

# ヒノキチオールを配合した 口腔ケア用品の抗菌作用

佐藤則文<sup>1, 3)</sup> + 中村盛幸<sup>2, 3)</sup> + 泉福英信<sup>3)</sup> + 山崎統資<sup>2)</sup>  
*Norifumi SATO*                      *Moriyuki NAKAMURA*                      *Hidenobu SENPUKU*                      *Tsuneoyoshi YAMAZAKI*

- 1) イーエヌ大塚製薬株式会社 開発研究所
- 2) 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 障害者歯科学分野
- 3) 国立感染症研究所 細菌1部

**Do** DIAMOND

第33巻第4号・2008年3月号（別刷）

発行所 株式会社デンタルダイヤモンド社

## ヒノキチオールを配合した 口腔ケア用品の抗菌作用

佐藤則文<sup>1, 3)</sup> + 中村盛幸<sup>2, 3)</sup> + 泉福英信<sup>3)</sup> + 山崎統資<sup>2)</sup>

Norifumi SATO

Moriyuki NAKAMURA

Hidenobu SENPUKU

Tsuneyoshi YAMAZAKI

1) イーエヌ大塚製薬株式会社 開発研究所

2) 東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 障害者歯科学分野 3) 国立感染症研究所 細菌1部

### 緒言

近年、高齢者の肺炎は口腔をリザーバーとする口腔細菌等によって発症する可能性が示唆されている。そのため、口腔衛生状態を保つことで誤嚥性肺炎などの疾患を予防し、QOL 向上に役立てることを考慮した口腔ケアに対する関心が高まっている。

口腔衛生状態の悪化は、口腔に常在するレンサ球菌や歯周病菌による歯科疾患の増悪だけでなく、*Pseudomonas sp.* や *Candida albicans* をはじめとする日和見感染菌などの定着を招き、慢性感染症として全身的な疾患にもつながる<sup>1, 2)</sup>。また免疫機能の低下や嚥下反射の低下とともに口腔細菌等の誤嚥により、誤嚥性肺炎や発熱の発症率が上昇する<sup>3, 4)</sup>。とくに要介護高齢者では、肺炎発症のリスクも高く、要介護度の上昇とともにそのリスクは急激に上昇することも報告されている<sup>4)</sup>。さらに自立度の低下や唾液分泌能の低下なども重なり、口腔の状態はさらに悪化しやすい状況にある。したがって、日常的な口腔ケアにより口腔の衛生状態を維持していくことは肺炎

などの予防に繋がる重要なケアになる。

口腔細菌等に対する抗菌性を付与した口腔ケア用品は多数販売されているが、配合助剤等の影響で薬用成分の抗菌性が低下したり<sup>5)</sup>、あるいは刺激が強くて要介護高齢者には使用しにくい商品も多い。また、健常者では検出頻度が低いものの要介護高齢者では検出頻度が高い日和見感染菌等に対する抗菌性についての報告も多くない。

ヒノキチオールは、ヒバや台湾ヒノキに含まれ、医薬部外品や化粧品に使用されている。また、MRSA や歯周病菌等に対する抗菌性が報告されるが<sup>6~10)</sup>、日和見感染菌である *Candida* に対する抗菌性に関する報告は乏しい。そこで本稿では、ヒノキチオールを有効成分として含有する口腔ケア用歯磨剤 (EN-Q0101) の抗菌性 (とくに *Candida* を中心に) および Biofilm 形成阻害効果について検討したので報告する。

### 実験材料および方法

① *C. albicans* に対する抗菌試験および Biofilm 形成阻害試験

*C.albicans* に対する抗菌試験およびBiofilm 形成阻害試験については、以下のように実施した。

▶実験試料：有効成分としてヒノキチオールを含有し、また研磨剤や発泡剤を含まず、甘みとはちみつ風味を付与した歯磨剤試作品 EN-Q0101（イーエヌ大塚製薬<sup>®</sup>提供）を用いた。

▶抗菌試験1：*C.albicans* NBRC 1594を $1 \times 10^7 \sim 10^8$ /mL に調製し、試料5 g に菌液0.05mL を混合した。37℃で1、3、5分間作用した後にGPLP 寒天培地を用いた混釈平板培養法により生菌数を測定した。

▶抗菌試験2：*C.albicans* ATCC 10231を約 $1 \times 10^8$ /mL に調製し、試料 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ /mL の生菌数になるように接種、混合した。混合液を22.5℃で保存し、1、2、7日後の生菌数をポテトデキストロース寒天培地を用いた混釈平板培養法により測定した。

▶Biofilm 形成阻害試験：試料を所定濃度にRPMI-1640（100mM グルコース、10% FBS 含有）培地で希釈した。一方、*C.albicans* MYA-2876をYPD 培地で培養後にPBSで2度洗浄し、5倍希釈液を調製した。先に調製した試料希釈液と*Candida* 希釈液を1：1で混合し、96穴プレートに100 $\mu$ L 加え、37℃で24時間培養した。培養後にプレートをPBSで3度洗浄してからXTT assay を行い<sup>1)</sup>、492nm の吸光度でBiofilm 形成能を評価した。さらに顕微鏡観察を実施した。

## ②大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対する抗菌試験

*Escherichia coli* ATCC8739、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027、*Staphylococcus aureus*

ATCC6538を約 $1 \times 10^8$ /mL に調製し、試料 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ /mL の生菌数になるように接種、混合した。混合液を32.5℃で保存し、1、2、7日後の生菌数についてSCDLP 寒天培地を用いた混釈平板培養法により測定した。

## 結果

### ①*Candida* に対する抗菌効果およびBiofilm 形成阻害効果

▶抗菌効果1：イニシャル、1、3、5分後の生菌数を測定し、イニシャルに対する生存率（%）を図1に示した。試料と*Candida* を1分以上接触させることで約60%の*Candida* は死滅した。

▶抗菌効果2：イニシャルから1、2、7日間試料と共存した後の生菌数を測定し、図2に結果を示した。時間の経過とともに生菌数は減少した。7日目には生菌数は検出限界以下となった。

▶Biofilm 形成阻害効果：試料を含有した状態で24時間培養し、*Candida* Biofilm の形成状態をXTT assay にて分析した。*Candida* は

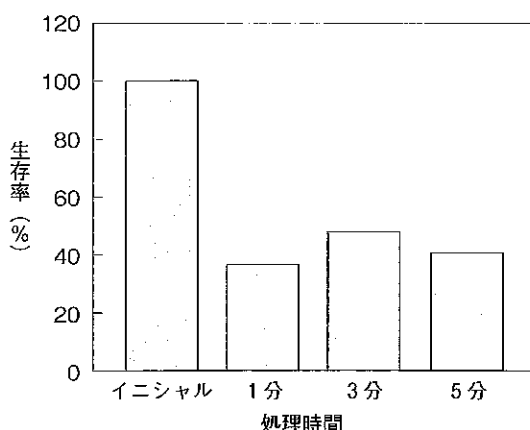
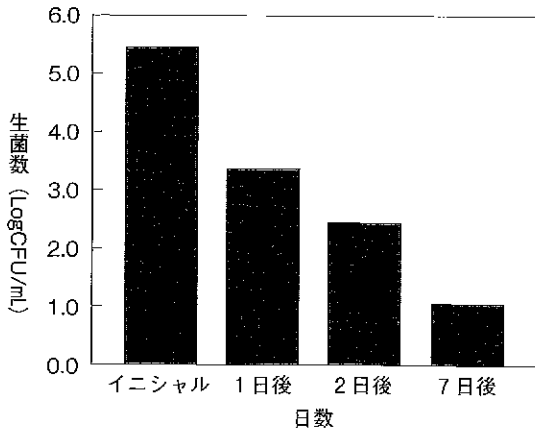
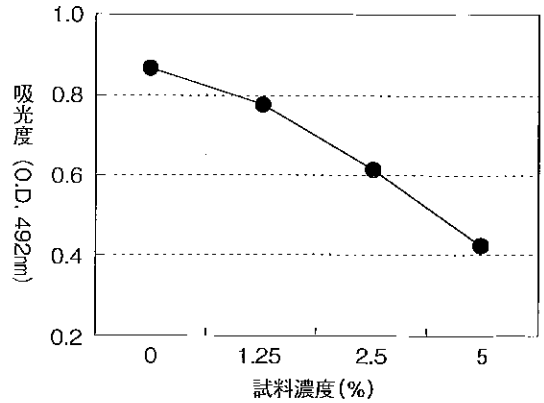


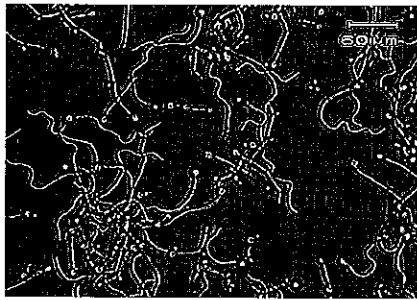
図1 *C.albicans* に対する抗菌効果1



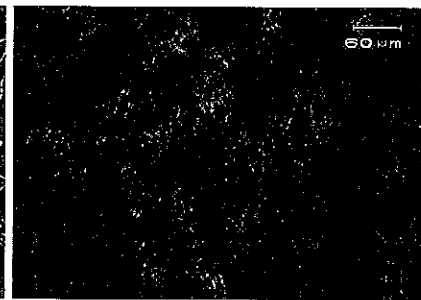
図② *C. albicans* に対する抗菌効果 2



図③ *C. albicans* Biofilm 形成の阻害効果



図④a 5%濃度



図④b 試料なし

図④ab *Candida* Biofilm の顕微鏡観察結果

MEM 培地中で培養すると菌糸を伸ばし、24 時間でプレート底面にBiofilmを形成するので本方法をBiofilm形成に利用した。XTT assay で比較した結果を図3に示した。試料の濃度依存的に吸光度は低下し、Biofilmの形成が阻害された。

また、顕微鏡下Biofilmの状態を観察したところ(図4)、試料濃度5%では菌糸の形成が阻害されていることがあきらかになった。

## ②大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果

1、2、7日目の生菌数を測定した結果を

図5に示した。約 $10^6$ /mLの菌数は1日後でほぼ検出限界以下( $<10$ )にまで減少した。

## 考察

今回、ヒノキチオールを有効成分として配合した歯磨剤の抗菌効果を検討した結果、*Candida*に対する抗菌効果、Biofilm形成阻害効果が認められた。さらには大腸菌や緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対しても抗菌効果が認められた。

ヒノキチオールの抗菌性については古くから報告があり、たとえば、MRSA<sup>9)</sup>やレジ

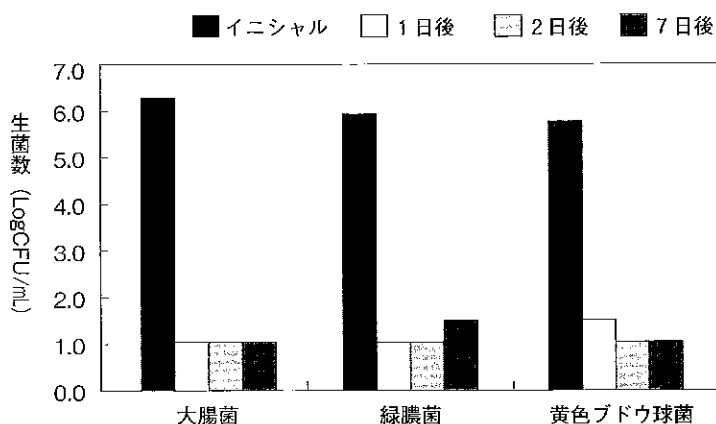


図6 大腸菌、緑膿菌、黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果

オネラ<sup>10)</sup>、さらには歯周病菌などの口腔細菌やカビ、酵母に至るまで広範な抗菌性を示すことが報告<sup>6~8)</sup>されている。とくに口腔細菌では、*P.gingivalis* に対して感受性が高いことも報告されている<sup>6)</sup>。そのために医薬部外品や歯周病治療薬としても使用されているが、今回の結果はヒノキチオールの有効性を裏付ける結果となった。

本歯磨剤には*Candida* Biofilmの形成を抑制する結果が得られた。*C.albicans* は、義歯や粘膜への付着性が高く、Biofilmを形成しやすいこと、また口内炎や口角炎、カンジダ症の原因菌となることが知られている<sup>12)</sup>。一方で*C.albicans* は菌糸を形成することで感染性や病原性に関与することが知られている<sup>13)</sup>。したがって、抗菌作用に加えて、Biofilmの形成や菌糸の発現を抑制することは*Candida*の感染性を抑制することにも繋がると考えられる。

要介護高齢者では、義歯の装着や生体防御能の低下により、日和見感染菌の口腔での検出が多くなる<sup>14,15)</sup>。また、唾液分泌能の低下

による自浄作用の低下も口腔衛生状態の悪化に繋がる。とくに*Candida*の増加は呼吸器疾患死亡リスクとの関連性や誤嚥性肺炎の発症との関連性も考えられていることから<sup>16,17)</sup>、日常的にヒノキチオールを含有する口腔ケア用品でケアを継続することは、*Candida*を中心とした日和見感染菌の低減に繋がると考えられる。

さらに要介護高齢者の口腔内からは、腸内細菌や緑膿菌、黄色ブドウ球菌も検出されることが報告されている<sup>1,2)</sup>。ヒノキチオールを含有する歯磨剤はこれらの菌に対する抗菌性を示し、緑膿菌等が常在しやすい要介護高齢者の口腔ケアに対しても有用であると考えられる。

一方、結果には記載していないが、歯科医を中心とする14名に本歯磨剤の官能特性についてアンケートを実施したところ、本歯磨剤は刺激性も少なく、発泡剤や研磨剤を含まないことから使用しやすく、またわずかな甘みとはちみつの風味を評価する意見が得られた。このような特性は、口腔ケアを拒絶しが

ちな要介護高齢者に対して、継続的なケアの実施に役立つ可能性が示唆される。

以上、ヒノキチオールを含有する歯磨剤を要介護高齢者の口腔ケアに利用することで、*Candida*を初め口腔微生物の口腔感染を予防し、衛生状態を改善することでQOLの向上に繋がると考えられる。本研究で使用した歯磨剤は高齢者に刺激にならないように配慮されており、発泡剤や研磨剤を含まないことから、要介護高齢者に使用しやすいと考えられた。今後は、要介護高齢者に対する臨床的な有用性について検討する必要があると考えられる。

## まとめ

ヒノキチオール含有歯磨剤EN-Q0101を用いて、*Candida*に対する抗菌試験やBiofilm形成阻害試験を実施した結果、*Candida*に対する抗菌性やBiofilm形成阻害、菌糸の発現抑制効果が認められた。さらには大腸菌等に対する抗菌性も認められた。したがって、日和見感染菌の検出頻度が高い要介護高齢者の日常的な口腔ケアに使用することで、口腔衛生状態を改善し、QOL向上に役立つ可能性が示唆された。今後は、要介護高齢者に日常的に使用した場合の有効性について臨床的にあきらかにしたいと考える。

### 【参考文献】

- 1) 泉福英信, 十亀 輝, 由川英二, 他: 特別養護老人ホーム等施設内高齢者の口腔バイオフィーム内細菌群と全身疾患との関係. *Bacterial Adherence 研究*, 14: 21-26, 2000.
- 2) 泉福英信: 口腔バイオフィーム感染症と全身の健康. *日本歯科評論*, 61: 61-66, 2001.
- 3) 米山武義, 吉田光由, 佐々木英忠, 他: 要介護高齢

者に対する口腔衛生の誤嚥性肺炎予防効果に関する研究. *日歯医学会誌*, 20: 58-68, 2001.

- 4) 平野浩彦, 網野 純: 口腔機能向上マニュアル. 財団法人 東京都高齢者研究・福祉振興財団, 東神堂, 東京, 20-22, 2006.
- 5) 向笠和夫, 渋谷耕司, 横尾孝男, 他: 非イオン界面活性剤存在下における塩化セチルピリジニウムの殺菌効果. *日歯周誌*, 36: 407-413, 1994.
- 6) 木下雄一, 渋谷 睦, 齊藤 育: 口腔内細菌に対するヒノボロンの*in vitro*抗菌力について. *日本歯科評論*, 516: 254-257, 1985.
- 7) 岡部敏弘, 齊藤幸司, 大友良光: 木材成分ヒノキチオールの物理化学的性状と抗菌作用. *フードケミカル*, 4: 45-52, 1988.
- 8) Saeki Y, Ito Y, Shibata M, et al: Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *Bull, Tokyo Dent, Coll*, 30: 129-135, 1989.
- 9) 小堀一二, 田辺忠夫: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対するヒノキチオールの抗菌作用 第2報. *医学検査*, 43: 15-20, 1994.
- 10) 石松維世, 大賀優希, 石田尾 徹, 他: レジオネラに対するヒノキチオールの抗菌性. *J UOEH (産業医科大学雑誌)*, 25: 435-439, 2003.
- 11) Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I et al: *Candida albicans* Biofilm: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryotic Cell*, 3: 536-545, 2004.
- 12) 二川浩樹, 牧平清超, 江草 宏, 他: 口腔カンジダの付着およびバイオフィーム形成. *Jpn. J. Med. Mycol*, 46: 233-242, 2005.
- 13) Ernst J F: Transcription factors in *Candida albicans* environmental control of morphogenesis. *Microbiology*, 146: 1763-1774, 2000.
- 14) 池邊一典, 喜多誠一, 吉備政仁, 他: 要介護高齢者の義歯への*Candida*菌付着状況. *老年歯学*, 12: 213-220, 1998.
- 15) 上野尚雄, 鄭 漢忠, 大類 晋, 他: 口腔微生物叢と健康との関連についての研究 第1報 老人保健施設入所高齢者における口腔微生物叢について. *老年歯学*, 14: 265-269, 2000.
- 16) 阿部行洋, 清浦有祐: マウスを用いた実験的嚥下性肺炎の病態解析. *口腔衛生学会雑誌*, 56(4): 456, 2006.
- 17) 栗野秀慈, 安細敏弘, 邵 仁浩, 他: 8020追跡調査研究からの報告-口腔内細菌と呼吸器疾患死亡との関連について-. *口腔衛生学会雑誌*, 56(4): 595, 2006.

イーエヌ大塚製薬 開発研究所  
〒025-0312 岩手県花巻市二枚橋第4地割3-5