



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_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 浜 本 朝 子

主査 教授 菅 谷 勉
審査担当者 副査 教授 吉 田 靖 弘
副査 教授 長 谷 部 晃

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

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、一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）によって殺菌する治療法である。金ナノクラスターは、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 $^1\text{O}_2$ は発生後すぐに抗菌性のない状態に戻ってしまうことから、選択的に細菌表面に付着し殺菌できる光増感剤が求められる。本研究では、AuAg NCsをキトサンで包含したナノゲル（AuAg@nanogel）を創製し、AuAg@nanogelとローズベンガル（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しAuAg NCsを調製し、さらにキトサンを添加してAuAg@nanogelを得た。動的光散乱法（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@nanogelの発光強度はAuAg NCsの1.5倍に増加した。 $^1\text{O}_2$ 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倍と大幅に向上した。

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（AuAg, RB）@nanogel，（AuAg, 3RB）@nanogelを得た。UV-visスペクト

ル測定の結果、(AuAg, RB)@nanogelでは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@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で観測されたことから、RBとの複合化によってAuAg NCsからRBにエネルギー移動 (RET) が生じたことがわかった。

続いて、*Streptococcus mutans* (*Sm*) を用いて抗菌性を調べた。*Sm*懸濁液に(AuAg, RB)@nanogel, (AuAg, 3RB)@nanogelを添加し光照射後、24時間嫌気培養し濁度を測定した。(AuAg, 3RB)@nanogelで最も低い濁度となったことから、以下の抗菌性の検討には(AuAg, 3RB)@nanogelを用いた。RBの複合効果を濁度測定により調べた結果、(AuAg, 3RB)@nanogelは、AuAg@nanogel, RBより有意に低い濁度を示し、複合化により抗菌効果の向上が確認された。濃度依存性を調べるため、(AuAg, 3RB)@nanogel (0, 5, 50, 500 $\mu\text{g/mL}$) を用いて濁度測定を行った。50 $\mu\text{g/mL}$ から有意に濁度が低下し ($p < 0.01$) , 有効濃度が存在することがわかった。光照射時間による抗菌性を調べるため、(AuAg, 3RB)@nanogelを添加した*Sm*懸濁液に、0, 30, 60, 90 秒間光照射し、24時間嫌気培養後の濁度を測定した。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。(AuAg, 3RB)@nanogelは $^1\text{O}_2$ によって容易に自己破壊されず、 $^1\text{O}_2$ を長時間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, LIVE/DEAD 染色を行った。(AuAg, 3RB)@nanogel の添加によりバイオフィー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わかった。また、(AuAg, 3RB)@nanogel 中のキトサンを標識し、*Sm* バイオフィームへの(AuAg, 3RB)@nanogel の浸透を確認した。標識した(AuAg, 3RB)@nanogel がバイオフィーム底面でも観察されたことから、(AuAg, 3RB)@nanogel はバイオフィーム内部に浸透し、殺菌効果を示すことができると推測された。

生体親和性を調べるため、(AuAg, 3RB)@nanogelを添加したNIH3T3細胞懸濁液を用いて、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、(AuAg, 3RB)@nanogelを添加し光照射した群で吸光度が低下した ($p < 0.01$) が、LIVE/DEAD染色と蛍光免疫染色では死細胞はほとんど観察されず、細胞の伸展やビンキュリンの発現に影響を及ぼさなかった。したがってWST-8活性の低下は、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。

以上より、光励起された(AuAg, 3RB)@nanogelは $^1\text{O}_2$ を生成し、*Sm*に対して抗菌性・抗バイオフィーム性を発揮し、NIH3T3細胞に対し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. AuAg@nanogelとの複合化にRBを選択したのはなぜか。
2. 白色LEDを照射する際に特別な器具は必要であるか。
3. 白色LEDを照射しないウェルはどのように遮光するのか。

4. 細胞親和性評価のWST-8活性の低下は細胞死によるものではないといえるのはなぜか.
5. 今までの金ナノクラスターからの改善点は何か.
6. 抗菌性があるキトサンをa-PDTに使用したのはなぜか.
7. 作製したバイオフィルムの厚さはどのくらいであるか.

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。