

題目: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

キーワード:腫瘍マーカー、尿、蛍光標識、HPLC

「研究の背景と目的」

我が国では超高齢化社会に伴い、がんの死亡率が上昇を続け、医療費の増大が大きな課題になっている。血液を試料とした場合、医療機関などの受診が必要となり、その受診者は限定される。一方、在宅で容易に採取できる試料としては唾液¹⁾、呼気²⁾、尿³⁾などがあるが、がんのバイオマーカー試料としては呼気、尿がある。検査室に普及している高速液体クロマトグラフィ装置(HPLC)を用いて大量の試料をスクリーニングできる測定法の開発が実用性の点で優れている。今回は低分子化合物に焦点を絞り、蛍光物質を標識して逆相クロマトグラフィによる分析を行った。その結果、がん患者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、このスクリーニング検査法の可能性を見出した。

「方法」

1. 蛍光標識法

ケト基化合物の検出に1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene, dihydrochloride(MDB)を、ヒドロキシ基化合物の検出に3-Chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1*H*)-quinoxalinone(DMEQ-COC1)の蛍光標識物質を各々用いて実施した。

2. クレアチニン測定

尿検体を生理食塩水にて10倍希釈した後、クレアチニン測定試薬を用いて日立7180形自動分析装置にてメーカー指定の条件で測定を行った。

3. 標準物質

ケト基を含む測定物質として、2,3-Butanedione, 2-Butanone, 2-Nonanone及びヒドロキシ基を含む化合物は1-Octanol, 1-Propanol, 2-Propanol, 2-Butanol, 2-Aminoethanolを用いた。

4. HPLC装置

HPLCによる蛍光標識物質の測定は島津高速液体クロマトグラフ Promience シリーズ(島津製作所)を用い、カラムはWakosil-II 5C18HG(φ3.0mm×250mm)とガードカラムはShim-pack GWS(G)、(4.0mm×10mm with)を用いた。測定条件は、ケト基化合物類については移動相としてメタノール/水:40/60(v/v)、流速は0.5ml/min 検出は励起波長373nm、蛍光波長448nm、ヒドロキシ基化合

物類については移動相としてメタノール/水:80/20(v/v)、流速は0.5ml/min 検出は励起波長400nm、蛍光波長500nmで、各々カラムオープン40℃、蛍光標識物質を10 μ L用いて行った。

「倫理上の配慮」

がん患者の尿試料の収集には、千葉大学病院検査部に提出されたがん患者尿を測定した。がん患者尿の利用に当たっては「千葉大学大学医学研究院 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-Io-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解を得て使用した。

「結果」

1. クロマトグラム溶出時間

各種ケト基化合物の溶出時間は、2-Nonanone:2.9 min, 2-Butanone:9.7min および 2,3-Butanedione:20.2minであった。ヒドロキシ基化合物の溶出時間は、2-Aminoethanol:3.1min, 1-Propanol:3.7min, 2-Propanol:3.7min, 2-Butanol:4.0min, 1-Octanol:8.9minと4成分の分離が可能であった。しかし、1-Propanolと2-Propanolは分離不能であった。

2. 同時再現性 2,3-Butanedioneと2-Butanoneの標準物質各濃度における変動係数はそれぞれ平均濃度0.7%、平均濃度0.3%および平均濃度4.8%、平均濃度6.3%、平均濃度2.3%であった。

3. 全がん患者と各種がん患者の有用性 がん患者検体(n=43)および健常者検体(n=60)の測定結果についてマン・ホイットニーU検定をおこなったところ、 $P=0.004$ と有意な結果が得られた。次に、ROC解析の結果、健常者に対して肝臓がん患者のデータはAUC値0.70と、統計学的に有意な結果となった。例数は少ないが大腸がん患者のAUC値は0.83であった。

「考察」

今回の検討では、ケト基化合物の2,3-Butanedioneががん患者群と健常者群において有意な差がみられたことよりがんの早期発見のマーカーとしての可能性が期待された。2,3-Butanedioneは、肝臓がんと大腸がんで有意な結果が得られたが、その生成について腸内細菌のピルビン酸とアセトアルデヒドを基質とするアセト乳酸合成酵素の関与が考えられる。

「結語」

ケト基含有低分子でのがんのスクリーニング検査としてはケト基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から、第一次にスクリーニング検査としては有用な検査法である。

「引用文献」

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.