

マルチターン飛行時間型質量分析計による オンサイト歯周病診断法の開発

大阪大学理学部物理学科
質量分析グループ

尾関美穂

目次

1	はじめに	3
2	メタボロミクス	4
3	歯周病の診断	5
3.1	従来の検査方法	5
3.2	MULTUM-S II を使った歯周病診断	5
4	実験装置	6
4.1	ガスクロマトグラフィー	6
4.2	MS(マスペクトロメトリー)	8
4.3	小型マルチターン飛行時間型質量分析計 (MULTUM-S II)	8
4.4	GC/MS	14
5	実験手法	16
5.1	手順	16
5.2	抽出操作	16
5.3	誘導体化操作	19
5.4	GC/MS による分析	20
6	結果	21
6.1	マウスの血清	21
6.2	イオン化電圧	26
7	まとめと今後のテーマ	28

1 はじめに

質量分析とは原子や分子をイオン化し、分離・検出することである。データとして、質量電荷数比に応じて分離・検出されたイオンをもとに横軸に m/z 、縦軸にイオンの相対強度をとったマススペクトルが得られる。

質量分析は様々な分野で使われおり、メタボロミクスでも使われている。メタボロミクスとは、アミノ酸や脂肪酸などの代謝物を網羅的に解析することである。質量分析は 100 種類ほどの物質の増減を同時に見ることで、相関を比較することが可能であるため、質量分析がよく使われている。また、この 100 種類ほどの物質の増減を同時に見ることが可能という点をいかして医療診断がされている。例えばがんの診断で、がん患者と健常者の血液中の代謝物における違いを解析することによる膵臓がん診断はすでに行われている。[1]

本研究では歯周病に注目した。歯周病は糖尿病や動脈硬化などの全身疾患と関連していることが報告されている。[2][3] また、早産・低体重児出産のリスクが高くなることも指摘されている。[4] しかし、その病態や疾病活動性の的確な評価法がないことから、オンサイトで迅速かつ簡便に評価が出来る新規診断・検査法の確立が切望されている。本研究ではオンサイトで臨床診断法の開発を目指し、マウス血清を模擬試料と見立て、GC/MS による予備実験を行った。将来的には、歯と歯肉の間に滲み出してくる組織液で病変部の炎症の強さと相関して滲出量が増加することが知られている、歯肉溝滲出液を解析し、血清メタボロミクスによる膵臓がん診断のように、歯周病態を判別出来る特徴的な物質を見つけることを目指す。

当研究室ではマルチターン飛行時間型質量分析計 (MULTUM) の開発を行ってきた。当研究室で開発した MULTUM はイオンを同一飛行空間を多重周回させることにより飛行距離を稼ぐことで、小型・軽量でありながら高質量分解能を得ることが可能である。一号機として MULTUM Linear plus を開発し [5]、その後小型・軽量化を図った MULTIM II を開発した [6]。さらに MULTUM-II のイオン光学系を 1/2 に縮小した MULTUM-S が開発された [7]。そしてさらに MULTUM-S を小型・軽量化した MULTUM-S II を開発し [8]、小型でありながら 3 万以上の高質量分解能を達成した。MULTUM-S II を病院に設置することで、小型で高質量分解能であるという特徴を活かしたオンサイト診断が可能であると考えられる。オンサイト診断法の確立により、歯周病の早期発見による予防や治療、また、歯周病態を迅速にモニタリング出来るようになることが期待される。

2 メタボロミクス

オミックスとは生物を構成する分子全体を様々な階層で網羅的に調べることである。オミックスの中には、生物のゲノム、遺伝子の網羅的解析（ゲノミクス）、mRNA の網羅的解析（トランスクリプトミクス）、構造と機能に重点を置いたタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）、生命現象に関係するアミノ酸、有機酸、脂肪酸といった低分子代謝物の網羅的解析（メタボロミクス）などがある。医学分野において、メタボロミクスによるバイオマーカー検索や疾患診断が多く行われている。[9][10] それ以外にも、食品中の成分を調べることによる機能性食品の開発、薬物投与後の影響を調べることによる創薬の開発など様々な分野でメタボロミクスが利用されている。ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスに比べてメタボロミクスは検査に用いる血液や尿などの体液中に検出される代謝物を直接調べることになるため、診断のためのバイオマーカーの発見につながりやすいと考えられる。メタボロミクスにおいては、試料中に存在する代謝物を一斉に、かつ網羅的に一括して代謝物を解析する技術が必要であるが、ここ数十年の間に、質量分析計を用いるメタボロミクスが開発されたことで、網羅的な解析が可能となりメタボロミクスが発展してきた。質量分析計を用いたメタボロミクスとしては、ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）や液体クロマトグラフィー質量分析計（LC/MS）が主に挙げられる。本研究では GC/MS による測定を行った。

メタボロミクスにおけるデータ処理は、一般的に多変量解析を行う。多変量解析の中でも主成分分析が最もよく使われている。主成分分析とは、各サンプルにおける多成分の測定値データを 2 個または 3 個の合成変数に変換し、この新たな変数を軸にとり 2 次元または 3 次元でプロットする手法である。多変量解析手法にはその他にも、判別分析やクラスター分析などがある。

3 歯周病の診断

3.1 従来の検査方法

歯周病は、歯の支持組織（歯周組織）が、近傍に棲息する歯周病菌からの長期間にわたる刺激を受けることにより惹起される慢性炎症性疾患で、進行に伴って歯周組織の破壊が高度化することから、成人が歯を喪失する原因の第一位となっている。歯周病は進行してくると歯肉から出血することもあるが、初期段階では自覚症状がほとんどない病気である。また歯周病は、病変部で産生される生理活性物質や代謝産物を介して糖尿病や冠動脈疾患などの全身疾患と相互に影響を与えているとの指摘がなされている病気である。

一般的な検査方法は、歯と歯茎の境目の歯周ポケットにプローブという細い器具をいれてポケットの深さを調べる検査である。歯周病が進行すると歯茎が腫れて歯周ポケットは深くなり、この歯周ポケットが深いほど歯周病の程度が進んでいるとされる。健康な状態だと歯周ポケットは非常に浅く、プローブは1～2mmほどしか入らない。歯周ポケットが3～4mmで軽度歯周病、5～6mmで中程度歯周病、7mm以上では重度歯周病と診断される。歯周ポケットは1歯に対して6カ所計測され、5mm以上の歯周ポケットが認められる部分は歯周病と判定される。

また、歯周ポケットに器具を挿入した際に出血の有無や歯のぐらつきを調べる。健康な歯肉は出血はなく痛みもないが、歯周ポケット内部の炎症がある歯肉の場所は出血する。歯のぐらつきの程度によっても診断が行われる。

歯周病は歯を支えている骨を溶かす病気であるが、歯周ポケットの検査ではどの程度骨が溶けてしまっているかなどは分からない。そのため、目で見ることの出来ない歯肉の奥にある歯と骨の状態を確認する一番確実な方法として、現在はレントゲン検査が行われている。

3.2 MULTUM-S II を使った歯周病診断

歯周ポケットの検査をはじめ様々な検査方法があるが、初期段階の人の場合や、歯周病の人の歯のうちどの歯から治療すれば良いのか、など歯周病の進行度合いを定量的に評価する方法は現在まだ確立されていない。歯周ポケットの深さで判断するだけでなく、数値で示すなど危険度を表すような指標をつくることが望まれている。そこで歯周病態を表すマーカーを見つけることを目指し、GC-MULTUM-S II を使って歯肉溝滲出液中の代謝物の網羅的な解析を行う。歯肉溝滲出液とは、歯と歯肉の間にしみ出してくる組織液で、病変部の炎症の強さと相関して滲出量が増加することが知られている。GC-MULTUM-S II による解析により得られた結果から歯周病態を表す特徴的な物質を特定し、測定対象をその特定した物質に絞ることにより前処理や測定にかかる時間の短縮が期待出来る。また、ここで、高質量分解能である質量分析計を使えば、前処理を簡易化したりGCの時間を短縮化することで分離出来なくなるピークを分離することが可能である。また、実際にオンサイトで分析を行うにあたっては、持ち運びが可能な小型の分析装置であることが必要とされる。このような必要とされる点全てを満たすMULTUM-S II を使って、オンサイトシステムの構築を目指す。オンサイトでの迅速な診断法の確立により、歯周病の早期発見による予防や治療、また、歯周病態を迅速にモニタリング出来るようになることが期待される。

本研究では、歯肉溝滲出液の測定の前段階としてマウスの血清を模擬試料と見立ててGC-MULTUM-S II による測定を行った。

4 実験装置

4.1 ガスクロマトグラフィー

4.1.1 ガスクロマトグラフィーの仕組み

クロマトグラフィーとは、固定相と移動相よりなる平衡の場において、試料の各成分の両相への相互作用の大きさに差があることを利用して、それぞれの成分を分離する方法である。移動相に気体を用いる方法をガスクロマトグラフィー、液体を用いる方法を液体クロマトグラフィーという。試料を移動相とともにカラムの中に流し、固定相の相互作用（吸着・分配）によって分離する。カラムの種類には、ステンレスやガラスなどの内径 2~4mm の管の中に粒子状の充填剤をつめた充填カラムと、フューズドシリカやステンレスなどで内径 1mm 以下の管の内面に液相や充填剤を保持させたキャピラリーカラムがある。キャピラリーカラムの材質には熔融シリカチューブが最も多く使用されている。熔融シリカは高純度で表面活性点が少なく、さらにチューブの外側をポリイミド樹脂でコーティングしているので折れにくく、取り扱いやすいという特徴がある。

ガスクロマトグラフィーの分析対象物は、常温で気体または加熱することで気体になるものである必要がある。ガスクロマトグラフィーに用いる装置をガスクロマトグラフという。図 1 にガスクロマトグラフの構成を示す。注入口で導入された試料は、キャリアガスによってカラムへ送り込まれる。注入口を高温に加熱し、気体試料はそのまま、液体試料は気化されてカラムへ移動する。キャリアガスにはヘリウムが一般的に使われている。GC 内には、カラム温度を変えるためのオープンがあり、恒温法と昇温法がある。恒温法は、成分数が少ないときに用いるが、低沸点成分から高沸点成分まで様々な成分を分析する際には、低温から高温まで温度を上昇させながら行う昇温法が有効である。図 2 にカラム内で分離する試料の簡易図を示す。カラム内では試料成分とカラム中の固定相との相互作用により、はじめは混合していたものが検出器までの到達時間に差が現れて分離され、検出される。試料を注入してから各物質が検出されるまでの時間を保持時間という。

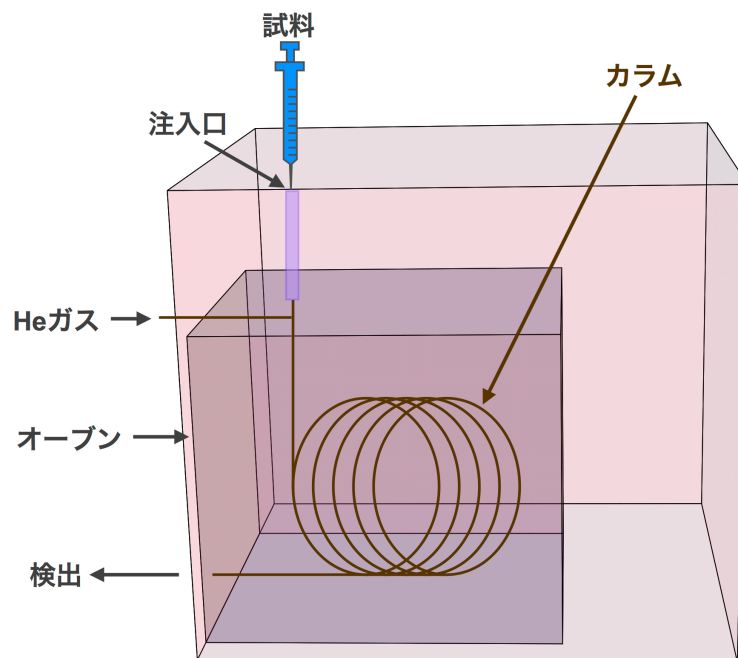


図1 GCの構成

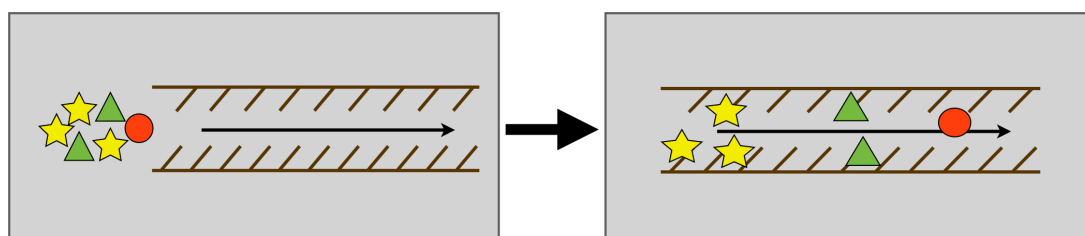


図2 カラム内での試料の様子

4.2 MS(マススペクトロメトリー)

MSは質量分析計により原子や分子をイオン化し、質量電荷比 (m/z) に応じて分離・検出することである。質量分析計は試料をイオン化するイオン源、イオンを運動させ分離する質量分離部、そのイオンを検出する検出部からなっている。

質量分析計には磁場型、四重極型、飛行時間型などがあり、磁場型は高質量分解能であるが大型で重く、四重極型は小型であるが高質量分解能ではないため本研究には不向きである。また、一般的な飛行時間型は小型の場合高質量分解能は得ることが出来ないが、一方 MULTUM-S II は小型かつ高質量分解能であるため、本研究では MULTUM-S II を使用した。

4.3 小型マルチターン飛行時間型質量分析計 (MULTUM-S II)

4.3.1 飛行時間型質量分析計

イオン源で加速電圧 V により加速された質量 m 、価数 z のイオンは飛行距離 L を飛行し、検出器で検出される。このとき、エネルギー保存則により

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV \quad (1)$$

が成り立つので、

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \quad (2)$$

である。このときの飛行時間 T は

$$T = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} \quad (3)$$

と表される。したがって、飛行時間の違いによりイオンの質量電荷比 m/z を求めることが出来る。

4.3.2 イオン源

MULTUM-S II のイオン化法として使われているのは, EI(電子イオン化) 法である. GC/MS 分析では EI が一般的に用いられている. フィラメントから放出される熱電子を気体試料に衝突させて電子が生成する. これによってラジカルカチオンが生成される.



図 3 にイオン源の構造を示す. 電流を流し熱せられたフィラメントから熱電子が放出され加速される. イオン源に熱電子と 90 度の方向から, キャピラリーカラムより導入した試料に熱電子が衝突し, イオンが生成する. イオン化されたイオンは空間的な広がりを持って加速される. イオンは初期状態で獲得するエネルギーが異なることにより, 飛行時間も異なる. そこで, イオン源はイオンの初期位置 S_0 のばらつきによる飛行時間の広がりを抑えるために Wiley-McLaren タイプの二段加速型イオン源となっている [11]. 時間収束する距離は 1 段目と 2 段目のプレート間距離を S , 2 段目とアインツェルレンズのプレート間距離を D とすると, 式 (5) で表される. 1 段目の加速電圧 V_{push} , 2 段目の加速電圧 V_{float} の値を変化させることによって自由に L を調整することが出来る. さらに z 方向に加速されたイオンは x, y 方向に拡散してしまうが, 電場のゆがみを利用したアインツェルレンズ V_{ein} によって収束され, 質量分離部へと進む. フィラメントとイオン化室との間の電圧をイオン化電圧と呼び, イオン化電圧は化合物を壊すのに十分な 70eV を一般的に用いる. この 70eV というイオン化電圧は, 化合物によっては過剰な場合もあり, この過剰なエネルギーにより分子イオンが壊れてフラグメントイオンが生成する. フラグメントイオンの分布は化合物の構造を反映しており, このスペクトルパターンは試料化合物の同定に利用される.

$$L = 2S \left(\sqrt{\frac{S}{S_0}} + \frac{\sqrt{V_{push}} D}{V_{float}} \right) \left(\frac{S_0 V_{push} + S V_{float}}{S V_{push}} \right)^{3/2} \quad (5)$$

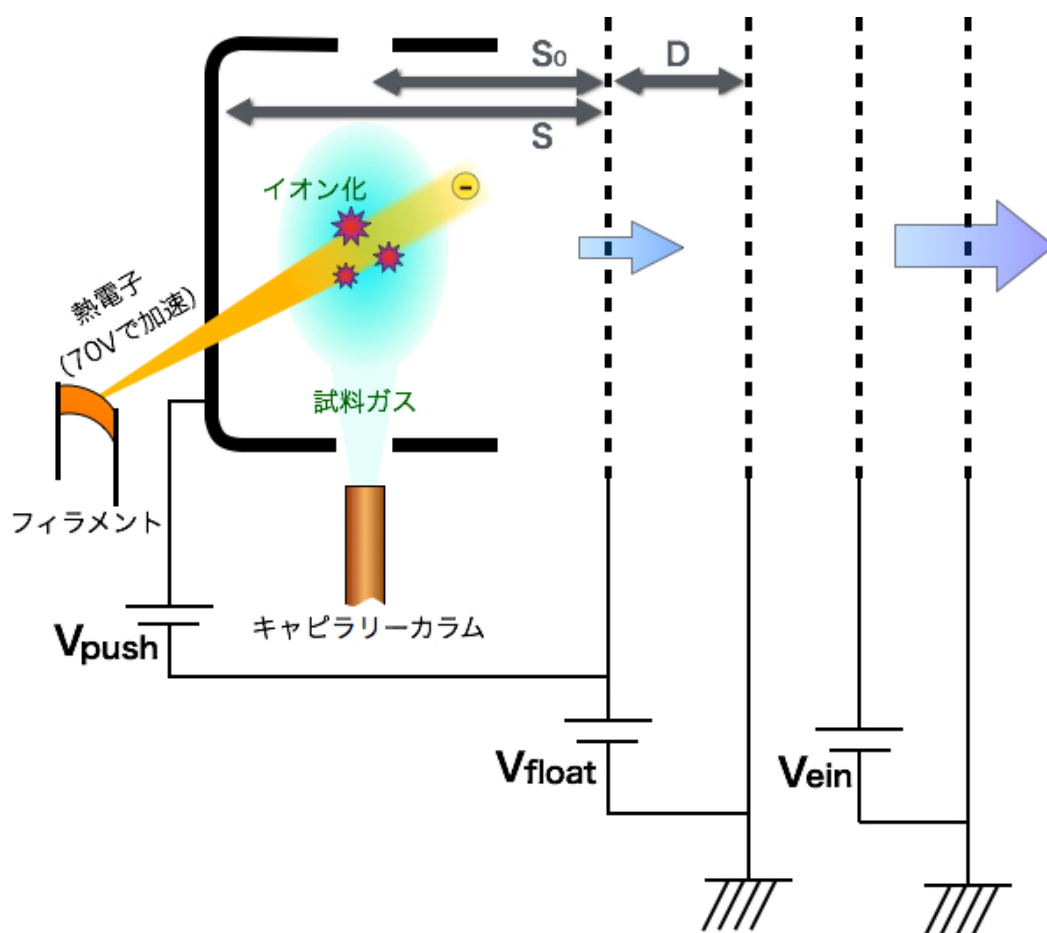


図3 イオン源の構造

4.3.3 質量分解能

質量分解能とは、近接した二つのイオンのピークを互いに分離する能力のことである。質量を m 、飛行時間を T とすると、質量分解能 R は、

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{T}{2\Delta T} \quad (6)$$

と表される。これより、高分解能を得るためにはイオンの飛行時間を長くするか、飛行時間のずれ ΔT を短くする必要がある。イオンの飛行時間を長くする必要があるが、その場合装置を大きくする必要がある。

4.3.4 質量分離部

小型の装置で高分解能を得ることは難しいとされていたが MULTUM-S II であれば、同一飛行空間を複数回周回させることで飛行距離を稼ぐことが出来るため、45cm × 23cm × 64cm, 36kg と小型でありながら高い質量分解能を達成することが出来る。図 4 が MULTUM-S II の全体写真である。

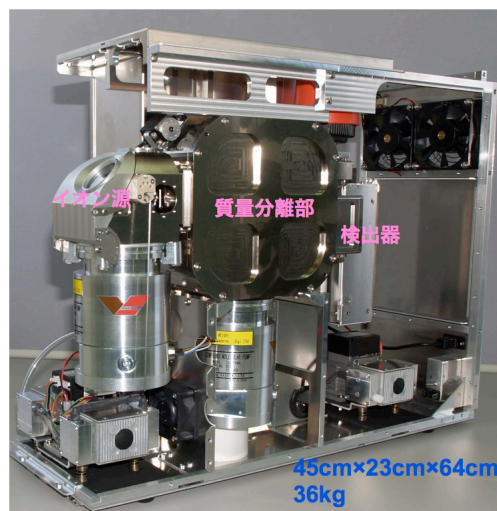


図 4 MULTUM-S II の全体写真

MULTUM-S II は完全時間、空間収束を持つ光学系である。[12] によって、多重周回させることによるイオンの感度低下や質量分解能の低下を抑えることが出来る。質量分離部では、4つの扇形電極、入射電極、出射電極が組み合わされている。イオン化されて質量分離部に送られたイオンは入射扇形電場を通り、周回部へ入る。出射扇形電場の電極に電圧をかけることでイオンを検出器へ送る。入射電極と出射電極にかかる電圧を時間制御することで周回の回数を変えることが出来る。図5はMULTUM-S IIの質量分離部の写真、図6は質量分離部でのイオン軌道の図である。

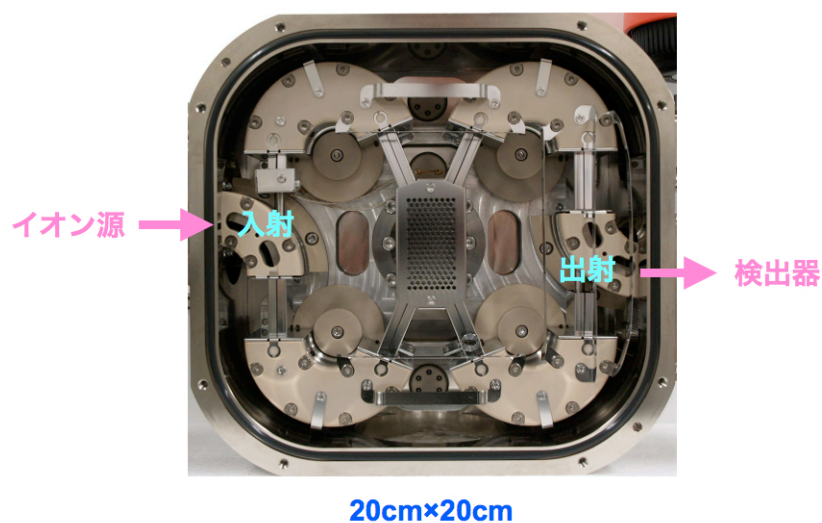


図5 MULTUM-S IIの質量分離部

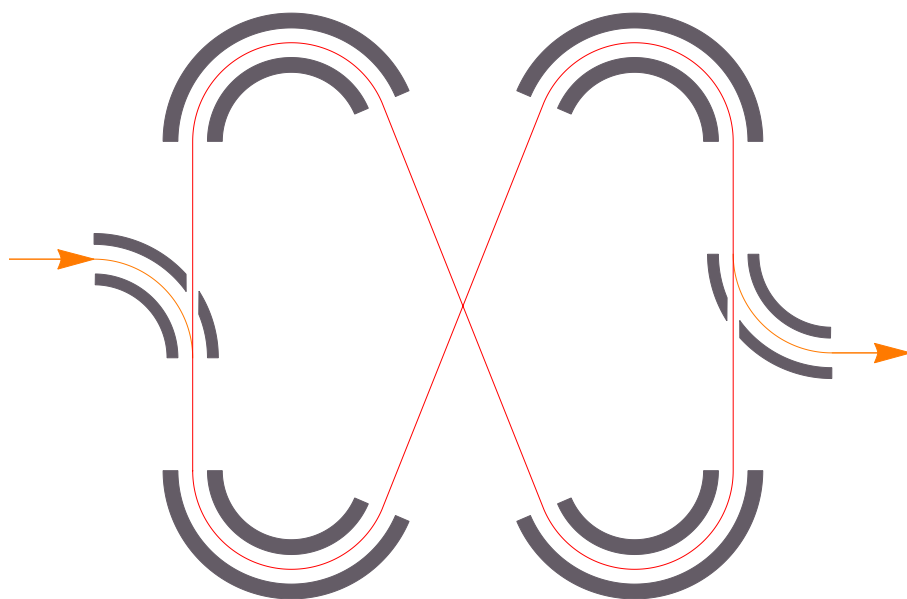


図 6 イオン軌道

4.4 GC/MS

GC/MS とは GC と MS を組み合わせた手法である。一般に GC は混合物の分離は得意であるが、GC だけでは分離した各物質の詳細な同定は困難である。これに対して MS は一つの物質の同定は得意であるが、混合物に関してはピークの重なりなどの問題で不得意である。したがってこれら二つの方法を組み合わせることで、混合物の分析を可能としている。図 7 のように、 m/z 、試料を注入してから各物質が検出されるまでの時間である保持時間、イオン強度の情報を持つ 3 次元データが得られる。保持時間ごとにマススペクトルが得られる。図 8 は本研究で使用した装置の全体写真である。GC は Agilent 6890N を使用した。

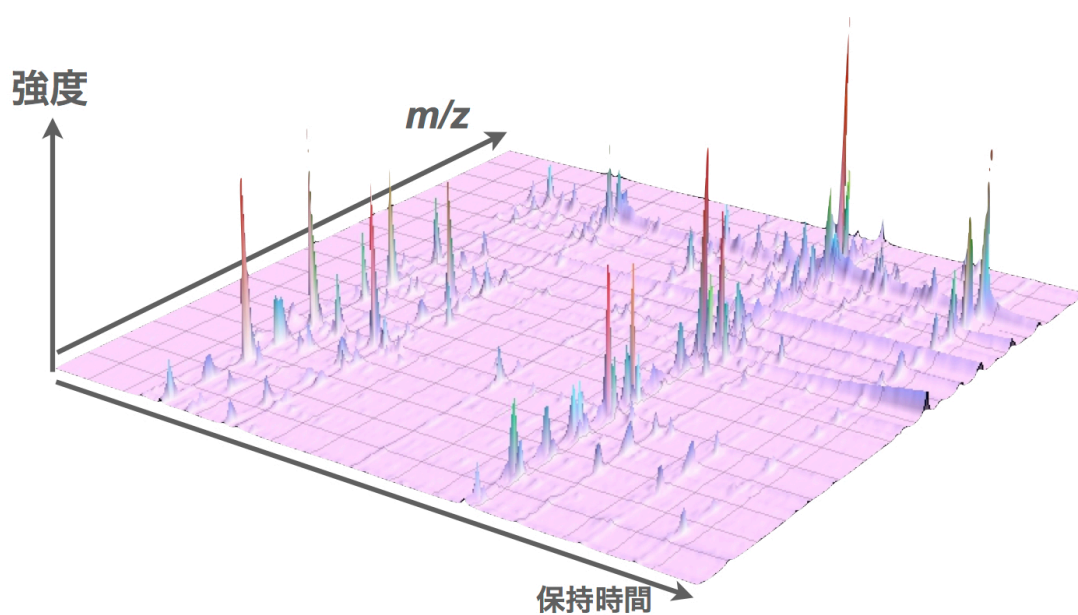


図 7 GC/MS で得られるデータ

MS(質量分析計)

試料

GC



図8 GC/MSの全体写真

5 実験手法

5.1 手順

歯肉溝滲出液の測定の前段階として、マウスの血清を模擬試料と見立てて GC/MS で測定した。GC に注入する前に、分析対象物以外のものを取り除き、対象物を出来るだけ濃くするために抽出・濃縮を行い、アミノ酸や脂肪酸は温度を上げるだけでは気化しにくいために誘導体化をする必要がある。まず抽出では、水溶性の層と脂溶性の層に分けて、水溶性の層を取り出し、次に濃縮では濃縮分離機でアルコールを飛ばし、凍結乾燥機で水分を飛ばす。最後に誘導体化では、難揮発性の物質を揮発性にする。使用した装置、薬品は以下の通りである。濃縮分離機は TOMY MV-100, 凍結乾燥機は EYELA FDU-1200, 遠心分離機は TOMY CAX-370 を使用した。マウス血清はコージンバイオ株式会社 12181005, クロロホルムは Wako 034-02603, メタノールは Wako 138-14521, ピリジンは SIGMA-ALDRICH 360570, メトキシアミン塩酸塩は SIGMA-ALDRICH 226904, MSTFA は GL Sciences 1022-11061 を使用した。

5.2 抽出操作

メタノール/水/クロロホルム (2.5:1:1) 溶液 250 μ L をマウスの血清 50 μ L に加え、1200rpm, 37℃で 10 分間混和した。その後 16000 $\times$ g, 4℃で 5 分間遠心分離を行い、225 μ L の上清を新しいチューブに移し、200 μ L の蒸留水を加えた。常温でボルテックスで 30 秒混和し、16000 $\times$ g, 4℃で 5 分間遠心分離を行った。その上清 250 μ L を新しいチューブに移し、チューブのふたに穴を 5 ヶ所程開け、1 時間濃縮分離した後、凍結乾燥を一晩かけて行った。図 9 は濃縮分離機、図 10 は凍結乾燥機である。



図9 濃縮分離機



図 10 凍結乾燥機

5.3 誘導体化操作

難揮発性化合物や熱により分解してしまうような熱に不安定な化合物は, GC-MS で測定することが困難である。そのため, これらを誘導体化試薬と反応させることによって揮発性, 熱安定性に富んだ化合物に変えることが出来, 測定が可能となる。誘導体化で起こる反応を図 11 に示す。

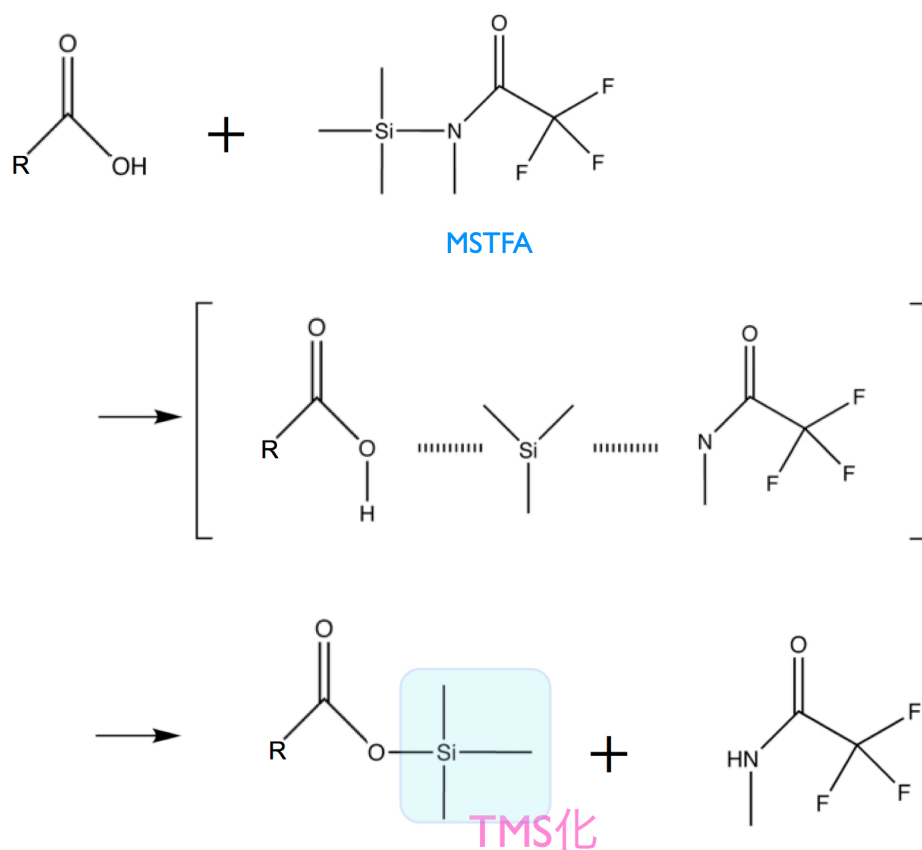


図 11 誘導体化

抽出操作後、ピリジンに溶かしたメトキシアミン塩酸塩 40 μ L (20mg/mL) を加えて 1200rpm, 30 °C で 90 分間混和しメトキシ化反応させた。これに 20 μ L の N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA) を加えて, 1200rpm, 37 °C で 30 分間混和しシリル化反応させた。16000 $\times$ g, 20 °C で 5 分間遠心分離し, その上清をバイアル瓶に入れて測定した。

5.4 GC/MS による分析

抽出操作, 誘導体化操作を行ったサンプル 1 μ L を分析に使用した。GC は Agilent 6890N を使い, 100 °C から 300 °C まで 30 °C/min で昇温した。カラムは Agilent DB-5MS 25m $\times$ 0.25mm(0.25 μ m) を使用し, 測定を 10 分間行った。イオン化電圧は 60V に設定し, 試料注入部は 280 °C, GC から MULTUM-S II への接続部は 230 °C とした。 $V_{float}=1895V$, $V_{push}=1196V$, $V_{ein}=20V$, 入射電圧内側 $V_{in(+)}=855V$, 外側 $V_{out(-)}=1218V$, 出射電圧内側 $V_{out(+)}=815V$, 外側 $V_{out(-)}=1070V$, 周回部電圧内側 $V_{tn(+)}=830V$, 外側 $V_{tn(-)}=1085V$ とし, 周回数は 0 回とした。データの取得には InfiTOF Control System を使用した。

6 結果

6.1 マウスの血清

マウスの血清を上記の手法で測定した結果を図 12 に示す。すべての m/z を取り出したトータルイオンクロマトグラムである。横軸は時間、縦軸はイオン強度である。5 分 7 秒で出現しているのは内部標準として用いる 2-イソプロピルリンゴ酸である。顕著なピークのマススペクトルを図 13, 14, 15, 16 に示す。横軸は m/z , 縦軸は相対強度である。

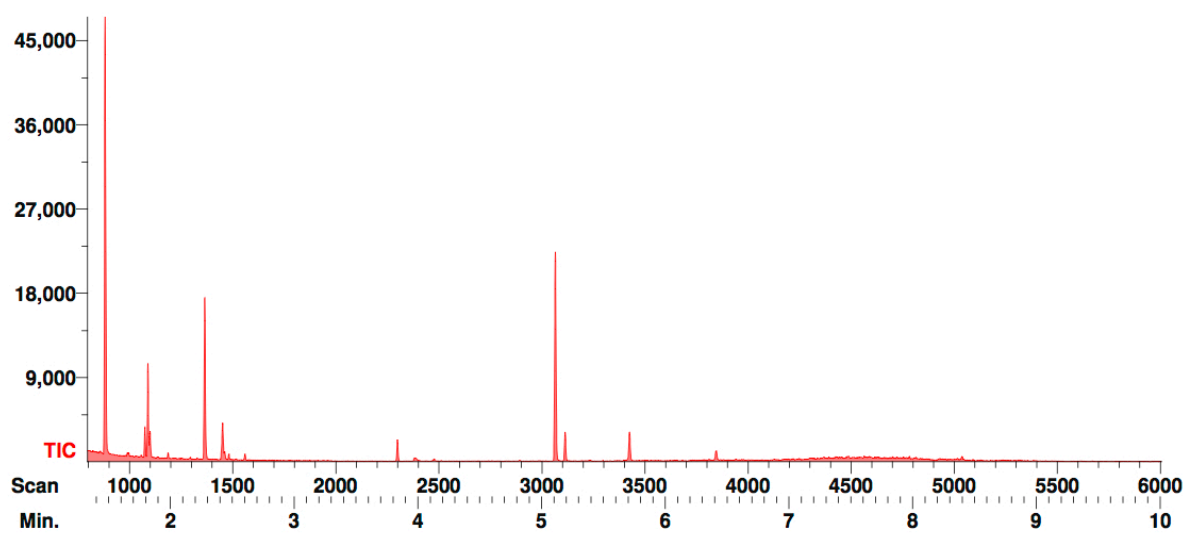


図 12 マウス血清のトータルイオンクロマトグラム

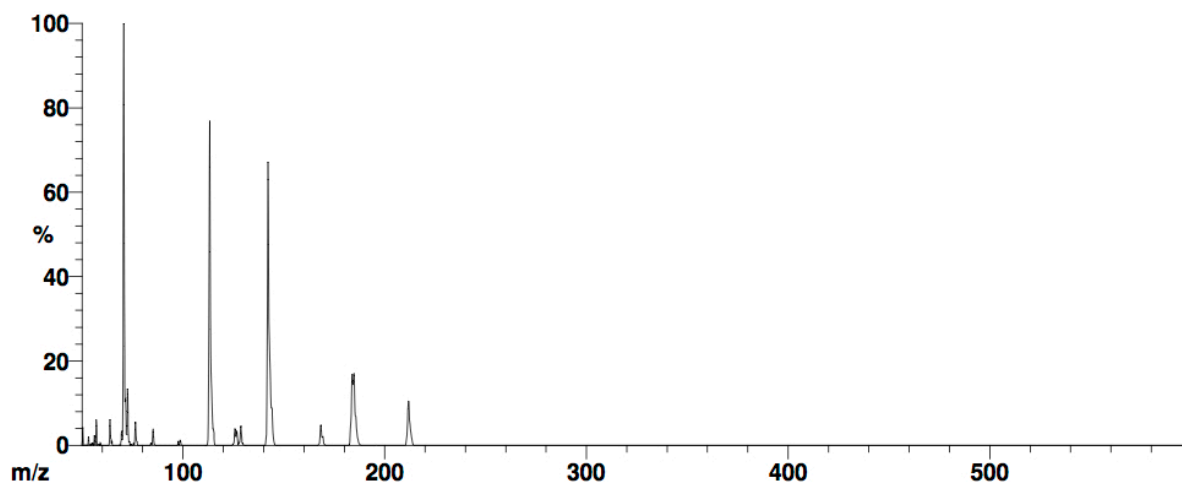


図 13 Retention Time:1.5[min] でのマスペクトル

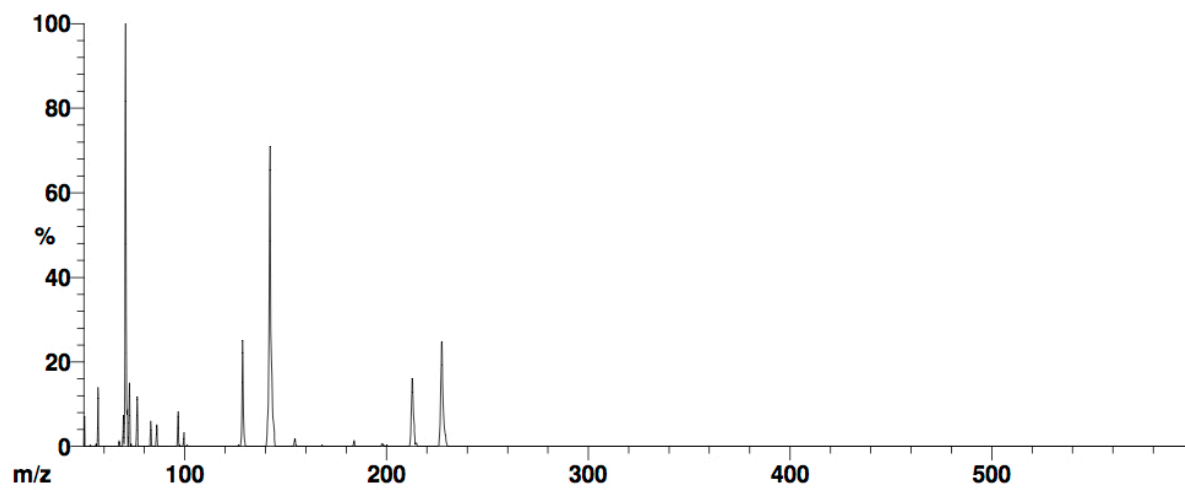


図 14 Retention Time:1.8[min] でのマススペクトル

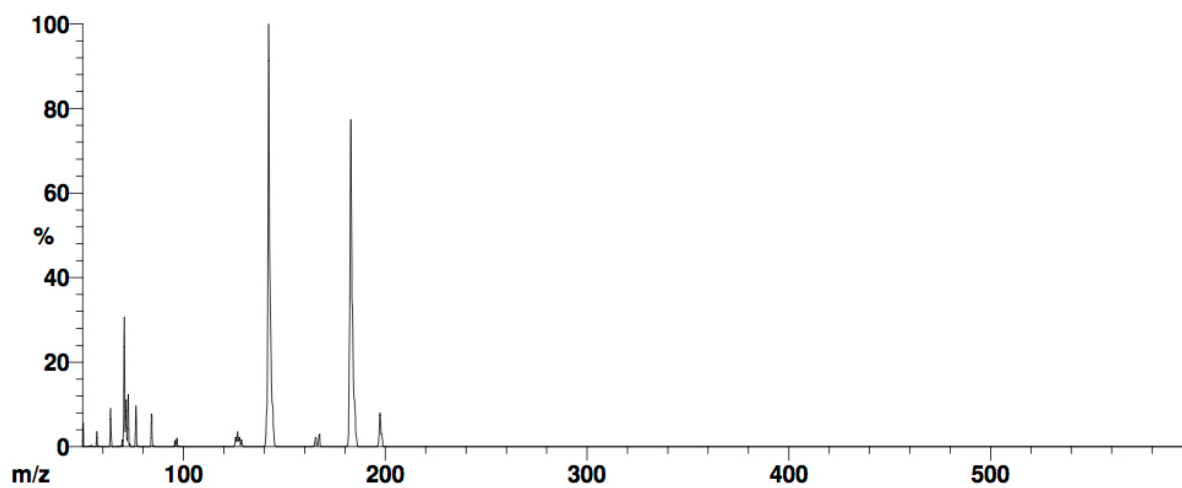


図 15 Retention Time:2.3[min] でのマススペクトル

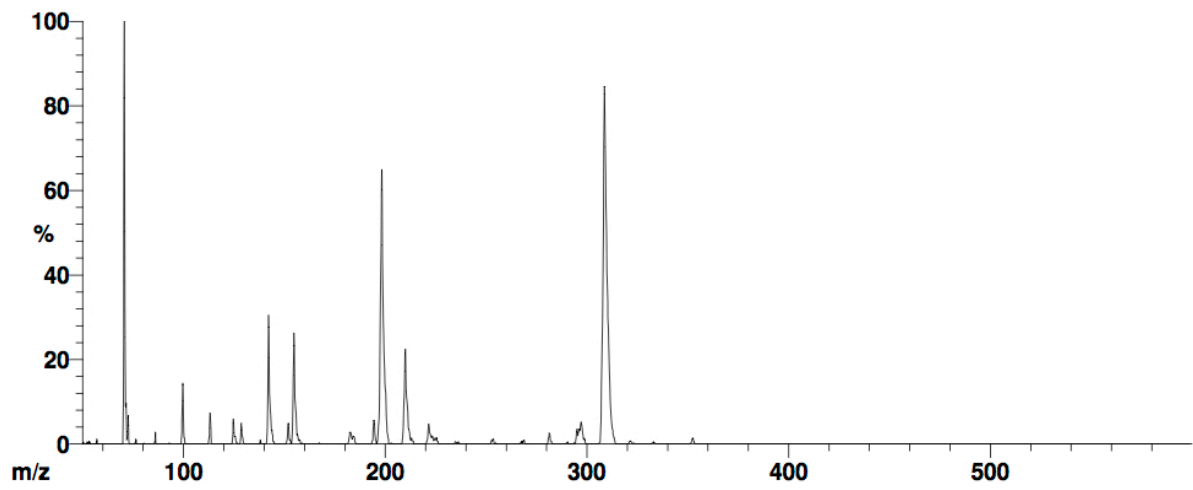


図 16 Retention Time:5.1[min] でのマススペクトル

6.2 イオン化電圧

イオン強度はイオン化電圧に大きく左右される。そこで、イオン化電圧の最適値を調べるため、イオン化電圧を変えたときのそれぞれのピーク面積を比較した。この結果を図 14 に示す。ステアリン酸メチルをメタノールに溶解させ、1ppm としたサンプル 1 μ L を使って測定を行った。ステアリン酸メチルは Wako 135-03085 を使用した。GC は Agilent 6890N を使い、100 $^{\circ}$ C から 300 $^{\circ}$ C まで 30 $^{\circ}$ C/min で昇温した。カラムは Agilent DB-5MS 25m $\times$ 0.25mm(0.25 μ m) を使用し、測定を 10 分間行った。イオン化電圧は 60V に設定し、試料注入部は 280 $^{\circ}$ C、GC から MULTUM-S II への接続部は 230 $^{\circ}$ C とした。 $V_{float}=1895$ V, $V_{push}=1196$ V, $V_{ein}=20$ V, 入射電圧内側 $V_{in(+)}=855$ V, 外側 $V_{out(-)}=1218$ V, 出射電圧内側 $V_{out(+)}=815$ V, 外側 $V_{out(-)}=1070$ V, 周回部電圧内側 $V_{tn(+)}=830$ V, 外側 $V_{tn(-)}=1085$ V とし、周回数は 0 回とした。データの取得には Infi TOF Control System を使用した。

ピーク面積はイオン化電圧 17V で最大値をとっている。一般的に EI で使用される電圧は 70V である。しかし、今回の結果では 60V でのピーク面積は大幅に小さくなっている。イオン化室にはキャリアガスの He が常に流入しており、イオン化電圧が 60V だと He イオンが多く生成され、この大量に生成された He イオンによりイオン化室が満たされてしまう。低い電圧でピーク面積が増えたのは、He のイオン化エネルギーより下の電圧を設定することで He の量を抑えることが出来たからであると考えられる。また、ピーク面積最大となったイオン化電圧が、He のイオン化エネルギーである 24V でない理由としては、実際にイオン量に影響を及ぼし始めるのが 17V であったからだと考えられる。よって、イオン強度を最大にするためには、イオン化電圧を 17V に設定すれば良いと言える。

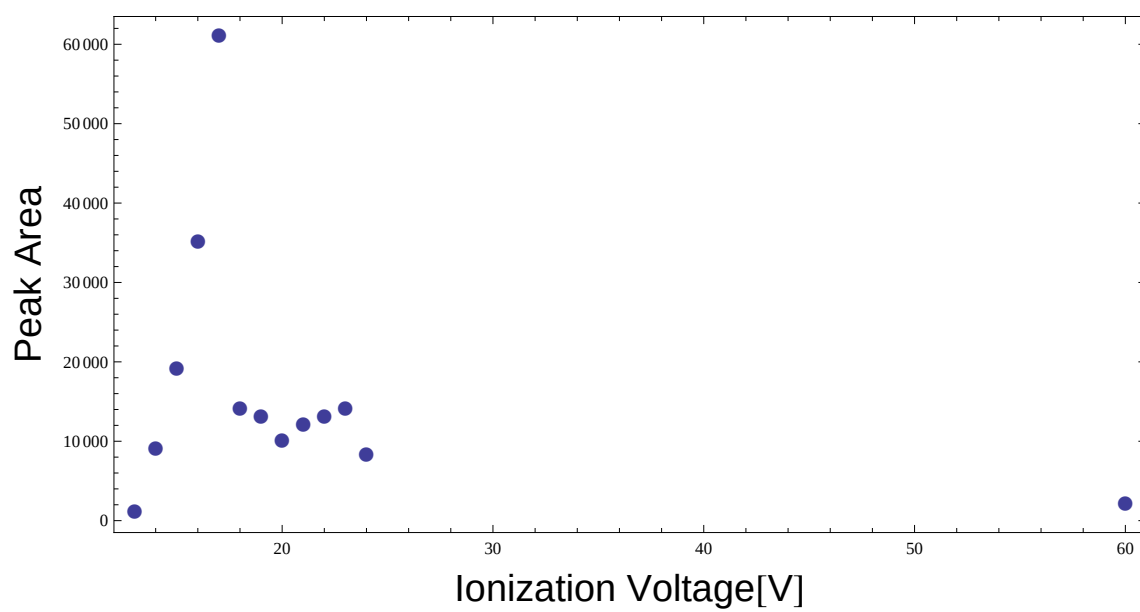


図 17 イオン化電圧を変えたときのピーク面積の変化

7 まとめと今後のテーマ

模擬試料と見立てたマウスの血清を測定することが出来た。よって、歯肉溝滲出液に関しても同様の手法で処理を行えば測定出来ると考えられる。また、イオン化電圧を変えたときにピーク面積が変化することが分かった。イオン化電圧だけでなく、入射電圧、出射電圧、周回部電圧などに関しても最適な条件を設定して測定を行う必要がある。

今後は実際に歯肉滲出液の測定を行い、歯周病態を表す特徴的な物質を特定することで歯周病の疾病活動性や病態とそれらの代謝物の相関関係の評価を行う。また、オンサイトで迅速かつ簡便に歯周病態を評価する新規診断法の開発に向けて、測定時間全体を短縮することを検討する。

参考文献

- [1] S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, and M. Yoshida*. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010 Nov; **6(4)** :518-28. (*correspondence)
- [2] R.G. Nelson, M. Shlossman, L.M. Budding, D.J. Pettitt, M.F. Saad , R.J. Genco , W.C. Knowler. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1990; **13(8)**:836-40.
- [3] J. Beck, R. Garcia, G. Heiss, P.S. Vokonas , S. Offenbacher. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996 Oct; **67(10 Suppl)**:1123-37
- [4] S. Offenbacher, V. Katz, G. Fertik, J. Collins, D. Boyd, G. Maynor, R. McKaig, J. Beck. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*. 1996 Oct; **67(10 Suppl)**:1103-13.
- [5] M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Roll and H. Rosenbauer, *J. Mass Spectrom*, **35** (2000), 163-167.
- [6] D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara, I. Katakuse, *Nucl. Instr. and Meth. A*, **519** , (2004), 331-337.
- [7] T. Ichihara, S. Uchida, M. Ishihara, I. Katakuse, M. Toyoda, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, (2007), 363-368.
- [8] S. Shimma, H. Nagao, J. Aoki, K. Takahashi, S. Miki, M. Toyoda, *Anal. Chem.*, **82**, (2010), 8456-8463.
- [9] M. Yoshida*, N. Hatano, S. Nishiumi, Y. Irino, Y. Izumi, T. Takenawa, T. Azuma. Diagnosis of gastroenterological diseases by metabolome analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *J Gastroenterol*. 2012 Jan; **47(1)**:9-20. (*correspondence)
- [10] L.A. Paige, M.W. Mitchell, K.R.R. Krishnan, R. Kad- durah-Daouk, and D.C. Steffens, *Int. J. Geriatr. Psy- chiatry.*, **22**, 418 (2007).
- [11] W. C. Wiley, I. H. McLaren, *Rev. Instrum.*, **26(1955)**, 1150-1157.
- [12] M. Ishihara, M. Toyoda, T. Matsuo, *J. Mass Spectrom.* , **197(2000)**, 197-189

謝辞

豊田岐聡先生には、本研究テーマを提案していただき、研究方針に関して多くのご指導をいただきました。石原盛男先生には、実験結果に対する貴重なご意見をいただきました。青木順先生には、本研究を進めるにあたって多くのアドバイスをいただきました。質量分析グループのスタッフの皆様、学生の皆様には研究室生活を送る上で多くのご指導をいただきました。深く感謝申し上げます。

工学研究科の馬場健史先生には GC-MS を使う上での試料調整法などに関してご指導いただきました。深く感謝申し上げます。