

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7125579号

(P7125579)

(45)発行日 令和4年8月25日(2022.8.25)

(24)登録日 令和4年8月17日(2022.8.17)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/48 (2006.01)

G 0 1 N 33/48

G

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

Z Z N A

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

G 0 1 N 33/48

A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

請求項の数 8 (全28頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-546555(P2021-546555)

(86)(22)出願日 令和2年8月20日(2020.8.20)

(86)国際出願番号 PCT/JP2020/031367

(87)国際公開番号 WO2021/054028

(87)国際公開日 令和3年3月25日(2021.3.25)

審査請求日 令和3年12月14日(2021.12.14)

(31)優先権主張番号 特願2019-169216(P2019-169216)

(32)優先日 令和1年9月18日(2019.9.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関

日本国(JP)

(73)特許権者 507416805

株式会社テクノスルガ・ラボ

静岡県静岡市清水区長崎330番地

(74)代理人 100205914

弁理士 堀越 総明

(74)代理人 100162189

弁理士 堀越 真弓

(72)発明者 國弘 忠生

静岡県静岡市清水区長崎330番地 株

式会社テクノスルガ・ラボ内

審査官 海野 佳子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 検体保存液並びにそれを用いた分析用装置及び分析方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体由来又は環境由来の検体中に含まれる、胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸からなる群から選択される少なくとも1種の成分を分析するために使用される検体保存液であって、

以下(A)及び(B)を少なくとも含有することを特徴とする検体保存液。

(A)縮合リン酸塩又はポリオキシエチレンソルビタンアルキレート

(B)グアニジンチオシアン酸塩、Tris-HCl(pH7~9)及びEDTA

【請求項2】

前記縮合リン酸塩が、5mM~150mMのピロリン酸ナトリウムであることを特徴とする請求項1に記載の検体保存液。 10

【請求項3】

前記ポリオキシエチレンソルビタンアルキレートが、0.2~1.0重量%のモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタンであることを特徴とする請求項1に記載の検体保存液。

【請求項4】

前記グアニジンチオシアン酸塩の濃度が0.1M~5Mであり、
前記Tris-HCl(pH7~9)の濃度が40mM~150mMであり、及び
前記EDTAの濃度が1mM~50mMであることを特徴とする請求項1~3のいずれか1項に記載の検体保存液。 20

【請求項 5】

前記検体が糞便であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の検体保存液。

【請求項 6】

前記検体を保存する保存容器と、

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の検体保存液と、を有し、

前記検体が、前記検体保存液に浸漬又は懸濁された状態で、前記保存容器内で保存されるように構成されていることを特徴とする分析用装置。

【請求項 7】

前記検体に対する前記検体保存液の量は、容量比で、検体：検体保存液 = 1 : 3 以上となるように構成されていることを特徴とする請求項 6 に記載の分析用装置。

10

【請求項 8】

前記検体に対し、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の検体保存液を添加して、前記検体を保存し、

少なくとも 7 日間保存した後の前記検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸からなる群から選択される少なくとも 1 種の成分を分析することを特徴とする分析方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、生体由来又は環境由来の検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸といった成分を安定的に保存することができる検体保存液に関し、この検体保存液を有する分析用装置、並びに、この検体保存液を用いた分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト又は動物の健康状態や病態の評価を行うため、糞便等の生体由来の検体を採取し、その検体中に存在する微生物の群集構造を分子生物学的手法により解析することが行われている（非特許文献 1）。さらに、微生物群集構造の解析に加えて、これらの検体に含まれる種々の代謝物質を解析することによって、生体中の代謝活性を総合的に解明するメタボローム解析も盛んに行われるようになってきている。

30

【0003】

ところが、糞便等の生体由来の検体は主に有機物と微生物とから構成されるため、微生物による有機物の分解作用、微生物の増殖・死滅等によって経時変化が生じやすく、非常に不安定である。また、検体中に含まれる代謝物質も酸化、分解又は揮発等によってその量が経時的に増減したり、変化しやすい。そして、上述した解析は所定の分析機器を備えた検査機関にて行われるため、採取された検体は検査機関まで輸送される必要があり、検査機関が検体を入手するまで時間を要する。それゆえ、検体を採取してから解析が実施されるまでの経過時間、保管・輸送の際の温度や保管方法等により、解析された微生物群集構造や代謝物質の分析値が採取時点のものとは異なるといった問題があった。

【0004】

40

そこで、微生物群集構造解析及び代謝物質の解析を実施する際には、採取時点の検体の内容を維持するために、検体を採取直後に冷凍して保存することが一般的に行われている。そのため、冷凍設備がない場所では、検体採取を行うことが事実上不可能であり、冷凍設備があったとしても、一般家庭や職場等では衛生上の問題から糞便等の生体由来の検体を冷凍して保存することは困難であった。また、冷凍処理前後の検体及び長期間に亘る冷凍保管前後の検体について解析した結果を検討したところ、冷凍処理又は長期間の冷凍保管によって、一部の微生物群集の検出率の低下が認められる場合があり、DNA の分解が生じている疑いがあること、及び、有機酸量が変化する等の問題があった。

【0005】

そこで、検体に含まれる微生物群集構造に変化を与えないよう、検体を冷凍保存せずに

50

安定的に保存・輸送できる方法として、出願人による特許文献1では、0.01M以上4M未満のグアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl (pH9.0)及び40mM EDTAを含む溶液中で検体を常温保管する方法が報告されている。また、出願人による特許文献2では、4Mのグアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl (pH9.0)又は40mM EDTAのいずれか1種以上を含む溶液中で検体を室温保存し、検体のDNA及び有機酸やポリアミン類等の化学物質を保存する方法が提案されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【文献】特開2016-136911号公報

国際公開第2018/138913号

【非特許文献】

【0007】

【文献】Koji NAGASHIMA, Daisuke YASOKAWA, Kentaro ABE, Ryoji NAKAGAWA, Tooru KITAMURA, Toshiharu MIURA, Shu KOGAWA, Bioscience Microflora, Vol.29, No.2, 2010年, p.97-110

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

近年、腸内細菌叢の解析と合わせて分析を行うことにより、多面的な腸内環境の評価をすることができる代謝物質として、糞便中に含まれる胆汁酸、腐敗物質（フェノール類・インドール類）及び有機酸が注目されている。例えば、胆汁酸は生体内で、コレステロール代謝、脂溶性成分の消化吸収、界面活性による腸内細菌叢の変化に關与する化合物である。胆汁酸には、肝臓で生合成された一次胆汁酸と、この一次胆汁酸が腸内細菌により変換されて生成する二次胆汁酸とがあるが、二次胆汁酸は毒性を有しており、大腸癌の発癌プロモーターといわれている。

【0009】

また、フェノール、p-クレゾール及び4-エチルフェノール等のフェノール類は、生体内で腸内細菌の働きによってチロシンから生成し、インドール及びスカトール等のインドール類は、生体内で腸内細菌の働きによってトリプトファンから生成する。これらのフェノール類及びインドール類は腐敗物質と呼ばれ、糞便の悪臭の原因と言われるほか、腸内環境の悪化を示す指標として知られている。生成したフェノール類の多くは血液を介して表皮形成過程に悪影響を及ぼすことから、肌荒れを起こす要因の一つにも挙げられている。

【0010】

さらに、有機酸は、生体内で腸管内を酸性に保ち、腸の蠕動運動や腸管からの水の分泌を促進するほか、感染防御、腐敗産物の生産抑制、便性・便通の改善効果を有する化合物である。有機酸は、腸内細菌による食物繊維や炭水化物の代謝物であると共に、タンパク質やペプチドの消化でも増加するため、腸内細菌叢と共に評価されることが好ましいとされている。

【0011】

しかしながら、糞便検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸といった代謝物質は、上述したように、酸化、分解又は揮発等によってその量が経時的に増減し易く、検体を冷凍保存した際においても、冷凍処理又は長期間の冷凍保管等によって代謝物質の量が変化する場合があるため、採取時点の糞便検体中に含まれる代謝物質の量の分析が困難であるという問題があった。

【0012】

また、特許文献1及び特許文献2には、検体を冷凍せずに安定的に保存・輸送できる保存方法がそれぞれ記載されているが、少なくとも胆汁酸、フェノール類及びインドール類

10

20

30

40

50

に着目し、これらの代謝物質を安定的に保存・輸送するための検討はなされておらず、その有効性も不明であった。

【0013】

したがって、本発明は上述した点に鑑みてなされたもので、その目的は、検体を冷凍保存せずに、検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸を安定的に保存できる手段を提供することにある。

【0014】

また、本発明の他の目的は、検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸といった代謝物質を安定的に保存できると共に、検体中に含まれる微生物群集構造も安定的に保存できる手段を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記課題を解決するため、本発明の検体保存液は、生体由来又は環境由来の検体中に含まれる、胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸からなる群から選択される少なくとも1種の成分を分析するために使用される検体保存液であって、次の(A)及び(B)を少なくとも含有している。(A)縮合リン酸塩又はポリオキシエチレンソルビタンアルキレート、(B)グアニジンチオシアン酸塩、Tris-HCl (pH7~9)及びEDTA。

【0016】

(A)縮合リン酸塩又はポリオキシエチレンソルビタンアルキレート並びに(B)グアニジンチオシアン酸塩、Tris-HCl (pH7~9)及びEDTAを含有する検体保存液で検体を保存することによって、検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸を30以下の室温条件下において、少なくとも2週間に亘り安定的に保存することができる。さらに、検体中に含まれる微生物群集構造も安定的に保存することができるため、胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸といった代謝物質の分析と微生物群集構造の解析とを、同じ検体保存液に保存された検体に基づいて行うことができる。また、本発明の検体保存液の配合成分は、代謝物質の分析及び微生物群集構造の解析を行う際の妨害物質を含まないため、前処理も不要であり、分析や解析等の操作を一般的なプロトコールに従って行うことができる。なお、本明細書における「室温」とは1~30(日本薬局方準拠)をいう。また、本明細書において「安定的に保存される」とは、保存期間前後の検体について得られた分析値または解析値との差異が30%以内に留まることをいう。

【0017】

また、本発明の検体保存液の縮合リン酸塩が、5mM~150mMのピロリン酸ナトリウムであることも好ましい。これにより、縮合リン酸塩として好適な化合物及びその保存液中での好適な濃度が選択される。

【0018】

また、本発明の検体保存液のポリオキシエチレンソルビタンアルキレートが、0.2~1.0重量%のモノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタンであることも好ましい。これにより、ポリオキシエチレンソルビタンアルキレートとして好適な化合物及びその保存液中での好適な濃度が選択される。

【0019】

また、本発明の検体保存液は、グアニジンチオシアン酸塩の濃度が0.1M~5Mであり、Tris-HCl (pH7~9)の濃度が40mM~150mMであり、及びEDTAの濃度が1mM~50mMであることも好ましい。これにより、各成分の好適な濃度が選択される。

【0020】

また、本発明の検体保存液に適用される検体は、糞便であることも好ましい。これにより、検体として好適なものが選択される。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の分析用装置は、検体を保存する保存容器と、上述した検体保存液と、を有し、検体が、検体保存液に浸漬又は懸濁された状態で、保存容器内で保存されるように構成されている。これにより、検体が検体保存液に浸漬又は懸濁された状態で保存容器内に保存されるため、検体の採取から保存・輸送までを誰もが簡単に行うことができ、検体が安定的に保存された状態で分析や解析を行うことができる。

【0022】

また、本発明の分析用装置は、検体に対する検体保存液の量が、容量比で、検体：検体保存液 = 1：3以上となるように構成されていることも好ましい。これにより、保存対象である検体に対して使用すべき検体保存液の量の好適な比率が選択される。

【0023】

さらに、本発明の分析方法は、検体に対し、上述した検体保存液を添加して、検体を保存する工程と、少なくとも7日間保存した後の検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸からなる群から選択される少なくとも1種の成分を分析する工程とを有する。これにより、少なくとも7日間保存した後においても、検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸といった代謝物質の増減や変化が抑制されているため、精度が高い分析を行うことができる。

【発明の効果】

【0024】

本発明によれば、以下のような優れた効果を有する検体保存液及びそれを用いた分析用装置及び分析方法を提供することができる。

(1) 検体中に含まれる胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸を30以下の室温条件下において、少なくとも2週間に亘り安定的に保存することができる。

(2) 検体中に含まれる微生物群集構造も安定的に保存することができるため、同じ検体保存液に保存された検体を用いて、分子生物学的手法により微生物群構造の解析を行うことができる。

(3) 代謝物質の分析及び微生物群集構造の解析を行う際の妨害物質を含まないため、前処理も不要であり、通常の操作により分析又は解析に適用することができる。

(4) 検体を保存する保存容器と検体保存液とを備えた分析用装置を使用することにより、30以下の室温環境下において、安定的に検体を保存及び輸送することができるため、検体の分析又は解析を容易に行うことができる。また、少なくとも2週間は安定的に保存できるため、遠方から輸送される検体の分析にも対応することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】本発明の分析用装置の第一の実施形態及びその使用状態を示す正面図である。

【図2】本発明の分析用装置の第二の実施形態を示す(A)分解斜視図、及び(B)正面図である。

【図3】図2に示す第二の実施形態における分析用装置の使用状態を示す正面図である。

【図4】実施例1における、糞便検体を各検体保存液で保管する前(横軸)と14日間保管した後(縦軸)の各検体懸濁液に含まれるフェノールの濃度を示すグラフである。

【図5】実施例2における、糞便検体を検体保存液で保管する前(横軸)と所定期間保管した後(縦軸)の検体懸濁液に含まれるフェノールの濃度を示すグラフである。

【図6】実施例2における、糞便検体を検体保存液で保管する前(横軸)と所定期間保管した後(縦軸)の検体懸濁液に含まれるp-クレゾールの濃度を示すグラフである。

【図7】実施例2における、糞便検体を検体保存液で保管する前(横軸)と所定期間保管した後(縦軸)の検体懸濁液に含まれる4-エチルフェノールの濃度を示すグラフである。

【図8】実施例3における、糞便検体を各検体保存液で保管する前(横軸)と14日間保管した後(縦軸)の各検体懸濁液に含まれるコール酸の濃度を示すグラフである。

【図9】実施例3における、糞便検体を各検体保存液で保管する前(横軸)と14日間保管した後(縦軸)の各検体懸濁液に含まれるケノデオキシコール酸の濃度を示すグラフ

10

20

30

40

50

である。

【図10】実施例4における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるコール酸の濃度を示すグラフである。

【図11】実施例4における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるケノデオキシコール酸の濃度を示すグラフである。

【図12】実施例4における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるウルソデオキシコール酸の濃度を示すグラフである。

【図13】実施例6における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれる酢酸の濃度を示すグラフである。

10

【図14】実施例6における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるプロピオン酸の濃度を示すグラフである。

【図15】実施例6における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるn-酪酸の濃度を示すグラフである。

【図16】実施例6における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるn-吉草酸の濃度を示すグラフである。

【図17】実施例6における、糞便検体を検体保存液で保管する前（横軸）と所定期間保管した後（縦軸）の検体懸濁液中に含まれるiso-吉草酸の濃度を示すグラフである。

【図18】実施例7における、糞便検体を検体保存液で保管する前（Day0生便・Day28冷凍便）と所定期間保管した後（Day14・Day28）の検体懸濁液から抽出されたDNAについて行われたリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

20

【図19】比較例3における、糞便検体を各検体保存液で保管する前（0日）と所定期間保管した後（3日・7日）の各検体懸濁液から抽出されたDNAについて行われたリアルタイムPCRの結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

以下、本発明を詳細に説明する。本発明の検体保存液は、次の(A)成分及び(B)成分群を少なくとも含有しており、(A)は縮合リン酸塩又はポリオキシエチレンソルビタンアルキレート、(B)はグアニジンチオシアン酸塩、Tris-HCl (pH7~9)及びEDTAである。なお、本発明の検体保存液の溶媒は水である。

30

【0027】

(A)成分は、縮合リン酸塩又はポリオキシエチレンソルビタンアルキレートであるところ、これらの(A)成分を、後述する(B)成分群に加えて配合すると、胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸が30以下の室温条件下において、少なくとも2週間に亘り安定的に保存される。それゆえ、これらの成分は、検体保存液中での胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸の酸化、分解又は揮発等を防ぐ作用を有するものと考えられる。

【0028】

(A)成分の縮合リン酸塩としては、ピロリン酸塩、メタリン酸塩及びポリリン酸塩が挙げられ、具体的には、ピロリン酸ナトリウム、ピロリン酸カリウム、メタリン酸ナトリウム、メタリン酸カリウム、ポリリン酸ナトリウム及びポリリン酸カリウムが挙げられる。このうち、検体保存液中での胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸の保存効果に優れる観点から、ピロリン酸ナトリウムが好適に用いられる。検体保存液中に配合される縮合リン酸塩の濃度としては、1mM~300mMが好ましく、5mM~150mMがより好ましく、10mM~100mMが特に好ましい。

40

【0029】

他方、(A)成分のポリオキシエチレンソルビタンアルキレートとしては、水溶性を呈するものが好適に用いられ、具体的には、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン(Tween20)、モノパルミチン酸ポリオキシエチレンソルビタン(Tween40)

50

)、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 60) 及びモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 80) が挙げられる。このうち、検体保存液中での胆汁酸、フェノール類、インドール類又は有機酸の保存効果に優れる観点から、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (Tween 20) が特に好適に用いられる。検体保存液中に配合されるポリオキシエチレンソルビタンアルキレートの濃度としては、0.05重量% ~ 3.0重量%が好ましく、0.1重量% ~ 2.0重量%がより好ましく、0.2重量% ~ 1.0重量%が特に好ましい。

【0030】

また、(B)成分群は、グアニジンチオシアン酸塩、Tris-HCl (pH 7 ~ 9) 及びEDTAであり、これらの(A)成分群は、主に、検体中に含まれる微生物の細胞壁のタンパク質を変性させることにより、微生物の増殖及び活動を抑制してDNAの再合成・分解を妨げる作用を有している。これにより、検体中に含まれる微生物の群集構造が維持され、安定的に保存される。また、微生物の増殖及び活動が抑制されるため、微生物による代謝物質の生産や消費も抑制される作用を有する。

10

【0031】

(B)成分群のグアニジンチオシアン酸塩の検体保存液中に配合される濃度としては、0.01M ~ 5Mが好ましく、0.1M ~ 5mMがより好ましく、0.5M ~ 4Mが特に好ましい。また、Tris-HClの検体保存液中に配合される濃度としては、10mM ~ 300mMが好ましく、40mM ~ 150mMがより好ましく、50mM ~ 100mMが特に好ましい。また、Tris-HClのpHについてはpH = 7 ~ 9の範囲が好ましいが、pH = 7.5 ~ 8.5がより好ましく、pH = 8.0が特に好ましい。さらに、EDTAの検体保存液中に配合される濃度としては、1mM ~ 50mMが好ましく、10mM ~ 50mMがより好ましく、特に30mM ~ 50mMが特に好ましい。

20

【0032】

本発明の検体保存液には、本発明の作用効果を損なわない範囲において、上述した成分以外の他の成分が含まれていてもよい。他の成分としては、着色剤、香料、分散剤、保湿剤等が挙げられる。

【0033】

本発明における検体保存液で保存される検体は、生体由来又は環境由来の検体である。生体由来の検体としては、糞便、直腸ぬぐい液、尿、鼻汁、喀痰、唾液、組織、血液又は血清等が挙げられる。このうち、糞便は多量の微生物と有機物を含んでいるにもかかわらず、本発明の検体保存液により安定的に保存され得る。また、環境由来の検体としては、河川・湖沼・海等からの環境水、土壌、廃水、汚水処理における生物処理槽水・汚泥等が挙げられる。

30

【0034】

本発明において、上述した検体保存液中で検体を保存することにより、検体中に含まれている量及び内容の変化が抑制される成分は胆汁酸、フェノール類、インドール類及び有機酸である。以下、これらの成分について詳述する。

【0035】

胆汁酸とは、生体中でコレステロールより生合成されるステロイド化合物である。本発明の検体保存液で安定的に保存される胆汁酸には、一次胆汁酸、二次胆汁酸及びこれらの反応中間体並びにアミノ酸類と結合した抱合胆汁酸が含まれる。胆汁酸の具体例としては、特に限定されないが、コール酸、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸、リトコール酸、ウルソデオキシコール酸、ヒオデオキシコール酸、デヒドロコール酸、イソデオキシコール酸、グリココール酸、グリコケノデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、グリコリトコール酸、グリコウルソデオキシコール酸、タウロコール酸、タウロケノデオキシコール酸、タウロデオキシコール酸、タウロリトコール酸、タウロウルソデオキシコール酸、ミュリコール酸、ミュリコール酸、ミュリコール酸、タウロミュリコール酸、タウロミュリコール酸、7-オキシデオキシコール酸及び7-オキシリトコール酸等が挙げられる。

40

50

【 0 0 3 6 】

また、本発明の検体保存液で安定的に保存されるフェノール類としては、生体内で腸内細菌の働きによってチロシンから生成するフェノール類が挙げられ、特に限定されないが、例えば、フェノール、p-クレゾール及び4-エチルフェノール等が挙げられる。同様に、本発明の検体保存液で安定的に保存されるインドール類としては、生体内で腸内細菌の働きによってトリプトファンから生成するインドール類が挙げられ、特に限定されないが、一例として、インドール及びスカトール等が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

さらに、本発明の検体保存液でにより安定的に保存される有機酸としては、主に、生体内で腸内細菌の働きによって産生する短鎖脂肪酸が挙げられるが、短鎖脂肪酸以外の他のカルボン酸類も広く含まれる。一例として、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、イソ酪酸、n-吉草酸、イソ吉草酸、カプロン酸、ギ酸、コハク酸及び乳酸等が挙げられる。

10

【 0 0 3 8 】

本発明の検体保存液は、保存すべき検体を浸漬又は懸濁し、保存することにより使用される。これにより、30以下の室温環境下において、少なくとも2週間に亘り、代謝物質を安定的に保存することができる。使用する検体保存液の量は、容量比で、検体：検体保存液 = 1：3以上とすることが好ましく、検体：検体保存液 = 1：4以上とすることがより好ましく、検体：検体保存液 = 1：5以上とすることが特に好ましい。

【 0 0 3 9 】

さらに、本発明の検体保存液は、上述した胆汁酸等の代謝物質を安定的に保存するだけでなく、検体中に含まれる微生物の群集構造の変化も抑制することができる。そのため、リアルタイムPCR解析、次世代シーケンサーによるメタゲノム解析、T-RFLP解析やDGGE解析などの微生物群集構造解析および生物培養株のDNA塩基配列解析や菌株の識別を行うDNA多型性解析の手法であるRAPD解析、マイクロサテライト解析などのDNAを用いた様々な分子生物学的手法に利用することができる。このように、同じ検体保存液に保存された検体を用いて、代謝物質の分析と微生物群集構造の解析とを行うことができるため、検体の保存・輸送に手間がかからず簡便であると共に、同一検体についての分析及び解析を確実に行うことができるため、総合的かつ多面的な評価を行うことができる。

20

【 0 0 4 0 】

本発明の検体保存液を用いて検体を保存する際の保管温度としては、1～30の室温環境下であるところ、本発明の検体保存液は、10～30の温度範囲、15～30の温度範囲、20～30の温度範囲又は25～30の温度範囲においても、代謝物質及び微生物群集構造を安定的に保存することができる。

30

【 0 0 4 1 】

以下、図1～図3を参照し、上述した検体保存液と、検体を保存する保存容器とを備える分析用装置について以下詳述する。

【 0 0 4 2 】

まず、図1に示す第一の実施形態の分析用装置1について説明する。本実施形態に係る分析用装置1は、一端が開口した有底筒状の保存容器3、この保存容器3内に収容された本発明の検体保存液S、保存容器3の開口部を封止する蓋部材2及び検体を採取するために使用する検体採取部材4を有している。検体採取部材4は、その先端に検体を一定量すくって保持できるように形成されたスプーン状の採取部42と他端側に伸長する軸部41を有している。軸部41の先端側は蓋部材2の裏面に連結されており、蓋部材2を把持することにより、検体採取部材4を操作できるように形成されている。また、検体採取部材4の採取部42には、その底面を貫通する孔43が2つ設けられている。この採取部42に設けられた孔43は、保存容器3内において、検体保存液Sをこの孔43を介して採取部42に保持された検体Cに接触させ、採取部42の底面に検体保存液Sを流入させるために設けられている。これにより、採取部42に保持された検体Cが採取部42の底面から離れて検体保存液S中に移動し、検体Cが検体保存液S中で分散、懸濁されるため、検

40

50

体 C が本発明の検体保存液 S に確実に接触された状態で保存され得る。なお、本実施形態では、孔 4 3 は採取部 4 2 の底面に 2 つ設けられているが、その数は特に限定されず、また、孔 4 3 を設けない構成としてもよい。

【 0 0 4 3 】

検体保存液 S は、図 1 に示すように使用された状態において、検体採取部材 4 の採取部 4 2 が完全に浸る位置まで保存容器 3 内に收容されている。検体保存液 S の量は、容量比で、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 3 以上となるように保存容器 3 内に收容されていることが好ましく、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 4 以上であることがより好ましく、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 5 以上であることが特に好ましい。本実施形態においては、一例として、検体採取部材 4 の採取部 4 2 の容量が 1 mL であるところ、検体保存液 S は 5 mL 收容

10

【 0 0 4 4 】

図 1 に示す分析用装置 1 の使用方法は以下の通りである。まず、分析用装置 1 の蓋部材 2 を開けたのち、蓋部材 2 を把持して検体採取部材 4 を操作し、検体 C を採取部 4 2 に取る。この検体採取部材 4 を保存容器 3 の内部に入れ、検体 C が保持された採取部 4 2 を保存容器 3 内の検体保存液 S に浸漬させ、蓋部材 2 で保存容器 3 を封止する。これにより、検体 C が分析用装置 1 内にて検体保存液 S に浸漬、懸濁された状態で保管される。保管後は分析用装置 1 ごと、室温で保存及び輸送することが可能である。

【 0 0 4 5 】

次に、図 2、3 に示す第二の実施形態の分析用装置 1 0 について説明する。本実施形態に係る分析用装置 1 0 は、一端が開口した有底筒状の保存容器 3、保存容器 3 の開口部を封止する蓋部材 2 0、この蓋部材 2 0 内の收容空間内に收容された本発明の検体保存液 S、この蓋部材 2 0 内の收容空間を保存容器 3 と連通させて検体保存液 S を保存容器 3 へと移動させることのできる押圧部材 5 及び検体を採取するために使用する検体採取部材 4 を有している。検体採取部材 4 は、その先端に検体を一定量すくって保持できるように形成されたスプーン状の採取部 4 2 と他端側に伸長する軸部 4 1 を有している。軸部 4 1 の先端側は押圧部材 5 の内部に連結されており、押圧部材 5 の外周面を把持することにより、検体採取部材 4 を操作できるように形成されている。また、検体採取部材 4 の採取部 4 2 には、その底面を貫通する孔 4 3 が 2 つ設けられている。この孔 4 3 の機能及び作用については、上述した第一の実施形態と同様である。

20

30

【 0 0 4 6 】

さらに、図 2 に示すように、蓋部材 2 0 と保存容器 3 との間に組み込まれる押圧部材 5 には、蓋部材 2 0 と対向する側に押圧ピン 5 a が設けられている。他方、蓋部材 2 0 内の收容空間の底部には、押圧ピン 5 a に押圧されることにより破断可能に形成された薄肉部が備えられており（図示せず）、保存容器 3 を蓋部材 2 0 で封止すると、押圧部材 5 の押圧ピン 5 a が蓋部材 2 0 の底部を押圧してこの底部を破断し、收容空間内の検体保存液 S が破断した部分から漏出するように形成されている。蓋部材 2 0 内の收容空間内から漏出した検体保存液 S は、押圧部材 5 の隙間を介して保存容器 3 に流入する。このように、検体保存液 S が予め保存容器 3 内に收容されていない構成とすることによって、保存容器 3 から検体採取部材 4 を出し入れする際に誤って検体保存液 S をこぼしたり、失うおそれが無くなるため、採取した検体 C を所定量の検体保存液 S で確実に保存することが可能となる。また、検体保存液 S の量を一定とすることができるため、分析用装置 1 0 の重量を測定することにより、保存容器 3 内に保存された検体 C の重量を正確に算出することができ、分析対象である代謝物質の濃度をより正確に得ることができる。

40

【 0 0 4 7 】

検体保存液 S は、図 3 に示すように使用された状態において、検体採取部材 4 の採取部 4 2 が完全に浸る位置の量だけ、蓋部材 2 0 内の收容空間内に收容されている。検体保存液 S の量は、容量比で、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 3 以上となるように蓋部材 2 0 内に收容されていることが好ましく、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 4 以上であることがより好ましく、検体 C : 検体保存液 S = 1 : 5 以上であることが特に好ましい。本実施形態にお

50

いては、一例として、検体採取部材 4 の採取部 4 2 の容量が 1 m L であるところ、検体保存液 S は蓋部材 2 0 内に 5 m L 収容されている。

【 0 0 4 8 】

図 2 及び図 3 に示す分析用装置 1 0 の使用方法は以下の通りである。まず、分析用装置 1 0 の蓋部材 2 0 を開けたのち、押圧部材 5 の外周面を把持して検体採取部材 4 を操作し、検体 C を採取部 4 2 に取る。この検体採取部材 4 を保存容器 3 の内部に入れ（この時点では、検体保存液 S はまだ保存容器 3 内に入っていない）、保存容器 3 の開口部側に押圧部材 5 を嵌めこみする。さらに、押圧部材 5 を覆うように蓋部材 2 0 を被せ、保存容器 3 を蓋部材 2 0 で封止する。このとき、押圧部材 5 の押圧ピン 5 a が蓋部材 2 0 の底部を押圧するため、蓋部材 2 0 の底部が破断され、検体保存液 S が蓋部材 2 0 の底部から漏出し、押圧部材 5 を介して保存容器 3 に流入する。これにより、検体 C が保持された採取部 4 2 が保存容器 3 内で検体保存液 S に浸漬され、検体 C が分析用装置 1 0 内にて検体保存液 S に浸漬、懸濁された状態で保管される。保管後は分析用装置 1 0 ごと、室温で保存及び輸送することが可能である。

10

【 0 0 4 9 】

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例によってなんら限定されるものではない。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

[実施例 1]

1 . 糞便検体中に含まれるフェノール類の分析 (1)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて - 8 0 ℃ に冷凍保存したものをいい、3 名の被験者から得た糞便検体 A ~ C を使用した。解凍後の糞便検体を 1 g 取り、3 種類の検体保存液 5 m L にそれぞれ懸濁させ、3 0 ℃ の恒温槽にて 1 4 日間保管した。3 種類の検体保存液としては、0 . 5 重量% Tween 2 0 (モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン)、4 M グアニジンチオシアン酸塩、1 0 0 m M Tris - HCl、4 0 m M EDTA (pH 8 . 0) 及び水からなる「0 . 5 % Tween 2 0 , 4 M GTC 溶液」と、1 0 m M ピロリン酸ナトリウム、4 M グアニジンチオシアン酸塩、1 0 0 m M Tris - HCl、4 0 m M EDTA (pH 8 . 0) 及び水からなる「1 0 m M ピロリン酸 Na , 4 M GTC 溶液」と、4 M グアニジンチオシアン酸塩、1 0 0 m M Tris - HCl、4 0 m M EDTA (pH 8 . 0) 及び水からなる「4 M GTC 溶液」を用いた。3 0 ℃ での保管直前の検体懸濁液 (0 日) と保管後の検体懸濁液 (1 4 日) について、フェノール、p - クレゾール及び 4 - エチルフェノールの各濃度を次に示す方法にて測定した。遠沈管に検体懸濁液を一定量精秤し、内部標準物質 (4 - イソプロピルフェノール) 含有リン酸緩衝液を添加して混合した。これを 8 5 ℃ で 1 5 分間熱処理し、冷却後に溶媒抽出を行った。この粗抽出溶液を固相カートリッジで精製し、得られた抽出溶液を測定試料とした。この測定試料について、ガスクロマトグラフィー - 質量分析法 - 選択イオン検出法 (GC - MS - SIM) にて、フェノール、p - クレゾール及び 4 - エチルフェノールの各濃度を測定した。結果を以下表 1 及び図 4 に示す。なお、4 - エチルフェノールは糞便検体 B から検出されなかった。

20

30

40

【 0 0 5 1 】

50

【表 1】

	検体No.	フェノール (μg/g)		p-クレゾール (μg/g)		4-エチルフェノール (μg/g)	
		0日	14日	0日	14日	0日	14日
0.5% Tween20 4M GTC溶液	A	0.96	0.66	120.45	108.72	1.33	1.28
		100%	69%	100%	90%	100%	96%
	B	45.48	40.62	60.96	57.42	-	-
		100%	89%	100%	94%		
	C	4.98	3.86	130.22	112.04	1.54	1.45
		100%	78%	100%	86%	100%	94%
10mM ピロリン酸Na 4M GTC溶液	A	0.96	0.77	120.45	113.03	1.33	0.95
		100%	81%	100%	94%	100%	72%
	B	45.48	45.73	60.96	63.92	-	-
		100%	101%	100%	105%		
	C	4.98	4.12	130.22	113.23	1.54	1.57
		100%	69%	100%	90%	100%	96%
4M GTC溶液	A	0.96	0.56	120.45	88.02	1.33	0.94
		100%	58%	100%	73%	100%	70%
	B	45.48	37.41	60.96	50.32	-	-
		100%	82%	100%	83%		
	C	4.98	3.67	130.22	111.95	1.54	1.58
		100%	74%	100%	86%	100%	103%

10

20

【0052】

表1では、上欄に各測定対象物質の濃度を、下欄に保管前の濃度（0日の濃度）に対する割合（%）を示している。この結果によれば、4M GTC溶液に加えてピロリン酸Na又はTween20を配合させた検体保存液を用いることにより、30で14日間経過後でも、各糞便検体中のフェノール類化合物が安定的に維持されることが分かった。さらに、図4では横軸に保管前の各糞便検体のフェノールの濃度（0日の濃度）、縦軸に14日後の各糞便検体のフェノールの濃度をプロットし、各検体保存液の回帰直線を示している。このグラフによれば、4M GTC溶液に加えてピロリン酸Na又はTween20を配合させた検体保存液の方が回帰式の傾きが大きく（1に近く）なっており、30で14日間保管した後も各糞便検体中のフェノール類の濃度が大きく変化せず、フェノール類を定量できることがわかった。

30

【0053】

[実施例2]

2.糞便検体中に含まれるフェノール類の分析(2)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて-80にていったん冷凍保存したものを、-80で冷凍保存してから1週間以内の糞便検体について本試験を行った。糞便検体は6名の被験者から得たNo.1-1~No.1-6を使用した。解凍後の糞便検体を1g取り、100mMピロリン酸ナトリウム、4Mグアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl、40mM EDTA (pH 8.0)及び水からなる検体保存液5mLに懸濁させ、30の恒温槽にて保管した。30での保管直前(Day 0生便)、7日間保管後(Day 7)、14日間保管後(Day 14)、28日間保管後(Day 28)の検体懸濁液について、実施例1と同様の方法でフェノール、p-クレゾール及び4-エチルフェノールの各濃度を測定した。また、各糞便検体の残りを再度-80で冷凍し、そのまま-80で28日間保管した後に解凍して、上述の方法同様に検体保存液に懸濁させた。この検体懸濁液(Day 28冷凍便)について、フェノール、p-クレゾール及び4-エチルフェノールの各濃度を測定した。フェノールについての結果を表2及び図5に、p-クレゾールについての結果を表3及び図6に、4-エチルフェノールについての結果を表4及び図7に示す。なお、4-エチルフェノールは糞便検体No.1-

40

50

3、No. 1 - 5、6には検出されなかった。

【0054】

【表2】

フェノール (μg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.1-1	5.00	5.31	4.04	5.23	4.44
No.1-2	11.01	11.69	8.21	10.33	11.24
No.1-3	7.65	9.17	6.31	7.49	8.13
No.1-4	7.30	5.23	5.45	5.01	6.92
No.1-5	1.76	1.53	2.03	1.78	1.37
No.1-6	11.43	7.86	9.80	7.01	8.74

10

【0055】

【表3】

p-クレゾール (μg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.1-1	18.69	16.17	12.31	13.53	20.84
No.1-2	32.51	29.90	24.35	28.10	34.51
No.1-3	88.70	92.41	66.93	63.38	75.14
No.1-4	139.71	106.11	112.28	104.85	120.03
No.1-5	106.36	87.89	100.20	77.13	99.65
No.1-6	1.38	0.87	1.03	1.17	1.51

20

【0056】

【表4】

4-エチルフェノール (μg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.1-1	20.93	18.62	16.23	16.63	16.92
No.1-2	0.48	0.45	0.41	0.50	0.48
No.1-4	6.37	4.77	4.62	4.84	6.96

30

【0057】

表2～4では、測定時点における、各測定対象物質の濃度を示している。この結果に基づき、横軸に30℃での保管直前(Day0生便)の各糞便検体の各測定対象物質の濃度を、縦軸に各糞便検体の各測定時点における各測定対象物質の濃度をプロットし、回帰直線を求めたグラフを図5～7に示している。これらのグラフによれば、本発明の検体保存液(100mMピロリン酸ナトリウム+4M GTC溶液)を用いて30℃で保管したものは、糞便検体をそのまま-80℃で28日間保管したもの(Day28(冷凍便))と比べても、濃度に大きな変化は見られず、安定的に30℃で28日間も長期間、保管できることがわかった。具体的には、図5によれば、フェノールについては、30℃で7日間保管した場合(回帰式の傾き:0.84)、-80℃で28日間保管した場合(回帰式の傾き:0.90)と同様の分析値が示され、14日間又は28日間保管した場合には、分析値が若干小さくなる傾向にあるものの、回帰式の傾きが0.7程度までに留まることがわかった。また、図6によれば、p-クレゾールについては、30℃条件下で14日間に亘り(回帰式の傾き:0.80～0.85)、-80℃で28日間保管した場合(回帰式の傾き:0.85)と同様の分析値が示され、28日間保管した場合には、分析値が若干小さくなる傾向にあるものの、回帰式の傾きが0.7程度までに留まることがわかった。さらに、図7によれば、4-エチルフェノールについては、30℃条件下で28日間に亘り(回帰式の傾き:0.78～0.90)、-80℃で28日間保管した場合(回帰式

40

50

の傾き：0.78)と同様の分析値が得られることがわかった。

【0058】

[比較例1]

3. 糞便検体中に含まれるフェノール類の分析(3)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて-80℃に冷凍保存したものを、3名の被験者から得た糞便検体1~3を使用した。解凍後の糞便検体を1g取り、4種類の検体保存液5mLにそれぞれ懸濁させ、30℃の恒温槽にて7日間保管した。4種類の検体保存液としては、20mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「20mM ピロリン酸Na」と、50mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「50mM ピロリン酸Na」と、100mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「100mM ピロリン酸Na」と、4M グアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl、40mM EDTA (pH 8.0) 及び水からなる「4M GTC溶液」を用いた。30℃での保管直前の検体懸濁液(0日)と保管後の検体懸濁液(7日)について、フェノール、p-クレゾール及び4-エチルフェノールの各濃度を実施例1と同様の方法にて測定した。4-エチルフェノールは糞便検体1~3では検出されなかったため、フェノール及びp-クレゾールの測定結果を以下表5に示す。

【0059】

【表5】

	検体No.	フェノール (µg/g)		p-クレゾール (µg/g)	
		0日	7日	0日	7日
20mM ピロリン酸Na	1	0.85	6.30	38.67	467.87
		100%	741%	100%	1210%
	2	1.89	5.42	88.17	236.80
		100%	287%	100%	269%
	3	0.33	22.18	78.93	233.68
		100%	6686%	100%	296%
50mM ピロリン酸Na	1	0.84	13.39	37.83	480.31
		100%	1586%	100%	1270%
	2	1.98	6.20	90.93	334.43
		100%	314%	100%	368%
	3	0.42	71.55	66.83	296.47
		100%	16848%	100%	444%
100mM ピロリン酸Na	1	0.86	374.90	43.10	226.35
		100%	43609%	100%	525%
	2	2.10	7.93	97.50	344.91
		100%	377%	100%	354%
	3	0.41	75.71	66.28	270.30
		100%	18384%	100%	408%
4M GTC溶液	1	2.72	1.88	44.18	41.63
		100%	69%	100%	94%
	2	5.05	2.12	103.12	85.34
		100%	42%	100%	83%
	3	2.49	4.16	80.59	97.07
		100%	167%	100%	120%

【0060】

表5では、上欄に各測定対象物質の濃度を、下欄に保管前の濃度(0日の濃度)に対する割合(%)を示している。この結果によれば、ピロリン酸ナトリウム単独からなる検体保存液を用いた場合、各糞便検体中のフェノール類化合物は保管前と大きく濃度が変化し

てしまうことが分かった。配合したピロリン酸ナトリウムの濃度が高いほど、濃度変化の度合いが大きくなる傾向があることから、ピロリン酸ナトリウムは糞便検体中に含まれる微生物の生育を向上させてしまう可能性があることが推測された。しかしながら、実施例 1、2 において、ピロリン酸ナトリウムと、4 M グアニジンチオシアン酸塩、100 mM Tris-HCl 及び 40 mM EDTA (pH 8.0) からなる「4 M GTC 溶液」とを組み合わせるにより、30 条件下であってもフェノール類を安定的に保存できる検体保存液が得られることが示された。

【0061】

[実施例 3]

4. 糞便検体中に含まれる胆汁酸の分析 (1)

10

(実験方法)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて -80 に冷凍保存したものを用い、4 名の被験者から得た糞便検体 A ~ D を使用した。解凍後の糞便検体を 1 g 取り、3 種類の検体保存液 5 mL にそれぞれ懸濁させ、30 の恒温槽にて 14 日間保管した。3 種類の検体保存液としては、実施例 1 に記載されたものと同様のものを用いた。30 での保管直前の検体懸濁液 (0 日) と保管後の検体懸濁液 (14 日) について、柿山らによる分析方法 (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, Vol.55, pp.978-990) に基づき、コール酸、ケノデオキシコール酸及びウルソデオキシコール酸の各濃度の測定を行った。なお、試料の前処理方法は次のように改変した。一定量の検体懸濁液をビーズチューブに精秤し、9 倍量の酢酸ナトリウム緩衝液/エタノール混合溶液を加えて、検体懸濁液を破碎した。これを 85 で 30 分間熱処理し、冷却後に 18,400 × g で 10 分間遠心分離処理した。上清を回収して超純水で 4 倍希釈し、固相抽出カラム (Bond Elut C18 カートリッジ、アジレント・テクノロジー株式会社製品) に供し固相抽出を行った。得られた抽出液を乾固させた後、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たものに内部標準液を加えて測定試料溶液とした。この測定試料溶液について、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) にて、コール酸、ケノデオキシコール酸及びウルソデオキシコール酸の各濃度を測定した。結果を以下表 6 及び図 8、9 に示す。なお、ウルソデオキシコール酸は糞便検体 A 及び C からは検出されなかった。

20

30

【0062】

40

50

【表 6】

	検体No.	コール酸 (μmol/g)		ケノデオキシコール酸 (μmol/g)		ウルソデオキシコール酸 (μmol/g)	
		0日	14日	0日	14日	0日	14日
0.5% Tween20 4M GTC溶液	A	0.05	0.03	0.07	0.05	-	-
		100%	54%	100%	68%		
	B	5.03	4.37	2.90	2.54	0.93	0.79
		100%	87%	100%	88%	100%	85%
	C	0.06	0.03	0.08	0.05	-	-
		100%	53%	100%	65%		
	D	0.84	0.66	0.45	0.39	0.64	0.55
		100%	79%	100%	86%	100%	85%
10mM ピロリン酸Na 4M GTC溶液	A	0.05	0.03	0.07	0.05	-	-
		100%	52%	100%	67%		
	B	5.03	4.84	2.90	2.88	0.93	0.87
		100%	96%	100%	99%	100%	94%
	C	0.06	0.03	0.08	0.05	-	-
		100%	52%	100%	63%		
	D	0.84	0.73	0.45	0.43	0.64	0.57
		100%	87%	100%	94%	100%	89%
4M GTC溶液	A	0.05	0.03	0.07	0.05	-	-
		100%	51%	100%	68%		
	B	5.03	3.71	2.90	2.26	0.93	0.71
		100%	74%	100%	78%	100%	76%
	C	0.06	0.03	0.08	0.05	-	-
		100%	52%	100%	62%		
	D	0.84	0.61	0.45	0.36	0.64	0.51
		100%	73%	100%	80%	100%	79%

10

20

【0063】

表 6 では、上欄に各測定対象物質の濃度を、下欄に保管前の濃度（0日の濃度）に対する割合（%）を示している。この結果によれば、4 M GTC 溶液に加えてピロリン酸 Na 又は Tween 20 を配合させた検体保存液を用いることにより、30 で 14 日間経過後も、各糞便検体中のコール酸、ケノデオキシコール酸及びウルソデオキシコール酸といった、胆汁酸化合物が安定的に維持されることが分かった。さらに、図 8、9 では横軸に保管前の各糞便検体のコール酸又はケノデオキシコール酸の濃度（0日の濃度）、縦軸に 14 日後の各糞便検体のコール酸又はケノデオキシコール酸の濃度をプロットし、各検体保存液の回帰直線を示している。このグラフによれば、4 M GTC 溶液に加えてピロリン酸 Na 又は Tween 20 を配合させた検体保存液の方が回帰式の傾きが大きく（1 に近く）なっており、30 で 14 日間保管した後でも各糞便検体中の胆汁酸の濃度が大きく変化せず、胆汁酸を定量できることがわかった。

30

【0064】

[実施例 4]

5 . 糞便検体中に含まれる胆汁酸の分析（2）

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて - 80 にていったん冷凍保存したものをを用い、- 80 で冷凍保存してから 1 週間以内の糞便検体について本試験を行った。糞便検体は異なる 5 名の被験者から得た No . 2 - 1 ~ No . 2 - 5 を使用した。解凍後の糞便検体を 1 g 取り、100 mM ピロリン酸ナトリウム、4 M グアニジンチオシアン酸塩、100 mM Tris - HCl、40 mM EDTA (pH 8 . 0) 及び水からなる検体保存液 5 mL に懸濁させ、30 の恒温槽にて保管した。30 での保管直前（Day 0 生便）、7 日間保管後（Day 7）、14 日間保管後（Day 14）、28 日間保管後（Day 28）の検体懸濁液について、実施例 3 と同様の方法でコール酸、ケノデオキシ

40

50

コール酸及びウルソデオキシコール酸の各濃度を測定した。また、各糞便検体の残りを再度 - 80 で冷凍し、そのまま - 80 で 28 日間保管した後に解凍して、上述の方法同様に検体保存液に懸濁させた。この検体懸濁液 (Day 28 冷凍便) について、コール酸、ケノデオキシコール酸及びウルソデオキシコール酸の各濃度を測定した。コール酸についての結果を表 7 及び図 10 に、ケノデオキシコール酸についての結果を表 8 及び図 11 に、ウルソデオキシコール酸についての結果を表 9 及び図 12 に示す。なお、ウルソデオキシコール酸は糞便検体 No. 2 - 5 には検出されなかったため、異なる被験者から得た糞便検体 No. 2 - 6 について同様の試験を行った。

【 0 0 6 5 】

【表 7】

10

コール酸 (μmol/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.2-1	0.70	0.57	0.64	0.59	0.64
No.2-2	2.07	2.06	2.04	1.71	2.01
No.2-3	1.90	1.89	1.79	1.62	1.74
No.2-4	0.51	0.41	0.38	0.42	0.46
No.2-5	0.11	0.10	0.10	0.15	0.10

【 0 0 6 6 】

20

【表 8】

ケノデオキシコール酸 (μmol/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.2-1	0.53	0.45	0.52	0.42	0.55
No.2-2	0.88	0.67	0.76	0.56	0.81
No.2-3	0.92	0.70	0.71	0.58	0.70
No.2-4	0.41	0.38	0.41	0.32	0.38
No.2-5	0.11	0.15	0.16	0.14	0.10

30

【 0 0 6 7 】

【表 9】

ウルソデオキシコール酸 (μmol/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.2-1	0.18	0.15	0.16	0.19	0.14
No.2-2	1.18	1.05	1.07	0.82	1.07
No.2-3	0.28	0.26	0.25	0.25	0.23
No.2-4	0.32	0.32	0.31	0.28	0.29
No.2-6	0.19	0.19	0.16	0.19	0.17

40

【 0 0 6 8 】

表 7 ~ 9 では、測定時点における、各測定対象物質の濃度を示している。この結果に基づき、横軸に 30 での保管直前 (Day 0 生便) の各糞便検体の各測定対象物質の濃度を、縦軸に各糞便検体の各測定時点における各測定対象物質の濃度をプロットし、回帰直線を求めたグラフを図 10 ~ 12 に示している。これらのグラフによれば、本発明の検体保存液 (100 mM ピロリン酸ナトリウム + 4 M GTC 溶液) を用いて 30 で保管したものは、糞便検体をそのまま - 80 で 28 日間保管したもの (Day 28 (冷凍便)) と比べても、濃度に大きな変化は見られず、安定的に 30 で 28 日間も長期間、保管できることがわかった。具体的には、図 10 によれば、コール酸については、30 で

50

14日間保管した場合（回帰式の傾き：0.99）、-80 で28日間保管した場合（回帰式の傾き：0.96）と同様の分析値が示され、30 で28日間保管した場合においても回帰式の傾きが0.82までに留まることがわかった。また、図11によれば、ケノデオキシコール酸は30 条件下で14日間に亘り（回帰式の傾き：0.67~0.71）、-80 で28日間保管した場合（回帰式の傾き：0.8）と同様の分析値が得られることがわかった。さらに、図12によれば、ウルソデオキシコール酸については、30 条件下で14日間に亘り（回帰式の傾き：0.88~0.91）、-80 で28日間保管した場合（回帰式の傾き：0.93）と同様の分析値が得られることがわかった。

【0069】

[実施例5]

6.糞便検体中に含まれる有機酸の分析(1)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて-80 に冷凍保存したものをを用い、3名の被験者から得た糞便検体A~Cを使用した。解凍後の糞便検体を1g取り、3種類の検体保存液5mLにそれぞれ懸濁させ、30 の恒温槽にて14日間保管した。3種類の検体保存液としては、実施例1に記載されたものと同様のものをを用いた。30 での保管直前の検体懸濁液(0日)と保管後の検体懸濁液(14日)について、酢酸、プロピオン酸及びn-酪酸の各濃度を次に示す方法にて測定した。一定量の検体懸濁液をビーズチューブに精秤し、抽出溶液を加えて混合した。これを85 で15分間熱処理し、冷却後にビーズにより検体懸濁液を破碎し、18,400 x gで10分間遠心分離処理した。上清を回収して孔径0.20 μmのメンブレンフィルターで濾過し、測定試料溶液とした。この測定試料溶液について、高速液体クロマトグラフ装置(株式会社島津製作所製品、有機酸分析システム)にて、酢酸、プロピオン酸及びn-酪酸の各濃度を測定した。

【0070】

【表10】

	検体No.	酢酸(mg/g)		プロピオン酸 (mg/g)		n-酪酸(mg/g)	
		0日	14日	0日	14日	0日	14日
0.5% Tween20 4M GTC溶液	A	1.00	1.08	0.52	0.50	0.34	0.33
		100%	108%	100%	96%	100%	98%
	B	4.80	4.71	2.02	1.98	1.06	1.05
		100%	98%	100%	98%	100%	99%
	C	1.37	1.29	0.99	0.90	1.81	1.64
		100%	94%	100%	91%	100%	91%
10mM ピロリン酸Na 4M GTC溶液	A	1.00	1.14	0.52	0.47	0.34	0.31
		100%	114%	100%	91%	100%	91%
	B	4.80	5.06	2.02	2.10	1.06	1.10
		100%	106%	100%	104%	100%	104%
	C	1.37	1.34	0.99	0.93	1.81	1.69
		100%	98%	100%	94%	100%	94%
4M GTC溶液	A	1.00	1.19	0.52	0.53	0.34	0.36
		100%	119%	100%	103%	100%	108%
	B	4.80	5.20	2.02	2.16	1.06	1.12
		100%	108%	100%	107%	100%	105%
	C	1.37	1.27	0.99	0.89	1.81	1.62
		100%	93%	100%	91%	100%	90%

【0071】

表10では、上欄に各測定対象物質の濃度を、下欄に保管前の濃度(0日の濃度)に対する割合(%)を示している。この結果によれば、4M GTC溶液に加えてピロリン酸Na又はTween20を配合させた検体保存液を用いることにより、30 で14日間経過後でも、各糞便検体中の有機酸類化合物が安定的に維持されることが分かった。

【0072】

10

20

30

40

50

[実施例 6]

7. 糞便検体中に含まれる有機酸の分析 (2)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて -80°C にていったん冷凍保存したものを
 用い、 -80°C で冷凍保存してから1週間以内の糞便検体について本試験を行った。糞
 便検体は14名の被験者から得たNo. 3-1~No. 3-14を使用した。解凍後の糞
 便検体を1g取り、100mM ピロリン酸ナトリウム、4M グアニジンチオシアン酸塩
 、100mM Tris-HCl、40mM EDTA (pH 8.0) 及び水からなる検体
 保存液5mLに懸濁させ、 30°C の恒温槽にて保管した。 30°C での保管直前 (Day 0
 生便)、7日間保管後 (Day 7)、14日間保管後 (Day 14)、28日間保管後 (Day 28)
 の検体懸濁液について、実施例5と同様の方法でHPLCを用いて酢酸、プロ
 ピオン酸、n-酪酸、n-吉草酸及びiso-吉草酸の各濃度を測定した。また、各糞
 便検体の残りを再度 -80°C で冷凍し、そのまま -80°C で28日間保管した後に解凍し
 て、上述の方法同様に検体保存液に懸濁させた。この検体懸濁液 (Day 28 冷凍便)
 について、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、n-吉草酸及びiso-吉草酸の各濃度を測定
 した。酢酸についての結果を表11及び図13に、プロピオン酸についての結果を表12
 及び図14に、n-酪酸についての結果を表13及び図15に、n-吉草酸についての結
 果を表14及び図16に、iso-吉草酸についての結果を表15及び図17に示す。な
 お、n-酪酸及びn-吉草酸は糞便検体No. 3-10~14には検出されず、iso-
 吉草酸は、糞便検体No. 3-3、11、13、14には検出されなかった。

【 0 0 7 3 】

【 表 1 1 】

酢酸 (mg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.3-1	2.14	2.41	2.60	2.57	2.16
No.3-2	3.03	3.01	3.09	3.10	2.96
No.3-3	4.78	4.63	4.69	4.78	5.12
No.3-4	3.69	3.68	3.82	3.83	3.76
No.3-5	2.90	3.06	3.23	3.25	3.30
No.3-6	2.51	2.57	2.67	2.95	2.62
No.3-7	3.71	3.43	3.45	3.56	3.76
No.3-8	3.73	3.67	3.94	3.91	3.83
No.3-9	3.04	2.97	3.12	3.27	2.97
No.3-10	2.54	2.66	2.65	2.79	2.74
No.3-11	2.05	2.04	2.32	2.44	1.78
No.3-12	1.18	1.29	1.46	1.79	1.40
No.3-13	3.24	3.25	3.41	3.47	3.18
No.3-14	5.12	5.13	5.57	5.55	5.22

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

プロピオン酸 (mg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.3-1	1.12	1.14	1.20	1.12	1.13
No.3-2	2.18	2.10	2.12	2.09	2.11
No.3-3	1.34	1.27	1.27	1.32	1.34
No.3-4	1.83	1.77	1.80	1.75	1.83
No.3-5	1.25	1.31	1.32	1.31	1.33
No.3-6	1.70	1.65	1.66	1.77	1.74
No.3-7	1.19	1.12	1.14	1.15	1.13
No.3-8	1.14	1.09	1.19	1.16	1.14
No.3-9	1.83	1.70	1.71	1.74	1.77
No.3-10	1.06	1.06	0.95	0.99	1.03
No.3-11	1.33	1.10	1.15	1.10	1.10
No.3-12	0.80	0.79	0.87	0.79	0.78
No.3-13	1.25	1.21	1.26	1.27	1.20
No.3-14	1.42	1.39	1.50	1.49	1.45

10

【 0 0 7 5】

20

【表 1 3】

n-酪酸 (mg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.3-1	1.11	1.12	1.18	1.07	1.07
No.3-2	1.12	1.06	1.07	1.03	1.05
No.3-3	2.00	1.94	1.93	1.93	2.02
No.3-4	1.35	1.29	1.29	1.22	1.33
No.3-5	1.50	1.58	1.59	1.54	1.61
No.3-6	0.85	0.81	0.82	0.80	0.83
No.3-7	1.26	1.19	1.16	1.16	1.18
No.3-8	1.32	1.23	1.36	1.30	1.30
No.3-9	0.76	0.70	0.69	0.63	0.75

30

【 0 0 7 6】

【表 1 4】

n-吉草酸 (mg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.3-1	0.24	0.23	0.24	0.20	0.23
No.3-2	0.15	0.14	0.15	0.11	0.15
No.3-3	0.16	0.16	0.14	0.15	0.16
No.3-4	0.34	0.32	0.33	0.27	0.33
No.3-5	0.22	0.21	0.23	0.19	0.22
No.3-6	0.20	0.17	0.16	0.18	0.19
No.3-7	0.32	0.30	0.29	0.29	0.28
No.3-8	0.13	0.13	0.13	0.13	0.14
No.3-9	0.23	0.22	0.20	0.20	0.22

40

【 0 0 7 7】

50

【表 1 5】

iso-吉草酸 (mg/g)	Day0(生便)	Day7	Day14	Day28	Day28(冷凍便)
No.3-1	0.41	0.42	0.47	0.39	0.41
No.3-2	0.14	0.14	0.12	0.12	0.13
No.3-4	0.14	0.13	0.14	0.13	0.15
No.3-5	0.30	0.29	0.32	0.25	0.31
No.3-6	0.23	0.22	0.24	0.20	0.21
No.3-7	0.19	0.18	0.17	0.16	0.17
No.3-8	0.12	0.12	0.13	0.13	0.14
No.3-9	0.24	0.22	0.19	0.21	0.21
No.3-10	0.43	0.42	0.36	0.36	0.41
No.3-12	0.28	0.26	0.26	0.23	0.26

10

【0078】

表 1 1 ~ 1 5 では、測定時点における、各測定対象物質の濃度を示している。この結果に基づき、横軸に 3 0 での保管直前 (D a y 0 生便) の各糞便検体の各測定対象物質の濃度を、縦軸に各糞便検体の各測定時点における各測定対象物質の濃度をプロットし、回帰直線を求めたグラフを図 1 3 ~ 1 7 に示している。これらのグラフによれば、本発明の検体保存液 (1 0 0 m M ピロリン酸ナトリウム + 4 M G T C 溶液) を用いて 3 0 で保管したものは、糞便検体をそのまま - 8 0 で 2 8 日間保管したもの (D a y 2 8 (冷凍便)) と比べても、濃度に大きな変化は見られず、安定的に 3 0 で 2 8 日間もの長期間、保管できることがわかった。具体的には、図 1 3 によれば、酢酸については、3 0 条件下で 2 8 日間に亘り (回帰式の傾き : 0 . 8 9 ~ 0 . 9 5) 、 - 8 0 で 2 8 日間保管した場合 (回帰式の傾き : 1 . 0) と同様の分析値が得られることがわかった。また、図 1 4 によれば、プロピオン酸についても、3 0 条件下で 2 8 日間に亘り (回帰式の傾き : 0 . 9 2 ~ 0 . 9 5) 、 - 8 0 で 2 8 日間保管した場合 (回帰式の傾き : 0 . 9 9) と同様の分析値が得られることがわかった。同様に、図 1 5 によれば、n-酪酸についても、3 0 条件下で 2 8 日間に亘り (回帰式の傾き : 1 . 0 0 ~ 1 . 0 4) 、 - 8 0 で 2 8 日間保管した場合 (回帰式の傾き : 1 . 0 6) と同様の分析値が得られることがわかった。また、図 1 6 によれば、n-吉草酸については、3 0 条件下で 2 8 日間に亘り (回帰式の傾き : 0 . 8 1 ~ 0 . 9 5) 、 - 8 0 で 2 8 日間保管した場合 (回帰式の傾き : 0 . 8 5) と同様の分析値が得られることがわかった。さらに、図 1 7 によれば、i s o - 吉草酸については、3 0 条件下で 1 4 日間に亘り (回帰式の傾き : 0 . 8 6 ~ 1 . 0 2) 、 - 8 0 で 2 8 日間保管した場合 (回帰式の傾き : 0 . 9 8) と同様の分析値が得られることがわかった。

20

30

【0079】

[比較例 2]

8 . 糞便検体中に含まれる有機酸の分析 (3)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて - 8 0 に冷凍保存したものを、3 名の被験者から得た糞便検体 1 ~ 3 を使用した。解凍後の糞便検体を 1 g 取り、4 種類の検体保存液 5 m L にそれぞれ懸濁させ、3 0 の恒温槽にて 7 日間保管した。4 種類の検体保存液としては、2 0 m M のピロリン酸ナトリウムと水からなる「 2 0 m M ピロリン酸 N a 」と、5 0 m M のピロリン酸ナトリウムと水からなる「 5 0 m M ピロリン酸 N a 」と、1 0 0 m M のピロリン酸ナトリウムと水からなる「 1 0 0 m M ピロリン酸 N a 」と、4 M グアニジンチオシアン酸塩、1 0 0 m M T r i s - H C l 、4 0 m M E D T A (p H 8 . 0) 及び水からなる「 4 M G T C 溶液」を用いた。3 0 での保管直前の検体懸濁液 (0 日) と保管後の検体懸濁液 (7 日) について、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸及び i s o - 吉草酸の各濃度を実施例 5 と同様の方法にて測定した。結果を以下表 1 6 に示す。

40

50

【 0 0 8 0 】

【 表 1 6 】

	検体 No.	酢酸(mg/g)		プロピオン酸(mg/g)		n-酪酸(mg/g)		iso-吉草酸(mg/g)	
		0日	7日	0日	7日	0日	7日	0日	7日
20mM ピロリン酸Na	1	4.06	16.92	1.89	4.70	1.36	12.03	0.16	1.76
		100%	417%	100%	249%	100%	882%	100%	1093%
	2	3.86	15.90	1.36	8.47	1.66	5.58	0.33	2.30
		100%	412%	100%	621%	100%	336%	100%	697%
	3	1.47	10.39	0.77	3.78	0.35	2.81	0.26	0.78
		100%	707%	100%	493%	100%	806%	100%	295%
50mM ピロリン酸Na	1	4.10	19.42	1.91	5.29	1.38	12.97	0.17	2.43
		100%	474%	100%	277%	100%	941%	100%	1425%
	2	3.30	20.49	1.23	11.06	1.48	6.79	0.27	2.80
		100%	622%	100%	897%	100%	460%	100%	1032%
	3	1.46	12.00	0.77	3.87	0.33	2.90	0.28	2.73
		100%	820%	100%	506%	100%	869%	100%	987%
100mM ピロリン酸Na	1	3.90	21.05	1.86	3.98	1.32	10.51	0.17	2.82
		100%	540%	100%	214%	100%	797%	100%	1676%
	2	3.47	20.26	1.35	10.14	1.59	5.72	0.30	3.06
		100%	584%	100%	751%	100%	360%	100%	1006%
	3	1.53	10.68	0.74	3.34	0.32	3.14	0.28	0.58
		100%	698%	100%	453%	100%	989%	100%	208%
4M GTC溶液	1	4.06	3.49	1.97	1.37	1.40	1.69	0.13	0.33
		100%	86%	100%	70%	100%	121%	100%	246%
	2	3.21	3.92	1.26	1.90	1.56	1.35	0.26	0.14
		100%	122%	100%	151%	100%	87%	100%	54%
	3	1.36	1.52	0.73	0.77	0.32	0.33	0.22	0.24
		100%	112%	100%	107%	100%	103%	100%	111%

10

20

【 0 0 8 1 】

表 1 6 では、上欄に各測定対象物質の濃度を、下欄に保管前の濃度（0日の濃度）に対する割合（%）を示している。この結果によれば、ピロリン酸ナトリウム単独からなる検体保存液を用いた場合には、各糞便検体中の有機酸類は保管前と大きく濃度が変化してしまうことが分かった。しかしながら、実施例 5、6 において、ピロリン酸ナトリウムと、

30

【 0 0 8 2 】

[実施例 7]

9 . 糞便検体中に含まれる微生物数の解析（1）

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて - 8 0 にていったん冷凍保存したものを、 - 8 0 で冷凍保存してから 1 週間以内の糞便検体について本試験を行った。糞便検体は 1 9 名の異なる被験者から得た 1 9 検体を用いた。解凍後の糞便検体を 1 g 取り、1 0 0 m M ピロリン酸ナトリウム、4 M グアニジンチオシアン酸塩、1 0 0 m M T r i s - H C l、4 0 m M E D T A (p H 8 . 0) 及び水からなる検体保存液 5 m L に懸濁させ、3 0 の恒温槽にて保管した。3 0 での保管直前（Day 0 生便）、1 4 日間保管後（Day 1 4）、2 8 日間保管後（Day 2 8）の検体懸濁液からそれぞれ D N A を抽出した。抽出された D N A についてリアルタイム P C R を行い、試料 1 g 中に含まれる全真正細菌の標的遺伝子（1 6 S r R N A）のコピー数を求めた。リアルタイム P C R に用いた全真正細菌コピー数定量用のプライマーセットの配列は「3 4 1 F : 5 ' - C C T A C G G G A G G C A G C A G - 3 '」、 「5 3 4 R : 5 ' - A T T A C C G C G G C T G C T G G - 3 '」とした。リアルタイム P C R はリアルタイム P C R 装置（Rotor-Gen e Q、株式会社キアゲン製品）とリアルタイム P C R 用試薬（TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)、タカラバイオ株式会社製品）を用いて行った。結果を図 1 8 に示

40

50

す。

【0083】

図18では、縦軸に試料1gあたりの全真正細菌コピー数(10ⁿ)を示している。これらのグラフによれば、本発明の検体保存液(100mMピロリン酸ナトリウム+4M GTC溶液)を用いて30℃で保管したものは、保管前の糞便検体(Day 0(生便))と比べ、そのコピー数に大きな変化は見られず、安定的に30℃で28日間も長期間、保管できることがわかった。なお、各糞便検体の残りを再度-80℃で凍結し、そのまま-80℃で28日間保管した後に解凍して、上述の方法同様に検体保存液に懸濁させて得たサンプル(Day 28(凍便))については、若干のコピー数の減少がみられた。

【0084】

[比較例3]

10.糞便検体中に含まれる微生物数の解析(2)

糞便検体は、採取後直ちに超低温フリーザにて-80℃に凍結保存したものを、5名の被験者から得た糞便検体を使用した。解凍後の糞便検体を1g取り、4種類の検体保存液5mLにそれぞれ懸濁させ、30℃の恒温槽にて7日間保管した。4種類の検体保存液としては、20mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「20mMピロリン酸Na」と、50mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「50mMピロリン酸Na」と、100mMのピロリン酸ナトリウムと水からなる「100mMピロリン酸Na」と、4Mグアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl、40mM EDTA(pH 8.0)及び水からなる「4M GTC溶液」を用いた。30℃での保管直前の検体懸濁液(0日)と保管を行った検体懸濁液(保管3日目及び保管7日目)について、それぞれDNAを抽出した。抽出されたDNAについてリアルタイムPCRを行い、試料1g中に含まれる全真正細菌の標的遺伝子(16S rRNA)のコピー数を実施例7と同様の方法にて測定した。得られた定量結果について、30℃での保管直前の検体懸濁液(0日)を基準(数値1.0)とし、各保管経過日の変化割合を求めた。結果を図19に示す。

【0085】

図19では、縦軸に検体懸濁液(保管0日)から求められた標的遺伝子のコピー数を基準(基準値1)としたときの比率を示している。この結果によれば、ピロリン酸ナトリウム単独からなる検体保存液を用いた場合には、標的遺伝子のコピー数が保管前と大きく増減してしまうことが分かった。配合したピロリン酸ナトリウムの濃度が高いほど、比率の変化の度合いが大きくなる傾向があることから、ピロリン酸ナトリウムは糞便検体中に含まれる微生物の生育や作用を亢進させてしまう可能性があることが推測された。しかしながら、実施例7において、ピロリン酸ナトリウムと、4Mグアニジンチオシアン酸塩、100mM Tris-HCl及び40mM EDTA(pH 8.0)からなる「4M GTC溶液」とを組み合わせることにより、30℃条件下であっても微生物のDNAを安定的に保存できる検体保存液が得られることが示された。

【0086】

本発明は、上記の実施形態又は実施例に限定されるものでなく、特許請求の範囲に記載された発明の要旨を逸脱しない範囲内の種々、設計変更した形態も技術的範囲に含むものである。

【符号の説明】

【0087】

- 1、10 分析用装置
- 2、20 蓋部材
- 3 保存容器
- 4 検体採取部材
- 41 軸部
- 42 採取部
- 43 孔
- 5 押圧部材

10

20

30

40

50

- 5 a 押圧ピン
- S 検体保存液
- C 検体

【配列表フリーテキスト】

【0088】

配列番号1：16S rRNA 遺伝子領域のPCR増幅のためのフォワードプライマー

配列番号2：16S rRNA 遺伝子領域のPCR増幅のためのリバースプライマー

10

20

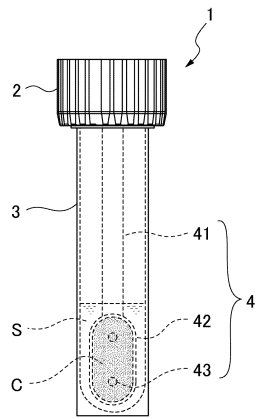
30

40

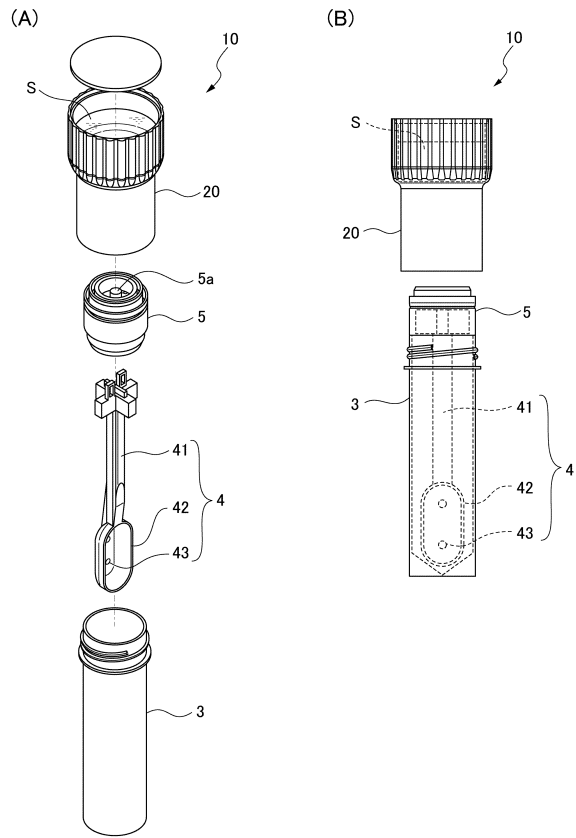
50

【図面】

【図 1】



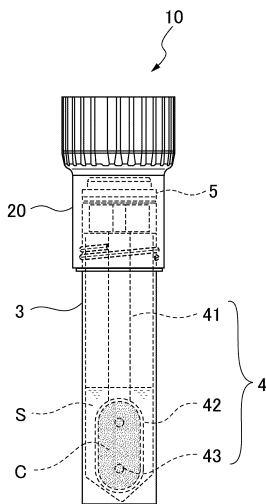
【図 2】



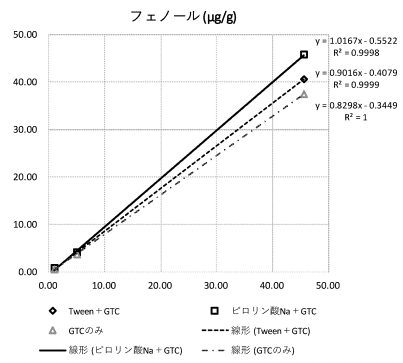
10

20

【図 3】



【図 4】

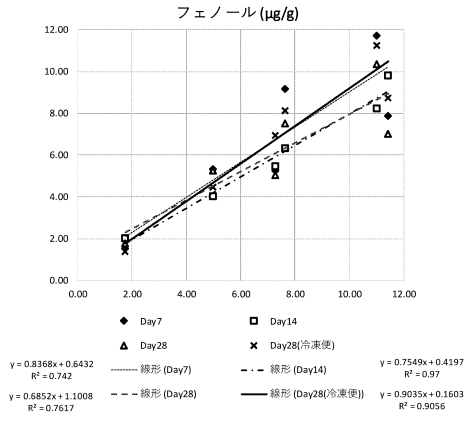


30

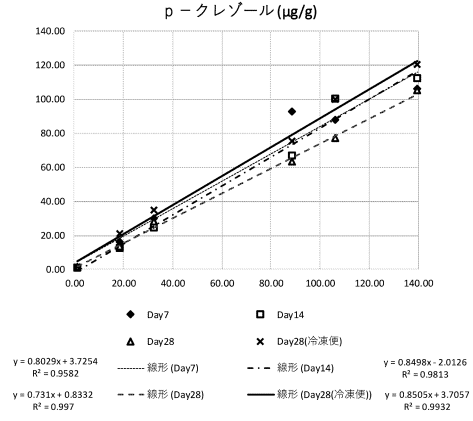
40

50

【 図 5 】

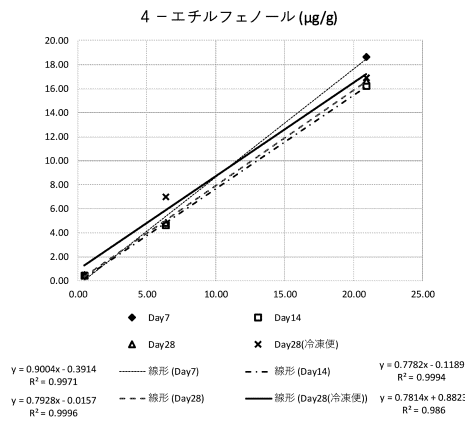


【 図 6 】

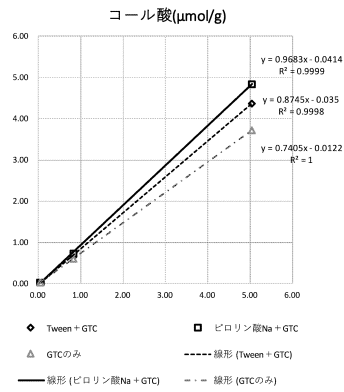


10

【 図 7 】

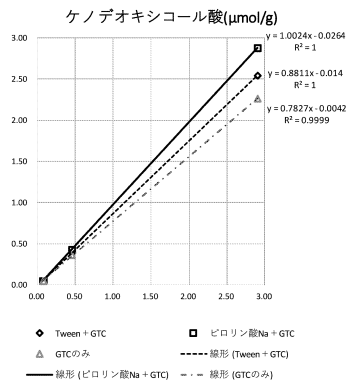


【 図 8 】

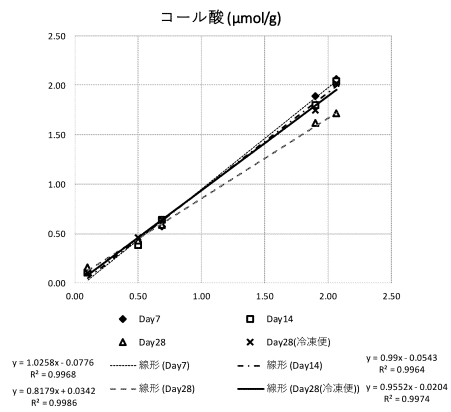


20

【 図 9 】



【 図 10 】

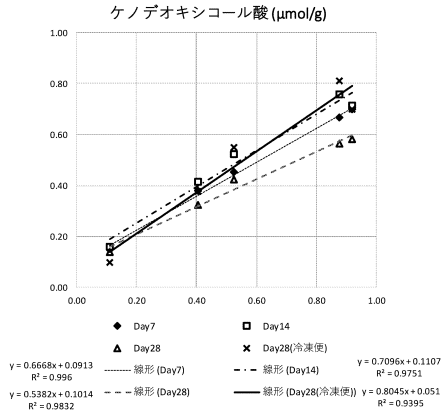


30

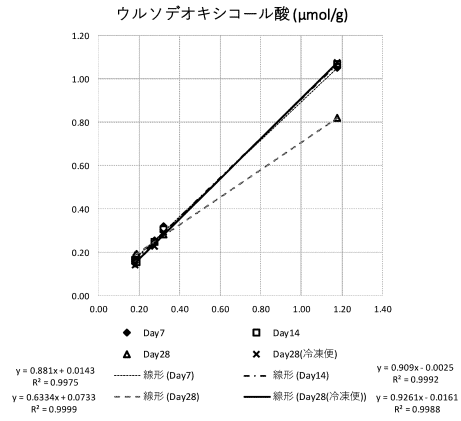
40

50

【図 1 1】

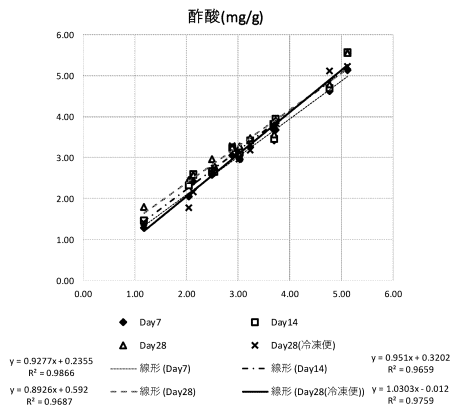


【図 1 2】

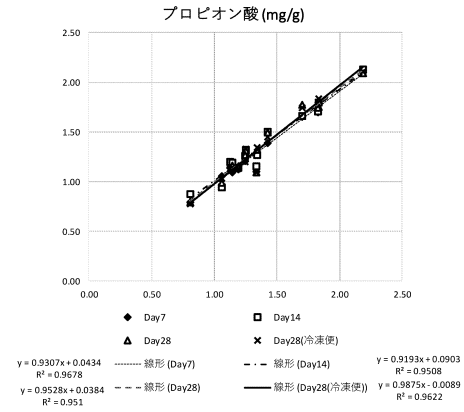


10

【図 1 3】

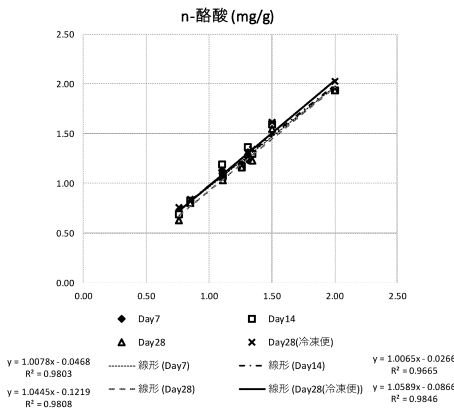


【図 1 4】

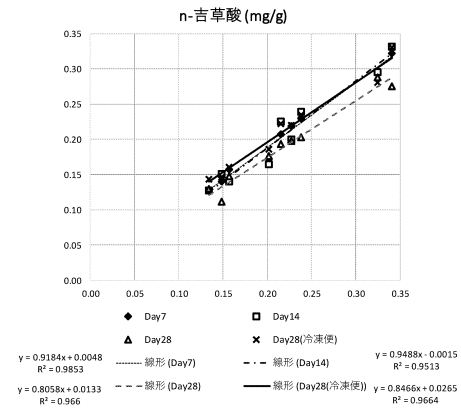


20

【図 1 5】



【図 1 6】

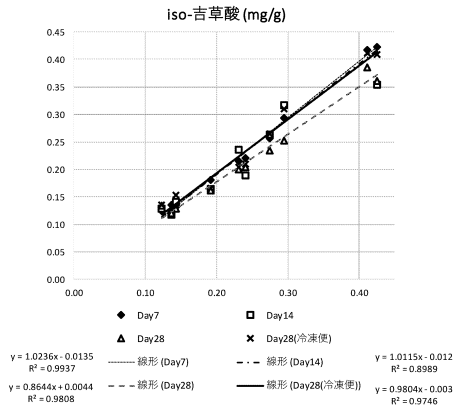


30

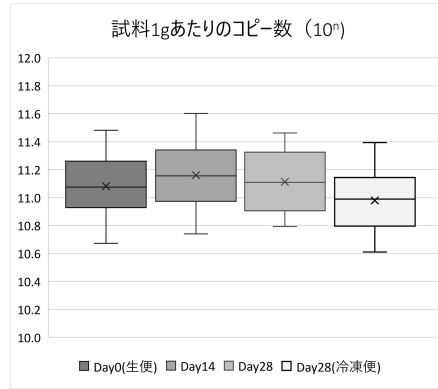
40

50

【 図 1 7 】

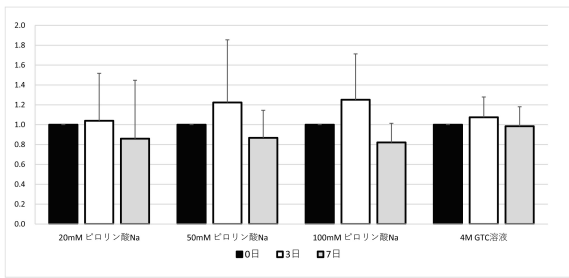


【 図 1 8 】



10

【 図 1 9 】



20

【 配列表 】

0007125579000001.app

30

40

50

フロントページの続き

- (51)国際特許分類
- F I
C 1 2 N 15/09 Z
- (56)参考文献
- 特開平 0 6 - 1 8 0 3 1 9 (J P , A)
特開 2 0 1 6 - 1 3 6 9 1 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 8 / 1 3 8 9 1 3 (W O , A 1)
中国特許出願公開第 1 0 8 8 9 3 5 2 3 (C N , A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
- G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8