

発 表 要 旨

歯周病原細菌の迅速定量を目指した細菌計測システムの開発
(QCM 法による細菌計測に関する試験的研究)

平成 29 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

金田研郎

【緒言】

近年、歯周病の診断や治療の評価のために、歯周ポケット内の細菌を定性および定量化する様々な手法が開発されており、現在は PCR 法が主流となっているが、検査結果の取得に時間を要する欠点がある。歯周ポケット内の細菌種の特定や細菌数の定量が簡便かつ迅速に測定可能となれば、歯周病の診断や治療の評価に有用となる可能性が高い。近年、高周波数で振動する水晶振動子に物質が吸着した時の共振周波数変化から極微量の物質を短時間で正確に定量できる手法として、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法が普及してきた。QCM 法では細菌の測定も行われているが、歯周病原細菌である Red complex に分類される菌や *A. actinomycetemcomitans* は測定された報告はない。そこで、本研究では QCM を用いて、簡便かつ迅速な細菌の定量を目的として、*E. coli* および *A. actinomycetemcomitans* の抗体を用いてセンサーの作成および条件の設定を行った。また、センサーに安定的に抗体を固定化するための手法を検討した。

【材料と方法】

*実験 1

QCM 測定装置として、日本電波工業製 NAPiCOS システムを使用した。測定には 30 MHz チタンツインセンサーを用いた。本研究での対照サイトは、0.1% ウシ血清アルブミンを滴下してブロッキングした。測定は、反応サイトに測定試料を滴下し、反応サイトと対照サイトの差を計測して周波数変化を算出した。

Protein A の飽和吸着濃度は、Protein A の濃度を 10, 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ になるよう PBS を用いて希釈調整し、チタンセンサーへの Protein A の付着量を NAPiCOS システムにて測定した。抗 *E.coli* 抗体の飽和吸着濃度は、50, 100, 250, 500, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ となるよう PBS で希釈調整し、Protein A を吸着させたチタンセンサーへの抗 *E.coli* 抗体の結合量を NAPiCOS システムにて測定した。

E. coli C-600 株を PBS に懸濁し OD = 1.0 に調整した。OD = 1.0 = 10^8 CFU/ml の菌液を PBS で順次希釈し、 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/ml になるよう調整した。抗 *E.coli* 抗体を結合させたチタンセンサーに対して 0.1% BSA を用いてブロッキングし、*E.coli* を反応させた時の周波数変化を NAPiCOS システムにて測定した。

OD = 1.0 = 10^8 CFU/ml に調整した *E.coli* の菌液に反応サイトに相当する処理を行ったチタンディスクと対照サイトに相当する処理を行ったチタンディスクを浸漬し、37°C で 1 時間培養した。培養後は、両チタンディスクとも PBS で洗浄し、2.5% グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、乾燥させた。その後、それぞれのディスクの分光反射率を分光測色系を用いて測定し、チタンセンサーへの *E. coli* の付着量の確認した。

A. actinomycetemcomitans (Y4) 株を PBS に懸濁し、吸光度が OD = 1.0 になるよう調整した。OD = 1.0 = 10^8 CFU/ml の菌液を PBS で順次希釈し、 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/ml になるよう調整した。抗 *A. actinomycetemcomitans* 抗体を用いて *E. coli* と同様なセンサーを作成し、*A. actinomycetemcomitans* を反応させた時の周波数変化を NAPiCOS システムにて測定した。

* 実験 2

純チタンディスクを 0.1 mM Carboxy-EG₃-HPA (HPA) の THF 溶液に浸漬し、室温で溶媒を揮発除去して表面にカルボキシ基を導入した。その後、Protein A 含有 1.47% EDC 溶液に 4℃で 72 時間浸漬し、Protein A を HPA のカルボキシ基との脱水縮合反応によって純チタン表面に化学的に固定化した。さらに、IgG 溶液に 1 時間浸漬し、チタン表面の Protein A に IgG を結合させた。チタン表面へのカルボキシ基の導入は、X 線光電子分光分析 (XPS) およびフーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) で確認した。また、チタン表面に結合させた Protein A および IgG 抗体の量は X 線光電子分光法で計測した。

【結果】

* 実験 1

Protein A および抗体の飽和吸着濃度は、それぞれ 300µg/ml および 500µg/ml となった。この条件でチタンセンサーを処理し、*E. Coli* 濃度を変化させ周波数変化を測定したところ、濃度依存的に周波数は低下し、広い濃度変化に応じて周波数変化に直線関係がみられ、検量線が得られた。

また、*E. coli* を付着させた純チタンディスクの反射率を分光測色計で計測した結果、BSA 処理チタンディスクに比較して、PA-Ab チタンディスクでは有意に反射率が低下した。これらの結果から、*E. coli* を抗原抗体反応によってチタンに結合させ得ることが明らかとなった。また、*E. coli* の測定に要する時間は約 30 分であり、従来法に比べて短時間だった。

さらに抗 *A. actinomycetemcomitans* 抗体を結合したチタンセンサーに *A. actinomycetemcomitans* の濃度を変化させて測定したところ、濃度依存的に周波数は低下し、広い濃度変化に応じて周波数変化に直線関係がみられ、検量線が得られた。

* 実験 2

HPA の結合が FT-IR および X 線光電子分光分析で確認され、チタン表面に固定化する最適 Protein A 濃度と、その表面に結合させる最適抗体濃度を決定することができた。HPA を介した Protein A および抗体の最適濃度は、それぞれ 25µg/ml および 300µg/ml となり、QCM で明らかにされた物理吸着より吸着飽和濃度が低下した。

【考察】

E. coli で得た知見を基に、*A. actinomycetemcomitans* でも定量可能であることが確認された。今後、抗原抗体反応が確立しているものであれば、他の歯周病細菌やその反応物質にも応用できる可能性があり、臨床検査への応用性は高いと思われる。現状では NAPICOS システムは計測時間においては有意だが、検出感度の面で、リアルタイム PCR 法がかなり有意である。また、計測時間に関しては細菌カウンターが有意である。しかしながら、NAPICOS システムによる抗原抗体反応の動態が予測可能になるようデータを蓄積していけば、格段に時間短縮できる可能性はある。

HPA をチタン表面に固定化する目的は、1 つは、Protein A の結合安定性を高めること、2 つめは、Protein A の固定化に使用する結合子をスパーサーに利用し、タンパクの構造と機能を守ることである。X 線光電

子分光分析によって Protein A の飽和濃度は 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、抗体の飽和濃度は 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることが分かった。この結果は、HPA を固定化せずにチタン表面に Protein A を吸着させた時の飽和濃度 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とその上に抗体を結合させた時の飽和濃度 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) より低い濃度となった。この原因として、今回使用した HPA の構造は長いため、旋回によりチタン表面への結合量が減少し、Protein A の固定化できる量が減少し、さらにその後の抗体の結合量も減少したと考えられる。したがって、今後はタンパク質の構造や機能に変化を与えない程度に短い結合子を検討する必要があると考えられる。

【結論】

本研究では、短時間で高精度に質量変化を定量できる QCM の物理的特性に注目し、QCM センサー表面に抗体を処理することで病原因子を迅速定量する手法の開発を目指す試験的研究を行った結果、以下の結論を得た。

1. *E. coli* の抗体を修飾するための Protein A および抗体の最適濃度が明らかとなった。
2. このセンサーを用いて、*E. coli* 付着による抗原抗体反応を QCM を用いて検出することができた。また、3 桁の濃度範囲で検量線が得られた。
3. *A. actinomycetemcomitans* で検量線を作成し、定量可能であることを確認した。
4. センサーの性能を安定化する技術につながる抗体の化学的固定化方法を確立した。