

令和 6 年 10 月 4 日現在

機関番号： 8 2 6 2 6

研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間： 2018 ~ 2023

課題番号： 1 7 K K 0 1 7 8

研究課題名（和文）製剤 病原体間相互作用評価に基づく分子標的指向型有機無機複合製剤の設計

研究課題名（英文）Design of inorganic-organic materials for drug delivery of molecular targeted therapeutics

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： 5 0 5 7 4 4 4 8

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000 円

渡航期間： 18 ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、合成した製剤の最適化のため最先端の電子顕微鏡群及び放射光を用いた評価系の確立を目的として実施した。有機無機複合製剤の設計は、国内で実施し金属ナノ粒子を複合した高分子製剤の調製法を確立した。2019年度は、仏国のパリデイドロ大学にて、液中観察ホルダーを用いて有機無機複合製剤への電子線ダメージが少ない観察条件を導くことに成功した。2023年度には、英国diamond light sourceにて、放射光を用いたXRF分析・イメージングと液中TEMを用いたイメージングを実施することで、有機無機複合製剤中の金属ナノ粒子がバイオフィーム形成菌に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国際共同研究を通して、ナノレベルで電子・光子プローブを用いた新規の有機無機複合製剤および製剤とターゲットとの相互作用の評価を遂行し、その結果をフィードバックさせることで、疾患部位に適した機能性製剤を作製した試みは世界的にも新しい。学術的にも液中TEMと放射光を用いた分光分析の最適条件を見出し、溶液中の製剤とターゲットとの反応をダメージレスでイメージング・分析できた点は非常にインパクトが大きい。さらに、バイオフィーム形成機構を明らかにすることで、バイオフィーム感染症に対して有効な製剤の設計を可能としており、今後、感染症治療に大きく寄与できるため社会的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to establish characterization techniques using various types of electron microscopes and synchrotron for optimization of formulations. In FY 2019, we successfully optimized observation conditions that minimize electron beam damage to organic-inorganic composite formulations using liquid cell TEM at the University Paris Diderot, France. In FY2023, we conducted XRF analysis and XRF imaging using synchrotron and liquid cell TEM, Diamond Light Source, UK, to clarify the effect of metal nanoparticles in organic-inorganic composite formulations on biofilm-forming bacteria.

研究分野： ナノ材料

キーワード： 放射光 電子顕微鏡 有機無機複合製剤 金属ナノ粒子 バイオフィーム 菌 マイクロベシクル 感染症治療

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、バイオフィーム感染症治療に使用する高分子ナノ粒子ドラッグデリバリーシステム (DDS) 製剤の設計を行っているが、高分子を基剤とした製剤設計に留まっている。しかし、罹患部位によっては、バイオフィーム除去のために薬剤の長期徐放性を必要とするケースも多い。そのため、国際共同研究先の無機材料創成技術を習得し、有機無機複合製剤の開発ができれば、無機材料の安定性と長期徐放性を兼ね備えかつ罹患部位に合わせた製剤設計ができると考えられる。一方で、製剤設計の最適化を目的とする新規電子顕微鏡法の開発については、現在、2つの手法を確立しつつあり、製剤と標的物質であるバイオフィームの相互作用を捉えることに成功している。しかし、分子標的指向性を持つ DDS 製剤設計のためには、製剤の構造及び挙動を分子レベルで捉えることは必要不可欠である。そこで、国際共同研究先で既に確立している3次元像構築を行い、分子レベルで評価し、生体機能特性に合わせて製剤表面に修飾を施すことで、分子標的指向性を備えた製剤設計に繋げる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、基課題である「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」研究を発展させ、バイオフィーム感染症治療のための有機無機複合製剤の設計をするとともに、作製した製剤の最適化のため最先端の電子顕微鏡群及び放射光を用いた評価系の確立を進めるものである。申請者は、高分子基剤を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) 用ナノ粒子製剤の設計を行っており、そのために2つの評価法 (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) を進めていた。しかし、副作用を示すことなく、高い治療効果を示す製剤を設計するためには、標的に適した材料創製技術と分子標的化を見据えた標的物質との相互作用の分子イメージング・分析が必要不可欠であった。そこで、国際共同研究での製剤設計技術の確立を行い、さらに疾患部位との相互作用を界面から分子レベルで捉えることで、標的指向性の高い新規製剤の開発を推進することを考えた。

### 3. 研究の方法

製剤設計としては、国内外の共同研究者の持つ無機材料の作製技術に申請者が基課題で確立している有機材料の作製技術を組み込み、新規有機無機複合製剤の作製及び作製技術の確立を進めた。国際共同研究先である研究機関1 (Paris Diderot University, France) (2019年4月~2020年3月) では、液中観察が可能なセル、ホルダーを用いたTEMを駆使し、有機無機複合製剤および菌と有機無機複合製剤を対象としたダメージレスな観察を実施した。さらに、水中溶媒拡散法による有機無機複合製剤の溶液中における合成挙動をインジェクションシステムが付属された液中TEMを用いて観察した。

国内では、ターゲットであるバイオフィームの形成機構を種々の電子顕微鏡および観察手法を用いて実施するとともに、有機無機複合製剤の評価として、抗菌活性評価、細胞毒性評価、放射光を用いた分光分析による製剤の構造評価を実施した。

国際共同研究先である研究機関2 (Diamond light source, UK) (2023年9月~2024年3月) では、放射光を用いたXRF分析・イメージングを実施した。具体的には、有機無機複合製剤の金属ナノ粒子とバイオフィーム形成菌に着目し、有機無機複合製剤の効果を明らかにした。また、同時に、液中TEMによる有機無機複合製剤と有機無機複合製剤を投与したバイオフィームの評価も併せて実施した。

### 4. 研究成果

#### 製剤設計と評価

本研究で、種々の有機無機複合製剤を調製することができた。その中で、金属が含有されていても母材と複合することで毒性の低い有機無機複合製剤の調製することに成功した (図1)。また、製剤の基剤である高分子種を変えることにより、薬剤の徐放速度や金属の放出量を調節できることが明らかになった。本研究では、ターゲットであるバイオフィームのモデル菌として、グラム陽性菌 *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) とグラム陰性菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) を用いた。バイオフィーム形成菌に対する抗菌活性評価から、有機無機複合製剤 (薬剤封入銀ナノ粒子修飾高分子製剤) 投与後2時間および6時間の場合に、同条件で *E. coli* よりも *S. epidermidis* バイオフィームに対して2倍程度、抗菌効果が高いことがわかった。*E. coli*

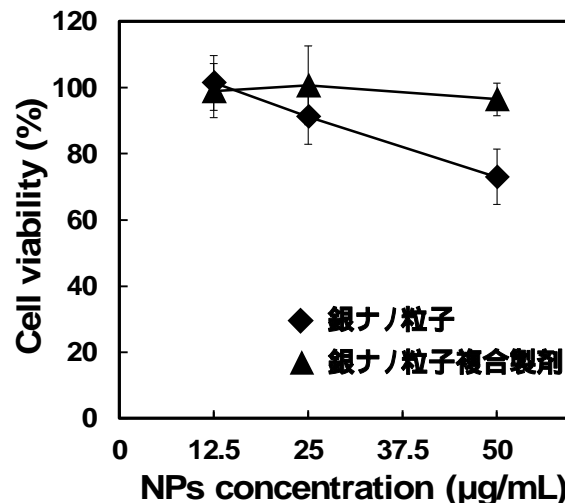


図1: KB細胞を用いた銀ナノ粒子複合製剤の細胞毒性評価

の場合には、バイオフィルムのフィルム層が短時間投与では除去されにくい傾向にあった。共同で実施したバイオセンサーを用いた測定法により、製剤による抗菌効果が評価できる可能性が示唆された。今後、この簡便な測定法を確立できれば、製剤設計へのフィードバックがスムーズになることが期待される。

### 液中電子顕微鏡と放射光分光分析による評価

国内にて、ターゲットである菌のバイオフィルム形成機構を明らかにすべく、液中観察が可能な走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。本観察で、菌の増殖機構に関するとの報告があるマイクロベシクルおよびフィブリルの形態を保持したまま、経時的な変化を捉えることができた。

製剤の投与時間ごとのバイオフィルム形成菌への効果は、透過型電子顕微鏡を用いて評価した(図2)。本研究で、製剤にコンポジットした金属ナノ粒子は、決まった投与時間、製剤投与量まではチューブ状のフィブリルを使って菌外へ排出されるが、それ以上の条件では菌外への排出が困難になることが明らかになった。

研究機関1と研究機関2にて、ナノレベルで電子・光子プローブを用いた新規の有機無機複合製剤および製剤とターゲットとの相互作用の評価を行った。液中TEMを用いた評価では、電子線照射および水の放射線分解による試料ダメージを定量し、ダメージレスな観察・評価ができる条件を検討し、最適な条件を見出すことに成功した。また、インジェクションシステムを用いた液中TEMによる動的な観察により、これまで理論でしか分かりえなかった高分子製剤の液中における合成反応を視覚的に捉えることに成功した(図3)。

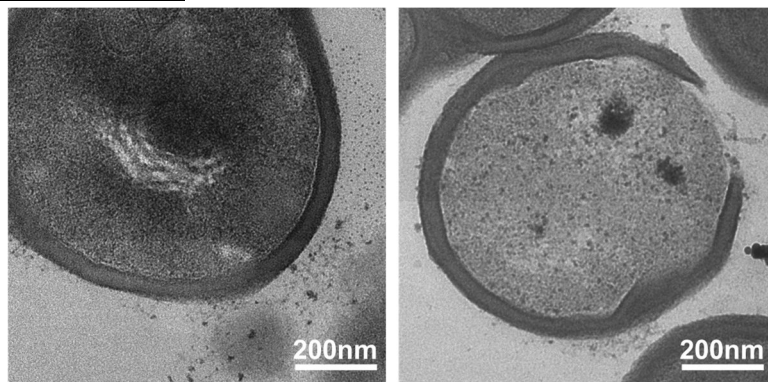


図2: *S. epidermidis* バイオフィルムへ製剤投与と30分後(左)、6時間後(右)

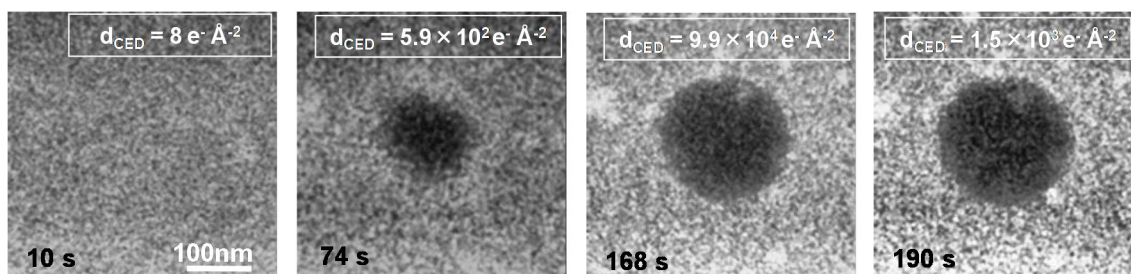


図3: 液中TEMを用いた高分子製剤の液中での合成挙動その場観察

放射光を用いたXRF分析・イメージングでは、液体セルを用いて溶液中の製剤とバイオフィルムの分析・イメージングができる条件を探り、最適な条件で製剤中の金属ナノ粒子およびバイオフィルム形成菌の構成元素を捉えることができた。

液中TEMと放射光を用いた分光分析の最適条件を見出し、溶液中の製剤とターゲットとの反応をダメージレスでイメージング・分析できた点は学術的にも非常にインパクトが大きい。さらに、バイオフィルム形成機構を明らかにできたことで、バイオフィルム感染症に対して有効な製剤の設計に寄与できると考えられ、今後、感染症治療に大きく貢献できるため、社会的な意義が大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>高橋知里  | 4. 巻<br>not decided       |
| 2. 論文標題<br>電子顕微鏡で含水状態を捉える～含水セラミックス成形体、溶液中の酸化鉄ナノ粒子および菌を例に～ | 5. 発行年<br>2024年           |
| 3. 雑誌名<br>粉体工学会誌  | 6. 最初と最後の頁<br>not decided |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                             | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi, C   | 4. 巻<br>35           |
| 2. 論文標題<br>In-situ observation of preparation of PLGA polymeric nanoparticles using liquid cell transmission electron microscopy | 5. 発行年<br>2023年      |
| 3. 雑誌名<br>Mater. Today. Commun   | 6. 最初と最後の頁<br>106176 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.mtcomm.2023.106176  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する         |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>高橋知里   | 4. 巻<br>60            |
| 2. 論文標題<br>種々のナノ粒子合成と電子顕微鏡を用いた評価～ソフトマテリアルからハードマテリアルまで～ | 5. 発行年<br>2023年       |
| 3. 雑誌名<br>粉体工学会誌                                       | 6. 最初と最後の頁<br>407-413 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.4164/sptj.60.407         | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi, C. Sato, M. Sato, C.   | 4. 巻<br>413             |
| 2. 論文標題<br>Biofilm formation of Staphylococcus epidermidis imaged using atmospheric scanning electron microscopy. | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Anal. Bioanal. Chem.  | 6. 最初と最後の頁<br>7549-7558 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00216-021-03720-x.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi, C. Moriguchi, K. Horii, M. Kawai, T. Sato, M. Sato, C.   | 4. 巻<br>28              |
| 2. 論文標題<br>Biofilm formation of Staphylococcus epidermidis with and without collagen imaged using atmospheric scanning electron microscopy and antibacterial effect of Ag-decorated polymeric particles imaged by transmission electron microscopy. | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Microsc. Microanal.   | 6. 最初と最後の頁<br>1432-1433 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi C, Yamada T, Yagi S, Murai T, Muto S  | 4. 巻<br>121          |
| 2. 論文標題<br>Preparation of silver-decorated Soluplus nanoparticles and antibacterial activity towards S. epidermidis biofilms as characterized by STEM-CL spectroscopy | 5. 発行年<br>2021年      |
| 3. 雑誌名<br>Mater Sci Eng C Mater Biol Appl   | 6. 最初と最後の頁<br>111718 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.msec.2020.111718.   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi C, Hattori Y, Yagi S, Murai T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H  | 4. 巻<br>100395       |
| 2. 論文標題<br>Ionic liquid-incorporated polymeric nanoparticles as carriers for prevention and at an earlier stage of periodontal disease. | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Materialia  | 6. 最初と最後の頁<br>100395 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.mtla.2019.100395  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi C, Hattori Y, Yagi S, Murai T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H                      | 4. 巻<br>97          |
| 2. 論文標題<br>Optimization of ionic liquid-incorporated PLGA nanoparticles for treatment of biofilm infections | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications                           | 6. 最初と最後の頁<br>78-83 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.msec.2018.11.079  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する        |



|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Takahashi C   | 4. 巻<br>67        |
| 2. 論文標題<br>Imaging of antibacterial activity of polymeric micelle based nanomedicine for drug delivery. | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Microscopy  | 6. 最初と最後の頁<br>i30 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/jmicro/dfy086   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する      |

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>C. Takahashi   |
| 2. 発表標題<br>In-situ liquid cell TEM imaging of preparation of polymeric particles for drug delivery system |
| 3. 学会等名<br>Nanoscale In Situ Microscopy Workshop, Royal Microscopical Society, Oxford (UK) (国際学会)         |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C  |
| 2. 発表標題<br>Liquid cell transmission electron microscopy technique for polymeric nanoparticles |
| 3. 学会等名<br>Nano Science & Technology 2023 (招待講演) (国際学会)                                       |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋知里   |
| 2. 発表標題<br>Characterization of degradation behavior of nanomaterials using liquid-cell transmission electron microscopy |
| 3. 学会等名<br>日本顕微鏡学会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C  |
| 2. 発表標題<br>In-situ liquid cell transmission electron microscopy for polymeric particles |
| 3. 学会等名<br>The 4th East-Asia Microscopy Conference (国際学会)                               |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋知里                               |
| 2. 発表標題<br>ドラッグデリバリー用ナノ粒子製剤の合成と製剤効果の可視化       |
| 3. 学会等名<br>第2回 SPIRITS生物-無機-有機融合化学セミナー (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋知里、細川裕之、D. Alloyeau                   |
| 2. 発表標題<br>ナノ材料反応場観察のための新規手法の確立～磁性ナノ粒子と高分子ナノ粒子を例に～ |
| 3. 学会等名<br>日本女性科学者の会新春シンポジウム                       |
| 4. 発表年<br>2021年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>C. Takahashi  |
| 2. 発表標題<br>Characterization of Biological Materials and Their Behaviors by TEM and STEM Techniques |
| 3. 学会等名<br>TOWARDS HIGH IMPACT RESEARCH SERIES 2 (招待講演) (国際学会)                                     |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C  |
| 2. 発表標題<br>STEM observation of antibacterial effect of silver-decorated polymeric nanoparticles |
| 3. 学会等名<br>Microscopy conference 2019 ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C, Alloyeau D  |
| 2. 発表標題<br>Degradation behavior of nanomaterials in biological media: the case of MoS2 nanoflakes and polymer nanoparticles |
| 3. 学会等名<br>Nanoperando 2019 ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C, Sato M, Sato C   |
| 2. 発表標題<br>Atmospheric scanning electron microscopy imaging and ionic liquid technique imaging of Staphylococcus epidermidis biofilm formation |
| 3. 学会等名<br>Liquid Phase Electron Microscopy Gordon Research Conference ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takahashi C  |
| 2. 発表標題<br>Imaging of antibacterial activity of polymeric particles for drug delivery systems using scanning transmission electron microscopy |
| 3. 学会等名<br>19th International Microscopy Congress (IMC19) ( 国際学会 )  |
| 4. 発表年<br>2018年   |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高橋知里  |
| 2. 発表標題<br>Imaging of antibacterial activity of polymeric micelle based nanomedicine for drug delivery |
| 3. 学会等名<br>第61回電子顕微鏡シンポジウム   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高橋知里                         |
| 2. 発表標題<br>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 |
| 3. 学会等名<br>第34回医学生物学電子顕微鏡技術学会           |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------------------|--|-----------------------------------|----|
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | リコリュール クリスチャン<br><br>(Ricolleau Christian) | パリディドロ大学・MPQ laboratory・Professor |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----|
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | アロヨ ダミアン<br><br>(Alloyeau Damien) | パリディドロ大学・MPQ laboratory・Professor |    |
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | パーカー ジュリア<br><br>(Parker Julia)   | ダイヤモンドライトソース・I14・Professor        |    |
| 主たる渡航先の主たる海外共同研究者 | アレン クリス<br><br>(Allen Chris)      | ダイヤモンドライトソース・ePSIC・Professor      |    |

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|----------------------------|-----------------------|----|
| その他の研究協力者 | シェン エイミー<br><br>(Shen Amy) | 沖縄科学技術大学・Professor    |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|----|
| その他の研究協力者 | 竹口 雅樹<br><br>(Takeguchi Masaki)   | 物質材料研究機構・主席研究員        |    |
| その他の研究協力者 | 武藤 俊介<br><br>(Muto Shunsuke)      | 名古屋大学・教授              |    |
| その他の研究協力者 | 堀 美喜<br><br>(Hori Miki)           | 愛知学院大学・講師             |    |
| その他の研究協力者 | 盛口 敬一<br><br>(Moriguchi Keiichi)  | 愛知学院大学・教授             |    |
| その他の研究協力者 | 菅野 亮<br><br>(Kanno Ryo)           | 沖縄科学技術大学              |    |
| その他の研究協力者 | 山本 浩充<br><br>(Yamamoto Hiromitsu) | 愛知学院大学                |    |
| その他の研究協力者 | 永野 恵司<br><br>(Nagano Keiji)       | 北海道医療大学               |    |

## 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                  |  |  |  |
|---------|--------------------------|--|--|--|
| France  | Paris Diderot University |  |  |  |
| 英国      | Diamond light source     |  |  |  |