呼気中バイオマーカーとしての揮発性有機化合物の質量分析

Mass Spectrometry of Volatile Organic Compounds as Biomarkers in Breath Analysis

澤野 誠^{1,2}

Makoto SAWANO

¹埼玉医科大学教授（救急医学） *Acute Medicine, Saitama Medical University*

²中部大学教授（生命健康科学） *Life and Health Science, Chubu University*

(Received April 2, 2018; Accepted April 12, 2018)

1. 呼気分析と質量分析

呼気分析と医学の関係は意外と古く、紀元前400年ごろ医学の父といわれるヒポクラテスの著書に、すでに「呼気の匂いが、さまざまな疾患の診断の鍵となる」との記載があり、甘い果実→糖尿病、腐った魚→肝臓病、尿臭→腎臓病など呼気臭と疾患の関連が指摘されている。しかし、この呼気（官能）分析の医学応用の端緒ともいべき知識は中世の闇に埋もれ、その再発見は18世紀後半の「近代化学の父」といわれる Antoine Lavoisier による呼気中二酸化炭素の発見まで待たねばならなかった。その後相次いで呼気中にアセトンやアルコールといった揮発性有機化合物 (Volatile Organic Compound: VOC) が発見され、近代分析化学としての呼気分析の確立へとつながっていくことになる¹⁾。

一方、1900年代初頭に Thomson は、陰極線管を用いて質量分析の端緒ともいべき実験を行った²⁾。この装置では陰極より陽極に向かって放出された電子が容器中の気体原子と衝突し、電子をたたき出すことによりイオンを生じる。生じたイオンは陰極に向かって加速されるが、電場と磁場を通過する際にその進路が曲げられ、その程度は m/z に依存する。さらに Aston は、軽い気体分子の動きは速く、重い分子は遅い性質を応用し、図1に示した質量分離装置を開発し、ネオンをはじめとした多くの元素の安定同位体を発見した。この質量分離装置の基本的な概念は、現在用いられている質量分析計の源流となっている³⁾。

質量分析の呼気分析への応用の試みは早く、1900年代末期の Siri⁴⁾ や Hunter⁵⁾ らに遡る。1950年代後半に入り、この機運は欧米の呼吸生理学者の間で急速に高まり、1960年代には Fowler らによる呼気分析を目的とした質量分析計の開発が進んだ⁶⁾。本邦でも、やや遅れて1970年代に

西らが同様の装置を開発し、呼気サンプリング法や分析条件などの確立に寄与した⁷⁾。これらの装置は主に、肺機能の評価のために利用されていた。すなわち、生理的役割を有するガス（酸素、二酸化炭素、窒素、水蒸気）や呼吸機能試験の際に被験者が吸入したテストガス（ヘリウム、ネオンなど）の呼気中濃度の変動を測定することを主たる目的としており、微量の VOC の測定や同定に用いられることはなかった。

2. 呼気中 VOC の発見と質量分析計

1970年代初頭、「近代分析化学の父」といわれる Pauling が、当時分析化学の最先端技術であったガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography: GC) を用いて、呼気中には200種を超える VOC が含まれていることを発見し、近代分析化学としての呼気分析の発展の扉を開いた。この基盤の上に、1980年代後半に Phillips は、GC と質量分析計 (Mass Spectrometry: MS) を用いて呼気中 VOC の分離・同定に精力的に取り組み、呼気中バイオマーカー（診断の指標となる生体物質）による医療診断の道を拓いた⁸⁾。Phillips は、75歳を超えた現在も乳がんの呼気診断を実用化するなどトップランナーとして走り続けている。

図1. Aston が考案した質量分離装置の概念図 (文献3より引用)。

3. 呼吸分析の基礎

呼吸を構成する物質（成分）は、その相からガス（気相）、ミスト（液相）、パーティクル（固相）に大別される。飽和した水蒸気を除いたガスの約80%は大気と同じく窒素が占める。約16%は酸素が、約4%は二酸化炭素が占め、さらに水素、一酸化炭素（CO）、一酸化窒素（NO）、硫化水素（H₂S）、そして数百種類のVOCが極微量（ppm～ppbレベル）含まれる。ミストには吸入あるいは誤嚥された液体成分、唾液、そしてrespiratory (lining) fluidと呼ばれる気道分泌物が含まれ、VOCならびに不揮発性有機化合物（non-VOC）も含有される。パーティクルには主に、呼吸に伴う肺胞レベルでの気道の開閉により放出される1ミクロン径以下の微小な細胞塊や固形化した気道分泌物が含まれるが、吸入された微粒子も混じる。

一方、上記の呼吸成分はその由来から、exposome, metabolome, microbiome, human metabolomeに大別される。Exposomeは気道や皮膚が暴露している、あるいは過去に暴露した大気由来の物質である。Metabolomeは、摂取している、あるいは過去に摂取した飲食物由来の物質である。Microbiomeは腸、口腔、気道に生息する微生物（細菌、ウイルス、真菌など）が産生する物質であり、H₂もこれに含まれる。Human metabolomeは、人体の細胞の代謝活動により産生される物質であり、CO₂以外にもCO、NO、H₂Sなどの内因性ガスや多種類のVOCが含まれる。このように、呼吸中にはさまざまな由来の物質が混在し、医療診断に有望な物質がある一方で、目的とする物質の測定を妨げる汚染物質も含まれ、呼吸分析におけるサンプリングおよび測定の難しさにつながっている。

呼吸には、大量の検体（サンプル）を、全く無侵襲に（時には被験者が意識することなく）・随時・繰り返し採取できるという大きな利点がある。一方で、その採取（サンプリング）にはいくつかの重大な問題点あるいは難点がある。呼吸採取の最大の問題点は、サンプルの質の確保が困難なことである。例えば、呼吸中の特定の物質の濃度は、大まかに血中濃度、換気量そして心拍出量（肺動脈血流量）により規定されるが、呼吸の採取を意識した途端に被験者の換気量が増加する（過換気になる）ことはよく知られている。したがって、複数サイクルの呼吸採取を行う場合には、心拍数や気道内圧を監視しつつ、メトロノームを用いて換気回数（量）を一定にする“Paced sampling”などの厳密な採取法が実践される。また、呼吸の成分・組成は呼吸相により複雑かつ大幅に変動する。呼吸のサンプルとしては、多くの場合に終末呼吸（息を吐き終わる直前の呼吸）が物質の血中濃度を反映することが知られている。そこで、呼吸中二酸化炭素濃度を指標として終末呼吸を採取する“CO₂ triggered sampling”などの採取技術が取り入れられる。このように、複数回採取された呼吸サンプルの質は、単回採取の呼吸サンプルのそれとは全く異なるという事実を認識することが重要である。

しかし一方で、多数の被験者から短時間に呼吸を採取す

る場合など、単回呼吸採取とならざるをえない場合もある。このような場合には“Critical flow orifice”などの呼出抵抗を増大させる装置を用いて、連続的に呼出圧（P_{ex}）と呼吸二酸化炭素濃度（cCO₂）をモニタリングする。ここで呼吸サンプルの質は、P_{ex}の変動（＝標準偏差）とcCO₂の変動（＝標準偏差）の積として表され、これを評価して質の確保を行う。

呼吸分析において、呼吸サンプルの質を確保することは前提であるが、分析を実行するまでの間のサンプルの保存も同様に重要である。安定した物質の場合には、市販されている呼吸サンプルバッグ（尿素呼吸試験用）にて一定期間保存可能であるが、VOCのように不安定な物質や水への溶解度の高い物質の場合には、保存中の変化や温度に留意する必要がある。その意味では、呼吸の採取と分析を同時に行うオンライン測定が理想的と言える。オンライン測定は、医療現場（Point of care）での検査・診断という最新の医療技術の方向性にも合致する。

4. 呼吸中VOCの分析・計測技術

呼吸中のガスやVOCの分離定量の基本はガスクロマトグラフィー（GC）である。GCでは、カラムの入り口にサンプルガスを注入し、一定流量のキャリアガス（ヘリウムや窒素など）を供給しながら、カラム基剤との相互作用の強弱により物質を分離し、各々の保持時間（Retention Time: RT）における検出器の信号強度（ピーク面積）をもとに定量する。二つの異なる性質のカラムを併用して分離能を向上させた2次元GCも実用化されている。

GCによって分離された物質を質量分析（MS）する際は通常、電子イオン化が使われる。電子イオン化によって生成した分子イオンとフラグメントイオンの m/z を測定することで、質量スペクトル（Mass spectrum）が得られる。これを質量スペクトルのデータベース（Library）と照合することで、目的物質を同定する。時には、異性体の判別も可能となる。よってGC-MSは、サンプルに含有される微量物質を網羅的に分離・同定・定量することが可能である。このような特長を活かし、GC-MSは医療診断につながる呼吸中バイオマーカーの候補となるVOCの探索において主力分析手法となっている。

さらに質量分析計は、特定の m/z のイオンだけを選択する高精度なフィルターとして用いることも可能である。この原理を応用し、目的物質の一次イオン（Precursor ion）から衝突・解離で生成した二次イオン（Product ion）を限定的に検出するため、三連四重極型質量分析計を用いたMultiple reaction monitoring（MRM）により、選択性と感度（S/N比）を格段に向上させたGC-MS/MSも実用化されている。

5. GC-MSによる呼吸中VOC分析の実例

ppm～ppbレベルの呼吸中VOCを分離・同定・定量する目的において、いきなり呼吸バッグに採取した検体を気体用シリンジにてGC-MSに注入したのでは、いかに高感度・

図2. SPME装置（SPME針）の構造（文献10より引用）。

高分離能を誇るGC-MSとはいえ評価に耐える結果は得られない。適切な前処理（濃縮）が不可欠である。1990年代までの気体サンプル中VOC測定の前処理（濃縮）法としては、活性炭管を用いる固相吸着・溶媒抽出法やTenax管などを用いる固相吸着・加熱脱着法が一般的であった⁹⁾。しかし、これらの前処理法は、長時間にわたる多段階の試料脱着操作が必要であった。よって現在では、より簡便な固相マイクロ抽出法（Solid phase micro extraction: SPME）が主として用いられる。

図2に示したSPME装置（SPME針）は、外筒および出入りの可能な内針からなる外套針であり、内針にはポリジメチルシロキサン（Polydimethylsiloxane: PDMS）などの吸着剤がコーティングされている¹⁰⁾。以下の手順にて、呼気サンプル中のVOCの前処理（濃縮）を行う。

- ① 呼気バッグ内部の水分が結露しVOCが溶解しないように、バッグを40度前後に加温する。
- ② SPME針を吸着剤がコーティングされている内針が外筒に隠れる状態で、呼気バッグの気密性を保ったまま直接挿入する。
- ③ 吸着剤がコーティングされている内針を呼気サンプル中に露出させ、5～15分間VOCを吸着する。
- ④ 内針を外筒内に収納し、SPME針を呼気バッグより抜去する。
- ⑤ SPME針を250度に加熱されたGC-MSの注入ポート（オープン）内に挿入、内針を高温のキャリアガス中に露出して吸着・濃縮されたVOCを加熱脱着する。

図3の上段には、健康人の呼気サンプルを前処理なしに直接GC-MSに注入して得られる全イオン電流クロマトグラフ（Total Ion-current Chromatograph: TIC）を、下段には同一サンプルについてSPME法による前処理（濃縮）を行った場合のTICを示した。前処理を行うと、前処理なしの場合と比較して、圧倒的に多数のピークが分離され、かつ夾雑（ノイズ）が低下し、VOCに対する感度・選択能ともに大幅に向上する。しかし定量測定の際には、個々のVOCにより吸着能すなわち濃縮率が異なることに留意する必要がある。

最後に、呼気中VOCのGC-MS分析の実用例として、受動喫煙の影響の評価を目的とした喫煙者の呼気分析を紹介

図3. 上段：健康人の呼気サンプルを前処理なしに直接GC-MSに注入して得られる全イオン電流クロマトグラフ（TIC）。下段：同一サンプルについてSPME法による前処理（濃縮）を行った場合のTIC。

図4. 上段：一般的な紙巻きタバコに含有されるVOCのトータルイオンクロマトグラムと同定結果。下段：紙巻きタバコを喫煙した後に採取した呼気に含まれる二次生成VOCのトータルイオンクロマトグラムと同定結果。

する。図4の上段には、一般的な紙巻きタバコに含有されるVOCをメタノールにて抽出し、これを直接GC-MSに注入して得られたTICを示した。グリセロール、ニコチン、ネオフィタディエン、酸化リモネンなどのピークが認めら

れる。図4の下段には、この紙巻きタバコを喫煙した後に採取した呼気サンプルをSPME法にて前処理（濃縮）しGC-MS分析して得られたTICを示す。なおここでは、喫煙前に採取した呼気サンプルのTICを差し引いており、喫煙により新たに出現したピークが表示されている。喫煙後の呼気からは、紙巻きタバコに含有されるVOC以外にも、これらのVOCが加熱・燃焼および人体に暴露されることで新たに（＝二次的に）生成した化合物が分離・同定された。これら二次生成VOCには、デカン・ドデカンなどのアルカン類をはじめとする有害物質が多数含まれており、受動喫煙による健康被害の原因となっていることが明らかになった。

6. 呼気中VOC分析と医療診断の現状

初期の期待に反して、過去四半世紀にわたり、特定疾患の診断につながる呼気バイオマーカーとしてのVOCの探索はことごとく失敗に終わっていると言っても過言ではない。近年では、単一の呼気バイオマーカーによる医療診断については絶望視されており、多数の選択性や応答性の異なる微小センサーを一つのチップ上に配列したセンサー・アレイとニューラル・ネットワークなどの機械学習を組み合わせた電子嗅覚センサー（Electronic nose）の医療診断への応用が期待されている¹¹⁾。GC-MSに代表される従来の呼気分析技術による医療診断は、呼気中の多種多様なVOCを一つずつ分離・同定したうえで定量し、特定の疾患の罹患者と非罹患者を比較することにより、各々のVOCに対してバイオマーカーとしての有用性を検討するものである。一方、電子嗅覚センサーは、個別のVOCに注目するのではなく、多種のVOCの相対的な分布や変動をパターンとして認識・処理する探索的技術である。この技術には、人間を含めた動物の嗅覚認識の生理学的機序に近いことから“Electronic nose”という名称がつけられたが、今後の呼気分析による医療診断の動向にも合致しており、大きな期待が持たれている。現実には乳がんや肺がんの呼気診断のように一部はすでに実用化され臨床応用も始まっている。しか

し、電子嗅覚センサーの診断精度の検証や、生理学的・病理学的裏付けには、GC-MSを用いた個々の呼気中VOCの変動の解析および標準化が不可欠である。

一方、安定同位体である¹³Cにて標識された有機化合物を投与し、呼気中¹³CO₂の経時的変動より、消化管運動、消化吸収機能、薬物代謝などを測定する¹³C化合物負荷呼気試験は、呼気分析による医療診断として最も早く臨床応用や普及が進んだ検査法である。呼気中¹³CO₂と¹²CO₂の存在比（同位体比）の測定には、当初は原理的に同位体分析に適した質量分析計が用いられてきた。しかし近年では、安価でコンパクトな赤外線分光法によるCO₂同位体比測定装置が普及し、小型化が進んだとはいえ測定準備やメンテナンスが煩雑な質量分析計にとって替わったと言っても過言ではない。¹³C化合物負荷呼気試験は、呼気バイオマーカーとしてのVOCの探索と比較して、呼気検体の採取・保存や測定法のクオリティー・コントロール、そしてバックグラウンドの排除が容易であることが特長であり、臨床応用や普及が早かったことの要因である。

文 献

- 1) 澤野 誠, 空気清浄：コンタミネーションコントロール, **54**(5), 329 (2017).
- 2) J. J. Thomson, *Proc. R. Soc. Lond. A*, **89**, 1 (1913).
- 3) 熊本卓哉, 化学と教育, **61**(2), 70 (2013).
- 4) W. Siri, *Rev. Sci. Inst.*, **18**, 540 (1947).
- 5) J. A. Hunter, R. W. Stacy, and R. A. Hitchcock, *Rev. Sci. Inst.*, **20**, 332 (1949).
- 6) K. T. Fowler, *Phys. Med. Biol.*, **14**, 185 (1969).
- 7) 西 功, 応用物理, **43**(4), 372 (1972).
- 8) M. Phillips, *Anal. Biochem.*, **247**(2), 272 (1997).
- 9) The Japan Ministry of Health, Labour, and Welfare, Committee on Sick House Syndrome, Indoor Air Pollution Progress Report No. 1 (2000).
- 10) Sigma-Aldrich 社 HP <https://www.sigmaaldrich.com/japan/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html#01> (2018.3.29閲覧)
- 11) A. K. Pavlou and A. P. Turner, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**(2), 9 (2000).