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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15017
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89306
Type	doctoral thesis
File Information	Asako_Hamamoto.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

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

令和 4 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学院口腔医学専攻

浜　本　朝　子

キーワード

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）

抄録

抗菌的光線力学療法（a-PDT）は，光照射と光増感剤を用いて発生させた一重項酸素（$^1O_2$）によって殺菌する治療法である．しかし $^1O_2$ は不安定で発生後に数百ナノ秒程度で抗菌性を失うため，バイオフィルム内へ浸透し，細菌に付着して効率的に殺菌を行う新たな光増感剤が求められている．本研究では，光増感剤の金銀ナノクラスター（AuAg NCs），およびローズベンガル（RB）をカチオン性の高分子であるキトサンで包含したナノゲル（(AuAg, 3RB)@nanogel）を創製し，光線力学的特性を調べた．また，口腔内細菌 *Streptococcus mutans* を用いて，白色 LED 照射により光励起した（AuAg, 3RB）@nanogel の抗菌・抗バイオフィルム性を評価するとともに，NIH3T3 線維芽細胞を用いて細胞毒性を評価した．

AuAg NCs はキトサンナノゲルとの複合化によって $^1O_2$ 生成量が増大し，さらに RB と複合化することで，AuAg NCs から RB への共鳴エネルギー移動（RET）が発生し，さらなる $^1O_2$ 生成量の向上が示された．(AuAg, 3RB)@nanogel は *S. mutans* バイオフィルムへの浸透性を示し，光励起によって抗菌・抗バイオフィルム効果を示した．また光励起（AuAg, 3RB)@nanogel の NIH3T3 線維芽細胞に対する細胞毒性は低いことが示された．

以上より，(AuAg, 3RB)@nanogel と白色 LED 照射による a-PDT は，口腔内バイオフィルム感染症に効果的である可能性が示唆された．

1 緒言

超高齢社会において，加齢や歯周病により歯肉が退縮した際に，露出根面に発生する根面う蝕が大きな問題となっている [1]．根面う蝕は酸を産生する口腔内細菌のバイオフィルム感染症であり [2]，う蝕の進行により歯を失うケースも多く，国民の健康寿命延伸のためにも根面う蝕の予防法の確立は必須である．根面う蝕を予防する第 1 の方策はブラッシング等を用いてバイオフィルムを定期的，機械的に除去することである．しかし，高齢者は加齢に伴う認知・手指機能の低下等，いわゆるフレイルによりホームケアが困難であることが多い．次に第 2 の方策として抗菌薬を用いた化学的清掃を行う方法があげられる．しかし，歯の表面には細菌と菌体外多糖などの細胞間マトリックスの複合体，すなわちバイオフィルムが形成され，抗菌薬はバイオフィルムに浸透しにくいことが明らかになっている [3]．さらにバイオフィルム内の細菌は抗菌薬に耐性をもつことも知られている [4]．例えば口腔レンサ球菌 *Streptococcus sanguinis* のバイオフィルム内細菌と浮遊性細菌の両者を用いて，アモキシシリンの抗菌性を調べると，バイオフィルム内の *S. sanguinis* が強い抗菌薬耐性効果を示

したことが報告されている[5]．したがって，抗菌薬に代わる新たな抗バイオフィルム療法の開発が求められている．

抗菌的光線力学療法（Antibacterial photodynamic therapy；a-PDT）は，光感受性物質を光励起することで発生する活性酸素の作用で殺菌を行う治療法である[6,7]．活性酸素は抗菌薬に比較して耐性菌の出現が少ない[8,9]ことから，抗菌薬に代わる抗菌・抗バイオフィルム療法として近年広く a-PDT の研究が進められている．う蝕や歯周病の口腔内感染症に対しても a-PDT が効果的であると報告があり，抗バイオフィルム効果も示されている[10]．a-PDT には一般に，メチレンブルー[11]，ローズベンガル（RB）[11]，インドシアニングリーン[12]などの有機色素系光感受性物質が使用されているが，これらはバイオフィルム内への浸透性が低く[13]，水中での自己会合や凝集により活性酸素の生成能が著しく減少する[14]ことから抗菌性を十分に発揮するためには高濃度で使用する必要があり，その結果として細胞毒性を発現してしまう欠点があった[14]．近年，従来の有機色素光増感剤の欠点を解決する新しい光増感剤として，金ナノクラスター（Au NCs）が注目されている[15]．宮田らは，25 個の金原子を 18 個のカプトプリル配位子で保護した $Au_{25}(Capt)_{18}$ を光感受性物質として a-PDT に使用し，一重項酸素（$^1O_2$）の発生と，う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* に対する殺菌性，ならびに有機色素光増感剤に比較して哺乳類細胞に対する低い細胞毒性を示した[16]．岡本らは，リゾチーム保護 Au NCs と RB の複合体を創製し，良好な分散性（RB 単独による会合を抑制）と細胞親和性を示すこと，また低用量でも高い抗菌・抗バイオフィルム活性を示すことを報告した[17]．

Au NCs から発生した $^1O_2$（抗菌性を有する状態）は不安定な状態であり，すぐに安定な三重項酸素（抗菌性が失われた状態）に変化する．その変化に必要とされる時間は数百ナノ秒程度であり，水溶液中では発生源である Au NCs から 100 nm の範囲しか $^1O_2$ の抗菌効果が発揮されないと想像できる[18,19]．したがって Au NCs が抗菌性を発揮するためには，細菌表面に吸着するか，または細菌内に取り込まれ $^1O_2$ を発生する必要がある[20]．プラスに帯電した Au NCs 光増感剤を創製することができれば，マイナスに帯電する口腔内バイオフィルムの細菌に吸着し，より効率的な a-PDT が可能になると考えた[21]．そこで本研究では，細菌と親和性の高い天然多糖であるキトサンで Au NCs を包含しナノゲル化することを考案した．キトサンは，甲殻類の外骨格に存在する多糖のキチンを脱アルキル化することで得られる物質で，様々な生理活性（抗菌性，生分解性，生体適合性，物理的・化学的特性等）を有することが判明している[22]．キトサンはカチオン性の高分子であるため，アニオン性のグラム陽性菌，グラム陰性菌の両者に静電的に付着し，抗菌性を示すことが知られていることから，効率的に細菌に付着し細菌に取り込まれると考えた[23]．

光感受性物質（Au NCs や有機色素など）と生体高分子（多糖やタンパク質）を複合化させると，上述のように細菌との親和性が向上するメリットがあるが，一方で光感受性物質から生成した酸化力の強い $^1O_2$ の一部が生体高分子を攻撃し消費されるため，光感受性物質単独使用と比べて，複合化により正味の $^1O_2$ 発生量が低下する課題がある．山本らは，メチ

レンブルーと生体高分子であるアルブミンとの複合化において同様に正味の $^1O_2$ 発生量が低下する問題が発生したことを報告している[24]．したがって，a-PDT 応用のためには，複合化による細菌との親和性向上と光感受性物質の $^1O_2$ 生成効率向上を両立させる必要がある．そこで，本研究では，Au NCs をキトサンで包含してナノゲル化することに加え，正味の $^1O_2$ 発生量を増大させるために次のアプローチを取り入れることとした．1）Au と Ag の合金化（AuAg@nanogel）：Au NCs に別の金属原子を加えると $^1O_2$ 生成効率が改善されることが報告されている[25]．また Ag による追加的抗菌能付与も期待される[26]．2）AuAg@nanogel にさらに RB を内包（(AuAg, RB)@nanogel）：光吸収で得た AuAg NCs のエネルギーを RB へ移動させることで，RB 単独に比べて，RB からの $^1O_2$ 発生量を増大できると期待される(図 1)．そこで本研究では，新規光感受性物質である(AuAg, RB)@nanogel の光線力学的特性を調査した．次に *S. mutans* を用いて(AuAg, RB)@nanogel を a-PDT に使用した場合の抗菌・抗バイオフィルム特性の評価を行った．さらに，ナノゲルの安全性を確認するため，マウス由来の線維芽細胞である NIH3T3 細胞を用いて細胞毒性を評価した．

2 材料と方法

2.1 AuAg@nanogel の合成

硝酸銀 10 mM, 塩化金酸 200 mM, 水の混合溶液にグルタチオン 15 mM を添加し, 70 ℃, 500 rpm で 24 時間撹拌することで，AuAg NCs 溶液を調製した．これを 25 ℃で穏やかに撹拌（500 rpm）しながら，キトサン（medium molecular weight，5 mg/mL，シグマアルドリッチ，St. Louis，MO，USA）を 2 mL 添加した．1 M の水酸化ナトリウム水溶液を添加し，25℃で 30 分穏やかに撹拌（500 rpm）することで pH 6.5 に調製し，AuAg@nanogel を生成した（図 2）[25,27]．

2.2 キャラクタリゼーション

動的光散乱法 （DLS）測定は， Zetasizer nano ZSP（Malvern Panalytical, Worcestershire, UK）を用いて行った（平衡時間 :180 秒, 測定角度 :173 ° Backscatter, 測定回数 :3 回, 測定間隔 :0 秒）．透過型電子顕微鏡（TEM）観察は，JEM-1400（日本電子株式会社，東京，日本）を使用し，加速電圧 120 kV で切片化し分析した．UV-vis 吸収スペクトルは，紫外可視近赤外分光法（UV-vis-NIR）分光光度計（V-670 spectrophotometer，JASCO，東京，日本）を用いて測定した．蛍光スペクトルは，FP-6200 fluorescence spectrophotometer（JASCO）を用いて測定した．

2.3 $^1O_2$ 生成効率の評価

9,10-anthracenedinyl-bis（methylene）dimalonic acid（ABDA）の $^1O_2$ 酸化による吸光度の減少を調べることで，$^1O_2$ 生成能を評価した．AuAg NCs および AuAg@nanogel に

ABDA/*N,N*-dimethylformamide 混合溶液 0.5 mM を添加し，暗所にて 60 分静置した．その後，波長 420~750 nm の白色発光ダイオード（light emitting diode；LED，80 mW/cm^2, SPF-D2，松電舎，大阪，日本）を 1 分間照射し，これを 3 回繰り返した．LED 照射後，紫外可視近赤外分光法（UV-vis-NIR）分光光度計を用いて，UV-vis スペクトル測定を行った [28]．

2.4 AuAg@nanogel と RB の複合化

AuAg@nanogel に RB 水溶液 0.1 mg/mL を，AuAg NCs と RB が 1：1，あるいは 1：3 の割合になるよう混合し，500 rpm で 2 時間撹拌後，遠心式限外ろ過フィルターを用いて複合比 1：1 および 1：3 の複合体を調製し，それぞれ(AuAg, RB)@nanogel，(AuAg, 3RB)@nanogel とした（図 2）．遠心ろ過で得られたろ液には，いずれも RB による着色は観測されず，導入した RB はすべてキトサンと複合化していることが示唆された．

AuAg@nanogel と RB の複合化を確認するため，AuAg@nanogel および(AuAg, RB)@nanogel の UV-vis スペクトル測定を行った．また，RB 複合比率の異なる(AuAg, RB)@nanogel と(AuAg, 3RB)@nanogel の UV-vis スペクトル測定を行い比較した．

次に，335 nm の波長で，AuAg@nanogel，(AuAg, RB)@nanogel，および RB の蛍光スペクトル測定を行い，RB 複合化前後の蛍光スペクトルの比較を行った．

2.5 細菌懸濁液の調整

口腔内う蝕原因菌 *S. mutans*（American Type Culture Collection 35668）を入手調整後，分析まで凍結保存した．*S. mutans* は，ブレインハートインフュージョン培地（パールコア®，栄研化学株式会社，東京，日本）に 0.1 %抗菌薬（グラミシジン D およびバシトラシン，富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本），1 %スクロース（富士フィルム和光純薬株式会社）を加えたものを用いて，嫌気的かつ静的に培養した．嫌気培養は，嫌気性角型ジャーとアネロパック（三菱ガス化学株式会社，東京，日本）を用いて行った．本研究の抗菌性評価では，1.0×10^7 colony-forming unit (CFU)/mL に希釈した細菌を用いた．

2.6 (AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌性評価

(AuAg, RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL），(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL），およびコントロールとして等量の蒸留水（DW）を *S. mutans* 懸濁液に溶解し，48 穴マイクロプレート（BioLite Multidish，Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA，USA）に播種した．各ウェルに白色 LED を 2 cm 上方から 1 分間照射し，37 ℃で 24 時間嫌気培養した．培養後，可視光度計（波長 590 nm，CO7500 Colourwave，フナコシ株式会社，東京，日本）を用いて濁度を測定した．

RB の複合効果を調べるために，(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL），AuAg@nanogel（最終濃度 50 μg/mL），RB（最終濃度 1.36 μg/mL），およびコントロールとして

DW を *S. mutans* 懸濁液に溶解，48 穴マイクロプレートに播種し，白色 LED を 2 cm 上方から 1 分間照射後, 37 ℃で 24 時間嫌気培養した. 培養後, 可視光度計で濁度を測定した.

(AuAg, 3RB)@nanogel の濃度依存的な抗菌特性を評価するために，(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度：0（添加なし），5，50，および 500 μg/mL）を *S. mutans* 懸濁液に溶解し，48 穴マイクロプレートに播種した．各ウェルに白色 LED を 2 cm 上方から 1 分間照射し，37 ℃で 24 時間嫌気培養後，可視光度計で濁度を測定した.

白色 LED 照射時間による抗菌特性を評価するために，(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL）を，*S. mutans* 懸濁液に溶解，48 穴マイクロプレートに播種し，各ウェルに白色 LED を 2 cm 上方から 0，30，60，あるいは 90 秒間照射し，37 ℃で 24 時間嫌気培養した．培養後，可視光度計で濁度を測定した.

(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度：0（添加なし），50 μg/mL）を *S. mutans* 懸濁液に添加し，白色 LED で 1 分間光照射した．0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝 2.5 %グルタルアルデヒド溶液（pH 7.4）で固定後，1 %オスミウム酸で後固定を行い，エタノールで脱水した. 酸化プロピレンを置換剤として浸透させ, エポキシ樹脂で包埋後, 超薄切切片を作製し, TEM（加速電圧 80 kV）にて観察分析を行った.

2.7 (AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィルム性評価

Biofilm formation assay kit（株式会社同仁化学研究所，益城，日本）を用いて，抗バイオフィルム性を評価した．*S. mutans* 懸濁液を 180 μL/well で 96 穴マイクロプレートに播種し，96 個ピン付きマイクロプレート蓋を設置した．24 時間嫌気培養することでピン表面に *S. mutans* のバイオフィルムを形成させた．続いて(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL）を含む培地を新しい 96 穴マイクロプレートに分注し，*S. mutans* のバイオフィルムを形成させたピン付きの蓋を設置した．コントロールとしてナノゲルを含まない培地を用いて同様に *S. mutans* のバイオフィルムを形成させたピン付きの蓋を設置した. 白色 LED を各ウェルに 2 cm 上方から 1 分間照射し，48 時間嫌気培養した．その後，クリスタルバイオレット染色法 [29] で各ピン表面のバイオフィルム量を，マイクロプレートリーダー（Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific）にて 595 nm の吸光度で測定した.

Biofilm viability assay kit（株式会社同仁化学研究所）を使用して，バイオフィルム内の生菌量を定量した．上述のように 96 個ピン付きマイクロプレート蓋のピン表面に *S. mutans* のバイオフィルムを形成させ，(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL）を含む，あるいは含まない（コントロール）培地を分注した 96 穴マイクロプレートに移設した．白色 LED を各ウェルに 2 cm 上方から 1 分間照射後，水溶性テトラゾリウム塩（Water-soluble tetrazolium；WST）試薬を入れた新しい 96 穴マイクロプレートにピン付きの蓋を移設し，37 ℃で 48 時間培養後，ピン付きの蓋を外してマイクロプレートプレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定した.

生菌，死菌を蛍光観察するために，ガラスベースディッシュ（AGC テクノグラス株式会

社，吉田，日本）に *S. mutans* 懸濁液を播種し，37 ℃で 24，48 時間嫌気培養して，バイオフィルムを形成させた．作製したバイオフィルムに(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度：0（添加なし），50 μg/mL）を滴下し，2 cm 上方から 1 分間白色 LED を照射した．照射後すぐに，LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてバイオフィルムを染色した．ガラスベースディッシュの底面（バイオフィルムの最下層）を，蛍光顕微鏡（BZ-9000 BioRevo，キーエンス株式会社，大阪，日本）で観察した．蛍光強度は，ImageJ ソフトウェア（ver 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を使用して測定した．定量評価のため，測定値から赤色蛍光強度の割合を求めた．

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（HiLyte Fluor™ 647 Labeling Kit - NH_2, 株式会社同仁化学研究所）を用いて(AuAg, 3RB)@nanogel 中のキトサンを標識した．ガラスベースディッシュに *S. mutans* 懸濁液を播種し，37 ℃で 48 時間嫌気培養して，バイオフィルムを形成させた．作製したバイオフィルムに標識した(AuAg, 3RB)@nanogel（1.0 mg/mL）を添加し，ガラスベ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 を添加（0.9 mg/mL）したものをコントロールとした．

2.8 (AuAg,3RB)@nanogel の細胞毒性評価

マウス線維芽細胞（NIH3T3，理化学研究所バイオリソースセンター，つくば，日本）を用い，定量的および定性的に細胞適合性評価を行った．1×10^4 に調整した NIH3T3 細胞と，培地（MEM alpha, GlutaMAX-I; Thermo Fisher Scientific），10 %ウシ胎児血清（FBS; Thermo Fisher Scientific），1 %抗生物質（ペニシリン-ストレプトマイシン; Thermo Fisher Scientific）を用いて作製した懸濁液に，(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度：0（添加なし），50 μg/mL）を添加した．この懸濁液を 96 穴マイクロプレートに 200 μL/well ずつ分注した．各ウェルに 2 cm 上方から 1 分間白色 LED を照射したプレート，および照射しなかったプレートをそれぞれ 37 ℃，5 %CO_2 下にて 24 時間培養した．その後，WST-8 測定キット（Cell Counting Kit-8，株式会社同仁化学研究所）を使用し，マイクロプレートリーダーを用いて，450 nm の吸光度で測定した．

蛍光顕微鏡観察による細胞親和性の定性的評価のため，ビンキュリン／F-アクチン二重染色を行った．2×10^3 の NIH3T3 細胞をガラスベースディッシュに播種した．(AuAg, 3RB)@nanogel（最終濃度 50 μg/mL）を添加し，白色 LED を 2 cm 上方から 1 分間照射した．ナノゲルを添加せず，光照射を行わなかったものをコントロールとした．37 ℃, 5 %CO_2 下にて 24 時間培養した．培養後，3.5 %パラホルムアルデヒドで 5 分間固定し，リン酸緩衝液（PBS，富士フィルム和光純薬株式会社）で希釈した 0.5 %Triton X-100（富士フィルム和光純薬株式会社）で透過処理を行った．PBS で洗浄後，4‘,6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（株式会社同仁化学研究所），ビンキュリンモノクローナル抗体（Anti-Vinculin Alexa Fluor 488，eBioscience，San Diego，CA，USA），蛍光標識ファロイジン（Anti-Stain

555 fluorescent Phalloidin，Cytoskeleton，Inc.，Denver，CO，USA）にて多重染色を行った．染色された細胞は，蛍光顕微鏡を用いて観察した．

2.9 統計分析

計測値から平均値±標準偏差を算出後，セクション 2.5 の(AuAg, 3RB)@nanogel の濁度測定に対しては One way ANOVA と Tukey HSD post hoc test を，セクション 2.6 の Biofilm formation assay，Biofilm viability assay およびセクション 2.7 の WST-8 アッセイに対しては Student-T test を用いて統計分析を行った．P 値<0.05 で統計学的に有意であるとみなした．すべての統計手順は，統計ソフト SPSS ver11.0（IBM，Armonk，NY，USA）を用いて行った．

3 結果

3.1 (AuAg, RB)@nanogel の光線力学的特性評価

AuAg NCs および AuAg@nanogel の特性評価結果を図 3 に示す．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 像で類円形の AuAg@nanogel が確認された（図 3A，B）．AuAg NCs および AuAg@nanogel の UV-vis スペクトル測定の結果，両者のピーク波長はほぼ一致していた（図 3C）．一方で発光強度の測定の結果，AuAg@nanogel は AuAg NCs の 1.5 倍に増大した（図 3D）．ABDA（$^1O_2$ と選択的に反応）プローブ法を用いて $^1O_2$ 検出を行った結果，ABDA 由来の吸収ピークである 378 nm の吸光度は，AuAg@nanogel の変化量が AuAg NCs の約 3.4 倍と大きく，AuAg@nanogel の高い $^1O_2$ 生成能が示された（図 3E）．

RB 複合化後の特性評価結果を図 4 に示す．AuAg@nanogel および(AuAg, RB)@nanogel の UV-vis スペクトル測定の結果，(AuAg, RB)@nanogel では 565 nm 前後で RB 由来のピーク波長がみられ，AuAg@nanogel では見られなかったことから，RB の複合化が示された（図 4A）．AuAg NCs：RB の複合比 1：1 の(AuAg, RB)@nanogel，および 1：3 の(AuAg, 3RB)@nanogel の UV-vis スペクトルを比較した結果，RB 複合比の大きい(AuAg, 3RB)@nanogel は 500~600 nm でのピークが上昇した（図 4B）．

AuAg@nanogel と RB の複合化によって期待される AuAg NCs（ドナー）から RB（アクセプター）への共鳴エネルギー移動（Resonance energy transfer；RET)を調べるために，AuAg@nanogel と(AuAg, RB)@nanogel の蛍光スペクトル（励起波長 Ex = 335.2 nm）を取得した（図 4C）．AuAg NCs（ドナー）から RB（アクセプター）へ RET が起こるためには，条件 1：AuAg NCs（ドナー）の蛍光スペクトルの発光ピーク波長域と RB（アクセプター）の吸収スペクトルの吸収ピーク波長域が重なっていること，条件 2：AuAg NCs の蛍光強度の減少（エネルギーを RB を渡すため）と RB の蛍光強度増大（AuAg NCs からエネルギーをもらうため）が同一励起波長で観測されることが必要であるが，(AuAg, RB)@nanogel は

これら 2 つの条件を満たしていることが確認された．AuAg NCs（ドナー）の蛍光ピークは RB（アクセプター）の吸収スペクトルと 500~600 nm 域で重なっていた（図 4D）．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（図 4C）．なお，RB の蛍光強度増大は（AuAg, RB)@nanogel と AuAg@nanogel の蛍光スペクトルの差（差スペクトル）より取得した（図 4E）．以上の蛍光スペクトル解析より，(AuAg, RB)@nanogel では，AuAg NCs から RB にエネルギーが移動する RET が発生したことが示された（図 1）．

3.2 抗菌性評価

AuAg NCs と RB の複合比率による抗菌効果を検討するために，(AuAg, RB)@nanogel, および（AuAg, 3RB)@nanogel を用いて濁度の比較を行った（図 5A）．その結果，ナノゲルを添加していないコントロールの濁度に比較して，(AuAg, RB)@nanogel では *S. mutans* の濁度が約 30 %低下し，統計学的に有意差を認めた（$p<0.05$）．また(AuAg, 3RB)@nanogel では濁度が約 80 %低下し，有意差を認めた（$p<0.01$）．さらに(AuAg, 3RB)@nanogel と (AuAg, RB)@nanogel の比較でも有意差を認め（$p<0.01$），(AuAg, 3RB)@nanogel を添加した場合に最も低い濁度を示した．この結果から，以下の本研究の抗菌・抗バイオフィルム性の検討には（AuAg, 3RB)@nanogel を用いた．

（AuAg, 3RB)@nanogel，AuAg@nanogel，RB の抗菌特性を濁度測定により比較検討した（図 5B）．なお RB 量は，(AuAg, 3RB)@nanogel に含まれる RB 量と一致させた．その結果，(AuAg, 3RB)@nanogel は RB 複合前の AuAg@nanogel，および RB 単独よりも有意に低い *S. mutans* 濁度を示した（$p<0.01$）．(AuAg, 3RB)@nanogel は，AuAg@nanogel の約 0.3 倍，RB の約 0.28 倍の濁度を示した．RB のみでは濁度は低下せず，コントロールとほぼ同じ濁度を示した．AuAg@nanogel は RB の濁度より低い傾向を示したが，有意差はみられなかった（$p>0.05$）．

(AuAg, 3RB)@nanogel の添加濃度による抗菌性を濁度測定により評価した（図 5C）．(AuAg, 3RB)@nanogel の最終濃度 5 μg/mL では，0 μg/mL（添加なし）と比較して有意な濁度の低下はみられなかったが（$p>0.05$），50 および 500 μg/mL では有意に低い濁度となった（$p<0.01$）．最終濃度 500 μg/mL は 50 μg/mL よりも濁度の値は低かったが，統計学的に有意な差は認められなかった（$p>0.05$）．

白色 LED の照射時間による抗菌性を濁度測定により評価した（図 5D）．その結果，光照射 30 秒で濁度の低下がみられ，90 秒で最も低い濁度となった．照射時間 30，60，90 秒は，それぞれ 0 秒（非照射）と比較し，有意差を認めた（$p<0.01$）．照射時間 90 秒は 60 秒のものより濁度は低い値だったが，有意差はみられなかった（$p>0.05$）．

微細形態学的評価のため，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射を行った *S. mutans* 懸濁液の TEM 観察を行った．コントロール（添加なし）の TEM 画像では，細胞膜に囲まれた類円形の *S. mutans* が観察された（図 6）．一方，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射

を行ったサンプルでは不定型の微粒子（矢印）を認め，*S. mutans* に近接しているのが認められた．また大きく変形した *S. mutans* や，細胞膜が鮮明ではない *S. mutans* を認めた．

3.3 抗バイオフィルム性評価

(AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィルム性を検討した．Biofilm formation assay kit, Biofilm viability assay kit を用いた検討では，ともに(AuAg, 3RB)@nanogel の添加により，コントロールと比較し有意に吸光度が減少した（$p<0.01$）（図 7A）．LIVE/DEAD Baclight 染色を行い，ディッシュ底面（バイオフィルム最深部）を観察した結果，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加と 1 分間の白色 LED 照射により，24 時間，48 時間培養後ともに赤色蛍光に標識された細菌を多く認めた．一方，ナノゲルを添加しなかったコントロールでは赤色蛍光の細菌はほぼ認めず，緑色蛍光で標識された細菌が多く観察された（図 7B 画像）．本画像より，蛍光強度全体における赤色蛍光強度の割合を求めた結果，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加により，バイオフィルム 24 時間，48 時間培養後ともにコントロールと比較し有意に赤色蛍光強度が強いことが明らかとなった（$p<0.01$）（図 7B）．

蛍光標識した(AuAg, 3RB)@nanogel を添加後に，ディッシュ底面を蛍光顕微鏡にて観察した結果，緑色蛍光が観察された（図 7C）．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無いことが確認された．

3.4 細胞毒性評価

NIH3T3 細胞の WST-8 アッセイの結果，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加と光照射で吸光度が約 0.7 倍に減少した（$p<0.01$）．一方で(AuAg, 3RB)@nanogel の添加のみで光照射をしなかった場合，吸光度が約 1.2 倍に増加した（$p<0.01$）（図 8A）．

(AuAg, 3RB)@nanogel を添加せず光照射を行わなかったコントロールと，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射を行ったサンプルに対し LIVE/DEAD 染色を行った結果，両者とも緑色蛍光が多く観察され，赤色蛍光で染色された細胞はほとんど見られなかった．またビンキュリン-F-アクチン二重染色では，両者とも F-アクチン，ビンキュリンの発現を示し，細胞伸展を認めた（図 8B）．

4 考察

4.1 キトサンを用いた AuAg NCs のナノゲル化

UV-vis スペクトル測定の結果，AuAg@nanogel のスペクトルが，AuAg NCs と一致することが示され（図 3 C），約 2 nm の微粒子である AuAg NCs が約 25 nm のキトサンナノゲル内に取り込まれたことが示された．光感受性物質へ光照射を行った場合，光のエネルギーは，発光，$^1O_2$ 生成，熱失活の 3 つに変換されると考えられる [25]．従来の Au NCs では，吸

収された光エネルギーのほとんどが保護剤となる有機配位子の熱運動に使われており，$^1O_2$ 生成効率が低かった [27]．この熱運動を抑えることができれば，発光や $^1O_2$ 生成へのエネルギーパスを増大させることができ，a-PDT 効果を増強できる可能性が高い．今回キトサンを用いて AuAg NCs とのナノゲル化を行った結果，発光強度が増強し，$^1O_2$ 生成量が大幅に増大した．これは，AuAg NCs のカルボキシ基とキトサンのアミノ基が架橋を形成し，AuAg NCs の熱運動，つまり熱失活過程が抑制され $^1O_2$ を生成するエネルギーパスが増えたことで，$^1O_2$ の生成能が向上したと推測された [25]．AuAg NCs が安定して効果を発揮できる可能性があり，光増感剤の保護剤としてキトサンは有用であることが示唆された．

4.2 AuAg@nanogel から RB への RET 効果

RET とは，2 つの異なる光感受性物質間でエネルギー移動が起こる現象である [30]．AuAg NCs（ドナー）の発光スペクトルと RB（アクセプター）の吸収スペクトルが重なるため（図 4D），RET 効果が起こることが期待された．RET の発生によって，AuAg NCs の励起エネルギーを使って RB を励起させることができ，RB が効率的に $^1O_2$ を生成できると考えられる． 蛍光スペクトル測定の結果（図 4C），RB と複合化された(AuAg, RB)@nanogel の発光強度は，AuAg@nanogel の発光強度より減少した．また，AuAg@nanogel と (AuAg, RB)@nanogel の蛍光スペクトルの差を求めると，RB の発光ピークと一致する波形を認めた（図 4E）．このことから，AuAg NCs から RB への RET が起こったことが示唆された．したがって，RET により白色 LED の光エネルギーを効率的に利用でき，RB からの $^1O_2$ 生成増大による高い抗菌能が期待される．この RET による光感受性物質の a-PDT 効果増強に関しては，これまでにも様々な検討が進められている．岡本らは，リゾチームで保護した金ナノクラスターと RB を複合化することで RET が発生し，その効果により $^1O_2$ 生成能が向上して，RB 単独使用よりも口腔内細菌に対して高い抗菌性をもつことを示した [17]．また Yuan らは，ルミノールの生物発光が RET により別の光増感剤であるカチオン性オリゴに吸収・励起されることで活性酸素種を生成し，癌細胞と隣接する病原性微生物を死滅させたと報告した [31]．

4.3 (AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌特性

S. mutans 懸濁液濁度による抗菌性評価の結果，(AuAg, 3RB)@nanogel は RB 複合前の AuAg@nanogel，および RB 単独より有意に低い濁度を示した（$p<0.01$）（図 5 B）．濁度は細菌増殖と強い関連があることから [32]，(AuAg, 3RB)@nanogel は白色 LED による光励起によって高い抗菌性を示すことが明らかとなった．これは，上述（セクション 4.2）のように AuAg NCs と RB との間で RET が発生し，$^1O_2$ 生成量が増加したことに起因すると考えられた．$^1O_2$ をはじめとする活性酸素は，細胞膜や DNA を損傷させ殺菌効果をもつことが知られており [19]，$^1O_2$ 生成量が増えたことでより効率的に抗菌効果を得られると考えられる．また添加濃度の検討において，(AuAg, 3RB)@nanogel 濃度 5 μg/mL では濁度は低下し

なかったが，50 μg/mL では有意に低い濁度となり（$p<0.01$），有効濃度が存在することがわかった（図 5 C）．50 μg/mL はバイオフィルムに対しても有意な抗菌性を示しており（$p<0.01$），50 μg/mL が臨床使用の目安となることが示唆された．さらに，LED 光照射時間の検討において，光照射時間 30 秒から有意に濁度が低下し（$p<0.01$），90 秒後も低い濁度を維持していたことから（図 5 D），(AuAg, 3RB)@nanogel は $^1O_2$ によって容易に自己破壊されることはなく，$^1O_2$ を長時間にわたり発生し続ける可能性があると考えられた．

TEM 観察による形態学的評価の結果，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射を行ったサンプルでは，大きく変形したものや細胞膜が鮮明にみられない *S. mutans* を認め，これらの細菌体に近接した不定型の微粒子が多数観察された（図 6）．この微粒子はコントロール（添加なし）では観察されなかったことから，*S. mutans* に付着した(AuAg, 3RB)@nanogel であると考えられた．キトサンはカチオン性であるため，細菌に静電的に付着して抗菌性を示すことが知られており [23]，細菌への(AuAg, 3RB)@nanogel のデリバリー効果と，それによる効率的な $^1O_2$ による抗菌効果が得られている可能性が示唆された．

4.4 (AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィルム効果

自然界に存在する細菌は，浮遊菌の状態ではなく，バイオフィルムを形成している．バイオフィルムは抗菌薬が浸透しにくく，抵抗性を持つことが知られている [4]．歯科治療では，このバイオフィルム感染による疾患治療が主要であり，抗バイオフィルム性能を持つ治療法は臨床上とても有益である．そこで本研究では，(AuAg, 3RB)@nanogel の a-PDT による抗バイオフィルム効果を検討した．Biofilm formation assay では，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加と光照射により吸光度が有意に減少したことから（$p<0.01$）（図 7A），バイオフィルムの体積を減少させたことが示唆され，これはバイオフィルム中の細菌増殖並びに細胞外基質分泌を抑制したと考えられる．Biofilm viability assay においても，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射することにより吸光度の低下がみられ(図 7A)，バイオフィルム内 *S. mutans* の WST 活性が低い状態であることが示唆された．これらの結果から，(AuAg, 3RB)@nanogel の a-PDT 効果により，バイオフィルム内の細菌の増殖や代謝活性が抑制されたと考えられる．Viability assay はバイオフィルム内の生菌代謝活性を WST 法で測定する方法である．WST は，細胞内のエネルギー代謝活動に関与する補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドにより無色から橙色のホルマザンに還元され，このホルマザン色素量は生菌数に比例することがわかっており [33]，ホルマザン色素量を吸光度測定することで，生菌数を測定することができる．

さらにバイオフィルムを形成したディッシュ底面を観察することで，厚みのあるバイオフィルム最深部の状態を評価した．生死（LIVE/DEAD Baclight）染色した結果，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加しなかったサンプルでは，緑色蛍光色素で標識された生細菌が多く観察されたが，(AuAg, 3RB)@nanogel 添加と光照射を行うと赤色蛍光色素で標識された死細菌を多く認めた（図 7 B）．したがって，(AuAg, 3RB)@nanogel は細菌の増殖，代謝活性に

加え，バイオフィルム内の細菌に対する殺菌効果を持つことが示され，バイオフィルムの最深部まで効果的であったと考えられた．この(AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィルム特性は，ナノサイズ微粒子であること，そして静電的特性で説明できるであろう．バイオフィルムには栄養分の移動などに用いられる Water channel が備わっており [34,35]，ナノ微粒子である(AuAg, 3RB)@nanogel は水の移動とともに細菌のマイクロコロニー間を移動できるものと推測できる．さらにキトサンはカチオン性の高分子であり，アニオン性である細菌に静電的に付着することが知られ [23]，本研究でも TEM 観察において *S. mutans* への付着を示唆する結果を得た．また蛍光標識した(AuAg, 3RB)@nanogel をバイオフィルムに添加した結果，バイオフィルム最深部に緑色蛍光を認めたことから（図 7C），(AuAg, 3RB)@nanogel が *S. mutans* バイオフィルム内を移動でき，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．ナノゲルを用いた a-PDT が抗菌薬に代わる新しい抗バイオフィルム療法として確立できる可能性が示唆された．

4.5 細胞毒性評価

強い抗菌性材料は同時に細胞毒性を示すことも多いため，安全にヒトに応用できるか検討するために(AuAg, 3RB)@nanogel の細胞毒性評価を行った．本研究では WST 法を利用する WST-8 アッセイによって生細胞の代謝活性を測定した．光照射したサンプルでは，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加により吸光度の減少がみられた（$p<0.01$）（図 8A）．しかし，ビンキュリン-F-アクチン二重染色の蛍光観察の結果，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加し光照射を行ったサンプルと，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加せず光照射を行わなかったコントロールとでは，細胞形状に違いは見られなかった（図 8B）．また，LIVE/DEAD 染色では，(AuAg, 3RB)@nanogel を添加しても生細胞である緑色蛍光標識細胞が多く観察され，死細胞はほとんど観察されず，コントロールと同程度であった（図 8B）．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 $^1O_2$ によって，細胞の代謝活性が下がったためと考えられる．

一方で，光照射しなかったサンプルの WST-8 アッセイにおいては，(AuAg, 3RB)@nanogel の添加により吸光度の増加が有意に認められ（$p<0.01$）（図 8A），生細胞数が増加したと考えられた．キトサンは，甲殻類の外骨格や，細菌の細胞壁の構成要素として知られるキチンを脱アセチル化することにより得られる天然物由来の多糖類の一種である．生体により分解される性質をもつことから，生体材料の足場として使用されるなど，生体親和性の高い材料として知られている．以前の研究で，Yang らはキトサンゲルの凍結乾燥により多孔性のキトサンスキャフォールドを作製し，in vitro で NIH3T3 細胞がキトサンスキャフォールド上で良好な細胞接着，拡散をみせることを明らかにした [36]．今回の光照射しなかったサンプルにおいて(AuAg, 3RB)@nanogel 添加による吸光度の増加は，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要因の一つと考えられる．

5 結論

本研究では，a-PDT の新しい光増感剤として，(AuAg, 3RB)@nanogel を創製した．白色 LED 照射による光励起 (AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌・抗バイオフィルム性，細胞毒性を調査した．AuAg NCs はキトサンナノゲルとの複合化によって $^1O_2$ 生成量が増大し，さらに RB と複合化することで，AuAg NCs から RB への RET が発生し，さらなる $^1O_2$ 生成量の向上が示された．(AuAg, 3RB)@nanogel は口腔内細菌である *S. mutans* バイオフィルムへの浸透性を示し，光励起によって抗菌・抗バイオフィルム効果を示した．また，光励起 (AuAg, 3RB)@nanogel は NIH3T3 線維芽細胞に対して親和性を示した．したがって，(AuAg, 3RB)@nanogel と白色 LED 照射による a-PDT は，口腔内バイオフィルム感染症に効果的である可能性が示された．

6 参考文献

1) Griffin SO, Griffin PM, Swann JL, Zlobin N. Estimating rates of new root caries in older adults. J Dent Res. 2004 Aug;83(8):634-8. doi: 10.1177/154405910408300810.
2) Bignozzi I, Crea A, Capri D, Littarru C, Lajolo C, Tatakis DN. Root caries: a periodontal perspective. J Periodontal Res. 2014 Apr;49(2):143-63. doi: 10.1111/jre.12094.
3) Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017 May 1;41(3):276-301. doi: 10.1093/femsre/fux010.
4) Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001 Jan;9(1):34-9. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2.
5) Larsen T, Fiehn NE. Resistance of Streptococcus sanguis biofilms to antimicrobial agents. APMIS. 1996 Apr;104(4):280-4.
6) Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. J Dent Res. 2007 Aug;86(8):694-707. doi: 10.1177/154405910708600803. Erratum in: J Dent Res. 2007 Nov;86(11):1126.
7) Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. J Indian Soc Periodontol. 2011 Oct;15(4):323-7. doi: 10.4103/0972-124X.92563.
8) Lauro FM, Pretto P, Covolo L, Jori G, Bertoloni G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates. Photochem Photobiol Sci. 2002 Jul;1(7):468-70. doi: 10.1039/b200977c.
9) Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Feb;54(2):637-42. doi:

10.1128/AAC.00603-09.
10) Teixeira AH, Pereira ES, Rodrigues LK, Saxena D, Duarte S, Zanin IC. Effect of photodynamic antimicrobial chemotherapy on in vitro and in situ biofilms. Caries Res. 2012;46(6):549-54. doi: 10.1159/000341190.
11) Soria-Lozano P, Gilaberte Y, Paz-Cristobal MP, Pérez-Artiaga L, Lampaya-Pérez V, Aporta J, Pérez-Laguna V, García-Luque I, Revillo MJ, Rezusta A. In vitro effect photodynamic therapy with differents photosensitizers on cariogenic microorganisms. BMC Microbiol. 2015 Sep 26;15:187. doi: 10.1186/s12866-015-0524-3.
12) Parker S. The use of diffuse laser photonic energy and indocyanine green photosensitiser as an adjunct to periodontal therapy. Br Dent J. 2013 Aug;215(4):167-71. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.790. Erratum in: Br Dent J. 2013 Sep;215(5):223.
13) Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani A. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: A review of literature. Int J Mol Sci. 2015 Oct 13;16(10):24111-26. doi: 10.3390/ijms161024111.
14) Shitomi K, Miyaji H, Kawsaki H. Antibacterial/photosensitizing action of thiolate-protected metal nanoclusters and their application to antimicrobial photodynamic therapy. Acc Mater Surf Res. 2020;5(3): 68-79.
15) Kawasaki H, Kumar S, Li G, Zeng C, Kauffman DR, Yoshimoto J, Iwasaki Y, Jin R. Generation of singlet oxygen by photoexcited $Au_{25}(SR)_{18}$ clusters. Chem Mater. 2014;26(9):2777-88. doi: 10.1021/cm500260z.
16) Miyata S, Miyaji H, Kawasaki H, Yamamoto M, Nishida E, Takita H, Akasaka T, Ushijima N, Iwanaga T, Sugaya T. Antimicrobial photodynamic activity and cytocompatibility of $Au_{25}(Capt)_{18}$ clusters photoexcited by blue LED light irradiation. Int J Nanomedicine. 2017 Apr 4;12:2703-16. doi: 10.2147/IJN.S131602.
17) Okamoto I, Miyaji H, Miyata S, Shitomi K, Sugaya T, Ushijima N, Akasaka T, Enya S, Saita S, Kawasaki H. Antibacterial and antibiofilm photodynamic activities of lysozyme-Au nanoclusters/rose bengal conjugates. ACS Omega. 2021 Mar 24;6(13):9279-90. doi: 10.1021/acsomega.1c00838.
18) Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. J Phys Chem B. 2005 May 12;109(18):8570-3. doi: 10.1021/jp051163i.
19) Chilakamarthi U, Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. Chem Rec. 2017 Aug;17(8):775-802. doi: 10.1002/tcr.201600121.
20) Wang S, Wang Y, Peng Y, Yang X. Exploring the antibacteria performance of multicolor Ag, Au, and Cu nanoclusters. ACS Appl Mater Interfaces. 2019 Feb 27;11(8):8461-9. doi: 10.1021/acsami.8b22143.

21) Li X, Yeh YC, Giri K, Mout R, Landis RF, Prakash YS, Rotello VM. Control of nanoparticle penetration into biofilms through surface design. Chem Commun (Camb). 2015;51(2):282-5. doi: 10.1039/c4cc07737g.
22) Li J, Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. Eur Polym J. 2020;138(109984). doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109984.
23) Prashanth KVH, Tharanathan RN. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. Trends Food Sci Technol. 2007;18(3):117-31. doi: 10.1016/j.tifs.2006.10.022.
24) Yamamoto M, Shitomi K, Miyata S, Miyaji H, Aota H, Kawasaki H. Bovine serum albumin-capped gold nanoclusters conjugating with methylene blue for efficient $^1O_2$ generation via energy transfer. J Colloid Interface Sci. 2018 Jan 15;510:221-7. doi: 10.1016/j.jcis.2017.09.011.
25) Hikosou D, Saita S, Miyata S, Miyaji H, Furuike T, Tamura H, Kawasaki H. Aggregation/self-assembly-induced approach for efficient AuAg bimetallic nanocluster-based photosensitizers. J Phys Chem C. 2018;122 (23):12494-501. doi: 10.1021/acs.jpcc.8b02373.
26) Shitomi K, Miyaji H, Miyata S, Sugaya T, Ushijima N, Akasaka T, Kawasaki H. Photodynamic inactivation of oral bacteria with silver nanoclusters/rose bengal nanocomposite. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2020 Jun;30:101647. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101647.
27) Goswami N, Lin F, Liu Y, Leong DT, Xie J. Highly luminescent thiolated gold nanoclusters impregnated in nanogel. Chem Mater. 2016;28(11):4009-16. doi: 10.1021/acs.chemmater.6b01431.
28) Idris NM, Gnanasammandhan MK, Zhang J, Ho PC, Mahendran R, Zhang Y. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. Nat Med. 2012 Oct;18(10):1580-5. doi: 10.1038/nm.2933.
29) Pedersen K. Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. Appl Environ Microbiol. 1982 Jan;43(1):6-13. doi: 10.1128/aem.43.1.6-13.1982.
30) Sekar RB, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. J Cell Biol. 2003 Mar 3;160(5):629-33. doi: 10.1083/jcb.200210140.
31) Yuan H, Chong H, Wang B, Zhu C, Liu L, Yang Q, Lv F, Wang S. Chemical molecule-induced light-activated system for anticancer and antifungal activities. J Am Chem Soc. 2012 Aug 15;134(32):13184-7. doi: 10.1021/ja304986t.
32) Koch AL. Some calculations on the turbidity of mitochondria and bacteria. Biochim

Biophys Acta. 1961 Aug 19;51:429-41. doi: 10.1016/0006-3002(61)90599-6.
33) Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. Talanta. 1997 Jul;44(7):1299-305. doi: 10.1016/s0039-9140(97)00017-9.
34) Caldwell DE, Korber DR, Lawrence JR. Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology. Microb Ecol. 1992;12. doi: 10.1007/978-1-4684-7609-5_1.
35) Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol. 1994 Apr;176(8):2137-42. doi: 10.1128/jb.176.8.2137-2142.1994.
36) Yang B, Li X, Shi S, Kong X, Guo G, Huang M, Luo F, Wei Y, Zhao X, Qian Z. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. Carbohydrate Polymers. 2010;80(3):860-5. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.12.044.

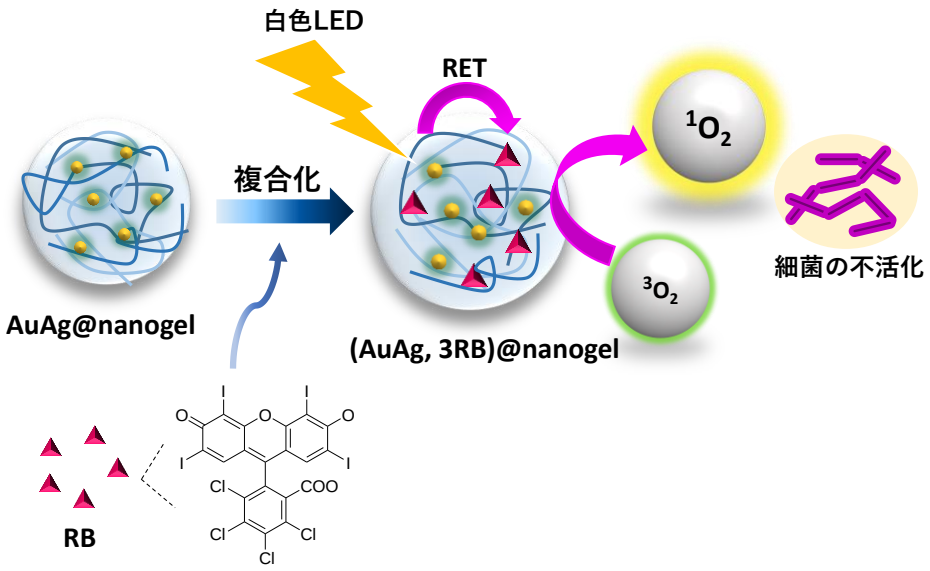

図 1　光励起（AuAg, 3RB)@nanogel の a-PDT メカニズム

略語の説明：LED, light emitting diode（発光ダイオード）；RB, ローズベンガル；RET, 共鳴エネルギー移動.

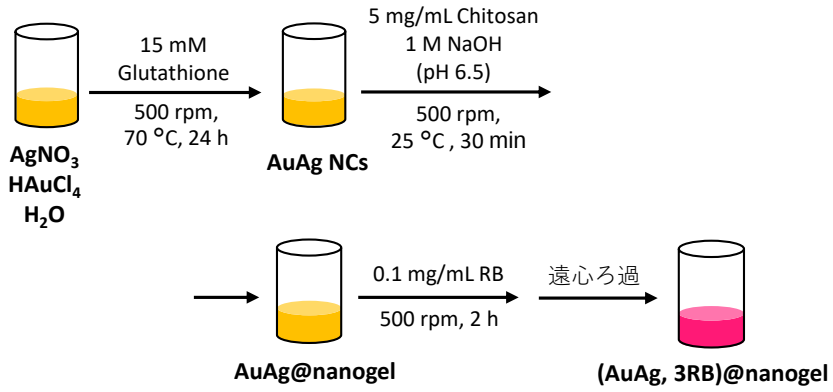

図 2　(AuAg, 3RB)@nanogel の合成手順

略語の説明：RB，ローズベンガル.

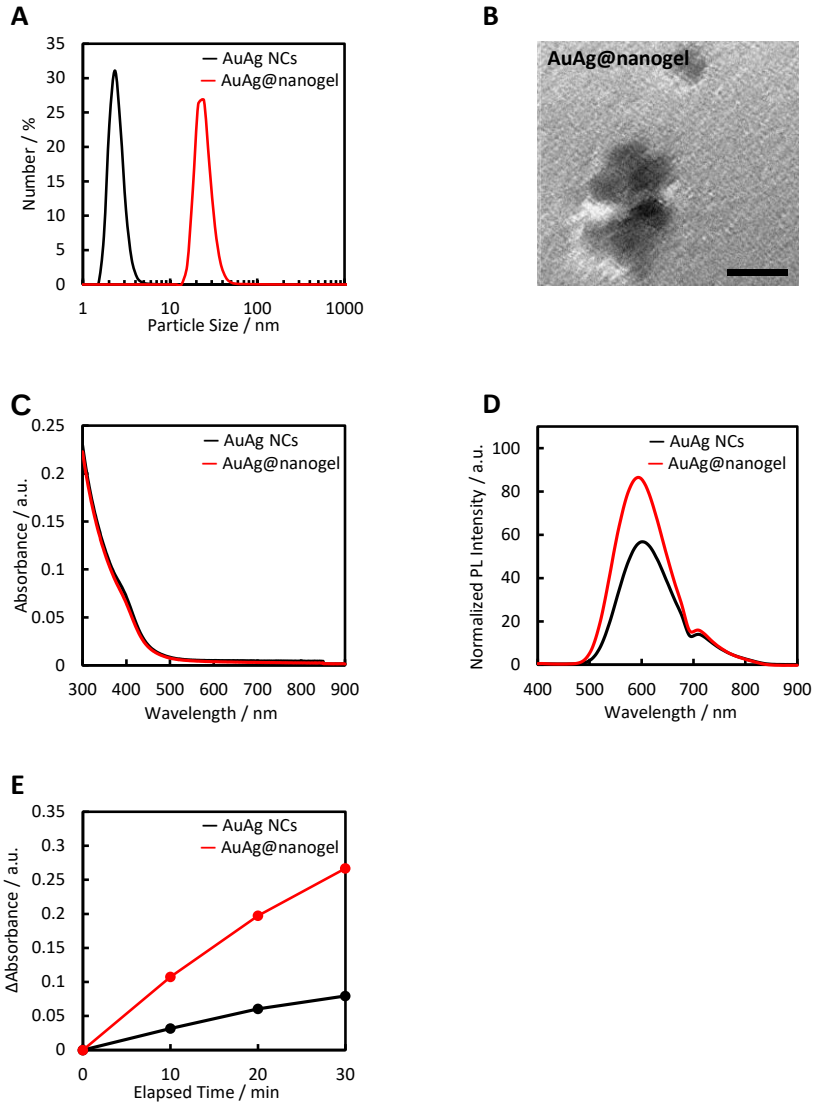

図 3　AuAg NCs と AuAg@nanogel の特性評価

（A）DLS 測定結果.（B）AuAg@nanogel の TEM 画像（スケールバー：50 μm）.（C）UV-vis スペクトル.（D）蛍光スペクトル.（E）ABDA 吸光度減少量.

略語の説明：a.u., arbitrary unit；RB, ローズベンガル；TEM, 透過型電子顕微鏡；UV-vis, 紫外可視分光法.

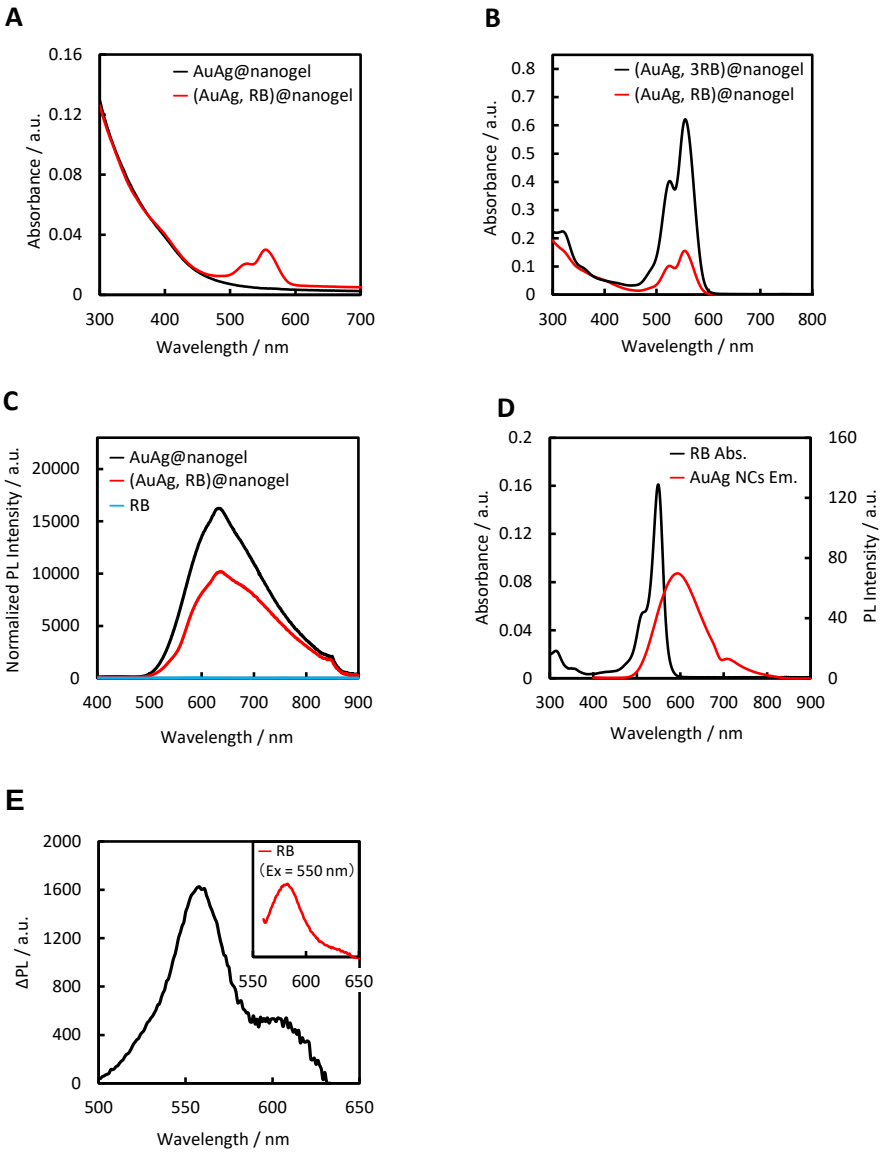

図 4　(AuAg, RB)@nanogel の特性評価

（A）AuAg＠nanogel と(AuAg, RB)@nanogel の UV-vis スペクトル．（B）(AuAg, RB)@nanogel と(AuAg, 3RB)@nanogel の UV-vis スペクトル. (C) AuAg@nanogel, (AuAg, 3RB)@nanogel, および RB の蛍光スペクトル．（D）RB の吸収スペクトルと AuAg NCs の蛍光スペクトル（励起波長 335 nm）．（E）AuAg@nanogel と(AuAg, 3RB)@nanogel の蛍光スペクトルの差スペクトル.

略語の説明：a.u., arbitrary unit；PL, フォトルミネッセンス；RB, ローズベンガル；UV-vis, 紫外可視分光法.

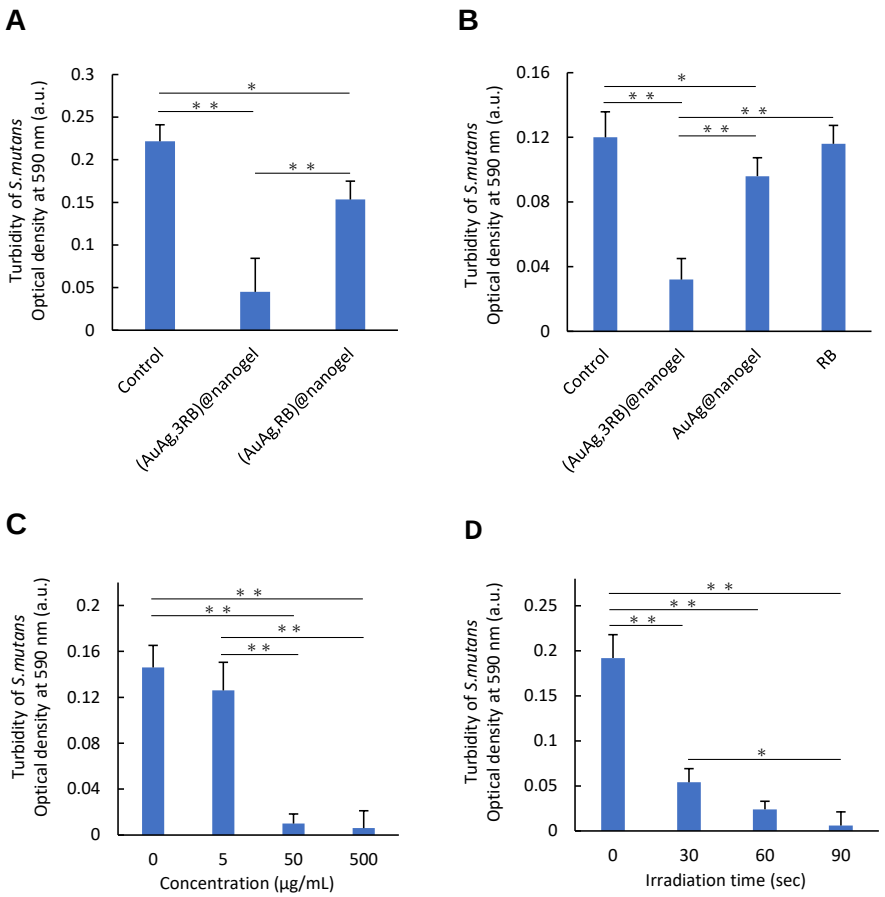

図 5　(AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌性評価

（A）コントロール（未添加），（AuAg, 3RB)@nanogel，（AuAg, RB)@nanogel 添加後の *Streptococcus mutans* 濁度（n=6）．（B）コントロール（未添加），(AuAg, 3RB)@nanogel, AuAg@nanogel，RB 添加後の *S. mutans* 濁度（n=5）．（C）（AuAg, 3RB)@nanogel の各添加濃度における *S. mutans* 濁度（n=5）．（D）(AuAg, 3RB)@nanogel の各光照射時間における *S. mutans* 濁度（n=5）．A，B，C，Dの計測値はすべて平均+標準偏差で示し，統計学的分析は one-way ANOVA と Tukey HSD post hoc test（*，p<0.05；**，p<0.01）で行った．

略語の説明：a.u.，arbitrary unit；RB，ローズベンガル．

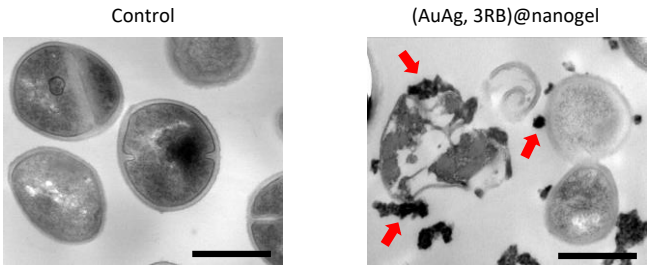

図 6　TEM 観察

コントロール（未添加）と(AuAg, 3RB)@nanogel 添加後の *Streptococcus mutans* の TEM 画像（スケールバー：500 nm）．(AuAg, 3RB)@nanogel を添加したサンプルでは *S. mutans* に近接する不定型の微粒子を認めた（矢印）．

略語の説明：RB，ローズベンガル；TEM，透過型電子顕微鏡．

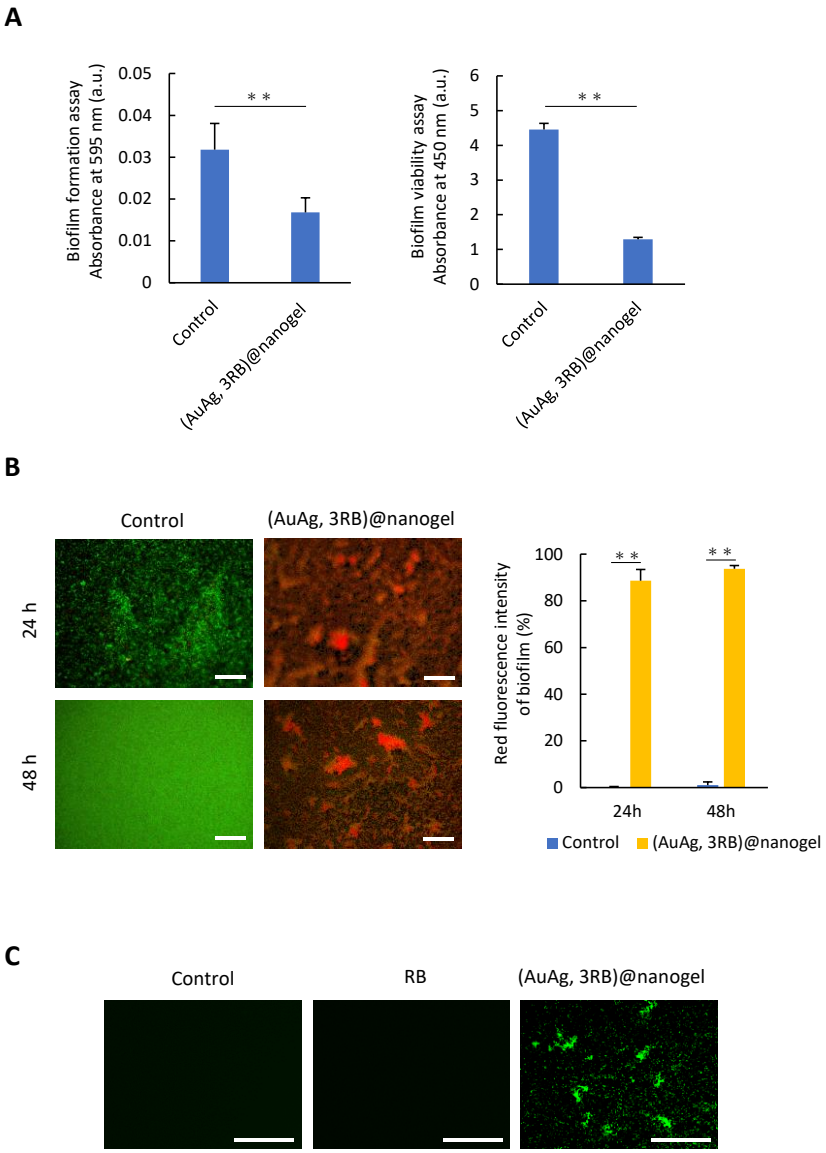

図 7　(AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィルム評価

（A）コントロール（未添加），(AuAg, 3RB)@nanogel 添加後の *Streptococcus mutans* バイオフィルムの Biofilm formation assay と Biofilm viability assay（n=5）．計測値はすべて平均+標準偏差で示し，統計学的分析は Student-T test（**，p<0.01）で行った．（B）コントロール（未添加），(AuAg, 3RB)@nanogel 添加後の *S. mutans* バイオフィルム最深部の LIVE/DEAD Baclight 染色像（左．緑色蛍光は生菌，赤色蛍光は死菌を示す．スケールバー：100 μm），および赤色蛍光強度測定結果（右，n=3）．計測値はすべて平均+標準偏差で示し，統計学的分析は Student-T test（**，p<0.01）で行った．（C）コントロール（未添加），NH_2 標識処理 RB，NH_2 標識（AuAg, 3RB)@nanogel 添加後の *S. mutans* バイオフィルム最深部の蛍光画像（スケールバー：50 μm）．緑色蛍光は NH_2 標識を示す．

略語の説明：a.u.，arbitrary unit；RB，ローズベンガル．

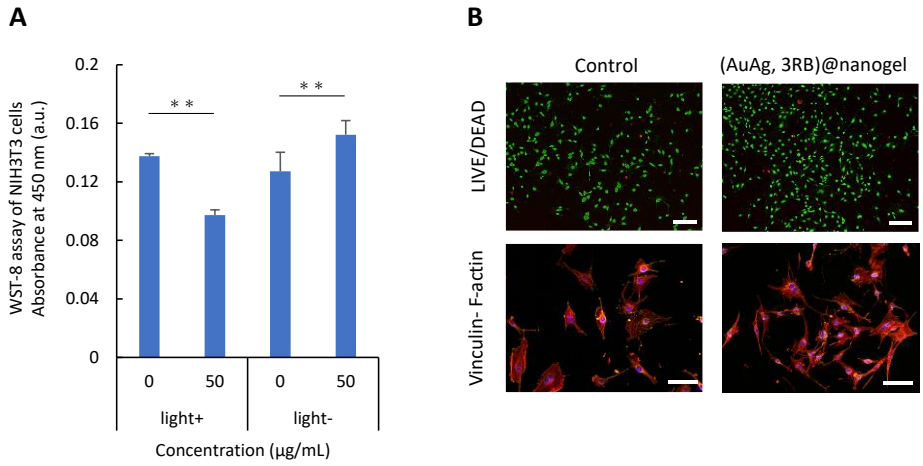

図 8　(AuAg, 3RB)@nanogel の細胞毒性評価

（A）NIH3T3 細胞の WST-8 アッセイ（n=5）．計測値はすべて平均+標準偏差で示し，統計学的分析は Student-T test（**，$p<0.01$）で行った．（B）コントロール（未添加），(AuAg, 3RB)@nanogel 添加後の NIH3T3 細胞の LIVE/DEAD Baclight 染色像（緑色蛍光は生細胞，赤色蛍光は死細胞を示す．スケールバー：200 μm）およびビンキュリン-F-アクチン染色（赤色蛍光は F-アクチン，緑色蛍光はビンキュリンを示す．スケールバー：100 μm）．

略語の説明：a.u.，arbitrary unit；RB，ローズベンガル；WST，水溶性テトラゾリウム塩．