

## 脂肪酸や胆汁酸のメタボローム解析

研究分担者 窪田 哲也  
国立研究開発法人理化学研究所

### 研究要旨

<目的> 環境因子の一つとして注目されている腸内細菌は、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

<方法> 1. 脂肪酸の測定: Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する。2. 胆汁酸の測定: サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50  $\mu$ Lで再溶解しGC-MSで測定する。

<結果> 健常者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定することができた。

<まとめ> 脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

### A. 研究目的

肥満・2型糖尿病といった生活習慣病やアトピー性皮膚炎といったアレルギー性疾患は、近年増加の一途を辿っている。これらの疾患の増加は、遺伝素因と高脂肪食といったエネルギー過剰や車社会といった身体活動・運動不足といった環境因子の相互作用に起因すると考えられている。特に環境因子の一つとして最近腸内細菌は注目されており、食事によりダイナミックにその組成が変化し、肥満・2型糖尿病をはじめとする生活習慣病やアレルギー性疾患との関連性が指摘されている。従って腸内細菌を含む環境因子と遺伝素因の相

互作用を明らかにしていくことが極めて重要である。しかしこれまでの腸内細菌に関連した多くの研究は、欧米によるデータであり、欧米とは遺伝的背景や食事・運動といった身体活動も異なっていることから、日本人のデータが必須である。そこで食事・栄養摂取状況や身体活動・運動と生活習慣病との関連について、コホート研究から得られたヒト試料を用いて、バイオインフォマティクス手法などを駆使し、腸内細菌を含めた食・栄養による免疫と代謝の相互メカニズムを踏まえつつ、生活習慣病やアレルギー疾患の新しい予防法確立に資する健康な日本人の腸管免疫と腸内細菌データベースを構築する。また、そのデータベースを横断的に分析することに

より、生活習慣、腸内細菌叢、腸管免疫、疾患発症との相互関係を明らかにすることも目的とする。具体的には、国立健康・栄養研究所が確立し運営している既存のコホート研究（NEXIS）600名に対し、1）腸内細菌叢のメタゲノム解析、2）腸管免疫指標、3）メタボローム解析、4）詳細かつ標準的な生活習慣、5）動脈硬化度、体格、身体組成、体力などの生理指標、6）GWASとインピュテーション法の併用による網羅的遺伝子多型解析する。遺伝子やパスウェイ情報を鍵とし、すでに構築しているデータベースに独自のデータウェアハウス技術等を用い新たな情報を追加した基盤データベースを設計する。特に食事に含まれる脂質や食後分泌される胆汁酸は腸内細菌によって分解され吸収されるが、食事や腸内細菌の変化によって分解や吸収が異なることが知られている。そこで本研究ではメタボローム解析を用いて、代謝産物である脂肪酸や胆汁酸を測定する方法を確立する。

## B．研究方法

国立健康・栄養研究所がすでに確立し運営している大規模介入研究の参加者を対象とし、20～80歳までの男女、合計600名の血漿を用いて、脂肪酸や胆汁酸を測定する。

### 1. 脂肪酸の測定

Folch法で全脂質を抽出し、カラムを用いて脂質クラスを分離する。分離した脂質に内部標準を加えて、誘導化試薬を用いてメチル化を行う。中和、洗浄を行った後、窒素気流下で乾燥して、ヘキサンに再溶解してGC-MSで脂肪酸組成を測定する(図1a)。

### 2. 胆汁酸の測定

サンプルを凍結乾燥し、緩衝液に再溶解する。溶解液に酵素を加えて脱抱合後し、イオン交換カラムを用いて遊離の胆汁酸分画を調整する。さらに水酸基・カルボン酸基を非極性化するために、ジアゾメタンを用いてカルボン酸基をメチル化、続いてジメチルエチルシリルイミダゾールを用いてジメチルエチルシリルエーテル化を行う。シリカゲルカラムにかけて誘導体化された胆汁酸を調整、乾固後ヘキサン50  $\mu$ Lで再溶解しGC-MSで測定する(図1b)。

## (倫理面への配慮)

提供された血漿サンプルは、鍵付きの-20で保存する。当研究室ではヒトゲノムを扱わ

ないが、本研究ではヒトゲノムを扱うことから、当研究所ではヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って申請し、倫理委員会で承認されている。

## C．研究結果

血漿中の代謝産物を精度と再現性良く測定するために、血漿からの各種代謝マーカーの抽出方法や測定方法を確立した。また健常者のサンプルであるため、適切な標準化物質を探索し、腸内細菌との関連性が深いと考えられるパルミチン酸、ステアリン酸といった飽和脂肪酸や不飽和脂肪酸、さらにコール酸、デオキシコール酸といった1次胆汁酸や2次胆汁酸などを定量的に測定できた(図2)。

## D．考察

脂肪酸と胆汁酸を定量的に測定することができたが、サンプル数も多いことから、イオン化などの前処理の部分などもう少し簡略化できるかどうか検討する余地があった。

## E．結論

当研究所の倫理審査が3ヵ月に1回しか行われないため、倫理審査の承認を得るために時間を要し、実際のサンプルを測定することができなかった。今後は実際のサンプルを測定しデータを解析していく。

## F．研究発表

1. 論文発表  
特になし

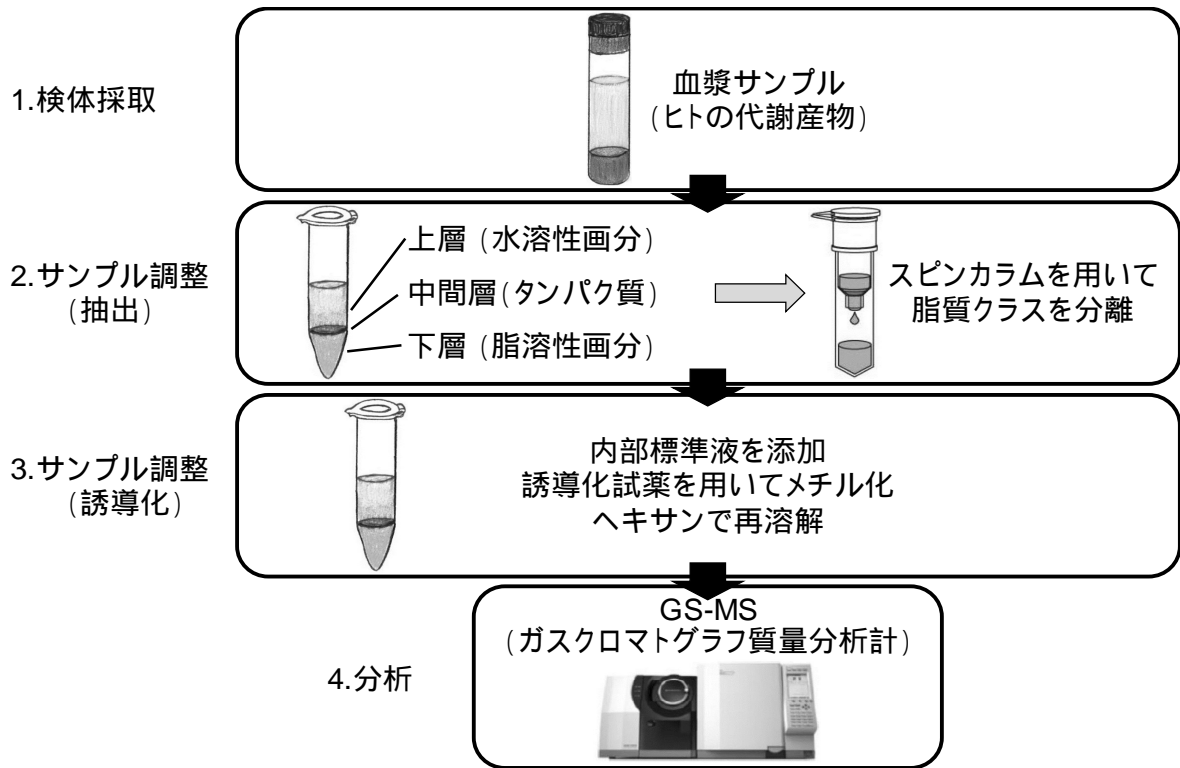
2. 学会発表  
特になし

## G．知的財産権の出願・登録状況

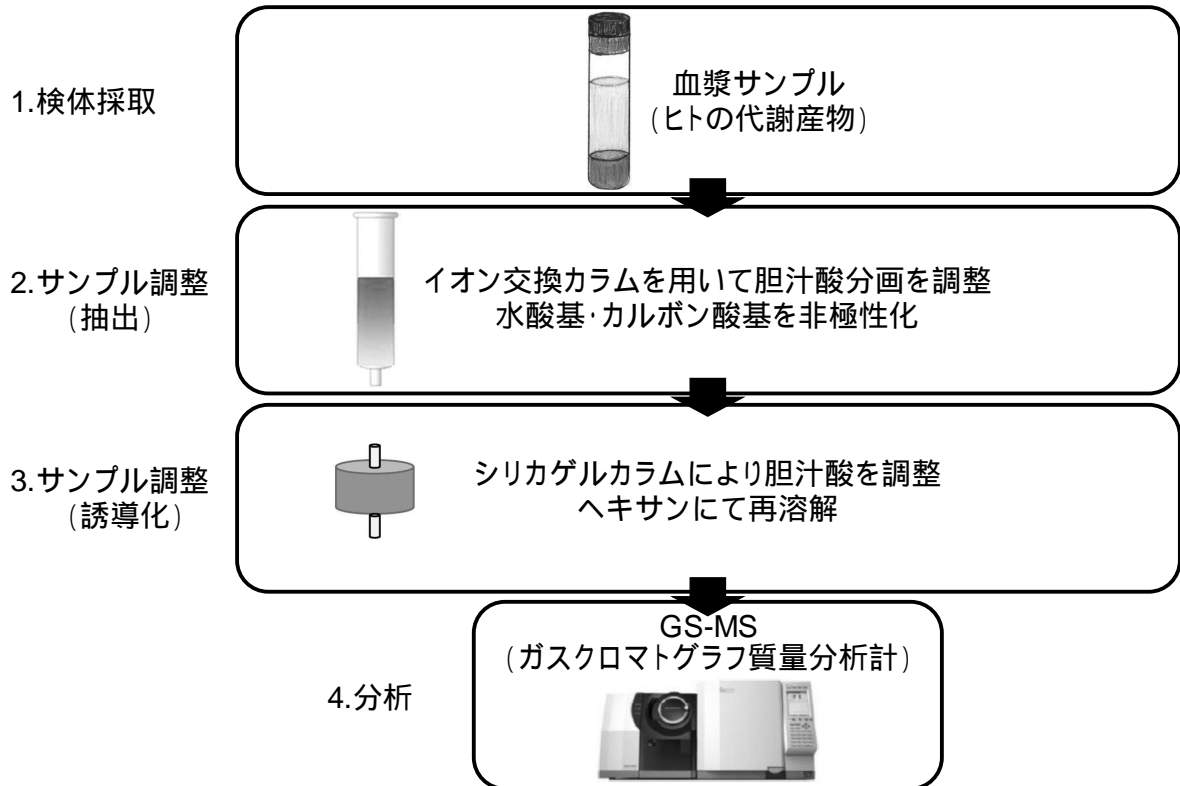
1. 特許取得  
特になし

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし



**図1a 脂肪酸の測定方法**



**図1b 胆汁酸の測定方法**

### 測定項目

脂肪酸	C12:0
ラウリン酸	C12:0
ミリスチン酸	C14:0
ミリストレイン酸	C14:1 ω5
パルミチン酸	C16:0
パルミトレイン酸	C16:1 ω7
ステアリン酸	C18:0
オレイン酸	C18:1 ω9
リノール酸	C18:2 ω6
γ-リノレン酸	C18:3 ω6
リノレン酸	C18:3 ω3
アラキジン酸	C20:0
エイコセン酸	C20:1 ω9
エイコサジエン酸	C20:2 ω6
5-8-11エイコサトリエン酸	C20-3 ω9
ジホモ-γ-リノレン酸	C20:3 ω6
アラキドン酸	C20:4 ω6
エイコサペンタエン酸	C20:5 ω3
ベヘニン酸	C22:0
エルシン酸	C22:1 ω9
ドコサテトラエン酸	C22:4 ω6
ドコサペンタエン酸	C22:5 ω3
リグノセリン酸	C24:0
ドコサヘキサエン酸	C22:6 ω3
ネルボン酸	C24:1 ω9

(μg/mL)

### 測定項目

胆汁酸	コール酸
タウロコール酸	コール酸
グリココール酸	タウロコール酸
ケノデオキシコール酸	グリココール酸
タウロケノデオキシコール酸	ケノデオキシコール酸
グリコケノデオキシコール酸	タウロケノデオキシコール酸
ウルソデオキシコール酸	グリコケノデオキシコール酸
タウロウルソデオキシコール酸	ウルソデオキシコール酸
グリコウルソデオキシコール酸	タウロウルソデオキシコール酸
デオキシコール酸	グリコウルソデオキシコール酸
タウロデオキシコール酸	デオキシコール酸
グリコデオキシコール酸	タウロデオキシコール酸
リトコール酸	グリコデオキシコール酸
タウロリトコール酸	リトコール酸
グリコリトコール酸	タウロリトコール酸

(μmol/L)

図2 脂肪酸と胆汁酸を絶対値で測定