

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10102

研究課題名(和文) 光殺菌と組織再生効果を併せ持つ新しい歯周病治療用ゲル剤の開発

研究課題名(英文) Development of the new gel agent for periodontal disease treatment combining photo-sterilization and tissue regeneration effects

研究代表者

加藤 昭人 (Kato, Akihito)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40507571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：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によって殺菌する治療法である。本研究では、光増感剤の金銀ナノクラスター、およびローズベンガルをカチオン性的高分子であるキトサンで包含したナノゲルを創製し、光線力学的特性を調べた。また、抗菌・抗バイオフィルム性を評価するとともに細胞毒性を評価した。その結果、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のゲル充填剤のベースとなるキトサンは、細胞に対するスキャフォールドとなり、生分解性を有するため、歯根膜細胞や骨細胞のゲル内への細胞浸潤後には吸収・分解され、治療後は患者元来の歯周組織となら変わりのない組織に置き換わると考えられる。ポケット内をデブライドメント後にゲル充填剤を満たし光照射を行うだけというシンプルな治療法により歯周病菌の殺菌と歯周組織再生を同時に促進できるというコンセプトは、今現在までになく、かつ患者への侵襲が少ないため高齢者や有病者など幅広い患者層への臨床応用が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Antimicrobial photodynamic therapy (a-PDT) is a treatment method that uses light irradiation and singlet oxygen generated by a photosensitizer to kill bacteria. In this study, gold and silver nanoclusters of photosensitizers and rose bengal nanogels containing chitosan, a cationic polymer, were prepared and their photodynamic properties were investigated. The photodynamic properties of the nanogels were investigated, and their antibacterial and antibiofilm properties and cytotoxicity were also evaluated. The results suggest that a-PDT using white LED irradiation may be effective against oral biofilm infections.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：抗菌光線力学療法 金ナノクラスター 一重項酸素 ローズベンガル色素 歯周病治療 キトサンゲル 共鳴エネルギー移動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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。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、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。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。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。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。

### 2. 研究の目的

抗菌の光線力学療法 (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。活性酸素は抗菌薬に比較して耐性菌の出現が少ないことから、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。a-PDT には一般にメチレンブルー、ローズベンガル (RB)、インドシアニングリーン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、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。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。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。これまでに、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が報告されている。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。その変化に必要な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 100nm 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。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。そこで我々は、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、本研究において、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。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。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、前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。これまでに、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生じたことが報告されている。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。また Ag による追加的抗菌能付与も期待される。(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。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。

### 3. 研究の方法

#### (1) キャラクタリゼーション

動的光散乱法 (DLS) 測定は, Zetasizer nano ZSP 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 を使用し, 加速電圧 120kV 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) 分光光度計を用いて測定した. 蛍光スペクトルは, FP-6200 fluorescence spectrophotometer を用いて測定した.

#### (2) $^{10}_2$ 生成効率の評価

9,10-anthracenediyl-bis (methylene) dimalonic acid (ABDA) の  $^{10}_2$  酸化による吸光度の減少を調べることで,  $^{10}_2$  生成能を評価した. AuAg NCs および AuAg@nanogel に ABDA/N,N-dimethylformamide 混合溶液 0.5mM 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.

#### (3) AuAg@nanogel と RB の複合化

AuAg@nanogel に RB 水溶液 0.1mg/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, 500rpm で 2 時間攪拌後, 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. 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, 335nm 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.

#### (4) (AuAg, 3RB)@nanogel の抗菌性評価

(AuAg, RB)@nanogel (最終濃度 50 $\mu$ g/mL), (AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 50 $\mu$ g/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に播種した. 各ウェルに白色 LED を 2cm 上方から 1 分間照射し, 37 $^{\circ}$  で 24 時間嫌気培養した. 培養後, 可視光度計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 $\mu$ g/mL), AuAg@nanogel (最終濃度 50 $\mu$ g/mL), RB (最終濃度 1.36 $\mu$ g/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 2cm 上方から 1 分間照射後, 37 $^{\circ}$  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 $\mu$ g/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 2cm 上方から 1 分間照射し, 37 $^{\circ}$  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 $\mu$ g/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 2cm 上方から 0, 30, 60 あるいは 90 秒間照射し, 37 $^{\circ}$  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 $\mu$ g/mL) を *S. mutans* 懸濁液に添加し, 白色 LED で 1 分間光照射した. 0.1M 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 (pH7.4) 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, 超薄切片を作製し, TEM (加速電圧 80kV) にて観察分析を行った.

#### (5) (AuAg, 3RB)@nanogel の抗バイオフィーム性評価

Biofilm formation assay kit を用いて, 抗バイオフィーム性を評価した. *S. mutans* 懸濁液を 180 $\mu$ L/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* のバイオフィームを形成させた. 続いて (AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 50 $\mu$ g/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* のバイオフィー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* のバイオフィー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 2cm 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で各ピン表面のバイオフィーム量を, マイクロプレートリーダーにて 595nm の吸光度で測定した. Biofilm viability assay kit を使用して, バイオフィー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* のバイオフィームを形成させ, (AuAg, 3RB)@nanogel (最終濃度 50 $\mu$ g/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 2cm 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 $^{\circ}$  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リーダーにて 450nm 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に *S. mutans* 懸濁液を播種し, 37 $^{\circ}$  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 $\mu$ g/mL)を滴下し,2cm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を用いてバイオフィルムを染色した。ガラススペースディッシュの底面(バイオフィルムの最下層)を,蛍光顕微鏡で観察した。蛍光強度は,ImageJソフトウェア(ver1.41)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-NH2)を用いて(AuAg,3RB)@nanogel中のキトサンを標識した。ガラススペースディッシュに*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(1.0mg/mL)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を添加(0.9mg/mL)したものをコントロールとした。

#### (6) (AuAg,3RB)@nanogelの細胞毒性評価

マウス線維芽細胞(NIH3T3)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 $\times$ 10<sup>4</sup>に調整したNIH3T3細胞と,培地(MEM alpha),10%ウシ胎児血清(FBS),1%抗生物質(ペニシリン-ストレプトマイシン)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 $\mu$ g/mL)を添加した。この懸濁液を96穴マイクロプレートに200 $\mu$ L/wellずつ分注した。各ウェルに2cm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<sub>2</sub>下にて24時間培養した。その後,WST-8測定キットを使用し,マイクロプレートリーダーを用いて,450nm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,ピンキュリン/F-アクチン二重染色を行った。2 $\times$ 10<sup>3</sup>のNIH3T3細胞をガラススペースディッシュに播種した。(AuAg,3RB)@nanogel(最終濃度50 $\mu$ g/mL)を添加し,白色LEDを2cm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<sub>2</sub>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,リン酸緩衝液で希釈した0.5%Triton X-100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,ピンキュリンモノクローナル抗体,蛍光標識ファロイジン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。

#### (7) 統計分析

計測値から平均値 $\pm$ 標準偏差を算出後,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を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) (AuAg, RB)@nanogelの光線力学的特性評価

AuAg NCsおよびAuAg@nanogelの特性評価結果を示す。DLS測定の結果,AuAg NCsは平均粒径2.2nm,AuAg@nanogelは平均粒径28.2nmであり,TEM像で類円形のAuAg@nanogelが確認された。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。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。ABDA(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>と選択的に反応)プローブ法を用いて<sup>1</sup>O<sub>2</sub>検出を行った結果,ABDA由来の吸収ピークである378nm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<sup>1</sup>O<sub>2</sub>生成能が示された。RB複合化後の特性評価結果を示す。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565nm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。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500~600nmでのピークが上昇した。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=335.2nm)を取得した。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500~600nm域で重なっていた。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(335nm)で観測された。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。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。

#### (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。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,3RB)@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,3RB)@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。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。(AuAg,3RB)@nanogel の最終濃度  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  では、 $0\mu\text{g}/\text{mL}$  (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  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  では有意に低い濁度となった ( $p < 0.01$ )。最終濃度  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  は  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  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。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。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) 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 ( $p < 0.01$ )。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。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 ( $p < 0.01$ )。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。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。

### (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 ( $p < 0.01$ )。(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、ピンキュリン-F-アクチン二重染色では、両者とも F-アクチン、ピンキュリンの発現を示し、細胞伸展を認めた。

### (5) まとめ

本研究では、a-PDT の新しい光増感剤として、(AuAg,3RB)@nanogel の創製と白色 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  $^1\text{O}_2$  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  $^1\text{O}_2$  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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okamoto Ichie, Miyaji Hirofumi, Miyata Saori, Shitomi Kanako, Sugaya Tsutomu, Ushijima Natsumi, Akasaka Tsukasa, Enya Satoshi, Saita Satoshi, Kawasaki Hideya	4. 巻 6
2. 論文標題 Antibacterial and Antibiofilm Photodynamic Activities of Lysozyme-Au Nanoclusters/Rose Bengal Conjugates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 9279 ~ 9290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c00838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shitomi Kanako, Miyaji Hirofumi, Miyata Saori, Sugaya Tsutomu, Ushijima Natsumi, Akasaka Tsukasa, Kawasaki Hideya	4. 巻 30
2. 論文標題 Photodynamic inactivation of oral bacteria with silver nanoclusters/rose bengal nanocomposite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 101647 ~ 101647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2019.101647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤昭人, 宮治裕史, 齋田慧, 川崎英也
2. 発表標題 合金クラスター / ローズベンガル含有キトサンナノゲルの抗菌性評価
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院歯学研究院 歯周病再生治療研究班 研究紹介 光殺菌治療への金属ナノクラスターの応用  
<https://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/newpage22.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川崎 英也  (Kawasaki Hideya)  (50322285)	関西大学・化学生命工学部・教授    (34416)	
研究分担者	宮治 裕史  (Miyaji Hirofumi)  (50372256)	北海道大学・大学病院・講師    (10101)	
研究分担者	竹生 寛恵  (Takefu Hiroe)  (40609103)	北海道大学・大学病院・助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関