

## 唾液から見える全身の代謝

杉本昌弘\*

東京医科大学医学総合研究所  
慶應義塾大学先端生命科学研究所

Saliva reflects systemic metabolism

Masahiro SUGIMOTO

Institute of Medical Sciences, Tokyo Medical University  
Institute for Advanced Biosciences, Keio University

## Abstract

Saliva often reflects the status in the oral cavity but also systemic health. For instance, the volume of saliva secretion and its hormones have been used as indicators of stress and immunity. Recently, noninvasive saliva-based tests have become increasingly common. Metabolome technologies have enabled us the simultaneous identification and quantification of the metabolite profiles (the concentration patterns of hundreds of metabolites) and are used as biomarker discovery in saliva samples. Cancer is one of the metabolic diseases, and metabolite biomarkers for cancer diagnosis have been intensively explored. We found salivary metabolite biomarkers to detect patients with oral, breast, colon, and pancreatic cancers. Machine learning has been utilized to realize higher accuracy by combining multiple markers. In addition, standard operating procedures, including preconditioning, collection, storage, processing, measurement, and data analysis, have been established to obtain reproducible quantified levels. Salivary metabolomics is one of the liquid biopsies that detect metabolic abnormalities.

\* 責任著者連絡先：東京医科大学医学総合研究所  
〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1  
杉本昌弘  
e-mail: mshrgmt@gmail.com

## 1. はじめに

「唾液は体の鏡である」さまざまな唾液検査を開発してきた UCLA 大学 David T. Wong 博士が論文や学会で唾液を説明するときに使うフレーズである<sup>1)</sup>。唾液は口腔内あるいは唾液腺の状態を反映するだけでなく、全身性のさまざまな状態を反映するという意味である。例えばストレスに関連するコルチゾールや免疫に関連する s-IgA などのホルモン類が唾液中において変動することが知られている。一方、近年の網羅的な分子測定技術（オミックス解析技術）の発展により、唾液中の数百～数千に及ぶ多数の分子を一斉に同定・

定量し、生体内のさまざまな疾病状態との関連を示す分子または分子の濃度パターン（プロファイル）を調べることが盛んに行われるようになってきた。その中でも、唾液中の分子成分と全身性の疾患との関連性の調査も頻繁に行われている。さまざまな分子の中でも代謝物を一斉に測定する技術をメタボローム解析技術（またはメタボロミクス解析技術）と呼ぶ。本技術を用いて口腔がんだけでなく、口腔領域から離れた臓器のがんも検出するマーカーの研究例も多い。本稿では、これらの解析技術と、がんの唾液中マーカー探索を中心とした研究事例を紹介する。

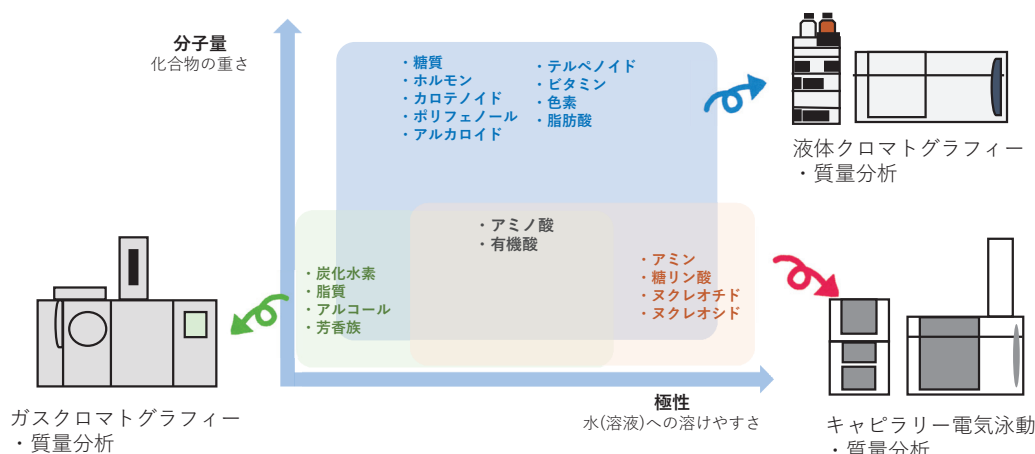


図1 メタボローム分野で利用される質量分析装置による測定方法

ガスクロマトグラフィー・質量分析装置、液体クロマトグラフィー・質量分析、キャピラリー電気泳動・質量分析装置に関して、それぞれの方法が測定を得意とする分子量と極性の関係

## 2. オミックス解析技術と唾液検査

オミックス解析技術はDNA情報を解読するゲノミクス、mRNAの発現情報を一斉分析するトランスクリプトミクス、タンパク質を一斉定量するプロテオーム等がある。これらの技術を用いれば生体中の試料に含まれる多数の分子を一斉に分析することができる。例えば血中を流れる circulating tumor や cell-free DNA もこのような技術を用いて解析された例であり、再発や治療効果のモニタリングとして利用されている。近年では、DNAのメチル化や、がん細胞から特異的に分泌されるエクソソームの中に含まれる物質等も網羅的に分析し、がん患者で特異的にみられる変化を探索している例が多い。

唾液もコルチゾールやs-IgAのようなストレス性ホルモンの検査に利用されている。欧米では、歯科領域で全身性疾患のリスクを評価して早期介入を行う仕組みを作ることを目指し、新しい唾液検査の開発が積極的である。ここでもオミックス解析技術を用いて唾液中のさまざまな分子を一斉に分析し、歯周病や口腔がんなどの口腔内疾患のマーカーを探索する研究が多数行われている<sup>2)</sup>。口腔がんでは、mRNAをトランスクリプトーム、タンパク質をプロテオーム解析などの技術で一斉測定し、複数の分子を機械学習等で組み合わせてがん患者を健常者から識別する研究例が多い<sup>3-5)</sup>。また、乳がんやすい臓がんなどの口腔疾患から遠い臓器でのがんでも同様に唾液によるマーカー探索が行われている<sup>6,7)</sup>。

## 3. メタボローム解析

メタボローム解析とは、代謝物(メタボライト)を網羅的に測定する技術である。代謝物はヒトの生体内

には3,000種類程度あると言われており、アミノ酸、有機酸、核酸、脂質などさまざまな分子が含まれている。メタボローム解析の問題点としては、単一の測定方法でこれらの分子を一斉に解析はできず、一部の分子のみが解析対象となることである。このため、複数の装置を組み合わせて測定できる分子の対象を広げることが必要となる。

## 4. 測定機器

メタボローム解析で最も広く利用されている測定器は核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance; NMR)であり、測定サンプルを非破壊的に測定できることが特徴である。しかし、NMRの測定感度は低く、試料内に高濃度で含まれる物質しか検出できない課題がある。

他の測定方法では、質量分析装置(Mass spectrometry; MS)が広く使われている。測定対象の試料に対して破壊的な処理が必要ではあるが、高感度な測定が可能という特徴がある。また、MSの前には分子の分離装置をつけてあらかじめ化学的な特徴で分離してからMSで測定することが一般的である。このため、分離装置とMSを連結して、ガスクロマトグラフィー・質量分析装置(gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS)<sup>8)</sup>、液体クロマトグラフィー・質量分析装置(Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS)<sup>9)</sup>、キャピラリー電気泳動・質量分析装置(capillary electrophoresis; CE-MS)<sup>10)</sup>などが広く利用されている。

それぞれの分離装置ごとに、測定が得意な分子が異なる(図1)。例えば、GC-MSは揮発性物質を分離することができる。つまり匂いに関係する物質の測定が

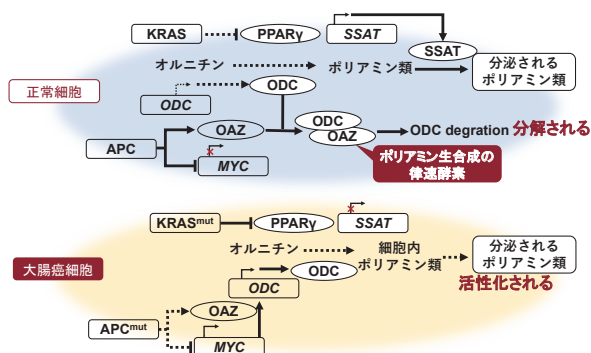


図2 正常細胞とがん細胞におけるポリアミン代謝の違い  
尿素回路のオルニチンから細胞内のポリアミンができる仕組み

可能である。揮発しない物質も分子の誘導体化の処理をすることで分離が可能であり、アミノ酸や有機酸をはじめ、幅広い物質の測定が可能である。LC-MSは溶媒に溶ける代謝物を幅広く測定することができる。脂溶性の物質等も測定が可能であるが、前処理やLCカラムを測定対象ごとに最適化する必要がある。CE-MSはイオン性分子を陽イオンと陰イオンの2回の測定で幅広い分子の測定ができる。アミノ酸や有機酸に加え、解糖系、TCA回路、核酸など一次代謝の一斉分析が可能である。

### 5. メタボローム解析を用いた唾液中分子マーカーの探索

メタボローム解析を用いて唾液中の代謝物を一斉分析し、歯周病疾患のマーカーを探索した例は数多くある<sup>11)</sup>。唾液だけでなく、歯肉浸出液も解析され、歯周病の進行にあわせてプリン体代謝の分解物が蓄積し、酸化ストレスの上昇が見られたと報告がある<sup>12)</sup>。唾液中では歯周病の進行に合わせてアミノ酸とペプチド類が上昇することから、タンパク質の分解が促進している可能性が高いと報告されている<sup>13)</sup>。唾液から口腔がんを検出するマーカー探索の研究例も多くあり<sup>14-19)</sup>、白板症と口腔扁平苔癬を識別するマーカー等も報告されている<sup>20,21)</sup>。

### 6. がんにみられる代謝異常

われわれは唾液の代謝マーカーを探索する前に、がん組織部で起きている代謝異常を調べてきた。個人差をなくすために、がん組織と近傍の健常組織を採取し、その差分を解析してきた。例えば大腸がんでは、200症例を超えるデータを進行度に沿って並べると、進行度による変化は相対的に少なく、むしろ健常組織とアデノーマの違いが最も大きい結果であった<sup>22)</sup>。同一検体でトランスクリプトーム解析を実施し、代謝酵素の遺伝子発現プロファイリングもデータと同様の変化

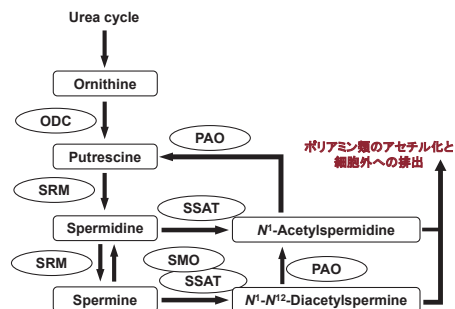


図3 がん細胞におけるポリアミン代謝のアセチル化の仕組み  
プトレシン、スペルミジン、スペルミン等のポリアミンの合成経路と、SSATによるアセチル化の代謝経路

を示した。がん促進遺伝子であるMYCがアデノーマの時点で変異を起こし、これらがアデノーマやがんでの代謝異常のドライバーになっていることを突き止めた。

MYC遺伝子の下流でアデノーマやがんでは活性化が起きる酵素に、尿素回路中の代謝物であるオルニチンからポリアミンを合成する尿素回路のオルニチン脱炭酸酵素 (ornithine decarboxylate; ODC) も含まれ、アデノーマの時点で細胞内にはポリアミンが過剰な状態になり、更に周辺組織や血中へ分泌される<sup>23)</sup> (図2)。がん細胞ではスペルミジン / スペルミン  $N^1$ -アセチルトランスフェラーゼ (SSAT) も活性化し、アセチル化したポリアミン類が体液中に高濃度になる報告が多数ある<sup>24)</sup> (図3)。

ポリアミンの中でも特に  $N^1$ ,  $N^{12}$ -ジアセチルスペルミンが高濃度になる報告例が多く、例えば肺がん患者の尿中での上昇が報告されている<sup>25)</sup>。すい臓がん患者では、すい臓がん組織中のポリアミンと尿中ポリアミンの濃度が正の相関を示しており<sup>26)</sup>、大腸がん患者では尿中  $N^1$ ,  $N^{12}$ -ジアセチルスペルミンの濃度上昇だけでなく、アセチル化のパターンが異なる他のポリアミン類も濃度上昇が見られている<sup>27)</sup>。

唾液においても乳がんでは複数種類のポリアミンが健常者に比べて高く、再発症例では更に高濃度になることが報告されており<sup>28)</sup>、複数種類のポリアミンを組み合わせて進行度に応じた指標ができるという例もある<sup>29)</sup>。アセチル化されていないスペルミンやスペルミジンなどのポリアミンは感度よく検出できるものの炎症などでも上昇して特異性が低く、一方  $N^1$ ,  $N^{12}$ -ジアセチルスペルミンはがんへの特異性は高いものの感度が低いというトレードオフの関係性になる。そこでわれわれは、口腔がん<sup>30)</sup>、乳がん<sup>31)</sup>、すい臓がん<sup>32)</sup>、大腸がん<sup>33)</sup>の唾液中のポリアミン類を質量分

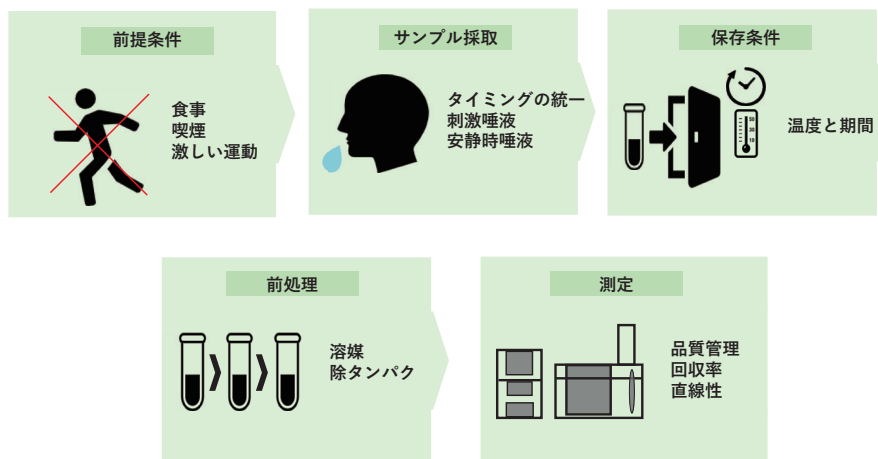


図4 唾液検査のSOP

唾液採取条件, サンプル採取, 保存条件, 前処理, 測定に関する標準化に関連する要素

析装置で一斉分析し, 人工知能の一種である機械学習を用いて複数分子の組み合わせによって高精度にがん患者を検出する手法を開発してきた。

#### 7. 実用化に向けた取り組み

唾液は侵襲性がなく採取できるメリットがあるものの, 採取方法や採取条件を統一しなければ再現性の低いデータになる課題がある。メタボローム解析そのものの長期的な品質制御<sup>34)</sup>も重要な課題であるが唾液特有の問題も多数ある。例えば, 唾液のメタボローム解析には非刺激性の全量唾液を用いているが, 刺激性唾液と非刺激性では異なる結果が観測される<sup>35)</sup>。日内変動や日間変動<sup>36)</sup>, 採取前の絶食時間の影響<sup>37)</sup>, 採取後の保存温度や保存期間による変動<sup>38)</sup>を調べ, 唾液検査のプロトコルを確定してきた<sup>39,40)</sup>(図4)。さらに, 尿のクレアチンのように唾液中代謝物全体の濃度を補正する物質が確立していないために, ささまざまな工夫が必要とされる。特に刺激性唾液や痰などが含まれるような白濁した唾液の場合, 一般的に値が高くなるために, 擬陽性になる可能性がある。そこでわれわれは唾液を画像処理によって白濁度合いを判定し, 一定化の白濁度合いの場合は濃度補正を実施, 一定以上の白濁度合いの場合は, 検査不適検体として再度唾液の採取を実施している。1,000名程度の前向き試験では本プロトコルにより, すい臓がんハイリスク症例となるすい臓関連疾患の症例を拾えている<sup>41)</sup>。イムノクロマトなど<sup>42)</sup>, 低価格でハイスループットな測定器の開発も同時に必要である。

#### 8. おわりに

本稿ではメタボローム解析を唾液に適用することで, がんを中心とした全身の代謝に関連した疾患を検出するマーカーの事例を紹介した。侵襲性が低く, 安

全に採取できる唾液はさまざまな疾患の高頻度な検査を可能とする最適な検体であると考えられる。

#### 参考文献

1. Wong DT: Salivary Diagnostics: Amazing as it might seem, doctors can detect and monitor diseases using molecules found in a sample of spit. *Am Sci.* **96**: 37-43, 2008.
2. Panneerselvam K, Ishikawa S, Krishnan R *et al.*: Salivary metabolomics for oral cancer detection: A narrative review. *Metabolites.* **12**: 436, 2022.
3. Li Y, St John MA, Zhou X *et al.*: Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* **10**: 8442-8450, 2004.
4. Aro K, Wei F, Wong DT *et al.*: Saliva liquid biopsy for point-of-care applications. *Front Public Health.* **5**: 77, 2017.
5. Gleber-Netto FO, Yakob M, Li F *et al.*: Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma in a taiwanese population. *Clin Cancer Res.* **22**: 3340-3347, 2016.
6. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H *et al.*: Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology.* **138**: 949-957 e941-947, 2010.
7. Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, Chardin H *et al.*: Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol.* **110**: 62-73, 2017.
8. Tantray S, Sharma S, Prabhat K *et al.*: Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia through gas chromatography-mass spectrometry. *J Oral Maxillofac Pathol.* **26**: 31-37, 2022.
9. Zhong L, Cheng F, Lu X *et al.*: Untargeted saliva

- metabonomics study of breast cancer based on ultra performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*. **158**: 351–360, 2016.
10. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A *et al.*: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*. **6**: 78–95, 2010.
  11. Baima G, Iaderosa G, Citterio F *et al.*: Salivary metabolomics for the diagnosis of periodontal diseases: A systematic review with methodological quality assessment. *Metabolomics*. **17**: 1–21, 2021.
  12. Barnes VM, Teles R, Trivedi HM *et al.*: Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. *J Dent Res*. **88**: 851–855, 2009.
  13. Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O *et al.*: Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res*. **90**: 1293–1297, 2011.
  14. Wang Q, Gao P, Wang X *et al.*: The early diagnosis and monitoring of squamous cell carcinoma via saliva metabolomics. *Sci Rep*. **4**: 6802, 2014.
  15. Sridharan G, Ramani P, Patankar S *et al.*: Evaluation of salivary metabolomics in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. **48**: 299–306, 2019.
  16. Wei J, Xie G, Zhou Z *et al.*: Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer*. **129**: 2207–2217, 2011.
  17. Kaur J, Jacobs R, Huang Y *et al.*: Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: A review. *Clinical oral investigations*. **22**: 633–640, 2018.
  18. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS *et al.*: Role of salivary biomarkers in oral cancer detection. *Adv Clin Chem*. **86**: 23–70, 2018.
  19. Song X, Yang X, Narayanan R *et al.*: Oral squamous cell carcinoma diagnosed from saliva metabolic profiling. *Proc Natl Acad Sci USA*. **117**: 16167–16173, 2020.
  20. Yan SK, Wei BJ, Lin ZY *et al.*: A metabonomic approach to the diagnosis of oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus and oral leukoplakia. *Oral Oncol*. **44**: 477–483, 2008.
  21. Ishikawa S, Sugimoto M, Edamatsu K *et al.*: Discrimination of oral squamous cell carcinoma from oral lichen planus by salivary metabolomics. *Oral Dis*. **26**: 35–42, 2020.
  22. Satoh K, Yachida S, Sugimoto M *et al.*: Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci USA*. **114**: e7697–e7706, 2017.
  23. Soda K: The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res*. **30**: 95, 2011.
  24. Gerner EW, Meyskens FL Jr: Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer*. **4**: 781–792, 2004.
  25. Takahashi Y, Sakaguchi K, Horio H *et al.*: Urinary  $N^1,N^{12}$ -diacetylspermine is a non-invasive marker for the diagnosis and prognosis of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. **113**: 1493–1501, 2015.
  26. Löser C, Fölsch UR, Paprotny C *et al.*: Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. **5**: 119–127, 1990.
  27. Nakajima T, Katsumata K, Kuwabara H *et al.*: Urinary polyamine biomarker panels with machine-learning differentiated colorectal cancers, benign disease, and healthy controls. *Int J Mol Sci*. **19**: 756, 2018.
  28. Tsutsui H, Mochizuki T, Inoue K *et al.*: High-throughput LC-MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients. *Anal Chem*. **85**: 11835–11842, 2013.
  29. Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I *et al.*: Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. **452**: 18–26, 2016.
  30. Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K *et al.*: Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Sci Rep*. **6**: 31520, 2016.
  31. Murata T, Yanagisawa T, Kurihara T *et al.*: Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination. *Breast Cancer Res Treat*. **177**: 591–601, 2019.
  32. Asai Y, Itoi T, Sugimoto M *et al.*: Elevated polyamines in saliva of pancreatic cancer. *Cancers*. **10**, 2018.
  33. Kuwabara H, Katsumata K, Iwabuchi A *et al.*: Salivary metabolomics with machine learning for colorectal cancer detection. *Cancer Sci*. **113**: 3234–3243, 2022.
  34. Saito R, Sugimoto M, Hirayama A *et al.*: Quality assessment of untargeted analytical data in a large-scale metabolomic study. *J Clin Med*. **10**, 2021.
  35. Okuma N, Saita M, Hoshi N *et al.*: Effect of masticatory stimulation on the quantity and quality of saliva and the salivary metabolomic profile. *PLoS One*. **12**: e0183109, 2017.
  36. Kawanishi N, Hoshi N, Masahiro S *et al.*: Effects of inter-day and intra-day variation on salivary metabolomic profiles. *Clinica Chimica Acta*. **489**: 41–48, 2019.
  37. Ishikawa S, Sugimoto M, Kitabatake K *et al.*: Effect of timing of collection of salivary metabolomic biomarkers on oral cancer detection. *Amino Acids*.

- 49: 761–770, 2017.
38. Tomita A, Mori M, Hiwatari K *et al.*: Effect of storage conditions on salivary polyamines quantified via liquid chromatography-mass spectrometry. *Sci Rep.* **8**: 12075, 2018.
39. Sugimoto M, Ota S, Kaneko M *et al.*: Quantification of salivary charged metabolites using capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry. *Bio Protoc.* **10**: e3797, 2020.
40. Sugimoto M, Saruta J, Matsuki C *et al.*: Physiological and environmental parameters associated with mass spectrometry-based salivary metabolomic profiles. *Metabolomics.* **9**: 454–463, 2013.
41. Nose D, Sugimoto M, Muta T *et al.*: Salivary polyamines help detect high-risk patients with pancreatic cancer: A prospective validation study. *Int J Mol Sci.* **24**: 2998, 2023.
42. Zhang Z, Niwa O, Shiba S *et al.*: Electrochemical enzyme biosensor for carnitine detection based on cathodic stripping voltammetry. *Sensors and Actuators B: Chemical.* **321**: 128473, 2020.
-