

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。当社受託サービス等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

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。

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°C 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

検体を精秤し、水で懸濁後に熱処理 (85°C, 15 分) した後、上清を用いて pH 計により測定しました。

- ・ pH 計 LAQUAtwin-pH-22B (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>

検体を精秤し、水で懸濁後に熱処理 (85°C, 15 分) しました。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 \times 250 mm) (Thermo Fisher Scientific, Japan)
- ・ ガードカラム IonPac (CG12A (4 mm \times 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 (サブレッサー使用)
- ・ 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。

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ・ 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) |
| ・ 測定装置 | 全自動 ELISA プロセッシングシステム DS2
(Dynerx Technologies, 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-タンデム四重極質量分析装置 (LC-MS/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	略号
コール酸	CA
α ムリコール酸	αMCA
β ムリコール酸	βMCA
ω ムリコール酸	ωMCA
ヒオコール酸	HCA
ケノデオキシコール酸	CDCA
デオキシコール酸	DCA
ウルソデオキシコール酸	UDCA
ヒオデオキシコール酸	HDCA
リトコール酸	LCA
デヒドロコール酸	DHCA
イソデオキシコール酸	isoDCA
7-ケトデオキシコール酸	7-oxo-DCA
7-ケトリトコール酸	7-oxo-LCA
内部標準物質	
ノルデオキシコール酸	NDCA
d ₄ -コール酸	d ₄ -CA
d ₅ -リトコール酸	d ₅ -LCA

<液体クロマトグラフ-タンデム四重極質量分析装置 (LC-MS/MS)による測定>

[測定条件]

- ・ システム Waters ACQUITY UPLC, Waters Xevo TQ-XS, 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 55°C
- ・ 注入量 3 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 0.38 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 (%)	曲線
0	70	30	6
5	65	35	6
11	55	45	6
12	45	55	6
18	15	85	6
22.5	70	30	1

[MS/MS 測定条件]

- ・ Capillary 2 kV
- ・ Cone gas 150 L/h
- ・ Source temp. 150°C
- ・ Desolvation gas 950 L/h, 470°C
- ・ Mode Negative
- ・ MS Scan MRM mode (表 3 参照)
- ・ ソフトウェア MassLynx 4.1, TargetLynx (Waters, USA)

表 3. MRM mode の測定条件

胆汁酸	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage	Collision energy
コール酸	407.1	343.1	50	35
α ムリコール酸	453.1*	407.1	20	25
β ムリコール酸	453.1*	407.1	20	25
ω ムリコール酸	453.1*	407.1	20	25
ヒオコール酸	453.1*	407.1	20	20
ケノデオキシコール酸	437.1*	391.1	20	15
デオキシコール酸	391.1	345.1	50	25
ウルソデオキシコール酸	437.1*	391.1	20	15
ヒオデオキシコール酸	437.1*	391.1	20	15
リトコール酸	421.1*	375.1	20	25
デヒドロコール酸	401.1	331.1	50	25
イソデオキシコール酸	391.1	345.1	20	25
7-ケトデオキシコール酸	405.1	343.1	60	30
7-ケトリトコール酸	389.1	389.1	60	2
ノルデオキシコール酸 (IS)	377.1	331.1	30	25
<i>d</i> ₄ -コール酸 (IS)	411.1	347.1	50	35
<i>d</i> ₅ -リトコール酸 (IS)	426.1*	380.1	20	15

*ギ酸付加体 [M+HCOO]⁻を Precursor ion として採用

* 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 4. 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 5. 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 6. 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									

表 7. 胆汁酸測定結果 1

検体名	SIID	胆汁酸 (nmol/g)						
		CDA	α MCA	β MCA	ω MCA	HCA	CDCA	DCA
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 8. 胆汁酸測定結果 2

検体名	SIID	胆汁酸 (nmol/g)						
		UDCA	HDCA	LCA	DHCA	Iso DCA	7-oxo- DCA	7-oxo- LCA
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	μg/g
ヒト IgA	1	μg/g
腐敗産物	0.3	μg/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	9.8	nmol/g
7-oxo-LCA	48.8	nmol/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.