

Approach to Periodontal Disease Using PLGA Nanoparticles

Naomi IKEDA¹, Tomomi TOGO¹, Aiko SASAI¹, Hiroyuki TSUJIMOTO²,
Hiromitsu YAMAMOTO³, Mitsuo FUKUDA⁴

It has been reported that oral health is closely related to overall health, and dental health management can be considered an integral part of general health management. Oral biofilm is widely recognized as a key factor in the etiology of periodontal disease. The primary goal in preventing periodontal disease is to inhibit the formation and reformation of oral biofilms, which necessitates the development of highly effective biofilm inhibiting materials. Therefore, we developed IPMP (isopropylmethylphenol) loaded PLGA (polylactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles (NP) with high permeability to biofilms, aimed at effectively preventing periodontal disease.

Active ingredient-loaded PLGA NP are thought to be capable of delivering drugs deeper into biofilms compared to the active ingredient alone. IPMP not only has a strong antibacterial effect but is also less irritating and highly safe and widely used in cosmetics and other products, including toothpaste. We developed three prototypes of toothpaste: one that did not contain either IPMP or PLGA NP, one that contained IPMP, and one that contained the IPMP-loaded PLGA NP, and conducted clinical trials. The increase in oral bacterial counts was suppressed in the IPMP-loaded PLGA NP group compared with the IPMP-only group. The amount of hemoglobin in the saliva tended to be lower in the IPMP-loaded PLGA NP group than in the IPMP-only group. The sulfur compound concentration tended to be lower in the IPMP-loaded PLGA NP group than in the IPMP-only group. When PLGA NP containing the fluorescent component Coumarin were used, the fluorescent component remained on the tongue even after rinsing.

Clinical trials using IPMP-loaded PLGA NP demonstrated reductions in bacterial counts, subgingival bleeding, and improved halitosis. These results suggest that IPMP-loaded PLGA NP are effective in inhibiting biofilm formation.

Keywords:

Periodontal disease

Biofilm

PLGA NP

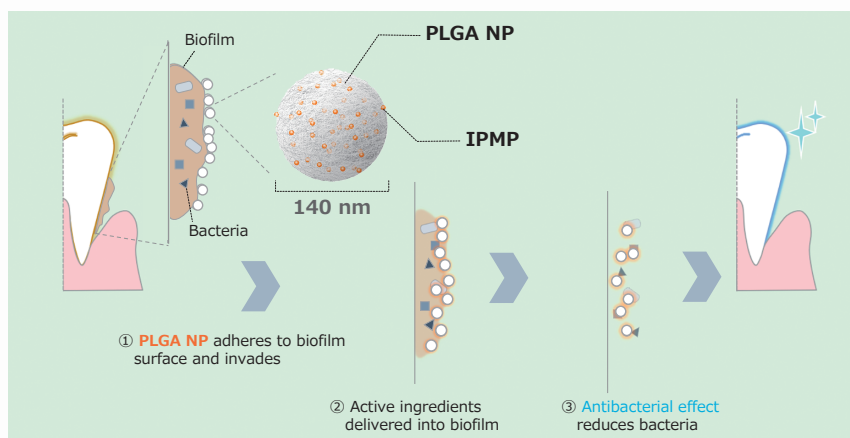
Drug delivery

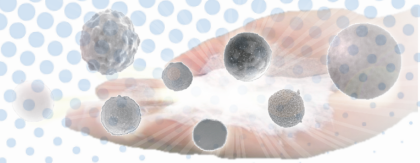
¹ Pharmaceutical & Beauty Science Research Center, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

² Material Business Division Director, Director & Operating Officer, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

³ Professor, School of Pharmacy, Pharmaceutical Engineering, Aichi Gakuin University, JAPAN

⁴ Honorary Professor, Aichi Gakuin University, JAPAN





PLGA ナノ粒子を用いた歯周病へのアプローチ

池田 直美¹, 東郷 智美¹, 笹井 愛子¹, 辻本 広行², 山本 浩充³, 福田 光男⁴

¹ ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業本部 製薬・美容科学研究センター

² 同 取締役, 執行役員, マテリアル事業本部長

³ 愛知学院大学 薬学部 教授

⁴ 愛知学院大学 名誉教授

抄 録

口腔の健康と全身の健康が密接に関係していることが報告されていることから、歯の健康管理は全身の健康管理の一環となっている。しかしながら、高齢化が進む国内では、歯周病の患者数が増加している状況にある。歯周病には、歯周組織に形成される口腔バイオフィルムが深く関与していることが広く認識されている。歯周病予防には口腔バイオフィルムの形成および再形成を防ぐことが重要であり、バイオフィルムの薬剤抵抗性や再形成の機構を踏まえた有用性の高い素材の開発が求められる。そこでバイオフィルムへの高い浸透性を有し、歯周病予防に効果的なイソプロピルメチルフェノール (IPMP) 封入ポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) ナノ粒子 (NP) の開発を行った。IPMP 封入 PLGA NP を用いた臨床試験において、口腔内の菌数の減少、歯周組織の潜血の減少、口臭の改善が認められた。以上の結果から、IPMP 封入 PLGA NP はバイオフィルムの形成抑制に有効であると考えられる。

1 はじめに

歯や口腔の健康は、健康的な人生を送り QOL を充実させるために基本かつ重要な事柄である。近年口腔内の健康が全身の健康とも密接に関係していることが報告され、口腔内の健康管理は全身の健康管理の一つとして注目されている。そのため、歯や口腔の健康づくりへの様々な取組みが活発に行われるようになっている。

2011 年に施行された『歯科口腔保健の推進に関する法律』では、歯科口腔保健の推進に関する基本理念等が定められている。また『健康日本 21 (第三次)』及び『歯科口腔 保健の推進に関する基本的事項 (第 2 次)』では、2024 年から 2035 年までの歯科口腔保健施策等の総合的な推進が示され、歯や口腔の健康づくりが国家的なプロジェクトとして重要視されている。したがって、歯や口腔内の健康を

改善し維持する素材の開発や日常ケアアイテムの開発が社会的ニーズであると考えられる。

2 歯周病

2.1 口腔内細菌と口腔バイオフィルム

口腔内には 700 種以上の細菌が生息しており、歯、歯茎、舌、頬粘膜など特有の生息場所で唾液などの影響を受けながら細菌叢 (フローラ) を形成している。特に歯表面に付着した細菌が菌体外物質を産生しながら互いに強固に結合し合い形成した「バイオフィルム」が「歯垢」や「デンタルプラーク」である。口腔バイオフィルム中には 1 g あたり約 1 兆個の菌が生息しており、これは便と同程度の極めて高い密度である。バイオフィルムの形成過程は、①細菌の歯表面への付着から始まり、②細菌の増殖 (細菌叢の生長) や菌体外物質の産生 (多糖体) が進み、

③バイオフィームを形成する。そして④成熟したバイオフィームの一部（細菌）が分離（飛散）し他の箇所に付着し拡大していくことが知られている。

細菌が産生する菌体外多糖体は粘性を持ち細菌の周りを囲んでいるため、バイオフィームを形成した細菌は消毒液や抗菌剤、免疫（白血球の貪食）などに抵抗性を示す（浸透しにくく、作用されにくい）ことが知られている。そのため物理的な除去が必要となるが、ブラッシングなどでバイオフィームを除去した場合でも、数時間後には再形成されてしまうという報告もある。

また口腔バイオフィーム形成には唾液の関与が大きく、唾液は口腔内を循環しており口腔内の健康維持にも寄与しているが、唾液中に含まれる口腔内細菌が唾液タンパク質を介して歯表面に付着することでバイオフィーム形成が進行すると考えられている。

2.2 歯周病と口腔バイオフィーム

歯周病とは、歯と歯茎の隙間の歯周ポケットに歯周病菌が溜まり増殖することが引き金になり、歯茎の内部で炎症が起こる細菌感染症である。感染が進行すると歯周組織の炎症や骨芽細胞よりも破骨細胞の働きが活発となることで、歯槽骨の破壊が進み歯の動揺や喪失によって口腔機能が損なわれる。また歯周病は、歯や口腔内だけでなく、糖尿病や心臓疾患、呼吸器疾患など全身の病気との関係性も報告されている。

歯周病罹患の年代については、2016年の厚生労働省『歯科疾患実態調査』によると、40歳以上で4 mm以上の歯周ポケットを有する歯周炎発症者が56.2%（年齢調整値）に達しているとの報告がある。しかし一方で、15歳以上の3人に1人が歯周病を患っているとの報告もあり、歯周病の発症予防は若年層でも重要であることが示されている。年齢問わず生涯を通じた切れ目のない対策が必要であることを示している。

歯周病の原因としては、口腔バイオフィームが深く関与していることが知られており、歯周病はバイオフィーム感染症であるとも言われている。そのため、防止策の基本としては、①感染源である歯周病菌の付着防止、②バイオフィームの除去、③炎症部位の消炎、④再感染の防止などが挙げられる。

また口臭の原因の1つとして口腔バイオフィーム

や歯周病が挙げられるが、これは歯周病菌を中心とした口腔内細菌の産生物質の臭いが基となり、口臭が起きているとされているためである。そのため、バイオフィーム形成抑制や歯周病予防は口臭予防としても有効であると言える。

2.3 歯周病予防の素材開発

前述の通り、歯周病予防において重要なのは口腔バイオフィームの形成を防ぐことおよび再形成を防ぐことであり、バイオフィームの薬剤抵抗性や再形成の機構を踏まえた有用性の高い素材開発が求められる。そこで、歯周病予防として、有効成分であるイソプロピルメチルフェノール（IPMP）を封入したポリ乳酸・グリコール酸（PLGA）ナノ粒子（NP）の開発を行った。この製剤は、バイオフィームへの浸透性を有し、歯周ポケットに留まることでバイオフィームの再形成を予防することが期待される。

3 PLGA NP

3.1 PLGA NP の特徴

PLGAは、乳酸とグリコール酸がエステル結合によってランダムに共重合した単鎖構造の生体適合性ポリマーである。エステル結合部位は水存在下で加水分解し、生成した乳酸とグリコール酸はTCA回路（Tri-Carboxylic Acid cycle）を経て最終的には水と二酸化炭素にまで分解され体外へ排出される。そのため、理論的に体内蓄積性や他のナノ粒子で懸念される細胞毒性などは無く、口腔内でも使用可能な安全・安心な化粧品原料である（川島，2006）（FDA認可，医薬部外品・添加剤として承認取得済）（図1）。また、ナノ粒子はそのサイズから、マイクロ粒子では浸透することができない粘膜組織まで到達することが確認されている（図2）。

3.2 バイオフィームへの有用性

バイオフィームの構造は、細菌が栄養素を取り入れるためにスポンジのように無数の小孔を有している。抗菌剤であるクラリスロマイシン（CAM）を封入したPLGA NPではCAM溶液に比べ強い抗菌作用を示した結果も報告されており、PLGA NPはバイオフィームの深部まで薬物を送達することができると考えられている（山本ら，2015）（図3）。

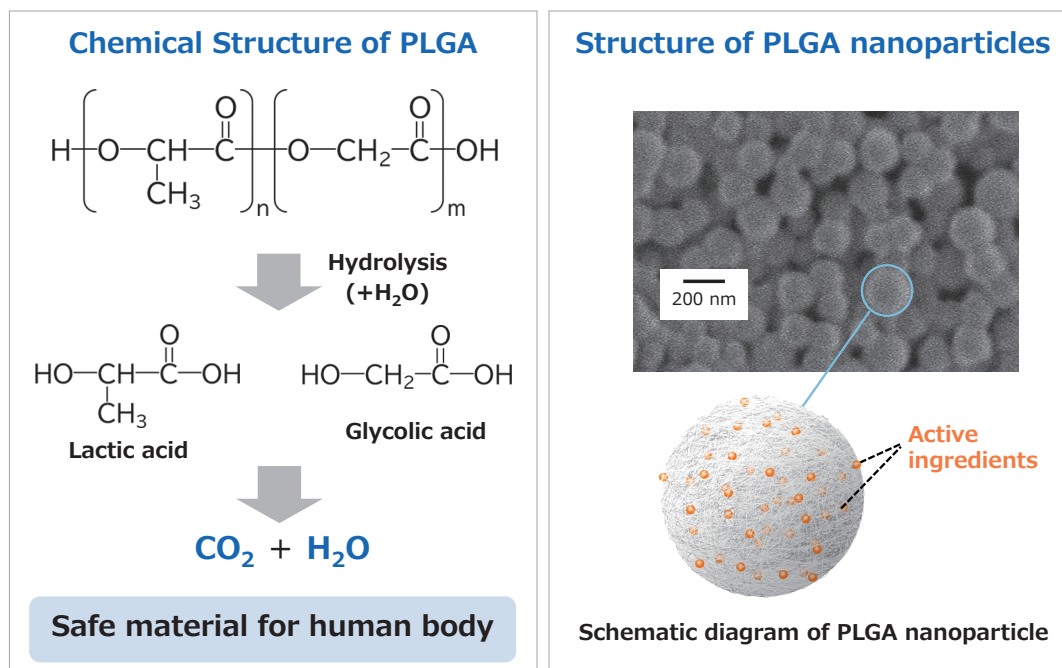


図 1 PLGA の化学構造および PLGA ナノ粒子の SEM 写真 (越智ら, 2023)

Fig. 1 PLGA chemical constitution and SEM image of the PLGA nanoparticles (Ochi et al.,2023).

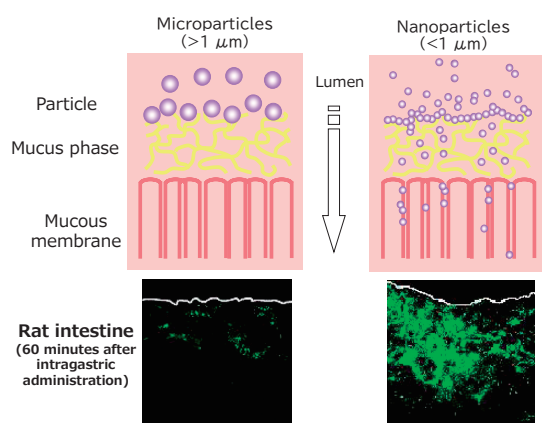


図 2 クマリン封入 PLGA NP の浸透性検証 (愛知学院大学 川島先生作成スライドに加筆)

Fig. 2 Verification of permeability of Coumarin-encapsulated PLGA NP (The figure was added to a slide created by Prof. Kawashima, Aichi Gakuin University).

4 IPMP 封入 PLGA NP の開発

4.1 有効成分の選定

歯周病予防を目的として、PLGA NP に封入する有効成分として抗菌効果を有するイソプロピルメチルフェノール (IPMP)、トタロール、CAM を用いた。

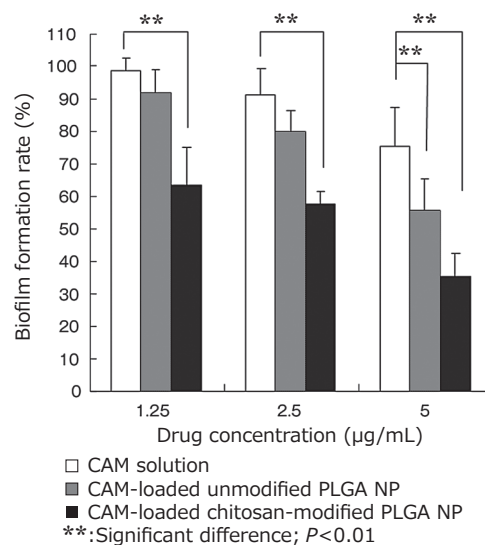


図 3 バイオフィーム形成抑制効果の比較 (山本ら, 2015)

Fig. 3 Comparison of biofilm formation inhibition effects. Adapted from Ref. (Yamamoto H., 2015) under the terms of the CC BY 2.1 JP license. Copyright: (2015) Japan Society of Drug Delivery System.

この 3 成分を封入した PLGA NP について抗菌効果を検証した (図 4)。図中のコロニー数は薬剤投与後の生菌数に相当し、小さな値であるほど生きている細菌が少ない、つまり抗菌効果が高いことを示し

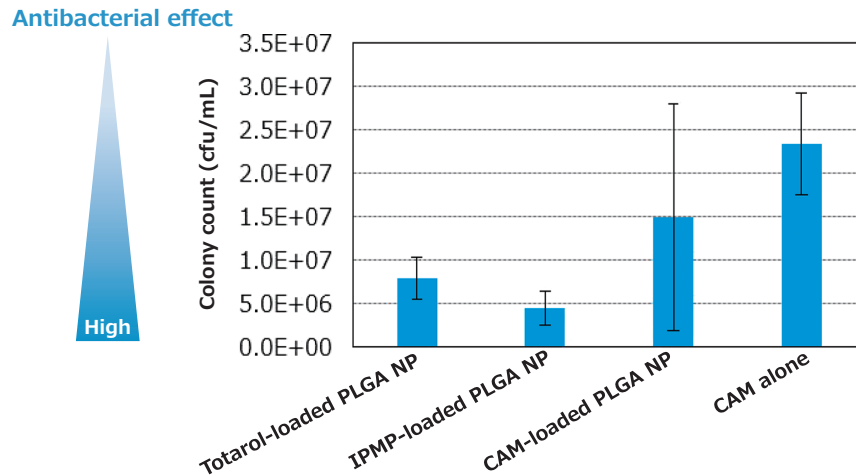


図 4 有効成分封入 PLGA NP による細菌への効果

Fig. 4 Effect of active ingredient loaded PLGA NP on bacteria.

Test toothpaste

	A	B	C
IPMP ⁺ ₊	Not contain	Contain	Contain
PLGA NP	Not contain	Not Contain	Contain
Image	Blank		

Test period

Week	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Test toothpaste	← A →		← B →	← A →		← C →	← A →		

図 5 臨床試験 -1 の実施方法

Fig. 5 How clinical trials-1 are conducted.

ている。歯周病治療にも用いられている CAM の溶液に比べ、PLGA NP に封入して投与した製剤はいずれも強い抗菌作用を示し、特に IPMP 封入 PLGA NP が最も強い抗菌効果を示した。

IPMP は抗菌効果が高いだけでなく、刺激性も少なく、安全性の高い成分として化粧品などに広く用いられており、歯磨き剤への使用も可能である。そこで、上記 *in vitro* 抗菌実験結果を受け、IPMP 封入 PLGA NP を配合した歯磨き剤を試作し、歯周病への効果を検証するために医師指導のもと臨床試験を実施した。

4.2 口腔内細菌数

臨床試験-1 は単盲検法で行った。IPMP および

PLGA NP のいずれも含まない歯磨き剤 A と、IPMP を含む歯磨き剤 B、IPMP を封入した PLGA NP 配合の歯磨き剤 C を使用した。被験者 10 名には歯磨き剤 A を 2 週間連用した後に歯磨き剤 B を 1 週間連用、その後再び歯磨き剤 A を 2 週間連用した後に歯磨き剤 C を 1 週間連用してもらった (図 5)。測定には細菌カウンター (Panasonic 製) を用いた。

被験者の口腔内細菌数を測定したところ、PLGA NP に封入していない IPMP に比べ、IPMP 封入 PLGA NP の方が細菌数の増加を抑制していた (図 6)。この結果は IPMP を PLGA NP に封入することで、より効果的に口腔内の細菌に対して抗菌剤の送達が可能となり、強い抗菌効果を示したことを示唆している。

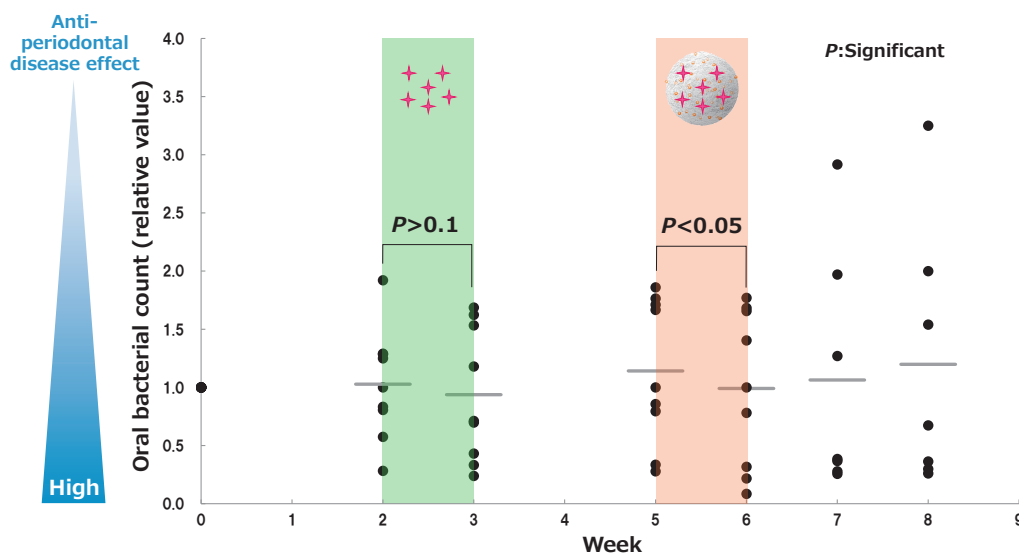


図 6 口腔内細菌数の結果

Fig. 6 Results of oral bacterial counts.

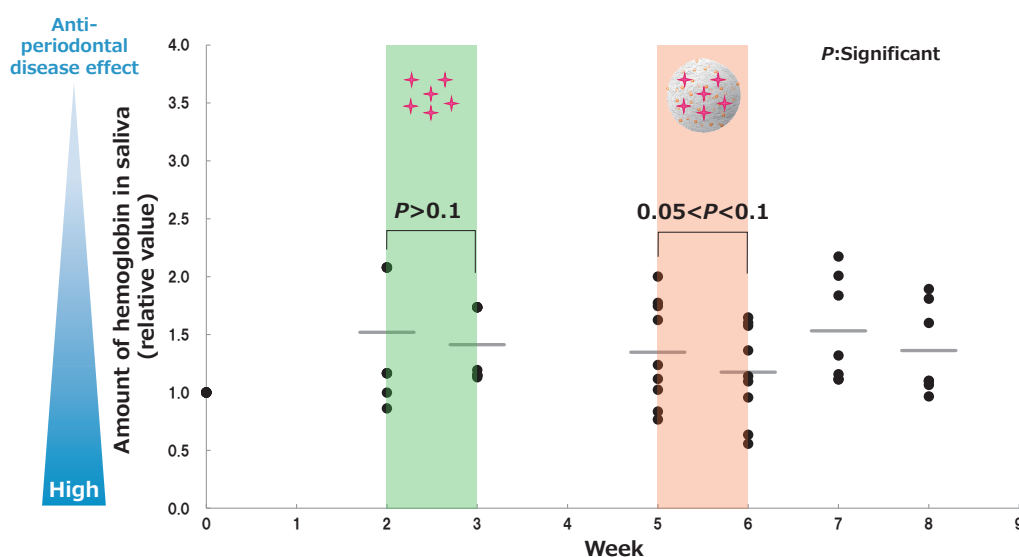


図 7 唾液中ヘモグロビン量の結果

Fig. 7 Results of amount of hemoglobin in saliva.

4.3 唾液中ヘモグロビン量

歯周病が進行すると、歯茎に炎症が生じ、出血することがある。通常、唾液中にはヘモグロビンが存在しないため、唾液中にヘモグロビンが検出されることは出血があることを示唆する。

4.2 と同じ条件で臨床試験-1 を行い、唾液中のヘモグロビン量を測定した。測定は抗原抗体反応を用いて定量した。

被験者の唾液中ヘモグロビン量は、PLGA NP に封入していない IPMP に比べ、IPMP 封入 PLGA NP の方が低い値を示す傾向がみられた (図 7)。この結果は、唾液中の出血が減少傾向にあることを示唆しており、IPMP 封入 PLGA NP は歯茎の炎症を改善する効果が期待できる。



Sampling by Prof. FUKUDA



Bad breath measurement

図 8 臨床試験 -2 の実験風景

Fig. 8 Experimental scene of clinical trials-2.

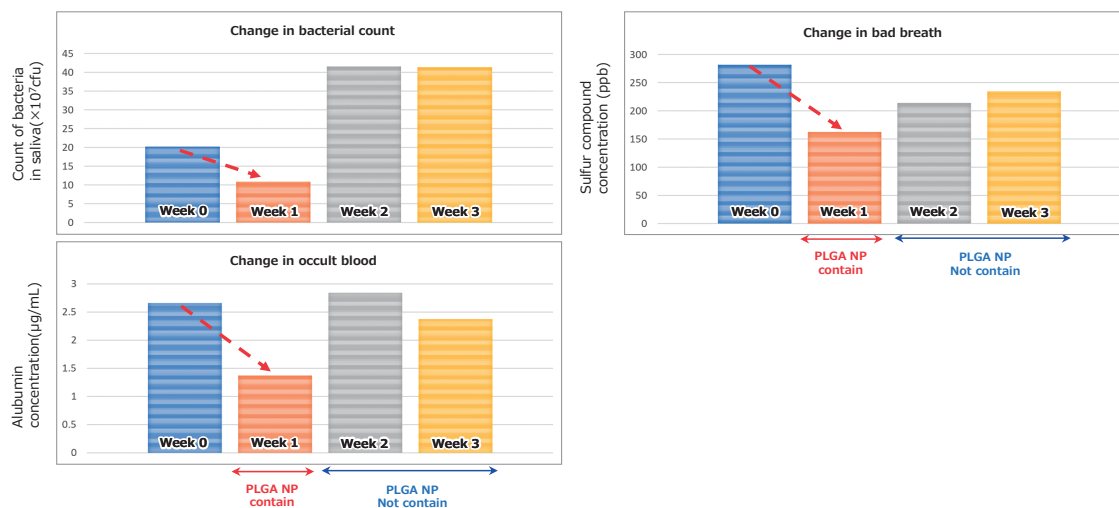


図 9 臨床試験 -2 の結果 (著効例: 20 代男性)

Fig. 9 Results of clinical trials-2 (remarkable results: Male in his 20s).

4.4 口臭

臨床試験-2は単盲検法で行った。IPMP封入PLGA NP配合の歯磨き剤Dと、それぞれIPMPおよびPLGA NPのいずれも含まない歯磨き剤EおよびFを使用した。被験者19名には歯磨き剤D、E、Fをそれぞれ1週間連用してもらった。臨床試験-2では、唾液中の菌数測定や潜血指標のアルブミン濃度測定と合わせて、口臭測定器ハリメーター（TAIYO製）を用いた呼気中の硫黄化合物測定による口臭への効能評価を行った（図8）。

被験者の菌数、アルブミン濃度、硫黄化合物濃度を測定したところ、IPMPおよびPLGA NPのい

れも含まない歯磨き剤EおよびFに比べ、IPMP封入PLGA NP配合の歯磨き剤Dの方が減少傾向にあった（図9）。この結果はIPMP封入PLGA NPが歯周病だけでなく、細菌を原因とする口臭にも効能を示すことを示唆している。

4.5 舌への残存

蛍光成分であるクマリンを封入したPLGA NP配合の歯磨き剤を舌の上に塗布し、5分後に洗口した。洗口後の舌の上に蛍光成分が確認されたことから、PLGA NPは舌背の間隙にも残存することができると考えられる（図10）。舌背の糸状乳頭の間隙にも

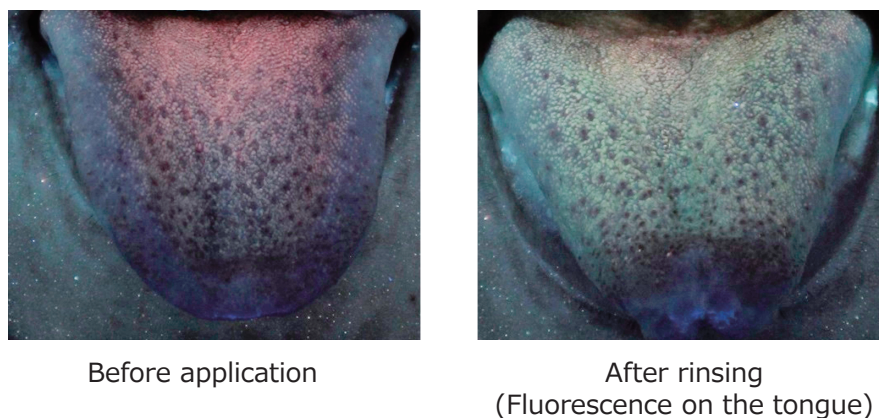


図 10 PLGA NP の舌への残存

Fig. 10 Retention of PLGA NP on the tongue.

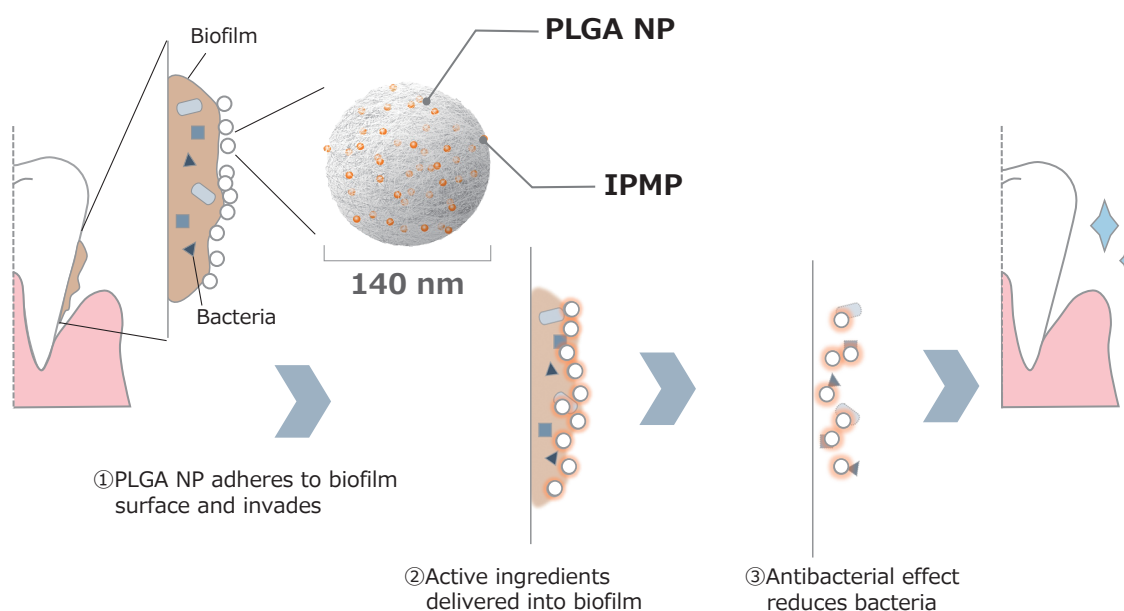


図 11 IPMP 封入 PLGA NP によるバイオフィルム形成抑制

Fig. 11 Biofilm formation inhibition by IPMP-loaded PLGA NP.

バイオフィルムの元となる細菌が存在しており、PLGA NP が残存することでこれらの細菌にも作用することが期待できる。

したオーラルケアが歯周病予防や口臭改善に繋がります。QOL 向上の一役を担えると期待する。

5 おわりに

抗菌成分である IPMP を封入した PLGA NP のバイオフィルムへの効能を検証した。その結果から、IPMP 封入 PLGA NP はバイオフィルムの形成抑制に有効であると考えられる (図 11)。本技術を生か

References

- 越智 綾香, 田中 萌, 笹井 愛子, 辻本 広行, “最新のヒト幹細胞培養液を配合したまつ毛育毛技術の開発—M 再生クリニックとのコラボレーション—”, 粉砕, 66 (2023) 72–77.
Ochi A., Tanaka M., Sasai A., Tsujimoto H., “Development of Eyelash Growth Technology with The Latest Human Stem Cell Culture Supernatant —Collaboration with M Regenerative Clinic—”, The Micromeritics, 66 (2023) 72–

77. <https://doi.org/10.24611/micromeritics.2023015>

川島 嘉明, “PLGA ナノスフェアの設計と DDS への展開”, 薬剤学, 66 (2006) 224–238.

<https://doi.org/10.14843/jpstj.66.224>

山本 浩充, 小川 法子, 高橋 知里, “球形技術を応用したバイオフィルム感染症治療を目的としたナノ粒子製剤の開発”, Drug Delivery System, 30 (2015) 129–138.

<https://doi.org/10.2745/dds.30.129>

著者紹介



池田 直美 Naomi IKEDA

〔経歴〕 2011 年岡山大学大学院自然科学研究科博士前期課程修了。受託分析会社の技術職を経て、2024 年ホソカワミクロン株式会社入社。2024 年から現職。

〔専門〕 機器分析, 無機物の結晶化を用いたナノ粒子技術開発。

〔連絡先〕 nikeda@hmc.hosokawa.com



東郷 智美 Tomomi TOGO

〔経歴〕 2017 年滋慶医療科学大学院大学医療安全管理学研究科博士前期課程修了。化粧品メーカーの研究開発職, バイオ技術の専門学校教員を経て, 2022 年ホソカワミクロン株式会社入社。2022 年から現職。

〔専門〕 美容皮膚科学, 培養細胞を用いた化粧品有効性評価・安全性評価, PLGA ナノ粒子技術を応用した機能性化粧品の研究・開発。

〔連絡先〕 ttogo@hmc.hosokawa.com



笹井 愛子 Aiko SASAI

〔経歴〕 2009 年岩手大学大学院博士後期課程修了。博士 (工学)。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2010 年より製薬・美容科学研究センターにて勤務。同センター長。

〔専門〕 ナノマテリアル。PLGA ナノ粒子の医薬品・化粧品開発。

〔連絡先〕 ayasutake@hmc.hosokawa.com



辻本 広行 Hiroyuki TSUJIMOTO

〔経歴〕 1988 年中央大学大学院理工学研究科博士前期課程修了。博士 (工学)。同年ホソカワミクロン株式会社入社。粉体工学研究所, 粉体システム事業部等を経て, 取締役, 執行役員, マテリアル事業本部長。

〔専門〕 粉体工学, 化粧品, 育毛剤開発等 PLGA ナノ粒子の実用化開発の国家プロジェクト等多数。

〔連絡先〕 hytsujimoto@hmc.hosokawa.com



山本 浩充 Hiromitsu YAMAMOTO

〔経歴〕 1994 年岐阜薬科大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。博士 (薬学)。1995 年同大学助手。2006 年愛知学院大学薬学部製剤学講座助教授を経て, 2012 年から現職。2014 年より 1 年間, ゲーテ大学 (ドイツ) 博士研究員

〔専門〕 粉体工学, 製剤工学, ドラッグデリバリーシステム。

〔連絡先〕 hiromitu@dpc.agu.ac.jp



福田 光男 Mitsuo FUKUDA

〔経歴〕 1982 年東京医科歯科大学大学院歯学研究科修了。博士 (歯学)。同年東京医科歯科大学歯学部助手。1989 年愛知学院大学歯学部歯周病学講座講師。1994 年同助教授。2006 年同特殊診療科教授。1995 年より 1 年間, ポストフォーサイスデンタルセンター研究員。2023 年愛知学院大学名誉教授。日本歯周病学会名誉会員。2024 年日本口臭学会名誉会員・監事。

〔専門〕 歯周病学, 口臭治療

〔連絡先〕 fukuda-m@dpc.agu.ac.jp