

腸内細菌叢検索における試料保存方法が DNA 解析に与える影響の評価

梶田和彌・青木 萌・寺澤沙希・飯野久和

Evaluation of the Efficacy of Fecal Sample Storage Methods for Analyzing Human Microbiota

Kazuya MASUDA, Megumi AOKI, Saki TERASAWA and Hisakazu IINO

Recently, studies of intestinal microbiota have been conducted using mainly next-generation sequencers to perform comprehensive bacterial DNA analyses. When using this molecular biological approach, intestinal bacterial DNA is extracted from fecal samples. But the influence of the fecal sample storage condition and the methods of DNA extraction on the analysis have not been investigated as far as we know. In this study, we evaluate the effects of different freezing conditions and storage periods of microbial DNA in fecal samples using PCR-DGGE analysis. Fecal samples were stored at -20°C , -80°C and -80°C followed by a liquid nitrogen treatment and kept for 3 months and 1 year, respectively.

Microbial DNA extracted from these fecal samples was examined using PCR-DGGE analysis to monitor total intestinal microbiota: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Clostridium* groups. DGGE profiles demonstrated that the total bacterial flora was stable and no significant changes were found due to storage conditions or periods. In genus specific detection of samples stored for three months, DNA bands were detected in all samples except for in part of the *Clostridium* group. In the case of fecal samples stored for one year, both at -80°C and also treated with liquid nitrogen, amplified genus specific bands were present in all samples. A different band pattern was observed only in the amplicon of the liquid nitrogen treated samples from the *Clostridium* group. On the other hand, in microbial DNA extracted from samples preserved at -20°C it was impossible to amplify specific fragments. Since some bacterial groups in fecal samples were affected by the freezing method, storage conditions and period, it appears that rapidly freezing fecal samples may be the most effective way to maintain intestinal microbiota.

Key words: intestinal microbiota (腸内細菌), DGGE (DGGE 法), freezing method (冷凍方法)

背景

ヒトの腸管内には数百種類の細菌が存在し、ヒト細胞を上回る数の細菌が生息していることが知られている。近年、このような腸内細菌が数々の疾病に影響を与えることが明らかになりつつある^{1,2)}。腸内細菌の研究は、培養法による腸内細菌の挙動の観察が主体であったが、現在では次世代シーケンサーを用いることにより腸内細菌の DNA を元に腸内細菌叢の網羅的解析が可能であり、エンテロタイプに

ついて様々な議論が行われている³⁾。これらの腸内細菌の DNA 解析に用いられる試料は一般に糞便から抽出された DNA が用いられている。従って、次世代シーケンサーをはじめとした腸内細菌叢の DNA 解析は、抽出された DNA の質や量に依存し、試料となる糞便の保存方法や DNA 抽出方法の検討が重要となると考えられる⁴⁾。これまでに糞便の凍結の有無により Firmicutes と Bacteroidetes の割合に変化が報告されており、糞便の保存条件はその後の解析に影響を与えることが示唆されている⁵⁾。

本研究では腸内細菌叢の DNA 解析に適した糞便の保存方法や保存期間の検討を目的として、PCR-DGGE 法により保存方法の異なる糞便から抽出した DNA の解析を行った。PCR-DGGE 法を用いると、解析対象となる細菌の 16S rRNA 遺伝子を PCR により増幅し、変性剤の濃度勾配をつけたアクリルアミドゲルにより電気泳動を行うことで、試料に含まれる細菌叢をバンドパターンにより可視的に観察できる。また、増幅に使用するプライマー (primer) の組合せにより、総細菌叢だけでなく、特定の種に絞っての観察も可能である。そこで本研究では、糞便の総細菌叢及び 4 種の属 (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*) を特異的に検出することで、糞便の保存方法が分子生物学的手法による DNA 解析に与える影響を評価した。

実験材料及び方法

供試試料

本研究に用いた糞便は、22~23 歳の健康な女子学生 13 名から任意に提供されたものを用いた。

糞便の採取及び輸送・保存方法

糞便は 1 回に排便された全量を採取し、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学株式会社) と共にパウチ袋に入れ密閉した。排便後 24 時間以内に試料を低温輸送し、冷凍した。冷凍保存条件は、 -20°C 保存、 -80°C 保存、液体窒素による予備凍結後

-80°C 保存 (以下 $N-80^{\circ}\text{C}$) の 3 通りとした。なお、保存期間は 3 か月間と 1 年間とした。

糞便からの DNA 抽出

3 通りの冷凍条件により保存した糞便試料は、滅菌した 0.1 mm 及び 0.3 mm ジルコニアビーズ (TORAY) を加えたスクリーキャップチューブにそれぞれ 20 mg ずつ凍結した状態で加えた。糞便溶解用緩衝液を添加後、TissueLyser (QIAGEN) により Speed25 の条件で、15 分間試料を破碎した。遠心分離後、上清を回収し、QIAamp DNA stool Kit (QIAGEN) により DNA を抽出した。

rRNA 遺伝子の増幅

本研究で用いたプライマーを Table 1 に示した。なおすべてのフォワードプライマーには GC クランプの配列を追加した。DNA の増幅は 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いた。糞便中の総細菌叢の検出は 341F と 518R を用いた。*Bacteroides* の DNA の増幅は、303F と 708R を用いた。*Bifidobacterium* の DNA の増幅は、Bif-F と Bif-R を用いた。*Lactobacillus* の DNA の増幅は、F-Lac と R-Lac を用いた。*Clostridium* の DNA の増幅は、Per-F と Per-R を用いた。すべての PCR 反応液の調整及び PCR 条件は各参考文献に記載された条件に従った⁶⁻¹⁰⁾。

Table 1 本研究で用いた primer

Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
341F	ATTACCGCGGCTGG	Yu <i>et al.</i> 2004
518R	CCTACGGGAGGCAGCAG	
303F	(G)GAAGGTCCCCACATTG	Bernhard <i>et al.</i> 2000
708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	
Bif-F	(G)TGGCGTCYGGTGTGAAAG	Rinttilä <i>et al.</i> 2004
Bif-R	CCACATCCAGCRTCCAC	
F-Lac	(G)GCAGCAGTAGGGAATCTTCCA	Verma <i>et al.</i> 2012
R-Lac	GCATTYCACCGCTACACATG	
Per-F	(G)ATGCAAGTCGACGCAKG	Possemiers <i>et al.</i> 2004
Per-R	TATGCGGTATTAATCTYCCTT	

DGGE 法による DNA の解析

PCR により増幅した DNA の DGGE 法による解析は DCode System (Bio-Rad Laboratories) により行った。総細菌叢及び 4 属の DGGE 法による解析は、8% ポリアクリルアミドゲルを使用し、濃度勾配は 0 から 80% とした。電気泳動は 60 °C, 120 V で 5 時間行った。泳動後のゲルは SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) により染色後、Gel Doc (Bio-Rad Laboratories) により各サンプルのバンドパターンを検出した。

倫理的配慮

本研究は、昭和女子大学倫理審査委員会の承認を得て実施された。

結果及び考察

3 か月間冷凍保存した試料の DGGE 解析結果

保存方法の異なる糞便から抽出した DNA を用い、保存条件の差異が分子生物学的手法による細菌叢の解析に与える影響を、DGGE 解析により検討した。図 1 に 3 か月間保存試料の DGGE 法による代表的なバンドパターンを示した (No. 1~No. 3)。3 か月間保存試料に含まれる総細菌叢はユニバーサルプライマーにより増幅した DNA を用いた。DGGE 解析の結果、保存条件の差異による総細菌叢のバンドパターンの変化は確認されなかった (図 1-A)。

属特異的プライマーを用いた場合、*Bacteroides* 及び *Lactobacillus* のバンドパターンは 3 か月間保存の試料を用いた場合、保存方法の差に関わらず、同様のバンドパターンを示した (図 1-B, 1-D)。*Bifidobacterium* のバンドパターンは 3 か月間保存の試料を用いた場合、ほとんどの試料で同様のバンドパターンが確認された (図 1-C)。No. 1 の試料では N -80 °C 保存後の試料でのみ他のものでは確認されなかったバンドが存在し、3 か月間という短期間であっても保存法の差異により検出されるバンド数に影響を与えることが示唆された。

Clostridium の検出は、3 か月間保存した時点で、本研究で用いたプライマーでは検出が困難な試料が確認された (図 1-E)。一般に *Clostridium* は腸管

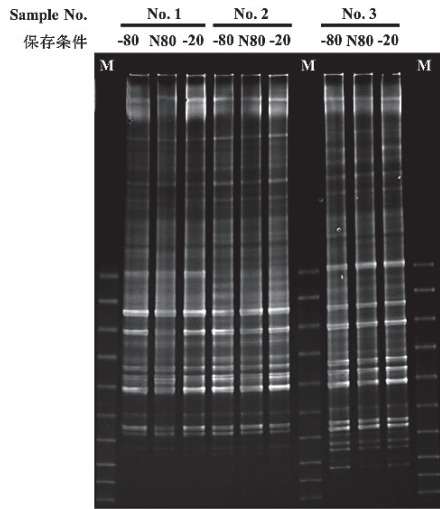
内に常在していると考えられていることから、試料の保存方法の影響が顕著に現れたものと推察された。また、No. 1~2 の試料で優勢と考えられるバンドが 1 本確認された。特に No. 2 の試料では変性剤濃度の薄いゲルの上部にさらにもう 1 つのバンドが確認されたが、保存条件により検出の程度が異なっていた。-80 °C 保存の試料では、変性剤濃度が高い下部のバンドが優勢であるのに対し、N -80 °C 保存後の試料では変性剤濃度が薄い上部のバンドがレーン内で優勢であった。一部の試料で *Clostridium* の DNA が増幅されない点や、同一試料にも拘わらず優勢なバンドの変化が保存方法の違いにより確認されたことから、*Clostridium* を検出する場合、保存期間が 3 か月間であっても保存方法の影響が強く現れることが示唆された。

1 年間冷凍保存した試料の DGGE 解析結果

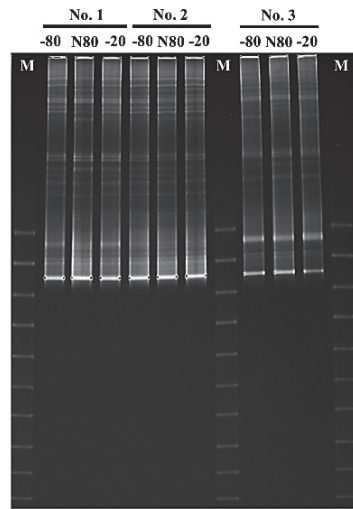
図 2 に 1 年間冷凍保存した糞便試料の代表的な DGGE 解析結果を示した (No. 4~No. 6)。総細菌叢のバンドパターンは 1 年間保存した場合でも、保存方法に関わらず、同一の試料採取者に由来する試料では同様のバンドパターンを示した (図 2-A)。3 か月間及び 1 年間異なる冷凍条件により保存した試料であっても顕著な差が確認されなかったことから、ユニバーサルプライマーを用いた総細菌叢の検出には、保存方法や期間による DNA の変化の影響は受けにくいものと考えられた。総細菌叢の検出の場合、糞便中の優勢な細菌 DNA を検出することになることから、保存方法や期間に影響を受けやすい少量の DNA の変化の影響は受けにくいものと考えられた。

属特異的プライマーを検出に用いた場合、すべての試料で -20 °C 保存した試料からは DNA の増幅が確認できなかった。*Bacteroides*, *Bifidobacterium* 及び *Lactobacillus* のバンドパターンは、-80 °C 及び N -80 °C の保存条件であれば顕著な変化は確認されなかった (図 2-B, C, D)。*Clostridium* も他の属と同様に、-80 °C および N -80 °C 保存後の試料では *Clostridium* のバンドが検出された (図 2-E)。また、No. 5 の試料では、N -80 °C 保存の試料からのみ変性剤濃度が高い部位にバンドがさら

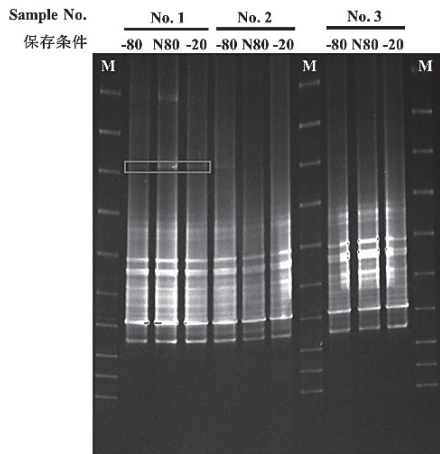
(A) 総細菌叢



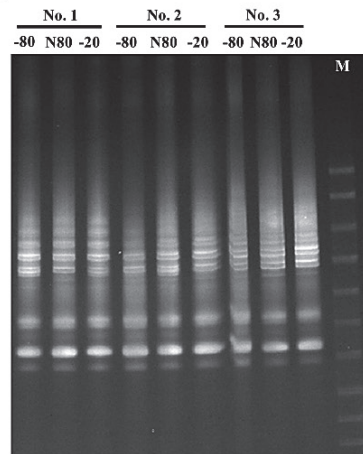
(B) *Bacteroides*



(C) *Bifidobacterium*



(D) *Lactobacillus*



(E) *Clostridium*

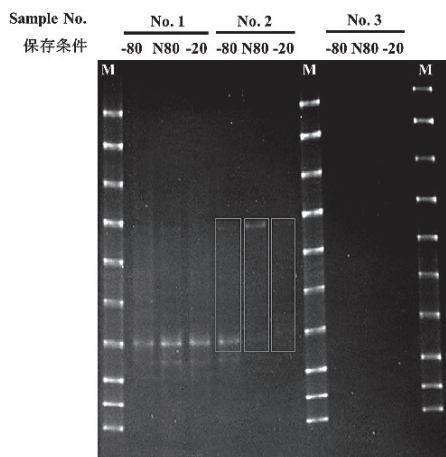
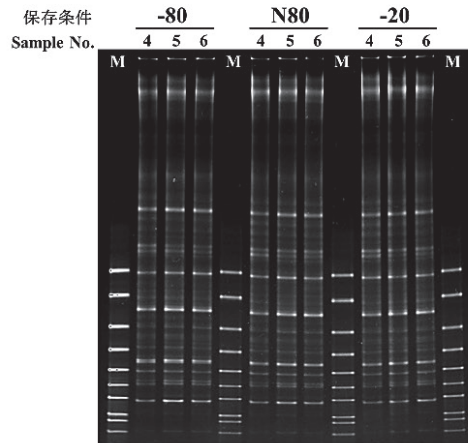


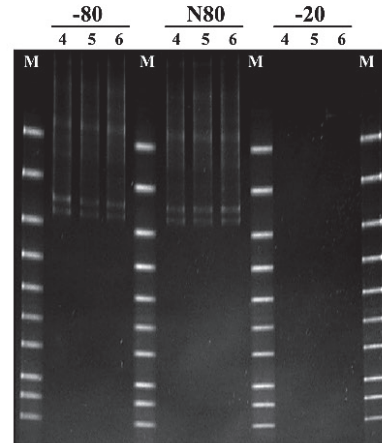
図 1. 3 か月間冷凍保存した糞便試料の DGGE 解析

異なる保存方法で凍結された糞便を 3 か月間冷凍保存後、DNA を抽出し特異的プライマーにより増幅した DNA を DGGE 法により検出した。図には代表的なバンドパターンを示す試料を示した。(A) はユニバーサルプライマーにより増幅した総細菌叢のバンドパターン、(B)~(E) はそれぞれ属特異的プライマーにより増幅した *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* のバンドパターンである。保存条件の -80 は -80 °C 保存, N80 は液体窒素による凍結後 -80 °C 保存, -20 は -20 °C 保存の試料を泳動した。白枠は試料間あるいは試料内でバンドパターンに変化が確認された部分である。M は DGGE Marker (ニッポンジーン) を泳動したレーンを表す。

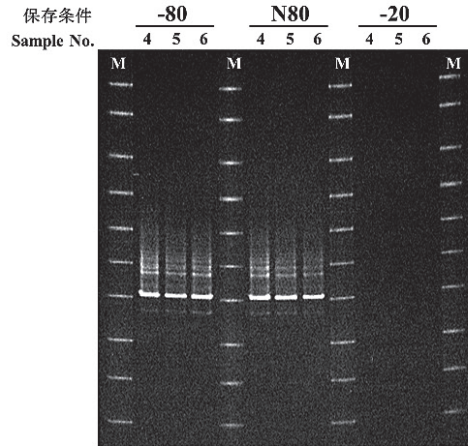
(A) 総細菌叢



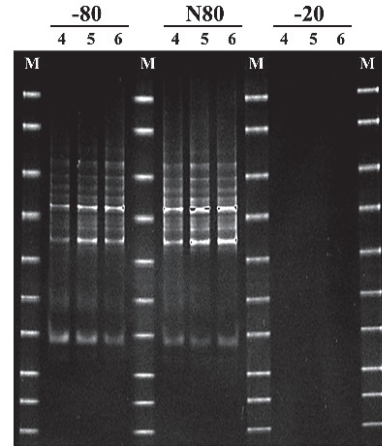
(B) *Bacteroides*



(C) *Bifidobacterium*



(D) *Lactobacillus*



(E) *Clostridium*

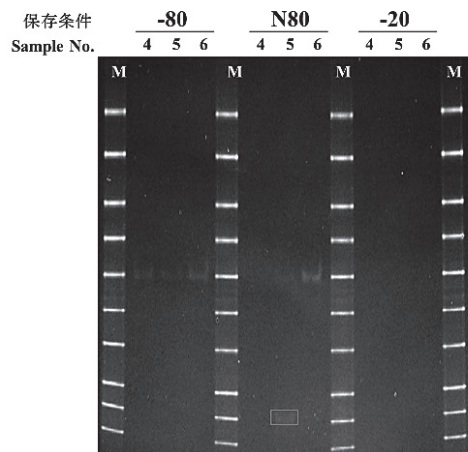


図 2. 1年間冷凍保存した糞便試料の DGGE 解析

異なる保存方法で凍結された糞便を1年間冷凍保存後、DNAを抽出し特異的プライマーにより増幅したDNAをDGGE法により検出した。図には代表的なバンドパターンを示す試料を示した。(A)はユニバーサルプライマーにより増幅した総細菌叢のバンドパターン、(B)~(E)はそれぞれ属特異的プライマーにより増幅した*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Clostridium*のバンドパターンである。保存条件の-80は-80℃保存、N80は液体窒素による凍結後-80℃保存、-20は-20℃保存の試料を泳動した。白枠は試料間あるいは試料内でバンドパターンに変化が確認された部分である。MはDGGE Marker(ニッポンジーン)を泳動したレーンを表す。

に確認された。このことから、液体窒素による急速な保存が他の緩慢な冷凍方法に比べDNAの保存性に寄与することが推察された。

以上の結果から、糞便中で元々優勢な細菌を検出する場合であれば、糞便の保存方法や保存期間の影響は少ないものと考えられた。現在、世界各国のヒト腸内細菌叢の構成が調べられているが、日本人の腸内細菌叢の特徴として *Bifidobacterium* が多く、*Bacteroides* や *Prevotella*, *Clostridium* が少ない傾向を示すことが報告されている¹¹⁾。本研究において *Clostridium* の検出が不安定だった点はこのような菌叢に占める割合の影響が考えられた。従って、特定の属のみを検出する場合、元々の糞便中に含まれる菌数の影響が大きいといえる。本研究で検討した -20°C での緩慢な凍結保存方法では、DNA量が少ないサンプルの菌叢解析に顕著な影響を与えることが示唆された。 -80°C での保存は1年間の保管後も概ね菌叢を維持していたが、液体窒素による急速保存でのみ検出されたバンドパターンが確認されたことから、糞便試料を急速凍結することが冷凍保存中の菌叢の維持に有効であるものと考えられた。最近では、常温保存での有効性をうたう試料の保存方法が報告されている¹²⁾。このような試料の保存方法と急速凍結を組み合わせることにより、実際の腸内細菌叢を反映した安定的な試料保存が可能になるのではないかと考えられる。

参考文献

- 1) Kinross JM, Darzi AW and Nicholson JK: Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.*, (3), 14 (2011).
- 2) Marchesi JR et al.: The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.*, 65(2), 330-339 (2016).
- 3) Arumugam M et al.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180 (2011).
- 4) Wu GD et al.: Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol.*, 10, 206 (2010).
- 5) Bahl MI, Bergström A and Licht TR: Freezing

fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiol Lett.*, 329(2), 193-197 (2012).

6) Yu Z and Morrison M: Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.*, 70(8), 4800-4806 (2004).

7) Bernhard AE and Field KG: Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol.*, 66(4), 1587-1594 (2000).

8) Rinttilä T et al.: Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol.*, 97(6), 1166-1177 (2004).

9) Verma AK, Verma R, Ahuja V and Paul J: Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. *BMC Microbiol.*, 12, 183 (2012).

10) Possemiers S, Verthé K, Uyttendaele S and Verstraete W: PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol.*, 49(3), 495-507 (2004).

11) Nishijima S et al.: The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res.*, 23(2), 125-133 (2016).

12) Nishimoto Y et al.: High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut.*, 65(9), 1574-1575 (2016).

(ますだ かずや 管理栄養学科)

(おおき めぐみ 平成 25 年度生活機構研究科修了)

(てらさわ さき 平成 25 年度健康デザイン学科卒業生)

(いいの ひさかず 管理栄養学科)