

令和 4 年 9 月 21 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10457

研究課題名(和文) う蝕による生活習慣病の予防を目的としたフッ化物含有口腔粘膜付着性パッチの開発

研究課題名(英文) Development of fluoride-containing oral mucoadhesive patch for the prevention of lifestyle-related diseases caused by dental caries

研究代表者

小野 浩重 (ONO, HIROSHIGE)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90368704

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)：本研究では、水を使用せずう蝕及び歯周病の原因菌であるミュータンス菌に対する予防効果を有する口腔内パッチ製剤の開発を目的としてフッ化ナトリウム(NaF)含有S/O(solid-in-oil)エマルジョンを用いたパッチ製剤を調製し、組成成分である様々な油相やNaFの放出制御に関わるゲル化剤HSA(12-ヒドロキシステアリン酸)の有用性を検討した。その結果、ヤシ油を用いたHSA0.05g/mL、1mg/ml NaFを含有したパッチ製剤で添加後3時間までの早期のミュータンス菌増殖の抑制とその後の持続的なミュータンス菌増殖抑制効果を示し、フッ化物イオンの徐放化に伴う本パッチ製剤の有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国での口腔保健におけるフッ化物配合歯磨剤の普及はう蝕予防に大きく貢献してきた。その一方で、歯磨きで水を使用して洗浄する際に肺炎起炎菌を含む洗浄水を誤嚥することで誤嚥性肺炎発症を惹起させるリスクや、ウイルス、細菌を含んだ唾液や分泌物の飛沫が洗面台の蛇口やレバーに付着することにより感染が広がる可能性が指摘されている。本パッチ製剤はフッ化物含有S/Oエマルジョンの調製段階でゲル化剤HSAを用いることでフッ化物イオンの放出制御を可能とし、口腔内に低濃度のフッ化物イオンを一定時間滞留させる徐放化を実現したことで水を使用せずに簡便かつ安全なう蝕予防効果の高い口腔セルフケア製剤になり得るものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop patch preparation that prevents caries and periodontal disease without water. S/O (solid-in-oil) emulsion containing sodium fluoride (NaF) was prepared, and the efficacy of various oil phase and gelling agent HSA (12-hydroxy stearic acid), which is designed to control the release of the NaF, was assessed. The combination of coconut oil-based HSA0.05g/mL and the patch preparation containing 1 mg/ml of NaF showed initial suppression of Streptococcus mutans propagation in the first three hours of exposure. Moreover, the effect persisted beyond the initial phase. This observation strongly suggests the effectiveness of the patch preparation with controlled fluoride ion release.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ミュータンス菌 う蝕 フッ化ナトリウム パッチ製剤 ゲル化剤 放出制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

口腔ケアは単に口腔衛生の予防的手段ではなく、QOLの維持向上や全身疾患の改善、健康増進に向けた医療の一環として重要視されているが、高齢者に対する口腔ケアは常に誤嚥のリスクが存在する。特に、水を使って洗浄する口腔ケア方法では誤嚥性肺炎起炎菌を含む洗浄水を誤嚥させるリスクがあり、誤嚥性肺炎発症を惹起させる可能性がある。また、近年、全世界で問題となっている新型コロナウイルス感染において、家庭や職場などの洗面台スペースにおける歯磨き中にウイルスや細菌を含んだ唾液や分泌物の飛沫が洗面台の蛇口やレバーに付着することにより、感染が広まる可能性が指摘されている。

フッ化物はう蝕発病から咀嚼機能の低下にいたる、健康被害のリスク低減にとって不可欠な栄養であるとともに、歯科疾患の予防を目的とした薬剤である。現在、わが国で使用されているフッ化物の局所応用には、フッ化物歯面塗布、フッ化物洗口およびフッ化物配合歯磨剤がある。このうち、フッ化物歯面塗布は医療用の医薬品として高濃度のフッ化物イオン (9,000 ppm) の塗布剤が認可されており、歯科専門家が直接応用する。また、フッ化物洗口は歯科専門家の指導に基づく自己応用であり、週1回法では約900 ppm、毎日法では約225 ppmを使用する。これに対し、本人が主体的に行う自己応用法 (セルフケア) として使用するフッ化物歯磨剤は、フッ化物イオン濃度の上限が1,500 ppm以下であり、消費者が自由に家庭で使用できるため、比較的低濃度で簡単にう蝕予防に応用できる反面、使用方法が個人で異なることから、有効性と安全性への影響が変化する。

う蝕を予防するための再石灰化には、低濃度で絶え間のない量のフッ化物の徐放が必要である。フッ化物歯磨剤はセルフケアとして使用でき、比較的低濃度で簡単にう蝕予防に応用できるが、使用後約2時間で唾液中のフッ化物イオン濃度が0.05 ppm以下になることが報告されている。一方、高濃度を徐放するガラスイオノマーセメント、中濃度徐放のレジン添加ガラスイオノマーモディファインドコンポジットレジン、低濃度の徐放のフッ化物徐放性のコンポジットレジンやフッ化物含有アマalgam等があるが、いずれも歯科専門家の指導に基づくオフィスユースであり、セルフケアが可能な製剤はない。

う蝕による全身疾患の予防におけるフッ化物の応用は、少ない唾液分泌量及び低い唾液緩衝能、口腔清掃を維持する能力の欠如等、高齢者に生じやすいう蝕リスクを考慮する必要があり、水を使用せずに低濃度のフッ化物を口腔内に一定時間滞留させ、有効、簡便でセルフケアが可能な製剤の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

う蝕は唾液の分泌量が少ない就寝中に発生しやすいことから、う蝕を予防するには就寝前にフッ化物製剤を使用後、口腔内に一定のフッ化物イオン濃度を維持する製剤が望ましい。一方、近年のフッ化物によるう蝕予防メカニズムに関する報告では、エナメル質へのフッ化物取り込み量とう蝕との明確な関連が認められず、むしろ低濃度フッ化物イオンの口腔環境における常在が脱灰-再石灰化に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、細胞増殖を抑制するフッ化物イオンの最も低い濃度として0.5 ppmの報告があり、放出濃度の増加とともに毒性作用が増加する可能性がある。本研究では水を使用せずに低濃度のフッ化物を口腔内に一定時間滞留させ、簡便でセルフケアが可能な製剤開発を目的としてフッ化物含有口腔粘膜付着性パッチ製剤を調製し、本製剤のフッ化物イオン放出特性及びう蝕及び歯周病の原因菌である *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌) に対する予防効果を検討した。

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

3. 研究の方法

(1) フッ化物含浸口腔内パッチ製剤の調製(HSAによる s/o エマルジョンのゲル化)

0.1 mg/mL のフッ化ナトリウム(NaF)水溶液 5 mL、10 wt%界面活性剤シヨ糖エルカ酸エステル(ER-290)含有シクロヘキサン 10 mL を 25,000 rpm で 5 分間高速攪拌して W/O エマルジョンを調製した。その後凍結乾燥して油(大豆油、オリーブ油、ヤシ油)に分散させ S/O サスペンションとし、フッ化物イオンの放出制御を目的としてゲル化剤 HSA (12-ヒドロキシステアリン酸) 0.05, 0.2, 0.3, 0.5 g/mL を添加し、S/O エマルジョンをゲル化した。さらに、8 wt%のヒドロキシプロピルセルロース(HPC)水溶液をシリコンシートウェル中に各 60 μL 滴下して冷凍乾燥した後、ゲル化 S/O エマルジョンをパッチに各 15 μL 滴下した (図1)。

(2) ミュータンス菌に対する油相成分の影響(濁度測定)

パッチ製剤の組成成分である油相がミュータンス菌に与える影響を検討するため、ストレプト・ヘモサプリメント(HS)添加 Mueller-Hinton 液体培地(MHB)5 mL に前培養した菌液 100 μL 及び界面活性剤(Tween 80)、各油相成分(大豆油、オリーブ油、ヤシ油)を 5, 20, 80 μL 添加し、37°Cで9時間振盪培養した。10分ごとに、濁度計を用いて吸光度(OD 660)で濁度を測定した。

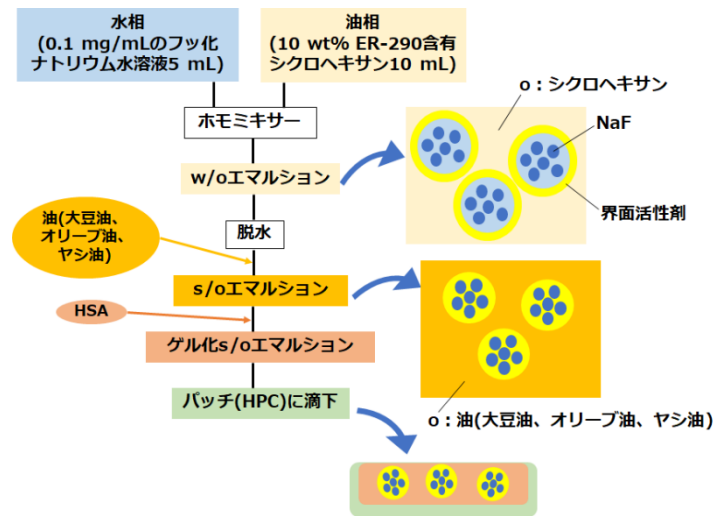


図1. フッ化物含浸口腔内パッチ製剤の調製フロー

(3) フッ化物含浸口腔内パッチ製剤のミュータンス菌に対する感受性試験

CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)、日本化学療法学会標準法に準拠したディスク拡散法により実施した。MHB 3 mL に、前培養した菌液 10 μL を添加後、McFarland ≒0.5 になるまで 37°Cで振盪培養した。次に、菌液を HS 添加 Mueller-Hinton 寒天培地(MHA)に塗布した後、大豆油を含有したパッチ製剤(HSA 0.05, 0.2, 0.5 g/mL)を静置して転倒し、37°Cで 48 時間培養した。培養後、ディスク周囲に形成した阻止円直径(mm)を計測した。

(4) フッ化物イオン濃度 pH 測定

フッ化物イオン標準液 ( NaF 0.2%, F<sup>-</sup> 1000 mg/L 東亜 DKK ) を用いてマルチ水質計 ( 東亜 DDK, MM-43X ) のフッ素濃度を校正した後、人工唾液 ( pH 7.0 ) 270 mL、イオン強度調整液 27 mL を混和した試験液にパッチ製剤を添加し、添加 30 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後、6 時間後、8 時間後、24 時間後のフッ化物イオン濃度及び pH を測定した。

(5) ミュータンス菌に対するフッ化物含浸口腔内パッチ製剤の効果(濁度測定)

ミュータンス菌の増殖を示す濁度上昇を評価するため、HS 添加 MHB 5 mL に、前培養した後希釈した菌液 20 μL 及びパッチ製剤(HSA 0.3, 0.05 g/mL)を添加し、37°Cで 12 時間振盪培養した。10分ごとに、濁度計を用いて吸光度(OD 660)で濁度を測定した。

4. 研究成果

(1) ミュータンス菌増殖に及ぼす油相成分の影響

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

ミュータンス菌に及ぼす油相成分の影響を検討した (図 2) 結果、大豆油は 20  $\mu$ L、80  $\mu$ L ともに増殖増加傾向、オリーブ油ではコントロール群と同様の増殖、ヤシ油では濃度依存的な増殖抑制傾向を示した。本要因として大豆油やオリーブ油はヤシ油に比べて組成比の高いリノール酸やオレイン酸がミュータンス菌増殖に関与していることが示唆された。一方、ヤシ油は 20  $\mu$ L、80  $\mu$ L ともに添加後 3 時間まで増殖が見られず、その後も他の油相に比べてミュータンス菌増殖抑制を示したが、本要因はヤシ油の約 50%を占めるラウリン酸が黄色ブドウ球菌、各連鎖球菌、クラミジア等に抗菌作用を有することに起因するものと考えられる。

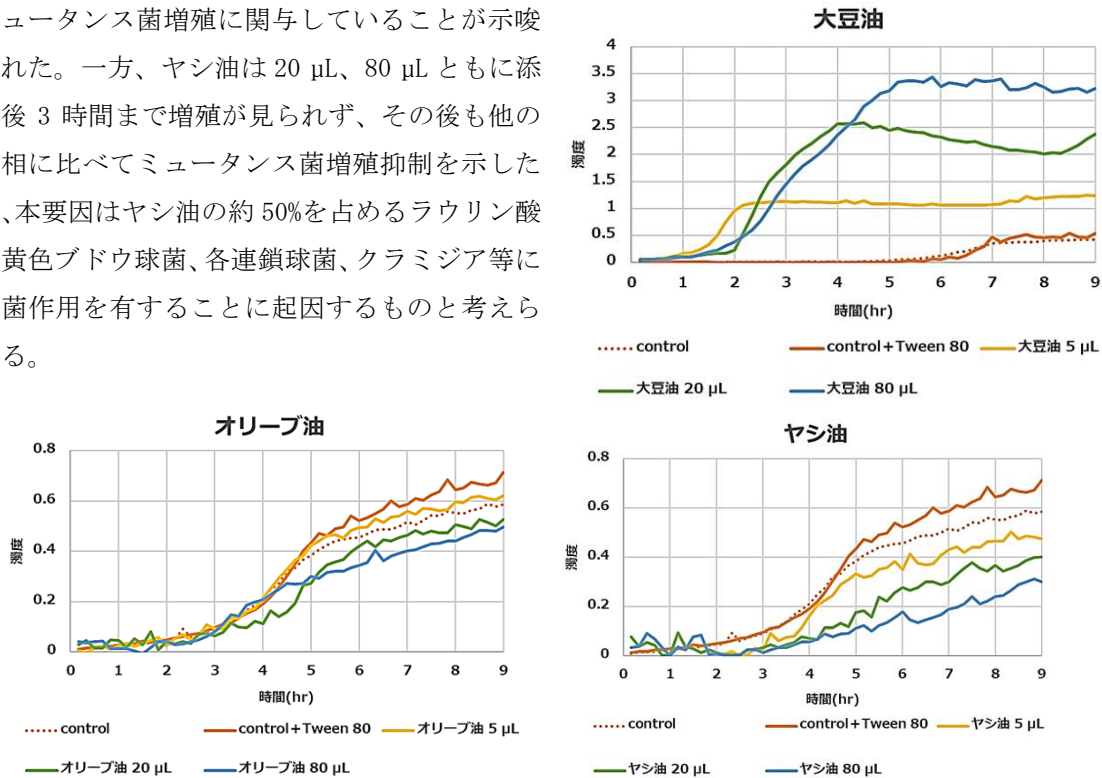
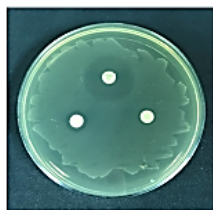


図 2. *St. mutans* 増殖に及ぼす油相成分の影響

(2) ディスク拡散法によるフッ化物含浸口腔内パッチ剤の阻止円

大豆油を含有したパッチ剤 (HSA 0.05、0.2、0.5 g/mL) を用いてミュータンス菌に対する感受性試験を行った (図 3) 結果、パッチ剤のゲル化を目的とした HSA はフッ化物イオンの保持性を高めてパッチ剤に徐放性をもたらす一方、高濃度 (0.5 g/mL) HSA を添加した際にはフッ化物イオンの放出制御が生じることがわかった。



HSA含有量	阻止円直径(mm)
0.05 g/mL	20.5 $\pm$ 1.55
0.2 g/mL	11.8 $\pm$ 1.48
0.5 g/mL	7.05 $\pm$ 0.74

図 3. ディスク拡散法による NaF 及び MFP の阻止円図

(3) フッ化物含有パッチ剤の放出特性

油相として大豆油、オリーブ油、ヤシ油を含有したパッチ剤 (HSA 0.05g/mL) を用いてフッ化物イオンの放出特性を評価した (図 4) 結果、ピーク時間は 3 種類の油相とも添加後 30 分~1 時間であり、ヤシ油添加群で 30 分後に他の油相に比べて高濃度のフッ化物イオンの放出が見られたものの、油相成分による有意な放出性の違いは見られなかった。

【1 研究目的、研究方法など (つづき)】

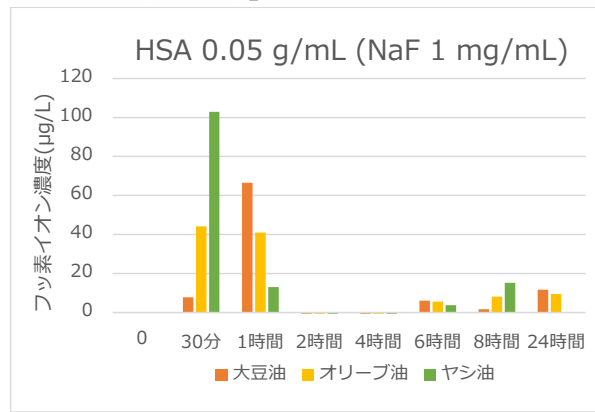


図 4. ミュータンス菌増殖に及ぼす HAS 濃度及び油相の影響

(4) フッ化物含浸口腔内パッチ製剤存在下でのミュータンス菌に対する増殖抑制効果

これまで NaF 濃度の 10 倍濃度の 1mg/ml NaF と油相成分としヤシ油を用いたフッ化物含有 S/O (solid-in-oil) エマルジョンにおいて 2 種類の HSA (0.05 g/mL、0.3 g/mL) を用いたフッ化物含有パッチ製剤のミュータンス菌増殖に対する抑制効果を評価した (図 5)。その結果、HSA0.05 g/mL を用いて調製した製剤では添加後 3 時間まで濁度の増加を抑制し、その後も同濃度の NaF 添加群や NaF を含有しないパッチ製剤群に比べて持続的なミュータンス菌増殖抑制効果を示した。本要因

として、HSA0.05 g/mL は HSA 0.3 g/mL に比べてミュータンス菌増殖期に添加直後から効果的なフッ化物イオン濃度を放出したことで初期増殖の抑制につながったこと、ヤシ油の組成成分の約 50%を占めるラウリン酸が抗菌作用を示すことに起因するものと思われる。本結果より、S/O エマルジョンの油相成分としてヤシ油が適しており、NaF 濃度 1mg/ml、ゲル化剤 HSA 濃度 0.05g/mL を調製条件とするフッ化物含有パッチ製剤が最も有用であることが示唆された。

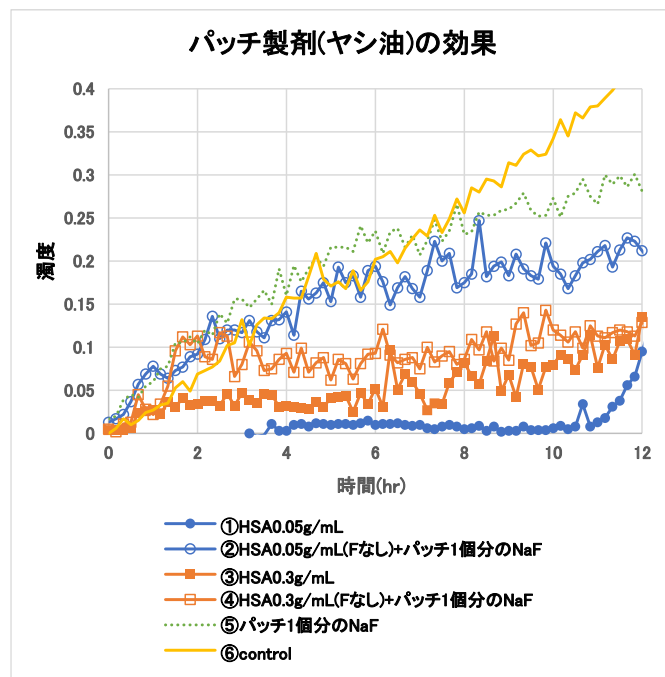


図 5 ヤシ油含有パッチ製剤のミュータンス菌増殖抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 久保 由依菜	4. 巻 なし
2. 論文標題 ミュータンス菌増殖に及ぼすフッ化物含有口腔粘膜付着性パッチ製剤の油相成分の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 2020年度就実大学卒業論文実習レポート	6. 最初と最後の頁 17-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩崎佑美	4. 巻 なし
2. 論文標題 ミュータンス菌増殖に及ぼすフッ化物含浸口腔粘膜付着性パッチ製剤の組成成分の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2019年度就実大学卒業論文実習レポート	6. 最初と最後の頁 96-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村向日葵、通阪栄一、伊藤丈真、相良英憲、岩崎佑美、久保由依菜、山田陽一、塩田澄子、小野浩重
2. 発表標題 ミュータンス菌増殖に及ぼすフッ化物含浸口腔内パッチ製剤の組成成分の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔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	塩田 澄子  (SHIOTA SUMIKO)  (00368698)	就実大学・薬学部・教授    (35307)	

6. 研究組織（つづき）

	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	加地 弘明  (KAJI HIROAKI)  (10368706)	就実大学・薬学部・准教授    (35307)	
研究分担者	通阪 栄一  (TOORISAKA EIICHI)  (40363543)	山口大学・大学院創成科学研究科・准教授    (15501)	

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