

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590044

 研究課題名（和文） バイオフィーム感染症治療、歯周病予防のための表面修飾ナノ粒子薬物
キャリアの設計

 研究課題名（英文） Antibacterial Drug Delivery by Surface Modified Nanoparticle for
Treatment of Biofilm Infection Disease

研究代表者

山本 浩充 (YAMAMOTO HIROMITSU)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：30275094

研究成果の概要（和文）：バイオフィームは、薬や周囲の環境から自己の生育環境を守るために細菌が産生する防御膜である。このバイオフィームが存在することで、近年問題となっている歯周病や各種感染症に対して薬が効きにくくなり、治療期間を長引かせてしまう。我々は安全性の高いポリ乳酸グリコール酸を基剤としたナノ粒子に抗菌剤を封入し、さらにその粒子の表面をキトサンで修飾することにより、バイオフィームを形成している細菌に効率良く抗菌剤を送達させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Biofilms increased resistance to detergents and antibiotics, as the dense extracellular matrix and the outer layer of cells protect the interior of the community. These biofilms cause the intractable infections. Therefore, the development of antibacterial drug delivery systems for treatment of biofilm infection disease is strongly desired. We intended to design surface modified PLGA nanoparticle for antibacterial drug delivery to the bacteria in the biofilm. CS-modified PLGA NP indicated the strongly antibacterial effect and suppression of biofilm formation. Because CS-modified NP could adsorb on the negatively charged biofilms and deliver antibacterial drug to biofilm formed with bacteria, in which the high concentration gradient of CAM was formed. Therefore, CS-modified PLGA NP has a high potential to be used in biofilm infection disease therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：バイオフィーム感染症・生分解性高分子ナノ粒子・表面修飾・ドラッグデリバリーシステム・歯周病・キトサン

1. 研究開始当初の背景

多くの細菌は自己の生存に不適な環境において、菌体表面に粘着性のある多糖体（グリコカリックス）から成るバイオフィームと呼ばれる微生物膜を形成し、増殖する。バイオフィームは生体内の各種臓器や、体内へ挿入・留置した医用器材などの異物表面に微生物が付着・粘着した場合に産生される。バイオフィーム形成の原因となりうる細菌として、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、肺炎桿菌、グラム陰性桿菌、インフルエンザ菌、口腔内細菌などが挙げられる。

バイオフィームが関与する感染症には、歯周病、院内感染症、う蝕、骨髄炎などがあり、バイオフィーム形成は、これら疾病の難治化・慢性化の原因となっている。特に歯周病は45～79歳では40%に認められ、糖尿病、高脂血症、高血圧症などと並ぶ代表的な生活習慣病のひとつとなっており、厚生労働省が掲げる「健康日本21」にも取り入れられ、その対策が切望されている。さらに近年、各種の体内挿入・留置型医用器材（カテーテル、ペースメーカー、人工関節、人工弁など）が広汎に使用され治療に大きく貢献しているが、これらの医用機器上にも各種の微生物が強固なバイオフィームを形成することがあり、院内感染症の感染源となる等、しばしば問題となる。

バイオフィームを形成した感染菌には、消毒薬や抗菌剤が効きにくく、また、白血球や抗体が菌を攻撃しづらいといった問題もある。上記の理由から、生体内に形成されたバイオフィーム形成菌に対し、ほとんどの抗菌剤が無効になってしまい、その除去は困難で感染症が難治化しやすい。近年、マクロライド系抗菌剤の長期微量投与が臨床的に有用であるとの報告もあるが、適切な化学療法剤の開発が現在望まれている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、生体内分解性・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薬物送達用ナノ粒子の開発に成功し、新規なドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発に取り組んできた。PLGA ナノ粒子の特徴は、封入した薬物の放出をコントロールすることにより、①長期間にわたり薬効を持続化できること、含有薬物を標的組織まで、酵素分解などから保護した状態で送達できるため、②薬物のバイオアベイラビリティを向上させられることにある。更に、我々の研究の特徴でもある PLGA ナノ粒子の表面を種々の物質で修飾することにより、生体組織への付着性等、新たな機能を賦与させることにも成功している。特に、カチオン性多糖であるキトサンで表面修飾したナノ粒子は、静電気

的な相互作用により、③粘膜への侵入性・付着滞留性が著しく向上することを明らかにしている。また、④細胞内へのナノ粒子の取り込みならびに内封した薬物の細胞内送達量を飛躍的に向上させることから遺伝子用キャリアとしても有用であることも明らかにしている。

かかる背景のもと、難治性感染症治療を目的とし、バイオフィーム形成細菌叢へ効率良く薬物を送達することで、抗菌作用を向上させる DDS キャリアの設計を企図した。

3. 研究の方法

(1) PLGA ナノ粒子の調製

100 mg の PLGA7520 と 10 mg の抗菌剤をアセトン 2 mL 中に溶解し、エタノール 1 mL を加え、ポリマー溶液とした。これを、2% の PVA 溶液 25 mL と 0.5% キトサン溶液 25 mL 等量混液中（外相）に、400 rpm で攪拌下（TORNADO、SM-103、ASONE）、ペリスタポンプ（PST-110、IWAKI）を用いて滴下した（2 mL/min）。得られた懸濁液中に残存する PVA やキトサンを取り除くため、ナノ粒子を遠心分離（20,000 rpm、4℃、10 min）した。ペレットを精製水で再分散した後、再度遠心分離（20,000 rpm、4℃、10 min）を行った。最終的に得られたペレットを精製水に再分散し、48 時間凍結乾燥（EYELA、FDU-1200 型、東京理科器械）した。

(2) バイオフィームの作成

S.aureus と *S.epidermidis* の培養には、0.25% グルコース含有 TSB 培地を、*S.mutans* の培養には、BHI 培地を用い、バイオフィーム形成実験の際には、5% スクロース含有 BHI 培地を用いた。また、細菌の平板培養には 6% TSB 培地、3% アガロース（Wako）を含む TSB 寒天培地を用いた。

前培養した細菌液を液体培地に播種し、紫外・可視分光光度計（Ultrospec 210 pro、Amersham Biosciences）を用いて、細菌液の 520 nm における濁度が 0.2 Abs となるよう濃度を調整した。調整した細菌液をプレートに播種し、CO₂ インキュベーターを用いて培養した（37℃、CO₂ 5%）。24 時間後、マイクロプレートのウェル底面に付着増殖した細菌叢を、精製水で洗浄（2 回）し、残存したものをバイオフィームとした。

(3) フェノール硫酸法によるバイオフィームの定量

凍結乾燥した、バイオフィームを 500 μL の精製水中に懸濁させた。その懸濁液に 5% のフェノール水溶液 500 μL を加え、よく攪拌した。そして、硫酸を 2.5 mL 勢いよく加え、30 秒間ボルテックスミキサーを使って激しく攪拌した。その後、室温で 30 分間放置し、

分光光度計 (U-1800, HITACHI) を用いて 490 nm における吸光度を測定した。

(4) バイオフィーム形成菌に対する抗菌効果の評価

(2) に準じて 200 μ L の細菌液を 96 穴蛍光測定用黒色マイクロプレート (96F NUNCLON DELTA BLACK MICROWELL, Nalge Nunc International Corp.) に加え、ウェルの底面にバイオフィームを形成させた。ウェル内の培地を吸引除去し、抗菌剤を溶解した培地及びナノ粒子を懸濁させた培地を 200 μ L 添加した。そして 24 時間インキュベートした。その後は Biotrak II Plate Washer (Amersham Biosciences) を用いて培地の除去とバイオフィームの洗浄を行った。200 μ L の LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Invitrogen) をウェルに添加し、バイオフィーム内の細菌を染色した。30 分後 Biotrak II Plate Washer を用いて、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits の除去と洗浄を行った。その後、200 μ L のエタノールをウェルに添加し、菌層を溶解した。30 分後、マルチモードプレートリーダー DTX 880 を用いて、蛍光強度を測定した。得られた蛍光強度からバイオフィーム内の細菌の生存率を算出した。

(5) 流体流れ場におけるナノ粒子のバイオフィーム内滞留性評価

吸光度が 0.2 Abs となるように調整した細菌液をヒドロキシアパタイト (HA) ペレットが入った 24 穴 well プレート (IWAKI 3820-024) に播種し、CO₂ インキュベーターを用いて 24 時間培養した (37°C, CO₂ 5%)。HA ペレットを取り出し、12 穴 well プレート (BD FALCON R35-3043) 内にてペレットを 2 回、TSB 液体培地 2mL、3min 静止させる洗浄し、バイオフィームが形成された HP ペレットを得た。

HP ペレットに蛍光標識したナノ粒子を吸着させた後、ペレットの表面をペリスタポンプ (アト株式会社 AC-2110) を用いて生理食塩水を流速 2mL/min で各時間流した後、バイオフィーム内に残存しているナノ粒子を抽出し、蛍光光度計により定量した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム定量法の確立

バイオフィームの主成分である多糖類を定量する方法を検討した。今回、糖タンパクの中性糖含量を定量するのに用いられる代表的な測定方法である、フェノール硫酸法を用いて、3 種の細菌が産生したバイオフィームを凍結乾燥した後、バイオフィーム内の多糖類を定量した。結果を Fig.1 に示す。

いずれの細菌を用いて形成させたバイオフィームでも、バイオフィームの質量とバイオ

フィルム中の多糖類量は直線的な正の相関性を示した。また、バイオフィームの単位質量あたりのバイオフィーム内多糖類量は、*S.aureus* < *S.epidermidis* < *S.mutans* の順に多かった。

これらのことからバイオフィーム内の多糖類の定量法としてフェノール硫酸法が有用であること示唆された。

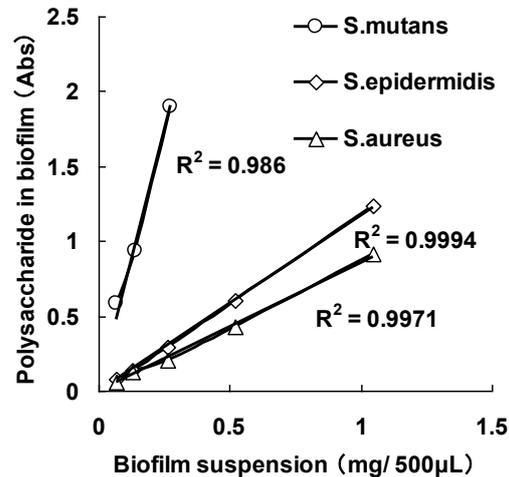


Fig.1 The quantitative analysis of polysaccharide in biofilm by the phenol-sulfuric acid colorimetric method

(2) 浮遊細菌に対する CAM 封入 PLGA ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果

バイオフィーム形成前の浮遊細菌に対してクラリスロマイシン (CAM) 封入 PLGA ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果の評価をした。菌数を調整した浮遊細菌に抗菌剤を添加後、24 時間インキュベートすることで形成させたバイオフィームを、サフラニン染色法によりバイオフィーム形成度を評価した (Fig.2)。

浮遊細菌に抗菌剤を添加すると、抗菌剤の感受性が高く CAM 溶液においてもほとんどの細菌を死滅させた。さらに、CS 修飾 CAM 封入 PLGA ナノ粒子を添加した場合は、CAM 溶液や未修飾 PLGA ナノ粒子と比較しても優位にバイオフィーム形成度を減少させることが明らかとなった。これらのことから、浮遊細菌に対しては、CAM 溶液の添加で十分な抗菌効果を示すが、バイオフィーム形成細菌叢に対しては、CAM 溶液では抗菌効果が不十分であり、CAM 封入 PLGA ナノ粒子の添加が必要であることが示唆された。

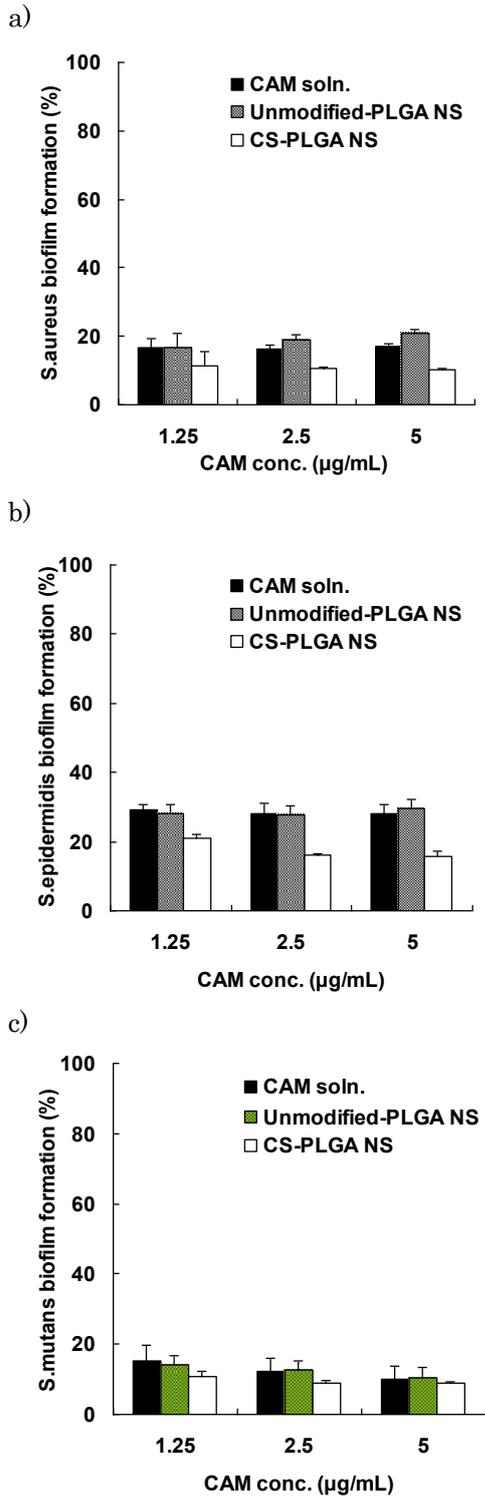


Fig.2 Quantitative analysis of biofilm formation after planktonic bacteria incubated with antimicrobial for 24 h. The results were expressed as a percentage of control (without antimicrobial). Biofilm formation; measuring the optical density at 490 nm after stained with 0.2% safranin solution. a) *S. aureus*, b) *S. epidermidis*, c) *S. mutans*

(3) バイオフィーム形成細菌叢に対する CAM 封入 PLGA ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果

バイオフィーム形成細菌叢に対する CAM 封入 PLGA ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果について評価した。96 穴プレートに形成させたバイオフィームに抗菌剤を添加後、24 時間インキュベートすることで形成させたバイオフィームをサフラニン染色法により、バイオフィーム形成度を評価した。

いずれの細菌を用いたバイオフィームにおいても CAM 濃度の増加とともに CAM 未添加の群と比較して、バイオフィームの形成度が減少した。これは CAM のバイオフィーム細菌叢への抗菌効果によるものと考えられた。しかし、バイオフィームに、CAM 溶液を添加した場合には、バイオフィーム形成細菌叢は抗菌剤に対する抵抗性を有するため、バイオフィーム形成度が高い値を示した。未修飾 PLGA ナノ粒子を添加した場合には CAM 濃度が高くなるほど、CAM 溶液と比較してバイオフィーム形成を抑制させた。さらに、CS 修飾 CAM 封入 PLGA ナノ粒子を添加した場合には、CAM 溶液や未修飾 PLGA ナノ粒子と比較しても優位にバイオフィーム形成度を減少させた。抗菌剤添加後のバイオフィーム量は *S. aureus* < *S. epidermidis* < *S. mutans* の順に高い傾向を示した。これは、バイオフィーム層が厚いため、バイオフィーム内部にまで抗菌剤を送達することができなかったためと考えられる。

(4) 唾液流場におけるバイオフィームに対する PLGA ナノ粒子の滞留性・吸着性評価

唾液分泌量は例えば睡眠時には分泌速度を 0.1mL/min、安静時には 0.32mL/min、食事刺激時には 4mL/min など条件によって様々であり、一般的には一日の唾液分泌量は 1,000mL~1,500mL といわれている。

歯周病治療として口腔内に薬物を投与することの問題点となるのが、上記の唾液の生理作用にあげた洗浄作用によるターゲットとなる病変患部からの薬物消失である。そこで、唾液を模した流場を人工的に作り、PLGA ナノ粒子が病変患部であるバイオフィームに特異的に吸着し、唾液による洗浄作用にも耐え、滞留性を示すか否かを評価した。

ペリスタポンプを用いて、人の刺激時唾液分泌量と同程度である流速 2mL/min という安静時唾液分泌より厳しい条件で模擬唾液である生理食塩水を流すことで唾液流場とみなし、唾液流場におけるナノ粒子のバイオフィームへの吸着性及び滞留性を評価した (Fig. 3)。

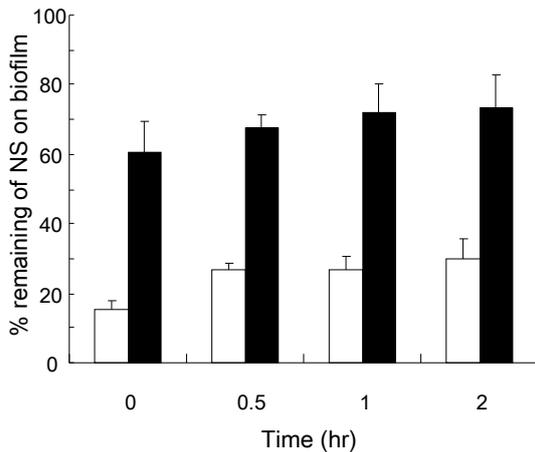


Fig. 3 Retention behavior of nanosphere on the biofilm of *S. epidermidis*
 □: unmodified-PLGA NS, ■: CS-PLGA NS

単位バイオフィルム量当たりのナノ粒子量の質量割合は未修飾の PLGA ナノ粒子同様、測定評価を開始した 0.5hr から一定であり、約 70w/w% であった。これは、未修飾の PLGA ナノ粒子の吸着力に起因しているファンデルワールス力に加え、キトサン修飾により正電荷に帯電したナノ粒子表面と負に帯電しているバイオフィルム表面が静電的相互作用を示したためと推察される。

(5) ヒドロキシアパタイトへのバイオフィルム形成予防物質の探索

歯周病の治療はバイオフィルムの形成後の細菌に対して行うことも重要であるが、細菌の歯面への付着を防いでなおかつ、細菌が歯面に吸着しづらい環境を形成することも歯周病治療において非常に重要である。そこで、ヒドロキシアパタイト(HA)ペレットをモデル歯とし、その表面を様々な物質で処理し、HA ペレットへのモデル細菌である *Staphylococcus epidermidis* の吸着の付着抑制効果、増殖抑制効果の発現について評価・検討を行った。

なお、表面処理物質として、界面活性作用を有する Soluplus[®]、ポリエチレングリコール (PEG)400・6,000、ステアリン酸、アニオン性ポリマーであるポリアクリル酸 (PAA, Mw.5,000, 25,000)、PEG-PLGA(Mw. 8,000, 10,000)、カチオン性ポリマーであるキトサン (CS)を用いた。(Fig4)

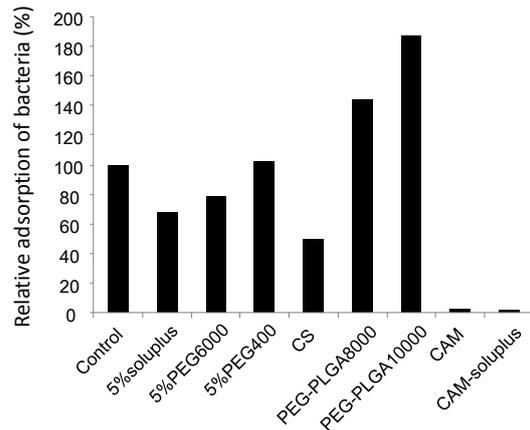


Fig.4 Effect of surface modifier on bacterial adsorption on hydroxyapatite pellet.
 Relative adsorption of bacteria was calculated bacterial adsorption on the surface modified hydroxyapatite divided by bacterial adsorption on unmodified hydroxyapatite.

Soluplus[®]、PEG6,000、PAA2,5000 で処理したペレットにおいて約 60%にまで細菌の付着抑制、増殖抑制効果が得られた。これらの付着・増殖抑制効果機構については不明なため、今後検討する必要がある。キトサンで処理したペレットでは約 15%にまで細菌の付着抑制効果、増殖抑制効果が得られた。キトサンは抗菌効果が報告されており、厳密には作用は解明されていないが細菌は細胞膜表面が負に帯電しており、キトサンが有している正電荷と相互作用を示し効果が発現されたものと考えられている。この抗菌作用により付着・増殖抑制効果が得られたものと示唆される。

以上得られた成果は、現在社会問題となっている歯周病や、臨床現場で問題となっている感染症などに対して、有効な抗菌剤の活用、ならびに治療用製剤を提示することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nagahara A, Mitani A, Fukuda M, Yamamoto H, Tahara K, Morita I, Ting CC, Watanabe T, Fujimura T, Osawa K, Sato S, Takahashi S, Iwamura Y, Kuroyanagi T, Kawashima Y, Noguchi T., Antimicrobial photodynamic therapy using a diode laser with a potential new photosensitizer, indocyanine green-loaded nanospheres, may be effective for the clearance

of *Porphyrromonas gingivalis*, J Periodontal Res, 査読有り, doi: 10.1111/jre.12042 (2013)

② 大澤数洋、福田光男、三谷章雄、永原絢子、渡辺智久、佐藤聡太、高橋伸行、藤村岳樹、須賀貴行、佐々公太、多湖準、三輪晃資、真岡淳之、青木恒宏、山本浩充、野口俊英、歯周治療における半導体レーザーと光感受性物質の併用による抗菌光線力学療法 (antimicrobial Photodynamic Therapy) の臨床的効果について、査読有り、日本レーザー歯学会誌、22, 21-27 (2011)

③ 池田理央、山本浩充、田原耕平、川島嘉明、バイオフィルムを標的とした生分解性ナノ粒子の設計、査読有り、愛知学院薬学会誌、3, 39-41 (2010)

〔学会発表〕(計 11 件)

① 岩村侑樹、福田光男、三谷章雄、大澤数洋、永原絢子、山本浩充、佐藤聡太、高橋伸行、藤村岳樹、須賀貴行、渡辺智久、佐々公太、野口俊英、半導体レーザーの軟組織透過性に関する基礎的検討、第 24 回日本レーザー歯学会、2012 年 12 月 1-2 日、神戸

② 半導体レーザーとインドシアニングリーン封入ナノ粒子による抗菌光線療法の上皮細胞への影響、藤村岳樹、福田光男、三谷章雄、永原絢子、山本浩充、大澤数洋、佐藤聡太、高橋伸行、岩村侑樹、須賀貴行、渡辺智久、佐々公太、林潤一郎、菊池 毅、別所 優、野口俊英、日本歯周病学会、2012 年 9 月 22-23 日、筑波

③ 山本浩充、ナノ化技術とその医療への応用、粉体工学会 中部談話会、2012 年 8 月 30-31 日、岐阜

④ 星川晃宏、小川法子、山本浩充、川島嘉明、バイオフィルム感染症治療と予防を目的としたナノ粒子 DDS 製剤の設計、第 59 回日本薬学会東海支部、2012 年 7 月 7 日、静岡

⑤ 藤村岳樹、福田光男、三谷章雄、大澤数洋、永原絢子、山本浩充、佐藤聡太、高橋伸行、須賀貴行、渡辺智久、佐々公太、野口俊英、半導体レーザーと光感受性物質を用いた aPDT が上皮細胞に与える影響、第 23 回日本レーザー歯学会、2011 年 12 月 3-4 日、大阪

⑥ 星川晃宏、鈴木龍一郎、山本浩充、小川法子、川島嘉明、歯周病予防を目的としたナノ粒子製剤の設計、粉体工学会 中部談話会、2011 年 9 月 15-16 日、愛知

⑦ Hiromitsu Yamamoto, Rio Ikeda, Kohei Tahara, Noriko Ogawa, Yoshiaki Kawashima, Antibacterial Drug Delivery with Surface Modified Nanoparticle for Treatment of Biofilm Infection Disease, 18th International symposium on microencapsulation, 2011 年 9 月 12-14 日, アンタルア-トルコ

⑧ 池田利央、伊藤裕美子、西野直子、田原耕平、山本浩充、川島嘉明、バイオフィルム感染症治療を目指した表面修飾生分解ナノ粒子の設計、第 56 回日本薬学会東海支部、2010 年 7 月 3 日、岐阜

⑨ 山本 浩充、新海 友理、田原 耕平、川島嘉明、山本 浩充、新海 友理、田原 耕平、川島 嘉明、粉体工学会 2010 年度 秋期研究発表会、2010 年 12 月 1 日、東京

⑩ 福田光男、三谷章雄、永原絢子、佐藤聡太、渡辺智久、大澤数洋、野口俊英、田原耕平、山本浩充、川島嘉明、ナノ粒子を用いた光線力学療法の上皮細胞への応用、バイオアカデミックフォーラム 2010、2010 年 6 月 30 日、東京

⑪ 池田利央、田原耕平、山本浩充、川島嘉明、バイオフィルム感染症治療を目的とした薬物送達用生分解性ナノ粒子の設計、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 12-14 日、徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩充 (YAMAMOTO HIROMITSU)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号：30275094

(2) 研究分担者

福田 光男 (FUKUDA MITSUO)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：40156790

小川 法子 (OGAWA NORIKO)
愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号：80409359