

## 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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390397

研究課題名（和文）

歯周病原細菌の IgG 抗体価検査の自動化・高速化に関する研究

研究課題名（英文）

Investigation on the automation and speeding up of measurement of the plasma IgG antibody titers against periodontopathic bacteria

研究代表者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50226768

研究成果の概要（和文）：

歯周病原細菌の血漿 IgG 抗体価測定では、全菌体抗原が使用されるためにその標準化・高速化が困難である。本研究では、*Porphyromonas gingivalis* の全菌体抗原の中から歯周病患者が認識する抗原成分を選抜し、16 種類の抗原タンパク質の合成に成功した。さらに、患者血清との反応性を検討した。今後、血清の認識パターンと臨床所見との関連性を分析することによって、測定に有用な抗原分子を特定し、高速自動化を目指す。

研究成果の概要（英文）：

It is difficult to measure serum IgG antibody titers against periodontopathic bacteria stably and speedily. In this study, we have succeeded to select antigens of *Porphyromonas gingivalis* for effective serodiagnosis of periodontitis and synthesized 16 antigens. In addition, we confirmed the reaction against serum obtained from periodontal patients. In the future, we will identify antigens for effective serodiagnosis and establish the automatic diagnostic system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	10,000,000	3,000,000	13,000,000

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：歯学，細菌，感染症，免疫学，プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

国民の 70-80% が罹患しているに関わらず受診率が低く、歯周病専門医による対応が 10% に満たないとされる歯周病に関して、Periodontal medicine 分野の知識が集積され、

医療へと展開されつつある。口腔の慢性的な細菌感染-慢性炎症である歯周病が全身的な疾患に直接的・間接的に関与していることが、内科的疾患にも関与しているので、医科から

の関心が高くなっている。このような状況において、歯周病患者のスクリーニングを歯科のみならず内科（特に内科領域）でも行うことには、受診率を上昇させ、全身の健康を守るために有効と思われる。内科医にも理解出来る指標として歯周病原細菌に対するIgG抗体価は有望であるが、現在実用化されているマニュアル式のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) では多数の検体が集中すると対応しきれない。そこで、プロテオーム関連の技術を用いて、特定の細菌抗原を複数取りだし、従来の検査結果と同等の結果を得ることと検査の自動化・高速化を目指そうとしている。

## 2. 研究の目的

歯周病原細菌の感染度を調べる血清（血漿）IgG抗体価検査は、単に歯周病罹患のスクリーニングや活動度を調べるためだけではなく、糖尿病や動脈硬化症などの全身性の疾患と歯周病との関係を知る際にも有用である。しかし、実用化されているenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) では、超音波破碎した菌の水溶性抗原群（粗抗原）を用いているため、マニュアル操作を避けることができない。そのため、一度に多数の検体検査を行うことが困難である。そこで、血清に反応する抗原群を整理して検査の自動化と高速化を進めることを、本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 抗原タンパク質の精製および同定：健康者および歯周病患者プール血清を用いてイムノアフィニティカラムを作製した。抗原調整液（*Porphyromonas gingivalis* : Pg菌体破碎液）をイムノアフィニティカラムにより粗精製し、MS解析によりタンパク質を同定した。

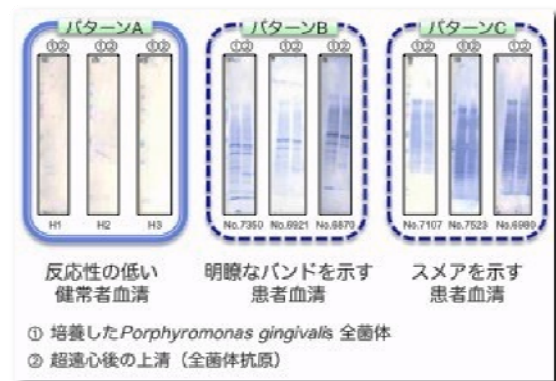
(2) 同定タンパク質の合成：Pg (FDC381株)より、29種類の抗原候補タンパク質の遺伝子をクローニングし、コムギ無細胞系タンパク質発現システムによりタンパク質合成を行った。

(3) 抗原性の評価：各合成タンパク質 (50 ng) の健康者と患者血清 (1/2500希釈) に対する反応性をドットプロット法にて調べた。

(4) ドットプロット法での反応シグナルは、ImageQuantLAS4000を用いて撮影後、ImageQuantTLによりその強度を数値化した。

## 4. 研究成果

(1) Pg全菌体とヒト血清との抗原抗体反応の結果、3種類の反応パターンが確認できた。これらの血清を用いて、3種類のイムノアフィニティカラムを作製した。



<図1>

### ヒト血清との抗原抗体反応パターンの確認

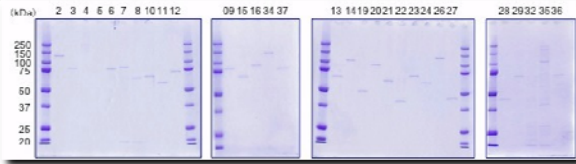
(2) 精製したタンパク質についてスキヤホールド解析を行い、抗原タンパク質の同定を行った。8種類のカテゴリーに分類される37種類のタンパク質を同定した。

No.	Accession#	MW	Category
1	g1345246	242 kDa	糖質
2	g1345245	23 kDa	糖質
3	g1345244	53 kDa	糖質
4	g1345243	145 kDa	糖質
5	g1345242	83 kDa	糖質
6	g1345241	115 kDa	糖質
7	g1345240	28 kDa	糖質
8	g1345239	62 kDa	糖質
9	g1345238	33 kDa	糖質
10	g1345237	45 kDa	糖質
11	g1345236	45 kDa	糖質
12	g1345235	45 kDa	糖質
13	g1345234	45 kDa	糖質
14	g1345233	45 kDa	糖質
15	g1345232	45 kDa	糖質
16	g1345231	45 kDa	糖質
17	g1345230	282 kDa	プロテオーム
18	g1345229	195 kDa	プロテオーム
19	g1345228	24 kDa	プロテオーム
20	g1345227	24 kDa	プロテオーム
21	g1345226	19 kDa	プロテオーム
22	g1345225	42 kDa	糖質
23	g1345224	42 kDa	糖質
24	g1345223	102 kDa	糖質
25	g1345222	115 kDa	糖質
26	g1345221	42 kDa	糖質
27	g1345220	42 kDa	糖質
28	g1345219	42 kDa	糖質
29	g1345218	115 kDa	糖質
30	g1345217	88 kDa	糖質
31	g1345216	115 kDa	糖質
32	g1345215	62 kDa	糖質
33	g1345214	115 kDa	糖質
34	g1345213	42 kDa	糖質
35	g1345212	42 kDa	糖質
36	g1345211	42 kDa	糖質
37	g1345210	88 kDa	糖質

<図2>

### 精製抗原タンパク質の同定

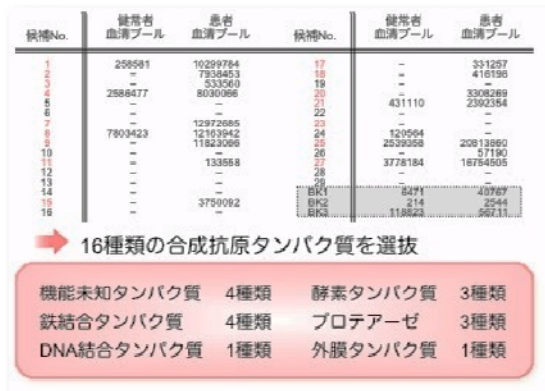
(3) 同定した37種類の抗原タンパク質のうち、29種類の抗原タンパク質の合成に成功した。



<図3>

### 同定した抗原タンパク質の無細胞タンパク質の合成 (SDS-PAGE)

(4) 健常者血清と比べて、患者血清に対するシグナル値が高値を示した16種類の合成抗原タンパク質を選抜した。



<図4>

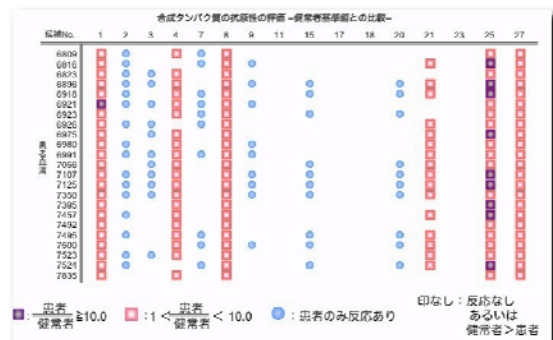
### 血清プールと合成抗原タンパク質との反応性 (血清反応のシグナル値による合成抗原タンパク質の選抜)

(5) 個々の健常者血清との反応性を調べ、最も高いシグナル値を健常者の基準とした。その上で、個々の患者血清との反応性を調べた (図5-a)。抗原タンパク質の種類によって、患者血清に特異的なもの (抗原番号: 2, 3, 7, 9, 15, 20), 健常者にも反応性があるが患者にはさらに反応性があるもの (抗原番号: 1, 4, 8, 21, 25, 27) があることが明らかとなった (図5-b)。



<図5-a>

### 個々の健常者血清および患者血清反応のシグナル値



<図5-b>

### 合成抗原タンパク質の評価

選抜した16種類のPg合成タンパク質を血清IgG抗体価検査に応用することによって、安定した検査抗原の供給、つまり検査の標準化を目指すことができる。さらには、検査の自動化・高速化を実現できる可能性が示唆された。

また、使用する抗原の組み合わせを検討することによって、より有用性の高い検査の確立できる可能性がある。

### 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)

【学会発表】(計 14 件)

- 山口知子, 野添幹雄, 工藤值英子, 平井公人, 江口 徹, 前田博史, 高柴正悟, 歯周病原細菌の血漿IgG抗体価測定の高速度自動化, 第22回日本歯科医学会総会, 2012年11月9-10日, 大阪
- 山口知子, 野添幹雄, 工藤值英子, 山部こころ, 平井公人, 江口徹, 前田博史, 高

柴正悟，血中IgG抗体価検査用の  
*Porphyromonas gingivalis*合成抗原タンパク質の選抜・合成および患者血清との反応性，第4回日本口腔検査学会総会・学術大会，2011年8月27日，福岡

③ 山口知子，野添幹雄，工藤値英子，山部こころ，平井公人，江口徹，前田博史，高柴正悟，血中IgG抗体価検査用の  
*Porphyromonas gingivalis*合成抗原タンパク質の患者血清との反応性，第54回春期日本歯周病学会学術大会，2011年5月27日，福岡

④ 野添幹雄，山口知子，工藤値英子，山部こころ，平井公人，江口徹，前田博史，高柴正悟，血中IgG抗体価測定に用いる  
*Porphyromonas gingivalis*抗原タンパク質の選抜と合成，第54回春期日本歯周病学会学術大会，2011年5月27日，福岡

#### 〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット

発明者：野添幹雄

権利者：サンスター株式会社

種類：特願

番号：特願 2010-279268

出願年月日：2010年12月15日

国内外の別：国内

名称：歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット

発明者：野添幹雄

権利者：サンスター株式会社

種類：特願

番号：特願 2011-228984

出願年月日：2011年10月18日

国内外の別：国内

名称：歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット

発明者：野添幹雄

権利者：サンスター株式会社

種類：PCT

番号：PCT/JP2011/073942

出願年月日：2011年10月18日

国内外の別：国外

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50226768

##### (2)研究分担者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00274001

大原 直也 (OHARA NAOYA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70223930

##### (3)研究協力者

野添 幹雄 (NOZOE MIKIO)

サンスター株式会社