

原 著

Chlorhexidine による副作用と耐性菌発現 に 関 す る 研 究

有 田 正 俊* 山 田 茂** 江 間 誠 二*
小 山 哲* 島 田 正* 岡 田 圭 二*

概要：CHDG (chlorhexidine digluconate) 応用による副作用の有無，Str. mutans の耐性変異を生ずる可能性の有無を検討し，かつ副作用の少ない応用方法の開発を目的として本研究を行なった。

ラットを対象として CHDG の 0.2%，2.0% 水溶液を35日間塗布した成績では，歯面，歯肉，口腔粘膜に異常を認めなかった。マウスを対象として12mg/kg，120mg/kg，180mg/kg，240mg/kg，300mg/kg の5種を経口投与した成績では，12mg/kg 投与群は発育良好で異常を認めなかった。Str. mutans 5菌株を対象として稀釈法によつて CHDG による耐性獲得の可能性を研究した結果，その可能性は困難であろうと考えられた。小学校3学年生を対象として1週間1回宛1年間 CHDG の2.0%塗布または0.2%含嗽を行ない，併せて刷牙励行を指導したところ，歯面，歯肉，口腔粘膜，舌などに異常を認めなかった。1週1回の応用によつて菌垢生成抑制効果を認めたが，成績は後日報告する。

第1章 緒 言

近年 Löe¹⁻⁴⁾らによつて chlorhexidine digluconate (以下 CHDG と略す) による菌垢生成抑制効果，歯肉炎の治癒効果，齲蝕の予防効果が相次いで報告された。われわれ^{5,6)}も小学校児童を対象として1日，5日の短期間応用によつて著しい菌垢生成抑制効果を認めた。従来短期間の応用においては諸外国の報告でも，われわれの研究でも全く有害な作用を認めなかった。しかしながら，長期間の応用や公衆衛生的な応用にあつては，有害な副作用の有無，あるいは耐菌の発現，菌交代現象などに関する研究を慎重に行なわねばならない。これらの研究は比較的少ないが，Davies ら⁸⁾はマウスおよびラットを対象として1年間 CHDG を飲用させ，組織学的検査をした結

果，対照と全く差異を認めなかったと報告し，Beeuwkes⁹⁾はヒトに毎日2.0g 宛6日間経口投与した結果，有害作用を認めなかったと報告し，小国ら¹⁰⁾は CHDG をブドウ球菌に対する菌交代現象の予防として優秀であり，母体の乳房の消毒に使用し，乳児に副作用を認めなかったと報告し，角田ら¹¹⁾は従来の外科手術に関する消毒剤に比して CHDG が最も組織を障害することが少ないと報告している。一方 Flötra ら¹²⁾は CHDG の0.1%，0.2%水溶液による含嗽を4ヶ月間毎日継続させた結果，歯牙への着色，口腔粘膜の炎症を認めた例のあることを報告しているが，共同報告者である Gjermo ら²⁵⁾は歯みがき剤に0.8%の CHDG を添加したものを6ヶ月間使用させた結果，歯面やシリケート充填物に着色を認めた以外副作用は認めなかったと報告している。

* 日本大学歯学部矯正学教室 (主任：有田正俊教授)

** 日本大学総合研究所 (山田茂教授)

*** Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry (Director: Prof. Masatoshi Arita)

**** Overall Research Institute, Nihon University (Prof. Shigeru Yamada)

昭和49年7月22日受付

われわれは CHDG を長期間、ヒトを対象として応用する場合、有害な副作用の有無を慎重に研究し、且つ副作用を防止する応用方法の開発を目的として本研究を行なった。

われわれの行なった研究では、1) ラットを対象として35日間毎日前歯部に CHDG の2.0%水溶液を塗布した結果何等障害を認めなかった。2) *Str. mutans* を対象として耐性菌発現の有無を研究した結果、全く耐性獲得を認めなかった。3) 小学校児童を対象とし1週間1回1ケ年間 CHDG の塗布または含嗽を行なった結果全く異常を認めなかった。これらの研究成績の概要を報告する。

第2章 研究の対象、方法と成績

第1節 CHDG の塗布または含嗽による歯面、歯肉、口腔粘膜への副作用

第1項 ラットの歯肉、口腔粘膜への CHDG 塗布成績

120 g 前後のラット 7 匹を A 群、4 匹を B 群、2 匹を対照群とし、上下顎前歯、前歯部歯肉、口腔粘膜に CHDG の0.2%水溶液を A 群に、2.0%水溶液を B 群に1日1回35日間毎日塗布し、対照群には水道水を塗布した。この間毎日歯面、歯肉、口唇粘膜と運動状態、食慾、外観的異常の有無を観察し、体重を測定した。ラットは23°Cの恒温室に、同一飼料で飼育した。

35日間の観察結果、0.2% CHDG 塗布群は歯面への着色、歯肉、口腔粘膜の炎症その他の異常を全く認めることなく、対照群と対比して発育、運動状態、食慾などにも差異を認めなかった。2.0%塗布群は歯面への着色、口腔粘膜の炎症等の異常を認められず、発育状態、生活状態も対照群と対比して差異を認めなかったが、8日目、9日目に2匹の辺縁部歯肉に僅かに発赤を認めたけれども、その後数日で自然治癒し、その後は発赤その他の異常を認めなかった。この歯肉の発赤は CHDG によるものかどうか明かでない。またラットの歯牙表面は象牙質でエナメル質は比較して粗造で着色しやすいと考えられるが、絶えず発育するものであるから人の歯の着色とは比較しがた

い。

0.2%塗布群、2.0%塗布群ともに発育良好で、表1、2、図1のように実験群と対照群との体重はほとんど差がなく、0.2%塗布群は20日目頃から僅かに対照群に劣る傾向を示したが、2.0%塗布群は14日目頃から対照群よりむしろ優る傾向を示した。

第2項 児童の歯面、歯肉への CHDG 塗布あるいは含嗽による副作用

小学校児童3学年生158名中78名に対し、1ケ年間、毎週1回 CHDG の0.2%水溶液で1分間うがいさせ、吐出してから3分間放置後水でうがいさせた。対照群80名には1%硼酸水でうがいさせた。他の小学校児童51名の右側第1大臼歯に毎週1回1ケ年間簡易防湿のもとに2.0% CHDG 水溶液を1分間塗布、防湿下に3分間放置後うがいさせた。各群とも刷掃を指導して励行に努めた。この期間中歯面、歯肉、口腔粘膜を詳細に観察して異常の有無を確認した。

表1 実験開始時と終了時における CHDG 塗布群と対照群の体重(ラット)

| 区 分 | CHDG 塗布群 | | 対 照 群 |
|--------------|----------|--------|--------|
| | 0.2% | 2.0% | |
| 実験鼠数 | 7 匹 | 4 | 2 |
| 次 亡 鼠 数 | 0 匹 | 0 | 0 |
| 次 亡 率 | 0 % | 0 | 0 |
| 始 の 体 重 (平均) | 126.1 g | 121.0 | 127.0 |
| 終りの体重(平均) | 273.7 g | 314.5 | 285.0 |
| 体 重 増 減 | +147.6 g | +193.5 | +158.0 |

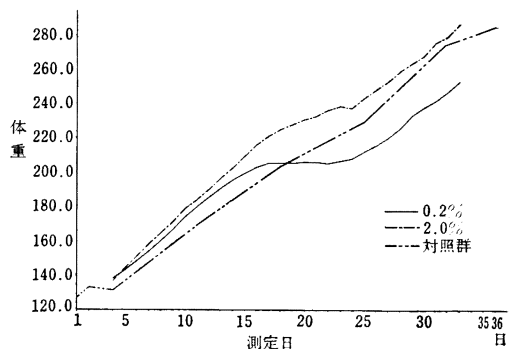


図1 実験期間中における CHDG 塗布群と対照群の体重の変化

表 2 CHDG 塗布群, 対照群の実験期間中の平均体重 (ラット)

| 測定日 | | 1日 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 群別 | 区分 | | | | | | | | | | | | |
| 0.2% 塗布群 (n=7) | M | 126.1 g | 129.0 | 134.0 | 135.4 | 139.6 | 148.0 | 154.1 | 162.6 | 166.9 | 172.7 | 177.4 | 184.4 |
| | SD | 5.49 | 8.26 | 8.00 | 8.30 | 9.41 | 11.25 | 12.99 | 13.84 | 13.95 | 14.47 | 14.42 | 15.40 |
| | 移動平均 | | | | 138.0 | 143.2 | 148.6 | 154.1 | 160.1 | 166.5 | 173.7 | 179.7 | 185.5 |
| 2.0% 塗布群 (n=4) | M | 121.0 g | 120.0 | 128.5 | 135.0 | 145.0 | 149.3 | 158.5 | 171.0 | 170.0 | 179.0 | 180.8 | 190.3 |
| | SD | 4.76 | 8.67 | 8.38 | 10.13 | 4.76 | 4.57 | 8.38 | 3.82 | 12.11 | 14.00 | 14.52 | 16.66 |
| | 移動平均 | | | | 136.7 | 143.9 | 151.1 | 158.2 | 164.8 | 171.2 | 178.9 | 184.0 | 189.9 |
| 対照群 (n=2) | M | 127.0 g | 133.0 | | 131.2 | | | | | | | 169.0 | |
| | SD | 15.55 | 12.72 | | | | | | | | | 26.87 | |

| 測定日 | | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 群別 | 区分 | | | | | | | | | | | | |
| 0.2% 塗布群 (n=7) | M | 195.0 g | 199.4 | 202.9 | 203.4 | 206.1 | 205.4 | 209.3 | 210.9 | 199.1 | 204.9 | 207.4 | 204.9 |
| | SD | 19.12 | 18.82 | 21.62 | 25.38 | 30.87 | 33.77 | 39.10 | 43.83 | 41.83 | 45.64 | 48.87 | 48.90 |
| | 移動平均 | 190.7 | 195.5 | 199.5 | 203.0 | 205.3 | 205.3 | 205.5 | 206.1 | 205.9 | 205.2 | 206.4 | 208.1 |
| 2.0% 塗布群 (n=4) | M | 203.0 g | 194.5 | 211.0 | 216.5 | 222.0 | 226.5 | 237.8 | 239.0 | 221.5 | 232.5 | 235.3 | 237.5 |
| | SD | 18.22 | 29.50 | 21.44 | 23.40 | 21.66 | 21.80 | 22.69 | 26.95 | 17.54 | 21.00 | 18.24 | 17.99 |
| | 移動平均 | 196.5 | 202.5 | 209.1 | 215.9 | 221.0 | 224.9 | 227.9 | 230.6 | 232.8 | 236.1 | 238.2 | 237.6 |
| 対照群 (n=2) | M | | | | | | 203.5 | | | | | | |
| | SD | | | | | | 2.12 | | | | | | |

| 測定日 | | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 群別 | 区分 | | | | | | | | | | | | |
| 0.2% 塗布群 (n=7) | M | 200.4 g | 217.4 | 223.1 | 225.7 | 231.0 | 236.9 | 245.4 | 250.9 | 251.1 | 250.9 | 261.4 | 273.7 |
| | SD | 56.19 | 56.32 | 55.61 | 55.51 | 54.00 | 54.76 | 52.51 | 51.27 | 51.18 | 47.64 | 48.57 | 49.81 |
| | 移動平均 | 211.9 | 215.7 | 219.9 | 225.7 | 232.9 | 237.7 | 241.7 | 246.8 | 252.9 | | | |
| 2.0% 塗布群 (n=4) | M | 249.3 g | 252.5 | 234.8 | 260.3 | 267.0 | 269.3 | 279.0 | 281.5 | 282.5 | 289.0 | 289.0 | 314.5 |
| | SD | 20.32 | 19.87 | 51.68 | 18.33 | 22.06 | 19.82 | 22.06 | 21.99 | 20.84 | 22.71 | 21.32 | 29.32 |
| | 移動平均 | 243.1 | 248.1 | 252.9 | 258.8 | 263.4 | 267.7 | 275.5 | 279.6 | 286.4 | | | |
| 対照群 (n=2) | M | 229.0 g | | | | | | | 274.0 | | | | 285.0 |
| | SD | 4.24 | | | | | | | 0 | | | | 1.41 |

備考; 1. 対照群は4日以後, 週1回測定

2. 塗布群は移動平均して(7日間)を使用

含嗽群中2, 3名のものが初め1, 2回味の悪いことについて不満を訴えたが, 4, 5回目から不満を訴えるものは無くなり, 全期間中歯肉, 口腔粘膜, 舌などに炎症その他の異常を認めたものは1例もなかった。また歯面の着色, 汚れも全く認めなかった。CHDG 応用群は対照群に比較して歯垢生

成抑制効果を認めたが, この応績は他日報告の予定である。

第2節 CHDG 経口投与による為害作用

平均体重24gのマウス43匹中6匹に毎日CHDGの0.2%水溶液を体重1kg 当り6ml 宛カテーテルを用いて21日間経口投与し, 同じ方法で7匹に

表 3 CHDG 経口投与群の実験期間中における平均体重 (マウス)

| 測定日 | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1 日 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| 群 別 | 対照群 | M | 26.1 g | 28.6 | 26.4 | 26.5 | 27.2 | 27.1 | 28.1 | 27.4 | 28.1 | 28.1 | 28.1 |
| | | SD | 0.84 | 1.03 | 0.69 | 0.58 | 0.70 | 0.75 | 0.87 | 1.11 | 0.98 | 0.94 | 1.28 |
| | | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| C H D G 経口投与群 | 0.2% | M | 24.3 g | 25.3 | 25.6 | 25.3 | 26.2 | 25.8 | 26.3 | 26.8 | 27.1 | 27.9 | 28.3 |
| | | SD | 1.94 | 2.54 | 2.29 | 2.09 | 2.07 | 2.73 | 2.19 | 2.94 | 2.58 | 2.40 | 3.03 |
| | | n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | 2.0% | M | 22.8 g | 23.1 | 21.1 | 21.6 | 22.0 | 21.6 | 22.4 | 22.8 | 25.2 | 23.7 | 21.2 |
| | | SD | 1.14 | 1.36 | 2.85 | 3.75 | 4.37 | 4.15 | 3.25 | 3.96 | 2.02 | 4.16 | 3.21 |
| | | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| | 3.0% | M | 24.0 g | 24.1 | 23.6 | 22.5 | 23.6 | 21.3 | 21.4 | 21.1 | 21.8 | 22.1 | 24.8 |
| | | SD | 1.29 | 1.06 | 2.57 | 3.73 | 3.95 | 4.50 | 4.76 | 5.12 | 5.04 | 5.13 | 2.93 |
| | | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 | 6 | 5 | 5 | 4 | 3 | 3 |
| | 4.0% | M | 23.5 g | 23.4 | 24.0 | 22.1 | 21.2 | 20.1 | 22.1 | 26.0 | 26.3 | 27.0 | 25.0 |
| | | SD | 1.87 | 2.59 | 3.40 | 4.28 | 4.64 | 4.76 | 5.59 | 0.86 | 1.04 | 1.32 | 1.32 |
| | | n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 5.0% | M | 24.1 g | 24.3 | 23.6 | 22.6 | 21.7 | 21.3 | 22.2 | 22.8 | 22.5 | 22.0 | 22.8 | |
| | SD | 2.15 | 2.78 | 3.16 | 3.55 | 3.17 | 3.88 | 4.31 | 4.59 | 5.65 | 6.36 | 6.71 | |
| | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | |

| 測定日 | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|--------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | |
| 群 別 | 対照群 | M | 28.4 g | 29.4 | 28.4 | 28.4 | 28.3 | 28.8 | 28.4 | 29.1 | 28.6 | 28.1 |
| | | SD | 1.46 | 1.07 | 1.68 | 1.81 | 2.32 | 1.97 | 2.09 | 1.86 | 2.12 | 1.93 |
| | | n | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| C H D G 経口投与群 | 0.2% | M | 27.5 g | 29.2 | 26.6 | 26.8 | 26.5 | 27.2 | 27.5 | 27.8 | 27.0 | 26.8 |
| | | SD | 3.39 | 2.89 | 1.93 | 1.72 | 1.67 | 1.57 | 1.64 | 2.25 | 1.76 | 2.04 |
| | | n | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | 2.0% | M | 18.8 g | 19.0 | | | | | | | | |
| | | SD | 3.88 | 0 | | | | | | | | |
| | | n | 3 | 1 | 0 | | | | | | | |
| | 3.0% | M | 23.0 g | 22.0 | 21.8 | 22.5 | 22.8 | 23.0 | 21.5 | 23.0 | 23.5 | 23.3 |
| | | SD | 1.32 | 0.83 | 1.76 | 0.70 | 0.34 | 1.41 | 0.70 | 1.41 | 0.70 | 1.76 |
| | | n | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 4.0% | M | 22.0 g | 21.0 | | | | | | | | |
| | | SD | 0.50 | 0 | | | | | | | | |
| | | n | 3 | 1 | 0 | | | | | | | |
| 5.0% | M | 22.0 g | 27.0 | 27.5 | 27.0 | 23.5 | 21.0 | | | | | |
| | SD | 5.65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| | n | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | |

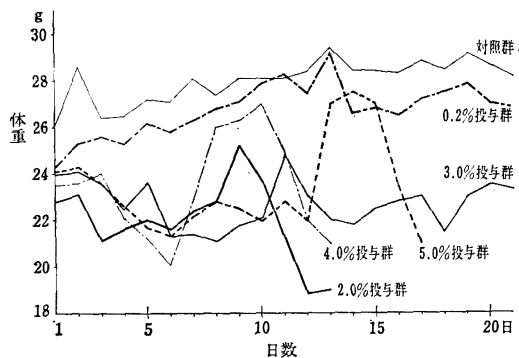


図 2 CHDG 経口投与群のマウスの平均体重傾向線

2.0% CHDG 水溶液を、7匹に3.0% CHDG 水溶液を、6匹に4.0% CHDG 水溶液を、7匹に5.0% CHDG 水溶液を21日間毎日経口投与した。体重1kg 当り6ml 量は、体重1kg当りにすると0.2%水溶液から順に12.0mg, 120.0mg, 180.0mg, 240.0mg, 300.0mg になる。対照群には蒸留

水0.2ml を21日間経口投与した。

これら CHDG 投与群、対照群の実験期間中における体重変動をみると、表3、図2のように対照群と0.2% CHDG 投与群は実験開始時から終りまで、体重の増減状態が平行的であつて、全般的には体重の増加傾向を示し、運動も活発であつたが、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%投与群、特に4.0%、5.0%投与群は体重の増加を示した時期もあつたが、全般的には体重の減少傾向が認められた。実験開始時と終了時の体重の差は表4のように、体重の増加を示したのは0.2%は投与群の2.5g 増、対照群の2.1g 増だけで、2.0%以上の投与群は体重の減少が認められた。2.0%投与群4.2g 減、3.0%投与群4.2g 減、4.0%投与群5.3g 減、5.0%投与群4.4g 減であつて、4.0%、5.0%投与群は一般に運動も不活発であつた。これら各群の初めと終りにおける体重の差はいずれも5%の危険率で有意である。

表 4 CHDG 経口投与群の実験開始時と終了時の体重 (マウス)

| 群 別 | 0.2% | 2.0% | 3.0% | 4.0% | 5.0% | 対 照 群 |
|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 区 別 | | | | | | |
| 実 験 鼠 数 | 6匹 | 7 | 7 | 6 | 7 | 7 |
| 死 亡 鼠 数 | 0匹 | 7 | 5 | 6 | 7 | 0 |
| 始の平均体重 | 24.3g | 22.8 | 24.0 | 23.5 | 24.1 | 26.1 |
| SD | 1.14 | 1.14 | 1.29 | 1.87 | 2.15 | 0.84 |
| 次亡時および 実験最終日の 平均体重 | 26.8g | 18.6 | 19.8 | 18.2 | 19.7 | 28.2 |
| SD | 2.40 | 3.48 | 3.08 | 3.57 | 3.41 | 1.89 |
| 体 重 増 減 | +2.5g* | -4.2* | -4.2* | -5.3* | -4.4* | +2.1* |

備考 1. * 印は5%危険率で有意。

2. CHDG 水溶液を各濃度とも体重1kg 当り6ml 投与。

表 5 CHDG 経口投与群の死亡状態 (マウス)

| 群別 | 生存日数 n | 1日後 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 死亡率 |
|------|-----------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| 対照群 | 7匹 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0% |
| 0.2% | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 |
| 2.0% | 7 | | | | | | | 3 | | 1 | | | | 2 | 1 | | | | | | | 100.0 |
| 3.0% | 7 | | | | 1 | | | 1 | | 1 | 1 | | | | 1 | | | | | | | 71.4 |
| 4.0% | 6 | | | | | | | | 2 | | | | | 2 | 1 | | | | | | | 100.0 |
| 5.0% | 7 | | | | | | 1 | 3 | 1 | | | | | 1 | | | | | | 1 | | 100.0 |

備考：事故死を除く

表 6 CHDG 経口投与群の平均生存日数 (マウス)

| 群 別 | n | M | SD |
|------|----|-------|-------|
| 対照群 | 7匹 | 20.0日 | |
| 0.2% | 6 | 20.0 | |
| 2.0% | 7 | 9.3 | 3.52日 |
| 3.0% | 7 | 11.9 | 6.86 |
| 4.0% | 6 | 11.3 | 6.40 |
| 5.0% | 7 | 8.9 | 4.84 |

つぎに CHDG 経口投与群の死亡状態をみると、対照群と 0.2% 投与群には実験の途中で死亡したものはなかったが、他の群は表 5 のように 2.0% 投与群と 4.0% 投与群は実験開始後 14 日目までに、5.0% 投与群は 19 日目までに全部死亡し、3.0% 投与群は 14 日目までに 5 匹死亡、残り 2 匹は実験終了日まで生存した。実験 20 日間の平均生存日数は表 6 のように、対照群と 0.2% 投与群は 20 日間、2.0% 投与群 9.3 日、3.0% 投与群 11.9 日、4.0% 投与群 11.3 日、5.0% 投与群 8.9 日、で濃度の高いものに生存日数の少ない傾向を認められた。ただし各群の生存日数の有意差は認め難い。

第 3 節 耐性菌発現に関する研究

CHDG による耐性菌発現の有無を検討するために次の研究を行なった。

供試菌株は *Streptococcus mutans* の Ingbr H 株、PS 14 株、6715 株、K 株、NA 株の 5 菌株であつて、使用培地は Tryptic Soy Broth (Difco) である。

当初上記 5 菌株が増殖可能な CHDG の最高濃度を決定し、この濃度で 37°C、24 時間毎に 1 滴を継代培養し、10 代毎に増殖可能な最高濃度を検し、濃度の上昇を認めた株については、その濃度でさらに 10 代継代する方法をとった。このようにして 30 代まで継代し、これを CHDG を含まない

培地で 5 代継代した、前述の研究方法によつて増殖可能最高濃度を検査確認した。その成績は表 7 のとおりである。復帰後の集落、形態、Gram 染色性は当初の菌株と差異が認められなかった。また復帰培養 5 代で初濃度に復帰した。

以上の成績から *Str. mutans* は CHDG による耐性獲得は困難であるように考えられる。

第 3 章 考 按

Löe, Schiött¹⁾らが 1970 年に CHDG によつて歯垢、歯石の生成を完全に抑制できることを報告して以来、CHDG による歯垢生成抑制効果は Johnson (1972)⁴⁾、Hamp ら (1973)⁵⁾の動物実験によつて追試確認され、ヒトに対しては Löe ら (1971)²⁾、Von Der Fehr ら (1972)³⁾、Cancro ら (1972)¹⁴⁾、Cumming ら (1973)¹⁵⁾によつて CHDG の歯垢生成抑制効果の確認、適正使用量の研究が行われ、Turesky ら (1973)¹⁶⁾は In Vitro で効果を確認している。われわれ (1972)^{6,7)}は小学校児童を対象として 1 日および 5 日間 CHDG の 0.2% の含嗽および 2.0% の塗布を行ない著明な歯垢生成抑制効果を認め、その効果は持続性のあることを報告したが、この応用期間において全く副作用は認めなかった。Löe ら²³⁾は数百名の学生に 2 ケ年間 CHDG を応用したが、口腔組織に悪影響を認めなかった。またこの間血液像は正常であつて毒性は極めて低く、問題があるのは菌の表面に汚れを認めることがあることであると述べ、Houlkes²⁴⁾は動物実験および臨床経験によつて口腔衛生への応用は安全に進め得ると考えたと述べている。

一方 Flötra ら (1971)¹²⁾は 50 名の兵士を対象として 4 ケ月間 0.1%、0.2% の CHDG の含嗽を続けた結果、歯面、シリケート充填物への着色、数

表 7 CHDG による耐性測定成績

| 区 分 | 初 濃 度 | 10 代 後 | 20 代 後 | 30 代 後 |
|-----------|-----------------------------------|----------------------|---------------------------|------------------|
| 菌 株 | | | | |
| Ingbr H 株 | $4 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$ | 0.2 $\mu\text{g/ml}$ | (19代で消失) $\mu\text{g/ml}$ | $\mu\text{g/ml}$ |
| PS 14 株 | 同 上 | 0.1 | 0.5 | 1.25 |
| 6715 株 | 同 上 | 0.1 | 0.25 | 0.63 |
| K 株 | 同 上 | 0.1 | 0.5 | 0.5 |
| NA 株 | 同 上 | 0.1 | 1.0 | 1.0 |

名の口腔粘膜の落屑や痛みを認め、短期間の使用は推奨できるが、長期間の使用には含嗽法以外の応用法の研究が必要であると述べている。Flötra らとの共同報告者である Gjermo ら (1970), (1971)^{25,26)}は歯みがき剤に CHDG を添加したものを使用して、歯垢抑制効果を認めているが、ここでは歯面、シリケート充填物への着色以外に副作用を認めていない。

CHDG や Chlorhexidine acetateなどを公衆衛生的に、特に長期間応用する場合、慎重に有害な副作用の有無を研究する必要あるのは当然であつて、WHO の報告²⁷⁾にも、CHDG の名はあげていないが、一般的に抗生物質、殺菌剤を齶蝕予防に応用する場合、耐性菌の発現やその他有害な副作用の有無に対して十分な研究が必要であると述べている。われわれもこれと同じ目的から本研究を行ない、児童に応用するにあつても、刷掃指導を行ないながら週1回の応用にとどめ、その効果と副作用の有無を慎重に注意しながら調査を進めたが、全く副作用を認めなかつた。

CHDG は1954年英国 ICI 社で開発された抗菌剤で感染予防に優れた性質をもち、ヒビテンの名称で市販されているが、諸外国でもわが国でもかなり前から広く使用され、院内感染の防止の目的にも応用されている。副作用としては従来結膜に0.1%以上の濃度を使用した場合の不快感、創傷面に1%以上のものを使用した場合の刺激などがあげられている。たとえば角田ら¹¹⁾は CHDG の5%で消毒した手術野を無菌的に被つておけば4日間は菌を証明し得ないこと、新鮮創、粘膜面の消毒に適していること、組織の最小発育阻止濃度で細菌の最少発育阻止濃度を除いたいわゆる毒性指数からみると通常使用されている消毒剤中 CHDG が最も優れていることを報告し、小国ら¹⁸⁾は新生児の皮膚や、母体の乳房の消毒に CHDG を使用し、新生児の皮膚や、哺乳乳児に副作用を認めなかつたと報告し、小崎ら¹⁹⁾は膀胱洗浄に0.2%水溶液を40日間使用し、注意すべき副作用を認めなかつたと報告し、宮崎ら²⁰⁾は2年以上の臨床応用経験で不快な局所刺激作用は認めなかつたと報告しているが、CHDG の応用によ

つて Flötra ら¹²⁾の報告のように0.2%濃度で粘膜の劇しい痛みや落屑を生ずる副作用を認めた例はほかに見当たらない。また歯科領域において、一般に認められている副作用は長期に渉つて毎日使用した場合に歯面やシリケート充填物に着色することだけであつて、口腔粘膜に落屑を認めたのは Flötra ら¹²⁾だけのようである。

われわれがラットの歯面、歯肉、口腔粘膜に CHDG の0.2%および2.0%を35日間毎日塗布した成績では塗布群には全く異常を認められず、2.0%塗布群も当初軽度の歯肉炎を認めたものがあつたが、塗布を継続したところ間もなく治癒し、その後は異常を認めなかつた。これまでの動物を対象とした塗布実験をみると、Johnson ら⁴⁾は猿を対象とし、下右犬歯、臼歯部を除いた全歯牙に2.0% CHDG を毎日45日間塗布し、組織学的検査をした結果、歯肉炎を認めたものは塗布した歯では0~6%、非塗布歯では16~40%であつたと報告している。また Hamp ら⁵⁾は犬を対象として1日2回2.0% CHDG を12ヶ月間塗布し、著明な歯垢、歯石、歯肉炎の発生抑制効果を認め、実験期間中歯の着色を認めた例のある以外に副作用を認めなかつたと報告している。

われわれが小学校児童を対象として1ヶ年間1週間に1回2.0% CHDG 水溶液を塗布した場合、および1週間に1回0.2% CHDG 水溶液で含嗽させた場合はともに歯面、歯肉、口腔粘膜に何等も副作用を認めなかつた。このことは1週1回つまり6日間の間隔を置いたことと、その期間中刷掃がかなりよく実施されていたことにも関係があるものように考えられる。Löe ら^{1,2,3)}はヒトを対象として0.2% CHDG 水溶液で1日2回22日間、1日1回40日間含嗽を継続した場合、歯面の着色以外副作用を認めないことを報告しているが、Flötra ら¹²⁾の報告はこれらの研究成績と全く異なっている。Flötra ら¹²⁾の CHDG の応用方法の詳細は不明な点があるので、同氏に問合せ中であるが、本論文執筆の段階では詳細を知ることができなかつた。同報告によると、50人の兵士を対象に CHDG または Chlorhexidine acetate で4ヶ月間含嗽させたところ、CHDG の0.2%の含嗽

をした1人は1週間目に唇の内側に灼熱感を訴え、4週間後歯肉口腔粘膜に広範囲の落屑を認めた。また CHDG の0.1%の含嗽をした人は11週後口内炎を認め、4ヶ月目には小部位に落屑を認めたと報告している。実験群全体では11人の口腔粘膜に病変を認めたが、その中の1人は対照群のものであつた。これら病変の多くは軽度のものであつたが、3名は著明なものであつたと報告している。このほか CHDG および Chlorhexidine acetate の含嗽群にはいずれも前歯唇面、隣接面に変色を認め、全体では歯面の12%に、シリケートセメントの62%に変色を認め、舌の36%にも着色を認めたと報告している。

われわれが小学校児童を対象に毎週1回1ケ年間、CHDG の0.2%水溶液を含嗽継続した場合は、歯面、舌の変色や着色、歯肉、口腔粘膜の疼痛病変などの副作用を認めなかつた。われわれの方法は Flötra の毎日と違い週1回であり、その間刷掃を励行しており、応用方法が異なるので、われわれの方法では副作用を認めなかつたという他ない。

CHDG の経口投与による急性毒性は、製造会社である ICI (Imperial Chemical Industries) の情報によればマウスにおける急性中毒量は2530 mg/kg であるという。Davies ら⁸⁾によれば雄と雌のラット各々12匹に飲物として水のかわりに1ケ年間1/2000の CHDG を与え、3ヶ月毎に血液の細胞とヘモクロビンを検査し、実験終了時に組織学的検査をしたところ、すべての面に対照群との間に差を認めなかつたと報告している。また Beeuwkes²¹⁾は毎日マウスに5 mg/kg を、ヒトには2.0g を1週間経口投与したが毒作用を認めなかつた。人に対する最高経口投与は100mg/kg であつた。またラットの飲物として1/2000 CHDG を3世代にわたつて与えたが異常を認めなかつたと報告している。なお同氏はこの論文に1956年に DeVries, H. R. と共同で CHDG を含嗽に使用したと述べているが、この論文は入手できなかった。阿多ら²²⁾は体重16~20g のマウスが経口投与で供試マウスの半数が死亡する量は2000 mg/kg、皮下注射で325mg/kg、静脈内注射で28mg/kg

であり、0.05%の CHDG を水の代りにマウスに与え、1ケ年間飼育したところ、体重の変化、血液状態などに変化はなく、何ら病変を認めなかつた。また0.01%の CHDG はヒトの白血球のブドウ球菌食菌作用に全く悪影響を与えなかつたという研究成績を得、毒性の少ない点では現在使用されている消毒剤中最も優秀であり、慢性的毒性はないものと考えてよいと述べている。

CHDG は味が悪く、歯科医の監督下でこれを含嗽剤に用いた場合、誤つて飲むことは考えられないが、仮りに誤つて0.2%水溶液10ml を全部飲んだとすると、CHDG の量は20.0mg となる。小学校3学年生の体重は全国平均ではおよそ25.1kg、5学年生では30.5 kg (文部省47年度学校保健統計)であるから、およそ3学年生0.8mg/kg、5学年生0.6mg/kg となり、Beeuwkes のヒトに対する最高経口投与のおよそ1/125 (3学年生)または1/159 (5学年生)となる。またわれわれがマウスを対象とした経口投与では12mg/kg 投与群は発育、食慾、運動その他の健康状態など対照群と差異なく、有害な作用は認められなかつた。この投与量はヒトが誤つて含嗽剤を全部飲んだ場合、体重1 kg 当りで約15倍にあたる。味の悪い含嗽剤を誤つて飲むこと自体考え難いけれども、もし誤つて全部飲んだとしても有害な作用をおよぼすとは考え難い。

つぎに CHDG の局処応用によつて、齶蝕病原菌の耐性獲得が生ずるかどうかを研究する目的で5種類の *Str. mutans* を対象とし、希釈法によつて薄い濃度の CHDG を含んだ培地からしだいに CHDG の濃度を増し、30代で増殖可能な最高濃度に達したものを、CHDG を含まない培地で5代継続すると、全く当初の性状に復帰した。この状態はいずれの菌株においても同じであつた。これからみると *Str. mutans* の CHDG による耐性獲得は困難であろうと考えられる。

小国ら⁹⁾は CHDG が強力な殺菌力と持続性に優れているところから、耐性菌対策として使用し、交叉感染の予防としても優秀であると述べ、阿多ら²²⁾は多重耐性の菌株でもおよそ40万倍の CHDG で発育が抑えられ、CHDG に対してはな

かなか耐性菌はできないであろうと述べている。

以上から、われわれは CHDG の 2.0 % 水溶液の局処塗布または 0.2 % 水溶液の含嗽を短期間毎日、あるいは週 1 回長期に応用することによつて歯肉、口腔粘膜に障害を招来する危険は極めて少なく、*Str. mutans* の耐性獲得を来たすことも極めて困難であろうと考えられる。

第 4 章 総 括

1. ラットの歯面、歯肉、口腔粘膜に、CHDG の 0.2% および 2.0% 水溶液を 35 日間塗布したが、0.2% 塗布群には異常を認めなかつた。2.0% 塗布群は当初歯肉に僅かな発赤を認めたものがあつたけれども、塗布を続けたところ数日で治癒し、再び発赤その他の異常を認めなかつた。塗布群はいずれも発育良好で対照群との間に差異が認められなかつた。

2. 小学校 3 学年生 51 名の片側上下顎第 1 大臼歯に 1 週 1 回宛 1 ケ年間、簡易防湿のもとに CHDG 2.0% 水溶液を塗布し、他の 3 学年生 78 名に CHDG 0.2 % 水溶液で 1 週 1 回宛 1 ケ年間含嗽を継続させたが、両群とも歯肉、口腔粘膜に異常を認めなかつた。また歯面の変色または着色も認めなかつた。

3. マウスを 6 群に分け、CHDG を毎日 12 mg/kg, 120mg/kg, 180mg/kg, 240mg/kg 300 mg/kg 宛 20 日間経口投与し、対照群には滅菌蒸留水を経口投与した。12mg 投与群と対照群には発育状態に差がなく、120mg/kg 以上の投与群は体重の増加が順調でなく、途中死亡するものが多かつた。

4. CHDG 水溶液含嗽法において 0.2% 10ml を仮りに誤つて全部飲んだ場合、小学校 3 学年生ではおよそ 0.8mg/kg, 5 学年生では 0.6mg/kg となり、有害な作用をおよぼすとは考え難い。

5. *Str. mutans* 5 菌株を対象とし、希釈法により増殖可能な CHDG の最高濃度を決定し、その濃度 (0.04 μ g/ml) から濃度漸増法によつて培養を 30 代行ないつた結果、増殖可能な濃度が 0.5~1.25 μ g/ml に達したが、これを CHDG を含まない培地で 5 代継続したところ、いずれの菌株も実

験当初の状態に復帰した。したがつて *Str. mutans* の CHDG による耐性獲得は困難であろうと考えられる。

終りに臨み、本研究に対し多大の御協力と御指導をいただいた本学薬理学教室佐藤三樹雄教授、細菌学教室正古良夫教授に対し深謝の意を表します。

文 献

- 1) Löe, H. and Schiött, C. R.: The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man; *J. Periodont. Res.*, 5: 79-83, 1970.
- 2) Löe, H.: Mandell, M., Derry, A. and Schiött, C. R.: The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on calculus formation in man; *J. Periodont. Res.*, 6: 312-314, 1971.
- 3) Löe, H., Von Der Fehr, F. R. and Schiött, C. R.: Inhibition of experimental caries by plaque prevention; *Scand. J. Dent. Res.*, 80: 1-19, 1972.
- 4) Johnson, N. W. and Kenner, E. B.: Effects of topical application of chlorhexidine on plaque and gingivitis in monkeys; *J. Periodont. Res.*, 7: 180-188, 1972.
- 5) Hamp, E., Linahe, L., Löe, H.: Long term effect of chlorhexidine on developing gingivitis in the beagle dog; *J. Periodont. Res.*, 8: 63-70, 1973.
- 6) 有田正俊, 山田茂, 堀内敦彦, 今井香樹, 梅沢富嶽, 永田温, 広田幹哉: Chlorhexidine による歯垢生成抑制効果に関する研究; *日大歯学*, 46: 10-14, 1972.
- 7) 有田正俊, 山田茂, 今井香樹, 永田温, 梅沢富嶽, 岡田圭二: Chlorhexidine による歯垢生成抑制効果の持続性に関する研究; *日大歯学*, 46: 667-672, 1972.
- 8) Davies, G. E., Francis, L., Martin, A. R., Rose, F. L. and Swain, G.: 1: 6-DI-4'-Chlorophenyldigunidohehexane. Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency; *Brit. J. Pharmacol.*, 9: 192-196, 1954.
- 9) Beeuwkes, H.: The use of chlorhexidine; *J. Microbiol.*, 9: 192-196, 1954.
- 10) 小国新久, 吉本了: 新生児における細菌の検出と感染予防について; *臨床小児医学*, 9: 302-313, 1961.
- 11) 角田栄一, 田丸卓郎, 児玉利武, 浦門忍, 安藤正史: 手術野並びに手指の消毒 (殊に Chlorhexidene について); *臨床と研究*, 37: 747-755, 1960.

- 12) Flötra, I., Gjermo, P., Rølla, G. and Wæ-
rhaug, J.: Side effect of chlorhexidine mo-
uth washes; *Scand. J. Dent. Res.*, 79: 119-
125, 1971.
- 13) Flötra, L., Gjermo, P., Rølla, G. and Wa-
erhaug, J.: A 4-month study on the effect
of chlorhexidine mouth washes on 50 soldi-
ers; *Scand. J. Dent. Res.*, 80: 10-17, 1972.
- 14) Cancro, L. P., Paulovich, D. B., Klein, K.,
Picozzi, A.: Effect of a chlorhexidine glu-
conate mouthrinse on dental plaque and
calculus; *J. Periodontol.*, 43: 687-691, 1972.
- 15) Cumming, B. R., and Löe, H.: Optimal do-
sage and method of delivering chlorhexidine
solutions for the inhibition of dental pla-
que; *J. Periodont. Res.*, 8: 57-62, 1973.
- 16) Turesky, S., Glickman, I., Warner, V. D.,
Mirth, D. B.: In vitro plaque inhibition
by chlorhexidine gluconate and homologues
effect of pH and pretreatment; *J. Periodo-
ntol.*, 44: 709-711, 1973.
- 17) 山田茂, 広田幹哉, 永田温, 梅沢富嶽, 八巻麗
子: Chlorhexidine 応用による菌垢生成抑制率;
口腔衛生学会雑誌, 24: 19-23, 1974.
- 18) 小国新久, 吉本了: 新生児における細菌の検出
と感染予防について (特に Chlorhexidine 剤ヒ
ビテン使用について); *臨床小児医学*, 9: 302-
313, 1961.
- 19) 山崎巖, 塚本俊雄, 加藤薫: 泌尿器科領域に於
ける Hibitane 使用経験に就いて; *泌尿紀要*,
8: 565-577, 1962.
- 20) 宮崎雄二, 松本信勝, 竹田正文, 大川原修二, 高
松秀彦: ヒビテン・ディグルコネートの消毒効
果に関する研究; *外科治療*, 14: 242-246, 1966.
- 21) Beeuwkes, H.: The use of chlorhexidine;
J. Microbiol., 24: 49-62, 1958.
- 22) 阿多実茂, 八神喜昭: ヒビテン・シンボジウム
細菌学的問題; ヒビテン文献集第2集, p. 4-9,
住友化学工業医学事業部発行, 大阪市, 1969.
- 23) Löe, H.: Does chlorhexidine have a place
in the prophylaxis of dental diseases; *J. Pe-
riodont. Res.*, 8: Suppl. 12: 92-99, 1973.
- 24) Foulkes, D. M.: Some toxicology observa-
tions on chlorhexidine; *J. Periodont. Res.*, 8:
Suppl. 12: 55-57, 1973.
- 25) Gjermo, P. and Rølla, G.: Plaque inhibiti-
on by antibacterial dentifrices; *Scand. J.
Dent. Res.*, 78: 465-470, 1970.
- 26) Gjermo, P. and Rølla, G.: The plaqueinhi-
biting effect of chlorhexidine containing den-
tifrices; *Scand. J. Dent. J. Dent. Res.*,
79: 126-132, 1971.
- 27) Wld. Hlth. Org.: The etiology and preve-
nition of dental caries; Report of a WHO
scientific group. No. 494: 12 and 16, 17,
1972.

Abstract: Adverse Effect of Chlorhexidine and the Development of Resistant Strains, of Bacteria, Masatoshi ARITA*, Shigeru YAMADA**, Seiji EMA*, Tetsu KOYAMA*, Tada-shi SHIMADA* and Keiji OKADA*. The authors studied the possibility of adverse effects of chlorhexidine digluconate as applied to the oral area and the possible development of resistant *Streptococcus mutans* as a result of prolonged application.

Different groups of experimental rats were respectively treated with 0.2% and 2.0% aqueous solutions of chlorhexidine digluconate for 35 days. However, there were not observed any abnormal findings on the dental surfaces, gingivae and oral mucosa.

In another series of tests with mice to which chlorhexidine digluconate was orally administered in 5 different dosages of 12 mg/Kg, 120 mg/Kg, 180 mg/Kg, 240 mg/Kg, and 300 mg/Kg, the 12 mg/Kg group was found to show a normal healthy growth without abnormal findings.

Five *Streptococcus mutans* strains were subjected to the dilution method in an effort to study the possibility of the development of resistant strains as a result of prolonged use of chlorhexidine digluconate. The result indicated that it would be difficult for resistant strains to develop.

An experiment with primary school pupils, in which 3rd grade pupils were either treated with 2.0% solution or rinse of chlorhexidine digluconate in conjunction with instruction in the proper use of the toothbrush for a year, showed no abnormalcy on the dental surfaces, gingivae and oral mucosa. An application of chlorhexidine digluconate on a weekly basis proved successful in inhibiting the formation of dental plaques, and findings of this part of our studies will be given in a later report.