

2021年7月5日

報道関係各位

慶應義塾大学先端生命科学研究所

唾液中のがんマーカーをわずか1分で測定する技術を開発 —唾液検査で大腸がん患者を高精度かつ大規模に診断することが可能に—

慶應義塾大学先端生命科学研究所（以下「慶大先端生命研」、所長 富田勝、山形県鶴岡市）の曾我朋義教授、五十嵐香織技術員らのグループは、キャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）を用いた多検体同時測定技術を開発し、唾液中のがんマーカーであるポリアミン類を1分で測定することを実現しました。

ポリアミン類は、大腸がん、膵臓がんなどのがん患者の唾液や尿で急激に増加することが知られていましたが、既存の方法では1検体の測定に10分以上必要でした。

今回研究グループが開発したCE-MSを用いた多検体同時測定技術は、一度に40検体の唾液を40分（1検体につきわずか1分）で測定することを可能にしました。また、東京医科大学（以下「東京医大」）の杉本昌弘教授らが採取した唾液検体のポリアミン測定に本法を応用した結果、大腸がん患者と非がん患者を高い精度で区別することができました。

本法は、これまで困難であった低分子マーカーの迅速かつ高精度な測定を実現し、臨床への更なる応用を可能にする技術であります。

この研究成果は、2021年7月5日（日本時間）に分析化学誌『*Journal of Chromatography A*』電子版に掲載されました。

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462355>

研究の背景

50年前から、大腸がんなどのがん患者の尿から高濃度のポリアミン類が検出されることが知られています。2010年、慶大先端生命研とUCLAのグループは、膵臓がん、乳がん、口腔がん患者でも唾液中のポリアミン類の濃度が上昇することを発見、杉本昌弘教授らは唾液でがんを早期発見するビジネスを主軸としたベンチャー企業「株式会社サリバテック」（山形県鶴岡市）を創業しました。

しかしながら、ポリアミン類などの低分子化合物は、抗体の作成が困難であることから、一般に臨床検査会社で迅速診断法として使われているELISA法^{（語句1）}が使えませんでした。そこで、低分子マーカーの測定には、液体クロマトグラフィー-質量分析計（LC-MS）法^{（語句2）}やキャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）法^{（語句3）}などの分離分析法が用いられていましたが、1検体の測定に10分以上必要とするため、測定コストがかかるといった問題がありました。

この問題を解決するため、本研究では、ポリアミンをはじめとする低分子化合物の迅速測定技術の開発に取り組みました。本研究で開発した多検体同時測定CE-MS法は、抗体が作成できない低分子化合物の迅速分析を可能にし、これまで困難であった低分子バイオマーカー^{（語句4）}の臨床応用への道を切り開くものです。

研究内容

1. 多検体同時分析 CE-MS 法の開発

LC-MS 法や CE-MS 法は、一回の測定に 1 検体しか測定できないため、バイオマーカーの測定に 10 分以上必要としていました。私たちのグループは、CE-MS で分離に用いるキャピラリーに一度に唾液 40 検体を順次注入後、一度に電圧をかけて、40 検体を同時に測定する技術を開発しました。

その測定原理を例として図 1 に示しました。まず、キャピラリーに唾液検体 (図 1a 黄色、赤、緑、青の 4 検体) と泳動バッファ (BGE) を交互に順次注入します。その後、電圧を印加すると唾液中のポリアミン類などのイオンは質量分析計 (MS) 方向に移動しますが、赤線で示したように唾液検体に印加される電圧 (E) は高いため速く移動します。しかし、BGE に印加される電圧は低いいため移動速度は遅くなり、その結果、ポリアミン類などのイオンは各検体と BGE の境界でスタックされます (図 1b)。その後、検体と BGE の液が混合すると印加電圧は一定になるため (図 1c)、一定の移動速度でポリアミン類などは MS に向かい、それぞれの化合物が持つ固有の質量で検出されます (図 1d)。

本法を用いることで、唾液 40 検体を 40 分で測定できることが可能になりました (図 2、図 3)。

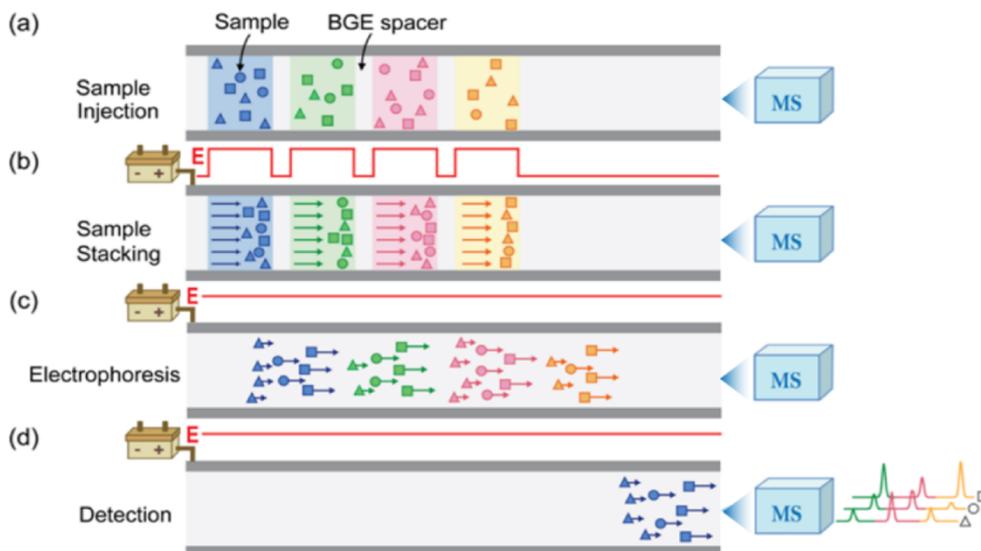


図 1 多検体同時分析 CE-MS 法によるポリアミン測定の実験原理

- (a) 唾液サンプルと泳動バッファ (BGE) を交互にキャピラリーに注入する。
- (b) 唾液中のポリアミン類は、サンプルと泳動バッファの境界にスタックされる。
- (c) サンプルと泳動バッファが混合すると電圧が一定になり、電気泳動が開始される。
- (d) 各唾液のポリアミン類は、固有の質量で順次質量分析計 (MS) で測定される。

開発にあたっては、①いくつかの化合物が同時に質量分析計 (MS) に導入されるため、各化合物のイオン化^(語句 5)が抑制されてしまう、②ポリアミン以外の化合物がポリアミンと同じ質量で検出される、といった問題がありました。そこで、①ポリアミンの同位体^(語句 6)を唾液検体に添加し、同位体を用いてイオン化抑制を補正 (図 2)、②質量分析計 (MS) の設定を工夫したことでポリアミンのみを検出できるようにし、問題を解決しました。

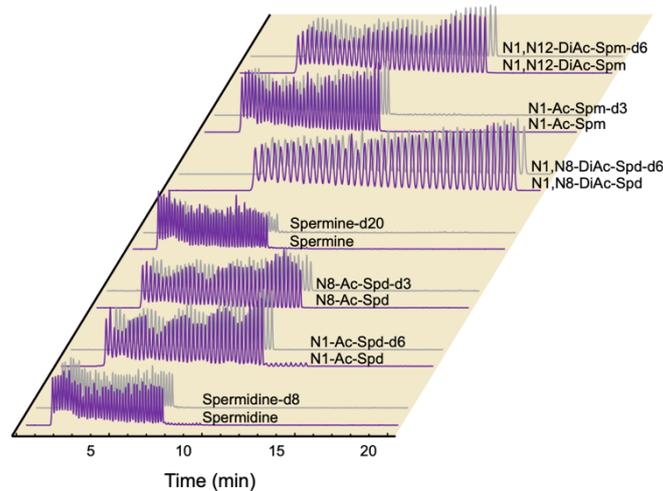


図2 多検体同時分析 CE-MS 法による 7 種類のポリアミン標準およびその同位体の測定(40 回)の結果
 ポリアミン標準液 (各 1 μm 、紫色) は、同じ濃度であるがイオン抑制の影響を受けピーク強度は測定ごとに異なる。一方、同じ試料のポリアミン同位体標準液 (各 1 μm 、灰色) も同様に異なる。したがって、同位体を用いることによりイオン抑制を補正することができる。

2. 大腸がん患者の唾液中ポリアミン測定への応用

本法の応用として、東京医大で採取された健常者 20 例、大腸がん患者 20 例、計 40 検体の唾液中ポリアミン測定を実施しました。

測定結果は図 3 に示した通り、どのポリアミンも健常者に比べて大腸がん患者で高値を示し、40 検体を 40 分 (サンプル注入 20 分、測定 20 分) で分析することが可能でした。

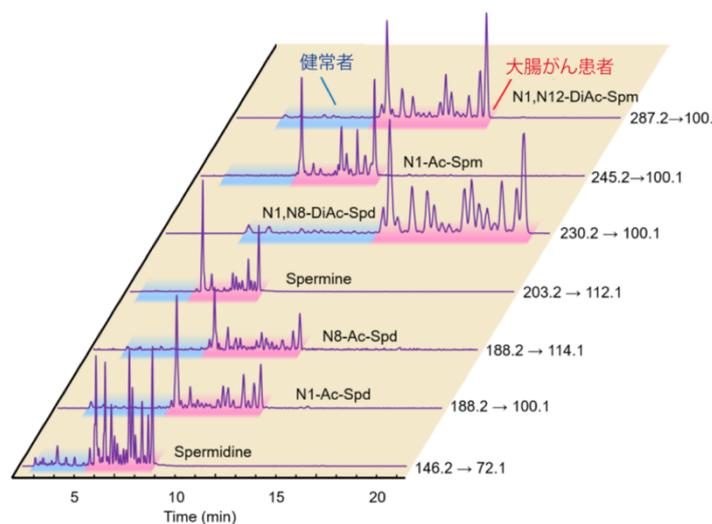


図3 多検体同時分析 CE-MS 法による唾液中のポリアミン類 (7 種類) の測定例

健常者 (n=20、青色) と大腸がん患者 (n=20、赤色) の結果を示した。

続いて、健常者 57 例、大腸良性ポリープ患者 26 例、大腸がん患者 276 例から採取した唾液中のポリアミン類を測定しました。(図 4)

図 4 は、N1-アセチルスぺルミジン、N1-アセチルスぺルミン、N1,N12-ジアセチルスぺルミンの結果を示しています。この測定では、健常者や大腸良性ポリープ患者に比べ、大腸がん患者で 3 種類のポリアミンとも濃度が有意に高くなっていることが判明しました。また、N1-アセチルスぺルミンを用いると、大腸がん患者を 83.4% の精度で非がん患者と区別することができました。この精度は、既存の大腸がんの血液マーカーである CEA、CA19-9、NSE など (精度 56-77%) より高い精度で大腸がんを診断できること

を示しています。

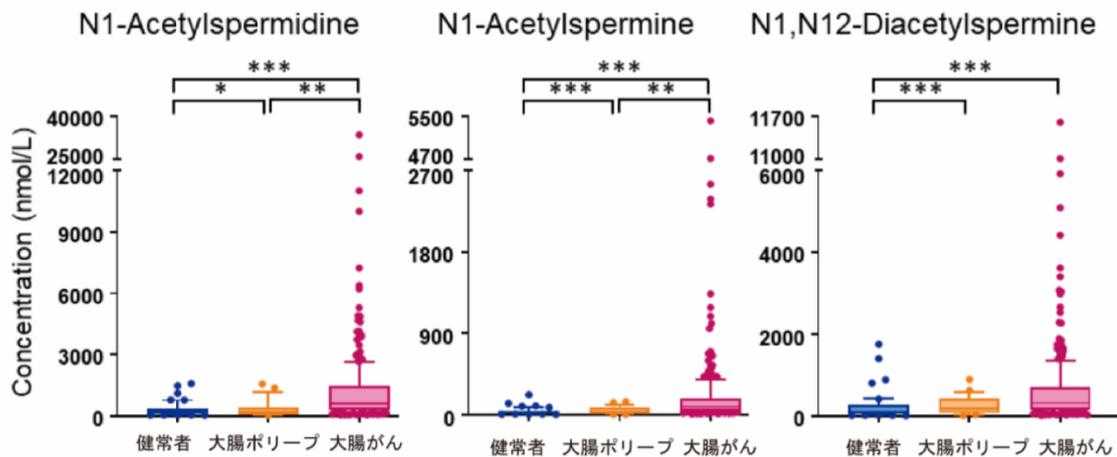


図4 多検体同時分析 CE-MS 法による健常者、大腸ポリープ、大腸がん患者の唾液中の N1-アセチルスペルミジン、N1-アセチルスペルミン、N1,N12-ジアセチルスペルミンの測定結果 (唾液は、健常者 57 例、大腸良性ポリープ患者 26 例、大腸がん患者 276 例から採取されたもの)

今後の展望

本法は、唾液中のポリアミン類を 1 検体 1 分で測定できる迅速分析技術であり、大腸がんの診断精度も極めて高い手法です。現在、株式会社サリバテックでは、唾液中のポリアミン測定によって大腸がんや膵臓がんなどの幾つかのがんの可能性を同時に予測するビジネスを行っていますが、本法を技術移転することで、短時間に大規模の唾液測定が可能となり、大幅なコスト削減が期待されます。

<慶應義塾大学 曾我朋義教授 コメント>

今回開発した多検体同時測定 CE-MS 法は、低分子マーカーを臨床応用する際の障壁であった測定時間、コストを大幅に削減します。本法は、唾液のポリアミン測定による大腸がんの診断の大規模・迅速分析を実現しました。また、ポリアミン以外の低分子マーカーの臨床応用も実現する測定技術であると考えています。

論文情報

<タイトル>

High-throughput Screening of Salivary Polyamine Markers for Discrimination of Colorectal Cancer by Multisegment Injection Capillary Electrophoresis Tandem Mass Spectrometry

<著者>

Kaori Igarashi, Sana Ota, Miku Kaneko, Akiyoshi Hirayama, Masanobu Enomoto, Kenji Katumata, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga

<雑誌>

Journal of Chromatography A

<DOI>

10.1016/j.chroma.2021.462355

語句の説明

語句1：ELISA 法

試料に含まれる目的の抗原を抗体で捕捉するとともに酵素反応を利用して、検出、定量する方法である。また、数時間で96検体の検出が可能である。臨床検査では、タンパク質などの高分子バイオマーカーの検出に広く用いられているが、抗体が作成できない低分子などの検出は不可能である。

語句2：液体クロマトグラフィー-質量分析計（LC-MS）法

試料を分離カラムに導入後、試料が持つ疎水性や極性などの性質の違いを利用して分離後、質量分析計（MS）に導入し各物質の同定、定量を行う方法。

語句3：キャピラリー電気泳動-質量分析計（CE-MS）法

キャピラリーとは「毛細管」を意味する。この方法は、試料を細長いキャピラリー（内径50 μ m、長さ1m）に導入後、その両端に高電圧を加えることにより、イオン性を持つ物質がキャピラリー内を異なった速度で移動する原理を利用して分離後、質量分析計に導入し各物質の同定、定量を行う方法。

語句4：バイオマーカー

血液や尿などの体液や組織に含まれるタンパク質や遺伝子などの生体内の物質で、病気の変化や治療に対する反応に相関し、指標となるもの。

語句5：イオン化

気相、液相、固相にある試料を気体状の正イオンおよび負イオンにすること。質量分析計は、正あるいは負に帯電した化合物を検出する装置である。

語句6：同位体

ある化合物の水素などの原子を重水素などに置き換えて質量を変えた物質。同位体は、イオン化抑制など質量分析計で起きる現象を補正するときによく用いられる。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、各社科学部等、山形県政記者クラブ、鶴岡市記者会に送信させていただきます。

本発表資料のお問い合わせ先

慶應義塾大学先端生命科学研究所 渉外担当 塩澤、日野

TEL：0235-29-0802 FAX：0235-29-0809 Email：office@ttck.keio.ac.jp

<http://www.iab.keio.ac.jp/>

本リリースの配信元

慶應義塾 広報室 担当 宮崎

TEL：03-5427-1541 FAX：03-5441-7640 Email：m-pr@adst.keio.ac.jp