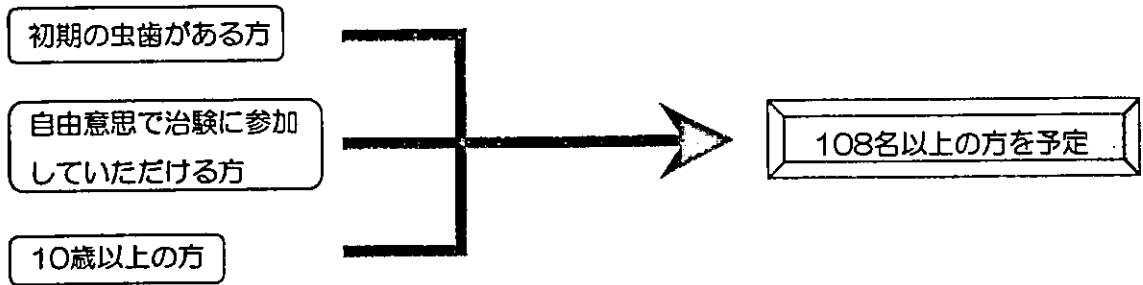


4. 治験の方法

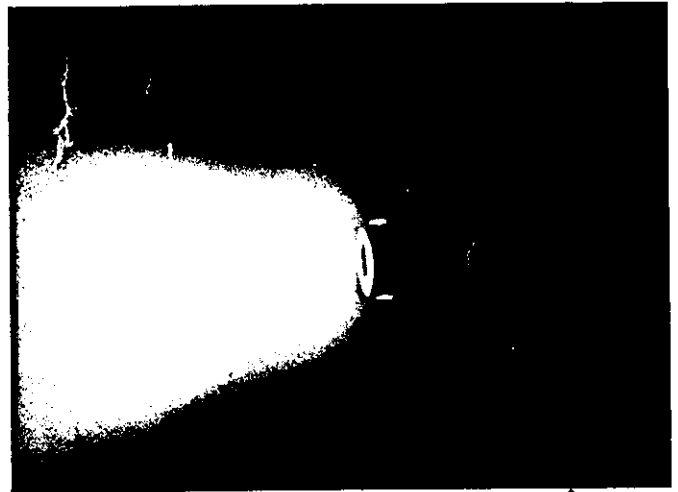
(1) 治験参加者



(2) 治験の参加者を決める方法

簡単な診査（痛みなどはともないません）

- ①歯の中にできた目に見えない初期の虫歯を調べるために、歯に青い光を当て、専用カメラで撮影します
- ②その他にお口の中の状態を調べます



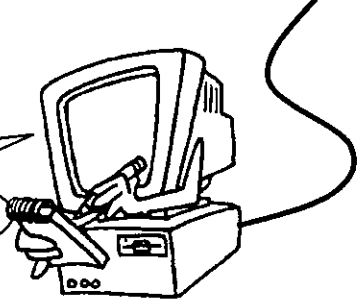
↓

治験の対象となる初期の虫歯がある歯を決めます

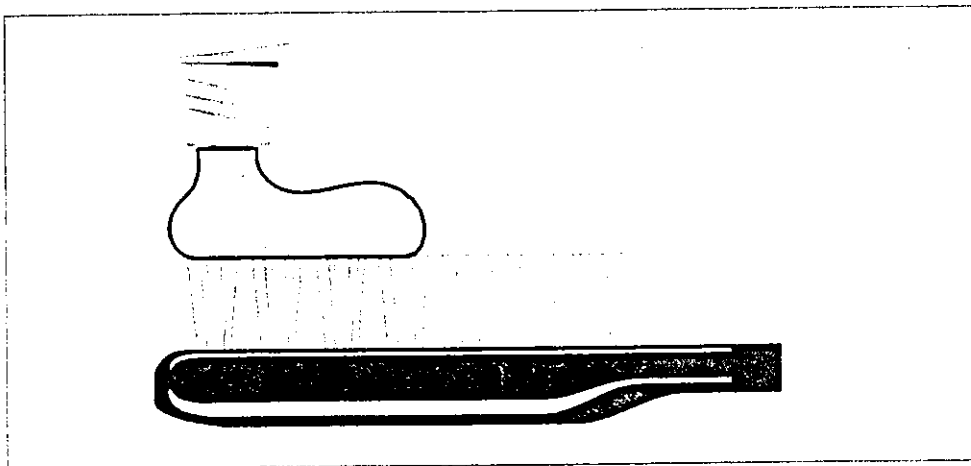
↓

その部位の写真を撮影します

診査の結果、今回の治験の対象とならないこともあります。その場合はご了承ください。



(3) お渡しする歯磨き剤と歯ブラシをお使いください。歯磨き剤を歯ブラシの長さの約半分位とり、1日2回（朝と夜）歯磨きしてください。これを1年間使用していただきます。

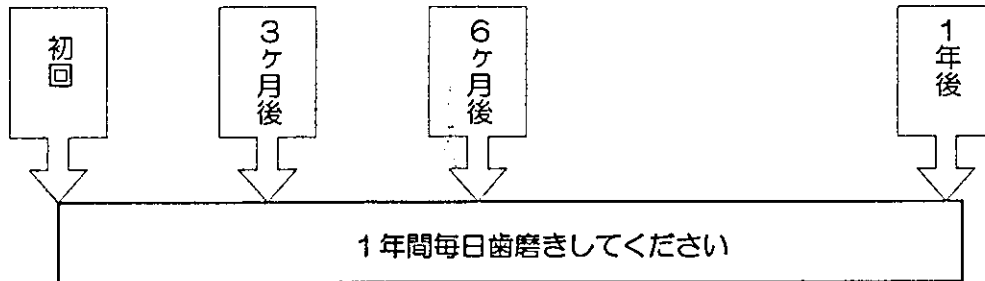


(4) この歯磨き剤の効きめを調べるために、初期の虫歯の修復に対する効果が期待される有効成分を含む歯磨き剤、またはそれを含まない歯磨き剤(*)のどちらか一方を使用していただきます。それがどちらであるかは、私(歯科医師)にも皆さんにもわからないようになっています。これを二重盲検法といい、治験では広く行なわれている方法です。

*:この歯磨き剤は、歯及び口腔内を清掃することにより虫歯を防ぐ効果があります。

(5) 治験への参加予定期間は1年間です。この歯磨き剤の使用期間中、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後に来ていただきます。その際に行うことは次の通りです。

①歯科医師によるお口の中の診査と問診 ②初期の虫歯の状態の診査と写真撮影



(6) 使用済みの歯磨き剤と歯ブラシは捨てないでください。また、次回以降の診査時には、使用・未使用にかかわらず、お渡ししたビニールバッグに入れて持参してください。新しいものと交換します。

(7) 今回の治験に参加していただける場合、来院毎に交通費として、一律3000円をお支払い致します。また、お口の中を診査しただけで、治験の対象とならなかった場合でも、交通費として3000円をお支払い致します。なお、この治験期間中に、治験のために行なわれる診査や問診に関して皆さんの金銭的な負担はありません。

5. 安全性

この歯磨き剤に含まれる成分は、動物を用いた安全性試験等で安全であることが確かめられています。

6. 予測される不利益

万が一、お口の中がヒリヒリするなどの不快な症状が起った場合は、治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師にすぐに連絡してください。必要に応じて適切な処置を行います。

7. 治験期間中の注意事項

(1) 以下の事項は、結果に影響しますので、必ず守ってください。

- 1) お渡しした歯磨き剤と歯ブラシ以外の市販の歯磨き剤や歯ブラシ、洗口剤等は一切使用しないでください。
- 2) 歯科医師によるフッ素歯面塗布、対象となる歯の治療、プロフィペーストによる歯面清掃、スクーリング等はしないでください。もし、これらを行ないたい場合は、治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師に連絡して相談し、その指示に従ってください。
- 3) お渡しする歯磨き剤は、ご本人以外は絶対に使用しないでください。兄弟姉妹で、治験に参加される場合は、間違いなく自分の歯磨き剤を使用するようにしてください。

- (2) 何らかの理由（歯の痛み、歯が抜けた、歯が折れた等）で、歯科医院に行きたい場合は、治験期間中いつでも構いませんので、治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師に連絡してください。
- (3) 使用上の注意
 - 1) お口のまわりの傷などに直接つけてください。
 - 2) 発疹などの異常が現れたときは使用を中止し、すぐに治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師に連絡してください。

8. 初期の虫歯の処置に対して有効な他の方法

歯科医院で行なわれるフッ素塗布等の方法に同様の効果が期待されています。

9. 安全性に関わる中止基準

治験期間中に以下の項目に該当した場合は、この治験を直ちに中止します。

- (1) 治験の継続が困難な程度に口腔内に異常が発現した場合
- (2) 発疹などの異常が発現した場合
- (3) 被験者又は代諾者から同意が撤回された場合
- (4) 歯科医師によるフッ素歯面塗布等の歯磨き剤の有効性を判断できなくなるような処置等を行った場合
- (5) 抜歯、保存治療等で対象となる歯の有効性の評価が不可能になった場合
- (6) その他、治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師が継続困難と判断した場合



IV. あなたの人権保護への配慮

- 1. この治験で大切なことは、皆さんの人権と安全を最大限に守ることとこの治験を正しく行うことです。治験には、「医薬品の臨床試験の実施の基準」（GCP省令）と呼ばれる大変きびしいルールがあります。我々歯科医師はそれに基づいて治験を行います。
- 2. この治験への参加に同意するかどうかは、あなたやあなたの保護者の方の自由です。この治験に参加することに同意した後でも、治験期間中いつでも、この治験への参加をやめることができます。
- 3. 治験への参加に同意されない場合、又は治験の途中で参加をやめた場合でも、そのために不利な扱いを受けることは、一切ありません。
- 4. この治験の計画内容については、皆さんの人権を守るために大阪歯科大学附属病院の治験審査委員会で、倫理性や科学性が審議され、承認されています。
- 5. あなたがこの治験を継続することに関して、重要と考えられる新しい情報が得られた場合には、速やかにお知らせします。

6. あなたのプライバシーを守るために、最大限の注意を払います。そのうえで、GCP省令のルールに従い、治験がきちんと行われているかどうかを調べるために、治験の関係者（モニター、監査担当者、治験審査委員会、規制当局）によって、原資料（あなたのカルテ、同意書等）を調べることがありますが、あなた個人の情報は完全に秘密とされます。また、この治験の結果が、学術論文や厚生労働省へ提出する資料の一部として公表されることがありますが、あなたの住所、氏名、電話番号等の個人情報は、公表されることは絶対ありません。
7. この治験期間中又は終了後、お渡しする歯磨き剤の使用により、万が一、何らかの不快な症状、あるいは健康上の問題が生じたと思われる場合には、適切な治療を行います。また、それに関して補償を受けることができます。
8. この治験やあなたの権利に関する質問がある場合、又は前記のようにこの治験により、何らかの不快な症状、あるいは健康上の問題が生じた場合には、治験責任歯科医師又は治験分担歯科医師にお尋ねください。

V. 最後に

担当歯科医師からこの治験に関する内容の説明を聞かれたことと思います。何か不明なところや分かりにくかったところがありましたら、何でも遠慮なく担当歯科医師に質問してください。

治験に参加していただける場合、20歳未満の方は、保護者等の代諾者の方が同意書に署名（サイン）と日付を記入してください。この場合、可能であればご本人も署名（サイン）と日付を記入してください。また、20歳以上の方は、ご本人が同意書に署名（サイン）と日付を記入してください。

治験責任歯科医師：神原 正樹

大阪歯科大学口腔衛生学講座 教授 tel 072-864-3019

大阪歯科大学附属病院予防歯科 科長 tel 06-6943-4184

治験分担歯科医師：上村 参生

大阪歯科大学口腔衛生学講座 講師 tel 072-864-3059

大阪歯科大学附属病院予防歯科 tel 06-6910-1047

*In vitro*における各種フッ化物応用が再石灰化に及ぼす影響

分担研究者 川崎弘二 大阪歯科大学口腔衛生学講座助手

研究要旨

本研究では、臨床応用を目指したQLF法の応用のため、異なる脱灰の程度のエナメル質に対し、それぞれ異なる局所的フッ化物応用を試みたうえで、経時的な再石灰化過程のモニタリングを行うことにより、脱灰程度に対するフッ化物応用の至適条件を検索した。その結果、 ΔF 値が-16%までの低脱灰の初期う蝕においては、フッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化率がみられることがわかった。 ΔF 値が-24%以上の高い脱灰を示す初期う蝕に対しては、高濃度のフッ化物塗布を行わず、低濃度のフッ化物を継続的に作用させることがより高い回復を導く可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

現在、初期う蝕あるいはう窩形成前のう蝕は、う窩に至ったう蝕より多く発生していることが知られている^{1~3)}。脱灰によって引き起こされたエナメル質の障害が、再石灰化現象によって修復することができるという概念は、う蝕予防のマネジメントにおいてとくに重要である。

初期う蝕の脱灰程度を非破壊的に観察する手段としてQLF（quantitative light-induced fluorescence）法がある^{4~6)}。QLF法はエナメル象牙境付近に多く存在するといわれる蛍光物質を利用し、歯に励起光を照射して得られる自家蛍光のうち健全部と初期う蝕部の蛍光強度差をもとに初期う蝕を検出し、コンピュータに取り込んだうえで画像処理を行い、初期う蝕を定量的に分析する方法である。

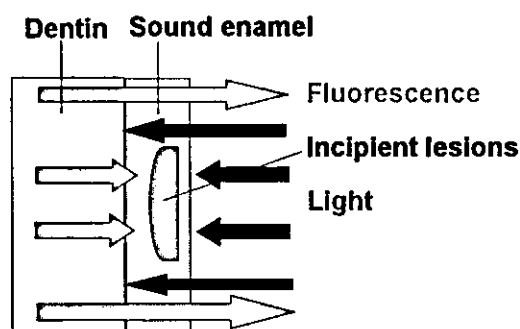


図1 QLF法の原理

初期う蝕の再石灰化にフッ素イオンが与える影響は数多くの研究で検討され、低濃度フッ素イオンの存在下で再石灰化は促進されると報告されている^{7~11)}。しかし、初期う蝕における脱灰病変の大きさやミネラル喪失量¹²⁾、初期う蝕表層のエナメル質性状¹³⁾が再石灰化量に影響を与えるという報告もあり、初期う蝕における再石灰化の至適条件について、いまだコンセンサ

スが得られていないのが現状である。

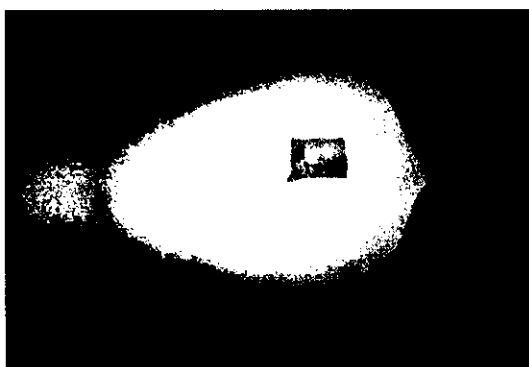


図2 QLF法による初期う蝕像

本研究では、臨床応用を目指したQLF法の応用のため、異なる脱灰の程度のエナメル質に対し、それぞれ異なる局所的フッ化物応用を試みたうえで、経時的な再石灰化過程のモニタリングを行うことにより、脱灰程度に対するフッ化物応用の至適条件を検索した。

B. 研究方法

①エナメル質試料の作製

ダイヤモンドドリルを用いウシ下顎中切歯の唇側面から流水下で直径4 mmのエナメル質ディスクを取り出した。エナメル質ディスクは中空のアクリリックロッドにデンチャーレジンを用いて包埋し、耐水ペーパー (Silicon Carbide, #1000) にて15分間、ゲル状研磨剤 (Gamma Alumina, 0.05 μm) にて90分間、鏡面研磨を行いエナメル質試料とした。

②初期う蝕試料の作製

エナメル質試料の表面中央に初期う蝕を作製するため、 2×2 mmの脱灰予定窓以外をネイルパーニッシュで被覆したのち、脱灰溶液 (乳酸: 100 mM、ハイドロキシ

アパタイト: 3 g/l、carboxymethyl cellulose: 0.2 g、pH: 5.0) に 37°C で12から96時間の浸漬を行い、脱灰程度の異なる試料を作製した。作製した初期う蝕試料はアセトンによりネイルパーニッシュを除去した。



図3 初期う蝕試料 (左から処理前、 ΔF -8%、-16%、-24%、-32%)

③初期う蝕試料の再石灰化

初期う蝕試料は再石灰化溶液 (KCl: 130 mM, KH_2PO_4 : 0.9 mM, CaCl_2 : 1.5 mM, HEPES: 20 mM、pH: 7.0) に 37°C にて合計28日間浸漬した。再石灰化溶液は5日ごとに新たに調製し交換した。

④フッ化物の応用

以下の四種類のフッ化物を初期う蝕試料に応用した。

- I) コントロール群: 初期う蝕試料を継続的に再石灰化溶液のみに浸漬した。
- II) フッ化物配合歯磨剤群: 一日3回、フッ化物配合歯磨剤溶液 (1 g / 14 ml、950 ppm F) に初期う蝕試料を5分間浸漬した。
- III) APF群: 実験開始前、および実験開始後14日目にAPFゲル (9000 ppm F) を初期う蝕試料に5分間作用させた。
- IV) フッ化物配合歯磨剤 + APF群: IIおよびIII両方の処理を行った。

⑤QLF法による脱灰および再石灰化程度の評価

Inspektor Pro QLFシステム (QLFTM、

Inspektor Research Systems 社製、オランダ) により初期う蝕試料の脱灰および再石灰化程度の評価を行った。デジタル画像の取得は試料表面についた水滴を吸い取り、25℃にて15分間乾燥させたのちに撮影した¹⁴⁾。得られたデジタル画像は付属の画像解析ソフト (QLF200h) により解析した。今回は脱灰程度の指標として ΔF 値を用い解析を行った。

再石灰化程度の評価は、3、6、9、12、15、21、28日目にいった。

C. 研究結果

①低脱灰群の初期う蝕試料の再石灰化

ΔF 値が-8%および-16% (それぞれ ± 4) を示した初期う蝕試料を低脱灰群と群分けした。再石灰化過程の評価の結果、すべてのフッ化物応用において、-8%群 (図4) は3日、-16%群 (図5) は6日以内に平衡状態に達した。コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群、APF群とフッ化物配合歯磨剤+APF群はそれぞれ近似した ΔF 値の変化を示し、前者と後者の統計的有意差は、-8%群は3日目、-16%群は6日目に現われた。

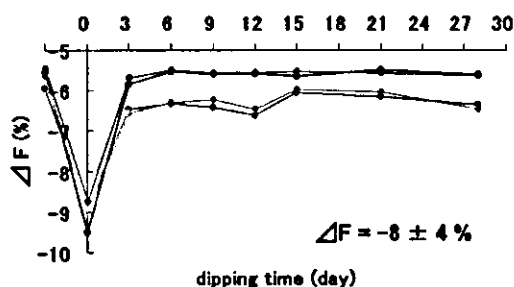


図4 $\Delta F = -8\%$ 群の再石灰化過程

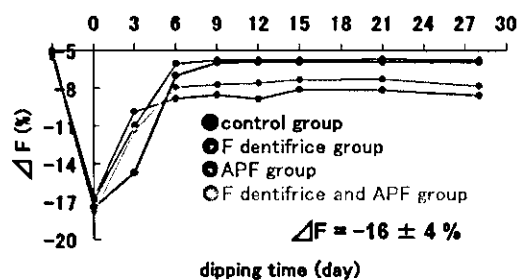


図5 $\Delta F = -16\%$ 群の再石灰化過程

②高脱灰群の初期う蝕試料の再石灰化

ΔF 値が-24%および-32% (それぞれ ± 4) を示した初期う蝕試料を高脱灰群と群分けした。再石灰化過程の評価の結果、コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群、-24%群 (図6) および-32%群 (図7) は15日目以内に平衡状態に達した。APF群およびフッ化物配合歯磨剤+APF群は、-24%群では9日目以内、-32%群では12日目以内に平衡に達した。コントロール群とフッ化物配合歯磨剤群、APF群とフッ化物配合歯磨剤+APF群の統計的有意差は、-8%群および-16%群において9日目に現われた。

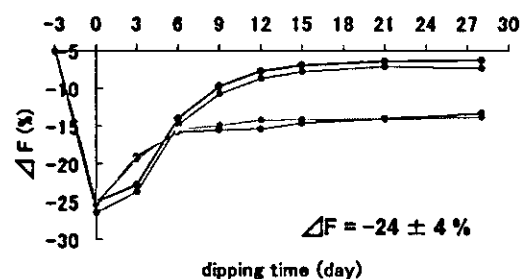


図6 $\Delta F = -24\%$ 群の再石灰化過程

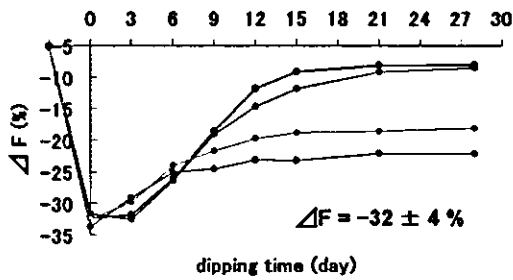


図7 $\Delta F = -32 \pm 4\%$ 群の再石灰化過程

D. 考察

①初期う蝕試料の脱灰程度が再石灰化に与える影響

本研究の結果、低脱灰群ではすべてのフッ化物応用群において高い回復率を示した。これは本研究の *in vitro* 環境下では低脱灰の初期う蝕試料に対するフッ化物応用は種類を問わないということの意味しており、再石灰化を促進させる環境が整っていれば、コントロール群のようにフッ化物を含んでいなくても高い回復が見られることが明らかとなった。すなわち、 ΔF 値が -16% までの低脱灰の初期う蝕においては、フッ化物応用の種類が重要なのではなく、いかに再石灰化に向かわせる環境を整えるかが重要であるといえる。

また、高脱灰群では A P F 処理を行うと再石灰化率が低下するということが明らかとなり、 ΔF 値が -24% 以上の高い脱灰を示す初期う蝕に対しては、高濃度のフッ化物塗布を行わず、低濃度のフッ化物を継続的に作用させることがより高い回復を導く可能性があることが明らかとなった。

これらの結果は、臨床の現場で Q L F 法を応用して、再石灰化療法プログラムを構築するには不可欠な基本的データであり、こうした知見は Q L F 法の応用によっては

じめて明らかになる事柄であり、今後の臨床研究が不可欠であると考えている。

②各種フッ化物の応用が再石灰化に与える影響

本研究の結果、A P F の応用は再石灰化率を減少させ、再石灰化過程において早い段階で平衡に達することが明らかとなった。初期う蝕の表層は多孔性であることが Arends ら¹⁵⁾ によって確認されている。そのため、エナメル表面の多孔度が再石灰化過程に影響することが考えられるが、A P F の応用により再石灰化率を減少したのは表層にフルオロアパタイトが生成されることによる¹⁶⁾。フルオロアパタイトは初期う蝕表面の多孔性をブロックするが、初期う蝕部へのミネラルの拡散を制限すると考えられる。低脱灰群において ΔF 値は早期に平衡に達したが、これは低脱灰群ではエナメル質表面の多孔度が低いため、A P F 処理が行われた場合であっても容易にミネラルによる初期う蝕部の修復が行われたものと考えている。

また、本研究ではコントロール群とフッ化物配合歯磨剤群のあいだに統計的な有意差はみられなかった。しかしながらこの四半世紀、数多くの研究においてフッ化物配合歯磨剤の有用性は確認されている¹⁷⁾。この理由として、Arends¹⁸⁾ らが指摘するように *in vitro* と *in vivo* における環境が大きく異なっていることが挙げられる。実際の口腔内環境においては、唾液、微生物、食事などの多様な要因が修飾していると考えられ、とくにスタセリン¹⁹⁾ や高プロリントタンパク質²⁰⁾ などの再石灰化抑制に働くタンパク質の影響が大きいことが考えら

れる。今後、タンパク質の介在した実験系の検索が必要であると考えている。

E. 結論

本研究の結果、 ΔF 値が -1.6% までの低脱灰の初期う蝕においては、フッ化物応用の種類にかかわらず高い再石灰化率がみられることがわかった。

ΔF 値が -2.4% 以上の高い脱灰を示す初期う蝕に対しては、高濃度のフッ化物塗布を行わず、低濃度のフッ化物を継続的に作用させることがより高い回復を導く可能性があることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Ismail AI, Brodeur JM, Gagnon P, Payette M, Picard D, Hamalian T, Olivier M, Eastwood BJ. Prevalence of non-cavitated and cavitated carious lesions in a random sample of 7-9-year-old schoolchildren in Montreal, Quebec. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20: 250-255.
- 2) Clark DC, Hann HJ, Williamson MF, Berkowitz J. Effects of lifelong consumption of fluoridated water or use of fluoride supplements on dental caries prevalence. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995; 23: 20-24.
- 3) Marthaler TM. Changes in dental Caries 1953-2003. *Caries Res* 2004; 38: 173-181.
- 4) Hafstrom-Bjorkman U, Sundstrom F, de Josselin de Jong E, Oliveby A, Angmar-Mansson B. Comparison of laser fluorescence and longitudinal microradiography for quantitative assessment of in vitro enamel caries. *Caries Res* 1992; 26: 241-247.
- 5) de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res.* 1995; 29: 2-7.
- 6) al-Khateeb S, ten Cate JM, Angmar-Mansson B, de Josselin de Jong E, Sundstrom G, Exterkate RA, Oliveby A. Quantification of formation and remineralization of artificial enamel lesions with a new portable fluorescence device. *Adv Dent Res.* 1997; 11: 502-506.
- 7) Borsboom PCF, van der Mei HC, Arends J. Enamel lesion formation with and without 0.12 ppm F in solution. *Caries Res* 1985; 19: 396-402.
- 8) Page DJ. A study of the effect of fluoride delivered from solution and dentifrices on enamel demineralization. *Caries Res* 1991; 25: 251-255.
- 9) Lammers PC, Borggreven JPM, Driessens FCM. Influence of fluoride and pH on in vitro remineralization of bovine enamel. *Caries Res* 1992; 26: 8-13.
- 10) Ten Cate JM: Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci* 1997; 105: 461-465.

- 1 1) Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 31-40.
- 1 2) Mellberg R. Relationship of original mineral loss in caries-like lesions to mineral changes in situ. *Caries Res* 1991; 25: 459-461.
- 1 3) Al-Khateeb S, Exterkate R, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 2000; 58: 31-36.
- 1 4) Al-Khateeb S, Exterkate RA, de Josselin de Jong E, Angmar-Mansson B, ten Cate JM. Light-induced fluorescence studies on dehydration of incipient enamel lesions. *Caries Res* 2002; 36: 25-30.
- 1 5) Arends J. The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 1986; 65: 2-11.
- 1 6) ten Cate JM, Arends J. Remineralization of artificial enamel lesions *in vitro*. *Caries Res* 1977; 11: 277-286.
- 1 7) Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003, Issue 1.
- 1 8) Arends H, Ten Bosch JJ. *In vivo* de- and remineralization of dental enamel. edited by Leach SA. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. IRL press, Oxford., 1986, pp1-11.
- 1 9) Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem* 1977; 252: 1689-1695.
- 2 0) Hay DI, Carlson ER, Schluckebier SK, Moreno EC, Schlesinger DH. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary acidic proline-rich proteins: structure-activity relationships. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 126-132.

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

高島隆太郎, 川崎弘二, 上村参生, 酒井怜子, 川上富清, 小室崇, 西島典幸, 田治米元信, 多名部実, 小室美樹, 神原正樹. エナメル質人工初期う蝕試料の再石灰化における QLF 観察. *口腔衛生学会雑誌* 55 (1) : 41-49 : 2005.

2. 学会発表

Sakai R, Takashima R, Kawasaki K, Kambara M. *In vitro* QLF observation of remineralizing effect in fluoride

applications. Journal of Dental
Research 84 Special Issue A : Seq
#229 2051 : 2005.

上村参生, 三宅達郎, 上根昌子, 川崎弘
二, 日吉紀子, 土居貴士, 伊津元博, 田
中秀直, 高島隆太郎, 神原正樹.

Quantitative Light-induced
Fluorescence (QLF)による早期う蝕診
断への応用. 第20回日本歯科医学会総
会プログラム・事前抄録集 57 ; 396 :
2004.

上村参生, 川崎弘二, 神原正樹. 光誘導
蛍光定量法 (QLF) の応用による早期う
蝕診断に関する臨床研究. 日本レーザー
医学会誌 25 (2) ; 120 : 2004.

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

QLF法およびPCR法の応用による歯垢特性の評価

分担研究者 川崎 弘二 大阪歯科大学 口腔衛生学講座 助手

研究要旨

蛍光性の歯垢と非蛍光性の歯垢を採取し、polymerase chain reaction 法（PCR法）による解析を施すことによって、蛍光性の違いにより歯垢の持つ病原性にどのような違いがあるのかを明らかにする目的で本研究を行った。その結果、蛍光を発する歯垢のなかには、歯周病関連菌が多いことがわかり、各被験者の歯垢付着状態、成熟度および蓄積速度のみならず、歯垢の質的評価にもQLF法が応用できることがわかった。

A. 研究目的

QLF（Quantitative Light-induced Fluorescence）法の応用により歯垢が発する蛍光を検出できることが明らかとなりつつある¹⁾。色素で歯垢を染色し、各種インデックスによって評価を行う場合^{2~4)}、その評価は診査者の主観によるため標準化が困難であり、さらに、得られる情報は歯垢付着面積の解析に留まっていたのが現状であった。

QLF法による歯垢の評価は、蛍光を発する歯垢を検出し、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による分析を施すことによって、蛍光を発する面積、平均蛍光強度、最大蛍光強度を測定できる。すなわち、定量的な歯垢の性状を詳細に評価できる可能性がある。

本事業における前年度の報告では、人を対象に口腔内に歯垢を蓄積させ、QLF法による歯垢の経時的な評価を行った。その結果、歯垢付着面積および歯垢の発する蛍

光の強度がQLF法により定量的に評価できることが明らかとなった。

しかし、上記の研究の遂行課程において、蛍光を発する歯垢と蛍光を発しない歯垢が存在することが明らかとなった。

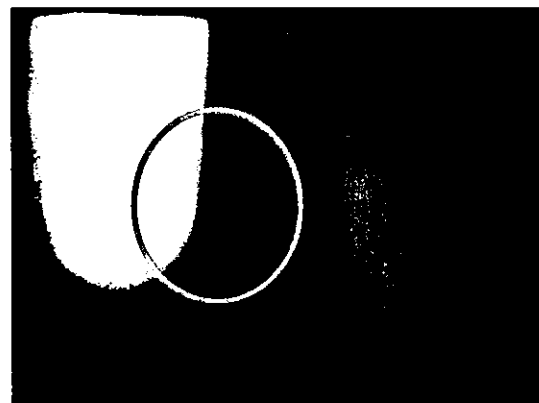


図1 蛍光を発する歯垢

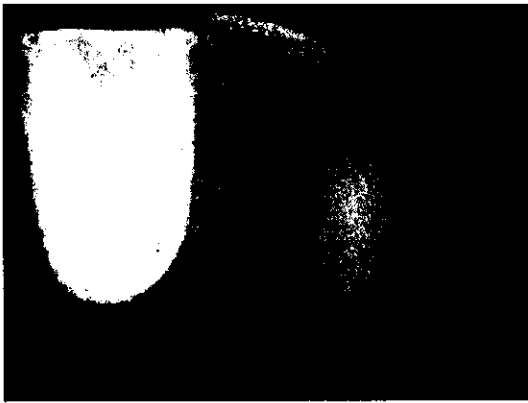


図2 色素により染色した歯垢（全体的に歯垢が存在することがわかる）

そこで、蛍光性の歯垢と非蛍光性の歯垢を採取し、polymerase chain reaction法（PCR法）による解析を施すことによって、蛍光性の違いにより歯垢の持つ病原性にどのような違いがあるのかを明らかにする目的で本研究を行った。

B. 研究方法

①被験者

被験者は、インフォームドコンセントによる内容説明を行い実験の参加に同意を得た健康な成人10名とした（大阪歯科大学医の倫理委員会 承認番号11）。

②歯垢の評価

歯垢の評価はQLFシステム（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（ ΔR Average）、歯垢が発する蛍光強度の最大値（ ΔR Max）を算出した。

③診査スケジュール

被験者に歯口清掃を四日間にわたり停止

させ、毎日QLF法による診査を行ってデジタル画像を取得し、解析は初回と四日目のデータを対象に行った。

④歯垢のPCR解析

各被験者から採取した赤い蛍光を発する歯垢と、赤い蛍光を発しない歯垢について、BML社（東京）のPCR法による歯周病関連菌の検査を行い、口腔内総細菌数に占める歯周病関連菌の割合を算出した。解析を行った歯周病関連菌は以下の通りである。

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Porphyromonas gingivalis

Prevotella intermedia

Tannerella forsythensis

Treponema denticola

C. 研究結果

Area、 ΔR Average、 ΔR Maxの平均値は被験者ごとに異なる値を示した。また、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 ΔR 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。被験者ごとの ΔR 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。さらに、Area、 ΔR Average、 ΔR 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を確認した。

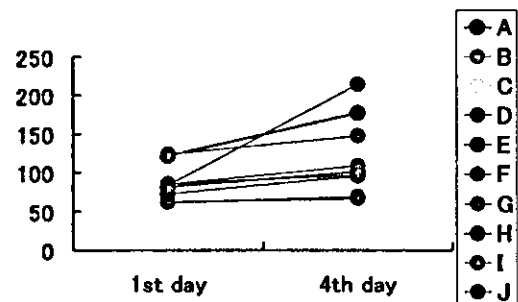


図3 ΔQ Maxの経日的変化

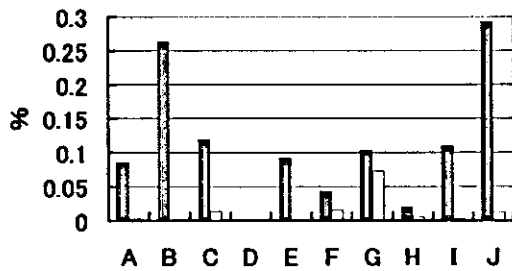


図4 各被験者ごとの総細菌数に占める歯周病関連菌の割合（赤いバーは赤い蛍光を発する歯垢、白いバーは赤い蛍光を発しない歯垢の分析結果を示す）

図4に示すように、PCR法による歯垢構成菌の分析結果によると、赤い蛍光を発する歯垢には歯周病関連菌が多く存在していた。

D. 考察

歯垢の顕示には色素による歯垢染色法が応用されてきたが、色素による歯垢の染色は評価が難しい。各種インデックスや写真撮影による評価を行っても、得られる情報は歯垢付着面積の解析に留まってきたのが現状である^{2~4)}。さらに、診査者の主観による各種インデックスや写真撮影による歯垢付着面積の評価は標準化が困難であった。

QLF法を応用した光学的診査による歯垢の検出は、赤色～オレンジ色の蛍光を発する歯垢のなかには、歯周病に関連する微生物が特に多く含まれていることが明らかとなった。赤色～オレンジ色の蛍光を発する物質は *Porphyromonas gingivalis* などのポルフィリン産生菌が算出するポルフィリンであると考えられており^{5, 6)}、今後はその解析が必要である。

すなわち、QLF法を応用した歯垢診断

の臨床研究により、健全なヒトにおける歯垢の微生物の構成とその光学的診断との関連が明らかとなり、QLF法は病原性歯垢の選択的検出ならびに質的診断が可能であることがわかった。

この成果を基に、歯周疾患を持つ患者における歯垢の質的診断について臨床研究を実施中である。

E. 結論

蛍光を発する歯垢のなかには、歯周病関連菌が多いことがわかり、各被験者の歯垢付着状態、成熟度および蓄積速度のみならず、歯垢の質的評価にもQLF法が応用できることがわかった。

引用文献

- 1) Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, van der Veen M, de Josselin de Jong E, Stosser L. Quantitative light-induced fluorescence (QLF) - a potential method for the dental practitioner. *Quintessence Int.* 2003; 34: 181-188.
- 2) Sagel PA, Lapujade PG, Miller JM, Sunberg RJ. Objective quantification of plaque using digital image analysis. *Monogr Oral Sci* 2000; 17: 130-143.
- 3) Smith RN, Rawlinson A, Lath D, Elcock C, Walsh TF, Brook AH. Quantification of dental plaque on lingual tooth surfaces using image analysis: reliability and validation. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 569-573.
- 4) Carter K, Landini G, Walmsley AD. Automated quantification of dental plaque accumulation using digital

- imaging. *J Dent* 2004; 32: 623-628.
- 5) Koenig K, Hibst R, Meyer H, Flemming G, Schneckenburger H. Laser-induced autofluorescence of carious regions of human teeth and caries-involved bacteria. *Proceedings of SPIE* 1993; 2080: 170-180.
- 6) Koenig K, Flemming G, Hibst R. Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 1293-1300.

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

神原正樹, 川崎弘二, 上村参生. バイオフィルム検出における口腔内カメラ活用の意義と使用解説. *The Quintessence* 24 (3); 567-573 : 2005.

2. 学会発表

Kawasaki K, Sakai R, Takashima R, Kambara M. Evaluation of red-fluorescent dental plaque using QLF method. *Journal of Dental Research* 84 Special Issue A ; Seq #229 2059 : 2005.

Kishikawa R, Tsubaki E, Koiwa A, Otsuki M, Kambara M, Matoba K, Tagami J. Oral examination using a new oral scope. *Japanese Association*

for Dental Research 52nd Annual Meeting Program and Abstracts of Papers 52 ; 101 : 2004.

川崎弘二, 上村参生, 上田雅俊, 今井久夫, 神原正樹. QLF法による歯垢付着特性の評価. *日本歯周病学会会誌* 46(秋季特別号); 113 : 2004.

竹内博朗, 的場一成, 奥田健太郎, 神原正樹, 花田信弘. *Porphyromonas gingivalis* によるバイオフィルムの光学的手法を用いた臨床検出法の検討. *日本口腔衛生学会雑誌* 54 (4); 439 : 2004.

川崎弘二, 酒井怜子, 高島隆太郎, 伊津元博, 朴容徳, 西島典幸, 川上富清, 田中浩二, 河村泰治, 神原正樹. 歯垢の検出に対するQLF法の応用. *日本口腔衛生学会雑誌* 54 (4); 313 : 2004.

川崎弘二, 高島隆太郎, 伊津元博, 上村参生, 朴容徳, 神原正樹. QLF法による歯垢検出技術の評価に関する研究. *歯科医学* 67 (3/4); 289 : 2004.

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

感染象牙質の除去におけるQLF法の応用

分担研究者 川崎 弘二 大阪歯科大学口腔衛生学講座助手

研究要旨

ヒトを対象に感染象牙質の除去を行う際に段階的なQLF法による評価を行い、感染象牙質の除去に対するQLF法の応用の可能性について検討した。その結果、QLF法の応用により、肉眼では検出困難なHidden cariesの検出が可能であることが明らかとなり、QLF法による赤色蛍光を解析するパラメータのうち、 ΔR_{Max} は感染象牙質の除去に対応した局所的な蛍光強度の変化を観察することが可能であることが明らかとなった。すなわち、QLF法の応用により感染象牙質の露出状態および感染象牙質の除去の程度が定量的に評価できることが明らかとなった。

A. 研究目的

21世紀の健康科学時代において、歯科のフィールドにおける疾患の予防、さらに健康増進を目指した医療の構築のためには、予防歯科診療に必要なArts（技術）の開発が不可欠である。近年の多くの疫学的調査において、う蝕の総修復数に占める再修復数の割合が高いことが報告されている^{1~4)}。う蝕の修復治療において感染象牙質の除去が不十分であった場合、う蝕の再発を招く原因のひとつとなるため、感染象牙質の有無の診断は再発予防を考慮した修復治療における重要なポイントとなる。

いまだ口腔内における二大疾患のひとつであり続けているう蝕において、ミニマル・インターペンション^{5, 6)}の考え方が膾炙してきているとはいうものの、除去が必要な感染象牙質から健全な歯質にいたる段階、すなわち象牙質における微生物感染の

診断は、視診による色調の変化や触診による象牙質の硬さ⁷⁾、う蝕検知液による染色^{8, 9)}などが指標となるが、これらの主観的診断は標準化が困難である¹⁰⁾。

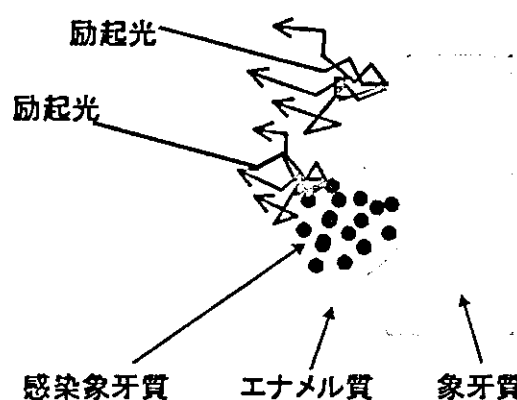


図1 QLF法により感染象牙質を検出する原理

エナメル質の表層下脱灰を、歯の持つ自家蛍光を応用した光誘導蛍光定量法

(Quantitative Light-induced Fluorescence、以下QLF法と略)^{11~14)}によって非破壊的な定量的観察が可能であることは知られているが、QLF法により感染象牙質が発する蛍光も検出できることが明らかとなってきた(図1)^{15, 16)}。QLF法による診査は対象物が発する蛍光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を施すもので、定量的に感染象牙質の性状を詳細に評価できる可能性がある。

本研究ではヒトを対象に感染象牙質の除去を行う際に段階的なQLF法による評価を行い、感染象牙質の除去に対するQLF法の応用の可能性について検討した。

B. 研究方法

被験者はX線診査により確定した臨床的に修復治療が必要な象牙質に達するう蝕を持ち、インフォームドコンセントによる内容説明を行い実験の参加に同意を得た健康な成人3名とし、各被験者それぞれ2歯を対象とした。感染象牙質の評価はInspektor Pro システム (Inspektor Research Systems 社製、オランダ、図2) および青色発光ダイオードを照明として使用する口腔内カメラ、ペンスコープ (モリタ製作所製、図3) により行った。

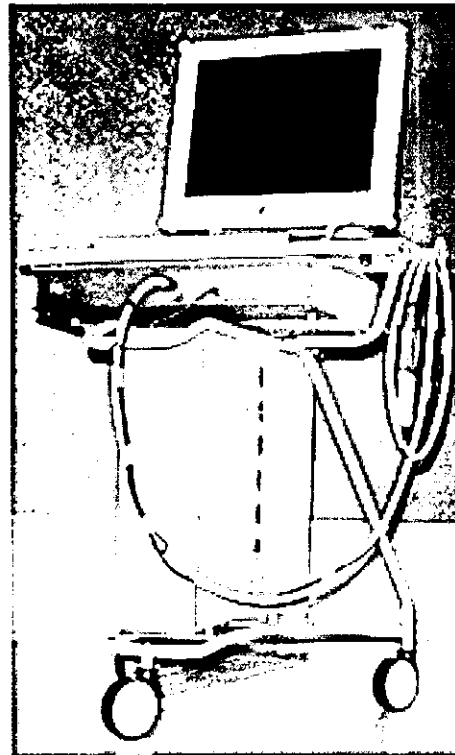


図2 Inspektor Pro システム

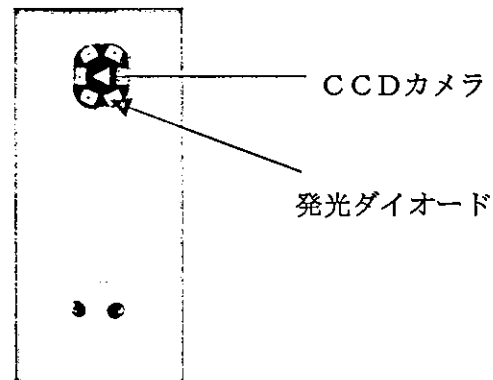
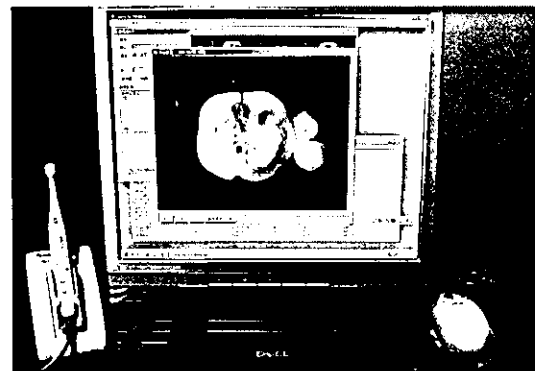


図3 ペンスコープ

Inspektor Pro システムでは蛍光が観察された感染象牙質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にて、蛍光が観察された面積 (Area)、感染象牙質が発する蛍光強度の平均 (ΔR Average)、感染象牙質が発する蛍光強度の最大値 (ΔR Max) を算出した。

感染象牙質の除去は視診による色調の変化、触診による象牙質の硬さを基準としてラウンドバーおよび手用エキスカベータにより行い、その過程を段階的に Inspektor Pro システムおよびペンスコープで観察した。

C. 研究結果

エックス線写真の撮影により、う蝕の存在が疑われる部位を実体写真により撮影すると、表面の連続性が保たれているためう蝕の存在は視診では明確ではない (図 4-1、図 4-2)。



実体写真



エックス線写真



Inspektor Pro



ペンスコープ

図 4-1~4 う蝕部位の各種画像

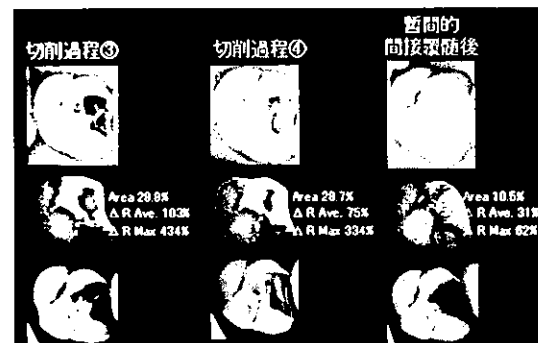
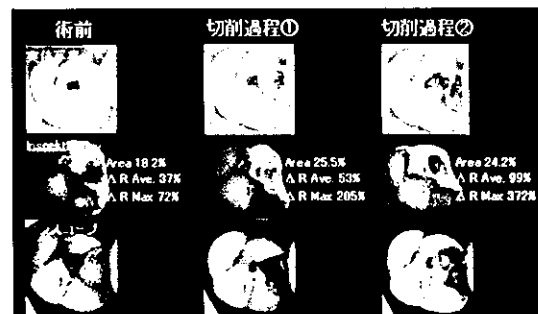


図 5 う窩の開拡に伴う赤色蛍光の変化

しかし、Inspektor Pro システムおよびペンスコープによるデジタル画像ではう蝕部位と一致して赤い蛍光が観察された。

Inspektor Pro システムによる画像解析の結果、すべての被験歯において ΔR Max はう窩の開拡に伴って上昇し、エナメル質を除去することによって感染象牙質が露出すると最大値を示し、感染象牙質の除去が進むにつれ低下するという山型の変化を示した (図5)。

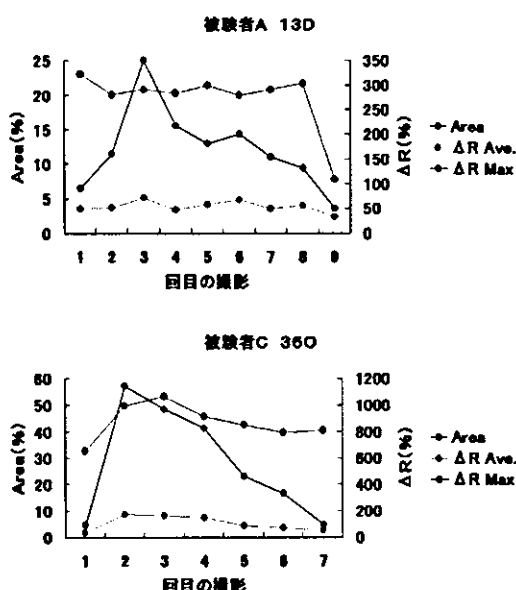


図5 う窩の開拡に伴うQLFパラメータの推移 (上: 被験者A、下: 被験者C)

同様の過程において、Areaは次第に減少するケースやほとんど変化を示さないケースがあり一定の傾向を示さず、 ΔR Average はほぼ一定の値を示した。ペンスコープによる診査では、臨床的に感染象牙質と診断した部位に一致して赤い蛍光が観察された。

D. 考察

Inspektor Pro システムによる解析結果においてAreaが一定の傾向を示さなかったのは、感染象牙質がほぼ除去できたケースや、露髄の危険性があったため感染象牙質の除去途中で暫間的間接覆髄法に移行したケースが存在したためであり、 ΔR Average がほぼ一定の値を示したのは平均値による表現では局所的な感染象牙質の存在を明示できなかったためと考えている。

一方、 ΔR Max は感染象牙質の除去に対応した局所的な蛍光強度の変化が観察できたものと考えている。

E. 結論

- ①QLF法の応用により、Hidden cariesの検出が可能であることが明らかとなった。
- ②QLF法の応用により感染象牙質の露出状態が定量的に評価できることが明らかとなった。
- ③QLF法の応用により感染象牙質の除去の程度が定量的に評価できることが明らかとなった。

引用文献

- 1) Qvist V, Qvist J, Mjor IA. Placement and longevity of tooth-colored restorations in Denmark. Acta Odontol Scand 1990; 48: 305-311.
- 2) Mjor IA, Medina JE. Reasons for placement, replacement, and age of gold restorations in selected practices. Oper Dent 1993; 18: 82-8.
- 3) Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G. Placement and replacement of amalgam restorations in Germany; Oper Dent 1994; 19: 228-232.

- 4) Deligeorgi V, Mjor IA, Wilson NH. An overview of reasons for the placement and replacement of restorations. *Prim Dent Care* 2001; 8: 5-11.
- 5) Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry - a review; *Int Dent J* 2000; 50: 1-12.
- 6) Mount GJ. Minimal intervention dentistry: rationale of cavity design; *Oper Dent* 2003; 28: 92-99.
- 7) van Amerongen JP, van Loveren C, Kidd EAM. Caries management: Diagnosis and treatment strategies, ed: Summitt JB, Robbins JW, Schwartz RS, dos Santos J. *Fundamentals of Operative Dentistry*; 2nd ed, Quintessence Publishing, Illinois, 70-90, 2000.
- 8) Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining; *J Dent Res* 1976; 55: 678-683.
- 9) 伊藤和雄. EDTA、GM によるデンティンボンディング理論の確立と新しい齲蝕検知液「カリエスチェック」. 歯界展望 2004 ; 104 : 910-923.
- 10) Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993; 27: 402-408.
- 11) de Josselin de Jong E, Sundstrom F, Westerling H, Tranaeus S, ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A new method for in vivo quantification of changes in initial enamel caries with laser fluorescence. *Caries Res* 1995; 29: 2-7.
- 12) van der Veen MH, Ando M, Stookey GK, de Josselin de Jong E. A Monte Carlo simulation of the influence of sound enamel scattering coefficient on lesion visibility in light-induced fluorescence. *Caries Res* 2002; 36: 10-18.
- 13) Heinrich-Weltzien R, Kuhnisch J, van der Veen M, de Josselin de Jong E, Stosser L. Quantitative light-induced fluorescence (QLF) a potential method for the dental practitioner; *Quintessence Int* 2003; 34: 181-188.
- 14) Pretty IA, Edgar WM, Higham SM. The effect of dehydration on quantitative light-induced fluorescence analysis of early enamel demineralization. *J Oral Rehabil* 2004; 31: 179-184.
- 15) Lennon AM, Buchalla W, Switalski L, Stookey GK: Residual caries detection using visible fluorescence. *Caries Res* 2002; 36: 315-319.
- 16) Lennon AM. Fluorescence-aided caries excavation (FACE) compared to conventional method; *Oper Dent* 2003; 28: 341-345.

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