

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790626

研究課題名（和文） 表面プラズモン共鳴を用いた歯周病診断システムの開発

研究課題名（英文） Development of periodontal diagnosis system using surface plasmon resonance.

研究代表者

大西 英知 (ONISHI HIDETOMO)

明海大学歯学部・口腔生物再生医工学講座歯周病学分野・助教

研究者番号：30580279

研究成果の概要（和文）：

本研究事業では、光ファイバ表面プラズモン共鳴センサ(光ファイバSPRセンサ)を用いて、歯周病原細菌が保有する病原因子である *Forsythia detaching factor* (FDF) の検出システムの開発を進めてきた。その結果、FDF と結合する抗FDF IgG抗体をスキヤホールドプロテイン(Outer membrane protein A)を介在させて固定化することによりFDF抗原の定量化に必要な検量線の作成が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

In this project, system for detecting virulence factors of periodontopathic bacteria by using optical fiber surface plasmon resonance sensor (optical fiber SPR sensor) has been developed. We used outer membrane protein A (OmpA) as scaffold protein possessed binding domain for IgG at its constant region. Consequently, we successfully created a standard curve that is required for quantification of FDF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：境界医学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：①表面プラズモン共鳴 ②バイオセンサ ③歯周病診断

1. 研究開始当初の背景

歯周病のポイントオブケア診断の実現において歯周病原細菌の簡単、迅速、高精度の定量方法の確立は重要である。光ファイバ表面プラズモン共鳴センサ(光ファイバ SPR センサ)は抗原抗体反応を非標識で即時定量が可能なナノデバイスとして、診断領域での実

用化が期待されている。我々の研究グループでは、これまでに歯周病原細菌である *Tannerella forsythia* から、病原因子 *Forsythia detaching factor* (FDF) を分離・精製し、FDF の歯周病診断マーカーとしての有用性を報告し、歯周病診断への応用を検討してきた。歯周炎患者と健常者由来の歯肉溝

滲出液中に含まれる当該病原因子に対する抗体レベルの定量を行ったところ、健常者より歯周炎患者で当該抗体レベルが高く、さらに歯周炎患者内での比較において重度部位で健常部位より低い抗体レベルが認められた。さらに当該抗体レベルが歯周組織の破壊状態と相関しており、歯周病診断の指標の一つとして有用であることを報告した。しかし、我々の報告も含め、過去の抗体レベルなどを報告した論文においても、定量法として酵素免疫学的手法は、反応に数時間かかりチェアサイドで行うことは現実的ではない。本研究では、表面プラズモン共鳴の原理を利用したバイオセンサを使用することで、抗原抗体反応をリアルタイムで、かつ即時定量が可能になると考えられる。それにより、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歯周病診断が可能となるであろう。

そこで我々の研究グループでは、上記のような問題点の解決を目指して光ファイバ表面プラズモン共鳴センサの開発に着手した。

2. 研究の目的

我々の研究グループは、これまでに歯周病原細菌である *Tannerella forsythia* から病原因子である FDF の分離を行い、一連の基礎・臨床研究から歯周炎への関与を報告してきた。そこで、これまでの結果を実際の臨床の場で役立てることを目的に歯周病診断に応用することとした。

このようなことから、本研究では、新規歯周病バイオセンサ (Periosensor) を開発し、臨床サンプルから、当該病原因子を検出・定量することを主たる目的とした。

本研究により開発する光ファイバセンサプローブは表面プラズモン共鳴を基本原理とするものである。表面プラズモン共鳴は光によってのみ励起される金属表面に存在す

る自由電子の波である。表面プラズモン共鳴センサは、その共鳴特性を応用したセンサであり、光ファイバセンサ表面の屈折率の変化に非常に敏感で、屈折率変化を高感度に検出できる。このことから屈折率変化を伴う抗原抗体反応などの生体高分子の相互作用の迅速・簡単・高精度なリアルタイム検出やモニタリングの主要なアプリケーションとして広く研究されており、優れた特徴を持つナノデバイスとして、特に医療分野における応用が期待されている。

このような特徴を持つ歯周病バイオセンサ (Periosensor) が開発されれば、個別の歯周炎の状態をリアルタイムに検出・評価できるようになる。また小型化によりポータブル、かつ無線による測定も可能であり、より高度な IT ネットワーク診療も可能となる。

以上のような研究目的を掲げ、研究を行った。

3. 研究の方法

申請者らは、これまで *Tannerella forsythia* から病原因子である *Forsythia detaching factor* (FDF) を用いた基礎研究、および臨床研究により、FDF が歯周炎の病態形成に関与しており、FDF が保有する特性が臨床パラメーターと相関している知見を得ている。そこで FDF を光ファイバ SPR センサを用いた歯周病診断における、標的物質として使用することとした。

初年度には、まず光ファイバ SPR センサによる FDF の検出と、その評価を実施する。光ファイバ SPR センサシステムは株式会社精工技研より提供されたものを使用した。

(1) センサ表面におけるソフト界面の最適化の検討

再現性のある定量を行うには、光ファイバセンサ上に再現性のある自己組織化膜を構

築し、IgG 抗体を規則正しく配列する必要がある。そのため、我々は自己組織化膜構築の各処理ステップ段階から、SPR スペクトルの変化をリアルタイムでモニタリングを行い、センサ表面に構築された自己組織化膜の再現性を検討する。光ファイバセンサに使用される光ファイバの製造およびその性能評価は株式会社精工技研に依頼しておりファイバのロットによる違いは無いことを確認している。

(2) 構築した自己組織化膜を用いた標準溶液の測定

抗原として FDF の精製物を用いて、抗原抗体反応による SPR スペクトルの変化を検討し、検量線の作成を行う。

(3) 慢性歯周炎患者と健常者から採取した唾液サンプルを用いて、当該サンプル中の FDF 濃度を測定

以上(1)～(3)により当該センサの信頼度を、歯科健診・チェアサイドに応用できる水準まで引き上げる。

4. 研究成果

(1) 今回の研究開発の結果、センサ表面の自己組織化膜構築の際に、SPR スペクトルの変化をリアルタイムでモニタリングし、各工程を数値化して確認することでセンサ表面の自己組織化膜を再現性よく構築し、その確認を行うことが可能であることが明らかとなった。これによりファイバセンサのロットによる違い、自己組織化膜の構築による測定結果への影響を大きく排除することができると思われる。

(2) 上記の確認により、当初バラつきの大きかった抗原濃度依存的な、抗原抗体反応の検出が安定し、検量線の作成が可能となった。検出限界および定量限界の確認は今後の課題であるが、 $\mu\text{g/ml}$ のオーダーで検出は可能

であることが明らかとなった。

(3) さらに慢性歯周炎患者と健常者より採取した唾液サンプルの測定を試験的に行った結果、慢性歯周炎患者から FDF による抗原抗体反応の検出に初めて成功した。一方、健常者からは抗原抗体反応は検出できなかった。今後は大規模な唾液サンプルを用いた臨床研究を行う予定である。また感度の向上は並行して行っていく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Onishi H, Ro M, Hayashi J, Tatsumi J, Namba S, Yatabe K, Arakawa S, Izumi Y, Shin K. 査読あり, 2013. Modification of forsythia detaching factor by gingival crevicular fluid in periodontitis. Archives of oral biology, 58, pp.1007-1013
2. 石井麻紀子, 辰巳順一, 小野裕貴, 小川洋一, 遠藤 学, 大西英知, 大塚秀春, 林 丈一郎, 申 基喆. 査読あり, 2012. 不織布フィルター法で採取したイヌ末梢血由来単核球と β -リン酸三カルシウム微細顆粒のイヌにおける実験的骨欠損部への骨再生効果. 明海歯科医学, 第 41 巻 2 号, pp. 67-80.

[学会発表] (計 6 件)

1. Onishi H, Nakajima T, Ro M, Ono Y, Hayashi K, Gon H, Yatabe K, Arakawa S, Izumi Y, Shin K. Cleavage of Forsythia detaching factor by gingival crevicular fluid. The 98th Annual Meeting of American Academy of Periodontology, September 29, 2012,

Los Angeles, USA.

2. 大西英知, 呂 宗彦, 小野裕貴, 林 鋼兵, 寺西麻里奈, 西村将吾, 石井麻紀子, 谷田部一大, 申 基喆. 光ファイバ表面プラズモンセンサを用いた歯周病原細菌由来病原因子の定量法の構築 第1報. 第55回秋季日本歯周病学会学術大会, つくば, 2012年9月23日, 茨城.
3. 成田宗隆, 辰巳順一, 寺西麻里奈, 市村光, 大西英知, 谷田部一大, 申 基喆. 光線力学療法を用いたインプラント周囲炎治療の臨床研究. 第22回日本歯科医学会総会, 2012年11月9日, 大阪.
4. 大西英知. 表面プラズモン共鳴光ファイババイオセンサを利用した抗Forsythia Detaching Factor 抗体の検出に関する研究. 第17回明海歯科医学会学術大会, 2012年6月7日, 埼玉.
5. 呂宗彦, 大西英知, 林 丈一朗, 荒川真一, 中島琢磨, 和泉雄一, 申 基喆. 歯周炎患者歯肉溝滲出液によるTannerella forsythia Forsythia Detaching Factor の分子量変化. 第55回春季日本歯周病学会学術大会, 2012年5月18日, 札幌.
6. Hideharu OTSUKA, Koichiro MIKAMI, Satomi NAMBA, Yuki ONO, Munehiko RO, Miki MARUYAMA, Munetaka NARITA, Hidetomo ONISHI, Kazuhiro YATABE, Joichiro HAYASHI, Junichi TATSUMI, and Kitetsu SHIN. Clinical Evaluations of Short Implants in Patients with Periodontal Diseases. Japan-China Dental Conference 2012, April 26, 2012, 成都, 中国.

[その他]

ホームページ等

http://www.meikai.ac.jp/01about/catetem_p2/2011-0325-2036-1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 英知 (ONISHI HIDETOMO)

研究者番号 : 30580279

(2) 研究分担者

q 無し ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号 :