

(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2016-31306  
(P2016-31306A)

(43) 公開日 平成28年3月7日(2016.3.7)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D  
 GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2014-154169 (P2014-154169)  
 (22) 出願日 平成26年7月29日 (2014.7.29)

(71) 出願人 390011143  
 株式会社松風  
 京都府京都市東山区福稲上高松町 1 1 番地  
 (72) 発明者 水野 光春  
 京都府京都市東山区福稲上高松町 1 1 番地  
 内 株式会社松風内  
 (72) 発明者 三島 昭宏  
 京都府京都市東山区福稲上高松町 1 1 番地  
 内 株式会社松風内  
 (72) 発明者 高橋 啓至  
 京都府京都市東山区福稲上高松町 1 1 番地  
 内 株式会社松風内

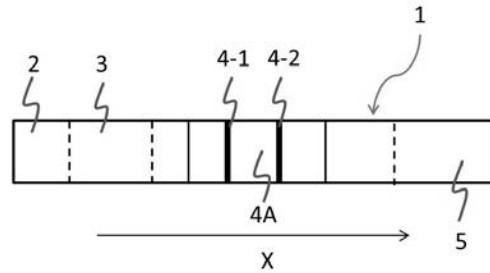
(54) 【発明の名称】 歯周病の検査方法および検査診断キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 歯周病の有無や進行状態を簡便に迅速かつ正確に判定できる検査方法及び検査診断キットを提供する。

【解決手段】 歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査方法、および、歯肉溝滲出液又は唾液の検体を採取する手法と、歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫クロマトグラフィー法を用いる免疫学的測定法により検出又は測定する手法とを含み、カルプロテクチンを検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査診断キットを含む。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査方法。

**【請求項 2】**

歯肉溝滲出液又は唾液の検体を採取する手法と、歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定する手法とを含み、カルプロテクチンを検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査診断キット。

**【請求項 3】**

前記免疫学的測定法がカルプロテクチンを検出することを特徴とする免疫クロマトグラフィー法である請求項1又は2記載の歯周病検査方法及び検査診断キット。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、歯周病の検査方法および検査診断キットに関する。より具体的には、歯肉溝滲出液（GCF）又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定することで、歯周病の有無や進行状態をチェアサイドで簡便に迅速かつ正確に判定できる検査方法及び検査診断キットに関する。

20

**【背景技術】****【0002】**

歯周病は、歯肉、セメント質、歯根膜および歯槽骨よりなる歯周組織に起こるすべての疾患をいい、主にプラーク中の口腔細菌が原因となって生じる炎症性疾患であり、歯肉炎と歯周炎とに大別される。炎症が歯肉に限局したものを「歯肉炎」といい、炎症部位が歯肉を超えて広がり歯根膜や歯槽骨が損傷、破壊した場合を「歯周炎」という。

歯肉炎の場合、歯周組織が炎症を起こしていても、歯根膜や歯槽骨まで炎症が広がっていないので、原因であるプラーク除去を行い清掃することにより、治癒することができる。しかし歯肉炎から歯周炎に症状が進行した場合、特に歯がぐらついたり、歯根膜や歯槽骨が損傷、破壊したりしてしまう重症化した歯周炎の場合、口腔内を清掃してもプラーク除去も困難となり、元の健康状態に戻すのは難しくなる。

30

**【0003】**

近年、歯周病は生活習慣病として位置づけられ、国内の成人のおよそ80%に蔓延しており、成人の歯牙喪失の最大の原因となっている。また最近の研究から重篤な全身疾患（糖尿病、動脈硬化、心疾患、早産、低体重児出産、脳血管疾患など）との関連性が示唆され、リスク因子となることが明らかになってきている。

歯科2大疾患といわれるう蝕と歯周病において、う蝕が徐々に減少する中で、歯周病は難治性である疾患ゆえ減少する傾向はなく、その対策は予防医学的に重要かつ急務の課題とされている。このため歯周病をなるべく早期に発見し、すぐに治療をすることで重症化させないことが重要である。

40

**【0004】**

現在、一般歯科診療所などでの歯周病の検査、診断、または歯周治療後の効果の判定には様々な臨床パラメーターが用いられており、歯周ポケット検査、歯の動揺度検査、およびエックス線検査などがある。標準的な診断方法としては形態計測学的な手法のプロービングデプス（PD）がある。これは、歯周ポケットにプローブと呼ばれる器具を挿入し、その深さを測ることにより、歯周組織の破壊の程度を評価する方法である。

**【0005】**

しかしながら、プローブによる検査は歯周病により既に歯周組織が破壊された程度を知るものであり、検査時点での炎症の程度による疾病活動度を知ることはできない。さらに計

50

測に熟練を要する、歯周組織に損傷を与える可能性がある、目視評価のため判定が主観的であり不確実でばらつきが生じるという問題点も指摘されている。

【0006】

一般的に歯周病は慢性疾患といわれるが、歯周組織の破壊は常に一定速度でなく、活動期と休止期を繰り返すことが知られている。活動期は疾病活動度が大きく、アタッチメントロスや歯槽骨の吸収が短期間に急速に進行するが、休止期には進行が止まっているように見える。しかしながら、これら活動期と休止期を1回の検査で診断する方法はまだ確立されていない。

【0007】

このため、前記診断方法に加え、歯周疾患の早期診断や進行を予測する客観的な指標として、細菌学的検査や生化学的検査に関する手法が数多く提案され、プローブを使用しない非侵襲な検査として臨床的に応用される試みがなされている。

10

【0008】

細菌学的検査では、歯周病はその発症、進行に歯周病原細菌が大きく関与している感染症であることから、細菌叢と細菌数を把握することで、リスク因子の特定や診断、治療効果の判定など必要な情報を得ることがある。例えば、唾液中に含まれる歯周病原性細菌が放出する酵素であるALP（アルカリフォスファターゼ）やトリプシン様酵素であるペプチダーゼを特異的に検出する手法について考案され実用化もされている。（特許文献1、非特許文献1参照）。しかしながら、これらの手法による歯周病菌の把握は、現在の歯周組織の状態を必ずしも反映するものでないことが問題として指摘されている。

20

【0009】

生化学的手法については、主に歯肉溝に漏出する滲出液（歯肉溝滲出液）や唾液中に含まれる特定の蛋白質や酵素を歯周疾患マーカーとして検査および診断に用いるものが数多く提案されている。例えば、歯肉結合組織を構成する主成分であるコラーゲンを分解する酵素であるプロテアーゼの一種であるMMP（マトリックスメタロプロテアーゼ）が歯周疾患の進行度に関係していることを利用した診断キットも考案されている（特許文献2参照）。

【0010】

さらに、歯肉溝滲出液中の酵素類である -GTP（グルタミルトランスフェラーゼ）、抗菌ペプチドの1種である -デフェンシンやカルシウム結合性タンパク質のカルプロテクチン等を検出、測定し歯周病の有無を判定する手法も提案されている（特許文献3～4、非特許文献2参照）。しかしながら、これらの手法による測定は、高価な装置を使用する、検体の処理操作が複雑である、測定結果が出るまでに長時間を要しチェアサイドに不向きである、検体の量が微量なため検査の信頼度が低い等の課題があり診断方法として十分に満足できるものでなかった。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開平8 - 75729号公報

【特許文献2】特許第3083325号公報

40

【特許文献3】特許第35299283号公報、

【特許文献4】特開2009 - 145220号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】株式会社ヒョーロン出版「歯科医師・歯科衛生士のための唾液検査ハンドブック」2008：62～63、68～69

【非特許文献2】日本歯周病学会会誌、Vol. 49 (2007)、No. 1、P 13-19

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

50

従って、本発明の目的は、歯周病の有無や進行状態を簡便に迅速かつ正確に判定できる検査方法及び検査診断キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者は、従来技術の問題点に鑑みて鋭意検討を重ねた結果、歯肉溝滲出液（GCF）又は唾液に含まれるカルシウム結合性タンパク質であるカルプロテクチンが他の歯周疾患マーカーと比較して絶対量が多く検出が容易であること、更には歯肉溝滲出液又は唾液中のカルプロテクチンの濃度が歯周病の程度と高い相関性があることに着目し、歯肉溝滲出液又は唾液中のカルプロテクチンを歯周疾患マーカーとし、検体中のカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定することで、カルプロテクチンの有無又は含有量を目視又は測定装置により数値で判定、歯周病の有無や進行状態を、チェアサイドで簡便に迅速かつ正確に判定できることを見出し、本発明を完成させた。

10

【0015】

従って、本発明は以下の手段により解決される。

（１）歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査方法。

（２）歯肉溝滲出液又は唾液の検体を採取する手法と、歯肉溝滲出液又は唾液の検体に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定する手法とを含み、カルプロテクチンを検出又は測定することを特徴とする歯周病の検査診断キット。

（３）前記免疫学的測定法がカルプロテクチンを検出することを特徴とする免疫クロマトグラフィー法である前記（１）又は（２）記載の歯周病検査方法及び検査診断キット。

20

【発明の効果】

【0016】

本発明の歯周病の検査方法及び検査診断キットによれば、歯周病の有無や進行程度を、歯周組織に損傷を与えず、簡便に迅速かつ正確に判定できるもので、歯科医院のチェアサイド、集団検診および自己診断等に好適に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図１】免疫クロマト装置の平面図

【図２】図１で示された免疫クロマト装置の縦断面

【符号の説明】

【0018】

- 1 免疫クロマト装置
- 2 試料添加部位（「サンプルパッド」）
- 3 標識物質保持部位（「コンジュゲートパッド」）
- 4 クロマトグラフィー膜担体
- 4 - 1 判定部位（「判定ライン」）
- 4 - 2 コントロール部位（「コントロールライン」）
- 4 A 補足部位
- 5 吸収部位（「吸収パッド」）
- 6 粘着シート（「裏打ち粘着シート」）

30

40

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の歯周病の検査方法は、歯肉溝滲出液又は唾液の検体中に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により検出又は測定し、歯周病の有無あるいはその進行状態を判定するものであり、その検査方法に基づく検査診断キットは、歯肉溝滲出液又は唾液の検体を採取する手法と、歯肉溝滲出液又は唾液の検体中

50

に含まれるカルプロテクチンを検出又は測定する手法とを含み、簡便に迅速かつ正確に判定するものである。

【0020】

本発明に係るカルプロテクチン(Calprotectin)とは、一連のカルシウム結合性タンパク質として知られるタンパク質のS100A8とS100A9(別呼称はMRP8とMRP14)が一分子ずつ対をなすヘテロダイマー複合体であり、シグナル伝達のメディエーターである。カルプロテクチンはいずれも好中球、単球、マクロファージに多く存在することが知られ、血管内皮細胞などに結合して炎症作用へ関与することも知られている。またカルプロテクチンは急性または恒常性炎症の診断マーカーとしても用いられており、虫垂炎患者の血漿中、炎症性腸疾患患者の便中および慢性関節リウマチ患者の関節骨液などではカルプロテクチンの発現レベルが上昇することが報告されている。

10

【0021】

またカルプロテクチンは、口腔内の正常な粘膜上皮や歯肉中にも発現していることも知られており、本発明では、ヒトの歯肉溝滲出液又は唾液を検体とし、該検体中のカルプロテクチンを検出又はその濃度を測定することで、歯周病の有無あるいはその進行状態を判定する。

【0022】

歯肉溝滲出液を検体として用いる場合、口腔内の歯肉ポケットの滲出液、歯科用インプラントの周囲組織の滲出液を採取して用いる。また採取手段としては、公知の方法で行ってよく、液体を吸収する性質を有する検体採取用の支持体を用いることができる。例えば、ペリオペーパー等の濾紙片状のもの、あるいはペーパーポイント等の捻った糸状ものが上げられる。採取方法としては、支持体を歯肉ポケットの入り口付近に添える又は挿入して、滲出液をしみ込ませ採取する。採取する時間は、10~60秒が好ましく、より好ましくは10~30秒である。

20

【0023】

歯肉溝滲出液の採取量としては、本発明の効果が得られる範囲内であれば特に制限はないが、具体的には0.1~2.5 $\mu$ Lが好ましく、より好ましくは0.5~2.0 $\mu$ Lである。歯肉溝滲出液がしみ込んだ支持体から、抽出溶媒を用いて抽出処理を行いカルプロテクチンを抽出、測定に供することができる。抽出溶媒としては、例えば水、生理食塩水、PBS等のリン酸緩衝液、

30

HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)等のグッド緩衝液などが挙げられる。抽出条件は、歯肉溝滲出液がしみ込んだ支持体をマイクロチューブ又は遠心試験管等に入れ、そこに抽出溶媒を50 $\mu$ L~2.0mL入れ浸し静置する、または高速攪拌装置を用いて攪拌あるいは振とう器で振とうしてカルプロテクチンを抽出し、これを検体として測定に供することができる。

【0024】

唾液を検体に用いる場合の採取手段は、公知の方法で行ってよく、安静状態で口中にたまった安静唾液を容器に吐出す方法、パラフィンガム等を咀嚼することで口中にたまった刺激唾液を容器に吐出す方法、市販品の唾液採取用キットなどを用いることができる。採取する唾液の量は、0.2~2.0mLが好ましく、0.5~1.0mLがより好ましい

40

【0025】

検体に供する唾液は、採取した唾液をそのまま用いる、もしくは唾液を遠心分離して不溶物を除去した唾液上清のいずれをも用いることができる。唾液上清をそのまま検体として用いてもよいが、唾液上清を溶媒で希釈して用いた方が、より正確な測定結果が得られるという点から好ましい。なお唾液を希釈する溶媒としては、蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝液などが挙げられる。唾液上清の希釈倍率は、遠心分離して得た上清を2~6倍希釈することが好ましく、希釈倍率が2倍に満たないと唾液成分により測定結果に影響を受けることがあり、一方希釈倍率が6倍を超えるとカルプロテクチン濃度が検出限界に満たない場合がある。

50

## 【0026】

本発明においては、歯肉溝滲出液又は唾液の検体中に含まれるカルプロテクチンを免疫学的測定法により行う。前記免疫学的測定法としては、一般的に使用されている方法を用いることができる。例えば、酵素標識免疫測定 (ELISA)、放射免疫測定 (RIA)、凝集法、免疫クロマトグラフィー法、比濁法、混濁度測定法、ウエスタンブロット法などが挙げられる。本発明では、チェアサイドにおいて簡便かつ迅速に正確な測定結果を得ること、また特別で高価な測定装置を必要としない点から、免疫クロマトグラフィー法が最も好適に用いられる。

## 【0027】

前記免疫クロマトグラフィー法に使用されるカルプロテクチンを検出する免疫クロマト装置は、膜担体上を被検物質が試薬を溶解しながらゆっくりと流れる性質である毛細管現象を応用した免疫学的測定法が挙げられる。また前記免疫クロマトグラフィー法としては、特に限定されるものではないが、カルプロテクチン抗原に対する第一の抗体と第二の抗体との間に該抗原をサンドイッチするサンドイッチ式免疫測定法である免疫クロマト装置が最も好適に用いられる。

10

## 【0028】

さらに前記免疫クロマト装置は、被検試料であるカルプロテクチン抗原に対する第一の抗体を予め所定位置にライン状に集積し固定せしめて形成された捕捉部位 (判定ライン) を備えるクロマトグラフィー膜担体を用意し、カルプロテクチン抗原に対する第二の抗体により修飾された標識物質と所定量の被検試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記クロマトグラフィー膜担体にて展開せしめ、前記被検試料中に含まれるカルプロテクチン抗原と前記標識物質との免疫複合体を前記捕捉部位に捕捉させライン状に呈色し、該呈色状態を目視または適当な機器を用いて、カルプロテクチンが存在することを定性および定量的に測定することを特徴とする。

20

## 【0029】

前記免疫クロマト装置としては、通常の免疫クロマトグラフィー法に用いることができる装置である限り、特に限定されるものではない。例えば、図1に免疫クロマト装置の平面図を模式的に示す。図2に図1で示された免疫クロマト装置の縦断面を模式的に示す。

## 【0030】

本発明に用いる免疫クロマト装置の仕様について、以下に詳細な説明をする。前記免疫クロマト装置1は、展開方向 (図1において矢印Xで示す方向) の上流から下流に向かって、試料添加部位2 (「サンプルパッド」)、標識物質保持部位 (「コンジュゲートパッド」) 3、クロマトグラフィー膜担体4 (「メンブレン」)、及び吸収部位5 (「吸収パッド」) がこの順に、粘着シート6上 (「裏打ち粘着シート」) に配置されている。さらに前記クロマトグラフィー膜担体4は、補足部位4Aを有し、分析対象物と特異的に結合する抗体又は抗原を固定化した領域である判定部位 (「判定ライン」) 4-1を有する。前記判定ラインは通常1本であるが、所望により2本以上を設けることもできる。さらにコントロール用抗体又は抗原を固定化した領域であるコントロール部位 (「コントロールライン」) 4-2を有することができる。

30

各部位の構造、仕様および態様は以下のとおりである。

40

## 【0031】

試料添加部位2 (「サンプルパッド」) は、試料が迅速に吸収されるが、保持力は弱く、速やかに反応部位へと試料が移動していくような性質の多孔質シートで構成されている。多孔質シートとしては例えば、ガラスファイバー、多孔質のポリエチレン又はポリプロピレン等の多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、濾紙および綿布などのようなセルローズ製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。本発明においては、さらに非特異的反応を抑制するために、試料添加部位2中に、アルブミン等の蛋白質、緩衝液および界面活性剤等々を含む試薬組成物を予め含浸させ担持させる態様とすることができる。

## 【0032】

標識物質保持部位3 (「コンジュゲートパッド」) には、標識物質を含む懸濁液を調製

50

し、その懸濁液を適当な吸収パッドに塗布した後、それを乾燥することにより調製することができる。前記標識物質保持部としては、例えば、グラスファイバー、セルロース、親水性に表面処理が施されたポリエチレン又はポリプロピレン等の多孔質材料が挙げられる。

#### 【0033】

前記標識物質としては、特に制限はなく、例えば、呈色標識物質、酵素標識物質、放射線標識物質などが挙げられるが、測定の迅速性から、特に呈色標識物質が最も好適に用いられる。呈色標識物質としては、金属コロイドおよび着色ラテックスなどが挙げられ、金属コロイドの代表例としては、白金コロイド、金コロイドなどが挙げられる。金属コロイドの粒子の大きさは、特に制限はなく、通常は、直径3 ~ 100 nm程度が好適である。また着色ラテックスの代表例としては、赤色および青色などの顔料で着色された合成ラテックスあるいは天然ラテックスが挙げられる。着色ラテックスの大きさは、直径数nm ~ 数百nm程度から選択される。これらの着色標識物質は、公知の方法で製造することもできるが、市販品を使用する、あるいは加工することもできる。またさらに蛍光標識なども使用することができる。

10

#### 【0034】

クロマトグラフィー膜担体4（「メンブレン」）としては、毛細管現象を起こす作用を有し、かつ被検物質等を吸収し移動させることができるものであれば、特に限定されるものではない。例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、グラスファイバー、ポリオレフィン、セルロース、これらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択されるが、ニトロセルロースの膜担体が本発明に最も好適である。

20

#### 【0035】

吸収部位5（「吸収パッド」）は、添加された試料がクロマト移動により物理的に吸収されると共に、クロマトグラフィー膜担体から未反応標識物質等を吸収除去する部位であり、セルロース濾紙、不織布、布等の吸水性材料が用いられる。

#### 【0036】

本発明で使用されるカルプロテクチン抗体としては、特に限定されるものではなく、各種免疫測定法において通常使用されているポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が挙げられる。例えば、抗ヒトカルプロテクチンモノクローナル抗体、抗ヒトカルプロテクチンポリクローナル抗体などがあげられ、そのうち抗ヒトカルプロテクチンモノクローナル抗体がヒトカルプロテクチン抗原との反応特異性が優れているなどの理由で最も好ましい。

30

#### 【0037】

本発明で用いられる展開液は、通常の免疫クロマトグラフィー法において用いることができる展開液である限り、特に限定されるものではない。本発明で使用される展開液は移動相を構成する液体であり、固定相であるクロマトグラフィー膜担体上を、被検試料及び標識物質と共に移動する。また、本発明の展開液は展開液としてだけでなく、試料希釈液としても使用することができ、試料の希釈に用いた希釈液をそのまま免疫クロマトグラフィー法における展開液として使用することができる。

40

#### 【0038】

該展開液としては例えば、非イオン性界面活性剤を含有するものが使用され、ポリオキシエチレン系界面活性剤を好ましく用いることができる。ポリオキシエチレン系界面活性剤の好ましい例としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（商品名「Tween」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル（商品名「Triton」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-ノニルフェニルエーテル（商品名「Triton N」シリーズ）等を挙げることができる。上記した非イオン性界面活性剤の含有量は、特に限定されないが、組成物全体の重量に対し0.01 ~ 10重量%の範囲であり、好ましくは0.05 ~ 5重量%である。

また前記非イオン性界面活性剤は、単独でも2種以上を混合して用いることもできる。

50

## 【実施例】

## 【0039】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例に何ら限定されるものではない。

## 【0040】

(参考例1) カルプロテクチン検出免疫クロマト装置の作製

(1) 抗カルプロテクチン抗体修飾金コロイドの調製

直径50 nmの金コロイド溶液(WRGH1-50NM、ワインレッドケミカル社) 10mLに50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>バッファー(pH 7.0) 1mLを加えた金コロイド溶液に、40 μg / mLの抗カルプロテクチンモノクローナル抗体(社)溶液1 mLを加え攪拌した。15分間静置した後、1%ポリエチレングリコール(PEG Mw.20000、和光純薬)を加え、続いて10%牛血清アルブミン(BSA FractionV、SIGMA)水溶液を1.0mL加え攪拌した。この溶液を7500 rpm、4、30分間遠心した後、1 mL程度を残して上清を取り除き、超音波洗浄機により金コロイドを再分散した。上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を10%サッカロース・1%BSA・0.5%トリトン(Triton)-X100を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。

10

## 【0041】

(2) 金コロイド標識抗体保持部位(コンジュゲーションパッド)の作製

(1)で調製した金コロイド標識抗体溶液を、5 mm×15 mmに切ったグラスファイバーパッド(Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社)へ40.0 μlを含浸せしめ、一晚減圧乾燥し、金コロイド標識抗体保持部位を得た。

20

## 【0042】

(3) 抗体固定化メンブレン(クロマトグラフィー膜担体)の作製

25mm×200 mmに裁断したニトロセルロースメンブレン(HiFlow Plus HF180、メルクミリポア社)に関し以下に示す方法により抗体を固定し、抗体固定化メンブレンを作製した。メンブレンの長辺を下にし、1.5 μg / mLとなるように調製した固定化用抗カルプロテクチンモノクローナル抗体(社)溶液を塗布機を用いて、下から7mmの位置に幅1mm程度のライン状に塗布した。同様に、下から13 mmの位置に、0.5 mg / mLとなるように調製したコントロール用抗マウスIgG抗体溶液をライン状に塗布し、室温で乾燥した。その後、抗体固定化メンブレンをブロッキング液(1.0 w%BSA、メルクミリポア社)500 mLを液槽に入れ浸し、そのまま15分間静置した。メンブレンを液から取り出し室温で一晩乾燥し、抗体固定化メンブレンとした。

30

## 【0043】

(4) 試験用免疫クロマト装置の作製

裏打ち粘着シートに、(3)で作成した抗体固定化メンブレンを貼り付けた。抗体固定化メンブレンの下側に約1 mm重なるように(2)で作製した金コロイド標識抗体保持部位を貼り付け、さらに、約2 mm重なるようにして試料添加パッド(20 mm×150 mmに切ったグラスファイバーパッド、メルクミリポア社)を重ねて貼り付けた。さらに、抗体固定化メンブレンの上側には約6 mm重なるように吸収パッド(80 mm×150 mmに切ったセルロース膜、メルクミリポア社)を重ねて貼り付けた。これら重ね張り合わせた部材を、長辺側を4 mm幅になるように短辺に平行にカッターで切断し、5 mm×55 mmの免疫クロマト用ストリップを作製、さらにプラスチック製ケースに入れ、試験用免疫クロマト装置とした。

40

## 【0044】

<実施例1> 歯肉溝滲出液(GCF)中のカルプロテクチン検出による歯周疾患検査

(1) GCFの採取および前処理

慢性歯周炎と診断された歯周病患者10名および健常者5名の合計15名を被験者とし、1名につき1~3部位で採取し、合計30のGCF検体を収集した。採取方法については以下の通りである。歯周病患者について目視で検査をおこない、炎症が認められ罹患部と疑

50

いのある部位、および健常者において炎症が認められなく健常と推測される部位の歯肉溝にペリオペーパー（Oraflow社）を約30秒間挿入してGCF検体を採取し、1.0mLのリン酸緩衝液が入ったマイクロ遠心チューブへ浸し5分間静置した。その後、高速攪拌装置を用いて5分間振り、抽出操作を行った後、50μLを取り出し検体とした。

(2) 免疫クロマトグラフィー法によるカルプロテクチン検出

上記、(1)で得た50μL GCF検体を150μLの0.10%非イオン性界面活性剤Tween 20溶液にて4倍希釈したものを滴下試料とし、前記参考例1にて作製した試験用免疫クロマト装置の試料添加パッド部位へマイクロピペットを使い100μLを滴下しクロマト展開させた。室温で展開後10分間放置し、判定ラインにおける捕捉量を肉眼で観察し、赤い線をほとんど確認できないものを「-」、赤い線を僅かに確認できるものを「+」、鮮明に確認できるものを「++」、より強く鮮明に確認できるものを「+++」、とした。さらにイムノクロマトリーダー（DiaScan、大塚電子製）を使用し判定ラインの呈色強度を数値化した。表1に試験結果を示す。

< 比較例1 > 目視およびプローブを使った従来の歯周組織検査

実施例1で検体を採取した30部位について歯周組織検査を行い、以下に示す臨床パラメーターについて調べた。プローブ（歯周ポケット測定器）を使用し、歯周ポケットの深さ（Probing pocket depth、PPD）、プロービング時の出血反応（Bleeding on probing、BOP）を目視にて確認し、出血があったものを陽性の「+」、なかったものを陰性の「-」とし記録した。さらに歯肉の炎症程度である歯肉炎症指数（Gingival index、GI）についても目視にて確認し、歯肉に炎症が認められず正常な状態を「0」、軽度の歯肉炎症を「1」、中等度の歯肉炎症でBOPあり、を「2」、重度の炎症で自然出血あり、を「3」として記録した。表1に試験結果を示す。

【0045】

【表1】

| 目視検査         | 検体No. | 実施例1 |              | 比較例1     |     |     | 歯周組織の判定結果 |              |
|--------------|-------|------|--------------|----------|-----|-----|-----------|--------------|
|              |       | 目視   | イムノクロマトリーダー値 | PPD (mm) | BOP | GI  | 分類        | 組織の炎症状態      |
| 歯周病患者の罹患部位検体 | 1     | ++   | 155          | 4        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 2     | ++   | 148          | 3        | +   | 1   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 3     | +++  | 219          | 5        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 4     | +    | 92           | 4        | -   | 1   | 歯周炎       | 炎症が抑制されている   |
|              | 5     | ++   | 164          | 6        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 6     | +++  | 205          | 5        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 7     | ++   | 183          | 5        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 8     | +    | 89           | 7        | +   | 1   | 歯周炎       | 炎症がやや進行している  |
|              | 9     | +++  | 229          | 4        | +   | 1   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 10    | ++   | 191          | 5        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 11    | +++  | 228          | 6        | +   | 3   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 12    | +    | 94           | 5        | -   | 1   | 歯周炎       | 炎症が抑制されている   |
|              | 13    | +++  | 245          | 7        | +   | 3   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 14    | ++   | 187          | 6        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 15    | ++   | 129          | 4        | +   | 1   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 16    | ++   | 190          | 8        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 17    | +    | 96           | 5        | -   | 1   | 歯周炎       | 炎症が抑制されている   |
|              | 18    | ++   | 175          | 5        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が進行している    |
|              | 19    | +++  | 210          | 6        | +   | 2   | 歯周炎       | 炎症が著しく進行している |
|              | 平均    |      | 169.9        | 5.3      |     | 1.7 |           |              |
| 健常者の健常部位検体   | 20    | -    | 27           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 21    | -    | 12           | 1        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 22    | -    | 29           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 23    | -    | 38           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 24    | +    | 85           | 3        | +   | 1   | 歯肉炎       | 炎症がやや進行している  |
|              | 25    | -    | 25           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 26    | -    | 32           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 27    | +    | 95           | 3        | -   | 0   | 歯肉炎       | 炎症が抑制されている   |
|              | 28    | -    | 9            | 1        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 29    | -    | 28           | 2        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 30    | -    | 19           | 1        | -   | 0   | 正常        | 炎症は無く安定している  |
|              | 平均    |      | 36.3         | 1.9      |     | 0.1 |           |              |

【0046】

実施例1の結果および従来法の比較例1の結果から、検体を採取した部位について総合的に診断し、正常かつ健常な状態である部位は「正常」とし、炎症が認められる罹患部位は、「歯肉炎」又は「歯周炎」と分類した。さらに歯周組織の炎症状態について、表2に示す基準に従って判定をした。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

【 表 2 】

| 組織の炎症状態      | イムノクロマトリーダー値 | PPD (mm) | BOP    | GI  |
|--------------|--------------|----------|--------|-----|
| 炎症は無く安定している  | 50以下         | 3mm未満    | -      | 0   |
| 炎症が抑制されている   | 51~100       | 3mm以上    | -      | 0~1 |
| 炎症がやや進行している  |              |          | +      |     |
| 炎症が進行している    | 101~200      | 4mm以上    | + or - | 1~3 |
| 炎症が著しく進行している | 200以上        | 5mm以上    | +      | 2~3 |

10

【 0 0 4 8 】

本発明における実施例1の免疫クロマトグラフィー法の結果より、歯周病患者群の罹患部位と目視判定された部位から採取した全てのGCF検体が「+」以上の陽性を示した。しかし、健常者群の健常部位と目視判定されたGCF検体は11検体中の2検体を除き「-」の陰性であった。また、イムノクロマトリーダーの数値では、歯周病患者から採取したGCF検体の平均値が166.9であったが、健常者のGCF検体の平均値は35.8と有意に低かった。従って、本発明の方法を用いれば、免疫クロマトグラフィー法でGCF検体中のカルプロテクチンを検出、測定することによって、検体を採取した部位を罹患部位と健常部位に簡便に区別できることがわかった。

【 0 0 4 9 】

20

続いて、本発明における実施例1の免疫クロマトグラフィー法による炎症評価と従来法のBOPによる出血反応の有無による炎症評価について比較した。なお実施例1の免疫クロマトグラフィー法の炎症評価の基準として、イムノクロマトリーダー値が50をカットオフ値として設定し、50以下を「炎症なし」、51以上を「炎症あり」とした。結果を表3に示す。その結果、比較例1の従来法のBOPで17部位が出血反応を認め陽性と判定されたが、実施例1の前記基準に従うと21部位でカルプロテクチンが検出され「炎症あり」と判定された。つまり、比較例1で陰性結果であった4部位は、炎症が生じてはいたが検出できなかった可能性がある。また、健常者の正常部位として採取した検体No.24および検体No.27は、イムノクロマトリーダー値が50以上であり、他の健常部位の検体と比較して高く、PPDは小さいが軽度な炎症が発生している可能性があり、比較例1の臨床パラメータと

30

【 0 0 5 0 】

【 表 3 】

|     | 実施例1              |          | 比較例1 |    |
|-----|-------------------|----------|------|----|
|     | 免疫クロマトグラフィー法(本発明) | BOP(従来法) | +    | -  |
| 検体数 | 21                | 9        | 17   | 13 |

【 0 0 5 1 】

40

さらに、検体No.8と検体No.13の両部位を比較した場合、PPDが7mmかつBOPも陽性と同じであったが、実施例1のイムノクロマトリーダー値が検体No.8は89で検体No.13は245と大きく異なっており、検体No.13の部位は炎症程度が大きいことが示唆された。実際、目視によるGIにおいても、検体No.13の方がGI=3と重度の炎症程度が認められ、臨床所見とも一致した。従って、本発明の方法を用いれば、歯周組織の炎症を生化学的に検出し、さらに炎症程度の差異も判定できることがわかった。

【 0 0 5 2 】

すなわち、本発明の免疫クロマトグラフィー法による歯周組織検査は、プローブを使った従来の検査方法で見落とされていた炎症の兆候を検出できる可能性あり、さらに炎症の程度も明確に把握することができることから、臨床で有効な検査ツールになり得ることが示

50

された。

【0053】

< 実施例 2 > 唾液中のカルプロテクチン検出による歯周疾患のスクリーニング検査

(1) 唾液の採取および前処理

歯周組織検査を行い慢性歯周炎と診断された歯周病患者15名および健常者8名の合計23名を被験者とし、各被験者から合計23の唾液検体を収集した。採取方法については以下の通りである。各被験者にパラフィンガムを3分間咀嚼させた後、市販品の唾液採取用チューブ(ザルスタット社)で唾液を採取した。唾液が入った前記唾液採取用チューブを遠心分離処理(3000rpm、2分)した後、上清を200μL取り出し検体とした。

10

(2) 免疫クロマトグラフィー法によるカルプロテクチン検出

上記、(1)で得た50μL唾液検体を150μLの0.10%非イオン性界面活性剤Tween20溶液にて4倍希釈したものを滴下試料とし、前記参考例1にて作製した試験用免疫クロマト装置の試料添加パッド部位へマイクロピペットを使い100μLを滴下しクロマト展開させた。室温で展開後10分間放置し、判定ラインにおける捕捉量を肉眼で観察し、赤い線をほとんど確認できないものを「-」、赤い線を僅かに確認できるものを「+」、鮮明に確認できるものを「++」、より強く鮮明に確認できるものを「+++」、とした。さらにイムノクロマトリーダー(DiaScan、大塚電子製)を使用し判定ラインの呈色強度を数値化した。表5に試験結果を示す。

20

< 比較例 2 > CPI (Community Periodontal Index、地域歯周疾患指数)による歯周疾患検査

実施例2で唾液検体を採取した歯周病患者12名および健常者8名の合計20名を対象として、地域歯周疾患指数計測用に開発されたWHO型プローブを用いて歯周疾患のCPI検査を実施し、表4に示すCPIコードに従い記録した。検査方法について以下の通りである。口腔内を上下顎、前歯臼歯の6ブロックに分け、各ブロックで最も高いCPIコードを選択した。詳細な検査部位について前歯部ブロックは上顎右側中切歯、下顎左側中切歯であり、臼歯部ブロックは第一大臼歯と第二大臼歯である。表5に試験結果を示す。

【0054】

【表4】

| CPIコード | 所見           | 判定基準                  |
|--------|--------------|-----------------------|
| 0      | 健全           | 異常なし                  |
| 1      | 出血あり         | ブローピング後、10~30秒以内に出血あり |
| 2      | 歯石あり         | 歯肉縁上または線下に歯石あり        |
| 3      | 4~5mmの歯周ポケット | ポケットの深さが4~5mm         |
| 4      | 6mm以上の歯周ポケット | ポケットの深さが6mm以上         |

【0055】

【表5】

| 被験者No | 実施例2<br>免疫クロマトグラフィー法 |              |       | 比較例2<br>CPI検査 |
|-------|----------------------|--------------|-------|---------------|
|       | 目視                   | イムノクロマトリーダー値 | ICレベル | CPIコード        |
| 1     | +                    | 89           | 1     | 2             |
| 2     | ++                   | 112          | 2     | 3             |
| 3     | +                    | 78           | 1     | 1             |
| 4     | ++                   | 156          | 3     | 3             |
| 5     | ++                   | 123          | 2     | 2             |
| 6     | ++                   | 180          | 3     | 3             |
| 7     | +                    | 98           | 1     | 1             |
| 8     | ++                   | 132          | 2     | 3             |
| 9     | ++                   | 178          | 3     | 4             |
| 10    | +                    | 75           | 1     | 2             |
| 11    | +++                  | 210          | 4     | 4             |
| 12    | ++                   | 121          | 2     | 3             |
| 平均    |                      | 129.3        |       | 2.6           |
| 1     | -                    | 16           | 0     | 0             |
| 2     | -                    | 13           | 0     | 1             |
| 3     | -                    | 20           | 0     | 0             |
| 4     | -                    | 18           | 0     | 0             |
| 5     | -                    | 14           | 0     | 0             |
| 6     | +                    | 58           | 1     | 1             |
| 7     | -                    | 19           | 0     | 0             |
| 8     | +                    | 65           | 1     | 1             |
| 平均    |                      | 27.9         |       | 0.4           |

40

【0056】

本発明における実施例2の免疫クロマトグラフィー法の結果より、歯周病患者の被験者12

50

名から採取した全ての唾液検体が「+」以上の陽性を示した。しかし、健常者の被験者から採取した唾液検体は8検体中の2検体を除き「-」の陰性であった。また、イムノクロマトリーダーの数値では、歯周病患者から採取した唾液検体の平均値が129.3であったが、健常者のGCF検体の平均値は27.9と有意に低かった。従って、本発明の方法を用いれば、免疫クロマトグラフィー法で唾液検体中のカルプロテクチンを検出、測定することによって、歯周病患者群と健常者群を概ね判別できることがわかった。

【0057】

続いて、本発明における実施例2の免疫クロマトグラフィー法による検査と比較例2のCPIによる歯周疾患検査について比較した。なお表5に示す「ICレベル」とは、実施例2のイムノクロマトリーダー値について50以下をレベル0、51~100をレベル1、101~150をレベル2、151~200をレベル3及び201以上をレベル4として5段階に設定し値を記した。前記ICレベルと比較例2のCPIコードの0~4の値について、Spearmanの順位相関係数を求めた結果、 $r=0.950$ と2つの判定法に有意な相関が得られた。

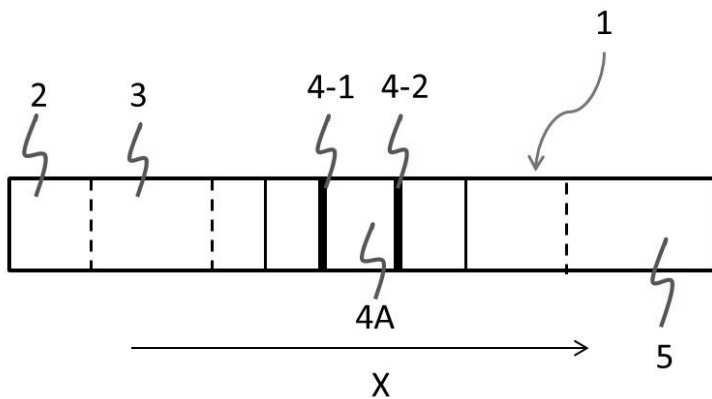
10

【0058】

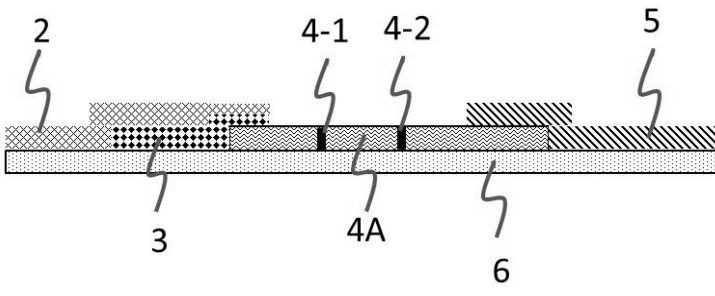
すなわち、実施例2に示す本発明の免疫クロマトグラフィー法による唾液を検体とする歯周疾患検査は、従来の集団検診等で行われるCPIによる歯周疾患検査と比較して、高い相関を示したことから、CPIによる歯周疾患検査の代替法になり得る。さらに、本発明法の検査方法は、従来のプローブを使う手法と比較して、簡便かつ非侵襲的に検体採取が可能であり、特に集団検診等の健康診断において、歯周疾患の可能性のある受診者を選別し、さらに歯科医師による精密な歯周組織検査を受診させるためのスクリーニング検査法として有効である。

20

【図1】



【 図 2 】



|                |                               |         |            |
|----------------|-------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 牙周病检测方法和诊断检测试剂盒               |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2016031306A</a> | 公开(公告)日 | 2016-03-07 |
| 申请号            | JP2014154169                  | 申请日     | 2014-07-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 株式会社松风                        |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | SHOFU INC.                    |         |            |
| [标]发明人         | 水野光春<br>三島昭宏<br>高橋啓至          |         |            |
| 发明人            | 水野 光春<br>三島 昭宏<br>高橋 啓至       |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543          |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D G01N33/543.521    |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>     |         |            |

|  |           |                              |          |  |
|--|-----------|------------------------------|----------|--|
| 摘要(译)<br>要解决的问题：提供一种检查方法和检查诊断试剂盒，能够简单快速准确地确定牙周病的存在与否以及进展情况。检查牙周病，其中检测或通过免疫测定和，龈沟液或唾液测定包括龈沟液或唾液的样品中的钙网蛋白的方法收集样品的方法，包括龈沟液或唾液样品中的免疫学色谱钙防卫蛋白以及通过使用费用方法的免疫学测量方法检测或测量的方法，并且包括用于牙周病的诊断试剂盒，其特征在于检测或测量钙卫蛋白。 | (21) 出願番号 | 特願2014-154169 (P2014-154169) | (71) 出願人 | 390011143<br>株式会社松風<br>京都府京都市東山区福穂上高松町1-1番地  |
|  | (22) 出願日  | 平成26年7月29日 (2014. 7. 29)     | (72) 発明者 | 水野 光春<br>京都府京都市東山区福穂上高松町1-1番地<br>内 株式会社松風内<br>(72) 発明者 三島 昭宏<br>京都府京都市東山区福穂上高松町1-1番地<br>内 株式会社松風内<br>(72) 発明者 高橋 啓至<br>京都府京都市東山区福穂上高松町1-1番地<br>内 株式会社松風内 |