

匂いの類似性を利用したセンサーによる泌尿器癌検査法、 及び測定情報共有法の開発

Semiconductor and Metabolome Analyses of Metabolite derived from
a Bladder Cancer Cell Line and Epithelial Cells

2041026



研究代表者

東京慈恵会医科大学

講師

藤岡宏樹

[研究の目的]

本研究は、泌尿器癌に由来する揮発成分の匂いをセンサーにより測定、基準試薬の匂いに対する類似度で表現し、再現性良く、高感度に癌を判別する方法を開発することを目的とする。

現行の泌尿器癌の検査法では、尿の細胞診、腹部エコー、PSAの血液検査などが行われている。しかしながら、これらの内、細胞診やエコー検査は診断予測をつけてから行う場合が多く、簡便なスクリーニングに適用することが難しい。そこで本研究では、尿の匂いをセンシングして絶対値で記録する、簡便な泌尿器癌のスクリーニング法を開発し、人への身体的負担を軽減した早期発見法を構築することを最終目標とする。

なぜ匂いに着目するのか？我々が匂いに着目した要因の一つにメタボローム解析とセンサー技術の発展がある。メタボローム解析は、LC、GC、CEなどと質量分析装置を組み合わせ、代謝物に含まれる物質の中から、バイオマーカー候補となる物質を網羅的に探索するものである。現在までに、多くの癌で候補物質が報告されてきた。

また、代謝物には揮発性のある物質も含まれており、センサーや犬の嗅覚などを使って、揮発成分のパターンを比較する研究も進んでいる。

これらの研究は、先述の成分を一つ一つ同定するメタボローム解析とは異なり、成分を一度に、またはいくつかの群として捉えて測定し、判別する方法である。成分の種類によっては、質量分析よりも高感度に検出できるものもあり、これまでに犬の嗅覚やセンサーを使った膀胱癌患者の尿の判別研究や、犬の嗅覚で大腸癌患者の呼気を判別する研究などが報告されてきた。これらの研究で得られた判別精度は、既存の血中マーカーと同様か、それ以上の精度を推移しているものが多く、匂いだけでも十分に診断に応用できることを示唆している。

しかしながら、センサーや犬の嗅覚による判別では、どのような成分が認識されているかを判断することが難しい。このため、センサーや犬の嗅覚から得られた結果とメタボローム解析から得られた結果との比較や、異なるセンサー間の認識成分の違いを考察する事が困難であった。

そこで、我々はセンサーによる香り表現法に着目し、正常と癌の代謝物などサンプル間の匂いの違いを表現させる方法を試みる。この表現法は、喜多らによって構築された方法であり、サンプルと基準となる成分(9種類)との類似度を計算することで、擬似的にどのような成分が含まれているか、またどのような匂いの質かを表現させることができる方法である。

近年、我々はこの手法を発展させ、ワインの香り表現キット (Le Nez du Vin) に含まれる 51 種類の香りをセンサー装置に記憶させ、匂いを判別する手法を構築してきた(藤岡ら, 日本味と匂学会誌, 2013)。この手法を用いることで、コーヒーや飲料のような複雑な香りでも、類似度で分かり易く表現させ、判別することに成功している (Fujioka et al, Sensors, 2015)。

本報告では、我々が構築したワインの香りキットによる表現法を応用し、泌尿器癌細胞株、及び正常上皮細胞を培養した培地の匂いの違いを匂いセンサーで判別することができるか、また癌細胞の増殖性と匂いとの関連性について検証した結果を報告する。

[研究の内容, 成果]

1. 方法

(1) 細胞：

正常膀胱上皮細胞は、Bladder Epithelial Cell Growth Medium (Cell Applications, Inc.) で培養を行なった。また、膀胱癌細胞株 (TCC-SUP, RT4, 及び T24), 及び前立腺癌細胞株 (DU145, 及び LNCaP) は、10% の牛血清を含む RPMI 培地で培養を行なった。

その後、代謝物を含む培地の匂いを比較するため、正常膀胱上皮細胞、及び膀胱癌細胞株 TCC-SUP については、75 cm²シャーレに 1×10⁶個の細胞を Bladder Epithelial Cell Growth Medium で 72 時間培養した。

また、Bladder Epithelial Cell Growth Medium で維持できなかった膀胱幹細胞株 RT4・T24, 及び前立腺癌細胞株 DU145・LNCaP は 25 cm²シャーレに 10% の牛血清を含む RPMI 培地で 5×10⁴個を 48 時間培養した。

培養後、これらの培地はガラス瓶に回収され、匂いセンサーによる測定まで、冷凍保存された。

(2) 匂いセンサーによる細胞代謝物の測定：

Bladder Epithelial Cell Growth Medium 培地で培養したものは 200 μL, また RPMI 培地で

培養したものは 2 mL 採取し、それぞれ 2L のサンプリングバッグに注入して 30 分以上静置した。その後、匂いセンサー FF-2A (島津製作所) の 10 個のセンサー (Ch_1~Ch_10) を使って、2つのモード (ダイレクトモード・捕集管モード) で測定した。

(3) Le Nez du Vin アロマキットと培地の匂いデータの比較：

Le Nez du Vin (Editions Jean Lenoir) のワインアロマ 54 種類のうち 51 種類の試薬を匂いセンサー FF-2A で測定して、記録したデータを用いた (藤岡ら, 日本味と匂学会誌, 2013)。培地の匂いをワインアロマ軸で表現させるため、類似度解析ソフト ASmell2 (島津製作所) で類似度を計算した。これらのデータが、複雑な匂い判別にも応用できることを確かめるため、飲料の判別を行ない、精度よく判別できることを確かめた (データ未掲載 : Fujioka K et al, Sensors, 2015)。

2. 結果と考察

(1) 正常膀胱上皮細胞と膀胱癌細胞株の培地の匂いの比較：

始めに、正常膀胱上皮細胞と膀胱癌細胞株 TCC-SUP のそれぞれを培養した培地を匂いセンサー装置 FF-2A で測定した (図 1)。

今回の測定では、2つのモード ((1) 直接センサーで測定するダイレクトモード、及び (2) 一度担体に捕集して熱放出させた成分を測定するキャプチャーモード) で測定を行なっている。

この結果、ダイレクトモードにおいて、FF-2A に搭載された 10 種類のセンサーのうち、Ch_2, Ch_8, 及び Ch_10 の抵抗値で正常細胞と膀胱癌細胞株に差が見られた (図 1)。一方、キャプチャーモードでは、どのセンサー抵抗値も、両者の細胞でほぼ同様の値を示していた。これらの結果から、正常上皮細胞と比較して膀胱癌細胞株には、キャプチャーモードで検出にくい揮発成分、つまり揮発性の高い、あるいは水溶性の高い成分に違いがあることが予測さ

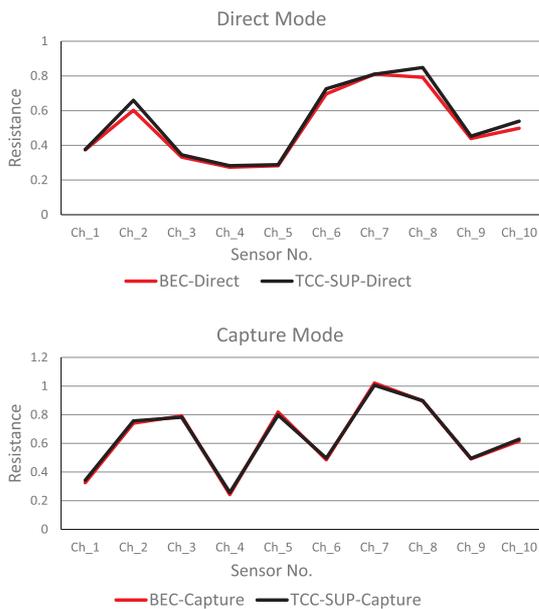


図1 正常膀胱上皮細胞 (BEC) と膀胱癌細胞株 (TCC-SUP) を培養した培地揮発成分の代表的なセンサー値。ダイレクトモード (上), 及び捕集管モード (下) で測定した結果。

れた。

次に、これらの電気抵抗値について、51種類のワインの香りに対する類似度を求めた。正常膀胱上皮細胞、及び TCC-SUP の類似度を比較した結果、28種類の香りに対して有意差が見られた ($p < 0.05$)。

有意差のあった香りのうち、アプリコット、メルカプタン、硫化水素、及びパイナップルの香りについては、膀胱癌と正常細胞の差が2倍以上、または、膀胱癌細胞株のみに対して類似度が見られた。

一方、これらの培地をメタボローム解析した結果からは、癌細胞においてピルビン酸などを含む酸の上昇や硫黄成分を含むシスチンやグルタチオンの上昇が示唆されており (データ未掲載)、これらの代謝成分の違いが培地の匂いに変化をもたらしている可能性が考えられた。

(2) 膀胱癌細胞株と前立腺癌細胞株の匂いの比較、及び倍加時間との関連性：

本検討では、増殖速度の異なる2種類の膀胱癌細胞株 (T24：高増殖, RT4：低増殖)、及び前立腺癌細胞株 (DU145：高増殖, LNCaP：低増殖) を用いて、匂いの違いを比較した。

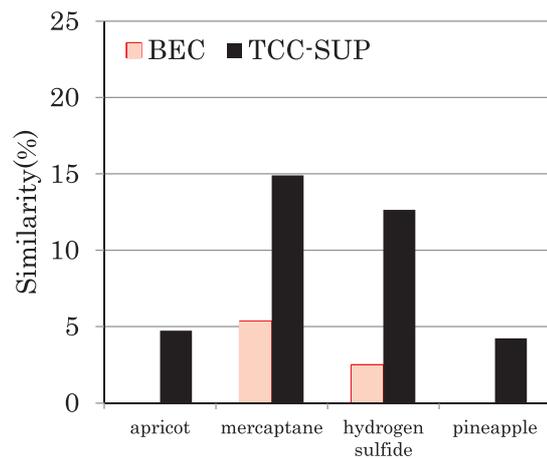


図2 Le Nez du Vin のワインアロマに対する、正常膀胱上皮細胞 (BEC) と膀胱癌細胞株 (TCC-SUP) を培養した培地揮発成分の類似度の代表的な結果。

まず始めに、膀胱癌細胞株と前立腺癌細胞株で、匂いを比較したところ、組織の違いによる匂いの差を見いだすことはできなかった。しかしながら、4つの細胞で RT4 のみ、タイムの香りへの類似性が見られ、特徴的な代謝を行っていることが示唆された。

次に、それぞれの組織で癌細胞の増殖性と匂いとの関連性を調査した。この結果、膀胱癌細胞株では高増殖性の T24 細胞でアプリコットに対する類似度が高く、また先述の通り RT4 でタイムの香りへの類似性が見られた (データ未掲載)。前立腺癌細胞株では、高増殖性の DU145 は松の香りへの類似度が、LNCaP と比較して低いことがわかった (データ未掲載)。

[今後の研究の方向、課題]

以上の様に、本研究では癌と正常細胞を培養した培地の匂いに対して、センサーによる計測を行ない、電気抵抗値に差があることを示すだけでなく、代謝物の匂いの違いを類似度という絶対値で記録し、比較できることを明らかにした。また、癌の増殖性との関連が示唆される匂いを同定することにも成功した。

一方、今回の結果は、細胞株での違いを検討した結果であり、今後、本法を臨床に展開して

実際に判別に適応できるかどうかを検討することが必要である。本検討で用いた培地自体にも揮発成分が含まれていたが、尿にも特有の揮発成分が多く含まれている。このため、これらの揮発成分が混在する中で、今回検出されたアプリコット、硫黄系、松のような香りが含まれた匂いの差を検出できる必要があるだろう。

本検討では、癌細胞株に特有な代謝揮発成分をセンサーで検出できること、また、ワインアロマのような試薬の匂いに対して類似度を使い絶対値で記録できることを示した。本法をさらに発展させ、泌尿器癌のセンサースクリーニング法を構築していきたい。

[成果の発表, 論文等]

1. 学会発表

- (1) Fujioka K, Tomizawa Y, Shimizu N, Manome Y, Learning Wine Aroma Descriptions Improved Ability of Expression in an Electronic Nose, Digital Olfaction Society World Congress 2014, Tokyo, 2014年12月.
- (2) 藤岡宏樹, 富澤康子, 清水信夫, 馬目佳信. 化学センサーとワイン香料の組み合わせによる匂いの客観的評価法の構築. 電気化学会第82回大会. 横浜. 2015年3月.

2. 論文

- (1) Fujioka K, Tomizawa Y, Shimizu N, Ikeda K, Manome Y.: Improving the performance of an electronic nose by wine aroma training to distinguish between drip coffee and canned coffee, Sensors, 15(1), 1354-64, 2015.