

バイオフィルムを標的とした生分解性ナノ粒子の設計 Design of PLGA Nanoparticles for bio-film targeting

池田利央、山本浩充、田原耕平、川島嘉明*
Rio Ieda, Hiromitsu Yamamoto, Kohei Tahara, Yoshiaki Kawashima*

愛知学院大学 薬学部 製剤学講座
Laboratory of pharmaceutical engineering, School of Pharmacy,
Aichi-Gakuin University, 1-100 Kusumoto, Chikusa, Nagoya, 464-8650, Japan

Keywords: PLGA Nanoparticles; bio-film; chitosan; drug delivery system

1. 緒言

多くの細菌は自己の生育に不適な環境において、菌体表面に粘着性のある多糖体 (グリコカリックス) を産生し、さらに隣接した細菌が互いに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増殖する。グリコカリックスはグルコースやフルクトース、グルクロン酸、N-アセチルグルコサミンなどから成る高分子多糖体の混合物であり、生体内では各種組織や、体内へ挿入・留置した医用器材などの異物表面に微生物が付着・粘着した場合に産生される。

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感染症では、消毒薬や抗菌剤が効きにくく、また、白血球や抗体が菌を攻撃しづらいといった問題がある。そのためバイオフィルムの除去は困難で疾病の難治化・慢性化の原因となっている。マクロライド系抗菌剤の長期微量投与が臨床的に有用であるとの報告もあるが、適切な化学療法剤の開発が現在望まれている。

当研究室ではこれまでに、生体内分解性・適合性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) を基剤とするサブミクロンサイズの薬物送達用ナノ粒子 (PLGA ナノ粒子) の開発に成功し、新規なドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発に取り組んできた。PLGA ナノ粒子の特徴は、封入した薬物放出をコントロールすること

により、長期間にわたり薬効を持続化できるだけでなく、含有薬物を標的組織まで、酵素分解などから保護した状態で送達できるため、薬物のバイオアベイラビリティが飛躍的に向上する。更に、PLGA ナノ粒子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をはじめ新たな機能を賦与させることも可能である。

かかる背景のもと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 キャリアの設計を企図した。

即ち、表面特性を制御した抗菌剤封入ナノ粒子を調製すると共に、*in vitro* において細菌によるバイオフィルムを人為的に形成させ、抗菌剤を封入したナノ粒子について、通常使用されている薬物溶液に対する抗菌活性向上効果、表面修飾による物性変化がナノ粒子のバイオフィルム内での挙動や抗菌活性に及ぼす影響について評価を行った。

2. 方法

2.1 表面修飾した抗菌剤封入 PLGA ナノ粒子の調製

抗菌剤封入ナノ粒子はエマルション溶媒拡散法により調製した¹⁾。モデル薬物として、マクロライド系抗菌剤であるクラリスロマイシン (CAM, SIGMA) を用いた。まず、100 mg の PLGA (分子量 20,000、乳酸:グリコール酸比 = 75:25、和光純薬) と 10 mg の CAM を 3 ml のアセトン・エタノール混液 (2:1) 中に溶解する。この PLGA・

Corresponding author.
Yoshiaki Kawashima
Tel: +81 52 757 6771; Fax: +81 52 757 6799
E-mail address: kawa@dpc.agu.ac.jp

CAM溶液を 50 ml の 2% ポリビニルアルコール (PVA、クラレ社)水溶液中に攪拌下滴下した。得られたナノ粒子懸濁液を遠心分離 (43,400×g, 4℃, 10 min)し、精製水で再懸濁後、凍結乾燥することにより未修飾PLGAナノ粒子粉末を得た。キトサンで表面修飾したナノ粒子の調製は、4% PVA水溶液と0.5%キトサン (片倉チッカリン)水溶液の混液中にPLGA・CAM溶液を攪拌下滴下し、その後上記と同様の操作によりキトサン修飾ナノ粒子粉末を得た。凍結乾燥後、ナノ粒子を精製水に再懸濁し、光子相関法を原理とした粒子径測定装置(Zetasizer Nano ZS90, MALVERN)を用いて粒子径を測定した。また、粒子のゼータ電位についても、Zetasizer Nano ZS90 (MALVERN)を用いて測定した。

2.2 抗菌剤封入ナノ粒子の抗菌活性評価

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, NBRC13276)を懸濁させたTryptic Soy Broth培地 (TSB培地, Bacto)を96穴プレートに加え、24時間インキュベートしバイオフィルム細菌叢を形成させた。形成したバイオフィルム細菌叢に、TSB培地に懸濁させたCAM封入ナノ粒子を添加し24時間インキュベート後、バイオフィルム細菌叢を洗浄した。洗浄後、96穴プレートに付着しているバイオフィルム細菌叢を、細菌染色剤であるサフラニン (Chroma Gesellschaft)により染色し、マルチモードディテクター DTX 880 (BECKMAN COULTER)を用いて、490 nmの吸光度を測定することによりバイオフィルムの形成率を算出した。さらに、バイオフィルム形成前の細菌懸濁液にCAM封入ナノ粒子を添加した群についても同様に、24時間インキュベート後のバイオフィルムの形成率を算出し評価を行った。

また、TSB培地に懸濁させたCAM封入ナノ粒子を、黄色ブドウ球菌を懸濁させたTSB培地中へ添加し、24, 48, 72時間インキュベート後のプレート底部に形成されたバイオフィルム細菌叢をサフラニンにより染色し、バイオフィルム形成率を算出してCAM封入ナノ粒子の抗菌活性持続性について評価を行った。

2.3 バイオフィルムとナノ粒子の相互作用評価

バイオフィルムへのPLGANANO粒子の侵入性、付着滞留性を評価した。6-クマリン (ICN Biomedicals, Inc)で蛍光標識したナノ粒子懸濁液を、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、バイオフィルム細菌叢を洗浄した。その後バイオフィルム細菌叢を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510META)により観察し、ナノ粒子のバイオフィルムへの侵入性を3次元的に観察した。

ナノ粒子のバイオフィルム内滞留性はバイオフィルム

細菌叢に残存している6-クマリン量を定量することで、評価した。12穴プレートに形成させたバイオフィルム細菌叢にナノ粒子懸濁液を添加し、一定時間後に上清みを除去した。その後、1 mlのPBS (Phosphate Buffered Saline, ニッスイ)を加え、バイオフィルム細菌叢を剥がし回収した。この回収したバイオフィルム懸濁液を 500 μl採り、3 mlのメタノール/クロロホルム混液(1:1)と混合し1時間振とうした。その後、3000 rpmで10分間遠心分離し、上清みの蛍光を蛍光光度計 (EYELA, F-2500型、HITACHI)を用いて測定した。(Ex wavelength: 490 nm、Em wavelength: 520 nm、Ex bandpass: 10 nm、Em bandpass: 5 nm)そしてバイオフィルム細菌叢に残存しているナノ粒子量を算出した。

3. 結果・考察

3.1 抗菌剤封入PLGA ナノ粒子の粒子物性

エマルション溶媒拡散法により調製したCAM封入ナノ粒子の粒子径は未修飾ナノ粒子では 199 nm、キトサンで表面修飾したナノ粒子では 388 nmであった。いずれの粒子においても粒度分布が均一なサブミクロンサイズのナノ粒子を得ることができた。PLGAの末端にはカルボキシル基が存在するため、未修飾ナノ粒子のゼータ電位は -28.2 mVと負の値を示した。一方、キトサンで表面修飾したナノ粒子では、粒子表面がカチオン性のポリマーであるキトサン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。ナノ粒子中のCAM含有率は未修飾ナノ粒子では 2.06%、キトサン修飾ナノ粒子では 0.80%であった。

3.2 CAM封入ナノ粒子抗菌活性

バイオフィルム形成前の細菌懸濁液に抗菌剤を添加した場合では抗菌剤の感受性が高く、CAM溶液においても24時間インキュベート後のバイオフィルム形成率は非常に低く、CAM濃度 5 μg/mlではCAM未添加系の約25%まで減少させた。キトサンで表面修飾したナノ粒子ではCAM濃度 5 μg/mlではバイオフィルム形成率を約15%にまで減少させ、CAM溶液と比較しても有意に減少させた。

バイオフィルム形成後に抗菌剤を添加した場合には、バイオフィルムが細菌に抗菌剤に対する抵抗性を付与するため、CAM濃度 5 μg/mlの溶液ではCAM未添加と比較し、バイオフィルム形成率が約 80%と高い値を示した。一方、キトサンで表面修飾したナノ粒子では、CAM濃度 5 μg/mlにおいてバイオフィルム形成率を約 30%にまで減少させ、CAM溶液と比較しても優位に減少させることが明らかとなった。これは、粒子表面をキトサンで修飾してナノ粒子に正電荷を付与することによ

り、負に帯電しているバイオフィーム細菌叢への静電的相互作用による付着が生じ、細菌に効率的にCAMを送達出来たためだと考えられた。

3.3 CAM封入ナノ粒子抗菌活性の持続性

ナノ粒子は内封した薬物の放出を制御することも特徴の一つである。そこで、CAM封入ナノ粒子の抗菌活性の持続効果について検討した。CAM溶液ではインキュベーション時間の延長とともにバイオフィーム形成量が急激に増加し、72時間後にはCAM未添加と比較し約70%を示した。一方で、キトサンで表面修飾したナノ粒子では、バイオフィーム形成量は緩やかに増加するものの、72時間後のバイオフィーム形成率は約40%を示し、バイオフィーム形成量はCAM溶液投与群と比較して有意に減少していた。これはCAMのナノ粒子からの徐放化により抗菌活性が持続したためと考えられた。

3.4 ナノ粒子のバイオフィーム内での分布、滞留性

バイオフィーム細菌叢に6-クマリンを封入したナノ粒子を添加し3時間後、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ未修飾ナノ粒子と比較し、キトサンで表面修飾したナノ粒子は、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。このことからキトサン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事が示された。またバイオフィーム内部を観察したところナノ粒子が観察された。このことからナノ粒子がバイオフィーム内部にまで浸透することが示された。さらに6-クマリンの蛍光量においてもキトサン修飾ナノ粒子では溶液や未修飾ナノ粒子と比較し高い値を示した。この様な高いキトサン修飾ナノ粒子のバイオフィーム内浸透性が、バイオフィーム形成後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。

4. 結論

抗菌剤をナノ粒子へ封入しさらにキトサンで表面修飾することにより、バイオフィーム形成細菌叢に対して殺菌効果を増大することができた。これは粒子表面をキトサンで修飾することにより、負に帯電している細菌に静電的相互作用により付着がおこり、細菌に効率的にCAMを送達できたためだと考えられた。さらに粒子表面をキトサン修飾することにより粒子のバイオフィームに対する付着性を増大させる事ができた。また、バイオフィーム内部にまでナノ粒子が浸透する事が確認できた。以上の結果より、抗菌剤を封入したキトサン修飾CAM封入PLGA ナノ粒子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。今後はナノ粒子のバイオフィーム細菌叢に対する相互作用のメカニズムを

明らかにしていきたいと考えている。

5. 参考文献

- 1) Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H., Kawashima Y., *Journal of Controlled Release*, **102**, 373-381 (2005)
- 2) Chiappetta D. A., Degrossi J., Teves S., D'Aquino M., Bregni C., Sosnik A., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **69**, 535-545, (2008)
- 3) Beyth N., Hourri-Haddad Y., Baraness-Hadar L., Yudovin-Farber I., Domb A. J., Weiss E. I., *Biomaterials*, **29**, Pages 4157-4163 (2008)
- 4) Vyas S. P., Sihorkar V., Jain S., *International Journal of Pharmaceutics*, **330**, 6-13 (2007)
- 5) Yasuda H., Ajiki Y., Koga T., Yokota T., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**, 138-141 (1994)
- 6) Shimotoyodome A., Koudate T., Kobayashi H., Nakamura J., Tokimitsu I., Hase T., Inoue T., Matsukubo T., Takaesu Y., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**, 3634-3641 (2007)
- 7) Johansen C., Falholt P., Gram L., *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3724-3728 (1997)
- 8) Takenaka S., Pitts B., Trivedi H. M., Stewart P. S., *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 1750-1753 (2009)
- 9) Takenaka S., Trivedi H. M., Corbin A., Pitts B., Stewart P. S., *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 1869-1875 (2009)
- 10) Suzuki T., Kawamura Y., Uno T., Ohashi Y., Ezaki T., *American Journal of Ophthalmology*, **140**, 844-850 (2005)