

(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2005-189183

(P2005-189183A)

(43) 公開日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 N	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 Z N A G	4 H O 4 5
// CO 7 K 14/315	CO 7 K 14/315	

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-433412 (P2003-433412)	(71) 出願人	000181217 株式会社ジーシー 東京都板橋区蓮沼町76番1号
(22) 出願日	平成15年12月26日(2003.12.26)	(71) 出願人	591222245 国立感染症研究所長 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
		(72) 発明者	鱒沢 諭美子 東京都板橋区蓮沼町76番地1号 株式会 社ジーシー内
		(72) 発明者	岡田 淳一 東京都板橋区蓮沼町76番地1号 株式会 社ジーシー内
		(72) 発明者	泉福 英信 神奈川県横浜市金沢区富岡西6-37-5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 う蝕リスク検査方法

(57) 【要約】

【課題】 特定のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原とし、該抗原に対する唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価を測定するう蝕リスク検査方法に於いて、被験者から採取した唾液試験体を8倍を超える希釈を行っても十分な感度で検査が可能なるう蝕リスク検査方法を提供すること。

【既決手段】 下記のアミノ酸配列を有し、且つその末端にキャリアタンパクを結合させたペプチドを抗原とし、該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリンAの抗体価を測定することを特徴とするう蝕リスク検査方法とする。

Asn Ala Lys Ala Thr Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala Ala
Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、且つその末端にキャリアタンパクを結合させたペプチドを抗原とし、該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリン A の抗体価を測定することを特徴とするう蝕リスク検査方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトの唾液中に含まれる分泌型免疫グロブリン A (sIgA) の抗体価を免疫学的方法で測定することにより行うう蝕リスクの検査方法に関するものである。

10

【背景技術】

【0002】

ヒトの口腔内に存在するミュータンス連鎖球菌の存在とう蝕の発生との間には密接な関係があることが知られており、多くの研究が報告されている。ミュータンス連鎖球菌はヒトの唾液中に存在する菌種では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（以後それぞれ *S. mutans* 及び *S. sobrinus* と記す）の総称である。

【0003】

ヒトの唾液中に存在するミュータンス連鎖球菌の数が多きほど将来新たなう蝕が多く生じること報告されているから、ヒトの唾液中のミュータンス連鎖球菌を簡易に定量する試みが数多く行われてきた。例えばストレプトコッカス・ミュータンスに特異的に反応するモノクローナル抗体を応用して定量しようとするもの（例えば、特許文献 1 及び 2 参照。）、簡易培養キットで増殖した菌体そのものを目視により定量するもの等がある（例えば、特許文献 3 参照。）。しかし、ヒトの唾液中のミュータンス連鎖球菌の量を測定することとう蝕のリスクを検査することには次のような問題が存在している。先ず、ヒトの唾液中のミュータンス連鎖球菌の量が常に一定ではないということである。例えば、唾液中のミュータンス連鎖球菌の量の検査を行う直前に被験者が歯をきれいに磨いてしまうと、一時的にミュータンス連鎖球菌の量が低下するのでう蝕のリスクは低いと判断されてしまう。

20

【0004】

また、ヒトによってミュータンス連鎖球菌の量の増加の仕方が異なっていることが解っているが、この増加の仕方の差を予め検査することが可能となればミュータンス連鎖球菌の実際の増加や量と関係無くう蝕のリスクを知ることが可能となる。そこで、ミュータンス連鎖球菌の量を直接測定する以外にう蝕のリスクを検査する方法として、特定の感染症に罹患しているか否かを判定するために用いる体内に特定の感染源に起因する抗体が含まれているかを検査する方法が注目されてきた。即ち、抗体は特定の感染源に対抗するために作られるのであるから、例えば、ヒトの唾液中にミュータンス連鎖球菌に対する抗体が多く含まれていればミュータンス連鎖球菌の量が多いのではないかという仮定が成り立つ。現に、ヒトはミュータンス連鎖球菌に感染すると、ミュータンス連鎖球菌に対する抗体を唾液中に分泌することが解っており、ヒトに死菌体としてのストレプトコッカス・ミュータンスを経口投与すると唾液中のストレプトコッカス・ミュータンスに対する免疫グロブリン抗体の抗体価が顕著に上昇するという報告もある。

30

40

【0005】

近年、ミュータンス連鎖球菌の一種であるストレプトコッカス・ミュータンス菌の体表面物質の中で、分子量約 19 万の PAc (Protein Antigen cerotype C) とよばれるペプチド抗原がミュータンス連鎖球菌の歯面への初期付着に関連があることがそれを抗原としたモノクローナル抗体を利用した研究から確認された。その後、本発明者の一人である泉福らの研究により、PAc (361-386) を抗原として、ミュータンス連鎖球菌の歯面への付着の防御として機能している口腔粘膜から分泌される分泌型免疫グロブリン A (sIgA) の抗体価を測定すれば、う蝕リスクの検査が正確に行えることを見出し、ミュータンス連鎖球菌に特有な下記のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原とし、該抗原に対する唾液中

50

の分泌型免疫グロブリン A の抗体価を測定するう蝕リスク検査方法として提案した（特許文献 4 参照。）。

【0006】

Asn Ala Lys Ala Thr Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala Ala
Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala

【0007】

しかし、その後の研究により、先の発明に係る方法はう蝕リスク検査の精度が高く有用なもの、特に抗体価の測定として一般的な抗原抗体反応に基づく手法であるイムノクロマトグラフィーやイムノコンセンション等の多孔質膜を用いる試験の場合には以下の問題が発生した。う蝕のリスク検査に於いて被験者から採取した唾液を原液で用いることが操作の簡便性の点からは最も好ましいが、イムノクロマトグラフィー等のように多孔質膜に試験液である唾液を毛細管現象にて流す試験の場合には唾液を希釈して使用する必要がある。そのため、通常は 4 倍、被験者によっては 8 倍を超える希釈をしなければ正確なイムノクロマトの検査を行うことができないのだが、一方、8 倍を超えて希釈すると抗体反応の感度の点から検査の正確性が低下してしまうという問題である。

10

【0008】

【特許文献 1】特開平 2 - 177898 号公報

【特許文献 2】特開平 10 - 36400 号公報

【特許文献 3】米国特許 5374538 号公報

【特許文献 4】特願 2002 - 273125 号公報

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は特定のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原とし、該抗原に対する唾液中の分泌型免疫グロブリン A の抗体価を測定するう蝕リスク検査方法に於いて、被験者から採取した唾液試験体を 8 倍を超える希釈を行っても十分な感度で検査が可能なるう蝕リスク検査方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは前記課題を解決するために鋭意検討した結果、特定のアミノ酸配列の端部にキャリアタンパクを結合させると検査の感度が飛躍的に向上することを見だし本発明を完成した。

30

【発明の効果】

【0011】

本発明に係るう蝕リスク検査方法は、特定のアミノ酸配列を有するペプチドを抗原とし、該抗原に対する唾液中の分泌型免疫グロブリン A の抗体価を測定するう蝕リスク検査方法に於いて、被験者から採取した唾液試験体を 8 倍を超える希釈を行っても十分な感度で検査が可能なるう蝕リスク検査方法であり、その歯科口腔衛生に貢献するところ非常に大なるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0012】

即ち本発明は、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有し、且つその端末にキャリアタンパクを結合させたペプチドを抗原とし、該抗原に対するヒトの唾液中の分泌型免疫グロブリン A の抗体価を測定することを特徴とするう蝕リスク検査方法である。

【0013】

本発明に係る PAc(361-386)を得るためには、このようなアミノ酸配列を得ることができる手法であれば特に限定されないが、一般的にはアミノ酸シンセサイザーを用いるのが便利である。ペプチドの合成に際しては上記アミノ酸配列内には余計なアミノ酸配列を有していないことが重要である。もし、余計な配列が存在すると、本来ミュ-タンズ連鎖球菌に関連しない免疫グロブリンの抗体価も測定することになり検査の精度が低下してしまう

50

。

【0014】

本発明に係るう蝕リスク検査方法に於いては、キャリアタンパクを前記ペプチドの片端、あるいは両端に結合（コンジュゲート）する。キャリアタンパクとしては一般にキャリアタンパクとして用いられているBSA（Bovine Serum Albumin）、KLH（Keyhole Limpet Hemocyanin）、OVA（OVA Albumin）等を利用可能であり、本発明で使用する特定のアミノ酸配列のペプチドのN末端またはC末端に必要であればシステインを介して結合することができる。また、ペプチドとキャリアタンパクの結合比は1：5～5：1の範囲であれば利用可能であるが1：1であることが好ましい。

【0015】

検体にはヒト唾液を用いる。実際には唾液を生理食塩水、燐酸緩衝食塩水等で任意の倍率に希釈して検査に用いられる。イムノクロマトグラフィーのように多孔質膜を用いる試験では希釈倍率は8倍以上であることが好ましい。また、検体の希釈倍率が高くては抗原抗体反応が得られた検体を有していた人は、う蝕の発症リスクが低いという判定もできる

。

【0016】

抗原抗体反応の定量には、ヒトの唾液が有する分泌型免疫グロブリンAに対するヒト以外の任意の動物由来抗体を使用する。例えばウサギ、マウス、ヤギ、ニワトリ、ヒツジ由来のものが使用できる。これらの抗体には任意の物質が標識され、標識物質の量に応じた反応性から抗体価の定量を行う。定量のための標識物質には抗体の活性を妨げない物質であればどのようなものでも応用可能である。しかしながら入手や標識の容易さから、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソチオシアネート等の蛍光物質、金コロイド、ラテックスビーズ等を使うと良い。

【0017】

本発明に係るう蝕リスク検査方法に於いては、抗体価の測定として一般的な抗原抗体反応に基づく手法がそのまま応用できるが、唾液の希釈倍率が8倍を超えても十分な測定感度を得られるためイムノクロマトグラフィーやイムノコンセントレーション等の検査方法が最も好ましい。勿論、通常のELISA（ミュートランス連鎖球菌に対する抗体価測定法の一つ、酵素抗体法（Enzyme Linked immunosorbent Assay；以下ELISAと記す）を用いても十分実用的であり、更に抗原抗体反応で得られる測定値の感度向上のために一般的に用いられる技術、例えば、唾液中の分泌型免疫グロブリンAを一旦ビオチン化抗ヒト免疫グロブリン等と反応させ定量時の測定感度を増すこともできる。本発明に係るう蝕リスク検査方法に於いては、唾液を検体とすることが重要でありヒトの血清を用いても抗体価を測定することはできない。

【0018】

抗体価の測定にあたっては本発明に使用するペプチドを固体表面に固相化し、これに任意に希釈した検体を反応させれば本発明に係る特定のアミノ酸配列を用いたう蝕リスク診断を行うことができる。逆の方法も可能である。即ち、検体を任意の複数の倍率に希釈して任意の固体表面に固相化し、これに測定を妨げない物質で標識したPAC(361-386)を反応させて抗体価を評価しても良い。

【実施例】

【0019】

以下本発明を実施例を示し具体的に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

【0020】

<ペプチドの合成>

PAC(361-386)のアミノ酸配列をもつペプチドをステップワイスの固相ペプチド合成法から得た。合成器には、Model 350 Multiple Peptide Synthesizer（製品名：Advanced Chemitech, Louisville社製）を使用し、カラム（30×1）を用いた逆相のHPLC（10-45% アセトニトリル のグラジエントを0.1% TFA）にて合成ペプチドの確認を行った

10

20

30

40

50

。最終精製度は95%以上であった。

【0021】

< キャリアータンパクの結合 >

PAC(361-386)のN末またはC末にシステイン(Cys)を導入してMBS(m-Meleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)法によりペプチドとキャリアータンパクとを結合する。

4mgのキャリアータンパク(BSA、Sigma社製)10mMを sodium phosphate buffer (pH7.2)0.25mLで溶解する。0.7mgのMBS(Sigma社)を少量のDMF(N,N-Dimethylformamide)に溶解する。sodium phosphate buffer (pH6.0)で平衡化したカラム(SephadexG-25,アマシャムバイオサイエンス社製)でゲル濾過し、A280を測定してキャリアータンパクの画分を集める。ペプチド5mgを1mLの0.1M sodium borate buffer (pH9.0)に溶解しておき、これにキャリアータンパク画分を少しずつ攪拌しながら加える全て加え終わった後pHを7.0~7.5に調整し、3時間室温で攪拌を続ける。PBS(Phosphate Buffer Saline)にて1晩透析後に凍結乾燥機(YAMATO社製)で凍結乾燥する。

10

【0022】

< 実施例 >

A) 補足抗体を塗布した多孔質膜の調整

多孔質膜としてニトロセルロースメンブレン(商品名: SXHF、日本ミリポア社製)を用いた。この膜を5mm×40mmの長方形に切りだし、膜中央部にPBSにて500µg/mLに調整したキャリアータンパク結合後のPAC(361-386)を1µLを帯状に塗布した。これを37

20

【0023】

B) 唾液検体の調整

被験者から3分間パラフィンワックスをかむことによって得られた刺激唾液をプラスチック容器に回収し、後述する方法でミュータンス連鎖球菌数を測定した。ミュータンス連鎖球菌数の多い被験者と少ない被験者の唾液をそれぞれ8倍と16倍に+PBS(1%界面活性剤(Tween20)及び0.5%スキムミルク含有)で希釈したものを唾液検体として使用した。

【0024】

C) 測定

96穴マイクロプレートのwellに、金標識した抗ヒトIgA(商品名: BA.GAHA40, British Biocell International社製)をPBSにて5倍希釈したものを50µL注入した。先にA)にて調整した補足抗体を塗布した多孔質膜の片端にクリップで40mm×40mmのろ紙を四折にして固定した。ろ紙を固定していないもう片端をwellに浸漬させ8倍希釈及び16倍希釈の検体を染み込ませて抗体反応の有無を観察した。結果を表1に示す。多孔質膜上の補足抗体を塗布した部分が赤く染まったものを「反応あり」とした。

30

【0025】

D) ミュータンス連鎖球菌数の測定方法

唾液中のミュータンス連鎖球菌の数は、MSB(ミティスサリバリウスバシトラシン培地)を用いて以下の方法で測定した。無菌的条件下で唾液をPBSで希釈し、50µLを培地に塗布し、37℃、嫌気条件下で2日間培養を行い、コロニー数の計測からミュータンス連鎖球菌量(CFU/mL)を算出した。

40

【0026】

< 比較例 >

ペプチドにキャリアータンパクを結合させてない以外は実施例と同様の方法により唾液中のミュータンス連鎖球菌数と抗体反応との関係を調べた。結果を表1に示す。多孔質膜上の補足抗体を塗布した部分が赤く染まったものを「反応あり」とした。

【0027】

【表 1】

	免疫キモトグラフィの 反応	唾液中のミュータンス 連鎖球菌量 ($\times 10^5$ CFU/mL)
実施例 8倍希釈	反応なし	17.5
	反応あり	2.4
実施例 16倍希釈	反応なし	17.5
	反応あり	2.4
比較例 8倍希釈	反応なし	17.5
	反応なし	2.4
比較例 16倍希釈	反応なし	17.5
	反応なし	2.4

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> GC Corporation

<120> Method for examining caries risk

20

<130> P421-010

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

30

<213> Streptococcus mutans

<400> 1

Asn Ala Lys Ala Thr Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Val Lys Lys Ala Asn Ala Ala
 20 25

フロントページの続き

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB07 DA37 DA77 FB03 JA01
4H045 AA11 BA18 BA40 CA11 DA86 EA52

专利名称(译)	龋齿风险检查方法		
公开(公告)号	JP2005189183A	公开(公告)日	2005-07-14
申请号	JP2003433412	申请日	2003-12-26
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社GC 日本国立感染症研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社ジーシー 国立感染症研究所長		
[标]发明人	鱒沢諭美子 岡田淳一 泉福英信		
发明人	鱒沢 諭美子 岡田 淳一 泉福 英信		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/315 G01N33/50		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/50.ZNA.G C07K14/315 G01N33/50.GZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB07 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/JA01 4H045/AA11 4H045/BA18 4H045/BA40 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA52		
其他公开文献	JP2005189183A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供龋齿风险检查方法，通过使用具有特定氨基酸序列的肽作为抗原来测量唾液中包含的分泌性免疫球蛋白A的抗体滴度，其中即使在具有足够敏感性的检测时也可以进行检测。将从待测量的人获得的唾液样品稀释超过8次。ZSOLUTION：龋病风险检查方法的特征在于使用具有氨基酸序列的肽，其序列列表的序列号为1，并且末端载有载体蛋白作为抗原并测量分泌型免疫球蛋白A的抗体滴度。包含在人唾液中抗抗原。Z

【表1】

	免疫グロブリンAの反応	唾液中のミュータンス連鎖球菌量 (×10 ⁵ CFU/mL)
実施例 8倍希釈	反応なし	17.5
	反応あり	2.4
実施例 16倍希釈	反応なし	17.5
	反応あり	2.4
比較例 8倍希釈	反応なし	17.5
	反応なし	2.4
比較例 16倍希釈	反応なし	17.5
	反応なし	2.4