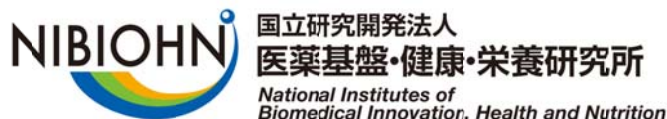


平成 29 年 6 月 28 日



腸内細菌叢プロファイリングのためのグアニジン溶液を用いた ヒト便のサンプリングおよび核酸抽出方法の最適化

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

1. 発表者

國澤 純	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー、東京大学客員教授、大阪大学招へい教授、神戸大学客員教授
細見 晃司	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 特任研究員
宮地 元彦	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 部長
村上 晴香	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 室長
水口 賢司	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー、大阪大学招へい教授

2. 発表ポイント

- ◆ 腸内細菌叢解析における、グアニジン溶液を用いたサンプリングから核酸抽出までの一連のプロトコルの最適化を行いました。
- ◆ 本研究で得られた結果は、腸内細菌叢の解析プロトコルの標準化に向けた重要な知見であり、腸内細菌研究の発展に寄与すると考えられます。
- ◆ グアニジン溶液を用いた際の注意点は以下の通りです。
 - ① 複数の部位から採取する。
 - ② 採便量が多すぎると保存に影響するため、 $\leq 0.1\text{g/ml}$ とする。
 - ③ グアニジン溶液は希釈しない。
 - ④ 便の水分量が影響するため、特に堅い便はよく混和する。
 - ⑤ 保管期間は 1 週間以内が望ましい。
 - ⑥ 遠心操作や洗浄などは行わずに、グアニジン溶液に浸した便から直接核酸を抽出する。

3. 発表概要

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所のワクチンマテリアルプロジェクトならびに腸内環境システムプロジェクトの國澤純プロジェクトリーダーと細見晃司特任研究員は、身体活動研究部 宮地元彦部長、村上晴香室長、バイオインフォマティクスプロジェクト 水口賢司プロジェクトリーダーらと共同で、腸内細菌叢プロファイリングのためのグアニジン溶液を用いたヒト便のサンプリングから核酸抽出までの一連のプロトコルの最適化を行いました。

腸内細菌と健康や疾患が関連することが近年明らかとなっており、腸内細菌に関する研究は世界中で精力的に進められていますが、便などのサンプリングや核酸抽出の方法などを含む解析プロトコルは研究機関によって異なるのが現状です。解析プロトコルを標準化（統一化）することによって、研究結果の再現性の向上や多施設間でのデータの共有などが期待でき、腸内細菌研究はさらに進展すると考えられます。近年、利便性などの観点からグアニジン溶液を用いた採便キットが広く使用されるようになってきていることから、本研究で、グアニジン溶液を用いて採取した便からの核酸抽出において、核酸抽出時の前処理の影響、採便量、グアニジン溶液の希釈、保管期間、採便部位について検討を行い、腸内細菌叢の解析のための採便から核酸抽出までの一連のプロトコルの最適化を行いました。

具体的には、グアニジン溶液を取り除くことを目的に遠心操作などの前処理を行うと、菌叢解析の結果が変化してしまうことから、グアニジン溶液に浸して保管した便サンプルからは前処理を行わずに直接抽出した核酸を用いて菌叢解析することが望ましいと考えられます。また、採便量が多すぎる場合やグアニジン溶液を PBS で希釈した場合には菌叢を安定に保存できないことや、長期間の保管や採便部位の違いが菌叢解析の結果に影響することも判明しました。

これらの結果から、グアニジン溶液を使用する際の注意点が明らかとなり、グアニジン溶液を用いた解析プロトコルの最適化に向けた知見を得ることができました。本研究で得られた成果が、腸内細菌叢の解析プロトコルの標準化、さらには腸内細菌研究の発展を通して、人々の健康増進や疾患対策に繋がることが期待されます。

4. 発表内容

グアニジン溶液の除去や便の洗浄といった前処理の影響に関する検討

グアニジン溶液は核酸成分の解析において便サンプルを室温で安定に輸送・保管できる有用なツールですが、グアニジン溶液に浸した便サンプルから菌叢解析を行うための核酸抽出方法についてはこれまでに十分検討されておらず、最適なプロトコルは示されていませんでした。そこでまず、グアニジン溶液の除去や便の洗浄といった核酸抽出における前処理の影響について検討を行いました。

22歳から55歳までの18名の被験者から採取した便サンプルの菌叢解析を行ったところ、

過去の報告にあるようにバクテロイデス門 (Bacteroidetes)、ファーミキューテス門 (Firmicutes)、アクチノバクテリア門 (Actinobacteria) をそれぞれ優占種とする 3 つのグループに分けられることが判明しました (図 1)。

グアニジン溶液を取り除く目的で、グアニジン溶液に浸した便を遠心分離し、ペレットから調整した核酸を用いて菌叢解析を行ったところ、前処理を行わずに直接核酸を調整した場合に比べて、同定される菌数 (operational taxonomic units) に違いは認められませんでした (データ示さず)、菌の組成に違いが認められました。Bacteroidetes が多いグループでは、遠心分離を行うことで Bacteroidetes の割合が有意に減少し、Firmicutes の割合が増加する傾向にありました (図 2)。Firmicutes が多いグループにおいては顕著な変化は認められませんでした。Actinobacteria が多いグループにおいては、平均値でみると顕著な変化は認められませんでした。個々のサンプルについてみると Actinobacteria の割合が減少しているサンプルがありました。さらに属レベルで検討したところ、Bacteroidetes の中で優占種であるバクテロイデス属 (*Bacteroides*) やプレボテラ属 (*Prevotella*) の割合が前処理によって減少していました。Actinobacteria の割合が減少しているサンプルでは、優占種であるビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium*) の割合が減少していました。また、遠心分離後のペレットを PBS 溶液で洗浄した場合にも同様の結果が得られました。これは細菌の種類によって膜成分や構造が異なるために、タンパク質やペプチドグリカンを変性させ、細菌を溶菌する活性を持つグアニジンに対する感受性が細菌によって異なるためだと考えられます。これらの結果から、グアニジン溶液に浸して保管した便サンプルからは前処理を行わずに直接抽出した核酸を用いて菌叢解析することが望ましいと考えられます。

採便量やグアニジン溶液の希釈による影響の検討

採便量の影響について検討するために、様々な濃度で調整した便サンプルをグアニジン溶液に懸濁し、採便後 3 日以内と室温で 1 か月間保管した後の菌叢解析の結果を比較しました。その結果、3 日以内に核酸を調整した場合は便の濃度による影響はありませんでしたが、1 か月間保管した場合は便の濃度が濃いサンプル (0.3 g/ml) においてすべてのグループでプロテオバクテリア門 (Proteobacteria) の割合が増加しており (図 3a)、Proteobacteria の中でもガンマプロテオバクテリア綱 (Gammaproteobacteria) に属する菌の割合が増加していました (図 3b)。この原因は、採便量が多いサンプルでは保存液の効果が十分ではなく、菌が不活化されないために、酸素が存在する環境下でも増殖することができる通性嫌気性の腸内細菌である Gammaproteobacteria に属する菌が保管の間に増殖したと考えられます。また、グアニジン溶液を PBS 溶液で希釈した検討においてもすべてのグループで 1 か月間保管したサンプルで Proteobacteria および Gammaproteobacteria の割合が増加していました。

便の水分量の違いによる影響の検討

上述した採便量の検討において、1 か月間保管した便の濃度が濃いサンプル (0.3 g/ml) で Proteobacteria および Gammaproteobacteria の割合が増加していましたが、個々のサンプルについてみると、すべてのサンプルでこれらの菌の割合が増加していたのではなく、増加していたサンプルと増加していなかったサンプルがありました。そこで、個々のサンプルの便の水分量と、1 か月保管後の Proteobacteria および Gammaproteobacteria の割合の相関を調べたところ、負の相関があることが明らかとなりました (図 4)。この結果から、水分量が少ない硬い便はグアニジン溶液と十分に混ざらず、グアニジン溶液によって菌が不活化されにくい可能性があると考えられますので、採便の際には便とグアニジン溶液を十分に混和するように注意する必要があります。

採便部位や保管期間による影響の検討

最後に、サンプルを採取する便の部位による菌叢の違いと保管期間による影響について検討しました。まず、図 5a に示しているように、被験者 10 名の便を用いて、便の表面 3 か所、深部 1 か所、表面の 3 か所を混ぜての合計 5 か所からサンプルを採取し、菌叢を比較しました。その結果、多くのサンプルでは採便部位の違いによる菌叢の違いはほとんど認められませんでした。3 名の被験者においては、便先端部の表面から採取した場合、その他の部位の表面や深部から採取した場合とは異なる菌叢が見られました (図 5b)。この結果から、便の 1 か所 (特に先端部表面) からサンプルを採取するのではなく、便の複数か所から採取したサンプルを用いて菌叢解析することが望ましいと考えられます。次に、保管期間について検討するために、グアニジン溶液に浸した 10 名の便サンプルを用いて、採便した日、採便日から 3 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間後に抽出した核酸を用いて菌叢解析を行い、結果を比較しました。その結果、ほとんどの被験者においては採便日から 4 週間後まで菌叢に顕著な変化は認められず、菌叢が安定に保存できていましたが (図 6)、一部の被験者では 2 週間以上の保管後において *Bifidobacterium* の割合が減少していました (図 6)。この結果から、採便後できるだけ早くに (1 週間以内) 核酸を抽出することが望ましいと考えられます。

以上の結果から、グアニジン溶液を用いた際の注意点は以下の通りです。

- (1) 複数の部位からサンプルを採取する。
- (2) 採便量は 0.1 g/ml 以下が望ましい。
- (3) グアニジン溶液の希釈を避ける (例、水没した便は使用しない等)。
- (4) 便とグアニジン溶液をよく混和する (特に水分量の少ない硬い便)。
- (5) 長期間の保存を避ける (1 週間以内が望ましい)。
- (6) 前処理を行わずに、保存液に浸した便サンプルから直接核酸を抽出する。

5. 発表雑誌

雑誌名：「Scientific Reports」

論文タイトル：Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA-based profiling of human microbiota diversity

著者：細見晃司、大野治美、村上晴香、夏目やよい、谷澤薫平、平田宗一郎、鈴木英彦、長竹貴広、西野友美、水口賢司、宮地元彦、國澤純

6. 問い合わせ先

國澤 純（クニサワ ジュン）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

ワクチンマテリアルプロジェクト、腸内環境システムプロジェクト

プロジェクトリーダー

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8

電話：072-641-9871 FAX：072-641-9872

メール：kunisawa @ nibiohn. go. jp

出張で不在としていますので、質問などにつきましては、まずはメールでご連絡下さい。

7. 添付資料

図 1～6

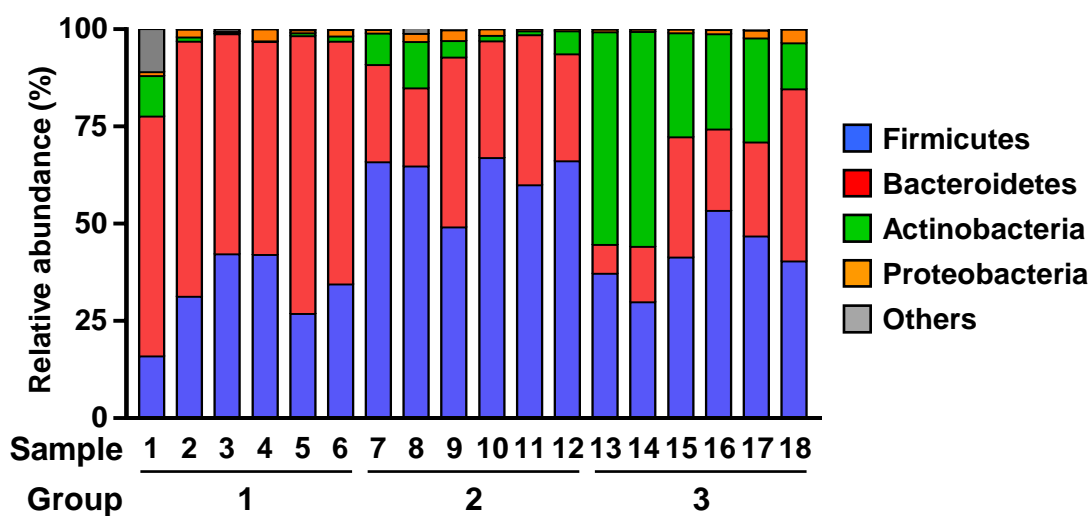


図1 被験者18名の菌叢解析

便サンプルをグアニジン溶液に懸濁した後、前処理を行わずに調整した核酸を用い、16S菌叢解析を行った。

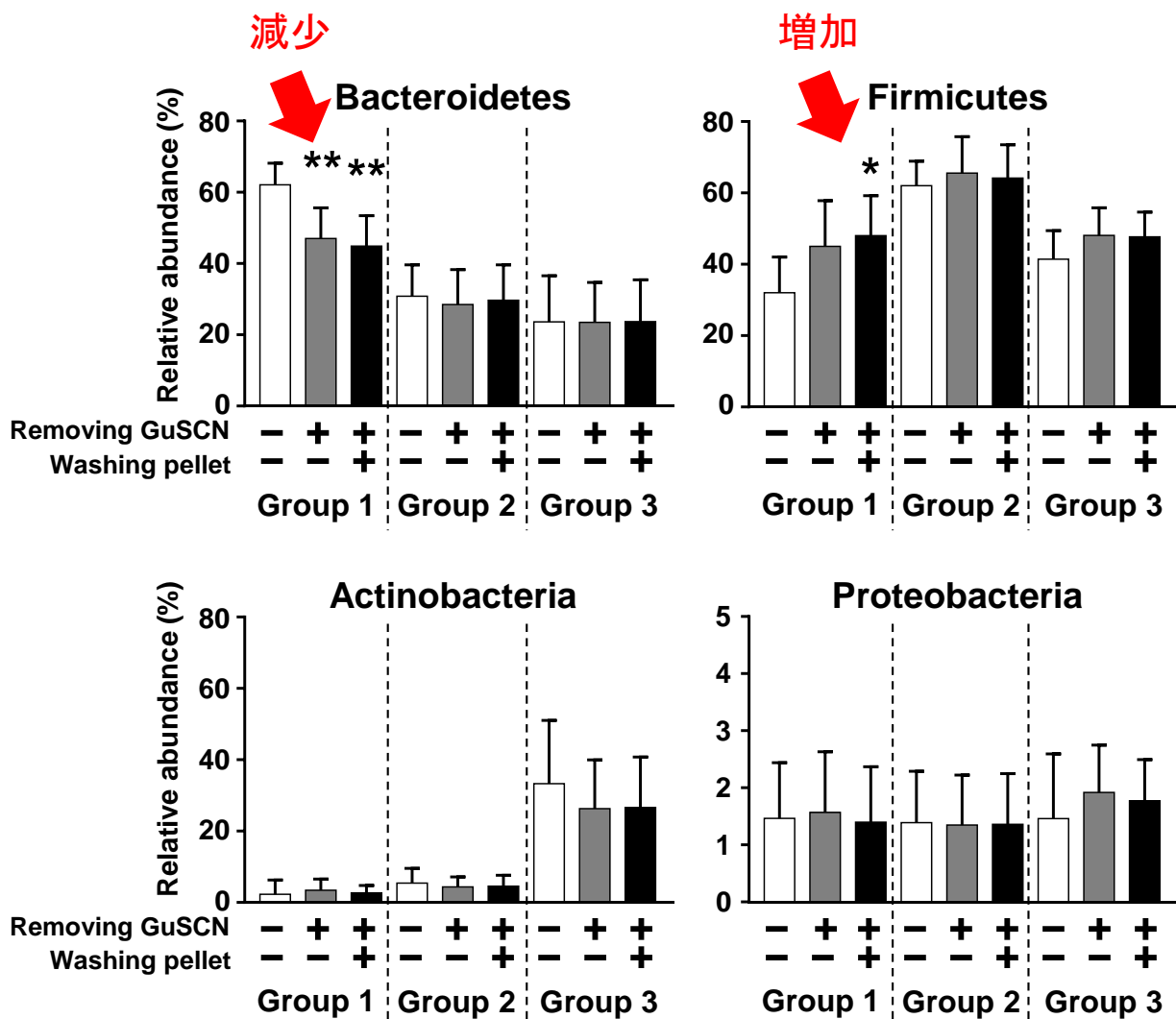


図2 前処理の影響の検討

グアニジン溶液に懸濁した便サンプルから、直接抽出した核酸（白カラム）、遠心分離によるグアニジン溶液の除去作業を行ったサンプルから調整した核酸（灰カラム）、遠心操作後のペレットをさらにPBSで洗浄したサンプルから調整した核酸（黒カラム）を用い、16S菌叢解析を行った。

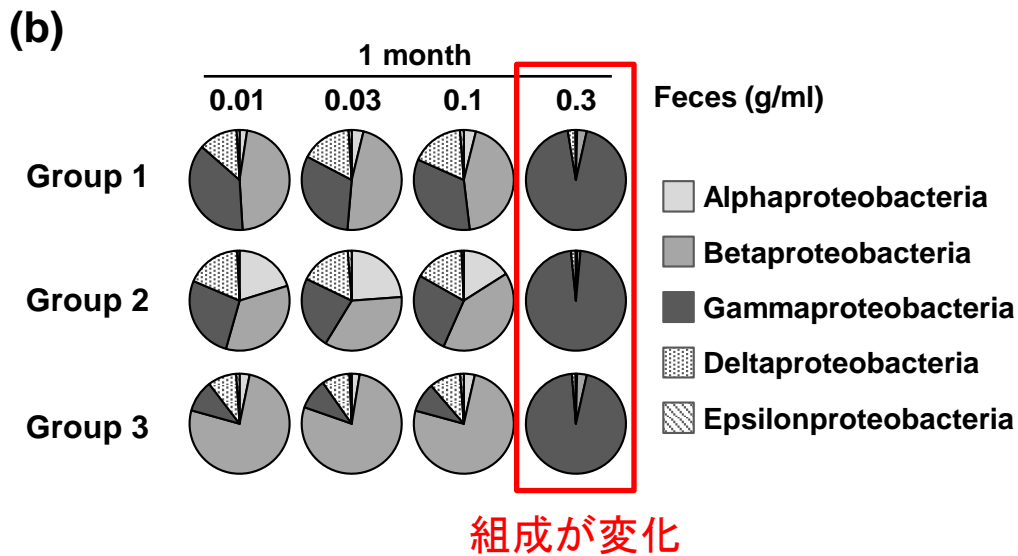
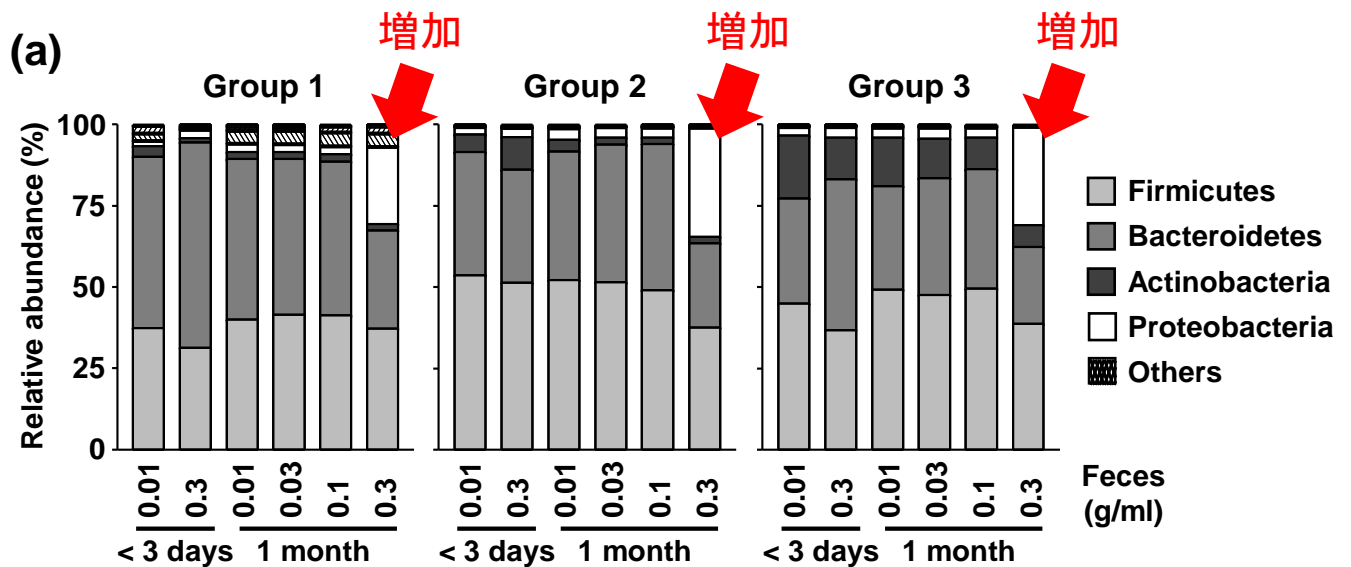
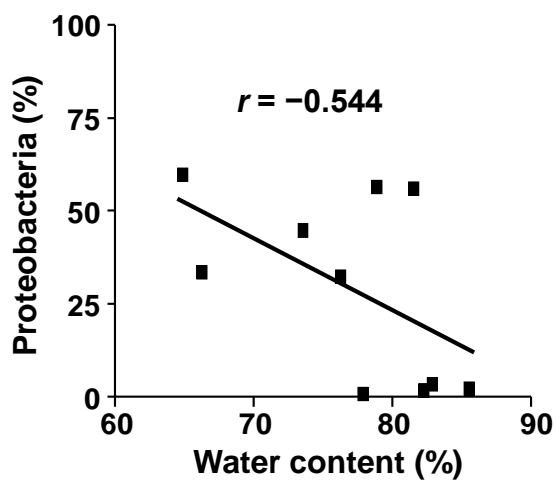


図3. 採便量の検討

便サンプルを濃度が0.01-0.3 g/mlになるようにグアニジン溶液に懸濁した。室温で保存し、採取から3日以内もしくは1か月後に調整した核酸を用い、16S菌叢解析を行った。(a) 門レベルにおける解析結果。(b) 綱レベルにおける解析結果。

(a)



(b)

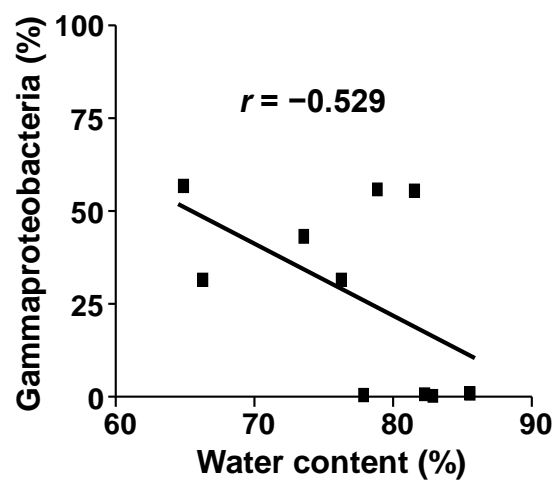
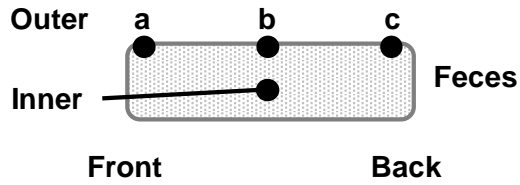


図4. 便の水分量の検討

グアニジン溶液に0.3 g/mlとなるように懸濁した便サンプルを、室温で1か月間保管した後のProteobacteria門 (a) 及びGammaproteobacteria綱 (b) の割合と、採取時の便の水分量の相関を検討した。

(a)



(b)

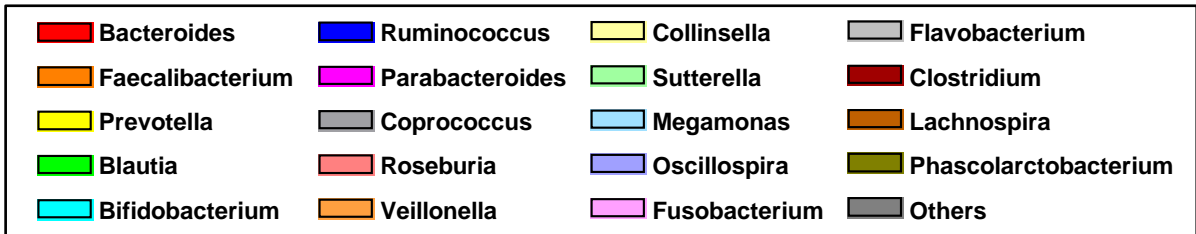
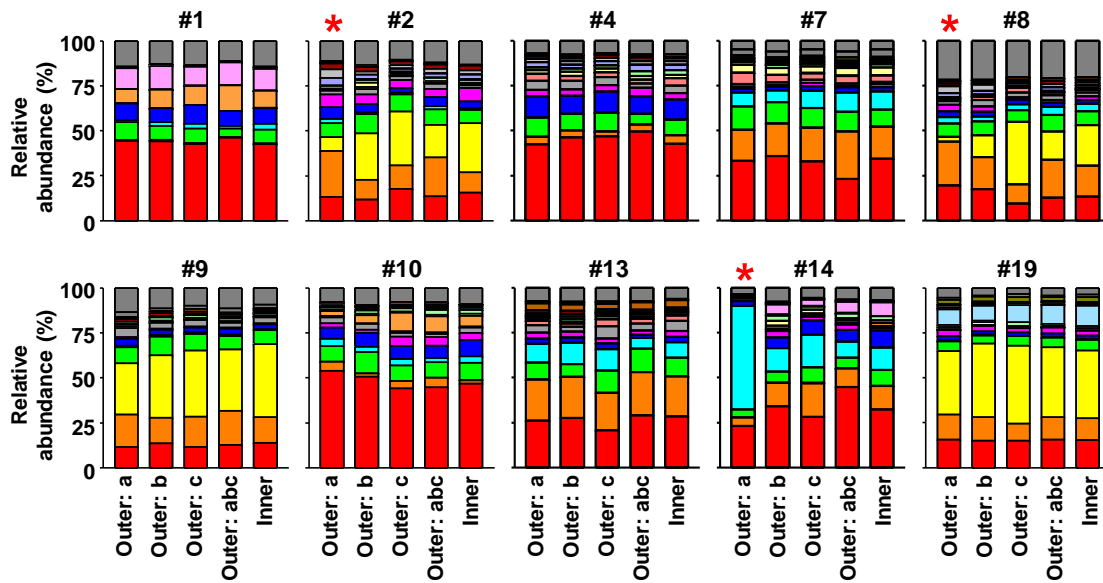


図5. 採便部位の検討

(a) 採便部位の模式図。便の各部位からサンプルを採取した。(b) 属レベルでの菌叢解析の結果。*は菌叢に違いが見られたサンプルを示す。

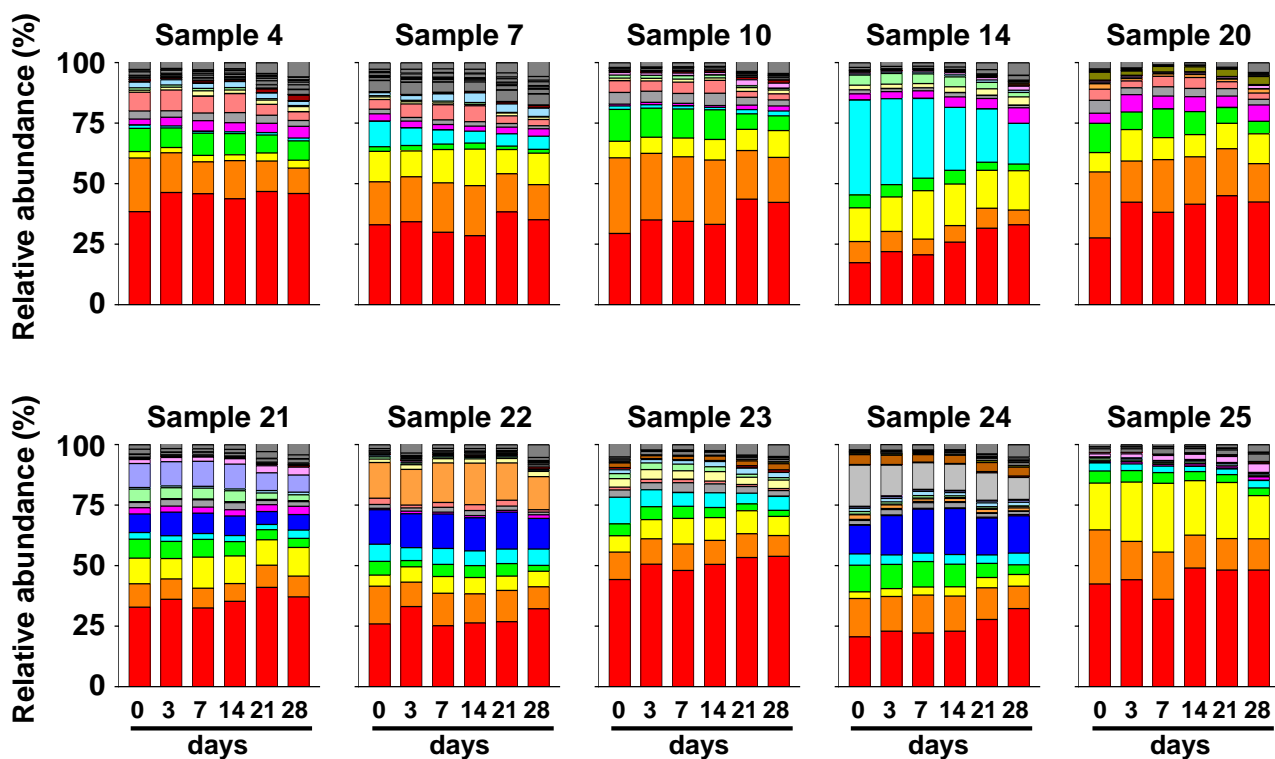


図6. 保管期間の検討

グアニジン溶液に懸濁した便サンプルを、室温で0~28日間保管した後の菌叢を解析した。