

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/081306

発行日 平成26年5月22日 (2014.5.22)

(43) 国際公開日 **平成24年6月21日 (2012.6.21)**

(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 Z N A F	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
CO 7 K 14/195 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	CO 7 K 14/195	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2012-548692 (P2012-548692)	(71) 出願人	000106324 サンスター株式会社 大阪府高槻市朝日町3番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/073942	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(22) 国際出願日	平成23年10月18日 (2011.10.18)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	特願2010-279268 (P2010-279268)	(74) 代理人	100156122 弁理士 佐藤 剛
(32) 優先日	平成22年12月15日 (2010.12.15)	(72) 発明者	野添 幹雄 大阪府高槻市朝日町3番1号 サンスター株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	Fターム(参考)	4B024 AA11 BA31 CA02 DA06 EA04 HA04

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット

(57) 【要約】

本発明は、広範囲の免疫型を有する患者に対して歯周病を高い精度で検査することができ、かつ、自動化された機器で高速処理することが可能な、歯周病原菌に対する血液試料中の抗体価または抗体の検査キット、該キットに好適に使用できる歯周病原菌抗原タンパク質、および該キットを用いた血液試料中の抗体価または抗体の存在を検査する方法、ポルフィロモナス・ジンジバリス菌株をタイピングするキットを提供することを目的とする。本発明は、配列番号：1、3、9、15、19、31、41、43、63、65および67の酸配列を有する一連のポリペプチドを含む検査キット、配列番号：67のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド、ならびにヒト身体から分離した血液試料を前記した一連のポリペプチドと接触させることを含む該血液試料中の歯周病原菌に対する抗体価または抗体の存在を測定する方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1、3、9、15、19、31、41、43、63、65および67のアミノ酸配列を有する一連のポリペプチドを含む歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 2】

さらに、配列番号：5および37のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 1 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 3】

さらに、配列番号：23、35および47のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 1 または 2 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 4】

さらに、配列番号：17のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 5】

配列番号：63のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号：64のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項 5 記載の改変ポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号：65のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号：66のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項 7 記載の改変ポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号：67のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号：68のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項 9 記載の改変ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号：141のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号：142のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項 11 記載の改変ポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号：145のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号：146のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項 13 記載の改変ポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、63、65、67、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 16】

該ポリペプチドが、配列番号：3、5、15、19、31、41、141および145よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドである請求項 15 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項 17】

該ポリペプチドが、配列番号：2、4、6、10、16、18、20、24、32、36、38、42、44、48、64、66、68、142、144、146、148、152、154および156よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである請求項

10

20

30

40

50

15記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット。

【請求項18】

ヒト身体から分離した血液試料を歯周病原菌抗原ポリペプチドと接触させることを含む該血液試料中の歯周病原菌に対する抗体価を測定する方法であって、該歯周病原菌抗原ポリペプチドが配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、63、65、67、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする該方法。

【請求項19】

ヒト身体から分離した血液試料を歯周病原菌抗原ポリペプチドと接触させることを含む該血液試料中の歯周病原菌に対する抗体の存在を測定する方法であって、該歯周病原菌抗原ポリペプチドが配列番号：3、5、15、19、31、41、141および145よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする該方法。

10

【請求項20】

該ポリペプチドが、配列番号：4、6、16、20、32、42、142および146よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである請求項19記載の方法。

【請求項21】

配列番号：151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポルフィロモナス・ジンジバリス菌株のタイピングキット。

20

【請求項22】

該ポリペプチドが、配列番号：152、154および156よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである請求項21記載のタイピングキット。

【請求項23】

配列番号：151のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項24】

配列番号：152のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項23記載のポリペプチド。

30

【請求項25】

配列番号：153のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項26】

配列番号：154のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項25記載のポリペプチド。

【請求項27】

配列番号：155のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項28】

配列番号：156のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる請求項27記載のポリペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット、より詳細には機器による自動化検査に適した特定の歯周病原菌抗原タンパク質を含んでなる歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット、該キットに用いる改変ポリペプチド、ならびに血液試料の歯周病原菌に対する抗体価を測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

歯周病は、口腔細菌が歯周組織へ感染することによって発症する細菌感染症である。

50

歯科臨床の現場における歯周病の診断は、臨床症状、口腔内写真、レントゲン画像あるいは歯周組織検査などの臨床検査の結果を総合して行われている。これらの検査のうち、口腔内写真やレントゲン画像診査は歯周組織の形態的な変化を視覚的に評価するものであり、歯周組織検査はプラーク付着状況、歯周ポケットの深さ、プロービング時の出血あるいは歯の動揺度などの様々な臨床項目を測定して評価するものである。したがって、これらの検査は複雑な操作が必要とされ、患者の歯周病病態を正確に診断するためには術者に高度の技術が要求される。

【0003】

すなわち、場合によっては、術者の熟練度によって検査結果が異なり、ひいては患者に対する診断が異なる可能性がある。また、上述したような歯科臨床検査では、歯周病が細菌感染症であるにもかかわらず、歯周病原菌の「感染」レベルではなく、歯周組織の「形態的な変化」のレベルで評価されており、いわば術者の主観によって検査がなされ、従来から、細菌学的・免疫学的観点から妥当であり、かつ、術者の熟練度によって検査結果に差異の生じない客観的な歯周病検査法に対する要望が存在していた。

10

【0004】

このような状況の中、歯周病原菌に対する血清抗体価を歯周病検査の指標とした歯周病検査システムが行われている（非特許文献1）。この歯周病検査システムは、患者の指先から採血し分離した微量な血液から歯周病原菌に対する「特異抗体」を検出・定量することによって、歯周病原菌の感染状態や歯周病の重篤度（炎症の状態）を評価するものであり、免疫学的手法を採用することによって歯周病の病態を客観的かつ均一に評価することが可能である。

20

【0005】

また、この歯周病検査システムでは、指先から採血した血液から血漿を分離し、血漿の試料を検査機関に郵送し、検査機関で歯周病原菌に対するIgG抗体価を測定し、歯周病の重篤度を評価後、各患者に歯周病検査の結果が通知される（歯周病原菌 血漿抗体価検査）。したがって、一般開業医あるいは家庭における歯周病検査の補助が実施可能となり、また、検査データを一括収集して解析することにより、膨大なデータを用いて病態との関連付けを行うこともできる。

一方で、このような歯周病検査システムにおいては、大量の試料が取り扱われることから自動で高速処理することが求められる。

30

【0006】

このような検査システムにおいては、試料（血液）中の検査対象とする抗原に対する抗体の種類が多ければ多いほど検査結果と歯周病との相関性は高く、歯周病を精度よく検査することが可能となる。また、歯周病に感染したヒトにおいては、歯周病原菌およびヒトの個体差に起因して認識される歯周病原菌抗原の種類が異なり、この点においても検査対象とする抗体の種類が多ければ多いほど歯周病を精度よく検査することができる。

しかしながら、多種の抗体の抗体価を測定しようとする試料の高速処理が困難となり、機器による自動化検査には適さない。

【0007】

現在の抗体価測定に使用されている抗原は、ポルフィロモナス・ジンジバリス（*Porphyromonas gingivalis*）などの歯周病原菌を破碎して調製した溶液であり、多種雑多な細菌タンパク質（LPS、膜脂質も含む）を含む混合物である。そのため、大量の試料を機器により自動で高速処理することが困難であった。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】工藤 英子、岡山歯学会雑誌、第28巻、第1号（2009）1-14頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

50

本発明の目的は、変化する歯周病原菌の抗原性と検査対象の多様な免疫反応性とに起因して生じる多様な抗原抗体反応をカバーして多様な免疫型を有する広範囲の患者の歯周病を高い精度で検査することができ、かつ、自動化された機器で高速処理することが可能な歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット、該キットに好適に使用できる歯周病原菌抗原タンパク質、および該キットを用いた血液試料の歯周病原菌血漿または血清抗体価を検査する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、かかる課題の下に、少ない種類でも多様な抗原抗体反応をカバーして歯周病を精度よく判定し得る歯周病原菌タンパク質の選抜を検討した。その結果、特定の歯周病原菌タンパク質の組合せが歯周病患者から分離した血液試料中の血漿抗体と特異的に反応し、それらの菌タンパク質の組合せを選択的に用いることによって多様な抗原抗体反応をカバーして血液試料を精度よく検査でき、かつ、自動化された機器で高速処理できることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

すなわち、本発明は、

[1]

配列番号：1、3、9、15、19、31、41、43、63、65および67のアミノ酸配列を有する一連のポリペプチドを含む歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[2]

さらに、配列番号：5および37のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む前記 [1] 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

20

[3]

さらに、配列番号：23、35および47のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む前記 [1] または [2] 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[4]

さらに、配列番号：17のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む前記 [1] ないし [3] のいずれか 1 に記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[5]

配列番号：63のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド；

[6]

配列番号：64のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [5] 記載の改変ポリペプチド；

30

[7]

配列番号：65のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド；

[8]

配列番号：66のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [7] 記載の改変ポリペプチド；

[9]

配列番号：67のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド；

[10]

配列番号：68のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [9] 記載の改変ポリペプチド；

40

[11]

配列番号：141のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド；

[12]

配列番号：142のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [11] 記載の改変ポリペプチド；

[13]

配列番号：145のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド；

[14]

50

配列番号：146のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [1 3] 記載の改変ポリペプチド；

[1 5]

配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、63、65、67、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[1 6]

該ポリペプチドが、配列番号：3、5、15、19、31、41、141および145よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドである前記 [1 5] 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[1 7]

該ポリペプチドが、配列番号：2、4、6、10、16、18、20、24、32、36、38、42、44、48、64、66、68、142、144、146、148、152、154および156よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである前記 [1 5] 記載の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キット；

[1 8]

ヒト身体から分離した血液試料を歯周病原菌抗原ポリペプチドと接触させることを含む該血液試料中の歯周病原菌に対する抗体価を測定する方法であって、該歯周病原菌抗原ポリペプチドが配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、63、65、67、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする該方法；

[1 9]

ヒト身体から分離した血液試料を歯周病原菌抗原ポリペプチドと接触させることを含む該血液試料中の歯周病原菌に対する抗体の存在を測定する方法であって、該歯周病原菌抗原ポリペプチドが配列番号：3、5、15、19、31、41、141および145よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであることを特徴とする該方法；

[2 0]

該ポリペプチドが、配列番号：4、6、16、20、32、42、142および146よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである前記 [1 9] 記載の方法；

[2 1]

配列番号：151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポルフィロモナス・ジンジバリス菌株のタイピングキット；

[2 2]

該ポリペプチドが、配列番号：152、154および156よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである前記 [2 1] 記載のタイピングキット；

[2 3]

配列番号：151のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

[2 4]

配列番号：152のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [2 3] 記載のポリペプチド；

[2 5]

配列番号：153のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

[2 6]

配列番号：154のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [2 5] 記載のポリペプチド；

[2 7]

10

20

30

40

50

配列番号：155のアミノ酸配列を有するポリペプチド；

[2 8]

配列番号：156のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列からなる前記 [2 7] 記載のポリペプチドを提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明は第1の態様において、特定の抗原タンパク質を含む歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットを提供する。

本発明の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットは、ヒト身体から分離した少量の血液と反応させて血液試料（血漿または血清）の歯周病原菌に対するIgG抗体価を測定することにより対象の歯周病原菌感染を検査するものであり、一般的には、

- (1) 対象身体に小さな傷をつけて少量の出血を起こすためのランセット
- (2) 該血液を採取するためのキャピラリー
- (3) 特定の歯周病原菌抗原タンパク質を含む溶液を入れたボトル
- (4) 該ボトル内部を圧縮して血液から血漿を分離するためのシリンダー
- (5) 該ボトルを密閉するキャップ

からなり、キャピラリーで採取した血液をボトル内の溶液と混合することにより、血液試料中に歯周病原菌に対するIgG抗体が存在する場合にはボトル内の抗原タンパク質と抗原抗体反応を生じ、免疫沈降を測定することにより歯周病原菌による感染を検査するものや

(1) 抗原タンパク質を固定化する96穴プレートに固定化し、
 (2) 血液試料（血漿または血清）を96穴プレートに加えて抗原抗体反応を行わせ、
 (3) 96穴プレートを洗浄した後に抗ヒトIgG二次抗体を加えて抗原抗体反応を行わせ、
 (4) 96穴プレートを洗浄した後に、特異的に結合した抗ヒトIgG二次抗体の存在による発色または発光反応を行わせてそのシグナルを検出するELISA法に用いるもの、

(1) 抗原タンパク質をフィルターに固定化し（ビオチン化など）、
 (2) 血液試料（血漿または血清）をフィルターに加えて、フィルター中で抗原抗体反応を行わせ、

(3) フィルターを洗浄した後に抗ヒトIgG二次抗体を加えて抗原抗体反応を行わせ、

(4) フィルターを洗浄した後に、特異的に結合した抗ヒトIgG二次抗体の存在による発色または発光反応を行わせてそのシグナルを検出する抗原固定化フィルター法に用いるものなどが存在する。

【 0 0 1 2 】

本発明のこの態様における特徴は検査キットに含まれる歯周病原菌ポルフィロモナス・ジンジパリス (*Porphyromonas gingivalis*) 抗原タンパク質にあり、歯周病患者が有する歯周病原菌に対する抗体と特異的に反応し、かつ、広範囲の歯周病患者が有する抗体と反応するものである。

すなわち、本発明の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットに含まれる歯周病原菌抗原タンパク質は、配列表の配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、これらの抗原タンパク質の一種または二種以上を組み合わせる使用することにより、歯周病患者が有する抗体の抗体価や種類を検査し、歯周病原菌への感染度や感染タイプを検査することができる。また、歯周病原菌の抗原タンパク質および個々の歯周病患者の免疫型（歯周病原菌に対する抗体の種類）には個体差があるが、本発明の抗原タンパク質を組み合わせる使用することにより、広範な免疫型の歯周病患者をカバーすることができる。また、心臓血管または脳血管の疾患のリスクファクターである歯周病原菌SU63株を検知できる。

また、本発明に使用する歯周病原菌抗原タンパク質は、好ましくは、配列表の配列番号：2、4、6、10、16、18、20、24、32、36、38、42、44、48、142、144、146、148、152、154および156よりなる群から選択される一種または二種以上のヌクレオチド配列によって

コードされるポリペプチドである。

さらに、好ましくは、本発明の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットに含まれる歯周病原菌抗原タンパク質は、配列表の配列番号：3、5、15、19、31、41、63および67よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、好ましくは、配列番号：4、6、16、20、32、42、64および68よりなる群から選択される一種または二種以上のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドである。

【0013】

本発明は第2の態様において、前記した歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットに使用する改変ポリペプチドを提供する。

本発明者らは抗体価検査キットに好適な歯周病原菌抗原タンパク質を見出すにあたり、一部の抗原タンパク質が、広範囲の歯周病患者の抗体と反応するにもかかわらずプロテアーゼ活性を有するため、その自己消化作用や他の抗原タンパク質の分解作用により検査に支障をきたすことを見出した。そこで、本発明者らは、これらの抗原タンパク質の抗原性を維持しつつ、プロテアーゼ活性を消失させた改変ポリペプチドを遺伝子工学的手法により作製した。

【0014】

すなわち、本発明の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットに使用する改変ポリペプチドは、配列番号：63、65または67のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、配列番号：51の野生型ポリペプチドのポジション477または488のシステイン残基を欠失しているか、または他のアミノ酸残基に置換した、好ましくはアラニン残基に置換した改変ポリペプチド（各々、配列番号：63および65）ならびに配列番号：57の野生型ポリペプチドのポジション471のシステイン残基を欠失しているか、または他のアミノ酸残基に置換した、好ましくはアラニン残基に置換した改変ポリペプチド（配列番号：67）である。これらの改変ポリペプチドの一種または二種以上を組み合わせることで使用することにより、特により広範な種類の歯周病原菌に対する抗体の検査が可能となる。

【0015】

本発明は第3の態様において、ヒト身体から分離した血液試料を歯周病原菌抗原ポリペプチドと接触させることを含む該血液試料の歯周病原菌に対する抗体価を測定する方法を提供し、方法に用いる血液試料は、好ましくは指尖毛細血管または静脈から採取した血液、血清または血漿であり、歯周病原菌抗原ポリペプチドは配列番号：1、3、5、9、15、17、19、23、31、35、37、41、43、47、63、65、67、141、143、145、147、151、153および155よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。好ましくは、歯周病原菌抗原ポリペプチドは配列番号：3、5、15、19、31、41、63および67よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0016】

本発明のこの態様における方法は、第1の態様の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットを用いて好適に実施することができ、好ましくは歯周病原菌血漿抗体価検査を用いて好適に実施することができる。

さらに、抗体価に基づいて歯周病の進行度（重症度）も検査することができる。

【0017】

本発明は第4の態様において、ポルフィロモナス・ジンジパリス菌株のタイピングキットを提供し、このキットはヒト身体から分離された血液試料中に存在するポルフィロモナス・ジンジパリス菌株、特にFDC381株およびSU63株をタイピングし、試料にいずれの菌株が存在するか検査し得るものである。該キットは、配列番号：151、153および155よりなる群から選択される一種または二種のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、好ましくは、ポリペプチドは配列番号：152、154および156よりなる群から選択される一種または二種のポリヌクレオチドによりコードされるものである。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、高速かつ高い精度で歯周病を検査することができる歯周病検査キットを提供することができる。また、施術者技術の熟達度に依存することなく客観的に歯周病を検査することができる歯周病検査キットを提供することができる。

また、本発明の歯周病検査キットが普及することにより、全国の歯科医院において統一した方法で歯周病を検査ことができ、また得られた測定結果をデータベース化することにより、歯周病の判定基準や治療指針を作成または改訂することができる。

さらに、本発明の歯周病検査キットは、心血管または脳血管疾患のリスクファクターを検知できる。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】歯周病原菌抗原タンパク質のヒト血清に対する抗原抗体反応を示す図である。A：健常者血清に対する抗原抗体反応、BおよびC：歯周病患者血清に対する抗原抗体反応。

【図2】抗体カラムを用いて粗精製したポルフィロモナス・ジンジバリスFDC381菌株抗原タンパク質のSDS-PAGE電気泳動図である。レーンA：健常者血清カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンB：患者血清1カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンC：患者血清2から粗精製した抗原タンパク質。

【図3】粗精製したFDC381菌株抗原タンパク質と血清との抗原抗体反応を示す図である。レーンA：健常者血清カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンB：患者血清1カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンC：患者血清2カラムから粗精製した抗原タンパク質。

【図4】抗体カラムを用いて粗精製したポルフィロモナス・ジンジバリスSU63菌株抗原タンパク質のSDS-PAGE電気泳動図である。レーンA：健常者血清カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンB：患者血清1カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンC：患者血清2カラムから粗精製した抗原タンパク質。

【図5】粗精製したSU63菌株抗原タンパク質と血清との抗原抗体反応を示す図である。レーンA：健常者血清カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンB：患者血清1カラムから粗精製した抗原タンパク質、レーンC：患者血清2カラムから粗精製した抗原タンパク質。

【図6】抗原タンパク質のMascotサーチ結果を示す図である。

【図7】同定した抗原タンパク質の遺伝子情報および選抜結果を示す図である。

【図8】血清と合成抗原タンパク質との抗原抗体反応を示す図である。

【図9】血清と合成抗原タンパク質との抗原抗体反応シグナル値を示す図である。

【図10】合成抗原タンパク質の安定性を示すSDS-PAGE電気泳動図である。

【図11】健常者血清と合成抗原タンパク質との抗原抗体反応シグナル値を示す図である。

【図12】種々の患者血清と抗原タンパク質との抗原抗体反応シグナル値を示す図である。

【図13】種々の患者血清と抗原タンパク質との抗原抗体反応を要約した図である。

【図14】改変ポリペプチドの安定性および抗原性を示す図である。

【図15】血清と合成抗原タンパク質との抗原抗体反応を示す図である。

【図16】血清と合成抗原タンパク質との抗原抗体反応シグナル値を示す図である。

【図17】種々の血清と抗原タンパク質との抗原抗体反応を要約した図である。

【図18】健常者および患者血清と抗原タンパク質との抗原抗体反応シグナル平均値およびS/N値を示す図である。

【図19】種々の抗原タンパク質に対する各血清のシグナル値について求めたROC曲線およびAUC値を示す図である。

【図20】血清と種々の抗原タンパク質（SU63株）との抗原抗体反応を示す図である。

【図21】血清と抗原タンパク質（SU63株）との抗原抗体反応を要約した図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

10

20

30

40

50

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0021】

本実施例全体をとおして、歯周病原菌としてポルフィロモナス・ジンジパリス (*Porphyromonas gingivalis*) FDC381菌株およびSU63菌株を用いた。FDC381菌株は住商ファーマインターナショナル(株)から販売されており、SU63菌株はII型またはIV型線毛保有株として入手可能である。

【0022】

抗体カラムの作製

ヒトが歯周病原菌に感染した際、ヒト身体には免疫反応により歯周病原菌の抗原に対する多種の抗体が産生される。ここで産生される抗体が認識する抗原は、個体の免疫反応の差異によって異なる。

そのため、歯周病原菌の抗原調製液の組成のうち、どのような抗原が抗体のターゲットとなっているかを調べ、その結果に基づいてより多くの抗原を精製するための血清を選抜した。

【0023】

抗原タンパク質の調製

ポルフィロモナス・ジンジパリス菌 (FDC381株およびSU63株) を超音波破碎し、超遠心した上清画分を回収した抗原調製液 (株式会社 特殊免疫研究所、200 μ gタンパク質相当量) にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えて270 μ lとした。これに、トリクロロ酢酸を加えて水中で静置後、低温で遠心を行って上清を除去した。その沈殿に氷冷エタノールを加えて洗浄し、再度低温で遠心を行った後、上清を除去した。さらに、上記の操作を2回行った。風乾後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を0.06%加えたPBS 120 μ lを加えて沈殿を溶解し、各々の菌株ごとに抗原タンパク質溶液を調製した。

【0024】

抗原タンパク質の定量

調製したスタンダード (濃度 ; 1000、500、250、125、62.5または31.25ng/ μ l) 25 μ l、PBSで希釈した抗原タンパク質溶液25 μ l、対照としてPBS 25 μ lを96穴プレートのウェルに各々加え、ついで、タンパク質ワーキングソリューション (Thermo scientific, Reagent A : B = 50 : 1の用量で混合) 200 μ lを各々のウェルに加えた。ついで、反応液をシェーカーで攪拌し、恒温恒湿機内、37 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした後にプレートリーダー (Intermed, NJ2000) を用いて577nmの吸光度を測定して、収集した抗原タンパク質を定量した。

【0025】

SDS-PAGE電気泳動

定量したジンジパリス菌 (FDC381菌株およびSU63菌株) 抗原タンパク質について、各々試料バッファー (Invitrogen) を用いてタンパク質濃度400ng/ μ lに調製した。調製試料を熱変性後、SDS-PAGE電気泳動に付した (タンパク質溶液5 μ l)。

【0026】

SDS-PAGE電気泳動後のゲルについて、iBlotドライプロットティングシステム (Invitrogen) を用いて、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF膜) にプロットティングを行った。

PVDF膜に転写した後、泳動したレイアウト (分子量マーカー、FDC381株、SU63株) を1セットとして切り出した。切り出した1セットのスリットについて、ボンソー染色を行い、タンパク質のプロットティングを確認した。残りのスリットについては、ファルコンチューブに入れ、ブロッキング溶液 (スキムミルク3%およびTween20 0.1%を加えたトリス緩衝生理食塩水 (以下、「TBS」という)) に浸漬した。

【0027】

血清を用いた抗原抗体反応

ブロッキング後のスリットについて、ブロッキング溶液を除去した後、血清反応液 (スキムミルク3%を添加したTBS 20mlに健常者または歯周病患者から採取した血清8 μ lを加

10

20

30

40

50

えた溶液)を加え、室温にて振盪した。ついで、Tween20 0.05%を加えたTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体反応液(スキムミルク3%を加えたTBSに抗ヒト二次抗体(CHEMICON)を加えた溶液)を加え、室温で振盪した。ついで、Tween20 0.05%を加えたTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、スリットを0.61mg/mLの4-メトキシ-1-ナフトールおよび0.018%の過酸化水素水を含むTBSに浸漬して発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。

【0028】

抗原タンパク質とヒト血清との反応結果を図1に示す。

健常者血清との抗原抗体反応では、ほとんどシグナルが観察されなかった(図1A:健常者対象血清)。

一方、歯周病患者血清との抗原抗体反応では、明瞭なシグナルが観察され、そのパターンは多様であった(図1Bおよび図1C)。また、患者血清との抗原抗体反応において観察された多様なシグナルは、大きく2つに分けることができた。すなわち、明瞭なバンドを示すシグナル(図1B)および全体的に広がるスメアを示すシグナル(図1C)に分けられた。多様な抗原抗体反応パターンは、これらのサイズの違いや菌株への特異性の違いにより形成されていた。

【0029】

そして、下記に示すサイズのシグナルが多くの患者の血清に対して特異的に強く観察された。

46kDa (FDC381菌株およびSU63菌株の抗原タンパク質)

25-37kDa (FDC381菌株およびSU63菌株の抗原タンパク質)

100-110kDa (FDC381菌株およびSU63菌株の抗原タンパク質)

57kDa (SU63菌株の抗原タンパク質)

150-250kDa (SU63菌株の抗原タンパク質)

【0030】

歯周病患者血清を用いた抗原抗体反応の結果を見ると、大きく2種類のシグナルパターン(明瞭なバンドおよび全体に広がるスメア)が観察され、それらの組合せ(サイズ・菌株)により多様な抗原抗体反応パターンが形成されていた。すなわち、ジンジバリス菌感染者が産生する抗体は様々であり、ある血清では抗原タンパク質として認識されている一方で、他の血清ではまったく認識されていない場合があることが示された。このことは、様々な歯周病患者血清に含まれる抗体が多様なタンパク質を抗原としているという報告と矛盾しない。そのため、ジンジバリス菌の感染を抗体価で測定するためには、多様な検査抗原タンパク質が必要となることが示された。

【0031】

また、FDC381菌株とSU63菌株に共通する抗原タンパク質を検査に用いた場合には、菌株の同定までは困難と考えられる。一方、菌株に特異的な抗原タンパク質のみを検査に用いれば、その検査で陽性が示される場合、その菌株による感染が疑われる。

患者血清において観察された抗原抗体反応パターンは多様であったが、初診患者(FV)とメンテナンス患者(SPT)のパターンに顕著な違いは観察されなかった。このことから、患者血清において強いシグナルを示す抗原タンパク質を同定し、それを検査に使用する抗原の候補とすることとした。

【0032】

多くの患者血清に対して強いシグナルを示したバンドとして、結果に示したとおり、46kDa、25-37kDa、100-110kDa、57kDaおよび150-250kDaの抗原タンパク質群が挙げられる。そこで、種々な患者の血清に対するこれらのタンパク質群の抗原性の有無を調べた。その結果を表1に示す。

【0033】

10

20

30

40

【表1】

抗原タンパク質群に対する患者血清の反応

	患者血清No	血漿抗体価		共通抗原			SU63 特異抗原			
		FDC381:	SU63:	46kDa	25-37kDa	100-110kDa	57kDa	150-250kDa		
FV	381 ≥ 1 SU < 1	7056	7.36	0.1	○					
		7457	6.18	0.6	○	○	○		○	
		6991	4.43	0.9				○		
		7492	3.76	0.59	○		○		○	
		6809	3.35	0.9		○	○	○		
		6816	1.89	0.76	○					
		7125	1.89	0.09	○	○	○		○	
		7500	1.87	0.93		○	○		○	
		7107	1.8	0.06		○	○		○	
		7835	1.64	0.19	○					
	381 ≥ 1 SU ≥ 1	7350	5.45	10.18	○					
		7523	15.11	9.08		○	○		○	
		7524	44.9	7.35		○	○	○	○	
		6921	7.55	5.07	○		○	○		
		6896	4.36	4.37		○	○		○	
		6975	7.98	4.31	○	○	○	○	○	
		6923	5.2	4.11	○	○	○	○		
		7393	15.2	4.07	○	○			○	
		6926	5.63	3.61	○			○		
		7495	11.38	2.61			○	○		
	381 < 1 SU ≥ 1	6817	0.11	1.32		○				
		6820	0.68	2.01	○		○		○	
		6828	0.55	1.97						
		6855	0.58	1.03		○	○			
		6863	-0.32	2.2	○					
		6867	0.93	1.46	○			○		
		6874	0.03	2.83	○		○	○		
		6881	0.66	1.4	○	○	○			
		6889	0.28	2.23	○	○	○			
		6904	0.88	1.51	○					
	SPT	381 ≥ 1 SU ≥ 1	6935	0.63	1.31	○				
			6968	0.08	1.93	○				○
			7082	133.77	39.79	○	○	○		
6918			30.24	6.71	○	○	○	○		
6870			13.32	5.85	○	○	○	○		
6980			13.36	5.52	○	○	○		○	
6872			6.19	4.66	○		○	○		
7001			3.77	3.32	○	○	○		○	
6802			1.16	3.05	○	○	○			
		7268	23.57	2.87	○	○	○	○		
		7004	1.54	2.31		○	○		○	
381 ≥ 1 SU < 1		6823	4.57	0.44		○	○			
		7234	3.25	0.63	○		○	○		
		7230	3.22	0.87	○		○			
		7381	3.22	0.09	○	○	○	○		
	7210	1.74	0.32	○	○	○	○			
	7253	1.57	-0.19	○				○		
	7263	1.49	0.07				○			
	7135	1.49	0.14	○	○	○				

10

20

30

【0034】

表1から明らかなように、これら5種の抗原タンパク質群の組合せを用いることにより、すべての患者血清中のジンジパリス菌に対する抗体の有無を確認することができ、広範な歯周病患者の検査をカバーすることができることが示された。

40

【0035】

イムノアフィニティカラム作製に使用する血清の選抜

つぎに、これら5種類の抗原タンパク質群をイムノアフィニティカラムを用いて精製するために、カラム作製に使用する血清を選抜した。その際、患者血清の抗原抗体反応パターンおよび血漿抗体価の測定値を考慮し、2種類の患者血清プールを抗体カラム作製に用いることとした。すなわち、標的抗原に明瞭なバンドを示し、血漿抗体価の高い、No.7350、No.6921およびNo.6870の血清プールを46kDa (FDC381菌株およびSU63菌株) および57kDa (SU63菌株) の抗原タンパク質群を精製するための抗体カラム作製に使用した。一方、全体的にスミアなバンドを示すが標的抗原に強いシグナルを示し、血漿抗体価の高い、No.7107、No.7523およびNo.6980の血清プールを25-37kDa (FDC381菌株およびSU63菌株)、1

50

00-110kDa (FDC381菌株およびSU63菌株)および150-250kDa (SU63菌株)の抗原タンパク質群を精製するための抗体カラム作製に使用した。なお、比較対象として、健常者のNAI、TOMおよびKOBの血清プールを健常者の抗原タンパク質を精製するための抗体カラム作製に使用した。

【0036】

一方、血漿抗体価検査に用いる抗原タンパク質として、5種の抗原タンパク質群(46kDa、25-37kDa、100-110kDa、57kDaおよび150-250kDa)を選択した。これらの5種の抗原タンパク質群をイムノアフィニティカラムを用いて精製するために、3種類のカラムを作製した。すなわち、カラムA:健常者血清カラム(NAI、TOMおよびKOB血清リガンド)、カラムB:明瞭なバンド精製カラム(No.7350、No.6921およびNo.6870血清リガンド)およびカラムC:スミアなバンド精製カラム(No.7107、No.7523およびNo.6980血清リガンド)を作製した。

10

【0037】

イムノアフィニティカラムを用いた抗原タンパク質の精製

選択した抗原タンパク質を同定するためには、抗原調製液から抗原タンパク質を精製する必要がある。そこで、選抜した血清を用いて抗体カラムを作製し、抗原タンパク質を精製した。

【0038】

イムノアフィニティカラムは、岡田雅人および宮崎香著、「タンパク質実験ノート(下巻)」,羊土社,pp.131-136(1990)および高津聖志ら著、「タンパク質研究のための抗体実験マニュアル」,羊土社,pp.53-61(2005)に基づいて以下の手法により作製した。

20

歯周病患者血清または健常者血清1.5ml(各血清500 μ l \times 3検体)に、抗体結合バッファー(50mM 酒石酸緩衝液、3M NaCl、pH9.0)2.5ml、塩化ナトリウム0.26gを加えて混合し、抗体反応液を調製した。

【0039】

一方、プロテインGセファロース(GE Healthcare)をエコノパックカラム(BIO-RAD)に加えて超純水で洗浄し、さらに、抗体結合バッファーを用いて洗浄した。そのカラムに調製した抗体反応液を全量加え、カラムを密閉した後に、ローテーターを用いて攪拌した。攪拌後、抗体反応液を除去した後に、抗体結合バッファー(50mM 酒石酸緩衝液、3M NaCl、pH9.0)でカラムを洗浄した。

30

クロスリンカー-BS3(PIERCE)100mgを6.8mlのクロスリンカー溶液(0.2M トリエタノールアミン-HCl、pH8.0)に溶解し、3本のカラム(健常者血清カラムおよび2本の患者血清カラム)に分注後、室温でローテーターを用いて攪拌した。

【0040】

カラムからクロスリンカー溶液を除去した後、ブロッキング溶液(0.2M エタノールアミン-HCl、pH8.0)で洗浄した。カラムを密閉した後にブロッキング溶液を加え、ローテーターを用いて室温で攪拌した。その後、ブロッキング溶液を除去し、カラムを溶出溶液(0.1M グリシン-HCl、pH2.8)、ついで50mM Tris-HCl(pH7.5)で洗浄した後に50mM Tris-HCl(pH7.5)を加えて保存した(イムノアフィニティカラムA、BおよびC)。

40

【0041】

抗原タンパク質試料の調製

ジンジバリス菌(FDC381株およびSU63株)の抗原調製液(特殊免疫研究所、200 μ gタンパク質相当量)にPBSを加えて270 μ lに調製した。それにトリクロロ酢酸を加え、氷中で静置後、低温で遠心を行い、上清を除去した。さらに、氷冷エタノールを加え、沈殿を洗浄後、再度低温で遠心を行い、上清を除去した。上記の操作を3回行った。

風乾後、SDS 0.06%を添加したPBS 200 μ lを加えて沈殿を溶解した後に、それぞれの菌株ごとのタンパク質溶液をまとめた。まとめたタンパク質溶液と等量のPBS(0.01% Brij-35および0.2% CHAPS含有)を加えて沈殿を溶解させて、各々の菌株ごとに抗原タンパク質試料を調製した。

50

【0042】

抗原タンパク質定量

調製したスタンダード（濃度；1000、500、250、125、62.5および31.25ng/μl）25μl、PBSで希釈した抗原タンパク質試料25μl、コントロールとしてPBS 25μlを96穴プレートのウェルに各々加え、ついで、タンパク質ワーキングソリューション（Thermo scientific, Reagent A:B=50:1の用量で混合）200μlを各々のウェルに加えた。ついで、反応液をシェーカーで攪拌し、恒温恒湿機内、37℃にて30分間インキュベートした後にプレートリーダー（Intermed, NJ2000）を用いて577nmの吸光度を測定して、試料中の抗原タンパク質を定量した。

【0043】

イムノアフィニティカラムを用いた抗原タンパク質の精製

PBSで平衡化したイムノアフィニティカラム（A、BおよびC）に、それぞれ約133μg/1.5mlの抗原タンパク質試料をアプライした（試料のバッファー組成；0.03% SDS、0.005% Brij-35および0.2% CHAPS（同仁化学研究所）を含有するPBS）。ローテーターを用いて室温で攪拌した後、フロースルーを回収し、試料として保存した。また、ウォッシュバッファー（0.005% Brij-35、0.1% CHAPS、20mM Tris-HClおよび500mM NaCl、pH7.5）を加え、ローテーターを用いて室温で攪拌してカラムを洗浄した。攪拌後、フロースルーを回収し、試料として保存した。この操作を3回行った。

超純水でカラムを洗浄後、溶出バッファー（0.05% トリフルオロ酢酸）5mlを2回加え、溶出タンパク質溶液を回収して凍結乾燥した。

【0044】

SDS-PAGE電気泳動

抗原タンパク質試料、各過程のフロースルーおよび溶出タンパク質の一部を分取し、終濃度5%のメルカプトエタノールを含む試料バッファーとなるように調製した。

調製した試料を熱変性後、SDS-PAGE電気泳動に付した（CBB染色用10μl、抗原抗体反応用5μl）。

【0045】

SDS-PAGE電気泳動後のゲルについて、蒸留水で洗浄した後にCBB染色液に浸漬し、室温で攪拌した。その後、バンドが明瞭に観察できるまで蒸留水で洗浄した。

また、SDS-PAGE電気泳動後のゲルについて、iBlotドライプロットティングシステム（Invitrogen）を用いて、PVDF膜にプロットティングを行った。

PVDF膜に転写した後、レイアウトを1セットとして切り出し、ブロッキング溶液（スキムミルク3%、Tween20 0.1%を加えたTBS）に浸漬した。

【0046】

血清を用いた抗原抗体反応

ブロッキング後のスリットについて、ブロッキング溶液を除去した後、血清反応液（3%スキムミルクを含むTBS 20mlに血清8μlを加えた溶液）を加え、室温で振盪した。加えた血清のセットを以下に記載する。

セットA（健常者血清）：NAI、TOM、KOB

セットB（患者血清1）：No.7350、No.6921

セットC（患者血清2）：No.7107、No.7523、No.6980

スリットを0.05% Tween20を含むTBSで洗浄し、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗ヒト二次抗体反応液（3%スキムミルクを含むTBSにヒト二次抗体（CHEMICON）を加えた溶液）を加え、室温で攪拌した。

ついで、スリットを0.05% Tween20を含むTBSで洗浄し、スリットを発色液（0.61mg/mlの4-メトキシ-1-ナフトールおよび0.018%の過酸化水素水を含むTBS）に浸し、発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。

【0047】

FDC381菌株抗原タンパク質の精製

カラムより精製した抗原タンパク質のSDS-PAGE電気泳動図を図2に示す。

10

20

30

40

50

抗原タンパク質試料をそれぞれのイムノアフィニティカラムに供した後のフロースルーを確認したところ、健常者血清カラムと患者血清カラムの間に大きな違いは観察できなかった。しかし、精製されたタンパク質を観察すると、健常者血清カラムより精製されたものと比べて（図2、レーンA）明らかに患者血清カラムから精製された方がCBB染色のシグナルが強かった（図2、レーンBおよびC）。特に50kDa近辺のバンドは、患者血清カラムにおいて顕著に強いシグナルを示した。また、25kDaより少し大きいサイズのバンドも患者血清において強いシグナルを示した（図2、レーンBおよびC）。

【0048】

SU63菌株抗原タンパク質の精製

カラムより精製した抗原タンパク質のSDS-PAGE電気泳動図を図4に示す。

10

抗原タンパク質試料をそれぞれのイムノアフィニティカラムに供した後の精製されたタンパク質を観察すると、FDC381菌株の場合ほど明確ではないが、健常者血清カラムより精製された方と比べて（図4、レーンA）明らかに患者血清カラムから精製された抗原タンパク質のCBB染色シグナルが強かった（図4、レーンBおよびC）。特に顕著な差は、25kDaより少し大きいサイズのバンドと、50kDaより少し大きいサイズのバンドにおいて観察された。FDC381菌株の精製において観察された強いシグナルは、SU63菌株の精製においても強いシグナルを示す傾向にあった（図4）。

【0049】

抗原タンパク質の抗原抗体反応

SDS-PAGE電気泳動に付したFDC381菌株およびSU63菌株の抗原タンパク質の抗原抗体反応の結果を各々図3および図5に示す。

20

血清セットA（健常者血清）は、健常者血清カラムおよび患者血清カラムのいずれから溶出した抗原タンパク質にも、高分子量のタンパク質には反応したが150kDa以下のタンパク質にはほとんど反応しなかった（図3および図5）。

一方、血清セットB（患者血清1；カラムBの作製に使用した血清群）は、患者血清カラムから溶出した抗原タンパク質と強く反応した（図3および図5、「患者血清1」のレーンBおよびC）。なお、患者血清カラム（カラムB）から溶出したタンパク質の方が、強いシグナルを観察した。

血清セットC（患者血清2；カラムCの作製に使用した血清群）も、血清セットBと同様に患者血清カラムから溶出したタンパク質と強く反応した（図3および図5、「患者血清2」のレーンBおよびC）。一方、血清セットCは健常者血清カラムから溶出したタンパク質とも比較的反応した（図3および5、「患者血清2」のレーンA）。なお、患者血清カラム（カラムC）から溶出したタンパク質の方が、強いシグナルが観察された。

30

【0050】

イムノアフィニティカラムから溶出されたタンパク質を観察すると、患者血清カラムから溶出したタンパク質は、健常者血清カラムから溶出したタンパク質と比べて明らかに多かった。これは、患者血清カラムのプロテインGセファロースには、ジンジバリス菌に対する抗体が多く結合しており、それを用いた精製過程でジンジバリス菌抗原タンパク質とより多く結合し、精製できるためと考えられる。

このことから、健常者血清カラムと患者血清カラムを用いて精製したタンパク質を比較することにより、抗原タンパク質の候補を選抜した。

40

【0051】

前記の精製した抗原タンパク質を比較した結果、表1に候補として示した共通する抗原（46kDa、25-37kDaおよび100-110kDa）を含む抗原タンパク質が、患者血清カラムにより精製したタンパク質において健常者血清カラムにより精製したタンパク質よりも多く含まれることがわかった。したがって、精製されたタンパク質全体の構成を明らかにして、両者を比較することにより検査キットに用いることが可能な抗原タンパク質の候補として選択することが可能であることから、各々の精製タンパク質を構成する全てのタンパク質を質量分析に付して同定した。

【0052】

50

質量分析

前記と同様にして粗精製した抗原タンパク質をSDS-PAGE電気泳動に付して分離し、CBB染色した溶出タンパク質（カラムA・B・C）のバンドを、それぞれ3レーン分まとめて切り出した。切り出したゲルをファルコンチューブに入れ、超純水200 μ lを加えて以下の質量分析に付した。

【0053】

質量分析用試料の調製

調製した試料を、下記のようにProGest (Genomic Solutions) workstationによりタンパク質消化し、60 $^{\circ}$ Cでジチオトレイトールによる還元を行った後、室温まで冷やした。ついで、ヨードアセトアミドを用いてアルキル化した。トリプシンの存在下、37 $^{\circ}$ Cにて4時間インキュベートし、ギ酸を加えて反応を停止させた。反応停止後の上清を試料として解析に使用した。

【0054】

LC/MS/MS

調製した試料について、ThermoFisher LTQ Orbitrap XLを用いてナノLC/MS/MS解析を行った。

加水分解産物30 μ lを、5mm \times 75 μ m ID C12カラム (Jupiter Proteo, Phenomenex) v entedカラムに適用した。グラディエント溶出は300nl/minで、15cm \times 75 μ m ID C12カラム上で行った。

MS/MSについては、data-dependent mode, six most abundant ionsにより操作されるマスペクトロメーターにより解析した。Orbitrap MSスキャンは60000 FWHM解像度で行った。

MS/MSデータはMascot (www.matrixscience.com) のローカルコピーを用いてサーチした。

LC/MS/MSサーチのパラメーターは下記のように設定した。

検索タイプ：MS/MSイオンサーチ

分類：バクテリア全般、あるいは全生物種

酵素：トリプシン

既定修飾：カルバミドメチル

可変修飾：酸化、アセチル化、ピログルタミル化、脱アミド化

マスvalue：モノイソトピック

タンパク質量：制限しない

ペプチド質量許容範囲： ± 10 ppm (Orbitrap)

フラグメント質量許容範囲： ± 0.5 ダルトン (LTQ)

誤切断の最大値：2

【0055】

SCAFFOLD

試料は、Mascotにより作成されたDATファイルを用いて、Scaffold algorithm (www.proteomesoftware.com) 内で加工した。LTQ Orbitrap XLデータパラメーターは、2ペプチド以上マッチするタンパク質を同定した。

結果を図6に示す。

【0056】

FDC381菌株

解析した3試料 (A~C: A: 健常者血清カラム、B: 患者血清カラム1、C: 患者血清カラム2) について、バクテリア全般を対象にMascotサーチを行った結果、合計28種のタンパク質が同定された (図6左)。同定されたタンパク質のうち、No.9、17および18についてはIgG抗体の一部であった。また、28種のうち15種のタンパク質が、患者血清カラム (BおよびC) より精製されたタンパク質群にのみ同定された。一方、その他の10種のタンパク質については、健常者血清カラム (A) より精製されたタンパク質群においても観察されたが、患者血清カラム (BおよびC) より精製されたタンパク質群において、スペクトルカウント数が高かった。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

SU63株

解析した3つの試料(A~C)について、バクテリア全般を対象にMascotサーチを行った結果、合計28種のタンパク質が同定された(図6右)。同定されたタンパク質のうち、No.8および12についてはIgG抗体の一部であった。また、28種のうち20種のタンパク質が、患者血清カラム(BおよびC)より精製されたタンパク質群にのみ同定された。一方、5種のタンパク質については、健常者血清カラム(A)精製タンパク質群においても観察されたが、患者血清カラム(BおよびC)精製タンパク質群において、スペクトルカウント数が高かった。また、No.22については、健常者血清カラム(A)においてのみ同定された。

【 0 0 5 8 】

今回得られた結果をみると、FDC381菌株およびSU63菌株とも、健常者血清カラムより溶出したタンパク質群よりも患者血清カラムより溶出したタンパク質群の方が、種類・量ともに明らかに多かった。このことは、イムノアフィニティカラム法により、患者血清が有する抗体に保持される抗原タンパク質が精製されたことを示唆している。同定されたタンパク質の中には、既に抗原として報告されているタンパク質が含まれていた。このことから、今回イムノアフィニティカラム法を用いた精製で得られたタンパク質についても、抗原タンパク質である可能性が高いと考えられた。

【 0 0 5 9 】

合成タンパク質の選択

2回の抗原タンパク質同定において観察されたタンパク質を整理し、実際に合成するタンパク質を選抜した。

同定されたタンパク質について、アクセションNo.を基に両株で同定されたタンパク質については同じ行として記し、遺伝子情報を調べて機能が既知か未知か、抗原性が既知か未知かを調べて分類した(図7)。

患者に特異的かどうかについて、健常者カラムより同定されたタンパク質の方が明らかに高いスペクトルカウントを示す場合を×、健常者カラムと患者カラムより同定されたタンパク質のスペクトルカウントがあまり変わらないもの、明らかに患者カラムより同定されたタンパク質のスペクトルカウントが高いものを○とした(1次選抜)。また、ジンジバリス菌に対して特異的かどうか調べるため、塩基配列を基に相同性の高いタンパク質を調べた。他の菌種と相同性が若干あるものを△、他の菌種と相同性が高いものを×、相同性が低くジンジバリス菌に特異的なタンパク質を○とした(2次選抜)。

【 0 0 6 0 】

2回の質量分析により同定されたタンパク質を整理した結果、合計37種のタンパク質を抗原タンパク質候補として同定した。アミノ酸配列の重複、1次選抜および2次選抜の結果、全ての要件を満足するタンパク質はNo.3、4、6、9、10、15、16、19、24、26、37、32および37の合計13種のタンパク質であった。

【 0 0 6 1 】

1次選抜および2次選抜により、患者特異的であってジンジバリス菌特異的なタンパク質を選抜することも考えたが、この段階で候補タンパク質を選抜することは、使用可能な抗原タンパク質を失う可能性がある。例えば、患者に非特異的と選抜されないタンパク質であっても、健常者に対する抗体価よりも患者に対する抗体価が充分高ければ、検査の抗原として利用可能なタンパク質である。そのため、実際に合成したタンパク質において抗原性を評価する方が抗原タンパク質候補のものをなくすことができると考えた。

【 0 0 6 2 】

そこで、質量分析により同定した合計37種のタンパク質からアミノ酸配列が重複していたNo.1、17、18、25、30および31を除く合計31種のタンパク質を候補としてタンパク質合成した。

【 0 0 6 3 】

タンパク質合成および合成タンパク質の抗原性評価

候補とした31種のタンパク質が実際に抗原性を示すかを評価するため、タンパク質合成

10

20

30

40

50

を行い、つづいて、合成したタンパク質について健常者血清および患者血清を用いて抗原性を評価した。

【0064】

各々の目的タンパク質の遺伝子情報をデータベースより入手し（抗原タンパク質情報）、配列表の配列番号:71から132に示す合成したプライマー対を用いてジンジバリス菌株のゲノムDNAより目的遺伝子を増幅し、ゲートウェイシステム（Invitrogen社）を用いてプラスミドDNA（pDONRベクター）にクローニングした。

【0065】

つづいて、遺伝子をクローニングしたpDONRベクターDNAを制限酵素処理して、同制限酵素で処理したタンパク質発現ベクター（セルフリーサイエンス社：pEuベクター）にライゲーションした。ライゲーション産物をトランスフォーメーションにより大腸菌（E.coli）に導入した。ついで、遺伝子が導入されたクローンを選抜した。

選抜したクローンよりプラスミドDNAを回収し、シークエンス解析を行った。シークエンス解析の結果から重大な変異が認められなかったクローンについて、プラスミドを大量調製して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成し、GSTタグを用いて精製した。

【0066】

31種のすべての遺伝子についてイン・ビトロ（in vitro）タンパク質合成を目指したが、No.33はタンパク質発現ベクターへのクローニングができず、No.5についてはタンパク質合成ができないあるいは非常に合成量が少ない結果となったため、残りの29種のタンパク質について抗原性を評価した。合成タンパク質についての抗原性を評価するためにドットプロット解析を行った。

【0067】

ドットプロット

29種の抗原タンパク質をドットプロットに付した。抗原タンパク質の量は50ngに調製し、各々の抗原タンパク質についてドットプロットを4セット作成した。ただし、No.32および35のタンパク質は定量できなかったため、合成タンパク質溶液4 μ lをドットプロットに付した。ドットプロットした後、ブロッキング溶液（スキムミルク（3%）およびTween20（0.1%）を含むTBS溶液）に浸漬した。

一次抗体として、健常者対象NAI、TOMおよびKOBからの血清を3 μ lずつ混合した健常者血清プールのうちの8 μ l、歯周病患者No.7350および6921からの血清を4 μ lずつ混合した患者血清プール1 8 μ l、および歯周病患者No.7107、7523および6980からの血清を3 μ lずつ混合した患者血清プール2のうちの8 μ lを3%のスキムミルクを含むTBS 20mlにそれぞれ加え、この3種類の抗体溶液にドットプロットのスリットを加え、抗原抗体反応を行わせた。

ついで、Tween20（0.05%）を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体反応液（スキムミルク（3%）を含むTBSに抗ヒト二次抗体（CHEMICON）を添付した溶液）を加え、室温で振とうした。ついで、Tween20（0.05%）を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、スリットを4-メトキシ-1-ナフトール（0.61mg/ml）および過酸化水素（0.018%）を含むTBSに浸漬して発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。

ドットプロットに付した合成タンパク質のレイアウトおよびドットプロット解析の結果を図8に示す。

【0068】

ドットプロット解析の結果、健常者血清プールとの反応においてはNo.2、6、10、26、29、32および35のスポットの発色が認められた。一方、患者血清プール1との反応においてはNo.2、3、4、6、9、10、11、13、19、21、22、24、26、28、32および35のスポットの発色が認められ、患者血清プール2との反応においてはNo.2、3、4、6、10、11、19、24、26、32および35のスポットの発色が認められた。

目視での確認では、いずれのスポットも健常者血清プールにおける発色よりも患者血清

10

20

30

40

50

プールにおける発色の方が高かった。また、患者血清プールでは、健常者血清プールでは観察されないスポットの発色を確認できた。

【 0 0 6 9 】

シグナル値の検出

つぎに、以下の方法でドットプロット解析の結果を定量化した。

1. ImageQuant LAS4000 (GEヘルスケア社)を用いて、メンブレンの画像を撮影した。フォーカスを合わせた後、下記の条件で画像を撮影した。

・画像取り込み条件

Exposure Type : Precision

Exposure Time : 1/100 Sec

Sensitivity/Resolution : Standard

2. ImageQuant TL (GEヘルスケア社)を用いて、撮影画像のドットのシグナル値を求めた。

・シグナル値の取り込み条件

Array analysisモードにおいて、ドットのスポットサイズおよび配置に併せて、シグナル値を数値化した。なお、バックグラウンド設定はスポットに近接する一部を設定した。

3. 数値化の後、各スポットのシグナル値を表として整理した。また、抗原タンパク質を載せていないスポット(ブランク)のシグナル値のうち最も高いシグナル値を示したシグナル値を基準として、それ以下のシグナル値についてはノイズとして処理した。定量化したシグナル値を図9に示す。

【 0 0 7 0 】

スポットのシグナルを数値化した結果、目視で確認した結果とほとんど同様の結果が得られた。ただし、患者血清プール1におけるNo.28はノイズと判断されるほどシグナル値が低かった。一方、No.34については目視ではほとんどスポットを確認できなかったにもかかわらず、シグナル値が検出された。また、患者血清プール2におけるNo.19もノイズと判断されるほどシグナル値が低かった。

【 0 0 7 1 】

これらの結果を総合すると、合成した29種のタンパク質のうち、健常者血清と反応せず患者血清とのみ反応したタンパク質は、No.3、4、9、11、13、19、21、22、24および28の10種のタンパク質であった。一方、健常者血清よりも患者血清において発色が高かったタンパク質は、No.2、3、4、6、9、10、11、13、19、21、22、24、26、28、32および35の16種のタンパク質であった。

これらの結果から、No.2、3、4、6、9、10、11、13、19、21、22、24、26、28、32および35のタンパク質が、本発明の抗体価検査キットに使用する抗原タンパク質として適当であることが示された。

【 0 0 7 2 】

合成タンパク質の安定性

合成した抗原タンパク質について、これらのタンパク質が抗体価検査キットに実際に使用し得るかを確認するため、SDS-PAGEを行って合成タンパク質の状態を調べた。

50ng/10 μ l試料バッファ(+DTT)となるように試料を調製した。また、No.5、32および35のタンパク質は定量値がないため、合成タンパク質溶液を4 μ lと試料バッファ(+DTT)を6 μ lを混合して試料とした。

調製した試料を熱変性し、全量10 μ lの試料をアプライしてSDS-PAGE電気泳動を行った。つづいて、泳動後のゲルについて、蒸留水で洗浄した後にCBB染色してバンドが明瞭に観察できるまで蒸留水で洗浄した。その結果を図10に示す。

【 0 0 7 3 】

No.5、32および35以外のタンパク質については、目的のサイズのタンパク質が合成されていることが確認された。一方、No.5のタンパク質についてはバンドがまったく観察されず、No.32および35のタンパク質については複数のバンドが観察された。

No.5については、メッセンジャーRNAの合成までは確認できたが、タンパク質の合成は確認できなかった。したがって、このタンパク質が非常に不安定なタンパク質であるか、合成自体が困難なタンパク質であることが予想された。

一方、No.32および35のタンパク質はプロテアーゼであることが知られており、合成タンパク質においてもプロテアーゼ活性を有するために自己消化すると考えられた。このように一部分の抗原タンパク質がプロテアーゼ活性を有する場合は、本発明の抗体価検査キットに含まれる他の抗原タンパク質の分解を生じ、タンパク質の安定性が悪く、検査に用いることができないと考えられる。

【0074】

したがって、No.5のタンパク質は合成困難なため使用できず、また、No.32および35のタンパク質はプロテアーゼ活性を有するため、そのままでは利用できないことが判明した。

【0075】

患者血清との抗原抗体反応

表1からもわかるように、個々の血清中の抗体が抗原とするタンパク質はそれぞれ異なることが考えられる。そこで、多数の患者血清と反応性の高い抗原タンパク質を選抜するため、抗原性が観察されたタンパク質について様々な患者血清との抗原抗体反応を調べた。

この実験では、健常者血清よりも患者血清において発色が高かった16種の抗原タンパク質をドットプロットに付した。ドットプロットに付したタンパク質量は50ngとした。また、No.32および35についてはタンパク質濃度が不明のため、4 μ lの合成タンパク質溶液をアプライした。また、それぞれの抗原タンパク質について個々の健常者血清と反応させて基準値を設定した。

【0076】

シグナル値の検出

1. ImageQuant LAS4000 (GEヘルスケア社)を用いて、メンブレンの画像を撮影した。フォーカスを合わせた後、下記の条件で画像を撮影した。

・画像取り込み条件

Exposure Type : Precision

Exposure Time : 1/100 Sec

Sensitivity/Resolution : Standard

2. つぎに、ImageQuant TL (GEヘルスケア社)を用いて、撮影画像のドットのシグナル値を求めた。

・シグナル値の取り込み条件

Array analysisモードにおいて、ドットのスポットサイズを合わせ、配置については2列 \times 8行(2 \times 8)に対して3列 \times 8行のスポット配置として、シグナル値を数値化した。

3. 数値化の後、それぞれのスポットのシグナル値より、真ん中の1列をスポットに近接するバックグラウンドとして、その差を各スポットのシグナル値として表に整理した。なお、目視にて確認できないスポットのシグナル値は、検出不可として処理した。

4. 健常者基準として、NAI、TOMおよびKOBのシグナル値を求めた。このうち、目視にて確認できたスポットのシグナル値を比較して、3検体の中で最も高いシグナル値を健常者血清基準とした(図11)。なお、どの検体においても発色の確認できなかったスポットについては、基準値を0とした。そのシグナル値よりも高いシグナル値を示したスポットに印をつけて整理した(図12および図13)。

【0077】

その結果、健常者血清と比較して、明らかに発色スポット数が多く、また、そのシグナル値も健常者血清における発色と比べて高いことが確認できた。予想していた通り、患者によっては抗原とならないタンパク質が存在した。

ここで、全ての患者抗体との反応が認められた抗原タンパク質No.32または35を用いることにより全ての患者の歯周病を判定し得ることが示されたが、変化する歯周病原菌の抗

10

20

30

40

50

原性と検査対象の多様な免疫反応性を考慮して、選択したタンパク質の二種以上の組合せを適宜選択して用いることにより、広範囲にわたる歯周病原菌および検査対象における歯周病の検査が可能になる。

また、発色シグナル値は患者の血漿または血清中の歯周病原菌タンパク質に対する抗体価を反映する。したがって、得られたシグナル値に基づいて歯周病の進行度（重症度）も検査できるが、この際にも選択したタンパク質の一種または二種以上を適宜選択して用いることにより、広範囲にわたる歯周病原菌および検査対象による歯周病進行度の検査が可能になる。

【0078】

健常者血清と患者血清のシグナル値の比較

健常者基準と比較して、患者血清に対してシグナル値が高かった抗原タンパク質について整理したところ、No.32および35の抗原タンパク質は調査した23名すべての血清に対して基準よりも高いシグナル値を示し、本発明の抗体価検査キットに使用する抗原タンパク質として特に適していることが判明した（図12および図13）。また、No.2、3および26の抗原タンパク質は、各々、調査した23名のうち19名、16名および12名の血清に対して基準よりも高いシグナル値を示し、検査対象のカバー率が比較的高いことが判明した（図12および図13）。

【0079】

このように、No.32および35の抗原タンパク質はシグナル値およびカバー率ともが高く、抗体価検査キットに使用する抗原として適していることが判明したが、プロテアーゼ活性が伴うためそのままでは検査抗原として利用できない。

一方、No.32および35以外のタンパク質を抗体価検査キットの抗原として使用するためには、複数種の抗原タンパク質を組合せることが必要となる。例えば、No.2と3との抗原タンパク質を組合せることにより、カバー率を100%まで上げることが可能であることが確認できた。

【0080】

前記したように、No.32および35の抗原タンパク質は優れた特性を有するもののプロテアーゼであるため、検査抗原として使用することができない。

そのため、これらの抗原タンパク質の抗原性を残した状態で、プロテアーゼ活性を消失させた改変ポリペプチドを作製した。

【0081】

Genetyxの相同性検索ツールを用いてNo.32および35のタンパク質のアミノ酸配列を解析し、各々のタンパク質について確認された2箇所のシステイン残基について以下の方法によりそれぞれアラニン残基に置換した。No.32について作製した2種の改変ポリペプチド（No.32Aおよび32B）のアミノ酸配列を配列番号：63および65に、それらをコードするポリヌクレオチド配列を各々配列番号：64および66に示す。また、No.35について作製した2種の改変ポリペプチド（No.35Aおよび35B）のアミノ酸配列を配列番号：67および69に、それらをコードするポリヌクレオチド配列を各々配列番号：68および70に示す。

タンパク質発現プラスミドの作製

・プライマー合成

変異導入部位を含む以下の配列表の配列番号に示すプライマー対を合成した。

改変ポリペプチドNo.32A

フォワードプライマー 配列番号：133

リバースプライマー 配列番号：134

改変ポリペプチドNo.32B

フォワードプライマー 配列番号：135

リバースプライマー 配列番号：136

改変ポリペプチドNo.35A

フォワードプライマー 配列番号：137

リバースプライマー 配列番号：138

10

20

30

40

50

改変ポリペプチドNo.35B

フォワードプライマー 配列番号：139

リバースプライマー 配列番号：140

・プライマーのリン酸化：T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡)

反応液組成	20 μ l 調製	
合成プライマー (50 μ M)	14 μ l	
10x Protruding End Kinase Buffer	2 μ l	
10mM ATP	2 μ l	
T4 Polynucleotide Kinase (5-20U/ μ l)	2 μ l	

【0082】

10

反応組成

37 に60min、ついで95 に5min保持した後、50 μ lのDWを加えた (10pmol/ μ lプライマー-DNA)。

・インバースPCR：Prime STAR MAX (Takara)

反応液組成	50 μ l 調製	
Takara PrimeSTAR MAX Premix (2x)	25 μ l	
フォワードプライマー (10pmol/ μ l)	1.5 μ l	
リバースプライマー (10pmol/ μ l)	1.5 μ l	
Template DNA (No.32または35抗原タンパク質の プラスミドDNA：10ng/ μ l)	1 μ l	20
滅菌水	21 μ l	

反応条件

98 にて30sec処理した後、98 にて10sec、55 にて5sec、72 にて50secのサイクルを30サイクル行った。

【0083】

QIAGENキットを用いてPCR産物を精製した後に、Template DNA (プラスミドDNA) を分解するためにDpnI処理を行った。

以下の組成でQIAGENキットを用いてPCR産物を精製した。

・DpnI処理

精製PCR産物	30 μ l	30
NEB4	5 μ l	
BSA	5 μ l	
DpnI (20unit/ μ L)	0.5 μ l	
滅菌水	9.5 μ l	

37、1時間

【0084】

制限酵素処理産物の精製：PCI処理を行い、DNA産物を精製した。

・ライゲーション

精製DNA	5 μ l	
Ligation Mighty Mix	5 μ l	40

16、1時間

ライゲーション産物をトランスフォーメーションにより大腸菌 (E.coli) に導入した。

遺伝子導入が確認されたプラスミドDNAについて、シーケンス解析を行った。

目的の変異が導入されたプラスミドを大量調製して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成し、GSTタグを用いて精製した。

【0085】

合成タンパク質の確認

SDS-PAGE

合成タンパク質溶液を4 μ lと試料バッファー (+DTT) を6 μ lを混合して試料とした。調製試料を熱変性し、全量10 μ lの試料をアプライし、SDS-PAGE電気泳動に付した。

50

CBB染色

SDS-PAGE後のゲルについて、蒸留水で洗浄し、CBB染色液に浸漬後、攪拌した。
蒸留水でバンドが明瞭に観察できるまで洗浄した。

ドットプロット

作製した4種の改変ポリペプチド (No.32A、32B、35Aおよび35B) をドットプロットに付した。ドットプロットする抗原タンパク質量12.5ng/μlを4μlアプライして、50ngとした。ドットプロットは3セット実施した。ドットプロットはスキムミルク5%を加えたTBSに一晚浸漬してブロッキングし、以下の血清溶液と室温にて反応させた。

血清溶液 (一次抗体)

A : NAI、TOMおよびKOBの血清を3μlずつを混合したうちの8μlを3%スキムミルクを含むTBS 20mlに混合した溶液 10

B : No.7350および6921の血清を4μlずつ混合した8μlを3%スキムミルクを含むTBS 20mlに混合

C : No.7107、7523および6980の血清を3μlずつ混合したうちの8μlを3%スキムミルクを含むTBS 20mlに混合 140mL 1×TBS

ついで、Tween20 (0.05%) を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体反応液 (スキムミルク (3%) を含むTBSに抗ヒト二次抗体 (CHEMICON) を添加した溶液) 20mlを加え、室温で振盪した。ついで、Tween20 (0.05%) を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、スリットを4-メトキシ-1-ナフトール (0.61mg/ml) および過酸化水素 (0.018%) を含むTBSに浸漬して発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。 20

【0086】

結果を図14に示す。

No.32については、どちらの改変ポリペプチドにおいてもプロテアーゼ活性が抑制されていた。一方、No.35については、No.35Bの改変ポリペプチドでは完全にプロテアーゼ活性が抑制されていなかったが、No.35Aではプロテアーゼ活性が抑制されていた。また、抗原性を調べた結果、いずれの改変ポリペプチドについても抗原性の維持が確認された。

【0087】

試験方法

・ドットプロット解析 30

先に記載した実験と同様に、16種の抗原タンパク質を健常者10名、歯周病患者20名の血清に対してドットプロットした (ただし、No.32とNo.35の抗原タンパク質については、得られた改変ポリペプチドであるNo.32AおよびNo.35Aを使用した)。ドットプロットに付したタンパク質量は50ngとした (ただし、No.4の抗原タンパク質についてはタンパク質濃度が薄く、37ngを付した。また、試験途中にタンパク質溶液が不足したため、血清番号H9、H10、P10、P20についてはプロットしていない)。

ドットプロットした後、ブロッキング溶液 (スキムミルク (5%) を含むTBS溶液) に浸漬した。

一次抗体溶液として、個々の健常者血清 (H1~H10) あるいは歯周病患者血清 (P1~P20) 8μLを、3%スキムミルクを含むTBS 20mLに混合した溶液を使用し、ブロッキング後のスリットをこれに浸漬し、室温で2時間抗原抗体反応を行った。 40

ついで、Tween20 (0.05%) を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体反応液 (スキムミルク (3%) を含むTBSに抗ヒト二次抗体 (MILLIPORE) を添加した溶液) 20mLを加え、室温で1時間抗原抗体反応を行った。

ついで、Tween20 (0.05%) を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、スリットを4-メトキシ-1-ナフトール (0.61mg/mL) および過酸化水素 (0.018%) を含むTBSに浸漬して発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。結果を図15に示す。

【0088】

・シグナル値の検出 50

1. ImageQuant LAS4000 (GEヘルスケア社)を用いて、メンブレンの画像を撮影した。フォーカスを合わせた後、下記の条件で画像を撮影した。

-画像取り込み条件-

Exposure Type : Precision

Exposure Time : 1/100 Sec

Sensitivity/Resolution : Standard

2. つぎに、ImageQuant TL (GEヘルスケア社)を用いて、撮影画像のドットのシグナル値を求めた。

-シグナル値の取り込み条件-

Array analysisモードにおいて、ドットのスポット全体を取り囲むように丸型カーソルを合わせ、配置については2列×8行のスポットレイアウトとして合わせ、シグナル値を数値化した。

バックグラウンドの設定は、Spot Edge Averageモードを設定し、スポット周囲のバックグラウンドに対してスポットのシグナル値が反映されるように設定した。

【0089】

・シグナル値の解析

1. それぞれの抗原タンパク質に対する各血清のシグナル値について、健常者血清グループおよび患者血清グループのシグナル平均値を計算した(図16および17)。その結果、No.13、21、22、28の抗原タンパク質はいずれの血清とも反応しない、あるいは反応する割合が低いことが判明した。

ついで、患者血清グループのシグナル値をSignal値、健常者血清グループのシグナル値をNoise値として、Signal/Noiseの比を求めた。なお、健常者血清グループのシグナル平均値がゼロのものについては、計算値の算出ができないためNoise:0と記した(図18)。その結果、No.2、6、10および26の抗原タンパク質については、シグナル平均値は高いがS/N比が低く、多様な免疫型を有する広範囲の患者の歯周病の検査には適当でないことが示された。一方、No.3、4、9、11、19、24、32Aおよび35Aの抗原タンパク質は、S/N比が高く、患者血清に対する特異性が高いと考えられた。

2. それぞれの抗原タンパク質に対する各血清のシグナル値について、エクセル統計2010ソフトウェアを用いてROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線およびROC曲線下面積 (Area under the curve, AUC) を求めた(図19)。

【0090】

ここで、ROC曲線は、境界値(カットオフ値)を変化させていった時に、陽性率(感度)と偽陽性率(1-特異度)がどのように変化するかをグラフ化したものであり、理想的な検査を考えると、感度も特異度も1.0である状態、すなわち左上端の点にある時が理想の状態となる。そのため、ROC曲線が左上端に近くなるように推移するグラフが、検査の診断能・予測能が高いと考えられる。そこで、ROC曲線下面積を測定することによって、検査の予測能・診断能を判断できる。

一般的には、AUCの値に基づく予測能・診断能は下記の様に判断される。

AUC 0.9 - 1.0 High accuracy

AUC 0.7 - 0.9 Moderate accuracy

AUC 0.5 - 0.7 Low accuracy

【0091】

図19の結果から、No.3、4、9、11、19、24、32Aおよび35Aの抗原タンパク質はAUC 0.6以上の診断能・予測能を有することが判明した。

【0092】

高発現抗原タンパク質の作製

試験方法

・No.32N、32C、35Nおよび35Cのタンパク質合成

No.32AおよびNo.35Aのヌクレオチド配列に基づき、以下のプライマリストに示す合成したプライマー対を用いて、約半分のヌクレオチドサイズとなるように目的遺伝子配列を

10

20

30

40

50

増幅した。

タンパク質発現プラスミドの作製

・プライマー合成

以下の配列表の配列番号に示すプライマー対を合成した。

改変ポリペプチドNo.32N

フォワードプライマー 配列番号：157

リバースプライマー 配列番号：158

改変ポリペプチドNo.32C

フォワードプライマー 配列番号：159

リバースプライマー 配列番号：160

改変ポリペプチドNo.35N

フォワードプライマー 配列番号：161

リバースプライマー 配列番号：162

改変ポリペプチドNo.35C

フォワードプライマー 配列番号：163

リバースプライマー 配列番号：164

【0093】

つづいて、増幅DNA産物を制限酵素処理して、同制限酵素で処理したタンパク質発現ベクター（セルフリーサイエンス社：pEuベクター）にリーディングフレームが合うようにライゲーションした。ライゲーション産物をトランスフォーメーションにより大腸菌（*E. coli*）に導入した。ついで、遺伝子が導入されたクローンを選抜した。

選抜したクローンよりプラスミドDNAを回収し、シーケンス解析を行った。No.32Aについて作製した2種の改変ポリペプチド（No.32Nおよび32C）のアミノ酸配列を配列番号：141および143に、それらをコードするポリヌクレオチド配列を各々配列番号：142および144に示す。また、No.35Aについて作製した2種の改変ポリペプチド（No.35Nおよび35C）のアミノ酸配列を配列番号：145および147に、それらをコードするポリヌクレオチド配列を各々配列番号：146および148に示す。

シーケンス解析の結果から重大な変異が認められなかったクローンについて、プラスミドを大量調製して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成し、GSTタグを用いて精製した。

No.32AのN末端およびC末端、No.35AのN末端およびC末端の4種のタンパク質合成に成功し、これらについてドットプロット解析を行った。

その結果、これらの改変ペプチドは、約半分の長さとしても患者血清グループと反応することが認められ、抗原性の維持が確認された。

【0094】

ポルフィロモナス・ジンジパリス菌株SU63株を認識する抗原タンパク質

試験方法

・菌株間の同一性の検証

FDC381株の各タンパク質のアミノ酸配列を基に、NCBIサイトのBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）のblastpを用いて検索を行った。

検索結果より、データベース上に登録されているPorphyromonas gingivalis菌の菌株W83株、ATCC33277株、TDC60株におけるタンパク質との同一性を確認した。

・SU63株由来の遺伝子クローニングおよびタンパク質合成

選抜したタンパク質の遺伝子情報をデータベースより参照し、以下の配列表の配列番号に示したプライマー対を用いてジンジパリス菌株SU63株由来のゲノムDNAより目的遺伝子を増幅した。

Su63株 No.15抗原タンパク質（No.15Su）

フォワードプライマー 配列番号：165

リバースプライマー 配列番号：166

Su63株 No.16抗原タンパク質（No.16Su）

10

20

30

40

50

フォワードプライマー 配列番号：167
 リバースプライマー 配列番号：168
 Su63株 No.34抗原タンパク質 (No.34Su)
 フォワードプライマー 配列番号：169
 リバースプライマー 配列番号：170
 Su63株 No.37抗原タンパク質 (No.37Su)
 フォワードプライマー 配列番号：171
 リバースプライマー 配列番号：172

【0095】

つづいて、増幅DNA産物を制限酵素処理して、同制限酵素で処理したタンパク質発現ベクター（セルフリーサイエンス社：pEuベクター）にライゲーションした。ライゲーション産物をトランスフォーメーションにより大腸菌（*E. coli*）に導入した。ついで、遺伝子が導入されたクローンを選抜した。

10

選抜したクローンよりプラスミドDNAを回収し、シーケンス解析を行った。No.15Su、No.16Su、No.34SuおよびNo.37Suの抗原タンパク質のアミノ酸配列を各々配列番号：149、151、153および155に、それらをコードするポリヌクレオチド配列を各々配列番号：150、152、154および156に示す。その結果、No.15Su抗原タンパク質をコードするポリヌクレオチドの配列はW83株の対応するポリヌクレオチド配列と1塩基違いであり、No.16Su抗原タンパク質をコードするポリヌクレオチドの配列はTDC60株やATCC33277株の対応するポリヌクレオチド配列と相同性が高く、No.34Su抗原タンパク質をコードするポリヌクレオチドの配列はragA（A011/9株）のポリヌクレオチド配列と相同性が高いことが判明した。

20

【0096】

シーケンス解析の結果から重大な変異が認められなかったクローンについて、プラスミドを大量調製して、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系によりタンパク質を合成し、GSTタグを用いて精製した。

その結果、SU63株由来のNo.15、16、34および37の4種のタンパク質合成に成功し、これらについてドットプロット解析を行った。

【0097】

・ドットプロット解析

8種の抗原タンパク質（FDC381株：No.15、16、34および37、SU63株：No.15Su、16Su、34Suおよび37Su）をドットプロットした。ドットプロットに付したタンパク質量は50ngとした。

30

ドットプロットした後、ブロッキング溶液（スキムミルク（5%）を含むTBS溶液）に浸漬した。

一次抗体溶液として、個々の健常者血清（H1～H10）あるいは歯周病患者血清（P1～P20）4μLを、3%スキムミルクを含むTBS 10mLに混合した溶液を使用し、ブロッキング後のスリットをこれに浸漬し、室温で2時間抗原抗体反応を行った。

ついで、Tween20（0.05%）を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、5000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体反応液（スキムミルク（3%）を含むTBSに抗ヒト二次抗体（MILLIPORE）を添加した溶液）10mLを加え、室温で1時間抗原抗体反応を行った。

40

ついで、Tween20（0.05%）を含むTBSを用いてスリットを洗浄した。洗浄後、スリットを4-メトキシ-1-ナフトール（0.61mg/mL）および過酸化水素（0.018%）を含むTBSに浸漬して発色を確認後、精製水で洗浄し、乾燥させた。結果を図24および25に示す。

これらの図から明らかなように、No.15抗原タンパク質は、FDC381株およびSU63株の両方の抗原タンパク質で患者血清P19に対して抗原性を示した。一方、No.16、34および37の抗原タンパク質は、FDC381株またはSU63株のいずれか一方の抗原タンパク質が健常者血清または患者血清のいずれか一方に対して抗原性を示した。

したがって、No.16、34および37抗原タンパク質は、FDC381株とSU63株の感染を区別して把握し得ることが示唆された。

50

【 0 0 9 8 】

試験結果

菌株間の相同性を調べた結果、FDC381株における各タンパク質とデータベース上のタンパク質の相同性は以下の通りであり、菌株間で相同性が低いことが確認できた。

No.	W83株	ATCC33277株	TDC60株
15	387/387(100%)	202/398(51%)	213/402(53%)
16	553/553(100%)	242/566(43%)	243/566(43%)
34	1015/1016(99%)	737/1039(71%)	719/1022(70%)
37	500/500(100%)	249/511(49%)	249/511(49%)

【 0 0 9 9 】

シークエンス解析の結果、FDC381株由来とSU63株由来の各タンパク質の相同性は次のとおりであった。

No.15 : 99.7%

No.16 : 41.4%

No.34 : 65.2%

No.37 : 47.3%

【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 0 0 】

本発明の歯周病原菌血漿または血清抗体価検査キットは、大量の試料を自動で高速処理する歯周病原菌血漿または血清抗体価検査システムに好適に利用される。

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 1 0 1 】

配列番号：1は亜鉛カルボキシペプチダーゼ・ドメインを有する保存仮説タンパク質のアミノ酸配列である。

配列番号：2は亜鉛カルボキシペプチダーゼ・ドメインを有する保存仮説タンパク質をコードする塩基配列である。

配列番号：3は仮説タンパク質PG1881のアミノ酸配列である。

配列番号：4は仮説タンパク質PG1881をコードする塩基配列である。

配列番号：5は仮説タンパク質PGN_0291のアミノ酸配列である。

配列番号：6は仮説タンパク質PGN_0291をコードする塩基配列である。

配列番号：7は仮説タンパク質PG0491のアミノ酸配列である。

配列番号：8は仮説タンパク質PG0491をコードする塩基配列である。

配列番号：9は仮説タンパク質PGN_1611のアミノ酸配列である。

配列番号：10は仮説タンパク質PGN_1611をコードする塩基配列である。

配列番号：11は仮説タンパク質PGN_0477のアミノ酸配列である。

配列番号：12は仮説タンパク質PGN_0477をコードする塩基配列である。

配列番号：13は仮説タンパク質PGN_0860のアミノ酸配列である。

配列番号：14は仮説タンパク質PGN_0860をコードする塩基配列である。

配列番号：15は53kDa主要外側膜タンパク質のアミノ酸配列である。

配列番号：16は53kDa主要外側膜タンパク質をコードする塩基配列である。

配列番号：17は35kDaヘミン結合タンパク質のアミノ酸配列である。

配列番号：18は35kDaヘミン結合タンパク質をコードする塩基配列である。

配列番号：19はヘム結合タンパク質FetBのアミノ酸配列である。

配列番号：20はヘム結合タンパク質FetBをコードする塩基配列である。

配列番号：21はNAD依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列である。

配列番号：22はNAD依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする塩基配列である。

。

配列番号：23はホスホセリンアミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列である。

配列番号：24はホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードする塩基配列である。

配列番号：25はTonB結合受容体Tlrのアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

- 配列番号：26はTonB結合受容体Tlrをコードする塩基配列である。
- 配列番号：27はフィムブリリンのアミノ酸配列（FDC381株）である。
- 配列番号：28はフィムブリリンをコードする塩基配列である。
- 配列番号：29は微量成分FimEのアミノ酸配列（FDC381株）である。
- 配列番号：30は微量成分FimEをコードする塩基配列である。
- 配列番号：31はHmuY'のアミノ酸配列である。
- 配列番号：32はHmuY'をコードする塩基配列である。
- 配列番号：33はM24ファミリーペプチダーゼのアミノ酸配列である。
- 配列番号：34はM24ファミリーペプチダーゼをコードする塩基配列である。
- 配列番号：35はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1型のアミノ酸配列である。 10
- 配列番号：36はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1型をコードする塩基配列である。
- 配列番号：37はフェリチンのアミノ酸配列である。
- 配列番号：38はフェリチンをコードする塩基配列である。
- 配列番号：39はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列である。
- 配列番号：40はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードする塩基配列である。
- 配列番号：41は外側膜リポタンパク質Omp28のアミノ酸配列である。
- 配列番号：42は外側膜リポタンパク質Omp28をコードする塩基配列である。 20
- 配列番号：43は有望ナリシルエンドペプチダーゼ前駆体のアミノ酸配列である。
- 配列番号：44は有望ナリシルエンドペプチダーゼ前駆体をコードする塩基配列である。
- 配列番号：45はキノンファミリー-NAD(P)デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列である。
- 配列番号：46はキノンファミリー-NAD(P)デヒドロゲナーゼをコードする塩基配列である。
- 配列番号：47は飢餓細胞DpsからのDNA-結合タンパク質のアミノ酸配列である。
- 配列番号：48は飢餓細胞DpsからのDNA-結合タンパク質をコードする塩基配列である。
- 配列番号：49は免疫反応性42kDa抗原 PG33のアミノ酸配列である。
- 配列番号：50は免疫反応性42kDa抗原 PG33をコードする塩基配列である。
- 配列番号：51はLys - ギンギパインのアミノ酸配列である。 30
- 配列番号：52はLys - ギンギパインをコードする塩基配列である。
- 配列番号：53はペプチジルアルギニン・デイミナーゼのアミノ酸配列である。
- 配列番号：54はペプチジルアルギニン・デイミナーゼをコードする塩基配列である。
- 配列番号：55はragAタンパク質のアミノ酸配列（FDC381株）である。
- 配列番号：56はragAタンパク質をコードする塩基配列である。
- 配列番号：57はアルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのアミノ酸配列である。
- 配列番号：58はアルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードする塩基配列である。 40
- 配列番号：59は外側膜タンパク質41前駆体のアミノ酸配列である。
- 配列番号：60は外側膜タンパク質41前駆体をコードする塩基配列である。
- 配列番号：61はリポタンパク質RagBのアミノ酸配列（FDC381株）である。
- 配列番号：62はリポタンパク質RagBをコードする塩基配列である。
- 配列番号：63は突然変異導入Lys - ギンギパインのアミノ酸配列である。
- 配列番号：64は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードする塩基配列である。
- 配列番号：65は突然変異導入Lys - ギンギパインのアミノ酸配列である。
- 配列番号：66は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードする塩基配列である。
- 配列番号：67は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのアミノ酸配列である。
- 配列番号：68は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコー 50

ドする塩基配列である。

配列番号：69は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのアミノ酸配列である。

配列番号：70は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードする塩基配列である。

配列番号：71は亜鉛カルボキシペプチダーゼ・ドメインを有する保存仮説タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：72は亜鉛カルボキシペプチダーゼ・ドメインを有する保存仮説タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：73は仮説タンパク質PG1881をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。 10

配列番号：74は仮説タンパク質PG1881をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：75は仮説タンパク質PGN_0291をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：76は仮説タンパク質PGN_0291をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：77は仮説タンパク質PG0491をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：78は仮説タンパク質PG0491をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。 20

配列番号：79は仮説タンパク質PGN_1611をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：80は仮説タンパク質PGN_1611をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：81は仮説タンパク質PGN_0477をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：82は仮説タンパク質PGN_0477をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：83は仮説タンパク質PGN_0860をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。 30

配列番号：84は仮説タンパク質PGN_0860をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：85は53kDa主要外側膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：86は53kDa主要外側膜タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：87は35kDaヘミン結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：88は35kDaヘミン結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。 40

配列番号：89はヘム結合タンパク質FetBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：90はヘム結合タンパク質FetBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：91はNAD依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：92はNAD依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：93はホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチド 50

のPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：94はホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：95はTonB結合受容体TlrをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：96はTonB結合受容体TlrをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：97はフィルムブリリンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：98はフィルムブリリンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：99は微量成分FimEをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：100は微量成分FimEをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：101はHmuY'をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：102はHmuY'をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：103はM24ファミリーペプチダーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：104はM24ファミリーペプチダーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：105はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1型をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：106はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ 1型をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：107はフェリチンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：108はフェリチンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：109はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：110はセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：111は外側膜リポタンパク質Omp28をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：112は外側膜リポタンパク質Omp28をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：113は有望ナリシルエンドペプチダーゼ前駆体をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：114は有望ナリシルエンドペプチダーゼ前駆体をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：115はキノンファミリー-NAD(P)デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：116はキノンファミリー-NAD(P)デヒドロゲナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：117は飢餓細胞DpsからのDNA-結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：118は飢餓細胞DpsからのDNA-結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

のPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：119は免疫反応性42kDa抗原 PG33をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：120は免疫反応性42kDa抗原 PG33をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：121はLys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：122はLys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：123はペプチジルアルギニン・デイミナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：124はペプチジルアルギニン・デイミナーゼをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：125はragAタンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：126はragAタンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：127はアルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：128はアルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：129は外側膜タンパク質41前駆体をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：130は外側膜タンパク質41前駆体をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：131はリボタンパク質RagBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：132はリボタンパク質RagBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：133は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：134は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：135は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：136は突然変異導入Lys - ギンギパインをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：137は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：138は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：139は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：140は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：141は突然変異導入Lys - ギンギパインのN末端側の約半分のアミノ酸配列である。

配列番号：142は突然変異導入Lys - ギンギパインのN末端側の約半分をコードする塩基配列である。

配列番号：143は突然変異導入Lys - ギンギパインのC末端側の約半分のアミノ酸配列で

10

20

30

40

50

ある。

配列番号：144は突然変異導入Lys - ギンギパインのC末端側の約半分をコードする塩基配列である。

配列番号：145は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのN末端側の約半分のアミノ酸配列である。

配列番号：146は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのN末端側の約半分をコードする塩基配列である。

配列番号：147は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのC末端側の約半分のアミノ酸配列である。

配列番号：148は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのC末端側の約半分をコードする塩基配列である。

配列番号：149はフィムブリリンのアミノ酸配列（SU63株）である。

配列番号：150はフィムブリリンをコードする塩基配列（SU63株）である。

配列番号：151は微量成分FimEのアミノ酸配列（SU63株）である。

配列番号：152は微量成分FimEをコードする塩基配列（SU63株）である。

配列番号：153はragAタンパク質のアミノ酸配列（SU63株）である。

配列番号：154はragAをコードする塩基配列（SU63株）である。

配列番号：155はリポタンパク質RagBのアミノ酸配列（SU63株）である。

配列番号：156はリポタンパク質RagBをコードする塩基配列（SU63株）である。

配列番号：157は突然変異導入Lys - ギンギパインのN末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：158は突然変異導入Lys - ギンギパインのN末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：159は突然変異導入Lys - ギンギパインのC末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：160は突然変異導入Lys - ギンギパインのC末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：161は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのN末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：162は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのN末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：163は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのC末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：164は突然変異導入アルギニン - 特異的システインプロテイナーゼRgpAのC末端側の約半分をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：165はSU63株のフィムブリリンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：166はSU63株のフィムブリリンをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：167はSU63株の微量成分FimEをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：168はSU63株の微量成分FimEをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

配列番号：169はSU63株のragAタンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：170はSU63株のragAタンパク質をコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用

10

20

30

40

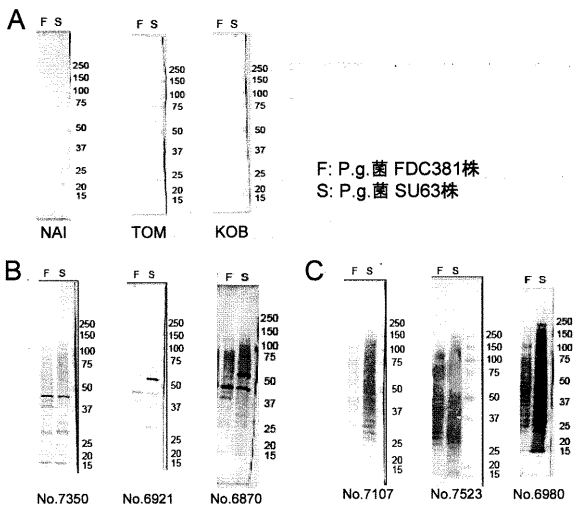
50

いたリバースプライマーである。

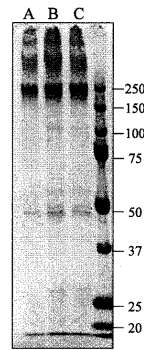
配列番号：171はSU63株のリポタンパク質RagBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたフォワードプライマーである。

配列番号：172はSU63株のリポタンパク質RagBをコードするポリヌクレオチドのPCR増幅に用いたリバースプライマーである。

【図1】



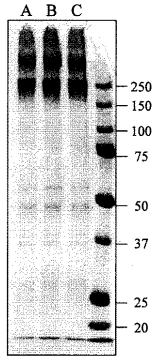
【図2】



(FDC381)

レーンA: 健常者血清より精製した抗原
 レーンB: 患者血清1より精製した抗原
 レーンC: 患者血清2より精製した抗原

【 図 4 】



(SU63)

レーンA: 健常者血清より精製した抗原
 レーンB: 患者血清1より精製した抗原
 レーンC: 患者血清2より精製した抗原

【 図 7 】

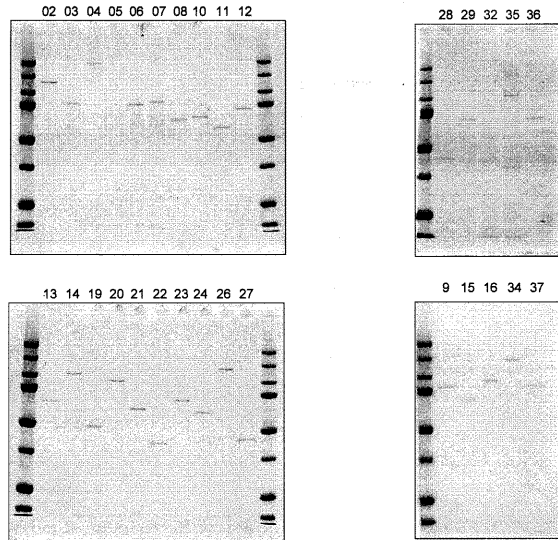
No.	Identified proteins	Accession	MW	SU63株			FDCR1株			1次感染患者の血清陽性率	2次感染患者の血清陽性率
				A	B	C	A	B	C		
1	putative lipoprotein [Porphyromonas gingivalis] 345400	340,240 kDa	2	10	10	0	0	0	0	0	○
2	conserved hypothetical protein [Porphyromonas gingivalis] 188994	92 kDa	2	21	13	0	0	2	4	0	○
3	hypothetical protein PG1881 [Porphyromonas gingivalis] 345414	153 kDa	0	6	3	0	0	2	4	0	○
4	hypothetical protein KGN_0291 [Porphyromonas gingivalis] 188994	134 kDa	0	6	6	0	0	0	0	0	○
5	hypothetical protein KGN_0291 [Porphyromonas gingivalis] 188994	134 kDa	0	6	6	0	0	0	0	0	○
6	hypothetical protein KGN_1611 [Porphyromonas gingivalis] 188994	83 kDa	0	2	5	0	0	0	0	0	○
7	hypothetical protein KGN_0471 [Porphyromonas gingivalis] 188994	61 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	○
8	hypothetical protein KGN_0860 [Porphyromonas gingivalis] 188994	49 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	○
膜タンパク質・抗原性未知											
9	Stx2a major outer membrane protein [Escherichia coli] 55232	54 kDa	0	29	13	2	12	8	0	0	○
10	Stx2b major outer membrane protein [Escherichia coli] 55233	54 kDa	0	29	13	2	12	8	0	0	○
11	hemagglutinin [Porphyromonas gingivalis] 188994	183 kDa	0	6	2	0	5	2	0	0	○
12	NAD-dependent glutamate dehydrogenase [Porphyromonas gingivalis] 150842	49 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	○
13	phosphoserine aminotransferase [Porphyromonas gingivalis] 345405	40 kDa	0	2	2	3	4	11	0	0	○
14	Tandemly repeated receptor [Porphyromonas gingivalis] 188994	79 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	○
15	transferrin [Porphyromonas gingivalis] 345417	41 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	○
16	transferrin [Porphyromonas gingivalis] 345417	41 kDa	0	4	0	0	0	0	0	0	○
17	hemagglutinin protein [Porphyromonas gingivalis] 188994	183 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	○
18	protease precursor [Porphyromonas gingivalis] 181399	86 kDa	0	0	0	6	15	29	0	0	○
19	Hmfl [Porphyromonas gingivalis] 119392	24 kDa	0	2	0	0	4	4	0	0	○
20	N24 family peptidase [Porphyromonas gingivalis] 345409	77 kDa	0	0	0	0	3	3	0	0	○
21	serine protease [Porphyromonas gingivalis] 345409	77 kDa	0	0	0	0	3	3	0	0	○
22	ferritin [Porphyromonas gingivalis] 345409	81 kDa	0	0	0	2	2	0	0	0	○
23	serine hydroxymethyltransferase [Porphyromonas gingivalis] 345409	77 kDa	0	0	0	2	0	4	0	0	○
24	outer membrane lipoprotein [Porphyromonas gingivalis] 345417	32 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	○
25	periplasmic lipoprotein [Porphyromonas gingivalis] 188994	88 kDa	0	0	0	0	0	22	0	0	○
26	probable lysyl endopeptidase [Porphyromonas gingivalis] 188994	105 kDa	0	0	0	0	0	3	0	0	○
27	outer membrane lipoprotein [Porphyromonas gingivalis] 345409	32 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	○
28	DNA-binding protein from strain [Porphyromonas gingivalis] 188994	18 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	○
膜タンパク質・抗原性未知											
29	immunoreactive 4.2 kDa antigen [Porphyromonas gingivalis] 345404	4.2 kDa	0	3	2	0	0	0	0	0	○
膜タンパク質・抗原性未知											
30	RagA2 [Porphyromonas gingivalis] 161652	116 kDa	23	27	30	3	4	7	0	0	○
31	RagB2 [Porphyromonas gingivalis] 161653	116 kDa	23	27	30	3	4	7	0	0	○
32	lysine phosphatase [Porphyromonas gingivalis] 111435	187 kDa	0	14	12	0	0	0	0	0	○
33	lysine phosphatase [Porphyromonas gingivalis] 111435	187 kDa	0	14	12	0	0	0	0	0	○
34	peptidylarginine deiminase [Porphyromonas gingivalis] 345411	62 kDa	2	9	10	0	0	0	0	0	○
35	arg1 protein [Porphyromonas gingivalis] 345404	112 kDa	0	4	6	6	12	15	0	0	○
36	arginine-specific cysteine protease [Porphyromonas gingivalis] 188994	185 kDa	25	37	34	0	0	0	0	0	○
37	outer membrane protein-11 [Porphyromonas gingivalis] 188994	53 kDa	0	2	2	0	0	0	0	0	○
38	lipoprotein Lqg [Porphyromonas gingivalis] 345404	18 kDa	0	2	2	0	0	0	0	0	○

【 図 9 】

抗原No.	健常者血清プール	患者血清プール1	患者血清プール2
2	258581	10299784	4544221
3	0	7938453	3591925
4	0	533560	1030417
6	2586477	8030066	8508309
7	0	0	0
8	0	0	0
9	noise	12972685	0
10	7803423	12163942	13135284
11	0	11823066	4149132
12	0	0	noise
13	0	133558	noise
14	0	0	noise
15	0	0	noise
16	0	0	0
19	0	3750092	noise
20	noise	noise	noise
21	0	331257	noise
22	0	416198	noise
23	0	noise	noise
24	0	3308269	6252161
26	431110	2392354	1561578
27	0	0	0
28	noise	noise	noise
29	120564	0	noise
32	2539358	20813860	21344255
34	0	57190	noise
35	3778184	16754505	15833022
36	noise	noise	noise
37	noise	noise	noise
ブランク1	6471	40767	231273
ブランク2	214	2544	568794
ブランク3	118823	56711	803725

注)ブランク3以下のシグナル値を持つものはノイズとして処理した。

【 図 10 】



【 図 1 1 】

抗原タンパク質No.	健常者血清			
	TOM	NAI	KOB	健常者基準
2	1598447	n.d.	2085186	2085186
3	n.d.	n.d.	n.d.	0
4	n.d.	n.d.	n.d.	0
6	5738276	6763839	7678131	7678131
9	n.d.	n.d.	n.d.	0
10	4314709	n.d.	10899925	10899925
11	n.d.	n.d.	n.d.	0
13	n.d.	n.d.	n.d.	0
19	n.d.	n.d.	n.d.	0
21	n.d.	n.d.	n.d.	0
22	n.d.	n.d.	n.d.	0
24	n.d.	n.d.	n.d.	0
26	867630	n.d.	70695	867630
28	n.d.	n.d.	n.d.	0
32	2060812	n.d.	2503064	2503064
35	1207265	2214521	4781758	4781758

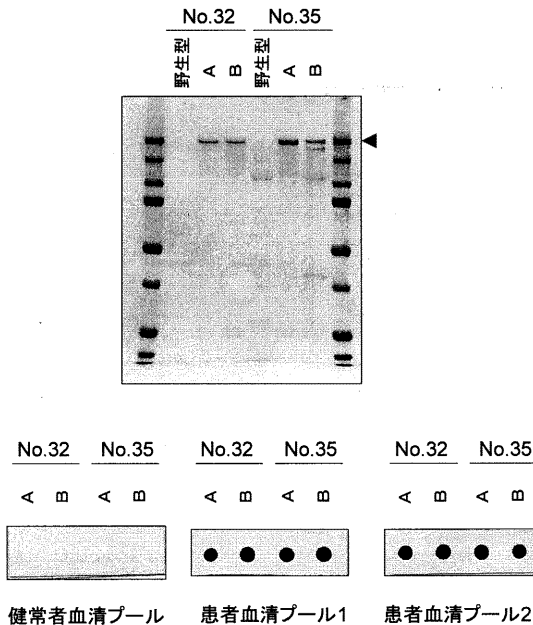
【 図 1 2 】

抗原タンパク質No.	患者血清																						
	6809	6816	6823	6895	6918	6921	6923	6926	6975	6975	7107	7125	7125	7150	7150	7457	7462	7495	7500	7523	7524	7835	
2	5803638	34056	1831604	11420150	8725062	21783541	4619359	1122471	7837207	3844670	6365756	1327426	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	4213786	1052786	4273715	1786686	2667842	1717463	n.d.	4076342	n.d.	3063362	758382	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	982289	n.d.	3339197	5638192	9315389	13663288	2638447	n.d.	445621	1466594	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	2181181	530806	n.d.	n.d.	8130689	19108792	2478879	18838709	n.d.	1660360	5766628	12045846	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	3071824	1688842	514974	4587276	9466623	12686974	8658062	35389280	7551568	4304723	1189988	10191477	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
26	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	10060844	31073871	1567585	24806162	27580035	37893886	21951328	134893585	24471576	33808621	18913419	18458270	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	16400320	30769150	22164743	126889140	132034025	38202968	28517158	25858515	27895794	34695924	24907585	19496370	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

【 図 1 3 】

患者	抗原タンパク質No.															
	2	3	4	6	9	10	11	13	19	21	22	24	26	28	32	35
6809	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6816	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6823	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6896	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6918	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6921	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6923	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6926	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6975	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6980	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6991	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7056	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7107	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7125	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7350	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7395	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7457	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7492	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7495	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7500	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7523	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7524	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7835	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

【 図 1 4 】



【 図 1 6 】

血清No.	抗原No.																		
	2	3	4	6	9	10	11	13	19	21	22	24	26	28	32A	35A			
健康者血清サンプル	5854199	0	0	1381433	0	4515719	0	0	117043	0	0	0	158493	0	8397932	1796072			
H1	7203723	0	0	744716	0	2644644	0	0	0	0	0	0	872139	0	8161840	849813			
H2	2389618	0	0	478198	0	417398	0	0	0	0	0	0	356337	0	1347265	224723			
H3	317790	0	0	1288768	0	3817394	0	0	0	0	0	0	0	0	1478959	2293959			
H4	805872	0	0	99837	0	1643154	0	0	0	0	0	0	0	0	4601450	5098186			
H5	185496	0	0	1906100	0	159831	0	0	0	0	0	0	0	0	1919412	1734553			
H6	317790	0	0	334140	0	159831	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
H7	185496	0	0	50527	0	159831	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
H8	185496	0	0	1444505	0	159831	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
H9	2391316	0	0	174279	0	324225	0	0	152933	0	0	0	0	0	0	0			
H10	522990	0	0	12984	0	1394672	102	0	910916	3012	0	0	0	0	0	0			
P1	292173	46373	0	68562	0	68562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P2	350373	421092	0	41854	0	41854	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P3	0	0	0	1655204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P7	632427	0	0	760653	116173	0	0	0	54753	0	0	0	0	0	0	0			
P8	3047617	0	0	572708	8301958	389154	0	0	418574	727651	0	0	0	0	0	0			
P9	4149339	0	0	5501148	9796030	609493	7015622	0	0	825206	0	0	0	0	0	0			
P10	486739	232940	0	394774	0	270586	0	0	1932	0	0	0	0	0	0	0			
P11	364246	0	0	685834	0	291947	89175	0	0	27868	0	0	0	0	0	0			
P12	364246	0	0	417811	0	244029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P13	284425	251426	4712	515860	0	2763931	340263	0	0	1339425	1122399	0	0	0	0	0			
P14	3833136	0	0	1776591	0	9544403	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P15	1417	0	0	227029	0	230700	39426	0	0	284636	356898	0	0	0	0	0			
P16	337451	0	0	301375	1123419	0	682401	680068	0	0	0	0	0	0	0	0			
P17	1045628	224392	0	10971464	0	20992788	832291	0	0	473064	1235810	0	0	0	0	0			
P18	9824454	1263374	241915	8109638	1199007	2959557	1912661	0	0	346732	374668	0	0	0	0	0			
P19	7159271	0	0	803503	53955	8134039	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
P20	4419581	0	0	1481318	0	2330398	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
患者血清サンプル																			

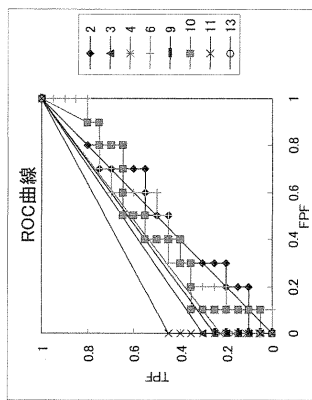
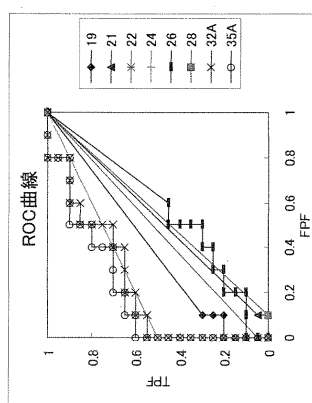
【 図 1 7 】

血清No.	抗原No.																		
	2	3	4	6	9	10	11	13	19	21	22	24	26	28	32A	35A			
健康者血清サンプル	H1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	H10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P6	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P7	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P8	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P9	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P11	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P12	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P13	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P14	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P15	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P16	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P17	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P18	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P19	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
	P20	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
患者血清サンプル																			

【 図 1 8 】

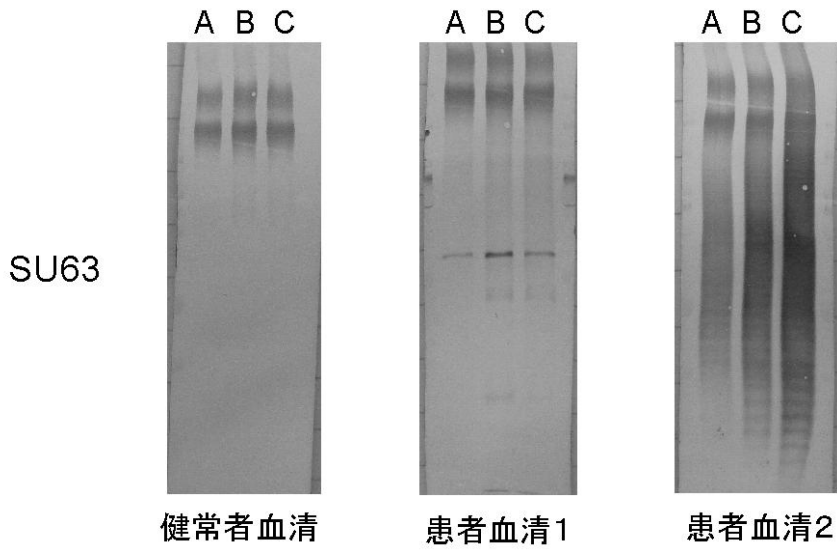
抗原No.	シグナル平均値		Signal/Noise比
	健康者G (Noise)	患者G (Signal)	
2	2922163	3345752	1.14
3	0	147099	Noise:0
4	0	37664	Noise:0
6	2377035	2254253	0.95
9	0	1053325	Noise:0
10	3936021	4424951	1.12
11	0	562020	Noise:0
13	0	0	Noise:0
19	15529	1664125	107.16
21	11704	1507	0.13
22	0	6612	Noise:0
24	0	242985	Noise:0
26	343240	276752	0.81
28	6738	0	0.00
32A	3422092	8959774	2.62
35A	4634482	12671575	2.73

【 図 1 9 】



抗原No.	AUC	2	3	4	6	9	10	11	13
		0.490	0.650	0.611	0.495	0.625	0.530	0.725	0.500
抗原No.	AUC	19	21	22	24	26	28	32A	35A
		0.605	0.473	0.525	0.750	0.430	0.450	0.780	0.815

【図5】



レーンA: 健常者血清より精製した抗原
レーンB: 患者血清1より精製した抗原
レーンC: 患者血清2より精製した抗原

【 6 】

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (28)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	RelyOn Nezee-Re...		
							40513A RAW (F043599)	40514A RAW (F043600)	40515A RAW (F043598)
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	glutamate dehydrogenase [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889958...	gi 1889958...	185 kDa	★	25	37	34
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	arginine-specific cysteine prot... gi 1889958...	gi 1889958...	185 kDa	★	23	27	30
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	protease precursor [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889958...	gi 1889958...	116 kDa	★	23	27	30
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ragA protein [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454004...	gi 3454004...	54 kDa	★	28	13	13
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	53kDa fimbriin [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454004...	gi 3454004...	240 kDa	★	5	14	12
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	putative lipoprotein [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454004...	gi 3454004...	56 kDa	★	2	10	10
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RagB2 [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889941...	gi 1889941...	92 kDa	★	2	9	10
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein ... gi 1889941...	gi 1889941...	62 kDa	★	7	5	5
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	peptidylarginine deiminase [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454110...	gi 3454110...	23 kDa	★	7	5	5
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Lys-zingipain [Porphyromonas gingivalis]... gi 1521491...	gi 1521491...	38 kDa	★	7	5	5
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RagA2 [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	112 kDa	★	4	6	6
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A, Crystal Structure Of ... gi 1521491...	gi 1521491...	53 kDa	★	3	3	2
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ragA protein [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454004...	gi 3454004...	53 kDa	★	6	2	2
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein PG1881 [Porphyromonas gingivalis]... gi 34541489...	gi 34541489...	33 kDa	★	3	2	2
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain D, Crystal Structure Of ... gi 1521491...	gi 1521491...	49 kDa	★	4	4	4
16	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HmuY [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889954...	gi 1889954...	187 kDa	★	13	13	13
17	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	M24 family peptidase [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540922...	gi 34540922...	62 kDa	★	2	2	2
18	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	serine hydroxymethyltransferase [Porphyromonas gingivalis]... gi 34539916...	gi 34539916...	32 kDa	★	2	2	2
19	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein ... gi 1889941...	gi 1889941...	92 kDa	★	2	2	2
20	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	outer membrane lipoprotein Om... gi 34541744...	gi 34541744...	62 kDa	★	2	2	2
21	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	peptidylarginine deiminase [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454110...	gi 3454110...	24 kDa	★	1	1	1
22	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain H, 1.9a Structure Of The... gi 5542161...	gi 5542161...	12 kDa	★	2	1	1
23	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain O, Crystal Structure Of ... gi 1012065...	gi 1012065...	188 kDa	★	2	2	2
24	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	porphyain ... gi 1314326...	gi 1314326...	79 kDa	★	2	2	2
25	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TonB-linked receptor Tlr [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	19 kDa	★	2	1	1
26	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ferritin [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540987...	gi 34540987...	240 kDa	★	1	2	2
27	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	putative lipoprotein [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540040...	gi 34540040...	56 kDa	★	1	2	2
28	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RagB2 [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889952...	gi 1889952...	103 kDa	★	1	2	2

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (28)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	RelyON 072... Rely...		
							39888A RAW (F040069)	39889A RAW (F040070)	39789A RAW (F040968)
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	glutamate dehydrogenase [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540940...	gi 34540940...	49 kDa	★	11	16	26
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	protease precursor [Porphyromonas gingivalis]... gi 1813996...	gi 1813996...	186 kDa	★	6	15	29
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ragA protein [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454004...	gi 3454004...	112 kDa	★	6	12	15
4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	53kDa major outer membrane p... gi 5832527...	gi 5832527...	54 kDa	★	2	12	8
5	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	phosphoserine aminotransferas... gi 34540980...	gi 34540980...	40 kDa	★	3	4	11
6	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	heme-binding protein FetB [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	33 kDa	★	5	9	9
7	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Lys-zingipain ... gi 1314751...	gi 1314751...	187 kDa	★	4	8	23
8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RagA2 [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	116 kDa	★	3	4	7
9	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A, Crystal Structure Of ... gi 1521491...	gi 1521491...	23 kDa	★	2	4	5
10	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	glyceraldehyde 3-phosphate de... gi 34541701...	gi 34541701...	36 kDa	★	2	2	5
11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	HmuY [Porphyromonas gingivalis]... gi 1193922...	gi 1193922...	24 kDa	★	4	4	4
12	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	M24 family peptidase [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540922...	gi 34540922...	67 kDa	★	1	3	3
13	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	serine hydroxymethyltransferase [Porphyromonas gingivalis]... gi 34539916...	gi 34539916...	47 kDa	★	2	1	4
14	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	conserved hypothetical protein ... gi 1889941...	gi 1889941...	92 kDa	★	2	2	4
15	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	outer membrane lipoprotein Om... gi 34541744...	gi 34541744...	32 kDa	★	2	2	4
16	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	peptidylarginine deiminase [Porphyromonas gingivalis]... gi 3454110...	gi 3454110...	62 kDa	★	1	1	4
17	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain H, 1.9a Structure Of The... gi 5542161...	gi 5542161...	24 kDa	★	1	1	2
18	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Chain O, Crystal Structure Of ... gi 1012065...	gi 1012065...	12 kDa	★	2	1	1
19	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	porphyain ... gi 1314326...	gi 1314326...	188 kDa	★	2	1	22
20	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	TonB-linked receptor Tlr [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	79 kDa	★	2	1	4
21	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	ferritin [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540987...	gi 34540987...	19 kDa	★	2	1	1
22	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	putative lipoprotein [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540040...	gi 34540040...	240 kDa	★	1	2	2
23	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	RagB2 [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889952...	gi 1889952...	56 kDa	★	1	2	2
24	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	probable lysyl endopeptidase pr... gi 1889952...	gi 1889952...	103 kDa	★	1	2	3
25	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	quinone family NAD(P)H dehydr... gi 34541436...	gi 34541436...	20 kDa	★	2	2	2
26	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	35 kDa heme binding protein [Porphyromonas gingivalis]... gi 1889945...	gi 1889945...	38 kDa	★	2	2	2
27	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	DNA-binding protein from star... gi 1889959...	gi 1889959...	18 kDa	★	2	2	2
28	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	lipoprotein RagB [Porphyromonas gingivalis]... gi 34540043...	gi 34540043...	56 kDa	★	2	2	2

SU63株

FDC381株

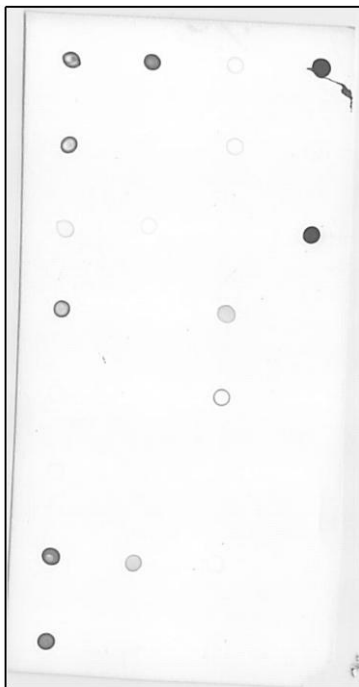
【 図 8 】

レイアウト

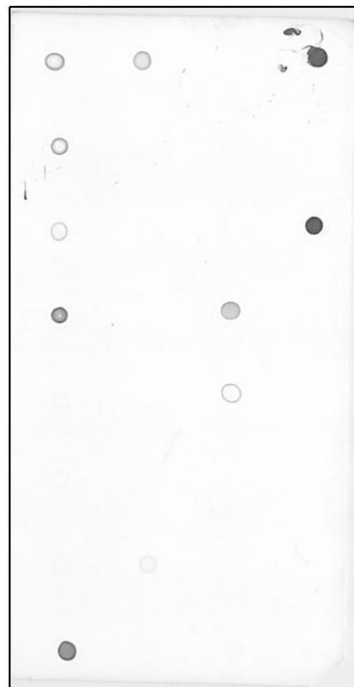
	A	B	C	D
1	2	11	21	32
2	3	12	22	34
3	4	13	23	35
4	6	14	24	36
5	7	15	26	37
6	8	16	27	
7	9	19	28	
8	10	20	29	



健常者血清プール

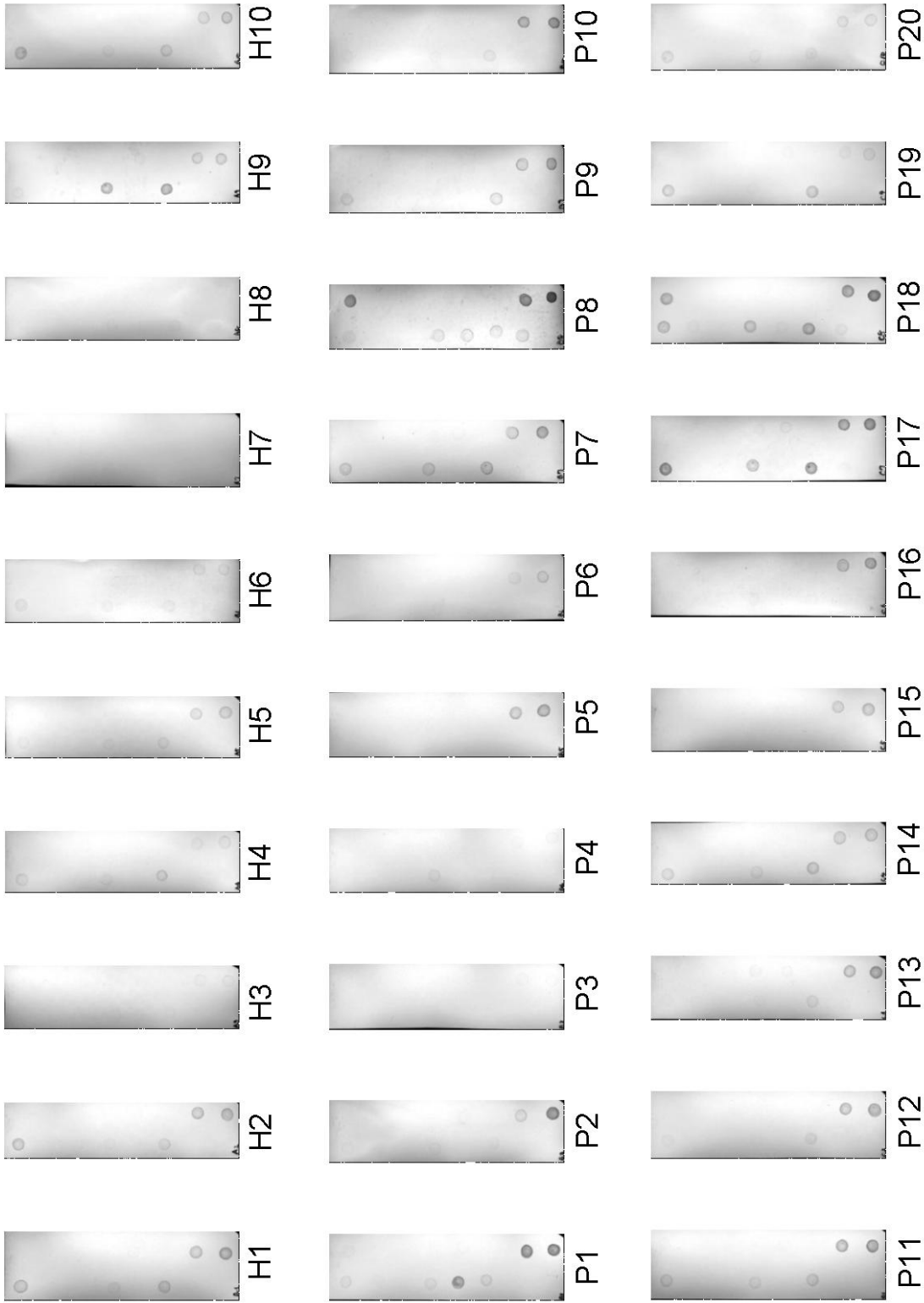


患者血清プール1



患者血清プール2

【 図 15 】

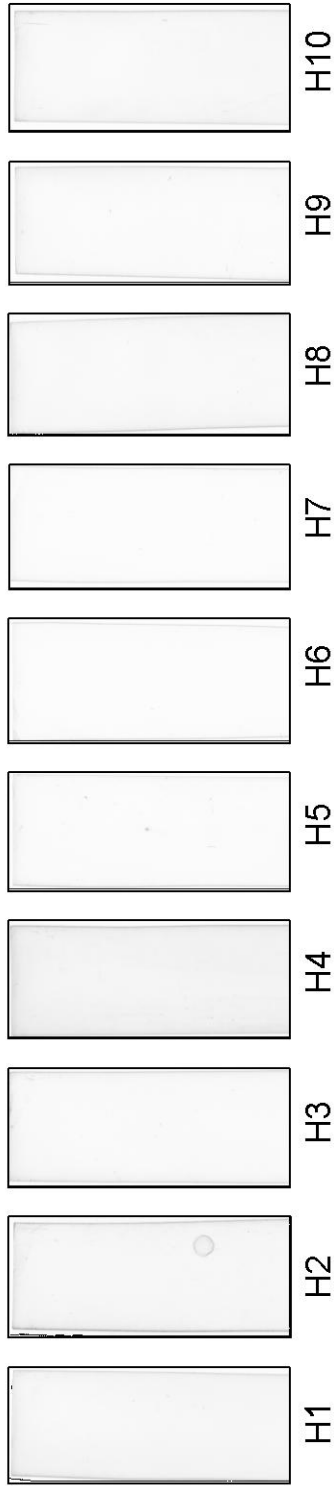


2	19
3	21
4	22
6	24
9	26
10	28
11	32A
13	35A

レイアウト図

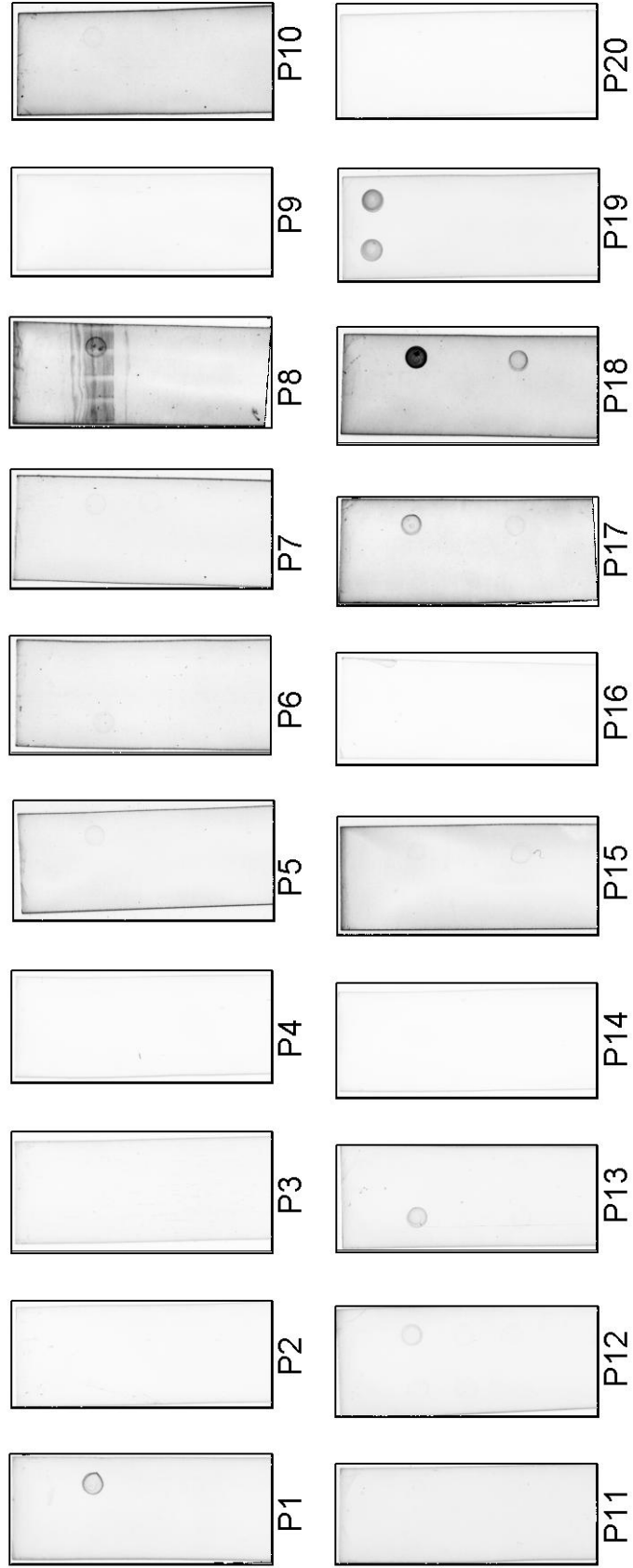
【 図 2 0 】

健常者血清グループ



15F	15S
16F	16S
34F	34S
37F	37S
BL	BL

菌周病患者血清グループ



【 配列表 】

201208130600001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/073942
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/569(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/569, C07K14/195, C12N15/09, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2-135096 A (Nihon University), 23 May 1990 (23.05.1990), (Family: none)	1-4
Y	Masahiko TANI et al., "Studies on Antigenic Proteins of Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans by Western Blotting Assay Using Purified IgGs from Patients with Periodontitis", Journal of the Japanese Society of Periodontology, 1992, vol.34, no.1, pages 194 to 203	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 December, 2011 (28.12.11)		Date of mailing of the international search report 17 January, 2012 (17.01.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073942

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-526035 A (CSL Ltd.), 18 December 2001 (18.12.2001), & JP 2009-136300 A & US 6444799 B1 & EP 1037999 A & WO 1999/029870 A1 & AU PP083997 D & ZA 9811333 A & CA 2313823 A & NZ 504811 A & AU PP083997 D0	1-4
A	WO 2005/019249 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA), 03 March 2005 (03.03.2005), & JP 2007-529195 A & US 2006/0078950 A1 & US 2008/0299591 A1 & EP 1660524 A & DE 602004031024 D & CA 2535799 A & AU 2004266213 A & AT 495189 T & DK 1660524 T	1-4
A	JP 2009-544279 A (Oral Health Australia Pty Ltd.), 17 December 2009 (17.12.2009), PG0350 & US 2010/0092471 A1 & EP 2038297 A & WO 2008/000028 A1 & CA 2652957 A	1-4
A	JP 2000-083676 A (Japan Science and Technology Corp.), 28 March 2000 (28.03.2000), sequence 1 (Family: none)	1-4
A	JP 2003-192616 A (Nihon University), 09 July 2003 (09.07.2003), sequence 1 & WO 2003/055529 A1 & AU 2002367108 A	1-4
A	Mikio NOZUE et al., "Kecchu IgG Kotaika Sokutei ni Mochiiru Porphyromonas gingivalis Kogen Tanpakushitsu no Senbatsu to Gosei", The Japanese Society of Periodontology Gakujutsu Taikai Program Oyobi Koen Shorokushu, 08 April 2011 (08.04.2011), vol.54th Shunki, page 103	1-4
A	Aya HISAEDA et al., "Supportive Periodontal Therapy-ki no Shishubyo Saihatsu no Yochi ni Okeru Kessei IgG Kotaika no Yuyosei", The Japanese Society of Periodontology Gakujutsu Taikai Program Oyobi Koen Shorokushu, 30 April 2007 (30.04.2007), vol.50th Shunki, page 104	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073942

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yoshihiko SOGA et al., "A Study on the Relationships between the Severity of Periodontitis and Serum IgG Antibody Titer against Porphyromonas gingivalis among Patients with Hematologic Malignancies", Nihon Shika Hozongaku Zasshi, 31 December 2006 (31.12.2006), vol.49, no.6, pages 731 to 738	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073942

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See extra sheet</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/073942

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention of claim 1 and the inventions of claim 5, claim 7, claim 9, claim 11, claim 13, claim 15, claim 19, claim 21, claim 23, claim 25 and claim 27 do not have a same or corresponding special technical feature. Consequently, the claims of this international application contain the following 12 (groups of) inventions.

(Invention group 1) the inventions of claims 1-4
Kit for antibody titer test, which contains a series of polypeptides that comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 3, 9, 15, 19, 31, 41, 43, 63, 65 and 67.

(Invention group 2) the inventions of claims 5 and 6
A modified polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 63.

(Invention group 3) the inventions of claims 7 and 8
A modified polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 65.

(Invention group 4) the inventions of claims 9 and 10
A modified polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 67.

(Invention group 5) the inventions of claims 11 and 12
A modified polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 141.

(Invention group 6) the inventions of claims 13 and 14
A modified polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 145.

(Invention group 7) the inventions of claims 15-18
A kit for antibody titer test and a method for measuring antibody titer, each of which contains a polypeptide that comprises one or more amino acid sequences selected from the group consisting of the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 3, ..., 153 and 155.

(Invention group 8) the inventions of claims 19 and 20
A method for determining the presence of an antibody, which is characterized in that a periodontal pathogen antigen polypeptide brings a polypeptide which comprises one or more amino acid sequences selected from the group consisting of the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 3, 5, 15, 19, 31, 41, 141 and 145 into contact with a sample.

(Invention group 9) the inventions of claims 21 and 22
A typing kit for Porphyromonas gingivalis strain, which contains a polypeptide that comprises one or more amino acid sequences selected from the group consisting of the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 151, 153 and 155.

(Invention group 10) the inventions of claims 23 and 24
A polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 151.

(Invention group 11) the inventions of claims 25 and 26
A polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 153.

(Invention group 12) the inventions of claims 27 and 28
A polypeptide which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 155.

While, the invention of claim 1 is characterized by "containing a series of polypeptides that comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 1, 3, 9, 15, 19, 31, 41, 43, 63, 65 and 67", the inventions of claims 2-12 do not contain all of the series of polypeptides that comprise the amino acid sequences.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/073942									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/569(2006.01)i, C07K14/195(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/569, C07K14/195, C12N15/09, G01N33/53											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	JP 2-135096 A (学校法人日本大学) 1990.05.23, (ファミリーなし)	1-4									
Y	谷真彦 他, 歯周病原性細菌の抗原性タンパク質に関する研究 Porphyromonas gingivalis および Actinobacillus actinomycetemcomitans の菌体ならびに培養上清と歯周炎患者 IgG との反応について, 日本歯周病学会会誌, 1992, Vol.34 No.1, Page.194-203	1-4									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。									
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 28.12.2011		国際調査報告の発送日 17.01.2012									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 白形 由美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2J 3496								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/073942
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2001-526035 A (シーエスエル、リミテッド) 2001.12.18, & JP 2009-136300 A & US 6444799 B1 & EP 1037999 A & WO 1999/029870 A1 & AU PP083997 D & ZA 9811333 A & CA 2313823 A & NZ 504811 A & AU PP083997 D0	1-4
A	WO 2005/019249 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA) 2005.03.03, & JP 2007-529195 A & US 2006/0078950 A1 & US 2008/0299591 A1 & EP 1660524 A & DE 602004031024 D & CA 2535799 A & AU 2004266213 A & AT 495189 T & DK 1660524 T	1-4
A	JP 2009-544279 A (オーラル ヘルス オーストラリア ビーティ ーワイ リミテッド) 2009.12.17, P G O 3 5 0 & US 2010/0092471 A1 & EP 2038297 A & WO 2008/000028 A1 & CA 2652957 A	1-4
A	JP 2000-083676 A (科学技術振興事業団) 2000.03.28, 配列1 (フ ファミリーなし)	1-4
A	JP 2003-192616 A (学校法人日本大学) 2003.07.09, 配列1 & WO 2003/055529 A1 & AU 2002367108 A	1-4
A	野添幹雄 他, 血中 IgG 抗体価測定に用いる Porphyromonas gingivalis 抗原タンパク質の選抜と合成, 日本歯周病学会学術大会 プログラムおよび講演抄録集, 2011.04.08, Vol.54th 春季, Page.103	1-4
A	久枝綾 他, Supportive Periodontal Therapy 期の歯周病再発の予 知における血清 IgG 抗体価の有用性, 日本歯周病学会学術大会プロ グラムおよび講演抄録集, 2007.04.30, Vol.50th 春季, Page.104	1-4
A	曾我賢彦 他, 造血器腫瘍を中心とした血液疾患患者における歯周 病の重症度と Porphyromonas gingivalis に対する血清 IgG 抗体価と の関連性に関する研究, 日本歯科保存学雑誌, 2006.12.31, Vol.49 No.6, Page.731-738	1-4

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 7 3 9 4 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

請求項 1 - 4

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2011/073942

請求項1に係る発明、請求項5、請求項7、請求項9、請求項11、請求項13、請求項15、請求項19、請求項21、請求項23、請求項25、請求項27に係る発明は、それぞれ同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しない。そして、請求の範囲には以下に示す12の発明(群)が含まれる。

(発明1) 請求項1-4に係る発明

配列番号: 1、3、9、15、19、31、41、43、63、65 および 67 のアミノ酸配列を有する一連のポリペプチドを含む抗体価検査キット。

(発明2) 請求項5-6に係る発明

配列番号: 63 のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

(発明3) 請求項7-8に係る発明

配列番号: 65 のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

(発明4) 請求項9-10に係る発明

配列番号: 67 のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

(発明5) 請求項11-12に係る発明

配列番号: 141 のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

(発明6) 請求項13-14に係る発明

配列番号: 145 のアミノ酸配列を有する改変ポリペプチド。

(発明7) 請求項15-18に係る発明

配列番号: 1、3、・・・153 および 155 よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む抗体価検査キット及び測定方法。

(発明8) 請求項19-20に係る発明

菌周病原菌抗原ポリペプチドが配列番号: 3、5、15、19、31、41、141 および 145 よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドと試料を接触させることを特徴とする抗体の存在を測定する方法。

(発明9) 請求項21-22に係る発明

配列番号: 151、153 および 155 よりなる群から選択される一種または二種以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むボルフィロモナス・ジンジパリス菌株のタイピングキット。

(発明10) 請求項23-24に係る発明

配列番号: 151 のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(発明11) 請求項25-26に係る発明

配列番号: 153 のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(発明12) 請求項27-28に係る発明

配列番号: 155 のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

請求項1に係る発明が、「配列番号: 1、3、9、15、19、31、41、43、63、65 および 67 のアミノ酸配列を有する一連のポリペプチドを含む」ことに特徴があるのに対し、発明2-12は当該アミノ酸配列を有する一連のポリペプチドをすべて含有するものではない。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T
J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R
O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H
U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI
, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ06 QR48 QS33 QX01
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA86 EA50 FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	牙周病细菌血浆或血清抗体滴度检测试剂盒		
公开(公告)号	JPWO2012081306A1	公开(公告)日	2014-05-22
申请号	JP2012548692	申请日	2011-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	太阳星光齿磨公司		
申请(专利权)人(译)	日星有限公司		
[标]发明人	野添幹雄		
发明人	野添 幹雄		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07K14/195 C12Q1/04 C12N15/09		
CPC分类号	C07K14/195 G01N33/54366 G01N33/56911 G01N33/56955 G01N33/68 G01N33/6854 G01N2333/195 G01N2469/20 G01N2800/18 Y10S435/81 G01N33/6893		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.F G01N33/53.D G01N33/53.N C07K14/195 C12Q1/04 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA04 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛		
优先权	2010279268 2010-12-15 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供：血液样品中的针对牙周疾病致病菌的抗体效价或抗体的测试试剂盒，其能够对免疫范围广且免疫力高的患者进行牙周疾病的测试。精度高，可以通过自动化设备进行高速处理；可以适当地用于试剂盒中的牙周病致病细菌抗原蛋白；使用试剂盒测试血液样品中抗体滴度或抗体是否存在的方法；以及用于打字牙龈卟啉单胞菌菌株的试剂盒。本发明公开了一种测试试剂盒，其包含分别具有由SEQ ID NO：1、3、9、15、19、31、41、43、63、65和67表示的酸序列的一组多肽；具有氨基酸序列SEQ ID NO：67所示的修饰多肽；以及在与人体分离的血样中确定针对引起牙周病的细菌的抗体滴度或抗体的存在的方法，其包括使血样与上述多肽组接触。

患者血清No	血型抗体価		共通抗原			SUH3特異抗原	
	FD3381	SUH3	46kDa	26-37kDa	100-110kDa	57kDa	150-250kDa
7050	3.26	0.1	○				
7457	6.18	0.6	○	○	○		○
6991	4.43	0.8	○			○	
7496	3.76	0.99	○		○		○
6826	3.35	0.6	○	○	○	○	
6816	3.26	0.76	○				○
7135	1.86	0.09	○	○	○		○
7500	1.87	0.93		○	○		○
7107	1.8	0.96		○	○		○
7835	1.64	0.19	○				○
7350	1.45	13.18	○				
7523	15.11	9.08		○	○		○
7524	44.6	7.35	○	○	○	○	○
6911	7.55	5.07			○		○
6896	4.36	4.37		○	○		○
6923	3.69	4.11	○		○		○
7592	3.2	4.07	○				○
6926	2.65	3.01	○				○
7495	11.38	2.61			○		○
6817	0.11	1.22					○
6820	0.69	2.01	○				○
6826	0.55	1.97	○				○
6855	0.56	1.03	○				○
6863	-0.32	2.2	○				○
6867	0.23	1.46	○				○
6874	0.03	2.33	○				○
6881	0.66	1.4	○	○	○		
6886	0.28	2.23	○	○	○		
6904	0.86	1.51	○				
6932	0.63	1.31	○				○
6936	0.96	1.92	○				
7082	1.33	2.7	○	○	○		
6918	33.42	6.71	○				
6970	13.52	5.95	○				○
6980	13.32	4.52	○	○	○		○
6972	9.19	4.96	○	○	○		○
7001	3.77	3.32	○	○	○		○
6995	1.16	2.05	○	○	○		○
7088	23.52	2.87	○				○
7004	1.54	2.31		○	○		○
6920	4.17	0.44	○	○	○		
7094	3.25	0.63	○				○
7030	3.22	0.87	○				○
7081	2.22	0.92	○	○	○		○
7010	1.74	0.32	○	○	○		○
7032	1.32	-0.13	○				○
7060	1.46	0.97					○
7132	1.46	0.14	○	○	○		○