



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0085751
(43) 공개일자 2025년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/02 (2006.01) G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 1/02 (2020.05)
G01N 1/4077 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2025-7012290
(22) 출원일자(국제) 2022년10월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2022/038170
(87) 국제공개번호 WO 2024/079839
국제공개일자 2024년04월18일

(71) 출원인
미츠마루 카가쿠 가부시카이가이사
일본국 989-1304 미야기켄 시바타군 무라타마치
오아자 무라타 아자 니시가오카 12반지 1
가부시카이가이사 다키노우세 단파쿠 켄큐쇼
일본국 981-0904 미야기켄 센다이시 아오바구 아
사히가오카 1쵸메 4-2

(72) 발명자
쿄미네 켄이치
일본 981-0905 미야기켄 센다이시 아오바구 고마
쓰시마 2-27-23
쿄미네 유미코
일본 981-0905 미야기켄 센다이시 아오바구 고마
쓰시마 2-27-23

(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

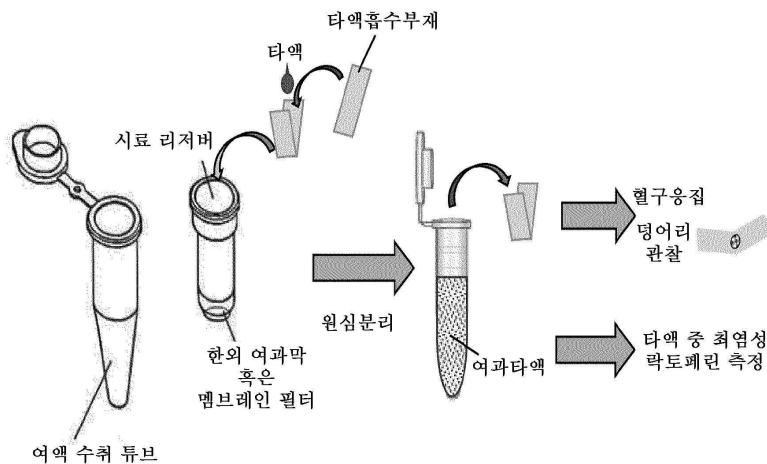
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **타액채취방법 및 타액채취부재 그리고 출혈유무의 판정방법 및 치주병의 진행상태를 판정하는 방법**

(57) 요약

본 발명은, 간편하고 비침습적으로 채취 가능한 타액채취부재를 발견하여, 어떠한 가공도 필요로 하지 않고 사용할 수 있으며, 타액채취 후의 채취부재를 원심분리하는 것만으로 타액 중 잠혈의 판정과, 타액 중 최염성 락토페린·폴리펩티드 농도를 측정하고, 사람 및 동물의 치주병의 병태 분류를 가능하게 하는 판정방법을 제공한다. 정량적으로 채취 가능한 부직포를 선택하여 사용함으로써, 타액을 비침습적으로 채취한다. 채취 후의 부직포를 여과기구에 세팅하여 원심분리를 행하고, 원심분리 후의 부직포 상에 잔존하는 혈액 성분을 눈으로 관찰하여 타액 잠혈을 검출한다. 또한, 더불어 원심분리 후의 액상 검체 중의 I-Lf 농도를 측정함으로써 치주병의 병태별로 분류하는 것을 가능하게 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/483 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2001/4088 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치주병 검사를 위한 타액채취방법으로, 타액을 정량적으로 흡수 가능한 부직포로 이루어지는 타액채취용 부재에 사람 또는 개나 고양이 등의 동물의 타액을 흡수시킴으로써 타액을 채취하는 타액채취방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 부직포는, JIS P8124:1998에 의한 평량 30~80g/m², 시트밀도 0.01~0.05g/cm³, KES법에 의한 압축작업량이 0.85~5.0gf · cm/cm², 습윤인장강도가 8N/100mm 이상인 부직포인 타액채취방법.

청구항 3

제 1 항에 기재된 타액채취방법에 의하여 타액채취 후, 타액을 포함하는 타액채취부재를 원심분리 여과필터에 장착하여 원심분리하고, 원심분리 후의 상기 타액채취부재 중에 보유하고 있는 혈구 성분을 관찰하는 출혈 유무의 판정방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서의 원심분리에서 얻어진 액상 중의 최염성 락토페린 · 폴리펩티드와 잠혈측정을 함께 측정함으로써, 치주병의 진행상태를 판정하는 방법.

청구항 5

치주병 검사를 위한 타액채취방법에 이용되는 타액채취부재로, 타액을 정량적으로 흡수 가능한 부직포로 이루어지는 타액채취용 부재.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 부직포는, JIS P8124:1998에 의한 평량 30~80g/m², 시트밀도 0.01~0.05g/cm³, KES법에 의한 압축작업량이 0.85~5.0gf · cm/cm², 습윤인장강도가 8N/100mm 이상인 부직포인 타액채취부재.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은, 타액채취방법 및 타액채취부재 그리고 출혈유무의 판정방법 및 치주병의 진행상태를 판정하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 사람 및 개 등의 애완동물에 있어서 치주병은, 심내막염이나 당뇨병 등 여러 갈래에 걸친 질환을 유발하는 중대한 생활습관병이다(비특허문헌 1, 치주병과 생활습관병의 관계. 재단법인 8020 추진재단편. 2005.). 그 때문에, 사람에게 있어서는 정기관리에 의하여, 도 1에 나타내는 바와 같은 프로브(탐침)라는 기구를 이용한 치주낭의 측정이나 출혈, 치주 조직의 발적 등의 검사가 행하여지고 있다. 하지만, 프로브를 이용한 환부의 검사시에는 통증을 수반하는 경우가 많이 있다.

[0003] 최근에는, 통증을 수반하지 않는 검사, 즉 비침습성 검사로서 치주 조직으로부터의 출혈에 수반되는 타액 중 잠혈의 측정이나 타액 중에 포함되는 혈액 성분의 측정이 행하여지고 있는데, 측정시에 회석을 해야 하는 수고나

측정에 시간이 걸린다는 문제가 있어, 아직 침투하고 있다고는 할 수 없다.

- [0004] 한편, 개 등의 동물에서는 윈트겐 검사나 치주낭의 측정을 하는 데에도 전신마취를 실시하지 않으면 할 수 없어, 애완동물 자체의 부담도 크다는 것과 입원이 필요해지기 때문에 의료비도 고액이 된다는 과제가 있다(비특허문헌 2, 가정사육동물(개·고양이)의 진료요금 실태조사 및 사육자 의식조사 조사결과. (평성 27년도), 일본수의사회편. 2015.).
- [0005] 또한, 타액을 이용한 검사로서 원인균의 배양이나 유전자 검사도 행하여지기 시작하고 있는데, 간편하게 누구라도 할 수 있는 타액검사방법은 확립되어 있지 않다.
- [0006] 치주병은, 치주 조직의 위치가 내려가 있지 않은지 관찰함으로써, 또한 치주낭의 깊이를 프로브에 의하여 측정함으로써, 더욱이 치주병에 의한 출혈이나 고름의 유무를 측정함으로써 판정하고 있다. 판정은, 플라크 지수의 평가에 의한 OHI(Oral Hygiene Index)(비특허문헌 3, J. Amer. Dent. Ass. 61: 172- 179, 1960.), PLI(Plaque Index)(비특허문헌 4, Acta. Odont. Scand. 22: 121-135, 1964.)나 치은의 염증을 평가하는 GI(Gingival Index)(비특허문헌 5, Acta. Odont. Scand. 21: 533-551, 1963.) 등의 판정방법을 이용하여 치과 현장에서 행하여지고 있다.
- [0007] 상술한 방법은, 검사비용도 높아지는 동시에 병든 가축의 부담도 커져, 치주병의 병태 판정에 유효하며 저렴하게 행할 수 있는 비침습성 검사방법의 제공이 요구되고 있다.
- [0008] 더욱이, 이러한 판정방법은, 모든 치아를 대상으로 행하기 때문에 시간이 걸리는 판정방법으로, 숙련된 기술이 필요한 판정방법이며, 그리고 치주병에 의한 치은 조직의 염증 부위에서는 통증 검사로서 타액을 이용한 판정방법이 도입되기 시작하고 있다.
- [0009] 비침습성 판정방법으로서 도입되고 있는 것으로는, 다음의 기술이 실시되고 있다.
- [0010] 타액잠혈 검출키트(특허문헌 1: 일본특허공보 제4590581호, 비특허문헌 6: 일본치주병학회지 43(4): 416423, 2001).
- [0011] 변잠혈 검출키트(비특허문헌 7: 타액검사 표준화에 관한 연구 8020 추진재단 지정연구사업보고서. 2012).
- [0012] 젯산탈수소효소를 측정하는 방법(특허문헌 2: 일본공개특허공보 2010-130924호, 비특허문헌 8: 일본치주병학회지 44(3): 261-272, 2002).
- [0013] 하지만, 면역크로마토그래피법에 의한 타액잠혈 검출키트에서는 무당검 등을 이용하여 타액 1mL 이상을 종이컵 등에 토출하고, 뮤신 등의 멤브레인 상의 전개를 저해하는 물질의 영향을 억제하기 위하여 물로 5배로 희석하거나, 3mL의 물로 10초간 행군 후의 토출액으로 만들 필요가 있다(비특허문헌 9: 페리오스크린 '선스타' 첨부문서, 2017.).
- [0014] 한편, 변잠혈 검출키트를 이용한 타액잠혈검사에서는, 면역크로마토그래피에 의한 키트와 마찬가지로 타액을 채취하여 측정하는데, 고액의 자동분석장치를 구비한 외부의 검사기관에서 행하여야만 한다(비특허문헌 10: 변잠혈 키트 OC-헤모디아어오트 III '에이켄' 첨부문서, 2021.).
- [0015] 그 밖에 타액 중에 포함되는 치주병 원인균을 검출하여 판정하는 통상의 세균검사법이나 유전자 검사인 Polymerase Chain Reaction(PCR)법에 의한 방법도 행하여지며, 전용 기기를 구비한 외부의 검사기관에서 행하여지고 있다(비특허문헌 11: GCCIRCLE. 141: 2012-2016. 2012. 특허문헌 3: 일본공개특허공보 2017-85944호.).
- [0016] 조기 치주병에서는 자각증상이 나타나기 어렵기 때문에, 이러한 검사는 초기보다 프로브를 사용하였을 때에 명확하게 출혈이 인정된 경우나 구취가 신경쓰이기 시작한다는 등의 자각증상이 이미 나타나고 있는 중등도 이상의 환자가 대상으로 되고 있다.
- [0017] 한편, 개 등의 동물에서는 일반적으로 치주병 검사시에 전신마취를 실시하여 행하여지고 있다(비특허문헌 13: 개의 치주병에 대하여(진단법) | 포켓펫즈닥터즈(POKET PETS DOCTORS), <https://pocketpetsdoctors.com/?p=134> 2021.).
- [0018] 우리들은 이미, '최염성 락토펜·폴리펩티드(I-Lf)'가 치주병 환자의 타액 중에 나타나는 것을 보고하였고(비특허문헌 12: Mol. Immunol. 44: 1498-1508. 2007. 특허문헌 4: 일본특허공보 제4029988호), 프로브를 사용하지 않고 조기 치주병 환자의 발견에 유효성이 인정되는 것을 면역효소항체(ELISA)법에 의하여 나타내었다.
- [0019] I-Lf의 측정과 마찬가지로, 조기 치주병 발견에는 타액 중의 출혈을 판정하는 타액잠혈의 측정이 상기와 같이

행하여지고 있다. 그 중에서, 부직포를 이용한 타액잠혈의 측정에 대하여도 보고가 되어 있고(특허문헌 6: 일본 특허공보 제2860660호), 부직포 중에 용혈 성분이나 각종 약제를 침지한 후에 건조시키고, 폴리염화비닐 등의 지지체에 점착하여 색도에 의하여 판정하고 있다. 보다 상세하게 서술하면, 특허문헌 6에서는, 혈액 중에 존재하는 보혈분자족의 존재로 색변화를 수반하여 산화되는 지시약, 그 지시약을 산화하는 데에 유효한 산화제, pH를 4-7의 범위로 유지하는 완충제, 감도를 높이기 위한 활력제, 및 사포닌을 종이, 셀룰로오스, 화학섬유, 합성수지제 직포 및 부직포로부터 선택되는 흡수성 담체에 함침시키고 있다.

[0020] 부직포로서 특허문헌 7에 기재된 부직포가 알려져 있다. 이러한 부직포는, JIS P8124: 1998에 의한 평량 30~80g/m², 시트밀도 0.01~0.05g/cm³, KES법에 의한 압축작업량이 0.85~5.0gf·cm/cm², 습윤인장강도가 8N/100mm 이상인 부직포이다. 단, 그 용도는 쿠킹페이퍼이며, 그 이외의 용도에 대한 개시는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0021] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본특허공보 제4590581호
 (특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본공개특허공보2010-130924호
 (특허문헌 0003) 특허문헌 3: 일본공개특허공보2017-85944호
 (특허문헌 0004) 특허문헌 4: 일본특허공보 제4029988호
 (특허문헌 0005) 특허문헌 5: 일본특허공보 제4627263호
 (특허문헌 0006) 특허문헌 6: 일본특허공보 제2860660호
 (특허문헌 0007) 특허문헌 7: 일본특허공보 제6259365호

비특허문헌

[0022] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: 치주병과 생활습관병의 관계. 재단법인 8020 추진재단편. 2005.
 (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: 가정사육동물(개·고양이)의 진료요금 실태조사 및 사육자 의식조사 조사결과(평성 27년도), 일본수의사회편. 2015. (<http://nichiju.lin.gr.jp/small/ryokin.html>)
 (비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: J. Amer. Dent. Ass. 61: 172- 179, 1960.
 (비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Acta. Odont. Scand. 22: 121-135, 1964.
 (비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Acta. Odont. Scand., 21: 533-551, 1963.
 (비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: 일본치주병학회지 43(4): 416-423, 2001.
 (비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: 타액검사 표준화에 관한 연구 8020 추진재단 지정연구사업보고서 2012.
 (비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: 일본치주병학회지 44(3): 261-272, 2002.
 (비특허문헌 0009) 비특허문헌 9: 페리오스크린 '선스타' 첨부문서, 2017.
 (비특허문헌 0010) 비특허문헌 10: GCCIRCLE. 141: 2012-2016. 2012.
 (비특허문헌 0011) 비특허문헌 11: Mol. Immunol. 44: 1498-1508. 2007.
 (비특허문헌 0012) 비특허문헌 12: 변잠혈 키트 OC-헤모디어오토III '에이켄' 첨부문서, 2021.
 (비특허문헌 0013) 비특허문헌 13: 개의 치주병에 대하여(진단법) | 포켓펫즈닥터즈(POCKET PETS DOCTORS) <https://pocketpetsdoctors.com/?p=134> 2021.
 (비특허문헌 0014) 비특허문헌 14: J. Clin. Pathol 31: 139-143 1978.

(비특허문헌 0015) 비특허문헌 15: Clin. Chim. Acta. 136. 95-104. 1984.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0023] 본 발명에서는, 타액 중의 I-Lf를 정량화하기 위하여, 채취시에 사용하는 부직포가 타액을 정량적으로 채취할 수 있는 것으로 선정하고, 측정하는 방법을 확립한다는 과제가 있다. 또한, 채취시에도, 환자나 애완동물 등의 병든 가축에게 고통을 주지 않는 비침습적인 방법일 필요가 있다. 특히, 애완동물 등에서는 현재 구강 내를 관찰할 때에 전신마취를 실시할 필요가 있는데, 마취가 필요 없는 채취방법을 확립한다는 과제가 있다.
- [0024] 비침습성의 타액채취방법으로는 구강 내에 포함하여 채취부재에 포함시키거나, 또는 토출하여 채취하는 방법 등에서의 사용을 상정하고, 생체에 사용하여도 안전하고 타액잡혈의 측정도 가능한 타액채취부재로서도 검토가 되고 있는 부직포를 선정한다. 부직포는 특수한 가공법이 아니라 일반적으로 입수하기 쉬운 것을 이용하여, 타액 흡수 후의 부직포에 의한 간편하고 신속한 타액잡혈의 판정을 행할 수 있는 방법의 검토를 행하는 것으로 하였다. 화학적 검사방법으로서 오르토폴리딘법과 구아약(Guajac)법이 변잡혈 등에서는 일상검사로서, 일부 타액잡혈 검사에도 이용되고 있다.
- [0025] 또한, 하부소화관이나 대장출혈 및 타액잡혈(비특허문헌 9: 페리오스크린 '선스타' 첨부문서, 2017.)에서는 항원항체반응을 이용한 면역학적 방법이 이용되고 있다.
- [0026] 특허문헌 6에서는, 부직포 중에 용혈 성분이나 각종 약제를 침지한 후 건조시키고, 폴리염화비닐 등의 지지체에 점착하여 색도에 의하여 판정하고 있는데, 번잡한 작업과 재료를 필요로 한다. 또한, 부직포의 상세는 개시되어 있지 않는데, 시판 부직포를 사용한 경우에는, 판정에 필요한 타액량의 흡수가 이루어지지 않고, 그 때문에 안정적인 판정을 행할 수 없다. 본 발명자는, 안정적인 판정을 행할 수 없는 원인을 더욱 탐구한 결과, 그 원인은 흡수량의 편차에 있는 것을 발견하였다. 본 발명에서는, 흡수량을 일정하게 제어하는 것이 가능한 부직포를 탐구한 바, 특허문헌 7에 기재된 부직포는 타액 흡수량이 큰 동시에 편차가 작은 것을 발견하였다. 또한, 점성이 높은 식용유 등의 여과에도 이용되며, 협잡물의 보유능력도 높으므로, 타액을 흡수한 부직포를 원심여과 멸균필터나 원심환의 여과필터에 장착함으로써, 타액 중 잡헌혈을 검출하는 것이 가능해진다는 식견을 얻었다.
- [0027] 타액잡혈측정, I-Lf 및 원인균 등의 현행 보고되어 있는 측정법에서는, 타액검체에 의하여 치주병의 병태를 분류하는 검사방법은 확립되어 있지 않다. 그 때문에, 치주병의 발견에 유효하고 타액 중의 판정지표이기도 한 I-Lf 농도와 타액잡혈의 양쪽을 지표로써 치주병태 분류를 가능하게 하는 판정방법을 확립하여 과제의 해결을 도모하기로 한다.
- [0028] 본 발명은, 사람에서는 간편하게 치주병 검사를 위한 타액을, 그리고 개나 고양이 등의 동물에서도 마취 없이 간편하게 행할 수 있는 타액채취방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0029] 본 발명은, 간편하고, 비침습적이며, 어떠한 가공도 필요로 하지 않고 사용할 수 있으며, 번잡한 작업과 재료를 필요로 하지 않고, 원심분리하는 것만으로 타액 중 잡혈의 판정과, 타액 중 최염성 락토펜린·폴리펩티드 농도를 편차가 적고 안정적으로 측정하는 것이 가능한 타액채취방법 및 타액채취부재 그리고 출혈 유무의 판정방법 및 치주병의 진행상태를 판정하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0030] 본 발명은, 치주병의 진행상태에 대하여 타액을 검체로 함으로써 간편하고 또한 단시간에 판정하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 하는 동시에, 비침습성으로 사람에서는 프로브에 의한 고통을 수반하지 않고 행할 수 있고, 애완동물 등에서도 마취에 의한 처치를 실시할 필요가 없는 타액채취방법을 사람에서는 본인, 동물에서는 그 주인도 치주병을 판정할 수 있는 타액채취방법을 제공하는 것을 목적으로 하고 있다.

과제의 해결 수단

- [0031] 본 발명은, 치주병 검사를 위한 타액채취방법으로, 타액을 정량적으로 흡수 가능한 부직포로 이루어지는 타액채취용 부재에 사람 또는 개나 고양이 등의 동물의 타액을 흡수시킴으로써 타액을 채취하는 타액채취방법이다.
- [0032] 상기 부직포는, JIS P8124:1998에 의한 평량 $30\sim 80\text{g/m}^2$, 시트농도 $0.01\sim 0.05\text{g/cm}^3$, KES법에 의한 압축작업량이 $0.85\sim 5.0\text{gf}\cdot\text{cm/cm}^2$, 습윤인장강도가 $8\text{N}/100\text{mm}$ 이상인 부직포인 것이 바람직하다.

- [0033] 본 발명은, 상기 타액채취방법에 의하여 타액채취 후, 타액을 포함하는 타액채취부재를 원심분리 여과필터에 장착하여 원심분리하고, 원심분리 후의 상기 타액채취부재 중에 보유되어 있는 혈구 성분을 관찰하는 출혈 유무의 판정방법이다.
- [0034] 본 발명은, 상기에 있어서의 원심분리에서 얻어진 액상 중의 최염성 락토페린·폴리펩티드와 잠혈 측정을 함께 측정함으로써, 치주병의 진행상태를 판정하는 방법이다.
- [0035] 본 발명은, 치주병 검사를 위한 타액채취방법에 이용되는 타액채취부재로, 타액을 정량적으로 흡수 가능한 부직포로 이루어지는 타액채취용 부재이다.
- [0036] 상기 부직포는, JIS P8124:1998에 의한 평량 30~80g/m², 시트농도 0.01~0.05g/cm³, KES법에 의한 압축작업량이 0.85~5.0gf·cm/cm², 습윤인장강도가 8N/100mm 이상인 부직포인 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0037] 본 발명의 효과를, 본 발명을 이루었을 때에 얻은 식견 등과 함께 설명한다.
- [0038] 본 발명자는, 특허문헌 7에 기재된 부직포가, I-Lf 농도와 타액잠혈을 지표로 하는 치주병의 판정을 행하기 위하여 필요한, (1) 단위체적당 타액흡수량이 크다는 특성을 가지고, 또한, (2) 단위체적당 타액흡수량의 편차(나아가서는 전체 타액흡수량의 편차)가 매우 적다는 특성을 가지고 있는 것을 발견한 것이다. 이러한 특성의 발견에 근거하여, I-Lf 농도에 의한 치주병의 판정에 이용하는 타액채취부재라고 하는 용도를 개발한 것에 근거하여 이루어진 것이다.
- [0039] 타액의 채취에는 에어레이드법에 의하여 작성된 오지키노크로스 주식회사 제품의 부직포(상품명 '리드')를 이용한다. 해당 부직포는 다른 방법으로 작성되는 부직포보다 습윤인장강도가 강하고, 원심 등 물리적 처리로도 찢어지기 어려워 중잇조각의 탈락이 적은 특성을 가지고 있다.
- [0040] I-Lf의 면역비탁법에 의한 측정에서는 측정값의 신뢰를 높이기 위하여 2~3회의 반복 측정이 필요해진다. 그 때문에, 검체량은 2회 측정으로 하여서 40 μL가 필요해진다. 더욱이, 면역비탁법으로 희석하여 재측정을 행하는 경우를 고려하여, 검체량이 60 μL 이상 채취 가능한 것이 필요하다. 본 발명에서는 상기 부직포를 사용하는 원심여과필터의 리저버(reservoir)에 장착 가능해지는 체적 84mm³이 되도록 절단하고, 체액 중에서도 점성이 높은 타액 100 μL를 99.5±0.5 μL로 정량적으로 흡수하는 것을 확인할 수 있었다(표 1).

표 1

[0041]

A		B		C	
84mm ³	168mm ³	84mm ³	168mm ³	84mm ³	168mm ³
100±0.5 μL	200±0.65 μL	40.2±64.2 μL	61.1±139.3 μL	35.3±65.6 μL	56.1±145.7 μL

- [0042] 타액첨가량: 84mm³ 100 μL, 168mm³ 200 μL반복시험횟수: 11회
- [0043] A: 오지키노크로스사 제품의 부직포, B: B사 제품의 부직포, C: C사 제품의 부직포
- [0044] 하단: 흡수량+표준편차
- [0045] 특허문헌 7에 나타난 바와 같이, 목재펄프를 원료로 하여 작성되는데, 코튼, 레이온 등의 천연섬유나 폴리에스테르, 폴리프로필렌 등의 합성섬유 등에서도 점성이 높은 유분에서도 흡수 가능한 해당 쿠킹페이퍼와 동등한 성능을 가지는 것이라면 사용이 가능하다. 그 때문에, 상기 소재로 작성된 부직포를 채취타액량에 맞춰서 조정하고, 비침습적으로 검사 필요량의 타액을 간편하고 신속하게 채취하는 것을 특징으로 한다.
- [0046] 또한, 채취한 타액은, 잡균 등의 영향을 제거하기 위하여 0.2 μm 또는 0.45 μm의 포어사이즈(pore size)인 멤브레인 필터나 측정 지표가 되는 타액 성분의 분자량에 맞춘 한외여과막을 장착한 원심분리 여과필터 혹은 유사한 기능을 가지는 원심여과기구에 세팅하고, 여과기구의 규격에 적합한 1,000~3,000G(원심력)로 5~15분 정도 원심분리한다. 원심분리 후의 액상 중에 포함되는 치주병의 판정 지표가 되는 I-Lf를 항원항체반응이나 효소반응, 화학적 정색반응 등으로 측정할 수 있다. 한편, 타액채취제에 잔존하는 타액 중 잠혈은 원심분리 후, 부직포 상에 출혈의 유무를 눈으로 확인할 수 있었다. 지금까지 부직포에 발색제 등의 첨가 등의 가공이 필요하였는데,

본 발명에서는 그러한 가공을 필요로 하지 않고 여과멸균필터에 장착하며, 원심분리만으로 간편하게 판정할 수 있는 방법인 것이 나타났다. 해당 부직포의 원심여과기구로의 장착방법은 도 2에 나타난 바와 같으며, V자 또는 U자형으로 구부러 기구 내에 장착함으로써 여과필터 바닥부에 접촉하는 부직포에 혈구 성분이 집적하여, 눈으로의 확인이 가능해지는 것을 특징으로 한다. 해당 부직포와는 다른 방법으로 작성된 부직포에서는, 흡수한 타액량은 2배 이상 타액보유량이 다르고, 또한 보유량의 편차도 100배 이상 다르며, 측정에 필요 충분한 타액 검체를 안정적으로 수집할 수 없다는 것이 판명되었다. 그 때문에, 본 측정법에 있어서 해당 부직포의 사용이 매우 유효한 타액채취부재가 되는 것이 나타났다.

[0047] 더욱이, 보다 미량의 출혈을 정량적으로 확인하기에는, 원심 후의 부직포 중에 포함되는 혈액 성분을 각 측정법에 적합한 완충액 중에 분산시키고, 국제표준법인 시안메트헤모글로빈법(비특허문헌 14: J. Clin. Pathol. 31. 139-143. 1978.)이나 Triton/NaOH법(비특허문헌 15: Clin. Chim. Acta. 136. 95-104. 1984.) 등으로 흡광도를 측정하여 정량하는 것도 가능한 방법을 확립하였다.

[0048] 본 발명에 따르면, 사람에서는 간편하게 치주병 검사를 위한 타액을, 그리고 개나 고양이 등의 동물에서도 마취 없이 간편하게 행할 수 있는 타액채취방법을 제공할 수 있다.

[0049] 본 발명에 따르면, 간편하고, 비침습적이며, 어떠한 가공도 필요로 하지 않고 사용할 수 있으며, 번잡한 작업과 재료를 필요로 하지 않고, 원심분리하는 것만으로 타액 중 잠혈의 판정과, 타액 중 최염성 락토펙틴·폴리펩티드 농도를 편차가 적고 안정적으로 측정하는 것이 가능한 타액채취방법 및 타액채취부재 그리고 출혈 유무의 판정방법 및 치주병의 진행상태를 판정하는 방법을 제공할 수 있다.

[0050] 해당 부직포의 타액흡수량의 검토결과를 표 1에 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은, 타액 검체의 처리방법과 측정까지의 흐름도이다.

도 2는, 면역비탁법에 의한 검량선 작성예이다.

도 3은, 치주병을 이환한 병든 개(개)의 타액 검체의 병상에 의한 I-Lf 농도이다.

도 4는, 치주병을 이환한 환자의 타액 검체의 병상에 의한 I-Lf 농도이다.

도 5는, 본 발명에 있어서 사용한 부직포를 이용한 타액 중 잠혈 관찰 감도시험이다.

도 6은, 치주병을 이환한 개의 출혈 검체를 나타내는 외관사진이다.

도 7은, 프로브를 이용한 치주병 진단의 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 본 발명은, 치주병을 이환한 사람이나 동물의 타액으로부터 타액 중에 포함되는 극조기의 치주병 판정의 마커가 되는 I-Lf와 치주병의 진행에 수반되는 출혈에 의하여 타액 중에 증가하는 출혈의 유무를 동시에 측정하고, 치주병의 진행 상황을 판정하는 것이다.

[0053] 본 시험에 있어서는 타액흡수부재로서, 오지키노크로스 주식회사의 부직포(제품명 '리드')를 100 μ L의 사람 및 개의 타액을 각각 흡수하도록 체적이 84mm³인 사이즈로 미리 절단하고, 환자 및 병든 개로부터 타액을 채취하였다. 한편, 상기 사이즈로 한정되는 것은 아니며, 100 μ L의 검체의 흡수가 가능한 사이즈라면 된다. 그러한 관점으로부터, 80~90mm³가 바람직하고, 82~86mm³가 보다 바람직하다.

[0054] 그리고, 이러한 타액흡수완료 부직포를 포어사이즈 0.2 μ m의 멤브레인 필터를 장착한 시판의 원심분리 여과필터에 구부러서 설치하고, 2,000G로 5분간 원심분리하였다. 그리고, 원심분리 후의 부직포를 백지의 아크릴판 등의 위에 놓고 혈구성분의 유무를 눈으로 관찰하여 판정하였다.

[0055] 다음으로, 원심분리 후의 여액에 대하여는, I-Lf를 항I-Lf 토끼 혈청으로부터 작성한 어피니티 항체를 이용하여, 단시간에서의 측정이 가능한 면역비탁법에 의하여 측정하였다. 측정에는, 폴리에틸렌글리콜 8000을 4.5% 포함하는 트리스염산 완충액(pH7.2)을 반응완충액으로서 이용하고, 마이크로플레이트(MICROLON 762070, greiner bio-one)의 웰에 120 μ L씩 분주(分注)하여 37 $^{\circ}$ C로 보온해 두었다. 이어서, I-Lf 어피니티 항체를 1mg/mL로 트리스염산 완충액으로 조정하고, 각 웰에 15 μ L 분주하여 플레이트믹서로 혼합한 후, 원심분리 후의

타액 검체를 20 μ L 첨가하여 다시 혼합하고 37°C의 항온조 내에서 8분간 반응시켰다. 반응 종료 후, 면역 복합체를 재부유시키기 위하여 플레이트믹서로 다시 혼합하여 540nm로 흡광도를 측정하고 타액 중 I-Lf 농도를 구하였다. 한편, 타액 중 잠혈이 인정되어 측정범위를 초과한다고 생각되는 것에 대하여는, 트리스염산 완충액으로 희석하여 다시 측정하였다.

[0056] 개의 타액에서는 경도~중등도에서 $8.89 \pm 5.25 \mu\text{g/ml}$ 의 값이었는데, 중증으로 판정된 그룹에서는 $21.21 \pm 11.26 \mu\text{g/ml}$ 로 보다 높은 값이었다. 하지만, 중증 및 경도~중등도의 그룹은 각각 편차가 크고, I-Lf의 측정만으로는 각각의 증상에 딱맞춰 분류하는 것은 어렵다는 결과였다. 한편, 측정시간은 종래 행하여지고 있던 면역효소항체법(ELISA법)의 측정시간인 약 2시간에 대하여, 측정 개시부터 결과를 얻기까지의 시간을 5~10분으로 대폭 단축할 수 있었다.

[0057] 한편, 사람의 타액 검체에서는, GI값에 의한 판정으로 중증 환자가 된 환자의 타액에서는 $62.2 \pm 10.3 \mu\text{g/ml}$ 로 높은 값이었는데, 중등도 환자의 타액($31.0 \pm 8.3 \mu\text{g/ml}$), 그리고 경도 환자의 타액($8.4 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$)으로 증상이 가벼운 환자의 타액 정도로 낮아져 있었다.

[0058] 이 결과는, 사람 쪽이 치주병에 의한 I-Lf의 농도 변화가 개에 비하여 예민하게 변동하고 있어, 개에 비하여 분류하기 쉽다는 것을 시사하고 있다. 또한, 사람에서는, 구강 내의 위생환경을 유지하기 위한 양치나 가글액, 치간 칫솔 등 다양한 자기관리 대책이 이루어지고 있으므로, 치태나 치석의 침착 등이 억제되고 있기 때문에 병태에 의한 개체차가 적은 것으로 짐작된다. 그에 대하여, 개의 경우에는 구강 내의 위생환경 유지에 대하여 양치 등의 관리방법이나 의식에 차이가 있어, 구강 내 위생환경의 개체차가 커서, I-Lf의 값에 편차가 큰 것으로도 짐작되었다.

[0059] 타액 중 잠혈의 측정에 있어서, 비용혈 성분인 적혈구는 비교적 큰 입자직경인 것에 대하여, 용혈 성분인 헤모글로빈 등은 눈으로 관찰하는 것이 어렵다. 그 때문에, 시판 헤모글로빈(SIGMA사, Cat. No.H7379-5G)을 인산생리완충액에 용해하고, 1mg/mL에서 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 까지 단계 희석한 용액을 이용하여 헤모글로빈의 측정 감도를 검토하였다. 각각의 농도의 헤모글로빈 용액을 부직포에 포함시키고, 0.45 μm 의 멤브레인 필터를 장착한 시판의 원심분리 여과필터를 이용하여 2,000G로 15분간 원심분리하고, 액체 검체를 분리한 후에 취출하여 눈으로 관찰하였다. 그 결과, 본 측정법에서는 1 $\mu\text{g/mL}$ ~1mg/mL까지 눈에 의한 확인이 가능하였다. 한편, 이미 시판되고 있는 면역크로마토그래피법에 의한 사람 타액 잠혈 검출키트의 측정 감도가 2 $\mu\text{g/mL}$ ~500(미만) $\mu\text{g/mL}$ (비특허문헌, 페리오스크린 '선스타' 첨부문서, 2017.)으로, 본 발명의 방법과 거의 같은 정도인 것이 시사되었다.

[0060] 그 결과를 도 5에 나타낸다.

[0061] 상기 결과를 근거로 타액 중 잠혈의 관찰을 개의 타액에 대하여 행한 바, 치주병의 병태의 악화에 수반하여, 타액 중 잠혈 검출률은 치주병이 경도인 검체에서는 검출되지 않았지만, 중등도에서 88%, 중증에서 100%로 증가하고 있었다. 더욱이, 구강 내의 탈락상피조직에 대하여도 병태의 악화에 따라서 경도에서는 검출되지 않았지만, 중등도에서 12%, 그리고 중증에서 80%로 검출률이 증가하고 있었다.

[0062] 치주병의 진행상황을 확인하는 데에 타액 중 잠혈의 관찰은 유효하긴 하지만, 경도에서는 잠혈의 관찰만으로는 치주병의 검출이 어렵고, I-Lf와 조합함으로써 효율적으로 치주병의 진행상태를 정확하게 판단할 수 있다는 것이 시사되었다.

[0063] 그 결과를 표 2에 나타낸다. 즉, 표 2는, 치주병을 이환한 개의 타액의 타액 중 잠혈 및 탈락상피의 측정결과이다. 한편, 그 출혈 검체를 도 6에 나타낸다.

표 2

[0064]

	출혈		탈락상피조직	
	없음	있음	없음	있음
경도	100%	0%	100%	0%
중등도	12%	88%	88%	12%
중증	0%	100%	20%	80%

[0065] 경도: 검체수 6 중등도: 검체수 11 중증: 검체수 12

[0066] 어떠한 가공도 필요로 하지 않고, 부직포를 원심처리하는 것만으로 타액 중 잠혈을 판정할 수 있음으로써, 동시에 타액 중 잠혈과 타액 중 I-Lf 농도의 2항목을 측정할 수 있어, 치주병의 병태를 보다 정확하게 판정할 수 있

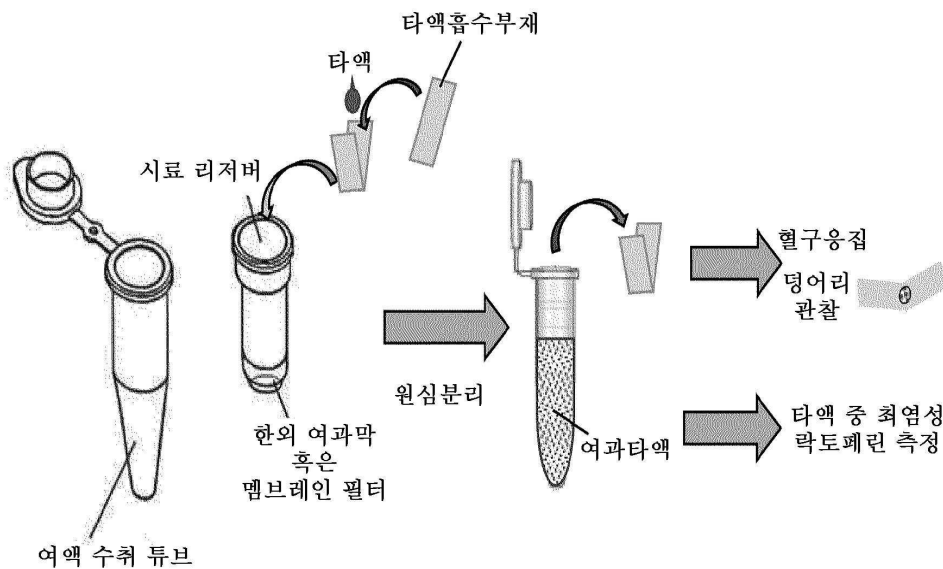
는 것과 판정시간을 비약적으로 단축하는 것이 가능해졌다.

[0067] 또한, 본 방법에서는 I-Lf 이외에도 치주병의 판정에 유효한 항목의 측정에 응용할 수 있다. 타액채취 후의 부직포는, 여과막을 투과하지 않는 세균이 농축된 상태로 포함되어 있으므로, 미량의 멸균완충액에 현탁시켜 농축검체로서 유전자 검사나 세균 배양에 사용할 수 있다. 또한, 액상부분은 면역글로불린이나 그 밖의 단백질, 무기질, 효소 등 다방면에서의 측정에 이용 가능하다. 그 때문에, 사람 및 동물의 일반검진에 있어서의 치주병의 일차 스크리닝이나 구강 내 위생 및 건강검진 등 폭넓은 분야에서의 응용이 가능한 방법이다.

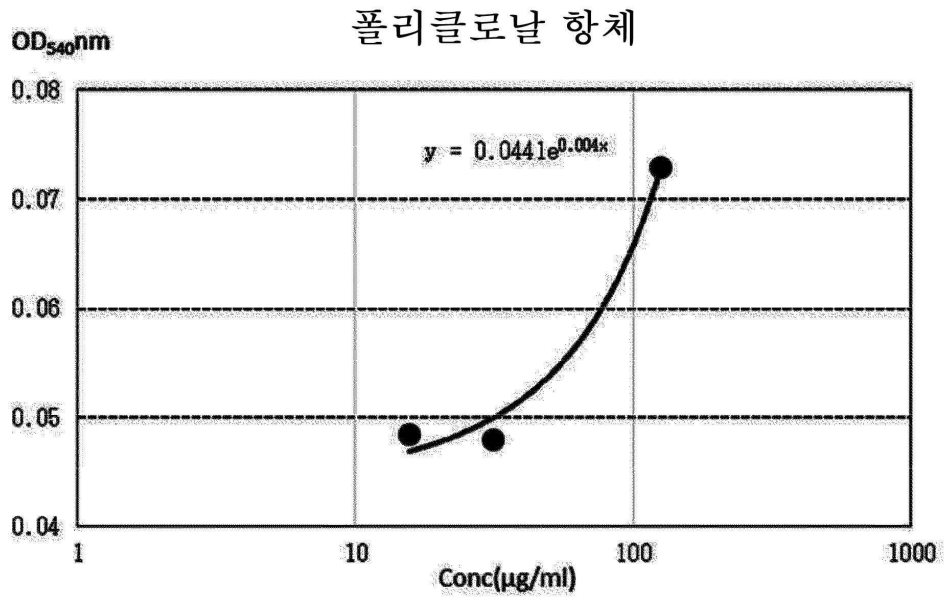
[0068] 개 등의 애완동물에 있어서는 상세한 검사를 행하기 위하여는 전신마취가 필요해지므로, 사람에 비하여 치주병의 판정이 곤란한 것과, 발견이 늦어지는 경향이 있다. 그 때문에 중증화되고 나서 발견되는 경우가 많아, 본 발명과 같이 비침습성의 검사방법에 의하여 치주병이 검출 가능함으로써, 조기에 치료를 개시할 수 있다. 더욱이, 전신마취에 의한 애완동물의 부담을 저감하는 동시에 애완동물의 고액 의료비의 저감에도 이바지하는 것이다.

도면

도면1

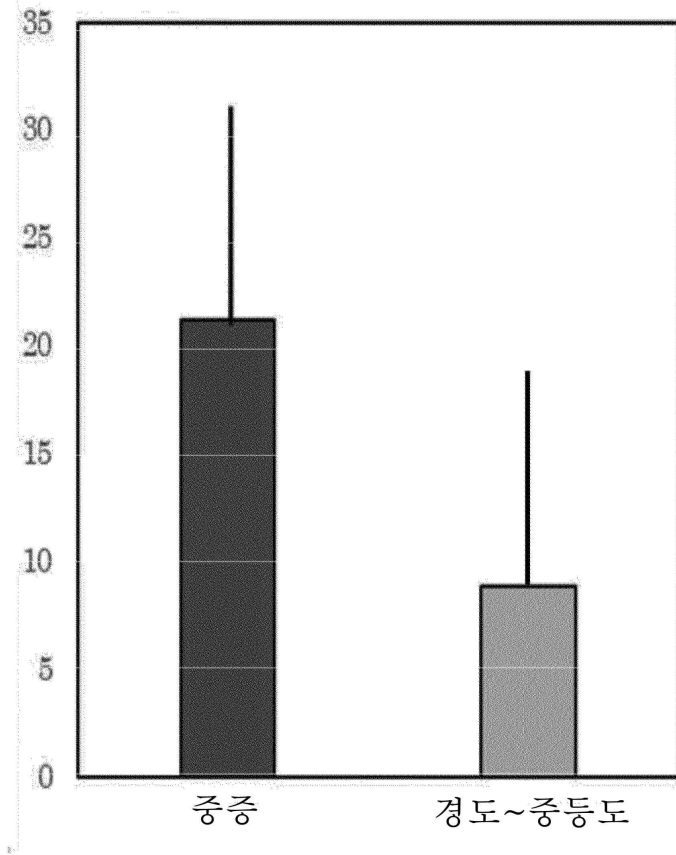


도면2



도면3

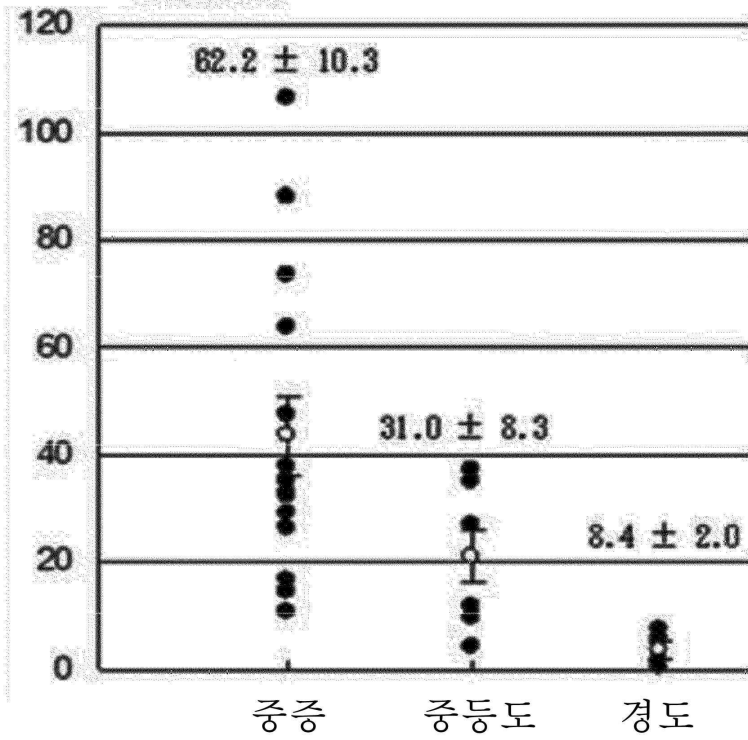
I-Lf 농도 ($\mu\text{g/ml}$)



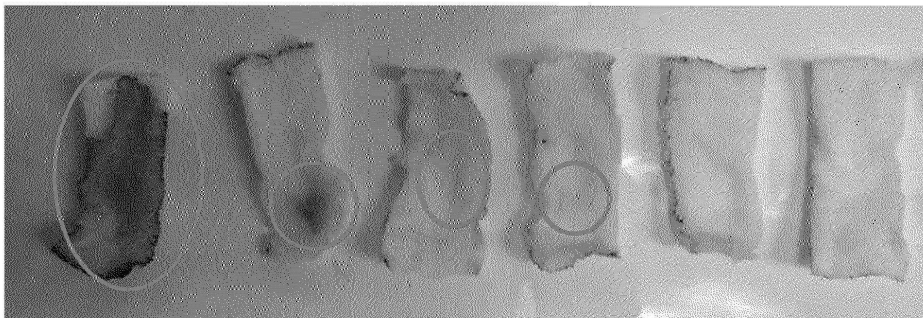
중증: 검체수 12 경도~중등도: 검체수 17

도면4

I-Lf농도 ($\mu\text{g/ml}$)



도면5



1mg/mL 100 $\mu\text{g/mL}$ 10 $\mu\text{g/mL}$ 1 $\mu\text{g/mL}$ 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 0.01 $\mu\text{g/mL}$

