

課題番号 : 28-1107

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムバンク構築から新たな腸疾患リスクを解明する疫学研究 : Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名 : 永田尚義

分担研究者 : なし

キーワード : 腸内細菌、便容器、保存方法、経口洗浄液下剤

研究成果 :

背景 近年、大腸疾患の発症にある特定の腸内細菌種が関連している可能性が示唆されている。疾患と腸内細菌との関連をあきらかにするためには、ヒトの糞便からメタゲノムショットガンシーケンスにより細菌をゲノムレベルで解析する必要がある。一方、腸疾患の診断も重要であるため、大腸内視鏡検査の受診したものを対象にすることが望ましい。このような条件下のもと、大規模な臨床研究（疫学研究）で“疾患と腸内細菌”との関連を解明することが重要である。しかし、大規模な検体を収集するためには、いくつかの課題をクリアする必要がある。まず、検体収集の普及・促進のためには簡易的で安価な検便容器は必須であるが、そのような検便容器は腸内細菌叢に影響をあたえないのか？を調べる必要がある。また、被験者はすぐに糞便検体を解析場所に持参することは不可能な事が多く、糞便検体を自宅で保管しても細菌叢に影響ないのか？などの課題も解決する必要がある。さらに、大腸内視鏡検査は通常多量の経口洗浄液下剤（2L）を内服するが、その下剤直後の便は水で薄まっており、下剤直後の便は腸内細菌叢解析に本当に適しているのか？（検査当日または下剤直後の便で解析してもよいのか？）を検証する必要がある。簡易的で患者の手間がかからない糞便収集の流れが確立できれば、腸内細菌の大規模研究が普及していく可能性がある。

目的 本研究では、冷凍保存（標準方法）と比較し、現在 NCGM で収集している糞便収集方法に関して、の妥当性を検証する。

方法 対象 : 50 歳以下の健常成人、病院勤務の医療関係者を対象。除外基準 : 3 か月以内の薬剤内服歴、並存疾患を有するもの。

I 保存方法による腸内細菌の違いを検討

- ①すぐに-80 度に冷凍保存
- ②液体窒素に入れてから冷凍庫保存
- ③24 時間室温に放置後冷凍庫に保存

II 便容器による腸内細菌の違いを検討

空容器と培地入り容器で比較

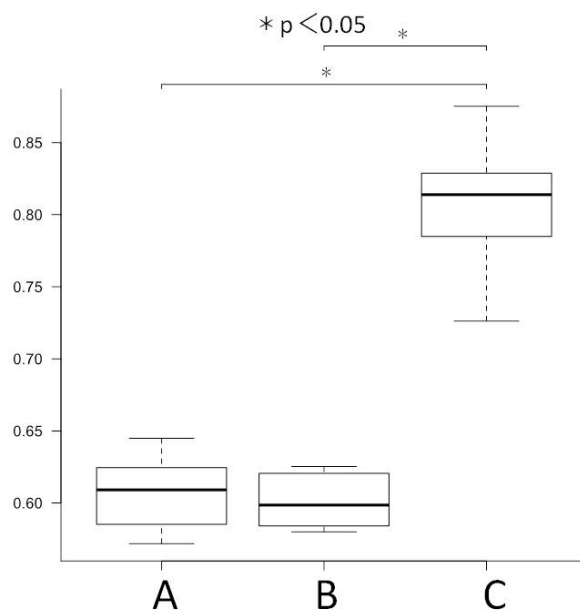
III 下剤による腸内細菌の影響

- ①下剤前通常便、②下剤直後、③下剤 2 週後の便で違いを検討

結果

I. 保存方法の検討

Unifrac Principal Coordinate Analysis

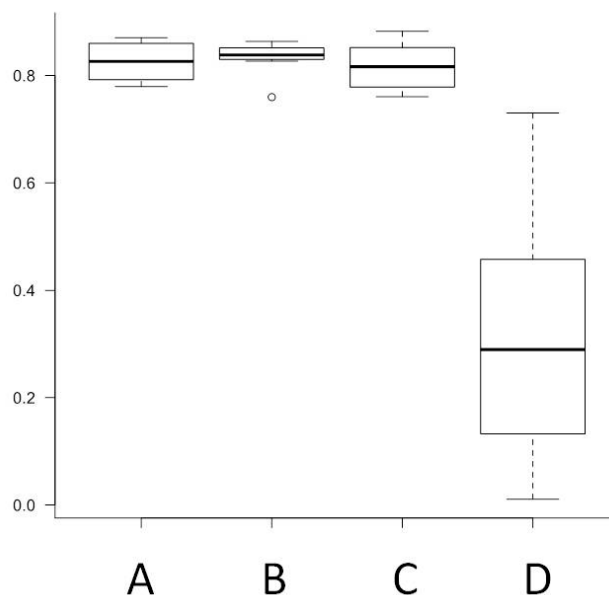


A: 液体窒素瞬間凍結と -80°C 冷凍庫保存時の比較、B: -80°C 冷凍庫保存時と 4°C 1日静置後保存時の比較、C: 異なる個人間の比較

→どの保存過程条件であっても大きな違いはなく、 4°C 1日保存をしても細菌叢への大きな影響はない。一方、個人間の細菌叢への影響は大きい。

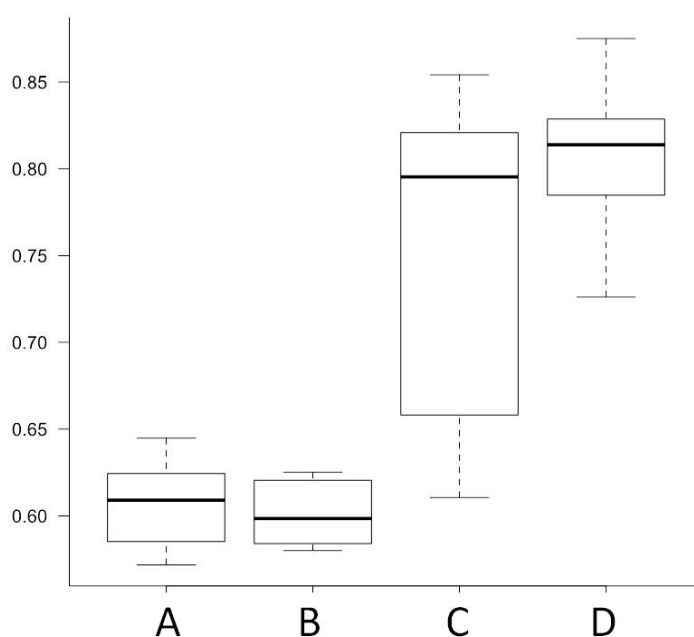
II. 便容器の影響

Pearson correlation coefficient



A: -80°C 冷凍庫保存の培地有り容器と無し容器の比較、B: 液体窒素保存の培地有り容器と無し容器の比較、C: 4°C 1日静置の培地有り容器と無し容器の比較、D: 異なる個人間の比較

→培地有無の条件による細菌叢への影響は少ない。



A: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と通常便の液体窒素保存の比較、B: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と通常便の 4°C 1 日静置の比較、C: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と下剤便の比較、D: 異なる個人間の比較

→下剤便は通常便と比べ、細菌叢が大きく異なる場合がある

結果のまとめ

- ▶ 液体窒素による瞬間凍結、 -80°C 冷凍庫保存、および 4°C 1 日静置後の保存において腸内細菌叢への影響は少なく、保存方法間で有意差を認めなかったため、患者が便サンプルを解析場所に持参する場合、サンプリング当日あるいは翌日どちらでも今後問題はなさそう。
- ▶ -80°C 冷凍庫保存の培地有り容器と無し容器の比較、 4°C 1 日静置の培地有り容器と無し容器の比較において腸内細菌叢の一致度は高いため、培地有の便容器で検体収集可能である。
- ▶ 同一症例の下剤便と通常便の検討は、腸内細菌の影響は大きく、個人間のばらつきと同じ程度に腸内細菌叢が異なっている。下剤直後の便をもちいた解析は不適切な可能性がある。

Subject No.: 28-1107

Title: The gut microbiome and colorectal disease: A human microbiome cohort study

Researchers: Nagata Naoyoshi

Key words: human gut microbiome, feces container, intestinal lavage

Abstract

Background: It was recently suggested that certain populations of the normal flora resident in the human gut are associated with the development of colonic disease. To clarify this association, fecal analysis based on shotgun metagenomic sequencing, preferably using fecal specimens collected from individuals who had undergone diagnostic colonoscopy, is performed. Large-scale clinical (epidemiologic) studies that meet the above conditions are crucial to examine the “disease-gut microbiota” association, but several issues need to be addressed in such large-scale specimen collection. First, simplicity and affordability are essential features of fecal specimen containers for large-scale collection, but the effect of such containers on gut microbiota needs to be examined. Other factors that need to be investigated are the influence of fecal specimen storage at the homes of study participants before being submitted to the laboratory (as is usually the case), and the suitability for gut microbiota analysis of fluid-diluted specimens collected immediately after consumption of a large volume (2 liters) of oral cathartic solution prior to colonoscopy (i.e., fecal specimens collected on the day of colonoscopy or immediately after administration of the cathartic agent). Establishing a simple and easy procedure for fecal specimen collection could promote large-scale studies on the gut microbiota.

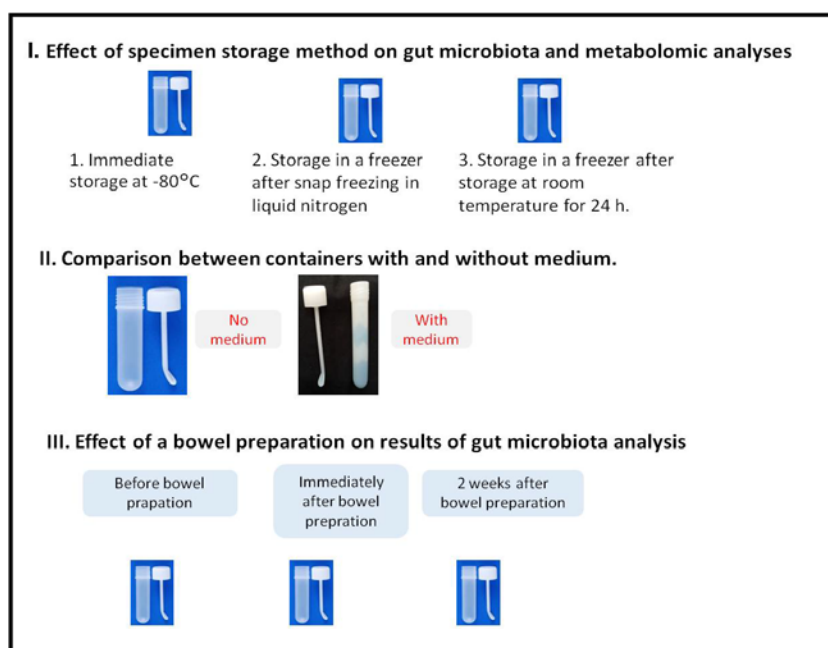
Aims: This study sought to verify the validity of fecal specimen collection methods currently used at the National Center for Global Health and Medicine, by comparing them with the conventional freeze-storage method.

Methods: Participants were healthy healthcare professionals aged ≤ 50 years. Those who were on oral medication in the preceding 3 months or who had underlying disease were excluded.

I. Effect of specimen storage method on gut microbiota and metabolomic analyses

II. Comparison between containers with and without medium.

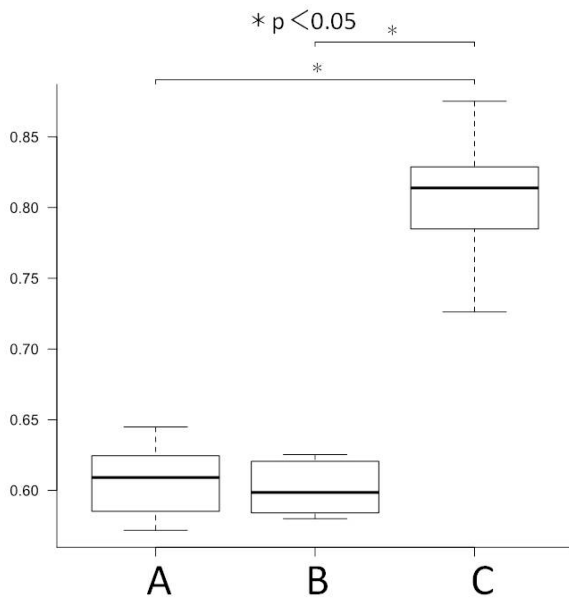
III. Effect of a bowel preparation on results of gut microbiota analysis



Results:

I. Effect of storage methods on gut microbiota and metabolomic analyses

Figure 1: Unifrac principal coordinate analysis



A: Comparison between -80°C storage methods with and without preceding liquid nitrogen snap freezing. B: Comparison between -80°C storage methods with and without preceding storage at 4°C for 1 day.

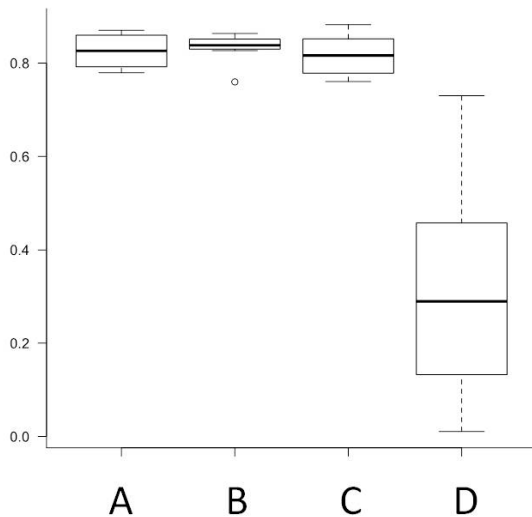
C: Comparison among individuals.

● There were no marked differences among the storage conditions tested, and even storage for 1 day at 4°C resulted in a negligible effect on the gut microbiota. Conversely, there were considerable inter-individual differences in the gut microbiota.

II. Effect of specimen containers on gut microbiota analysis

Figure 2: Pearson's correlation coefficient analysis

A: Comparison between containers with and without medium (specimens kept at -80°C).



B: Comparison between containers with and without medium (specimens kept at -80°C after liquid nitrogen snap freezing).

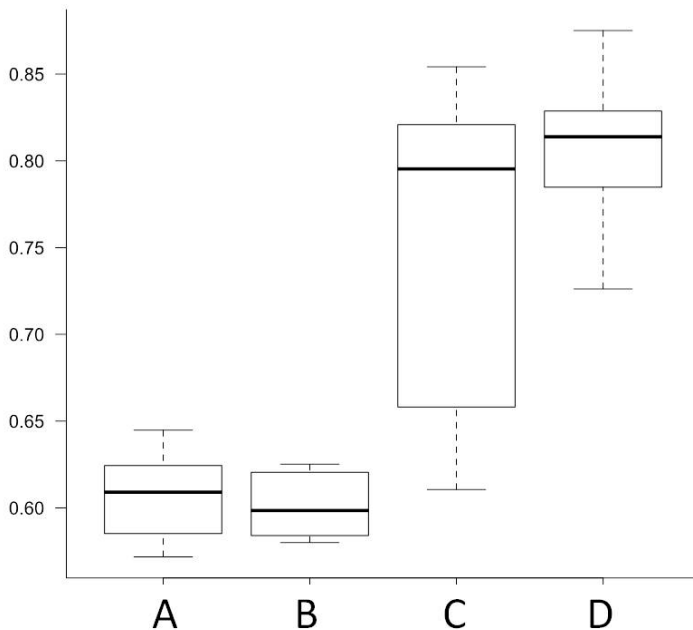
C: Comparison between containers with and without medium (specimens kept at -80°C after 1-day standing at 4°C).

D: Comparison among individuals.

● The effect of the presence/absence of medium in specimen containers on the gut microbiota was negligible.

III. Effect of bowel preparation on results of gut microbiota analysis

Figure 3: Unifrac principal coordinate analysis



A: Comparison between normal fecal specimens stored at -80°C with and without preceding liquid nitrogen snap freezing.

B: Comparison between normal fecal specimens stored at -80°C with and without preceding storage at 4°C for 1 day.

C: Comparison between normal fecal specimens and post-bowel preparation fecal specimens stored at -80°C .

D. Comparison among individuals.

● The microbiota was largely different between normal fecal specimens and post-bowel preparation fecal specimens.

Summary of Results

- Preceding snap freezing in liquid nitrogen, storage at -80°C , and preceding storage at 4°C for 1 day had a negligible effect on the results of gut microbiota analysis. No significant differences attributed to storage methods were observed, suggesting that either same-day or next-day specimen submission by patients is likely to be acceptable.
- When specimens were stored at -80°C with or without preceding storage at 4°C for 1 day, gut microbiota analysis results obtained using containers with medium were consistent with those obtained using containers without medium. These results suggest that using containers with medium is preferable for specimen collection.
- Intra-individual comparison between normal fecal microbiota and post-cathartic fecal microbiota showed that use of a cathartic agent caused as large a variation in the gut microbiota as that seen among individuals. Use of fecal specimens collected immediately after administration of a cathartic agent may not be suitable for analysis.

課題番号 : 28-1107

研究課題名 : 腸内細菌ゲノムバンク構築から新たな腸疾患リスクを解明する疫学研究
研究 : Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名 : 永田尚義

I. Effect of specimen storage method on gut microbiota and metabolomic analyses



1. Immediate storage at -80°C



2. Storage in a freezer after snap freezing in liquid nitrogen



3. Storage in a freezer after storage at room temperature for 24 h.

II. Comparison between containers with and without medium.



No medium



With medium

III. Effect of a bowel preparation on results of gut microbiota analysis

Before bowel preparation



Immediately after bowel preparation



2 weeks after bowel preparation



サンプリングの保存過程の影響

◆ 相関解析: 値が1に近づくほど、相似性が高い関係性

・3つの保存過程の影響を比較

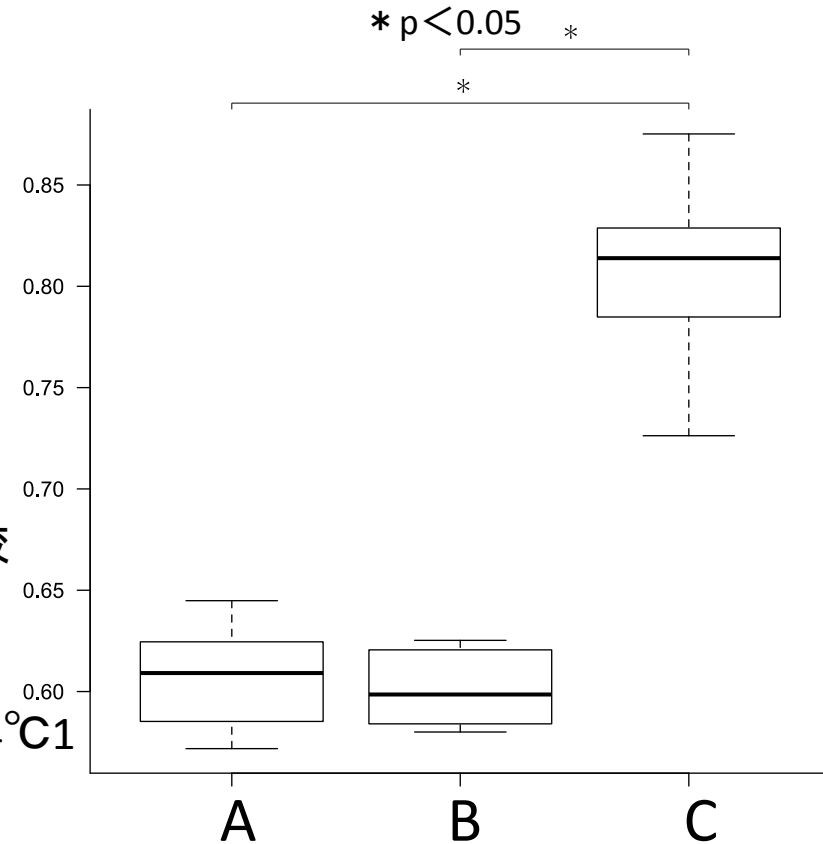
①液体窒素 ②-80°C冷凍庫 ③4°C1日静置

各条件の細菌叢データを同一人物のデータ同士で比較し、異なる条件下で保存した細菌叢データがどれだけ異なっていたかを明らかにする。



- A: 液体窒素瞬間凍結と-80°C冷凍庫保存時の比較
- B: -80°C冷凍庫保存時と4°C1日静置後保存時の比較
- C: 異なる個人間の比較

➡ どの保存過程条件であっても大きな違いはなく、4°C1日保存をしても細菌叢への大きな影響はない



サンプリング容器の影響

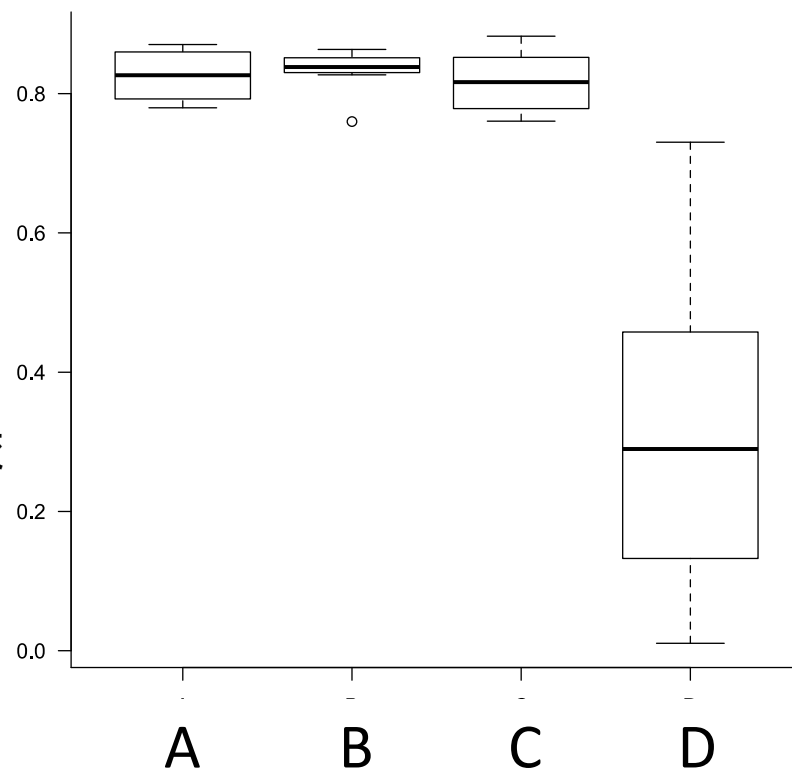
・培地有無の条件下で比較


◆ 相関解析: 値が1に近づくほど、相似性が高い関係性

各保存過程条件下で培地有り・無しのサンプリング容器で保管した際の細菌叢データを同一人物のデータ同士で比較し、サンプリング容器の違いが細菌叢データへどれだけ影響を与えるかを明らかにする。



- A: -80°C冷凍庫保存の培地有り容器と無し容器の比較
- B: 液体窒素保存の培地有り容器と無し容器の比較
- C: 4°C1日静置の培地有り容器と無し容器の比較
- D: 異なる個人間の比較



 培地有無の条件による細菌叢への影響は少ない

サンプリング方法の影響

・通常排便のサンプルと下剤便の比較

下剤便のサンプルを用いた時、同一人物の通常排便とどの程度違いがあるのかを明らかにする。




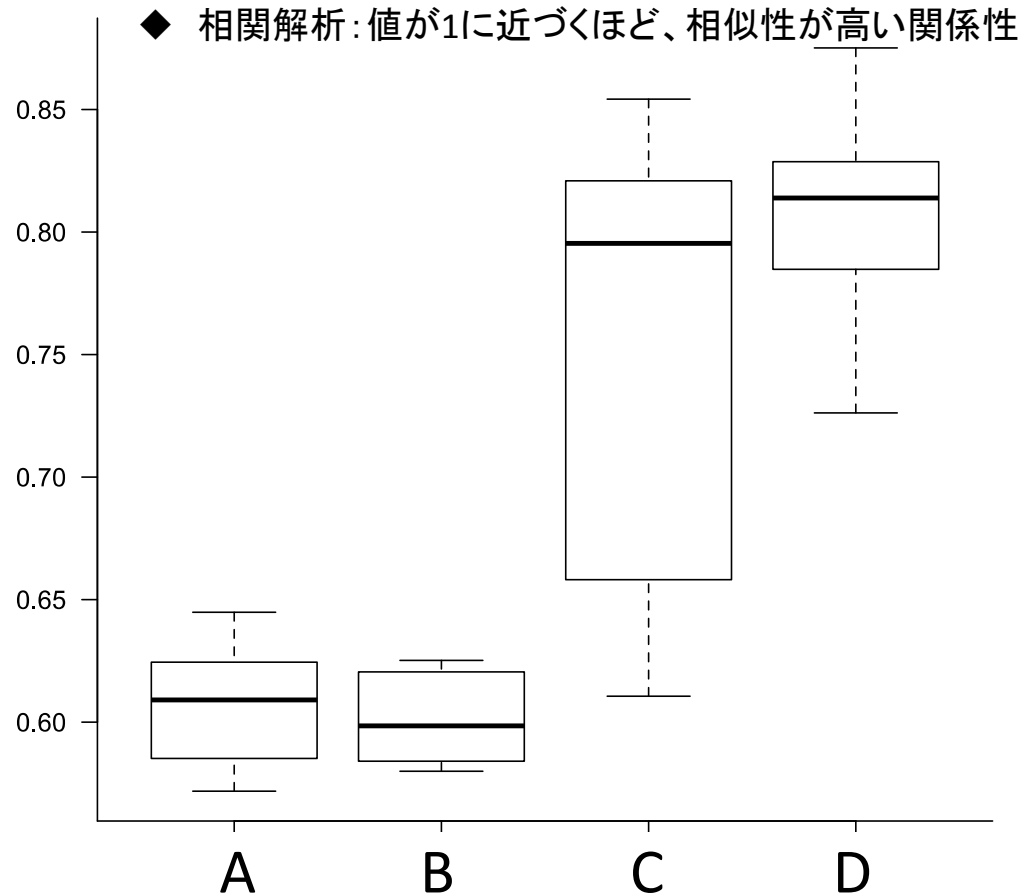
A: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と通常便の液体窒素保存の比較

B: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と通常便の 4°C 1日静置の比較

C: 通常便の -80°C 冷凍庫保存と下剤便の比較

D: 異なる個人間の比較

 下剤便は通常便と比べ、細菌叢が大きく異なる場合がある



研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 28-1107

研究課題名： 腸内細菌ゲノムバンク構築から新たな腸疾患リスクを解明する疫学研究：Human Microbiome Cohort Study

主任研究者名：永田 尚義

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
なし				

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
腸内細菌大規模データベース化	永田尚義	毎日新聞	新聞誌	2016年9月23日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。