



Title	Synthesis and antibacterial photodynamic assessments of lysozyme-Au nanoclusters/rose bengal conjugate [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岡本, 一絵
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13860号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78500
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ichie_Okamoto_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 岡 本 一 絵

学 位 論 文 題 名

Synthesis and photodynamic assessments of lysozyme-Au
nanoclusters/rose bengal conjugate

（リゾチーム金ナノクラスター/ローズベンガル複合体の合成と光線力学的評価）

キーワード：抗菌的光線力学療法，抗菌性試験，細胞親和性，一重項酸素，共鳴エネルギー移動

抗菌的光線力学療法（aPDT）は，従来の抗生物質療法の問題点である薬剤耐性菌の出現やバイオフィルムへの浸透性，アレルギーの発現などを解決する可能性があり，歯内療法，歯周炎，インプラント周囲炎などの口腔感染症の治療のために広く研究されている．aPDT の光増感剤としてメチレンブルー（MB）やローズベンガル（RB）等の有機色素が用いられており，それらは高い抗菌効果を示すが， $^1\text{O}_2$ を生成するには励起波長が狭範囲である．川崎らは，光励起波長が広範囲な金ナノクラスターを含む新たな光増感剤を合成し， $^1\text{O}_2$ の生成による光線力学的効果を示した．一方，共鳴エネルギー移動（RET）は，二つの光感受性分子間のエネルギー移動の現象として知られている．山本らは金ナノクラスターと有機色素の複合体が可視光の波長を吸収して RET メカニズムを介して $^1\text{O}_2$ を効果的に生成することを報告した．今回，リゾチーム（Lys）で保護した金ナノクラスターを従来の光増感剤である RB と複合した新しい光増感剤であるリゾチーム金ナノクラスターローズベンガル複合体（Lys-Au NCs/RB）を合成した．本研究では Lys-Au NCs/RB と白色 LED 光照射による一重項酸素生成能と RET イベントの発生を調べた．さらに口腔内細菌 *Streptococcus mutans* (*Sm*)，*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)，*Actinomyces naeslundii* (*An*)，*Prevotella intermedia* (*Pi*) 及び *Escherichia coli* (*Ec*) に対する抗菌活性と，線維芽細胞 NIH3T3 を用いた細胞障害性を評価した．

テトラクロリド金酸溶液とリゾチーム溶液を攪拌し水酸化ナトリウム溶液を添加して Lys-Au NCs を精製した．そこに RB を混和し攪拌，限外ろ過し Lys-Au NCs/RB を精製した．光励起の光源には波長 420-750 nm の白色 LED を使用した．特性評価として $^1\text{O}_2$ の発生をメトトレキサート（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し，RET イベントの確認のため UV-Vis スペクトル法および蛍光スペクトル法にて分析した．また Lys-Au NCs/RB とその成分の抗菌効果を比較するために *Sm*懸濁液に Lys-Au NCs, Lys-Au NCs/RB,

RB を添加後 1 分間の光照射を行い、24 時間培養後に比色計を使用して濁度測定した。続いて Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を *Sm* の懸濁液に添加し、そこに 1 分間光照射を行い 24 時間培養後、血液寒天培地に播種して 37°C で 24 時間嫌気培養し、CFU を決定した。さらに抗菌活性の用量依存効果を評価するために、Lys-Au NCs/RB (0, 0.01, 0.1, 1 μ g) を *Sm* 懸濁液に添加し 1 分間の光照射を行い 24 時間嫌気培養して濁度を測定した。また照射時間依存効果の評価として Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を *Sm* 懸濁液に添加後 0, 30, 60 秒光照射を行った各群の濁度測定を行った。また、*Ec*, *An*, *Pg*, *Pi* 菌懸濁液に Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を添加し 1 分間の光照射を行い、24 時間嫌気培養後各懸濁液の濁度を測定した。同様に Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を *Sm* 懸濁液に添加、1 分間光照射を行い 24 時間嫌気培養し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。加えて Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を 24 あるいは 48 時間培養して作製した *Sm* の Biofilm に滴下し 1 分間光照射した直後に、LIVE/DEAD 染色を行った。また、細胞親和性の評価として、NIH3T3 細胞懸濁液中へ Lys-Au NCs/RB (1 μ g/mL) を添加して 1 分間光照射を行い、24 時間培養後、蛍光免疫染色、WST-8 assay, LDH assay を行った。

Lys-Au NCs の吸収および蛍光スペクトルでは、520nm の表面プラズモン共鳴吸収ピークは見られなかった。370nm で励起すると、650nm を中心とする発光ピークを示した。RB の吸収スペクトルは 550 nm 付近であり、430 nm から 580 nm の Lys-Au NCs の発光スペクトルと重なり RET イベントの条件を満たしていた。蛍光寿命測定により RET プロセスのドナーとなる Lys-Au NC の蛍光減衰時間の減少が観察され、RET の発生が示唆された。また光照射時間に依存して MTX 酸化による 466 nm での蛍光強度が増大し、 $^1\text{O}_2$ の発生が確認された。Lys-Au NCs, Lys-Au NCs/RB, RB の濁度比較ではコントロールに対して Lys-Au NCs と RB 単独の濁度は同等で、Lys-Au NCs/RB では低かった。したがって RET プロセスを通じて光励起された Lys-Au NCs が RB にエネルギーを移動させ、RB による $^1\text{O}_2$ 産生が強化され抗菌作用が上がった可能性がある。*Sm* の CFU の評価ではコントロールと比較して *Sm* のコロニー形成が 1/1000 程度に減少した。Lys-Au NCs/RB の濃度別の濁度比較において光照射なしの群ではすべての濃度でコントロールに対し濁度の減少はわずかであり、光照射ありの群では 0.1 及び 1 μ g/mL の濃度で濁度が有意に低下した。光照射の時間依存効果の評価では照射時間が長くなる程コントロールに対する濁度低下がみられた。また、Lys-Au NCs/RB と光照射の適用により、*Ec*, *An*, *Pg* 及び *Pi* の濁度がコントロールと比較して減少した。これにより Lys-Au NCs/RB はグラム陰性および陽性細胞の両方に対して抗菌活性をもつことが示唆された。また Lys-Au NCs/RB と光照射の適用により SEM 観察で *Sm* 菌塊形成の減少がみられ、TEM 観察では *Sm* の細胞壁の破壊がみられた。光励起された Lys-Au NCs/RB が生成した $^1\text{O}_2$ によって、細胞体への $^1\text{O}_2$ の破壊効果が及んだ可能性がある。*Sm* のバイオフィルムへの LIVE/DEAD 染色の評価では、生細胞に対する死細胞の割合が Lys-Au NCs/RB 添加群で有意に多かった。

NIH3T3 細胞への細胞接着に関連するビンキュリン-F-アクチン二重染色の蛍光観察では、コントロールと Lys-Au NC/RB 適用群の両群に細胞伸展がみられ、ビンキュリンの発現が同

程度であった。さらに、WST-8 assay および LDH assay で有意差は認められなかった。これらの結果より、Lys-Au NCs/RB の細胞適合性は良好であることが示唆された。従来の抗菌性材料はしばしば高い抗菌性を示す一方細胞障害性も有することが多いが、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抗菌剤に比較して大きな利点と考えられる。

以上より Lys-AuNCs/RB と白色 LED 照射は歯科治療における aPDT に有用である可能性がある。