

(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2018-21882

(P2018-21882A)

(43) 公開日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(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 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/50 G	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2016-154972 (P2016-154972)	(71) 出願人	000002897
(22) 出願日	平成28年8月5日 (2016.8.5)		大日本印刷株式会社
			東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
		(71) 出願人	506152818
			公立大学法人九州歯科大学
			福岡県北九州市小倉北区真鶴2-6-1
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100120905
			弁理士 深見 伸子
		(72) 発明者	高橋 洋一
			東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号
			大日本印刷株式会社内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周病の検査方法

(57) 【要約】

【課題】 歯周病の発症の有無及び／又は進行度の判定を迅速、簡便、かつ正確に行うことのできる歯周病の検査方法及び検査用キットを提供すること。

【解決手段】 被験体の口腔から採取した試料中のアメロブラスチンを検出又は測定するステップを含む、歯周病の検査方法、及びアメロブラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含む、歯周病の検査用キット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体の口腔から採取した試料中のアメロプラスチンを検出又は測定するステップを含む、歯周病の検査方法。

【請求項 2】

前記検出又は測定が、アメロプラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片を用いた免疫学的測定法により行われる、請求項 1 に記載の歯周病の検査方法。

【請求項 3】

前記試料中の IL-1 β 又は IL-6 の少なくとも 1 種の炎症性サイトカインを検出又は測定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の歯周病の検査方法。

10

【請求項 4】

前記検出又は測定が、IL-1 β 又は IL-6 の少なくとも 1 種の炎症性サイトカインに特異的に結合する抗体又はその断片を用いた免疫学的測定法により行われる、請求項 3 に記載の歯周病の検査方法。

【請求項 5】

前記試料が、唾液である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の歯周病の検査方法。

【請求項 6】

前記試料が、歯肉溝滲出液である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の歯周病の検査方法。

【請求項 7】

前記試料が、歯肉の血液由来の血清である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の歯周病の検査方法。

20

【請求項 8】

前記検査が、歯周病の発症の有無及び／又は進行度を判定するものである、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の歯周病の検査方法。

【請求項 9】

アメロプラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含む、歯周病の検査用キット。

【請求項 10】

前記アメロプラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片が、免疫クロマトグラフィー用試験片に保持されている、請求項 9 に記載の歯周病の検査用キット。

30

【請求項 11】

IL-1 β 又は IL-6 の少なくとも 1 種の炎症性サイトカインに特異的に結合する抗体又はその断片をさらに含む、請求項 9 又は 10 に記載の歯周病の検査用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、口腔試料中のアメロプラスチンを検出又は測定することによる歯周病の検査方法、及び該方法に用いる歯周病の検査用キットに関する。

【背景技術】

40

【0002】

歯周病は、歯肉縁上や歯肉縁下の歯垢（プラーク）中で歯周病菌が増殖・感染することにより引き起こされる疾患で、炎症によって歯肉に局限して出血や腫れを起こす歯肉炎と、歯肉の炎症に加えて歯を支えている歯槽骨が破壊される歯周炎に分けられる。いわゆる歯槽膿漏は、慢性歯周炎と呼ばれ、歯周組織を破壊することにとどまらず、歯周病原因菌が作り出す内毒素や、細菌に抵抗する白血球から放出される炎症性物質によって様々な全身疾患を悪化させることが知られている。例えば、歯周病は、糖尿病、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、早産、低体重児早産、嚥下性肺炎、自己免疫疾患（アレルギー、リウマチ等）、骨粗しょう症といった疾患との関連性が示唆されている。よって、歯周病をできるだけ早期に発見し、治療を開始することは、重症化を阻止する上で、また、その症状と進行

50

度に応じた適切な治療を行う上で非常に重要である。

【0003】

歯周病の診断としては、ペリオドンタルプローブと呼ばれる探針で歯と歯肉の境目にできる歯周溝（歯周ポケット）の深さを測るプロービング検査が知られている。しかしながら、プロービング検査は、熟練した技術と経験が必要であり、歯周組織を損傷する場合もある。また、目視による評価であるため、客観的な判断ができない。さらに、プロービング検査は、歯周病により既に歯周組織が破壊された程度を調べるものであるから、プロービングポケットデプスが浅く、病変も認められない初期の歯周病を発見できない。よって、唾液や歯肉溝滲出液等の検体を用いて歯周病を早期に発見し、またその進行度を知ることのできる簡便な方法が、被験者の負担の軽減、及び検査の迅速性と正確性の観点から望ましい。

10

【0004】

これまで、唾液や歯肉溝滲出液に含まれる特定のタンパク質を歯周病の診断マーカーに用いる方法が数多く提案されている。例えば、システインプロテアーゼ（特許文献1）、ラクトフェリンやミエロペルオキシダーゼ（特許文献2）、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン（特許文献3）、ヒスタチン（特許文献4）、8-ヒドロキシデオキシグアノシン（特許文献5）、 β -デフェンシン（特許文献6）等を検出又は測定し、歯周病の有無や進行度を判定する方法が提案されている。これらのマーカータンパク質は、ジンジバリス菌等の歯周病菌に由来する物質、炎症や出血に関連する物質、歯周病菌感染に対する生体防御性（抗菌性）物質等であるが、いずれも慢性歯周病に進行してから発現するマーカーであったり、検査結果が出るまでに時間を要するなど、迅速性と正確性に欠けるという問題があった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】W02004/106541号公報

【特許文献2】特開平10-2899号公報

【特許文献3】特開2000-28608号公報

【特許文献4】特開2005-249567号公報

【特許文献5】W02002/079780号公報

【特許文献6】特開2009-145220号公報

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、歯周病の発症の有無及び／又は進行度の判定を迅速、簡便、かつ正確に行うことのできる歯周病の検査方法及び検査用キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、歯のエナメル質を構成するタンパク質の1種であるアメロブラスチンが、歯周病に関連し、アメロブラスチンを指標とすれば歯周病を初期段階で発見できることを見出した。また、アメロブラスチンとともに、IL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインを合わせて検出又は測定することにより、歯周病の進行度を含む歯周病の状態をより正確に判断できることを確認し、本発明を完成させるに至った。

40

【0008】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

（1）被験体の口腔から採取した試料中のアメロブラスチンを検出又は測定するステップを含む、歯周病の検査方法。

（2）前記検出又は測定が、アメロブラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片を用いた免疫学的測定法により行われる、（1）に記載の歯周病の検査方法。

（3）前記試料中のIL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインを検出又は測

50

定するステップをさらに含む、(1)に記載の歯周病の検査方法。

(4) 前記検出又は測定が、IL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインに特異的に結合する抗体又はその断片を用いた免疫学的測定法により行われる、(3)に記載の歯周病の検査方法。

(5) 前記試料が、唾液である、(1)～(4)のいずれかに記載の歯周病の検査方法。

(6) 前記試料が、歯肉溝滲出液である、(1)～(4)のいずれかに記載の歯周病の検査方法。

(7) 前記試料が、歯肉の血液由来の血清である、(1)～(4)のいずれかに記載の歯周病の検査方法。

(8) 前記検査が、歯周病の発症の有無及び／又は進行度を判定するものである、(1)～(7)のいずれかに記載の歯周病の検査方法。

(9) アメロブラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片を含む、歯周病の検査用キット。

(10) 前記アメロブラスチンに特異的に結合する抗体又はその断片が、免疫クロマトグラフィー用試験片に保持されている、(9)に記載の歯周病の検査用キット。

(11) IL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインに特異的に結合する抗体又はその断片をさらに含む、(9)又は(10)に記載の歯周病の検査用キット。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、歯周病の発症の有無及び／又は進行度の判定を迅速、簡便、かつ正確に行うことのできる歯周病の検査方法及び検査用キットが提供される。本発明によれば、被験者から容易に採取できる唾液や歯肉溝滲出液等を用いて、免疫学的測定法、特に簡易な免疫クロマトグラフィー法によって、初期段階の歯周病を検出することができる。よって、歯周病検査における被験者への負担が少なく、また、歯肉炎や軽度歯周炎の段階では歯磨きの励行や歯石の除去等の簡単な対処ですみ、患者の治療費も軽減できる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、健常人、初期歯周炎患者、慢性歯周炎患者から採取した唾液中のアメロブラスチンの免疫クロマトグラフィーによる検出結果を示す。

【図2】図2は、健常人、初期歯周炎患者、慢性歯周炎患者から採取した唾液中の炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6)のELISA法による定量結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の歯周病の検査方法は、被験体の口腔から採取した試料中のアメロブラスチンを検出又は測定するステップを含む。

【0012】

アメロブラスチンは、歯のエナメル質に存在する遺伝子特異的なタンパク質であり、アメロジェニン、エナメルリン、タフテリン等とともにエナメル質を構成する。アメロブラスチンは、エナメル芽細胞によって歯の発生時期に形成され、62kDaのタンパク質として合成されるが、分解されて13～17 kDaの断片(エナメル小柱鞘)として、エナメル質結晶を囲む組織に局在する。アメロブラスチンの機能は未だ解明されていない点が多いが、カルシウム結合能を有しており、エナメル質結晶の成長や石灰化の促進の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。ヒトアメロブラスチン(Genbank number: Nucleotide NM_016519; Protein NP_057603.1)の塩基配列は配列表の配列番号1に、アミノ酸配列は、配列表の配列番号2にそれぞれ示される。

【0013】

本発明において「被験体」は歯周病を発症しうる哺乳動物であれば限定されないが、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、マウス、ラット等が挙げられ、ヒトが好ましい。

【0014】

10

20

30

40

50

本発明の検査方法では「口腔から採取した試料」として、唾液、歯肉溝滲出液、又は歯肉の血液由来の血清を用いることが好ましい。

【0015】

唾液の採取は、公知の方法により行うことができ、例えば、安静状態で口中にたまった安静唾液を容器に吐出する方法（吐唾法）、専用の採唾管を用いて唾液腺の開口部から直接純唾液を採取する方法、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る方法などが挙げられるが、チェアサイドでの簡便さと採取の容易性から吐唾法が好ましい。

【0016】

本発明の検査方法において、試料として唾液を用いる場合、採取した唾液をそのまま用いることができるが、唾液を遠心分離して不溶物を除去した唾液上清や、界面活性剤（例えばTween 20等の陽性界面活性剤）による処理液を用いてもよい。遠心分離は、5000～12000rpm、好ましくは8000～10000rpmで、10～30分程度行う。唾液上清を用いる場合、そのまま用いてもよいが、唾液上清を溶媒で約2～5倍に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。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。唾液の採取量は、0.1～1.0ml程度が好ましい。

【0017】

歯肉溝滲出液の採取もまた、公知の方法で行うことができる。例えば、歯肉溝滲出液の採取方法としては、ペリオペーパーを歯肉溝に挿入する方法、マイクロピペットを用いる方法、歯肉溝にねじった糸又はペーパーポイントを挿入する方法などが挙げられるが、ペリオペーパーを歯肉溝に挿入し、ペリオトロンで歯肉溝滲出液の採取量を確認する方法は、操作時間が短時間であり、患者に負担を与えないことからより好ましい。ペリオペーパーなどの濾紙で歯肉溝滲出液を採取する場合、歯肉溝に挿入する時間は約15～60秒が好ましく、採取する歯肉溝滲出液の量としては、0.5～5.0 μ l程度が好ましい。

【0018】

本発明の検査方法には、採取した歯肉溝滲出液を直接使用することが可能であるが、歯肉溝滲出液がしみ込んだペリオペーパーなどの濾紙から、抽出溶媒を用いて抽出した試料を用いることが好ましい。抽出溶媒としては、例えば水、生理食塩水、PBS等のリン酸緩衝液などが挙げられる。抽出は、歯肉溝滲出液がしみ込んだペリオペーパーなどの濾紙をマイクロチューブ等の容器内の抽出溶媒に浸漬することによって行うことができる。

【0019】

また、試料として歯肉から採取した血液から分離した血清を使用する場合、歯肉からの血液は歯科用注射針で採取可能であり、血清も遠心分離法等の通常方法で得ることができる。採取する血清の量としては、0.5～1.0 μ l程度が好ましい。

【0020】

本発明の検査方法においては、このような被験体の口腔から採取した試料中のアメロプラスチンの検出又は測定を、アメロプラスチンに特異的に結合し得る抗体（抗アメロプラスチン抗体）を用いる免疫学的測定法により行う。

【0021】

アメロプラスチンの上記免疫学的測定に用いる抗体は、当業者に周知の方法を用いて得ることができる。抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

【0022】

抗体は、測定しようとする動物種のアメロプラスチン又はその部分ポリペプチドを抗原として用い、公知の方法に従って作製することができる。抗原に用いるアメロプラスチン又はその部分ポリペプチドは、例えば配列番号1に示す塩基配列又はその部分配列からなるポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体又は培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、配列番号2に示すアミノ酸配列又はその部分配列からなるポリペプチドを化学的に合

10

20

30

40

50

成し、免疫原として用いることもできる。アメロブラスチンの部分配列からなるポリペプチドを抗原として用いる場合は、アメロブラスチンのアミノ酸配列(配列番号2)のうち連続する少なくとも30個以上、好ましくは50個以上のアミノ酸配列を含むポリペプチドが好ましい。

【0023】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から抗体産生細胞(脾臓細胞、リンパ節細胞など)を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。また、ポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物(例えば、ウサギ、ラット、マウスなど)から血液を採取し、この血液から公知の方法により血清を分離することにより調製できる。

10

【0024】

また抗体はアメロブラスチンに特異的に結合し得る限り断片として使用することもできる。抗体の活性断片としては、例えば、Fab断片、F(ab')₂断片、単鎖抗体(scFv)等が挙げられる。これら活性断片の調製は、パパイン、ペプシン、トリプシン処理などの公知の方法を適用することで行うことができる。

【0025】

また、抗体を標識化する場合、標識物質としては、アメロブラスチンの免疫学的測定法を可能とする標識物質であれば特に制限はなく、例えば酵素(ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等)、蛍光物質(FITC、RITC等)、化学発光物質(アクリジニウム、ルテニウム、ロフィン等)、放射性同位元素(³H、¹⁴C、³⁵S、³²P、¹²⁵I、¹³¹I等)、ビオチン、ジゴキシゲニン、タグ配列を含むポリペプチド、金コロイド粒子等が挙げられる。標識物質は、抗体に直接結合してもよく、又は標識物質を認識する抗体やアビジン-ビオチン系などを利用して間接的に標識することもできる。

20

【0026】

免疫学的測定法としては、特に制限はなく、従来公知の方法、例えば酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA法)、ラテックス凝集法、免疫クロマトグラフィー法、ウェスタンブロット法、放射免疫測定法(RIA法)、蛍光免疫測定法(FIA法)、ルミネッセンス免疫測定法、スピン免疫測定法、抗原抗体複合体形成に伴う濁度を測定する比濁法、抗体固相膜電極を利用し抗原との結合による電位変化を検出する酵素センサー電極法、免疫電気泳動法等が用いられる。ELISA法には、競合法、サンドイッチ法、直接吸着法が包含される。これらの中でも、免疫クロマトグラフィー法、ELISA法、ウェスタンブロット法が好ましいが、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より好ましい。

30

【0027】

免疫クロマトグラフィー法を本発明の免疫学的測定法として用いる場合は以下の手順で行う。まず、抗アメロブラスチン抗体(第一抗体)を所定位置にライン状に結合させた捕捉部位(判定ライン)と、着色微粒子で標識した抗アメロブラスチン抗体(第二抗体)を結合させた試料滴下部とを備えた免疫クロマトグラフィー用試験片を用意する。次に、被験体の口腔から採取した試料(以下、単に試料という場合がある)を前記試料滴下部に添加し、一定時間放置することによって、担体の持つ毛細管現象の作用で前記捕捉部位に向けて順次拡散・移動させる。その後、前記試料中に含まれるアメロブラスチンと着色微粒子で標識した抗アメロブラスチン抗体との免疫複合体を前記捕捉部位で捕捉し、ライン状に呈色し、該呈色状態を目視により判定する。

40

【0028】

上記免疫クロマトグラフィーに用いる着色微粒子としては、肉眼で検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、金、銀、銅などの金属からなるコロイド粒子、スダンブルー、スダンレッド、オイルオレンジ、キニザリングリーン等の顔料や染料などでラテックスを着色した着色ラテックスなどを用いることができる。上記免疫クロマトグラフィーに

50

用いる試験片は、公知の方法にて市販の材料を用いて作製することができる。例えば、試料が迅速に吸収され、速やかに反応部へと試料が移動していくような性質の多孔質シートが好ましく、多孔質シートとしては、セルロース濾紙、ガラスファイバー濾紙、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、綿布等が挙げられる。

【0029】

ELISA法を本発明の免疫学的測定法として用いる場合、抗アメロプラスチン抗体を担体に固定化し、試料を添加してインキュベートした後、標識した二次抗体を添加し、結合した二次抗体を測定することにより行う。抗アメロプラスチン抗体を固定化させる担体としては、例えばポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、フッ素樹脂、ガラス、金属などが使用できる。担体の形状としては、プレート、ビーズ、セル、試験管などが挙げられる。好ましくは、エンザイムイムノアッセイ用のマイクロタイタープレート（96穴マイクロタイタープレート）などの市販の固相担体を使用できる。抗アメロプラスチン抗体を固定化する方法は、公知の方法に従って行えばよい。例えば、適当な緩衝液に溶解した抗アメロプラスチン抗体溶液を担体と接触させ、4~37℃にて1~24時間放置して抗アメロプラスチン抗体を固定化する。このとき、非特異的吸着を防ぐために、1~10%のアルブミン、ゼラチン、粉ミルク又はウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、又はトリス緩衝液（TBS）等の緩衝液をブロッキング溶液として用い、未吸着部分をブロッキングすることが好ましい。固定化後、担体を適当な緩衝液で洗浄する。次に試料をインキュベーションする前に50~5000倍程度に希釈する。上記のようにして調製した担体に希釈した試料を添加し、インキュベーションすることにより、試料中に存在するアメロプラスチンを担体上の抗アメロプラスチン抗体と反応させる。インキュベーションは、4~37℃にて1~24時間、好ましくは16時間程度行う。反応後、反応液を除去し、担体を洗浄する。次に、アメロプラスチンに対する二次抗体を添加する。アメロプラスチンに対する二次抗体は、測定すべきアメロプラスチンと結合し得る抗体であり、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質などの標識物質で標識したものを使用することができる。これらの中でも、酵素標識された二次抗体が好ましく、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼなどの酵素で標識したヤギ抗ヒト免疫グロブリン、ウサギ抗ヒト免疫グロブリン、ヒツジ抗ヒト免疫グロブリンを用いることができる。二次抗体はインキュベーションの前に1000~10000倍程度に希釈する。反応は、4~37℃にて1~2時間程度行う。反応終了後、反応液を除去し、担体を洗浄する。

【0030】

二次抗体の測定は、使用した二次抗体の標識物質の種類に応じて公知の方法に従って行うことができる。酵素標識された二次抗体を用いた場合は、選択した酵素に応じてそれぞれ公知の発色剤を添加することにより発色反応を行う。例えば、ペルオキシダーゼを用いる場合は、*o*-フェニレンジアミン、ABTS〔2,2'-アジノ-ビス-(3'-エチルベンゾジアゾリンスルホン酸)〕などの基質と過酸化水素とを、アルカリ性ホスファターゼを用いる場合は、*p*-ニトロフェニルリン酸、4-メチルウンベフェリルリン酸などの基質を、 β -ガラクトシダーゼを用いる場合は、*o*-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトシドなどの基質を発色剤として使用すればよい。試料中のアメロプラスチンの量に依存して生じた発色を、分光光度計、蛍光光度計などを用いて反応液の吸光度を測定することにより試料中のアメロプラスチンを定量することができる。

【0031】

ウェスタンブロット法を本発明の免疫学的測定法として用いる場合、ドデシル硫酸ナトリウム含有ポリアクリルアミドゲル上に試料を添加し、一定の電圧をかけて電気泳動を行い、泳動によりゲル上で分離されたタンパク質をPVDF(ポリビリニデンジフルオライド)膜のようなプロッティング用メンブレンに電氣的にトランスファーする。このメンブレンをスキムミルク等でブロッキング処理した後に、抗アメロプラスチン抗体をメンブレンと反応させ、次いで酵素、蛍光物質等で標識した標識二次抗体を結合させ、標識物質に応じて検出試薬を添加して検出する。

【0032】

なお、上記免疫学的測定法によってアメロブラスチンの検出又は測定を行う場合、いずれの方法も市販のキットを用いることもできる。

【0033】

本発明においては、上記のような免疫学的測定法を用いてアメロブラスチンを検出（アメロブラスチンの有無の確認）又は測定することによって、歯周病を検査又は診断する。本発明において「検査」又は「診断」とは、典型的には、被験体が歯周病に罹患しているか否かの判定を意味するが、これには限定されず、該疾患の進行度の判定、該疾患に対する治療効果の判定、及び治療後に該疾患を再発する危険性が存在するか否かの判定などを包含する。また、「検査」又は「診断」は、医師による診断を包含しない「検査の補助」又は「診断の補助」という語で置き換えることができ、具体的には、「検査」又は「診断」のためのデータを取得することをいう。

10

【0034】

例えば、アメロブラスチンによる歯周病の発症の有無及び／又は進行度の判定は、被験体の口腔から採取した試料中のアメロブラスチンの量を対照試料中のアメロブラスチンの量を比較することによって行うことができる。対照試料とは、比較の基準となる試料をいい、健常者の口腔から採取した試料（ネガティブコントロール）、歯周病患者の口腔から採取した試料（ポジティブコントロール）のいずれであってもよい。対照試料中のアメロブラスチンの量の測定は、被験体試料中のアメロブラスチンの量の測定と同様の手順で行うことができる。対照試料中のアメロブラスチンの量は、被験体試料中のアメロブラスチンの量の測定のたびに測定してもよいし、事前に測定しておいてもよい。被験体試料中のアメロブラスチン量がネガティブコントロールのアメロブラスチン量よりも優位に多い場合、当該被験体は歯周病に罹患していると判定され、ネガティブコントロールのアメロブラスチン量と同等である場合は、当該被験体は歯周病に罹患していないと判定される。また、被験体試料中のアメロブラスチン量が、ポジティブコントロールのアメロブラスチン量よりも優位に少ない場合、当該被験体は歯周病に罹患していない、あるいは、治療により症状が改善されたと判定できる。被験体試料中のアメロブラスチンの量の測定は、対照試料中のアメロブラスチンの量との比較などにより絶対量を測定してもよいが、必ずしもアメロブラスチンの絶対的な量を測定する必要はなく、対照試料中のアメロブラスチンの量との相対的な関係が明らかになれば十分である。

20

30

【0035】

また、本発明の歯周病の検査方法は、被験体の口腔から採取した試料中のアメロブラスチンを検出又は測定するステップに加え、同試料中のIL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインを検出又は測定するステップをさらに行ってもよい。これらの炎症性サイトカインの検出又は測定もまた、免疫学的方法により行うことが好ましく、抗IL-1 β 抗体、抗IL-6抗体を備えた市販のキット等を利用して上記のアメロブラスチンの測定手法に従って行えばよい。

【0036】

歯周ポケットは、健常歯であれば0.5～2mm程度であるところ、歯肉炎の場合は2～4mm程度となり、歯周炎の場合、軽度であれば3～4mm程度、中等度であれば4～7mm程度、重度であれば7mm以上となる。すなわち、歯周ポケットが3mm以下であれば健康あるいは健康を保てる範囲で、4mm以上は歯周病が進行している状態を示す。歯肉炎、又は歯肉炎から初期歯周炎に移行するまでの時期（本明細書において「初期段階」という）は、歯肉に多少の出血や腫れが認められる場合もあるが、ほとんど自覚症状がないか、あっても軽視して放置することにより進行する場合が多い。後記実施例に示すように、本発明の歯周病の検査方法によれば、アメロブラスチンを検出又は測定することによってこの初期段階の歯周病の有無を判定することが可能である。初期段階では歯肉のみの炎症で、歯槽骨に異常はないため、歯磨きと歯石除去により改善することも可能であり、初期段階の歯周病の有無を判定できることは、歯周病の進行の阻止と低侵襲な治療を可能にする。

40

【0037】

50

また、本発明の歯周病の検査方法においては、IL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインの検出又は測定を合わせて行うことにより、さらに検査の正確性を確保できる。具体的には、アメロプラスチンの検出が陽性であっても、IL-1 β 及び／又はIL-6の検出が陰性であれば、歯周病は初期段階と判定でき、いずれも陽性であれば、慢性歯周病であると判定できる。また、本発明の歯周病の検査方法においては、アメロプラスチンによる歯周病の発症の有無及び／又は進行度の判定を補助する効果を達成できる限り、歯周病細菌とその産生物質（毒素や酵素等）の検出又は測定を合わせて行ってもよい。

【0038】

本発明の歯周病の検査方法は、天然歯はもとよりインプラント体周囲の炎症（インプラント周囲炎）の診断にも応用できる。一般に、インプラント周囲炎は、天然歯の歯周炎と症状が異なり、深いポケットが形成されない。インプラント周囲炎の診断は主に術者の目視により行われていることから、本発明による炎症の数値化は、インプラント周囲炎の新たな診断指標となる。

【0039】

本発明は、上記検査方法を実施するための歯周病の検査用キットも提供する。本発明の歯周病の検査用キットは、少なくともアメロプラスチンに特異的に結合する抗体を含んでいればよく、IL-1 β 又はIL-6の少なくとも1種の炎症性サイトカインに特異的に結合する抗体を含めてもよい。また、本発明の歯周病の検査用キットに含める上記アメロプラスチンに特異的に結合する抗体は、免疫クロマトグラフィー用試験片に保持された態様であることが好ましい。本発明の歯周病の検査用キットは、さらに、固定化担体、標識化された二次抗体、検出のための試薬、反応緩衝液、洗浄用緩衝液、反応停止液、発色試薬、標準物質（ポジティブコントロール、ネガティブコントロール）、希釈用試薬、使用説明書などを含んでもよい。

【実施例】

【0040】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0041】

（実施例1）抗アメロプラスチン抗体が保持された免疫クロマトグラフィー用試験片の作製

（1）金コロイド標識抗アメロプラスチン抗体の調製

市販の金コロイド溶液（EMGC40、BBI Solutions社、粒子サイズ：40nm）9 mlに50 mM KH₂PO₄バッファー（pH 7.5）1 mlを加え、続いて51.1 μ g/mlの抗アメロプラスチン（AM-1）モノクローナル抗体（ジーンネット社作製）溶液1 mlを加えて攪拌した。30分間静置した後、1%ポリエチレングリコール（PEG Mw.20000、ナカライテスク社）を加え、続いて10%牛血清アルブミン（BSA FractionV、ナカライテスク社）水溶液を1.1 ml加えて攪拌した。この溶液を11000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間遠心した後、0.5 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。この分散液に、0.05% PEG・150 mM NaCl・1% BSA・0.1% NaN₃を含有する20 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.2）を加えて上記と同様な攪拌・遠心・上清除去の操作を3回繰り返して洗浄を行った。洗浄後、上清液を除いて得られた金コロイドを、0.05% PEG・1% BSA・5% スクロースを含有する20 mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁して金コロイド標識抗アメロプラスチン抗体溶液を得た。

【0042】

（2）金コロイド標識抗アメロプラスチン抗体保持部位の作製

（1）で調製した金コロイド標識抗アメロプラスチン抗体溶液30 μ lを、5 mm $\times$ 10 mmに切ったグラスファイバーパッド（GLASSFIBER DIAGNOSTIC PAD、メルクミリポア社）に含浸させ、一晚減圧乾燥し、金コロイド標識抗体保持部位を作製した。

【0043】

（3）抗体固定化メンブレンの作製

26 mm $\times$ 250 mmに裁断したニトロセルロースメンブレン（HiFlow Plus HF135、メルクミ

10

20

30

40

50

リポア社)の長辺を下にし、533 $\mu\text{g/ml}$ となるように調製した固定化用抗アメロプラスチン(AM-2)モノクローナル抗体(ジーンネット社作製)溶液を塗布機(ニッポンエンジニアリング社)を用いて、上から8.5 mmの位置に1.46 $\mu\text{l/cm}$ でライン状に塗布した。同様に、同メンブレンの上から13 mmの位置に、133 $\mu\text{g/ml}$ となるように調製したコントロール用抗マウスIgG抗体(サンタクルズ社)溶液を1.43 $\mu\text{l/cm}$ でライン状に塗布した。塗布後、メンブレンを50 $^{\circ}\text{C}$ で30分乾燥し、抗体固定化メンブレンとした。

【0044】

(4) 免疫クロマトグラフィー用試験片の作製

裏打ち粘着シート(プレカットバックキングシート、ニッポンエンジニアリング社)に、(3)で作製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4 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3 mm重なるようにして試料添加パッド(17 mm $\times$ 250 mmに切ったCELLULOSE FIBER SAMPLE PADS、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3 mm重なるように吸収パッド(17 mm $\times$ 250 mmに切ったCELLULOSE FIBER SAMPLE PADS、メルクミリポア社)を重ねて貼り付けた。このようにして複数の部材を重ねて貼り合わせたシートの長辺側を5 mm間隔で短辺に平行にカッターで切断し、5 mm $\times$ 60 mmの免疫クロマトグラフィー用試験片を得た。

【0045】

(実施例2)

1. 試験方法

(1) 唾液サンプルの回収

以下の3群の被験者から唾液サンプルを回収した。

(i) 初期歯周炎患者：プロービングポケットデプス(退縮がある場合はアタッチメントレベルを使用)が3mm以下で、歯槽骨吸収度が歯根長の1/3以下、根分岐部病変がない患者3名

(ii) 慢性歯周炎患者：プロービングポケットデプスが4 mm以上で、歯槽骨吸収度が歯根長の1/3 以上、根分岐部病変がある、動揺がある患者3名

(iii) 健常人：上記の症状がいずれも認められないもの3名

各群の被験者に対し、嚥下を禁じ、口腔内に分泌される唾液をカップに吐き出すように指示して、1 ml程度の唾液を採取し(吐唾法)、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0046】

(2) 免疫クロマトグラフィーによるアメロプラスチンの検出

採取した唾液サンプルを0.5% Tween20含有PBSで5倍に希釈後、実施例1で作製した抗アメロプラスチン抗体が保持された免疫クロマトグラフィー用試験片に120 μl アプラインした。アプライン後30分のバンドパターンを計測し、アメロプラスチンの有無を確認した。

【0047】

(3) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) による炎症性サイトカインの定量

採取した唾液サンプル中に含まれるIL-1 β 、IL-6、及びTNF- α の濃度を市販のELISAキットを用いて定量した。IL-1 β の濃度測定には、ヒトIL-1 β ELISAキット(BioLegend社製)を用いて以下のようにして行った。

【0048】

まず、抗IL-1 β 抗体を固定化したキットのウェルに、唾液サンプルを50 μl ずつ添加し、室温で2時間インキュベートし、反応終了後、洗浄バッファーにより4回洗浄した。次に、各ウェルに100 μl の標識した抗IL-1 β 抗体を添加し、室温で30分間インキュベートし、反応終了後、洗浄バッファーにより5回洗浄した。その後、基質を100 μl 添加し、20分間室温でインキュベートし、反応停止溶液を100 μl 加え、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定した。キャリブレーションの希釈系列を用いて作成した検量線に基づいて、サンプルの吸光度からIL-1 β 濃度を算出した。

【0049】

また、IL-6の濃度測定には、ヒトIL-6 ELISAキット(BioLegend社製)、TNF- α の濃度

10

20

30

40

50

測定には、ヒトTNF- α ELISAキット（BioLegend社製）をそれぞれ用い、上記IL-1 β の測定と同様の手順にて行った。

【0050】

2. 結果

免疫クロマトグラフィーによるアメロプラスチンの検出結果を図1に示す。いずれの試験群にもアメロプラスチンが検出された。サンプル間の比較では、健常人又は慢性歯周炎患者と比較して、初期歯周炎患者においてバンドの発現パターンの増強傾向が観察された。また、ELISA法による炎症性サイトカインの濃度測定結果を図2に示す。IL-1 β とIL-6は、慢性歯周炎患者の唾液サンプル中で濃度の増加が観察された。TNF- α は全実験群で検出不可であった。

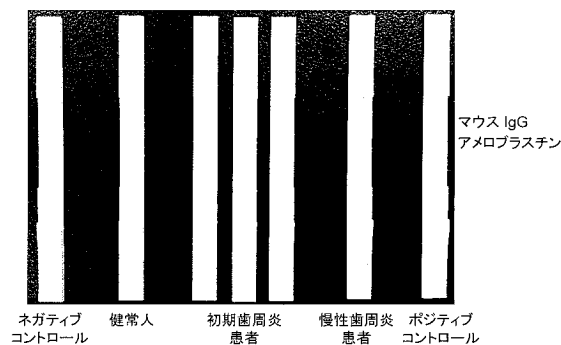
10

【産業上の利用可能性】

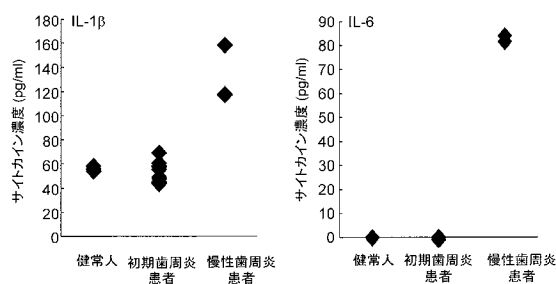
【0051】

本発明は、歯周病の検査薬の製造分野において利用可能である。

【図1】



【図2】



【配列表】

2018021882000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 藤本 興治

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内

(72)発明者 西原 達次

福岡県北九州市小倉北区真鶴2-6-1 公立大学法人九州歯科大学内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB07 DA36 FB03 FB06

专利名称(译)	测试牙周病的方法		
公开(公告)号	JP2018021882A	公开(公告)日	2018-02-08
申请号	JP2016154972	申请日	2016-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	大日本印刷有限公司 公立大学法人九州歯科大学		
申请(专利权)人(译)	大日本印刷有限公司 公立大学法人九州歯科大学		
[标]发明人	高橋 洋一 藤本 興治 西原 達次		
发明人	高橋 洋一 藤本 興治 西原 達次		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/53.P G01N33/50.G G01N33/543.521 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB07 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB06		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种牙齿缺失牙周疾病和/或确定快速，简便，准确的是提供一种检测方法和能够执行它牙周病的检验试剂盒的进展的发作。该方法包括检测或测量从受试者的口腔中采集的样品中的成釉细胞素的步骤，检测牙周病的方法以及与成釉细胞素特异性结合的抗体或其片段，用于检查牙周病的试剂盒。

(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2018-21882 (P2018-21882A)
		(43) 公開日	平成30年2月8日 (2018.2.8)
(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考) 2 G 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)		G O 1 N 33/53	Z N A D
G O 1 N 33/50 (2006.01)		G O 1 N 33/53	P
G O 1 N 33/543 (2006.01)		G O 1 N 33/50	G
		G O 1 N 33/543	5 2 1
		審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13 頁)	
(21) 出願番号	特願2016-154972 (P2016-154972)	(71) 出願人	000002897 大日本印刷株式会社
(22) 出願日	平成28年8月5日 (2016.8.5)	(71) 出願人	506152818 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 公立大学法人九州歯科大学 福岡県北九州市小倉北区真鍋2-6-1
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 聡
		(74) 代理人	100120905 弁理士 深見 伸子
		(72) 発明者	高橋 洋一 東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号 大日本印刷株式会社内
		最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 歯周病の検査方法			