(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2010-85244
(P2010-85244A)
(43)公開日　平成22年4月15日(2010.4.15)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
G01N 33/531	(2006.01)	G01N 33/531	B	
G01N 33/569	(2006.01)	G01N 33/569	F	

審査請求 未請求　請求項の数 6　ＯＬ　（全 17 頁）

(21)出願番号　特願2008-254653 (P2008-254653)
(22)出願日　平成20年9月30日 (2008.9.30)

(71)出願人　000003034
東亞合成株式会社
東京都港区西新橋１丁目１４番１号
(72)発明者　直江　智子
茨城県つくば市大久保２番　東亞合成株式会社先端科学研究所内
(72)発明者　田中　陽一
愛知県名古屋市港区昭和町１７番地の２３　東亞合成株式会社名古屋工場内
(72)発明者　松尾　克彦
茨城県つくば市大久保２番　東亞合成株式会社先端科学研究所内
(72)発明者　丹羽　幹夫
茨城県つくば市大久保２番　東亞合成株式会社先端科学研究所内

(54)【発明の名称】歯周病原菌の抗原を免疫測定法において高感度化する水性試薬

(57)【要約】

【課題】
免疫測定方法の内、研究、診断の分野で最も幅広くまた数多く用いられているより安価で定量性のある酵素免疫測定法〔Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏ－ｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）〕において、歯周病原菌の抗原測定を高感度化する水性試薬を提供することにある。
【解決手段】
歯周病原菌を緩衝剤、水溶性界面活性剤を含む水性試薬を用いることで歯周病原菌の抗原を免疫測定法において高感度に測定することが可能となる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
緩衝剤、水溶性界面活性剤を含み歯周病原菌の抗原を免疫測定法において高感度化することを特徴とする水性試薬。
【請求項２】
水溶性界面活性剤がノニオン界面活性剤である請求項１の水性試薬。
【請求項３】
ノニオン界面活性剤がポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルである請求項２の水性試薬。
【請求項４】
ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルがポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルである請求項３の水性試薬。
【請求項５】
緩衝剤が２５ｍＭのトリス、１０ｍＭのリン酸、０．１０％乃至１０．０％ｗ/ｖの水溶性界面活性剤を含み歯周病原菌の抗原を免疫測定法において高感度化することを特徴とする請求項１乃至４のいずれか記載の水性試薬。
【請求項６】
ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテルの取り扱い温度として、水溶性を示す室温（１５乃至３０℃）である請求項４または５記載の水性試薬。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、歯周病原菌の抗原を免疫測定法において高感度化する水性試薬に関する。すなわち、本発明は臨床検査技術における試料の感度向上に関するもので有用である。

【背景技術】
【０００２】
歯周病とは、歯の表面につくプラーク、即ち細菌の塊である歯垢によっておこる感染症である。歯肉の腫れ、出血、膿が生じた結果、口臭を伴い、本人以外の周囲の者にも不快な思いをさせる。痛みを伴わないため、放置される場合も多く、最終的に歯が抜け落ちることにもなりかねない。
【０００３】
歯周病原菌は、酸素がないところを好む嫌気性細菌であり、歯周病の悪化と共にその菌数も増加する。歯周病には、多種類の嫌気性細菌が関与しているが、歯肉溝浸出液や唾液等の検体から検出され歯周病原菌の代表と挙げられるのは、ポルフィロモナス・ギンギバリス〔Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ（Ｐ.ｇ.）〕、プレボテーラ・インターメディア〔Ｐｒｅｖｏｔｅｌｌａ ｉｎｔｅｒｍｅｄｉａ（Ｐ.ｉ.）〕及びアクチノバシラス・アクチノミセテムコミタンス〔Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ（Ａ.ａ.）〕である。
【０００４】
歯周病の診断法としては、例えば、レントゲン検査、プラーク付着検査、動揺度検査、歯周ポケットの測定検査、細菌検査等が挙げられる。
【０００５】
歯周病は、歯周病原菌による感染症のため、細菌検査を行うことにより、歯周病の病型がわかる。これにより科学的根拠に基づく歯周病の診断や治療方針の決定、治療後の精度

の高い予後判定の実施が可能となる。

【０００６】

細菌検査を行うために用いる生体試料の内、代表的なものは歯肉溝浸出液あるいは唾液である。いずれも、水分、有機・無機成分、その他歯周病の原因菌を含む約２５０乃至３００種の細菌などの浮遊物質などを含んでいる。この中から歯周病原菌の代表と挙げられるのは、Ｐ.ｇ.、 Ｐ.ｉ.及び Ａ.ａ.（非特許文献１）であり、それらの定量的な測定が必要である。歯周病原菌からの抗原の抽出は、正確、迅速、再現性よく且つ高感度な測定を提供する上で重要である。一般的に生物試料からの抗原の抽出には、超音波、ミキサー、加熱、遠心および凍結融解などの物理的可溶化、可溶化剤、キレート化剤および界面活性剤などによる化学的可溶化が使用されてきた。

【０００７】

特許文献１はポリペプチドおよび抗原の安定化希釈液を開示している。本発明は、水溶液中の安定化が困難であるポリペプチドおよび抗原について、約２乃至８℃、室温および約４５℃の温度における貯蔵安定性を向上させた。安定性がＡ型より悪いとされるＢ型不活性化インフルエンザウイルスにおいて、単純希釈液または市販の希釈液では３日あるいは４日の時点で完全に失われている安定性を、徐々に低下しているものの最大２１日前までの貯蔵を可能とした。本発明における安定化希釈液の構成要素の１つとして、０．０５％乃至０．１％ｖ/ｖの界面活性剤、２％乃至２０％ｖ/ｖの間の血清が含まれていた。しかし、本発明の安定化希釈液に高感度な測定を可能とする記載は見られず、その効果はないと考えられる。

【０００８】

特許文献２は、抽出組成物として界面活性剤を使用する歯周病に随伴する微生物検出用キットおよびその検出方法を開示している。カチオン界面活性剤とアニオン界面活性剤をいずれも０．０５重量％以上含みｐＨ８．０以上に緩衝化された組成物を用いることで、Ｐ.ｇ.、 Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.のすべての血清型から抽出された抗原に対して感度の低下を招くことなく、許容できる程度の低いバックグラウンドシグナルを示す高感度化を可能とした。しかし、Ｐ.ｇ.、 Ｐ.ｉ.の菌数は10^4オーダー以上、Ａ.ａ.では10^6オーダー以上であり、更に少ない菌数での測定可能性についての記載は見られない。歯周病の予防や治療効果を診断するためには、より少ない菌数での測定が必要と考えられる。

【０００９】

特許文献３は、歯周病原菌の検出方法を開示している。Ｐ.ｉ.、Ａ.ａ. の他にトレポネーマ・デンティコーラ〔Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｄｅｎｔｉｃｏｌａ（Ｔ.ｄ.）〕のリアルタイムＰＣＲ法による特異的な定量検出を報告している。モデル系であるプラスミドＤＮＡを用いた実験系においては、測定チューブあたり１０コピーという少数での検出、また、その他１２乃至１４菌種の混在下においても特異的な検出を示した。

【００１０】

また、特許文献４においても歯周病原菌の検出方法が開示されている。Ｐ.ｉ.、Ａ.ａ、Ｔ.ｄ.、Ｐ.ｇ.およびバクテロイデス・フォルシサス〔Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｆｏｒｓｙｔｈｕｓ（Ｂ. ｆ.）〕をインベーダーアッセイ法により可能とした。モデル系であるプラスミドＤＮＡを用いた実験系においては、測定チューブあたり10^3コピーからの検出、また、その他１４菌種の混在下においても特異的な検出を示した。

【００１１】

上記特許文献３、特許文献４は、ヒトの口の中において約２５０乃至３００種存在すると言われる細菌の中から、歯周病原菌を定量するという点において、重要な進歩を示したものである。しかし、いずれにおいてもリアルタイムＰＣＲ装置のような高価な装置が必要なため、当業者実施に制限がかかると言わざるをえない。したがって、より安価で簡便な方法、具体的にはチェアサイドで簡便に菌の検出ができる免疫クロマトグラフィー等の抗原抗体反応を利用した免疫測定法が求められている。

【００１２】

【非特許文献１】Ｊ. Ｃｌｉｎ Ｐｅｒｉｏｄｏｎｔｏｌ.、２８、１１６３－１１７１

、２００１
【特許文献１】特許第３８８４６５２号特許公報
【特許文献２】特公平７－９２４６０号公報
【特許文献３】特開２００７－２２２１３６号公報
【特許文献４】特開２００７－２４４３４９号公報
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
歯周病は、歯周病原菌による感染症のため、細菌検査により、当該歯周病原菌を定量することにより、歯周病の病型がわかり、それに応じた原因除去療法が可能となると考えられている。
【００１４】
しかし、ヒトの口の中において約２５０乃至３００種存在すると言われる細菌の中から歯周病原菌のみを特定し、定量検出することは、上記リアルタイムＰＣＲ装置の使用で可能となるが、それ以外は困難である。
【００１５】
本発明では、このような状況を鑑み、免疫測定法の中でより安価で定量性のある酵素免疫測定法〔Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏ－ｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）〕において、歯周病原菌の代表と挙げられるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.の抗原測定を高感度化する水性試薬を提供することにある。
【課題を解決するための手段】
【００１６】
本発明者らは、上記課題の解決のために、歯周病原菌であるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.のＥＬＩＳＡにおける抗原測定の高感度化を目指して、界面活性剤の種類と濃度の検討を行い、本発明を完成した。
【００１７】
すなわち、本発明は、歯周病原菌であるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.のＥＬＩＳＡにおける抗原測定の高感度化を特徴とする水性試薬を提供する発明である。
【００１８】
緩衝剤及び水溶性ノニオン界面活性剤を含み歯周病原菌であるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.の抗原を免疫測定法において高感度化することを特徴とする水性試薬である。
【発明の効果】
【００１９】
本発明により、歯周病原菌であるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.の抗原を免疫測定法において精度よく、再現性よく、かつ高感度化する水性試薬が提供される。
【００２０】
また、Ｐ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.以外の歯周病原菌、その他の細菌、真菌およびウイルスなどの微生物からの抗原検出を行う際にも同様の効果が期待される。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２１】
本明細書中で用いられる「緩衝剤」とは、酸や塩基を加えてもｐＨの変化が小さく、当業者には公知の組成物である。緩衝剤として、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、グリシン緩衝液、炭酸緩衝液及びトリス緩衝液などが考案され、目的に応じて使用されている。その中でトリス緩衝液及びリン酸緩衝液が好ましい。リン酸緩衝液の種類には、等張溶液である等張リン酸緩衝液〔Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｂｕｆｆｅｒｅｄ Ｓａｌｉｎｅ（ＰＢＳ）〕も挙げられる。トリス緩衝液の種類としては、トリス緩衝液、トリス－塩酸緩衝液及びトリス－マレイン酸緩衝液が挙げられる。好ましい緩衝剤濃度は２Ｍ未満であり、最も好ましい濃度は０．２Ｍ、０．１Ｍ、０．０５Ｍ、０．０２５Ｍ、０．０１Ｍ、０．００５Ｍ、０．００１Ｍ及び０．０００１Ｍである。トリス緩衝液の好ましいｐＨは、７．０乃至９．０を有し、最も好ましいｐＨとして

６．０乃至７．０である。リン酸ナトリウムの好ましいｐＨは、５．８乃至８．０を有し、最も好ましいｐＨとして６．０乃至７．０である。

【００２２】

本明細書中で用いられる「水溶性界面活性剤」とは、油を乳化することが可能であり、潤滑剤として当業者には公知の化合物である。水溶性界面活性剤には、アニオン界面活性剤、ノニオン界面活性剤、両性界面活性剤、カチオン界面活性剤が含まれる。

【００２３】

アニオン界面活性剤は、水浴中で親水基がマイナスの電荷をもつものである。アニオン界面活性剤は、脂肪酸系、直鎖アルキルベンゼン系、高級アルコール系、アルファオレフィン系およびノルマルパラフィン系が挙げられる。使用するのは、いずれも好ましい。脂肪酸系には、脂肪酸ナトリウム、アルファスルホン化脂肪酸エステルナトリウムがある。直鎖アルキルベンゼン系には、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムがある。高級アルコール系には、アルキル硫酸エステルナトリウム、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウムがある。アルファオレフィン系には、アルファオレフィンスルホン酸ナトリウムがある。ノルマルパラフィン系には、アルキルスルホン酸ナトリウムがある。所望であれば、アニオン界面活性剤の混合物の使用も可能である。

【００２４】

ノニオン界面活性剤は、親水部が非電解質、つまりイオン化しない親水性部分を持つものである。ノニオン界面活性剤は、アルキルフェノール系、脂肪酸系および高級アルコール系などが挙げられる。アルキルフェノール系には、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルがある。 脂肪酸系には蔗糖脂肪酸塩エステル、ソルビタン脂肪酸エステル 、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びポリオキシエチレン脂肪酸エステルがある。高級アルコール系にはポリオキシエチレンアルキルエーテルがある。好ましいノニオン界面活性剤は、アルキルフェノール系、脂肪酸系であり、その中で最も好ましいものはアルキルフェノール系であるポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（商品名：ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）である。所望であれば、ノニオン界面活性剤の混合物の使用も可能である。

【００２５】

両性界面活性剤は、親水基にプラスとマイナスの両方の電荷をもっているものである。水溶液が酸性の場合はプラス、アルカリ性ではマイナスに帯電する。両性界面活性剤は、アミノ酸系、ベタイン系及びアミンオキシド系などが挙げられる。使用するのは、いずれも好ましい。アミノ酸系には、アルキルアミノ脂肪酸ナトリウムがある。ベタイン系には、アルキルベタインがある。アミンオキシド系には、アルキルアミンオキシドがある。所望であれば、両性界面活性剤の混合物の使用も可能である。

【００２６】

カチオン界面活性剤は、水浴中で親水基がプラスの電荷をもっているものである。カチオン界面活性剤においては、第四級アンモニウム塩系が挙げられる。使用するのは、いずれも好ましい。第四級アンモニウム塩系には、アルキルトリメチルアンモニウム塩、ジアルキルジメチルアンモニウム塩がある。所望であれば、カチオン界面活性剤の混合物の使用も可能である。

【００２７】

水溶性界面活性剤の好ましい量は、０．１０％乃至２０．０％ｗ/ｖである。最も好ましい量は、本発明の水性試薬を室温（１５℃乃至３０℃）で調製可能な０．１０％乃至１０．０％ｗ/ｖである。

【００２８】

本明細書中で用いられる「歯周病原菌」とは、歯周病の発症に関与することが報告されている細菌を示す。Ｐ.ｇ.、Ｐ.ｉ.、Ａ.ａ.、フソバクテリウム・ヌクレアトゥム〔Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ（Ｆ.ｎ.）〕、オイコネラ・コロデンス〔Ｅｉｋｅｎｅｌｌａ ｃｏｒｒｏｄｅｎｓ（Ｅ.ｃ.）〕、キャプノサイトファーガ・オクラセア〔Ｃａｐｎｏｃｙｔｏｐｈａｇａ ｏｃｈｒａｃｅａ（Ｃ．ｏ．）〕、Ｂ．ｆ．及

びＴ．ｄ．などのグラム陰性菌が挙げられるがそれらに限定されるものではない。好ましい歯周病原菌は、その代表として挙げられるＰ.ｇ.、Ｐ.ｉ.及びＡ.ａ.であり、最も好ましい歯周病原菌は、Ｐ．ｇ．（血清型Ａ）、Ｐ．ｉ．（血清型Ａ）及びＡ．ａ．（血清型Ｃ）である。

【００２９】

本明細書中で用いられる「抗原」とは、抗原性タンパク質、炭水化物、糖類、毒物類、レクチン類、酵素類、多糖類、糖脂質類、抗体類、核酸類、アミノ酸類、ペプチド類、ポリペプチド類、糖タンパク質類などが挙げられるがそれらに限定されるものではない。好ましい抗原は、歯周病原因菌に対して特異的な抗原となりうるグラム陰性菌の外膜に存在する外膜タンパク質であり、最も好ましい抗原はリポ多糖（Ｄｅｎｔ．Ｒｅｓ．，７３，３，６６１－６７０，１９９４）である。リポ多糖は、グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり 、脂質及び多糖から構成される物質を示す。

【００３０】

抗原を抽出する生物試料としては、ヒトあるいは動物の全血、血漿、血清、リンパ液、胆汁、尿、髄液、精液、膣分泌液、喀痰、汗、便、組織流体調製物、歯周組織、歯垢、歯肉溝浸出液及び唾液などが挙げられるがそれらに限定されるものではない。最も好ましい生物試料は、歯肉溝浸出液あるいは唾液である。

【００３１】

本発明の上記構成成分以外に、必要に応じて、例えば、その長期保存性を持たせるために「牛血清アルブミン〔Ｂｏｖｉｎｅ Ｓｅｒｕｍ Ａｌｂｕｍｉｎ（ＢＳＡ）〕」を添加することも可能である。ＢＳＡとは、血清中に約５０％占められている血清タンパク質である。最も好ましい牛血清アルブミンは、シグマ社のＡ４５０３である。

【００３２】

最も好ましい実施態様において、本発明の水性試薬は、０．１０％乃至１０．０％ｗ/ｖのＴｒｉｔｏｎＸ－１００を含む２５ｍＭトリス－塩酸 ｐＨ７．０、この水性試薬を生物試料に対して１００倍量添加し、攪拌器、好ましくはボルテックスミキサーにて１０秒以上攪拌する。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００の濃度は、生物試料に対して１００倍量添加する際のものである。この時点における好ましいｐＨは、４．７乃至９．０であり、最も好ましいｐＨは６．０乃至７．０である。そして、生物試料を含む水性試薬と等量の１．０％ｗ/ｖのＢＳＡを含むＰＢＳ ｐＨ７．０を添加し、再度、攪拌器、好ましくはボルテックスミキサーにて１０秒以上攪拌する。この時点における好ましいｐＨは６．０乃至９．０であり、最も好ましいｐＨは６．０乃至７．０である。以上の処理を実施したものを、免疫測定法での測定試料とする。

【００３３】

本明細書中で用いられる「免疫測定方法」とは、生物試料中の抗原に対するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体とを反応させることによる抗原抗体反応を利用したものであり、その結果生じた反応生成物について光学的、またはその他の方法により測定する測定方法を示す。具体的には例えばＥＬＩＳＡ法、免疫比濁法、免疫比ろう法、免疫拡散法（ＳＲＩＤ法）、免疫クロマトグラフィー等が挙げられる。最も好ましいとされる免疫測定方法は、臨床診断の分野では、最も幅広くまた数多く用いられているＥＬＩＳＡ法である。

【００３４】

ＥＬＩＳＡ法における実施に有用な抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体である。これら抗体は、Ｐ．ｇ．、Ｐ．ｉ．及びＡ．ａ．の全菌体を用い、当業者において標準的な操作により取得できる。本発明は、歯周病原菌の抗原に対する特異的な抗体が供給できた後に実施可能となる。そして、抗原と抗体が検出可能な免疫複合体を形成することによって実施される。この複合体形成は、各種方法により達成できる。「サンドイッチ」アッセイが最も好ましいが、本発明は特定の方法に限定されるものではない。

【００３５】

抗体を感作する固相は、タンパク質を物理的に吸着する性質を有するものであればいず

れでも可能である。最も好ましい態様は、マイクロプレートであり、ＥＬＩＳＡ法において用いられるものであれば、特に限定されるものではない。マイクロプレートの材質は、例えばポリスチレン、ポリ塩化ビニルが好ましい。

【００３６】

本発明の好ましい態様は、歯周病原菌の各種抗原に対してエピトープ部位が異なる２つの抗体を用いることである。１つの抗体はマイクロプレートに感作し固定化する。もう１つの抗体は、検出可能に標識されている。標識としては、限定されるものではないが、酵素、アビジン、ビオチン、放射性同位体、蛍光体及び発色体が挙げられる。最も好ましい標識は酵素であり、例えば、ペルオキシダーゼ〔Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（ＰＯＤ）〕、アルカリホスファターゼ〔Ａｌｋａｌｉｎｅ Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ（ＡＬＰ）〕、ホースラディッシュペルオキシダーゼ〔Ｈｏｒｓｅ Ｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ（ＨＲＰ）〕等が挙げられる。各々の酵素に合わせた発色基質剤を添加し所定の反応条件で反応させる。最終的な検出法は、酵素の発色法によるか、あるいは蛍光法によるかを選択して測定する。発色あるいは蛍光の強さは、試料中の抗原濃度に比例するため、測定する際は、標準試料を同時に測定して、標準曲線を作成することで抗原濃度、本発明においては菌数の算出を行う。

【００３７】

本明細書中で用いられる「高感度」とは、歯周病原菌の菌数として極めて微少、具体的には数10^3オーダーでの免疫測定法における測定が可能なことを示す。

【実施例】

【００３８】

実施例１：モノクローナル抗体の取得とＥＬＩＳＡの条件決定

モノクローナル抗体取得の為の免疫原として、Ｐ．ｇ．（血清型Ａ）はＡＴＣＣ３３２７７、Ｐ．ｉ．（血清型Ａ）はＡＴＣＣ２５６１１、Ａ．ａ．（血清型Ｃ）はＡＴＣＣ３３３８４ の全菌体を用いた。ミエローマ細胞はＮＳ－１、ＳＰ２を用いて細胞融合を行い、上記菌液にて感作したマイクロプレートを用いてスクリーニングを行い、それぞれ複数個の抗体産生ハイブリドーマを得た。これらを組み合わせてＥＬＩＳＡの条件を決め、歯周病原菌以外の口腔内細菌とは交差反応が生じない測定系を開発した。

【００３９】

取得した抗体産生ハイブリドーマの内、それぞれ最良の反応性を示した固相抗体とビオチン標識化抗体の組み合わせを選出した。それらを表１に示す。

【００４０】

【表１】

	固相抗体	ビオチン標識化抗体
	クローン名	クローン名
Ｐ．ｇ．	Ｇ２	Ｇ１８
Ｐ．ｉ．	Ｉ６	Ｉ４
Ａ．ａ．	Ａ４０	Ａ３８

【００４１】

ＥＬＩＳＡの条件を下記に示す。

（１）１次反応

抗体を感作したマイクロプレート（Ｔｈｅｒｍｏ ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＣ社 ＮＯ．９５０２９１８０）に、本発明の水性試薬で処理した歯周病原菌を含む測定用試料をウエルあたり１００μＬ分注し、低温（４乃至１０℃）にて１晩（１５乃至２６時間）反応させた

。
（２）２次反応
プレートを洗浄液（０．０５％ｗ／ｖのＴｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ）で６回洗浄し、ビオチン標識化抗体を適当な濃度となるように１．０％ｗ／ｖのＢＳＡを含むＰＢＳで希釈したものを１００μＬ分注し、室温（１５乃至３０℃）にて１時間反応させた。
（３）３次反応
プレートを洗浄液で６回洗浄し、１．０％ｗ／ｖのＢＳＡを含むＰＢＳによりＰ．ｇ．、Ｐ．ｉ．は６，０００倍希釈、Ａ．ａ．は４，０００倍に希釈したストレプトアビジン-ＰＯＤ（ＤＡＫＯ社 Ｎｏ．Ｐ０３９７）を１００μＬ分注し、室温（１５乃至３０℃）にて１時間反応させた。ストレプトアビジン-ＰＯＤは、上記よりも濃い濃度でも問題なく使用できた。
（４）酵素基質反応
プレートを洗浄液で８回洗浄し、ＴＭＢ$^{+}$(ＤＡＫＯ社 Ｓ－１５９９)を１００μＬ分注し、室温（１５乃至３０℃）にて３０分反応させた。
（５）反応停止、吸光度測定
２Ｎ硫酸を１００μＬ分注し、反応を停止した。直後にプレートリーダーにて４５０ｎｍ-６５０ｎｍの吸光度値を測定した。
【００４２】
実施例２：Ｐ．ｇ．における界面活性剤の選定
３種類の界面活性剤、具体的には、ノニオン界面活性剤であるＴｒｉｔｏｎＸ－１００、Ｔｗｅｅｎ－２０、カチオン界面活性剤である塩化ベンザルコニウムを用い、高感度化における効果を調べた。
【００４３】
実験方法を下記に示す。２×１０^{9}個／ｍＬの菌数にＰＢＳで調整し、そこから３０μＬ用いた。１．０％ｗ／ｖ及び０．１％ｗ／ｖの各界面活性剤を２５ｍＭトリス-塩酸 ｐＨ７．０に溶解したものを処理液とした。試料３０μＬに、各処理液５７０μＬを加えボルテックスで１０秒以上撹拌し、１０分間放置し、更に２．０％ｗ／ｖのＢＳＡを含むＰＢＳにて１０倍希釈したものをＥＬＩＳＡでの測定試料とした。用いた界面活性剤および処理温度を表２に示す。実験結果を表３に示す。０．１％ｗ／ｖの塩化ベンザルコニムの場合を除き、いずれの界面活性剤においても、歯周病原菌なしであるブランクと歯周病原菌を１×１０^{7}個／ｍＬの菌数含むものとの発色の差が界面活性剤無処理の場合と比較して顕著となった。効果としては、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、続いてＴｗｅｅｎ２０と塩化ベンザルコニムであった。Ｔｗｅｅｎ２０と塩化ベンザルコニムは同等の効果であった。
【００４４】
【表２】

界面活性剤の種類	処理温度
Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００	室温（１５乃至３０ ℃）
Ｔｗｅｅｎ２０	９５℃
塩化ベンザルコニウム	９５℃
無	室温（１５乃至３０ ℃）

【００４５】

【表３】

		界面活性剤濃度		界面活性剤濃度	
		０．１（％）（ｗ／ｖ）		１．０（％）（ｗ／ｖ）	
界面活性剤の種類	菌液濃度（個／ｍＬ）	吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	ブランクとの差	吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	ブランクとの差
ＴｒｉｔｏｎＸ－１００	ブランク	0.031		0.043	
	１×１０^{7}	2.168	2.142	2.836	2.798
Ｔｗｅｅｎ２０	ブランク	0.028		0.043	
	１×１０^{7}	0.589	0.563	0.756	0.718
塩化ベンザルコニウム	ブランク	0.028		0.018	
	１×１０^{7}	0.293	0.267	1.062	1.024
無	ブランク	0.027		0.027	
	１×１０^{7}	0.313	0.287	0.313	0.287

＊　ブランクは菌なし

【００４６】
実施例３：Ｐ．ｇ．、Ｐ．ｉ．及びＡ．ａ．におけるＴｒｉｔｏｎＸ－１００の測定下限菌数と定量性の確認
実施例２で最良の効果を示したＴｒｉｔｏｎＸ－１００を用いて検討を行った。
【００４７】
実験方法を下記に示す。
（１）試料の希釈
処理液：２．０％ｗ／ｖのＴｒｉｔｏｎＸ－１００、０．１％ｗ／ｖのNaN_3を含む２５ｍＭ トリス-塩酸 ｐＨ７．０を０．４５μｍのフィルターでろ過したもの。
希釈液：１．０％ｗ／ｖのＢＳＡ、０．１％ｗ／ｖのNaN_3を含むＰＢＳを０．４５μｍのフィルターでろ過したもの。
Ｐ．ｇ．：２０,６２８個／ｍＬ 、Ｐ．ｉ．：２,３６２個／ｍＬ、Ａ．ａ．：２,３４８７個／ｍＬに調整した試料を、上記の処理液と希釈液の等量混合液により、１／６、２／６、３／６、 ４／６、 ５／６、 １倍としたものを作製し、吸光度値（ＯＤ４５０ｎｍ－６５０ｎｍ）を測定した。それぞれｎ＝６で測定し、標準試料による検量線を用いて歯周病原菌数を算出した。
（２）検出限界の算出
下記により算出した。
検出限界＝（ｍ－２ＳＤ）－（ブランクのｍ＋２ＳＤ）＞０ となる範囲
ｍ：各測定値の平均値、 ＳＤ：標準偏差、ブランク：歯周病原菌なし
（３）測定可能な下限菌数の算出
下記により算出した。
測定可能な下限菌数＝各々の測定値が希釈倍に応じて算出される理論値の１００％±１５％以内に収まる範囲、且つＣＶ（変動係数）が１０％以内に収まる範囲
【００４８】
検出限界と測定下限菌数の算出を行った結果、Ｐ．ｇ．：検出限界が４，０００個／ｍＬ、測定下限が８，０００個／ｍＬ、Ｐ．ｉ．：検出限界、測定下限いずれも４００個／ｍＬ、Ａ．ａ．：検出限界が４，０００個／ｍＬ、測定下限が１２，０００個／ｍＬであ

った。Ａ．ａ．は更なる改善が必要と思われるが、これはビオチン標識化抗体濃度やストレプトアビジン-ＰＯＤの濃度を更に調整することにより可能である。Ｐ．ｉ．の測定下限は４００個／ｍＬと十分高感度であることが示された。また、希釈試験の結果から、定量的な測定に問題がないことも確認された。結果を表４、表５及び表６に示す。

【００４９】

【表４】

P.g. $OD_{450nm-650nm}$	ブランク	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	0.013	0.019	0.024	0.028	0.031	0.035	0.039
2	0.013	0.020	0.024	0.028	0.032	0.035	0.040
3	0.014	0.019	0.023	0.028	0.033	0.035	0.040
4	0.014	0.020	0.024	0.029	0.033	0.037	0.040
5	0.016	0.020	0.023	0.028	0.033	0.037	0.040
6	0.014	0.020	0.023	0.027	0.030	0.036	0.039
m	0.0140	0.0197	0.0235	0.0280	0.0320	0.0358	0.0397
SD	0.0011	0.0005	0.0005	0.0006	0.0013	0.0010	0.0005
CV（%）	7.8	2.6	2.3	2.3	4.0	2.7	1.3
m±2SD	0.0162	0.0186	0.0224	0.0267	0.0295	0.0339	0.0386
(m-2SD)-(ブランクのm+2SD)		0.0024	0.0062	0.0105	0.0133	0.0177	0.0224

P.g.菌数（個/mL）	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	4035	8178	11430	13835	16998	20113
2	4871	8178	11430	14630	16998	20885
3	4035	7356	11430	15422	16998	20885
4	4871	8178	12235	15422	18561	20885
5	4871	7356	11430	15422	18561	20885
6	4871	7356	10622	13036	17781	20113
m	4592	7767	11429	14628	17650	20628
SD	431	450	510	1006	769	398
CV(%)	9.4	5.8	4.5	6.9	4.4	1.9
理論値	3438	6876	10314	13752	17190	20628
m/理論値	133.6%	113.0%	110.8%	106.4%	102.7%	100.0%

ｍ：各測定値の平均値、ＳＤ：標準偏差、ブランク：歯周病原菌なし、ＣＶ：変動係数

【００５０】

【表５】

P. i . $OD_{450nm-650nm}$	ブランク	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	0.010	0.015	0.018	0.023	0.028	0.033	0.038
2	0.010	0.014	0.017	0.022	0.028	0.032	0.037
3	0.010	0.015	0.018	0.024	0.027	0.032	0.037
4	0.010	0.015	0.018	0.023	0.029	0.032	0.036
5	0.011	0.015	0.018	0.023	0.028	0.034	0.038
6	0.011	0.015	0.018	0.022	0.028	0.033	0.040
m	0.0103	0.0148	0.0178	0.0228	0.0280	0.0327	0.0377
SD	0.0005	0.0004	0.0004	0.0008	0.0006	0.0008	0.0014
CV（%）	5.0	2.8	2.3	3.3	2.3	2.5	3.6
m±2SD	0.0114	0.0140	0.0170	0.0213	0.0267	0.0310	0.0349
(m-2SD)-(ブランクのm+2SD)		0.0027	0.0057	0.0100	0.0154	0.0197	0.0236

P. i . 菌数（個/mL）	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	454	735	1181	1603	2004	2388
2	357	642	1094	1603	1926	2313
3	454	735	1267	1520	1926	2313
4	454	735	1181	1685	1926	2237
5	454	735	1181	1603	2083	2388
6	454	735	1094	1603	2004	2537
m	438	719	1166	1603	1978	2362
SD	39	38	65	52	64	102
CV(%)	9.0	5.3	5.6	3.2	3.2	4.3
理論値	394	787	1181	1575	1969	2362
m/理論値	111.1%	91.4%	98.7%	101.8%	100.5%	100.0%

ｍ：各測定値の平均値、ＳＤ：標準偏差、ブランク：歯周病原菌なし、ＣＶ：変動係数

【００５１】

【表６】

A．a．$OD_{450nm-650nm}$	ブランク	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	0.010	0.014	0.018	0.023	0.025	0.029	0.034
2	0.010	0.014	0.017	0.021	0.025	0.028	0.034
3	0.011	0.014	0.017	0.022	0.025	0.029	0.034
4	0.011	0.014	0.017	0.022	0.026	0.028	0.034
5	0.011	0.014	0.016	0.021	0.026	0.028	0.033
6	0.011	0.014	0.018	0.022	0.025	0.029	0.034
m	0.011	0.014	0.017	0.022	0.025	0.029	0.034
SD	0.0005	0.0000	0.0008	0.0008	0.0005	0.0005	0.0004
CV（%）	4.8	0.0	4.4	3.4	2.0	1.9	1.2
m±2SD	0.0117	0.0140	0.0157	0.0203	0.0243	0.0274	0.0330
(m-2SD)-(ブランクのm+2SD)		0.0023	0.0040	0.0086	0.0126	0.0157	0.0213

A．a．菌数（個/mL）	×1/6	×2/6	×3/6	×4/6	×5/6	×1
1	3786	7946	13004	14987	18886	23644
2	3786	6915	10999	14987	17919	23644
3	3786	6915	12004	14987	18886	23644
4	3786	6915	12004	15970	17919	23644
5	3786	5879	10999	15970	17919	22703
6	3786	7946	12004	14987	18886	23644
m	3786	7086	11836	15315	18403	23487
SD	0	777	755	508	530	384
CV(%)	0.0	11.0	6.4	3.3	2.9	1.6
理論値	3915	7829	11744	15658	19573	23487
m/理論値	96.7%	90.5%	100.8%	97.8%	94.0%	100.0%

ｍ：各測定値の平均値、ＳＤ：標準偏差、ブランク：歯周病原菌なし、ＣＶ：変動係数

【００５２】

実施例４：Ｐ．ｇ．、Ｐ．ｉ．及びＡ．ａ．の高濃度菌液におけるＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の効果の確認

歯周病原菌の菌数が非常に多い場合において、実施例３の条件で、ＥＬＩＳＡ法における高感度化が再現性良く得られるかを調べた。用いた歯周病原菌数は各々１０^{9}個／ｍＬのオーダーとした。処理ありは上記歯周病原菌溶液から２０μＬを用い、そこに処理液２ｍＬを加えボルテックスで１０秒以上攪拌後に希釈液２ｍＬを添加し、直後にボルテックスで１０秒以上攪拌した。無処理は上記歯周病原菌溶液から２０μＬに希釈液４ｍＬを添加し、ボルテックスで１０秒以上攪拌した。

【００５３】

処理ありは、処理液と希釈液を等量ずつ混合した溶液で、Ｐ．ｇ．及びＡ．ａ．の場合１００倍、Ｐ．ｉ．の場合１，０００倍に希釈して測定を行った。無処理は、希釈液のみで、Ｐ．ｇ．及びＡ．ａ．の場合１０倍、Ｐ．ｉ．の場合１００倍に希釈して測定を行った。測定はｎ＝２で行い、処理、希釈操作は３回ずつ行った。結果を表７に示す。

【００５４】

【表７】

Ｐ．ｇ．	処理			無処理		
	１回目	２回目	３回目	１回目	２回目	３回目
菌数（個／ｍＬ）	1.95E+05	2.02E+05	2.03E+05	2.74E+05	2.62E+05	2.57E+05
元の菌数（個／ｍＬ）	3.90E+09	4.04E+09	4.07E+09	5.48E+08	5.25E+08	5.15E+08
処理効果	7.10	7.70	7.90			

Ｐ．ｉ．	処理			無処理		
	１回目	２回目	３回目	１回目	２回目	３回目
菌数（個／ｍＬ）	5.44E+04	4.83E+04	5.10E+04	2.95E+04	2.83E+04	2.72E+04
元の菌数（個／ｍＬ）	1.09E+10	9.66E+09	1.02E+10	5.91E+08	5.67E+08	5.44E+08
処理効果	18.43	17.04	18.75			

Ａ．ａ．	処理			無処理		
	１回目	２回目	３回目	１回目	２回目	３回目
菌数（個／ｍＬ）	1.35E+05	1.36E+05	1.37E+05	2.07E+05	2.09E+05	2.07E+05
元の菌数（個／ｍＬ）	2.69E+09	2.72E+09	2.73E+09	4.14E+08	4.18E+08	4.15E+08
処理効果	6.50	6.52	6.59			

【００５５】

歯周病原菌数は、各菌の標準試料を用いて作成した検量線から算出した。処理、無処理の場合の歯周病原菌数は、ｎ＝２の平均値とし、それら歯周病原菌数に希釈倍数を掛け合わせ、元の歯周病原菌数を求めた。

【００５６】

処理効果は、元の歯周病原菌数のデータを用い、処理ありを無処理で割った商の値とした。Ｐ．ｇ．で約８倍、Ｐ．ｉ．で約１８倍、Ａ．ａ．で約７倍の処理効果を示した。また、３回の操作によるばらつきもなく再現性も良いことが確認できた。

【００５７】

実施例５：Ｐ．ｇ．、Ｐ．ｉ．及びＡ．ａ．におけるＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００の条件検討

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００の濃度が与える影響を無添加から２０％ｗ／ｖの範囲において調べた。２０％ｗ／ｖは室温（１５乃至３０℃）で固化する傾向にあったため、５０℃の湯せんで加温して調整した。実験条件は実施例４の条件を用いた。但し、歯周病原菌数はＰ．ｇ．は1×10^{8}個／ｍＬ、Ｐ．ｉ．は3×10^{7}個／ｍＬ、Ａ．ａ．は2×10^{8}個／ｍＬと調整したものを用いた。また、検討未実施であるアニオン界面活性剤からドデシル硫酸ナトリウム〔ｓｏｄｉｕｍ ｄｏｄｅｃｙｌｓｕｌｆａｔｅ（ＳＤＳ）〕を選択し、同様に行った。測定はｎ＝２で行った。

【００５８】

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００、ＳＤＳの濃度が異なる各処理液を用いた場合の歯周病原菌なしであるブランク値の平均吸光度値、歯周病菌ありの測定値の平均吸光度値を算出した。歯周病菌ありの測定値の平均吸光度値からブランク値の平均吸光度値を差し引いた値を反応強度とした。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００の結果を表８に示す。

【００５９】
【表８】

P.g.

TritonX-100 (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.009	0.097	0.088	1.00
0.01%	0.010	0.109	0.099	1.12
0.05%	0.011	0.177	0.166	1.89
0.10%	0.012	0.397	0.385	4.37
0.30%	0.012	0.508	0.496	5.64
0.50%	0.012	0.529	0.518	5.88
1.00%	0.012	0.560	0.548	6.23
2.00%	0.012	0.597	0.585	6.65
5.00%	0.011	0.622	0.611	6.94
10.00%	0.012	0.635	0.623	7.08
20.00%	0.011	0.586	0.575	6.53

P.i.

TritonX-100 (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.019	0.123	0.105	1.00
0.01%	0.012	0.161	0.150	1.43
0.05%	0.010	1.385	1.375	13.15
0.10%	0.011	2.032	2.021	19.34
0.30%	0.012	1.969	1.957	18.72
0.50%	0.010	1.878	1.868	17.87
1.00%	0.011	1.837	1.827	17.48
2.00%	0.010	1.824	1.814	17.36
5.00%	0.011	1.810	1.800	17.22
10.00%	0.020	1.952	1.933	18.49
20.00%	0.011	2.135	2.124	20.32

A.a.

TritonX-100 (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.010	0.174	0.164	1.00
0.01%	0.010	0.203	0.193	1.17
0.05%	0.011	0.941	0.930	5.67
0.10%	0.011	1.190	1.179	7.19
0.30%	0.012	1.180	1.168	7.12
0.50%	0.011	1.167	1.156	7.05
1.00%	0.011	1.143	1.132	6.90
2.00%	0.011	1.142	1.131	6.90
5.00%	0.011	1.152	1.141	6.95
10.00%	0.011	1.174	1.163	7.09
20.00%	0.011	1.167	1.156	7.05

【００６０】

処理効果は、各界面活性剤の濃度ごとの反応強度を各界面活性剤無添加の場合の反応強度で割った商の値とした。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００の処理効果は、Ｐ．ｇ．において０．１０ｗ／ｖ％以上で約６倍、Ｐ．ｉ．において０．１０ｗ／ｖ％以上で約１８倍、Ａ．ａ．において０．１０ｗ／ｖ％以上で約７倍であった。また、２０％ｗ／ｖよりも濃い濃度では、室温（１５乃至３０℃）以下で固化する傾向にあり、調製、保存するにも好ましくないことがわかった（表９）。

【００６１】

【表９】

ＴｒｉｔｏｎＸ－１００の濃度（％）（ｗ／ｖ）	作製時の混和性（５０ｍＬ作製の場合）	保存時の変化
＜１０％	室温（１５乃至３０℃）にて１０分以内に混和した。	冷蔵（４℃）で水溶性を示した。
１０％～２０％	ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を添加すると、緩衝液中で固化した。約５０℃に加温し、３０分程撹拌すれば全体に混和した。	冷蔵（４℃）で水溶性を示した。
＞２０％	ＴｒｉｔｏｎＸ－１００を添加すると、緩衝液中で固化した。加温しても粘度高く、混和できているのか判別し難い。室温に戻ると糊状に固まり、処理液としては使用不可であった。	室温（１５乃至３０℃）以下で固化した。

【００６２】

ＳＤＳの結果を表１０に示す。Ｐ．ｇ．０．１０乃至０．５０ｗ／ｖ％で約６倍、Ｐ．ｉ．において０．１０乃至０．５０ｗ／ｖ％で約１３倍、Ａ．ａ．において０．０３乃至０．０５ｗ／ｖ％以上で約３倍であった。

【００６３】

【表１０】

P.g.

SDS (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.009	0.095	0.086	1.00
0.01%	0.009	0.099	0.090	1.05
0.03%	0.009	0.117	0.108	1.26
0.05%	0.011	0.160	0.149	1.73
0.10%	0.010	0.637	0.627	7.29
0.30%	0.011	0.495	0.485	5.63
0.50%	0.010	0.354	0.344	3.99
1.00%	0.011	0.016	0.005	0.05
2.00%	0.011	0.018	0.007	0.08
5.00%	0.012	0.024	0.012	0.14
10.00%	0.011	0.025	0.014	0.16

P.i.

SDS (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.020	0.130	0.111	1.00
0.01%	0.011	0.155	0.145	1.31
0.03%	0.011	0.289	0.279	2.52
0.05%	0.012	0.612	0.600	5.43
0.10%	0.012	1.842	1.830	16.56
0.30%	0.012	1.427	1.416	12.81
0.50%	0.011	1.212	1.201	10.86
1.00%	0.011	0.182	0.171	1.54
2.00%	0.012	0.013	0.002	0.01
5.00%	0.011	0.012	0.001	0.01
10.00%	0.012	0.011	-0.001	0.00

A.a.

SDS (%) (w/v)	ブランク 吸光度値 $OD_{450nm-650nm}$	菌あり 同左	菌あり－ブランク 同左	処理効果
0.00%	0.009	0.175	0.166	1.00
0.01%	0.010	0.200	0.190	1.15
0.03%	0.010	0.557	0.547	3.31
0.05%	0.011	0.633	0.623	3.76
0.10%	0.011	0.091	0.081	0.49
0.30%	0.011	0.021	0.010	0.06
0.50%	0.011	0.011	0.001	0.00
1.00%	0.011	0.012	0.001	0.00
2.00%	0.011	0.012	0.001	0.00
5.00%	0.011	0.012	0.001	0.01
10.00%	0.011	0.012	0.001	0.00

专利名称(译)	一种水溶性试剂，在免疫测定中使牙周病原体的抗原敏感		
公开(公告)号	JP2010085244A	公开(公告)日	2010-04-15
申请号	JP2008254653	申请日	2008-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
申请(专利权)人(译)	东亚合成株式会社		
[标]发明人	直江智子 田中陽一 松尾克彦 丹羽幹夫		
发明人	直江 智子 田中 陽一 松尾 克彦 丹羽 幹夫		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/569.F		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种水性试剂，用于提高酶免疫测定[酶联免疫吸附测定（ELISA）]中牙周病病原菌抗原敏感性的灵敏度，具有较低的成本和定量性，在最广泛或频繁使用免疫测定中的研究或诊断领域。解决方案：使用含有缓冲剂和水溶性表面活性剂的水性试剂，可以高灵敏度地测量牙周病致病菌的抗原。 Ž