

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-519923  
(P2007-519923A)

(43) 公表日 平成19年7月19日(2007.7.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 B O 6 3
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

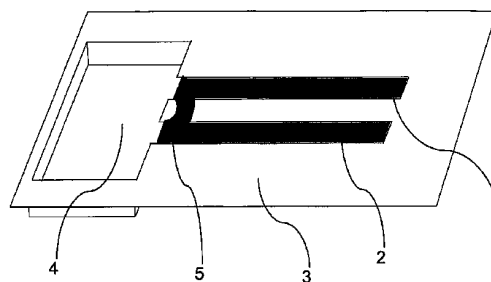
(21) 出願番号	特願2006-550989 (P2006-550989)	(71) 出願人	506261349 テンデラ・エービー
(86) (22) 出願日	平成16年12月16日 (2004.12.16)		スウェーデン国、エス-411 26 ゲ
(85) 翻訳文提出日	平成18年9月21日 (2006.9.21)		テボルグ、エリク・ダールベルグスガタン
(86) 国際出願番号	PCT/SE2004/001883		11ビー
(87) 国際公開番号	W02005/073721	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(87) 国際公開日	平成17年8月11日 (2005.8.11)	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(31) 優先権主張番号	60/540,296	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
(32) 優先日	平成16年1月30日 (2004.1.30)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075672 弁理士 峰 隆司
(31) 優先権主張番号	0400191-3		
(32) 優先日	平成16年1月30日 (2004.1.30)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯周病を検出するためのテストキット

(57) 【要約】

患者の口腔からのサンプルを分析することにより患者の歯周病を診断するためのテストキット。テストキットは、細菌に由来する第一の物質を検出するための少なくとも一の第一の検出アッセイ、および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質を検出するための少なくとも一の第二の検出アッセイを含む。最も好ましくは、前記第一の物質は、細菌性毒性産物、たとえばPorphyromonas gingivalis由来のarg - ジンジパインであり、前記第二の物質は、ヒトの好中球エラスターゼである。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者の口腔からのサンプルを分析することにより患者の歯周病を検出するためのテストキットであって、

細菌に由来する第一の物質を検出するための第一の検出アッセイ、および

患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質を検出するための第二の検出アッセイを少なくとも含むテストキット。

## 【請求項 2】

前記第一の検出アッセイが、細菌に由来する前記第一の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一の第一の親和性リガンドを含み、

前記第二の検出アッセイが、患者の免疫系または炎症系に由来する前記第二の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一の第二の親和性リガンドを含む、請求項 1 に記載のテストキット。

10

## 【請求項 3】

前記第一の物質が細菌性毒性産物である、請求項 1 または 2 に記載のテストキット。

## 【請求項 4】

前記第一の物質が酵素である、請求項 3 に記載のテストキット。

## 【請求項 5】

前記酵素がプロテアーゼである、請求項 4 に記載のテストキット。

## 【請求項 6】

前記プロテアーゼが、*Porphyromonas gingivalis*由来のarg-ジンジパイン (arg-gingipain) および*Bacteroides forsythus*由来の48 kDaプロテアーゼから成る群より選択される、請求項 5 に記載のテストキット。

20

## 【請求項 7】

前記第一の物質が毒素である、請求項 3 に記載のテストキット。

## 【請求項 8】

前記毒素が、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*由来のロイコトキシンである、請求項 7 に記載のテストキット。

## 【請求項 9】

前記第二の物質が白血球産物である、先行する請求項の何れかに記載のテストキット。

30

## 【請求項 10】

前記白血球産物が天然のセリンプロテアーゼである、請求項 9 に記載のテストキット。

## 【請求項 11】

前記天然のセリンプロテアーゼがヒトの好中球エラスターゼである、請求項 10 に記載のテストキット。

## 【請求項 12】

前記第二の物質がサイトカインである、請求項 1 ~ 8 の何れかに記載のテストキット。

## 【請求項 13】

前記サイトカインがインターロイキンである、請求項 12 に記載のテストキット。

## 【請求項 14】

前記インターロイキンが、インターロイキン - 1、インターロイキン - 6 およびインターロイキン - 8 の中から選択される、請求項 13 に記載のテストキット。

40

## 【請求項 15】

前記サイトカインが炎症性メディエーターである、請求項 12 に記載のテストキット。

## 【請求項 16】

前記炎症性メディエーターが、腫瘍壊死因子 - およびプロスタグランジンE<sub>2</sub> から成る群より選択される、請求項 15 に記載のテストキット。

## 【請求項 17】

前記第一の親和性リガンドが、前記第一の物質の選択的結合を示す第一の抗体であり、前記第二の親和性リガンドが、前記第二の物質の選択的結合を示す第二の抗体である、請

50

求項 2 ~ 16 の何れかに記載のテストキット。

【請求項 18】

前記第一および第二の検出アッセイの各々が、免疫クロマトグラフィーアッセイを提供する、請求項 17 に記載のテストキット。

【請求項 19】

前記サンプルを受容するためのサンプル貯蔵所を備えた支持体を更に含み、

前記第一および第二の検出アッセイが、前記サンプル貯蔵所と直接接して、または前記サンプル貯蔵所を前記検出アッセイから分離する取り外し可能に配置された分離手段を介して接して、前記支持体上に配置される、

先行する請求項の何れかに記載のテストキット。

10

【請求項 20】

前記検出アッセイのために前記サンプルを希釈し適合させるための追加のバッファーを更に含む、先行する請求項の何れかに記載のテストキット。

【請求項 21】

前記サンプル貯蔵所とは別にバッファー貯蔵所を更に含む、請求項 20 に記載のテストキット。

【請求項 22】

前記サンプルを得るための少なくとも一のサンプリングデバイスを更に含む、先行する請求項の何れかに記載のテストキット。

【請求項 23】

歯周病を検出するための、先行する請求項の何れかに記載のテストキットの使用。

20

【請求項 24】

歯周病を診断する、および/または前記疾患の進行についてリスクを予測する方法であって、

細菌に由来する少なくとも一の第一の物質の存在、および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質の存在について、患者の口腔からのサンプルを分析することを含む方法。

【請求項 25】

前記第一の物質が細菌性毒性産物である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記第一の物質が酵素である、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記酵素がプロテアーゼである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記プロテアーゼが、*Porphyromonas gingivalis*由来の arg-ジンジパイン (arg-gingipain) および *Bacteroides forsythus*由来の 48 kDaプロテアーゼから成る群より選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第一の物質が毒素である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

前記毒素が、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*由来のロイコトキシンである、請求項 29 に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記第二の物質が白血球産物である、請求項 24 ~ 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 32】

前記白血球産物が天然のセリンプロテアーゼである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記天然のセリンプロテアーゼがヒトの好中球エラスターゼである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

50

前記第二の物質がサイトカインである、請求項 24 ~ 30 の何れかに記載の方法。

【請求項 35】

前記サイトカインがインターロイキンである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 36】

前記インターロイキンが、インターロイキン - 1、インターロイキン - 6 およびインターロイキン - 8 の中から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記サイトカインが炎症性メディエーターである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記炎症性メディエーターが、腫瘍壊死因子 - およびプロスタグランジン E<sub>2</sub> から成る群より選択される、請求項 37 に記載の方法。 10

【請求項 39】

前記分析が、前記第一の物質の存在を選択的に検出する第一の方法および前記第二の物質の存在を選択的に検出する第二の方法を用いて、前記サンプルを分析することを含む、請求項 24 ~ 38 の何れかに記載の方法。

【請求項 40】

前記第一の方法が、前記第一の物質の選択的結合を示す第一の抗体を使用することを含み、前記第二の方法が、前記第二の物質の選択的結合を示す第二の抗体を使用することを含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記第一および第二の方法の少なくとも一つが、免疫クロマトグラフィーアッセイを使用することを含む、請求項 40 に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、歯周病を検出するためのテストキットに関する。更に本発明は、歯周病の診断、および歯周病の進行に関するリスクの予測のための方法に関する。

【技術背景】

【0002】

歯周炎は、西側世界において成人の約 7-15% に影響を及ぼし、これにより我々の最も多発する疾患の一つになっている。歯周病は、多因子疾患であり、歯と歯茎の間のポケットに病原性細菌が存在することが、必要であるが十分ではない診断基準である。宿主の炎症系および免疫系も、当該疾患の発症において重大な役割を果たす。歯周病の進行は、歯肉下の細菌に対する慢性炎症反応の結果、歯の支持組織の破壊につながると考えられる。歯周病は、その挙動が周期性であり、その初期段階には気付かれないままのことがある。 30

【0003】

その破壊プロセスは、宿主の防御システムと歯周ポケットにおける特定の細菌種との間の複雑な相互作用の結果であると考えられる。歯周病の出現および進行に關与する病原性細菌には、*Porphyromonas gingivalis* (以前は *Bacteroides gingivalis*)、*Bacteroides forsythus* (今日 *Tannerella forsythensis* とも称される)、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Triponea denticola* および *Prevotella intermedia* が含まれるが、これらに限定されない。 40

【0004】

近年、細菌の毒性産物 (主として毒素および酵素) の重要性が広く研究され、その病因に主要な役割を果たすと信じられている (Eley and Cox (2003))。細菌は、様々な増殖期を経て、これら増殖期の間歯周ポケットにおいて多かれ少なかれ破壊的であると考えられる。活性な細菌は、毒性産物を産生して、歯周ポケットでの生存および栄養摂取を助ける。この毒性産物は、高い細菌活性の期間に、歯の支持組織の破壊および宿主の防御システムの有効性の低減に寄与する。

【0005】

今日、歯科医は、歯周ポケットのプロービング深さを測定し、歯槽骨への歯のアタッチメントのX線画像を検査し、プロービングによる出血を調べることにより歯周炎を評価する。危険因子には、喫煙習慣、ストレスおよび歯周炎の家族歴が含まれる。この方法は、歯科医の主観的な専門的技術に大きく依存する。プロービング深さは、過去のアタッチメントの減少の測定のみであり、歯周炎の実際の発生や歯周炎の将来的な進行にほとんど有用ではない。プロービングによる出血は、破壊プロセスの代わりに治癒プロセスを示すことができる。

#### 【0006】

時折、微生物サンプルを採取し、培養またはDNA技術 (Socransky (1994)により開発されたチェッカーボードDNA-DNAハイブリダイゼーション技術)の何れかによる分析のためにラボに送る。しかし、その回答は約1週間で得られるが、ある種の細菌の存在を示すのみであり、これは歯周炎を必ずしも示すものではない。

10

#### 【0007】

歯周炎を診断するか、または歯周炎の進行を予測することができる化合物、主としてタンパク質、たとえば酵素またはサイトカインを、患者の口腔からの流体中、たとえば歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid (GCF)) 中に見出すために、多大な研究がなされている。

#### 【0008】

今日までに、幾つかのテストおよびアッセイが開発されている (Armitage (2003))。これらアッセイは、細菌、細菌性毒性産物、または宿主タンパク質の同定を専門としている。

20

#### 【0009】

歯周炎の診断または予後の値について調査された宿主由来のタンパク質には、ヒトの炎症系に由来する産物が主に含まれる。これらタンパク質の役割は、炎症および免疫応答を組織化して、組織のリモデリングをすること、または侵入する細菌の殺傷を助けることである。

#### 【0010】

最も研究された歯周炎診断用の宿主由来タンパク質には、天然のセリンプロテアーゼ (カテプシンG、アズロシジン、プロテイナーゼ3、エラスターゼ)、コラゲナーゼ、アミノトランスフェラーゼ (米国特許第4,981,787号、第5,834,226号および第4,801,535号)、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -グルクロニダーゼ (米国特許第6,277,587号)、ジペプチジルペジダーゼ、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (米国特許第5,866,432号)、マトリックスメタロプロテイナーゼ (米国特許第5,736,341号および第6,280,687号) およびサイトカイン、たとえばインターロイキン (特にIL-1 (米国特許第5,328,829号)、IL-6およびIL-8) および炎症性メディエーター、たとえばプロスタグランジンE<sub>2</sub> および腫瘍壊死因子 (TNF-) が含まれる。

30

#### 【0011】

マトリックスメタロプロテイン (MMP's) は、歯周病のマーカーとして提案されている。米国特許第5,736,341号は、MMP-8の存在を検出することを開示し、米国特許第5,866,432号は、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンの存在を検出することを開示し、米国特許第6,280,687号は、MMP-13の存在を開示する。これら3つの特許は、歯周炎の診断および進行予測のための、免疫クロマトグラフィー原理に基く迅速なチェアサイドテストを提案する。しかし、American Association of Periodontology by Oringer (2002) からの情報論文では、歯周病の進行におけるMMP'sの役割を証明するためには更なる研究が必要であることが議論されている。

40

#### 【0012】

米国特許第6,406,873号は、二つの炎症性メディエーター (プラスミノゲン活性化因子阻害剤2および組織プラスミノゲン活性化因子) は、単独または組み合わせて、歯周炎を診断可能であると主張する。

#### 【0013】

50

米国特許第5,248,595号は、3つまでの異なる歯周病病原体を同時に分析する方法を記載する。

【0014】

Chapple (1997) は、従来および現在において使用される歯周病診断の方法を概説し、マーカーの検出、たとえば歯肉溝滲出液 (gingival crevice fluid) におけるアルカリホスファターゼの存在の検出は、臨床的評価、たとえば組織の色を分析し、ポケットの深さを探針で探り (probe)、歯の易動性を測定することと比較して、感受性および特異性が高いと結論づける。また、Chappleは、かかるマーカーの二つ以上を組合せることにより、進行中または将来の疾患活性を診断するための最も正確な手段が得られるかもしれないと結論づけるが、かかる組合せを示していない。

10

【0015】

Jin et al. (1999) は、歯周ポケットにおいてDNAプロービング法を用いることにより、歯周病病原体、すなわち細菌の存在と歯肉溝滲出液 (GCF) 中のエラスターゼとの間の関係を調査した。

【0016】

Nisengard et al. (1992) は、*P. gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*および*P. Intermedia*の存在に関して、迅速なラテックス凝集テストを記載した。

【0017】

Lamster et al (1994) は、臨床アタッチメントの減少およびそれとヒト白血球由来の - グルクロニダーゼとの関係を調査した。

20

【0018】

Eley and Cox (1996) は、*P. gingivalis*由来のジンジパインに特異的な酵素基質に基づくチェアサイドテストを開発した。

【0019】

今日までに、歯周病活性を評価するための多くの方法が開発されている。しかし、これらの上記方法はいずれも、歯周病およびその破壊パターンを診断するのに十分特異的で感受性のあるアッセイを提供していない。非特異的な方法の一つの結果として、何人かの患者が、歯周病に実際に罹っていないのに治療されるということがある。深さポケットが進行中の炎症を必ずしも有しておらず、正確な診断を得るためにはラジオグラフィーの評価を詳細な臨床観察と併用しなければならず、歯周ポケットに病原性細菌が単に存在することが疾患活性を正確に反映していないため、プロービング深さなどの臨床観察は、十分に信頼できない。更に、宿主または細菌由来のタンパク質に対する酵素的方法に基づくこれまでに開発された診断は、酵素基質が多数の種々の酵素により開裂され得るという事実のために、十分に特異的ではなかった。

30

【0020】

また、種々のサイトカインが研究されているが、迅速で特異的なテストは設計されていない。

【0021】

このため、歯科医は、好ましくは

- 迅速で、数分以内に結果が得られる、
- 最小限の時間と作業労力を必要とする、
- 頑丈で、診療室の環境で手荒に処置可能である、
- 容易に解釈される結果を提供する、
- 室温または冷蔵庫で長期の貯蔵寿命を有する、
- 歯科診療室にそのトレイを備え付け、環境にやさしく、優れた患者の情報材料を提供する、

チェアサイドテストキットを必要としている。

40

【発明の概要】

【0022】

本発明の一つの目的は、従来技術の欠点を解消し、歯科医の現在の要求を満たすテスト

50

キットを提供することである。より具体的には、本発明は、特異的で、感受性がよく、使用し易い歯周病を検出するためのキットおよび方法を提供することを目的とする。

【0023】

本発明の発明者らは、細菌に由来する物質およびヒトの免疫系または炎症系に由来する物質の共存を検出することを含む方法が、本目的のために使用可能であることを見出した。

【0024】

本発明は、歯科医および歯科衛生士の手助けとなって、更に効果的な歯周病治療を患者に提供するために使用することができる。本発明のテストキットおよび方法は、疑わしい歯をスクリーニングするため、以前の治療を追跡するため、最適な形態の治療を決定する

10

【0025】

第一の側面において、本発明は、患者の口腔からのサンプルを分析することにより患者の歯周病を診断するためのテストキットであって、細菌に由来する第一の物質を検出するための第一の検出アッセイ、および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質を検出するための第二の検出アッセイを含むテストキットに関する。

【0026】

好ましくは、本発明は、患者の口腔からのサンプルを分析することにより患者の歯周病を診断するためのテストキットであって、細菌に由来する第一の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一の第一の親和性リガンドを含む第一の検出アッセイ、および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一の第二の親和性リガンドを含む第二の検出アッセイを少なくとも含むテストキットに関する。

20

【0027】

好ましくは、前記患者は哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【0028】

前記第一の検出アッセイからの結果と前記第二の検出アッセイからの結果とを組み合わせて使用して歯周病を検出する。

【0029】

好ましくは、前記第一の物質は、前記細菌により産生されるタンパク質である。好ましくは、前記タンパク質は、細菌性毒性産物であり、より好ましくは、酵素または毒素である。好ましい酵素は、プロテアーゼであり、たとえば、*Porphyromonas gingivalis*由来の arg - ジンジパインおよび *Bacteroides forsythus*由来の 48 kDaプロテアーゼである。有利な毒素の例は、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*由来のロイコトキシンである。

30

【0030】

前記第二の物質は、好ましくは白血球、サイトカイン、またはヒト炎症性メディエーターである。好ましい白血球は、天然のセリンプロテアーゼであり、より好ましくはヒトの好中球エラスターゼである。好ましいサイトカインは、インターロイキン - 1、インターロイキン - 6 およびインターロイキン - 8 である。有利な炎症性メディエーターの例は、腫瘍壊死因子 - である。

40

【0031】

細菌性由来の第一の物質および上記第二の物質、好ましくはヒトの好中球エラスターゼの共存は、活性な細菌および活性な免疫系または炎症系の両方を示すはずであり、これは歯周破壊を示す。

【0032】

歯周病が多因子疾患であることが科学界で十分確立されていたとしても、サンプル中の細菌および宿主由来の産物の両方を分析するテストが未だに開発されていないことは明らかである。

【0033】

50

テストキットは、上述のとおり細菌または患者の免疫系または炎症系に由来する（好ましくは細菌に由来する）第三の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一の第三の親和性リガンドを含む第三の検出アッセイを含んでいてもよく、幾つかの態様においては、追加の物質の結合のための更なる検出アッセイを更に含んでいてもよい。

【0034】

好ましくは、第一の親和性リガンドは、前記第一の物質の選択的結合を示す抗体であり、第二の親和性リガンドは、前記第二の物質の選択的結合を示す抗体である。

【0035】

抗体は、開発され交差反応について試験されると、ターゲットに対して非常に特異的であり、酵素以外の化学物質（たとえば毒素およびサイトカイン）を検出することが可能であるため、抗体の使用は、他の方法（たとえば酵素的な方法）より有利である。更に、新規抗原に対して新規抗体を開発する方法は、当業者に周知である。

10

【0036】

好ましくは、本発明のテストキットにおける前記検出アッセイは、免疫クロマトグラフィーアッセイを含む。

【0037】

免疫クロマトグラフィーアッセイ/方法を使用する利点は、これらが容易に作成され使用されること、長期貯蔵寿命を有していること、迅速に回答が得られること、検出目的の物質に対して非常に特異的に設計することができることである。

【0038】

前記テストキットは、サンプルを受容するためのサンプル貯蔵所を備えた支持体を更に好ましくは含み、前記第一および第二の検出アッセイは、前記サンプル貯蔵所と直接接して、または前記サンプル貯蔵所を前記検出アッセイから分離する取り外し可能に配置された分離手段を介して接して、前記支持体上に配置される。前記キットは、好ましくは前記サンプル貯蔵所とは別にバッファ貯蔵所中に、前記検出アッセイのために前記サンプルを希釈し適合させるための追加のバッファを含んでいてもよいし、サンプルを得るための少なくとも一のサンプリングデバイスを含んでいてもよい。

20

【0039】

本発明のテストキットに具備される個々の検出アッセイは、一緒に提供されてもよいし別々に提供されてもよい。検出アッセイが別々に販売される場合、同時に採取されるGCF等のサンプルは、各アッセイで別々に分析され、その結果は、歯周病の診断のために組合せられる。

30

【0040】

本発明のテストキットおよび方法は、歯周病のためのチェアーサイドテストを備え、このテストにおいて歯科医または歯科衛生士は、歯周ポケットからたとえばGCFサンプルを採取する。サンプルは、テストキットで提供されるアッセイにより分析され、これらアッセイから得られる結果は、規定の基準に従って判断され、進行中の歯周病の発症を評価する。

【0041】

第二の側面において、本発明は、歯周病を診断する、および/または前記疾患の進行についてリスクを予測する方法であって、細菌に由来する少なくとも一の第一の物質の存在および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質の存在について、患者の口腔からのサンプルを分析することを含む方法に関し、第一および第二の物質は上記規定のとおりである。

40

【0042】

更に、本発明の診断方法は、上述の追加の物質の存在を検出する方法を含んでいてもよい。

【0043】

好ましくは、本発明の方法は、前記第一の物質の選択的結合を示す第一の抗体を使用することを含み、前記第二の方法は、前記第二の物質の選択的結合を示す第二の抗体を使用

50

することを含む。

【0044】

より好ましくは、前記第一および第二の方法の少なくとも一つは、免疫クロマトグラフィーアッセイを使用することを含む。

【発明の詳細な説明】

【0045】

本発明は、患者の口腔からのサンプルを分析することにより患者の歯周病を検出するためのテストキットであって、細菌に由来する第一の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一つの第一の親和性リガンドを含む第一の検出アッセイ、および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質を結合するための結合部位を有する少なくとも一つの第二の親和性リガンドを含む第二の検出アッセイを少なくとも含むテストキットに関する。

【0046】

好ましくは、患者の口腔からの前記サンプルは、歯肉溝滲出液、ペリ-インプラント溝液、唾液または口内洗浄サンプルである。

【0047】

歯肉溝滲出液(GCF)は、歯周ポケットから口腔へ流れる流体である。炎症の起こっている場合、GCFは、炎症細胞、細菌およびそれらの副生成物をそれぞれ含有し、その含有物は、破壊性歯周炎のためのマーカーとして使用され得る。GCFの採取は低侵襲的処置であり、その流体は、生化学的インジケータの定量的な出所を提供し、これは、患者の応答および細菌の攻撃を反映するものである。

【0048】

ペリ-インプラント溝液は、歯を歯科インプラントに置換した場合のGCF相当物であり、すなわちインプラントの部位から口腔へ流れる流体である。

【0049】

第一および第二の物質の部位特異的検出を望む場合、調査される歯の表面それぞれから別々のサンプルを得ることが可能であるため、GCFおよびペリ-インプラント溝液が好ましい。

【0050】

唾液または口内洗浄サンプルは、部位特異的でない検出または診断を達成するために使用することができる。

【0051】

ここで使用される「歯周病」および歯周炎の用語は、その最も広い意味で解釈され、歯周炎、インプラント周囲炎(peri-implantitis)(インプラントを支持する組織が崩壊する)、および1999 International workshop for classification of periodontal diseases and conditionsで定義される他の形態の歯周病などの疾患を包含する。

【0052】

歯周病病原性細菌、たとえばPorphyromonas gingivalis、Bacteroides forsythus、Actinobacillus actinomycetemcomitans、Tritonema denticolaおよびPrevotella intermediaは、歯周病の進行に至ることなく、口腔、および歯と健康な歯茎との間のポケットに存在することができる。細菌は、活性になるために、ある増殖条件および栄養の存在を必要とする。活性な細菌は、毒性産物(たとえば上述の毒素および酵素)を産生し、その生存および栄養摂取を助ける。

【0053】

Porphyromonas gingivalisおよびBacteroides forsythusは、約50 kDaの分子量のトリプシン様セリンプロテアーゼとして公知のタンパク質分解酵素を産生する。P. gingivalis由来のプロテアーゼの一つは、arg-ジンジパインと称され、B. forsythus由来のプロテアーゼの一つは、48 kDaプロテアーゼである。Actinobacillus actinomycetemcomitansは、116 kDaロイコトキシンを産生し、これは、孔形成(pore-forming)ロイコトキシンのリピート-イン-トキシン(repeats-in-toxin)エキソプロテインファミリーのメンバーであり、ヒトの多形核白血球に対して特異的に細胞毒性がある。

10

20

30

40

50

## 【0054】

好ましい態様において、前記第一の物質は、細菌性毒性産物、好ましくは酵素、たとえばプロテアーゼ、より好ましくはPorphyromonas gingivalis由来のarg-ジンジパイン、およびBacteroides forsythus由来の48 kDaプロテアーゼ、または毒素、より好ましくはActinobacillus actinomycetemcomitans由来のロイコトキシンである。

## 【0055】

毒性産物の存在は、宿主の炎症応答および免疫系を誘発し、これにより防御系細胞、たとえば多形核(PMN)白血球を感染部位に集めることができる。

## 【0056】

白血球は、感染部位において多量の細菌および細菌性産物を処理することはできず、白血球粒状物由来の酵素が歯周ポケットに放出される。これら酵素は、侵入する細菌を殺傷することを本来の目的とするものであり、周囲の組織に対して非常に破壊的である。ヒトの好中球エラスターゼは、歯の周囲の支持組織の多くを分解することが示されている。エラスターゼは、歯周ポケットにおいてそのプロテアーゼ阻害剤(-1アンチトリプシン)に結合することがしばしば見出されている。しかし、P. gingivalis由来のプロテアーゼは、ヒト血清においてプロテアーゼインヒビターの-1アンチトリプシンおよび-2マクログロブリンを分解して、歯周ポケットまたはペリ-プラントポケットにおいて高い破壊形態でエラスターゼを放出することが示されている。

10

## 【0057】

ここで使用される「免疫系または炎症系に由来する」物質は、免疫系または炎症系に参与する細胞に由来する物質を指す。かかる物質は、前記細胞から分泌されてもよいし、かかる細胞の溶解に由来してもよく、たとえば免疫および炎症応答を組織化するか、または組織のリモデリングもしくは侵入する細菌の殺傷を行う。

20

## 【0058】

第二の物質は、白血球産物、たとえば天然のセリンプロテアーゼ、好ましくはヒトの好中球エラスターゼまたはサイトカイン、たとえばインターロイキン-1、インターロイキン6およびインターロイキン-8から好ましくは選択されるインターロイキン、または炎症性メディエーター、好ましくは腫瘍壊死因子- またはプロスタグランジンE<sub>2</sub>であり得る。

## 【0059】

より好ましくは、前記第二の物質は、ヒトの好中球エラスターゼである。

30

## 【0060】

本発明の検出に適した患者の免疫系または炎症系に由来する他の物質には、コラゲナーゼ、アミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、-グルクロニダーゼ、ジペプチジルペジダーゼ、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンおよびマトリックスメタロプロテイナーゼが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0061】

最も好ましくは、前記第一の物質は、細菌性毒性産物であり、前記第二の物質は、ヒトの好中球エラスターゼである。

## 【0062】

少なくとも一の細菌由来の第一の物質および上述の第二の物質、好ましくはヒトの好中球エラスターゼの共存は、活性な細菌および活性な免疫系または炎症系の両方を示すはずであり、これは歯周病を示唆する。よって、少なくとも前記第一の物質および前記第二の物質の共存を検出することが有利である。

40

## 【0063】

幾つかの例において、本発明のテストキットは、前記サンプルにおいて追加の物質を検出するための追加の検出アッセイを含み、好ましくは、かかる追加の物質は、上述の細菌由来の物質から選択される。

## 【0064】

好ましい態様において、本発明のテストキットでは、前記第一の親和性リガンドは、前

50

記第一の物質への選択的結合を示す第一の抗体を含み、前記第二の親和性リガンドは、前記第二の物質への選択的結合を示す第二の抗体を含む。

【0065】

ここで使用される「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、合成で作成される抗体または抗体等価物およびその機能的フラグメントを指す。

【0066】

本発明にとって特別興味深い抗体は、上述の第一または第二の物質の何れかに特異的に結合する抗体である。ヒトの好中球エラスターゼに対する抗体は、MP Biomedicalsから商業的に入手可能である。A. actinomycetemcomitans由来のロイコトキシンに対する抗体は開発されており (Johansson et al. 2000)、P. gingivalis由来のプロテアーゼに対する抗体も開発されている (Nakagawa et al. 2001)。

10

【0067】

ここで使用される「アッセイ」は、サンプル中の一または複数の物質の存在を検出する、および/またはその量を決定するための手段をいう。アッセイでの分析から得られる結果は、検出可能な応答であり、たとえば色、蛍光、吸光度および/または発光の変化、伝導度の変化、放射能の変化等である。

【0068】

本発明のテストキットでの使用に適した検出アッセイは、幾つかの免疫学的方法のものに基くことができる。かかる方法には、免疫クロマトグラフィー方法、免疫測定方法、免疫凝集方法、蛍光免疫学的方法、免疫発光方法、濁度測定 (turbidimetric) 免疫学的方法、ELISAおよび比濁分析 (nephelometric) 方法が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0069】

本発明のテストキットの好ましい態様において、前記第一および第二の検出アッセイは、免疫クロマトグラフィーアッセイ、好ましくは、ラテラルフローテスト (lateral flow test) として実行されるいわゆる「ストリップテスト (strip-test)」として具体化されるものを提供する。当業者に公知の、免疫クロマトグラフィーアッセイの幾つかの種々の変形例が存在する。それぞれの免疫クロマトグラフィーアッセイは、好ましくは、検出すべき物質の異なるエピトープに特異的な二つの抗体を使用する。

【0070】

更に、二以上の検出アッセイを単一のストリップテストに適合させ、その結果、二以上の物質の存在を単一のストリップ上で特異的に検出することができる。

30

【0071】

更に、免疫クロマトグラフィーアッセイは、当業者に知られているとおり、ポジティブシグナルを得るために、予め規定された閾値量の探索物質をサンプル中に必要とするように設計することができる。

【0072】

また本発明は、歯周病を診断する、および/または前記疾患の進行についてリスクを予測する方法であって、細菌に由来する少なくとも第一の物質の存在および患者の免疫系または炎症系に由来する第二の物質の存在について、患者の口腔からのサンプルを分析することを含む方法に関する。

40

【0073】

本発明の方法において、患者の口腔からのサンプルおよび第一および第二の物質は、上述のとおりである。

【0074】

また幾つかの例において、本発明の診断方法は、前記サンプル中に上述の追加の物質の存在を検出する工程を更に含む。

【0075】

本発明の診断方法の好ましい態様において、前記第一の方法は、前記第一の物質の選択的結合を示す第一の抗体を使用することを含み、前記第二の方法は、前記第二の物質の選択的結合を示す第二の抗体を使用することを含み、前記抗体は上述のとおりである。

50

## 【0076】

最も好ましくは、前記第一および第二の方法の少なくとも一つは、免疫クロマトグラフィー方法を使用することを含む。

## 【0077】

本発明の方法での使用に適した他の検出方法は、幾つかの免疫学的方法のものに基くことができる。かかる方法には、免疫クロマトグラフィー方法、免疫測定方法、免疫凝集方法、蛍光免疫学的方法、免疫発光方法、濁度測定免疫学的方法、ELISAおよび比濁分析方法が含まれるがこれらに限定されない。

## 【好ましい態様】

## 【0078】

好ましくは、本発明のテストキットは、図1に図示されるとおり、サンプルを受容するためのサンプル貯蔵所4を備えた支持体3上に配置された、二つの免疫クロマトグラフィー検出アッセイ1、2を含む。二つの検出アッセイ1、2は、サンプル貯蔵所4と直接接して、または取り外し可能に配置された分離手段5を介して接して配置される。

## 【0079】

サンプル貯蔵所4は、好ましくは支持材料で形成される。支持体3は、幾つかの異なる材料、たとえばプラスチック、紙、カートンまたはその組合せ、たとえばプラスチックとのラミネート紙から作成することができる。検出アッセイ1、2は、各アッセイのサンプル受容領域が、サンプル貯蔵所4と直接接するか、または取り外し可能に配置された分離手段5を介して接するように、支持体3上に固定される。前記分離手段5は、アッセイ上でサンプル受容領域を覆う取り外し可能なフォイル、アッセイから当該貯蔵所を分離するダム等であり得る。

## 【0080】

キットは、前記検出アッセイのために前記サンプルを希釈し適合させるための追加のバッファー、および分析すべきサンプルを得るための少なくとも一つのサンプリングデバイスを更に含んでもよい。使用に適したサンプリングデバイスのタイプは、分析すべきサンプルのタイプに依存し得る。たとえば、歯肉溝滲出液は粘性流体であり、小さなブラシ、デンタルフロス、ペーパーポイントまたは使い捨てピペットにより容易に収集することができる。唾液または口内洗浄サンプルを得るための他のサンプリングデバイスは、当業者に公知である。好ましくは、バッファーは、サンプル貯蔵所とは別に、バッファー貯蔵所に保存され、たとえば別々のフラスコ、支持体上に形成された追加の貯蔵所、またはサンプル貯蔵所に配置した穴開け可能なバッグにバッファーを提供することにより、保存される。

## 【0081】

サンプルを得た後、検出アッセイに適したpH、イオン強度および粘度を得るために、サンプルは好ましくはバッファーと混合される。混合した後、サンプルをサンプル貯蔵所に移し、必要に応じて分離手段を移動させることにより、検出アッセイの受容領域と接触させる。

## 【0082】

サンプルは、検出アッセイにより分析すべきタンパク質（抗原）の一つのエピトープに特異的な抗体でコーティングした小粒子（たとえばコロイド金またはラテックス）が液体フローによりピックアップされる別の領域に、セルロースストリップに沿って、キャピラリーフローにより移動する。サンプル中に存在する抗原は、抗体結合粒子に結合し、セルロースストリップに沿って更に移動する。キャピラリーフローの流路の更に下流に、抗原の別のエピトープを認識する別の抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）が、不可逆的にストリップに結合する。抗原を捕捉した粒子は、粒子とストリップ結合抗体との間に抗原が挟まれた状態で、第二の抗体が結合したストリップ上の領域に結合する。

## 【0083】

十分な粒子が同じ領域に捕捉された場合、目に見えるライン（テストライン）が、ストリップ上に形成される。抗原を捕捉しなかった粒子は、ストリップを下降し続け、幾つか

10

20

30

40

50

は、ファンクションコントロールラインで捕捉される。粒子は小さいため一つずつではヒトの眼に見えない。十分な粒子が同じ領域に捕捉された場合のみ、目に見えるラインが形成される。

【0084】

上記方法は、両ストライプでほぼ同時に行い、これにより分析される物質の各々について数分以内に一つの結果が得られる。

【0085】

本発明の上述の好ましい態様および以下の実験は、説明の目的のみを意図しており、本発明を限定するものと解釈すべきではない。本発明の範囲は、添付のクレームにより規定される。

10

【実験】

【0086】

材料と方法

以下の研究のためのサンプルは、スウェーデン、クリシャンスタードの行政歯科サービス (Public dental service)、歯周療法部門 (Department of Periodontology) に歯周治療のためにまわされた16人のボランティアから得た。患者の年齢は、28~54才で、平均40才であった。すべての個人が、プロービング深さが6 mm以上の少なくとも3つの部位を別々の歯に有していた。患者は、ここ6ヶ月の間に、医学的に欠陥があったり、歯周治療および/または抗生物質による治療を受けたりしなかった。

【0087】

20

サンプリングおよび臨床検査は、1週間の間隔で2回行った。酵素分析のためのサンプルは、微生物のサンプリングおよび臨床検査の前に集めた。1回目のサンプリングおよび検査は、任意の処置を施す前に行った (ベースライン、測定1)。2回目のサンプリングおよび検査は、1回目の処置の完了から6ヵ月後に行い (測定2)、3回目は、2回目の処置の完了から更に6ヵ月後に行った (測定3)。

【0088】

ベースライン検査の後、すべての患者は、口腔衛生指導、および全歯列にわたって歯肉縁上および歯肉縁下のデブリドマンを受けた。嫌気性生物の生存総数に対し *P. gingivalis* が 0.5% または *P. intermedia* が 5% を占めるか、あるいは歯肉縁下サンプルに *A. actinomycetemcomitans* が存在するすべての部位で、2回目の処置期間に、麻酔下で歯周の外科処置または歯石除去 (rescaling) を行った。研究のために選択した他の部位はすべて、歯肉縁上の研磨を受けた。

30

【0089】

各患者から、最初のプロービング深さが 6 mm である3~10部位からサンプルを集めた。サンプリング領域を乾燥させ、コットンロールで隔離し、歯肉縁上では、無菌のキュレットおよび外科用綿糸糸を用いてプラークを注意深く除去した。酵素アッセイのために、3つの媒質ペーパーポイント (Johnson and Johnson, Windsor, NJ) を、歯周溝に約1 mm連続して挿入し、15秒間放置した。各ペーパーポイントの湿った部分を無菌のはさみで切断し、100  $\mu$ l 0.85% NaCl を含有するミニソープ (minisorb) チューブ (Nunc, Roskilde, Denmark) にプールした。サンプルをすぐに -20  $^{\circ}$ C に、6時間以内に -80  $^{\circ}$ C に凍結し、アッセイまで保存した。微生物の分析のために、抵抗性が満たされるまで、3つのペーパーポイントを歯周ポケットに連続して挿入し、15秒間放置した。そのポイントを、直径3 mmの10個のガラスビーズおよび3.3 mmのVMGA III輸送培地を含有するバイアルにプールし、好氣的に調製し保存した。サンプルを24時間以内に処理した。細菌は、栄養強化ブルセラ寒天プレートで生育させ、適切な方法により同定した。

40

【0090】

診断テストのための適切なカットオフ値を研究するために、ヒト好中球に由来するエラスターゼおよび *P. gingivalis* に由来する arg-ジンジパインを、選択的基質を用いて研究した。

【0091】

50

重複サンプルの第一セットは、酵素アッセイのために使用した。すべてのサンプルは、氷上で解凍し、13,000×gで3分間遠心分離した。

【0092】

*P. gingivalis*由来のarg-ジンジパインを測定するための酵素基質は、5% DMSOを含有するアッセイバッファー中で最終濃度1 mMであるN-ベンゾイル-L-アルギニン-p-ニトロアニリン (BAPNA)であった。アッセイバッファーは、50 mMグリシルグリシン (本発明者らによりUS 5,981,164特許で以前に報告されるとおり、gly-glyは、arg-ジンジパインの存在下でBAPNAを選択的に刺激する)および5 mM L-システインとともに5 mM CaCl<sub>2</sub>を含有する0.1 M Tris-HCl, pH 7.5であった。50 μlの基質を添加する前に、10 μlのサンプルを、ウシ血清アルブミンでプレコーティングした96ウェルマイクロタイタープレートのウェルにおいて、140 μlのアッセイバッファーと15分間プレインキュベートした。プレートを加湿チャンバーにおいて37 °Cでインキュベートし、pNAの放出を、12~36時間の間、数時間ごとに、マイクロタイタープレートリーダーを用いてOD<sub>405</sub>を読み取ることにより分光光度法で追跡した。1ユニットの活性は、1時間のインキュベーションの間に1 nmolの基質を開裂した酵素の量に等しい。

10

【0093】

エラスターゼアッセイは、5 μlのCGFを、145 μlのアッセイバッファー (0.1 M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5)を含有する96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに添加することにより行った。15分後、20% DMSOを含有するアッセイバッファー中の2 mMメトキシスクシニル-Ala-Ala-Pro-バリン-pNAの溶液50 μlを添加することにより、反応を開始した。プレートを加湿チャンバーにおいて37 °Cでインキュベートした。pNAを放出する酵素反応を、12~26時間の間、数時間ごとに、マイクロタイタープレートリーダー (Molecular Devices)を用いてOD<sub>405</sub>を読み取り、希釈された精製酵素の標準液と比較した。記録された読み取り値を、時間に対してプロットし、プロットの直線部分からDA<sub>405</sub>/60分として酵素活性を計算した。エラスターゼの量は、部位あたりngで表示した。

20

【0094】

*P. gingivalis*の増殖またはgly-gly刺激性BAPNA活性がみられるが、*A. actinomycetemcomitans*の増殖のみられない患者を、カットオフ研究に含めた。この基準により、8人の異なる患者から35部位が得られた。最初の処置から1年後の測定を、この限られた研究で使用した。圧力平衡状態のプロープを用いて歯周ポケットの底部から歯根セメント縁へと測定したアタッチメントの減少を、歯周病の更なる進行の測定値として使用した。エラスターゼおよびarg-ジンジパインは、それらの能力について分析し、更なるアタッチメントの減少を予測した。個々に、エラスターゼのカットオフレベルを、部位あたり20 ngに設定し、arg-ジンジパインについては、部位あたり0.27ユニットに設定した。

30

【0095】

結果

【表1】

エラスターゼ	アタッチメントの減少	アタッチメントの増大またはゼロ
陽性テスト (エラスターゼ>20 ng)	3	2
陰性テスト (エラスターゼ≤ 20 ng)	3	27

40

【0096】

更なるアタッチメントの減少の予測指標であるエラスターゼでは、50%の感受性および93%の特異性が得られた。フィッシャーの直接確率検定を用いて、0.0264のp-値が計算

50

された。

【表 2】

Arg-ジンジパイン	アタッチメントの減少	アタッチメントの増大またはゼロ
陽性テスト (arg-ジンジパイン > 0.27 U)	6	13
陰性テスト (arg-ジンジパイン ≤ 0.27 U)	0	16

10

【0097】

更なるアタッチメントの減少の予測指標であるarg-ジンジパインでは、100%の感受性および55%の特異性が得られた。フィッシャーの直接確率検定を用いて、0.0216<sup>\*</sup>のp-値が計算された。

【0098】

エラスターゼおよびarg-ジンジパイン単独では、感受性または特異性の何れかが犠牲にされなければならなかった。このため我々は、二つの酵素の組合せを調査することを進めた。我々は二つの酵素について新たなカットオフレベルを調査し、エラスターゼの検出限界は部位あたり2 ngにすべきであり、arg-ジンジパインについては0.30ユニットにすべきであることを見出した。

20

【表 3】

組合せ	アタッチメントの減少	アタッチメントの増大またはゼロ
陽性テスト (エラスターゼ > 2 ng および arg-ジンジパイン > 0.30 U)	5	3
陰性テスト (エラスターゼ ≤ 2 ng または arg-ジンジパイン ≤ 0.30 U)	1	26

30

【0099】

更なるアタッチメントの減少の予測指標であるエラスターゼとarg-ジンジパインの組合せでは、83%の感受性および90%の特異性が得られた。フィッシャーの直接確率検定を用いて、0.001<sup>\*\*\*</sup>未満のp-値が計算された。歯周病のマーカーとしてエラスターゼとarg-ジンジパインを組合せることにより、何れかの酵素単独よりも統計的に有効なテストが得られることを、この限られたデータは示す。

40

【参考文献】

【0100】

Armitage G.C. (2003) Position paper: Diagnosis of Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology* 74, 1237-1247.

Chapple I.L.C (1997) Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. *Journal of Dentistry* 25, 3-15. 10

Eley B.M. and Cox S.W. (1996) Correlation Between Gingivain/Gingipain and Bacterial Dipeptidyl Peptidase Activity in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Attachment Loss in Chronic Periodontitis Patients. A 2-Year Longitudinal Study. *Journal of Periodontology* 67, 703-716.

Eley B.M. and Cox S.W. (2003) Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defences and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontology* 2000, 31, 105-124. 20

Jin L.J., Söder P-Ö. , Leung W.K., Corbet E.F., Samaranayake L.P., Söder B. and Davies W.I.R. (1999) Granulocyte elastase activity and PGE2 levels in gingival crevicular fluid in relation to the presence of subgingival periodontopathogens in subjects with untreated adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 26, 531-540. 30

Johansson A., Sandström G., Claesson R., Hänström L., Kalfas S. (2000) Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the bacterial leukotoxicity. *European Journal of Oral Sciences* 108, 136-149.

Lamster I.B., Smith Q.T., Celenti R.S., Singer R.E. and Grbic J.T. (1994) Development of a risk profile for periodontal disease: microbial and host response factors. *Journal of Periodontology* 65 (5 Suppl), 511-20. 40

Nakagawa, T., Sims, T., Fan, Q., Potempa, J., Travis, J., Houston, L. and Page, R.C. (2001) Functional characteristics of antibodies induced by Arg-gingipain (HRgpA) and Lys-gingipain (Kgp) from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology* 16 (4), 202-211.

Nisengard R.J., Mikulski L., McDuffie D. and Bronson P. (1992) Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* 63 (7), 611-617. 10

Oringer R.J. (2002) Modulation of the Host Response in Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology* 73, 460-470.

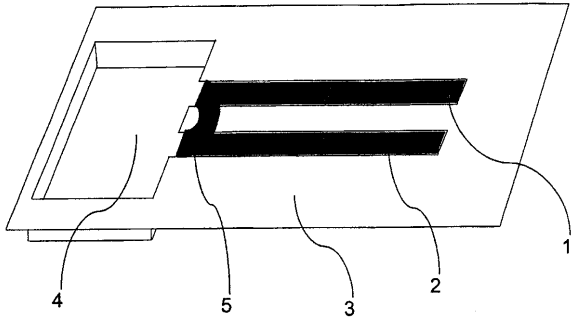
Socransky S.S., Smith C., Martin L., Paster B.J., Dewhirst F.E. and Levin A.E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17 (4), 788-92. 20

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】図1は、サンプル貯蔵所を備えた支持体上に二つの免疫クロマトグラフィーアッセイが配置されたテストキットの一態様を示す。

【 図 1 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/SE 2004/001883
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC7: G01N 33/53, G01N 33/573, G01N 33/569 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC7: G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
WPI DATA, EPO-INTERNAL, BIOSIS, MEDLINE, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Dentistry, Vol. 25, No. 1, 1997, I.L.C. Chapple, "Periodontal disease diagnosis: current status and future developments", pages 3-15, pages 7-9 --	1-41
A	Journal of periodontal research, Volume 25, 1990, Cox SW et al, "A simple, combined fluorogenic and chromogenic method for the assay of proteases in gingival crevicular fluid", pages 164-171 --	1-41
A	US 5328829 A (STASHENKO), 12 July 1994 (12.07.1994) --	1-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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		Date of mailing of the international search report
3 May 2005		12-05-2005
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Terese Persson/EÖ Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE 2004/001883

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Periodontal Research, Volume 36, 2001, Tan KS et al, "Bacteroides forsythus prTH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease", pages 398-403 --	1-41
A	US 6280687 B1 (GOLUB ET AL), 28 August 2001 (28.08.2001) --	1-41
A	Journal Periodontal, Volume 67, 1996, B.M. Eley et al, "Correlation Between Gingivain/Gingipain and Bacterial Dipeptidyl Peptidase Activity in Gingival Crevicular Fluid and Periodontal Attachment Loss in Chronic Periodontitis Patients. A 2-Year Longitudinal Study", pages 703-716 --	1-41
A	Journal Periodontal, Volume 65, 1994, Gary C. Armitage et al, "Longitudinal Evaluation of Elastase as a Marker for the Progression of Periodontitis", pages 120-128 -- -----	1-41

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/SE 2004/001883**

<b>US</b>	<b>5328829</b>	<b>A</b>	<b>12/07/1994</b>	<b>NONE</b>		
-----						
<b>US</b>	<b>6280687</b>	<b>B1</b>	<b>28/08/2001</b>	<b>US</b>	<b>6143506</b>	<b>A 07/11/2000</b>
-----						

## フロントページの続き

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

(74) 代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74) 代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74) 代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74) 代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74) 代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74) 代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72) 発明者 ベングトソン、トマス

スウェーデン国、エスイー - 4 1 6 5 4 ゲテボルグ、ウィンガルドスガタン 1 4 ビー

(72) 発明者 ウィクストレム、マウデ

スウェーデン国、エスイー - 4 1 1 3 3 ゲテボルグ、アシェベルグスガタン 2 8

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ36 QR48 QX01

专利名称(译)	用于检测牙周病的检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007519923A</a>	公开(公告)日	2007-07-19
申请号	JP2006550989	申请日	2004-12-16
申请(专利权)人(译)	Tendera-AB		
[标]发明人	ベングトソントマス ウイクストレムマウデ		
发明人	ベングトソン、トマス ウイクストレム、マウデ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/573 G01N33/53 C12Q1/37 G01N G01N33/569 G01N33/68 G01N33/88		
CPC分类号	G01N33/56955 G01N33/6869 G01N33/88 G01N2333/966		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/573.A G01N33/53.P C12Q1/37		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ36 4B063/QR48 4B063/QX01		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	60/540296 2004-01-30 US 0400191 2004-01-30 SE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

通过分析来自患者口腔的样品来诊断患者牙周病的检测试剂盒。测试试剂盒至少包括用于检测源自细菌的第一物质的第一检测测定法和用于检测源自患者的免疫或炎性系统的第二物质的至少第二检测测定法。

