

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460046

研究課題名(和文) 歯周病治療を目的とした低侵襲型高分子ナノ粒子DDS製剤の設計

研究課題名(英文) Design of polymeric nanoparticle for treatment of periodontal 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病に対し、高分子ナノ粒子または高分子ミセルを用いることで、バイオフィルム深層へ抗菌剤を、さらに歯周組織内へ抗炎症剤を送達可能なドラッグデリバリーシステムの構築を試みた。本研究で確立した嫌気性の*P. gingivalis*とマクロファージ細胞を共培養する*in vitro*抗炎症作用評価系を用いた検討において、薬物ナノキャリアを用いた系は、薬物水溶液に比べサイトカイン産生量を抑制した。さらに、ナノキャリアは歯周組織深部へ侵入することを明らかにした。ナノキャリアはバイオフィルムの構造を退縮させ、抗菌剤を送達する能力も有しており、歯周病治療に適した製剤設計を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Polymeric nanoparticle and polymeric micelles were designed as drug carrier for treatment of periodontal disease. In this study, we established evaluation method of *in vitro* anti-inflammatory effect with macrophage cell under cocultivation with *P. gingivalis*. Nanocarriers shows strongly suppression of cytokine production compared with drug solution. Furthermore, deeply penetration of nanocarriers into the periodontal tissue were observed with the confocal laser scanning microscopy. Nanocarrier indicated the strongly anti-bacterial effect by biofilm retraction effect. We could successfully prepare the nano drug carrier for treatment of periodontal disease.

研究分野：製剤工学

キーワード：高分子ナノ粒子 歯周病 歯周組織浸透性 バイオフィルム感染症 ドラッグデリバリーシステム 高分子ミセル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、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一つであり、その対策は厚生労働省の掲げる「健康日本21」にも取り入れられている。45～79歳では40%以上の国民に中等度以上の歯周病が認められる。このように、多くの日本人が歯周病を患っており「国民病」とも言うべき状況にある。

歯周病の初期段階は歯垢の付着から始まる。歯垢は、バイオフィルム(BF)とも呼ばれ、歯面や口腔内のさまざまな表面に定着・生息する多様な口腔常在細菌とその産生する多糖体から構成されている。歯垢を放置すると細菌の酸性物などによって歯周組織の炎症が誘発され、次第に歯周ポケットの形成や歯周ポケット内での細菌の増殖が促進される。一旦罹患すると、様々な因子が増悪因子となる。この細菌感染により生体側からは各種サイトカインが放出され、炎症を引き起こされる。このため歯周病の治療は、歯周ポケット内の細菌を徹底的に除去するとともに、炎症を消失させることがキーとなる。さらに歯周病が進行すると、歯を支持していた歯槽骨が溶解し吸収され、最終的には歯肉や歯槽骨が破壊されて、歯の喪失へとつながる。

歯垢の原因であるBF形成後の菌には抗菌薬が効きにくく、物理的な除去も困難である。抗菌剤が効きにくい原因としては、BFによる抗菌剤と細菌との接触の抑制、ならびに、歯の患部での薬剤の滞留性が乏しいためである。

さらに初期の歯周病の治療に対しては、歯肉内部や歯槽骨部分において炎症が発生しているため、その効果は限定的である。ナノ粒子DDSの大きな特徴の一つとして、低侵襲的な投与経路でありながら、組織深部にまで薬物を送達できる点にある。このような特性を利用することで、炎症を発症している歯肉内部や歯槽骨部分への薬物送達も可能となり、ステージにかかわらず、歯周病治療が可能となると期待される。

当研究室では、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・グリコール酸共重合体(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、様々な治療法、投与経路の確立など、新規なドラッグデリバリーシステムの開発に取り組んできた。この中で、粘膜付着性ナノキャリアが、歯周病治療用ドラッグデリバリーシステムの構築にも有用であることが期待された。

2. 研究の目的

かかる背景のもと、本研究では歯周病巣部に効率良く薬物を送達して炎症を抑えると共に、長期にわたり滞留させることにより歯の喪失を抑えることのできる高分子ナノ粒子の設計を目的とし、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 水中エマルジョン溶媒拡散法によるPLGAナノ粒子の調製

100 mgのPLGA7520と20 mgのクラリスロマイシン(CAM)をアセトン2 mL中に溶解し、エタノール1 mLを加え、完全に溶解させ、ポリマー溶液とした。これを0.5%キトサン溶液25 mLと4%のPVA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水分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) 水中エマルジョン溶媒拡散法によるソルプラスミセルの調製

200 mgのCAMをアセトン4 mL中に溶解し、950 mgのSoluplus®と50 mg SDS、エタノール4 mLを加え、完全に溶解させ、ポリマー溶液とした。これを0.5%キトサン溶液と精製水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水分野を有機溶媒を取り除くため、標準RC透析チューブ(前処理済・Spectra/Por® 6 Dialysis Membrane)に得られた溶液を入れ、濃縮を行なった。24時間後に取り出し、得られた溶液を48時間、凍結乾燥(EYELA、FDU-1200型、東京理科器械)した。

(3) ナノ粒子の物性評価

NPを精製水中に懸濁させ、動的光散乱法を原理としたZetasizer Nano ZS90(Malvern Instruments)を用いて粒子径を測定した。また、ゼータ電位をZetasizer Nano ZS90(Malvern Instruments)を用いて測定した。

(4) 抗炎症剤含有ナノ粒子のin vitroでの炎症性サイトカイン産生抑制効果

RAW264細胞を 1×10^5 cells/mLで24穴プレートに播種する。CO₂インキュベーター内で48時間培養後、コンフルエントになったところで、培養液を吸引除去し、無血清DMEMに分散させたベクロメタゾンプロピオン酸エステル封入CS修飾PLGAナノ粒子とLPSの混濁液を添加した。37℃で24時間インキュベートしナノ粒子を細胞内に取り込ませた後、培養液を採取した。培養液を遠心分離(14,000 rpm、4、10 min)により不溶性物質を除去した後、上清をMilliQで希釈なし又は、10倍し、ELISA(Quantikine®、R&D Systems)により炎症性サイトカイン放出量を定量した。

(5) 細菌培養方法

S.epidermidisを培養する液体培地は、

0.25%グルコース含有 TSB 培地を用いた。また、細菌の平板培養には 6%TBS 培地を含む、TSB 寒天培地を用いた。

凍結細菌の復元方法として、クライオチューブに凍結保存された菌体を白金耳にて取り出し、液体培地に移植した。菌液を CO₂ インキュベーター内にて 24 時間培養後、以下の実験に用いた。

(6) バイオフィルムの形成

(5)の方法で前培養した細菌液を BF 形成用培地に播種した。その後、細菌液の濁度を紫外・可視分光光度計 (Ultrospec 2010 pro, Amersham Biosciences) を用いて、520 nm の波長で吸光度が 0.2 Abs となるよう細菌液を調整した。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。24 時間後、プレートの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 BF とした。

(7) バイオフィルム形成菌に対するナノ粒子の抗菌活性評価

(6)に準じて、24 穴プレートに形成させた BF に、抗菌剤を溶解した溶液 (5 μg/mL) 及びナノ粒子を懸濁した培地を添加し、CO₂ インキュベーターを用いて培養した。2 時間後ウェル内の培地を吸引除去し、精製水 2 mL で洗浄を行った。その後、PBS 緩衝液を各ウェルに 1 mL 添加し、セルスクレーパーを用いてウェル底面の BF を回収した。各希釈液 (10³, 10⁶ 希釈) 50 μL を寒天培地に画線し、CO₂ インキュベーターを用いて培養した。24 時間後、寒天培地に形成されたコロニー数をカウントし、細菌液 1 mL 中に含まれる細菌数を算出した。

(8) 蛍光標識 PLGA ナノ粒子を用いた歯肉組織移行性評価

マウスにソムノペンチル (ペントバルビタール 0.4 ~ 0.6 mL/kg) を腹腔注射して麻酔をした。その後、未修飾 PLGA ナノ粒子懸濁液 (8 mg/mL) を、マイクロピペットを用いてマウスの上あごの歯周ポケットに滴下した。30 分後と 60 分後に上あごを切り取り、コンパウンドで固定し凍結させた。凍結させた試料をクライオスタット (LEICA CM3050S) を用いて厚さ 5 μm の切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて切片の蛍光を観察し、組織移行性を評価した。

4. 研究成果

(1) 炎症性サイトカイン産生に対するナノキャリアによる産生抑制効果

図 1 に、抗炎症剤であるベクロメタゾン (BEC) 水溶液を用いた各種サイトカイン産生抑制効果の比較について示す。

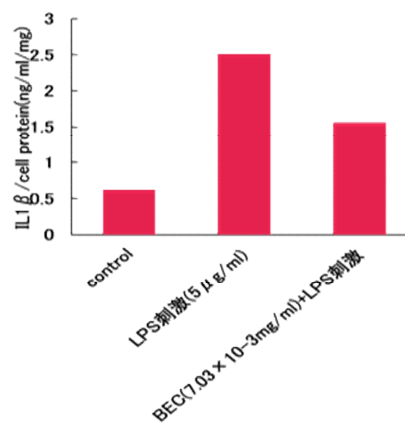
IL-1 では LPS による炎症を惹起した細胞に比べて、BEC を投与した細胞のサイトカイン産生量が低下していた (図 1-a)。

今回の実験で、BEC は溶解度が低いことが知られており、薬剤投与のみでは細胞内に BEC

が必要量取り込まれず、十分な抗炎症効果を得られないことが考えられた。

これに対し、BEC をナノキャリア内に封入して投与したところ、細胞でのサイトカイン産生量が抑制されることが明らかとなった。また、サイトカイン量は濃度依存的に減少していないものの、全ての濃度でサイトカイン量を減少させることができていた。

a) BEC



b) BEC-ナノ粒子

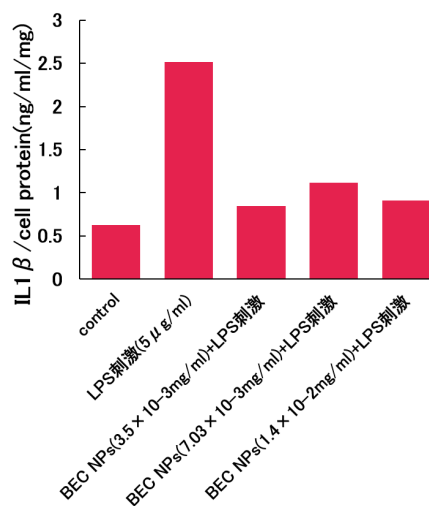


図 1 抗炎症剤投与によるサイトカイン産生抑制効果 a) ベクロメタゾン溶液, b) ベクロメタゾン封入ナノ粒子

(2) ナノ粒子の歯肉組織移行性

未修飾 PLGA ナノ粒子のマウス歯肉組織移行性の評価結果を図 2 に示した。粒子投与後 30 分では歯肉組織表面上に 6-クマリンで蛍光標識された粒子の存在が確認できた。粒子投与後 60 分では、歯肉組織内部まで蛍光標識された粒子の存在がみられた。このことから、粒子投与後 60 分には、未修飾 PLGA ナノ粒子は歯肉内部まで移行していると考えられた。

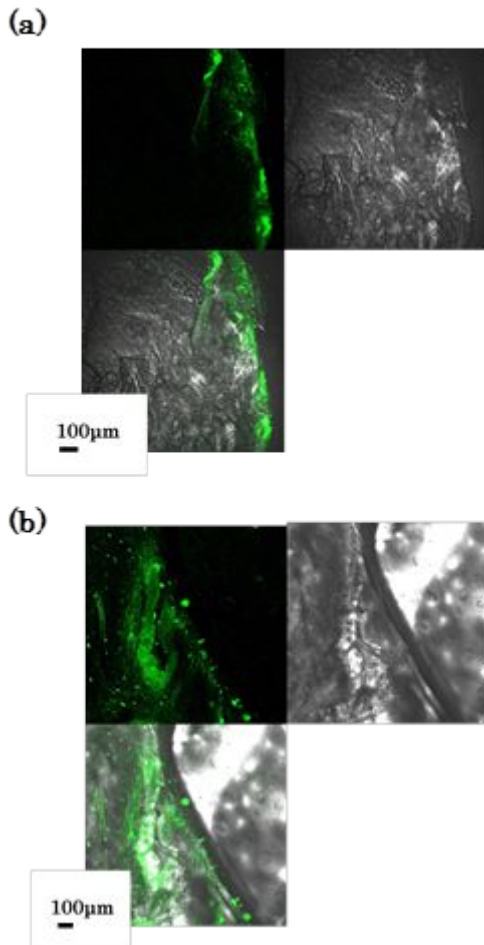


図2 PLGA ナノ粒子のマウス歯周病組織への浸透 (a)-投与後 30 分, (b)-投与後 60 分

(3) バイオフィーム形成菌に対するナノ粒子の効果

未修飾及び CS 修飾ソルプラスミセルを投与した BF では、BF フィルム層が除去されており、コロニーの状態が存在していることが確認できた(図 3 a,c)。高倍率の像で菌の変形が見られることから、菌が溶解していることが示唆された(図 3 b,d)。

CAM を封入した CS 修飾ソルプラスミセルを投与した BF 上でも、BF のフィルム層除去に加え、形成菌へのソルプラスミセルの付着が見られた。付着した箇所を中心に形成菌への高い抗菌作用が観察された(図 3 e,f)。

これらにの結果より、ソルプラスミセルは PLGA ナノ粒子に比べ、BF のフィルム除去能が高いことが分かった。

FE-SEM による微視的評価では、表皮ブドウ球菌のサイズに加え、BF の 3D 構造及び表面の小孔形成が確認できた。

抗菌効果の定量評価から、ソルプラスミセルは PLGA ナノ粒子に比べ高い抗菌活性を有することが分かった(図 4,5,6)。また、表面修飾や薬物封入による抗菌活性の差も明らかとなった。これは、PLGA ナノ粒子に比べ、粒子径の小さいソルプラスミセルの方が BF 表面の小孔に侵入して、菌近傍へ移動することで、強い BF 形成抑制効果を示すためと考

えられた。

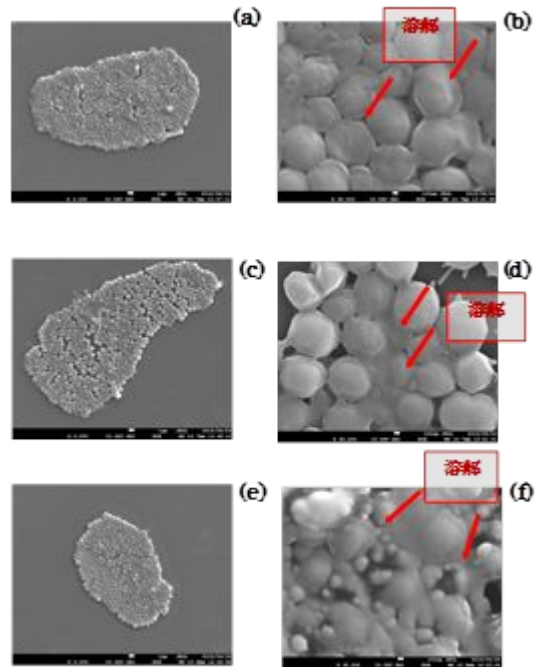


図3 バイオフィームの電子顕微鏡像 (a,b)-未修飾ソルプラスミセルを投与した BF , (c,d)-キトサン修飾ソルプラスミセルを投与した BF , (e,f)-CAM 封入キトサン修飾ソルプラスミセルを投与した BF

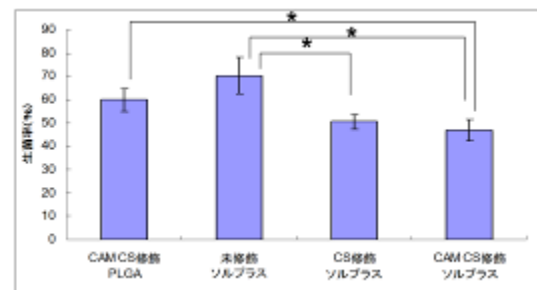


図4 ナノ粒子を投与した BF 形成菌の生菌率

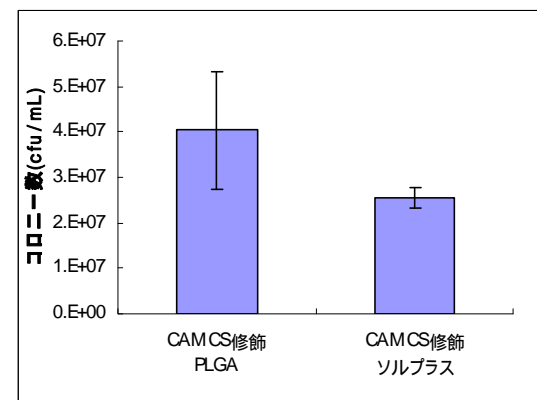


図5 ナノ粒子投与後(CAMCS 修飾 PLGA と CAMCS 修飾ソルプラス)のコロニー形成数

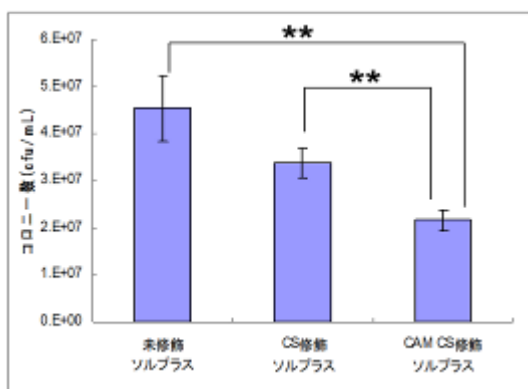


図 6 ナノ粒子投与後(未修飾ソルプラス、CS修飾ソルプラス、CAMCS 修飾ソルプラス)のコロニー形成数

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) C. Takahashi, G. Kalita, N. Ogawa, K. Moriguchi, M. Tamura, Y. Kawashima, H. Yamamoto, Electron microscopy of Staphylococcus epidermidis fibril and biofilm formation using image-enhancing ionic liquid., Anal Bioanal Chem., 407, 1607-1613, 2015 (査読有り)

2) 山本浩充, 小川法子, 高橋知里, 球形晶析技術を応用したバイオフィルム感染治療を目的としたナノ粒子製剤の開発, Drug Delivery System, 30, 129-136, 2015

3) C. Takahashi, N. Ogawa, Y. Kawashima, H. Yamamoto, Observation of antibacterial effect of biodegradable polymeric nanoparticles on Staphylococcus epidermidis biofilm using FE-SEM with an ionic liquids, Microscopy (Oxf), 64, 196-180, 2015 (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 山本浩充, 添加剤粒子の設計から構築する製剤機能, 第 15 回医薬品添加剤セミナー, 2016 年 2 月 9 日 (薬業年金会館, 大阪), 2 月 12 日(連合会館, 東京)

2) 山本浩充, 難治性疾患治療用高分子ナノ粒子 DDS の設計, 「ライフサイエンスネットワーク形成事業」(医薬品分野), 2015 年 11 月 20 日 (パシフィックホテル沖縄, 沖縄) (招待講演)

3) H. Yamamoto, Development of Polymeric Nanoparticle Carrier for Drug Delivery System and Design as Solid Dosage forms,ACHEMA2015, 2015 年 6 月 17 日 (Messe, Frankfurt am Main, Germany) (招待講演)

4) H. Yamamoto, A. Suda, A. Hoshikawa, C. Takahashi, N. Ogawa, Y. Kawashima, Antibacterial Drug Delivery with Nano-Drug Carrier against Biofilm Infection Disease, 19th International Symposium on Microencapsulation, 2013 年 9 月 9 日 ~ 9 月 12 日 (Pamplona, Spain) A

5). Suda, A. Hoshikawa, N. Ogawa, C. Takahashi, Y. Kawashima, H. Yamamoto, Design of polymeric micelle to treat for biofilm infection disease, 5th Asian Arden Conference, 2013 年 8 月 5 日 ~ 8 月 6 日 (愛知学院大学, 愛知)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 浩充 (HIROMITSU YAMAMOTO)
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 (MITSUO FUKUDA)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 40156790

古野 忠秀 (TADAHIDE FURUNO)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 80254308