

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4417008号
(P4417008)

(45) 発行日 平成22年2月17日 (2010. 2. 17)

(24) 登録日 平成21年12月4日 (2009. 12. 4)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01) C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/26 (2006. 01) C 1 2 Q 1/26

請求項の数 9 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2002-568773 (P2002-568773)	(73) 特許権者	500213199
(86) (22) 出願日	平成14年2月22日 (2002. 2. 22)		スリーエム エスベ アーゲー
(65) 公表番号	特表2004-536574 (P2004-536574A)		ドイツ国, ディー 8 2 2 2 9 ゼーフエル
(43) 公表日	平成16年12月9日 (2004. 12. 9)		ト, エスベ ブラッツ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/001907	(74) 代理人	100079108
(87) 国際公開番号	W02002/068679		弁理士 稲葉 良幸
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002. 9. 6)	(74) 代理人	100080953
審査請求日	平成17年2月14日 (2005. 2. 14)		弁理士 田中 克郎
(31) 優先権主張番号	101 08 900.7	(74) 代理人	100093861
(32) 優先日	平成13年2月23日 (2001. 2. 23)		弁理士 大賀 真司
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(72) 発明者	エベルライン, インゴ
			ドイツ連邦共和国, オーバーペー, 8 2 3
			6 3 ヴァイルエイム イー, アイヒトヴ
			アイド 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 う食の患者関連危険性の確認

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

口腔サンプル中の乳酸および／または乳酸塩を用いて、う食の危険性を体外で測定する方法であって、

0. 1 m l のサンプル量を有する唾液の場合は、0. 0 0 1 単位から 1 0 0 単位の乳酸脱水素酵素と、サンプル量 0. 1 m l 当たり 0. 0 0 1 μ m o l から 5 μ m o l の濃度のピルビン酸塩とを添加し、

0. 0 1 c m ² から 2 5 c m ² の口腔内表面から得られた舌の被膜の場合は、0. 0 0 1 単位から 1 0 0 単位の乳酸脱水素酵素を添加し、

上記双方の場合において、N A D が、被験混合物全体を基準として 0. 0 1 m m o l / 1 から 1 0 m m o l / 1 の濃度で存在していた場合、

生成した N A D H 量を測定し、

測定した N a D H 量が多いほど、う食の危険性が高いと判断する、方法。

【請求項 2】

サンプル量は、口腔内の少なくとも 1 つの領域に対する機械的動作の結果として、唾液中に移動された微生物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記口腔内の領域が舌である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルが、乳酸および／または乳酸塩の形成を誘導または増加させる糖類に接触させら

10

20

れる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

検出方法を実施する前に、少なくとも 1 種の緩衝液を添加する請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

口腔内からサンプル量を取り出した後、ピルビン酸塩を該サンプルに添加する請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

う食の危険性を位置特異的に測定する方法であって、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載された方法が用いられ、次いで、膜形成性担体物質および診断物質を含む診断用印象化合物を用いて印象を取る方法。

10

【請求項 8】

請求項 1 に記載のう食の危険性を測定する方法に用いるキットであって、

少なくとも 1 個のサンプルチューブと、

少なくとも 1 つの吸収手段と、

少なくとも 1 種の緩衝物質と、

サンプル量 0.1 ml 当たり 0.001 単位から 100 単位を得る量の乳酸脱水素酵素と、

被験混合物全体を基準として 0.01 mM から 10 mM の濃度の NAD と、を含むキット。

20

【請求項 9】

サンプル量 0.1 ml 当たり 0.001 μmol から 5 μmol の濃度を得る量のピルビン酸塩をさらに含む、請求項 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸および／または乳酸塩の測定により、う食の危険性を確認するための適切な試験に関する。

【背景技術】

【0002】

う食は感染症である。最もよく言及される原因生物としては、ストレプトコッカス属および乳酸桿菌が挙げられる。う食の原因微生物としての共通点は、とりわけ、それらが糖類、例えば飲食物に由来する糖類を摂取して醗酵し、代謝最終産物として酸を排泄するという点である。

30

【0003】

原理的には、微生物による唾液中への酸放出と歯垢中への酸放出とは区別しなければならない。というのは、歯のう食病巣は、以後歯垢とも称される、歯の表面に付着している微生物により形成される酸によって生じるからである。歯表面環境中における局部的酸性化がヒドロキシアパタイトの溶解を生じさせ、その結果、う食の病巣形成の化学的原因となる。

【0004】

40

歯垢が酸性となる速さおよび酸性の強度は、とりわけ、唾液の緩衝能力、歯垢液の緩衝能力、歯垢における微生物の増殖 (Coogan, M. M., Motlekar, H. B. Journal of the Dental Association of South Africa 51, 823-827 (1996)) および拡散過程 (Dawes, C., Dibdin, G. H. Journal Dental Research 65, 89-94 (1986)) に依存する。

【0005】

この生理学的、微生物学および化学的要因の複雑な相互作用は、歯垢におけるう食の可能性を引き起こす。これらの要因は、患者 1 人 1 人によって異なった程度で存在する。

【0006】

50

現代歯科医術の目的の1つは、患者を危険群に割り当てることである。う食病巣の発生前にう食の危険性を認識することは有益である。診断を達成するためには、多数の個人サンプルを取り、また分析しなければならないことから、歯垢分析によってう食の患者関連危険性を測定し、実際に確立することは不可能であった。このような試験は、手間がかかり、費用がかかりすぎ、かつその管理が複雑すぎる。

【0007】

歯垢試験に替るものとして、う食の患者関連危険性の確認は、唾液試験により試みられている。したがって、唾液中のストレプトコッカス・ミュータンスおよび／または乳酸桿菌の定量化可能な量が、歯垢中のストレプトコッカス・ミュータンスおよび／または乳酸桿菌の量と相関していること、そしてその結果、唾液試験を用いて患者に対するう食の危険性を推測することが可能であると推定される。

10

【0008】

う食の原因微生物、例えば、唾液中のストレプトコッカス・ミュータンスおよび／または乳酸桿菌の測定には種々の方法が利用できる。

【0009】

1. う食の原因微生物の測定は、もともと存在する微生物数が、直接的結果を得るには十分でないため、通常適切な培養培地中で数日間サンプルをインキュベートした後で実施される。数時間から数日間の持続期間に亘って微生物を増殖させた後、コロニー形成単位(CFU)をカウントし、サンプルに存在する微生物数を推測する(Kneist, S.; Klein, C.; Rupf, S.; Eschrich, K. Quintessenz (1999) 50, 33~43)。

20

【0010】

重要なのは微生物数ではなく、むしろ代謝活性であることから、唾液中のう食に係る微生物数とう食の危険性との間の相関性が不満足なものでしかなく、不都合である。さらに、サンプルのインキュベーションは、病原性微生物の培養を確立してしまうことになり、実施の際の危険性を最少化するために、適切な警戒対策をもって処理しなければならない。特別な廃棄処理が必要である。これらの不都合さに加えて、微生物学的診断を達成するために必要なインキュベーション法は、費用がかかり、かつ非常に時間がかかる。

【0011】

2. 唾液中のう食の原因微生物の測定へのさらなるアプローチは、免疫学的方法である。この場合、測定される微生物の表面構造に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体が使用される。

30

【0012】

項目1によるインキュベーション法と比較すると、これらの免疫学的方法は、より特異的で、より迅速、より安価ではあるが、再現性に関して明らかな欠点を有している(Kneist, S.; Klein, C.; Rupf, S.; Eschrich, K. Quintessenz (1999) 50, 33~43)。例えば、唾液は、生存微生物のみならず、死滅微生物がかなりの量で含んでいる。死滅微生物と生存微生物の比率は、患者1人1人によって異なっていると考えられる。前記抗体が、生存微生物と死滅微生物とを識別できないという事実は、評価対象微生物に病原の可能性あることを推測する際に予測できない範囲の変動があることを意味する(Aass, A. M.; Preus, H. R., Zambon, J. J., Gjermo, P. Scand J. Dent Res (1994) 102, 355~360)。さらに、重要なのは微生物数ではなく、むしろ代謝活性であることから、唾液中のう食に係る微生物数とう食危険性との間の相関性が不満足なものでしかない、という限定がこの場合においても当てはまる。

40

【0013】

3. 最も高い感受性を有する方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法に基づく。微量の微生物を、高度の特異性によって検出することができる。PCR法は、時間がかかり、複雑、高価でかつ習得が容易ではない(Rupf, S., Kneist, S., Merte, K., Eschrich, K. Eur. J. Oral. Sci. (1999) 10

50

7、75～81)。この場合もまた、生存微生物と死滅微生物との区別がなされないという限定が付けられる。さらに、重要なのは微生物数ではなく、むしろ代謝活性であることから、唾液中のう食に係る微生物数と、う食危険性との間の相関性が不満足なものでしかないというさらなる追加の限定が、この場合においても当てはまる。

【0014】

う食の危険性を確認するために唾液中のう食の原因微生物を定量するための全ての方法は、唾液中に存在するう食の原因微生物の量から、歯垢中のその微生物によるう食の可能性を推測できないことから、「う食の患者関連危険性」に関する所望の知見を得ることが不可能であるという深刻な不都合を有する。

【0015】

唾液組成物は、患者1人1人によって異なり、かつ存在する微生物の代謝能力に影響を及ぼすことから (Minah, G. E., McEnery, M. C., Flores, J. A. *Archivs Oral Biol.* (1986) 31, 633～638)、う食の原因微生物の定量化に加えて、糖類によって生じ得る患者の唾液の酸性化をも調べることが推奨される。pH値の低下は、微生物の酸放出のためであり、唾液中の微生物代謝活性の尺度として見られる。しかしながら、唾液中のpH値に観察される低下は、患者の唾液の緩衝能力レベルに依存する。したがって、う食の患者関連の危険性を測定するためには、唾液の緩衝能力を、唾液中のう食の原因微生物の定量化とpH測定に組み合わせることもまた必要である。

【0016】

しかし、臨床経験によると、ストレプトコッカス・ミュータンス／乳酸桿菌の定量化、pH測定および緩衝能力を組み合わせ、う食の患者関連の危険性に関して信頼できる所見を提供できないことが示されている (KleinfelderおよびKirchnerの「Die diagnostische Sicherheit biologischer zur Bestimmung des individuellen Kariesrisiko」[「The diagnostic reliability of biological saliva tests for determination of the individual risk of caries」], *Dtsch. Zahnärztliche Zeitschrift* (1993) 48, 646～648)。

【0017】

米国特許第3, 332, 743号明細書およびEP-A-0 097 904明細書には、唾液中の微生物代謝活性からう食の患者関連危険性を推測するさらなる試みを記載している。レサズリンをリソルフィン (resorufin) に還元する唾液能力が観察されており、微生物の代謝活性が、リソルフィンの形成率に相関すると言われている。う食の患者関連危険性は、リソルフィンの形成率から推測される。レサズリンからリソルフィンへの還元は、微生物の脱水素酵素によってもたらされる。レサズリンからリソルフィンへ還元できる脱水素酵素を有するのはストレプトコッカス・ミュータンスと乳酸桿菌だけではない。この理由から、レサズリン／リソルフィン試験は、微生物の生存能力試験として一般に用いられ、それ故、酸の放出を介して口腔環境の酸性化に寄与するう食病原体には特異的ではなく、したがって、それは、う食の患者関連危険性の確認には使用できない。

【0018】

歯の硬度物質を損傷するう食の原因微生物の代謝活性を確認するために文献で考察されたさらなる可能性は、酸類、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸および乳酸の遊離である。どの酸が、歯の硬度物質の損傷に決定的に関連するかは、例えば栄養物の供給に依存する。十分なグルコースが存在すると、ストレプトコッカス属が優先して乳酸を分泌するが、一方、グルコースの供給が制限されると、酢酸、プロピオン酸およびギ酸が優先的に形成される。

【0019】

米国特許第4, 351, 899号特許明細書および米国特許第4, 254, 222号の特許明細書には、生体液、特に血中乳酸の酵素的測定法を記載している。脱水素酵素による乳酸の酵素的還元の結果、ピルビン酸塩の他にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が形成される。NADHは引続き、酸化還元指示薬、好ましくはテトラゾリウム誘導体およびフェナジン誘導体を用いて測定される。この方法を唾液に転用すると、う食原性微生物の代謝活性の測定と、その結果のう食の危険性の測定にとって迅速かつ簡便な方法を可能にすると思われる。しかしながら、これらの明細書に記載された方法は、唾液に生じる付随反応が、酸化還元指示薬によって生成されたシグナルを偽る(falsify)ことが決定的となるため、唾液の場合使用することができない。検出反応に必要な脱水素酵素を添加しない場合でも、酸化還元指示薬が、NADと一緒にあった唾液成分によって還元され、唾液中の乳酸塩存在に基づかないシグナルが生じる。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

したがって、本発明の課題は、一般的なう食の危険性の評価を可能にする方法を提供することであり、その過程において先行技術の既知の不利益な点を避けることである。

【課題を解決するための手段】

【0021】

驚くべきことに、う食の危険性が増大している患者を、本発明に従った方法に関連して用いる試験により見分けることができることを見出した。

20

【発明の効果】

【0022】

本試験と、診断上の歯科用印象、例えば、DE-A-199 26 728によるものとの組合せもまた、本発明に準拠する。この方法によって、唾液中または舌にはう食の危険性を示しているにもかかわらず、歯には、う食の危険性を伴う歯垢がない患者と、実際に危険性がある患者とを区別することができる。

【0023】

さらに、本発明の利点は、ある患者におけるう食の危険性を明瞭に確認して、適切な方向での薬物治療することが可能であり、かつ治療過剰および治療不十分を避けることができるという事実に見出される。

30

【0024】

さらに、本発明の利点は、唾液試験を用いてさらなる調査、例えば、診断上の歯科用印象、実際の治療開始時、例えば学校や幼稚園における集団予防に関連する調査の必要性を確立することが可能であるという事実に見出される。また、治療経過が簡便にモニタできることも有益である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

語句「う食の危険性」は、本発明に関連した、患者がう食を患う基本的危険性並びに時刻および食習慣に依存する危険性の双方のものとして解する。口腔フローラの基本的構成により支配される基礎的危険性を決定する目的で、本発明による方法を使用する前に、患者は、例えばうがいおよび／または歯の洗浄、好ましくは歯の洗浄のような簡単な洗浄処置を施すと都合がよい。時刻および食習慣に依存する危険性を測定する際には、洗浄処置を必ずしも実施する必要はないが、本発明による方法の好適な実施形態においては、実施すべきである。

40

【0026】

本明細書において「含む」および「含有する」という語句は、構成要件を他に備えてもよい意味で用いられる。

【0027】

本発明に従って用いられる唾液試験は、適切な予備的条件を満たせば、一般的なう食の患者関連危険性を測定するための、唾液中における微生物代謝活性の指標として、乳酸の

50

形成が著しく適しており、乳酸の定量化または半定量化により確認できるという驚くべき効果に基づいている。

【0028】

本発明に関連して、語句「乳酸塩」は、L (+) - 乳酸塩として解され、語句「乳酸脱水素酵素 (LDH)」は、L (+) - 乳酸脱水素酵素として解する。

【0029】

乳酸の検出には、原則として検出可能なシグナルを発生させる化学的、生化学的または物理的反応に関連し得る。

【0030】

驚くべきことに、酸化還元阻害剤と唾液成分との間の望ましくない付随反応は、乳酸脱水素酵素、唾液と、阻害剤、すなわちピルビン酸塩との間で、量について特定の比率を維持することにより抑制できることを見出した。この知見に驚くべき理由は、ピルビン酸が乳酸脱水素酵素の知られた阻害剤であることである (例えば、Williams, R. A., Andrews, P., Biochem, J. 236, 721~727 (1986); Oba, K., Murakami, S., Uritani, I., J. Biochem. 1193~1201 (1977) を参照)。技術的教示に反して、乳酸脱水素酵素と酸化還元阻害剤による乳酸の酵素的測定が可能となる程度まで、唾液の不特定の付随反応を抑制するために、測定酵素 (この場合は乳酸脱水素酵素) を、既知の阻害剤の存在下で使用する必要があることは当業者にとって予測できない解決策である。ピルビン酸塩という語句は、ここではピルビン酸またはその塩、特にそのNa塩またはK塩として解する。

【0031】

乳酸脱水素酵素 (例えば、バクテリア、好ましくは乳酸桿菌、ストレプトコッカス属またはスタフィロコッカス属から、動物、好ましくはブタ、ウシ、ニワトリまたはウサギから、植物から、またはヒト組織、例えば胎盤から得ることができる) による唾液中の乳酸の酵素的測定では、唾液と乳酸脱水素酵素との間の量について適切な比率を維持しなければならない。唾液0.1ml当たり、0.001単位から100単位の間の乳酸脱水素酵素、好ましくは0.01単位から10単位の間の乳酸脱水素酵素、非常に好ましくは0.05単位から1単位の間の乳酸脱水素酵素を使用する必要がある。さらに、ピルビン酸塩は、唾液0.1ml当たり、0.001μmolから5μmolの間の濃度、好ましくは唾液0.1ml当たり、0.01μmolから2.5μmolの間の濃度、非常に好ましくは唾液0.1ml当たり、0.01μmolから1μmolの間の濃度を使用する必要がある。

【0032】

1単位の乳酸脱水素酵素は、蛋白質1mg当たりで、1分に1μmolのピルビン酸を変換する量として解する。

【0033】

例として、以下の群から選択される酸化還元指示薬を本発明に従って使用することができる: メチレンブルー、塩化5-シアノー2, 3-ジトリル-テトラゾリウム (CTC)、塩化2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム (INT)、8-ジメチルアミノ-2, 3-ベンゾフェノキサジン (メルドラブルー)、メト硫酸1-メトキシフェナジン (MPMS)、5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4, 5-ジメチルチアゾリル)-3-(4-スルホフェニル)-テトラゾリウム (MTS)、臭化3-(4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2, 5-ジフェニルテトラゾリウム (MTT)、塩化3, 3'-(3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニレン)-ビス[2-(4-ニトロフェニル-5-フェニル)]-2H-テトラゾリウム (NBT)、ニトロ-テトラゾリウムバイオレット (NTV)、メト硫酸フェナジン (PMS)、3'-[1-[(フェニルアミノ)カルボニル]-3, 4-テトラゾリウム]ビス(4-メトキシ-6-ニトロ)ベンゼンスルホン酸ナトリウム (XTT)、エト硫酸フェナジン (PES, WST-1)。

【0034】

これらのうち、メルドラブルー、PES、PMS、MTS、MTTおよびXTTが好ましく；PES、PMS、MTSおよびMTTが特に好ましい。

【0035】

被験混合物中における酸化還元指示薬の濃度は、 0.001 mmol/l から 10 mmol/l の間であり、 0.01 mmol/l から 5 mmol/l の間が好ましく、 0.05 mmol/l から 2 mmol/l の間が非常に好ましい。

【0036】

必要に応じて、酸化還元指示薬は、固体、例えば粉末状、顆粒状または錠剤形で試験に使用できる。

【0037】

本発明に従って、NADは非限定的であるだけでなく、非阻害的な量で用いることが好ましく、例えば被験混合物全体を基準として 0.01 mmol/l から 10 mmol/l の間、好ましくは 0.05 mmol/l から 5 mmol/l の間、非常に好ましくは 0.1 mmol/l から 1 mmol/l の間の濃度で使用する。

【0038】

必要に応じて、NADは、固形、例えば粉末、顆粒または錠剤形で試験に使用できる。

【0039】

バクテリア、動物および植物に由来する乳酸脱水素酵素は、至適pHを4.0から10.0の間に有する。使用される乳酸脱水素酵素に依って、種々のpH値を有する適切な緩衝液を使用しなければならない。適切な緩衝剤は、特に以下の群の構成物が緩衝剤として適切である：

リン酸塩類、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、リン酸二水素カリウム、ピロリン酸塩；

炭酸塩類、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム；

酢酸／酢酸塩；クエン酸／クエン酸塩、ジエチルバルビツール酸、トリス（ヒドロキシメチル）－アミノメタン（TRIS）、グリシン、グリシルグリシン（Glygly）、N－（2－アセトアミド）－2－アミノ－エタンスルホン酸（ACES）、N－（2－アセトアミド）イミノジアセテート（ADA）、N，N－ビス（2－ヒドロキシエチル）－2－アミノエタンスルホン酸（BES）、N，N－ビス（2－ヒドロキシエチル）グリシン（BICINE）、2，2－ビス（ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（BIS－TRIS）、2－（シクロヘキシルアミノ）エタンスルホン酸（CHES）、2－〔4－（2－ヒドロキシエチル－1－ピペラジン）〕エタンスルホン酸（HEPES）、3－〔4－（2－ヒドロキシエチル－1－ピペラジニル）〕－プロパンスルホン酸（HEPPS）、2－モルホリノエタンスルホン酸（MES）、3－モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、ピペラジン－1，4－ビス（2－エタンスルホン酸）（PIPES）、N－〔トリス（ヒドロキシメチル）－メチル〕－2－アミノエタンスルホン酸（TES）、N－トリス（ヒドロキシメチル）－メチル〕－グリシン（TRICINE）。

【0040】

特に、リン酸緩衝剤、トリス（Tris）緩衝剤、Glygly緩衝剤および酢酸／酢酸塩緩衝剤が好ましい。

【0041】

検出反応に応じて、1から12のpH値が必要とされ得る。条件に応じて、緩衝液の濃度は、 0.001 mol/l から 5.0 mol/l の間、好ましくは 0.01 mol/l から 1.0 mol/l の間、非常に好ましくは 0.1 mol/l から 0.5 mol/l の間とされる。

【0042】

反応溶液のpH調整はまた、条件に応じて、固体、例えば粉末状または錠剤形などの緩衝剤を決められた量試験に用いることにより達成できる。必要ならば、緩衝剤はまた、液

10

20

30

40

50

体形態で試験に使用できる。

【0043】

緩衝物質、酸化還元指示薬、NADおよび乳酸脱水素酵素および他の産生アジュバントは、固体同士の組合せ、または固体と液体形態の組合せとして添加することができ、例えば、1mgから20g、好ましくは10mgから10g、より好ましくは50mgから5g、非常に好ましくは100mgから1gの範囲の粉末として、または例えば、1錠から20錠、好ましくは2錠から10錠、非常に好ましくは3錠から5錠の錠剤形として添加できる。錠剤の重量は、例えば、1mgから2gの間、好ましくは10mgから1.5gの間、非常に好ましくは100mgから1gの間であり得る。

【0044】

産生アジュバントは、例えば、ガレヌス製剤化学、例えばデキストラン類、糖類、酸化アルミニウム、ガラス、石英、セルロース誘導体、ワックス類、脂肪類および塩類からの既知の補助物質として解する。

【0045】

緩衝物質、酸化還元指示薬、NADおよび乳酸脱水素酵素は、液体形態で唾液サンプルに添加することもでき、この場合、それらが液体であれば直接添加できるか、または水、エタノールまたはプロパノールなどの溶媒に予め溶解して添加できる。0.001mlから20ml、好ましくは0.01mlから10ml、非常に好ましくは0.1mlから1mlの容量が使用できる。

【0046】

乳酸および検出できるシグナルの形成は、並行して進む連続的な工程で検出でき、この場合、例えば、0.01分から60分、好ましくは0.1分から30分、非常に好ましくは1分から10分の間の決められた間隔後、検出できるシグナルを評価するか、または検出すべき代謝物の形成および／または検出できるシグナルの形成を終了させる。

【0047】

終了目的のために、例えば、例えばリン酸塩のような阻害剤などの中止剤、または塩酸または水酸化ナトリウム液により開始されるpHの急激な変化、またはプロテアーゼまたは界面活性剤の添加、などが考慮される。

【0048】

乳酸形成はまた、独立したインキュベーションステップにおいて実施することもでき、この場合、例えば、0.01分から60分、好ましくは0.1分から30分、非常に好ましくは1分から10分の決められた間隔後、乳酸形成を終了させる。

【0049】

終了目的のために、例えば、上記の中止剤、またはサンプルを50℃から100℃の間の温度に加熱すること、または中止剤と温度上昇の組合せが考慮される。

【0050】

微生物による乳酸形成の終了目的のためには、多種多様な方法を用いることができ、例えば：

UVのような高エネルギー光の照射、

放射性処理、

熱処理、

例えば酸類または塩基類の添加によるpH変化、

界面活性剤の添加、

重金属塩、アルキル化剤などの阻害剤添加、

リゾチーム、トリクロサン、クロルヘキシジン、タウロリジンなどの微生物破壊物質の添加、

例えば、限外濾過、除菌フィルタミクロ濾過、遠心分離などによる調査対象の唾液サンプルからの微生物除去、またはこれら方法のうち2つ以上の適切な組合せなどが挙げられる。

【0051】

本発明による試験を実施するために、例えば、0.001mlから20ml、好ましくは0.01mlから10ml、非常に好ましくは0.1mlから1mlの唾液を反応容器に移す。一般に、使用される唾液量は、少なくともシグナル生成添加物の結果としての乳酸塩測定のために得られるシグナルが検出可能であるよう、十分に多くなければならない。

【0052】

また、微生物を、機械的動作により口腔領域から唾液中に移動させてから、唾液サンプルを反応容器に移すと好都合である。例えば、舌用スパチュラまたはスクレーパなどの適切な器具を用いて、舌から舌の被膜を脱離し、その直後にサンプルを取ることができる。

【0053】

直接的唾液サンプルの替りに、適切なサンプル採取装置によって口腔中の適切な位置から微生物サンプルを取り、唾液の替りにそのサンプルを、本発明による基本的な方法に供することができる。この場合、綿毛チップ、綿棒または他の吸湿性材料および用具によって、0.01cm²から25cm²、好ましくは0.1cm²から10cm²、さらに好ましくは1cm²から5cm²の舌領域から舌の被膜を脱離することが好ましい。一般に、舌被膜は、少なくともシグナル生成添加物の結果としての乳酸塩測定のために得られるシグナルが検出可能であるよう、十分に大きい舌領域から取らなければならない。

【0054】

患者関連の患者唾液中の検出可能シグナルを標準化する目的のために、最大限の乳酸形成を可能にする物質、例えば糖類、好ましくはショ糖およびグルコースを唾液に加えることが有利となり得る。これらの物質は、固体若しくは液体形態、または固体と液体形態の組合せのいずれかで導入できる。

【0055】

例えば、唾液サンプルの採取または舌被膜の脱離前に、口腔を、0.1%から70%、好ましくは1%から50%、非常に好ましくは5%から30%の糖を含有する、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ショ糖およびマルトースの水溶液などの糖溶液で濯ぐことが可能である。

【0056】

同様に、0.1%から70%、好ましくは1%から60%、非常に好ましくは10%から50%飽和のグルコース、フルクトース、ガラクトース、ショ糖、マルトースなどの糖類を、唾液サンプル自体に添加することも有利となり得る。

【0057】

また、唾液サンプルの採取または舌被膜の脱離前に、例えば、角砂糖、粉糖または糖錠の形態で0.1gから10g、好ましくは0.5gから5g、非常に好ましくは1gから2gの間の糖を口腔で溶解させることも有利となり得る。

【0058】

使用される綿毛チップ、綿棒または他の吸収材によって舌被膜を脱離させるために、0.1%から70%、好ましくは1%から50%、非常に好ましくは5%から30%の糖含有溶液にそれらを浸し、乾燥後それらを使用することが有利となり得る。

【0059】

同様に、本発明に従った方法の1つの好適な形態において、例えば、舌被膜の脱離のために用いられる綿毛チップ、綿棒または他の吸収材は、例えば、前記のショ糖、NAD、MTP、PMS、LDHまたはピルビン酸塩などの1種以上の診断用構成要素を含むことができる。この中でもとりわけNADが好ましい。

【0060】

特に好適な実施形態において、例えば、舌被膜の脱離のために用いられる綿毛チップ、綿棒または他の吸収材は、上記の少なくとも1種の糖溶液および、例えばNADなどの少なくとも1種の診断用構成要素の双方を含む。

【0061】

本発明は、例えば、DE 297 142 46 Uに記載されているブリスタパック

10

20

30

40

50

の形態で実際に利用可能となる。本提示態様は、本発明による方法を特に簡便な様式で実施することが可能となる。

【0062】

本発明はまた、診断用印象化合物を用いた、う食の患者関連危険性の位置特異的測定法に関するものである。

【0063】

この場合、う食の患者関連危険性を、先ず上記の本発明に従った方法によって測定し、危険性が陽性の場合、診断用印象化合物を用いて少なくとも1つの顎領域、例えば上顎および／または下顎から印象を取る。

【0064】

適切な診断用印象化合物は、例えばDE-A-199 26 728からのもの、特にアルギン酸塩、ポリエーテル、シリコーンまたはポリエーテル・シリコーンをベースとした化合物である。このような化合物は、0.0001重量%から10重量%の好適な量で位置特異的および物質特異的な口腔内診断のための診断的に有用な添加物を含有する硬化性または被膜形成担体物質である。その明細書によれば適切な診断用添加物としては、診断検査システムの開発に精通している当業者によく知られている色素指示薬、抗体、酵素および他の任意の物質がある。

【0065】

このような印象化合物は、完全に硬化した印象物質において、う食の危険性が増加している位置に検出可能なシグナル（例えば着色）を示す。このため、う食促進微生物の代謝物が、使用される検出法における活性種として選択的に用いられる。

【0066】

これに関連して、例えば、予め調製された診断用印象化合物を使用することが可能である。しかしながら同様に、従来の印象化合物を使用することも可能で、治療を行う者が診断上効果的な物質を添加して診断的機能性を有する印象化合物に変換することができる。

【0067】

本発明を、以下の実施例によってより詳細に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではない。

【実施例】

【0068】

実施例

適用例 1

シグナル生成溶液を混合するために、0.1mlのNAD溶液（50mmol/l Glygly緩衝液中の30mmol/l NADの保存液、pH9.0）、0.1mlのMTT（50mmol/l Glygly緩衝液中の1.5mmol/l MTTの保存液、pH9.0）、0.1mlのPMS溶液（50mmol/l Glygly緩衝液中の1.0mmol/l PMSの保存液、pH9.0）、0.1mlのLDH溶液（50mmol/l Glygly緩衝液中の60単位/ml乳酸脱水素酵素（LDH）の保存液、pH9.0）および0.1mlのピルビン酸塩溶液（50mmol/l Glygly緩衝液中の25mmol/lピルビン酸塩の保存液、pH9.0）を、ピペットを用いてねじ栓を有するプラスチック製試験管（2.5ml）に移し、ねじ栓を閉じて5秒間振とうする。

【0069】

患者の口腔から唾液を採取し、少なくとも1mlの唾液を、ねじ栓を有する5mlプラスチック製試験管に移す。ピペットを用いて0.6mlを、既に0.25gのショ糖が入っている反応容器に移す。前記反応容器をねじ栓により閉じて5秒間振とうする。

【0070】

3分後、シグナル生成溶液を、反応容器中の唾液サンプルに加える。閉じた反応容器を5秒間振とうする。3分後、検出可能なシグナル形成を終了させるために、0.4mlの酢酸溶液（水中酢酸1mol/lの保存液）を反応容器に加える。反応経過は、黄色から

10

20

30

40

50

青色への色変化により追跡できる。黄色は、う食の危険性を示さず、青色着色が強くなるにつれて、う食の危険性が高くなる。

【0071】

1 ml 容量を有するプラスチック製セルを用いた U V I K O N 9 3 0 分光光度計を用いて、入射光 5 7 0 nm の波長で、吸光度 0. 9 5 7 Δ E / 分と測定された。

比較例 1 a

比較例 1 a は、適用例 1 と同様に実施したが、ピルビン酸塩を加えなかった。吸光度 3. 3 と測定された。

比較例 1 b

比較例 1 b は、適用例 1 と同様に実施したが、ピルビン酸塩も L D H も加えなかった。吸光度 0. 8 1 5 と測定された。

比較例 1 c

比較例 1 c は、適用例 1 と同様に実施したが、L D H を加えなかった。吸光度 0. 1 5 6 と測定された。

【0072】

適用例 1 と共に比較例 1 a から 1 c は、たとえピルビン酸塩が L D H を阻害するとしても（1 a と比較）、ピルビン酸塩による阻害は、L D H の添加を増量することにより（1 b と比較）過剰に補われるが、それにもかかわらず、1 つ以上の未知の付随反応が抑制される（1 c と比較）、ということを示している。

適用例 2

シグナル生成溶液を混合するために、0. 1 ml の N A D 溶液（5 0 mmol / l G l y g l y 緩衝液中の 3 mmol / l N A D の保存液、p H 9. 0）、0. 1 ml の M T T （5 0 mmol / l G l y g l y 緩衝液中の 0. 1 5 mmol / l M T T の保存液、p H 9. 0）、0. 1 ml の P M S 溶液（5 0 mmol / l G l y g l y 緩衝液中の 0. 1 mmol / l P M S の保存液、p H 9. 0）、0. 1 ml の L D H 溶液（5 0 mmol / l G l y g l y 緩衝液中の 4 0 単位 / ml 乳酸脱水素酵素（L D H）の保存液、p H 9. 0）および 0. 1 ml のピルビン酸塩溶液（5 0 mmol / l G l y g l y 緩衝液中の 2. 5 mmol / l ピルビン酸塩の保存液、p H 9. 0）を、ピペットを用いてねじ栓を有するプラスチック製試験管（2. 5 ml）に移し、ねじ栓を閉じて 5 秒間振とうする。

【0073】

ピペットを用いて 1 0 0 μ l を、2 cm × 0. 6 cm × 0. 7 8 mm の吸収性綿棒に吸わせ、凍結乾燥する。前記乾燥綿棒を、ポリエステル製の細片（7 cm × 0. 6 cm × 0. 2 5 mm）の一端上に面と面で貼り付ける。適用例 1 の 2 段落目に記載されたとおり、唾液サンプルを前もって反応容器に調製した。検査用細片上の綿棒を、完全に唾液サンプルに導入する。3 分後、前記検査用細片綿棒を、p H 7. 5 の 5 0 mmol / l リン酸水素ナトリウム溶液からなる中止剤を 2 ml 入れてある容器に浸漬する。検査用細片上の綿棒の青色着色強度が増すにつれて、う食の危険性が高くなる。

適用例 3

シグナル生成溶液を、適用例 2 の 1 段落目に記載のとおり調製する。患者の口腔に、角砂糖を溶解させ、口腔から唾液を採取する。綿毛チップ（例えば、Q チップ）を口腔に導入し、唾液を浸すために 5 秒間そこに置く。チップの唾液の浸漬した綿毛領域を、シグナル生成溶液に浸漬し、3 分間そこに置く。青色着色が強くなるにつれて、う食の危険性が高くなる。

適用例 4

検査用細片を、適用例 2 の 1 段落目に記載のとおり調製する。患者の口腔に、角砂糖を溶解させる。検査用細片を口腔に導入し、吸収性綿棒を舌の中央に置き、舌の被膜を取り出すためにこする。検査用細片をの吸収性綿棒を、シグナル生成溶液に浸漬し、3 分間そこに置く。次に綿棒に生じた青色着色を評価する。青色着色が強くなるにつれて、う食の危険性が高くなる。

適用例 5

唾液試験を実施するために適用例 1 から 4 に記載された成分を、このキットに含ませる。20 g のアルギン酸塩（ESP E 社の Pal g a t）を診断印象用バッグに入れる。前記アルギン酸塩を混合用ボール（250 ml）に移す。DE-A-19926728 に従って調製され、0.26 g のグリシルグリシン、0.24 g のトリ（ヒドロキシメチル）アミノメタン、36 mg の NAD、0.9 mg のメト硫酸フェナジン、3 mg の臭化 3-（4,5-ジメチルチアゾリル-2）-2,5-ジフェニルテトラゾリウム（MTT）および 1850 単位の乳酸脱水素酵素を含有するシグナル生成溶液（それによって歯垢中のう食原因微生物により乳酸遊離が観察できる）を容器に入れて用意する。前記シグナル生成溶液をアルギン酸塩に加える。速やかに、均一になるまでハンドスパチュラで混合する（約 30 秒）。印象化合物を調製している間、患者の口腔に角砂糖を溶解させる。印象化合物を、印象トレイに導入する。印象を取るために、印象トレイを、上顎または下顎のいずれかに対して押し付け、3 分間そこに置く。印象を口から外す。代謝活性があり、う食原因微生物を有する歯の位置が、印象化合物上の点および領域により示される。青色着色が強くなるにつれて、う食の局所危険性が高くなる。唾液試験により測定されたう食の危険性と、歯に存在するう食の危険性とが比較できる。

10

適用例 6

DE 29714246 U に従ったブリスタが使用される。綿毛チップ（例えば、Q チップ）を、50 重量%糖溶液に浸漬する。前記綿毛チップを口腔内に導入し、舌の被膜を取り出すために舌の中央でこすり回転させる。前記綿毛チップをブリスタの第 1 の貯蔵所に導入する。第 2 の貯蔵所を押すことにより、適用例 2 の 1 段落目に従って調製されたシグナル生成溶液を、第 1 の貯蔵所へと送る。綿毛チップを回転することにより、唾液サンプルを有する領域を、シグナル生成溶液でぬらす。綿毛チップは、3 分後ブリスタから除去できる。

20

比較例 1

米国特許第 4,351,899 号特許明細書および米国特許第 4,254,222 号特許明細書の教示が、う食の患者関連危険性を測定するために適切でないことを示すために、比較例 1 および比較例 2 が調製された。

【0074】

米国特許第 4,351,899 号特許明細書および米国特許第 4,254,222 号特許明細書の教示に従って、0.6 μmol の乳酸塩、0.6 μmol の NAD、0.03 μmol の MTT、0.02 μmol の PMS および 0.6 単位の乳酸脱水素酵素を含有する 0.1 ml の pH 9.0 の Glygly 緩衝液を 100 μl の唾液に加え、完全に混合した。マイクロプレートリーダー（モレキュラー・デバイス社）を用いて、570 nm で反応経過を追跡した。0.6 / 分の吸光度増加を測定した。唾液なしの対照実験においては、1.1 / 分の吸光度変化を測定した。結果：唾液は、シグナル生成に必要である酵素の乳酸脱水素酵素を 45 % 阻害する。

30

比較例 2

米国特許第 4,351,899 号特許明細書および米国特許第 4,254,222 号特許明細書の教示に従って、0.6 μmol の乳酸塩、0.6 μmol の NAD、0.03 μmol の MTT および 0.02 μmol の PMS を含有する 0.1 ml の pH 9.0 の Glygly 緩衝液を 100 μl の唾液に加え、完全に混合した。マイクロプレートリーダー（モレキュラー・デバイス社）を用いて、570 nm で反応経過を追跡した。乳酸脱水素酵素が存在しなくても、0.4 / 分の吸光度増加を測定した。0.3 単位の乳酸脱水素酵素の存在下における比較試験においては、1.2 / 分の吸光度変化を測定した。結果：唾液は、酸化還元指示薬 PMS / MTT をそれ自体で還元できる成分を含み、その結果、測定シグナルを 50 % 偽って伝える。

40

フロントページの続き

- (72)発明者 ウァグナー, インゴ
ドイツ連邦共和国, ヴェルスシー 8 2 2 3 7, アウインガーストラッセ 1 6
- (72)発明者 グッゲンベルガー, レイナー
ドイツ連邦共和国, ヘルシング 8 2 2 1 1, キエンバッハストラッセ 2 6
- (72)発明者 ベケンカンブ, トーマス
ドイツ連邦共和国, ジャーマリング 8 2 1 1 0, フェレンストラッセ 2
- (72)発明者 シュティンベイス, クリスチャン
ドイツ連邦共和国, ミュンヘン 8 1 2 4 5, インダストリーストラッセ 8 3
- (72)発明者 バデルーダンツィガー, ミハエル
ドイツ連邦共和国, ウェスリング ホッホスタッド 8 2 2 3 4, ドルフストラッセ 2 3 アー

審査官 横田 倫子

- (56)参考文献 特表平11-507228 (JP, A)
米国特許第04351899 (US, A)
東北大学歯学雑誌, 22[2] (2003) p.79-89
生化学, 73[4] (2001 Apr) p.239-246
日大歯学, 64[1] (1990) p.24-31
日大歯学, 62[4] (1988) p.477-481
Kitasato Arch Exp Med., 61[1] (1988) p.1-20
日大歯学, 60[5] (1986) p.487-493

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)