

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593071

研究課題名(和文)唾液メタボローム解析による歯周病検出技術の確立

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of salivary metabolites of periodontal diseases

研究代表者

川村 浩樹(KAWAMURA, HIROKI)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：60256998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は口腔および全身性疾患を引き起こす可能性の報告があり、早期発見・治療が重要である。そこで唾液を用いた歯周病のスクリーニング方法の開発をめざし歯周病患者の唾液中の低分子の網羅的な解析を実施した。健康者と歯周病の唾液をキャピラリー電気泳動・質量分析装置(CE-MS)により代謝物を網羅的に解析した。その結果、アミノ酸などの代謝物質を同定・定量することができ、多変量解析の一つである主成分分析を行い特異的な代謝物プロファイル(代謝濃度パターン)を確認した。このパターンは歯周病の進行度と相関を示し、治療後に健康者に近いパターンに変化することも確認した。今後、実用化に向けたマーカーの探索・評価を行う。

研究成果の概要(英文)：Development of non-invasive screening method is importance to find out periodontal diseases at early stage. The purpose of this study was to analyze small molecules in saliva and to develop mathematical model to discriminate periodontal disease patients from healthy controls. We conducted comprehensive metabolomic analysis using capillary electrophoresis-mass spectrometry(CE-MS) that enables simultaneous profiling of charged metabolites. As a result, hundreds of charged molecules were identified and quantified in salivary samples. Multivariable analysis, using principal component analysis, revealed that the metabolite profiles showed clear correlation with the progress of periodontal diseases. The change of the profile after treatment was also reasonable. We would like to increase the number of samples to confirm the usability of these profiles to diagnosis of periodontal diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 唾液 メタボローム キャピラリー電気泳動・質量分析装置

1. 研究開始当初の背景

日本は「歯周病大国」と揶揄されるように、歯周病は成人の約80%と罹患者数が極めて多い。歯周病の悪化と共に歯を失うだけでなく、糖尿病などの全身性疾患のリスクを向上させる危険性があるが、初期段階では自覚症状がない事が、治療開始時期が遅くさせる原因になっている。このため早期発見と早期治療が患者のQOLを確保するだけでなく医療費を軽減させる観点でも重要である。既に実用化されている唾液を用いた簡易なスクリーニング方法があるが、既存の方法は感度も特異性も悪く、医療効率の改善につながるには程遠い。そこで今回の研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、低分子の網羅的な解析が可能なメタボローム解析技術を用いて、唾液中の代謝プロファイルを安定して採取・測定する方法の確立を目的とする。実験対象被験者に対し、問診、口腔内診査、歯周組織検査、唾液採取を行い、収集された唾液試料のメタボローム測定を行い、歯周病によって唾液中に含まれる低分子プロファイルがどのように変化するかを明らかにする。代謝プロファイルの統計解析を行うことにより、歯周病以外での変動要因を特定し、これらの影響を考慮した上での歯周病の影響を調べる。更にそれを基に、高精度に歯周病を検知する代謝プロファイルの取得と、数理モデルの開発、更にそのモデルを既存の検査方法との比較や、様々な口腔内条件での試験を行い、評価試験の実施を行い、歯周病の簡易で高精度なスクリーニング技術の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

日本歯科大学生命歯学部附属病院総合診療科及び日本医科大学千葉北総病院歯科に来院した、健常者と歯周炎(軽度歯周炎・限局性中等度歯周炎・広汎性中等度歯周炎・広汎性重度歯周炎)の患者を対象とした。

初診時、実験対象被験者に対し、問診、口腔内診査、歯周組織検査を行った。初診時、初期治療終了時に採取した合計 84 検体の唾液をキャピラリー電気泳動・質量分析装置(CE-MS)により、水溶性の代謝物を網羅的に解析した。特に特に飛行時間型(TOF)MSを用いることで幅広く様々な物質の定量を行った。

(2) 唾液採取のプロトコール

唾液試料採取は以下のプロトコールにて実施する。

食後 2 時間以降たった方からのみ唾液試料提供対象者とする。

唾液試料採取 1 時間前から、水以外の飲食、口腔内の手入れ(歯磨きなど)を控えてもらう。

採取前に水で口腔内をゆすぐ。

無糖ガムを被験者に 5 分間かませながら、スピッツにためる

資料の採取はスピッツを氷上において行い、極力低温に保つ。3ml 程度集まれば終了。量よりも 15 分以内に終わらせることを優先する。

採取後、1ml をエッペンドルフチューブに移し、即座に(5 分以内に)マイナス 80 度の冷凍庫またはドライアイス入りの発泡スチロールの箱で凍結する。

残存した唾液は、サリバスター潜血用キットに垂らし、遊離 Hb の有無を調べる。適応症例は、年齢 20 才~80 才とする。問診内容は、喫煙の有無、飲酒の有無、服用剤等とする。

唾液採取を行い、収集された唾液試料のメタボローム測定を行い、歯周病によって唾液中に含まれる低分子プロファイルがどのように変化するかを明らかにする。問診や各種検査項目と、代謝プロファイルの統計解析を行うことにより、歯周病以外での変動要因を特定し、これらの影響を考慮した上での歯周病の影響を調べる。また、本研究にて歯周病によって変動する物質を同定した場合、将来的には抗体や電気泳動チップなど簡易に低コストで測定する方法の開発を行うことが想定される。これを見据えて、できるだけ高濃度で少数の分子の組み合わせで、感度と特異性が高いクラス分類ができるモデルの作成を行う。

(3) メタボローム測定方法

研究デザイン

本研究は、探索フェーズ、検証フェーズの 2 段階で歯周病によって変動する唾液中の代謝物質を調査する。

探索フェーズ：メタボロームの測定は網羅性の高い方法を用いて、できるだけ多くの物質をプロファイリングする。歯周病の進行度に応じて上昇、低下のある物質を統計的に選別する。また多変量解析や、機械学習的な手法を用いて複数物質で進行度を見分けられる分子セットを選定とモデルの開発を行う。本フェーズで得られたデータ内で、感度や特異度とともに、汎用性の検証を行う。

検証フェーズ：探索フェーズで開発したモデルの汎用性を本フェーズで評価する。

メタボロームの測定は探索フェーズと同様に網羅性の高い方法を用いた測定と並行して、特定の分子だけを高精度に検出することができる方法も同時に行い、それぞれの測定結果を用いて、モデルの動作範囲(測定データの許容誤差)を評価する。

同一人物にて、異なる採取条件で唾液(例えば、午前と午後で時間を変えた唾液や、食後

の経過時間の異なる唾液を収集する)を採取し、採取条件とモデルの動作範囲の評価を行う。

同一人物にて、治療前後の唾液、治療後の経過観察の唾液を採取し、臨床評価とモデルの予測の変化が一致するかを調べる。

凍結された唾液を解凍し、限外濾過フィルターを用いて遠心し、たんぱく質などの3kDa以上の大きな分子は除く。その後、測定装置の感度を補正するために内部標準物質(Methionine Sulfone など)を添加し、測定を行う。

探索フェーズでは、特定の分子へのターゲットを絞らず、測定機器で検出可能な全ての物質を解析対象とする。検出装置には質量分析装置(MS)を用いる。MSの前段に、キャピラリー電気泳動(Capillary electrophoresis; CE)分離装置を組み合わせ(CE-MS)、分子をイオン性や分子サイズの違いを用いて分離する。

(4) データ解析

統計解析は、健常群と歯周病全体の2群の比較、また、歯周病の進行度(軽度・中度・高度)と健常群の個別の多群に分けて検定を行う。更に詳細な解析を行うために、広範性中等度と高度、限局性中等度などに細かい分類も行った。個々の物質の挙動は様々な変動を示す可能性が考えられたため、多変量解析の一つである主成分分析を用いて、測定できた代謝物全体の濃度のパターンでの比較を行った。ただし、少数検体でしか検出できないノイズと考えられるような代謝物を解析対象とすると、本来調べたい全体的な挙動が見られなくなることが懸念されたので、50%以上の検体で定量限界値以下の濃度で検出できた物質だけを対象として、データ解析を実施した。

(5) 実施場所

日本歯科大学附属病院総合診療科

日本歯科大学附属病院口腔外科

日本医科大学千葉北総病院歯科

(6) 期間

研究期間は、平成23年8月22日～平成26年3月31日までとする。

(7) 倫理的配慮

本研究への参加、不参加は本人の自由意思であり、不参加であっても一切不利益を受けることはない。被験者募集の際には、その旨を伝え、研究参加を強制しないよう配慮する。

調査途中での不参加もこれによる一切の不利益を受けることはない。被験者には研究に関する情報、目的、方法などを口頭で説明するとともに、説明文を加えた同意書(添付書類)を渡す。採取した試料、データ、ファイルは対応表を残さないCode化を行い、患者名とIDとの関連は採取した機関内にて保存し、インターネットやLANに接続可能なパソコンには保存しない。これらの対策により、被験者の個人情報の漏洩を防止する。

また、本人からデータの開示要求があった場合、本人に問診票、検査した生化学項目、メタボローム解析結果を開示する。本人から廃棄要求があった場合は上記項目を廃棄する。

4. 研究成果

測定したアミノ酸、ペプチド、解糖系など一次代謝物質約200物質を同定・定量することができ、この中で多くの検体で検出できている信頼できる119ピークを用いて、主成分分析などの多変量分析を行い、歯周病に特異的な代謝物プロファイル(代謝濃度パターン)を確認することができた。

唾液のメタボローム解析により歯周病の進行度に伴う唾液中の低分子のパターンの違いを明らかにすることができた。特に進行に伴って明確に増加・低下を示す物質が多く、酸化ストレスに関連した物質(グルタチオンやヒポキサンチン)の変化も見られた。一方、年齢の違いや食事の影響は、進行度に比べれば影響は小さい結果であった。更に治療前後の比較により、唾液中代謝物のパターンが健常者のパターンに近づいていくことも確認できた。

今後は同一患者から唾液サンプルを収集し継続的な変化を調べ、また少数の分子だけで疾患群を見分ける感度・特異度の評価を実施し、実用化に向けたマーカーの探索・評価を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

歯周病患者の唾液中低分子の網羅的解析

川村浩樹, 杉本昌宏, 鴨井久博, 小倉喜一郎,

熊澤康雄, 鴨井久一

第58回日本歯周病学会学術大会

平成27年5月15日,千葉

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：
取得状況（計0件）
名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川村浩樹（KAWAMURA, Hiroki）
日本歯科大学生命歯学部・総合診療科・
准教授
研究者番号：60256998

(2) 研究分担者

杉本昌宏（SUGIMOTO, Masahiro）
慶應義塾大学大学院・政策メディア研究
科・特任准教授
研究者番号：30458963

鴨井久博（KAMOI, Hisahiro）
日本医科大学・千葉北総病院歯科・教授
研究者番号：20297972

(3) 連携研究者

（ ）
研究者番号：