

全、福祉および利益を最大限に優先した。大阪歯科大学医の倫理委員会に実施計画書（資料1）、説明文書（資料2）を提出し実施の承認を得た（受付番号11）。承認済みの説明文書をもとに対象者にインフォームドコンセントによる内容説明を行い、参加への同意を得た。

2) 歯垢の評価法：QLF法（Inspektor Research Systems、オランダ）により、蛍光が観察された歯垢の画像をデジタル画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェア（Inspektor Pro; Inspektor Research Systems、オランダ）にて、蛍光が観察された面積（Area）、歯垢が発する蛍光強度の平均（ $\Delta R$  Average）、歯垢が発する蛍光強度の最大値（ $\Delta R$  Max）を算出した（図1、2）。

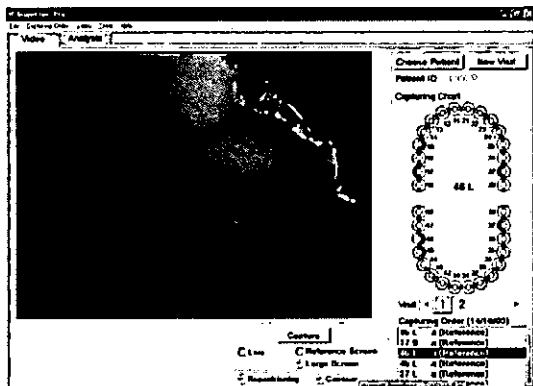


図1 QLF法により撮影した口腔内画像

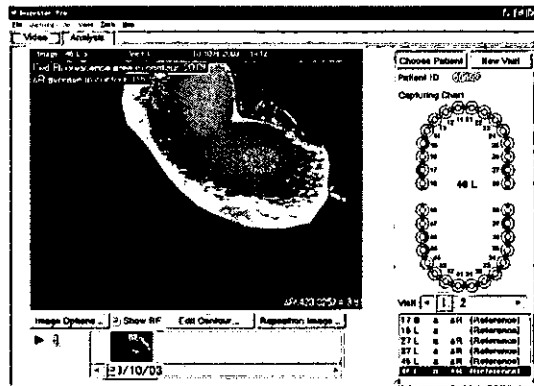


図2 QLF法による口腔内画像解析

蛍光が観察された面積（Area）は、撮影した歯面における蛍光の観察された面積をパーセント表示したものである。歯垢が発する蛍光強度の平均（ $\Delta R$  Average）は、健全歯面が発する蛍光をリファレンスとし、それに対する歯垢の蛍光強度の平均を求めたもので、歯垢が発する蛍光強度の最大値（ $\Delta R$  Max）も同様に求められる。

3) 診査スケジュールおよび解析：被験者に歯口清掃を四日間にわたり停止させ、毎日診査を行ってQLF画像を撮影した。解析は初回と四日目のデータを対象に行った。

### C. 研究結果

すべての被験者において、被験者ごとのAreaの平均値および $\Delta R$  Maxの平均値は一日目よりも四日目のほうが高値を示した（図3、5）。被験者ごとの $\Delta R$  Averageの平均値についても、一名の被験者を除き一日目よりも四日目のほうが高値を示した（図4）。

Areaにおける被験者全体の平均値は約13%から20%に増加し、 $\Delta R$  Averageにおける被験者全体の平均値は0.40から0.46に増加し、 $\Delta R$  Maxにおける被験者全体の平均値も0.88から1.27に増加した。

さらに、Area、 $\Delta R$  Average、 $\Delta R$  Max の変化は被験者ごとに増加の傾向が異なっていることがわかった。

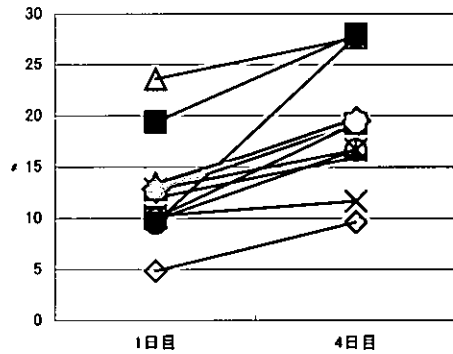


図3 Areaの平均値の経日的変化 (赤は被験者全体の平均値を示す)

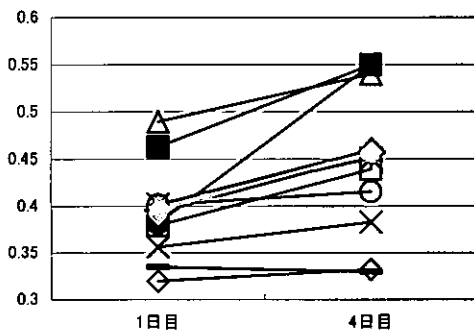


図4  $\Delta R$  Averageの平均値の経日的変化 (赤は被験者全体の平均値を示す)

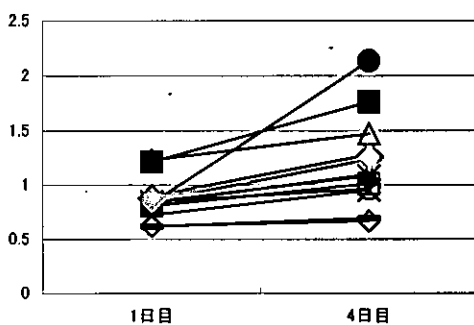


図5  $\Delta R$  Maxの平均値の経日的変化

(赤は被験者全体の平均値を示す)

#### D. 考察

口腔内の二大疾患であるう蝕と歯周疾患の原因のひとつである歯垢は、肉眼的に識別が困難であるため、その付着部位を知るためにさまざまな歯垢顕示剤が古くから開発、応用されてきた。歯垢顕示剤は大きくヨウ素系<sup>11)</sup>、色素系<sup>12)</sup>、蛍光色素系<sup>13)</sup>の染色剤に分かれ、ヨウ素系の染色剤は染色性が弱いことや、過敏症の問題があるため現在では色素系の染色剤が多く用いられている。しかし、色素系の染色剤についてもエリスロシン、フロキシリン、アシッドレッドなどの色素成分には発ガン性や遺伝子損傷性などの人体に対する有害性のあることが指摘されている<sup>14, 15)</sup>。

本研究で使用したQLF法による光診査では、染色剤の使用により生ずるような有害性を人体に与えないことが考えられ、安全性の高いQLF法の利用は推進されるべきものと考えられる。

色素系の染色剤を使用した歯垢の顕示に関する研究は数多くみられる<sup>7~13, 16, 17)</sup>。いずれの報告も歯垢の付着部位あるいは付着面積を肉眼的に識別するものであるが、口腔内の画像を取得する研究では口腔内の撮影の困難さから診査部位を前歯部に限定したものが多く<sup>7, 8, 13)</sup>、臼歯部をも評価した研究ではインデックスによる主観的評価によるものが主であり<sup>18)</sup>、歯垢の定量的評価については十分に解明されていないのが現状である。さらに、歯垢の成熟度という定性的な評価については、酸化還元指示薬を使用した研究<sup>19)</sup>や色素の拡散性の違いを応用した研究<sup>16, 17)</sup>がみられるが、

いずれも比較的新しい歯垢と比較的古い歯垢の二つへと大別を試みたに過ぎず、定性的な研究についても十分に解明されているとはいえないのが現状である。

本研究では、図3から図5に示すように各被験者の歯垢付着状態に差があることが明確に示され、QLF法により歯垢付着における定量的評価が可能であることが明らかとなった。さらに、歯垢の成熟に比例して平均蛍光強度および最大蛍光強度も増加していくことが示され、その増加の程度は各被験者において異なっていることから、歯垢の付着量および蓄積速度という定性的な面についてもQLF法により評価できることが明らかとなった。すなわち、これらの結果は個人の口腔清掃状態の評価にQLF法が応用できる可能性を示唆している。

今後は、従来色素系の染色剤を使用した場合の歯垢付着面積とQLF法によって顕示された歯垢との関連性、さらに、QLF法によって顕示された歯垢と歯肉炎や歯周疾患との関連性についての研究が不可欠であると考えている。

#### E. 結論

①QLF法の応用により歯垢の付着面積における定量的評価が可能であることが明らかとなった。

②QLF法の応用により個人の歯垢の成熟度および蓄積速度の差異という定性的評価が可能であることが明らかとなった。

③個人の口腔清掃状態の評価にQLF法が応用できる可能性が示唆された。

#### 引用文献

1) Hafstorm-Bjorkman U, Sundstorm F,

de Josselin de Jong E et al. :

Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res* 26 : 241-247, 1992.

2) AL-Khateeb S, Ten Cate J M,

Angmar-Masson B et al. :

Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res* 11 : 502-506, 1997.

3) de Josselin de Jong E, Sundstorm F,

Westerling H et al. : A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 29 : 2-7, 1995.

4) Heinrich-Weltzien R, Kuehnisch J,

van der Veen M, de Josselin de Jong E, Stoesser L. : Quantitative light-induced fluorescence (QLF) - A potential method for the dental practitioner. *Quintessence International* 34 : 181-188, 2003.

5) Loe H : The gingival index, the plaque index and the retention index system.

*J Periodontol* 38 : 610-616, 1967.

6) O'leary T J, Drake R B, Naylor J E :

The plaque control record. *J Periodontol* 43 : 38, 1972.

7) 細見環, 柴谷貴子, 椿井孝芳, 上村参生,

神原正樹 : 二色性染色液による歯垢付着状態の把握 画像解析の応用. *口腔衛生学会雑誌* 50 : 833, 2000.

- 8) 細見環, 大岡知子, 弘田恭子, 柴谷貴子, 上村参生, 神原正樹: 二色性染色液およびデジタル画像解析による歯垢付着状態の把握 齲蝕活動性試験との関係. 口腔衛生学会雑誌. 52 : 724, 2002.
- 9) Arnim S S : The use of discoloring agents for measuring tooth cleanliness. J Periodontol 34 : 227-245, 1963.
- 10) Caldwell R C, Hunt D E : A comparison of the antimicrobial activity of disclosing agents. J Dent Res 48 : 913-915, 1969.
- 11) Skinner F H : The prevention of pyorrhea and dental caries by oral prophylaxis. Dent Cosmos 56 : 299-309, 1914.
- 12) Kieser J B, Wade A B : Use of food colourants as plaque disclosing agents. J Clin Periodontol 3 : 200-207, 1976.
- 13) Lang N P, Ostergaard E, Loe H : A fluorescent plaque disclosing agent. J Periodontol Res 7 : 59-67, 1972.
- 14) Seno M, Fukuda S, Umisa H : A teratogenicity study of phloxine B in ICR mice. Food Chem Toxicol 22 : 55-60, 1984.
- 15) 榊原悠紀田郎. 歯垢染め出し剤としての赤色3号の発ガン性をめぐる論議. The Quintessence 10 : 33-36, 1991.
- 16) Block P L, Lobene R P, Derdivanis J P : A two-tone dye test for dental plaque. J Periodontol 43 : 423-426, 1972.
- 17) Gallagher I H C, Fussell S J, Cutress T W : Mechanism of action of two-tone plaque disclosing agent. J Periodontol 48 : 395-396, 1977.
- 18) Tan A E S, Wade A B : The role of visual feedback by a disclosing agent in plaque control. J Clin Periodontol 7 : 140-148, 1980.
- 19) 片山剛, 鈴木武, 岡田昭五郎: 歯垢成熟度を判定する新しい染め出し剤の試みについて. 日歯周誌 17 : 86-91, 1975.
- F. 健康危険情報  
研究の結果、得られた成果の中で健康危険情報として厚生労働省に報告すべき点はみられなかった。
- G. 研究発表  
1. 論文発表  
なし  
2. 学会発表  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得  
特になし  
2. 実用新案登録  
特になし  
3. その他  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）

分担研究報告書

### 口腔内蛍光測定用のプローブ開発

分担研究者 松村英夫 独立行政法人・産業技術総合研究所・光技術研究部門・  
ライフエレクトロニクス研究ラボ主任研究員

#### 研究要旨

口腔内齲蝕などの疾患の検出に最近QLF (Qualitative Light Fluorescence)法が有用であることが明らかとなりつつある。さらなる極初期齲蝕の検出を目指し、プローブ粒子とQLFとを組合せた手法開発の可能性を追求する目的で、種々の微粒子系の探索研究を行った。いくつかの微粒子で初期齲蝕サイトと思われるところに結合し、黒点スポットとして蛍光強度を減少させる系を見出した。

#### A. 研究目的

口腔内疾患の齲蝕などの早期発見に利用が試みられているQLF (Qualitative Light Fluorescence)法のさらなる発展を探る目的で、極めて初期の齲蝕等の発見の可能性に結びつくプローブの開発を研究目的とする。

#### B. 研究方法

QLF法は健康な歯からはほぼ均一な蛍光（青色励起で黄緑色発光）を発光するが、齲蝕などでエネメル質や象牙質に欠損を生ずると蛍光強度が低下することを利用した検出法である。この原理を拡張してさらに極初期疾患発見の可能性をもたらすプローブの開発

を試みている。

方法論としては、極めて初期の齲蝕部位に結合するとともに、QLFで使用される励起光波長や蛍光波長の光を吸収する微粒子の開発をおこなうことで、均一的蛍光発光の健康歯部位と極初期齲蝕部位との区別化を行うことである。

実験法としては、1) 抜歯試料の一部の酸処理（希塩酸水溶液）を行い、前に述べた光吸収特性をもつヘマタイト微粒子（約2ミクロン）分散水と混合後、水洗し、蛍光顕微鏡観察をおこなう（実験法の予備的確認）。2) 歯科で齲蝕過程を調べる目的で行われる脱灰試料を転用して上記と同様の実験をおこなう。

この場合の脱灰液組成はCaCl<sub>2</sub>: 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 10 mM, NaCl: 100 mM、乳酸: 100 mM、pH 4.5である。鏡面研磨されたヒト抜去上下顎第一小白歯を用い、透明マニキュアで四角窓以外を被覆し、脱灰液に各時間浸漬した。浸漬時間の長さにより低脱灰、中脱灰、高脱灰の試料を準備した。

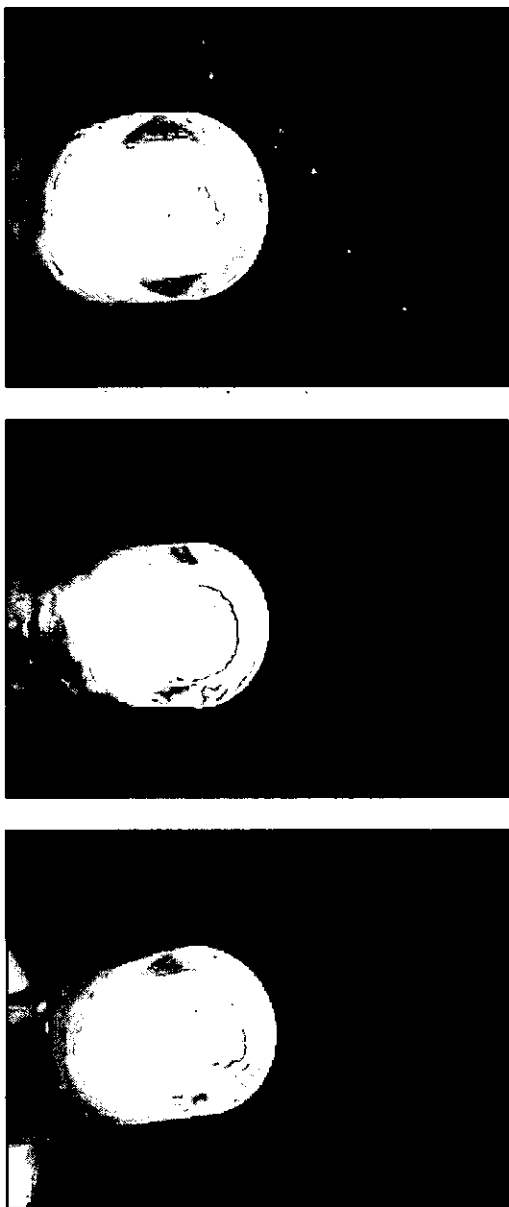


図1.

図1に脱灰処理された試料の実体顕微鏡写真(明視野照明)を示す。試料の直径は約4 mmである。写真は上から、低脱灰、中脱灰、高脱灰の試料である。高脱灰試料では脱灰部分の荒れ(凸凹)による散乱光白色が強調されている。

### C. 研究結果

1) 予備的実験でおこなった抜歯試料の酸処理(希塩酸水溶液)の結果を図2に示す。ここで用いたヘマタイト微粒子(約2ミクロン)は歯試料より発せられる蛍光を吸収する分光特性をもつ。図2の蛍光顕微鏡観察写真で、左は酸処理面、右は無処理面、中は境界面を示す。

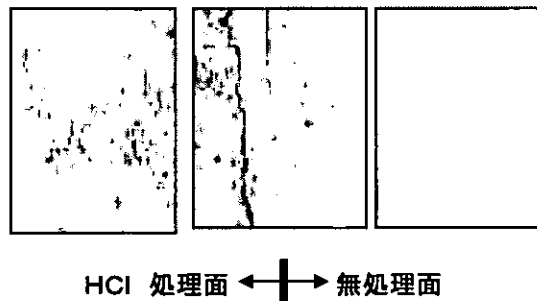


図2.

ヘマタイト粒子は酸処理された表面により多く吸着し、歯からの黄緑色の蛍光を阻害し黒点として観測される。無処理面にも粒子は吸着するがその割合は少ないことが判った。

2) 齶蝕過程を調べる目的で行われる脱灰試料については、まず、脱灰試料そのものの蛍光顕微鏡観察した結果を図3に示す。上の写真から低脱灰、中脱灰、高脱灰の試料である。高脱灰試料は表面荒れ(凸凹)による原因で蛍光測定の際起光や発光(蛍光)を散乱させるため蛍光強度の大きな減少を起し、画像中で黒ずんで見えている。低脱灰試料は脱灰

面からの蛍光強度がかなりあり、場合によっては無処理面との差が少ない。中脱灰試料はマニキュアでマスクされた境界近傍がより蛍光強度の減少を起こしている。これは脱灰液に浸漬されたときに境界と四角窓中の面とで処理のされ方が異なる可能性もあるが、光学的観察方法において光の照射法に原因する可能性もある。

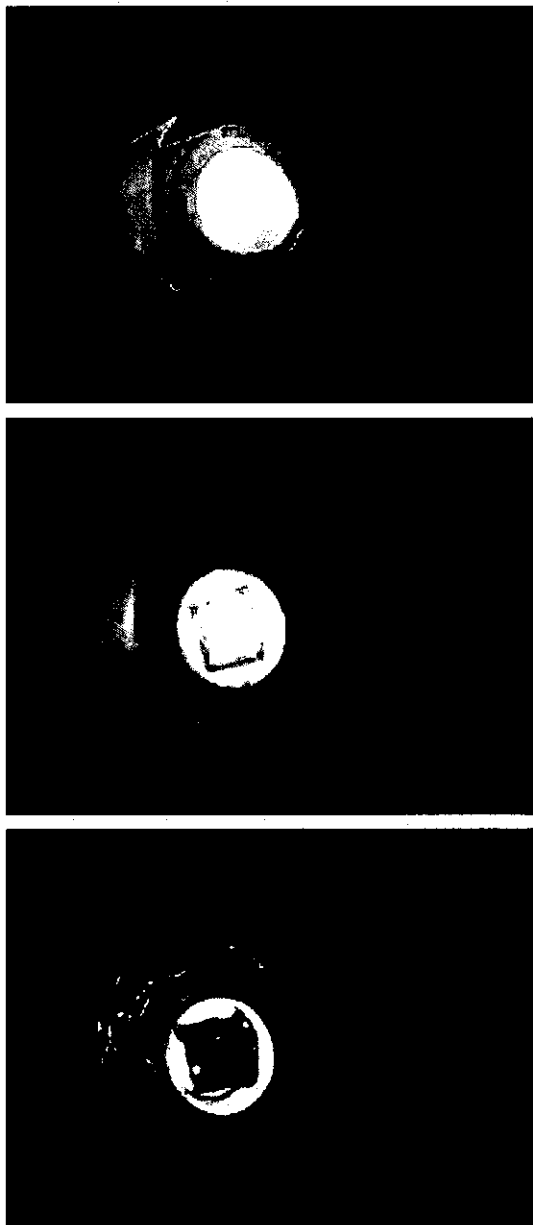


図 3.

図 4 に低脱灰試料、中脱灰試料、高脱灰試料にそれぞれ微粒子系を作用させ水洗後の蛍光顕微鏡写真を示す（上：低脱灰、中：中脱灰、下：高脱灰）。

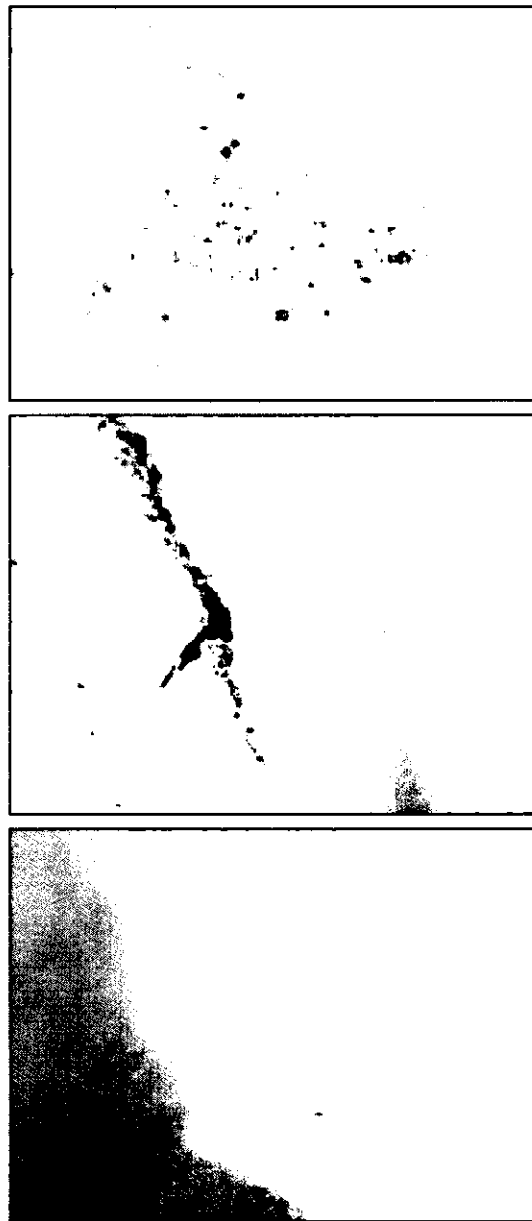


図 4.

ここで用いた微粒子系は先のヘマタイト粒子表面にヒト血清アルブミン (HSA) を飽和吸着させた微粒子である。低脱灰試料では脱

灰面と無処理面とで明らかに微粒子吸着量に違いが出て、蛍光強度減少の黒点の分布状態の差が観測された。また、中脱灰試料においては、脱灰面と無処理面との境界近傍に特に黒点が集中している様子が見られた。一方、高脱灰試料においては脱灰面と無処理面とで明確な差が観測されなかった。

#### D. 考察

予備実験や脱灰試料実験から、酸により脱灰され凸凹がある表面にヘマトイト粒子やHSA吸着ヘマトイト粒子はより多く吸着を起こすことが判った。しかし、脱灰の程度が大きくても必ずしも粒子吸着量が多いとは限らないことが、図4の高脱灰試料の場合にみられた。特に、中脱灰試料において脱灰処理面と無処理面境界に多くの黒点が観測された事実は、脱灰の程度により試料表面に現れる面の物理的構造や化学的構造に多様性がある可能性を示している。現在までは得られたデータからはこれらの原因を明確にすることは出来ないが、この現象は微粒子の種類と疾患状態との組み合わせにより様々な状況が現れる可能性があり、今後の研究開発の進展によっては歯科応用に有用な診断手法を提供する可能性がある。

#### E. 結論

「QLFで使用される励起光波長や蛍光波長の光を吸収すると同時に疾患部分に吸着するプローブの開発はQLF法を拡張してさらに極初期疾患発見の可能性をもたらす」との考えから実験系を模索した結果、プローブとして極めて初期の齲蝕部位に結合する微粒子の開発は今後この方法を飛躍的に有用にする

可能性があるとの感触を得た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

o Bo Yang , Kunio Furusawa , and Hideo Matsumura : Adsorption state of PC vesicles on solid colloidal particles and their aggregation behavior induced by the PC vesicle, Langmuir, 19(2003)9023-9027.

o K.Furusawa, H. Matsumura, T.Majima, Characterization of Silica Coated Hematite and Application to the Formation of Composite Particles Including PC Liposomes, J. Colloid Interface Sci., 264 (2003) 95-100

o 松村英夫、リポソーム含有複合微粒子、p 71-76、ナオバイオテクノロジーの最前線、シーエムシー出版 (2003)。

##### 2. 学会発表

o 古澤邦夫、松村英夫、シリカ層による各種ラテックス表面のコーティング、第56回コロイドおよび界面化学討論会。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。



厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）  
分担研究報告書

歯列不正と齲蝕との関連評価、臨床試験

分担研究者 相馬 邦道 東京医科歯科大学大学院咬合機能制御学分野教授

研究要旨

歯列不正と齲蝕との関連を明らかにすることを目的に、平成15年度は基礎資料の収集の準備を行った。すなわち、歯列不正がある者となない者における、歯列模型、口腔内写真を中心とする形態学的データの採得準備と、QLF (Qualitative Light Fluorescence) 法により明らかとなる初期齲蝕を含めた齲蝕に関する診査の準備を開始した。

また、医療経済研究機構研究および厚生労働科学研究において過去6年間行ってきた歯列不正（咬合）と咀嚼機能の関連評価を継続していくための打ち合わせを行い、機能評価項目を再検討した。

A. 研究目的

一般に歯列不正部位は、自浄作用や口腔清掃の効率が低下しやすいことから、齲蝕や歯周疾患に罹患しやすいと考えられている。しかしながら、歯列不正と齲蝕との関連について、初期齲蝕まで含めた科学的背景は、いまだ十分とはいえない。本研究では歯列不正と齲蝕との関連を明らかにすることを目的に、平成15年度は基礎資料の収集準備を行った。

また、医療経済研究機構研究および厚生労働科学研究において過去6年間行ってきた歯列不正（咬合）と咀嚼機能の関連評価を継続発展していくことを目的に、機能評価項目を再検討した。

B. 研究方法

東京医科歯科大学歯学部附属病院矯正歯科外来に初診来院した患者を対象に、歯列

不正を有する群と有しない群とに分けて資料採得を行う際の、説明と同意のための書類を作成した。また、矯正歯科治療の診断に必要な資料の中から、歯列不正および齲蝕を客観的に評価するために必要な資料を選択することを検討した。さらに、歯列不正部位における初期齲蝕を検出する方法についても文献的検索を行った。

また、医療経済研究機構研究および厚生労働科学研究において行ってきた歯列不正（咬合）と咀嚼機能の関連評価を継続していくため、機能評価項目を再検討した。

C. 研究結果と考察

歯列不正を客観的に評価するための形態学的資料として、矯正歯科治療の診断に必要な資料の中から、歯列模型、口腔内写真を選択した。また、齲蝕を客観的に評価す

る資料として、矯正歯科治療の診断に必要な資料の中から、口腔内診査、口腔内写真、デンタルX線写真を選択した。また、歯列不正部位における初期齲蝕を検出する方法についても検討を行い、QLF (Quantitative Light-induced Fluorescence)法の有用性と歯列不正部位への応用時の注意事項を再確認した。

歯列不正（咬合）と咀嚼機能の関連評価のための機能評価項目としては、咬合力測定や顎運動関連データのほか、咀嚼能力検査表の応用も再検討の余地があると考えられた。

次年度以降、実際の資料収集等を開始する。

#### D. 発表

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版 地	出版 年	ページ
松村英夫	リポソーム含有 複合微粒子	植田充美	ナノバイオテ クノロジーの 最前線	シーエム シー	東京	2003	71-76

雑誌

発表者氏名	論文 タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
上村参生 神原正樹	早期う蝕診断への機器 応用の必要性	日本歯科評論	63 (6)	161-165	2003
神原正樹	予防歯科へのテクノロ ジー - 齲蝕予防にお ける早期う蝕診断 -	日本歯科医師会雑 誌	56 (7)	611-618	2003
Yang B Furusawa K Matsumura H	Adsorption state of PC vesicles on solid colloidal particles and their aggregation behavior induced by the PC vesicle	Langmuir	19 (21)	9023- 9027	2003
Furusawa K Matsumura H Majima T	Characterization of silica coated hematite and application to the formation of composite particles including PC liposomes	J Colloid Interface Sci.	264 (1)	95-100	2003
高島隆太郎 川崎弘二 神原正樹	エナメル質表層化脱灰 試料の作製に及ぼす脱 灰溶液の影響	歯科基礎医学会雑 誌	45 (5)	297	2003
上村参生 三宅達郎 土居貴士	QLF を用いた初期う蝕 に及ぼすフッ素配合歯 磨剤の影響について	口腔衛生学会雑誌	53 (4)	336	2003

上根昌子 日吉紀子 長沼 健 松山和正 中嶋省志 金子憲司 神原正樹					
坂本吉史 上村参生 神原正樹	In vivoにおけるQLFによる早期う蝕診断に関する研究 - 初期う蝕病巣の定量評価について -	口腔衛生学会雑誌	53 (4)	374	2003
川崎弘二 高島隆太郎 上村参生 安達 郁 吉田邦晃 石川博敏 神原正樹	エナメル質初期脱灰試験料作製法に対する QLF 観察	口腔衛生学会雑誌	53 (4)	376	2003
中嶋省志 斉藤浩一 藤川晴彦 氏家高志 上村参生 中矢健二 薬師寺健太郎 伊津元博 田中秀直 神原正樹	QLF 法によるフッ素歯磨剤の初期う蝕改善効果に関する臨床研究 第一報: 初期う蝕の改善効果	口腔衛生学会雑誌	53 (4)	383	2003
大塚秀人 三宅達郎 神原正樹	In vivoにおけるQLFによる早期う蝕診断に関する研究 - 初期う蝕病巣の一年間の追跡結果について -	口腔衛生学会雑誌	53 (4)	468	2003
高島隆太郎 川崎弘二	エナメル質人工初期う蝕の再石灰化に対する	Cariology Today in Japan.	4	10	2003

神原正樹	QLF 観察	The 4th Workshop in Osaka Program & Abstracts			
Uemura M Kambara M	Early detection of dental caries with new clinical technologies	Japanese Association for Dental Research. 51st Annual Meeting Program and Abstracts of Papers	51	71	2003
上村参生 神原正樹	早期う蝕診断装置 「QLF」の実力	Dental Diamond	29 (1)	72-75	2004
Kambara M Uemura M Izu M Tanaka H Nakashima S	Effect of dentifrice containing fluoride on incipient caries using QLF method	Dentistry in Japan	40	83-84	2004
Uemura M Miyake T Uene M Okumura N Yakushiji K Izu M Tanaka H Nakashima S Saito K Kambara M	Clinical study of fluoride dentifrice on remineralization of incipient lesions	Journal of Dental Research	83 Special Issue A	Seq #95 0799	2004
Takashima R Kawasaki K Kambara M	The effect of fluoride to remineralization of incipient enamel lesion	Journal of Dental Research	83 Special Issue A	Seq #220 2040	2004

20031012

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。