

# 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*

戸高 惣史<sup>1)</sup>、関根 嘉香<sup>1)2)</sup>、平林 健一<sup>2)3)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学大学院理学研究科化学専攻、<sup>2)</sup> 東海大学先進生命科学研究科、<sup>3)</sup> 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学  
*Michihito Todaka<sup>1)</sup>, Yoshika Sekine<sup>1)2)</sup>, Kenichi Hirabayashi<sup>2)3)</sup>*

*1) Graduate School of Science, Tokai University*

*2) Institute of Advanced Biosciences, Tokai University*

*3) Department of Pathology, School of Medicine, 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、または尿および皮膚ガス中の匂い物質を質量分析器により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。今回は、皮膚ガス分析に着目し、癌患者の皮膚ガス放散量および検出パターンの特徴について考察したので報告する。

### [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. In this paper, the characteristic emission pattern of the skin gas was discussed for cancer patients.

### [Key Words]

scent substance, carcinoma, *Caenorhabditis Elegans*, mass spectrograph, early diagnosis, human skin gas

## 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<sup>1)</sup>、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。

そこで、東海大学医学部附属病院において癌患者の尿・皮膚ガス検体を採取し、質量分析器により匂い物質の分析を行った。癌患者と健常者の皮膚ガスの種類・放散量に着目して解析したので報告する。

## 2. 実験の概要

本研究では、東海大学医学部附属病院において尿・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った。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 日以内にガスクロマトグラフ-質量分析計 (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 (PFS) 法<sup>2)</sup>を用いた (図1)。PFS 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。PFS の開口部側を前腕部にのせて固定する。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。

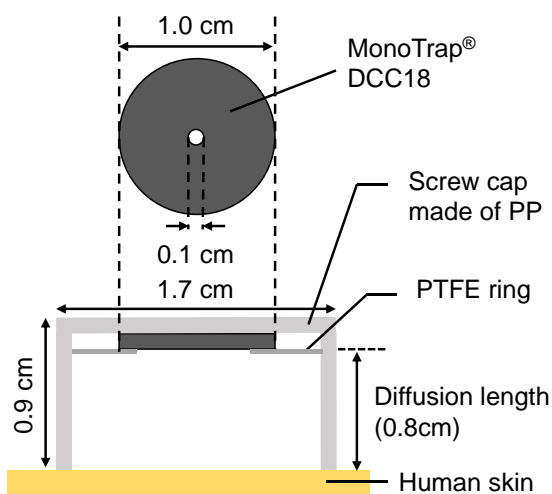


図1 皮膚ガス測定用 PFS の構成図

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)。

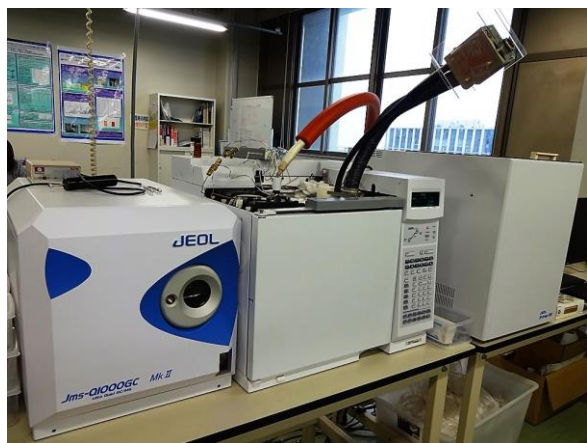


図2 加熱脱離 - ガスクロマトグラフ - 質量分析装置

### 3. 結果および考察

#### 1) 尿検体の測定

患者尿検体はこれまで17検体を採取することができ、その内、大腸癌3検体、胃癌2検体、膵癌4検体、舌癌1検体、慢性膵炎・肝炎1検体の計11検体について匂い物質の測定値が得られた。検出された物質は NIST ライブラリー検索により推定した。その結果、検出された物質は多種にわたり、11 検体を総合すると 211 種類が検出された。検出された物質の種類・量 (ピーク強度) は被験者毎に異なり、複数の検体が多検出された大腸癌、胃癌および膵癌患者の検体についても各病態に特有の検出パターンは見いだせなかった。さらに、尿中夾雑物の影響により、GC-MS 装置の故障が頻発したことから尿検体中の匂い物質の分析は、2018年6月時点で一旦休止とした。

#### 2) 皮膚ガスの測定

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<sup>3)</sup>。

皮膚ガス検体はこれまで28検体を採取することができ、その内、大腸癌4検体、胃癌4検体、膵癌13検体、舌癌・口唇癌3検体、慢性膵炎・肝炎1検体の計25検体について分析を行った。2018年6月までに採取した検体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を定量した。尚、2018年7月以降は分析条件を変更し、より多くの物質の検出を試みた。以下、過去に得られた健康者データと比較するため、2018年6月までに分析された14検体、41物質について解析した。

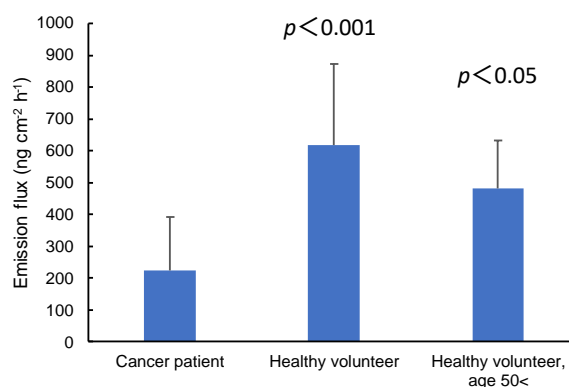


図3 皮膚からの酢酸放散量の比較

図3は、癌患者14名の皮膚から放散される酢酸の放散フラックス ( $\text{ng cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) を健常ボランティアの値と比較したものである。健常ボランティアは男性10名、女性18名の合計28名、年齢範囲は17~59歳であった。尚、癌患者の年齢範囲は40~78歳であり、40歳の患者1名を除き50歳以上であったため、健常ボランティアについても50歳以上の3名(男性2、女性1)を抽出し、比較した。皮膚からの酢酸の放散には“発汗”が強く関与し、安静時では発汗量が多い部位から比較的多く放散し、また発汗量の増減に伴い酢酸放散フラックスが変動することが知られている<sup>4)</sup>。癌患者の酢酸放散フラックスは、健常ボランティア28名、50歳以上の健常ボランティアの値に比べて有意に低く、安静時発汗量が少ないことが示唆された。

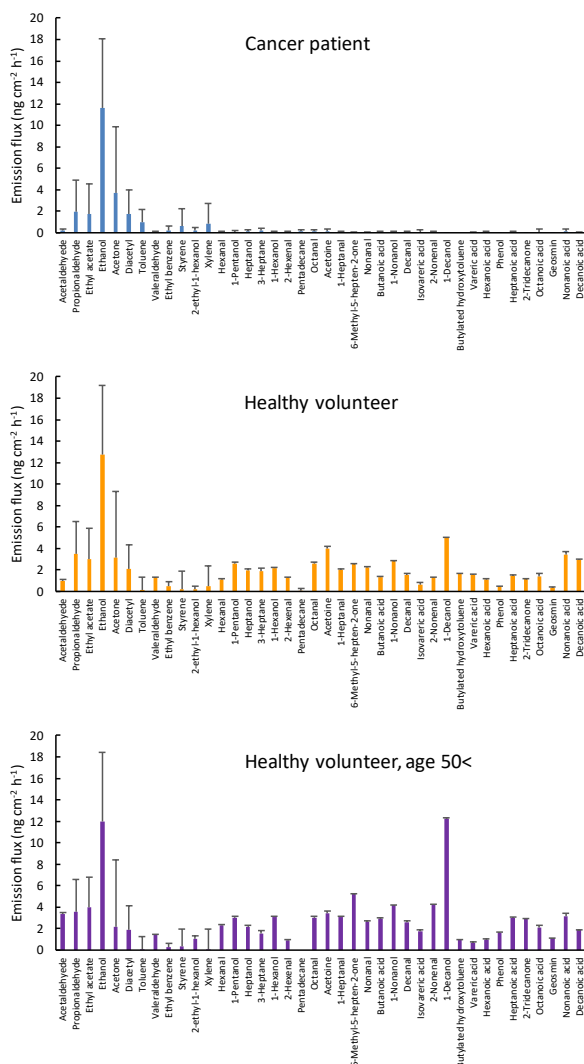


図4 皮膚ガス40成分の放散フラックスの比較

図4に、酢酸以外の皮膚ガス40成分の放散フラックスを示す。癌患者の場合、エタノール>アセトン>ジ

アセチルの順で高い放散量が認められたが、健常ボランティアの値に比べて全般に放散量が少ない傾向が見られた。そこで、癌患者(1例の慢性肺炎・肝炎患者を含む)と健常ボランティア28名の各皮膚ガス成分の平均放散フラックスの比を求めた。

図5に示すように多くの皮膚ガスの放散フラックス比は1よりも小さくなり、癌患者の方が体臭の元になる皮膚ガス放散量が少ないことがわかる。一方、放散フラックス比が1よりも大きい成分があり、それらはトルエン(放散フラックス比6.3)、スチレン(2.7)、キシレン(1.7)、アセトン(1.2)およびペンタデカン(1.1)などであった。

トルエン、スチレンおよびキシレンなど通常生体内では産生されない化学物質も皮膚からの放散が認められている<sup>5)</sup>。これは経口・吸入曝露により体内に侵入し

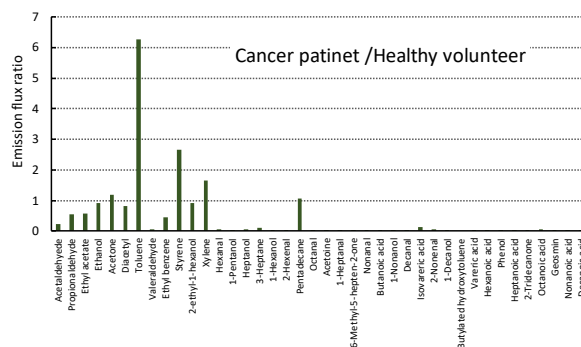


図5 癌患者および健常ボランティア28名の皮膚ガス40成分の放散フラックス比

た化学物質が血中に移行し、体内を循環する過程で血液から直接揮発して放散された外因性化学物質と考えられ、化学物質に対する曝露履歴の指標として利用できる可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。健常者の場合、トルエンの吸入直後から皮膚放散量が増加し、2時間程度で吸入前の水準に減衰する。今回の癌患者の場合、病室内空気中のVOCsの吸入曝露に起因すると考えられ、VOCsの代謝能力が低下しているため、皮膚からの放散が持続して可能性が考えられる。

一方、アセトンは脂質の代謝生成物であり、絶食、減食(ダイエット)、飢餓などにより糖質の供給やその利用が不十分になると脂質の分解が促進され、肝臓においてケトン体(アセト酢酸、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸およびアセトン)が生成し血中に移行する。ケトン体の中で揮発性の高いアセトンは、血中から直接揮発して体表面から放散される。したがって皮膚アセトンの放散は、癌患者の脂質代謝の状態を反映していると考えら

れ、病態との関連で詳細に考察する必要がある。

ペンタデカンの皮膚からの放散機構は現時点では不明であるが、ソウル大学の Lee ら<sup>6)</sup>は、培養した癌細胞から放散する VOCs をスクリーニングしたところ、ペンタデカノンが特異のバイオマーカーになり得ると報告している。そこで、2018年7月以降、GC-MS の分析条件を変更し、ペンタデカノンを測定項目に追加した。

次に、癌患者および健常ボランティアの皮膚ガス40成分のデータを用いて因子分析を行った。解析ソフトには IBM SPSS ver.23 を使用し、相関行列に基づき因子を抽出した。軸の回転には Varimax 法を用いた。欠損のあるデータは削除し、キシレンの異性体は合計値を用いた。その結果、有意な因子は6個抽出され、寄与率は因子1が31%、因子2が15%、因子3が14%、因子4が12%、因子5が6.9%、因子6が6.2%であった。

図6は因子1および因子2に対する各皮膚ガス検体の因子負荷量をプロットしたものである。興味深いことに癌患者の検体は因子1に対して高い因子負荷量、因子2に対しては低い因子負荷量となり、癌患者群と健常者群に大別することができた。

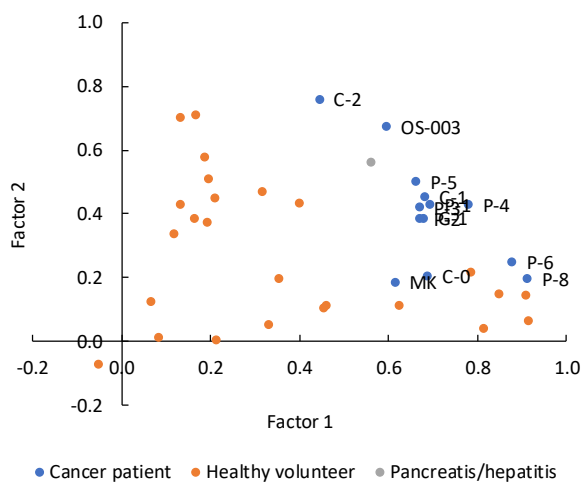


図6 因子1および因子2に対する各検体の因子負荷量 (癌患者, 健常ボランティア)

癌患者の中で、健常者データとの判別が困難であった検体は、P-6: 膵癌 (Stage IIB, 女性70歳)、P-8: 膵癌 (Stage III, 男性67歳)、C-0: 早期大腸癌 (Stage IA, 65歳) およびMK: 早期胃癌 (Stage IA, 男性73歳) であり、早期癌2検体が含まれる点は興味深い、必ずしも共通性は認められなかった。これら4点の近傍に分布した健常者検体は、19歳~20歳の大学生のものであった。また慢性膵炎・肝炎患者の検体は癌患者群の近傍に分布した。

図7に因子1~3における皮膚ガス成分の因子得点を示す。因子1は、癌患者の皮膚ガスパターンと考えられ、エタノール、アセトン、ノナン酸などで特徴づけられた。ノナン酸は脂質の分解物で、加齢臭の一つと考えられている。

因子2はジアセチル、酢酸エチル、エタノールが相対的に高く、アセトンやノナン酸は低い放散量を示す因子であった。ジアセチルも30~40代男性に多くみられる加齢臭であり、“中年男性臭”とも呼ばれる。皮膚常在菌による乳酸の代謝生成物と考えられている。酢酸エチルは、化粧品の成分に含まれていることから女性に比較的多くみられる成分である。したがって因子2は、若年~中年の健常者に関連する因子と思われる。因子3は、エタノール、デカン酸が高く、アセトンが低いパターンであった。

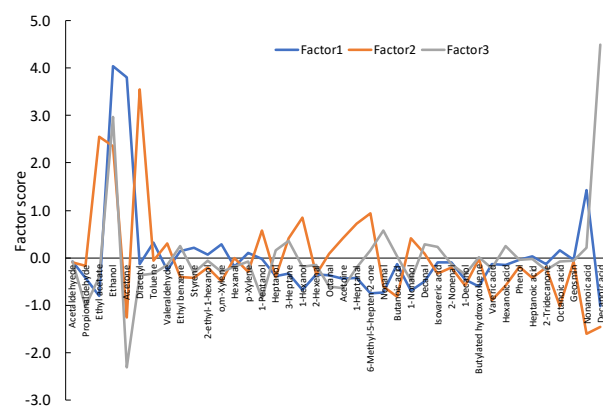


図7 因子1~3における皮膚ガス成分の因子得点

#### 4. 結言

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る。今回の解析により、癌患者の皮膚ガス放散量は健常者に比べて少ない傾向にあるが、エタノール、アセトンおよびノナン酸で特徴づけられる皮膚ガスパターンを示し、皮膚ガスパターンによって健常者との判別が可能になるかもしれない。今後は、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, et al., *PLoS One*. 2015; 10:e0118699. doi: 10.1371/journal.pone.0118699. eCollection 2015. PMID: 25760772

- [2] Kimura K, Sekine Y et al, *J. Chromatogr. B*, 1028, 181-185, (2016)
- [3] 関根嘉香, 木村桂大, 梅澤和夫, におい・かおり環境学会誌, 48(6), 410-417(2017)
- [4] Sekine Y et al., *Fragrance Journal*, 46(9), 19-25(2018)
- [5] Sekine Y et al., *J. Chromatogr. B*, 1092, 394-401(2018)
- [6] Lee D K et al., *Proc. of 7th EuChems Chemistry Congress*, PL63 (2018)

## 6. 業績

### 【論文発表】

- 1) Umezawa K, Sekine Y, Kimura K, Asai S, Miyachi H, Emanation of fenitrothion from the skin surface of a patient who attempted to commit suicide by acute poisoning, *Rinsho Byori(臨床病理)*, 66(9), 949-956 (2018)
- 2) Sekine Y, Sato S, Kimura K, Sato H, Nakai S, Yanagisawa Y, Detection of tobacco smoke emanating from human skin surface of smokers employing passive flux sampler-GCMS system, *J. Chromatogr. B*, 1092, 394-401(2018)
- 3) Kawashima Y, Kawaguchi Y, Kawanishi A, et al. Comparison between Endoscopic Treatment and Surgical Drainage of the Pancreatic Duct in Chronic Pancreatitis. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine*, 43, 117-21 (2018).
- 4) Amato E, Mafficini A, Hirabayashi K, et al. Molecular alterations associated with metastases of solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *J Pathol*, 247, 123-34 (2019).

### 【学会等発表】

- 1) Michihito Todaka, Shodai Sato, Yoshika Sekine and Kenichi Hirabayashi, Detection of volatile organic compounds emanating from human skin surface of cancer patients employing passive flux sampler-GC/MS method, 7th EuChems Chemistry Congress, 26-30 August 2018, Liverpool UK
- 2) 戸高惣史, 佐藤祥大, 二階堂直樹, 藤原滉稀, 関根嘉香, 平林健一, 木村桂大, ガン患者のヒト皮膚表面から放散する生体ガスの測定法, 平成 30 年 KISTEC Innovation Hub, 1PS-2, 2018.10

## 7. 謝辞

研究分担者である東海大学健康学部健康マネジメント学科・石井直明教授、同・安田佳代講師、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・川島洋平助教、同・羽田野敦子助教、同・中原史雄助教、同・川西彩大学院生、同・森町将司大学院生、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・加藤久視講師に感謝いたします。