

令和元年6月11日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18849

研究課題名(和文)高分子ナノ粒子キャリアの病原体との相互作用の可視化のための電子顕微鏡評価法の開発

研究課題名(英文) Development of electron microscopy technique for observation of interaction between polymeric nano carriers and bacteria

研究代表者

高橋 知里 (Takahashi, Chisato)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：50574448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イオン液体を応用した微細形態観察手法及びナノ領域からの蛍光可視化手法を組み込んだ評価を試みた。既存の定量的な評価とこれらの評価結果に基づき、難治性のバイオフィーム感染症治療のための高分子ナノ粒子キャリアの設計を試みた。この試みにより、病原体であるバイオフィームの生体機構に合わせた製剤設計を手掛けることができ、またナノ粒子の抗菌能を最大限に発揮させることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の「研究成果の概要」に記載した新規の評価法を組み込むことで、有効なバイオフィーム感染症治療薬が開発できれば、治療の短期化による医療費の抑制や多剤耐性菌の発現リスク低減などが期待される。また、本研究成果は歯周病が引き起こしうる白内障や糖尿病、心筋梗塞などの疾病予防にも繋がるため社会的波及効果は大きい。また、学術的観点から、従来の試料作製法では形態維持が難しいとされる微小器官の構造解析が可能となり、微生物のみでなく動植物の生体機構解明及び未知なる機能探索にも大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To optimize the preparation technique of drug delivery system particles for biofilm infections, we developed sample pretreatment technique using an ionic liquid and scanning transmission electron microscopy-cathodoluminescence. Especially, CL imaging and CL analysis of polymeric particles in the biofilm was successfully performed by attaching the fluorescent materials. These developed techniques could be effective to design of polymeric particles for treating biofilm infection diseases.

研究分野：製剤工学

キーワード：バイオフィーム感染症 ソードルミネッセンス ドラッグデリバリーシステム 高分子キャリア 電子顕微鏡 イオン液体 カ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム(BF)形成菌に起因する感染症の例として、歯周病や院内感染症、骨髄炎などが挙げられる。特に、歯周病は生活習慣病の一つとされ、糖尿病のような全身疾患を引き起こす一要因であるとの報告もなされている。平成23年には歯周病疾患患者が40万人を突破しており、厚生労働省もその対策に着手している。しかしながら、BFは外部環境から菌を守るバリアの役割を担い、BF形成菌に対して抗菌剤の効力が乏しくなるため病気を難治化する。このためBF感染治療や予防に向けた製剤開発が求められている。

申請者らの研究室では、これまでに、生分解性、生体適合性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸(PLGA)を基剤としたサブミクロンサイズのドラッグデリバリーシステム(DDS)ナノ粒子を開発し、新しいDDSの設計を試みてきた。微粒子キャリアシステムにおいて、粒子サイズをナノレベルにすると、従来のミクロレベルのキャリアには見られない生体膜への浸透能及び長期滞留能を備えることにより、飛躍的に薬物吸収性能が向上することを明らかにしている。

上記のようにDDS設計を行っていく中で、標的である病原体の微細形態が明らかになっていないものは少なくない。特に、BF形成菌の中で、菌増殖への関与が報告される微細器官の構造解析は不明なものも多い。また、ナノ粒子の抗菌効果は巨視的評価や定量的評価が一般的であり、病原体に対するナノ粒子の薬剤作用及び相互作用を微視的評価した報告はほぼない。これらの評価が進めば、ナノ粒子DDS設計の最適化を行うことが可能である。微細形態評価には電子顕微鏡が幅広く用いられているが、生物試料の形態評価では試料を真空環境下に置かねばならず、試料作製技術や特殊装置が必要であるため簡便ではない。そこで、申請者は不揮発性や難燃性、高導電性などの性質を持つイオン液体(IL)という常温で液体の溶解塩を電子顕微鏡観察のための試料前処理剤として使用した。

ILの観察手法を用いてBFの増殖機構を明らかにし、これまで明確に捉えることができなかったBF内でのナノ粒子の挙動を明らかにするとともに、TEMにカソードルミネッセンス法(CL法)を組み合わせた手法を用いることで、電子線照射する際に蛍光付与したナノ粒子から放射された光を可視化できることが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来評価法に対して①イオン液体を応用した微細形態観察手法及び②ナノ領域からの蛍光可視化手法を組み込むことで、歯周病などを始めとする難治性のバイオフィーム(BF)感染症治療のための高分子ナノ粒子キャリアを設計することである。この新たな試みにより、病原体の生体機構に合わせた製剤設計を手掛けることができ、さらに設計したナノ粒子により抗菌能を最大限に発揮することが可能となる。そこで、BFの形成機構をタンパク質配列レベルで解明し、菌の増殖を阻害するよう作製した治療薬の抗菌作用を2つの評価法を用いて可視化することで、ナノ粒子ドラッグデリバリーシステム(DDS)の設計を図った。

3. 研究の方法

(1) IL観察法によるBF形成菌の増殖機構の解明

実験には、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)を用い、当研究室で確立した、菌を懸濁した培地を24穴プレート内で24時間インキュベートする方法により、BFを形成した。形成したBFをIL観察法により親水性ILを用いて電子顕微鏡で観察した。具体的には、FE-SEM及びTEMを用いてそのBF及び菌増殖機構を明らかにした。

(2) 従来法によるナノ粒子の抗菌性評価

粒子蛍光マーカーとして6-クマリンを付与し、表面修飾及び抗菌薬封入したPLGA及びソルブラスナノ粒子をエマルジョン溶媒拡散法で作製した。表面修飾剤にはキトサンやTween80、抗菌薬にはクラリスロマイシンなどを用いた。ナノ粒子の物性評価には、動的光散乱式粒子径測定装置を用い、粒子径及びゼータ電位測定を行った。ナノ粒子の侵入性及び付着分布は、(1)のように形成したBFに作製したナノ粒子を投与し、インキュベート後、BF表面を洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡で評価した。これらの評価に基づき、適した表面修飾剤や抗菌薬、高分子基剤を選択しナノ粒子作製条件の最適化を行った。

(3) IL観察法によるナノ粒子抗菌性の微視的評価

ナノ粒子を投与したBFを緩衝液で一定時間固定し、(1)と同様の手法でILを処理した後、電子顕微鏡観察用試料とした。作製した種々のナノ粒子のBFへの抗菌作用をFE-SEM及びTEMで評価した。

(4) TEM-CL法によるナノ粒子の抗菌性評価

TEM-CL法による実験は、研究協力者である名古屋大学武藤教授の協力により実施した。高分子を扱うため、試料冷却をしながら実験を行った。電子線照射された試料から発する光を集光ミラーで集め分光する仕組みであり、分光することでその強度の違いを可視化した。

(5) BF感染症治療を目的とするナノ粒子キャリアの最適化

上記の評価結果に基づき、作製した増殖抑制能を保持する抗菌剤封入ナノ粒子の調製法の最適

化を実施した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成機構の解明

図1にFE-SEM及びFE-TEMで観察したバイオフィームの形態及び微細器官を示す。図1aのFE-SEM像のように、多糖類のフィルム層で覆われたバイオフィームが観察された。バイオフィーム表面からは、直径1 μm 程度の表皮ブドウ球菌は確

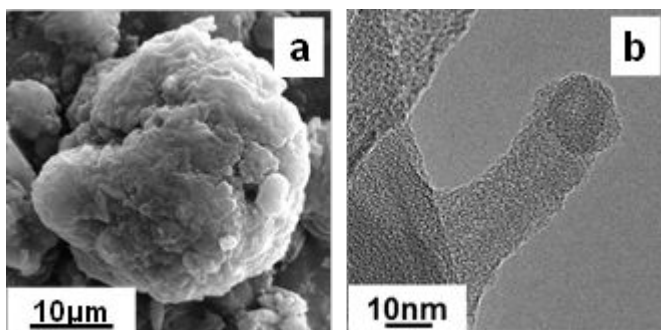


図1：形成したバイオフィーム(a)のSEM像と菌増殖に関するフィブリル(b)のFE-TEM像

認できなかった。FE-TEM観察では、菌増殖に關与するとされるフィブリルと称される微細器官を捉えることに成功した(図1b)。イオン液体を試料前処理に用いることで、バイオフィームおよび菌の微細な形態を壊すことなく観察できることがわかった。

(2) 製剤設計と電子顕微鏡による評価

様々な高分子基剤、表面修飾物質、薬剤を用いて高分子の製剤調製を行った。調製に成功した多くの製剤では、高い抗菌活性が認められた。イオン液体を試料前処理に用いたSTEM観察の結果から、クラリスロマイシン封入キトサン修飾PLGA粒子とクラリスロマイシン封入キトサン修飾ソルプラス粒子では、抗菌作用が異なることがわかった(図2a,c)。特にソルプラス粒子が付着した菌では、付着箇所を中心にえぐられたようなダメージが見られた。また、超薄切片法を用いた観察結果から、PLGA粒子は菌の細胞壁に付着し、抗菌活性をもたらしているのに対し(図2b)、ソルプラス粒子は細胞膜を通過し、菌の分裂を大きく阻害することで抗菌活性を発揮することがわかった(図2d)。試料作製の際のイオン液体処理と試料冷却による走査透過電子顕微鏡(STEM)観察の組み合わせにより、ダメージを受けやすい有機材料の観察が可能であることがわかった。

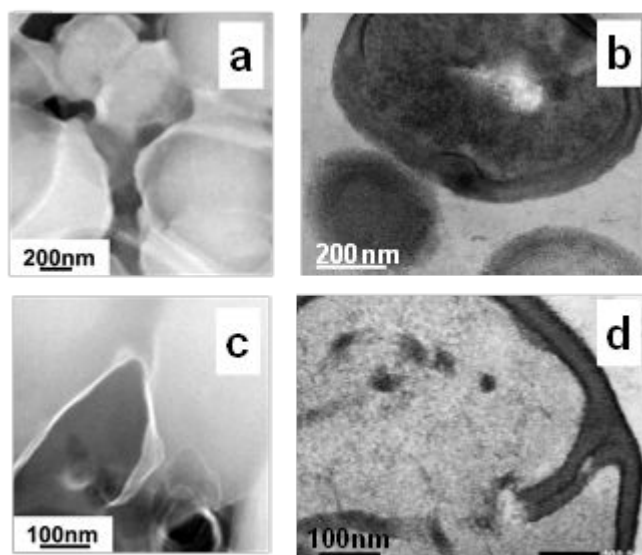


図2：クラリスロマイシン封入キトサン修飾PLGA粒子を投与したバイオフィームのSTEM像(a)と超薄切片像(b)およびクラリスロマイシン封入キトサン修飾ソルプラス粒子を投与したバイオフィームのSTEM像(c)と超薄切片像(d)

(3) TEM-CL法によるナノ粒子の抗菌性評価

当初試みたSTEM-CL法を用いた評価の結果、①粒子表面に付与した蛍光物質の偏析と②蛍光物質の電子線照射による失活が課題であることが明らかとなった。そこで、既に調製した乾燥粉末のPLGA球形粒子に蛍光物質をラベリングするのではなく、エマルション溶媒拡散法を改良し、PLGA球形粒子の調製の際に蛍光物質を封入する手法を試みた。STEM-CL法を用いたSEI-COMPO像及びCL像から明らかのように、蛍光物質の偏析は見られなかった(図3)。しかし、問題点として、電子線照射時間が長くなるに従い、ピークのブロード化が進む傾向がみられた。これは、電子線照射による蛍光物質の失活が原因であると考えられた。蛍光波長の異なる蛍光物質

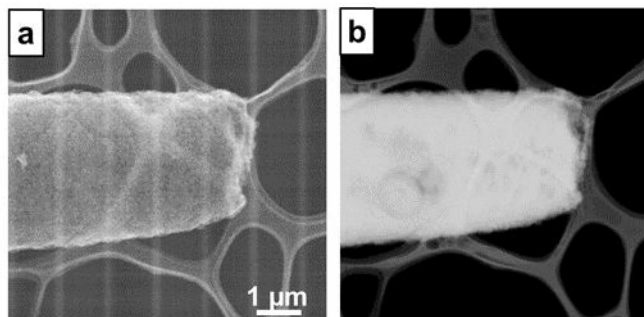


図3：キトサン修飾したPLGA球形粒子のSEI-COMPO像(a)とCL像(b)

を付与した PLGA 球形粒子でも試行したが、同じように蛍光物質の失活がみられたため、新たな蛍光物質または手法の探索が必要であることがわかった。

(4) 評価結果に基づくナノ粒子調製法の最適化

定量的な抗菌活性評価と電子顕微鏡評価を基に、ナノ粒子調製法の最適化を行った。その結果、菌増殖を選択的に阻害するようなナノ粒子キャリアを設計することに成功した。今回の試みのように評価結果に基づいた製剤調製を進めることで、目的とするナノ粒子の設計が効率的に行えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

- 1) “Optimization of ionic liquid-incorporated PLGA nanoparticles for treatment of biofilm infections.”, Takahashi C, Hattori Y, Yagi S, Murai T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, in press. (査読有)
- 2) “Imaging of antibacterial activity of polymeric micelle based nanomedicine for drug delivery.”, Takahashi C, Microscopy, i30, 2018. (査読有)
- 3) “SEM imaging of the stimulatory response of RAW264.7 cells against *Porphyromonas gingivalis* using a simple technique employing new conductive materials.”, Takahashi C, Umemura Y, Naka A, Yamamoto H, J. Biomed. Mater. Res. B, 106, 1280-1285. 2018. (査読有)
- 4) “A simple sample preparation technique for morphological observation of wet inorganic and biological materials using conductive materials.”, Takahashi C, Yamamoto H, Microscopy, i39, 2017. (査読有)
- 5) “A microscopy method for scanning transmission electron microscopy imaging of the antibacterial activity of polymeric nanoparticles on a biofilm with an ionic liquid.”, Takahashi C, Muto S, Yamamoto H, J. Biomed. Mater. Res. B, 105, 1432-1437, 2017. (査読有)
- 6) “Imaging of intracellular behavior of polymeric nanoparticles in Staphylococcus epidermidis biofilms by slit-scanning confocal Raman microscopy and scanning electron microscopy with energy-dispersive X-ray spectroscopy.”, Takahashi C, Ueno K, Aoyama J, Adachi M, Yamamoto H, Mater. Sci. Eng. C, 76, 1066-1074, 2017. (査読有)
- 7) “Morphological study of efficacy of clarithromycin-loaded nanocarriers for treatment of biofilm infection disease.”, Takahashi C, Akachi Y, Ogawa N, Moriguchi K, Asaka T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H, Med. Mol. Morphol., 50, 9-16, 2017. (査読有, 招待有)
- 8) “STEM observation for understanding antibacterial mechanism of polymeric particles against biofilm.”, Takahashi C, Yamamoto H, Microscopy, 65, i31, 2016. (査読有)
- 9) “Antibacterial activities of polymeric poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and Soluplus® micelles against Staphylococcus epidermidis biofilm and their characterization.”, Takahashi C, Saito S, Suda A, Ogawa N, Kawashima Y, Yamamoto H, RSC adv., 5, 71709-71717, 2015. (査読有)
- 10) “Observation of antibacterial effect of biodegradable polymeric nanoparticles on Staphylococcus epidermidis biofilm using FE-SEM with an ionic liquid.”, Takahashi C, Ogawa N, Kawashima Y, Yamamoto H, Microscopy, 64, 169-180, 2015. (査読有, 招待有)
- 11) “Electron microscopy of Staphylococcus epidermidis fibril and biofilm formation using image enhancing ionic liquid.”, Takahashi C, Kalita G, Ogawa N, Moriguchi K, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H, Anal. Bioanal. Chem., 407, 1607-1613, 2015. (査読有)
- 12) “球形晶析技術を応用したバイオフィーム感染症治療を目的としたナノ粒子製剤の開発”, 山本浩充, 小川法子, 高橋知里, Drug. Deliv. Sys., 30, 129-138, 2015. (査読有)
- 13) 「形態観察結果に基づくバイオフィーム感染症治療用高分子ナノ粒子製剤の設計」, 高橋知里, 武藤俊介, 山本浩充, 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌 (印刷中) (査読有)
- 14) 「イオン液体を用いた含水材料の電子顕微鏡観察～ハイドロキシアパタイト、寒天ゲル、バイオフィーム～」高橋知里, 山本浩充, 藤正督, 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌, 29, 10-13, 2015. (査読有)

[学会発表](計 20 件) 筆頭の発表のみ記載

- 1) “Imaging of antibacterial activity of polymeric micelle based nanomedicine for drug delivery.”, 高橋知里, 第 61 回電子顕微鏡シンポジウム, 富山, 2018. 11
- 2) 「STEM を用いたバイオフィーム形成菌に対するイオン液体含有高分子製剤の抗菌効果の可視化」, 高橋 知里, 日本顕微鏡学会, 久留米市, 2018. 5
- 3) 「歯周病治療用の銀ナノ粒子封入高分子製剤の 抗菌作用可視化」, 高橋 知里, 第 34 回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 衆議院第一議員会館内, 2018. 5
- 4) “Design of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery System.”, Takahashi C, Nano Science & Technology 2017, 福岡, 2017.10 (招待講演)
- 5) 「ナノイメージングに基づく機能性材料・機能性粒子の設計」, 高橋知里, 粉体工学会 第 1 回界面特性を利用した粒子設計とプロセス開発に関するワークショップならびに粉体グリーンプロセス研究会講演会, 東京, 2017.5 (招待講演)

- 6) 「医学生物学電子顕微鏡技術学会奨励賞講演 電子顕微鏡評価に基づく機能性材料の設計」, 高橋知里, 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 神戸, 2017.5 (招待講演)
- 7) 「種々の電子顕微鏡法による銀ナノ粒子複合製剤の抗菌活性評価」, 高橋知里, 種村眞幸, 武藤俊介, 花市敬正, 小川法子, 川嶋 嘉明, 山本 浩充, 日本電子顕微鏡学会第 73 回学術講演会, 札幌, 2017. 5
- 8) 「ラマンイメージング法および新規 SEM イメージング法を用いた高分子ナノ粒子 DDS 製剤の評価」, 高橋知里, 上野楠夫, 青山淳一, 足立真理子, 小川法子, 浅香透, 川嶋嘉明, 山本浩充, 日本薬剤学会第 32 年会, 大宮, 2017. 5
- 9) 「バイオフィーム感染症治療を目的とする球形晶析法を用いた DDS 製剤設計とその評価」, 高橋知里, 製剤技術研究会第 6 回セミナー, 長野, 2017. 2 (招待講演)
- 10) 「表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成機構の可視化とそれに基づく DDS 設計」, 高橋知里, 第 47 回日本臨床分子形態学会, 長崎, 2015. 9 (招待講演)
- 11) 「イオン液体処理技術を用いた電子顕微鏡評価法に基づく製剤設計」, 高橋知里, 粉体工学会 粉体操作に伴う諸現象に関する勉強会 夏の若手研究会 2015, 高島, 2015. 7. (招待講演)
- 12) "STEM observation for understanding antibacterial mechanism of polymeric particles against biofilm.", 高橋知里, 山本浩充, 日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム, 東京, 2016. 11
- 13) 「バイオフィームに対する高分子ナノ粒子の抗菌作用の微視的評価」, 高橋知里, 種村眞幸, 平成 28 年度文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム総会「秀でた成果報告」, 東京, 2016. 10
- 14) 「バイオフィーム感染症治療を目的とした高分子ナノ粒子 DDS 製剤設計とその評価」, 高橋知里, 松原庸博, 小川法子, 盛口敬一, 本田雅規, 川嶋嘉明, 山本浩充, 粉体工学会第 52 回夏期シンポジウム, 神戸, 2016. 8
- 15) STEM-CL 法及び種々の電子顕微鏡法による高分子ナノ粒子製剤の抗菌メカニズムの解明」, 高橋知里, 小川法子, 盛口敬一, 武藤俊介, 川嶋嘉明, 山本浩充, 第 72 回日本顕微鏡学会学術講演会, 仙台, 2016. 6
- 16) バイオフィーム感染症治療に効果的な高分子ナノ粒子ドラッグデリバリーシステム製剤設計のための新規電子顕微鏡評価法の確立」, 高橋知里, 小川法子, 盛口敬一, 浅香透, 種村眞幸, 武藤俊介, 川嶋嘉明, 山本浩充, 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 東京, 2016. 6
- 17) 「高分子ナノドラッグキャリアの抗菌メカニズム解明のための新たな電子顕微鏡法の確立」, 高橋知里, 小川法子, 盛口敬一, 浅香透, 種村眞幸, 武藤俊介, 川嶋嘉明, 山本浩充, 日本薬剤学会第 31 年会, 岐阜, 2016. 6
- 18) 「イオン液体を用いた電子顕微鏡観察評価に基づく DDS 製剤設計」, 高橋知里, 赤地志, 斉藤祥子, 須田麻美, 小川法子, 種村眞幸, 武藤俊介, 川嶋嘉明, 山本浩充, 医学生物学電子顕微鏡技術学会, 名古屋, 2015. 6
- 19) 「表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成機構とその治療を目的とするナノキャリアの設計」, 高橋知里, 小川法子, 川嶋 嘉明, 武藤俊介, 山本浩充, 日本電子顕微鏡学会第 71 回学術講演会, 京都, 2015. 5
- 20) 「抗菌作用の微視的評価に基づくナノ粒子ドラッグデリバリーシステムの設計」, 高橋知里, 小川法子, 浅香透, 種村眞幸, 武藤俊介, 川嶋嘉明, 山本浩充, 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎, 2015. 5

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Yamamoto H, Takahashi C, (2017): Chapter title: Application of polymeric nanoparticle and polymeric micelle for treatment of biofilm infection disease, Nanoparticle Technology Handbook Third Edition (Book), Elsevier, in press. (査読有, 招待有)
- 2) Takahashi C, (2017): Chapter title: Electron microscopy using ionic liquids for wet materials, Ionic Liquid Devices (Book), Editor: Ali Eftekhari, Royal Society of Chemistry, 30-52. (査読有, 招待有)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年:
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：武藤俊介

ローマ字氏名：Muto Shunsuke

研究協力者氏名：八木伸也

ローマ字氏名：Yagi Shinya

研究協力者氏名：山本浩充

ローマ字氏名：Yamamoto Hiromitsu

研究協力者氏名：永野恵司

ローマ字氏名：Nagano Keiji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。