



HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨



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 岡 本 一 絵

	主査	教授	菅谷	勉
審 査 担 当 者	副査	教授	吉田	靖弘
	副査	准教授	安田	元昭

学 位 論 文 題 名

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

（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）

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（aPDT）は、薬剤耐性など抗菌薬の問題点を解決する可能性があり、広く研究されている。また、aPDTの光増感剤として現在用いられているメチレンブルー（MB）やローズベンガル（RB）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の範囲が狭いことが課題である。今回、リゾチーム（Lys）で保護した金ナノクラスターをRBと複合し、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、まずLys-Au NCs/RBと白色LED光照射による一重項酸素生成能を調べ、さらに *Streptococcus mutans* (*Sm*)、*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)、*Actinomyces naeslundii* (*An*)、*Prevotella intermedia* (*Pi*) および *Escherichia coli* (*Ec*) に対する抗菌活性と、線維芽細胞 NIH3T3 への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、RBを混和、攪拌、限外ろ過してLys-Au NCs/RBを生成した。光励起の光源には波長420-750 nmの白色LEDを使用した。メトトレキサート（MTX）を用いた蛍光スペクトル測定で $^1\text{O}_2$ の発生を定量したところ、RBおよびLys-Au NCsに比較してLys-Au NCs/RBの方が蛍光強度は減少した。また、UV-Visスペクトル法による分析では、RBおよびLys-Au NCsよりLys-Au NCs/RBの方が550 nmの吸収率は高かった。また、蛍光寿命測定では複合化することで蛍光減衰時間の減少がみられた。これらのことから、RBにLys-Au NCsを複合化することで金ナノクラスターの発光エネルギーがRBに移行して $^1\text{O}_2$ の発生が増加したと考えられた。

次に、*Sm*懸濁液にRB、Lys-Au NCs、Lys-Au NCs/RBを添加後、光照射を行って、24時間培養後に濁度測定した結果、コントロールに対してRBとLys-Au NCsの濁度は同等で、Lys-Au NCs/RBでは低い値となった。これはLys-Au NCsをRBに複合化することで、抗菌作用が上がったためと考えられた。さらにLys-Au NCs/RBを*Sm*の懸濁液に溶解し、光照射を行って24時間培養後、血液寒天培地に播種しCFUを測定したところ、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。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 $\mu\text{g/mL}$)

を *Sm* 懸濁液に溶解し、光照射後に 24 時間嫌気培養して濁度を測定した。光照射なしの群では、濁度の減少はコントロールに比べてすべての濃度でわずかであったが、光照射ありの群では 0.1 及び 1 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で濁度が有意 ($p < 0.05$) に低下した。また Lys-Au NCs/RB を *Sm* 懸濁液に溶解後 0, 30, 60 秒光照射を行って濁度測定を行ったところ、照射時間が長くなるほど濁度低下がみられた。また、*Ec*, *An*, *Pg*, *Pi* 菌懸濁液に Lys-Au NCs/RB を溶解して光照射を行い、24 時間嫌気培養して濁度を測定すると、いずれの菌でもコントロールより有意 ($p < 0.05$) に低下した。このことから、Lys-Au NCs/RB はグラム陰性および陽性細菌の両方に対して抗菌活性を有することが示唆された。また、同様に Lys-Au NCs/RB を *Sm* 懸濁液に添加、光照射を行い 24 時間嫌気培養して、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行ったところ、SEM 観察では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。さらに、Lys-Au NCs/RB を *Sm* 懸濁液に添加して光照射した直後に、LIVE/DEAD 染色を行った結果、生菌に対する死菌の割合がコントロールに比較して有意 ($p < 0.05$) に多かった。これらの結果から、光励起された Lys-Au NCs/RB が生成した $^1\text{O}_2$ は、菌体への破壊効果が及ぶものと考えられた。

また、NIH3T3 細胞懸濁液中へ Lys-Au NCs/RB を添加して光照射を行い、24 時間培養後 Vinculin-F-actin 二重染色、WST-8 assay, LDH assay を行った。その結果、Lys-Au NCs/RB 添加と光照射は細胞の増殖、付着、伸展に影響を及ぼさなかった。

以上より Lys-Au NCs/RB と白色 LED 照射は一重項酸素を生成し、*Sm*, *An*, *Pg*, *Pi* 及び *Ec* に対して抗菌効果を示すとともに、NIH3T3 細胞に対しては細胞障害性が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. 一重項酸素はどのようなメカニズムで抗菌性を発現するのか。
2. 一重項酸素の抗菌性は光照射後どのくらい持続するのか。
3. 殺菌効果があっても線維芽細胞に傷害性を発揮しないのはなぜか。
4. リゾチームの酵素活性は消えていないのか。
5. 銀クラスターと比較して抗菌性はどちらが優れているのか。
6. CFU が 1/1000 に低下したことで殺菌力は十分に高いと言えるのか。
7. Live/Dead 染色はどのようなメカニズムか。
8. Au ナノ粒子は細菌や細胞に取り込まれないのか。

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。