球形晶析技術を応用したバイオフィーム感染症治療を目的としたナノ粒子製剤の開発

愛知学院大学 薬学部 製剤学講座

山本浩充*・小川法子*・高橋知里*

Design of nanoparticulate drug delivery system for biofilm infection disease by spherical crystallization method

Bacteria living in a biofilm can have significantly different properties from free-floating bacteria, as the dense and protected environment of the film allows them to cooperate and interact in various ways. This environment provides the resistance to detergents and antibiotics, as the dense extracellular matrix and the outer layer of cells protect the interior of the community. These biofilms cause the intractable infections. Therefore, the development of antibacterial drug delivery systems against the biofilm infection disease is strongly desired. In this review, we intended to design the surface modified PLGA nanoparticle and polymeric micelles for antibacterial drug delivery to the microorganisms in the biofilm. Clarithromycin-loaded drug carrier showed the stronger antibacterial effect against biofilm formed microorganisms compared with drug solution. Especially, CS-modified carrier indicated the more effective antibacterial activity and decreased the biofilm formation because nanocarrier adsorbed on the biofilm. Especially, soluplus micelles indicated the strongest anti-bacterial effect because the adsorption amount was higher than PLGA NP. Therefore, soluplus micelles with smaller particle size could access to the deeply part of biofilm which has sponge like structure.

バイオフィーム感染症は、抗菌剤が効きにくいいため難治性であり、医療現場において大きな問題点となってきた。本稿では、これらの疾患に対して、バイオフィームと相互作用するナノ粒子化製剤を用い、抗菌剤をバイオフィーム形成菌に長時間さらさせるようにすることで、抗菌活性を示す製剤が設計できることを紹介している。このなかで、バイオフィーム内の細菌へ薬物を効率良く送達するためには、バイオフィーム内に水路として形成されている小孔にアクセスできるサイズの薬物キャリアであるミセルナノ粒子を用いることで達成できることを紹介する。

Hiromitsu Yamamoto, Noriko Ogawa, Chisato Takahashi*

Keywords: Nanoparticle, Spherical crystallization, Biofilm infection disease

はじめに

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)からなるバイオフィームと呼ばれる微生物膜を形成し、増殖する。バイオフィームは、細菌が自己の生育に適さない環境において、菌体外表面に粘着性のある細胞外多糖類(EPS; extra cellular polysaccharides)を産生し、隣接する細菌同士が互

いに共凝集することによって形成される微生物膜である^{1,2)}。EPS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なる高分子多糖類で構成されており、周りの環境因子や構成微生物種によりEPSの構成成分やバイオフィームの構造が異なる³⁻⁵⁾。また、バイオフィーム内では、単一の菌種だけでなく、複数種の菌が共存するかたちで、コロニーを形成しており、バイオフィームは単なる微生物の凝集体ではなく、構成微生物が相互に作用し合うコミュニティとして生理性生態学的多様性を獲得、発揮していることも明らかに

* Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University

なっている^{6,7)}。

バイオフィルムは生体内の各種臓器や、体内へ挿入・留置した医用器材などの固体表面に微生物が付着・増殖する場合に産生される。バイオフィルム下で生育している感染菌には、バイオフィルムがバリアとして機能するため、消毒薬や抗菌剤が効きにくい。また、白血球や抗体も細菌を攻撃しづらい環境が構築されている。上記の理由から、生体内に形成されたバイオフィルム形成菌に対し、ほとんどの抗菌剤が無効化されてしまい、その除去は困難で感染症が難治化しやすい。バイオフィルムを形成する代表的な細菌として、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、肺炎桿菌、グラム陰性桿菌、インフルエンザ菌、口腔内細菌などがあげられる。

バイオフィルムが関与する感染症には、歯周病、院内感染症、う蝕、骨髄炎などがあり、バイオフィルム形成は、上記のとおり、抗菌剤の有効性が低下することから、疾病の難治化・慢性化の原因となっている。歯周病は45～79歳のおよそ40%に認められ、糖尿病、高脂血症、高血圧症などとならぶ代表的な生活習慣病の1つとなっており、厚生労働省が掲げる「健康日本21」にも取り入れられるなど、その対策が切望されている。さらに近年、各種の体内挿入・留置型医用器材(カテーテル、ペースメーカー、人工関節、人工弁など)が広汎に使用され治療に大きく貢献しているが、これらの医用機器上にも各種の微生物が強固なバイオフィルムを形成することがあり、院内感染症の感染源となるなど、しばしば問題となる。

バイオフィルムは耐性菌の出現にも関係していることが指摘されている^{8,9)}。耐性菌の出現は、菌の増殖阻害や殺菌に利用できる抗菌薬の種類が限定されるようになるため、感染症治療を困難にさせている。近年では、さらに治療困難な多剤耐性菌も出現してきたことから、耐性菌の世界的な監視と対策が行われているのが現状である。耐性菌を出現させないためには高濃度に、短時間に抗菌薬を作用させる必要があるが、バイオフィルムはこれを阻害し、低濃度で長時間抗菌薬にさらされる場所を提供し、耐性菌の発現に寄与しているとも考えられる。バイオフィルムが形成されるようなヒトへの細菌感染

症の罹患率は、全体の65%以上であるといわれ¹⁰⁾、Parsek と Singh らはバイオフィルム感染症の特徴として、①感染菌が何らかの固体表面に付着していること、②菌体外マトリックスに包まれたコロニーが観察できること、③二次的播種は起こりうるが、感染部位が限定されていること、④原因菌に対して有効性が確認されている抗生剤を使用しても治療できないことなどをあげて定義している¹¹⁾。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、適切な抗菌製剤の開発が望まれている。

われわれの研究室では、これまでに球形晶析技術を応用することで、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を調製する技術の開発に成功し、新規なドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用に取り組んできた^{12,13)}。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。また、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の飛躍的な向上が期待できる。さらに、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^{14,15)}。

本稿では、PLGA ナノ粒子を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 製剤として設計することを企図して実施した研究について紹介したい。さらに、最近取り組んでいる両親媒性高分子を基剤として用いたミセル粒子に関する取り組みも交えて紹介する。

1. 球形晶析法による高分子ナノ粒子の調製

球形晶析法の1つ、水中エマルション溶媒拡散法による PLGA ナノ粒子およびソルプラスミセル粒子の基本的な調製メカニズムを図1に示す。水中エマルション溶媒拡散法では、貧溶媒と混和する良溶媒中に薬物および PLGA もしくはソルプラスを溶

図1 球形晶析法(水中エマルション溶媒拡散法)によるナノ粒子の調製機構

ナノ粒子構成物質を良溶媒に溶解し、これを良溶媒と混和する貧溶媒中に加えると、溶媒の相互拡散によって界面に乱れが生じ、自己乳化的にサブミクロンサイズのエマルション滴が形成される。エマルション滴からの良溶媒の拡散がさらに進行すると、溶解度の低下に伴って構成物質が析出し、球形のナノ粒子が得られる。

表1 ナノ粒子の基本物性

	平均粒子径(nm)	ゼータ電位(mV)	薬物含量(%)
未修飾PLGA ナノ粒子	168	-26.0	2.06
キトサン修飾PLGA ナノ粒子	302	31.1	0.82
キトサン修飾ミセル粒子	97.4	15.5	0.12

解した溶液を、貧溶媒中に滴下する。このとき、急速に良溶媒が貧溶媒中に、また貧溶媒は良溶媒中へと、相互に拡散する。この溶媒同士の相互拡散によって有機溶媒相と水相の界面が乱れ、自己乳化的にサブミクロンサイズのO/W型エマルションが形成される。このとき、貧溶媒中に存在するPVAや共存させたキトサンなどの表面修飾物質がエマルション滴界面に吸着し、界面張力の低下ならびに保護コロイドとして作用することにより、エマルションの合一を防ぐ。その後、溶媒の相互拡散がさらに進み、溶解度の低下に伴ってPLGAまたはソルプラスおよび薬物が析出し、ナノ粒子が得られる。ナノ粒子の形成はエマルション滴の形状を保持したまま、液滴表面から内部に向かってポリマーおよび薬物が固化していくため、微細な球形の粒子が得られる。

水中エマルション溶媒拡散法により調製したナノ粒子の基本的な物性を表1に示す。また表中では、抗菌剤としてクラリスロマイシン(CAM)を封入した粒子について、薬物含量をあわせて示した。

PLGA ナノ粒子では、粒子径約250nmで、未修

飾のナノ粒子では、ゼータ電位が-40mVと負電荷を示しているのに対し、キトサンで修飾した粒子では、ゼータ電位が+20mVと正の値を示す、電荷の異なる粒子を得ることができる。一方、ソルプラスミセル粒子では、PLGA ナノ粒子よりも粒子径が微細化され、約100nm程度の粒子が得られている。また、表面電荷については、PLGA ナノ粒子と同様に、キトサンで修飾したミセル粒子は正電荷(+15mV)を示した。

CAMの封入率については、粒子径の大きなPLGA ナノ粒子のほうがソルプラスミセル粒子よりも高い値となった。ミセル粒子では、粒子が微細であるため貧溶媒と接する面積が大きいこと、さらに疎水性部分の拡散距離が短いなどの理由により、調製工程において貧溶媒中への薬物の漏出が多くなったためと考えられる。

PLGA ナノ粒子、ソルプラスミセル粒子はいずれも凍結乾燥により粉末化しても、用時水を加えることで容易に再懸濁し、元のナノ粒子懸濁液、ミセル粒子懸濁液を再構築できる。

2. 抗菌剤封入ナノ粒子の バイオフィーム形成抑制効果と抗菌効果

バイオフィームを形成していない浮遊細菌に対して抗菌剤を適用した後の、バイオフィーム形成抑制効果ならびに抗菌活性を評価した結果を図2、図3に示す。なお、本実験では、モデルバイオフィーム形成菌として、*Staphylococcus epidermidis* を用い、菌数を調整した浮遊細菌に抗菌剤を添加後、24時間インキュベートすることで形成させたバイオフィームを、サフラニン染色法により定量し、バイオフィーム形成度の評価に用いている。

浮遊細菌に対して抗菌剤を添加した場合、バイオフィームを形成していないため抗菌剤に対する感受性が高く、CAM溶液を適用した系においてもほとんどの細菌が死滅し、バイオフィーム形成を抑制した。このなかでも、キトサンで修飾したCAM封入PLGAナノ粒子を添加した系において、CAM溶液や未修飾PLGAナノ粒子と比較して、より低濃度からバイオフィーム形成度の抑制が確認された。これは、菌体表面が負に帯電しており、正電荷のキトサンが菌体に静電的に付着し、効率良く細菌へ抗菌

剤を送達できたためと考えられた。

3. バイオフィーム形成菌に対する CAM封入PLGAナノ粒子の バイオフィーム形成抑制効果

バイオフィーム形成細菌叢に対するCAM封入PLGAナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果について評価した(図4)。

前述した浮遊細菌に対する抗菌効果とは異なり、CAM溶液では、バイオフィームが抗菌剤に対する抵抗性を示すため、バイオフィーム形成度が高い値を示し、また抗菌活性も弱くなった。このとき、バイオフィーム形成度は、CAM添加濃度の増加とともに減少していた。これはCAM単体でも、長時間、高濃度で菌にさらすことによってバイオフィーム細菌叢に対する抗菌効果を示すものと考えられる。

これに対し、PLGAナノ粒子に封入したCAMでは、CAM溶液に比べ強い抗菌作用を示し、特にキトサン修飾ナノ粒子において、その効果が顕著に現れた。バイオフィームの構造は、細菌が栄養素を取り入れるため、スポンジのように無数の小孔を有し

図2 浮遊細菌に対するCAM封入ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果
浮遊細菌に対しては、薬物溶液でも抗菌活性によってバイオフィーム形成量が減少する。

図3 浮遊細菌に対するCAM封入ナノ粒子の抗菌活性

図4 バイオフィーム形成細菌叢に対する CAM 封入ナノ粒子のバイオフィーム形成抑制効果

浮遊細菌には有効であった抗菌剤溶液は、バイオフィーム形成細菌に対しては効果が減弱していた。キトサン修飾ナノ粒子も効果は減弱するものの、バイオフィーム形成細菌に対しても強いバイオフィーム形成抑制効果を示した。

ている。このため、ナノ粒子はバイオフィーム深部まで薬物を送達することができると考えられる。

上記推察を検証するため、粒子蛍光マーカーである6-クマリンを封入した PLGA ナノ粒子を用いて、バイオフィーム細菌叢との相互作用について、視覚、定量的に評価し、キトサン修飾、粒子径、ナノ粒子濃度がバイオフィーム細菌叢への付着・滞留性に及ぼす影響を検討した。

バイオフィーム細菌叢を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、視覚的評価を行った結果を図5に示す。なお粒子添加後のインキュベーション時間は3時間とし、バイオフィーム細菌叢を細菌染色剤である、サフラニンにより染色し、観察を行った。

いずれの粒子においても、バイオフィーム細菌叢にナノ粒子の蛍光標識物質である6-クマリンの蛍光が観察され、ナノ粒子がバイオフィーム細菌叢表面に侵入していることが確認された。ナノ粒子に封入した6-クマリンを定量したところ、キトサン修飾ナノ粒子は未修飾粒子よりも高い吸着量を示した(図6)。バイオフィームは、ゼータ電位を測定した

図5 PLGA ナノ粒子を適用したバイオフィームの共焦点レーザー顕微鏡画像

PLGA ナノ粒子をバイオフィームに適用すると、バイオフィームにナノ粒子が吸着していることが確認できる。正のゼータ電荷を有するキトサン修飾ナノ粒子は、負に帯電しているバイオフィームと静電的な相互作用をすることによって吸着量が増加する。

図6 バイオフィームに吸着したナノ粒子の定量的評価

図5に示した共焦点レーザー顕微鏡結果と同様に、キトサン修飾ナノ粒子のバイオフィームへの吸着量は未修飾ナノ粒子よりも多くなった。

結果、マイナス電荷を有しており、正電荷を有しているキトサン修飾ナノ粒子との間に働く静電的な相互作用により、バイオフィームへの吸着が促進され、未修飾PLGA ナノ粒子よりもさらに大きな濃度勾配を形成でき、薬物を効率良くCAMを送達できた

ものと考えられる。

以上のことから、ナノ粒子表面にキトサン修飾を施すことにより、バイオフィーム細菌叢への侵入性だけでなく、付着・滞留性も促進されることが明らかとなった。

図7には、ナノ粒子を適用したバイオフィームについて、イオン液体を用いた湿潤状態での電子顕微鏡観察技術を用いたバイオフィームへのナノ粒子の侵入性に関する評価を行った結果を示す^{16,17)}。電子顕微鏡においても、ナノ粒子がバイオフィーム内部へ侵入していることが確認できた。さらに興味深い点として、キトサン修飾ナノ粒子がバイオフィームを退縮させ、バイオフィームを薄くし、浸食させる効果を示すことも確認され、キトサン修飾ナノ粒子を適用したバイオフィームでは、表面に多数の小孔が形成されていることも確認できた¹⁷⁾。キトサン修飾ナノ粒子では、バイオフィームを退縮させることによって、細菌のより近い場所、すなわちバイオフィーム深部へ粒子自身が侵入することにより抗菌剤を送達できるようになったことも、強い抗菌効果を示した1つの要因となっているものと考えられる。

図7 ナノ粒子を適用したバイオフィームの電子顕微鏡写真

バイオフィームをイオン液体中に浸潤させ、湿潤状態で走査型電子顕微鏡により観察した。ナノ粒子のバイオフィームへの吸着している様子が確認でき、また、キトサン修飾ナノ粒子を適用した系では、バイオフィームの退縮している様子が観察された。

4. ミセル粒子を用いた バイオフィーム感染症治療用DDS

図7に示したように、バイオフィームには多数の小孔が存在し、キトサン修飾したPLGA ナノ粒子を適用すると、バイオフィームが退縮し、粒子が小孔にアクセスできるようになることが明らかになった。電子顕微鏡画像を観察すると、小孔サイズには分布があり、平均粒子径が250nmのPLGA ナノ粒子では依然アクセスできない小孔が多数存在することが確認できる。そこで、より粒子径の小さなミセル粒子に抗菌剤を封入し、さらにこのミセル粒子表面をキトサンで修飾した粒子を用いれば、より効果

の高いバイオフィーム感染症治療用製剤が開発できるのではないかと考えた(図8)。

キトサン修飾CAM封入ソルプラスミセルでは1.5、2.5、5 $\mu\text{g/mL}$ のクラリスロマイシン濃度においてバイオフィーム形成率が約20%まで減少し、CAM未封入群と比較してバイオフィームの形成度を減少させることがわかった。また、PLGA ナノ粒子と比較しても、ミセル粒子製剤のほうがより低濃度のCAMでバイオフィーム抑制効果を示すことがわかった。これは、ソルプラスミセル粒子の粒子径が80nmと微細であり、広範囲にわたってバイオフィーム内に抗菌剤を送達し、抗菌活性を発揮させたためと考えられる。

図8 クラリスロマイシン封入ナノ粒子、ミセル粒子による抗菌効果(バイオフィーム形成抑制効果)

PLGA ナノ粒子よりもソルプラスミセル粒子のほうが、バイオフィーム内に広範に侵入することができるため、より強い抗菌効果を示す。また、微粒子製剤は抗菌剤水溶液よりもバイオフィーム形成菌に対して強い抗菌効果を示す。

おわりに

バイオフィーム感染症は、抗菌剤が効きにくいため難治性であり、医療現場において大きな問題点となってきた。これらの疾患に対して、バイオフィームと相互作用するナノ粒子化製剤を用いることにより、効率良く細菌近傍に抗菌剤を送達し、高濃度で

長時間暴露させることにより、バイオフィーム形成菌であっても、抗菌剤の活性を発揮させることが可能なDDS製剤の設計に関する事例を紹介した。バイオフィーム内の細菌へ薬物を効率良く送達するためには、バイオフィーム内に形成されている小孔にアクセスできるサイズの薬物キャリアを用いるとより効果的であった。微粒子DDS製剤を用いること

で、これまで治療が困難とされてきたバイオフィルム感染症治療や医療現場で問題となってきたバイオフィルム形成菌が関与する医療用器具の汚染などに

対して有効な製剤を開発できるようになり、治療の短縮、複合感染の予防など患者の QOL 向上に寄与できるものと期待している。

文献

- 1) Lindberg B. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 1995; 48, 279-318
- 2) Roberts IS. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 1995; 285-315
- 3) Davey ME, O' Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol and Mol. Biol. Reviews. 2000; 64, 847-867
- 4) Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology. 2001; 147, 3-9
- 5) Nyvad B, Fejerskov O. An ultrastructural study of bacterial invasion and tissue breakdown in human experimental root surface caries. J. Dent. Res. 1990; 69: 2218-2225.
- 6) 谷口弘芳. バイオフィルム入門—環境の世紀の新しい微生物像. 2007
- 7) Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients J. Clin. Invest. 2002; 109, 317-325
- 8) Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). PNAS. 2002; 99, 7687-7692
- 9) Wootton M, Howe RA, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. J. Antimicrob Chemother. 2002; 50, 760-761
- 10) Potera, C. Biofilms Invade Microbiology. Science. 1996; 273, 1795-1797
- 11) Parsek MR and Sing PK. Annu. Rev. Microbiol. 2003; 57, 677-701
- 12) Yamamoto H, Tahara K, Kawashima Y. Nanomedical system for nucleic acid drugs created with the biodegradable nanoparticle platform. J. of microencapsulation. 2012; 29, 54-62
- 13) Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. J. of controlled release. 2005; 102, 373-381
- 14) Hirofumi, Takeuchi, Thongborisute Jringjai, Matsui Yuji, Sugihara Hikaru, Yamamoto Hiromitsu, Kawashima Yoshiaki. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews. 2005; 57, 1583-1594
- 15) Tahara K, Samura S, Tsuji K, Yamamoto H, Tsukada Y, Bando Y, et al. Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease. Biomaterials 2011; 32, 870-878
- 16) Takahashi C, Kalita G, Ogawa N, Moriguchi K, Tanemura M, Kawashima Y, Yamamoto H. Electron microscopy of Staphylococcus epidermidis fibril and biofilm formation using image-enhancing ionic liquid. Anal Bioanal Chem. 2014; in press
- 17) Takahashi C, Ogawa N, Kawashima Y, Yamamoto H. Observation of antibacterial effect of biodegradable polymeric nanoparticles on Staphylococcus epidermidis biofilm using FE-SEM with ionic liquid. Microscopy. 2015; in press