

学位論文

原稿総紙数 60 枚 (本文, 文献, 表題脚注)

図 7 枚 (図 1～図 7)

写 真 0 枚

表 7 枚

別 刷 数 50 部

連 絡 先 河田 有祐

(勤) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

電話内線 6677, 6678

(住) 〒700-0921 岡山県岡山市北区東古松 2-10-37-1005

電話 090-3371-7684

表題：天然多糖プルランのリン酸化合物と塩化セチルピリジニウム混合液
が細胞と生体および口腔内細菌叢に与える影響

所 属 氏 名 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野
河田有祐

天然多糖プルランのリン酸化合物と塩化セチルピリジニウム
混合液が細胞と生体および口腔内細菌叢に与える影響

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻
病態機構学講座 歯周病態学分野

河田有祐

**The effects of phosphorylated natural polysaccharide
pullulan mixed with cetylpyridinium chloride *in vitro*
and *in vivo*, and on oral microflora**

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Yusuke Kawata

(平成 24 年 9 月 19 日受付)

緒言

近年の我が国では急速な高齢化の進展に伴い、要介護認定者数は経年的に増加して9年間で2倍以上増加し¹⁾、今後も増加が見込まれている。それに伴い、医療費や介護費などの増加が社会的な問題¹⁾になっており、さらに実際の介護の現場における職員や介護者の負担も問題になっている。最近では歯の喪失による口腔機能低下が認知症や寝たきりと相関があることが報告され、口腔機能低下を予防する口腔ケアが全身の健康維持に役立つことが明らかになってきている²⁾。また、口腔内の細菌は齲蝕や歯周病などの口腔内感染症の原因菌となるだけでなく、アテローム性動脈硬化との関連⁴⁾や高齢者に多くみられる誤嚥性肺炎の一因となること^{5,6)}が示唆されるようになり、口腔ケアの重要性が高くなっている。その一方で、我が国の方針であった8020運動の効果により、80歳で20本以上の現在歯を持つ者の割合の推定値は24.1%（平成5年10.9%，平成11年15.3%）であり、12年間で2倍以上増加している⁷⁾。それに伴い、従来は義歯を中心に行われていたケアから、残存歯が多数存在する口腔内に対する口腔衛生管理に変わってきている。さらに、歯面や歯肉溝などに存在する様々な細菌叢から形成

されるバイオフィルム⁸⁾の除去は義歯に形成されたバイオフィルムの除去よりも難しく、現在歯の存在は、口腔衛生管理（いわゆる口腔ケア）を困難にさせる要因となっている。

口腔衛生管理を行うためには、原因となる菌の増殖を抑える必要がある。抗菌性を有する医薬部外品である洗口剤や洗口液は、バイオフィルムへの浸透性は低いながらもバイオフィルムの形成を抑制する上で極めて有効であり⁹⁾、特にブラッシングを十分行えない要介護者等への応用が期待される。しかし、現在市販されている洗口剤は一時的な殺菌効果しかなく、歯面において特異的かつ持続的に効果を発揮するような口腔衛生管理補助剤（いわゆる口腔ケア剤）はない。そこでわれわれは全身的に機能が劣った要介護者に対して、効率的かつ安全に口腔衛生管理を行うことができる口腔衛生管理剤の研究を行ってきた。

塩化セチルピリジニウム（Cetylpyridinium Chloride : CPC）は、優れた抗菌作用をもつ陽イオン性の物質^{10, 11)}で歯磨剤や洗口剤の成分として多く使用されているが、一般的にその殺菌作用の効果時間は一時的で持続性がない。そこで、デンプンを原料とし黒色酵母によって生成される天然多糖であるプルランのリン酸化合物であるリン酸化プルラン（Phosphorylated Pullulan : PP）を新規に合成

した。この新規物質である PP は、その構造がガラスアイオノマーセメント¹²⁾に類似していることから、歯面上の Ca イオンに吸着し、さらに陽イオン性の物質と結合力を有することが想像された。この性質を利用することで、陽イオン性の CPC を Ca が豊富な歯面に停滞させて持続的な殺菌効果を発揮させることができると考えられた¹³⁾。さらに、プルランは細粒を服用する際のカプセルや食品の粘度を上げるための添加物など、安全性の高い材料としてすでに世間に広く普及しており、また CPC も、歯磨剤や洗口液、さらには喉飴（トローチ）に含まれる殺菌成分として用いられ、他の洗口剤等の口腔衛生管理剤に比較して安全性の高い抗菌剤として広く用いられている。これらの特徴を組み合わせることで、安全性が高く、持続的に効果を発揮する口腔衛生管理剤の開発を行ってきた。

CPC と PP の混合物の持続的な抗菌効果と人工歯面への停滞性は、難波の報告¹³⁾で明らかになっている。しかし現在まで、それらの混合物の *in vitro* における細胞毒性、*in vivo* における生体毒性および口腔内細菌に対する影響は明らかにされていない。そこで本研究では、臨床応用に向けてそれらを検証することを目的としている。

まず、*in vitro* における細胞毒性を検証するため、3 種類のヒト由来細胞に対する毒性を、形態と細胞数の変化および細胞活性によって検証した。その後、*in vivo* における生体毒性を、ラット、マウス、およびハムスターに対する毒性試験によって検証した。さらに、これらの安全性が確認できた段階で、健常者に対する臨床試験を行い、ヒト口腔内細菌への影響を検討した。

材料と方法

1. 殺菌剤

殺菌剤として、陽イオン性の塩化セチルピリジニウム (CPC: SIGMA, St Louis, MO, USA) を用いた。

2. 天然多糖プルランリン酸化合物

殺菌剤を歯面に留め、殺菌効果を持続させるためのキャリアとして、新規物質であるリン酸化プルラン (PP) を開発した。プルランは株式会社林原から購入し、プルランのリン酸化は神戸天然物化学株式会社 (Kobe, Japan) に委託合成することで供試した。

3. 細胞障害実験

1) 細胞とその培養

ヒト子宮頸部上皮癌由来の HeLa 細胞 (The American Type Culture Collection : ATCC), ヒト口腔癌由来の KB 細胞 (The American Type Culture Collection : ATCC),

およびヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts : HGF, ScienCell : California, USA) は、市販のものを購入して供した。培養は、20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, SIGMA), 10 %ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, GIBCO, New York, NY, USA), さらに 10 μ g/ml ゲンタマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium : DMEM, Invitrogen) を用いて、37 °C, 5 % CO₂ の存在下で行った。細胞がサブコンフルエントになったところで細胞濃度が 4 倍希釈となるように継代し、HGF に関しては 4 - 9 継代した細胞を実験に供した。なお、細胞活性の変化を測定する実験では、細胞周期を静止期に揃えるために、細胞播種の 24 時間後に FBS 濃度を 0.5 %に低下させた培地で 24 時間培養した後に使用した。

2) 試験溶液の作成

CPC 溶液および PP 溶液は、CPC と PP をそれぞれリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate-buffered saline : PBS, GIBCO) にて溶解して 0.1 あるいは 0.2 w/v% (以下単に%と表記) となるものを原液とした。必要な濃度になるように、この原液を PBS で希釈した。PP-CPC 溶液は、使用直前に CPC 溶液と PP

溶液を混和して必要な最終濃度に調製した。

3) 細胞形態の観察

HeLa 細胞の形態に対する試験溶液の影響を観察するため、光学顕微鏡 (ECLIPSE TS 100; NIKON, Tokyo, Japan) と Array Scan VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて観察した。

(1) 光学顕微鏡による細胞形態の観察

HeLa 細胞を 12 穴マルチプレート (Corning, Corning, NY, USA) に 5.2×10^3 cells/cm² の密度で播種し、前述の記載 (材料と方法 3 項) の方法で培養した後、0.01% および 0.1% (10 µg/ml と 100 µg/ml に相当) の試験溶液 (PP 溶液および PP-CPC 溶液) で作用した。対照として同濃度の CPC 溶液および PBS を用いた。作用直前に培地を吸引し、PBS にて 2 回洗浄を行った後、各溶液を 3 分間作用させた。作用後に PBS にて 2 回洗浄し、培地を入れて 24 時間培養した後の細胞形態を光学顕微鏡 (ECLIPSE TS 100; NIKON) にて観察した¹⁴⁾。

(2) 免疫蛍光染色後の Array Scan による細胞形態の観察

HeLa 細胞を 48 穴マルチプレート (Corning) に 2.1×10^4 cells/cm² の密

度で播種し, 前述の記載(材料と方法3項)の方法で培養した後, 0.0001% から 0.1% (0.1 $\mu\text{g/ml}$ から 100 $\mu\text{g/ml}$ に相当)に段階希釈した試験溶液 (PP 溶液および PP-CPC 溶液) を作用させた。対照として CPC 溶液および PBS を用いた。作用は前項記載と同様の方法で行い, 作用後に 24 時間培養を行った。その後, 培地を除去し, PBS にて洗浄した後, 4 % パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS にて 15 分間浸漬して固定を行った。固定後, PBS にて 3 回洗浄し, 0.1% Triton X-100 (ナカライテスク, Tokyo, Japan) を含む PBS にて 5 分間浸漬した。その後, PBS にて 3 回洗浄し, PBS で 1:200 に希釈した AlexaFluor[®]594-phalloidin (Invitrogen) を用い, 遮光した状態の室温にて 30 分間反応させた。その後, 核の染色として 4',6-diamidino-2-phenylindole : DAPI (ProLong[®] Gold and Slowfade[®] Gold Antifade Reagents with DAPI ; Invitrogen) を室温にて 10 分間反応させ¹⁴⁾, 染色した細胞を Array Scan VTI HCS Reader にて観察および解析を行った。

4) 細胞数の測定

HeLa 細胞, KB 細胞, および HGF の細胞数に対する試験溶液の影響を検討す

るため、試験溶液で作用した後の細胞数を比較した^{15,16)}。

3種類の細胞を48穴マルチプレート（Corning）に 2.1×10^4 cells/cm² の密度で播種し、前述の記載（材料と方法3項）の方法で培養した後、0.0001%から0.1%（0.1 µg/ml から 100 µg/ml に相当）に段階希釈した試験溶液（PP 溶液および PP-CPC 溶液）を作用させた。対照として CPC 溶液および PBS を用い、PBS を用いた時をベースラインとした。前項記載と同様の方法で作用させ24時間培養した。その後、培地を除去して PBS にて洗浄した後、4 % PFA を含む PBS に15分間浸漬して固定した。そして PBS にて3回洗浄した後、0.1% Triton X-100（ナカライテスク）を含む PBS に5分間浸漬して透過処理した。さらに、PBS にて3回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole : DAPI を室温にて10分間反応させて核を染色した。その細胞数を Array Scan VTI HCS Reader を用いて計測した。

5) 3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法

HeLa 細胞, KB 細胞, および HGF の細胞活性に対する試験溶液の影響を検討するため、MTT 法を用いて調べた^{17,18)}。

3種類の細胞を48穴マルチプレート（Corning）に 2.1×10^4 cells/cm² の密度で播種し、前述の記載（材料と方法3項）の方法で培養した後、0.0001%から0.1%

(0.1 µg/ml から 100 µg/ml に相当) に段階希釈した試験溶液 (PP 溶液, PP-CPC 溶液) を作用させた。対照として, CPC 溶液および PBS を用いた。前項記載と同様の方法で作用させ 24 時間培養した。その後に MTT 試薬 (SIGMA) を最終濃度 0.5 mg/ml になるように添加し, 4 時間後に MTT を取り込んで青褐色のホルマザンを形成した細胞を酸性プロパノールで溶解し, 細胞溶解液を回収した。そして, 回収した細胞溶解液の吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 680 : Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した (測定波長 : 595 nm)。

4. 反復経口投与毒性試験

試験溶液 (PP 溶液および PP-CPC 溶液) を長期間経口投与したときの生体と口腔内細菌の変化への影響を観察するため, 以下の実験を行った^{19,20}。なお, 全ての実験は岡山大学動物実験承認 (OKU-2010105) を得て, 岡山大学歯学部動物実験施設の基準に従い行った。

1) 使用動物および飼育方法

本実験には Sprague-Dawley ラット (日本チャールズ・リバー, Yokohama, Japan), 雌雄各 20 匹を生後 4 週齢で購入したものをを用いた。飼育は室温 22~24℃, 人工照

明6：00～18：00に設定されたspecific pathogen freeの岡山大学歯学部動物実験施設にて行った。飼育期間中、放射線滅菌された固形飼料（CE-2，日本クレア，Tokyo，Japan）を自由に摂取させ、給水は試験溶液もしくは対照溶液のみを自由に摂取させた。

2）試験溶液の投与量設定，調整および投与方法

試験溶液の濃度は，実際の臨床応用を想定し 0.01%とした。CPC 溶液および PP 溶液は，それぞれ超純水にて 0.01%に希釈した。PP-CPC 溶液は，投与直前に 0.02%CPC 溶液と 0.02%PP 溶液を混和することで，0.01%PP-0.01%CPC 溶液を作成した。対照群には CPC 溶液および媒体である超純水を投与した。投与は，試験溶液および対照溶液を給水瓶に入れ，自由に経口摂取させた。

3）ラットに対する反復経口投与毒性試験

(1) 飼育期間

投与期間は 28 日間とした。

(2) 一般性状の観察

飼育期間中，毎日全てのラットに対し死亡もしくは肉眼的に異常所見がないか確認した。

(3) 体重の測定

飼育期間中，各群特定の3匹に関して，1週間に1度の間隔で体重を測定した。

(4) 摂水量および摂食量の測定

飼育期間中，各群特定の3匹に関して，給水瓶または給餌器を交換する時に，残存量を測定し，前交換時の量との差により，摂水量および摂食量とした。

(5) 剖検および血液採取

観察期間終了後，ジエチルエーテル麻酔にて鎮静した後，生理食塩水で1：2に希釈したペントバルビタール（ネンブタール：大日本住友製薬，Osaka, Japan）を腹腔内に体重100gあたり0.1 mlの割合で投与した。全身麻酔下で腹側から切開し，心臓を明示した。心臓から22Gの針を用い，シリンジにて直接血液を採取し，直ちに微量採血管へ保管した。その後，各群特定の3匹に関して心臓から4%PFAを注入し全身の灌流固定を行い，肝臓，腎臓，脾臓，そして歯肉を採取し，直ちに4%PFAにて固定した²¹⁾。

(6) 病理組織学的検査

各群特定の3匹に関して前項で採取した臓器を、固定、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、および病理組織学的分析は、株式会社バイオ病理研究所（Oita, Japan）に依頼した²¹⁾。

(7) 血液検査

剖検時、微量採血管に採取した血液は（株）ファルコバイオシステムズ岡山営業所（Kyoto, Japan）に解析を依頼し、血液の一般性状および生化学的性状の変化を検討した。検査項目として、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、AST、ALT、総コレステロール、中性脂肪、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、無機リン、尿素窒素、クレアチニン、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC、血小板数、網状赤血球数、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球を測定した²¹⁾。

4) ラット口腔内細菌に及ぼす影響

試験溶液を長期的に投与したときの口腔内細菌に及ぼす影響を検討するため、経時的に口腔内細菌を採取し、DNA抽出後、リアルタイム polymerase chain reaction（PCR）法により口腔内細菌量の定量および Terminal Restriction Fragment

Length Polymorphism (T-RFLP) 法により口腔内細菌叢の解析を行った²²⁾。

(1) 口腔内細菌の採取

観察期間中、2 週間に 1 度の頻度でラットの口腔内細菌を採取した。

口腔内細菌は、ラット覚醒下に手指にてラットの頭部を固定し、高圧蒸気滅菌したペンダブラシマイクロ (Centrix, Shelton, CT, USA) を口腔内に挿入し、左側臼歯頬側面を 5 回拭い、直ちに PBS 1ml を分注した 1.5ml マイクロチューブに採取した。採取後、1 分間攪拌しペンダブラシマイクロにて採取した細菌を PBS 中に混濁させ、混濁液を新しいマイクロチューブに移し、4℃、10,000g で 15 分間遠心分離した。その後、上清を除去し、底面に溜まったペレットを-30℃にて保存した。

(2) DNA の抽出

全 DNA の抽出は、InstaGeneTMMATRIX (BIO-RAD Laboratories) を用いて行った²²⁾。すなわち、-30℃にて保管したペレットに InstaGeneTMMATRIX を 200 μ l 加え、56℃にて 30 分間反応させた後、100℃にて 8 分間熱処理を加え、遠心後の 50 μ l の上清を回収した。

(3) リアルタイム PCR 法による口腔内細菌量の定量

採取した細菌の定量は、リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて 16S rDNA 遺伝子を増幅し、比較 Ct 法によって行った^{23,24)}。抽出した DNA の 1/20 量を、酵素として AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase を含有している 12.5 μ l の SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)²⁵⁾、2 μ l のプライマー（フォワード 5'-GTGSTGCAYGGYTYTCGTCA-3' , 2 μ l の リ バ ー ス 5'-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC- 3', 各 10mM, SIGMA), および Nuclease-free-water (QIAGEN) を最終的に合計 25 μ l になるように混合した。95°Cで 10 分間の変性の後、95°Cで 15 秒, 60°Cで 1 分間を 1 サイクルとした 35 サイクルの PCR 反応にて増幅した。PCR 反応および増幅サイクル毎の蛍光強度の測定は、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて行った。

(4) T-RFLP 法による口腔内細菌叢の解析

① DNA の抽出, 増幅, および精製

各菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子の DNA 断片の増幅は、これらを標的としたプライマー（フォワード 27F :

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGCTCAG-3' , リバース 1492R:

5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', SIGMA) を用いた PCR 法を行った。

なお, 27F プライマーの 5'-末端は T-RFLP 法のために florescent molecule

6-carboxyfluorescein (6-FAM)により蛍光標識したものを用了^{26,27)}。

DNA の増幅反応は, 前述の DNA 産物を 2-5 μ l を基に, 5 U/ μ l の TaKaRa

Ex Taq を 0.25 μ l, 10 倍濃縮の Ex Taq Buffer を 5 μ l , 2.5 mM の dNTP

を 4 μ l, 蛍光標識フォワードプライマーを 10 pmol, リバースプライマー

を 10 pmol, そして RNase-free Water を最終的に合計 50 μ l となるように

混合し, ASTEC Program Temp Control System PC-700 (ASTEC, Fukuoka,

Japan) を用いて 95°C で 30 秒間, 50°C で 30 秒間, そして 72°C で 1 分 30

秒間のステップを 35 サイクル行い, 最後に 72°C で 10 分間の伸長ステッ

プを付加して行った。増幅した DNA の確認のため, PCR 産物の 2 μ l を

使用し, TAE (40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA) buffer を用いて, 1.5% の

アガロースにて電気泳動を行った。その際, DNA を ethidium bromide (最

終濃度 50 μ g/ml) によって染色し, 短波長の紫外線 (260 nm) にて観察

した。

PCR 産物の精製には MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用い, キット添付の説明書に従って沈殿法にて行った。すなわち, PCR 反応液の 5 倍量の Buffer PB を加え, 1 分間の遠心分離の後, 750 μ l の Buffer PE を加え, 遠心分離を行った。10 μ l の Buffer EB を加え遠心分離を行い, 濾過されて新しいチューブの中に, 精製された PCR 産物を 9 μ l の溶液中に回収した。

② T-RFLP 法

精製された PCR 産物を制限酵素 *Msp* I (Takara Bio, Siga, Japan) によって切断し, 末端断片を作成した。すなわち, 2 μ l の精製された PCR 産物, 20U/ml の *Msp* I (Takara Bio) を 2 μ l , 1% の bovine serum albumin および Buffer を 1 μ l , RNase-free Water を総量 10 μ l になるように混合し, 37°C で 3 時間反応させた。

切断された PCR 産物 (1 μ l) は 12 μ l の deionized formamide および 1 μ l の DNA 断片長のスタンダードを混合し 95°C にて 2 分間反応させて酵素の不活性化後, 氷水にて急冷し, 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に変性させた。DNA 断片長のスタンダードは, GS 500 ROX と GS 1000 ROX (Applied

Biosystems) を 1 : 1 で混和して作成した。

DNA の末端断片の長さは、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の GeneScan mode (15kV, 8mA, 60°C, 各サンプル 60 分間) で測定し、GeneScan 3.1 (Applied Biosystems) にて解析した。DNA の末端断片の蛍光強度ピークが 50 以下のものをバックグラウンドノイズとして削除した。

③ クラスタ解析

すべてのサンプルの T-RFLP データは MicrobiotaProfiler (Infocom, Tokyo, Japan) によりデンドログラムを作成し、クラスタ解析を行った²⁸⁾。

5. GLP (Good Laboratory Practice) 基準に準拠した毒性試験

試験溶液 (PP 溶液および PP-CPC 溶液) の生体への影響を網羅的に観察するため、GLP 基準の検査が可能な財団法人食品農医薬品安全性評価センター (Shizuoka, Japan) に以下の毒性試験を依頼した。さらにその際に、腸内細菌叢への影響の検討を、フローラサービスジャパン (Tokyo, Japan) に依頼した。な

お、本試験のサイズ等の条件は GLP 基準には相当しない。動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」を遵守し、動物を適正に使用した。

(安全性評価センター動物実験倫理委員会審承番号 10-0216A)

1) マウスを用いた経口投与毒性試験

本実験には日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) から雌雄各 18 匹のマウス (Slc : ICR(SPF)) を生後 5 週齢で購入し、その後 1 週間検疫・馴化したものをを用いた。飼育は室温 23~26℃, 人工照明 7 : 00~19 : 00 に設定されたバリアシステム飼育室にて行った。飼育期間中, オリエンタル酵母工業 (Tokyo, Japan) で購入した放射線滅菌された固形飼料 CRF-1 を自由に摂取させ, 給水は水道水を給水ノズルから自由に摂取させた。

(1) 反復経口投与毒性試験

① 試験溶液の投与量設定, 調整および投与方法

試験溶液の濃度は, PP 溶液はげっ歯類を用いる反復経口投与試験に

において一般的に投与量の上限とされる 1,000mg/kg に相当する 10%に,

PP-CPC 溶液の濃度は実際の臨床応用を想定し 0.01%に設定した。対照群には注射用水を投与した。投与は、胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて 1 日 1 回強制投与を行った。投与量は、体重 10g あたり 0.1ml とし、個体別に測定した最新体重に基づき算出した。

②飼育期間

飼育期間は 14 日間とした。

③一般性状の観察

飼育期間中、全動物の一般性状を毎日 1 回観察した。

④体重の測定

飼育期間中、全動物の体重を 1 週間に 1 度の間隔で測定した。

⑤腸内細菌叢の採取および検索

雄についてのみ試験開始時および投与期間終了後の剖検時に糞便を 0.1g 以上採取し、専用のセラムチューブに回収し、採取量の 10 倍量になるように嫌気性希釈液（フローラサービスジャパンから送付）を加えて冷蔵保存した。これらの検体は、各採取日の翌朝着でフローラサービスジャパンへ冷蔵送付した。

冷蔵送付された検体は、光岡の方法²⁹⁾に準じて糞便細菌叢の検索を行った。すなわち、嫌気性希釈液にて 100 倍希釈し、平板寒天培地 1/3 ～1/4 区分に 0.05ml 塗布した。生育してきたコロニー形態、グラム染色性、菌形態の観察により菌群の同定を行い、コロニー数に希釈倍率を乗じて糞便 1g あたりの菌数を対数にて表示した。非選択培地として glucose-blood-liver (BL) 寒天培地および Eggeth-Gagnon (EG) 寒天培地、L(+) *Clostridium* 選択培地として neomycin-Nagler (NN) 寒天培地、*Bifidobacterium* 選択培地として *bifidobacteria selective* (BS) 寒天培地、*Lactbacillus* 選択培地として変法 *lactobacilli selective* (LBS) 寒天培地、*Bacteroidaceae* 選択培地として *neomycin-brilliant green-taurocholate-blood* (NBGT) 寒天培地、*Enterobacteriaceae* 選択培地として *desoxycholate-hydrogen sulfide- lactose* (DHL) 寒天培地をそれぞれ用いた。

⑥血液検査

観察期間終了後、ジエチルエーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から採血し、総合血液学検査装置 (ADVIA 120, バイエル, Tokyo, Japan) を用

いて測定した。検査項目として、総ビリルビン、総蛋白、アルブミン、AST、ALT、総コレステロール、中性脂肪、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、無機リン、尿素窒素、クレアチニン、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCV、MCH、MCHC、血小板数、網状赤血球数、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球を測定した。

⑦病理学的検査

投与期間終了後、ジエチルエーテル麻酔下で採血後、放血により安楽死させた後、剖検を行った。剖検時に器官（心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、肺、胸腺、脳）の重量測定を行った。さらに肝臓、腎臓、空腸、結腸（遠位部）を摘出および観察し、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋し、HE染色を施し検鏡した。

(2)単回経口投与毒性試験

①試験溶液の投与量設定、調整および投与方法

試験溶液の濃度は、PP 溶液はげっ歯類を用いる単回経口投与試験に

において一般的に投与量の上限とされる 2,000mg/kg に相当する 20%に、PP-CPC 溶液の濃度は実際の臨床応用を想定した 10 倍の 0.1%に設定した。対照群には注射用水を投与した。投与は、4 時間絶食させた後、胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて単回強制投与した。投与量は、体重 10g あたり 0.1ml とし、個体別に測定した最新体重に基づき算出した。

②飼育期間

飼育期間は 14 日間とした。

③一般性状の観察

投与日は、投与後 30 分以内に一回、その後は投与後 4 時間まで 1 時間に 1 回観察した。投与翌日以降については 1 日 1 回観察した。

④体重の測定

飼育期間中、全動物の体重を 1 週間に 1 度の間隔で測定した。

⑤病理学的検査

投与 14 日後、ジエチルエーテル麻酔下で放血により安楽死させた後、剖検を行った。剖検では、動物の体表、自然開孔部を観察し、腹腔、胸

腔，骨盤腔および頭蓋腔内の器官，組織をはじめとする全身の諸器官および組織を肉眼観察した。肉眼的異常について部位，大きさ等を記録し，異常が存在した器官および組織は 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

2) ハムスターを用いた頬袋粘膜刺激性試験

本実験には日本エスエルシー株式会社よりハムスター (Slc : Syrian) 雄 19 匹を生後 7 週齢で購入し，その後 1 週間検疫・馴化したものを用いた。飼育は室温 23～26℃，人工照明 7 : 00～19 : 00 に設定されたバリアシステム飼育室にて行った。飼育期間中，オリエンタル酵母工業で購入した放射線滅菌済みの固形飼料 CRF-1 を自由に摂取させ，給水は水道水を給水ビンから自由に摂取させた。

①試験溶液の投与量設定，調整および投与方法

PP 溶液の濃度は，実際の臨床応用を想定した 0.01%に対して 100 倍の濃度である 1 %とし，PP-CPC 溶液および CPC 溶液は，医薬部外品の CPC 濃度の上限である 0.05%とした。

②飼育期間

飼育期間は 5 日間とした。

③処置

投与経路は臨床応用を考慮して口腔粘膜へ処置した。動物の口をシリコンゴムで被覆したピンセットで開け、粘膜に傷付けないように頬袋を反転させた。粘膜表面を生理食塩水で洗浄し、粘膜に炎症等の異常がないことを確認した後、0.2ml の投与液を右頬内に 1ml のディスポーサブルシリンジを用いて投与した。この操作を 1 日 1 回、4 日間連続して行った。左頬袋粘膜は無処置の対照とした。

④頬袋粘膜の肉眼観察

各投与の直前および最終投与後約 24 時間に頬袋粘膜における病変の有無を肉眼的に観察した。

⑤一般状態観察

各投与の直前および最終投与 24 時間後に動物の一般性状を観察した。

⑥体重の測定

初回投与時および剖検前に体重を測定した。

⑦病理学的検査

病理学的検査として、頬袋の病理組織学的検査を実施した。最終投与

24 時間後に各動物をペントバルビタールナトリウム過麻酔により安楽死させ、被験物質と接触した部位（右）および対照部位（左）の頬袋をそれぞれ摘出し 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包埋し、HE 染色後に検鏡した。

6. 健常者に対する臨床試験

PP-CPC 溶液のヒト口腔内細菌への影響を検討し、臨床応用の有用性を検討するため、健常者に対して臨床試験を行った。本試験は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認（受付番号：1089）を得て、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野にて行った。

1) 被験者

岡山大学の教職員，大学院生，研究生等で，本研究の趣旨を理解して同意の得られた者を対象とした。なお，過去 3 ヶ月以内に抗生物質を服用した者や，塩化セチルピリジニウムにアレルギー症状を有するものは除外とした。

2) 試験溶液の投与量設定，調整および投与方法

試験溶液の濃度は実際の臨床応用を想定して PP-CPC 溶液 (0.01% / 0.01% もしくは 0.02% / 0.01%) とし、対照溶液は、CPC 溶液 (0.01%)、蒸留水、および市販品洗口液 (デンタルリンス GUM アルコールタイプ, SUNSTER, Osaka, Japan) とした。溶媒は全て蒸留水を使用した。

3) 試験方法および観察, 評価項目

(1) □□□□溶液の口腔内細菌に対する効果

□□□□溶液の口腔内細菌の抗菌効果を検討するため、以下の□つの方法を用いて実験を行った。

①含嗽とブラッシング併行による効果

食後 1 時間後に生理食塩水にて含嗽 (10ml で 30 秒間) し、試験溶液を使用する前のサンプルとして採取した。その後、試験溶液 10ml (PP-CPC 溶液 : 0.01% / 0.01%) もしくは対照溶液 (0.01% CPC 溶液, 蒸留水, 市販品洗口液) で含嗽した後に、試験溶液に浸漬した歯ブラシで 3 分間ブラッシングを行い、最後に試験溶液 10ml で 30 秒間含嗽した。経時的な細菌量の変化を観察するため、30 分後、60 分後、および 180 分後に生理食塩水で含嗽 (10ml で 30 秒間) し、吐出した物をサンプルと

して採取した。被験者には、試験期間に他の含嗽および飲食は行わないようにした。

②専門的歯面清掃（PMTC）による効果

上下顎前歯部 6 本を対象として実験を行った。まず、対象歯面を蒸留水にて洗浄し、綿球で歯面を拭い、試験溶液を使用する前のサンプルとして採取した。次に、試験溶液（PP-CPC 溶液：0.02% / 0.01%）もしくは対照溶液（0.01% CPC 溶液）を塗布しながら、対象歯面に対して専門的歯面清掃を行った。その後、歯面を蒸留水にて洗浄し、エアーにて歯面を乾燥させ、試験溶液あるいは対照溶液を含んだ綿球を 60 秒間歯面上に保持した。その 90 分後、歯面を蒸留水にて洗浄した後に、滅菌された小綿球で歯面上の細菌を採取した。

③評価方法

まず、採取した口腔内細菌を生理食塩水にて 500 倍希釈して brain heart infusion （BHI）培地に 100 μ l 播種して、20 時間培養した後に形成されたコロニー数を計数して colony forming unit （CFU）を得た。これを比較することによって、細菌数の変化を検討した。

(2) PP-CPC 溶液の長期使用が口腔内細菌叢に与える影響

試験溶液を長期間使用したときの口腔内細菌叢への影響を検討するため、Pahwa らの方法³⁰⁾を改変して実験を行った。

①長期間の含嗽とブラッシング併行による影響

試験溶液を長期間使用した際の歯面上の細菌叢の変化を観察するため、左側の上顎中切歯から犬歯の唇側歯面を高圧蒸気滅菌したペンダブラシマイクロ（Centrix）で拭い、試験溶液を使用する前のサンプルとして採取した。その後、1日2回以上4週間、試験溶液（PP-CPC 溶液：0.01% / 0.01%）もしくは対照溶液（デンタルリンス GUM ノンアルコールタイプ、SUNSTER）を用いてブラッシングと含嗽を行った群、さらに非介入群の3群を設定した。試験期間中に2週間に1度、前述した方法で歯面から細菌を採取した。さらに、試験溶液の使用を終了後の細菌叢の変化を観察するため、使用終了後の4週間も継続して同様の方法で歯面上の細菌を採取した。

採取した細菌は、直ちに1mlのPBSを分注した1.5mlマイクロチューブに入れ、1分間攪拌して細菌をPBS中に混濁させ、混濁液を新しいマ

イクロチューブに移し、4℃、10,000g で 15 分間遠心分離した。その後、上清を除去し、底面に溜まったペレットを-30℃にて保存した。

②評価方法

採取した細菌サンプルは、グラム陽性菌までも十分に溶解させるために Gentra Puregene Yeast/Bact. Kit (Qiagen) を用いて、DNA の抽出を行った。すなわち、-30℃にて保存したペレットに 300 μ l の Cell Suspension を添加し、吸排出して解凍と混和を行い、後の方法はキット添付の説明書に従って行った。DNA 抽出後は前述した T-RFLP 法と同様の方法で解析した。本実験では前述 (材料と方法 4 項) のクラスター解析は行わず、すべてのサンプルの T-RFLP データからピークの数进行数することで、細菌の種類の数进行比较して細菌叢の変化を検討した。

6. 統計処理

各実験系における検定を、Student's *t* test および ANOVA/Scheffe's test によって行った。Student's *t* test には、Microsoft Excel 2008 for Mac (日本マイクロソフト, Tokyo, Japan) を、ANOVA/Scheffe's test には、SPSS ソフトウェア (ver. 13.0,

Chicago, IL, USA) を用いて検定を行った。各検定において $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

非 GLP 施設における毒性試験（材料と方法 5 項）については、得られた定量値を最初 F 検定を実施し、データの分散性を検定した。等分散の場合 ($p \geq 0.05$) の場合は、Student's t test を行い、対照群と各投与群間の有意性を検定した。F 検定で不等分散 ($p < 0.05$) の場合は、Aspin-Welch's t test で対照群と各投与群間の有意性を検定した。各定量値の有意水準は、F 検定で両側 5%，Student's および Aspin-Welch's t test で両側 5% および 1% とした。

結果

1. 試験溶液が細胞に及ぼす影響

1) 上皮細胞の形態に対する影響

HeLa 細胞に 0.01%および 0.1%の試験溶液（PP 溶液，PP-CPC 溶液）を 3 分間作用させた後に 24 時間培養して光学顕微鏡で観察した結果，PP 溶液および PBS ではいずれの濃度でも細胞形態の変化はなかったが，PP-CPC 溶液および CPC 溶液ではいずれの濃度でも細胞が収縮していた（図 1 A, B）。一方で，HeLa 細胞に 0.0001%から 0.1%まで段階希釈した試験溶液を作用させた場合では，PP 溶液では濃度に関係なく細胞の形態は変化していないが，PP-CPC 溶液および CPC 溶液では 0.01%以上の濃度において細胞が収縮していた（図 1 C）。

2) ヒト由来細胞の細胞数と活性に対する影響

ヒト由来細胞（HeLa 細胞，KB 細胞，HGF 細胞）に 0.0001%から 0.1%に段階希釈した試験溶液を 3 分間作用させた後に 24 時間培養した結果，PP 溶液は

濃度に関係なく細胞数の変化はほとんどなかった。さらに、PP-CPC 溶液およびCPC 溶液の0.0001%および0.001%の濃度でも細胞数にほぼ変化はなかった。しかし、PP-CPC 溶液およびCPC 溶液の0.01%の濃度では有意に細胞数が減少した。なお、0.1%の濃度では逆に細胞数が増加していた。これらは、3種類の細胞全てにおいて同様であった（図2）。

2. 反復経口投与毒性試験

1) 一般性状

ラットに試験溶液を4週間経口投与させたときの体重、摂水量、摂食量を比較したところ、体重に関して性差はあったものの、性別群内で有意差のある変化はなかった。また摂水量、摂食量についてはいずれの群においても有意差はなかった（図3）。

2) 病理学的所見

4週間の観察期間終了後の生体へ対する影響を検討した（表1，2）。

(1) 血液検査所見（表1）

各群をコントロール群と比較すると、CPC 群の雄においてALTが有意に低

値を示し、PP 群の雌において ALP およびクロールが高値を、また CPC 群の雌においてクレアチニンが有意に低値を示し、ALP が高値を示した。その他の項目については各群間に有意差はなかった。

(2) 病理組織学的所見

・肝臓： 肝細胞のび慢性空胞化が雄および雌のコントロール群に軽微に存在した。炎症性細胞小集簇巣が全群で軽微に存在した。類洞の拡張と鬱血が雌のコントロール群で存在した。髓外造血小葉が雄の PP 群，CPC 群，および PP-CPC 群で軽微に存在した（表 2）。

・腎臓： 髓質外帯尿細管の拡張，尿円柱の形成が雄および雌のコントロール群に軽微に存在した。腎盂粘膜下の炎症性細胞浸潤が雄の CPC 群，雌の CPC 群および PP-CPC 群に軽度 to 存在した。髓質外帯尿細管の拡張と石灰化が雌の CPC 群に軽度 to 存在した。皮質部尿細管の再生像が雌の PP-CPC 群に軽度 to 存在した。腎盂粘膜の肥厚が雌の PP-CPC 群に軽度 to 存在した（表 2）。

・脾臓および歯肉： いずれの検体も正常であった。(表 2)。

3) ラット口腔内細菌に及ぼす影響

2 週毎に 4 週間の観察期間終了後の生体へ対する影響を検討した (図 4)。

(1) 口腔内細菌量の変化

各時期の試験液と対照液間で、さらには同一液間での経時的に有意な差はなかった (図 4 A)。

(2) 口腔内細菌叢の変化

各群内でばらつきが大きく、各時期の各液間傾向は見出せなかった (図 4 B)。

3. GLP (Good Laboratory Practice) 基準に準拠した毒性試験

マウスへの反復投与毒性試験、マウスへの坦懷投与毒性試験、そしてハムスター頬粘膜刺激性試験を行ったが、試験期間中の各動物の体重の変化は成長に伴うものであった (図 5)。なお、マウスでは、体重に性差があった (図 5 A, B)。

1) マウスを用いた経口投与毒性試験

(1)反復経口投与毒性試験

①一般性状の観察

投与期間を通じて死亡例はなく，一般性状は正常であった。

②血液学的検査（表 3）

好中球が 0.1 % PP－0.1 % CPC 投与群の雄で，リンパ球数が 10 % PP 投与群の雌でそれぞれ統計学的有意な低値であった。

③血液生化学検査（表 3）

全ての項目で，対照群との間に明確な差異はなかった。

肉眼的観察所見（表 4）

雄では，腎臓の嚢胞が 10 % PP 投与群の 1 例に存在し，雌では脾臓の肥大，肺の結節，卵巣の嚢胞がそれぞれ 10 % PP 投与群，対照群および 0.1 % PP－0.1 % CPC 投与群の各 1 匹に存在した。

④病理学的検査（表 5）

0.1 % PP－0.1 % CPC 投与群において，腎集合管上皮細胞の肥大が雄の全例および雌の 2 例で，腎遠位尿細管上皮細胞の肥大が雌の 2 例に存在した。その他に存在した所見はいずれもマウスにしばしばみられる自

然発生性の病変であった。

⑤器官重量（図 6）

脳の重量が 0.1 % PP－0.1% CPC 投与群の雄で、対照群に比較し統計学的有意な低値を、10% PP 投与群の雌で高値を示した。また、精巢上体の重量が 10% PP 投与群の雄で有意な高値を示した。

⑥腸内細菌叢

投与前後を比較して、検出した細菌では変化はなかった。また、*Bifidobacterium* および L(+) *Clostridium* はともに検出限界以下であった。

(2)単回経口投与毒性試験

①一般性状の観察

観察期間を通じて死亡例はなく、一般性状は正常であった。

②病理学検査（表 6）

腎臓の嚢胞が 20 % PP 投与群の雄で存在したがその他の動物は正常であった。

2）ハムスターを用いた頬袋粘膜刺激性試験

①一般性状の観察

いずれの動物も観察期間を通じて死亡例はなく，一般性状は正常であった。

②頬袋の肉眼観察（表 7）

腎臓の嚢胞が 20 % PP 投与群の雄で存在したが，その他の動物は正常であった。

③病理学的検査（表 7）

1 % PP 投与群では，いずれの動物も処置側および無処置側とも正常像であった。0.05 % CPC 投与群では無処置側にごく軽度の白血球浸潤が存在した動物が 1 例存在し，処置側にごく軽度の充血および白血球浸潤が存在した動物が 1 例存在した。0.05 % PP－0.05 % CPC 投与群では，いずれの動物も処置側および無処置側とも正常像であった。

3. 健常者に対する臨床試験

1) 含嗽とブラッシング併用による効果

0.01% PP－0.01% CPC 溶液で含嗽およびブラッシングした後の口腔内細菌の CFU の経時的変化は，蒸留水に比較して有意な差をもって減少していた。

一方、対照では同等の経時変化が見られた。すなわち、蒸留水でうがい及びブラッシングをした群では、実施後 180 分まで経時的に菌数が増えた。その他の群では、実施後に菌数が著しく減少し、180 分経っても実施前の菌数より少なかった（図 7 A）。

2) 専門的歯面清掃 (PMTC) による効果

0.02% PP-0.01% CPC 溶液では、0.01% CPC 溶液を応用した場合に比べて 90 分経過後の歯面上の細菌数が有意に少なかった（図 7 B）。

3) 口腔内細菌叢に与える影響

PP-CPC 溶液を長期使用した際の口腔内細菌叢への影響を T-RFLP 法を用いて検討したところ、有意差はなかったが、0.01% PP-0.01% CPC 溶液では経時的に細菌種の数が増加し、対照溶液では経時的に細菌種の数が増加し、さらに非介入群では経時的に細菌種の数が増加する傾向であった（図 7 C）。

考察

本研究で明らかになった PP-CPC 溶液の細胞および生体への毒性は、以下の
ようにまとめることができる。

1. PP 溶液には濃度に関係なく細胞毒性がなかったが、0.01%以上の濃度の CPC
を含む溶液（CP 溶液，PP-CPC 溶液）では細胞毒性があった。
2. ラットを用いた試験から，PP には生体毒性はないが，CPC を含む溶液（CPC
溶液，PP-CPC 溶液）では腎臓に軽度の毒性があった。
3. マウスを用いた試験から，PP には急性毒性も慢性毒性はなく，CPC を含む
溶液（CPC 溶液，PP-CPC 溶液）では腎臓に器質的変化が起きたが，血液
検査では異常はなかった。そして，PP 溶液および PP-CPC 溶液ともに，腸
内細菌叢には影響を及ぼさなかった。
4. ハムスターを用いた試験から，口腔粘膜には刺激性がなかった。
5. ヒト健常者に対する臨床試験から，CPC を 0.01%含有する PP-CPC 溶液
でのブラッシングおよび含嗽は低濃度でも CPC 単独や市販の洗口液と同等
の抗菌作用を示す事が示唆され，特に専門的歯面清掃後に用いた場合は

CPC 溶液のものに比べて細菌量が減少した。また、長期間の応用時の菌面上の細菌叢を検討すると、CPC 溶液では細菌種が増加し、PP-CPC 溶液では細菌種が減少する傾向にあった。

CPC の細胞毒性は細胞膜へイオンの吸着して細胞膜上にある脂質成分を変性させ、その結果として細胞膜の耐浸透性と膜透過性の異常を引き起こす²⁶⁾と理解されている。細胞形態の観察から、0.01%以上の濃度の PP-CPC 溶液および CPC 溶液では細胞が縮小しており、この CPC の作用機序が働いたものと考えられる。しかし、0.1%の PP-CPC 溶液および CPC 溶液で細胞数が増加し、細胞活性の結果と矛盾する結果となった。これは、高濃度 CPC が細胞膜成分を変性³¹⁾させたことにより、細胞がウェル底面に凝集し、本来であれば洗浄する際に流出する、MTT を取り込まない失活した細胞が、流出せずに残存したためと考える。さらに、DAPI は失活した細胞の細胞核も染色するため、失活した細胞も計数された結果このような矛盾が発生したと考える。以上のことから、0.01%以上の濃度の CPC を含む溶液（CPC 溶液、PP-CPC 溶液）には細胞毒性があることが明瞭となった。ただし、PP-CPC 溶液の細胞毒性は CPC 溶液のものとほぼ同

等である。一方、PP 溶液に毒性がないことを考えると、PP-CPC 溶液の細胞毒性は CPC によるものであり、CPC の細胞毒性を PP が増強することはないと考えられる。一方、0.01% CPC 含有溶液において細胞毒性が出現したにも関わらず、歯肉や口腔粘膜に 0.01%さらに 0.05%の CPC 含有溶液を投与しても刺激性が出現しなかった。これは、実際の口腔内では唾液による粘膜保護作用および角化重層扁平上皮に覆われているためと考えられる。

細胞活性実験の結果から、PP-CPC 溶液の細胞毒性の L/D50 を算出すると、約 0.003%となる。Katsuragi らの報告から¹⁶⁾他の消毒剤の細胞毒性を消毒剤の成分含有量として比較すると、クレゾール (1.0%, 15W/W%) および塩化ベンザルコニウム(0.025%, 15W/W%) とほぼ同等の毒性を示す。つまり、細胞毒性に関しては他の一般的な消毒剤と変わらないと考えられる。ただし、塩化ベンザルコニウムではアレルギーの報告^{32,33)}があるが、CPC ではアレルギーの報告はほとんどないことを考慮すると、臨床応用に有利であると考えられる。

ラットおよびマウスによる毒性試験から腎臓への障害が示唆された。これは、CPC と同じ陽イオン性界面活性剤である塩化ベンザルコニウムでも腎臓に浮腫が惹起されたという報告があり³⁴⁾、これらを考慮すると腎臓は陽イオン性界面

活性剤に共通の標的器官³⁵⁾である可能性がある。今回、同様の機構が関与した可能性が考えられる。

ヒトに対する臨床試験では、ブラッシングと含嗽による効果と専門的歯面清掃（PMTC）後に応用したときの効果を検討すると、前者では唾液中の細菌を測定しているのに対し、後者では歯面上の細菌を測定している。応用方法は異なるが、この実験の結果から CPC 溶液と比較したときの PP-CPC 溶液の抗菌作用の特徴として、唾液中の細菌量は変化させないが、歯面上の細菌量は減少させる事が示唆された。この事は PP-CPC の歯面への吸着という特性に合致している。全身的機能の低下した高齢者や要介護者における菌交代現象および日和見感染症のリスクを考慮すると、今回の結果は非常に有望な結果である²²⁾。さらに口腔内細菌叢の解析から、有意差は無かったものの、PP-CPC 溶液では細菌の種類を減らし、口腔内の細菌叢を単純化する傾向があり、CPC 溶液では複雑化させる傾向がある。これは PP-CPC は抗菌物質を歯面に停滞させるため抗菌作用を緩やかに発揮するためと考えられ、この事も菌交代現象のリスクを減らす一因になるかもしれない³⁶⁾。

今回の実験での CPC 投与量と現在市販されている口腔ケア剤の CPC 投与量を

比較すると、現在市販されているトローチでは CPC の有効成分が 6〜72 mg/日の使用量が推奨されているのに対し、0.01% CPC (0.1 mg/ml CPC に相当) を含む PP-CPC 溶液を 1 回 10 ml 使用すると CPC 有効成分で 1〜5 mg/日に相当する。さらに、医薬部外品の洗口剤等には CPC が 0.05%含有されているが、PP-CPC 溶液では 0.01%である。これらから、より低濃度で、かつ少量での応用が可能になると考えられ、全身的機能の低下した高齢者や要介護者に対し、安全に応用できると考える^{30, 37)}。

現段階では、実際のヒトの口腔内での抗菌効果の作用時間、また効果的な応用方法の検討が不十分である。また実際の臨床応用を考えると咀嚼やブラッシングなど、PP-CPC の吸着を阻害する様々な因子が考えられる。今回の実験では条件を限定して抗菌作用の検討を行ったが、今後はさらに日常的な条件下での臨床試験を行い、安全で効果的な応用方法を模索する必要があると考える。

結論

PP-CPC 溶液には濃度依存的に細胞障害性があるが、小動物に対する生体毒性は極めて低い。さらに、CPC を 0.01%含有する PP-CPC 溶液は、ヒト口腔内において口腔内細菌に対して抗菌作用があり、細菌叢を単純化する傾向がある。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究の遂行に際し，リン酸化プルランを供与いただいた岡山大学大学院医歯薬学総合研究科機能再生再建学専攻 生体材料学分野の吉田靖弘准教授ならびに岡山大学大学院自然科学研究科機能分子化学専攻高分子材料学分野の沖原巧講師に謹んで感謝の意を表します。

様々な面にわたり終始ご指導賜り，貴重な御助言とご協力を下さいました難波尚子先生（前，岡山大学大学院特任助教）ならびに岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の長岡紀幸助教に厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり様々な面からご協力いただいた岡山大学産学官連携本部の梶谷浩一氏，斎藤晃一氏，岡山大インキュベータの鈴木幸次氏，ならびに歯周病態学分野の諸先生に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生労働省老健局「平成 20 年度 介護保険事業状況報告」

<http://www.mhlw.go.jp/topics/kaigo/osirase/jigyo/08/> (平成 24 年 9 月現在)
- 2) Kondo, K., Niino, M. and Shido, K.: A case-control study of Alzheimer's disease in Japan-significance of life-styles. *Dementia*, 5, 314-326, 1994.
- 3) Shimazaki, Y., Soh, I., Saito, T., Yamashita, Y., Koga, T. and Takehara, T. :

Influence of dentition status on physical disability, mental impairment, and mortality in institutionalized elderly people. *J. Dent. Res.*, 80, 340-345, 2001.
- 4) Beck, J. D., Offenbacher, S., Williams, R., Gibbs, P. and Garcia, R. :

Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann. Periodontol.*, 3, 127-141, 1998.
- 5) Yoneyama, T., Yoshida, M., Ohru, T., Mukaiyama, H., Okamoto, H., Hoshida,

K., Ihara, S., Yanagisawa, S., Ariumi, S., Morita, T., Mizuno, Y., Ohsawa, T., Akagawa, Y., Hashimoto, K., Sasaki, H. and members of the Oral Care Working Group: Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **50**, 430-433, 2002.

- 6) Adachi, M., Ishihara, K., Abe, S., Okuda, K. and Ishikawa, T.: Effect of professional oral health care on the elderly living in nursing homes. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **94** (2), 191-195, 2002.

- 7) 厚生労働省ホームページ：統計情報「平成 17 年度 歯科疾患実態調査」
<http://www.mhlw.go.jp/topics/2007/01/tp0129-1.html> （平成 24 年 9 月現在）

- 8) Marsh, P. D.: Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.*, **38**, 204-211, 2004.

- 9) Sharma, N., Charles, C. H., Lynch, M. C., Qaqish, J., Mcguire, J. A., Galustians, J. G. and Kumar, L. D. : Adjunctive benefit of an essential oil-containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss

regularly. *J. Am. Dent. Assoc.*, 135, 496-504, 2004.

- 10) Blubaugh, L. V., Botts, C. W., and Gerwe, E. G. : A study of the germicidal properties of cetylpyridinium chloride. *J. Bacteriol.*, 39, 51, 1940.
- 11) Huyck, C. L. :Cetylpyridinium chloride. *Am. J. Pharm.*, 116, 50-59, 1944.
- 12) 井上廣, 田村尚治 : グラスアイオノマーセメント修復 ; 保存修復学 (小野瀬英雄, 平井義人, 井上廣, 田中久義編) . 4 版, 医歯薬出版株式会社, 東京, 172-189, 2000.
- 13) 難波尚子 : 口腔細菌感染制御のための殺菌剤デリバリーシステムの研究. 岡山歯誌, 28, 学位論文, 2009.
- 14) 佐藤公麿 : Eosinophil Cationic Protein が正常ヒト線維芽細胞に及ぼす影響に関する研究, 岡山歯誌, 31, 学位論文, 2012.
- 15) Kuo-Wei Tai, Fu-Mei Huang, and Yu-Chao Chang, DDS MMS.: Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures

and a permanent hamster cell line. *J. Endod.*, 27: 571-573, 2001.

- 16) Katsuragi, H, Ohtake, M, Kurasawa, I, Suzuki, A and Saito, K: Bactericidal Effect against several genera of bacteria and cytotoxicity of newly developed super reductive water. *Japanese journal of oral biology*, 43: 166-174, 2001.
- 17) Gerlier, D., and Thomasset, N.: Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods.*, 94, 57-63, 1986.
- 18) Imazato, S., Horikawa, D., Takeda, K., Kiba, W., Izutani, N., Yoshikawa, R., Hayashi, M., Ebisu, S., and Nakano, T.: Proliferation and differentiation potential of pluripotent mesenchymal precursor C2C12 cells on resin-based restorative materials. *Dent. Mater. J.*, 29 (3): 341-346, 2010.
- 19) 厚生労働省薬務局「医薬品毒性試験法ガイドライン」
- 20) Takashima, H., Kato, H., Nagata, T., Furuya, M., Horiuchi, S., Inada, H., Saegusa, K., Morimura, S., Seki T., and Tago K.: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study of Macrophomopsis Gum in Rats. 秦野研究所年報, 28, 16-24,

2005.

- 21) Omosu, M., Eluard, B., Thien-Aubert, H., Stepniewski, J P., Vidal, J M., Bode, G., Roeder, V., Bonnat ,C., Lenfant, B., Sacre-Salem, B., Guffroy, M., and Detilleux, P G : Oral repeated-dose toxicity studies and toxicokinetic studies of telithromycin in rats. *Jpn. J. Chemother.*, 55 (S-1) : 28-33, 2003.
- 22) Wael Amgad Hassan: Analysis of Human Oral Bacterial Communities in health and Disease. 岡山歯誌, 29 (1) , 学位論文, 2010.
- 23) Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeyuchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., and Takashiba, S.: Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 39:81-86, 2003.
- 24) Okuda, H., Ohya, K., Shiota, Y., Kato, H., and Fukushi, H.: Detection of *Chlamydia psittaci* by Using SYBR green Real-Time PCR. *J. Vet. Med. Sci.*,

73 (2) : 249-254, 2011.

- 25) Morisson, TM, Weis, JJ, and Wittwer, CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24: 954-962, 1998.
- 26) Miyagawa, J, Maeda, H, Murauch, I, Koeguchi, S, Yamabe, K, Tanimoto, I, Nishimura, F, Fukui, K. and Takashiba, S.: Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 53: 314-321, 2008.
- 27) Sakamoto, M., Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishikawa, I., and Benno, Y.: Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. Med. Microbiol.*, 52: 79-89, 2003.
- 28) Nakano, Y., Takeshita, T., Kamio, N., Shiota, S., and Shibata, Y.: Development and application of a T-RFLP data analysis method using correlation coefficient

matrices. *J. Microbiol. Meth.*, **75**: 501-505, 2008.

- 29) 光岡知足: 腸内細菌叢の検索手段 感染症学雑誌, **45**: 406-419, 1971.
- 30) Narinder Pahwa., Atul Kumar., and Siddharth Gupta. Short term clinical effectiveness of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in patients undergoing fixed orthodontic appliance treatment. *The Saudi Dental Journal*, **23**: 135-141, 2011.
- 31) 大林 晃 : 微生物に対する表面活性剤の作用. *農化*, **35** (1), 61-66. 1961.
- 32) 厚生省薬務局 : 医薬品副作用情報. 5 : 1974, 26 : 1997, 37 : 1979, 67 : 1984.
- 33) 日本歯科医師会 : ヒビテングルコネートに代わる口腔粘膜の消毒剤. 日歯広報, 726, 1985.
- 34) Xue, Y., Hieda, Y., Saito, Y., Nomura, T., Fujihara, J., Takayama, K., Kimura, K. and Takeshita, H. Distribution and disposition of benzalkonium chloride following various routes of administration in rats., *Toxicol. Lett.*, **148**: 113-123,

2004.

- 35) Greaves, P. : Urinary Tract ; *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies 3rd edition*. Elsevier science, 2007.
- 36) Roldan, S., Winkel, EG., Herrera, D., Sanz, M., and Van Winkelhoff, A.J.:
The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine,
cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral
halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study.
J. Clin. Periodontol., **30**: 427-434, 2003.
- 37) Radford, J.R., Beighton, D., Nugent, Z., and Jackson, R.J.: Effect of use of 0.05%
cetylpyridinium chloride mouthwash on normal oral flora. *J. Dent.*, **25**: 35-40,
1997.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

岡山大学知恵の見本市 2009 (2009 年 11 月, 岡山)

イノベーションジャパン 2011 (2011 年 9 月, 東京)

第 135 回日本歯科保存学会秋季大会 (2011 年 10 月, 大阪)

岡山大学知恵の見本市 2011 (2011 年 11 月, 岡山)

第 55 回日本歯周病学会秋季学術大会 (2012 年 9 月, 茨城)

第 98 回アメリカ歯周病学会 (AAP) (2012 年 9 月, ロサンジェルス)

岡山大学知恵の見本市 2012 (2012 年 11 月, 岡山)

第 22 回日本歯科医学会総会 (2012 年 11 月, 大阪)

図の説明

図 1. PP 溶液および PP-CPC 溶液のヒト由来細胞に対する影響

ヒト由来細胞（HeLa 細胞）の形態に対する影響を観察するため、試験溶液を 3 分間作用させ 24 時間培養した。(A) 光学顕微鏡観察像、(B) 蛍光染色の ArrayScan での観察像。なお、図は 5 回の独立した実験のうち代表的な像を示す。

スケールバー：100 μm

図 2. PP 溶液および PP-CPC 溶液のヒト由来細胞の細胞活性に対する影響

細胞毒性を検討するため、ヒト由来細胞（HeLa 細胞、HGF 細胞、KB 細胞）に試験溶液（PP 溶液、PP-CPC 溶液）もしくは対照溶液（CPC 溶液、PBS）を 0.0001%～0.1%の濃度で 3 分間作用させ、24 時間培養した。(A) Array Scan による細胞数計数。(B) MTT assay による細胞活性の測定。ともに、：陰性対照（PBS, n=10）の結果の平均と比較した。

エラーバー、標準偏差；*, $p < 0.05$ ；**, $p < 0.01$ （ともに Student's t -test）；

■, PP 溶液, □, CPC 溶液, ▨, PP-CPC

図 3. PP 溶液および PP-CPC 溶液の生体への影響（一般性状）

SD 系ラットに試験溶液（0.01% PP 溶液, 0.01% PP-0.01% CPC 溶液）もしくは対照溶液（0.01% CPC 溶液, 超純水）を投与し 28 日間観察した。体重変化では、性差があった。

(A) 体重変化, (B) 飲水総量, (C) 食餌総量 ; 実線, 雄 ; 破線, 雌

* : $p < 0.05$ (Student's $-t$ test)

図 4. ラット口腔内細菌に及ぼす影響

長期間投与時の口腔内細菌への影響を検討するため、28 日間の反復経口投与期間中 2 週間に 1 度の頻度で 4 匹のラットの口腔内細菌を採取した。

(A) リアルタイム PCR 法による細菌量の定量 : 平均値を表し, エラーバーは標準偏差を示す。2 週および 4 週の値は 0 週を基準としたときの増減をパーセントで表示した。

□, 超純水 ; ■, PP 溶液 ; ▨, CPC 溶液 ; ▩, PP-CPC 溶液

(B) T-RFLP 法およびクラスター解析による経時的な細菌叢の変化：経時的な細菌叢の変化をクラスター解析で分析した。各週にそれぞれの溶液ごとに色分けした。

図 5. GLP 基準に準拠した試験時の体重変化

生体への影響を観察するため、GLP 基準に準拠した試験を外部施設に依頼した。各試験時の動物の体重変化を測定した。

(A) マウスを用いた反復経口投与毒性試験, (B) マウスを用いた単回経口投与毒性試験, (C) ハムスターを用いた頬袋粘膜刺激性試験；実線, 注射用水；破線, PP-CPC 溶液；点線, PP 溶液；▲, ■, ●：各群での平均値；エラーバー, 標準偏差

図 6. GLP 基準に準拠した反復経口投与毒性試験時の器官重量変化

試験期間終了後、剖検時にマウスから器官を摘出し、それぞれの器官重量を測定した。(A) 雄, (B) 雌；■, PP 溶液, □, CPC 溶液, ▨, PP-CPC 溶液；エラーバー, 標準偏差；*, $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

図 7. 健常者に対する臨床試験による口腔内細菌に対する効果

(A) 含嗽とブラッシング併行による効果

口腔内細菌を採取して培養し、CFU を得た。試験溶液を使用する前の値を基準とし、その後の増減をパーセントで表示し、対照溶液とした蒸留水と比較した

実線, PP-CPC 溶液 ; 破線, CPC 溶液 ; 点線, デンタルリンス ; 一点鎖線, 蒸留水 ; ●, ◆, ▲, ■ : 各群での平均値 ; エラーバー, 標準偏差 ;

******, $p < 0.01$ (Student's *t*-test)

(B) PMTC による効果

専門的歯面清掃に使用したときの口腔内細菌への抗菌効果を検討するため、PMTC 実施 90 分後の歯面上の細菌を採取して培養し、CFU を得た。

エラーバー, 標準偏差 ; *, $p < 0.05$ (Student's *t*-test)

(C) 口腔内細菌叢に与える影響

試験溶液もしくは対照溶液を用いる介入群と非介入群の 3 群を設定し、歯面から細菌を採取した。細菌 DNA を抽出して T-RFLP 法にて解析し、ピー

クの数に計数した。

実線, PP-CPC 溶液 ; 破線, デンタルリンス ; 点線, 非介入群 ; ●, ◆,

▲ : 各群での平均値 ; エラーバー, 標準偏差

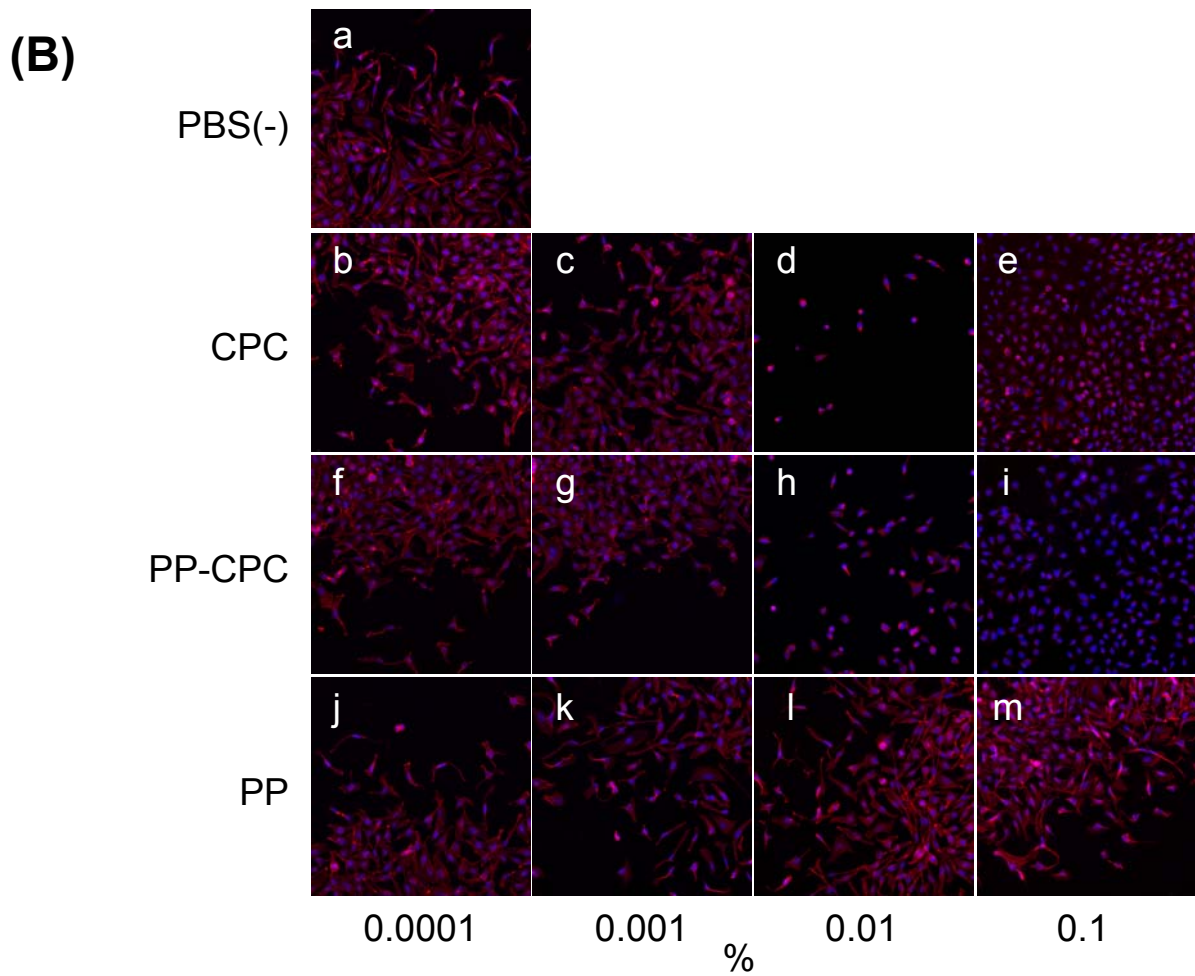
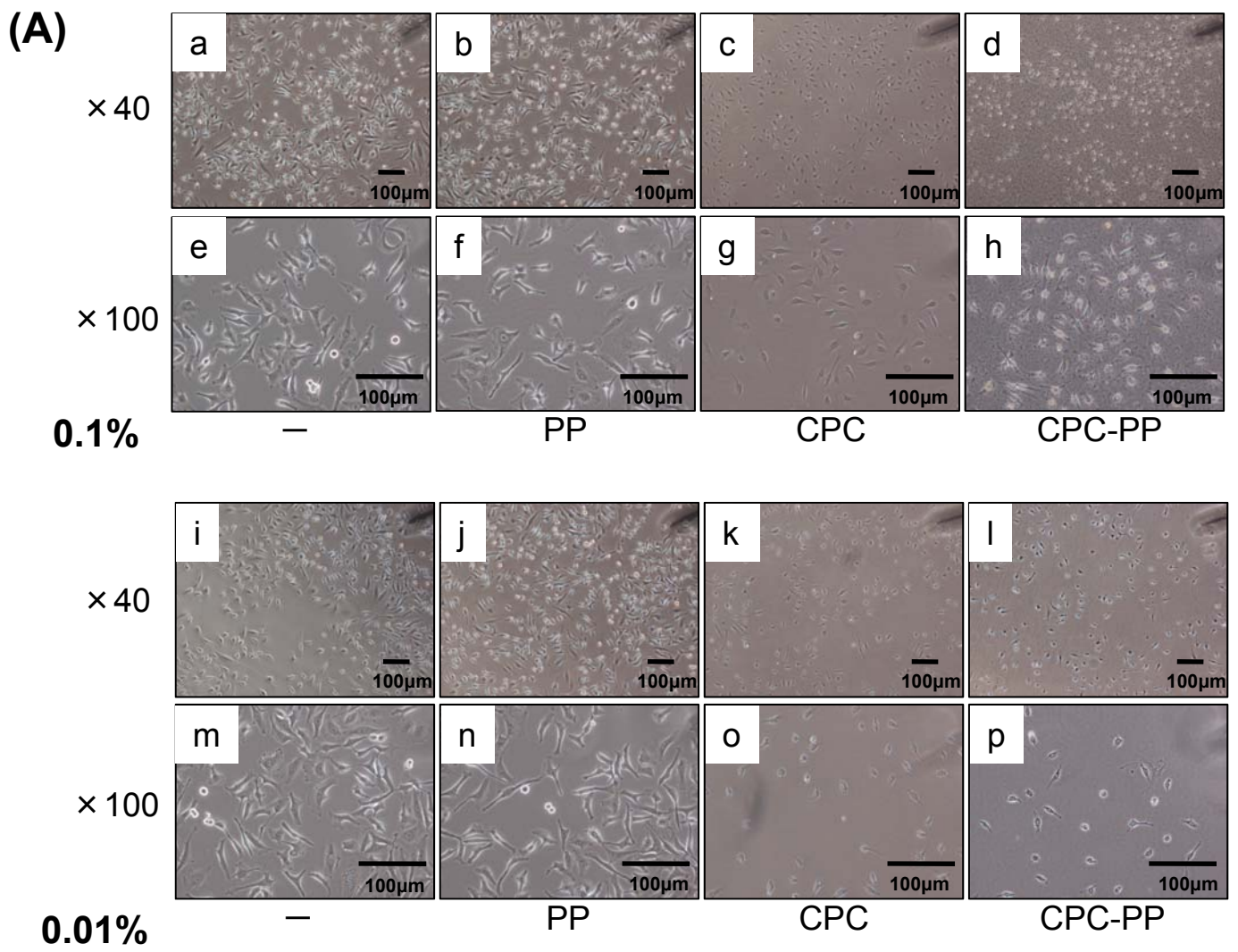
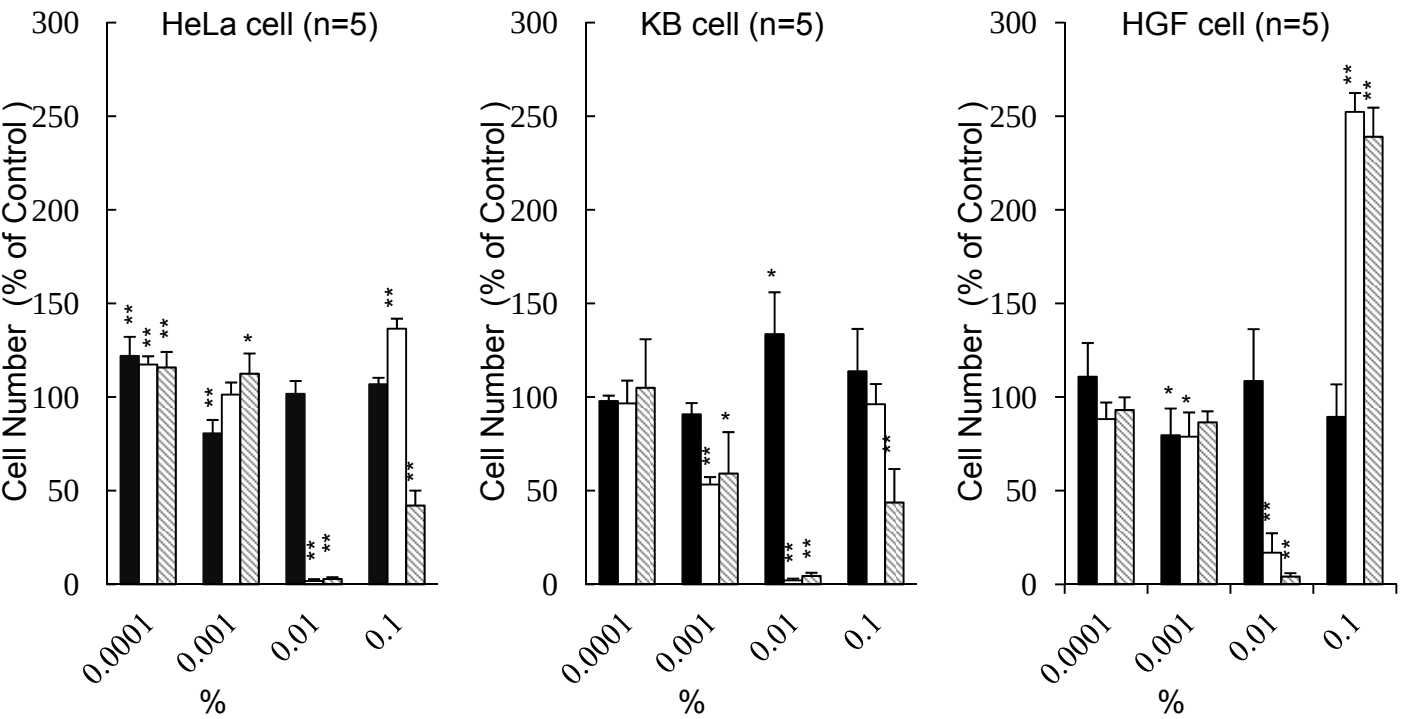


図1
河田有祐

(A)



(B)

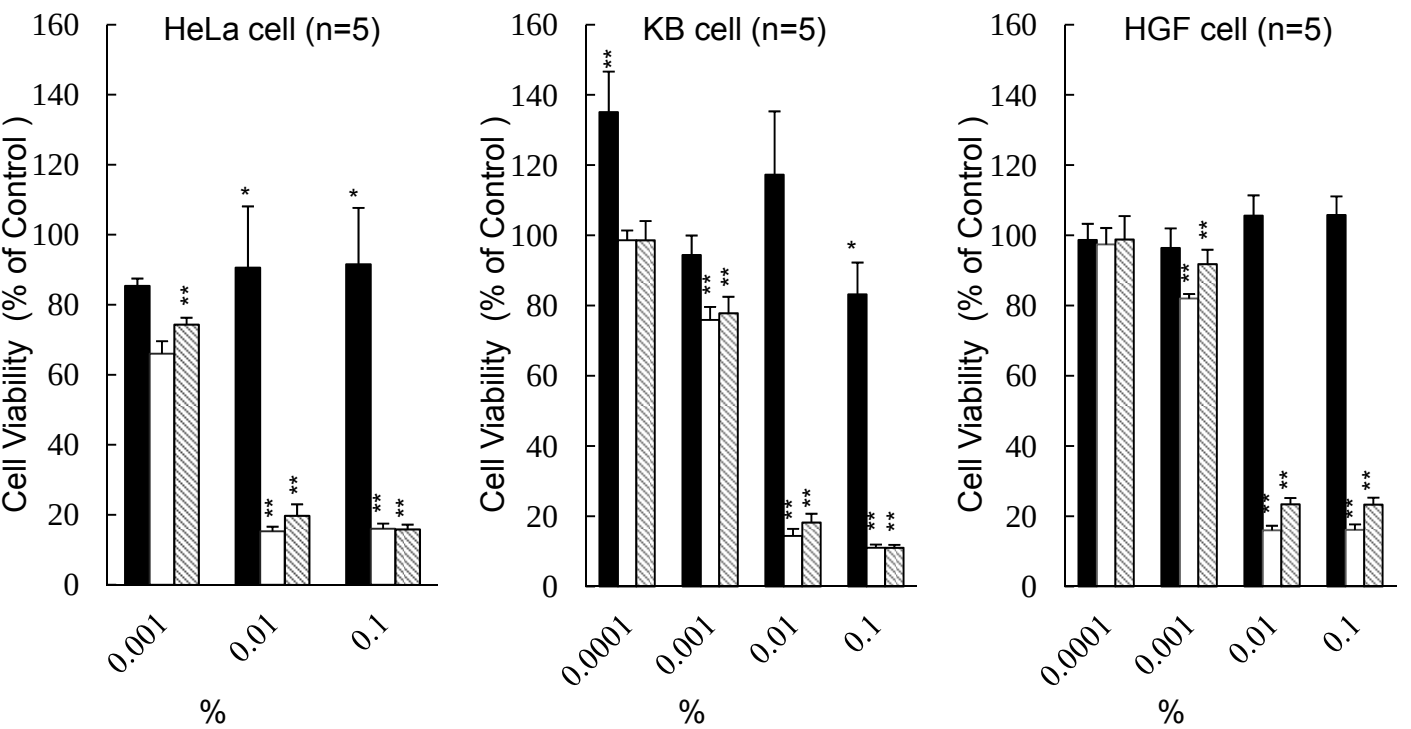


図2
河田有祐

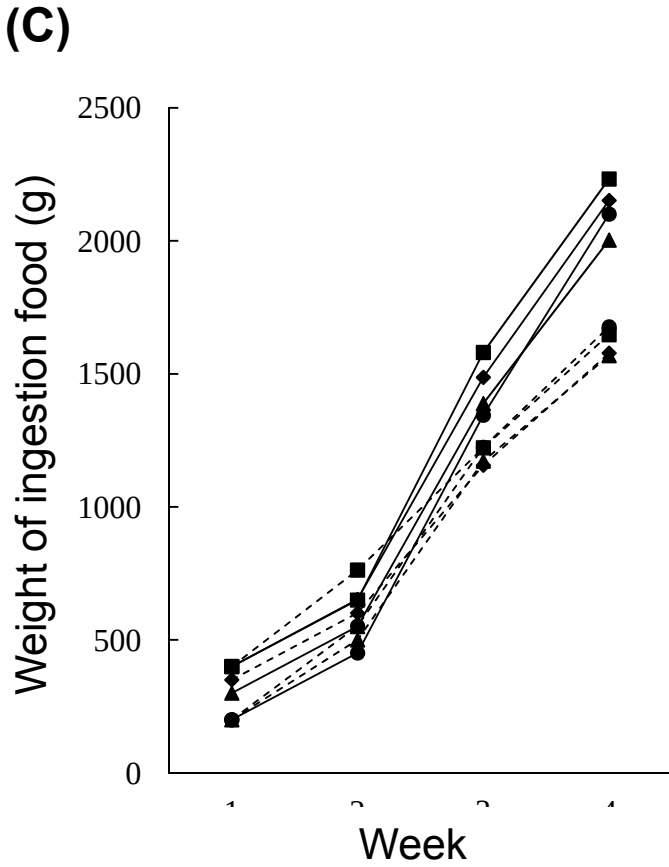
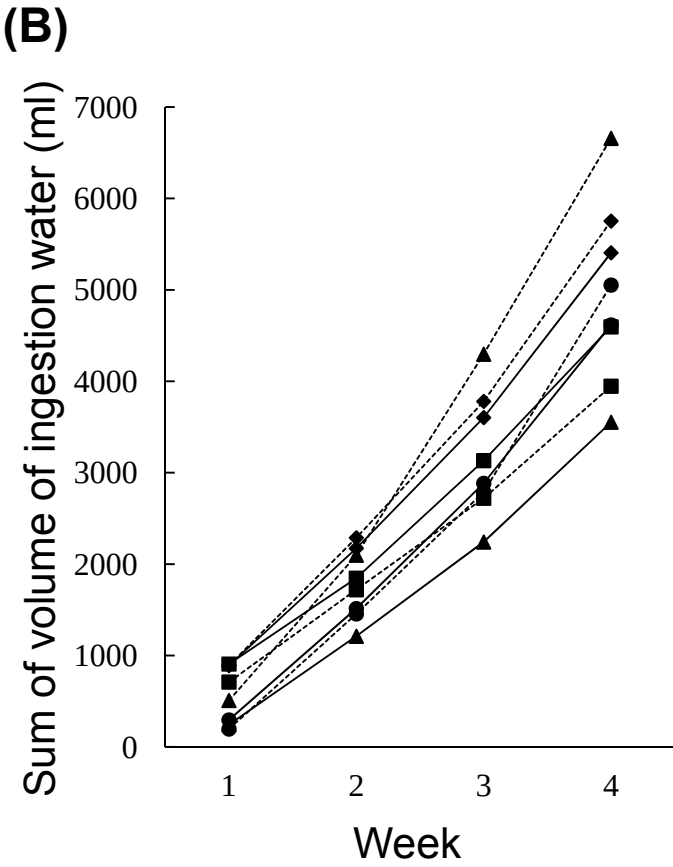
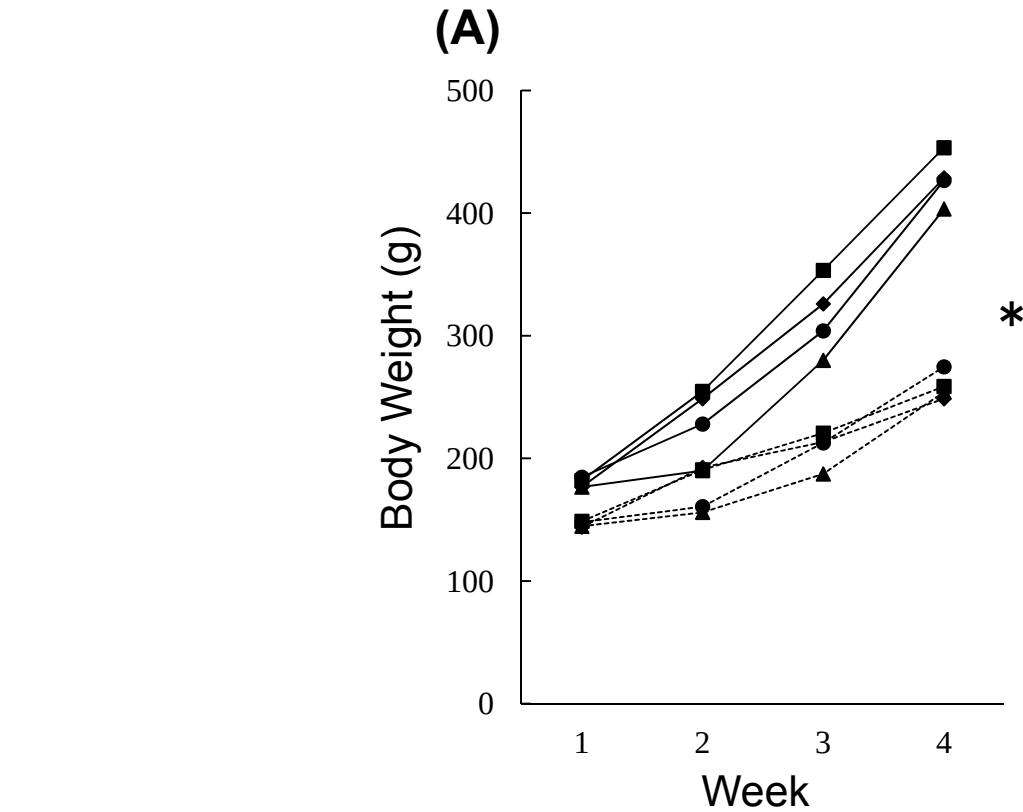
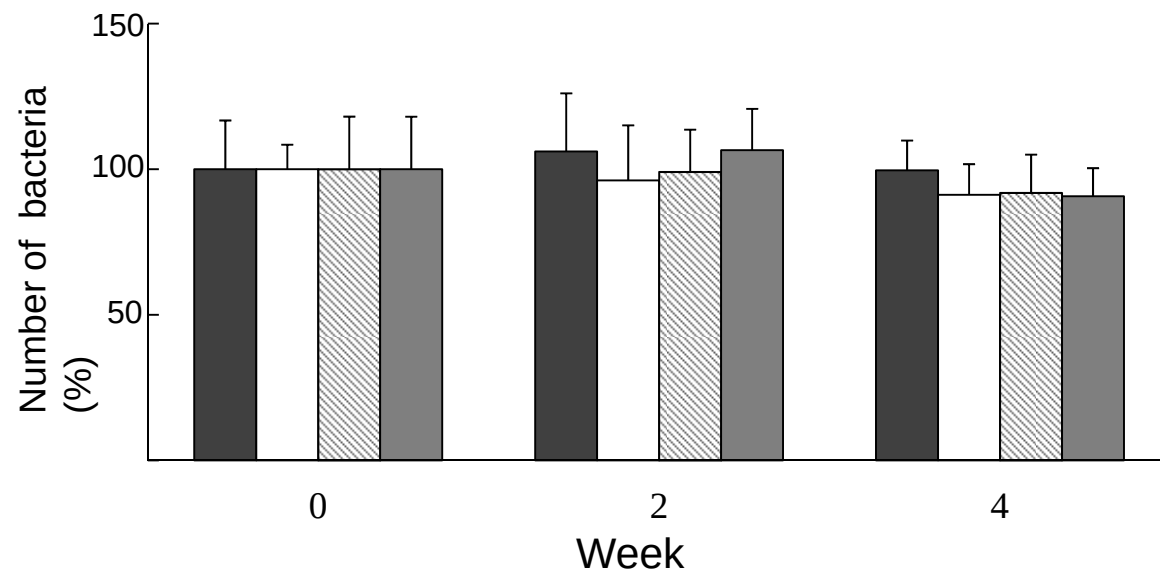


図3
河田有祐

(A)



(B)

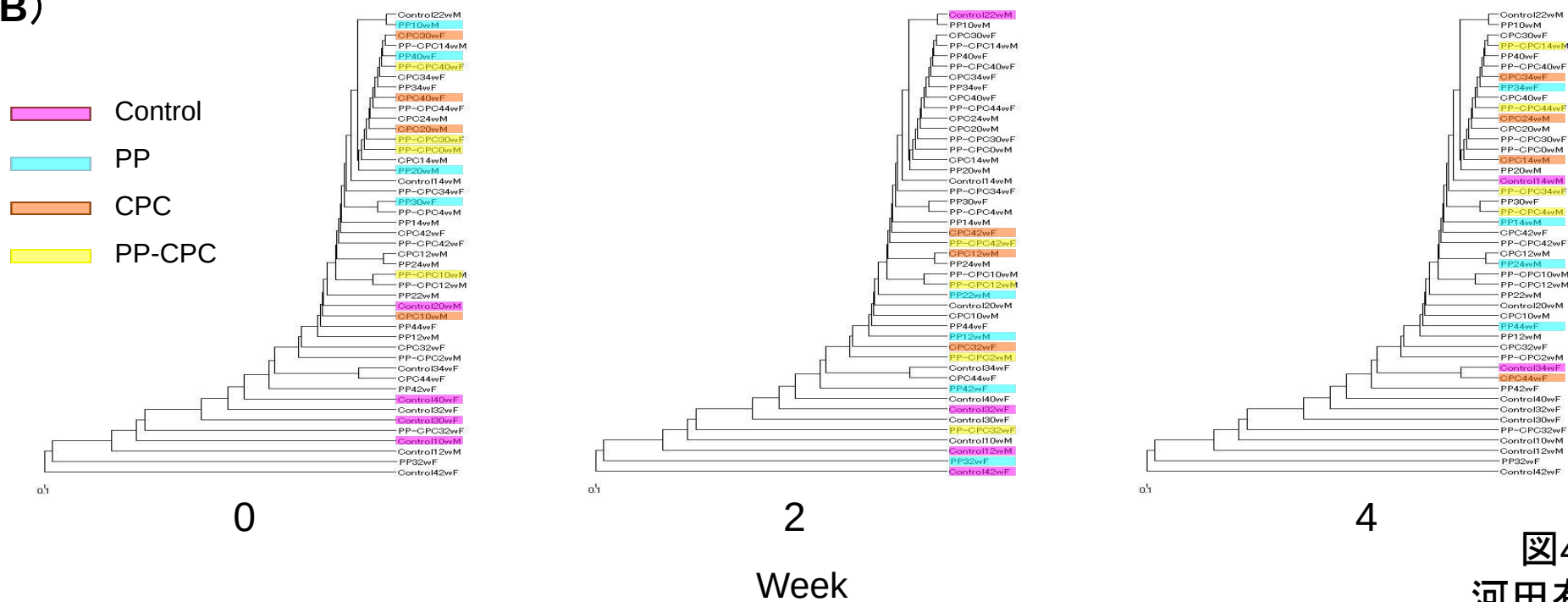
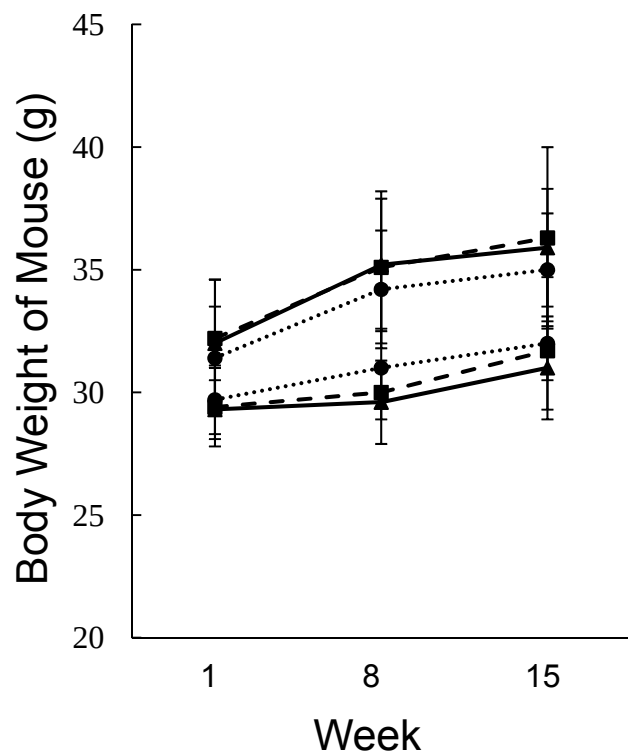
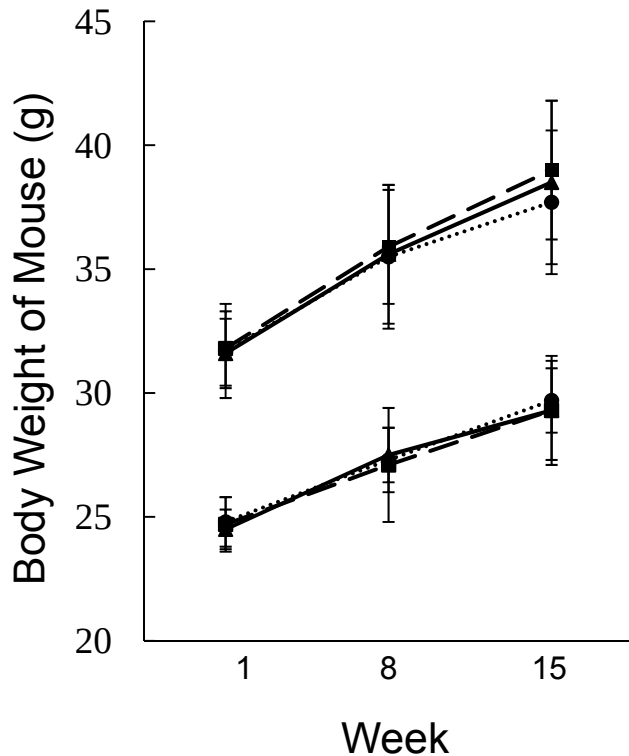


図4
河田有祐

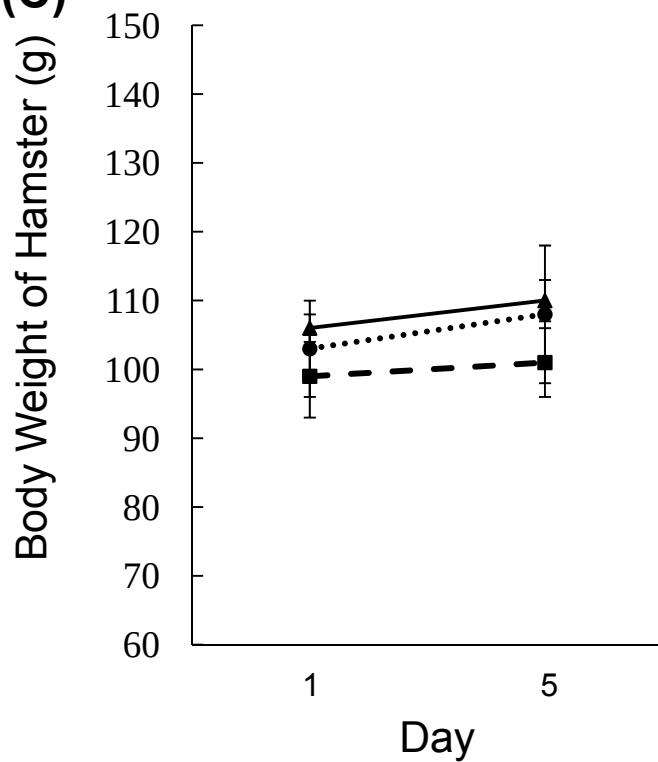
(A)



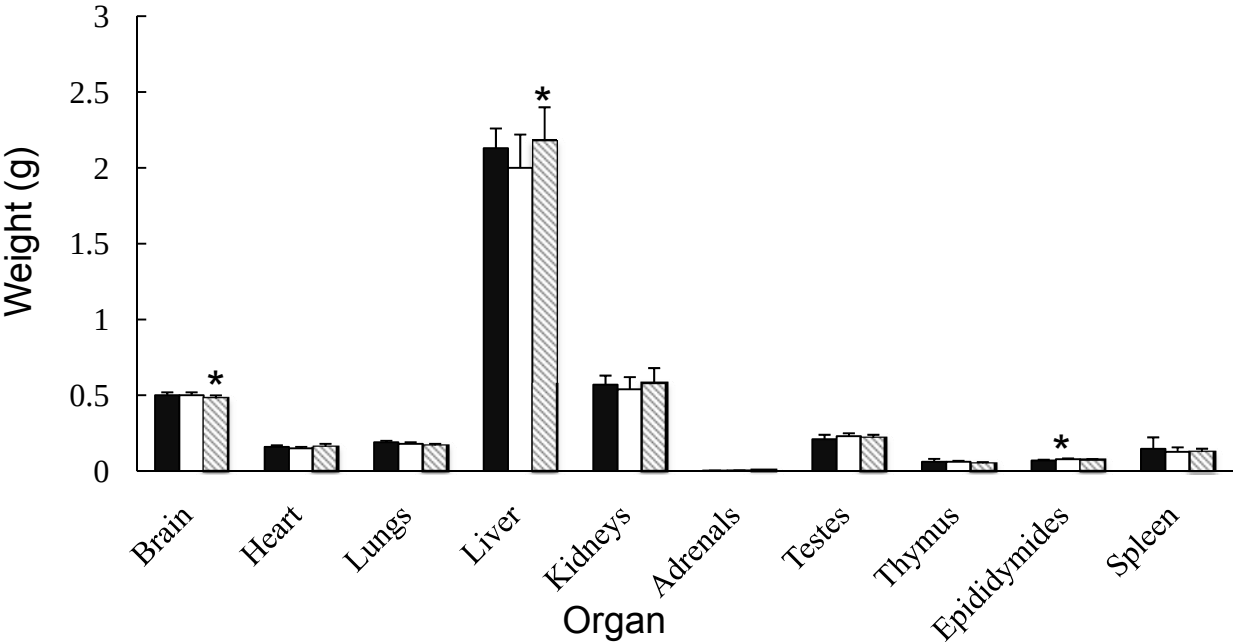
(B)



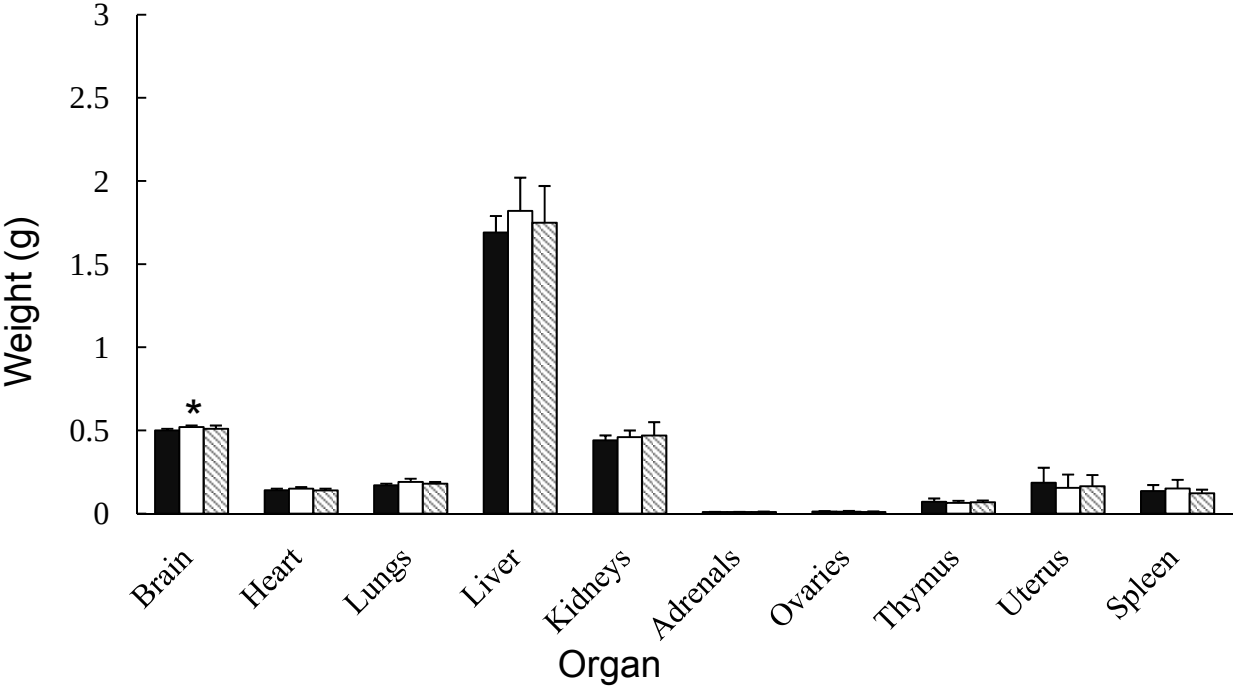
(C)



(A)



(B)



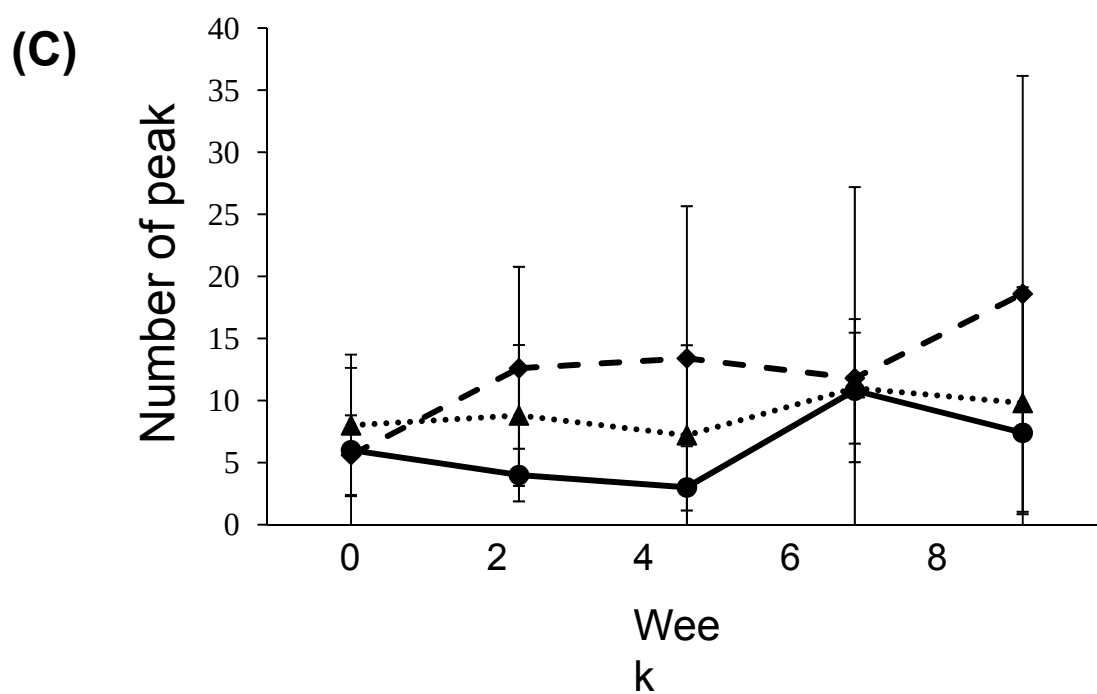
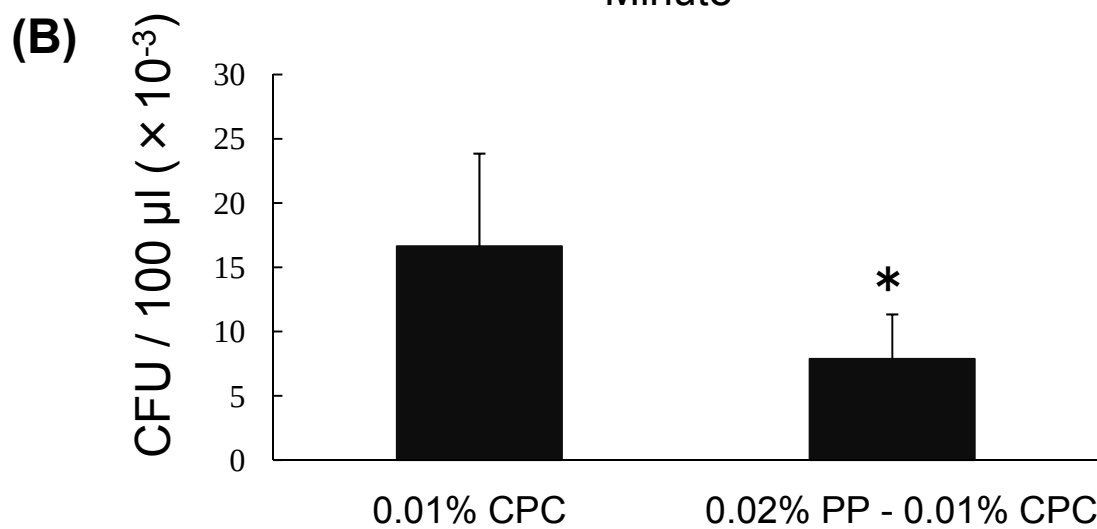
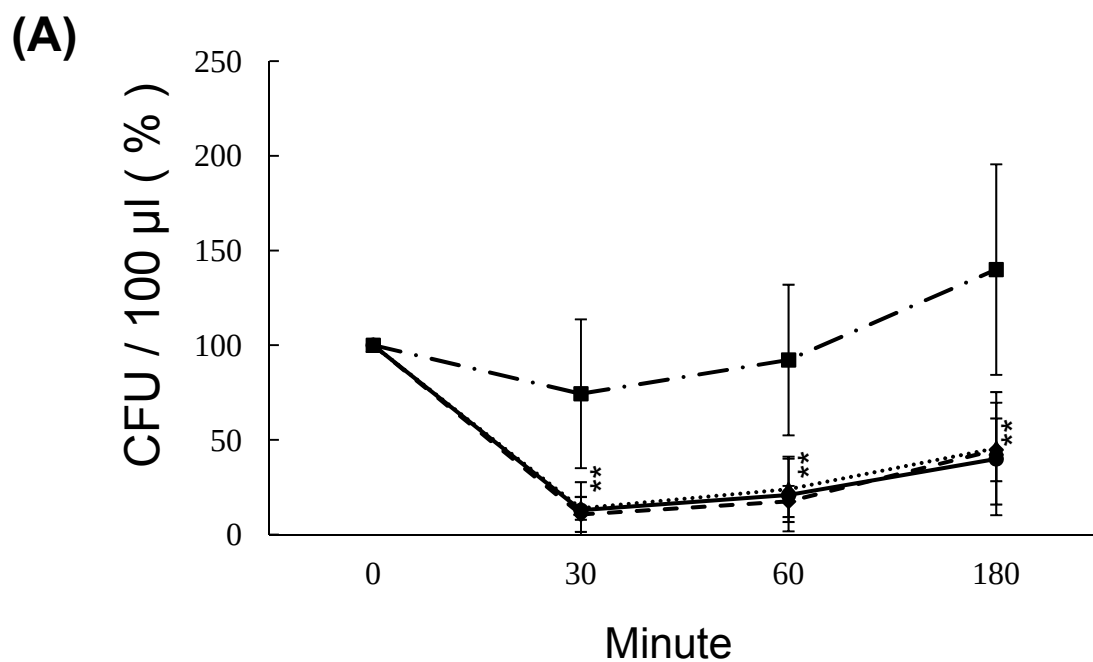


表 1. ラットに対する反復投与毒性試験における血液検査（生化学的検査）

	Parameter	Unit	Control	PP	CPC	CPC - PP
雄	ALT	U/ L	40.75±2.63 ^a	38.25±6.08	34.25±3.10 *	39±0.82
	AST	U/ L	174.75±13.89	172.00±29.78	192.00±28.31	179.00±24.70
	総ビリルビン	mg/ dL	0.20±0.00	0.20±0.00	0.20±0.00	0.20±0.00
	総コレステロール	mg/ dL	61.75±4.03	66.25±6.80	71.00±8.83	63.50±15.72
	クレアチニン	mg/ dL	0.40±0.07	0.36±0.03	0.37±0.03	0.37±0.07
	尿素窒素	mg/ dL	29.68±3.41	32.75±2.64	33.70±0.65	32.15±3.64
	総蛋白	g / dL	6.00±0.40	6.18±0.10	6.33±0.12	5.98±0.26
	アルブミン	g / dL	2.38±0.10	2.38±0.05	2.43±0.05	2.33±0.13
	ALP	U/ L	641.25±154.85	671.25±46.76	650.75±127.88	739.25±93.92
	無機リン	mg/ dL	19.65±3.24	19.90±1.64	19.38±1.20	19.80±1.16
	ナトリウム	mEq/ L	148.00±1.41	147.50±2.52	148.25±0.5	147.25±1.26
	カリウム	mEq/ L	7.95±1.60	7.73±1.75	7.93±1.12	8.43±1.80
	カルシウム	mg/ dL	9.88±0.39	9.85±0.13	9.68±0.94	10.25±0.98
	クロール	mEq/ L	96.00±0.82	94.75±1.26	94.50±2.22	95.75±2.06
	中性脂肪	mg/ dL	118.75±49.89	155.00±59.57	159.00±108.78	229.75±137.87
雌	ALT	U/ L	34.50±2.65	30.75±4.11	33.50±3.32	33.00±4.40
	AST	U/ L	134.25±19.62	134.25±19.62	169.25±6.40	148.00±24.06
	総ビリルビン	mg/ dL	0.20±0.00	0.20±0.00	0.20±0.00	0.20±0.00
	総コレステロール	mg/ dL	82.75±10.69	70.25±12.42	77.50±5.26	68.50±11.36
	クレアチニン	mg/ dL	0.41±0.04	0.42±0.04	0.37±0.02 *	0.41±0.07
	尿素窒素	mg/ dL	32.85±2.38	32.45±3.55	34.90±4.74	37.83±7.39
	総蛋白	g / dL	6.73±0.24	6.70±0.08	6.83±0.35	6.73±0.25
	アルブミン	g / dL	2.78±0.13	2.80±0.08	2.83±0.13	2.75±0.06
	ALP	U/ L	348.75±71.94	466.25±43.37 *	434.75±37.51 *	442.00±75.09
	無機リン	mg/ dL	16.40±1.53	16.70±1.40	16.85±2.49	15.80±0.22
	ナトリウム	mEq/ L	146.00±1.83	147.50±1.29	147.25±1.26	147.00±2.00
	カリウム	mEq/ L	6.90±0.85	7.33±0.44	7.73±2.17	6.58±1.37
	カルシウム	mg/ dL	10.25±0.73	10.20±0.55	9.93±0.57	9.98±0.33
	クロール	mEq/ L	96.75±1.71	99.75±0.50 *	97.25±2.22	97.50±2.65
	中性脂肪	mg/ dL	234.50±168.08	85.25±34.80	103.25±64.72	151.00±99.00

a : 平均値 ± 標準偏差, n = 4

* : $P < 0.05$; Student's t test (Control群と比較)

Control : 超純水, PP : 0.01% PP溶液, CPC : 0.01% CPC溶液, PP-CPC : 0.01% PP- 0.01% CPC溶液

表 2. ラットに対する反復投与毒性試験における病理組織学的所見

臓器および所見	雄				雌			
	Cont.	PP	CPC	PP-CPC	Cont.	PP	CPC	PP-CPC
(肝臓)								
肝細胞のび慢性空胞化	++	—	—	—	++	—	—	—
炎症性細胞小集簇	±	±	±	±	±	±	±	±
類洞の拡張と鬱血	—	—	—	—	++	—	—	—
髓外造血小葉	—	±	±	±	—	—	—	—
(腎臓)								
髓質外帯尿細管の拡張, 尿円柱の形成	±	—	—	—	±	—	—	—
腎盂粘膜下の炎症性細胞浸潤	—	—	+	—	—	—	+	+
髓質外帯尿細管の拡張と石灰化	—	—	—	—	—	—	+	—
皮質部尿細管の再生像	—	—	—	—	—	—	—	+
腎盂粘膜の肥厚	—	—	—	—	—	—	—	+
(脾臓)								
異常所見	—	—	—	—	—	—	—	—
(歯肉)								
上皮や結合組織の変性・壊死	—	—	—	—	—	—	—	—
炎症性細胞浸潤	—	—	—	—	—	—	—	—

— : なし, ± : 軽微, + : 軽度, ++ : 中等度, +++ : 重度

Cont. : 超純水, PP : 0.01% PP溶液, CPC : 0.01% CPC溶液, PP-CPC : 0.01% PP- 0.01% CPC溶液

表 3. GLP基準準拠でのマウスに対する反復投与毒性試験における血液検査

Parameter	Unit	雄			雌		
		Control	PP	CPC - PP	Control	PP	CPC - PP
赤血球数	× 10 ⁶ / mm ³	9.02±0.47 ^a	9.44±0.53	9.00±0.40	9.53±0.47	9.19±0.75	9.30±0.62
ヘモグロビン量	g/ dL	14.4±1.8	15.2±0.7	14.6±0.9	15.5±0.5	14.7±1.0	15.1±0.9
ヘマトクリット値	%	44.8±9.4	48.0±2.4	46.0±2.8	48.8±1.1	46.8±2.6	48.0±2.1
MCV	fL	49.4±9.0	50.9±1.1	51.1±1.2	51.2±0.6	51.0±1.8	51.7±1.9
MCH	pg	15.9±1.5	16.1±0.4	16.2±0.4	16.2±0.4	16.0±0.4	16.3±0.5
MCHC	%	32.8±4.4	31.6±0.6	31.8±0.7	31.7±0.5	31.4±0.5	31.6±0.6
網状赤血球数	%	3.7±1.3	3.1±0.4	2.9±0.4	2.7±1.1	5.6±5.0	3.2±0.7
血小板数	× 10 ³ / mm ³	1038±87	1040±15	1026±126	977±172	1057±22	960±126
白血球数	× 10 ² / mm ³	4.65±1.43	4.25±1.56	4.81±3.37	4.05±1.10	2.89±0.76	2.92±0.61
好中球	%	11.2±1.3	12.6±3.9	9.7±2.9	9.1±1.8	12.3±3.3	7.3±2.2*
好酸球	%	1.6±1.1	2.0±0.9	1.7±0.9	2.3±1.5	2.9±2.0	3.4±2.3
好塩基球	%	0.0±0.1	0.0±0.1	0.0±0.1	0.1±0.1	0.0±0.1	0.1±0.1
単球	%	1.5±0.7	1.5±0.8	2.2±0.9	0.9±0.3	1.0±0.4	1.1±0.5
リンパ球	%	85.3±2.5	83.5±4.6	85.9±3.6	87.2±2.4	83.3±4.6*	87.6±3.4
ALT	U/ L	28±6	27±5	26±13	22±3	24±4	20±4
AST	U/ L	44±6	43±3	45±21	44±7	45±6	42±7
総ビリルビン	mg/ dL	0.10±0.03	0.10±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.09±0.04	0.06±0.02
総コレステロール	mg/ dL	139±21	122±16	135±20	99±15	101±19	109±7
クレアチニン	mg/ dL	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01
尿素窒素	mg/ dL	22.9±4.5	18.5±1.8	26.7±2.7	17.6±3.1	15.6±5.7	18.9±3.8
総蛋白	g/ dL	5.17±0.22	5.19±0.23	5.09±0.34	5.24±0.16	5.25±0.20	5.13±0.16
アルブミン	g/ dL	3.08±0.17	3.12±0.14	3.03±0.19	3.34±0.15	3.31±0.24	3.28±0.16
ALP	U/ L	364±155	383±129	387±158	336±68	390±153	401±145
無機リン	mg/ dL	7.02±1.16	5.84±0.78	7.51±1.42	8.17±0.76	8.29±0.32	8.99±0.53
ナトリウム	mmol/ L	150.7±1.7	149.5±1.7	151.2±1.9	150.4±1.9	150.1±0.5	149.6±1.8
カリウム	mmol/ L	4.44±0.33	4.43±0.42	4.70±0.32	4.14±0.43	4.55±0.42	4.53±0.28
カルシウム	mg/ dL	9.19±0.21	9.16±0.40	9.46±0.29	9.45±0.32	9.43±0.28	9.42±0.35
クロール	mmol/ L	115.8±2.3	115.2±1.1	115.1±3.2	115.4±1.6	116.0±2.9	115.1±3.2
中性脂肪	mg/ dL	69.1±33.1	52.0±9.7	79.6±37.9	67.5±31.1	70.0±9.9	75.9±24.6

a : 平均値 ± 標準偏差, n = 6

* : P < 0.05, ** : P < 0.01 (Control群と比較)

F検定にて等分散の場合はStudent's t testで検定を行い, 不等分散の場合はAspin-Welch's t test で検定

Control : 水道水, PP : 10% PP溶液, PP-CPC : 0.01% PP- 0.01% CPC溶液

表 4. GLP基準準拠でのマウスに対する反復投与毒性試験における臓器肉眼所見

臓器および所見		雄			雌		
		Control	PP	PP-CPC	Control	PP	PP-CPC
(腎臓)	嚢胞	－	1 ^a	－	－	－	－
(子宮)	嚢胞				－	－	1
(脾臓)	拡大	－	－	－	－	1	－
(肺)	結節	－	－	－	1	－	－

a：該当所見のマウス頭数, n = 6

－：該当所見のマウスなし

Control：水道水，PP：10% PP溶液，PP-CPC：0.01% PP- 0.01% CPC溶液

表 5. GLP基準準拠でのマウスに対する反復投与毒性試験における病理組織学的所見

臓器および所見	雄			雌		
	Control	PP	PP-CPC	Control	PP	PP-CPC
(肝臓)						
肝細胞壊死	—	—	—	—	—	1 ^a
単核球細胞浸潤	—	—	—	1	—	—
有糸分裂 亢進	—	—	—	1	1	2
(腎臓)						
好塩基性尿細管	1	1	1	—	1	1
硝子様変性	—	1	—	1	1	—
嚢胞	—	1	—	—	—	—
石灰化	2	—	1	1	1	—
集合管上皮 肥大	—	—	6	—	—	2
遠位尿細管上皮 肥大	—	—	—	—	—	2
(卵巣)						
嚢胞				—	—	1
(造血系)						
髄外造血 亢進	—	—	—	—	1	—
(呼吸器系)						
細気管支肺泡 アデノーマ	—	—	—	1	—	—

a : 該当所見のマウス頭数, n = 6

— : 該当所見のマウスなし

Control : 水道水, PP : 10% PP溶液, PP-CPC : 0.01% PP- 0.01% CPC溶液

表 6. GLP基準準拠でのマウスに対する単回投与毒性試験における臓器肉眼所見

臓器および所見	雄			雌		
	Control	PP	PP-CPC	Control	PP	PP-CPC
(腎臓)						
嚢胞	－	1 ^a	－	－	－	－

a : 該当所見のマウス頭数, n = 6
－ : 該当所見のマウスなし
Control : 注射用水, PP : 20% PP溶液, PP-CPC : 0.1% PP- 0.1% CPC溶液

表 7. GLP基準準拠でのハムスターに対する頬袋粘膜刺激性試験

検査方法	所見	PP		CPC		PP-CPC	
		右頬 Test	左頬 Cont.	右頬 Test	左頬 Cont.	右頬 Test	左頬 Cont.
肉眼観察	異常所見	— ^a	—	—	—	—	—
病理組織学的検査							
	上皮異常所見	—	—	—	—	—	—
	白血球浸潤	—	—	±	±	—	—
	血管充血	—	—	±	—	—	—
	浮腫	—	—	—	—	—	—

PP : 1 % PP溶液, CPC : 0.05% CPC, PP-CPC : 0.05%PP– 0.1% CPC溶液
Test : 試験溶液, Cont. : 無処置
a : 所見の程度 (– : なし, ± : 軽微, + : 軽度, ++ : 中等度, +++ : 重度)
n = 5