

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月9日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592625

研究課題名（和文） マイクロデバイスを用いたカルプロテクチン測定による歯周病診断法の開発

研究課題名（英文） Development of the diagnostic method for periodontal diseases Using a microdevice to determine calprotectin

研究代表者

木戸 淳一（KIDO JUNICHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10195315

研究成果の概要（和文）：本研究は、微量な歯肉溝滲出液(GCF)中のカルプロテクチンを測定するマイクロデバイスシステムを開発することを目指した。その結果、インクジェットプリンター法により抗体をマイクロチップ上に固相化させた ELISA 法により GCF 中のカルプロテクチン測定系を構築した。この方法は、従来の ELISA 法と比較して使用サンプル量や抗体量が 1/50 になり、測定時間も 1/5 に短縮化された。本方法は、GCF 中のカルプロテクチン測定による歯周病診断に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is a development of a microdevice system to determine calprotectin in gingival crevicular fluid (GCF) with a small volume. We discharged an anti-calprotectin antibody on a microchip using an inkjet printing system and made the system to determine calprotectin in GCF using a microchip ELISA method. This method enabled to save GCF sample and antibody to one-fifty and a time one-five compared to a conventional ELISA method. This method to determine calprotectin in GCF may be useful for diagnosis of periodontal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病診断，カルプロテクチン，マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

現在行われている歯周病の臨床的検査法は、プロービングデプスの測定や視診による歯肉炎指数の評価など検査者による評価のバラツキを含め正確度や客観性に問題がある。そこで、より高精度で客観的な歯周病診断法として歯肉溝滲出液 (Gingival crevicular fluid: GCF)中のバイオマーカー

物質を測定し、歯周病診断に応用する研究が行われてきた。私たちも、以前より炎症関連蛋白であるカルプロテクチンが GCF 中に含まれており、そのレベルが健常部位 GCF よりも歯周病部位 GCF において高いことから GCF 中のカルプロテクチンが歯周病診断の有用なマーカーとなる可能性を示してきた。しかしながら、カルプロテクチンを含

む歯周病マーカー物質の定量にはそれぞれの測定キットが必要であり、現状ではこれらのマーカーは、血液サンプル用の測定キットで測定されているが、微量な GCF ではマーカーの測定ができないものも多い。また、従来の ELISA 法では3~4時間の測定時間が必要であり、歯科診療室でのチェアサイドでの測定、診断は困難である。

一方、医科領域では、多くの疾患の診断のために血液や尿などの体液中のマーカーの測定が行われている。最近、これらの測定のためにマイクロデバイスの開発が行われており、私たちもマイクロチップ電気泳動法を用いた血糖やアミラーゼの測定系の構築を行ってきた。

2. 研究の目的

私たちが、疾患マーカー測定用デバイスとして研究を行っているマイクロチップを用いてカルプロテクチン標準蛋白および GCF 中カルプロテクチンを測定する測定系を構築する。具体的には、マイクロチップ上での ELISA 法に適合する抗カルプロテクチンの1次および2次抗体の種類と濃度の選択、1次抗体の固相化法、ブロッキング法および免疫シグナル検出法などの検討、および各反応時間などの検討を行った。さらに、反応時間短縮化への対策を検討した。

3. 研究の方法

1) 抗体の選択と調整：予備実験により市販の複数の抗ヒトカルプロテクチン抗体から1次抗体と2次抗体として適正な組み合わせの選択を行った。その結果、1次抗体に抗ヒトMRP8/14 monoclonal antibody (clone IDCP2, Immundiagnostik AG)を、2次抗体に抗ヒトS100A8/A9 monoclonal antibody (clone 27E10, Hycult Biotechnology)を選択した。これらの抗体は、IgG Purification Kit-G (Dojindo Laboratories)を用いて精製した。2次抗体のペルオキシダーゼ標識は、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (Dojindo Laboratories)を用いて行った。また、それぞれの抗体の使用至適濃度は、カルプロテクチンシグナルドットの強度測定から決定した。

2) マイクロチップと抗体の固相化：マイクロチップは環状オレフィン系共重合体製マイクロチップ (住友ベークライト社)を用いた。抗体のマイクロチップ上への固相化は、ピエゾ素子インクジェットプリンターシステム (Pulseinjector[®], CLUSTER TECHNOLOGY Co.)を用いてマイクロチップ流路表面に1ドットあたり5.3 nLの抗体を吐出し、その後、ポリメチルメタアクリレート素材接着層 (TOYO INK MFG. Co.)を用いてシールした。

3) GCFの採取とGCF液の調整：GCFの採取は、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。本研究への参加被験者は、徳島大学病院歯科を受診した歯周病やう蝕を有する歯科疾患患者を対象とし、本研究の主旨と内容を説明し、同意が得られた11名 (男性4名、女性7名)とした。なお、11名中3名は非歯周病被験者であり、8名は歯周病患者であった。GCFの採取は、以前からの私たちの方法に従って行った。すなわち Periopaper[®] (Oraflow Inc)を歯周ポケット挿入し、10秒間保持し、吸収されたGCF量をペリオトロン8000[®] (Harco Electronics)にて測定した。歯周ポケット1ヶ所につき3枚のPeriopaperを用いてGCFを採取した。GCF液の調整は、1ヶ所あたり3枚のPeriopapersをProtease inhibitorを含む110μLの10 mM Tris-HCl bufferで遠心抽出し約100μLのGCFサンプル液を調整した。

歯周病診断のためにプロービングデプス測定 (PD)、プロービング時出血 (BOP)の有無および歯肉炎指数臨床 (GI)の評価を行った。

4) カルプロテクチン標準蛋白の調整：カルプロテクチン標準蛋白は、Hycult Biotechnology社のHUMAN CALPROTECTIN ELISA KIT中に含まれるカルプロテクチン抗原を用いた。

5) マイクロチップ処理および免疫反応：1次抗体を固相化したマイクロチップ流路はブロッキング液 (住友ベークライト社)で1時間静置し、ブロッキングを行った。その後、Washing液 (住友ベークライト社)にて3回洗浄を行った。その後、2μLのカルプロテクチン標準蛋白液 (1.56 - 100 ng/ml)あるいは同量のGCFサンプル液を各流路に導入した。なお、各液体の流路への導入はピペットマンを用いて行い、廃液はシリンジあるいはペリスタポンプによる空気により行った (図1)。カルプロテクチン標準蛋白およびGCFサンプル液と1次抗体の反応時間は予備実験を行い、15分間とした。Washing液にて3回洗浄後、2μLのペルオキシダーゼ標識2次抗体液を流路に加え、15分間反応させた。流路の再洗浄後、各流路に化学発光剤であるSuper Signal[®] West Femto (Thermo Scientific)を導入し、5分間反応させた。カルプロテクチン免疫反応シグナルの化学発光強度はImage Quant[™] LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences)にて測定し、その結果をImage Quant TL (GE Healthcare Bio-Sciences)を用いて分析した。

6) ELISA：本研究課題のマイクロチップELISA法の特徴を検討するために、本法と従来のマルチウェルプレートを用いたELISA法

による GCF サンプルの測定比較を行った。従来 ELISA 法による測定のために、clone IDC2 抗体液を Nunc-Immuno™ Modules 469949 (Nunc A/S Roskilde) ウェルに加え、4℃で 12 時間反応させ、固相化させた。Washing 液にて洗浄後、ELISA ULTRABLOK BUF033A (AbD Serotec) にて 3 時間ブロッキングを行った。100 μl のカルプロテクチン標準蛋白液 (1.56-100 ng/ml) あるいは同量の GCF サンプル液をウェルに加え 1 時間、室温で反応させた。ウェルの洗浄後、100 μl のペルオキシダーゼ標識 2 次抗体を加え、1 時間反応させた。再洗浄後、100 μl の基質液 (Sure Blue™ TMB Microwell Peroxidase Substrate solution (KPL) を加え、30 分間反応後、同量の TMB Stop Solution (KPL) を加え、反応を停止させた後、反応液の吸光度を 450 nm で測定し、カルプロテクチン濃度を算定した。

7) 統計分析：カルプロテクチン標準蛋白濃度とカルプロテクチン免疫シグナルの化学発光強度との、また GCF サンプル希釈率とカルプロテクチン濃度との関連性は単回帰分析により分析を行った。GCF 中のカルプロテクチン量のマイクロチップ ELISA 法と従来の ELISA 法による測定値の比較は単回帰分析および Bland-Altman Plot により分析を行い、P 値が 0.05 以下を有意差ありと評価した。

4. 研究成果

1) マイクロチップを用いたカルプロテクチン蛋白のサンドイッチ ELISA 法の確立と標準蛋白の測定

「研究の方法」で述べた COC マイクロチップ流路表面に、インクジェットプリンター法を用いてカルプロテクチン 1 次抗体を液量 5.3 nL、液滴直径 45 μm のごく微量を吐出し、抗体の固相化が可能となった (図 1)。

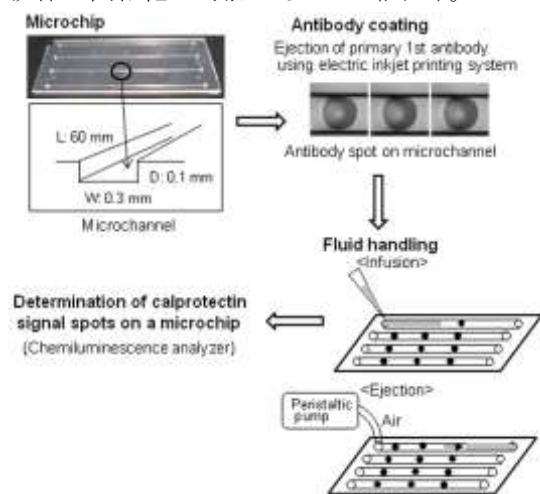


図 1 マイクロチップへの 1 次抗体の吐出・固相化と測定行程

マイクロチップ ELISA 法を用いてカルプロテクチン標準蛋白を測定した結果、有用な検量線が得られた。測定した化学発光強度は、1.56-100 ng/ml 蛋白の範囲で統計学的に有意な直線関係が認められた (図 2, $R^2=0.998$)。この測定範囲から GCF 中のカルプロテクチンの測定が十分に可能であることが判明した。

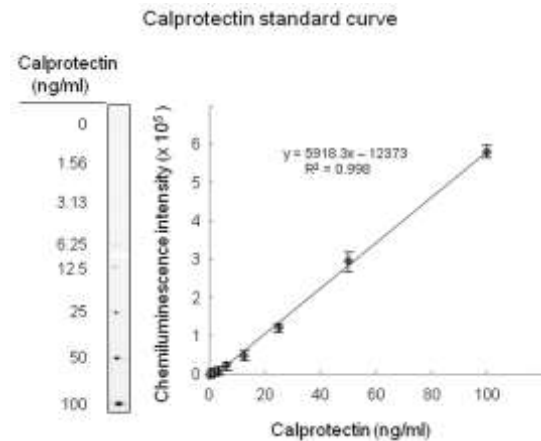


図 2 マイクロチップ ELISA 法によるカルプロテクチンの検量線

2) マイクロチップ間およびその流路上の抗体スポット間による測定誤差の検討

12.5 ng/ml のカルプロテクチン標準蛋白を用いて 1 枚のマイクロチップ流路上の固相化された 1 次抗体スポット間の化学発光強度値のバラツキを検討した結果、相対標準偏差は 6.73% となった (表 1)。また、異なる 3 枚のマイクロチップ間での測定値のバラツキの相対標準偏差は 5.75% となった (表 1)。これらの相対標準偏差値は従来タイプの市販の ELISA キットの値と近似しており、本方法により別々のマイクロチップを用いて経時的にカルプロテクチンを測定した場合も、合理的な測定ができることが示唆された。

Table 1 Repeatability of chemiluminescence intensity of calprotectin signal on the separate spots and microchips

Calprotectin (12.5 ng/ml)	Chemiluminescence intensity	Mean ± SD	RSD* (%)
Spot ^b 1	713688	772345.0 ± 51948.5	6.73
Spot 2	790803		
Spot 3	812544		
Chip ^c 1	772345	733153.1 ± 42144.2	5.75
Chip 2	688575		
Chip 3	738540		

* Relative standard deviation
^b Calprotectin signal spot on a microchannel
^c COC microchip

表 1 別々の 1 次抗体スポットおよびマイクロチップでの測定値のバラツキの検討

3) GCF 中カルプロテクチンのマイクロチップ ELISA 法を用いた測定

歯周病部位の歯周ポケットから採取した GCF を 1/100-1/800 倍に緩衝液にて希釈してマイクロチップ ELISA 法を用いてカルプロテクチンの測定を行った。その結果、測定値は

GCF の希釈率に比例した値を示し、歯周病由来サンプルでは 1/100-1/800 希釈のサンプル液でも測定が可能であることが分かった (図 3A)。

臨床的評価による非歯周病部位 (健康部位) および歯周病程度の異なる部位から 4 つの GCF サンプルを採取し、これらのサンプルを 1/100 倍希釈し、カルプロテクチン量を測定した。その結果、健康部位サンプルでは 8.61 ng/site, 歯周病程度が軽度, 中度, 重度のサンプルではそれぞれ 13.12, 96.09, 560.7 ng/site の歯周病程度に相応する測定値が得られた (図 3 B)。

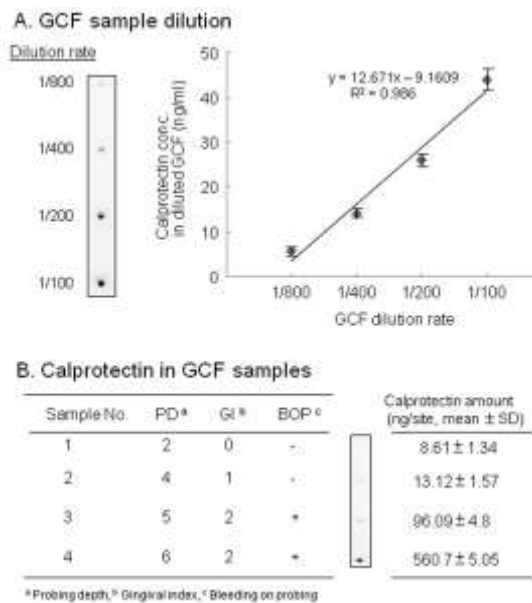


図 3 GCF サンプルの希釈によるカルプロテクチン測定値の変化と歯周病程度の異なる GCF サンプルでのカルプロテクチン測定

4) マイクロチップ ELISA 法と従来型 ELISA 法による GCF サンプル中のカルプロテクチン量の測定値の比較

被験者から採取した歯周病程度の異なる 7 個の GCF サンプルについてマイクロチップ ELISA 法と従来からのマルチプレートを用いた ELISA 法を用いてカルプロテクチンの測定を行った。各サンプルのカルプロテクチン測定値は、マイクロチップ ELISA 法でそれぞれ 47.9, 96.1, 233.8, 272.7, 378.0, 516.3, 561.2 ng/site であり、一方、従来法での測定値はそれぞれ、42.3, 138.5, 201.6, 250.8, 352.3, 533.5, 580.4 ng/site であった。これらの値の単回帰分析の結果、2 つの方法による測定値は有意な正の相関を示した (図 4 A, $R^2=0.981$)。また、本結果を Bland-Altman Plot で示した結果、2 つの測定値の差の平均は 1 ng/site で、SD は 27.6 ng/site となり、系統的誤差を有さない良好な一致を示した (図 4 B)。

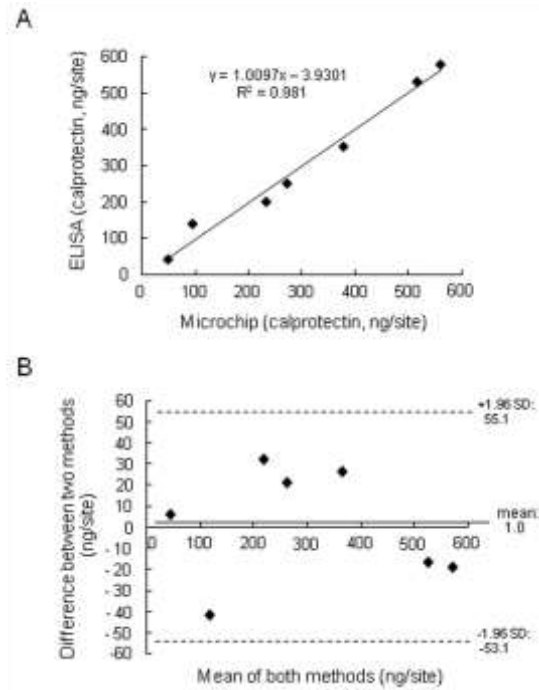


図 4 GCF カルプロテクチンのマイクロチップ ELISA 法と従来型 ELISA 法による測定値の比較

<まとめ>

- 1) マイクロチップ ELISA 法によるカルプロテクチンの測定系を構築した。
- 2) マイクロチップ ELISA 法では、微量の GCF 中のカルプロテクチンの測定が可能となった。
- 3) 本法によるカルプロテクチンの測定値は、従来のマルチプレート ELISA 法の測定値と有意な相違はなく、測定範囲も市販キットと同程度を確保できた。
- 4) 本法では、使用するサンプル量や抗体などの液量が約 1/50 であり、省サンプルある。
- 5) 本法によるカルプロテクチンの測定時間は従来法の約 1/5 であり、短時間での測定が可能である。
- 6) 上記の特徴から、マイクロチップ ELISA 法による GCF 中のカルプロテクチン測定は、歯科治療現場での歯周病診断に貢献することが期待される。

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 4 件)

- ① J Kido, K Abe, S Yatsushiro, M, Bando, Y Hiroshima, T Nagata, T Ooie, M Tanaka, M Kataoka. Determination of calprotectin in gingival crevicular fluid by immunoassay on a microchip. Clin Biochem, 査読有, 2012

DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.009.

② J Kido, M Hino, M Bando, Y Hiroshima.
Diagnosis of periodontal diseases by
biomarkers. Electrical Engineering in
Japan, 査読有, 179, 2012, 233-237.

③ J Kido, M Bando, Y Hiroshima, H Iwasaka,
K Yamada, N Ohgami, T Nambu, M Kataoka, T
Yamamoto, Y Shinohara, I Sagawa, T Nagata.
Analysis of proteins in human gingival
crevicular fluid by mass spectrometry. J
Periodont Res, 査読有, 2011.
DOI: 10:1111/j.1600-0765.2011.01458.x.

④ Y Hiroshima, M Bando, Y Inagaki, C
Mihara, M Kataoka, H Murata, Y Shinohara,
T Nagata, J Kido. Resistin in gingival
crevicular fluid and induction of resistin
release by *Porphyromonas gingivalis*
lipopolysaccharide in human neutrophils.
J Periodont Res, 査読有, 2011
DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01466.x.

[学会発表] (計 4 件)

① 木戸淳一 ほか, バイオマーカーを用
いた糖尿病関連歯周炎の診断研究, 第 28 回
歯科医学を中心とした総合的な研究を推進
する集い, 2012.1.7, 日本歯科医師会館 (東
京都)

② 木戸淳一 ほか, マイクロチップ ELISA
法による歯肉溝滲出液中のカルプロテクチ
ンの測定, 第 54 回秋季日本歯周病学会学術
大会, 2011.9.24, 海峡メッセ下関 (下関市)

③ 坂東由記子 ほか, 歯肉溝滲出液中の
YKL-40 の分析, 第 54 回秋季日本歯周病学会
学術大会, 2011.9.24, 海峡メッセ下関 (下
関市)

④ 板東美香 ほか, 歯肉溝滲出液中のグ
リコアルブミン測定法の確立, 第 54 回春季
日本歯周病学会学術大会, 2011.5.27, 福岡
国際会議場 (福岡市)

[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 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木戸 淳一 (KIDO JUNICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号 : 10195315

(2) 研究分担者

永田 俊彦 (NAGATA TOSHIHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号 : 10127847

(H21 研究分担者)

板東 美香 (BANDO MIKADO)

徳島大学・病院・医員

研究者番号 : 10510000

(H21 研究分担者)

(3) 連携研究者

なし