

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 1日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791959

研究課題名（和文）アカントアメーバ角膜炎に対するナノテクノロジーを用いた新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new anti-Acanthamoeba treatment with nanotechnology.

研究代表者

横倉 俊二 (YOKOKURA SHUNJI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：30400378

研究成果の概要（和文）：銀ナノ粒子は trophozoite に対してステリクロンよりも有意な抗アメーバ効果を示し、cyst に対してはステリクロンよりも有効な傾向を示した。また電子顕微鏡での観察では、trophozoite と cyst の両方でナノ粒子のアメーバ内への取り込みが確認できた。

MPS に銀ナノ粒子を添加することにより、栄養体・シストどちらに対しても抗アメーバ作用を上昇させることができた。家兎をアカントアメーバ角膜炎の状態とし銀ナノ粒子点眼を投与した所、角膜内アメーバ数は日数と共に減少した。

研究成果の概要（英文）：The Ag nanoparticles were significantly more effective than Chlorhexidine gluconate for anti-trophozoite of Acanthamoeba medication. These particles tended to be more effective than Chlorhexidine gluconate for anti-cyst of Acanthamoeba medication. Electron microscope analysis showed that these particles were taken in not only trophozoite but also cyst.

MPS containing Ag nanoparticles manifested significant effectiveness of anti-trophozoite and anti-cyst of Acanthamoeba.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼微生物学、感染症学

キーワード：アカントアメーバ、ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

アカントアメーバ角膜炎現在のところ特效薬がないため、しばしば治療に難渋し、極度の視力低下をきたすことが多い疾患である。ここ数年患者数の急激な増加がみられ、大きな社会問題となっている。ソフトコンタクトレンズ(SCL)使用中に発症する例が全体の9割近くを占め、またその多くが洗浄・消毒・保存を単一の液で行う、マルチパーパスソリューション(MPS)と呼ばれる洗浄剤を使用していることから、MPS 内でアメーバが繁殖

して SCL に付着し、本来洗浄の際に必要な SCL の擦り洗いが不足した場合に角膜にアメーバが付着し、感染の原因になるといわれている。

アメーバは栄養に乏しい環境や外界からの攻撃に晒されるような環境ではシストと呼ばれる形態をとる。この状態では、多くの抗微生物薬に対して強い抵抗を示すため、本来眼科用の使用が認められていないポリヘキシジンビグアナイド(PHMB)などの、抗アメーバ力が高いといわれる消毒剤を直接点

眼する方法が併用されており、臨床的に頻繁に用いられている。しかし適応外使用である点が倫理的に問題である。

感染性角膜炎・結膜炎の治療はかつて硝酸銀の直接点眼が主流であったが、副作用が非常に強く、抗生物質の登場により急速に廃れていった。その後メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に代表される耐性菌が出現するに至り、耐性をきたさない銀による殺菌に再び注目が集まるようになったが、これまでは安定な銀イオンの形態として使用する方法しかなく、臨床応用は限られた範囲でしか行われてこなかった。しかし近年、銀をナノ粒子化する方法が考案され、銀ナノ粒子が一部の細菌(緑膿菌)や真菌(カンジダ)には十分な殺菌作用を発揮することも判明してきた。この方法ではコストがかかり大量生産が難しく、また精製の過程で環境汚染物質が排出されるため、工業的な展開は困難であった。一方で、一部の細菌が重化学工場からの廃液に含まれる重金属を細胞内に取り込み、イオン化しない状態で体内に蓄積する性質を有し、そのようにして蓄積された金属の中に非イオン化銀ナノ粒子があることが判明した。その後ヒト腸内細菌の一種である乳酸桿菌(*Lactobacillus fermentum*)でも銀ナノ粒子の作製が可能であることが近年判明し、環境汚染のリスクが極めて低く、人体への害も少ない系で銀ナノ粒子の大量生産をすることが可能となった

2. 研究の目的

本研究は、一部の細菌や真菌に対しては効果が認められていて、かつ不活性化しにくい非イオン銀ナノ粒子を用いることで、これまで報告がないアメーバ角膜炎の新規点眼治療法を開発することを主たる目的とする。銀ナノ粒子の作製には、人体への毒性が極めて低い乳酸菌を用いるため、臨床応用の可能性が非常に高い研究であると考えられる。

3. 研究の方法

A. 銀ナノ粒子の製造 銀ナノ粒子の製造法として、低コストで臨床応用の可能性が高い、乳酸桿菌(*Lactobacillus fermentum*)を用いた前出の方法(Sintubin L, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009)をとる。硝酸銀に、ジアミン銀錯体となって溶解するまで水酸化アンモニウムを加え、MilliQ水で

26mg/mLに濃度調整しておく。*Lactobacillus fermentum*を37°CのLB(Luria Bertani)培地で24時間培養し、遠心(5,000rpm)して沈殿させた細菌塊をMilliQ水で洗浄し、1リットルあたり乾燥重量で5gの菌が溶解するようにODを調整してMilliQ水に溶解させる。乾燥重量5gあたり1gの割合でジアミン錯体を加え、更に0.025Nとなるように水酸化ナトリウムを加え、100rpmでシェイクしながら28°Cで24時間インキュベーションする。これを遠心して細菌塊を沈殿させ、MilliQ水で洗浄したのち、MilliQ水に溶解させる。水酸化ナトリウムを加えてpH=11として2時間室温において細胞を融解させたのち、塩酸で中和し、ミリポアフィルターを通して細胞成分を除去することで、銀ナノ粒子が得られる(1gの細菌塊から約140mgの銀ナノ粒子が得られる)。これを用いて以下の実験を行う。

B. in vitroにおける、銀ナノ粒子液の抗アメーバ作用についての解析

American Type Culture Collection (Manassas, VA)より入手したアメーバ株を既報(Sacramento RS, Parasitology 2009)にしたがって培養し、96wellプレートにtrophozoiteとcystの浮遊液($1 \times 10^3/100 \mu\text{l}$)をそれぞれ用意する。それぞれの浮遊液に20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/ml}$ に濃度をふったナノ粒子を加えた培地を加え、25°Cで7日間培養する。培養期間中は顕微鏡で連日各wellを観察し、well内の決められた区画(6箇所)の中での細胞数を計測することでwell内の細胞数を割り出し、培養初日からの細胞減少率を計算する。ポジティブコントロールとして同様に濃度をふったステリクロンを含んだ培地を加え、細胞減少率を比較する。観察後、ナノ粒子を加えているwellからアメーバを採取し、オスミウム固定して走査型電子顕微鏡用に切片を作製し、実際にナノ粒子がアメーバ内に取り込まれているか観察する。更に $1 \times 10^8/\text{ml}$ に調整したアメーバ栄養体及びシストに40 $\mu\text{g/ml}$ の銀ナノ粒子を加えて8時間インキュベーションした後、25 $\mu\text{g/ml}$ となるようにPIを添加して4°Cの暗所で1時間インキュベーションし、FACS解析を行う。これにより細胞膜の透過性が亢進しているか調べる。

一方で $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ に調整した家兎角膜上皮(SIRC cell)に、同様に濃度をふったナノ

粒子を加えて4時間インキュベーションした後、MTTを0.5mg添加して更に4時間インキュベーションし、更に10%ドデシル硫酸ナトリウム100 μ lを添加して暗所で一晚インキュベーションし、570nmでの吸光度を測定することで、細胞障害性を計算する(具体的な計算方法は前出の Sacramento らの論文に基づく)。

C. 既存MPSへの銀ナノ粒子添加による、アメーバ増殖抑制に関する解析

米国FDAで行われているstand alone testに準拠して行う。即ち、清潔なコンタクトレンズケースに培養して 5×10^6 /mlとなるように調整したアメーバ栄養体とシスト浮遊液を100 μ lづつ入れておく。一方で、日本コンタクトレンズ学会と国民生活センターとの共同実験(国民生活センター報道用資料、平成21年12月16日)でアメーバ増殖抑制作用が弱いと判定されたMPS8種類に、20, 40, 60, 80 μ g/mlとなるように銀ナノ粒子を加えたものをアメーバ浮遊液の100倍量となるように添加し、一般的なMPSの付け置き時間である2, 4, 8, 24時間後の各wellの細胞数を計測し、銀ナノ粒子の添加によって抗アメーバ作用が増強したか解析する。

D. in vivoにおける、銀ナノ粒子液の抗アメーバ作用についての解析

これまでの実験で、十分な抗アメーバ作用を発揮し、かつ角膜上皮への毒性が少ない濃度を割り出し、これを点眼に用いる濃度とする。次に、家兎の角膜に一定量のアメーバ栄養体を接種してアカントアメーバ角膜炎の状態とする。ここに銀ナノ粒子点眼を1時間ごとに点眼し、14日間連日、細隙灯顕微鏡による角膜所見の変化・生体共焦点顕微鏡であるHRT-II角膜モジュールによる角膜内アメーバ数の変化・涙液のreal-time PCRによるアメーバコピー数の変化を観察し、銀ナノ粒子点眼によってアメーバ角膜炎が改善するか解析する。14日目にはこの家兎をsacrificeし、病変部角膜を採取して電顕用切片を作製し、銀ナノ粒子の移行などの組織学的解析を行う。

4. 研究成果

平成23年度

乳酸桿菌(*Lactobacillus fermentum*)を用いた既報を用い、銀ナノ粒子を作成した。アメー

バ株を既報にしたがって培養し、96wellプレートにtrophozoiteとcystの浮遊液をそれぞれ用意した。それぞれの浮遊液に20, 40, 60, 80 μ g/mlに濃度をふったナノ粒子を加えた培地を加え、25 $^{\circ}$ Cで7日間培養した。培養期間中は顕微鏡で連日各wellを観察し、well内の決められた区画(6箇所)の中での細胞数を計測することでwell内の細胞数を割り出し、培養初日からの細胞減少率を計算した。ポジティブコントロールとして同様に濃度をふったステリクロンを含んだ培地を加え、細胞減少率を比較した。この結果、trophozoiteに銀ナノ粒子液を加えたwellでは、ステリクロンを加えたwellよりも有意に細胞の減少がみられ、抗アメーバ効果が高いことが示唆された。

一方でcystに銀ナノ粒子得液を加えたwellでは、ステリクロンよりも細胞が減少する傾向がみられたが、有意差はみられなかった。

観察後、ナノ粒子を加えているwellからアメーバを採取して走査型電子顕微鏡用に切片を作製し、実際にナノ粒子がアメーバ内に取り込まれているか観察した所、trophozoiteとcystの両方でナノ粒子のアメーバ内への取り込みが確認できた。

一方で家兎角膜上皮(SIRC cell)に、同様に濃度をふったナノ粒子を加えて4時間インキュベーションした後、MTTを0.5mg添加して更に4時間インキュベーションし、更に10%ドデシル硫酸ナトリウム100 μ lを添加して暗所で一晚インキュベーションし、570nmでの吸光度を測定することで細胞障害性を計算した所、家兎角膜上皮の傷害率は5%未満と軽微であった。

平成24年度

米国FDAで行われているstand alone testに準拠して、清潔なコンタクトレンズケースに培養して濃度調整したアメーバ栄養体とシスト浮遊液を用意し、市販のソフトコンタクトレンズ保存・洗浄液(MPS)8種類に、20, 40, 60, 80 μ g/mlとなるように銀ナノ粒子を加えたものをアメーバ浮遊液の100倍量となるように添加し、一般的なMPSの付け置き時間である2, 4, 8, 24時間後の各wellの細胞数を計測し、銀ナノ粒子の添加によって抗アメーバ作用が増強したか解析した。その結果、栄養体・シストどちらの群でも8時間以上の

後に抗アメーバ作用が濃度依存性に上昇していることが確認できた。

家兔の角膜に一定量のアメーバ栄養体を接種してアカントアメーバ角膜炎の状態とした。ここにこれまでの実験で割り出された、抗アメーバ効果を十分有しかつ角膜上皮毒性が少ない銀ナノ粒子点眼を1時間ごとに点眼し、14日間連日、細隙灯顕微鏡による角膜所見の変化・生体共焦点顕微鏡であるHRT-II 角膜モジュールによる角膜内アメーバ数の変化・涙液の real-time PCR によるアメーバコピー数の変化を観察し、銀ナノ粒子点眼によってアメーバ角膜炎が改善するか解析した。この結果日数の経過を共に、角膜内アメーバ数が減少していくことが確認できた。

このように銀ナノ粒子点眼がMPSの抗アメーバ能を上げる他、直接点眼としても有効な抗アメーバ能を有していることが確認できた。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 横倉 俊二 角膜移植術後形状解析における、前眼部OCTとペンタカムの有用性についての検討 第37回日本角膜学会総会・第29回日本角膜移植学会
平成25年2月14～16日、和歌山県西牟婁郡白浜町

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横倉 俊二 (YOKOKURA SHUNJI)
東北大学・病院・講師
研究者番号：3040078

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者