

糞便中水分・pH・アンモニア・IgA・腐敗産物・有機酸・
胆汁酸（非抱合型）分析報告書

シリアル番号 XXXXXxx
管理番号 SIID 00000
作業完了日 202x 年 xx 月 xx 日
発行日 202x 年 xx 月 xx 日

極秘資料

本報告書の使用にあたっての確認事項

1. 本報告書は株式会社テクノスルガ・ラボ 技術責任者による承認済みです。
2. 研究発表（論文投稿）や特許明細書への転用を除き、本報告書の一部または全部をそのままあるいは改変して第三者へ転用などされた場合には、株式会社テクノスルガ・ラボは一切の責任を負いかねます。
3. 当社受託サービス等は、試験・研究用途を目的として販売しております。当社受託サービスを医療や臨床診断などの試験・研究目的以外へご使用される場合、これに起因する損失・損害等については、当社では一切の責任を負いかねます。

技術責任者

印

株式会社テクノスルガ・ラボ 研究センター 技術部

〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 388 番地の 1

TEL : 054-349-6155 FAX : 054-349-6121

Mail : tsl-contact@tecsrg.co.jp

検体情報

[illegible]

備考

目的

検体の水分、pH、アンモニア、IgA、腐敗産物、有機酸、胆汁酸を測定します。検体の水分測定を行います。

方法

1) 水分

検体中の水分は、秤量した検体を定温恒温乾燥器により 80℃ で 16 時間以上乾燥した後、再度秤量して得られた値を元に百分率として算出しました。

・ 定温恒温乾燥器 NDO-420W (Tokyo Rikakikai, Japan)

2) pH

検体の pH は、一定量の試料を試験管に精秤し、水で懸濁後に熱処理 (85℃, 15 分) した後、静置し、上清を用いて pH 計により測定しました。

・ pH 計 LAQUAtwin B-712 (HORIBA, Japan)

3) アンモニア

検体に含まれるアンモニウムイオン濃度をイオンクロマトグラフィーにより測定し、得られた値よりアンモニア濃度を算出しました。

<前処理>

一定量の検体を試験管に精秤し、水で懸濁後に熱処理 (85℃, 15 分) しました。静置後の上清を孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターで濾過し、測定用試料としました。

<測定条件>

・ システム Dionex Integrion HPIC (Thermo Fisher Scientific, Japan)
・ カラム IonPac (CS12A (4 mm × 250 mm) (Thermo Fisher Scientific, Japan)
・ ガードカラム IonPac (CG12A (4 mm × 50 mm) (Thermo Fisher Scientific, Japan)
・ 溶離液 10.7 mmol/L H₂SO₄
・ オープン温度 30° C
・ 注入量 25 μL
・ 検出器 電気伝導度 (サプレッサー使用)
・ 検出器温度 35°C

4) IgA

検体に含まれるヒト IgA を Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により測定しました。測定は、Human IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, USA)の方法に準拠し、マイクロプレートリーダーにより測定しました。

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ・ ELISA 試薬
(Bethyl Laboratories) | Purified Human IgA (P80-102)
Anti-Human IgA antibody Goat-Poly (A80-102A)
Goat anti-Human IgA Antibody HRP Conjugated (A80-102P) |
| ・ マイクロプレートリーダー | Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, USA) |

5) 腐敗産物

検体中の各腐敗産物の濃度を、溶媒抽出後ガスクロマトグラフィー質量分析計 選択イオンモニタリング法 (GC-MS-SIM) で測定しました。測定対象とした腐敗産物はフェノール、p-クレゾール、4-エチルフェノール、インドール、スカトールの 5 物質です。

<前処理>

検体を遠沈管に精秤し、内部標準物質 (4-Isopropylphenol) 含有リン酸緩衝液を添加して混合した後に、85°C で 15 分間熱処理しました。冷却後に溶媒抽出を行い、固相カートリッジで精製し、得られた抽出溶液を測定に用いました。

<測定条件>

- | | |
|-------------|---|
| ・ システム | GC-MS (5977A, Agilent Technologies, USA) |
| ・ カラム | DB-WAX UI+G
(60 m × 0.25 mm id, 膜厚 0.25 μm, Agilent Technologies, USA) |
| ・ カラム流量 | 1.7 mL/min |
| ・ カラム温度 | 70°C (hold 2 min) → 25°C/min → 190°C (hold 2 min) → 2°C/min
→ 200°C (hold 1.5 min) → 25°C/min → 240°C (hold 8 min) |
| ・ キャリアガス | ヘリウム |
| ・ 注入モード | Splitless |
| ・ 注入口 | 70°C → 200°C/min → 240°C |
| ・ 注入量 | 0.8 μL |
| ・ イオン源温度 | 230°C |
| ・ インタフェース温度 | 240°C |

<特記事項>

本報告書に記載しているフェノール、p-クレゾール、4-エチルフェノール、インドール、スカトールは、IUPAC (国際純正・応用化学連合) による命名法ではそれぞれフェノール、4-メチルフェノール、4-エチルフェノール、1H-インドール、3-メチル-インドールになります。

6) 有機酸

検体に含まれる有機酸の濃度を高速液体クロマトグラフィーによって測定しました。測定対象とした有機酸は、コハク酸、乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-吉草酸、n-吉草酸の9物質です。

<前処理>

一定量の検体をビーズチューブに精秤し、抽出溶液で懸濁後に熱処理 (85°C, 15 分) しました。ビーズにより破碎した後に遠心 (18,400 × g, 10 分) し、上清を孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターで濾過し、試料溶液としました。

<測定条件>

- | | |
|----------|---|
| ・ システム | 島津有機酸分析システム (Shimadzu, Japan) |
| ・ カラム | Shim-pack Fast-OA, 100 mm × 7.8 mm ID, 3 本直列で使用 |
| ・ ガードカラム | Shim-pack Fast-OA, 10 mm × 4.0 mm ID |
| ・ 溶離液 | 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸 |
| ・ 反応液 | 5 mmol/L p-トルエンスルホン酸, 100 μmol/L EDTA, 20 mmol/L Bis-Tris |
| ・ 流速 | 0.8 mL/min |
| ・ オープン温度 | 50°C |
| ・ 検出器 | 電気伝導度検出器 CDD-10Avp |

7) 胆汁酸

検体中の胆汁酸の濃度を、液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF/MS) により測定しました。測定対象の胆汁酸を表 1 に示します。

<前処理>¹⁾

検体 100 mg をビーズチューブに精秤し、9 倍量の酢酸ナトリウム buffer/エタノール混合溶液を加えて、ビーズにより破碎した後に熱処理 (85°C, 30 分) しました。遠心 (18,400 × g, 10 分) 後の上清を MilliQ 水で 4 倍希釈した後に、Bond Elute C₁₈ カートリッジ (Agilent Technologies, USA) に供し固相抽出を行いました。得られた抽出液を乾固後に、50% エタノールに溶解し、孔径 0.2 μm の親水性 PTFE フィルターで濾過し、内部標準液を加えて試料溶液としました。

表 1. 測定対象の胆汁酸

胆汁酸	構造式	モノアイソトピック質量	[M-H] ⁻	略号
コール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	407.2797	CA
α ムリコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	407.2797	αMCA
β ムリコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	407.2797	βMCA
ω ムリコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	407.2797	ωMCA
ヒオコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	408.2876	407.2797	HCA
ケノデオキシコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.2927	391.2848	CDCA
デオキシコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.2927	391.2848	DCA
ウルソデオキシコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.2927	391.2848	UDCA
ヒオデオキシコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.2927	391.2848	HDCA
リトコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₃	376.2977	375.2899	LCA
デヒドロコール酸	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	402.2406	401.2328	DHCA
イソデオキシコール酸	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	392.2927	391.2848	isoDCA
7-ケトデオキシコール酸	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406.2719	405.2641	7-oxo-DCA
7-ケトリトコール酸	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.2770	389.2692	7-oxo-LCA
内部標準物質				
23 ノルデオキシコール酸	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	378.2770	377.2692	NDCA
d4-コール酸	C ₂₄ H ₃₆ D ₄ O ₅	412.3127	411.3050	d4-CA
d5-リトコール酸	C ₂₄ H ₃₅ D ₅ O ₃	381.3291	380.3213	d5-LCA
d5-グリココール酸	C ₂₆ H ₃₈ D ₅ NO ₆	470.3404	469.3326	d5-GCA
d4-タウロコール酸	C ₂₆ D ₄ H ₄₁ NO ₇ S	519.3168	518.3090	d4-TCA

<液体クロマトグラフ-四重極飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF/MS) による測定>

[測定条件]

・ システム	Waters ACQUITY UPLC, Xevo G2-S QTOF, ESI プローブ (Waters, USA)
・ カラム	Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm, Waters, USA)
・ カラム温度	65°C
・ 注入量	4 μ L
・ オートサンプラー温度	10°C
・ 移動相	A: 0.1% ギ酸水溶液, B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル
・ 流速	0.5 mL/min (グラジエント条件: 表 2)

表 2. 移動相のグラジエント条件

時間	A (%)	B (%)
0	70	30
0.5	70	30
1.0	65	35
7.0	60	40
10.0	50	50
11.5	5	95
13.0	5	95
13.1	70	30
17.0	70	30

[QTOF 測定条件]

・ Capillary	0.5 kV
・ Sampling cone	20 V
・ Cone gas	100 L/h
・ Source temp.	150°C
・ Desolvation gas	1000 L/h, 450°C
・ Mode	Negative
・ Lockmass	Leucine enkephalin [M-H] ⁻ : 554.2615 m/z
・ MS Scan	50 – 850 amu, scan time 0.3 sec
・ Target ion	表参照
・ ソフトウェア	MassLynx 4.1, TargetLynx (Waters, USA)

* 会社名、製品名は一般に各社の日本および各国での商標または登録商標です

結果

表 3. 水分、pH、アンモニア、ヒト IgA 測定結果

検体名	SIID	水分 (%)	pH	アンモニア (mg/g)	ヒト IgA (μg/g)
SAMPLE01	00000-01				
SAMPLE02	00000-02				
SAMPLE03	00000-03				
SAMPLE04	00000-04				
SAMPLE05	00000-05				
SAMPLE06	00000-06				
SAMPLE07	00000-07				
SAMPLE08	00000-08				
SAMPLE09	00000-09				
SAMPLE10	00000-10				
SAMPLE11	00000-11				
SAMPLE12	00000-12				
SAMPLE13	00000-13				
SAMPLE14	00000-14				
SAMPLE15	00000-15				
SAMPLE16	00000-16				
SAMPLE17	00000-17				
SAMPLE18	00000-18				
SAMPLE19	00000-19				
SAMPLE20	00000-20				

表 4. 腐敗産物測定結果

検体名	SIID	腐敗産物 (μg/g)				
		フェノール	p-クレゾール	4-エチル フェノール	インドール	スカトール
SAMPLE01	00000-01					
SAMPLE02	00000-02					
SAMPLE03	00000-03					
SAMPLE04	00000-04					
SAMPLE05	00000-05					
SAMPLE06	00000-06					
SAMPLE07	00000-07					
SAMPLE08	00000-08					
SAMPLE09	00000-09					
SAMPLE10	00000-10					
SAMPLE11	00000-11					
SAMPLE12	00000-12					
SAMPLE13	00000-13					
SAMPLE14	00000-14					
SAMPLE15	00000-15					
SAMPLE16	00000-16					
SAMPLE17	00000-17					
SAMPLE18	00000-18					
SAMPLE19	00000-19					
SAMPLE20	00000-20					

表 5. 有機酸測定結果

検体名	SIID	有機酸 (mg/g)								
		コハク 酸	乳酸	ギ酸	酢酸	プロピ オン酸	iso- 酪酸	n- 酪酸	iso- 吉草酸	n- 吉草酸
SAMPLE01	00000-01									
SAMPLE02	00000-02									
SAMPLE03	00000-03									
SAMPLE04	00000-04									
SAMPLE05	00000-05									
SAMPLE06	00000-06									
SAMPLE07	00000-07									
SAMPLE08	00000-08									
SAMPLE09	00000-09									
SAMPLE10	00000-10									
SAMPLE11	00000-11									
SAMPLE12	00000-12									
SAMPLE13	00000-13									
SAMPLE14	00000-14									
SAMPLE15	00000-15									
SAMPLE16	00000-16									
SAMPLE17	00000-17									
SAMPLE18	00000-18									
SAMPLE19	00000-19									
SAMPLE20	00000-20									

備考

空欄: 定量下限未満

pH: 精度 ± 0.1 校正後に標準液を測定した場合の繰り返し再現性

NT: Not tested

定量下限:

アンモニア	0.5	$\mu\text{g/g}$
ヒト IgA	1	$\mu\text{g/g}$
腐敗産物	0.3	$\mu\text{g/g}$
有機酸		
コハク酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸	0.05	mg/g
ギ酸、iso-酪酸、n-酪酸、iso-吉草酸、n-吉草酸	0.1	mg/g
夾雑物を含む値		
胆汁酸	0.04	$\mu\text{mol/g}$
7-oxo-LCA	0.25	$\mu\text{mol/g}$
DCA, DHCA	0.02	$\mu\text{mol/g}$

補足

本報告書に関するご質問等につきましては、株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部までお問い合わせください。

本報告書に付随する電子データ一覧

データ内容	形式
結果の表	Excel

引用文献

- 1) **Kakiyama G, Muto A, Takei H, Nittono H, Murai T *et al.*** A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS. *J Lipid Res* 2014;55:978–990.