

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01745

研究課題名(和文) キャリア粒子を用いた種・部位特異的な薬物伝達技術の開発と農業分野への応用

研究課題名(英文) Development of species/site-specific drug delivery technology using carrier particles and their application to agriculture field

研究代表者

野村 俊之 (Nomura, Toshiyuki)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00285305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、キャリア粒子を用いた細胞壁を備えた細胞への目的物質の送達について検討を行った。その結果、植物病原菌に生分解性ポリマー粒子が取り込まれることが分かった。また、この粒子に農薬を封入すると、植物病原菌の感染阻害率が向上することを明らかにした。さらに、カチオン性脂質を吸着させたポリスチレン粒子(粒子径：30 nm)をキャリア粒子として用いると、植物細胞にタンパク質と多糖を送達できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the delivery of target substances to cells with cell walls was investigated using carrier particles. As a result, it was found that biodegradable polymer particles were taken into plant pathogens. In addition, it was revealed that encapsulation of pesticide in the carrier particle improved the inhibition of infection by plant pathogens. Furthermore, it was found that proteins and polysaccharides can be delivered to plant cells by using polystyrene particles (particle size 30 nm) adsorbing cationic lipids as carrier particles.

研究分野：粒子-細胞間に働く相互作用力の評価と応用

キーワード：キャリア粒子 DDS 植物 イメージング

1. 研究開始当初の背景

食料の安定供給はエネルギーとならび、人類繁栄のための重要かつ喫緊の世界規模の課題である。食料生産における最重要課題は、病害による被害の軽減である。例えば、ジャガイモ疫病菌による被害額は年間 67 億ドルに達すると報告されている。近代農業では、病害の予防や対策、除草の簡素化などを目的として大量の農薬が使用される。また、農業を持続的に行うために、土壌に肥料を補給することも必要不可欠である。しかし、これらの作業は、植物への吸収効率が低いことから、大部分を土壌や環境中（生態系）に散布しているようなものであり、人的負担もかなり大きい。したがって、環境、コスト、人的負担の面から、無駄や負担の軽減と食料の生産性の向上が同時に達成できるような画期的な負荷低減技術が望まれている。

申請者は、環境ナノリスクの網羅的研究において、粒子径 100 nm の PSL ナノ粒子を酵母細胞に暴露した際、イオン雰囲気によってナノ粒子が能動的に細胞に取り込まれて細胞死を回避することを CLSM 観察により見出した。通常、緻密な網目構造の細胞壁を持つ細胞が能動的に異物を取り込むことは困難と考えられており、興味深い成果である。細胞壁を持つ酵母の場合、その成果は植物細胞への応用が期待される。しかし、植物の細胞壁の主要な構成成分はセルロースであり、酵母とは異なっている。そこで、ナノ粒子の取込現象を農業技術に応用することを目的として、モデル蛍光分子を封入した粒子径 100 nm のリポソームを試作し、タバコカルス細胞に暴露後、DSU を用いてタイムラプス観察を行った。その結果、リポソームが細胞に取り込まれて細胞骨格上を滑走する興味深い動画が得られた。さらに、レタスの種から発芽した根に暴露したところ、リポソームが根の先端から細胞に取り込まれることも分かった（中間から基部側では取り込まれず）。以上の知見は、リポソームに薬物を封入すれば、植物細胞への薬物送達に利用できるだけでなく、簡便な遺伝子導入への応用も期待できる。

2. 研究の目的

食料の安定供給は、人類繁栄のための喫緊の課題である。申請者は、環境ナノリスクの網羅的研究において、細胞壁を備えた植物細胞へのリポソームの導入に成功した。本研究では、機能性成分を封入したリポソームを創製し、植物や植物病原菌に対して種・部位特異的に薬物を導入するデリバリーシステムを『工学』と『農学』の異分野融合により開発することを目的とする。具体的には、モデル分子を封入したリポソームを用い、各種顕微鏡を駆使して、薬物の導入条件、動態挙動、及び導入メカニズムを明らかにする。また、薬物伝達に適したリポソームを、封入率、除放性、表面性状、サイズ、種特異性、部位

特異性、安全性、コスト面などから最適化した後、ラボスケールの植物栽培試験によりその効能を検証し、実用化に向けた課題を抽出する。

3. 研究の方法

(1) 農薬封入 PLGA ナノ粒子を用いたジャガイモ疫病菌の防除

植物病原菌としてジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans*、植物体としてトマトの葉、農薬としてシアゾファミド（呼吸阻害剤）、生分解性ポリマーのキャリア粒子として乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）ナノ粒子を用いた。

ジャガイモ疫病菌の懸濁液 50 μ L と蛍光マーカーカーマリン 6 を封入した PLGA ナノ粒子懸濁液 (0.2 mg/mL) 50 μ L を 96 穴プレート内で等量混合した。30 分暴露後、1 mg/mL カルコフロールホワイト 0.5 μ L で細胞壁を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 CLSM で PLGA ナノ粒子の局在を観察した。

孢子囊懸濁液 (1×10^5 sporangia/mL) 50 μ L と、シアゾファミドを封入した PLGA ナノ粒子懸濁液、もしくはシアゾファミドを PLGA ナノ粒子に封入せずにそのまま水に分散した溶液 50 μ L を、それぞれ 96 穴プレートのウェルに分注して 10°C で静置した。1.5 時間後、光学顕微鏡を用いて孢子囊と空の孢子囊を合計 400 個以上カウントした。シアゾファミドの阻害効果は、孢子囊からの遊走子の放出阻害率 (%) として ($1 - \text{空の孢子囊数} / \text{全孢子囊数}$) $\times 100$ より算出した。

ミストスプレーを用いて、シアゾファミド封入 PLGA ナノ粒子懸濁液と未封入のシアゾファミド 80 μ L を寒天の上に乗せたトマトの葉にそれぞれ散布した。農薬を散布して 18°C で 1 日静置してから純水 10 mL を約 10 cm の高さから人工的な雨として葉の表面に注いだ。葉を新しい寒天プレートに移し、18°C で 3 日静置してから孢子囊懸濁液を葉の上下 2 箇所 10 μ L ずつ接種した。10°C で 1.5 時間静置して遊走子の放出を促してから 18°C で静置した。10 日後、葉の表面を Image J により画像解析し、感染阻害率 (%) を ($1 - \text{葉の感染面積} / \text{葉の面積}$) $\times 100$ より算出した。また、SEM を用いて 10 mL の純水を注いだ後の葉の表面に残存している PLGA ナノ粒子を観察した。さらに、感染阻害実験後の葉を 1 cm 角にカットし、エタノールで脱色後、0.01% トリパンブルーで孢子囊を染色し、60% グリセロールで洗浄してから観察した。

(2) ナノ粒子を用いた植物細胞への生体物質の送達

植物細胞としてタバコ培養細胞 BY-2 を用いた。生体物質のキャリアナノ粒子として PLGA 粒子とポススチレン (PSL) ナノ粒子を検討した。モデルタンパク質として牛血清アルブミン (BSA)、モデル多糖としてデキストラン、モデル遺伝子として pDNA を使用した。まず、BY-2 細胞を MS 培地に分散させた懸濁

液に種々のキャリアナノ粒子を暴露し、ナノ粒子の局在と細胞の生死を CLSM で観察した。次に、細胞内に取り込まれたキャリア粒子を DOTAP 溶液と混合し、ナノ粒子表面に DOTAP を静電的に吸着させた。さらに、モデル生体分子を加えて攪拌後、BY-2 細胞に暴露して 28°C で振とうした。1 時間後、生体分子およびキャリア粒子の局在と細胞の生死を CLSM で観察した。

4. 研究成果

(1) 農薬封入 PLGA ナノ粒子を用いたジャガイモ疫病菌の防除

クマリン 6 を封入した PLGA ナノ粒子をジャガイモ疫病菌に暴露したときの CLSM 像を図 1 に示す。ジャガイモ疫病菌のいずれの状態に対しても、青色に蛍光させた細胞壁の内部に緑色に蛍光した PLGA ナノ粒子が局在していることが分かった。これより、生分解性 PLGA ナノ粒子は、農薬送達用キャリア粒子として有効であることが分かった。

シアゾファミド封入 PLGA ナノ粒子 (CF-NP) と未封入のシアゾファミド (CF-AQ) を用いた時の阻害効果を比較するために、96 穴プレート内 (*in vitro*) でジャガイモ疫病菌の感染阻害実験を行った。感染阻害率とシアゾファミド濃度との関係を図 2 に示す。シアゾファミドを PLGA ナノ粒子に封入することで、未封入のシアゾファミドを用いた時と比べ、阻害効果が明らかに向上していることが分かった。これは、シアゾファミドを PLGA ナノ粒子に封入することで、PLGA ナノ粒子が孢子嚢に取り込まれ、シアゾファミドをジャガイモ疫病菌の細胞内部に送達できたため、効率的に成長を阻害できたと推察される。

トマトの葉をモデルとした耐雨性実験 (*in vivo*) を行った。その結果、シアゾファミド

を封入した PLGA ナノ粒子を用いた時 (CF-NP)、未封入のシアゾファミド (CF-AQ) と比べて感染阻害効果が明らかに向上していることが分かった (図 3 A)。9 枚の葉の感染阻害率を算出したところ未封入の農薬では $45 \pm 28\%$ であったのに対し、農薬封入 PLGA ナノ粒子では $90 \pm 15\%$ となり優位性があることが分かった (図 3 B)。また、10 mL の純水を注いでから 18°C で 1 日静置した葉を SEM で観察したところ、葉の表面に PLGA ナノ粒子が残存しており、降雨により流されずに葉の表面に残存することが確認できた (図 4)。これは、PLGA ナノ粒子がトマトの葉に付着したときの自由エネルギー変化が負のため、熱力学的に安定に付着したためと推察され、降雨においても PLGA ナノ粒子は葉に付着しており、環境中への拡散が抑制されることが示唆された。また、葉を脱色し、内部の孢子嚢を染

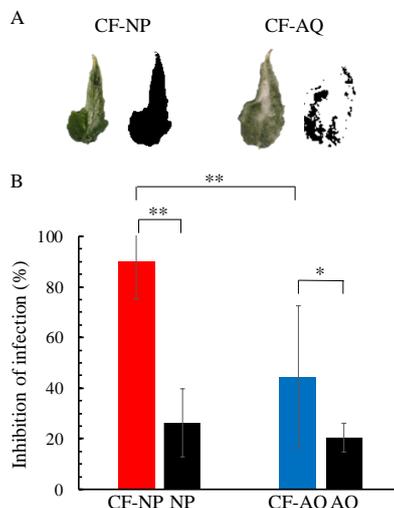


図 3 耐雨性実験: A) トマトの葉 (左: 写真、右: 画像解析像)、B) 感染阻害率 (黒: コントロール)

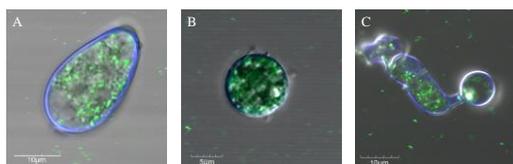


図 1 CLSM 像: A) 孢子嚢、B) シスト、C) シスト発芽 (青: 細胞壁、緑: ナノ粒子)

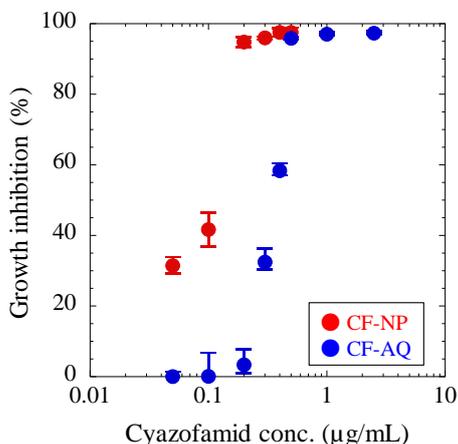


図 2 感染阻害率とシアゾファミド濃度の関係

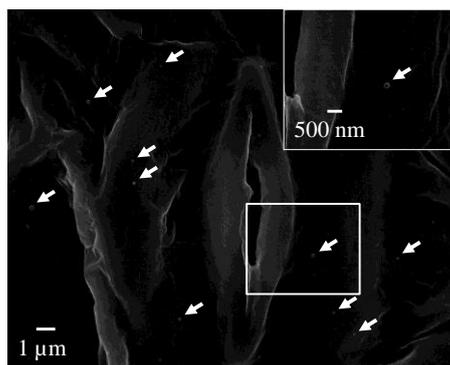


図 4 降雨後のトマトの葉表面の SEM 像 (矢印: キャリア粒子)

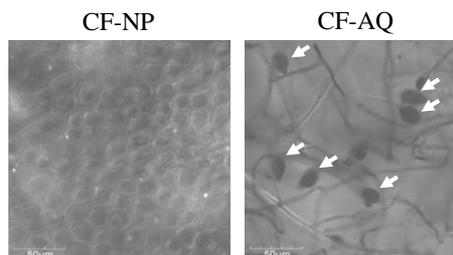


図 5 トマトの葉の内部像 (矢印: 孢子嚢)

色した結果を図5に示す。その結果、葉の表面を視覚的に観察していた時と同様に、PLGAに封入したシアゾファミドでは葉の内部でも感染していないことが分かった。以上より、農薬を PLGA ナノ粒子に封入して用いることで画期的な負荷低減技術として期待できることが分かった。

(2) ナノ粒子を用いた植物細胞への生体物質の送達

種々のキャリア粒子の BY-2 細胞への送達について検討を行った。その結果、PLGA 粒子は、BY-2 細胞に取り込まれたが、生体物質を封入すると粒子径が大きくなるため、BY-2 細胞への導入が困難であった。一方、PSL ナノ粒子は、正帯電や粒子径 100 nm 以上の粒子は細胞に取り込まれず細胞表面に付着したが、粒子径 30 nm のカルボキシル基修飾した PSL ナノ粒子が植物細胞に取り込まれ、キャリア粒子として期待できることが分かった。

カルボキシル基修飾 PSL ナノ粒子は負帯電であるため、負帯電の BSA は粒子表面に吸着はしにくい。そこで、粒子表面に、カチオン性脂質 DOTAP を吸着させ、BY-2 細胞に暴露した。なお、DOTAP は 2 本の疎水鎖を持つ両親媒性の脂質で、細胞膜との親和性が高いと報告されている。その結果、DOTAP 濃度が増加すると、粒子の帯電は負から正へと変化し、BY-2 細胞への取込量も増加した。しかし、過剰に吸着すると、細胞が死滅することも分かった。次に、細胞内への取込量の多かった、DOTAP 吸着 PSL ナノ粒子に BSA を静電的に吸着させた。その結果を図6に示す。BSA 担体では細胞に取り込まれなかったが、DOTAP 吸

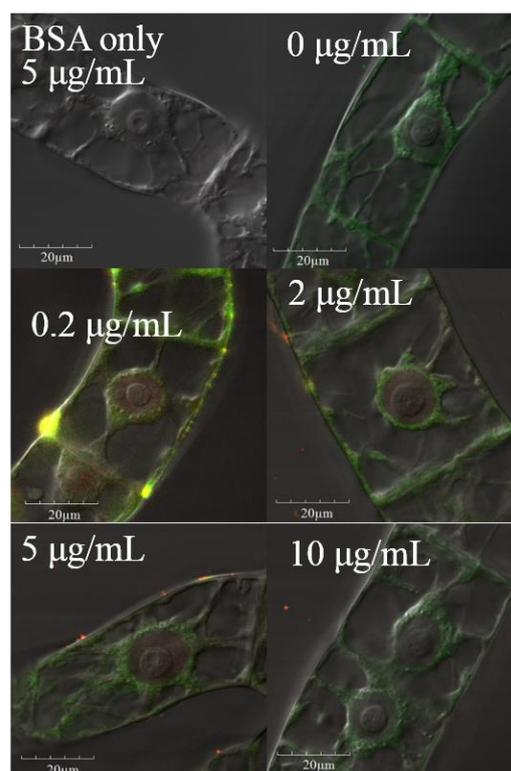


図6 DOTAP吸着PSL粒子にBSAを吸着させたキャリア粒子をBY-2細胞に暴露後のCLSM像

着 PSL ナノ粒子に吸着させると細胞内に取り込まれることが分かった。ただし、BSA 濃度が増加すると取り込まれなくなった。これは、粒子表面の BSA 被覆率が増加して、細胞との親和性が低下したためと推察される。以上より、PSL 粒子表面に DOTAP を吸着させることで植物細胞へのモデルタンパク質の送達に成功した。同様の実験を、デキストランと pDNA についても行った。その結果、BSA と同様にデキストランも BY-2 細胞に送達することができた(図7)。しかし、pDNA は取り込まれなかった。これは、キャリア粒子の粒子径が大きくなったためと推察される。しかし、siRNA などの分子量の小さな遺伝子であれば細胞内への送達は期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① T. Nomura, E. Fujisawa, S. Itoh, Y. Konishi, Comparison of the cytotoxic effect of polystyrene latex nanoparticles on planktonic cells and bacterial biofilms, *J. Nanopart. Res.*, 18, 157 (2016), 査読有
DOI:10.1007/s11051-016-3471-5
- ② T. Nomura, S. Tani, M. Yamamoto, T. Nakagawa, S. Toyoda, E. Fujisawa, A. Yasui, Y. Konishi, Cytotoxicity and colloidal behavior of polystyrene latex nanoparticles toward filamentous fungi in isotonic solutions, *Chemosphere*, 149 84-90 (2016), 査読有

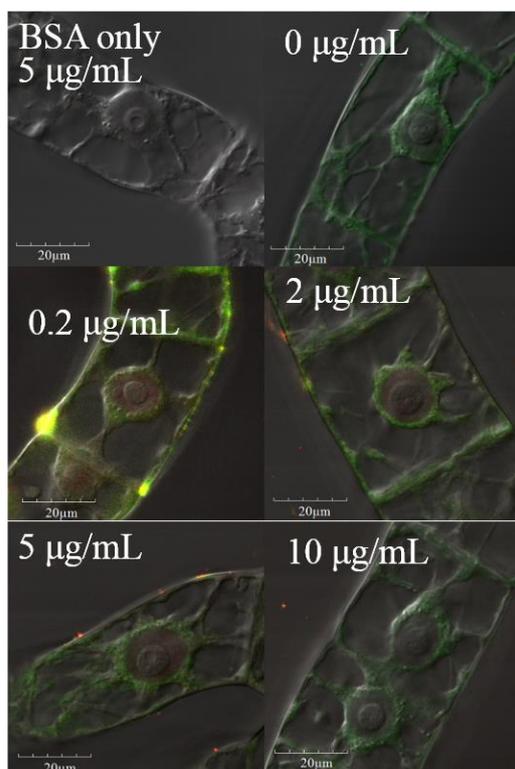


図6 DOTAP吸着PSL粒子にBSAを吸着させたキャリア粒子をBY-2細胞に暴露後のCLSM像

[学会発表] (計 31 件)

- ① 田川花菜, 小西康裕, 野村俊之, 原子間力顕微鏡を用いた粒子-植物細胞に働く相互作用力の直接評価, 第 20 回化学工学会学生発表会 (東広島大会) (2018)
- ② 野村俊之 (依頼講演), 粒子-細胞間に働く相互作用力の評価とその利用, NEPTIS-26 (2018)
- ③ 南浦茉奈, 小西康裕, 野村俊之, 農薬封入キャリア粒子を用いた植物病原菌の防除, 化学工学会金沢大会 2017 (2017)
- ④ 野村俊之 (依頼講演), 粒子を利用して食料問題に貢献!, APPIE 産学官連携フェア 2017 (2017)
- ⑤ 田川花菜, 小西康裕, 野村俊之, 原子間力顕微鏡を用いた植物細胞に働く相互作用力の直接測定, 2017 年度粉体工学会秋期研究発表会 (2017)
- ⑥ K. Fukamachi, S. Tani, Y. Konishi, T. Nomura, Disease control of *Phytophthora infestans* using cyazofamid loaded PLGA nanoparticles, 7th Asian Particle Technology Symposium (APT 2017) (2017)
- ⑦ Y. Yuasa, Y. Konishi, T. Nomura, Delivery of carrier nanoparticles into tobacco BY-2 cells, 7th Asian Particle Technology Symposium (APT 2017) (2017)
- ⑧ 南浦茉奈, 谷 修治, 小西康裕, 野村俊之, 農薬封入キャリア粒子を用いたウリ炭疽病菌の防除, 第 19 回化学工学会学生発表会 (大阪大会) (2017)
- ⑨ 野村俊之, 山本 亮, 中川拓実, 谷 修治, 小西康裕, 糸状菌を用いた高分子ナノ粒子の取込現象の評価, 日本植物学会第 80 回大会 (2016)
- ⑩ 湯浅友貴, 小西康裕, 野村俊之, PLGA ナノ粒子のタバコ培養細胞への導入, 日本植物学会第 80 回大会 (2016)
- ⑪ 深町一仁, 谷 修治, 小西康裕, 野村俊之, メタラキシル封入 PLGA ナノ粒子を用いた植物病原菌 *P. infestans* の防除, 日本植物学会第 80 回大会 (2016)
- ⑫ 野村俊之, 湯浅友貴, 深町一仁, 弓山翔平, 中川拓実, 小西康裕, 薬物送達用キャリアナノ粒子の種々の細胞への導入, 第 52 回粉体工学会夏期シンポジウム (2016)
- ⑬ 湯浅 友貴, 小西康裕, 野村俊之, キャリアナノ粒子のタバコ BY-2 細胞への導入, 第 18 回化学工学会学生発表会 (福岡大会) (2016)
- ⑭ 深町一仁, 谷 修治, 小西康裕, 野村俊之, 農薬内包 PLGA 粒子を用いた植物病原菌の防除, 第 18 回化学工学会学生発表会 (福岡大会) (2016)
- ⑮ 湯浅 友貴, 小西康裕, 野村俊之, タバコ培養細胞へのナノ粒子の導入, 2015 年度粉体工学会秋期研究発表会 (2015)
- ⑯ 深町一仁, 小西康裕, 野村俊之, 農薬封入キャリア粒子を用いた植物病原菌の防除, 2015 年度粉体工学会秋期研究発表会 (2015)
- ⑰ 野村俊之 (依頼講演), 微生物・植物細胞へのナノ粒子の付着・取込現象, 第 66 回コロイドおよび界面化学討論会 (2015)
- ⑱ E. Fujisawa, S. Itoh, Y. Konishi, T. Nomura, Eco-toxicity of polystyrene latex nanoparticles toward biofilm, 6th Asian Particle Technology Symposium (APT 2015) (2015)
- ⑲ T. Nakagawa, M. Yamamoto, S. Tani, Y. Konishi, T. Nomura, Eco-toxicity of polystyrene latex nanoparticles toward biofilm, 6th Asian Particle Technology Symposium (APT 2015) (2015)
- ⑳ 中島淑乃, 竹田恵美, 野村俊之, 徳本 勇人, 酸化亜鉛ナノ粒子が細胞増殖に及ぼす影響, 日本植物学会第 79 回大会 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊之 (NOMURA TOSHIYUKI)
大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 00285305

(2) 研究分担者

谷 修治 (TANI SHUJI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師
研究者番号: 80405357

(3) 研究分担者

徳本 勇人 (TOKUMOTO HAYATO)
大阪府立大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号: 70405348