

## バイオフィルム感染症治療を目的とした生分解性ナノ粒子の設計

092A01 池田 利央

製剤学講座

### 【目的】

多くの細菌は自己の生育に不適な環境において、菌体表面に粘着性を有する多糖体を産生し、さらに隣接した細菌同士が共凝集することにより、バイオフィルムと呼ばれる微生物膜を形成しながら増殖する。バイオフィルムが関与する感染症には、う蝕、歯周病、中耳炎、筋骨格感染症、骨髄炎、細菌性前立腺炎、院内感染症などがある。バイオフィルムを形成した細菌は、抗菌剤や免疫グロブリンに対して高度の抵抗性を持つことから、慢性、場合によっては難治性の感染症を引き起こす。当研究室ではこれまでに、ポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) を基材とする薬物担体ナノ粒子 (ナノスフェア、NS) の開発に成功し、薬物送達システム (DDS) への応用を試みてきた。さらに、PLGA NS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。

そこで本研究では、PLGA NSを用いて、バイオフィルム形成細菌叢へ効率良く薬物を送達し、抗菌作用を向上させることができるDDSキャリアを設計することを企図した。

### 【方法】

#### NSの調製と物性評価

抗菌剤封入PLGA NSはエマルジョン溶媒拡散法により調製した<sup>1)</sup>。抗菌剤は、マクロライド系抗菌剤であるクラリスロマイシン (CAM) を用いた。まず、PLGAとCAMをアセトン・エタノール混液 (2:1) 中に溶解させた。このPLGA・CAM溶液をポリビニルアルコール (PVA) 水溶液中 (外相) に攪拌下滴下し、有機溶媒を留去することにより、未修飾PLGA NSを得た。また外相にキトサン (CS)・PVA混合液を用いることで、CS表面修飾PLGA NSを得た。凍結乾燥後、NSを精製水に再懸濁し、粒子径とゼータ電位を測定した。またPLGA NSからの薬物放出挙動を評価した。

#### 抗菌活性評価

表皮ブドウ球菌を12穴プレートへ播種後、24時間イン

キュベートし、ウェルの底面にバイオフィルム細菌叢を作製した。バイオフィルム細菌叢に、CAM封入PLGA NSを添加し、一定時間インキュベート後、サフラニン染色法により抗菌活性を評価した。またCAM封入PLGA NSの抗菌活性の持続性についても評価した。6-クマリンで蛍光標識したNS懸濁液を、形成したバイオフィルム細菌叢へ添加し、3時間インキュベート後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、バイオフィルム細菌叢に残存している6-クマリン量を定量することで、NSのバイオフィルムへの付着・滞留性を評価した。

### 【結果・考察】

エマルジョン溶媒拡散法により調製したCAM封入PLGA NSの粒子径は、未修飾NSで199 nm、CS修飾NSで388nmであった。PLGAの末端にはカルボキシル基が存在するため、未修飾PLGA NSのゼータ電位は-28.2mVと負の値を示した。一方、CS修飾PLGA NSでは、粒子表面がカチオン性のポリマーであるCSにより修飾されているため、ゼータ電位は31.6 mVと正の値を示した。PLGA NSのCAM含有率は未修飾では2.06 %、CS修飾では0.80 %であった。PLGA NSからの薬物放出挙動は初期バーストの後、徐々に抗菌剤が放出された。これは粒子表面近傍に存在する抗菌剤が初期バースト的に放出され、内部に存在する抗菌剤が時間の経過と共にポリマーマトリックス中を拡散し、放出されたためと考えられた。バイオフィルム形成細菌叢にCS修飾PLGA NSを添加したところ、CAM溶液及び未修飾PLGA NSと比較し、バイオフィルム内の細菌に対して強い抗菌活性を示した (Fig.1)。これは、CS修飾PLGA NSが静電的相互作用によりバイオフィルムへ付着・集積し、バイオフィルム内の細菌に効率的にCAMを送達出来たためと考えられた。また、CAM溶液ではインキュベート時間の延長とともに抗菌活性が低下したのに対し、CS修飾PLGA NSでは、72時間抗菌活性が持続した。これはCAMのナノ粒子からの徐放化によるものと考えられた。

バイオフィーム細菌叢に6-クマリン封入PLGA NSを添加し、3時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ未修飾PLGA NSと比較し、CS修飾PLGA NSは、バイオフィーム内において6-クマリンの蛍光が強く観察された。このことからCS修飾を施すことによりバイオフィームとの付着が促進されることが示された。このような高いCS修飾PLGA NSのバイオフィーム付着・滞留性が、バイオフィーム細菌叢においても高い抗菌効果を示した要因の一つであると考えられた。

以上の結果より、抗菌剤を封入したCS修飾PLGA NSはバイオフィームが関与する感染症の治療に有用であると考えられた。

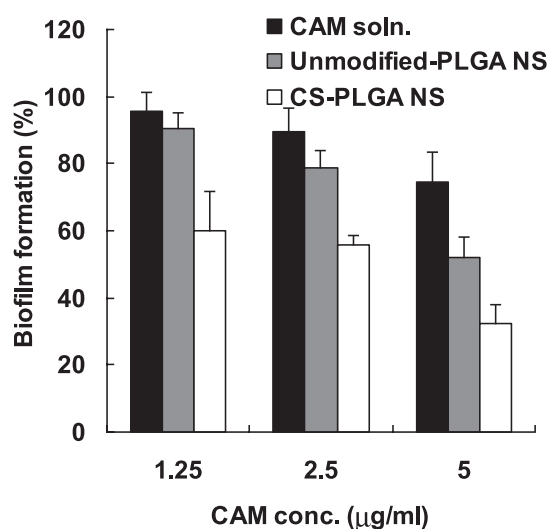


Fig.1 The quantitative analysis of biofilm formation incubated with CAM loaded NS for 24 h

【文献】

1) Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H., Kawashima Y., *Journal of Controlled Release*, 102, 373-381 (2005)