(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5421096号
(P5421096)

(45)発行日　平成26年2月19日(2014.2.19)　(24)登録日　平成25年11月29日(2013.11.29)

(51)Int.Cl.		F I		
A61C 19/06	(2006.01)	A61C	19/06	A
A61C 19/04	(2006.01)	A61C	19/04	Z
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	C
		A61C	19/04	J

請求項の数 9　(全 19 頁)

(21)出願番号	特願2009-506536 (P2009-506536)
(86)(22)出願日	平成19年4月17日 (2007.4.17)
(65)公表番号	特表2009-534097 (P2009-534097A)
(43)公表日	平成21年9月24日 (2009.9.24)
(86)国際出願番号	PCT/US2007/009316
(87)国際公開番号	WO2007/123880
(87)国際公開日	平成19年11月1日 (2007.11.1)
審査請求日	平成22年3月10日 (2010.3.10)
(31)優先権主張番号	60/792,768
(32)優先日	平成18年4月18日 (2006.4.18)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	60/819,135
(32)優先日	平成18年7月7日 (2006.7.7)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　507403735
プレジデント　アンド　フェローズ　オブ　ハーバード　カレッジ
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ケンブリッジ　クインシー　ストリート　１７
(74)代理人　100082072
弁理士　清原　義博
(72)発明者　永井　成美
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０２４２１　レキシントン　ウィンスロップ・ロード　４２
審査官　川島　徹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】初期段階虫歯検出方法及びキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

患者の歯のエナメル質における初期段階の虫歯を検出するキットであって、

該キットは、光学的に検出可能な蛍光プローブ又はその薬学的に許容可能な塩を少なくとも１つ含む溶液を備え、

該光学的に検出可能な蛍光プローブは、テトラサイクリン、カルボニル反応性蛍光色素、量子ドットの製剤、インドシアニングリーン、ドキソルビシン、リボフラビン、及びクロロフィルＡからなる群より選択され、

該プローブは、脱灰の前の段階における前記歯のエナメル質の深さ約１００μｍ以下の初期段階の虫歯の白斑に選択的に結合する組成物であり、

光が照射された状態の前記歯のエナメル質における虫歯と結合された該プローブは、光の波長の蛍光発光によって特徴づけられ、

該キットは、前記溶液を調製するため及び光学装置とともに前記溶液を使用するための使用説明書をさらに備え、

該使用説明書は、前記溶液を歯に適用すること、及び少なくとも１つの励起波長を用いて隣接歯間表面を含む歯の表面全体をスキャニングすることを含み、

該励起波長は、蛍光プローブがテトラサイクリンのとき３５０～４５０ｎｍ、蛍光プローブがカルボニル反応性蛍光色素のとき７２０～７５０ｎｍ、蛍光プローブが量子ドットの製剤のとき４００～７５０ｎｍ、蛍光プローブがインドシアニングリーンのとき７５０～８００ｎｍ、蛍光プローブがドキソルビシンのとき４００～５００ｎｍ、蛍光プローブ

がリボフラビンのとき４００～５００ｎｍ、蛍光プローブがクロロフィルＡのとき６００～６５０ｎｍから選択される少なくとも１つであり、
該使用説明書はさらに、該プローブの蛍光発光を、蛍光プローブがテトラサイクリンのとき４５０～６００ｎｍ、蛍光プローブがカルボニル反応性蛍光色素のとき７５０～８００ｎｍ、蛍光プローブが量子ドットの製剤のとき７５０～９００ｎｍ、蛍光プローブがインドシアニングリーンのとき８２０～８７０ｎｍ、蛍光プローブがドキソルビシンのとき６００～７００ｎｍ、蛍光プローブがリボフラビンのとき５００～７００ｎｍ、蛍光プローブがクロロフィルＡのとき６７０～９００ｎｍの波長で、前記光学装置を用いて検出することを含み、
該キットは容器をさらに備えることを特徴とするキット。
【請求項２】
前記テトラサイクリンがテトラサイクリンの結合体である請求項１記載のキット。
【請求項３】
患者の歯のエナメル質における初期段階の虫歯を検出するキットであって、
該キットは、光学的に検出可能な蛍光プローブ又はその薬学的に許容可能な塩を少なくとも１つ備える溶液を備え、
該プローブは、脱灰の前の段階における前記歯のエナメル質の深さ約１００μｍ以下の初期段階の虫歯の白斑に選択的に結合する組成物であり、
該組成物は、薬学的に許容可能な担体又はバッファ、及びインドシアニングリーン、ドキソルビシン、リボフラビン、及びクロロフィルＡからなる群より選択される少なくとも１つを備え、該組成物は、歯のエナメル質における虫歯に結合したプローブからの光の波長の蛍光発光によって特徴づけられ、
該キットはさらに光学装置を備え、該光学装置は、ハンドヘルド型の口腔内光波検出装置、カメラ、光ファイバー装置、ＵＶ励起ランプ、及び分光光度計の少なくとも１つから選択され、これらは結合されたプローブを有する虫歯を検出し、
該キットはさらに溶液を調製するため及びその使用のための使用説明書を備え、該使用説明書は、少なくとも１つの歯を該プローブの濃度の溶液と接触させること、余分なプローブを除去するためにすすぐこと、光学装置を用いて前記結合されたプローブの蛍光励起のための波長で歯に光を当てることにより前記結合されたプローブを視覚化すること、及び歯表面全体をスキャニングすることを含み、蛍光励起の領域は虫歯の位置を示し、
該キットは容器をさらに備えることを特徴とするキット。
【請求項４】
前記光学装置がＵＶ励起ランプ又は分光光度計であって、
該光学装置が電磁波波長放射装置をさらに備え、波長は発光プローブの励起のために生成される請求項３記載のキット。
【請求項５】
前記プローブは、ユニットで使用されることを特徴とする請求項１記載のキット。
【請求項６】
前記キットはさらに、前記プローブに用いるアプリケータを備えることを特徴とする請求項３記載のキット。
【請求項７】
前記アプリケータは、スプレー、咬翼法で使用される溶液、及び圧縮性チューブから押出すジェルからなる群から選択される１以上のものであることを特徴とする請求項６記載のキット。
【請求項８】
前記使用説明書が、光学装置を用いて視覚化する前に、余分なプローブを除去するために溶液を用いて歯をすすぐことをさらに備える請求項３記載のキット。
【請求項９】
前記使用説明書が、光学装置を用いて視覚化する前に、余分なプローブを除去するために水を用いて歯をすすぐことをさらに備える請求項３記載のキット。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、米国仮出願番号60/792,768、60/819,135、60/850,922及び60/901,421に関する。これらは夫々2006年4月18日、2006年7月7日、2006年10月11日及び2007年2月15日に米国特許商標局に出願されており、夫々参照することにより全体を本明細書に組み込むこととする。
【０００２】
本発明は、初期段階の虫歯の検出を、選択的に虫歯に結合する複合物を用いて行うことに関する。虫歯になりうる病変は、近赤外線波長帯の吸光、又は分光光度計或いは他の光学装置に用いられるハンドヘルド型のプローブによる発光、紫外線ランプを用いた蛍光、或いは円偏光二色性を検出する蛍光のいずれかにより検出される。
【背景技術】
【０００３】
主にフッ化物を様々な方法で使用する虫歯を減少させる効果的な予防方法が存在するにも関わらず、歯周病に伴う虫歯は依然として世界的に歯の喪失の主な原因となっている。歯の表面の脱灰がエナメル質にまで到達する前、すなわち虫歯が早期に検出されていれば、初期の虫歯病変は、再石灰化による治癒が可能である。
【０００４】
しかし、病変がエナメル質内まで進んでいた場合、例えば、アマルガムや合成物の詰め物の充填といった修復作業が必要となってくる。一般的に、そのような修復作業はより観血的なものであり、患者や第三者に対し非常に高額な支出を要するものである。したがって、虫歯病変を初期に検出することは、虫歯の予防及び治療において重要な要素である。
【０００５】
２０世紀前半において、歯の疾病の程度に関する調査を実施するための指針及び手法が発展した。近代疫学研究は１９５０年代の間で始まり、１９６０年以降は多くの信頼性の高い研究がなされてきている。ＯＲＣＡは初期の科学的な評議会の一つで、病変の進行度が低い人々における虫歯の診断の試みに重点的に取り組んだ。ＯＲＣＡの虫歯診断作業部会のシンポジウムの結びの言葉は以下の通りである。「虫歯病変が進行的であるかどうかを決定する方法を発展させることは、虫歯研究において優先してなされるべきだ。」
【０００６】
従来の虫歯検出方法の診断能はかなり不十分なものであったため、研究団体は定量的検出方法の発展を促された。定量的検出方法とは例えば、電気伝導度測定、光散乱法、及びレーザ蛍光法である。これらの検出方法が、現在のスタンダードであるエックス線技術に加え発展した。この発展には少なくとも３つの動機が存在する。その動機とは、（１）定量的方法は、従来の方法よりも早い段階で病変を検出できる、（２）定量的測定は、性質的測定よりも信頼性がある、（３）定量的評価は、病気の経過を患者に害の無い方法で観察する手段をもたらすことができる、ということである。
【０００７】
しかしながら、「生涯にわたる虫歯の診断と管理方法」についての２００１年の米国国立衛生研究所コンセンサス開発会議のために用意された診断方法の系統的レビューは、現在虫歯の検出に用いられる様々な方法の相対的な有効性を確立することができなかった。
【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
ある実施形態において、本発明は患者の初期段階の虫歯を検出する方法を提供し、該方法は、光学的に検出可能なプローブを虫歯に選択的に結合させることにより、初期段階の虫歯の病変に接触させる段階と、光学装置を用いて、プローブと結合された虫歯を検出する段階を備えることを特徴とする。ある特定の実施形態において、初期段階の虫歯は、脱灰前の段階である。すなわち、虫歯は「白斑」を有する、もしくは初期段階の虫歯である

。

【０００９】

本明細書記載の方法における特定の実施形態は、選択的結合の検出は、さらに、蛍光プローブを歯に接触させる段階を備え、該蛍光プローブは、テトラサイクリン、Hilight Fluor（登録商標)、Qdot（登録商標）、インドシアニングリーン、ドキソルビシン、リボフラビン、クロロフィル、及びポルフィリンのグループから選択される。選択的結合の検出は、歯に対して励起波長で照射し、放射波長で照射された光放射部分を検出することで診断を行なう段階を備える。本発明の方法の代替可能な実施形態は、選択的結合の検出は、さらに、歯とプローブを接触させる段階を備える。該プローブは管腔及びルシフェリンなどである。本方法は、さらに、前記歯と過酸化水素、ルシフェラーゼ及び金属イオン等の他の反応剤を触媒として接触させる段階を備える。

【００１０】

本発明の方法の代替可能な実施形態において、選択的結合の検出は、さらに、歯とコロイド金を接触させ、近赤外線（NIR）の吸光部分を検出することで診断を行なう段階を備える。本発明の代替可能な実施形態において、選択的結合の検出は、さらに、歯と量子ドット複合体のプローブを接触させ、蛍光検出もしくは二色性の蛍光検出で診断を行なう段階を備える。さらに別の代替可能な実施形態において、選択的結合は、さらに、歯と量子ドット複合体に結合するプローブを接触させる段階を備え、結合物は、テトラサイクリン、ビスマス、コロイド金などのグループから選択される第二物質に取り付けられ、蛍光検出もしくは二色性の蛍光検出が行われる。別の代替可能な実施形態において、選択的結合は、さらに、歯とコロイド金を接触させ、HiLyte Fluor 750ヒドラジドで蛍光検出を行い、診断を行なう段階を備えることを特徴とする。

【００１１】

本方法の別の代替可能な実施形態において、光学的に検出可能なプローブは、帯電され、プローブは初期段階の虫歯に、イオン結合により結合することを特徴とする。別の実施形態において、虫歯の検出段階は、測光により観察されることを特徴とする。別の実施形態において、プローブはテトラサイクリンであり、テトラサイクリンプローブに選択的に結合される前記虫歯は、白斑が観察されることを特徴とする。本発明の方法の別の実施形態において、量子ドットプローブに選択的に結合される前記虫歯は、半透明のエナメルの蛍光局所であることを特徴とする。本発明の方法の別の実施形態において、白斑は、エナメル表面において診断される、もしくは、表面から約５０から約１００マイクロメータの下層内で診断されることを特徴とする。

【００１２】

本発明の方法の別の実施形態において、前記蛍光プローブはテトラサイクリンであり、前記歯を照射する波長は約３５０から約４５０nmであり、テトラサイクリンの蛍光を検出する波長は約４５０から約６００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の実施形態において、前記蛍光プローブはHilyte Fluorであり、前記歯を照射する波長は約７２０から約７５０nmであり、Hilyte Fluorの蛍光を検出する波長は約７５０から約８００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはQdotであり、前記歯を照射する波長は約４００から約７５０nmであり、Qdotの蛍光を検出する波長は約７５０から約９００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはインドシアニングリーンであり、前記歯を照射する波長は約７５０から約８００nmであり、インドシアニングリーンの蛍光を検出する波長は約８２０から約８７０nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはドキソルビシンであり、前記歯を照射する波長は約４００から約５００nmであり、ドキソルビシンの蛍光を検出する波長は約６００から約７００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはリボフラビンであり、前記歯を照射する波長は約４００から約５００nmであり、リボフラビンの蛍光を検出する波長は約５００から約７００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはクロロフィル

Aであり、前記歯を照射する波長は約６００から約６５０nmであり、クロロフィルAの蛍光を検出する波長は約６７０から約９００nmであることを特徴とする。さらに本発明の別の関連する実施形態において、前記蛍光プローブはポルフィリンであり、歯を照射する波長が約５５０から約６５０nmであり、ポルフィリンの蛍光を検出する波長は約６５０から約７５０nmであることを特徴とする。

【００１３】

本発明の方法の別の実施形態において、プローブは、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びアデノシン三リン酸を備え、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びアデノシン三リン酸の蛍光を検出する波長は約６００から約８００nmであることを特徴とする。本発明の方法の別の関連する実施形態において、プローブはコロイド金であり、前記コロイド金の吸収領域を検出する波長は約５００から約８００nmであることを特徴とする。さらに本発明の方法の別の関連する実施形態において、前記プローブはビスマスであり、前記ビスマスの吸収領域を検出する波長は約５００から約８００nmであることを特徴とする。

【００１４】

特定の実施形態において、虫歯は隣接歯間に有する。他の実施形態において、接触させる段階の前に、隣接歯間は、以下に示すグループから選択される１以上の方法によりアクセスされ、前記グループは、スペーサを挿入する段階と、プローブの含有する金属断片もしくはプラスティック断片を用いて、隣接歯間部分にプローブを導く段階を備えることを特徴とする。

【００１５】

本発明の方法の特定の実施形態において、結合物は、量子ドット複合物もしくはHiLyte Fluor 750ヒドラジドを用いて構成されることを特徴とする。別の実施形態において、コロイド金は、金ナノシェル粒子を備えることを特徴とする。さらに別の実施形態において、プローブは、トラサイクリン蛍光プローブであり、該テトラサイクリン蛍光プローブは、少なくともクロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリンの１つを備えることを特徴とする。

【００１６】

ある実施形態において、接触継続時間は、少なくとも約２０秒、約４０秒、もしくは約６０秒であることを特徴とする。これらの方法の別の実施形態において、灰色、銀色、白色、もしくは半透明局所の部分は、前記虫歯の位置を示すことを特徴とする。これらの方法の関連する実施形態において、灰色、銀色、白色、もしくは半透明局所の大きさは、前記虫歯の範囲を示すことを特徴とする。

【００１７】

これらの方法の関連する実施形態において、光学装置は、ハンドヘルド型の口腔内光学装置であることを特徴とする。これらの方法の関連する実施形態において、発光は、分光光度計及び／または光学装置に接続される、紫外線ランプもしくはハンドヘルド型口腔内プローブのアタッチメントを用いて検出されることを特徴とする。

【００１８】

別の実施形態において、本発明の方法は、接触前に、自家蛍光の存在を検出する段階をさらに備えることを特徴とする。別の実施形態において、本発明の方法は、再石灰化することで、検出された虫歯を治療する段階をさらに備えることを特徴とする。特定の実施形態において、哺乳類の患者の虫歯が検出されることを特徴とする。別の実施形態において、患者は人間であることを特徴とする。

【００１９】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらにプローブが結合された前記虫歯の領域の画像を準備する段階を備えることを特徴とする。別の実施形態において、本発明の方法は、虫歯病変を再石灰化する段階をさらに備え、前記虫歯病変が観測、予防、もしくは軽減されることを特徴とする。

【００２０】

別の実施態様において、本発明は、患者の初期段階の虫歯を検出するキットを提供し、

該キットは、前記初期段階の虫歯に結合する検出可能なプローブを備え、前記キットは、さらに、容器、及び初期段階の病変を有する、陽性対照の歯質試料を備えることを特徴とする。別の実施形態において、本発明は、患者の初期段階の虫歯を検出するキットを提供し、該キットは以下に示すグループから選択される1以上のプローブを備え、前記グループは、コロイド金、蛍光プローブ、及び生物発光であり、前記プローブは、前記虫歯に選択的に結合し、前記キットはさらに、容器、及び初期段階の病変を有する、陽性対照の歯質試料を備えることを特徴とする。

【００２１】

特定の実施形態において、キットは、光学装置の使用説明書をさらに備えることを特徴とする。別の実施形態において、キットにおける蛍光プローブは、テトラサイクリンあるいはテトラサイクリンの結合物であることを特徴とする。例えば、蛍光プローブは、インドシアニングリーン、ドキソルビシン、リボフラビン、クロロフィル及びポルフィリンのグループから選択されることを特徴とする。

【００２２】

別の態様において、本発明は、検出可能なプローブ、光学装置、及び容器を備える、患者の初期段階の虫歯を検出するキットを提供することを特徴とする。関連する実施例において、本発明はさらに、初期段階の病変を有する、陽性対照の歯質試料をさらに備えることを特徴とする。別の関連する実施形態において、キットはさらに、しっよう説明書を備えることを特徴とする。

【００２３】

さらに別の関連する実施形態において、光学装置は、ハンドヘルド型口腔内光波検出装置、カメラ及び光ファイバ光学装置のグループから選択される１以上の装置を備えることを特徴とする。特定の実施形態において、光学装置はさらに、電磁波波長放射装置を備え、波長が発生することで、蛍光プローブが励起することを特徴とする。

【００２４】

特定の実施形態において、キットにおけるプローブは、蛍光複合物及び生物発光複合物のグループから選択される１以上の複合物であることを特徴とする。関連する実施形態において、プローブは、化学発光複合物であり、例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びその混合物であることを特徴とする。別の関連する実施形態において、プローブは蛍光プローブであり、例えば、インドシアニングリーン、ドキソルビシン、リボフラビン、クロロフィル、及びポルフィリンのグループから選択される１以上の複合物であることを特徴とする。さらに別の関連する実施形態において、プローブは、Qdot、コロイド金及びビスマスのグループから選択される１以上の複合物であることを特徴とする。

【００２５】

特定の実施形態において、プローブは、ユニットで使用されることを特徴とする。別の実施形態において、キットはさらに、前記プローブに用いるアプリケータを備えることを特徴とする。アプリケータは例えば、スプレー、咬翼法で使用される溶液、圧縮性チューブから押出すジェルであることを特徴とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２６】

定量的な虫歯の検出の新たな可能性は、現在、口腔内光学装置の発展と共に兆しが見えてきた。虫歯検出のための現在の工業的に容認される規格は、臨床的及び放射線学的試験の組み合わせである。その一方で口腔内光学装置は、非常に小さい光学的特性変化を検出する可能性を有する。この光学的特性変化は、肉眼では見落とされる可能性がある。またこのような発展は、レントゲン写真に付き物である放射線被爆が患者に及ぶことを回避する。また、非常に初期の段階の虫歯を検出するのに要する労働集約的な医師の時間を削減する。さらには、このような発展は、更に後の段階まで検出されなかったであろう虫歯の検出を可能にする。

【００２７】

歯のエナメル質表面の脱灰は、口腔内に酸及びバクテリアが存在することにより起こり

、これらの物質により虫歯が発症する。したがって、初期段階虫歯の領域、すなわち、脱灰の領域において陽／陰イオンとして結合できる分子は、制限なく、本明細書の方法及び装置に用いられる潜在的なプローブである。

【００２８】

実用的なプローブの種類の例は、光に対する追加的特性を有している。すなわち、励起光により蛍光するプローブ、光の励起無しで蛍光するプローブ、すなわち、ルシフェラーゼ／ルシフェリン系等の生物発光プローブ、及びビスマス、金コロイド等の照射光を吸収するプローブ等である。

【００２９】

１以上の標準光学特性（反射率曲線パターン、色読み取り、分散／吸収係数、或いはその他の光学データ）の僅かな差異が、本明細書において探求された。これは、健常歯と比較することにより、虫歯病変を判別するためである。そして、ハンドヘルド型装置がプログラムされてもよく、患者の口腔内の虫歯病変の正確な光学特性を得るよう設計がなされる。意外にも、これらの差異は実際、本明細書の実験例において説明したプローブの種類を用いて実験的に検出された。したがって、初期の病変における潜在的な変化を検出するのに光学装置を用いることは、本明細書において初期段階の病変における潜在的な変化を検出する手段として説明されている。例えば初期の病変として、他の種類の物質を用いて蛍光或いは自己蛍光することが可能なプローブの結合の範囲があげられる。

【００３０】

照射（励起）波長及び蛍光の放射はプローブ毎に最適化される。標準の光学装置は適切に使用するために変形されてもよい。照射光は歯の表面全体に用いられ、例えば、照射光線で表面がスキャニングされる。スキャニングは、隣接歯間領域の検出に特に重要である。さらに、本明細書内の実験例において、照射角度もまた重要であることがわかった。したがって、エナメル小柱に平行な方向に照射することは、プローブでの検出において特に効果的である。

【００３１】

本明細書中の様々なプローブと共に用いられる光学装置は、カメラで検出することが最適である。例えばカメラは、光ファイバカメラ等の小さいカメラである。光学装置に関するさらなる基準としては、照射光線の直径のサイズである。この照射光線は直接歯に接触するものである（よりサイズが小さい光線ほど優位なデータを創出する）。すなわち、光学装置に関する基準としては、光を吸収するプローブの検出に用いるカメラの直径（より小さい直径が優位であって、内視鏡の使用の考え方と同様である）、蛍光のプローブの検出に用いるカメラの直径（より小さい直径が優位であって、内視鏡の使用に関わる考え方と同様である）、及び、スキャニング可能な照射及び照射光の記録が可能なカメラがあげられる。

【００３２】

さらに、虫歯の検出に関する多数の最近の研究は、隣接歯間の虫歯病変を検出する正確な光学的方法はないことを示した。「近赤外(NIR)」に基づく検出は、隣接歯間の病変を撮像するのに可能な技術であるが、相当な数の誤診が発見され、したがってこの方法は臨床における用途からはかけ離れたものとなる。しかし驚くべきことに、本明細書中の実験例において示されるように複合物が発見され、この複合物は特に虫歯に結合し、光学装置を用いることにより検出することが可能である。

【００３３】

本明細書中で用いられる「白斑」という語句は、非常に初期段階の腐敗を表す。この腐敗は、エナメル質の内部、すなわちエナメル質表面から１００から１５０μｍ以下の場所で始まる。図１を参照する。バクテリア及び酸はさらに、エナメル小柱の空間（各エナメル小柱の間の１０μｍの空間）に達する。そして、そこで脱灰が行われ、エナメル質の表面の方へと進んでいく。病変の初期段階における白斑の検出は、再石灰化の方法の可能性を結果としてもたらす。この検出は、本明細書中にもたらされる検出の方法及び技術を用いて行われる。これらの処置は、歯科衛生及び費用の削減の向上に多大な貢献となるであ

ろう。

【００３４】

本明細書中で用いられる「プローブ」という用語は検出可能な複合物を表し、特に或いは好適に虫歯病変に結合するものである。プローブという言葉は、歯のエナメル層における虫歯に結合することができる染み、マーカ及び着色を制限なく含む。ある実施形態において、プローブは蛍光複合物である。例として、テトラサイクリン、HyLight Fluor（登録商標）、Qdot（登録商標）、ドキソルビシン、リボフラビン、クロロフィル、或いはポルフィリンが挙げられる。一般に、エナメル質に結合する蛍光複合物は、治療済みの歯を励起波長で照射することにより検出される。そしてこれにより放射波長を有する光放射領域を検出する。その他の実施形態において、プローブは生物蛍光複合物である。例として、ルシフェラーゼ及びルシフェリン或いはエクオリンが挙げられる。

【００３５】

他の実施形態において、プローブは光を吸収する複合物である。例として、ビスマス或いはコロイド金が挙げられる。一般に、光を吸収する複合物は、関心領域、例えば虫歯病変を有する歯を照射することにより検出される。これにより、特定の光の波長を吸収する歯の範囲或いは領域を検出する。特定の光の波長の吸収とは、近赤外（NIR）光の吸収等である。

【００３６】

金ナノ粒子は、NIRの光中に強力に吸収するよう設計されているということが「Lasers in Surgery and Medicine 37」（123-129 (2005) Gobin他）に示されている。金ナノ粒子はNIRと共に用いられ、創傷治癒研究において接合をもたらす。この接合は、ラットの皮膚創傷治癒モデルにおけるレーザによる組織接合及びレーザによる組織接着として知られているものである。金ナノ粒子の様々な役割がMazzola, L.著「Nature Biotechnology」（21 (10): 1137-1143, 2003）に記述されている。またこの中には、分子検出試験、局所的ペイロードデリバリ(payload delivery)、光活性化及び分離等の二次的な機構に誘発される組織剥離も含み記述されている。

【００３７】

オルトケイ酸テトラエチルの塩基性を減少させることで、Gobin.他著の文献中にある金ナノシェル合成が行われる。この塩基性の減少は、石英コアナノ粒子を３－アミノプロピルトリエトキシシラン（APTES、Sigma-Aldrich社、セントルイス、ミズーリ州）と反応させた後に起こる。そして、コア表面上のアミン群は金コロイドの沈殿をさせることができる。市販の金粒子（Auroshell（登録商標））はNanospectra Biosciences社（ヒューストン、テキサス州）、及びPurest Colloids（MesoGold（登録商標）；ウェストハンプトン、ニュージャージー州）より入手可能である。本明細書中の実験例ではColloidal gold total protein probe（BioRad社、ハーキュリーズ、カリフォルニア州）を用いる。しかし、いかなる市販のコロイダル金製剤でも初期段階の虫歯の検出において同様に機能することが想定されている。

【００３８】

抗生物質としての周知の重要性に加え、テトラサイクリンは測光用の蛍光投射剤（fluorescence incident agent）であり、例えば、骨の発達／形成の標識に用いられる。しかしテトラサイクリンは歯を変色させる。これは歯学において「テトラサイクリン歯」と呼ばれる。テトラサイクリンは新たに形成された骨或いは歯に接する部分で結合する。そして結果として起こった結合は、蛍光の線或いは点として観察される。「テトラサイクリン蛍光」という語句は、新たに形成された骨或いは歯に結合する薬剤であって、予め設定された光の波長で照射された場合、蛍光が可能になる。また、テトラサイクリン蛍光は全てのテトラサイクリンファミリーメンバを制限なく含み、また同様にさらなる複合物も含む。この複合物とは、金化合物、量子ドット複合物、HyLyte fluor 750 ヒドラジド化合物、及びその他の複合物である。前述のその他の化合物は、新たに骨或いは歯と結合する機能的属性、及び刺激光波長で照射時に、蛍光或いは他の光学的信号又は物理的信号の放射の機能的属性を共有するものである。

【００３９】
インドシアニン・グリーン（ＩＣＧ）はトリカルボシアニン色素である。これは励起の時、約８００ｎｍ、約８２０ｎｍ、約８４０ｎｍ或いは約８６０ｎｍの光を放射する。ＩＣＧはH.W.Sands Corp.（ジュピター、フロリダ州）から入手が可能で、赤外線写真で用いられる、Wratten Filter（登録商標）の製剤、及び血液量測定、心拍出量或いは肝機能の診断補助薬として用いられる。ＩＣＧの特性はLandsman他による参考文献に記述されている（J. Appl. Physiol., 40:575-583, 1976）。
【００４０】
ドキソルビシン（アドリアマイシン或いはヒドロキシル基ダウノルビシンとしても知られている）は、ＤＮＡ相互作用抗がん剤として化学療法において広く利用されている。ドキソルビシンの化学療法的投与量の範囲は、約６０から７５ｍｇ／ｍ^{2}である。ドキソルビシンは蛍光性を有し、及び光を放射する。この光の波長は例えば、約５５０ｎｍ、６００ｎｍ、或いは６５０ｎｍである。そしてこの特性は細胞生物学の研究において用いられている。この研究とは、化学療法的投与量よりも非常に低い濃度において、薬物排出ポンプ作用及び様々な多剤耐性たんぱく質の細胞内局在性を測定することである。ドキソルビシンはSigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州）より入手可能である。リボフラビン（ビタミンＢ$_2$）は吸収されやすい微量栄養素であり、多様な細胞過程において、例えばエネルギ代謝といった役割を有する。リボフラビンは吸収されやすい、水溶性の微量栄養素であり、脂肪、炭水化物及びたんぱく質の代謝を助けることにより、エネルギ生成をサポートするものである。リボフラビンはまた、赤血球の形成及び呼吸、抗体の生産、及びヒトの成長及び生殖を制御する。リボフラビンは、遊離基として知られる体内の損傷を受けた分子を除去することにより、抗酸化物質として機能する。リボフラビンは、甲状腺活性と共に、健康な肌、爪、髪の成長及び一般的な健康状態にとって重要なものである。
【００４１】
リボフラビンは水溶性であり、過剰分は保存されないが、一般に尿と共に排出される。一般的に、リボフラビンは中毒量がないとされている。推奨最低一日投与量は、栄養補助食品として１ｍｇから２ｍｇである。一方、標準の一日の薬用量は５０ｍｇから１００ｍｇである。実質的に、本明細書中の歯の表面に接触する方法において、リボフラビンは少量でよい。リボフラビンはSigma-Aldrich社（セントルイス、ミズーリ州）から入手可能である。またリボフラビンは、例えば約４５０ｎｍ、約５５０ｎｍ、約６５０ｎｍ、或いは約７５０ｎｍの波長の光を放射する蛍光体である。リボフラビンの特性はDu他による参考文献に記述されている（Photochemistry and Photobiology, 68:141-142, 1998）。
【００４２】
クロロフィルＡは緑色の光合成色素で、例えば約６００ｎｍ、約７００ｎｍ、或いは約８００ｎｍの波長の光を放射する。クロロフィルＡはSigma Chemical社（セントルイス、ミズーリ州）及びTurner Designs社（サニーベール、カリフォルニア州）等から仕入れることが可能である。クロロフィルＡは通常のヒトの食物の一部であるので、周知の毒性を有しない。
【００４３】
ポルフィリンは複素環の大員環で、４つのピロールのサブユニットからできている。このサブユニットは４つのメチンのブリッジ（＝ＣＨ-）を介し反対側に接続している。ポルフィリンは広範囲に非タンパク質と結合する構造を有しており、化合物を着色させる。すなわち、ポルフィリンは、例えば約６００ｎｍ、約６５０ｎｍ、或いは約７００ｎｍの波長の蛍光体である。ポルフィリンはSigma-Aldrich社（セントルイス、ミズーリ州）から入手可能である。ポルフィリンはヘモグロビン及びミオグロビンと結合される。これらは動物性食物の構成要素であり、ひいては通常のヒトの食物の一部である。したがって、周知の毒性を有しない。
【００４４】
生物発光プローブでは、励起エネルギは、入射光源よりも化学反応により供給される。ルシフェリン及びルシフェラーゼは基質及びその基質に関連する酵素の例であって、発光

反応を触媒する、すなわち生物発光である。またアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）はこの反応に関係するものである。ルシフェラーゼがＡＴＰ存在下で適切なルシフェリン基質にさらされる場合、光が放射される（例えば約５００ｎｍ、約５５０ｎｍ、及び約６５０ｎｍ）。そして、本明細書中に記述される光学装置等の光検出装置により、光子放出が検出される。ルシフェラーゼ及びルシフェリンは、例えば感染の生物学的過程及び段階を観察するのに広く用いられている。またルシフェラーゼ及びルシフェリンは、Sigma-Aldrich社（セントルイス、ミズーリ州）から入手可能である。

【００４５】

生物発光複合物のさらなる例としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＥ）及びエクオリンである。これらの生物発光複合物はオワンクラゲから分離される。カルシウムイオンがエクオリンに結合する場合、複合体はアポエクオリン及び蛍光複合物に分解される。この蛍光複合体は青い光（約４６６ｎｍ）を放射する。合成エクオリンはSealite, Sciences社（ボガート、ジョージア州）からAQUALITE（登録商標）として入手可能である。ＧＦＰは可視スペクトラム（約４９０ｎｍから約５７０ｎｍ）のより低い緑色部分の光を放射する。合成ＧＦＰはClontech社（マウンテンビュー、カリフォルニア州）より入手可能である。

【００４６】

「量子ドット」として知られる複合物は、ナノメートルスケール（ほぼタンパク質と同じ大きさ）の原子集団からなる。これはInvitrogen社（カールズバッド、カリフォルニア州）から入手可能であるQdot（登録商標）に例示されるものである。原子集団は物質の結合を含む。例えば、アルカリ金属（Ｌｉ，Ｎａ，Ｋ，Ｒｄ，Ｃｓ及びＦｒ）の結合、アルカリ土類金属（Ｂｅ，Ｍｇ，Ｃａ，Ｓｒ，Ｂａ及びＲａ）の結合、遷移金属（Ｓｃ，Ｔｉ，Ｖ，Ｃｒ，Ｍｎ，Ｆｅ，Ｃｏ，Ｎｉ，Ｃｕ，Ｚｎ，Ｙ，Ｚｒ，Ｎｂ，Ｍｏ，Ｔｃ，Ｒｕ，Ｒｈ，Ｐｄ，Ａｇ，Ｃｄ，Ｈｆ，Ｔａ，Ｗ，Ｒｅ，Ｏｓ，Ｉｒ，Ｐｔ，Ａｕ及びＨｇ）の結合、ランタニド（Ｌａ，Ｃｅ，Ｐｒ，Ｎｄ，Ｐｍ，Ｓｍ，Ｅｕ，Ｇｄ，Ｔｂ，Ｄｙ，Ｈｏ，Ｅｒ，Ｔｍ，Ｙｂ及びＬｕ）の結合、及びアクチノイド（Ａｃ，Ｔｈ，Ｐａ，Ｕ，Ｎｐ，Ｐｕ，Ａｍ，Ｃｍ，Ｂｋ，Ｃｆ，Ｅｓ，Ｆｍ，Ｍｄ，Ｎｏ及びＬｒ）の結合である。これらの結合はシリカ或いはシリコンベースのコア上で行われる。

【００４７】

量子ドットの製剤は、試料に結合することにより発達してきたことで、蛍光体として利用可能になった。その後、試料は、紫外スペクトラムの光で照射される。量子ドットの製剤は大きなモル吸光係数、高光安定性及び強力で大きさに依存的な可変放射性を示す。放射ピークの可変的状態は赤外光、遠赤光及び赤色光に調整される。これらの光はしたがって歯のエナメル質に結合する。様々な金属、及び様々な大きさの粒子を有する入手可能な製剤により結合される。加えて、ドット粒子製剤は、金属の結合に応じて全ての負電荷或いは陽電荷に利用できる。

【００４８】

本明細書中で量子ドットの製剤は、脱灰したエナメル質に選択的に結合するが、健康的な電気的に中性なエナメル質には結合しない。これは、製剤が電子電荷を有するためである。

【００４９】

さらに、量子ドットは、本明細書中のあらゆる低分子複合物に結合することが可能である。例えば、複合物はテトラサイクリン、カルセイン（無傷細胞と生細胞を分類するのに用いられる蛍光染色液；Invitrogen社）、及びこれらの誘導体があげられ、これらは、脱灰されたエナメル質に親和性を有する。これらの結合により、「エナメル質との親和性を有する量子ドット」の製剤を形成する。そして、脱灰されたエナメルは、エナメル質との親和性を有する量子ドットを、半透明エナメル質の蛍光として利用し、検出される。あるいは、脱灰したエナメル質に結合する量子ドットは、二色性により検出される。この二色性としては、蛍光体を検出する円偏光二色性があげられる。

【００５０】

本発明における、有益な複合物のさらなる他の実施形態として、HiLyte Fluor 750ヒドラジドがあげられる。HiLyte Fluor 750ヒドラジドは、市販されている蛍光色素であり、コロイド金（AnaSpec,Inc社　サンノゼ　カリフォルニア州）のプローブとして利用される。HiLyte Fluor 750ヒドラジドはカルボニル反応による蛍光識別色素である。HiLyte Fluor 750ヒドラジドは、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などの糖タンパク質を識別するのに用いられる。HiLyte Fluor 750ヒドラジドは、現在入手可能なHyLyte Fluor色素の中で最も長い波長を有する。蛍光放射は約782nmであり、一般的に利用される遠赤外蛍光体とは十分に分離されている。遠赤外蛍光体として、例えば、HiLyte Fluor 647、HiLyte 680もしくはアロフィコシアニン（APC）があげられ、これらは、多色分析を促進する。

【００５１】

プローブの使用は、哺乳類の種、体重、年齢、個々の状態、個々の薬物動態データ、及び使用形態により決定される。本明細書記載のプローブは、哺乳類の歯（ヒト及び高等動物）に接触もしくは使用し、初期段階の虫歯病変を検出するのに最適である。この虫歯病変に対し、プローブが結合する。本明細書記載のプローブとしては、本発明の方法によるプローブ、あるいは薬学的に許容可能な塩の量が含まれ、初期段階の虫歯検出に有効である。本発明の方法によるプローブは、哺乳類の歯（ヒト及び高等動物）の口内で接触する、もしくは口内で使用される。プローブの口内接触もしくは口内使用は、単体もしくは薬学的に許容可能な相当量の担体もしくはバッファと共に、プローブを効果的に使用することを含む。

【００５２】

溶液濃度を有する、本発明の方法におけるプローブもしくは、大人のヒトの歯表面などの、歯表面に接触される薬学的に許容可能な塩は、例えば、約1ng/mlから約100ng/ml、約100ng/mlから約500ng/ml、約500ng/mlから約1μg/ml、約1μg/mlから約50μg/ml、約50μg/mlから約500μg/mlである。虫歯予測のため子供の歯に対して使用する場合、プローブもしくは塩はより少ない量である。例えば、2分の1から１０分の１である。

【００５３】

歯科医学で、初期段階の虫歯を検出することが長年求められている。本明細書記載の複合物は、以前虫歯病変のプローブとしては用いられていなかった。例えば、虫歯病変としては、初期の脱灰などの初期事象があげられる。他に、隣接歯間の病変を検出することが長年求められている。隣接歯間とは、すなわち、歯間の表面に存する病変を指す。初期段階の歯間の表面の病変（即ち、エナメル質の２分の１の深さに存在する）を検出するには、Ｘ線（咬翼法）もしくは視覚による臨床検査が利用されていたが、検出は、これまでは不可能であった。

【００５４】

本発明の方法において、プローブに結合する虫歯を検出するのに適した光学装置は、光学部材を備え、該光学部材は内視鏡の光学部材に類似している。これらの部材は、剛体のチューブもしくは弾性をそなえたチューブのいずれかを備え、該チューブは1以上の光ファイバシステムを備える。チューブは、光伝送システムなどの機械装置に用いられるチャネルを備える。該光伝送システムは、例えば、検査中の対象、すなわち本明細書中においては歯表面を照射するのに用いられている。ある特定の実施例において、光学装置は、さらに電磁波を放射する装置を備える。このような装置は、Bukosky 他などにより記載されている。（米国特許番号第6076948号2000年6月20日発行）。

【００５５】

ある実施形態において、光伝送システムは、口腔外に位置する光源を備える。この光源を用いて、光ファイバシステムを介して歯に光を照射する。また、光学装置は、LEDなどの埋め込み型の光源を含む。ある実施形態において、光学装置は、レンズシステムを備え、これにより、使用者に対し画像を送信する。使用者は、送信した光源の波長を制御する。例えば、この制御により蛍光プローブの励起に最適な光を送信する。ハンドヘルド型の口腔内光波検出装置として、Sharp Vision ZE-411口腔内視鏡（Sharp Vision Co, Ltd.社　広東　中華人民共和国）があげられる。

【００５６】
ある実施形態において、光学装置は、紫外線(UV)ランプである。紫外線は約10nmから約400nmの幅を有する波長の電磁波放射を示す。約345nmから約400nmの紫外線波長は、「ブラックライト」の効果を作り出す。すなわち、この波長幅により、特定の複合物は蛍光を発する。紫外線ランプは、Unilam Co, LTD.社（大韓民国）で入手可能である。
【００５７】
他の実施形態において、光学装置は、分光光度計である。本明細書では、分光光度計は、光の彩度を測定する装置を示す。すなわち、装置は、光の彩度を、色の関数として測定する。もしくは、より詳細には、光の波長として測定する。ある特定の実施例において、分光光度計は、蛍光プローブを検出するのに用いられ、該プローブは、歯の初期段階の病変に結合する。分光光度計は、Hitachi Ltd. (サンノゼ　カリフォルニア州)から市販されている。関連する実施形態として、分光光度計はハンドヘルド型分光光度計であり、技術者は、口腔内において、プローブからの電磁波光波（放射もしくは吸収）を測定することが可能である。このプローブは、歯の初期段階の虫歯に結合されている。ハンドヘルド型の分光光度計は、Konica Minolta社（東京　千代田区）から市販されている。
【００５８】
他の実施形態において、プローブは、可視光のスペクトルの範囲の波長を有する蛍光を発する。従って、プローブは、カメラを用いて検出され、初期段階の虫歯病変を有する歯の写真が撮影される。この病変にはプローブが結合されている。本明細書において、カメラは静止写真の画像もしくは一連の動画を撮像する装置を示す。本明細書ではプローブの検出に適したカメラは、Texas Instruments社（ダラス　テキサス州）を示す。
【００５９】
ファイバ光学で使用される光ファイバは、本明細書の光学装置の範囲に含まれる。光ファイバは、ガラス繊維もしくはプラスティック繊維であり、全反射させることで、ファイバ全長に沿って光を送信する。ファイバは、芯を備え、該芯はクラッド層に包囲されている。クラッド層の中の1以上の低屈折率の層は、高屈折率の芯の材質と接触する。本明細書に記載の光ファイバは、光を案内するのに用いられ、これにより、歯表面の部分あるいは部位を照射する。歯表面には、隣接歯間が含まれる。光ファイバは、コーヒレント束のファイバを含み、レンズを伴うこともある。
【００６０】
ファイバ光学は、以前から、歯の治療に用いられていることが知られている。例えば、歯牙充てんに用いられる光重合性組成物が知られている。硬化処理には、ハンドヘルド型の光源から供給される約４５０nmの波長を有する青色の光が用いられる。青色の光は、ファイバロッドもしくはファイバテーパ（SCHOTT North America Inc.社　サウスブリッジ
マサチューセッツ州）を介して、処置される歯に供給される。これらの装置は、本明細書記載のキット及び方法に対して即座に適応可能である。
【００６１】
本明細書記載のキットとして、様々な方法により、1以上のいずれかのプローブが用いられ、歯表面に接触する。例えば、薄膜もしくは結合剤はプローブでコーティングされ、結合剤が歯に用いられる。基板は薄い細長い紙、プラスティックテープ、もしくは他の便利なアプリケータの一片である。代替的に、プローブの溶液を含有する注射外筒を備えた注射型シリンジを、少量の溶液浸漬プローブ用として用いてもよい。ウェッジで隣接歯間を予め治療することにより、2以上の歯間の空間を広げ、隣接歯間領域はよりアクセスしやすくなる。
【００６２】
歯にプローブが接触した後、光学装置で確認する前に、領域は少なくとも1回、水で洗浄され、余分なプローブを除去する。
【００６３】
歯の治療に用いる光ファイバの例として、ハンドピースの光を含む。歯治療器具は、一般的に光源を備え、該光源により治療領域を照射する。治療領域を照射するため、誘導灯

がハンドピース器具内に組み込まれる（SCHOTT North America Inc.社，サウスブリッジ，マサチューセッツ州）。そして、このような器具は、本明細書において、治療領域を照射するのに用いられる。

【００６４】

図２は、本発明の特定の実施例で用いられる光学装置を示す。該装置は、切片、歯の試料、もしくは実験用の歯における、初期段階の虫歯病変に結合するプローブを、検出する。歯は、台（４）に設置され、プローブ結合させることで初期段階の虫歯病変が検出される。光源（１）、MAX301のキセノン光（Asahi Spector社，中国）は、あらゆるプローブ結合を検出することが可能な波長を用いて、歯の病変領域を照射する。すなわち、吸収波長もしくは放出波長を有する光で照射する。ある実施形態において、光ファイバ（５）（Olympus社,メルビル　ニューヨーク州）は、光源（１）の放射する電磁光波を放出すると共に集束させ、台（４）上の歯の病変領域に誘導する。シリコンキャップ及び紙で被うことで、光ファイバ（５）を改良し、これにより電磁光波を誘導し、局所照射を形成する。カメラ（２）、MC285SPD-L0B0カメラ（Texas Instruments社、ダラス、テキサス州）は検出可能なプローブの画像を撮像するとともに、コンピュータ（３）、Optiplex 201L (Dell Inc.,社　ラウンドロック、テキサス州)に画像を送信する。コンピュータ（３）は、Capture eBase（Solution Systems，Inc社ローリングミドウ　イリノイ州）を用いる。Capture eBaseは、光源（１）を制御するソフトウェアである。例えば、このソフトウェアは、光源（１）の波長を制御し、プローブの励起に最適な光を送信する。

【００６５】

再石灰化には、歯科の分野において従来から周知の複合物及び方法が用いられる。例えば、商的に利用可能な製品であるエナメロンがあげられる。エナメロンは、歯に直接供給される可溶性のリン酸カルシウムを有する歯磨き粉である。エナメロンはさらに、フッ化物を含有し、カルシウムを有する白色の歯磨き粉、及びリン酸塩とフッ化物を有する青色の歯磨き粉を備える。チューブを搾ることにより、並列してストライプが形成され、再石灰療法を行う。代替的に、１以上の再石灰化ジェルを歯科検診時に用いる。例えば、１ヶ月に１度の治療に、１００－１５０ppmのフッ化物を有する局所ジェルを用いたり、２．７２％の酸性フッ素リン酸を有する局所ジェルを用いたり、２％の中性フッ化ナトリウムを有する局所ジェルを用いたりする。毒性の許容濃度をはるかに下回る使用量が用いられるよう、注意が払われる。また、患者が絶対にジェルを飲み込まないよう、注意が払われる。

【００６６】

本発明は詳細に記述されてきたが、本発明の例及び請求の範囲を以下に開示し、例示することとする。この例示は、実施例を示すものであり、本発明の記載内容を制限するものではない。引用されるすべての参考文献の記載内容は、参照することにより本明細書に組み込まれるものとする。

【実施例】

【００６７】

実施例１．抜歯した歯の蛍光検出及び白斑との相関関係

各々抜去した歯の一部を含むエナメル質試料は分析され、１以上の「白斑」を有する試料を識別し、白斑を有するエナメル質試料を獲得した。白斑は、２段階に区分された。１つは視認可能な白斑、もう１つはエナメル質表面の濁った白斑であった。歯は照射され、自己蛍光するかどうか確認された。紫外線下において、特定の自己蛍光現象が確認されるわけではなかった。データによると、歯の白斑とそれ以外の部分は自己蛍光を示さないことが明らかである。従って、蛍光剤を用いて観察することで、白斑検出が促進される。

【００６８】

抜去した歯の試料は、テトラサイクリン溶液（1mg/ml）に６０秒培養された。そして、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄した。試料は、260nm(紫外線ランプSB-4W)の紫外線（UV）光下で観察された。加えて、蛍光は、Olympus社製の分光光度計に取付けられたハンドヘルド型のプローブを用いて測定される。明黄色のはっきりとした蛍光箇所がこれらの歯

に観察された。これは、明黄色の蛍光箇所は、結合されたテトラサイクリンが、以前、白斑と識別されていた局所部分に対応する部分に存在するためである。

【００６９】

実施例２．組織学的な分析

白斑を有する歯は、電子顕微鏡法により横方向から分析される。以下に示すが、獲得された横断面及び蛍光範囲は相互に関連付けられ、さらに組織学的に分析される。この方法により、初期段階の虫歯病変の蛍光部分の識別方法が確立される。

【００７０】

実施例３．コロイド金のプローブによるウシの歯の虫歯検出

ウシの歯は、１０％の塩酸で１０から３０秒間の浸漬過程により洗浄された。虫歯に対するモデル試験システムは、選択表面をエッチングすることで、確立された。選択表面のエッチングは、デンタルエッチングジェル、非シリカ10%リン酸エッチングジェルで３０秒行われる。他の試料は、エッチングを行わないで放置し、陰性対照とした。

【００７１】

Colloidal Gold Total Protein Stain (BioRad社、ハーキュリーズ、カリフォルニア州)を、各テスト試料および陰性対照試料に対して用いられ、２０から３０秒間浸漬させた。そして、試料は蒸留水で濯がれた。試料は、さらに、Gottleib and Chavko (Anal Biochem 165:33, 1987) により開発された方法から得られたSilver Stain Plus kit (Bio-Rad社)を用いて、染色した。全ての歯の試料は、その後、近赤外線光で照射され、試料は近赤外線を吸光した。

【００７２】

結果により、浸漬の前にエッチングを行っていたテスト試料は、銀白色の着色領域を示すことがわかった。一方、陰性対照（エッチングを行っていない試料）において、銀白色を示す部分はどこにも見当たらなかった。このデータは、近赤外線光を、金のプローブに接触する歯の試料に照射させると、初期段階の虫歯を検出することを示している。なお、この初期段階の虫歯には、隣接歯間の虫歯病変も含まれる。

【００７３】

実施例４．ヒトの虫歯検出

テトラサイクリン溶液を、歯科患者に頬側口腔及び舌口腔を経て接触させた。例えば、1mg/mlのテトラサイクリン溶液で、３０秒間うがいをすることで接触させる。よく濯いでから、頬側口腔及び舌口腔は紫外線光で照射される。そして、各蛍光局所の有無と位置が、分光光度計のハンドヘルド型アタッチメントを用いて調べられる。蛍光部分もしくは灰色局所部分は撮像される。

【００７４】

コロイド金溶液で、頬側口腔及び舌口腔を接触させた。例えば、BioRad Total Protein Stain カタログ番号170-6527で、３０秒間うがいをすることで接触させる。うがいの後、水でよく濯いでから、金処理が行われ、その後にSilver stain Plus (Bio-Rad社)で２０から３０秒うがいを行う。そして、頬側口腔及び舌口腔は近赤外線光（NIR）で照射され、銀白色染色の有無と位置が、分光光度計のハンドヘルド型アタッチメントを用いて調べられる。染色局所部分は撮像される。

【００７５】

実施例５．光学的特性により検出される、ヒト患者の初期段階の虫歯の再石灰化

検出及び、再石灰化治療は、以下のように、初期段階の虫歯位置で行われる。例えば、フッ化物イオンは、本目的のために考案された局所ジェルあるいは歯磨き粉を病変に用いることで、導入される。再石灰化治療により、部分的に脱灰されたエナメル質の結晶にカルシウム及びリン酸が沈着する。その結果、エナメル質を修復し完全な状態になる。

【００７６】

実施例６．ウシの歯試料を利用した検出プローブの診断

ウシの歯を入手する。そして、ウシの歯から象牙質層を除外して、エナメル質試料を得るためにウシの歯をスライスした。脱灰した部分は、エナメル質試料をスライスした部分

をエッチングすることで準備される。脱石灰部分を有するスライスしたエナメル表面は、連続した濃度の各プローブに接触される。さまざまな励起波長で照射し、エナメル質表面に結合するプローブの有無が確認される。その後、波長の放出が確認される。さらに、照射波長の吸収が検出される。目視、分光光度計、及び歯を撮像するカメラで、直接、光学観察が行われる。もしくは、光学装置上のプローブから光学装置上の撮像装置へと送信されるデータを間接的に用いることで、光学観察が行われる。

【００７７】

実施例７．ヒトの抜歯の隣接歯間モデルを利用した検出プローブの評価

ヒトの抜歯（臼歯および小臼歯）の隣接歯間モデルは、シリコン印象材を用いて、作られ、支台歯が作成される。実験用隣接歯間におけるエナメル質の虫歯（500nmの深さ及び1.5mmの幅）は、各支台歯の隣接歯間の接触部位を用いて準備される。人工虫歯の支台歯は、放射線フィルム(咬翼法)及び顕微鏡により評価される。

【００７８】

初期接触方法において、綿ボールに検出プローブを染み込ませる。そして、綿ボールは隣接歯間のエナメル質の虫歯領域に接触するよう、設置される。結合されたプローブは、様々な励起波長で照射させることで観察される。その後、蛍光放出が観察される。さらに、波長照射の吸収は、各プローブで適切に検出される。各プローブの光学観察は、以下に示す表１において示される。

【００７９】

【表１】

検出プローブ	複合物	検出	励起 / 吸収 (nm)	放出 (nm)	検出
ビスマス	金属	吸収	吸収		良好
金コロイド	金属コロイド	吸収	530		弱
ドキソルビシン	抗癌剤	蛍光	480	630	良好
リボフラビン	ビタミン B_2	蛍光	450	550 – 700	良好
クロロフィルA	クロロフィル	蛍光	614	670 - 900	良好
インドシアニングリーン	染料	蛍光	800	835	弱
ポルフィリン		蛍光	600	700	良好
ルシフェラーゼ/ルシフェリン	有機酵素及びたんぱく質	化学反応による蛍光		630 (PH) 依存	良好
Qdot	ナノドット	蛍光			良好
Hylight Flour	低分子量化合物	蛍光			良好

【００８０】

隣接歯間のエナメル質の虫歯を有し、プローブと結合する各支台歯は、照射され、撮像された。図３は、初期段階の虫歯病変を有する支台歯が光を吸収する写真を示している。虫歯病変に対し、ビスマスプローブの製剤が結合されている。図４は、支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光発光を示す写真である。虫歯病変に対し、ドキソルビシンプローブの製剤が結合されている。図５は、支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光発光を示す写真である。虫歯病変に対し、リボフラビンプローブの製剤が結合されている。図６は、支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光発光を示す写真である。虫歯病変に対し、クロロフィルＡプローブの製剤が結合されている。図７は、支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光発光を示す写真である。虫歯病変に対し、ポルフィリンプローブの製剤が結合

されている。図８は、支台歯における初期段階の病変の生物発光を示す写真である。虫歯病変に対し、ルシフェラーゼ及びルシフェリンを有するプローブの製剤が結合されている。

【００８１】

実施例８．変数の最適化

各プローブにおいて、光照射強度及び照射光線の大きさは異なり、そのデータは観察される。一定期間浸漬時間を設け、歯科用に適した検出可能なプローブとし、各検出可能なプローブの濃度は、適切な濃度を有するよう変更される。一般的に、上述の例におけるシステムを用いて接触時間を決定するが、歯科用に適した接触時間は、約２０秒、約４０秒、もしくは約６０秒である。さまざまなpHにおけるルシフェラーゼ及びルシフェリンの光学特性は、適切な蛍光特性を獲得するために決定される。

検出可能なプローブはさまざまな口腔での咬合状態を有する歯表面（すなわち、歯垢、歯肉、歯石、軟組織）に結合するが、この検出可能なプローブの能力及び隣接歯間の接触度合は、上述の実施例に記載されたシステムを用いて決定される。

【図面の簡単な説明】

【００８２】

【図１】「白斑」の性質を示す図である。白斑は100マイクロメートル以内（エナメル質表面からエナメル質の厚さの半分までの位置）に位置する。初期段階の虫歯は従来の手段により検出することができない。これはエックス線がより大きな病変（４００から５００マイクロメートル）しか検出しないからである。

【図２】本発明の実施形態に用いられるプローブを検出する光学装置を示す写真である。このプローブは一本の歯或いは複数の歯における初期段階の虫歯病変に結合される。写真は歯に光を当てるための光源（１）を示す。この光源（１）により、プローブが虫歯に結合された初期段階の虫歯病変を観察することができる。本明細書中におけるカメラ（２）は、初期段階の虫歯病変を有する歯及び結合された検知可能なプローブの画像を撮影する。コンピュータ（３）は発光源を制御し、さらに観察データを保存する。台（４）は試料、すなわち人工の歯、牛の歯、或いはスライスしたエナメル質を保持する。これらの試料は光を当てるため初期段階の虫歯病変を有している。光学ファイバ（５）は光源（１）から放射された電磁光波を伝導及び集束させる。そしてその電磁光波を台（４）にある歯の上の領域に導く。

【図３】初期段階の虫歯病変を有する人工支台歯の光の吸収を示す写真であって、虫歯病変にビスマスプローブが結合されている。

【図４】人工支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光を示す写真であって、虫歯病変にドキソルビシンプローブが結合されている。

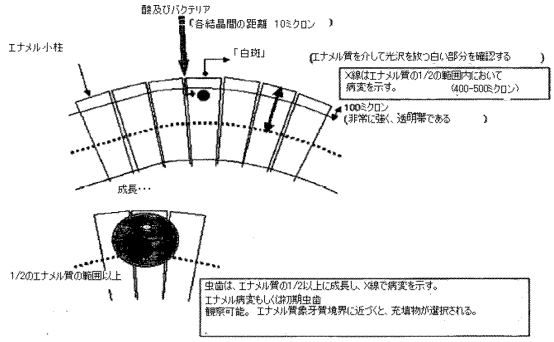
【図５】人工支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光を示す写真であって、虫歯病変にリボフラビンプローブが結合されている。

【図６】人工支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光を示す写真であって、虫歯病変にクロロフィルＡプローブが結合されている。

【図７】人工支台歯における初期段階の虫歯病変の蛍光を示す写真であって、虫歯病変にポルフィリンプローブが結合されている。

【図８】人工支台歯における初期段階の虫歯病変の生物発光を示す写真であって、虫歯病変にルシフェラーゼ及びルシフェリンが結合されている。

【図１】



【図２】

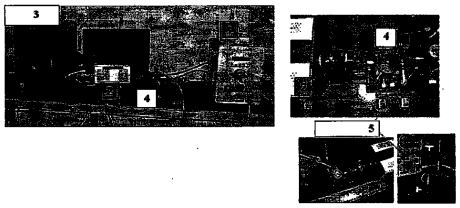


Fig. 2

【図３】



Fig. 3

【図４】

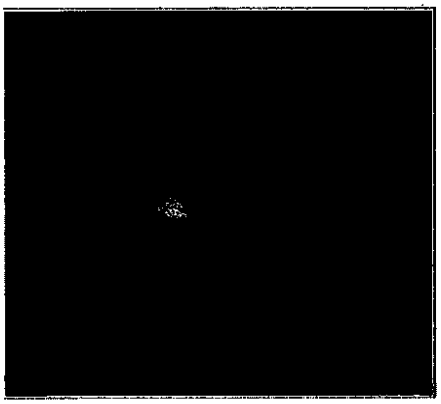


Fig. 4

【図５】

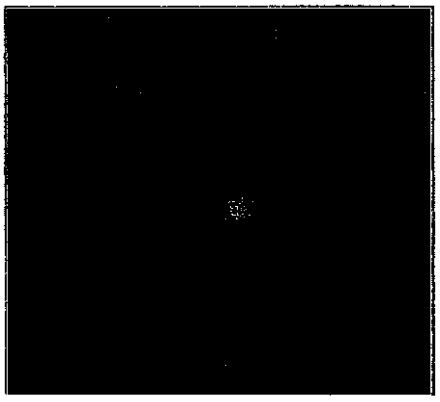


Fig. 5

【図６】

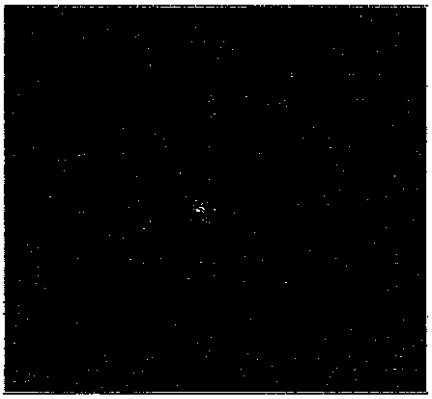


Fig. 6

【図７】

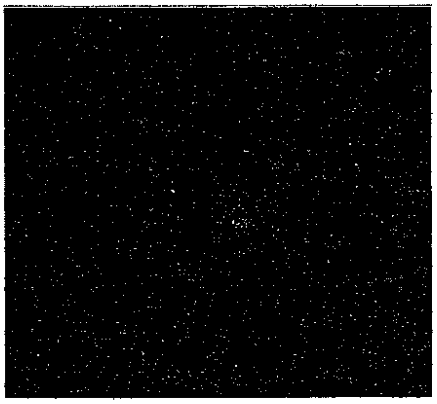


Fig. 7

【図８】



Fig. 8

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/850,922
(32)優先日 平成18年10月11日(2006.10.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/901,421
(32)優先日 平成19年2月15日(2007.2.15)
(33)優先権主張国 米国(US)

(56)参考文献 特公昭５６－０４８４９０（ＪＰ，Ｂ２）
特開平１０－２３６９１４（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－１８７８５７（ＪＰ，Ａ）
特開２００２－３４８２２４（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５０３０８９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０２５５２８（WO，Ａ１）
国際公開第２００６／０２８０９９（WO，Ａ１）
米国特許第０３３０９２７４（ＵＳ，Ａ）
米国特許第０５９５７６８７（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｃ １９／０６
Ａ６１Ｃ １９／０４
Ｇ０１Ｎ ２１／７８