

平成 24 年度 課題解決型医療機器等開発事業

「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 25 年 2 月

委託者 経済産業省

委託先 公益財団法人 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 | 6 |
| 1-3. 成果概要 | 7 |
| 1-4. 当該研究開発の連絡窓口 | 12 |
| 2. 本論 | 13 |
| 2-1. 歯周組織破壊酵素検出システム開発 | 13 |
| 2-1-1. プローブの設計・合成 | 13 |
| 2-1-2. 検出チップの構築 | 14 |
| 2-2. 歯周病原因菌叢検出システム開発 | 19 |
| 2-2-1. プローブの設計・合成 | 19 |
| 2-2-2. 検出チップの構築 | 25 |
| 2-2-3. 病原菌の統計解析 | 28 |
| 2-3. 炎症性メディエータ検出システム開発 | 29 |
| 2-3-1. 抗体の合成・評価 | 29 |
| 2-3-2. 電気化学的エライザシステムの構築 | 32 |
| 2-4. 歯周病総合診断装置の開発 | 38 |
| 2-5. 臨床試験データの取得 | 41 |
| 2-5-1. ターゲットモデルサンプルの作成 | 41 |
| 2-5-2. 臨床検体採取方法の検討 | 42 |
| 2-5-3. 臨床試験 | 43 |
| 2-6. 研究全体の総括、プロジェクトの管理運営 | 43 |

| | |
|-----------------------------|----|
| 3. 全体総括 | 44 |
| 3-1. 研究開発成果 | 44 |
| 3-1-1. 平成 24 年度研究実施内容 | 44 |
| 3-1-2. 平成 24 年度の達成状況 | 44 |
| 3-1-3. 今後検討すべき課題 | 45 |
| 3-2. 今後の進め方 | 46 |

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。

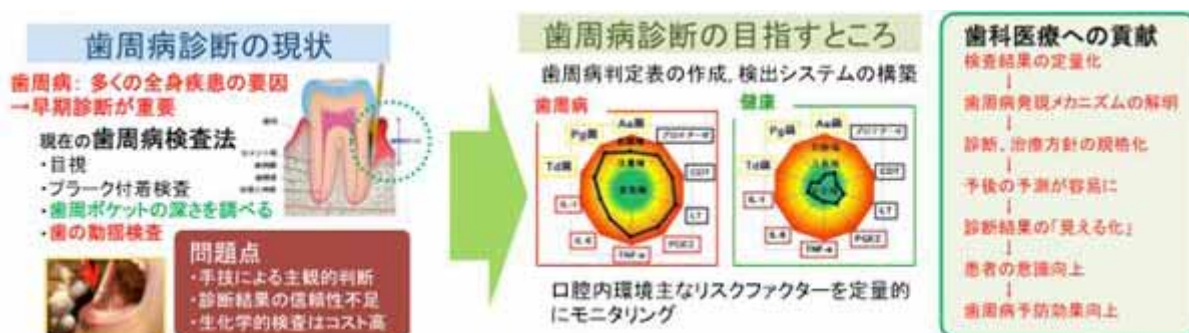


図 0-1 歯周病診断の現状・課題と目指すべき姿

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、歯周病原因菌叢の検索、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 を用いて歯周病原因菌叢(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。

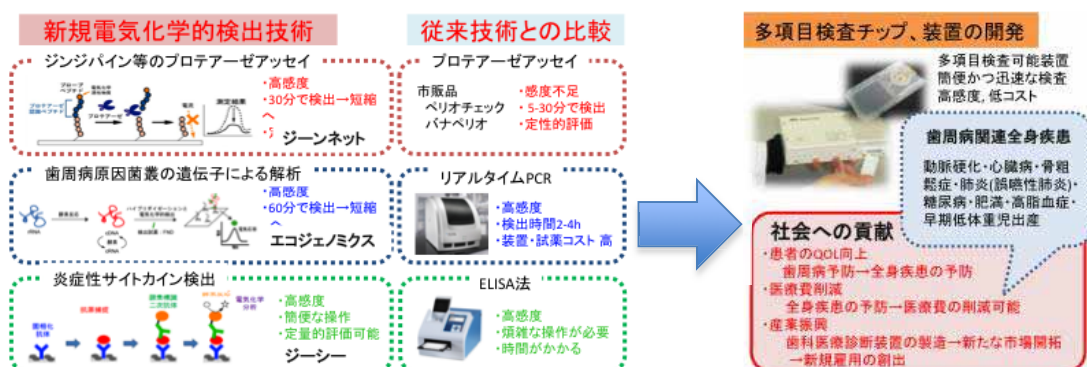


図 0-2 定量的歯周病総合診断システムの実現に必要な技術開発

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。

平成 23 年度は、前述の3つの検出項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、シングルチャンネルチップ上で、それぞれ検出時間の短縮に成功した。また、製品化に必要なチップのマルチチャンネル化、及びマルチチャンネルチップに対応した専用読み取りデバイスの試作を行った。

平成 24 年度は、前年度の成果を踏まえ、各項目の更なる検出時間短縮を図ると同時に、マルチチャンネルチップの最適化、読み取り装置の小型化により、臨床検体検出時の問題を解決するため以下を実施する。

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利用した検出プローブを昨年度の知見をもとにさらに高感度化と保存安定性の両立のため最適化する。

①-2 検出チップの構築

マルチ電極チップを用いて短時間で検出できるシステムを開発する。測定時間短縮のために高感度化が必要であり、電気化学プローブの開発と、基質ペプチドを検出チップへ固定化する方法を検討する。さらに、システムの最適化と評価を行う。

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

昨年度設計・評価した PCR プライマーを用いて、サンプル中における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に、検出チップの構築に必須であるデータの収集を行う。また、歯周病患者から提供されるサンプルを解析に供することで、細菌種内・遺伝子内の多様性データに基づいた検出チップ用遺伝子プローブを新たに設

計・作製する。

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、患者サンプルを用い、高感度検出のためのサンプル調整の条件検討を行う。

②-3 病原菌の統計解析

得られたデータを統計処理し、歯周病原因菌叢を解析する手法を確立する。

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

TNF- α 検出のため、昨年度開発した電気化学的エライザ法を簡便化する手法を検討する。また、更なる診断精度向上のため、歯肉炎から歯周炎に進行する際に歯肉上皮細胞に致死的に作用をする物質に着目し、モノクローナル抗体の作成を検討する。

③-2 電気化学的エライザシステムの構築

これまで開発してきた TNF- α の電気化学的エライザによる高感度検出技術を基に、検出の安定性向上のための最適化を行い、チップの作成方法等を改良する。

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

昨年度の知見を反映させた金電極チップを外注により試作し、各機関にてその使用し易さに関して評価を行い、最適化する。

④-2 チップの品質評価・改良

昨年度に試作した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

昨年度開発した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う。

⑤ 臨床試験データの取得(九州歯科大学、九州工業大学、(株)ジーンネット、(株)エコジエノミクス、(株)ジーシー)

⑤-1 ターゲットモデルサンプルの作成

昨年度に引き続き、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。また、歯周組織破壊酵素検出システムによる診断精度を高めるため、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の構築を目指して、遺伝子欠損株の作成を検討する。

⑤-2 臨床検体採取方法の検討

本事業で開発する検査は、一般の歯科クリニックで広く利用されることを目的としているため、患者に苦痛を与えない非侵襲的、かつ短時間でサンプルを採取する方法を検討し確立する。

⑤-3 前臨床試験

既存の方法で蓄積された歯周組織破壊酵素、歯周病原因菌叢、炎症性メディエータのデータと、本事業によって開発された手法で採取したデータとを比較し、性能評価を行う。また、評価結果を各検討グループにフィードバックし、チップ、装置の改良を行う。

⑥ 研究全体の総括、プロジェクトの管理運営((公財)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。

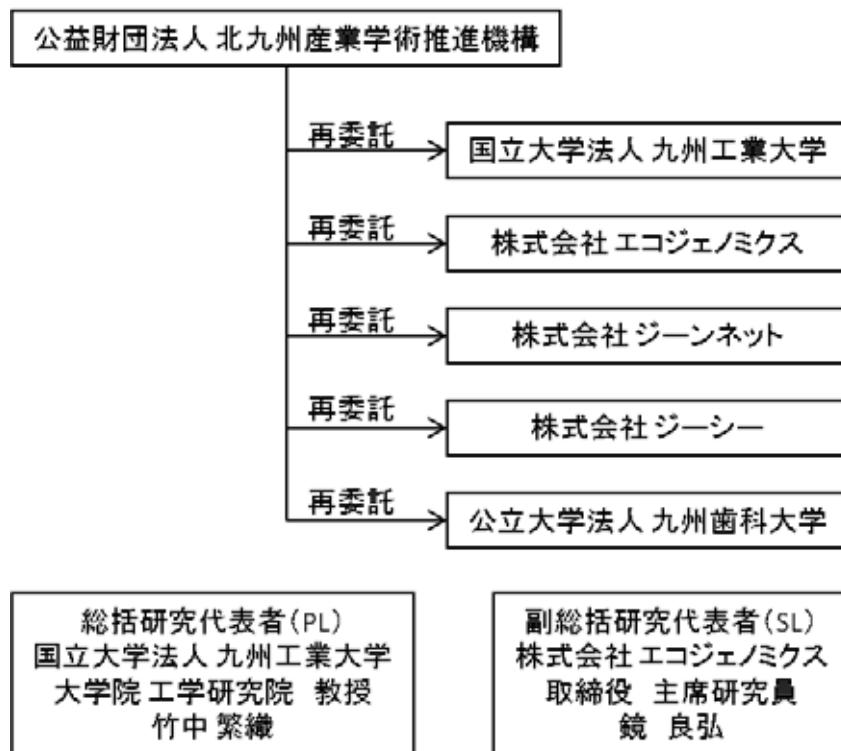


図 0-1 研究組織

1-3. 成果概要

平成 23 年度は、3つの検出項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、シングルチャンネルチップ上で、それぞれ検出時間の短縮に成功した。また、製品化に必要なチップのマルチチャンネル化、及びマルチチャンネルチップに対応した専用読取りデバイスの試作を行った。

平成 24 年度は、前年度の成果を踏まえ、各項目の更なる検出時間短縮を図ると同時に、マルチチャンネルチップの最適化、読み取り装置の小型化により、臨床検体検出時の問題を解決することを目標とした。これに対し、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>

- ・ 新規な構造のペプチドプローブを 8 種類設計、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>

- ・ ペプチドプローブの性能評価を行い、高性能なプローブを見出した。
- ・ 酵素の培養液を用い、実用感度での検出を達成した。
- ・ マルチ電極へ展開し、歯周病患者と健常者の臨床サンプルの検出に成功した(検出時間 30 分)。
- ・ チップの保存安定性評価を行い、冷蔵で数ヶ月間安定であることが分かった。

<今後の課題>

- ・ 採取サンプルの前処理方法の最適化
- ・ 臨床サンプルに対するしきい値等の精度向上
- ・ 常温保存で長期安定化するためのチップの管理方法の検討

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

<成果>

- ・ 電気化学式チップ用プローブとして、24 種類を設計した。それらの中から、性能が極めて良好と思われる 5 種類のプローブを合成した。

<今後の課題>

- ・ 細菌検出用 DNA プローブのチップへの固定化効率の確認が必要。
- ・ DNA プローブの固定化効率が簡易に判定できるような試験法を開発が必要。

②-2 検出チップの構築

<成果>

- ・ 歯周病関連菌の培養液から抽出した RNA の直接検出をマルチ電極で達成した(検出時間 5 時間)。
- ・ PCR 産物の簡易電気化学検出に成功した(検出時間 2.5 時間)。

<今後の課題>

- ・ 現在の検出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。

②-3 歯周病原菌(菌叢)の統計解析

<成果>

- ・ 歯周病患者および健常者からのサンプルを利用して得られた菌叢解析データをもって、データの図式化および口腔内細菌群の特徴に基づいたプロファイリングの検討を実施した。
- ・ これらのデータを有効に活用しながら、診断支援ツールの開発を目的として、レーダーチャート等の図式化パターンからの歯周病原菌の検出・プロファイリングを検討した。

<今後の課題>

- ・ 歯周病原菌や常在細菌の明確な分類手法の開発、そして検出細菌の定量性の確認、あるいは相対定量手法がまだ検討中の段階である。
- ・ 今後も引き続きデータの図式化および歯周病原菌や常在細菌の分類手法の開発が必

要。

- ・ 電気化学式チップからのデータを収集し、診断支援に必要となる要素の確認が必要。

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>

- ・ 新規メディエータのモノクローナル抗体作成(免疫、抗体価確認)

<今後の課題>

- ・ 電気化学的エライザシステムへの適用。

③-2 電気化学的エライザシステムの構築

<成果>

- ・ TNF- α をターゲットとして、検出システムの最適化を行った。
- ・ MMeELISA 法を開発し、シングル電極による電気化学測定での検出下限は、サブ pg/mL であった(検出時間 43 分)。
- ・ 歯周病患者、健常者由来のサンプルから TNF- α の検出に成功した。

<今後の課題>

- ・ MMeELISA の短縮化とイミノクロマトグラフィーの最適化が必要。

④ 歯周病総合診断装置の開発

④-1 チップの試作

<成果>

- ・ プラスチック基板上にマルチ電極チップを構築し、樹脂によって表面マスキングを行った。

<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>

- ・ 測定精度向上のため、マスキング方法、チップの前処理方法を検討し、ばらつきを 5% に抑えることに成功。
- ・ ホルダの改良により液漏れ等の問題を解決。

<今後の課題>

- ・ 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>

- ・ 15 電極まで測定可能なマルチ電極測定電気化学アナライザーを開発した(装置の大きさ:80×180×40 mm)。

<今後の課題>

- ・ 医師が使用した感想を集め、使いやすいようにソフトウェアを改良することが必要。

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>

- ・ 歯周病原細菌の歯周組織破壊酵素に関する遺伝子欠損株を作成した。
- ・ 倫理委員会の承認を受け、歯周病患者より関連試料を採取、コンソ各機関へ提供した。

<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。

⑤-2 臨床検体採取方法の検討

<成果>

- ・ 患者サンプルの採取法を検討し、ペーパーポイントを用いる方法を構築した

<今後の課題>

- ・ サンプルの保存、管理方法を検討する必要がある

⑤-3 前臨床試験

<成果>

- ・ 破壊酵素、菌叢解析、炎症性サイトカインをターゲットとして、患者サンプルの種類について検討を行い、全ての検出が可能なサンプルを見出した。

<今後の課題>

- ・ サンプル採取後の処理方法の確立。
- ・ 各種サンプルの最適溶媒の決定。

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 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

本実施内容は、歯周組織破壊酵素検出用の基質ペプチドを設計合成し、これを検出チップへ固定化する方法を検討する。更に、こうして構築した破壊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。

今回は、新たに設計したペプチドを含めたプローブペプチド 8 種を合成し、これと並行してこれまでの基板固定化部位の異なるペプチドプローブを利用してジンジパインを検出できるシステムの試作、評価を行った。

2-1-1. プローブの設計・合成

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うことでプローブを得た。

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

本年度は、ペプチドプローブの性能評価および歯周病原細菌培養液によるシステム構築と臨床検体の評価システムの構築を行った。さらに、使い捨てシングルチップからマルチ電極チップへ展開した。

本システムの検出原理を図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。

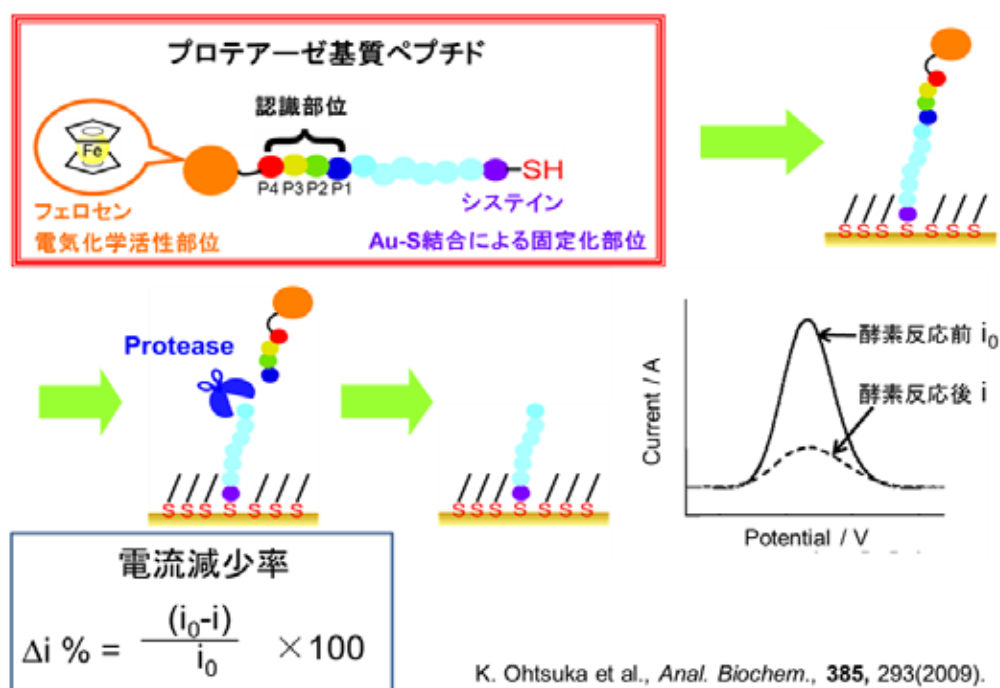


図 0-1 電気化学的プロテアーゼアッセイの検出原理

(1) プローブペプチドの電気化学的性能評価

本実験では、ペプチド固定化電極を調製し、フェロセンの電子移動速度を算出した。図 2-1-2a には、ペプチド H を固定化したときの結果を示す。走引速度の増加に応じて、酸化電流、還元電流が増加した。図 2-1-2b に示すように、走引速度に対して電流値が直線関係を示したことより、ペプチド H が電極表面に固定化されていることが示された。他のペプチドプローブもペプチド H と同様の挙動を示し、すべてのプローブが金表面に固定化可能であることが示された。

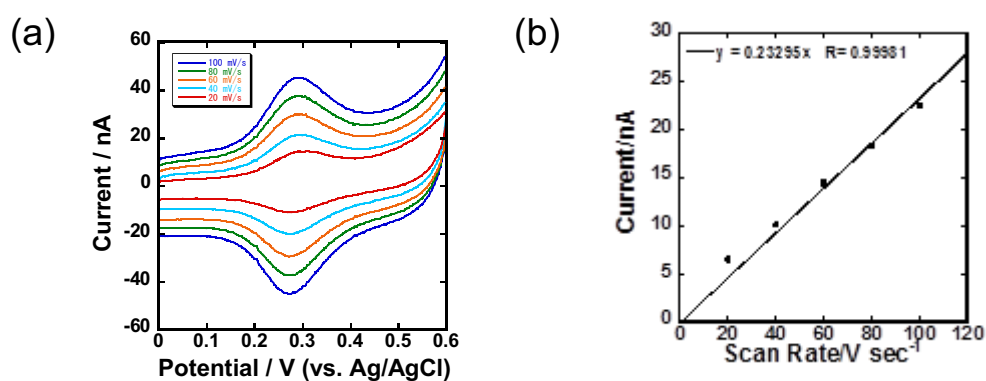


図 2-1-2. (a) ペプチド H 固定化金電極のサイクリックボルタモグラム(走査速度: 20, 40, 60, 80, 100 mV/s). (b) 走引速度に対して、酸化電流をプロットしたもの.

今回合成した8種類のペプチドについての評価結果を表2-1-1に示す。各種特性を勘案すると、ペプチドG、ペプチドHが最も性能が良いと考えられる。

表 2-1-1. ペプチドプローブの特徴

| | 電子移動 速度/ s^{-1} | 溶解性 評価 | 固定化 評価 | 特徴 |
|-------|----------------------|-----------|-----------|--------------|
| ペプチドA | 460 | ○ | ○ | 強固に固定化可能 |
| ペプチドB | 420 | △ | △ | 水溶性に乏しい |
| ペプチドC | 2000 | ◎ | ○ | 水溶性は高い |
| ペプチドD | 1500 | ◎ | ○ | 水溶性は高い |
| ペプチドE | — | ◎ | △ | ポリマー化 |
| ペプチドF | — | ◎ | △ | ポリマー化 |
| ペプチドG | 2160 | ◎ | ○ | ダイマー形成の可能性なし |
| ペプチドH | 2450 | ◎ | ○ | ダイマー形成の可能性なし |

(2) ディスポーサブル電極による培養液検出の検討

前節の検討より、性能の高かったペプチドプローブを固定化し、歯周病原細菌培養液の上清の濃度変化に対する電流減少率を観察した(図 2-1-3)。その結果300倍希釈まで検出可能であることがわかった。

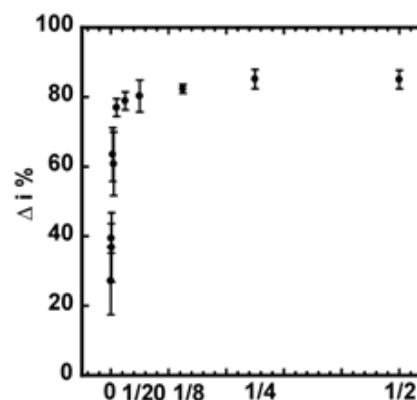


図 2-1-3. ペプチド固定化電極に対して、細菌培養液を作用させたときの電流減少率.

(3) ディスポーザブル電極による臨床サンプル検出の検討

健常者と歯周病患者の臨床サンプルについて、歯周病原細菌の発現量(Ct値、小さければ菌が多く存在)と電流減少率の相関関係を調べた(図 2-1-4)。その結果、Ct 値の小さなものほど、電流減少率は大きく、電流減少率は菌量を反映していることが示された。

さらに病態不明な患者のブラインドテストを行った。判定を行った結果、ペプチドG固定化電極では正解率60%、ペプチドH固定化電極では正解率90%であった。現在の調整方法ではサンプルが希釈されすぎており、ペプチドG固定化電極を用いた系では含まれる酵素が検出下限以下であると推察される。臨床サンプルの調整方法を見直すことで、より高精度な検出が達成されると期待される。

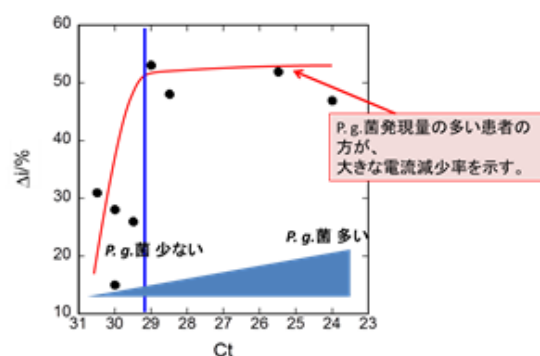


図 2-1-4 RT-PCR における Ct 値と電流減少率(Δi/%)の関係。

(4) 10 電極マルチチップによる操作の簡略化と臨床サンプル検出の検討

シングルチップからマルチチップへと展開した。電極は 10 電極マルチチップを用いた。10 電極のうち、反応溶液のみを作用させるコントロール電極を設けることで、1 度の測定で反応前後の電流値を得られるようにした。これにより、洗浄など、煩雑な操作を簡略化することができる。歯周病患者サンプルについて検討したところ、電流減少率により健常者との判別が可能であった。これより、マルチチップを利用することで、さらに簡略化した操作で酵素の検出を行うことができた。

(5) まとめ

現在は、図 2-1-5 に示すように、すべての操作で 17 時間必要とするが、ペプチドチップは調整後、数ヶ月間冷蔵保存で安定であることを確認している。ペプチドチップは提供可能であるため、チェアサイドでの操作は 32 分となる。今後はペプチドチップの保存管理方法の検討等を引き続き行う必要があると思われる。



図 2-1-5. 現在の操作手順.

2-2. 歯周病原菌叢検出システム開発

2-2-1. プローブの設計・合成

(1) 細菌種に特異的な毒素や酵素等の遺伝子配列の選定

昨年度中に実施したリアルタイム PCR を利用した歯周病原菌の検出試験の結果、歯周病関連細菌種特異的遺伝子を 5 細菌種 17 遺伝子に絞り込み、電気化学式チップ用の DNA プローブ設計へ向けて研究開発を進めた。

(2) リアルタイム PCR、高密度蛍光式 DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを利用した解析からの歯周病原菌特異的遺伝子配列の選定

(2)-1 リアルタイム PCR による細菌種特異的遺伝子の検出

前述の検討の対象に挙げられた 5 細菌種 17 遺伝子のそれぞれ遺伝子配列情報から、リアルタイム PCR 用プライマーを 2 セットずつ設計・合成した。PCR プライマーの長さは、すべてのプライマーにおいて同等となるように設定し、最適 T_m 値、PCR 産物の長さ等の条件に可能な限り適するように設定したうえで、「PRIMER3」ソフトウェアによるプライマーの設計を行った。

これらの 34 プライマーセットの中から、100%相補的な配列を持つサンプルに対して、およびメタゲノムサンプル(歯周ポケット内サンプルには約 800 種の細菌種が存在)に対しての、上記のプライマーの細菌種特異的な検出精度(図 2-2-1 参照)をリアルタイム PCR 実験の実施によって確認した結果、8 遺伝子 24 種類の「プライマーセット+遺伝子配列(PCR 産物の塩基配列)」を選定することができた。

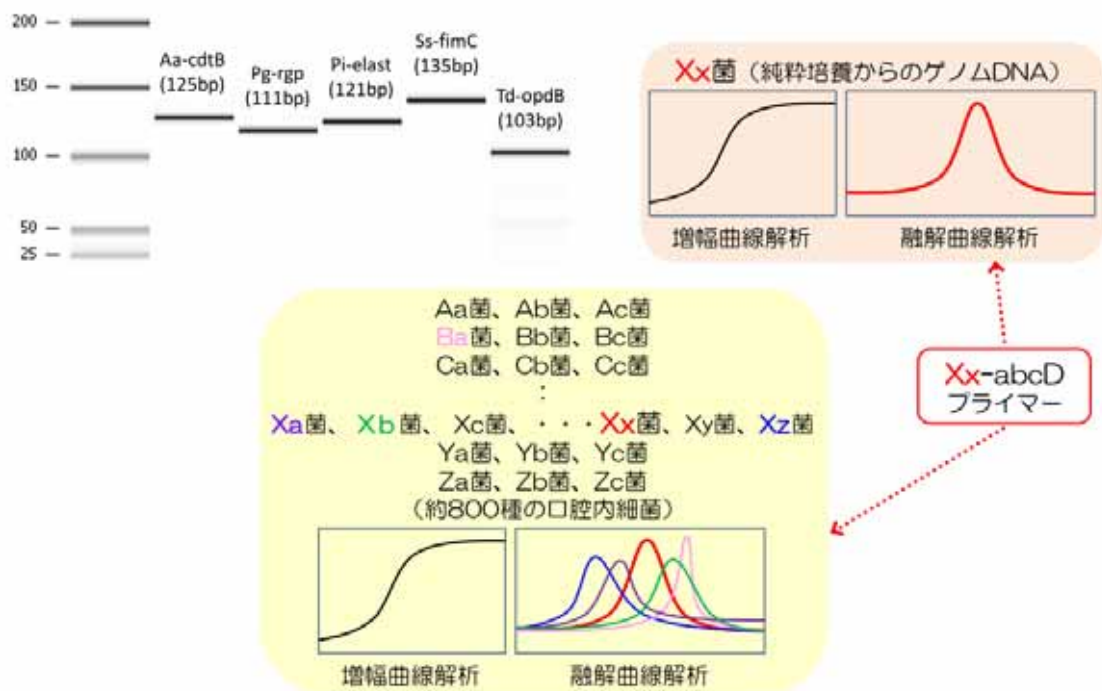


図 2-2-1. 確認されている歯周病原菌の細菌種特異的なリアルタイム PCR による検出精度 (左上の電気泳動画像)、および他の細菌種による非特異的検出 (擬陽性) が生じる場合の模式図。

(2)-2 高密度蛍光式 DNA マイクロアレイによる解析

昨年度の研究開発中に、以下の 4 細菌種について、細菌種特異的なゲノム配列のスクリーニング用の DNA プローブをそれぞれ 12,000 種類ずつ設計した。

これは、電気化学式検出チップ(歯周病原菌叢検出チップ)から得られるデータとの比較・参照を目的としたデータ収集、そして、電気化学式チップ用 DNA プローブの設計・合成の支援を目的として本年度中に実施したが、ある種の菌のゲノム情報が公共の塩基配列データベースにおいて完全なものではなかったため、この菌種のゲノムスクリーニング用としての高密度蛍光式 DNA マイクロアレイの作製は断念した。しかしながら、ゲノム DNA サンプルとしてのスクリーニングは可能であったがゆえに、ゲノムスクリーニングおよび電気化学式チップ用 DNA プローブの設計支援を目的として、「5 細菌種のゲノムサンプル vs. 4 種の比較ゲノムハイブリダイゼーション用 DNA マイクロアレイ」の全ての組合せによるハイブリダイゼーション試験を実施した。図 2-2-2 にそれらの試験から得られたマイクロアレイ画像の一例を示す。

このスクリーニングから歯周病原菌特異的配列と予想されるプローブの数は、4 菌種でそれぞれ 290 個、252 個、0 個、20 個、という結果が得られた。残念ながら、今回の検討において 1 菌種で特異的なプローブ配列を見出すことができなかったため、これらの細菌種を識別し検出するプローブ配列の探索は、リアルタイム PCR による解析からの結果に依存することとなった。

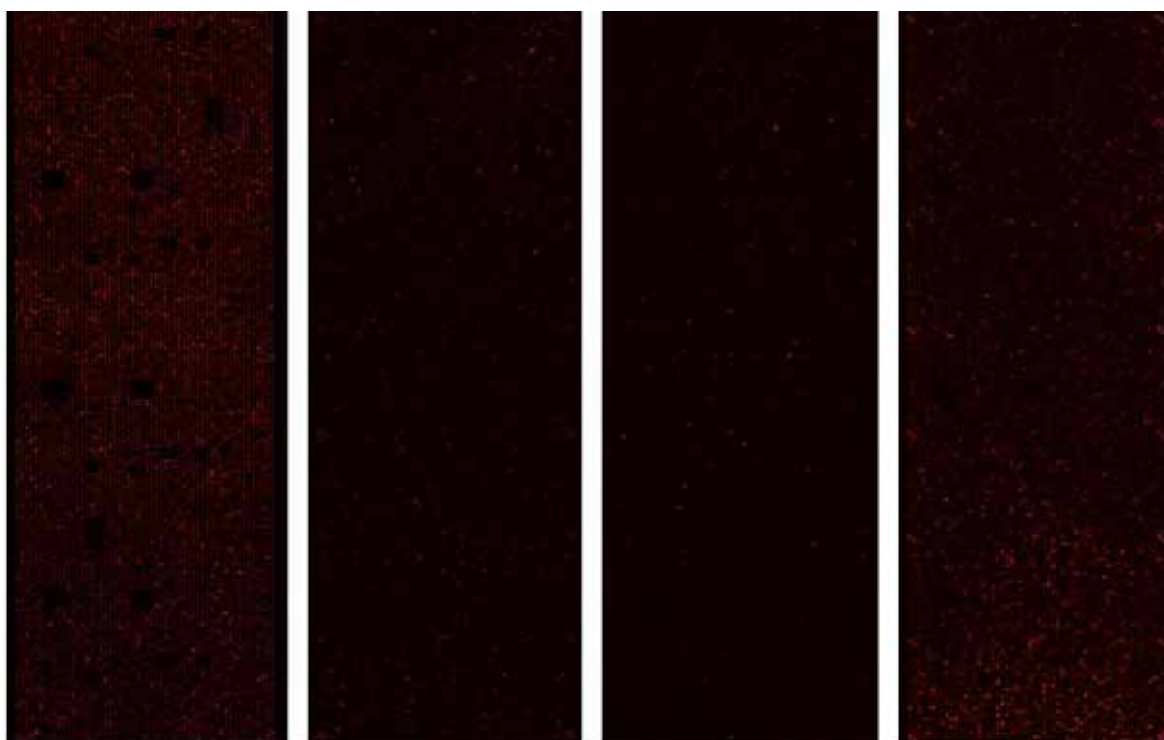


図 2-2-2. 歯周病原菌ゲノムスクリーニング用 DNA マイクロアレイによる解析画像の一例。

(2)-3 次世代シーケンサー(Ion Torrent PGM)による解析

歯周ポケット内に存在する細菌叢の、より正確で定量的な解析結果を事前を取得し、後に電気化学式チップから得られた菌叢解析データと比較することが、次世代シーケンサーによる解析の第一の目的であり、また、そこから得られたデータを有効に活用することで、診断のためのデータの可視化・図式化に関わる作業を円滑に実施することが第二の目的であった。本年度中の次世代シーケンサーによるメタゲノムの菌叢解析は、歯周病患者のサンプルと、対照群サンプルとして同様に提供された健常人のサンプルを用いて行った。その結果、歯周病患者からのサンプルと健常人からのサンプル間においての菌叢の差異は歴然としており、さらに、歯周病患者からのサンプルには、設計・合成を予定していた電気化学式チップ用のプローブで検出が可能である細菌種が確実に含まれていた、という事には我々も非常に驚かされた。したがって、現時点では、次世代シーケンサーによる菌叢解析から、電気化学式チップ用プローブ作製のために選択した歯周病原菌種が歯周病の診断に適していることが確認されているため、今後は前述した次世代シーケンサーによる解析の本来の二つの目的の追求に力を入れていく。

(2)-4 電気化学式チップ用プローブ配列の設計

前述の各種解析の結果から、5 細菌種の電気化学式チップによる定量的な検出を目的として 8 遺伝子 24 種類のプローブ配列候補を得ることができた。ここから 5 細菌種 5 遺伝子を特異的に検出する、5 種類の電気化学式チップ用のプローブ配列を選択し、歯周病原菌検出用電気化学式チップ(図 2-2-3 を参照)に 3 電極×5 種類のパターンで固定化され、今後の開発では以下のような評価試験を実施していく。

- ①チップ基板の電極上に 5 種類の歯周病原菌検出用プローブを固定し、その固定度合いを確認する。
- ②プローブと完全に相補的な配列を持ち、尚かつ定量性を有するターゲットサンプルを利用して、チップの基本的な精度・感度の評価を実施する。
- ③歯周病患者/健常人からの歯肉溝内メタゲノムサンプルを用いたハイブリダイゼーション、チップによる菌叢解析を実施する。
- ④サンプル調製および解析にかかる時間を大幅に短縮する方法を開発する。

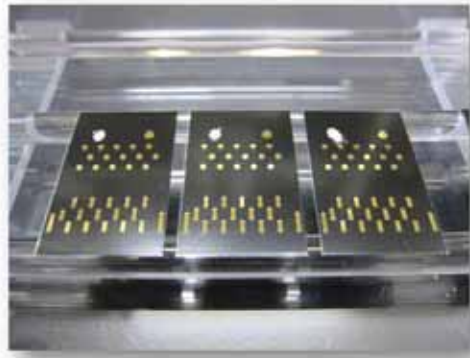
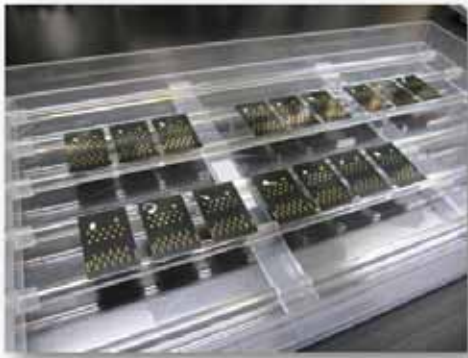


図 2-2-3. 歯周病原菌検出用電気化学式チップ

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メダカ的环境応答因子に関して全RNAからの目的遺伝子の検出について検討を行うことで、まず条件検討を行った。さらに、これを踏まえて歯周病原細菌のRNA検出を試みた。

図2-2-4に開発チップとFNDを用いた電気化学的菌叢解析の概念図を示した。これによって特定の菌種がどれくらい存在するかを推測できる。

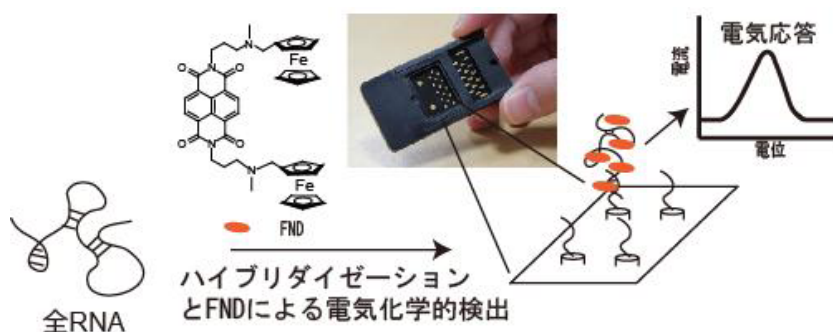


図2-2-4. 開発チップとFNDを用いた電気化学的菌叢解析の概念図

我々は電気化学二本鎖DNA検出試薬フェロセン化ナフタレンジイミド(FND)を利用した電気化学的遺伝子検出法を確立している。検出原理を図2-2-5に示す。FNDは二本鎖DNAに縫い込型で結合するインターカレータである。センサチップは、前処理した金電極にDNAを添加してプローブDNA固定化電極を作成した。これにターゲットとなるRNAを作用させ、最後に二本鎖DNA検出試薬フェロセン化ナフタレンジイミド(FND)で電気化学的検出を行った。また、Real Time RT-PCRを利用して目的遺伝子の発現解析を行い、電気化学検出の妥当性を評価した。

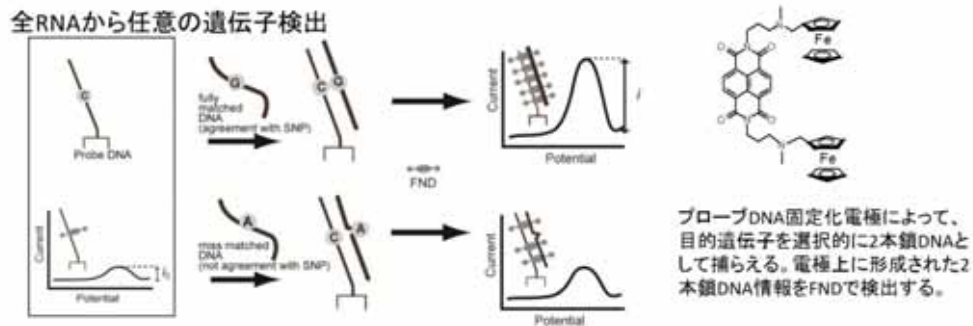


図 2-2-5. FND による電気化学的遺伝子検出の概念図.

プローブとして arp_P0, chgH, chgL, ctcP1A, ctcP3A40, hsp70 固定化電極を調整し、各遺伝子の発現解析を電気化学的に行った。その結果を図 2-2-6 に示す。今回検討した6種類の遺伝子のうち、hsp70 遺伝子が最も大きな電流を示し、発現量が多いことを示した。逆に、ctcp1A 遺伝子の応答が最も小さく、発現量が小さなことが示された。

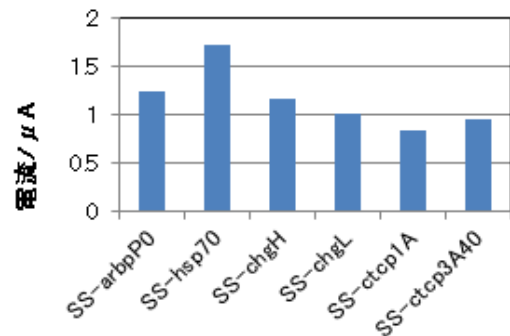


図 2-2-6. 各種遺伝子固定化電極における応答電流値の変化.

実際に Real Time RT-PCR によって、発現量を確認した。cDNA の増幅に伴い、CYBR Green の蛍光強度は増大した。増大の度合いは、鋳型 RNA の含有量に依存する。そこで、蛍光強度 0.1 を示す時の PCR サイクルナンバーを Ct 値として得た。Ct 値は発現量が多いものほど小さな値を示す。その結果、最も発現量が多いのは hsp70 であり、少ないのは ctcp1A であった。これは、電気化学測定の結果と同様の結果である。図 2-2-7 に示すように、電流に対して Ct 値をプロットすると負の相関が得られた。この結果は、

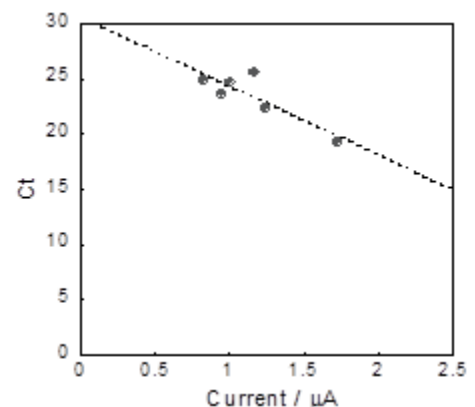


図 2-2-7. リアルタイム RT-PCR と電気化学測定結果の相関図.

電気化学測定において、ターゲットが多い場合電流増加が起こっていることを示唆している。

本結果より、電気化学測定結果は、サンプル中の発現量を繁殖したものであることがわかり、さらにハイブリダイゼーション時間については、わずかに 2 時間で検出可能であることが示された。このことは、本システムが RNA ターゲットを短時間で高精度に検出できる可能性を示すものである。

菌から市販のキットを利用して抽出された全 RNA とあらかじめ作成した菌叢解析チップを利用して直接ハイブリダイゼーションを行った後、FND を含む電解溶液で電気化学測定を行うことにより、どのような菌がどれぐらい存在するかを見積もれることが今回の結果より明らかとなった。特に本系が優れている点は、全 RNA 中に含まれるメッセンジャーRNA は数%であるにも関わらず高感度検出できる点である。また、FND を用いるだけの非ラベル検出である。しかしながら、ハイブリダイゼーションが 2 時間かかるため、チップを作成していたとしてもかなりの測定時間を必要とする。今後、以下に測定時間を短縮できるかが本手法の実用化のカギとなると考えている。

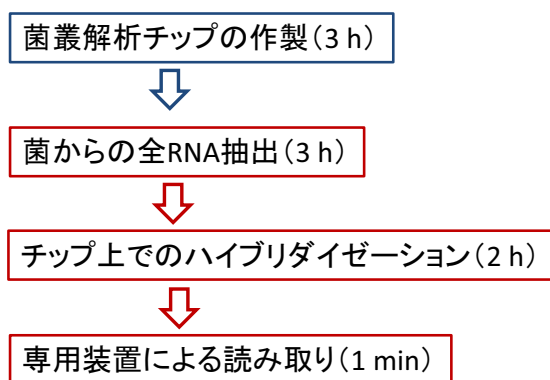


図 2-2-8. 現在の操作手順.

2-2-3. 病原菌の統計解析

(1) 歯周病患者からのメタゲノムサンプルを利用した解析

次世代シーケンサーによる解析で利用したものと同一サンプルであるが、歯周病患者のサンプルと健常人のサンプルからメタゲノムサンプルを抽出し、リアルタイム PCR によって4種類の歯周病原菌+1種類の常在細菌に特異的な遺伝子の検出を定量的に行ってみた。その結果、リアルタイム PCR 法でも検出・検査項目が複数であれば、高精度に歯周病の診断ができる可能性が見出された。次年度は、歯周病菌叢解析用電気化学式チップから得られる歯周病原菌の検出データをこれらの結果とも比較することで、チップの性能評価と歯周病診断(支援)手法の確立に役立てることができると予想される。

(2) 菌叢解析データの可視化・図式化

歯肉溝内や口腔内の細菌サンプルの菌叢解析データについては、それぞれの検査項目から得られる数値の比較が明確であり、解析結果の図式をもって歯科医師が容易に、しかも正確に患者に歯周病の診断(重度、中度、軽度、健常)等を行なえることが望ましい。そこで、3次元グラフ、レーダーチャート、計算表などの手法で図式化を試みた。しかし、次のような問題点もまだまだ存在するために、次年度の研究開発では数多くのサンプルの解析を実施しながら更なる検討ならびに研究開発が必須であると考えている。

- ① サンプル間でのメタゲノム量にばらつきが生じる場合が多いため、検出項目(細菌/遺伝子)間やサンプル間での相対比較用(データ正規化用)の内在性レファレンス因子の探索を検討しなければならない。
- ② 電気化学式チップ上のプローブ配列に相似の配列を持つ歯肉溝内細菌が、非特異的に検出される可能性は無いとは言えない(擬陽性を示す)ため、検体数を増やすことやシーケンス等の精度の高い解析を今後も引き続き実施することによって、プローブ配列の性能をさらに調査、確認していく必要がある。
- ③ 歯周病患者、予備軍、健常者の境界線をどこに設定すべきであるかは、かなり難しいことであろうと予想されているが、臨床からのデータを、この菌叢解析データや同事業内の他2種類の検出システムからのデータと相関させることで、境界線の設定、すなわち「より正確な診断(支援)手法の開発」につながると期待している。

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

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。

(1) リコンビナントタンパク抗原の調製

まず、タンパク発現系の確立を試みた。タンパク質発現プラスミドをアフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞に導入した。導入後、培養した細胞よりタンパクを抽出した。細胞より抽出したタンパクからアフィニティークロマトグラフィーによる組み換えタンパクの最終的な精製を行った。アフィニティークロマトグラフィーは、タンパク質と特定物質との親和性を利用した吸着クロマトグラフィーである。アフィニティークロマトグラフィーは他のクロマトグラフィーに比べ高い精製効率と回収率をもち、かつ一度に多量の試料を処理することができる。

精製後のタンパクについて、Western blotting 法でアメロプラスチンタンパクの発現を確認したところ、強いタンパクの発現が観察された。このタンパクの分子量はおよそ 70 kDa で、目的のタンパク質の分子量に関する過去の報告と一致するものであった。

また、この方法で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。

(2) ペプチド抗原の調製

同時に合成ペプチドを抗原として使用した。合成ペプチドは、抗原部位が短いために抗体価が上がりにくいという欠点はあるものの、精製タンパク質やリコンビナントタンパク質を用いる方法に比べ、手間と時間を節約できるという利点がある。

抗原ペプチドは抗原部位が短いために抗体価が上がりにくい。そこで抗体価を上げるために、キャリアタンパク質と結合させてから免疫に使用した。

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、純度の高いタンパクの大量精製を予定している。

(3) サイトカインモノクローナル抗体作製

モノクローナル抗体作製に当たり、抗原として精製タンパクとペプチド抗原 2 種類を免疫抗原とすることとした。

免疫抗原は精製タンパクおよびペプチド S1、S2 の 3 種類を使用した。mouse-1、mouse-2 はペプチド S1 抗原、mouse-3、mouse-4 はペプチド S2 抗原、mouse-5 は精製タンパクをそれぞれ腹腔内投与した。

免疫前および抗原溶液投与から 2 週間経過後のマウスから少量採血し血清を得た。免疫前のマウスから得た血清は抗体力価測定のネガティブコントロールとした。得られた抗血清を ELISA 試験にてそれぞれのペプチド抗原およびアメロプラスチンタンパクに対する抗体力価測定した。

採血 1 回目ではペプチド S2 を免疫した mouse-3、mouse-4 でペプチド S2 に対する抗体力価の上昇が見られた。

採血 2 回目ではペプチド S1、ペプチド S2 を免疫したマウスはどちらもそれぞれのペプチドに対する抗体力価が上昇していた。採血 2 回目のタンパクに対する反応性を比較すると、ペプチド S1 の方が抗体力価が上昇した結果となった。以上より、mouse-1 を選択して細胞融合を行い、mouse-2、3、4、5 については引き続き免疫を継続することとした。

ペプチド S1 を mouse-1 の尾静脈より投与し、最終免疫とした。

スクリーニングの結果、ペプチド S1 に対する陽性ハイブリドーマ細胞が 2 ウェル得られた。この 2 ウェルの細胞を 24 ウェルプレートに移して培養し、タンパク質に対する反応性を ELISA 試験にて確認したところ、1 ウェルのみがタンパクにも反応した。スクリーニングの段階では陽性ウェルが複数のハイブリドーマ細胞が混在した段階になっているため、不必要な抗体を産生するハイブリドーマ細胞や抗体を産生しないハイブリドーマ細胞が混在した状態になっており、このまま培養を続けると目的のハイブリドーマ細胞が消失し

てしまう可能性がある。そのため、スクリーニングで目的の抗体を産生するウェルを選択した後、ハイブリドーマ細胞の凍結とともにモノクローン化する必要がある。現在、限界希釈法によりクローニング作業を行っているところである。

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、電気化学的エライザシステムを構築し、炎症性サイトカインの一つである TNF- α の検出システムの構築と臨床検体による評価を行うものである。検出概念を図 2-3-1 に示す。検出は、(i) 迅速な BF 分離の可能なイムノクロマトグラフィーと(ii)ニトロセルロースメンブレンを利用した Membrane-based microwave mediated electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay (MMeELISA)法の二つについて検討を行った。

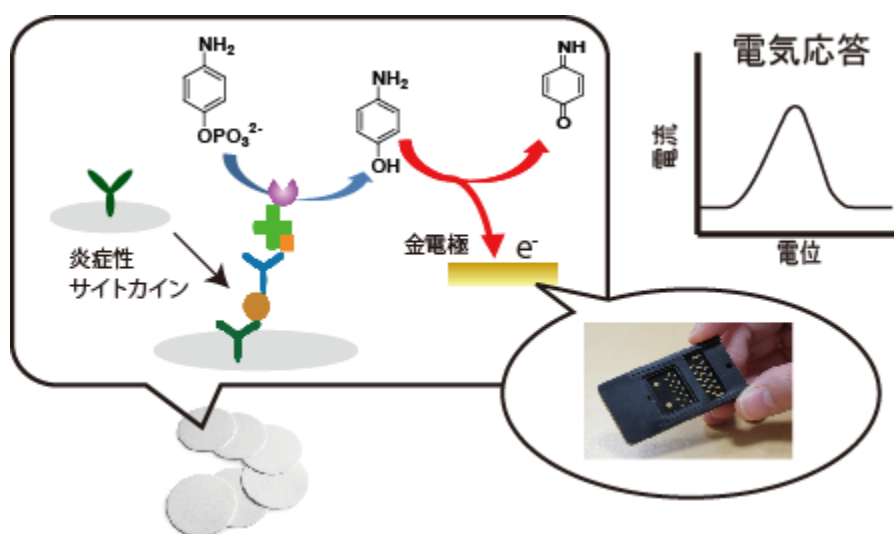


図 2-3-1. 炎症性サイトカインの検出概念.

(1) イムノクロマトグラフィーの検討

まず、(i) 迅速な BF 分離の可能なイムノクロマトグラフィーの開発と電気化学的エライザ検出につて検討を行った。イムノクロマトグラフィーによる電気化学的エライザ検出システムの検出原理を図 2-3-2 に示す。イムノクロマトグラフィーでは、通常金ナノ粒子による比色検出を行うため、メンブレンの表面の抗原抗体しか観察できないことから、感度に問題がある。そこで、検出感度向上のために、基質として吸光度測定用基質と p-ニトロフェニルリン酸と電気化学活性基質である p-アミノフェニルリン酸で検討を行った。これらの基質はメンブレン全体と反応させ、反応終了後の溶液を用いることで、メンブレンの表面だけでなく、内部に固定化されたすべての抗原のモニタリングができるため、感度向上につながると期待される。

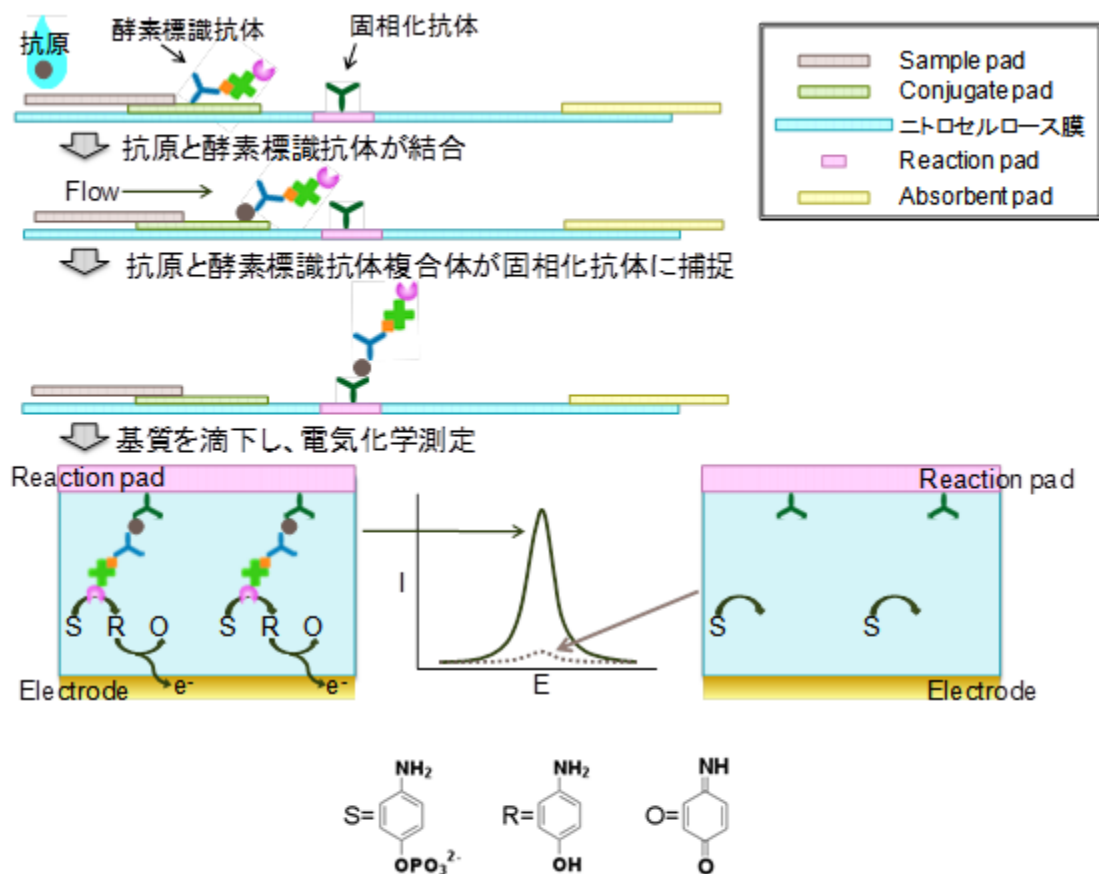


図 2-3-2. イムノクロマトグラフィーによる電気化学的エライザ法の検出原理.

図 2-3-3 には TNF- α を作用させたときの TZ と CZ をストリップから切り出し、反応させた後の吸光度測定の結果を示す。TNF- α を含まない溶液の場合、TZ と CZ の吸光度はほぼ同じであるが、TNF- α を含むときは、大きな吸光度の増大を示した。

TNF- α の濃度を変化させ、CZ における吸光度(Abs._{CZ})と TZ における吸光度(Abs._{TZ})との比を算出した。その結果を図 2-3-4 に示す。コントロールとなる TNF- α を含まない場合 Abs._{TZ}/Abs._{CZ} は 0.97 ± 0.42 であった。これより、検出下限は、100 pg/mL であることが示された。昨年度までの検出下限は 1.0 ng/mL であったため、およそ 10 倍の感度向上に成功した。今後、ストリップ上に固定化する TNF- α 一次抗体の濃度を高くすること、電気化学的な基質である p-アミノフェニルリン酸を利用することで、さらなる感度向上は期待できる。

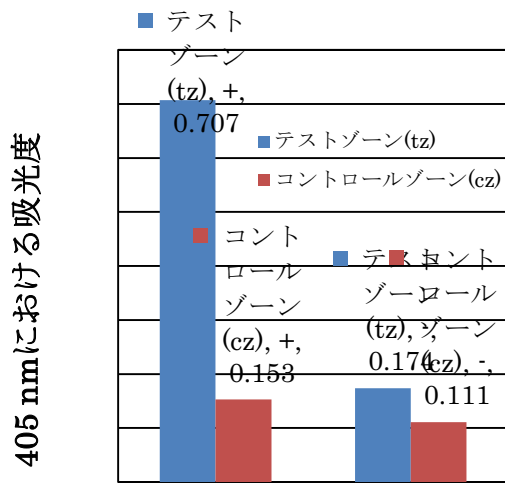


図 2-3-3. 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の TNF- α を作用させたときの TZ と CZ の吸光度.

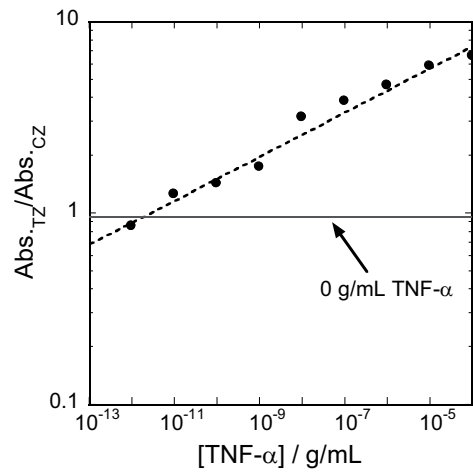


図 2-3-4. 0 pg/mL ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α の濃度変化.

(2) MMeELISA の検討

次に(ii)ニトロセルロースメンブレンを利用した Membrane-based microwave mediated electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay (MMeELISA)法について検討を行った。イムノクロマトグラフィーは BF 分離が容易であるが、感度が 100 pg/mL であった。電気化学的基質を使うことでさらなる感度向上は期待できるが、ストリップではなくディスク状のメンブレンを利用することによって、さらなる感度向上を試みた。ディスク状のメンブレンを利用する本手法を Membrane-based microwave mediated electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay (MMeELISA)と名付けた。抗原抗体反応の反応場としてニトロセルロースを用いることで、通常の ELISA 法よりも高感度かつ簡便なアッセイになると期待される。

最適条件において、TNF- α の濃度を 0.475 pg/mL ~ 2000 pg/mL までの範囲で変化させ、測定を行った。図 2-3-5 に測定結果を示した。2000 pg/mL の TNF- α を作用させたとき、0 V で大きな電流増加が観察された。一方、TNF- α を作用させないときには、ほとんど電流増加は観察されなかった。これより *p*-アミノフェニルリン酸が加水分解されたことに由来する酸化電流を観察することができた。

TNF- α の濃度変化の結果を図 2-3-6 に示す。この結果より 0.475 ~ 1000 pg/mL の範囲で定量的な変化を観察することができた。0.475 pg/mL と 0 pg/mL TNF- α で、有意差検定をしたところ $p=0.05$ であり、検出下限は 0.475 pg/mL であるといえる。

従来の ELISA 法と MMeELISA との比較を表 2-3-1 に示した。分光光度計を利用する従来の ELISA 法は、抗原抗体反応や洗浄に時

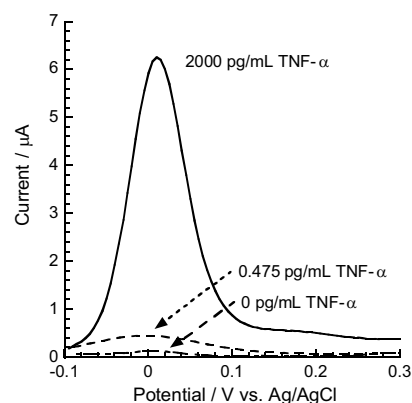


図 2-3-5. 2000 pg/mL, 0.475 pg/mL, 0 pg/mL の TNF- α を作用させたときの DPV 結果.

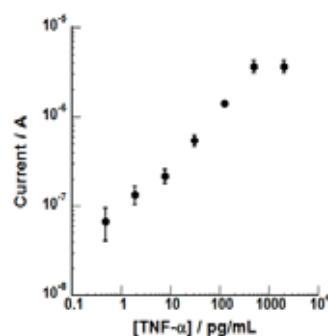


図 2-3-6. 0.475 pg/mL ~ 2000 pg/mL TNF- α の濃度変化.

間がかかるため、トータルで 6.5 時間かかる。しかし、32-20000 pg/mL と広い濃度範囲で検出することができる。一方、MMeELISA の検出範囲は 0.475 -2000 pg/mL であり、濃度の上限は低下したものの、検出下限が向上しており、ダイナミックレンジとしては、同程度の手法を確立することができた。さらに、検出時間が 1.5 時間であり、従来法と比べ大幅に時間を短縮することができた。

表 2-3-1. MeELISA と従来の ELISA 法との比較.

| | MMe ELISA | 従来法 |
|-----------|-------------------------|-----------------------|
| プラットフォーム | Sandwich ELISA | Sandwich ELISA |
| 抗原/抗体のタイプ | MAB / PAb biotin | MAB / PAb biotin |
| 基質 | AP/ p- APP | AP/p-NPP |
| 測定デバイス | 電気化学測定 | 分光光度計 |
| 検出下限 | 0.475 pg/ml- 2000 pg/ml | 32 pg/ml- 20000 pg/ml |
| 検出時間 | 1 hr 30 min | 6 hr 30 min |

(7) まとめ

現在は、図 2-3-7 に示すように、イミノクロマトグラフィーはすべての操作で 92 分、MMeELISA は 84 分かかるが、一次抗体を固定化したストリップおよびメンブレンディスクは提供可能であるため、チェアサイドでの操作はそれぞれ 62 分、43 分となる。今後は電気化学基質による酵素反応の短縮化等によってさらなる短縮化が可能になると思われる。また、検出システムについては、ほぼ確立することができたため、今後はストリップおよびメンブレンディスクの保管方法(温度、湿度)や保管期間について詳細に検討する必要がある。

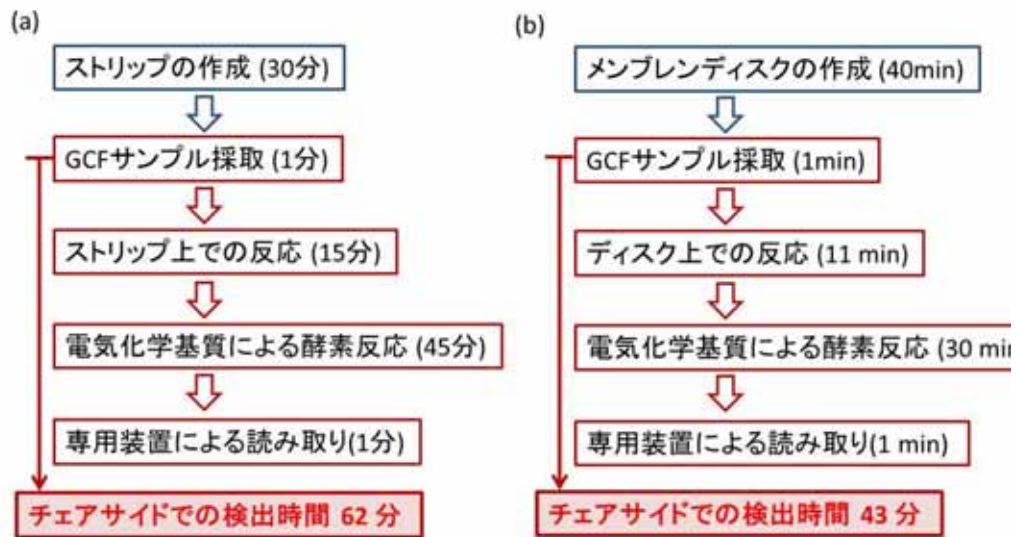


図 2-3-7. イミノクロマトグラフィー(a)と MMeELISA(b)による現在の操作手順.

2-4. 歯周病総合診断装置の開発

開発した歯周病破壊酵素、菌叢解析、炎症性メディエーターの検出原理の最適化に加え、測定可能なチップの最適化を行ってきた。これらのチップを更に最適化するとともに本チップに最適な電気化学的シグナルの読み取り装置が必要である。また、この電気化学測定装置は小型で安定したシグナルが得られる必要がある。この観点から、昨年度までにマルチ電極として 5 電極チップを試作し、この情報を読み取る電気化学測定装置を試作した(図 2-4-1)。本年度は、5 電極に加え、10、15 電極の試作と電気化学測定装置の小型化を試みた。



図 2-4-1. H24 年度に開発した電気化学測定装置とマルチ電極.

歯周病判定表の作成に置いて、歯周病組織破壊酵素としてのターゲットは三種類、原因菌は三種類、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、破壊酵素には 10 電極、菌叢解析には 15 電極、炎症性メディエータには 5

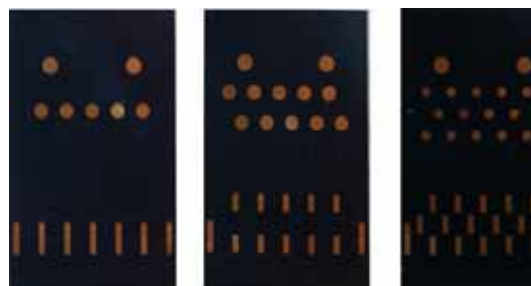


図 2-4-2. マルチ電極の試作品.

電極タイプのマルチ電極をそれぞれ試作した(図 2-4-2)。電極の基板材料にはプラスチックを選択した。各電極チップは、W 電極 5、10、15 個と R 電極、C 電極各 1 個の構成で設計した。

また、開発済みのハンディ型電気化学測定装置を改良し、多項目同時測定可能な装置の試作を行った。本年度試作装置を図 2-4-3 に示す。図 2-4-4 に示すとおり、H23 年度試作装置から、大きさは大幅に減少した(容積で 60%減)。また、15 電極測定に対応した。



図 2-4-3. 電気化学測定装置.



図 2-4-4. H23 年度版装置(左)と H24 年度版装置(右)の比較.

本年度は破壊酵素、菌叢解析、炎症性サイトカインそれぞれに適応したチップの開発を完了した(図 2-4-5)。金電極面積の均一化が問題であったが、チップ表面の樹脂マスクによって、精度の高い均一電極を制作することができた。

ホルダについては、試作、試用を繰り返し、ハンドリングしやすい形状とした。

装置については、装置のコンパクト化をはかり、昨年比 60%減を達成した。歯科診療所のチェアサイドでの利用を目的として、ハンディータイプで USB 駆動であり、マルチ電極の自動測定可能なプログラムを搭載した。



図 2-4-5. 本年度の開発したチップ、ホルダおよび装置.

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

(1) 歯周病関連試料の提供

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うと同時に、性別、年齢、採取部位、歯周ポケット深さ、出血の有無、歯槽骨の吸収程度、歯周炎の分類、全身疾患の有無についても計測・記録を行った。

これら歯周病患者サンプルを本事業参画機関に提供した。

(2) 歯周病原細菌 遺伝子欠損株の作製

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。

ここで作成した欠損株を用い、電気化学チップによる測定を行った。欠損株培養液をサンプルとして測定したところ、電気化学的に二つの型の識別に成功した。また、一方の型の方が患者の重症度と相関があることが分かった。

2-5-2. 臨床検体採取方法の検討

本事業において、歯周組織破壊酵素、炎症性メディエータ、歯肉縁下細菌叢の検出を目的としている。それぞれが含まれるサンプルを以下に示す。

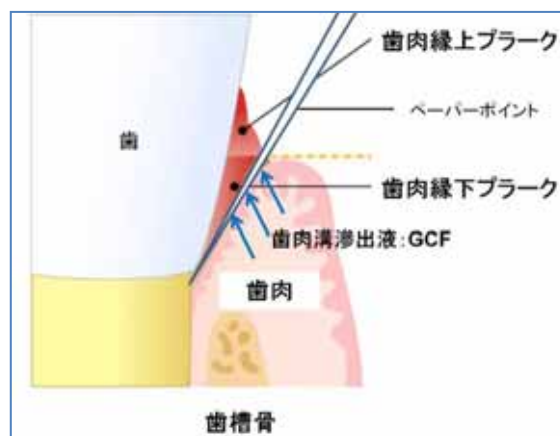
| ターゲット | サンプル |
|------------|----------|
| 歯周組織破壊酵素 | 歯肉溝滲出液 |
| 炎症性メディエーター | 歯肉溝滲出液 |
| 歯肉縁下細菌叢 | 歯肉縁下プラーク |



採取方法を各種検討した結果、本機器で使用するサンプル採取はペーパーポイントを用いることとした。歯肉溝滲出液・歯肉縁下プラークを実際に採取している様子と概念図を下図に示す。



ペーパーポイントによる臨床
サンプルの採取



それぞれのサンプルについての、保存溶媒と容量の検討を行った。当初、全ての臨床サンプルを純水にて、保存・凍結していたが、検査対象により最適な条件を探索し、最適条件で保存・凍結している。

2-5-3. 臨床試験

本年度は、破壊酵素の検出、菌叢解析、炎症性サイトカインの検出において、アッセイに適すサンプルの検討を行った。歯肉溝滲出液は高濃度に様々な菌や蛋白質を含む生体液であり、これが検体として適していると思われる。しかし、これを溶解する溶媒は検出種によって、適正があることが明らかになった。今後は、これらのアッセイに最適な溶媒量の規格化が必要であると思われる。

2-6. 研究全体の総括、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、及び実務者会議の開催により、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 24 年度研究実施内容

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。

| 検討項目 | 平成 24 年度実施内容・目標 |
|-----------------------|---|
| 1. 歯周組織破壊酵素検出システム構築 | 臨床検体／5 電極チップ／検出時間 10 分以内 |
| 2. 歯周病原菌遺伝子検出システム構築 | 臨床検体／5 電極チップ／検出時間 30 分以内 |
| 3. 炎症性メディエーター検出システム構築 | 臨床検体／5 電極チップ／検出時間 1 時間以内 |
| 4. 歯周病診断装置開発 | チップ最適化(5 電極／5cm ²)／装置小型化(B6 型)／ソフトウェア改良 |
| 5. 臨床試験データの取得 | 臨床検体検出の問題解決 |

3-1-2. 平成 24 年度の達成状況

上記目標に対し、以下の項目を達成した。

| 検討項目 | 平成 24 年度達成状況 |
|-----------------------|--|
| 1. 歯周組織破壊酵素検出システム構築 | 臨床検体／10 電極チップ／検出時間 30 分以内／検出酵素 2 種／数ヶ月安定保存(冷蔵) |
| 2. 歯周病原菌遺伝子検出システム構築 | 臨床検体／15 電極チップ／検出時間 60 分以内(遺伝子増幅あり)／1 菌種 |
| 3. 炎症性メディエーター検出システム構築 | 臨床検体／5 電極チップ／検出時間 60 分以内／検出メディエーター 1 種 |
| 4. 歯周病診断装置開発 | チップ最適化(5～15 電極)／装置小型化(B6 型)／ソフトウェア改良 |
| 5. 臨床試験データの取得 | 臨床検体検出の問題解決 |

3-1-3. 今後検討すべき課題

今後、事業化へ向けて、チップの保存安定性向上、前処理の簡便化、検出対象の拡大、臨床データ収集等に取り組んでいく予定である。具体的には、以下の課題に取り組む。

| 検討項目 | 平成 25 年度に検討すべき課題 |
|-----------------------|--|
| 1. 歯周組織破壊酵素検出システム構築 | 臨床検体／10 電極チップ／検出時間 30 分以内／ 検出酵素 3 種 ／ 常温保存 |
| 2. 歯周病原菌遺伝子検出システム構築 | 臨床検体／15 電極チップ／検出時間 120 分以内(遺伝子増幅なし)／5 菌種 |
| 3. 炎症性メディエーター検出システム構築 | 臨床検体／5 電極チップ／検出時間 60 分以内 ／ 検出メディエータ 3 種 |
| 4. 歯周病診断装置開発 | チップ安定性評価／ユーザビリティ評価 |
| 5. 臨床試験データの取得 | 外部機関活用臨床データ収集 |

3-2. 今後の進め方

平成 23 年度は、前述の3つの検出項目について、電気化学的バイオチップの構築のための検討を進め、シングルチャンネルチップ上で、それぞれ検出時間の短縮に成功した。また、製品化に必要なチップのマルチチャンネル化、及びマルチチャンネルチップに対応した専用読取りデバイスの試作を行った。

平成 24 年度は、平成 23 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、各項目の更なる検出時間短縮を図ると同時に、マルチチャンネルチップの最適化、読み取り装置の小型化により、臨床検体検出のための条件最適化を行った。

平成 25 年度はこれまでの成果を踏まえ、他機関による試用協力を仰ぎつつ、新規電気化学システムによる歯周病総合診断の臨床実験データの蓄積と、システムの完成度向上を図る。

| 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 | 検出対象拡大 |
| ①破壊酵素 | ①30 分以内(達成) | ①30 分以内 | 前処理簡便化 |
| ②菌叢 | ②2 時間以内(目標 1 時間) | ②60 分以内 | 保存安定性向上 |
| ③メディエータ | ③4 時間以内 | ③60 分以内 | |
| 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 | 5~15 チャンネル、最適化 | 仕様確定 |
| 読み取り装置 | 5 チャンネル対応装置試作(達成) | 装置小型化、ソフトウェア改良 | ユーザーテスト 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 |

リサイクル適性 (A)

この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。