

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20652

研究課題名（和文）尿揮発成分の網羅的分析と機械学習による簡便な癌患者診断法の開発

研究課題名（英文）Early diagnosis of cancers using urinary volatile compounds analysis

研究代表者

田中 航（Tanaka, Wataru）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：70908300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：悪性脳腫瘍は発見後の5年生存率が特に低い癌の一つであり、早期診断法の開発が強く望まれている。申請者は、非侵襲的に取得可能で管理も容易な尿検体に着目し、尿中揮発性成分群を利用した脳腫瘍診断手法開発を行った。ガスクロマトグラフ質量分析計を利用した分析では、健常者と患者を100%の精度で判別するとともに、16の脳腫瘍バイオマーカー候補化合物の同定に成功した。また、ガスクロマトグラフ質量分析と比較して、より迅速かつ簡単に測定可能な小型ガスセンサを使用した場合でも、健常者と患者を約80%の精度で判別することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍は主に、患者に脳卒中などの症状が現れた後にMRI・CTなどの高価な画像診断法によって初めて発見され、発見時には治療困難な状態まで成長・拡散が進行している場合が多い。そのため、通常健康診断で利用可能な低コスト・簡便・迅速な脳腫瘍診断ツールの開発が強く望まれている。本研究で示した小型ガスセンサを利用した尿揮発成分群分析による脳腫瘍診断手法は、この需要に当てはまる。また、本手法は、脳腫瘍に限らず様々な疾病に適用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There is no practical mass examination method for early detection of central nervous system (CNS) tumors. In this study, we demonstrate that urinary volatile organic compounds (VOCs) are reliable biological analytes for early diagnosis of the CNS tumors. We have measured urinary VOCs by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) coupled with solid phase micro extractions (SPME). Machine learning-based analysis of the GC-MS data successfully discriminated a difference between the CNS tumors patients and healthy controls with 100% accuracy. Moreover, we identified and quantified 16 VOCs biomarker candidates that increased or decreased in urine of the patients. Finally, we distinguished the patients from the healthy controls with 78% accuracy using a compact-size chemical sensor system.

研究分野：ナノテク・材料

キーワード：早期癌診断 尿揮発性成分 機械学習 ガスクロマトグラム質量分析 ガスセンサ

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系腫瘍(CNS 腫瘍)は脳や脊髄等の中枢神経系に生じる腫瘍全般を指す。中枢神経系腫瘍には様々な種類があり、危険度の高い GradeIV にあたる膠芽腫などの腫瘍では、生存期間中央値 14.5 から 16.6 ヶ月となっている。CNS 腫瘍の完治や延命に向けて有効な処置を行うには早期発見、早期治療が重要である。現状の中枢神経系腫瘍の診断は次のように行われている。中枢神経系腫瘍の疑いのある症状を持つ患者に対し、初期診断としてコンピュータ断層撮影(CT: Computed Tomography)や磁気共鳴画像診断(MRI: Magnetic Resonance Imaging)等の画像診断が行われる。画像診断により腫瘍の存在を認められた患者に関して、手術により組織を採取し生検を行うことで腫瘍の種類を断定し診断が下され、それに適した治療行為が開始される。このような画像診断は高価で大型の装置を必要とするので、基本的に認知障害などの症状が出た後に初めて利用される。そのため、腫瘍発見時には治療困難な状態まで成長・拡散が進行している場合が多い。したがって、画像診断を行うきっかけとなる、より早期の診断に向けた、広範囲の対象に対し一斉に行えるマスキリーニング検査手法が強く求められている。

マスキリーニング検査で使用する検体として、血液、咽頭粘液、尿、呼吸等が候補に挙がる。血液やインフルエンザの抗原検査に用いられるような咽頭粘液の採取には痛みを伴い侵襲的である。また、呼吸は採取が簡単である一方、サンプルの長期保管が困難である。一方で、尿検体は、非侵襲的に採取可能かつ容易に保存ができるため、研究および実用の両面で非常に優れた検体と言える。また、尿中にはタンパク質や miRNA、揮発性有機分子など様々な物質が含まれていることが知られている。その中でも尿中揮発性分子は抽出が容易であり、種類も多く(数 100 種類)生体情報も十分に含むことから注目され初めており、疾病診断研究でも利用されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「尿の揮発性成分の網羅的分析と機械学習を組み合わせ、脳腫瘍患者を簡便に見分けるマスキリーニング検査手法を開発する」ことである。非侵襲的で簡便な脳腫瘍診断ツールの開発は、患者の早期発見・死亡率低下につながる重要な研究課題である。しかし、これまでそのような診断ツールは殆ど開発されてこず、実用化されているものは存在しない。本研究では、簡単・非侵襲的に取得可能な尿から放出される揮発性分子群を、ガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)から作成した 2 次元画像と申請者の所属研究室が独自に開発した機械学習法を用いて網羅的に解析することで、健常者と脳腫瘍患者の判別を行った。さらに、サイズが大きく高価な GCMS の代わりに、より迅速・簡単に測定が可能で小型・安価なガスセンサを用いて脳腫瘍患者と健常者の判別に挑戦した。

## 3. 研究の方法

### (1) ガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)

75 人の CNS 腫瘍患者と 77 人の健常者の尿中 VOCs を、固相マイクロ抽出(SPME)法により抽出後、GCMS によって測定した。GCMS データは、7 対 3 の比率でトレーニング用データとテスト用データに分離して、それぞれ機械学習と判別に使用した。この分析には、申請者の研究室で独自開発したデータ解析プログラムを使用した。まず、GCMS データから 2 次元画像(保持時間×m/z)を作成後、正規化やノイズ除去などの画像処理を行った。次に、この 2D 画像内のピクセルごとの強度を特徴量として、ロジスティック回帰を利用した機械学習によって診断モデルを構築した後、判別テストを行った。さらに、診断モデルから再構成した特徴量の重要度 2D 画像を使用して、CNS 腫瘍患者と健常者の判別に効果的に寄与したバイオマーカー候補 16 分子を特定した。尿中のこれらの化合物の濃度は、検量線を作成して定量した。

### (2) ガスセンサ測定

30 人の CNS 腫瘍患者と 30 人の健常者の尿中 VOCs をシリカモノリス吸着剤によって抽出した。吸着剤を、センサ用チャンバーと接続した加熱装置内に設置後、加熱装置の温度を段階的に昇温(図 3d)することで、吸着化合物を徐々に脱離させた。脱離分子の測定にはポリマー被覆カーボンブラックセンサを用い、抵抗値変化をセンサ応答として読み取った。得られたデータを利用して機械学習を行い、CNS 腫瘍患者と健常者の判別テストを行った。また、CNS 腫瘍患者および健常者の尿と同じ濃度でいくつかの尿中バイオマーカー候補を含む尿模倣水溶液を調整し、カーボンブラックセンサによって測定した。

## 4. 研究成果

### (1) ガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)

図 1a, 1b は、それぞれ、健常者および CNS 腫瘍患者の尿中 VOCs の 2D GCMS 画像の例を示している。尿中の VOCs に由来する多くの信号が両画像で観察され、2 つの画像間で異なる信号の存在も確認できた。得られた画像のうち 7 割を使用して機械学習により診断モデルを構築後、残り 3 割のデータで診断テストを行ったところ、患者と健常者を 100%の精度で識別することに成功した。図 1c は特徴量重要度を画像化したものであり、ピンク色と水色の領域はそれぞれ、健

常者と比較して CNS 腫瘍患者の尿中で増加、あるいは減少した化合物由来の信号を示している。特徴量重要度の絶対値が大きい領域から 16 化合物を尿中バイオマーカー候補として同定し、次いで定量した(図 2a)。次に同定したバイオマーカー候補化合物と CNS 腫瘍形成との関係を探るため、正常脳細胞(正常 ヒトアストロサイト:NHA)と脳腫瘍細胞(U87wt)を培養し、その培地に含まれる VOCs を尿と同条件で GCMS 測定した。腫瘍細胞培養液と正常細胞培養液の尿中バイオマーカー候補の濃度の違いを図 2b に示す。正の値は U87wt 培養液、負の値は NHA 培養液において、その VOCs 濃度が高いことを示す。棒グラフのピンク色・水色は、CNS 腫瘍患者および健康者の尿分析結果と同じ VOCs の増減傾向であることを示している。結果として、患者の尿中で相対的に高濃度検出された 8 つの VOCs のうち 5 つは腫瘍細胞培地中にも多く含まれており、患者の尿中で相対的に低濃度検出された 8 つの VOCs のうち 7 つは、腫瘍細胞培地中でも存在量が少ないことがわかった。この結果は、CNS 腫瘍患者の尿中 VOCs の多くが CNS 腫瘍組織から分泌される VOCs と密接に関連していることを示唆している。

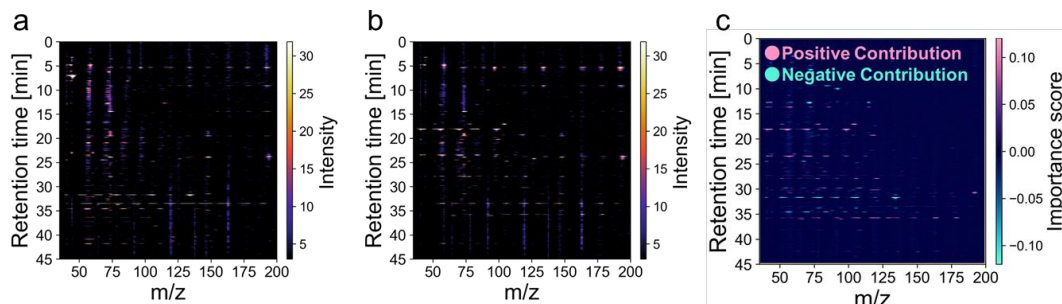


図 1. GC-MS データ画像。(a)(b). 学習に用いたデータ例(健康者(a)、CNS 腫瘍患者(b))。(c). 特徴量重要度画像

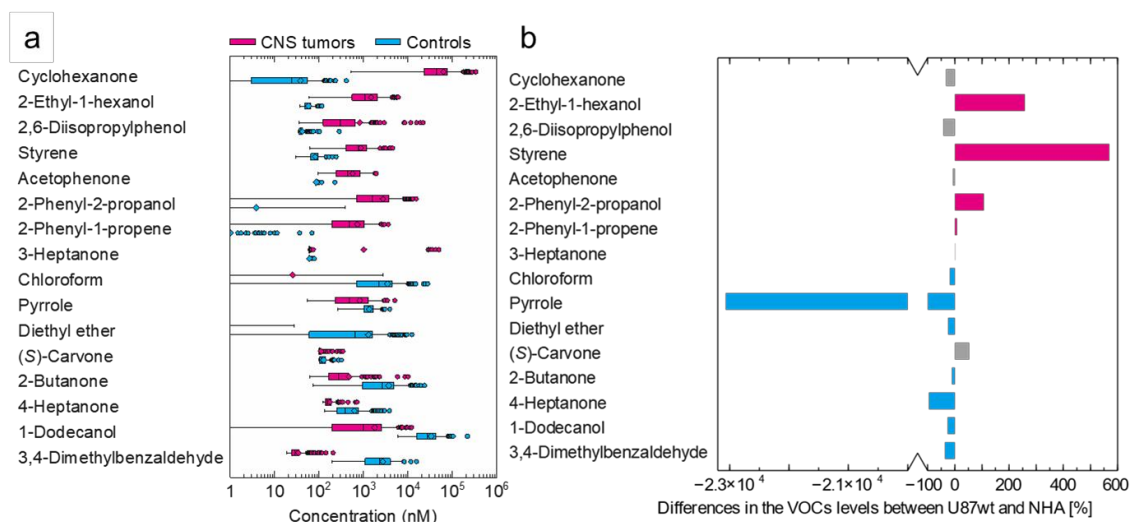


図 2. バイオマーカー候補 16 化合物。(a). バイオマーカー候補化合物濃度の各サンプル間の分布。箱ひげの上端(下端)は第三(第一)四分位数+(-)1.5×IQR を示しそれ以上(以下)の値を外れ値として点描。(b). 腫瘍細胞培養液と正常細胞培養液における尿中バイオマーカー候補濃度の違い。

## (2) ガスセンサ測定

CNS 腫瘍患者をより迅速かつ簡便に診断するために、GCMS の代替として小型のカーボンブランクガスセンサを使用して尿 VOCs の測定を行った。初めに上記 GCMS で得られた VOCs の尿中濃度を参考に、特に特徴的な 5 種類の VOCs を含んだ尿模倣水溶液を調製し、この尿模倣液由来の VOCs を吸着剤で抽出し、センシングシステムで測定した。得られたデータの波形処理後(図 3a)、機械学習を利用して判別を行った結果、97%の分類精度を達成した。次に、実際の尿を測定し(図 3b)、同様の条件で学習、評価を行ったところ 76%の精度で判別することに成功した。ここで、センシング波形に着目すると、尿模倣液と実際の尿で、加熱脱離の第二段階において腫瘍サンプルで応答が大きいという共通の特徴がある。これは、尿模倣水溶液中に加えたバイオマーカー候補化合物が実際の尿のセンサ判別に大きく寄与する事を示唆している。続けて、CNS 腫瘍患者の尿中で特に多く検出されたシクロヘキサノンと健康者の尿中で多かった 3,4-ジメチルベンズアルデヒドを単一の化合物ごとにセンサ測定したところ、図 3c のような挙動が得られた。第二段階の昇温時に、健康者尿に多く観察された 3,4-ジメチルベンズアルデヒドによる顕著な応答はないのに対し、腫瘍患者に多く検出されたシクロヘキサノンでは強い応答が観察された事から、シクロヘキサノンの判別への寄与が特に大きい事が示唆された。実際の尿の測定で判定精度が高くない原因として、尿模倣溶液と比較して実際の尿では、バイオマーカー候補化合物の存在量のばらつきが大きく、また、その他の物質も多く存在していることが挙げられる。GCMS ほどの分離性能と感度の無い今回のセンサ測定系では、他の物質の影響が大きく、高精度での判定は難しかったと考えられる。

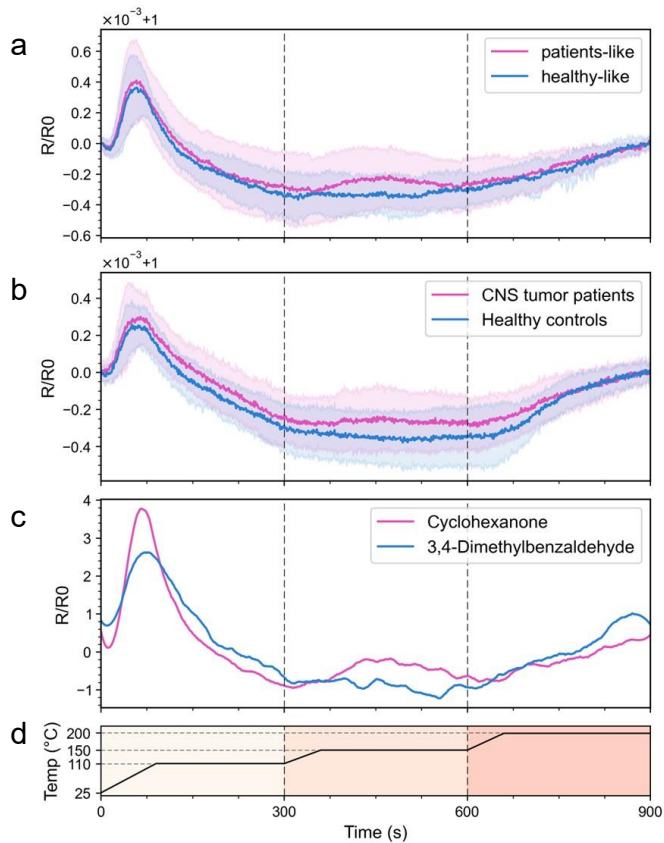


図 3. カーボンブラックセンサによる VOCs の測定。(a).尿模倣溶液の測定 (全測定の平均値 $\pm$ S.D.)。(b).実尿の測定 (全測定の平均値 $\pm$ S.D.)。(c). バイオマーカー候補化合物単独での測定 (尿中濃度と同程度)。(d). 吸着材加熱脱離の昇温過程について

### (3) 将来展望

マスククリーニング検査に適した小型の化学センサによる測定においては、腫瘍患者と健常者の判別精度が76%とまだ不十分である。センサ感度の上昇や測定条件の検討、複数種のセンサの利用や、データ数の増加によって、判定精度の向上できると考えられる。このような小型センサシステムによる尿揮発成分分析を利用した病理診断が可能になれば、将来的に排尿時に自動的に健康管理を行えるシステムへの応用できることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jirayupat Chaiyanut, Nagashima Kazuki, Hosomi Takuro, Takahashi Tsunaki, Tanaka Wataru, Samransuksamer Benjarong, Zhang Guozhu, Liu Jianguang, Kanai Masaki, Yanagida Takeshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Image Processing and Machine Learning for Automated Identification of Chemo-/Biomarkers in Chromatography?Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14708 ~ 14715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c03163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jirayupat Chaiyanut, Nagashima Kazuki, Hosomi Takuro, Takahashi Tsunaki, Samransuksamer Benjarong, Hanai Yosuke, Nakao Atsuo, Nakatani Masaya, Liu Jianguang, Zhang Guozhu, Tanaka Wataru, Kanai Masaki, Yasui Takao, Baba Yoshinobu, Yanagida Takeshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Breath odor-based individual authentication by an artificial olfactory sensor system and machine learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6377 ~ 6380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC06384G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊達基起, 田中航, Chaiyanut Jirayupat, 長島一樹, 高橋綱己, 細見拓郎, 夏目敦至, 安井隆雄, 馬場嘉信, 柳田剛
2. 発表標題 機械学習を使用した尿中揮発成分分析に基づく中枢神経系腫瘍の診断
3. 学会等名 第6回ナノ分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊達基起, 田中航, Chaiyanut Jirayupat, 長島一樹, 高橋綱己, 細見拓郎, 夏目敦至, 安井隆雄, 馬場嘉信, 柳田剛
2. 発表標題 機械学習を用いた尿中揮発性成分分析に基づく中枢神経系腫瘍患者の診断
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wataru Tanaka
2. 発表標題 Early Diagnosis of Central Nervous System Tumors Based on Urinary Volatile Organic Compounds Analysis
3. 学会等名 e-ASIA Workshop on “ Microfluidic nanowires coupled with gold nanoparticles for Dengue viral disease diagnosis ” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長島一樹、C. Jirayupat、細見拓郎、高橋綱己、田中 航、柳田 剛	4. 発行年 2022年
2. 出版社 北隆館 / ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊「細胞」2022年3月号 ガスバイオロジーの医学への展開 「ノンターゲットガスメタボロミクス・生体センシングへ向けたAIデータ解析」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------