

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3757171号
(P3757171)

(45) 発行日 平成18年3月22日(2006.3.22)

(24) 登録日 平成18年1月6日(2006.1.6)

(51) Int. Cl.			F I		
GO 1 N	33/531	(2006.01)	GO 1 N	33/531	A
C 1 2 M	1/12	(2006.01)	C 1 2 M	1/12	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	A
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	C
GO 1 N	1/04	(2006.01)	GO 1 N	1/04	H

請求項の数 5 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-18905 (P2002-18905)	(73) 特許権者	000003182
(22) 出願日	平成14年1月28日(2002.1.28)		株式会社トクヤマ
(65) 公開番号	特開2003-215126 (P2003-215126A)		山口県周南市御影町1番1号
(43) 公開日	平成15年7月30日(2003.7.30)	(73) 特許権者	391003576
審査請求日	平成16年6月28日(2004.6.28)		株式会社トクヤマデンタル
			東京都台東区台東1丁目38番9号
		(72) 発明者	宇梶 文緒
			東京都台東区台東1丁目38番9号 株式
			会社トクヤマデンタル内
		(72) 発明者	平田 広一郎
			東京都台東区台東1丁目38番9号 株式
			会社トクヤマデンタル内
		(72) 発明者	羽生 尚広
			東京都台東区台東1丁目38番9号 株式
			会社トクヤマデンタル内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物抗原の抽出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖鎖抗原を有する微生物が含有されている可能性のある被抽出液を濾材で濾過した後、該濾材上に、予め調合しておいた亜硝酸水溶液を流し込み、次いで、速やかに加圧して該流し込んだ亜硝酸水溶液の余分量を排出させ、さらに、濾材に含まれる残余の亜硝酸水溶液を、濾材に保持される微生物に一定期間作用させた後、遊離した糖鎖抗原を、濾材に回収液を流して回収することを特徴とする微生物抗原の抽出方法。

【請求項2】

被抽出液が、唾液、歯垢、またはその混合物を含んでなることを特徴とする請求項1記載の微生物抗原の抽出方法。

【請求項3】

糖鎖抗原を有する微生物が、ストレプトコッカス・ミュータンス、またはストレプトコッカス・ソブリヌスである請求項1または請求項2記載の微生物抗原の抽出方法。

【請求項4】

請求項1～3記載の何れかの方法で抽出した糖鎖抗原抽出液中に含まれる糖鎖抗原の量を免疫学的測定方法にて測定し、測定結果に基づいて被抽出液中に含まれる糖鎖抗原を有する微生物の量を決定することを特徴とする微生物の測定方法。

【請求項5】

免疫学的測定方法が免疫クロマトグラフィー法であることを特徴とする請求項4記載の微生物の測定方法。

10

20

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、被抽出液中の微生物を濾過により濃縮し、該微生物の糖鎖抗原を抽出する方法、及びそのための濾過装置、並びに上記のようにして調製した糖鎖抗原抽出液中の糖鎖抗原量を免疫学的測定方法により決定する微生物の高感度な測定方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

医学検査や食品検査、または環境測定において微生物検査は重要な検査項目となっている。

10

【0003】

口腔内には多種多様な微生物が存在しており、これらの微生物の中に感染症を引き起こす微生物が存在する場合があることが知られている。例えば、齲蝕、歯周病の発生には齲蝕関連菌や歯周病関連菌が強く関与していることが知られている。近年、従来感染症とは関係ないと思われていた疾患、例えば、心臓病、胃潰瘍、癌等の発症にも口腔内に存在する微生物が関与している場合があることが明らかとなり、口腔内の微生物検査は歯科領域のみならず、医科領域においても重要になっている。

【0004】

微生物の測定は、従来培養法によって実施されており、結果が判明するまで長時間かかるという問題があったが、免疫学的測定方法が開発され検査時間が大幅に短縮された。免疫学的測定方法は微生物が有する特異的な抗原に対する抗体を利用して該微生物を高感度に検出するという方法である。

20

【0005】

微生物から抗原を抽出し調製した抗原抽出液を免疫学的測定方法により測定することで、検出感度を更に高めることが可能である。その理由として、1) 抗原が可溶化され低分子となるので、抗原抗体反応が進行しやすくなる、2) エピトープが露出する、等のことが考えられている。

【0006】

特に、展開メンブレン上を抗原を含む溶液を展開させ、抗原抗体反応により抗原を検出する免疫クロマトグラフィー法により抗原を測定する場合、不溶性抗原よりも抽出抗原のほうが展開性が良いので、微生物から抗原を抽出することで高感度測定が期待できる。

30

【0007】

微生物抗原の抽出方法としては、界面活性剤処理、酵素処理、熱処理等多種多様な方法が実用化されているが、糖鎖抗原の抽出方法として亜硝酸抽出法(武井勉、阪大医学雑誌、35:93-109, 1990.)が知られている。該方法は、特に、A群レンサ球菌、口腔内レンサ球菌等ストレプトコッカス属に属する微生物の糖鎖抗原の抽出に対して有効である。

【0008】

この亜硝酸抽出法は、亜硝酸水溶液を糖鎖に反応させ、糖鎖を切断し菌体から遊離させるという方法であり、一般的な亜硝酸抽出法は、微生物を含む被抽出液に亜硝酸塩水溶液(多くの場合は亜硝酸ナトリウム)と酸水溶液(酢酸、塩酸、硝酸等)とを混合(以下、これらの溶液を「亜硝酸抽出試薬」とも総称す)することで亜硝酸を生成させ、微生物と該亜硝酸とを十分な時間反応させることにより実施される。上記の反応液は強酸性であるので、反応後に塩基[2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(以下、「トリス」とも略す)、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等]を添加し、該反応液を中和した後分析するのが一般的である。

40

【0009】**【発明が解決しようとする課題】**

ところが、唾液、歯垢、またはその混合物等を含む被抽出液から、前記ストレプトコッカス属に属する微生物の糖鎖抗原を抽出する場合等においては、該被抽出液に含まれる微生物

50

物濃度が希薄であるため、被抽出液に亜硝酸抽出試薬を直接に添加して糖鎖抗原抽出液を調製したのでは、その後において免疫学的測定方法により測定可能なほどに十分な濃度で糖鎖抗原を抽出することが困難であった。

【0010】

したがって、被抽出液中に含まれる糖鎖抗原を有する微生物の含有量が希薄な場合においても、免疫学的測定方法による測定が十分に可能な濃度で糖鎖抗原を簡単に抽出できる方法を開発することが望まれていた。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を続けてきた。その結果、糖鎖抗原を有する微生物が含有されている可能性のある被抽出液から該糖鎖抗原を抽出するに際して、濾過による濃縮と特定の態様の亜硝酸抽出法とを組合せることにより、上記の課題が解決できることを見出し本発明を完成するに至った。

【0012】

即ち、本発明は、糖鎖抗原を有する微生物が含有されている可能性のある被抽出液を濾材で濾過した後、該濾材上に、予め調合しておいた亜硝酸水溶液を流し込み、次いで、速やかに加圧して該流し込んだ亜硝酸水溶液の余分量を排出させ、さらに、濾材に含まれる残余の亜硝酸水溶液を、濾材に保持される微生物に一定期間作用させた後、遊離した糖鎖抗原を、濾材に回収液を流して回収することを特徴とする微生物抗原の抽出方法である。

【0013】

また、本発明は、上記方法で抽出した糖鎖抗原抽出液に含まれる糖鎖抗原の量を免疫学的測定方法にて測定し、測定結果に基づいて被抽出液に含まれる糖鎖抗原を有する微生物の量を決定することを特徴とする微生物の測定方法も提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明において微生物とは、細菌、リケッチア属 (*Rickettsia*)、クラミジア属 (*Chlamydia*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma*) および単細胞真核生物を指す。

【0015】

本発明で使用する被抽出液は、糖鎖抗原を有する微生物を含有する可能性のあるものであれば特に限定されないが、一般には、該糖鎖抗原を有する微生物の含有量を検査するためのものが対象となる。こうした被抽出液は、通常、測定対象である糖鎖抗原を有する微生物とそれ以外の不溶物とが混在する状態にある。

【0016】

上記被抽出液を例示すると、微生物の培養液、微生物の懸濁液、食品およびその懸濁液、咽頭ぬぐい液、唾液、血漿、血清、尿等の体液、或いは歯垢の懸濁液等が挙げられる。口腔内に存在する糖鎖抗原を有する微生物から糖鎖抗原を抽出する場合には、被抽出液は、口腔から採取した唾液、歯垢、またはその混合物を含んでなるものが、一般に使用される。

【0017】

唾液、歯垢に含まれる糖鎖抗原を有する微生物のうち、感染症を引き起こす原因になる微生物を例示すると、齶蝕関連菌、歯周病関連菌、上気道感染起因菌、日和見感染菌等が挙げられる。それぞれについて具体例を表示すると、齶蝕関連菌としては、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス (*Streptococcus sobrinus*) 等のミュータンスレンサ球菌に属する細菌、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) に属する細菌、アクチノミセス属 (*Actinomyces*) に属する細菌が、歯周病関連菌としては、ポルフィロモナス・ジンジパリス (*Porphyromonas gingivalis*)、アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、バクテロイデス・フォルシザス (*Ba*

10

20

30

40

50

cteroides forsythus)、カンピロバクター・レクタス(Campylobacter rectus)、エイケネラ・コロデンス(Eikenella corrodens)、トレポネマ・デンチコラ(Treponema denticola)、プレボテラ・インターメディア(Prevotella intermedia)、プレボテラ・ニグレッセンス(Prevotella nigrescens)、フゾバクテリウム・ヌクレアタン(Fusobacterium nucleatum)等が、上気道感染起因菌としては、A群レンサ球菌(Group A Streptococcus)、マイコプラズマ・ニューモニエ(Mycoplasma pneumoniae)、クラミジア・ニューモニエ(Chlamidia pneumoniae)等が、日和見感染菌としては、カンジダ菌(Candida sp.)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)、肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)、ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)、クレブシラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)、セラチア・マーセセンス(Serratia marcescens)等が挙げられる。

10

【0018】

本発明の抽出方法では、上記のような被抽出液を、まず、濾材を用いて濾過し、被抽出液中に存在する微生物を濾材上に保持する。この操作により、被抽出液中の糖鎖抗原を有する微生物は、濾材上に良好に濃縮される。なお、本発明において、濾材上への微生物の保持とは、濾材の面上に保持されるものだけでなく、その細孔内に捕らわれたものもいう。

20

【0019】

従来、免疫学的測定方法による微生物検査等において、被抽出液中の微生物を濃縮するに際して被抽出液が不溶物を多く含むような場合には、目詰まり等の危険性のある濾過法よりも、遠心分離法が主に採用されている。しかしながら、遠心分離法は、高価な遠心分離機が必要な上、先ず、被抽出液を遠心分離し微生物を沈殿させた後、上清を廃棄するという方法で実施しなければならず、操作が煩雑で濃縮に時間がかかる難点があった。したがって、簡単な濾過装置を用いて短時間に操作が実行できる濾過法により、糖鎖抗原を有する微生物を濃縮し、これを該微生物の検査等に利用することは極めて有意義である。

【0020】

本発明において、濾材としては、亜硝酸抽出を施しても安定なものであれば公知の材質からなる膜状、層状の濾材が制限無く使用できる。このような濾材を例示すると、メンブランフィルターの等のスクリーンフィルターやガラス繊維濾紙や濾紙のようなデプスフィルター等が挙げられる。微生物を含む被検体液を濾過する際に、通常使用されるメンブランフィルターの材質は、セルロースアセテート、ポリビニリデンフルオライド(以下、「PVDf」と略す)、ナイロン等であるが、これらの材質は、亜硝酸抽出時の強酸性条件下ではやや不安定であるため、前記ガラス繊維や濾紙からなるデプスフィルターや、或いは酸に対して十分な耐性を有する材質からなるスクリーンフィルターを使用するのが好ましい。

30

【0021】

本発明において濾材の孔径は、被抽出液に含まれる測定対象とする糖鎖抗原を有する微生物の90%以上が保持される孔径であることが好ましい。

40

【0022】

ここで、微生物のサイズは、例えば、口腔内に存在する糖鎖抗原を有する微生物の一種であるストレプトコッカス・ミュータンスやストレプトコッカス・ソブリヌスであれば0.5~0.9 μ mであるように、大抵において、0.3~1.0 μ mの範囲にある。したがって、微生物検査における被検体液(糖鎖抗原抽出液)の調製工程等において、被抽出液を濾過する場合には、濾材としては、上記微生物のサイズよりも十分に小さい孔径、具体的には、0.22~0.45 μ mの孔径を有する濾材が使用されるのが常法である。

【0023】

本発明においても、被抽出液の濾過は、上記小孔径を有する濾材を用いて行えば、糖鎖抗

50

原を有する微生物を良好に捕捉することができるが、このように小孔径であると、液の濾過速度が遅くなり、また、被抽出液にその他の不溶物が混在する場合には、目詰まりも生じ易くなる。そして、このようにして濾材に目詰まりが生じた場合には、上記工程に続く、濾材上に保持される糖鎖抗原を有する微生物に亜硝酸水溶液を作用させる工程においても、抽出の効率性がやや低下する。

【0024】

このような背景から、本発明では、濾材として、 $0.8 \sim 2 \mu\text{m}$ 、更に好適には $0.8 \sim 1.6 \mu\text{m}$ の孔径のものを用いるのが好ましい。上記孔径は、濾材上に保持する前記糖鎖抗原を有する微生物の大きさよりも大抵において若干上回るものになるが、このように糖鎖抗原を有する微生物の場合においては、この程度に孔径が大きい濾材であってもほとんど流下させることなく捕捉できる。したがって、濾過速度も大幅に向上し、さらに、他の不溶物による目詰まりも極めて生じ難く、より効率的に亜硝酸水溶液を用いた糖鎖抗原の抽出が行えるようになる。

10

【0025】

なお、本発明において濾材の孔径とは、濾材が、その孔径より大きな粒子の98%以上を捕捉する値のことをいう。濾材がメンブランフィルターの等のスクリーンフィルターである場合は、市販濾材カタログに表示されている孔径が本発明の孔径に相当し、濾材がガラス繊維濾紙や濾紙のようなデプスフィルターの場合は、市販濾材カタログに表示されている保留粒子径や粒子保持能が本発明の孔径に相当する。

【0026】

濾材上に保持した微生物は、濾過装置に洗浄液を流して洗浄するのが好ましい。本発明の方法により抽出された糖鎖抗原の量を免疫学的測定方法により測定する場合、上記洗浄を行うことにより、非特異的反応による偽陽性の発生を低減させることができる。

20

【0027】

濾過法によれば、濃縮した微生物の洗浄を簡便で短時間に行えるという特徴がある。例えば、本発明の抽出方法において、このように濾材上に保持した微生物の洗浄操作を加えた場合、濾過装置に洗浄液を添加し流下させるという簡単な操作で洗浄を短時間に完了させることができる。これに対して、微生物の洗浄を遠心分離法により行った場合には、濃縮された微生物の洗浄操作は、被濃縮液を遠心分離し上清を廃棄した後、得られた沈殿を洗浄液に懸濁し、さらに遠心分離して上清を廃棄する煩雑な方法により行わなければならない。上記濾過法の通常、2～5倍の操作時間が必要になる。

30

【0028】

さらに、このように濾過法において洗浄を施せば、遠心分離法による洗浄に比べて洗浄効率を高くすることができ、後述する実施例で示されるように、遠心分離法で濃縮した糖鎖抗原を有する微生物から抽出した糖鎖抗原では、非特異的反応が検出されてしまうような特異性の低い抗体により免疫学的測定方法を実施した場合でも、正確な測定が可能になるという大きな効果も得られる。

【0029】

微生物の洗浄液としては、例えば、緩衝液、酸水溶液、アルカリ水溶液、界面活性剤水溶液等の液体が使用できる。

40

【0030】

被抽出液の濾過操作は、一般的な濾過の方法に従って実施できる。重力下の他、加圧下、減圧下で濾過しても良い。好適には、内部に濾材が固定されたシリンジフィルターを使用し、被抽出液を注入した後シリンジを用いて加圧することで実施するのが好ましい。また、例えば、シリンジ内に濾材を固定し、プランジャーを外した状態で該シリンジ内に被抽出液を分注し、プランジャーをシリンジに挿入し加圧することで濾過することもできる。

【0031】

また、例えば図1に示すような、容器上面が開口し、底壁に排液口(1)が突出し、且つ内部に濾材(2)が固定された円筒状等の形状からなる本体容器(3)と、該本体容器(3)の上面に嵌合可能であり、天板部にシリンジ差込口(4)が突出する蓋部(5)からなる濾過装置(6)

50

を用いて濾過を行うのも好適な態様である。即ち、この濾過装置(6)によれば、容器本体の上面開口部から、被抽出液を容器内に注液し、次いで、この容器本体の上面に蓋部(5)を嵌合した後、そのシリンジ差込口(4)に加圧用シリンジの先端部を取付け、プランジャーを押して容器内を加圧し濾液を排液口(1)から排出することにより、被抽出液を簡単な操作で迅速に加圧濾過することができる。また、かかる濾過装置(6)によれば、上記濾過後の洗浄操作や、さらには、その後において、濾材上に保持された微生物に亜硝酸水溶液を作用させる際にも、同様な手順により効率的に操作を行うことができる。

【0032】

ここで、上記構造の濾過装置において、本体容器(3)は、柔軟な物質(例えばポリプロピレン等のプラスチック)で構成されているのが好ましい。この本体容器(3)に対して、濾材(2)は接着剤により底面に保持されていても良いし、または特に接着をせずに摩擦力によってのみで底面に保持されていても良い。

10

【0033】

濾材(2)を本体容器の底面に直接固定した場合、濾過速度が遅い被抽出液(例えば、粘度が高い、大量の不溶物を含有する場合等)を濾過するとき、濾過速度を上げようとして必要以上に加圧すると、濾材(2)の一部が排液口(1)内に押し出され、濾過速度が顕著に低下する場合があります。このような場合には、濾材(2)と底面の間に、サポートフィルター、メッシュシート等を置けば濾材(2)の排液口(1)内への進入を阻止でき、より好適である。サポートフィルターとしては、例えば、一般的な液体クロマトグラフィー用オープンカラム底部においてクロマトグラフィー担体のカラムからの流出を防ぐ目的で使用されているもの、具体的には、ガラスフィルター、ポリプロピレンフィルター、ポリエステルフィルター、ポリアミドフィルター等が使用できる。メッシュシートとしては、例えば一般的に市販されている、上記サポートフィルターと同様な材質のメッシュシートが使用できる。

20

【0034】

さらに、本体容器(3)の上面への蓋部(5)の嵌合は、摩擦力で行うだけでなく、スクリューネジまたはその他の密閉方法により行っても良い。

【0035】

次に、本発明の微生物抗原の抽出方法では、上述のような方法によって濾材上に保持させた微生物に亜硝酸水溶液を作用させることにより、上記微生物が糖鎖抗原を有する場合において、該糖鎖抗原を抽出する。微生物に亜硝酸水溶液を作用させる方法は、濾材上に、予め調合しておいた亜硝酸水溶液を流し込み、次いで、速やかに加圧して該流し込んだ亜硝酸水溶液の余分量を排出させ、さらに、濾材に含まれる残余の亜硝酸水溶液を、濾材に保持される微生物に一定期間作用させる方法により実施する。亜硝酸水溶液は、一般には、亜硝酸塩水溶液と酸水溶液とを混合することで調合できる。抽出効率と、後の免疫学的測定法での精度という観点から、混合液の液量に対して、0.2~8Mの亜硝酸塩と0.3~4Mの酸とが使用されたこととなるような量で各溶液が混合されて得られた亜硝酸水溶液を用いるのが望ましい。

30

【0036】

亜硝酸水溶液の使用量は、濾材の上面の面積 1 cm^2 当たり $5\sim 400\ \mu\text{l}$ 、好適には $20\sim 300\ \mu\text{l}$ が好ましい。亜硝酸水溶液を作用させる温度は、 $15\sim 50$ が好ましく、また、作用時間は $1\sim 10$ 分が好ましい。

40

【0037】

亜硝酸水溶液の調合は、亜硝酸塩水溶液として、例えば、0.2~8Mの亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム等を用い、酸水溶液として、例えば、0.3~4Mの酢酸、硝酸、塩酸、クエン酸等を混合することにより行う。

【0038】

従来の亜硝酸抽出法では、糖鎖抗原の抽出時、即ち、糖鎖抗原を抽出する微生物の共存化で亜硝酸塩水溶液と酸水溶液とを反応させて亜硝酸水溶液を生成させ微生物に作用させるのが一般的な手法であるが、本発明では、斯様な常法を採用せず、予め、こうした反応

50

により亜硝酸水溶液を調合しておき、これを前記濾過により、上記微生物が保持された濾材上に流し込むことにより作用させる。濾材に保持された微生物は、通常、その他の不溶物と混ざった状態にあり、さらに細孔の内部まで侵入しているものもあり、これらに均一に亜硝酸水溶液を作用させるには、上記の如く予め均一な溶液に調製してから濾材に流し込む方が効果的であり、これにより、糖鎖抗原の抽出効率がさらに向上し、抽出時間の短縮化も可能になる。

【0039】

なお、調合した亜硝酸水溶液は、亜硝酸の安定性の観点から、調合してから使用するまであまり長期間を空けないのが好ましいが、2～25 に保管するのであれば4時間程度保存しても、実用上ほとんど問題は生じない。

10

【0040】

濾材上に保持される微生物やその他の不溶物は、濾材の表面だけでなく細孔の内部まで侵入しているため、供給した亜硝酸水溶液は、重力下ではほとんど流下しないのが一般的である。そのため、細孔の内部に保持される微生物までは、亜硝酸水溶液が十分に作用し難いため、本発明では、供給した亜硝酸水溶液を供給当初に加圧して流下させる。これにより、亜硝酸水溶液の余分量は排出されてしまうものの、必要量が濾材の細孔の隅々まで均一に行き渡るため、その後、亜硝酸の作用時間を前記時間程度とることにより糖鎖抗原の抽出効率は一層に向上する。

【0041】

ここで、亜硝酸水溶液の加圧による流下は、液を濾過装置に流し込んだ後速やかに終える必要がある。具体的には、少なくとも2分以内に終えるように操作する。これ以上時間が経過した後流下させると、糖鎖抗原の抽出が相当程度進行してしまうため、排出される余分量の液に、遊離した糖鎖抗原が同伴して有効量が消失するようになる。糖鎖抗原の抽出時に亜硝酸塩水溶液と酸水溶液とを反応させて亜硝酸水溶液を生成させる手法では、両方の液を濾材に供給した後、かかる短時間で加圧して混合液を流下させたのでは、均一な亜硝酸水溶液が生成していないおそれがあるため、かかる観点からも、濾材への供給に先立ち、亜硝酸水溶液を調合しておく手法は有利である。

20

【0042】

本発明において糖鎖抗原抽出液は、上記亜硝酸抽出法により濾材上に保持される微生物に亜硝酸水溶液を作用させた後、液成分を流下させて回収することにより行えば良い。その際、前記した如くに、作用の開始当初に亜硝酸水溶液の余分量を加圧して排出させているため、濾材に含有される亜硝酸水溶液の量は僅かである。したがって、遊離した糖鎖抗原を十分に回収するには不足するため、適量の回収液を追加して流す操作を行う。この回収液は、水等でも良いが、残留する酸による強酸性を中和するため、回収される糖鎖抗原抽出液のpHが7.0～8.5になるような塩基性水溶液であるのが好ましい。

30

【0043】

このような塩基性水溶液としては、1～3M 水酸化ナトリウム水溶液、0.5～2M トリス水溶液、0.5～1M 炭酸水素ナトリウム水溶液等を用いるのが好ましい。なお、残留する酸の中和は、糖鎖抗原抽出液を回収した後、所定濃度の上記塩基性水溶液を混合することにより実施することも可能であるが、免疫学的測定方法での感度の観点からは、上記したように、回収液を塩基性水溶液として実施する方がより好ましい。

40

【0044】

本発明では、上記方法により抽出した糖鎖抗原抽出液を被検体液として、免疫学的測定方法により、含有される糖鎖抗原量を定量し、その結果に基づいて被抽出液中の微生物量を決定する。以下、この微生物の測定方法について説明する。

【0045】

本発明において免疫学的測定方法は、糖鎖抗原抽出液に存在する糖鎖抗原に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体を使用する。該抗体におけるグロブリンクラスは特に限定されず、現在知られている全てのグロブリンクラスが使用できる。更に、通常の抗体分子のみならず、該抗体の部分分解物(Fab、Fab'、Fab'2等)、及び該抗

50

体の活性フラグメント（抗体の抗原認識部位）も使用できる。

【0046】

例えば、ストレプトコッカス・ミュータンスやストレプトコッカス・ソプリヌスの糖鎖抗原抽出液中の糖鎖抗原量を測定し、被抽出液中のストレプトコッカス・ミュータンスやストレプトコッカス・ソプリヌスの量を決定する場合には、これら細菌の糖鎖抗原と反応する抗体を使用する。

【0047】

このような抗体は公知であり、具体例として、ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗体としては、Z b l . B a k t . H y g . (1 9 8 7 年) A 2 6 5 巻 3 3 0 - 3 3 9 ページに記載のポリクローナル抗体、ストレプトコッカス・ソプリヌスに対する抗体として、阪大医学雑誌（1990年）35巻93 - 109ページに記載のポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が例示できるが、ストレプトコッカス・ミュータンスやストレプトコッカス・ソプリヌスの糖鎖抗原に結合できる抗体であれば特に限定されず、公知の方法で作製したポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が使用できる。

10

【0048】

例えば、ポリクローナル抗体は、免疫動物にストレプトコッカス・ミュータンス菌体或いはストレプトコッカス・ソプリヌス菌体、またはこれらの菌体から得られる糖鎖抗原抽出液を免疫することにより得ることができる。得られたポリクローナル抗体は、他の微生物との交差反応性を有する抗体の除去等の精製処理により、さらに特異性をあげて使用するのが好ましい。

20

【0049】

免疫学的測定方法の具体的手法は、免疫凝集法、光学免疫測定方法、標識免疫測定方法、およびこれらの方法の組合わせ等の従来公知の方法が制限無く採用出来る。

【0050】

以下、これら免疫学的測定方法について説明する。

【0051】

[免疫凝集法]

該方法は、抗原抗体反応に基づく不溶性担体の凝集反応を利用して、糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量する方法である。半定量的方法としてはラテックス凝集法、マイクロタイター法等が、定量的測定方法としてはラテックス定量法等がある。

30

【0052】

例えば、ラテックス凝集法を利用して糖鎖抗原抽出液中の抗原量を免疫学的に測定する場合には、ラテックスビーズに微生物の糖鎖抗原と結合する抗体（以下、単に「抗体」ともいう）を固定化した抗体感作粒子からなる測定試薬を作製後、該測定試薬と糖鎖抗原抽出液を混合し、抗原抗体反応後における感作粒子の凝集の度合を、目視、或いは光学的測定方法等により検出することで測定することが出来る。

【0053】

[光学免疫測定方法]

該方法は、抗体と糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った場合に、抗原抗体反応の結果生じる凝集物の濁度の変化を検出する方法、又は抗体を固定化した薄層（以下、「抗体層」ともいう）に糖鎖抗原抽出液を接触させ、抗原抗体反応の結果生じる抗体層の屈折率の変化を透過光や表面プラズモン波等の変化として検出する方法等、抗原抗体反応の有無を光学的に検出する方法のことである。

40

【0054】

[標識免疫測定方法]

該方法は、抗体に放射性物質、酵素、各種色素類、コロイド類、各種粒子等の各種標識物質を結合させて得た標識抗体を含む測定試薬と、糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、糖鎖抗原抽出液中の抗原に結合した標識物質の量、すなわち標識物質に由来する放射活性、酵素活性、蛍光強度、着色等を測定することによって、糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量する方法である。

50

【 0 0 5 5 】

該方法では、例えば抗体を固定化した不溶性担体（粒子、メンブレン、イムノプレート等）からなる測定試薬と糖鎖抗原抽出液とを接触させて抗原抗体反応を行った後に、抗体を標識物質で標識した標識抗体を含む別の測定試薬を接触させて更に抗原抗体反応を行った後に、標識物質の量を測定することによって、又は糖鎖抗原抽出液と標識物質で標識した糖鎖抗原とを混合し、抗体を固定化した不溶性担体からなる測定試薬に接触させて抗原抗体反応を行った後に、抗体に結合した標識物質の量を測定することによって糖鎖抗原抽出液中の抗原を検出、定量することができる。

【 0 0 5 6 】

標識物質としては、放射性物質として放射性ヨード、放射性炭素等が、酵素としてペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ等が、各種色素類として、フルオレセインイソチシアネート、テトラメチルローダミン等の蛍光色素類が、コロイドとして金コロイド、炭素コロイド等が、各種粒子としては着色ラテックス粒子等が使用出来る。なお、酵素標識を行う場合は、チオール基とマレイミド基、アミノ基とアルデヒド基等の共有結合により直接標識する、或いはビオチン・アビジン複合体を介し標識する等の方法が使用可能である。

10

【 0 0 5 7 】

また、標識酵素としてアルカリホスファターゼ及びパーオキシダーゼを使用し、さらに前者の酵素の場合にはジオキセタン誘導体等の化学発光物質を、また後者の酵素の場合にはルミノール誘導体等の化学発光物質を酵素の基質として使用した場合には、該基質の発光を検出することも出来る。

20

【 0 0 5 8 】

これら各種標識免疫測定方法における操作、手順等は一般に採用されているそれらと特に異ならず、公知の非競合法や競合法、サンドイッチ法等に準じることが出来る。また、抗体と共に、上記の各標識物質で標識した二次抗体、プロテイン A 等の抗体に結合可能な物質を使用して糖鎖抗原の検出・定量に用いることもできる。

【 0 0 5 9 】

該標識免疫測定方法では、用いる標識に応じて従来使用されている方法が特に限定無く使用できるが、中でも放射性物質を標識として使用する放射免疫測定方法、酵素を標識として使用する酵素免疫測定方法、色素、特に蛍光色素を標識として利用する蛍光免疫測定方法、酵素の基質としての化学発光物質を標識として利用する化学発光免疫測定方法等は定量性が高いので、高精度の定量測定を行なう場合にはこれら測定方法を採用するのが好適である。また、コロイドまたは各種粒子を標識として使用するフロースルー免疫測定方法、免疫クロマトグラフィー法、並びにラテックス凝集法は、操作が簡便であるという特徴がある。

30

【 0 0 6 0 】

これらの方法のなかでも特に免疫クロマトグラフィー法は、歯科医院や家庭においても実施可能な簡便迅速な方法である。以下に図を参照して該方法について詳しく説明する。

【 0 0 6 1 】

図 2 および図 3 に本発明の免疫学的測定方法で好適に使用できる代表的なストリップ(7)の構造を示す。該ストリップ(7)は、従来のストリップと同様に、それぞれ目的に応じた多孔性支持体からなる各部材、すなわち糖鎖抗原抽出液を一時的に吸収、保持するためのサンプルパッド(8)、標識抗体を一時的に保持するためのコンジュゲートパッド(9)、検出抗体が固定化される展開メンブレン(10)、およびサンプルパッド(8)より展開された糖鎖抗原抽出液を吸収するための吸収パッド(11)がこの順番で接合された構造からなる。

40

【 0 0 6 2 】

ストリップ(7)におけるコンジュゲートパッド(9)には、糖鎖抗原抽出液中の抗原を標識するための抗体（以下、「標識抗体」という）が塗布・乾燥することにより保持されている。該標識抗体としては、例えば金コロイド等の標識物質で標識した抗体が使用される。また、上記展開メンブレン(10)上の検出ライン(12)には、糖鎖抗原抽出液中の抗原を捕捉す

50

るための検出用抗体が固定化されている。

【0063】

なお、図2および図3中に示される各寸法(長さ)は、単に大きさの目安を示すものであり、本発明の免疫クロマトグラフィー法で使用するストリップの大きさは、これら図に示される値に限定されるものではない。

【0064】

上記各部材を構成する多孔性支持体に用いる材料は特に限定されず、各部材の目的に応じて吸湿性材料、多孔質材料、繊維質材料等から適宜選択される。例えば、サンプルパッド(8)としては、濾紙、吸取紙等を用いるのが好適であり、コンジュゲートパッド(9)としてはガラス繊維布、ポリプロピレン不織布、ガラスフィルター等を用いるのが好適である。また、展開メンブレン(10)としてはニトロセルロース、或いは酢酸セルロースを含むニトロセルロース等を用いるのが好適であり、吸収パッド(11)としては濾紙、吸取紙等を用いるのが好適である。

10

【0065】

なお、検出用抗体およびコントロール抗体の展開メンブレン(10)への固定化方法は特に限定されず、従来公知の物理的吸着法や共有結合法が何ら制限無く使用できるし、他のタンパク質等と混合して固定化することもできる。また、展開メンブレンへの糖鎖抗原抽出液成分の非特異的吸着を抑制する、或いは展開メンブレンへの糖鎖抗原抽出液の湿潤性を向上するため抗体固定化後の展開メンブレンを公知の方法によりタンパク質、脂質、高分子化合物等によりブロッキング処理することもできる。このブロッキング処理に用いるタンパク質等は特に限定されるものではないが、一般的な免疫学的測定方法において、非特異的反応を抑制する目的で使用されているBSA、スキムミルク等が好適である。また、糖鎖抗原抽出液が展開メンブレンを均一に展開するように、展開メンブレンの吸水性を調整するために、展開メンブレンの表面に親水性重合体や界面活性剤を被覆または含浸させることもできる。

20

【0066】

なお、コンジュゲートパッド(9)については、糖鎖抗原抽出液を添加したときに、糖鎖抗原抽出液と標識抗体との複合体が、この部分から容易に脱離するように、水溶性重合体、またはサッカロース等の糖類で予めブロッキングした後標識抗体を添加してから乾燥させる、或いは標識抗体を予め水溶性重合体、またはサッカロース等の糖類と混合してからコンジュゲートパッドに塗布し乾燥させるのが好ましい。

30

【0067】

上記水溶性重合体としては、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、セルロースエーテル(メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシエチルセルロース、オキシエチルセルロース、シアンエチルセルロース等)、ゼラチン等が使用できる。

【0068】

また、標識抗体を調製するための標識物質としては、金コロイド、炭素コロイド、着色ラテックス等の目視によって確認できる標識物が使用できる他、放射性物質や蛍光物質も使用可能である。また、標識物質として酵素を利用し、抗原抗体反応の後に基質を添加して、酵素反応により生じる化合物を検出することもできる。本発明の抗体の標識化は特に限定されず、従来一般的に採用されている方法により行なうことができる。

40

【0069】

免疫クロマトグラフィー法では、前記ストリップ(7)のコンジュゲートパッド(9)の近傍に位置するサンプルパッド(8)に糖鎖抗原抽出液を添加し、室温で1~30分間放置することにより糖鎖抗原抽出液とともに標識抗体を検出ライン(12)まで展開し、サンドイッチ法の原理に基づいて、展開液中の標識抗体と結合した微生物の糖鎖抗原を検出用抗体にて検出ライン(12)上に捕捉し、捕捉された微生物の糖鎖抗原に結合した標識抗体を検出することにより、糖鎖抗原抽出液中の微生物の糖鎖抗原の有無またはその多寡を測定することができる。このときに標識抗体が糖鎖抗原抽出液と共に正常に展開されていることは、上記

50

検出ライン(12)の下流のコントロール判定ライン(13)に標識抗体と反応する抗体を固定化しておき、この位置で標識抗体が検出されることにより確認することができる。

【0070】

なお、図2に示される展開メンブレン(10)上の検出ライン(12)およびコントロール判定ライン(13)の位置、順、形状、数等は一例であり特に限定されるものではない。

【0071】

以上、標識抗体を予め塗布して乾燥させたストリップを用いた免疫クロマトグラフィー法について説明したが、標識抗体を予め糖鎖抗原抽出液と混合し抗原抗体反応を行わせた後に、該混合液を検出用抗体が固定化された多孔性支持体の一端に添加するという方法でも測定可能である。

【0072】

免疫クロマトグラフィー法による測定においては、例えば以下のような手順で測定を行なうことにより、迅速簡便に糖鎖抗原抽出液中の抗原量を定量し、この値に基づいて被抽出液中の微生物量を決定することができる。

【0073】

即ち、まず、糖鎖抗原抽出液(例えば100~200 μ l)を分取し、前記ストリップのサンプルパッドに添加し、所定時間(例えば1~30分)静置した後、該ストリップの検出ライン(12)およびコントロール判定ライン(13)の着色の有無あるいはその状態により判定することにより糖鎖抗原が存在するか否か、或いはその量を知ることができる。糖鎖抗原抽出液中の抗原濃度と被抽出液中の微生物濃度は比例関係にあるので、抗原量に基づいて被抽出液中の微生物量を決定する。

【0074】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0075】

製造例1[ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の作製と精製]

(1)[ストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清の作製]

ブレインハートインフュージョン、「BHI」とも略す;DIFCO社)3.7gを100mlの超純水に溶解後、オートクレーブ処理し、BHI液体培地を調製し、Ingbritt(ストレプトコッカス・ミュータンス)を37、18時間、嫌気条件下で培養した。培養液を4000g、5分遠心処理し、上清の培地成分を除去し菌体沈殿を回収した。次いで、沈殿物を100mlのリン酸生理食塩緩衝液(pH7.4)(以下、「PBS」とも略す)に懸濁させて、同様の遠心分離をする操作を3回行い、沈殿物を洗浄した。

【0076】

菌体沈殿をPBSに懸濁し $A_{600} = 1.0$ に調整し、Ingbrittの菌体懸濁液を調製した。なお、該菌体懸濁液を超音波処理後、適宜希釈した後にBHI培地プレート上に添加し、生じたコロニー数を計数し菌体懸濁液の希釈倍率を乗じることで該菌体懸濁液の菌体濃度を求めたところ、約 1×10^9 個/mlであった。

【0077】

免疫は以下のように実施した。

【0078】

第1週は菌体懸濁液0.5mlを、5日連続で5回ウサギに対し耳介静脈注射した。第2週は該菌体懸濁液1.0mlを、5日連続で5回ウサギに対し耳介静脈注射した。第3週は菌体懸濁液2.0mlを、5日連続で5回ウサギに対し耳介静脈注射した。第4週は第3週と同様に免疫した。力価の上昇をスライドガラスを利用した菌体の凝集反応の程度により確認後、最終免疫より1週間後に、定法に従い採血しストレプトコッカス・ミュータンスに対する抗血清を得た。

【0079】

10

20

30

40

50

(2)〔ストレプトコッカス・ミュータンスに対するポリクローナル抗体の精製〕
BHI培地にて、上記(1)と同様の方法でChallis(ストレプトコッカス・ゴールドニイ)を培養した後、PBSで洗浄し 2×10^{12} 個/ml含む菌体懸濁液30mlを調製した。次いで該菌体懸濁液と、抗血清0.5mlを混合し4、60分反応した。混合液を4000g、5分遠心処理後上清を分取し、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターで濾過した。

【0080】

次いで、あらかじめPBSで平衡化した1mlのプロテインA-セファロース(アマシャムファルマシアバイオテク社)を充填したカラムに上清試料を添加し、5mlのPBSでカラムを洗浄後、5mlの0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH3.0)にて溶出し、直ちに1M トリス-塩酸(pH9.0)を添加しpH7.4に調整した。IgGの溶出画
10

【0081】

参考例1 [濾過装置による被抽出液の濾過]

被験者にパラフィンペレットを5分間噛ませ、分泌された唾液を被抽出液として回収した。

【0082】

SCカートリッジ(マルエム社製)にガラス繊維濾紙、または濾紙をセットし、図1の構造の濾過装置を作製した。ガラス繊維濾紙、濾紙は表1のものを使用した。

【0083】

1mlの被抽出液を濾過装置に添加し、蓋を閉めシリンジにより加圧濾過し、濾液を回収した。被抽出液及び濾液を適宜希釈して、 $100 \mu\text{l}$ をミチス・サリパリウス・バシトラシン(以下、「MSB」とも略す)固体培地上に添加し、37、嫌気条件下、48時間培養した。
20

【0084】

メンブランフィルターによる濾過の例として、マイレクスHV(孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のPVDF膜、直径13mm)による被抽出液の濾過も実施した。MSB培地上に生じるコロニー数を計数し、保持率[(被抽出液中の菌数-濾液中の菌数)/被抽出液中の菌数 $\times 100$]を算出した。結果を表1に示す。

【0085】

【表1】

実験 No.	孔径(μm)	濾過量(ml)	捕捉率(%)	製品名(メーカー)*	材質
1	0.3	0.2	>95	GF-75 (A)	ガラス繊維濾紙
2	0.6	0.4	>95	GA-55 (A)	ガラス繊維濾紙
3	0.8	1.0	>95	GA-200 (A)	ガラス繊維濾紙
4	1.0	1.0	>95	GA-100 (A)	ガラス繊維濾紙
5	1.6	1.0	>95	GF/A (W)	ガラス繊維濾紙
6	2.0	1.0	90	GMF150 2.0 μm (W)	ガラス繊維濾紙
7	3.0	0.8	70	グレード6 (W)	濾紙
8	11.0	1.0	10	グレード1 (W)	濾紙
9	0.45	0.1	>95	マイレクス HV(M)	PVDF メンブランフィルター

*A: アドバンテック東洋社、W: ワットマン社、M: ミリポア社

【0086】

MSB培地で生育してくる菌は、主にストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソプリヌスであるので、菌体は $0.5 \sim 0.9 \mu\text{m}$ の大きさである。菌体より小さな孔径の濾材を用いた場合(実験No. 1, 2, 9)、早期に目詰まりが生じてしまい濾過できた液量は0.5ml未満であった。特に、メンブランフィルターを用いた場合は
50

0.1 mlしか濾過できなかった。

【0087】

濾材による捕捉率は、孔径0.8~2.0 μmまで90%以上、特に0.8~1.6 μmでは95%以上であり、菌体自身の大きさより孔径が大きくてもこの範囲なら口腔内のストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスが濾材上に捕捉されることが確認できた。また、0.8~2.0 μmの濾材では濾過可能な被検体液量は1.0 mlであった。

【0088】

比較例1 [唾液と歯垢を含む被抽出液からの糖鎖抗原の抽出：濾材に、亜硝酸水溶液と酸水溶液を別々に流し込んで亜硝酸抽出した態様]

10

(1) [被抽出液の採取と培養法による菌数の測定]

異なる18人の被験者から、実施例1の方法に従い唾液及び歯垢を含む検体をそれぞれ得た。各検体を、適宜希釈して、100 μlをMSB固体培地上およびBHI固体培地上に添加し、37℃、嫌気条件下、24~48時間培養した。MSBおよびBHI固体培地上に生じるコロニー数を計数し、被抽出液の希釈率から、ミュータンスレンサ球菌濃度を個/mlとして算出し、表2に示した。

【0089】

MSBおよびBHI培地上のストレプトコッカス・ミュータンスの識別は、コロニーの形態学的分類、および形態学的に識別不可能なコロニーに関しては、該コロニーを純粋培養後、ミュータンスレンサ球菌の血清型特異的な抗体を利用した免疫学的測定方法および、糖発酵試験等の生化学的方法によりストレプトコッカス・ミュータンスの同定を行った。

20

【0090】

(2) [糖鎖抗原抽出液の調製]

(1)で採取した被抽出液0.5 mlをGA-100をセットした濾過装置により濾過した。次いで、0.5 mlの0.1 M NaOH溶液を濾過装置に添加し濾過し、さらに0.5 mlのPBSを濾過装置に添加し濾過することで、濾材上の微生物と濾材の洗浄を行った。濾材に20 μlの2 M 酢酸溶液と20 μlの1 M 亜硝酸ナトリウム塩水溶液を添加し、室温で2分、または10分間放置した後、90 μlの0.05% Tween 20を含む1 M トリス(pH未調製)を添加し、濾過装置をシリンジで加圧することで糖鎖抗原抽出液(100~140 μl)を回収した。

30

【0091】

(3) [免疫クロマトグラフィー法ストリップによる糖鎖抗原抽出液の測定]コロイド粒径が40 nmの市販金コロイド溶液(EY Laboratory) 10 mlに100 mM K_2CO_3 を88 μl添加し、pHを9.0に調製後、0.22 μmフィルター処理した。金コロイド溶液の520 nmの吸光度を測定したところ、 $A_{520} = 1.0$ であった。

【0092】

次いで、1 mg/mlに調整した製造例1で調製した抗体の2 mMホウ酸緩衝溶液(pH 9.0) 64 μlを、上記金コロイド溶液に攪拌しながら添加し、室温下5分放置した。次いで、10%スキムミルク-2 mMホウ酸緩衝液(pH 9.0)を1.1 ml攪拌しながら添加し(スキムミルク終濃度1%)、室温下30分放置した。次いで、反応溶液を1000 g、30分遠心処理し、上清を除去後、2 mlの2 mM PBS(pH 7.4)を添加し、下層の金コロイド画分を再懸濁した。該再懸濁した画分の520 nmの吸光度を測定したところ、 $A_{520} = 4.9$ であった。得られた金コロイド画分(以下、「金コロイド標識抗体」とも略する)は、4℃にて保存した。

40

【0093】

ニトロセルロースメンブレン(MILLIPORE社、Hi-Flow Plus Membrane、HF180、25 mm x 6 mm)からなる展開メンブレン(10)上の検出ライン(12)およびコントロール判定ライン(13)上に、それぞれ1 mg/mlの製造例1で調製した抗体および抗ウサギIgG(H+L)ポリクローナル抗体(ICNファーマシュー

50

ティカルズ社) 1 μ l をスポットし、インキュベーター内で37、60分乾燥し抗体を固定化した。該抗体固定化メンブレンを1%スキムミルク - 0.1% Triton X 100 水溶液中で室温下、5分振とうした。次いで、該メンブレンを10mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で室温下、10分振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。

【0094】

また、コンジュゲートパッド(9) (MILLIPORE社、7.5mm x 6mm) を0.5% PVA - 0.5% ショ糖水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。該コンジュゲートパッドに $A_{520} = 1.0$ に調整した金コロイド標識抗体を25 μ l 添加し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。更に、サンプルパッド(8) (MILLIPORE社、17mm x 6mm) を1% Tween 20 - PBS 水溶液中で1分間振とう後取り出し、真空ポンプで吸引しながら60分間デシケーター中で乾燥した。尚、吸収パッド(11) (MILLIPORE社、20mm x 6mm) は未処理のまま用いた。

10

【0095】

このように調製した、図2に示すような免疫クロマトグラフィー法ストリップの各構成部分をプラスチックの支持台上に配置し、図3に示すような免疫クロマトグラフィー法ストリップを組み立てた。

【0096】

免疫クロマトグラフィー法ストリップのサンプルパッド(8)上に、糖鎖抗原抽出液100 μ l を添加し、10分後にスポットの有無を判定した。判定は、検出用抗体スポット上に捕捉された金コロイドの程度を4段階(+++ : 強い陽性、++ : 陽性、+ : 弱い陽性、- : 陰性)に目視で識別した。結果を表2に示す。

20

【0097】

【表2】

	培養法	免疫クロマト法 (2分)	免疫クロマト法 (10分)
検体	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	判定	判定
1	139.0	++	+++
2	122.0	++	+++
3	52.8	++	++
4	29.0	+	++
5	18.0	+	++
6	16.0	+	++
7	8.0	-	+
8	7.0	-	+
9	3.92	-	-
10	1.52	-	-
11	0.88	-	-
12	0.78	-	-
13	0.01	-	-
14	0.00	-	-
15	0.00	-	-
16	0.00	-	-
17	0.00	-	-
18	0.00	-	-

10

20

【0098】

表2に示したように、培養法により得られたストレプトコッカス・ミュータンスの濃度と相関するスポット発色強度が得られた。亜硝酸水溶液の作用時間は2分より10分の方がスポット強度が強かった。本発明の測定方法により糖鎖抗原抽出液中の抗原量を、言い換

30

【0099】

比較例2 [唾液と歯垢を含む被抽出液からの糖鎖抗原の抽出：遠心分離法により抽出した態様]

(1) [糖鎖抗原抽出液の調製]

比較例1で採取した唾液と歯垢を含む被抽出液(0.5ml)を10,000rpmで5分間遠心分離し、沈殿を0.5mlの0.1M NaOHに懸濁し、遠心分離により上清を除去した。次いで沈殿を0.5mlのPBSに懸濁し、遠心分離にて上清を除去した。

【0100】

PBSによる同様の操作を再度実施した後、沈殿に20 μ lの2M 酢酸溶液と20 μ lの1M 亜硝酸ナトリウム塩水溶液を添加し良く混合後、室温で10分間放置した。90 μ lの0.05% Tween 20を含む1M トリス(pH未調製)を添加し、糖鎖抗原抽出液を調製した。

40

【0101】

(2) [免疫クロマトグラフィー法ストリップによる糖鎖抗原抽出液の測定]

上記(1)で調製した糖鎖抗原抽出液を比較例1(3)と同様の方法にて測定した。結果を表3に示す。

【0102】

【表3】

50

検体	培養法	免疫クロマト法(10分)
	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	判定
1	139.0	+++
2	122.0	+++
3	52.8	++
4	29.0	++
5	18.0	++
6	16.0	++
7	8.0	+
8	7.0	+
9	3.92	-
10	1.52	-
11	0.88	+
12	0.78	-
13	0.01	-
14	0.00	+
15	0.00	+
16	0.00	-
17	0.00	+
18	0.00	-

10

20

【0103】

表3に示したように培養法でストレプトコッカス・ミュータンスが検出されなかった検体で陽性となるものがあつた(検体14、15、17)。これは被抽出液中に含まれる非特異的反応原因物質が遠心分離法による洗浄では十分に除去できなかったために非特異的反応により陽性となったものと思われる。

【0104】

実施例1 [唾液と歯垢を含む被抽出液からの糖鎖抗原の抽出：濾材に、予め調合しておいた亜硝酸水溶液を流し込んで、速やかに余分量を加圧排出させて亜硝酸抽出した態様]

30

比較例1(1)と同様の方法により、被抽出液を濾過した後、0.5mlの0.1M NaOH溶液で濾材上の微生物と濾材を洗浄した。1M 亜硝酸ナトリウム溶液と2M 酢酸溶液を1:1で混合し、亜硝酸水溶液を調製し、該亜硝酸水溶液0.2mlを濾過装置に添加し、シリンジで加圧して速やかに余分量を流下させた。2分間室温で放置した後、90 μ lの0.05% Tween20を含む1M トリス(pH未調製)水溶液を添加し、濾過装置をシリンジで加圧することで糖鎖抗原抽出液(100~140 μ l)を回収した。比較例1(3)と同様の方法により糖鎖抗原抽出液を測定した。結果を表4に示す。

【0105】

【表4】

検体	培養法	免疫クロマト法(2分)
	ストレプトコッカス・ミュータンス ($\times 10^5$ 個/ml)	判定
1	139.0	+++
2	122.0	+++
3	52.8	++
4	29.0	++
5	18.0	++
6	16.0	++
7	8.0	+
8	7.0	+
9	3.92	-
10	1.52	-
11	0.88	-
12	0.78	-
13	0.01	-
14	0.00	-
15	0.00	-
16	0.00	-
17	0.00	-
18	0.00	-

10

20

30

【0106】

亜硝酸抽出の反応時間を2分に短縮しても比較例1で10分間反応させたものと同じ結果であり、濾材に、予め調合しておいた亜硝酸水溶液を流し込んで、速やかに余分量を加圧排出させて亜硝酸抽出する態様により、糖鎖抗原の抽出効率が大きく向上することが確認できた。

【0107】

【発明の効果】

本発明の微生物抗原の抽出方法により、被抽出液中に存在する糖鎖抗原を有する微生物を簡便迅速に濃縮し、容易に糖鎖抗原抽出液を調製することができる。この糖鎖抗原抽出液を免疫学的測定方法にて分析することで、被抽出液中の上記微生物の濃度が希薄である場

40

【0108】

特に唾液や歯垢を含む被抽出液中のストレプトコッカス・ミュータンスまたはストレプトコッカス・ソプリヌスより糖鎖抗原を抽出し、該糖鎖抗原抽出液を免疫クロマトグラフィー法、ラテックス凝集法、フロースルー免疫測定方法により測定する本発明の測定方法によれば、歯科医院や家庭で迅速、且つ簡便にストレプトコッカス・ミュータンスまたはストレプトコッカス・ソプリヌスの測定を行うことが可能となり、新たな齲蝕診断システムを構築することも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本図は、本発明の微生物抗原の抽出方法で使用する濾過装置の略図である。

50

【図2】本図は、本発明の微生物の測定方法を、免疫クロマトグラフィー法により実施する場合において使用するストリップの各部材の概略図である。

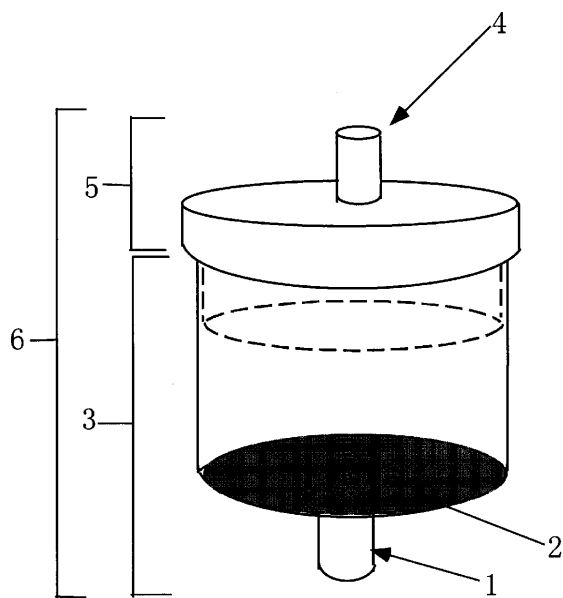
【図3】本図は、図2のストリップの側面図である。

【符号の説明】

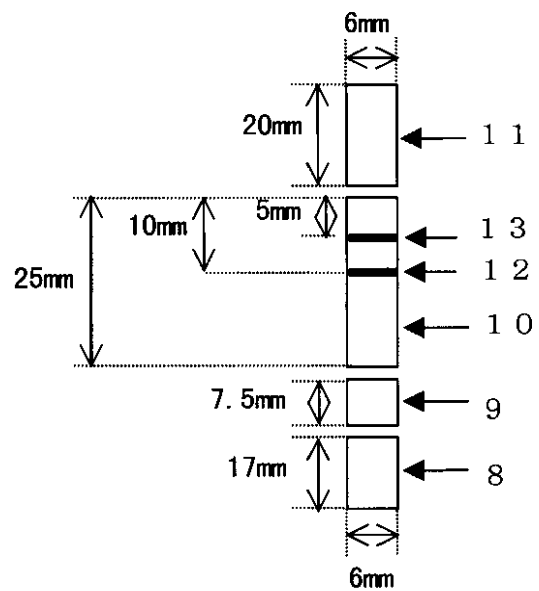
- 1・・・排液口
- 2・・・濾材
- 3・・・容器本体
- 4・・・シリンジ差込口
- 5・・・蓋部
- 6・・・濾過装置
- 7・・・ストリップ
- 8・・・サンプルパッド
- 9・・・コンジュゲートパッド
- 10・・・展開メンブレン
- 11・・・吸収パッド
- 12・・・検出ライン
- 13・・・コントロール判定ライン

10

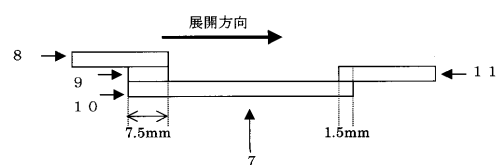
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	F
C 1 2 R 1/46 (2006.01)		C 1 2 M 1/12	
		C 1 2 R 1:46	
		C 1 2 M 1/34	A
		C 1 2 R 1:46	
		C 1 2 N 1/20	C
		C 1 2 R 1:46	

審査官 宮澤 浩

- (56) 参考文献 特開平 0 8 - 2 3 3 8 1 9 (J P , A)
 特開昭 6 0 - 0 3 5 2 6 2 (J P , A)
 特開 2 0 0 1 - 1 9 4 3 6 4 (J P , A)
 特表平 9 - 5 0 1 4 9 4 (J P , A)
 特開平 1 - 2 5 0 0 6 7 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 33/531
 C12M 1/12
 C12M 1/34
 C12N 1/20
 G01N 1/04
 G01N 33/569
 C12M 1/12
 C12R 1:46
 C12M 1/34
 C12R 1:46
 C12N 1/20
 C12R 1:46

专利名称(译)	提取微生物抗原的方法		
公开(公告)号	JP3757171B2	公开(公告)日	2006-03-22
申请号	JP2002018905	申请日	2002-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社徳山歯科		
申请(专利权)人(译)	徳山公司 株式会社トクヤマデンタル		
当前申请(专利权)人(译)	徳山公司 株式会社トクヤマデンタル		
[标]发明人	宇梶文緒 平田広一郎 羽生尚広		
发明人	宇梶 文緒 平田 広一郎 羽生 尚広		
IPC分类号	G01N33/531 C12M1/12 C12M1/34 C12N1/20 G01N1/04 G01N33/569 C12R1/46		
FI分类号	G01N33/531.A C12M1/12 C12M1/34.A C12N1/20.C G01N1/04.H G01N33/569.F C12R1/46		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AA33 2G052/AB17 2G052/AD32 2G052/EA03 2G052/FC02 2G052/FC11 2G052/FC15 2G052/GA30 2G052/JA04 2G052/JA07 4B029/AA09 4B029/BB02 4B029/CC01 4B029/HA06 4B065/AA34X 4B065/BC31 4B065/BD18 4B065/BD32 4B065/CA46		
审查员(译)	宮澤浩		
其他公开文献	JP2003215126A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：开发一种简单的方法，将具有糖链抗原的微生物浓缩在待提取的液体中并提取糖链抗原，并使用获得的糖链抗原提取物，提取液体中的微生物量决定。溶液：可能含有具有糖链抗原的微生物的待提取液体用过滤介质，优选孔径为0.8-2 μ m的过滤介质过滤，保留在过滤介质上的微生物是硝酸水溶液。通过允许起作用来提取上述糖链抗原，并且使用结合糖链抗原的抗体通过免疫学测量方法定量该糖链抗原的量。

実験 No.	孔径(μ m)	濾過量(ml)	捕捉率(%)	製品名(メーカー)*	材質
1	0.3	0.2	>95	GF-75 (A)	ガラス繊維濾紙
2	0.6	0.4	>95	GA-55 (A)	ガラス繊維濾紙
3	0.8	1.0	>95	GA-200 (A)	ガラス繊維濾紙
4	1.0	1.0	>95	GA-100 (A)	ガラス繊維濾紙
5	1.6	1.0	>95	GF/A (W)	ガラス繊維濾紙
6	2.0	1.0	90	GMF150 2.0 μ m (W)	ガラス繊維濾紙
7	3.0	0.8	70	グレード6 (W)	濾紙
8	11.0	1.0	10	グレード1 (W)	濾紙
9	0.45	0.1	>95	フィルクス HV(M)	PVDF ノブテック

*A：アドバンテック東洋社、W：ワットマン社、M：ミリポア社