



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization and antibacterial assessments of Ag nanoclusters/rose bengal nanocomposite for antimicrobial photodynamic therapy [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	薮, 佳奈子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13482号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74018
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kanako_Shitomi_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 薮 佳 奈 子

学 位 論 文 題 名

Characterization and antibacterial assessments of Ag nanoclusters / rose bengal
nanocomposite for antimicrobial photodynamic therapy
(抗菌的光線力学療法に向けた銀ナノクラスター/ローズベンガル複合体
の特性並びに抗菌性評価)

抗菌的光線力学療法 (a-PDT) は薬剤耐性菌の出現, バイオフィルムへの浸透性, アレルギーなど, 抗菌薬局所投与の問題点を解決する治療方法で, 歯周病等の感染症に対する治療法として用いられている. しかしながら従来の光増感剤では光照射で発生する一重項酸素の半減時間が 200 n 秒以内と非常に短く, 消灯後すぐに抗菌効果を消失し, さらに低酸素領域での効果が低下することから嫌気性菌の生育する歯周ポケットでは抗菌活性が持続しないとされている. したがって, この問題を解決することでより効果的な a-PDT になると考えられる. 近年, ナノ粒子よりさらにサイズが小さく, 高い抗菌性を有する水溶性銀ナノクラスター (AgNCs) が抗菌材料として注目されており, 我々は AgNCs を安定的に合成することに成功した. そこで, 従来の光増感剤であるローズベンガル (RB) と AgNCs とをナノコンポジット化することで, RB が生成する一重項酸素によって AgNCs が酸化され, Ag^+ を放出, RB 単体よりも強い抗菌性を発揮できるのではないかと考えた. 本研究では, 銀ナノクラスターローズベンガル複合体 (AgNCs/RB) を作製し, その一重項酸素生成能および Ag^+ の溶出を調べた. さらに口腔内細菌 *Streptococcus mutans* (*Sm*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) に対する抗菌活性と線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いた細胞障害性について評価した.

AgNCs は硝酸銀 (I) とグルタチオンの混合溶液に水素化ホウ素ナトリウムを添加して生成した. その後, 水に溶解した AgNCs に RB を混和, 限外濾過し AgNCs/RB を生成した. 光励起の光源には波長 420-750 nm の白色 LED (SPF-D2, 松電舎) を使用した. 生成した AgNCs/RB の特性を知るため, 一重項酸素の発生を methotrexate (MTX) によるプローブ法を用いた蛍光スペクトル測定にて定量, 光照射時の AgNCs/RB からの銀の溶出を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 並びに紫外可視近赤外分光 (UV-Vis) スペクトル法にて定量し, さらにゼータ電位の変動を測定した. 次に, AgNCs/RB の抗菌活性をみるために, AgNCs/RB (0, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を *Sm*, *Aa*, *Pg* 菌懸濁液へ添加して光照射 (1 分) を行い, 24 時間, 37 $^{\circ}\text{C}$ で嫌気培養後, 濁度測定した. なお, 培地は *Sm*; brain heart infusion (BHI) 液体培地, 0.1 % 抗生剤, 1 % スクロース, *Aa*; BHI, 1 % yeast, *Pg*; BHI, 0.5 % yeast extract, 0.0005 % hemin, 0.0001 % menadione を使用した. 同様に AgNCs/RB (0, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を *Sm* 懸濁液に添加, 光照射 (1 分) を行い 24 時間培養し, 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察, LIVE/DEAD 染色を行った. また, 複合体とすることの効果を知るため, *Sm*, *Aa* 菌懸濁液に AgNCs/RB (10.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AgNCs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), RB (0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を

添加して光照射（1 分）を行い、24 時間嫌気培養して濁度を測定した。さらに、 Ag^+ 溶出による抗菌効果を調べるため、菌懸濁液を含まない AgNCs/RB を溶解した培地に 1 分光照射した後、10、60、900 秒後に *Sm* 菌懸濁液を播種し、24 時間培養して濁度を測定した。また、細胞親和性の評価として、NIH3T3 細胞懸濁液中へ AgNCs/RB を添加（0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）して光照射（1 分）を行い、24 時間インキュベート後 SEM 観察、蛍光免疫染色、WST-8 assay, LDH assay を行った。

AgNCs/RB は UV-vis 吸収スペクトル測定において、AgNCs に由来する 485 nm と RB に由来する 550 nm の 2 つのピークがみられた。MTX を用いた蛍光スペクトル測定では、一重項酸素の発生を示す 466 nm で光照射時間に伴い蛍光強度の増大が見られた。また、AgNCs と比較して AgNCs/RB は光照射後の 440 nm における UV-vis 吸収スペクトル減少率が約 5 倍に増大し、ICP-MS で 377 ppb の Ag 溶出が定量された。さらに、AgNCs への RB 複合化によりゼータ電位は -27 mV から -51 mV へと負電荷の増加が認められた。

Sm, *Aa*, *Pg* 懸濁液に AgNCs/RB を添加、光照射し、24 時間培養後の濁度は、AgNCs/RB の濃度依存性に低い値を示した。さらに、AgNCs/RB 非添加と比較して添加、光照射により、SEM 観察で菌塊形成の減少がみられ、LIVE/DEAD 染色で Propidium iodide 陽性の死菌の増加が観察された。*Sm*, *Aa* 菌懸濁液に AgNCs/RB, AgNCs, RB を添加して光照射、濁度を測定した結果、AgNCs/RB は RB より有意に低い値を示した。また AgNCs/RB に光照射し *Sm* 菌懸濁液を播種、24 時間培養後の濁度は、10 秒後に播種した場合には上昇が抑制された。

AgNCs/RB の添加と光照射による細菌増殖の抑制は、MTX を用いた蛍光スペクトル測定において一重項酸素の発生を示す蛍光強度の増大が見られたことから、光励起された RB が生成した一重項酸素の効果であると考えられた。AgNCs/RB では光照射後の UV-vis 吸収スペクトルの減少率が増大したこと、および ICP-MS で Ag^+ の溶出が認められたことから、RB が生成した一重項酸素が AgNCs を酸化し Ag^+ 溶出を促進したと考えられ、さらに、RB と比較して AgNCs/RB の添加と光照射が有意に高い抗菌活性を示したことから、 Ag^+ 溶出が抗菌性を増強したと考えられた。また、一重項酸素は消灯後きわめて短時間で失われることから、光照射の 10 秒後でも抗菌性がみられたのは、溶出した Ag^+ の抗菌効果が持続していたためと思われた。

NIH3T3 細胞に AgNCs/RB を添加し光照射を行った後、細胞伸展およびビンキュリンの発現は非添加と同程度であり、LIVE/DEAD 染色で死細胞は認められず、WST-8 assay および LDH assay で有意差は認められなかった。抗菌性材料は、しばしば高い抗菌性を示す条件下では細胞障害性も有することが多いが、AgNCs/RB は抗菌効果を示す濃度で光照射を行っても細胞障害性を示さなかったことは、他の光増感剤に比べて大きな利点になると思われた。

本研究より、光励起した AgNCs/RB は一重項酸素および Ag^+ を生成し *Sm*, *Aa*, *Pg* に対して濃度依存的に抗菌効果を発揮し、さらに NIH3T3 細胞に対し細胞障害性がきわめて低いことが明らかとなり、AgNCs/RB は歯科用 a-PDT の光増感剤として有用である可能性が示唆された。