

唾液から「癌匂い」の解明

匂いによる新しい口腔癌 診断技術の確立

2018年12月10日

公立大学法人北九州市立大学 国際環境工学部

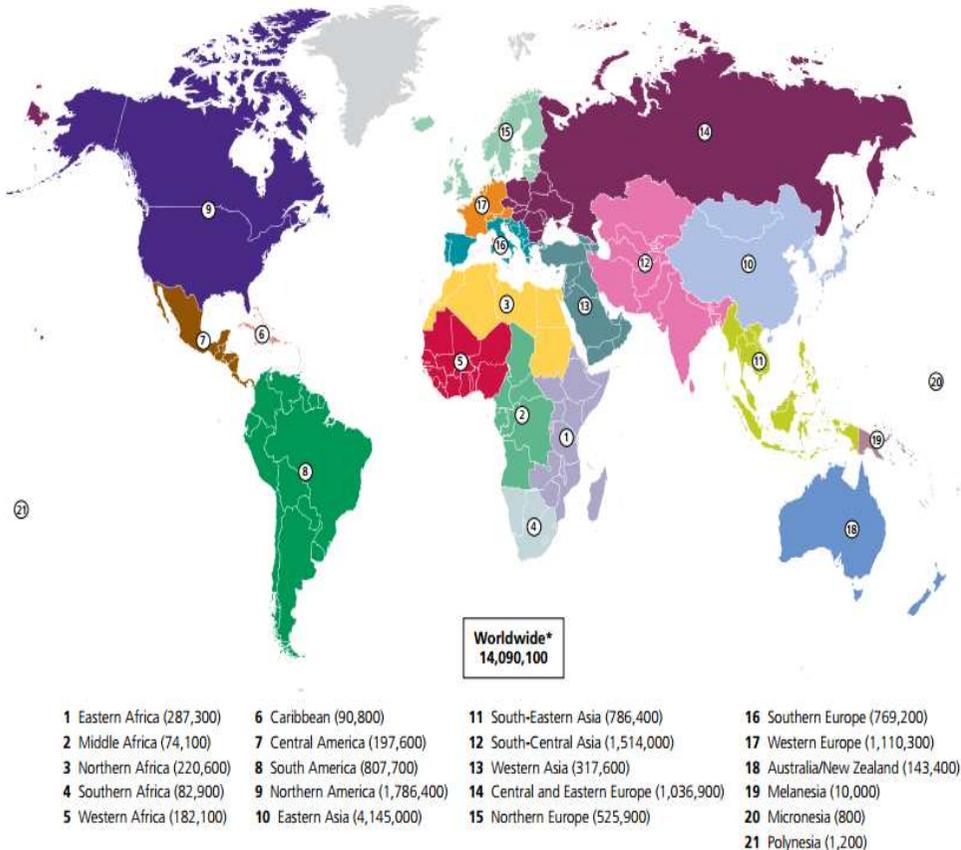
教授 李 丞祐

九州歯科大学 地域健康開発歯学分野

教授 安細 敏弘

世界の新規がん患者数

Estimated Number of New Cancer Cases by World Area, 2012*



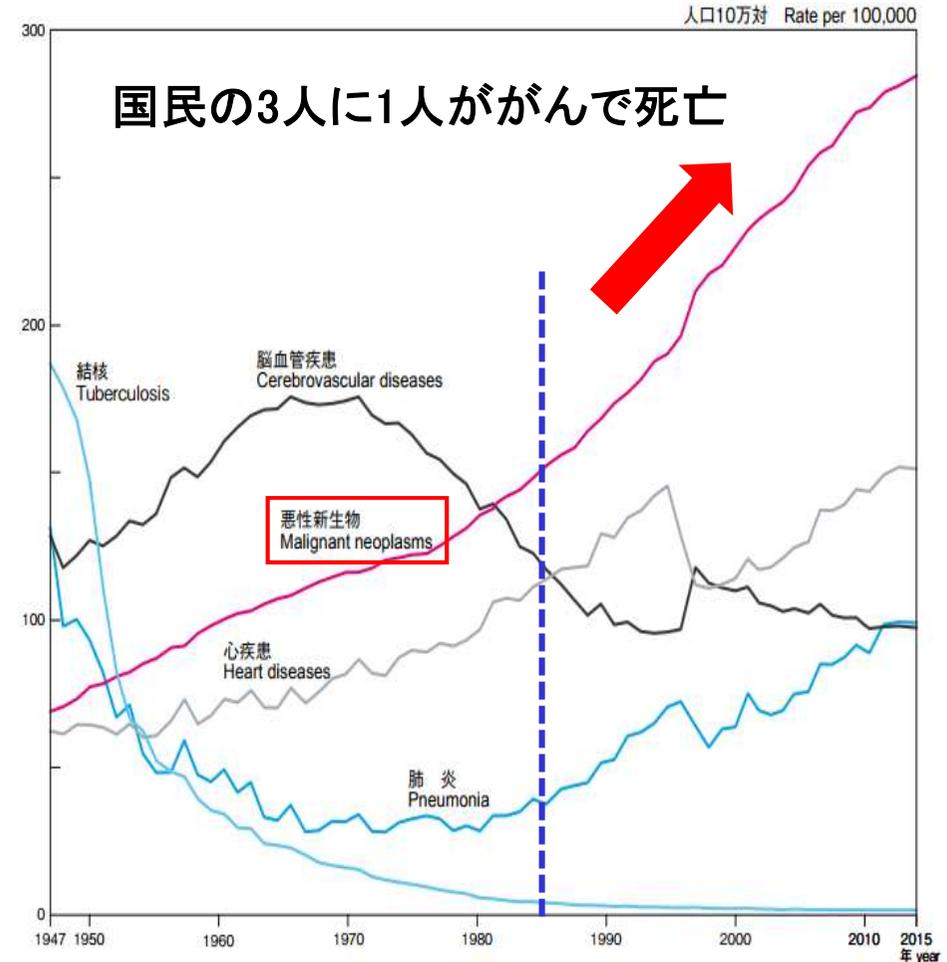
*Region estimates do not sum to the worldwide estimate due to calculation method.

Source: GLOBOCAN 2012.

アメリカがん協会

<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/>

日本の主要死因別死亡率

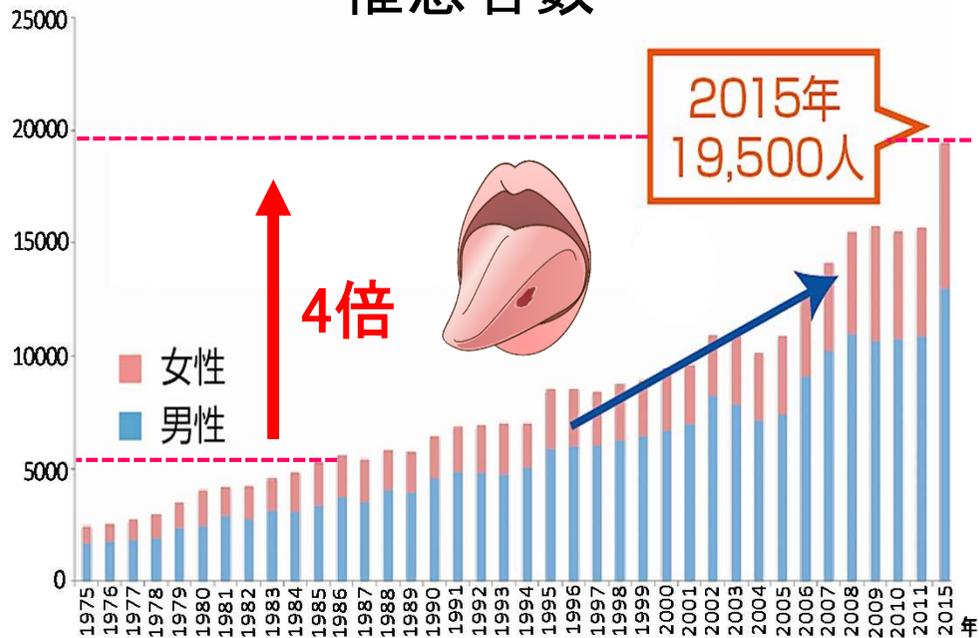


国立がん研究センターがん対策情報センター2016

- ✓ 世界における新規がん患者数は1750万人、死亡者数は880万人(2015年)
- ✓ 日本でがんは30年以上に渡り死因第一位の疾患であり、年間死亡者数は37万人を超える

罹患者数

死亡者数



国立がん研究センターがん対策情報センター-2016



国立がん研究センターがん対策情報センター-2016

初期段階で無症候性、頸部リンパ節に転移しやすい、全身に血行性に広がりやすい

早期発見の遅れ



5年生存率が5割以下

- ✓ 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
- ✓ 罹患者数は30年前の約4倍、死亡者数は約3倍以上に増加

がん早期発見の重要性

肺癌



The earlier, the better !!

DIAGNOSED EARLIER

AT STAGE 1



More than 5 in 10 survive 5 or more years

DIAGNOSED LATER

AT STAGE 4



Less than 1 in 10 survive 5 or more years

大腸癌



DIAGNOSED EARLIER

AT STAGE 1



More than 9 in 10 survive 5 or more years

DIAGNOSED LATER

AT STAGE 4



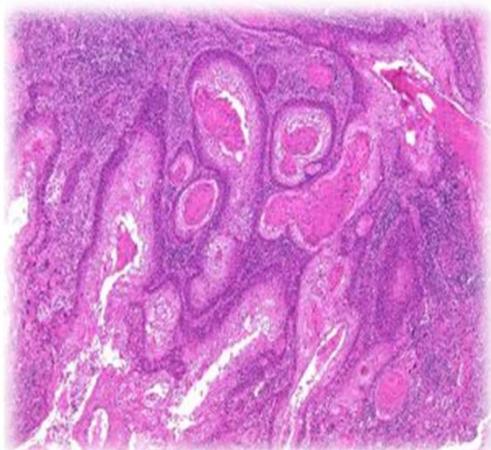
Less than 1 in 10 survive 5 or more years

<https://www.owlstonemedical.com/science-technology/voc-biomarkers/>

- ✓ 肺がんの場合、ステージ1における5年以上の生存率は50%以上
- ✓ ステージ4では、生存率が10%未満と大幅に低下

病理検査

- ✓ 細胞診
- ✓ 組織生検



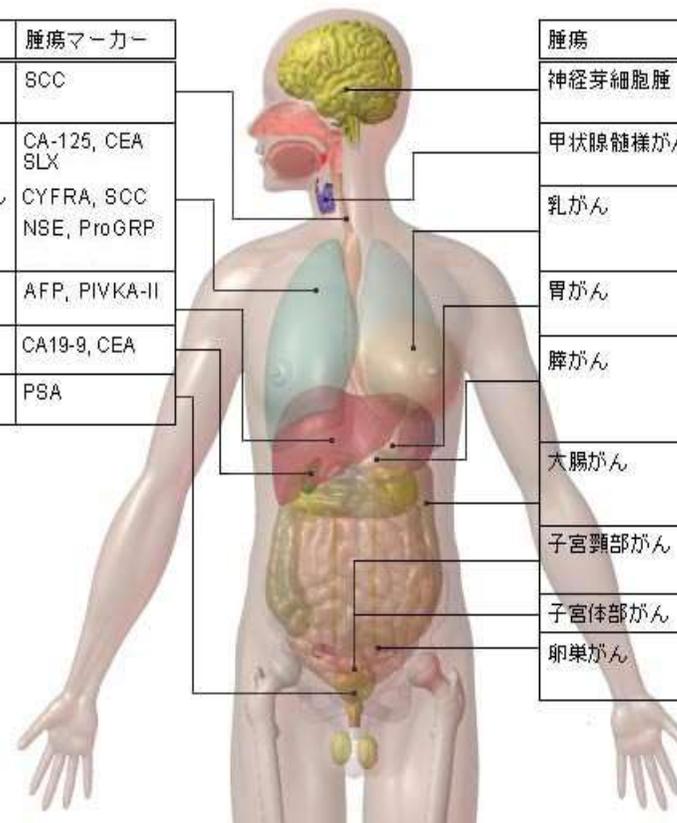
画像診断

- ✓ 超音波検査
- ✓ X線
- ✓ CT
- ✓ MRI



腫瘍マーカー

腫瘍	腫瘍マーカー
食道がん	SCC
肺がん	CA-125, CEA, SLX
扁平上皮がん	CYFRA, SCC
小細胞がん	NSE, ProGRP
肝細胞がん	AFP, PIVKA-II
胆道がん	CA19-9, CEA
前立腺がん	PSA



腫瘍	腫瘍マーカー
神経芽細胞腫	NSE
甲状腺髄様がん	NSE
乳がん	CA-125, CA15-3, CEA, NCC-ST-439
胃がん	CEA, STN
膵がん	CA-125, CA19-9, CEA, Elastase I, NCC-ST-439, SLX, STN
大腸がん	CEA, NCC-ST-439, STN
子宮頸部がん	β HCG, SCC, STN
子宮体部がん	β HCG, SCC
卵巣がん	β HCG, CA125, STN, SLX

国立がん研究センターがん情報サービス

- 侵襲性
- 診断に時間を要する

- 採血が必要
- がんの早期診断に不向き

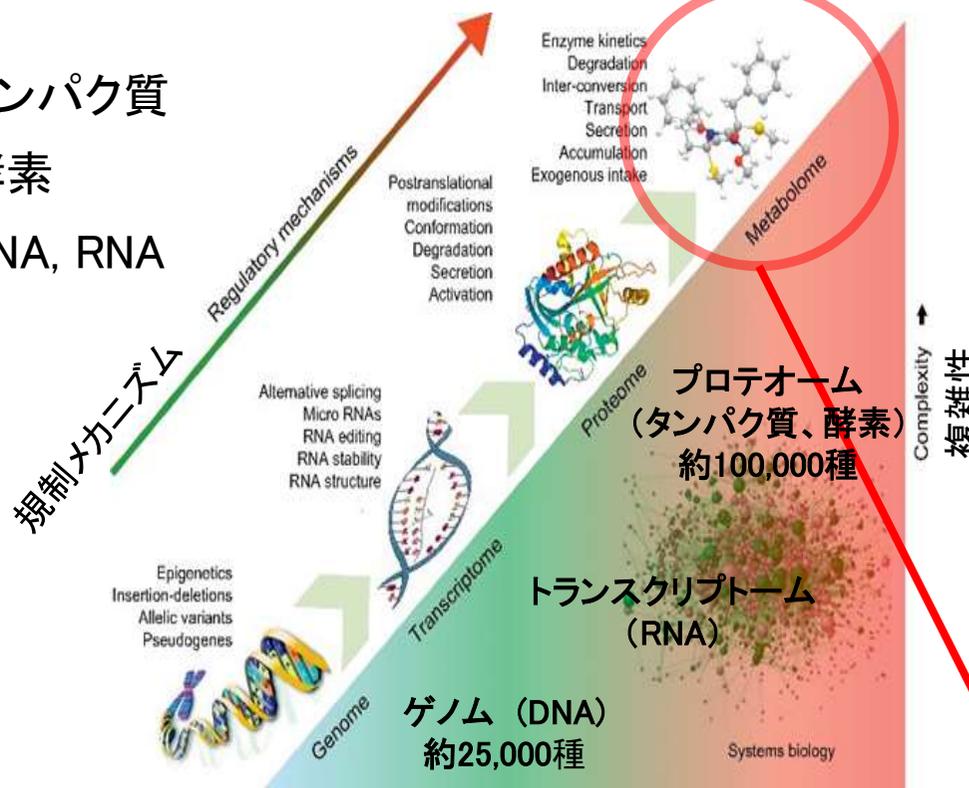
バイオマーカー

正常な生物学的過程、病理学的過程、
もしくは治療介入による薬理的反応の指標
客観的に測定・評価される物質¹⁾

1) Clin Pharmacol Ther. 69(3): 89-95, 2001.



- タンパク質
- 酵素
- DNA, RNA



分子量1,000以下の対象となる代謝物は、約4,000種

揮発性有機化合物、糖、アミノ酸、アミン、有機酸、ヌクレオチド、脂肪酸、脂質など

血液以外の体液からでも検出可能

がん関連因子を発見しやすい

分析機器により迅速に定性・定量が可能

https://www.newtonpress.co.jp/separate/back_biology/mook_161025.html

メタボローム解析は、対象となる代謝物が約4,000種類程度
血液の他、汗や尿、唾液などの体液中からでも分析可能

**揮発性有機化合物
に注目**

Volatile Organic Compounds (VOCs)

揮発性有機化合物

- 分子量300以下、常温常圧で 大気中で容易に揮発する 有機化学物質
- 呼気、唾液、血液、尿、糞便、汗、皮膚などから検出
- **生体内の代謝変化を反映**
- VOC起源
 - ✓ 細胞分泌
 - ✓ バクテリアによる分解



Shockco et al, NATURE REVIEWS. CANCER · AUGUST 2004.

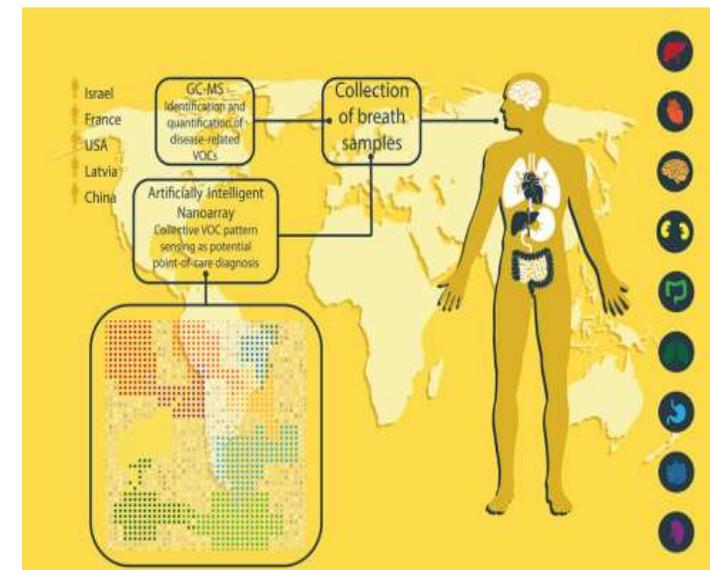
- ✓ 非侵襲性
- ✓ 保存・輸送の簡便性
- ✓ 情報の多様性
- ✓ **血液に比べ、成分が少ない**

Sample	Reflection	Sample type
Saliva	Oral cavity, GIT	Solution
Breath	Respiratory system Metabolism	Gas
Skin emanations	Skin malignancy Metabolism	Gas
Nipple aspirate fluid	Breast health (malignancy)	Gas, solution
Sweat	Drug metabolism Metabolism	Gas, solution
Blood Serum	All systems	Solution
Urine	Urinary tract, metabolism	Solution, gas
Faeces	Gastrointestinal tract	Gas, solid, solution

体内の様々な代謝経路を介し細胞から分泌され、血液を介し、呼気その他唾液や尿などの体液中へ転送され、生体内の生化学的変化を反映

関連する疾患	化合物名	サンプル
口腔がん	Undecane ¹⁾ , Benzaldehyde ¹⁾	呼気
肺がん	1-Butanol ²⁾	呼気
	2-Pentanone ³⁾	尿
大腸がん	Nonanal ⁴⁾	呼気
糖尿病	Acetone ⁵⁾	呼気

呼気中の揮発性有機化合物⁶⁾



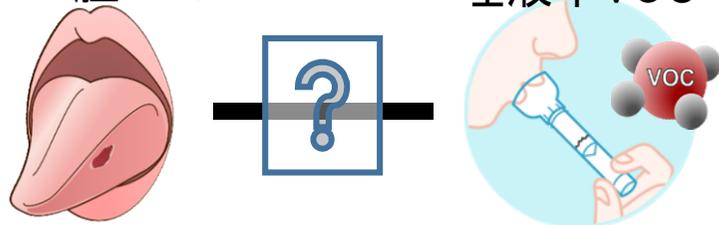
唾液が用いられていない理由

- 唾液中のVOCは血液の1000分の1と濃度が低い
- 極微量の成分を高感度に検出するための分析手法が確立されていない

- 1) Bouza M, et al, 2017.
- 2) Schallschmidt K, et al, 2016.
- 3) Hanai Y, et al, 2012.
- 4) Altomare DF, et al, 2013.
- 5) Galassetti PR, et al, 2005.
- 6) <https://pharmaceuticalintelligence.com>
- 7) Pfaffe, T. et al, 2011.

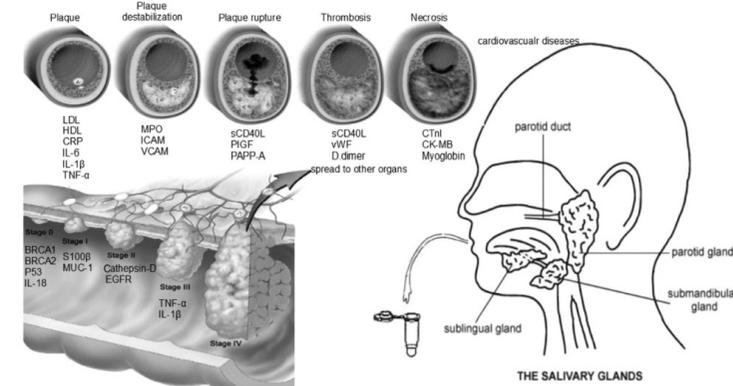
口腔がん

唾液中VOC



口腔がんと唾液中VOCに関する研究は報告されていない！！

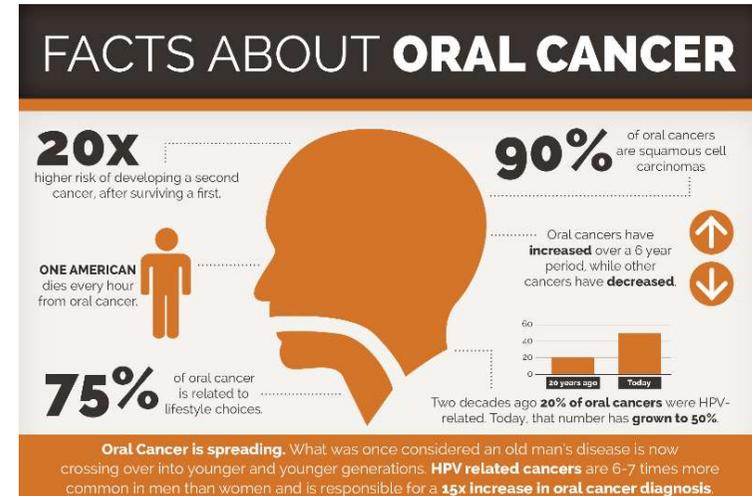
唾液分析の有用性⁷⁾



唾液は血液を原料とする重要な体液の一つであり、非侵襲的に採取可能であることから検査試料としての可能性は大きい

- 健常者と口腔がん患者の唾液中VOCを比較

Oral cancer ranks sixth among cancers in worldwide occurrence, and 90% of all oral cancers are diagnosed as oral squamous cell carcinoma (OSCC)



- 口腔がん診断に有用な揮発性バイオマーカーの探索

揮発性バイオマーカーに基づく

- 口腔がん診断プロファイルの提案・確立

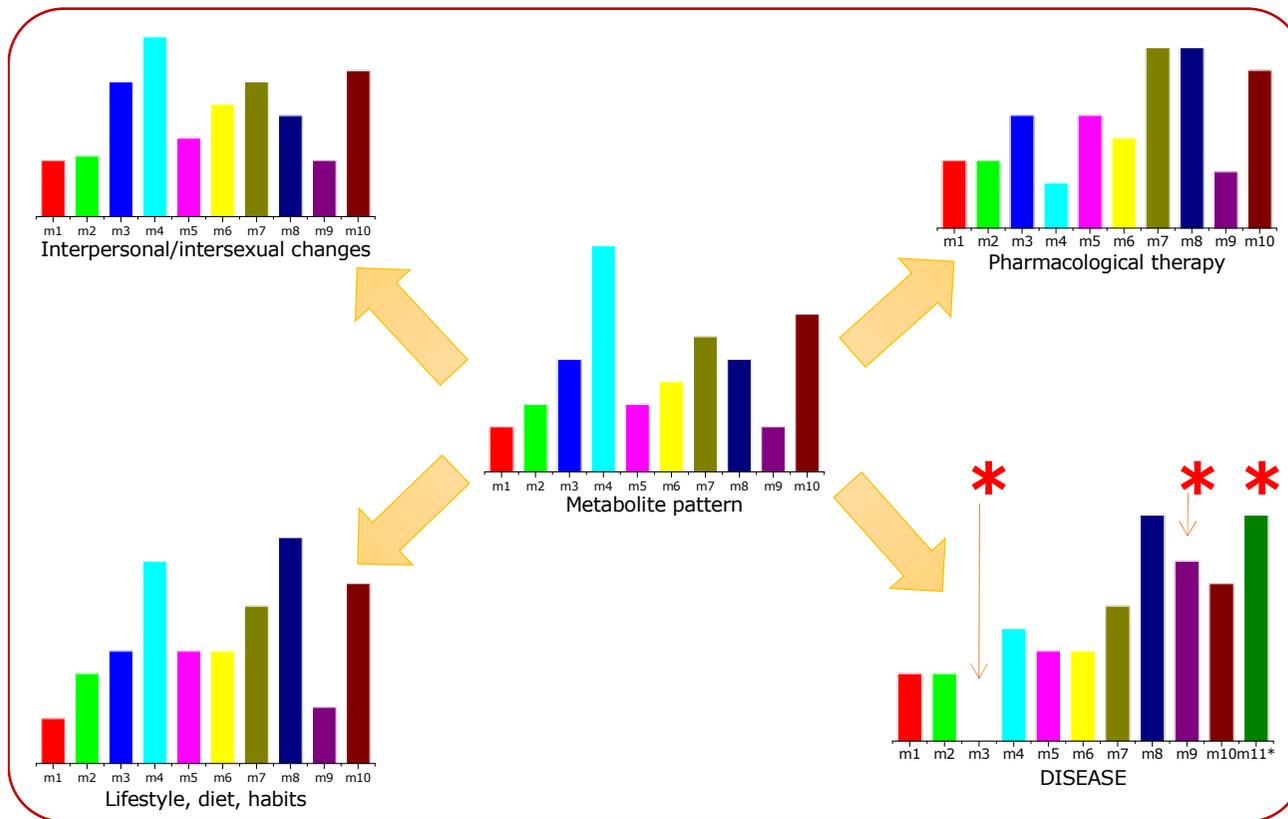
バイオマーカーの特定：従来技術

匂いの指紋 ‘Odor-fingerprints’

Metabolomic Profiles for Disease Diagnosis



健常者



癌患者

健常者とがん患者が示す臭気パターンに基づく診断技術

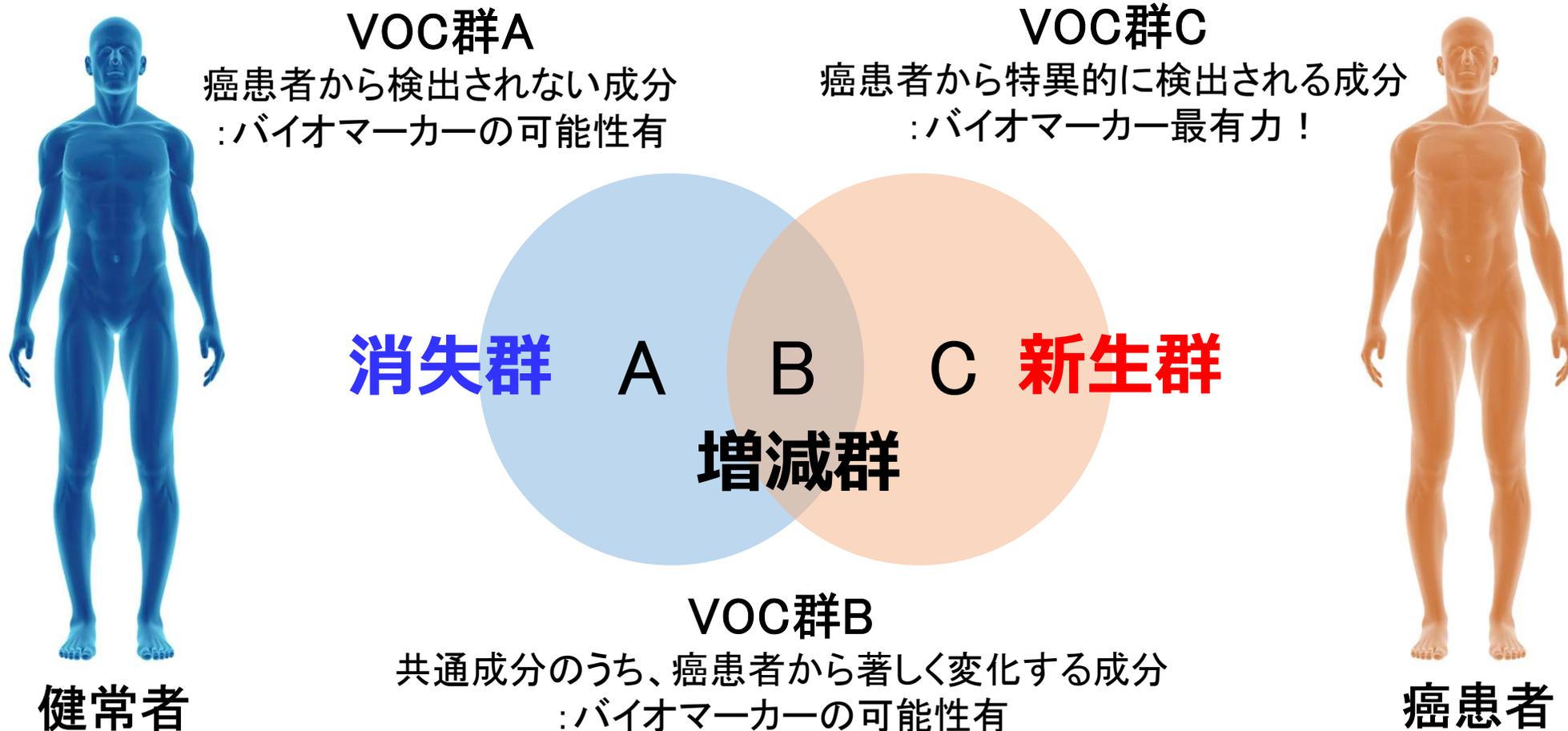
問題点

生活スタイル、薬物療法、人別・性別などによって代謝プロフィールが異なる

パターン認識に基づく従来技術にはバイオマーカーの特定に限界がある

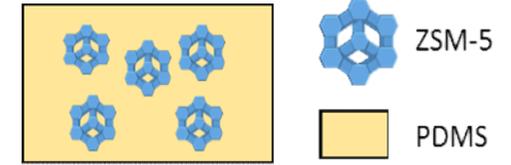
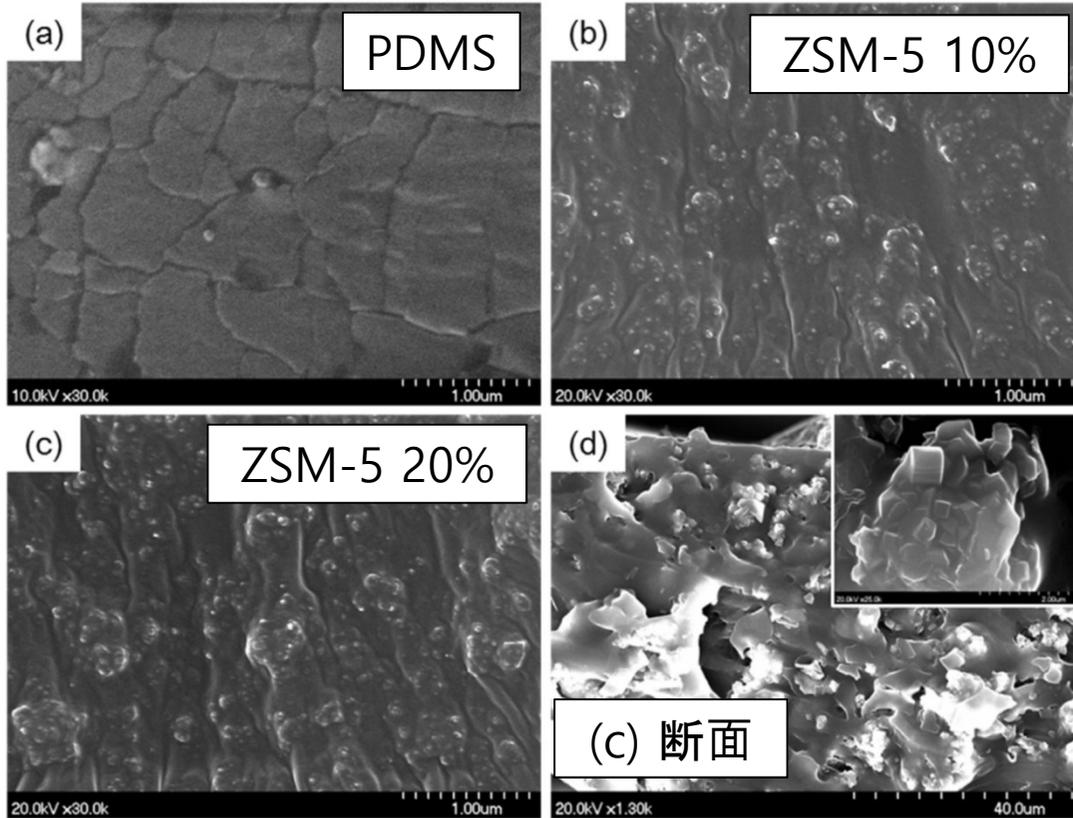
バイオマーカー特定のための仮説

健常者とがん患者の間で考えられるVOC群



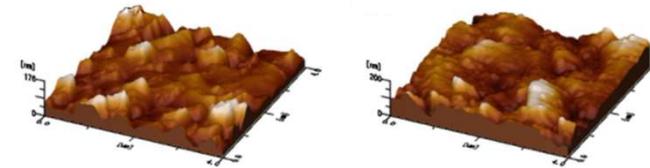
健常者およびがん患者から発生する揮発性代謝成分のVOC群から疾患に特異的な成分を効率よく抽出することができる

抽出膜の走査型電子顕微鏡(SEM)イメージ

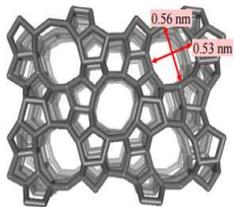


- ✓ 大きな比表面積
- ✓ 多細孔構造
- ✓ 高い分子選択性

(b)と(c)のAFMイメージ

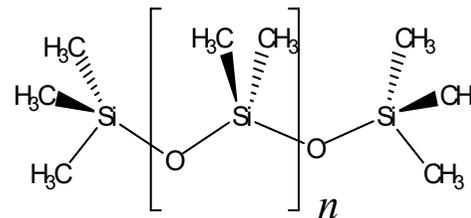


Journal of Chromatography B, 1041 (2017) 133–140



ZSM-5ゼオライト

- ✓ 親水性
- ✓ 分子量が小さい化合物



PDMS(ジメチルポリシロキサン)

- ✓ 疎水性
- ✓ 分子量が大きい化合物



高感度
VOC抽出

唾液採取



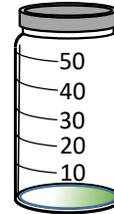
唾液2 mL+水3 mL



3時間振とう



膜の洗浄 & 乾燥

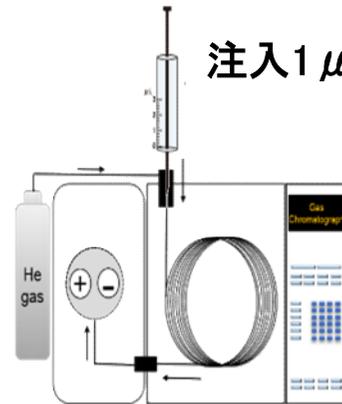


<条件>

- 平均2mLを安静時に採取
- 採取後、直ちに-80℃で保管
- 被験者あたり複数回を採取
- 唾液採取1時間前の口腔清掃と喫煙を禁止

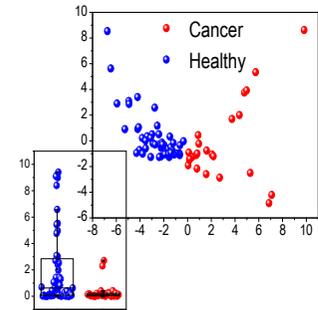
唾液中 VOC抽出

注入1 μL



Methanol 溶出

GC-MS分析



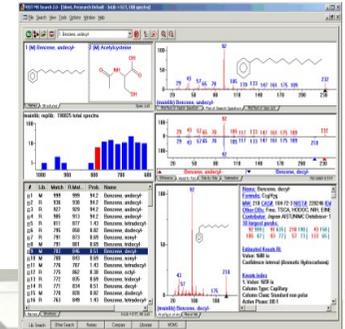
統計処理 & データ解析

- 主成分分析
- 解析ソフト: Origin 9 software
- t検定 ($P < 0.05$)

GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析装置)

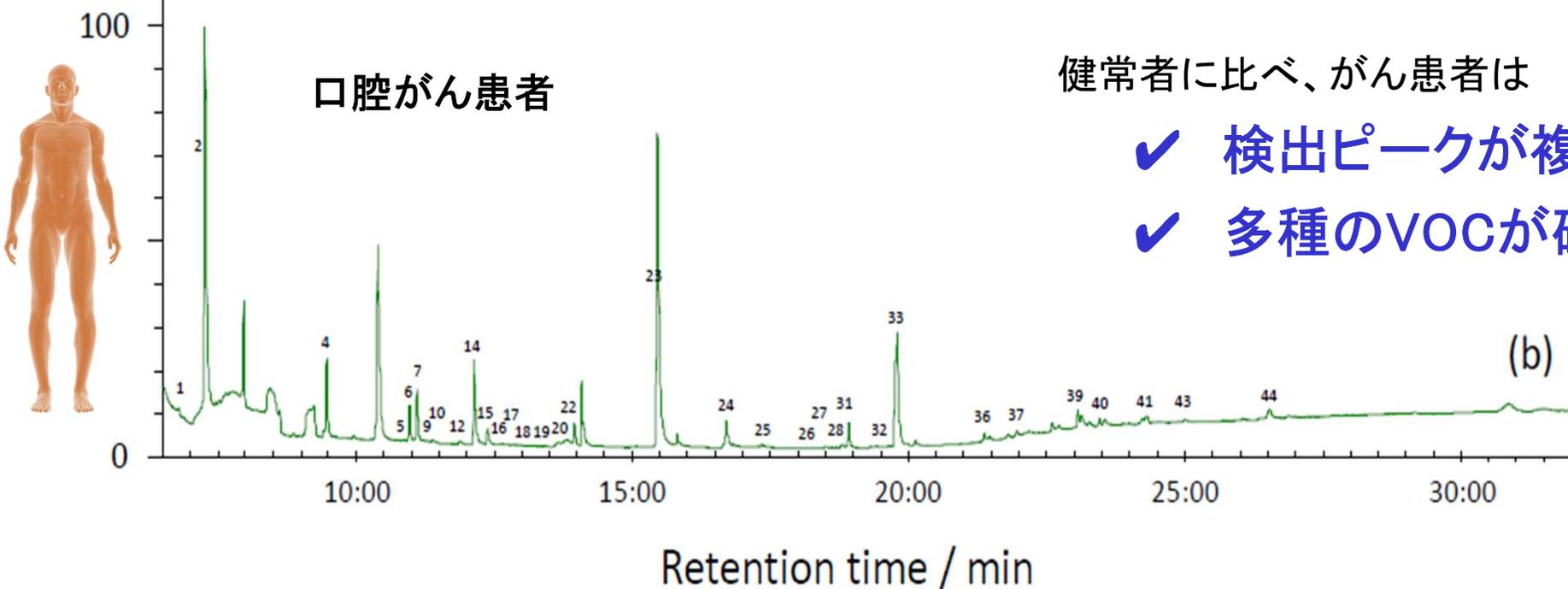
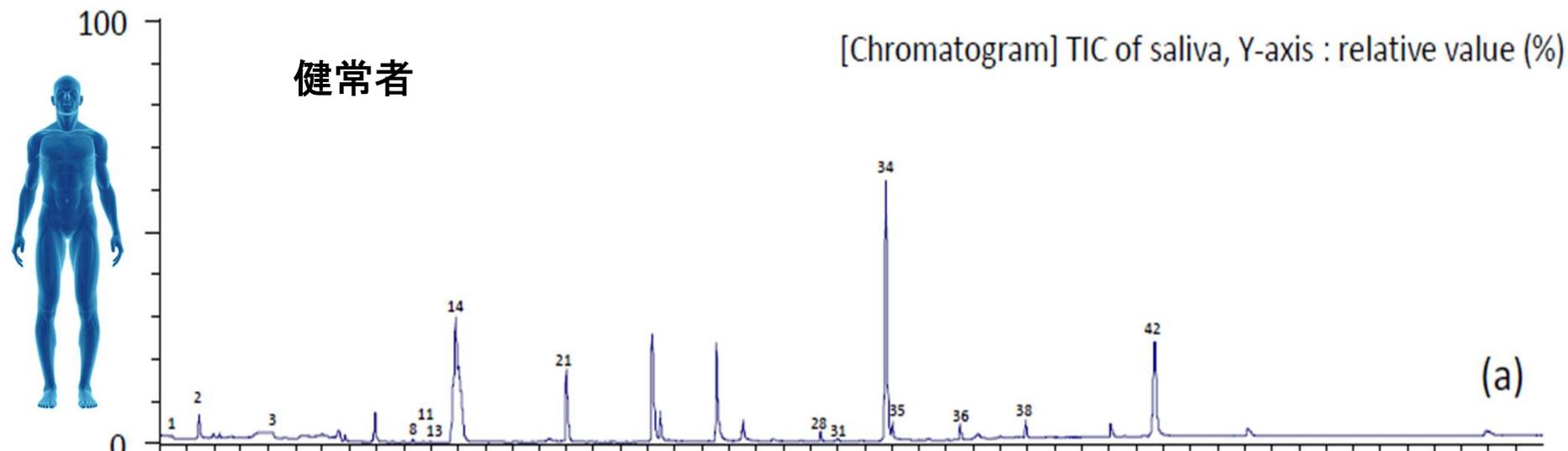
- ✓ 高分離能
- ✓ 安定で再現可能な測定
- ✓ 定性・定量化可能
- ✓ 豊富なライブラリ
- ✓ 試料の前処理が必要

NIST Mass Spectral Library
約30万件

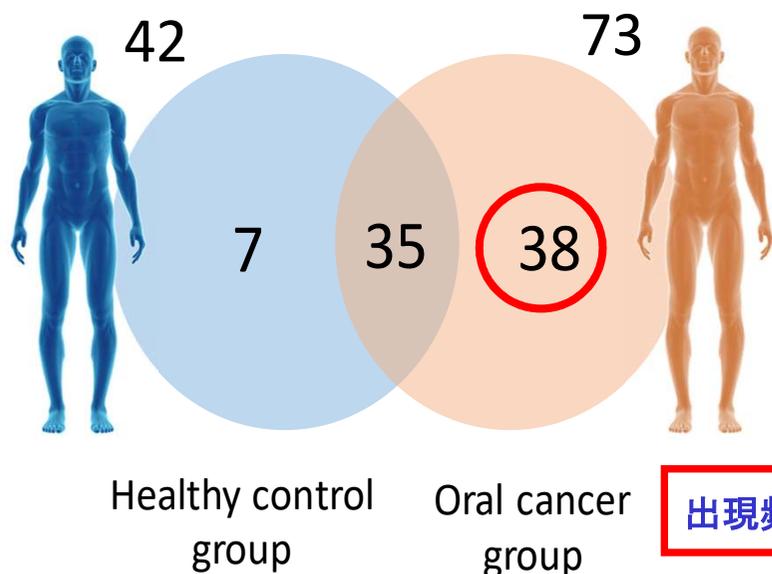


<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1001015>

GC-MS総イオンクロマトグラム(TIC)結果



検出されたVOCのVenn図



出現頻度が0.25以上

Frequency of Appearance (FA)
 出現頻度

$$FA = \frac{\text{Number of detections (検出された回数)}}{\text{Total number of analyses (全分析回数)}}$$

口腔がん患者のみから検出された38成分中最も出現頻度が高いVOC10成分

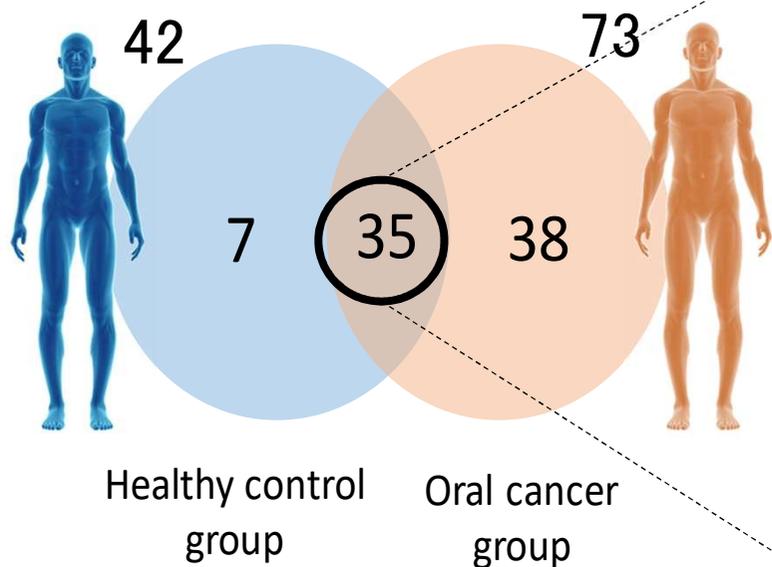
Table 2

No.	Compounds	Retention time, min	Selected ion, m/z	Classification	FA (n = 24)
1	3-Heptanone	8:47	57	ketone	0.38
2	Acetaldehyde, methoxy-	11:16	45	aldehyde	0.25
3	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	11:35	43	ketone	0.25
4	2-Butanol, 3-methyl-	14:59	45	alcohol	0.33
5	Oxime, methoxy-phenyl-	16:31	77	imine	0.29
6	1,3-Butanediol	16:48	43	alcohol	0.79
7	1,2-Pentanediol	17:15	55	alcohol	0.42
8	Butanoic acid, butyl ester	18:25	71	ester	0.25
9	1-Hexadecanol	21:26	55	alcohol	0.46
10	1-Tetradecanol	23:31	69	alcohol	0.29

FA: frequency of appearance.

検出された38成分のうち、出現頻度0.25以上のがん患者に特異的な最有力バイオマーカー候補10成分を抽出

両群に共通して検出されたVOC35成分



両群のVOC検出量に有意差を示し、口腔がんグループで減少傾向の20成分(P < 0.05)

and

口腔がんグループでVOC検出量が増加傾向の2成分*

共通35成分のうち、

- ✓ 両グループ間で統計学的有意差を示した減少傾向の20成分
- ✓ 増加傾向の特異性を示した2成分

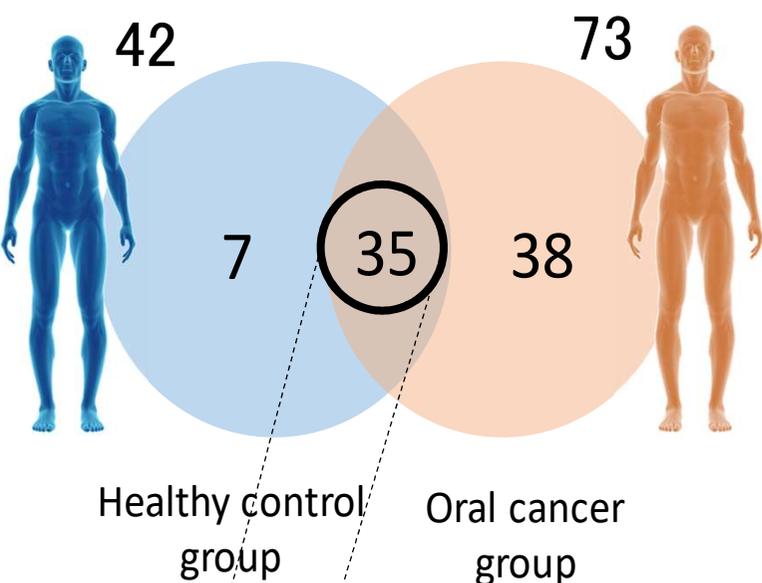
Table 3.

No.	Compounds	Selected ion, m/z	Classification	FA		p-value	↓ or ↑ (in cancer)
				Healthy control (n = 51)	Oral cancer (n = 24)		
1	Ethanol	31	alcohol	0.98	1.00	< 0.01	↓
2	2-Pentanone	43	ketone	0.98	0.96	< 0.01	↓
3	1-Propanol	31	alcohol	0.96	0.75	< 0.01	↓
4	Hexanal	56	aldehyde	0.10	0.25	< 0.05	↓
5	3-Penten-2-one, 4-methyl*	83	ketone	0.10	0.17	> 0.1	↑
6	Thiocyanic acid	73	inorganic acid	0.37	0.13	< 0.05	↓
7	Cyclohexanone*	55	ketone	0.14	0.25	> 0.1	↑
8	2-Propanone, 1-hydroxy-	43	ketone	0.82	0.75	< 0.01	↓
9	Propanoic acid, 2-hydroxy-	45	acid	0.61	0.17	< 0.01	↓
10	Propylene glycol	45	alcohol	0.61	0.21	< 0.05	↓
11	1-Hexanol	56	alcohol	0.53	0.13	< 0.01	↓
12	Ethanedioic acid	59	acid	0.39	0.17	< 0.05	↓
13	Acetic acid, hydroxy-	59	acid	0.53	0.25	< 0.01	↓
14	1-Octen-3-ol	57	alcohol	0.84	0.33	< 0.01	↓
15	Dimethyl sulfone	79	organosulfur	0.49	0.08	< 0.05	↓
16	Phenylethyl alcohol	91	alcohol	0.78	0.29	< 0.01	↓
17	Phenol	94	phenol	1.00	0.92	< 0.01	↓
18	Phenol, 4-methyl-	107	phenol	0.37	0.08	< 0.01	↓
19	2-Piperidinone	99	amide	0.82	0.33	< 0.01	↓
20	Hexadecanoic acid	74	acid	0.96	1.00	< 0.01	↓
21	Docosanoic acid	74	acid	0.47	0.21	< 0.05	↓
22	Indole	117	heterocyclic	0.78	0.29	< 0.01	↓

FA: frequency of appearance; ↓ = decreased and ↑ = increased.

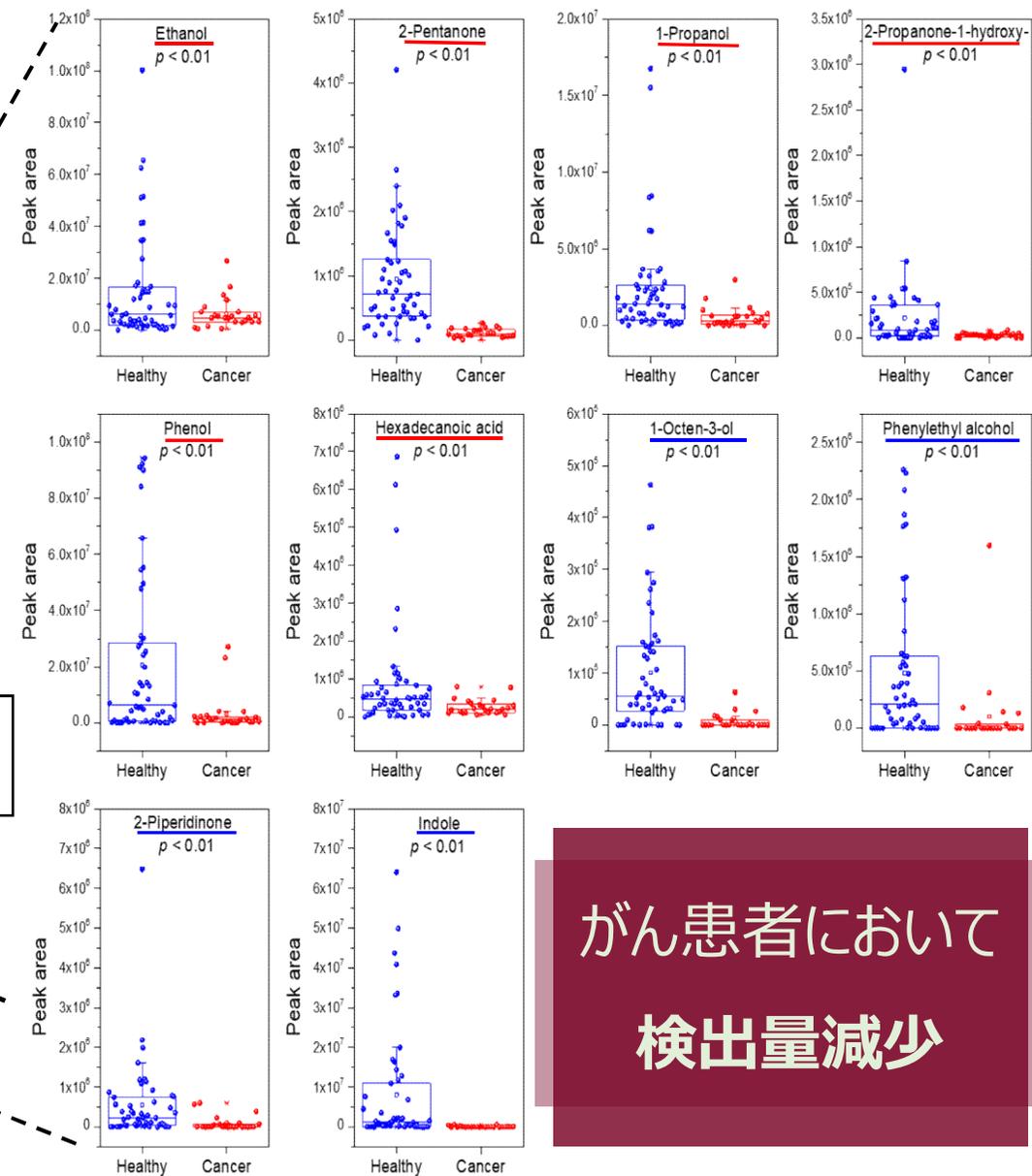
両群に共通して検出されたVOC35成分

Figure 4



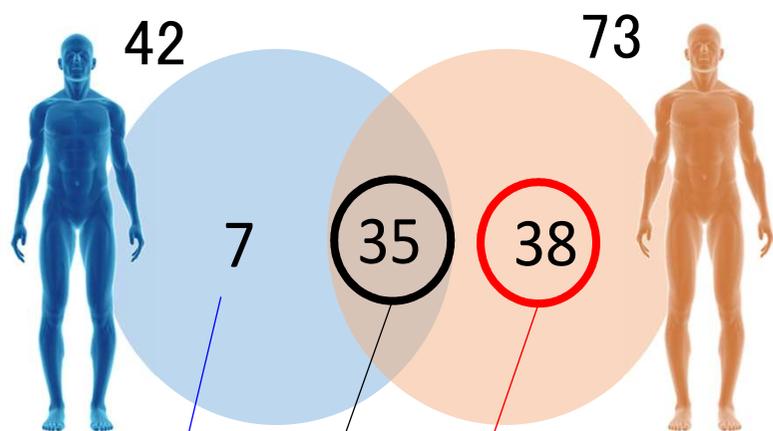
両Gで0.70以上の6成分
出現頻度

健常者Gで0.70以上
がん患者Gで0.40以下
の4成分
 $P < 0.01$



がん患者において
検出量減少

Principal Component Analysis (PCA), 主成分分析



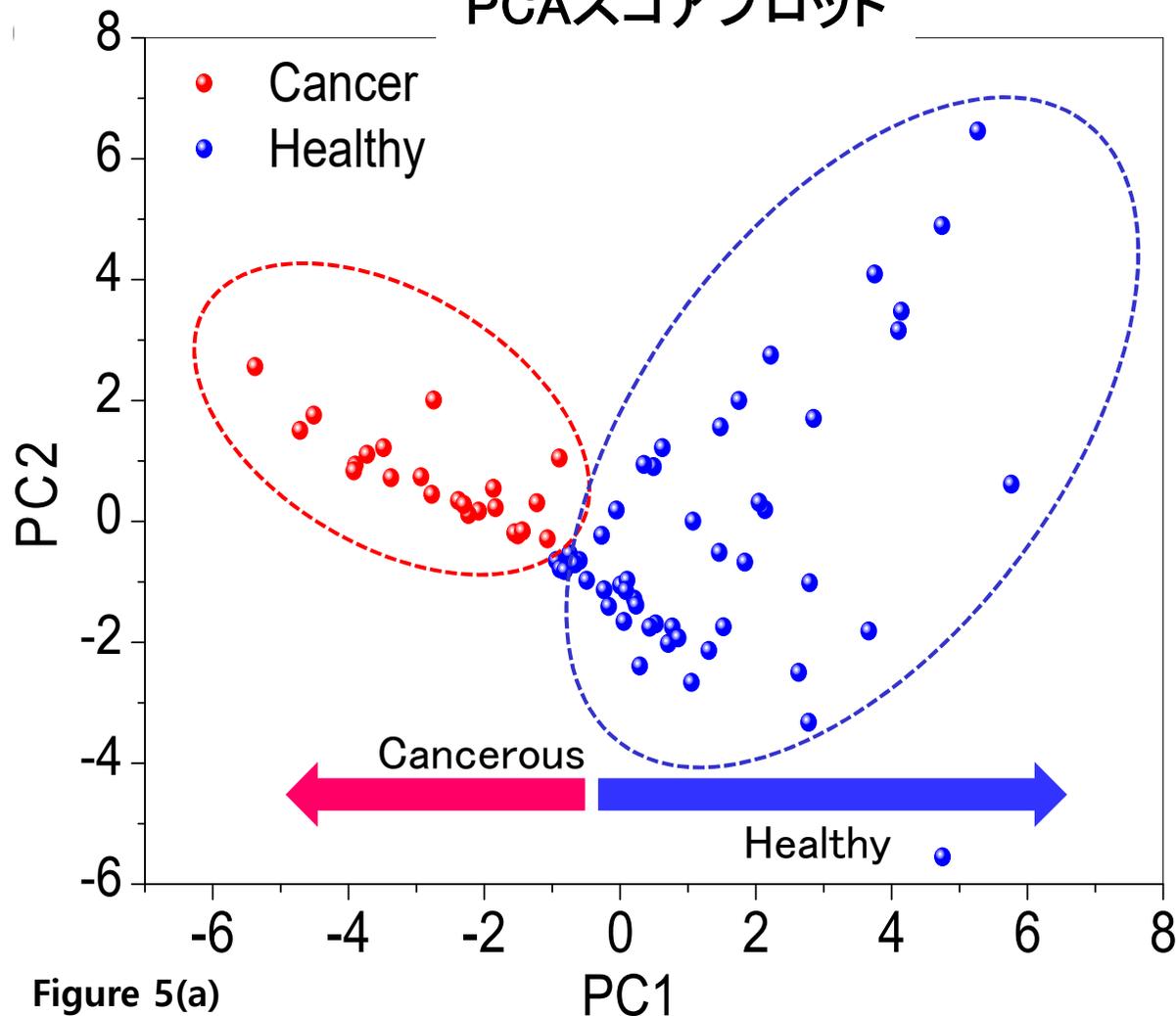
7 + 10 + 10 = 27 成分

消失 減少 新生

癌の進行に基づいたVOC代謝成分の分類

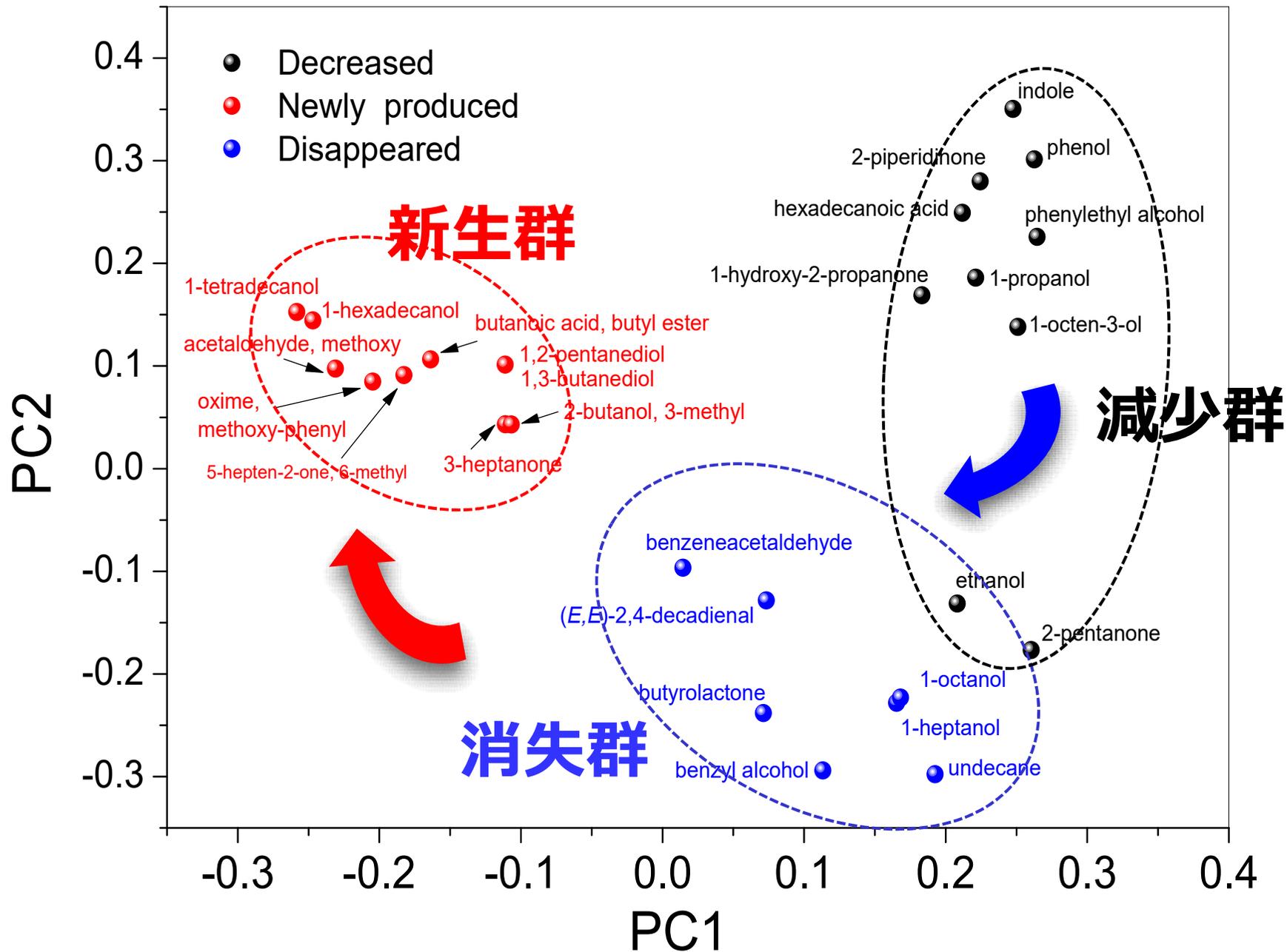
- ・健常者のみで見られる成分: **消失成分**
- ・健常者と癌患者に共通して著しく減少する成分: **減少成分**
- ・癌患者のみで見られる成分: **新成成分**

PCAスコアプロット



✓ 27成分によって健常者Gと癌患者Gが区別

PCAスコアプロット上の27 VOC挙動



27 VOCから12候補成分の抽出

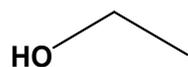


健常者

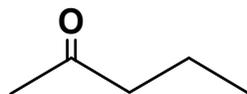


癌患者

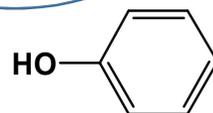
減少



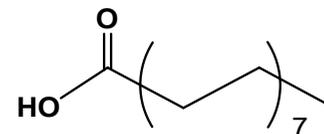
Ethanol



2-Pentanone



Phenol



Hexadecanoic acid

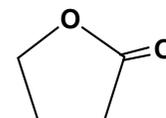
消失



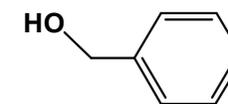
Undecane



1-Octanol

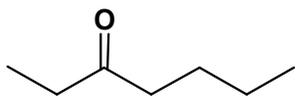


Butyrolactone

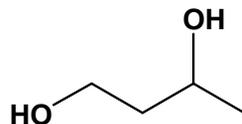


Benzyl alcohol

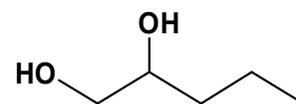
新成



3-Heptanone



1,3-Butanediol



1,2-Pentanediol



1-Hexadecanol

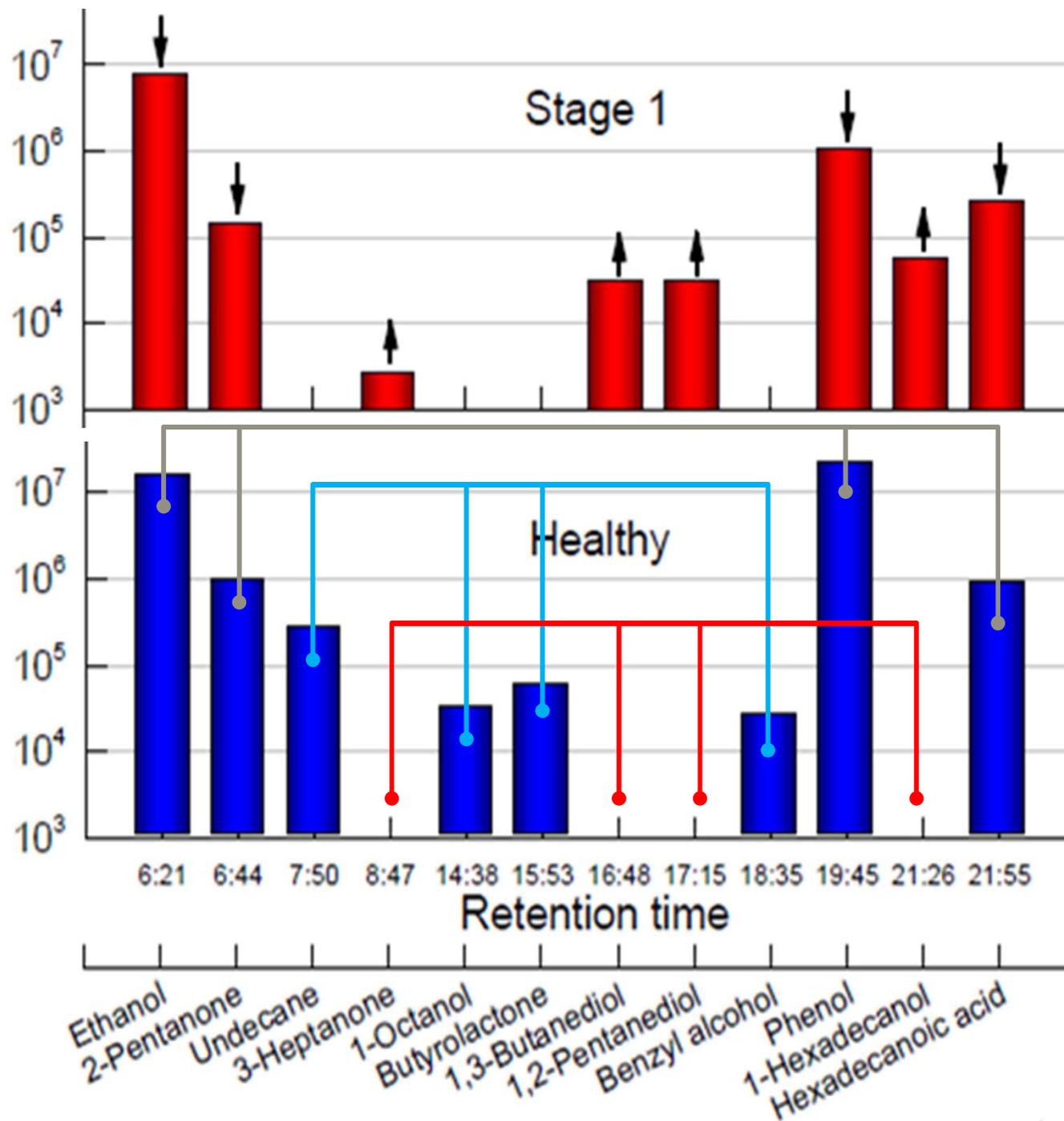
12候補成分の病期との関連性



癌患者



健常者



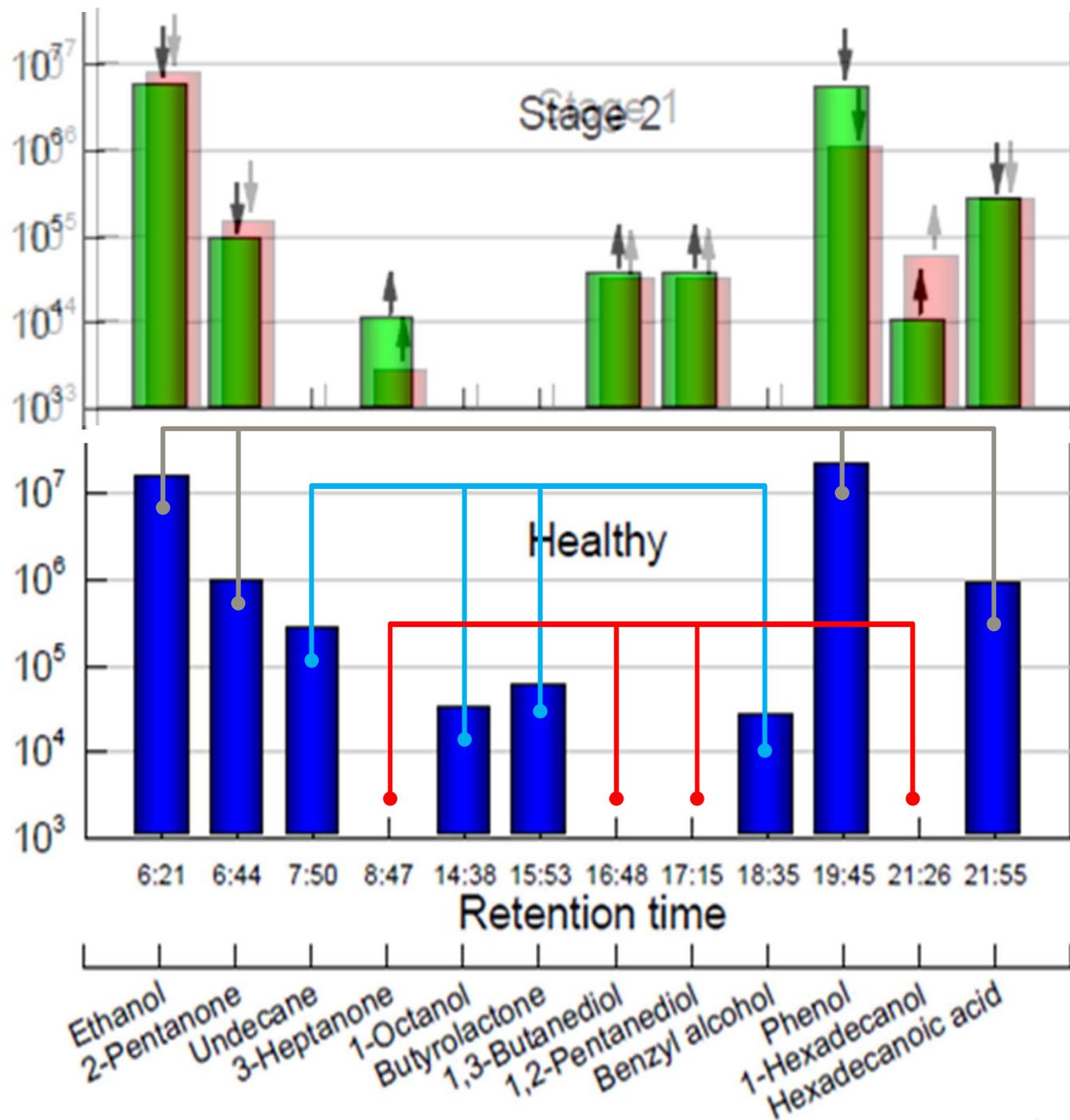
12候補成分の病期との関連性



癌患者



健常者

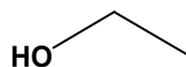


- 減少群
- 消失群
- 新生群

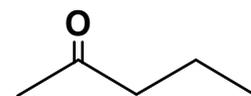
最も確率の高いマーカ―の決定



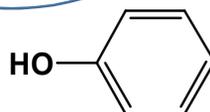
健常者



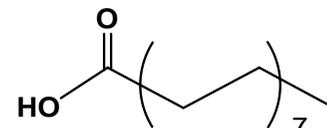
Ethanol



2-Pentanone



Phenol



Hexadecanoic acid

減少

消失

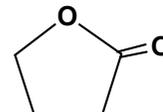
新成



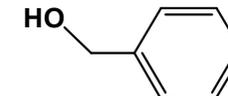
Undecane



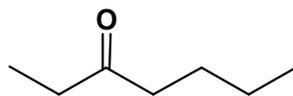
1-Octanol



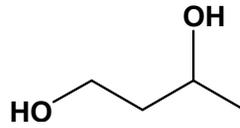
Butyrolactone



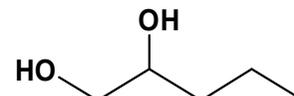
Benzyl alcohol



3-Heptanone



1,3-Butanediol



1,2-Pentanediol



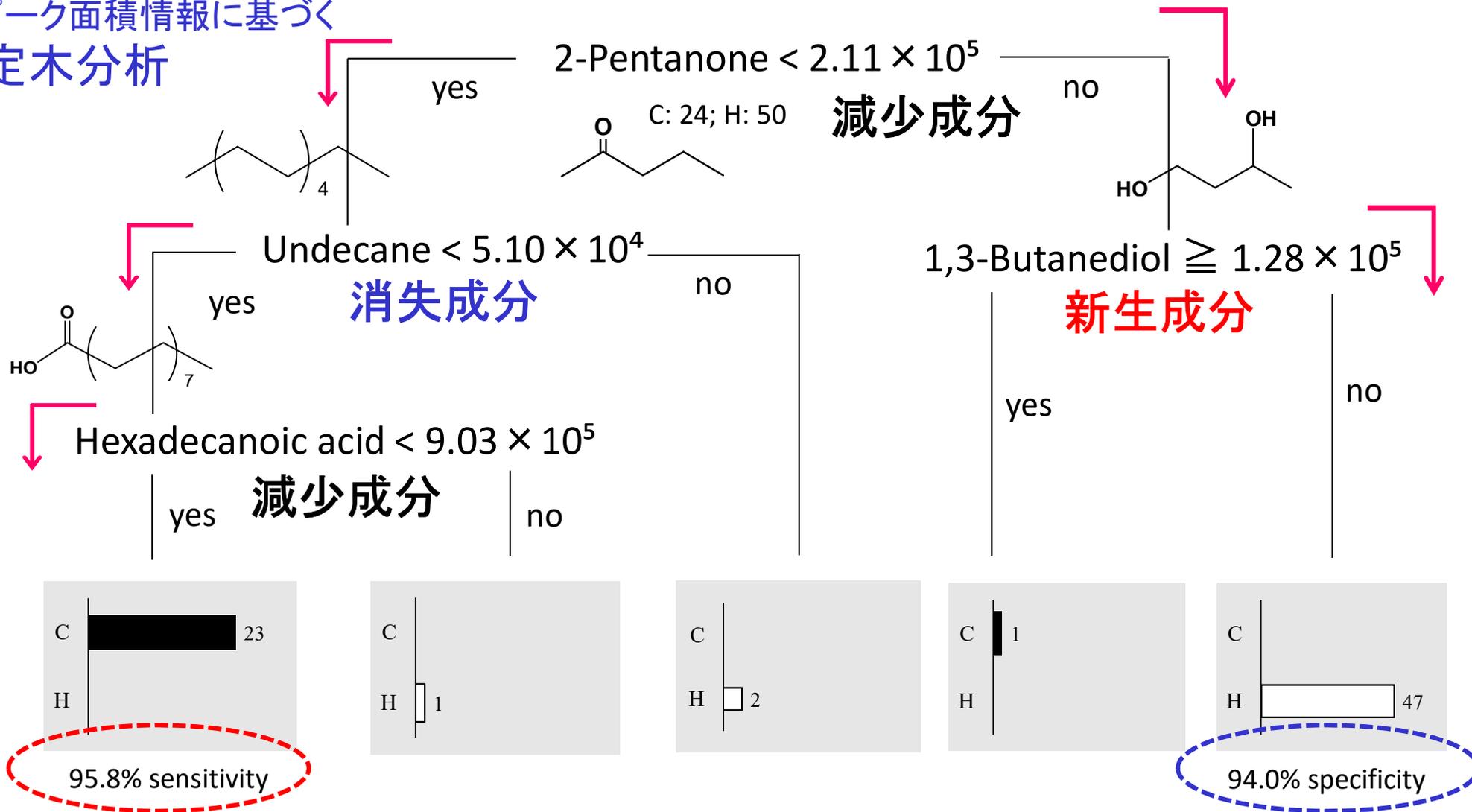
1-Hexadecanol



癌患者

最も確率の高いマーカーの決定

GCピーク面積情報に基づく
決定木分析



減少、消失、新生の群から選ばれる
最終4成分による口腔がん検知の感度及び特異性は、各々95.8%と94.0%

想定される用途

- ✓ 揮発性バイオマーカーによる口腔癌スクリーニング
- ✓ 癌診断匂い検知技術及び計測デバイスの開発
- ✓ 匂い情報に基づく総合ヘルスケア

想定される用途

Q. 今後、どのような応用が考えられるのか？

匂いを対象とする既存の研究開発・産業に明確な根拠と方向性を提示！！
1) 動物を使ったがん検知

疾患VOC群の分子情報

細胞内の化学平衡に基づく

増減

消失

新成

癌化

健常者

回復

癌患者

疾患(癌)スクリーニング及び
診断技術の開発

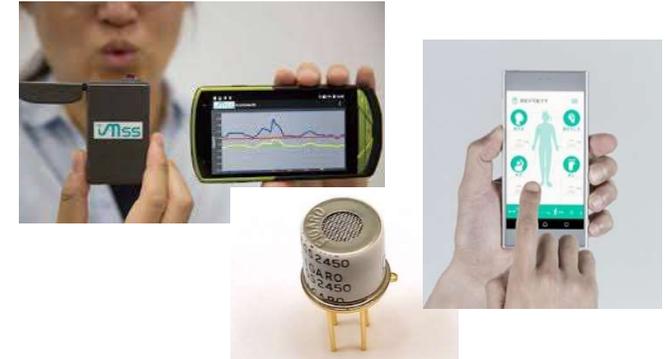
がん早期発見
予後の判定

匂い情報に基づく総合ヘルスケア

匂いの再現



2) がん診断匂い計測機器開発



3) がんの薬物治療(化学療法)、
食品などの評価



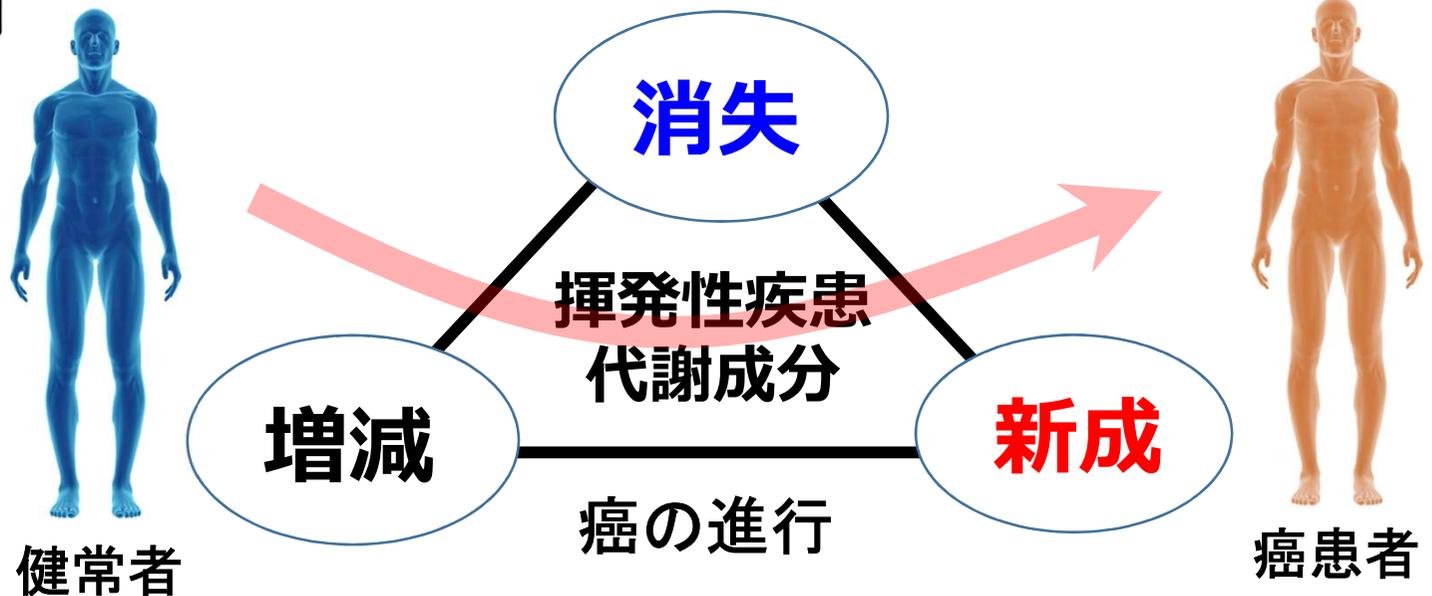
✓ 健常者と口腔がん患者の唾液中のVOCを比較

➡ 口腔がん患者73成分、健常者42成分、共通35成分

✓ 口腔がん診断に有用なバイオマーカーの探索

➡ 27種のVOC口腔癌のバイオマーカーの抽出

✓ 健常者およびがん患者の両者から検出されるVOC代謝成分が癌の進行に伴って「増減」、「消失」、「新生」の群を形成、高い疾患相関を示すことを世界で初めて証明

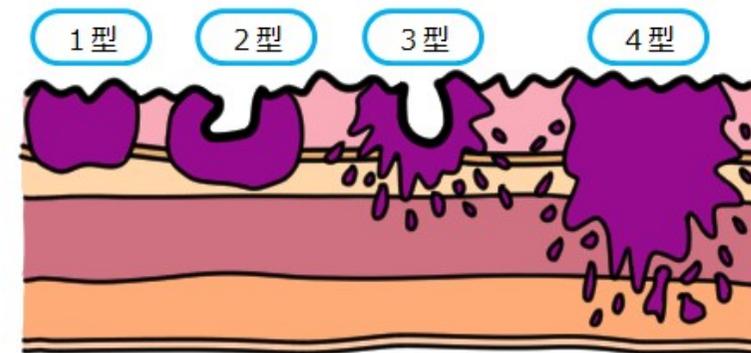


✓パターン分析に基づいた従来技術に比べ、

- ・疾患の匂いを「増減」、「消失」、「新生」のVOC群の分類に成功
- ・複雑な生体臭気の分子情報をVOC群に単純化することで、
バイオマーカーの決定までの時間を大幅に短縮
- ・感度・選択性の高い信頼性のある癌マーカーの抽出を実現

✓本手法は、疾患に関係する幅広いVOC分子情報を得ることができ、 癌の代謝経路や生体代謝メカニズムの解明に寄与するものと期待

✓医（歯）工連携の成功事例として 地域医療、産業活性化につながる ものと期待



Early detection is the best way for complete cure of cancer !!

本技術に関する知的財産権

発明の名称：揮発性口腔癌バイオマーカー

出願番号：特願2018-205844

出願日：平成30年10月31日

出願人：北九州市立大学

発明者：李 丞祐（北九州市立大学）

安細 敏弘（九州歯科大学）

- ✓北九州市立大学 環境技術研究所
知的財産・産学官連携コーディネーター 中村 邦彦
- ✓北九州市立大学 企画管理課 有菌 和子

TEL : 093-695-3367 FAX : 093-695-3368

E-mail : k-arizono@kitakyu-u.ac.jp