乳酸菌配合フィルム製剤の保存安定性に関する研究

Studies on Preservation Stability of Lactic Acid Bacteria in a Film Dosage Form

西村 美佐夫,^a 中谷 清吾,^b 竹内 洋文,^c 竹内 淑子,^a 月岡 忠夫^a

Misao Nishimura, Seigo Nakaya, Hirofumi Takeuchi, Yoshiko Takeuchi, Tadao Tsukioka

Received 9 October 2008 ; Accepted 15 October 2008

Lactobacilli (*Streptococcus faecalis* WB2000) are effective in controlling plaque, in preventing dental caries and periodontal disease and in preventing halitosis.

In this study, pharmaceutical thin films, with live lactobacilli, were developed and examined as a dosage form that disintegrates rapidly and stays in the oral cavity. Four dosage forms were designed. Films were formed in a single layer, (A) and (B), and in two layers, (C) and (D). All films showed rapid disintegration and satisfactory mechanical strength. Dosage form (D) which consists of an active ingredient layer and a base layer without a plasticizer of glycerin gave the most excellent stability in preservation among the four. Lactobacilli formulated in (D) showed the same growth tendency as the powder lactobacilli. Pharmaceutical solid dosage film (D) as a new Lactic acid bacteria preparation could be designed.

Keywords : Pharmaceutical film, Lactic acid bacteria, Preservation stability test, Weight deviation test, Growth curve of lactobacilli

1. 緒 言

日本におけるウ蝕および歯周病の罹患率は、他の疾患に類を見ないほど高率である。両疾患とも、慢性の細菌感染症であることが、広く認識されている。ウ蝕および歯周病の原因としてプラークの付着があり、そのプラークの除去や付着予防というプラークコントロールが口腔衛生において重要である。プラークは、400種以上の細菌の複雑な集合体であり、正常な口腔

常在菌に加えて口腔病原菌が混在して、デンタル・バイオフィルムを構成している^{1, 2)}。

プラークコントロールの方法として、歯ブラシやスクレーパーを用いた機械的な除去が有効な治療手段であることが実証されている³⁾。しかし、プラークを機械的に除去できたとしても、歯周ポケットなどが残存すれば、病原菌は再定着しやすく、プラークが再発しやすい。また、抗菌剤を用いた方法も、プラーク中の細菌は菌体外マトリックスで保護されているため⁴⁾、抗菌剤がプラークの内部に浸透せず、その効果が十分に発揮できない。

Ishihara ら⁵⁾は、ヒト糞便から分離した *Streptococcus faecium*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus fermentum* および *L. salivarius* の菌体水抽出画分が、ウ蝕菌である *Streptococcus mutans* 8148 の増殖を抑制することを報告している。

一方、歯周病原菌に関して、Ishikawa ら⁶⁾は、*Lactobacillus salivarius* TI2711 の *in vitro* における *Porphyromonas gingivalis* の増殖抑制および成人を対象とした *L. salivarius* TI2711 配合錠剤の8週間連続摂取試験における唾液中の黒色色素産生嫌気性桿菌の減少を報告

a 株式会社ツキオカ

(〒504-0925 岐阜県各務原市松本町2-451) TEL 058-383-2911
Tsukioka Co., Ltd.

(2-451 Matsumoto-cho, Kakamigahara, Gifu 504-0925, Japan)

b わかもと製薬株式会社 相模研究所

(〒258-0018 神奈川県足柄上郡大井町金手378番地)
TEL 0465-83-8041

Sagami Research Laboratories, Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.

(378 Kanate, Ohi-machi, Asigarakami-gun, Kanagawa 258-0018, Japan)

c 岐阜薬科大学

(〒504-8585 岐阜市三田洞東5-6-1) TEL 058-237-3931
Gifu Pharmaceutical University

(5-6-1, Mitahora-Higashi, Gifu 502-8585, Japan)

Table 1 Formulation of films

Formulation	Base layer		Active ingredient layer	
	Additive	(%)	Additive	(%)
(A)	HPC*	36.0		
	Hypromellose**	26.6		
	Calcium carbonate	2.5		
	Glycerin	2.5		
	Sucrose esters of fatty acids	2.5		
	Mint flavor	2.5		
	l-Menthol	1.5		
	Sucralose	1.0		
	Polysorbate	0.3		
(B)	Lactic acid bacteria	25.0		
	HPC*	38.0		
	Hypromellose**	28.2		
	Calcium carbonate	2.5		
	Glycerin	2.5		
	Sucrose esters of fatty acids	2.5		
	Sucralose	1.0		
	Polysorbate	0.3		
	Lactic acid bacteria	25.0		
(C)	HPC*	26.2	HPC*	24.7
	Hypromellose**	11.3	Polysorbate	0.3
	Calcium carbonate	2.5	Lactic acid bacteria	25.0
	Glycerin	2.5		
	Sucrose esters of fatty acids	2.5		
	Mint flavor	2.5		
	l-Menthol	1.5		
	Sucralose	1.0		
(D)	HPC*	40.0	HPC*	24.7
	Calcium carbonate	2.5	Polysorbate	0.3
	Sucrose esters of fatty acids	2.5	Lactic acid bacteria	25.0
	Mint flavor	2.5		
	l-Menthol	1.5		
	Sucralose	1.0		

* HPC : Hydroxypropyl cellulose

** Hypromellose : Hydroxypropyl methylcellulose

している。

乳酸菌ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株は、*Streptococcus mutans* といったウ蝕の原因菌および *Porphyromonas gingivalis* といった歯周病原菌を抑制する効果を有する（データ未発表）。しかし、その効果は死菌では認められず、生きた菌である必要がある。ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株は、生きた菌として口腔内に留まることにより、ウ蝕菌や歯周病原菌を抑制し、プラークコントロールすることができ、口腔内フローラを乱すことなく正常化することが可能となる。そのためには、乳酸菌を生きたまま製剤化することが求められている。乳酸菌は、熱、水分および香料などの影響により死滅しやすく、安定性が低下することが知られている。口腔用製剤としては、錠剤、粉末、ガム、洗口剤、フィルム剤、歯磨剤などが知られているが、乳酸菌製剤を設計するた

めには、前述の理由から、その安定性に特に留意する必要がある。

本研究では、この目的を達成するために、口腔内において水無しで唾液により溶解する口腔内溶解性フィルム剤に乳酸菌ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株を含有させ、より長く口腔内で滞留でき、かつ、安定性の高いフィルム製剤の検討を行った。以下に、検討内容の詳細を報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

フィルム製剤の成分としては、主成分として乳酸菌ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株（わかもと製薬）、基剤成分としてヒプロメロース 60SH-06（信越化学）、ヒドロキシプロピルセルロース（日本曹達）、添加剤成分として、日本薬局方濃グリセリン（花

Fig. 1 Manufacturing processes

王), ショ糖脂肪酸エステル S1670 (三菱化学フーズ), 炭酸カルシウム (白石カルシウム), ミントフレーバー (高砂香料), L-メントール (東洋薄荷), スクラロース (三栄源エフ・エフ・アイ) およびポリソルベート 80 (日油) を用いた。

2. 2 フィルム製剤の製法

2. 2. 1 製剤の構造

モデル薬剤として乳酸菌 (ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株) を用いた。フィルム製剤は, 乳酸菌を含む基剤, 香料, L-メントールなどの矯味剤等の全てを単層構造にしたものと, 乳酸菌を含む薬剤層と香料, L-メントールを含む層の 2 層構造とした 2 種の製剤構造を検討した。

2. 2. 2 製剤の処方

薬剤層および皮膜層の基剤組成が異なる製剤 A~D の 4 種類の製剤を試作した。各製剤の処方を Table 1 に示した。

2. 2. 3 製剤の製造方法

製造工程を Figs. 1~3 に示した。フィルム製造は溶液流延法を用いた。概説すると, フィルムの基剤溶液を調製し, 薄く均一な厚みで塗布することのできるコーティング機械を用いてベースフィルム (PP や PET など) の平滑な面の上に引き伸ばし塗布する。このとき, 塗布層の厚みは, 主に溶液の固形分濃度,

Fig. 2 Preparation method for film (A) and (B)

粘度, 塗布速度等によって大きく左右されることから, 実績データをもとにして塗布を行った。その後, 塗布されたフィルム溶液は, 乾燥させ水分を蒸発させることによってフィルムとなる。

乾燥は, ベースフィルムに塗布された溶液を風乾燥

Fig. 3 Preparation method of (I) base layer and (II) active ingredient layer for film (C) and (D)

で室温にて水分を蒸発させることで行った。このとき、乾燥時間を調整することで、残留水分量の調整を行った。乾燥温度は、通常約 20～100℃ の範囲内であるが、フィルムの基剤、有効成分の熱安定性を考慮し、試作されるフィルムに合った乾燥温度を設定した。その後、製剤を横 20mm、高さ 30mm の長方形に打ち抜いた。

2. 3 フィルム溶解性の評価

フィルムをピンセットで 10mm 挟み、30℃、200 ml のイオン交換水の入ったビーカーに瓶底から 55mm の位置で固定した。フィルムが崩壊しながら溶解し、フィルム成分が底に到達するまでの時間 (s) を崩壊時間として測定した (Fig. 4)。フィルムの質量

Fig. 4 Method of disintegration test

のばらつきを補正するため、崩壊時間をフィルムの質量で除して算出し、(s/mg) をフィルム溶解性の指標として用いた ($n=3$)。

2. 4 フィルム強度の評価

FUDOH レオメーター ((株) 島津製作所製 AGS-J) を用いて測定した。サンプルフィルムを 24h 恒温室に放置した後、15mm×150mm の短冊状にサンプルを切断 (CD, MD) した。両端をアダプターではさみ、つかみ間隔を 100mm にしてサンプルをセットし、一定の速度条件で測定した ($n=3$)。試験は JIS K7127 : 1999 プラスチック-引張特性の試験方法-第 3 部 : フィルム及びシートの試験条件に準拠して試験を実施した。

2. 5 質量偏差試験

第 15 改正日本薬局方 (JPXV) 製剤均一性試験法の質量偏差試験に準じて行った。各製剤 10 サンプルについて質量を測定した。質量偏差は JPXV の判定基準に従って判定した。

2. 6 安定性試験

2. 6. 1 安定性予備試験

各製剤を専用ケースに収納し、室温 40℃、相対湿度 75% RH および室温 25℃ の条件下にて保存した。室温 40℃、相対湿度 75% RH の条件では、保存後 2 週間および保存後 4 週間、室温 25℃ の条件では、保存後 4 週間、2 ヶ月後および 6 ヶ月後における各製剤について乳酸菌生菌数の測定を行った。

2. 6. 2 安定性試験

製剤を 1 枚ごとアルミ包装 (SP 包装) し、室温 40℃、相対湿度 75% RH の条件下にて保存した。保存前、保存後 2 週間および保存後 4 週間における各製剤について乳酸菌生菌数の測定を行った。なお、乳酸菌数の測定は以下の方法に従った。

サンプル約 5g を精密に量り、希釈液 (1) 又は希釈液 (2) 30 ml 中に加えて強く振り混ぜ、更に希釈液 (1) 又は希釈液 (2) を加えて正確に 50 ml とし、よく振り混ぜ、試料原液とした。試料原液 1 ml を正確に採り、別に正確に分注した希釈液 (1) 又は希釈液

Table 2 Disintegration test

Formulation	Lactic acid bacteria (mg/ strip)	Moisture content (%)	Weight (mg)	Disintegration time (s)	Disintegration index (s/ mg)
(A)	9.2	5-6	20.2 ± 0.7	4.4 ± 0.1	0.22 ± 0.01
(B)	9.7	5-6	20.7 ± 0.5	4.8 ± 0.1	0.23 ± 0.01
(C)	8.2	6-7	44.8 ± 1.7	20.4 ± 1.3	0.46 ± 0.01
(D)	9.8	< 4	48.5 ± 1.6	17.7 ± 1.4	0.37 ± 0.02

Table 3 Mechanical strength

Formulation		Maximum load (N)	Maximum stress (N/mm ²)	Displacement (mm)	Speed (mm/ min)
(A)	CD	3.4	4.6	1.7	5
	MD	2.0	2.6	2.1	5
(B)	CD	3.7	4.8	1.8	5
	MD	2.2	2.9	2.4	5
(C)	CD	14.3	13.6	3.3	50
	MD	14.9	14.2	5.4	50
(D)	CD	8.4	9.4	2.5	50
	MD	10.2	11.3	2.6	50

* Films were stored in 20 ± 1 °C, 65 ± 2 % RH

** JIS K7127 : 1999

(2) 9 ml 中に加える操作 (10 倍希釈法) を繰り返し、1 ml 中に生菌を 20~200 個含む濃度に希釈し、試料溶液とする。3 枚のペトリ皿に試料溶液 1 ml ずつを入れ、これに 50 °C に保ったラクトミン試験用カンテン培地 (1) 又はラクトミン試験用カンテン培地 (2) を 20 ml ずつ加えてすばやく混和し、固化させる、35~37 °C で 24~72 時間培養し、出現した集落をかぞえ、平均集落数を求めた。

試料 1 g 中の生菌数 = (平均集落数 × 希釈倍数 × 5) / 試料採取量 (g)

2. 7 製剤 D の乳酸菌の増殖

0.7 % グルコースを添加した GAM 液体培地 (日水製薬) (10 ml) に、製剤 D を 1 枚入れた (n = 3)。37 °C で静置培養し、0, 2, 4, 6 および 8 時間後に、それぞれ 0.1 ml ずつサンプリングし、乳酸菌生菌数を測定した。対照として、乳酸菌粉末を用いた。

3. 結 果

3. 1 製剤の外観

各製剤の大きさは横約 20 mm、高さ約 30 mm にカットした各フィルムでは、製剤 A, B は、厚さ 43 μm、重さは 20 mg であった。製剤 C, D は厚さ約 70 μm、

Table 4 Weight variation test

Formulation	Weight* (mg)	Criterion** (%)	Assessment***
(A)	21.50 ± 1.23	2.96	good
(B)	21.64 ± 0.97	2.30	good
(C)	45.64 ± 1.12	2.69	good
(D)	46.44 ± 0.74	1.77	good

* Average ± SD (n = 10)

** JPXV

*** Criterion is less than 15 %.

重さは約 50 mg であった。

3. 2 溶解性の試験

製剤 A は、0.22 s/ mg、製剤 B は、0.23 s/ mg、製剤 C は、0.46 s/ mg、製剤 D は、0.37 s/ mg であり、溶解性はフィルム厚に依存している。(Table 2)

3. 3 フィルム強度試験

製剤 A においては、フィルム厚が薄いため、引張強度は劣るものの、ハンドリング性に問題があるほどではなかった。その他の製剤に関しては、適度な強度があった。(Table 3)

3. 4 質量偏差試験

質量偏差試験は JPXV の規定に従って判定値を計算した結果、各製剤とも JPXV の基準に適合した。(Table 4)

Table 5 Active ingredient content after stability test

Stored in 40 °C, 75 % RH

Formulation	After 2weeks (%)	After 4weeks (%)
(A)	0	—
(B)	13.7 ± 0.2	1.0 ± 0.5
(C)	16.7 ± 0.1	1.0 ± 0.3
(D)	56.6 ± 3.3	9.7 ± 1.6

Stored at room temperature (25 °C)

Formulation	After 4weeks (%)	After 2months (%)	After 6months (%)
(A)	0	—	—
(B)	75.5 ± 16.4	52.6 ± 2.3	26.5 ± 7.6
(C)	52.0 ± 2.1	54.3 ± 2.7	42.1 ± 10.8
(D)	100.6 ± 4.7	100.0 ± 10.5	88.1 ± 6.6

* Average ± SD (n=3)

3. 5 安定性試験

予備安定性試験後の各製剤の含量変化を **Table 5** に示した。製剤Dは、製剤A、BおよびCと比較して安定な結果であった。

製剤Dの包装形態を変え、1枚ずつのアルミSP包装にし、本安定性試験を試みた結果を **Table 6** に示した。40 °C 保存、4週間後の残存率が66.4 %と専用ケースより安定性が向上した。

3. 6 製剤Dの乳酸菌の増殖

製剤Dの乳酸菌の増殖の様子を **Table 7** に示した。製剤Dの乳酸菌は、乳酸菌粉末と同様な増殖を示した。

4. 考 察

ウ蝕および歯周病などの慢性細菌感染症の病原菌を抑制し、プラークコントロールすることができる生きた乳酸菌を配合した新規剤形の製剤をめざし、開発を試みた。

製剤Aの結果から、乳酸菌は、熱、水分、香料、可塑剤などの影響により死滅しやすく、安定性が低下す

Table 6 Active ingredient content after stability test (Packed in an aluminum pouch)

Stored in 40 °C, 75 % RH

Formulation	After 2weeks (%)	After 4weeks (%)
(D)	78.2 ± 12.8	66.4 ± 8.0

* Average ± SD (n=3)

ることが分った。そこで、本研究での製剤は、フィルム製造時には熱を与えず乾燥した。また、香料（L-メントール）を含有する層（基剤層）と乳酸菌を含有する層（乳酸菌層）との多層構造の検討（製剤C, D）、さらに、従来のフィルム製剤に必要な可塑剤を除いた基剤層の検討（製剤D）、また、乳酸菌層のみでのフィルムを検討した（製剤B）。製造方法は、口臭防止剤、口腔内清涼剤などの可食フィルムを製造する手法に準じて各層のフィルムを順に製造し積み上げる積層法で行った。本製剤は、携帯すること、口に入れやすい形状であること、口腔内で素早く溶解することを考え、形状はリーフ状とし、大きさは、横約20mm、縦約30mm、厚さ約70 μm、質量は約40mgとした。

本研究においては、4種類の製剤を試作したが、製剤の溶解性試験の結果、いずれの製剤も素早く溶解し、溶解性は問題ない値を示した（Table 2）。製剤の引っ張り強度試験の結果、ハンドリングには問題ない値を示した（Table 3）。質量偏差試験の結果、いずれの製剤も局方の規定に適合した（Table 4）。各製剤を40 °C、湿度75 %の条件で安定性試験を行った結果、製剤Dが、製剤A、BおよびCより安定な結果を示した（Table 5）。従来のフィルム製剤では可塑剤（グリセリン）が必要であるが、可塑剤を用いた製剤BおよびCは、乳酸菌の安定性が低かった。そのため、可塑剤を除いた新しいフィルム製剤の処方および製造方法で製造した製剤Dは、乳酸菌の安定性が向上した。可塑剤を除いたフィルム製剤は、従来のフィルム製剤より水分量を下げることができたことも乳酸菌の安定性の向上に寄与したと考えられる。さらに、製剤Dは、

Table 7 Growth of lactobacillus

Formulation	Initial	After 2hrs	After 4hrs	After 6hrs	After 8hrs
(D)	6.76 ± 0.02	7.04 ± 0.00	8.94 ± 0.06	9.31 ± 0.02	9.26 ± 0.01
Powder	6.75 ± 0.03	7.05 ± 0.03	8.95 ± 0.01	9.26 ± 0.05	9.28 ± 0.02

* Number of lactobacillus : Log₁₀ cfu / ml

** Average ± SD (n=3)

*** cfu : colony forming unit

1枚ずつのアルミ SP 包装にすることで安定性が更に向上し、長期保存も可能となった (Table 6)。また、製剤 D の乳酸菌は、製剤に用いた乳酸菌粉末と同様な増殖曲線を示した (Table 7)。このことは、フィルム製剤の乳酸菌は、製剤前の乳酸菌と同様な増殖性を保っていることを示している。そのため、本製造法は、乳酸菌の増殖性に影響を与えずに、製剤化できていると考えられた。

本研究においては、香料を用いても乳酸菌が安定で、かつ口腔内で水無しで素早く溶解するフィルム製剤 D を開発した。本製剤は、乳酸菌を 25 % まで配合

することが可能であり、ウ蝕の原因菌および歯周病原菌を抑制する効果を有する乳酸菌ストレプトコッカス・フェカリス WB2000 株を生きた状態で高菌数に配合することを可能とした。そのため、本製剤を服用することで、乳酸菌が口腔内に留まり、ウ蝕菌や歯周病原菌を抑制し、プラークコントロールすることが可能となり、ウ蝕や歯周病の予防および口臭予防又は除去という効果が大きいと期待される。

今後は、ヒトに対する服用試験を行い、オーラルケアとしての効果を確認し、新規剤形の製品として開発を目指したい。

References

- 1) Loesche, W. J. : "The anti microbial treatment of periodontal disease : Changing the treatment paradigm", *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **10**, 245-275 (1999)
- 2) Moore, W. E. C. and L. V. H. Moore : "The bacteria of periodontal disease", *Periodontol.* **2000**, **5**, 66-77 (1994)
- 3) Donnenfeld, O. W. and I. Glickman : "A biometric study of effects of gingivectomy", *J Periodontol.* **37**, 447-452 (1966)
- 4) Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott : "Microbiol biofilms", *Ann. Rev. Microbiol.*, **49**, 711-745 (1995)
- 5) Ishihara, K., H. Miyakawa, A. Hasegawa, I. Takazoe and Y. Kawai : "Growth inhibition of Streptococcus mutans by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria", *Infect. Immun.*, **49**, 692-694 (1985)
- 6) Ishikawa, H., Y. Aiba, M. Nakanishi, Y. Oh-hashii and Y. Koga : "Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of Lactobacillus salivarius TI2711", *J. Japan Soc. Periodontol.*, **45**, 105-112 (2003)