



Title	顎下腺舌下腺純唾液に含有される代謝物の包括的探索
Author(s)	石川, 明日香
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82165
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

顎下腺舌下腺純唾液に含有される代謝物の包括的探索

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 口腔分子免疫制御学講座

予防歯科学教室

石川 明日香

諸言

今日の日本の医療費の増加は、大きな社会課題となっている¹⁾。医療費抑制対策のひとつとして、高額な医療費を要する癌をはじめとした様々な NCDs (Non-Communicable Diseases: 非感染性疾患) の早期発見があげられている。さらにその手段のひとつに、体液によるバイオマーカー測定法がある。バイオマーカーとは、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、あるいは暴露や治療を含めた介入や反応に対する指標と定義されており²⁾、組織切片だけでなく、血液や尿、唾液などの生体試料を用いたバイオマーカーの利用が進んでいる³⁾。

バイオマーカーにはゲノム DNA 上の遺伝子、メッセンジャーRNA、マイクロ RNA、タンパク質、代謝物が用いられており、血液を用いた生化学検査項目として一般に普及しているものも多い。その代表例としては、II型糖尿病の血糖値や HbA1c (Hemoglobin A1c)⁴⁾、膵臓癌をはじめとした種々の癌における CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19-9: 糖鎖抗原)⁵⁾、前立腺癌における PSA (Prostate-Specific Antigen: 前立腺特異抗原)⁶⁾などがある。

各バイオマーカーは物質毎に特徴があるが、最も表現型に直結する情報を含むものは代謝物である⁷⁾。代謝物はタンパク質より小さい 1500 Da 以下の有機化合物の集合体で、アミノ酸、有機酸、脂質、糖などを含んでいる。代謝物の総体情報を解析する研究手法がメタボロミクスであり、セントラルドグマの最下流に位置するゲノム情報の実行結果を知ることができる⁸⁾。また、メタボロミクスは宿主の先天的な情報だけでなく、NCDs などの後天的な獲得形質理解にも有効であると期待されている⁷⁾。

血液は最も汎用的な検査試料であるものの、採取は専門職に限られ侵襲を伴う欠点を有する。一方、唾液は簡便に非侵襲的に、そして安価に採取可能であるため、歯科医院だけでなく健康診断などの公衆衛生の現場や家庭内でも採取可能である⁹⁾。しかし生体試料の研究の蓄積は血液と比較して非常に浅く、唾液メタボロミクスの研究報告は近年され始めたばかりである¹⁰⁾。今日世界的大流行となっている COVID-19 (Coronavirus Disease 2019: 新型コロナウイルス感染症)¹¹⁾の診断でも唾液検査の有用性は示されており¹²⁾¹³⁾、唾液は今後さらに検査対象が拡大する生体試料と

なることが予想される。

唾液の採取方法には吐出，吸引，スワブを用いた方法などがある¹⁴⁾。従来，採取唾液を用いた臨床研究では吐出された唾液を使用している。唾液には宿主由来の恒常的な内因性物質の他に，口腔衛生状態，口腔疾患や口腔細菌叢などの影響を受けた内因性・外因性物質も含まれている¹⁵⁾。そのため，口腔内環境の影響を受ける疾患の検査試料として唾液は有用である。例えば，歯周組織炎症の状態を定量化した歯周検査指標である PISA (Periodontal Inflamed Surface Area)¹⁶⁾の値と相関を示す物質が唾液中に存在することが報告されている¹⁷⁾。また，口腔癌のバイオマーカー候補物質も唾液中に複数存在することが報告されている¹⁸⁾。

唾液は，唾液腺より分泌された直後の唾液を純唾液，口腔内に停留している唾液を全唾液と区別することができる。純唾液成分が口腔内微生物により分解・修飾・消費されて全唾液となっている可能性が高いことから，純唾液は全唾液よりも口腔内環境の影響を受けない宿主情報を含んでいる試料と考えられる。そのため純唾液を直接採取できれば，全身状態に関するバイオマーカーの探索が可能となる。しかしながら，臨床応用を念頭に置いた純唾液の採取方法はこれまで検討されていない。また，純唾液と全唾液を特徴づける代謝物や代謝経路も不明であるため，両試料の比較のためにも純唾液の適切な採取方法の確立が望まれる。

安静時の純唾液分泌量は非常に微量¹⁹⁾で，健常者の唾液分泌量は 0.25-0.35 mL/min，さらに口腔乾燥を有する場合は 0.1 mL/min 以下²⁰⁾といわれている。そのため，純唾液に含まれるバイオマーカーを探索するには，少量でも確実に採取できる方法のみならず，高い精密性を有する前処理や分析・保管方法の確立が求められる。にも関わらず，これらの課題を全て解決した精度が高くかつ網羅的に測定可能な GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrometry: ガスクロマトグラフ質量分析計) を用いた微量生体試料の測定系は唾液以外の生体試料でも報告がない。

本研究では，純唾液に含まれる全身疾患バイオマーカーを探索するための臨床研究を念頭に置き，純唾液採取方法と保管，処理，分析条件を検討した。さらに考案した微量唾液の採取，前処理，分析の方法を用いて，実際に純唾液と全唾液を採取し，メタボロームプロファイルを比較することで新規の方法の再現性と妥当性を確認した。さらに両群を特徴づける代謝物と代謝経路について検討し，純唾液解析の基盤技術の構築を目指した。

材料および方法

1. 純唾液メタボローム解析法の考案

1.1. 純唾液を担持するろ紙の選定・洗浄溶媒の検討

微量生体試料の採取用ろ紙として CHROMATOGRAPHY PAPER (アドバンテック東洋株式会社, 東京) を用いた。セラミックシザーにてこのろ紙を抽出バイアルの径に合わせたサイズに裁断し担持媒体とした。担持媒体操作時のバックグラウンドの大幅な上昇を避けるため、個装ディスプレイプラスチックピンセット (アズワン, 大阪) を使用した。本ピンセットは臨床研究時にも用いられた。唾液採取前後に担持媒体の重量を測定し、採取唾液量を算出した。担持媒体の洗浄溶媒の検討には水と 99.5%エタノールを用いた。

1.2. 純唾液採取方法

舌下ヒダと舌下小丘より分泌される顎下腺と舌下腺からの唾液を、本研究では純唾液として採取した。また、採取に先立ち舌下部にロールワッテ (ハクゾウメディカル, 大阪) を留置し、残留する全唾液を可及的に排除した。

1.3. 溶出効率の検討

担持媒体を経由して採取した唾液の抽出溶媒への溶出効率の検討には卓上超音波洗浄器 Branson[®]2800-J (ヤマト科学, 東京) を用いた。出力を 40 kHz, 110 W に設定し、超音波処理時間 20 sec と 5 min にてクロマトグラムの比較を行った。さらに同工程の抽出回数 1 回と 2 回にて同様にクロマトグラムの比較を行った。

1.4. 抽出溶媒の検討

代謝物抽出時に用いる溶媒として Sakanaka ら¹⁷⁾の方法に準じて水, メタノール (LCMS 用, 和光純薬, 大阪), クロロホルム (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬, 大阪) を 2:5:2 で混合したものと, 最も除タンパク率の高いアセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬, 大

阪)²⁴⁾と水を7:3で混合したものにてクロマトグラムの比較を行った。

2. 純唾液と全唾液に含有される代謝物の検討

2.1. 被験者の選択

被験者はインフォームドコンセントが得られた成人30名とした。平均年齢42.1±11.1歳、男性21名、女性9名であった。本研究は大阪大学歯学研究科倫理委員会の承認を受けて2017年12月より2019年3月の間に4名の歯科医師により実施された(H28-E40-2)。

2.2. 唾液採取用ろ紙準備

水と99.5%エタノール(高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬, 大阪)を用いて担持媒体の洗浄を行った。本研究にて使用する全担持媒体は, 研究開始前に一斉に蒸留水(高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬, 大阪)を用いて洗浄した。重量を測定した新しい2 mL容のプラスチックチューブに担持媒体を入れ, 蒸留水を1500 µL添加, 25°C, 1000 rpmの条件で10 min間振盪させた。添加した蒸留水を全量回収し, 20%エタノールを1500 µL添加, 使用する前日まで担持媒体を20%エタノールに浸漬させた状態で-30°Cにて保管した。

採取前日に使用枚数分常温にて解凍し20%エタノールを全量回収後, 99.5%エタノールを1500 µL添加, 25°C, 1000 rpmの条件で10 min振盪させた。添加した99.5%エタノールを全量回収し, 65°Cのサーモミキサー上にて残留エタノールを蒸発させ再度重量を測定した。

担持媒体の操作時と以後の臨床研究時には, ノイズピークの原因となるパウダーのないニトリルグローブ(アズワン株式会社, 大阪)を使用した。

2.3. 純唾液と全唾液の採取

採取8 h前より絶飲食を指示した被験者より純唾液を採取し, 採取後直ちにキューブクーラー(フォルテグロウメディカル株式会社, 栃木)により冷却保存した。重量測定は分析用電子天秤GR-202(エー・アンド・ディー, 東京)を用いて小数点以下5桁まで測定した。測定中は実験室内の空調を止め, 複数回の同一測定値が得られるまで測定を繰り返した。また, 手垢による重量の

変化が生じないように、ニトリルグローブを使用した。

全唾液は Sakanaka ら¹⁷⁾の方法に準じ、安静時唾液を吐出させ 50 mL ポリプロピレン製遠沈管 (Corning, NY, USA) にて採取した。採取した唾液は氷上で 15 min 静置後上清のみ回収し、液体窒素にて凍結後、一旦-80℃にて保存した。純唾液との比較に用いる全唾液については、全被験者からのサンプル採取終了後一斉に解凍し、全サンプルを一体化した後に実験室にて 20 枚の担持媒体に唾液を吸収させ、全唾液群とした。

2.4. 採取した唾液の代謝物抽出

唾液を採取した担持媒体を 2 mL 容ガラスバイアル (日電理化学硝子, 神戸) 中に入れた。の内部標準物質であるリビトール (和光特級, 和光純薬, 大阪) (20 mg/100 mL) を含有した蒸留水 530 μ L を添加し、25℃, 1000 rpm の条件で 10 min 振盪させた。さらに 40 kHz にて 5 min 超音波処理を行い、4℃, 4000 rpm の条件で 3 min 遠心分離後、アセトニトリル²²⁾を 1400 μ L 添加した。攪拌後前述と同条件にて超音波による処理、振盪、遠心分離を行い、上清 1600 μ L を 2 mL 容のプラスチックチューブに回収した。得られた上清は 40℃, 2000 rpm にて 30 min 遠心濃縮後液体窒素を用いて迅速に凍結後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、全サンプル採取終了まで-80℃にて保存した。ノイズピークを減算するため、担持媒体ブランクも同様の抽出工程を行った。

2.5. GCMS 分析

全サンプルの代謝物抽出終了後、一斉に誘導体化を行った。まず 20 mg/ mL のメトキシアミン塩酸塩 (Merck, Darmstadt, Germany) を含有させたピリジンインフィニティピュア (和光純薬, 大阪) 溶液を 70 μ L 添加後、サーモミキサーにて 30℃, 1200 rpm にて 90 min 振盪させ、メトキシ化を行った。さらに MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide: 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; ジーエルサイエンス, 東京) を 35 μ L 添加後同様に 37℃, 1200 rpm にて 30 min 振盪させ、TMS (Trimethylsilyl: トリメチルシリル) 化を行った。誘導体化を行ったサンプルの上清 100 μ L をオートサンプラーバイアル (ジーエルサイエンス, 東京) に分注し、GCMS 分析に供した。

代謝物の GCMS 分析にはガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040 (島津製作所, 京都), ガスクロマトグラフ用自動液体試料導入システム AOC-20i (島津製作所, 京都) を用いた. GCMS の制御, データ取得はガスクロマトグラフ質量分析計用ワークステーション GCMS Solution Ver. 2.72 (島津製作所, 京都) を用いた.

分析条件は以下の通りである. キャリアガスには高純度ヘリウムを用い, カラム流量が 1.5 mL/min とした. 初期温度を 80°C, カラムオーブンを 80°C, 気化室を 270°C, イオン源を 260°C, インターフェースを 310°C に設定した. サンプルは 1 μ L をインジェクションし, スプリットレスの条件で分析した. カラムにはリテンションギャップの付与された InertCap 5MS/NP (ジーエルサイエンス, 東京) を使用した. 分析開始後はカラムオーブンを 80°C にて 2 min 間保持させ, その後 15°C/min で 325°C まで昇温, そして 325°C で 20 min 保持させた. EI 法にてイオン化を行い, スキャン速度 2500 scan/sec, 質量範囲を m/z 85 – 500 に設定した. データ取得はインジェクションより 4.7 min から 30 min まで行った.

2.6. GCMS データの解析

GCMS 分析データを GCMS solution より出力した. ABF file converter にて ABF 形式のデータに変換後, MS-DIAL Ver. 4.38 (理化学研究所 環境資源科学研究センター, 神奈川) を用いてノンターゲットメタボロミクス解析にてピークの検出, 化合物の同定を行った.

2.7. 統計解析

多変量解析ソフトである SIMCA Ver. 16 (Umetrics, Umeå, Sweden) を用いた. 純唾液と全唾液での前処理, GCMS 分析の再現性の有無を PCA (Principal Component Analysis: 主成分分析) を用いて検討した. 次に, OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis: 直交部分的最小二乗回帰判別分析) を用いてパレートスケーリングにて VIP (Variable Importance for Prediction) 値を算出した. さらに純唾液群と全唾液群の相対比とウェルチの t 検定を用いて有意差のある代謝物を検出, Volcano Plot にて表示し, 検出された代謝物リストと代謝経路の関連を MSEA (Metabolite Set Enrichment Analysis)²³⁾を用いて行った. MSEA については Metaboanalyst Ver. 4.0 (McGill University,

Montréal, Canada) ²⁴⁾を用いた.

結果

1. 純唾液メタボローム解析法の開発

1.1. 唾液腺唾液を担持するろ紙の選定・洗浄方法の検討

唾液を吸収させず担持媒体のみを用いて洗浄方法を比較したところ、水と 99.5%エタノールにて各 1 回ずつ洗浄した場合が、洗浄しない、あるいは水、99.5%エタノールのいずれかのみ用いて 2 回洗浄を行った場合と比較して最もノイズピークが小さくなった (図 1)。この結果より、臨床研究にて用いる担持媒体は水と 99.5%エタノールにて洗浄することとした。またロット間で生じる可能性のある誤差を回避するために全ての担持媒体は臨床研究開始前に水による洗浄を行い、ロットを統一した。さらに空気中のシロキサンなどを吸収しないよう、20%エタノールに浸漬させて前日まで保管し、採取前日に 99.5%エタノールにて洗浄を行うこととした。

1.2. 抽出効率の検討

全唾液を担持媒体にて採取後、20 sec または 5 min で超音波処理を実施後抽出したサンプルと、担持媒体を用いず全唾液を直接溶媒に添加後抽出したサンプルで TIC (Total Ion Chromatogram: トータルイオンクロマトグラム) を比較した。その結果、超音波処理時間を 5 min にしたサンプルの方がより全唾液を直接抽出したものに近いピーク形状となった (図 2)。これより臨床研究において、担持媒体で唾液を採取後、5 min 抽出処理を実施することとした。超音波処理時の水温の過上昇²⁹⁾および長時間の抽出操作によるメタボロームの変動を回避するため、5 min 以上の超音波処理を行わないこととした。

また、1 回目と 2 回目抽出処理後の代謝物のピークを比較した結果、2 回目抽出処理後のピーク検出物質は 1 回目の抽出時に網羅されていた (図 3)。この結果より臨床研究時には 1 回の抽出のみ行うこととした。

1.3. 抽出溶媒の検討

水、メタノール、クロロホルムによる抽出と水、アセトニトリルによる抽出結果の検出代謝物

のピークを比較した。その結果、水、アセトニトリルを用いた場合にサンプルピーク数が増加した (図 4)。この結果から、臨床研究では従来の抽出溶媒ではなく水とアセトニトリルを用いた抽出を行うこととした。

2. 純唾液と全唾液に含有される代謝物の検討

2.1. 試料採取・処理の再現性の評価

メタボロミクス解析の結果、両群で 141 の代謝物が検出された。主成分分析を実施したところ、第一主成分 (PC1: 49.4%)、第二主成分 (PC2: 20.5%) で群間差を認め、寄与率の高い結果となった (図 5)。また、全唾液群のサンプルがほぼ同一座標上にプロットされ、本研究にて考案した唾液前処理方法や分析方法の高い再現性が示された。

2.2. 採取方法の違いによって量的変化が生じた代謝物の同定

群情報を加味した OPLS-DA を実施し (図 6)、当判別分析において各群の明確な区別に寄与した程度を示す VIP 値を計算した。その結果 VIP 値が 1 以上の代謝物が 51 代謝物抽出され、そのうち 39 代謝物が純唾液群、12 代謝物が全唾液群において特徴的に検出された (表 1)。また、本メタボロミクス解析にて検出された全 141 代謝物の純唾液群と全唾液群の相対比とその有意性を Volcano plot にてプロットした (図 7)。純唾液群にて有意に 2 倍以上認められた代謝物は 76 代謝物、全唾液群にて有意に 2 倍以上認められた代謝物は 15 代謝物となり (表 2)、VIP 値が 1 以上の物質は全て含有されていた。

2.3. 採取方法の違いによって量的変化が生じた代謝経路の同定

MSEA にて選定された代謝物から統計的に有意な代謝経路を抽出した (表 3)。その結果、純唾液群では、30 代謝経路抽出され、そのうちバリン・ロイシン・イソロイシン合成経路、タウリン、ハイポタウリン代謝経路、アミノアシル tRNA 代謝経路、ガラクトース代謝経路、プリン代謝経路が有意に特徴づけられた。一方全唾液群では 8 代謝経路が抽出され、そのうちグルタチオン代謝経路が有意に特徴づけられた。

考察

本研究では、従来の唾液メタボロミクス研究に用いられていた全唾液解析方法とは異なり、純唾液の唾液腺開口部からの直接採取方法を考案した。その際に課題となる微量な採取唾液の精緻な前処理・分析、また実際の臨床現場にて応用可能となるよう簡便な採取・保管方法の検討を GCMS により網羅的に行った。さらに、新規前処理・分析方法を用いて純唾液と全唾液の代謝物プロファイルを精査した。その結果、新規微量唾液の採取、前処理、分析方法の高い再現性が示された。また、純唾液と全唾液では異なる代謝物と代謝経路が特徴づけられた。

歯肉溝滲出液採取時に用いる担持媒体である、PerioPaper® (Oralflow, NY, USA) は把持部の素材により、抽出過程でのバックグラウンドの上昇が生じてしまう。さらに PerioPaper にて採取した生体試料を測定する機器である Periotron® (Oralflow, NY, USA) は複数サンプル測定時、台座表面の微量代謝物のキャリーオーバーを起こす可能性があり、本研究における GCMS での微量唾液分析には不適當であった。そのため、本研究ではペーパークロマトグラフィにて用いられるろ紙を最適な形態に加工し担持媒体とした。さらに担持媒体の GCMS 分析時のノイズピークを減弱させるため、担持媒体の洗浄溶媒を検討し、蒸留水と 99.5%エタノールを用いた洗浄法を採用した。蒸留水は極性溶媒のため高極性の物質が除去される。一方、エタノールは両極性溶媒のため、両極性の物質が除去される。そのため水と 99.5%エタノールの組み合わせにより極性・無極性のいずれの物質も除去可能であったと考えられる。使用した担持媒体の組成はセルロースのみであるものの、製造過程で接触した機器類や包装類、空気中の浮遊無機・有機物に微量汚染されていた可能性が高い。今回の結果により、担持媒体の洗浄を実施することの必要性が示された。

新規純唾液採取方法が従来の全唾液採取方法と大きく異なる点は、採取試料が微量であること、および試料採取から代謝物抽出に至る過程で担持媒体を経由することである。そのため、担持媒体からの微量代謝物の抽出の際に、代謝物を喪失するリスクを抑えなければならない。しかし、担持媒体を抽出溶媒に浸漬するだけでは代謝物の十分な移動は困難であるため、代謝物の溶出効率を可及的に向上させる工夫が必要である。また、唾液には粘性な性状を有する糖タンパクであるムチンなどが含まれる²⁶⁾。そのため、糖タンパクが担持媒体に付着し、浸漬している抽出溶媒

との界面を形成し、担持媒体から抽出溶媒への代謝物の移動を阻害する可能性がある。この界面の破壊や溶媒中の代謝物の濃度勾配の平衡化による溶出促進には、キャビテーションによる分散と衝撃効果を有する超音波洗浄器による処理が有効であると考えられた。そのため担持媒体と抽出溶媒を添加したチューブに異なる条件での超音波処理を実施し、抽出効率を比較検討した。抽出効率に加えて、作業効率を改善するための現実的な処理回数などを総合的に勘案し、本研究で実施する抽出方法の至適化を完了した。

我々のグループでこれまでに実施してきた全唾液メタボロミクス臨床研究においては、超音波処理を前処理として実施していなかったが、今回純唾液群に対する比較対象群とするために、全唾液についても担持媒体に吸収させた後超音波処理を実施した。細菌破壊時に必要な超音波の周波数は 10-20 kHz²⁷⁾とされている一方、本研究ではキャビテーション効果のより軽度な出力である 40 kHz で処理を行っている。そのため、全唾液に含まれる微生物の細胞膜や細胞壁が超音波処理により軽微に傷害を受ける可能性は考えられるものの、その影響は小さいと推測される。また、全唾液代謝物抽出方法を用いて得られたサンプルで歯周病重症度予測モデルが構築できている (Sakanaka *et al.*)¹⁷⁾ことから、歯周病などの口腔感染症のバイオマーカー探索時には、全唾液中の微生物菌体内由来の代謝物ごと抽出する前処理方法が適していると考えられる。従って吐出により十分量の試料確保が可能である全唾液分析には、担持媒体の経由や超音波処理を必要としない従来の唾液直接抽出法を用いるのが最適であると考えられる。

今回、これまで唾液の抽出溶媒として用いられてきた水、メタノールとクロロホルム（ブライダイヤ法）ではなく、水とアセトニトリルを用いた方がより多くの代謝物を抽出できることを確認した（図 4）。その理由として採取可能な唾液量が微量であることより、除タンパク効率の影響をより受けていることが考えられる。上述のように唾液には粘性のタンパクが含まれていることから、夾雑タンパクを除去する効果が代謝物の溶媒中への放出に大きな影響を与えている可能性がある。

今回の唾液試料の処理方法の特徴として、汎用はされていないスプリットレス分析を用いたこともあげられる。スプリットレス分析では、生体試料からの抽出液を全量カラムに導入し、気化させた試料中の化合物をカラム内で分離する。通常の生体試料分析の場合、抽出試料に含まれる

代謝物の濃度が高いため、スプリットレス分析にて抽出液全量を導入した場合、試料負荷量を超えてしまう。そのためスプリット分析にて抽出液の一部のみカラムに導入し、ピーク形状や分離能を向上させている。一方、今回の微量試料の分析にはスプリットレス分析が適しているため、除タンパクの効果が最も高いアセトニトリルを用いて前処理を行いタンパクの注入によるカラムの負荷が抑えられるよう工夫を加えた。

本研究の唾液を用いた臨床研究では、純唾液群と全唾液群で明確な群間差を認め、さらに同サンプルを用いた全唾液群は同一座標付近にプロットされた (図 5)。これにより、純唾液と全唾液それぞれの採取と処理方法の再現性が示された。従来メタボロミクスの研究手法の開発や実施は、高い専門性を有する工学研究者の技術協力や支援が必要であった。その理由のひとつは、メタボロミクス解析の目的に応じた試料の採取と処理方法が複雑であるとともに、結果の再現性が乏しい²⁸⁾ことであった。今回、新たに考案した方法による微量試料採取と前処理、GCMSによるメタボローム測定、得られたデータの分析の各過程を、複数の医療従事者が1年4カ月にわたり実施し再現性が確認できた。これより、詳細なプロトコールの至適化を行った場合、メタボロミクスを専門としない医療従事者による純唾液試料採取と測定が可能である事が示された。

これまでに NMR (Nuclear Magnetic Resonance: 核磁気共鳴装置) を用いた顎下腺舌下腺メタボローム研究は報告がある²⁹⁾ものの、GCMS を用いた報告はみられない。NMR は測定が簡便である一方、機器類が高額なうえ、分離能が低いため物質の同定の精度が低い³⁰⁾という欠点を有する。GCMS は目的に応じて採取や抽出方法を開発する必要があり、測定系を構築するまでは煩雑ではあるが、大がかりな装置を必要とせず、精度が高く網羅的に代謝物の分析が可能である。そのため、唾液などの生体試料を対象とした臨床研究に適しているといえる。

純唾液群と全唾液群において、VIP 値の高い物質、すなわち各サンプル群を特徴づける物質の考察を行った。その結果、純唾液群を特徴づける物質の多くは血液、尿などのバイオマーカーとして報告されている物質であった。また全唾液群を特徴づける物質には、これまで歯周組織の状態を示すバイオマーカーとして報告されているものが多く含まれていた。一例として、純唾液群において最も VIP 値の高かったマルトトリオースは、卵巣がん患者の血清にて上昇³¹⁾、また前立腺がん患者の組織では減少した³²⁾という報告がある。また、ホスホエタノールアミンは、小児 NAFLD

(Nonalcoholic Fatty Liver Disease: 非アルコール性脂肪性肝疾患) 患者の血漿³³⁾, うつ病の血漿³⁴⁾, ADHD (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: 注意欠如・多動性障害) 患者の前頭前皮質³⁵⁾にて増加したという報告がある。さらに 2 型糖尿病患者の血漿にて減少することが知られている 1,5-アンヒドログルシトール³⁶⁾も純唾液群において高い VIP を示した。全唾液群で、高い VIP を示した代謝物のうち、5-アミノ吉草酸、プトレシン、カダベリン、オルニチン、ヒドロ桂皮酸、プロリンは、歯周組織の炎症状態を定量的に評価する PISA を表現可能なバイオマーカー候補物質である³⁷⁾。さらに、各群にて VIP が 1 以上の物質の代謝物の分類を行ったところ、純唾液群では、ビタミン、有機酸、核酸、糖、脂質など、生体由来と考えられる物質が多く認められた。また全唾液群では、アミン、アミノ酸、有機酸など、微生物の代謝により多く検出される種類の物質が高頻度に存在した。これらの結果より、口腔内の微生物や口腔内に局在する酵素が純唾液中に含まれる宿主由来の代謝物を消費し放出した結果、全身状態を反映するメタボローム情報が減弱する一方で、口腔内環境がより明確に全唾液メタボロームに反映している可能性が示された。今後血液等、既存の他の生体試料や全身疾患状態との関連を検討していくことにより、これらの考察の妥当性について検討を加える予定である。

次に、純唾液群と全唾液群にて特徴づけられる代謝経路 (表 2) を考察した。純唾液群にて有意に特徴づけられた 5 代謝経路のうち、バリン・ロイシン・イソロイシン生合成は消化管、免疫状態により活性化レベルが変動³⁸⁾し、タウリン・ハイポタウリン代謝にて代謝されるタウリンは浸透圧調節など細胞機能に関与³⁹⁾している。これらより、唾液腺の機能に関与する代謝経路である可能性が示された。一方、全唾液群において有意に特徴づけられたグルタチオン代謝は、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成能の抗生物質耐性を向上させると報告されているグルタチオン⁴⁰⁾を含有しており、代謝物での考察と同様に口腔内環境に関連する代謝経路に関する情報がより反映している可能性が示された。

本研究では、顎下腺と舌下腺の唾液腺開口部が存在する舌下ヒダと舌下小丘からの担持媒体による唾液採取を行った。そのため採取唾液は舌下腺、顎下腺唾液のみであり、耳下腺や他小唾液腺は含まれていない。その理由として、大唾液腺 3 つ全ての開口部からの同時の唾液採取は被験者への負担が大きく、また技術的に困難であった点が挙げられる。安静時唾液は舌下腺・顎下腺

由来の唾液が 8 割を占める一方、刺激時唾液は耳下腺由来の唾液が 5 割を占める²⁰⁾。宿主の全身状態を精確に反映するのは安静時唾液である⁴¹⁾ため、安静時唾液の大部分を占める顎下腺と舌下腺の採取を優先することとした。刺激時唾液は食事など咀嚼運動により分泌される。そのため、咀嚼運動や刺激時の唾液分泌状態を調べる場合には、耳下腺唾液の採取を検討する必要があるであろう。純唾液を用いたバイオマーカー測定をより汎用的に使用できるような器具類の規格化、さらに純唾液が適応となる条件を今後絞っていく予定である。

本研究での全唾液群は被験者個人のメタボローム情報を反映するものではなく、被験者全員の全唾液を混合し、一体化、均一化したものを担持媒体に吸収させて GCMS 分析に供したものである。これは唾液試料の処理方法自体の再現性の確認を目的とし、全唾液群を QC (Quality Control) として測定・分析に組み込んだためであるが、舌下腺顎下腺純唾液と全唾液をそれぞれ特徴付けるメタボロームの考察に影響はないと考えられる。また、今回の臨床研究において明らかとなった、各群を特徴づける代謝物と代謝経路に対する考察は予測の域を出ておらず、いまだ未解明な部分が多い。今後 *in vitro* でのリバーストランスレショナルリサーチによって、さらなる基礎的な検討が必要である。

結論

本研究では、唾液腺純唾液の新規微量解析方法を考案し、この方法を用いてヒト純唾液と全唾液の代謝物プロファイルの違いを示した。純唾液を特徴づける物質にはこれまで全身疾患のバイオマーカーとして報告されてきた物質、全唾液を特徴づける物質には歯周疾患の重症度と連関するバイオマーカーとして報告されてきた物質が含まれていたことより、スクリーニング対象とする疾患や目的毎に唾液サンプル採取方法を至適化する必要性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂くとともに、終始にわたり御懇篤なるご指導とご教授を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（予防歯科学教室）天野敦雄教授に深甚なる謝辞を表します。また、本研究を遂行するにあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました同口腔分子免疫制御学講座（予防歯科学教室）久保庭雅恵准教授，坂中哲人助教に深謝致します。また微量唾液解析の試料採取と処理方法の開発にあたり、ご指導と貴重なご助言を賜りました本学工学研究科生物工学専攻生物資源工学領域（福崎研）福崎英一郎教授，古野正浩研究員に深く感謝致します。最後に、本研究に際し、様々な御援助と御協力を頂きました予防歯科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

1. 厚生労働省 平成 30 年度国民医療費の概況.
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/18/index.html>
(参照 2021-1-17)
2. FDA-NIH Biomarker Working Group (2016): BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource
3. Leptak, C., Menetski, J.P., Wagner, J.A., Aubrecht, J., Brady, L., Brumfield, M., Chin, W.W., Hoffmann, S., Kelloff, G., Lavezzari, G., Ranganathan, R., Sauer, J.M., Sistare, F.D., Zabka, T., Wholley, D. (2017): What evidence do we need for biomarker qualification? *Sci. Transl. Med.*, 9, eaal4599.
4. U.S Preventive Services Task Force. Abnormal blood glucose and type 2 diabetes mellitus: screening.
<https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/document/RecommendationStatementFinal/screening-for-abnormal-blood-glucose-and-type-2-diabetes>
(参照 2021-1-17)
5. Hidalgo, M. (2010): Pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.*, 362, 1605-17.
6. Partin, A.W., Catalona, W.J., Southwick, P.C., Subong, E.N., Gasiior, G.H., Chan, D.W. (1996): Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology*, 48, 55-61.
7. 福崎 英一郎(2017): メタボロミクスの精密表現型解析への応用. *日本乳酸菌学会誌*, 28, 66-73
8. Wu, G. (2009): Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37, 1-17.
9. Lee, Y.H., Wong, D.T. (2009): Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *Am. J. Dent.*, 22, 241-8.
10. Gardner, A., Carpenter, G., So, P.W. (2020): Salivary Metabolomics: From Diagnostic Biomarker Discovery to Investigating Biological Function. *Metabolites*, 10, 47.

11. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it.
[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
(参照 2021-1-17)
12. Sapkota, D., Sjøland, T.M., Galtung, H.K., Sand, L.P., Giannecchini, S., To, K.K.W., Mendes-Correa, M.C., Giglio, D., Hasséus, B., Braz-Silva, P.H. (2020): COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J. Clin. Pathol.*, 0, 1-6.
13. Fernandes, L.L., Pacheco, V.B., Borges, L., Athwal, H.K., de Paula, Eduardo, F., Bezinelli, L., Correa, L., Jimenez, M., Dame-Teixeira, N., Lombaert, IMA., Heller, D. (2020): Saliva in the diagnosis of COVID-19: a review and new research directions. *J. Dent. Res.*, 99, 1435-43.
14. Navazesh, M. (1993): Methods for collecting saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 694, 72-7.
15. Mikkonen, J.J., Singh, S.P., Herrala, M., Lappalainen, R., Myllymaa, S., Kullaa, A.M. (2016): Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *J. Periodontal Res.*, 51, 431-7.
16. Nesse, W., Abbas, F., van, der, Ploeg, I., Spijkervet, F.K., Dijkstra, P.U., Vissink, A. (2008): Periodontal inflamed surface area: quantifying inflammatory burden. *J. Clin. Periodontol.*, 35, 668-73.
17. Kuboniwa, M., Sakanaka, A., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., Amano, A. (2016): Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. *J. Dent. Res.*, 95, 1381-6.
18. Hu, S., Arellano, M., Boontheung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J.A., Wong, D.T. (2008): Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin. Cancer Res.*, 14, 6246-52.
19. Carpenter, G.H. (2013): The secretion, components, and properties of saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 4, 267-76.
20. de Almeida, Pdel, V., Grégio, A.M., Machado, M.A., de Lima, A.A., Azevedo, L.R. (2008): Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent Pract.*, 9, 72-80.

21. 中村 洋 監修, 菊谷典久・藤原祺多夫・古野正浩 編 (2003). 分析試料前処理ハンドブック 丸善出版
22. Omori, K., Katakami, N., Arakawa, S., Yamamoto, Y., Ninomiya, H., Takahara, M., Matsuoka, T.A., Tsugawa, H., Furuno, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Shimomura, I. (2020): Identification of Plasma Inositol and Indoxyl Sulfate as Novel Biomarker Candidates for Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. -Findings from Metabolome Analysis Using GC/MS-. J. Atheroscler. Thromb., 27, 1053-67.
23. Xia, J., Wishart, D.S. (2010): MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. Nucleic Acids Res., 38, W71-7.
24. Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J. (2018): MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nucleic Acids Res., 46, W486-94.
25. Kaur, I., Ellis, L.J., Romer, I., Tantra, R., Carriere, M., Allard, S., Mayne-L'Hermite, M., Minelli, C., Unger, W., Potthoff, A., Rades, S., Valsami-Jones, E. (2017): Dispersion of nanomaterials in aqueous media: towards protocol optimization. J. Vis. Exp., 130, 56074.
26. Liu, J. and Duan, Y. (2012): Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring. Oral Oncol., 48, 569-77
27. 鶴ヶ谷 武雄(1982): 超音波の利用と応用. 日本船舶用機関学会誌, 17, 10-9
28. 福崎 英一郎 監修 (2013). メタボロミクスの先端技術と応用 (バイオテクノロジーシリーズ), シーエムシー出版
29. Meleti, M., Quartieri, E., Antonelli, R., Pezzi, M.E., Ghezzi, B., Viani, M.V., Setti, G., Casali, E., Ferrari, E., Ciociola, T., Spisni, A., Pertinhez, T.A. (2020): Metabolic profiles of whole, parotid and submandibular/sublingual saliva. Metabolites, 10, 318.
30. Human Metabolome Technologies. The Proceedings of Metabolomics.
<http://hmttest.smc-msv.jp/rd/proceedings>
(参照 2021-1-17)

31. Cheng, Y., Li, L., Zhu, B., Liu, F., Wang, Y., Gu, X., Yan, C. (2016): Expanded metabolomics approach to profiling endogenous carbohydrates in the serum of ovarian cancer patients. *J. Sep. Sci.*, 39, 316-23.
32. Jung, K., Reszka, R., Kamlage, B., Bethan, B., Stephan, C., Lein, M., Kristiansen, G. (2013): Tissue metabolite profiling identifies differentiating and prognostic biomarkers for prostate carcinoma. *Int. J. Cancer*, 133, 2914-24.
33. Jin, R., McConnell, R., Catherine, C., Xu, S., Walker, D.I., Stratakis, N., Jones, D.P., Miller, G.W., Peng, C., Conti, D.V., Vos, M.B., Chatzi, L. (2020): Perfluoroalkyl substances and severity of nonalcoholic fatty liver in Children: An untargeted metabolomics approach. *Environ. Int.*, 134, 105220.
34. Kawamura, N., Shinoda, K., Sato, H., Sasaki, K., Suzuki, M., Yamaki, K., Fujimori, T., Yamamoto, H., Osei-Hyiaman, D., Ohashi, Y. (2018): Plasma metabolome analysis of patients with major depressive disorder. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 72, 349-61.
35. Chen, T., Yuan, H., Sun, Y.B., Song, Y.C., Lu, M., Ni, X., Han, X. (2020): Metabolomics study of the prefrontal cortex in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder reveals the association between cholesterol metabolism disorder and hyperactive behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 523, 315-21.
36. Kim, W.J. and Park, C.Y. (2013): 1,5-Anhydroglucitol in diabetes mellitus. *Endocrine*, 43, 33-40.
37. Sakanaka, A., Kuboniwa, M., Hashino, E., Bamba, T., Fukusaki, E., Amano, A. (2017): Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. *Sci. Rep.*, 7, 42818.
38. Nie, C., He, T., Zhang, W., Zhang, G., Ma, X. (2018): Branched chain amino acids: beyond nutrition metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 954.
39. Fujiwara, M., Ubuka, T., Abe, T., Yukihiro, K., Tomozawa, M. (1995): Increased excretion of taurine, hypotaurine and sulfate after hypotaurine loading and capacity of hypotaurine metabolism in rats. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, 27, 131-7.
40. Nilsson, M., Jakobsen, T.H., Givskov, M., Twetman, S., Tolker-Nielsen, T. (2019): Oxidative stress

response plays a role in antibiotic tolerance of *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology (Reading)*, 165, 334-42.

41. Williamson, S., Munro, C., Pickler, R., Grap, M.J., Elswick, R.K. Jr. (2012): Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults. *Nurs. Res. Pract.*, 246178.

表 1-1 純唾液群に特徴づけられた代謝物

純唾液群	
代謝物名	VIP 値*
マルトトリオース	1.92529
エタノールアミンリン酸	1.71515
コレステロール	1.71197
ラフィノース	1.70479
ニコチンアミド	1.55933
1,5-アンヒドログルシトール	1.51638
α -トコフェロール	1.51153
マルガリン酸	1.47339
フマル酸	1.4201
アデノシン	1.41355
リンゴ酸	1.39302
グアニン	1.3617
イノシトール	1.35002
尿素	1.34961
乳酸	1.34342
UDP	1.28051
アラニン	1.23172
尿酸	1.21229
リグノセリン酸	1.19446
スクロース	1.19298
グルコノ-1,5-ラクトン	1.18867

クレアチニン	1.16606
タウリン	1.13787
エライジン酸	1.13471
3,4-ジヒドロキシマンデル酸	1.13414
スレオニン	1.12728
トレハロース	1.12712
ベヘン酸	1.12652
4-ヒドロキシ安息香酸	1.12568
アロース	1.10202
ジヒドロキシアセトンリン酸	1.09427
システイン	1.09144
α アミノ酪酸	1.08743
サリシン	1.06608
パルミトレイン酸	1.05634
ツラノース	1.05263
グリコース酸	1.04403
オレイン酸	1.04246
バリリン	1.00897

*VIP 値は OPLS-DA にて算出し、1 以上の代謝物を掲載した。

表 1-2 全唾液群に特徴づけられた代謝物

全唾液群	
代謝物名	VIP 値*
5-アミノ吉草酸	1.95219
プトレシン	1.87395
ガラクトース	1.69635
N-アセチルノイラミニン酸	1.61722
カダベリン	1.58437
N-アセチルグルコサミン	1.48356
オルニチン	1.46451
ヒドロ桂皮酸	1.40142
ウロカニン酸	1.31601
4-ヒドロキシフェニル酢酸	1.25516
プロリン	1.15636
リボース	1.00523

*VIP 値は OPLS-DA にて算出し, 1 以上の代謝物を掲載した.

表 2-1 純唾液中により多く存在する代謝物*

純唾液群		
代謝物名	log2 (全唾液群の平均値/純唾液群の平均値)	p 値
マルトトリオース	-7.363872586	<0.001
アラビノース	-5.957422546	<0.001
ラフィノース	-5.775330428	<0.001
エピガロカテキン	-5.337656302	<0.001
コレステロール	-5.101354005	<0.001
エタノールアミンリン酸	-4.809933947	<0.001
トコフェロール	-4.36385371	<0.001
ニコチンアミド	-4.23000164	<0.001
アデノシン	-4.033301973	<0.001
1,5-アンヒドログルシトール	-3.968834625	<0.001
ヘプタデカン酸	-3.848292277	<0.001
4-ヒドロキシ安息香酸	-3.657069761	<0.001
グアニン	-3.475971315	<0.001
フマル酸	-3.459484626	<0.001
マルトース	-3.380897847	<0.001
リンゴ酸	-3.379583503	<0.001
ツラノース	-3.282248121	<0.001
トレハロース	-3.267916551	<0.001
スクロース	-3.259221175	<0.001
グルタル酸	-3.222328276	<0.001
尿素	-3.168720817	<0.001

UDP	-3.16226101	<0.001
イノシトール	-3.131038311	<0.001
乳酸	-3.095967535	<0.001
アラニン	-2.908405536	<0.001
カフェイン	-2.90815009	<0.001
パラキサンチン	-2.843409107	<0.001
尿酸	-2.737331684	<0.001
リグノセリン酸	-2.68829921	<0.001
フルクトース-6-リン酸	-2.62169645	<0.001
クレアチニン	-2.613105518	<0.001
ベヘン酸	-2.580315541	<0.001
タウリン	-2.510235886	<0.001
グルコノ-1,5-ラクトン	-2.508221639	<0.001
パルミトレイン酸	-2.500106893	<0.001
3,4-ジヒドロキシマンデル酸	-2.492414489	<0.001
スレオニン	-2.472110537	<0.001
アロース	-2.461201014	<0.001
サリシン	-2.419834509	<0.001
エライジン酸	-2.390947932	<0.001
ジヒドロキシアセトンリン酸	-2.340539414	<0.001
フルクトース	-2.265976421	<0.001
α -アミノ酪酸	-2.252889324	<0.001
グリコール酸	-2.242747029	<0.001
システイン	-2.219835724	<0.001
単糖類混合物	-2.217843428	<0.001
グアノシン	-2.112904014	<0.001

2,3-ジヒドロフェニル酢酸	-2.101327462	<0.001
バリン	-2.066426916	<0.001
オレイン酸	-2.062725127	<0.001
α -アミノアジピン酸	-2.04690959	<0.001
トレオン酸	-2.02188552	<0.001
グルタミン	-1.954771216	<0.001
リン酸塩	-1.95294279	<0.001
ハイポキサンチン	-1.947475625	<0.001
N-アセチルアスパラギン酸	-1.910762853	<0.001
アラントイン	-1.903135349	<0.001
3,4-ジヒドロキシ安息香酸	-1.902742781	<0.001
ジヒドロキシアセトンリン酸	-1.829739193	<0.001
アデニン	-1.828950084	<0.001
β -ヒドロキシイソ吉草酸	-1.825940495	<0.001
ラウリン酸	-1.825531401	<0.001
β -ヒドロキシ酪酸	-1.780272917	<0.001
トレイトール	-1.701338084	<0.001
アスコルビン酸	-1.64148022	<0.001
リノール酸	-1.615983901	<0.001
グリセリン酸	-1.456634527	<0.001
イソロイシン	-1.443312012	<0.001
β -アラニン	-1.433709411	<0.001
イソロイシン	-1.369957569	<0.001
ペンタデカン酸	-1.302636395	0.003
ピログルタミン酸	-1.283893804	<0.001
シスチン	-1.283212713	<0.001

ロイシン	-1.276368913	<0.001
ハイポタウリン	-1.140698973	0.001
クエン酸	-1.068438047	0.002

*全唾液群で純唾液群の2分の1以下，かつその差が統計的に有意な代謝物を掲載

表 2-2 全唾液中により多く存在する代謝物*

全唾液群		
代謝物名	log2 (全唾液群の平均値/純唾液群の平均値)	p 値
5-アミノ吉草酸	4.546773772	<0.001
プトレシン	4.393218228	<0.001
ガラクトース	3.889750583	<0.001
N-アセチルノイラミニン酸	3.773089622	<0.001
N-アセチルグルコサミン	3.207629407	<0.001
カダベリン	2.786499499	<0.001
オルニチン	2.610991724	<0.001
ウロカニン酸	2.359991702	<0.001
ヒドロ桂皮酸	2.124889264	<0.001
4-ヒドロキシフェニル酢酸	1.856962328	<0.001
プロリン	1.727088486	<0.001
フコース	1.450792512	<0.001
リボース	1.356013054	<0.001
デオキシリボースリン酸	1.147965693	<0.001
リジン	1.081635722	<0.001

*全唾液群で純唾液群の2倍以上、かつその差が統計的に有意な代謝物を掲載

表 3-1 MSEA より純唾液群にて特徴づけられた代謝経路

純唾液群	
代謝経路名	p 値*
バリン/ロイシン/イソロイシン生合成	0.000281
タウリン/ハイポタウリン代謝	0.0048
アミノアシル-tRNA 生合成	0.00616
ガラクトース代謝	0.00739
プリン代謝	0.0306
アルギニン生合成	0.139
スクロース代謝	0.208
パントテン酸/CoA 生合成	0.226
フルクトース/マンノース代謝	0.244
グルタミン/グルタミン酸代謝	0.253
窒素代謝	0.253
チアミン代謝	0.288
バリン/ロイシン/イソロイシン分解	0.293
アスコルビン酸/アルダート代謝	0.322
カフェイン代謝	0.385
アラニン/アスパラギン酸/グルタミン酸代謝	0.386
グリシン/セリン/スレオニン代謝	0.469
システイン/メチオニン代謝	0.469
ペントース/グルクロン酸相互変換	0.584
セレン化合物代謝	0.623
一次胆汁酸生合成	0.651

グルタチオン代謝	0.746
ホスファチジルイノシトール シグナルシステム	0.746
イノシトールリン酸代謝	0.77
グリオキシレート/ジカルボキシオキシレート代謝	0.792
アミノ糖/ヌクレオチド糖代謝	0.837
ピリミジン代謝	0.853
ステロイド生合成	0.873
脂肪酸代謝	0.901
ステロイドホルモン生合成	0.986

*統計学的に有意に特徴づけられた代謝経路のセルを灰色で示す

表 3-2 MSEA より全唾液群にて特徴づけられた代謝経路

全唾液群	
代謝経路名	p 値*
グルタチオン代謝	0.0289
アルギニン/プロリン代謝	0.0507
アミノアシル-RNA 代謝	0.077
ビオチン代謝	0.0934
ペントースリン酸経路	0.195
リジン分解	0.218
ガラクトース代謝	0.234
アミノ糖/ヌクレオチド糖代謝	0.306

*統計学的に有意に特徴づけられた代謝経路のセルを灰色で示す

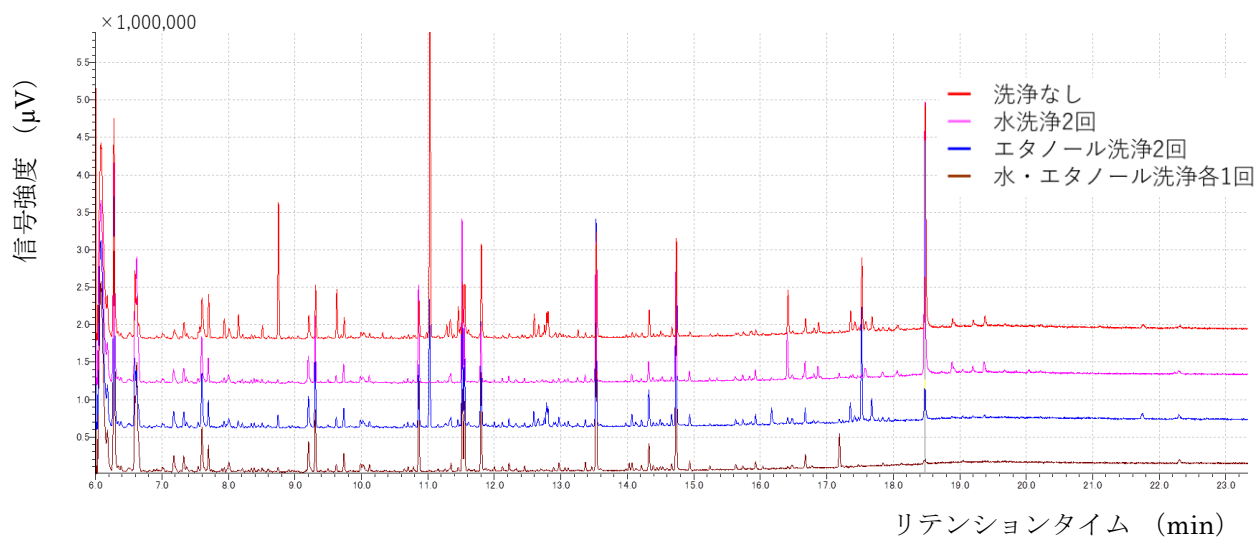


図1 担持媒体洗浄方法比較試験における代表的な TIC

唾液を吸収させていない状態での担持媒体の洗浄方法の比較を行った結果を示す。赤にて示したピークは洗浄を行っていない空白サンプル、ピンクは超純水にて2回洗浄、青は99.5%エタノールにて2回洗浄、茶色は水、99.5%エタノールの順に各1回洗浄を実施した空白サンプルの代表的な結果である。

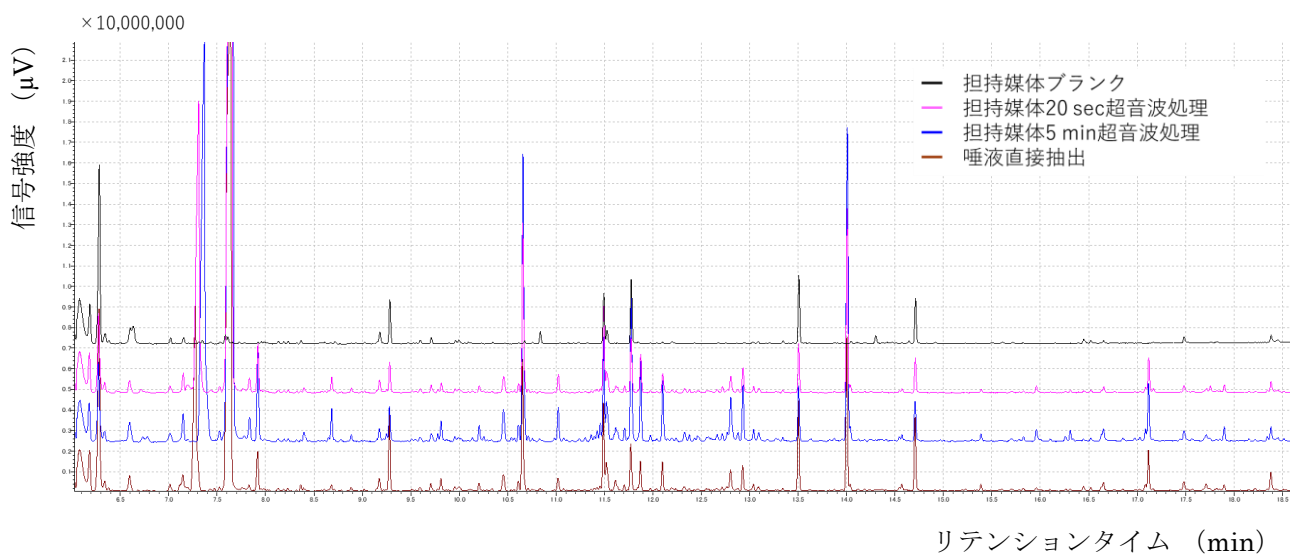


図2 担持媒体からの唾液溶出効率比較試験の代表的な TIC

唾液を吸収させた担持媒体からの代謝物抽出時に実施する超音波処理時間の比較の結果を示す。

黒にて示したピークは唾液を採取させていない担持媒体のみの空白サンプル，ピンクは全唾液を吸収させた担持媒体に 20 sec 超音波処理を行ったサンプル，青は全唾液を吸収させた担持媒体に 5 min 超音波処理を行ったサンプル，茶色は担持媒体を経由せず全唾液を直接抽出溶媒に添加し抽出したサンプルの代表的な結果である。

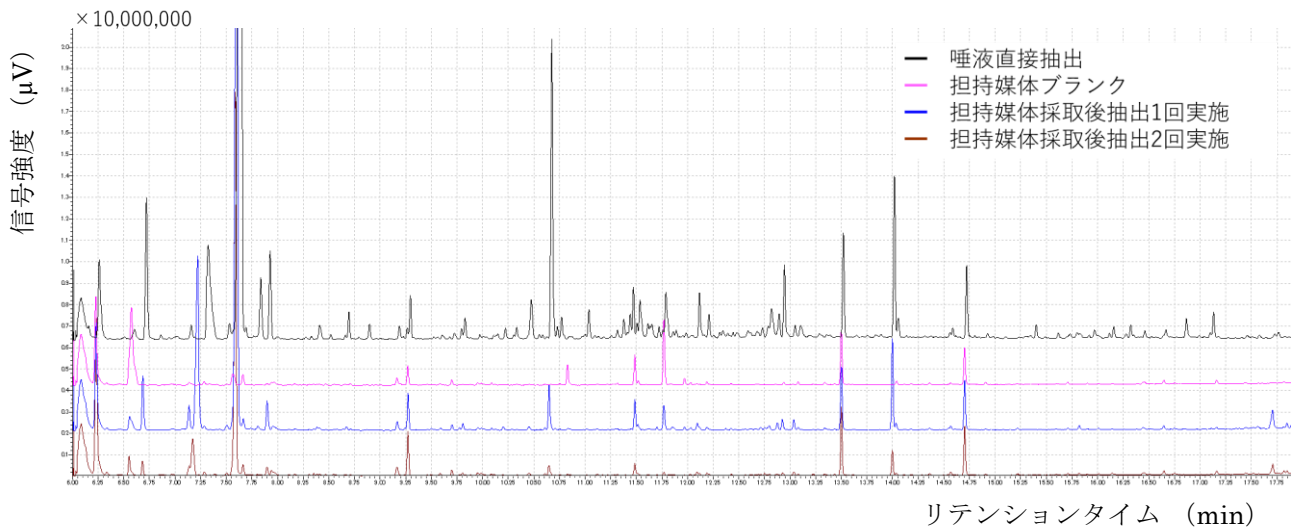


図3 担持媒体からの代謝物抽出工程の反復回数比較試験の代表的な TIC

抽出工程の反復回数を比較した結果を示す。黒にて示したピークは担持媒体を経由せず全唾液を直接抽出溶媒に添加し抽出したサンプル，ピンクは唾液を吸収させていない担持媒体のみのブランクサンプル，青は全唾液を吸収させた担持媒体に抽出工程を1回行ったサンプル，茶色は全唾液を吸収させた担持媒体に抽出工程を2回行ったサンプルの代表的な結果である。

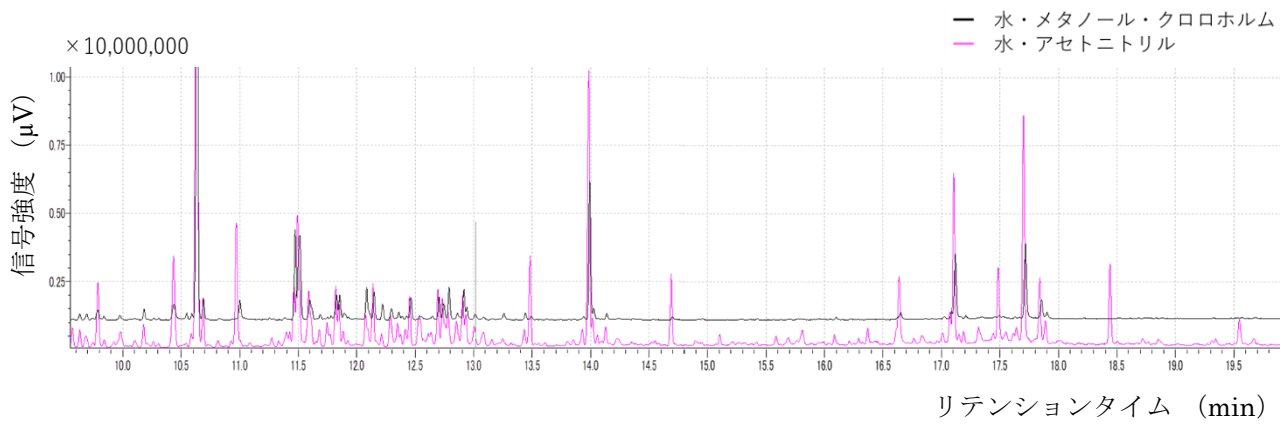


図 4 抽出溶媒比較試験の代表的な TIC

抽出溶媒用いられる水・メタノール・クロロホルム混合液と水・アセトニトリル混合液にて抽出された代謝物の数と量の比較を行った結果を示す。黒にて示したピークは水・メタノール・クロロホルム混合液、ピンクは水・アセトニトリル混合液を用いて担持媒体から全唾液代謝物を抽出した代表的な結果である。

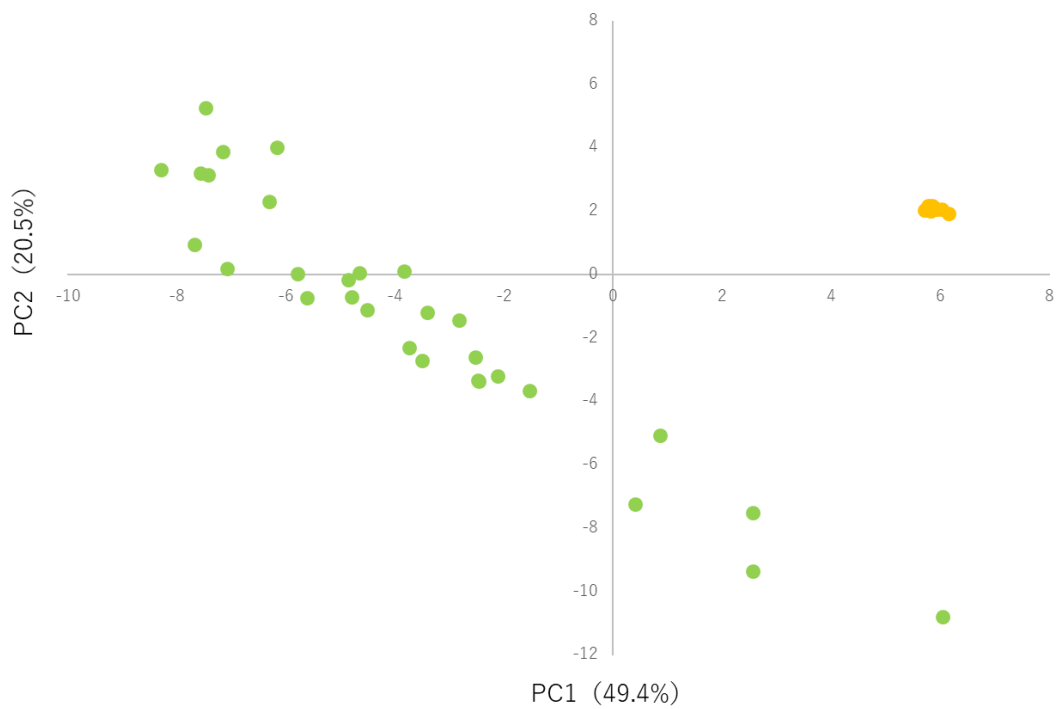
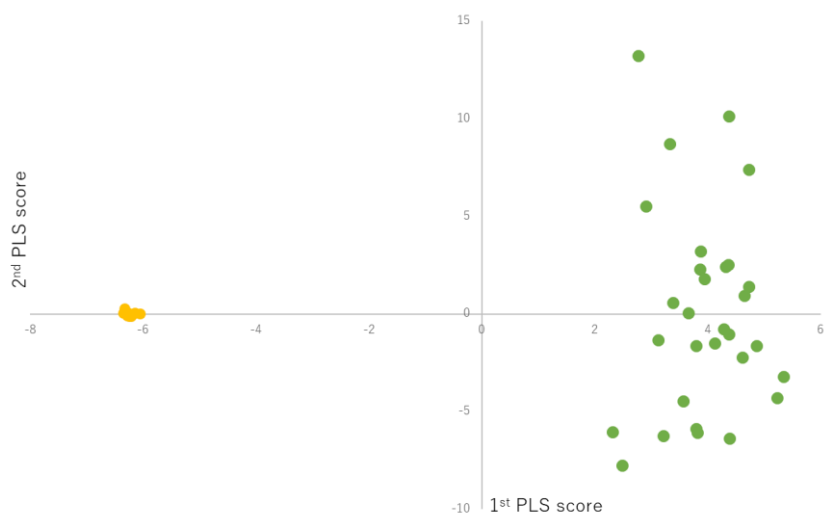


図5 純唾液群と全唾液群についてのPCA

第1主成分(PC1)と第2主成分(PC2)から成るPCAのScore Plotを示す。緑のプロットが純唾液群のサンプル、黄色が全唾液群のサンプルを示す。PCAは141個の代謝物量を変数とする多変量空間上のプロットに対し、その分散が最大となるよう、2次元平面へ投影した図とみることができる。

1) OPLS-DA Score Plot



2) OPLS-DA S-plot

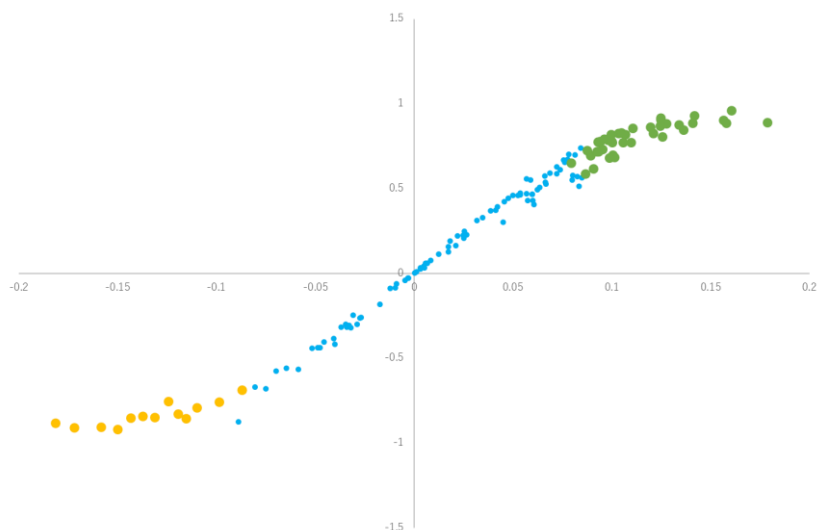


図 6 純唾液群と全唾液群についての OPLS-DA の Score Plot, S-plot

1) にて第 1 主成分 (1st PLS score) と第 2 主成分 (2nd PLS score) から成る OPLS-DA の Score Plot を示す。緑のプロットが純唾液群のサンプル, 黄色が全唾液群のサンプルを示す。2) にて 141 個の代謝物量を OPLS-DA の S-plot 上に示す。変数重要度を VIP 値が 1 以上で純唾液群に特徴的に検出される代謝物を緑色, 全唾液に特徴的に検出される代謝物を黄色, いずれにも当てはまらない代謝物を青色でプロットする。S-plot では, 縦軸の絶対値が大きいほど信頼性が高く, 横軸の正の値が大きいほど純唾液に多く含まれ, 負の値が大きいほど全唾液に多く含まれることを意味している。



図7 GCMS 分析にて抽出された代謝物の純唾液群と全唾液群の相対比を用いた Volcano Plot

141 個の代謝物の純唾液群と全唾液群の平均値の相対比の二進対数と p 値の常用対数を比較した。純唾液群が全唾液群の 2 倍以上かつ $p < 0.05$ の代謝物を緑色のプロット，全唾液群が純唾液群の 2 倍以上かつ $p < 0.05$ の代謝物を黄色のプロット，いずれにも当てはまらないその他の代謝物を青色のプロットにて示す。