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)	蔀, 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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　蔀　佳　奈　子

審 査 担 当 者
主査　特任教授　柴田　健一郎
副査　教授　田村　正人
副査　准教授　菅谷　勉

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　）

審査は，審査担当者全員の出席の下，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた．

抗菌的光線力学療法（a-PDT）は近年歯科においても臨床応用されている．しかし，従来の光増感剤では一重項酸素の発生時間が短いことや，低酸素領域において殺菌効果が低下するなどの問題がある．我々は，従来からある光増感剤ローズベンガル（RB）と銀ナノクラスター（AgNCs）を複合化することで，RBから発生した一重項酸素がAgNCsのAg^+溶出を促進し，より効果的な光増感剤とな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^+の溶出量を調べ，さらに*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）への細胞障害性を評価した．

まず硝酸銀(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AgNCsを生成し，これを水に分散してRBを混和することでAgNCs/RBを作製した．AgNCs/RBのゼータ電位を測定したところ，AgNCsと比較して負電荷が増大していたことから，AgNCsとRBは複合化し，分散安定性が向上したと考えられた．また，AgNCs/RBに波長420-750 nmの白色LEDで光照射し，MTXを用いた蛍光スペクトルの測定を行った結果，一重項酸素の発生が確認された．さらに，AgNCs/RBからのAg^+溶出量を，誘導結合プラズマ質量分析および紫外可視近赤外分光スペクトル法にて計測したところ，白色LED照射によってAg^+が溶出することが確認された．

AgNCs/RBの抗菌活性をみるために，0～10 μg/mlのAgNCs/RBをSm，AaならびにPgの菌懸濁液へ添加して白色LED照射を行い，24時間嫌気培養後に濁度測定するとともに，SmについてはSEM観察，LIVE/DEAD染色を行った．その結果，AgNCs/RBはいずれの菌種にも濃度依存的に抗菌活性を示した．また，AgNCとRBを複合化することの効果を調べるため，SmならびにAaの菌懸濁液

にAgNCs/RB，AgNCsあるいはRBを添加して白色LED照射を行い，24時間嫌気培養して濁度を測定したところ，AgNCs/RBはAgNCsやRBより有意に高い抗菌活性を示した．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を分散した培地に白色LED照射し，10，60，900秒後にSm菌懸濁液を播種，24時間培養後に濁度を測定した．その結果，一重項酸素の効果が消失している10秒後に播種した場合でも濁度の上昇が抑制されたことから，Ag^+が溶出して抗菌効果を発揮したのではないかと考えられた．

また，細胞親和性の評価として，NIH3T3細胞懸濁液中へAgNCs/RBを添加して白色LED照射を行い，24時間培養後にSEM観察，蛍光免疫染色，WST-8 assayならびにLDH assayを行った．その結果，AgNCs/RBの添加と白色LED照射は細胞の増殖，付着，伸展に影響を及ぼさなかった．

本研究より，白色LEDによって光励起したAgNCs/RBは一重項酸素およびAg^+を生成し，Sm，Aaならびに Pgに対して濃度依存的に抗菌効果を発揮するとともに，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った．

審査者から以下のような質問がなされた．

1. a-PDTは臨床でどの程度行われているのか．また，他の抗菌薬と比較して効果は高いのか．
2. RBに複合化させる材料として銀クラスターを選択したのはなぜか．
3. RBとAgNCsはどのように結合しているのか．
4. ゼータ電位測定の原理はどのようなものか．
5. 一重項酸素の抗菌性は消灯後どのくらい持続するのか．
6. バイオフィルムでの抗菌効果の評価が必要ではないのか．
7. Ag^+溶出の抗菌効果はAgNCs/RBだけでなくRBでも同様の実験をすべきではないのか．
8. 殺菌効果があるのに線維芽細胞には障害性を発揮しないのはなぜか．
9. マウス胚性線維芽細胞ではなくヒト由来の細胞に対する障害性を評価すべきではないか．

これらの質問に対して，申請者は適切に，かつ論理的に回答したことから，本研究の内容を中心とした専門分野はもとより，関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された．本研究の内容は，歯科医学の発展に十分貢献するものであり，審査担当者全員は学位申請者が博士(歯学) の学位を授与されるに値するものと認めた．