

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07169

研究課題名(和文) イオン液体・抗菌薬共内封ミセルを利用した口腔内ケアの新規治療戦略

研究課題名(英文) New strategy for oral care by means of micelles containing ionic liquid and antimicrobial agent

研究代表者

岩尾 康範 (Iwao, Yasunori)

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30433022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔内細菌が形成するバイオフィルムを破壊し、歯周病及び種々の全身性関連疾患への罹患を予防するため、バイオフィルム破壊能を有するイオン液体と抗菌薬を内封したミセル製剤を開発し、新規洗口液としての可能性を追求することを目的としている。CAGEを始めとして幾つかの新しいイオン液体を非イオン性界面活性剤によりミセル化し、さらに抗菌薬クラリスロマイシンを内封させた製剤は優れた物理化学的安定性を示し、う蝕原因菌由来バイオフィルムに対して高い抗菌効果・バイオフィルム除去能を示した。今後、本製剤の口腔内疾患への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

厚生労働省調査によれば、30代以上の3人に2人が歯周病に罹患していること、また歯周病は口腔内疾患に限らず、種々の全身性関連疾患罹患との関連性が強く示唆されている。したがって、歯周病の本体であるバイオフィルムを効率的に除去し、オーラルケアを達成できる優れた製剤・製品開発が喫緊の課題である。本研究は、イオン液体と抗菌薬を内封したミセル粒子は優れたバイオフィルム除去効果を示すことを初めて明らかとした。今後、本研究の応用展開が期待され、国民病である歯周病治療という側面において、社会的意義は大変大きい。

研究成果の概要(英文)：Oral biofilms are known to show antibacterial drug resistance and cause not only oral infections but also systemic disorders. In this study, in order to disrupt the biofilms for plaque control, we tried to prepare ionic liquids-encapsulated micelles containing antibacterial drugs and evaluate the anti-biofilm activity against *Streptococcus mutans* as a mouthwash. The prepared micelles containing ionic liquid (CAGE and newly prepared ionic liquids) and surfactant mixtures had small particles with high stability for over 12 months. From the results of antimicrobial and anti-biofilm activities, the micelles showed quick and strong activities than commercial mouthwash products. Therefore, this study demonstrated that prepared ionic liquid-encapsulated micelles might be useful as a mouthwash for dental health.

研究分野：DDS

キーワード：歯周病 バイオフィルム オーラルケア イオン液体 ミセル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患であり、う蝕と共に口腔の二大疾患の一つである。国民の約 80%以上が感染し、推定患者数は 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、糖尿病、心臓血管系疾患、関節リウマチ等）を誘因するなど、その発症や進行のリスク因子となることが言われている。口腔には、未同定の細菌を含め約 700 種の常在細菌が存在するが、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ーム（デンタルプラーク）である。バイオフィームは強い付着性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。これらバイオフィームはブラッシング、うがい、抗菌剤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る。したがって、バイオフィーム形成の阻害または破壊する新規技術開発の要望は非常に高く、超高齢社会に突入した今、高齢者を含めた国民すべてが安全・安価でかつ有効な口腔内ケアを実現できる新しい治療戦略の開発が急務の課題となる。特に、食後 8 時間ほどでバイオフィームは形成され始め、約 48 時間に歯石になるなど、その予防・治療は「時間との闘い」であり、日々のコンプライアンスと使用してから吐き出せるなど高い安全性を考慮すると、デンタルリンスが最適な製剤になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、歯周病及び種々の疾患の発症・進展に關与する口腔内細菌叢バイオフィームの形成を阻害または破壊し、恒常的な口腔内ケアを達成することを目的に、イオン液体と抗菌薬内封ミセル製剤を創製し、その臨床応用の可能性を追求する。

「イオン間の静電相互作用を弱め、結晶化しにくいようデザインされたユニークな液体」であるイオン液体は、水や有機溶媒でもない「第 3 の液体」とも呼ばれ、これまでリチウムイオン電池や太陽電池等、電気化学分野において活発に利用されてきた。近年、あるイオン液体にはバイオフィーム除去能があることが分かり、医療分野への応用が試みられているが、ほとんどが皮膚への適応を考えた経皮製剤に限られていた。この理由は、イオン液体の「高粘性」と「易加水分解性」に起因し、高粘性は使用や製剤開発に難しさを与え、易加水分解性は水分が豊富な環境下で容易に分解し、不安定性を示す。すなわち、口腔内という水分リッチな環境でかつバイオフィーム近傍にイオン液体を特異的に作用させることは、通常不可能である。このような理由から、イオン液体を他の製剤開発に生かそうという試み自体が世界でも例がなかったが、種々の製剤技術を習得し、そのノウハウを持つ代表者の岩尾はイオン液体のミセル製剤化により、本目的を達成できると考えた。加えて、本研究で用いるイオン液体 CAGE は、申請者と Mitragotri 教授 (Harvard University) で共に見出した化合物であり、抗菌薬との相乗効果を狙う研究自体、オリジナリティーは非常に高い。現状の医療を鑑みると、口腔内バイオフィームを除去するためには、機械的・外科的な除去に頼るしかなく、洗口液のみで効率よくバイオフィーム除去を試みようとする本研究は、患者のクオリティ・オブ・ライフを著しく増大させることができ、医学臨床上、その社会的意義は極めて大きい。さらに、本技術の成功は大腸内細菌叢由来バイオフィーム除去にも応用できる可能性もあり、まさにブレイクスルー的な新しい道を拓く研究になると考えている。

本研究では、口腔内バイオフィームに対する高い浸透性と付着性を有するミセル処方への検討と、イオン液体/抗菌薬内封ミセルの物性評価、*in vitro* 歯周病菌バイオフィーム除去効果の検討と、新規イオン液体の創出と製剤化検討、ミセルの創製と評価、*in vivo* におけるバイオフィーム除去効果と治療効果を確認した。

3. 研究の方法

ミセル調製は転相乳化法により行った。基本処方として、非イオン性界面活性剤混合系 Tween 80/Tween 20/ethanol (疎水性蛍光プローブクマリン含有) と塩化ジステアрилジメチルアンモニウムまたは塩化ベンザルコニウムなどの陽イオン界面活性剤を任意の割合で混合し、ミセルを作製した。調製したミセルの粒子径、粒度分布、ゼータ電位を測定した。ミセルのバイオフィーム浸透性・付着性評価を検討するため、代表的な歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* を用いて 96 穴マイクロプレートに歯周病菌を播種し、1 - 7 日間、35 °C で静置培養後、ウエル上に残ったものをバイオフィームとして作製した。その後、ミセルを添加・インキュベーションし、クマリンの蛍光強度を顕微鏡観察により測定し、浸透性・付着性を検討した。また、電子顕微鏡 (SEM) によるバイオフィームの状態観察を行った。最適な調製条件が決定した際は、調製 6 ヶ月後までの物性値も合わせて評価し、製剤の安定性を評価した。また、抗菌薬クラリスロマイシン (CAM) を内封させ、同様に物性評価を行うと同時に、バイオフィーム破壊能及び形成阻害能を評価した。具体的には、上記と同様にバイオフィームを作成後、バイオフィームに対して、各種濃度のミセル、コントロールとして CAGE 単独、ミセル単独を添加・インキュベーションし、クリスタルバイオレット染色による顕微鏡観察と吸光度 (A595) を測定し、バイオフィーム破壊効果を検討した。

次に、CAGE 以外のイオン液体創製のため、ゲラン酸を anionic 分子の基本構造体とし、種々の cationic 分子（イミダゾリウム系、ピリジニウム系、ピロリジニウム系、アンモニウム系、ホスホニウム系）をその候補として、新規イオン液体の創生とバイオフィーム除去効果を検討した。上記の検討同様、バイオフィーム除去能まで評価した。その後、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* を染みこませた絹糸を、C57BL/6 マウス（雄性 6 週齢）の上顎右側第 2 臼歯の歯肉溝に結紮し、歯周病モデルマウスを作成した。上記ミセルを塗布後、口腔内バイオフィーム形成量を測定した。

4. 研究成果

種々の検討の結果、水 80wt%、Smix (Tween 80:Tween 20:Ethanol=5:4:3) 15wt%、CAGE 5wt% の処方 (CAM 1 mg/ml) で、平均粒子径 7.91 nm、PDI 0.26 の微小で均一なミセルが得られた (Table 1)。また、このミセルは 4 °C、20 °C の保管条件下で少なくとも 18 ヶ月間安定であった (Fig.1)。S. mutans に対するミセルの MIC 及び MBC 値は、いずれも市販洗口液と比較して小さく (Table 2)、高い抗菌静菌・殺菌効果を有することが示された。さらに、S. mutans バイオフィームに対し、生菌率を約 35%減少させ、市販洗口液比較し有意に高い抗 BF 効果を示した (Fig.2 & 3)。

Table 1. Physical properties of prepared micelles. Data are means \pm SD (bars), n=3

	mean \pm S.D.
Particle size (nm)	7.91 \pm 1.19
Polydispersity Index	0.26 \pm 0.01
Zeta potential (mV)	-2.03 \pm 1.18
pH	7.83 \pm 0.04

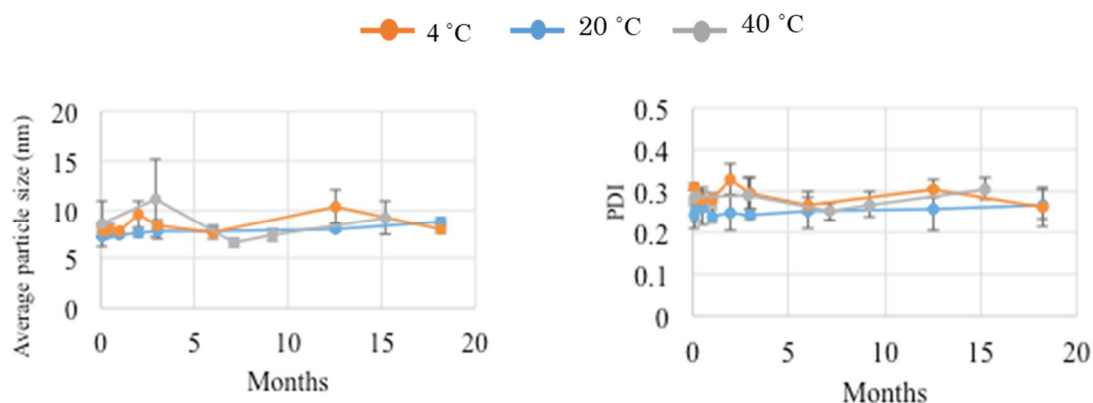


Fig. 1. Stability of prepared micelles on physical properties at 4 °C or 20 °C, 40 °C. (a) Average particle size, and (b) PDI.

Data are means \pm SD (bars), n=3, * p <0.05, compared with 1 day.

Table 2. MIC and MBC of the samples.

Sample	MIC (%)	MBC (%)
Control	> 50	> 50
Blank micelles	> 50	> 50
Neat CAGE	< 0.78	1.56

CAGE suspensions	6.25	12.5
CAGE micelles	6.25	25
Listerine	12.5	> 50

Fig. 2. Fluorescence images of *S. mutans*'s biofilm after 30 s sample exposure. (a) Control, (b) Blank micelles, (c) Neat CAGE, (d) CAGE suspensions, (e) CAGE micelles and (f) Listerine.

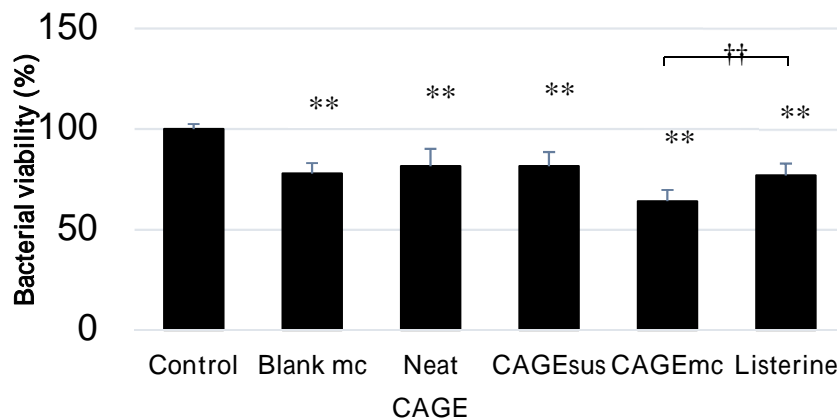
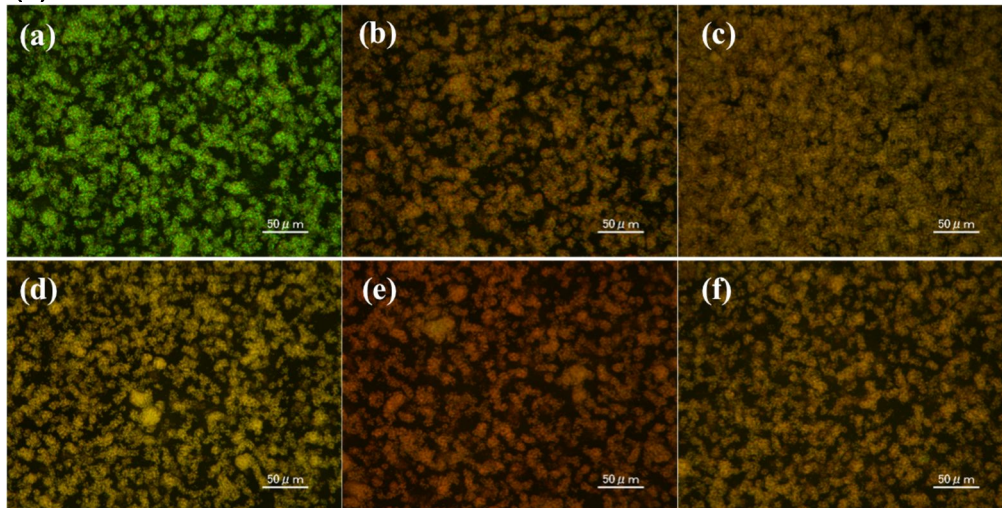


Fig. 3. Bacterial viability of *S. mutans* inside the biofilm after 30 s sample exposure.

Data are means \pm SD (bars), $n=6$, ** $p<0.01$ (vs. Control), ††: $p<0.01$.

次に、CAM 内封イオン液体ミセルの調製を行ったが、水 75wt%、Tween 80 5 wt%、Tween 20 4 wt%、ethanol 3 wt%、塩化ベンザルコニウム 5 wt%、CAGE/CAM 5 wt%の処方、平均粒子径 10.5 nm、PDI 0.25 で、冷所で 6 か月それらに変化がなく、種々の処方の中で最も安定で、微小なナノミセルとなることが明らかとなった。また、CAGE に代わるイオン液体として調製した 1-ethyl-3-methylimidazolium geranic acid が *S. Mutans* バイオフィルムに対して高い破壊効果を有し、加えて、同様の処方でミセルを作成することで、さらに高い抗菌効果・殺菌効果を有することが明らかとなった。歯周炎モデルマウスを用いた検討から、本ナノミセル 1 週間処置により、口腔内バイオフィルム量が約 1/3 まで減少させることが明らかとなった。加えて、炎症性サイトカイン IL-6、IL-8、TNF- α 産生量はそれぞれ 1/3、1/2、1/2 まで優位に減少したことで、また歯肉・歯槽骨組織において炎症の改善効果が認められた。さらに、以上の結果から、本ナノミセル処置により優位に口腔内バイオフィルムを除去し、治療効果を得られる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 啓 (Kondo Hiromu) (10825110)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	
研究分担者	木村 晋一郎 (Kimura Shinichiro) (20791338)	静岡県立大学・薬学部・助教 (23803)	
研究分担者	稲井 誠 (Inai Makoto) (20621626)	静岡県立大学・薬学部・講師 (23803)	
研究分担者	菅 敏幸 (Kan Toshiyuki) (10221904)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関