

機関番号：32622  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590584  
 研究課題名（和文）高感度同時検出発光酵素イムノアッセイの開発と3種歯周病原菌の検出への応用  
 研究課題名（英文）Development of highly sensitive simultaneous bio- and chemi-luminescent enzyme immunoassay for periodontal pathogens genes  
 研究代表者  
 伊藤 克敏（ITO KATSUTOSHI）  
 昭和大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：20223141

研究成果の概要（和文）：代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa 菌)、*Treponema denticola* (Td 菌) の3種の歯周菌遺伝子の検出を PCR 法及びイクオリン (Aq)、ビオチン化ルシフェラーゼ (b-luc)、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の3成分同時検出生物化学発光検出イムノアッセイを組み合わせた方法で行った。

歯周病菌遺伝子の Multiplex PCR の増幅産物を希釈し三成分同時発光検出酵素イムノアッセイにより歯周病菌遺伝子の検出したところ、Pg 菌、Aa 菌では PCR 増幅産物の 12800 倍希釈まで、Td 菌では 3200 倍希釈までそれぞれ検出可能であった。

研究成果の概要（英文）：We have developed simultaneous luminometric assay for aequorin, firefly luciferase and horseradish peroxidase. In this study, we applied this analysis method to the detection of the polymerase chain reaction (PCR) products. We selected the periodontal pathogens genes as a measurement genes. Among putative periodontal pathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* are related most as etiological agents in periodontal disease. Therefore, detection of those three pathogens are useful to diagnosis for periodontal disease. We developed simultaneous detection of multiplex PCR products of three periodontal pathogens by using the bio- and chemi-luminescent enzyme immunoassay (BCLEIA). The simultaneous BCLEIA could be highly sensitive detection compared with conventional agarose gel electrophoresis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：イクオリン，ルシフェラーゼ，ペルオキシダーゼ，生物発光，化学発光，同時検出，イムノアッセイ，歯周病菌遺伝子

#### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は広く蔓延している疾患の一つであり、日本人の 24 歳以下では約半数に出血や歯石沈着などの初期症状が見られている。さらに、自覚症状が乏しい疾患であることから、年齢と共に増加し 30~69 歳では 80%以

上の罹患率になっていると報告されている。歯周病は、食生活、歯磨き習慣、喫煙、ストレスなどの日常生活が、歯周病の進行に大きく影響すると考えられていることから、生活習慣病に指定されており、21 世紀の国民健康づくりの政策として発足した、「健康日本 21」

にも取り入れられ注目されている。

また、歯周病は歯の症状だけでなく、全身疾患にも影響を与えると考えられているため、多方面からも関心が高まっている。糖尿病や骨粗鬆症などの全身疾患が歯周病へ作用する因果関係は以前から報告されていたが、歯周病の全身疾患の進行への関わりについての検証とメカニズムの解析も急速に行なわれている。近年、この領域は **Periodontal medicine** と呼ばれ「歯周病に医学的根拠をもって予防や治療をしたり、歯周病がどのように全身的な状態に影響するか、さらには全身的な状態が歯周組織にどのように関わるかを研究すること」と定義されている。

歯周病は歯周病菌の感染により、歯周組織に炎症が起こる疾患であるが、その炎症部位から産生される炎症性サイトカインや菌自体が血中へ流れ込み、糖尿病、心臓血管疾患、呼吸器疾患などの様々な全身疾患にも影響を与えると考えられている。従って、歯周病の予防や早期発見は、全身の健康管理の観点からも患者の **Quality Of Life** を高めるために、きわめて重要であると考えられる。

口腔内の歯周病菌は、現在までに 20 種以上存在していることが知られており、その中でも *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌)、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa 菌)、*Treponema denticola* (Td 菌) の 3 種の菌が、歯周病の発症に最も関連していると考えられている。これら 3 種の菌はいずれも、一般的な歯周炎である成人性歯周炎や、進行の早い若年性歯周炎で検出される。特に Pg 菌と Td 菌は成人性歯周炎から、Aa 菌は若年性歯周炎から多く検出される菌であり、進行に大きく関与していると考えられる。これら 3 種の歯周病菌を特異的かつ迅速に検出を行なうことができれば、歯周病の早期発見に大きく貢献できると考えられる。

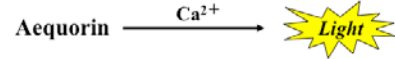
現在の歯周病菌の検出法に、チェアーサイドで行なうことができるトリプシン様酵素活性測定法がある。これは、プラーク細菌のトリプシン様活性を示す細菌でのみにしか適用できず、菌数が  $10^6$  程度存在しなければ検出できない。また、PCR 法により患者のサンプル中の遺伝子を増幅し、アガロースゲル電気泳動により菌種の同定や定量を行なう方法では、判定に長時間を要することから、実際の臨床への適用は困難である。よって検出法のさらなる迅速化と高感度化が求められている。

## 2. 研究の目的

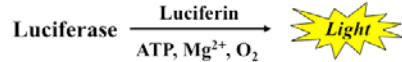
上記の問題点の克服のため、本研究では、代表的な歯周病菌である Pg 菌、Aa 菌、Td 菌を測定対照物とした Multiplex PCR 増幅を行ない、その増幅産物をイクオリン、ビオチン化ルシフェラーゼ、HRP の 3 酵素同時測定法を用いた 3 成分同時生物化学発光検出

酵素イムノアッセイ (BCLEIA) による迅速、簡便かつ高感度な検出法の開発を行なった。本研究で使用したイクオリン、ビオチン化ルシフェラーゼの生物発光法及び HRP の化学発光法の 3 酵素同時生物化学発光測定法の原理を Fig. 1 に示す。

### First Step



### Second Step



### Third Step

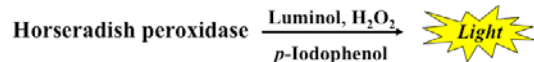


Fig. 1 Principle of simultaneous luminometric assay for Aequorin, Luciferase and Horseradish peroxidase

第 1 段階の発光ではイクオリンをカルシウムイオンで発光検出する。第 2 段階ではルシフェラーゼをルシフェリン、ATP、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{O}_2$  存在下で発光検出する。第 3 段階では HRP をルミノール、過酸化水素を基質として発光検出する。その時、残存するルシフェラーゼ由来の発光を消去する目的でカチオン系界面活性剤である塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium chloride, BAC) を、また、HRP の発光増強を目的とし、*p*-Iodophenol をルミノール溶液中に添加した。

ルミノール/ $\text{H}_2\text{O}_2$  を基質とする HRP の化学発光は、発光増強剤の添加により著しく増発光し、さらに発光持続時間を延長する効果があることを Thorpe らは見いだしている。発光増強剤としてルシフェリンなどの 6-ヒドロキシベンゾチアゾール誘導体が挙げられ、 $3.6 \text{ mmol/L}$  のルシフェリンにより約 200 倍の発光増強があると報告されている。本 3 酵素同時測定法では第 2 段階の発光反応において、ルシフェリンを使用しているため、その増発光が期待される。また、フェノール誘導体も発光増強剤の一つであり、その中でも *p*-Iodophenol が極めて強く発光を増強する効果があることが報告されている。*p*-Iodophenol の増発光メカニズムは、*p*-Iodophenol が HRP によりラジカル化され、これがルミノールと反応し増発光することによる。この発光増強剤を用いることで、さらなる高感度検出が可能となる。

3 種の歯周病菌遺伝子の Multiplex PCR を行い、その増幅産物を三成分同時 BCLEIA により検出する方法を検討した。

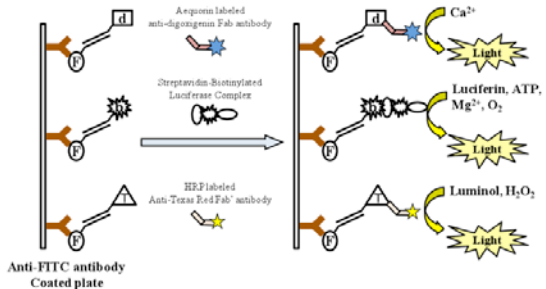
Pg 菌、Aa 菌、Td 菌のプライマーには澤田らの研究により選択されたものを用いた。Pg 菌、Aa 菌は 16S rRNA 遺伝子、Td 菌は aspartate carbamoyltransferase 遺伝子から

設計したプライマー配列を用い、その3種プライマーのForward側にTR、ビオチン、ジゴキシゲニン、Reverse側にFITCをそれぞれ標識した (Table 1)。これらの標識プライマーを用い Multiplex PCR を行なった。また Pg 菌、Aa 菌の Reverse プライマーは保存された配列を選択した。

Table 1 Primers for periodontal pathogens genes

Species	Primer	Sequence	Product
Pg	PgF	5' (Texas Red) TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC-3'	197 bp
	Pg.AaR	5' (FITC) ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'	
Aa	AaF	5' (biotin) ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG-3'	360 bp
	Pg.AaR	5' (FITC) ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'	
Td	TdF	5' (digoxigenin) ACT CAG GAG CTG CTT GAC GAA-3'	895 bp
	TdR	5' (FITC) CGG CAG ACA GCC TCT TTA AAT-3'	

得られた PCR 増幅産物を希釈し、抗 FITC 抗体を固相化したマイクロタイタープレートに加え室温で 1 時間反応させた。洗浄後、Aq 標識抗ジゴキシゲニン Fab 抗体、SA/b-Luc 複合体、HRP 標識抗 TR Fab' 抗体溶液を各々添加して室温で 1 時間反応させた。再洗浄後、三成分同時発光測定による測定



を行なった (Fig. 2)。

Fig. 2 Principle of simultaneous multiplex luminescent enzyme immunoassay

### 3. 研究の方法

(1) HRP 標識抗 Texas Red Fab' 抗体の調製  
HRP 標識抗 TR Fab' 抗体の調製は Fab' とした抗 TR 抗体とマレイミド化した HRP を結合させて調製した。

抗 TR 抗体の Fab' は以下の方法で調製した。0.9% NaCl を含む 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した PD-10 カラムを用い、調製した抗 TR 抗体 2.03 mg ( $1.35 \times 10^{-8}$  mol) をゲル濾過した。得られた画分のうち 280 nm での吸光度の高い画分を集め限外濾過カートリッジで濃縮した。これに 0.9% NaCl を含む 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 50  $\mu$ L に溶解した  $7.9 \times 10^{-5}$  g のペプシン ( $2.25 \times 10^{-9}$  mol) を添加し 37°C で一晩放置した。次にこの反応液を 0.3 mol/L NaCl 及び 5 mmol/L EDTA を含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Superdex 200 10/300 GL を用いゲル濾過した。分子量 100 kDa 程度の 280 nm の吸光度の高い画分を集め限外濾過カートリッジで濃縮し  $F(ab')_2$  とした。得られた  $F(ab')_2$  に 0.1 mol/L 2-メルカプトエタノール 50  $\mu$ L 添加し、37°C で 90 分放置すること

で還元した。攪拌後、HPLC により精製した。分子量 50 kDa 程度の 280 nm の吸光度の高い画分を抗 TR Fab' 抗体とした。

次に、以下の方法でマレイミド化 HRP を調製した。0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 mL 中に溶解した 1 mg の HRP ( $2.5 \times 10^{-8}$  mol) にジメチルスルホキシド (DMSO) 50  $\mu$ L に溶解した  $2.3 \times 10^{-4}$  g の EMCS ( $7.5 \times 10^{-7}$  mol) を添加し 4°C で一晩攪拌した。次に 0.3 mol/L NaCl 及び 5 mmol/L EDTA を含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-25 カラムを用い、過剰な EMCS を除き、403 nm での吸光度の高い画分をマレイミド化 HRP とした。

調製した  $8.0 \times 10^{-4}$  g の抗 TR Fab' 抗体 ( $1.6 \times 10^{-8}$  mol) と  $8.9 \times 10^{-4}$  g のマレイミド化 HRP ( $2.1 \times 10^{-8}$  mol) を混合して 4°C で一晩放置し、その反応液を HPLC により精製した。250  $\mu$ L ずつ分画し 280 nm、403 nm の吸光度、酵素活性、免疫活性を測定し、免疫活性の高い画分を HRP 標識抗 TR Fab' 抗体とした。最後に BSA を最終濃度が 1% になるように添加し、使用時まで -80°C で保存した。

#### (2) 歯周病菌遺伝子の Multiplex PCR

PCR は Pg 菌、Aa 菌、Td 菌の 3 種を同時に増幅する Multiplex PCR で行なった。PCR 溶液は鋳型 DNA 1  $\mu$ L (10 ng/ $\mu$ L)、10x reaction buffer 2.5  $\mu$ L、2.5 mM dNTP 1  $\mu$ L、10  $\mu$ M プライマー 5 種を各 0.5  $\mu$ L、PfuTurbo DNA polymerase 1  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 適量を加え、全量 25  $\mu$ L で行なった。また PCR 反応は 95°C、2 分間加熱後、95°C、0.5 分間、60°C、0.5 分間、72°C 1 分間を 1 サイクルとし、これを 20 サイクル行ない、最後に 72°C、7 分間の伸長反応を行なった。

#### (3) 歯周病菌遺伝子の三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイ

##### ① 抗 FITC 抗体固相化プレートの調製

抗 FITC 抗体の最終濃度が 5  $\mu$ g/mL になるように固相化抗体希釈用緩衝液で希釈し、96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加した。室温で一晩放置し吸着させた後、各ウェル内の抗体溶液を除去した。ポストコーティング溶液 200  $\mu$ L を分注し、使用時まで 4°C で保存した。

##### ② ストレプトアビジン/ビオチン化ルシフェラーゼ複合体の調製

SA/b-Luc 複合体の調製は辰巳らの方法に準じて行なった。SA と b-Luc を各々酵素希釈用緩衝液で  $1 \times 10^{-8}$  mol/L に希釈し、等量ずつ混和した後室温で 30 分間放置し使用した。調製した SA/b-Luc 複合体は 4°C の保存で 1 週間以上安定であった。使用時は酵素希釈用緩衝液で b-Luc を濃度  $1 \times 10^{-9}$  mol/L となるように希釈した。

③三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイ

抗 FITC 抗体を固相化した 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに免疫反应用緩衝液で希釈した PCR 増幅産物 100  $\mu\text{L}$  を加え室温で一時間放置した。洗浄後、酵素希釈用緩衝液で 8000 倍希釈した Aq 標識抗ジゴキシゲニン Fab 抗体溶液、 $1 \times 10^{-9}$  mol/L の SA/b-Luc 複合体溶液及び 1000 倍希釈した HRP 標識抗 TR Fab' 抗体溶液を各 50  $\mu\text{L}$  加え室温で一時間放置した。再洗浄後、三酵素同時発光検出法により Aq、b-Luc 及び HRP の活性を測定した。最初にカルシウム溶液 50  $\mu\text{L}$  を加え、直後に 1 秒間の発光量を測定し Aq 活性とした。次にルシフェラーゼ基質液 50  $\mu\text{L}$  を加えた 1 秒後の 1 秒間の発光量を測定し b-Luc 活性とした。最後にルミノール溶液 50  $\mu\text{L}$  を加え室温で 7 分間放置後、1 秒間の発光量を測定し HRP 活性とした。

(4) 歯周病菌遺伝子の抽出

歯肉縁上プラークからの DNA 抽出操作は QIAamp® DNA Mini Kit を用いて行った。ボランティアから採取した歯肉縁上プラークを Tissue Lysis buffer 180  $\mu\text{L}$  中に懸濁させ Proteinase K 溶液 20  $\mu\text{L}$  を添加した。56°C で 3 時間以上放置した後、7500 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した溶液に Lysis buffer 200  $\mu\text{L}$  を添加した後、70°C で 10 分間放置した。次に 100 %エタノール 200  $\mu\text{L}$  を添加した。溶液全量をシリカメンブレンスピнкаラムに移した後、8000 rpm で一分間遠心しスピнкаラムに DNA を吸着させた。次にスピнкаラムに 500  $\mu\text{L}$  の Wash buffer 1 を添加し 8000 rpm で一分間遠心した。その後、スピнкаラムに 500  $\mu\text{L}$  の Wash buffer 2 を添加し 15000 rpm で 4 分間遠心した。スピнкаラムに吸着した DNA の溶出は 100  $\mu\text{L}$  の Elution buffer 3 を添加して 5 分間室温で放置した後、8000 rpm で一分間遠心した。得られた濾液を DNA 溶液とし溶出操作を 10 回繰り返し 100  $\mu\text{L}$  ずつ DNA 溶液を分取した。得られた DNA 溶液は使用時まで 4°C で保存した。

4. 研究成果

(1) イクオリン、ビオチン化ルシフェラーゼ及び西洋わさびペルオキシダーゼの 3 酵素同時発光検出

イクオリン、ビオチン化ルシフェラーゼ及び HRP の 3 酵素同時測定による標準曲線を Fig. 3 に示す。本同時測定系によるイクオリンの検量域は  $1.2 \times 10^{-19}$  ~  $4.8 \times 10^{-16}$  mol/assay、最小検出感度は  $2.64 \times 10^{-21}$  mol/assay (blank+3SD)、各標準濃度における同時再現性は 1.5 ~ 7.7% (CV%, n=8) であった (Fig. 3a)。ビオチン化ルシフェラーゼの検量域は  $5.3 \times 10^{-18}$  ~  $2.2 \times 10^{-14}$  mol/assay、最小検出感度は  $7.37 \times 10^{-19}$  mol/assay (blank+3SD)、

各標準濃度における同時再現性は 3.2 ~ 8.9% (CV%, n=8) であった (Fig. 3b)。HRP の検量域は  $4.9 \times 10^{-16}$  ~  $3.1 \times 10^{-14}$  mol/assay、最小検出感度は  $3.87 \times 10^{-17}$  mol/assay (blank+3SD)、各標準濃度における同時再現性は 1.6 ~ 9.6% (CV%, n=8) であった (Fig. 3c)。各々の酵素の測定においても同一ウェルに混在する他の酵素の影響は見られず、安定した測定が行なえた。本 3 酵素同時測定法の全測定は約 13 分で完了した。

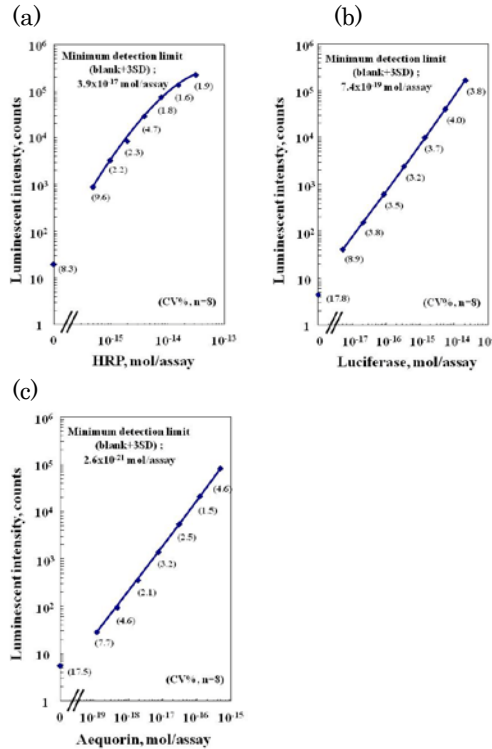


Fig. 3 Standard curves of Aequorin, Luciferase and HRP

(2) 三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイ

新たに調製した HRP 標識抗 TR Fab' 抗体を用いて三成分同時 BCLEIA の検討を行った。Pg 菌を HRP 標識抗 TR Fab' 抗体、Aa 菌を SA/b-Luc、Td 菌を Aq 標識抗ジゴキシゲニン Fab 抗体でそれぞれ検出した。Pg 菌、Aa 菌は PCR 増幅産物の 12800 倍希釈まで検出可能であった。Td 菌は 3200 倍希釈まで検出可能であった。Pg 菌を Aq 標識抗 TR 抗体、Aa 菌を HRP 標識抗ジゴキシゲニン Fab 抗体、Td 菌を SA/b-Luc 複合体で検出する方法と比較すると Aa 菌ではほぼ同程度の感度が得られ、Pg 菌では 22 倍、Td 菌では 1.8 倍高い感度が得られた。(Table 2) 新たに調製した抗 TR 抗体が高力価であるため Pg 菌の測定感度が向上したと考えられた。Aa 菌の検出においては PCR 増幅効率が十分に高く HRP 標識抗ジゴキシゲニン Fab 抗体、SA/b-Luc 複体のどちらを用いても良好な感度が得られるため、ほぼ同程度の感度が得られたと考えられた。Aq を Td 菌の検出に使用したのもかかわらず、

Td 菌の高感度化は b-Luc を用いて検出する方法と比べて 1.8 倍に留まった。これは Td 菌の PCR の増幅効率が悪いためと考えられた。Td 菌をより高感度に検出するには PCR 増幅産物の塩基配列が短くなるようなプライマー選択をして Td 菌の増幅効率を改善する必要があると考えられた。

Table 2 Luminescent intensity of PCR products diluted to 400 times

<i>Porphyromonas gigivalis</i> (197 bp)		
	Previous method	Proposed method
	Aq labeled anti TR antibody	HRP labeled anti TR Fab' antibody
Signal	6121	32709
Noise	80	19
S/N ratio	77	1722

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (360 bp)		
	Previous method	Proposed method
	HRP labeled anti dig Fab antibody	SA/b-Luc complex
Signal	26933	12774
Noise	27	18
S/N ratio	998	710

<i>Treponema denticola</i> (895 bp)		
	Previous method	Proposed method
	SA/b-Luc complex	Aq labeled anti dig Fab antibody
Signal	142	450
Noise	58	105
S/N ratio	2.4	4.3

(3) プラークより歯周病菌遺伝子の添加回収試験

最適化した条件下で Pg 菌、Aa 菌、Td 菌の 3 種の歯周病菌遺伝子の添加回収試験を行った。歯肉縁上プラーク 0.5 mg に Pg 菌、Aa 菌、Td 菌遺伝子をそれぞれ 115 ng ずつ添加して DNA 抽出操作を行った。同時に歯周病菌遺伝子を添加せずにプラーク 0.5 mg から DNA を抽出し検出した。

歯周病菌遺伝子を添加せずにプラークから抽出を行った DNA 溶液からの発光数はブランクの発光数と比較して同程度であった。今回用いた検体には歯周病菌は含まれていないと考えられた。

歯周病菌遺伝子を添加したプラークから抽出を行った DNA 溶液からの発光数は歯周病菌遺伝子を添加せずにプラークから抽出を行った DNA 溶液からの発光数をブランクとして補正した。その補正值を用いた溶出の推移を Fig. 4 に示した。

プラーク存在下で抽出されたフラクション No. 1~5 を等量混合した DNA 溶液からの添加回収率は Pg 菌で 85.0 %、Aa 菌で 130 %、Td 菌で 70.1 % となった。

Pg 菌は Pg 菌のみで添加回収試験を行ったときと同様の溶出の推移、添加回収率となっ

た。Aa 菌ではプラーク非存在下で添加回収試験を行い得られた発光数よりプラーク存在下で添加回収試験を行い得られた発光数の方が高かった。この原因は不明であるが、プラークのみから抽出を行った DNA 溶液の発光数とブランクの発光数は同程度であったため、プラーク由来の Aa 菌による発光数ではないと考えられた。またプラーク存在下、非存在下で行ったどちらの添加回収試験においてもフラクション No. 10 まで Aa 菌遺伝子が検出された。Td 菌はプラーク存在下での添加回収試験においてフラクション No. 1 よりフラクション No. 2 の方が発光数は高く、カラムからの Td 菌遺伝子の溶出が遅れることが観察された。

各菌種で異なる溶出の推移を示したがフラクション No. 5 付近までにほとんどの DNA が溶出されたと考えられた。よって溶出操作を 5 回繰り返し計 500  $\mu$ L の DNA 溶液を得ることで良好な添加回収率が得られると考えられた。

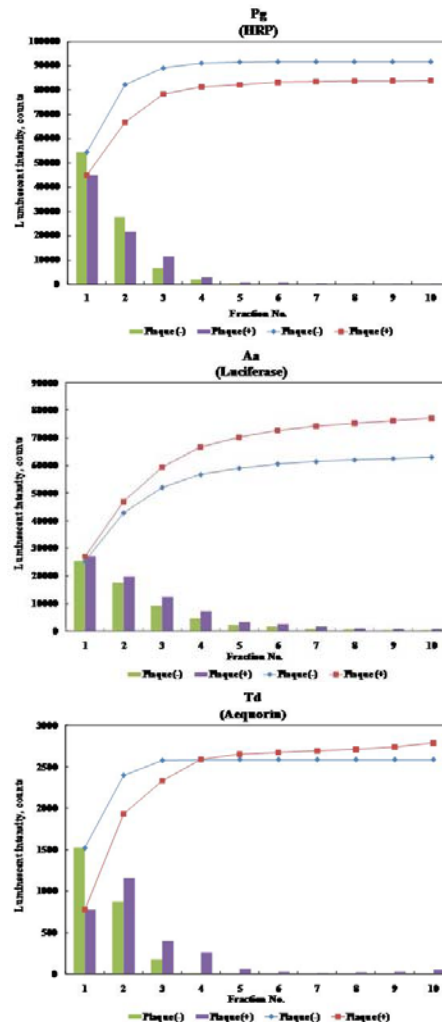


Fig. 4 Elution profile of periodontal pathogens DNA Luminescent intensity of each fraction in the bar graph, Accumulating luminescent intensity of each fraction in the line graph

#### (4) まとめ

本研究では3種の歯周病菌遺伝子であるPg菌、Aa菌、Td菌を測定対照物とし、Aq、b-Luc及びHRPの三成分同時BCLEIAによる同時検出法について検討した。

得られた抗TR抗体を用いてHRP標識抗TR Fab'抗体を調製し、三成分同時BCLEIAを行った。Pg菌、Aa菌はそれぞれHRP、b-lucの発光によりPCR増幅産物の12800倍希釈まで検出可能であった。Td菌は、Aqの発光によりPCR増幅産物の3200倍希釈まで検出可能であった。すでに行っていた方法と比較するとAa菌ではほぼ同程度の感度が得られ、Pg菌では22倍、Td菌では1.8倍高い感度が得られた。今回新たに調製した抗TR抗体が高力価であるためPg菌の測定の感度が向上したと考えられた。Aa菌の検出においてはPCR増幅効率が十分に高くHRP標識抗ジゴキニン Fab抗体、SA/b-Luc複合体のどちらを用いても良好な感度が得られるため、ほぼ同程度の感度が得られたと考えられた。AqをTd菌の検出に使用したのもかわらず、Td菌の高感度化はb-Lucを用いて検出する方法と比べて1.8倍に留まった。これはTd菌のPCRの増幅効率が悪いためであると考えられた。Td菌をより高感度に検出するにはPCR増幅産物の塩基配列が短くなるようなプライマー選択をしてTd菌の増幅効率を改善する必要があると考えた。

歯周病菌遺伝子の歯肉縁上プラークからの添加回収率は、Pg菌：85.0%、Aa菌：130%、Td菌：70.1%となった。

新たにHRP標識抗TR Fab'抗体を調製することで高感度にPg菌、Aa菌、Td菌の同時検出が可能となった。歯周病関連菌が棲息する歯肉縁下プラークなどの臨床検体中の菌を検出することが可能であれば、本三成分同時BCLEIAは歯周病菌遺伝子の高感度検出法として歯周病の早期発見と治療に有用な方法になるものと期待される。

#### 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3件)

① Simultaneous multiplex bio- and chemiluminescent enzyme immunoassay for PCR products derived from genetically modified Papaya, 査読有, Ito k, Tanaka Y, Maeda M, Gomi K, Inouye S, Akiyama H and Arakawa H, *BIOLUMINESCENCE and CHEMILUMINESCENCE*, 197-201 (2009)

② Development of a novel bioluminescent assay for nitric oxide by using soluble guanylate cyclase, 査読有, Sano Y, Seki M, Suzuki S, Abe S, Ito K and Arakawa H, *BIOLUMINESCENCE and CHEMILUMINESCENCE*,

109-112 (2009)

③ メチレンジオキシアニフェタミン (MDA) 抗体の作成とその抗体の関連化合物との反応性, 査読有, 田中佐知子, 渡辺紫織, 古家恵子, 野村琢磨, 貝崎明日香, 伊藤克敏, 鳥居塚和生, 荒川秀俊, 伊田喜光, 吉田武美 *法科学技術*, **13**, 125-132 (2008)

[学会発表] (計6件)

① 生物発光検出アプタマーバインディングアッセイを用いた活性化血液凝固第X因子の活性測定への応用

館 由紀子, 伊藤克敏, 井上 敏, 荒川秀俊

日本薬学会 129 年会 2009 年 3 月

② イクオリンを検出に用いる生物発光アプタマーバインディングアッセイの検討

伊藤克敏, 館 由紀子, 井上 敏, 荒川秀俊

第 22 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2009 年 7 月

③ 歯周病菌遺伝子検出のための三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイの検討

大久保 俊介, 伊藤克敏, 五味恵子, 井上敏, 五十嵐 武, 荒川秀俊

日本薬学会 130 年会 2010 年 3 月

④ 歯周病菌遺伝子検出のための三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイの検討

伊藤克敏, 大久保俊介, 五味恵子, 井上 敏, 五十嵐 武, 荒川秀俊

第 23 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2010 年 7 月

⑤ イクオリン, ガウシアルシフェラーゼ, アクリニジウムエステルを組み合わせた超高速3成分同時発光分析法の構築

名取あゆみ, 伊藤克敏, 井上敏, 荒川秀俊

日本薬学会 131 年会 2011 年 3 月

⑥ 希土類蛍光標識試薬を用いる時間分解蛍光検出液体クロマトグラフィーの検討

丸山真一, 伊藤克敏, 荒川秀俊

日本薬学会 131 年会 2011 年 3 月

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤克敏 (ITO, KATSUTOSHI)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20223141

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし