



Title	Assessment of antimicrobial and biocompatible effects of Au ₂₅ (Capt) ₁₈ clusters photoexcited by blue LED [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宮田, さほり
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12603号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65624
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Saori_Miyata_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 宮田さほり

学位論文題名

Assessment of antimicrobial and biocompatible effects of Au₂₅(Capt)₁₈ clusters photoexcited by blue LED (カプトプリル保護金クラスターの青色 LED 光照射による 抗菌効果と生体親和性の評価)

近年、歯科治療において光増感剤の光励起によって発生する一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の抗菌効果を利用した抗菌的光線力学療法 (aPDT) が注目されている。この方法は、抗菌薬投与と比較して耐性菌の出現やバイオフィルム内への浸透性などの問題が解消でき、歯周病やインプラント周囲炎、齲蝕などに有効な治療法として発展する可能性を持っている。現在 aPDT にはメチレンブルー (MB) などの色素系光増感剤が用いられているが、安定性が乏しいため光励起後に分解し、有機溶媒を使用するため生体に障害を及ぼす可能性がある。さらに光励起波長が約 650–800nm と狭いために使用できる光源に制限がある。そこで今回、新規の光増感剤として金原子 25 個からなる直径 0.9nm のカプトプリル保護金クラスター粒子 ($\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$) を創製した。これは水溶性で光安定性が高く、励起波長が 400–900nm と広範囲である。そのため、MB では使用できなかった低波長の光源が利用でき、歯科臨床で広く普及しているレジン重合用の青色 LED (400–500nm) を光源として使用できる可能性がある。本研究では金クラスターの aPDT への応用を目指し、金クラスターを青色 LED によって光励起した際の細菌の増殖抑制効果と生体細胞に対する親和性について検討した。

金クラスターは、塩化金酸とカプトプリルの混合溶液に水素化ホウ素ナトリウム還元剤を添加して作製し、青色 LED にはペンキュアー（モリタ、420–480nm）を使用した。金クラスターの光の吸収と発光を UV-Vis スペクトルと蛍光スペクトルによって計測し、LED 照射による $^1\text{O}_2$ 生成を蛍光スペクトルで評価した。

次に、金クラスターを *S. mutans* (Sm) 懸濁液へ添加 (0, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) して LED 照射 (1 分間) を行い、37°C 嫌気培養後、SEM (4, 24, 72h), TEM (48h), 蛍光免疫染色 (24h), 濁度測定 (24h), WST-8 assay (24h), lactate assay (24h) にて評価した。また、LED 照射時間を変えた場合 (0, 30, 60, 90sec) の濁度測定 (24h)、および蛍光ラベル化した金クラスターを Sm 懸濁液中に添加した際の蛍光顕微鏡観察も行った。同様に *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg) 懸濁液に金クラスターを添加 (0, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) し、LED 照射 (1 分間) 後の濁度測定 (24h) も行った。

また、細胞親和性の評価として、NIH3T3 細胞および MC3T3-E1 細胞懸濁液中へ金クラスターの添加 (0, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と LED 照射 (1 分間) を行い、SEM 観察 (24h), 蛍光免疫染色 (24h), WST-8 assay (2, 4, 6day), LDH-assay (2, 4, 6day) を行った。

さらに、メチレンブルーとの細胞親和性の差異を検討するために、NIH3T3, MC3T3-E1 細胞懸濁液中に金クラスター (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または MB (10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、LED 照射を行わずに SEM 観察 (24h), 蛍光免疫染色 (24h), WST-8 assay (2, 4, 6day), LDH-assay (2, 4, 6day) を行った。抗菌性の比較として、Aa, Pg に金クラスターと MB を同様に添加して濁度測定 (24h) を行った。

作製した金クラスターの光の吸収は 400, 450, 670nm 付近、発光は 450, 670nm 付近でピークを示した。また、金クラスターの光照射によって $^1\text{O}_2$ 生成量が増加した。

Sm への金クラスター添加と青色 LED 照射によって、コントロールと比較してバイオフィルム形成量が 24 時間後から減少し、72 時間後にはより顕著となり、TEM では Sm の細胞壁が不整となって、その細胞壁周囲および内部には非添加群ではみられない黒い粒子が認められた。LIVE/DEAD 染色では死菌の大幅な増加が観察され、金クラスターの Sm 周囲への凝集がみられた。濁度は金クラスターの添加濃度に依存して低い値を示し、LED 照射によりさらに低い値となった。また LED 照射時間が長くなる程濁度は低い値を示した。Sm の増殖量と乳酸量は、金クラスター(500 μ g/mL)添加と LED 照射でコントロールの約 50%に減少した。Aa, Pg においては金クラスター添加のみで濁度が大幅に低くなり、LED 照射でより低い値を示した。

細胞親和性の評価において、NIH3T3, MC3T3-E1 細胞ともに金クラスター添加(500 μ g/mL)と LED 照射を行っても、細胞伸展およびビンキュリンの発現はコントロールと同程度であり、LIVE/DEAD 染色で死細胞は認められなかった。しかし、高濃度(50, 500 μ g/mL)の金クラスター添加と LED 照射を行った群では、培養 4 日目から細胞増殖が抑制され、LDH も金クラスターの濃度依存性に高くなった。

また、金クラスターと MB との比較では、Aa, Pg の濁度は金クラスター(500 μ g/mL)と MB(10 μ g/mL)で同等であった。しかし、NIH3T3, MC3T3-E1 細胞の増殖は金クラスターに比べて MB 添加で大きく抑制され、アクチンの伸展およびビンキュリン発現は不良となり、とくに高濃度 MB(100 μ g/mL)添加では細胞は極度に萎縮した。

本法で作製した金クラスターの光の吸収と発光が金原子 25 個からなる Au₂₅(Capt)₁₈の特徴と一致し、金クラスターへの青色 LED 照射による ¹O₂ の生成が確認された。これは光増感剤である Au₂₅(Capt)₁₈ が青色 LED により光励起され、その際エネルギーを基底状態の三重項酸素 (³O₂) に与えた結果と考えられた。

Sm に対する抗菌性の評価により、光励起された金クラスターによって生成された ¹O₂ が Sm の増殖およびバイオフィルムの形成を抑制し、細胞壁を破壊することで細胞死をもたらしたと考えられた。また、金クラスターが細菌に付着して ¹O₂ を供給し、抗菌効果を発揮したと思われる。

青色 LED は抗菌効果を持つと報告されているが、本実験においても青色 LED の照射単独による抗菌性が確認された。このことから aPDT の光源として青色 LED を用いることは抗菌性を増大するという面から有効であると考えられた。

さらに、Aa, Pg に対する実験の結果から、金クラスターへの青色 LED 照射はグラム陽性菌だけでなく、陰性菌にも抗菌作用を発揮することが示唆された。

生体細胞に対しては、金クラスター添加と LED 照射によって培養初期に障害は生じないものの、高濃度の金クラスター添加と繰り返しの LED 照射により増殖を抑制すると考えられた。また、金クラスターと MB との比較から、金クラスター(500 μ g/mL)の細胞親和性は MB(10, 100 μ g/mL)と比較して良好であることが示唆された。

本研究の結果より、青色 LED によって光励起されたカプトプリル保護金クラスターは、濃度依存性に抗菌性と細胞毒性を示した。