

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-52945

(P2009-52945A)

(43) 公開日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)  
 GO 1 N 33/531 (2006.01) GO 1 N 33/531 B  
 GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2007-218170 (P2007-218170)                  (22) 出願日 平成19年8月24日 (2007.8.24)</p>	<p>(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                  (72) 発明者 桑野 美幸                  大阪府高槻市朝日町3番1号 サンスター株式会社内                  (72) 発明者 安田 多賀子                  大阪府高槻市朝日町3番1号 サンスター株式会社内                  (72) 発明者 西田 美恵子                  大阪府高槻市朝日町3番1号 サンスター株式会社内</p>
--	---

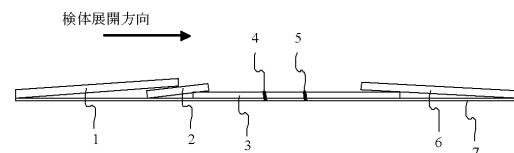
(54) 【発明の名称】 免疫クロマト検査における口腔内由来検体の処理方法

(57) 【要約】

【課題】免疫クロマトグラフィー法により口腔由来検体を用いて歯周疾患の検査又は診断を行う際に、より正確かつ簡便に検査を行なう為に必要な上記口腔由来検体の処理方法を提供することである。

【解決手段】歯周疾患の検査又は診断をするために口腔より採取した検体、例えば唾液や洗口吐出液、歯肉溝浸出液、プラーク等について、陰イオン性界面活性剤、好適にはドデシル硫酸ナトリウム又はデオキシコール酸ナトリウムを用いて作用させることにより、上記口腔由来検体を処理することを特徴とする。

【選択図】 図 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

免疫クロマトグラフィー法による歯周疾患検査又は診断用の口腔由来検体について、陰イオン性界面活性剤を用いることを特徴とした検体の処理方法。

**【請求項 2】**

上記陰イオン性界面活性剤が、ドデシル硫酸塩又はデオキシコール酸塩のいずれかであることを特徴とする請求項 1 に記載の処理方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、免疫クロマトグラフィー検査用検体の処理に関するものであり、より詳しくは、歯周疾患の検査又は診断用の口腔由来検体の前処理方法に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

歯周疾患は、歯を支持するための組織である歯周組織における疾患の総称であり、様々なリスクが要因となる多因子性疾患であるが、そのうち必要条件として挙げられるのが、歯周病原性細菌の歯周ポケット部位への感染である。この歯周疾患は、はじめ歯肉の炎症から始まって歯周組織が崩壊し、ついには歯の脱落に至る。この様に歯周疾患は歯に重大な影響を及ぼす一方で、進行が緩慢であり痛み等がほとんどないために自覚症状がないまま悪化してしまう。そこで歯周ポケット内にどのような細菌が存在するかを調べることが、歯周疾患を早期に発見すること、及び歯周疾患のリスクを調べることに重要であると考

**【0003】**

えられている。歯周病原性細菌は数多く存在することが知られているが、中でも非特許文献 1 に示されるように、「レッドコンプレックス」と呼ばれるポルフィロモナス ジンジバリス、バクテロイデス フォーサイサス、トレポネーマ デンティコラの 3 菌種に感染することが、最も歯周疾患に罹るリスクが高いとされている。現在では、細菌の検出手段として、リアルタイム PCR を用いる検査方法や、上記 3 菌種が分泌する酵素を検出し、検査する方法が実用化されている。また、実験室レベルでは、抗原抗体反応を利用したエンザイムイムノアッセイやラジオイムノアッセイ等を用いて、細菌の検査を行うこともある。

**【0004】**

しかし、上記検査方法では、特定の専用装置が必要であったり、専門的知識をもって複数の複雑な検査処理を行う必要があったり、またそのために、検査を行い、その結果が得られるまでの時間が非常にかかってしまったりと、費用面においても手間の面からも、簡便に検査をすることができなかった。

**【0005】**

一方、抗原抗体反応を利用する技術の一つである免疫クロマトグラフィー法は、採取した検体に含まれる細菌を抗原として、当該抗原を認識する抗体が塗布された専用ストリップに滴下することにより、当該抗原の有無や量を知ることができる方法である。この専用ストリップには、主としてニトロセルロース等の多孔質膜が利用されており、当該抗原はこの多孔質膜中を毛細管現象により移動することにより上記抗体と結合することにより検出される。そのため、操作としても検体を滴下するのみであり、抗原及び抗体を含む試料が移動して反応するまでの時間はおよそ 30 分程度であることから、この免疫クロマトグラフィー法を利用すれば、検査を簡便に行うことができる。

**【0006】**

しかし、歯周疾患の検査又は診断において、口腔より採取した検体、その中でも特に唾液や洗口吐出液は、その粘性性が非常に高いために上記多孔質膜中をそのまま毛細管現象によって移動させることは非常に困難である。そのため、これらの検体に対して事前処理を行い、毛細管現象による移動を容易にさせる必要がある。これらの検体に対する処理には、化学物質による分解等がよく見られるが、その分解を過剰に行うものでは目的の抗

10

20

30

40

50

原や抗体までも分解してしまい、検体を検出することが不可能となる。また、上記化学物質が分子等の変性を引き起こすものであれば、正確な検体の検出を損ねることになる。よって、これらの検体に対しては適切な物質を用いて処理を行う必要がある。

【0007】

例えば特許文献1には、免疫クロマトグラフィー法によりう蝕原因細菌（ミュータンス連鎖球菌）を測定又は同定する検査において、唾液をアルカリ処理（NaOH）し、その後、酸処理（酒石酸/クエン酸）により中和を行い、さらにその後非イオン性界面活性剤又は両性界面活性剤処理をして、唾液中のムチンやグルカンを分解させる方法が開示されている。ところがこの処理方法においては、検体処理のために複数の溶液材料を必要としており、それに伴って複数の処理ステップを実施するため、検体処理において非常に手間と時間がかかることが問題となり、さらにはコスト面からの懸念も必要となる。

10

【0008】

一方、特許文献2には、免疫クロマトグラフィー法によりインフルエンザの検査を行う場合において、インフルエンザ検査用の生体から採取した検体（鼻汁、痰、咽頭ぬぐい液等）を非イオン界面活性剤（ポリオキシエチレン系界面活性剤）及び0.3Mのアルカリ金属イオン（ナトリウムイオン）を含む前処理液で処理する方法が開示されている。しかしながら、これらの技術は唾液や洗口吐出液の処理については全く開示されていない。

【特許文献1】特開2002-357599

【特許文献2】特開2005-24323

【非特許文献1】Socransky SSら、「歯肉縁下プラークにおける細菌複合体（Microbial complexes in subgingival plaque）」、ジャーナル・オブ・クリニカル・ペリオドントロジー（J. Clin. Periodontol.）、第25巻、第134～144頁（1998年）

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上述したように、う蝕原因細菌の検査において唾液を処理する方法は知られていたが、複数の材料や処理行為を必要とする等簡便なものではなかった。その一方でインフルエンザの検査において生体由来検体を処理する方法はあったが、唾液や洗口吐出液ではなく、また歯周疾患の検査又は診断を特定するものではなかった。

30

【0010】

そこで本発明が解決すべき課題は、免疫クロマトグラフィー法により口腔由来検体を用いて歯周疾患の検査又は診断を行う際に、より正確かつ簡便に検査を行なう為に必要な上記口腔由来検体の処理方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、口腔由来検体の処理につき鋭意検討を重ねた結果、上記口腔由来検体について、陰イオン性界面活性剤、好適にはドデシル硫酸ナトリウム又はデオキシコール酸ナトリウムを用いて検体処理を行うことにより、正確かつ簡便に歯周疾患の検査又は診断を行なえることを見出し、本発明を完成した。

40

【0012】

すなわち本発明は、口腔由来検体に係る検体処理方法を提供するものであり、免疫クロマトグラフィー法による歯周疾患検査又は診断用の口腔由来検体について、陰イオン性界面活性剤を用いることを特徴とした検体の処理方法である。

【0013】

また、上記検体の処理方法においては、上記陰イオン性系界面活性剤が、ドデシル硫酸塩又はデオキシコール酸塩であることが好適である。

【発明の効果】

【0014】

以上詳述したように、免疫クロマトグラフィーにより歯周疾患の検査又は診断を行う場

50

合について、ドデシル硫酸ナトリウム又はデオキシコール酸ナトリウムを用いて口腔由来検体の処理を行うことにより、免疫クロマトグラフィー用ストリップに目詰まりを発生させることなく、正確かつ簡便に歯周疾患の検査又は診断を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明において、測定の対象となる検体は、口腔内由来のものであればよく、特に限定されないが、好ましくは、唾液、洗口吐出液、歯肉溝浸出液又はプラーク等が挙げられる。

【0016】

これらの検体を採取する方法は特に制限されず、公知の方法を採用することができる。例えば唾液であれば、ガムベースやパラフィンワックス等の咀嚼により得られる刺激唾液や、安静時の無刺激唾液、スワブや吸水紙を用いて唾液を吸着する方法で採取することができるが、検体の採取が短時間ででき、検体の処理が容易となる刺激唾液が最も望ましい。また、洗口吐出液は、水や生理食塩水又は緩衝液等を口に含んだ後、口をよく動かして漱口を行なっても、口に含むのみですぐに吐き出してもよい。プラークに関しては、スクレーパーや歯ブラシで掻き取ったものを水や生理食塩水又は緩衝液等に懸濁したものや、ブラッシング後に洗口した水や生理食塩水又は緩衝液等が挙げられる。

【0017】

本発明の検体の処理方法に用いられる陰イオン性界面活性剤は、特に限定されないが、アルキル硫酸エステル塩（ドデシル硫酸ナトリウム等）、胆汁酸塩（デオキシコール酸ナトリウム等）や、ラウリルスルホコハク酸ナトリウム、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテルリン酸ナトリウム、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム等が挙げられる。本発明においては、特にアルキル硫酸エステル塩や胆汁酸塩が良いが、中でもドデシル硫酸ナトリウム又はデオキシコール酸ナトリウムが最も適している。

【0018】

上記の陰イオン性界面活性剤は、検体の処理に使用する際には、0.001～0.1%の濃度になるように添加することができる。

【0019】

本発明の検体の処理方法には、上記の陰イオン性界面活性剤の他、一般的に当業者が使用しうる成分を含ませて用いることができる。具体的には、反応に至適なpHに保持しうる緩衝液を構成する成分や、その他有機酸や無機酸、金属塩等を含ませることができる。緩衝液としては、リン酸や、ホウ酸、トリス緩衝液といったものが挙げられる。pHは、特に制限されないが、中性程度（pH 5.0～9.0）が好ましい。有機酸としては、具体的には酒石酸、クエン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、酢酸、ギ酸等があり、無機酸としては硫酸、塩酸、硝酸、亜硝酸等が挙げられる。また、金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩等が挙げられる。

【0020】

検体の処理方法は、通常の方法に従えば良く、液状の検体を処理する際には、上記陰イオン性界面活性剤を含む液体等を検体に加え、転倒混和や、振とう、攪拌等により、その液体等と検体とが混合されればよい。また、唾液をスワブや吸水紙を用いて採取した場合は、上記陰イオン性界面活性剤を含む液体等に当該吸水体を浸し、混和した後、その液体等と検体とを吸水体より搾り取るにより処理を行うことができる。また、免疫クロマトグラフィー上の、抗原検出部位よりも上流の部位に設置する部材、例えば、サンプルパッドや、ニトロセルロースメンブレンの抗原検出部位より上流の部分に直接、あらかじめ上記陰イオン性界面活性剤を含む液体等を含浸させることで、免疫クロマトグラフィー上で検体の移動と同時に処理を行うことも可能である。処理時間は特に制限されないが、処理後2時間以内が望ましく、処理後すぐに検査等を行うことも可能である。反応温度は室温であれば問題なく、5～35℃で反応すれば良い。

【0021】

10

20

30

40

50

さらに本発明により、上記陰イオン性界面活性剤を含む検体等を構成部材の一つとして、当該処理方法により口腔由来検体を処理することを特徴とする歯周疾患検査又は診断用の免疫クロマトグラフィー用検査キットを提供することもできる。

【実施例】

【0022】

本発明の理解のために、以下に実施例を示して説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0023】

試験例1 唾液検体における陰イオン性界面活性剤の効果

本試験例は、検体として唾液を用いた際の陰イオン性界面活性剤の効果について確認することを目的に行なった。

【0024】

コロイド粒形が40nmの市販の金コロイド溶液(BBI社)0.1mLに、50mMリン酸緩衝液を0.9mL添加し、pHを9.0に調製した。一方、本発明に係るポルフィロモナス ジンジバリス(以下、「Pg」とする。)を特異的に認識するモノクローナル抗体は、「単クローン抗体実験マニュアル」(富山朔二・安藤民衛編, 講談社発行参照)等に示されたような細胞融合によるハイブリドーマの樹立に基づいて、常法により作製し、得られた抗Pgモノクローナル抗体を、蒸留水を用いて60μg/mLに調製した。金コロイド懸濁液に抗Pgモノクローナル抗体溶液を100μL添加し、攪拌後10分間静置した。次いで、1%PEG20000 55μLと10%BSA 110μLを添加し、10 10000rpmで15分間遠心処理し、上清を除去した。次いで1%BSAと0.1%PEG20000、0.1%アジ化ナトリウムを含む20mM TBS緩衝液(以下、「金コロイド保存バッファー」とする。)500μLで再懸濁し、再度10 10000rpmで15分間遠心処理した。再び上清を除去した後、金コロイド保存バッファーを100μL加え、懸濁し、金コロイド標識抗体とした。

【0025】

図1に示したような、ニトロセルロースメンブレン(millipore社、Hi-Flow Plus membrane, HF120, 25mm×5mm)からなる展開メンブレン3上の検出部(テストライン)4及び抗原抗体反応確認部(コントロールライン)5に、それぞれ0.5mg/mLの抗Pgモノクローナル抗体と0.25mg/mLの市販の抗マウスIgGポリクローナル抗(SIGMA社)体を直線状に塗布し、50で30分間インキュベートした。当該抗体固定化メンブレンを、0.5%BSAを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に30分間含浸し、次に0.5%スクロース及び0.05%コール酸ナトリウムを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)に60分間含浸後、抗体固相化メンブレンを取り出し、室温で一晩放置し乾燥した。

【0026】

金コロイド標識抗体10μLに蒸留水10μLと、5%スクロース及び0.05%PEG20000を含む20mM TBS緩衝液20μLを混合したものを、グラスファイバー(millipore社、8mm×5mm)に25μL塗布し、一晩真空乾燥してコンジュゲートパッド2とした。

【0027】

作製した抗体固相化メンブレン3及びコンジュゲートパッド2と、サンプルパッド1(millipore社、18mm×5mm)及び吸収パッド6(millipore社、20mm×5mm)を支持台紙7(millipore社、60mm×5mm)上に図1のように貼り合わせ、免疫クロマトグラフィー用ストリップとした。

【0028】

10mM Tris-HCl緩衝液、0.9%NaClを含有する溶液(pH7.4)に、ドデシル硫酸ナトリウムを0.05%になるように加え、これを検体処理液とした(実施例1)。さらに、上記ドデシル硫酸ナトリウムに換えて、デオキシコール酸ナトリウ

10

20

30

40

50

ムを加えたものを使用し（実施例 2）、その他として Triton X-100、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン（Tween 20）、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油（HCO-60）を加えたものを使用した（比較例 1～3）。また、上記ドデシル硫酸ナトリウムを加えなかったものも使用した（比較例 4）。

【0029】

健常者にガムベースを 5 分間咀嚼させ、分泌された刺激唾液を採取した。上記刺激唾液は、リアルタイム PCR 法により P g 細菌数が測定機器（Applied Biosystems 7500 Fast）の検出限界以下であることを確認し、その後、上記刺激唾液に 1000 分の 1 量の濃度既知の P g 懸濁液を添加し、107 個/mL としたものを陽性検体とし、上記刺激唾液そのままのものを陰性検体とした。それぞれの検体 20 μL を、上記検体処理液 180 μL に添加し、転倒混和して測定用試料とした。

10

【0030】

上記免疫クロマトグラフィー用ストリップに、測定用試料である陽性検体又は陰性検体を 100 μL 滴下し、測定用試料の移動を 30 分間確認した。各測定用試料の滴下後、コンジュゲートパッドに含浸された金コロイド標識抗体（赤紫色）の移動を目視で確認し、金コロイド標識抗体の移動が見られなかったものについて、目詰まりが発生するものとした。

【表 1】

	検体処理液	陽性検体	陰性検体
実施例 1	ドデシル硫酸ナトリウム	○	○
実施例 2	デオキシコール酸ナトリウム	○	○
比較例 1	Triton X-100	○	○
比較例 2	Tween 20	○	○
比較例 3	HCO-60	○	○
比較例 4	界面活性剤なし	×	×

20

(○：目詰まり不発生、×：目詰まり発生)

【0031】

上記のように目詰まりを確認した後、目詰まりが発生しなかった検体処理液を用いて上記免疫クロマトグラフィー用ストリップにおける検体の検出を調べた。具体的には上記と同様に、測定用試料である陽性検体又は陰性検体を 100 μL 滴下し、P g の検出を 30 分間調べた。上記測定用試料の滴下後、P g 検出部（テストライン）及び抗原抗体反応確認部（コントロールライン）について目視で判定を行い、反応が確認できた場合を「+」とし、反応が確認できなかった場合を「-」とした。

30

【0032】

その結果は表 2 の通りであり、ドデシル硫酸ナトリウムを検体処理液とした場合及びデオキシコール酸ナトリウムを検体処理液とした場合は、陽性検体は「+」と判定され、陰性検体は「-」と判定された。一方、その他の検体処理液については、全て陰性検体が「+」と判定され、正確に P g の判定を行うことができなかった。なお、コントロールラインはいずれも「+」と判定され、抗原抗体反応が行われていることは確認できた。

40

【表 2】

検体処理液		検体	テストライン	コントロール ライン
実施例 1	ドデシル硫酸 ナトリウム	陽性検体	+	+
		陰性検体	-	+
実施例 2	デオキシコール酸 ナトリウム	陽性検体	+	+
		陰性検体	-	+
比較例 1	T r i t o n X-100	陽性検体	+	+
		陰性検体	+	+
比較例 2	T w e e n 20	陽性検体	+	+
		陰性検体	+	+
比較例 3	H C O-60	陽性検体	+	+
		陰性検体	+	+

(+: 反応あり、 -: 反応なし)

## 【0033】

試験例 2 洗口吐出液検体における陰イオン性界面活性剤の効果

本試験例は、検体として洗口吐出液を用いた際の界面活性剤の効果について確認することを目的に行なった。

## 【0034】

試験例 1 に従って、免疫クロマトグラフィー用ストリップを作製した。

## 【0035】

10 mM T r i s - H C l 緩衝液、0.9% N a C l を含有する溶液 (pH7.4) に、ドデシル硫酸ナトリウムを 0.05% になるように加え、これを検体処理液とした (実施例 3)。さらに、上記ドデシル硫酸ナトリウムに換えて、デオキシコール酸ナトリウムを加えたものを使用し (実施例 4)、その他として T r i t o n X-100、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (T w e e n 20)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (H C O-60) を加えたものを使用した (比較例 5~7)。また、上記ドデシル硫酸ナトリウムを加えなかったものも使用した (比較例 8)。

## 【0036】

健常者に 15 mL の滅菌蒸留水で 10 秒間洗口させ、吐き出したものを洗口吐出液として採取した。上記洗口吐出液は、リアルタイム PCR 法により P g 細菌数が測定機器 (A p p l i e d B i o s y s t e m s 7500 F a s t) の検出限界以下であることを確認し、その後、上記洗口吐出液に 1000 分の 1 量の濃度既知の P g 懸濁液を添加し、107 個/mL となるように調製したものを陽性検体とし、上記洗口吐出液そのままのものを陰性検体とした。それぞれの検体 180 μL に、上記検体処理液 20 μL を添加し、転倒混和して測定用試料とした。

## 【0037】

試験例 1 と同様に、上記免疫クロマトグラフィー用ストリップに、測定用試料である陽性検体又は陰性検体を 100 μL 滴下し、測定用試料の移動を 30 分間確認した。各測定用試料の滴下後、コンジュゲートパッドに含浸された金コロイド標識抗体 (赤紫色) の移動を目視で確認し、金コロイド標識抗体の移動が見られなかったものについて、目詰まりが発生するものとした。

10

20

30

40

【表 3】

検体処理液		陽性検体	陰性検体
実施例 3	ドデシル硫酸ナトリウム	○	○
実施例 4	デオキシコール酸ナトリウム	○	○
比較例 5	T r i t o n X-100	○	○
比較例 6	T w e e n 20	○	○
比較例 7	H C O-60	×	×
比較例 8	界面活性剤なし	×	×

(○：目詰まり不発生、×：目詰まり発生)

10

## 【0038】

その結果は表 4 の通りであり、試験例 1 と同様にドデシル硫酸ナトリウムを検体処理液とした場合及びデオキシコール酸ナトリウムを検体処理液とした場合は、陽性検体は「+」と判定され、陰性検体は「-」と判定された。一方、その他の検体処理液については、全て陰性検体が「+」と判定され、正確に P g の判定を行うことができなかった。なお、コントロールラインはいずれも「+」と判定され、抗原抗体反応が行われていることは確認できた。

【表 4】

20

検体処理液		検体	テストライン	コントロールライン
実施例 3	ドデシル硫酸 ナトリウム	陽性検体	+	+
		陰性検体	-	+
実施例 4	デオキシコール酸 ナトリウム	陽性検体	+	+
		陰性検体	-	+
比較例 5	T r i t o n X-100	陽性検体	+	+
		陰性検体	+	+
比較例 6	T w e e n 20	陽性検体	+	+
		陰性検体	+	+

(+: 反応あり、-: 反応なし)

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0039】

【図 1】免疫クロマトグラフィー用ストリップの概略を示す図である。

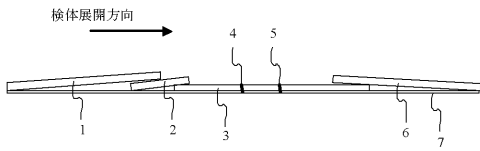
## 【符号の説明】

## 【0040】

40

- 1 サンプルパッド
- 2 コンジュゲートパッド
- 3 ニトロセルロースメンブレン
- 4 テストライン
- 5 コントロールライン
- 6 吸収パッド
- 7 支持台紙

【 図 1 】



专利名称(译)	通过免疫色谱法处理口腔中的标本的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009052945A</a>	公开(公告)日	2009-03-12
申请号	JP2007218170	申请日	2007-08-24
[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	桑野美幸 安田多贺子 西田美惠子		
发明人	桑野 美幸 安田 多贺子 西田 美惠子		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.521		
其他公开文献	JP5124211B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：通过免疫色谱法使用源自口腔的标本检查或诊断牙周病时，提供准确和简单地进行检查所需的口腔标本的治疗方法。

ŽSOLUTION：来源于口腔的标本通过允许阴离子表面活性剂，优选十二烷基硫酸钠或脱氧胆酸钠，对从口腔内收集的样本起作用，用于检查或诊断牙周病，如唾液，小鼠清洗排出液，牙龈缝隙渗滤液或牙菌斑。Ž

