

氏名	河田 有祐
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4715号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	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へ与える影響
学位論文審査委員	大原 直也 教授 森田 学 教授 高柴 正悟 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

塩化セチルピリジニウム (CPC) は、優れた抗菌作用をもつ陽イオン性の物質で歯磨剤や洗口剤の成分として多く使用されているが、その抗菌作用の効果時間は一時的で効果の持続性に問題がある。そこで、黒色酵母によって生成される天然多糖のプルランのリン酸化合物 (PP) を新規に合成し、その化合物の歯面および陽イオン性の物質との結合力を利用することで、CPC を歯面に停滞させて持続的に抗菌効果を発揮させ、従来の口腔ケア剤より効果の高い口腔ケア剤の開発を試みた。本研究では、臨床応用に向けて、新規の材料である PP 溶液および PP - CPC 溶液の細胞と生体へ与える影響を検証し、細胞と生体への安全性が確認できた後、ヒトへの臨床試験を行い、ヒト口腔内での PP-CPC 溶液の効果について検証した。

【方法と材料】

- 細胞障害実験：ヒト由来細胞 (HeLa 細胞, KB 細胞, ヒト歯肉線維芽細胞) を用い、以下の方法で試験溶液 (PP 溶液, PP-CPC 溶液) の細胞障害性を調べた。対照には CPC 溶液とリン酸緩衝液の群を設定した。
 - 1) 光学顕微鏡および Array Scan を用いた細胞形態の観察
 - 2) 細胞数の計測
 - 3) MTT assay
- ラットによる反復経口投与実験：岡山大学歯学部動物実験施設において、ラットに試験溶液 (0.01%PP, 0.01%PP-0.01%CPC) と対照溶液 (0.01%CPC, 超純水) を投与し、以下の項目に関して調べた。
 - 1) 一般性状 (体重, 摂水量, 摂食量)
 - 2) 血液検査 (一般性状, 生化学的性状)
 - 3) 各臓器 (肝臓, 腎臓, 脾臓, 下顎歯肉) の組織学的検討
 - 4) ラット口腔内細菌の変化 (リアルタイム PCR 法, T-RFLP 法)
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科動物実験承認: OKU-2010105)
- GLP 準拠施設における生体への影響の検討：PP 溶液および PP-CPC 溶液の生体への影響を網羅的に検討するため、外部施設 (GLP 準拠施設) において以下の試験を実施した。
 - 1) マウスを用いた 2 週間の反復経口投与毒性試験
 - 2) 前項の反復経口投与毒性試験期間中の腸内フローラの変化
 - 3) マウスを用いた単回経口投与毒性試験
 - 4) ハムスターを用いた頬粘膜刺激性試験
- ヒト口腔内細菌へ及ぼす影響：ヒト口腔内に PP 溶液および PP-CPC 溶液を応用したときの口腔内細菌の変化を検討するため、以下の実験を行った。
 - 1) 含嗽とブラッシング併行による細菌量の変化
 - 2) 専門的歯面清掃による細菌量の比較
 - 3) 長期使用時の口腔内細菌叢の変化 (T-RFLP 法)
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会 承認番号: 1089)

【結果】

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（CPC 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では、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では、PP には急性毒性も慢性毒性もなく、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では、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では、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、長期間の応用時の歯面上の細菌叢を検討すると、CPC 溶液では細菌種数が増加し、PP-CPC 溶液では細菌種数が減少する傾向にあった。

【考察】

PP 溶液には細胞障害性と生体毒性がなく、PP-CPC 溶液には濃度依存的に細胞障害性があった。そして、その障害性は CPC の影響によると考えられた。さらに、細胞形態の観察から、これらの障害性は細胞質を溶出させることによるものであった。動物での試験から、生体毒性は低いことが示唆された。その後に行った健常者での試験の結果から、専門的歯面清掃後の歯面の細菌量は CPC 溶液より PP-CPC 溶液の方が低いことが示唆された。しかし、含嗽による細菌量の変化は両者間で類似していた。口腔内細菌叢の変化は、統計学的な差はなかったが、CPC では細菌叢が複雑化する傾向があり、PP-CPC では細菌種数が減少する傾向にあった。

本研究では、細胞および生体への安全性は確認できたが、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ことが示された。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にあることが示された。

学位論文審査結果の要旨

う蝕・歯周病などの口腔感染症は歯を喪失する最たる原因であり、その予防としてバイオフィルム除去が行われる。その除去には、機械的除去と化学的除去があるが、機械的除去は高齢者には困難な場合があり、一方化学的除去は効果が一時的で持続的な効果が乏しい。さらに平成17年の歯科疾患実態調査によると、自分自身の歯を保有している高齢者の数が増え、それに伴い歯周病を有する高齢者の数も増加している。そのため、高齢者の現在歯に対する口腔ケアの機会が増え、今後は高齢者に対して安全で作用時間が長い口腔ケア剤が必要である。

塩化セチルピリジニウム（以下CPC）は現在すでに多くの口腔ケア剤に含まれているカチオン性の抗菌剤である。細菌の膜成分の変性や酵素活性の阻害により幅広い細菌に対し抗菌作用があり、比較的安全性の高い抗菌剤である。しかし、口腔ケア剤として口腔内に応用しても、その効果は一時的である。そこで我々は、CPCを歯面に停滞させ抗菌効果を持続的に発揮させる媒体として、デンプンを原料として得られるプルランをリン酸化することで作成したリン酸化プルラン（以下PP）に着目し研究してきた。

本研究では、PP溶液およびPP-CPC溶液の、*in vitro*による細胞毒性試験および*in vivo*による生体毒性試験を行い、本口腔ケア剤の安全性を検討した。さらに、健常者に対する臨床試験による口腔内細菌に対する影響を検討した。

研究結果は、以下の内容であった。

1. 培養細胞を用いた試験では、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（CPC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では、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では、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では、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では、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、長期間応用時の歯面上の細菌叢の変化を検討したところ、細菌種がCPC溶液では増加し、PP-CPC溶液では減少する傾向にあった。

これらの結果から、本論文では、PP溶液には細胞毒性および生体毒性がなく、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ことが示唆された。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ことが示唆された。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士（歯学）の学位論文として価値があるものと認めた。