

平成 23 年度課題解決型医療機器の開発・改良に向けた

病院・企業間の連携支援事業

「全身疾患予防につなげる定量的歯周病総合診断実現のための

多項目検査システムの開発」

研究成果報告書(要約版)

平成 24 年 2 月

委託者 経済産業省

委託先 財団法人 北九州産業学術推進機構

目 次

1. 研究開発の概要.....	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-1-1 研究背景	1
1-1-2 研究目的	2
1-1-3 研究目標	3
1-2 研究体制.....	5
1-3 成果概要.....	6
1-4 当該研究開発の連絡窓口	9
2. 本論	10
2-1 歯周組織破壊酵素検出システム開発.....	10
2-1-1 プローブの設計・合成	10
2-1-2 検出チップの構築.....	11
2-2 歯周病原菌菌叢検出システム開発	13
2-2-1 プローブの設計・合成	13
2-2-2 検出チップの構築.....	15
2-3 炎症性メディエータ検出システム開発.....	18
2-3-1 抗体の合成・評価.....	18
2-3-2 電気化学的エライザシステムの構築.....	19

2-4 歯周病総合診断装置の開発.....	22
2-4-1 チップの試作.....	22
2-4-2 チップの品質評価・改良.....	23
2-4-3 装置・ソフトウェアの改良.....	24
2-5 臨床試験データの取得.....	25
2-5-1 ターゲットモデルサンプルの作成.....	25
2-6 プロジェクトの管理運営.....	26
3. 全体総括.....	27
3-1 研究開発成果.....	27
3-1-1 平成 23 年度研究実施内容及び目標.....	27
3-1-2 平成 23 年度の達成状況.....	27
3-1-3 今後検討すべき課題.....	28
3-2 今後の進め方.....	30

1. 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1-1-1 研究背景

現在の主要な歯周病診断法は、目視、プラーク付着検査、動揺度検査(ピンセットで歯のぐらつきを確認)、歯周病ポケットの深さ測定(測深プローブ(針)をポケットに挿入)であり、何れも歯科医師の手技に頼った主観的判断であり、再現性のない測定を通院ごとに行っている。そのため、①疾患の進行度に応じた治療法が施されていない(例えば、難治性歯周炎や若年性歯周炎では、歯を残すより抜歯して他の治療法を考えなければならない症例) ②現行検査法に対する患者の信頼性が低く、患者自身のケア意識が低い、という課題がある。

更に、近年、歯周病が全身疾患(動脈硬化・心臓病、骨粗鬆症、肺炎(誤嚥性肺炎)、糖尿病、肥満・高脂血症、早期低体重児出産など)の原因となっていることが明らかになっている。しかしながら、慢性全身疾患の要因は多岐にわたるため、歯周病との関連メカニズムを解明し、的確な予防的診断を行うためには、多種類の生体分子の測定が必要となり、現在の技術では時間とコストが障壁となり、実現できていない。

そこで、①的確かつ科学的根拠に基づいた ②歯科の臨床現場(チェアサイド)で使用可能な ③装置・ランニングともに低コストでコンパクト、簡便で、多種類の生体分子を迅速に検出する「定量的歯周病総合診断システムの開発」が求められている。

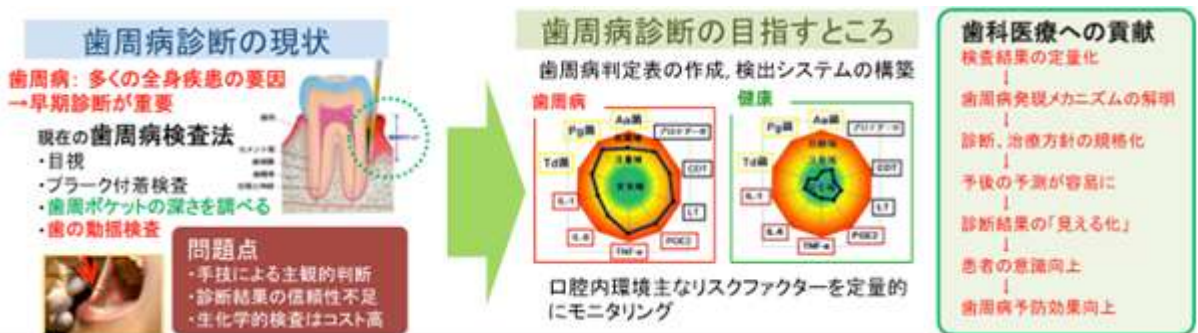


図 1-1-1 歯周病診断の現状・課題と目指すべき姿

1-1-2 研究目的

これまでの臨床研究により、多くの歯周病診断指標の中からの確な診断に必要な項目を抽出し、歯周病原菌叢の検索、それらが産生する歯周組織破壊酵素や毒素の活性測定、さらに炎症性メディエータ(破壊サイトカイン)等の指標の変化と疾患の進行度・予後との関係が体系化されている。また、これらの項目は、医師と連携することで、慢性の全身疾患の予防につながる事が明らかとなっている。

現在、歯周病の原因菌特有の酵素活性を調べるキットが市販されているが、感度が低く定量的評価はできない。リアルタイムPCRを用いて歯周病原菌叢(菌種の分布)を調べる手法もあるが、高コストかつ操作が煩雑であるなど多くの制限があり、臨床現場では普及していない。上記の歯周病診断指標を簡便に測定できるバイオチップの開発が必要であり、電気化学的手法を利用したバイオセンシングシステムの研究開発により、これを実現する事を目指す。



図 1-1-2 定量的歯周病総合診断システムの実現に必要な技術開発

1-1-3 研究目標

本事業では、歯周組織破壊酵素検出、歯周病原菌叢検出、炎症性メディエータ検出が可能な3種類の電気化学的バイオチップと、これら3種の検査全てに対応可能な専用読み取りデバイスからなる低コストかつ簡便な歯周病総合診断用装置の開発を行う。これにより、従来不可能であった定量的歯周病総合診断を実現する。

H23年度は、三つの測定項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、専用読み取りデバイスの試作を行うことを目標とする。上記テーマのうち、年度目標達成に向けて、以下の研究開発を実施する。

① 歯周組織破壊酵素検出システム開発(株)ジーンネット、九州工業大学)

①-1 プローブの設計・合成

歯周病原菌が産生する歯周組織破壊酵素の基質ペプチドを検出プローブとすべく、基質ペプチドプローブの設計と合成を行う。

①-2 検出チップの構築

基質ペプチドを検出チップへ固定化する方法を検討し、酵素を検出できるシステムの試作、評価を行う。

② 歯周病原菌叢検出システム開発(株)エコジェノミクス、九州工業大学)

②-1 プローブの設計・合成

歯周病菌の rRNA 遺伝子によって、歯周病関連菌の量と存在比の定量的な検出を行うシステムを開発するため、rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR を用いて検出し、プローブ設計に必要なデータ収集を行う。

②-2 検出チップの構築

電気化学的検出チップ構築のため、非対称 PCR によるサンプル調整の条件検討を行う。

③ 炎症性メディエータ検出システム開発(九州工業大学、(株)ジーンネット、九州歯科大学)

③-1 抗体の合成・評価

炎症性メディエータとして TNF- α に着目し、市販の抗体を用いて検討を進める。

④ 歯周病総合診断装置の開発(株)ジーシー、九州工業大学、九州歯科大学)

④-1 チップの試作

3種の検出チップの共通基盤となる金電極チップを各検討グループに供給する体制を構築するため、金電極チップの設計、試作を行う。

④-2 チップの品質評価・改良

金電極チップの個体差を管理する手法を確立するため、試作チップを用いて繰り返し測定やチップの安定性等について検討しデータを蓄積する。

④-3 装置・ソフトウェアの試作・改良

開発済みのハンディ型電気化学測定装置を外注により改良し、多項目同時測定へ拡張可能な装置の試作を行う。

⑤ 臨床試験データの取得(九州歯科大学、九州工業大学)

⑤-1 ターゲットモデルサンプルの作成

インフォームドコンセントを得た歯周病関連試料を各機関へ提供する。

⑥ 研究全体の総括、プロジェクトの管理運営((財)北九州産業学術推進機構)

当該プロジェクトが円滑に運営され、かつ目標を確実に達成できるように、プロジェクト全体の企画運営と進捗管理を行う。

1-2 研究体制

本事業を実施する研究組織の全体像を図 1-2-1 に示す。

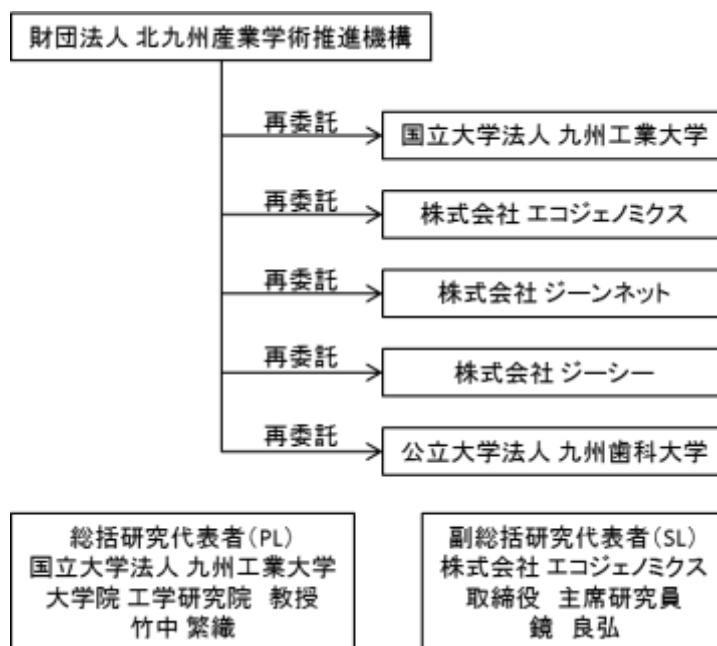


図 1-2-1 研究組織

1-3 成果概要

H23年度は、三つの測定項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、専用読取りデバイスの試作を行うことを目標とした。得られた成果の概要を以下に示す。

① 歯周組織破壊酵素検出システム開発

①-1 プローブの設計・合成

<成果>

- ・ 新規な構造のプローブを合成した。

<今後の課題>

- ・ 長期保存可能なチップの製品化のために設計プローブのチップ上の安定性の評価、その結果を踏まえた最適なプローブを設計・合成が必要。

①-2 検出チップの構築

<成果>

- ・ ペプチドプローブを用いて、固定化条件と検出システムの最適化を行い、30分で酵素反応が終了することを見出した。
- ・ 酵素活性をほぼ30分で検出することが出来た。
- ・ 使い捨てタイプのシングル電極に本システムを適用することに成功。
- ・ チップへのプローブの固定化密度を制御することによって得られるシグナル強度が異なることが明らかとなった。

<今後の課題>

- ・ 最適な固定化密度が実現できる作成方法を検討する必要がある。
- ・ 臨床サンプルへ適用し、評価を行っていく必要がある。

② 歯周病原菌菌叢検出システム開発

②-1 プローブの設計・合成

<成果>

- ・ 複数の歯周病原菌から58セットの定量的リアルタイムPCR用プライマーを設計・合成。

<今後の課題>

- ・ これらを用いて、歯周病患者や健常人のサンプル(歯垢や唾液等)中の菌叢の検出実験を実施が必要。
- ・ より精度の高い検出のためにプライマー設計の必要。
- ・ 検出チップに応用可能なDNAプローブの塩基配列を検討する必要もある。

②-2 検出チップの構築

<成果>

- ・ モデル遺伝子を用いてゲノム DNA からサンプルを PCR 増幅し、ディスプレイサブタイプ
のシングル電極を利用して目的遺伝子を選択的に検出することに成功。

<今後の課題>

- ・ 現在の検出 2 時間の更なる短縮化が必要。
- ・ チップの長期間安定性のための保存方法を検討が必要。
- ・ 臨床サンプルへ適用し、共雑物の影響について検討が必要。

③ 炎症性メディエータ検出システム開発

③-1 抗体の合成・評価

<成果>

- ・ イムノクロマトの安定性評価により、現在の調整法で 3 日間まで安定であることを確
認。
- ・ 調製したイムノクロマトを利用することで、検出時間は 1 時間となった(大幅な短縮に
成功)。
- ・ シングル電極による電気化学測定での検出下限は、1.0 pg/mL である。

<今後の課題>

- ・ 結合体と比結合体の分離(BF 分離)を行うためのイムノクロマトシステムに代わる迅
速分離系へ発展させることが必要。
- ・ 抗体の固定化方法を更なる最適化が必要。

④ 歯周病総合診断装置の開発

④-1 チップの試作

<成果>

- ・ 5 電極チップを構築した。

<今後の課題>

- ・ コストの低減、均一チップの作成、測定の再現性のためにチップ材質、形状につい
ての検討が必要。

④-2 チップの品質評価・改良

<成果>

- ・ 電極直径 1 mm のチップを試作。
- ・ 電気化学標準液(フェロセンカルボン酸)で応答確認より $0.104 \pm 0.002 \mu\text{A}$ と高精度な
電極を作成することに成功した。

<今後の課題>

- ・ 金電極チップの個体差を管理する手法を確立が必要。
- ・ 試作チップを用いて繰り返し測定やチップの安定性等について更に検討しデータを蓄積する必要がある。

④-3 装置・ソフトウェアの試作・改良

<成果>

- ・ 25 電極まで拡張可能なマルチ電極測定電気化学アナライザーを開発(装置の大きさ:350 mm × 250 mm × 100 mm)。

<今後の課題>

- ・ 医師が使用した感想を集め、ソフトウェアのユーザビリティ向上が必要。

⑤ 臨床試験データの取得

⑤-1 ターゲットモデルサンプルの作成

<成果>

- ・ 歯周病患者からの歯周組織破壊酵素サンプル採取方法を確立。

<今後の課題>

- ・ 臨床サンプルを採取しての活性測定の実験系では、サンプル中の酵素活性阻害剤の混入等が考えられるので、その点に注意を払う必要がある。

⑥ 研究全体の総括、プロジェクトの管理運営((財)北九州産業学術推進機構)

<以下の項目について実施>

- ・ プロジェクト全体の企画運営と進捗管理
- ・ 2回の推進委員会の開催
- ・ 実務者会議の開催
- ・ 本年度の研究開発の実施内容を整理、経理報告書と成果報告書の取りまとめ。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

【所属】

九州工業大学工学 大学院工学研究院 物質工学研究系 応用化学部門 教授
バイオマイクロセンシング技術研究センター長
歯工学連携教育研究センター長

【氏名】

竹中 繁織 (たけなか しげおり)

【TEL & FAX】

093-884-3322

【E-mail】

shige@che.kyutech.ac.jp

2. 本論

2-1 歯周組織破壊酵素検出システム開発

2-1-1 プローブの設計・合成

本テーマに関する本年度の実施内容は次のとおりである。すなわち、歯周病原菌の一つが産生する歯周組織破壊酵素に着目し、その基質ペプチドを検出プローブとすべく、基質ペプチドプローブの設計と合成を行った。これまでシステインを利用して金基板へ固定化を行っていたが、ジンジパインの反応性や得られる電流変化を向上するためには、固定化されたペプチドの基板上では配向状態を制御する必要性が明らかとなったので、今回、その制御が比較的容易であると期待される部位の導入したペプチドプローブの設計を行った。

これまでにペプチドをプローブとして、金の基板に固定化する場合は、システインを利用することが多かった。しかし、検出ターゲットとなる酵素は活性発現のために、反応溶液中にシステインを添加する必要がある。このため、システインを用いたプローブ固定化法では、反応溶液中のシステインと固定化されているプローブが置き換わる懸念があるため、新たな固定化の検討を行うことにした。設計したプローブは電気化学シグナル部位、ジンジパインの認識部位、金への固定化部位を有する。

電気化学活性部位としてのフェロセン酢酸、酵素の基質部位としてのリジン、そして金電極表面からのリンカー部位を有する基質ペプチドの合成は、全自動ペプチド合成装置を用いて行った。次に保護基の選択的脱保護を行い、固定化部位を縮合反応させる。最後に、樹脂からの切り出しを行ってプローブを得た。

脱保護後のペプチドを RP-HPLC で分取、精製を行った。精製後の MALDI-TOF-MASS スペクトルより、目的物が得られたことを確認した。

2-1-2 検出チップの構築

本実施内容は、基質ペプチドを検出チップへ固定化する方法を検討し、酵素を検出できるシステムの試作、評価を行うものである。しかし、新たに設計したペプチドプローブの合成に時間を要したため、並行して従来型ペプチドプローブを利用して酵素を検出できるシステムの試作、評価を行った。

具体的には酵素の反応時間の検討と、ディスポーサブル電極への適用を検討した。本系の検出原理を図 2-1-1 に示す。このシステムは、九州工業大学で世界に先駆けて開発したものであり、すでに国際誌に掲載されている。ペプチドは電気化学シグナル部位と酵素の基質部位、そして電極への固定化部位を有している。センサとしてペプチド固定化電極を調整し、この電極をプローブとする。検体に酵素が含まれるとき、電極上のペプチドは切断され、フェロセンは電極表面から遊離する。これによってセンサの電流シグナルは減少するため、電流減少量によって酵素の量を評価することができる。

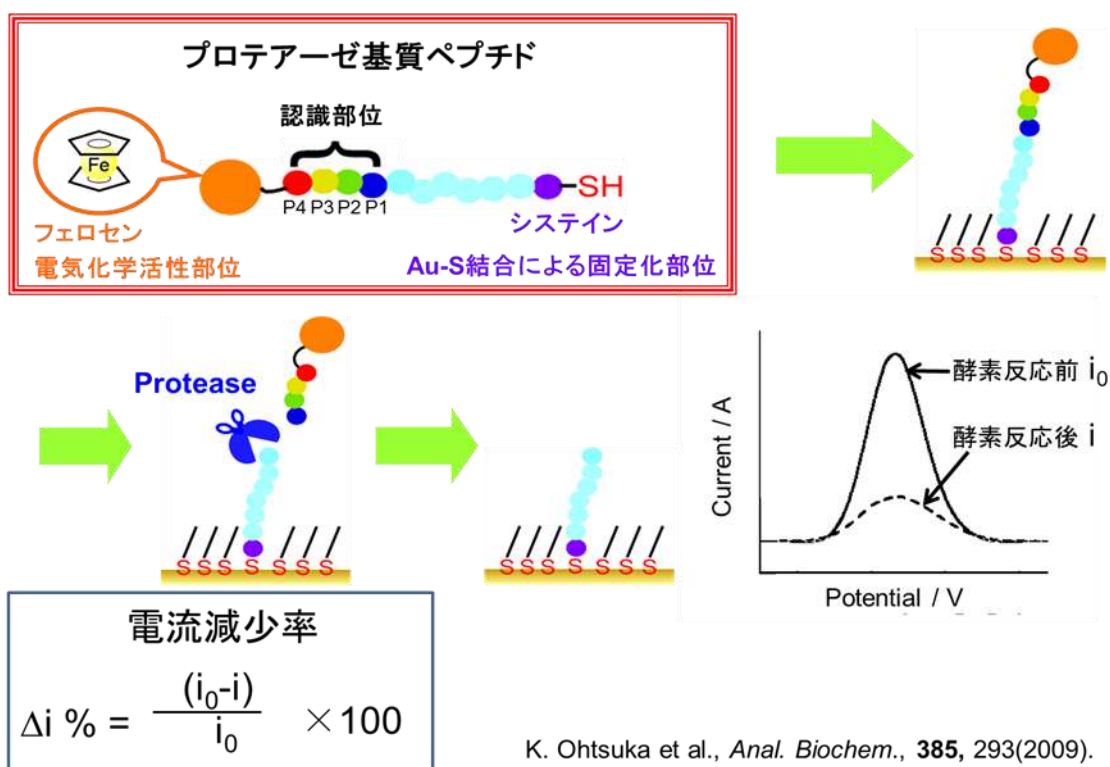


図 2-1-1 電気化学的プロテアーゼアッセイの検出原理。

本実験では、基質ペプチドとして従来型ペプチドプローブを用いた。図 2-1-2 に酵素を作用させたときの DPV 測定結果と反応時間変化を示す。基質ペプチドのフェロセンに由来する電流は、0.23 V で観察された。この電流は酵素を作用させると、大きく減少した。この電流減少は、反応開始から 5 分で 60% の電流減少を示した。これより、5 分以上で酵素の活性は検出可能であることが示された。

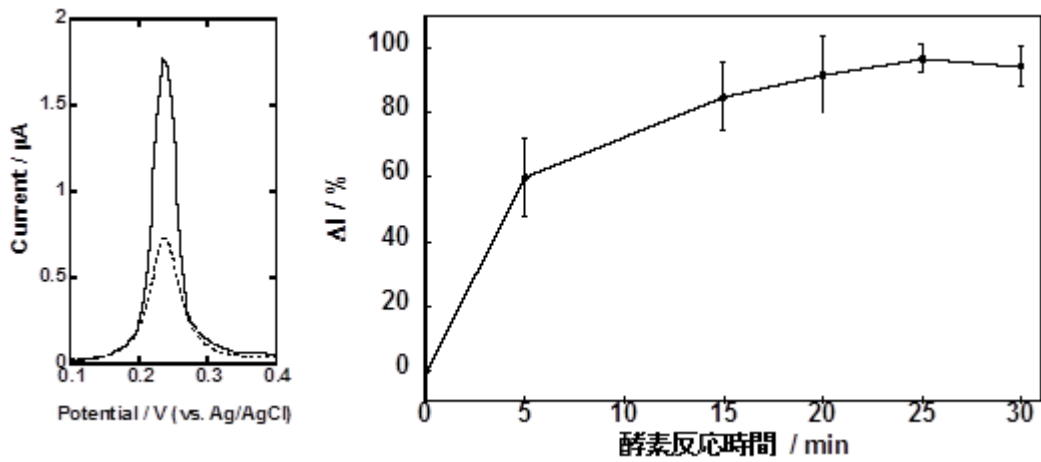


図 2-1-2 酵素反応前後の DPV 測定の結果(左)と酵素反応の経時変化(右)

2-2 歯周病原因菌叢検出システム開発

2-2-1 プローブの設計・合成

歯周病関連細菌 8 種および口腔内常在細菌 1 種のゲノム DNA 配列や 16S-rRNA 遺伝子、そしてさらには歯周病関連細菌種特異的な遺伝子の塩基配列(公共データベース:NCBI genbank RefSeq からダウンロード)を基に、69 セットの定量的リアルタイム PCR 用プライマーを設計・合成した。プライマーの長さはすべてにおいて同じに設定し、合成を実施した。これらの PCR 用プライマーを利用して、歯周病原因細菌 4 種および口腔内常在細菌 1 種のレファレンス細菌(図 2-2-1~5)群から抽出されたゲノム DNA および歯周病患者や健常人のサンプル(歯周病ポケットや歯垢からの口腔内細菌メタゲノム DNA)中における菌叢の検出実験を、実験条件の検討を交えながら繰り返し実施した。



図 2-2-1 レファレンス細菌 A
(BHI 寒天培地)



図 2-2-2 レファレンス細菌 B
(BHI 寒天培地)



図 2-2-3 レファレンス細菌 C(BHI 寒天培地)



図 2-2-4 レファレンス細菌 D
(羊血液寒天培地)



図 2-2-5 レファレンス細菌 E
(羊血液寒天培地)

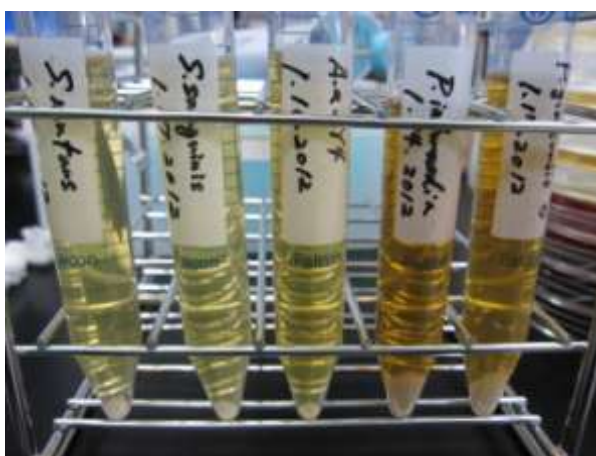


図 2-2-6 液体培養細菌種

サンプル調整条件の検討に関しては、研究計画当初では九州歯科大学・西原研究室を介して得られる歯周病原菌菌株ならびに歯周病患者からの口腔内細菌サンプルを用いて、九州工業大学・竹中研究室の指導の下で PCR によるサンプル調製の条件検討を行うことを計画していたが、今年度の研究開発期間が数ヶ月と短かったために、歯周病原菌菌株、歯周病患者からの口腔内細菌サンプル共に必要数量の入手が不可能であった。よって、エコジェノミクス社内における健康人ボランティアからの口腔内細菌サンプルを 2 日間嫌気培養し、増殖された細菌群からメタゲノム DNA を抽出・精製することで、口腔内細菌メタゲノムサンプルの調製条件を試験的に検討した。

2-2-2 検出チップの構築

本実施内容は電気化学的検出チップ構築することにある。本年度の実施計画は、患者サンプルを用い、非対称 PCR によるサンプル調整の条件検討を行うことにあるが、患者サンプル調整に時間を要したために、モデル遺伝子に関して非対称 PCR による条件検討を行った。また、このサンプルを用いて試作の使い捨てタイプのシングル電極での評価を行った。

検出原理を図 2-2-7 に示す。調べたい遺伝子(DNA)と相補的な DNA 断片を固定化したプローブ DNA 固定化電極を準備する。検体に目的の DNA が含まれるとき、プローブ DNA と検体 DNA がフルマッチ 2 本鎖 DNA を形成する。しかし、検体の DNA が変異体となっていたり、目的遺伝子でない場合、プローブ DNA と検体 DNA は mismatches 2 本鎖 DNA を形成する、もしくは 2 本鎖 DNA は形成されない。電気化学的遺伝子検出試薬は、2 本鎖 DNA 構造に結合するため、プローブ DNA と検体 DNA が電極上で 2 本鎖 DNA 構造を形成したときに、大きな電流シグナルを示す。この電流値によって、目的遺伝子の有無を判別することができる。

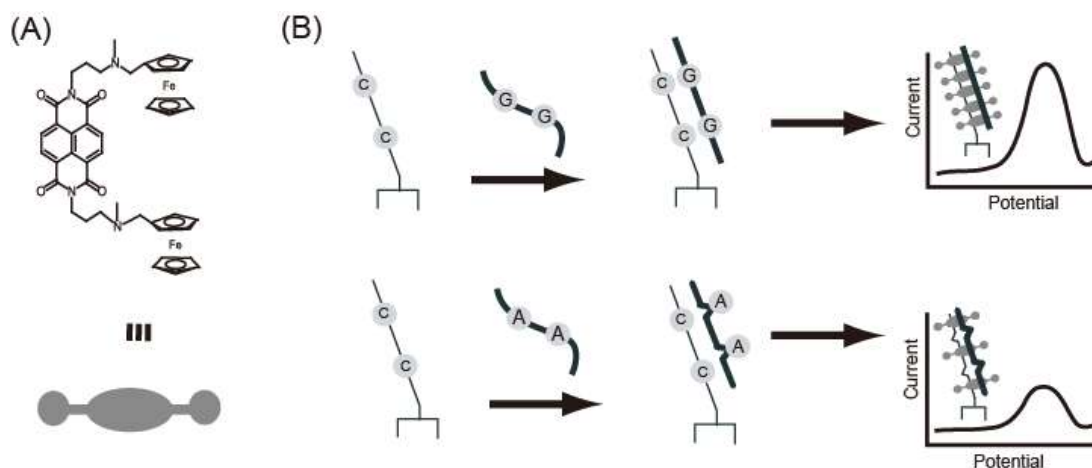


図 2-2-7 電気化学的遺伝子検出の検出原理

今回、電極には5つの異なる配列を有するプローブを固定化した。図 2-2-8、2-2-9 より電気化学応答は、これまでのディスク電極と同様に得られており、シングル使い捨て電極であっても問題ないことが示された。プローブの酸化還元電位も妥当であり、金電極として問題なく利用可能であることが分かった。得られた電流値は、ハイブリダイゼーション後ミスマッチの個数に応じて減少している。グラフ化した図 2-2-9 に示すとおり、2 種のモデル DNA とともにフルマッチで最も高い電流増加率を示し、ミスマッチの個数が増すにつれて電流増加率は減少している。市販の金棒電極との比較実験を行った結果、本シングル電極は市販の金棒電極とほぼ同等であり、本シングル電極によって PCR 産物からの電気化学遺伝子検出が可能であることが明らかとなった。

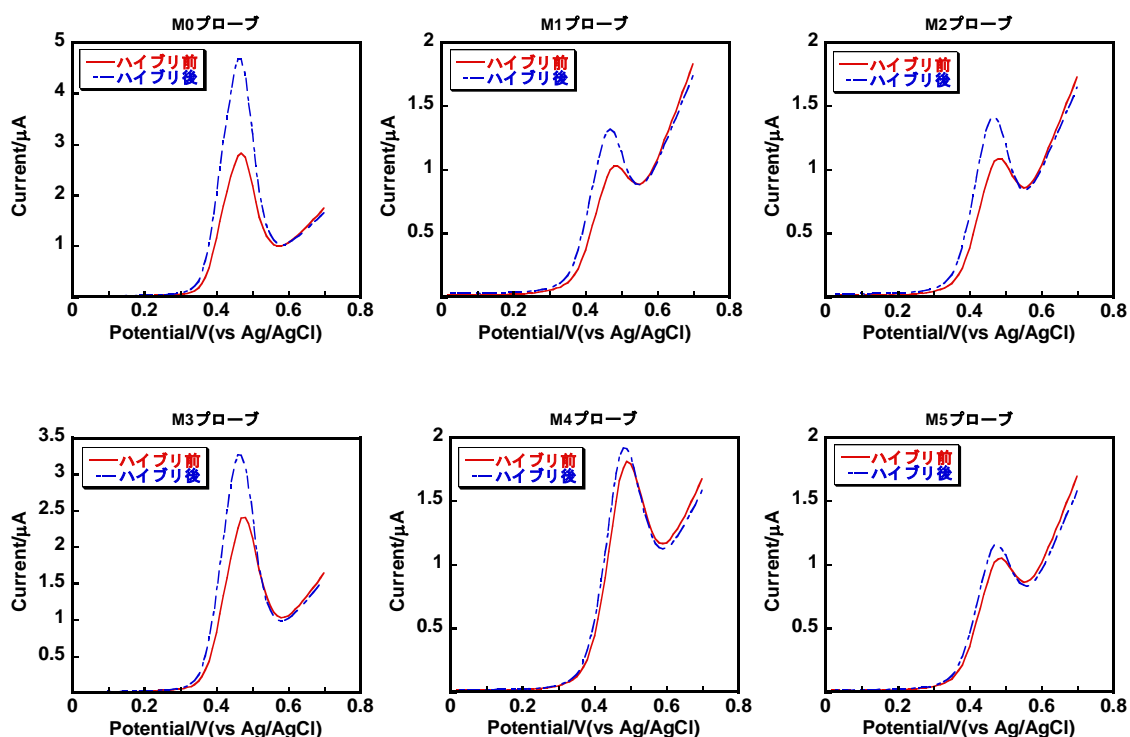


図 2-2-8 各プローブ DNA の SWV 測定

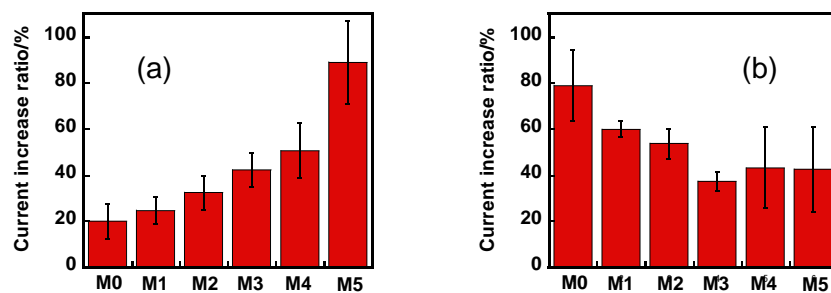


図 2-2-9 各サンプルでの電流増加率(単電極の場合)

(a):モデル遺伝子 A、(b):モデル遺伝子 B

2-3 炎症性メディエータ検出システム開発

2-3-1 抗体の合成・評価

「炎症性メディエータの検出」に関しては、過去の歯周病の病因論の研究成果から、IL-1、TNF あるいはプロスタグランジンといった炎症性サイトカインやメディエータが歯肉炎から歯周炎への進行に深く関わっていることは広く知られている。そこで、本研究事業の当初から定量的解析が行える機器開発に向けて、研究事業を展開した。

歯周病が進行する過程で、歯面から歯肉上皮細胞が剥離するという現象が起きる。歯周病診断を行っていくうえで、この病態変化の把握はきわめて重要であるが、これまでその発症メカニズムが明らかにされていないということもあり、確実な検査方法は存在していない。そのようななかで、ある種のサイトカインが歯周組織の表層に存在する歯肉上皮細胞に致死的に作用をするということを見出した。そこで、我々は、そのサイトカインの持つ上皮細胞致死活性に着目し、モノクローナル抗体の作成を行うこととした。

このサイトカインに関しては市販のリコンビナントタンパクが存在しないため、まず、タンパク発現系の確立を試みた。サイトカイン発現プラスミドを細胞導入後、24 時間培養した細胞より mRNA を抽出し、real-time RT-PCR 法にてサイトカイン遺伝子発現を確認したところ、強い発現が観察された。

培養細胞よりサイトカインタンパクを抽出、精製を行った。精製したタンパクを上皮細胞に添加して培養を行ったところ、上皮細胞に対して強い致死活性の発現が認められた。今回の研究事業で作成するモノクローナル抗体を用いて、純度の高いサイトカインタンパクの大量精製を予定している。

2-3-2 電気化学的エライザシステムの構築

本実施内容は、計画では次年度からスタートするようになっていたが、本年度予備的検討を行った。ここでは、これまで開発してきた炎症性メディエータである TNF- α の電気化学的 ELISA による高感度検出技術を基に最適化を行い、検出の安定性やチップの作成方法等を改良する。

開発する電気化学的エライザ検出システムの検出原理を図 2-3-1 に示す。検出は、迅速な BF 分離の可能なイムノクロマトグラフィーを利用する。ただし、イムノクロマトグラフィーでは、検出感度に問題がある。そこで、検出感度向上のために、基質として電気化学活性物質を利用する。これによって簡便活高感度に目的物質を検出することができる。

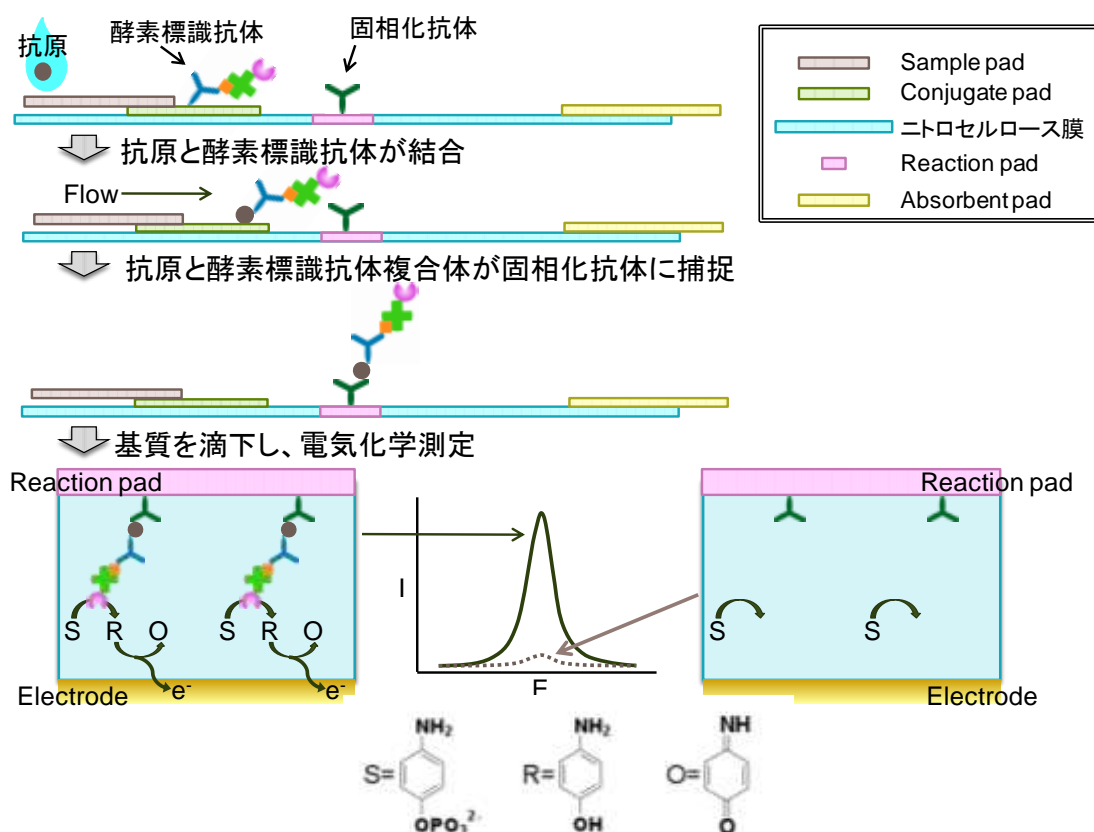


図 2-3-1 電気化学的エライザ法の検出原理

作成したテストストリップを用いて TNF- α を展開し、メンブレンをカットして各部位の吸光度測定を行ったところ、抗体固定化位置で最も高い吸光度が観察された。図 2-3-2 には、TNF- α の濃度を変化させたときの吸光度変化を示す。TNF- α の増加に伴い定量的に吸光度は増大した。これより、イムノクロマト法で TNF- α の検出に成功した。

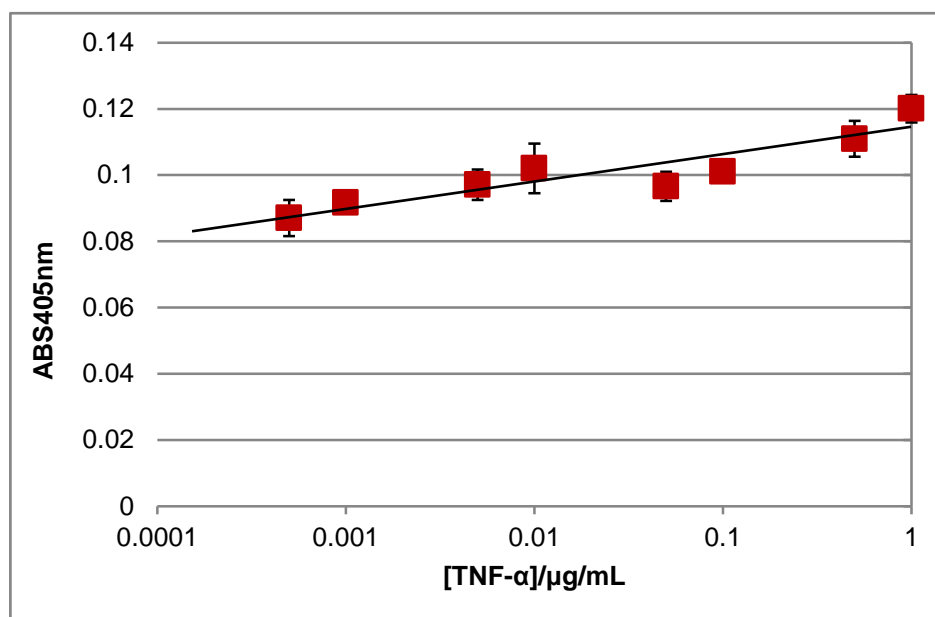


図 2-3-2 TNF- α の濃度を変化させたときの吸光度変化

次に、イムノクロマトデバイスの保存方法、および保存期間について検討した。乾燥剤と脱酸素剤を同封して密閉保存し、4°Cで保管したデバイスの評価を行った。その結果、4日までは、安定に利用出来ることが分かった。今後更に安定に保管出来るように、検討する。

更に、電気化学的検出の検討を行った。図 2-3-3 に示すとおり、pAPP がアルカリフォスファターゼによって分解され pAP と変化したときに観察される 0.1 V 付近の電流値を観察した。吸光度測定と同様に濃度変化を観察したところ、1 pg/mL の TNF- α を検出することができた。これは、吸光度測定の感度を大きく上回るものであった。

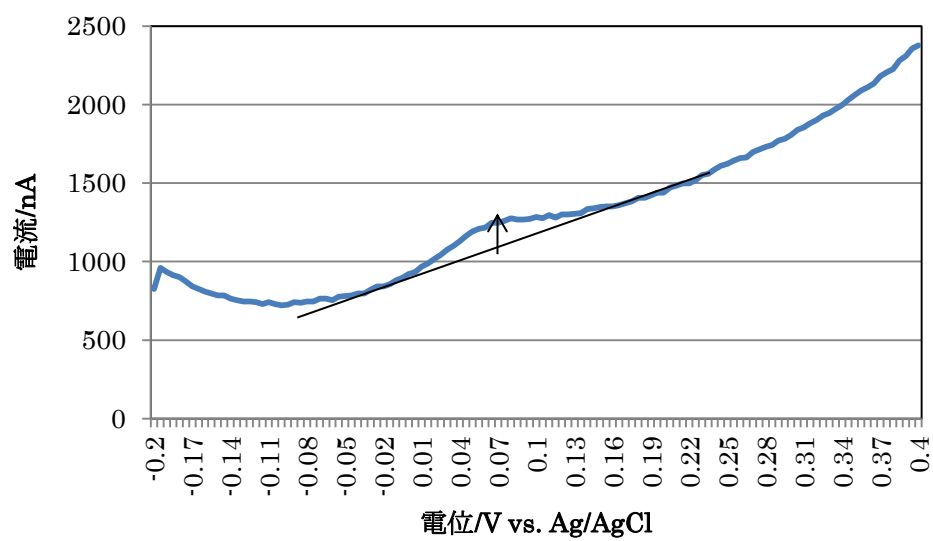


図 2-3-3 電気化学的エライザによる 1.0 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α の検出.

2-4 歯周病総合診断装置の開発

2-4-1 チップの試作

3種の検出チップの共通基盤となる金電極チップの設計、試作を行い、各検討グループに供給する。更に、検査の効率化を図るため、マルチ電極化したチップの開発を行う。

本年度は、3種の検出チップの共通基盤となる金電極チップを各検討グループに供給する体制を構築するため、金電極チップの設計、試作を行った。

歯周病判定表の作成において、歯周病組織破壊酵素としてのターゲットは3種類、原因菌は3種類、炎症性メディエータは4種類である。そこで、これらのターゲットを酵素、菌、メディエータ3種類のチップで評価することを目標として、5電極チップの作成を試みた。5電極チップは、W電極5個とR電極、C電極各1個の構成で設計した。試作したチップを図2-4-1に示す。



図 2-4-1 5電極チップのチップ写真

電極を電気化学アナライザで測定可能とするため、測定セル一体型の電極モジュールを試作した。図2-4-2に電極モジュールの構想図を示した。

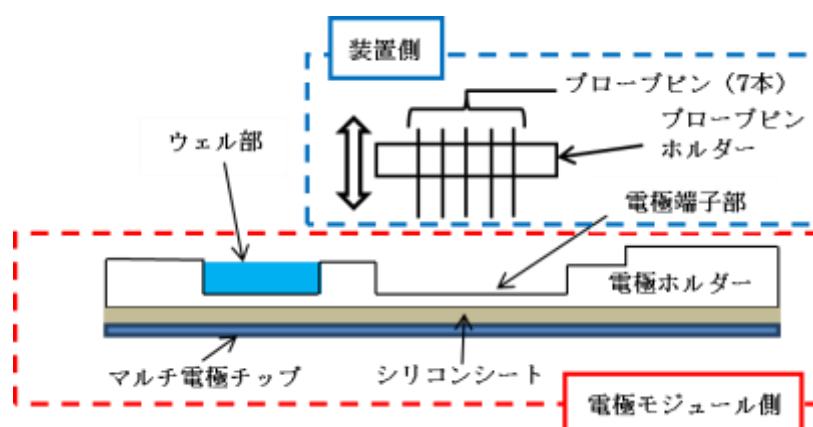


図 2-4-2 電極モジュールの構想図

2-4-2 チップの品質評価・改良

未修飾時の金電極チップ、及び検査項目ごとに表面修飾した金電極チップの個体差を管理する手法を確立する。また、マルチ電極化した際の1チップ上の電極間差の管理手法についても検討し、確立する。本年度は、金電極チップの個体差を管理する手法を確立するため、試作チップを用いて繰り返し測定やチップの安定性等について検討しデータを蓄積した。

2-4-1 で試作したチップの応答電流を観察した。フェロセンカルボン酸を標準物質として評価したところ、チップ自身の電位にぶれはなく、金電極が安定であることが明らかになった(図 2-4-3)。電流値に関しては、5電極の平均電流値は、 $0.43 \pm 0.02 \mu\text{A}$ であり、電極表面積も安定に形成されていることが分かった。

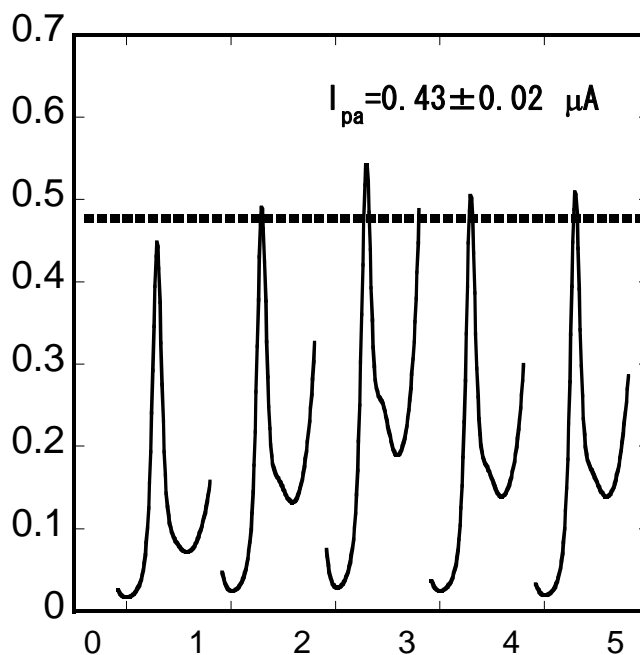


図 2-4-3 フェロセンカルボン酸の応答

2-4-3 装置・ソフトウェアの改良

本項目では、開発済みのハンディ型電気化学測定装置を改良し、各検討グループに供給する。また、各検査チップの開発に目処が立った時点で、臨床試験用の測定装置を試作する。更に、臨床試験の結果をフィードバックし、改良を行う。このために、本年度は、開発済みのハンディ型電気化学測定装置を改良し、多項目同時測定へ拡張可能な装置の試作を行った。

本装置(図 2-4-4)は、マルチ電極対応の 3 電極方式の電気化学アナライザーである。5 電極モジュール専用の測定装置である。本装置は、CV、DPV、CC の測定を可能とした。また他の装置でも測定を可能にする為に外部端子を設け、マルチ電極のアダプターとしても使用できるように設計した。測定データは、CSV 形式で保存するようにし、どの計算ソフトを使用しても解析が可能な仕様にした。



図 2-4-4 装置の外観とチップ

2-5 臨床試験データの取得

2-5-1 ターゲットモデルサンプルの作成

本研究事業の最終的な目標が臨床サンプルを用いての定量的な測定系の開発であり、ここでは、臨床症状および治療成績の判定等に使用可能なまでの精度が求められる。当然のことながら、このことを確認するためには、臨床サンプルが必要である。そこで、九州歯科大学の倫理委員会の認可を受け、九州歯科大学附属病院歯周病科外来に通院する患者から臨床サンプルを採取する。なお、九州歯科大学では、非侵襲的にサンプルを採取する方法は確立しているので問題なく行うことができる。

九州歯科大学歯周病制御再建学分野を受診している歯周病患者から、インフォームドコンセントを得て歯肉縁上・縁下プラークおよび歯肉溝浸出液のサンプル回収を行った。プロトコールに沿って回収したサンプルで、縁上・縁下プラークは、電気化学測定装置により解析を行った。今後、歯肉溝浸出液については、ELISA 法により解析していく。炎症性サイトカインをターゲットした ELISA キットで分析する。また、歯周病患者サンプルから rRNA 遺伝子を解析し、歯周病原細菌の量や存在比の定量的な検出システムの開発を行ううえで、まず代表的な歯周病原細菌および口腔内常在細菌の純粋培養したサンプルにおける rRNA 遺伝子解析が必要である。

まず、口腔細菌叢のなかで、代表的な口腔内常在菌、う蝕原細菌、歯周病原細菌、歯肉炎原細菌を担当機関に供与した。

本研究プロジェクトにおけるサブテーマ1では、ペプチドプローブによる電気化学的手法による歯周組織破壊酵素の検出システムの開発を進めている。この検出システムでは、歯周病原細菌が産生する歯周組織破壊酵素が二つの型を有することに着目し、これらを見分ける検出系を構築することで、精度を正確に評価していく必要がある。そこで、歯周病原細菌の2種類の酵素欠損株の作製を行った。その結果、2種類のうち、1つの欠損株の作成に成功した(図 2-5-1)。

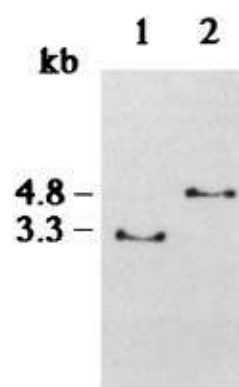


図 2-5-1 遺伝子欠損の PCR による確認(レーン 1: 親株、レーン 2: 欠損株)

2-6 プロジェクトの管理運営

当該プロジェクトが円滑に運営され、かつ目標を確実に達成できるように、プロジェクト全体の企画運営と進捗管理を行った。事業の進捗につき、推進委員会の開催により、研究開発の進捗状況を把握すると共に、経理処理状況を各研究機関に赴き、現地確認を行なう等、適正な管理を行った。また、本年度の研究開発の実施内容を整理し、経理報告書と成果報告書の取りまとめを行った。

3. 全体総括

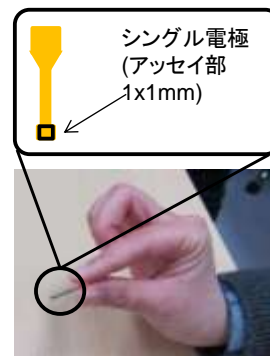
3-1 研究開発成果

3-1-1 平成 23 年度研究実施内容及び目標

以下に、本年度の研究実施内容及び目標を以下にまとめた。

(1) 検出方法の検討

- ・ 3 種類の検出アッセイを、使い捨てシングルチャンネルチップ(図 3-1-1)上で再構築する。
- ・ 検出時間の短縮を行う。



(2) チップ・読み取り装置の検討

- ・ 5 チャンネル検出チップを試作する。
- ・ 5 チャンネル対応読み取り装置を試作する。

図 3-1-1 シングルチャンネルチップ

3-1-2 平成 23 年度の達成状況

上記目標に対し、以下の項目を達成した。

(1) 検出方法の検討

- ・ 同じチップを使い、3 種類のターゲットの検出に成功
- ・ 検出時間の短縮を達成
 - ・ 歯周組織破壊酵素:30 分で検出(目標達成)
 - ・ 歯周病原菌叢:2 時間で検出(目標:1 時間)
 - ・ 炎症性メディエータ:1 時間で検出(目標:4 時間、H24 年度目標を前倒して達成)

(2) チップ・読み取り装置の検討

- ・ 検出チップ: 基板をガラス→プラスチックにすることで低コスト化を実現
- ・ 読み取り装置: 同じ装置で3種の検査に対応



図 3-1-2 検出モジュール



図 3-1-3 読み取り装置

3-1-3 今後検討すべき課題

今後、マルチチャンネルチップを使い、臨床データ収集を開始する。具体的には、以下の課題に取り組んでいく予定である。

(1) 検出方法の課題

- ・ 検出時間の更なる短縮
 - ・ 目標 10～30 分以内
- ・ 5 チャンネルチップへの適応
 - ・ n数増による精度アップ
 - ・ 同時多項目検出
- ・ 臨床サンプルを用いた評価→課題の洗い出し

(2) チップ・読み取り装置の課題

- ・ チップの安定製造法確立
- ・ 使い勝手の改良
- ・ 臨床検体採取方法の確立

(3) 薬事申請対応

- ・ PMDA への事前相談
- ・ 臨床データの蓄積

3-2 今後の進め方

H23年度は、3つの測定項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、専用読取りデバイスの試作を行った。

H24年度は、前年度の成果を踏まえ本年度の目標達成に向けて、H23年度において試作・開発した電気化学アナライザーを5台追加購入し、各研究実施場所に配置した上で、以下の研究開発を実施する。

課題	H23年度	H24年度	H25年度
検出法の構築	検出時間短縮	検出時間短縮	
①破壊酵素	①30分以内(達成)	①10分以内	臨床検体による評価 →最適化
②菌叢	②2時間以内(目標1時間)	②30分以内	
③メディエータ	③4時間以内	③1時間以内	
検出チップ	シングルチャンネル →5チャンネル試作(達成) 現状:2.5cm×5.0cm	5チャンネル、最適化	25チャンネル、 仕様確定
読み取り装置	5チャンネル対応装置試作 (達成)	装置試作、 ソフトウェア改良	小型化(容積30%減)、 仕様確定
臨床テスト	臨床検体採取法の確立 (非侵襲かつ5分以内)	臨床検体検出上の 課題抽出・解決	臨床検体による 測定データ収集
薬事申請対応		PMDAへの事前相談 開始	クラス分類、申請/届出、検 出チップの扱いなどを確定

また、事業化までのスケジュールを以下に示す。

時期(年度単位)	事業化(上市)までの計画内容
H26年度	追加研究、研究最終試作品評価、 治験開始
H27年度	製造技術・製品開発、 治験終了、薬事申請
H28年度	製造(量産)準備、 薬事承認、出荷認可、上市

