

ポビドンヨードの培養哺乳類細胞に対する毒性について

岩崎直弥 鴨井久一 盧東培* 筒井健機*

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

(主任: 鴨井久一教授)

* 日本歯科大学歯学部薬理学教室

(主任: 筒井健機教授)

(平成元年6月9日受付)

Cytotoxicity of Povidone-Iodine on Cultured Mammalian Cells

Naoya IWASAKI, Kyuichi KAMOI, Ro Dong Bae* and Takeki TSUTSUI*

Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

(Chief: Prof. Kyuichi KAMOI)

* Department of Pharmacology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

(Chief: Prof. Takeki TSUTSUI)

Cytotoxicity of povidone-iodine on cultured mammalian cells was studied using cultured Chinese hamster lung cells (V 79 cells). Treatment of V 79 cells with povidone-iodine at 100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 24 to 72 hr induced a growth inhibition of the cells in a dose-dependent manner. Although minimum inhibition of survival of V 79 cells was elicited in cultures treated with povidone-iodine at 100~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 to 24 hr, treatment at 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 6 to 24 hr resulted in decrease in cell survival in a treat-

ment time-dependent fashion. Exposure of cells to povidone-iodine at 100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 2 hr caused inhibition of DNA, RNA or protein synthesis of cells up to 13.9% of untreated cells. These results indicate that cytotoxicity of povidone-iodine occurs in dose- and treatment time-dependent manners and that povidone-iodine induces inhibition of DNA, RNA and protein syntheses of cells, even by the treatment which causes no reduction of cell survival.

Key words: Cytotoxicity, Cultured mammalian cells, Povidone-iodine

要旨: ポビドンヨードの培養哺乳類細胞に対する毒性と、その細胞増殖阻害性、細胞致死効果、細胞内高分子 (DNA・RNA・蛋白質) 合成阻害性から調べた。その結果、1. ポビドンヨードの 100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (イソジン液®の 0.1~0.5%) を 24 時間以上作用させると、細胞増殖の阻害がおこった。2. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 時間、6 時間、12 時間、24 時間作用させると、作用時間に依存して細胞の致死効果が増大した。3. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 24 時間作用させると、約 50% の細胞が死滅した。4. ポビドンヨードの 100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 時間作用させると、細胞内 DNA・RNA・蛋白質合成がともに濃度依存的に減少した。

これらのことは、ポビドンヨードの毒性は、濃度と作用時間に依存してあらわれること、また、致死効果があらわれない条件下でも細胞内 DNA・RNA・蛋白質合成の抑制がおこることを示している。

索引用語: 細胞毒性, 培養哺乳類細胞, ポビドンヨード

緒 言

ヨウ素とポリビニルピロリドンとの化合物であるポビドンヨードは、ヨウ素の優れた殺菌作用を損うことなく、作用が持続し、かつ、ヨウ素のもつ不快な刺激性もないことから火傷、創傷、褥瘡性潰瘍などの治療に広く使用されている¹⁾。

歯周疾患領域においては、Rosling ら²⁾が、ポビドンヨードで歯周ポケット内を洗浄することにより歯周病原菌を除去し、probing depth の減少を導いている。また奥田³⁾は、歯周ポケット内の各種細菌に対して、ポビドンヨードが極めて良好な殺菌力を示したと報告している。これらのことは、歯周ポケットへのポビドンヨードの適用が、歯周病の治療や歯周病原菌による感染予防に有効であることを示唆している。

皮膚や粘膜にポビドンヨードを局所適用した場合、アレルギーや接触皮膚炎などの発症頻度は極めて低いとされているが、適用が長期にわたると吸収されたヨウ素の血中濃度が上昇することから、腎と甲状腺機能に障害のある患者への適用には注意が必要である⁴⁾。

本研究ではポビドンヨードが生体組織に対して為害作用を有するかどうかを調べるため、培養された哺乳類細胞を用いてその毒性を細胞レベルで検討したものである。ポビドンヨードをチャイニーズ・ハムスター肺由来の V 79 細胞に作用させ、その毒性を細胞増殖阻害性、形態、生存率、DNA 合成、RNA 合成、蛋白質合成に対する阻害性から研究し、興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 細胞と培養液

雄チャイニーズ・ハムスター肺由来の線維芽細胞、V 79 細胞⁵⁾を用い、これらを Eagle 最少培地 (MEM 培地) (GIBCO 社、米国) に 10% の比率で牛胎児血清 (GIBCO 社) を加えた培地を使って、5% 炭酸ガス-95% 空気混合恒温器 (Forma 社、米国) 中で培養した。また細胞を培養面から剝離するに際しては、カルシウム、マグネシウムを含まないリン酸緩衝液 [PBS(-), pH 7.4] で 2 回洗浄後、0.05% トリプシン-0.02% EDTA 溶液 (GIBCO 社) を 37°C で 5~10 分作用させた。

2. ポビドンヨードの作用濃度の決定

1) プラスチック製マルチウエル (Lux 社、米国、直

径 16 mm、深さ 18 mm のカップ 24 個を有する本体と、プラスチックの蓋より成り、各カップに細胞を播き、培養液を 2 ml 容れるようになっている) の各カップに V 79 細胞を 2×10^4 個播いた。

2) 翌日、ポビドンヨード [商品名: イソジン液, ポビドンヨード 100 mg/ml, 有効ヨウ素 10 mg/ml 含有, 明治製菓 (株), 東京] を培地で直接所定濃度まで希釈し、細胞に作用させた。

3) 48 時間後に PBS (-) で 1 回洗浄後、メタノールで細胞を 5 分間固定し、3% ギムザ液 (Merck 社、西独) で 1 時間染色をした。

3. 細胞の増殖におよぼす影響

1) 直径 35 mm のプラスチック製のシャーレ (Lux 社、米国) に V 79 細胞を 5×10^4 個播いた。

2) 翌日、各濃度 (0, 100, 300, 500 μ g/ml) のポビドンヨードを含む培地と交換した。

3) 薬物作用後 24, 48, 72 時間目にシャーレを取り出し、細胞を PBS (-) の 1 ml で 2 回洗浄後、0.2 ml の 0.05% トリプシン-0.02% EDTA 溶液を入れ、37°C で 3 分間作用させた。次いで 0.8 ml の PBS (-) を入れ、ピペティングで細胞を剝し、その細胞数を血球計算盤を使って数えた。

4) 一部の実験においては、薬物を 2 時間作用させた後、正常培地の 1 ml で 2 回洗浄して薬物を除去し、2 ml の正常培地を加えて培養を継続した。これらの実験群では薬物除去後 24, 48, 72 時間目に細胞数を数えた。

4. 細胞の形態におよぼす影響

1) 5×10^4 個の V 79 細胞を直径 35 mm のプラスチックシャーレに播いた。

2) 翌日、各濃度のポビドンヨードを含む培地に換えた。

3) 作用開始 48 時間後に位相差顕微鏡像を写真撮影した。

5. 細胞の生存率におよぼす影響

1) 100 個の V 79 細胞を直径 60 mm のプラスチック製シャーレ (Lux 社、米国) に播いた。

2) 翌日、各濃度のポビドンヨードを含む培地に換えた。

3) 作用開始 2, 6, 12, 24 時間経過後、それぞれのシャーレを薬物を含まない正常培地の 2 ml で 2 回洗浄し、4 ml の正常培地を加え、さらに 7 日間培養した。

4) 各シャーレを PBS (-) で 1 回洗浄後、メタノールで 5 分間固定し、3% ギムザ液で 1 時間染色した。シャーレに形成されたコロニーの数を数え、無処理群を

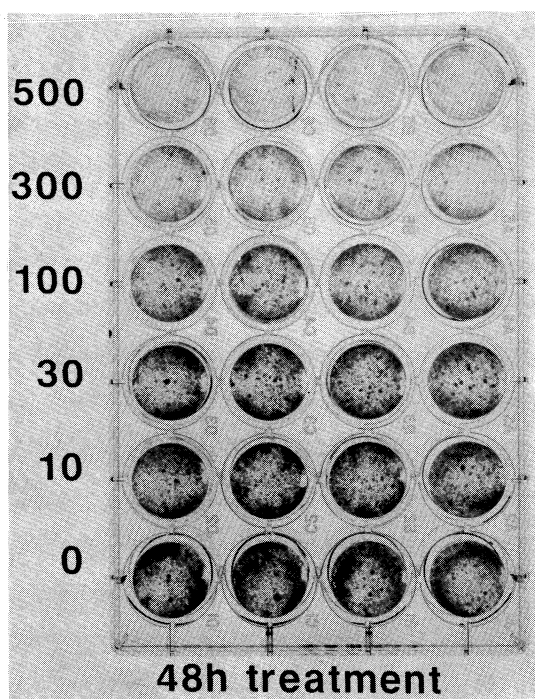


図1 ポビドンヨードの V79 細胞の増殖
におよぼす影響 ($\mu\text{g/ml}$)

100 とした場合の処理群の細胞生存率を縦軸にとってグラフにした。

6. 細胞内高分子 (DNA・RNA・蛋白質) 合成におよぼす影響

1) 直径 15 mm のガラス製カバースリップを上記のプラスチック製マルチウエルに入れた。

2) このカバースリップ上に 2×10^4 個の V79 細胞を播いた。

3) 48 時間培養後、各濃度のポビドンヨードを含む培地に換えた。

4) 1 時間培養後、DNA 合成を測定するために ^3H -thymidine, RNA 合成のために ^3H -uridine, 蛋白質合成のために ^3H -leucine を最終濃度がそれぞれ 37 KBq/ml, 37 KBq/ml, 185 KBq/ml となるように加えた。 ^3H -thymidine (比放射能 1.6 TBq/m mol) ^3H -uridine (比放射能 2.16 TBq/m mol), ^3H -leucine (比放射能 2.7 TBq/m mol) は Amersham 社 (英国) より入手した。なお、 ^3H -uridine を加えた群には、 ^3H -uridine が DNA 合成系に入るのを可及的に抑えるため、thymidine (Sigma 社, 米国) を 10^{-5} の割合で加えた。

5) さらに 1 時間培養後、 4°C の生理食塩水で 1 回洗

淨し、同じく 4°C の 5% トリクロル酢酸水溶液 (5% TCA) 処理を行った。次いで細胞の酸不溶性分画へ取り込まれた ^3H -前駆体を細胞外へ洗い流すため、1 時間おきに 3 回 4°C の 5% TCA で洗浄した。その後、蒸留水で 2 回洗浄後、ガスバーナーで加熱した注射針でプラスチック製のマルチウエルの底からカバースリップを押し上げ、ピンセットでカバースリップを取り出して濾紙上に並べて乾燥した。これを液体シンチレーション用のバイアルに入れ、3 ml のトルエン系のシンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-900 型, アロカ社, 東京) でカバースリップ上の細胞の酸不溶性分画に取り込まれた放射能を測定した。カバースリップ上の細胞数は各実験群とも無処理群と有意差はなかった。

結 果

1. ポビドンヨードの作用濃度の決定

ポビドンヨードのおよその作用濃度を決定するために、V79 細胞を図 1 にあるような 24 個のカップをもったマルチウエルに播いて、10~500 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨードを 48 時間作用させた。その後ギムザ液で染色した。ポビドンヨードによって細胞の増殖が抑制される程、ギムザ液で薄く染まるから、その染まり具合からポビドンヨードの増殖阻止濃度が推測できる。

細胞の増殖はポビドンヨードを 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 作用させてもほとんど影響をうけなかったが、300 $\mu\text{g/ml}$ になると軽度、500 $\mu\text{g/ml}$ になるとかなり抑制された。よって以後の実験には 100, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$ を作用させることにした。

2. 細胞の増殖におよぼす影響

V79 細胞の増殖におよぼすポビドンヨードの影響をポビドンヨード作用後、経時的に細胞数を数えることによって調べた (図 2)。

100 $\mu\text{g/ml}$ 作用によって、細胞増殖がわずかに減少し、300 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ と濃度の上昇とともにその抑制効果が増強した。

3. 細胞の形態におよぼす影響

5×10^4 個の V79 細胞を直径 35 mm のプラスチックシャーレに播き、翌日 100~500 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨードを作用させた。48 時間経過後、位相差顕微鏡を通して細胞の形態を写真撮影した (図 3)。

無処理群の細胞は飽和密度近くまでその数を増しており、ほとんどの細胞の形態は多角形あるいは紡錘形であった。細胞質と核を容易に識別でき、細胞質中に異常な

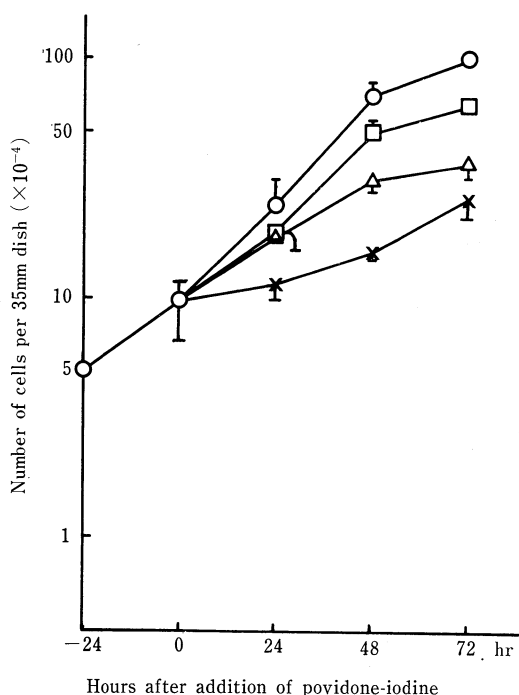


図2 ポビドンヨードの V 79 細胞の増殖におよぼす影響

バーは標準偏差を示す。バーのないものは、標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。○, 無処理群; □, 100 $\mu\text{g/ml}$; △, 300 $\mu\text{g/ml}$; × 500 $\mu\text{g/ml}$

顆粒や空胞は認められなかった。丸い分裂期の細胞もみられた (図 3 A)。

300 $\mu\text{g/ml}$ 作用群では、細胞数が無処理群に比べてやや少なく、紡錘形の細胞の割合が減少した。また細胞質と核との識別は容易であるが、細胞質中に空胞あるいは液胞のみられる細胞が増加した (図 3 B)。

500 $\mu\text{g/ml}$ 作用群では、細胞数が著しく減少した。ほとんどの細胞が多角形を呈し、細胞質中に空胞や液胞が認められた。また、細胞質が極めて大きくなった細胞もみられた (図 3 C)。

4. 細胞の生存率におよぼす影響

ポビドンヨードの殺細胞効果を処理細胞のコロニー形成率から調べた。図 4 にみられるように 100 または 300 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨードを 2, 6, 12, 24 時間作用させると、濃度に依存してわずかな生存率の低下がみられたが、作用時間依存性はほとんどなかった。しかし 500 $\mu\text{g/ml}$ を作用させた細胞では、その生存率が作用時間の延長とともに減少した。

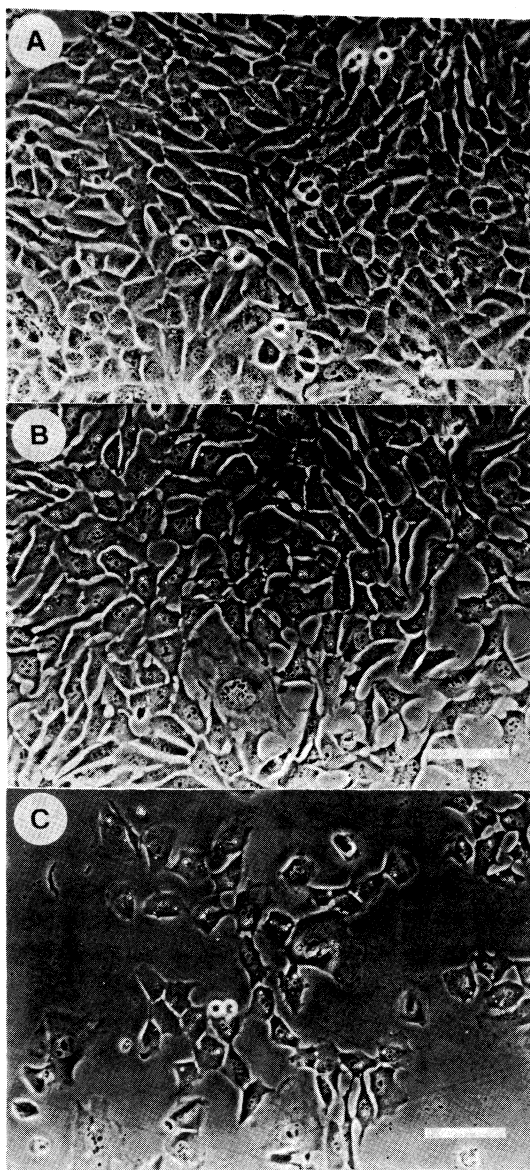


図3 ポビドンヨードの V 79 細胞の形態におよぼす影響

A. 無処理群; B. 300 $\mu\text{g/ml}$; C. 500 $\mu\text{g/ml}$
バーは 200 μm を示す。

5. 細胞内高分子 (DNA・RNA・蛋白質) 合成におよぼす影響

100~500 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨード 2 時間処理で、細胞内高分子 (DNA・RNA・蛋白質) 合成がどのように影響をうけるかを ^3H -前駆体の細胞内酸不溶性分画への取り込み率から検討した。

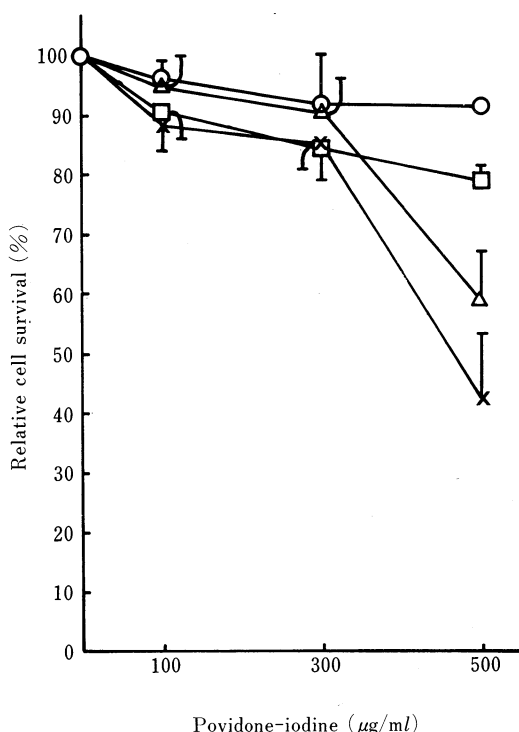


図4 ポビドンヨードの V79 細胞の生存率におよぼす影響

バーは標準偏差を示す。バーのないものは、標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。

○, 2 時間作用; □, 6 時間作用; △, 12 時間作用; ×, 24 時間作用

ポビドンヨードの 100~500 $\mu\text{g/ml}$ 処理によって DNA 合成, RNA 合成, 蛋白質合成がともに濃度に依存して抑制された (図 5)。これらの DNA・RNA・蛋白質合成の抑制が, その後の細胞増殖にとって障害となるかどうかを調べるため, 同一条件で処理された細胞について回復培養を試みた。図 6 に示したように, 培養開始後 24 時間目の細胞に 100~500 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨードを 2 時間処理したのち, 薬物を除去し, 正常培地で培養を継続して細胞数を数えた。その結果, いずれの濃度においても細胞の増殖能は無処理群の場合とほぼ同様であった。また, 既に図 4 で示したようにポビドンヨードの 100~500 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間処理では有意な生存率の低下がみられないことから, この処理による DNA・RNA・蛋白質合成の抑制は, 細胞の増殖や生存にとって致死的なものでなく, ポビドンヨードの除去によって正常レベルまで回復することがわかった。

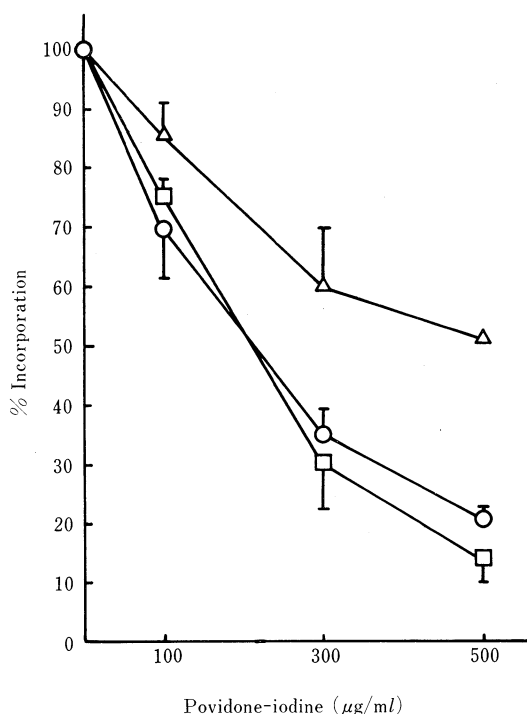


図5 ポビドンヨードの V79 細胞の DNA・RNA・蛋白質合成におよぼす影響

バーは標準偏差を示す。バーのないものは標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。

³H-thymidine (○), ³H-uridine (□), ³H-leucine (△) の細胞内酸不溶性分画への取り込みで調べた。

考 察

ポビドンヨードの培養哺乳類細胞に対する毒性を, その細胞増殖阻害性, 細胞内高分子 (DNA・RNA・蛋白質) 合成阻害性から調べた。

ポビドンヨードは, 一般に 10% ポリビニールピロリドン・ヨウ素溶液で, 水, 90% : ポリビニールピロリドン, 8.5% : ヨウ素またはヨウ化物, 1% からなる⁹⁾。本研究で使用したポビドンヨードは, 商品名イソジン液 [明治製菓 (株)] で, 1 ml 中ポビドンヨードを 100 mg (有効ヨウ素 10 mg) を含むが, 配合その他の詳細は明らかでない。

このポビドンヨードの培養 V79 細胞の増殖阻害効果は, 濃度が 100~500 $\mu\text{g/ml}$ (イソジン液の 0.1~0.5%) と上昇するにつれて増大した。ポビドンヨードの V79

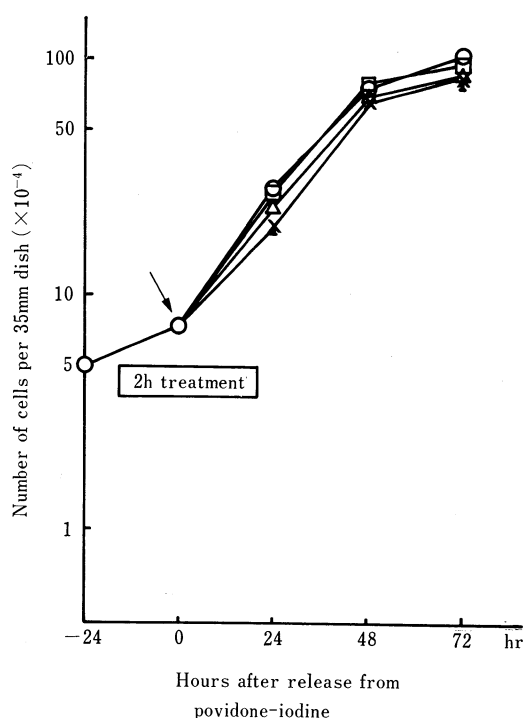


図6 ポビドンヨードを2時間作用させた後のV79細胞の増殖能の回復

バーは標準偏差を示す。バーのないものは、標準偏差がシンボルマーク内にあることを示す。

○, 無処理群; □, 100 $\mu\text{g/ml}$; △, 300 $\mu\text{g/ml}$; ×, 500 $\mu\text{g/ml}$

細胞のコロニー形成率におよぼす効果を濃度と作用時間の両方から観察したところ、濃度が100~300 $\mu\text{g/ml}$ であれば作用時間(2~24時間)によるコロニー形成率の違いはほとんどみられなかった。500 $\mu\text{g/ml}$ になると、作用時間(2~24時間)に依存してコロニー形成率の減少が認められた。すなわち、このことからポビドンヨードの細胞致死効果(コロニー形成率より決定)は濃度と作用時間に依存してあらわれることがわかった。

ポビドンヨードの細胞内高分子(DNA・RNA・蛋白質)合成におよぼす効果を調べたところ、細胞致死効果がほとんどあらわれない条件、すなわち、100~500 $\mu\text{g/ml}$ のポビドンヨードの2時間作用でDNA合成、RNA合成、蛋白質合成が濃度に依存して減少した(図5)。細胞の増殖能力は、この作用条件でほとんど影響をうけないことから(図6)、ポビドンヨードによって致死効果があらわれない条件下でも、細胞内DNA・RNA・蛋白質合成の抑制がおこなることがわかった。またこの抑制は、

ポビドンヨードの除去によって正常レベルまで回復するものと思われる。

ポビドンヨードの毒性を培養哺乳類細胞を使って細胞の増殖能、生存率、細胞内高分子合成(DNA合成、RNA合成、蛋白質合成)の面から研究した報告は、これまでほとんどない。本研究からポビドンヨードの培養哺乳類細胞に対する毒性は、濃度と作用時間に依存してあらわれること、またポビドンヨードによって哺乳類細胞のDNA合成、RNA合成、蛋白質合成が抑制され、その作用は細胞に対して致死効果があらわれない条件下でもおこなることがわかった。

結 論

ポビドンヨードの培養哺乳類細胞に対する毒性を、その細胞増殖阻害性、細胞致死効果、細胞内高分子(DNA・RNA・蛋白質)合成阻害性から調べた。その結果、

1. ポビドンヨードの100~500 $\mu\text{g/ml}$ (イソジン液®の0.1~0.5%)を24時間以上作用させると、細胞増殖の阻害がおこった。
2. 500 $\mu\text{g/ml}$ を2時間、6時間、12時間、24時間作用させると、作用時間に依存して細胞の致死効果が増大した。
3. 500 $\mu\text{g/ml}$ を24時間作用させると、約50%の細胞が死んだ。
4. ポビドンヨードの100~500 $\mu\text{g/ml}$ を2時間作用させると、細胞内DNA・RNA・蛋白質合成がともに濃度依存的に減少した。
5. これらのことは、ポビドンヨードの毒性は濃度と作用時間に依存してあらわれること、また、致死効果があらわれない条件下でも細胞内DNA・RNA・蛋白質合成の抑制がおこなうことを示している。

謝 辞

稿を終るにあたり、種々ご協力いただいた日本歯科大学歯学部歯周病学教室ならびに薬理学教室の各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 真泉平治: 新臨床歯科薬理学, 永末書店, 京都, 1980, 314-322.
- 2) Rosling, B.G., Slots, J., Webber, R.L., Christersson, L.A. and Genco, R.J.: Microbiological and clinical effects of topical subgingi-

- val antimicrobial treatment on human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 10 : 487-514, 1983.
- 3) 奥田克爾, 太田功正, 加藤哲男, 石原和幸, 高添一郎, 清田 築, 中川種昭, 山田 了, 佐藤徹一郎 : ネオヨジン® (ポビドンヨード剤) の歯周ポケット内細菌殺菌効果. 歯界展望, 70 : 1409-1415, 1987.
- 4) Aronoff, G.R., Friedman, S.J., Doedens, D.J. and Lavelle, K.J. : Increased serum iodide concentration from iodine absorption through wounds treated topically with povidone-iodine. *Am. J. Med. Sci.*, 279 : 173-176, 1980.
- 5) Ford, D.K. and Yerganian, G. : Observation on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, 21 : 393-441, 1958.
- 6) Zamora, J.L. : Chemical and Microbiologic Characteristics and Toxicity of Povidone-Iodine Solutions. *Am. J. Surg.*, 151 : 400-406, 1986.
-