

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619002

研究課題名(和文) マルチターン飛行時間型質量分析計によるオンサイト歯周病態解析

研究課題名(英文) On-site diagnosis of periodontal disease by the multi-turn TOF mass spectrometer

研究代表者

豊田 岐聡 (Toyoda, Michisato)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80283828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：提案者らがこれまでに開発してきた、小型でありながら高い質量分解能を得ることができるマルチターン飛行時間型質量分析計を用いて、歯肉溝滲出液中の代謝物を網羅的に解析することで、歯周病の疾病活動性や病態をチェアサイドで迅速かつ簡便に評価できる臨床診断法を確立することを目指して研究を行った。歯周病の程度を顕著にあらわす代謝物マーカーを19種類同定することに成功し、これらの代謝物の量の変化を測定することで、歯周病の診断を行えることを示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the usefulness of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) in metabolomic analysis of gingival crevicular fluid (GCF) in order to objectively diagnose periodontitis at a molecular level. Nineteen metabolites were identified using GC/MS. Total ion current chromatograms showed broad differences in metabolite peak patterns between GCF samples obtained from healthy sites, moderate-pocket sites, and deep-pocket sites. The intensity difference of some metabolites was significant at sites with deep pockets compared to healthy sites. Principal component analysis confirmed these observations by clearly delineating healthy sites and sites with deep pockets. These results suggest that metabolomic analysis of GCF is useful for discovery of potential biomarkers in establishing a new diagnostic method for periodontitis.

研究分野：質量分析学

キーワード：メタボロミクス 歯周病診断 オンサイトマススペクトロメトリー

1. 研究開始当初の背景

豊田らは、1990年代後半から、小型でありながら非常に高い質量分解能が得られる「マルチターン飛行時間型質量分析計(MULTUM)」を開発してきた。飛行時間型質量分析計の質量分解能は、飛行距離に比例するため、扇形電場で形状の閉軌道を作りイオンを多重周回させることで、飛行距離をかせいでいる。小型でありながら、飛行時間型質量分析計としては世界最高の分解能35万を達成している技術である。この装置は40cm×40cmと小型でありながら一般的に市販されている装置より一桁以上高い分解能を得ることができている。つづいてJST大学発ベンチャー創出プロジェクトでは、さらに半分サイズの小型装置「MULTUM-S II」を開発した。この装置は、制御系、真空ポンプ込みで50cm×60cm×30cm、35kg程度と、携帯も可能なサイズでありながら大型機に匹敵する高分解能を得ることが可能である。この装置は、電子イオン化(EI)イオン源を有しており、質量分解能は3万以上を達成している。豊田は、この装置は、その特徴を活かして、オンサイト(現場)での迅速分析に用いてこそ意味があると考えている。例えば、医療診断や環境モニタリングなど、これまでの質量分析計では活躍できなかった分野である。オンサイト分析では、十分な前処理などを行なえないため、夾雑物が多い環境であり、MULTUMの高精度質量分解能は夾雑物と目的物質を分離して検出できるというメリットがある。本研究は、これまでに構築した技術をさらに発展させ、オンサイトでの迅速診断が望まれている歯周病の診断に活用するための要素技術構築を行なおうとするものである。

歯周病は、細菌性バイオフィームに対する生体応答を主因として惹起される疾患で、歯を失う第一原因となっている。また、糖尿病などの多くの全身疾患のリスク因子となることも疫学的研究によって示されている。しかしながら、現状では、歯周病の診断は、歯科で歯周ポケットの深さを計測して判定するにとどまっており、疾病活動性や病態をオンサイト(チェアサイド)で評価する臨床診断法はいまだ確立されていない。さらに歯周病が全身疾患に影響を与える機序も不明であることから、患者を診察中にチェアサイドで迅速に診断結果を出せるような、新規診断法の確立が望まれている。これまでに村上らは、歯周組織中や歯肉溝滲出液中に歯周病の病態により増減するサイトカインタンパク質やmRNAが存在することを示している。しかしながら、歯肉溝滲出液は多く取れても10uLと微量であり、これまでの研究ではmRNAを抽出し、半定量性RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)法を応用して、サイトカインmRNAの増減量を検出している。この方法は、多大な時間と手間を要し、歯周病の迅速診断には向かない。

そこで我々は、近年、癌などのバイオマーカー検出に用いられている質量分析による歯周病診断の検討を行うこととした。質量分析を用いた場合の対象分子は、タンパク質や代謝物である。歯周病についてもサイトカインなどのタンパク質を、そのまま分析できれば、診断できる可能性はある。このようなタンパク質の直接分析を試してみる価値はあるが、歯肉溝滲出液10uL中に含まれるタンパク質の量は極微量であり、検出は難しいと考えられる。一方、代謝物の網羅的解析による診断は、血清や唾液を試料に行なわれるようになってきている。例えば、神戸大の吉田らは、血清中のアミノ酸や脂肪酸などの代謝物をGC/MS(ガスクロマトグラフィー質量分析)で網羅的に解析し、膵臓癌の進行状況と相関が見られることを報告している。我々は、微量の歯肉溝滲出液中でも、代謝物であればGC/MSで検出可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究において、歯周病の代謝物マーカーの特定と、オンサイトでの分析手法の確立を目指す。本研究では、まず健康者ならびに歯周病患者の歯肉溝滲出液中に含まれる代謝物を、血清で行なわれている方法と同様な手法で、既存のGC/MSを用いて測定し、歯周病態を表すバイオマーカーが存在するかどうかを探索する。少なくとも炎症由来の生理活性物が複数見られ、炎症の度合いを反映することが予想される。

特異的なマーカーが見つければ、次にオンサイトで迅速分析を行なうことができる手法の確立を行なう。オンサイトに持ち込むためには、素人でも簡単に測定できることが必要である。まずはMULTUMの高精度質量分解能を活かして、前処理/精製/ガスクロマトグラフィーの過程を大幅に簡略化することを目指す。例えば、ポリ塩化ビフェニル(PCB)の測定では、低分解能質量分析計を用いる場合、前処理やクロマトグラフィーで夾雑物を分離しなければならぬため煩雑な前処理過程が求められるが、高精度質量分析計の場合は、溶媒で希釈するだけで測定が可能である。同様にMULTUMを用いることで簡略化は可能と考えられるので、固相マイクロ抽出(SPME)などを駆使し、歯肉溝滲出液を2、3ステップの処理で質量分析装置に持ち込めるような手法を開発する。さらに、歯肉溝滲出液の採取は歯科医師が注意深く行なわなければならない。そこで、濾紙のようなものを歯周ポケットにあてて採取するなど、簡単に採取できるようなサンプリング手法についても検討する。併行して、データ解析手法や、質量分析の素人でも扱えるような自動分析のためのソフトウェアの構築も行なう。

ここまでの診断法が構築できれば、多くの検体についてのデータ取得が可能となり、歯周病の疾病活動性や病態、さらには全身疾患と

の関係などについての知見を得ることが可能となる。本研究では、診断システムを構築し、このような知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 歯肉溝滲出液中の代謝物を網羅的に解析

健康者の歯肉溝滲出液中の代謝物の測定
まずは、歯肉溝滲出液中の代謝物を GC/MS で分析するための手法の確立を、健康者の歯肉溝滲出液を用いて行う。健康者ボランティア数名の歯肉溝滲出液を採取し、溶媒で希釈後、水溶性の代謝物を抽出する。抽出した代謝物は、遠心濃縮機、凍結乾燥機で乾燥し、ガスクロマトグラフィーのための誘導体化を行って、GC/MS で代謝物の網羅的分析を行う。ここで最適な抽出方法や測定条件などを確立する。

歯周病患者の歯肉溝滲出液中の代謝物の測定

歯周病のマーカーとなる代謝物を特定する。同程度の病態の歯周病患者の歯肉溝滲出液を採取し、健康者の場合で確立した方法で処理後に GC/MS で代謝物の網羅的分析を行う。メタボロミクス手法ののっとり、多変量解析などのデータ解析を行い、歯周病に特異的なマーカーを特定する。さらにさまざまな程度の病態の患者についても解析し、程度の違いを識別できるかを検討する。

(2) チェアサイドでの分析のためのサンプリング/前処理/ソフトウェアの検討

サンプリング/前処理の検討

チェアサイドでの分析は、質量分析の専門家ではない素人でも簡便に測定できることが必要である。まずは MULTUM の高分解能を活かして、前処理/精製/ガスクロマトグラフィーの過程を大幅に簡略化することを目指す。近年、固相マイクロ抽出 (SPME) などによる簡便な前処理法が広く用いられるようになってきている。既存の技術や新たな抽出・濃縮技術を用いて、歯肉溝滲出液を 2, 3 ステップの簡便な処理で質量分析装置に持ち込める手法を開発する。また、前処理とともに、測定に時間を要するガスクロマトグラフィーも、MULTUM の高い質量分解能を活かせば、完全にクロマトグラム上で分離している必要がないため、極力短いカラムを用いて保持時間を短くするなどの検討をする。

システム/ソフトウェアの検討

チェアサイドでの分析では、質量分析の専門家ではない歯科医師などが、試料をセットすれば、複雑な設定など無しに、自動的に解析をするようなシステムを構築する必要がある。MULTUM-S II のシステムは、開発当初からこのようなオンサイトでの利用を視野に入れてあるが、データ解析部も含め歯周病診断に適したシステムの構築を行う。

4. 研究成果

(1) 歯肉溝滲出液中の代謝物を網羅的に解析
歯肉溝滲出液の測定を試みたところ、0.2 μ L 程度のサンプル量で十分に代謝物を検出できることが分かった。そこで、健康者 30 名と歯周病患者 4 名の歯肉溝滲出液の測定を行って見たところ、図 1 のトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラムに示すように、健康者 (A) と歯周病患者の程度の軽い歯 (B) 程度の重い歯 (C) では、検出される代謝物の量に違いがあることが分かった。

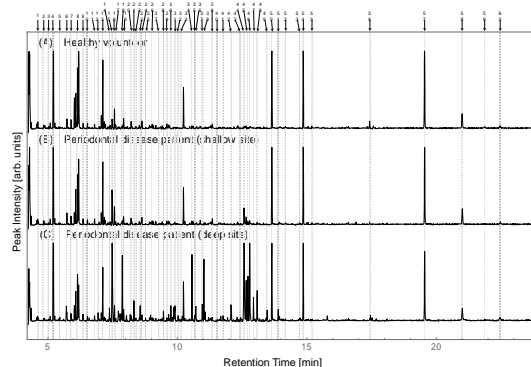


図 1 歯肉溝滲出液を分析したトータルイオンカレントクロマトグラム。(A)健康者、(B)歯周病の程度の軽い歯、(C)程度の重い歯から採取したもの。

そこで、これらのデータを元に、主成分解析を行って見たところ、健康者と歯周病患者で分布が大きく異なることが分かったため、患者 16 名と健康者 14 名のデータを新たに測定し、解析を行った。図 2 に主成分解析を行った結果を示す。

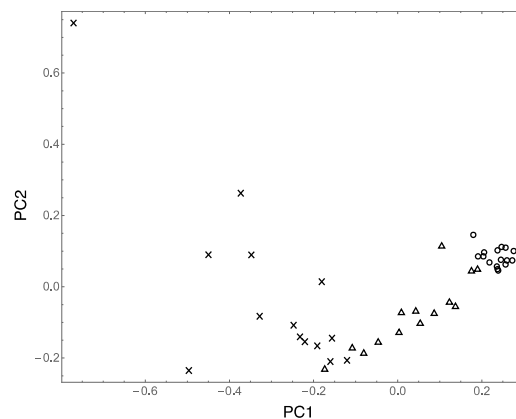


図 2 主成分解析した結果。○が健康者、△が患者の程度の軽い歯、x が程度の重い歯から採取したもの。

この結果は、健康者と歯周病の程度が重い歯から採取したサンプルでは、大きく分布が異なり、その間に程度の軽い歯からのサンプルのデータが分布しており、この手法で歯周病の診断が可能であることを示している。図示しないが歯周ポケットの深さ (PD) との相関も見られている。

次に、歯周病診断において貢献度の高い代謝物質の同定を行ったところ、図 3 の 20 種類

が同定できた。これらの歯周病の程度との関係を見ると、歯周病になると急激に増加するもの、歯周病の程度に応じて増加するものなどが見られ、歯周病の程度の診断が可能であることを示している。

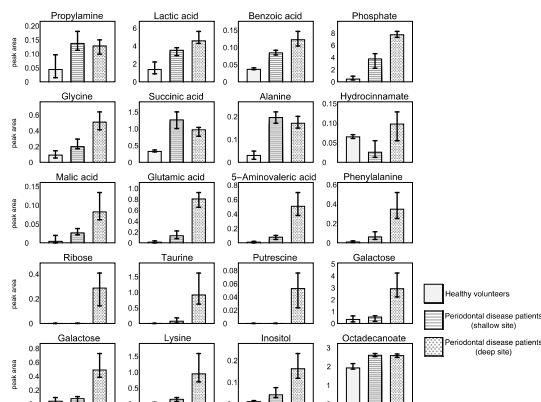


図 3 同定された代謝物の歯周病の程度による量の違い

(2) チェアサイドでの分析のためのサンプリング/前処理/ソフトウェアの検討

歯科医師が歯肉溝滲出液をサンプリングする方法として、当初ガラスキャピラリーを用いることを考えたが、サンプリングが困難かつ時間も要するため患者に対する負担が大きい。そこでもっと簡単な方法として、ろ紙のようなペリオペーパーを用いる方法を考えた。ペリオペーパーは、歯と歯茎の間にろ紙を差しこむことで採取でき、簡便かつ他の部位からの混入も考慮しなくてよい。しかし採取量が 0.2 μ L 未満と微量で、かつろ紙からの抽出が必要になる。0.2 μ L で代謝物の網羅的な検出が可能かどうか調べたところ、問題なく測定ができ、診断が可能であることを示せた。これにより歯肉溝滲出液の採取が非常に容易になった。

また、簡便な前処理法として固相抽出を用いた方法を試してみたが、現時点では診断の対象となる代謝物を落とすこと無く網羅的に抽出できる方法は見いだせていない。また、簡便な前処理でイオン化出来る方法として、DART (direct analysis in real time) を試みた。対象代謝物をイオン化することは出来ているが、診断のための定量的な議論などでは、まだ今後の検討が必要である。ソフトウェアに関しては、簡単な操作で対象物の定量測定を行うための機能を実装した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

豊田 岐聡, 新聞 秀一, 青木 順, 石原 盛男, マルチターン飛行時間型質量分析計, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 査読有, **60** 巻, 2012, 87-102.
DOI: 10.5702/massspec.12-47

[学会発表] (計 6 件)

尾関 美穂, 馬場 健史, 新聞 秀一, 野崎 剛

徳, 村上 伸也, 豊田 岐聡: 小型マルチターン飛行時間型質量分析計による歯肉溝滲出液の分析, 第 61 回質量分析総合討論会, 2013 年 9 月 10 日, つくば国際会議場 (つくば市, 茨城県)

尾関 美穂, 馬場 健史, 新聞 秀一, 野崎 剛 徳, 村上 伸也, 豊田 岐聡: 歯周病オンサイト診断に向けた歯肉溝滲出液の分析, 大阪大学未来研究イニシアティブ講演会, 2014 年 3 月 18 日, 大阪大学 (豊中市, 大阪府)

尾関 美穂, 馬場 健史, 新聞 秀一, 野崎 剛 徳, 村上 伸也, 豊田 岐聡: 小型マルチターン飛行時間型質量分析計による歯肉溝滲出液の分析, 第 62 回質量分析総合討論会, 2014 年 5 月 15 日, ホテル阪急エキスポパーク (吹田市, 大阪府)

Miho Ozeki, Jun Aoki, Takeshi Bamba, Shuichi Shimma, Takenori Nozaki, Shinya Murakami, Michisato Toyoda: Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using GC/MS, 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014 年 8 月 27 日, Centre International de Congrès Genève, Genève, Switzerland

豊田 岐聡, オンサイトマススペクトロメトリーが切り拓く新しい医療診断, JASIS2014 先端診断イノベーションゾーン, 2014 年 9 月 4 日, 幕張メッセ (千葉市, 千葉県)

Michisato Toyoda, Development of High Resolution Multi-turn Time-of-Flight Mass Spectrometer, PITCON 2015, 2015 年 3 月 9 日, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, LA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 岐聡 (TOYODA, Michisato)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 80283828

(2) 研究分担者

村上 伸也 (MURAKAMI, Shinya)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 70239490

馬場 健史 (BAMBA, Takeshi)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 10432444

新聞 秀一 (SHIMMA, Shuichi)
国立がん研究センター・研究員
研究者番号: 30515896