

バイオセンサーを用いた唾液ヘモグロビン検出による
歯周病スクリーニング検査法の開発

権 海尚

明海大学大学院 歯学研究科 歯学専攻

(指導: 申 基喆 教授)

Development of Screening Method for Periodontal Disease by Detecting
Salivary Hemoglobin Using Biosensor

Haesang KWON

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Director : Prof. Kitetsu SHIN)

要旨

本研究ではバイオセンサーを用いた唾液ヘモグロビン検出による歯周病スクリーニング検査法の検討を行った。まずOrla91 proteinによる自己組織化膜の構築と、自己組織化膜へのマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニット β モノクローナル抗体 (IgG 抗体) の結合による共鳴波長変化を光ファイバ Surface plasmon resonance (SPR)センサーで評価した。次にヘモグロビンによる共鳴波長変化を検討し、さらに唾液ヘモグロビンの検出を健常者と中等度慢性歯周炎患者から行った。その結果、センサーへの自己組織化膜の構築と自己組織化膜へのIgG抗体の結合を示す共鳴波長変化が検出された。ヘモグロビン検出では濃度10 ng/ml - 200 μ g/mlで反応開始1.0分まで時間依存的な波長変化の増加が認められた。さらに、唾液ヘモグロビンを検出した結果、慢性歯周炎患者からのみ共鳴波長変化を検出した。以上の結果より光ファイバSPRセンサーを用いた唾液ヘモグロビンによる歯周病スクリーニング検査が可能であることが示唆された。

索引用語: 光ファイバSPRセンサー, 唾液ヘモグロビン, 歯周病, 唾液

Abstract

In this study, we investigated the application of biosensors in screening tests for periodontal disease. First, changes in resonance wavelength during building of self-assembled monolayers using Orla91 protein and changes in resonance wavelength caused by binding of mouse anti-human hemoglobin beta-subunit monoclonal antibody (IgG antibody) to self-assembled monolayers were evaluated by fiber optical surface plasmon resonance (SPR) sensor. Next, changes in resonance wavelength in levels of hemoglobin were then examined and the detection of salivary hemoglobin present in saliva samples from healthy volunteers and patients with moderate periodontitis were investigated. As a result, changes in resonance wavelength during the process of building self-assembled monolayers and binding of IgG antibodies to the self-assembled monolayers were detected. Changes in resonance wavelength by hemoglobin revealed a time-dependent increase up to 1.0 minutes after starting the reaction at hemoglobin levels of 10 ng/ml-200 µg/ml. The subsequent detection of hemoglobin in salivary samples revealed that changes in resonance wavelength were only detected in patients with periodontitis. The above findings suggest that optical fiber SPR sensors are capable of detecting salivary hemoglobin in periodontal disease screening tests.

Keyword: fiber optical SPR sensor, salivary hemoglobin, periodontal disease, saliva

緒言

国民の8割以上が罹患している歯周病は生活習慣病とも言われ、自覚症状に乏しく重症化するまで早期発見が難しい¹⁾。現在、国内外において、小型で携帯性に優れ、迅速な検査結果の表示が可能な血液や唾液、尿等を試料とした生活習慣病に対する検査キットや、デバイスの実用化が望まれている。このような検査キット・デバイスは Point of Care Testing (POCT) と呼ばれ、生活習慣病の早期発見、即時治療に有効である²⁾。歯科領域においても開発が進められており³⁾、歯周病のスクリーニング検査に使用可能な、検査キットやデバイスを開発し、実用化することにより、国民の健康寿命の延伸、健康格差の縮小、および医療費の抑制効果が期待されている。

歯周病スクリーニング検査に有用な歯周病に関係するバイオマーカーには、唾液ヒトヘモグロビン⁴⁾や matrix metalloproteinase-8 (MMP-8)⁵⁾などが存在し、歯科健診への導入が期待されている。花田ら⁶⁾は、体外診断用医薬品として厚生労働省の承認を受けている歯周病に関連するバイオマーカーは、現時点で唾液ヘモグロビンのみであることを報告しており、2001年から2015年までに、唾液ヒトヘモグロビンを用いた歯周病スクリーニング検査の有効性に関する研究が数多く報告されている⁷⁻⁹⁾。それらの報告によると、抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を用いた唾液潜血試験紙法は歯周疾患のスクリーニングテストとして有用であること⁷⁾、唾液ヒトヘモグロビンは、非侵襲的に利用可能な歯周病バイオマーカーの一つであり、重度歯周炎のスクリーニングが可能であること⁸⁾。また、唾液ヒトヘモグロビン

レベルは、地域歯周疾患指数である CPI コード 1 (出血) とコード 3 (4-5 mm の歯周ポケット) のスクリーニングに有用であること⁹⁾などが明らかとなっている。唾液ヒトヘモグロビンを用いた歯周病スクリーニング検査の有効性に関するエビデンスは、現時点でも数多く報告されており、当該マーカーを歯周病スクリーニング検査に用いることは、本研究で開発するバイオセンサーの臨床現場での使用や、普及という点で有用であるだけでなく、実用化に必要な期間の短縮という点で非常に効率が良い。しかし、現在のところ、唾液ヒトヘモグロビンを用いた歯周病スクリーニング検査は、国内の一部の地方自治体が実施している歯科健診などで試験的に用いられるに留まっている。その原因としては、使用されている検査キットが、試験紙などのアナログ形式のものしか存在せず、数千から数万人という大規模な検査の実施や、検査データの管理という点で実用的でないということが考えられ、早期に改善すべき課題が残っている。

近年ナノテクノロジー分野において技術革新が進み、酵素、微生物、抗体といった生体関連物質が有する分子識別機能を利用して、特異的な分子の検出や測定を行うバイオセンサーの開発が急速に進み、検査結果などのデータ管理の効率化が実現している¹⁰⁾。本研究で対象とするバイオセンサーは、抗原抗体反応などの生体反応を即時に、リアルタイムで電気的な信号に変換することが可能な光ファイバ表面プラズモン共鳴 (**Surface plasmon resonance: SPR**) センサーであり、その原理は光によってのみ励起される金属表面に存在する自由電子の波である表面プラズモンの共鳴特性を応用したものである¹¹⁾ [Fig. 1

(1)]。光ファイバ SPR センサーは、センサー表面の屈折率の変化に非常に敏感で、屈折

率変化は **SPR** スペクトルの最小反射率を示す共鳴波長変化として高感度に検出される [Fig. 1 (2)]. 表面プラズモン共鳴現象は、光ファイバなどの誘電体表面に存在する物質の屈折率と示量性の状態量、すなわち分子数、濃度を反映してその特性が敏感に変化する。このことから屈折率変化を生じさせる抗原抗体反応などに代表される生体高分子相互作用の、高精度なリアルタイム検出や、標的物質の経時的モニタリングの主要なデバイスとして広く研究開発が進められている¹²⁾。バイオセンサーの有効性に関し **Bellan** ら¹³⁾は、バイオセンサーがテクノロジーの進歩と、その信頼性の向上により、血糖値測定、細菌の検出や癌マーカーの検出などの臨床診断に使用され始めていることを報告し、**Piliarik** ら¹⁴⁾も、**SPR** センサーが 1990 年代後半から非標識、リアルタイムで即時に抗原を検出可能な機器として、医療や環境モニタリングなどの分野で利用されていることなどを報告している、一方で **Pires** ら¹⁵⁾は、検出技術には著しい進歩が認められるが、実用化レベルでの臨床応用が可能な機器は未だ存在しないと報告しており、バイオセンサーに関する研究は発展途上であり、さらなる研究の余地と、その必要があると考えられている。以上のように、臨床検査へのバイオセンサーの応用は急速に進んでいるが、実用化され、広く普及しているものは未だ存在せず、特にバイオセンサーを歯周病診断や、スクリーニング検査に用いたという報告は存在しない。

本研究の目的は光ファイバ **SPR** センサーを用いた唾液中のヘモグロビン検出による歯周病スクリーニング検査法の開発を行うことである。

材料および方法

1. 光ファイバSPRセンサー

SPRセンサープローブには、その表面に厚さ30 nmの金薄膜を蒸着した、直径400 μm 、長さ10 mmのステップインデックス型マルチモードファイバ (精工技研, 千葉)を用いた[Fig. 2 (1)]. 白色光源にはHL2000 (OCEAN OPTICS, Dunedin, FL), 光ファイバにはBIF400-VIS-NIR (OCEAN OPTICS), 分光器にはUSB4000 (OCEAN OPTICS), 解析ソフトにはOP wave+ ver.2.04 (OCEAN OPTICS)を用いて光ファイバSPRセンサーを構成した[Fig. 2 (2)].

2. 自己組織化膜の構築

SPRセンサープローブへのIgG 抗体の固定化に必要な *Escherichia coli* の外膜主要タンパクであるOuter membrane protein A (OmpA) とPolyethylene glycol with a thiolalkane (thioPEG) から構成される Orla91 protein [Fig. 3 (1)]による自己組織化膜の構築は、Orla91 kit (Orla Protein Technologies, Newcastle, UK)に添付されたプロトコルに従った。まず、SPRセンサープローブ表面に蒸着された金薄膜の洗浄を目的にエタノール浸漬を行った後、ミリQ水を用いて洗浄を行った。次に、2 % Hellmanex II (Hellma, Müllheim, Germany)に25 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間浸漬後、ミリQ水により十分に洗浄し、乾燥処理を行った。次に、1 % β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)に25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間浸漬後、ミリQ水により5 秒間洗浄を行った。上記処理によりSPRセンサープローブ表面の金薄膜の洗浄

およびチオール化を行った後, 0.5 M Tris 2-carboxyethyl phosphine hydrochloride (TCEP-HCl)を添加した後, 37 °Cで10 分間, 還元処理を行った10 μM Orla91 protein溶液に, SPRセンサープローブを25 °C, 20 分間浸漬後, 1 % SDS に25 °C, 5 分間浸漬した. 同様にして再度, TCEP-HClで処理したOrla91 protein溶液に25 °C, 4 分間浸漬後, 1 % SDS に25 °C, 5 分間浸漬した. 余剰Orla91 proteinの除去を目的に100 mM HCl に25 °C, 10 秒間浸漬後, ミリQ水に直ちに浸漬し, 洗浄を行った.

以上の処理は全て光ファイバSPRセンサーによる共鳴波長変化をリアルタイムで測定して行った(Fig. 8). 自己組織化膜の構築を行ったSPRセンサープローブは実験に使用するまで, 4 °Cで保管した. 本研究では, Orla91 proteinの陰性対照として, IgG 結合部位を保有しないOrla9 proteinを使用し, 同様の条件下で対照実験を行った.

3. 抗原および抗体

実験には抗原としてヒトヘモグロビン (Abcam, Cambridge, UK)を用いた. 一方, 抗体としてマウス抗ヒトヘモグロビン サブユニットβ モノクローナル IgG 抗体 (Abcam), および金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビン ポリクローナル抗体 (アルフレッサファーマ, 大阪) を用いた. 抗体は0.05 % Tween20 添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 50 mM, pH 7.2) で希釈し, 実験に供した.

4. 自己組織化膜とIgG 抗体の結合

自己組織化膜を構築したSPRセンサープローブを, 0.05 % Tween 20添加PBSを用いて 1 mg/mlの濃度に希釈したマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニットβモノクローナル IgG 抗体

溶液に25 °C, 20 分間浸漬後, PBSに25 °C, 4 分間浸漬することでOrla91 proteinと結合させた (Fig. 4). 以上の処理は全て光ファイバSPRセンサーによる共鳴波長をリアルタイムで測定して行った.

5. ヘモグロビンと金コロイド標識抗体による免疫複合体の形成

標準試料としたヘモグロビンをPBSで10 ng/ml, 1 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/mlに調整後, 0.05 % Tween 20添加PBSにより20 µg/mlに調整した金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体 (アルフレッサファーマ, 大阪) を添加し, 25 °C, 45 分間反応させた. その後, 室温にて9,510 × g, 2 分間遠心分離を行い, 上清を除去後, 再度PBSに懸濁し測定に用いた (Fig. 5). 本研究では本法をpre-mix法とした.

6. ヘモグロビン検出

ヘモグロビンの検出は, SPRセンサープローブ上の自己組織化膜に結合したマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニットβモノクローナル IgG 抗体が, 金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体と免疫複合体を形成したヘモグロビン分子表面の異なるエピトープを認識し, 結合することで共鳴波長変化が生じ, その変化を検出することにより可能となる (Fig. 6). SPRセンサープローブに対するヘモグロビンの結合による共鳴波長変化の測定は, 分光器のパラメーター設定を, 露光時間6 ms, 積算回数300 回, スムージング無し, 波長計測領域:波長400-800 nm, 保存間隔30 秒, 保存時間30 分として行った. 測定後0.5 分, 1.0 分, 1.5 分における検量線の作成を行った. 陰性対照としてIgG 結合部位を持たないOrla9 protein を用いて同様の実験を行い, その共鳴波長変化を非特異的反応とした.

7. 統計分析

標準試料とした唾液ヘモグロビンの測定後、回帰分析を用いて10 ng/ml, 1 µg/ml, 100 µg/mlの領域における検量線の作成を行った。解析には SPSS version 20 (日本アイ・ビー・エム, 東京) を用いた。

8. 被験者

明海大学歯学部附属明海大学病院歯周病科へ来院し、歯周病検査の結果、日本歯周病学会が定める歯周病診断基準¹⁶⁾で中等度慢性歯周炎と診断されたもののうち、本研究への参加に同意が得られ、かつ以下に示す適格性に合致した慢性歯周炎患者2名と、健常者ボランティア2名の計4名を被験者とした。適格性の設定に関して、慢性歯周炎患者は、プロービングポケット深さ (probing pocket depth: PPD) 4 mm以上の部位が存在する歯が1歯以上存在するものとし、健常者はPPDが全て3 mm以下でプロービング時の出血 (bleeding on probing: BOP) が認められないものとした。除外基準は免疫反応に影響の及ぼす全身疾患の既往があるもの、妊娠しているもの、過去3ヶ月以内に歯周治療を受けているもの、過去3ヶ月以内に抗菌薬の服用があるものとした。本研究は本学倫理審査委員会の承認 (承認番号A1008) を受けて行った。

9. 口腔内検査

全ての被験者に歯周病検査を行った。歯周病検査項目は PPD, clinical attachment level (CAL), BOPとした。PPD, CAL, BOPはHu-Friedy 社製 (Hu-Friedy, Chicago, IL) CP-15 プローブを使用し、6点法にて測定した。

10. 唾液採取および保存方法

唾液は, spitting method ¹⁷⁾を用いて安静時唾液を採取した. 採取用容器はサリバチェックラボ(GC, 東京) を用いて3 ml採取した. 被験者には当日の朝, 飲食および歯みがきを行わないように指導した. 唾液検体は採取後, 15 ml 遠心チューブに移し, 速やかに -80 °C に保存した.

11. 唾液処理

唾液採取後, 1.5 ml 遠心チューブに 1.0 ml 分注し, 室温で 25 °C, 9,510 × g で 2 分間, 速やかに遠心分離を行った(Fig. 7). その後, 上清を回収し金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体との反応に使用した.

結果

1. 自己組織化膜の構築

自己組織化膜の構築による共鳴波長変化は、各処理段階の測定開始時、測定終了時および任意のタイムポイントを連続的に測定し記録した。その結果、ミリQ水とエタノールの測定開始時と終了時共鳴波長には変化なく、それぞれ617.4 nm, 669.6 nmであった。Hellmanex IIの共鳴波長変化は開始時620.7 nm, 540 秒後621.1 nmであった。β-mercaptoethanolの共鳴波長変化は、開始時618.2 nm, 60 秒後618.3 nm, 240 秒後618.5 nmであった。また Orla91 protein溶液への浸漬 (Orla①)による共鳴波長変化は、開始時624.8 nm, 1140 秒後626.6 nmであり、1 %SDS (SDS①) では変化なく、共鳴波長は619.3 nmであった。さらに2回目のOrla91 protein溶液への浸漬 (Orla②) による共鳴波長変化は、開始時および60 秒後は624.3 nmで変化なかったが、180 秒後に624.9 nmに変化し、2回目の1 %SDS (SDS②) の共鳴波長は、619.8 nmとなった。100 mM HClの共鳴波長は変化なく620.1 nmであった (Fig. 8)。

2. 自己組織化膜へのIgG 抗体の結合

自己組織化膜を構築したSPRセンサープローブをマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニットβモノクローナル IgG 抗体溶液に浸漬し、抗体の結合による共鳴波長変化を測定したとこ

ろ, IgG 抗体を含まないPBSの共鳴波長は619.3 nmであり, 浸漬による共鳴波長変化は認められなかった. 抗体溶液への浸漬による共鳴波長変化は, 開始時619.3 nm, 60 秒後619.5 nm, 1740 秒後619.6 nmであった. その後再度PBSに浸漬したところ共鳴波長は619.8 nmであった(Fig. 9).

3. ヘモグロビン検出

抗体を結合したSPRセンサープローブを用いて, 金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体と結合したヘモグロビンを測定した結果, ヘモグロビン濃度10 ng/ml, 100 µg/ml, 200 µg/mlでは, 反応開始1.5 分まで時間依存的な共鳴波長変化の増加が認められ, 1 µg/ml, 200 µg/mlでは, 反応開始1.0 分まで時間依存的な共鳴波長変化の増加が認められた (Fig. 10, 11).

4. 検量線の作成

反応時間0.5 分, 1.0 分, 1.5 分の各濃度における共鳴波長変化をプロットし, 各反応時間における検量線の作成を行った結果, 0.5 分では $Y = 0.3X + 4E-14$, $R^2 = 1$, 1.0 分では $Y = 0.4X - 0.1$, $R^2 = 1$, 1.5 分では $Y = 0.4X - 0.0667$, $R^2 = 0.9231$ であった(Fig. 12).

5. 患者情報および臨床パラメーター

2 名の健常者 (H1: 男性・27 歳, H2: 女性・32 歳)と2 名の慢性歯周炎患者 (P1: 男性・52 歳, P2: 女性・58 歳)の患者情報および臨床パラメーターをTable1 に示す. 平

均PPDは, P1とP2がH1とH2より深い値を示し, それぞれ P1:3.5 mm, P2:3.2 mm, および H1:1.6 mm, H2:1.7 mmであった. また, 平均CALはそれぞれ P1:5.1 mm, P2:3.6 mm, およびH1:1.6 mm, H2:1.7 mmであった. 平均BOPは, H1とH2では検出されず, P1とP2ではそれぞれ55.9 %, 45.8 %であった. 唾液ヘモグロビンの検出による共鳴波長変化はP1とP2のみで検出され, 反応時間1.0 分における共鳴波長変化はそれぞれ1.99 nm, 1.19 nmであった (Table1).

考 察

本研究で行った光ファイバSPRセンサーに関する基礎的検討により、SPRセンサープローブ表面に OmpA と thioPEG からなるOrla91 proteinを用いて自己組織化膜を構築することで、IgG 抗体の固定化が可能であることが示唆された。そして、光ファイバSPRセンサーによるヘモグロビンの検出は、SPRセンサープローブに固定化したIgG 抗体にヘモグロビンを単独で結合させて検出するのではなく、金コロイド標識IgG 抗体とヘモグロビンをpre-mix法で処理し、免疫複合体として標的分子の分子量を増大させることで、光ファイバSPRセンサーが検出可能なレベルに共鳴波長変化を増幅できることが示唆された。さらに、臨床的検討事項として患者から採取した唾液を、遠心分離処理により、混合物を除去することで、非特異的反応を抑制して唾液ヘモグロビンが検出可能であることが示唆された。

まず、自己組織化膜の構築に関して、我々は前田ら¹⁸⁾が定義した、高分子、両親媒性分子、コロイド、生体物質などの物質群に対する総称であるソフトマターが形成する動的な界面を意味するソフトインターフェース(ソフト界面)に注目し、抗体や病原因子がつくるソフト界面のセンサー表面への応用が進められていることに着目した。Nagasakiら¹⁹⁾は、抗体と水溶性高分子であるPEGが密に配置された表面を構築する過程において、抗体の活性がPEGの共固定によって増強され、抗体タンパク質の立体構造を安定化することで、高い感度を有する抗体基板が調製できることを報告している。本研究において構築したOrla91 proteinによる自己組織化膜とIgG 抗体の結合、およびヘモグロビン検出はNagasakiらの報

告にある抗体活性の増強維持を示唆するものであり, IgG 抗体の安定化が結果に寄与した
ものと考えられる. Le Burmら²⁰⁾は, *E. coli*由来の膜貫通ドメインであるOmpAと
*Staphylococcus aureus*由来 protein AのZ domain²¹⁾の融合タンパクを作製した. これにより
SPRセンサープローブ表面の自己組織化膜内に融合タンパクOmpA部がスキャホールドとし
て取り込まれ, Z domain部が抗体の定常部位に結合することで可変部位が規則正しく配列
し, 抗体の活性維持およびセンサーの感度の上昇が認められることを報告している. 本研究
では, SPRセンサープローブ表面への自己組織化膜の構築を, OmpA と thioPEG からな
るOrla91 proteinを用いたLe Brunら^{20, 22)}の方法で行っていることから, 使用した抗体の活性
維持およびセンサーの感度の上昇が生じていることが示唆される. 本研究において自己組
織化膜の構築ステップにおけるSPRスペクトルと共鳴波長の変化を経時的に測定したとこ
ろ, Orla91 protein処理の際に顕著な共鳴波長の変化が観察された[Fig. 8(5, 7)]. これら
の結果はLe Brunら²¹⁾の自己組織化膜の構築に関する報告と一致したものであり, 本研究に
おけるOrla91 proteinによる自己組織化膜の構築を示すものである. しかし, Le Brunらの方
法はチップ状のセンサーであることから, センサー形状の違いが及ぼす影響について, 抗
体分子固定後のセンサー表面の評価は今後の検討課題である. 構築した自己組織化膜と
してセンサープローブ表面に固定化されたOmpAは, IgG 抗体に対する結合ドメインを有し
ており, 本研究ではマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニットβモノクローナル IgG 抗体と結合
させた. その結果, IgG 抗体溶液への浸漬処理により共鳴波長の増加が確認できた[Fig.
9(2)]. これらの結果も, Le Brunら²²⁾の報告と一致するものであり, OmpAへのIgG 抗体の

結合を示していると考えられる。

次に、ヘモグロビンの検出に関して、本研究では予備実験において、Orla91 proteinによる自己組織化膜への構築と、マウス抗ヒトヘモグロビンサブユニット β モノクローナル IgG 抗体の結合を行った後、直接ヘモグロビンの検出を行ったが、SPRセンサープローブ表面のIgG 抗体と、ヘモグロビンの結合による共鳴波長変化を検出することができなかった(データ非表示)。Lyonら²³⁾は、SPRバイオセンサーによる目的タンパクの検出で生じる共鳴波長変化が、当該タンパクの異なるエピトープを認識する金コロイド標識抗体を添加することで13倍に増大したことを報告している。本研究においては、金コロイド標識ウサギ抗ヒトヘモグロビンポリクローナル抗体をヘモグロビンと結合させ、形成された免疫複合体を遠心分離処理により沈殿させ、上清を除去後、PBSに再懸濁した。そして、形成された免疫複合体に存在するヘモグロビンの、異なるエピトープを認識するマウス抗ヒトヘモグロビンサブユニット β モノクローナル IgG 抗体により検出したところ、共鳴波長の変化が検出可能となることが明らかとなった(Fig. 10, 11)。調整したヘモグロビン各濃度において、反応初期(0.5, 1.0, 1.5分)では時間依存的な共鳴波長変化が認められたことから、検量線の作成による定量化が可能であることが示唆された(Fig. 12)。しかしながら、本研究において使用可能なセンサープローブ数に制限があったため、再現性の検証が限られ、SPRセンサープローブの追加生産と、検量線の更なる再現性の確認は今後の検討課題である。

次に、唾液ヘモグロビンの検出による歯周病スクリーニング検査を想定して、健常者と慢性歯周炎患者から採取した唾液中に含まれる唾液ヘモグロビン検出を行った。唾液中には

ムチン, アミラーゼ, リゾチーム, IgA など局所, あるいは全身に由来する多くのタンパクやペプチド, 核酸, 電解質ならびにホルモンが含まれている. このことから, 唾液は種々の疾患の診断への応用が可能な試料となる可能性が高く, 特にヘモグロビンの唾液への混入は口腔内に慢性歯周炎や, 口腔癌などで認められることが明らかとなっている²⁴⁾. しかしながら, 唾液成分中に存在するヘモグロビンを, 採取した唾液検体から直接検出することは, 唾液中に存在する高分子量糖タンパクであるムチンなどの粘性物質や, 多くの目的物質以外のタンパク成分が, 非特異的反応を生じさせ困難である. 本研究では, これらの問題に対して唾液の遠心分離処理および上清の回収と, その後の免疫複合体の回収によるpre-mix法を用いて非特異的反応を抑制した. その結果, 反応時間1.0 分間として測定した場合, H1, H2から採取した検体からは唾液ヘモグロビンによる共鳴波長変化は検出されず, P1, P2から採取した唾液検体では1.99 nm, 1.19 nmの共鳴波長変化が認められた. しかしながら, 本研究で用いた唾液サンプルは4 症例のみであり, 今後は更なる多くの唾液検体の測定を行い, その検出感度や, 再現性の確認が必要であると同時に, 歯周病スクリーニング検査への応用と, その実用化を見据えた唾液処理工程の簡素化, 短時間化が必要である.

結 論

本研究の結果から、自己組織化膜の構築、金コロイド標識抗体によるpre-mix法、および唾液中の遠心分離処理により、非特異的な反応を抑えた唾液ヘモグロビン検出が可能であることが明らかとなり、光ファイバSPRセンサーを用いた唾液ヘモグロビン検出による歯周病スクリーニング検査への応用が可能であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました明海大学大学院歯学研究科歯学専攻再生再建医療系歯周病学 申 基詰教授に深甚なる謝意を表します。また御校閲を賜りました本学大学院歯学研究科歯学専攻機能発達医療系小児歯科学 渡部 茂教授、ならびに機能系生化学 友村 明人教授、機能系口腔微生物学 大森 喜弘教授に深く感謝の意を表します。また光ファイバ SPR センサー技術と、種々の御教示と様々な御助言を下された静岡大学工学部 前教授であり、株式会社 SAW&SPR Tech 代表 塩川祥子先生、株式会社精工技研 呉玉英先生に深く感謝の意を表します。最後に、本研究の遂行に当たり、種々の御協力を頂きました歯周病学分野の先生方に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C and Kent RL, Jr.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144, 1998
- 2) Paknikar S, Sarmah R, Sivaganeshan L, Welke A, Rizzo A, Larson K and Rendell M: Long-term performance of point-of-care hemoglobin A1c assays. *J Diabetes Sci Technol* doi: 10.1177/1932296816645362, 2016
- 3) Lorenz K, Keller T, Noack B, Freitag A, Netuschil L and Hoffmann T: Evaluation of a novel point-of-care test for active matrix metalloproteinase-8: agreement between qualitative and quantitative measurements and relation to periodontal inflammation. *J Periodontal Res*, doi.org/10.1111/jre.12392, 2016
- 4) Maeng YJ, Kim BR, Jung HI, Jung UW, Kim HE and Kim BI: Diagnostic accuracy of a combination of salivary hemoglobin levels, self-report questionnaires, and age in periodontitis screening. *J Periodontal Implant Sci* **46**, 10-21, 2016
- 5) Sorsa T, Tjäderhane L, Konttinen Y T, Lauhio A, Salo T, Lee H M, Golub M, Brown D L and Mäntylä P: Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* **38**, 306-321, 2006

- 6) 花田信弘, 野村義明, 佐藤勉: 唾液検査標準化に関する研究. 8020 推進財団指定
研究事業報告, 2005
- 7) 大島光宏, 藤川謙次, 熊谷京一, 出澤政隆, 江澤眞恵, 伊藤公一, 大塚吉兵衛:
新しい唾液潜血試験紙法による歯周疾患のスクリーニングテストの有用性. 日本歯
周病学会会誌 **43**, 416-423, 2001
- 8) Shimazaki Y, Takeshita T, Shibata Y, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Hirakawa Y,
Kiyohara Y and Yamashita Y: Effectiveness of the salivary occult blood test as a
screening method for periodontal status. J Periodontol **82**, 581-587, 2011
- 9) Yoshiaki Nomura, Akiko Eto, Erika Kakuta, Daisuke Ogino, Yuichi Nakamura, Naoki
Takahashi, Fumihiko Hino, Keizo Koresawa, Nobuhiro Hanada and Keita Shimizu:
Screening for periodontal diseases using salivary lactate dehydrogenase, hemoglobin
level, and statistical modeling. J Dent Sci **7**, 379-383, 2012
- 10) Bhalla N, Jolly P, Formisano N and Estrela P: Introduction to biosensors. Essays
Biochem **60**, 1-8, 2016
- 11) Damborsky P, Svitel J and Katrik J: Optical biosensors. Essays Biochem **60**, 91-100,
2016
- 12) Dudak FC and Boyaci IH: Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon

- resonance biosensors. *Biotechnol Journal* **4**, 1003-1011, 2009
- 13) Bellan LM, Wu D and Langer RS: Current trends in nanobiosensor technology.
WIREs Nanomed Nanobiotechnol **3**, 229-246, 2011
- 14) Piliarik M, Vaisocherova H and Homola J: Surface plasmon resonance biosensing.
Methods Mol Biol **503**, 65-88, 2009
- 15) Pires NM, Dong T, Hanke U and Hoivik N: Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications. *Sensors* **14**, 15458-15479, 2014
- 16) 日本歯周病学会: 歯周病検査, 診断, 治療計画立案. In: 歯周治療の指針 2015.
日本歯周病学会編, 医歯薬出版, 東京, pp24-28, 2015
- 17) Dawes C: Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* **66**, 648-653, 1987
- 18) 前田瑞夫: ソフトインターフェースの分子科学. *応用物理* **79**, 219-224, 2010
- 19) Nagasaki Y, Kobayashi H, Katsuyama Y, Jomura T and Sakura T: Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system. *J Colloid Interface Sci* **309**, 524-530, 2007

- 20) Le Brun AP, Shah DS, Athey D, Holt SA and Lakey JH: Self-assembly of protein monolayers engineered for improved monoclonal immunoglobulin G binding. *Int J Mol Sci* **12**, 5157-5167, 2011
- 21) Tashiro M, Tejero R, Zimmerman DE, Celda B, Nilsson B and Montelione GT: High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *J Mol Biol* **272**, 573-590, 1997
- 22) Le Brun AP, Holt SA, Shah DS, Majkrzak CF and Lakey JH: Monitoring the assembly of antibody-binding membrane protein arrays using polarised neutron reflection. *Eur Biophys J* **37**, 639-645, 2008
- 23) Lyon LA, Musick MD and Natan MJ: Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Anal Chem* **70**, 5177-5183, 1998
- 24) Kim JJ, Kim CJ and Camargo PM.: Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *J Calif Dent Assoc* **41**, 119-124, 2013

Figure legends

Fig. 1, Schematic representation of an electron density wave propagating along a metal – dielectric interface.

(1) The propagating surface plasmon can be excited by p polarized light. In the optical phenomenon of Surface Plasmon Resonance, a metal-dielectric interface supports a p-polarized electromagnetic wave, namely Surface Plasmon Wave (SPW), which propagates along the interface. When the p-polarized light is incident on this metal-dielectric interface in such a way that the propagation constant (and energy) of resultant evanescent wave is equal to that of the SPW, a strong absorption of light takes place as a result of transfer of energy. (2) The output signal demonstrates a sharp dip at a particular wavelength known as resonance wavelength.

Fig. 2, The system of fiber optical surface plasmon resonance sensor.

The fiber optical surface plasmon resonance sensor is constructed with multimode fiber SPR sensor probe (①), halogen lamp: HL2000 (②), spectrometer: USB4000 (③), optical coupler: Multimode fiber 1×2coupler (④), softwar: OPwave+ ver.2.04 (⑤). This system and operation skills were supported by Dr. Kure and Dr. Shiokawa.

Fig. 3, A schematic of Orla91 protein.

(1) Domain structure of Orla91 protein and (2) a model of the Orla91 and Orla9 proteins.

The scaffold protein part is in red and the Z domains in purple. The linker region is in green and is shown as unstructured.

Fig. 4, A schematic of self-assembly of protein monolayer on gold surface.

(1) A model of the binding antibody on the Orla91 protein and (2) a model of the array proteins on gold surface.

Fig. 5, An illustration of immune complex formation.

Rabbit anti-hemoglobin polyclonal antibody conjugated gold nanoparticle was added to the purified human hemoglobin solution to form the immune complex.

Fig. 6, A schematic of hemoglobin detection and subsequent determination of resonance wavelength change using fiber optical SPR sensor.

(1) A model of inserted SPR sensor probe in the sample solution that include immune complexes. (2) A model of wavelength change occurred by hemoglobin detection using fiber optical SPR sensor.

Fig. 7, Saliva collection and processing method.

After collecting saliva, all samples were centrifuged ($9,510 \times g$, 2 min) to remove particulate matter, then clear supernatant were transferred into appropriate test tubes.

Fig. 8, SPR curves measured during the adsorption of Orla91 protein on gold surface.

SPR curves before and after each procedure on a gold surface (1- 9). The change of resonance wavelength of 1.8 nm (624.8 nm-626.6 nm) in (5) and 0.6 nm (624.9 nm- 624.3 nm) in (7) characterizes the amount of Orla91 protein adsorbed, which corresponds to a self-assembled monolayer.

Fig. 9, SPR curves measured during the adsorption of IgG antibody on self-assembled monolayer.

SPR curve before and after IgG immobilization on a gold surface coated with a self-assembled monolayer of Orla91protein (1- 3). The change of resonance wavelength of 0.3 nm (619.6 nm- 619.3 nm) characterizes the amount of IgG antibody adsorbed on self-assembled monolayer.

Fig. 10, SPR trace of hemoglobin binding to sensor surface.

Black solid lines in all graphs indicate the total reaction of resonance wavelength change

associated with hemoglobin detection by using fiber optical SPR sensor immobilized with Orla91 protein. Gray solid lines in all graphs indicate the non-specific reaction of resonance wavelength change associated with hemoglobin detection by using fiber optical SPR sensor immobilized with Orla9 protein. Color solid lines (green, pink, yellow, blue) in all graphs indicate the specific reaction of resonance wavelength change associated with hemoglobin detection.

Fig. 11, Changes in resonance wavelength by hemoglobin detection in time-dependent data.

Color solid lines (green, pink, yellow, blue) indicate the time-dependent data of resonance wavelength change up to 1.5 minutes after starting the reaction.

Fig. 12, Hemoglobin Standard curve.

Color solid lines (red, yellow, blue) represents the standard curve generated in either reaction time (0.5 min, 1.0 min, 1.5 min).

バイオセンサーを用いた唾液ヘモグロビン検出による 歯周病スクリーニング検査法の開発

権 海尚

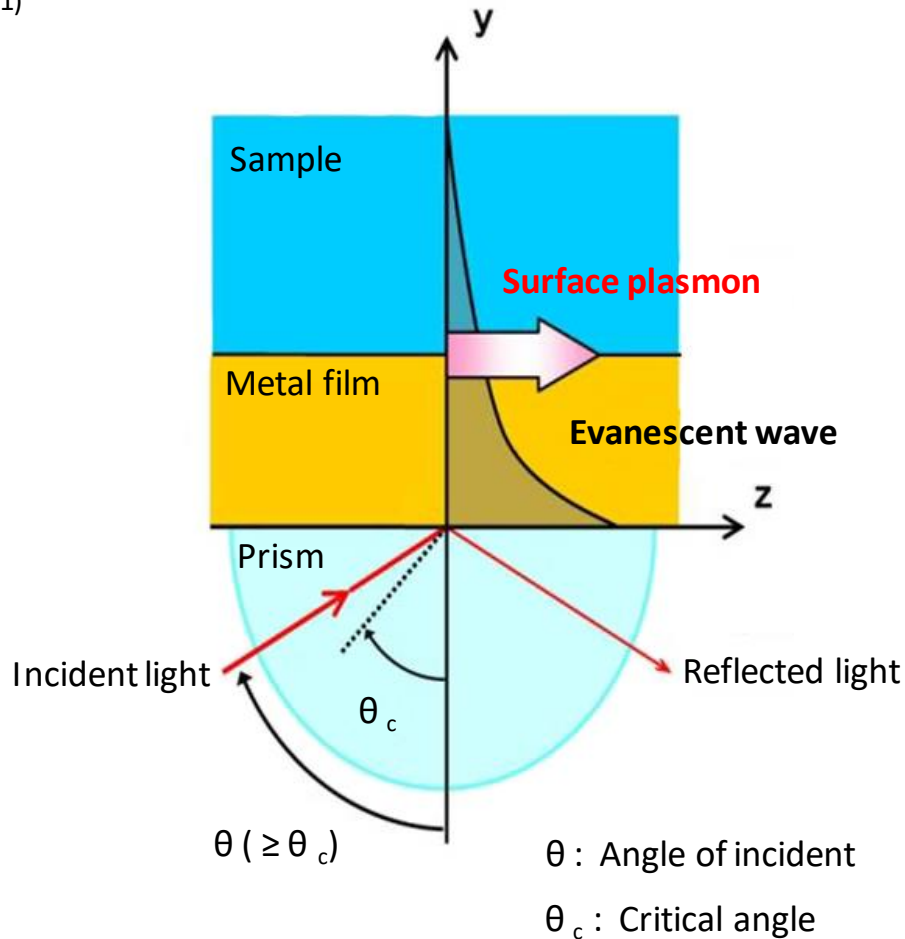
明海大学大学院 歯学研究科

歯学専攻

(指導: 申 基喆 教授)

Figure 1

(1)



(2)

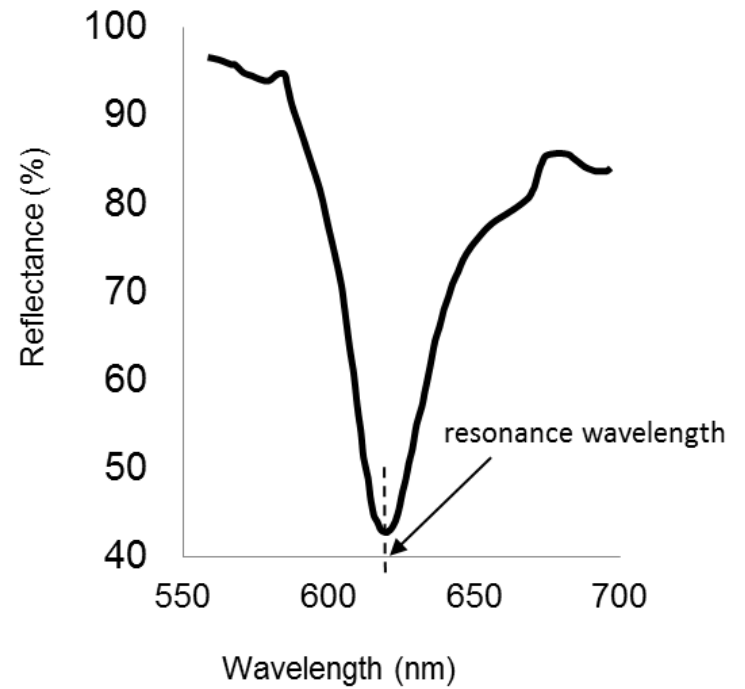
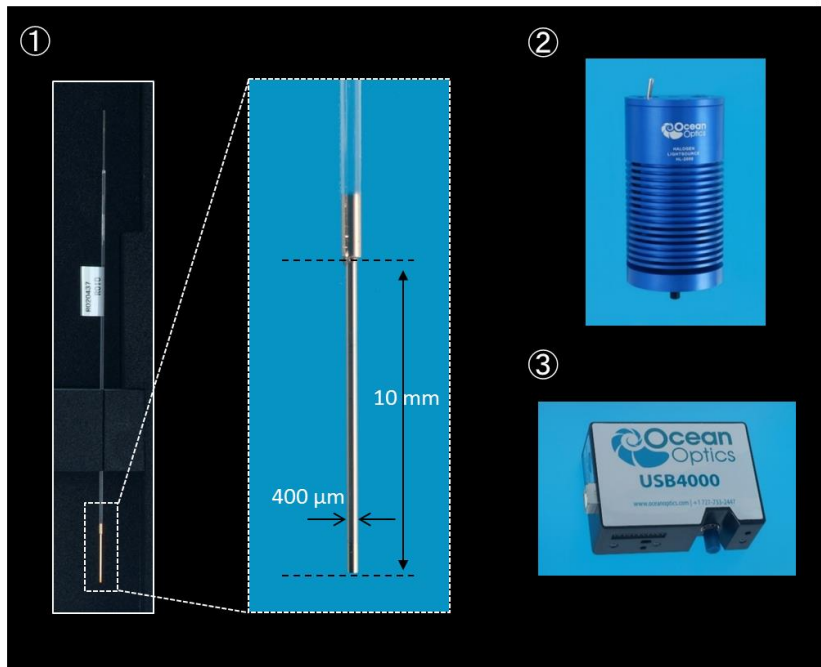
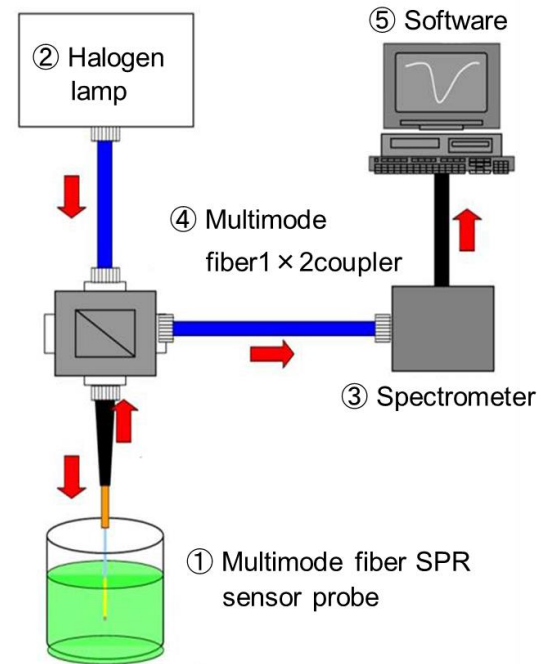


Figure 2

(1)



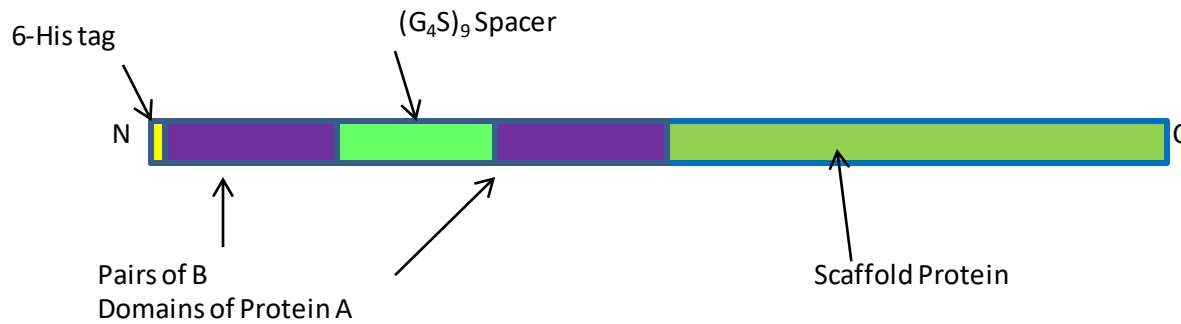
(2)



- ① Multimode fiber SPR sensor probe (SEIKOH GIKEN, Chiba)
- ② Halogen lamp : HL2000 (OCEAN OPTICS, Dunedin, FL)
- ③ Spectrometer : USB4000 (OCEAN OPTICS)
- ④ Optical couple : Multimode fiber 1 × 2 coupler (OCEAN OPTICS)
- ⑤ Software : OPwave+ ver.2.04 (OCEAN OPTICS)

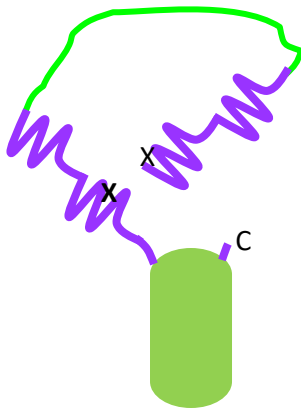
Figure 3

(1)

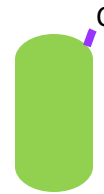


ORLA91 Data:
474 amino acids
50970 molecular weight
5.41 theoretical pI

(2)



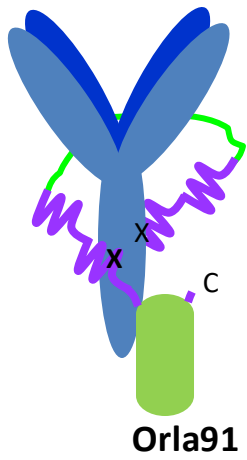
Orla91



Orla9

Figure 4

(1)



(2)

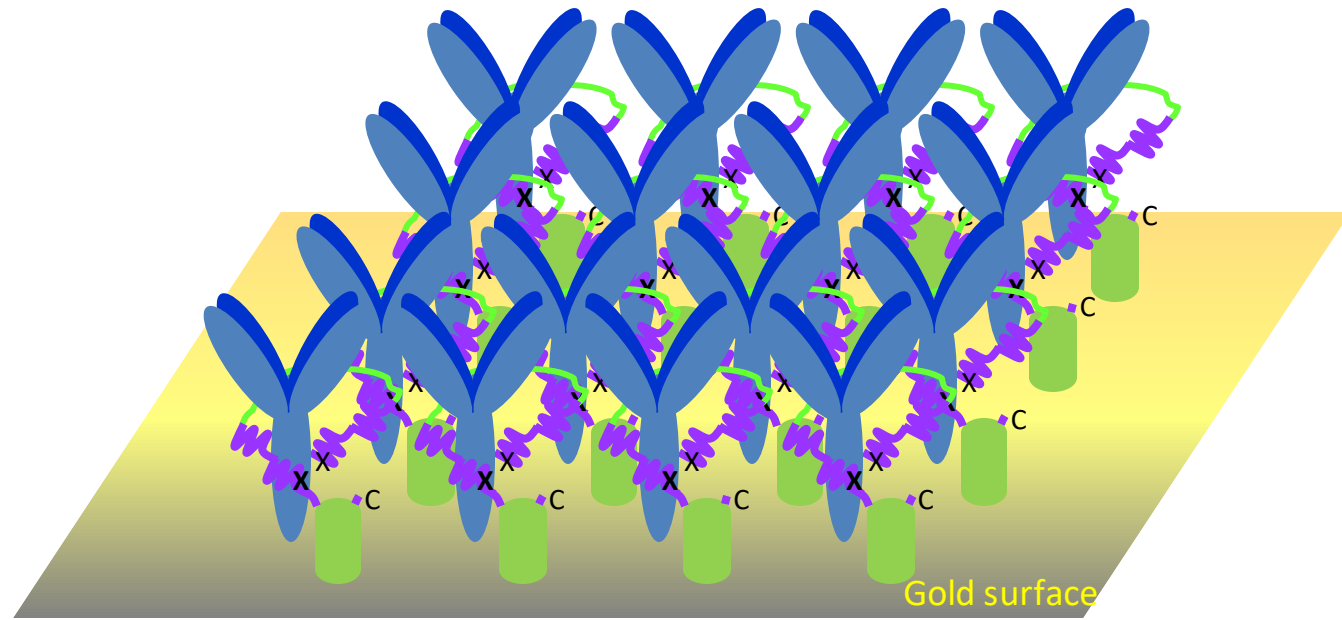


Figure 5

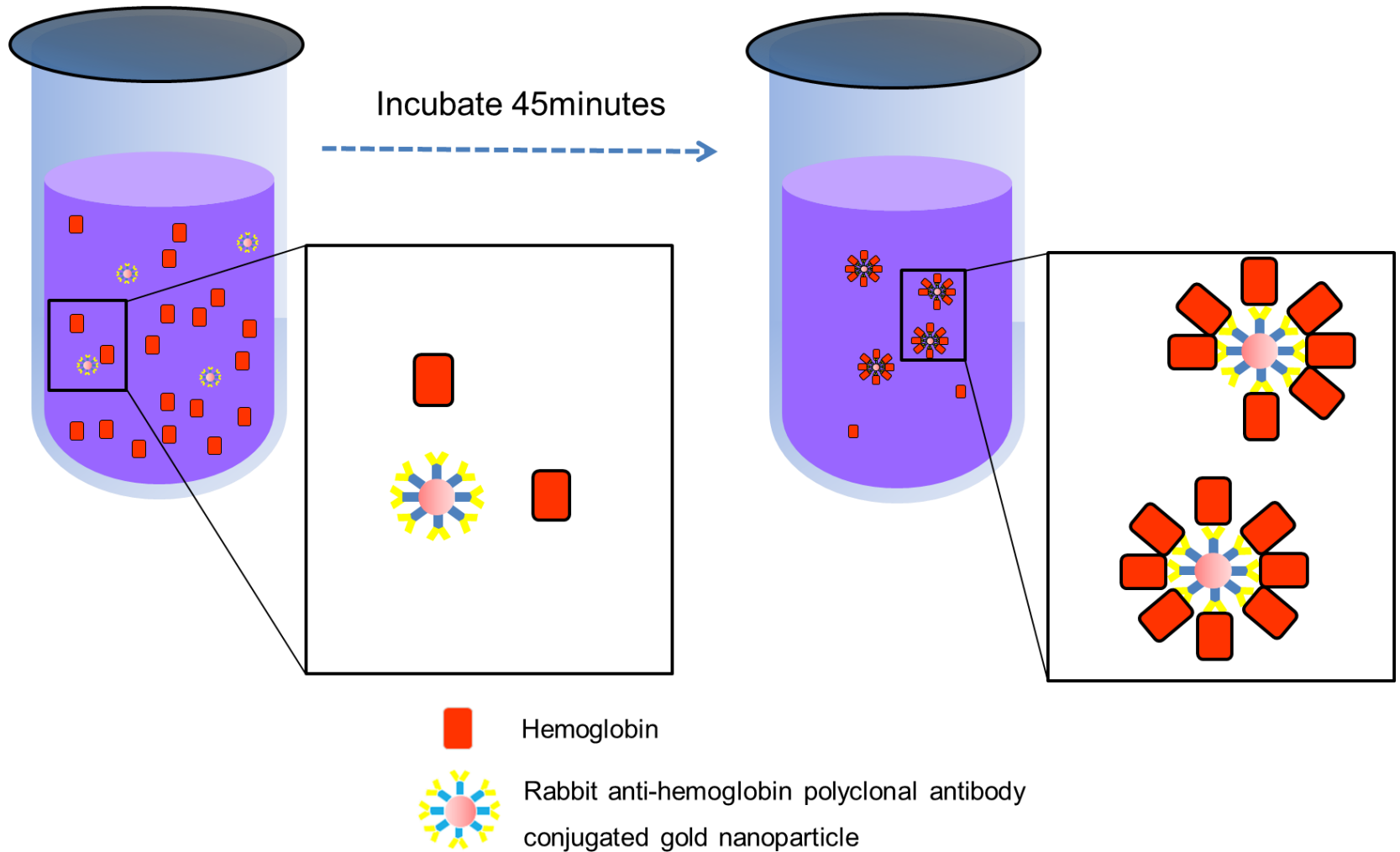


Figure 6

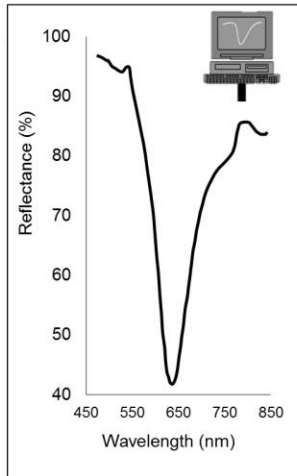
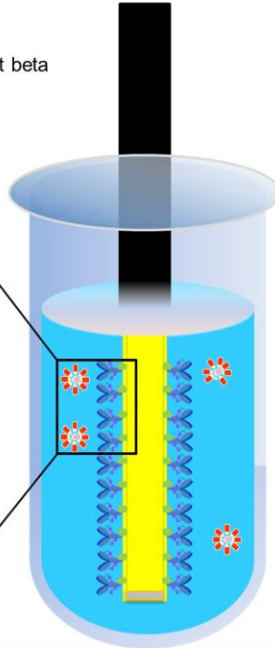
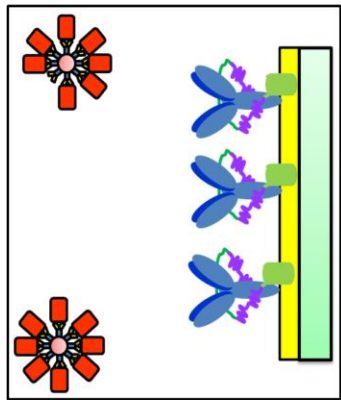


Rabbit anti-hemoglobin polyclonal antibody
conjugated gold nanoparticle and human hemoglobin
immune complex



Mouse anti-human hemoglobin subunit beta
monoclonal antibody

(1)



(2)

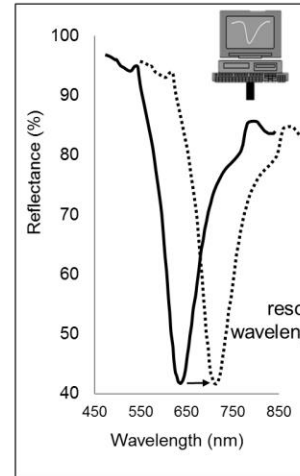
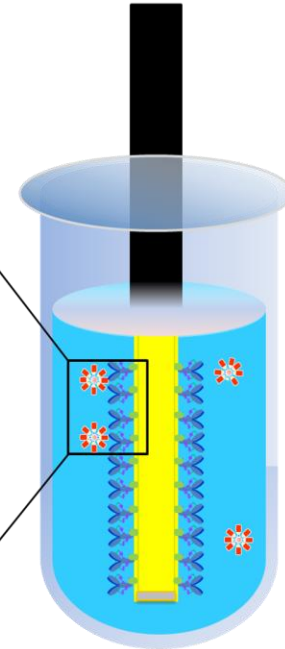
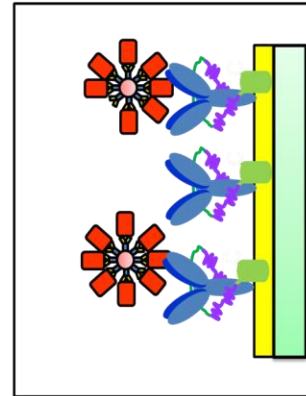


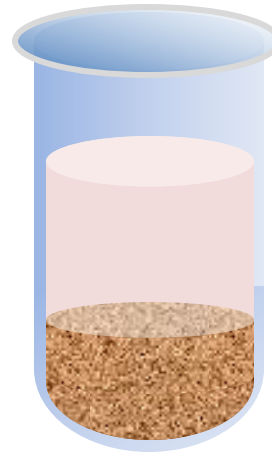
Figure 7



Collect
saliva



Centrifuge
2 minutes,
 $9,510 \times g$



Remove
Precipitation
and
collect the
resulting
supernatant

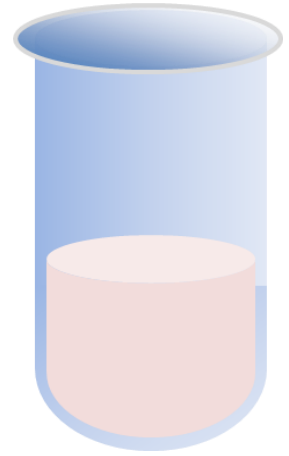
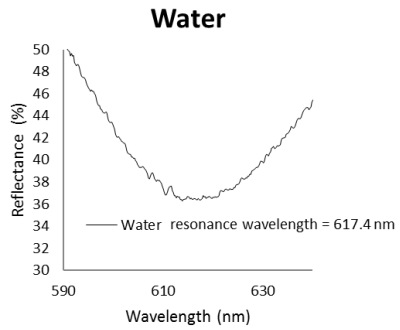
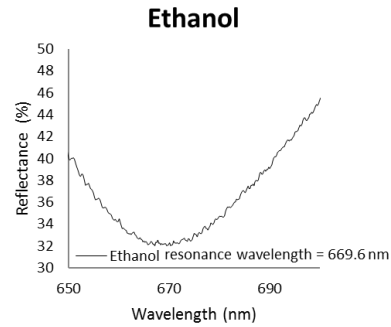


Figure 8

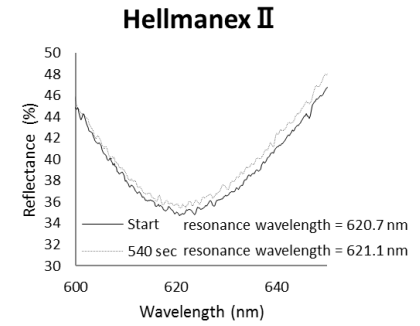
(1)



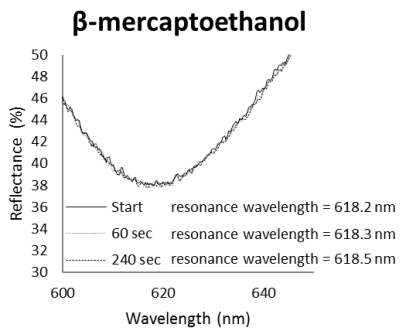
(2)



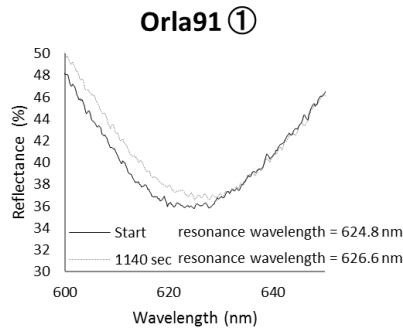
(3)



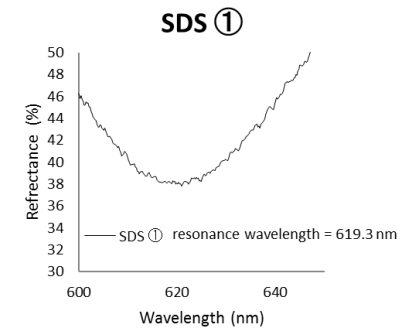
(4)



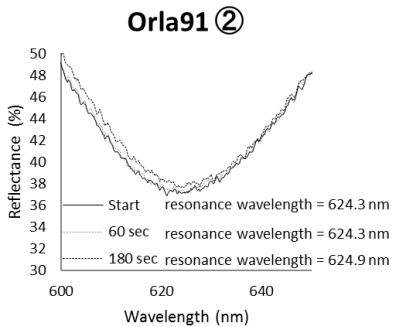
(5)



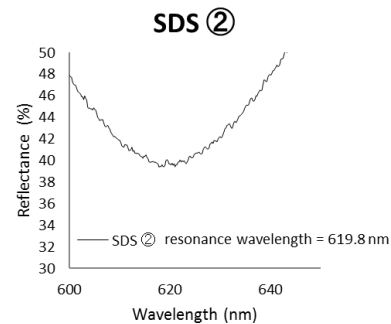
(6)



(7)



(8)



(9)

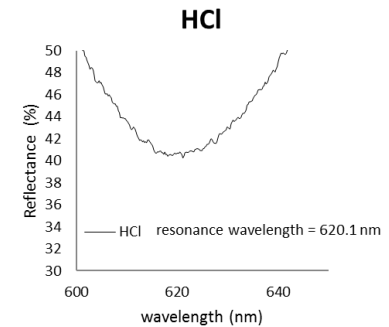
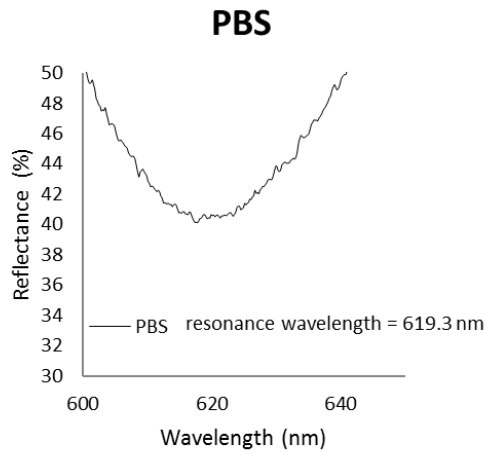
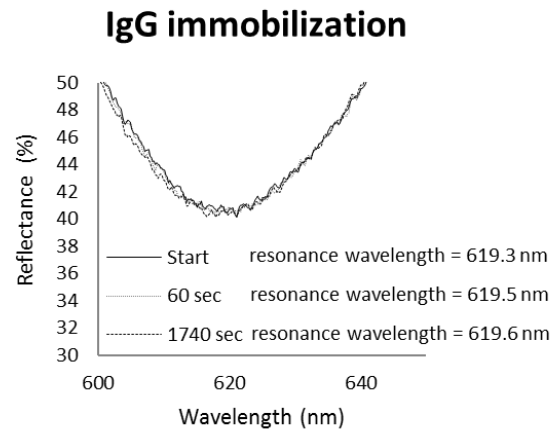


Figure 9

(1)



(2)



(3)

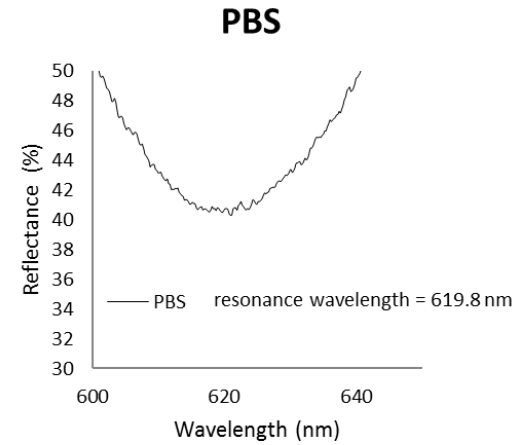


Figure 10

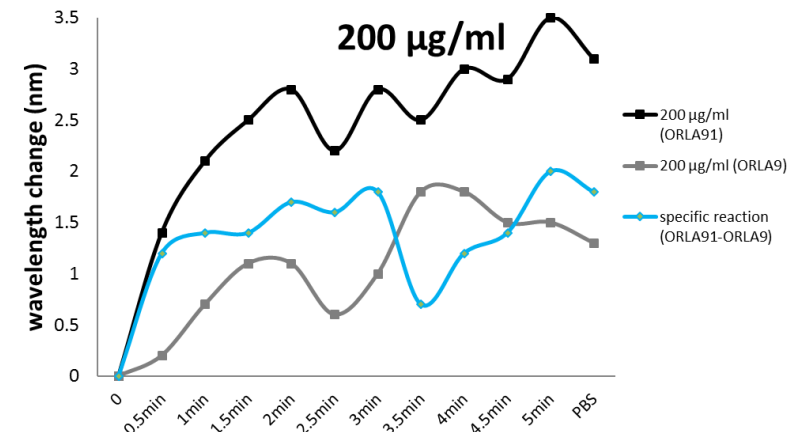
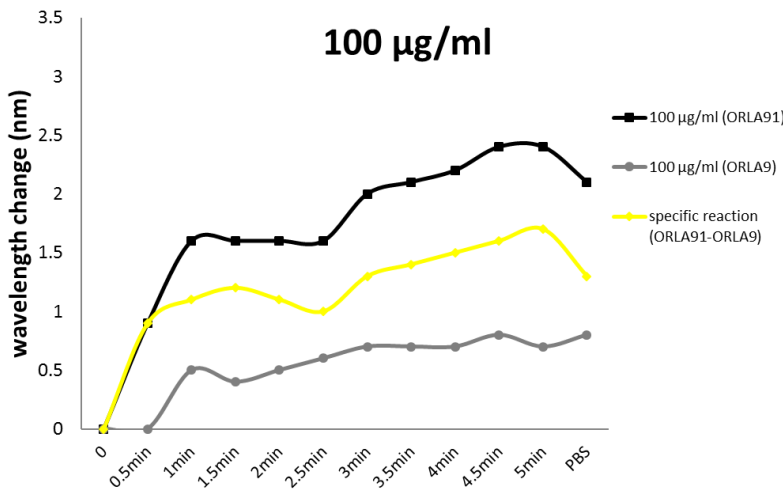
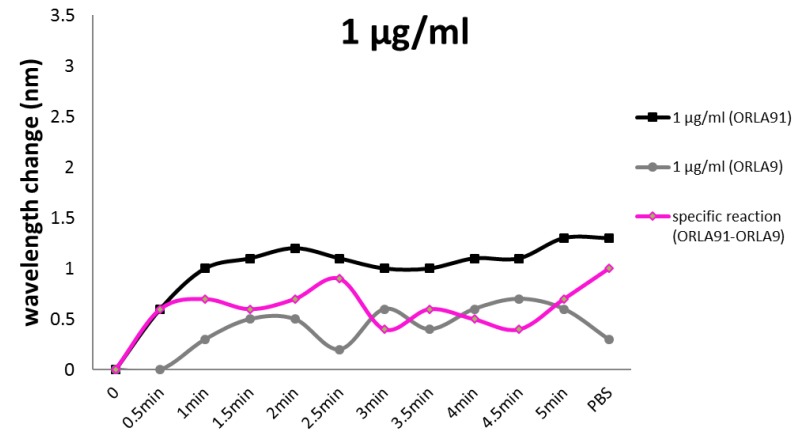
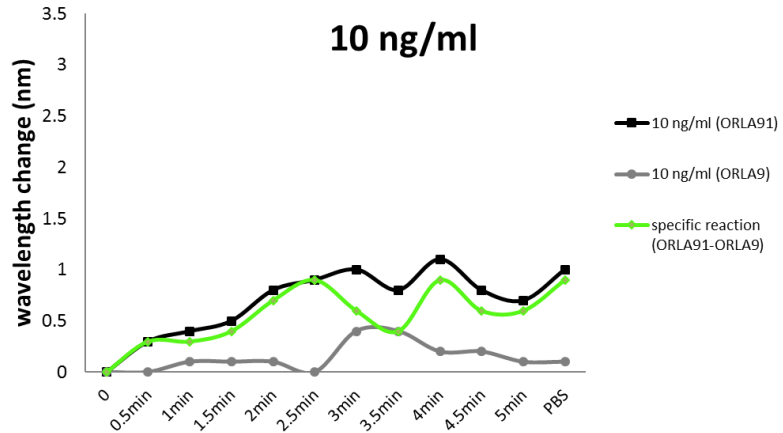


Figure 11

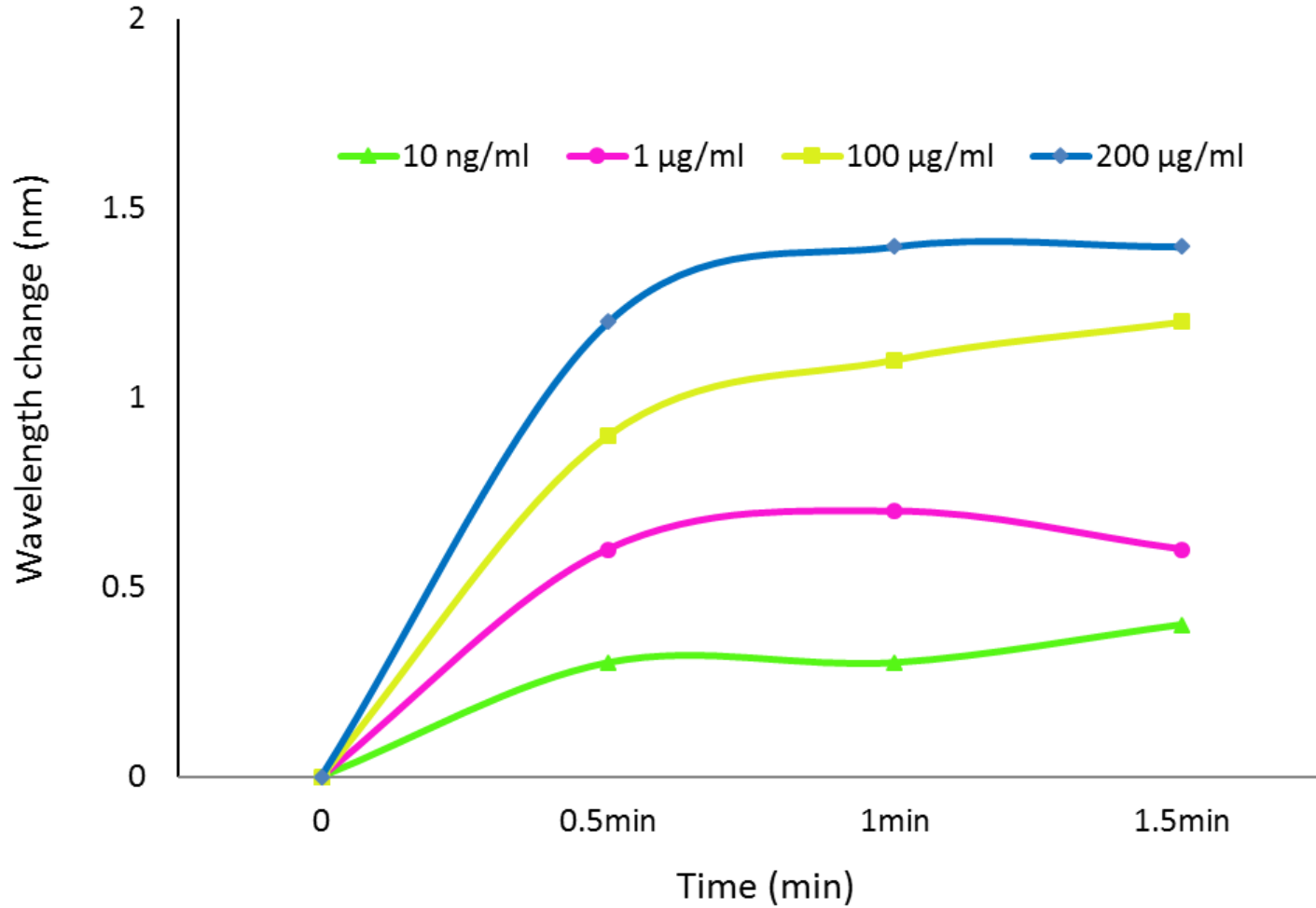


Figure12

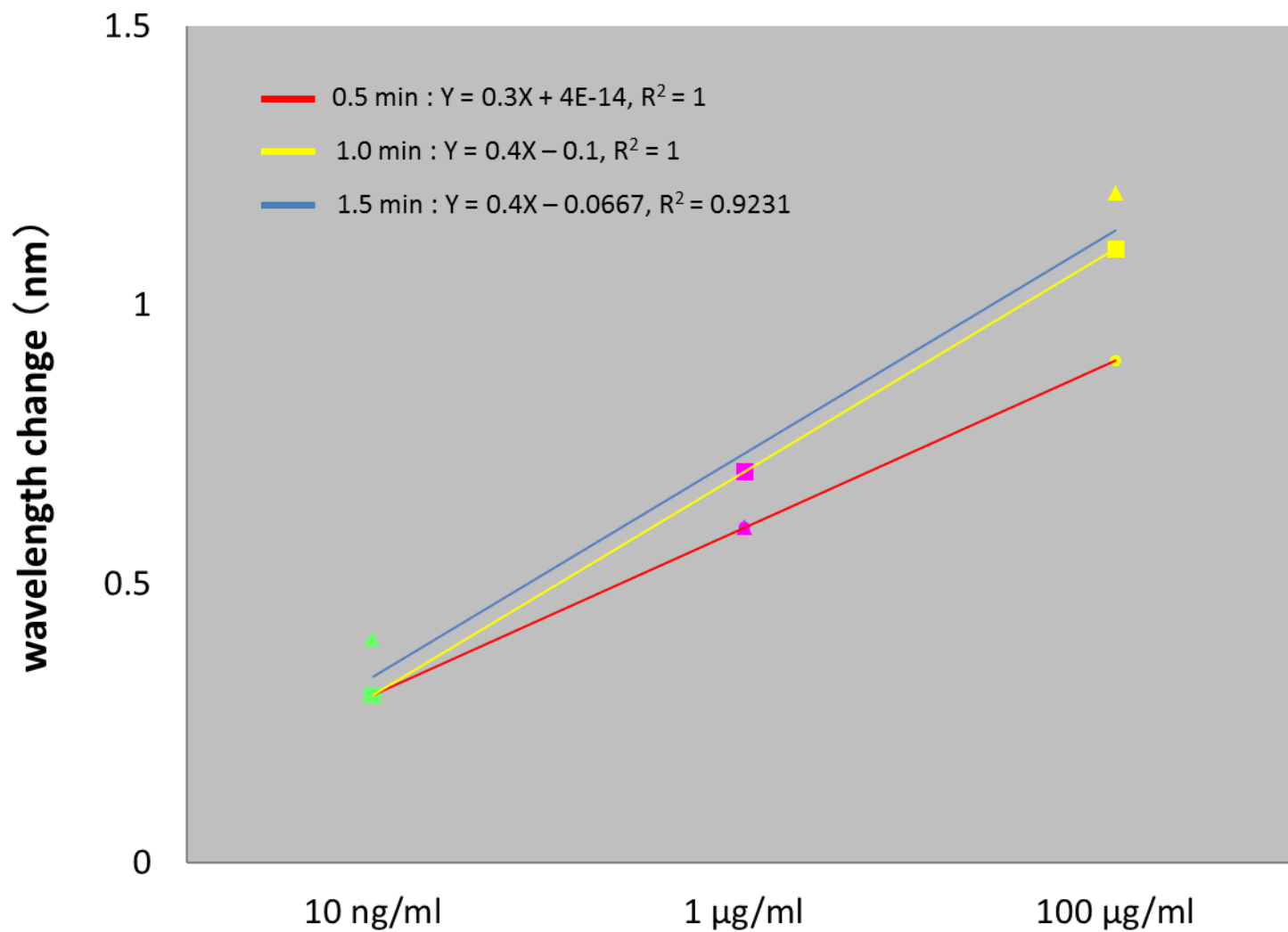


Table1

Table 1. Clinical parameter of healthy subjects and patients with periodontitis.

	Healthy subjects		Patients with periodontitis	
	H1	H2	P1	P2
Age (years)	27	32	52	58
Gender	male	female	male	female
Number of teeth	28	28	17	28
Mean PPD (mm)	1.6	1.7	3.5	3.2
Mean CAL (mm)	1.6	1.7	5.1	3.6
Bleeding on probing (% of site)	0	0	55.9	45.8
Resonance wavelength change by Hemoglobin (nm)	-	-	1.99	1.19

PPD: probing pocket depth, CAL: clinical attachment level