

研究者：茂山 博代 (所属：九州歯科大学 地域健康開発歯学分野)

研究題目：揮発性生体分子情報に基づいた頭頸部がんの病態評価と 新規バイオマーカーの探索

目的：

医療や保健衛生の進歩により、日本は世界有数の長寿国となったが、がんは30年以上にわたり死因第一位の疾患である。厚生労働省の調査によると、がんによる死亡者数は年間37万人を超え、年々増加している。なかでも口腔がんは、罹患者数、死亡者数ともに増加し、2016年は7600人以上が死亡したと報告されている。今後もがん患者は増え続けることが予測され、早期発見・診断が効果的な治療や予後に不可欠である。近年、人体と高い病理学的相関性を示す揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compounds, 以下 VOC) が新たな疾患診断技術として注目されている。VOCは生体内のあらゆる代謝変化を反映し、血液を介し、呼気、唾液、尿、糞便などから排出される。なかでも唾液は、非侵襲性・保存や輸送の簡便性・情報の多様性に優れた生体試料である。一方で、唾液中 VOC に関する報告は少なく、疾患診断への応用は進展していない。

本研究では、VOC抽出効果に優れた薄膜抽出デバイスを開発し、ガスクロマトグラフ質量分析 (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, 以下 GC-MS) を用いて口腔がん患者および健常者の唾液中 VOC の比較検討を行った。口腔がんの病態と相関が高い VOC を同定することで、がんの代謝経路や生化学的供給源を解明する今後の研究に大いに貢献すると考えられる。

対象および方法：

1) 対象者

対象は、九州歯科大学附属病院を受診した口腔がん患者12名および健常者8名とした。健常群は、基礎疾患がなく悪性腫瘍の既往がない者とし、口腔がん群は、化学療法、放射線療法、外科手術、その他代替療法を受けておらず、病理組織検査にて扁平上皮がんと診断された者とした。

2) 唾液の採取

唾液採取の少なくとも1時間前には、歯磨剤や洗口剤を含む口腔清掃や喫煙を禁止した。採取直前に口を水ですすぎ、10mLのガラス瓶に平均2mLの安静時唾液を採取し、直ちに-80℃で保管した。VOCの日間変動や再現性を考慮し、各対象者あたり複数回の唾液採取を行った。

3) ZSM-5/PDMS 複合膜の作製

容量50mLのガラス瓶をZSM-5/PDMS複合膜の支持体として使用した。2液型のPDMSを混合し、硬化する前に、PDMSモノマーに対して20%重量比のZSM-5を加え、混合試料1.0gをガラス瓶の底面に入れた。次いで、25℃で72時間静置したのち、100℃で1時間熱処理を行った。その後、メタノールを加え振とうさせながら3日間複合膜の洗浄を行った。

4) 唾液分析

ZSM-5/PDMS 複合膜付きガラス瓶に、採取した唾液 2 mL を入れ、3 mL の脱イオン純水で希釈した。続いて試料を 3 時間振とうさせ、唾液中 VOC を抽出した後、ガラス瓶を純水で洗浄し、窒素ガスによる乾燥を行った。最後に、100 μ L のメタノールを加え、抽出膜から VOC の再抽出を 30 分間行い、そのうち 1 μ L のメタノールを JMS-Q1000 GC (日本電子株式会社、東京) を用いて GC-MS 分析を行った。

5) 統計解析

主成分分析 (PCA) を用いて、被験者から検出された VOC のクロマトグラフピーク面積について、多変量解析を行った。データの評価は、Origin 9 software (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) を用いた。統計解析には t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果および考察：

健常者 8 名および口腔がん患者 12 名から、それぞれ合計 51 および 24 個の唾液サンプルを採取した。健常群 (n=51) および口腔がん群 (n=24) の試料において、それぞれ 42 種および 73 種の VOC が検出された。両群に共通して検出された VOC は 35 成分であった。多変量解析の結果、全ての被験者から検出された 80 成分のうち 27 成分 (口腔がん群において減少した 10 種の VOC、消失した 7 種の VOC および新たに産生された 10 種の VOC) が両群間の識別に寄与することが明らかになった (図 1a, b)。このうち、12 成分の GC-MS ピーク面積の平均値を比較したところ、健常群と口腔がん群の間には明確な差異が認められたことから、これら 12 成分は口腔がんの高い疾患相関性をもつバイオマーカー候補と考えられた (図 2)。今後、更に試料を増やし、がんの病期と VOC 検出量との相関等について、詳細に検討する予定である。

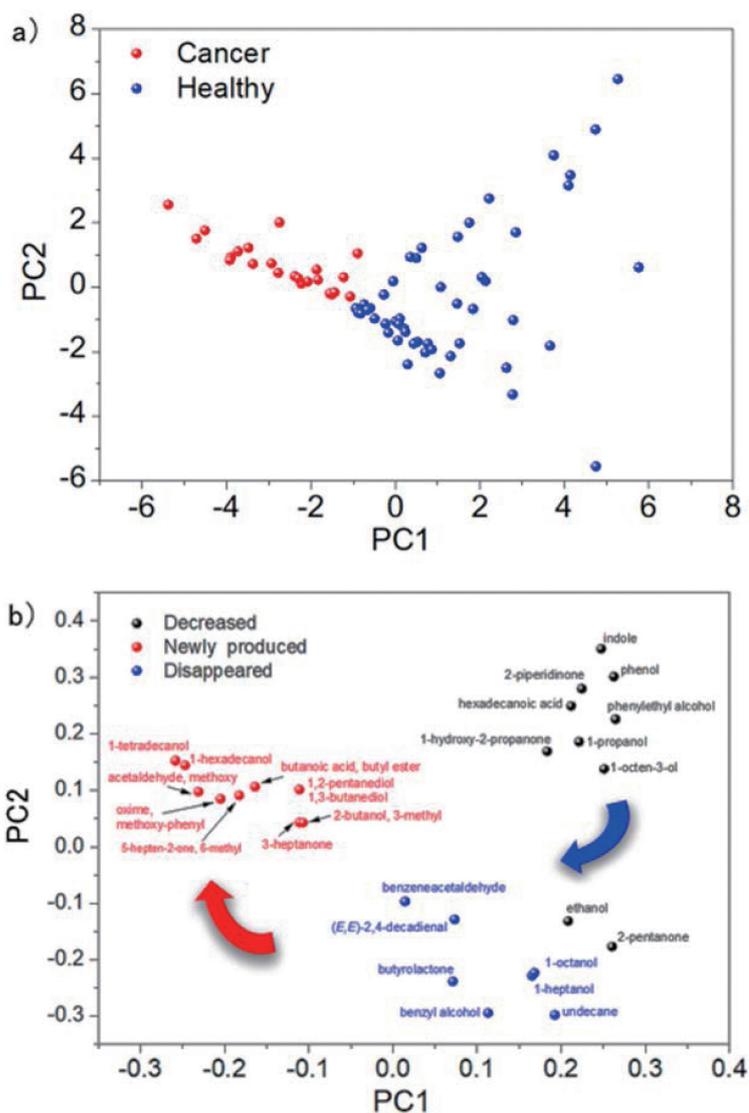


図 1 a) 健常者および口腔がん患者から検出された 27 種の VOC のピーク面積を用いた PCA (PC1 対 PC2) によって得られた 2 次元スコアプロット
b) 第一、第二主成分の因子負荷量から得られた変数間のローディングプロット

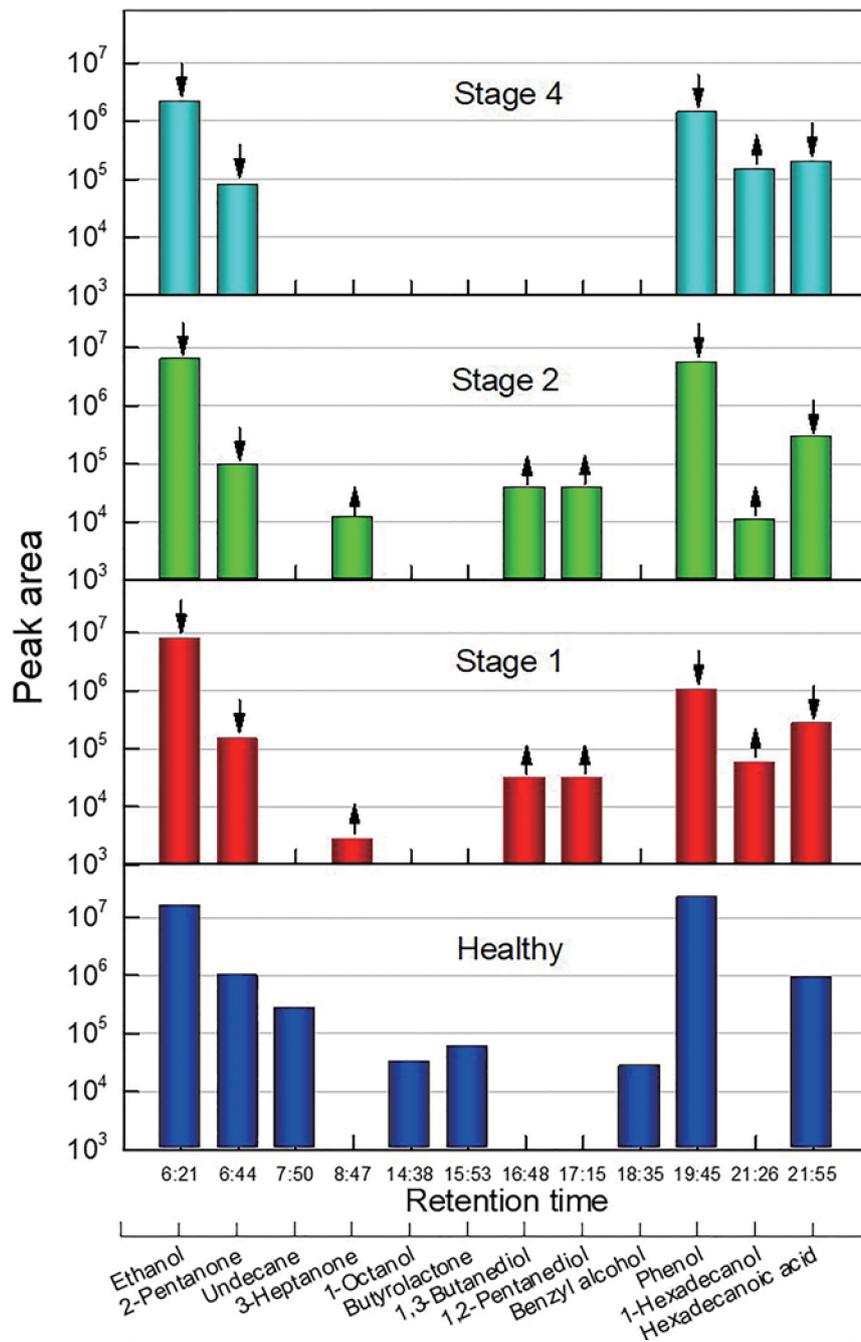


図2 バイオマーカー候補となる12成分のVOC検出量と病期の関連
 口腔がんバイオマーカー候補12成分に対し、GC-MS平均ピーク面積を比較した。口腔がん群は、病期別に分類した。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

1. IADR/ AADR/CADR General Session & Exhibition (March 2017, San Francisco, CA, USA)
2. 第77回九州歯科学会・総会 (2017年5月、福岡県)
3. 第66回日本口腔衛生学会・総会 (2017年5月、山形県)

上記内容含め、学術雑誌投稿中