

イオン液体を用いた新規電子顕微鏡解析手法に基づく バイオフィーム感染症治療 DDS 製剤の設計

高橋知里（創薬科学ユニット）

【目的】 多くの細菌は、菌体表面に粘着性のある細胞外多糖から成るバイオフィームと呼ばれる膜を形成する。バイオフィームは、生体内の臓器や、体内へ挿入・留置した医療器材などの異物表面に微生物が付着し、増殖する際に産生される。近年、カテーテルやペースメーカー、人工関節などが治療に大きく貢献しているが、バイオフィームが院内感染症の感染源となるなど、医療現場において問題となっている。本研究は、バイオフィーム感染症治療を目的としたバイオフィーム中への浸透能及び長期滞留能を備えるナノ粒子作製のため、従来の定量的評価法に加え、自身が確立してきた簡便な湿潤試料の電子顕微鏡観察手法を組み込むことで、ターゲットの微視的構造解析に立脚した新しいナノキャリアの設計を試みた。

【実験方法】 本研究では、バイオフィーム形成菌として、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) を用いた。ナノ粒子は、ポリ乳酸・グリコール酸 (PLGA) とソルプラスを高分子基剤として用い、当研究室で確立した手法であるエマルション溶媒拡散法により調製した。ナノ粒子の表面修飾剤及び封入薬剤には、キトサン及びクラリスロマイシンをそれぞれ用いた。定量的評価として

は、コロニー数測定や LIVE/DEAD BacLight 試薬を用いた抗菌活性評価及びフェノール硫酸法によるバイオフィームの定量、蛍光標識したナノ粒子を用いたバイオフィームへの付着・侵入性評価を行った。電子顕微鏡（電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM)）観察には、親水性イオン液体 (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate) を前処理に用いた観察手法と試料冷却ホルダーを用いた観察手法にて行った。

【結果・考察】 イオン液体を試料前処理に用いた FE-SEM 及び TEM 観察により、バイオフィームの形成機構が明らかとなり、さらに、菌増殖に関与するとされるナノスケールの微細器官フィブリルを捉えることに成功した [1]。また、種々の高分子ナノ粒子のバイオフィームに対する付着・侵入挙動の違いを表面形態を捉えることで明らかにした [2, 3]。加えて、イオン液体処理と試料冷却ホルダー付属の走査透過型電子顕微鏡観察を組み合わせることで、新たな手法を開発し、ナノ粒子の付着・侵入挙動を内部構造から捉えることに成功した。これらの観察結果から、ソルプラスを高分子基剤に用いたナノ粒子には、菌増殖に大きく関与するフィブリルに選択的

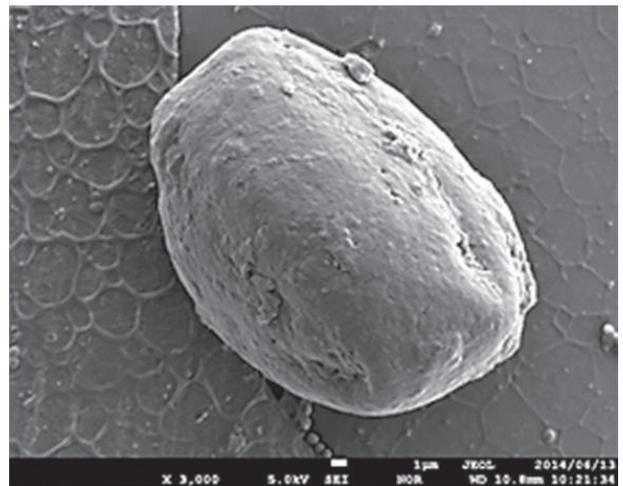
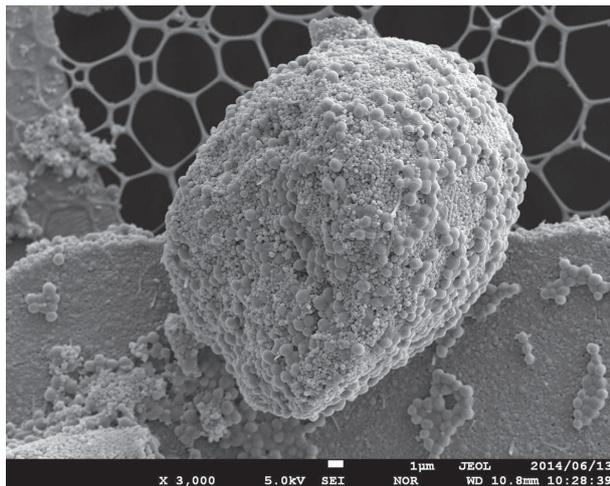


図 ナノ粒子を2時間投与したバイオフィームの FE-SEM 像 (加速電圧 5 kV)
左：キトサン修飾した PLGA ナノ粒子投与後のバイオフィーム
右：未修飾の PLGA ナノ粒子投与後のバイオフィーム

に付着し阻害することが可能であることが明らかとなった。この新規観察手法を従来手法に組み込むことで、バイオフィルムに対してより有効なナノ粒子キャリアを設計することができた。

【謝辞】 この研究は愛知学院大学 医療生命薬学研究所の助成を受けて行いました。研究協力者である製剤学講座の山本浩充教授、香田小百合氏、斉藤祥子氏を始めとする関係各位に感謝致します。

【研究成果】

[1] [Takahashi C](#), Kalita G, Ogawa N, Moriguchi K, Tanemura M, Kawashima Y, and Yamamoto H (2015) Electron microscopy of *Staphylococcus epidermidis* fibril and biofilm formation using image enhancing ionic liquid. *Anal. Bioanal. Chem.* 407: 1607-1613.

[2] [Takahashi C](#), Ogawa N, Kawashima Y, and Yamamoto H (2015) Observation of antibacterial effect of biodegradable polymeric nanoparticles on *Staphylococcus epidermidis* biofilm using FE-SEM with an ionic liquid. *Microscopy* 64: 169-180.

[3] [Takahashi C](#), Saito S, Suda A, Ogawa N, Kawashima Y, and Yamamoto H (2015) Antibacterial activities of polymeric poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and Soluplus[®] micelles against *Staphylococcus epidermidis* biofilm and their characterization. *RSC adv.* 5: 71709-71717.