

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K18388

研究課題名(和文)電子顕微鏡と放射光分光解析から探る有機無機ハイブリッド製剤の最適な設計法

研究課題名(英文) Optimization of organic-inorganic hybrid preparation based on electron microscopy and synchrotron radiation spectroscopic analysis studies

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤投与に比べバイオフィーム形成菌に対し3倍以上の抗菌効果を持つ銀・金・銅微粒子を複合した様々な高分子製剤の調製に成功した。放射光を用いたX線吸収微細構造測定および透過型電子顕微鏡にカソードルミネッセンスを組み込んだ手法、溶液中の試料観察が可能な透過型電子顕微鏡の新しい評価法を確立するとともに、これらの評価結果から、製剤中の金属ナノ粒子の化学状態および菌に対する有機無機ハイブリッド製剤の抗菌効果を有色で明らかにした。また、金属複合製剤の金属に対する菌の菌体外排出機構の解明と金属複合製剤の抗菌効果発揮機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオフィーム感染症予防・治療を目的とし、有機材料のみの製剤とは違い、無機材料由来の安定性と長期徐放性を兼ね備えた有機無機ハイブリッド製剤の設計・調製をする画期的な試みである。イオン液体を用いた試料作製技術を組み込んだTEM-CL法や液中観察が可能なTEM法の最適化により、生物・複合材料の有色ナノイメージング・分析および溶液中の挙動観察を実現した。今回の発展により、今後バイオフィーム感染症予防のための製剤最適化を進めることで、医療器材を用いた治療におけるリスク軽減と治療の短期化に伴う治療費の軽減が期待できる。評価法に関しては、有色および反応場のナノイメージング技術の基盤が確立できた。

研究成果の概要(英文)：I successfully prepared metal decorated polymeric particles which possess high antibacterial activity against *S. epidermidis* bacteria compared with administration drugs alone. I developed evaluation methods for X-ray absorption fine structure measurement using a synchrotron and transmission electron microscopy (TEM) with cathodoluminescence, and liquid cell TEM for inorganic-organic materials. Using these techniques, the chemical state of metal nanoparticles in polymeric particles and antibacterial activity of metal decorated polymeric particles against bacteria were determined. In addition, the mechanism of detoxification of *S. epidermidis* against metal nanoparticles was revealed.

研究分野：ナノ材料・計測

キーワード：ナノ材料 ドラッグデリバリー 高分子 金属 電子顕微鏡 放射光 その場観察 菌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ドラッグデリバリーシステム製剤を用いた病気治療

臨床現場において、薬剤投与のみでは根治治療が見込めないバイオフィーム感染症が問題となっている。そこで、この治療を目的として、生体適合性高分子を基剤としたナノ～サブミクロンサイズのドラッグデリバリーシステム粒子の開発を行ってきた。しかし、疾患部位によっては、短時間でバイオフィームを除去することが難しい。そこで、安定性と長期徐放性を発揮する無機材料を用いた製剤の設計に着眼した。これまでに、数ナノサイズの銀微粒子を複合した PLGA 製剤の調製法の確立に成功し、この製剤が薬剤未封入でもバイオフィームに対し効果的であることを明らかにしている。また、種々のカーボンナノ材料合成を行っており、本研究ではこれらの技術を取り入れることで、新規有機無機ハイブリッド製剤の調製を検討する。

### (2) 電子顕微鏡法及び放射光を用いた分光法による評価系の確立

製剤設計をする上で、材料物性がドラッグデリバリーの効果に関係するため、製剤の構造及び標的部位への効果を分子・ナノレベルで評価する技術が必要となっている。これまでに確立しているウェットな状態で形態を保持したまま評価が可能なイオン液体を用いた観察技術により、断片的に製剤効果を可視化することには成功しているが、製剤効果の長期的な可視化は困難であった。そこで、イオン液体前処理に透過型電子顕微鏡 (TEM) + カソードルミネッセンス (CL) を組み合わせたナノ領域蛍光可視化法のベース技術を応用した長期製剤効果の評価に着目した。本研究では、蛍光マーカーとして量子ドットを製剤に緩く結合させ、製剤が効果を示した箇所に量子ドットがマーカーとして残るように粒子設計し、製剤効果を継続的に明らかにする。さらに、他の装置では微量のため検出が不可能であった封入物質と製剤の化学結合状態は、放射光を用いた X 線吸収微細構造測定から明らかにする。本研究では、試料周りを He ガスで満たし大気環境にすることで、液中における製剤の構造・挙動を捉えていく。

## 2. 研究の目的

本研究では、有機無機ハイブリッド製剤設計技術の確立とバイオフィーム感染症治療に有効な製剤設計を目指すイメージング・解析手法の確立を目的とする。無機材料と有機材料を複合した製剤 (数十ナノ～数ミクロン) を調製するとともに、ウェットな状態で電子顕微鏡解析及び放射光による分光測定を行うことで、これまでわかっていなかった製剤挙動を捉える。バイオフィーム形成菌への薬物送達・長期徐放に必要な機能・適した材料を明らかにし、治療目的ごとに最適な材料設計法を見出すことで、バイオフィーム感染症の標的治療に向けた DDS を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 製剤の設計と物性および抗菌活性評価

水中溶媒拡散法を用いて、金属微粒子 (銀、金、銅) を複合し表面修飾および薬剤封入をした高分子製剤を調製した。物性評価として、ゼータサイザーを用いた粒子径および電荷測定、原子吸光度計を用いた製剤中における金属ナノ粒子の含有量測定、高速液体クロマトグラフィーを用いた製剤中の薬剤含有量測定、LIVE/DEAD 細胞生存率アッセイおよび平板希釈法を用いた抗菌活性評価、MTT 法による製剤の細胞毒性評価、マウスを用いた製剤の歯肉浸透性評価を実施した。

### (2) 電子顕微鏡法および放射光を用いた分光法による評価

ソフトマテリアルおよび有機無機複合材料の観察を目的とした「イオン液体前処理に TEM + CL を組み合わせたナノ領域蛍光可視化法」と「液中観察が可能な TEM および SEM による試料の液中観察法」のための条件検討を行った。また、液中および乾燥状態の製剤 (母材) 中における金属微粒子および表面修飾剤の化学結合状態を明らかにするために、放射光を用いた X 線吸収微細構造測定を実施した。金属微粒子が抗菌活性を発揮することで菌が産生する活性酸素種の評価として、活性酸素種阻害剤を用いて試料を作製 (超薄切片法) し、電子顕微鏡観察・分析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 製剤の設計と物性および抗菌活性評価

本研究で、金属微粒子複合高分子製剤の調製法を最適化することができた。粒子径のそろった 50～500 nm 程度のサイズの種々の製剤を調製し、高分子基剤、表面修飾剤、封入薬剤、金属微粒子の種類によって抗菌効果が異なることを明らかにした。バイオフィーム形成菌としては、*Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus epidermidis* を用いた。材料および調製法の条件をパラメータ化することに成功し、目的のサイズ、電荷に合わせて製剤を調製することが可能となった。金属微粒子複合製剤では、高分子母材に対し、およそ数 wt% の金属ナノ粒子が担持されていた。高分子母材に含まれる薬剤は、およそ 0.1～2 wt% であった。金属微粒子単体の投与では細胞毒性が高いのに対し、高分子製剤に複合した系では細胞毒性が著しく低くなることがわかった (図 1)。図 1 は、KB 細胞を用いて銀ナノ粒子複合 PLGA 粒子と銀ナノ粒子投与 6 時間後の細胞毒性

を評価した結果である。銀ナノ粒子の濃度がそれぞれ 12.5, 25, and 100  $\mu\text{g/mL}$  になるように調整し比較検討した。金属ナノ粒子を高分子と複合することで、母材である高分子中から銀イオンを一定量放出することができ、細胞毒性を軽減できることが示唆された。抗菌活性評価の結果から、銀ナノ粒子および金ナノ粒子を複合した高分子製剤でバイオフィルム形成菌に対して、高い抗菌効果が得られることがわかった。薬剤のみの投与に比べ、3 倍以上の抗菌効果が得られた。マウスの歯肉に対する製剤の浸透性評価では、粒子径の小さい製剤が比較的歯肉深部に浸透しやすいことを明らかにした。また、表面電荷がポジティブな製剤の場合、さらに歯肉に浸透しやすくなることがわかった。

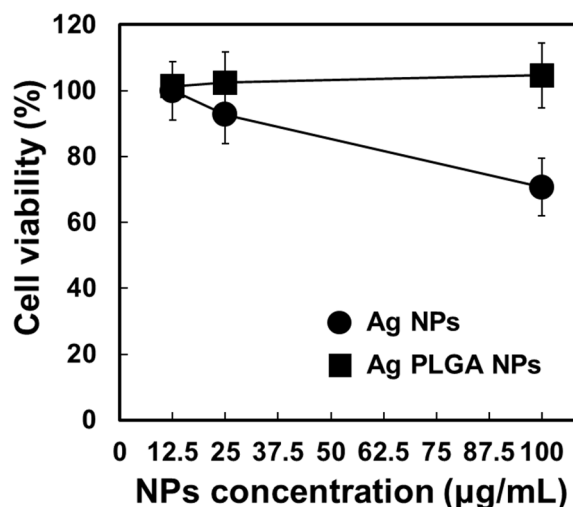


図 1 : 銀ナノ粒子複合 PLGA 粒子と銀ナノ粒子投与 6 時間後の細胞毒性評価 (銀ナノ粒子の濃度: 12.5, 25, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ) (n=3).

(2) 電子顕微鏡法および放射光を用いた分光法による評価

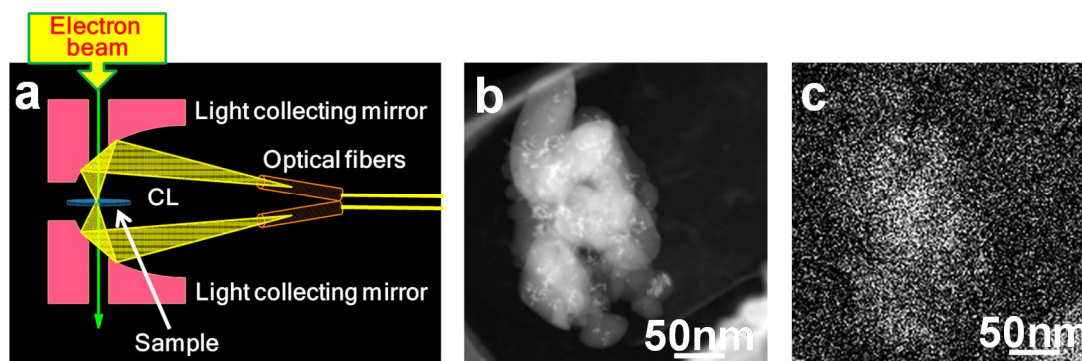


図 2 : (a) STEM-CL システムの模式図、(b) 銀ナノ粒子複合ソルプラス製剤の STEM 像と (c) STEM-CL 像

4 (1) のように調製した製剤および製剤を投与したバイオフィルムを電子顕微鏡および放射光を用いた分光法を用いて評価するために下記の手法を最適化した。液中の製剤の化学結合状態の評価として、放射光を用いた X 線吸収微細構造測定法の条件を見出すことに成功した。この測定により、液中での高分子母材中における修飾剤や複合金属微粒子の化学結合状態が明らかとなった。さらに、イオン液体を前処理に用い試料冷却が可能なホルダーを組み合わせることで、高分子が母材の有機無機複合製剤の電子線照射によるダメージを軽減することができ、透過型電子顕微鏡にカソードルミネッセンスを組み込んだ手法を最適化することができた (図 2)。図 2 のように、高分子母材中の銀ナノ粒子の発光を STEM-CL システムで捉えることに成功している。この手法を用いることで、銀ナノ粒子の高分子母材中における分布を初めて明らかにすることができた。

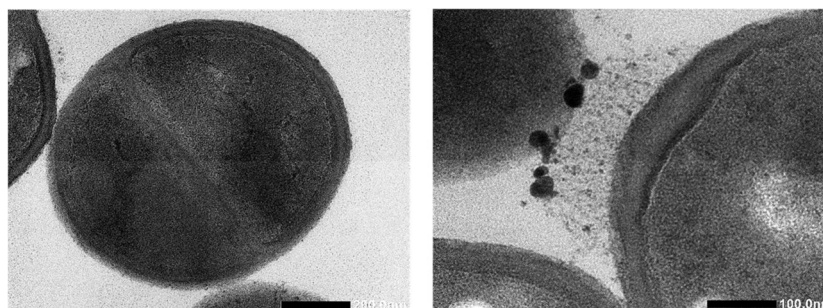


図 3 : 銀ナノ粒子複合 PLGA 製剤投与前 (左) と後 (右) のバイオフィルム形成菌

さらに、製剤のターゲットであるバイオフィルムの液中における形態観察および菌のバイオフィルム形成機構を捉えるため、液中電子顕微鏡観察を試みた。観察のための試料前処理として、いくつかの条件を検討し、菌の増殖に関するマイクロベシクルを捉えられる前処理および観察条件を見出すことができた。また、金属微粒子複合製剤中の金属微粒子が菌に及ぼす抗菌効果

を活性酸素発生機構の観点から探り、金属微粒子複合製剤の投与時間による抗菌作用の違いを定量的かつ視覚的に評価することができた(図3)。菌の解毒作用による金属微粒子の菌体外排出機構を探り、解毒作用を上回って抗菌効果が得られる条件を見出すことに成功した。菌の増殖機構や生体機構を解明することで、抗菌効果を効果的に発揮しやすい製剤を設計し、またその効果を明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

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

1. 著者名 Takahashi, C. Moriguchi, K. Hori, M. Kawai, T. Sato, M. Sato, C.	4. 巻 not decided
2. 論文標題 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 2022年
3. 雑誌名 Microsc. Microanal.	6. 最初と最後の頁 not decided
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

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

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

1. 著者名 Takahashi C (70%), Hattori Y, Yagi S, Murai T, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H	4. 巻 In press
2. 論文標題 Optimization of ionic liquid-incorporated PLGA nanoparticles for treatment of biofilm infections.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2018.11.079	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 高橋知里
2. 発表標題 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 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 2022年

1. 発表者名 高橋知里、細川裕之、D. Alloyeau、
2. 発表標題 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 日本女性科学者の会新春シンポジウム
4. 発表年 2021年

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

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

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

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

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

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	武藤 俊介  (Muto Shunsuke)	名古屋大学	
研究協力者	敬一 盛口  (Moriguchi Keiichi)	愛知学院大学歯学部	
研究協力者	堀 美喜  (Hori Miki)	愛知学院大学歯学部	

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			
フランス	Universite Paris Cite			