

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0025

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（国際共同研究強化）

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

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） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、生分解性の乳酸・グリコール酸共重合体（PLGA）ポリマー粒子への水溶性物質の封入を目的とした環境調和型合成法について検討した。その結果、連続相に植物油を用いて生成したPLGAナノ粒子を、水滴上に自己集合させてW/O（Water in Oil）エマルジョンを安定化後、ポリマー粒子を結合させることで、水溶性の多糖、タンパク質、微生物を封入できるPLGAマイクロカプセルの合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PLGAは、生体適合性、生分解性、薬物徐放性に優れたポリマー基材であるが、疎水性のため、親水性物質の封入には適していない。また、PLGA粒子の合成には、生体に有害な化学物質が使用される。本研究で合成したPLGAマイクロカプセルは、内相が水であるため、親水性物質の封入が可能であるだけでなく、その合成プロセスにおいて有害な化学物質をまったく使用していないため、環境調和型の薬物送達システムを可能とする。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated environment-friendly synthetic methods for the encapsulation of water-soluble substances in biodegradable poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) polymer particles. As a result, PLGA nanoparticles generated using vegetable oil as a continuous phase self-assembled on water droplets to stabilize W/O (Water in Oil) emulsion and then the polymer particles were fused by heating, leading that PLGA microcapsules capable of encapsulating water soluble polysaccharides, proteins and microorganisms have been successfully synthesized.

研究分野：微粒子工学

キーワード：環境材料 薬物送達システム コロイドソーム

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

植物病害による食料被害は、世界の農業生産の 10~20%を占めており、8 億人の食料に相当すると言われている。現在採択されている基課題の科研費では、キャリアナノ粒子を用いて薬物を種・部位特異的に細胞内に直接送達することで、植物病害の駆除や予防、回復を試みる検討を行っている。しかし、生物に由来した植物病原は、細菌、菌類、放線菌などの微生物、植物ウイルス、線虫やダニなどの小動物と多岐にわたり、種によって薬剤が異なるだけでなく局在も異なっているため、生物由来の植物病害を阻止するには多様な技術が必要とされている。

申請者のこれまでの研究成果と課題は下記の通りである。

【科研費】生分解性ポリマー-PLGA (ポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体) を基材として、粒子径と表面電荷を制御した薬物内包用キャリア粒子 (PLGA ナノ粒子) の合成に成功している。しかし、内包できる薬剤は油性のものに限られている。また、PLGA ナノ粒子は中実粒子であるため、薬物送達量を増やすには、それに比例してポリマー量も増やす必要がある。

【海外との共同研究】界面活性剤の代わりにポリマー粒子を用いて、W/O (Water in Oil) エマルションを安定化させたのち、ポリマー粒子を結合させることで、水溶性分子や微生物を内包できる『コロイドソーム』と呼ばれる W/W (Water in water) エマルション (中空粒子) の合成に成功している。通常、油相にはクロロホルムなどの有機溶媒が用いられるが、本法では食用油を用いているため安全かつ安価である。また、コロイドソームは中空構造のため、必要なポリマー量が少ない点も利点である。しかし、ポリマー粒子は、難生分解性のものを用いている。

以上の研究成果を融合すると、「生分解性ポリマーを用いてコロイドソームを合成すると、基剤となるポリマーやその製造過程で使用する有機溶剤を大幅に削減できるだけでなく、疎水性と親水性という性質の異なる薬剤を同時に内包することができ、使用後も環境中に残留しない環境調和型の農業用薬剤を開発できる」と考えたのが本研究の着想に至った経緯である。

2. 研究の目的

性質の異なる薬剤を同時に内包できる生分解性 PLGA マイクロカプセルの合成法の開発とその実証試験を行うことを目的とする。具体的には、まず、ポリ乳酸とポリグリコール酸の比率、緩衝液の pH、攪拌速度、帯電性と疎水性を調整するための添加剤などの条件を変化させて表面性状の異なる PLGA 粒子を合成する。次に、油相に食用油を用いて、水と油の比率、攪拌速度、PLGA 粒子濃度を変化させて超音波ホモジナイザーで乳化し、W/O エマルションの安定化条件を探索後、PLGA 粒子同士を結合させてマイクロカプセル化にするための手法を構築する。次に、親水性のモデル物質を用いて、PLGA マイクロカプセルへの封入効率について評価後、作物の連作障害の防止を目的として、性質の異なる薬剤を封入したマイクロカプセルを細菌、カビ、線虫を接種したモデル土壌に散布することで実証試験を行う。また、次世代シークエンサーを用いて、農薬封入マイクロカプセル散布前後の実際の土壌の菌叢解析を行う。

3. 研究の方法

(1) PLGA マイクロカプセルの合成

PLGA (Resomer® RG 502 H, lactide : glycolide = 50 : 50, molecular weight = 7,000-17,000) 2.0 mg を溶解させた食用油 (日清キャノーラ油、日清オイリオ) 4 mL に、目的物質を溶解もしくは分散させた水相を加え、超音波ホモジナイザー (Branson, Sonifier 250) を用いて 20 s もしくは 40 s 間攪拌し、油水混合液を水温で 10 min 静置した。その後、等量の 2 w/v% ポリビニルアルコール (PVA) 溶液を加え、チューブローテータで 90 秒間攪拌 (60 rpm) 後、遠心分離により生成物を回収した。沈殿物は、PVA 溶液で 3 回洗浄することで油を除去してから純水に再分散させた。生成物は、共焦点レーザー顕微鏡 CLSM (オリンパス、FV1000D) により観察した。水溶性のローダミン B は、親水性モデル物質として用いると共に、CLSM を用いた水相の判別にも用いた。また、モデル多糖としてデキストラン、モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA)、モデル微生物としてグラム陽性細菌の乳酸菌 *Lactococcus lactis* (JCM5805 株) を用いた。乳酸菌は PBS 緩衝液で 3 回洗浄したものを実験に用いた。

(2) 内水相のゲル化による封入効率の向上

(1) の手法により合成される PLGA マイクロカプセルの内水相への目的物質の封入率を向上させるために、アルギン酸ナトリウムを用いて水相のゲル化を試みた。アルギン酸ナトリウムをゲル化するためのカルシウムの供給源として炭酸カルシウムのナノ粒子、酸性源としてグルコン- δ -ラクトンを用いた。

(3) 農薬封入 PLGA マイクロカプセルを用いた線虫の防除

(1) の手法により、線虫の殺虫剤 (オキサミル) を封入した PLGA マイクロカプセルを合成し、大阪府立大学圃場より提供された線虫で汚染された実際の土壌に暴露後、線虫の計数と次世代シークエンサーによる 16S rRNA 解析を行った。

4. 研究成果

(1) PLGA マイクロカプセルの合成

食用油への水の溶解性は PLGA の溶解性に影響する重要な操作因子である。超音波ホモジナイザーで油水混合液を攪拌すると溶解性に影響する液温が上昇する。ポリマーはガラス転移温度 T_g で流動状態が変化するため、液温も粒子生成にとって重要な操作因子である。本実験で用

いた PLGA のガラス転移温度は 42–46°C であるため、超音波ホモジナイザーで攪拌前の初期温度が低温 (2.1°C)、室温 (24.2°C)、 T_g 以上の温度 (48.1°C) の 3 条件と、室温から攪拌したときの油水混合液の温度が約 40°C ($< T_g$) となる 20 s と、約 50°C ($> T_g$) となる 40 s を攪拌時間とした。また、 T_g において、水が食用油に完全に溶解する 5 μL と、水の一部しか溶解せず、w/o マイクロエマルジョンを形成する 10 μL を食用油 4 mL に添加する水の液量とした。

PLGA マイクロカプセルの合成条件を表 1、洗浄後に得られた生成物の代表的な CLSM 像を図 1 に示す。これより、攪拌後の液温が T_g 以下の条件で得られたサンプル A、B、E、F は不定形の沈殿物、液温が T_g 以上の条件で得られたサンプル C、D、G、H はマイクロカプセルが得られた。前者の合成条件では、油水混合液の温度が T_g 未満であったため、PLGA の流動性が低く、凝集沈殿が進行したと考えられる。一方、後者を比較すると、油相に添加した水量が溶解限界未満の 5 μL のサンプル C と D では、滑らかなマイクロカプセルが生成したのに対し、溶解限界以上の 10 μL のサンプル G と H では、表面に PLGA ナノ粒子が自己集合したコロイドソーム様カプセルが生成した。これより、前者のマイクロカプセルは、攪拌後の油水混合液を冷却すると、はじめに均一核生成により水の液滴が析出し、その後油水界面に PLGA が析出したと推察される。それに対して、後者のコロイドソーム様カプセルでは、溶解限界よりも油相に添加した水量が多いため、前者よりも油への PLGA の溶解性が低くなる。そのため、攪拌後の油水混合液を冷却すると、水が析出するとともに、均一核生成により PLGA ナノ粒子が油相中に生成した後、油水界面に自己集合したと推察される。以上の知見に基づき、PLGA マクロカプセルが生成されるときメカニズムの概略を図 2 のように考えた。

表 1 PLGA マイクロカプセルの合成条件

サンプル	初期液度(°C)	液量(μL)	攪拌時間(s)	最終液度(°C)
A	2.1	5	40	38.1
B	24.2	5	20	38.5
C	24.2	5	40	48.8
D	48.1	5	20	53.5

E	2.1	10	40	38.1
F	24.2	10	20	38.5
G	24.2	10	40	48.8
H	48.1	10	20	53.5

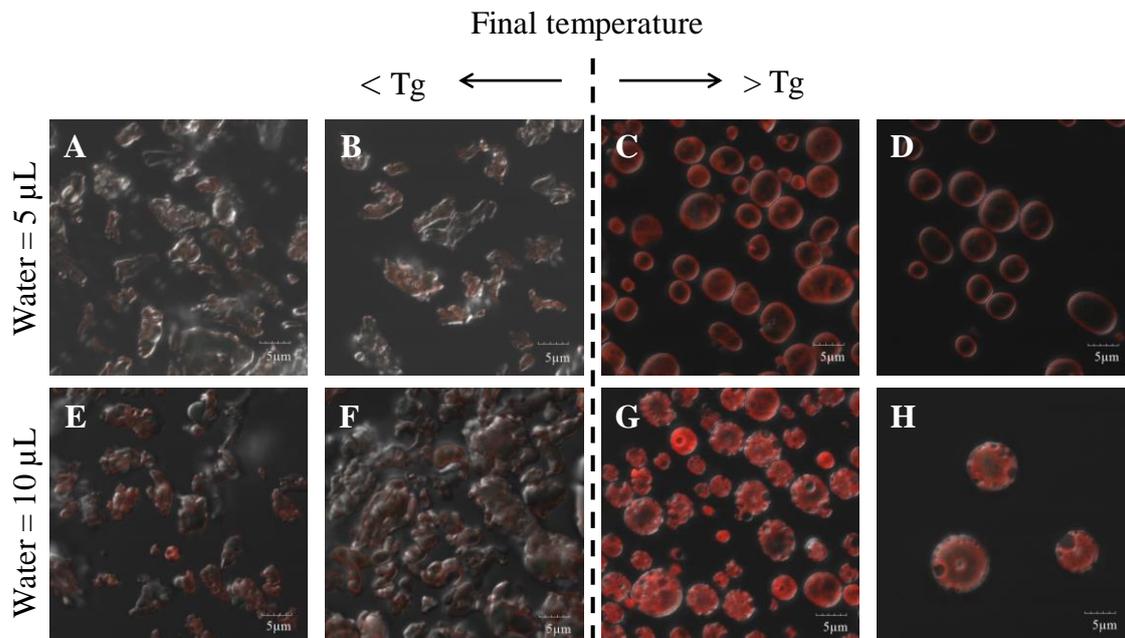


図 1 生成物の代表的な CLSM 像

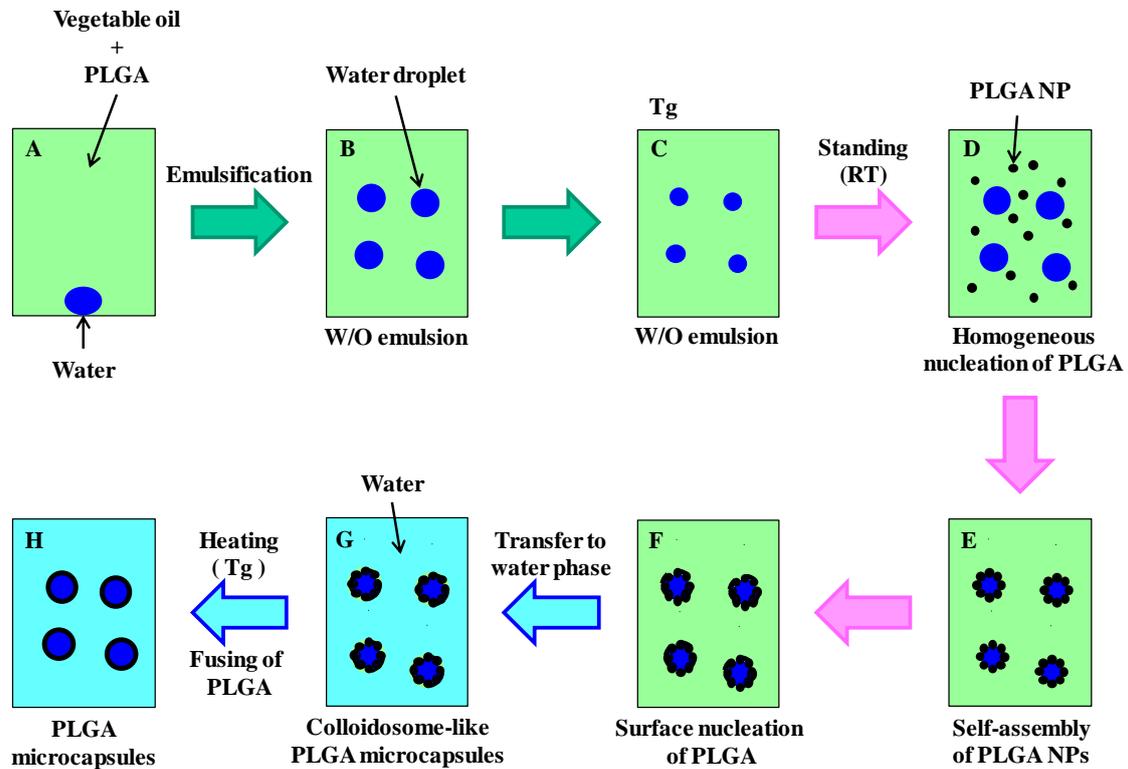


図2 PLGA マイクロカプセルの合成メカニズム：A) 低水量、B) 高水量

親水性モデル物質としてローダミン B、蛍光デキストラン、蛍光 BSA をそれぞれ純水に、モデル微生物として乳酸菌を PBS 緩衝液に分散した溶液を用いて、コロイドソーム様カプセル粒子が合成される条件で、PLGA マイクロカプセルを調製した。親水性モデル物質を封入した PLGA マイクロカプセルの CLSM 像を図 3 に示す。ローダミン B および蛍光デキストランを封入したマイクロカプセル像では、いずれの親水性物質でもカプセル内部が赤色に蛍光しており、封入を確認することができた。一方、蛍光 BSA では、カプセルと外水相の間に緑色に蛍光しており、蛍光 BSA はナノ粒子と油相の界面に局在していることが分かった。また、乳酸菌は、カプセル内部に青色に蛍光した菌体が見られることから、乳酸菌がカプセルに封入されており、封入された乳酸菌は生存していることが確認できたが、カプセル外部には死滅した乳酸菌による赤色の蛍光もみられた。これら親水性物質の封入率の相違は、疎水性の度合いが原因であると推察される。

(2) 内水相のゲル化による封入効率の向上

カプセル内水相への BSA と乳酸菌の封入過程を観察した結果、PLGA ナノ粒子が油水界面に自己集合する前に、目的物質は水・油との親和性により油水界面に拡散していることが分かった。そこで、目的物質の油水界面への局在を抑制するために、アルギン酸ナトリウムを用いて水相のゲル化を試みた。ゲル化速度が速ければ不定形なものとなり、遅ければ目的物質が油水界面に局在してしまうため、アルギン酸ナトリウムをゲル化するためのカルシウムの供給源として炭酸カルシウムのナノ粒子、酸性源としてグルコノ- δ -ラク톤を用いた。その結果、BSA と微生物を封入したカプセルの合成に成功した (図 4)。

(3) 農薬封入 PLGA マイクロカプセルを用いた線虫の防除

線虫で汚染された土壌に殺虫剤を封入した PLGA マイクロカプセルを暴露した。暴露した土壌を次世代シーケンサーによる 16S rRNA 解析を行った結果を図 5 に示す。水のみ、農薬未封入 PLGA カプセルと比較して、土壌菌叢はほとんど変化していないことが分かった。これ

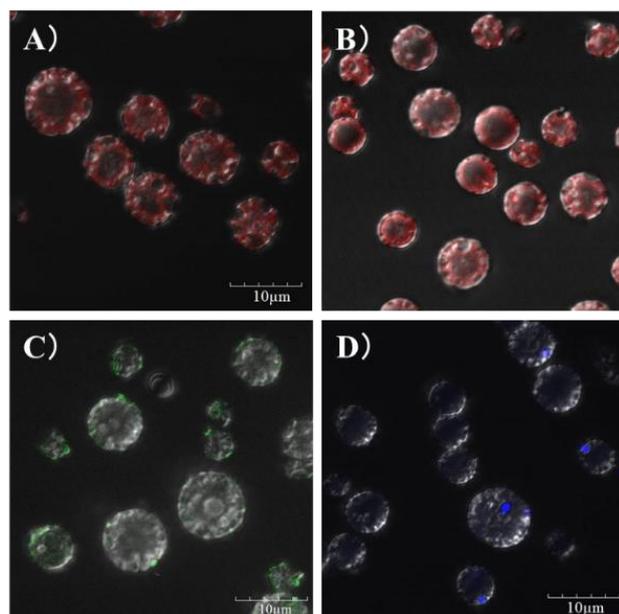


図3 親水性モデル物質を封入したPLGAマイクロカプセルのCLSM像：A) ローダミン B、B) デキストラン、C) BSA、D) 乳酸菌

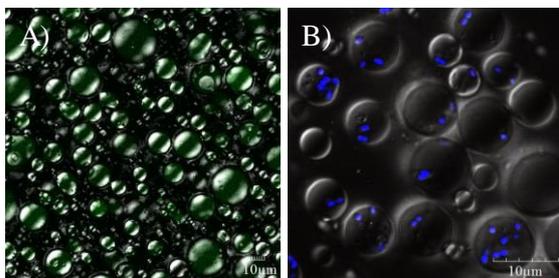


図4 親水性モデル物質を封入したPLGAマイクロゲルカプセルのCLSM像：A) BSA、B) 乳酸菌

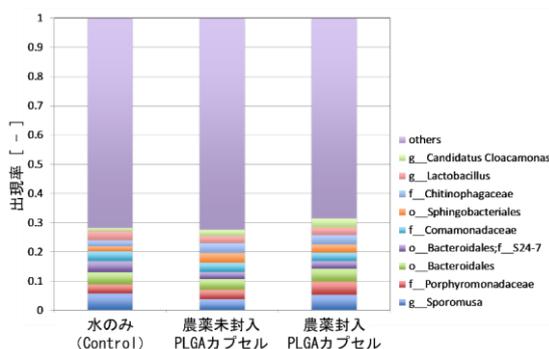


図5 農薬封入PLGAマイクロカプセルを暴露した土壌の16S rRNA解析

より、本カプセルを用いて、線虫を選択的に死滅できることが示唆された。

本研究期間内では、疎水性と親水性という性質の異なる薬剤を同時に内包した PLGA マイクロカプセルの合成とその実証試験までは至らなかったが、PLGA は疎水性物質を封入しやすいため、その実現性は期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① K. Fukamachi, Y. Konishi, T. Nomura, Disease control of *Phytophthora infestans* using cyazofamid encapsulated in poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles, *Colloids and Surfaces A*, 577, 315-322 (2019), 査読有, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.05.077
- ② 中川拓実, 小西康裕, 野村俊之, 生分解性乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子の酵母細胞への導入, *粉体工学会誌*, 55, 626-630 (2018), 査読有, DOI: 10.4164/sptj.55.626
- ③ T. Nomura, A.F. Routh, Benign preparation of aqueous core poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) microcapsules, *Journal of Colloid and Interface Science*, 513, 1-9 (2018), 査読有, DOI: 10.1016/j.jcis.2017.11.007

[学会発表] (計 12 件)

- ① T. Nomura, A.F. Routh, Preparation of Aqueous Core PLGA Microcapsules for Biological Applications, The 6th International Conference on the Characterization and Control of Interfaces for High Quality Advanced Materials (ICCCI2018) (2018)
- ② S. Chiba, T. Nomura, Y. Konishi, A.F. Routh, Encapsulation of hydrophilic materials in benignly prepared PLGA microcapsules, 8th International Colloids Conference (2018)
- ③ T. Nomura, K. Fukamachi, Y. Konishi, Disease control of plant pathogen using pesticide encapsulated in PLGA nanoparticles, 8th International Colloids Conference (2018)
- ④ K. Tagawa, T. Nomura, Y. Konishi, Elucidation of nanoparticle uptake into plant cells using atomic force microscopy, 8th International Colloids Conference (2018)
- ⑤ 野村俊之 (特別講演), 農薬封入生分解性キャリアナノ粒子を用いた植物病原菌の防除, 第38回農薬製剤・施用法シンポジウム (2018)
- ⑥ T. Nomura, A.F. Routh, Preparation of PLGA microcapsules for biological applications, UK colloids 2017 (2017)
- ⑦ T. Nomura, A.F. Routh, Fabrication of water in water PLGA microcapsules without harmful chemicals, 7th International Colloids Conference (2017)
- ⑧ 野村俊之, 千葉祥枝, A.F. Routh, 生分解性ポリマーを用いた農薬送達用マイクロカプセルの合成, 平成 29 年度先端ゲノミクス研究発表会 (2017)
- ⑨ 千葉祥枝, 小西康裕, 野村俊之, A.F. Routh, PLGA マイクロカプセルの合成法の開発, 2017 年度粉体工学会秋期研究発表会 (2017)

[図書] (計 1 件)

- ① 野村俊之 (分担執筆), 粉体の表面処理・複合化技術集大成 ―基礎から応用まで― 第 12 章「バイオコロイド (生きた微生物) に働く相互作用評価」, 内藤牧男監修, テクノシステム, pp.353-360 (2018)

6. 研究組織

研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

研究協力者氏名: Alexander F. Routh

所属研究機関名: University of Cambridge

部局名: Department of Chemical Engineering and Biotechnology

職名: Professor