

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2018年10月25日(25.10.2018)



(10) 国際公開番号
WO 2018/193904 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/155 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/014999
- (22) 国際出願日: 2018年4月10日(10.04.2018)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2017-082793 2017年4月19日(19.04.2017) JP
- (71) 出願人: 株式会社大塚製薬工場 (OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, INC.) [JP/JP]; 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 1 1 5 Tokushima (JP).
- (72) 発明者: 二井 卓哉 (NII, Takuya); 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 1 1 5 株

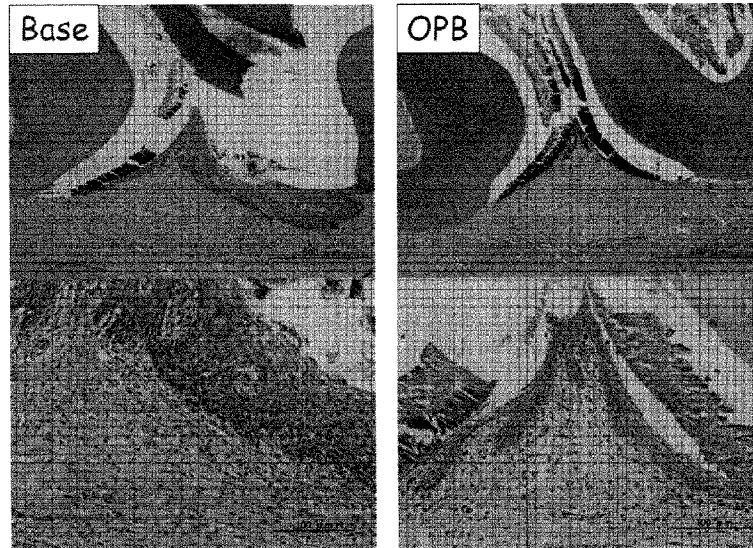
式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP). 萩 彰文 (HAGI, Akifumi); 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 1 1 5 株式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP). 坪谷 好恵 (Tsubotani, Yoshie); 〒7728601 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原 1 1 5 株式会社大塚製薬工場内 Tokushima (JP).

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 2 番 1 9 号アドレスビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

(54) Title: ANTI-INFLAMMATORY AGENT

(54) 発明の名称: 抗炎症剤



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a composition which is usable as a novel anti-inflammatory agent. Inflammation such as stomatitis, oral mucositis, gingivitis and pneumonia can be ameliorated and/or prevented by using a composition which comprises olanexidine or a pharmacologically acceptable salt thereof. Preferably, the composition according to the present invention further comprises a poloxamer which is a block copolymer comprising a polyoxypropylene (POP) chain sandwiched between two polyoxyethylene (POE) chains.



WO 2018/193904 A1

NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,
SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類 :

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 新規の抗炎症剤として用いることのできる組成物を提供することを課題とする。オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を含む組成物を用いることで、口内炎、口腔粘膜炎、歯肉炎、肺炎等の炎症を改善及び/又は予防することができる。本発明の組成物は、好ましくはポリオキシプロピレン鎖 (POP) 及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖 (POE) からなるブロック共重合体であるポロキサマーをさらに含む。

明 細 書

発明の名称： 抗炎症剤

技術分野

[0001] 本発明は、オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を有効成分として含む抗炎症剤に関する。

背景技術

[0002] オラネキシジンは、化学名 1 - (3, 4 - ジクロロベンジル) - 5 - オクチルピグアナイドという高い殺菌活性を有する化合物である。そのグルコン酸塩であるオラネキシジングルコン酸塩は、広い殺菌スペクトルを有し、殺菌効果が短時間で現れ、さらにその活性が長時間持続する。さらに、オラネキシジングルコン酸塩の水溶液は、安定性が高く、長期間保存でき、その上、皮膚に対する刺激性や毒性が低く、安全性の面でも優れている。加えて、オラネキシジングルコン酸塩の水溶液は、色、臭い及び味に問題がないため、製剤化しやすい（特許文献 1）。そのため、オラネキシジングルコン酸塩は、手術部位（手術野）の皮膚の消毒に主に用いられている。

[0003] しかしながら、オラネキシジンやその塩が抗炎症作用を示すことは、これまで知られていない。さらに、オラネキシジングルコン酸塩は粘膜に対して刺激性を有するため、オラネキシジングルコン酸塩の口腔粘膜等の粘膜への適用は困難である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：特開 2005 - 289959 公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の課題は、新規の抗炎症剤として用いることのできる組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、オラネキシジンやその塩が抗炎症作用を示すことを予想外に見いだした。さらに、オラネキシジングルコン酸塩と、ポリオキシプロピレン鎖（POP）及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーとを含む組成物を用いることで、オラネキシジングルコン酸塩の、口腔粘膜等の粘膜への適用が可能になることを見だし、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

(1) オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を含む、炎症の改善用及び／又は予防用の組成物。

(2) オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩が、オラネキシジングルコン酸塩であることを特徴とする上記(1)に記載の組成物。

(3) ポリオキシプロピレン鎖（POP）及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーをさらに含むことを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) 炎症が、口内炎、口腔粘膜炎、歯肉炎、及び肺炎から選択されることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 炎症ががんの治療による口腔粘膜炎であり、

0.01～1.5% (W/V) のオラネキシジングルコン酸塩と、
ポリオキシプロピレン鎖（POP）及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーと
を含むことを特徴とする上記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) ポロキサマーが、ポリオキシエチレン(42)ポリオキシプロピレン(67)グリコール(Pluronic P-123)、ポリオキシエチレン(54)ポリオキシプロピレン(39)グリコール(Pluronic P-85)、及びポリオキシエチレン(196)ポリオキシプロピレン(67)グリコール(Pluronic F-127)から選択されることを特徴とする上記(3)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(7) ポロキサマーが、ポリオキシエチレン (42) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic P-123) であることを特徴とする上記 (6) に記載の組成物。

(8) オラネキシジングルコン酸塩の濃度が、0.05~0.5% (W/V) であることを特徴とする上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載の組成物。

(9) ポロキサマーの濃度が、0.1~5.0% (W/V) であることを特徴とする上記 (3) ~ (8) のいずれかに記載の組成物。

(10) 液剤又は含嗽剤であることを特徴とする上記 (1) ~ (9) のいずれかに記載の組成物。

(11) がんの治療が、化学療法、放射線治療、又は化学療法と放射線治療との同時併用療法であることを特徴とする上記 (5) ~ (10) のいずれかに記載の組成物。

[0008] また、本発明の実施の他の形態として、上記本発明の炎症の改善用及び／又は予防用の組成物を炎症の改善や予防（治療）を必要とする患者に投与することにより、炎症の改善や予防（治療）する方法や、上記本発明のがんの治療による口腔粘膜炎の改善用及び／又は予防用組成物を、がんの治療による口腔粘膜炎の改善や予防（治療）を必要とする患者に投与することにより、がんの治療による口腔粘膜炎の改善や予防（治療）する方法や、炎症の改善や予防（治療）に使用するためのオラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を含む組成物や、がんの治療による口腔粘膜炎の改善や予防（治療）に使用するための、0.01~1.5% (W/V) のオラネキシジングルコン酸塩と、ポリオキシプロピレン鎖 (POP) 及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖 (POE) からなるブロック共重合体であるポロキサマーを含む組成物や、上記本発明の炎症の改善用及び／又は予防用組成物を調製するための、オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩の使用や、上記本発明のがんの治療による口腔粘膜炎の改善用及び／又は予防用組成物を調製するための、0.01~1.5% (W/V) のオラネキシジングルコン酸塩と、ポリオキシプロピレン鎖 (POP) 及び該POPを挟む2個のポ

リオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーの使用を挙げることができる。

発明の効果

[0009] 本発明により、新規の炎症の改善用及び／又は予防用の組成物が提供される。本発明の組成物は、肺炎、口内炎、歯肉炎、肺炎等の幅広い炎症に適用可能である。さらに、本発明の炎症の改善用及び／又は予防用の組成物（抗炎症剤）は、がんの化学療法、放射線治療、又は化学療法と放射線治療の併用療法を受けている患者の口腔粘膜炎を改善及び／又は予防することができ、ひいては、患者のコミュニケーション機能の阻害、睡眠障害、疼痛、嚥下障害（食事摂取量の減少）などのQOLの低下や、化学療法、放射線治療のDose遵守妨害を防ぐことができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例1の、好気性培養による口腔内細菌数の測定結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図2]実施例1の、レンサ球菌選択培地での培養による口腔内細菌数の測定結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図3]実施例1の、嫌気性培養による口腔内細菌数の測定結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図4]実施例1の、細菌カウンタによる口腔内細菌数の測定結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図5]実施例2の、オラネジン（登録商標）消毒液（OPB）と他剤との比較試験結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図6]実施例3の、殺菌効力に及ぼすオラネキシジン濃度の影響を検討した結果を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図7]実施例4の、各群の体重変化を示す図である。

[図8]実施例4の、肉眼的観察結果を示す表である。表中の数値は口内炎 grade を示し、網掛けは白板様症状（角化亢進、肥厚等）を呈した群を示す。

[図9]実施例4の、最終日の各群の頬袋の写真である。

[図10]実施例4の、病理組織学的検査結果を示す表である。

[図11]実施例5の、肉眼的観察結果を示す表である。表中の数値は口内炎 grade を示し、網掛けは白板様症状（角化亢進、肥厚等）を呈した群を示す。

[図12]実施例5の、病理組織学的検査結果を示す表である。

[図13]実施例6の、ハムスター口腔における生残菌数を示す図である。縦軸の細菌数は対数値で表した。

[図14]実施例6の口内炎 grade を示す図である。口内炎 grade を縦軸に示す。

[図15]実施例7の口内炎 grade を示す図である。口内炎 grade を縦軸に示す。

[図16]実施例8の口内炎 grade を示す図である。口内炎 grade を縦軸に示す。

[図17]実施例9の、病理学的検査結果を示す図である。

[図18]実施例9の、HE染色標本の顕微鏡写真である。

[図19]実施例10の、血液学的検査及び生化学的検査の結果を示す図である。

[図20]実施例11の、オラネジン（登録商標）消毒液（OPB）によるSEAP発現の阻害率を示す図である。

[図21]実施例12の、オラネジン（登録商標）消毒液（OPB）によるNO産生阻害を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の組成物は、オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を含む炎症の改善用及び／又は予防用の組成物である。オラネキシジンの薬理学上許容される塩としては、薬理学上公知のものを用いることができ、例えば、塩酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、クエン酸塩、グルコン酸塩、乳酸塩、酢酸塩、グルセプテート、酒石酸塩等を例示することができるが、水への溶解性の

観点からオラネキシジングルコン酸塩が好ましい。

[0012] 本発明の組成物において、オラネキシジンは抗炎症作用を示すことのできる濃度で含まれていればよく、オラネキシジングルコン酸塩換算で0.001~20% (W/V)、好ましくは0.005~15% (W/V)、より好ましくは0.01~10% (W/V)、さらに好ましくは0.1~5% (W/V) を例示することができる。また、本発明の組成物を口腔粘膜等の粘膜に適用する場合、オラネキシジンの濃度は、オラネキシジングルコン酸塩換算で0.01~1.5% (W/V) が好ましく、0.05~0.5% (W/V) がより好ましく、0.1~0.3% (W/V) がさらに好ましい。なお、本発明の組成物を口腔粘膜に適用する場合、オラネキシジングルコン酸塩の濃度が0.01% (W/V) より低いと、口腔細菌の殺菌効力が十分に得られず、1.5% (W/V) を超えると、口腔粘膜への刺激が強くなりすぎるため望ましくない。

[0013] 本発明の組成物は、適用部位への刺激を低減するため、1種又は2種以上のポロキサマーをさらに含んでもよい。ここでポロキサマーとしては、ポリオキシプロピレン鎖 (POP) 及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖 (POE) からなるブロック共重合体であって、適用部位への刺激を低減するものであれば特に制限されないが、ポリオキシエチレン (42) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic P-123)、ポリオキシエチレン (54) ポリオキシプロピレン (39) グリコール (Pluronic P-85)、及びポリオキシエチレン (196) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic F-127) から選択される1種又は2種以上のポロキサマーが好ましく、中でもポリオキシエチレン (42) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic P-123)、ポリオキシエチレン (3) ポリオキシプロピレン (17) グリコール (Pluronic L-31)、ポリオキシエチレン (20) ポリオキシプロピレン (20) グリコール (Pluronic L-44)、ポリオキシエチレン (120) ポリオキシプロピレン (40) グリコー

ル (Pluronic F-87)、ポリオキシエチレン (160) ポリオキシプロピレン (30) グリコール (Pluronic F-68) を例示することができる。

[0014] 上記ポロキサマーの中でも、ポリオキシエチレン (42) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic P-123)、ポリオキシエチレン (54) ポリオキシプロピレン (39) グリコール (Pluronic P-85)、及びポリオキシエチレン (196) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic F-127) から選択される1種又は2種以上のポロキサマーが好ましく、中でもポリオキシエチレン (42) ポリオキシプロピレン (67) グリコール (Pluronic P-123) がより好ましい。

[0015] ポロキサマーの濃度としては、特に制限されるものではないが、0.1～5.0% (W/V)、好ましくは0.1～4.0% (W/V)、より好ましくは0.1～3.0% (W/V)、さらに好ましくは0.1～2.0% (W/V)、最も好ましくは0.1～1.5% (W/V) を挙げることができる。また、オラネキシジングルコン酸塩とポロキサマーの濃度比は、1:2～1:20が好ましく、1:5～1:10であることがより好ましい。本発明の組成物を口腔粘膜に適用する場合、オラネキシジングルコン酸塩濃度0.3% (W/V) 以上の高濃度域では、オラネキシジングルコン酸塩による口腔粘膜への刺激がより強いため、ポロキサマー量をより多くした方が、オラネキシジングルコン酸塩による刺激 (角化亢進) を抑えるうえで好ましい。

[0016] 本明細書において、「炎症」とは、自己免疫疾患等の内的要因、又は、細菌・ウイルス感染、外傷、物理的刺激 (熱、寒冷、放射線、電気等)、化学物質等の外的要因により、発赤、熱感、腫脹、疼痛という徴候が生じる生体反応を意味する。本発明における炎症としては、本発明の組成物を適用することのできる炎症であれば特に制限されないが、好ましくはToll様受容体が発現する炎症、より好ましくは細菌感染による炎症を挙げることができる。また、炎症部位としては、脳、眼、気管、血管、肺、肝臓、心臓、膵臓

、胃、腸、腸間膜、腎臓、皮膚、鼻炎膜、口腔粘膜、歯肉あるいは関節を例示することができ、具体的には、脳炎、気管支炎、血管炎、肺炎、肝炎、心筋炎、膵炎、腸炎、胃炎、腹膜炎、腎炎、口内炎、口腔粘膜炎、歯肉炎、関節炎、虚血後再灌流障害に起因する炎症、移植後免疫拒絶に起因する炎症、火傷、多発性臓器障害に起因する炎症、手術後に生じる炎症、及び動脈硬化症に起因する炎症を挙げることができ、中でも、口内炎、口腔粘膜炎、歯肉炎、及び肺炎を好適に例示することができる。本明細書において口腔粘膜炎とは、がんの治療によって口腔粘膜に生じた炎症をいい、口内炎とは、がんの治療によらないで口腔粘膜に生じた炎症をいう。また、本発明の組成物は、がんの治療による口腔粘膜炎の改善用及び／又は予防用という特定の用途を有する組成物であってもよいが、一態様において、本発明は、がんの治療による口腔粘膜炎の改善用及び／又は予防用という用途を有する組成物を除外する。

[0017] 本発明の組成物は、炎症部位の皮膚や、口腔粘膜、歯肉、消化管、気管、肺等の粘膜に適用することができる。投与方法としては、注射（静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内等）、経口、経皮、吸入、口腔内への塗布、歯肉への塗布、含嗽などを挙げることができ、これらの投与方法に応じて適宜製剤化することができる。また、選択し得る剤形も特に限定されず、例えば注射剤（溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等）、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、含嗽剤、リポ化剤、軟膏剤、ゲル剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤等から広く選択することができる。また、これらの製剤調製にあたり、慣用の賦形剤、安定化剤、結合剤、滑沢剤、乳化剤、浸透圧調整剤、pH調整剤、その他着色剤、崩壊剤等、通常医薬に用いられる成分を使用することができる。

[0018] 本発明の組成物を口腔内に適用する場合、口腔内に適用するのに適したいかなる剤形であってもよいが、好ましくは液剤、含嗽剤を挙げることができる。また、飴類、キャンディー類、グミ類、トローチ類、ガム類等の、口中で徐々に溶解又は崩壊する固形組成物であってもよい。さらに、必要に応じて

て、風香味を付与したり、着色したりする目的で用いられる種々の添加物を更に含有することができる。風香味付与を目的とする添加物としては、例えば合成香料、天然香料、アスパルテーム、アセスルファムカリウム、スクラロース、アリテーム、ネオテーム、カンゾウ抽出物（グリチルリチン）、サッカリン、サッカリンナトリウム、ステビア抽出物、ステビア末等の甘味料を挙げることができる。着色を目的とする添加物としては、カラメル、天然着色料、合成着色料を挙げることができる。また、本発明の組成物は、乳化剤（グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、レシチンなど）、安定剤、防腐剤等の添加物を含有してもよい。これらの添加剤は、単独で使用しても、2種以上組み合わせて使用してもよい。

[0019] 本発明の組成物を液剤又は含嗽剤として投与する場合の1回あたりの投与量としては、炎症が生じた部位や重篤度によって任意に決定することができるが、1～100mL、好ましくは2～50mL、より好ましくは5～40mL、最も好ましくは10～30mLを挙げることができる。

[0020] 本発明の組成物を投与する時期としては、炎症が生じた部位や重篤度、又は炎症の改善度によって任意に決定することができるが、食後又は起床後もしくは就寝前を挙げることができる。あるいは、2～8時間間隔で、好ましくは4～6時間間隔で投与することもできる。また、本発明の組成物は、手術前の患者、オーラルケア後の患者に投与することにより、炎症を予防することができる。

[0021] 本発明の組成物の投与期間としては、炎症の改善度により任意に決定することができるが、1週間～3か月、好ましくは1週間～2か月、より好ましくは1週間～1か月、最も好ましくは1～2週間を挙げることができる。

[0022] 本発明において、がんの治療としては、がんの化学療法、放射線治療、又は化学療法と放射線治療との同時併用療法を挙げることができる。がんの化学療法とは、抗がん剤によるがんの治療全般を指す。本発明で使用される抗がん剤としては、口腔粘膜炎を起こしやすいフルオロウラシル（5-FU）

、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム（S-1）、テガフル・ウラシル（UFT）等のフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤、メトトレキサート等の葉酸代謝拮抗剤、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、アクチノマイシンD等の抗腫瘍性抗生物質、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンクリスチン、エトポシド等の植物アルカロイド、シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン等の白金製剤を挙げることができ、特に5-FU等のフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤を好適に例示することができる。これらの抗がん剤は、単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

[0023] また、本発明において、放射線治療とは、悪性腫瘍部に放射線を照射してがん細胞の増殖を抑制することを目的とした治療であり、その治療に使用される放射線としては、X線、電子線などが挙げられる。また、化学療法と放射線治療との同時併用療法とは、がんの局所療法である放射線療法を抗がん剤と併用することにより、放射線の効果を強める治療法を指す。放射線治療の対象部位は特に制限されるものではないが、頭頸部、特に口腔内や咽頭部への放射線治療を例示することができる。

[0024] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0025] 1. カニクイザルを用いた口腔内殺菌効力試験

本試験では簡易細菌カウンタと培養法を併用して、試験物質（殺菌消毒剤として0.1%（w/v）オラネキシジングルコン酸塩及び0.47%ポビドンヨード、陰性対照薬として生理食塩液）のカニクイザル口腔内細菌に対する殺菌効力を比較、検討した。

[0026] 1-1 試験物質

被験物質はオラネジン（登録商標）消毒液1.5%（以下「1.5%OPB」などという、オラネキシジングルコン酸塩として1.508%（w/v）を含む液、株式会社大塚製薬工場製）を15倍希釈し、オラネキシジング

ルコン酸塩濃度が0.1% (w/v) となるように調製した (0.1% OPB)。対照物質のイソジンガーグル液7% (以下「7% PVP-I」などという、Meiji Seika ファルマ株式会社製) は15倍希釈し (0.47% PVP-I)、生理食塩液 (Saline、株式会社大塚製薬工場製) はそのまま用いた。

[0027] 1-2 試験動物

使用時年齢2歳11ヶ月～3歳11ヶ月齢のカニクイザル (雄、カンボジア産、株式会社イブバイオサイエンス製) を用いた。

[0028] 1-2-1 群構成

各動物の口腔内を試験部位とした。9頭の動物を使用し、0.1% OPB、0.47% PVP-I 及び Saline を塗布するため、1群当たりの試験部位は3箇所とした。試験物質塗布前、塗布10分後、6時間後及び24時間後の計4回細菌を採取した。

[0029] 1-2-2 動物番号及び試料番号

以下の表1のように動物番号及び試料番号を割り振った。尚、動物番号1～3のベースライン細菌数を測定し、細菌数が多い順に saline、0.1% OPB、0.47% PVP-I による試験に供した。同様に、動物番号4～6は細菌数が多い順に0.1% OPB、0.47% PVP-I、saline による試験に供し、動物番号7～9は細菌数が多い順に0.47% PVP-I、saline、0.1% OPB による試験に供した。

[0030]

[表1]

試料番号	動物番号	時点	試料番号	動物番号	時点
1	1	baseline	21	6	baseline
2		10min	22		10min
3		6hr	23		6hr
4		24hr	24		24hr
5	2	baseline	25	7	baseline
6		10min	26		10min
7		6hr	27		6hr
8		24hr	28		24hr
9	3	baseline	29	8	baseline
10		10min	30		10min
11		6hr	31		6hr
12		24hr	32		24hr
13	4	baseline	33	9	baseline
14		10min	34		10min
15		6hr	35		6hr
16		24hr	36		24hr
17	5	baseline			
18		10min			
19		6hr			
20		24hr			

[0031] 1-3 試験方法

[0032] 1-3-1 麻酔

カニクイザルにケタラール（ケタミンとして50mg/mL、第一三共プロファーマ株式会社製）とセラクター2%注射液（キシラジンとして2.0g/100mL、バイエル薬品株式会社製）の2:1の混合液を体重1kg当たり0.5mLを筋注し、全身麻酔した。

[0033] 1-3-2 塗布

〔1〕マウスピュア口腔ケアスポンジ（川本産業株式会社製）を2本入れたコンテナ（250mL、コーニング株式会社製）に試験物質100mLを注いだ。

〔2〕スポンジ内の空気を抜き十分に浸した。

〔3〕口腔内に約2分間塗布した。

[0034] 1-3-3 細菌採取1

〔1〕滅菌済み手袋で滅菌綿棒を用いて、サル口腔内から細菌を採取した（口腔内両側壁を2回ずつ前後にこすり取った）。

〔2〕 5 mL サンプリグ液（10%（w/v）ポリソルベート80、0.04%（w/v）リン酸二水素カリウム、0.1%（w/v）Triton X-100、1.01%（w/v）無水リン酸一水素ナトリウム、2%（w/v）大豆レシチン、5%（w/v）ポリオキシエチレン（20）セチルエーテル、H7.8～7.9）の中に綿棒を入れた。

[0035] 1-3-4 細菌採取2

〔1〕 定圧検体採取器具（DU-AE01NT-H、パナソニックヘルスケア社製）に測定消耗品（DU-AC02NP-H、パナソニックヘルスケア社製）の綿棒を取り付けた。

〔2〕 サルの舌上に綿棒を定圧で押し当て、約1 cmの間隔で3回前後にこすった。

[0036] 1-3-5 平板培養法による口腔内細菌数測定

新GMP微生物試験法2）、食品衛生検査指針3）を参考にカンテン平板混釈法及びカンテン平板表面塗沫法を実施した。

〔1〕 1-3-3で細菌を回収したサンプリグ液を激しく攪拌し、これを回収菌液とした。

〔2〕 回収菌液0.5 mLを10倍希釈し、更に同様の操作により希釈を繰り返して10倍希釈系列（5段階）を作製した。

〔3〕 回収菌液及び段階希釈された希釈液を1 mLずつシャーレに分注した。これに約47℃で保存した測定培地（TSA+）を約15 mL加えて混釈平板を作製した。また、回収菌液及び段階希釈された希釈液を100 µLずつ血液寒天培地及びMS寒天培地に分注し、コンラージ棒を用いて表面塗沫した。

〔4〕 測定培地（TSA+）の固化後、混釈平板を倒置し、コロニー計数が可能となるまで培養した。また、表面塗沫平板は倒置し、コロニー計数が可能となるまで、嫌気性条件下で培養した。

〔5〕 混釈平板及び表面塗沫平板で増殖したコロニーをコロニーカウンター（DC-3、アズワン株式会社）を用いて計数した。コロニー数が多すぎて

コロニー間の区別ができない混釈平板は、TNTC (too numerous to count) とし計数しなかった。

[0037] 1-3-6 細菌カウンタによる口腔内細菌数測定

[1] 細菌カウンタ (DU-AA01、パナソニックヘルスケア社製) の蓋を開けた。

[2] 測定消耗品のセンサーチップを細菌カウンタに取り付けた。

[3] 測定消耗品のディスポーザブルカップを細菌カウンタにセットした。

[4] ディスポーザブルカップ中心に、細菌を採取した綿棒をセットした。

[5] 細菌カウンタの蓋を閉じた。

[0038] 1-4 結果

[0039] 1-4-1 平板培養法による口腔内細菌数測定

[0040] (1) 好気性培養

結果を図1に示す。ベースライン口腔内細菌数は $1.73 \times 10^5 \sim 4.20 \times 10^6$ であった。Saline 塗布後の口腔内細菌数はほぼ一定であった。試験物質塗布10分後の生菌数は、Saline、0.1%OPB及び0.47%PVP-Iでそれぞれ、 6.48×10^5 CFU、 4.65×10^3 CFU及び 2.35×10^4 CFU、塗布6時間後でそれぞれ、 1.66×10^6 CFU、 1.47×10^3 CFU及び 4.93×10^5 CFU、24時間後でそれぞれ、 4.67×10^5 CFU、 5.58×10^4 CFU及び 1.22×10^6 CFUであった。

[0041] (2) レンサ球菌選択培地での培養

結果を図2に示す。ベースライン口腔内細菌数は $2.85 \times 10^5 \sim 7.60 \times 10^7$ であった。Saline 塗布後の口腔内細菌数はほぼ一定であった。試験物質塗布10分後の生菌数は、Saline、0.1%OPB及び0.47%PVP-Iでそれぞれ、 1.26×10^6 CFU、 5.97×10^3 CFU及び 7.33×10^4 CFU、塗布6時間後でそれぞれ、 5.51×10^6 CFU、 2.79×10^4 CFU及び 2.20×10^6 CFU、24時間後でそれぞれ、 1.71×10^6 CFU、 4.30×10^5 CFU及び 7.81

$\times 10^6$ CFUであった。

[0042] (3) 嫌気性培養

結果を図3に示す。ベースライン口腔内細菌数は $2.45 \times 10^5 \sim 1.65 \times 10^7$ であった。Saline塗布後の口腔内細菌数はほぼ一定であった。試験物質塗布10分後の生菌数は、Saline、0.1%OPB及び0.47%PVP-Iでそれぞれ、 2.70×10^6 CFU、 1.33×10^4 CFU及び 7.33×10^4 CFU、塗布6時間後でそれぞれ、 3.22×10^6 CFU、 1.38×10^4 CFU及び 1.80×10^6 CFU、24時間後でそれぞれ、 1.71×10^6 CFU、 3.04×10^5 CFU及び 1.40×10^6 CFUであった。

[0043] 1-4-2 細菌カウンタによる口腔内細菌数測定

結果を図4に示す。ベースライン口腔内細菌数は $1.29 \times 10^6 \sim > 1.00 \times 10^8$ であった。試験物質塗布10分後の生菌数は、Saline、0.1%OPB及び0.47%PVP-Iでそれぞれ、 2.84×10^6 CFU、 $< 3.49 \times 10^5$ CFU及び 5.09×10^5 CFU、塗布6時間後でそれぞれ、 2.04×10^7 CFU、 5.58×10^5 CFU及び 8.98×10^6 CFU、24時間後でそれぞれ、 4.10×10^7 CFU、 3.14×10^7 CFU及び 3.14×10^7 CFUであった。

[0044] 平板培養法による細菌数測定、細菌カウンタによる細菌数測定のいずれにおいても、同様な傾向の結果が得られた。つまり、0.1%OPB群は塗布6時間後まで細菌数を低値に保つが、0.47%PVP-I群は塗布10分後までしか効果を示さなかった。しかし、両群とも24時間後には細菌数が回復していた。0.47%PVP-I群の持続性が認められなかったのは、PVP-Iが口腔内の有機物により不活化の影響を受けやすいからだと考えられる。口腔内殺菌消毒効果は、0.1%OPBの方が持続性を持ち優れていると考えられた。

実施例 2

[0045] 2. ハムスターを用いた口腔内殺菌試験 1

本試験では、正常ハムスター口腔内粘膜に対する含嗽剤（殺菌消毒剤）の殺菌効力を、他剤と比較検討することを目的とした。殺菌活性の持続性を検討するため、試験物質含嗽後～24時間まで時点（前置、直後、8時間後、24時間後）をとり、細菌カウント及び培養法を用い細菌数を計測した。

[0046] 2-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0047] 2-1-1 被験物質1

名称 : 0.1% OPB-1
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 1.0w/v%

[0048] 2-1-2 被験物質2

名称 : 0.1% OPB-2
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 1.0w/v%
 Lipidure (登録商標) 1.0w/v%

[0049] 2-1-3 対照物質1

名称/略称 : 基剤/Base
 組成 : Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 1.0w/v%

[0050] 2-1-4 対照物質2

名称/略称 : Peridex (登録商標) / 0.12% CHG
 組成 : クロルヘキシジングルコン酸塩 0.12w/v%

[0051] 2-1-5 対照物質3

名称/略称 : イソジンガーグル液0.47% / 0.47% PVP-I
 組成 : イソジンガーグル液7% (7% PVP-I、Meiji Seikaファルマ株式会社製) の15倍希釈液

[0052] 2-2 使用動物

入荷時6週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群4匹で試験を行った。

[0053] 2-3 試験方法

[0054] 2-3-1 麻酔

ガス麻酔〔導入麻酔：空気3.0L/minに3%イソフルラン（マイラン製薬株式会社製）、持続麻酔は適宜濃度を調整〕を実施した。

[0055] 2-3-2 試験物質投与

麻酔下にて、ハムスターを仰臥位に固定し、片頬袋に試験物質を1mLずつ注入した。30秒後、試験物質を排出し、余分な頬袋内の試験物質を滅菌綿棒で吸い取った。

[0056] 2-3-3 細菌採取

試験物質投与前、0hr、8hr、24hrの計4時点に、麻酔下で両頬袋内から滅菌綿棒を用いて細菌を採取した。採取後の綿棒は5mL SCDLP培地に浸漬後攪拌し、細菌計数用サンプルとした。

[0057] 2-3-4 生残菌数の測定

新GMP微生物試験法1)、食品衛生検査指針2)を参考にカンテン平板混釈法を実施した。

〔1〕細菌計数用サンプル500 μ Lを採取し、4.5mLの希釈液を用いて、 10^1 倍~ 10^6 倍の10倍希釈系列を作製した。

〔2〕細菌計数用サンプル原液及び各希釈菌液1mLずつ滅菌シャーレに分注した。

〔3〕上記のシャーレに、速やかに約47 $^{\circ}$ Cに設定した恒温槽で保温した測定培地(TSA+)15mLを分注した。

〔4〕測定培地の固化後、混釈平板をインキュベーター内に倒置し、コロニーが計数できるまで35 $^{\circ}$ Cで培養した(約2日間)。

〔5〕培養後、混釈平板で増殖したコロニーを目視にて計数した。コロニー数が多すぎてコロニー間の区別ができない混釈平板は、TNTC(too numer

ous to count) とし計数

しなかった。

〔6〕コロニー数に希釈倍率を乗じて、生残菌数を算出した。

[0058] 2-4 結果

結果を図5及び表2に示す。

[0059] [表2]

ハムスター口腔における生残菌数

試験物質	n	生残菌数 {Mean ±SD[Log ₁₀ (CFU/swab)]}			
		Baseline	0 hr	8 hrs	24 hrs
Base	4	6.09 ± 0.87	5.26 ± 0.50	5.55 ± 0.52	5.86 ± 0.53
0.1%OPB-1	4	6.13 ± 0.40	3.13 ± 0.52	3.98 ± 1.03	5.57 ± 0.69
0.1%OPB-2	4	6.16 ± 0.27	3.24 ± 0.34	4.52 ± 0.65	6.24 ± 0.22
Peridex	4	6.17 ± 0.65	4.04 ± 0.69	3.86 ± 0.92	5.68 ± 0.49
0.47% PVP-I	4	6.50 ± 0.39	4.35 ± 0.33	5.79 ± 0.31	6.08 ± 0.47

[0060] 試験物質投与前の口腔内細菌数は、群間に差が無かった。試験物質投与直後の殺菌効力は、0.1%OPB-1 = 0.1%OPB-2 > 0.12%CHG > 0.47%PVP-I > Baseであり、投与8時間後は、0.1%OPB-1 = 0.1%OPB-2 = 0.12%CHG > 0.47%PVP-I = Baseであり、24時間後は群間に差は無かった。以上の結果から、口腔内殺菌効力は0.1%OPBと0.12%CHGは同等程度であり、0.47%PVP-Iは即効性が弱く持続活性は認められなかった。

[0061] 本試験で0.47%PVP-Iの殺菌活性が低かった理由として、口腔内のたんぱく等による不活化が大きく寄与していると考えられた。0.12%CHGは0.1%OPBと同様に持続活性を有する口腔内殺菌消毒剤であると考えられた。

実施例 3

[0062] 3. ハムスターを用いた口腔内殺菌試験2

本試験では、正常ハムスター口腔内粘膜に対する含嗽剤（殺菌消毒剤）の

殺菌効力に及ぼすオラネキシジン濃度の影響を検討することを目的とした。

[0063] 3-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0064] 3-1-1 被験物質1

名称：0.1%OPB-1

組成：オラネキシジングルコン酸塩. . . 0.10w/v%

ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(20)グリコー
ル. . . 0.07w/v%

ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコ
ール. . . 0.10w/v%

[0065] 3-1-2 被験物質2

名称：0.1%OPB-2

組成：オラネキシジングルコン酸塩. . . 0.10w/v%

ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(20)グリコー
ル. . . 0.07w/v%

ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30). . .
1.00w/v%

[0066] 3-1-3 被験物質3

名称：0.5%OPB-3

組成：オラネキシジングルコン酸塩. . . 0.50w/v%

ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(20). . . 0
. 36w/v%

ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30). . .
5.00w/v%

[0067] 3-1-4 被験物質4

名称：1%OPB-2

組成：オラネキシジングルコン酸塩. . . 1.00w/v%

ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(20)グリコー

ル. . . 0. 7 2 w / v %

ポリオキシエチレン (1 6 0) ポリオキシプロピレン (3 0) グリコ
ール. . . 1 0. 0 0 w / v %

[0068] 3 - 1 - 5 対照物質

名称 : 基剤

組成 : ポリオキシエチレン (2 0) ポリオキシプロピレン (2 0) グリコ
ール. . . 0. 0 7 w / v %

ポリオキシエチレン (1 6 0) ポリオキシプロピレン (3 0) グリコ
ール. . . 0. 1 0 w / v %

[0069] 3 - 2 使用動物

入荷時 6 週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群 3 匹で試験を行
った。

[0070] 3 - 3 試験方法

[0071] 3 - 3 - 1 麻酔

ガス麻酔 [導入麻酔 : 空気 3. 0 L / m i n に 3 % イソフルラン (マイラ
ン製薬株式会社製)、持続麻酔は適宜濃度を調整] を実施した。

[0072] 3 - 3 - 2 試験物質投与

麻酔下にて、ハムスターを仰臥位に固定し、片頬袋に試験物質を 1 m L ず
つ注入した。1 分後、試験物質を排出し、余分な頬袋内の試験物質を滅菌綿
棒で吸い取った。

[0073] 3 - 3 - 3 細菌採取

試験物質投与前、0 h r、1 h r、3 h r、6 h r の計 5 時点に、麻酔下
で両頬袋内から滅菌綿棒を用いて細菌を採取した。採取後の綿棒は 5 m L
S C D L P 培地に浸漬後攪拌し、細菌計数用サンプルとした。

[0074] 3 - 3 - 4 生残菌数の測定

生残菌数の測定は、2 - 3 - 4 と同様の方法で行った。

[0075] 3 - 4 結果

結果を図 6 に示す。結果より、0. 1 % O P B で持続的 (6 時間後) に細

菌数を低値に抑えることができることがわかった。また、OPB濃度が0.5 w/v%以上で、持続活性がより優れていた。

実施例 4

[0076] 4. ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験 1

本試験では、0.1%オラネキシジングルコン酸塩の基剤組成を変えた検討製剤をハムスターの頬袋に14日間反復投与し、刺激性の程度を比較検討した。

[0077] 4-1 被験物質

[0078] 4-1-1 被験物質 1

名称	: 0.1%OPB-1	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10 w/v%
	Pluronic L-44	0.07 w/v%

[0079] 4-1-2 被験物質 2

名称	: 0.1%OPB-2	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10 w/v%
	Pluronic L-44	0.07 w/v%
	Pluronic L-31	1.0 w/v%

[0080] 4-1-3 被験物質 3

名称	: 0.1%OPB-3	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10 w/v%
	Pluronic L-44	0.07 w/v%
	Pluronic P-123	1.0 w/v%

[0081] 4-1-4 被験物質 4

名称	: 0.1%OPB-4	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10 w/v%
	Pluronic L-44	0.07 w/v%
	Pluronic P-85	1.0 w/v%

[0082] 4-1-5 被験物質 5

名称 : 0.1%OPB-5
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic F-127 1.0w/v%

[0083] 4-1-6 被験物質6

名称 : 0.1%OPB-6
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.14w/v%
 Pluronic F-68 1.0w/v%

[0084] 4-1-7 被験物質7

名称 : 0.1%OPB-7
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Trehalose 5.0w/v%

[0085] 4-2 使用動物

入荷時8週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群3匹で試験を行った。

[0086] 4-3 試験方法

[0087] 4-3-1 被験物質適用方法

[0088] (1) 適用量

右頬袋に被験物質1mLを適用した。

[0089] (2) 適用方法

〔1〕ガス麻酔により麻酔を導入した〔導入麻酔：空気3.0L/minに3%イソフルラン（マイラン製薬株式会社製）〕。

〔2〕維持麻酔下（濃度は適宜調整）にて動物を仰臥位に固定し、綿棒を用いて動物の頬袋を引き出し、片手で引き出した頬袋を軽くつまんだ。

〔3〕生理食塩液及び綿棒で頬袋粘膜に付着した飼料等の異物を取り除き、清潔にした後頬袋を元に戻した。

〔4〕 1 mL シリンジ及び経口投与用ゾンデを用いて、右頬袋には被験物質 1 mL を適用し、左頬袋には 1 mL シリンジに取り付けた空の経口投与用ゾンデを挿入・抜去した。

〔5〕 適用 30 秒後、被験物質が気道内へ逆流しないように動物を腹臥位に反転させ排出した。口腔内の余分な被験物質は綿棒を用いて全て除去した。

〔6〕 適用部位の頬粘膜の色調等を観察・記録し、動物の頸部にハムスター用カラーを装着した後、動物をケージに戻した。

〔7〕 上記の操作を 1 日 2 回（朝・夕）、14 日間繰り返した。

[0090] 4-3-2 検査及び観察

[0091] (1) 一般状態の観察

各群の全例について、適用期間中は、試験物質の適用前及び適用終了時に一般状態観察を行った（Day 1～Day 14）。また、適用期間終了日の翌日にも観察を行った（Day 15）。

[0092] (2) 体重測定

各群の全例において、適用期間中は、試験物質の適用前に体重を測定した（Day 1～Day 14）。また、適用期間終了日の翌日にも測定を行った（Day 15）。ただし、体重計の故障のため Day 13、14 は体重を測定しなかった。

[0093] (3) 適用部位の肉眼的観察方法

各群の全例の頬袋について、適用期間中は、試験物質の適用前及び適用終了時に頬袋粘膜の状態を観察し、評点化を記録した（Day 1～Day 14）。また、適用期間終了日の翌日（24 ± 2 時間）にも観察を行った（Day 15）。観察部位は各試験物質の接触部位頬粘膜とした。なお、肉眼的観察の評価法は以下の表 3（ISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.2 Grading system for oral and penile reactions」）に記載されている観察基準及び評価点に従って、紅斑及び痂皮形成の程度に評価点（口内炎 grade）をつけた。また、その他に見られた所見についても記録した。得られた観察結果をもとに、各群について試験物質ごとに、各動物の粘膜における評価点を合

計し、観察数及び動物数で除して平均値（小数第一位四捨五入）を求め、総合評価の参考資料とした。

[0094] [表3]

Table B.2 Grading system for oral and penile reactions

(紅斑及び痂皮形成)	評価点
紅斑なし	0
極めて弱い紅斑（やっと認められる程度）	1
明瞭に識別できる紅斑	2
中程度の紅斑	3
重度の紅斑（ビート赤色）から痂皮形成により紅斑格付不可能レベルまで	4

[0095] (4) 病理学的検査

各動物について、適用期間終了日の翌日の肉眼的観察の終了後、イソフルラン麻酔下で放血致死させ、左右頬袋を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。常法に従いHE染色の標本作製し、病理学的検査を実施した。なお、肉眼的観察の評価法はISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.3 Grading system for microscopic examination for oral, penile, rectal and vaginal tissue reaction」に記載されている基準に従って、上皮、白血球浸潤、血管充血及び浮腫の各項目について所見又はグレードを記録した。また、その他に認められた所見についても記録した。

[0096] (5) 総合評価

観察期間中の一般状態及び体重推移を参考にし、頬粘膜の肉眼的観察結果及び病理学的観察結果から得られた各試験物質の反応程度をもとにして、各試験物質の口腔粘膜への影響を総合的に評価した。

[0097] 4-4 結果

[0098] 4-4-1 一般状態

いずれの動物にも異常は認められなかった。

[0099] 4-4-2 体重

結果を図7に示した。0.1%OPB-5群は体重がほとんど変化しなか

った。他の群は平均値が徐々に増加した。

[0100] 4-4-3 適用部位の肉眼的観察

結果を図8に示し、最終日の各群の頬袋を図9のPhoto1~8に示した。全ての製剤で紅斑等の刺激性がほとんど認められなかった。しかし、0.1%OPB-1、-2、-6、-7及び-8では、白板様症状（角化亢進、肥厚）が認められた。一方、0.1%OPB-3、-4及び-5では全く異常が認められなかった。

[0101] 4-4-4 病理組織学的検査

結果を図10に示した。ISO 10993-10、Annex B.3「Table B.3 Grading system for microscopic examination for oral, penile, rectal and vaginal tissue reaction」に記載されている評価基準に従って、上皮（細胞変性、化生及びびらん）、白血球浸潤、血管充血及び浮腫のグレード付けにより、個体毎の炎症指数及び群毎の炎症指数の平均を算出した。また、評価基準以外の所見についても記録した。その結果、平均値は0.1%OPB-3群では変化は認められなかった。0.1%OPB-1群を含む他の群では、上皮の細胞変性及び極小~中等度の白血球浸潤が認められ、炎症指数は1~3の極小と評価された。これらの群では、評価基準以外の所見として、軽微な細胞間浮腫及び軽微から軽度の過角化が認められた。

[0102] 以上の結果から、0.1%OPB-3で使用した基剤Pluronic P-123は、オラネキシジングルコン酸塩の口腔粘膜適用製剤の基剤として特に有用であることが示唆された。また、肉眼的観察で全く異常が見られなかった0.1%OPB-4及び-5で使用したPluronic P-85及びPluronic F-127も、オラネキシジングルコン酸塩の口腔粘膜適用製剤の基剤として使用しうることが示唆された。

実施例 5

[0103] 5. ハムスターを用いた口腔粘膜刺激性試験2

実施例4の刺激性試験において、基剤Pluronic P-123が、オラネキシジングルコン酸塩の口腔粘膜適用製剤の基剤として有用であるこ

とが示唆された。そこで、本試験では、刺激のない製剤を作製するための基剤として Pluronic P-123 を採用し、引き続き OPB 濃度及び基剤濃度の検討を行った。試験系は、ハムスター頬袋への反復投与とし、期間を 2 週間から 4 週間に延ばし実施した。

[0104] 5-1 被験物質

[0105] 5-1-1 被験物質 1

名称 : 0.1%OPB-1
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 0.50w/v%

[0106] 5-1-2 被験物質 2

名称 : 0.1%OPB-2
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 1.0 w/v%

[0107] 5-1-3 被験物質 3

名称 : 0.1%OPB-3
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 0.50w/v%
 Lipidure (登録商標) 1.0 w/v%

[0108] 5-1-4 被験物質 4

名称 : 0.1%OPB-4
 組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10w/v%
 Pluronic L-44 0.07w/v%
 Pluronic P-123 1.0 w/v%
 Lipidure (登録商標) 1.0 w/v%

[0109] 5-1-5 被験物質 5

名称	: 0.3%OPB-1	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.30w/v%
	Pluronic L-44	0.22w/v%
	Pluronic P-123	1.50w/v%
[0110]	5-1-6 被験物質6	
名称	: 0.3%OPB-2	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.30w/v%
	Pluronic L-44	0.22w/v%
	Pluronic P-123	3.0 w/v%
[0111]	5-1-7 被験物質7	
名称	: 0.3%OPB-3	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.30w/v%
	Pluronic L-44	0.22w/v%
	Pluronic P-85	1.50w/v%
[0112]	5-1-8 被験物質8	
名称	: 0.3%OPB-4	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.30w/v%
	Pluronic L-44	0.22w/v%
	Pluronic P-85	3.0 w/v%
[0113]	5-1-9 被験物質9	
名称	: 0.5%OPB-1	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.50w/v%
	Pluronic L-44	0.36w/v%
	Pluronic P-123	2.50w/v%
[0114]	5-1-10 被験物質10	
名称	: 0.5%OPB-2	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.50w/v%
	Pluronic L-44	0.36w/v%

	Pluronic P-123	5.0 w/v%
[0115] 5-1-11	被験物質11	
名称	: 0.5% OPB-3	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.50 w/v%
	Pluronic L-44	0.36 w/v%
	Pluronic P-123	2.50 w/v%
	Lipidure (登録商標)	1.0 w/v%
[0116] 5-1-12	被験物質12	
名称	: 0.5% OPB-4	
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.50 w/v%
	Pluronic L-44	0.36 w/v%
	Pluronic P-123	5.0 w/v%
	Lipidure (登録商標)	1.0 w/v%

[0117] 5-2 使用動物

入荷時8週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群3匹で試験を行った。

[0118] 5-3 試験方法

[0119] 5-3-1 被験物質適用方法

[0120] (1) 適用量

左頬袋に被験物質1mLを適用した。

[0121] (2) 適用方法

[1] ガス麻酔により麻酔を導入した [導入麻酔: 空気3.0L/minに3%イソフルラン (マイラン製薬株式会社製)]。

[2] 維持麻酔下 (濃度は適宜調整) にて動物を仰臥位に固定し、綿棒を用いて動物の頬袋を引き出し、片手で引き出した頬袋を軽くつまんだ。

[3] 生理食塩液及び綿棒で頬袋粘膜に付着した飼料等の異物を取り除き、清潔にした後頬袋を元に戻した。

[4] 1mLシリンジ及び経口投与用ゾンデを用いて、左頬袋には被験物質

1 mLを適用し、右頬袋には1 mLシリンジに取り付けた空の経口投与用ゾンデを挿入・抜去した。

〔5〕適用30秒後、被験物質が気道内へ逆流しないように動物を腹臥位に反転させ排出した。口腔内の余分な被験物質は綿棒を用いて全て除去した。

〔6〕適用部位の頬粘膜の色調等を観察・記録し、動物をケージに戻した。

〔7〕上記の操作を1日2回（朝・夕）、28日間繰り返した。

[0122] 5-3-2 検査及び観察

[0123] (1) 一般状態の観察

各群の全例について、適用期間中は、試験物質の適用前及び適用終了時に一般状態観察を行った（Day 1～Day 28）。また、適用期間終了日の翌日にも観察を行った（Day 29）。

[0124] (2) 体重測定

各群の全例において、適用期間中は、試験物質の適用前に体重を測定した（Day 1～Day 28）。また、適用期間終了日の翌日にも測定を行った（Day 29）。

[0125] (3) 適用部位の肉眼的観察方法

各群の全例の頬袋について、適用期間中は、試験物質の適用前に頬袋粘膜の状態を観察し、評点化を記録した（Day 1～Day 28）。また、適用期間終了日の翌日（ 24 ± 2 時間）にも観察を行った（Day 29）。観察部位は各試験物質の接触部位頬粘膜とした。なお、肉眼的観察の評価法は前記の表3（ISO 10993-10, Annex B.3「Table B.2 Grading system for oral and penile reactions」）に記載されている観察基準及び評価点に従って、紅斑及び痂皮形成の程度に評価点（口内炎 grade）をつけた。また、その他に見られた所見についても記録した。得られた観察結果をもとに、各群について試験物質ごとに、各動物の粘膜における評価点を合計し、観察数及び動物数で除して平均値（小数第一位四捨五入）を求め、総合評価の参考資料とした。

[0126] (4) 病理学的検査

各動物について、適用期間終了日の翌日の肉眼的観察の終了後、イソフルラン麻酔下で放血致死させ、左右頬袋を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。常法に従いHE染色の標本作製し、病理学的検査を実施した。なお、肉眼的観察の評価法はISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.3 Grading system for microscopic examination for oral, penile, rectal and vaginal tissue reaction」に記載されている基準に従って、上皮、白血球浸潤、血管充血及び浮腫の各項目について所見又はグレードを記録した。また、その他に認められた所見についても記録した。

[0127] (5) 総合評価

観察期間中の一般状態及び体重推移を参考にし、頬粘膜の肉眼的観察結果及び病理学的観察結果から得られた各試験物質の反応程度をもとにして、各試験物質の口腔粘膜への影響を総合的に評価した。

[0128] 5-4 結果

[0129] 5-4-1 一般状態

いずれの動物にも異常は認められなかった。

[0130] 5-4-2 体重

すべての群で経時的に体重が増加し、群間による差はほとんど無かった。

[0131] 5-4-3 適用部位の肉眼的観察

結果を図11に示した。全ての製剤で紅斑等の刺激性が認められなかった(評価点0)。しかし、0.3%濃度以上のOPBでは、白板様症状(角化亢進、肥厚)が認められた。一方、0.1%濃度のOPBでは全く異常が認められなかった。

[0132] 5-4-4 病理組織学的検査

結果を図12に示した。ISO 10993-10, Annex B.3 「Table B.3 Grading system for microscopic examination for oral, penile, rectal and vaginal tissue reaction」に記載されている評価基準に従って、上皮(細胞変性、化生及びびらん)、白血球浸潤、血管充血及び浮腫のグレード付けにより、個体毎の炎症指数及び群毎の炎症指数の平均を算出した。また、評価基準以

外の所見についても記録した。その結果、0.1%OPBの各群では炎症性の反応は認められなかった。0.3%濃度以上のOPB各群では、上皮の変性及び白血球浸潤が認められ、炎症指数は1~3でいずれも極小の反応であった。評価基準以外の所見として、0.1%OPB群では一部の個体に軽微~軽度の過角化が認められ、0.3%濃度以上のOPB各群では、軽微~中程度の過角化及び軽微な棘細胞増生が認められた。その他コントロール群（右頬袋：Sham-ope側）で認められた表皮内微小膿瘍は自然発症性の病変と考えられた。

実施例 6

[0133] 6. 5-FU誘発ハムスター口内炎モデルにおける効力試験1

本試験では、5-FU誘発口内炎モデルにおけるOPB製剤の効力を試験した。具体的には、5-FU誘発口内炎モデルにおいて、0.1%OPBで口腔内を含嗽した際の口腔内細菌数の経時的な測定及び口内炎評価を行った。

[0134] 6-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0135] 6-1-1 被験物質

名称：0.1%OPB

組成：オラネキシジングルコン酸塩. . . 0.10w/v%

ポリオキシエチレン（20）ポリオキシプロピレン（20）グリコール. . . 0.14w/v%

ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール. . . 0.10w/v%

[0136] 6-1-2 対照物質

名称：基剤

組成：ポリオキシエチレン（20）ポリオキシプロピレン（20）グリコール. . . 0.07w/v%

ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコ

ール. . . 0. 1 0 w / v %

[0137] 6-2 使用動物

入荷時6週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群5匹で試験を行った。

[0138] 6-3 試験方法

[0139] 6-3-1 麻酔

ガス麻酔〔導入麻酔：空気3. 0 L / m i nに3%イソフルラン（マイラン製薬株式会社製）、持続麻酔は適宜濃度を調整〕を実施した。

[0140] 6-3-2 口内炎モデル作製

麻酔下にて、5-FUを60 mg / k gとなるようにハムスターの腹腔内に投与した。投与はd a y 0、d a y 2の計2回とした。

[0141] D a y 4に麻酔下にて、ハムスターの頬袋を摘出した。頬袋に溜まっている餌・実験動物用床敷を取り除き、生理食塩液を含ませたカット綿で軽く拭き取った。精密ワイヤーブラシ（φ2. 34 mm、サンフレックス株式会社製）で頬袋の表層（角質層）をブラッシングした。ブラッシング後、頬袋を口腔内に戻した。

[0142] 6-3-3 試験物質投与

麻酔下にて、ハムスターを仰臥位に固定し、片頬袋に試験物質を1 mLずつ注入した。30秒後、試験物質を排出し、余分な頬袋内の試験物質を滅菌綿棒で吸い取った。この含嗽操作による投与は1日2回とした。投与は口内炎の障害がピークに達した後は実施しなかった。

[0143] 6-3-4 細菌採取

D a y 0、4、7、10、17において、1回目の試験物質投与前、0 h r、6 h r後の計4時点に、麻酔下で両頬袋内から滅菌綿棒を用いて細菌を採取した。但し、d a y 10、17において試験物質適用しなかった場合は、1回のみ採取とした。採取後の綿棒は5 mL S C D L P培地に浸漬後攪拌し、細菌計数用サンプルとした。

[0144] 6-3-5 生残菌数の測定

新GMP微生物試験法1)、食品衛生検査指針2)を参考にカンテン平板混釈法を実施した。

〔1〕細菌計数用サンプル500 μ Lを採取し、4.5mLの希釈液を用いて、 10^1 倍～ 10^4 倍の10倍希釈系列を作製した。

〔2〕細菌計数用サンプル原液及び各希釈菌液1mLずつ滅菌シャーレに分注した。

〔3〕上記のシャーレに、速やかに約47 $^{\circ}$ Cに設定した恒温槽で保温した測定培地(TSA+)15mLを分注した。

〔4〕測定培地の固化後、混釈平板をインキュベーター内に倒置し、コロニーが計数できるまで35 $^{\circ}$ Cで培養した(約2日間)。

〔5〕培養後、混釈平板で増殖したコロニーを目視にて計数した。コロニー数が多すぎてコロニー間の区別ができない混釈平板は、TNTC (too numerous to count) とし計数しなかった。

[0145] 6-3-6 生残菌数の算出

6-3-5の項に基づいて採用したコロニー数に希釈倍数を乗じ生残菌数(CFU/mL)を求めた。採用コロニー数は小数点以下第2位を四捨五入して表示した。下式により生残菌数(CFU/swab)を計算した。

A: 採用コロニー数

生残菌数(CFU/swab) = A \times 希釈倍数 \times サンプル液量(5mL)

[0146] さらに、生残菌数の対数値よりLog Reductionを次式で求めた。Log Reductionは小数点以下第3位を四捨五入して表示した。生残菌数1以下の対数値は0とした。

B: ベースラインの生菌数対数値

C: 試験物質塗布後の生菌数対数値

Log Reduction = B - C

[0147] 6-3-7 統計学的解析

各群の生菌数(CFU/swab)とその対数値の平均値及び標準偏差を求めた。生菌数は小数点以下第1位を四捨五入して整数で表示した。生菌数

の対数値は小数点以下第3位を四捨五入して表示した。なお、生菌数が0の場合は生菌数の対数値は0とした。また、探索試験のため検定は行わなかった。

[0148] 6-3-8 口内炎評価

以下の表4に基づき、口内炎 grade を評価した。

[0149] [表4]

Grade	状態
0	紅斑、血管拡張なし
1	紅斑及び血管拡張
2	表在性の粘膜びらんを伴う深刻な紅斑
3	粘膜潰瘍形成 (25%)
4	粘膜潰瘍形成(50%)
5	粘膜潰瘍形成(100%)

[0150] 6-4 結果

[0151] 6-4-1 細菌数

結果を表5及び図13に示す。Day 0、4、10においては、0.1% OPB群で投与後の細菌数減少が顕著であったが、口内炎の重症化が顕著であったday 7では、細菌数減少値が微量であった。

[0152]

[表5]

ハムスター口腔における生残菌数

試験物質	n	生残菌数 {Mean ± SD [Log ₁₀ (CFU/swab)]}												
		0 day			4 day			7 day			10 day			17 day
		pre	0h	6h	pre	0h	6h	pre	0h	6h	Pre	0h	6h	pre
処置なし	5	6.78	6.72	6.79	7.07	6.97	6.82	7.03	6.84	6.90	6.59	6.54	6.54	6.65
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.43	0.38	0.22	0.49	0.53	0.20	0.48	0.35	0.21	0.26	0.30	0.18	0.16
Base	5	6.61	5.95	6.10	6.62	6.08	6.30	7.12	6.89	6.68	6.61	6.67	6.85	6.68
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.52	0.39	0.39	0.42	0.09	0.20	0.07	0.29	0.23	0.59	0.57	0.31	0.56
0.1%OPB	5	6.86	4.69	4.78	6.78	5.32	6.31	7.02	6.36	6.84	6.60	5.82	6.54	6.50
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		0.42	0.15	0.68	0.30	0.25	0.55	0.19	0.44	0.35	0.35	0.27	0.32	0.27

[0153] 6-4-2 口内炎 grade

結果を図14に示した。0.1%OPB群において、口内炎 grade が顕著に低かった。

[0154] 本試験において、0.1%OPB群の day 7 の細菌数減少値が低かった原因として、細菌採取方法若しくは浸出液過多による殺菌活性の低下が考えられた。本試験において、0.1%OPBを投与し口腔内を清潔に保つことが口内炎重症化を軽減させることが示唆された。

実施例 7

[0155] 7.5-FU誘発ハムスター口内炎モデルにおける効力試験2

本試験では、5-FU誘発ハムスター口内炎モデルにおいて、0.1%オラネキシジングルコン酸塩と0.1%CHGの口内炎軽減効果を比較検討した。

[0156] 7-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0157] 7-1-1 被験物質 1

名称 : 0.1%OPB

組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10 w/v %
Pluronic L-44 0.07 w/v %

[0158] 7-1-2 被験物質 2

名称 : Peridex (登録商標) / 0.1% CHG

製造元 : 3M ESPE Dental Products

組成 : クロルヘキシジングルコン酸塩 0.12 w/v %

[0159] 7-1-3 対照物質

名称 : 基剤

組成 : ポリオキシエチレン (20) ポリオキシプロピレン (20) グリコール. . . 0.07 w/v %

[0160] 7-2 使用細菌

本試験には、口腔内の常在菌であるスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus、ATCC 番号 : 6538、Microbiologics, Inc. 社製) を用いた。

[0161] 7-3 使用動物

入荷時 6 週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群 5 匹で試験を行った。

[0162] 7-4 試験方法

[0163] 7-4-1 試験菌液の調製

[1] 保管されている細菌ペレットの入ったバイアルを取り出し室温に戻した。

[2] バイアルから細菌ペレットを 1 個取り出し、滅菌チューブに移した。

[3] 0.5 mL の生理食塩液を加えた。

[4] 滅菌綿棒で細菌ペレットを押しつぶし、菌懸濁液とした。

[5] TSA 平板に菌懸濁液を滅菌綿棒で直径約 2 cm の円形エリアに接種し、白金耳を用いて接種エリアから画線接種した。

[6] 画線接種された TSA 平板を倒置し、コロニーを形成するまで培養した。

〔7〕 形成されたコロニーの中から単一のコロニーを選び、白金線で採取してカジトン培地に穿刺した。

〔8〕 穿刺したカジトン培地を、菌の増殖が確認できるまで培養した。

〔9〕 菌の増殖を確認後、冷蔵保管した（設定値2～8℃）。

〔10〕 カジトン培地で冷蔵保管された試験菌の一部を白金線で採取し、MH B培地5 mLを入れた14 mL滅菌チューブに移し、菌が増殖するまで静置培養した。

〔11〕 培養後、培養液10 μ Lを滅菌チップで採取し、再度MH B培地5 mLを入れた14 mL滅菌チューブに移し、菌が増殖するまで静置培養した。

〔12〕 培養後、MH B培地で継代培養した試験菌培養液約5 mLを15 mLコニカルチューブに回収し、生理食塩液を8 mL添加した後、緩やかに攪拌した。

〔13〕 3000 rpm、10分間、23℃で遠心（冷却遠心機5800、ロータRS-720、株式会社久保田製作所製）し、上清を廃棄した。

〔14〕 沈殿している試験菌に蒸留水（大塚蒸留水、株式会社大塚製薬工場製）1 mLを添加し、懸濁した。

〔15〕 菌懸濁液を14 mL滅菌チューブに移し、濁度をMcFarland Standard（品番70900、シスメックス・バイオメリユ株式会社製）を用いて判定した。McFarland 5となるように、生理食塩液を加え、菌液濃度を調節した。

〔16〕 McFarland 5とした菌懸濁液を、試験菌液とした。

[0164] 7-4-2 麻酔

ガス麻酔〔導入麻酔：空気3.0 L/minに3%イソフルラン（マイラン製薬株式会社）、持続麻酔は適宜濃度を調整〕を実施した。

[0165] 7-4-3 口内炎モデル作製

麻酔下にて、5-FUを60 mg/kgとなるようにハムスターの腹腔内に投与した。投与はday 0、day 2の計2回とした。Day 4に麻酔下

にて、ハムスターの頬袋を摘出した。頬袋に溜まっている餌・実験動物用床敷を取り除き、生理食塩液を含ませたカット綿で軽く拭き取った。精密ワイヤーブラシ（φ 2.34 mm、サンフレックス株式会社製）で頬袋の表層（角質層）をブラッシングした。ブラッシング後、頬袋を口腔内に戻した。

[0166] 7-4-4 試験物質投与

麻酔下にて、ハムスター頬袋に綿棒を用いて1日2回塗布（群分け日から4日間）した。ただし、4日目は午前のみ1回投与とした。

[0167] 7-4-5 試験菌液塗布

麻酔下にて、7-4-1で調製した試験菌液を、午前の試験物質投与前にハムスター頬袋に白金耳を用いて1日1回塗布（群分け日から5日間）した。

[0168] 7-4-6 口内炎評価

前記の表4に基づき、口内炎 grade を評価した。

[0169] 7-4-7 統計学的解析

各群の grade の平均値及び標準偏差を求め、平均値のみでグラフを作成した。探索的な解析のため検定は行わなかった。

[0170] 7-5 結果

結果を図15に示した。0.1%OPB群は基剤及び0.1%CHG群と比較して口内炎重症化を軽減する傾向であった。基剤群と0.1%CHG群はほとんど同じ grade であり差は無かった。口内炎の重症化軽減効果から、0.1%OPBの方が、0.1%CHGと比較して塗布した細菌若しくは頬袋粘膜の常在菌に対する殺菌効力が優れていることが考えられた。

実施例 8

[0171] 8.5-FU・放射線照射併用により誘発されたハムスター口内炎モデルにおける効力試験

本試験では、5-FU・放射線照射併用により誘発されたハムスター口内炎モデルにおいて、Pluronic P-123を基剤とした0.1%OPB製剤を含嗽法により適用し、口内炎軽減効果を比較検討した。

[0172] 8-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0173] 8-1-1 被験物質

名称	: OPB		
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10 w/v %	
	Pluronic L-44	0.07 w/v %	
	Pluronic P-123	1.0 w/v %	

[0174] 8-1-2 対照物質

名称/略称	: 基剤/Base		
組成	: Pluronic L-44	0.07 w/v %	
	Pluronic P-123	1.0 w/v %	

[0175] 8-2 使用動物

入荷時6週齢のハムスター、Slc:Syrian、雄を用い、各群8匹で試験を行った。

[0176] 8-3 試験方法

[0177] 8-3-1 麻酔

[0178] (1) 放射線照射時

ソムノペンチル（登録商標）（共立製薬株式会社製）を40mg/kgとなるように腹腔内に投与した。

[0179] (2) 口内炎評価及び試験物質投与時

ガス麻酔〔導入麻酔：空気3.0L/minに3%イソフルラン（マイラン製薬株式会社製）、持続麻酔は適宜濃度を調整〕を実施した。

[0180] 8-3-2 口内炎モデル作製

[0181] (1) 放射線照射

Day 0にて、麻酔下でハムスターの頬袋を綿棒で摘出した。頬袋に溜まっている餌・実験動物用床敷を取り除き、生理食塩水を含ませたカット綿で軽く拭き取った。成型したアクリル板上に体、頬袋を共に固定し、照射部位の頬袋以外を鉛で覆い、〔棚板距離：12.5cm、管電圧：160 kV

、管電流：6.2 mA] の条件で放射線を照射 (40 Gy) した。但し、照射は1個体に付き片頬袋とし、各群左頬袋と右頬袋に4匹ずつとなるように振り分けた。

[0182] (2) 5-FU投与

Day 0、5、10の計3回、5-FUを60 mg/kgとなるようにハムスターの腹腔内に投与した。

[0183] 8-4-3 試験物質投与

麻酔下にて、ハムスターを仰臥位に固定し、片頬袋に試験物質を1 mLずつ注入した。30秒後、試験物質を排出し、余分な頬袋内の試験物質を滅菌綿棒で吸い取った。この含嗽操作による投与は1日2回とした。投与は口内炎の障害がピークに達した後は実施しなかった。

[0184] 8-4-4 口内炎評価

前記の表4に基づき、口内炎 grade を評価した。

[0185] 8-4-5 統計学的解析

各群の口内炎 grade の平均値及び標準偏差を求めグラフを作成した。探索的な解析のため検定は行わなかった。

[0186] 8-5 結果

結果を図16に示した。口内炎 grade の最大値は base 群が4.9、OPB群が4.3であり、さらに立ち上がりも base 群の方が早かった。モデルの強度が強かった影響も有り、day 40においても潰瘍が治らない個体もいたため完全に全例治癒はしなかったが、OPB群の方が明らかに治癒が早かった。

実施例 9

[0187] 9. ラット歯肉炎モデルにおける効力試験

本試験では、ラット歯肉炎モデルにおいて、0.1%オラネキシジングルコン酸塩の歯肉炎に対する治療効果を検討した。

[0188] 9-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0189] 9-1-1 被験物質

名称 : OPB

組成 : オラネキシジングルコン酸塩 0.10 w/v%

Pluronic L-44 0.07 w/v%

Pluronic P-123 1.0 w/v%

[0190] 9-1-2 対照物質

名称/略称 : 基剤/Base

組成 : Pluronic L-44 0.07 w/v%

Pluronic P-123 1.0 w/v%

[0191] 9-2 使用細菌

本試験には、歯肉炎起因菌であるポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*、ATCC番号: 33277、Microbiologics, Inc.社製) を用いた。

[0192] 9-3 使用動物

入荷時5週齢のラット、Jcl:Wistar、雄を用い、各群5匹で試験を行った。

[0193] 9-4 試験方法

[0194] 9-4-1 試験菌の調製 (保存以外のすべての操作は嫌気チャンバー内で行った)

[1] 保管されている細菌ペレットの入ったバイアルを取り出し嫌気チャンバーに入れた。

[2] バイアルから細菌ペレットを1個取り出し、滅菌チューブに移した。

[3] 0.5 mLの調製TSB培地を加えた。

[4] 滅菌綿棒で細菌ペレットを押しつぶし、菌懸濁液とした。

[5] 菌懸濁液をCDC嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地に接種した。

[6] 嫌気条件下 (37℃) で3~4日間培養した。

[7] 形成されたコロニーの中から単一のコロニーを選び、再度同様にCDC嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地に接種した。

〔8〕菌の増殖を確認後、3 mLの調製TSB培地を加えスプレッダーで懸濁し、グリセロールストックを作製した。

〔9〕上記ストックを冷凍保存した。

〔10〕ストックからCDC嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地に接種し嫌気条件下で培養した。

〔11〕菌の増殖を確認後、適量の調製TSB培地で懸濁し、一部を取りだし濁度をMcFarland Standardを用いてMcFarland 5とした。希釈倍率を計算し、残存している懸濁液から 1×10^{10} CFU/mLとなるように菌液濃度を調整した。

〔12〕上記を試験菌液とした。

[0195] 9-4-2 麻酔

[0196] (1) カタン糸挿入、剖検時

ペントバルビタールナトリウム水溶液を腹腔内に40 mg/kg投与した。

[0197] (2) 細菌接種、試験物質投与

ガス麻酔〔導入麻酔：空気1.0 L/minに5%イソフルラン（マイラン製薬株式会社）、持続麻酔は適宜濃度を調整〕を実施した。

[0198] 9-4-3 カタン糸挿入

麻酔後、専用台に背位で固定し下顎を持ち上げ、上顎右第一臼歯と第二臼歯の間にカタン糸を挿入した。

[0199] 9-4-4 細菌接種

麻酔後、試験菌液0.2 mLをカタン糸挿入部位に接種した。この操作は2時間おきに実施した。

[0200] 9-4-5 試験物質投与

麻酔後、試験物質1 mLを口腔内に洗浄投与した。この操作は1日2回とした。

[0201] 9-4-6 観察及び検査

[0202] (1) 一般状態

カタン糸挿入日から剖検日まで1日1回実施した。

[0203] (2) 体重測定

カタン糸挿入日から剖検時まで計2回実施した。

[0204] (3) 剖検

麻酔下で、腹大動脈を切断し放血死させ、剖検を行った。

[0205] (4) 病理組織学的検査

摘出した上顎を10v/v%中性緩衝ホルマリン液で固定し、脱脂、脱灰後、HE染色標本を作製した。各標本につき炎症性変化について病理検査した。

[0206] 9-4-7 統計学的解析

各群の体重の平均値及び標準偏差を算出する。検定は行わなかった。

[0207] 9-5 結果

一般状態に異常は認められず、体重に群間の差は無かった。

病理学的検査結果を図17に示した。また、HE染色標本の顕微鏡写真を図18に示す。

OPB投与群では、歯肉の重層扁平上皮における好中球の浸潤が8/10例、細胞間水腫が1/10例及び潰瘍が1/10例で何れも軽微に認められた。歯肉の固有層における好中球の浸潤が8/10例及び出血が1/10例で何れも軽微に認められた。一方、base投与群では、歯肉の重層扁平上皮における好中球の浸潤が軽微8/10例及び軽度2/10例で認められた。細胞間水腫が2/10例、過角化が2/10例、表皮肥厚が2/10例及び潰瘍が1/10例で何れも軽微に認められた。歯肉の固有層における好中球の浸潤が軽微6/10例及び軽度3/10例で認められた。出血及び水腫が何れも1/10例で軽微に認められた。

[0208] 9-6 考察

歯肉の重層扁平上皮における好中球の浸潤、細胞間水腫、過角化、表皮肥厚及び固有層における好中球の浸潤及び水腫はいずれも炎症に関連した変化であり、処置に起因して生じたと考えられた。これらの何れの変化もbas

e投与群と比較してOPB投与群で頻度及び程度共に低い傾向にあったことから、OPB投与による炎症軽減効果が認められた。

実施例 10

[0209] 10. ラット肺炎モデルにおける効力試験

本試験では、ラットの誤嚥性肺炎モデルにおいて、0.1%オラネキシジングルコン酸塩の肺炎に対する治療効果を検討した。

[0210] 10-1 試験物質

被験物質と対照物質を合わせて試験物質とした。

[0211] 10-1-1 被験物質

名称	: OPB		
組成	: オラネキシジングルコン酸塩	0.10w/v%	
	Pluronic L-44	0.07w/v%	
	Pluronic P-123	1.0w/v%	

[0212] 10-1-2 対照物質

名称/略称	: 基剤/Base		
組成	: Pluronic L-44	0.07w/v%	
	Pluronic P-123	1.0w/v%	

[0213] 10-2 使用動物

入荷時7週齢のラット、CrI:CD(SD)、雄を用いて試験を行った。

[0214] 10-3 群構成

気管内投与日の朝に体重を測定し、層別無作為化割付により以下の表6に示す4群(1~4群)に割り付けた。割付から外れた6匹を層別無作為化割付により以下の表6に示す2群(5, 6群)に割り付け、唾液採取用個体とした。

[0215]

[表6]

群番号	投与物質	BALF 採取時期 (気管内投与後の経過時間)	n 数
1	唾液(5 群から採取)	6h	6
2	唾液(5 群から採取)	24h	6
3	唾液(5 群から採取)	6h	6
4	唾液(5 群から採取)	24h	6

BALF 回収用個体

群番号	口腔内洗浄 (試験物質)	n 数
5	OPB	3
6	Base	3

唾液採取用個体

[0216] 10-4 試験方法

[0217] 10-4-1 麻酔

[0218] (1) 口腔内洗浄、唾液採取

ソムノペンチルを腹腔内に40mg/kgとなるように投与した。

[0219] (2) 気管内投与時、気管支肺胞洗浄液(BALF)採取時

ガス麻酔[導入麻酔: 空気3.0L/minに3%イソフルラン(マイラン製薬株式会社)、持続麻酔は適宜濃度を調整]を実施した。

[0220] 10-4-2 口腔内洗浄

麻酔下で、試験物質を滅菌綿棒に含浸させ口腔内に十分量塗布した。

[0221] 10-4-3 唾液採取

麻酔下で、0.1%塩酸ピロカルピン(5mg/kg)を腹腔内投与した。過剰分泌される唾液を回収した。回収した唾液は、中和剤入り栄養培地に加え静置した。その後、遠心(r.t., 3000rpm, 10min)し、沈渣を同量の生理食塩液で懸濁し、気管内投与液とした。

[0222] 10-4-4 気管内投与

唾液採取後、麻酔下で咽頭鏡を用い気管内に投与用チューブを留置し、唾

液若しくは生理食塩液を0.1 mL投与した。

[0223] 10-4-5 BALF採取

気管内投与6, 24時間後、麻酔下で正中切開し、腹大動脈切開により放血し安楽死させた。その後、肺を露出させ、気管支起始部にカテーテルを挿入した。そのラインから0.1%BSA、0.05 mM EDTA-2Na含有PBS溶液（以下、PBS）8 mLで3回洗浄し（各回2回注入回収を繰り返す）、洗浄液を採取した（BALF）。BALFを遠心（200 g, 4°C, 10 min）し、上清は別の保存チューブに分取し、LDH濃度測定、サイトカイン類測定（ELISA）用とした。沈渣はPBS 1 mLで懸濁し血液学的検査用とした。

[0224] 10-4-6 唾液採取用動物の取扱

気管内投与終了後、唾液採取用の動物は過麻酔下で放血させ安楽死させた。

[0225] 10-4-7 サイトカイン（TNF- α 、IL-6）濃度測定

キット添付のプロトコールに従い測定した。

[0226] 10-4-8 血液学的検査

懸濁した沈渣に対して、多項目自動血球計数装置を用いて血液学的解析を実施した。

[0227] 10-4-9 生化学的検査

採取したBALF上清に対して、自動分析装置7180（株式会社日立ハイテクノロジーズ）を用いLDH濃度を測定した。

[0228] 10-4-10 統計学的解析

探索的な解析のため検定は行わなかった。

[0229] 10-5 結果

血液学的検査及び生化学的検査の結果を図19に示した。

血液学的検査からは両群間に差が無かった。IL-6に関しては24時間値においてOPB群で2.5倍ほど低い値となった。TNF- α に関しては、両時点でOPB群の方が低い値となった。

したがって、OPBで口腔内を処理した方が、唾液の誤嚥による肺での炎症性反応は低いことが示唆された。

実施例 11

[0230] 11. オラネキシジンのTLR Reporter Cell Lineを用いた抗炎症作用の検討
実施例6～10より、オラネキシジンには口内炎、歯肉炎、肺炎に対して抗炎症作用を有することが示された。炎症は、LPSやLTAを認識する受容体であるToll-like receptor 4 (TLR-4)、Toll-like receptor 2 (TLR-2)を介した免疫応答と関連していることが明らかになっている (ChemMedChem, 2016 Jan 19;11(2):154-65、Biotechnol Adv, 2012 Jan-Feb;30(1):251-60、J Dent Res, 2016 Jul;95(7):725-33)。

オラネキシジンは、TLR-4及びTLR-2に対するアンタゴニスト(様)作用によって炎症を抑えている可能性がある。そこで、本試験ではこのことを明らかにするため、TLR-4、TLR-2やレポーター遺伝子(SEAP)を安定発現したヒト由来細胞を用いたレポーターアッセイにより、オラネキシジンのTLR-4及びTLR-2に対するアンタゴニスト(様)作用を確認する。

[0231] 11-1 被験物質

名称 : 1.5%OPB

組成 : オラネキシジングルコン酸塩 1.5w/v%

[0232] 11-2 細胞

以下の表7に記載の細胞を用いた。

[0233]

[表7]

名称 (略称)	宿主細胞	発現遺伝子	カタログ番号/ 入手元	培地
TLR4/MD-2/CD14 Reporter Cell Line (HEK-TLR4)	HEK293 (ヒト胎 児腎由来)	human Toll-like receptor 4 (TLR4)、human MD-2、human CD14、secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene under the transcriptional control of a NF-κB response element	NBP2-26503/ Novus Biologicals, LLC	DMEM (4.5 g/L glucose) + 10% FBS + 4 mM L-glutamine + 1 mM sodium pyruvate + 100 unit/mL penicillin* + 100 μg/mL streptomycin* + 10 μg/mL blastcidin** + 2 μg/mL puromycin** + 200 μg/mL zeocin** + 500 μg/mL G418**
TLR2 Reporter Cell Line (HEK-TLR2)	HEK293 (ヒト胎 児腎由来)	human Toll-like receptor 2 (TLR2)、secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene under the transcriptional control of a NF-κB response element	NBP2-26274/ Novus Biologicals, LLC	DMEM (4.5 g/L glucose) + 10% FBS + 4 mM L-glutamine + 1 mM sodium pyruvate + 100 unit/mL penicillin* + 100 μg/mL streptomycin* + 10 μg/mL blastcidin** + 500 μg/mL G418**

*必要に応じて加える。

**セレクション試薬

[0234] 11-3 試験方法

[0235] 11-3-1 オラネキシジンのTLR-4に対するアンタゴニスト (様)
作用の検討

[0236] -使用細胞: HEK293-TLR4発現細胞

-使用培地

前培養: DMEM+FBS (終濃度10%) +ペニシリン (終濃度100 unit/mL) +ストレプトマイシン (終濃度100 μg/mL)

サンプル投与、投与後培養: DMEM+FBS (終濃度5%)

-活性測定: SEAP assay kit (Novus Biologicals社製)

-タンパク量定量: BCA protein assay (フナコシ株式会社製)

[0237] [1] 細胞を 1.0×10^5 cell/well/100 μLになるよう、10%FBSDMEMで調整し、96well plate (コラーゲン処理) に撒いて、40h培養 (37℃、5%CO₂)。

[2] 1.5%OPBを、以下の表8に示す濃度になるよう5%FBSを用いて希釈する。

[0238]

[表8]

	OPB 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
調製濃度	20, 10, 5, 2
終濃度	10, 5, 2.5, 1

[0239] [3] LPSを $20\text{ ng}/\text{mL}$ (終濃度 $10\text{ ng}/\text{mL}$) になるよう5% FBSを用いて調製する。

[4] 培地を除去後、OPB培地 $50\ \mu\text{L}$ 、LPS培地 $50\ \mu\text{L}$ の順番で培地を加え、8h培養 (37°C 、5% CO_2)。

[5] 培養後、上清を $50\ \mu\text{L}$ 別の96well plateに移し、SEAP assayを行う。

[6] 上清の残りを除去した96well plateに、0.1% SDS - 0.1N NaOHを $50\ \mu\text{L}$ 加えて、overnightで凍結 (-20°C) させる。融解後、BCA protein assayを行う。

[7] レポーター遺伝子であるSEAPの発現量をタンパク質濃度で校正し、OPB濃度毎の阻害率を算出した。

[0240] 11-3-2 オラネキシジンのTLR-2に対するアンタゴニスト (様) 作用の検討

[0241] -使用細胞: HEK293-TLR2発現細胞

-使用培地

前培養: DMEM+FBS (終濃度10%) +ペニシリン (終濃度100 unit/mL) +ストレプトマイシン (終濃度 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)

サンプル投与、投与後培養: DMEM+FBS (終濃度1%)

-活性測定: SEAP assay kit (Novus Biologicals社製)

-タンパク量定量: BCA protein assay (フナコシ株式会社製)

[0242] [1] 細胞を $1.0 \times 10^5\ \text{cell}/\text{well}/100\ \mu\text{L}$ になるよう、10% FBS DMEMで調整し、96well plate (コラーゲン処

理)に撒いて、36 h培養(37℃、5%CO₂)。

[2] 1. 5%OPBを、前記表8に示す濃度になるよう1%FBSを用いて希釈する。

[3] LTAを2 μg/mL(終濃度1 μg/mL)になるよう1%FBSを用いて調製する。

[4] 培地を除去後、OPB培地50 μL、LTA培地50 μLの順番で培地を加え、12 h培養(37℃、5%CO₂)。

[5] 培養後、上清を50 μL別の96well plateに移し、SEAP assayを行う。

[6] 上清の残りを除去した96well plateに、0.1%SDS-0.1N NaOHを50 μL加えて、overnightで凍結(-20℃)させる。融解後、BCA protein assayを行う。

[7] レポーター遺伝子であるSEAPの発現量をタンパク質濃度で校正し、OPB濃度毎の阻害率を算出した。

[0243] 11-4 結果

結果を図20に示す。

OPB濃度が上昇するにしたがい、SEAPの阻害率が高まっており(IC₅₀:約10 μg/mL)、OPBが、TLR4、TLR2に対するアンタゴニスト(様)作用を示すことが明らかになった。この結果より、OPBが、TLR4、TLR2を介した免疫応答を阻害することにより、抗炎症作用を有することが示唆された。

実施例 12

[0244] 12. マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7を用いたオラネキシジンの抗炎症作用の検討

マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7は、LPSやLTAで刺激すると、それらを認識する受容体を介して免疫応答を開始し、炎症性メディエーターであるNOの産生を行う。そこで、オラネキシジンがLPS刺激による炎症に対する抗炎症作用を有するかどうかを、RAW264.7細胞

からのNO産生を指標として確認する。

[0245] 12-1 被験物質

名称 : 1.5% OPB

組成 : オラネキシジングルコン酸塩 1.5 w/v %

[0246] 12-2 細胞

以下の表9に記載の細胞を用いた。

[0247] [表9]

名称	動物種	組織	カタログ番号等/入手元	培地
RAW 264.7	マウス、BALB/c	Leukemic monocyte	EC91062702-F0/D Sファーマ バイオメディカル株式会社	DMEM + 10% FBS + 100 unit/mL penicillin* + 100 µg/mL streptomycin*

*必要に応じて加える。

[0248] 12-3 試験方法

[0249] 12-3-1 オラネキシジンのLPS刺激に対する抗炎症作用の検討

[0250] -使用細胞 : RAW 264.7

-使用培地

前培養 : DMEM + FBS (終濃度 10%) + ペニシリン (終濃度 100 unit/mL) + ストレプトマイシン (終濃度 100 µg/mL)

サンプル投与、投与後培養 : DMEM + FBS (終濃度 5%) - 活性測定 : Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Griess Reagents社製)

-タンパク量定量 : 細胞を染色しにくく、値が不安定になるため測定せず。

[0251] [1] 細胞を 1.0×10^5 cell/well / 100 µL になるよう、10% FBS DMEM で調整し、96 well plate (無処理) に撒いて、24 h 培養 (37°C、5% CO₂)。

[2] 1.5% OPB を、前記表8に示した濃度になるよう 5% FBS を用いて希釈する。

[3] LPS を 200 ng/mL (終濃度 100 ng/mL) になるよう 5% FBS を用いて調製する。

[4] 培地を除去後、OPB 培地 50 µL、LPS 培地 50 µL の順番で培

地を加え、8 h 培養 (37°C、5%CO₂)。

[5] 培養後、上清を50 μL別の96well plateに移し、Nitrate/Nitrite colorimetric assayを行う。

[0252] 12-3-2 オラネキシジンの大腸菌 (LPS 産生菌) 刺激に対する抗炎症作用の検討

[0253] -使用細胞: RAW264.7

-使用培地

前培養: DMEM+FBS (終濃度10%) +ペニシリン (終濃度100 unit/mL) +ストレプトマイシン (終濃度100 μg/mL)

サンプル投与、投与後培養: DMEM+FBS (終濃度1%)

-活性測定: Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Griess Reagents社製)

-タンパク量定量: 細胞を染色しにくく、値が不安定になるため測定せず。

[0254] [1] 細胞を 1.0×10^5 cell/well/100 μLになるよう、10%FBS DMEMで調整し、96well plate (無処理) に撒いて、24 h 培養 (37°C、5%CO₂)。

[2] 1.5%OPBを、前記表8に示した濃度になるよう1%FBSを用いて調製する。

[3] 培地を除去後、OPB培地50 μLを加え、37°C、5%CO₂で静置する。

[4] MHBで一晩培養した大腸菌を、McF 1になるよう調製し、5%DMEMで300倍希釈する。更に、Ampicillinを終濃度50 μg/mLになるよう添加する。

[5] OPB培地を添加したプレートに、更に調製した菌培地50 μLを加え、密閉して24 h 培養する (37°C、5%CO₂)。

[6] 培養後上清を50 μL別の96well plateに移し、Nitrate/Nitrite colorimetric assayを行う

。

[0255] 12-4 結果

結果を図21に示す。

OPB濃度が上昇するにしたがい、NO産生が減少しており、OPBがNO産生阻害作用を示すことが明らかになった（ IC_{50} ：約 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。この結果より、OPBが抗炎症作用を有することが示唆された。

産業上の利用可能性

[0256] 本発明により、広範な炎症性疾患に適用可能な、炎症の改善用及び／又は予防用の組成物が提供される。また、本発明の組成物をがんの治療による口腔粘膜炎の改善用及び／又は予防用の組成物として用いることで、化学療法、放射線治療を受けている患者のコミュニケーション機能の阻害、睡眠障害、疼痛、嚥下障害（食事摂取量の減少）などのQOLの低下や、化学療法、放射線治療のDose遵守妨害を防ぐことができるため、産業上の有用性は高い。

請求の範囲

- [請求項1] オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩を含む、炎症の改善用及び／又は予防用の組成物。
- [請求項2] オラネキシジン又はその薬理学上許容される塩が、オラネキシジングルコン酸塩であることを特徴とする請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] ポリオキシプロピレン鎖（POP）及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーをさらに含むことを特徴とする請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 炎症が、口内炎、口腔粘膜炎、歯肉炎、及び肺炎から選択されることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の組成物。
- [請求項5] 炎症ががんの治療による口腔粘膜炎であり、
0.01～1.5%（W/V）のオラネキシジングルコン酸塩と、
ポリオキシプロピレン鎖（POP）及び該POPを挟む2個のポリオキシエチレン鎖（POE）からなるブロック共重合体であるポロキサマーと
を含むことを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の組成物。
- [請求項6] ポロキサマーが、ポリオキシエチレン（42）ポリオキシプロピレン（67）グリコール（Pluronic P-123）、ポリオキシエチレン（54）ポリオキシプロピレン（39）グリコール（Pluronic P-85）、及びポリオキシエチレン（196）ポリオキシプロピレン（67）グリコール（Pluronic F-127）から選択されることを特徴とする請求項3～5のいずれかに記載の組成物。
- [請求項7] ポロキサマーが、ポリオキシエチレン（42）ポリオキシプロピレン（67）グリコール（Pluronic P-123）であることを特徴とする請求項6に記載の組成物。
- [請求項8] オラネキシジングルコン酸塩の濃度が、0.05～0.5%（W/V）

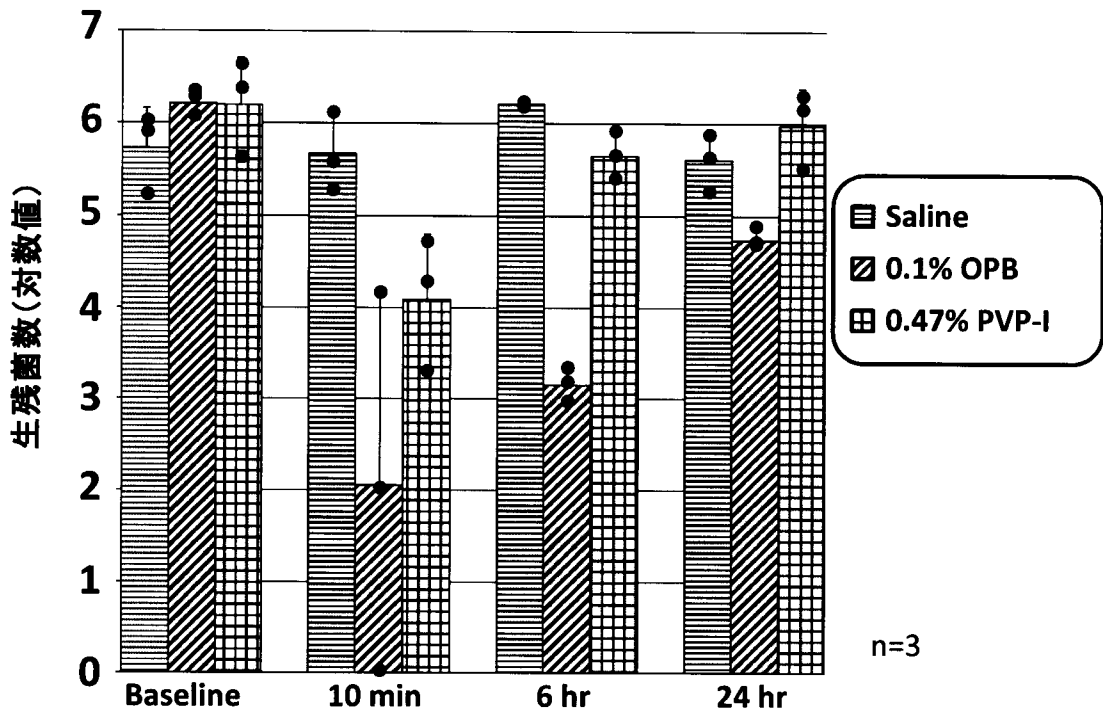
V)であることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の組成物。
。

[請求項9] ポロキサマーの濃度が、0.1～5.0% (W/V)であることを特徴とする請求項3～8のいずれかに記載の組成物。

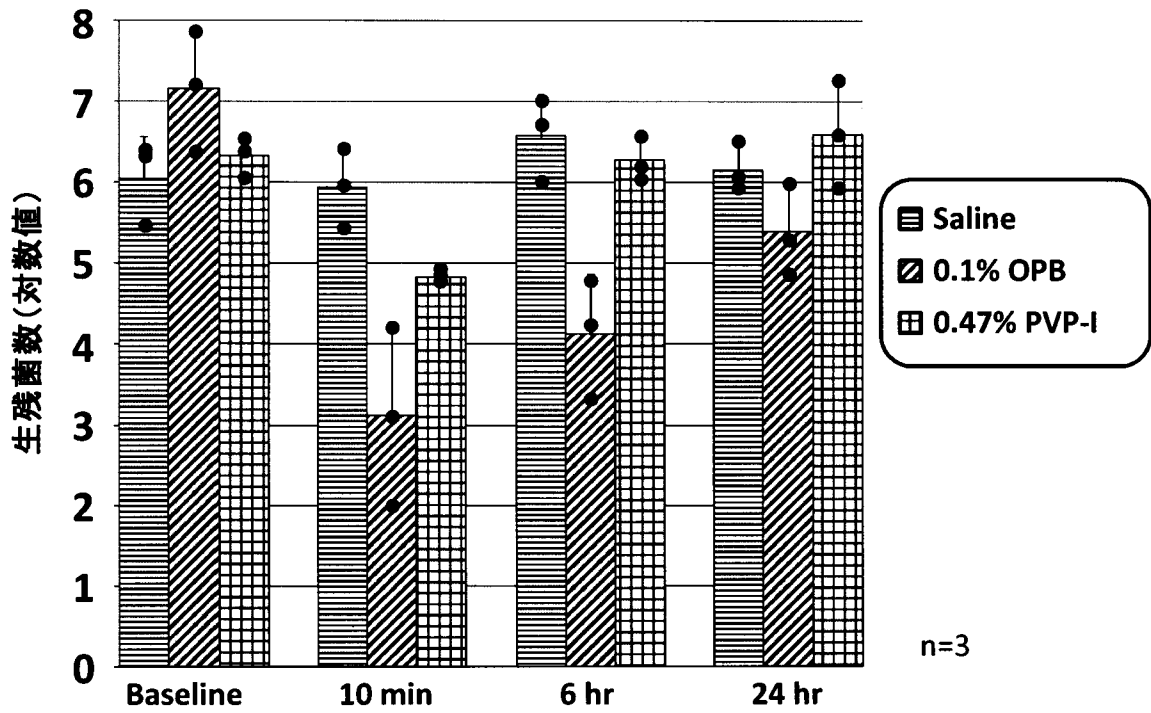
[請求項10] 液剤又は含嗽剤であることを特徴とする、請求項1～9のいずれかに記載の組成物。

[請求項11] がんの治療が、化学療法、放射線治療、又は化学療法と放射線治療との同時併用療法であることを特徴とする、請求項5～10のいずれかに記載の組成物。

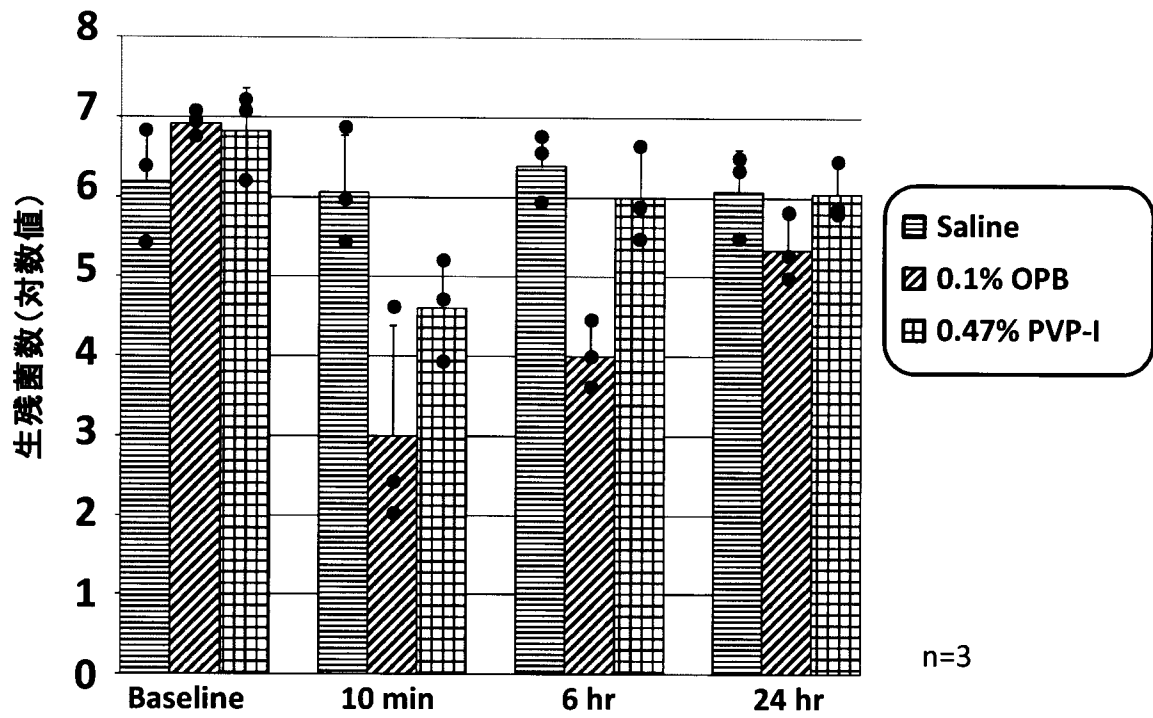
[图1]



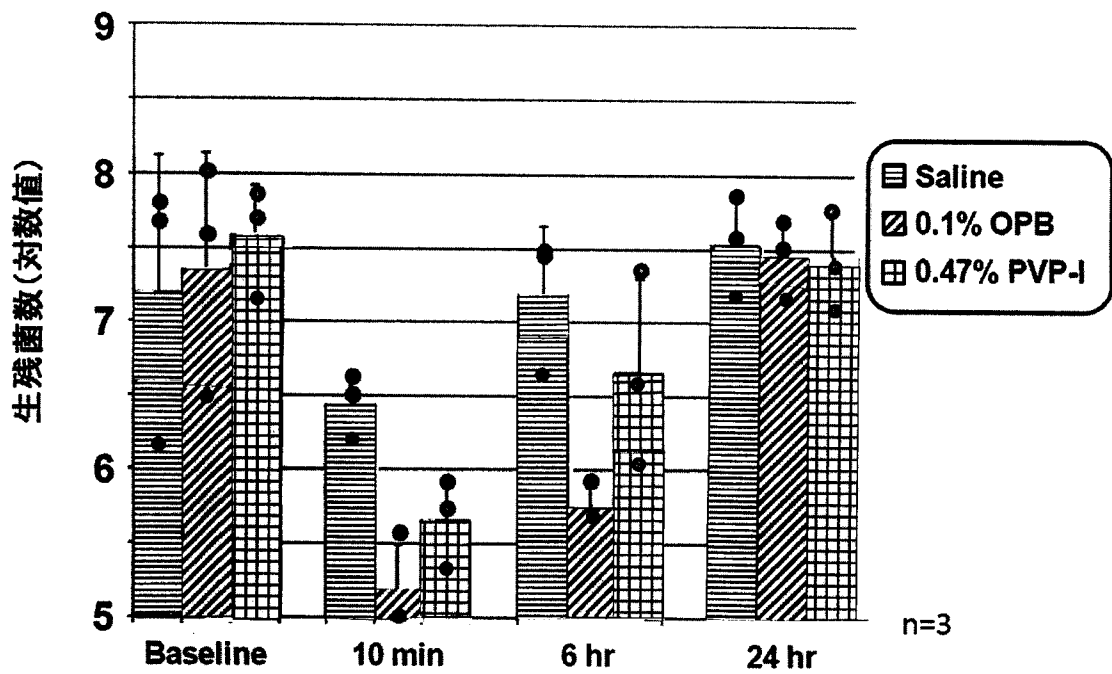
[图2]



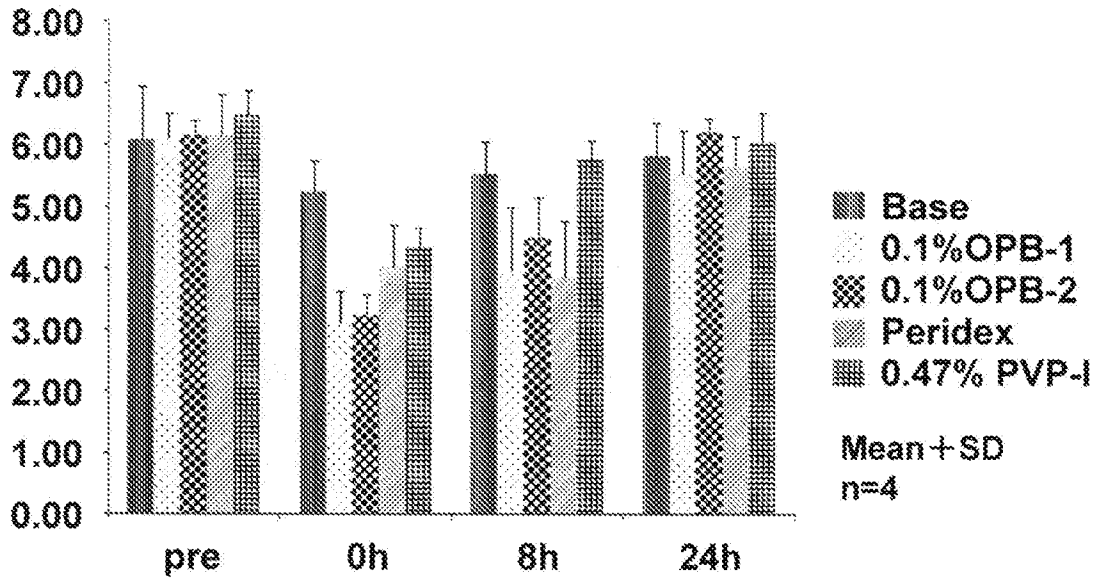
[图3]



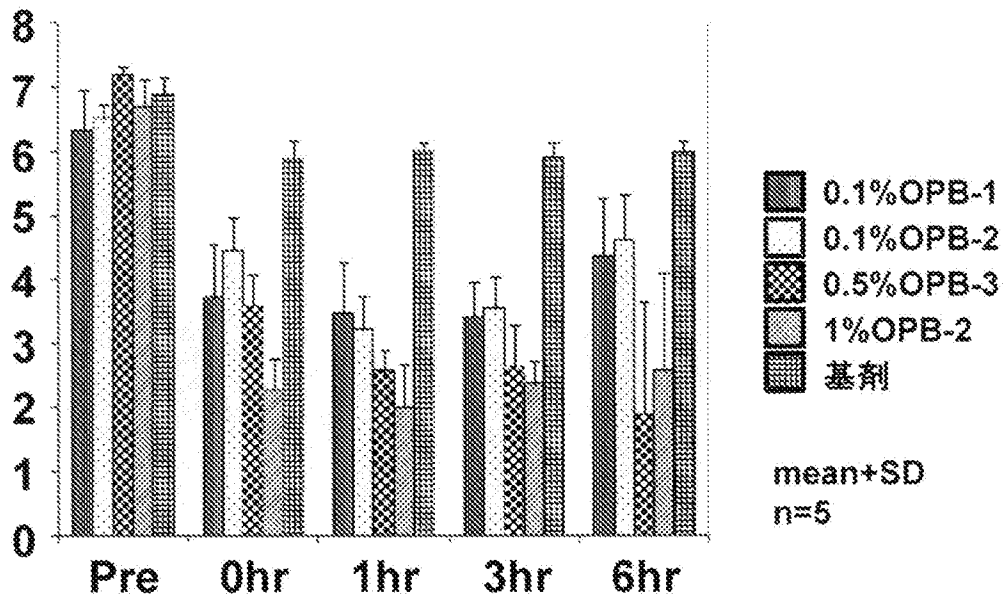
[图4]



[図5]



[図6]



[図9A]

Photo 1 0.1%OPB-1 群

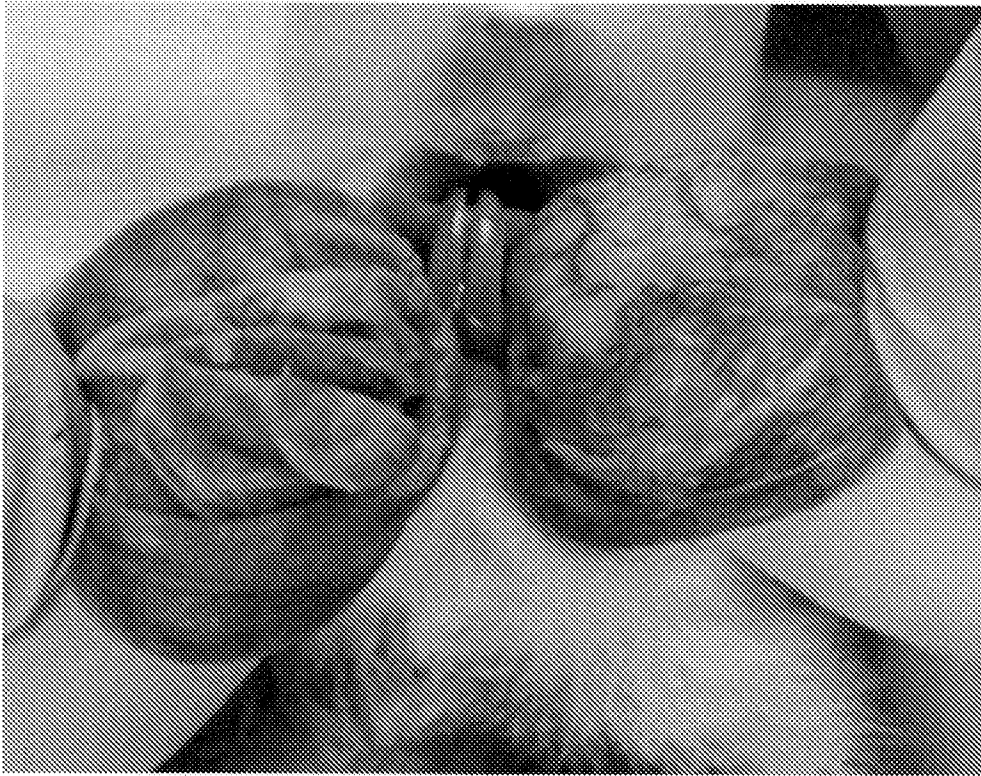


Photo 2 0.1%OPB-2 群



[9B]

Photo 3 0.1%OPB-3 群

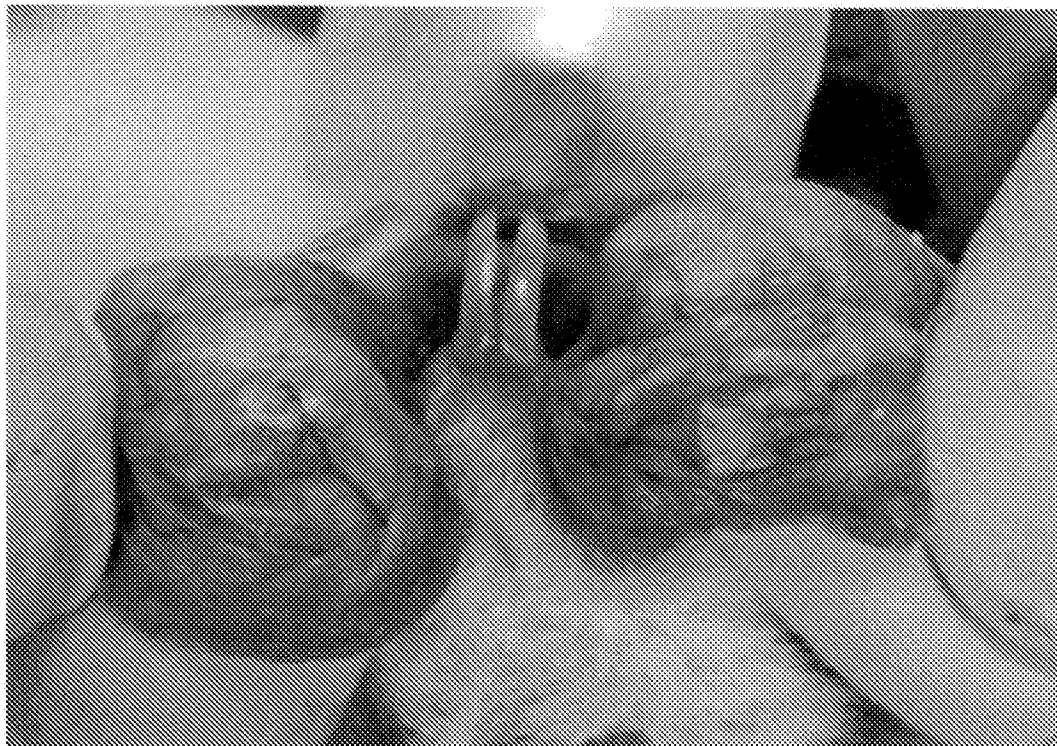
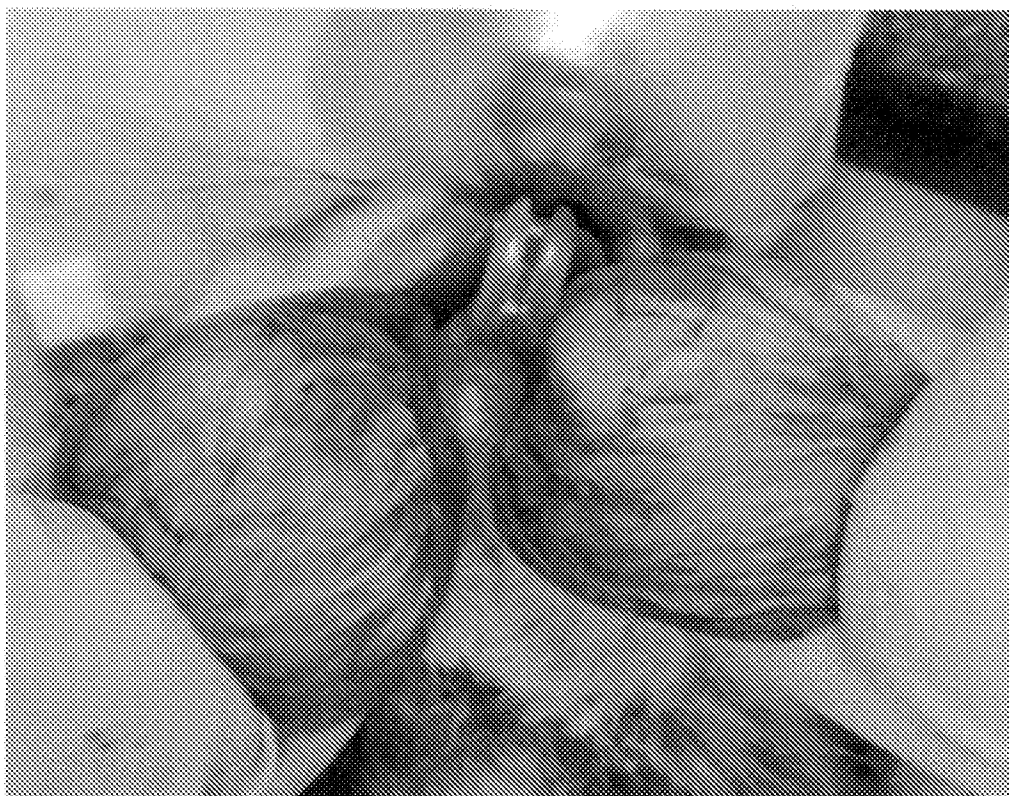


Photo 4 0.1%OPB-4 群



[図9C]

Photo 5 0.1%OPB-5 群



Photo 6 0.1%OPB-6 群



[9D]

Photo 7 0.1%OPB-7 群



Photo 8 0.1%OPB-8 群



[図10]

器官:	Group	0.1% OPB-1			0.1% OPB-2			0.1% OPB-3			0.1% OPB-4			0.1% OPB-5		
		Animal No.			4 5 6			7 8 9			10 11 12			13 14 15		
病理組織学的所見	Sample No.	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
右頬袋、口腔粘膜																
上皮(細胞変性、化生、びらん)		0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
白血球浸潤		2	1	2	1	3	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1
血管の鬱血		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数		2	1	3	1	4	2	0	0	0	0	3	0	0	2	2
平均Grade		2			2			0			1			1		
他の所見																
細胞間浮腫		-	-	±	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
角化亢進		+	+	+	+	+	+	-	-	-	±	±	±	±	±	±

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe
+:バラ角化

器官:	Group	0.1% OPB-6			0.1% OPB-7			0.1% OPB-8		
		Animal No.			19 20 21			22 23 24		
病理組織学的所見	Sample No.	32	34	36	38	40	42	44	46	48
右頬袋、口腔粘膜										
上皮(細胞変性、化生、びらん)		1	1	1	1	1	1	1	1	1
白血球浸潤		1	1	2	1	1	2	3	2	2
血管の鬱血		0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫		0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数		2	2	3	2	2	3	4	3	3
平均Grade		2			2			3		
他の所見										
細胞間浮腫		-	-	-	-	-	-	±	-	-
角化亢進		+	+	+	+	+	+	+	+	+

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe
+:バラ角化

器官:	Group	Control(DW)																								
		Animal No.																								
病理組織学的所見	Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
右頬袋、口腔粘膜		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
上皮(細胞変性、化生、びらん)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2
白血球浸潤		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管の鬱血		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2
平均Grade		0																								
他の所見																										
細胞間浮腫		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
角化亢進		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

[図12]

器官:	Group		0.1% OPB-1			0.1% OPB-2			0.1% OPB-3			0.1% OPB-4			0.3% OPB-1			0.3% OPB-2		
	Animal No.	Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	19	20	21	22	23	24
	1L	2L	3L	4L	5L	6L	7L	8L	9L	10L	11L	12L	19L	20L	21L	22L	23L	24L		
右頬袋、口腔粘膜																				
上皮(細胞変性、化生、びらん)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
白血球浸潤			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
血管の鬱血			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	1	0
平均Grade			0			0			0			0			2			1		
他の所見																				
細胞間浮腫			±	-	-	±	-	±	-	+	-	-	-	±	+	+	2+	+	+	+
角化亢進			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
表皮内微小膿瘍			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

器官:	Group		0.5% OPB-1			0.5% OPB-2			0.5% OPB-3			0.5% OPB-4		
	Animal No.	Sample No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
	31L	32L	33L	34L	35L	36L	37L	38L	39L	40L	41L	42L		
右頬袋、口腔粘膜														
上皮(細胞変性、化生、びらん)			1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
白血球浸潤			2	1	2	0	0	0	1	1	1	0	1	1
血管の鬱血			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数			3	2	3	1	1	1	2	2	2	0	2	2
平均Grade			3			1			2			1		
他の所見														
細胞間浮腫			2+	2+	2+	2+	+	±	2+	2+	2+	+	2+	2+
角化亢進			±	±	±	-	-	-	-	±	±	-	-	±
表皮内微小膿瘍			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

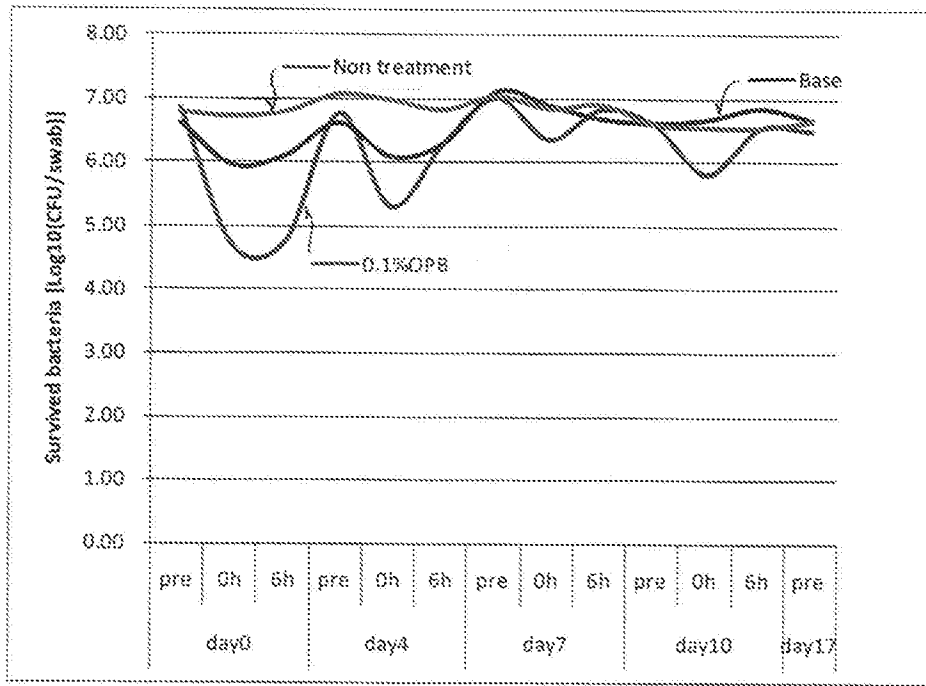
器官:	Group		Control																								
	Animal No.	Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	1R	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	11R	12R	13R	14R	15R	16R	17R	18R	19R	20R	21R	22R	23R	24R			
右頬袋、口腔粘膜			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
上皮(細胞変性、化生、びらん)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
白血球浸潤			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管の鬱血			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均Grade			0																								
他の所見																											
細胞間浮腫			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
角化亢進			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
表皮内微小膿瘍			-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

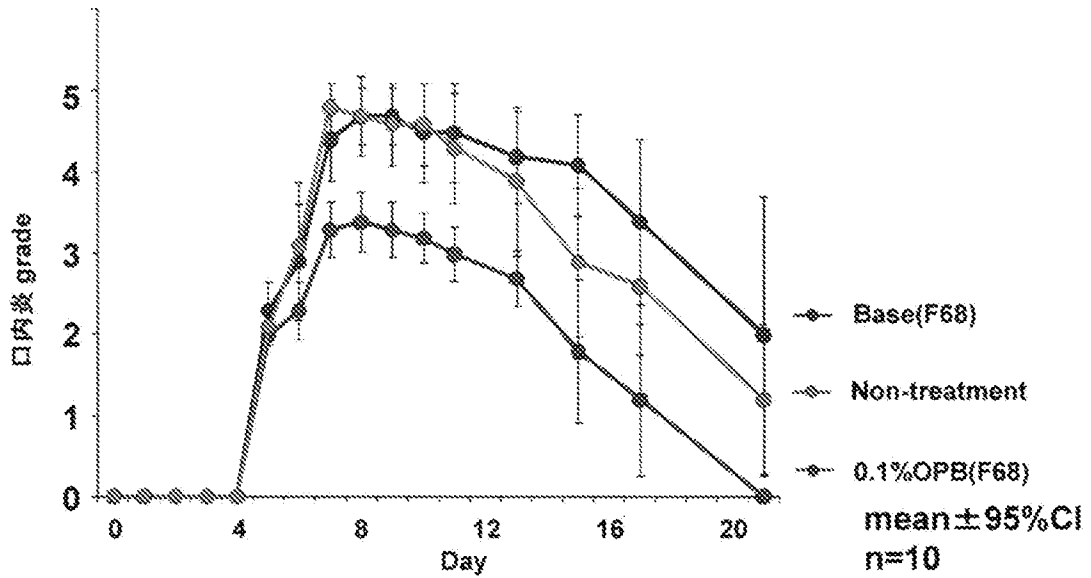
器官:	Group		Control											
	Animal No.	Sample No.	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
	31R	32R	33R	34R	35R	36R	37R	38R	39R	40R	41R	42R		
右頬袋、口腔粘膜			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
上皮(細胞変性、化生、びらん)			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
白血球浸潤			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
血管の鬱血			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浮腫			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症指数			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均Grade			0											
他の所見														
細胞間浮腫			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
角化亢進			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
表皮内微小膿瘍			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-

他の所見におけるGrade: -: within normal limited, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

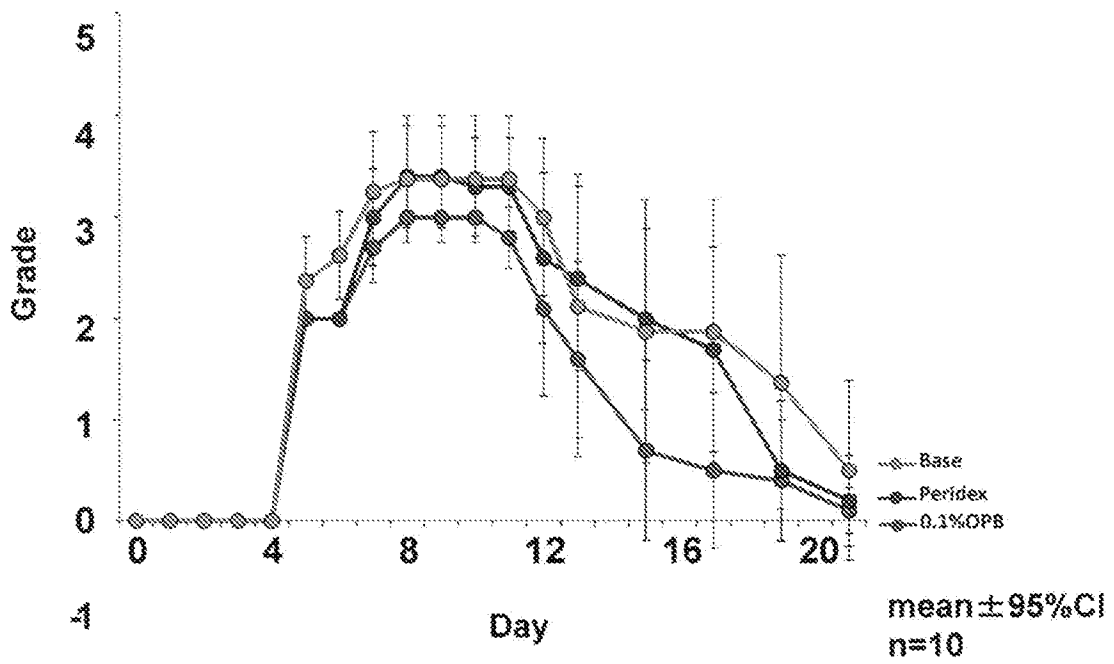
[圖13]



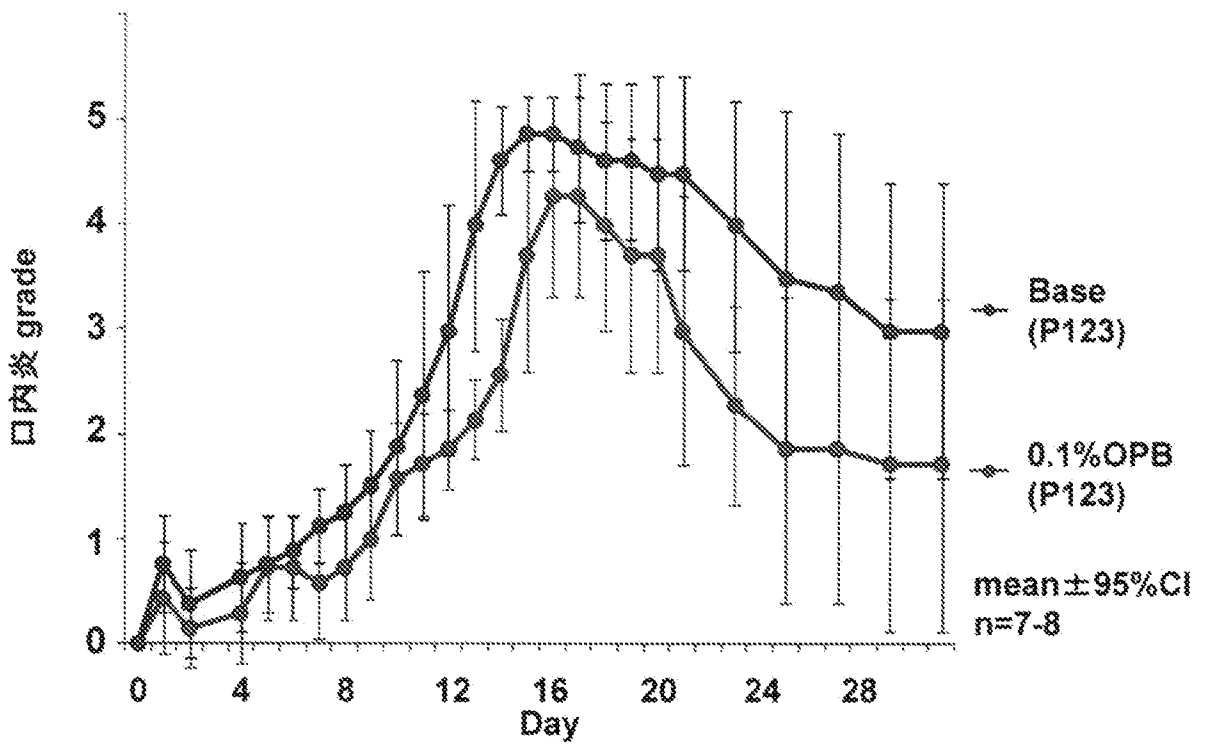
[圖14]



[図15]



[図16]

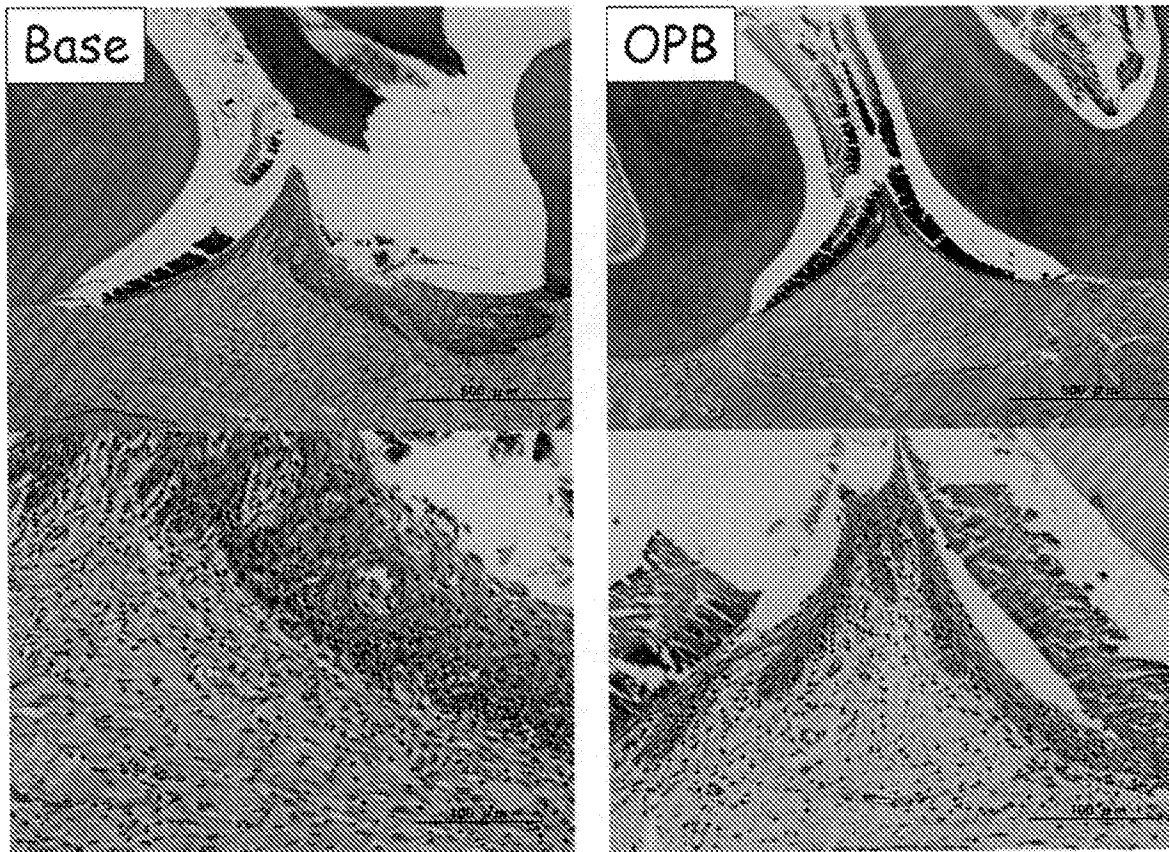


[図17]

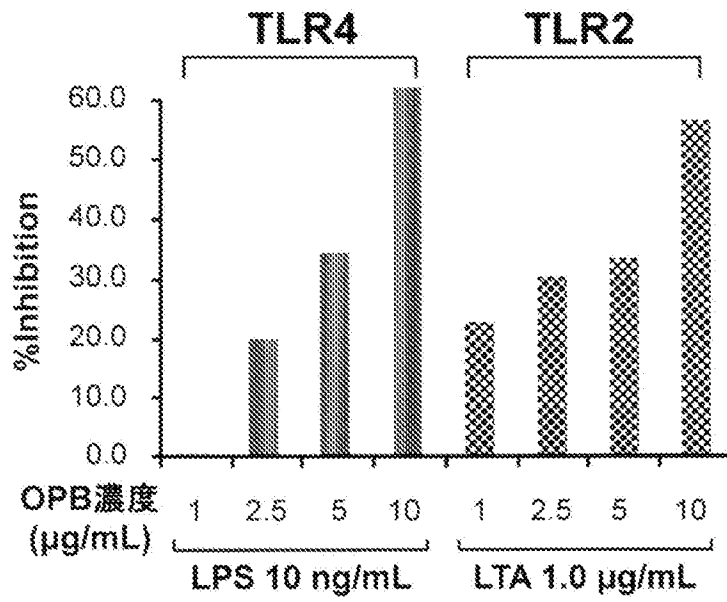
器官:	Group	OPB										Base									
病理組織学的所見	Animal No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
重層扁平上皮, 歯肉																					
好中球浸潤		-	±	±	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±	+
細胞間水腫		-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
過角化		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-	-
表皮肥厚		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-
びらん		-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-
基底膜, 歯肉																					
好中球浸潤		±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	±	±	-	+	±	+	±	±	±	+
出血		-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
水腫		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-

Grade; - : negative, ±: very slight, +: slight, 2+: moderate, 3+:severe

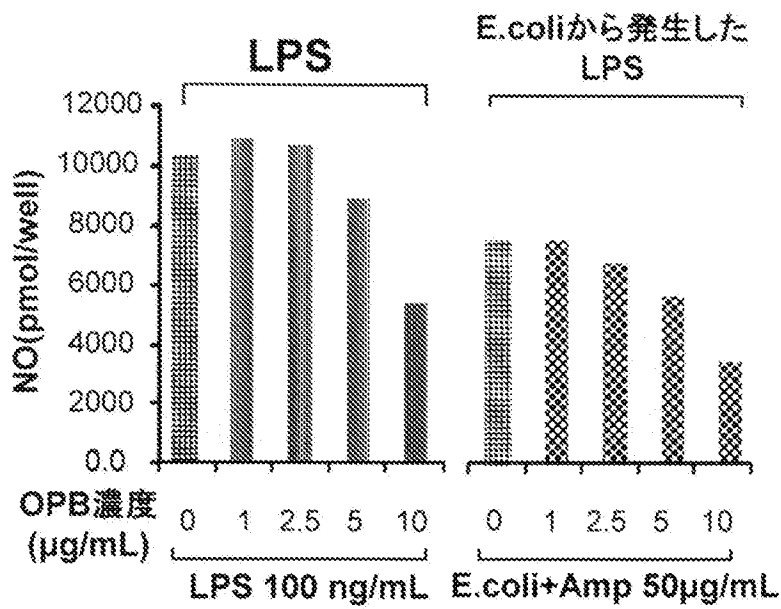
[図18]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/014999

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A61K31/155(2006.01)i, A61K47/10(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. A61K31/155, A61K47/10, A61P1/02, A61P11/00, A61P29/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Japio-GPG/FX, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/105745 A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 09 December 2004, claims, page 10, lines 3-7 & EP 1634589 A1, claims, paragraph [0043] & JP 2005-289959 A & US 2006/0189500 A1	1-11
A	Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, [Brand name] Olanedine Antiseptic Solution 1.5%; Olanedine Solution 1.5% Antiseptic Applicator 10 mL; Olanedine Solution 1.5% Antiseptic Applicator 25 mL, Report on the Deliberation Results, 22 June 2015, pp. 1-68, p. 33 lines 1-17, table 20	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 01.06.2018	Date of mailing of the international search report 12.06.2018
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2018/014999

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-352635 A (OTSUKA PHARMA CO., LTD.) 16 December 2004, claims & EP 1634499 A1, claims & US 2007/0053942 A1 & WO 2004/105492 A1	1-11
A	JP 2005-22995 A (OTSUKA PHARMA CO., LTD.) 27 January 2005, claims & EP 1634499 A1, claims & WO 2004/105492 A1 & US 2007/0053942 A1	1-11
A	JP 2005-343964 A (OTSUKA PHARMA FACTORY INC.) 15 December 2005, claims (Family: none)	1-11
A	JP 2009-526624 A (ENTURIA, INC.) 23 July 2009, claims & WO 2007/095576 A2, claims & US 2007/0231051 A1 & EP 1986790 A2	1-11
A	HAGI, Akifumi et al., Bactericidal effects and mechanism of action of olanexidine gluconate, a new antiseptic, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, August 2015, vol. 59, no. 8, pp. 4551-4559, ISSN:0066-4804	1-11
P, X	JP 2017-78046 A (OTSUKA PHARMA FACTORY INC.) 27 April 2017, claims (Family: none)	1-11

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/155(2006.01)i, A61K47/10(2006.01)i, A61P1/02(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. A61K31/155, A61K47/10, A61P1/02, A61P11/00, A61P29/00, A61P43/00</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018年										
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Japio-GPG/FX, Science Direct</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p>											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
A	WO 2004/105745 A1 (大塚製薬株式会社) 2004. 12. 09, 請求の範囲, 10 ページ 3-7 行 & EP 1634589 A1, Claims, [0043] & JP 2005-289959 A & US 2006/0189500 A1	1-11									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>		<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>									
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">01.06.2018</p>		<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">12.06.2018</p>									
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p style="text-align: center;">郵便番号 100-8915</p> <p style="text-align: center;">東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">横山 敏志</p>	4U	2927							
		<p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>									

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Evaluation and Licensing Division, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, [Brand name] Olanedine Antiseptic Solution 1.5%; Olanedine Solution 1.5% Antiseptic Applicator 10 mL; Olanedine Solution 1.5% Antiseptic Applicator 25 mL, Report on the Deliberation Results, 2015.06.22, pp.1-68, p.33 lines 1-17, Table 20	1-11
A	JP 2004-352635 A (大塚製薬株式会社) 2004.12.16, 特許請求の範囲 & EP 1634499 A1, Claims & US 2007/0053942 A1 & WO 2004/105492 A1	1-11
A	JP 2005-22995 A (大塚製薬株式会社) 2005.01.27, 特許請求の範囲 & EP 1634499 A1, Claims & WO 2004/105492 A1 & US 2007/0053942 A1	1-11
A	JP 2005-343964 A (株式会社大塚製薬工場) 2005.12.15, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2009-526624 A (アレジヤンス・コーポレーション) 2009.07.23, 特許請求の範囲 & WO 2007/095576 A2, Claims & US 2007/0231051 A1 & EP 1986790 A2	1-11
A	HAGI, Akifumi et al., Bactericidal effects and mechanism of action of olanexidine gluconate, a new antiseptic, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015.08, Vol.59, No.8, pp.4551-4559, ISSN:0066-4804	1-11
P, X	JP 2017-78046 A (株式会社大塚製薬工場) 2017.04.27, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-11