

国際医療福祉大学審査学位論文(博士)

大学院医療福祉学研究科博士課程

尿中ケト基及びヒドロキシ基を含む化合物の
高速液体クロマトグラフ蛍光検出による
がんのスクリーニング検査法の開発

2019年度

保健医療学専攻・臨床検査学分野
学籍番号:17S3038 氏名:杉田義弘

研究指導教員 :大澤 進
副研究指導教員:清宮正徳

尿中ケト基及びヒドロキシ基を含む化合物の高速液体クロマトグラフ 蛍光検出によるがんのスクリーニング検査法の開発

保健医療学専攻 臨床検査学分野

学籍番号:17S3038 氏名:杉田義弘

研究指導教員:大澤 進 副研究指導教員:清宮正徳

「要旨」

現代社会において癌の死亡率が上昇している。がんのバイオマーカーの開発は種々行われているが、血液を試料とする場合は医療機関への受診が必要となる。容易に採取できる試料に唾液、呼気、尿などがあるが、癌のバイオマーカーとして開発されているのは呼気、尿である。しかしながら、これらの分析に必要な機器類はあまり普及していない。また尿中の成分を線虫や犬の嗅覚を利用する検査が行われているが、線虫を観察する装置や犬の育成が必要であり一般的ではない。そこで、検査室に普及している高速液体クロマトグラフィを用いた測定法の開発が実用性で優れている。今回は、尿中の低分子成分を蛍光標識して測定できる化合物のうち、ケト基とヒドロキシ基に焦点を絞り、蛍光物質を標識し逆相クロマトグラフィによる分析を行った。その結果、尿の代謝産物の中でケト基化合物の成分ががん患者尿で出現していることを確認し、スクリーニング検査法の可能性を見出した。

キーワード:腫瘍マーカー、尿、蛍光標識、HPLC

High-performance liquid chromatography-fluorescence detection of compounds containing keto and hydroxy groups in urine for cancer screening

Student number:17S3038 Yoshihiro Sugita

Research Supervisor: Susumu Osawa

Masanori Seimiya

Summary

The cancer-related mortality rate has increased with the rapid aging of society. Several biomarkers for the early detection of cancer using serum samples have been reported. Since urine samples are easy to collect, the development of a method to screen a lot of samples using widely available high-performance liquid chromatography devices has important practical implications. We examined the levels of the keto group-containing substances 2,3-butanedione and 2-butanone and the hydroxy group-containing substances 1-octanol and 2-butanol in urine samples from patients with cancer and healthy adults. We detected 2,3-butanedione and 2-butanone. In particular, there was a significant difference in the level of 2,3-butanedione between the cancer and healthy control groups. In particular, 2,3-butanedione was an effective marker of liver and colorectal cancer. Accordingly, low-molecular-weight compounds containing keto groups are promising for the development of a useful primary screening test.

Key words: Urine, High-performance liquid chromatography, Fluorescent label, Cancer screening

[目次]

1. 序論
2. 材料および方法
 - 2.1 試薬
 - 2.1.1 ケト基を含む化合物の種類
 - 2.1.2 ヒドロキシ基を含む化合物の種類
 - 2.1.3 ケト基検出のための蛍光試薬
 - 2.1.4 ヒドロキシ基検出のための蛍光試薬
 - 2.1.5 クレアチニン測定試薬
 - 2.2 測定試料
 - 2.3 HPLC 装置
 - 2.4 生化学自動分析装置
 - 2.5 使用カラム
 - 2.6 標識方法
 - 2.6.1 ケト基化合物標識方法
 - 2.6.2 ヒドロキシ基化合物標識方法
 - 2.6.3 ヒドロキシ基化合物のアルコール脱水素酵素による検出法
 - 2.7 測定方法
 - 2.7.1 HPLC 測定条件
 - 2.7.2 尿中クレアチニンの測定方法
 - 2.8 尿中ケト基化合物及びヒドロキシ基化合物類のクレアチニン補正式
 - 2.9 解析方法
 - 2.10 倫理上の配慮
3. 結果
 - 3.1 アルコール脱水素酵素によるヒドロキシ基化合物の検出
 - 3.2 クロマトグラム溶出時間
 - 3.3 がん患者尿と健常者尿の各成分のピーク検出
 - 3.4 2,3-Butanedione および 2-Butanone の直線性
 - 3.5 定量限界
 - 3.6 再現性

- 3.7 保存安定性
- 3.8 健常者とがん患者の測定結果
- 3.9 全がん患者と各種がん患者の有用性
- 4. 考察
- 5. 結語
- 6. 謝辞
- 7. 引用文献

1. 序論

我が国では、超高齢化社会および食生活の変化により、がんの死亡率が上昇を続け、これにともなう医療費の増大が大きな課題となっている。がんの早期発見のために、これまで血液を材料としたバイオマーカーの開発が種々行われ報告がなされているが、血液を試料とする場合には採血を行うために、医療機関を受診しなければならない、その受診者は限定される。生体試料の各種がんマーカーの文献を調査したところ、多くの研究では液体クロマトグラフィー質量分析やガスクロマトグラフィー質量分析法を用いたメタボローム解析が多い^{1,2)}。これらのメタボローム解析で用いられる試料としては唾液¹⁾、呼気²⁾、尿³⁾などが報告されているが、被検者自身が容易に採取もしくは運搬できる試料として尿に優位性がある。今までに報告されたがんで検出される生体成分の例を表1に示した。例えばS.M.Gordonらは、ガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いて、呼気中のアセトン、メチルエチルケトン、n-プロパノールを測定することにより肺がんのバイオマーカーとして報告した²⁾。加藤らは、金コロイド法にて尿中のジアセチルスペルミンを測定することにより肺がんの腫瘍マーカーとして報告した⁴⁾。また、G.Gkotsosらは、尿中のサルコシン、ウラシル、キヌレン酸を超高速液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー(UPLC-MS/MS)を用いて検出することにより、前立腺がんのバイオマーカーとして報告をした⁵⁾。これらの成分は、今後新たな腫瘍マーカーとして有用である可能性がある一方で、いずれの成分の濃度はマイクロモルからナノモル濃度であることから、超高感度な質量分析装置を必要とする。しかしながら、質量分析装置は病院の検査室に広く普及していないことから、高速液体クロマトグラフィーでの測定であれば、がんスクリーニング検査機器として利用できる可能性がある。本研究では、生体成分の検出法でマイクロモルレベルの濃度を検出できる方法として、蛍光検出が適していると考え、各種化合物の蛍光標識試薬を検索した結果、中村らによるケト基化合物¹⁰⁾、長岡らによるヒドロキシ基化合物¹¹⁾およびアミノ基の蛍光標識方法についての報告により標識物質のターゲットを絞り込んだ。さらに尿中のアミノ基を含有する腫瘍マーカーとしては、既にジアセチルスペルミンが報告⁴⁾されていることより、ヒドロキシ基、ケト基をもつ尿中の低分子成分に焦点を当てて測定法の開発を行った。

表1 生体試料を用いたがん検出のバイオマーカー例

検査材料	検査方法(検査媒体)	がん種類	検出物質	参考文献
尿	線虫(嗅覚)	大腸がん、乳がん、胃がん	各種がん組織	6)
尿	犬(嗅覚)	膀胱がん	イソブレン、2-メチルペンタン、ペンタン、エチルベンゼン、キシレン	3)
尿	UPLC-MS/MS	前立腺がん	サルコシン、ウラシル、キヌレン酸	5)
尿	金コロイド凝集法	肺がん	尿中ジアセチルスベルミン	4)
乳腺分泌液	酵素免疫測定法	乳がん	乳腺分泌液CEA、乳腺分泌液c-erbB-2蛋白	9)
におい	犬(嗅覚)	悪性黒色腫	がん組織	3)
呼気、便汁	犬(嗅覚)	大腸がん	がん患者の呼気、便中物質	8)
呼気	ガスクロマトグラフィー質量分析法	肺がん	アセトン、メチルエチルケトン、n-プロパノール	2)
呼気	犬(嗅覚)	肺がん、乳がん	がん患者の呼気	3)
血漿	ガスクロマトグラフィー質量分析法	結腸直腸がん	ピルビン酸、グリコール酸、トリプトファン、パルミトレイン酸、フマル酸、オルニチン、リジン、3-ヒドロキシイソ吉草酸	7)
唾液	蛍光標識二次元電気泳動法 液体クロマトグラフィー質量分析法	口腔がん	Annexin A2、Protein AMBP、JHD2C、Lysyl-tRNA synthetase、Enolase1、PRSS3 protein、TM14E	1)

2. 材料および方法

2.1 試薬

がんの尿中代謝物の候補として図1に示した8種類の化合物を目的成分とした。

2.1.1 ケト基を含む化合物の種類

- ・ 2,3-Butanedione : $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$ (富士フィルム和光純薬,大阪)
- ・ 2-Butanone : $\text{C}_2\text{H}_5\text{COCH}_3$ (富士フィルム和光純薬)
- ・ 2-Nonanone : $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$ (富士フィルム和光純薬)

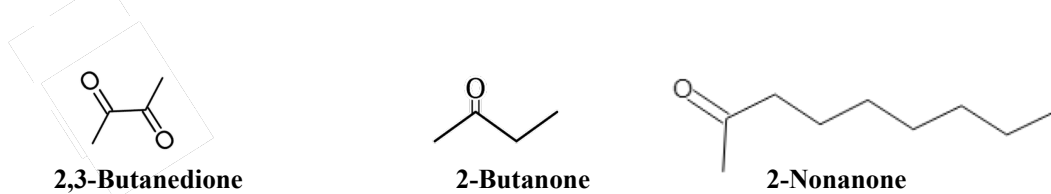
上記標準物質を、イオン交換水にて $70\mu\text{mol/L}$ の濃度に調製し、標準液として使用した。

2.1.2 ヒドロキシ基を含む化合物の種類

- ・ 1-Octanol : $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{OH}$ (富士フィルム和光純薬)
- ・ 1-Propanol : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (富士フィルム和光純薬)
- ・ 2-Propanol : $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (富士フィルム和光純薬)
- ・ 2-Butanol : $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (富士フィルム和光純薬)
- ・ 2-Aminoethanol : $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (富士フィルム和光純薬)

上記標準物質をベンゼンにて 1mmol/L の濃度に調製し、標準液として使用した。

>C=O 化合物(ケト基化合物)



R-OH 化合物(ヒドロキシ基化合物)

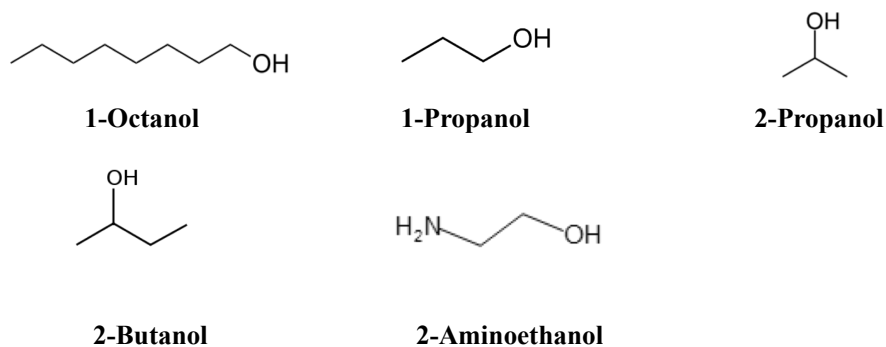


図1 がんの尿中代謝物の候補物質

2.1.3 ケト基検出のための蛍光試薬

MDB (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene, dihydrochloride) 試薬 (同仁化学, 熊本) を使用し、蛍光試薬の調製を行った

2.1.4 ヒドロキシ基検出のための蛍光試薬

DMEQ-COCl (3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1*H*)-quinoxalinone 試薬 (同仁化学) を使用し、蛍光試薬の調製を行った。

2.1.5 クレアチニン測定試薬

尿中クレアチニンの測定はアクアオート カイノス CRE-II 試薬 (カイノス, 東京) を使用した。日立 7180 形自動分析装置を用いた測定にあたっては、メーカー指定の測定条件と標準物質を用いて、尿を生理食塩水で 10 倍希釈した試料中のクレアチニン濃度を測定した。

2.2 測定試料

千葉大学病院においてインフォームドコンセントの得られた、がんと確定診断された入院患者の尿 42 例（肝臓がん・胆管がん 20 例、子宮がん・卵巣がん 9 例、大腸がん・結腸がん 5 例、膵臓がん 3 例、肺がん 3 例、前立腺がん 3 例）を用いた（千葉大学倫理委員会 3472）。また、株式会社サンリツにおいてインフォームドコンセントの得られた健康診断で生化学検査と血液検査を実施し、異常の認められなかった健常者尿（随時尿） 60 例を用いた。いずれも検査目的に採取された随時尿を検査終了後に、分取し測定まで凍結保存（-20℃）にて保管した。

2.3 HPLC 装置

HPLC(high-performance liquid chromatograph)は、島津高速液体クロマトグラフ Promience シリーズ（島津製作所,京都）を用いた。機器構成はポンプ（LC-20AD、グラジェント用 2 台、ポストラベル用 1 台）、カラムオーブン（CTO-20AC）、オートサンプラ（SIL-20AC）、蛍光検出器（RF-20Axs）を使用した。

2.4 生化学自動分析装置

尿中クレアチニン測定には、日立 7180 形自動分析装置（日立ハイテクノロジーズ, 東京）を使用した。

2.5 使用カラム

HPLC の測定カラムには、蛍光標識試薬使用時の検討では、Wakosil-II 5C18HG (3.0mm×250mm)（富士フィルム和光純薬）およびガードカラムに Shim-pack GWS(G) (4.0mm×10mm)（島津製作所）を使用した。アルコールの酵素的測定法の検討では、RSpak DE-613(6.0mm×150mm)（昭和電工,東京）を使用した。

2.6 標識方法

2.6.1 ケト基化合物標識方法

中村らの報告¹⁰⁾による高感度蛍光検出が可能な標識方法にしたがい、MDB (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene,dihydrochloride)試薬 15.8 mg と亜ジチオン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 48.8 mg および 2-メルカプトエタノール 735 μL をイオン交換水にて 10 mL に溶解調製し MDB 溶液とした。

試料 200 μL に MDB 溶液 200 μL を添加混和し、60 $^\circ\text{C}$ の温浴にて 2.5 時間加熱した。その後、氷水にて冷却し、3000 rpm \times 10 min 遠心分離後、上清をサンプルバイヤルに分取し、測定を行った。(図 2)

2.6.2 ヒドロキシ基化合物標識方法¹¹⁾

長岡らの報告によるヒドロキシ基化合物の高感度蛍光検出が可能な方法¹¹⁾に基づいて標識を行った。DMEQ-COCl (3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone 試薬 8.5 mg をベンゼンにて 10 mL に調製し DMEQ-COCl 溶液とした。

試料 200 μL をガラスバイアル瓶に分取し、DMEQ-COCl 溶液 200 μL を添加混和し、密栓した後、100 $^\circ\text{C}$ 40 分間加熱した。流水にて冷却した後、3000 rpm \times 10 min 遠心分離を行い、反応液の上清部分より 10 μL をサンプルバイヤルに分取し、メタノール 990 μL を加え混和した後、測定を行った。(図 3)

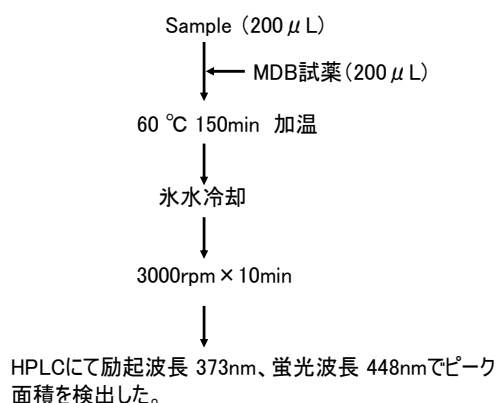


図 2 ケト基化合物蛍光標識法

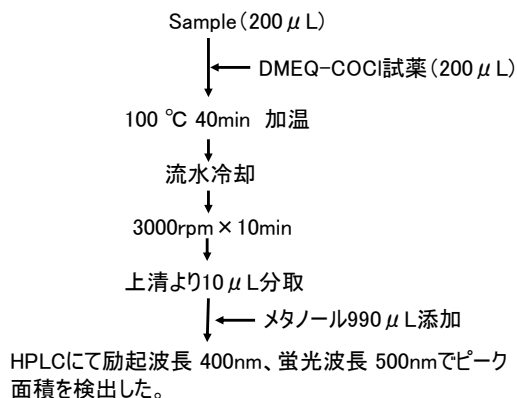


図 3 ヒドロキシ基化合物蛍光標識法

2.6.3 ヒドロキシ基化合物のアルコール脱水素酵素による NADH 蛍光検出法

RSpak DE-613 カラムにてアルコール類を分離後、酵素反応試薬には、0.15 mol/L Tris 塩酸 Buffer (pH8.5) にアルコール脱水素酵素 120 U/mL および NAD 4.1625 mmol/L を溶解した反応液を注入し、酵素反応コイルには 1.0 mm×10 M のチューブを使用した。

2.7 測定方法

2.7.1 HPLC 測定条件：ケト基とヒドロキシ基の化合物は、メタノール濃度を経時的に変化させるグラジエントモードでの分析では、メタノールが目的物質の蛍光強度に変化を与えるためメタノール濃度を一定条件で測定するイソクラティックモードで分析した。

1) ケト基化合物

移動相はメタノール/水の混合比 40/60 (v/v)、流速 0.5mL/min、検出器は励起波長 373 nm、蛍光波長 448 nm の条件で検出し、カラムオーブンは 40 °C、サンプル量は 10 μL インジェクションした。分析時間は 30 分。

2) ヒドロキシ基化合物

移動相はメタノール/水の混合比 80/20 (v/v)、流速 0.5mL/min、検出器は励起波長 400 nm、蛍光波長 500 nm の条件で検出し、カラムオーブンは 40 °C、サンプル量は 10 μL インジェクションした。分析時間は 10 分。

3) ヒドロキシ基化合物のアルコール脱水素酵素によるポストカラム誘導体化蛍光検出法

移動相に精製水を流速 1.0 mL/min で流し、各成分の分離後にアルコール脱水素酵素および NAD 混合酵素反応試薬を流速 0.5 mL/min で用いた。検出器は NADH の励起波長 340 nm、蛍光波長 491 nm の条件で検出し、カラムオーブンは 40 °C、サンプル量は 10 μL インジェクションした。分析時間は 60 分。

2.7.2 尿中クレアチニンの測定方法

尿を生理食塩水にて 10 倍希釈した後、クレアチニン測定試薬のメーカー指定の測定条件にて、日立 7180 形自動分析装置を用いて測定を行った。

2.8 尿中ケト基化合物及びヒドロキシ基化合物類のクレアチニン補正式

尿中ケト酸濃度(nmol/L)/尿中クレアチニン濃度 (mg/dL) ×100 の計算式で nmol/g・クレアチニン濃度を求めた。

2.9. 解析方法

データ処理は、測定結果が対数正規分布であったことより、対数変換を行って検討した。患者群と健常者群の比較をマン・ホイットニーU 検定にて実施し、有意水準を 0.05 以下とした。統計学的解析は StatFlex Version 7.1 (アーテック, 大阪) で行った。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

2.10. 倫理上の配慮

がん患者の尿試料は、千葉大学病院検査部に提出されたがん患者尿を分与いただいた。尿試料は 2018 年 4 月から 2019 年 8 月までに提出されたがん患者尿を使用し測定した。がん患者尿の利用にあたっては「千葉大学大学院医学研究院 倫理申請承認番号 3472 各種臨床検査における測定法の開発」及び「国際医療福祉大学 倫理申請承認番号 18-10-132 尿中低分子がんマーカーのスクリーニング検査法の開発」の倫理申請を行い、承認された。健常者尿については、株式会社サンリツの健康診断で採取した尿を受診者および会社の了承を得て使用した。

3. 結果

3.1 アルコール脱水素酵素によるヒドロキシ基化合物の検出

図 4 に Ethanol と 1-Propanol のクロマトグラムを示すが、その他長鎖のヒドロキシ化合物は検出できない結果であった。このため、このポストカラム誘導体化法によるヒドロキシ基化合物の検討は中止した。

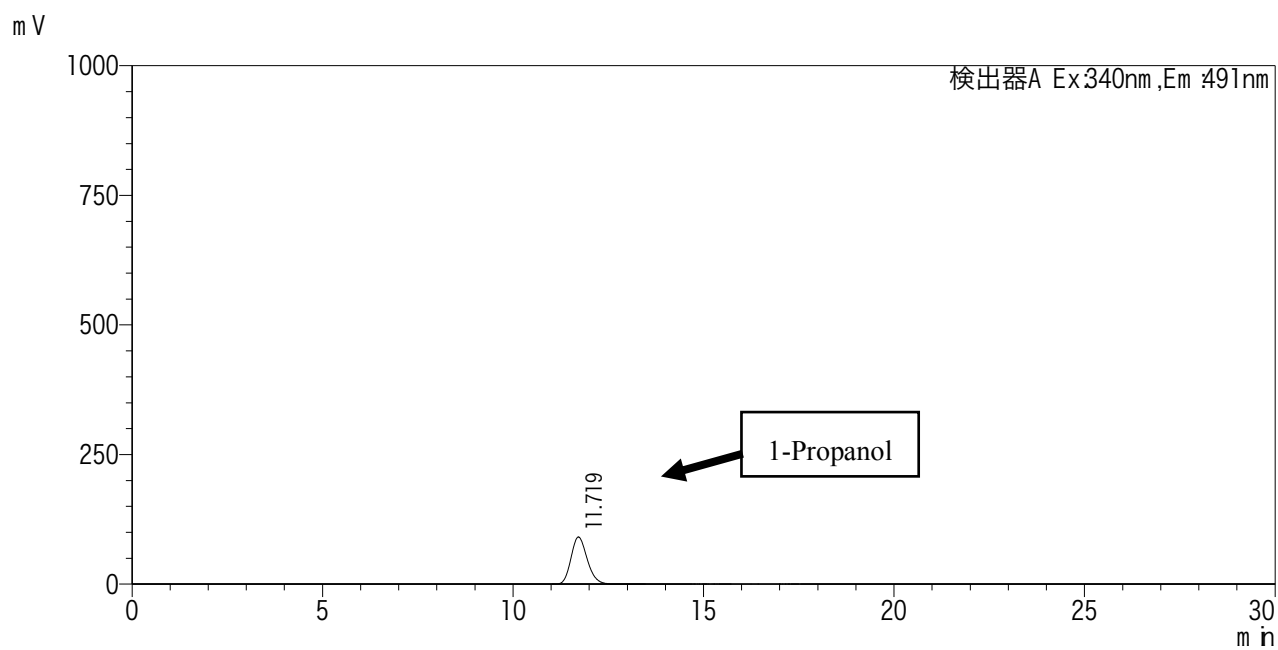
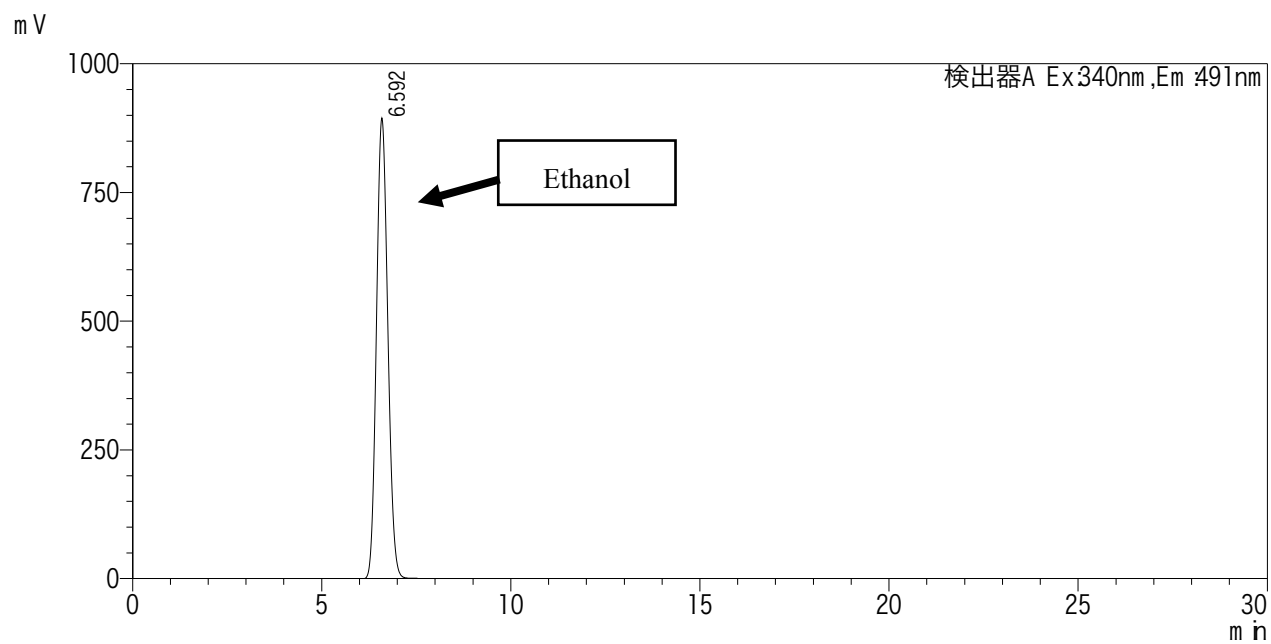


図4 ヒドロキシ基化合物ポストカラム誘導体法による標準物質のクロマトグラム例

上段は Ethanol、下段は 1-Propanol のクロマトグラムを示す。

Ethanol は 6.592 分に、1-Propanol は 11.719 分に溶出した。

3.2 各成分のクロマトグラム溶出時間

各種ケト基化合物の分離能を検討において、移動相のメタノール/水の混合比は40/60 (v/v)、流速 0.5 ml/min にて測定した結果、各標準液の溶出時間は、2-Nonanone: 2.958 min、2-Butanone: 9.715 min、2,3-Butanedione : 20.289 min であった。(図 5 に 2-Butanone と 2,3-Butanedione の標準液のクロマトグラムを示す) したがって、すべての測定時間を 30min に設定した。また同様に、各種ヒドロキシ基化合物の分離能の検討では、メタノール/水の混合比は 80/20 (v/v)、流速 0.5 ml/min とすることで標準液の溶出時間は、2-Aminoethanol : 3.121 min、1-Propanol : 3.744 min、2-Propanol : 3.749 min、2-Butanol : 4.079 min、1-Octanol : 8.973 min となり、分析時間を 10 min とした。(図 6 に 2-Butanol,1-Octanol の標準液クロマトグラムを示す) 両者ともカラムオープン温度は 40 °Cに設定した。また、がん患者尿および健常者尿のケト基化合物検出の蛍光標識をおこなったクロマトグラム例を図 7 および図 8 に、ヒドロキシ基化合物検出の蛍光標識をおこなったクロマトグラム例を図 9 および図 10 に示した。

3.3 がん患者尿と健常者尿の各成分のピーク検出

各種ケト基化合物とヒドロキシ基化合物について、がん患者と健常者の尿を前述の測定方法にてスクリーニング検査をしたところ、がん患者のみに検出された物質はケト基化合物の 2,3-Butanedione および 2-Butanone であった。特に、2,3-Butanedione の検出率が高く、2-Butanone は数例であり、その他の 6 化合物は検出されなかった。この結果より、以後の検討は 2,3-Butanedione および 2-Butanone の定量特性の検討を行った。

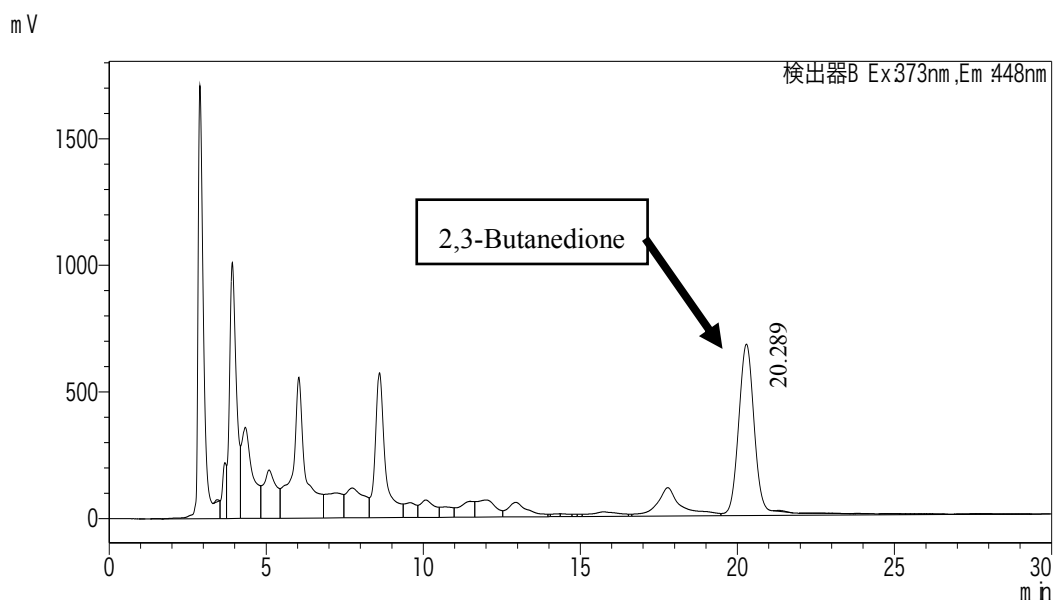
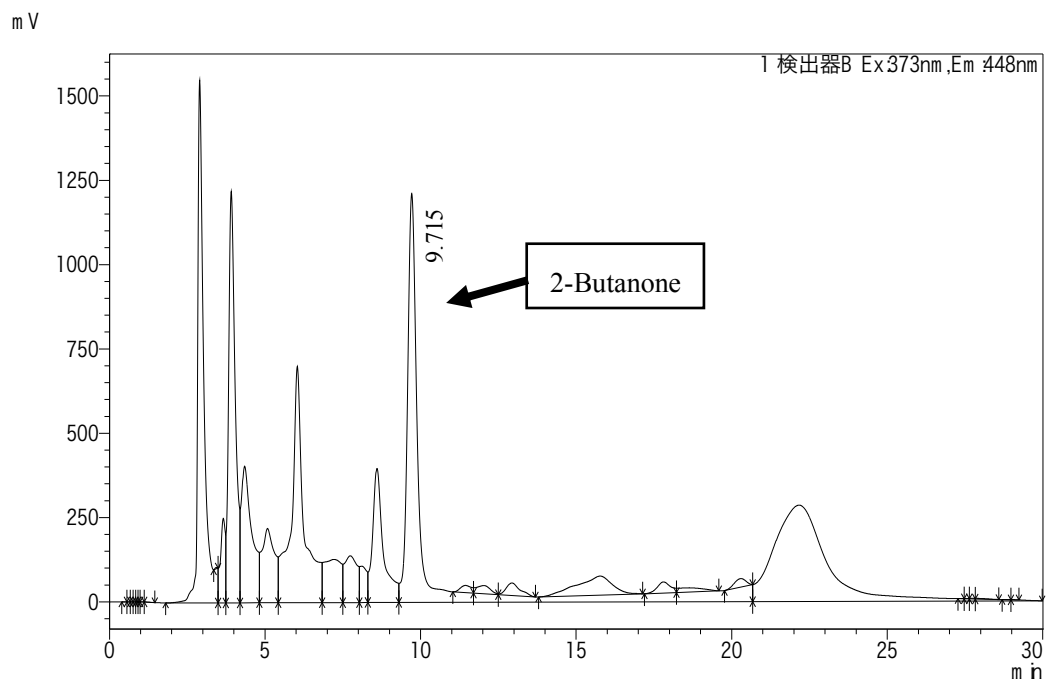


図5 ケト基化合物標準物質のクロマトグラム例

上段は2-Butanone、下段は2,3-Butanedioneのクロマトグラムを示す。

2-Butanoneは9.715分に、2,3-Butanedioneは20.289分に溶出した。

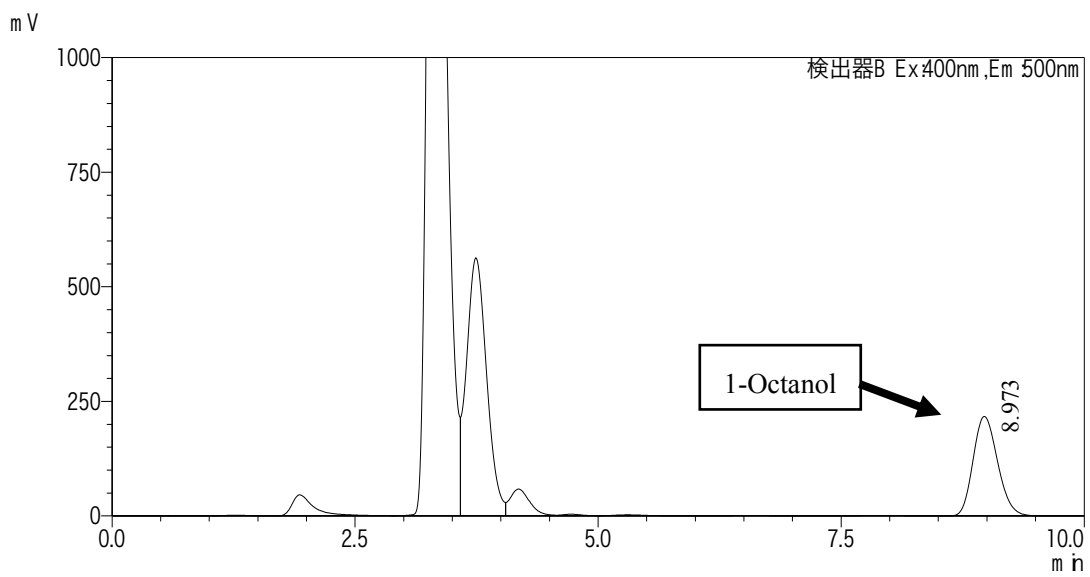
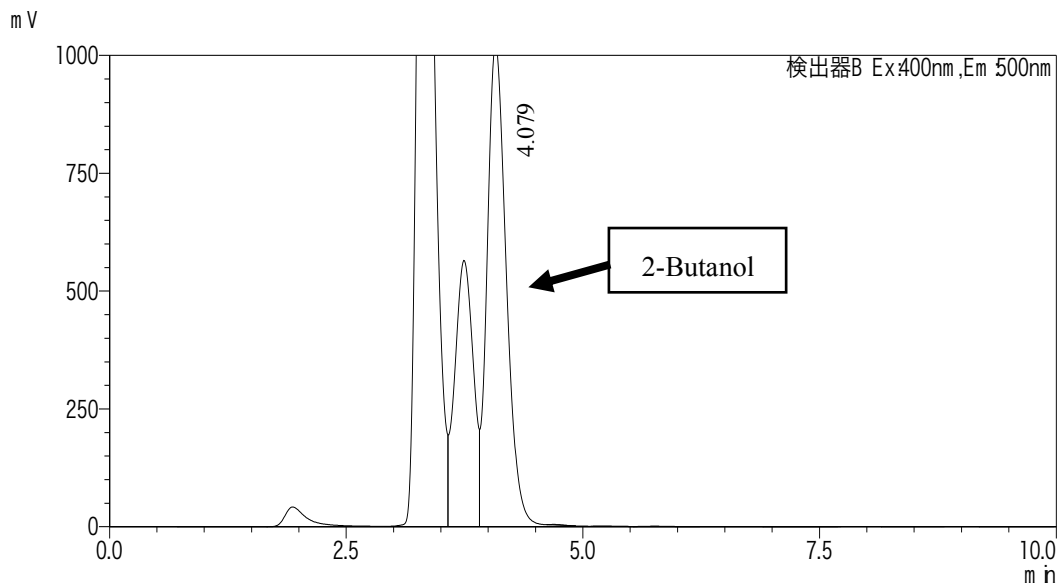


図6 ヒドロキシ基化合物標準物質のクロマトグラム例
上段は2-Butanol、下段は1-Octanolのクロマトグラムを示す。
2-Butanolは4.079分に、1-Octanolは8.973分に溶出した。

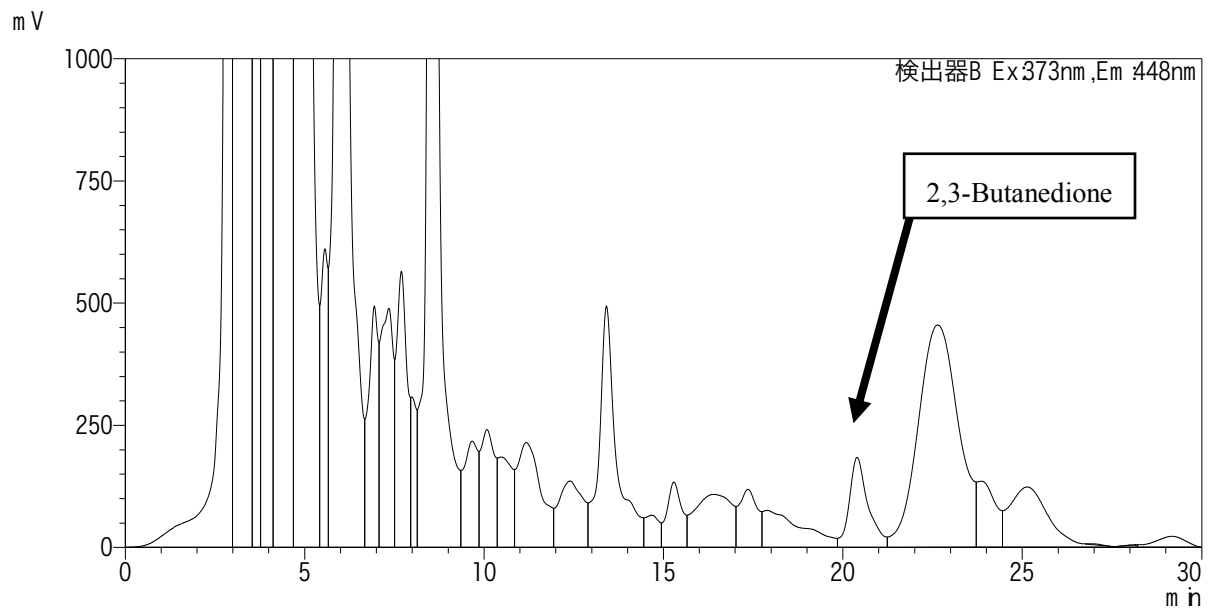


図7 がん患者尿におけるケトン化合物蛍光標識のクロマトグラム例

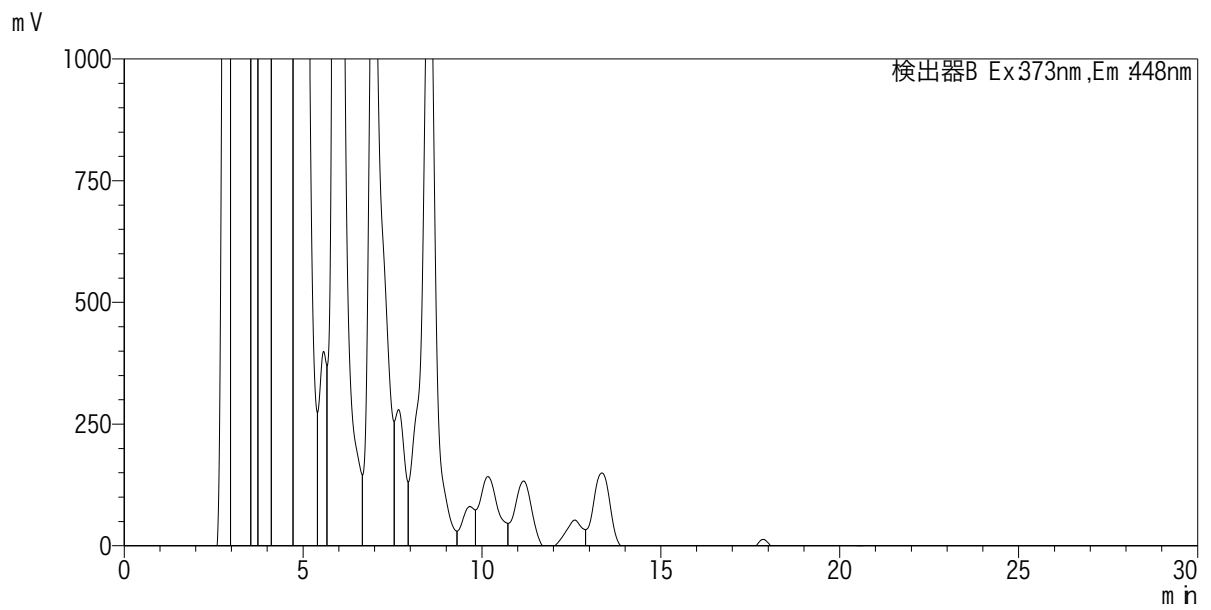


図8 健常者尿におけるケトン化合物蛍光標識のクロマトグラム例

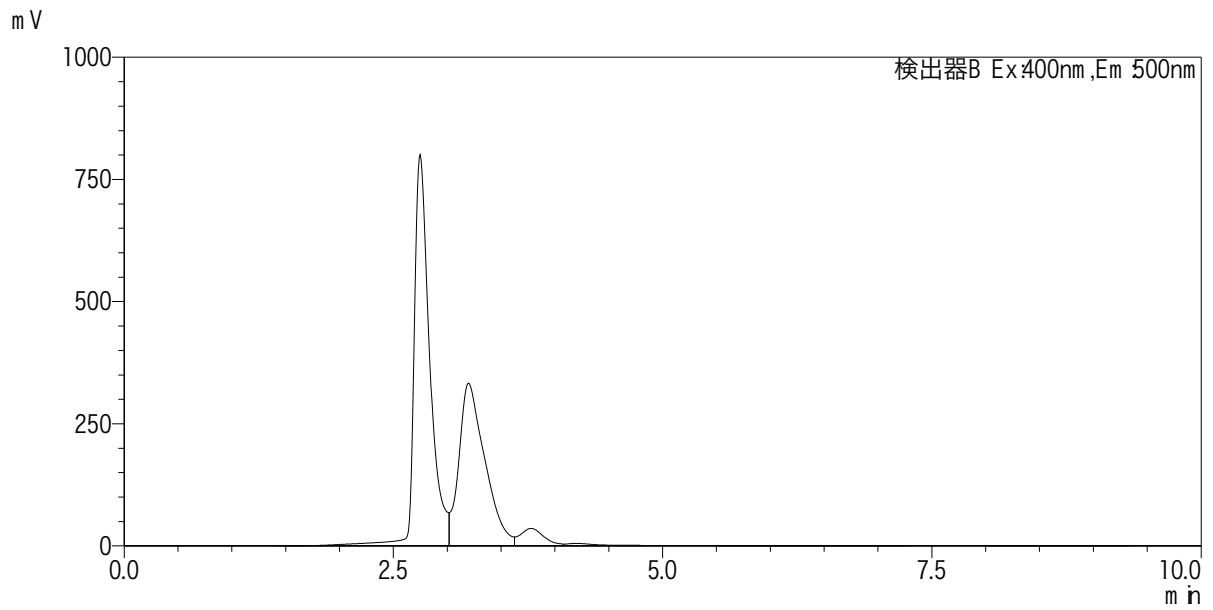


図9 がん患者尿におけるヒドロキシ基化合物蛍光標識のクロマトグラム例

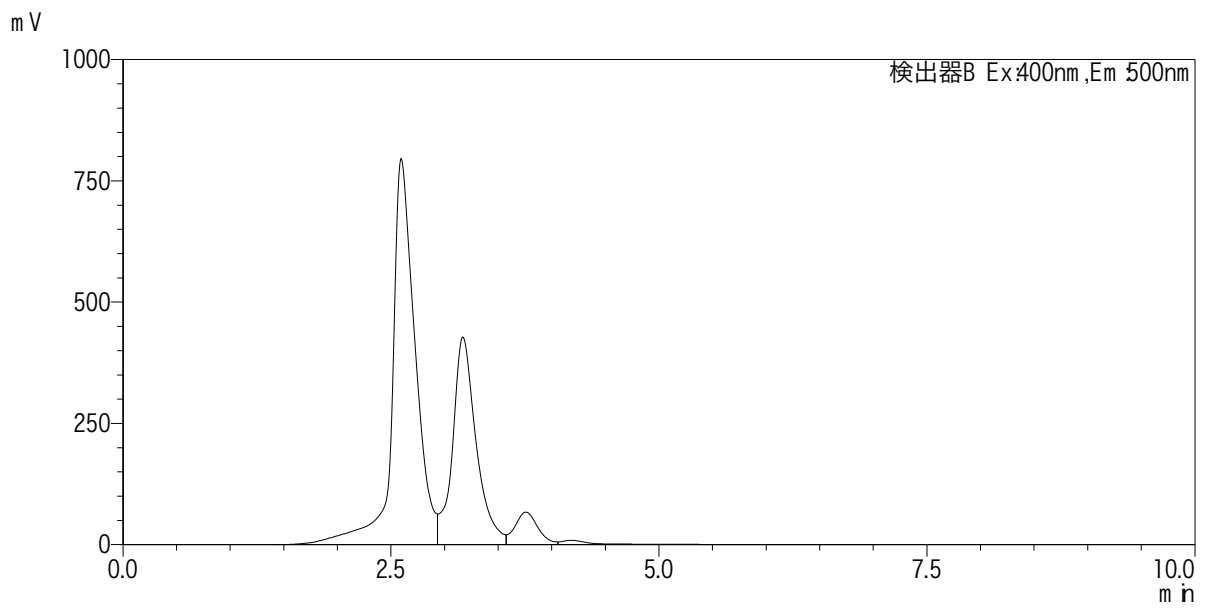


図10 健常者尿におけるヒドロキシ基化合物蛍光標識のクロマトグラム例

3.4 2,3-Butanedione および 2-Butanone の直線性

各種ケト基化合物の 2,3-Butanedione および 2-Butanone の標準物質にて希釈系列を作成し、直線性について検討した結果、図 11 に示すように、それぞれ 54 nmol/L と 1.75 $\mu\text{mol/L}$ まで直線性を認めた。

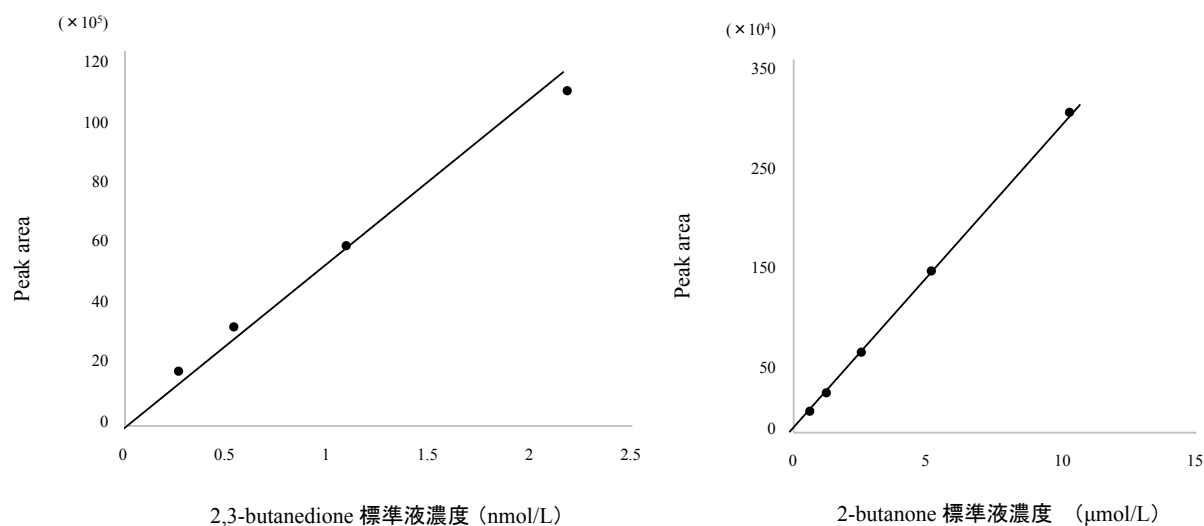


図 11 2,3-Butanedione および 2-Butanone の直線性

3.5 定量限界

ケト基化合物の 2,3-Butanedione および 2-Butanone の最小検出感度は、それぞれ 2.1 nmol/L と 0.875 $\mu\text{mol/L}$ であり、非常に高感度であった。

3.6 再現性

ケト基化合物の 2,3-Butanedione 標準物質各濃度における五重測定による再現性は、平均 \pm 2SD (Standard deviation) は、 $2.54 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ 、 $2.06 \pm 0.014 \mu\text{mol/L}$ 、CV(Coefficient of Variation)値は 0.7 %、0.3 %と良好な結果が得られた。また、2-Butanone においては、平均 \pm 2SD は、 $9.55 \pm 0.92 \mu\text{mol/L}$ 、 $5.65 \pm 0.72 \mu\text{mol/L}$ 、 $3.45 \pm 0.16 \mu\text{mol/L}$ 、CV 値は 4.8 %、6.3 %、2.3 %であった。(表 2)

表2 2,3-Butanedione および 2-Butanone の同時再現性

	2,3-Butanedione ($\times 10^8$)		2-Butanone ($\times 10^5$)		
	試料 1	試料 2	試料 1	試料 2	試料 3
1	2.56	2.06	8.86	5.76	3.38
2	2.53	2.06	9.68	5.66	3.41
3	2.55	2.06	10.1	6.17	3.56
4	2.51	2.05	9.42	5.23	3.45
5	2.54	2.07	9.66	5.43	
平均値	2.54	2.06	9.55	5.65	3.45
SD	0.02	0.007	0.46	0.36	0.08
CV(%)	0.7	0.3	4.8	6.3	2.3

3.7 保存安定性

2,3-Butanedione 1.0 μ mol/L 濃度標準液を、健常者尿（遠心分離し、沈渣物を除去）に混和し、マイクロスピッツに分注した後、室温、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。その後、3日後、6日後、13日後に各々の保存条件の試料について測定を行った。その結果、図12に示すように4 $^{\circ}$ Cで1週間、-20 $^{\circ}$ Cで2週間安定であった。

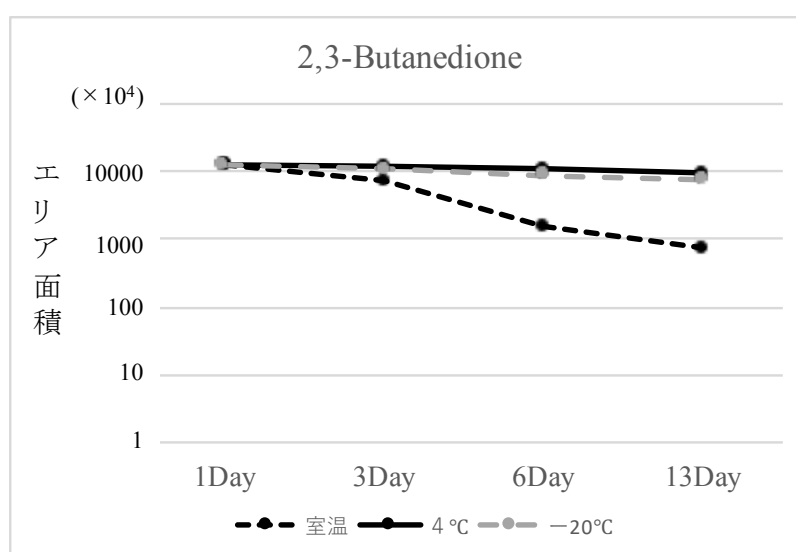


図12 2,3-Butanedione の保存安定性

3.8 健常者とがん患者の測定

がん患者群 43 例のがんの種類とそのステージ、TNM 分類および 2,3-Butanedione の測定値を表 3 に示した。健常者群 60 例とがん患者群 43 例で有意な差が見られた 2,3-Butanedione の測定結果の分布は、表 4 に示すように、健常者群の中央値は 0.87 nmol・g クレアチニンであった。また、全がん患者群の中央値は 1.37 nmol・g クレアチニン、肝臓がん患者群 1.54 nmol・g クレアチニン、大腸がん患者群 1.84 nmol・g クレアチニンと健常者群の中央値より高値を示した。

表3 がん患者検体のがん疾患種類とステージ、TNM 分類および2,3-Butanedione 測定値

検体No.	疾患名	ステージ	TNM分類	備考	2,3-Butanedione (nmol・gクレアチニン)
肝臓がん・胆管がん					
3	肝細胞がん・左肺に転移性腫瘍				0.717
4	肝細胞がん・リンパ節転移の疑い				1.176
5	肝細胞がんを疑う所見なし			C型肝炎	0.843
13	多発性肝細胞がん				0.923
14	肝細胞がん・肺転移				0.649
16	肝細胞がん				1.302
18	肝細胞がん・左肺腫瘍(脈管浸潤あり)				1.576
21	肝細胞がん		T3N0M1		1.343
22	肝細胞がん・骨転移	II			2.633
24	肝門部領域胆管がん				1.637
25	アルコール性肝硬変				2.227
29	肝細胞がん(S状結腸がん 手術根治:2008年)				1.500
31	肝細胞がん				2.786
32	肝細胞がん				1.723
36	多発肝転移			元々S状結腸癌	3.160
38	肝細胞がん				0.525
39	多発肝細胞がん	III B	T4N2M0		0.410
41	肝細胞がん				3.867
42	肝細胞がん(大腸がん術後)				9.613
43	C型肝炎(HCC疑いだったが所見なし)				1.819
子宮がん・卵巣がん					
6	骨盤内腫瘍・両側卵巣多房性腫瘍・腹膜播種・進行性卵巣がん				0.923
7	子宮体がん・卵巣がん	IA期、IC期			1.931
8	子宮体がん卵巣転移 or 子宮体がん→卵巣がん・卵巣がん・子宮体がん再発		T2b(子宮体癌)、T3bN1M1(卵巣癌)		0.634
9	左卵巣がん(間質浸潤あり)		T3bN1M0		1.766
11	卵巣がん肝転移				1.190
33	卵巣がん・多発リンパ節転移				0.743
34	子宮体がん肉腫	I期			0.722
35	卵巣がん再発		T3cNxM0		0.555
37	子宮頸がん	VIa期以上	T4aN1Mx		0.418

大腸がん・結腸がん・胃がん

1	大腸がん	4		多発LN転移	1.490
19	横行結腸がん・肝、肺、骨転移		T3N1M0	最初は直腸癌(T1N0M0)	2.641
20	上行結腸がん・上行結腸がん肝転移	IV			1.373
26	S状結腸がん多発肝転移				1.838
30	進行胃がん・肝転移・肺転移・リンパ節転移	4b	T4aN1M1		2.033

膵臓がん

2	膵体尾部がん・肝転移				1.150
10	膵体部がん術後再発(胃に転移)	II B(膵体部癌)			1.524
28	膵尾部がん・多発肝転移・肺転移				4.087

肺がん

12	進行性非小細胞肺がん・多発転移性脳腫瘍	IVB			0.905
17	右上葉肺腺がん・右副腎脾転移・脳転移再発				1.016
40	肺腺がん・肺動脈&心膜浸潤・右副腎転移				1.066

前立腺がん

15	去勢抵抗性前立腺がん・多発骨転移		T3bN1M1	右骨盤内LN転移、前立腺局所浸潤(特に右側)	0.559
23	去勢抵抗性前立腺がん		T4N1M1b		2.087
27	前立腺がん放射線治療後PSA再発・CRPC骨転移				1.467

表 4 健常者群、全がん患者群、肝臓がんおよび大腸がん患者群における 2,3-Butanedione の測定結果

	健常者群	全がん患者群	肝臓がん患者群	大腸がん患者群	肝臓がん・大腸がん患者群
症例数	60	43	20	5	25
中央値 (nmol/g・Creatinine)	0.87	1.37	1.54	1.84	1.58

3.9 全がん患者と各種がん患者の有用性

表 4 に示した健常者 60 名と各種癌患者 43 名との 2,3-Butanedione の測定結果のばらつきは等分散の検定から $p = 0.001$ と等分散といえなかったことより、ノンパラメトリック検定のマン・ホイットニーU 検定を行ったところ、 $p = 0.004$ と有意な結果となった。図 13 および図 14 に健常者群および全がん患者群、健常者群および肝臓がん、大腸がん患者群の分布を箱ひげ図にて示す。

次に、多重比較検定の有意水準を 0.0125 として、健常者群を基準に各種がん患者群のデータを比較した。この結果、健常者群に対して 2,3-Butanedione が高値を示した患者群は、肝臓がん患者群と症例数は少ないが、大腸がん患者群であった。健常者群と肝臓がん・大腸がん患者群の比較における感度と特異度は、感度・特異度曲線（図 15）の交点より、カットオフ値を 1.1 nmol/g・クレアチニンにした場合、感度は 0.76、特異度は 0.6 となった。全がん患者群と健常者群での比較では、感度が 0.63 であったことより、特定のがん疾患を対象とすることにより感度の増加が認められた。

ROC(Receiver Operating Characteristic)解析では、健常者群と全がん患者群の AUC(Area under the Curve)値は 0.67、同様に肝臓がん患者のみでは AUC 値 0.70、大腸がん患者の AUC 値は 0.83 であり、肝臓がんおよび大腸がん患者群と健常者群では AUC 値は 0.73 であった。(図 16)

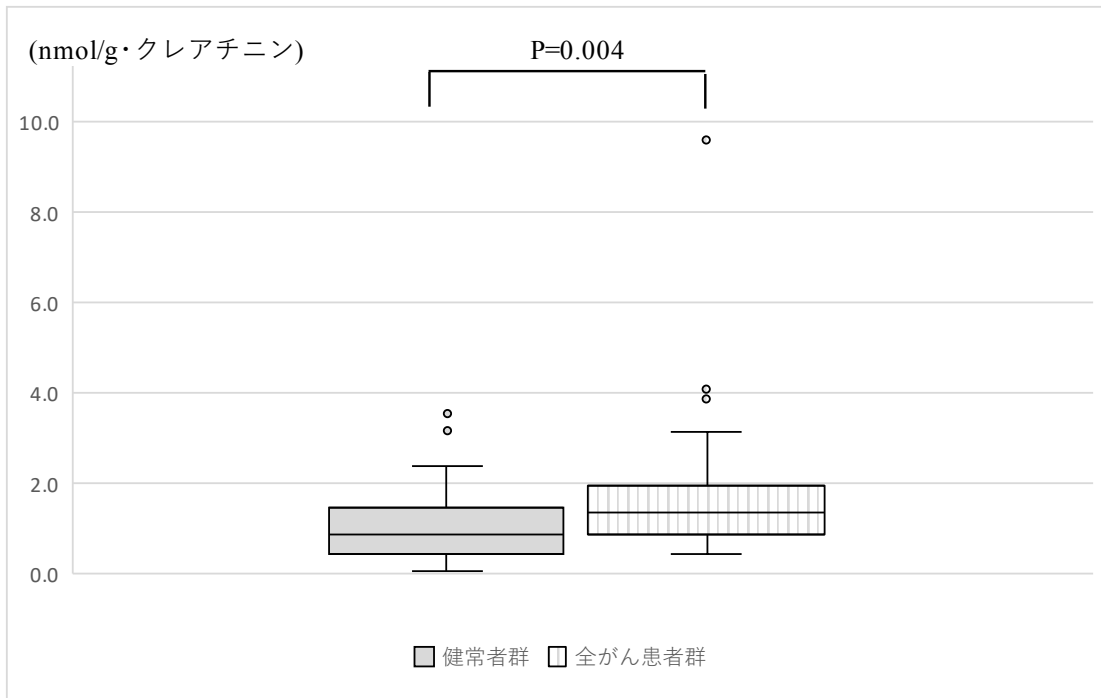


図 13 尿中 2,3-Butanedione の健常者群および全がん患者群における分布

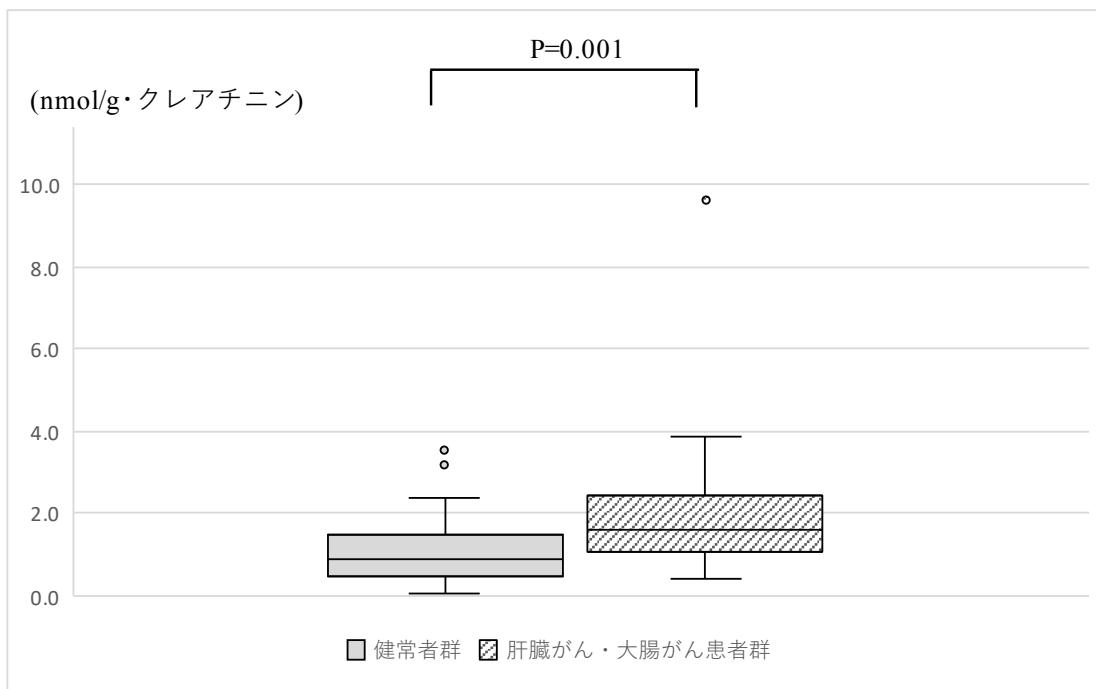


図 14 尿中 2,3-Butanedione の健常者群および肝臓がん・大腸がん患者群における分布

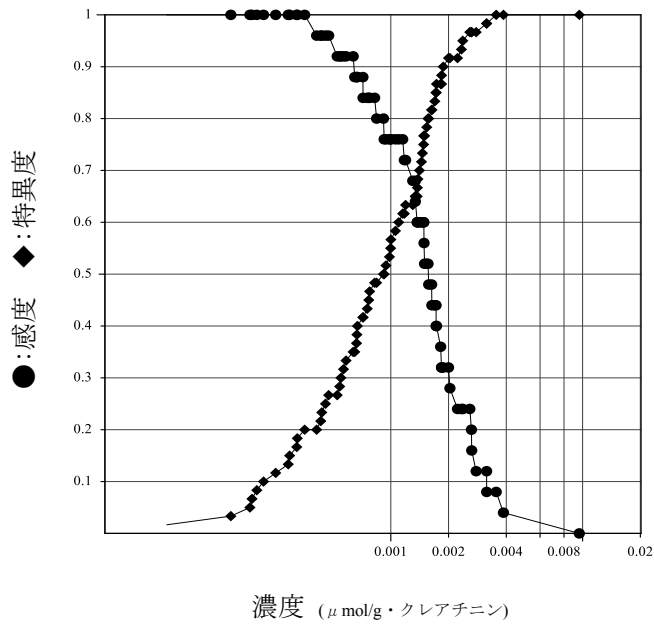
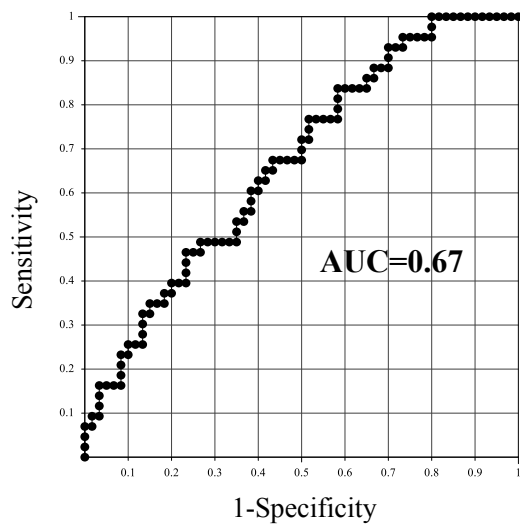


図 15 健常者群と肝臓がん・大腸がん患者群比較の感度・特異度曲線

健常者群と全がん患者群



健常者群と肝臓がんおよび大腸がん患者群

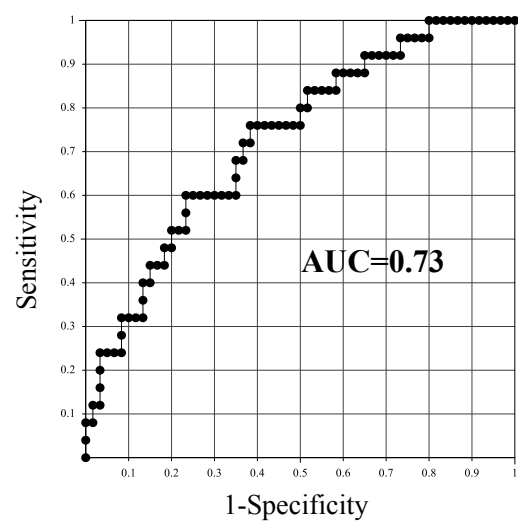


図 16 2,3-Butanedione 測定結果の健常者群と全がん患者群および健常者群と肝臓がん、大腸がん患者群の ROC 曲線

4. 考察

尿中のがんのバイオマーカーを文献検索した結果、多くの化合物候補が確認できたが、その検出法の多くは質量分析装置を用いているため、実用化が容易とはいえない。今回の検討では、多くの検査室で測定が可能な方法として、質量分析装置よりも一般的である HPLC 装置を選択した。HPLC 装置を質量分析装置と同等の感度に検出する方法として蛍光標識法を選択した。まず、ヒドロキシ基化合物のポストカラム誘導体化法として、カラムで分離した成分にアルコール脱水素酵素を作用させ、生成する NADH を蛍光検出する方法を試みたが、基質特異性が低分子ヒドロキシ基化合物であるメタノールやエタノールに親和性があり、ブタノール以上の化合物はほとんど検出できないことより、この方法の検討を中断した。一方、ケト基化合物としては MDB 試薬、ヒドロキシ基化合物には DMEQ-COCl 試薬を利用して検討した結果、合計 8 種類の低分子化合物の検出法を確立した。

そこで、今回の蛍光標識法を用いた方法で、がん患者尿中の各低分子化合物のピークについて測定した。ケト基化合物 2,3-Butanedione および 2-Butanone、ヒドロキシ基化合物 1-Octanol および 2-Butanol についてがん患者尿および健常者尿について検討を行った結果、ケト基化合物の 2,3-Butanedione および 2-Butanone は検出されたが、ヒドロキシ基化合物の検出はできなかった。ケト基化合物の 2,3-Butanedione については、がん患者群と健常者群の間において、有意な差が見られたことより、がんの早期発見のあらたな腫瘍マーカーとしての可能性が期待された。

そこで、健常者尿を用いて 2,3-Butanedione の保存安定性について検討を行った。その結果、尿の保存安定性は、4℃で 1 週間、-20℃で 2 週間安定であった。また、本検討において、健常者尿において 2,3-Butanedione が高値を示した検体は糖尿病を罹患しているものであった。本スクリーニング検査において、尿糖を同時に測定し、陽性検体を削除することにより、より有用性が向上するものと考えられた。この点については症例の追加が必要である。

ケト基化合物の 2,3-Butanedione のピーク波形が高い検体は、いずれもクレアチニン濃度が高かったことより、随時尿よりも早朝尿などの濃縮尿のほうが、本物質を検出しやすいものと考えられる。

各種がん疾患における分類より、2,3-Butanedione は、肝臓がんや大腸がんにおいて多く尿中に排泄されていた。その要因としては、がん化による嫌気性代謝で増加する酵素としてフォスフォエノールピルビン酸からピルビン酸を生成するピルビン酸キナーゼや乳酸からピルビン酸を触媒する乳酸脱水素酵素ががん細胞内で活性化することが知られている¹²⁾。

2,3-Butanedione が生体内で生成されるメカニズムについての報告はされていない。一方、酵母や細菌での酵素代謝ではピルビン酸とアセトアルデヒドからアセト乳酸合成酵素によりアセト酢酸が生成することが知られ、アセト酢酸は、酸化的脱炭酸分解によって 2,3-Butanedione が生成されることが報告¹³⁾されている。生体内では、通常アセトアルデヒドは生成されないが、アルコールの摂取によりアルコール脱水素酵素から生成され、さらにアセトアルデヒド脱水素酵素により酢酸に代謝される。しかし、アセトアルデヒド脱水素酵素の欠損した患者および大量の飲酒においては、アルコール摂取後に、体内のアセトアルデヒドの濃度が高くなることが知られている。また、タバコおよび電子タバコに添加された糖や保湿剤は、加熱によってアセトアルデヒドを生成することが報告されている¹⁴⁾。アルコールの飲酒やタバコの喫煙により体内に入ったアセトアルデヒドが腸管内に入り、微生物や酵母などにより、このアセトアルデヒドとピルビン酸を基質としてアセト乳酸合成酵素によってアセト酢酸を経由して 2,3-Butanedione が生成され、腸肝循環を経由して尿中に排泄されることが推定された。

今回の測定を行ったがん患者においては、尿中 2,3-Butanedione の高いがん疾患は、肝臓がんと大腸がんであった。これらの疾患の発生因子の一つとしてアルコール摂取^{15,16)} やタバコの喫煙¹⁴⁾ が 1 つの要因として報告されている。また、Tsuruya ら¹⁷⁾ はアルコールを多飲する大腸がん患者の腸内細菌叢を調べ、健常者には少ない *Streptococcus* が増殖していることを報告している。Walsh と Cogan は *Streptococcus diacetylactis* の培養においてクエン酸とアセトアルデヒドが存在すると多くの 2,3-Butanedione が産生されると報告¹⁸⁾ している。体内ではクエン酸は解糖系代謝の主要な成分であり、クエン酸とアセトアルデヒドが腸管内の細菌によって 2,3-Butanedione が生成され腸肝循環によって血中を介して尿中に 2,3-Butanedione ががん患者で出現したと推定した。

今回の各種がん患者での 2,3-Butanedione の尿中濃度の上昇は肝臓がんと大腸がん以外では見られないことより、前述の発生機序が推定されたが、代謝の経緯についてのさらなる確認が必要である。本報告は、新しいマーカーとしての可能性を見出したものであり、今後さらに測定法の妥当性を向上させるとともに、がんステージを考慮した上で症例数を増やして検討するなどの展開が必要である。

5. 結語

尿中の低分子物質のがんのスクリーニング検査としては、ケト基含有物質の検出が有効であった。特に、2,3-Butanedione は肝臓がんと大腸がんのがん患者で尿中に排泄されることより、一次スクリーニング検査として有用な検査法である。ただし、糖尿病罹患患者については除外することを考慮すべきであると思われる。

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員として本研究の実施の機会を与えてくださり、その遂行にあたり終始ご指導を賜りました国際医療福祉大学大学院 大澤 進 教授ならびにご助言とご指導を賜りました国際医療福祉大学大学院 清宮 正徳 准教授、佐藤 正一 准教授に深謝いたします。

また、がん患者様の尿を分取保存提供いただきました千葉大学医学部附属病院検査部の松下 一之 診療教授、西村 基 講師、佐藤 有華 技師に感謝いたします。

7. 文献

- 1) 恩田健志、林 宰央、野村武史ら. 唾液中のバイオマーカーを用いた早期診断の可能性. 口腔腫瘍 2013;25(3):89-97.
- 2) Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, et al. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. Clin Chem. 1985; 31: 1278-1282.
- 3) 岩永 剛、加藤雅彦. ニオイでがんの診断は可能か. 癌と化学療法 2007;34(13):2167-2174.
- 4) 加藤雅人、大西秀哉、鈴木宏従ら. 肺癌における癌マーカーとしての尿中ジアセチルスペルミンの臨床的意義. 肺癌 2011; 51 : 787-792.
- 5) Gkotsos G, Virgiliou C, Lagoudaki I, et al. The role of sarcosine, uracil, and kynurenic acid metabolism in urine for diagnosis and progression monitoring of prostate cancer. Metabolites. 2017, 7, 9; doi:10.3390/metabo7010009.
- 6) Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, Shinden Y, et al. A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. PLOS One. 2015; 11: 1-15.
- 7) Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, et al. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography / triple-quadrupole mass spectrometry. Oncotarget. 2017; 8(10): 17115-17126.

- 8) 園田英人、沖英次、田中充ら. がんの匂いの研究. 癌と化学療法 2018; 45(6): 911-915.
- 9) Inaji H, Koyama H, Motomura K, et al. ErbB-2 protein levels in nipple discharge: Role in diagnosis of early breast cancer. *Tumor Biol.* 1993; 14: 271-278.
- 10) Nakamura M, Hara S, Yamaguchi M, et al. 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α -keto acids. *Chem Pharm Bull.* 1987; 35: 687-692.
- 11) Nagaoka H, Nohta H, Kaetsu Y, Saito M, et al. 2-(5-Chlorocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran as fluorescence derivatization reagent for alcohols in high performance liquid chromatography. *Anal Sci.* 1989; 5: 525-530.
- 12) Miran J, Kin S. S, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp & Mol Med* 2013; e45, doi: 10. 1038/ emm.
- 13) Chuang, L. F, Collins, E. B. Biosynthesis of Diacetyl in Bacteria and Yeast. *J. Bacteriol.* 1968; 95: 2083-2089.
- 14) Jeroen L.A, Johannes W.J.M, Mark J.A, et al. Aldehyde and Volatile Organic Compound Yields in Commercial Cigarette Mainstream Smoke Are Mutually Related and Depend on the Sugar and Humectant Content in Tobacco. *Nicotine & Tobacco Research.* 2019; 1-9.
- 15) Shimazu T, Sasazuki S, Wakai K, et al. Alcohol drinking and primary liver cancer: a pooled analysis of four Japanese cohort studies. *Int J Cancer.* 2012; 130: 2645-2653.
- 16) Mizoue T, Inoue M, Wakai K, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer in Japanese: A pooled analysis of results from five cohort studies. *Am J Epidemiol.* 2008; 167: 1397-1406.
- 17) Tsuruya A, Kuwahara A, Saito Y, et al. Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer. 2016; *Scientific Reports* volume 6, Article number: 27923.
- 18) B. Walsh and T. M. Cogan. Diacetyl, acetoin, and acetaldehyde production by mixed-species lactic starter cultures. *Applied microbiol.* 1973; 26: 820-825.