

30TC-am02

歯周病菌遺伝子検出のための三成分同時生物化学発光検出酵素イムノアッセイの検討

○大久保 俊介¹, 伊藤 克敏¹, 五味 恵子², 井上 敏³, 五十嵐 武⁴, 荒川 秀俊¹
(¹昭和薬業, ²キッコーマン, ³チツソ, ⁴昭和薬業)

【目的】歯周病は、歯や口腔の健康のみならず、全身の健康にも悪影響を与える疾患であり、歯周病菌の迅速かつ高感度な分析が必要となる。本研究では、代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa 菌)、*Treponema denticola* (Td 菌) の3種の歯周病菌遺伝子のPCRとイムノアッセイを組み合わせた検出法の検討を行った。イムノアッセイの検出には抗体に標識したイクオリン (Aq)、ビオチン化ルシフェラーゼ (b-Luc)、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の三酵素同時発光検出法を用いた。

【方法】Reverse側にFITC、Forward側にTexas Red、biotin、digoxigeninを修飾した3対のプライマーを用いて歯周病菌遺伝子のMultiplex PCRを行った。その増幅産物を希釈し、抗FITC固相化プレートのウェルに添加し、室温で1時間反応させた。洗浄後、Aq標識抗digoxigenin Fab抗体、ストレプトアビジン/b-Luc複合体、及び、精製した家兎抗Texas Red抗体を用いて新たに調製したHRP標識抗Texas Red Fab抗体を添加し、室温で1時間反応させた。再洗浄後、カルシウム溶液の添加によりAqの発光を測定し、次いでルシフェリン溶液を添加し、b-Lucの発光を測定した。最後にルミノール溶液を添加し、HRPの発光を測定した。

【結果】同時発光法による各酵素の検出感度はAq: 4.7×10^{-19} 、b-luc: 5.3×10^{-18} 、HRP: 4.9×10^{-16} mol/assay、同時再現性は、2.6~10.5%であった。本発光法を用いた三成分同時発光検出酵素イムノアッセイによる歯周病菌遺伝子の検出において、Pg菌、Aa菌は、それぞれHRP、b-lucの発光によりPCR増幅産物の12800倍希釈まで検出可能であった。Td菌は、Aqの発光によりPCR増幅産物の3200倍希釈まで検出可能であった。現在、歯垢からの歯周病菌遺伝子の測定を検討中である。