

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293429

研究課題名(和文) 頭頸部・上部消化器がん発症予知に係わる呼気中臭気情報と関連パラメーターの探求

研究課題名(英文) Molecular analyses of volatile organic metabolites identified from human odor and the association with cancer of head, neck and upper digestive organ

研究代表者

安細 敏弘 (Ansai, Toshihiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80244789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで行われてきた国内外の疫学研究の成果を踏まえ、口腔状態と消化器がん発症との関連性を臨床データならびに共同研究者である李教授と共同で新しく開発された吸着剤を用いて唾液や呼気からの臨床サンプル中の揮発性有機化合物(VOC)を詳細に分析し、これまでに知られていない口腔・全身由来のパラメーターを探索することが目的である。李ラボで開発された薄膜マイクロ抽出法を用いてGC-MS分析を行い、疾患診断の可能性について検討を行った。その結果、再現性の高い成分として唾液から34成分、尿から33成分が確認された。今後、患者からのサンプルを採取してコントロールとの差異について検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：Disease diagnosis based on volatile organic compounds (VOCs) that are excreted from the human body is being realized in recent years. In this study, we report a novel method for analyzing VOCs present in healthy human saliva and urine via thin-film microextraction (TFME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The VOC extraction was conducted with polydimethylsiloxane (PDMS) films hybridized with ZSM-5 that is one of aluminosilicate zeolites. The saliva and urine samples were collected from 8 healthy volunteers. Approximately 50 to 100 VOCs were obtained from the individual samples, among which 34 and 33 compounds were reproducible for the saliva and the urine samples, respectively. The current study based on TFME using PDMS/ZSM-5 hybrid films would provide a potential methodology for the sensitive analysis of VOCs or new biomarkers present at trace levels in biological samples.

研究分野：予防歯科学・口腔衛生学

キーワード：呼気 唾液 口臭 頭頸部がん 上部消化器がん

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の調査によると癌(悪性新生物)による日本人の死者数は毎年30万人以上であり、癌の早期発見(早期診断)は現代医療において最も重要な関心事となっている。癌早期発見のための最近のアプローチとして、陽電子放射断層撮影(Positron Emission Tomography, PET)による癌検査方法が注目されているが、造影剤の安全性、検査費用、部位(組織)ごとに診断結果の正確さが異なるなどの課題を抱えている。一方、生理学的または病理学的プロセスや治療薬に対する薬理的反応の判断指標としてバイオマーカーが広く用いられている。これまでDNAやmRNA、タンパク質、血管新生物、神経伝達またはホルモン作用に関わる様々な物質がバイオマーカーの候補となってきた。それに加え、人体から排出される揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds, 以下VOC)が体内の健康状態を反映し、癌をはじめとする様々な病気と深く関係していることが最近の研究から明らかになっている。

## 2. 研究の目的

ヒトの唾液および尿中に含まれる分子量が数十から数百までの多くのVOC分子情報をもとに、疾患に高い相関性を示す新規バイオマーカーの発見を目指すことである。

## 3. 研究の方法

### PDMS/ZSM-5 複合膜の開発

李ラボと共同で、これまでの主流であったポリジメチルシロキサンに、ゼオライトを混ぜ合わせ、加熱重合した膜を開発した。ゼオライトはサイズが非常に細かいため、これを加えることで、揮発性の強い低分子有機化合物の吸着に対して有利と考えられる。膜の断面の顕微鏡写真で判断したところ、PDMSとZSM-5がしっかり重合し、強固な構造していることがわかった。

### 臨床サンプルの採取

安静時唾液2mLを吐唾法により試薬瓶にて採取した。唾液採取にあたり、少なくとも30分前は飲食、口腔清掃、喫煙を避けてもらった。また、尿については5日間連続して起床してすぐに採取し3時間震とう後用いた。

### GC-MSの測定条件

GC-MS分析にはJMS-Q1000GC(JEOL, Japan)を用いた。キャピラリーカラムはDB-WAX(ポリエチレングリコールベースの高極性固定相、内径0.25mm、吸着層厚み0.5 $\mu$ m、長さ30m)を用いた。GC注入口の温度は230 $^{\circ}$ Cでキャピラリーカラムの温度は40 $^{\circ}$ Cで3分間保持し、10 $^{\circ}$ C/minで230 $^{\circ}$ Cまで昇温し、10分間保持して測定した。キャリアガスは超

高純度ヘリウムガス(純度99.999%)を1mL/minの速度で流した。

## 4. 研究成果

PDMS/ZSM-5複合膜に導入したZSM-5の影響を調べたところ、含有量が20wt%の時に最も高い抽出効果が見られた。また、20wt%以上の含有率ではゼオライトの分散性や膜の安定性が低下したため、本研究では唾液および尿中VOCの抽出にPDMS/ZSM-5(20wt%)複合膜を用いた。

唾液分析に用いた8名の被験者の中で6名は20代男性であり、それぞれの被験者に対して5日間サンプルを採取して分析を行った。残りの2名は中年の男性および20代の女性であり、それぞれ8回と13回サンプルを採取した。唾液や尿などの生体試料中に含まれるVOCには体内の代謝による内因性成分や飲食・日常生活などの影響による外因性成分が混在し、日によって変動する可能性が極めて高い。

尿サンプルのGC-MS分析は唾液を提供した20代男性6名から唾液採取日と同じ日に採取した尿を用いて行った。本研究ではGC-MS分析に用いた唾液および尿サンプルの数はそれぞれ51個と30個であった。

PDMS/ZSM-5複合膜を用いて得られた唾液および尿中VOCの分析を行った。質量分析によるVOCの特定には700以上の類似度を示した化合物のみを用いた。尿分析には50mLのサンプルを用いたが、唾液の場合は分泌量が尿に比べ比較的少ないため、2.0mLの唾液に3.0mLのイオン交換水を加え、試料の流動性を向上させた。本研究において被験者一人当たりの唾液または尿から約50~100種類のVOCが検出されたが、その中の一部のVOCにおいて良好な日間再現性が現れた。すべての被験者から良好な日間再現性を示したVOCは唾液と尿においてそれぞれ34と33成分であった。被験者の唾液と尿のGC-MS分析から絞られた47成分は良好な日間再現性を示し、日常生活などの外的要因に大きく影響されないことがわかった。

本研究で試みた連続サンプリング法は得られた各VOCの出現頻度をもとに外的影響を排除するのに役に立つ。検出された各成分の日間再現性を表す指標として、本研究で定義した“出現頻度(appearance frequency, 以下AF)”は毎回の分析において検出できる確率を意味する。見積もられたAF値を、0.7以上(AP $\geq$ 0.7)、0.5以上0.7未満(0.7 $>$ AP $>$ 0.5)、0.5以下(AP $<$ 0.5)の3つのグループに分類した。AP $\geq$ 0.7のVOCは唾液と尿からそれぞれ13と8成分であり、6つの共通成分が検出された。AP $\geq$ 0.7のVOCは多くの被験者の唾液または尿に存在し、外因性と個人差と関係なく人体の一般的な代謝物であると考えられ

る。0.7>AP 0.5の範囲に属するVOCは唾液と尿からそれぞれ2と9成分であった。AP<0.5のVOCは唾液と尿からそれぞれ19と16成分であり、5つの共通成分が検出された。特に、AP値が低い成分は良好な日間再現性を示しながら少数の被験者に制限される。生体試料を分析する際に、VOCの個体間の変動や、内因性と外因性を識別することは非常に困難な作業である。Al-KatebらはヘッドスペーストラップGC-MS法によって健常者10人の10日間の連続唾液分析を行い、すべての唾液サンプルから317成分を検出したが、毎回検出された成分の数は34であり、顕著な日間または個体間変動が見られることを報告している。本研究は同一被験者から連続して生体試料を採取することで、VOCの出現頻度をもとに日間変動と個体間変動を考慮した有意なVOC分子情報の収集が可能になったことに大きな意義がある。

図1には同一被験者から同じ日に採取した唾液(a)および尿(b)サンプルのPDMS/ZSM-5複合膜を介したGC-MSトータルイオンクロマトグラム(以下、TIC)を示す。上述した47成分のピークに番号を付け、2つのTICに表した。47成分以外にも多くの成分が検出されたが、それらの成分は外因性の日間変動性の化合物である可能性が高い。

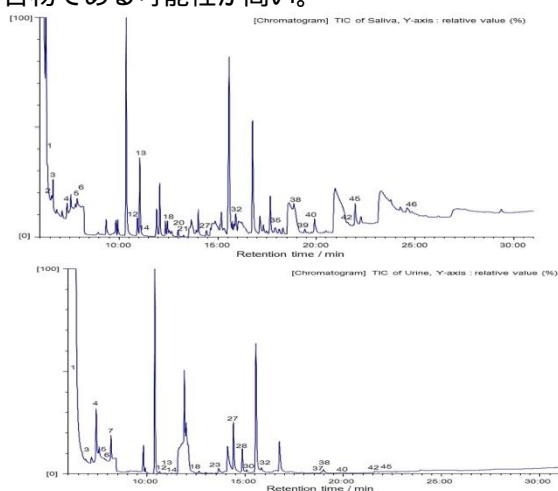


図1 唾液(上)および尿(下)サンプルのGC-MSパターン

図から分かるように、唾液と尿のTICは大きく異なり、TICの複雑さからより多くの成分が唾液中に含まれていることがわかる。唾液と尿からそれぞれ34と33成分が検出でき、両生体試料に共存する成分を除くと23と22成分となる。両生体試料において共通成分が少なく検出成分が異なる理由はそれぞれのVOCの発生源と代謝経路の違いが原因であると考えられる。注目すべきことは1-プロパノール(1-propanol)、1-ブタノール(1-butanol)、シュウ酸(ethanedioic acid)、マツタケアルコール(1-octen-3-ol)、ベンジ

ルアルコール(benzyl alcohol)、フェネチルアルコール(phenylethyl alcohol)およびインドール(indole)の人唾液におけるAP値は0.7以上であり、殆どの被験者の唾液から検出されたが、尿からは殆ど検出されていないことである。これらの成分は血液中に多く存在するが、他の代謝成分に変化した可能性が高いと考えている。

今後、口腔がん等の患者からのサンプルを採取して、がんの発生部位や進行度とVOC成分との関係を調べ、疾患相関性の高いバイオマーカーの探索を行う予定である。

#### 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 1件)

1. 王涛、西松慶恒、茂山博代、安細敏弘、李丞祐：  
唾液・尿中の揮発性有機化合物の分子情報アロマリサーチ 印刷中。

[学会発表](計 3件)

1. 茂山博代、岩崎正則、邵仁浩、角田聡子、栗野秀慈、安細敏弘：PDMS/ZSM-5複合薄膜-GC-MS法による唾液分析と疾患診断の可能性。第64回日本口腔衛生学会・総会(2015年5月27-29日、つくば市)。
2. Shigeyama H, Wang T, Kakuta S, Iwasaki M, Soh I, Awano S, Lee SW, Ansai T: Analysis of Volatile Organic Compounds in Human Saliva via Zeolite-Based Thin-Film Micro-extraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2016(2016年5月11日、北九州市)。
3. 茂山博代、角田聡子、岩崎正則、邵仁浩、栗野秀慈、安細敏弘：PDMS/ZSM-5複合薄膜-GC-MS法による唾液分析と疾患診断の可能性。第65回日本口腔衛生学会・総会(2016年5月27-29日、東京医科歯科大学)

[図書]

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：  
国内外の別：

研究者番号：60419570

取得状況（計 0 件）

(3)連携研究者  
なし

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www2.kyu-dent.ac.jp/dept/oral-health/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安細敏弘 (ANSAI TOSHIHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80244789

### (2)研究分担者

李 丞祐 (LEE SEUNGWOO)  
北九州市立大学・国際環境工学部・教授  
研究者番号：60326460

吉田明弘 (YOSHIDA AKIHIRO)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：20364151

高田 豊 (TAKATA YUTAKA)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40163208

岩崎正則 (IWASAKI MASANORI)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：80584614

邵 仁浩 (SOH INHO)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：10285463

角田聡子 (KAKUTA SATOKO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：70364156

粟野秀慈 (AWANO SHUJI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：20301442

中道郁夫 (NAKAMICHI IKUO)  
九州歯科大学・歯学部・講師