

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：21401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650635

研究課題名(和文)安定同位体比を用いた肺がんの初期診断技術の開発

研究課題名(英文)The initial diagnosis for lung cancer using isotope ratio

研究代表者

川島 洋人(Kawashima, Hiroto)

秋田県立大学・システム科学技術学部・助教

研究者番号：60381331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんの初期診断方法の開発のために、様々な分析条件の試験を行った。その結果、多数のVOCsの定性や感度を上げることができ、少ない呼気の捕集量での試験が可能になり、がん患者への負担を大幅に軽減することができた。呼気の測定においては、食事による変化もなく、また長時間の飲食の制限も必要ないことがわかった。喫煙者の呼気中のベンゼンは、喫煙後から約6時間の経過で一般の値まで減少することが分かった。またメンソール煙草の喫煙者の呼気からはベンゼンやトルエンが高く検出され、特に注意すべきであると考えられた。また、加熱濃縮器を用いることで、低濃度域のVOCs中の炭素安定同位体比の高精度測定法が可能になった。

研究成果の概要(英文)：For the development of the inspection method for lung cancer, we conducted various tests. As the results, the developed method can be measured lot of VOCs for high accuracy, and reduced a patient burden by small exhalation. As the exhalation test, there is almost no difference exhalation by different food and no long time by prohibited food and drinks before exhalation test. The exhalation for smokers included benzene than non-smoker. The benzene of exhalation was decreasing after smoking 6 hours. And, the exhalation for smoking menthol cigarettes included high level benzene and toluene. Using thermal desorption system, carbon isotope for many VOCs can be measured for high precision and accuracy.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：肺がん 初期診断 安定同位体比 分析化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がんの現状と問題点

日本におけるがんの死亡率は年々増加し、全死者数のうち3人に1人は、がんによって死亡している。中でも肺がんの死亡率は、1995年に胃がんを抜いて1位となった。2007年に厚生労働省では「がん対策推進基本計画」を掲げ、がん検診の受診率を50%以上にするを個別目標の1つとしているが、2010年の40歳以上の肺がん検診受診率は、全国平均で約23%であり、目標には届いていない。

がん検診には、診断方法が簡易であること、どの医療機関でも受診できること、身体に非侵襲的であることなどが望まれる。現在、肺がんの一次検診では「胸部X線検査」や「喀痰細胞診」が実施されているが、いずれの検診でも課題がある。「胸部X線検査」は心臓や骨などに隠れて見えにくい部分が存在し、また小さな(2cm未満)がんは検出されにくい。「喀痰細胞診」は検出感度が40%程度と低いため、数回の検査が必要なのが挙げられる。また、肺がんが初期段階で見つかった場合、手術後の5年生存率は約8割であるが、病期が重くなるにつれて生存率は急激に低くなる。そのため、いかに迅速に見つけ、初期段階で治療に結びつけるかが重要になる。

(2) 呼気 VOCs を使った診断技術

1971年に Pauling によって、呼気中には数百種の VOCs が低濃度で含まれていることが調査され、1985年に Gordon によって、肺がん患者特有の数種の VOCs が有意に含まれていることが証明された。さらに、90年代後半から現在まで Phillips らによって、肺がんの呼気診断への実用化に向けた研究が精力的に進められており、近年、肺がんのマーカーとなる VOCs を36種に限定し、各物質の生化学的経路についての調査も行っている。

しかし、既往の研究の方法にはいくつかの課題がある。1つ目に物質の正確な定性、定量ができていないことである。既往の研究における定性は、装置付属のデータベース機能を利用しており、それが本当にその物質かどうかは、証明が不十分であると言わざるを得ない。さらに、定量は物質が定性されないために全く行われておらず、物質の強度(アバンドス)のみである。2つ目に分析メソッドが不透明であることである。独自の呼気捕集装置を使用して分析を行っているものの、装置の詳細や手順が不明確であるため、確度・精度がどの程度あるのか不明である。

2. 研究の目的

本研究ではこれらを解決するために、データベース機能だけでなく、標準混合試薬を用いた確実な定性、定量を行うことで、より精度の高い分析条件を確立することを目指す。さらに、確立した分析条件を使って、喫煙後や食事後など、様々なパターンの分析を行い、成分の検出傾向や変化傾向を把握すること

を第一の目的とした。また、低濃度域に絞った VOCs 中の炭素安定同位体比の測定方法の開発も行った。

具体的には以下の項目の確立を目指す。がん患者の負担軽減や簡易診断のためには、呼気捕集量を減らす必要がある。そこで、本研究では検出感度を高めることで3L程度の捕集量での高精度分析方法を確立する(高精度方法の確立は中間発表要旨に記載した)。また、非肺がんの呼気がどのような傾向があるか、喫煙の傾向、煙草の種類の違い、食事によって呼気に変化があるかなどを明らかにし、またどの程度の低濃度域の VOCs の炭素安定同位体比が測定可能かについても考察した。

3. 研究の方法

(1) TDS/CIS-GC/MS の分析

加熱濃縮器と GCMS は TDS/CIS4 (ゲステル社製)-6890/5973MSD (アジレントテクノロジー社製)を用いて分析を行った。分析条件等は以下の表1に示す。

表1. TDS 及び GC の分析メソッド

TDS	Sample Remove Solvent Vent (Purge time: 3min) 30°C (4min)→60°C/min →280°C (3min)
	Vent flow: 20.9mL/min Vent pressure: 190kPa (0min) Split vent line flow: 19mL/min (0min)
GC	Pressure: 190.7kPa Total flow: 23.6mL/min Equity™-1 (SUPELCO) 60m×250µm.i.d., 1.0µm film 35°C(4min)→7°C/min→170°C →10°C/min→250°C (10min)

(2) 呼気及び大気の捕集と吸着

大気は、サンプリングポンプ(フレックスポンプ, GLサイエンス社製)の排出口にテドラーバッグを取り付けて捕集した。呼気は、テドラーバッグにタイゴンチューブと逆流弁を取り付け、逆流弁を啜って呼吸することで捕集した。なお、どちらも捕集量は3Lとした。その後、捕集した呼気及び大気が入ったテドラーバッグ、吸着管、ダイヤフラムポンプ(KNF)の順にタイゴンチューブを用いて接続し、物質を吸着管に吸着させた。なお、使用する吸着管は、吸着剤の量や密度によって吸着の際に流速の変化があるため、吸着量が3Lとなるようあらかじめ計測したのち、吸着を行った。結果は、呼気から大気の濃度を差し引いて算出した。また、以降に示すデータは、3Lの際に導入された絶対量としてすべて記載した。

(3) アンケートについて

呼気の捕集の際は、被験者に事前アンケート

トに記入してもらい、喫煙歴や食事内容、運動の有無、体調などの呼気に影響があると思われる項目について調査した。今回は、性別、食後の経過時間、喫煙の3点について考察を行った。

(4) 安定同位体比の測定について

呼気のような低濃度域のVOCs中の安定同位体比の測定について考察を行った。分析装置は気体濃縮器(GAS-10, 東亜 DKK 社製)とGC/C/IRMS(Trace GC, MAT253, 共にサーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を融合した装置を用いた。

4. 研究成果

(1) 喫煙者/非喫煙者の違いと喫煙後の変化

喫煙者(9人)(喫煙後1時間以内)と非喫煙者(9人)の呼気を測定した結果は、喫煙者の呼気において、44成分中11成分で3ng~81ngと定量限界値以上、検出された(図1参照)。11成分の中でもベンゼンとトリクロロエチレンは、喫煙者と非喫煙者の差がそれぞれ28ng, 6ngと大きく、喫煙の有無を判別することができる可能性があった。ベンゼンは既往研究においても、非喫煙者に比べて喫煙者の呼気中で高濃度であることが示されており、これは本研究と同様の結果であった。

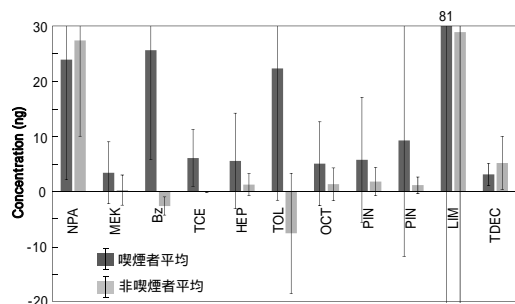


図1. 喫煙者と非喫煙者の比較
(図中の物質名は略語を使用)

喫煙後の時間経過と共に呼気中のベンゼン濃度は減少することが分かった(図2参照)。喫煙者の呼気中のベンゼン濃度が非喫煙者の値まで減少するには、喫煙から6時間以上の経過する必要がある。ベンゼンは既往研究において、肺がんのマーカーとしても挙げられているが、喫煙者の場合は喫煙後、一定時間(本研究としては6時間以上)経過してから呼気を捕集する必要があることが分かった。

(2) 煙草の種類による呼気の比較

煙草の種類に注目し、種類によって喫煙者の呼気に違いがあるのか調査した(普通煙草とメンソール系煙草)。普通煙草(5人)とメンソール系煙草(6人)の結果は、メンソール系煙草の喫煙者の呼気から、ベンゼンやトルエンが、それぞれ+19ng, +24ngと普通煙草に比べて高く検出された(図3参照)。厚

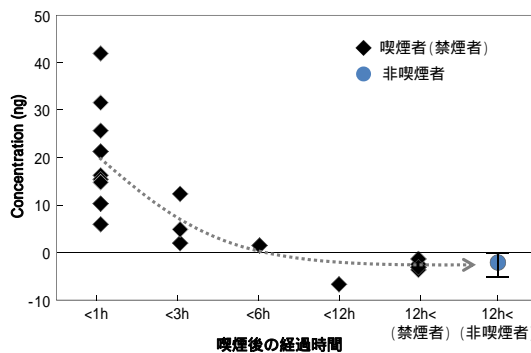


図2. 喫煙後の呼気中ベンゼンの経時変化

生労働省によると、主流煙中のベンゼンやトルエンの含有量はタール数と相関があり、またメンソール系煙草は、タール数の割にはベンゼンやトルエンの含有率が高いことを示しており、本実験の結果はそれらを反映していた。喫煙者の呼気分析において、メンソール系煙草及び、タール数の高い煙草での喫煙者は、呼気捕集の際に特に注意すべきであることが分かった。

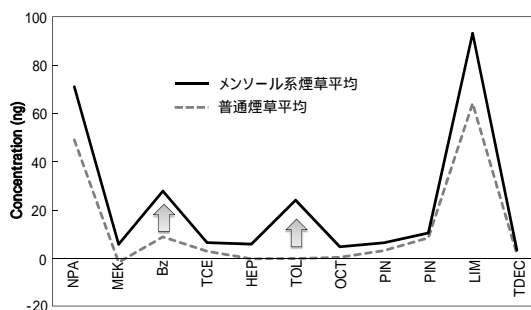


図3. 喫煙者の煙草種類別の呼気比較
(図中の物質名は略語を使用)

(3) 飲食前後の呼気の変化

非喫煙者において、飲食後1時間以内(12人)と飲食後3時間以上(5人)の呼気を測定した。各成分の飲食前後の平均の差が3ng以上であったのは、44成分中4成分であり、飲食による呼気の変化はほぼないことが分かった(図4参照)。既往研究の測定基準では捕集前に7~12時間の断食の必要性が示されているが、本研究の結果では長時間の飲食の制限は必要ないと推察された。

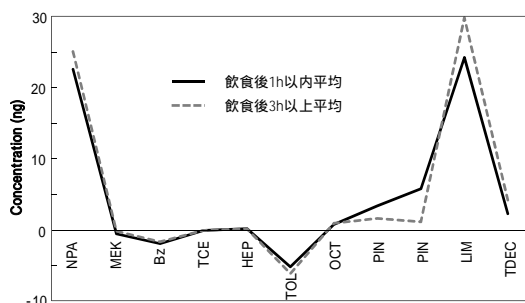


図4. 飲食前後の呼気比較
(図中の物質名は略語を使用)

(4) 低濃度域の VOCs の炭素安定同位体比の測定の現状

本研究で用いた GC/C/IRMS システムにおいては、様々な条件検討の結果、VOCs 標準ガス 58 成分中 36 成分の測定が可能となり、標準ガスの $\delta^{13}\text{C}$ 値は -49.7 (3-メチルペンタン) ~ -22.3‰ (n-ヘプタン) と幅広い値を取ることが分かった。また繰り返し測定の分析精度は 0.07 (シクロヘキサン) ~ 0.85‰ (メチルシクロヘキサン) と、いずれも高精度な結果となることが分かった。ただし、一般環境濃度レベルにおいては、現状において 150L 以上の大気捕集量が必要であり、実際にかん患者から呼気をこの分量を採取することは負担も大きく、また簡易検査するためには捕集に多大な時間を有するなど、課題も多いと予測された。

(5) 課題とさらなる研究の進展

本研究で対象とした一般の呼気では、年齢層は学生を中心としたほぼ 20 代の被験者であった。そのため、今後はもっと年齢層を広げた呼気の捕集と分析を行う必要がある。特に既往研究においては、健康な被験者を約 200 人測定しているため、同じ人数を測定すると考えると、本研究の約 5 倍のデータを測定することが必要である。また、運動後や歯磨きの有無、体調などの要因では呼気への変化があるのか、詳細な要因を設定し調査が必要である。

また安定同位体比の分析においては、測定感度をさらに高めることが必須である。

(6) まとめ

安定同位体比を用いた肺がんの初期診断方法の開発のために、基礎的データの検討を行った。TDS/CIS4-GC/MS を用いて呼気中 VOCs を分析するための様々な分析条件の試験を行い、室内大気分析用標準物質 50 成分のうち 44 成分が定性可能であった。検出限界、定量限界の平均はそれぞれ約 1ng、約 3ng であった。呼気の捕集量を少なくすることができ、被験者への負担を軽減することができた。また、確立させた分析方法を用いて、呼気や室内大気の測定を行うことができた。また、呼気の測定においては、男女差や食事による変化はほとんどないことが分かった。本研究の結果では長時間の飲食の制限は必要がないと推察された。また、煙草を吸わない一般の人と喫煙者を比較し、喫煙による呼気への影響から喫煙者への制限を考察することができた。喫煙者の呼気中のベンゼンは、喫煙後から時間が経つにつれて減少傾向にあることが分かり、約 6 時間の経過で喫煙者の値は一般の値まで減少することが分かった。そして、喫煙者の中でも、煙草の種類によって変化があることが分かった。普通煙草とメンソール煙草の 2 種類に分類した時、メンソール煙草の喫煙者の呼気から、ベンゼンやトルエンが高く検出された。メンソール系煙草やタール数の高い煙草での喫煙者は、呼気の捕集の際に特に注意すべきであると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Hiroto Kawashima, Mai Murakami (2014), Measurement of the stable carbon isotope ratio of atmospheric volatile organic compounds using chromatography, combustion, and isotope ratio mass spectrometry coupled with thermal desorption, *Atmospheric Environment*, vol.89, pp.140-147, 査読あり

Nami Kikuchi, Hiroto Kawashima (2013), Hydrogen isotope analysis of benzene and toluene emitted from vehicles, *Atmospheric Environment*, vol.72, pp.151-158, 査読あり

[学会発表](計 2 件)

Nami Kikuchi, Hiroto Kawashima (2013), Stable hydrogen isotope ratios and fractionation factors of VOCs during ultraviolet irradiation, Abstract of 5th FIRMS network conference, pp.69-70

菊池奈美, 川島洋人 (2012), 光化学反応によるベンゼン、トルエンの水素安定同位体の同位体効果, 大気環境学会年会講演要旨集, vol.53, pp.300

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 洋人 (KAWASHIMA HIROTO)
秋田県立大学・システム科学技術学部・助教
研究者番号: 60381331