



Title	in vitro培養系および唾液中VOC分析に基づく口腔細菌由来バイオマーカーの探索
Author(s)	森, あすか
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105809
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

in vitro 培養系および唾液中 VOC 分析に基づく
口腔細菌由来バイオマーカーの探索

森 あすか

2026年1月

大阪大学大学院工学研究科

目次

用語集	1
第 1 章 緒論	2
1.1. 口腔疾患と口腔細菌	2
1.2. 口腔内における揮発性有機化合物 (VOC).....	2
1.3. 唾液中 VOC の複雑性	4
1.4. VOC 分析における技術的課題.....	5
1.5. 本研究の目的と流れ.....	6
第 2 章 <i>in vitro</i> 培養系における口腔細菌の VOC プロファイルの包括的解析.....	9
2.1. 緒言	9
2.2. 実験材料と実験方法	10
2.2.1. サンプル調製	10
2.2.2. VOC の抽出と GC/MS/olfactometry (GC/MS/O)分析.....	10
2.2.3. データ解析	12
2.3. 結果と考察	13
2.3.1. <i>P. gingivalis</i> の VOC プロファイル	13
2.3.2. <i>F. nucleatum</i> の VOC プロファイル	17
2.3.3. 口腔細菌由来 VOC とそのにおいへの寄与	20
2.4. 小括	24
第 3 章 唾液腺唾液と全唾液の比較による口腔細菌由来 VOC の同定.....	25
3.1. 緒言	25
3.2. 実験材料と実験方法	25
3.2.1. 参加者	25
3.2.2. サンプル採取と前処理	26
3.2.3. VOC の抽出と GC/MS 分析.....	27
3.2.4. データ解析	29
3.3. 結果と考察	29
3.3.1. Salivette 由来アーティファクトが全唾液 VOC プロファイルに与える影響 の評価	30
3.3.2. 全唾液と唾液腺唾液の VOC プロファイルの比較	34
3.3.3. 本研究の限界	44
3.4. 小括	45
第 4 章 総括	47
4.1. 本研究の総括	47
4.2. 学術的意義	47

4.3. 技術的意義	48
4.4. 臨床的意義	48
引用文献	49
発表論文	54
学会発表	55
謝辞	56
付録	57

用語集

BCAA: Branched-chain amino acid, 分岐鎖アミノ酸

FC: Fold change

FDR: False discovery rate

GC/MS: Gas chromatography/mass spectrometry, ガスクロマトグラフィー質量分析法

GC/MS/O: GC/MS/olfactometry, におい嗅ぎガスクロマトグラフィー質量分析法

OD: Optical density

OPLS-DA: Orthogonal partial least squares discriminant analysis

RI: Retention index, 保持指標

RT: Retention time, 保持時間

SCFA: Short-chain fatty acid, 短鎖脂肪酸

SPME: Solid-phase microextraction, 固相マイクロ抽出法

VIP: Variable Importance for Prediction

VOC: Volatile organic compound, 揮発性有機化合物

VSC: Volatile sulfur compound, 揮発性硫黄化合物

第 1 章 緒論

1.1. 口腔疾患と口腔細菌

口腔は、腸に次いで 2 番目に多様な微生物叢を有し、700 種以上の細菌が共存している複雑な環境である[1]. この微生物群, すなわち口腔細菌叢は, 宿主の健康状態と密接に関わっており, そのバランスの破綻 (Dysbiosis) は, う蝕や歯周病といった主要な口腔疾患の直接的な原因となる[2].

中でも歯周病は, 歯を支える歯周組織に発生する慢性炎症性疾患であり[3], その罹患率は 20-50%程度であるとされている[4]. 歯周病は単なる口腔内の問題にとどまらず, 糖尿病や心血管疾患などの全身疾患との相関関係が近年強く指摘されている[5]. しかし, 歯周病がこれらの全身疾患の病態に与える詳細な因果関係のメカニズムについては, 現在も重要な研究課題として解明が求められている[6-8]. したがって, 歯周病の早期かつ非侵襲的な診断手法の確立は, 公衆衛生上の重要な課題となっている.

歯周病の発症と進行には, 特定のグラム陰性嫌気性菌が深く関与している[9,10]. 特に, *Porphyromonas gingivalis* は主要な歯周病菌の一種であり, 組織破壊に寄与する強力なプロテアーゼを産生する[3,9,10]. また, *Fusobacterium nucleatum* は初期のプラーク形成菌と *P. gingivalis* を含む後期の病原菌を結びつける重要な役割を果たしている[11,12]. これらの主要な歯周病菌の存在量や代謝活動を正確に把握することは, 疾患の進行評価および治療効果のモニタリングにおいて極めて重要となる.

1.2. 口腔内における揮発性有機化合物 (VOC)

口腔細菌の代謝活動は, 揮発性有機化合物 (VOC) の産生として, 直接的かつリアルタイムに反映される[13]. VOC は, 生体内で生成され, 呼気や唾液などの生体サン

ブルから検出される低分子の有機化合物の総体であり、そのプロファイルは生理的・病理的状态を反映する可能性があるため、近年注目を集めている[14,15].

口腔由来 VOC の大半は、揮発性硫黄化合物 (VSC) に焦点が当てられてきた [16,17]. VSC の中でも, hydrogen sulfide (腐卵臭), methyl mercaptan (腐ったキャベツ様のにおい), dimethyl sulfide (腐ったキャベツ様のにおい) の 3 成分は、極めて低いにおいの閾値を持つ (順に 4×10^{-5} , 5×10^{-13} , 1×10^{-4} ppm) ため、口臭の主要な原因成分として認識されている[18–20]. これらの VSC はグラム陽性菌による糖タンパク質からのタンパク質の獲得と、それに続くグラム陰性嫌気性菌によるタンパク質の分解および含硫アミノ酸 (Cysteine, methionine) の代謝によって産生される[21]. また、VSC の測定は官能評価と並んで口臭検査における標準的なアプローチとなっている[17].

しかし、VSC のみに限定した従来の口臭検査アプローチには、歯周病の病態評価を行う上でいくつかの限界がある。まず、VSC モニター (Halimeter) の測定値は、口臭測定のゴールドスタンダードと考えられている官能評価と弱い相関しか示さないことである[22]. さらに、重要な点として、VSC 以外の非硫黄系 VOC が、口腔疾患の病態や悪臭に大きく寄与しているにもかかわらず、臨床現場で標準的に用いられる VSC 測定アプローチでは、それらの存在が評価の対象外となっていることである。近年、VSC 以外にも Indole や Skatole といった窒素含有化合物、あるいは Butyric acid や Isovaleric acid といった短鎖脂肪酸 (SCFA) などの非硫黄系 VOC が、歯周ポケット内における歯周病菌の特異的な代謝活動を反映するバイオマーカーとして学術的に大きな関心を集めつつある[23]. これらの非硫黄系 VOC は、単なる悪臭への寄与だけでなく、特定の細菌の増殖や病原性との関連性が示唆されており、口腔疾患の病態をより特異的に反映する可能性がある[24].

口腔疾患の病態をより特異的に反映するバイオマーカーを探索するためには、これら非硫黄系 VOC を含めた包括的な VOC プロファイルを利用することが不可欠である。

したがって、このような背景から、口腔細菌が産生する VOC プロファイルを網羅的に評価し、個々の VOC と特定の細菌の代謝経路との関連を明らかにすることで、従来の診断アプローチを超越した、歯周病の特異的なバイオマーカー群を探索することが喫緊の課題となっている。

1.3. 唾液中 VOC の複雑性

口腔内の VOC を測定する際の理想的な検体として、非侵襲的かつ採取が容易な唾液が挙げられる。唾液は、口腔内の生理的状态と口腔細菌叢の活動を直接的に反映する生体サンプルである[25,26]。

しかし、唾液中の VOC プロファイルは極めて複雑であり、その由来は 3 つの主要な要素に分けられる[27,28]。一つ目は、口腔細菌由来の VOC である[29]。プラーク、舌苔、および歯周ポケット内に存在する細菌の代謝によって産生される VOC であり、本研究の主要なターゲットである。二つ目は宿主由来の VOC であり、唾液腺(耳下腺、顎下腺、舌下腺)から分泌される成分がここに含まれる[27]。これらは主に宿主の全身状態を反映していると考えられる。三つ目は、食事や喫煙、歯磨きに由来する外因性の VOC である。

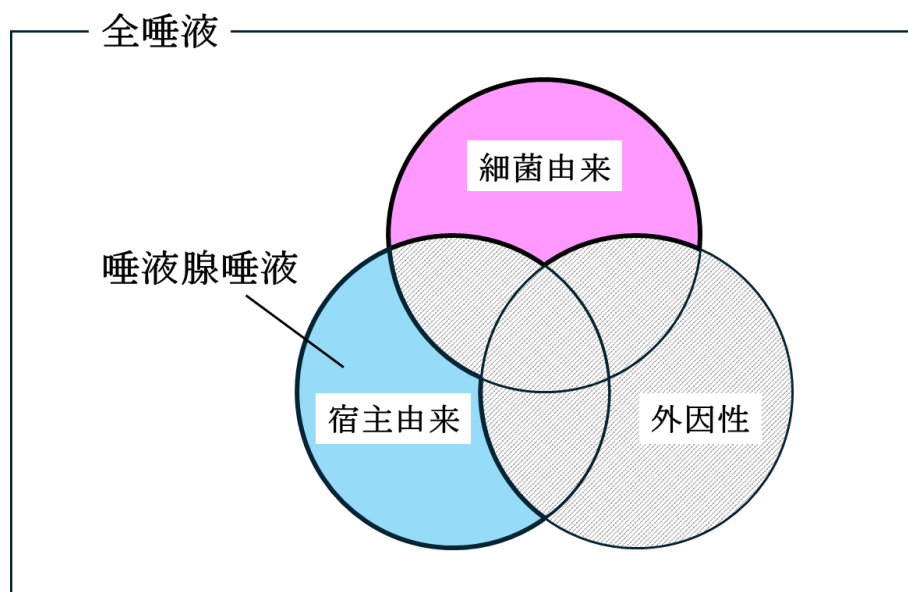


図 1-1. 唾液中 VOC プロファイルの構成要素と真の細菌由来 VOC 分離の課題

従来の唾液 VOC 研究では、これらの要素が混在した全唾液を分析することが一般的であった[30–32]. その結果、検出された VOC が口腔疾患の原因となる口腔細菌の代謝産物を反映しているのか、それとも宿主由来のバックグラウンド成分や採取デバイス由来のアーティファクトであるのかを区別することが困難であった[28,33]. この識別困難性こそが、VOC プロファイルを歯周病の特異的なバイオマーカーとして臨床診断へ応用する上での主要な課題の一つとなっていた.

この課題を克服するためには、宿主由来のバックグラウンドノイズを区別・分離し、真の細菌由来 VOC を特異的に分離するという研究デザインが必要である.

1.4. VOC 分析における技術的課題

唾液中 VOC をバイオマーカーとして確立するためには、生体サンプル特有の技術的制約を克服する必要がある. 本研究で解決すべき主な技術的課題は以下の 2 点である.

高感度 VOC 抽出法の確立

まず、微量サンプルからの高感度な VOC プロファイリングの実現は、重要な技術的課題である。唾液腺唾液は、口腔内の細菌による影響を最小限に抑えた宿主の生理状態を反映する理想的な検体であるが、採取できる量が少ない。また、唾液中の VOC 濃度は一般的に血液に比べて低いことが指摘されており、高感度分析には大量のサンプルが必要となる[34]。しかし、患者への負担を最小限に抑え、非侵襲性を損なわないためには、微量サンプルから広範な VOC を高感度で抽出・濃縮する技術が必要となる。一般的な VOC 抽出法であるヘッドスペース法や固相マイクロ抽出法 (SPME) では、水分の影響や濃縮効率の限界から、少量の水溶液サンプル中の微量な VOC の網羅的プロファイリングは困難であった[35]。

アーティファクトの問題

また、サンプリングデバイスなどに由来するアーティファクトの問題も無視できない。高感度化を追求するほど、採取デバイスなどに由来する VOC の混入、すなわち真の生体由来 VOC シグナルをマスクするアーティファクトの問題が顕著になる[36]。そのため、臨床研究に適用可能な、微量の生体 VOC を捉える高感度な抽出プロトコルの確立に加え、サンプリングや分析系に内在するアーティファクトの存在を前提とし、その影響を適切に評価した上で、生物学的な違いを反映する VOC を特定することが不可欠である。

1.5. 本研究の目的と流れ

本研究は、口腔細菌由来の VOC を歯周病の非侵襲的バイオマーカーとして確立することを目的とし、上記 2 つの学術的・技術的課題を克服するため、以下の 2 段階からなる体系的なアプローチを採用した(図 1-2)。

まず、第2章では、主要な歯周病原菌である *P. gingivalis* および *F. nucleatum* の培養上清を対象とし、におい嗅ぎガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS/olfactometry)を用いて網羅的な VOC プロファイリングを実施し、*in vivo* 検証におけるバイオマーカー探索の足掛かりとした。

続く第3章では、*in vitro* で得られた知見を実際の臨床検体である唾液で検証した。検証にあたって、微量サンプルからの VOC 抽出を可能とする前処理プロトコルの確立と、宿主やサンプリングデバイス由来のバックグラウンドノイズを排除するための研究デザインを適用した。

本研究は、この2段階のアプローチを通じて、口腔の健康状態を評価するための非侵襲的診断ツール開発に向け、微量サンプルからの高感度 VOC 分析技術と、宿主由来ノイズを排除した細菌特異的バイオマーカーの同定を達成した。これにより、口腔細菌由来 VOC の臨床応用を見据えた確固たる第一歩を確立することを最終目的とした。

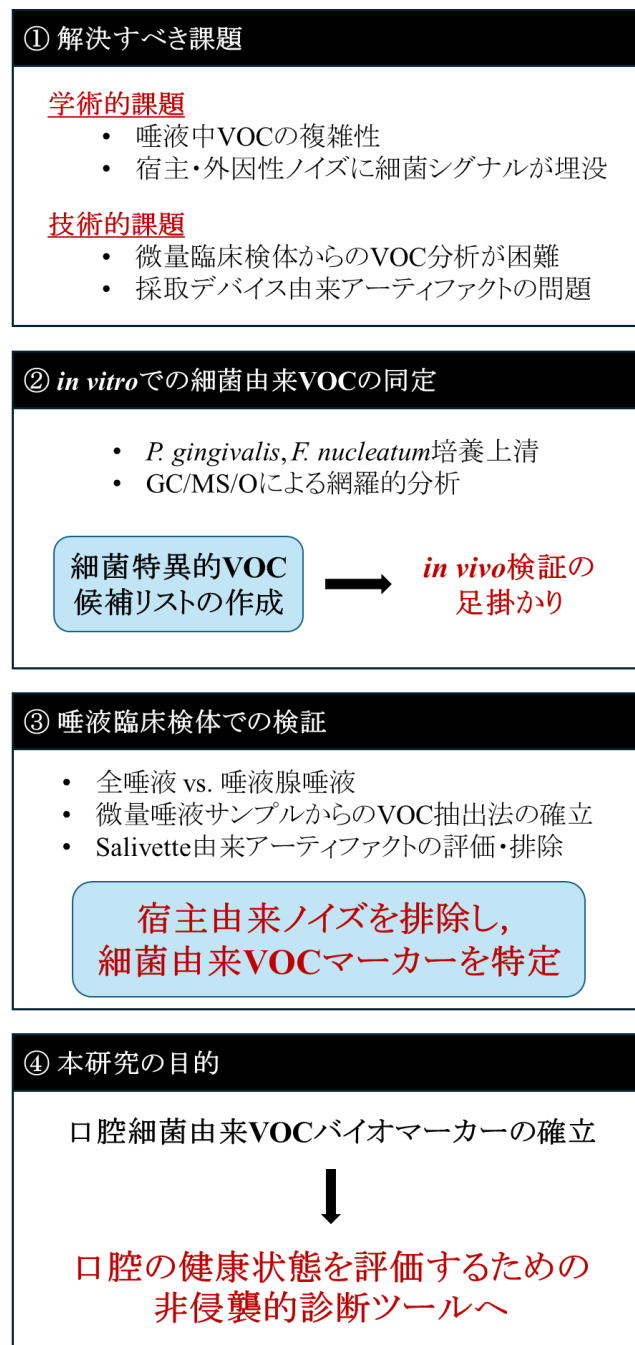


図 1-2. 本研究における課題克服とそのアプローチ

第 2 章 *in vitro* 培養系における口腔細菌の VOC プロファイルの包括的解析

2.1. 緒言

口腔細菌が産生する揮発性有機化合物 (VOC) は、口腔の健康状態を評価する非侵襲的バイオマーカーとして極めて有望である。しかし、従来の口腔 VOC 研究は主に悪臭成分 (口臭原因成分) である揮発性硫黄化合物 (VSC) に偏重しており[18–20], 歯周病菌が関与する多様な代謝経路によって産生される非硫黄系 VOC の全容は依然として不明なままである。

グラム陰性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* および *Fusobacterium nucleatum* は、歯周病の進行に深く関与する主要な病原菌である[37,38]。しかしながら、両菌種はその増殖戦略と代謝特性において本質的に異なる。*P. gingivalis* は、Glucose などの糖をエネルギー源とせず、Gingipain を含む強力な Exopeptidase を駆使して、環境中のタンパク質やジ・トリペプチドを分解・利用する、タンパク質分解に特化している[39]。一方、*F. nucleatum* は、バイオフィーム形成におけるブリッジ機能を担うだけでなく、共生菌 (*Streptococcus gordonii*) の存在下で、Putrescine や Butyric acid の産生を増強することが知られている[40]。したがって、これらの菌種が、特定の環境下でそれぞれどのような VOC プロファイルを示すのかを包括的に解析し比較することは、従来の VSC にとどまらない非硫黄系 VOC のバイオマーカー候補を効率的に探索するための有用な第一歩となる。

そこで本章では、網羅的な VOC 捕集を可能とする MonoTrap 抽出法と、高分解能な GC/MS 分析、およびにおいの評価を可能とする GC/olfactometry を統合的に適用し、2 種類の代表的な口腔細菌 (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*) の培養上清から産生される VOC プロファイルを包括的に解析することを目的とした。これにより、菌種間で異なる

る特徴的な VOC プロファイルを明らかにするとともに, *in vivo* 検証(唾液)に向けた VOC の候補リストを確立した.

2.2. 実験材料と実験方法

2.2.1. サンプル調製

本研究では, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 を用いた. すべての培養は 37°C の嫌気性条件下(80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂)で実施した. まず, *F. nucleatum* および *P. gingivalis* は, CDC Anaerobe Blood Agar plates (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd., Tokyo, Japan) 上で培養した. 3 日後, コロニーをそれぞれの液体培地 10 mL を含む 4 本のチューブに移した. *F. nucleatum* 用液体培地には Modified brain heart infusion broth, *P. gingivalis* 用液体培地には Modified trypticase soy broth を用いた. 各培地組成の詳細は付録 1 に示す. 液体培地で 12 時間培養後, 遠心分離(4°C, 7670 × g, 7 min)を行い, 上清を除去し, 新鮮な培地に移した. Optical density (OD_{600 nm})を 0.1, 液量を 15 mL に調製した後, 24 時間培養を実施した(*n* = 4). その後, OD_{600 nm} を測定し, 再度遠心分離(4°C, 7670 × g, 7 min)を行った. 上清を新しいチューブに回収し, シリンジ (Terumo, Tokyo, Japan)と Millex-GP filter unit (Merck Millipore Ltd., Darmstadt, Germany)を用いてフィルトレーションした. 培養上清サンプルは, VOC の抽出を行うまで-30°C で保存した. 培地由来の化合物を評価するため, *F. nucleatum* および *P. gingivalis* の液体培地も同時に回収した.

2.2.2. VOC の抽出と GC/MS/olfactometry (GC/MS/O)分析

サンプル(*F. nucleatum* (*n* = 4), *P. gingivalis* (*n* = 4), *F. nucleatum* 用液体培地(F.n

medium, $n = 4$), *P. gingivalis* 用液体培地 (P.g medium, $n = 4$)) を室温で解凍し, 全量 (15 mL) をバイアル (GL Sciences, Tokyo, Japan) に移した. MonoTrap RGPS TD (GL Sciences) をサンプルの気相部分に設置した. オープン内で 40°C で 2 時間 VOC を捕集した後, MonoTrap を GC/MS 分析用のライナー (GL Sciences) に移した.

GC/MS/O 分析は, 多機能オートサンプラー AOC-6000 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan), マルチモード GC インレット OPTIC-4 (GL Sciences) および Sniffing Port OP275 Pro II (GL Sciences) を搭載した GCMS-TQ8050 NX (Shimadzu) を用いて実施した. 分析対象物はスプリットモードで GC に導入し, 注入口温度は 250°C に設定した. クライオトラップは -110°C で使用した. カラム流量, スプリット流量, セプタムパージ流量は, それぞれ 4.6 mL/min, 4.6 mL/min, 5.0 mL/min に設定した. GC 分析は, InertCap FFAP (60 m × 0.32 mm i.d., $df = 0.50 \mu\text{m}$, GL Sciences) カラムを使用し, キャリアガスとしてヘリウムガスを用いた. カラムオープンの温度条件は以下の通りである: 40°C で 3 分間保持した後, 3°C/min で 250°C まで昇温し, 最後に 250°C で 17 分間保持した. MS は, 電子イオン化を用いてスキャンモード (m/z 24–350) で, イベントタイムは 0.200 sec で運用した. イオン源温度とインターフェース温度は 250°C に設定した. OP275 Pro II の温度条件は以下の通りである: 100°C で 23 分間保持した後, 3°C/min で 240°C まで昇温し, 240°C で 21 分間保持した. Sniffing データの取得には Olfactory Voicegram V2.3.0 Voice Recorder を使用した. Sniffing port の出口で, ヒトの嗅覚を用いて各化合物のにおいの強度 (強, 中, 弱の 3 段階) と持続時間を評価し, 記録した. なお, 培養から VOC 抽出, GC/MS/O 分析にいたる一連のフローを図 2-1 に示す.

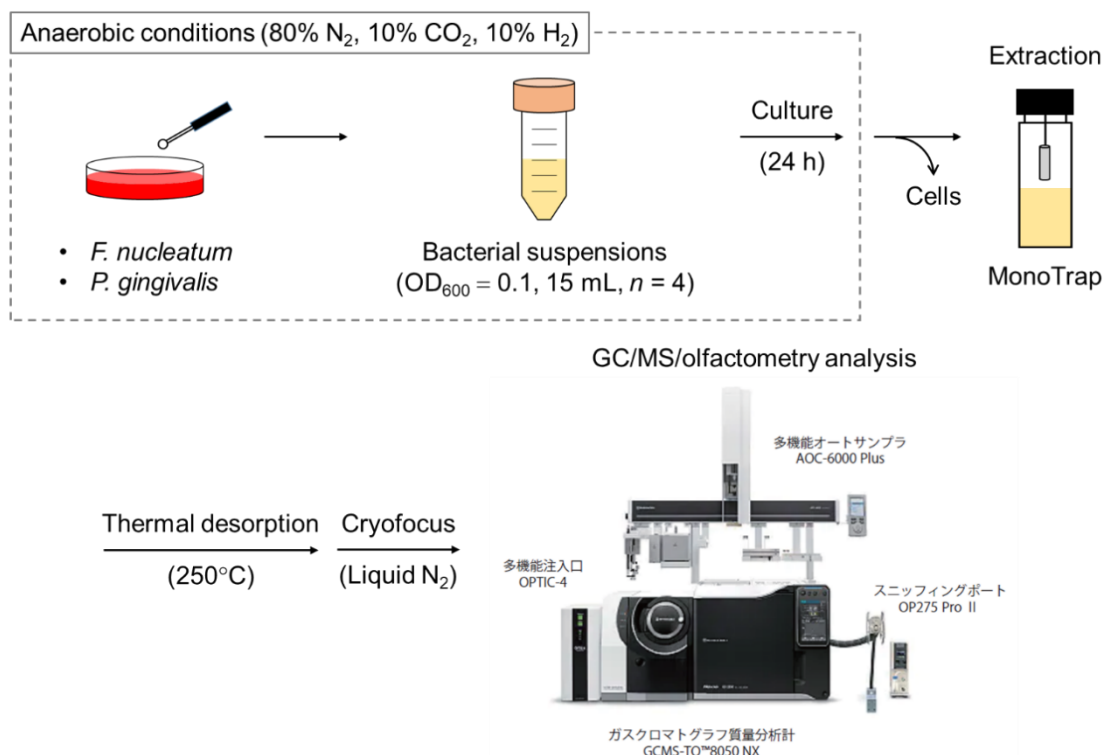


図 2-1. 第 2 章の実験装置フロー

2.2.3. データ解析

分析から得られた生データは、GCMSsolution ver. 4.20 (Shimadzu)を用いて netCDF ファイルに変換し、その後 Abf converter (Reifycs, Tokyo, Japan)を用いて ABF ファイルに変換した。MS-DIAL ver. 4.9.221218 (RIKEN, Saitama, Japan)を用いて、ベースライン補正、ノイズ除去、ピーク検出、アライメント、および自動アノテーションを行った。化合物同定は、実測 RT とマススペクトルとインハウスイブラリに登録されているデータとの類似性に基づいて行われた。このインハウスイブラリは 572 種類の化合物の情報で構成されている。MS-DIAL の解析条件は、最小ピーク高さ:1000, Smoothing method:線形加重移動平均, RT tolerance:3 に設定した。

Sniffing データ(においの時間と強度)とアノテーション結果を用いて、各化合物のにおいの有無と強度を確認した。においの強度は、4 回の測定値の最頻値によって決

定した.

以降の解析には, R (ver. 4.5.1)を使用した. 培養上清 (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*)と対応する培地 (P.g medium, F.n medium)間の VOC のピーク強度比較には, Welch の t 検定を実施し, q 値を算出した. 菌由来 VOC の可視化のため, ボルケーノプロットを作成した.

2.3. 結果と考察

本研究では, VOC の網羅的な捕集を可能とする MonoTrap 抽出法と, 高分解能な GC/MS 分析, およびにおいの評価を可能とする GC/Olfactometry を組み合わせることにより, 主要な口腔細菌株 (*P. gingivalis* および *F. nucleatum*) の培養上清から産生される VOC プロファイルの詳細に解析した. その結果, これら 2 種類の口腔細菌がそれぞれ特徴的な VOC プロファイルを有することが明らかになった. 以下にその詳細な結果を示す.

2.3.1. *P. gingivalis* の VOC プロファイル

本研究でアノテーションされた全 86 種類 (付録 2) の VOC のうち, *P. gingivalis* 培養上清において培地 (P.g medium) と比較して, $q < 0.05$ (Welch の t 検定) および Fold change (FC) > 2.0 の判断基準を満たした 37 種類の VOC が有意に増加していることを確認した. これらの 37 種類の VOC は, アルコール (15 種類), 脂肪酸 (6 種類), VSC (5 種類), 芳香族化合物 (3 種類), エステル (3 種類), アルデヒド (2 種類), ケトン (2 種類), その他 (1 種類) など, 多様な化合物クラスにわたって構成されていた (表 2-1).

表 2-1. *P. gingivalis* 培養上清で有意に増加した 37 種類の VOC
($q < 0.05$ かつ Fold change (FC) > 2.0)

No.	RT (min)	Quant mass	Compound	FC (Pg/medium)	q value	Sniffing
Alcohol						
1	6	31	Methanol	2.5	3×10^{-5}	
2	6.9	31	Ethanol	3	2×10^{-5}	
3	10.1	31	1-Propanol	18.8	2×10^{-5}	
4	12.4	43	2-Methyl-1-propanol	25.7	3×10^{-5}	
5	12.7	59	2-Methyl-2-pentanol	3.2	3×10^{-3}	
6	14.6	56	1-Butanol	57.7	3×10^{-7}	Medium
7	17.2	55	3-Methyl-1-butanol	243.8	3×10^{-7}	Strong*
8	17.2	57	2-Methyl-1-butanol	429.1	4×10^{-8}	Strong*
9	23.7	56	1-Hexanol	9	2×10^{-5}	
10	32.4	56	1-Octanol	4	5×10^{-4}	
11	32.9	45	2-Nonanol	10.2	8×10^{-5}	
12	42.3	81	1-Decanol	12.5	4×10^{-5}	
13	43.5	69	Geraniol	12	1×10^{-3}	Weak
14	44.7	79	Benzyl alcohol	6.2	2×10^{-3}	
15	45.9	91	2-Phenylethanol	735.3	2×10^{-5}	Weak
Aldehyde						
16	3.6	44	Acetaldehyde	2.3	2×10^{-2}	
17	5.6	44	Butyraldehyde	3.7	9×10^{-5}	
Aromatic compound						
18	24.5	121	2,4,6-Collidine	3.7	2×10^{-6}	

19	62.6	117	Indole	829	9×10^{-5}	Strong
20	63.9	130	Skatole	2.4	6×10^{-3}	
Ester						
21	10.1	88	Ethyl butyrate	5.4	3×10^{-3}	
22	17.2	56	Butyl propionate	408.1	4×10^{-8}	
23	18.4	88	Ethyl hexanoate	4.8	1×10^{-2}	
Fatty acid						
24	28.5	43	Acetic acid	3.4	8×10^{-4}	
25	31.9	74	Propionic acid	2.8	5×10^{-3}	
26	33.1	43	Isobutyric acid	4.4	1×10^{-3}	
27	35.5	60	Butyric acid	29.1	8×10^{-4}	Strong
28	37	74	2-Methylbutyric acid	138.2	1×10^{-4}	Medium**
29	37	60	Isovaleric acid	79.1	8×10^{-4}	Medium**
Ketone						
30	8.2	43	2-Pentanone	2.1	4×10^{-3}	
31	13.9	69	3-Penten-2-one	3.3	5×10^{-5}	
VSC						
32	3.5	47	Methyl mercaptan	11	2×10^{-2}	Weak
33	11.6	94	Dimethyl disulfide	307.9	3×10^{-4}	
34	16.9	43	S-Methyl thiobutyrate	330.9	7×10^{-4}	Medium
35	25.1	126	Dimethyl trisulfide	48.9	4×10^{-4}	Medium
36	38.8	106	Methionol	28	2×10^{-6}	
Others						

37 35.7 42 γ -Butyrolactone

8 4×10^{-7}

*, ** 2 成分の RT が非常に近接しているため、GC/O 分析における知覚可能なものは、両成分の複合的な寄与として評価した。

さらに、培養上清と培地で差異があった成分、すなわち細菌由来 VOC の可視化のため、ボルケーノプロットを作成した(図 2-2)。

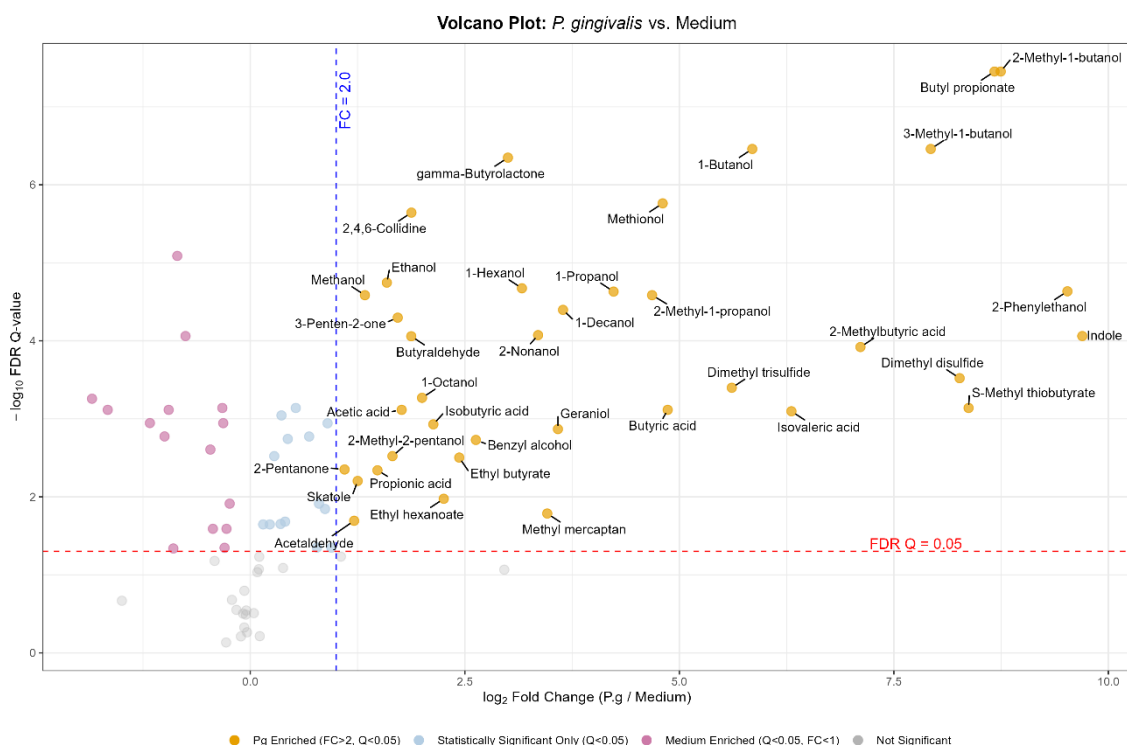


図 2-2. *P. gingivalis* 培養上清と培地(P.g medium)の VOC プロファイルの比較(ボルケーノプロット)。

オレンジ:*P. gingivalis* 培養上清で有意に増加した成分($q < 0.05$, $FC > 2.0$), ピンク:培地で有意に増加した成分($q < 0.05$, $FC < 1.0$), 水色:有意差のみあった成分($q < 0.05$, $1 < FC < 2.0$), グレー:その他(有意差なし)。

表 2-1 および図 2-2 の結果から、特に FC が大きく増加した主要な VOC は、Indole, アルコール類(2-phenylethanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 1-butanol), VSC(S-methyl thiobutyrate, dimethyl disulfide), 短鎖脂肪酸(2-methylbutyric acid,

isovaleric acid)などであった.

2.3.2. *F. nucleatum* の VOC プロファイル

本研究でアノテーションされた全 86 種類の VOC のうち, *F. nucleatum* 培養上清において培地 (F.n medium) と比較して, $q < 0.05$ (Welch の t 検定) および $FC > 2.0$ の判断基準を満たした 34 種類の VOC が有意に増加していることを確認した. これらの 34 種類の VOC は, アルコール (10 種類), ケトン (7 種類), VSC (6 種類), 脂肪酸 (3 種類), 芳香族化合物 (3 種類), エステル (3 種類), アルデヒド (1 種類), その他 (1 種類) など, 多様な化合物クラスにわたって構成されていた (表 2-2).

表 2-2. *F. nucleatum* 培養上清で有意に増加した 34 種類の VOC ($q < 0.05$ かつ $FC > 2.0$)

No.	RT (min)	Quant mass	Compound	FC (Fn/medium)	q value	Sniffing
Alcohol						
1	6.7	45	2-Propanol	9.1	1×10^{-4}	
2	10.1	31	1-Propanol	34.4	1×10^{-6}	
3	12.4	43	2-Methyl-1-propanol	2.3	3×10^{-4}	
4	12.7	59	2-Methyl-2-pentanol	4.4	2×10^{-5}	
5	17.2	57	2-Methyl-1-butanol	2.7	8×10^{-5}	
6	24.1	45	2-Heptanol	2.2	2×10^{-3}	
7	26.6	45	2-Octanol	3.8	4×10^{-3}	
8	27.9	41	trans-2-Hexen-1-ol	2.8	5×10^{-6}	
9	42.3	81	1-Decanol	11.9	3×10^{-4}	
10	43.5	69	Geraniol	13	7×10^{-3}	

Aldehyde						
11	5.6	44	Butyraldehyde	2.2	2×10^{-3}	
Aromatic compound						
12	24.5	121	2,4,6-Collidine	23.4	8×10^{-5}	
13	49.1	94	Phenol	42.3	6×10^{-5}	
14	62.6	117	Indole	724.5	8×10^{-5}	Strong
Ester						
15	10.1	88	Ethyl butyrate	15.8	1×10^{-4}	
16	17.2	56	Butyl propionate	2.1	3×10^{-4}	
17	18.4	88	Ethyl hexanoate	18.8	9×10^{-5}	
Fatty acid						
18	28.5	43	Acetic acid	2.9	7×10^{-3}	
19	31.9	74	Propionic acid	4.1	1×10^{-3}	
20	35.5	60	Butyric acid	60.1	5×10^{-6}	Strong
Ketone						
21	8.2	43	2-Pentanone	63.6	7×10^{-6}	
22	9.1	43	4-Methyl-2-pentanone	2.5	5×10^{-5}	
23	11.9	43	2-Hexanone	2.3	7×10^{-4}	
24	13.9	69	3-Penten-2-one	4.6	5×10^{-6}	
25	14.9	57	3-Heptanone	3.7	4×10^{-4}	
26	16.2	43	2-Heptanone	4.8	5×10^{-6}	
27	20.9	45	Acetoin	2	8×10^{-5}	
VSC						
28	3.5	47	Methyl mercaptan	5.6	3×10^{-2}	Medium

29	10.7	43	S-Methyl thioacetate	2758.2	8×10^{-5}	Strong
30	11.6	94	Dimethyl disulfide	532.9	9×10^{-4}	Weak
31	16.9	43	S-Methyl thiobutyrates	7283.5	7×10^{-5}	Strong
32	25.1	126	Dimethyl trisulfide	233.8	7×10^{-5}	Medium
33	38.8	106	Methionol	5.6	9×10^{-6}	
Others						
34	35.7	42	γ -Butyrolactone	2.5	8×10^{-5}	

さらに、培養上清と培地で差異があった成分、すなわち細菌由来 VOC の可視化のため、ボルケーノプロットを作成した(図 2-3)。

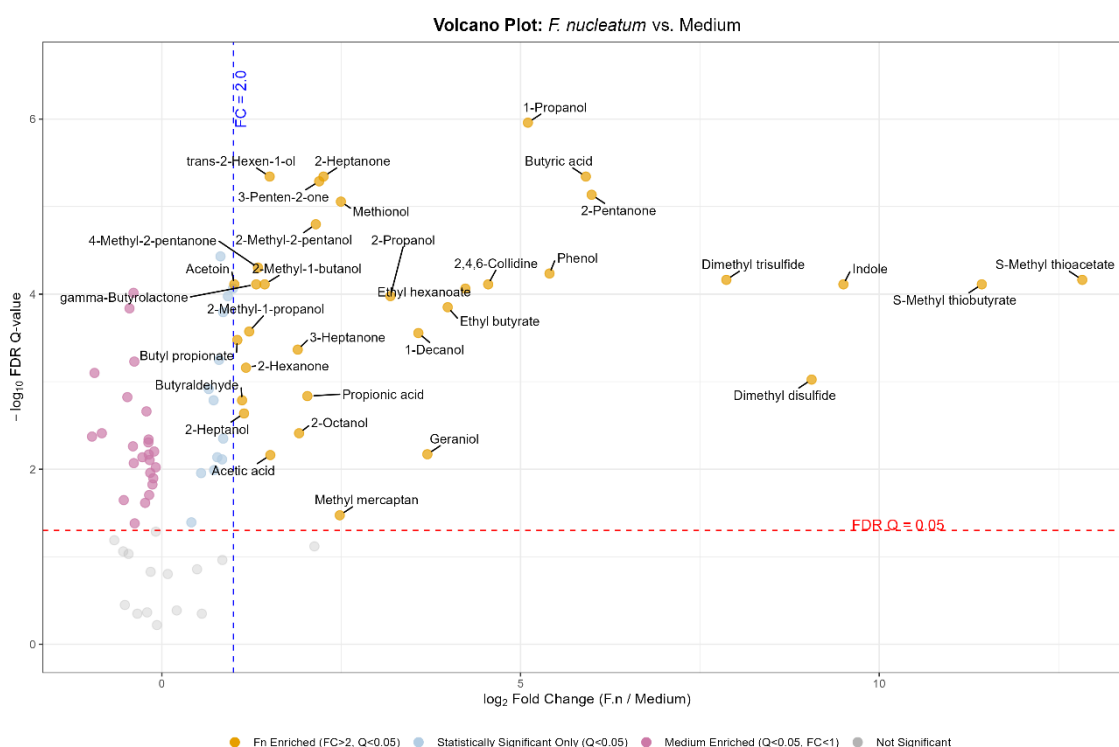


図 2-3. *F. nucleatum* 培養上清と培地 (F.n medium) の VOC プロファイルの比較 (ボルケーノプロット).

オレンジ: *F. nucleatum* 培養上清で有意に増加した成分 ($q < 0.05$, $FC > 2.0$), ピンク: 培地で有意に増加した成分 ($q < 0.05$, $FC < 1.0$), 水色: 有意差のみあった成分 ($q < 0.05$, $1 < FC < 2.0$), グレー: その他 (有意差なし).

表 2-2 および図 2-3 の結果から, 特に FC が大きく増加した主要な VOC は, VSC (S-methyl thioacetate, S-methyl thiobutyrate, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide), indole, butyric acid などであった.

2.3.3. 口腔細菌由来 VOC とそのにおいへの寄与

本研究で得られた VOC プロファイルは, 特定の培養条件下において, *P. gingivalis* と *F. nucleatum* がそれぞれ異なる特徴的な VOC 産生傾向を有することを示唆している. この傾向を, 両菌種の共通成分, および各菌種に特有な成分という構造で展開する (表 2-3).

表 2-3. 主要な臭気成分のリスト

Class	Compound	Fold change		Sniffing		Comment
		Pg	Fn	Pg	Fn	
Aromatic	Indole	829	724.5	Strong	Strong	両菌種に共通の悪臭成分
VSC	S-Methyl thiobutyrate	330.9	2758.2	Medium	Strong	Fn で Pg の約 8 倍高 FC
	S-Methyl thioacetate	0.4	7283.5	-	Strong	Fn に特異的
	Dimethyl disulfide	307.9	532.9	-	Weak	口臭患者の唾液から検出報告あり
	Dimethyl trisulfide	48.9	233.8	Medium	Medium	口臭患者の唾液から検出報告あり
SCFA	2-Methylbutyric acid	138.2	1.2	Medium	-	Pg の BCAA*代謝に強く関連
	Isovaleric acid	79.1	1.7	Medium	-	Pg の BCAA 代謝に強く関連
	Butyric acid	29.1	60.1	Strong	Strong	両菌種に共通の悪臭成分
Alcohol	2-Methyl-1-butanol	429.1	2.7	Strong	-	Pg の BCAA 代謝に強く関連
	3-Methyl-1-butanol	243.8	1.8	Strong	-	Pg の BCAA 代謝に強く関連

*分岐鎖アミノ酸

(1) 両菌種に共通する主要な臭気成分

まず、両菌種の培養上清において、Indole, Dimethyl disulfide, Dimethyl trisulfide, および Butyric acid は共通して有意な増加が見られ、悪臭への基礎的な寄与が示唆される成分である。Indole は Tryptophan の代謝によって生成され、そのおきの閾値は 0.0003 ppm と Dimethyl sulfide に匹敵することから、最も重要な悪臭関連化合物の一つであることが示唆される[18]。Dimethyl disulfide および Dimethyl trisulfide は口臭患者から採取し、インキュベートした唾液サンプルからの検出が報告されている[30]。Butyric acid も口臭への寄与の可能性が報告されている成分であり[41]、本研究の結果は両菌種が特定の条件下でこれらの成分の産生に関わっていることを示唆している。

(2) *P. gingivalis* に特徴的な分岐鎖アミノ酸代謝

P. gingivalis は共通成分に加え、分岐鎖アルコール(2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol)や分岐鎖脂肪酸(2-methylbutyric acid, isovaleric acid)の生成能が高いことを示している(表 2-1, 図 2-2)。これら 4 成分は、すべて分岐鎖アミノ酸(BCAA: isoleucine, leucine)の分解経路を通じて生成される[42,43]。この経路において、BCAA から生じた共通の中間体(アルデヒド)は、還元されればアルコールに、酸化されれば SCFA に変換される[43]。*P. gingivalis* のような偏性嫌気性菌の代謝では、BCAA が分岐鎖アルコールと分岐鎖脂肪酸の両方に変換されることが、他の嫌気性菌を用いた研究で実証されている[43]。嫌気性条件下では、細菌は BCAA 分解によって生じたアルデヒドを、一部は酸化して SCFA とし、一部は還元してアルコールにすることで、酸化還元バランスを効率的に維持している。さらに、*P. gingivalis* は BCAA を細胞外から取り込む能力が高いことが報告されている[44]。上記の複合的な証拠から、*P. gingivalis* は口腔内のタンパク質を積極的に分解し、その BCAA 代謝を通じて、分岐鎖アルコールと分岐鎖脂肪酸を多量に生成するという特定の代謝傾向を有していると考えられる。なお、本研究において、分岐鎖アルコール 2 種(2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol)および分岐鎖脂肪酸(2-methylbutyric acid, isovaleric acid)の異性体群(表 2-1. *, **)については、GC の RT が非常に近接しており、個々の成分にのこのデータを一意に割り当てるのが困難であったため、複合的な寄与として評価した

ことをここで補足しておく。いずれにしても、本結果は歯周病菌 *P. gingivalis* がこれまで重要視されてきた、特定の VSC にとどまらない多様な非硫黄系におい成分形成に寄与する可能性を示している。

(3) *F. nucleatum* に特徴的な硫黄代謝

一方、*F. nucleatum* は *P. gingivalis* とは対照的に、硫黄代謝物(チオエステルを含む)の産生に特化したプロファイルを示した(表 2-2, 図 2-3)。

F. nucleatum は S-methyl thiobutyrate および S-methyl thioacetate という 2 種類のチオエステルで極めて高い FC を示した。*F. nucleatum* の S-methyl thiobutyrate の FC (2758)は、*P. gingivalis* の FC(331)と比べて約 8 倍も高く、その主要な産生源は *F. nucleatum* にあると示唆される。しかしながら、この化合物について唾液や呼気からの検出例は報告されていない。そのため、このチオエステルが GC/MS の加熱脱離の過程において、前駆体である短鎖脂肪酸(SCFA)やチオール類からのエステル化反応生成物(アーティファクト)である可能性も考慮する必要がある。しかし、本研究の結果は、この検出量が *F. nucleatum* の代謝特性を強く反映していることを示唆する。培地単独での S-methyl thiobutyrate の検出量は低かったのに対し、*F. nucleatum* 培養上清では他の VOC クラスと比べて FC が圧倒的に高かった。さらに *F. nucleatum* は *P. gingivalis* と比べて、チオエステルの前駆体となる酪酸(SCFA)や他の VSC の産生能が格段に高いことが示されている。この事実は、検出された S-methyl thiobutyrate が二次生成物であったとしても、*F. nucleatum* の硫黄および炭素代謝経路がこれらの VOC を産生し得る環境を作り出していること、すなわち *F. nucleatum* の S-methyl thiobutyrate 高産生能を間接的に示していることを強く示唆する。一方、S-methyl thioacetate については口臭患者の唾液からの検出が報告されているものの[30]、先述のようなアーティファクトである可能性は否定できない。そのため、これらのチオエステルの口腔内での存在については今後の検証が必要である。

Dimethyl disulfide および Dimethyl trisulfide も *F. nucleatum* の FC が *P. gingivalis* よりも高く、VSC 全般の産生能が高いことを示している。これらの結果から、*F. nucleatum* はチオエステルを含む VSC の産生能力において *P. gingivalis* を凌駕して

おり, その VOC プロファイルが口臭形成に影響していることが示唆された.

2.4. 小括

第 2 章では, *P. gingivalis* と *F. nucleatum* という代表的な歯周病菌 2 種の培養上清から, MonoTrap による抽出, GC/MS および GC/olfactometry を用いて網羅的な VOC プロファイリングを達成した. その結果, これらの細菌が産生する VOC プロファイルを同定し, これらの成分が細菌由来バイオマーカーの候補となる可能性が示された.

両菌種で共通の成分に加えて, Modified trypticase soy broth で培養した *P. gingivalis* は分岐鎖アルコールや分岐鎖脂肪酸を, Modified brain heart infusion broth で培養した *F. nucleatum* は硫黄代謝物と Butyric acid を高産生するという特徴的な VOC プロファイルを有することが明らかになった. この知見は口腔内での悪臭形成が 2, 3 種の VOC だけでなく, 複数の菌種による多様な代謝の結果であることを示唆している. しかしながら, *in vitro* 培養系で得られたこれらの知見を臨床応用するためには, 生体内の複雑な環境における検証が不可欠である. 続く第 3 章では, 臨床検体としての唾液中 VOC に着目し, 口腔細菌由来の VOC について更なる検証を試みた.

第 3 章 唾液腺唾液と全唾液の比較による口腔細菌由来 VOC の同定

3.1. 緒言

第 2 章では、特定の培養条件下において、口腔細菌 *Porphyromonas gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* がそれぞれ特徴的な VOC プロファイルを有することを明らかにした。この基礎研究の成果を臨床応用するためには、非侵襲的な臨床検体である唾液を用いた *in vivo* での検証が不可欠となる。

しかし、唾液には口腔細菌による代謝産物だけでなく、唾液腺由来の宿主代謝物や、食べ物などの外因性成分が混在するため、その VOC プロファイルは非常に複雑である[27,28]。この複雑性のため、従来の *in vivo* 研究では、口腔細菌の代謝を反映する VOC を特定することが困難であった。しかし、第 2 章で得られた知見は、主要な歯周病菌が特有の VOC (Indole, Isovaleric acid など) を高産生することを初めて定量的に示唆した。この確固たる *in vitro* の知見を臨床的な文脈で明らかにするため、*in vivo* での検証の必然性が極めて高い。

この課題を克服するため、本章では 2 つの目的を設定した。第一に、少量の唾液サンプル (100 μ L) から広範囲な VOC を高感度に抽出するための前処理プロトコルを確立することである。第二に、口腔細菌の影響がほとんどない唾液腺唾液と、口腔細菌由来の成分を豊富に含む全唾液の VOC を比較するというアプローチを適用し、宿主バックグラウンドを排除した、真の口腔細菌由来 VOC を同定することである。さらに、サンプリングデバイス由来のアーティファクトを徹底的に評価・排除することで、特定された VOC が口腔内の生物学的な違いを反映する、信頼性の高いバイオマーカー候補であることを実証した。

3.2. 実験材料と実験方法

3.2.1. 参加者

本研究は大阪大学歯学部附属病院の倫理委員会により承認され (承認番号: R4-

E10-2, 承認日:2022 年 9 月 26 日), ヘルシンキ宣言に基づいて実施された. 研究参加者全員から書面によるインフォームド・コンセントを得た. 日本人参加者 10 名を募集した. 参加者 ID, 年齢, 性別は表 3-1 に示した. 本研究の主な目的は, 参加者 17 を除く 9 名から採取した唾液腺唾液と全唾液の VOC プロファイルを比較することであった. また, 予備実験として, 参加者 17 から採取した全唾液サンプルを用いて, Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Germany)の使用が VOC プロファイルに与える影響を評価した.

表 3-1. 参加者の情報(ID, 年齢, 性別)

ID	年齢	性別
01	72	M
02	44	F
03	48	F
04	30	M
06	49	F
08	22	M
10	22	M
12	24	F
13	23	F
17	27	F

3.2.2. サンプル採取と前処理

本実験

すべての唾液サンプルは, 午前 11 時から正午の間に, 唾液腺唾液, 全唾液の順で採取した. 参加者には, 唾液採取の 8 時間前から, 水以外の飲食を控えるように指示した. さらに, 唾液採取の 3 時間前からは, 水を含む一切の飲食と歯磨きを控えるように指示した. 唾液腺唾液と全唾液の採取は, 以下の手順に従って行った.

唾液腺唾液の採取では, まず参加者に水で口をゆすぐように指示した. 次に, 口を開け, 舌を上顎に押し当てた状態で, 使い捨てピンセット (AS ONE, Osaka, Japan)を用いて Salivette のコットンスワブを顎下腺/舌下腺の出口に設置した(付録 3). スワブは口を閉じた状態で 5 分間留置した(参加者 01 は唾液量が不十分だったため, 15 分間留置した). その後, 使い捨てピンセットでスワブを取り出し, Salivette チューブに移した. Salivette チューブを 4°C, 1000 g で 2 分間遠心分離することで唾液腺唾液を回

収した. 得られた唾液腺唾液は 200 μ L ずつ 2.0 mL マイクロチューブ (Eppendorf, Hamburg, Germany)に分注し, 液体窒素で凍結し, 分析まで -80°C で保存した.

全唾液の採取では, 氷上に置いた 50 mL チューブ (Corning, NY, USA)に, 5 分間かけて非刺激性全唾液を吐き出した. 氷上で 15 分間静置した後, 上清を回収した. 得られた全唾液は 200 μ L ずつ 2.0 mL マイクロチューブに分注し, 液体窒素で凍結し, 分析まで -80°C で保存した.

Salivette 由来アーティファクトの評価のための予備実験

Salivette の使用が唾液の VOC プロファイルに与える影響を調べるため, 一人の参加者(参加者 17)から採取した, Salivette 処理を行った全唾液と, 行っていない全唾液の VOC プロファイルを比較した. さらに, Salivette に由来する化合物を特定するために, Salivette 処理を行った超純水と, 行っていない超純水の VOC プロファイルを比較する補完的な分析も行った.

Salivette 処理を行わない全唾液の採取は, 本実験と同様の手順で行った. 氷上に置いた 50 mL チューブに, 5 分間かけて非刺激性全唾液を吐き出した. 氷上で 15 分間静置した後, 上清を回収した. 得られた全唾液は 200 μ L ずつ 2.0 mL マイクロチューブに分注し, 液体窒素で凍結し, 分析まで -80°C で保存した.

Salivette 処理を行う全唾液の採取では, Salivette のコットンスワブを 50 mL チューブにあらかじめ設置しておいた. そのチューブに 5 分間唾液を吐き出した. その後, 使い捨てピンセットでスワブを取り出し, Salivette チューブに移した. Salivette チューブを 4°C , 1000 g で 2 分間遠心分離することで唾液を回収した. 得られた唾液は 200 μ L ずつ 2.0 mL マイクロチューブに分注し, 液体窒素で凍結し, 分析まで -80°C で保存した.

3.2.3. VOC の抽出と GC/MS 分析

VOC の抽出

唾液からの VOC 抽出に先立ち, 以下の準備を行った. 特に指定がない限り, すべての手順は室温 ($22-24^{\circ}\text{C}$) で実施した. まず, MonoTrap RGPS TD (GL Sciences, Tokyo, Japan)を半分に切断した. 切断した MonoTrap は, 使用前に窒素ガスを約 45

mL/min で 2 時間, 270°C で流すことでコンディショニングした. すべての唾液サンプルは, 使用前に室温で解凍した.

次に, すべての唾液サンプルは以下の VOC 抽出プロトコルに従って処理した. 本実験では, 18 サンプル (唾液腺唾液 ($n = 9$)と全唾液 ($n = 9$))を, 予備実験では, Salivette 処理の有無で採取した全唾液 6 サンプル ($n = 3$, technical replicate)を用いた.

0.2 mL 平底ガラスインサート (GL Sciences)を 2 mL 透明バイアル (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)にセットした. MonoTrap をこのガラスインサートに入れ, 50 μ L のジクロロメタンを加えた. 10 秒間ボルテックスした後, バイアルを室温で 20 分間静置した, その後, MonoTrap を 100 μ L の唾液サンプルが入った新しいガラスインサート入りの 2 mL 透明バイアルに移した. 10 秒間ボルテックスした後, バイアルを室温で 60 分間静置して唾液から VOC を抽出した. この過程で, 20 分ごとに 10 秒間のボルテックスを行った. VOC 抽出後, MonoTrap をライナー (GL Sciences)に移し, 熱脱着-GC/MS 分析に供した.

GC/MS 分析

GC/MS 分析は, 多機能オートサンプラー AOC-6000 (Shimadzu, Kyoto, Japan)とマルチモード GC インレット OPTIC-4 (GL Sciences)を備えた GCMS-TQ8050 NX (Shimadzu)を用いて行った. OPTIC-4 注入口の温度プログラムは, 初期温度 40°C から 5°C/sec で 50°C まで上昇させ, 50°C で 240 秒間保持した後, 5°C/sec で 250°C まで上昇させ, 250°C で 360 秒間保持した. クライオトラップは-120°C で 600 秒間保持した後, 30°C/sec で 250°C まで急速昇温した. カラム流量は, 最初の 240 秒間は 1.0 mL/min に設定し, 以降は分析終了まで 2.3 mL/min に設定した. スプリット流量は, 最初の 240 秒間は 230 mL/min に設定し, 以降は分析終了まで 2.3 mL/min に設定した. セプタムパージ流量は 5 mL/min に設定した. 残存ジクロロメタンのベントを促すため, 最初の 240 秒間は, 注入口温度を 50°C に保ちながら, スプリット流量を高速な 230 mL/min に設定した. GC 分析は, InertCap FFAP (60 m $\times$ 0.32 mm i.d., df = 0.50 μ m, GL Sciences)カラムを使用し, キャリアガスとしてヘリウムガスを用いた. カラムオープン

の温度条件は、40°C で 3 分間保持した後、3°C/min で 250°C まで上昇させ、最後に 250°C で 30 分間保持した。MS は、電子イオン化を用いてスキャンモード (m/z 24–350)で、イベントタイムは 0.200 sec で運用した。イオン源温度とインターフェース温度は 250°C に設定した。感度を上げるため、検出器電圧を相対値で 0.2 kV 上昇させた。Retention index (RI)の計算には、アルカン混合物 (C7-C26)の標準品を使用した。

3.2.4. データ解析

分析から得られた生データは、GCMSsolution ver. 4.20 (Shimadzu)を用いて netCDF ファイルに変換し、その後 Abf converter (Reifycs, Tokyo, Japan)を用いて ABF ファイルに変換した。MS-DIAL ver. 4.9.221218 (RIKEN, Saitama, Japan)を用いて、ベースライン補正、ノイズ除去、ピーク検出、アライメント、および化合物の RI とマススペクトル情報に基づく自動アノテーションを行った。化合物同定には、インハウスライブラリを使用した。MS-DIAL の解析条件は、最小ピーク高さ:5000, Smoothing method:線形加重移動平均, RI 許容範囲:20 に設定した。

唾液腺唾液と全唾液の VOC プロファイルの比較にあたっては、Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA)には MetaboAnalyst 6.0, Wilcoxon signed-rank test には R (ver. 4.5.1)を使用した。Salivette 由来の VOC を特定するため、予備実験の全唾液、および超純水ブランクサンプルについて、データの分散に応じて Student's t -test または Welch's t -test を用いて、Salivette 処理の有無によるピーク強度を比較した (統計解析ツール : <https://systemsomicslab.github.io/compms/others/main.html#Statistics>, 2025 年 9 月 16 日アクセス)。棒グラフ, 箱ひげ図, 対散布図など, すべてのプロットは R を用いて作成した。

3.3. 結果と考察

本研究では、MonoTrap 抽出とジクロロメタンを組み合わせたサンプル調製法を確立し、比較的少量の唾液サンプル (100 μ L)からの VOC プロファイリングを可能にした。

このプロトコルを用いて、唾液腺唾液と全唾液の VOC プロファイルと比較し、両者の生物学的な違いを反映する VOC の特定に取り組んだ。なお、本研究で得られた全ての生データは MB-POST にデポジットした (<https://repository.massbank.jp/entry/MPST000109>)。

3.3.1. Salivette 由来アーティファクトが全唾液 VOC プロファイルに与える影響の評価

この VOC 抽出プロトコルを用いて、本研究の主要な目的である、唾液腺唾液と全唾液の生物学的な違いを反映する VOC を特定するという課題に取り組んだ。本研究では、唾液腺唾液は Salivette を用いて、全唾液はチューブに吐出する方法で採取した。理想的には、採取デバイスからのアーティファクトの混入を最小限に抑えるサンプリング方法が望ましい。しかし、唾液腺唾液を効率的に採取するためには Salivette の使用が不可欠であったため、このサンプリングデバイスに由来するアーティファクトを適切に評価する必要があった。Bosman らの研究から示唆されるように、Salivette の使用は唾液中のいくつかの不揮発性代謝物の分析結果に影響を与える可能性がある[36]。このサンプリングデバイス由来のアーティファクトの問題は、VOC 分析においても同様に重要である。本節では、Salivette が唾液の VOC プロファイルに与える影響を評価するための第一段階として、Salivette 処理を行った全唾液と、行わなかった全唾液の VOC プロファイルと比較し、Salivette の使用によってピーク強度が変化する VOC を特定した。

Salivette 処理を行った全唾液 ($n = 3$)と、行わなかった全唾液 ($n = 3$)の計 6 サンプルから、アルコール(13 種)、芳香族化合物(17 種)、アルデヒド(6 種)、脂肪酸(13 種)、ケトン(7 種)、揮発性硫黄化合物 (VSCs)(3 種)、およびその他(3 種)からなる合計 62 種類の化合物が検出された(表 3-2)。

表 3-2. Salivette 処理あり・なしの全唾液中で検出された化合物

No.	RT* (min)	RI	Quant mass	Compound
Alcohol				
1	7.6	933	45	2-Propanol
2	11.4	1051	31	1-Propanol

3	16.2	1167	56	1-Butanol
4	18.9	1226	57	2-Methyl-1-butanol
5	19	1227	55	3-Methyl-1-butanol
6	19.5	1239	69	2-Hexanol
7	21	1268	55	1-Pentanol
8	23.8	1328	43	Acetol
9	25.6	1367	56	1-Hexanol
10	31.6	1499	57	2-Ethyl-1-hexanol
11	38	1653	81	Menthol
12	47.1	1896	79	Benzyl alcohol
13	48.4	1932	91	2-Phenylethanol
Aromatic compound				
14	4.8	806	68	Furan
15	6.1	878	82	2-Methylfuran
16	18.3	1213	79	Pyridine
17	22.2	1294	94	2-Methylpyrazine
18	31.2	1490	96	Furfural
19	32.9	1530	95	2-Acetylfuran
20	33.8	1552	106	Benzaldehyde
21	35.9	1600	110	5-Methyl-2-furaldehyde
22	38.9	1677	98	Furfuryl alcohol
23	58.7	2251	82	4-Methylimidazole
24	65.2	2473	105	Benzoic acid
25	65.3	2477	117	Indole
26	66.6	2524	130	Skatole
27	66.8	2530	97	5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde
28	68.7	2601	151	Vanillin
29	70	2636	91	3-Phenylpropionic acid
30	89.4	3206	194	Caffeine
Aldehyde				
31	3.8	709	44	Acetaldehyde
32	4.8	804	58	Propionaldehyde
33	5	819	43	Isobutyraldehyde
34	5.8	858	56	2-Propenal
35	7.2	922	57	2-Methylbutyraldehyde
36	7.3	926	44	3-Methylbutanal
Fatty acid				
37	30.3	1469	43	Acetic acid
38	33.9	1554	74	Propionic acid
39	35.1	1581	43	Isobutyric acid
40	37.6	1643	60	Butyric acid
41	39.1	1682	60	Isovaleric acid
42	41.8	1752	60	Valeric acid
43	44.2	1816	57	4-Methylvaleric acid
44	45.7	1858	60	Hexanoic acid
45	49.5	1964	60	Heptanoic acid
46	53.1	2071	60	Octanoic acid

47	56.4	2177	60	Pelargonic acid
48	59.7	2283	73	Decanoic acid
49	65.8	2494	73	Lauric acid
Ketone				
50	5.1	825	43	Acetone
51	6.9	912	43	2-Butanone
52	9.3	993	43	2,3-Butanedione
53	10.3	1020	43	4-Methyl-2-pentanone
54	16.5	1174	57	3-Heptanone
55	23	1310	45	Acetoin
56	39	1679	105	Acetophenone
VSC				
57	3.7	698	47	Methyl mercaptan
58	27.3	1402	126	Dimethyl trisulfide
59	50.3	1990	135	Benzothiazole
Others				
60	6.5	899	43	Ethyl acetate
61	44.7	1829	44	Propionamide
62	56.1	2167	30	δ -Valerolactam

*Retention time

このうち, Salivette 処理の有無によってピーク強度の変化を示した化合物を調査した結果, 14 種類の化合物 (2-hexanol, 1-hexanol, 2-acetylfuran, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, acetophenone, benzothiazole, decanoic acid, furan, furfural, heptanoic acid, hexanoic acid, pelargonic acid, valeric acid, vanillin)は Salivette の使用によって有意に増加した一方で, furfuryl alcohol は有意に減少した (t -test, $p < 0.05$, $n = 3$) (図 3-1).

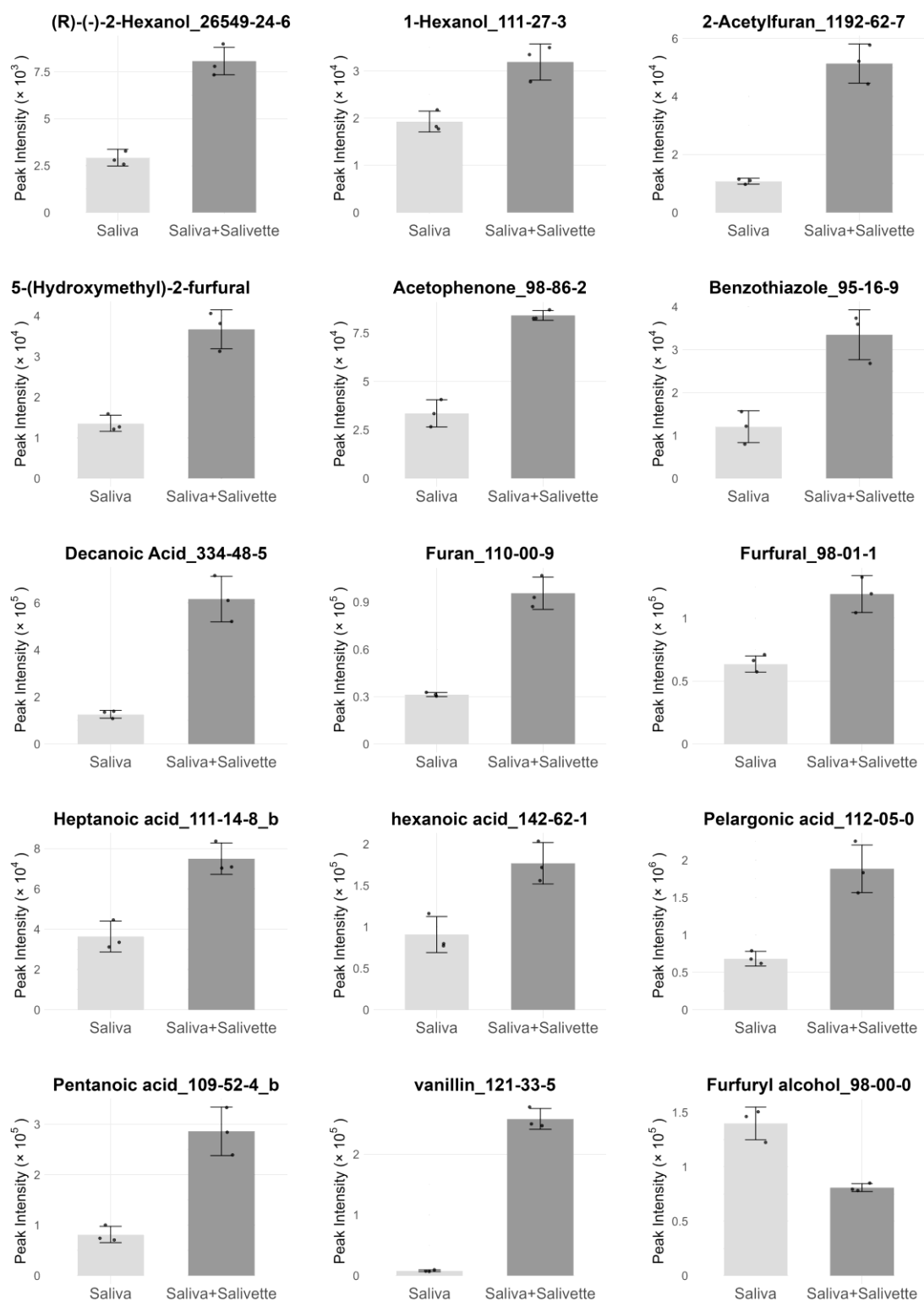


図 3-1. Salivette の使用により有意に変動した 15 化合物の棒グラフ

(Saliva: Salivette なしで採取した全唾液, Saliva+Salivette: Salivette を使用して採取した全唾液).

このブランク評価において、ブランクとして特定された VOC の大半は、Salivette の使用により増加した。そのうち、furfural と 5- hydroxymethyl-2-furaldehyde は、セルロースの分解生成物として広く認識されている[45,46]。Salivette コットンが主にセルロースで構成される植物由来の素材であることを考えると、これらの化合物が Salivette のコットンに由来する可能性は排除できない。同様に、短・中鎖脂肪酸 (C5-C10) とアルコール類 (1-hexanol, 2-hexanol) の増加は、Salivette のポリエチレン製キャップから溶出した結果である可能性がある。先行研究では、これらの化合物が食品包装に使用されるポリエチレン包装材から検出されることが示されている[47]。Acetophenone の存在も、食品包装に使用されるポリエチレンおよびポリプロピレン材料での検出報告によって裏付けられている[48]。これらの結果から、Salivette の使用により増加した化合物は、Salivette のコットンスワブまたはプラスチック容器のいずれかに由来するブランク化合物であることが示唆される。これらの化合物とは対照的に、furfuryl alcohol は Salivette の使用により減少したことから、コットンスワブまたはプラスチック容器に吸着した可能性がある。

以上の検証に基づき、Salivette の使用により有意な変化を示したこれら 15 種類の化合物は、以降の全唾液と唾液腺唾液の比較解析から除外した。

3.3.2. 全唾液と唾液腺唾液の VOC プロファイルの比較

次に、唾液腺唾液と全唾液の VOC プロファイルを比較した。両唾液サンプルを 9 名の参加者から採取し、GC/MS 分析に供した結果、合計 72 種類の化合物が検出された。このうち、Salivette の使用により有意な変化を示した 15 種類の化合物は、その後の解析から除外した。残りの 57 種類の化合物は、アルコール(11 種)、芳香族化合物(15 種)、アルデヒド(6 種)、脂肪酸(10 種)、ケトン(6 種)、VSC(4 種)、その他(5 種)で構成されていた(表 3-3)。

唾液腺唾液と全唾液の違いを特徴づける VOC を特定するため、これら 57 種類の成分を説明変数として OPLS-DA を実施した(図 3-2, 付録 4)。得られたモデルの R^2Y は 0.743, Q^2 は 0.679 であった。本解析のサンプル数 ($n = 9$) は限定的であるため、過学習の可能性は否定できず、モデルの汎用性については慎重な解釈が求められる、

しかしながら、本解析により、両群の分離に寄与すると考えられる Variable Importance for Prediction (VIP)値が 1.0 を超える 22 種類の化合物が特定された。

表 3-3. 唾液腺唾液および全唾液中に検出された化合物

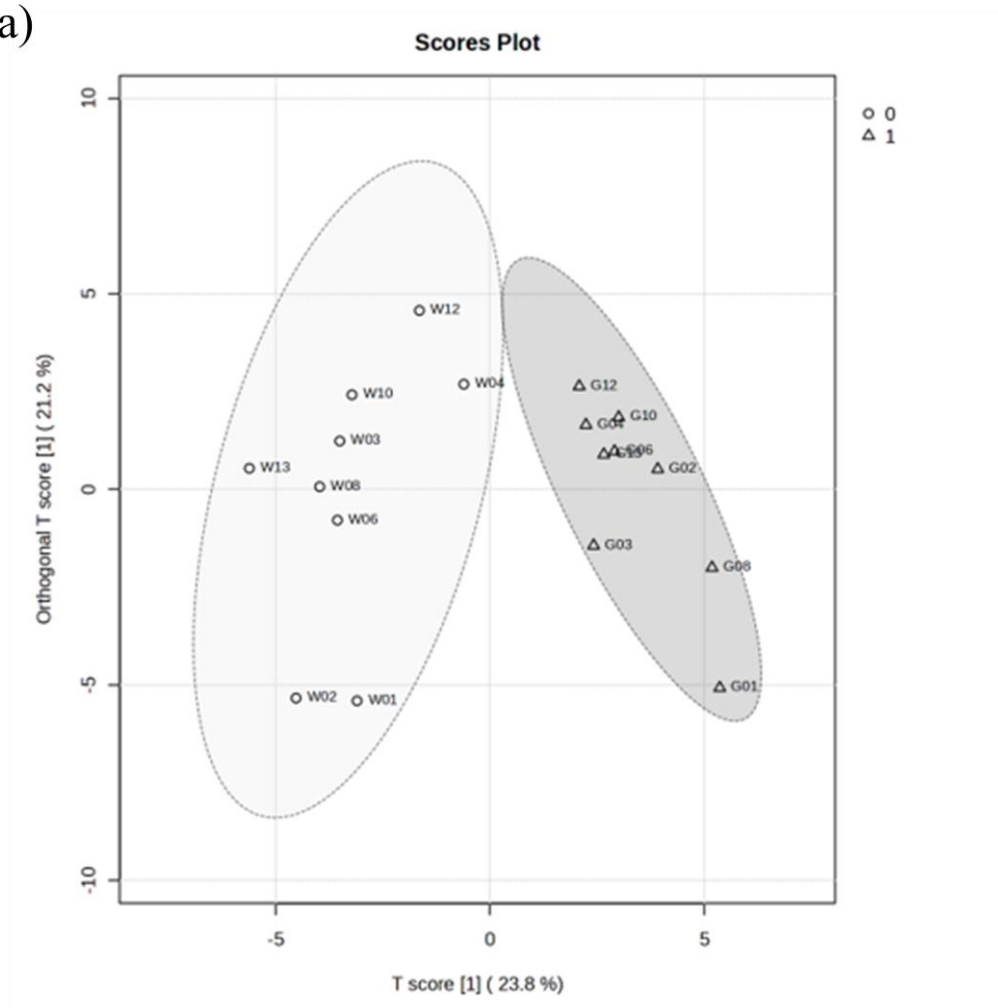
(Salivette の使用により有意に変化した 15 化合物を除く)

No.	RT* (min)	RI	Quant mass	Compound
Alcohol				
1	7.6	933	45	2-Propanol
2	11.5	1050	31	1-Propanol
3	16.3	1167	56	1-Butanol
4	19	1226	57	2-Methyl-1-butanol
5	19	1226	55	3-Methyl-1-butanol
6	21	1267	55	1-Pentanol
7	23.9	1327	43	Acetol
8	31.7	1498	57	2-Ethyl-1-hexanol
9	38.1	1653	71	Menthol
10	47.2	1896	79	Benzyl alcohol
11	48.5	1932	91	2-Phenylethanol
Aromatic compound				
12	6.2	878	82	2-Methylfuran
13	18.3	1211	79	Pyridine
14	19.7	1240	80	Pyrazine
15	20.1	1247	81	2-Pentylfuran
16	22.2	1292	94	2-Methylpyrazine
17	28.5	1426	122	2,3,5-Trimethylpyrazine
18	33.9	1551	106	Benzaldehyde
19	35.9	1599	110	5-Methyl-2-furaldehyde
20	58.7	2246	82	4-Methylimidazole
21	63.7	2416	120	4-Vinylphenol
22	65.4	2474	105	Benzoic acid
23	65.5	2477	117	Indole
24	66.8	2524	130	Skatole
25	70.1	2635	91	3-Phenylpropionic acid
26	89.6	3203	194	Caffeine
Aldehyde				
27	3.9	709	44	Acetaldehyde
28	4.8	803	58	Propionaldehyde
29	5.1	819	43	Isobutyraldehyde
30	5.8	857	56	2-Propenal
31	7.3	922	57	2-Methylbutyraldehyde
32	7.4	926	44	3-Methylbutanal
Fatty acid				
33	30.4	1468	43	Acetic acid
34	34	1554	28	Propionic acid

35	34.4	1561	46	Formic acid
36	35.2	1581	43	Isobutyric acid
37	37.7	1642	60	Butyric acid
38	39.3	1682	60	Isovaleric acid
39	44.3	1816	57	4-Methylvaleric acid
40	53.2	2071	60	Octanoic acid
41	65.9	2493	73	Lauric acid
42	90.8	3239	67	Linoleic acid
Ketone				
43	5.2	824	43	Acetone
44	7	912	43	2-Butanone
45	9.4	992	43	2,3-Butanedione
46	10.3	1019	43	4-Methyl-2-pentanone
47	16.6	1173	57	3-Heptanone
48	23	1309	45	Acetoin
VSC				
49	3.7	698	47	Methyl mercaptan
50	13.1	1094	94	Dimethyl disulfide
51	27.4	1402	126	Dimethyl trisulfide
52	29.8	1455	81	Furfuryl mercaptan
Others				
53	6.6	899	43	Ethyl acetate
54	20	1247	55	1-Dodecene
55	44.7	1827	44	Propionamide
56	56.2	2164	99	δ -Valerolactam
57	57.2	2197	135	Thymol

*Retention time

(a)



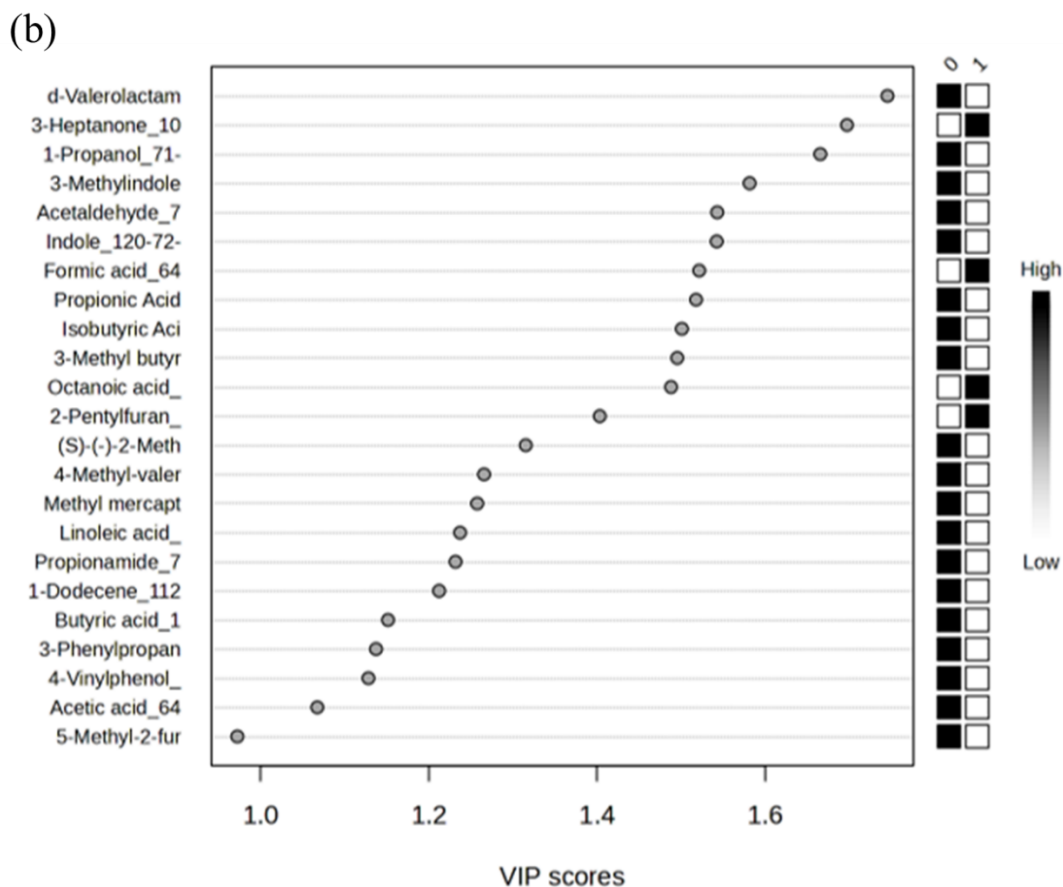


図 3-2. (a) OPLS-DA のスコアプロット(W: 全唾液, G: 唾液腺唾液); (b) OPLS-DA の VIP 値

さらに、これらの VIP 値上位の化合物の妥当性を評価した。まず、各化合物のピーク強度が両唾液サンプル間で統計的に有意な差を示すかを確認するため、Wilcoxon signed-rank test を実施した。その結果、VIP 値が高い化合物の大半(22 種類中 17 種類)で有意差 ($q < 0.05$) が認められた。次に、これらの VIP 値上位の化合物がサンプルリングデバイス由来のアーティファクトである可能性を排除するため、超純水をサンプルとして用いた二段階目のブランク分析を実施した。その結果、3-heptanone を含む 6 種類の化合物が、Salivette 由来のブランク化合物である可能性が示された。さらに、formic acid を含む一部の化合物はブランクサンプルで検出されず、Salivette 由来であるかを判断できなかった。

これらの検証結果は、VIP 値、Wilcoxon signed-rank test による False discovery rate

(FDR), および Salivette ブランク評価の結果とともに表 3-4 にまとめた. これらの検証に基づき, 統計的に有意な差を示し, かつサンプリングデバイス由来ではない 10 種類の化合物が, 唾液腺唾液と全唾液間の生物学的な違いを反映していると結論付けた. これらの 10 種類の化合物は, δ -valerolactam, 1-propanol, skatole, acetaldehyde, indole, isobutyric acid, isovaleric acid, 4-methylvaleric acid, methyl mercaptan および 3-phenylpropionic acid であった. これらの化合物の箱ひげ図と対散布図は, それぞれ図 3-3, 3-4 に示す.

表 3-4. VIP 値が 1.0 以上の化合物リスト

(VIP 値, Wilcoxon signed-rank test による FDR, および Salivette ブランク評価)

Compound	OPLS-DA VIP	Wilcoxon signed-rank test ($q < 0.05$)	Salivette blank evaluation*
δ-Valerolactam	1.75	0.028	No
3-Heptanone	1.70	0.016	Yes
1-Propanol	1.67	0.016	No
Skatole	1.58	0.016	No
Acetaldehyde	1.54	0.016	No
Indole	1.54	0.016	No
Formic acid	1.52	0.016	**
Propionic acid	1.52	0.035	Yes
Isobutyric acid	1.50	0.016	No
Isovaleric acid	1.50	0.016	No
Octanoic acid	1.49	0.016	Yes
2-Pentylfuran	1.40	0.016	**
2-Methyl-1-butanol	1.32	0.086	Yes
4-Methylvaleric acid	1.27	0.035	No
Methyl mercaptan	1.26	0.035	No
Linoleic acid	1.24	0.016	**
Propionamide	1.23	0.128	No
1-Dodecene	1.21	0.016	**
Butyric acid	1.15	0.289	Yes
3-Phenylpropionic acid	1.14	0.028	No
4-Vinylphenol	1.13	0.065	**
Acetic acid	1.07	0.065	Yes

*Salivette 処理あり・なしの超純水サンプルに対する t -test に基づく ($p < 0.05$)

**これらの化合物は, ブランク分析(水をサンプルとして使用)で検出されなかったため, ブランクかどうか判断できなかった.

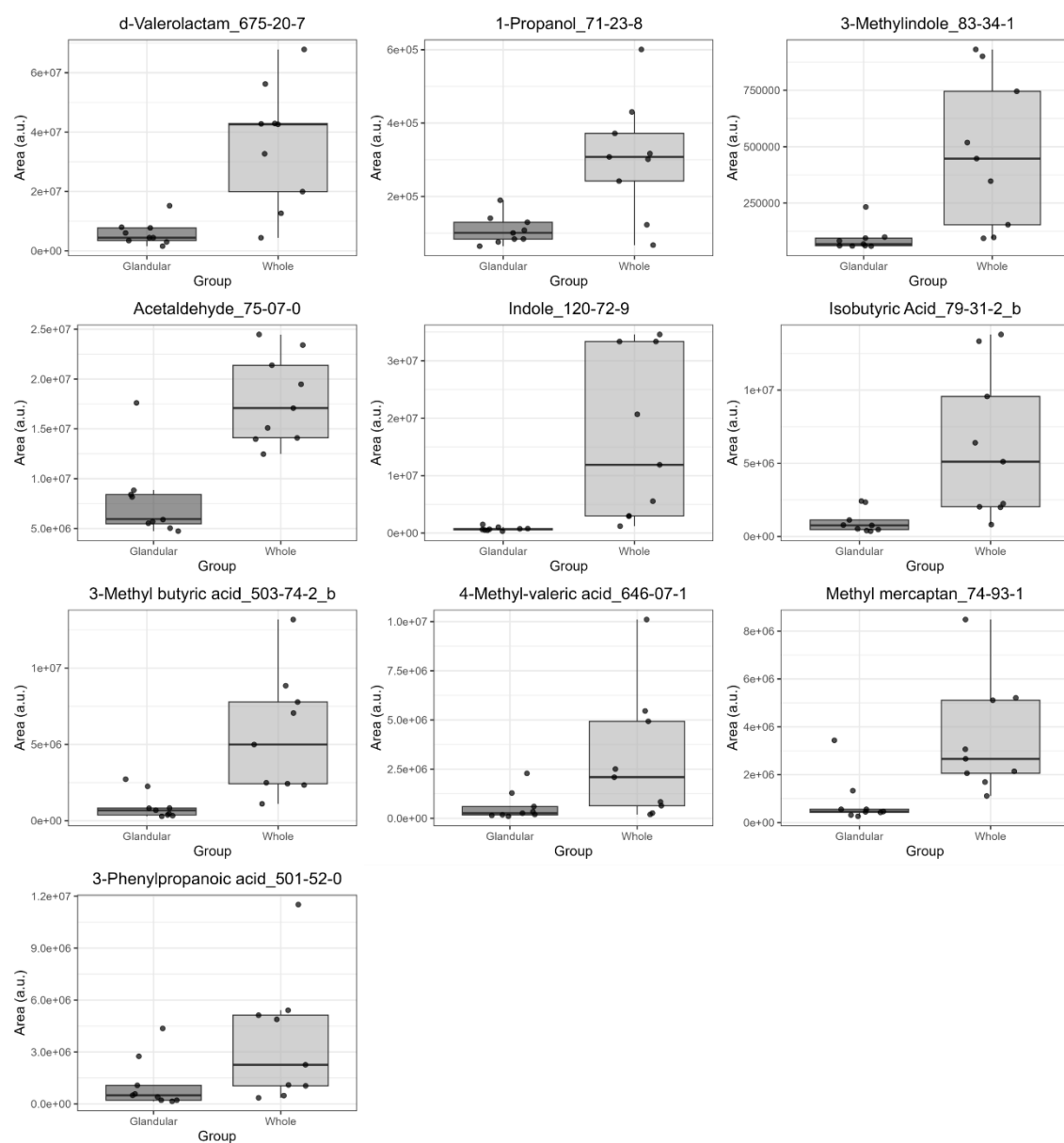


図 3-3. 唾液腺唾液と全唾液で有意な変化を示した 10 化合物の箱ひげ図
($q < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test)

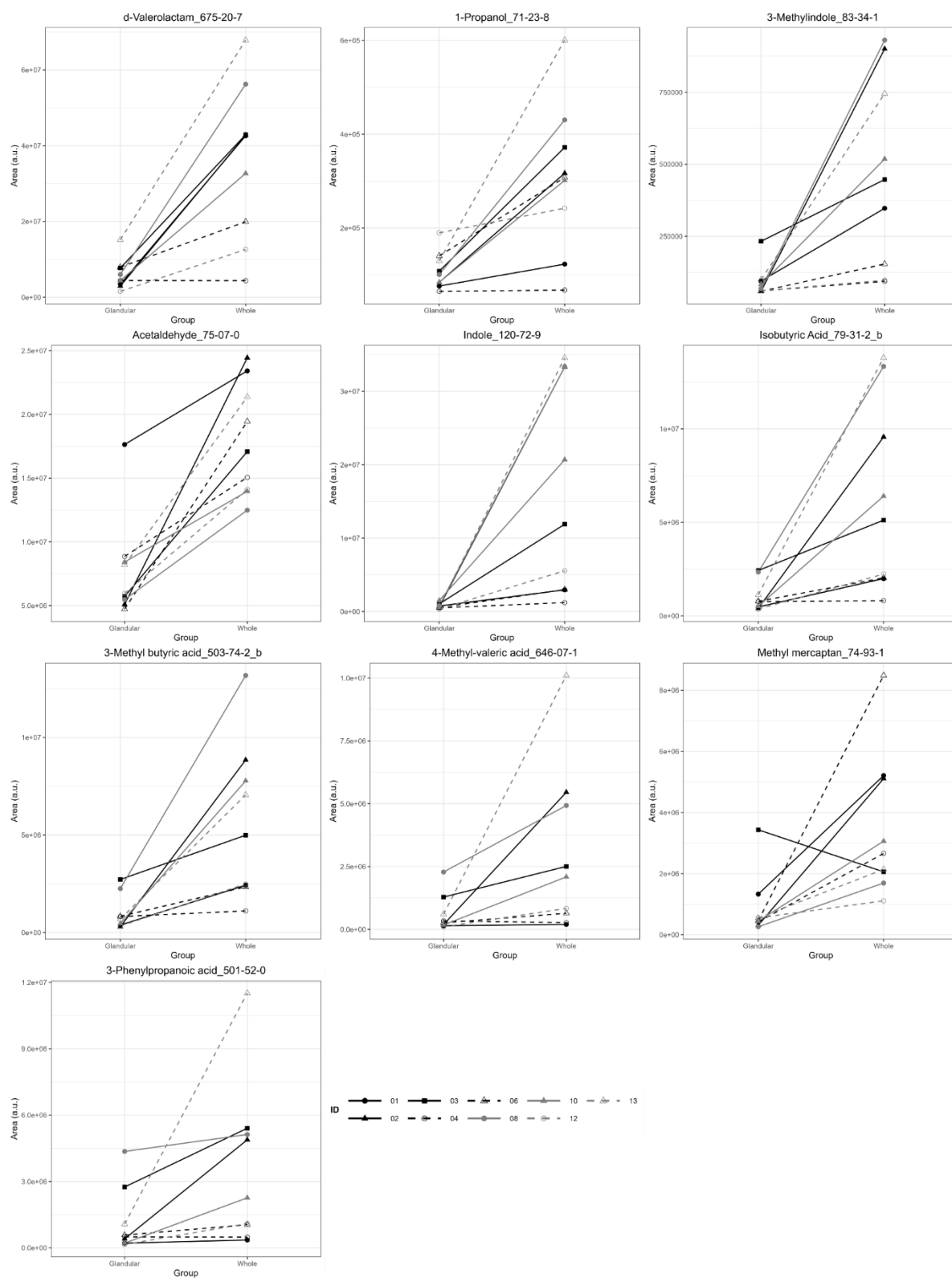


図 3-4. 唾液腺唾液と全唾液で有意な変化を示した 10 化合物の対散布図
($q < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test)

これらの化合物はすべて、唾液腺唾液と比較して全唾液で有意に多く検出された。これらの違いは、口腔細菌叢、食物残渣、剥離した上皮細胞などを含む口腔の特有な生物学的環境に起因する可能性が高い[26]。これら10種類の重要VOCについて、以下に、臨床的意義と第2章の *in vitro* 研究との関連を論じる。

Indole および Skatole

Indole および skatole は、グラム陰性嫌気性菌である *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* などの口腔細菌による Tryptophan 代謝によって産生されることが知られている[18,49]。第2章の *in vitro* 研究でも両菌種の培養上清から Indole が高 FC で検出され、強い臭気強度が確認されている[50]。本研究で *in vivo* サンプルングでも全唾液に特徴的であることが示された Indole は、口腔内の嫌気性細菌の活動を反映する高感度なバイオマーカーとしての可能性を強く示している。

短鎖脂肪酸(Isobutyric acid, Isovaleric acid, 4-Methylvaleric acid)

短鎖脂肪酸(SCFAs)は、口腔内の嫌気性細菌によるタンパク質の分解とそれに続く脱アミノ化によって産生される[51]。本研究で、全唾液中において有意な増加を示した Isobutyric acid と Isovaleric acid は、*P. gingivalis*, *P. asaccharolytica*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* などの細菌分離株から検出されている[51]。さらに、Isovaleric acid は第2章で *P. gingivalis* から高産生されることが示されており、*P. gingivalis* の BCAA 代謝経路が口腔内で実際に活発に働いていることを強く裏付ける結果である。同じく分枝鎖脂肪酸である 4-Methylvaleric acid も、全唾液で有意な増加が見られた。しかしながら、この化合物の口腔内での具体的な代謝経路は、まだ十分に明らかになっていない。

Methyl mercaptan

Methyl mercaptan は、その低いにおいの閾値(5×10^{-13} ppm)から、口臭の主要な原因成分として知られている[18,19]。この VOC は、*Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Treponema denticola* などの嫌気性細菌によ

って産生されることが知られており[18], 第 2 章の *in vitro* 研究においても, 両菌種に由来する VOC として検出されている.

δ-Valerolactam

δ-Valerolactam が全唾液中に存在することも注目に値する. この化合物の口腔内の代謝経路はまだ完全には解明されていないが, 唾液中の Lysine 分解産物である Cadaverine の代謝産物であることが推測されている[52]. さらに, 先行研究では, Passive drool 法で採取された全唾液からδ-Valerolactam が検出されたことが報告されている[53]. これらの知見を考慮すると, 全唾液におけるδ-Valerolactam の有意な増加は, 口腔細菌の代謝活動による産生を反映している可能性が高い.

3-Phenylpropionic acid

本研究では, 3-Phenylpropionic acid も全唾液で有意に増加した. 先行研究においては, この化合物のレベルが健康な被験者と比較して歯周炎患者で有意に高いことが報告されている[54]. さらに, 3-Phenylpropionic acid と口腔細菌との間に有意な相関関係が見出されている[54]. これらの知見を総合すると, 全唾液における 3-Phenylpropionic acid の有意な増加は, 口腔細菌叢の代謝活動による産生を強く示唆している.

1-Propanol

1-Propanol の存在も, 口腔細菌の活動に起因する可能性がある. 1-Propanol は, 内因性よりも口腔内の細菌によって高濃度で産生されと考えられている[55]. これは, 唾液腺唾液では起こらないプロセスである, 細菌による Threonine の発酵の結果であると示唆されている[56].

Acetaldehyde

最後に, 全唾液中の Acetaldehyde の存在について考察する. この化合物の口腔内における起源は複雑であり, 複数の要因の組み合わせによって影響を受けている可能性が高い. Acetaldehyde は上皮においてもエタノールから産生されるが, はるかに

高いレベルは口腔細菌によるエタノールの代謝に由来する[57]。喫煙や飲酒もその產生に影響を与える[57]。したがって、本研究において Acetaldehyde が唾液腺唾液よりも全唾液中で高いレベルで検出されたのは、微生物の活動、宿主の代謝、外因性要因の複合的な影響を反映している可能性が高い。

本研究において全唾液中に特徴的だと明らかになった 10 種類の VOC は、*in vitro* 研究で得られた知見(第 2 章)を強く裏付けるものであった。特に、*P. gingivalis* の BCAA 代謝経路によって高產生されることが示唆された Isovaleric acid、および両菌種による Tryptophan 代謝の指標である Indole は、全唾液中において唾液腺唾液と比較して有意に高いレベルで検出された。また、代表的な口臭原因成分であり、培養上清において GC/O で知覚可能なにおいを呈した Methyl mercaptan も、全唾液中に特徴的であった。これらの結果は、全唾液中の VOC プロファイルが口腔細菌による代謝活動に主に影響を受けていることを強く示唆している。

3.3.3. 本研究の限界

本研究では、Salivette に起因するアーティファクトを排除することで、口腔細菌に由来する可能性が高い 10 種類の VOC を特定することに成功した。これらの VOC は、第 2 章の *in vitro* で示唆された口腔細菌による代謝の *in vivo* での活動を強力に裏付けるものであった。

しかしながら、本研究にはいくつかの限界がある。第一に、9 名の参加者から採取体唾液腺唾液と全唾液中の VOC プロファイルには明確な違いが見られたものの、これらの知見を一般化するためには、より大規模なコホートでのさらなる検証が必要である。

また、今回行った 2 段階のブランク分析は、サンプリング由来の主要なアーティファクトを除外するのに成功し、口腔細菌に由来する可能性が高い 10 種類の VOC を特定することができた。しかし、他の未確認のアーティファクトの可能性を完全に排除することはできない。

最後に、MonoTrap 抽出とジクロロメタンを組み合わせたサンプル調製法を確立し、比較的少量の唾液サンプル(100 μ L)からの VOC プロファイリングを可能にした。この

プロトコルでは、ジクロロメタンが抽出溶媒としての役割と、疎水性で多孔質の Polydimethylsiloxane/グラファイトベースの MonoTrap を唾液サンプル(水溶液)に浸漬する手段という二重の目的を果たした[50,58]. この二重機能により、本手法は少量の唾液サンプルからの広範囲な VOC のプロファイリングを成功させることができた. この手法は有効であったが、ジクロロメタン, MonoTrap, 唾液間の VOC 移動の正確なメカニズムについては、さらなる調査が必要である.

3.4. 小括

第 2 章では, *in vitro* の培養系を用いて, 口腔細菌が産生する VOC プロファイルを網羅的に明らかにした. 培養液ではサンプル量が十分に確保できるため, 感度的な制約は比較的少なく, 網羅的な分析が可能であった. これに対し, 第 3 章では, *in vitro* で特定されたバイオマーカー候補が, 実際の臨床サンプルである唾液中で検出可能であるかを検証することを目的とし, 解析を行った. 唾液中の VOC は絶対量が少ないうえ, サンプル量も最小限に抑える必要があったため, VOC 抽出段階における濃縮処理が極めて重要となった.

本章では, ジクロロメタンを用いた MonoTrap 抽出法を採用し, 少量の唾液サンプル (100 μ L) から VOC を網羅的にプロファイリングするための高感度かつ信頼性の高い手法を確立した. 本プロトコルは, 涙や汗などの微量な臨床サンプルにも応用可能であり, 広範な臨床研究への展開が期待される.

本研究では, 従来の VOC 研究の最大の課題であった宿主由来のバックグラウンドノイズを排除するため, 口腔細菌の影響が最小限である唾液腺唾液と, 細菌叢を含む全唾液を比較するという独創的なアプローチを初めて採用した. この比較の妥当性を確保するため, 唾液腺唾液的採取に用いる Salivette デバイス由来のアーティファクトを完全に排除する目的で, 二段階のブランク評価プロセスを導入した. 第一に, Salivette の使用の有無によってピーク強度が変化する化合物を除外するために, Salivette 処理を行った全唾液と行わなかった全唾液の VOC プロファイルを比較した, 第二に, 唾液腺唾液と全唾液のプロファイルの違いに寄与した化合物の中から, 超純水の Salivette 処理によって変化した化合物をさらに除外した. この厳密なブランク分

析により、口腔細菌の代謝活動に特異的に由来する VOC 群(10 種類)を分離し、そのバイオマーカーとしての価値を議論することが可能となった。

特に、全唾液において特徴的であった Indole や Isovaleric acid といった化合物が、第 2 章で *P. gingivalis* および *F. nucleatum* により高産生されることが示唆された成分と一致したことは、本研究の *in vitro* と *in vivo* の論理的なつながりを強く裏付ける。得られた結果は、これらの化合物の多くが口腔細菌叢の代謝活動に主に由来する代謝産物であることを強く示唆している。本手法は、歯周病や口臭などの口腔疾患に対する迅速・簡便・非侵襲的な診断ツールの開発に向けた、今後の研究を推進する堅固な科学的基盤を提供するものである。

第4章 総括

4.1. 本研究の総括

本研究では、口腔細菌由来の VOC を、口腔の健康状態を評価するための非侵襲的バイオマーカーとして確立することを目的に、*in vitro* 培養系および唾液臨床検体の VOC プロファイリングを行うという二段階アプローチを採用した。

第2章では、主要な歯周病菌である *P. gingivalis* および *F. nucleatum* を対象に、MonoTrap による VOC 抽出法と GC/MS/olfactometry 分析を組み合わせた包括的 VOC プロファイリングを実施した。本章で特定された特徴的な VOC プロファイルは続く第3章の、より複雑な臨床検体である唾液における検証の基盤となった。

第3章では、実際の唾液検体を用いて、宿主由来成分を排除し、真に細菌由来の VOC を特定することを試みた。サンプリングデバイスに起因するアーティファクトを系統的に評価・除去することで、従来研究における大きな制約を克服した。また、唾液腺唾液と全唾液を比較するという新しい実験デザインにより、細菌由来 VOC を宿主バックグラウンド成分から明確に分離した。その結果、Indole や Isovaleric acid などの VOC がサンプリングデバイスや宿主由来ではなく、細菌に由来する VOC として特定された。

以上により、本研究は (1) *in vitro* での歯周病関連菌の VOC 代謝知見の確立、(2) 唾液臨床検体での検証、(3) サンプリングアーティファクトの徹底的な排除、という三つの主要な成果を挙げ、口腔疾患における VOC バイオマーカー研究の基盤を築いたと総括できる。

4.2. 学術的意義

歯周病原菌が産生する VOC の網羅的解析により、従来研究が限定的に扱ってきた VSC 以外の多様な成分(臭気成分を多数含む)を明らかにした点は大きな学術的進展である。特に *P. gingivalis* 培養上清からの分岐鎖アミノ酸代謝由来の分岐鎖アルコール・脂肪酸の検出は、これまでほとんど注目されてこなかった経路を新たな研究対象として提示した。本研究は、*in vitro* で歯周病菌が産生する VOC をにのいの有無を含めて網羅的に分析した初めての研究であり、口腔内における非硫黄系 VOC の重

要性を明確に示した.

4.3. 技術的意義

本研究の技術的意義は, 微量な臨床検体における VOC 分析の信頼性を飛躍的に高めた点にある. 具体的には, **MonoTrap** を駆使した高感度抽出プロトコルを確立し, わずか 100 μ L という少量の唾液サンプルからでも網羅的な VOC プロファイリングを可能にした. これは, 涙や汗など他の微量な臨床検体への応用も可能にする汎用性の高い技術基盤である.

さらに, VOC 分析の信頼性を担保するため, 頻用されている唾液採取デバイスである **Salivette** 由来のアーティファクトの存在を初めて系統的かつ定量的に提示し, これを排除するための厳密な二段階ブランク評価プロセスを実践した. この徹底的なアーティファクト除去手法は, 微量臨床検体の VOC 分析における新たな標準プロトコルとして, 今後の VOC 研究の正確性に大きく貢献するものである.

4.4. 臨床的意義

本研究は, 唾液という非侵襲的かつ採取が容易な検体を用いた歯周病診断の可能性を強く示唆するものである. 現在, 標準的に採用されている歯周組織検査と比較して, 患者の負担が極めて少ない唾液を対象とし, その中に含まれる口腔細菌由来の特定の VOC 群を明確に分離・特定できたことは, 将来的な診断ツールの開発に向けた堅固な科学的基盤となる. 今後, これらのバイオマーカー (Indole や Isovaleric acid など) と疾患の重症度との相関が明らかになれば, 歯周病を迅速, 簡便, かつ非侵襲的にスクリーニング・診断できる新しいシステムの実現に繋がる. これは歯科医療における早期介入と予防医学の推進に大きく貢献する可能性を秘めている.

引用文献

1. Deo, P.N.; Deshmukh, R. Oral Microbiome: Unveiling the Fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **2019**, *23*, 122, doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18.
2. Costalonga, M.; Herzberg, M.C. The Oral Microbiome and the Immunobiology of Periodontal Disease and Caries. *Immunology Letters* **2014**, *162*, 22–38, doi:10.1016/j.imlet.2014.08.017.
3. Mysak, J.; Podzimek, S.; Sommerova, P.; Lyuya-Mi, Y.; Bartova, J.; Janatova, T.; Prochazkova, J.; Duskova, J. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview., *J Immunol Res.* **2014**, doi:10.1155/2014/476068.
4. Nazir, M.A. Prevalence of Periodontal Disease, Its Association with Systemic Diseases and Prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* **2017**, *11*, 72–80, PMID: 28539867.
5. Liccardo, D.; Cannavo, A.; Spagnuolo, G.; Ferrara, N.; Cittadini, A.; Rengo, C.; Rengo, G. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, 1414, doi:10.3390/ijms20061414.
6. Bascones-Martinez, A.; Matesanz-Perez, P.; Escribano-Bermejo, M.; Gonzalez-Moles, Ma.; Bascones-Ilundain, J.; Meurman, Jh. Periodontal Disease and Diabetes-Review of the Literature. *Med Oral* **2011**, e722–e729, doi:10.4317/medoral.17032.
7. Mealey, B.L.; Oates, T.W. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology* **2006**, *77*, 1289–1303, doi:10.1902/jop.2006.050459.
8. Casanova, L.; Hughes, F.J.; Preshaw, P.M. Diabetes and Periodontal Disease: A Two-Way Relationship. *Br Dent J* **2014**, *217*, 433–437, doi:10.1038/sj.bdj.2014.907.
9. Hajishengallis, G.; Lamont, R.J. Beyond the Red Complex and into More Complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (PSD) Model of Periodontal Disease Etiology. *Molecular oral microbiology* **2012**, *27*, 409–419, doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x.
10. Lagha, A.B.; Yang, Y.; Trivedi, H.M.; Masters, J.G.; Grenier, D. A dual zinc plus arginine formulation attenuates the pathogenic properties of *Porphyromonas gingivalis* and protects gingival keratinocyte barrier function in an *in vitro* model. *Journal of Oral Microbiology* **2020**, *12*, 1798044, doi: 10.1080/20002297.2020.1798044.
11. Sharma, A.; Inagaki, S.; Sigurdson, W.; Kuramitsu, H.K. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol.* **2005**, *20*, 39–42, doi: 10.1111/j.1399-302X.2004.00175.x.
12. Periasamy, S.; Kolenbrander, P.E. Central role of the early colonizer *Veillonella* Sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *Journal of Bacteriology* **2010**, doi:10.1128/jb.01631-09.
13. Roslund, K.; Lehto, M.; Pussinen, P.; Groop, P.-H.; Halonen, L.; Metsälä, M. On-line profiling of volatile compounds produced *in vitro* by pathogenic oral bacteria. *J. Breath Res.* **2019**, *14*, 016010, doi:10.1088/1752-7163/ab5559.
14. Arulvasan, W.; Chou, H.; Greenwood, J.; Ball, M.L.; Birch, O.; Coplowe, S.; Gordon, P.; Ratiu, A.; Lam, E.; Hatch, A. *et al.* High-Quality Identification of Volatile Organic Compounds (VOCs) Originating from Breath. *Metabolomics* **2024**, *20*, 102, doi:10.1007/s11306-024-02163-6.
15. AL-Kateb, H.; de Lacy Costello, B.; Ratcliffe, N. An Investigation of Volatile Organic Compounds from the Saliva of Healthy Individuals Using Headspace-Trap/GC-MS.

- J. Breath Res.* **2013**, 7, 036004, doi:10.1088/1752-7155/7/3/036004.
16. Persson, S.; Edlund, M.-B.; Claesson, R.; Carlsson, J. The Formation of Hydrogen Sulfide and Methyl Mercaptan by Oral Bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* **1990**, 5, 195-201, doi: 10.1111/j.1399-302x.1990.tb00645.x.
 17. Aylıkçı, B.U.; Çolak, H. Halitosis: From Diagnosis to Management. *J Nat Sci Biol Med* **2013**, 4, 14–23, doi:10.4103/0976-9668.107255.
 18. Hampelska, K.; Jaworska, M.M.; Babalska, Z.Ł.; Karpiński, T.M. The Role of Oral Microbiota in Intra-Oral Halitosis. *Journal of Clinical Medicine* **2020**, 9, 2484, doi:10.3390/jcm9082484.
 19. Van den Velde, S.; van Steenberghe, D.; Van hee, P.; Quirynen, M. Detection of Odorous Compounds in Breath. *J Dent Res* **2009**, 88, 285–289, doi:10.1177/0022034508329741.
 20. Jeronimo Manco, V.P. Important Variables for Halitosis Clinical Trials: Causes, Diagnostic Methods and Treatments. *J Interdiscipl Med Dent Sci* **2014**, 02, doi:10.4172/2376-032X.1000119.
 21. Suzuki, N.; Yoneda, M.; Takeshita, T.; Hirofuji, T.; Hanioka, T. Induction and Inhibition of Oral Malodor. *Mol Oral Microbiol.* **2019**, 34, 85-96, doi:10.1111/omi.12259.
 22. Loesche, W.J.; Kazor, C. Microbiology and Treatment of Halitosis. *Periodontol* **2000**, 28, 256-79, doi: 10.1034/j.1600-0757.2002.280111.x.
 23. Basic, A.; Dahlén, G. Microbial Metabolites in the Pathogenesis of Periodontal Diseases: A Narrative Review. *Front. Oral Health* **2023**, 4, 1210200, doi:10.3389/froh.2023.1210200.
 24. Ghasemirad, M.; Tavakol, O.; Etesami, S.; Nikeghbal, K.; Nikeghbal, D.; Diznab, F.A.; Anzabi, R.M. A State of Art Review: Volatile Organic Compounds and Periodontitis. *Galen Medical Journal* **2024**, 13, e3730–e3730, doi:10.31661/gmj.v13iSP1.3730.
 25. Pereira, J.A.M.; Porto-Figueira, P.; Taware, R.; Sukul, P.; Rapole, S.; Câmara, J.S. Unravelling the Potential of Salivary Volatile Metabolites in Oral Diseases. A Review. *Molecules* **2020**, 25, 3098, doi:10.3390/molecules25133098.
 26. Milanowski, M.; Pomastowski, P.; Ligor, T.; Buszewski, B. Saliva – Volatile Biomarkers and Profiles. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2017**, 47, 251–266, doi:10.1080/10408347.2016.1266925.
 27. Meleti, M.; Quartieri, E.; Antonelli, R.; Pezzi, M.E.; Ghezzi, B.; Viani, M.V.; Setti, G.; Casali, E.; Ferrari, E.; Ciociola, T. *et al.* Metabolic Profiles of Whole, Parotid and Submandibular/Sublingual Saliva. *Metabolites* **2020**, 10, 318, doi:10.3390/metabo10080318.
 28. Gardner, A.; Parkes, H.G.; So, P.-W.; Carpenter, G.H. Determining Bacterial and Host Contributions to the Human Salivary Metabolome. *Journal of Oral Microbiology* **2019**, 11, 1617014, doi: 10.1080/20002297.2019.1617014.
 29. Haiek, M.; Dvoyris, V.; Broza, Y.Y.; Haick, H.; Weiss, E.; Hourri-Haddad, Y. Bacterial Volatile Organic Compounds as Potential Caries and Periodontitis Disease Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* **2025**, 26, 3591, doi:10.3390/ijms26083591.
 30. Monedeiro, F.; Milanowski, M.; Ratiu, I.-A.; Zmysłowski, H.; Ligor, T.; Buszewski, B. VOC Profiles of Saliva in Assessment of Halitosis and Submandibular Abscesses Using HS-SPME-GC/MS Technique. *Molecules* **2019**, 24, 2977,

- doi:10.3390/molecules24162977.
31. Bel'skaya, L.V.; Sarf, E.A.; Shalygin, S.P.; Postnova, T.V.; Kosenok, V.K. Identification of Salivary Volatile Organic Compounds as Potential Markers of Stomach and Colorectal Cancer: A Pilot Study. *Journal of Oral Biosciences* **2020**, *62*, 212–221, doi:10.1016/j.job.2020.05.002.
 32. Soini, H.A.; Klouckova, I.; Wiesler, D.; Oberzaucher, E.; Grammer, K.; Dixon, S.J.; Xu, Y.; Brereton, R.G.; Penn, D.J.; Novotny, M.V. Analysis of Volatile Organic Compounds in Human Saliva by a Static Sorptive Extraction Method and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Chem Ecol* **2010**, *36*, 1035–1042, doi:10.1007/s10886-010-9846-7.
 33. Schipper, R.G.; Silletti, E.; Vingerhoeds, M.H. Saliva as Research Material: Biochemical, Physicochemical and Practical Aspects. *Archives of Oral Biology* **2007**, *52*, 1114–1135, doi:10.1016/j.archoralbio.2007.06.009.
 34. Monedeiro, F.; Monedeiro-Milanowski, M.; Zmysłowski, H.; De Martinis, B.S.; Buszewski, B. Evaluation of Salivary VOC Profile Composition Directed towards Oral Cancer and Oral Lesion Assessment. *Clin Oral Invest* **2021**, *25*, 4415–4430, doi:10.1007/s00784-020-03754-y.
 35. Boyacı, E.; Bojko, B.; Reyes-Garcés, N.; Poole, J.J.; Gómez-Ríos, G.A.; Teixeira, A.; Nicol, B.; Pawliszyn, J. High-Throughput Analysis Using Non-Depletive SPME: Challenges and Applications to the Determination of Free and Total Concentrations in Small Sample Volumes. *Sci Rep* **2018**, *8*, 1167, doi:10.1038/s41598-018-19313-1.
 36. Bosman, P.; Pichon, V.; Acevedo, A.C.; Chardin, H.; Combes, A. Development of Analytical Methods to Study the Salivary Metabolome: Impact of the Sampling. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414*, 6899–6909, doi:10.1007/s00216-022-04255-5.
 37. Adedapo, A.H.; Kolude, B.; Dada-Adegbola, H.O.; Lawoyin, J.O.; Adeola, H.A. Targeted Polymerase Chain Reaction-Based Expression of Putative Halitogenic Bacteria and Volatile Sulphur Compound Analysis among Halitosis Patients at a Tertiary Hospital in Nigeria. *Odontology* **2020**, *108*, 450–461, doi:10.1007/s10266-019-00467-x.
 38. Awano, S.; Gohara, K.; Kurihara, E.; Ansai, T.; Takehara, T. The Relationship between the Presence of Periodontopathogenic Bacteria in Saliva and Halitosis. *International Dental Journal* **2002**, *52*, 212–216, doi:10.1002/j.1875-595X.2002.tb00927.x.
 39. Nemoto, T.K.; Ohara-Nemoto, Y. Exopeptidases and gingipains in *Porphyromonas gingivalis* as prerequisites for its amino acid metabolism. *Japanese Dental Science Review* **2016**, *52*, 22–29, doi:10.1016/j.jdsr.2015.08.002.
 40. Sakanaka, A.; Kuboniwa, M.; Shimma, S.; Alghamdi, S.A.; Mayumi, S.; Lamont, R.J.; Fukusaki, E.; Amano, A. *Fusobacterium nucleatum* metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms. *mSystems* **2022**, *7*, e00170-22, doi:10.1128/msystems.00170-22.
 41. Porter, S.R.; Scully, C. Oral Malodour (Halitosis). *BMJ* **2006**, *333*, 632-5, doi:10.1136/bmj.38954.631968.AE.
 42. Hazelwood, L.A.; Daran, J.-M.; Maris, A.J.A. van; Pronk, J.T.; Dickinson, J.R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: A Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, doi:10.1128/AEM.02625-07.
 43. Scully, S.M.; Orlygsson, J. Branched-Chain Amino Acid Catabolism of *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* Reveals Potential Route to Branched-Chain

- Alcohol Formation. *Extremophiles* **2020**, 24, 121–133, doi:10.1007/s00792-019-01140-5.
44. Wu, L.; Shi, R.; Bai, H.; Wang, X.; Wei, J.; Liu, C.; Wu, Y. *Porphyromonas gingivalis* Induces Increases in Branched-Chain Amino Acid Levels and Exacerbates Liver Injury Through Livh/Livk. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, 12, doi:10.3389/fcimb.2022.776996.
 45. Łojewski, T.; Sawoszczuk, T.; Łagan, J.M.; Zięba, K.; Barański, A.; Łojewska, J. Furfural as a Marker of Cellulose Degradation. A Quantitative Approach. *Appl. Phys. A* **2010**, 100, 873–884, doi:10.1007/s00339-010-5663-7.
 46. Yee, K.L.; Jansen, L.E.; Lajoie, C.A.; Penner, M.H.; Morse, L.; Kelly, C.J. Furfural and 5-Hydroxymethyl-furfural Degradation Using Recombinant Manganese Peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* **2018**, 108, 59–65, doi:10.1016/j.enzmictec.2017.08.009.
 47. Roosen, M.; Van Laere, T.; Decottignies, V.; Morel, L.; Schnitzler, J.-L.; Schneider, J.; Schlummer, M.; Lase, I.S.; Dumoulin, A.; De Meester, S. Tracing the Origin of VOCs in Post-Consumer Plastic Film Bales. *Chemosphere* **2023**, 324, 138281, doi:10.1016/j.chemosphere.2023.138281.
 48. Vera, P.; Canellas, E.; Nerín, C. Compounds Responsible for Off-odors in Several Samples Composed by Polypropylene, Polyethylene, Paper and Cardboard Used as Food Packaging Materials. *Food Chemistry* **2020**, 309, 125792, doi:10.1016/j.foodchem.2019.125792.
 49. Codipilly, D.; Kleinberg, I. Generation of Indole/Skatole during Malodor Formation in the Salivary Sediment Model System and Initial Examination of the Oral Bacteria Involved. *J. Breath Res.* **2008**, 2, 017017, doi:10.1088/1752-7155/2/1/017017.
 50. Mori, A.; Taniguchi, M.; Kuboniwa, M.; Amano, A.; Fukusaki, E. Profiling Volatile Compounds from Culture Supernatants of Periodontal Bacteria Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry/Olfactometry Analysis with a Monolithic Silica Gel Adsorption Device. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2022**, 134, 77–83, doi:10.1016/j.jbiosc.2022.04.002.
 51. Leonov, G.E.; Varava, Y.R.; Livantsova, E.N.; Starodubova, A.V. The Complicated Relationship of Short-Chain Fatty Acids and Oral Microbiome: A Narrative Review. *Biomedicines* **2023**, 11, 2749, doi:10.3390/biomedicines11102749.
 52. Gardner, A.; Carpenter, G.; So, P.-W. Salivary Metabolomics: From Diagnostic Biomarker Discovery to Investigating Biological Function. *Metabolites* **2020**, 10, 47, doi:10.3390/metabo10020047.
 53. Malkar, A.; Devenport, N.A.; Martin, H.J.; Patel, P.; Turner, M.A.; Watson, P.; Maughan, R.J.; Reid, H.J.; Sharp, B.L.; Thomas, C.L.P. *et al.* Metabolic Profiling of Human Saliva before and after Induced Physiological Stress by Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Ion Mobility–Mass Spectrometry. *Metabolomics* **2013**, 9, 1192–1201, doi:10.1007/s11306-013-0541-x.
 54. Wei, Y.; Shi, M.; Nie, Y.; Wang, C.; Sun, F.; Jiang, W.; Hu, W.; Wu, X. Integrated Analysis of the Salivary Microbiome and Metabolome in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Front. Microbiol.* **2022**, 13, doi:10.3389/fmicb.2022.959416.
 55. Khalid, T.Y.; Saad, S.; Greenman, J.; de Lacy Costello, B.; Probert, C.S.J.; Ratcliffe, N.M. Volatiles from Oral Anaerobes Confounding Breath Biomarker Discovery. *J. Breath Res.* **2013**, 7, 017114, doi:10.1088/1752-7155/7/1/017114.

56. van den Velde, S.; Quirynen, M.; Van hee, P.; van Steenberghe, D. Halitosis Associated Volatiles in Breath of Healthy Subjects. *Journal of Chromatography B* **2007**, 853, 54–61, doi:10.1016/j.jchromb.2007.02.048.
57. Homann, N.; Tillonen, J.; Meurman, J.H.; Rintamäki, H.; Lindqvist, C.; Rautio, M.; Jousimies-Somer, H.; Salaspuro, M. Increased Salivary Acetaldehyde Levels in Heavy Drinkers and Smokers: A Microbiological Approach to Oral Cavity Cancer. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 663–668, doi:10.1093/carcin/21.4.663.
58. Liu, C.; Liu, X.; Tian, X.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Shi, J.; Xu, J.; Ren, X. Determination of Volatile Profiles inside Apple Fruit Storage Facilities Using MonotrapTM Monolithic Silica Adsorbent and GC–MS. *Horticultural Plant Journal* **2021**, 7, 267–274, doi:10.1016/j.hpj.2020.12.003.

発表論文

1. **Mori A.**, Taniguchi M., Kuboniwa M., Amano A., & Fukusaki E., “Profiling volatile compounds from culture supernatants of periodontal bacteria using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry analysis with a monolithic silica gel adsorption device”, *J. Biosci. Bioeng.*, **134**, 77-83 (2022).

※本学位論文に関与する論文

2. **Mori A.**, Kuboniwa M., & Fukusaki E., “Comprehensive GC/MS Profiling of Volatile Organic Compounds in Whole and Glandular Saliva Using MonoTrap Micro-Extraction”, *Metabolites.*, **15**, 726 (2025).

※本学位論文に関与する論文

学会発表

国際学会・シンポジウムにおける発表

1. **Mori A.**, Taniguchi M., Kuboniwa M., Amano A., & Fukusaki E., “Profiling of volatile compounds from culture supernatants of periodontal bacteria”, The 19th Annual International Conference of the Metabolomics Society, Canada, June (2023).

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. **森あすか**, 谷口百優, 久保庭雅恵, 天野敦雄, 福崎英一郎「歯周病菌が産生する揮発性化合物のプロファイリング」第74回日本生物工学会大会, オンライン, 2022年10月.
2. 佐藤友紀, **森あすか**, 前川佳花, 伊藤謙, 中村啓哉, 濱口裕明, 福崎英一郎, 進藤昌「酒粕におけるD-アミノ酸の分析とその生理機能の評価」第74回日本生物工学会大会, オンライン, 2022年10月.

謝辞

本論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻において行った研究をまとめたものです。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 福崎英一郎 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、有益なご指導、ご助言、及びご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 内山進 教授、青木航 教授に厚く感謝申し上げます。

ご指導ならびに日頃からの貴重なご助言を頂きました新聞秀一 准教授、Sastia Prama Putri 准教授に心から感謝申し上げます。

本研究において多くの御指導・御助言と度重なる議論の機会を頂きました古野正浩 研究員、宿里ひとみ 研究員、楠香奈 研究員に深謝の意を表します。並びに、本研究において遂行の要となり多大なるご支援を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学 久保庭雅恵 教授に厚く感謝申し上げます。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた福崎研究室の諸先輩方、学生諸氏、研究員、事務補佐の方々に心から感謝の意を表します。

最後に、博士後期課程に進学する機会を与えいつも温かく見守ってくれた家族、そして応援し続けてくれた多くの友人に深い感謝の意を表して謝辞とします。

付録

付録 1. <i>F. nucleatum</i> (上段) および <i>P. gingivalis</i> (下段) 用液体培地の組成	58
付録 2. アノテートされた 86 種類の化合物のリスト	59
付録 3. 唾液腺唾液の採取の様子	62
付録 4. OPLS-DA の 57 化合物の VIP 値一覧	62

付録 1. *F. nucleatum* (上段) および *P. gingivalis* (下段) 用液体培地の組成

<i>F. nucleatum</i> 用液体培地	
Yeast extract	10 g/L
Trypticase peptone	10 g/L
Biosate peptone	10 g/L
Brain heart infusion broth	19.2 g/L
Hemin	5 mg/L
Menadione	1 mg/L
CaCl ₂	0.008 g/L
MgSO ₄	0.008 g/L
K ₂ HPO ₄	0.04 g/L
KH ₂ PO ₄	0.04 g/L
NaHCO ₃	0.4 g/L
NaCl	0.08 g/L
<i>P. gingivalis</i> 用液体培地	
Trypticase soy broth	30 g/L
Yeast extract	1 g/L
Hemin	5 mg/L
Menadione	1 mg/L

付録 2. アノテートされた 86 種類の化合物のリスト

No.	RT (min)	Quant mass	Compound
Alcohol			
1	6.0	31	Methanol
2	6.0	59	tert-Butyl alcohol
3	6.7	45	2-Propanol
4	6.9	31	Ethanol
5	10.1	31	1-Propanol
6	12.4	43	2-Methyl-1-propanol
7	12.7	59	2-Methyl-2-pentanol
8	14.6	56	1-Butanol
9	16.7	59	3-Hexanol
10	17.2	55	3-Methyl-1-butanol
11	17.2	57	2-Methyl-1-butanol
12	17.8	45	2-Hexanol
13	21.7	43	Acetol
14	23.7	56	1-Hexanol
15	24.1	45	2-Heptanol
16	26.6	45	2-Octanol
17	27.9	41	trans-2-Hexen-1-ol
18	29.6	57	2-Propyl-1-pentanol
19	32.4	56	1-Octanol
20	32.9	45	2-Nonanol
21	42.3	81	1-Decanol
22	43.5	69	Geraniol
23	44.7	79	Benzyl alcohol
24	45.9	91	2-Phenylethanol
Aldehyde			
25	12.5	84	trans-2-Methyl-2-butenal
26	25.6	57	Nonanal
27	30.1	55	Decanal
28	3.6	44	Acetaldehyde
29	5.6	44	Butyraldehyde
30	6.4	57	2-Methylbutanal
31	6.5	44	3-Methylbutanal
Aromatic compound			

32	13.6	91	Ethylbenzene
33	16.3	79	Pyridine
34	17.6	80	Pyrazine
35	20.0	94	2-Methylpyrazine
36	22.8	108	2,6-Dimethylpyrazine
37	23.0	107	2-Ethylpyrazine
38	23.6	108	2,3-Dimethylpyrazine
39	24.5	121	2,4,6-Collidine
40	25.5	121	2-Ethyl-3-methylpyrazine
41	26.1	122	2,3,5-Trimethylpyrazine
42	27.9	135	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine
43	28.6	135	2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine
44	29.2	136	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine
45	30.6	95	2-Acetylfuran
46	31.4	106	Benzaldehyde
47	36.7	98	Furfuryl alcohol
48	48.0	94	2-Acetylpyrrole
49	49.1	94	Phenol
50	62.6	117	Indole
51	63.9	130	Skatole
Ester			
52	5.8	43	Ethyl acetate
53	10.1	88	Ethyl butyrate
54	11.5	43	Butyl acetate
55	17.2	56	Butyl propionate
56	18.4	88	Ethyl hexanoate
Fatty acid			
57	28.5	43	Acetic acid
58	31.9	74	Propionic acid
59	33.1	43	Isobutyric acid
60	35.5	60	Butyric acid
61	37.0	60	Isovaleric acid
62	37.0	74	2-Methylbutyric acid
63	43.6	60	Hexanoic acid
64	47.3	57	2-Ethylhexanoic acid
65	54.2	60	Pelargonic acid

Ketone		
66	4.7	58 Acetone
67	6.1	43 2-Butanone
68	8.2	43 2-Pentanone
69	9.1	43 4-Methyl-2-pentanone
70	11.9	43 2-Hexanone
71	13.9	69 3-Penten-2-one
72	14.9	57 3-Heptanone
73	16.2	43 2-Heptanone
74	20.9	45 Acetoin
75	23.8	70 1-Octen-3-one
76	36.5	105 Acetophenone
VSC		
77	3.5	47 Methyl mercaptan
78	3.9	62 Dimethyl sulfide
79	10.7	43 S-Methyl thioacetate
80	11.6	94 Dimethyl disulfide
81	16.9	43 S-Methyl thiobutyrate
82	19.4	85 Thiazole
83	25.1	126 Dimethyl trisulfide
84	36.3	43 2-Acetylthiazole
85	38.8	106 Methionol
Others		
86	35.7	42 γ -Butyrolactone

付録 3. 唾液腺唾液の採取の様子



付録 4. OPLS-DA の 57 化合物の VIP 値一覧

化合物	VIP 値
δ -Valerolactam	1.75
3-Heptanone	1.70
1-Propanol	1.67
Skatole	1.58
Acetaldehyde	1.54
Indole	1.54
Formic acid	1.52
Propionic acid	1.52
Isobutyric acid	1.50
Isovaleric acid	1.50
Octanoic acid	1.49
2-Pentylfuran	1.40
2-Methyl-1-butanol	1.32
4-Methylvaleric acid	1.27
Methyl mercaptan	1.26
Linoleic acid	1.24
Propionamide	1.23
1-Dodecene	1.21
Butyric acid	1.15
3-Phenylpropionic acid	1.14
4-Vinylphenol	1.13
Acetic acid	1.07
5-Methyl-2-furaldehyde	0.97
Dimethyl trisulfide	0.88

Furfuryl mercaptan	0.87
2-Propenal	0.87
4-Methyl-2-pentanone	0.82
Propionaldehyde	0.80
2-Propanol	0.79
Ethyl acetate	0.79
2-Ethyl-1-hexanol	0.76
3-Methyl-1-butanol	0.74
2-Methylfuran	0.74
Acetoin	0.73
3-Methylbutanal	0.72
2-Methylbutyraldehyde	0.72
2,3,5-Trimethylpyrazine	0.67
Benzaldehyde	0.66
Thymol	0.61
Pyrazine	0.59
Caffeine	0.59
Dimethyl disulfide	0.57
1-Pentanol	0.57
4-Methylimidazole	0.56
Pyridine	0.50
Isobutyraldehyde	0.46
2-Phenylethanol	0.44
Lauric acid	0.38
1-Butanol	0.34
2,3-Butanedione	0.34
Benzyl alcohol	0.32
2-Methylpyrazine	0.29
2-Butanone	0.27
Acetol	0.23
Acetone	0.06
Benzoic acid	0.06
Menthol	0.03
