

高齢者を歯周病から衛る
イオン液体内封ミセル洗口液の開発

静岡県立大学薬学部 創剤工学研究室 准教授

いわお やすのり
岩尾 康則

高齢者を歯周病から衛るイオン液体内封ミセル洗口液の開発

静岡県立大学薬学部 創剤工学研究室 准教授 岩尾 康範

(分担研究者) 静岡県立大学薬学部 創剤工学研究室 教授 板井 茂
創剤工学研究室 助教 木村 晋一郎

(〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1 TEL: 054-264-5612)

1 調査研究目的

歯周病は、う蝕と共に口腔の二大疾患の一つであり、国民の約 80%以上が感染し、推定患者数 6000 万人とも言われている。歯周病は歯を喪失する最も大きな原因となるが、近年は種々の全身性疾患（誤嚥性肺炎 [1]、糖尿病 [2][3]、心臓血管系疾患、関節リュウマチ等）の誘因となることが言われている。実際に口腔には、未同定の細菌を含め約 700 種存在し、腸内フローラに匹敵するほどの常在細菌が生息するが、その主な生息部位は、歯や歯肉溝に形成されるバイオフィルム (BF)(デンタルプラーク) である。BF は強い付着力と凝集性により長期的な組織定着性を示し、多剤耐性菌の出現や治療の妨げとなるが、市販されるうがいやデンタルリンス、抗菌剤 [4][5] を使用しても簡単に除去することはできず、現状、機械的な除去に頼るのみとなり、BF 形成を阻止あるいは制御する技術の要望は非常に高い。

本研究では、近年申請者らが見出した細菌叢由来 BF 破壊能を有する新規イオン液体コリンゲラン酸 (CAGE) [6] に着目した。しかしながら、高い粘性と加水分解性を有するため、CAGE 単独で洗口液として利用することは難しい。そこで本研究では、CAGE のミセル化に着目した。ミセル化することで加水分解を回避しながら CAGE を水中に分散させ、粘性を下げることを期待できる。さらに、微小な粒子径を持つミセル化は口腔内 BF への浸透に有利であるため [7][8]、CAGE を効率的に BF 内に送達できると考えた。したがって本研究では、CAGE 含有ミセル (CAGEmc) が洗口液として応用できるかを検討した。

2 調査研究方法

2-1 CAGE mc の調製および処方検討

CAGE 0-30 w/w%, S_{mix} (Tween 80/Tween 20/Ethanol=5/4/3) 5-50 w/w% となるよう任意の割合で混合した。この混合液をスターラーで攪拌しながら、水を滴下し、CAGE mc を作製した。

調製後, CAGE mc の粒子径, 多分散性指数を測定し, 微小で均一な粒子径となる処方を選択した.

2-2 CAGE mc の粒子物性評価

平均粒子径, 多分散性指数, 表面電位の粒子物性を動的光散乱法および電気泳動光散乱法を用いて測定した.

2-3 CAGE mc 安定性評価

CAGEmc の安定性は, 4, 20, 40° C の温度条件下で一定期間保存後の平均粒子径, 多分散性指数, 表面電位の粒子物性を判定することで評価した.

2-4 抗菌効果の評価

抗菌効果は, う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を算出することで評価した. サンプルは CAGE mc に加え, 滅菌蒸留水 (Control), CAGE 非含有ミセル (Blank mc), CAGE 単独 (Neat CAGE), CAGE 水懸濁液 (CAGE sus), 市販洗口液を比較対象のサンプルとして評価を行った (Table 1). 段階希釈したサンプル含有培地に *S. mutans* を接種し, 24 時間培養後, 発育の見られない最小のサンプル濃度を MIC とした.

2-5 抗 BF 効果の評価

抗 BF 効果は, サンプル 30 秒間暴露後の *S. mutans* BF を, 2 種類の蛍光色素で生菌と膜障害菌に染め分け算出した生菌率で評価した. 2-4 同様, CAGE mc に加えて Control, Blank mc, Neat CAGE, CAGE sus, 市販洗口液をサンプルとして比較を行った. BF はスクロース含有培地に *S. mutans* を培養することで形成し, 染色には LIVE/ DEAD bacterial viability kit[®] を用いた. また, 染色後の BF の観察は蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で行った.

3 調査研究成果

3-1 CAGE mc の処方検討

Fig. 1 に粒子径 10 nm 以下, 多分散性指数 0.3 以下の, 微小で粒子径の均一性が高い CAGE mc が得られた処方範囲を示す. 図の頂点は各材料の含有率が 100wt% の点を示し, 頂点から離れるにつれ, その材料の含有率が低下することを表す. また, 白点は水 /Smix/CAGE = 80/15/5 (w/w%) の処方を表す. この処方で調製した CAGE mc は, 種々の処方の中でも微小で単分散性が高かったため, これを標準処方とし, 以降の実験に用いた.

3-2 粒子物性評価

Table 2 に CAGE mc 及びその比較として Blank mc, CAGE sus の粒子物性を示す. CAGE mc の平均粒子径は約 8 nm であった. また, 多分散性指数は 0.26 と, 0.3 以下であることから

粒子径の均一性が高いことが示された。したがって CAGE mc は均一な微小粒子であることが明らかとなった。また、表面電位は約 -2 mV であり、わずかに負電荷を帯びていることが示された。Blank mc の粒子物性と比較しても、ほぼ同程度の粒子径、多分散性指数、表面電位を示していることから、CAGE mc の物性は界面活性剤に起因するものであり、CAGE を内封しても変化しないことが確認された。また、CAGE sus では明らかに大きな粒子径を示し、CAGE 単独ではナノ粒子化できないことが明らかとなった。

3-3 CAGE mc の安定性評価

CAGE mc の安定性を各種温度において検討した結果、4, 20° C の温度条件下で少なくとも 12 ヶ月間、40° C の温度条件下では少なくとも 9 ヶ月間、粒子物性に有意な変化が認められなかった (data not shown)。したがって、CAGE mc は幅広い温度条件下でも安定性が高い粒子であることが示唆された。

3-4 *S. mutans* に対する抗菌効果

Table 3 に *S. mutans* に対する抗菌効果を示す。MIC は値が小さいほど高い抗菌効果を有することを表す。Control や Blank mc では抗菌効果を示さなかったのに対して、CAGE mc は高い抗菌効果を示した。また、CAGE mc の MIC は市販洗口液と比較し、1/4 と小さいことから、高い抗菌効果を有することが明らかとなった。

3-5 *S. mutans* に対する抗 BF 効果

Fig. 2 に各サンプルを暴露した BF 内 *S. mutans* の生菌率を示す。Control と比較し、すべてのサンプルが BF 内の生菌率を低下させた。中でも、最も高い抗 BF 効果を示したのは、CAGE mc であり、その効果は市販洗口液と比較し有意に高いことが明らかとなった。

4 考察

CAGE は、水溶性成分のコリンと脂溶性成分のゲラン酸で構成される両親媒性のイオン液体である。また、Table 2 で CAGE mc と Blank mc の平均粒子径を比較すると、どちらも約 7 ~ 8 nm と同程度であったことから、CAGE は両親媒性物質として Smix とともに会合物の界面付近に存在し、ミセルを形成していると推察された。一般に、ミセルは熱力学的に安定な系であることが知られている。そのため、CAGE mc においても 4 - 40° C の幅広い温度条件で長期保存後も粒子物性を維持し、高い安定性を示したと予想された。

抗菌効果の評価において、Blank mc は Control と同様に MIC 値が大きいことから、Smix のみでは *S. mutans* に対する抗菌効果が低いことが示された。一方、Neat CAGE, CAGE sus, CAGE mc の CAGE 含有サンプルは、MIC 値が市販洗口液と比較して低値を示したことから、

CAGE は *S. mutans* へ抗菌効果を有することが明らかとなった。抗 BF 効果は、有効成分の抗菌効果に加えて BF への浸透性が重要であると考えられる。また、BF への浸透はサイズが小さく電荷をもたない物質が有利とされる [7][8][9]。そのため、微小で表面電位がほぼ中性の CAGE mc は、BF 内部まで速やかに浸透し、広い範囲で抗菌効果を発揮したと推察された。一方で、CAGE sus の平均粒子径は約 33 μm (Table 2) と CAGE mc と比較し約 4100 倍大きく浸透性が低いと考えられる。また、Neat CAGE は粘度が約 7000 mPa·s と CAGE mc (26 mPa·s) と比較し約 270 倍高いため (Table 4)、30 秒の曝露では BF 内へ浸透しなかった可能性がある。高い浸透性が知られる市販洗口液は、抗菌効果が CAGE mc より低いことから、抗 BF 効果が CAGE mc に及ばなかったと考えられる。一方、Blank mc は抗菌効果が低いにも関わらず CAGE mc に次いで高い抗 BF 効果を示した。これは、Blank mc の高い浸透性および膜透過性が関与すると考えられる。Blank mc は CAGE mc 同様、微小で表面電荷をもたないため、BF への浸透に有利である。また、Blank mc に含まれる S_{mix} の構成成分 Tween 系界面活性剤は、細菌膜や核膜の透過性亢進作用が知られており、細胞の蛍光染色における透過処理等に用いられる [10]。この作用により膜障害菌のみを核染色する蛍光色素が BF 広域の *S. mutans* を染色させたことから、膜障害菌と偽陽性判定を受けたものと推察された。実際、寒天平板希釈法の生菌数計測により抗 BF 効果を評価した場合は、Blank mc の抗 BF 効果は Control と同等に低いことが示されている。

現段階では、各サンプルの BF への浸透性は推察にとどまっている。そのため、今後は Calcein-AM 蛍光色素を用いて、サンプルの浸透を継時的に観察し、浸透速度を指標に浸透性評価を行っていく予定である。また、CAGE をミセル化したことによる、毒性の変化も考えるため、口腔ケラチノサイトを用いた細胞毒性試験を実施する予定である。そして、有効性と安全性を加味した処方検討により、製剤の処方最適化を行うと共に、マウス口腔内感染モデルに対する治療効果を評価したいと考えている。

5 まとめ

CAGE をミセル化した CAGE mc は、30 秒の短時間曝露で、う蝕原因菌形成 BF に対して高い抗 BF 効果を示し、洗口液として応用可能であることが示唆された。

6 調査研究発表 (口頭又は誌上発表)

・日本薬学会 137 年会 口頭発表

題名「新規イオン液体含有マイクロエマルジョンの調製とその評価」

発表者 櫻井理咲子 (静岡県立大学), 岩尾康範 (静岡県立大学), Samir Mitragotri (University of Harvard), 木村晋一郎 (静岡県立大学), 板井茂 (静岡県立大学)

・第42回製剤・創剤セミナー ポスター発表

題名「口腔内バイオフィルム感染症に向けたイオン液体含有マイクロエマルジョンの調製と評価」
発表者 櫻井理咲子 (静岡県立大学), 岩尾康範 (静岡県立大学), Samir Mitragotri (Harvard University), 木村晋一郎 (静岡県立大学), 板井茂 (静岡県立大学)

7 引用文献

- [1] F. A. Scannapieco, "Role of Oral Bacteria in Respiratory Infection," *J. Periodontol.*, vol. 70, no. 7, pp. 793-802, 1999.
- [2] N. G. Chavarry, M. V. Vettore, C. Sansone, and A. Sheiham, "The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis," *Oral Health Prev. Dent.*, vol. 7, no. 2, pp. 107-127, 2009.
- [3] Y. S. Khader, A. S. Dauod, S. S. El-qaderi, A. Alkafajei, and W. Q. Batayha, "Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics : a meta-analysis," vol. 20, pp. 59-68, 2006.
- [4] R. P. Teles and F. R. F. Teles, "Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?," *Braz. Oral Res.*, vol. 23, no. suppl 1, pp. 39-48, 2009.
- [5] L. Netuschil, T. Hoffmann, and M. Brex, "How to select the right mouthrinses in periodontal prevention and therapy. Part I. Test systems and clinical investigations," *Int. J. Dent. Hyg.*, vol. 1, no. 3, pp. 143-150, 2003.
- [6] M. Zakrewsky et al., "Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 37, pp. 13313-13318, 2014.
- [7] T. Thurnheer, R. Gmür, S. Shapiro, R. Gmu, and B. Guggenheim, "Mass Transport of Macromolecules within an In Vitro Model of Supragingival Plaque Mass Transport of Macromolecules within an In Vitro Model of Supragingival Plaque," vol. 69, no. 3, pp. 1702-1709, 2003.
- [8] Z. Zhang, E. Nadezhina, and K. J. Wilkinson, "Quantifying diffusion in a biofilm of *Streptococcus mutans*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 3, pp. 1075-1081, 2011.
- [9] T. O. Peulen and K. J. Wilkinson, "Diffusion of nanoparticles in a biofilm," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 8, pp. 3367-3373, 2011.
- [10] M. R. Neifert and J. M. Seacat, "A guide to successful Immunohistochemistry," vol. 3, pp. 1-14, 1986.

Table 1. CAGE mc 及びその他サンプルの処方.

	Water (w/w%)	S_{mix} (w/w%)	CAGE (w/w%)
Control	100	-	-
Blank micelle (Blank mc)	85	15	-
Neat CAGE	-	-	100
CAGE suspension (CAGE sus)	95	-	5
CAGE mc	80	15	5
Commercial mouthwash	-	-	-

■ Monodispersed CAGE mc

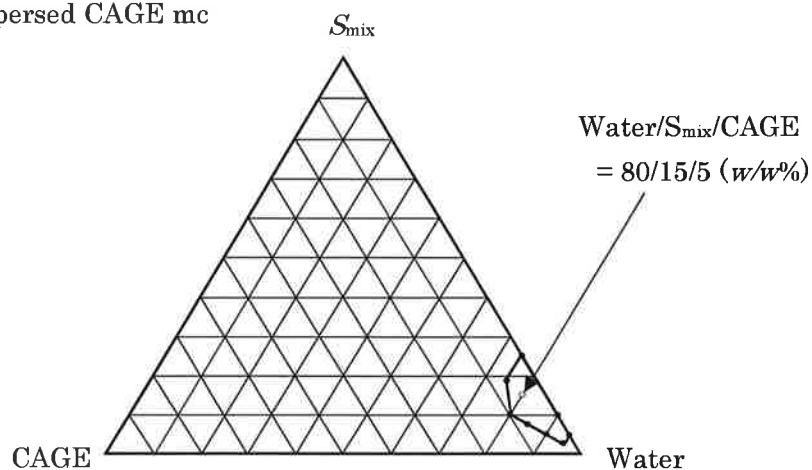


Fig. 1. 粒子径の均一性が高い CAGE mc が得られた処方範囲.

Table 2. CAGE mc, Blank mc, CAGE sus の粒子物性.

	CAGE mc	Blank mc	CAGE sus
Particle size (nm)	7.91 ± 1.19	7.53 ± 0.08	32900 ± 1700
Polydispersity index	0.26 ± 0.03	0.17 ± 0.02	-
Zeta potential (mV)	-2.03 ± 1.18	-2.14 ± 0.53	-

Table 3. *S. mutans* に対する抗菌効果.

	Control	Blank mc	Neat CAGE	CAGE sus	CAGE mc	Commercial mouthwash
MIC (μg/mL)	> 131072	> 131072	2048	32768	16384	65536

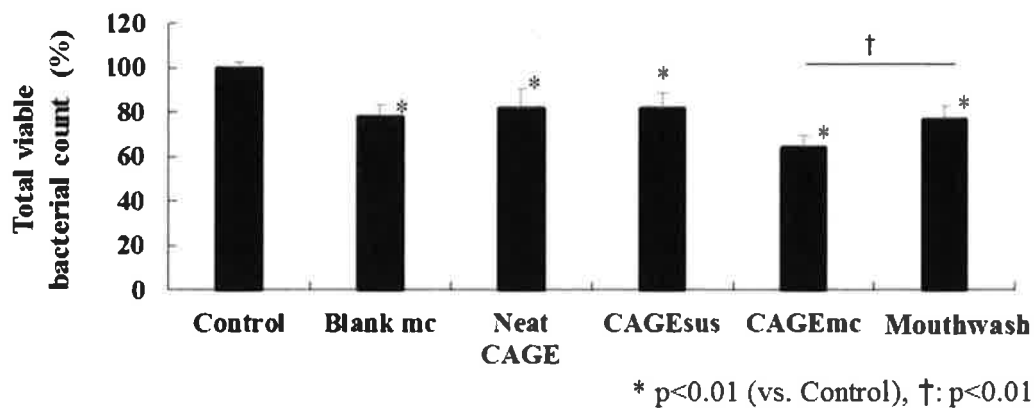


Fig. 2 サンプル曝露後のバイオフィルム内 *S. mutans* 生菌率.

Table 4. サンプル粘度

	Viscosity (mPa·s)
Neat CAGE	6994.7 ± 259.3
CAGE mc	25.6 ± 0.5
Commercial mouthwash	35.6 ± 0.2