

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15253

研究課題名(和文) 金属ナノ粒子を用いた感染予防システムの確立

研究課題名(英文) Development of metal nano particle-based infection control system

研究代表者

関根 美和 (SEKINE, MIWA)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10398670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は院内感染の蔓延と薬剤耐性黄色ブドウ球菌の感染の拡大に対抗するためにプラチナナノ粒子を使用するのより簡易で効果的な感染防御システムの構築を目指したものである。具体的な成果としては、1) プラチナナノ粒子の殺菌及び制菌性が確認され、2) プラチナナノ粒子の細胞毒性が低いことを明らかにし、3) プラチナナノ粒子の炎症性サイトカイン産生誘導が低いことを示した。これら成果により、プラチナナノ粒子による感染防御が有効である可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to develop simpler and more effective infection prevention system for the prevalence of widespread nosocomial infection and expansion of drug resistant *Staphylococcus aureus* such as VISA (Methicillin-resistant strain with vancomycin-intermediate resistance) infection. The main achievements are as follows; 1) Confirming the bactericidal effect and bacteriostatic effect of platinum nanoparticles, 2) Discovering the platinum nanoparticle dispersion has little or no cytotoxicity on conventional cultured human cells, 3) Finding that platinum nanoparticle dispersion does not induce inflammatory cytokine secretion. These results revealed that it is highly possible that protection against infection by platinum nanoparticles can be effective.

研究分野：微生物学

キーワード：ナノ粒子 黄色ブドウ球菌 院内感染 感染対策

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 黄色ブドウ球菌は、主要な院内感染菌であり、アトピー性皮膚炎の増悪因子、皮膚感染症から敗血症・骨髄炎・肺炎・食中毒・毒素性ショック症候群など、しばしば重篤な症状を引き起こすことで知られている。また、近年における薬剤耐性菌の発生は公衆衛生、保健医療における脅威となりつつある。なかでも院内感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(HA-MRSA)の多剤耐性化が脅威となっている。さらに、近年、VRSA(バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌)およびVISA(バンコマイシン中度耐性黄色ブドウ球菌)感染者の増加が報告され、より効果的な感染防御の必要性が高まっている。

(2) 人口の30%が黄色ブドウ球菌を保菌しているとされ、人々は常にリスクにさらされている状況であるにもかかわらず、いまだ、保健施設や病院内での感染が後を絶たない。

## 2. 研究の目的

(1) 極微小であり殺菌能をもつ可能性が示唆されている金属ナノ粒子、特に科学的に非常に安定である白金ナノ粒子含有コロイド溶液に着目した。白金は触媒として多く使用される化学的に非常に安定な金属である。また、白金を錯体の中心金属としたシス-ジアミンジクロロ白金(II)(cis-diamminedichloro-platinum(II), cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>])はシスプラチン(抗悪性腫瘍剤)として臨床応用をされている。近年、この白金を用いたナノ粒子含有コロイドの有用性が明らかになってきた。

(2) 抗生剤は通常・核酸合成阻害薬・細胞壁合成阻害薬・蛋白合成阻害薬、等といった増殖時を作用点としたものが主流であり、薬剤の分解・修飾機構の獲得や作用点の変異等により耐性を獲得されてしまう。ところが、白金ナノ粒子では薬剤耐性菌も薬剤感受性菌も同等に殺菌することから、保健衛生施設における感染予防法や、さらには治療法としての臨床応用、衛生保健施設及び病院内等における感染予防法の開発、更には全く新しい治療法の確立を実現することを目的としている。

## 3. 研究の方法

上記の目標を目指すに当たり、

- ① プラチナナノ粒子の殺菌及び制菌性
- ② プラチナナノ粒子の細胞毒性
- ③ プラチナナノ粒子による感染防御の検証として以下の調査を行った。  
プラチナナノ粒子含有溶液の殺菌能の検討、  
プラチナナノ粒子含有溶液のヒト細胞に対する毒性の検討  
プラチナナノ粒子含有溶液の黄色ブドウ球菌による細胞傷害活性への影響  
サイトカイン産生への影響を検討した。

### 《材料》

プラチナナノパーティクル溶液はサイズ1~6nm 10mMのものを使用した。

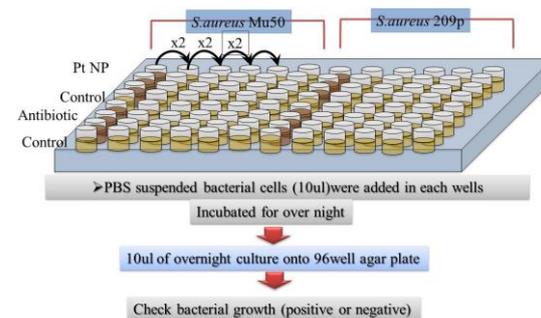
### 使用菌株

菌株は薬剤感受性黄色ブドウ球菌株 *Staphylococcus aureus* 209p  
中間耐性黄色ブドウ球菌株である *Staphylococcus aureus* Mu50を使用した。

### 使用細胞

市販培養細胞はヒトケラチノサイト、ヒト鼻粘膜細胞、ヒト微小血管内皮細胞、骨芽細胞を使用し、各細胞は適宜増殖培養し冷凍保存後適宜培養をして使用した。

- 1) MIC(最小発育阻止濃度)の検討  
各菌株を一夜培養し、OD600で調整を行った。プラチナナノ粒子有・無と抗菌剤の有・無で寒天96ウェルプレートを作成し、適宜希釈した各菌株を添加し、37℃一夜培養し生育・非生育を観察した。コントロール群としてはPBS(phosphate buffered saline solution)を使用した。



- 2) プラチナナノ粒子含有溶液のヒト培養細胞に対する傷害の検討  
細胞は各種市販細胞を適宜培養した後-80℃に保存したものを24ウェルプレートに数日培養したものを使用。培地は抗菌薬無添加のものを使用した。プラチナナノ粒子含有溶液に感作させたものとコントロールとしてPBSを感作させたものを20時間培養し細胞傷害を検討した。細胞傷害の指標としてはDEAD/ALIVE Assayをした後、蛍光顕微鏡にて観察した。
- 3) 黄色ブドウ球菌による細胞傷害活性にプラチナナノ粒子含有溶液が与える影響の検討  
細胞は各種市販細胞を適宜培養した後-80℃に保存したものを24ウェルプレートに数日培養したものを使用。培地は抗菌薬無添加のものを使用した。各菌株は37℃一夜培養し、PBS(phosphate buffered saline solution)にて洗浄し、OD600にて調整したものを使用した。

MOI(Multiplicity of Infection)が50となるように培養細胞に黄色ブドウ球菌のみ20時間感作させた群と黄色ブドウ球菌と同時にプラチナナノ粒子含有溶液に20時間感作させた。その後Cell Viability Assay をした後、蛍光顕微鏡にて観察した。

4) サイトカイン産生に与える影響の検討  
 微小血管内皮細胞を使用してサイトカイン産生への影響を検討した。細胞は市販細胞を適宜培養した後-80℃に保存したものを24ウェルプレートに数日培養したものを使用。培地は抗菌薬無添加のものを使用した。  
 各菌株は37℃一夜培養し、PBS (phosphate buffered saline solution)にて洗浄し、OD600 にて調整したものを使用した。

MOI(Multiplicity of Infection)が50となるように培養細胞に黄色ブドウ球菌のみ20時間感作させた群と黄色ブドウ球菌と同時にプラチナナノ粒子含有溶液、コントロールとしてPBSを20時間感作させた上清の各種サイトカイン産生を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 1) MIC(最小発育阻止濃度)の検討

|            | S.aureus Mu50(5×10 <sup>4</sup> CFU) |   |      |      |      |      | S.aureus 209p(5×10 <sup>4</sup> CFU) |   |      |      |      |      |
|------------|--------------------------------------|---|------|------|------|------|--------------------------------------|---|------|------|------|------|
| Pt 1ug/ml  | -                                    | - | -    | -    | -    | -    | +                                    | + | +    | +    | +    | +    |
| PBS ug/ml  | 16                                   | 8 | 4.00 | 2.00 | 1.00 | 0.50 | 16                                   | 8 | 4.00 | 2.00 | 1.00 | 0.50 |
| Ampicillin | -                                    | + | +    | +    | +    | +    | -                                    | - | -    | -    | -    | -    |
| Bac Cont   | +                                    | + | +    | +    | +    | +    | +                                    | + | +    | +    | +    | +    |

|                | S.aureus Mu50(5×10 <sup>4</sup> CFU) |   |   |     |      |      | S.aureus 209p(5×10 <sup>4</sup> CFU) |   |   |     |      |      |
|----------------|--------------------------------------|---|---|-----|------|------|--------------------------------------|---|---|-----|------|------|
| Pt 1ug/ml      | -                                    | - | - | -   | -    | -    | +                                    | + | + | +   | +    | +    |
| Bac Cont ug/ml | 4                                    | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.13 | 4                                    | 2 | 1 | 0.5 | 0.25 | 0.13 |
| Vancomycin     | -                                    | - | - | ±   | +    | +    | -                                    | - | - | -   | -    | -    |
| Bac Cont       | +                                    | + | + | +   | +    | +    | +                                    | + | + | +   | +    | +    |

図1 最小発育阻止濃度

Bacterial growth positive: +  
 Bacterial growth negative: -

5×10<sup>4</sup>CFUにおいて薬剤感受性黄色ブドウ球菌株である209p株はアンピシリンで発育抑制を受けている反面粒子含有溶液では発育抑制を受けなかった。また、バンコマイシン中間耐性であるMu50株ではプラチナナノ粒子含有溶液により発育抑制を受けていた。これよりプラチナナノ粒子含有溶液は特にメチシリン耐性株であるMu50に対して殺菌活性を持つ可能性が示唆された。

##### 2) プラチナナノ粒子含有溶液のヒト培養細胞に対する細胞毒性

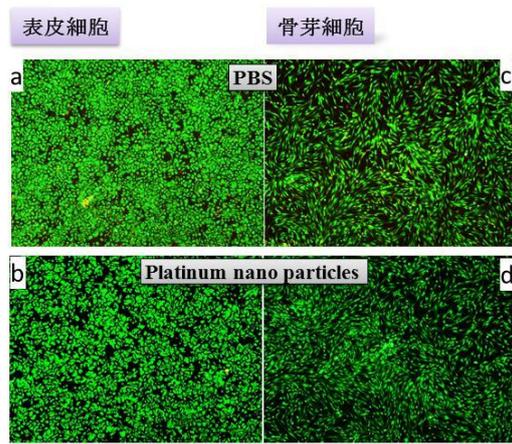


図2-1 細胞傷害活性顕微鏡観察結果  
 緑色:生きている細胞  
 赤色:死んでいる細胞  
 a. 表皮細胞にPBSを感作させたもの  
 b. 表皮細胞にプラチナナノ溶液を感作させたもの  
 c. 骨芽細胞にPBSを感作させたもの  
 d. 骨芽細胞にプラチナナノ溶液を感作させたもの

蛍光顕微鏡観察の結果、ヒト培養表皮細胞、骨芽細胞、微小血管内皮細胞および鼻腔上皮細胞でコントロール(PBS)への感作後とプラチナナノ粒子含有溶液への感作後のcell viability assay 間で有意な差が見られないことからプラチナナノ粒子含有溶液はヒト培養表皮細胞、骨芽細胞、微小血管内皮細胞および鼻腔上皮細胞に対して細胞毒性が低いことが示唆された。

##### 3) 黄色ブドウ球菌による細胞傷害活性にプラチナナノ粒子含有溶液が与える影響の検討

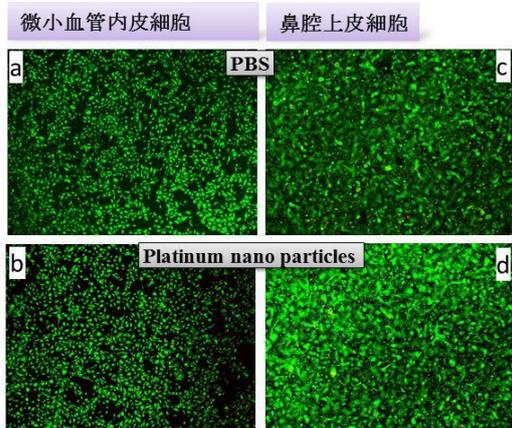
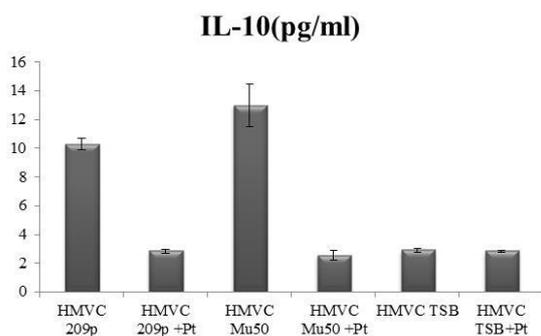
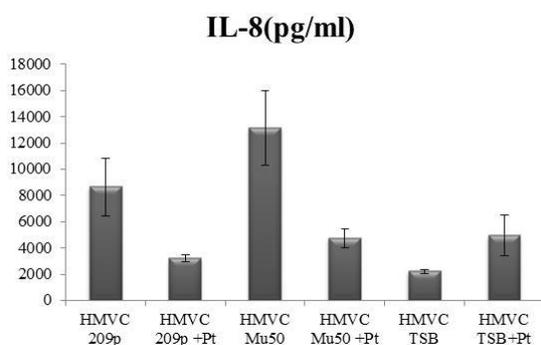
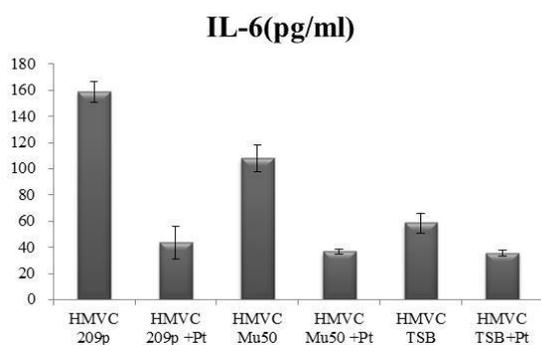
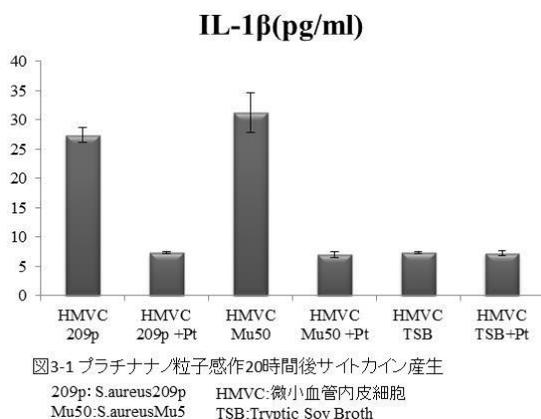


図2-2細胞傷害活性顕微鏡観察結果  
 緑色:生きている細胞  
 赤色:死んでいる細胞  
 a. 微小血管内皮細胞にPBSを感作させたもの  
 b. 微小血管内皮細胞にプラチナナノ溶液を感作させたもの  
 c. 鼻腔上皮細胞にPBSを感作させたもの  
 d. 鼻腔上皮細胞にプラチナナノ溶液を感作させたもの

Cell Viability Assay の後、蛍光顕微鏡観察をしたところ、生存細胞数が骨芽細胞ではS.aureus Mu50+Pt > S.aureus Mu50, S.aureus 209p+Pt ≧ S.aureus 209p. 微小血管内皮細胞では生存細胞数が S.aureus Mu50+Pt > S.aureus Mu50, S.aureus 209p+Pt > S.aureus 209p. 鼻腔上皮細胞では S.aureus Mu50+Pt > S.aureus Mu50,

*S.aureus* 209p+Pt > *S.aureus* 209pという結果が得られた。このことは薬剤感受性黄色ブドウ球菌209p株と中間耐性黄色ブドウ球菌Mu50株による細胞傷害をプラチナナノ粒子が抑制している可能性が考えられる。

#### 4) サイトカイン産生への影響



IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10において微小血管内皮細胞にTSB(Tryptic Soy Broth)を添加し20時間培養したものとTSBと共にプラチナナノ粒子含有溶液を添加し20時間培養したものでは差が見られなかった。このことはプラチナナノ粒子含有溶液の微小血管内皮細胞に対する傷害活性が低い可能性を示唆している。また、プラチナナノ粒子含有溶液と黄色ブドウ球菌209p株またはMu50株を共に感作させた検体で菌のみの時と比べてサイトカイン産生が減少した。これらはプラチナナノ粒子含有溶液が黄色ブドウ球菌を殺菌したことによる可能性、もしくは黄色ブドウ球菌による炎症性サイトカイン産生を抑制する可能性を示唆している。その場合、IL-8産生がプラチナナノ粒子含有溶液の共存により減少していることから、白血球走化性誘導に関しても抑制することが考えられる。

以上の結果から、①プラチナナノ粒子の殺菌及び制菌性が確認され、②プラチナナノ粒子の細胞毒性は低いことが示唆され、また、③プラチナナノ粒子による感染防御が有効である可能性が高いことが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計2 件)

黄色ブドウ球菌に対する金属ナノ粒子の殺菌効果の検討

○關根美和, 栗原京子

第31回日本環境感染学会総会・学術集会. 京都2月19-20日

Investigation into bactericidal effect of metal nano particles.

○Miwa Sekine, Kyoko Kuwahara, Teruo Kiri kae, Keiichi Hiramatsu

The 91st Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology. Fukuoka, Japan. March 27th-29th.

[図書](計 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

關根 美和 (Sekine, Miwa)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号:10398670

### (2)研究分担者 ( )

研究者番号:

### (3)連携研究者 ( )

研究者番号:

### (4)研究協力者 ( )