

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：30110

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670850

研究課題名(和文) 歯周病原細菌をターゲットとした歯肉溝挿入型微小バイオセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel biosensor for detecting pathogenic bacteria and their related pathogenic factors of periodontal diseases in the gingival sulcus.

研究代表者

遠藤 一彦 (Endo, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70168821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病の病原菌やそれらが分泌する病原因子を計測できるバイオセンサーを開発することによって、歯周病の病態を短時間で評価できる診断法を確立することを目的とした。

歯周病原菌である *P. gingivalis* が分泌する病原因子 (Kgp) によって分解・生成される K6F ペプチドをその抗体を修飾した水晶振動子を用いて計測したところ、10 ng/ml から 1,000 ng/ml の範囲で共振周波数変化と濃度の対数との間に直線関係が得られた。一方、電位差測定法では K6F ペプチドの検出限界は約 5 mg/ml であり、水晶振動子マイクロバランス法よりは高かったが、短時間で計測できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop a novel biosensor which detects pathogenic bacteria as well as pathogenic factors released from the bacteria for providing a diagnostic method of periodontal diseases.

The titanium sensor on the quartz crystal with K6F peptide antibody was made and measured the concentration of K6F peptide which was one of the degradation products of human gingival fibroblasts by a pathogenic factor (Kgp) released from *P. gingivalis*. A straight line relation was obtained between the resonant frequency change of the quartz crystal immobilized with K6F peptide antibody and the logarithm of the concentration of K6F peptide in the range from 10 ng/ml to 1,000 ng/ml. The detection limit of K6F peptide for the potential measurement method using the titanium wire sensor immobilized with K6F peptide antibody was approximately 5 mg/ml, which was significantly higher than that for quartz crystal microbalance method.

研究分野：生体材料工学

キーワード：バイオセンサー 抗原-抗体反応 歯周病原菌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 歯周病の診断と治療方針の決定に有用な計測システム構築の必要性

歯肉縁下の細菌検査を行うことは、歯周局所の病態の把握および抗菌療法における抗菌薬の選択において非常に重要である。現在、主に用いられている細菌検査として、細菌の酵素活性を利用した方法およびリアルタイム PCR を用いた方法がある。酵素活性を利用した方法は、チェアサイドでできる簡便さはあるが、菌種の同定ができず定性的な結果しか得られない。また、リアルタイムPCRを用いた方法は、菌種の同定ならびに菌数の定量的な解析結果が得られるが、分析に時間要することから広く普及するまでには至っていない。そこで、歯肉溝浸出液中に存在する特定細菌種やその細菌が分泌する病原因子を短時間で計測できる新たなセンサーが開発できれば、歯周病の診断と治療方針の決定にきわめて有効である。

### (2) 診断に活用できる生体情報を計測するバイオセンサーの開発

バイオセンサーとは、電極上に固定化されたタンパク質（酵素、抗体など）と対象物質（特異基質、抗原など）との化学的相互作用を電極の電位や電流あるいは共振振動数などの電気的出力信号として取り出し、対象物質の定量的な計測を行うデバイスである。しかし、歯肉溝浸出液中に含まれる特定細菌種やその細菌が分泌する病原因子を診療室内のチェアサイドで使用可能な小型バイオセンサーや歯肉溝内に直接挿入して対象物質の濃度をリアルタイムで計測できる微小バイオセンサーは未だ実用化されていない。また、現在までのところ、口腔内の疾患の診断に利用可能なセンサーを開発する取り組みは少なく、実用化に至った例は筆者等が知る限り国内外を問わず一例もない。

## (3) 本研究の意義

歯科領域では診断に有効な計測技術の開発や実用化に関する研究は極めて少なく、歯周病の診断と治療方針の決定に有用なバイオセンサーの開発は、歯科臨床や歯科医学の発展に大きく貢献するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

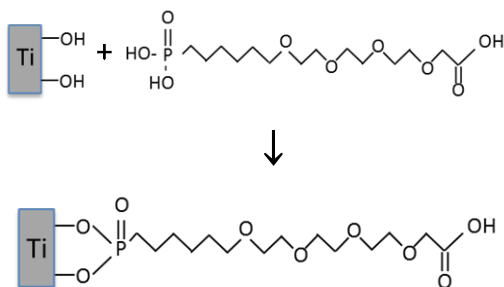
そこで本研究では、生体に対する侵襲がなく、かつ短時間で歯周病の病原菌やそれらが分泌する病原因子を計測できるバイオセンサーを開発することを目的とした。具体的には、チタン電極の表面に生体由来の機能性分子を固定化する技術を確認し、抗原-抗体反応を利用して歯周病の診断に有用な情報を得る微小バイオセンサーの製作を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 機能性分子（抗体）をセンサー検出部表面に化学修飾する手法の検討

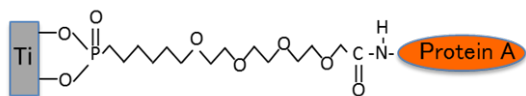
#### ① センサーの材質と抗体を結合させるプロセスの検討

センサーの検出部に用いる電極には、化学的に安定で歯肉溝内に挿入した場合にも生体組織に対する安全性に問題がない純チタンを用いた。チタン表面に抗体を固定化するために、まず、チタン表面に存在する水酸基にカルボキシ基を有するホスホン酸誘導体（11-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]undecylphosphonic acid) (EG<sub>3</sub>-HPA) を結合させ、チタン表面にカルボキシ基 (-COOH) を導入した。



次にチタン表面に導入したカルボキシ基

と Protein A のアミノ基を縮合剤 (EDC) の存在下で反応させ、抗体の Fc 部と結合する Protein A をチタン表面に固定化した。



Protein A を表面に結合させたチタン電極を濃度 0~500  $\mu\text{g/ml}$  の抗体 (IgG) を含む緩衝液に浸漬し、表面に抗体を固定化した。抗体を表面に固定化したチタンセンサーの断面図を図 1 に示す。



図 1 抗体を結合したチタン電極の断面構造

## ②各処理プロセスにおける電極表面のキャラクタリゼーション

チタン表面への  $\text{EG}_3\text{-HPA}$  の結合状態は、X線光電子分光装置 (ESCA-850、島津製作所) を用い、C 1s、O 1s、N 1s および P 2p スペクトルを測定することによって調べた。また、FT-IR (Frontier T、パーキンエルメージャパン) を用いて、 $\text{EG}_3\text{-HPA}$  が有するカルボキシ基の伸縮振動に由来する吸収ピークを測定した。Protein A ならびに抗体 (IgG) の結合量は、ESCA を用いて分析した。Protein A をそれぞれ 1, 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  含有した 1.47% 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド溶液に ( $\text{EG}_3\text{-HPA}$ ) を結合させたチタン試料を 4°C で 72 時間浸漬し、N 1s スペクトルの強度から結合した Protein A の量を推定し、処理に用いる溶液の Protein A 濃度を決定した。同様に IgG を 0~500  $\mu\text{g/ml}$  含む緩衝液に Protein A を固定化したチタンセンサーを浸漬し、Protein A に結合した IgG の量を ESCA で分析した。

## ③抗原の検出方法の検討

チタン電極による抗原-抗体反応の検出には、以下に示す二通りの方法を検討した。低濃度の抗原の検出と定量性に優れた水晶振動子マイクロバランス法と歯肉溝内に直接挿入可能なチタン微小電極を用いた電位差測定法である。水晶振動子マイクロバランスには、水晶振動子 (共振周波数 30 MHz) にデュアルチタン電極を有する NAPiCOS Lite (日本電波工業) を用いた。電位差の測定には自動分極システム (HZ-3000、北斗電工) を用いた。本研究では、代表的な歯周病原菌である *P. gingivalis* が分泌する病原因子 (リシン特異的ジンジパイン、Kgp) によって分解・生成されるサイトケラチン 6 フラグメント (K6F ペプチド) を K6F ペプチドの抗体を修飾したチタン電極を用いて計測することを試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 架橋剤として用いた $\text{EG}_3\text{-HPA}$ のチタン電極表面への結合

図 2 と図 3 に  $\text{EG}_3\text{-HPA}$  を結合させたチタン表面を ESCA で分析して得た P 2p と O 1s スペクトルを示す。 $\text{EG}_3\text{-HPA}$  のホスホン酸基に由来する P 2p スペクトルのピークが 133.3 eV に明瞭に認められ、 $\text{EG}_3\text{-HPA}$  分子がチタン表面に結合していることが確認された。また、O 1s スペクトルには、チタン表面に存在する不動態皮膜 ( $\text{TiO}_2$ ) に由来するピークの他、 $\text{EG}_3\text{-HPA}$  分子のカルボキシ基に由来するピークやチタン表面との結合を示唆する (Ti-O-P) に由来するピークがみられた。

$\text{EG}_3\text{-HPA}$  を結合させたチタン表面を FT-IR で分析したところ、 $1733\text{ cm}^{-1}$  に  $\text{EG}_3\text{-HPA}$  のカルボキシ基 (-COOH) の伸縮振動に由来する明瞭な吸収ピークがみられた。これらの結果から、 $\text{EG}_3\text{-HPA}$  分子はチタン表面に結合していることが確認された。

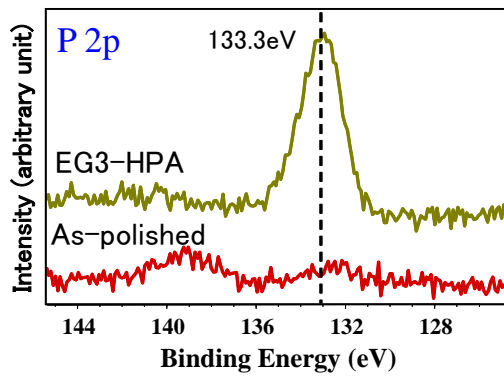


図2 EG<sub>3</sub>-HPAを修飾したチタン表面で得られたP 2pスペクトル

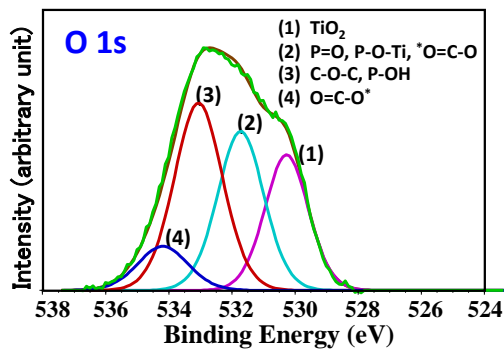


図3 EG<sub>3</sub>-HPAを修飾したチタン表面で得られたO 1sスペクトル

(2) プロテイン A のチタン電極表面への固定化

図4にEG<sub>3</sub>-HPAにProtein Aを結合させたチタン電極表面で得られたESCA N 1sスペクトルの強度と処理液に用いた溶液のProtein A濃度との関係を示す。Protein Aに含まれる窒素に由来するN 1sスペクトルのピーク強度は、Protein Aの濃度依存的に上昇し、25 μg/mlで一定値に達した。この結果から、EG<sub>3</sub>-HPAを介してチタン表面にProtein Aを固定化できること、また、処理液のProtein Aの至適濃度は25 μg/mlであることが明らかとなった。

(3) プロテイン A を固定化したチタン表面への抗体の結合

図5にProtein Aに抗体(IgG)を結合させたチタン表面で得られたESCA N 1sスペクトルの強度と処理液に用いた溶液のIgG濃度との関係を示す。IgGに含まれる窒素に由来

するN 1sスペクトルのピーク強度は、処理液のIgG濃度依存的に上昇し、300 μg/mlで一定値に達した。この結果から、EG<sub>3</sub>-HPAおよびProtein Aを介してチタン表面に抗体を結合させる処理液の至適濃度は300 μg/mlであることが明らかとなった。

(4) 抗体を結合したチタン電極を用いたK6Fペプチドの計測

図6にK6Fペプチドの抗体を結合させたチタン電極を有する水晶振動子を用いて、抗原であるK6Fペプチドの濃度と共振周波数変化との関係を調べた結果を示す。10 ng/mlから1,000 ng/mlの範囲で、共振周波数変化と濃度の対数との間に直線関係が得られ、広い濃度範囲でK6Fペプチドを定量できることが明らかとなった。一方、電位差測定法ではK6Fペプチドの検出限界は約5 mg/mlであり、水晶振動子マイクロバランス法と比較すると高かったが、短時間かつ簡便に計測できることが明らかとなった。以上の結果から、本研究で開発した抗原-抗体反応の検出を可能としたチタン電極を用いて*P. gingivalis*が分泌する病原因子による歯肉上皮細胞の分解産物であるK6Fペプチドを検出することが可能であり、歯周病の病態を短時間に評価できる可能性が示唆された。

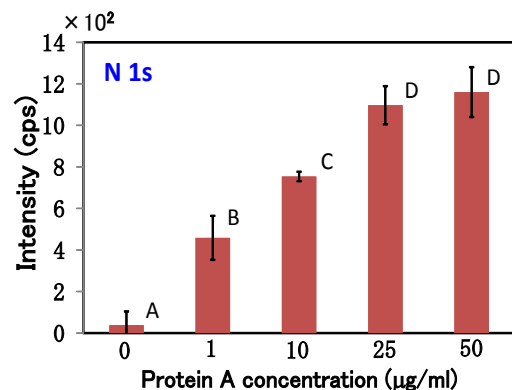


図4 EG<sub>3</sub>-HPAにProtein Aを結合させたチタンセンサー表面で得られたESCA N 1sスペクトルの強度と処理液に用いた溶液のProtein A濃度との関係

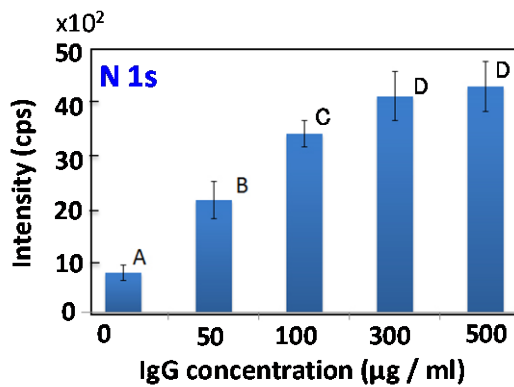


図5 Protein Aに抗体 (IgG) を結合させたチタン表面で得られたESCA N 1s スペクトルの強度と処理液に用いた溶液のIgG濃度との関係

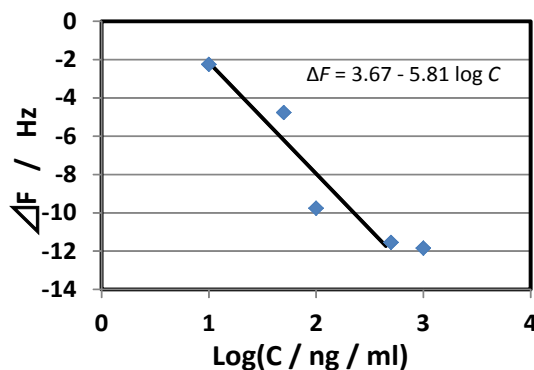


図6 K6F ペプチドの濃度と抗体を結合させた水晶振動子の共振周波数変化との関係

## 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 3 件)

(1) 金田研郎、門 貴司、根津尚史、伊藤大輔、市岡勇輝、遠藤 一彦、古市保志：歯周病原細菌計測システムの開発に関する研究、第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、平成 27 年 11 月 12 日、東京都。

(2) 金田研郎、門 貴司、根津尚史、伊藤大輔、市岡勇輝、遠藤 一彦、古市保志：歯周病検査用生体内情報モニターの開発に関する研究、第 59 回春季日本歯周病学会学術大会、平成 28 年 5 月 20 日、鹿児島市。

(3) 金田研郎、門 貴司、根津尚史、伊藤大輔、市岡勇輝、遠藤 一彦、古市保志：歯周病原細菌計測システムの開発に関する研究、

第 23 回日本歯科医学会総会、福岡市。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠藤 一彦 (ENDO Kazuhiko)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：70168821

### (2) 研究分担者

古市 保志 (FURUICHI Yasushi)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：80305143

### (3) 研究分担者

門 貴司 (KADO Takashi)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号：20632540

### (4) 研究分担者

建部 二三 (TAKEBE Futami)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：10534448