

線虫及び質量分析計を用いた癌の匂い物質の解明と早期診断法の開発

Investigation of Scent Substances and Development of Early Diagnosis for Carcinoma Using Caenorhabditis Elegans Scent Detection and Mass Spectrograph

平林 健一^{1,3)}、関根 嘉香^{2,3)}

1) 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学、2) 東海大学理学部化学科、3) 東海大学先進生命科学研究所

Kenichi Hirabayashi^{1,3)} and Yoshika Sekine^{2,3)}

1) Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University; 2) Department of Chemistry, School of Science, Tokai University;

3) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

癌の早期発見は患者の生命予後を延ばす上で重要であるが、膵癌などの難治癌では早期診断が困難なために進行癌で発見され、治療に難渋する場合がある。本研究では、尿検体を用いて線虫 *Caenorhabditis elegans* の嗅覚 による癌に対する走性行動または質量分析器により尿および皮膚ガス中の匂い物質を解明することで癌早期発見が可能であるかを検討する。患者にとって侵襲のない尿検体または皮膚ガス検体を用いて、癌の匂い物質が解明できれば、健診などで応用が可能である。

[Abstract]

Early diagnosis for carcinoma is important for extension of prognosis, but in the incurable carcinoma cases, for example pancreatic cancer, almost of them are discovered in advanced stage because of difficulty of early diagnosis. We examine the possibility of early diagnosis for carcinoma by investigation of scent substances using *Caenorhabditis Elegans* and mass spectrograph for urine and skin gas. If possible, scent substances can be used for early diagnosis in healthy examination.

[Key Words]

scent substance, carcinoma, *Caenorhabditis Elegans*, mass spectrograph, early diagnosis

1. はじめに

胆膵癌の早期発見は困難であり、進行癌で発見される場合がほとんどであり、難治癌の代表である。また口腔癌・消化管癌（食道癌、胃癌、大腸癌）の診断に関しても、より非侵襲的で簡便な検査による早期診断が望まれている。

線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、体長 1 mm 余りの非寄生性の生物であり、嗅覚受容体を約 1200 種（犬と同等）有する。近年、線虫が癌患者の尿に集まることが報告され¹⁾、新たな癌の早期診断法として期待されている。そこで本研究では、線虫の嗅覚による癌に対する走性行動または質量分析器を用いることで、胆膵癌・口腔癌・消化管癌の早期発見が可能であるかを検討する。患者にとって侵襲のない尿検体を用いて、*C. elegans* の胆膵癌・口腔癌・消化管癌診断能を測定するとともに胆膵癌・口腔癌・消化管癌特有の匂い物質を解明することは臨床的に意義深い。

今回は、前年度に実施した質量分析器を用いた測定条件の検討結果に基づき、東海大学医学部付属病院で癌患者の尿・皮膚ガス検体の採取を開始し、いくつかの検体についてガスクロマトグラフー質量分析計（GC-MS）による測定結果が得られたので報告する。

2. 実験の概要

本研究では、東海大学医学部付属病院において尿・皮膚ガス検体を捕集し、東海大学湘南校舎において匂い物質の化学分析を行う。サンプルの施設間の移動を伴うため、匂い物質の捕集法には、迅速性、簡便性、安定性が求められる。そこで匂い物質の捕集法を次のように定めた。

尿検体：尿中匂い物質の捕集方法として、固相添加捕集法を用いた。親水性捕集材（ジーエルサイエンス社製 MonoTrap®シリカモノリス、本研究用に特注）を尿検体に浸して引き上げ（Dipping 法）、バイアル瓶

に移して密封し、クール便で試料を授受した。捕集後、原則3日以内にGC-MSにて分析を行った。

皮膚ガス検体：皮膚ガスの捕集にはパッシブ・フラックス・サンプラー法²⁾を用いた。パッシブ・フラックス・サンプラーは分子拡散の原理を利用してガスを捕集する小形デバイスであり、容器状の本体部、捕集材および止め具で構成されている。図2に本研究で用いた揮発性有機化合物 (VOCs) 用パッシブ・フラックス・サンプラー (ジーエルサイエンス社製, MonoTrap SG DCC18) を示す。本体部はスクリュ瓶のキャップを使用しており、捕集時にスクリュ瓶を開栓し、本体部の開口部側を皮膚表面にのせて固定する。固定にはサージカルテープ (日東電工社製優肌絆®アルファ) が好適に用いられる。この時生じるヘッドスペース内をVOCsが分子拡散して捕集材に捕捉される。

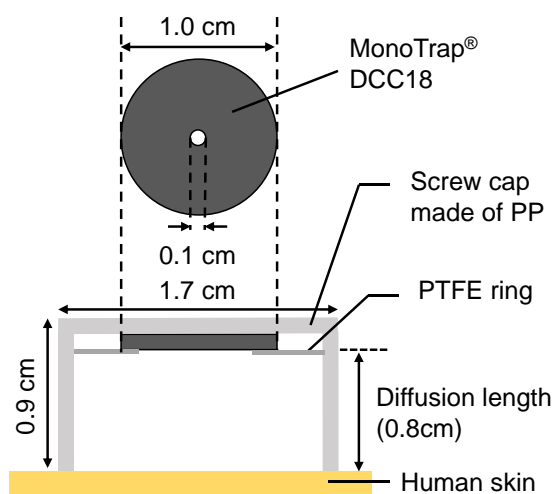


図1 皮膚ガス測定用パッシブ・フラックス・サンプラーの構造図 (ジーエルサイエンス社製, MonoTrap SG DCC18)

尿および皮膚ガス検体中の匂い物質は、加熱脱離後、ガスクロマトグラフ-質量分析装置 (GC 装置; アジレント・テクノロジー社製 6890N, MS 装置; 日本電子社製 Q1000GCMkII) により分析した (図2)。

3. 結果の概要

1) 尿検体の測定

大腸癌、胃癌、膵臓癌患者の尿検体の分析結果の1例を示す。横軸はNISTライブラリー検索によって推定された物質名、縦軸はピーク強度である。尿検体に関しては、過去の分析例が少ないため、物質名はあく

までマスフラグメンテーションパターンをもとにして推定したものであり、確定したものではない。また3検体間のパターン比較を容易にするため、匂い物質は

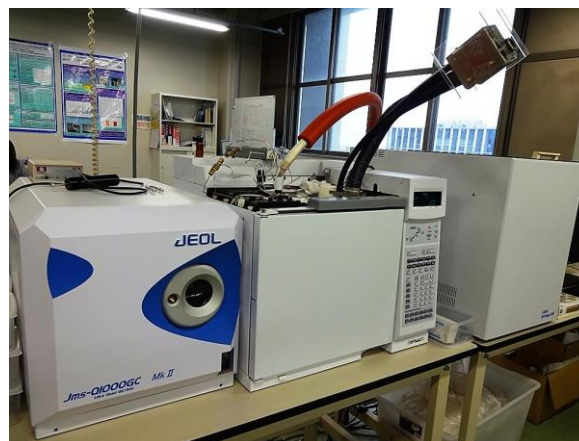


図2 加熱脱離 - ガスクロマトグラフ - 質量分析装置

検体間のパターン比較を容易にするため、匂い物質は大腸癌患者についてピーク強度の高いもの順に配列した。これら3検体を比較すると、アセトン、グルコース (非臭気)、ヘキサンなどが比較的高い強度で検出されたが、検出パターンは被験者間で異なることがわかった。

2) 皮膚ガスの測定

皮膚ガスに関しては従来研究をベースに、代表的な51物質について放散フラックスの定量を試みた。大腸癌、胃癌、膵臓癌患者の皮膚ガス検体の分析結果の1例を図4に示す。横軸は標準物質との照合によって同定された物質名、縦軸は皮膚放散フラックス ($\text{ng cm}^{-2} \text{h}^{-1}$) である。

皮膚ガスは、体表面から放散される揮発性の有機・無機化合物であり、エネルギー基質 (炭水化物、タンパク質、脂質) 等の代謝生成物、腸内細菌による分解生成物、吸入・経口摂取された外因性化学物質 (外来因子)、皮膚表面における生物的・化学的な反応生成物などから構成される混合ガスである。表1に主な皮膚ガスの生成要因と放散経路を示す³⁾。今回の癌患者において、酢酸、エタノール、アセトン等の代謝生成物は比較的高い放散フラックスを示し、低級脂肪酸、アルコール類、外来因子 (スチレンなど) は低かった。これら皮膚ガスパターンには、疾病 (癌) の影響を反映するもの、入院環境を反映するもの、個人差を反映するものなどが複合して影響していると考えられ、今後症例を増やして解析することにより、癌との関連性が明らかになると考えられる。

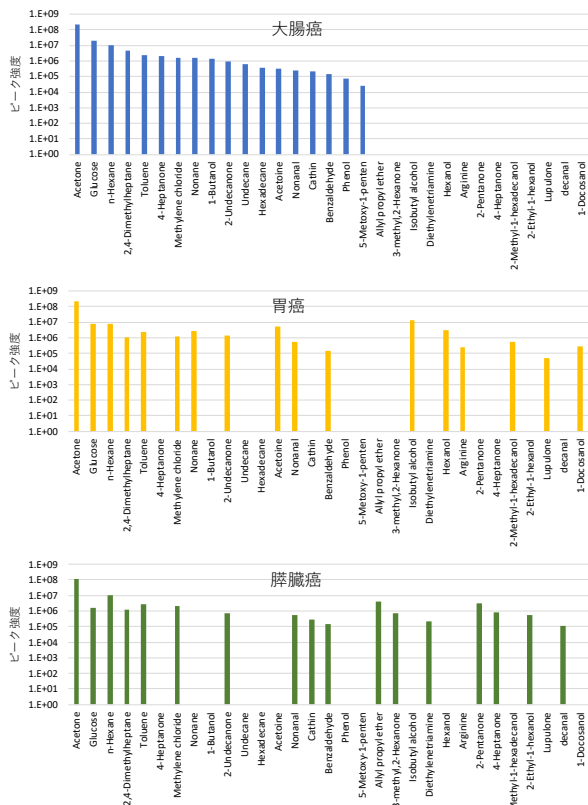


図3 大腸癌、胃癌および膵臓癌患者の尿検体から捕集された匂い物質の分析結果

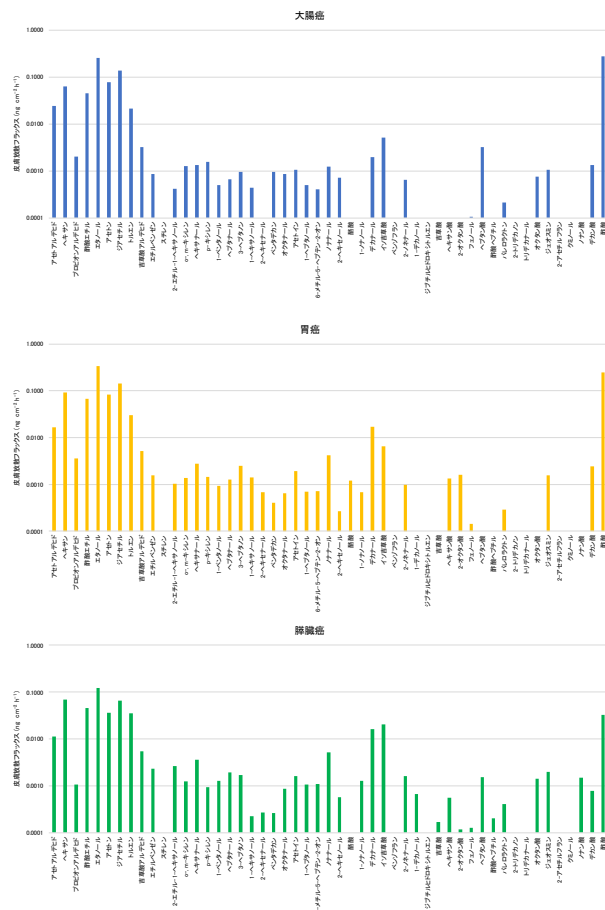


図4 大腸癌、胃癌および膵臓癌患者の皮膚ガス分析結果

表1 主な皮膚ガスの生成要因と放散経路

生成要因	主な放散経路	皮膚ガス
内因性		
タンパク質代謝	血液	アンモニア、アミン類
筋肉疲労、ストレス	血液、汗腺	アンモニア
脂質代謝	血液	アセトン
飲酒	血液、汗腺	エチルアルコール、アセトアルデヒド
ニンニク摂取	血液	ジアリルジスルフィド
カレー摂取	血液	クミンアルデヒド
腸内細菌	血液	水素、メタン、エタン、エチレン
脂質の酸化	表面反応	2-ノネナール、ペラルゴン酸、2-ヘキセナール
汗中成分の反応	表面反応	ジアセチル、酢酸、イソ吉草酸
外因性		
喫煙	血液	ニコチン、メチルフラン、2,5-ジメチルフラン
化学物質曝露	血液	ベンゼン、トルエン、キシレン、フェノール、2-エチル-1-ヘキサノール
農薬曝露	血液	フェニトロチオンおよびその代謝生成物
化粧品使用	血液	酢酸エチル、カルボン、リモネン

4. 展望

今後は、尿検体・皮膚ガスの検体を更に追加し解析を進めていく。また、線虫での解析についても準備が整い次第開始する予定である。

5. 引用文献

- [1] Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, Shinden Y, Mimori K, Maehara Y, Ueda N, Hamakawa M. A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using *Caenorhabditis elegans* Scent Detection. *PLoS One*. 2015;10:e0118699. doi: 10.1371/journal.pone.0118699. eCollection 2015. PMID: 25760772
- [2] Kimura K, Sekine Y, Furukawa S, Takahashi M and Oikawa D. Measurement of 2-nonenal and diacetyl emanating from human skin surface employing passive flux sampler – GCMS system, *J. Chromatogr. B*, 1028, 181-185, (2016).
- [3] 関根嘉香, 木村桂大, 梅澤和夫: 皮膚ガス測定は役に立つか?, におい・かおり環境学会誌,

6. 業績

【論文発表】

- 1) Furukawa S, Sekine Y, Kimura K, Umezawa K, Asai S and Miyachi H. Simultaneous and multi-point measurement of ammonia emanating from human skin surface for the estimation of whole body dermal emission rate, *J. Chromatogr B*, 1053,60-64, (2017).
- 2) Kawanishi A, Hirabayashi K, Yamada M, et al. Clinicopathological significance of Necl-4 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2017;70:619-24.
- 3) Yamada M, Hirabayashi K, Kawanishi A, et al. Nectin-1 expression in cancer-associated fibroblasts is a predictor of poor prognosis for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surg Today* 2017.
- 4) Hirabayashi K, Yamada M, Kono H, et al. Epidermoid cysts are a characteristic feature of intrapancreatic but not of extrapancreatic accessory spleens. *Virchows Arch* 2017;471:91-8.

【学会等発表】

- 1) Sekine, Y. Human Skin Gas in Indoor Environment, Healthy Buildings 2017 Asia, Society of Indoor Indoor Air Quality, Taiwan, 2017.9, Invited Speech
- 2) Sekine Y. Air Quality Watch for Human Wellness and Environment, Honorable Presentation - Environmental Chemistry, Faculty of Geology and Geography, Sofia University, 2017.11, Bulgaria, Invited Speech
- 3) 関根嘉香：ヒト皮膚から放散される微量生体ガスの測定と医療への応用，第30回におい・かおり環境学会，東京，2017.8，学術賞受賞記念講演

6. 謝辞

匂い物質の測定を協力していただいた東海大学大学院理学研究科・佐藤祥大大学院生、東海大学理学部化学科・戸高惣史君に感謝いたします。また、研究分担者・協力者である東海大学スポーツ医学研究所・石井直明教授、東海大学医学部内科学系消化器内科学・峯徹哉教授、同・松嶋成志教授、同・鈴木孝良教授、同・小川真実講師、同・川瀧洋平助教、同・羽田野敦子助教、

同・中原史雄助教、同・川西彩大学院生、東海大学医学部基盤診療学系病理診断学・中村直哉教授、同・高梨由美実験助手、東海大学工学部生命化学科・笹川昇教授、東海大学医学部外科学系口腔外科学・加藤久視講師、東海大学生命科学統合支援センター・安田佳代技術員、かわぐち消化器内科・川口義明先生に感謝いたします。