オンサイト歯周病診断に向けた
代謝物マーカーの探索

大阪大学大学院理学研究科博士前期過程物理学専攻

豊田研究室
尾関美穂

2015 年 3 月

目次

1 はじめに 3
1.1 歯周病 3
1.2 本研究の目的 3
1.3 メタボロミクスによる医療診断 4
1.4 実験装置 4

2 メタボロミクスによる医療診断の原理 7
2.1 ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS） 7
2.2 主成分分析（PCA） 9

3 歯肉溝滲出液のメタボロミクス 10
3.1 キャピラリーを用いた分析 10
3.2 実験手法 11
3.3 測定条件 11
3.4 解析結果 12

4 採取方法の検討 14
4.1 ペリオペーパーを用いた分析 14
4.2 実験手法 15
4.3 測定条件 15
4.4 TIC クロマトグラムの比較 15
4.5 ペリオペーパーを用いた分析の解析結果 18

5 歯肉溝滲出液による歯周病診断 20

6 代謝物同定 23
6.1 同定手法 23
6.2 測定条件 23
6.3 実験手法 23
6.4 同定結果 24

7 まとめ 27

1　はじめに

1.1　歯周病

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. 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.

歯周病の診断法には, 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.

1.2　本研究の目的

そこで本研究では, 歯周病態を表すマーカーを見つけることを目指し, ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）を使って歯肉溝滲出液中の代謝物の網羅的な解析を行った. 歯肉溝滲出液とは, 歯と歯肉の間隙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. 本研究では歯肉溝滲出液を検体に用いた. 歯肉溝滲出液は大阪大学歯学部附属病院にて採取された. 本研究は, 大阪大学歯学研究科・歯学部・同附属病院倫理委員会の承認を得て実施された.（受付番号： H24-E20）本研究の目的は, 歯肉溝滲出液中に歯周病態を表す特徴的な物質が存在するかどうか調べ, 歯周病態を表す物質を特定することである. その後, 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を目指す. これによりオンサイト診断法の

構築につながることが期待される.

1.3 メタボロミクスによる医療診断

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測定・解析することである. メタボロミクスは病態解析や食品・医薬品の品質管理など多岐にわたって用いられており, 医療分野では医療診断やバイオマーカー探索などに応用されている. 質量分析は, 微量の試料でも測定可能であり, また, 一度に多くの定性情報を得ることが出来るという特長があるため, メタボロミクスにおいても最もよく用いられている. メタボロミクスの手法には, GC/MS, 液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）, キャピラリー電気泳動質量分析（CE/MS）, 核磁気共鳴（NMR）などが広く用いられている. 例えば, GC/MS を用いた膵臓がんの新規診断法開発のための血清の分析 [1], GC/MS を用いた口腔がんの早期診断のための尿の分析 [2], UPLC/MS を用いた食道扁平上皮がんの診断のための血漿中の代謝物分析 [3], CE/MS を用いた大腸がんの診断のための尿中の代謝物分析 [4] などが報告されている.

1.4 実験装置

本研究の目的は, 歯肉溝滲出液中に歯周病態を表す特徴的な物質が存在するかどうか調べ, その物質を特定することである. 候補代謝物を絞った後には, 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を短縮することが必要である. 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を満たすと考えられるのが, 当研究室で開発した小型マルチターン飛行時間型質量分析計（MULTUM-S II）である.

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. 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 が開発され [5], その後イオン光学系の簡素化を図った MULTIM II が開発された [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]. その後, イオン光学系の改良と加工, 組み立て精度を向上させた MULTUM-S II が開発され [8], 電源, 真空排気込で 30 cm × 50 cm × 60 cm, 35 kg と小型でありながら

3 万以上の高質量分解能を達成した．従来, 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 は小型でありながら大型機を凌駕する高い質量分解能を達成することが出来る．MULTUM は完全時間, 空間収束条件を満足したイオン光学系を有することで, 多重周回させることによるイオンの透過率の低下や質量分解能の低下を抑えることが可能である [9]．MULTUM-S II の全体写真を図 1, 質量分離部の写真を図 2 に示す．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け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．この 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．

本論文では, 2 章でメタボロミクスによる医療診断の際に用いる GC/MS と PCA について説明する．3 章では, キャピラリーを用いて歯肉溝滲出液を採取し, 分析を行った．4 章ではキャピラリーとペリオペーパーを比較して採取方法を検討した．5 章ではペリオペーパーを用いて歯肉溝滲出液の採取を行い, 患者の数を増やして分析を行った．6 章では, 代謝物同定手法や同定結果について述べる．7 章では, まとめと今後の課題を述べる．

図 1　MULTUM-S II の全体写真

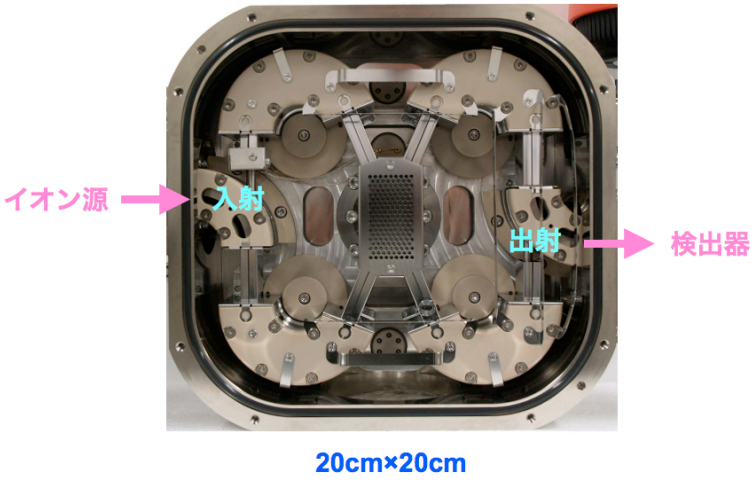


図 2　MULTUM-S II の質量分離部

2　メタボロミクスによる医療診断の原理

2.1　ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）

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溶融シリカチューブが最も多く使用されている. 溶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 3 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. ガスクロマトグラフ内には, カラム温度を変えるためのオーブンがあり, 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 4 にカラム内で試料が分離する様子を表した模式図を示す. 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.

GC/MS とはガスクロマトグラフィーと質量分析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.

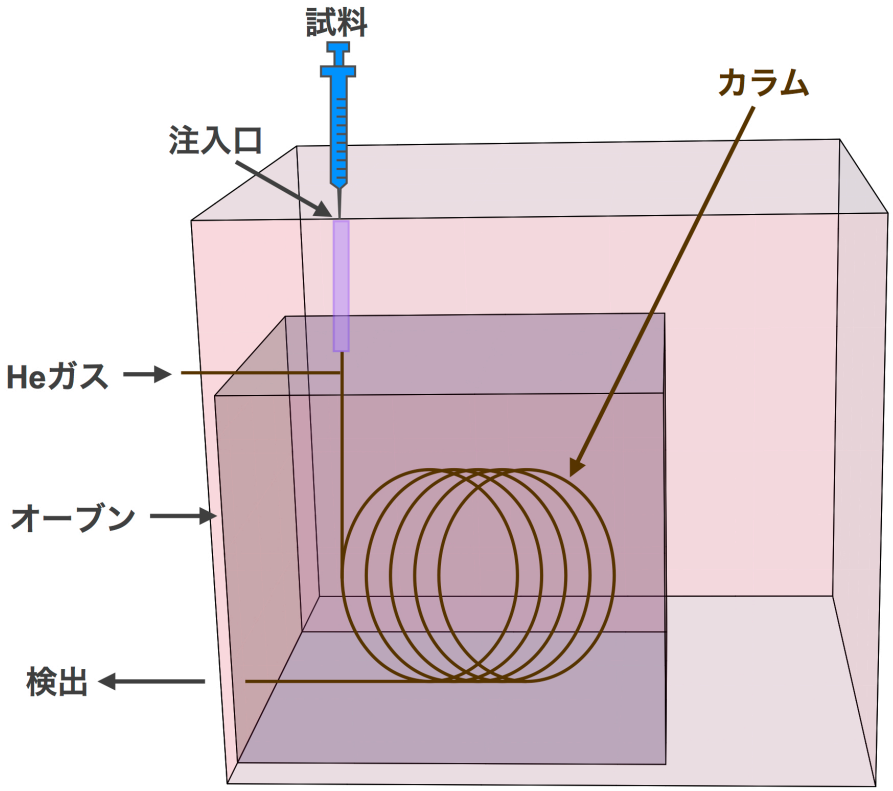


図３　ガスクロマトグラフの構成

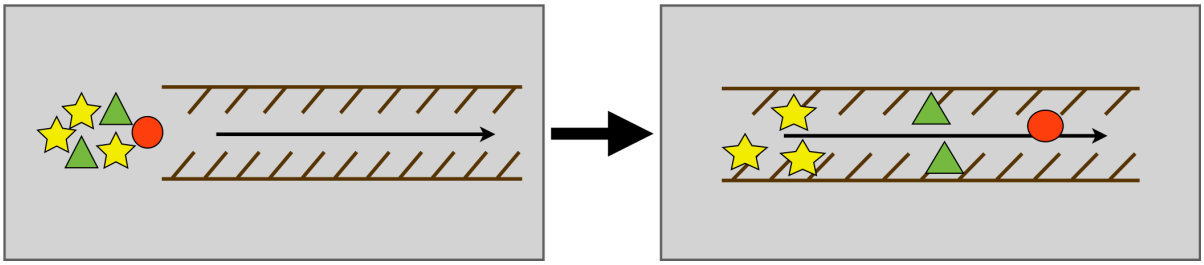


図４　カラム内で試料が分離する様子

2.2　主成分分析（PCA）

膨大な変量を扱うメタボロミクスにおいては, データ解析に多変量解析が用いられる. 多変量解析手法には, 正準相関分析, 重回帰分析, 判別分析, 主成分分析, クラスター分析, 因子分析などがあり, データの性質と解析の目的に応じて手法を選択する. メタボロミクスで最もよく用いられる手法は, 主成分分析（PCA）である. PCA は, 線形変換により多変量のデータから変量間の相関を無くし, より低次元の変量によって元のデータの特性を記述する手法である [10][11]. 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（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. GC/MS で測定して得られた TIC（total ion current）クロマトグラムにおけるピークごとに, ピーク面積を求めピーク面積リストを作成した. このデータを用いて Mathematica 10 (Wolfram Research, Champaign, IL, USA) を使って PCA を行った.

3　歯肉溝滲出液のメタボロミクス

3.1　キャピラリーを用いた分析

キャピラリーを使って, 4 名の患者と 27 名の健常者から歯肉溝滲出液を大阪大学歯学部附属病院にて採取した. 患者からは, 進行度が軽度の歯と重度の歯, それぞれから採取した. 採取に用いるキャピラリーの写真を図 5 に示す. このキャピラリーを歯と歯肉の間の部分に軽くあてて毛細管現象により採取する. キャピラリーでは最大 2 μ L の歯肉溝滲出液が採取可能である. この際, 歯周病進行度が重度の歯の場合, 歯肉溝滲出液は多く分泌されるため, 採取可能であるが, 進行度が軽度の歯や健常者の歯の場合は採取が難しく, 採取に 10 分以上かかることもあり, 口を開けたままじっとしておいてもらわなくてはならず, 負担が大きくなってしまう.

図 5　キャピラリーによるサンプル採取

3.2　実験手法

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・濃縮を行う. また, 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. 次に誘導体化を行う. 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. 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. 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.

3.2.1　抽出操作

サンプルに, メタノール/水/クロロホルム（2.5：1：1）溶液 450 μ L, 蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 6 μ L（1.0mg/mL）を添加後, 30 秒間混和した. その後 16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行い, 345 μ L の上清を新しいチューブに移し, 305 μ L の蒸留水を添加した. 16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行った後, 500 μ L の上清を 1 時間減圧遠心濃縮し, その後凍結乾燥を一晩かけて行った.

3.2.2　誘導体化操作

抽出操作後, ピリジンに溶かしたメトキシアミン塩酸塩 20 μ L（20mg/mL）を添加後, 1200rpm, 30 ℃で 90 分間インキュベートし, メトキシ化反応させた. これに 10 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）を添加後, 1200rpm, 37 ℃で 30 分間インキュベートし, シリル化反応させた.

3.3　測定条件

GC は 6890N（Agilent, Santa Clara, CA, USA）を使用し, 質量分析計として MULTUM-S II を使用した. MULTUM-S II は半周回モードとし, 加速電圧は 3000V と

した．キャピラリーカラムは CP-Sil 8 CB for Amines（30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m）（Agilent, Santa Clara, CA, USA）を用いた．GC の温度は 2 分間 80 ℃で保持後, 15 ℃ / min で 330 ℃まで昇温し, 最終温度で 6 分間保持した．注入口温度は 230 ℃, ヘリウム流量は 0.1 mL / min とした．サンプルはスプリット比 10 : 1 で 1 μ L 注入した．イオン化電圧は 70eV, インターフェース温度は 230 ℃, イオン源温度は 280 ℃とした．

3.4 解析結果

4 名の歯周病患者の軽度, 重度の歯と, 27 名の健常者から採取した歯肉溝滲出液を GC/MS で測定した．患者のサンプルから得られた TIC クロマトグラムを図 6 に示す．軽度の部位から採取したサンプルと重度の部位から採取したサンプルのクロマトグラムにおいては, いくつかのピークで明らかな強度の違いが見られる．図 6 中の f, L, l などのピークは軽度に比べて重度では明らかに大きなピーク強度である．また, 重度の部位のサンプル間でも, 患者ごとにピーク強度に違いが見られる．軽度と重度のクロマトグラムを比較して, 強度に違いが見られる 29 個を選択してデータ解析に使用した．使用したピークは図 6 中の A-O のピークである．それぞれのピーク面積を 29 個のピーク面積の合計で割ることで規格化をした後, その値を使って PCA を行った．これにより得られた PCA スコアプロットを図 7 に示す．赤色のプロットが患者の重度の歯から採取したサンプル, 青色のプロットが患者の軽度の歯から採取したサンプル, 緑色のプロットが健常者から採取したサンプルを表す．横軸の第 1 主成分（PC1）の寄与率は 67.96%, 縦軸の第 2 主成分（PC2）の寄与率は 26.52% である．累積寄与率は 94.48% であり, 第 1 主成分と第 2 主成分で元のデータの 94.48% を表すことを示している．緑色と青色のプロットのグループと赤色のプロットのグループの 2 つのグループとして分布していることが分かる．赤のプロット付近にある緑色のプロットのサンプルは, 健常者のサンプルとして採取したものであるが, 出血が見られており歯周病が疑われるサンプルである．よって, PCA による解析によって, 歯周病進行度が軽度のサンプルと重度のサンプルで区別することが出来ると考えられる．

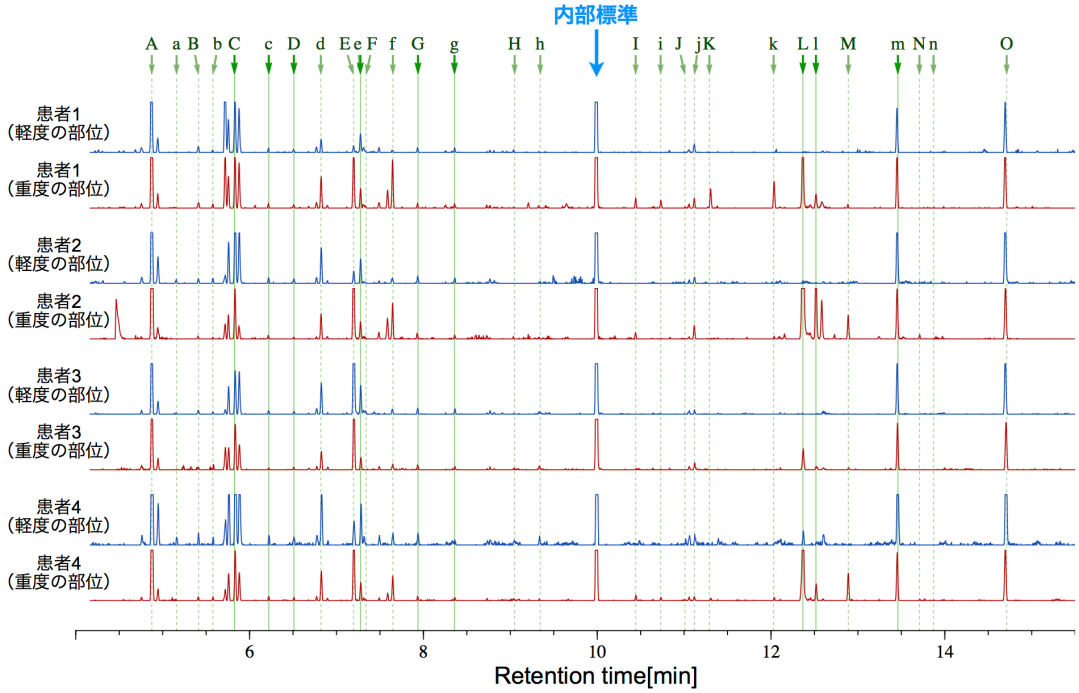


図 6　患者の軽度, 重度の部位からキャピラリーを用いて採取したサンプルの TIC クロマトグラム

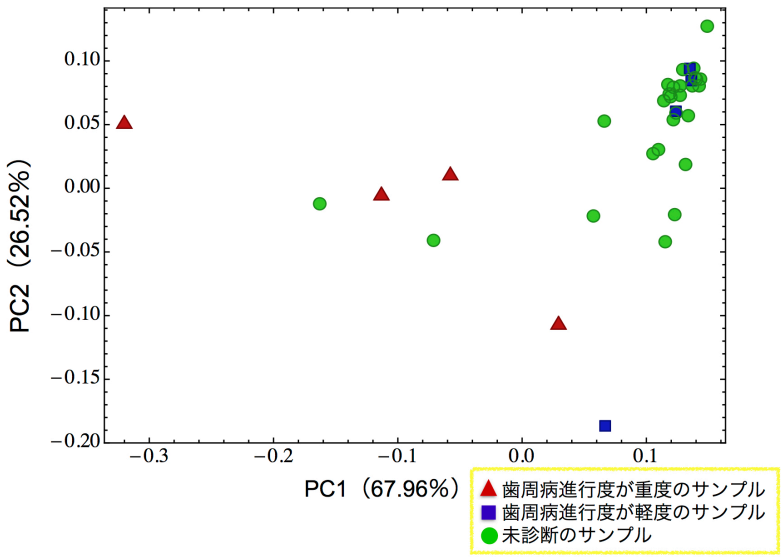


図 7　患者の軽度, 重度の部位からキャピラリーを用いて採取したサンプルの PCA スコアプロット

4　採取方法の検討

4.1　ペリオペーパーを用いた分析

歯肉溝滲出液の採取法にはキャピラリーの他に, ペリオペーパー（Oraflow Inc., NY, USA）による採取法がある. 採取に用いるペリオペーパーの写真を図 8 に示す. このペリオペーパーを歯と歯肉の間の部分に入れて採取する. ペリオペーパーを使うと, キャピラリーと比べて容易に採取可能であり, 負担をかけずに採取することが出来る. しかし, キャピラリーは最大 2 μ L 採取可能であるのに対し, ペリオペーパーの採取可能量は 0.2 μ L である. また, ペリオペーパーを使用する場合, その後の抽出操作において, 超音波抽出によりペーパーから抽出することが必要になる. そこで, ペリオペーパーによる採取でも代謝物の検出強度は十分であるのか, また, ペーパーからの抽出により代謝物が検出されるかどうかを評価し, 採取法を検討した.

図 8　ペリオペーパーによるサンプル採取

4.2　実験手法

4.2.1　抽出操作

ペリオペーパーをメタノール/水/クロロホルム（2.5：1：1）溶液 450 μ L に浸漬し, 5 秒間超音波抽出した. 蒸留水に溶解した 2-イソプロピルリンゴ酸 6 μ L（0.2 mg/mL）を添加後, 16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行い, 345 μ L の上清を新しいチューブに移し, 305 μ L の蒸留水を添加した. 16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行った後, 500 μ L の上清を 1 時間減圧遠心濃縮し, その後凍結乾燥を一晩かけて行った.

4.2.2　誘導体化操作

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）を添加後, 1200rpm, 30 ℃で 90 分間インキュベートし, 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）を添加後, 1200rpm, 37 ℃で 30 分間インキュベートし, シリル化反応させた.

4.3　測定条件

GC/MS 分析には, JMS-Q1000GC（JEOL, Japan）を使用した. キャピラリーカラムは CP-Sil 8 CB for Amines（30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m）（Agilent, Santa Clara, CA, USA）を用いた. GC の温度は 2 分間 80 ℃で保持後, 15 ℃ / min で 330 ℃まで昇温し, 最終温度で 6 分間保持した. 注入口温度は 230 ℃, ヘリウム流量は 0.1 mL / min とした. サンプルはスプリット比 10：1 で 1 μ L 注入した. イオン化電圧は 70eV, インターフェース温度は 230 ℃, イオン源温度は 280 ℃とした.

4.4　TIC クロマトグラムの比較

同じ患者からそれぞれキャピラリー, ペリオペーパーによって採取した歯肉溝滲出液を GC/MS で測定した結果を示す. キャピラリーによって採取したサンプルの TIC クロマトグラムを図 9 に, ペリオペーパーによって採取したサンプルの TIC クロマトグラムを図 10 に示す. キャピラリーのサンプル採取量は 0.07 μ L, ペリオペーパーのサンプル採取量は 0.20 μ L である. 保持時間 10 分で検出されているピークは内部標準である. ペリオペーパーによる採取でも, 十分な強度でキャピラリーと同様の数のピークが検出できている. キャピラリーとペリオペーパーは, 内部標準の量が同じであるため, 内部標準の強

度で規格化し比較することが可能である．内部標準の強度で規格化すると, 内部標準以外のピークはペリオペーパーがキャピラリーの約 2 倍である．サンプル採取量が 2.9 倍であるのに対し, 強度は約 2 倍であるため, ペリオペーパーからの抽出で検出可能であると考えられる．この結果からペリオペーパーによる評価が可能であることを示した．そのため, これ以降は歯肉溝滲出液の採取にはペリオペーパーを用いることとした．

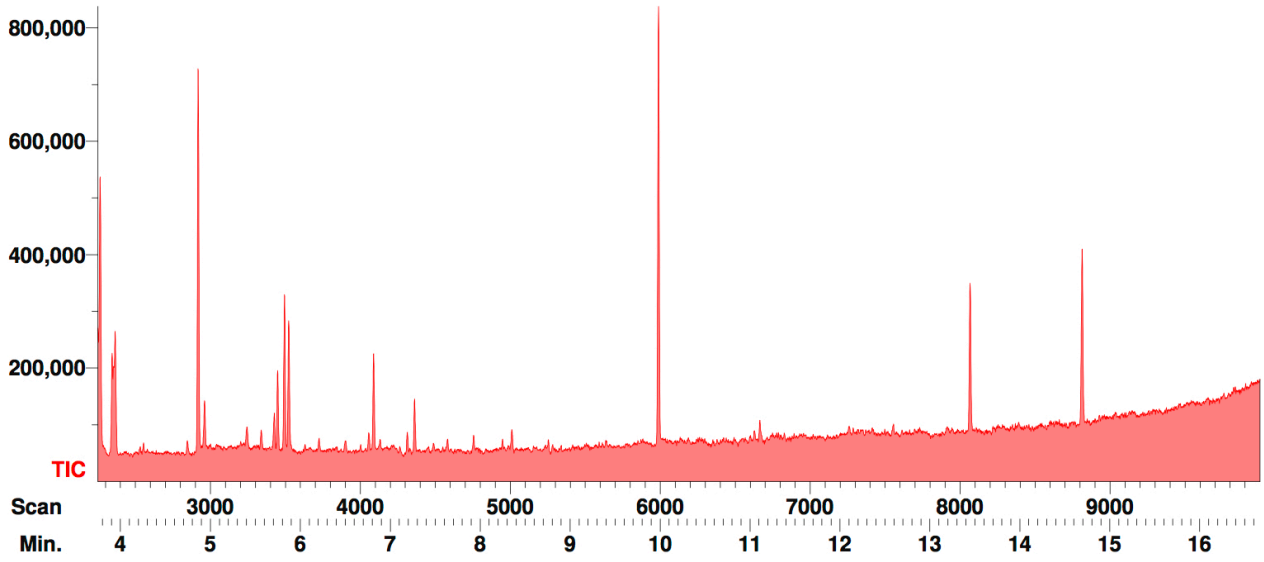


図 9　キャピラリーによって採取したサンプルの TIC クロマトグラム

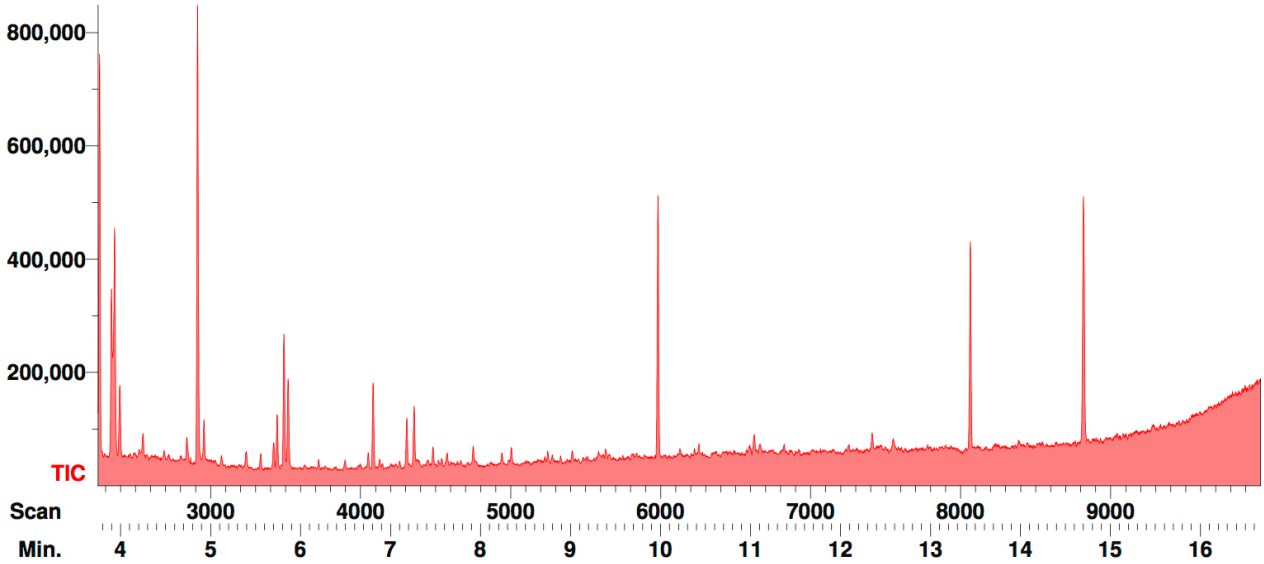


図 10　ペリオペーパーによって採取したサンプルの TIC クロマトグラム

4.5　ペリオペーパーを用いた分析の解析結果

前節でペリオペーパーによる評価が可能であることを示した. そこで, 次に, ペリオペーパーを用いて採取し, 患者の病態によって TIC クロマトグラムに違いが見られるかどうかを調べた. ペリオペーパーを使って, 3 名の患者と 16 名の健常者から歯肉溝滲出液を大阪大学歯学部附属病院にて採取した. 患者からは, 進行度が軽度の歯と重度の歯, それぞれから採取した. 得られた TIC クロマトグラムを図 11 に示す. 軽度の部位から採取したサンプルと重度の部位から採取したサンプルのクロマトグラムにおいては, いくつかのピークで明らかな強度の違いが見られる. 図 11 中の I, M, O, P, p, T, t, U, u などのピークは軽度に比べて重度では明らかに大きなピーク強度である. また, 重度の部位のサンプル間, 軽度の部位のサンプル間でも, 患者ごとにピーク強度に違いが見られる. 軽度と重度のクロマトグラムを比較して, 強度に違いが見られる 50 個を選択してデータ解析に使用した. 使用したピークは図 11 中の A-y のピークである. それぞれのピーク面積を 50 個のピーク面積の合計で割ることで規格化をした後, その値を使って PCA を行った. これにより得られた PCA スコアプロットを図 12 に示す. 赤色のプロットが患者の重度の歯から採取したサンプル, 青色のプロットが患者の軽度の歯から採取したサンプル, 緑色のプロットが健常者から採取したサンプルを表す. 横軸の第 1 主成分（PC1）の寄与率は 79.05%, 縦軸の第 2 主成分（PC2）の寄与率は 7.70% である. 累積寄与率は 86.75% であり, 第 1 主成分と第 2 主成分で元のデータの 86.75% を表すことを示している. 緑色と青色のプロットのグループと赤色のプロットのグループの 2 つのグループとして分布していることが分かる. よって, PCA による解析によって, 歯周病進行度が軽度のサンプルと重度のサンプルで区別することが出来ると考えられる. しかし, 患者の数が 3 名であり少ないため, より多い数の患者のサンプルの分析が必要である.

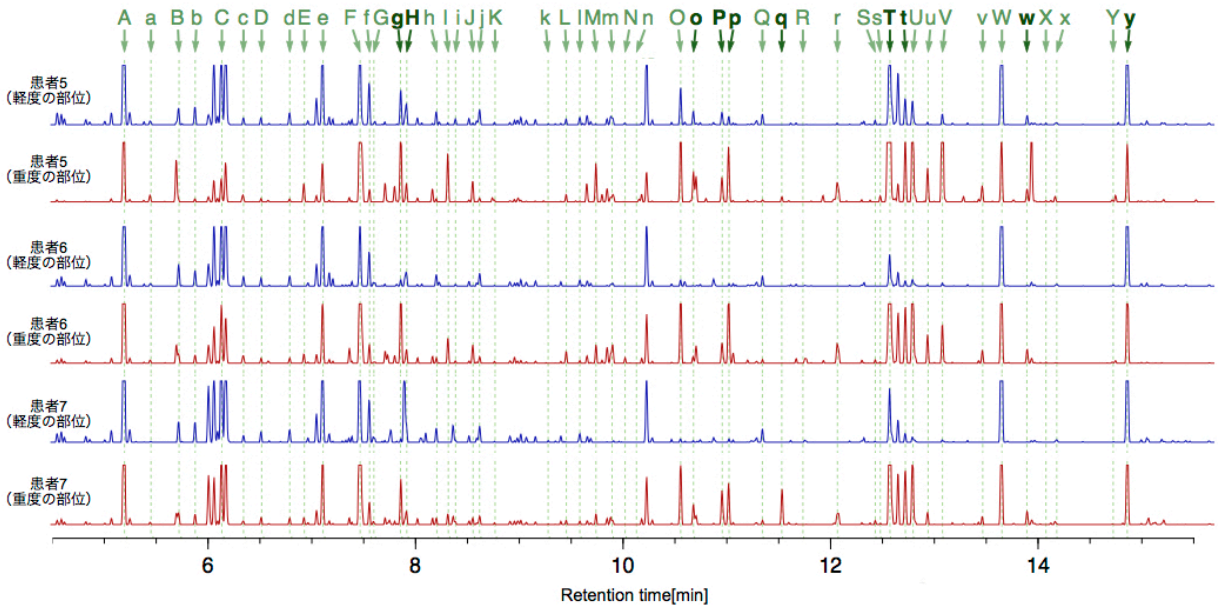


図 11　患者の軽度, 重度の部位からペリオペーパーを用いて採取したサンプルの TIC クロマトグラム

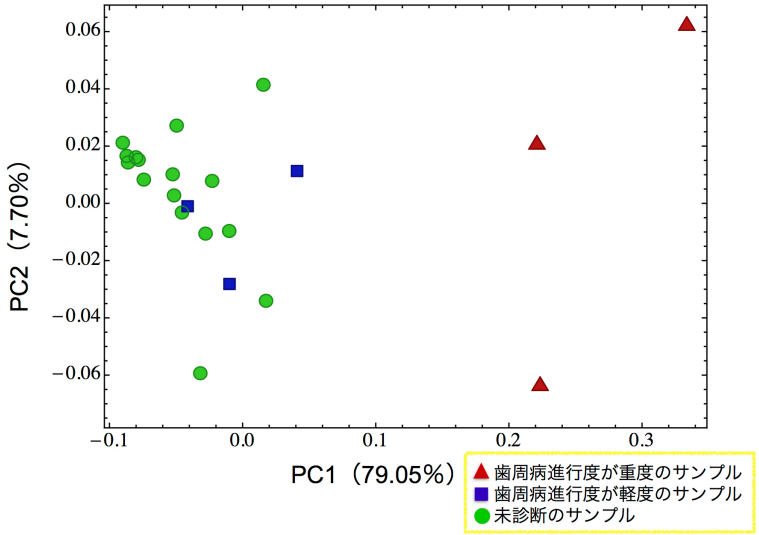


図 12　患者の軽度, 重度の部位からペリオペーパーを用いて採取したサンプルの PCA スコアプロット

5　歯肉溝滲出液による歯周病診断

前章でペリオペーパーを用いた採取によって患者の病態による TIC クロマトグラムの違いが見られることを示した．そこで, 患者のサンプル数を増やして分析を行った．ペリオペーパーを使って, 11 名の患者から歯肉溝滲出液を大阪大学歯学部附属病院にて採取した．患者からは, 進行度が軽度の歯と重度の歯, それぞれから採取した．採取した歯肉溝滲出液を GC/MS で測定した．得られた TIC クロマトグラムの一部を図 13 に示す．図 13 中の A-y の 50 個のピークをデータ解析に使用した．それぞれのピーク面積を 50 個のピーク面積の合計で割ることで規格化をした後, その値を使って PCA を行った．これにより得られた PCA スコアプロットを図 14 に示す．赤色のプロットが患者の重度の歯から採取したサンプル, 青色のプロットが患者の軽度の歯から採取したサンプルを表す．横軸の第 1 主成分（PC1）の寄与率は 48.78%, 縦軸の第 2 主成分（PC2）の寄与率は 26.28% である．累積寄与率は 75.06% であり, 第 1 主成分と第 2 主成分で元のデータの 75.06% を表すことを示している．また, プロットの数字はサンプル番号を表している．同じ数字のプロットは同じ患者から採取したサンプルであり, 同じ色, 同じ数字のプロットは同じサンプルの 1 回目測定, 2 回目測定を表す．1 回目測定, 2 回目測定のプロット同士は近くに分布している．この結果は再現性を示している．また, 進行度が重度のグループと軽度のグループとでは, 二つのグループにわかれる傾向を示している．しかし, 完全にグループがわかれているのではなく, 赤色と青色のプロットが重なる部分がある．これは, 同一検体の軽度の歯と重度の歯では状態は大きく異なるが, 異なる検体の軽度の歯と重度の歯では同じような状態である可能性があるためであると考えられる．

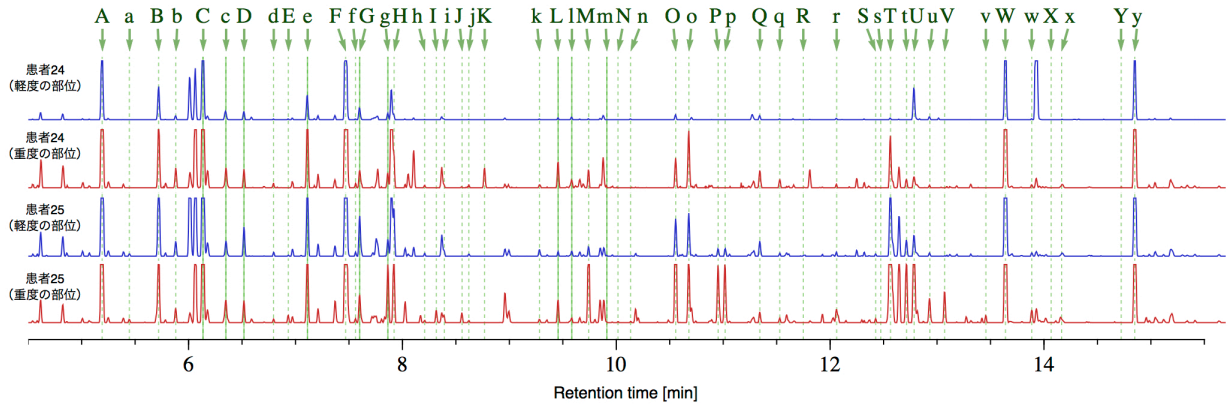


図 13　患者の軽度, 重度の部位からペリオペーパーを用いて採取したサンプルの TIC クロマトグラム

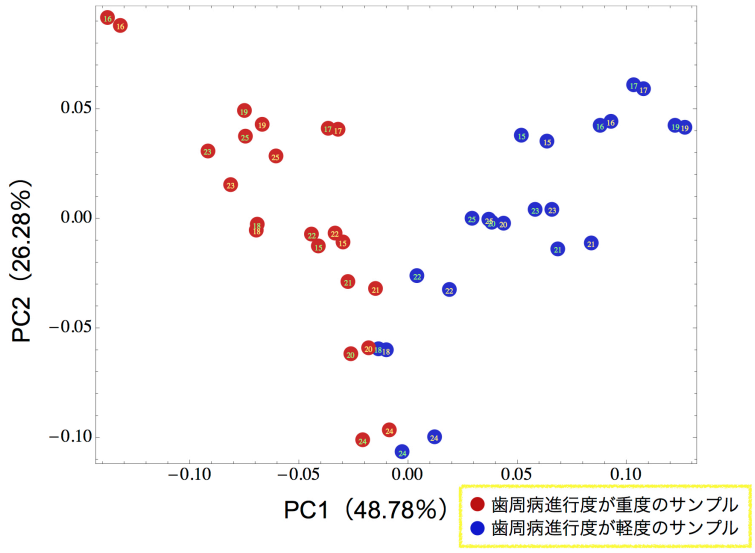


図 14　患者の軽度, 重度の部位からペリオペーパーを用いて採取したサンプルの PCA スコアプロット

英語論文

6　代謝物同定

6.1　同定手法

PCA によって健常者のサンプルのグループと患者の重度の歯のサンプルのグループをはっきり区別することができた．また, 患者の軽度のサンプルのグループはその間に分布していることを示した．次に, 測定対象を絞るために代謝物の同定を行った．代謝物の特定には大阪大学工学研究科福崎研究室で開発された GC/MS の代謝物ライブラリを使用した [12]．ライブラリとの照合により候補として挙がった 50 個の物質の標準品を購入し, 歯肉溝滲出液と同様の方法で前処理を行い GC/MS で測定し, 保持時間ならびに質量スペクトルを比較した．

6.2　測定条件

GC/MS 分析には, JMS-Q1000GC（JEOL, Japan）を使用した．キャピラリーカラムは CP-Sil 8 CB for Amines（30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μ m）（Agilent, Santa Clara, CA, USA）を用いた．GC の温度は 2 分間 80 ℃で保持後, 15 ℃ / min で 330 ℃まで昇温し, 最終温度で 6 分間保持した．注入口温度は 230 ℃, ヘリウム流量は 0.1 mL / min とした．サンプルはスプリット比 10：1 で 1 μ L 注入した．イオン化電圧は 70eV, インターフェース温度は 230 ℃, イオン源温度は 280 ℃とした．

6.3　実験手法

6.3.1　抽出操作

1mg/mL のサンプルに, メタノール/水/クロロホルム（2.5：1：1）溶液 450 μ L を添加後, 30 秒間混和した．その後 16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行い, 345 μ L の上清を新しいチューブに移し, 305 μ L の蒸留水を添加した．16000 × g, 4 ℃で 5 分間遠心分離を行った後, 500 μ L の上清を 1 時間減圧遠心濃縮し, その後凍結乾燥を一晩かけて行った．

6.3.2　誘導体化操作

抽出操作後, ピリジンに溶かしたメトキシアミン塩酸塩 20 μ L（20mg/mL）を添加後, 1200rpm, 30 ℃で 90 分間インキュベートし, メトキシ化反応させた．これに 10 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）を添加後, 1200rpm, 37 ℃で 30 分間インキュベートし, シリル化反応させた.

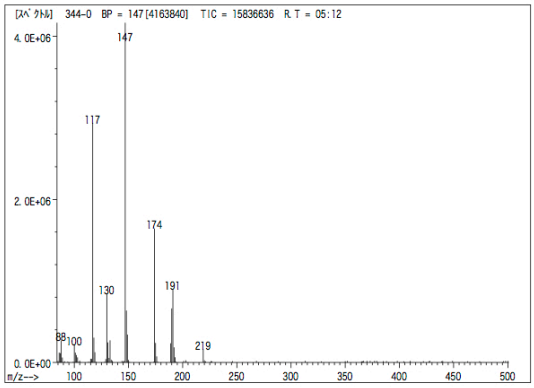
6.4 同定結果

標準品を測定し, 特定された代謝物のリストを表 1 に示す. 標準品から得られたマススペクトルと歯肉溝滲出液サンプルから得られたマススペクトルを比較して, 検出された保持時間とマススペクトルにおけるそれぞれのピークの強度比により同定を行った. 特定された代謝物の中から一部の代謝物について, 標準品を測定し得られたマススペクトルと歯肉溝滲出液サンプルを測定して得られたマススペクトルを図 15 に示す.

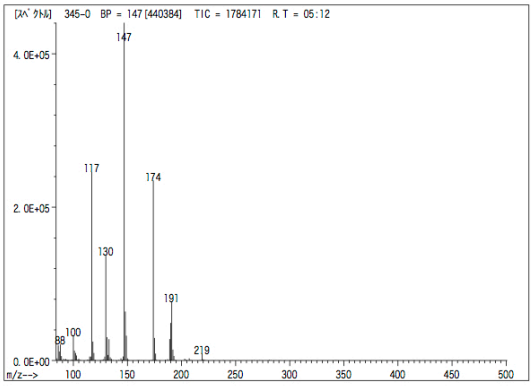
Peak number	RT[min]	Identified metabolites
2	4.83	Propylamine
4	5.20	Lactic acid
14	7.37	Benzoic acid
15	7.48	Phosphate
18	7.88	Glycine
19	7.93	Succinic acid
22	8.38	Alanine
26	9.00	Hydrocinnamate
28	9.45	Malic acid
34	10.55	Glutamic acid
35	10.68	5-Aminovaleric acid
36	10.70	Phenylalanine
37	10.95	Ribose
38	11.03	Taurine
40	11.55	Putrescine
44	12.57	Galactose
45	12.72	Galactose
46	12.78	Lysine
51	13.90	Inositol
54	14.85	Octadecanoate

表１　特定された代謝物リスト

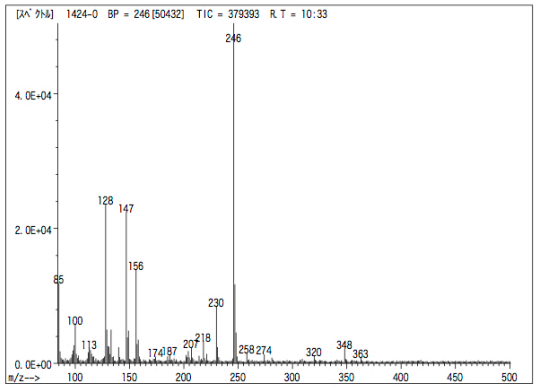
Lactic acid（標準品）のマススペクトル



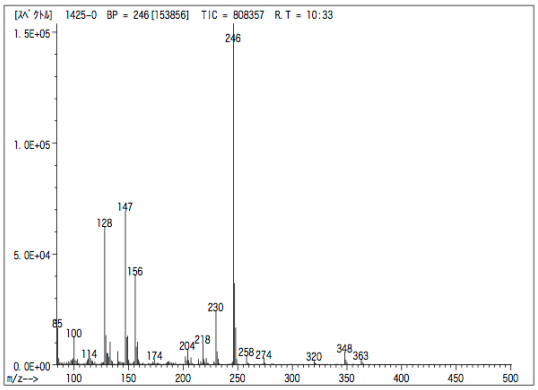
歯肉溝滲出液サンプルから得られたマススペクトル



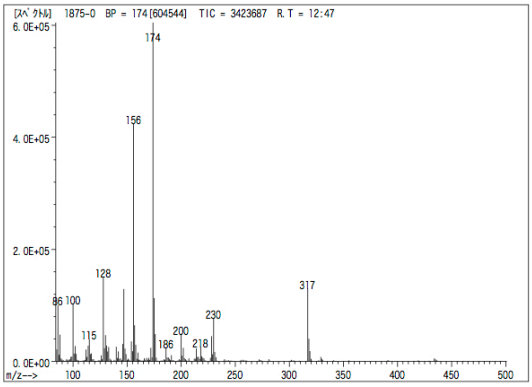
Glutamic acid（標準品）のマススペクトル



歯肉溝滲出液サンプルから得られたマススペクトル



Lysine（標準品）のマススペクトル



歯肉溝滲出液サンプルから得られたマススペクトル

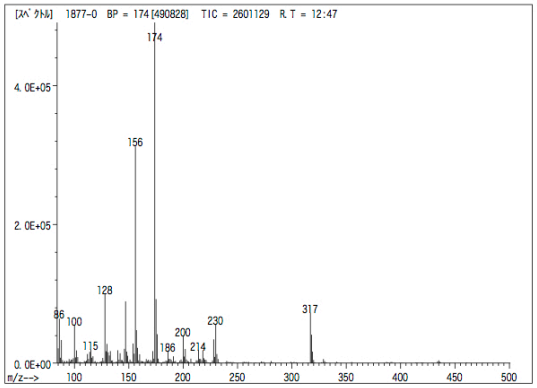


図 15　標準品, 歯肉溝滲出液サンプルから得られたマススペクトル

7　まとめ

歯肉溝滲出液の GC/MS 分析によって歯肉溝滲出液中の代謝物を検出できることを示した．さらに, そのうちいくつかの代謝物は歯周病態によって歯肉溝滲出液中の量が変化することが明らかになった．これは, 歯肉溝滲出液中に歯周病態を表す特徴的な物質が存在していることを表している．また, 代謝物同定によって, 歯周病態を表す物質を特定した．この結果は, GC/MS による歯肉溝滲出液の分析が, 歯周病の新規診断法開発につながるバイオマーカーの発見に有効であることを示している．

今後は, 測定対象をより少ない物質に絞り, 前処理や測定にかかる時間を短縮することが必要である．まずは, 検体数を増やし統計解析を行うことで, バイオマーカーをより少ない数に絞る．次に, 前処理の短縮には途中の処理を省略, 時間のかからない処理に変更するなどし, 測定時間の短縮には GC に使用するカラムを短くするなどして時間短縮を試みる．これによりオンサイト歯周病診断法の開発につながることが期待される．

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] Xie, G.X.; Chen, T.L.; Qiu, Y.P.; Shi, P.; Zheng, X.J.; Su, M.M.; Zhao, A.H.; Zhou, Z.T.; Jia, W. Urine metabolite profiling offers potential early diagnosis of oral cancer. Metabolomics 2012, 8, 220?231.

[3] Liu, R.; Peng, Y.; Li, X.; Wang, Y.; Pan, E.; Guo, W.; Pu, Y.; Yin, L. Identification of Plasma Metabolomic Profiling for Diagnosis of Esophageal Squamous-Cell Carcinoma Using an UPLC/TOF/MS Platform. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 8899?8911.

[4] Chen J.L., Fan J., Yan L.S., Guo H.Q., Xiong J.J., Ren Y., Hu J.D. Urine Metabolite Profiling of Human Colorectal Cancer by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry Based on MRB. Gastroenterol. Res. Pract. 2012; 2012: 125890.

[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. Ishihara, M. Toyoda, T. Matsuo, *J.MassSpectrom.* , **197(2000)**, 197-189

[10] Jain, Anil K., Robert P. W. Duin, and Jianchang Mao. 2000. Statistical Pattern Recognition: A Review. Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on 22 (1): 4?37.

[11] Shawe-Taylor, J., Cristianini, N. , Kernel methods for pattern analysis , Cambridge University Press 2004.

[12] Tsugawa, H., Bamba, T., Shinohara, M., Nishiumi, S., Yoshida, M., and

Fukusaki, E.,: Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. J. Biosci.Bioeng. 112, 292-298 (2011)

謝辞

本研究を進めるにあたってご指導, ご協力いただいた皆様に心より感謝致します. 豊田岐聡先生には, 本研究テーマを提案していただき, 研究方針から論文執筆まで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, 実験結果の考察やデータ解析など研究活動について多くのご指導をいただきました. 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大変お世話になりました.

また, 大阪大学歯学研究科の村上伸也先生, 野崎剛徳先生には. 本研究の検体である歯肉溝滲出液を提供していただき, また, 臨床的な知見からご助言をいただきました. 大阪大学工学研究科の馬場健史先生には, 実験手法や解析手法全般についてご指導いただきました. 国立がん研究センターの新間秀一先生には, 実験結果についてご助言いただきました. 深く感謝申し上げます.