

〔原著〕

## 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 -

金田 研郎<sup>1)</sup>, 根津 尚史<sup>2)</sup>, 門 貴司<sup>1)4)</sup>, 宮川 博史<sup>3)</sup>, 建部 二三<sup>2)</sup>, 市岡 勇輝<sup>1)</sup>, 遠藤 一彦<sup>2)</sup>, 古市 保志<sup>1)</sup>

1) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 生体材料工学分野

3) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系 微生物学分野

4) 北海道医療大学歯学部総合教育学系 歯学教育開発学分野

## Development of bacteria measurement system aimed at rapid quantification of periodontal pathogenic bacteria - Experimental study on measurement of bacteria by QCM method -

Kenro KANADA<sup>1)</sup>, Takashi NEZU<sup>2)</sup>, Takashi KADO<sup>1)4)</sup>, Hiroshi MIYAKAWA<sup>3)</sup>,  
Futami NAGANO-TAKEBE<sup>2)</sup>, Yuki ICHIOKA<sup>1)</sup>, Kazuhiko ENDO<sup>2)</sup>, Yasushi FURUICHI<sup>1)</sup>

1) Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

2) Division of Biomaterials and Bioengineering, Department of Oral Rehabilitation,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

3) Division of Microbiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

4) Division of Dental Education Development, Department of Integrated Dental Education,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

**Key words :** QCM法, 歯周病原細菌, 細菌計測

### Abstract

Various methods for identifying and quantifying bacterial species present in periodontal pockets have been studied. If identification and quantification of bacterial species can be carried out simply and rapidly at the chair side, it would be highly useful in the evaluation of treatments and predictions of the prognosis. The Quartz crystal microbalance (QCM) method is a method for measuring trace amounts of mass changes from resonance frequency changes when a substance is adsorbed on a quartz oscillator oscillating at high frequency. In this study, we attempted to quantify periodontal pathogens simply and quickly using the QCM method, with Anti-*E. coli* and anti-*A. actinomycetemcomitans* antibodies used to prepare sensors and set conditions.

The study used a QCM twin sensor system which is able to offset environmental factors. Protein A concentration to

be adsorbed on the titanium sensor surface, the anti-*E. coli* antibody, and the bound anti-*A. actinomycetemcomitans* antibody concentration were determined from the QCM measurements. With these QCM measurements using the twin sensor modified with anti-*E. coli* antibody and the anti-*A. actinomycetemcomitans* antibodies, it was possible to determine a calibration curve for *E. coli* and *A. actinomycetemcomitans*. It was confirmed that the *E. coli* and *A. actinomycetemcomitans* could be quantified in the  $10^5$  to  $10^7$  CFU/mL concentration range.

These results suggest that the twin sensor modified QCM anti-*E. coli* antibody and the anti-*A. actinomycetemcomitans* can be considered confirmed to be able to quantify the *E. coli* and *A. actinomycetemcomitans* simply and quickly.

## 緒 言

臨床におけるPOCT (point of care testing) の概念が注目されている。POCTは被験者の傍で医療従事者が検査し、その結果を速やかに診療に活かす検査のしくみである (Matsuo, 2011)。検査時間の短縮および被験者が検査を身近に感じるという利点を活かし、迅速かつ適切な診断および治療に寄与するものであり、歯科における応用も期待される。歯周治療においても、従来の診断方法は過去の組織破壊について評価しているものであり、疾患の活動状態の評価、治療に対する反応の評価および予後予測により、患者の良好な管理を助ける新しい診断方法が必要とされ、POCTの概念は注目されている (Srivastava et al., 2017)。

歯周治療においては、Renvertらは1990年に*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*が検出される部位では、歯周基本治療後のポケット深さ、プロービング時の出血およびアタッチメントレベルの改善が小さかったことを報告している (Renvert et al., 1990)。また、Socranskyらは1998年にRed complexに分類される*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*がポケット内に存在し、ポケット深さとプロービング時の出血の間に有意な相関があると報告している (Socransky et al., 1998)。したがって、これらの歯周ポケット内細菌の特定や定量を簡便かつ迅速にチェアサイドで行うことができれば、治療の評価および予後の予測に有用な情報を得ることができる。

近年、この目的で歯周ポケット内に存在している細菌を定性および定量するために、位相差顕微鏡による細菌の直接観察法、培養法、Real-time polymerase chain reaction (qPCR) 法、細菌カウンターによる細菌数の計測法および酵素判定法などの手法が検討されてきた。しかし、位相差顕微鏡での直接観察はチェアサイドで迅速に実施できるが、菌種の同定はできない。培養法では属種まで決定することが可能であるが、検索可能な範囲は細菌叢の70%程度しかない (Kohyama, 1989)。検出したい微生物が特有に持っている遺伝子をターゲットにして増幅し、細菌の検出を行うqPCR法は極めて感度が高く、特定の菌および総菌数を定量できる利点があるが (Heid et al., 1996)、測定時間は2時間程度とチェアサイドで行うには長く、感度が高いゆえに汚染DNAの混入によって偽陽性が生じる可能性がある (Corless et al., 2000)。細菌カウンターを用いた計測法は、誘電泳動で液体中の細菌を電極に捕集させ、インピーダンスの変化を計測して検体中の細菌濃度を換算する測定方法で

(Suehiro et al., 2002)、総菌数の定量が約1分で可能であるという利点があるが (Suehiro et al., 2002)、個別の菌の定量はできない。酵素判定法は短時間で簡便に歯周病原細菌の病原因子の定量を行うことができるという利点はあるが、特定の菌および総菌数の定量や菌種の同定は出来ない。このように、現行法には利点と共に欠点も多く、歯周ポケット内に存在する特定の歯周病原菌をより簡便かつ短時間で定量できる新しい細菌検査技術の登場が望まれている。

現行法の欠点をカバーするためには高感度かつ安定に定量できる検査技術が必要であり、そのためには単純な原理であるほど信頼性が高い。その一つの手法として、極微量の物質を短時間で正確に定量できる水晶振動子マイクロバランス (quartz crystal microbalance, QCM) 法がある。本法の原理は、高周波数で振動する水晶振動子に物質が吸着したときの共振周波数低下から極微量の物質を定量するというもので (図1)、Sauerbreyによって周波数変化と質量変化の間に簡単な比例関係式が提示された (Sauerbrey, 1959):

$$\Delta f = -k \Delta m$$

または

$$\Delta m = -k' \Delta f$$

ここで、 $\Delta f$  ( $< 0$ ) は吸着に伴う周波数低下、 $\Delta m$  は結合した物質の重量、 $k$  または  $k'$  は装置固有の係数である。この関係式は、振動子表面に結合した物質が振動子

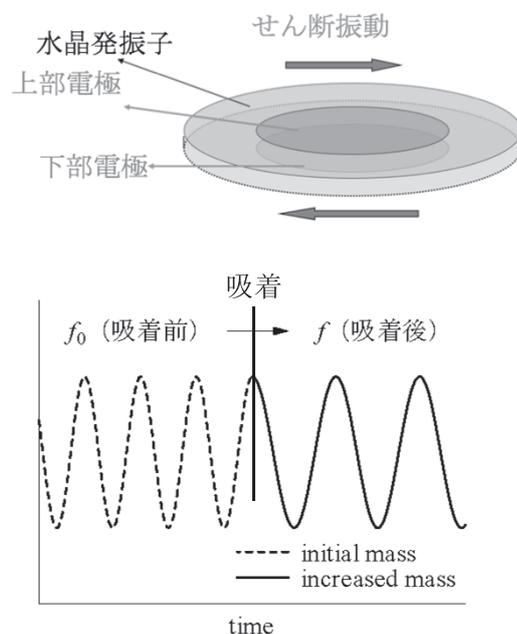


図1 水晶発振子マイクロバランス (QCM) の原理  
周波数 $f_0$ で定常発振している水晶に物質が吸着 (結合) すると、その重量に比例して周波数が低下する ( $f < f_0$ ) ことにより、発振子表面の微量吸着を高感度で計測できる。

と一体かつ同位相で運動するような剛体結合の場合に成立し、構造的な異方性の少ない多くのタンパク質にも適用できる。

QCM法は分子の吸着平衡到達が速ければ短時間のうちにpgオーダーの質量変化を溶液中で検出できるという利点を有している。これらの利点を活かして、QCMの電極に抗体を結合させて標的の物質や細菌を捉えるバイオセンサーが注目されてきた (Ivnitski et al., 1999)。医学分野においては、QCM法を用いて *Candida albicans* (Muramatsu et al., 1986), *Salmonella typhimurium* (Xiao-Li Su et al., 2005), *Escherichia coli* (Mao et al., 2006), CRP (Kurosawa et al., 2002) などの計測が試みられてきた。

QCM法は、上記のように比較的短時間に高感度で測定できる利点はあるが、欠点として周波数に影響する因子が質量変化以外にも密度、粘度、温度、圧変化等、多いことが挙げられる。従来のQCM測定法では周波数変動が純粋に質量変化によるものなのか、判断が困難で、QCM法を用いて細菌等を測定するためには、環境起源の周波数変動を起こさない工夫が必要であった。この問題を解決するには、装置を2台併用して実験系と対照系で同時に計測して差をとればよいが、非常に大きなコストがかかる。また、別装置である以上環境因子を完全に相殺することは不可能である。そこで、1枚の水晶振動子上に複数の電極を設けて完全に同一の環境下で同時・独立に計測する技術（ツインセンサーシステム）が開発、実用化された (渡辺ら, 2009)。ツインセンサーは、同一水晶発振子上に2組の微小電極が設けられ、各電極上で独立に周波数変化を測定する機構を持つ。結合特性の異なる2つの電極の差分を測定することで、原理的には質量変化以外に周波数変化をひき起こす環境因子をすべて相殺できる (図2)。また、制御用PCと無線接続された小型 (17.6 cm × 4.5 cm × 9.2 cm) の装置はチェアサイドでの運用に適している。

このような背景から、本研究はツインセンサー型QCMを用いて、チェアサイドで簡便かつ迅速な歯周病原細菌の定量を実現することを目的とした。まず、方法の妥当性を確認するために、従来型の単極QCMで研究実績のある高い *E. coli* の抗体を用いて抗体ツインセンサー作製技術の確立を図り、同センサーを用いた *E. coli* のツインQCM定量を行った。次に、侵襲性歯周炎の原因菌として注目されており、他の歯周病原細菌と比較してSRPに対する反応性の違い (Renvert et al., 1990) や、ニューキノロン系抗菌薬が奏功するなど特異的な特徴を持ち (Muller et al. 2002) POCTの対象となり得る *A. actinomy-*

*cetemcomitans* の定量を、*E. coli* の付着計測から得られた知見に基づき行った。

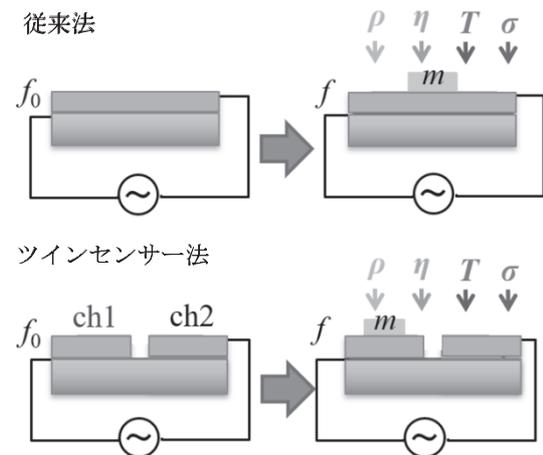


図2 QCM測定における周波数変動の要因の比較  
従来法：吸着重量 $m$ 以外に、媒質密度 $\rho$ 、媒質粘度 $\eta$ 、温度 $T$ 、剪断応力 $\sigma$ 等に起因する周波数変化も含まれる。  
ツインセンサー法：同一の水晶発振子上に設けた、結合特性の異なる二つの電極で差分計測し、吸着重量 $m$ 以外の環境因子を相殺する。

## 材料と方法

### 1. 試料

ツインQCM法で特異センサーを用いて検出するターゲット細菌として、侵襲性歯周炎原因菌の *A. actinomy-cetemcomitans* (以下、*A. a.*) を用いた。また、細菌特異センサー作製に必要な基本技術を確認するために、チタン上での抗体を介した選択的補足の基礎研究が進んでいる *E. coli* を用いた (C-600株)。

*A. a.* 抗体は、血清型特異的抗 *A. a.* ウサギ血清 (北海道医療大学 長澤敏行博士より提供) を用いた。 *E. coli* 抗体としては、抗ウサギ *E. coli* 抗体 (Agilent Technology, Inc, Santa Clara, CA, USA) を用いた。これらの抗体をチタン上に固定するためのスパーサーとして Protein A (*Staphylococcus aureus* 由来; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。また、チタン表面への試料の目的外の吸着を回避するブロッキング剤として0.1%ウシ血清アルブミン (BSA; 和光純薬) を用いた。

全ての実験で100mMリン酸緩衝液 (pH7.0; 以下PBS) を用いた。

### 2. ツインセンサー型QCMによる吸着測定

#### 1) 装置

本研究ではツインセンサーQCM装置としてNAPICOS Lite (日本電波工業) を、基本発振周波数30 MHzのATカット水晶振動子にTi電極を二組配置したチタンツイン

センサー（以下Tiセンサー；PSA-SB-3002Y，日本電波工業）と組み合わせて用いた。このセンサーは電子回路基板に取り付けられており、試料導入口とドレーン付きの専用ハウジングに基板ごと収納して、センサーモジュールとして装置本体のスロットに装着する仕様になっている。

## 2) センサーの作製

Tiセンサーの二つの電極部（ch 1, ch 2）をピラニア溶液で10分間清浄化後、専用のマスキングプレート装着下で対照電極（ch 2）を0.1%BSAで10分間ブロッキング（不感化）処理し、観測電極（ch 1）を検討に応じて以下のように処理した：

- (1) 未処理：Protein AのTiへの吸着と飽和条件の検討
- (2) 固定濃度のProtein A処理（10分間）：Protein Aへの細菌（*E. coli*, *A. a.*）特異抗体の吸着と飽和条件の検討（細菌特異センサーの条件決定）
- (3) 固定濃度のProtein A処理後に固定濃度の細菌抗体処理（それぞれ10分間）：細菌特異センサーへの細菌結合特性の検討（センサー性能の検証）

センサー処理の各工程で、吸着後の余剰試料はPBS10  $\mu$ Lで5回洗い流した。

## 3) 計測

装置を風防庫内に収納し、庫外のPCから制御して計測を行った。ツインセンサー効果で周波数への温度変動の影響を相殺できるため、精密な温度制御は行わず通常の実験室温度23°C付近で測定を行った。作製したセンサー上に、まず100  $\mu$ LのPBSを導入して平衡化し、その後試験液を50  $\mu$ L導入した。周波数変化が概ね収まる20分後に未吸着の余剰試料を40  $\mu$ LのPBSで洗い流し、この時の周波数と試料導入直前の周波数の差を、試料吸着による差分周波数変化 $\Delta f$ とした。Protein A、抗体、細菌について、異なる濃度の試料を濃度上昇の順に逐次添加する連続法で計測した。このとき、それぞれの試料導入時の $\Delta f$ 値を累積して、累積値 $\Delta F$ 値をその試料濃度での周波数変化とした。

全ての計測は3回繰り返し実施した。

## 3. 細菌特異センサーの作製から細菌計数までの流れ

チタンを基板とする細菌特異センサーは、抗体の菌体結合部位であるF<sub>ab</sub>がバルク相側を向くように設計することでターゲット細菌と効率よく結合できる。そのために、抗体の逆末端のF<sub>c</sub>がチタン基板側を向くよう、リンカーとしてProtein Aを介して抗体をチタン基板に固定す

る設計とし、最終目的の細菌の計数まで以下のステップで計測を行った。

### 1) チタンに結合させるリンカーProtein Aの至適濃度の決定

種々の濃度のProtein Aをチタン表面に吸着させ、飽和吸着となるProtein A濃度を見出した。飽和最低濃度をProtein Aの至適濃度とした。

### 2) Protein Aに結合させる細菌抗体の至適濃度の決定

1) で決定された至適のProtein A濃度でTiセンサーを飽和させた。このセンサー上に種々の濃度の*E. coli*抗体を吸着させ、飽和吸着となる抗体濃度を見出した。飽和最低濃度を*E. coli*抗体の至適濃度とした。*A. a.*抗体については、血清型特異的抗*A. a.*ウサギ血清を用い、種々の希釈倍率で上述の*E. coli*抗体と同様に飽和濃度決定を行い、飽和最低吸着濃度を至適濃度とした。

### 3) 細菌の計数

1), 2) で決定されたProtein Aおよび抗体の至適濃度でTi/Protein A/抗体の累積構造を持つ細菌センサーが得られた。*E. coli*および*A. a.*についてこのような手順でセンサーを作製、これを用いて細菌の捕集量を計測し、検量線とした。*E. coli*については、*E. coli* C-600株を寒天培地で培養した。培養は好気条件下、37°Cで行った。1日培養後、菌体をPBSを用いて懸濁・希釈し10<sup>8</sup> CFU/mL (OD<sub>600</sub> = 1.0) に調製した。さらに菌液は10<sup>5</sup> CFU/mLまで連続10倍希釈し*E. coli*センサーで捕集量を計測した（サンプルサイズn = 3, サンプル数N = 4）。一方、*A. a.*については、*A. a.* (Y4) 株を30mg/mLのTodd Hewitt Broth (TH, Becton Dickinson and company, MD, USA) に5 mg/mLのYeast Extract (Becton Dickinson) を添加した液体培地で培養した。培養は5%CO<sub>2</sub>の好気条件下、37°Cで行った。10<sup>8</sup> CFU/mL (OD<sub>600</sub> = 1.0) となるまで2日培養後、菌液は10<sup>5</sup> CFU/mLまでPBSを用いて連続10倍希釈し*A. a.*センサーで捕集量を計測した（サンプルサイズn = 3, サンプル数N = 4）。

### 4. 分光反射率による*E. coli*の付着の比較

QCM抗体センサーへの*E. coli*の結合を裏付ける目的で、センサーと同じ抗体化処理を施して菌液に浸漬したチタンディスクの分光反射率を測定し、抗体化処理なしの対象チタンディスクと比較した。直径12 mm, 厚さ3 mmのJIS第2種純チタンディスク (JIS, Japan Industrial Specification H 4600, 99.9 mass % Ti; Morita Corp., Osaka, Japan) をコロイダルシリカを用いて鏡面に研磨

し、洗浄・乾燥した。その後、QCMセンサーの抗体化と同じ手順でProtein A (QCM測定で見積もられた至適濃度で20分間)、*E. coli*抗体 (QCM測定で見積もられた至適濃度で1時間)をこの順にチタン表面に結合させた。この処理で未反応のチタン露出面は、0.1%BSAで10分間ブロッキング処理した。いずれの処理後も十分量のPBSで未反応物を洗浄した。対照のチタンディスク試料では、研磨後にBSAブロッキング処理のみ施した。

これらを浸漬した状態で、 $OD_{660} = 1.0$ に調製した*E. coli*菌液を37℃、1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、2.5%グルタルアルデヒドで菌を固定し、50, 60, 70, 80, 90, 100%エタノールで系列脱水(各20分間; 100%エタノールのみ10分間×3回)後、CO<sub>2</sub>臨界点乾燥を行った。

分光反射率は分光測色計 (CM-600d; KONICA MINOLTA) を用いて、1枚のディスクに対し部位を変えてD65光源、視野角10°, SCIモードで5回測定を行った。鏡面研磨したチタンディスクを基準色として抗体化処理の有無での菌付着状態で反射率を計測、比較した。(サンプルサイズn=10, サンプル数N=2)

5. 統計解析

Tukey's testsによる補正を伴うOne-Way ANOVA解析及びStudent t-testを用いて統計分析を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 吸着とQCMの周波数応答

QCM測定で得られた試料導入時の典型的な周波数応答を図3に示す。観測極 (ch 1)、対照極 (ch 2)とも試料導入後に周波数が低下しドリフトが続くが、その差

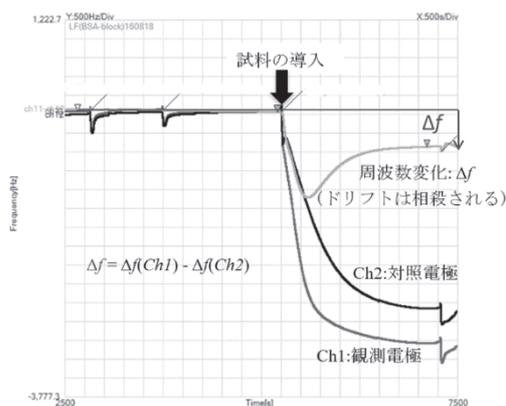


図3 QCMツインセンサーによる計測  
同一の水晶振動子上の観測電極 (ch 1) と対照電極 (ch 2) の応答の差分 ( $\Delta f$ ) を取ることで、ドリフトや外部ノイズの影響をキャンセルできる。

を取ると数分後には一定値に収束し、庫内の装置と導入した試料に温度差があっても吸着由来の周波数は一定値に収束することがわかる。

また、濃度増加系列で試料を逐次添加した場合の差分周波数の変化を図4に示す。試料を導入するたびに周波数が累積的に低下していくことがわかる。試料導入に応じた周波数低下 ( $\Delta f_A, \Delta f_B, \dots$ ) を累積したもの ( $\Delta f_A + \Delta f_B + \dots$ ) が、その濃度での正味の周波数変化となる。

2. TiセンサーへのProtein Aの吸着

Protein A濃度10, 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ でのQCM周波数変化 $\Delta F$ を図5に示す。Protein A濃度の増加に伴い $\Delta F$ は低下したが、高濃度で変化は小さくなった。低濃度域および高濃度域でそれぞれ直線的

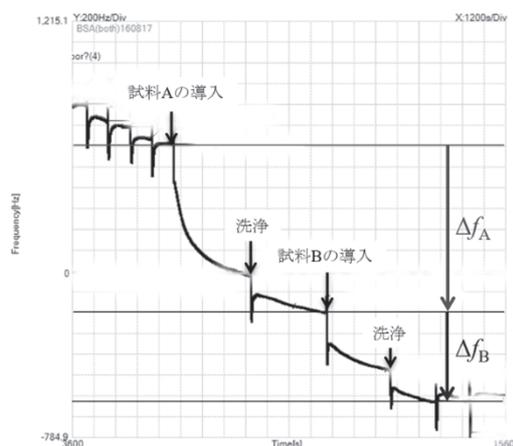


図4 QCM測定で観測される周波数変化  
試料導入前の周波数と洗浄後の周波数の差を、試料による「差分周波数変化」とする。  
 $\Delta f_A$ : 試料Aの周波数変化  
 $\Delta f_B$ : 試料Bの周波数変化  
この例では $\Delta f_A > \Delta f_B$ であり、Aの吸着重量の方がBよりも大きいことを示す。

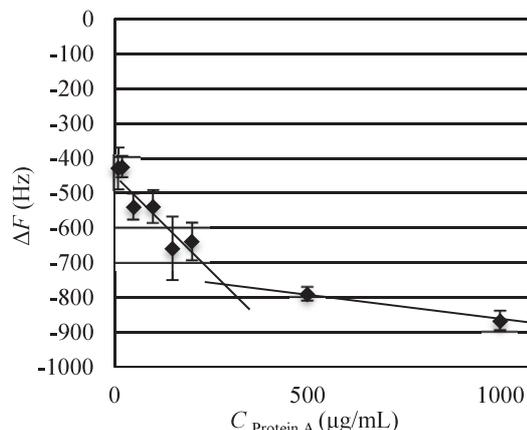


図5 QCMによるProtein Aの飽和吸着濃度の決定  
Protein A濃度10, 20, 50, 100, 150, 200, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ での周波数変化 $\Delta F$ 。近似直線の交点から飽和吸着濃度は300 $\mu\text{g/mL}$ と見積もった。

に変化しており、その交点を便宜的に結合飽和点とみなした。この方法によりProtein Aの飽和吸着濃度を300 µg/mLとした。

### 3. Protein Aを飽和吸着させたTiセンサーへの抗体の吸着

300 µg/mL Protein Aで吸着飽和させたTiセンサーに抗*E. coli*抗体を50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µg/mLで吸着させたときのQCM周波数変化 $\Delta F$ を図6に示す。抗体濃度の増加に伴い $\Delta F$ は低下した。濃度を対数とする片対数プロットで、傾きが不連続に変化して水平となる点が500 µg/mL付近に見出されたため、この濃度を飽和吸着濃度とした。

以上から、*E. coli*センサーを作製する際のProtein Aは300 µL、抗体濃度は500 µLが至適濃度であると決定された。

同様に、300µg/mL Protein Aで吸着飽和させたTiセンサーに、抗*A.a.*抗体を希釈倍率500, 250, 150, 100 (希釈率0.002, 0.004, 0.0067, 0.01)で吸着させたときのQCM周波数変化 $\Delta F$ を図7に示す。希釈倍率250 (希釈率0.004) 以上で $\Delta F$ の変化が非常に小さくなったことから吸着が飽和したとみなし、これを*A.a.*抗体の飽和吸着濃度すなわち至適濃度に対応する希釈倍率とした。

### 4. *E. coli*センサーへの*E. coli*の付着と定量

#### 1) *E. coli*センサーの検量線

Protein Aおよび抗体の濃度をそれぞれ300 µg/mL, 500 µg/mLとする*E. coli*センサーを用いて濃度の異なる*E. coli*菌液 ( $10^5 \sim 10^7$  CFU/mL) についてQCM測定を行った結果を図8に示す。濃度を対数とする片対数プロットを行うと $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLの濃度範囲で周波数変化との

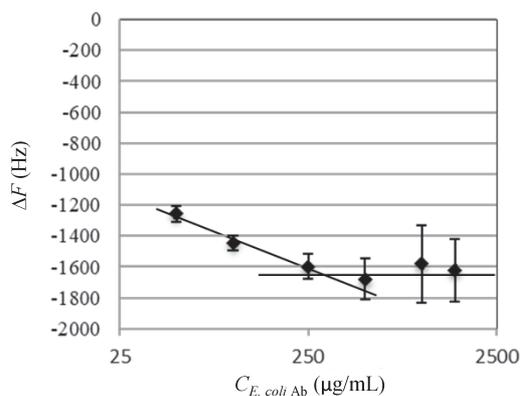


図6 QCMによる*E. coli*抗体の飽和吸着濃度の決定  
*E. coli*抗体濃度50, 100, 250, 500, 1000, 1500 µg/mLでの周波数変化 $\Delta F$ 。抗体濃度の増加に伴い周波数は低下し、500µg/mL以上で飽和が認められた。

間に直線関係がみられ ( $r = -0.99$ )、対数検量線を得ることができた。

#### 2) *E. coli*付着の分光反射率による確認

抗体を介して*E. coli*を付着させたTiディスク (*E. coli* Ab-coated Ti) と、0.1%BSAでブロッキングして*E. coli*を付着させたTiディスク (BSA-blocked Ti) の反射率を図9に示す。菌付着状態のSEM観察のためにディスクを金コーティングしたので、研磨したTiディスクに金コーティングをした表面の反射率を100%とし、各ディスクにおける反射率を算出した。抗体処理なしのディスクと比較して、抗体を結合させたディスクにおいて反射率は有意に低下した。

#### 5. *A. a.*センサーへの*A. a.*の付着と定量

Protein A濃度を300 µg/mL, *A. a.*抗体濃度 (希釈倍率) を250として作製した*A. a.*センサーを用いて、*A. a.*菌液の濃度範囲 $10^5 \sim 10^7$  CFU/mlで周波数変化を測定した結果を図10に示す。濃度を対数とする片対数プロット

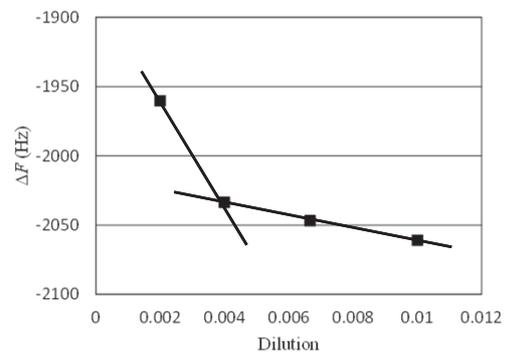


図7 QCMによる*A. a.*抗体の飽和吸着濃度の決定  
*A. a.*抗体の希釈倍率500, 250, 150, 100 (希釈率0.002, 0.004, 0.0067, 0.01)での周波数変化。希釈倍率250より高濃度で吸着の飽和が認められた。

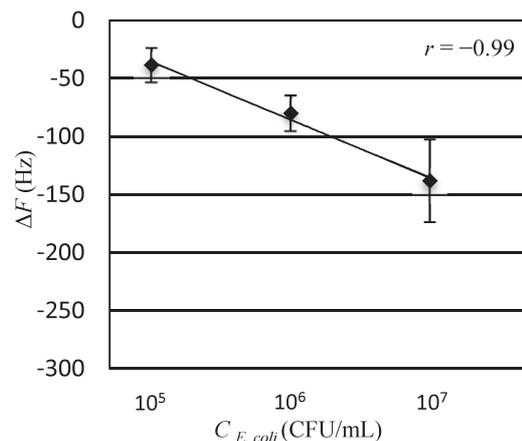


図8 *E. coli*センサーへの*E. coli*の吸着  
*E. coli*濃度 $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  CFU/mLでの周波数変化 $\Delta F$ 。 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の濃度範囲で $\Delta F$ と $\log C_{E.coli}$ の間に直線関係がみられた。

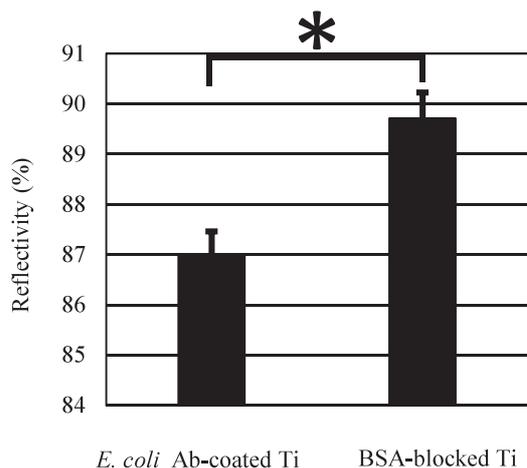


図9 *E. coli* 付着による分光反射率の変化

抗体を介して*E. coli*を付着させたTiディスクと、0.1%BSAでブロッキングして*E. coli*を付着させたTiディスクの反射率。抗体を結合させたディスクにおいて、反射率は有意に低下し (\* $p < 0.05$ )、抗体を介することで*E. coli*の付着量が増加したことが示された。

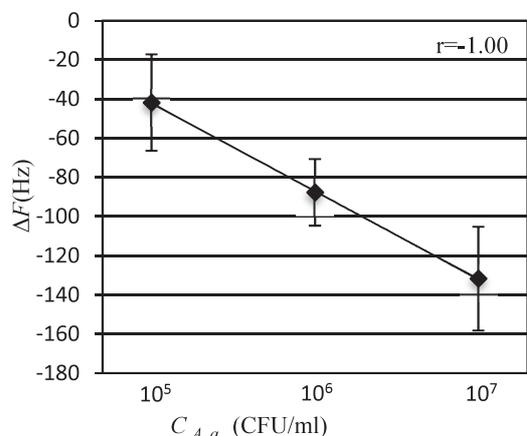


図10 *A. a.* センサーへの*A. a.* の吸着

*A. a.* 濃度  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  CFU/mLでの周波数変化 $\Delta F$ 。  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の濃度範囲で $\Delta F$ と $\log C_{A.a.}$ の間に直線関係がみられた。

を行うと $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLの濃度範囲で周波数変化との間に直線関係がみられ ( $r = -1.00$ )、この範囲で*A. a.*の対数検量線が得られた。

## 考 察

### 1. QCM法ツインセンサーを用いた細菌検査の他法との比較

細菌計測システムとして今回試みたQCM法を、先行する方法と比較する。

QCM法の利点としては、高度な知識が必要で検査結果が得られるまでに2時間もかかる大掛かりなPCR法に比べて30分程度と迅速で装置の導入コストも低く設置場所を選ばないこと、菌の総数は測れても種を区別することができない細菌カウンターに比べてカスタムメイドのセンサーで必要な細菌や病原因子の定量が可能であるこ

と、簡便さと設置・運用の容易さで細菌カウンターに劣らないことが挙げられる。特に、高感度装置でありながらQCMの弱点であった装置の大きさ、温度などの環境因子による検出感度への影響がツインセンサー化されたことで改善された利点は大きい。

一方、QCM法は検出感度の高さ、一度に多種の菌について高感度 ( $10 \sim 10^8$ 個) で定性定量分析できる利便性ではPCR法に及ばず、導入コスト、設置の容易さ、迅速・簡便さで細菌カウンターに対しての優位性はそれほど大きくない。

これらのことから、現状ではQCM法ツインセンサーは計測時間においては優位だが、細菌検査で重要な要素である検出感度の面でやはりqPCR法がかなり優位である。また、計測時間に関しては細菌カウンターが優位である。ポケット内に存在している菌を培養せずに検体として用いて、その中に存在する1菌種を計測する本システムでは、検出感度に関しては更なる向上が求められる。増感の手法として、本研究ではQCMセンサーに抗体を介して菌を付着させ測定しているが、センサー上に付着した菌の上にさらにその菌に特異的な抗体を結合させることによって増感できる可能性はある。計測時間に関しては、本研究の*E. coli*の抗体への結合反応は数分から10分程度で収束していたが、多少の周波数変化(ドリフト)があったため、余裕を見て20分間とした。したがって、QCMによる抗原抗体反応の動態をはっきりしとてくれば格段に時間短縮できる可能性はある。

### 2. *E. coli*および*A. actinomycetemcomitans*の検量線

本研究では、QCMツインセンサー法を用いて、まずは汎用性の高い*E. coli*の抗体を用いてセンサーの作製条件を確立し、それに倣って*A. actinomycetemcomitans*のセンサーを作製し、定量を行った。QCM法で作製した検量線の直線性から、 $10^5 \sim 10^7$  CFU/mlの範囲で*E. coli*を定量できるQCMセンサーの構築が可能であることが強く示唆された(図8)。2006年にMaoらは*E. coli*をQCMで定量している(Mao et al., 2006)。その方法は、*E. coli*に特異的なDNAプローブをセンサーに固定化するもので、菌濃度が $10^2 \sim 10^6$  CFU/mLの範囲での計測が可能であった。本研究で計測できる濃度範囲は $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLであり、Maoらの報告と比較して、計測範囲は狭くなった。ただし、Maoらの方法ではDNAプローブを得るまでに半日程度の培養時間が必要であり、その後のセンサーの修飾に1時間程度を要する。これと比較すると本研究でのセンサー処理では事前準備に煩雑な行程を必要としないことが利点である。また、*E. coli*と同様な方法

でセンサーと検量線の作製を行い *A. actinomycetemcomitans* について計測したところ、同様に  $10^5 \sim 10^7$  CFU/mL の幅で定量可能であることが確認された (図10)。この結果から、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幅広く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。

QCMで細菌の付着量を定量することを目指す今回の実験では、QCMでの議論の傍証として、*E. coli* の付着が多いほど鏡面研磨していたチタンの表面の曇りが著しかったという肉眼観察に着想を得て、分光反射率測定を行った。その結果、*E. coli* との接触後は、ブロッキングのみの処理を行ったチタンディスク表面の反射率に比べて、抗体化処理を行ったチタンディスク表面で反射率は低かった。チタンディスク表面を、Protein Aを介して *E. coli* 抗体で修飾した状態はツインセンサーの観測電極 (ch 1) に対応し、BSAでブロッキングしただけの状態はツインセンサーの対照電極 (ch 2) に対応している。このことから、分光反射率実験の結果は、QCM測定から導かれた、抗体を結合させたディスクの方が有意に *E. coli* が付着したという結論を別の角度から支持している。

口腔内から得られるサンプルには唾液、プラーク、歯肉溝浸出液などがあげられる。歯周病の病状を把握するには歯周ポケット内のサンプルを得る必要があり、かつ簡便に取得することを考慮するとプラークのサンプルが適している。しかし、現在までにQCMでプラークの測定を行った例はない。Xiao-Li-suらが *S. typhimurium* をQCMで測定した際には、サンプルの鶏肉を0.1%緩衝ペプトン水に混和し、サーキュレーターで破碎したのちに抗サルモネラビーズを混和し、得られた沈殿物をPBSで再懸濁した物を滴下サンプルとしている (Xiao-Li Su et al., 2005)。また、Muramatsuらが *C. albicans* をQCMで測定した際は、グルコース2%、ペプトン2%、イースト抽出物1%を含む培地で培養したのち、pH 7.0、0.05 MのPBSに懸濁している (Muramatsu et al., 1986)。本実験でも滴下バッファーにPBSを用いているため、プラークサンプルをPBSに分散状態に懸濁し、滴下サンプルとして利用可能と考えられる。

### 3. Protein Aと抗*E. coli*抗体の結合量比

QCM法は水晶振動子の共振周波数の変化 $\Delta f$ と質量の変化 $\Delta m$ の比例関係に基づいており、定量的な関係はSauerbreyの式

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} \Delta m$$

で与えられる。使用した装置では、 $\Delta m$ ：質量変化、 $\Delta f$ ：周波数変化、 $A$ ：電極の面積 (計測面積：2.5 mm<sup>2</sup>)、 $\rho_q$ ：水晶の密度 (2.65g/cm<sup>3</sup>)、 $\mu_q$ ：水晶振動子の剛性率 ( $2.95 \times 10^{11}$  g/cm<sup>3</sup>・s<sup>2</sup>)、 $f_0$ ：センサーの基本振動数 (30 MHz) で、上記のSauerbreyの式は

$$\Delta m \text{ (pg)} = -12.34f \text{ (Hz)}$$

となり、周波数変化から質量変化を算出できる。この条件は付着物がセンサーと一体で動く剛体吸着が仮定されているため、分子量がそれほど大きくなく、構造の異方性が低いタンパク質であれば多くの場合適用可能である。

Protein Aが300  $\mu$ g/mLで吸着飽和に達した時の周波数低下は約750 Hzであり (図5)、Sauerbreyの式から吸着量としては9,225 pgと算出される。Protein Aの分子量は約42,000なので、0.2 pmol ( $1.322 \times 10^{11}$ 分子)となる。また、抗*E. coli*抗体については500  $\mu$ g/mLで吸着飽和に達した時の周波数低下が約1,650 Hzであり (図6)、Sauerbreyの式から吸着量としては20,295 pgと算出される。抗*E. coli*抗体の分子量を約150,000とすると0.1 pmol ( $0.81 \times 10^{11}$ 分子)と見積もられる。これらの結果はProtein Aと抗体が約2:1の数比で結合していることを意味する。一方、Protein Aは1分子あたり4個の抗体を結合させることが報告されており、今回の結果と異なっている。その理由として、Protein Aのチタン表面への吸着は非特異的な物理吸着であるために、抗体との結合部位の向きを制御できず、結合部位の一部がチタン側を向いた状態で吸着してブロックされていたからだと考えられる。

もし抗体がProtein Aを介さずにBSAブロックが不完全なチタン表面に吸着した場合でも、F<sub>側</sub>でチタン表面に吸着しF<sub>側</sub>部が溶液側を向いていれば抗原は結合できるが、F<sub>側</sub>でチタン表面に吸着するとそこには結合できない。すべてのF<sub>側</sub>がブロックされるわけではないが、より感度を上げるためには抗体をF<sub>側</sub>でチタン表面に固定化しF<sub>側</sub>がブロックされないよう、抗体の結合部位の向きを制御する必要があると考えられた。

### 4. センサーへの抗体の固定化方法

本研究で作製した細菌センサーは、細菌の抗体をProtein Aを介して水晶振動子上に固定する設計で、抗体のF<sub>側</sub>部と細菌、F<sub>側</sub>部とProtein Aの結合はその特異性から十分に強固と考えられる。一方、Protein Aと水晶振動子のTi電極の間には結合の特異性がない。そこで、これらを化学的に結合させることが望ましい。

しかし、Protein AをTiに直接固定すると、チタン表面

に形成されている酸化膜の比誘電率の影響で吸着したタンパク質の構造と機能に変化を与えることが報告されている (Sundgren et al., 1986, Grinnell & Feld, 1981; Iuliano et al., 1993; Pettit et al., 1994; Garcia et al., 1999). そこで, Ti表面とProtein Aの間に適切なスペーサー分子を介在させてProtein Aの変性を避けながらも化学的にTi表面に固定する方法が考えられる. 抗体の代わりに細菌と特異的に結合するペプチドを用いる方法もある. チタン表面とArg-Gly-Aspペプチドの間にスペーサー分子としてポリエチレングリコールを挿入し, この条件下で骨芽細胞の石灰化機能が上昇した結果が報告されている (Oya et al., 2009).

この改良を加えた抗体のTi基板への固定方法についても検討を進めており (Kado et al., 2012), 既にTiディスク上では確実性の高い抗体固定処理法の見通しを得るので, 次報で詳細に報告したい.

## 5. 臨床的意義

歯周治療において, 特定の菌の定量ができることは非常に意義がある. 特にSupportive Periodontal Therapy (SPT) 中の患者において, 現在はX線写真, ポケット深さ, プロービング時の出血, 動揺度, プラークコントロールレコードなどが歯周組織および口腔内状態をモニターする指標となっている. ポケット深さやプロービング時の出血に有意に影響を及ぼすRed complexに属する菌は, 他の菌種に依存するために他の菌種が出現した後に出現して来ることから, Red complexがポケット内に増殖するためにはある程度の時間がかかることがわかっている. そのため, Red complexが検出されると, その時点でSPTの期間を短くして他の菌種の増殖を抑えることで, Red complexが再増殖しづらい環境を整えて歯周組織の破壊を防げられる可能性がある. そのために, SPTを行っているその日に細菌検査の結果がわかり, 次回のメンテナンスの予定を立てる必要がある. 一般的にSPTの治療時間は1時間であるため, qPCRの2時間ではやはり遅いのが現状である. そこで, 本研究で検討したQCM法を使えば20分という時間で結果を見ることができ, SPTの治療中に結果がでるので, 結果を見ながら次回の予定を立てることが可能となる. また, 患者もデータに基づいたSPT期間の設定であれば納得して通院が可能となるはずである.

また, 現在は2電極のツイン仕様であるが, 技術的には単一の水晶板上に4電極までは実装できる技術的見通しがあり, 異種抗体の反応を各電極で独立に同時計測することで, 細菌カウンターに比肩する迅速性が将来的に

は期待できる. さらに, 各電極を複数の特異抗体で修飾したカスタムメイドの特異マルチ抗体センサーを, パッケージ化した「専用センサー」として予め複数用意し, 順次装置スロットに挿し替えながら多数の試料または検体について吸着計測を繰り返す, 臨床検査装置としての利点も大きいと考えられる.

加えて, 本研究で使用したQCM装置は, 従来の機器のような厳密な測定環境条件の束縛がないうえに, 非常にコンパクトで患者への威圧感が少ない点も含め, チェアサイドでの検査機器として有望である.

## 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の特性に注目し, QCMセンサー表面に抗体を担持させ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い, 以下の結論を得た.

1. QCMのチタンセンサーを*E. coli*の抗体で修飾するための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たQCM測定で, *E. coli*付着による抗原抗体反応を検出することができ,  $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLの濃度範囲で検量線が得られた.
3. 同様に, *A. actinomycetemcomitans*の検量線を $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLの濃度範囲で作成し, 定量可能であることを確認した.

## 謝 辞

本研究で使用した血清型特異的抗*A. a.*ウサギ血清は, 北海道医療大学の長澤敏行教授より提供を受けた. ここに深謝する.

## 文 献

- Corless C.E, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek E.B, Fox A.J. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 38 : 1747-1752, 2000.
- Garcia AJ, Vega MD, Boettiger D. Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Mol Biol Cell* 10 : 785-798, 1999.
- Grinnell F, Feld MK. Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity. *J Biomed Mater Res* 15 : 363-381, 1981.
- Heid CA, Junko Stevens, Kenneth J. Livak, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *GENOME RESEARCH* 986

- 994, 1996.
- Iuliano DJ, Saavedra SS, Truskey GA. Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion. *J Biomed Mater Res* 27 : 1103–1113, 1993.
- Ivniński D, Ihab Abdel–Hamid, Plamen Atanasov, Wilkins E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics* 14 : 599–624, 1999.
- Kado T, Hidaka T, Aita H, Endo K, Furuichi Y. Enhanced compatibility of chemically modified titanium surface with periodontal ligament cells. *Appl Surf Sci* 262 : 240–247, 2012.
- Kohyama A. Microbiological and Serological Investigation of Periodontal Disease Activity. *日本歯周病学会雑誌* 31 : 360, 1989.
- Kurosawa S, Hirokawa T, Kashima K, Aizawa H, Jong–Won Park, Tozuka M, Yoshimi Y, Hirano K. Adsorption of anti–C–Reactive Protein Monoclonal Antibody and Its F(ab')<sub>2</sub> fragment on Plasma–Polymerized Styrene, Allylamine and Acrylic Acid Coated with Quartz Crystal Microbalance. *Journal of Photopolymer Science and Technology* 15 : 323–330, 2002.
- Mao X, Yang L, Su XL, Li Y. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of *Escherichia coli* O157 : H7. *Biosensors and Bioelectronics* 21 : 1178–1185, 2006.
- Matsuo H. POCT (point of care–testing) の現状と将来. *日本内科学会雑誌* 100 : 3175–3181, 2011.
- H.P. Müller, S. Holderrieth, U. Burkhardt, U. Höffler. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J. Clin. Periodontol* 29 : 736–742, 2002.
- Muramatsu H, Kajiwara K, Tamiya E, Karube I. PIEZO-ELECTRIC IMMUNO SENSOR FOR THE DETECTION OF *Candida albicans* MICROBES. *Analytica Chimica Acta* 188 : 257–261, 1986
- Oya K, Tanaka Y, Saito H, Kurashima K, Nogi K, Tsutsumi H. Calcification by MC3T3–E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. *Biomaterials* 30 : 1281–1286, 2009.
- Pettit DK, Hoffman AS, Horbett TA. Correlation between corneal epithelial cell outgrowth and monoclonal antibody binding to the cell binding domain of adsorbed fibronectin. *J Biomed Mater Res* 28 : 685–691, 1994.
- Renvert S, Maude Wikström, Gunnar Dahlén, Jørgen Slots, Egelberg J. On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology* 17 : 351–355, 1990.
- Sauerbrey G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* 155 : 206–222, 1959.
- Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent J. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25 : 134–144, 1998.
- Suehiro J, Hamada R, Noutomi D, Shutou M, Hara M. Selective detection of viable bacteria using dielectrophoretic impedance measurement method. *Journal of Electrostatics* 57 : 157–168, 2002.
- Sundgren J, E., Bodo P, Ivarsson B, Lundstrom I, G. Adsorption of fibrinogen on titanium and gold surfaces studied by ESCA and ellipsometry. *J Colloid Interface Sci* 113 : 530–543, 1986.
- Srivastava N, Nayak PA, Rana S. Point of Care– A Novel Approach to Periodontal Diagnosis–A Review. *J Clin Diagn Res* 11 : ZE01–ZE06, 2017.
- Xial–Li Su, Yanbin Li. A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. *Biosens Bioelectron* 21 : 840–848, 2007.
- 渡辺 重徳, 若松 俊一, 小山 光明. 二つの電極を設けた水晶センサの検討. *Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics* 30 : 515–516, 2009.



金田 研郎

平成25年 3月 北海道医療大学 歯学部 卒業

平成30年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成30年 4月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野  
任期制助手

平成30年 7月 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野  
任期制助手 退職