



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	金銀ナノクラスター／ローズベンガル含有キトサンナノゲル複合体の創製と抗菌性の評価 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	浜本, 朝子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15017号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85969
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Asako_Hamamoto_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 浜 本 朝 子

学 位 論 文 題 名

金銀ナノクラスター／ローズベンガル含有キトサンナノゲル複合体の創製と
抗菌性の評価

キーワード(5つ) 一重項酸素, 抗菌的光線力学療法, *Streptococcus mutans*,
バイオフィルム, 白色発光ダイオード (light emitting diode ; LED)

抗菌的光線力学療法 (a-PDT) は, 一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) によって殺菌する治療法であり, 耐性菌の出現抑制に効果的であることから, 抗菌薬に代わる新しい抗菌療法として注目されている. これまでに, 金銀ナノクラスター (AuAg NCs) は生体親和性が高く a-PDT の性質を示す新しい光増感剤であることが示されている. しかし, 不安定な $^1\text{O}_2$ は発生後数百ナノ秒で安定な三重項状態に戻ってしまい, 水溶液中では理論上 100 nm 程の距離でしか抗菌効果がないことから, 選択的に細菌表面に付着できる, または細菌に取り込まれる特性をもつ光増感剤が求められる. 本研究では, まず AuAg NCs を天然多糖類であるキトサンで包含したナノゲル (AuAg@nanogel) を創製し, AuAg@nanogel と有機色素であるローズベンガル (RB) を複合化 ((AuAg, 3RB)@nanogel) した. そして, (AuAg, 3RB)@nanogel の光線力学的特性, 抗菌性, 細胞親和性を評価した.

硝酸銀, 塩化金酸, 水の混合溶液にグルタチオンを添加, 攪拌して AuAg NCs を調製した. AuAg NCs にキトサン, 水酸化ナトリウムを添加, 攪拌して AuAg@nanogel を得た. AuAg@nanogel の特性を評価するために, 動的光散乱法 (DLS) 測定, UV-vis 吸収スペクトル測定, 蛍光スペクトル測定を行った. DLS 測定の結果, AuAg NCs は平均粒径 2.2 nm, AuAg@nanogel は平均粒径 28.2 nm であり TEM 像でも類円形のナノゲルが確認された. UV-vis スペクトル測定の結果, AuAg NCs と AuAg@nanogel のピーク波長はほぼ一致していたが, AuAg@nanogel の発光強度は AuAg NCs の 1.5 倍に増加した. また, 白色 LED (420～750 nm) で光励起された AuAg NCs, AuAg@nanogel の $^1\text{O}_2$ 生成効率を ABDA プローブ法にて調べた結果, AuAg@nanogel の $^1\text{O}_2$ 生成効率は AuAg NCs の約 3.4 倍に向上した. これは,

キトサンを用いて AuAg NCs とのナノゲル化を行ったことで、熱失活過程が抑制され、発光強度が増強し $^1\text{O}_2$ 生成量が大幅に増大したためと考えられた。

AuAg@nanogel と RB 水溶液を 1 : 1, 1 : 3 の割合で混合し、攪拌後遠心濾過することで、RB 複合比の異なる金銀クラスター／ローズベンガル含有キトサンナノゲル複合体 ((AuAg, RB)@nanogel, (AuAg, 3RB)@nanogel) を得た。特性評価のため、AuAg@nanogel および (AuAg, 3RB)@nanogel の UV-vis スペクトル測定、AuAg@nanogel, (AuAg, RB)@nanogel, および RB の蛍光スペクトル測定を行った。UV-vis スペクトル測定の結果、(AuAg, RB)@nanogel では 565 nm 前後に RB 由来のピーク波長がみられ、AuAg@nanogel と RB の複合化が示された。蛍光スペクトル測定の結果、AuAg NCs の蛍光ピークは RB の吸収スペクトルと 500~600 nm 域で重なっていた。また、AuAg@nanogel の蛍光強度の減少と RB の蛍光強度増大が、同一励起波長 (335 nm) で観測された。このことから、AuAg@nanogel と RB の複合化によって RB にエネルギー移動 (RET) が生じていることが明らかとなった。

続いて、(AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌効果を、口腔内細菌 *Streptococcus mutans* を用いて検討した。RB の混合比率による抗菌性を調べるため、最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の (AuAg, RB)@nanogel, (AuAg, 3RB)@nanogel, コントロールとして蒸留水を *S. mutans* 懸濁液に添加後、1 分間光照射し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間嫌気培養後、濁度を測定した。その結果、コントロールと比較し、(AuAg, RB)@nanogel で約 30 % ($p < 0.05$), (AuAg, 3RB)@nanogel で約 80 % と有意な低下を認め ($p < 0.01$), (AuAg, 3RB)@nanogel と (AuAg, RB)@nanogel の比較でも有意差が認められた ($p < 0.01$)。この結果から、以下の抗菌・抗バイオフィーム性の検討には (AuAg, 3RB)@nanogel を用いた。

同様に、RB の複合効果を調べるために、(AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、AuAg@nanogel (最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、RB (最終濃度 1.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、*S. mutans* 懸濁液に添加して 1 分間光照射し、24 時間嫌気培養後、濁度を測定した。(AuAg, 3RB)@nanogel は、AuAg@nanogel, RB より有意に低い濁度を示した ($p < 0.01$)。

(AuAg, 3RB)@nanogel の濃度依存性を調べるため、(AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 0, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を *S. mutans* 懸濁液に添加して 1 分間光照射し、24 時間嫌気培養後、濁度を測定した。最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では濁度の低下はみられず ($p > 0.05$), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から有意に濁度が低下した ($p < 0.01$)。

光照射時間による抗菌性を調べるため、最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の (AuAg, 3RB)@nanogel を *S. mutans* 懸濁液に添加して、0, 30, 60, 90 秒間光照射し、24 時間嫌気培養後、濁度を測定した。白色 LED 照射時間 30 秒から濁度の低下がみられ、90 秒で最も低い濁度となった。この結果より、(AuAg, 3RB)@nanogel は $^1\text{O}_2$ によって容易に自己破壊されることはなく、 $^1\text{O}_2$ を長時間にわたり発生し続けると考えられた。

抗バイオフィーム特性を調べるため、Biofilm formation assay, Biofilm viability assay を行った結果、(AuAg, 3RB)@nanogel の添加により、ナノゲルを添加していないコントロールと比較し吸光度が有意に低下し ($p < 0.01$)、(AuAg, 3RB)@nanogel は、バイオフィ

ィルム中の細菌増殖および細菌の代謝活性を抑制することが明らかとなった。また、ガラススペースディッシュに *S. mutans* 懸濁液を播種し、24, 48 時間培養後 (AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、1 分間光照射して直ちに LIVE/DEAD 染色を行った。その結果、(AuAg, 3RB)@nanogel を添加していないコントロールでは、赤色蛍光の細菌はほぼ認められず、緑色蛍光に標識された細菌が多くみられたが、(AuAg, 3RB)@nanogel の添加と 1 分間の光照射により、赤色蛍光に標識された細菌を多く認めた。このことから、(AuAg, 3RB)@nanogel は、バイオフィルム内部においても殺菌効果を示すことができると推測された。

S. mutans バイオフィルム最深部への (AuAg, 3RB)@nanogel の浸透を確認するため、標識キットを用いて (AuAg, 3RB)@nanogel (1.0 mg/mL) 中のキトサンを標識した。48 時間培養した *S. mutans* バイオフィルムに標識した (AuAg, 3RB)@nanogel を添加し、ガラススペースディッシュの底面を蛍光顕微鏡で観察した。(AuAg, 3RB)@nanogel の添加を行わなかったもの、標識キットで処理した RB (0.9 mg/mL) を添加したものをコントロールとした。蛍光標識した (AuAg, 3RB)@nanogel を添加後に蛍光顕微鏡にて観察した結果、ディッシュ底面に緑色蛍光が観察された。コントロール (添加なし)、RB 添加では蛍光発光は認められなかったことから、キトサンの自己発光や標識抗体の残留はないことが確認され、(AuAg, 3RB)@nanogel はバイオフィルム内部においても殺菌効果を示すことができると推測された。

(AuAg, 3RB)@nanogel の生体親和性を調べるため、NIH3T3 細胞懸濁液に (AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して 1 分間光照射し 24 時間培養後、WST-8 アッセイ、LIVE/DEAD 染色、蛍光免疫染色を行った。WST-8 アッセイでは、光照射により (AuAg, 3RB)@nanogel を添加した群で吸光度が低下した ($p < 0.01$) が、LIVE/DEAD 染色では死細胞はほとんど観察されず、蛍光免疫染色では (AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射をしても細胞の伸展やビンキュリンの発現はナノゲルを添加せず光照射しなかったコントロールと比較して同程度であった。したがって、WST-8 活性の低下は細胞死によるものではなく、a-PDT により生成された $^1\text{O}_2$ によって細胞の代謝活性が下がったためと考えられた。一方で、(AuAg, 3RB)@nanogel 添加後光照射をしなかった群では吸光度の増加 ($p < 0.01$) がみられ、生細胞数が増加したと考えられた。この吸光度の増加は、ナノゲル中のキトサンが細胞増殖の足場として働いたことが示唆された。よって (AuAg, 3RB)@nanogel 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ため、他の光増感剤に比べて大きな利点と考えられた。

本研究より、光励起された (AuAg, 3RB)@nanogel は、 $^1\text{O}_2$ を生成し *S. mutans* に対して濃度依存的、光照射時間依存的に抗菌性を発揮し、さらにバイオフィルムに対しても抗菌性を示した。また、NIH3T3 細胞に対し細胞障害性が低いことがわかった。以上より、(AuAg, 3RB)@nanogel は、新しい a-PDT 治療薬として有益である可能性が示された。