

オンサイト歯周病診断に向けた 代謝物分析による歯周病迅速診断法の開発

大阪大学大学院理学研究科博士前期課程物理学専攻

豊田研究室

奥山萌恵

2020年2月

目次

1. はじめに	1
1.1 歯周病とは	1
1.2 メタボロミクスと医療診断	2
1.3 先行研究	3
1.4 本研究の目的	4
2. 実験装置	5
2.1 ガスクロマトグラフィー (GC)	5
2.2 電子イオン化法 (EI 法)	8
2.3 四重極質量分析計	9
2.4 ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS)	11
3. 実験方法	13
3.1 試料の採取方法	13
3.2 試料の前処理および TMS 誘導体化	17
3.2.1 凍結乾燥を用いた従来の誘導体化法 (凍結乾燥法)	18
3.2.2 固相誘導体化法 (SPAD 法)	19
3.2.3 迅速固相誘導体化法 (迅速 SPAD 法)	21
3.3 試薬と GC/MS による分析条件	22
3.4 解析手法	25
3.4.1 統計的仮説検定	25
3.4.2 多変量解析	26
4. 歯周病診断法開発に向けた代謝物マーカー探索	27
4.1 固相誘導体化法 (SPAD 法) を用いた前処理法の検討	27
4.2 唾液中代謝物の食物摂取の影響と日間・日内変動の評価	29
4.2.1 食物摂取の影響の評価	29
4.2.2 日間・日内変動の評価	32
4.3 GCF 中代謝物の分析	36
4.4 プラーク中代謝物の分析	42

4.4.1	プラーク中代謝物分析の抽出条件の検討	42
4.4.2	歯周病患者のプラーク中代謝物分析	44
4.5	唾液中代謝物分析による歯周病バイオマーカー探索	47
4.5.1	自然唾液中代謝物分析による歯周病バイオマーカー探索	47
4.5.2	刺激性唾液中代謝物分析によるバイオマーカー探索	54
4.5.3	刺激性唾液採取に使用するガムと分析結果に与える影響	61
4.6	GCF, プラーク, 自然唾液, 刺激性唾液中代謝物の比較	66
5.	唾液中代謝物の迅速分析法の開発	70
5.1	唾液中代謝物の迅速分析法（迅速 SPAD 法）の適用と評価	70
5.1.1	除タンパク処理の時間短縮	70
5.1.2	GC/MS 分析時間の短縮	77
5.1.3	非凍結唾液試料の分析の際の注意点	80
5.1.4	改良迅速 SPAD 法の評価	83
5.1.5	非凍結試料と凍結試料の分析結果に与える影響について	85
5.2	歯学部附属病院での唾液検体測定	89
5.2.1	自然唾液中代謝物の測定結果	91
5.2.2	刺激性唾液中代謝物の測定結果	95
6.	まとめ	99

略称一覧

- ACN ; Acetonitrile (アセトニトリル)
- CV ; Coefficient of Variation (変動係数)
- EI ; Electron Ionization (電子イオン化)
- GC ; Gas Chromatography (ガスクロマトグラフィー)
- GCF ; Gingival Crevicular Fluid (歯肉溝浸出液)
- GC/MS ; Gas Chromatography/Mass Spectrometry (ガスクロマトグラフィー質量分析法)
- HETP ; Height Equivalent to a Theoretical Plate (理論段高)
- LC/MS ; Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー質量分析法)
- MS ; Mass Spectrometry (質量分析法)
- MSTFA ; N-Methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (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)
- OPLS-DA ; Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (直交部分的最小二乗判別分析)
- PCA ; Principal Component Analysis (主成分分析)
- PISA ; Periodontal Inflamed Surface Area
- PLS ; Partial Least Squares (部分的最小二乗回帰)
- SPAD ; Solid-Phase Analytical Derivatization (固相誘導体化法)
- TICC ; Total Ion Current Chromatogram
- TMS ; Trimethylsilyl (トリメチルシリル)
- TOF ; Time of Flight
- UPLC ; Ultra Performance Liquid Chromatography

医療用語解説 [1] [2]

- ・ 歯周ポケット

歯と歯肉の付着部分が破壊され、その付着部分の溝が深くなったポケット。

- ・ 歯肉溝浸出液

歯肉溝あるいは歯周ポケット内に漏出した組織液。

- ・ 自然唾液

口腔内に貯留した唾液。

- ・ 刺激性唾液

咀嚼により大唾液腺（耳下腺）から分泌された唾液。

- ・ プラーク

歯垢ともいう。歯面あるいは歯肉上に繁殖した細菌、細菌の産生物、剥離上皮および食物残渣の一部などにより形成される。

- ・ 歯槽骨

歯を支えるために存在する歯根周囲の骨。

- ・ 歯周組織

歯槽骨、歯根膜、セメント質、歯肉からなる組織。

- ・ 歯周病菌

歯周炎の発症や進行に関係する口腔内細菌。

- ・ 歯肉炎

プラークの付着によって起こる歯肉の病変。

- ・ 歯周炎

歯肉炎が進行し、歯周組織まで破壊が起こる病変。

- ・ プローブ

歯周ポケットの検査を行う際に用いる器具。

- ・ プロービング

プローブを用いて歯周ポケットの検査を行うこと

1. はじめに

1.1 歯周病とは

歯周病は、歯周組織が歯周病菌に侵され破壊される感染症である。進行に伴って治療が困難になる病であるが、初期症状で歯周病の治療を行わずに重度の歯周炎まで進行して初めて認識し、すでに手遅れとなっていることが多々あることから、現在成人が歯を喪失する最も大きな原因となっている。また、糖尿病や心臓病、誤嚥性肺炎などの全身疾患との関連性も近年報告されている[1]。

一般的な歯周病の検査では、まず歯周ポケットの検査方法であるプロービングを行う。具体的にはプロービング時に出血（Bleeding On Probing；BOP）を示す歯肉部位の検査、歯周ポケットの深さ測定（Probing Pocket Depth；PPD）などを行い歯周組織の炎症状態を調べる。さらに歯槽骨（歯を支える骨）の破壊の程度を検査するための X 線写真の分析などを行い、総合的に歯周病の進行度合いを診断する[2] [3] [4][5]。また現在、歯周病の炎症の程度を示す値として、PISA（Periodontal Inflamed Surface Area）[6]が用いられている。PISA は、従来の歯周病検査である歯周ポケット深さと歯周ポケット測定時の出血の値から歯周ポケット炎症面積を算出する方法である。

歯周病診断法には上記の歯周ポケットの検査やレントゲン検査をはじめ様々な検査方法があり、近年プラークの DNA 検査から歯周病菌を調べて治療に活かす方法も開発された。しかし、歯周病の病態を評価するための定量的検査方法はいまだ確立されていない。また、歯周病の進行速度は個人差が大きいため、歯周病の疾病活動性を迅速かつ簡便に評価し、病気の進行を予測できるような新規診断法の開発が望まれている。そこで、本研究では質量分析法を用いて唾液中の代謝物を分析し、歯周病態の定量的評価、将来予測などを行うことを目指す。

1.2 メタボロミクスと医療診断

オミクス (omics) 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。オミクスの中には、ゲノムの DNA 配列の網羅的解析(ゲノミクス; genomics), 発現タンパク質の網羅的解析(プロテオミクス; proteomics), 生命現象に関係するアミノ酸, 有機酸, 脂質, 糖, アミンなどの代謝物の網羅的解析(メタボロミクス; metabolomics)などがある。メタボロミクスでは、血液中や尿などの生体試料中の代謝物の種類や濃度の変化を分析するため、ある検体群と別の検体群の間で代謝物量の有意差を検出し、判別に用いることが可能である。医学分野においては医療診断のためのバイオマーカー探索が行われている。質量分析法を用いたメタボロミクス研究では、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (Gas Chromatography/Mass Spectrometry; GC/MS) や液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry; LC/MS) が主に用いられており、例えば、医療診断の実用例としては、新生児先天性代謝異常症の診断などがある [7]。近年、GC/MS を用いた膵臓がんの新規診断法開発のための血清中の代謝物分析 [8], GC/MS を用いた口腔癌の早期診断のための尿の分析 [9], UPLC/TOF/MS (Ultra Performance Liquid Chromatography/Time of Flight/Mass Spectrometry) を用いた食道扁平上皮がん診断のための血漿中の代謝物分析 [10] などが報告されている。

1.3 先行研究

当研究室の先行研究において、歯周病態を表すマーカーを見つけることを目指し、GC/MSを用いた歯肉溝浸出液（歯周ポケットにしみだしてくる組織液、Gingival Crevicular Fluid；GCF）中の代謝物の網羅的な分析が行われた。結果、GCF中から、健常者と歯周病患者の間に有意差が見られるバイオマーカー候補化合物が19種類特定された [11] [12]。GCFを用いることにより、歯一本ごとの歯周病進行状況の診断・予測が可能になることが期待されるが、歯科での採取が必要で、かつ採取量が0.2 μ L程度と極めて少ないなど誰でも容易に歯周病診断・将来予測をおこなう簡易診断への適用は難しく、今後の研究の方向性を考えると非侵襲性の試料を用いた診断・予測法が確立されることが望ましい。

そこで、本研究では唾液を分析試料として用いることとした。唾液は非侵襲性かつ簡便に採取することができ、簡易診断への適用が可能である。また、唾液は唾液腺から口腔内に分泌された生体液だが、口腔内に貯留するため、口腔内の炎症や細菌により産生された代謝物も含む。そのため唾液中の成分は口腔内の状態を反映しており、歯周病態など様々な情報を非侵襲的に取得できるために有用であると考えられる。

1.4 本研究の目的

本研究は、検体として唾液を用いて、大学附属病院などで治療時間内に迅速に結果を出し、歯周病治療に活かせるようなオンサイト診断法の開発を目的とする。

上記の目的のため、本研究では

1. 唾液分析法の確立、及び唾液中バイオマーカー探索（4章）
2. 大学附属病院内でのオンサイト分析のための迅速分析法検討、および大阪大学歯学部附属病院での実試料分析（5章）

を行った。

1.では、唾液中の代謝物バイオマーカー探索に向けた基礎的検討を行った。本研究で採用した固相誘導体化（Solid Phase Analytical Derivatization；SPAD）法について、文献[13]で用いられた条件による分析結果よりも代謝物の回収率を高めるためにサンプル前処理法の検討を行った。次に唾液中代謝物の採取時間や採取前条件による変動への影響の程度を把握するために日間・日内変動などの評価を行なった。さらに、健常者と軽・中等度歯周病患者の歯肉溝浸出液、唾液、プラークを分析し、比較を行った。プラークは、歯垢とよばれる歯の表面に付着する粘性の物質であり、歯周病菌が存在しているバイオフィルムの本体である。最後に、健常者と軽・中等度歯周病患者の自然・刺激性唾液の分析結果を用いて、健常者群と歯周病患者群の代謝物の検出量を比較した。

2.では、病院内でのオンサイト診断に向けて、前処理を含めて30分以内に分析する必要がある。このため、1.で使用したSPAD法の前処理条件、GC/MS条件の迅速化の検討を行った。また、唾液試料を用いて従来のSPAD法と迅速分析法の比較評価を行った。次に、歯周病患者試料をオンサイトで分析するため、前処理を含むGC/MSシステムを大阪大学歯学部附属病院に持ち込みセットアップし、被験者から自然・刺激性唾液を採取し、迅速分析法を用いて採取後ただちに分析を行った。

2. 実験装置

2.1 ガスクロマトグラフィー (GC)

クロマトグラフィーとは、ロシアの科学者ミハイル・ツヴェット (Михаил Семёнович Цвет) が発明した化合物を分離精製する技法である[20][21]. 分離の物理化学的原理によってさまざまな手法があるが、本研究では、気体状化合物を気相、液相の二層に対する分配の違いを利用して分離を行うガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography ; GC) を使用した. ガスクロマトグラフィーでは、化合物ごとに気相、液相に対する分配が異なるため、これに基づいてカラムの入口から出口まで移動する時間 (保持時間) の違いを利用して試料に含まれる混合物を分離、検出する分析法のことである. カラムは、内径 2~4 mm 程度のガラスやステンレススチール製の管に充填剤が詰められたパックドカラムや内径 0.1~1 mm 程度の溶融シリカの管が用いられ内壁にシリコンポリマー等の液相を塗布したキャピラリーカラムがある.

ここで、ピークの広がりについて、カラム中のガスの流れへの依存、移動相及び固定相中での溶質の拡散、相内、相間の物質移動の 3 つの因子を考える. 理論段高に対して、これらの因子を平均線速度 u との関係で記述した式(1)を van Deemter 式という.

$$\text{HETP} = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad \text{式(1)}$$

HETP : 理論段高 (m)

A : 多流路拡散 (m)

B : キャリヤーガス中での分子拡散 (m^2/s)

C_s : 固定相での物質移動抵抗 (s)

C_m : 移動相での物質移動抵抗 (s)

u : キャリヤーガスの平均線速度 (m/s)

キャピラリーカラムは図 2-1 のように内部での拡散が少なく, A の値は無視してよいためパックドカラムと比較してシャープなピークを得ることができる.

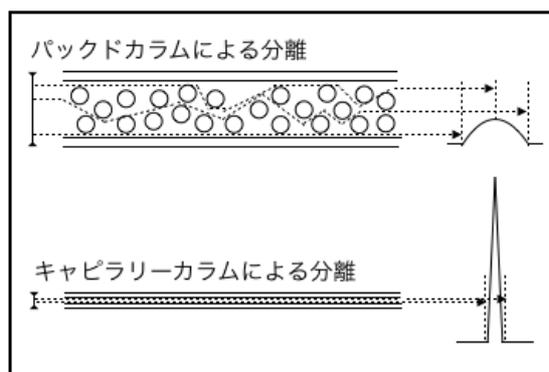


図 2-1 パックドカラム、キャピラリーカラムによる分離の様子

ピークの間隔度 R は、隣接する 2 つのピークがどの程度分離しているかを示したものである。分離度をピーク 1, 2 の保持時間 t_{R1} , t_{R2} とピーク幅 W_1 , W_2 を用いて示すと、式(2)のように定義される。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad \text{式(2)}$$

ガスクロマトグラフの構成を図 2-2 に示す。GC は移動相が気体のため、分析対象物は揮発性で熱的に安定な物質に限られる。したがって常温で気体あるいは加熱することで気体になる成分である必要がある。本研究で用いる液体試料は注入口で気化され、カラム内の固定相と移動相（キャリアーガス）で分配を繰り返しながら移動し分離される。加えてオープンによりカラム内温度を変化させることで、混合物中の低沸点成分から高沸点成分まで様々な成分を分離することができる。

近年、キャピラリーカラムの内径が 0.2 mm 以下（通常、0.1-0.18 mm）のカラムを用いて従来のキャピラリーカラム（内径 0.25-0.32 mm 程度）に比較して 3-10 倍程度早い分析時間で分析を行う手法が実用化された。これを Fast-GC という。Fast-GC では、短いカラム長さ、速いキャリアーガスのカラム線速度、急速なオープン温度の昇温が必要とされるが、精度の高いキャリアーガス圧力精度のコントロール、オープン温度の高い再現性などによって、再現性の高い分析が可能となった。またカラム内径が小さくなることで式(1)について内部での拡散がさらに小さくなり、従来のカラムで分析した場合よりもシャープなピークを得られるため、カラム分離度 R の値も高くなる。これにより、化合物の溶出を早めても従来のキャピラリーカラムと同じレベルの分離が可能となる。化合物の溶出を早める具体的な方法は、カラムの長さを短くしてカラム出口に到達するまでの時間を短くする方法、カラムの膜厚を薄くして分配に要する時間を短くする方法、昇温速度を速くして同様に分配に要する時間を短くする方法などがある。

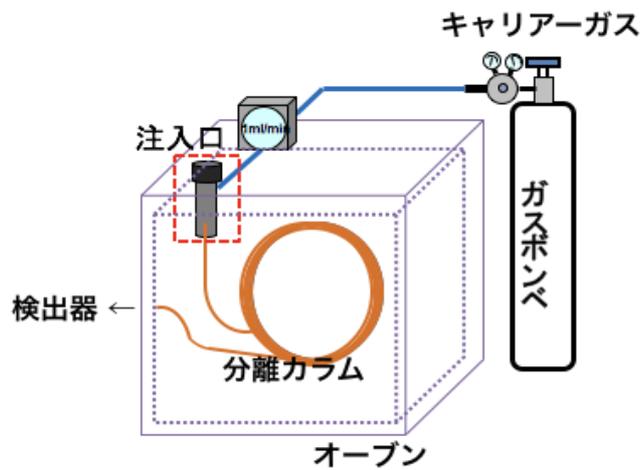


図 2-2 ガスクロマトグラフ 装置構成図

2.2 電子イオン化法 (EI 法)

電子イオン化 (Electron Ionization ; EI) 法は、タングステンなどの金属製フィラメントから出る熱電子を試料に照射し、イオンを生成する方法である。EI イオン源の模式図を図 2-3 に示す。生成したラジカルカチオンはリペラー電極によって質量分離部の方向へ押し出される。EI 法では、スペクトルライブラリー (NIST, Willy など) のデータはイオン化電圧 70 eV で取得しており、化合物の構造推定などにライブラリーを使用するため、一般的に 70 eV が使用されることが多い。本研究でもライブラリーサーチへの適用を考え、イオン化電圧は 70 eV とした。

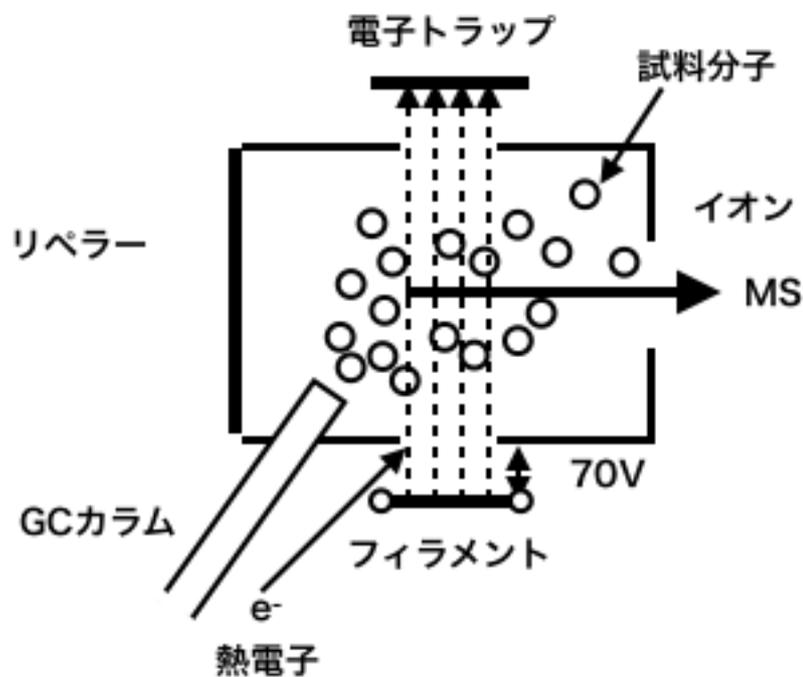


図 2-3 EI イオン源 模式図

2.3 四重極質量分析計

図 2-4 に四重極電極の模式図を示す。四重極質量分析計はガスクロマトグラフ質量分析計の質量分離部として広く普及している。4本の平行なロッド状電極から構成され、電極の一端にはイオン源、もう一端には検出器がある。相対する電極の極性を同じにして直流電圧 U と高周波交流電圧 V を重ね合わせた電圧 $\pm (U + V \cos \omega t)$ を印加し四重極電場を形成している。内部のポテンシャル ϕ は、四重極電極の内接円の半径を r_0 とすると、

$$\phi = \frac{(U + V \cos \omega t)}{r_0^2} (x^2 - y^2)$$

となる。 z 方向に運動する質量 m 、価数 z のイオンを電極間に入射させると、 x あるいは y 方向に電極間を振動しながら z 方向へ移動する。このとき x 、 y 方向の運動方程式は、

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2} (U + V \cos \omega t)x = 0 \quad \text{式(3)}$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2ze}{mr_0^2} (U + V \cos \omega t)y = 0 \quad \text{式(4)}$$

となる。ここで、変数変換して

$$a = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2}, \quad q = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2}, \quad \xi = \frac{\omega t}{2}$$

とおくと式(3), (4)は、Mathieu の方程式とよばれる式で表される。

$$\frac{d^2x}{d\xi^2} + (a + 2q \cos 2\xi)x = 0 \quad \text{式(5)}$$

$$\frac{d^2y}{d\xi^2} - (a + 2q \cos 2\xi)y = 0 \quad \text{式(6)}$$

図 2-5 は、Mathieu の方程式(5), (6)の安定領域を示している。 a 、 q が安定条件を満たすような m/z 値をもつイオンのみ、発散せず安定な振動運動をして電極間を通りぬけ検出器に到達する。

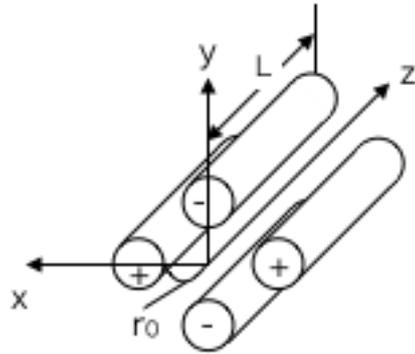


図 2-4 四重極質量分析計の電極模式図

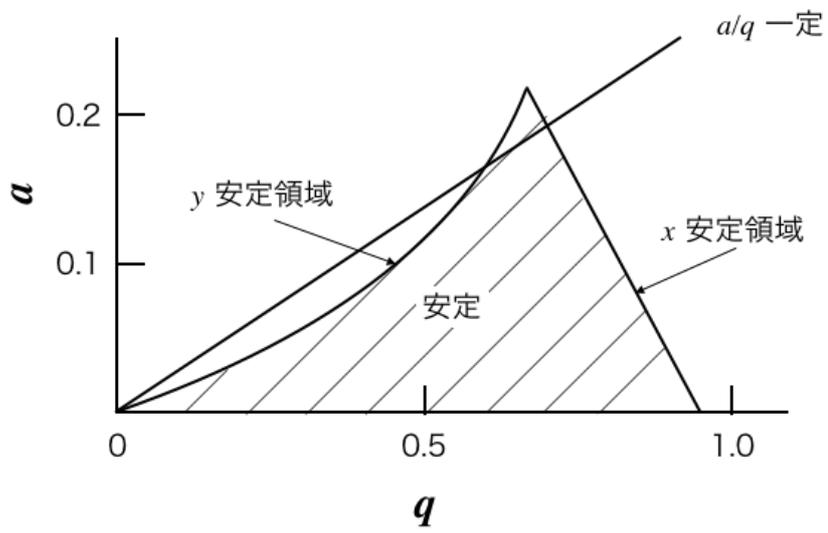
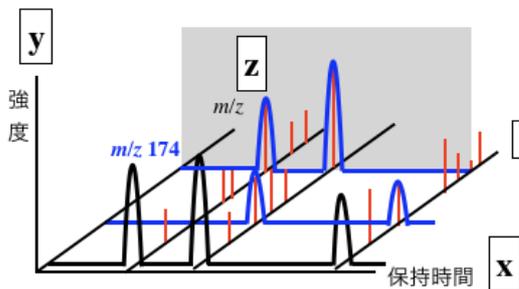


図 2-5 Mathieu の方程式の安定領域

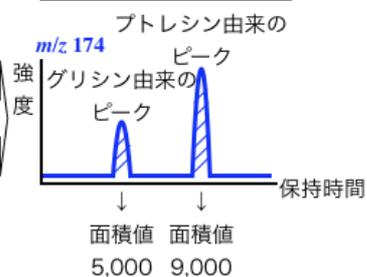
2.4 ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS)

GC で分離した各成分を、定性、定量分析に優れた MS で分析するという手法を GC/MS という。GC と MS を結合させることで混合物の分離と m/z の情報を利用した定性分析、さらには定量分析も可能としている。GC/MS 分析には、SIM (Selected Ion Monitoring) モードとスキャンモードがある。SIM モードでは、既知の分析対象化合物のマススペクトルから特定のイオンを選び、そのイオンだけが電極間を通過するように 2.3 節の式(5), (6)のパラメータ a, q を設定して測定するため感度が高く、微量成分の定量分析に適している。一方スキャンモードでは、ある範囲の質量が連続的に電極間を通過するようにパラメータ a, q を設定して測定するため、未知試料の定性分析に適している。ただし、スキャンモードでは、スキャン中に a, q の安定条件に合った特定のイオン以外は発散し、検出器に到達しないため SIM モードと比べて感度は低い。図 2-6 にスキャンモードの GC/MS で得られるデータの模式図を示す。x 軸が保持時間、y 軸が強度、z 軸が m/z 値である。x, y 軸のデータ (縦軸が強度、横軸が保持時間) を、各 m/z 値についてマスクロマトグラムとよぶ (全イオンの場合は TICC (Total Ion Current Chromatogram))。マスクロマトグラム内で検出された各分析化合物由来のピークからピーク面積値を求め、定量解析に用いる。また、z, y 軸のデータ (縦軸が強度、横軸が m/z 値) を、マススペクトルとよぶ。マススペクトルは検出されたイオンの情報を得ることができ、データベースや標準試料分析により得られたマススペクトル、保持時間の情報から定性解析に用いられる。本研究では、歯周病患者と健常者の自然・刺激性唾液、歯肉溝浸出液、プラーク中代謝物を網羅的に分析して検出される代謝物を同定し、さらに量的変動を調べて歯周病のバイオマーカーを探索するために GC/MS のスキャンモードを用いる。

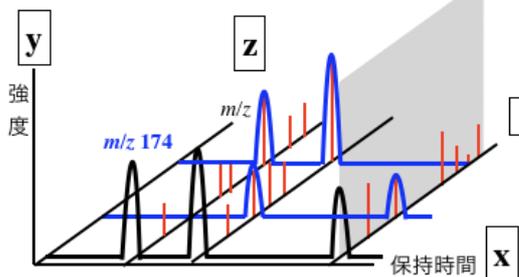
定量解析



マスクロマトグラム



定性解析



マススペクトル

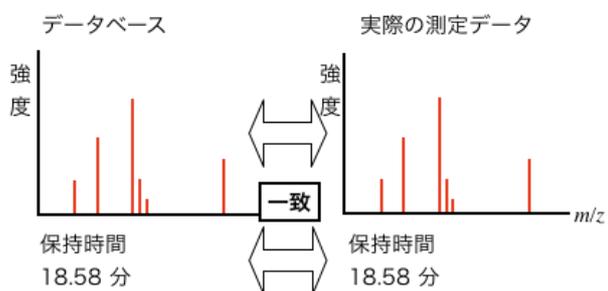


図 2-6 GC/MS で取得できるデータ

3. 実験方法

3.1 試料の採取方法

本研究では、GCF、プラーク、自然唾液、刺激性唾液を採取、分析した。

GCF は、歯肉溝あるいは歯周ポケット内に漏出した組織液で、血清成分や歯周組織局所で産生された成分を含む。GCF は、図 3-1 に示すペリオペーパー (PerioPaper® GCF Collection Strips, #593520, Oraflow Inc. NY USA) とよばれる採取用ろ紙を用いて最大 0.2 μ L 採取する。

プラークは、歯面あるいは歯肉上に繁殖した細菌、細菌の産生物、剥離上皮および食物残渣の一部などにより形成される。約 80%が水分、有形成分の 20%の大部分は細菌である。プラークは図 3-2 に示すペーパーポイント (A022T0040, Dentsply Sirona, Ballaigues Switzerland) を用いて採取する。なお、ペリオペーパーでは歯周ポケットの液体成分、ペーパーポイントでは歯周ポケットのプラークを採取することを目的としている。健常部位、罹患部位から GCF、プラークの両方を採取している。

自然唾液・刺激性唾液は、図 3-3, 3-4 に示すように採取用カップを用いて採取する。ただし刺激性唾液は、図 3-5 に示す採取用ガム (サリバチェックラボ用ガム, 株式会社ジーシー東京) を咀嚼し、大唾液腺の一つである耳下腺から分泌された唾液と、もともと口腔内にある自然唾液の混ざったものを採取する。



図 3-1 ペリオペーパーによる GCF 採取



図 3-2 ペーパーポイント



図 3-3 唾液採取の様子



図 3-4 唾液採取用カップ



図 3-5 刺激性唾液採取用ガム

被験者からの試料採取は、二期に分けて実験を行った。被験者の番号は、一期は歯周病患者 P1~P47(一回目の病院来院時に採取対象の被験者を選別したため欠番あり)、健常者 H1~H20、二期は健常者と歯周病患者を合わせて R1~R27 と表している。患者の臨床データなどの詳細は巻末に示す。なお、本論文では歯周病の重症度について、1. 健常者、2. 安定期歯周病患者、3. 軽度歯周病患者、4. 中等度歯周病患者、5. 重度歯周病患者の 5 段階で識別している。安定期歯周病患者とは、重症度 3~5 の歯周病の状態から治療を行い、採取時点では歯周病の炎症レベルが健常者とほぼ同じ状態まで下がっている患者のことである。なお、本研究では、重症度が 5 の患者は被験者に含まれていない。

唾液分析法の確立、および唾液中バイオマーカー探索 (4 章) では、24 名の軽度・中等度歯周病患者から自然唾液、刺激性唾液、歯肉溝浸出液、プラークを大阪大学歯学部附属病院にて採取した。本実験では、他の疾病等の要因による差を極力考慮せず病態の比較を行うために、特定の疾病、投薬がなく、歯周病の治療歴がない被験者から採取した。また採取の 2 時間前からは食事、ブラッシングも行っていない。コントロールとして 20 名の健常者から自然唾液、刺激性唾液、GCF を採取した。4 章ではいずれも凍結融解させた試料を分析した。ただし、本実験の対象被験者に 2. 安定期歯周病患者、5. 重度歯周病患者は含まれなかった。

次に、オンサイト分析のための迅速分析法検討、および大阪大学歯学部附属病院での実試料分析 (5 章) では、18 名の歯周病患者と 9 名の健常者から自然唾液、刺激性唾液を同附属病院にて採取した。本実験では、他の疾病や歯周病の治療介入などの差も含めたデータを取得するため、投薬や治療介入のある被験者を複数含んでいる (治療介入している患者を安定期歯周病患者と表記する)。5 章ではいずれの試料も凍結させず、採取後ただちに分析した。ただし、本実験の対象被験者に 3. 軽度歯周病患者、5. 重度歯周病患者は含まれなかった。

表 3-1, 3-2 にそれぞれの被験者の群の人数 (性別)、平均年齢 (範囲)、歯周ポケットの炎症面積を示す PISA 値の平均と範囲を示す。

表 3-1 被験者の臨床データ (4 章)

	健常者	軽度歯周病患者	中等度歯周病患者
人数 (男性/女性)	20 (11/9)	15 (4/11)	9 (3/6)
平均年齢 (範囲)	30.4 (25-37)	48.5 (42-54)	50.4 (42-72)
PISA	情報なし	248.6 (45.0-576.9)	635.9 (241.5-1311.9)

表 3-2 被験者の臨床データ (5 章)

	健常者	安定期歯周病患者	中度歯周病患者
人数 (男性/女性)	10 (3/7)	15 (0/15)	2 (2/0)
平均年齢 (範囲)	63 (37-84)	57 (36-89)	62 (48-75)
PISA	32.5 (0-136.7)	62.9 (0-241)	579.8 (541.5-618)

3.2 試料の前処理および TMS 誘導体化

GC/MS で分離分析を行う前に、試料化合物の極性を下げ、揮発性をあげるためにいくつかの前処理を行う必要がある。

まず、タンパク質を沈殿させて分析対象物（アミノ酸・有機酸・アミン・糖類などの親水性化合物）を抽出するために、有機溶媒（クロロホルム、メタノール、アセトニトリル（Acetonitrile；ACN）など）を用いた。なお、本研究で使用した薬品の詳細については、3.3 節で示す。有機溶媒を加えることでタンパク質は変性し、水への溶解度が低下するため沈殿する。次に、誘導体化試薬としてピリジンで適切な濃度に希釈したメトキシアミン塩酸塩と N-メチル-N-トリフルオロアセトアミド（N-Methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide；MSTFA）を添加し、各化合物のヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基の水素をトリメチルシリル（Trimethylsilyl；TMS）基に置換することで極性を下げ、ガスクロマトグラフ質量分析計での分析を行なった。TMS 誘導体化の各反応式を図 3-6 に示す。

本論文では 3.2.1 ~3.2.3 項に示す 3 種類の前処理を行なった。

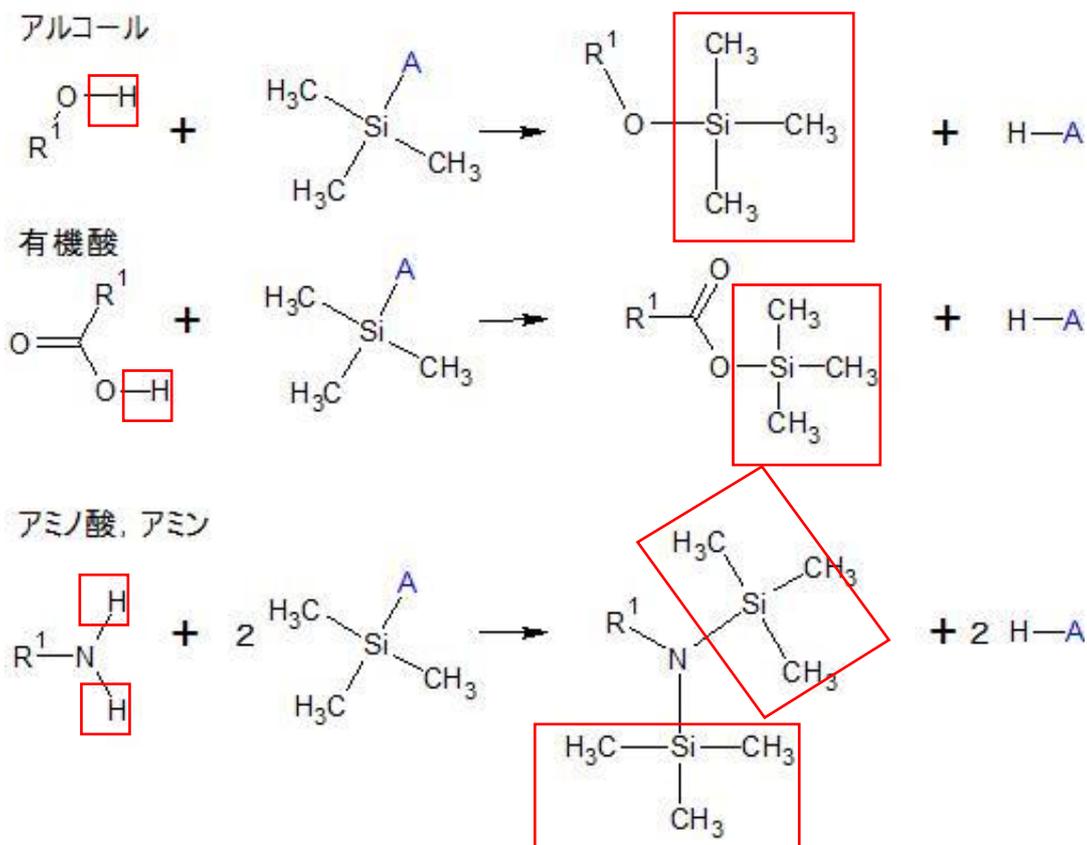


図 3-6 TMS 化の反応式

3.2.1 凍結乾燥を用いた従来の誘導体化法（凍結乾燥法）

凍結融解後、唾液試料 50 μL にメタノール/水/クロロホルム (2.5:1:1) 溶液 450 μL 、内部標準として蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 6 μL (100 ppm) を添加後、30 秒間混和した。その後 16,000 \times g、4°C で 5 分間遠心分離を行い、345 μL の上清を新しいチューブに移し、305 μL の蒸留水を添加した。16,000 \times g、4°C で 5 分間遠心分離を行った後、500 μL の上清を取り出した。次に 1 時間減圧遠心濃縮することでメタノールを蒸発させ、一晩凍結乾燥し水分を完全に除去した。

次に誘導体化操作を行った。ピリジンに溶かしたメトキシアミン塩酸塩 20 μL (20 mg/mL) を添加後、1,200 rpm、30°C で 90 分間振とうさせ、メトキシ化反応させた。これに 10 μL の MSTFA を添加後、1,200 rpm、37°C で 30 分間振とうさせ、シリル化反応させた[5]。手順を図 3-7 に示す。

使用した装置は以下のとおりである。振とう機は Eppendorf Thermomixer 5350、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。なお使用した試薬については、3.3 節 表 3-3 で示す。

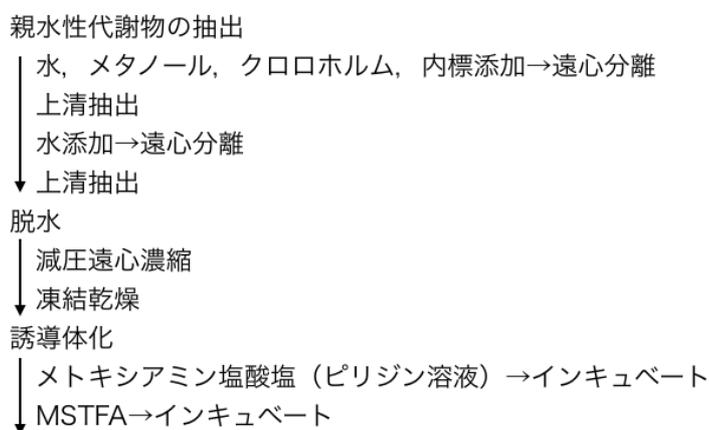


図 3-7 凍結乾燥を用いた従来の誘導体化法手順

3.2.2 固相誘導体化法 (SPAD 法)

イオン交換カラム内で濃縮・精製・誘導体化を行う SPAD 法を用いることで、抽出後の前処理時間を 15 分以内に収めることが可能である[11].

唾液分析法の確立、および唾液中バイオマーカー探索 (4 章) では、以下の生体試料に対して SPAD 法を適用し、誘導体化を行なった。

[唾液]

まず唾液試料 20 μL に ACN (25°C) 225 μL を加え、1,200 rpm, 37°C で 30 分間混和した。その後、内部標準として蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 5 μL (100 ppm) を加え、16,000 \times g, 4°C で 5 分間遠心分離を行った。その間に、蒸留水 100 μL , ACN 100 μL , ACN/水 (9:1) 溶液 100 μL をカラムに順に通し、コンディショニングを行った。次に、遠心分離させた試料溶液の上清 120 μL をカラムに導入した。さらに ACN 100 μL をカラムに通すことで脱水し、ピリジン/ACN (9:1) 溶液に溶解したメトキシアミン塩酸塩 5 μL (200 mg/mL) をカラムに導入しメトキシ化反応を行った。3 分後、MSTFA 25 μL をカラムに導入しシリル化反応を行った。最後に、ヘキサン 70 μL を通し、試料溶液を溶出させた。なお分析前に、濃度調整のためヘキサン 300 μL を加えた。手順を図 3-8 に示す。

[GCF]

GCF の場合は、試料溶液から代謝物を抽出する前に、採取用のろ紙であるペリオペーパーからサンプルを抽出する必要がある。そのため、まず ACN 450 μL , Milli-Q 水 (超純水) 40 μL をペリオペーパーが入ったチューブに加え、5 分間氷冷下で超音波抽出を行った。抽出した混合溶液 245 μL を別のチューブに移し替え、1,200 rpm, 37°C で 30 分間混和した。以下作業は唾液の場合と同様である。なお、氷冷下で超音波抽出した理由は、代謝物やタンパク質の生物・化学的分解を抑えるためである。

[プラーク]

プラークの場合は、試料溶液から代謝物を抽出する前にペーパーポイントからサンプルを抽出する必要がある。そのため、まず ACN 900 μL をプラーク溶液 100 μL に加えて氷冷下で超音波抽出を行った。抽出した混合溶液 240 μL を別のチューブに移し、秤量した。このプラーク溶液の重量として、規格化した。ACN 54 μL を添加して 1,200 rpm, 37°C で 30 分間混和した。内部標準液として蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 6 μL (100 ppm) を加える。以下作業は唾液の場合と同様である。

使用したカラム、装置は以下のとおりである。SPAD カラムは、上層に強陽イオン交換、下層に強陰イオン交換のポリマーベースの樹脂を含む Presh-SPE AOS (AiSTI SCIENCE) を使用した[7]。振とう機は Eppendorf Thermomixer 5350、遠心分離機は TOMY CAX-370 を使用し

た.

1. 親水性代謝物の抽出
ACN添加→インキュベート
2. タンパク質沈殿
内部標準溶液添加→遠心分離
上清抽出
3. カラムコンディショニング
水
ACN
90% ACN水溶液添加
4. 水溶性化合物吸着
試料導入 (90% ACN水溶液)
5. 脱水
ACN添加
6. 誘導体化
メトキシアミン塩酸塩 (10% ACN ピリジン溶液)
MSTFA添加
7. 溶出
ヘキサン添加

図 3-8 SPAD 法の前処理手順 (4 章)

3.2.3 迅速固相誘導体化法（迅速 SPAD 法）

一方，オンサイト分析のための迅速分析法検討，および大阪大学歯学部附属病院での実試料分析（5章）では，図 3-8 の手順 1 を短縮するために，唾液試料に添加する ACN の温度を変えた．温度の低い有機溶媒を加えることでタンパク質の溶解度が急速に下がり，短時間でタンパク質を沈殿させることができるため[22]，試料 20 μL に $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却した ACN 225 μL を加えた．3.2.2 項の従来の SPAD 法とは異なり 30 分の振とう操作をせず，内部標準液として蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 5 μL (100 ppm) を加えてただちに 16,000 \times g, 4°C で 5 分間遠心分離を行った．その間にカラムのコンディショニングを行い，遠心分離させた試料溶液の上清 30 μL をカラムに導入し，3.2.2 と同様の手順で誘導体化操作から試料溶出まで行なった．なお分析前に，濃度調整のためヘキサン 100 μL を加えた．手順を図 3-9 に示す．なお，検討事項の詳細は 5.1 節に示す．

1. 親水性代謝物の抽出，タンパク質の沈殿
ACN，内部標準溶液添加→遠心分離
上清抽出
2. カラムコンディショニング
水
ACN
90% ACN水溶液添加
3. 水溶性化合物吸着
試料導入（90% ACN水溶液）
4. 脱水
ACN添加
5. 誘導体化
メトキシアミン塩酸塩（10% ACN ピリジン溶液）
MSTFA添加
6. 溶出
ヘキサン添加

図 3-9 迅速 SPAD 法の前処理手順（5章）

3.3 試薬と GC/MS による分析条件

本研究で使用した試薬を表 3-3 に示した。

本研究で使用した分析装置は以下の通りである。ガスクロマトグラフは 6890N (Agilent) を使用した。本研究では、GCF、唾液、プラークなどの試料中に含まれる代謝物を誘導体化して分離し、定性・定量分析するために、4 章の実験では微極性の 5% フェニルジメチルポリシロキサンを液相とするカラム CP-Sil 8 CB for Amines (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm) を使用した。また 5 章実験ではより短時間で分析することを目的とし、同系統の液相を用いたカラムである DB-5MS UI (長さ 20 m, 内径 0.18 mm, 膜厚 0.18 μm) を使用した。このカラムは一般的なキャピラリーカラムと比べて内径が小さいため、よりシャープなピークを得ることができる。そこで、カラム長さを短くし、気相と液相での代謝物の相互作用に要する時間は短縮化できることから膜厚も薄くし、化合物の分離に要する時間を短縮して保持時間を短縮した。5 章の分析では、10 分以内に GC/MS 測定が終了するように GC オープン条件を設定した。質量分析計は JMS-Q1000GC (日本電子) を使用した。分析条件については 4 章実験を表 3-4 に、5 章の実験を表 3-5 に示した。

表 3-3 使用した試薬

試薬名	メーカー名	製品番号	グレード
クロロホルム	Wako	035-02616	一級
メタノール	Wako	138-14521	LC/MS 用
蒸留水	Wako	046-16971	HPLC 用
ヘキサン	関東化学株式会社	18041-1B	HPLC 用
アセトニトリル	Wako	014-00386	特級
ピリジン	SIGMA-ALDRICH	360570	-
メトキシアミン塩酸塩	SIGMA-ALDRICH	226904	-
2-イソプロピルリンゴ酸	SIGMA-ALDRICH	333115	-
MSTFA	GL Sciences	1022-11061	-

表 3-4 GC/MS 分析条件 (4 章)

GC 条件	
昇温条件	50°C(2分保持) -15°C/分 -320°C(5分保持)
注入口温度	230°C
ヘリウム流量	0.9 mL/分 (定流量モード)
注入法 (注入量)	スプリットレス (1 µL)
MS 条件	
イオン化電圧	70 V
イオン化電流	200 µA
検出器電圧	1300 V
測定質量範囲	<i>m/z</i> 30-450
サイクルタイム	340 ms
インターフェース温度	250°C
イオン源温度	230°C

表 3-5 GC/MS 迅速分析条件 (5 章)

GC 条件	
昇温条件	50°C (1 分保持) -35°C/分 -340°C (0.7 分保持)
注入口温度	230°C
ヘリウム流量	0.9 mL/分 (定流量モード)
注入法 (注入量)	スプリットレス (0.5 μ L)
MS 条件	
イオン化電圧	70 V
イオン化電流	200 μ A
検出器電圧	1000 V
測定質量範囲	m/z 30-450
サイクルタイム	150 ms
インターフェース温度	250°C
イオン源温度	230°C

3.4 解析手法

本研究にあたっては、GC/MS で取得したクロマトグラムの各ピークについて、定性・半定量解析を行なった。まず定性解析では、生体試料中の未知化合物を同定するために、NIST のライブラリサーチを用いてピークの化合物の推測を行った。そのサーチ結果で推定された候補化合物の標準試料を同条件で分析を行い、化合物の保持時間、スペクトルパターンなどから候補の化合物と同一であるかを判断した。半定量解析では、まず各ピークに対して検出されるフラグメントイオンや分子イオンの中から定量イオンを決める。定量イオンの選択条件は、クロマトグラムのピークのシグナル/ノイズ (Signal/Noise ; S/N) 比が高く、近傍に同じ質量の妨害ピークがないことである。各ピークについて定量イオンのピーク面積値を求め、分析のばらつきを補正するために内部標準の定量イオンピーク面積値で割った相対値のことを、相対ピーク面積値という。分析サンプルごとに求めた相対ピーク面積値を用いて、統計的仮説検定と多変量解析を行なった。メタボロミクスにおいて、統計的仮説検定は健常者、患者などの群間で得られる値の差の有意性の評価、多変量解析はデータの視覚化、または回帰・判別の子測モデルの構築のために用いられる。(各ピークの保持時間、定量イオンは巻末参照)

3.4.1 統計的仮説検定

統計的仮説検定は、データに基づいて何らかの仮説の真偽を客観的かつ合理的に判断するための方法である。ヒトのサンプルを扱う場合、データの正規分布を仮定せず、分布の形に関係なく行えるノンパラメトリック検定を用いることが多い。本研究においても、ノンパラメトリック検定の、2群間の差の有無を評価するマン=ホイットニーの U 検定、3群以上の差の有無を評価するクラスカル=ウォリス検定を用いた。これらの検定では帰無仮説として「群間に差がない」という仮説を立て、検定統計量はその仮説を証明する確率 P 値を求める。P 値が小さいほど仮説は起こりえないことを意味し、一般的に P 値が 5% (0.05) 以下の場合に帰無仮説を偽として棄却し、2あるいは3群間で有意に差があると言える。本研究においても P=0.05 を基準に有意差の判定を行った。

本研究では、EZR ソフトウェア (version 1.41; Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) [14], R ソフトウェア (version 3.6.0; The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [15]を用いて各検定を行なった。

3.4.2 多変量解析

多変量解析手法には判別分析、主成分分析 (Principal Component Analysis ; PCA)、クラスター分析、部分最小二乗法 (Partial Least Squares ; PLS) などがあり、データの性質と解析の目的に応じて手法を選択する。本研究では PCA 法、PLS 法を用いる。

これらの多変量解析から得られるデータとして、スコアプロット、ローディングプロットがある。なお、本研究において、スコアプロットとは、被験者間の差異を示す。ローディングプロットとは、スコアプロットで視覚化できた被験者の差異に対し、試料中のどの代謝物が影響を及ぼしているかを表している。PCA 法は、元のデータの分散が最大になるように線形結合式の係数を求める計算を行い、新たな座標軸を作る。これを第 1 主成分 (Principal Component 1 ; PC1) という。次に、残りの情報に対して同様の計算を行い、求められた新たな座標軸が第 2 主成分 (PC2) である。PCA 法では群情報なし (教師なし) の解析手法であるのに対し、PLS 法は群情報を用いた (教師あり) 解析手法である。PLS 法は、各種のデータに基づいた人や物などを特定の群に判別、あるいは判別に強い影響を与えるデータの探索に用いられる。また PLS 法では、解析に用いたデータから、教師データの線形予測式を求めることも可能である。

本研究では、SIMCA ソフトウェア (version 15.0.2.5959; Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Sweden) を用いて各多変量解析を行なった。

4. 歯周病診断法開発に向けた代謝物マーカー探索

4.1 固相誘導体化法 (SPAD 法) を用いた前処理法の検討

文献[11]の前処理条件を用いた SPAD 法と、従来用いられてきた前処理法である凍結乾燥法を用いて、標準試料のグリシン、5-アミノ吉草酸、イノシトール 1.0 ppm 水溶液をそれぞれ前処理、分析し、得られた相対ピーク面積値を比較したところ、表 4-1 の結果が得られた。表 4-1 から、糖類のみ SPAD 法で前処理した場合に得られるピーク面積値が凍結乾燥法に対して 4~5 倍小さいということがわかる。そこで、本実験では SPAD 法を用いて試料の前処理をした際の糖類の回収率を高めるために、前処理の条件検討を行った。文献[11]の前処理条件で糖類の回収率が低い原因は、前処理過程において、カラムにうまく吸着できていないためと考えられる。糖類は有機酸などと比べて多くのヒドロキシ基を有し親水性が高いことから、前処理で使用する溶媒の ACN と水の割合に注目し、条件検討を行った。条件 A を文献[11]で用いたサンプル溶液の割合 (水:ACN=2:8)、条件 B をサンプル溶液の割合 (水:ACN=1:9) とした。条件 A, B で標準試料の糖類 (イノシトール、ガラクトース) 1.0 ppm 水溶液をそれぞれ前処理、分析した。また、固相カラムを通さず標準試料を凍結乾燥法で前処理した 1.0 ppm のサンプルをコントロールとして分析した。凍結乾燥法で前処理した標準試料の分析で得られたピーク面積値を 100 とし、それに対する条件 A, B で前処理した標準試料の分析で得られたピーク面積値の比を求め (以下回収率とよぶ)、表 4-2 に示す。

表 4-2 から、条件 A に対して条件 B では糖類の回収率が 3 倍高くなり、サンプル溶液の水:ACN 比と糖類の回収率は関係があることがわかった。これは、上記の通り糖類は多くのヒドロキシ基を有し親水性が高いため、サンプル溶液に含まれる水の割合が多いほど、カラムに保持されず溶出してしまっているためと考えられる。以上のことから、本研究では条件 B によるサンプル前処理を行うこととした。

表 4-1 凍結乾燥法と SPAD 法で前処理した際に得られるピーク面積値比較

化合物名	面積値比率 (%) (SPAD 法[11] / 凍結乾燥法)
グリシン	83.1
5-アミノ吉草酸	64.0
イノシトール	15.9

表 4-2 各分析条件と糖類の回収率

条件	サンプル溶液割合 (水 : ACN)	洗浄溶媒割合 (水 : ACN)	回収率 (%)	
			イノシトール	ガラクトース
A	8:2	10:0	28.9	24.0
B	9:1	10:0	78.0	76.0

4.2 唾液中代謝物の食物摂取の影響と日間・日内変動の評価

唾液中代謝物は様々な要因から変動することが知られている[16][17]. そこで、マーカー探索に先立って食物摂取や日間・日内変動の程度を調べた。

4.2.1 食物摂取の影響の評価

まず、健常者1名の自然・刺激性唾液を午後0時に1回目の採取を行い(この採取を0時間とする)、その後ただちに主成分がフルクトース、スクロースであるグラニュー糖約30gを摂取し、以降0.5, 1.5, 3時間後にサンプル採取した。これにより食物摂取による唾液中代謝物の変動を評価した。まず、フルクトース、スクロース、グルコース、リン酸、グリシンの5種類の成分について、食物摂取後の経過時間と代謝物の検出量の関係を図4-1, 4-2に示す。また、各サンプルで得られた相対ピーク面積値のうち、最大値を最小値で割った比を最大最小比として表4-3に示す。

図4-1, 4-2に示すように、自然唾液、刺激性唾液ともに食物摂取0.5時間後のサンプルにおけるフルクトース、スクロース、グルコースの検出量が顕著に増加し、リン酸、グリシンはほぼ変化が見られなかった。刺激性唾液はガムを咀嚼して耳下腺から分泌された新鮮な唾液ともともと口腔内にある自然唾液の混ざったものを採取している。これらの原因として以下の2つが考えられる。

1. 口腔内にグラニュー糖が残っており(自然唾液由来)、一部は細菌がフルクトースとグルコースに分解した
2. グラニュー糖が消化・吸収され、循環して代謝産物のフルクトースとグルコースとして唾液中に再び含まれたこと

スクロースの分解の反応式を図4-3に示す。原因1は主に自然唾液での増加の原因、原因2は自然・刺激性唾液両方の増加の原因として考えられる。また表4-3に示すように、糖類の最大最小比について、自然唾液の方が13~42倍大きかった。このことと原因1, 2から、摂取後30分の段階では、原因1による増加が顕著に見られたと考えられる。原因1と比べて原因2は、本実験で採取したサンプルに対する影響は小さかったため、摂取後0~30分の間でより顕著に増加した、あるいは摂取後すみやかに消化・吸収され、唾液中に再び含まれる量は少ない、ということが考えられる。少なくとも摂取後1.5時間以降はいずれの代謝物の検出量も摂取前と同レベルまで減少しているため、グラニュー糖のケースでは、摂取後最低1.5時間以上たてば、採取したサンプルに対して代謝物変動は考慮しなくて良いと考えられる。

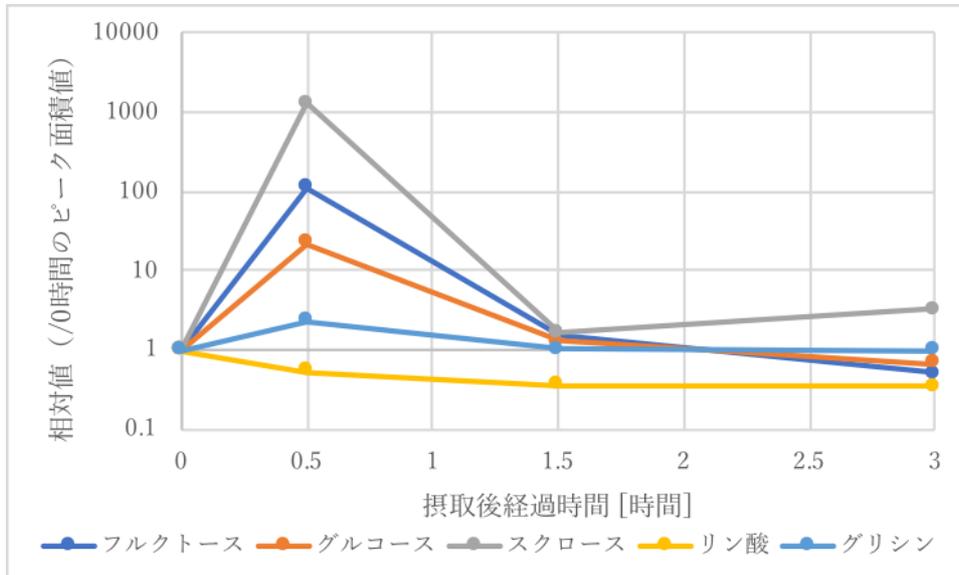


図 4-1 自然唾液中代謝物の変動値と食物摂取後経過時間の関係

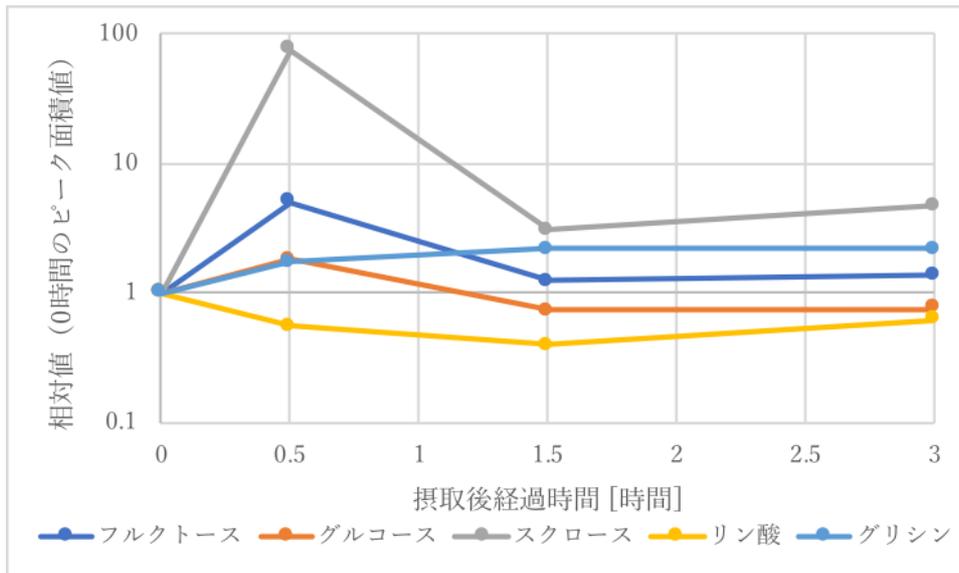


図 4-2 刺激性唾液中代謝物と食物摂取後経過時間の関係

4.2.2 日間・日内変動の評価

4.2.1 項の結果をふまえて、健常者 1 名の自然・刺激性唾液を 3 日間 12 時に採取し、日間変動の評価をした。同様に、1 日の間で 6 時から 18 時まで 3 時間おきに計 5 回採取し、日内変動の評価をした。自然唾液、刺激性唾液でそれぞれ 5 種類の代謝物について、採取日（または採取時間）と代謝物の検出量の関係を図 4-4, 4-5, 4-6, 4-7 に示す。日間変動については 1 日目のデータ、日内変動については 6 時に採取したデータで規格化した。また、各変動値を表 4-4, 4-5 に示す。ただし、上記サンプルは採取前 2 時間以内に食事やブラッシングは行っていない。

自然唾液の日内変動について、図 4-4 から起床時（6 時）採取の唾液のみ検出量が顕著に多い化合物がいくつかあることがわかる。そこで 6 時のデータを除外したところ、フェニルアラニン、GABA、グルコースでは最大最小比は 1.6~6.7 倍小さくなった（表 4-4）。これは、口腔内細菌が産生した代謝物が就寝中に蓄積されたため増加したと考えられる[16] [17]。また、日内変動について 12 時の代謝物の検出量はいずれも低いことがわかった。これは起床後の食事摂取、ブラッシングからの時間経過によるものであると考えられる。表 4-4, 4-5 に示すように、刺激性唾液の場合は自然唾液と比べて代謝物の変動が小さいという傾向が見られた（グルコースのみ異なる）。口腔内に貯留している自然唾液では体内の代謝と口腔内細菌の代謝の 2 つの要因によるが、咀嚼により分泌された刺激性唾液は主に体内の代謝の影響のみ考慮すればよいことがわかる。また図 4-7 から、日内変動についてバリンを除く 4 成分では、9 時で代謝物の検出量が増加し、その前後の 6, 12 時で減少したことがわかる。これは、4.2.1 項で示した変動の原因 2（消化・吸収され、循環して再び唾液中に含まれた）に由来して、朝食で体内に取り込まれた食物の代謝の影響による増減の可能性が考えられる。

以上のことから、本実験で採取した健常者 1 名の場合について、採取時の条件として起床直後には採取をしないことで、変動を抑えることができることがわかった。しかし採取に適した条件を決定するためには、少なくとも複数人の唾液を同じ条件で採取、分析し、同様に変動を評価する必要がある。

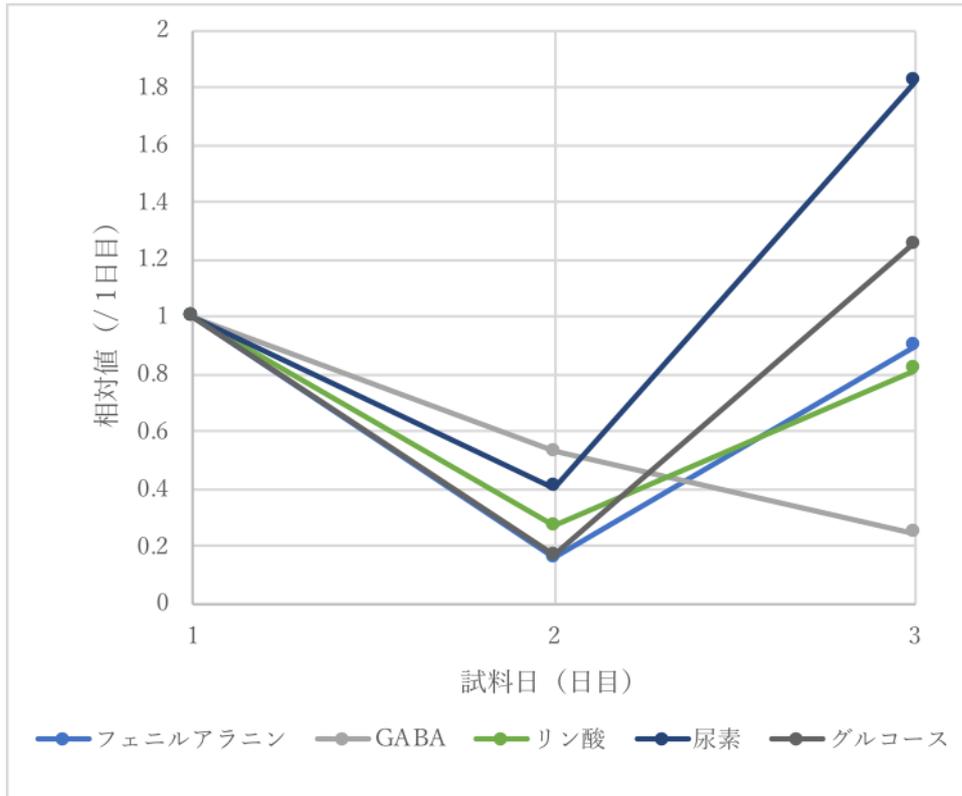


図 4-4 自然唾液中代謝物の日間変動

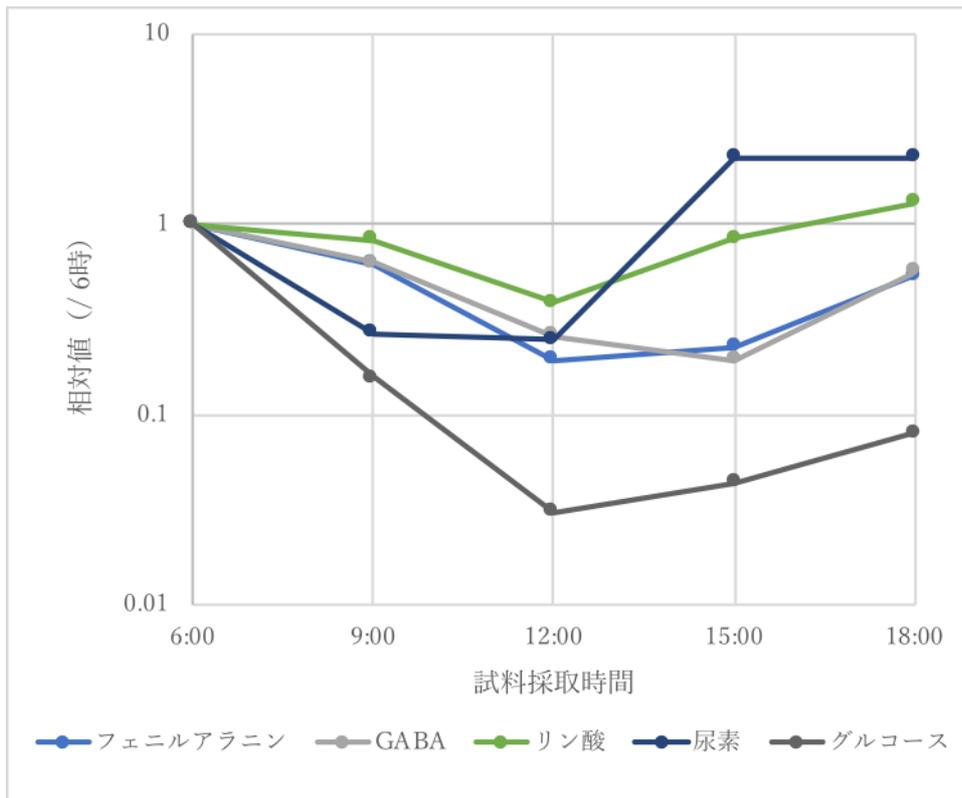


図 4-5 自然唾液中代謝物の日内変動

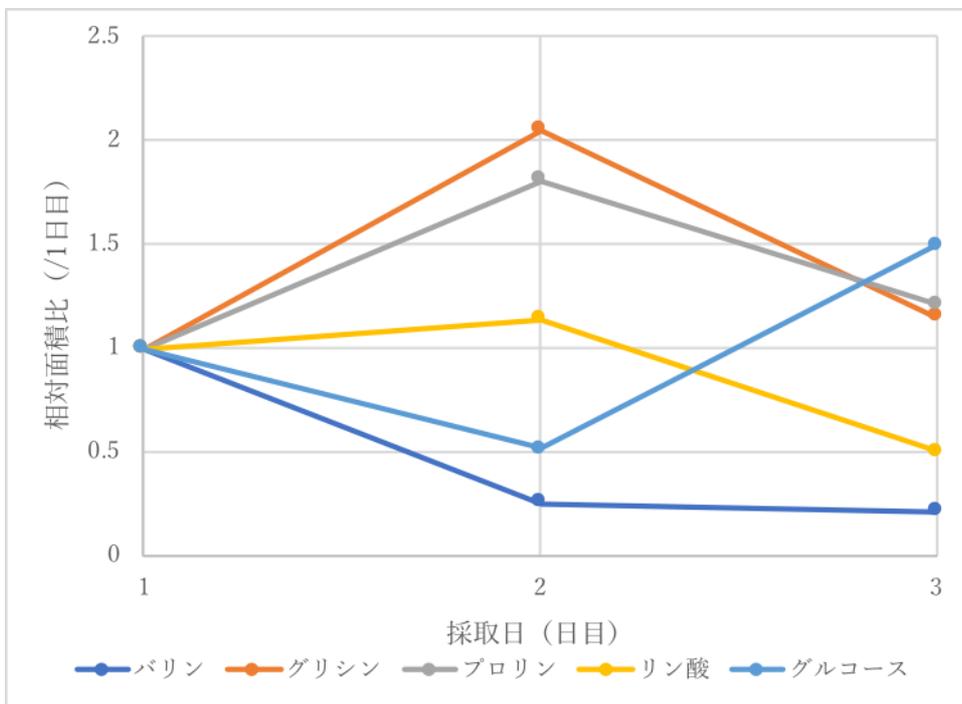


図 4-6 刺激性唾液中代謝物の日間変動

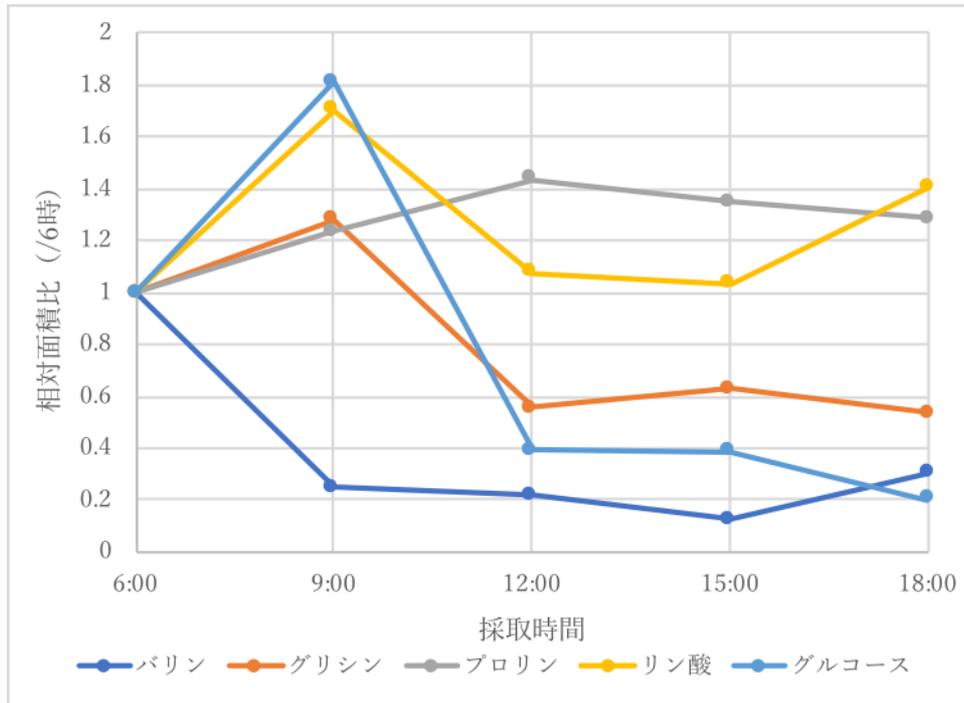


図 4-7 刺激性唾液中代謝物の日内変動

表 4-4 自然唾液中代謝物の日間・日内変動（最大最小比）

	リン酸	尿素	GABA	フェニルアラニン	グルコース
日間	3.5	4.6	4.0	6.1	7.8
日内	2.7	9.3	5.2	5.1	33
日内 (起床時除外)	2.7	9.3	3.3	3.2	4.9

表 4-5 刺激性唾液中代謝物の日間・日内変動（最大最小比）

	リン酸	バリン	プロリン	グリシン	グルコース
日間	2.3	4.7	1.7	2.0	2.9
日内	1.7	8.1	1.4	2.4	9.0
日内 (起床時除外)	1.7	4.6	1.2	1.3	9.0

4.3 GCF 中代謝物の分析

先行研究[11][12]において、GCF 中代謝物のバイオマーカーを複数発見している。GCF は、検体として簡易診断には向かないが、大学病院などで歯一本ごとの状態を調べるために用いることが期待される。そこで本実験では、1. 先行研究の再現として、健常者、歯周病患者の健常部位、罹患部位の3群の間で、先行研究のマーカー候補代謝物19成分の検出量に差があるか調べること、2. 上記の3群について代謝物の検出量から判別ができるか調べることを目的とした。大阪大学歯学部附属病院にて、健常者20名の健常部位から40検体、軽・中等度歯周病患者24名の健常部位から71検体、同じく患者の罹患部位から71検体のGCFをペリオペーパーを用いて採取した。分析した182検体のうち一部の検体のマスプロマトグラム (m/z 73) を図4-8に示す。ここで、 m/z 73のマスプロマトグラムは誘導体化を行った化合物のトリメチルシリル基 (TMS) 由来のフラグメントイオンのスペクトルピークから作成しており、TMS化された代謝物がこのマスプロマトグラム中に検出されている可能性が高い。上記の理由から、以下の4章、5章の実験結果で m/z 73のマスプロマトグラムを用いて比較を行なっている。ここではGCFから検出された68本のピーク(うち45本は同定済み)について相対面積値を求め、まず健常者、患者の健常部位、患者の罹患部位の3群に分けて有意差検定を行った。3群の検定で有意差P値が0.05以下を示した代謝物を表4-6に示し、その中の2群ごとの有意差検定の計算結果についても示す。D・L体の2つのピーク(※1と表す)、あるいは一種類の代謝物に対して異なる数のTMS基がついた2つ以上のピーク(※2と表す)が検出された代謝物については、全てのピーク面積値を合算して一種類の代謝物としてP値を求めた。また、有意差検定のプログラムでは、群の中から自動的に外れ値を除外して検定を行なっている。表4-6に示した代謝物の相対ピーク面積値を用いてOPLS判別分析を行ったスコアプロットを図4-9、ローディングプロットを図4-10に示す。図4-9について、横軸が第一主成分軸(PC1)、縦軸が第二主成分軸(PC2)、各プロットの色については青が健常者、緑が歯周病患者の健常部位、赤が歯周病患者の罹患部位である。図4-9中の青線は健常者と歯周病患者(健常部位、罹患部位)を判別する境界線である。図4-10について、横軸がPC1、縦軸がPC2、色分けは緑が代謝物、青が検体の種類((1); 健常者, (2); 患者軽度部位, (3); 患者罹患部位)を示している。

表4-6について、先行研究で発見されたバイオマーカー候補代謝物19成分(同定済みのみ)と一致している代謝物を赤文字で示した。プロピルアミン、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、リシン、ステアリン酸を除く13成分は一致した。先行研究で採取した被験者は重症度が高く、実験結果から代謝物の検出量も健常者と比べて非常に大きい[11][12]。一方本研究で採取した被験者

は軽・中等度歯周病のため、被験者の条件が異なることから検出量に有意差が見られなかったのではないかと考えられる。しかし半分以上の成分については異なるサンプルでも同様に有意差が見られたことから、先行研究を大まかに再現できたといえる。

図 4-9 について、境界線として線 A を引くと、健常者と歯周病患者（健常部位、罹患部位）を判別することはできたが、歯周病患者の健常部位、罹患部位ははっきりと判別することができなかった。このことから、健常者と歯周病患者の健常部位では見た目は同じでも代謝物を分析すると違いが見られることがわかった。これは、健常者と歯周病患者の口腔内に異なる種類の細菌が存在することが原因として考えられる。また、患者の健常部位と罹患部位では判別できない場合があり、見た目は健常であっても、代謝物を分析すると罹患部位と同じレベルの検出量である場合があることがわかった。

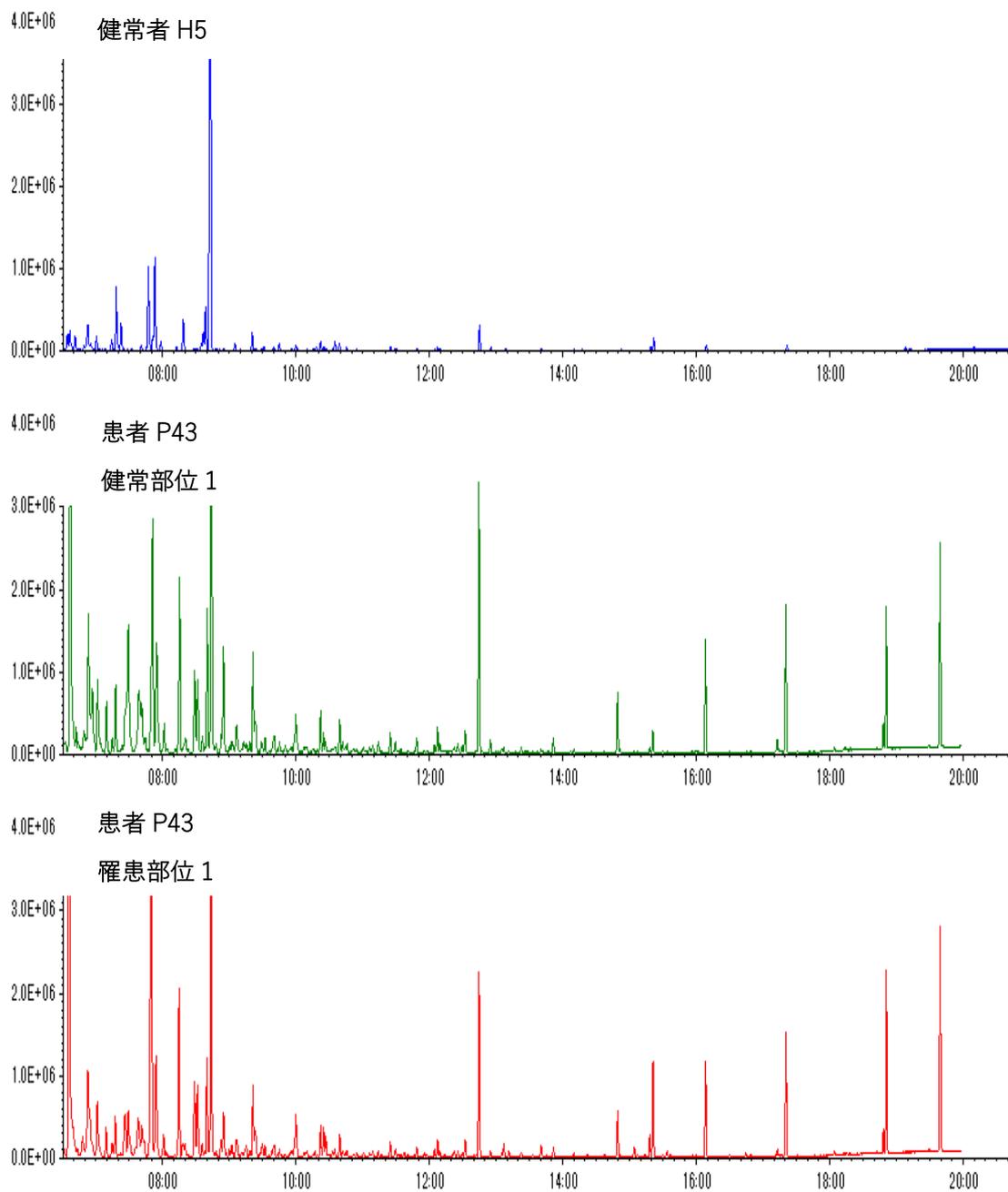


図 4-8 健常者，患者の健常部位，罹患部位から採取した歯肉溝浸出液のマスキロマトグラム
(m/z 73)

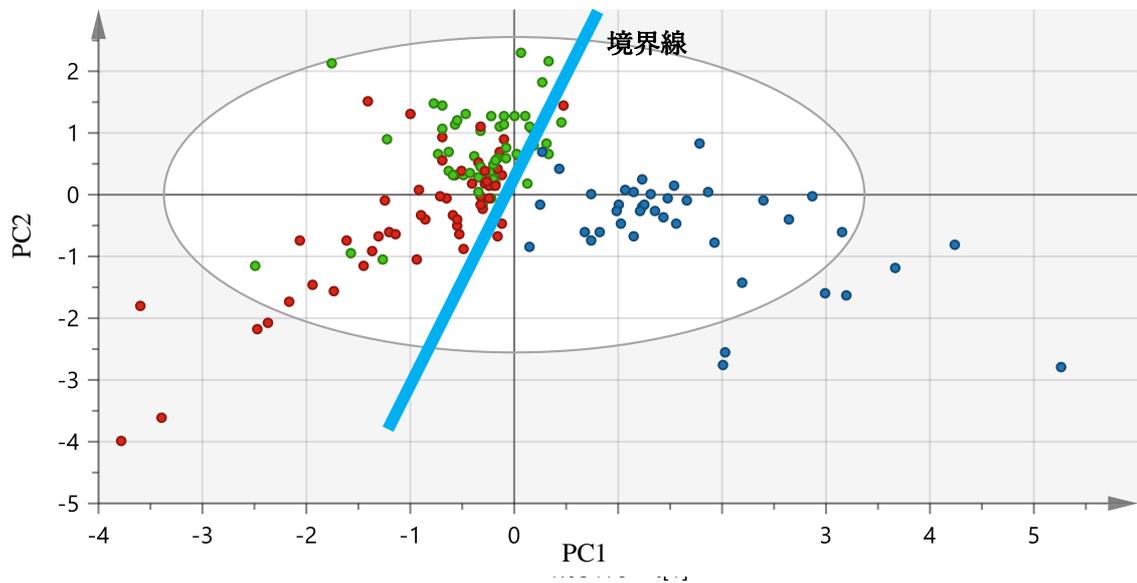


図 4-9 健常者，患者の健常部位，罹患部位の OPLS-DA (スコアプロット)
 青) 健常者，緑) 患者健常部位，赤) 患者罹患部位

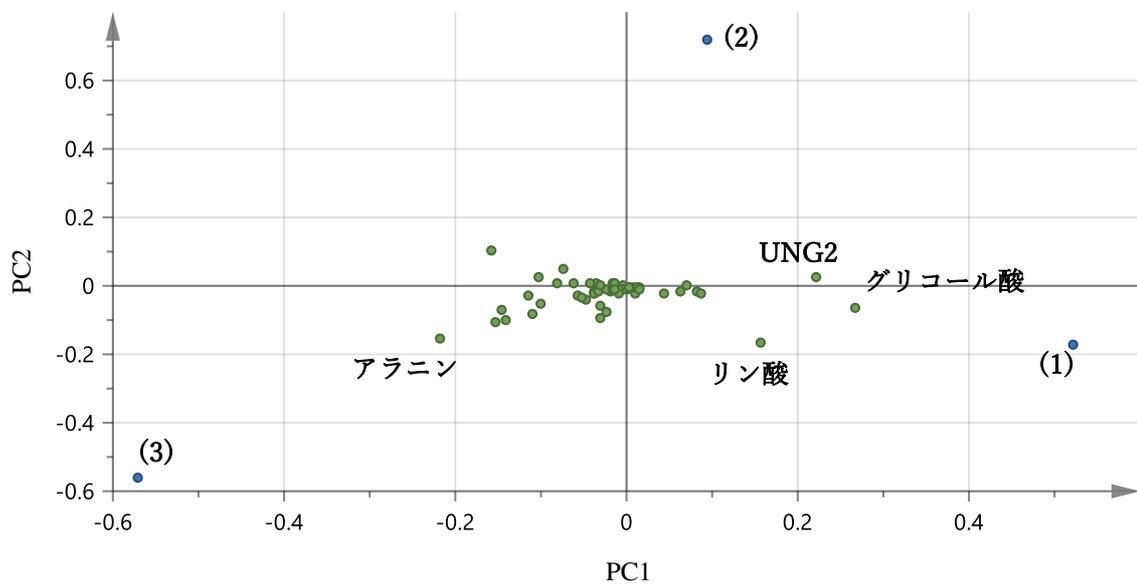


図 4-10 健常者，患者の健常部位，罹患部位の OPLS-DA (ローディングプロット)
 緑) 代謝物，青) 検体の種類 ((1)；健常者，(2)；患者健常部位，(3)；患者罹患部位)

表 4-6 GCF 分析結果

健常者, 患者の健常部位, 罹患部位間で有意差がある代謝物と各 2 群間の P 値 (P<0.05)

化合物名	健常者群	健常者群	患者健常部位群
	対	対	対
	患者健常部位群	患者罹患部位群	患者罹患部位群
グリコール酸	2.20E-06	1.01E-05	1.00E+00
アラニン	3.90E-05	4.00E-09	4.90E-03
プロリン※2	1.10E-07	1.70E-08	1.00E+00
バリン	1.50E-02	1.30E-05	4.70E-02
尿素	1.40E-09	1.70E-08	9.10E-01
安息香酸	3.70E-02	2.50E-02	1.00E+00
エタノールアミン	3.63E-05	4.60E-08	1.29E-08
リン酸	3.37E-05	4.50E-02	1.21E-01
ロイシン	3.33E-01	2.40E-02	5.01E-01
フマル酸	3.70E-03	5.30E-05	6.60E-01
グリシン	8.70E-01	5.30E-05	1.80E-03
メチルコハク酸	6.10E-03	2.06E-01	7.56E-01
セリン	5.10E-02	2.00E-03	1.00E+00
トレオニン	1.80E-02	8.07E-01	1.00E+00
ヒドロキシ桂皮酸	8.80E-03	1.00E+00	3.60E-02
アミノマロン酸	1.20E-04	1.74E-03	8.22E-01
メチオニン	3.70E-13	2.60E-12	1.00E+00
ピログルタミン酸	1.11E-01	1.00E+00	8.10E-02
γ-アミノ酪酸	4.50E-02	7.70E-05	5.20E-02
フェニルアラニン※2	1.00E+00	2.50E-02	7.00E-03
グルタミン酸	5.70E-11	4.30E-10	1.00E+00
5-アミノ吉草酸	4.35E-01	7.00E-06	4.70E-04
リボース	2.00E-04	1.00E+00	5.10E-04
タウリン	5.20E-03	4.30E-03	1.00E+00
キシリトール	1.46E-01	1.30E-02	6.36E-01
ラムノース	2.60E-04	2.80E-05	1.00E+00

ブトレシン	1.00E+00	1.60E-04	5.00E-04
カダベリン	5.67E-02	5.22E-03	2.60E-04
フルクトース※1	2.90E-02	4.41E-01	6.36E-01
グルコース	3.00E-02	2.60E-06	9.80E-02
チロシン※2	2.00E-03	5.60E-07	8.20E-02
ガラクトース	3.54E-01	6.69E-01	1.90E-02
マンニトール	2.16E-02	1.90E-03	5.91E-01
ソルビトール	1.15E-02	8.50E-04	5.25E-01
N-アセチルグルコサミン	4.10E-06	9.30E-04	1.07E-01
イノシトール	1.00E+00	1.86E-01	2.80E-02
スクロース	2.40E-06	5.25E-05	1.00E+00
ラクトース	1.40E-04	8.00E-04	1.00E+00
トレハロース	1.50E-02	1.20E-01	1.00E+00
UNG1	3.51E-02	1.20E-01	1.00E+00
UNG2	3.51E-02	3.30E-03	1.00E+00
UNG5	2.40E-02	1.70E-02	1.00E+00
UNG7	1.70E-08	5.80E-08	2.50E-02
UNG8	3.50E-02	2.50E-02	1.00E+00
UNG11	3.20E-02	2.20E-02	1.00E+00
UNG12	8.00E-03	3.40E-08	2.20E-03
UNG14	2.90E-01	8.20E-03	2.00E-01
UNG15	3.20E-03	1.12E-02	1.00E+00
UNG16	1.60E-04	2.29E-03	1.00E+00
UNG20	7.41E-05	2.90E-06	1.00E+00

注. UNG1~23：ピークの同定ができていない化合物。スペクトルは巻末参照。

先行研究で発見されたバイオマーカー候補 19 成分と一致している代謝物を赤文字で示した。ただし、以下の代謝物についてはピーク面積値を合算して一つの代謝物として P 値を求めた。

※1；D・L 体の 2 つのピークが検出された代謝物

※2；一種類の代謝物に対して異なる数の TMS 基がついた 2 つ以上のピークが検出された代謝物

4.4. プラーク中代謝物の分析

4.4.1 プラーク中代謝物分析の抽出条件の検討

プラーク中代謝物を分析する際、前処理操作を行う前にペーパーポイントから代謝物を抽出する必要がある。ここでは、超音波によるプラーク中の細菌破碎、抽出条件の検討を行った。

超音波発生機にサンプルチューブを入れて抽出時間 0, 5, 10, 15, 20, 60 分間と条件を変えて抽出した。ただし、プラーク P44-2 では抽出時間 60 分、プラーク P7-7 では抽出時間 20 分は測定していない。試料中での酵素的・化学的分解を防ぐため、氷水下で抽出した。ターゲット化合物 26 成分（表 4-7）の相対ピーク面積値の総和と抽出時間の関係を図 4-11 に示した。

図 4-11 から、P44-2 では抽出時間 15 分、P7-7 では抽出時間 10 分で最も高いピーク面積値が得られることがわかった。10, 15 分で得られた相対ピーク面積値の差は、プラーク中に含まれる細菌量の違い、抽出効率、分析のばらつきが原因として考えられる。ただし、ばらつきの程度について詳細の検討は行っていない。また、P44-2 の抽出時間 20 分、P7-7 の抽出時間 60 分で、10~15 分と比べて検出量が小さいことから、抽出時間を長くすることで代謝物が分解してしまっていることが考えられる。したがって、超音波抽出 10 分で代謝物の抽出を行うこととする。ここで、0 分ですでに代謝物が抽出されている理由として、最初に加えた ACN 中である程度の代謝物が抽出されているためと考えられる。

注) 「P44-2」；患者 44 番の採取部位 2，ということを示している。

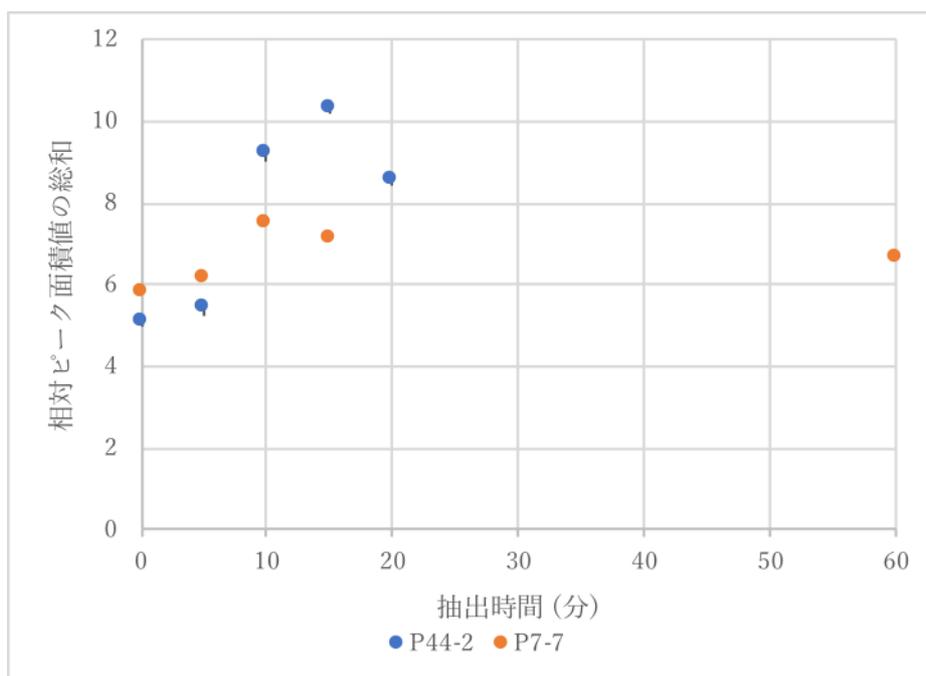


図 4-11 各抽出時間と得られた相対ピーク面積値の総和の関係

表 4-7 ターゲットとしたプラーク中代謝物

有機酸	安息香酸, リン酸, ヒドロキシ桂皮酸, 5-アミノ吉草酸, フマル酸, コハク酸, メチルコハク酸, リンゴ酸
アミノ酸	バリン, アスパラギン酸, セリン, グリシン, GABA, トレオニン, チロシン, ロイシン, イソロイシン, プロリン
アミン	プロピルアミン, 尿素, プトレシン
糖	リボース, ガラクトース, イノシトール

4.4.2 歯周病患者のプラーク中代謝物分析

プラークは、GCF 同様に歯一本ごとの状態を調べるために用いることが期待される。そこで、患者の健常部位、罹患部位間で代謝物の検出量に有意差があるか調べた。大阪大学歯学部附属病院にて、軽・中等度歯周病患者 24 名の健常部位から 71 検体、同じく患者の罹患部位から 71 検体のプラークを採取した。ここで一人当たりの採取箇所数が 4~8 箇所と人によって異なるため、個人差による影響を考慮して、各被験者の健常部位、罹患部位 1 検体ずつ分析した（計 48 検体）。48 検体のうち一部の検体のマスプロトグラム (m/z 73) を図 4-12 に示す。ここではプラークから検出された 56 本のピーク（うち 42 本は同定済み）について、各ピークの相対面積値を求め、データ解析に使用した。患者の健常部位、患者の罹患部位の 2 群に分けて有意差検定を行い、有意差 P 値が 0.05 以下を示した代謝物を表 4-8 に示す。ただし、D・L 体の両方、あるいは一種類の代謝物に対して異なる TMS 官能基のピークが検出されたことから、同じ代謝物ピークが 2 本以上検出された成分については、各ピークの面積値を合算して一種類の代謝物として P 値を求めた。

患者の健常・罹患部位間で検出量に有意差が見られた代謝物は 9 成分あった。同一被験者であっても、健常部位と罹患部位では棲息する細菌数や細菌種が異なることから、これらの 9 成分は歯周病と関連のある細菌由来であることが考えられる。4.6 節にてこの結果と GCF や自然・刺激性唾液の分析結果と比較を行う。

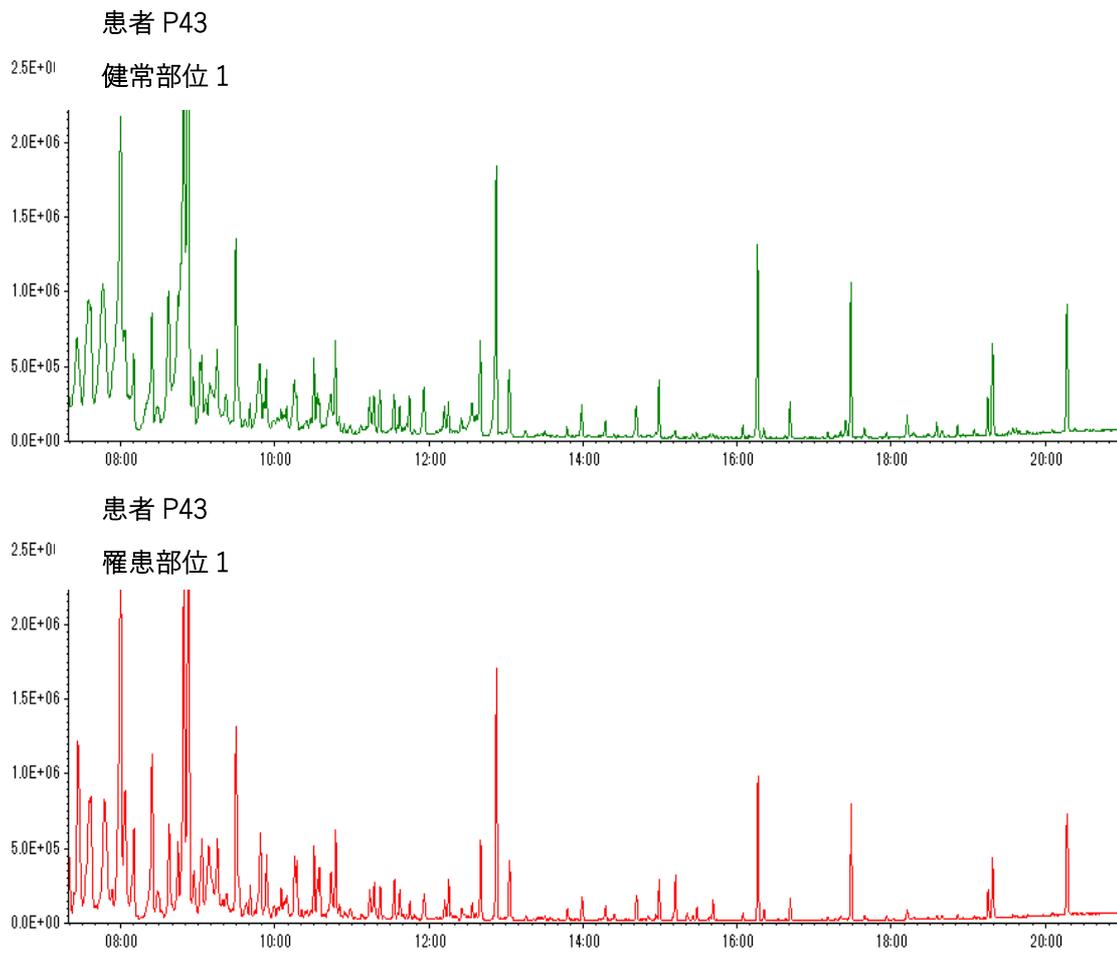


図 4-12 患者の健常部位，罹患部位から採取したプラークのマスクロマトグラム (m/z 73)

表 4-8 プラーク分析結果

患者の健常部位, 罹患部位間で有意差がある代謝物と 2 群間の P 値 (P<0.05)

化合物名	P 値
バリリン	4.87E-02
エタノールアミン	2.87E-02
グリシン	4.37E-02
5-アミノ吉草酸	3.37E-02
リボース	1.06E-02
グルコース	3.06E-05
チロシン	1.91E-07
ガラクトース※1	1.83E-02
イノシトール	7.71E-03

ただし, 以下の代謝物についてはピーク面積値を合算して一つの代謝物として P 値を求めた.

※1; D・L 体の 2 つのピークが検出された代謝物

※2; 一種類の代謝物に対して異なる数の TMS 基がついた 2 つ以上のピークが検出された代謝物

4.5 唾液中代謝物分析による歯周病バイオマーカー探索

唾液中の成分は口腔内の状態を反映しており、歯周病態など様々な情報を非侵襲的に取得できるために有用であると考えられる。そこで、歯周病診断法開発に向けて、唾液中の代謝物を用いて歯周病罹患の有無を判別できるか調べた。大阪大学歯学部附属病院にて、健常者 20 名、軽・中度歯周病患者 24 名から自然唾液、刺激性唾液を採取し、代謝物を分析した。自然唾液は、口腔内に存在する細菌の代謝、歯肉溝浸出液中の成分などを含み、細菌由来の代謝を主に反映していると考えられ、刺激性唾液はガムの咀嚼により分泌した新鮮な唾液を採取しており、口腔内の細菌由来の代謝物は希釈され、リンパ液など血液由来の代謝物を主に反映していると考えられる。以下にそれぞれの実験結果を示す。

4.5.1 自然唾液中代謝物分析による歯周病バイオマーカー探索

健常者 20 名、軽・中等度歯周病患者 24 名の自然唾液を分析し、44 検体のうち一部の検体のマスクロマトグラム (m/z 73) を図 4-13 に示す。各クロマトグラムについて、いくつかのピークで明らかな強度の違いが見られた。自然唾液から検出された計 154 個のピーク（うち 75 個は同定済み）について相対面積値を求め、データ解析に使用した。まず、健常者と歯周病患者の 2 群に分けて有意差検定を行い、有意差 P 値が 0.05 以下を示した代謝物を表 4-9 に示す。ただし、D・L 体の両方、あるいは一種類の代謝物に対して異なる数の TMS 基が誘導体化された化合物のピークが検出されたことから、そういった同じ代謝物由来のピークが 2 本以上検出された成分については、各ピークの面積値を合算して一種類の代謝物として P 値を求めた。また、表 4-9 に示した代謝物の相対ピーク面積値を用いた OPLS 判別分析の結果として、スコアプロット、ローディングプロット、PISA 値の予測式を図 4-14、4-15、4-16 に示す。図 4-14 において、横軸が PC1、縦軸が PC2、色分けは緑が健常者、青が軽・中等度歯周病患者である。図 4-14 中の青線は健常者と歯周病患者を判別する境界線である。図 4-15 において、横軸が PC1、縦軸が PC2 で、色分けは緑が代謝物、青が歯周病罹患の有無（(1)；なし、(2)；あり）を示している。なお青線は健常者と歯周病患者（健常部位、罹患部位）を判別する境界線である。図 4-16 は横軸が PISA の予測値、縦軸が実際に測定した各患者の PISA の実測値で、色分けは PISA 値の段階で分けており、青が 0~200、緑が 200~500、黄が 500~1000、赤が 1000 以上を示している。なお、予測モデル中の直線は、(PISA 実測値 : PISA 予測値 = 1:1) を表す。

図 4-14 に示すように、境界線の左右で健常者と歯周病患者を判別することができた。図 4-15 から、グリシン、5-アミノ吉草酸の検出量が多い方が患者側に寄与、乳酸、尿素、UNN1（ピー

クの同定ができていないため番号を付した)の検出量が多い方が健常者側に寄与し、PC2ではUNN1の値が大きく寄与していることがわかる。また図4-16のPISA値の予測式について、実際の臨床データとしての値と、代謝物の分析結果から算出した予測値は比較的相関していた(相関係数 $r = 0.78$)。自然唾液は口腔内に貯留している検体を採取しているため、口腔内に存在する細菌の種類や量、炎症などの状態をよく反映していると考えられ、代謝物から歯周病の炎症の面積値を示すPISA値の予測ができたと考えられる[18]。以上から、今回の分析では、軽・中等度の歯周病患者が対象であったが、自然唾液中代謝物分析による歯周病罹患の有無を判別できることがわかった。これは、ごく初期の患者であっても歯周病の発症を代謝物から判別できるということであり、歯周病診断にとって重要な結果である。

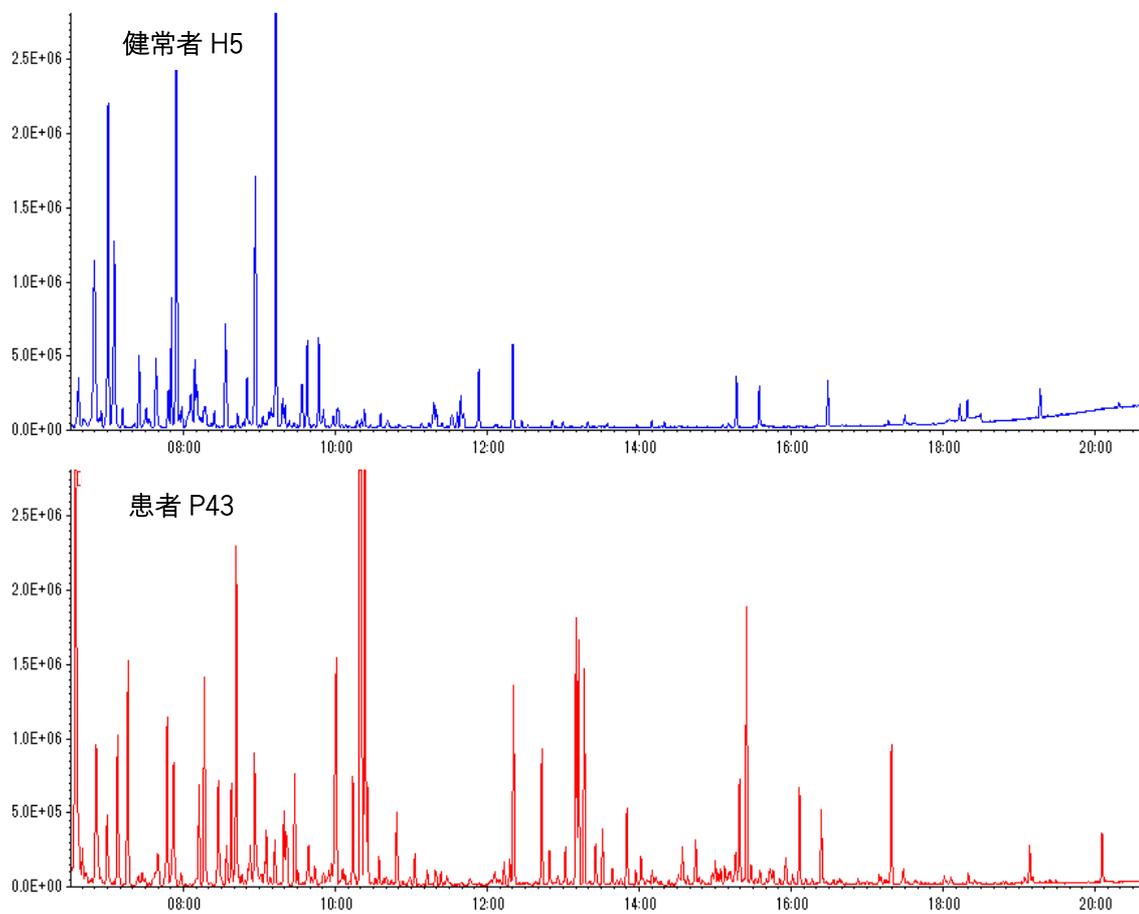


図 4-13 健常者、患者から採取した自然唾液のマスクロマトグラム(m/z 73)

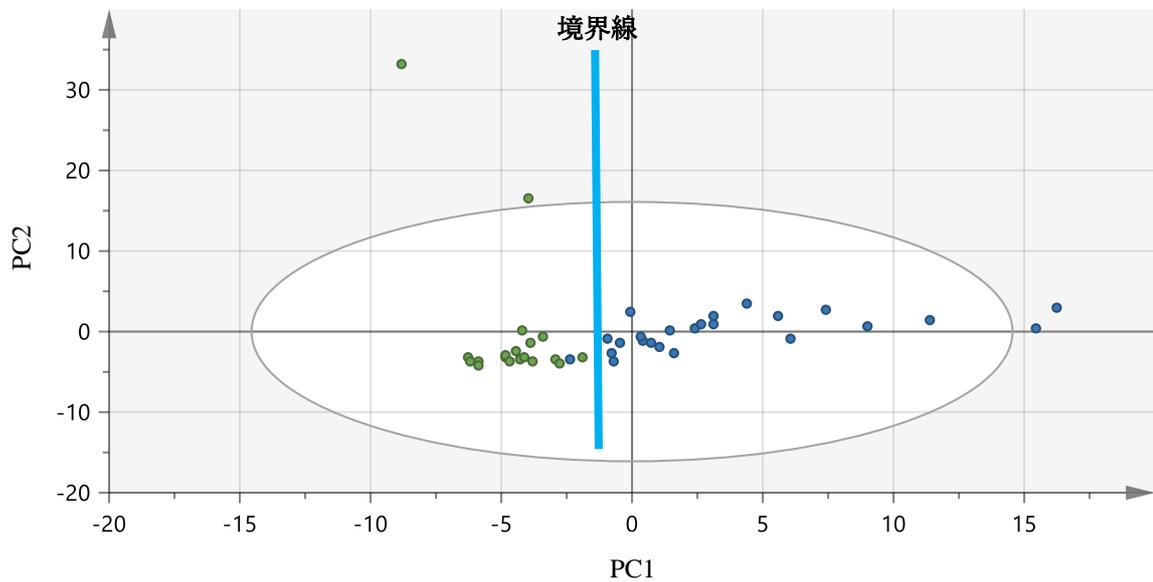


図 4-14 健常者，歯周病患者の自然唾液中代謝物の OPLS-DA（スコアプロット）
 緑）健常者，青）歯周病患者

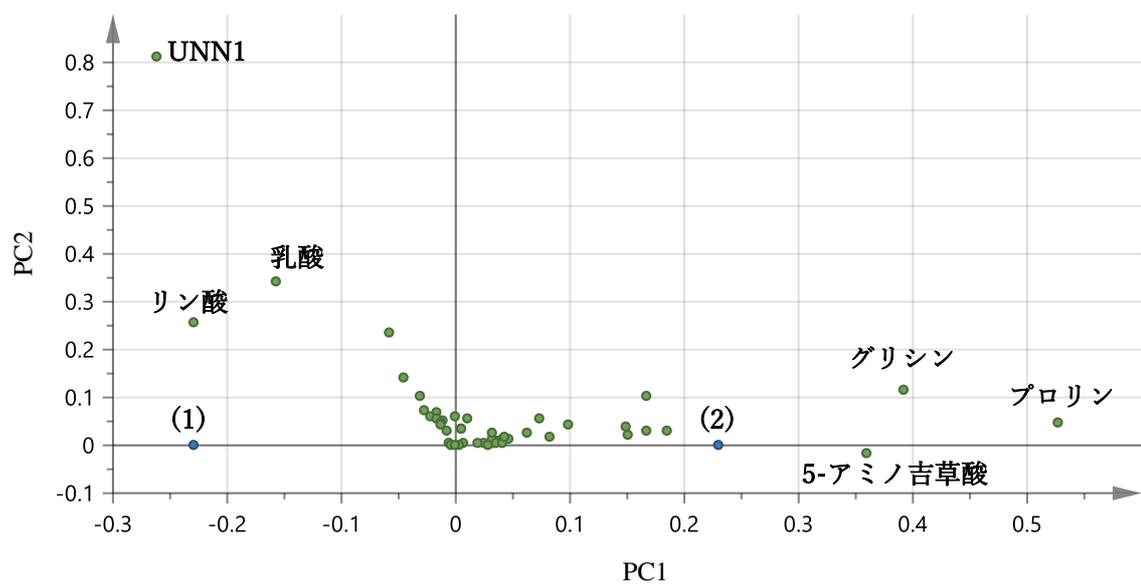


図 4-15 健常者，歯周病患者の自然唾液中代謝物の OPLS-DA（ローディングプロット）
 緑）代謝物，青）歯周病罹患の有無（(1)；健常者，(2)；歯周病患者）

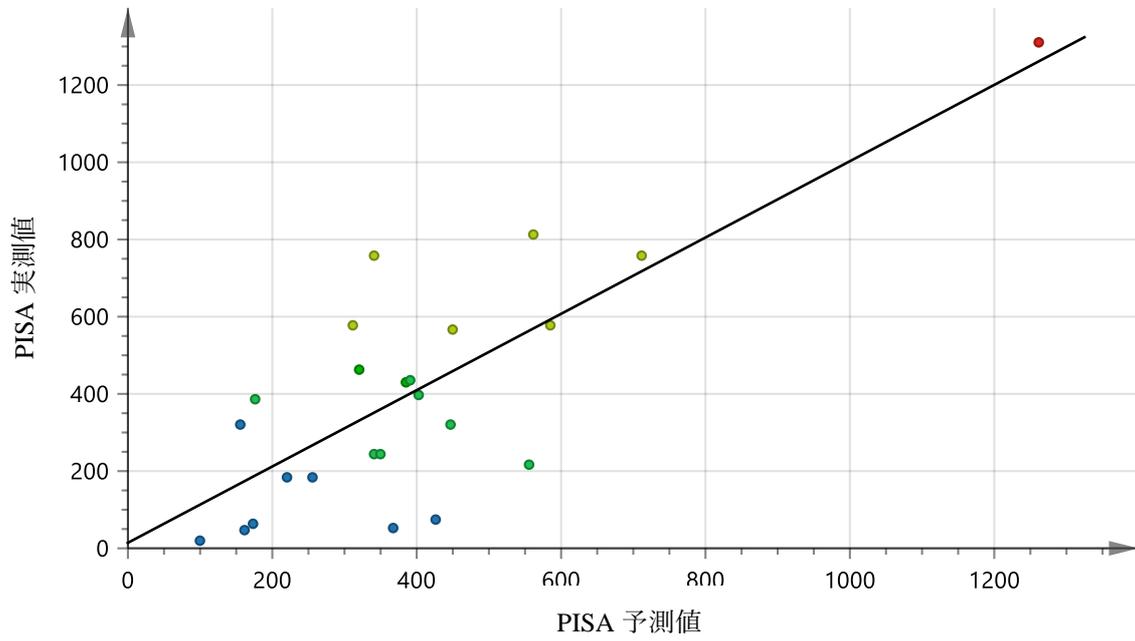


図 4-16 自然唾液中代謝物による PISA 予測式

それぞれ PISA 値で、青) 0~200, 緑) 200~500, 黄) 500~1000, 赤) 1000 以上

表 4-9 自然唾液分析結果

健常者，患者間で有意差がある代謝物と 2 群間の P 値 (P<0.05)

化合物名	P 値
乳酸	1.44E-08
グリコール酸	1.79E-03
アラニン	3.00E-11
プロリン※2	1.12E-10
バリン	1.30E-07
尿素	2.50E-12
セリン※2	2.42E-10
エタノールアミン	7.50E-04
リン酸	5.68E-08
ロイシン	2.91E-08
イソロイシン	3.03E-09
グリシン	5.68E-08
トレオニン※2	3.78E-05
アスパラギン酸※2	8.75E-09
アミノマロン酸	7.07E-06
リンゴ酸	5.04E-07
メチオニン	4.90E-05
ピログルタミン酸	6.78E-09
γ-アミノ酪酸	2.38E-07
フェニルアラニン※2	5.22E-06
グルタミン酸	5.52E-03
5-アミノ吉草酸	1.71E-02
キシロース	2.33E-03
リボース	2.50E-12
タウリン	2.91E-04
アラビトール	5.98E-03
ラムノース	6.48E-03
フコース	5.52E-03

オロト酸	8.20E-06
ヒポキサンチン	2.91E-08
グリシルグリシン	1.22E-06
ガラクトース※1	3.78E-02
グルコース※1	1.93E-05
チロシン※2	1.44E-08
ソルビトール	3.56E-02
キサンチン	2.02E-06
N-アセチルグルコサミン※1	1.31E-07
尿酸	4.68E-03
トレハロース	2.47E-08
グアノシン	9.49E-06
マルチトール	3.03E-09
イソマルトース	3.78E-05
UNN1	2.33E-04
UNN2	2.50E-12
UNN8	7.50E-04
UNN9	2.61E-08
UNN22	1.11E-03
UNN27	4.75E-11
UNN46	2.60E-04
UNN57	1.03E-02
UNN65	5.52E-04
UNN66	4.48E-04
UNN75	6.76E-06

注. UNN1~75：ピークの同定ができていない化合物. スペクトルは巻末参照.

ただし, 以下の代謝物についてはピーク面積値を合算して一つの代謝物としてP値を求めた.

※1；D・L体の2つのピークが検出された代謝物

※2；一種類の代謝物に対して異なる数のTMS基がついた2つ以上のピークが検出された代謝物

4.5.2 刺激性唾液中毒代謝物分析によるバイオマーカー探索

刺激性唾液は、ガムの咀嚼により唾液腺から分泌された新鮮な唾液を採取しており、自然唾液と異なり口腔内の細菌の代謝物は希釈され、リンパ液など血液由来の代謝物を反映していると考えられる。自然唾液とは異なる由来を含む刺激性唾液中の代謝物を用いて、歯周病罹患の有無を判別できるか調べた。健常者 20 名、軽・中等度歯周病患者 24 名の刺激性唾液を分析し、44 検体のうち一部の検体のマスプロマトグラム (m/z 73) を図 4-17 に示す。刺激性唾液から検出された 114 個のピーク (うち 72 個は同定済み) について相対面積値を求め、データ解析に使用した。健常者と歯周病患者の 2 群に分けて有意差検定を行い、有意差 P 値が 0.05 以下を示した代謝物を表 4-10 に示す。ただし、D・L 体の両方、あるいは一種類の代謝物に対して異なる数の TMS 基が誘導体化された化合物のピークが検出されたことから、そういった代謝物由来のピークが 2 本以上検出された成分については、各ピークの面積値を合算して一種類の代謝物として P 値を求めた。また、表 4-10 に示した代謝物の相対ピーク面積値を用いた OPLS 判別分析結果として、スコアプロット、ローディングプロット、PISA 値の予測式を図 4-18, 4-19, 4-20 に示す。図 4-18 において、横軸が PC1、縦軸が PC2、色分けは緑が健常者、青が軽・中等度歯周病患者である。図 4-19 において、横軸が PC1、縦軸が PC2 で、色分けは緑が代謝物、青が歯周病罹患の有無 ((1); なし, (2); あり) を示している。図 4-18 中の青線は健常者と歯周病患者を判別する境界線である。図 4-20 は横軸が PISA 予測値、縦軸が実際に測定した各患者の PISA 実測値で、色分けは PISA 値の段階で分けており、青が 0~200、緑が 200~500、黄が 500~1000、赤が 1000 以上を示している。図 4-20 中の直線は、(PISA 実測値 : PISA 予測値 = 1:1) を表す。

図 4-18 に示すように、境界線の左右で健常者と歯周病患者をほぼ判別することができた。図 4-19 から、PC1 ではプロリン、グリシン、プロピルアミンの検出量が多い方が患者側に寄与、乳酸、グリコール酸、尿素、リン酸の検出量が多い方が健常者側に大きく寄与しており、PC2 では乳酸の値が大きく寄与していたことがわかる。図 4-20 の PISA 値の予測式で低い PISA 値の患者 (青色)、高い PISA 値の患者 (赤色) は直線から大きく外れていることがわかる。なお、相関係数は $r = 0.62$ である。このことから、自然唾液と比べて、刺激性唾液中代謝物と PISA 値の相関関係が見られる代謝物は少ないと考えられる。刺激性唾液は、ガムの咀嚼により唾液腺から分泌された新鮮な唾液を採取しており、自然唾液と異なり口腔内の細菌の代謝物は希釈され、リンパ液など血液由来の代謝物をより反映していると考えられる。歯周病の炎症の面積値を示す PISA 値との相関は自然唾液と比べて低くなったと考えられる。以上から、刺激性唾液中

代謝物分析から自然唾液と同様に健常者と軽・中等度の歯周病患者を判別できることがわかった。

また、自然唾液、刺激性唾液の結果を照らし合わせると、ともに健常者の検体で乳酸、尿素の値が多く検出されているという点で共通しており、有意差を示す代謝物も共通しているものが複数成分あった。しかし図 4-16, 4-20 の PISA 値の予測式では異なる結果を得たことから、自然唾液と刺激性唾液では代謝物の生成由来について異なる点が多いと考えられ、得られた結果が反映している情報も異なると考えられる。したがって、今後の研究においても自然唾液、刺激性唾液の両検体の分析結果を注意して解析していく必要がある。

図 4-17 の灰色箇所を示すように、キシリトール、ソルビトールは他のピークと比べて検出量が 10~1000 倍大きく、サチュレーション（飽和）していることがわかる。これは全ての刺激性唾液検体から同様に顕著に検出された。キシリトールとソルビトールは市販のガムに含まれる甘味料として知られているため、4.5.3 項で、採取用ガムからキシリトール、ソルビトールが検出されるか調べる。

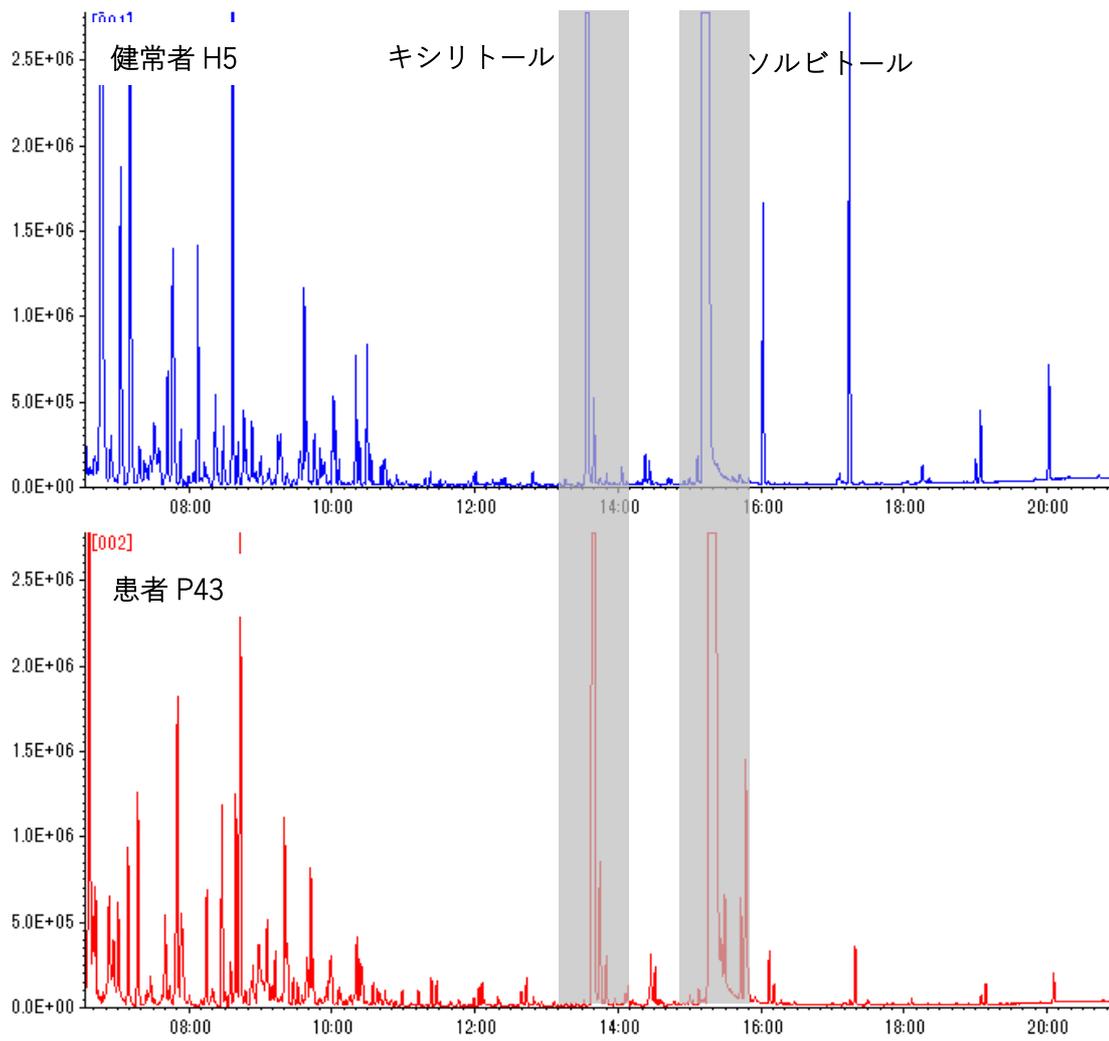


図 4-17 健常者，患者から採取した刺激性唾液のマスプロマトグラム(m/z 73)の比較

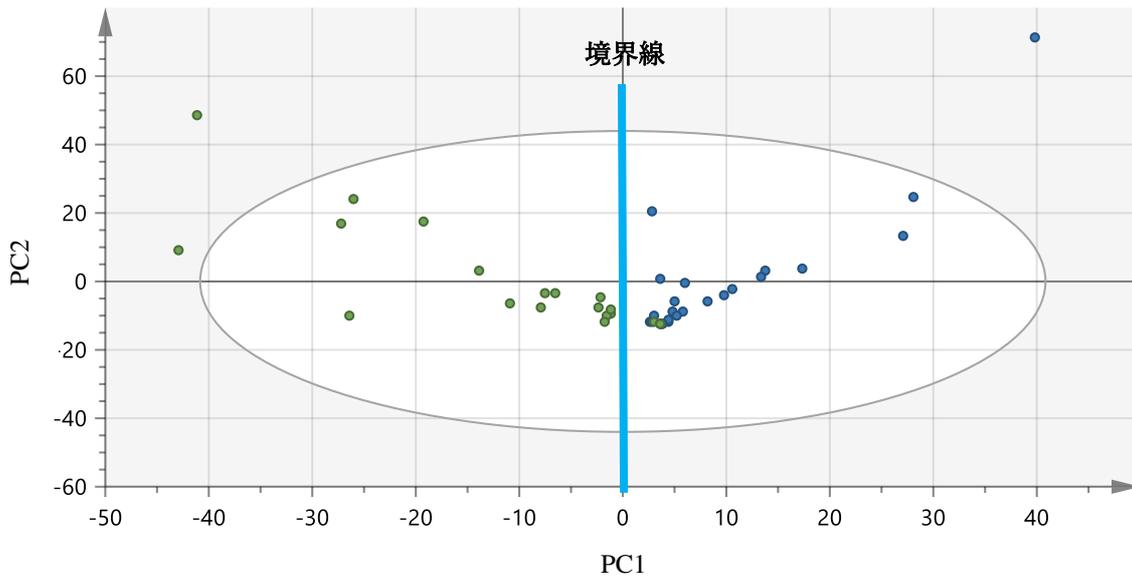


図 4-18 健常者，歯周病患者の刺激性唾液中代謝物の OPLS-DA（スコアプロット）
 緑）健常者，青）歯周病患者

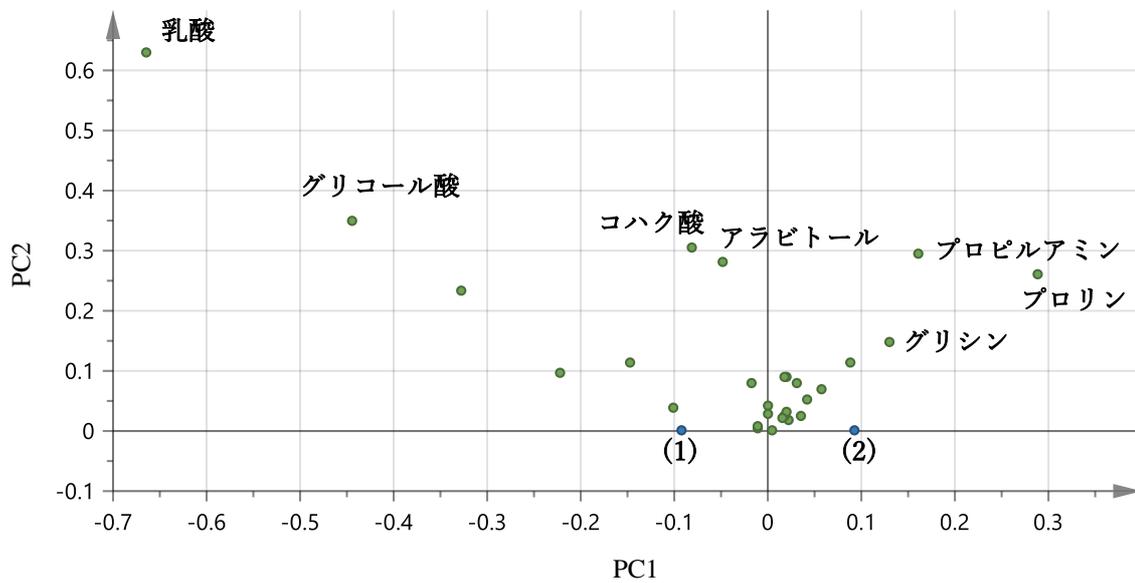


図 4-19 健常者，歯周病患者の刺激性唾液中代謝物の OPLS-DA（ローディングプロット）
 緑）代謝物，青）歯周病罹患の有無（(1)；健常者，(2)；歯周病患者）

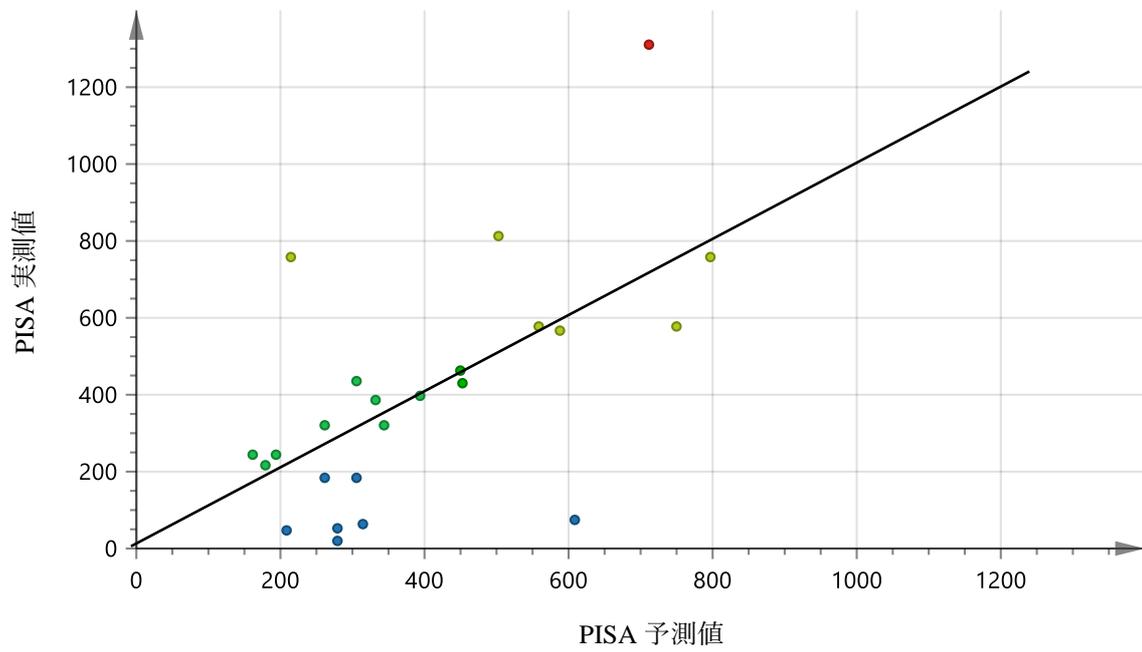


図 4-20 刺激性唾液代謝物による PISA 予測式

それぞれ PISA 値で、青) 0~200, 緑) 200~500, 黄) 500~1000, 赤) 1000 以上

表 4-10 刺激性唾液分析結果

健常者, 患者間で有意差がある代謝物と 2 群間の P 値 (P<0.05)

化合物名	P 値
プロピルアミン	2.24E-04
乳酸	4.65E-04
グリコール酸	1.59E-05
プロリン※2	2.59E-08
尿素	4.81E-03
安息香酸	3.92E-05
リン酸	7.09E-03
イソロイシン	2.18E-02
トレオニン※2	2.01E-04
マレイン酸	1.36E-02
グリシン	1.92E-02
コハク酸	1.36E-02
メチルコハク酸	3.90E-04
メチオニン※2	1.80E-04
2-アミノマロン酸	2.18E-02
フェニルアラニン※2	1.34E-06
キシロース	1.59E-07
リボース	2.75E-02
アラビトール	1.92E-02
グルタミン	2.49E-05
フルクトース※1	2.05E-02
キサンチン	2.33E-02
N-アセチルグルコサミン※1	2.65E-02
イノシトール	5.68E-04
スクロース	5.99E-06
アデノシン	5.68E-04
ラクトース※1	5.52E-08
トレハロース	2.10E-06

マルチトール	5.67E-05
UNS3	1.14E-12
UNS7	1.60E-03
UNS14	1.46E-02
UNS34	3.77E-03
UNS35	7.39E-03
UNS40	9.54E-03

注. UNS3~40：ピークの同定ができていない化合物. スペクトルは巻末参照.

ただし, 以下の代謝物についてはピーク面積値を合算して一つの代謝物としてP値を求めた.

※1；D・L体の2つのピークが検出された代謝物

※2；一種類の代謝物に対して異なる数のTMS基がついた2つ以上のピークが検出された代謝物

4.5.3 刺激性唾液採取に使用するガムと分析結果に与える影響

4.5.2 項で述べたように、全ての刺激性唾液でキシリトール、ソルビトールが顕著に検出され、ピークのサチュレーションが見られた。そこで採取に使用した採取用ガムが由来で検出される化合物の有無を調べるために、ブランクとしてガムの粉末と水を混合させた試料を分析した。前処理行程を図 4-21 に示す。乳鉢を用いて採取用ガム（図 3-5）を破碎し、ガムの粉末に水を加えて 60°C で 30 分間振とうさせた。その後 20 分間超音波抽出し、ACN を加えて 16,000 × g, 4°C で 5 分間遠心した。得られた上清を、従来の SPAD 法手順に沿って誘導体化し、分析した。得られたマスキロマトグラム (m/z 73) と、比較対象として健常者 5 のマスキロマトグラム (m/z 73) を図 4-22 に示す。なお、本実験の前処理で行ったガム中化合物の抽出はガムを咀嚼した場合とは条件が異なるため、得られたピーク強度は大きく異なる。

図 4-22 に示すように、ブランク測定では 5 つのピークが検出された。ピークを同定したところ、3. キシリトール、4. ソルビトールであった (1,2,5 は不明)。このことから、全ての刺激性唾液試料から顕著に検出されていたキシリトール、ソルビトールはガム由来であることがわかった。また、図 4-22 に示すように他の糖類のピークは検出されなかったため、バイオマーカー探索においては上記 5 成分のみ分析結果から除外すればよいということがわかった。

1. ガム中化合物を抽出
乳鉢でガムを破碎
ガムの粉末に水を加え、60°C で 30 分間振とう
20 分間超音波抽出
2. 親水性化合物の抽出、固形物の沈殿
ACN 添加 → 遠心分離
上清抽出
3. カラムコンディショニング
水
ACN
90% ACN 水溶液添加
4. 水溶性化合物吸着
試料導入 (90% ACN 水溶液)
5. 洗浄
90% ACN 水溶液添加
6. 脱水
ACN 添加
7. 誘導体化
メトキシアミン塩酸塩 (10% ACN ピリジン溶液)
MSTFA 添加
8. 溶出
ヘキサン添加

図 4-21 ブランク (水+ガム) 測定の前処理手順

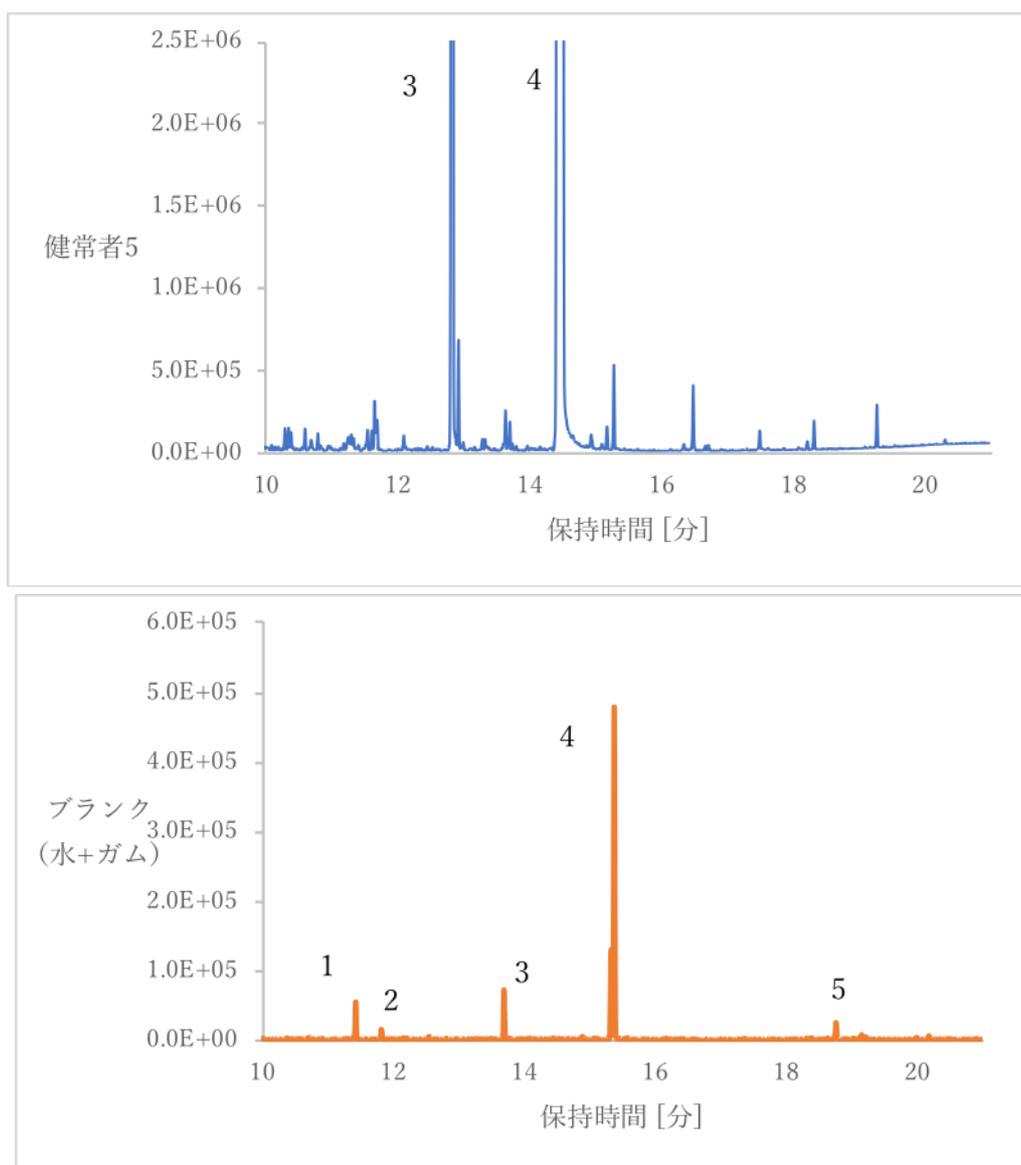


図 4-22 健常者から採取した刺激性唾液とブランクのマスプロマトグラム (m/z 73) の比較

次に、ガムから抽出される成分が分析結果に与える影響について調べた。固相カラム内に導入する刺激性唾液の試料量を条件① 120 μ L, 条件② 30 μ L と変えて同じ試料を前処理・分析した。また、比較対象として自然唾液の試料量を条件②で前処理・分析した。それぞれ得られた内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスクロマトグラム (m/z 275) を図 4-23, 注入条件と得られるピーク面積値の関係を表 4-11 に示す。内部標準は、全ての検体に対して同じ量を添加しているため、安定して検出されることから、分析法に関する評価のために用いた。以下 5 章の実験でも同じ理由で内部標準のピークを用いて評価を行った。

図 4-23, 表 4-11 から、刺激性唾液の導入試料量を比較すると条件②と比べて条件①では有機酸 2-イソプロピルリンゴ酸の検出量が非常に小さいことがわかる。一方で条件②で分析した自然唾液と刺激性唾液の結果から得られた 2-イソプロピルリンゴ酸の検出量は同程度であった。これは、ガム由来で多量に検出されるキシリトールとソルビトールの影響と考えられる。固相中には陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂が充填されているが、糖類と有機酸は陰イオン交換樹脂に吸着される。しかしイオン交換樹脂の試料負荷量を超えて多量の糖（他の代謝物と比べて 10~1000 倍の濃度, 試料 1 μ L あたり数 ng~数百 ng 程度）を導入した条件①の試料では、相互作用によりキシリトール、ソルビトールが陰イオン交換樹脂の吸着可能試料量の大半を占めてしまい、有機酸や糖類は全量吸着できていないと考えられる。自然・刺激性唾液の固相カラムへの試料導入と化合物吸着の模式図を図 4-24 に示す。条件②で分析した際の自然唾液と刺激性唾液で同レベルのピーク面積値が得られており、図 4-24 のような現象は起こっていないと考えられる。以上から、刺激性唾液の分析条件では固相内に導入する試料量を条件②の 30 μ L に減らす必要があるということがわかった。条件②では、試料 1 μ L あたり数 ng~数十 ng 程度のキシリトール、ソルビトールが含まれていると見積もることができる。

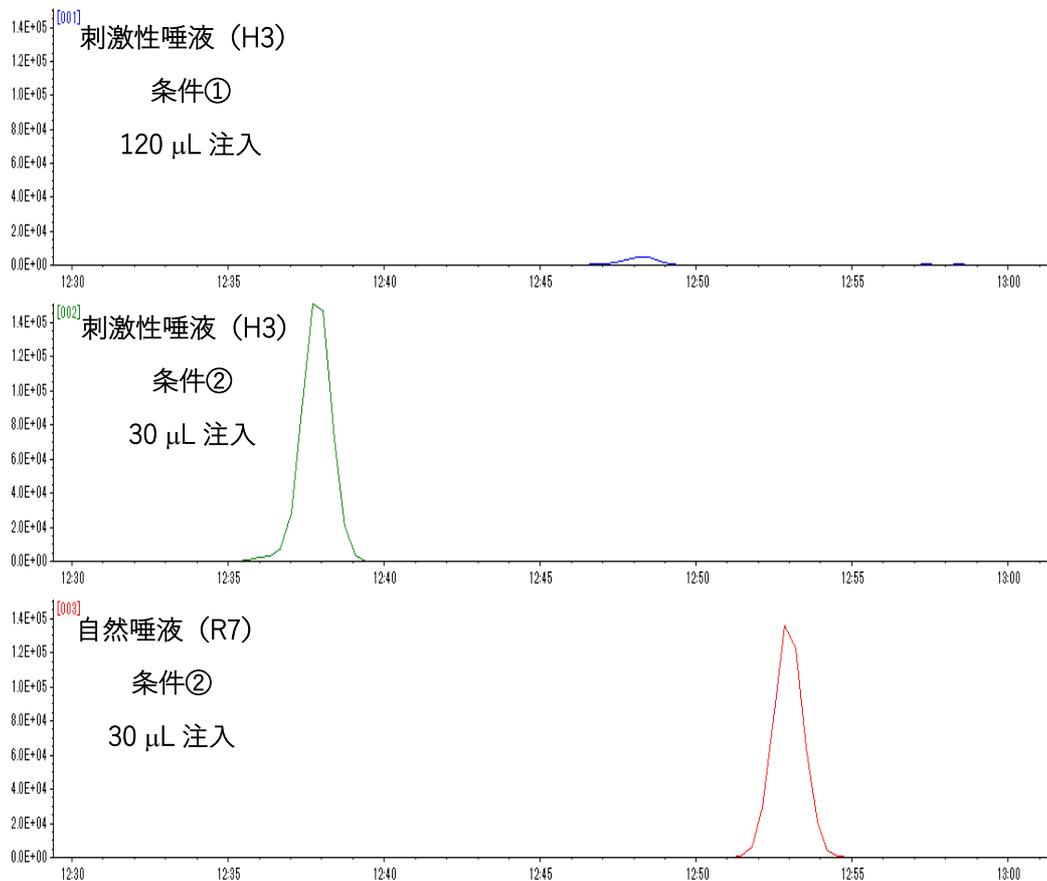


図 4-23 被験者 H3 の刺激性唾液と被験者 R7 の自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスキロマトグラム (m/z 275)

注入量によるピーク強度の比較

※分析した際の GC カラム長さが異なるためピーク位置がずれている

表 4-11 注入条件と得られるピーク面積値の関係

試料名	注入条件	peak area (m/z 275)
刺激性唾液 H3	①	11702
刺激性唾液 H3	②	360202
自然唾液 R7	②	325680

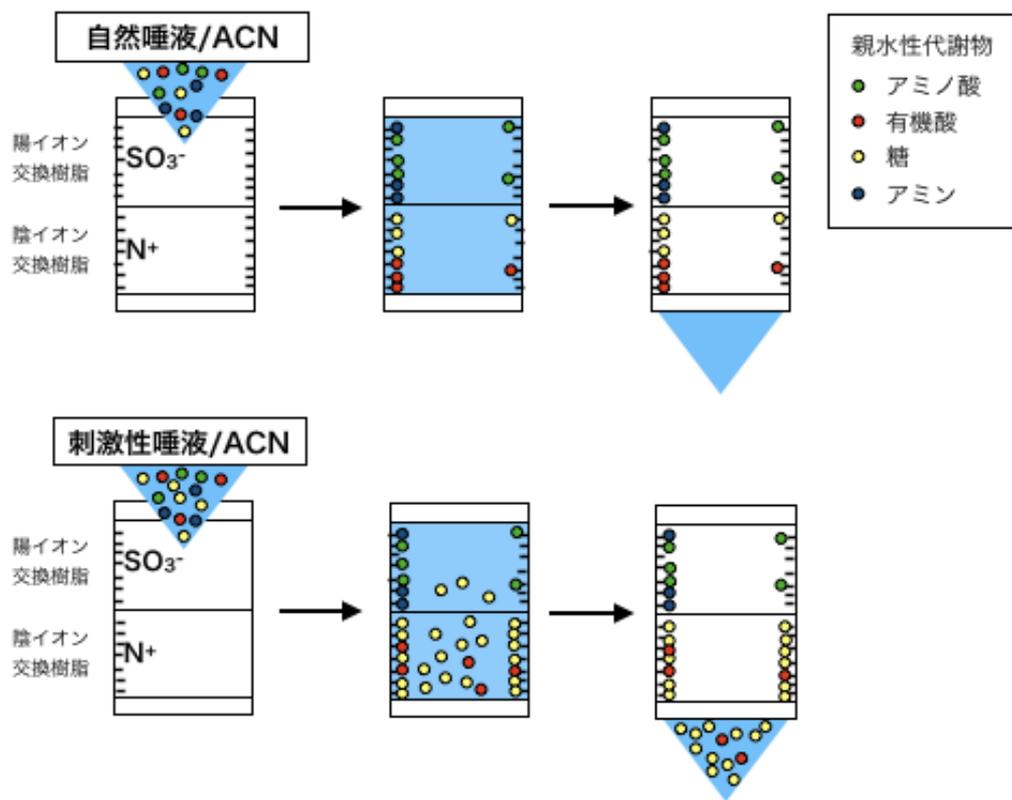


図 4-24 自然・刺激性唾液試料導入，代謝物吸着の模式図

4.6 GCF, プラーク, 自然唾液, 刺激性唾液中毒代謝物の比較

GCF 中代謝物の歯周病バイオマーカー候補化合物は複数発見されている[11][12]が, GCF やプラーク中代謝物と自然唾液, 刺激性唾液との関係は明らかになっていない. そこで各検体間で検出される代謝物の関係を調べるために, 4.3~4.5 節の分析結果を比較した. ここでは, 4.3 節の表 4-6 の患者の健常部位, 罹患部位間で有意差がある代謝物 ($P < 0.05$) の 11 成分 (表 4-12) を用いて比較を行った. ただしこの評価では中等度患者 8 名をターゲットとした. プラークと GCF 中の代謝物, また, プラークと自然唾液, プラークと刺激性唾液から検出される代謝物の関係を調べるために, プラークから得られた各代謝物の相対面積値と GCF, 自然唾液, 刺激性唾液から得られた代謝物の相対面積値の差の絶対値をそれぞれ求めた. さらに, 化合物ごとの比較を行うと, それぞれにばらつきがあり全体の傾向が見えにくく, また口腔内に存在する細菌数, 種類は異なり, 細菌由来で検出される代謝物の検出量も異なると推測されることから, 各被験者ごとに化合物の相対面積値の総和を求めた. 総和の大小関係を比較することで, 差が小さければプラークとの類似性が示され, 差が大きければプラークとの類似性は小さいといえる. GCF とプラークの差の総和を 1 として規格化し, 被験者ごとに差を比較した (図 4-25). 横軸は左から GCF とプラーク, 自然唾液とプラーク, 刺激性唾液とプラークの差を表しており, 縦軸は各被験者, 代謝物 11 成分の相対面積値の差の総和である.

図 4-25 から, 被験者 8 名全てで GCF とプラークの差がもっとも小さいことがわかった. GCF は唾液と比べて細菌由来の代謝物をより多く含んでおり, 検出される代謝物のパターンはプラークにもっとも類似していると考えられる. また, 自然唾液, 刺激性唾液では差の総和の大小関係として自然唾液の方がプラークとの差が小さいことがわかった (患者 P43 は除く). これは, 自然唾液は口腔内に貯留しているため GCF 中に含まれる成分を含んでおり刺激性唾液に比べてプラークに近い結果となったと考えられる. 一方で刺激性唾液は耳下腺から分泌された新鮮な唾液であることから, 自然唾液と比べて口腔内細菌との関連性は薄いことが原因として考えられる.

表 4-12 ターゲットとした代謝物一覧

有機酸	5-アミノ吉草酸, ヒドロキシ桂皮酸
アミノ酸	バリン, チロシン, グリシン, フェニルアラニン
アミン	エタノールアミン, プトレシン
糖	リボース, グルコース, ガラクトース

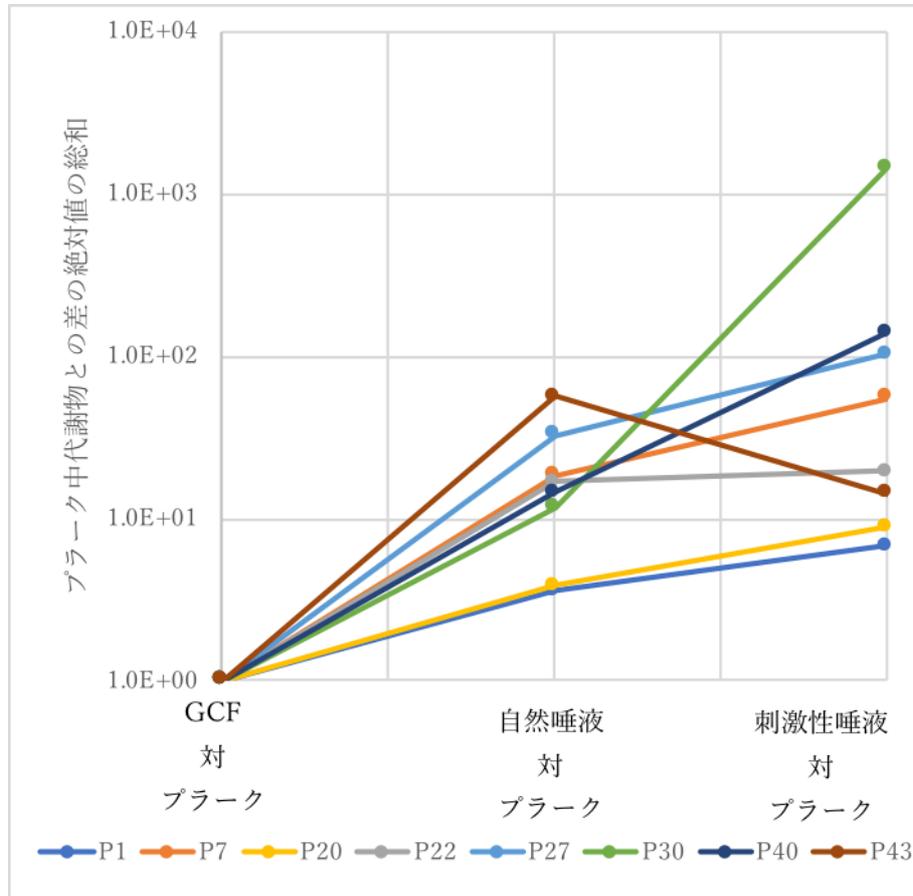


図 4-25 プラーク中代謝物と各検体中代謝物の検出量の差の絶対値の総和の関係

※左から GCF, 自然唾液, 刺激性唾液との差をとった

P1~P43 は被験者の番号を示す

・4 章まとめ

唾液中の代謝物バイオマーカー探索に向けた基礎的検討として、サンプル前処理法の検討を行った。従来の SPAD 法では低かった糖類の回収率を高めるために、前処理時に使用する ACN の割合と検出される化合物のピーク面積値の関係を調べた。これにより、サンプル溶液の ACN の割合を 90% とすることで、糖類についても有機酸、アミノ酸などと同等の回収率を得られることがわかった。

唾液中代謝物は様々な要因から変動するため、マーカー探索を行う前に食物摂取や日間・日内変動の程度を調べた。食事の簡単な例として、グラニュー糖摂取の前後に健常者 1 名の自然・刺激性唾液を複数回採取・分析し、グラニュー糖のケースについては摂取後最低 1.5 時間以上たてば、採取したサンプルに対して食物摂取による変動は考慮しなくてよいことがわかった。また 3 日間同じ時間に採取、1 日 6 時から 9 時までの間、3 時間おきにサンプルを採取し、日間・日内変動の評価を行った。採取時の条件として起床直後には採取をしないことで、変動を抑えることができることがわかった。ただし採取に適した条件を決めるためには、個人差を考慮する必要があるため、少なくとも複数名に対して 0 同様の実験を行う必要がある。

歯周病バイオマーカー探索を行うために、大阪大学歯学部附属病院で健常者 20 名、歯周病患者 24 名から GCF、プラーク（患者のみ）、自然唾液、刺激性唾液を採取、分析した。

GCF は、先行研究の再現を行うためにマーカー候補の 19 成分について本実験でも同様に有意差が見られるか調べた。本実験では、19 成分中 13 成分で同様に有意差が見られ、おおまかに先行研究を再現できたと考えられる。また健常者、患者の健常部位、罹患部位の 3 群で歯周病の判別が可能か調べたところ、健常者と患者の健常・罹患部位を判別することはできたが、患者の健常部位と罹患部位は判別できない検体が一部あることがわかった。

プラークについて、同一被験者であっても健常部位と罹患部位では棲息する細菌の数など異なるため、患者の健常部位、罹患部位間で代謝物の検出量に違いがあるか調べた。分析結果から、9 成分で代謝物の検出量に違いがあることがわかった。

唾液中代謝物を用いて歯周病診断が可能か調べるために、歯周病バイオマーカーを探索した。自然・刺激性唾液を分析し、検出量に有意差が見られた成分を用いて多変量解析を行った。OPLS 判別分析の結果、自然・刺激性唾液それぞれについて、代謝物の検出量から軽・中等度の歯周病罹患の有無を判別できることがわかった。しかし PISA 値の予測モデルでは異なる結果を得たことから、自然唾液と刺激性唾液では代謝物の生成由来について異なる点が多いと考えられる。

自然・刺激性唾液と GCF, プラーク中代謝物との関連性を調べるために, プラークから得られた各代謝物の相対面積値と GCF, 自然・刺激性唾液から得られた代謝物の相対面積値の差の絶対値をそれぞれ求めた. 大小関係を比較したところ, 全ての被験者で GCF とプラークの差がもっとも小さく, 自然唾液, 刺激性唾液では差の総和の大小関係として自然唾液の方がプラークとの差が小さかった (患者 P43 は除く). この結果から, GCF は検出される代謝物の傾向としてプラークに最も類似しており, 自然唾液は口腔内に貯留しているため GCF 中に存在する代謝物の結果をある程度反映しているが, 刺激性唾液は耳下腺から分泌された新鮮な唾液であることから, 自然唾液と比べて口腔内細菌との関連性は薄いことがわかった.

5. 唾液中代謝物の迅速分析法の開発

5.1 唾液中代謝物の迅速分析法（迅速 SPAD 法）の適用と評価

大学附属病院内でのオンサイト診断に向けて、前処理を含めて 30 分以内に分析する必要がある。このため、4 章で使用した SPAD 法の前処理条件、GC/MS 分析条件の迅速化の検討を行い、1 検体 30 分以内での分析を目指した。

5.1.1 除タンパク処理の時間短縮

従来の SPAD 法では 30 分 37°C で振とうさせた後、除タンパクを行って SPAD 法で濃縮、精製、誘導体化を行っていた。サンプル前処理では SPAD 法（図 3-8）のうち手順 1 の親水性代謝物の抽出操作、手順 2 の除タンパク操作の時間短縮・簡略化について検討した。まず、1 の操作ではろ過フィルターを用いた浮遊不純物除去を試みた。使用したポアサイズ 0.1 μm 精密ろ過フィルター付きチューブ（Merck Millipore Ltd., UFC30VV00）を図 5-1 に示す。次に 2 の操作では、オンサイトでの実験を見越して、大型の遠心分離機の代わりに小型の卓上遠心分離機を用いることを試みた。条件 A では、操作 1 に関して振とうをせずにサンプルをフィルターに通してろ過し、卓上遠心機で遠心した。条件 B では、操作 1 に関して振とうし、条件 A 同様にフィルターろ過を行い、卓上遠心機で遠心した。各前処理条件と、同一被験者の自然唾液を条件 A、B、従来 SPAD 法の 3 つの方法で分析し、得られたピーク面積値、代謝物数を表 5-1 に示す。ただし分析結果のピーク面積値は、従来の SPAD 法で得られた相対ピーク面積値の和を 1 として規格化した。また、条件 A、B を用いて前処理した唾液試料を分析し、得られた内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスクロマトグラム (m/z 275) を図 5-2 に示す。

表 5-1 より、条件 A、B ともに従来の SPAD 法と比べて得られたピーク面積値は半分程度に減少しており、条件 A、B では夾雑物（タンパク質など）の除去が十分にはできていないと考えられる。従来の SPAD 法の場合よりも夾雑物が多く含まれた試料溶液を固相カラムに導入しており、代謝物よりも相互作用の強い夾雑物がイオン交換樹脂に先に吸着してしまい、代謝物は全量吸着できていないことが原因として考えられる。また図 5-2 に示すように、どちらの条件でもピークのリーディングが見られた。これはガスクロマトグラフ内のカラム先端部が汚染された時に見られる現象であり、前処理時の夾雑物の除去が不十分であると考えられる。以上から、夾雑物を除去し、分析対象の親水性代謝物を抽出するための他の案が必要である。



図 5-1 精密ろ過フィルター付きチューブ

表 5-1 各前処理条件と実試料分析結果の関係①

		条件 A	条件 B	従来の SPAD 法
前処理条件	振とう (37°C)	なし	あり	あり
	フィルターろ過	あり	あり	なし
	遠心	2,000 × g (室温)	2,000 × g (室温)	16,000 × g (4°C)
	前処理に要する時間	20 分	50 分	50 分
分析結果	ピーク面積値	0.6	0.6	1.0
	代謝物数	34	34	38

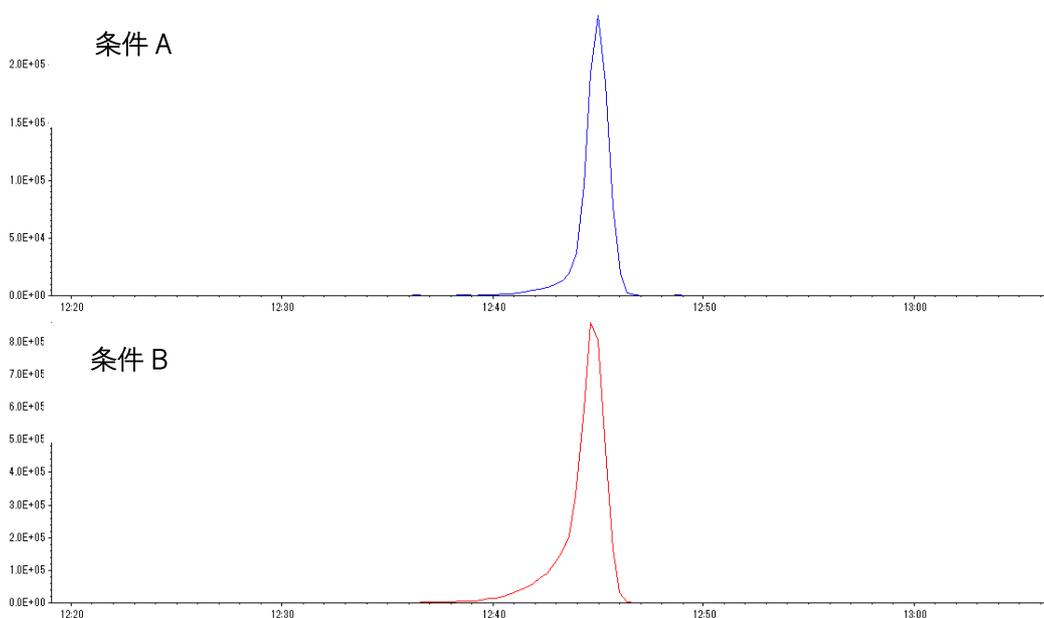


図 5-2 被験者 H3 の自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスクロマトグラム
(m/z 275)

夾雑物の除去と代謝物の抽出を行うために、フィルターを用いて手順 1 の親水性代謝物の抽出操作の短縮化についてのみ検討した。条件 C では操作 1 に関して振とうをせず大型遠心機で遠心した。条件 D では操作 1 に関して振とうし、フィルターろ過を行い、大型遠心機で遠心した。各条件と分析結果を表 5-2 に示す。ただし、分析結果のピーク面積値は、従来の SPAD 法で得られた相対ピーク面積値の和を 1 として規格化した。また、条件 C,D を用いて前処理した唾液試料を連続で複数回分析し、得られた内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスキロマトグラム (m/z 275) を図 5-3, 5-4 に示す。これにより分析の再現性を調べる。

表 5-2 に示すように、従来 SPAD 法と同等の分析結果を得られたことから、条件 C,D で代謝物の抽出ができていたことがわかった。抽出のためには、遠心分離の条件が必要ということがわかった。しかし、図 5-3, 5-4 に示すように、同じ試料を 2 回連続で測定すると、どちらの条件でも 2 回目の分析でピークのリーディングが見られ、前処理時の夾雑物の除去がまだ不十分であることがわかった。また、条件 C, D で得られたピーク面積値、代謝物数に違いが見られなかったことから、フィルターによる夾雑物除去の効果は得られていないと考えられるため、タンパク質を沈殿させるための別の手段が必要であることがわかった。

表 5-2 各前処理条件と実試料分析結果の関係②

		条件 C	条件 D	従来の SPAD 法
前処理条件	振とう (37°C)	なし	なし	あり
	フィルターろ過	なし	あり	なし
	遠心	16,000 × g (4°C)	10,000 × g (4°C)	16,000 × g (4°C)
	前処理に要する時間	20 分	20 分	50 分
分析結果	ピーク面積値	1.0	0.9	1.0
	代謝物数	27	27	27

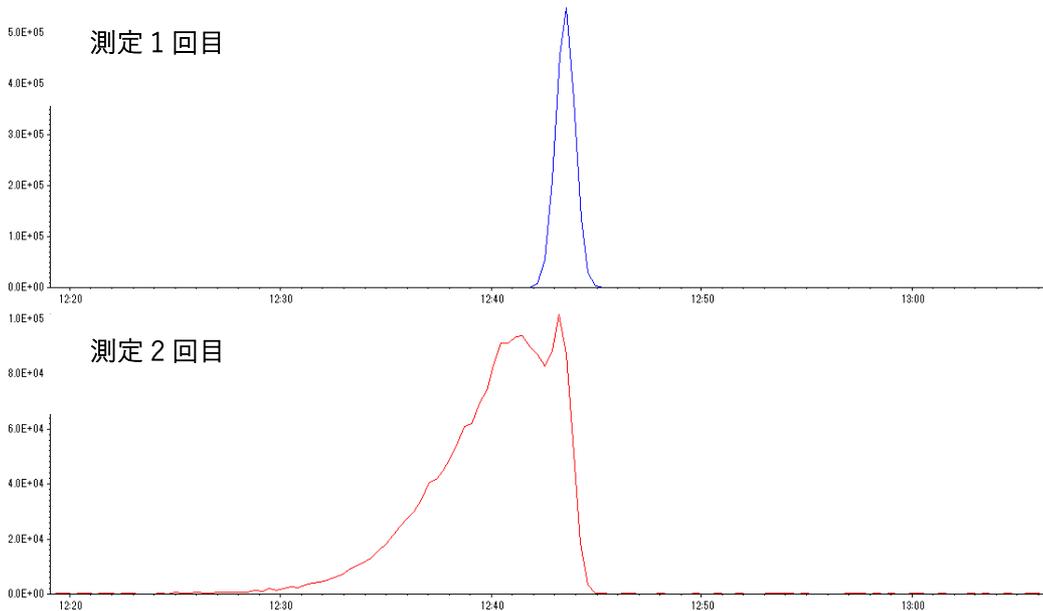


図 5-3 条件 C で分析した被験者 P11 の自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来の
マスキロマトグラム (m/z 275)

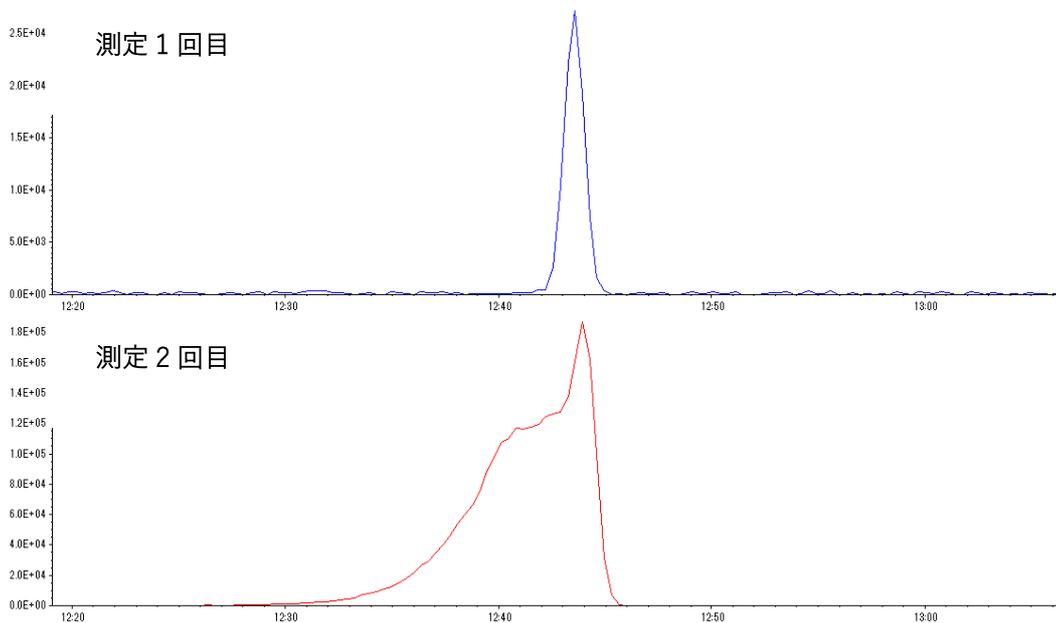


図 5-4 条件 D で分析した被験者 P11 の自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来の
マスキロマトグラム (m/z 275)

通常、常温の有機溶媒を用いるのに対して温度の低い有機溶媒を生体試料に添加することでタンパク質の水への溶解度が急速に下がり、短時間でタンパク質を沈殿させることが可能であるため、唾液試料に添加する ACN の温度を変えた。条件 E では、操作 1 に関して試料と混合させる ACN の温度を -20°C にして、振とうはせず、大型遠心機で遠心した。検討条件と分析結果を表 5-3 に示す。ただし分析結果のピーク面積値は、従来の SPAD 法で得られた相対ピーク面積値の和を 1 として規格化した。また、条件 E を用いて前処理した唾液試料を連続分析し、得られた内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスクロマトグラム (m/z 275) を図 5-5 に示す。

表 5-3 に示すように、条件 E で得られたピーク面積値が従来の SPAD 法と比べて大きい結果となったが、分析のばらつきを考慮すると、従来の SPAD 法とおおよそ同等の分析結果が得られたと考えられる。ただしばらつきについての評価はできていない。また、図 5-5 に示すように、同一検体の 10 回連続分析においてもピークのリーディングは見られなかったため、タンパク質の除去についても連続分析に影響を与えない程度にできたことがわかった。したがって、迅速 SPAD 法の前処理条件では条件 E を用いることとした。この方法により、従来 45 分かかっていた前処理操作が、約 20 分に短縮された。

表 5-3 各前処理条件と実試料分析結果の関係③

		条件 E	従来の SPAD 法
前処理条件	添加する ACN の温度	-20°C	室温
	インキュベート (37°C)	なし	あり
	遠心	$16,000 \times g$ (4°C)	$16,000 \times g$ (4°C)
	前処理に要する時間	20 分	50 分
分析結果	ピーク面積値	1.2	1.0
	代謝物数	30	30

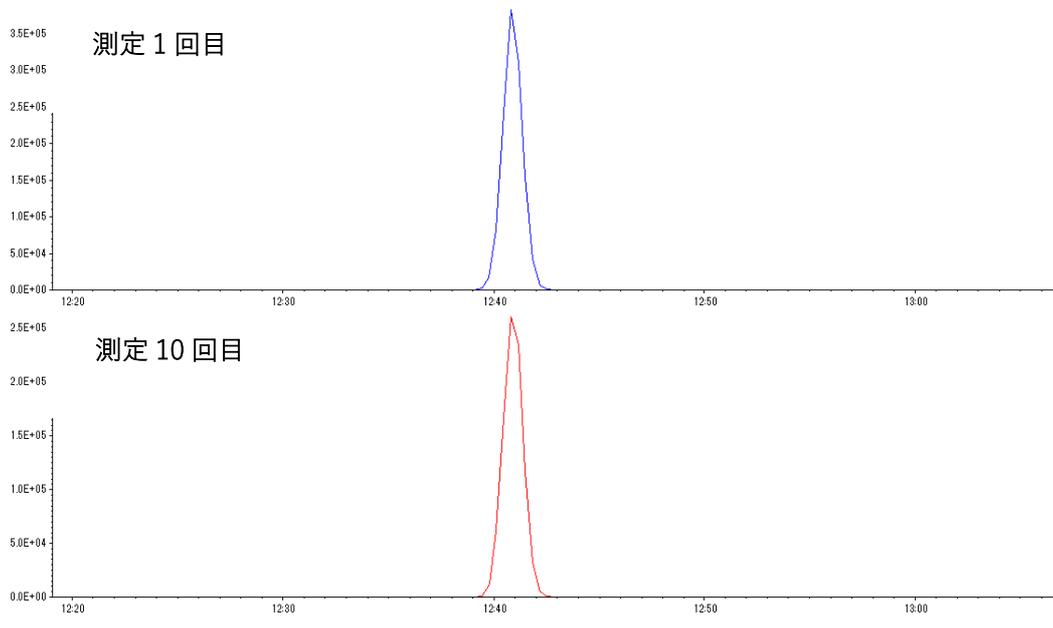


図 5-5 条件 E で分析した被験者 P7 の自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来の
 マスクロマトグラム (m/z 275)

5.1.2 GC/MS 分析時間の短縮

次に、GC/MS での分析時間の短縮を試みた。分析時間を決めているのはクロマトグラフィーによる分離である。分離度を高くするためにはカラムの内径を細くする必要があるため、従来分析法で使用した①CP-Sil 8 CB for Amines (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm) と比べてシャープなピークを得ることができる、ナローポアのキャピラリーカラムに変えて条件検討をした。ここでは①よりも内径が細く、また化合物の溶出を早めるためにカラム長さの短い、②DB-5MS UI (長さ 20 m, 内径 0.18 mm, 膜厚 0.36 μm)、③DB-5MS UI (長さ 20 m, 内径 0.18 mm, 膜厚 0.18 μm) のキャピラリーカラムを用いて、分析時間の短縮を検討した。なお、②、③の違いは膜厚の厚さである。膜厚が薄いほど液相と固相での代謝物の相互作用に要する時間を短縮できるが、一方でサンプル負荷量が小さくなるため、厚さの異なる 2 種類のカラムで検討を行った。分析では、GC/MS のメソッド作成において目的化合物の保持時間推定や分離条件の検討のために用いられる、ノルマルアルカン標準品混合物を使用して各条件の評価をした。ノルマルアルカンとは、直鎖の炭化水素のことで、炭素数でアルキル鎖長を表す (例えばノルマルヘキサンは C6)。本実験では C8~C40 の混合物を使用した。条件 a では①~③で膜厚が最も厚い②のカラムを使用し、条件 b では膜厚がもっとも薄い③のカラムを使用した。各カラムの種類、分析条件、分析結果を表 5-4 に示す。表 5-4 の負荷量は、カラム長さ、内径、膜厚を元に計算しており (Agilent Technologies Method Translator 使用)、分析結果の溶出アルカンは、分析の最後に溶出されたアルカンのことを示している。

ここで分離度 R は、隣接する 2 つのピークがどの程度分離しているかを示したものであり、ピーク幅が狭く、保持時間の差が大きくなれば R の値も大きくなる。すなわち R の数値が大きいほど分離がよいといえる。分離度は、式(2)で定義される。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \quad R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \quad \text{式(2)}$$

表 5-4 から、従来法では 25 分間 (最終温度 320 $^{\circ}\text{C}$) で C34 まで溶出されているのに対し、条件 a では 10.9 分間 (最終温度 320 $^{\circ}\text{C}$) で C21 までしか溶出されていないことがわかる。これは、①、②と比べて膜厚の厚いカラムを使用したことで化合物の溶出に時間を要しているためである。一方条件 b では 9.9 分間 (最終温度 340 $^{\circ}\text{C}$) で C30 まで分析できた。4.3 節の唾液分析結果から、ターゲットとする化合物は C29 までの保持時間で溶出するため、条件 b が適していると言える。したがって、条件 b を用いた分析法を採用する。この方法により、従来 25 分かかっていた GC/MS 分析時間を、10 分に短縮できた。

表 5-4 各カラムの昇温条件と分析結果の関係

		条件 a	条件 b	従来の GC/MS 法
GC カラム	種類	②	③	①
	長さ (m)	20	20	30
	内径 (mm)	0.18	0.18	0.25
	膜厚 (μm)	0.36	0.18	0.25
	負荷量	1.51	0.6	1.71
GC 分析条件	昇温条件	50 °C (1 分保持) -55 °C/分 -320°C (5 分保持)	50 °C (1 分保持) -35 °C/分 -340°C (0.7 分保持)	50°C (2 分保持) -15°C/分 -320°C (5 分保持)
	分析時間	10.9 分	9.9 分	25 分
分析結果	溶出アルカン	C21	C30	C34
	分離度	6.3	7.53	17.84

表 5-4 から、条件 b の GC カラム③は膜厚が薄く、カラム負荷量がカラム①、②と比べて少ないことがわかる。サンプル注入量を調整するために、自然唾液のサンプル注入量 1, 0.5 μL の分析結果を比較した。マスキロマトグラム (m/z 73) を図 5-6 に示す。

図 5-6 に示すように、従来法同様の 1 μL 注入ではカラム負荷量を超えてしまい、ピークのリーディングが見られる。一方で 0.5 μL ではピークのリーディングは見られなかったため、注入量は 0.5 μL とする。また、膜厚の薄いカラム③を使用した際の分析に与える影響についても、図 5-6 の 0.5 μL 注入の結果から、考慮しなくてよいと考えられる。

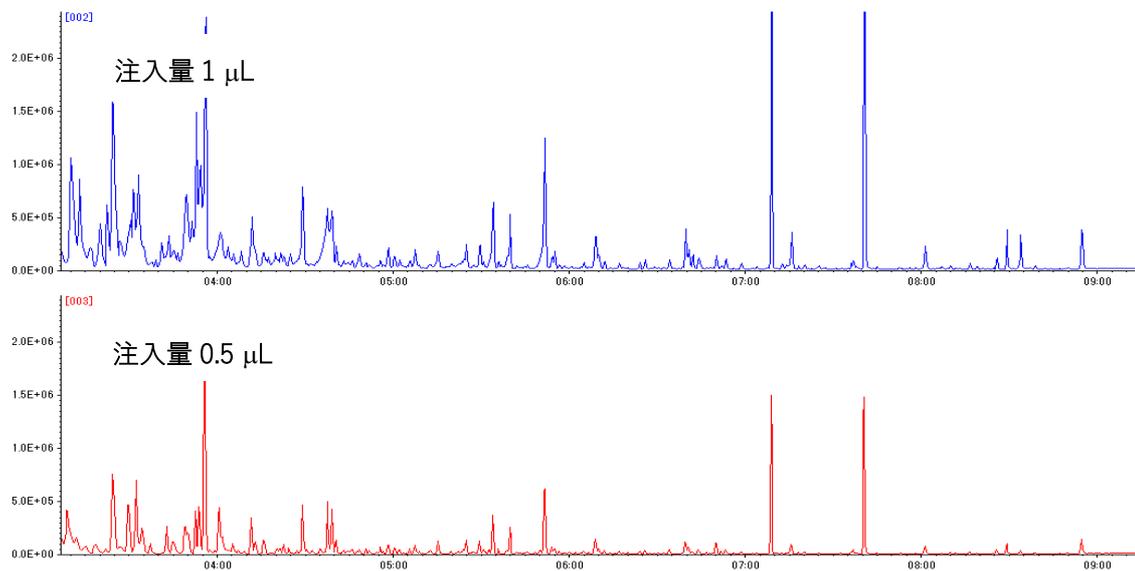


図 5-6 被験者 H54 の自然唾液のマスキロマトグラム (m/z 73)

5.1.3 非凍結唾液試料の分析の際の注意点

5.1.1 項で検討した迅速 SPAD 法 (図 3-9) と 5.1.2 項で検討した GC/MS 迅速分析条件 (表 3-5) を組み合わせて採取後すぐの非凍結自然唾液を計 5 回連続で分析したところ、分析 5 回目 で図 5-7 に示すピークのリーディングが見られた (赤枠箇所)。図 5-7 は、分析した非凍結自然唾液の内部標準 2-イソプロピルリンゴ酸由来のマスクロマトグラム (m/z 275) のピーク形状の変化の様子である。このピークのリーディングは、ガスクロマトグラフのオープン内のカラム先端部の汚染が原因であるが、従来の凍結乾燥法、SPAD 法で処理したサンプルについては、少なくとも 50 回以上連続で凍結融解させた唾液試料を分析してもこのような現象は見られなかった。そこで前処理時の行程を見直し、再検討した。唾液中には粘性物質の糖タンパク質 (ムチンなど) が大量に含まれていることが知られており、これがリーディングの原因として考えられる。糖タンパク質は凍結融解させると沈殿してしまうが、非凍結唾液の場合は沈殿せず、試料中に混和している。糖タンパク質は一般的なタンパク質と比べて水溶性が高く、混和している場合、迅速 SPAD 法の前処理条件 (図 3-9) で取り除くことは難しいため、分析試料中にムチンなどの糖タンパク質が含まれた状態でガスクロマトグラフに注入されてしまう。しかし糖タンパク質はアミノ酸、アミンなどの低分子量代謝物と比べて分子量が大きく、ガスクロマトグラフ内で気化されずに注入口やカラム先端部に次第に蓄積されていくため、数回の分析でピークのリーディングが見られたと考えられる。したがって、ムチンなどの糖タンパク質を取り除くために、前処理時の洗浄行程について検討した。洗浄溶媒中の水の割合を 20%以上にする と、糖類だけでなくアミノ酸や有機酸なども固相から溶出してしまうことがわかっているため、極力洗浄溶媒中の水の割合を小さくする必要がある。そこで、条件 I では割合 (ACN : 水 = 95:5)、条件 II では割合 (ACN : 水 = 90:10) として前処理し、糖タンパク質と糖類のみを溶出させられるか調べた。表 5-5 に条件と分析結果を示す。

自然唾液について、表 5-5 に示すように、条件 II では 10 回連続で分析してもリーディングは見られなかったため、糖タンパク質を除去できたと考えられる。したがって、自然唾液については条件 II を前処理の行程に加えて分析を行う。図 5-8 に前処理手順を示す。今後、洗浄行程を加えた迅速 SPAD 法を「改良迅速 SPAD 法」とよぶ。また、刺激性唾液については、従来の条件で 10 回連続分析してもリーディングは見られなかった。刺激性唾液は唾液腺から分泌された直後の唾液を採取しているため、含まれている糖タンパク質の量は分析に影響を与えない程度に低いと考えられる。したがって、刺激性唾液は洗浄の行程は加えず、迅速 SPAD 法 (図 3-9) の前処理手順を用いる。洗浄行程を加えることで糖類の保持が難しくなり、従来の SPAD 法と比べて糖類の検出量は 10 分の 1 程度に減少してしまうため、迅速 SPAD 法で分析可能であった糖類の分析が難しくなるデメリットがある。

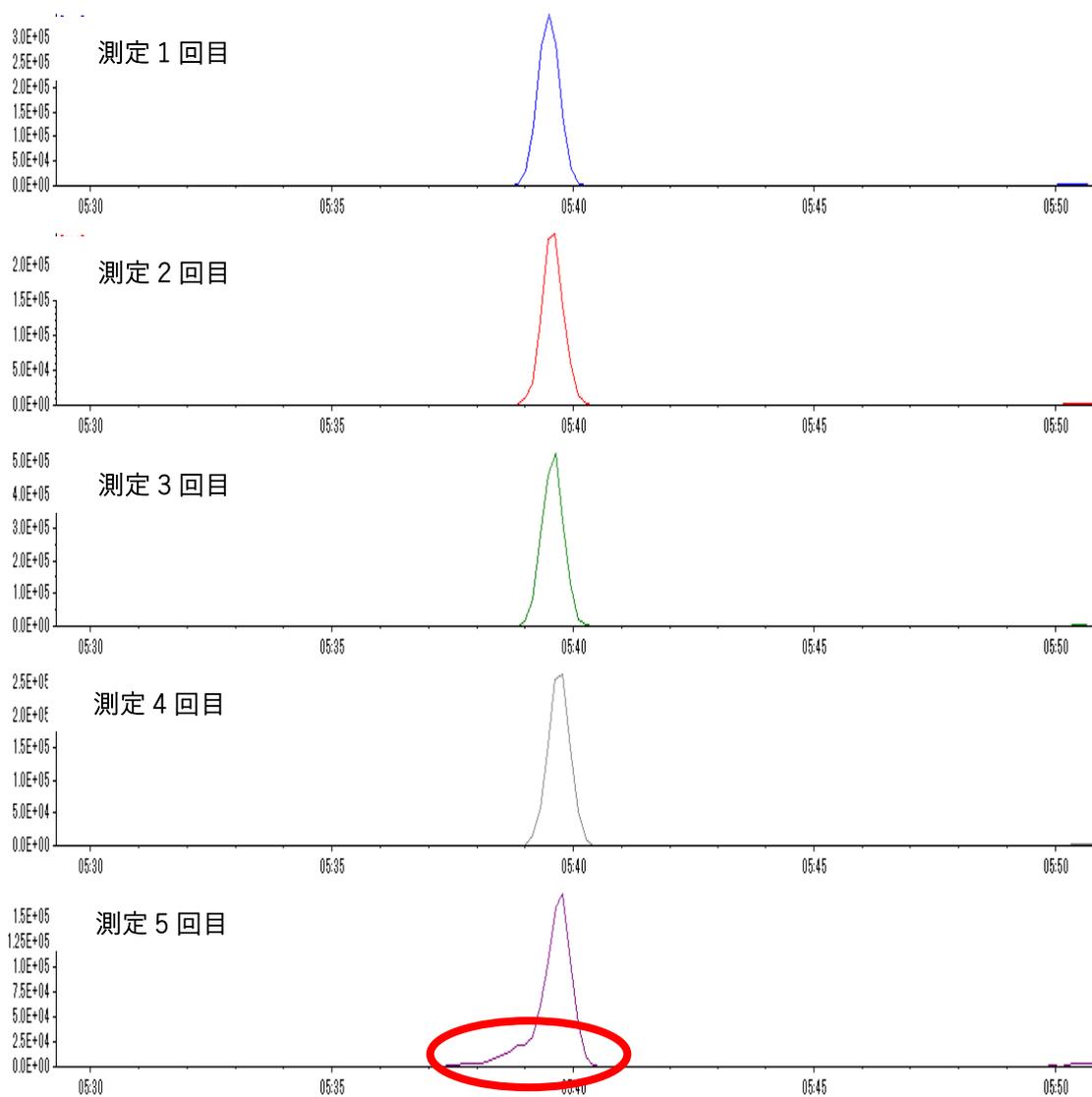


図 5-7 健常者 C54 の自然唾液のマスキロマトグラム (m/z 275) (測定 1~5 回目)

表 5-5 洗浄溶媒条件と実試料分析結果の関係

自然唾液				
		条件 I	条件 II	従来法
洗浄溶媒条件	割合(ACN:水)	95:5	90:10	100:0
分析結果	連続測定回数	5 回以下	10 回以上	5 回以下
刺激性唾液				
		条件 I	条件 II	従来法
洗浄溶媒条件	割合(ACN:水)	-	-	100:0
分析結果	連続測定回数	-	-	10 回以上

1. 親水性代謝物の抽出, タンパク質の沈殿
ACN, 内部標準溶液添加→遠心分離
上清抽出
2. カラムコンディショニング
水
ACN
90% ACN水溶液添加
3. 水溶性化合物吸着
試料導入 (90% ACN水溶液)
4. 洗浄
90% ACN水溶液添加
5. 脱水
ACN添加
6. 誘導体化
メトキシアミン塩酸塩 (10% ACN ピリジン溶液)
MSTFA添加
7. 溶出
ヘキサン添加

図 5-8 SPAD 法の前処理手順 (5 章, 自然唾液)

5.1.4 改良迅速 SPAD 法の評価

改良迅速 SPAD 法を評価するために、凍結融解させた自然唾液 14 検体について、従来の SPAD 法 (図 3-8) と通常の GC/MS 分析条件 (表 3-4)、改良迅速 SPAD 法 (図 5-8) と GC/MS 迅速分析条件 (表 3-5) をそれぞれ組み合わせて前処理と分析を行なった。両分析法で検出された代謝物の相対面積値を比較した (図 5-9)。横軸は改良迅速 SPAD 法、縦軸は従来の SPAD 法で検出された代謝物の相対面積値の対数プロットで、各点は同一試料の同一代謝物を表している。また、図 5-9 では比較に用いた 14 検体の全代謝物をプロットしたのに対して、14 検体それぞれについて、両分析法で検出された代謝物の相対面積値の相関係数を求めた。平均値とその変動係数 (CV ; Coefficient of Variation) を表 5-6 に示す。

まず、健常者と歯周病患者の間で検出量に有意差があったバイオマーカー候補化合物のヒポキサンチン、キサンチン、グアノシン (表 4-9) の 3 本のピークが改良迅速 SPAD 法で検出できなくなった。これらの代謝物は、いずれも従来の SPAD 法では検出量が少なく、改良迅速 SPAD 法では GC に導入するサンプル量を減らしたことで検出下限以下になってしまったと考えられる。しかし表 5-6 に示すように、両分析法で検出された代謝物の相関係数について被験者ごとに 10% 程度のばらつきはあるが、平均値として $r = 0.83$ が得られた。以上から、従来の SPAD 法と改良迅速 SPAD 法で検出される代謝物については、おおむね相関のある結果を得られることがわかった。

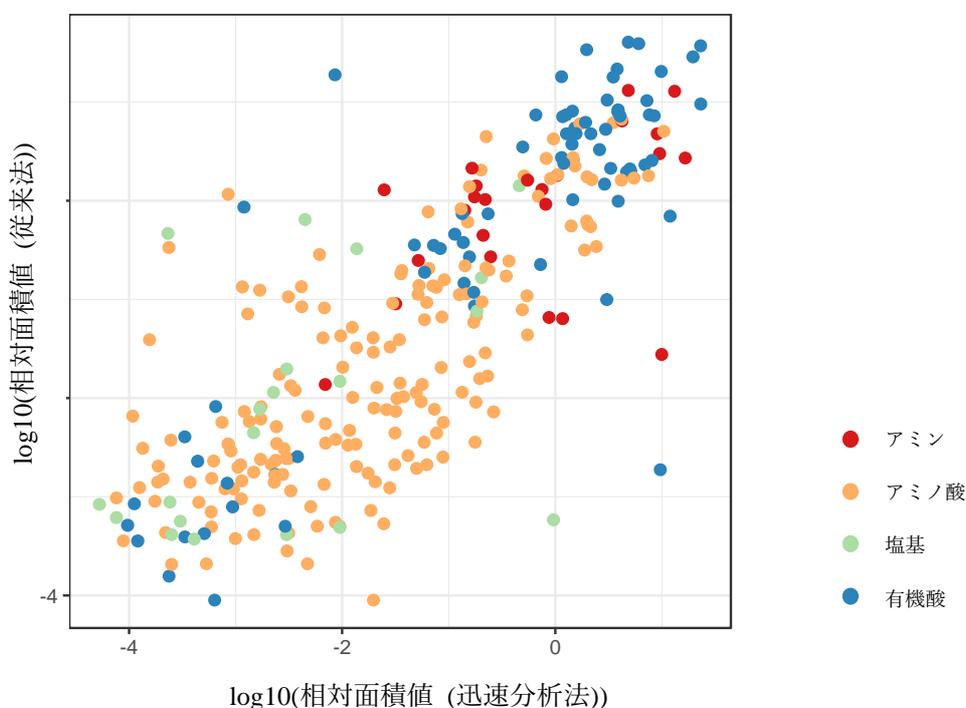


図 5-9 従来法と迅速法で得られた相対ピーク面積値の比較

表 5-6 相関係数の平均値とばらつき

平均値	相関係数のばらつき
0.83	0.099

5.1.5 非凍結試料と凍結試料の分析結果に与える影響について

唾液試料には口腔内に存在する常在菌なども含まれ、試料の凍結、融解などの操作を行うと、菌による代謝が進み、採取直後の試料とは異なる分析結果を得ることが推測される。そこで、非凍結試料と凍結融解させた試料の分析結果に与える影響を評価するために、非凍結自然唾液 21 検体 (R1~R21) と、それらを凍結融解させた 21 検体 (R1~R21) について、改良迅速 SPAD 法を用いて前処理し、GC/MS 迅速分析条件 (表 3-5) の条件で分析した。まず、非凍結試料、凍結融解試料で検出された代謝物 30 成分について、検体ごとに凍結・非凍結による分析結果の違いを評価するために、得られた相対ピーク面積値の総和を比較した (図 5-10)。ただしターゲットとした代謝物 30 成分を表 5-8、被験者ごとに求めた増加量を表 5-7 に示す。

図 5-10、表 5-7 より、非凍結試料と比べて凍結融解させた試料では多くの検体で相対ピーク面積値の増加が見られ、検出量の増加は被験者によって大きく異なる事もわかった。これらは、試料中に含まれる口腔内細菌の代謝が影響していると考えられる。試料を凍結させても、凍結するまでの時間、融解させて前処理を開始するまでの時間経過によって細菌の代謝が進み、代謝物の検出量に違いが見られたと考えられる。以上から、非凍結試料の分析結果から得られる情報は、採取した時点での被験者の状態を表しており、一方凍結融解させた試料の分析結果から得られる情報は、採取時点から細菌の代謝が進行した状態を表していると考えられる。このことから、オンサイトで非凍結試料を用いて歯周病診断をする場合、4 章で示したバイオマーカーが迅速診断に直ちには使用はできないと考えられる。

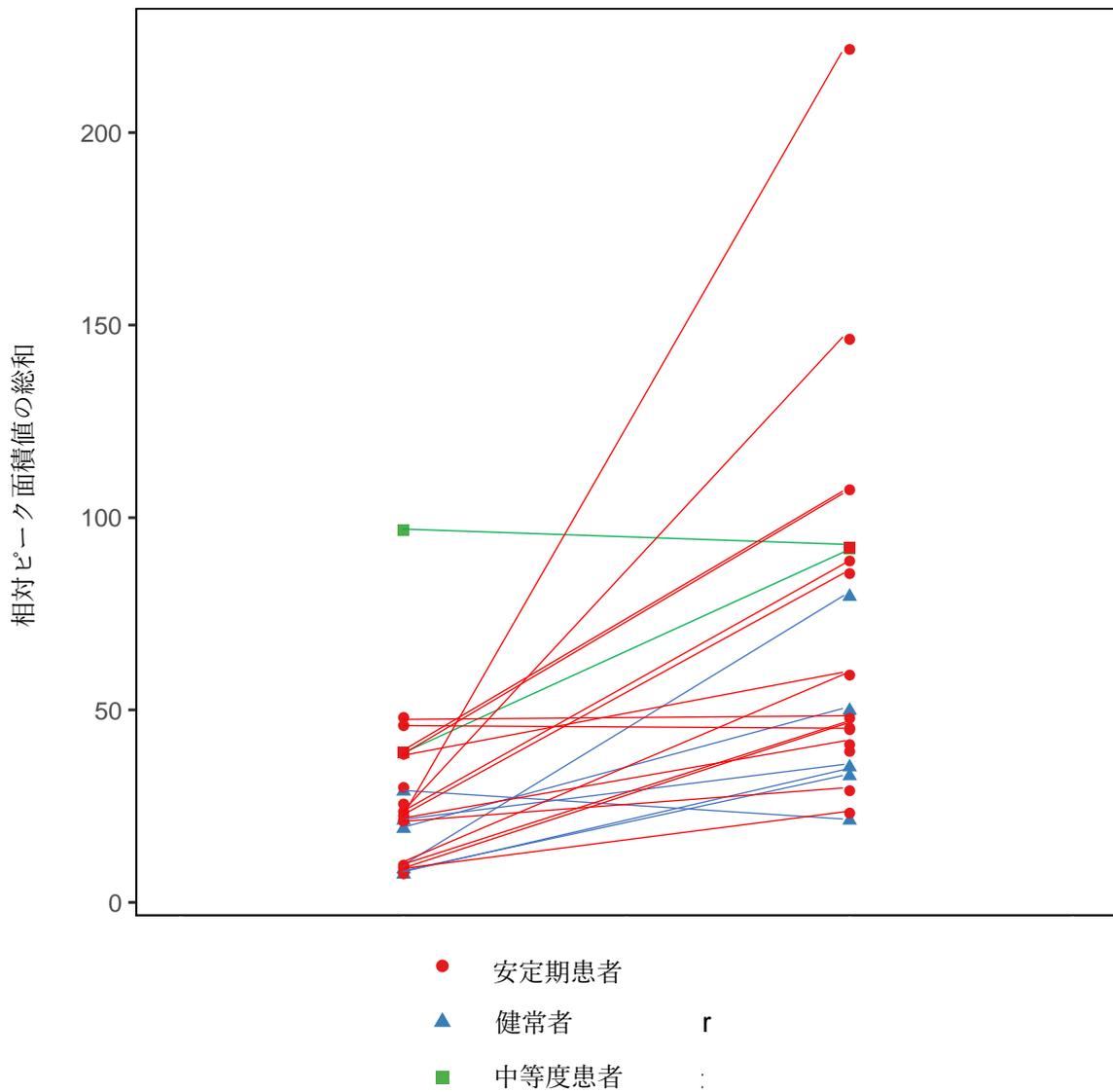


図 5-10 非凍結試料と凍結試料の代謝物の検出量の総和の比較
 左) 非凍結試料, 右) 凍結融解試料

表 5-7 代謝物の検出量の総和の比（凍結融解試料 / 非凍結試料）

被験者番号	増加量 (凍結融解試料 / 非凍結試料)	状態
R1	0.74	健常者
R2	1.3	安定期患者
R3	0.99	安定期患者
R4	1.8	健常者
R5	1.8	安定期患者
R6	0.85	安定期患者
R7	2.8	安定期患者
R8	3.0	安定期患者
R9	1.3	安定期患者
R10	4.9	安定期患者
R11	0.95	中等度患者
R12	2.3	健常者
R13	6.1	安定期患者
R14	9.2	健常者
R15	5.0	安定期患者
R16	10	安定期患者
R17	4.5	健常者
R18	6.4	安定期患者
R19	3.5	安定期患者
R20	3.6	安定期患者
R21	2.4	中等度患者

表 5-8 ターゲットとした自然唾液中代謝物

有機酸	乳酸, グリコール酸, リン酸, リンゴ酸, 5-アミノ吉草酸, オロト酸
アミノ酸	アラニン, プロリン, バリン, セリン, ロイシン, イソロイシン, トレオニン, グリシン, アスパラギン酸, アミノマロン酸, メチオニン, ピログルタミン酸, GABA, フェニルアラニン, グルタミン酸, タウリン, グリシルグリシン, チロシン
アミン	尿素, エタノールアミン, 尿酸

5.2 歯学部附属病院での唾液検体測定

オンサイト歯周病診断法開発に向けて、採取したサンプルを凍結させずにその場で迅速に分析してデータを集めるために、大学附属病院に分析システムを導入する必要がある。そこで GC/MS システムを大阪大学歯学部附属病院に持ち込み、5.1 節で検討した迅速分析法を用いて非凍結唾液試料の迅速分析を行った。

大阪大学歯学部附属病院にて、健常者 10 名、歯周病患者 17 名（うち 15 名は安定期歯周病患者）から自然唾液、刺激性唾液を採取し、迅速 SPAD 法・改良迅速 SPAD 法を用いてただちに分析した。今回の歯学部附属病院での検体採取・分析は、2019 年 11 月 13 日から 12 月 20 日までの約一ヶ月半で実施し、治療介入を行わずに安定期（炎症レベルは健常人レベル）に入った患者は 15 名集めることができたが、新規来院の治療未介入患者が 2 名と少なく、その症状は中程度であった。

GC/MS システムの積み込み、セットアップ、実験周辺環境の様子を図 5-11, 5-12, 5-13 に示す。運搬のためにバンを 1 台レンタルし、ガスクロマトグラフ質量分析計、実験道具、ヘリウムボンベ (10 L) などを積み込んで大阪大学豊中キャンパスの理学研究科から吹田キャンパスの大阪大学歯学部附属病院まで運び、診療室横の会議スペースを実験室として使用した。診療室で患者から検体を採取し、採取後ただちに検体を実験室に運び分析を開始した。



図 5-11 GC/MS システム積み込み・移動の様子

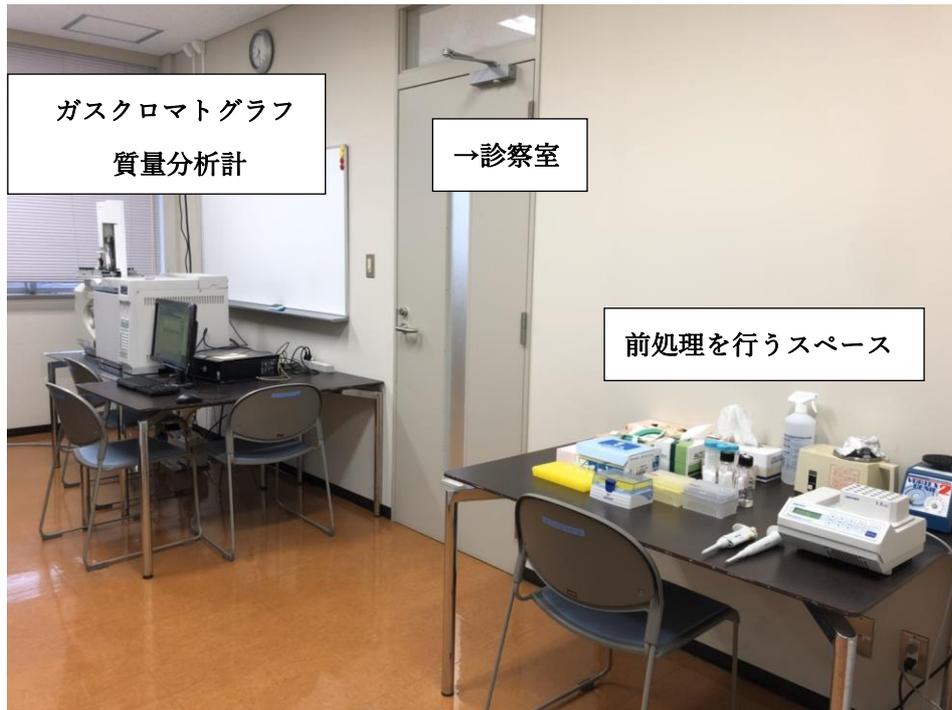


図 5-12 GC/MS システム セットアップ後の実験室の様子



図 5-13 実験室の隣の診療室（大阪大学歯学部附属病院総合診療科診療室）

5.2.1 自然唾液中代謝物の測定結果

5.1 節で検討した迅速分析法を、実際の歯周病患者に適用するために、被験者 27 名の自然唾液検体を採取後ただちに分析し、4.5 節同様に判別分析を行った。27 検体のうち一部の検体のマスキンググラム (m/z 73) を図 5-14 に示す。検出されたピーク計 70 成分 (うち 58 成分は同定済み) について相対面積値を求め、健常者と安定期・中等度歯周病患者の 2 群として OPLS 判別分析を行った。図 5-15, 5-16 にスコアプロット, ローディングプロットを示す。図 5-15 において、横軸が PC1, 縦軸が PC2, 色分けは緑が健常者, 青が安定期・中等度歯周病患者である。図 5-15 中の青線は健常者と安定期・中等度歯周病患者を判別する境界線である。図 5-16 について、横軸が PC1, 縦軸が PC2 である。

図 5-15 から、健常者と中等度歯周病患者 (赤文字) を境界線の左右で判別できることがわかった。図 5-16 から、PC1 に大きく寄与していたのは乳酸, グリコール酸, リン酸, 未同定代謝物 UNON8 で、患者で検出量が多いことがわかった。PC2 に大きく寄与していたのはグリシン, 尿素, 5-アミノ吉草酸, 未同定代謝物 UNON1 で、特に中等度歯周病患者 R11 で検出量が多いことがわかった。図 5-15 の判別分析では健常者と安定期・中等度歯周病患者の 2 群の判別を試みたが、結果は R5, 8, 13, 15, 18, 20 の 6 名のみ健常者側にプロットされた。安定期歯周病患者は見た目と PISA 値においては健常者とほぼ同じ炎症レベルまで下がっているが、代謝物の検出量は、1. 健常者と同じレベルの患者, 2. 治療未介入の中等度歯周病患者と同じレベルの患者の両方がいることがわかった。安定期歯周病患者について、1, 2 でそれぞれ臨臨床的な観点から共通点があるのか、調べる必要がある。

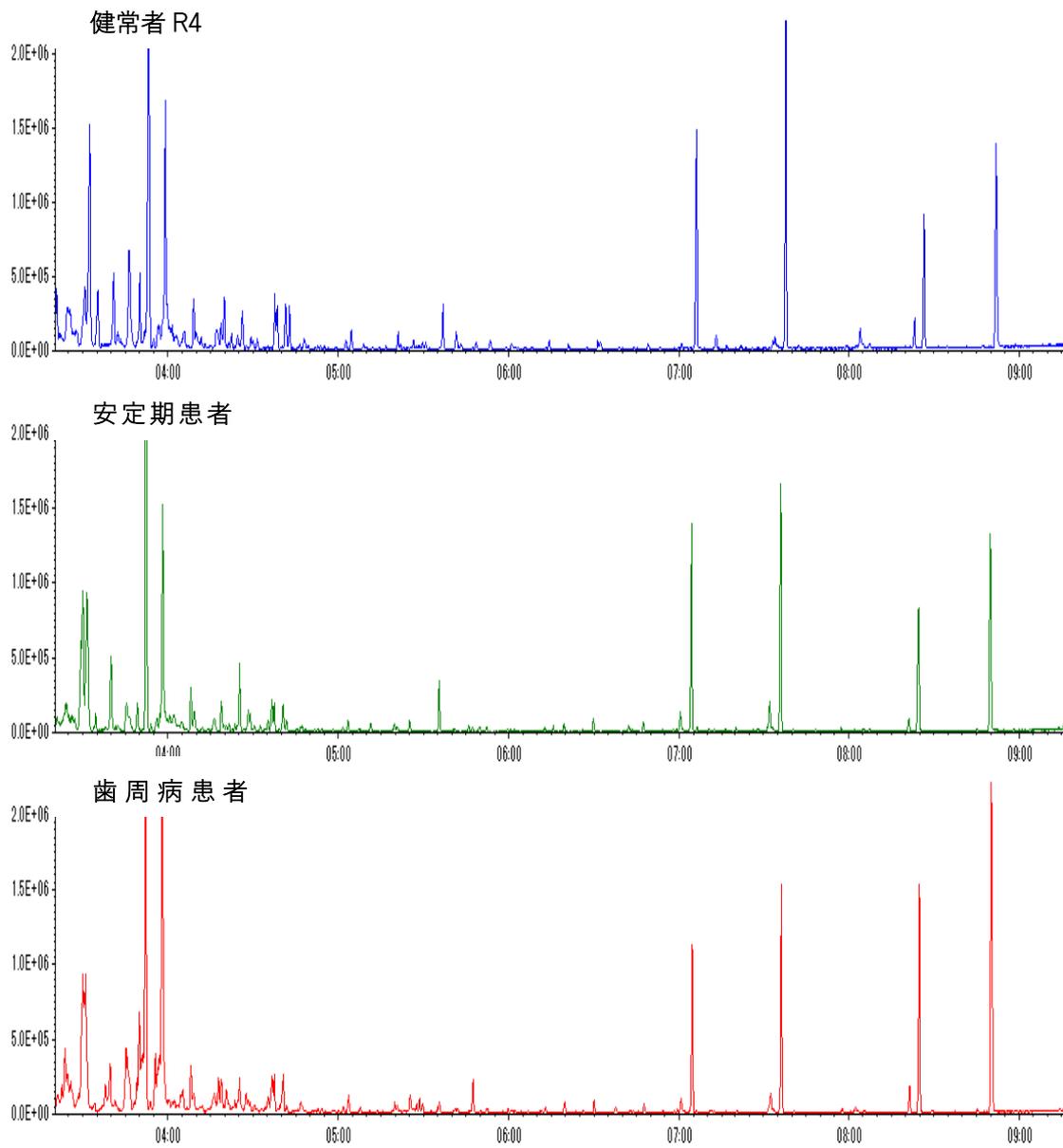


図 5-14 健常者, 患者から採取した自然唾液のマスクロマトグラム (m/z 73)

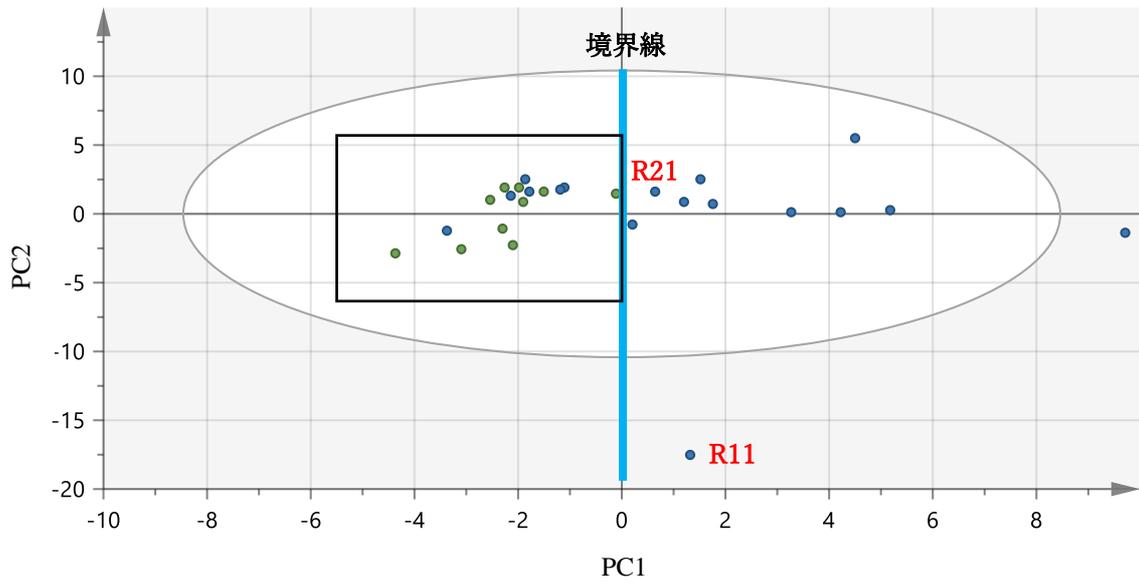


図 5-15 健常者，歯周病患者の自然唾液中代謝物の OPLS-DA (スコアプロット)

緑) 健常者，青) 安定期患者，中等度患者

赤文字は中等度歯周病患者

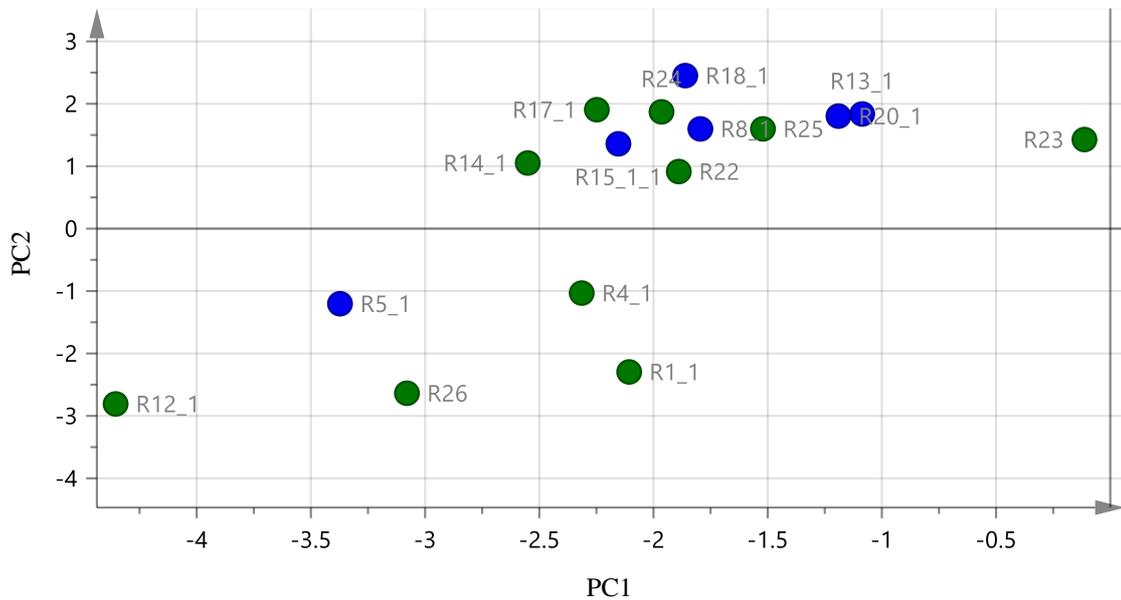


図 5-15 (2) 黒枠内拡大図

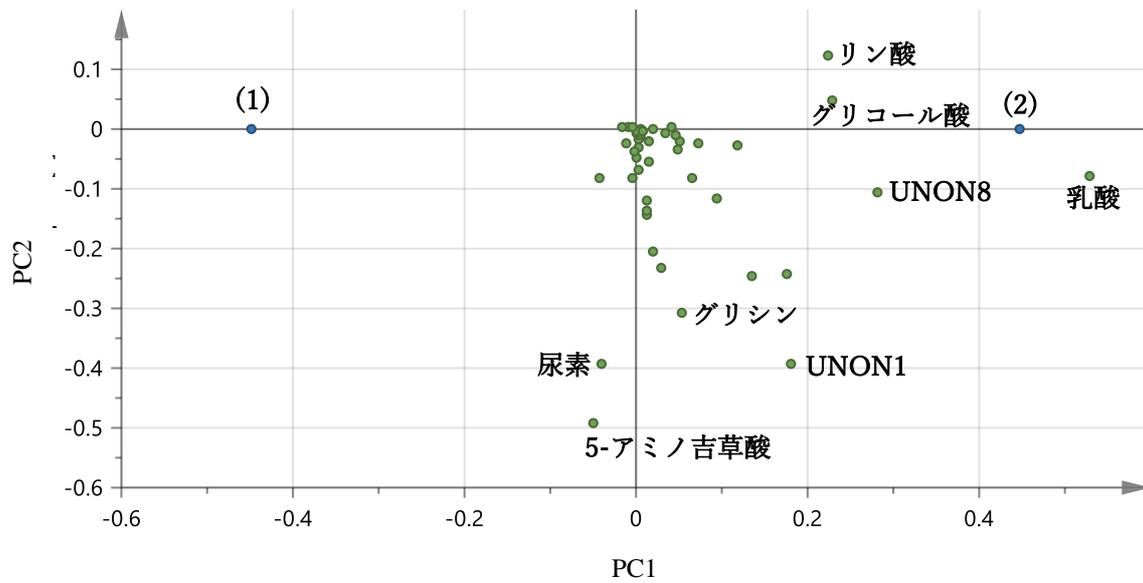


図 5-16 健常者，歯周病患者の自然唾液中代謝物の OPLS-DA（ローディングプロット）
 緑）代謝物，青）歯周病罹患の有無（(1)；健常，(2)；歯周病）

5.2.2 刺激性唾液中代謝物の測定結果

5.2.1 項同様に、迅速分析法を実際の歯周病患者に適用するために、被験者 27 名の刺激性唾液検体を採取後ただちに分析し、判別分析を行った。被験者 27 名の刺激性唾液を採取後ただちに分析した。27 検体のうち一部の検体のマスキロマトグラム (m/z 73) を図 5-17 に示す。刺激性唾液から検出されたピーク 75 成分 (うち 68 成分は同定済み) について、相対面積値を求め健常者と安定期・中等度歯周病患者の 2 群として OPLS 判別分析を行った。図 5-18, 5-19 にスコアプロット、ローディングプロットを示す。図 5-18 の横軸は PC1, 縦軸は PC2 で、色分けは緑が健常者, 青が安定期・中等度歯周病患者である。図 5-19 について、横軸が PC1, 縦軸が PC2 である。

図 5-18 から、本実験結果では健常者と安定期・中等度歯周病患者を判別できないことがわかった。4.5.2 項の凍結融解させた刺激性唾液試料では図 4-14 の判別分析結果が示すように判別できたことから、本実験で異なる結果を得た理由としては、試料の凍結・非凍結による代謝物検出量の変化、サンプルの条件の違い (被験者の年齢層, 採取前条件) が考えられる。原因を調べるために、従来 SPAD 法を用いて全てのサンプルを分析し、同様に解析を行って確認する必要があるが、本実験ではできていない。

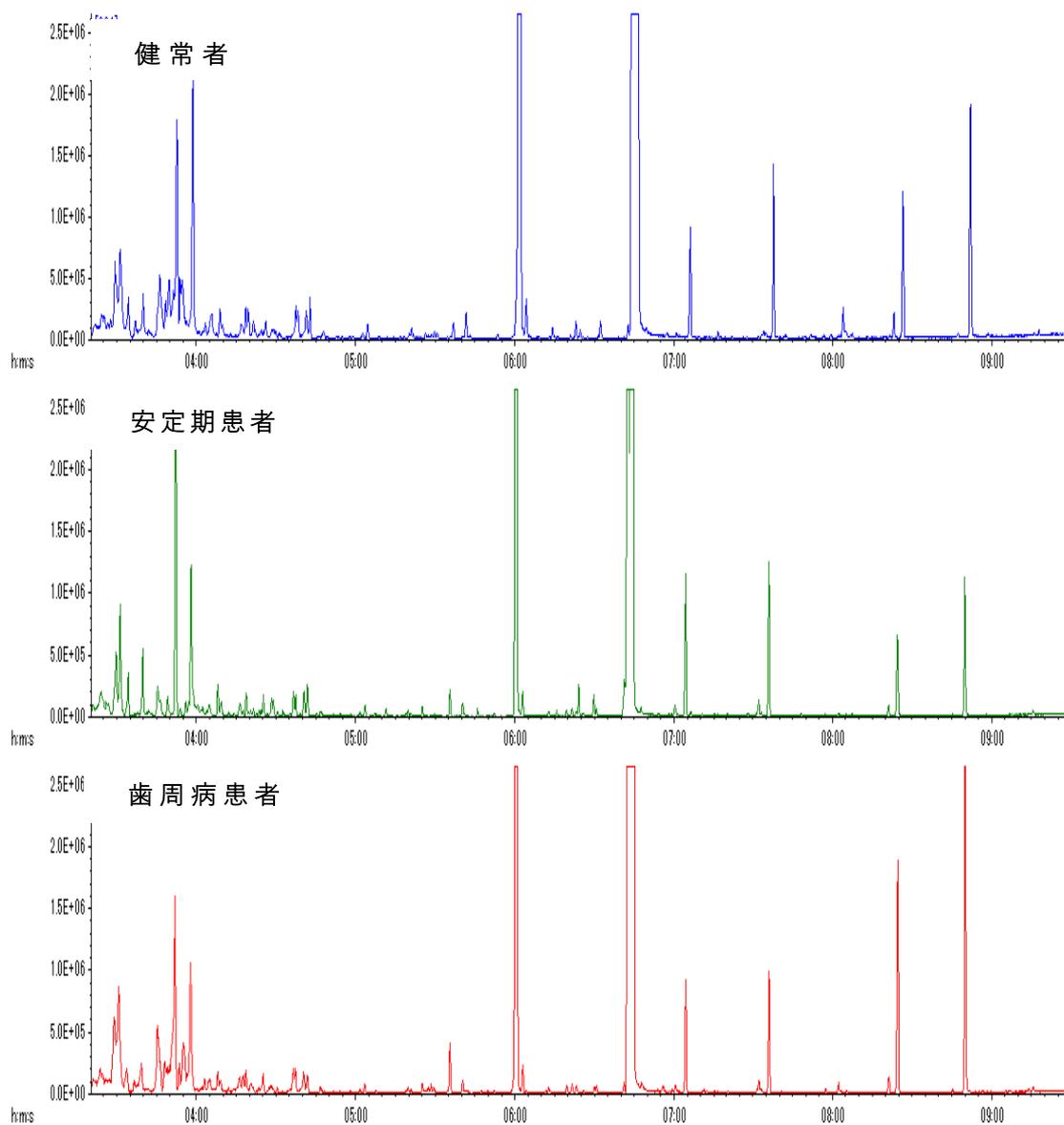


図 5-17 健常者，患者から採取した刺激性唾液のマスクロマトグラム (m/z 73)

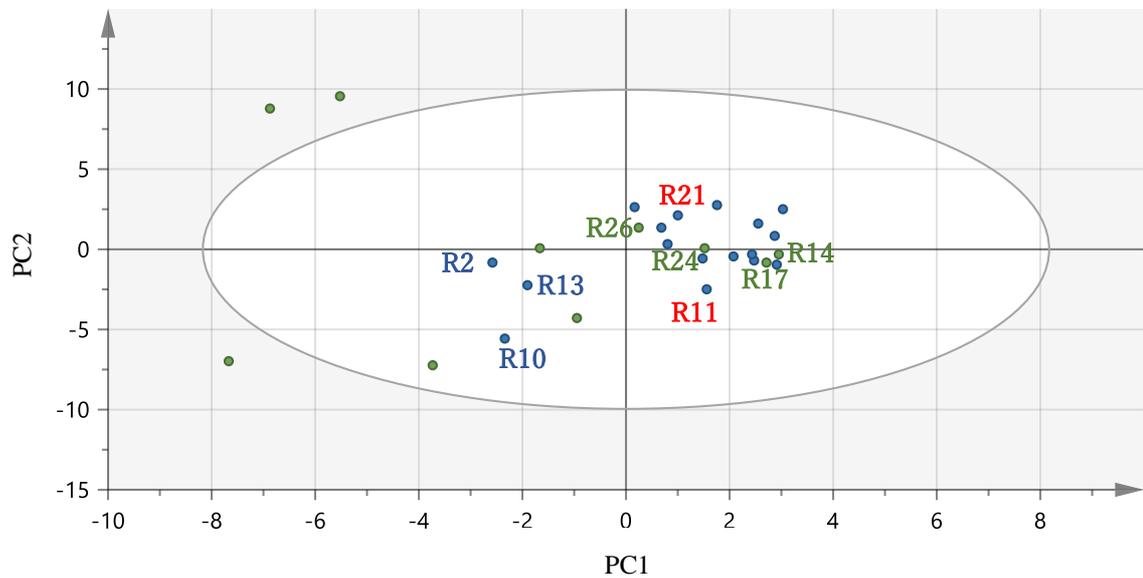


図 5-18 健常者，歯周病患者の刺激性唾液中代謝物の OPLS-DA (スコアプロット)

緑) 健常者，青) 安定期・中等度患者

緑文字は患者側にプロットされた健常者，青文字は健常者側にプロットされた安定期歯周病患者，赤文字は中等度歯周病患者

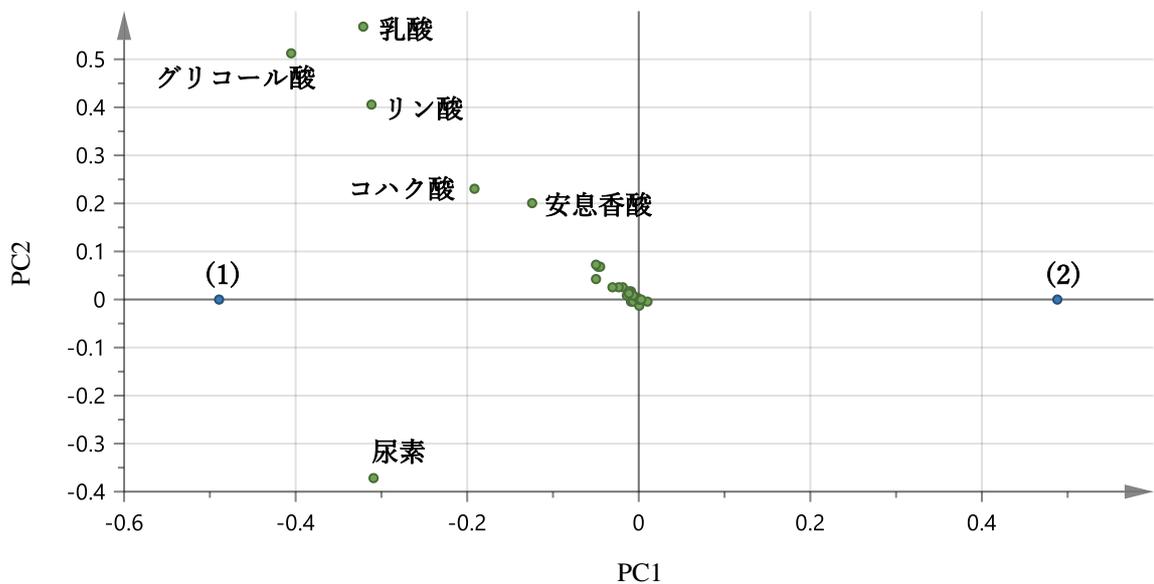


図 5-19 健常者，歯周病患者の刺激性唾液中代謝物の OPLS-DA (ローディングプロット)

緑) 代謝物，青) 歯周病罹患の有無 ((1)；健常，(2)；歯周病)

・5章まとめ

大学附属病院内でのオンサイト診断に向けて、代謝物の迅速分析法の検討とその評価を行った。代謝物を迅速に分析するために、前処理過程のタンパク質沈殿、分析に用いる GC カラムと昇温速度に注目して、時間短縮について検討した。タンパク質を迅速に沈殿させるために試料と混合させる有機溶媒の温度を下げ、前処理に要する時間を 45 分から 20 分に短縮した。また GC/MS 分析については、使用する GC カラムを従来よりも内径が小さく、膜厚の薄いカラムに変えて、分析に要する時間を 25 分から 10 分に短縮した。以上から 1 検体につき 30 分で前処理から分析まで完了できるようになった。考案した迅速 SPAD 法と従来の SPAD 法で得られる分析結果を比較するために、同じ試料を両分析法で分析した。ピーク面積値を比較し、両分析法で得られる代謝物の検出量はおおむね相関があることがわかった。

採取した試料をその場で迅速に分析するために、前処理を含む GC/MS システムを大阪大学歯学部附属病院に持ち込んでセットアップし、被験者から採取した自然・刺激性唾液をただちに分析した。OPLS 判別分析の結果、自然唾液では健常者と中等度歯周病患者を判別することができ、また安定期歯周病患者については健常者に判別される検体と患者に判別される検体の両方があることがわかった。この実験結果については、臨床データと照らし合わせてさらに議論をする必要がある。また、刺激性唾液については、本実験では健常者と安定期歯周病患者を判別できないことがわかった。

6. まとめ

本研究結果として、自然・刺激性唾液中代謝物の検出量の違いから歯周病の判別ができた。また唾液中代謝物の迅速分析法の検討、評価を行い、1検体30分で分析ができるようになった。

本研究の次の目標は、病院での実試料分析を通してデータを蓄積し堅牢な診断・予測モデルを作成することである。これにより他の疾病の有無、投薬の有無など様々な状態にある実際の歯周病患者においても歯周病診断や、治療効果の定量的評価・予測などの研究につながると期待される。

謝辞

豊田岐聡教授には、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。大須賀潤一特任研究員には、装置の使用法、研究方針に関して多くのご指導をいただきました。兼松泰男教授、石原盛男准教授、古谷浩志准教授、青木順助教、中山典子助教、樋上照男招へい研究員、三宅ゆみ特任技術職員には、実験結果に対して貴重なご意見をいただきました。大阪大学歯学研究科の村上伸也教授、大阪大学歯学部附属病院の野崎剛徳准教授には、本研究で使用した検体である自然唾液、刺激性唾液、GCF、プラークの採取をしていただき、臨床的な知見から実験結果に対して貴重なご意見をいただきました。大阪大学歯学研究科北村正博先生、藤原千春先生、柏木陽一郎先生、岩山智明先生、大阪大学歯学部附属病院の山下元三先生、竹立匡秀先生、三木康史先生、三浦治郎先生、清水真人先生には、本研究で使用した検体である自然唾液、刺激性唾液、歯肉溝滲出液、プラークの採取をしていただきました。九州大学生体防御医学研究所の馬場健史教授には、メタボロミクス研究に関して貴重なご意見をいただきました。京都大学薬学研究科石濱泰教授には、プロテオミクス実験手法に関してご指導いただきました。深く感謝申し上げます。

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生活を送る上で大変お世話になりました。深く感謝申し上げます。

本研究は、大阪大学歯学部倫理審査委員会(承認番号 H29-E41)の承認のもと行われました。

本研究は、

・大阪大学 Innovation Bridge グラント 大型産学共創コンソーシアム組成支援プログラム (代表 豊田岐聡)「オンサイト歯周病診断質量分析システムの開発」

・学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) 15K11386 (代表 野崎剛徳)

「低分子メタボロームの質量分析による歯周病と全身疾患の相互関連メカニズムの解明」

・学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) 19K101660 (代表 野崎剛徳)

「再生治療が組織にもたらす代謝アダプテーションと3次元超微細構造変化の解析」

の支援によって行われました。

参考文献

- [1] 『日本人はこうして歯を失っていく』 日本歯周病学会, 日本臨床歯周病学会著 朝日新聞
- [2] 『歯周病学』 沼部 幸博, 齋藤 淳, 梅田 誠 永末書店
- [3] 『第2版 Lindhe 臨床歯周病学』 岡本 浩/監訳, 医歯薬出版株式会社
- [4] 『歯周病診断のストラテジー』 吉江 弘正, 宮田 隆/編著, 医歯薬出版株式会社
- [5] 『ビジュアル歯周病を科学する』 天野 敦雄, 岡 賢二, 村上 伸也/監修, クインテッセ
ンス出版株式会社
- [6] Willem Nesse, Frank Abbas, Ids Van Der Ploeg, Frederik Karst Lucien Spijkervet, Pieter
Uble Dijkstra, Arjan Vissink. Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory
burden. *Journal of Clinical Periodontology* **35**, 8 (2008).
- [7] I. Matsumoto, T. Kuhara. A new chemical diagnostic method for inborn errors of
metabolism by mass spectrometry – rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites
analysis. *Mass Spectrometry Reviews* 1996, **15**, 1, 43-57 (1996).
- [8] S. Nishiumi, M. Nishihara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno,
T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida. Serum
metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*, **6**, 518-
528 (2010).
- [9] G. X. Xie, T. L. Chen, Y. P. Qiu, P. Shi, X. J. Zheng, M. M. Su, A. H. Zhao, Z.T. Zhou, W.
Jia. Urine metabolite profiling offers potential early diagnosis of oral cancer. *Metabolomics*,
8, 220-231 (2012).
- [10] R. Liu, Y. Peng, X. Li, Y. Wang, E. Pan. W. Guo, Y. Pu, L. Yin. Identification of Plasma
Metabolomic Profiling for Diagnosis of Esophageal Squamous-Cell Carcinoma Using an
UPLC/TOF/MS Platform. *International Journal of Molecular Science*, **14(5)**, 8899-8911
(2013).
- [11] M. Ozeki, T. Nozaki, J. Aoki, T. Bamba, K. R. Jensen, S. Murakami, M. Toyoda.
Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass
Spectrometry. *Mass Spectrometry*, **5**, A0047 (2016).
- [12] 尾関美穂 オンサイト歯周病診断に向けた代謝物マーカーの探索 修士論文 2015, 3
- [13] E. Takeo, R. Sasano, S. Shimma, T. Bamba, E. Fukusaki. Solid-phase analytical
derivatization for gas-chromatography-mass-spectrometer-based metabolomics. *Journal of*

- Bioscience and Bioengineering*, **6**, 700-706 (2017).
- [14] Y. Kanda. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 2013, 48, 452-458 URL (<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>)
- [15] R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- [16] Marianne C Walsh, Lorraine Brennan, J Paul G Malthouse, Helen M Roche, and Michael J Gibney. Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **84**, 531-539 (2006).
- [17] Y. Nakamura, H. Kodama, T. Satoh. Diurnal changes in salivary amino acids concentrations. *Vivo*, **24(6)**, 837-842 (2010).
- [18] M. Kuboniwa, A. Sakanaka, E. Hashino, T. Bamba, E. Fukusaki, A. Amano. Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *Journal of Dental Research*, **95(12)**, 1381-1386. (2016)
- [19] N. Takahashi, J. Washio, G. Mayanagi. Metabolomics of Supragingival Plaque and Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*, **89(12)**, 1383-1388 (2010)
- [20] M. S. Tswett and the discovery of chromatography I : Early work (1899-1903). *Chromatographia*, **35**, 3-4 (1993).
- [21] M. S. Tswett and the Discovery of Chromatography II : Completion of the Development of Chromatography (1903-1910). *Chromatographia*, **35**, 5-6 (1993).
- [22] Shyamal Subramanyam, Maria Spies. Expression, Purification, and Biochemical Evaluation of Human RAD51 Protein. *Method in Enzymology* **600**, 157-178 (2018)

患者の臨床データ (4章)

被験者番号	年齢	年齢	症状	PISA
P1	F	53	軽中度患者	241.5
P2	M	54	軽度患者	388.9
P3	F	48	軽度患者	45.0
P4	F	42	軽中度患者	815.5
P5	F	41	軽度患者	53.0
P6	F	50	軽度患者	464.5
P7	F	47	軽中度患者	428.2
P8	F	54	軽度患者	21.6
P11	F	50	軽度患者	321.9
P16	F	47	軽度患者	245.5
P18	F	41	軽度患者	217.9
P19	F	42	軽度患者	73.9
P20	F	46	軽中度患者	434.0
P22	M	44	軽中度患者	1311.9
P23	F	49	軽度患者	185.0
P27	F	50	軽中度患者	758.3
P30	F	57	軽中度患者	398.6
P31	F	51	軽度患者	568.7
P39	F	50	軽度患者	322.1
P40	M	43	軽中度患者	575.3
P41	M	49	軽度患者	576.9
P43	M	72	軽中度患者	759.4
P44	M	50	軽度患者	182.4
P47	M	51	軽度患者	62.1

健常者の臨床データ (4章)

被験者番号	性別	年齢
H1	M	36
H2	F	35
H3	M	29
H4	M	29
H5	F	32
H6	F	27
H7	F	27
H8	F	27
H9	M	34
H10	F	31
H11	M	28
H12	M	29
H13	F	28
H14	M	31
H15	F	26
H16	F	25
H17	M	35
H18	M	32
H19	M	37
H20	M	29

健常者，患者の臨床データ（5章）

被験者番号	性別	年齢	症状	PISA
R1	F	66	健常者	8.0
R2	F	48	安定期	8.8
R3	F	56	安定期	50.9
R4	M	68	健常者	0
R5	F	61	安定期	94.8
R6	F	36	安定期	26.2
R7	F	43	安定期	0
R8	F	54	安定期	160.9
R9	F	72	安定期	125.0
R10	F	89	安定期	51.8
R11	M	48	患者	541.5
R12	F	53	健常者	32.2
R13	F	55	安定期	43.7
R14	F	55	健常者	0
R15	F	57	安定期	0
R16	F	42	安定期	48.2
R17	M	37	健常者	136.7
R18	F	55	安定期	34.9
R19	F	54	安定期	14.9
R20	F	71	安定期	41.7
R21	M	75	患者	618.0
R22	F	56	健常者	58.0
R23	F	77	健常者	6.5
R24	F	84	健常者	25.4
R25	F	79	健常者	21.6
R26	M	56	健常者	36.2
R27	F	57	安定期	241.0

同定化合物一覧

化合物名	保持時間 [min]	保持時間 [min]	定量イオン [m/z]
	15 °C/min (表 3-13)	35 °C/min (表 3-14)	
C10	7.13	3.28	57
プロピルアミン 2TMS	7.38	3.38	174
乳酸 TMS	7.78	3.57	117
グリコール酸 2TMS	7.92	3.63	147
アラニン 2TMS	8.25	3.75	116
C11	8.3	3.77	57
プロリン TMS	9.1	4.12	70
C12	9.2	4.23	57
バリリン 2TMS	9.43	4.27	144
尿素 2TMS	9.67	4.37	189
セリン 2TMS	9.8	4.47	132
安息香酸 TMS	9.88	4.45	179
グリセリン 3TMS	9.93	4.5	147
エタノールアミン 3TMS	10.05	4.55	174
リン酸 3TMS	9.97	4.48	299
ロイシン 2TMS	10.08	4.5	158
イソロイシン 2TMS	10.2	4.58	158
トレオニン 2TMS	10.23	4.62	147
プロリン 2TMS	10.3	4.62	142
マレイン酸 2TMS	10.3	4.63	147
グリシン 3TMS	10.35	4.67	174
C13	10.33	4.65	57
コハク酸 2TMS	10.38	4.68	147
メチルコハク酸 2TMS	10.5	4.72	147
セリン 3TMS	10.78	4.85	204
トレオニン 3TMS	11.02	4.95	218
C14	11.27	5.05	57
ヒドロキシ桂皮酸 TMS	11.48	5.15	104

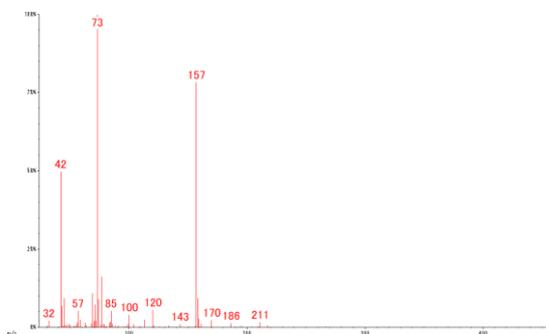
メチオニン TMS	11.4	5.12	104
アスパラギン酸 2TMS	11.42	5.12	160
アミノマロン酸 3TMS	11.78	5.32	218
アスパラギン酸 3TMS	12.18	5.33	232
リンゴ酸 3TMS	11.9	5.33	147
C15	12.12	5.26	57
メチオニン 2TMS	12.27	5.47	176
ピログルタミン酸 2TMS	12.32	5.48	156
GABA 3TMS	12.33	5.53	174
フェニルアラニン TMS	12.6	5.62	120
2-イソプロピルリンゴ酸 2TMS	12.68	5.67	275
C16	12.93	5.78	57
グルタミン酸 3TMS	13	5.8	246
ヒスタミン 2TMS	13.12	5.87	154
5-アミノ吉草酸 3TMS	13.13	5.85	174
フェニルアラニン 2TMS	13.17	5.87	218
キシロース 4TMS	13.2	5.9	217
リキソース 4TMS	13.25	5.92	217
アラビノース 4TMS	13.27	5.93	217
リボース 4TMS	13.38	5.97	217
アスパラギン 3TMS	13.45	6	116
タウリン 3TMS	13.48	6.02	326
C17	13.72	6.12	57
キシリトール 5TMS	13.62	6.07	319
アラビトール 5TMS	13.7	6.12	319
ラムノース 5TMS	13.72	6.12	117
フコース 4TMS	13.82	6.12	117
オロト酸 3TMS	14.05	6.27	254
プロレシン 4TMS	14.98	6.23	174
C18	14.45	6.43	57
グルタミン 3TMS	14.18	6.32	156
ヒポキサンチン 2TMS	14.63	6.45	230

グリシルグリシン 3TMS	14.7	6.48	174
カダベリン 4TMS	14.82	6.55	174
フルクトース 5TMS	14.82	6.6	307
フルクトース 5TMS	14.88	6.63	307
アスパラギン 4TMS	14.92	6.5	188
ガラクトース 5TMS	14.97	6.67	319
ヒスタミン 3TMS	15.02	6.68	174
グルコース 5TMS	15.1	6.73	319
マンノース 5TMS	15.08	6.72	319
チロシン 2TMS	15.1	6.7	179
C19	15.15	6.75	57
グルコース 5TMS	15.25	6.8	319
ガラクトース 5TMS	15.13	6.75	319
リジン 4TMS	15.23	6.78	317
マンニトール 6TMS	15.3	6.82	319
ソルビトール 6TMS	15.32	6.82	319
チロシン 3TMS	15.38	6.83	218
アスコルビン酸 4TMS	15.4	6.85	332
C20	15.82	7.03	57
キサントシン 3TMS	15.98	7.05	353
パルミチン酸 TMS	16.08	7.15	313
N-アセチルグルコサミン メトキシ 4TMS	16.33	7.27	319
N-アセチルグルコサミン 4TMS	16.4	7.27	173
N-アセチルグルコサミン 4TMS	16.43	7.3	173
イノシトール 6TMS	16.33	7.27	217
C21	16.45	7.32	57
尿酸 4TMS	16.48	7.27	441
C22	17.07	7.58	57
トリプトファン 3TMS	17.2	7.65	202
ステアリン酸 TMS	17.28	7.68	341
C23	17.63	7.83	57

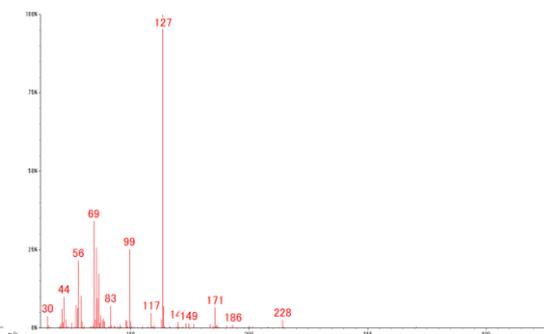
C24	18.2	8.08	57
C25	18.73	8.32	57
C26	19.25	8.55	57
アデノシン 4TMS	19.38	8.6	236
ラクトース 8TMS	19.17	8.65	361
ラクトース 8TMS	19.32	8.7	361
スクロース 8TMS	19.32	8.7	361
セロビオース 8TMS	19.5	8.78	361
C27	19.75	8.78	57
トレハロース 7TMS	19.88	8.82	361
グアノシン 5TMS	20.12	8.88	324
C28	20.25	8.98	57
マルチトール 9TMS	20.43	9.08	361
イソマルトース 8TMS	20.52	9.2	361
C29	20.77	9.2	57

未同定化合物のマススペクトル一覧

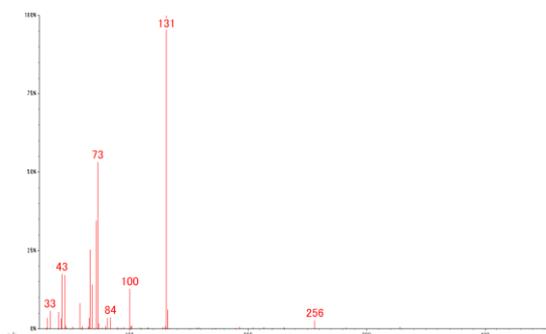
UNG1 : R.T. 9:51



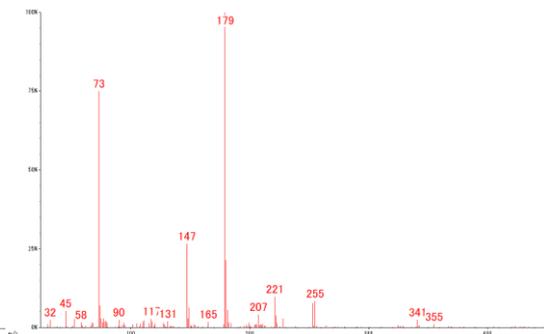
UNG2 : R.T. 10:05



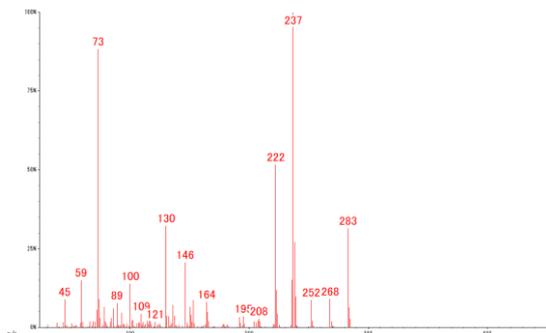
UNG5 : R.T. 11:09



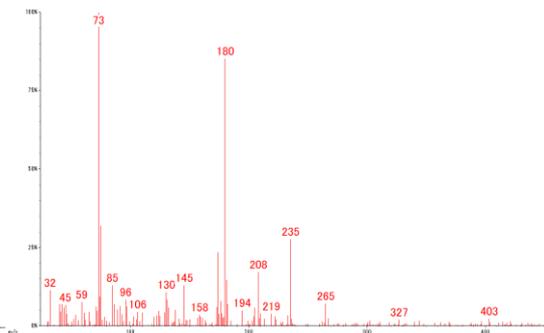
UNG7 : R.T. 11:55



UNG8 : R.T. 12:24

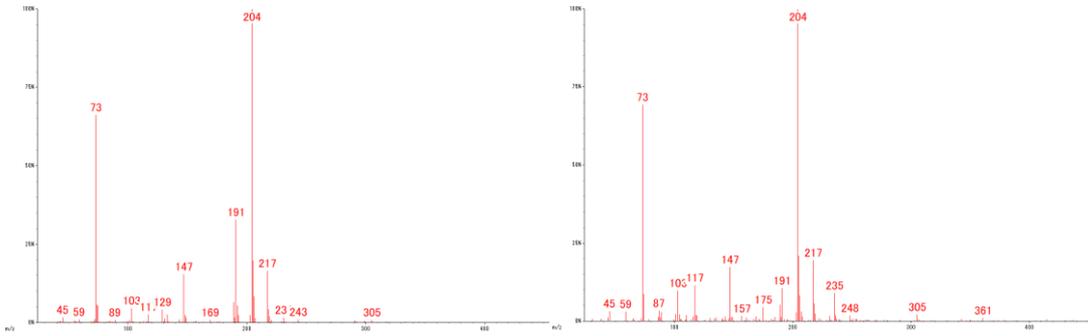


UNG11 : R.T. 14:16

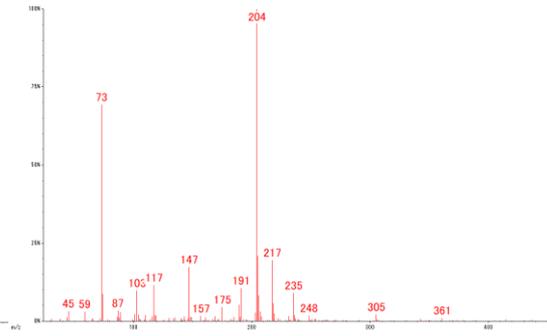


UNG12 : R.T. 15:34

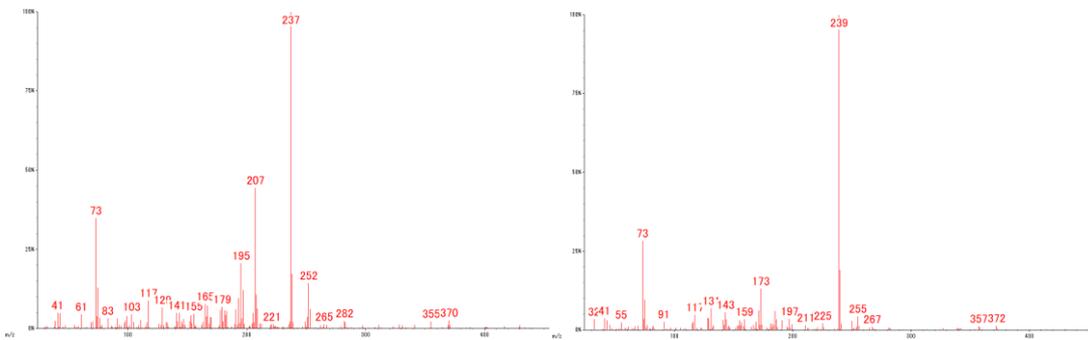
UNG14 : R.T. 16:34



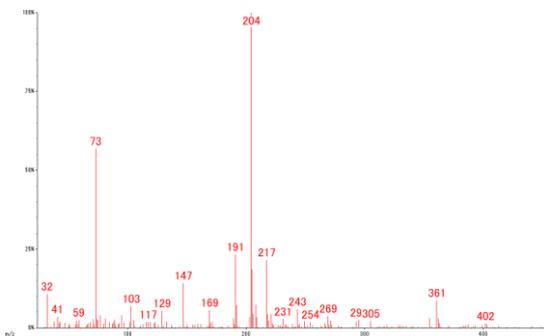
UNG15 : R.T. 18:09



UNG16 : R.T. 18:16

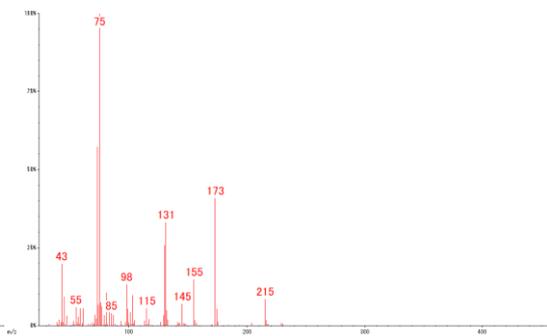
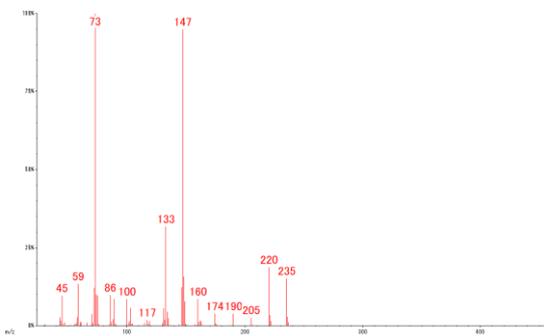


UNG20 : R.T. 19:11



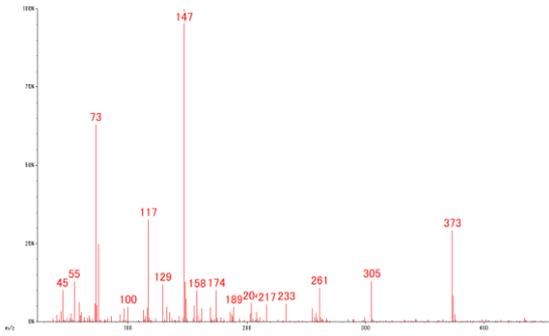
UNN1 : R.T. 8:42

UNN2 : R.T. 9:01

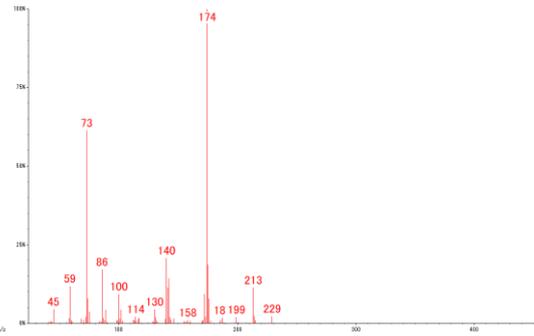


UNN7 : R.T. 11:15

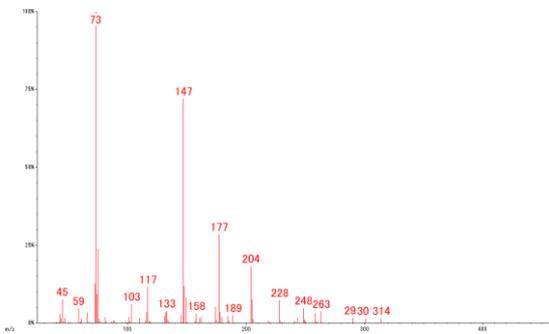
UNN8 : R.T. 11:19



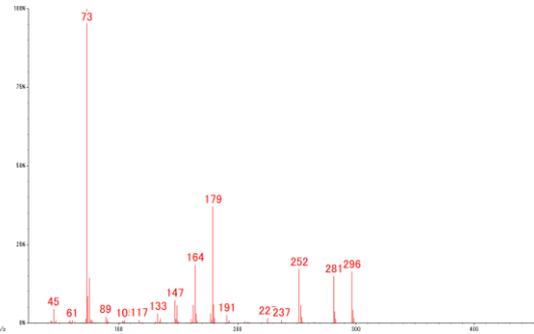
UNN9 : R.T. 11:28



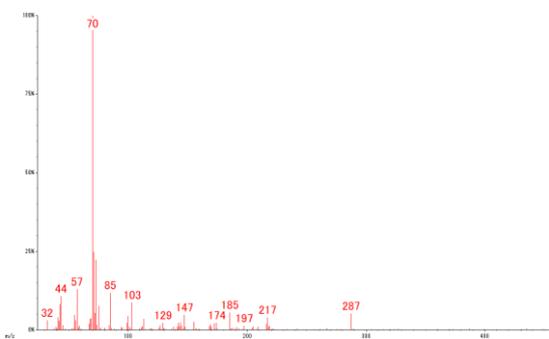
UNN22 : R.T. 13:17



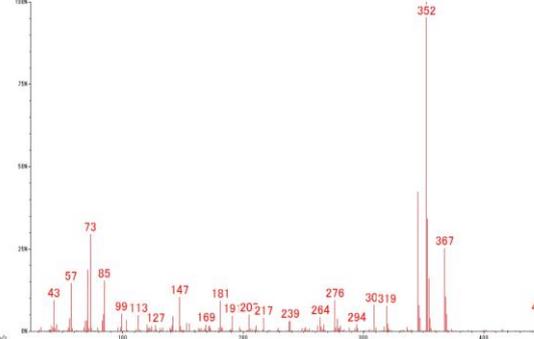
UNN27 : R.T. 13:55



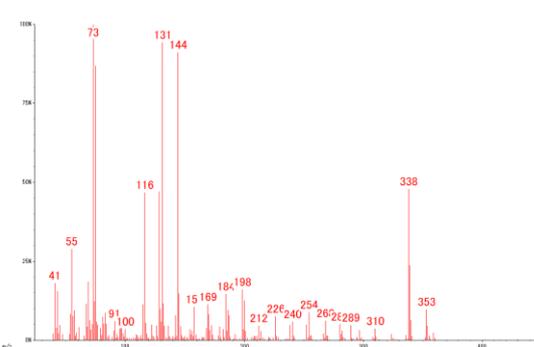
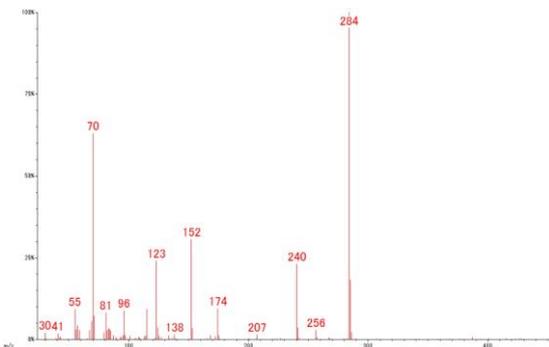
UNN46 : R.T. 16:38



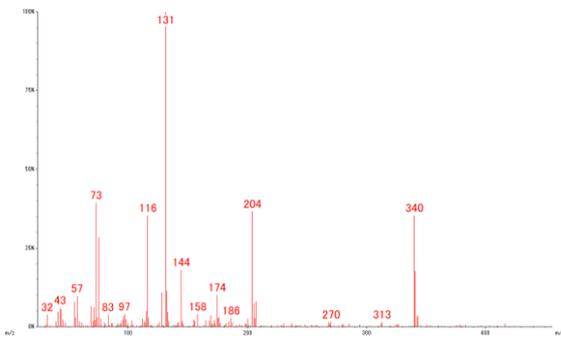
UNN57 : R.T. 17:31



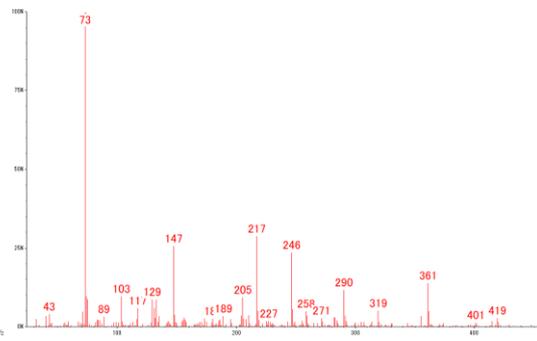
UNN65 : R.T. 18:20



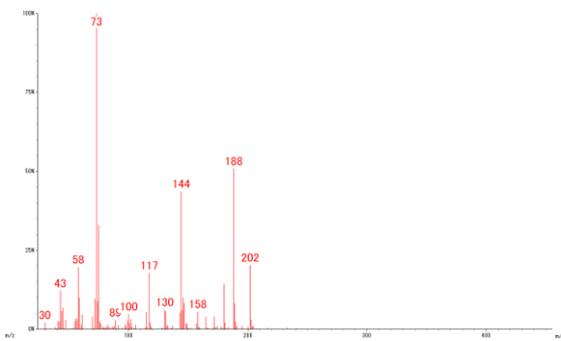
UNN66 : R.T. 18:28



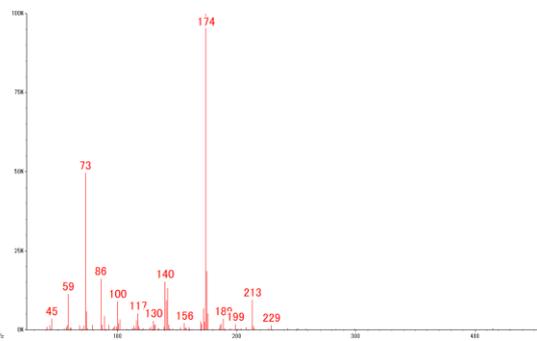
UNN75 : R.T. 19:21



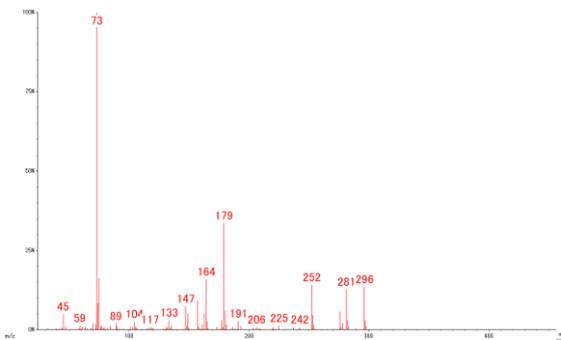
UNS3 : R.T. 9:05



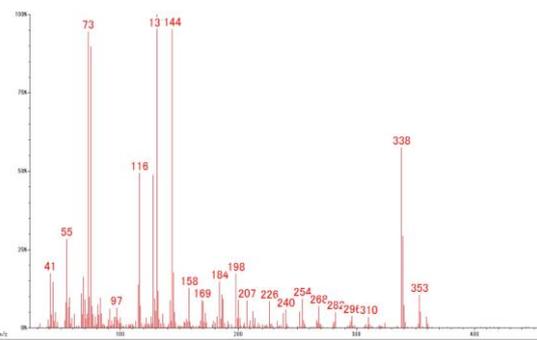
UNS7 : R.T. 11:19



UNS14 : R.T. 13:16



UNS34 : R.T. 18:20



UNS35 : R.T. 18:28

UNS40 : R.T.

