

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（B）一般

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20390531

研究課題名（和文） ナノテクノロジーを用いた歯周病診断キットの開発と健康情報ネットワーク研究への展開

研究課題名（英文） Development of periodontal disease-diagnosis kit by nanotechnology and the application for information on health network

研究代表者：西原 達次

Tatsuji Nishihara

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80192251

研究成果の概要（和文）：

本研究事業では、歯周病原性細菌およびその病原因子（組織傷害性酵素、外毒素、内毒素）、宿主組織内で産生される炎症性メディエーターおよびサイトカインの検出系の開発を進めてきた。まず、これまで開発してきたセンサチップを用いてヒトサンプルを測定し、そこで得られた成績の再現性および定量性を検証したところ、生体材料では、数マイクログラムのオーダーまで検出可能であることが明らかとなった。しかしながら、歯周病の病態を把握するためには、感度を向上させていかなければ実用化することは難しいと判断した。そこで、連携研究者である北九州市立大学・国際環境工学部・磯田隆聡准教授と意見交換を行い、センサチップの基板材料として金を用いることで感度の向上が図れないものかということをも提案し、工学的な視点から様々な改良を試みた。さらに、歯周病細菌の検出系では、我々の研究グループが作成したモノクローナル抗体の性状を網羅的に解析し、抗体価および特異性の高いクローンを見出し、2種類の異なるエピトープを認識する抗体の組み合わせで、歯周病細菌を100 cells/mlのオーダーで検出することができるようになった。

今回の磯田准教授が開発した抗原抗体反応を利用したバイオセンサチップを用いることで、複数の歯周病細菌の検出が可能となったものの、生体材料から炎症性サイトカインを検出するという当初の目的に関しては、生体内の塩が静電誘導を基本原理とするセンサチップの感度向上の妨げとなることが判明した。そこで、最終年度は、静電誘導を基本原理とする測定方法に加えて、電気化学的あるいは蛍光法による測定機器の開発が必要であると判断し、他の工学系の研究者とともに、より再現性および感度の高い測定が可能性を探った。

一方、ナノテクノロジーの技術活用し、歯周医学の視点に立った研究を進め、微小流路をマイクロチップ上に構築し、顕微鏡観察下で微細な流れを観察する実験系の構築に成功した。この実験系を活用し、歯周病と心筋梗塞の因果関係を *in vitro* の実験系で検討し、いくつかの興味ある実験結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

We developed the periodontal disease-diagnosis kit by nanotechnology and found that it would be useful tool to examine the relationship between the periodontal diseases and systemic dysfunctions. We also established the method involving the evaluation of *in vitro* plaque formation by macrophage cells in a fluid system via development of the micro-channel chip. In the micro-channel, plaque formation by RAW264.7 cells increased significantly following LPS stimulation. The current study attempted to elucidate the role of adhesion molecules in plaque formation. Initially, the time-dependent increase in plaque formation in LPS-stimulated RAW264.7 cells was confirmed. Expression of adhesion molecules on RAW264.7 cells was examined with flow cytometry and Western blotting analysis. Expression levels of ICAM-1 were very low in LPS-stimulated cells at 0 h of stimulation. However, these levels were elevated

markedly in LPS-stimulated cells at 6 and 12 h of stimulation. Expression levels of LFA-1 and L-selectin were medium in un-stimulated and LPS-stimulated cells at 0 h of stimulation. Levels of LFA-1 were elevated significantly in LPS-stimulated cells at 12 h of stimulation. However, L-selectin levels did not increase in LPS-stimulated cells. Western blot analysis detected ICAM-1 in RAW264.7 cells stimulated with LPS for 2 h. These findings indicated that LPS increases plaque formation and up-regulates expression of ICAM-1 and LFA-1, but not that of L-selectin, in RAW264.7 cells, which are accord with the results of the previous report showing the increased expression of monocyte adhesion molecules, such as LFA-1, Mac-1 and ICAM-1. Taken together, this study confirmed plaque formation by macrophages in a flowing liquid stream on our micro-channel chip. The current investigation indicated that ICAM-1 and LFA-1 play an important role in cell aggregation of LPS-stimulated macrophages. Our micro-channel chip is a suitable tool for the *in vitro* evaluation of etiological factors of atherosclerosis including periodontitis.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
平成21年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成22年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療学歯学

キーワード：

- ① 健康増進 ② 歯周病 ③ 歯周病細菌 ④ バイオセンサ ⑤ 診断キット

#### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染を伴う炎症性疾患であることから、IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが歯周病発症・進行に深く関わっている。一方、病原性細菌の検出系は、生化学的酵素反応に基づく BANA テストや 16s rRNA 情報に基づく PCR による検出系は既に臨床で広く応用されているが、それ以外にも、real-time PCR や LAMP 法を応用した迅速かつ高感度の検出系も開発されている。

近年、歯周医学 (Periodontal medicine) の観点から、歯周病と全身疾患 (糖尿病、細菌性心内膜炎、アテローム性動脈硬化など) との関連が指摘されているが、医科領域と連携するためには、歯周病と全身状態を一体的に評価することが今後強く求められてくる

ことが予想される。しかし、現在用いられている評価方法はそれぞれ異なった背景・技術に基づくため、検体は評価方法により血液、歯肉溝浸出液、唾液、プラークなどバラバラであり、検出方法、評価基準などもそれぞれで異なるため、検査で得られた情報を統合するといふことでは精度の点で多くの克服すべき課題が残されている。

ELISA や PCR など現行の方法は精度ということでは優れているが、検査機関に委託するため時間がかかることから、チェアサイドでリアルタイムに生体因子を評価することはできず、医科で開発が進められているポイントオブケアの視点にたったものは皆無である。さらに、歯科臨床の現場で汎用するにはコスト面での制約も大きい。このような状況

を考えると、歯周病患者からの同一検体を用いて、より多くの生体因子を同時かつリアルタイムに評価できる技術の開発・汎用化は、臨床において、また医科との連携を確立するためにも急務である。

そこで、我々の研究グループは、上記のような問題点の解決を目指し、有機半導体バイオセンサの開発に着手した。

## 2. 研究の目的

我々は、平成 18 年～19 年度の基盤研究(B)「歯周病細菌に起因した心疾患系疾患の個体差と細菌感受性に関する分子生物学的解析」で、歯周病細菌と心疾患系疾患との相関を明らかにすることを目指して研究を進め、興味深い知見を得た。そこで、大規模サンプルに対して心疾患に関する因子と歯周病細菌に関する指標を調査・分析することを計画したが、そこで、多大な労力とコストがかかり、疫学調査等においても生体分子を効率的かつ信頼性の高い評価する新たな方法が必要と考えるに至った。

このようなことから、本研究事業では、新規歯周病診断用バイオセンサを開発し、これを半導体ナノ加工技術で1枚のチップ上にコンパクトに集約したデンタルチップを試作することを主たる目的とした。さらに当該デンタルチップを応用した疫学情報の収集事業へ展開することとした。

本研究により開発するデンタルチップは、抗体・抗原反応を微小な電圧変化として捉える有機半導体バイオセンサをチップ上に集約したものであり、その検出部は半導体素子作製技術を応用することで、15×30 mm に微小マイクロウェルの形に納め、最大 24 種類の抗体を固定化したセンサをアレー状に配置することを可能とした画期的な生体物質検出系である。本デンタルチップは1枚あたりの製造コストは数百円程度であり、臨床に

汎用するに十分な費用対効果を見込める。検体の必要量は1  $\mu$ l 程度であり、貴重なサンプルを無駄なく分析できる。

このような特徴を持つデンタルチップが開発されれば、個別の炎症状況を治療経過ごとに評価する際、多種類の生体物質を同時かつリアルタイムで検出・評価できるようになり高度な IT ネットワーク診療が可能となる。以上のような研究目的を掲げ、歯周病診断に新たな道を開くべく研究を展開した。

## 3. 研究の方法

申請者らは、これまで微小液滴中の生体分子濃度を計測する新たな方法として、静電誘導を基本原理とするバイオセンサを開発している。このセンサの構造は電極上に有機絶縁膜を積層させたものであり、この表面に液体が接触すると誘電分極によって電荷が生じることに基いて設計されている。基本的には、個々で生ずる電荷量の変化は液滴中の物質濃度に相関するので、電極間電圧で濃度測定が可能である。また次の特徴がある。

- ① 特殊な有機薄膜構造のため、抗体分子を 5～10 分で表面に固定化できる。
- ② 検体中の抗原が膜表面の抗体と相互作用すると電荷が生じるため、抗原抗体反応が電気信号で検知できる。
- ③ 発生電荷量の測定のため数分で終了する。

このようなことを踏まえ、初年度にデンタルチップの作製と性能評価を実施する。Au/Cr を積層させたガラス基板に感光性樹脂をコーティングし、予め作製したセンサパターンのマスクを圧着させ、半導体用フォトリソグラフィ装置にて紫外線を照射させて微細パターンを露光する。I<sub>2</sub> 溶液で Au 層を、Ce アンモ溶液で Cr 層をエッチングして微小電極を構築する。この電極上に同様のフォトリソグラフィ法で樹脂層をウェル状に構築

する。電極ならびにウェルの直径は  $50\ \mu\text{m}$ 、線幅  $10\ \mu\text{m}$  で、24 センサを  $10\ \text{mm}$  四方に配置させる。次に、6 種類の炎症性因子に対する抗抗体物質を、各々のウェル底に配置した電極表面に固定化する、それぞれのウェルに  $1\ \mu\text{l}$  の検体を滴下すると、例えば IL-8 が含まれる場合、抗 IL-8 の固定化されているウェルのセンサ電圧が増加する。

さらに、データの信頼度を確認するため、以下の手順で実験を進めた。

#### ① 精製サンプルによる検討

抗原として歯周病細菌の全菌体、および宿主側の生体反応因子 (IL-1, -6, -8, -10, TNF- $\alpha$ , ケモカイン, PGE2, RANKL, アディポサイトカインなど) の精製物を用いて、それぞれの抗体に対する反応を ELISA との結果と比較検討する。

#### ② 生体サンプルによる検討

ヒト培養細胞または歯周病患者の血清サンプルを用いて、(1) と同様に ELISA との相関関係を検討する。

これらにより、当該センサーの信頼度を、臨床・疫学調査に応用できる水準まで引き上げるために、先述のバイオセンサチップを携帯無線型の電気信号処理装置(子機)に装着し、数十メートル先の親機に信号送信し、パソコン上でデータ解析するシステム一式を開発する。このようなシステムが確立されると、デンタルチップへの抗体固定化が 10 分、その後の計測が数分であり、短時間でデータ取得が可能であり、既存の ELISA と比較して、実験時間の大幅な短縮が期待できる。

今回開発するセンサは抗原抗体反応を応用しており、特異的検出の原理は ELISA と同様である。一方検出系は、ELISA が酵素反応による色素の分解に伴う比色によるのに対し、本デンタルチップは電極上に積層させた有機半導体表面に抗原を固相化させ、このセ

ンサ部位で抗体反応が起きる際の微小な電荷変化を電極間の通電電圧変化として評価するものである。つまり ELISA と本デンタルチップは入力情報が同一であるが、出力情報が比色と電気信号とで異なる。ELISA は分子間の特異性とアフィニティーを評価する方法としてこれまで広く用いられ、その信頼度も高い。このことから、本デンタルチップで得られるデータと ELISA により得られるデータの高い相関関係があれば、少なくとも ELISA と同等の特異的検出能と感度を持つ方法とすることができる。そこで、本デンタルチップにより取得するデータの信頼度を高める事を目的として、歯周病細菌に対する抗体と、炎症性サイトカインに対する抗体について、ELISA と本デンタルチップで得られるデータの相関関係を検討する。ここで用いる抗原とモノクローナル抗体は、これまで申請者らが作成してきたものを利用する。

#### 4. 研究成果

今回の研究開発では、高精度のセンサチップ生産がきわめて重要な位置を占めており、そのための基礎研究開発を継続してきた。

##### ① 量産バイオチップの開発

今回の 3 年間の研究開発の結果、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  等のイオンセンシング用センサチップの製造技術を確立し、サンプル供給が可能な環境を整えた。一方、抗原抗体反応等を利用したタンパク質の検出を意図した次世代センサチップの製造技術を開発を進めてきたが、こちらの開発は、感度的に歯周病診断に用いるところまで至らなかった。しかし、今回の研究期間に、抗体の特異性向上などを図り、一定の成果を得ることができた。

##### ② 携帯端末センサシステムの開発

センサチップとして汎用可能となったイオンチップ用のセンシング用センサモジュール

ルを製造した。一方で、タンパク質検出用センサモジュールを試作したが、センサ信号の処理系統（増幅回路、ノイズ処理回路等）に検討課題を残し、今回の研究期間で、抗原等の微量タンパク測定ができなかった。

## ② 歯周病診断への応用

今回の研究期間中に作成した歯周病細菌を認識するモノクローナル抗体の抗体値を従来法の ELISA で確認したところ、主たる歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* を 100 cells/ml の感度で検出することができることを確認した、さらに、歯周病細菌が産生する歯周組織破壊酵素活性を測定する機器のプロトタイプの前製に成功した。今後、歯周病細菌の菌数測定を重点化し、歯周病診断技術の確立とシステム構築を目指す。

今回、歯周病診断および健康情報ネットワーク開発を行う体制を整備するという視点では、歯周病診断に使用可能な抗体を作製し、歯周病細菌を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成に成功したので、これを用いることで、新たな道が開けるものと期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Ariyoshi, W., T. Takahashi, T. Kanno, H. Ichimiya, K. Shinnmyozu, H. Takano, T. Koseki, and T. Nishihara. 2008. Heparin inhibits osteoclast differentiation and function. *J. Cell. Biochem.* 103: 1707-1717.
  2. Noguchi, F., C. Kitamura, M. Nagayoshi, M., M. Terashita, and T. Nishihara. 2009. Ozonated Water Improves Lipopolysaccharide-Induced Responses of Odontoblast-like Cell Line. *J Endod.* 35: 668-672.
  3. Isoda, T. T. Tsutsumi, and T. Nishihara. Measurement of plaque-forming macrophages activated by lipopolysaccharide in a micro-channel chip. 2009. *J. Periodont. Res.* 44: 609-615. 315: 3036-3043.
  4. Akifusa, S., N. Kamio, Y. Shimazaki, N. Yamaguchi, T. Nishihara, and Y. Yamashita. 2009. Globular adiponectin-induced RAW 264 apoptosis is regulated by reactive oxygen species-dependent pathway involving Bcl-2. *Free Radical Biol. Med.* 46: 1308-1316.
  5. Kasai, H., K. Nakashima, M. Yokota, and T. Nishihara. 2010. The G1 cell cycle arrest of macrophages infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Oral Diseases.* 16: 305-30.
  6. Tsutsumi, T., K. Nakashima, T. Isoda, M. Yokota, and T. Nishihara. 2010. Involvement of adhesion molecule in *in vitro* plaque-like formation of macrophages stimulated with *A. actinomycetemcomitans* LPS. *J. Periodont. Res.* 45: 550-556.
- 〔学会発表〕(計23件)
1. H. Maeda, K. Tominaga, K. Iwanaga, F. Nagao, T. Tsujisawa, J. Fukuda, T. Nishihara. Targeted drug delivery system for cancer therapy using sonoporation. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  2. F. Nagao, T. Tsujisawa, H. Maeda, K. Iwanaga, M. Habu, I. Yoshioka, K. Tominaga, J. Fukuda, T. Nishihara. Gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist into HIG-82 cells. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  3. A. Toshinaga, C. Masaki, R. Hosokawa, T. Nishihara. Inflammatory mediators induced by mechanical stress in gingival epithelial cell. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  4. H. Ishimatsu, C. Kitamura, Y. Inuyama, T. Morotomi, T. Nishihara, Y. Tabata, M. Terashita. Effects of FGF-2 Concentration on Regenerated Dentin Structures. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  5. F. Noguchi, C. Kitamura, M. Nagayoshi, M. Terashita, T. Nishihara. Ozonated Water Inhibits Effects of Lipopolysaccharide on Odontoblast-Like Cells. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  6. A. Washio, C. Kitamura, M. Terashita, T. Nishihara. Effect of Hyaluronic Acid on Neurite Outgrowth of PC12 cells. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  7. Y. Inuyama, C. Kitamura, H. Ishimatsu, T. Morotomi, T. Nishihara, M. Terashita. Effects of Hyaluronic Acid on Rat Pulp Regeneration. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  8. S. Fujimoto, H. Maeda, K. K. Gunjikake, K. Yamaguchi, T. Nishihara. Inhibitory effect of EMD on gingival epithelial cells. IADR General Session, July 2008, Toronto, Canada
  9. T. Nishihara, T. Nishihara, J. Fukuda. On-demand video library system for

- dental practice with integrated authentication. IADR General Session, July 2008, Toront, Canada
- 1 0. Y. Kakinoki, T. koseki, T. Nishihara. Relationship Between Oral Dryness and Wetness of Tongue Dorsum. IADR General Session, July 2008, Toront, Canada
- 1 1. L. Xiaotao, X. Guan, T. Ueda, S. Tomita, T. Nishihara, C. Kitamura. Research on a Novel Sensor for Measuring Force in Arbitrary Direction. 2008 International Conference on Computer and Electrical Engineering. December 2008, Thailand
- 1 2. A. Toshinaga, C. Masaki, R. Hosokawa, T. Nishihara. Mechanical stress enhances the production of inflammatory mediators from gingival epithelial cells. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. July 2009, Tokyo, Japan.
- 1 3. M. Takao, A. Toshinaga, T. Tsujisawa, K. Iwanaga, M. M. Habu, I. Yoshioka, K. Tominaga, T. Nishihara. Mechanical stretch induces the mRNA expression of inflammatory cytokines in synovial cells. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. July 2009, Tokyo, Japan.
- 1 4. T. Tsutsumi, K. Nakasima, T. Isoda, H. Ksai, M. Yokota, T. Nishihara. Involvement of periodontopathic bacteria in the formation of infarction. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. July 2009, Tokyo, Japan.
- 1 5. T. Nishihara Periodontal diseases: The past, the present and the future. The second Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, November 2009, Kitakyushu, Japan
- 1 6. M. Kawano, T. Okinaga, K. Iwanaga, W. Ariyoshi, M. Habu, K. Tominaga, T. Nishihara. Effet of Hyaluronic acid and BMP-2 on osteoblasts differentiation. IADR General Session, July 2010, Barcelona, Spain
- 1 7. Y. Fukunaga, S. Sato, K. Mori, H. Endo, K. Morimoto, K. Tominaga, T. Nishihara, S. Takenaka. Tongue cancer diagnosis by FND-based electrochemical telomerase assay. 第37回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC 2010), November 2010, Yokohama, Japan
- 1 8. W. Ariyoshi, T. Okinaga, T. Nishihara. CD44 mediated internalization of aggrecan G1 domain by chondrocytes. 58<sup>th</sup> annual Meeting of JADR, November, Kitakyushu, Japan
- 1 9. O. Takahshi, T. Okinaga, K. Iwanaga, W. Ariyoshi, M. Habu, T. Tominaga, T. Nishihara. Effset of HDAC inhibitor in oral squamous cell carcinoma. IADR General Session, March 2011, San Diego, USA
- 2 0. T. Kaneuji, W. Ariyoshi, T.

- Okinaga, T. Takahashi, T. Nishihara. Mechanical stress inhibits osteoclast differentiation through noncanonical Wnt pathway. IADR General Session, March 2011, San Diego, USA
- 2 1. T. Okinaga, W. Aruyoshi, T. Nishihara. The role of SOCS in periodontal bacterium-infected macrophages. IADR General Session, March 2011, San Diego, USA
- 2 2. M. Takao, T. Okinaga, W. Ariyoshi, K. Iwanaga, M. Habu, T. Tominaga, T. Nishihara. Induction of HO-1 by mechanical stretch in synovial cells. IADR General Session, March 2011, San Diego, USA
- 2 3. W. Ariyoshi, T. Okinaga, T. Nishihara. Hyaluronan oligosaccharides up-regulate aggrecanase expression and function. IADR General Session, March 2011, San Diego, USA

[図書] (計1件)

1. 西原達次 口腔微生物学・免疫学 (第3版) 編集: 浜田茂幸, 川端重忠, 西原達次, 菅井基行, 中川一路 医歯薬出版株式会社 2010年

[その他]

ホームページ <http://www.kyu-dent.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西原 達次 Tatsuji Nishihara  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 80192251

### (2) 研究分担者

辻澤 利行 Toshiyuki Tsujisawa  
九州歯科大学・歯学部. 准教授  
研究者番号: 60265006  
磯田 隆聡 Takaaki Isoda  
北九州市立大学・国際環境工学部・准教授  
研究者番号: 70284544

### (3) 連携研究者

秋房 住郎 Sumio Akifusa  
九州大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 40295861  
山下 喜久 Yoshihisa Yamashita  
九州大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20192403  
清原 裕 Yutaka Kiyohara  
九州大学・医学部・教授  
研究者番号: 80161602  
飯田 三雄 Mitsuo Iida  
九州大学・医学部・教授  
研究者番号: 00127961