

揮発性肺がんマーカーの探索

2014年

花井 陽介

揮発性肺がんマーカーの探索

2014年

花井 陽介

目次

	頁
緒言	1
第 1 章 センサーマウスを使った尿臭による肺がんの識別	
1-1 緒論	5
1-2 方法	6
1-3 結果	11
1-4 考察	15
第 2 章 肺がん細胞培養液および肺がんモデルマウス尿由来の揮発性有機化合物の分析	
2-1 緒論	17
2-2 方法	19
2-3 結果	23
2-4 考察	36
第 3 章 ヒト肺がん患者の尿に含まれる揮発性肺がんマーカー候補化合物の探索	
3-1 緒論	39
3-2 方法	40
3-3 結果	42
3-4 考察	50
第 4 章 マウス尿中肺がんマーカー候補選定のための前処理法	
4-1 緒論	54
4-2 方法	54
4-3 結果および考察	56
4-4 結言	62

第 5 章	前処理法を用いた尿中新規肺癌マーカー候補化合物の探索	
5-1	緒論	63
5-2	方法	63
5-3	結果	64
5-4	考察	72
第 6 章	総括	75
	本研究に関する原著論文など	77
	引用文献	79
	謝辞	88

【緒言】

生活環境の改善や医学の進歩によって感染症が激減する一方で、がんや循環器疾患などの生活習慣病が増加し、疾病構造は大きく変化してきた。がん、循環器疾患、糖尿病及び慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD）を中心とした非感染性疾患（Noncommunicable Diseases: NCD）は、世界的にも死因の約 60%を占め（2008 年）、今後、10 年間でさらに 77%にまで増加するとの予測もなされている。今後、WHO において、NCD の予防のための世界的な目標を設定し、世界全体で NCD 予防の達成を図っていくこととされている。1981 年から今日までの約 30 年間、がんは日本での死因の第 1 位であり続けている。人口動態統計に基づく分析によると、2010 年にがんで死亡した日本人は 35 万人（男性 21 万人、女性 14 万人）で¹⁾、総死亡の約 30%を占めており、日本人の 3 人に 1 人はがんで亡くなっていることになる。特に、50 歳代後半においては、死因の半数近くをがんが占めている。がんによる死亡を部位別にみると、男性では肺が一番多く、胃、大腸、肝臓、膵臓の順である。一方、女性では大腸が一番で、肺、胃、膵臓、乳房の順である。

多くの場合、がんの兆候が見られたときには、既にごん細胞は組織内に広がり、治療効果も高くない。進行がんの罹患率を減少させ、がんによる死亡を防ぐために最も重要なのは、がんの早期発見である。早期発見には、自覚症状がない段階からの定期的ながん検診の受診が有効で、現在、胃エックス線による胃がん検診、細胞診による子宮頸部がん検診、視診・触診とマンモグラフィによる乳房がん検診、胸部エックス線と喀痰検査（喫煙者のみ）の併用による肺がん検診、便潜血検査による大腸がん検診などの有効性が確立されている。しかし 2009 年でのそれぞれの受診率は胃がん（男性 36.6% 女性 28.3%）、肺がん（男性 26.4% 女性 23.0%）、大腸がん（大腸がん 男性 28.1% 女性 23.9%）、子宮頸がん（子宮頸がん 女性 37.7%）および乳がん（乳がん 女性 39.1%）で、がん検診全体でみても、20~30%程度にとどまっている。低い受診率を向上させるためには、検診受診の手続きの簡略化、効果的な受診勧奨方法の開発、職域のがん検診との連携などがが必要であるが、特にがんがなくてもがん検診の結果が「陽性」となる場合があること、がん検診やその後の精密検査を受けることによって身体的（検査による合併症等）・精神的（苦痛、心配等）・社会的（費用、時間等）な負担が生じ得ること

など、がん検診の欠点やがん検診に伴う不利益を改善することが重要である。

このような背景から、被験者に対して負担を与えず、かつ高感度・高特異的ながんの診断技術が望まれており、これを実現するためにがんバイオマーカーが注目されている。米国 National Institutes of Health (NIH) によると、バイオマーカーとは、「正常な生体内作用、発病過程、あるいは治療的介入に対する薬理的効果を反映し、客観的に評価するための特性を持ったもの」と定義されている²⁾。バイオマーカーには、様々な分子形態があり、例えば、DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、代謝産物である。

がんバイオマーカーの探索は、がん研究には欠くことのできないテーマとなっており、この10年の間に、ハイスループットなオミックス技術(ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクス)が進歩したことにより、この技術が大学・企業・政府機関において精力的に取り組まれている。理想的ながんバイオマーカーには、がん患者のみが陽性となる血液検査で、がんのステージと相関があり、予後情報も得られ、治療効果も予測可能で、簡便かつ再現性が高いことが求められ、現在18種類のタンパク質性がんバイオマーカーが米国 Food and Drug Administration (FDA) によって認可されている(表)。

現在、がんスクリーニング用バイオマーカーとして最もよく知られ、研究例も多いのが、prostate specific antigen (PSA)である。PSAは1986年に前立腺がんのモニタリング用として認可され、PSAによるモニタリングにより、前立腺がんの治療に顕著な改善が見られている。さらに、症状が現れなくともPSA濃度が高い人で、前立腺がんのリスクが高まるという研究結果もある³⁾。PSA検査の普及により、約90%の前立腺がん患者が早期に発見され、診断後の延命期間向上にも寄与している。一方で、PSA高値は前立腺がん患者のみならず、良性前立腺肥大や前立腺炎、前立腺感染などの良性症状の人にも見られるという問題もある。

予後および予知バイオマーカーとして最も広く用いられているのが、乳がん患者に用いられるエストロゲンレセプター (estrogen receptor: ER)である。ER陽性がんの患者は、ER陰性がんに比べて、予後良好となる。しかし、予後マーカーとしての有用性は時間に依存し、リンパ節への転移が見られない場合の予後マーカーとしての有用性は限定的であるなどの問題がある⁴⁻⁶⁾。一方、ER陽性の乳がん患者には、選択的ER調節因子や

アロマトラーゼ阻害剤のような内分泌療法が有効であるため、ER は予知マーカーとしてルーチン使用が推奨されている⁶⁾。また、ER は実用になった乳がん予知マーカーとしては初めてのものである⁷⁾。しかしながら、末期のER 陽性患者の3分の1は、内分泌療法に対して抵抗性を示し、初期に内分泌療法が効果を示したER 陽性腫瘍も、最終的には抵抗性を示すことが多いことから、ER の予知有効性は十分とはいえない⁸⁾。

肺がんは男女それぞれ死亡原因の1位と2位で約20%を占めている¹⁾。また、初期の肺がんはほとんど症状が出ないため、早期に診断することは非常に困難である。高い死亡率を低下させるためには、簡便でかつ高感度・高特異的な肺がんの早期診断方法の開発が強く望まれている。肺がんにおいてもいくつかの腫瘍マーカーが知られており、carcinoembryonic antigen (CEA)、sialyl stage-specific antigen-1/sialyl Lewisx-i antigen (SSEA-1/SLX)、cytokeratin 19 fragment (CYFRA)、squamous cell carcinoma antigen (SCC)、pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) および neuron specific enolase (NSE) などがある。腫瘍マーカーのみを用いた肺がんの診断は行われませんが、これらのうちのCEA、CYFRA および ProGRP を組み合わせて肺がん診断の補助として用いられることがある。

現在、肺がんの診断において、臨床応用されている主な診断方法は胸部X線、CT スキャンである。しかしながら、これらは被験者に対して精神的、肉体的負担が生じるだけでなく、感度および特異度も十分とはいえない。そこで、高感度かつ高特異的であり、広く一般の人々に適応可能な苦痛を与えない非侵襲かつ簡便な診断技術が望まれている。

近年、そのような診断技術を実現するために、揮発性のバイオマーカーが注目されている。疾患と「におい」の間には関連があり、疾患特有のにおいがあることが報告されている。例えば、糖尿病患者からはりんご臭、壊血病患者からは腐敗臭、メチオニン代謝不全患者からはキャベツ臭がそれぞれ発せられる⁹⁾。肺がんについても、イヌを使った実験によって肺がん特有のにおいの存在が示唆されている¹⁰⁾。

本研究は、非侵襲かつ簡便な肺がんの早期診断方法の確立を最終目標とし、肺がんのにおい診断を実現するため、保存や輸送も容易な尿に着目し、そこに含まれる揮発性有機化合物 (volatile organic compounds: VOCs) の中から優れた揮発性の肺がんバイオマーカーの探索を行った。第1章では、尿に肺がん特異的な揮発性成分の存在を確認すると

ともに、尿のにおいを指標とした肺がん診断の実現可能性を示すことを目的として、センサーマウスを作成し、Y字迷路試験によって肺がん患者の尿をにおいで区別できるか調べた。第2章では、肺がん特有のにおい成分に関する知見を得るため、肺がん細胞を移植したモデルマウスの尿中揮発性有機化合物と肺がん細胞の培養液由来の揮発性有機化合物に共通する化合物を探索した。第3章では、肺がん患者と対照者の尿に由来する揮発性有機化合物を比較することによって、肺がんの指標となるバイオマーカーを探索した。第4章では、効率的な揮発性バイオマーカーの抽出方法を確立することを目的として検討を行った。第2章で特定した肺がんモデルマウス特異的な揮発性バイオマーカーを指標として、抽出効率に前処理方法が与える影響を調べた。第5章では、第4章において最も効率が高かった前処理方法を用いて、より有用な揮発性肺がんマーカーが存在するかについて分析を行った。

表 FDA が認可したタンパク質がんバイオマーカー

バイオマーカー	主な臨床応用	主な腫瘍タイプ	検体
1. α -Fetoprotein (AFP)	病期分類	非セミノーム性 精巣腫瘍	血清
2. Human chorionic gonadotropin (hCG)	病期分類	精巣腫瘍	血清
3. Carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9)	モニタリング	膵臓腫瘍	血清
4. Carbohydrate antigen 125 (CA125)	モニタリング	卵巣腫瘍	血清
5. Carcinoembryonic antigen (CEA)	モニタリング	結腸直腸腫瘍	組織
6. Epidermal growth factor receptor (EGFR)	予後の予測	結腸直腸腫瘍	組織
7. v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT)	予後の予測	消化管腫瘍	組織
8. Thyroglobulin (Tg)	モニタリング	甲状腺がん	血清
9. Prostate-specific antigen (PSA)	スクリーニング	前立腺がん	血清
10. Carbohydrate antigen 15.3 (CA15.4)	モニタリング	乳がん	血清
11. Carbohydrate antigen 27.29 (CA27.29)	モニタリング	乳がん	血清
12. Estrogen receptor (ER)	予後の予測	乳がん	組織
13. Progesterone receptor (PR)	予後の予測	乳がん	組織
14. human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/neu)	予後の予測	乳がん	組織
15. Nuclear matrix protein-22 (NMP22)	スクリーニング	膀胱がん	尿
16. Fibrinogen degradation products	モニタリング	膀胱がん	尿
17. Bladder tumor antigen (BTA)	モニタリング	膀胱がん	尿
18. High-molecular-weight CEA and two bladder cancer specific mucins	モニタリング	膀胱がん	尿

第1章 センサーマウスを使った尿臭による肺がんの識別

1-1 緒論

肺がんの主な診断方法としては、胸部 X 線や CT スキャンが用いられているが、これらは感度が不十分で、高コストや放射線被爆といった問題がある。一方、血液中のある特定のタンパク質や抗体が腫瘍マーカーとして利用され、CEA、SCC、NSE、CYFRA21-1、ProGRP、SLX などが臨床の現場で用いられている。しかしながら、これらのマーカーは肺がん特異的ではなく、測定するためには採血が必要な侵襲的な診断技術である。そこで、被験者に対して苦痛を与えない非侵襲かつ簡便な診断を可能にする技術が望まれている。このような診断技術を実現するために、揮発性のバイオマーカーが注目されている。

嗅覚は哺乳類の生活上非常に重要な役割を担っており、食物の認識・識別、危険の察知、仲間の認知などさまざまな行動のシグナルとして、においの情報を利用している。においの情報は、まず鼻腔内にある嗅上皮の嗅細胞に発現する嗅覚受容体で受容される。この嗅覚受容体はヒトで 347 種あることが分かっており、モデル生物の代表であるマウスにはその約 3 倍の 1000 種が確認されている^{11,12)}。嗅細胞は受容したにおい分子の情報を電気信号に変換し、軸索を介して嗅球の糸球体へと伝える。糸球体は末梢からのにおい情報を脳の高次領域へと伝える入口となるとともに、においの情報が最も収束している場所でもある。糸球体の応答パターンは、それぞれのにおい物質に特有のパターンを示すことがわかっており、その嗅球で得られるにおい分子の構造などの情報が特定のにおいの応答パターンを形成しにおいの認識に重要な貢献をしていることが分かってきている¹³⁾。

がんに関連したにおいの研究としては、松村らが、訓練したセンサーマウスが乳がんモデルマウスと対照を尿のにおいで識別できたことを報告している¹⁴⁾。肺がんについても、イヌを使った実験によって肺がん特有のにおいの存在が示唆されている^{10,15-17)}。従って、疾患特有のにおい物質を特定することができればその化合物を揮発性のバイオマーカーとして利用できる可能性があり、実際にこれまでに、血液や呼気などを対象として揮発成分の研究が行われている¹⁸⁻²¹⁾。さらに呼気を対象とした研究においては、

1-butanol と 3-hydroxy-2-butanone の呼気中濃度が、対象群と比較して肺癌患者で有意に高くなっていることが報告されている²⁰⁾。呼気は非侵襲的かついつでもどこでも得られる優れたサンプルではあるが、保存や輸送が難しいという問題がある。一方、尿は非侵襲的に収集できるだけでなく、保存や輸送も容易である。さらに、尿に含まれる揮発成分のみに限定することで、分析および化合物の同定が容易である。そこで、本研究では尿に肺癌特異的な揮発性成分の存在を確認することを目的として、センサーマウスを作成し、Y字迷路試験によってマウスが肺癌患者の尿のにおいを区別できるか調べた。

1-2 方法

1-2-1 ヒト尿の収集

ヒト尿の収集はペンシルベニア大学病院へ依頼し、ボランティアとして参加した肺癌患者4名と対照者4名からそれぞれ採取した(表1-1)。がん種については、生検によって確認した。採取した尿は、1 mL ずつ 1.5 mL 容チューブへ分注し、試験に用いるまで-80°Cで保存した。

表 1-1 被験尿サンプルリスト

A：肺癌患者	用途	年齢	性別	がん種	タバコ歴
1	訓練用	77	男	腺がん	前喫煙者
2	訓練用	69	女	肺胞上皮がん	前喫煙者
3	訓練用	不明	男	不明	現在喫煙者
4	本試験用	75	男	扁平上皮がん	前喫煙者

B：対照者	用途	年齢	性別	タバコ歴
1	訓練用	不明	女	前喫煙者
2	訓練用	不明	男	現在喫煙者
3	訓練用	不明	男	前喫煙者
4	本試験用	63	男	現在喫煙者

1-2-2 Y字迷路試験設備と全体の概要

山口らの報告²²⁾を参考に、Y字迷路試験を設計した。図1-1へY字迷路行動実験用の設備の概要図を示す。これは動物に提示するにおいが入ったボックス（左右に1つずつ）に脱臭した空気を送り込み、Y字の両方から異なるにおいが流れている状態で、スタート位置から放たれたマウスが学習目的のにおいに到達した場合に報酬用の水を与えるという訓練を行った。スタート位置にはゲートが設けてあり、そのゲートをあげてからいずれかのゴール位置に到達するまでの時間を記録した。一度ゴール位置に到達したらゴールゲートを下げ、そこで試行を終了させた。それぞれのゴール位置にはシャッター付きの報酬用の水ボトルが置かれ、正解時のみシャッターを上げて水を与えた。空気に含ませて送るにおいはY字迷路内で滞らないように、スタート位置側で排気されるようになっており、常に一定量のおい成分がY字迷路内を流れるように工夫した。

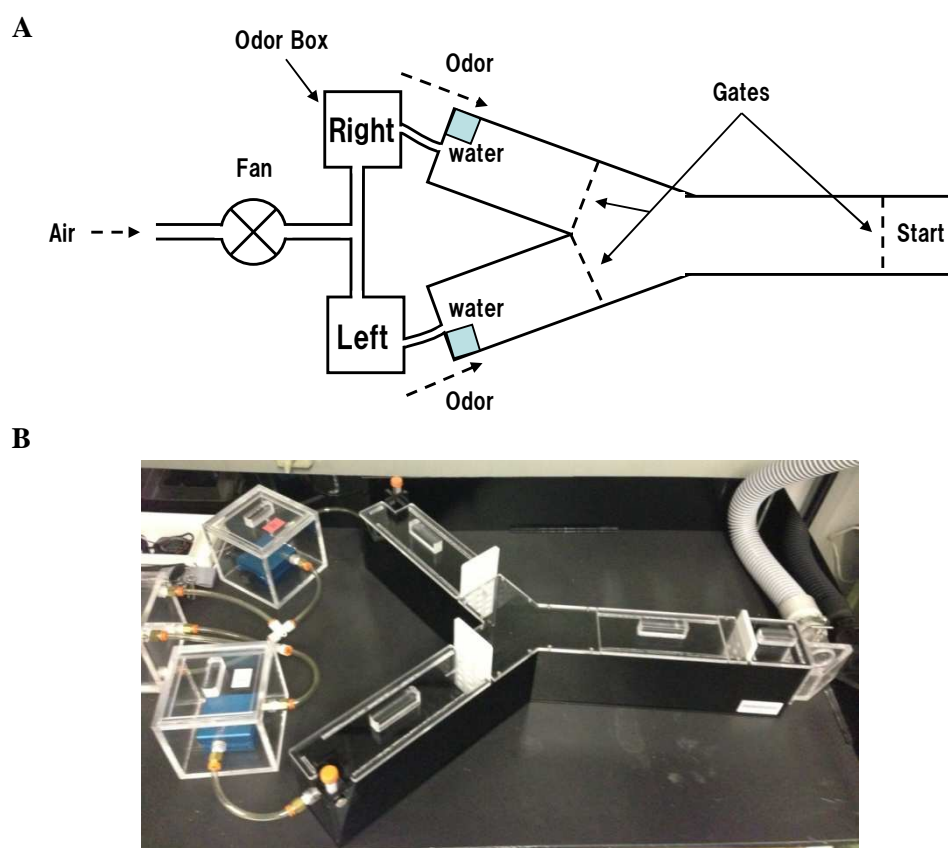


図 1-1 Y字迷路、A：設備の構成概要、B：写真

1-2-3 センサーマウスの作成と識別試験

肺がん患者の尿または対照の尿を識別できるセンサーマウスの作成を目的として、雌性マウス 4 匹 (C57BL/6JmsSlc、4 週齢：日本エスエルシー株式会社) を準備し、肺がん尿識別センサーマウス用 2 匹と対照尿識別センサーマウス用 2 匹の 2 つのグループに分けた。これらのマウスは個別のケージで飼育した。

センサーマウス①慣らし期間 (3 日間)、②訓練 (正答率が 80%を超えるまで) ③仮識別試験付き訓練の 3 段階で作成し、③の仮識別試験で正答率が 80%を超えた時点で④識別試験を実施した。

①慣らし期間について：マウスを Y 字迷路に慣らせるため、訓練開始 3 日前からマウス 4 匹を Y 字迷路に入れて飼育した。訓練開始前日には、飲料水を取り去り、絶水状態にした。

②訓練について：訓練に使う尿は、肺がん患者のサンプル 1~3 および対照者のサンプル 1~3 の中から 1 つずつ選び、35 mm ディッシュに 0.2 mL を入れた。一日に使う訓練用の尿は変更せずに、翌日の訓練には新しく肺がん患者尿 1~3 および対照者尿 1~3 の中から 1 つずつ選びなおした。与える水は水道水を使った。

訓練手順は、1)マウスを Y 字迷路のスタート位置に入れる。2)尿をにおい箱へセットする。3)水を両方のゴールに一滴ずつ入れる。4)スタート位置のゲートを開ける (ストップウォッチをスタート)。5)マウスがどちらかの水の手前に着いたらゲートをおろす (ストップウォッチをストップ)。6)においを嗅がせるため数秒待つ。7)正解 (覚えさせたい) の場合は水を与える。8)正解または不正解およびスタートからゴールまでの時間を記録する。9)マウスをスタート位置へ戻す。10)尿をランダムに置かれるように再配置する。11)数秒待った後、3)からの手順を繰り返す。次のマウスの訓練を行うときは、尿とマウスを取り除いた後数分待ってから行った。一日あたりの訓練時間は、手順の 1)から 8)までを 1 回と数え、一日あたり 36 回または、36 回に達していなくても訓練開始から 1 時間を経過した時点で訓練終了とした。

③仮識別試験付き訓練について：識別試験では訓練に用いていない尿を用いる。マウスにとってはそのにおいは未経験なので、何も行動をとらないことも起こりうる。そこでマウスにどんな状況でも選別行動をとらせるように、②の繰り返し選別訓練の合間に正

解しても水を与えない仮識別試験を挟んで、マウスに「正解しても水がもらえないときがある」と認識させることにした。

仮識別試験は、②の訓練において正答率が 80%を超えてから訓練に取り入れた。手順は、Y 字選択実験において 6 回連続で正解したら、7 回目は正解しても水を与えず、この後、通常の Y 字選択実験を行い、2 回連続で正解が続いたら、再度仮識別試験を行うこととした。なお仮識別試験は一日あたり最大で 5 回とした。仮識別試験における正答率を記録し、仮識別試験の正答率が 80%を超えたらセンサーマウス作成完了とし、④識別試験を実施した

④識別試験について：識別試験は、訓練したマウス（センサーマウス）が尿のにおいて肺癌患者と健常者を区別できるかどうかを試す試験とした。識別試験は、単独におこなうのではなく③の仮識別試験付き訓練の一連の手順の中に挟む形で実施した。すなわち③と同様にサンプル 1~3 の中から一つ選んで Y 字選択実験を実施し、識別試験のときだけ、訓練に用いていない肺癌患者尿のサンプル 4 と対照者尿のサンプル 4 を用いた。

手順は以下の通りである 1) 訓練用サンプルを用いた Y 字選択実験（以下リハーサルという）で 6 回連続正解したら③と同様に 7 回目に仮識別試験（1 回目）を実施する。2)その後、2 回連続リハーサルで正解したら識別試験（1 回目）を実施する（仮識別試験と同様に正解しても水は与えない）。③その後、リハーサルを実施し 2 回連続で正解したら仮識別試験（2 回目）を実施。④その後、リハーサルで 2 回連続で正解したら識別試験（2 回目）を実施。これ以降は仮識別試験と識別試験を繰り返し、それぞれ 5 回実施した時点で終了とした。識別試験での正答率を記録し、肺癌尿または対照者尿の識別能力を評価した。記録したデータシートの例を図 1-2 に示す。

マウス：肺がん尿識別センサーマウス1

実施日：8/31/2010

訓練および仮識別試験に用いた尿 A:肺癌患者1

B:健常者2

識別試験に用いた尿

A:肺癌患者4

B:健常者4

TRIAL	TIME(sec)		
	A	B	
1	L	Ⓡ	19
2	Ⓡ	L	4
3	Ⓡ	L	7
4	⓪	R	3
5	Ⓡ	L	3
6	⓪	R	3
7	⓪	R	4
8	R	⓪	4 仮
9	⓪	R	3
10	Ⓡ	L	3
11	⓪	R	2
12	Ⓡ	L	2
13	⓪	R	3
14	Ⓡ	L	2 仮
15	Ⓡ	L	2
16	⓪	R	2
17	Ⓡ	L	2
18	R	⓪	2
19	⓪	R	2
20	⓪	R	2
21	⓪	R	2 仮
22	⓪	R	2
23	Ⓡ	L	5
24	Ⓡ	L	5

TRIAL	TIME (sec)		
	A	B	
25	⓪	R	3
26	Ⓡ	L	1
27	Ⓡ	L	5 仮
28	⓪	R	2
29	R	⓪	2
30	⓪	R	3
31	Ⓡ	L	3
32	⓪	R	3
33	⓪	R	2
34	⓪	R	2
35	Ⓡ	L	2 仮
36	Ⓡ	L	2
37	R	⓪	2
38	⓪	R	1
39	Ⓡ	L	3
40	⓪	R	3
41	⓪	R	3
42	L	R	
43	R	L	
44	R	L	
45	L	R	
46	L	R	
47	R	L	
48	R	L	

訓練+仮識別試験	正答数	正答率
36	31	86% (31/36)

仮識別試験実施数	正答数	仮識別試験の正答率
5	4	80% (4/5)

識別試験実施回数	正答数	識別試験の正答率
5	5	100% (5/5)

図 1-2 識別試験におけるデータシートの例

丸：マウスが選んだ尿、破線四角：仮識別試験実施、実線四角：識別試験実施

1-3 結果

1-3-1 訓練および仮識別試験での正答率の推移

訓練を繰り返すことで、4匹全ての正答率が向上した。訓練と仮識別試験を合わせた正答率の推移を図 1-3 に示す。訓練開始直後は 50%前後であったが、訓練開始 18 日目から正答率が 80%を超えるマウスが現れ始め、32 日目には 4 匹全てで正答率 80%を超えた。また、肺がんを識別できるように訓練したマウスでは 32 日目以降正答率が 60%を下回ることはなかったのに対して対照者識別用に訓練したマウスでは、正答率が 60%を下回る日が見られた。

尿において肺がんを識別できるかどうかを判定する識別試験では、正解しても水を与えないため、これにマウスを慣れさせることを目的として、仮識別試験を行った。仮識別試験は Y 字選択実験 6 回連続で正解した次の 7 回目に実施し、正解しても水を与えない。またこれ以降は 2 回連続して正解した次の 3 回目は水を与えないという手順で実施した。従って仮識別試験は連続した正解が得られた場合にのみ行うことになるが、訓練開始 18 日目から実施できるようになり、一日当たり 14 回から多い日で 45 回実施することができた。仮識別試験が実施できたかどうかを、5 日分ずつまとめて平均化したグラフを図 1-4 に示す。肺がん尿識別センサーマウス群では、仮識別試験の開始初期は、連続した正解が得られず試験を実施することができない日（18 日目から 29 日目）が見られたが、その後は、安定して毎日仮識別試験を行うことができた。対照者尿識別センサーマウス群では、訓練日数が進むにつれて仮識別試験の実施率に上昇が見られたものの、連続した正解が得られず仮識別試験を行えない日があり、訓練最終日までに実施率が 100%とならなかった。

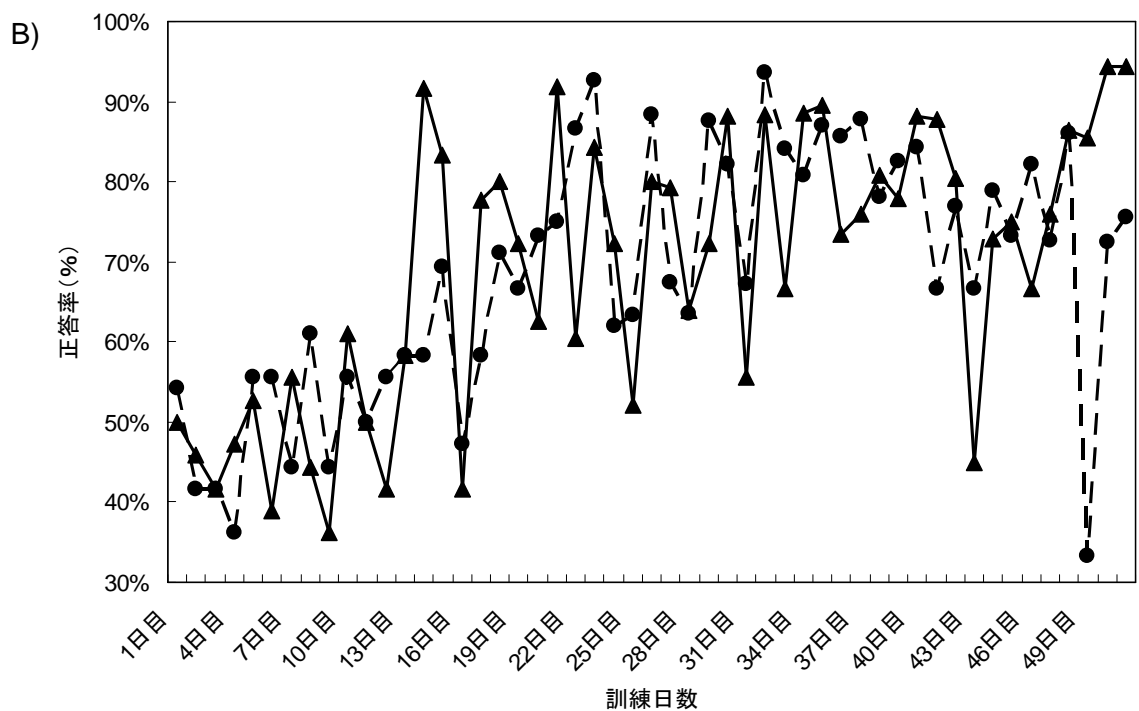
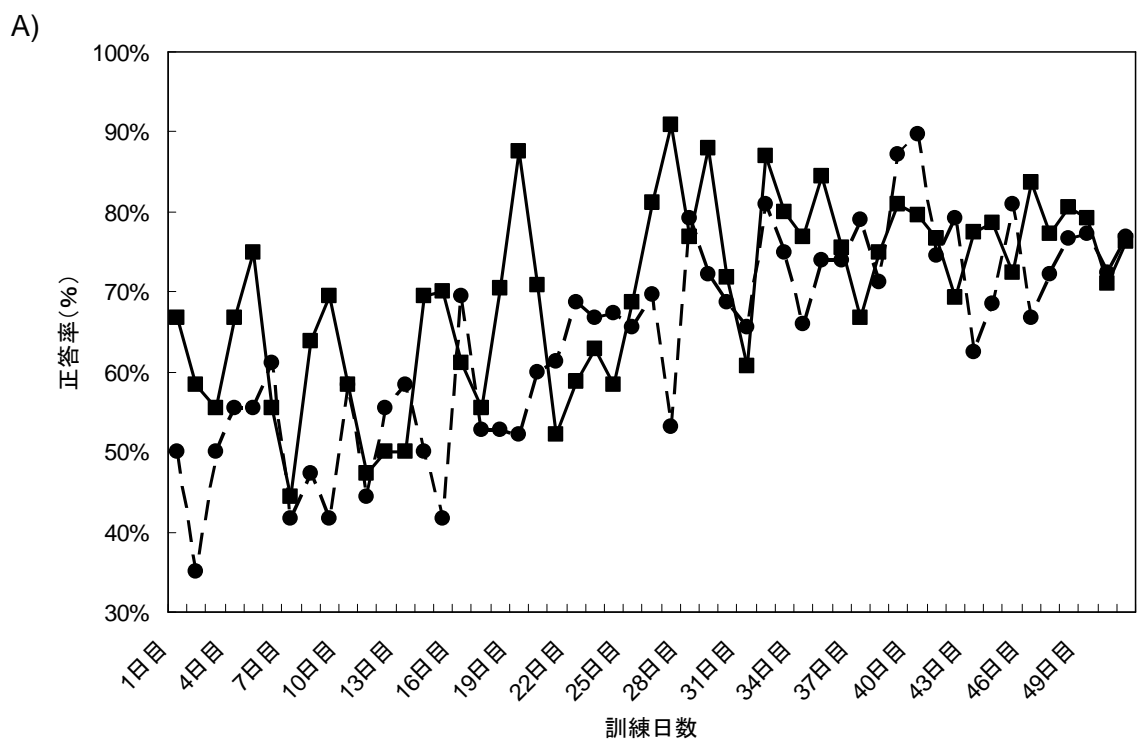


図 1-3 訓練と仮識別試験を合わせた正答率の推移。

A) : 肺がん尿識別センサーマウス。 —■— : マウス 1、 -●- : マウス 2。

B) : 対照者尿識別センサーマウス。 —●— : マウス 1、 -▲- : マウス 2。

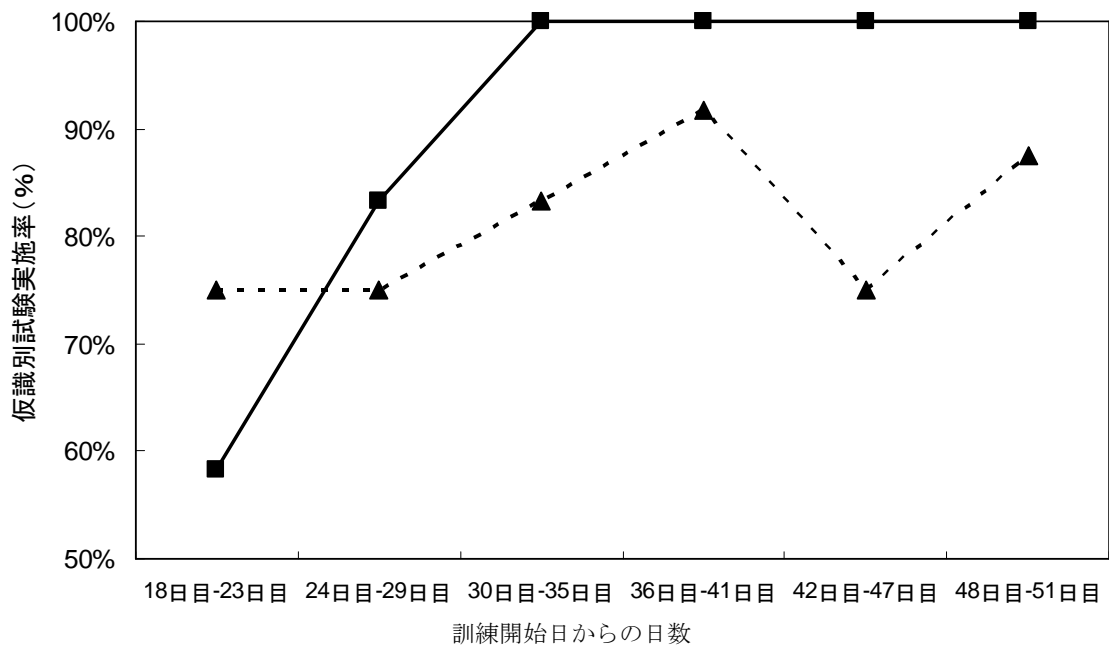


図 1-4 訓練における仮識別試験の実施率

—■—：肺がん尿識別センサーマウス群。 -▲-：対照者尿識別センサーマウス群

仮識別試験における正答率について、5日おきに平均化したグラフを図 1-5 に示す。肺がん尿識別センサーマウス 2 匹の正答率は、試験開始初期でそれぞれ約 60%および約 70%であったが、訓練日数が進むにつれて正答率の上昇が見られ、36 日目からはいずれのマウスもほぼ安定して正答率 80%以上が見られるようになった。対照者尿識別センサーマウス 2 匹については、試験開始初期からそれぞれ約 80%と 90%の高い正答率を示し、高い正答率は訓練最終日まで続いた。しかしながら、上述した通り、連続した正答が得られず仮識別試験を実施できない日も見られた。

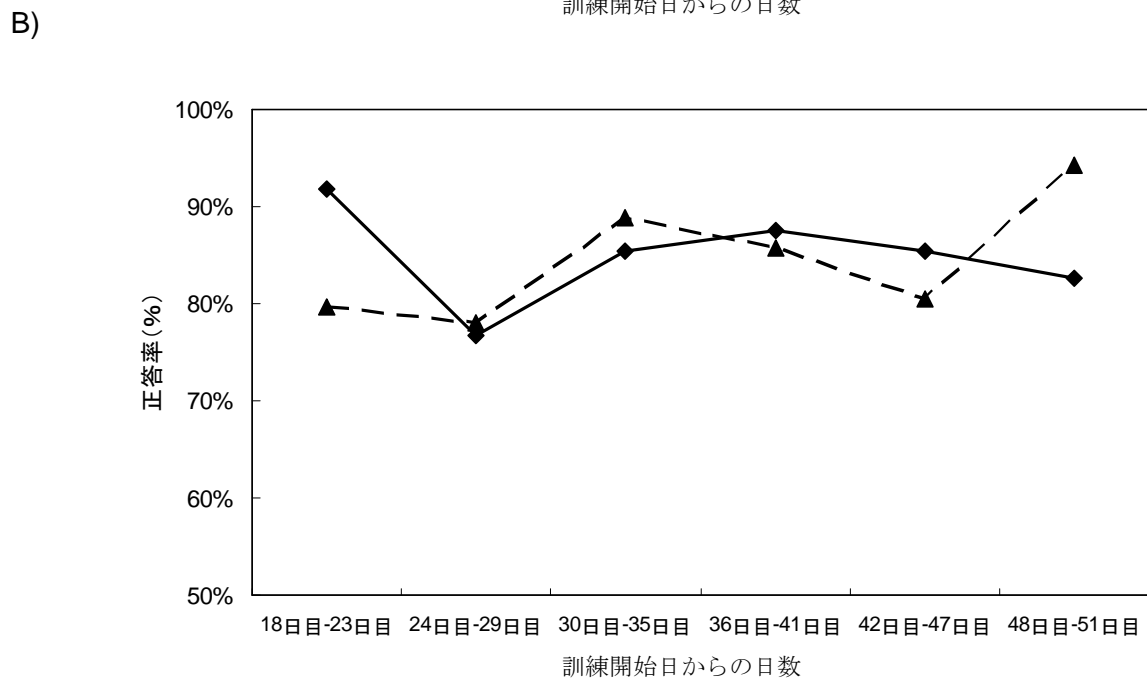
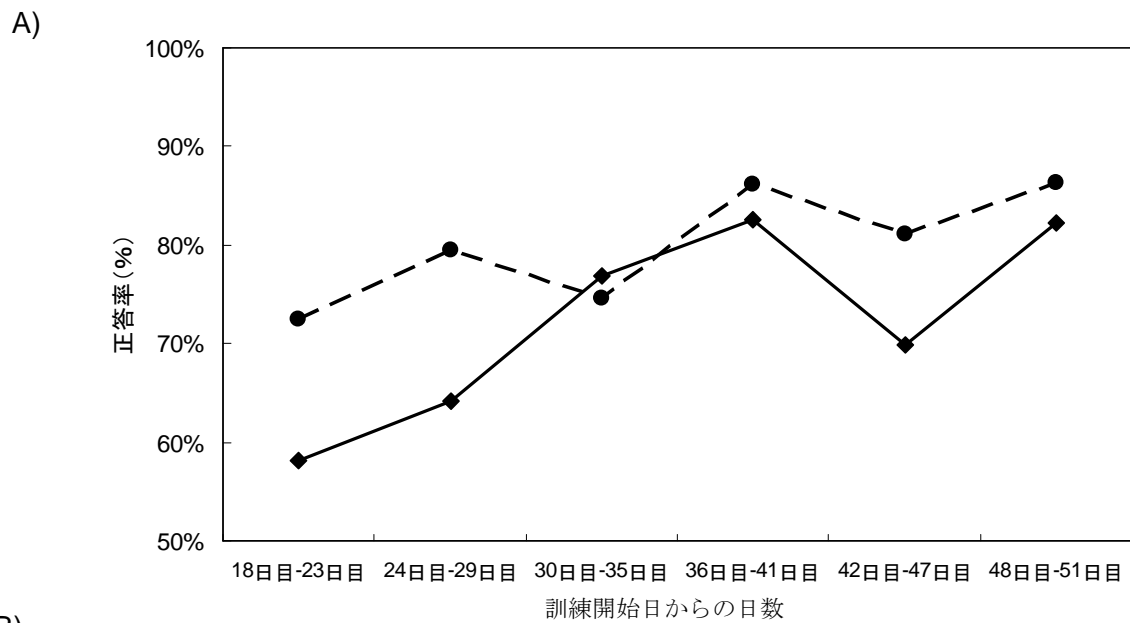


図 1-5. 仮識別試験の正答率推移

A) : 肺がん尿識別センサーマウス。 —■— : マウス 1、 -●- : マウス 2。

B) : 対照者尿識別センサーマウス。 —◆— : マウス 1、 -▲- : マウス 2。

1-3-2 識別試験の結果

本研究では、作成したセンサーマウスが肺がん尿または対照者尿の識別が可能かどうかを試験するために、訓練には用いていない肺がん尿（1名）および対照者尿（1名）を準備し、それぞれ5回の識別試験を行った。その結果、肺がん尿識別センサーマウス2匹は肺がん患者に由来する尿をそれぞれ100%と80%の正答率で識別した。また、対照者尿識別センサーマウス2匹は対照者に由来する尿をそれぞれ80%の正答率で識別した（表1-2）。

表 1-2. 識別試験の結果

センサーマウス	尿サンプル	
	肺がん尿	対照者尿
肺がん用 1	100% (5/5)	
肺がん用 2	80% (4/5)	
対照者用 1		80% (4/5)
対照者用 2		80% (4/5)

1-4 考察

揮発性肺がんマーカーに関する研究は、血液、呼気などを対象として研究されている¹⁸⁻²¹⁾。しかしながら、尿臭を対象とした研究は行われていない。本研究ではまず、尿において肺がんに罹患しているかどうかをマウスの嗅覚を利用した Y 迷路行動試験により明らかにすることを試みた。

マウス (C57BL/6JJmsSlc) に肺がん患者または対照者の尿のにおいを学習させた結果、訓練開始直後では両者を識別できなかったが（正答率 50%前後）、訓練を繰り返すことで、4 匹全ての正答率が向上し、訓練開始から 18 日目あたりから、正答率 80%を超えるようになった。これは訓練によってマウスが肺がん尿または対照者尿を識別していると考えた。松村らの報告では、マウスを利用した Y 字迷路試験によって乳がんモデルマウスと対照マウスに由来する尿が識別されることが示されている。また、正答率の上

昇は訓練開始 9 日目以降から見られ始め、安定した 80%前後の正答率は 20 日目以降で観察されている¹⁴⁾。これに対し本研究では、正答率の安定まで 36 日程度を必要としたが、その理由としては、乳がんと比べて、におい成分の濃度、特徴付けているにおい成分の種類に違いがあることが考えられる。また、肺がん識別センサーマウスでは、訓練が進むに連れて正答率約 80%前後に収束し、仮識別試験の実施率も 100%となった。一方、対照者尿識別センサーマウスでは、訓練が進むにつれて全体的な正答率の向上は見られたものの訓練終盤でも正答率にばらつきがみられ、仮識別試験の実施率も約 90%前後となった。考えられる理由としては、肺がん患者に由来する尿には、肺がんを特徴づけている揮発性化合物が共通して含まれており、マウスにとってはこれを覚えるだけで正答が得られるのに対して、対照者に由来する尿には対照者を特徴付ける共通した揮発性成分は存在せず、生活環境や他の疾患等により対照者尿個々について揮発性成分が違うため選別が難しかったという可能性があげられる。従って、対照者識別センサーマウスはさらに訓練を続けることで正答率が安定してくるかもしれない。

訓練完了後、尿のにおいで肺がんを識別できるかどうかを判断するため、訓練には用いていない第三者の尿サンプルを使った識別試験を行った。その結果、2 匹の肺がん尿識別センサーマウスはそれぞれ 100%と 80%の高い識別率を示した。対照者尿識別センサーマウスについても 80%の識別率となり、尿のにおいで肺がんの診断が可能であることが示された。しかしながら、本研究結果では肺がん識別の正答率に日間変動が見られたことから、動物を使った肺がん診断では正答率の安定性が保証できず、動物を使った肺がん診断は不可能であると結論した。

ゲノミクス、プロテオミクスの進歩は、様々なバイオマーカー候補を提供しており、診断時のがんの分類や個別診断への応用が示唆されている。しかしながら、ベッドサイドで利用可能ながんマーカーは存在していない²³⁾。今回の結果は、肺がん尿と対照者尿を識別できる何らかの揮発性化合物の存在を示しており、このにおい分子を同定することができれば、肺がんの揮発性マーカーとして利用でき、非侵襲かつ簡便な診断の実現につながるものと考え、次章以下の研究に取り組んだ。

第 2 章 肺がん細胞培養液および肺がんモデルマウス尿由来の揮発性有機化合物の分析

2-1 緒論

第 1 章では、センサーマウスを利用して肺がん患者特異的な揮発性成分の存在が尿に含まれていることを確認しそれを指標とした「におい診断」の実現可能性を示した。

疾患に関する「におい診断」の報告例としては、呼気を対象としたものがほとんどである。例えば、 ^{13}C 尿素を用いたによるヘリコバクターピロリの検出^{24, 25)}や水素を指標とした炭水化物吸収不良の診断などで呼気テストが採用されている²⁶⁾。また呼気中に最も豊富に含まれるアセトンは、糖尿病患者で濃度が上昇することが報告されており、診断への応用が検討されている²⁷⁾。さらにエチルメルカプタン、ジメチルスルフィド、ジメチルジスルフィドなどの含硫黄化合物は肝硬変患者の呼気の特有の臭いに関与しているとする報告や²⁸⁾。尿毒症を患者の呼気に含窒素化合物が特徴的にみられるという報告もある²⁹⁾。一方で、疾病との直接的な関連は示されていないものの、エタンとペンタンが血中の過酸化脂質の濃度が上昇するに伴って増加するという観察がある^{30, 31)}。

肺がんについても、呼気に含まれる VOC を指標とした非侵襲な肺がん診断の可能性が示されている³²⁻³⁵⁾。例えば、Chen らは、固相マイクロ抽出法 (solid phase micro extraction : SPME 法) とガスクロマトグラムを組み合わせ、肺がん患者の呼気から有意に高い濃度の 1-butanol、3-hydroxy-2-butanone を検出している³⁶⁾。また Dragonieri らは、“電子の鼻 (Electronic nose)”を利用して、肺がん患者と慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive lung disease : COPD) 患者を比較的高い感度と特異性で区別できることを報告している³⁷⁾。

しかしこれまでのところ、肺がんマーカーと考えられる内因性の VOC の細胞および生化学的起源はあまり理解されていない。VOC の放出に関する直接的な証拠を得ることを目的としてヒトのがん細胞を用いた *in vitro* の研究がいくつか行われており^{36, 39-41)}。例えばヒトの非小細胞肺がん細胞である CALU-1 細胞株では、2,3,3-trimethylpentane、2,3,5-trimethylhexane、2,4-dimethylheptane、4-methyloctane などの分枝炭化水素が有意に放出される一方、acetaldehyde、3-methylbutanal、n-butyl acetate、acetonitrile、acrolein、

methacrolein、2-methylpropanal、2-butanone、methyl tert-butyl ether、hexanal などの化合物の減少が観察されている⁴⁰⁾。またヒトの肺腫瘍の細胞である NCI-H2087 細胞株においては、アルコール類として 2-ethyl-1-hexanol、分枝アルカン類として 2-methylpentane の放出が観察され、acetaldehyde、2-methylpropanal、3-methylbutanal、2-methylbutanal、*n*-butyl acetate の減少が観察されている⁴¹⁾。さらに、細胞培養液と呼気中の VOC 量の間には相関傾向が見られることが報告されている³⁶⁾。

一方、第 1 章では、尿に含まれる VOC を指標として肺がんが識別できる可能性を示したが、これまでに肺がん患者の尿に含まれる VOC と肺がん細胞由来 VOC の相関を検討した研究報告はない。そこで尿中 VOC と肺がん細胞の相関を調べ肺がんの診断指標となる化合物についての知見を得ることを目的として以下の研究を行った。本章ではまずヒトの腺がん細胞である A549 細胞株を対象として、2 種類の正常細胞と比較しながらがん細胞に特徴的な VOC を探索した。さらに、肺腫瘍を持つ担がんマウス尿と対照マウス尿を区別する尿中の揮発成分の特徴的なパターンを調べた。

2-2 方法

2-2-1 細胞種と培養方法

本研究では、3種類のヒト由来肺細胞株を用いた：A549 細胞株 (JCRB No. JCRB0076)、OUS-11 細胞株 (JCRB No. JCRB1034)、WI-38 VA13 細胞株 (JCRB No. JCRB9057)。A549 細胞株は 58 歳男性の肺腺がん由来しており、変異型 K-ras 遺伝子と野生型 B-raf 遺伝子によって特徴付けられている。OUS-11 細胞株と WI-38 VA13 細胞株はそれぞれ対照として採用した。OUS-11 細胞株は正常なヒト肺組織に由来し、WI-38 VA13 細胞株は SV40 ウィルスを組み込んだ肺線維芽細胞に由来する。これらの細胞株は Health Science Research Resource Bank から購入し、10%FBS (HyClone、Logan、UT)、ペニシリン (30 unit/mL、明治製菓)、ストレプトマイシン (30 μ g/mL、明治製菓)を含む DMEM 培地 (Sigma-Aldrich)を用いた。培養は、各細胞株あたり 2 枚の培養用シャーレ (100 mm \times 20 mm)を準備し、10 mL の培地を加え、37°C、5%CO₂条件下で培養した。培地の交換は行わず、3 日おきに培地を 1 mL 加えた。VOC 測定のために、全ての細胞株はコンフルエントとなった状態から、一定期間 (1 週間、2 週間、3 週間) の培養を行った後、培地を回収し、分析まで-80°Cで保存した。

2-2-2 担がんマウスの作成と尿の回収

担がんマウスの作成および採尿は日本クレア株式会社へ依頼した。担がんマウスの作成には免疫不全マウスである 5 週齢 C.B-17/lcr-scid/scid jcl 雌性マウス (日本クレア株式会社)を用いた。担がんマウス 24 個体、対照マウス 16 個体、計 40 個体のマウスを用いた。ヒト由来の肺がん細胞株 A549 (DS ファーマメディカル株式会社)を担がんマウス作成に用いた。担がんマウスの作成は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10% Fetal Bovine Serum with Glutamine and NaHCO₃ (DS ファーマメディカル株式会社)を用いて、予め増殖させた A549 細胞株を 0.1 mL PBS に懸濁し、 1×10^7 /mL/匹で、マウス右腹側皮下に移植した。対照マウスには 0.1 mL PBS のみを注入した。これを移植 0 日目とした。マウスの飼育にはガラス製メタボリックゲージであるメタボリカ (株式会社スギヤマゲン)を用いた。採尿は、毎日行い、分析まで-80°Cで保存した。マウスの体重と腫瘍の長径と短径はデジタルノギスを用いて、移植後 6 日目以降から 3 日おきに計測した。今

回は、移植後 26 日目から 30 日目の尿を用いて研究を行った。本研究は、動物実験に関する各種ガイドラインに従い、適切に実施した。

2-2-3 固相マイクロ抽出法を用いた培養細胞あるいは尿由来 VOC の抽出

培養細胞あるいは尿由来 VOC を分析するための最適 SPME (solid phase microextraction) ファイバーを選定するため以下の 4 種類を用いた。1) divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane : DVB/CAR/PDMS、2) polyacrylate : PA、3) carboxen/polydimethylsiloxane : CAR/PDMS、4) polydimethylsiloxane/divinylbenzene : PDMS/DVB)。これらの比較の結果、低沸点成分から高沸点成分までバランスよく分析できた 2 cm 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS (Supelco Corp、Bellefonte、PA、USA) を本研究には用いた (図 2-1)。尿あるいは培養液は 10,000 g で 5 分間遠心分離して不溶成分を除いた後、その上清 200 μ L を 2 mL 容のクリンプトップバイアルへ入れ、密栓した。SPME 法によるヘッドスペース部 (Head space: HS) における VOC の抽出は Combi-pal オートサンプラー (CTC Analytics) を利用し、バイアルを 45 $^{\circ}$ C で 10 分間加温した後、SPME ファイバーを挿入した状態で 50 分間保持した。

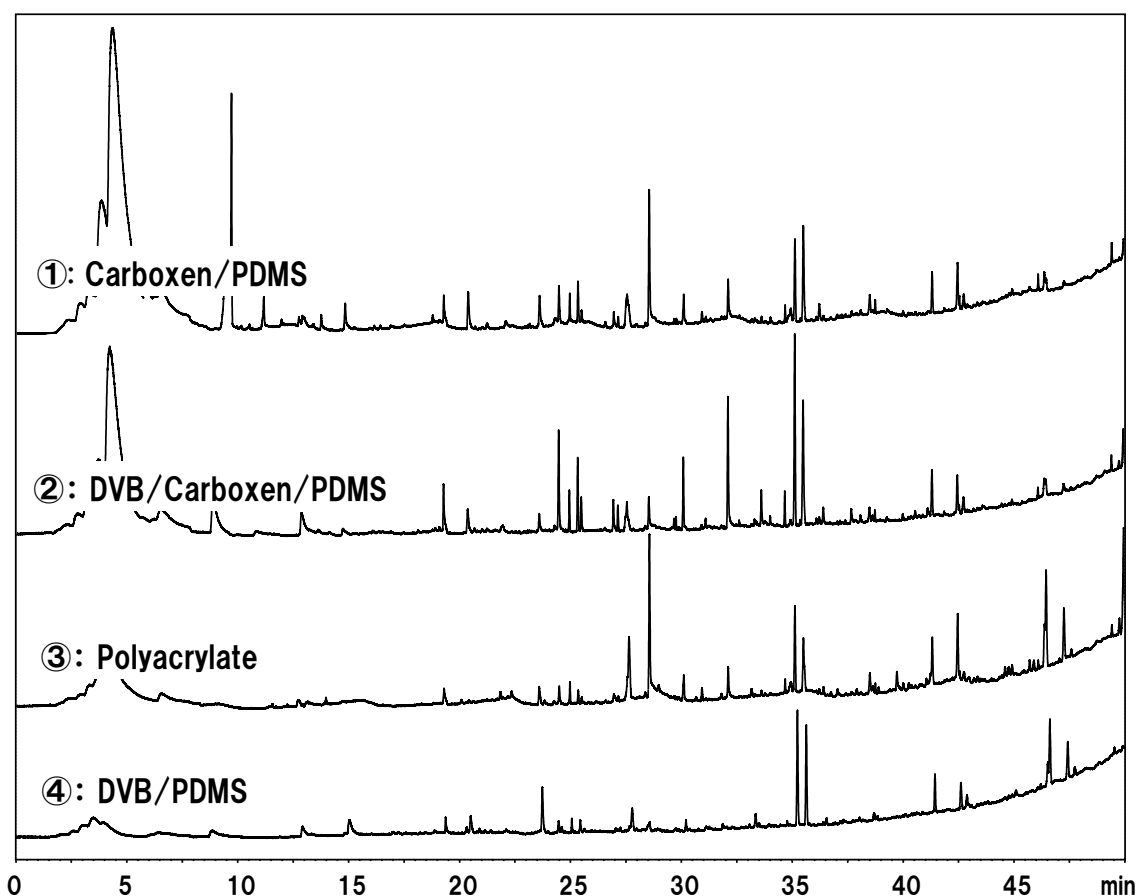


図 2-1. 各 SPME ファイバーによる尿由来 VOC の TIC

2-2-4 ガスクロマトマトグラフィー質量分析

GC 部として Combi-pal オートサンプラーを備えた 7890a (Agilent Technologies) と MS 部として GCT Premior (Waters) を備えたガスクロマトグラフィー飛行時間型質量分析計 (Gas chromatography time-of-flight mass spectrometry : GC-TOF MS) システム) を使用した。キャピラリーカラムは 60 m + 2 m トランスファーライン、内径 0.25 mm、膜厚 0.5 μm の InertCap Pure -WAX (GL サイエンス) を使用した。SPME ファイバーに吸着させた VOC の脱離は 240°C に加温した注入口へ SPME ファイバーを挿入し 10 分間保持させることによって行った。また、この操作はファイバーの洗浄も兼ねた。注入は、内径 0.75 mm のライナーを用い、パルスドスプリットレス (3 分間) により行った。カラムオープンの上昇プログラムは以下の通りとした。初期温度 40 °C (5 分一定)、3 °C/min

の速度で 240 °C (5 分一定) まで昇温した。キャリアガスにはヘリウムを使い、定流量モードで 1 mL/min とした。質量分析条件は以下の通りとした。測定範囲は m/z 20-400 (scan time 0.49 sec、 inter scan delay 0.01 sec) とした。イオン化法は 70 eV の電子イオン化法 (EI 法) を用いた。培養液サンプルについては 1 サンプルにつき 3 回の分析を行った。

2-2-5 データ解析および定量分析

得られた分析データファイルを netCDF 形式のファイルへ変換した。この形式変換作業は Masslynx 4.1 ソフトウェアに付属する Databridge Utility を利用した。イオンピークの抽出、保持時間補正、アライメント処理にはオープンソースソフトウェアである XCMS ソフトウェア (<http://masspec.scripps.edu>) を用いた⁴²⁾。その解析は、R 2.12.0 (<http://cran.r-project.org/>) 上で行い、バンド幅を 10 (bw = 10) にし、それ以外の設定値は初期値を用いて分析した。分析後のピークリストは tsv 形式で保存し、エクセル (Microsoft 社) を使って増加成分の探索を行った。エクセルを使った解析では、まずピークリストから P 値が 0.1 以下かつグループ間の平均ピーク面積が 1.5 倍以上の差を持つピークを抽出した。抽出したピークは目視により抽出イオンクロマトグラム (Extraction Ion Chromatogram : EIC) とピーク面積の確認を行った。有意な差が得られた増加ピークのアノテーションは、マススペクトルライブラリーである Wiley Registry 9th Edition/NIST 08 [NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST 08); mass spectral library of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites Wiley, USA] を利用して行った。またいくつかの成分については、購入した標準品との比較によって同定を行った。

VOC の定量は、作成した検量線より求めた。メタノール-水 (1/1 v/v) を用いて 100 mM の各 VOC 溶液を作成し、順次希釈して、HS-SPME GC-TOF MS から得られたピーク面積を元に検量線を作成した。

2-3 結果

2-3-1 ヒト由来肺がん細胞と正常肺細胞株の VOC の比較

各細胞株について、それぞれの細胞が培養シャーレ一面を覆い尽くした状態から、培養 1 週間後、2 週間後、3 週間後に培養液を回収し、その培養液中の VOC を抽出し比較した。

各培養期間における細胞の状態について、培養 1 週間では、全ての細胞種において死細胞は見られなかった。培養 2 週間では、全ての細胞種において一部死細胞が見られるようになり、培地の色が赤く変色していた。培養 3 週間では、全ての細胞種において多くの死細胞が見られるようになり、培地の色も琥珀色になっていた。従って、培養 3 週間では死細胞が多く、得られる VOC も死細胞の影響を強く受けると考え、VOC の抽出は、培養期間 1 週間と 2 週間の細胞について行うこととした。培養 1 週間後における各細胞種の分析結果を図 2-2 に示した。図を見ると例えば A549 細胞株において、12.82 分に見られるピークは他の細胞種と比べて明らかに増加しているが、含まれる全てのイオンピークを目視により比較することは不可能であるため、A549 細胞株とその他の細胞株との比較解析は XCMS ソフトウェアを用いて行った。

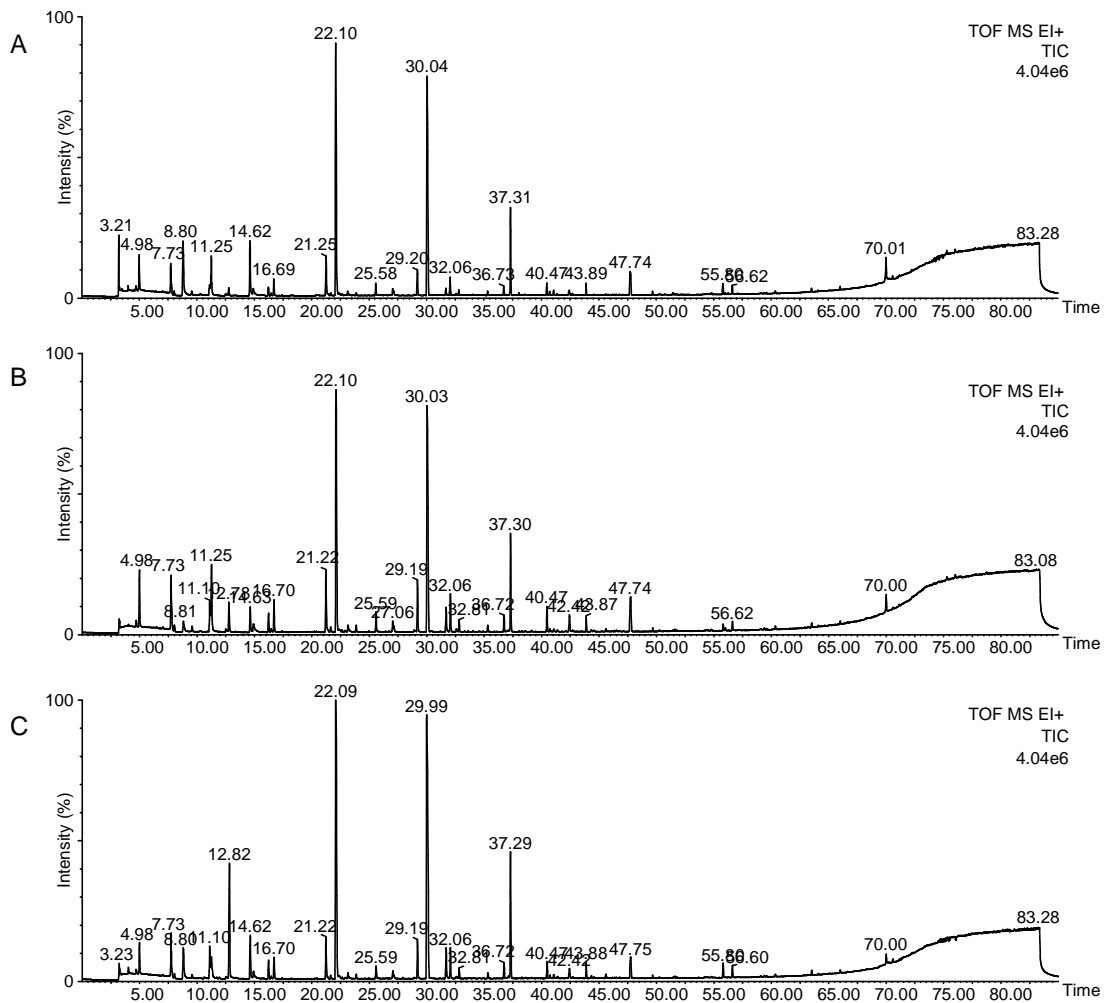


図 2-2 培養 1 週間において各培養細胞から得られる VOC のクロマトグラム (TIC)

A : WI-38 VA13 細胞株、B : OUS-11 細胞株、C : A549 細胞株

XCMS ソフトウェアを用いて解析したところ、今回の実験条件では、一つのクロマトグラムには平均して 751 のイオンピークが含まれていることが明らかとなった。これらのイオンピークから有意に増加または減少 (P 値 < 0.10 かつ正常細胞株群と比較して 1.5 倍以上変化) したものを抽出した。さらに、抽出されたイオンピークは保持時間を元にデコンボリューション解析を行い、スペクトルライブラリー (NIST'08 と Wiley library) を用いて化合物のアノテーションを行った。アノテーションの判定基準は一致度 80% 以上を用いた。一致度が低いため、化合物の特定が出来なかったピークは、今回の解析対象から除外した。

XCMS による解析結果を表 2-1 に示す。培養期間 1 週間では、31 化合物に違いが見られ、A549 細胞株で増加していた化合物は 18 であり、減少していた化合物は 13 であった (表 2-1A)。培養期間 2 週間では、45 化合物に違いが見られ、31 化合物が増加しており、14 化合物が減少していた (表 2-1B)。培養期間 3 週間では、30 化合物に違いが見られ、増加化合物と減少化合物はそれぞれ 28 化合物と 2 化合物であった (表 2-1C)。

表 2-1 A549 培養液において増加または減少した VOC 一覧

A: 培養 1 週間後				
化合物	分類	変化量*	P 値	
1-Dodecanol	Alcohols	++	< 0.01	
1-Methoxy-2-propanol	Ethers	+++	0.02	
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	Esters	+	0.09	
2,5-Hexanedione	Ketones	+	0.08	
2-butanone	Ketones	+	0.06	
2-Phenyl-2-propanol	Alcohols	+++	0.02	
3,3,5-Trimethylcyclohexanone	Ketones	++	0.04	
3-Butene-2-one	Ketones	+	0.03	
4-Cyanocyclohexene	Nitriles	+	0.07	
Acetonitrile	Nitriles	+	0.03	
Cyclohexanone	Ketones	+	0.04	
Diethyl ether	Ethers	++	< 0.01	
Dimethyl succinate	Esters	++	0.06	
Ethanol	Alcohols	+++	0.01	
Isobutyric acid 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester	Esters	+	< 0.01	
Isophorone	Ketones	++	0.02	
Orthoformic acid tri-sec-butyl ester	Esters	+++	0.02	
tert-Butanol	Alcohols	+	< 0.01	
1,3-Di-tert-butylbenzene	Hydrocarbons	---	0.07	
2,4-Dimethyl-1-heptene	Hydrocarbons	---	0.04	
2,4-Di-tert-butylphenol	Phenols	-	0.06	
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	Alcohols	--	0.02	
2-Methyl-1-propanol	Alcohols	--	0.06	
4,6-Dimethyl-2-heptanone	Ketones	--	0.05	
5-Methylnonane	Hydrocarbons	-	0.01	
Acetophenone	Ketones	-	0.08	
Benzophenone	Ketones	---	0.04	
Benzyl alcohol	Alcohols	--	0.02	
Dichloromethane	Halogens	-	< 0.01	
Maltol	Pyrans	---	< 0.01	
Styrene	Hydrocarbons	--	0.05	

表 2-1 の続き

B: 培養 2 週間後			
化合物	分類	変化量 [※]	P 値
1-Dodecanol	Alcohols	+++	< 0.01
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	Esters	+	0.03
2,2,5,5-Tetramethyltetrahydrofuran	Furans	+	< 0.01
2,2-Dimethyloxetane	Ethers	+	< 0.01
2,3-Dihydro-4-methylfuran	Furans	+	< 0.01
2,4,6-Trimethylpyridine	Pyridines	+	0.01
2,4-Di-tert-butylphenol	Phenols	+	0.01
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	Diols	+	0.03
2-Butanone	Ketones	++	< 0.01
2-Hexanone	Ketones	+	0.04
2-Methoxyfuran	Furans	+	0.02
2-Methyl-1-propanol	Alcohols	+	0.02
2-Octanone	Ketones	+	0.03
2-Pentanone	Ketones	+	< 0.01
3-Aminopyrazole-4-carboxylic acid	Carboxylic acids	+	< 0.01
3-Methyl-3-buten-1-ol	Alcohols	+	0.01
4-Isopropoxy-2-butanone	Ketones	+	0.02
4-Methylbenzyl alcohol	Alcohols	+	< 0.01
Acetylacetone	Ketones	++	< 0.01
Acetophenone	Ketones	++	< 0.01
Diethyl ether	Ethers	++	< 0.01
Dimethyl succinate	Esters	+++	< 0.01
<i>DL</i> -1-Phenylethyl alcohol	Alcohols	+	0.01
Ethanol	Alcohols	++	0.01
Furfural	Aldehydes	+	0.02
Isobutyric acid 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester	Esters	+	0.01
Methyl vinyl ketone	Ketones	+	< 0.01
Orthoformic acid tri-sec-butyl ester	Esters	+	< 0.01
<i>o</i> -Xylene	Hydrocarbons	+	0.05
Pyrrole	Pyrroles	++	< 0.01
trans-4-Methyl-2-pentene	Hydrocarbons	+	0.01
1,2-Dihydro-2,2,4-trimethylquinoline	Quinolines	-	0.01
1-Butanol	Alcohols	-	0.05
2,3-Butanediol	Diols	-	< 0.01
2-Ethyl-1-hexanol	Alcohols	-	0.06
2-Methyl-2-hepten-6-one	Ketones	--	< 0.01
3,5-Lutidine	Pyridines	-	< 0.01
Acetonitrile	Nitriles	--	< 0.01
Benzophenone	Ketones	--	< 0.01
Cyclohexanone	Ketones	-	0.01
Dimethyl disulfide	Sulfurs	---	0.09
Isophorone	Ketones	-	0.02
Maltol	Pyrans	---	< 0.01
Methanethiol	Thiols	---	0.10
Tributyl phosphate	Esters	--	0.03

表 2-1 の続き

C: 培養 3 週間後			
化合物	分類	変化量 [※]	P 値
1,4-Diacetylbenzene	Ketones	++	< 0.01
1-Hydroxycyclohexanecarboxylic acid	Carboxylic acids	+++	< 0.01
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	Esters	++	< 0.01
2,4,6-Trimethylpyridine	Pyridines	++	0.02
2,6-Di-tert-butylphenol	Phenols	+	0.08
2-Butanone	Ketones	++	< 0.01
2-Octanone	Ketones	+	< 0.01
3-Methyl-3-buten-1-ol	Alcohols	+	0.01
3-Octanol	Alcohols	+	0.01
4-Cyanocyclohexene	Nitriles	+	< 0.01
4-Methylbenzyl alcohol	Alcohols	++	< 0.01
Acetophenone	Ketones	+	< 0.01
Benzaldehyde	Aldehydes	+	0.07
Benzophenone	Ketones	+++	< 0.01
Benzyl alcohol	Alcohols	++	< 0.01
Bisisobutyric acid	Esters	++	0.02
2,4,4-trimethylpentane-1,3-diyl ester	Esters	+++	< 0.01
Carbamic acid, 4-methylphenyl ester	Esters	+++	< 0.01
Cyclohexanone	Ketones	+	0.02
Diethyl ether	Ethers	++	< 0.01
Dimethyl succinate	Esters	+++	0.01
DL-1-Phenylethyl alcohol	Alcohols	++	< 0.01
Ethanol	Alcohols	++	0.09
Furfural	Aldehydes	+	< 0.01
Isobutyric acid 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester	Esters	++	< 0.01
Phenol	Phenols	+	0.04
p-Tolualdehyde	Aldehydes	+	< 0.01
Pyrrole	Pyrroles	+	< 0.01
omega-Caprolactam	Amides	++	< 0.01
2,4-Dimethyl-1-heptene	Hydrocarbons	--	0.01
Maltol	Pyrans	---	0.01

※変化量は非腫瘍細胞株 (WI-38 VA13 および OUS-11) と比べた場合の A549 細胞株における変化量 (+ : 1.5 倍増加、++ : 1.5~3 倍増加、+++ : 3 倍以上増加、- : 1.5 倍減少、-- : 1.5~3.倍減少、--- : 3 倍以上減少) を示す。P 値は ANOVA より求めた。

2-3-2 ヒト肺がんモデルマウスの作出

A549 細胞を移植したマウスの腫瘍は移植後 13 日目から観察できるようになり、そのサイズの継時変化を図 2-3A へ示す。また、マウス体重の継時変化を図 2-3B へ示す。マウスの体重は移植 2 日後に減少が見られたもののその後は順調に増加した。このことから、担がんマウスと対照マウスの成長に大きな差は認められなかった。

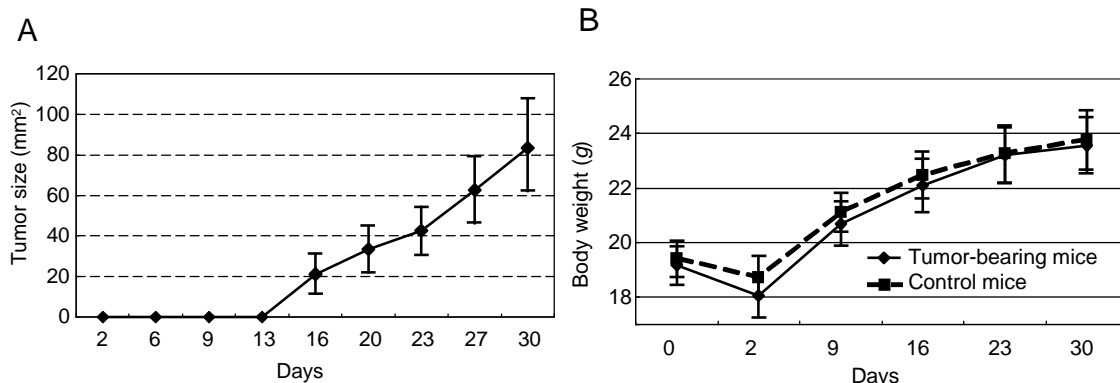


図 2-3 担がんマウスにおける腫瘍サイズと体重の経時変化

A : 腫瘍サイズ (mm²)、B : 体重 (直線 : 担がんマウス、破線 : 対照マウス)

2-3-3 担がんマウスと対照マウス尿に含まれる VOC の比較解析

担がんマウス 24 個体と対照マウス 16 個体から得た尿をそれぞれ一つにまとめた後、HS-SPME を用いて VOC を抽出し、GC-TOF MS を用いて分析した。得られたクロマトグラムの一部を図 2-3 へ示す。得られたクロマトグラムは、グループ間で非常に良く似ており、違いのあるイオンピークを特定することは困難であった。XCMS ソフトウェアを利用して解析を行ったところ、クロマトグラムあたり平均で 1493 イオンピークが含まれていることが明らかとなり、対照マウス尿と比較して担がんマウス尿では 68 イオンピーク ($p < 0.1$ かつ 1.5 倍以上) の面積が有意に増加、65 イオンピーク ($p < 0.1$ かつ 1.5 倍以上) に減少が見られた。これらのイオンピークについて、保持時間を元にしたデコンボリューション解析の結果、増加していた VOC として 76 種類、減少していた VOC 6 種類を特定した。これらの VOC について、スペクトルライブラリー(NIST'08 and Wiley)を用いた類似度検索を行ったところ、43 種類 をアノテーションすることができた (表 2-2)。43 種類の VOC の中で増加していたものは 42 種類であり、減少していたものが 1 種類あった。

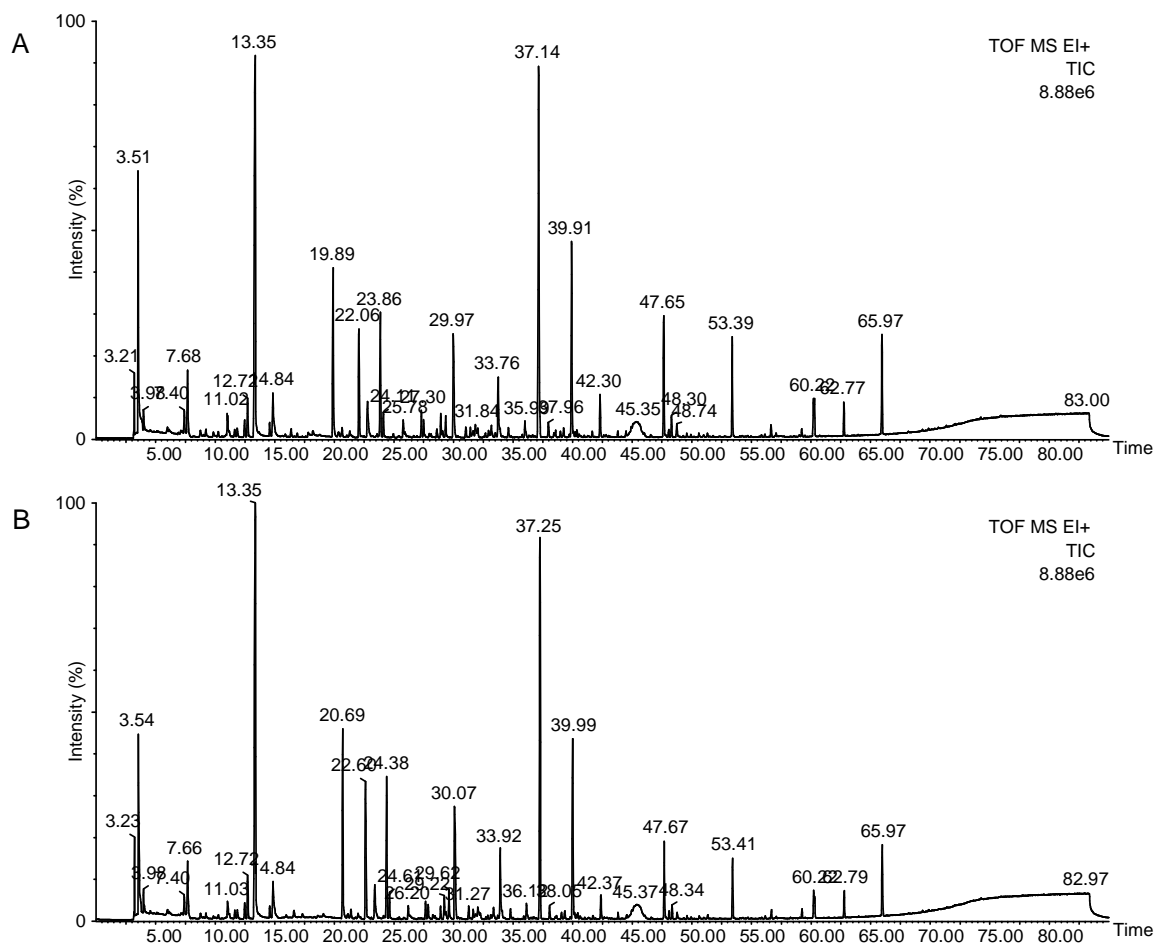


図 2-3 マウス由来尿 VOC のクロマトグラム (TIC)

A : 担がんマウス、B : 対照マウス

表 2-2 担がんマウス尿において増加または減少の見られた VOC 一覧

化合物	分類	変化率*	P 値
1,3-Di-tert-butylbenzene	Ethers	+	0.08
2-(sec-butyl)-4,5-dihydrothiazole	Sulfurs	++	0.01
2,4-Dimethylheptane	hydrocarbons	+	< 0.01
2,5-Dimethylpyrazine	Pyrazines	+	0.07
2,5-Heptanedione	Ketones	+	0.03
2-Acetyl-5-methylfuran	Furans	+	0.02
2-Aminobenzamide	Aldehydes	+	0.05
2-Butanone	Ketones	+	0.02
2-Ethyl-5-methylfuran	Furans	+	0.06
2-Heptanone	Ketones	+	0.04
2-Hexanone	Ketones	+	0.03
2-Methoxy-5-methylthiophene	Sulfurs	+	0.02
2-Methylfuran	Furans	++	0.01
2-Methylpyrazine	Pyrazines	++	0.07
2-Pentanone	Ketones	+	0.09
2-Methyl-6-vinylpyrazine	Pyrazines	++	0.02
3-Hexanone	Ketones	+	0.10
3-Methyl-1-hexen-3-ol	Alcohols	++	0.01
4-Heptanone	Ketones	+	0.03
4-Ketoisophorone	Ketones	+	0.05
4-Methoxyphenol	Phenols	+	0.02
4-Methyloctane	hydrocarbons	+	0.02
5-Hepten-2-one	Ketones	+	0.04
6-Methyl-3-heptanone	Ketones	+	0.03
Acetone	Ketones	+	0.03
Acetophenone	Ketones	+	0.03
Benzaldehyde	Aldehydes	+	0.03
Dimethyl succinate	Esters	+	0.05
Dimethyl trisulfide	Sulfurs	+	0.04
Dimethylamine	Amines	+++	0.10
<i>exo</i> -Brevicommin	Ethers	+	0.03
gamma-Crotonolactone	Esters	+	0.05
gamma-Hexanolactone	Esters	+	0.02
Maltol	Pyrans	+	0.02
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	Amines	+	0.08
<i>N</i> -Benzylidenemethylamine	Amines	+++	0.06
Phenol	Phenols	+	0.01
Phenylacetone	Ketones	+	0.07
<i>p</i> -Toluidine	Amines	+	0.03
Pyrazinamide	Amides	+	0.01
Quinazoline	Quinazolines	+++	0.07
Trimethylamine	Amines	+	0.02
4-Methyl-6-hepten-3-one	Ketones	--	< 0.01

※変化率は対照マウスと比べた場合の担がんマウスにける変化量（+ : 1.5 倍増加、++ : 1.5~3 倍増加、+++ : 3 倍以上増加、- : 1.5 倍減少、-- : 1.5~3 倍減少、--- : 3 倍以上減少）を示す。P 値は ANOVA より求めた。

2-3-4 培養細胞とマウス尿で共通する VOC

増加の見られた VOC の中で、7 種類 (dimethyl succinate、phenol、2-methylpyrazine、2-hexanone、2-butanone、2-pentanone、acetophenone) は A549 細胞株と担がんマウス尿に共通していた。これらの化合物については、ライブラリー検索だけではなく、市販標準品の保持時間とマススペクトルパターンが一致することを確認した。

次に各 VOC を定量するために検量線を作成した。検量線は SPME 法を用いて標準品の各濃度系列を分析し、最も強度の大きかった m/z 値のピーク面積を元にして作成した。検量線は 0.02 μM から 10 μM の範囲で有用な直線性 ($R^2 = 0.99$) を示し、これに基づいて検出限界 (LOD) と定量限界 (LOQ) を決定した。(表 2-3)。

各 VOC の定量結果を表 2-4 (培養液) と表 2-5 (尿) に示す。有意差については ANOVA により確認した。培養 1 週間後、A549 細胞培養液では培地である DMEM と比べて 5 つの化合物 (2-butanone、2-pentanone、dimethyl succinate、acetophenone、phenol) が有意に増加し、2-methylpyrazine については、有意な減少が見られた。一方、OUS-11 細胞培養液と比較した場合は、4 種類 (2-butanone: $p = 0.001$; 2-pentanone: $p = 0.015$; 2-methylpyrazine: $p = 0.012$; dimethyl succinate: $p = 0.023$) が有意に増加していた。また、WI-38 VA13 細胞培養液との比較では 5 種類 (2-pentanone: $p = 0.001$; 2-hexanone: $p = 0.002$; dimethyl succinate: $p = 0.016$; acetophenone: $p = 0.001$; phenol: $p = 0.011$) の有意な増加が観察された。

培養開始 2 週間後の A549 細胞培養液では、DMEM 培地に比べ 2-butanone、2-pentanone、dimethyl succinate、acetophenone そして phenol が有意に増加しており、これに対し 2-methylpyrazine が有意に減少していた。また、OUS-11 細胞培養液と比較した場合、7 種類全ての VOC が有意に増加していた (2-butanone; $p < 0.001$; 2-pentanone: $p < 0.001$; 2-hexanone; $p = 0.008$; 2-methylpyrazine; $p < 0.001$; dimethyl succinate; $p < 0.001$; acetophenone; $p < 0.001$; phenol; $p = 0.001$)。WI-38 VA13 細胞培養液と比較した場合は、5 種類の VOC の増加が確認できた (2-butanone: $p = 0.001$; 2-pentanone; $p = 0.001$; 2-hexanone; $p = 0.039$; dimethyl succinate; $p < 0.001$; acetophenone; $p < 0.001$)。

尿における 7 種類の VOC の定量結果を表 5 に示す。これにより担がんマウスでは 7 種類全ての VOC が対照マウス尿と比較して有意に増加していることが示された

(2-butanone: $p = 0.02$; 2-pentanone: $p = 0.08$; 2-hexanone: $p = 0.02$; 2-methylpyrazine: $p = 0.03$; dimethyl succinate: $p = 0.03$; acetphenone: $p = 0.02$; phenol: $p = 0.01$)。

表3 細胞培養液と担がんマウス尿に共通する増加 VOC 一覧

化合物	分類	標準品の 保持時間 (分)	定量に用いた <i>m/z</i> 値	定量範囲 (μM)	R^2	LOD (μM)	LOQ (μM)
2-Butanone	ketones	10.5	72	0.1-10	0.992	0.058	0.176
2-Pentanone	ketones	14.7	86	0.02-10	0.999	0.006	0.017
2-Hexanone	ketones	19.8	100	0.1-10	1.000	0.014	0.042
2-Methylpyrazine	pyrazines	27.0	94	0.05-10	1.000	0.004	0.013
Dimethyl Succinate	esters	36.3	115	0.1-10	1.000	0.014	0.043
Acetophenone	ketones	38.1	105	0.02-10	1.000	0.033	0.101
Phenol	phenols	45.6	94	0.1-10	1.000	0.011	0.033

検出限界 : limit of detection (LOD)、定量限界 : limit of quantitation (LOQ)

表 4 細胞培養液と担がんマウス尿に共通する増加 VOC の定量結果

A : 培養 1 週間	OUS-11-1w		WI-38 VA13-1w		DMEM		A549-1w		A549 vs. OUS-11		A549 vs. WI-38 VA13		A549 vs. DMEM	
	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/1034)	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/9057)	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/DMEM)
2-Butanone	4.656	0.165	13.826	0.945	0.554	0.104	13.418	1.452	0.001	2.9	0.756	1.0	< 0.001	24.2
2-Pentanone	0.220	0.030	0.384	0.006	0.048	0.003	0.312	0.010	0.015	1.4	0.001	0.8	< 0.001	6.4
2-Hexanone	0.034	0.001	0.043	0.002	0.035	0.002	0.033	0.001	0.256	1.0	0.002	0.8	0.284	0.9
2-Methylpyrazine	< LOD	-	0.004	0.000	0.016	0.003	0.004	0.001	0.012	-	0.337	0.9	0.004	0.2
Dimethyl Succinate	0.046	0.001	0.045	0.001	< LOD	-	0.055	0.004	0.023	1.2	0.016	1.2	< 0.001	-
Acetophenone	0.403	0.026	0.647	0.019	< LOD	-	0.465	0.020	0.055	1.2	0.001	0.7	< 0.001	-
Phenol	0.099	0.002	0.160	0.003	0.041	0.001	0.095	0.020	0.835	1.0	0.011	0.6	0.019	2.3

B : 培養 2 週間	OUS-11-2w		WI-38 VA13-2w		DMEM		A549-2w		A549 vs. OUS-11		A549 vs. WI-38 VA13		A549 vs. DMEM	
	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	平均 (μM)	標準 偏差	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/1034)	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/9057)	P 値 (ANOVA)	変化率 (A549/DMEM)
2-Butanone	4.293	0.184	8.971	0.761	0.767	0.120	14.616	0.570	< 0.001	3.4	0.001	1.6	< 0.001	19.1
2-Pentanone	0.158	0.003	0.203	0.024	0.031	0.002	0.363	0.016	< 0.001	2.3	0.001	1.8	< 0.001	11.6
2-Hexanone	0.030	0.000	0.033	0.000	0.034	0.002	0.037	0.002	0.008	1.2	0.039	1.1	0.150	1.1
2-Methylpyrazine	< LOD	-	0.004	0.001	0.015	0.003	0.004	0.000	< 0.001	-	0.750	1.0	0.005	0.3
Dimethyl Succinate	0.043	0.000	< LOD	-	< LOD	-	0.052	0.001	< 0.001	1.2	< 0.001	-	< 0.001	-
Acetophenone	0.245	0.004	0.311	0.015	< LOD	-	0.561	0.015	< 0.001	2.3	< 0.001	1.8	< 0.001	-
Phenol	0.077	0.006	0.120	0.005	0.031	0.001	0.129	0.005	0.001	1.7	0.144	1.1	< 0.001	4.1

各 VOC 濃度は作成した検量線から決定した。P 値は ANOVA によって求めた。変化率は A549 細胞培養液と他の培養液の濃度比を示す。

表 5 がん細胞培養液と担がんマウス尿で共通する増加 VOC の担がんマウス尿における定量結果

化合物	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		P 値 (ANOVA)	変化率 (tumor/control)
		平均濃度 (μM)	標準偏差	平均濃度 (μM)	標準偏差		
2-Butanone	10.5	8.808	1.154	13.226	1.297	0.02	1.5
2-Pentanone	14.7	2.180	0.209	2.599	0.142	0.08	1.2
2-Hexanone	19.8	0.085	0.016	0.134	0.010	0.02	1.6
2-Methylpyrazine	27.0	0.201	0.029	0.455	0.109	0.03	2.3
Dimethyl Succinate	36.3	0.237	0.017	0.334	0.038	0.03	1.4
Acetophenone	38.1	2.310	0.499	3.912	0.399	0.02	1.7
Phenol	45.6	1.824	0.207	2.722	0.213	0.01	1.5

各 VOC 濃度は作成した検量線から決定した。P 値は ANOVA によって求めた。変化率は担がんマウスと対照マウスの濃度比を示す。

2-4 考察

本章では、3種類の細胞株（A549、OUS-11、WI-38 VA13）に由来する VOC と A549 細胞を移植した担がんマウス尿および対照マウス尿に由来する VOC を HS-SPME 法によって回収し、GC-MS を用いた分析を行った。SPME 法は簡便かつ高感度な方法であり迅速かつ非侵襲な診断を実現する上で適しており、ppt レベルでの VOC の検出が可能とされている。SPME 法に用いたファイバーは、尿に含まれる VOC のピークがなるべく多く検出できるように、最も吸着剤の大きな 2cm の DVB/CAR/PDMS を選択した。このファイバーを用いて、それぞれのサンプルのヘッドスペース中に含まれる成分について分析を行った。

肺がんに関連する VOC の研究は他の研究者らによっても行われている⁴³⁻⁴⁸。しかしながら、検出された VOC が内因性であった場合、それらが腫瘍細胞に直接由来するののか、腫瘍細胞に由来する成分がさらに何らかの代謝を受けた結果として生成したものかについては明らかとなっていない。さらに、いくつかの化合物については外因性の可能性も否定できていない。そこでこの章では、ヒト由来肺がん細胞株（A549）と非腫瘍細胞株（ヒト肺正常細胞である OUS-11 と形質転換細胞である WI-38 VA13）に由来する VOC の比較によって肺がん細胞に直接由来する特徴的な VOC を探索した。その結果、得られた VOC の組成は細胞株ごとに異なっており、さらに培養期間ごとにも異なっていることが明らかとなった。非腫瘍細胞株と比較して A549 細胞株で増加していた化合物は、1 週間では 18 化合物、2 週間では 31 化合物、3 週間では 28 化合物であった。これらの化合物は、ケトン類が最も多く、次にアルコール類が多かった。培養期間 1 週間ではアルコール類である 1-methoxy-2-propanol、2-phenyl-2-propanol、ethanol が非腫瘍細胞群と比較して最も大きく増加していた。また、培養期間 2 週間では 1-dodecanol、dimethyl succinate が大きく増加していた。そして、培養期間 3 週間で大きく増加していた化合物は 1-hydroxycyclohexanecarboxylic acid、benzophenone、carbamic acid 4-methylphenyl ester、dimethyl succinate の 4 種類が観察された。しかしながら、3 週間の培養では多くの細胞が死んで培養液中に浮いた状態になっており、培地の色は黄色くなっていた。従って、このような状態で得られた VOC の違いというのは本来の姿を反映していないと考え、本章では解析対象から除外した。

培養 1 週間および 2 週間後に共通して増加していた化合物は、dimethyl succinate、diethyl ether、ethanol、2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate、isobutyric acid 2-ethyl-3-hydroxyhexyl ester、2-butanone、1-dodecanol、3-butene-2-one、orthoformic acid tri-sec-butyl ester、そして 2,5-hexanedione の 10 種類であった。今回観察された化合物の中には、可塑剤と思われる化合物（例えば 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate）も含まれており、外因性である可能性を考慮する必要がある。

今回観察された ethanol は、実験条件は異なるが、Filipiak からも同様に A549 細胞株で増加していることを報告している⁴⁹⁾。その一方で、今回の結果では Filipiak らの結果と異なる化合物も観察されており、培養条件や抽出方法（加熱脱着法と SPME 法）の違いがその違いの理由として考えられる。2-Butanone は、肺癌細胞株である NCI-H2087 および CALU-1 の培養液中で多くなっていることが示されている^{40,41)}。また、Sponring らは 2-butanone が肺癌患者の呼気において増加することを認めている⁴¹⁾。

今回の研究から、細胞株の違いによって、得られる VOC の種類や濃度に違いが見られた。さらに、肺癌細胞株で特徴的に増加している VOC が観察された。それら VOC の由来については不明であるが、がん細胞特有の VOC パターンの存在を明らかにした。

さらに本章では、ヒト肺癌モデルマウスを作成し、これに由来する尿中の VOC についても分析を行った。ヒト肺癌モデルマウス尿と対照マウス尿の VOC を比較したところ、43 化合物に違いが見られ、この中の 42 化合物は対照マウス尿と比較してヒト肺癌モデルマウス尿で増加していた。松村らはマウス肺癌モデルを作成し、尿に含まれる特徴的な VOC をいくつか特定した結果、2-heptanone、5-heptene-2-one がマウス肺癌モデルと対照マウスを識別するために有用な VOC であると報告している¹⁴⁾。これらの化合物は、今回の結果においても担がんマウス尿において増加しているとして特定された成分に含まれている。

担がんマウス尿と A549 細胞株の両方に共通して増加する VOC として 7 種類の VOC (dimethyl succinate、2-pentanone、phenol、2-methylpyrazine、2-hexanone、2-butanone、acetophenone) が認められた。肺癌細胞移植後 25-30 日の担癌マウスは、その移植後の時間を考慮すると、細胞の播種からコンフルエントな状態になるまで数日を要する培養 2 週間の培養細胞と比較するのが妥当であろうと考えて、それらに共通する成分を考

察した。A549 細胞株培養液において有意な増加が確認された 2-butanone、2-pentanone、dimethyl succinate、phenol、acetophenone は有用な肺がんマーカー候補と見なすことができる。一方で、2-methylpyrazine と 2-hexanone については、培養 2 週間の A549 細胞株において増加成分として検出されなかったことから、今回は肺がんマーカー候補から除外した。候補とした 5 化合物のうち 2-butanone および acetophenone については、ヒトの肺がん患者の呼気から検出されている⁵⁰⁾。さらに、benzaldehyde、2-butanone、acetophenone が 80%の感度と 100%の特異度で肺がん患者を識別できる呼気中肺がんバイオマーカーの構成成分として報告されている⁵¹⁾。

以上、本章では、肺がん細胞が放出する VOC が尿中へ移行する可能性が示唆された。また、揮発性肺がんマーカー候補は 1 種類だけでなく、複数の化合物が候補となることが明らかとなった。

第3章 ヒト肺癌患者の尿に含まれる揮発性肺癌マーカー候補化合物の探索

3-1 緒論

緒言で述べた通り、肺癌に関連するバイオマーカーとして血液、唾液、尿などからある種のタンパク質、腫瘍抗原、抗腫瘍抗体、特異的なペプチド、低分子代謝産物、DNA、RNA など様々な化合物が得られ、利用されている⁵²⁾。また前章で述べた通り、近年では、においに着目した肺癌診断が注目されており、ほとんどが呼気または血液に由来する VOC を対象としている。呼気中に含まれる肺癌に特徴的なにおいに関しては、固相マイクロ抽出法 (Solid phase micro extraction: SPME) とガスクロマトグラフ質量分析計を用いて肺癌患者の呼気が調べられており、1-butanol と 3-hydroxy-2-butanone の濃度が対照者と比べて有意に増加していることが見いだされている。これらは呼気中の揮発性肺癌マーカー候補化合物として注目されている⁴⁵⁾。

においに着目する場合、血液や呼気に加え尿も有望な分析対象と考えられる。血液は採血を必要とすることから非侵襲とは言えない。また呼気は非侵襲かつ簡便に収集できる分析対象であるけれども、その保存や運搬が困難であるという課題がある。それらの検体に対して、尿は非侵襲で得られ、その収集、保存そして運搬の点で検体として取り扱いやすいという利点がある。これまでに尿のにおいと肺癌との関連について研究報告はないが、本研究の第1章で示したように、ヒトの尿を使った肺癌診断の実現可能であり、第2章では、担がんマウスに特徴的ないくつかの尿中揮発性化合物を特定し、特にアルコール類およびケトン類が多く含まれることを明らかとした。さらに、担がんマウスを特徴付ける尿中 VOC のいくつかは、肺癌細胞から直接得られた VOC と共通していることも明らかとなった。そこで本章では、肺癌患者と対照者から得られた尿のにおいに関して、GC-TOF MS を用いた代謝物プロファイリングを行い、肺癌患者を特徴付ける尿中 VOC の同定を目的として研究を行った。対照者には、肺癌患者を特徴付けている VOC が、肺癌のみに特異的であること確認するため、肺癌以外の肺疾患患者 (慢性閉塞性肺疾患、喘息) を含めた。

3-2 方法

3-2-1 尿サンプル

米国 Pennsylvania Medical Center にて、肺癌患者 20 名と対照者 20 名から尿を収集した (表 3-1A)。各肺癌患者の確定診断は気管支鏡検査法と生検を用いて行った。肺癌のステージおよび転移の有無については、AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, 6th Edition に従った⁵³⁾。組織学的な診断と肺癌の状態は表 3-1B に記載し、対照者については表 3-1C に記載した。また、対照者には、肺癌患者を特徴付けている VOC が、肺癌のみに特異的であること確認するため、肺癌以外の肺疾患患者 (慢性閉塞性肺疾患、喘息) を含めた。収集した尿はすぐに -80°C で凍結し、分析に供するまで保管した。分析に際しては低分子化合物 (3000 Da 以下) を得ることを目的として、限外ろ過処理を行った。処理には、30-kDa、10-kDa、3-kDa のフィルター (Amicon YM-30、YM-10、YM-3 ; Milipore) を順次使用しそれぞれ 13,000 g で 10 分間濾過操作をおこなった。

3-2-2 SPME 法を用いた尿中揮発性有機化合物の抽出

VOC の抽出には、吸着剤部分の長さ 2 cm かつ厚さ 50 μm の DVB (divinylbenzene) 層と厚さ 30 μm の CAR/PDMS (carboxen/polydimethylsiloxane) 層の二重構造の SPME ファイバーを用いた。抽出に用いた尿サンプルの量は 100 μL とし、揮発性成分の抽出操作は、第 2 章の 2-2-3 と同様の方法で行った。

3-2-3 ガスクロマトグラフィ質量分析

GC-TOF MS には、オートサンプラー Combi-pal (CTC Analytics 社製) を備えた 7890aGC (Agilent 社) を使用し、飛行時間型質量分析計は GCT Premier (Waters 社) を用いた。抽出後の SPME ファイバーはオートサンプラーを用いて注入口へ挿入し、VOC の導入を行った。カラムは特別に製作した 2 m のトランスファーラインを持つ InertCap[®]5 (60 m + 2 m transfer line、0.25 mm i.d.、0.25 μm thick; GL science 社) を用いた。オープン温度は 40°C で 5 分間保持した後、240°C まで 5°C/min で昇温させ、最後に 240°C で 5 分間保持した。キャリアーガスにはヘリウムガスを用い、流速は 1 mL/min とした。注入口温

度は 240°Cとし、注入法はパルスドスプリットレス（パルスド圧力：200 kPa、パージ時間：5分）を用いた。注入口ライナーは内径 0.75 mm の SPME 用ガラスライナーを用いた。質量分析計の測定条件は、イオン化法：電子イオン化 (70 eV)、イオン源温度：200°C、測定範囲： m/z 40-500 とした。

3-2-4 データ解析と定量解析

データ解析および定量解析は、第 2 章の 2-2-5 と同様の方法で行った。

3-2-5 統計解析

識別能力（特異度と感度）の評価には、ROC 曲線(Receiver Operatorating Characteristic curve、受信者動作特性曲線)の曲線下面積(AUC: area under the curve) を利用した。ROC 曲線は Fawcett algorithm を参考に R 上で作成した⁵⁴⁾。また肺がん患者の尿に特徴的なパターンを見出すために、R のパッケージである“prcomp”を利用した主成分分析 (principal components analysis; PCA) を行った。

表 3-1：研究に用いたサンプル

A：検体の特徴	肺がん患者	対照者
検体数	20	20
平均年齢 (標準偏差)	68.5 (9.0)	50.5 (12.1)
性別 (男性/女性)	12/8	8/12
現在喫煙者数	4	11
過去喫煙者数	14	4

B：肺がんの分類とステージ	検体数
分類	
腺がん	10
扁平上皮がん	6
非小細胞肺がん (鑑別不可)	3
大細胞肺がん	1
ステージ	
I	8
II	3
III	9

C：対照者の診断結果	検体数
対照者	8
慢性閉塞性肺疾患 (COPD)	4
心疾患	2
喘息	2
高血圧	2
甲状腺疾患	1
胸膜線維症 (良性)	1

3-3 結果

3-3-1 肺がん患者および対照者由来の尿中 VOC の比較解析

肺がん患者 20 名および対照者 20 名の尿サンプル (100 μ L) を HS-SPME GC-TOF MS を用いて分析した。得られた total ion current (TIC) には非常に多くのイオンピークが

含まれており、肺癌患者と対照者のイオンピークを一つずつ比較していくのは不可能である。そこで、XCMS というソフトウェアを利用して肺癌患者に特徴的に見られるイオンピークの探索をおこなった。XCMS は得られた分析データからイオンピークのマッチング、保持時間のアライメント、およびイオン強度の比較解析を行うソフトウェアである。

XCMS を用いて各イオンピークの保持時間、 m/z 値、強度、肺癌患者と対照者を比較したときの Student's t -test 値、変化率をデータとして含むリストを作成して解析した。その結果、それぞれの尿サンプルから得られる一つのクロマトグラムには、約 940 イオンピークが含まれることが明らかとなった。肺癌患者尿に含まれるイオンピークのうち対照者と比較して P 値 < 0.05 かつ 1.5 倍以上増加したものを抽出した結果、101 イオンピークが選ばれた。さらにこれらのイオンピークについて、目視によるデコンボリューション解析を行い、19 種類の VOC を抽出した (表 3-2)。これらの VOC について、マススペクトルライブラリー (NIST 08 and Wiley) を利用した化合物のアノテーションを試みた結果、高い類似度を示す 9 種類の化合物が特定できた。残り 10 種類については類似度が低く特定することが出来なかった。9 種類の化合物については、市販標準品を用いて保持時間とマススペクトルパターンが一致することを確認し、同定した (表 3-3)。

3-3-2 定量解析

9 種類の尿中濃度を決定するために、HS-SPME 法を用いた検量線を作成した。検量線は、最も強度の大きかった m/z 値のピーク面積から作成した。作成した検量線は各 VOC において 10 nM ~ 10,000 nM の範囲で直線性 ($R^2 = 0.99$) を示した。作成した検量線を使って定量した各 VOC の尿中濃度を表 3-4 に示す。9 種類の VOC は全て肺癌患者グループと対照者グループの間で P 値が 0.05 以下の有意差を有しており、特に tetrahydrofuran、2-chloroethanol、cyclohexanone、2-ethyl-1-hexanol、2-phenyl-2-propanol、isophorone の 6 化合物については P 値が 0.01 以下となった。

表 3-2 肺がん患者において有意な増加が認められた尿中 VOC 一覧

VOCs	観察された m/z 値	保持時間 (分)	定量用イオン ^a (m/z)	増加率 ^b	P 値 ^c
1	42、71	5.1	42	7.6	< 0.01
2	48、49、80	5.8	48	11.6	< 0.01
3	41、42、51、53、55、58、66、67、68、70	6.6	55	2.5	0.01
4	94	12.4	94	9.4	0.03
5	50、51、52、53、54、55、56、61、63、65、66、67、68、79、80、81、94、96、97、98、99	15.2	98	8.1	< 0.01
6	101	17.8	101	5.2	< 0.01
7	41、42、43、53、55、56、57、67、68、69、70、81、82、83、84、110、112	20.5	57	2.3	< 0.01
8	53、55、67、68、69、81	21.4	69	2.2	< 0.01
9	78、89、103、115、116、117、118、121	22.5	118	2.8	< 0.01
10	82	23.6	82	6.8	< 0.01
11	106、120、121	25.2	121	10.8	< 0.01
12	158	28.5	158	3.8	< 0.01
13	160	29.4	160	8.4	< 0.01
14	127、145	29.8	145	2.3	0.01
15	164	30.8	164	17.7	0.02
16	64、116、127、129、130、141、142、143、144、157、158、159、161、176	31.2	116	7.3	< 0.01
17	156、157、158	33.2	157	1.8	< 0.01
18	160	33.9	160	1.8	< 0.01
19	93、104、149、177、178	36.7	149	7.6	0.01

a)はピーク面積を算出するために用いた。b)は平均ピーク面積を元に算出した。c)は Student's *t*-test より求めた。

表 3-3 肺がん患者尿において有意に増加する VOC として同定できた化合物

VOCs	分類	保持時間 (分)
Tetrahydrofuran	Furan	5.1
2-Chloroethanol	Organochlorine	5.8
2-Pentanone	Ketone	6.6
2-Methylpyrazine	Pyrazine	12.4
Cyclohexanone	Ketone	15.2
2-Ethyl-1-hexanol	Fatty alcohol	20.5
2-Phenyl-2-propanol	Alcohol	22.5
Isophorone	Ketone	23.6
2,6-Diisopropylphenol	Phenol	30.8

表 3-4 各 VOC の尿中濃度

VOCs	肺がん患者グループ			対照者グループ			P 値
	平均(nM)	最小(nM)	最大(nM)	平均(nM)	最小(nM)	最大(nM)	
Tetrahydrofuran	330.26	67.50	1913.93	43.38	0	390.90	< 0.01
2-Chloroethanol	846.09	0	1782.92	73.03	0	1470.00	< 0.01
2-Pentanone	1894.16	110.75	4701.70	762.26	50.68	6078.06	0.01
2-Methylpyrazine	207.02	0.80	1457.50	22.04	0.69	157.27	0.03
Cyclohexanone	3360.51	196.16	7382.86	413.31	171.99	3672.71	< 0.01
2-Ethyl-1-hexanol	1313.13	747.65	3274.08	579.54	313.67	2564.95	< 0.01
2-Phenyl-2-propanol	767.55	190.12	1786.08	272.89	108.93	1718.72	< 0.01
Isophorone	881.83	36.40	2807.27	130.00	39.29	1411.86	< 0.01
2,6-Diisopropylphenol	10.46	0.10	66.01	0.59	0.08	9.99	0.02

P 値は Student's *t*-test によって得た。

3-3-3 識別能力の評価

得られた 9 種類の VOC について、個々の識別能力を ROC 曲線から評価した (表 3-5)。ROC 曲線は臨床研究において、しばしばマーカーの有用性評価に用いられる手法である。ROC 曲線では、偽陽性率と偽陰性率の平均を **Balanced Error Rate (BER)** といい、この値が最小となる濃度を陽性または陰性を判定する閾値 (カットオフポイント) として算出できる。さらに、ROC 曲線によって、対照者を正しく陰性と判定できる「特異度 (真陰性数÷全体数)」および肺がん患者を正しく陽性と判定できる「感度 (真陽性数÷全体数)」を得ることができる。そこで、9 種類の VOC それぞれを用いて、ROC 曲線により肺がん患者 20 名および対照者 20 名を評価したところ、95%以上の感度と特異度を併せ持つものとして、2-ethyl-1-hexanol (閾値 747.65 nM)、tetrahydrofuran (閾値 87.9 nM)、2-chloroethanol (閾値 295.42 nM)、cyclohexone (閾値 1,404.55 nM)、isophorone (閾値 249.96 nM) の 4 化合物が該当した。このうち 2-ethyl-1-hexanol については特異度 100%と高い値を示した。これに対して 2-phenyl-2-propanol (閾値 386.8 nM) と 2,6-diisopropylphenol (閾値 0.25 nM)の感度と特異度はそれぞれ 95%と 90%とやや低かった。さらに 2-pentanone(閾値 1,331.48 nM)の感度と特異度はそれぞれ 85%および 70%であり、2-methylpyrazine (閾値 59.6 nM) はそれぞれ 95%と 70%であった。

表 3-5 ROC 解析の結果

VOCs	閾値 (nM)	感度	特異度	AUC
Tetrahydrofuran	87.90	95%	95%	0.96
2-Chloroethanol	295.42	95%	95%	0.93
2-Pentanone	1331.48	85%	70%	0.81
2-Methylpyrazine	59.60	95%	70%	0.79
Cyclohexanone	1404.55	95%	95%	0.92
2-Ethyl-1-hexanol	747.65	95%	100%	0.95
2-Phenyl-2-propanol	386.80	95%	90%	0.93
Isophorone	249.96	95%	95%	0.91
2,6-Diisopropylphenol	0.25	95%	90%	0.95

3-3-4 VOC による診断能力

9 種類の VOC 濃度を用いて主成分分析 (PCA) を行った。その結果、図 3-1 に示すように、主成分分析スコアのプロットは 肺がんグループと対照者グループを 2 つの領域に分離した。ただしこの分離に寄与するのは PC1 のみであった。この PCA モデルの頑健性を確認するために、PC1 スコアの値を使って ROC 解析を行ったところ、AUC 値は 0.955 となり、高い診断能力を有していることが明らかとなった。

次に、組織学的な識別の可能性を評価するために、腺がん患者と扁平上皮がん患者の 9 種類の VOC 濃度を用いて主成分分析を行った。その結果、腺がん患者のプロットは比較的狭い領域に集中している一方、扁平上皮がん患者のプロットは広い範囲に分散していた (図 3-2)。さらに、腺がん患者に最も寄与している化合物は 2-pentanone であることが示された。そこで、腺がん患者と扁平上皮がん患者の尿中 2-pentanone 濃度を用いて ROC 解析を行ったところ、AUC 値は 0.766 となり、感度と特異度はそれぞれ 100% と 70% であった。このことは、尿中の 2-pentanone 濃度によって、腺がんと扁平上皮がんが区別できるかもしれないことを示している。

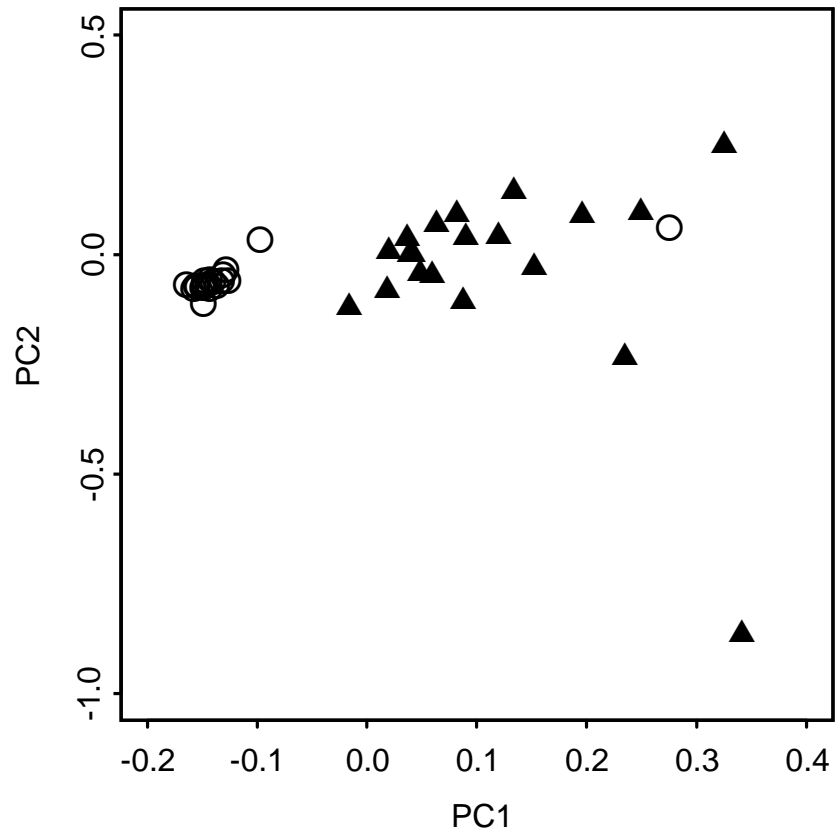


図1 肺がん患者と対照者のPCAスコアプロット

PCAスコアプロットは対照者(○)と肺がん患者(▲)の各VOC濃度を元に作成した。

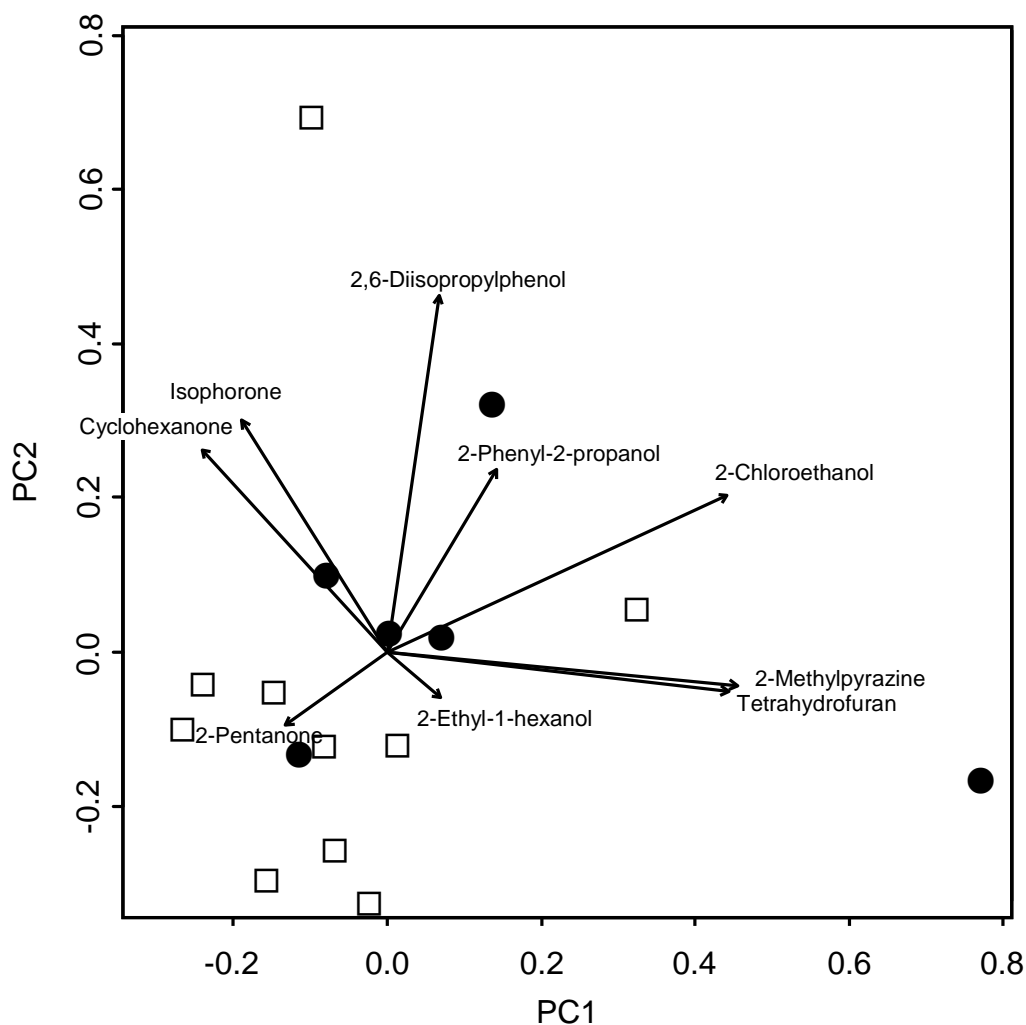


図2 腺がん患者と扁平上皮がん患者のPCAスコアプロット

PCAスコアプロットは腺がん患者(□)と扁平上皮がん患者(●)の各VOC濃度を元に作成した。矢印は各VOCの寄与度ベクトルを示している。

3-4 考察

従来用いられてきた腫瘍マーカーはタンパク質断片や抗体などの高分子化合物である。これらのマーカー分子検出は血液を試料とするのが一般的で、採血が必要となる。しかし採血のような侵襲的方法は、被験者にとって肉体的な苦痛を伴うことが多く、それにかわる簡便かつ非侵襲的に得られる試料を用いる手法が望まれている。そこで本研究では、この条件に当てはまる試料としての尿に着目し、肺がん患者と対照者を区別で

きる可能性を持つにおい成分 (VOC) の探索を試みた。

尿中 VOC の抽出には SPME 法を採用した。SPME 法は溶媒を必要とせず、水溶液中の VOC を容易に抽出できる方法である。SPME 法に用いるファイバーには数種類 (CAR/PDMS、DVB/CAR/PDMS、PDMS/DVB、Polyacrylate など)あり、対象となる VOC の種類に応じて選択可能である。第 2 章で 2 cm の DVB/CAR/PDMS ファイバーがマウス尿に含まれる揮発成分の分析に最適であることを示した結果に基づき、本章においても同じ SPME ファイバーを用いた。DVB/CAR/PDMS ファイバーは極性の divinylbenzene (DVB)、無極性の polydimethylsiloxane (PDMS)、carboxen (CAR)から構成されている SPME ファイバーである。

GC-MS 分析により肺がん患者と対照者の尿中 VOC を比較解析した結果、揮発性肺がんマーカー候補として 9 種類の成分を同定した。さらに、これらの VOC について、ROC 曲線の AUC 値を指標としてマーカーとしての診断能力を評価するために、これまでの臨床研究から AUC 値を指標とした診断能力の評価の有用性が数多く報告されている^{25, 53)}。AUC 値は 0.5 から 1 の範囲をとり、0.5 の場合は診断能力なし、 $0.5 < \text{AUC} < 0.7$ の場合では診断能力は低い、 $0.7 < \text{AUC} < 0.9$ の場合は中程度そして、 $0.9 < \text{AUC} < 1$ の場合は診断能力が高いと評価される。本研究において、0.9 以上の AUC 値を示した VOC は tetrahydrofuran (0.96)、2-chloroethanol (0.93)、cyclohexanone (0.92)、2-ethyl-1-hexanol (0.95)、2-phenyl-2-propanol (0.93)、isophorone (0.91)、2,6-diisopropylphenol (0.95) で、これらは、高い精度の肺がん診断に有用である。

2-Pentanone の AUC 値は 0.9 以上ではなかったが、腺がん患者と扁平上皮がん患者の主成分分析結果から、腺がん患者の尿の特徴に最も寄与している化合物は 2-pentanone であることが明らかとなった。そこで、腺がん患者と扁平上皮がん患者の尿中 2-pentanone 濃度を用いて ROC 解析を行ったところ、AUC 値は 0.766 となり、感度と特異度はそれぞれ 100%と 70%であった。この結果は、尿中の 2-pentanone 濃度が腺がん と扁平上皮がんを区別できる指標となる可能性を示している。

過去の報告では、呼気や血液から検出される様々な VOC が肺がんの揮発性バイオマーカー候補として報告されており^{17-20, 5-48, 55, 56)}そのほとんどはアルカン類やベンゼン誘導体である。Phillips らは、呼気を対象として、肺がん患者の呼気中には分枝炭化水素

類やアルカン類が豊富に含まれることを報告している²⁰⁾。一方アルデヒド類として、hexanal と heptanal が肺がん患者の血液に含まれる揮発性のマーカー候補として報告されている¹⁸⁾。これに対して本章において揮発性肺がんマーカー候補として同定した 9 種類の VOC は、ケトン類 (2-pentanone、cyclohexanone および isophorone) が最も多く、アルコール類 (2-ethyl-1-hexanol および 2-phenyl-2propanol) がそれに続いた。今回の結果がこれまでの呼気や血液で報告されている結果と異なっていた理由としては、①サンプル収集環境の違い、②VOC の抽出および分析方法の違い、③検体 (呼気、血液、尿) の違いが考えられる。

①サンプル収集環境の違いについては、本研究で尿サンプルを収集した医療機関が一カ所だけであったことから、患者にのみ共通する要因 (例えば食事、病室環境、医薬品) が影響した可能性が考えられる。従って得られた VOC のいくつかは肺がんに関連するものではなく、外因性の可能性が否定できない。実際、同定した VOC の一つである 2,6-diisopropylphenol はプロポフォールという麻酔薬である。また、2-chloroethanol は医療器具の消毒に用いられており⁵⁶⁾、2-phenyl-2-propanol は cumene または phenobarbital の代謝産物である⁵⁷⁻⁵⁹⁾。phenobarbital は抗不安薬であり、抗不安薬は肺がん患者の不安を軽減するために処方され場合がある。

Isophorone (3,5,5-trimethyl-2-cyclohexene-1-one)は無色透明な液体であり、ペパーミントの様なにおいである。この化合物は多様な工業製品 (例えばワックス、オイル、農薬、インクなど) に用いられており、どこにでも存在する可能性がある⁶⁰⁾。ヒトの尿から直接検出されている報告があるが^{61, 62)}、これも外因性であることを否定できない。Cyclohexanone は cyclohexane の酸化物である。Cyclohexanone は Phillips らが肺がん患者の呼気に含まれているマーカーのひとつとして報告しているが¹⁹⁾、今回 cyclohexanone が呼気ではなく尿から検出された理由としては、Cyclohexane よりも水溶性が高いことによると考えられる。しかし Westhoff らは COPD 患者 (肺がんを併発している患者含む) の呼気を分析し、cyclohexanone の濃度で診断できる可能性を示している⁶³⁾。一方で、cyclohexanone が輸液セットに由来する汚染物質であるとする報告もあり^{64, 65)}、今のところ cyclohexanone が外因性であることを完全には否定できないので、今回は揮発性肺がんマーカー候補から除外したが、今

後さらに検討が必要である。

Tetrahydrofuran および 2-methylpyrazine はタバコに由来し、喫煙者の尿で検出されている^{66,67)}。肺癌患者および対照者のどちらもタバコの煙にさらされる可能性は共通にあり、必ずしも肺癌患者にのみ特異的な環境要因とは言えない。さらに喫煙と発がんに関連関係があることはよく指摘されることであるため、少なくとも最初のスクリーニングにおいてはタバコに由来する化合物を肺癌患者の内因性マーカーとして利用できると考えた。

揮発性肺癌マーカーとして同定されている VOC の生物学的意義については明らかにされていないが、肺癌細胞株である NCI-H2087 や A549 の培養液からは、がん細胞に特徴的な VOC として 2-methylpentane、2-ethyl-1-hexanol、2-pentanone が同定されている^{19,45)}。従って、本章で同定した 2-ethyl-1-hexanol や 2-pentanone は肺癌細胞が産生した VOC である可能性は十分に考えられる。

呼気ガスを収集、分析することは技術的に困難であるのに対して、尿はスクリーニングにとって使いやすい検体である。本章では尿に肺癌マーカー候補となるいくつかの VOC が存在することを示し、特に 2-ethyl-1-hexanol、2-pentanone、tetrahydrofuran、2-methylpyrazine は肺癌のスクリーニング用マーカーとして有用であることを示すことができた。これは、新しい簡便かつ非侵襲的な肺癌診断法の実現可能性を示すもので、重要な知見と言える。今後は、大規模な試験によってこれらのマーカーとしての有用性をさらに評価する必要がある。

第4章 マウス尿中肺がんマーカー候補選定のための前処理法

4-1 緒言

第2章および第3章では、マウスおよびヒトの尿に含まれるVOCをSPME法で抽出し、いくつかの揮発性肺がんマーカー候補化合物を同定した^{68, 69}。SPME法は、Pawliszynらによって開発され、溶媒を必要としないVOCの簡便な抽出および濃縮方法である⁷⁰。しかしながら、試料中に含まれる塩濃度、夾雑物の有無、pHなどの要因がその抽出効率に影響すると考えられ、これらの要因を適切に制御できればさらに効率的なVOCの抽出が可能となる。本研究で用いているようなヘッドスペース/SPME法において、溶液中のVOCのSPMEファイバーへの分配係数を高める最も有効な手段は、目的とするVOCの溶解性を下げることであり、塩化ナトリウムの添加による塩析効果や水酸化ナトリウム添加によるpHの上昇が良く用いられる。また、VOCはタンパク質や脂質に吸着されやすいことが知られているため、加熱処理によるこれらの夾雑物の変性および分解がVOCの気相への分配係数の改善に効果があると考えた。

本章では、SPME法による揮発性マーカー候補化合物の抽出効率を改善するために、これらの手法を組み合わせた5種類の前処理方法を用い、その影響を調べた。前処理方法の評価には、今回新たに特定した担がんマウスを特徴付ける21種類VOCを用いて、その抽出効率の変化を指標として行った。

4-2 方法

4-2-1 担がんマウスの作成と尿の収集

用いた担がんマウスの作成と尿の収集は第2章の2-2-2に記載した方法と同様である。尿サンプルはA549細胞の移植後21日目から25日目のものを用い、氷上で融解した後、複数の尿サンプルを1.5 mL容チューブへまとめ、分析に用いた。

4-2-2 前処理方法の検討

試料は全て2 mL容クリンプトップバイアル (12 × 32 mm) に入れ、オートサンプラーを用いて分析を行った。試料として無処理群、塩化ナトリウム添加群、加熱処理群、塩

化ナトリウム添加+加熱処理群、水酸化ナトリウム添加+加熱処理群、水酸化ナトリウム+塩化ナトリウム+加熱処理群を用意した。塩化ナトリウム添加は、バイアルあたり飽和量の塩化ナトリウムを加えた。加熱処理は、試料を入れ密栓したバイアルをホットドライバスにセットし、120°Cで60分加熱した。水酸化ナトリウム添加は、バイアルあたり10 M水酸化ナトリウム20 μ Lを加えた。

4-2-3 ヘッドスペース-固層マイクロ抽出 (HS-SPME) による VOCs の抽出

SPMEファイバーは、2 cm 50/30 μ m divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (SUPELCO 社) を用いた。尿中の揮発成分の捕集は、サンプルを入れたバイアルをオートサンプラーCombi-pal (CTC Analytics 社) へセットし、10分間平衡化させた後、SPMEファイバーをヘッドスペース中へ挿入することにより行った。抽出時間および温度はそれぞれ50分、45°Cとした。抽出後のファイバーはGC注入口へ挿入後、コンディショニングを兼ねて240°Cで10分間吸着成分の加熱脱離を行った。

4-2-4 分析条件

GC-TOF MSによる分析は、第2章の2-2-4に記載した方法と同様に行った。ピークのアノテーションにはマススペクトルライブラリーであるWiley Registry 9th Edition/NIST 08 [NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST 08); mass spectral library of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites Wiley, USA]を用いた。分析は1つのサンプルに対して3回行った。

4-2-5 ディファレンシャル解析

ピーク面積はMassLynx 4.1 (ウォーターズ社) を用いて計算した。ディファレンシャル解析には第2章の2-2-5に記載した方法を用いた。XCMS分析は、R2.10.1 (<http://cran.r-project.org/>)上で行い、バンド幅を10 (bw = 10)にし、それ以外の設定値は初期値を用いた。

4-3 結果および考察

4-3-1 揮発性肺がんマーカー候補の特定

本研究では、作成したヒト肺がんモデルマウスの全てにおいて安定した腫瘍の成長が確認でき始めた移植後21日-25日目の尿を用いた。肺がんモデルマウス (n = 24) および対照マウス (n = 16) の尿サンプル (200 μ L, n = 3) はそれぞれ含まれるVOCをヘッドスペース固層マイクロ抽出法 (HS-SPME) により抽出し、ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析計 (GC-TOF MS) を用いて分析した。XCMSソフトウェアを用いて得られた尿VOCのクロマトグラムを解析したところ、2005イオンピークが含まれていることが示され、そのうちの502イオンピークが対照尿と比較してヒト肺がんモデルマウス尿で有意に増加 ($p < 0.05$) していた。得られた502イオンピークについて保持時間を基にしたデコンボリューション解析を行った後、ピークのマススペクトルのライブラリー検索を行い、VOCの同定を試みた。データベースに登録されているスペクトルとの一致率80%以上を指標として、VOCのアノテーションを試みたところ、21種類のVOCが特定でき(表4-1)、そのうち、2-methylfuran、2-butanone、*exo*-brevicommin、2-methyl-6-vinylpyrazine、benzaldehydeおよびmaltolは第2章で報告した肺がんマーカー候補と一致した。

次に特定できたこれら21種類のVOCについて、各種前処理方法による抽出効率に与える影響を調査した。結果は、無処理における各VOCのピーク面積を100%として評価した(表4-2)。

表 4-1 前処理の影響を評価するために用いた担がんマウス尿に特徴的な VOC 一覧

化合物	定量用 イオン ^a (<i>m/z</i>)	保持 時間 (分)	平均ピーク面積		変化率 ^b	P 値 ^c
			対照群	担がん群		
2-Methylfuran	82.041	10.57	357	544	1.5	0.02
2-Butanone	72.056	10.66	1826	2851	1.6	< 0.01
Ethanol	45.031	12.40	8750	13688	1.6	0.01
Acetonitrile	41.025	16.00	2032	3314	1.6	0.01
2-Methylthiophene	97.011	20.09	54	107	2.0	0.05
Methyl diselenide	189.884	26.26	8	24	3.1	0.02
exo-Brevicommin	114.103	28.16	946	2093	2.2	0.01
α -Methylstyrene	118.078	29.08	131	212	1.6	0.01
3-Ethyl-o-xylene	119.085	30.30	248	361	1.5	0.02
2-Methyl-6-vinylpyrazine	120.068	33.68	280	412	1.5	0.01
Benzaldehyde	105.031	34.73	4298	8314	1.9	0.01
4-Hydroxybenzaldehyde oxime	137.048	37.69	42	75	1.8	0.01
Valeric Acid	60.020	37.95	446	1126	2.5	< 0.01
2-Methyl-3-(methyldithio)furan	160.004	38.57	13	24	1.8	0.05
Ethyl(1-methyl-1-penten-3-ynyl) selenide	187.924	41.24	-	12	12.0	-
Maltol	126.031	44.88	442	723	1.6	0.01
<i>p</i> -Cresol	107.048	47.07	4794	7158	1.5	0.02
4-Ethylphenol	107.049	48.91	194	300	1.5	0.02
2-Aminobenzaldehyde	121.051	49.17	7061	10093	1.4	0.02
Thio-bis-aethylenmerkaptan	185.969	51.99	3	8	3.1	0.02
Indole	117.062	54.95	292	403	1.4	0.02

a)ピーク面積を算出するために用いた。b)平均ピーク面積を元に担がんマウス/対照マウスを計算し求めた。c)Student's *t*-test より求めた。

表 4-2 各前処理の影響一覧

化合物	Normal	NaCl	Δ	NaCl+Δ	NaOH	NaCl+ NaOH+Δ
2-Methylfuran	100%	55%	386%	397%	2%	11%
2-Butanone	100%	60%	256%	499%	80%	793%
Ethanol	100%	65%	23%	102%	2%	118%
Acetonitrile	100%	47%	26%	92%	14%	80%
2-Methylthiophene	100%	99%	435%	487%	105%	100%
Methyl diselenide	100%	168%	1544%	565%	254%	397%
exo-Brevicommin	100%	529%	1138%	1225%	76%	149%
α-Methylstyrene	100%	94%	100%	59%	37%	52%
3-Ethyl-o-xylene	100%	113%	151%	93%	54%	87%
2-Methyl-6-vinylpyrazine	100%	213%	535%	727%	307%	478%
Benzaldehyde	100%	277%	434%	301%	274%	304%
4-Hydroxybenzaldehyde oxime	100%	259%	345%	344%	40%	30%
Valeric Acid	100%	446%	35%	44%	2%	18%
2-Methyl-3-(methyldithio)furan	100%	193%	1718%	1754%	1%	24%
Ethyl(1-methyl-1-penten-3-ynyl) selenide	100%	1157%	1323%	1543%	243%	223%
Maltol	100%	251%	34%	54%	27%	0%
p-Cresol	100%	315%	111%	204%	129%	290%
4-Ethylphenol	100%	294%	197%	200%	240%	507%
2-Aminobenzaldehyde	100%	273%	211%	139%	3%	3%
Thio-bis-aethylenmerkaptan	100%	1804%	2880%	6068%	564%	580%
Indole	100%	729%	10788%	12099%	12409%	14244%

Normal : 無処理、NaCl : 飽和量 NaCl 添加、Δ : 加熱処理 (120°C、60 分)、NaCl+Δ : 飽和量 NaCl 添加と加熱処理の組み合わせ、NaOH+Δ : 10M NaOH 添加と加熱処理の組み合わせ、NaCl+NaOH+Δ : 飽和量 NaCl 添加、10 M NaOH 添加および加熱処理の組み合わせ。各処理の影響は、Normal を 100% として評価した。

4-3-2 塩化ナトリウム添加が VOC の抽出効率に与える影響

塩化ナトリウム添加により得られたクロマトグラムのパターンは無処理 (図 4-1A) と比べて大きな変化は見られず、いくつかのピークについて、強度の増加が確認できた

(図 4-1B)。また、担がんマウス尿に特徴的な成分として特定した VOC のうち 4 種類についてはピーク面積の減少がみられたものの、2 倍以上の増加が確認できた VOC が 12 種類あり、10 倍以上向上した VOC も 2 種類あった。塩化ナトリウムの添加による塩析は、有機化合物の水溶解度を低下させる方法としてよく用いられるが、本実験においても、塩化ナトリウムの添加により VOC の水相への溶解度が低下した結果と固相への移行が促進され、抽出効率が改善されたものと考えられる。

4-3-3 加熱処理が VOC の抽出効率に与える影響

加熱処理によって得られたクロマトグラムのパターンは、無処理と比べて大きく変化しており、新しく出現したいくつかのピークを確認した。これらのピークは熱分解物である可能性が高いと思われる(図 4-1C)。また、21 種類の VOC のうち、ethanol、acetonitrile、valelic acid、maltol については、それぞれ無処理と比べて 23%、26%、35%、34%と大幅に減少したが、2 倍以上増加した VOC が 7 種類見られ、10 倍以上増加した VOC も 6 種類見られた。特に indole に関しては 100 倍以上の増加が確認できた。

SPME 法において抽出効率を低下させる要因として夾雑物の存在がある。ここで試みた熱処理は、それにより尿中の夾雑物が適度に分解し抽出効率が向上することを期待して行った。熱分解により減少する VOC が 4 種類あったものの、13 種類の VOC の抽出効率を 2 倍以上向上することができ、全体として加熱処理は抽出効率の向上に有効であると考えられた。

4-3-4 塩化ナトリウム添加+加熱処理が VOC の抽出効率に与える影響

塩化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせた場合は、いくつかのピーク強度において増加が見られたものの、全体的なパターンは加熱処理に近いクロマトグラムとなった(図 4-1D)。また、ほとんどの VOC において増加が見られ、塩化ナトリウム添加および加熱処理それぞれ単独では減少していた ethanol と acetonitrile は増減なしとなった。一方 3-ethyl-o-xylene については、塩化ナトリウム添加あるいは熱処理どちらかのみでは増加したのに対して、両方の処理を組み合わせたところ増減は認められなかった(表 4-2)。従って、化合物によっては 2 つの処理が相加的あるいは相乗的に作用しないこと

がある場合もあることが明らかとなった。結果としてこの塩化ナトリウム添加+加熱処理の組み合わせでは、2倍以上増加した VOC が 14 種類見られ、今回試験した前処理の中では最も多かった。

4-3-5 水酸化ナトリウム添加+加熱処理が VOC の抽出効率に与える影響

水酸化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせた場合は、無処理と比べてクロマトグラムが大きく変化し、無処理で見られた主要なピークのいくつかは消失し、新たなピークが観察された (図 4-1E)。また、21 種類の VOC への影響は、2 倍以上の増加が 7 種類の VOC で確認できたが、11 種類の VOC においてはピーク面積の減少がみられ、特に 2-methylfuran、ethanol、valeric acid、2-methyl-3-(methyldithio)furan、2-aminobenzaldehyde はほぼ消失した (表 4-2)。この前処理では水酸化ナトリウムの添加、加熱によるアルカリ加水分解が起こっていると考えられ、そのために多数の VOC が分解され、消失または減少したと考えられる。以上の結果、この方法では、増加する VOC と減少する VOC の差が大きく、全ての VOC 抽出効率を一様に改善することは困難であると判断した。

4-3-6 塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウム添加+加熱処理が VOC の抽出効率に与える影響

塩化ナトリウムと水酸化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせた場合は、今回の実験の中で、無処理と比較して最も大きくクロマトグラムのパターンが変化しており、多数の新規ピークが観察された。全体的なパターンは水酸化ナトリウム添加と加熱処理を組み合わせた図 4-1E に近いクロマトグラムとなり (図 4-1F)、2-butanone、ethanol、4-ethylphenol および indole については、今回試験した前処理の中で最も抽出効率が向上した。また、塩化ナトリウムの添加によって、2 倍以上増加した VOC が 9 種類見られた。しかし、NaOH 添加処理と同様に、消失または大きく減少する VOC が確認され、増加と減少の差が大きく、抽出効率を一様に改善することは困難であると判断した。

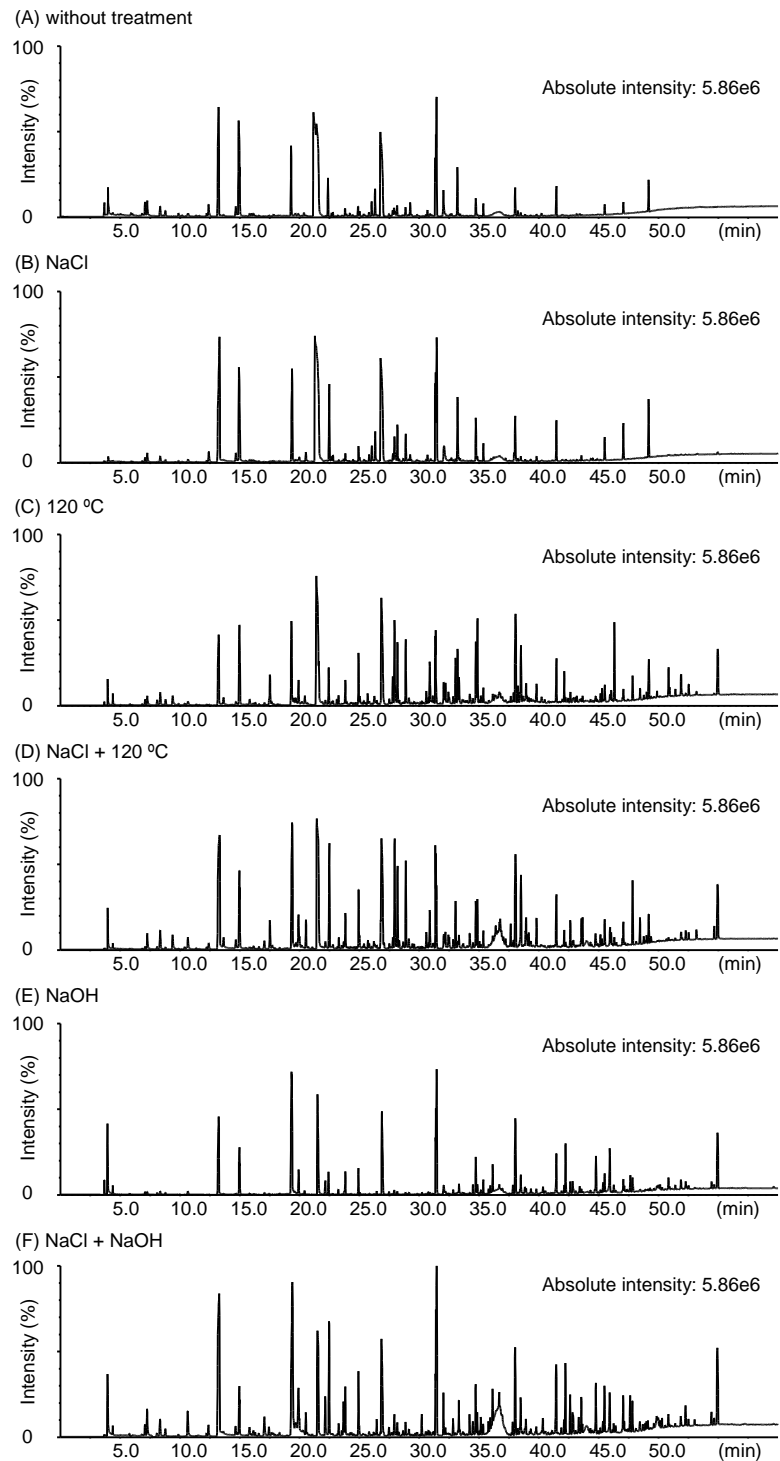


図 4-1 無処理および各前処理後の尿サンプルから得られた揮発成分の TIC
 (A): 処理なし、(B): 飽和量 NaCl 添加、(C): 加熱処理 (120°C、60 分)、(D): 飽和量 NaCl 添加と加熱処理の組み合わせ、(E): 10M NaOH 添加と加熱処理の組み合わせ、(F): 飽和量 NaCl 添加、10M NaOH 添加および加熱処理の組み合わせ。

4-4 結言

本章では、尿中の揮発性肺がんマーカーを高感度に検出するため、5種類の前処理方法を試した。水酸化ナトリウムの添加と加熱処理の組み合わせは、抽出効率が改善された VOC よりも減少した VOC の方が多くなり、今回の目的には適していないと判断した。塩化ナトリウムの添加はよく用いられている手法であり、本研究においてもマーカー候補 VOC をほぼ一様に抽出効率を改善することができた。しかしながら、試験した中で最も改善が見られた前処理は塩化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせた方法であり、14種の VOC が12倍以上改善されたのに対して、10%以上減少した VOC は3種のみにとどまった。

第3章では、揮発性化合物を熱分解から保護するために、抽出の際の加熱は控えたが、本研究テーマの最終的な目的は、早期肺がんを簡便かつ高精度に診断することである。揮発成分とがんとの生化学的な因果関係を考察する上では、尿中の成分の化学変化を伴うような処理は避けるべきであるが、診断の確実性の観点からは、がん患者と正常者の尿の違いが明確になることが最も重要であると考え、できるだけ揮発成分の検出感度を高めることのできる塩化ナトリウムの添加と加熱処理を組み合わせる前処理を用いて、再分析することとした。この方法は塩化ナトリウムを添加し加熱するだけの簡便さもあり、ヒト尿中の揮発性肺がんマーカーの検出感度の向上にとっても適した前処理方法であることが期待できる。この方法を用いてあらためて尿の揮発性化合物を分析した結果を次章で述べる。

第5章 前処理法を用いた尿中新規肺がんマーカー候補化合物の探索

5-1 序論

第2章および第3章では、マウスおよびヒトの尿に含まれる揮発性肺がんマーカーを探索し、尿のにおいをマーカーに用いることで肺がん罹患しているかどうかを区別できる可能性を示した^{68,69)}。一方、第4章では、尿を化学的に処理することで得られるクロマトグラムに大きな変化が生じることを示した。そこで本章では、肺がん罹患しているかどうかを従来よりも高い確度で識別可能にする尿中揮発性肺がんマーカーを得るため、SPME法による抽出条件についてサンプル尿の前処理を含めた最適化を検討した。さらにその結果得られた最適抽出条件を用いて、ヒト肺がん細胞であるA549細胞を移植したヒト肺がんモデルマウスの尿サンプルに含まれるVOCの代謝物プロファイリングをHS-SPME GC-TOF MSにより実施し、揮発性肺がんマーカー候補化合物の特定を行った。

5-2 方法

5-2-1 ヒト肺がんモデルマウスの作成と尿の収集

尿サンプルは、第4章で用いた尿サンプルと同じものを使用した。また、第2章の2-2-2に記載した方法でヒト肺がんモデルマウスの作成と尿の収集を行った。

5-2-2 分析用サンプル

尿中のクレアチニン濃度の測定には、ラボアッセイ(TM)クレアチニン(和光純薬工業株式会社)を用いた。また浸透圧の測定は、自動浸透圧分析装置オズモステーションOM-6060(アークレイマーケティング株式会社)を用いて行った。測定方法は、それぞれのマニュアルの記載に従った。

5-2-3 前処理検討用尿試料の作成

第4章と同様に、前処理方法を検討するための尿試料として塩化ナトリウム添加群、加熱処理群、塩化ナトリウム添加+加熱処理、水酸化ナトリウム添加+加熱処理群、水酸

化ナトリウム+塩化ナトリウム+加熱処理群を用意した。各前処理方法は第4章の4-2-2の記載と同じである。内部標準物質として *p*-ブロモフルオロベンゼン標準液 1 mg/mL メタノール溶液（和光純薬工業）を水で希釈し、10 µg/mL の溶液として、その 1 µL (10 ng) を尿サンプル 200 µL に対して添加した。

5-2-4 ヘッドスペース-固相マイクロ抽出による VOC の抽出および GC-TOF MS 条件
VOC の抽出および分析は第4章の4-2-3 および4-2-4 に記載した方法で行った

5-2-5 デイファレンシャル解析

化合物のアノテーション条件以外は、第4章と同じ方法で行った。化合物のアノテーションは、Match 値および R.Match 値がともに 750 以上かつ測定値と観測値の分子イオンの *m/z* が誤差 10 ppm 以内を基準とした。複数の化合物がヒットした場合は、最も Match 値の高い化合物を選択した。データベース検索でヒットした化合物については、抽出イオンクロマトグラム (Extracted ion chromatogram: EIC) からピーク面積を算出し、グループ間の有意差を ANOVA により検定した。

この結果に基づき以下の3条件を全て満たすピークを、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC と見なすことにした。1) *p* 値が 0.05 以下 (ANOVA)、2) 平均ピーク面積差が 1.5 倍以上増加、3) バックグラウンドノイズから十分に区別できる (平均ピーク面積が 1000 以上)。

5-3 結果

5-3-1 クレアチニン濃度および浸透圧

まず、サンプルとして用いた尿の濃さに差があるかどうかを検討するために、クレアチニン濃度および浸透圧を測定した。担がんおよび対照それぞれ3つずつの尿サンプルについて測定した結果、担がんサンプルのクレアチニン濃度および浸透圧はそれぞれ 6.1 mg/dL (標準偏差 0.6 mg/dL) および 2265 mOsm (標準偏差 156 mOsm) で、対照サンプルの測定値 (それぞれ 5.2 mg/dL (標準偏差 0.3 mg/dL) および 2080 mOsm (標準偏差 71 mOsm)) と、有意な差は認められなかった。

5-3-2 塩化ナトリウムを添加した尿のヘッドスペース中に含まれる VOC の比較分析

尿サンプル (200 μL) に対して飽和量の塩化ナトリウムを加えた後、HS-SPME GC-TOFMS を用いて分析した。得られた total ion current (TIC) を図 5-1A に示す。ヒト肺がんモデルマウスと対照マウスクロマトグラムの間には、明確な違いが認められたため、さらに XCMS ソフトウェアを用いた比較解析により対照に比べてヒト肺がんモデルマウスで増加しているイオンピークの特特定を試みた。XCMS ソフトウェアを用いた比較解析の結果、両者のクロマトグラムには合計 2332 イオンピークが検出され、これらの中から対照マウスと比較してヒト肺がんモデルマウスで有意に強度が増加 (ピーク強度 : 1.5 倍以上、P 値 (Student's *t*-test) : 0.05 以下) している 243 のイオンピークのリストを得た (表 5-1)。さらに、これらの増加イオンピークの保持時間を指標としてデコンボリューション解析を行った後、ピーク面積 100 以上のものについてデータベース検索を行った。その結果、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC として *exo-brevicom*in、2-(*sec*-butyl)-4,5-dihydrothiazole および benzaldehyde の 3 化合物が見いだされた。それぞれの増加率は 2.4 倍、1.5 倍および 1.5 倍、また ANOVA を利用した有意差検定における P 値はそれぞれ 0.002、0.02 および 0.006 であった。(表 5-2A)

5-3-3 加熱処理を行った尿のヘッドスペース中に含まれる VOC の比較分析

尿サンプル (200 μL) を 120°C で 1 時間処理した後、HS-SPME GC-TOF MS を用いて分析した。得られた TIC (図 5-1B) は図 5-1A と比較して大きくパターンが変化しており、XCMS 解析により、2654 イオンピークからなるピークリストが得られた。得られたイオンピークリストから、対照マウスと比較してヒト肺がんモデルマウスで有意に強度が増加 (上記記載と同一条件) しているイオンピークとして表 5-1 に示す 87 ピークを選抜し、これらの増加ピークについて同様の絞り込みを行った結果、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC として 3 化合物 (2-ethyl-1-hexanol、furfuryl alcohol、benzothiazole) が見いだされた。それらの増加率はそれぞれ 1.5 倍、1.7 倍、1.7 倍で ANOVA を利用した有意差検定ではすべて $P < 0.001$ となった。(表 5-2B)

5-3-4 塩化ナトリウムの添加と加熱処理を行った尿のヘッドスペース中に含まれる VOC の比較分析

尿サンプル (200 μL) に対して飽和量の塩化ナトリウムを添加し、120°Cで1時間処理した後、HS-SPME GC-TOF MS を用いて分析した。得られた TIC (図 5-1C) は、図 5-1A と比較すると大きくパターンが変化したが、図 5-1B と比較するとほとんど違いはなく、一部のピークの強度増加が見られたのみであった。上記と同様に XCMS 解析により、2565 イオンピークからなるリストを得た後、対照マウスと比較してヒト肺がんモデルマウスで有意に強度が増加 (上記記載と同一条件) しているイオンピークの絞り込みを行い、22 の増加イオンピークを見だし (表 5-1) さらに、同様の絞り込みを行った結果、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC として 4 化合物 (ethanol、2-methylpyrazine、furfuryl alcohol、benzothiazole) を見いだした。それぞれの増加率はそれぞれ 2.5 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍であった。また、ANOVA を利用した有意差検定における P 値はそれぞれ 0.048、0.047、 <0.001 、 <0.001 であった。(表 5-2C)

5-3-5 水酸化ナトリウムの添加と加熱処理を行った尿のヘッドスペース中に含まれる VOC の比較分析

尿サンプル(200 μL)に対して 10 M NaOH を 20 μL を加え 120°Cで1時間処理した後、HS-SPME GC-TOF MS を用いて分析して得られた TIC (図 5-1D) は、図 5-1A、図 5-1B、図 5-1C のいずれとも異なるパターンを示した。XCMS 解析により、2528 イオンピークを含むピークリストが得られ、対照マウスと比較してヒト肺がんモデルマウスで有意に強度が増加 (上記記載と同一条件) しているイオンピークの絞り込みを行い、70 の増加イオンピークを見出し (表 5-1) さらに、同様の絞り込みを行った結果、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC として 2 化合物 (1,2,3-trimethylcyclohexane、4-(2,6,6-trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one) を特定した。それらの VOC の増加率はそれぞれ 2.1 倍および 1.6 倍、ANOVA を利用した有意差検定における P 値はそれぞれ 0.012 および 0.029 であった (表 5-2D)。

5-3-6 塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムの添加と加熱処理を行った尿のヘッドスペース中に含まれる VOC の比較分析

尿サンプル (200 μL) に対して飽和量の塩化ナトリウムと 10 M NaOH を 20 μL を加え、120°C で 1 時間処理した後、HS-SPME GC-TOF MS を用いて分析した。得られた TIC (図 5-1E) は図 5-1A、図 5-1B および図 5-1C のそれらとは異なるクロマトグラムのパターンを与え、図 5-1D に近いパターンを示した。XCMS 解析により、2584 イオンピークを含むピークリストが得られた。得られたイオンピークリストから、対照マウスと比較してヒト肺がんモデルマウスで有意に強度が増加 (上記記載と同一条件) しているイオンピークの絞り込みを行い、87 の増加イオンピークを得た (表 5-1)。さらに、同様の絞り込みを行った結果、ヒト肺がんモデルマウスを特徴付ける VOC を 7 化合物 (2,4-dimethylheptane、ethanol、acetonitrile、4-heptanone、benzenamine、benzothiazole、3-methylthioindole) 得た。それらの VOC のピーク面積を指標としたときの増加率は最も小さいもので 1.5 倍 (2,4-dimethylheptane)、最も大きいもので 2.7 倍 (3-methylthioindole) となった。また、ANOVA を利用した有意差検定では、P 値 < 0.001 から 0.014 であった (表 5-2E)。

表 5-1 対照マウス尿と比較して担癌マウス尿で有意に増加または減少するイオンピーク数の前処理方法の違いによる変化

処理方法	検出された全イオンピーク数	増加イオンピーク数	特定できたマーカー候補数
飽和量 NaCl 添加	2332	243	3
加熱処理	2654	87	3
飽和量 NaCl 添加かつ加熱処理	2565	22	4
10 M NaOH 添加かつ加熱処理	2528	70	2
飽和量 NaCl 添加、10 M NaOH 添加かつ加熱処理	2584	87	7

表 5-2 各前処理によって得られたマーカー候補化合物

A) 飽和量 NaCl 添加

化合物	定量用イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		変化率 (Cancer/Control)	P 値 (ANOVA)
			平均ピーク面積	S.D.	平均ピーク面積	S.D.		
exo-Brevicomín	156.115	28.17	492	103	1193	91	2.4	0.002
2-(sec-butyl)-4,5-dihydrothiazole	143.077	33.20	1410	208	2052	121	1.5	0.020
Benzaldehyde	106.037	34.75	15404	1442	22604	1298	1.5	0.006

B) 加熱処理

化合物	定量用イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		変化率 (Cancer/Control)	P 値 (ANOVA)
			平均ピーク面積	S.D.	平均ピーク面積	S.D.		
2-Ethyl-1-hexanol	98.106	33.3	935	37	1417	30	1.5	<0.001
FurfurylAlcohol	98.041	37.7	1690	80	2838	25	1.7	<0.001
Benzothiazole	108.004	45.2	1310	31	2245	51	1.7	<0.001

C) 飽和量 NaCl 添加かつ加熱処理

化合物	定量用イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		変化率 (Cancer/Control)	P 値 (ANOVA)
			平均ピーク面積	S.D.	平均ピーク面積	S.D.		
Ethanol	45.031	12.4	5593	234	13997	4208	2.5	0.048
2-Methylpyrazine	94.091	26.8	8345	1966	12361	353	1.5	0.047
Furfuryl Alcohol	98.034	37.6	5668	30	9044	223	1.6	<0.001
Benzothiazole	108.005	45.2	1800	64	2972	39	1.7	<0.001

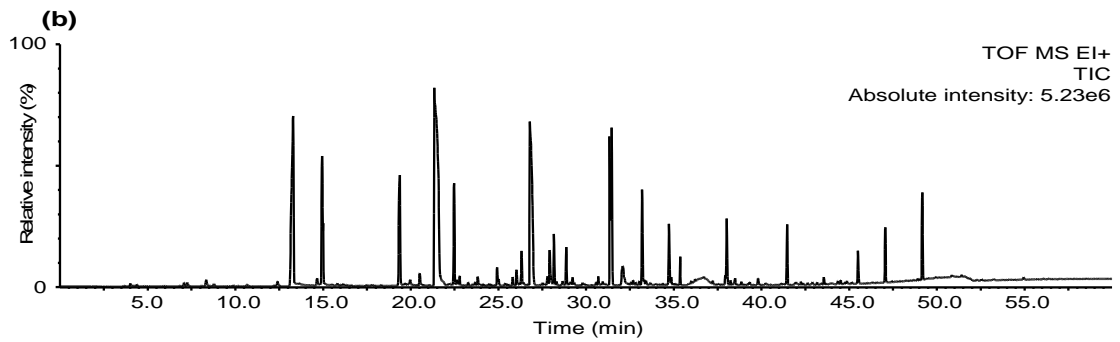
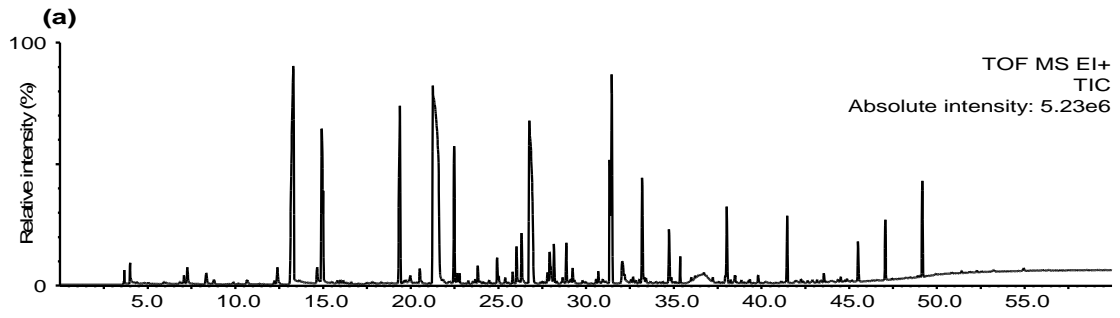
D) 10 M NaOH 添加かつ加熱処理

化合物	定量用イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		変化率 (Cancer/Control)	P 値 (ANOVA)
			平均ピーク面積	S.D.	平均ピーク面積	S.D.		
1,2,3-Trimethylcyclohexane	126.136	19.3	6595.0	1289.4	13621.7	1863.8	2.1	0.012
4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one	190.135	45.9	4192.3	1306.2	6766.7	950.0	1.6	0.029

E) 飽和量 NaCl 添加、10 M NaOH 添加かつ加熱処理

化合物	定量用イオン (<i>m/z</i>)	保持時間 (分)	対照マウス		担がんマウス		変化率 (Cancer/Control)	P 値 (ANOVA)
			平均ピーク面積	S.D.	平均ピーク面積	S.D.		
2,4-Dimethylheptane	85.100	7.1	4023.3	140.0	6211.7	183.1	1.5	<0.001
Ethanol	45.031	12.4	6247.3	49.0	16218.7	1023.6	2.6	<0.001
Acetonitrile	40.018	16.0	813.3	12.3	1673.7	33.0	2.1	<0.001
4-Heptanone	71.080	21.6	2791.3	297.2	4331.7	103.5	1.6	0.002
Benzenamine	66.046	40.3	2245.3	119.4	3575.0	306.1	1.6	0.005
Benzothiazole	108.004	45.1	769.7	233.6	1470.7	37.8	1.9	0.014
3-Methylthioindole	163.045	49.9	9392.7	555.4	25490.3	4688.8	2.7	0.009

A



B

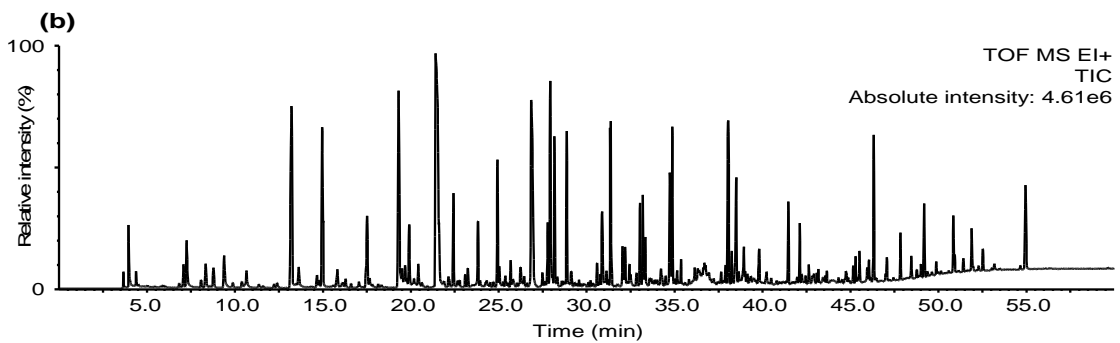
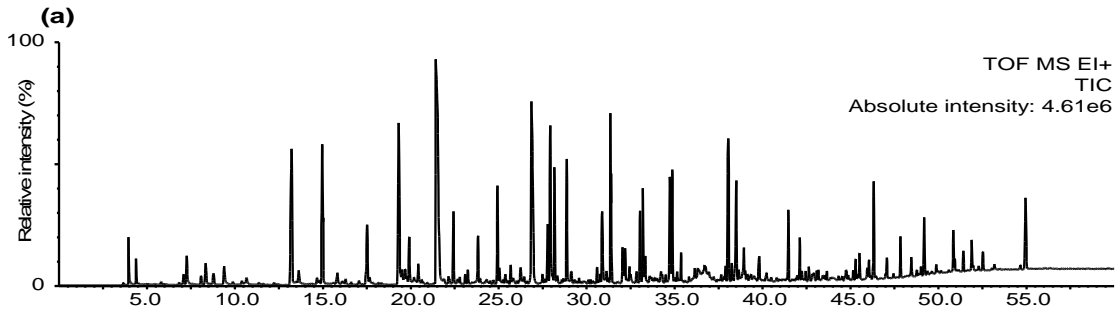
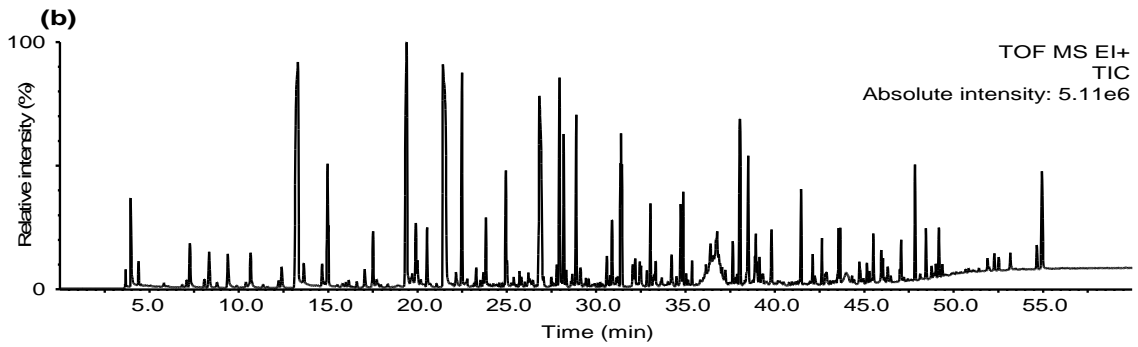
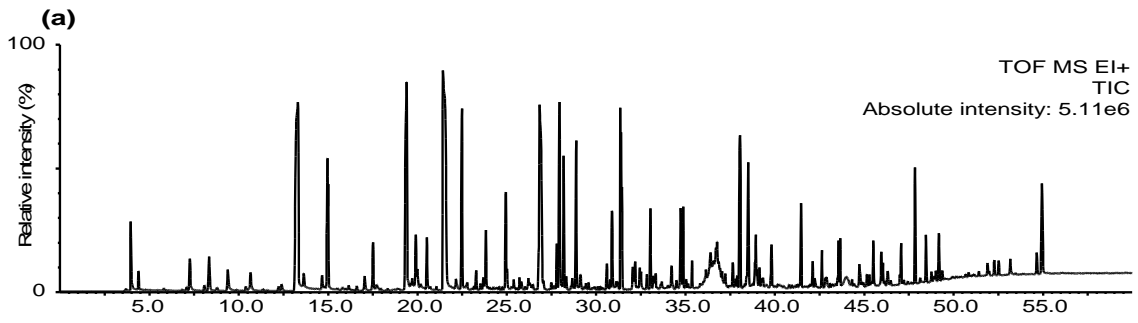


図 5-1 : 尿サンプルの TIC

C



D

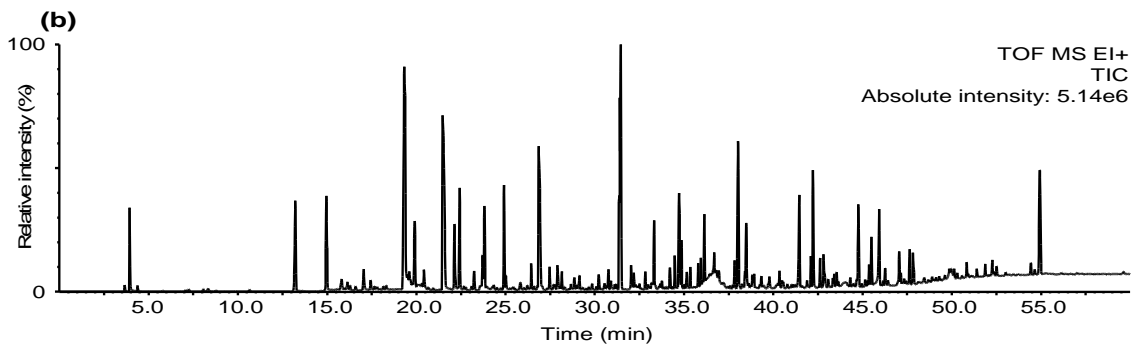
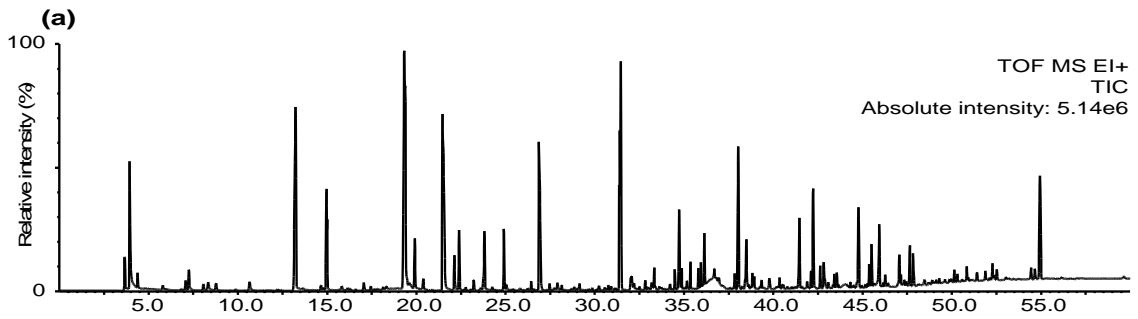


図 5-1 続き

E

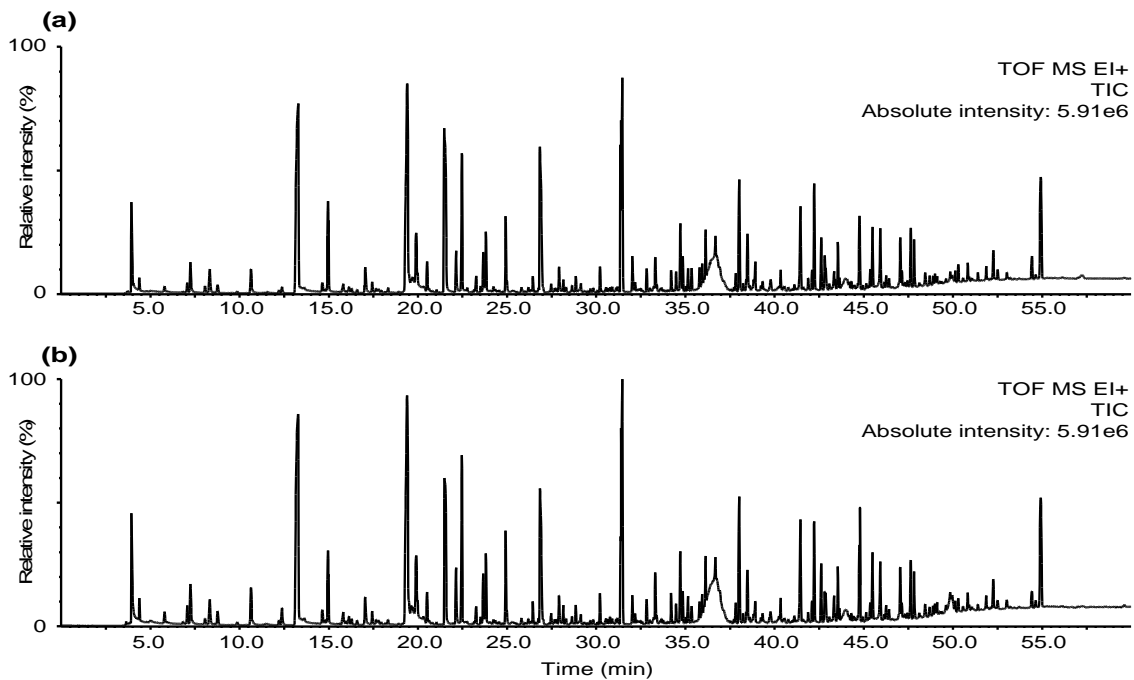


図 5-1 続き

(A) 飽和量 NaCl 添加、(B) 加熱処理 (120°C、60 分)、(C) 飽和量 NaCl 添加と加熱処理の組み合わせ、(D) 10 M NaOH 添加と加熱処理の組み合わせ、(E) 飽和量 NaCl 添加、10 M NaOH 添加および加熱処理の組み合わせ。(a) 対照マウス、(b) 担がんマウス

5-4 考察

第 4 章の結果から、前処理を行うことにより、尿から得られる VOC が変化することが明らかとなった。そこで、本章では、肺がん罹患しているかどうかをより高い確度での識別を可能にする揮発性肺がんマーカーを得るためのスクリーニング条件を検討した。検討したスクリーニング条件は、SPME ファイバー挿入前の尿サンプルに対して、塩化ナトリウム添加処理、加熱処理 (120°C、60 分)、塩化ナトリウム添加と加熱処理、水酸化ナトリウム添加と加熱処理、塩化ナトリウムと水酸化ナトリウムの添加と加熱処理の 5 種類とした。また、尿サンプルは第 4 章と同じものを使用した。

揮発性肺がんマーカー候補として選抜するための条件としては 1) P 値が 0.05 以下 (ANOVA)、2) 平均ピーク面積差が 1.5 倍以上増加、3) バックグラウンドノイズから十分に区別できるピーク (平均ピーク面積が 1000 以上) の 3 つを全て満たすこととし

た。また、尿をサンプルとした場合、水分摂取量などが測定値に影響を与えることが予想されたため、担がんサンプルと対照サンプルのクレアチニン濃度差 (0.9 mg/dL) および浸透圧差(185 mOsm)を指標として両者を比較したが、ほとんど差が見られなかったため、濃さの補正は行わずにマーカー候補の探索を行った。

探索の結果、処理の違いにより、ヒト肺がんモデルマウスに特徴的な VOC は異なるものの、全ての処理においてヒト肺がんモデルマウスと対照マウスを区別することが可能な VOC が 2 つ以上得られた。得られたマーカー候補化合物は、塩化ナトリウム添加処理では 3 化合物 (表 5-2A)、加熱処理では 3 化合物 (表 5-2B)、塩化ナトリウム添加と加熱の組み合わせ処理では 4 化合物 (表 5-2C)、水酸化ナトリウム添加と加熱の組み合わせ処理では 2 化合物 (表 5-2D)、塩化ナトリウムと水酸化ナトリウム添加と加熱の組み合わせ処理では 7 化合物 (表 5-2E) となった。

得られた VOC の中で、前処理を行わなかった場合 (第 2 章参照) では見られなかったマーカー候補として新しく 6 種類の VOC (2-ethyl-1-hexanol、ethanol、acetonitrile、furfuryl alcohol、benzothiazole、benzenamine および 3-methylthioindole) を特定した。また、他の VOC (2-(*sec*-butyl)-4,5-dihydrothiazole、benzaldehyde、2-methylpyrazine、2,4-dimethylheptane、4-heptanone および *exo*-brevicommin) は第 2 章においても見られているが前処理を行ったことで、これらの抽出効率および有意差に改善が見られた。

得られた VOC の由来については不明であるが、2-(*sec*-butyl)-4,5-dihydrothiazole^{68, 69, 72)}、benzaldehyde¹³⁾、2-ethyl-1-hexanol^{48, 68, 69)}、ethanol^{68, 69)}、2-methylpyrazine^{81, 82)}、2,4-dimethylheptane^{53, 82)}、acetonitrile⁸²⁾、4-heptanone⁸²⁾は呼気または尿の肺がんマーカー候補として報告されている。また、糖類の熱分解物と考えられる furfuryl alcohol⁷¹⁾が検出された。詳細については不明だが、解糖系を活性化させている肺がん細胞と何らかの関係があるのかもしれない。また、一般的に腎臓への転移があった場合、腎機能の低下から糖尿、血尿、タンパク尿の症状が見られる。今回は移植したがん細胞の転移状況を確認していないため詳細は不明であるが、腎臓への転移によって、腎機能の低下から尿中へ排泄された糖類によって furfuryl alcohol が検出されたのかもしれない。benzothiazole、*exo*-brevicommin、benzenamine および 3-methylthioindole の由来および肺がんとの関連については不明である。

検討した 5 種類の前処理方法の中で、特に水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加し、加熱を組み合わせた処理の場合は揮発性肺がんマーカー候補として 7 化合物が得られた。そして、この処理で得られた 2,4-dimethylheptane、ethanol、acetonitrile、4-heptanone、は、第 2 章において見つかったものと同じである。今回の研究に用いた尿サンプルは、第 2 章で用いた尿（移植後 26 日から 30 日）よりも早期の尿（移植後 20 日から 25 日）であることを考慮すると、この処理を行えば肺がんの初期のステージでも識別できる可能性がある。これらのことから、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加してさらに加熱処理すると、尿に含まれる本来の成分のかなりの部分が化学的に変化し、肺がんとの因果関係がわかりにくくなってしまうことは否定できないが、肺がん罹患由来の尿を早期に感度よく区別することが本研究の第一の目的であり、その観点に立てばヒト由来の尿の分析においてもこの前処理方法が有効に働く可能性は十分に期待できる。

第6章 総括

本論文は非侵襲かつ簡便な肺がん診断を可能とする揮発性肺がんマーカーの探索を目的とし、尿に由来する揮発性有機化合物について検討したものであり、以下のことを明らかにした。

1. 肺がんを特徴付けている揮発性成分が尿に存在するかどうかを確認するために、センサーマウスを作成し、さらに、Y字迷路試験によって肺がん罹患しているかどうかを尿のにおいで区別可能かどうか調べた。その結果、センサーマウスは80%以上の正答率で肺がん患者を識別できることを示した。よって、尿中揮発性肺がんマーカーの存在を、センサーマウスを使った行動実験によって明らかにした。
2. 肺がん特異的な揮発性化合物に関する知見を得ること目的として、ヒト由来肺がん細胞の培養液および肺がんモデルマウス尿に含まれる揮発性化合物の分析を行った。ここではSPME法による揮発性有機化合物の抽出・濃縮、GC-TOFMSを用いた高感度分析、および統計処理を利用したマーカー候補の特定の3つの技術を組み合わせ、希薄な尿中揮発性肺がんマーカーを同定するための方法確立した。その結果、培養液と尿の両方から、いくつかの肺がん特異的に増加している揮発性化合物が得られ、培養液と尿に共通する化合物として7化合物（dimethyl succinate, 2-pentanone, phenol, 2-methylpyrazine, 2-hexanone, 2-butanone, acetophenone）を特定した。
3. 尿中の揮発性ヒト肺がんマーカーを特定することを目的として、肺がん患者および対照者の尿に含まれる揮発性化合物の分析と比較解析を行った。その結果、9種類の尿中揮発性肺がんマーカーを同定した。さらに、ROC解析の結果、これらの揮発性化合物はいずれもマーカーとしての高い感度と高い特異度を持つことが示された。また得られた揮発性化合物を用いた主成分分析結果から、2-pentanoneは腺がんと扁平上皮がんを区別できることを示した。

4. 前処理を行うことで、揮発性化合物の抽出効率を改善できることを示した。また、前処理を行うことで、従来よりも高い確度で識別できる尿中揮発性肺がんマーカーが得られることが示唆されたため、その探索を試みた。その結果、水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムを添加した後、加熱処理することで新たに生じる揮発性化合物のうち、2,4-dimethylheptane, ethanol, acetonitrile, 4-heptanone が肺がんの初期ステージでも識別できるマーカー候補となることが認められた。

本研究に関する原著論文など

(原著論文)

Hanai Y, Shimono K, Matsumura K, Vachani A, Albelda S, Yamazaki K, Beauchamp GK, Oka H. (2012) Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76(4):679-84.

Hanai Y, Shimono K, Oka H, Baba Y, Yamazaki K, Beauchamp GK. (2012) Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. *Cancer Cell Int.* 12(1):7. doi: 10.1186/1475-2867-12-7.

花井陽介、馬場嘉信 マウス尿中肺がんマーカー候補選定のための前処理法
日本分析化学会、*分析化学*、Vol. 62 (2013) 462

花井 陽介、馬場 嘉信 SPME GC-TOF MS を用いた肺がん識別のための尿中揮発性有機化合物のスクリーニング法の検討 *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan.* Vol.61 (2013) 13-21

(関連論文)

花井陽介、下野健、岡弘章 センサーマウスを用いた尿臭による肺がんの識別
(投稿準備中)

(学会発表)

Yosuke Hanai, Ken Shimono, Hiroaki Oka, Yoshinobu Baba, Kunio Yamazaki and Gary K. Beauchamp. International Symposium on Innovative Nanobiodevices Analysis of volatile organic compounds released from human lung cancer cells and from the urine of tumor-bearing mice. ISIN 2012 名古屋

花井 陽介、下野 健、松村 幸一、Anil Vachani、Steven Albelda、山崎 邦郎、Gary Beauchamp、
岡 弘章「尿に由来する揮発性肺がんマーカーの探索」日本農芸化学会 2012 年度大会

引用文献

- 1) 国立がん研究センターがん対策情報センターのがん情報サービス
<http://ganjoho.ncc.go.jp/public/statistics/index.html>
- 2) Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 69: 89–95.
- 3) Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA and Andriole GL. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324(17): 1156-61.
- 4) Duffy MJ. *Clin. Chem.* 1990; 36: 188–91.
- 5) Isaacs C, Stearns V and Hayes DF. *Semin. Oncol.* 2001; 28(1): 53-67.
- 6) ASCO Tumor Marker Expert Panel. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. Adopted on May 17, 1996 by the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 2843–77.
- 7) Duffy MJ. *Clin. Chem.* 2005; 51(3): 494-503.
- 8) Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW and Bender HG. *Eur. J. Endocrinol.* 2004; 150(3): 243-55.
- 9) Penn D. and Potts W. K. *Trends Ecol. Evol.* 1998; 13: 391.
- 10) McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K. and Janecki T. *Integr. Cancer Ther.* 2006; 5: 30-39

- 11) Zhang X. and Firestein S. *Nature Neurosci.*2002; 5: 124-133.
- 12) Young J. M., Friedman C., Williams E. M., Ross J. A., Tonnes-Priddy L. and Trask B. J. *Human Mol. Genet.*2002; 11: 535–546
- 13) Mori K., Takahashi Y. K., Igarashi K. M. and Yamaguchi, M. *Physiol. Rev.* 2006; 86: 409-433.
- 14) Matsumura K., Opiekun M, Oka H., Vachani A., Albelda S.M., Yamazaki K. and Beauchamp G.K. *PLoS One* 2010; 27; 5(1):e8819
- 15) McCulloch M, Jezierski T, Broffman M, Hubbard A, Turner K, and Janecki T, *Integr. Cancer Ther.* 2006; 5: 30-39.
- 16) Cornu J. N., Cancel-Tassin G., Ondet V., Girardet C., and Cussenot O., *Eur. Urol.*2011; 59: 197
- 17) Willis C. M., Church S. M., Guest C. M., Coow. A. k, McCarthy N., Bransbury A. J., Church M. R., and Church J. C., *BMJ.* 2004; 329: 712
- 18) Deng C. H., ZhanX. M. g, and Li N., *J. Chromatogr. B.* 2004; 808: 269
- 19) Phillips M., Gleeson K., Hughes J. M., Greenberg J., Cataneo R. N., Baker L., and McVay W. P., *Lancet* 1999; 353: 1930
- 20) Phillips M., Cataneo R. N., Cummin A. R., Gagliardi A. J., Gleeson K., Greenberg J., Maxfield R. A., and Rom W. N., *Chest* 2003; 123: 2115

- 21) Poli D, Goldoni M, Corradi M, Acampa O, Carbognani P, Internullo E, Casalini A, and Mutti A, *J. Chromatogr. B* 2010; 878: 2643-2651.
- 22) Yamaguchi M, Yamazaki K, Beauchamp GK, Bard J, Thomas L, and Boyse EA, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(9): 5817-20
- 23) Ludwig JA and Weinstein JN. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5: 845-856.
- 24) Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, Glöckner S, Piantadosi S, Gabrielson E, Pridham G, Pelosky K, Belinsky SA, Yang SC, Baylin SB and Herman JG *The New England journal of medicine* 2008; 358: 1118-1128.
- 25) Sawyers CL. *Nature* 2008; 452: 548-552.
- 26) Greenberg AK and Lee MS. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2007; 13: 249-255.
- 27) In: Amann A, Smith D, editors. *World Scientific*; 2005.
- 28) Amann A, Spanel P and Smith D. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2007; 7: 115-129.
- 29) Schubert J, Miekisch W and Noldge-Schomburg G.: VOC breath markers in critically ill patients: potentials and limitations. In: *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring*. Amann A and Smith D editors. Singapore: *World Scientific*; 2005. p.267-292.
- 30) Risby T.: Current status of clinical breath analysis. In: *Breath Analysis for Clinical Diagnosis and Therapeutic Monitoring*. Amann A and Smith D editors. Singapore, *World Scientific*; 2005. p.251-265.

- 31) Chen CP, Chen CY, Lu CL, Chang FY, Lee SD, Chu LS, Liu RS and Wu HC. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2003; 18: 41–46.
- 32) Liao CC, Lee CL, Chiang TC, Lee SC, Huang SH, Tu TC, Chen TK and Wu CH. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2002; 16: 787–792.
- 33) Eisenmann A, Amann A, Said M, Datta B and Ledochowski M. *Journal of Breath Research* 2008; 2(4): 046002.
- 34) Lebovitz HE. *Lancet* 1995; 345: 767-772.
- 35) Chen S, Zieve L, Mahadevan V. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1970; 75: 628-635.
- 36) Simenhoff ML, Burke JF, Saukkonen JJ, Ordinario AT and Doty R. *The New England Journal of Medicine* 1977; 297: 132-135.
- 37) Aghdassi E and Allard JP. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28: 880-886.
- 38) Pabst F, Miekisch W, Fuchs P, Kischkel S and Schubert JK. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2007; 2: 37.
- 39) Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN and Schmitt P. *Cancer Biomarkers* 2007; 3: 95–109.
- 40) Wehinger A, Schmid A, Mechtcheriakov S, Ledochowski M, Grabmer C, Gastl GA and Amann A. *International Journal of Mass Spectrometry* 2007; 265: 49–59.

- 41) Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA and Erzurum SC. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 171: 1286–1291.
- 42) Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A and D'Amico A. *Biosensors & bioelectronics* 2003; 18: 1209–1218.
- 43) Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M and Mutti A. *Respiratory Research* 2005; 6: 71.
- 44) Ligor M, Ligor T, Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Denz H, Fiegl M, Hilbe W, Weiss W, Lukas P, Jammig H, Hackl M, Buszewski B, Miekisch W, Schubert J and Amann A. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2009; 47: 550–560.
- 45) Chen X, Xu F, Wang Y, Pan Y, Lu D, Wang P, Ying K, Chen E and Zhang W. *Cancer* 2007; 110: 835-844.
- 46) Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratù P, Resta O, Rabe KF and Sterk PJ. *Lung Cancer* 2009; 64: 166-170.
- 47) Gordon RT, Schatz CB, Myers LJ, Kosty M, Gonczy C, Kroener J, Tran M, Kurtzhals P, Heath S, Koziol JA, Arthur N, Gabriel M, Hemping J, Hemping G, Nesbitt S, Tucker-Clark L and Zaayer J. *Complementary Medicine* 2008; 14: 61-67.
- 48) Smith D, Wang TS, Sule-Suso J, Spanel P and El Haj A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003; 17: 845–850.

- 49) Filipiak W, Sponring A, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A and Troppmair J. *Cancer Cell International* 2008; 8: 17.
- 50) Sponring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A and Troppmair J. *Anticancer Research* 2009; 29: 419–426.
- 51) Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R and Sizudak G.. *Analytical Chemistry* 2006; 78: 779-787.
- 52) Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A and Troppmair J. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2010 19:182-195
- 53) O'Neill H.J, Gordon S.M, O'Neill M.H, Gibbons R.D and Szldon J.P. *Clinical Chemistry* 1988; 34/8: 1613-1618.
- 54) Kusuhara M, Urakami K, Zangicomi V and Hoshino K. *Anti-Aging Medicine* 2010; 7(6): 66-72.
- 55) Lam S, Lam B, and Petty TL *Can. Fam. Physician* 2001; 47: 537-544.
- 56) Mulshine JL and Scott F, *Chest* 1995; 107(suppl): 280S-286S.
- 57) Henschke CI and Yankelevitz DF, *Radiol. Clin. North Am.* 2000; 38: 487-495.
- 58) Ravenel JG, Costello P, and Silvestri GA, *Am. J. Roentgenol.* 2008; 190: 755-761.
- 59) Vander Heiden MG, Cantley LC, and Thompson CB, *Science* 2009; 324: 1029-1033.

- 60) Belda-Iniesta C, de Castro Carpeño J, Carrasco JA, Moreno V, Casado Sáenz E, Feliu J, Sereno M, García Río F, Barriuso J, and González Barón M, *Clin. Transl. Oncol.* 2007; 9: 354-358.
- 61) Song G, Qin T, Liu H, Xu GB, Pan YY, Xiong FX, Gu KS, Sun GP, and Chen ZD, *Lung Cancer* 2010; 67: 227-231.
- 62) Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M, “American Joint Committee on Cancer Staging Manual” 6th edition, Springer, New York, pp.157-164 (2002).
- 63) Fawcett T, *Pattern Recogn.* 2006; 27: 861-874.
- 64) Phillips M, Altorki N, Austin JHM, Cameron RB, Cataneo RN, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN, Schmitt P, and Wai J, *Clini. Chimi. Acta* 2008; 393: 76-84.
- 65) Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Schwarz K, Ligor M, Ligor T, Filipiak W, Denz H, Fiegl M, Hilbe W, Weiss W, Lukas P, Jamnig H, Hackl M, Haidenberger A, Buszewski B, Miekisch W, Schubert J, and Amann A, *BMC Cancer* 2009; 9: 348.
- 66) Horváth I, Lázár Z, Gyulai N, Kollai M, and Losonczy G. *Eur. Respir. J.* 2009; 34: 261–275.
- 67) Li N, Deng C, Yin X, Yao N, Shen X, and Zhang X, *Anal. Biochem.* 2005; 342: 318-326.
- 68) de Rudder D, de Graeve E, van Severen R, and Braeckman P, *J. Clin. Hosp. Pharm.* 1986; 11: 125-130.

- 69) Weiss RH and Estabrook RW, *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; 251: 348-360.
- 70) Lee EW, "Cumene" Section 1.5, ed. Snyder R, (Elsevier Science Publishers, New York,), 2, I (1987).
- 71) Meuwissen R and Berns A, *Genes Dev.* 2005; 19: 643-664.
- 72) International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 174 Isophorone, Geneva, WHO, 1995.
- 73) Skarping G, Dalene MD, and Tinnerberg H, *Analys.* 1994; 119: 2051-2055.
- 74) Tinnerberg H, Skarping G, Dalene MD, and Hagmar L. *Int. Occup. Environ. Health.* 1995; 67: 367-374.
- 75) Westhoff M, Litterst P, Maddula S, Bödeker B, Rahmann S, Davies AN and Baumbach JI, *Int. J. Ion Mobil. Spec.* 2010; 13: 131-139.
- 76) Thompson-Torgerson CS, Champion HC, Santhanam L, Harris ZL, and Shoukas AA, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296: H1926-H1932.
- 77) Mills GA and Walker V, *Clin. Chem.* 1990; 36/6: 870-874.
- 78) Florin I, Rutberg L, Curvall and M, Enzell CR, *Toxicology* 1980; 15: 219-232.
- 79) Buszewski B, Ulanowska A, Ligor T, Denderz N, and Amann A, *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23: 551-556.
- 80) Hanai Y., Shimono K., Oka H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012; 76: 679.

81) Hanai Y., Shimono K., Oka H., Baba Y., Yamazaki K., Beauchamp G. K., *Cancer Cell Int.* 2012; 12: 7.

82) Arthur C. L., and Pawliszyn J., *Anal. Chem.* 1990; 62: 2145.

83) Yang X. and Peppard T., *J. Agric. Food Chem.* 1994; 42: 1925

84) Proenza A. M., Oliver J., Palou A., and Roca P. J., *Nutr. Biochem.* 2003; 14: 133

謝辞

本研究はパナソニック株式会社バイオ技術開発室における 2 年間およびその後の名古屋大学馬場研究室における 4 年間の計 6 年間を通して行われたものであります。本研究を始めるにあたって、このような大変興味深いテーマに出会う機会を与えてくださった岡弘章博士（パナソニック株式会社バイオ技術開発室）、下野健博士（パナソニック株式会社バイオ技術開発室）に深く感謝いたします。また、両博士には、研究を進めるにあたり、貴重な助言をいただくとともに、学会発表や論文校閲のほか、様々な場面で熱心に指導していただきました。何事につけても始動の遅い私が、両博士の叱咤激励によって、時には心が折れそうになりながら、こうして無事に博士学位を取得することができました。両博士の存在無しでは、今の私はありませんでした。

名古屋大学大学院工学研究科・馬場研究室は 2010 年から 4 年間、“最先端研究開発支援プログラム（FIRST）”のメンバーとして研究を行ってきました。馬場嘉信教授（名古屋大学大学院工学研究科）には大変深く感謝しております。先生には、名古屋大学へ移動した後もこれまでの研究テーマを継続して行えるようご支援、ご配慮いただくとともに、的確なご助言、励ましの言葉をいただき深く感謝しております。また、“最先端研究開発支援プログラム（FIRST）”の奨励によって、継続してパナソニック株式会社バイオ技術開発室との共同研究が実現できただけでなく、有用な研究成果を得ることができ感謝しております。

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物調節化学研究室には大変お世話になりました。生物調節化学研究室における貴重な 3 年間の研究生活のおかげで今の私があるものと思っており、心より大変感謝しております。宮川恒先生（京都大学大学院農学研究科・教授）、中川好秋先生（京都大学農学研究科・准教授）、宮下正弘先生（京都大学農学研究科・助教）には、大変お世話になりました。博士学位を申請するに当たり、宮川恒先生には、貴重なアドバイスをいただき大変感謝しております。中川先生には、研究室を離れた今でも気にかけていただき大変感謝しております。また、いつもサソリ採取に誘っていただきありがとうございます御座います。いつも先頭に立って私たちを引っ張っていつてくださる先生の後姿を忘れることはせきません。宮下先生には公私ともに大

大変感謝しております。私が質量分析という学問に出会うことができ、その面白さを教えてくださったおかげで、ここまでできたと思っております。また、妻との出会いのきっかけを与えていただき、プライベートでも充実した生活を送ることができたのも先生のおかげだと思っております。

パナソニック株式会社バイオ技術開発室の皆様のおかげで、充実した会社生活を送ることができました。この場をお借りして感謝申し上げます。また、生体生理第一チーム、生体生理第二チームの皆様には、右も左も分からなかった私に、会社でのあり方をご指導していただき大変感謝しております。鈴木雅登氏（パナソニック株式会社バイオ技術開発室）には、会社生活だけでなく、人生の先輩として様々な熱いアドバイスを頂いきありがとうございます。研究を進めるための貴重なアドバイスを頂いただけでなく、AV 機器について熱い議論を交わすことができ、ストレス発散の場を与えていただいた瓜生幸嗣氏（パナソニック株式会社バイオ技術開発室）には大変感謝しております。また、ここでは書ききれませんが、日々研究に追われる中、適度にストレスを発散しつつ快適な生活を送ることができたのも、下野チームの皆様のおかげだと感謝しております。また、ここまで私の研究生生活を支えていただいた先輩・同僚・後輩そして友人の全ての皆様に心よりお礼申し上げます。

最後に、これまで私をあたたく応援してくれた両親と祖父母、私を明るく励まし続けてくれた妻 香代子、息子 寿成そして生まれてくる子供に心から感謝します。私の博士号取得を楽しみに、応援し続け、今年 3 月に、相前後して他界した父・寛に本研究を捧げます。

