

(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2013-185858

(P2013-185858A)

(43) 公開日 平成25年9月19日(2013.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	4 B O 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)		

(21) 出願番号 特願2012-49148 (P2012-49148)
 (22) 出願日 平成24年3月6日 (2012.3.6)

(71) 出願人 000181217
 株式会社ジーシー
 東京都文京区本郷3-2-14
 (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
 (74) 代理人 100070105
 弁理士 野間 忠之
 (72) 発明者 中尾 龍馬
 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立
 感染症研究所内
 (72) 発明者 泉福 英信
 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立
 感染症研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外膜ヴェシクルを用いた歯周病原細菌の検査方法及び測定用器具

(57) 【要約】

【課題】 精度良く簡便に歯周病等の診断に有用な唾液等の菌の外膜ヴェシクルを用いた菌の検査方法及びこの検査方法に使用する測定用器具を提供する。

【解決手段】 検出を目的とする菌の外膜ヴェシクルを測定用器具の測定部に予め配置しておき、被験者から採取した検体を該測定部に接触させ、抗原抗体反応により検体内の前記外膜ヴェシクルに対応する抗外膜ヴェシクル抗体を検出する。この菌の検査方法を実施するための測定用器具は、検出を目的とする菌の外膜ヴェシクルが予め測定部に配置されている。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルを測定用器具の測定部に予め配置しておき、被験者から採取した検体を該測定部に接触させ、抗原抗体反応により検体内の前記外膜ヴェシクルに対応する抗外膜ヴェシクル抗体を検出することを特徴とする歯周病原細菌の検査方法。

【請求項 2】

検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め測定部に配置されていることを特徴とする測定用器具。

【請求項 3】

検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め穴底部に配置されているマイクロプレートである請求項 2 に記載の測定用器具。

【請求項 4】

試験溶液滴下窓と検査結果検出窓とが設けられた上カバーと、試験片設置ガイドが設けられた下カバーと、上カバーと下カバーとの間に収納されている多孔質性であって薄板状の多孔質片とから成る免疫クロマトグラフィ検査用具であって、該多孔質膜片は、その片端に検体中に含まれている抗 O M V 抗体と特異的に結合する抗体が検出可能な標識が付着された状態で含まれた検体滴下部があり、中程に抗 O M V 抗体と特異的に結合する O M V が予め配置された測定部があり、該測定部を挟んで検体滴下部と反対側の端に検体吸収部が配置されている測定用器具である請求項 2 に記載の測定用器具。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、歯周病等の診断に有用な唾液等の歯周病原細菌の外膜ヴェシクルを用いた歯周病原細菌の検査方法及びこの検査方法に使用する測定用器具に関するものである。

【背景技術】**【0002】**

歯周病疾患の対策としては、正しい歯磨きや定期検診によるプラークコントロール、食生活の改善等の予防行為が挙げられる。しかし現実的には、静かに進行する歯周病疾患を可能な限り早期に的確に発見し、その症状に適した治療を行うことが非常に重要なポイントとなっている。

【0003】

歯周病の診断方法としては、歯周病原細菌の遺伝子中に存在する特定配列をインベーター・アッセイ法を用いて検出する方法が知られている（例えば、特許文献 1 参照。）。このような遺伝子を用いた診断方法は特異性が高く正確に菌数を測定することができるものの、唾液等の検体を検査センターに一旦送り、検査センター内で DNA の抽出、増幅等の専門操作を行う必要があるため、時間及び費用がかかるという欠点がある。

【0004】

また歯周ポケットからの滲出液には、種々の酵素類が含まれていることを利用して、滲出液からの酵素を分析する診断方法が知られている（例えば、特許文献 2 参照。）。しかしながら、酵素は複数種類の菌が同じ酵素を放出するために菌種を正確に特定することができなかった。またこの方法は、50～60 で 5～30 分間インキュベーションする必要があるため、高価な装置及び複数の操作を要することから一般歯科診療室や集団検診で行うことが現実的ではなかった。

【0005】

更に、歯肉に炎症が起きると歯周溝や歯周ポケットから出血が起こることが知られている。この唾液中に存在する潜血の濃度を潜血由来ヘモグロビンのペルオキシダーゼ様反応にて測定する方法もある（例えば、特許文献 3 参照。）。しかし、唾液中には好中球由来のミエロペルオキシダーゼや唾液ペルオキシダーゼが普遍的に存在しているために、この診断方法の精度は高くなかった。更に、診断直前のプロービング等の検査による出血を検

10

20

30

40

50

出してしまう問題もあった。

【0006】

【特許文献1】特開2007-244349号公報

【特許文献2】特開平2-261396号公報

【特許文献3】特開2002-181815号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで本発明は、精度良く簡便に歯周病の診断が可能な歯周病原細菌の検査方法及びこの検査方法に使用する測定用器具を提供することを課題とする。

10

【0008】

本発明者等は前記課題を解決するために鋭意検討した結果、歯周病原細菌の抗原性と免疫原性、病原性を保持する外膜ヴェシクル(OMV: outer membrane vesicle; 以後、単にOMVと称することがある。)に着目し、このOMVを用いて唾液等に含まれている抗OMV抗体を検出すれば、精度良く簡便に目的とする菌の存在や活性度を診断することが可能であることを究明して本発明を完成した。

【0009】

即ち本発明は、検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルを測定用器具の測定部に予め配置しておき、被験者から採取した検体を該測定部に接触させ、抗原抗体反応により検体内の前記外膜ヴェシクルに対応する抗外膜ヴェシクル抗体を検出することを特徴とする歯周病原細菌の検査方法、及びこの検査方法を実施するための検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め測定部に配置されていることを特徴とする測定用器具である。

20

【発明の効果】

【0010】

本発明に係る外膜ヴェシクルを用いた歯周病原細菌の検査方法及び測定用器具は、精度良く簡便に歯周病原細菌の診断が可能な優れた検査方法及び測定用器具である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明で用いる外膜ヴェシクルを得る方法は、例えば、検査を目的とする歯周病原細菌を培養してその培養上清を遠心分離する方法がある。その他にも培養上清を微小フィルターにかけることで精製する方法等がある。具体的には、検査を目的とする歯周病原細菌により、2500~5000×gの遠心分離を10~20分程度行い、その上澄み液を採取し、更に70000~150000×gの遠心分離を1~4時間行い、上澄み液を除去することで得ることができる。

30

【0012】

検査を目的とする歯周病原菌としては、例えば、*Porphyromonas gingivalis*(以下、*P.gingivalis*と言う。)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*、*Prevotella intermedia*、*Fusobacterium nucleatum/periodonticum*、*Campylobacter rectus*、*Eikenella corrodens*等がある。被験者から採取する検体としては、前記目的とする菌の存在する検体を適宜採取すればよく、例えば尿、血清、唾液、歯肉溝滲出液、歯垢等がある。中でも、歯肉溝滲出液、歯垢、唾液が検体としては好ましい。

40

【0013】

検出を目的とする菌のOMVを予め配置する測定用器具は、従来の抗原抗体反応を検出する測定用器具が使用できる。例えば、ELISA法であればマイクロプレートの穴底部を抗OMV抗体の測定部としてOMVを固定して配置する。固定方法は従来の抗原の固定方法が特に制限無く使用可能であり、OMVを炭酸バッファやPBS、TRIS液等に懸濁させ、この溶液をマイクロプレートの穴底部に添加し、液を乾燥させて物理的に吸着させる方法や、市販されているELISAプレート作製キットを用いる方法等で固定するこ

50

とができる。

【0014】

ELISA法での抗OMV抗体を検出する方法は、前記の方法でOMVを固定し修飾したマイクロプレートにウシ血清アルブミン溶液やスキムミルク溶液等でブロッキングを施した後、検体を添加し、抗体抗原反応により検体中の抗OMV抗体をマイクロプレートの穴底部上に捕捉して、不純物を洗浄により除去する方法がある。更に、前記方法等で捕捉した抗体を特異的に認識する市販の酵素修飾抗体とその反応基質を用いて発色、蛍光させて明確に検出する方法もある。具体的にはアルカリホスファターゼ修飾された抗ヒト免疫グロブリン抗体と基質であるp-ニトロフェニルリン酸ナトリウムとを用いて反応させた後、プレートリーダーにて吸光度を測定する方法や、ペルオキシダーゼ修飾された抗ヒト免疫グロブリン抗体と基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)等を用いて反応させた後、プレートリーダーにて吸光度を測定する方法等で検出する方法がある。

10

【0015】

また例えば、イムノクロマト法であれば、従来のイムノクロマト法での捕捉物質を配置している場所を抗OMV抗体の測定部として、OMVをメンブレン等の多孔質体内に固定することで配置が行われる。具体的には、多孔質体としてニトロセルロースメンブレンを用い、その上に微量の液体を直線状に配置できる抗体塗付機を用いてOMVを含む測定部作製溶液をニトロセルロースメンブレン上にOMVを配置する。

【0016】

イムノクロマト法での抗OMV抗体を検出する方法は、検出部に配置したOMVと検体中の抗OMV抗体とを抗体抗原反応させ、更に標識修飾された抗免疫グロブリン抗体を用いて視認できるラインを測定する方法で検出する方法がある。具体的な修飾物質としては、金コロイド、白金コロイド、ラテックスビーズ等の色素や、発色基質と共に使う場合ならばアルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ等の酵素が利用できる。

20

【0017】

また例えば、免疫沈降法であれば、一般にタンパク質等を回収するために利用されるビーズ等の担体を抗OMV抗体の測定部として利用することができる。ビーズの種類はシリカ性、ラテックス性、磁性ビーズ等がある。OMVとビーズとを結合させる方法は、ビーズ上のタンパク質の官能基を利用したカップリング反応等、一般的に知られている方法が利用可能である。検体中の抗OMV抗体を検出する方法は、前記ビーズを入れたカラムに検体を添加し、ビーズと検体中の抗OMV抗体とを結合させ、不純物を洗浄により洗い流すことで抗OMV抗体を精製し、更にビーズと抗OMV抗体との結合を切り離すことにより抗OMV抗体のみを含んだ溶液を得る。この溶液中の抗OMV抗体量を一般的な方法(ブラッドフォード法、BCA法等)のタンパク質量法を用いて測定して検出することができる。

30

【0018】

本発明における検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め測定部に配置されている測定用器具としては、ELISA法に使用するマイクロプレートを挙げるができる。具体的には、検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め測定部である穴底に固定され配置されているマイクロプレートである。同様に、従来のELISA法で使用されていた微小流路、キャピラリー等の測定用器具の測定部にOMVを配置した測定用器具を挙げるができる。

40

【0019】

本発明における検出を目的とする歯周病原細菌の外膜ヴェシクルが予め測定部に配置されている測定用器具としては、イムノクロマト法で使用する器具を挙げるができる。具体的には、試験溶液滴下窓と検査結果検出窓とが設けられた上カバーと、試験片設置ガイドが設けられた下カバーと、上カバーと下カバーとの間に収納されている多孔質性であって薄板状の多孔質片とから成る免疫クロマトグラフィ検査用具において、その多孔質膜片は、その片端に検体中に含まれている抗OMV抗体と特異的に結合する抗体が検出可

50

能な標識が付着された状態で含まれた検体滴下部があり、中程に抗OMV抗体と特異的に結合するOMVが予め配置された測定部があり、該測定部を挟んで検体滴下部と反対側の端に検体吸収部が配置されている測定用器具を例示することができる。

【実施例】

【0020】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0021】

< 歯周病原細菌のOMVの調整 >

歯周病原細菌の一つである *P. gingivalis* を、オートクレーブ滅菌した Brain Heart Infusion (BHI) に濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビタミンK、及び $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のヘミンを添加した培地を用いて2日間嫌気培養を行った。*P. gingivalis* の株はW83を用いた。培養液を遠心分離することで培養上清のみを採取し、更に $0.22 \mu\text{m}$ フィルターを用いて菌体を除去し、 $100,000 \times g$ の条件で3時間超遠心分離を行い、ペレットを採取した。採取したペレットは 20mM Tris バッファを用いて懸濁しOMV溶液を得た。作製したOMVのタンパク質量はブラッドフォード法にて測定した。

10

【0022】

< ELISA法での抗OMV抗体検出 >

96穴プレートに $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したOMV溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加し、十分に乾燥させ、プレート底部に吸着させ固定した。

20

1% skim milk / PBS でブロッキングを行った後、パラフィンワックスガムを用いて採取した刺激唾液を添加し、抗体抗原反応を行った。

アルカリホスファターゼ修飾抗ヒトIgA抗体を用いて抗OMV抗体を標識し、p-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを用いた発色反応をプレートリーダーで測定した。

その結果、*P. gingivalis* の株W83のOMVに対する唾液中のヒトIgA抗体価に示す図1のように、唾液サンプル中に存在する抗OMV抗体を検知することが可能であることが確認でき、またCPIコードの平均値が高い場合に大きくなることが分かった。従って、抗OMV抗体の力価は、少なくともCPIコードと関連していることが明らかであることが分かった。同様の方法でCPIコード以外の臨床症状との組合せ等を加えて評価すれば、より精度の高い検査を行うこともできる。

30

【0023】

< イムノクロマト法での抗OMV抗体検出 >

ニトロセルロースメンブレン(製品名: HiFlow Plus HF120, MILLIPORE社製)を厚さ 0.4mm の台紙に貼り付けた後、長さ 50mm 、幅 5mm となるように切断した。 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整したOMV溶液 $2 \mu\text{l}$ を前記メンブレン中央部へ円形状になるよう滴下し、十分に乾燥させることでOMVをメンブレン上に配置した。このOMVを配置したメンブレンの一端に長さ 10mm のグラスファイバー製のサンプルパッドを貼り付け試験端とした。更に、反対側の端に長さ 30mm の吸水濾紙を貼り付けイムノクロマト試験用ストリップを作製した。

40

PBSTを用いて4倍に希釈した刺激唾液 $100 \mu\text{l}$ と抗ヒトIgA抗体修飾金コロイド溶液 $10 \mu\text{l}$ を混合した溶液にイムノクロマト試験用ストリップの試験端を挿入し、15分後に目視にて確認し、赤い円形の着色が見られる場合を+、見られない場合を-として判定した。

その結果、表1のようにイムノクロマト法にて抗OMV抗体を検出可能であることが確認できた。更に、前記のELISA法の結果等を利用すれば、検出の閾値等を定めることも可能となり精度を高めることができることが示唆された。

【0024】

【表 1】

Sample ID	免疫反応結果 W83	ELISA 結果 W83
1	-	0.18
2	-	0.24
3	-	0.35
4	-	0.40
5	-	0.41
6	-	0.48
7	-	0.54
8	-	0.58
9	+	0.67
10	+	0.74
11	+	0.82
12	+	0.91

10

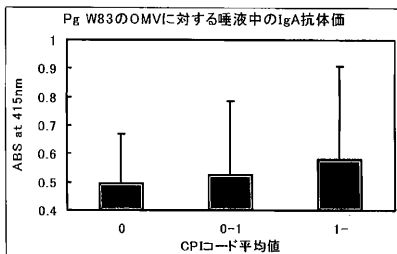
【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】 *P. gingivalis* の株 W83 の OMV に対する唾液中のヒト IgA 抗体価をアルカリホスファターゼ修飾抗ヒト IgA 抗体を利用して測定した結果を示す図である。

20

【図 1】



フロントページの続き

- (72)発明者 大西 真
東京都新宿区戸山一丁目2番1号 国立感染症研究所内
- (72)発明者 高山 和人
東京都板橋区蓮沼町7番1号 株式会社ジーシー内
- (72)発明者 内藤 裕樹
東京都板橋区蓮沼町7番1号 株式会社ジーシー内
- (72)発明者 佐久間 徹郎
東京都板橋区蓮沼町7番1号 株式会社ジーシー内
- Fターム(参考) 4B029 AA07 BB20 CC02 FA03 GA03 GB06
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ79 QR48 QS33 QX01

专利名称(译)	使用外膜囊泡测量牙周病原菌的方法和设备		
公开(公告)号	JP2013185858A	公开(公告)日	2013-09-19
申请号	JP2012049148	申请日	2012-03-06
[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	中尾龍馬 泉福英信 大西真 高山和人 内藤裕樹 佐久間徹郎		
发明人	中尾 龍馬 泉福 英信 大西 真 高山 和人 内藤 裕樹 佐久間 徹郎		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/56955 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.F G01N33/53.N G01N33/543.521 C12Q1/04 C12M1/34.F		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/FA03 4B029/GA03 4B029/GB06 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种利用细菌的外膜囊泡检查细菌的方法，该方法可用于高精度地容易地诊断牙周病细菌。待检测细菌的外膜囊泡预先布置在测量仪器的测量部分中，从测试对象收集的样品材料与测量部分接触，并且对应于外部的抗外膜囊泡抗体在抗原抗体反应的基础上检测标本材料中的膜囊泡。用于执行细菌检查方法的测量装置被构造成使得待检测细菌的外膜囊泡预先布置在测量部分中。

【表 1】

Sample ID	免疫学检测结果	ELISA 結果
	W83	W83
1	-	0.18
2	-	0.24
3	-	0.35
4	-	0.40
5	-	0.41
6	-	0.48
7	-	0.54
8	-	0.58
9	+	0.67
10	+	0.74
11	+	0.82
12	+	0.91