

Accounts of Materials & Surface Research

Antibacterial/Photosensitizing Action of Thiolate-protected Metal Nanoclusters and Their Application to Antimicrobial Photodynamic Therapy

Kanako Shitomi,¹ Hirofumi Miyaji,^{2,*} Hideya Kawasaki^{3,*}

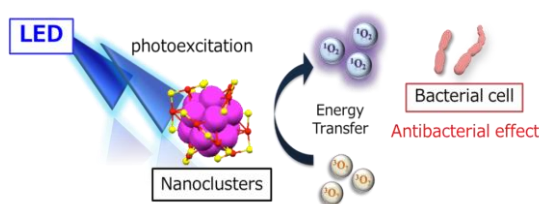
¹ Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido 1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

² Department of Periodontology and Endodontology, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University, N13 W7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

³ Department of Chemistry and Materials Engineering, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-8689, Japan

miyajji@den.hokudai.ac.jp(H.M):hkawa@kansai-u.ac.jp(H.K)

Water-soluble Au nanoclusters (NCs) show potential for medical applications. More recently, the Au NCs have been considered as promising photosensitizers for photodynamic therapy (PDT) because of good biocompatibility, photosensitization under near-infrared light irradiation, good resistance to photobleaching, and target specificity via surface modification. The present article primarily focuses on photosensitization for biomedical therapy applications of Au NCs. The antibacterial action of Ag NCs is also described.



Keyword: Gold nanoclusters; Silver nanoclusters; Antibacterial photodynamic therapy; Singlet oxygen; Photosensitizers

Kanako Shitomi, Assistant Professor of the Department of Oral Rehabilitation School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido since 2020. She received Doctor degree in dentistry in 2019 from Hokkaido University. She worked as a researcher in 2019 and moved to Health Sciences University of Hokkaido. Her current research interests include development of treatment methods for periodontal disease by antibacterial sonodynamic therapy.



Hirofumi Miyaji, Lecturer of the Department of Periodontology and Endodontology, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University, received Doctor degree (2001) in dentistry from Hokkaido University. Since then he has worked at Hokkaido University Hospital as a dentist. His current research interests include the assessments of biomaterials for dental therapy in the field of translational research.



Hideya Kawasaki, Professor of the Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University, received Doctor degree (1996) in science from Kyushu University. Since 1999, he worked as an assistant professor at Kyushu University. In 2006, he moved to be an Associate Professor at the Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University. His current research interests include synthesis of photo-functionalized metal nanoclusters and their applications for catalysis, sensing, and biomedical fields.



チオラート保護金属ナノクラスターの抗菌/光増感作用と 抗菌光線力学療法(α -PDT)への応用

蒔 佳奈子¹・宮治 裕史^{2*}・川崎 英也^{3*}

¹北海道医療大学歯学部・²北海道大学大学院歯学研究院・³関西大学化学生命工学部

1. はじめに

数個から百個程度の金原子の集合体が有機配位子で表面保護された直径約 1-2 nm の金ナノ粒子は、“有機配位子保護金ナノクラスター”と呼ばれている。有機配位子保護金ナノクラスターは、金属核による顕著な量子サイズ効果に加えて、金属核と構造・物性を異にする有機配位子が分子レベルで複合化している。そのユニークな構造と電子状態から直径約 3 nm 以上の金ナノ粒子とは異なる新規な構造・物性が報告されている¹⁻⁵。特に、チオラート保護金ナノクラスターは、原子数レベルでサイズ制御された合成ができるようになり、原子数が数個異なるだけで新たな構造や物性が発現することが見いだされていることから、新規の機能性ナノ物質として注目されている。チオラート保護金ナノクラスターは、金ナノ粒子の合成法で利用されている湿式法、つまり、保護剤となる有機配位子(有機チオールなど)と金イオン(塩化金酸など)を含む溶液に還元剤(水素化ホウ素ナトリウムなど)を添加し、金イオンを還元剤で還元することによって合成される^{1,4}。しかし、この段階ではサイズの異なる様々な金ナノクラスターの混合物になっているため、原子数レベルでサイズの揃った金ナノクラスターを得るには、サイズ排除クロマトグラフィーやポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサイズ分別、及びサイズ選択的沈殿法(サイズによって金ナノクラスターの溶媒への溶解性がわずかに異なることを利用)を利用する。また、大過剰の有機チオールの共存下で金ナノクラスターを化学エッジングさせる過程でサイズによる安定性の違いを利用して特定のサイズの新規な金ナノクラスターを得る方法(Size-focusing 法)がある¹⁻⁴。この方法で $\text{Au}_{25}(\text{SR})_{18}$, $\text{Au}_{38}(\text{SR})_{24}$, 及び $\text{Au}_{144}(\text{SR})_{59}$ などの組成をもつ安定な金ナノクラスターが得られている(SR=有機チオラート)^{1,4}。

近年では、チオラート保護金ナノクラスターを別の有機チオラートでリガンド置換する、或いはチオラート保護金ナノクラスター間の反応を利用して特性のサイズの新規な金ナノクラスターを合成するなど、新規合成法も報告されている¹⁻⁵。これらチオラート保護金ナノクラスターの化学組成は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)やエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)などのソフトイオン化を用いた質量分析法で同定される。また、単結晶 X 線構造解析によりチオラート保護金ナノクラスターの詳細な幾何構造が明らかになっている。例えば、単結晶 X 線構造解析により $\text{Au}_{25}(\text{SR})_{18}$ では、正二十面体構造の Au_{13} コアが 6 個の「—SR—Au—SR—Au—SR—」オリゴマーによって保護されていることが明らかにされた⁶。

金ナノ粒子が溶液に分散した金コロイドは赤く着色しており、ステンドグラスを赤く着色する目的で古くから使われてきた。金コロイドが赤色に呈するのは、光の「電場振動」にナノ粒子の「自由電子の振動」が共鳴することで起こる表面プラズモン共鳴(局在プラズモン共鳴)によるものである。他方、電子のフェルミ波長と同程度(2nm 程度)まで小さくなった金ナノクラスターでは、量子サイズ効果により電子のエネルギー準位が離散的となり(準位間のエネルギー差 $> kT$)、表面プラズモン共鳴は観測されない。この離散的なエネルギー準位をもつ電子構造の影響で金ナノクラスターは、HOMO-LUMO 遷移、発光、触媒、レドックス反応といった金ナノ粒子では観測されない興味深い物性が現れる¹⁻¹²。これらの電子構造は、チオラート保護金ナノクラスターの化学組成(構成原子数、有機配位子、幾何構造)に強く依存する。このことから、原子数レベルでサイズの揃った金ナノクラスターを得ることが重要となる。

チオラート保護金ナノクラスターのユニークな物性から、近年、触媒(Catalysis)、電子デバイス(Electronics)、及び医療 (Biomedical)などの応用展開がなされている。我々は、これまでに水分散性のチオラート保護金(及び銀)ナノクラスターの光機能に着目し、研究を進めてきた。特に、親水性配位子による保護されたチオラート保護金ナノクラスターは、水への高い分散性、低毒性、機能性官能基による表面修飾が可能のため、医療分野での応用が期待される。本稿では、水分散性のチオラート保護金(及び銀)ナノクラスターの医療応用として、抗菌/光増感作用と抗菌光線力学療法(a-PDT)への応用について紹介する(Figure 1)。

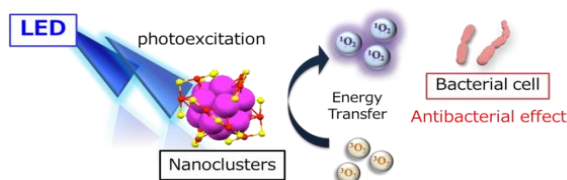


Figure 1. Photosensitizing action of gold nanocluster and PDT application

2. 光増感剤と活性酸素の生成

光増感剤は光を吸収すると、基底一重項状態(S_0)から励起一重項状態(S_1)に遷移し、 S_1 から系間交差(ISC)を経て三重項状態(T_1)へと変わる。 T_1 状態を有する光増感剤は、2つの特徴的なプロセスを経て減衰する(Type I と Type II, Figure 2)^{13,14}。Type I では、励起された光増感剤は、基質への1電子移動を経て、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)やスーパーオキシド(O_2^-)などの活性種を生成する。これらの反応性の高い活性種は、さらに脂質、タンパク質、およびDNAなどの生体分子と反応して、その構造および機能を改変する。他方、Type II では、光増感剤から酸素へのエネルギー移動を介して活性の高い一重項酸素($^1\text{O}_2$)が生成され、細胞および核膜の主成分である生体分子と反応する。以上の Type I 及び Type II を介した $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、及び $^1\text{O}_2$ のような活性種(活性酸素)は、PDT 効果の鍵となる。特に、 T_1 状態の高い量子収率をもつ光増感剤は、 T_1 状態におけるエネルギーおよび電子移動の確率が増えるため、PDT

に有効な光増感剤となる。生体環境においては、 $^1\text{O}_2$ の寿命は数百ナノ秒程度であり、光増感剤によって生成した $^1\text{O}_2$ は、光増感剤自体から距離(0.02~0.15 μm)内の生体分子に影響を与えることができる。他方、 $\cdot\text{OH}$ は反応性が高く、5 nm 未満の範囲内で生体分子と相互作用し、その効果は生成された場所に限定される。

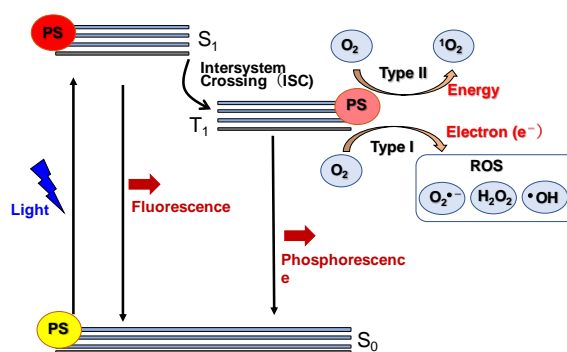


Figure 2. Schematic Jablonski's diagram of Type I and Type II reactions in PDT. PS: photosensitizer.

3. 金/銀ナノクラスターのバイオメディカル応用

水分散性金ナノクラスターは、その有機配位子として、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、デオキシリボ核酸(DNA)などの水溶性配位子が用いられ、親水性官能基(例:-COOH, -OH、および-NH₂など)を持つチオラート配位子で金属コアが覆われている¹⁵。これら水分散性金ナノクラスターは、高い光安定性、低毒性、および発光を含むユニークな物理化学的特性を示す。更に、水分散性金ナノクラスターの粒径は2nm以下と非常に小さいため細胞への浸透性や優れた体外排出特性を示す(3nm以上のナノ粒子では肝臓等の臓器に蓄積する場合がある)^{16,17}。このような利点から、水分散性金ナノクラスターは、バイオイメージング、バイオセンシング、ドラッグデリバリー、診断および治療用途などの生物医学分野での有用なナノ物質として期待されている^{4,5,13}。また、近年、銀特有の抗菌作用を利用した銀ナノクラスター抗菌剤が安全性と抗菌性を両立する新規銀系抗菌剤として注目されている。

4. 金ナノクラスターの光増感作用と PDT PDTとは、光と色素(光増感剤)の併用による光化学反応を利用した治療法である。PDT は早期ガンの治療や感染症の光治療に用いられている。治療法としては、悪性腫瘍などの患部に光に反応する性質のある物質(光増感剤)を集積し、そこに可視光レーザーを照射することで、光増感剤に光化学反応を引き起こして「活性酸素(一重項酸素)」が発生し、その活性酸素の酸化力ががん細胞を変性・壊死させてがん治療を行う^{5,13,14}。また、感染菌を活性酸素により殺菌して感染症を治療することもできる(a-PDT)。PDT の利点としては悪性腫瘍を狙い撃ちにするため、正常な細胞を傷つけるリスクが少ないという点、また一般的な高出力のレーザー治療とは異なり、手をかざしてもほとんど熱さを感じない程度のレーザー光を用いるため、患者への負担が少ないなどの特徴がある。しかし、現在、PDT に利用されている有機系光増感剤は、幾つかの課題がある。1. 低い光安定性、2. 毒性、3. 会合して活性を失う、4. 生体液中で還元され活性を失う、などがある。

我々は、チオラート保護金ナノクラスターが PDT 効果を示す光増感剤であることを見出した。金ナノクラスター光増感剤は、生体透過性の高い近赤外励起可能、高い光安定性、低毒性、会合による失活がなく、生体液中でも安定である利点がある。

水溶性チオラートであるカプトブリン(Capt)で保護された金原子 25 量体クラスター($\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$)に可視光/近赤外光を照射することで一重項酸素($^1\text{O}_2$)を生成することを見出した^{18,19}。その $^1\text{O}_2$ 生成は、 $^1\text{O}_2$ 検出プローブ(DPBFとADBA)の吸光度減少、及び $^1\text{O}_2$ からのリン光観測が実験的証拠となった¹⁹。

$\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の PDT 効果を検証するため、がん細胞の一種である Hela 細胞に対する PDT 効果を調べた。808nm の近赤外光を照射(30 min)することで Hela 細胞が破壊されることが確認された(細胞生存率 Viability 50%以下)。他方、光照射なしでは、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ 存在下でも Hela 細胞は正常であった。また、 $^1\text{O}_2$ の失活剤

であるヒスチジンを添加すると、Hela 細胞に対する $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の PDT 効果は減少した(Figure 3)。以上の結果は、近赤外光照射下で $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ により生成した $^1\text{O}_2$ が Hela 細胞にダメージを与えたことを示す。

$\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の HOMO-LUMO ギャップが $^1\text{O}_2$

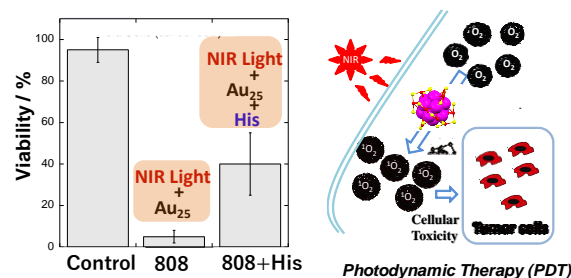


Figure 3. PDT effect of gold nanoclusters by near infrared excitation on Hela cells.

のエネルギー(0.97eV)よりも大きい(1.3eV)こと、 T_1 状態の高い量子収率、及び酸素吸着サイトが $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ に存在することが、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ から酸素分子へのエネルギー移動が促進され、 $^1\text{O}_2$ 生成の重要な要因であると考えられる¹⁹。

$\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の口腔内細菌 *Streptococcus mutans* への影響を TEM 観察、及び LIVE/DEAD 染色により調べた²⁰。ミュータンス菌(*Streptococcus mutans*)は、グラム陽性で通性嫌気性のレンサ球菌の一種であり、ヒトの口腔内にも存在し、う蝕(虫歯)の原因菌のひとつである。TEM 観察(Figures 4C and 4D)の矢印は菌の破壊を示す)、LIVE/DEAD 染色(緑色 Propidium iodide:生菌、赤色 SYTO 9:死菌)によって、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ 存在下、1 分間の青色 LED 照射によって、*Streptococcus mutans* の死菌が多く観測され、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ による a-PDT 効果が確認された(Figure 4)。更に $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の細胞毒性評価のため、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ 存在下における細胞増殖能、乳酸脱水素酵素(LDH)活性を 2 日後、4 日後、6 日後に調べた。細胞毒性は、2 日の暴露では細胞毒性は低いが、4 日以上暴露は細胞毒性が増加することが観測された。しかし、 $\text{Au}_{25}(\text{Capt})_{18}$ の細胞毒性は水溶性光増感剤として知られるメチレンブルーに比べると極

めて低いことが細胞増殖能試験から確認された。

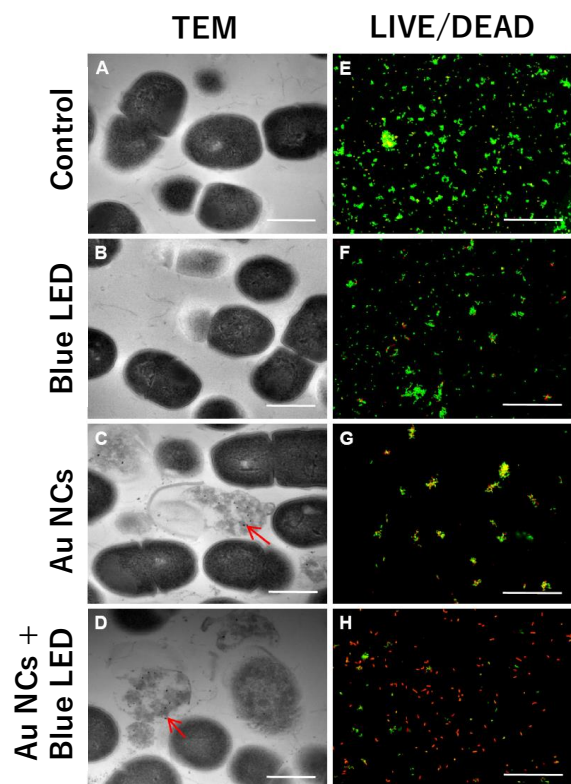


Figure 4. (A)~(D) TEM images of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) after 48 h incubation, and (E)~(H) LIVE (green)/DEAD (red) results of *S. mutans* after 24 h incubation.

5. キトサン/合金ナノクラスター複合ナノゲルの光増感作用と PDT 活性

金属ナノクラスターとカチオン性高分子との複合化により、クラスター表面の有機配位子の分子運動を抑制することで、励起状態における熱的失活過程の抑制することを検討した²¹。これにより、金属ナノクラスターの三重項励起状態へのエネルギーパスが増大し、酸素へのエネルギー移動確率が向上することで、¹O₂ 生成能が増大することを期待した。ここでは、グルタチオン保護金/銀合金ナノクラスターとキトサンとの複合ナノゲル (AuAgNCs@nanogel) を調製した (Figure 5)。

AuAgNCs@nanogel の粒径は、TEM 及び動的散乱 (DLS) により、約 30-50nm 程度あった。グルタチオン保護金ナノクラスター (SG-AuNCs)、グルタチオン保護金銀合金ナノクラス

ター (SG-AuAgNCs)、及び AuNCs AuAgNCs@nanogel の蛍光寿命を測定した。SG-Au NCs の平均蛍光寿命は 1.3 μs であり T₁ 状態の存在によりマイクロ秒オーダーの長い蛍光寿命を示した。他方、SG-AuAg NCs 及び AuAgNCs@nanogel ではそれぞれ、1.5 μs、2.5 μs と蛍光寿命が増大し、熱的失活過程の抑制が示唆された。

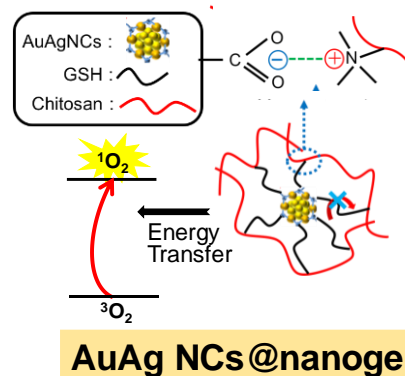


Figure 5. Self-Assembly-Induced Approach for Efficient AuAg Bimetallic Nanocluster-Based Photosensitizers

これら金属ナノクラスターについて、白色 LED 光照射時の ¹O₂ 生成能を調べた。光照射による ¹O₂ 生成能は、9,10-Antracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) の ¹O₂ 酸化による吸光度減少 (ΔAbs.) により評価した。ここでは、歯周病治療に向けた PDT を指向して、治療現場でも安全かつ簡便に使用できる白色 LED を用いた。いずれの試料においても、白色 LED 光照射により ¹O₂ を生成し ABDA の吸光度減少を示し (Figure 6a)、ΔAbs. より、AuAgNCs@nanogel の ¹O₂ 生成能は、SG-Au NCs の約 4 倍まで増大することが明らかとなった (Figure 6b)。

口腔内細菌 (*Streptococcus mutans*) に対する AuAgNCs@nanogel の a-PDT 効果を調べた。24 時間培養後、1 分間の短時間の白色 LED 照射下での *Streptococcus mutans* に対する a-PDT 活性を濁度測定法で評価した (Figure 7a)。この方法は、懸濁液中の細菌の経時的な成長を細菌の濁度測定により

評価する。白色 LED を照射していない懸濁液を対照として使用した。AuAgNCs@nanogel (金濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下において、白色 LED 照射下では、細菌懸濁液の濁度が劇的に低下し、LIVE/DEAD 染色によって(緑色:生菌, 赤色:死菌), 死菌が増加していることが示された(Figures 7b and 7c).

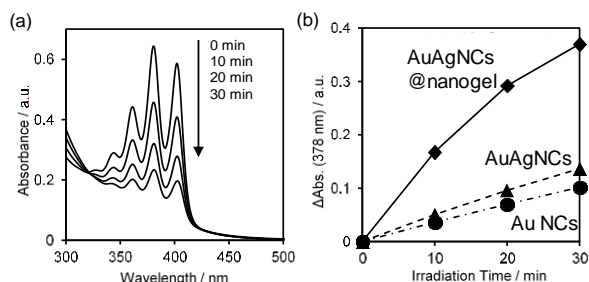


Figure 6. (a) UV-vis spectra of ABDA and (b) ABDA absorbance at 378 nm (ΔAbs) as a function of the irradiation time in the presence of NCs under white LED irradiation

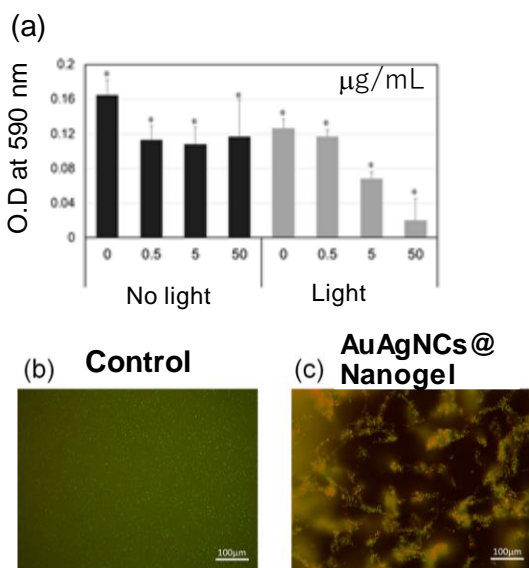


Figure 7. (a) Antimicrobial effects of AuAg NCs@nanogel at different Au concentrations on *Streptococcus mutans* (ATCC 35668) under white LED irradiation for 1 min after 24 h incubation ($n = 5$, mean \pm standard deviation). $*P < 0.05$ vs other groups. Fluorescence examination of the labeled *Streptococcus mutans* with the LIVE/DEAD kit after white LED irradiation for 1 min (b) in the absence of AuAg NCs@nanogel (control) and (c) in the presence of AuAg NCs@nanogel (the concentration of gold, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

6. アルブミン保護金ナノクラスター/メチレンブルー複合体の光増感作用と PDT 活性

先述した通り、有機系光増感剤は 1. 低い光安定性, 2. 毒性, 3. 会合して活性を失う, 4. 生体液中で還元され活性を失うなどの課題がある。この課題解決に向けて、有機系光増感剤をタンパク質と複合化させて安定性を向上させると毒性を低下させ、更に表面修飾による病変患部へのターゲティング試みがなされている。しかし、有機系光増感剤がタンパク質と複合化することで、有機系光増感剤の $^1\text{O}_2$ 生成能が低下する問題がある。我々は、有機系光増感剤-タンパク質複合体に、更に金ナノクラスターを複合化した光増感剤を提案した^{22,23}。ここでは、アルブミン(Alb)-メチレンブルー (MB, 光増感剤) — 金ナノクラスター(Au NCs)の 3 元系(Alb-MB-AuNCs)複合体を紹介する(Figure 8)。Alb-MB-AuNC 複合体では、金ナノクラスターからメチレンブルーへのエネルギー移動より、 $^1\text{O}_2$ 生成能の向上を意図して設計した。

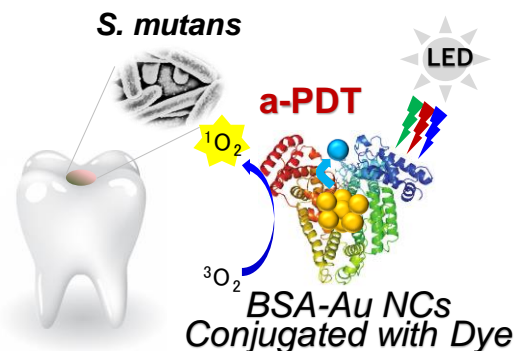


Figure 8. Enhanced a-PDT Activity of Alb-MB-Au NCs nanocomposite via FRET process

Alb-AuNCs の合成法は以下の通りである。10 mM HAuCl_4 水溶液 5 mL と 50 mg/mL Alb (牛血清アルブミン) 水溶液 5 mL を混合し、37 $^\circ\text{C}$ 800 rpm で 3 分間攪拌した。続いて、1 M NaOH 水溶液 1 mL 加え、8 時間攪拌を続けた。得られた Alb-AuNCs 水溶液を透析膜 (MWCO : 3500) に移し、1 日透析を行った。透析後、Alb-AuNCs 水溶液を 0.22 μm のシリンジフィルターで濾過し、減圧乾燥することで固体状の Alb-

AuNCsを得た。次に、Alb-AuNCsとMBが任意の割合で含む混合水溶液を調製し、これを2時間攪拌した。この溶液を遠心式限外ろ過フィルター (Ultracel:3K) を用いて限外濾過を行い (回転速度:14000 rpm, 回転時間:10 min), 未反応のMBを除去し、Alb-MB-AuNC複合体を得た。

Alb-MB-AuNCs複合体の紫外可視吸収スペクトルでは、AuNCsとMBそれぞれ特有の吸収を示すことから、複合体の形成を確認した (Figure 9a)。AuNCsの蛍光ピークとMBの吸収ピークが重なっていることから (Figure 9b)、AuNCsをドナー、MBをアクセプターとするAuNCsからMBへのエネルギー移動 (フェルスター共鳴エネルギー移動) の可能性が示唆された。このエネルギー移動は、複合体におけるAuNCsの蛍光強度減少と同時に起こるMBの蛍光強度増大、ならびにAuNCsの蛍光寿命が短くなることから示された。Alb-MB-AuNCs複合体におけるエネルギー移動効率、AuNCsとMBが1:1の複合体で約19%であった。

AuNCsとMBの複合体 (AuNCs:MB = 3:1, 1:1, 0.3:1, 0.1:1)のAlb-MB-AuNCs複合体について、白色LED照射下における $^1\text{O}_2$ 生成能を調べた。光照射による $^1\text{O}_2$ 生成能は、methotrexate (MTX)の $^1\text{O}_2$ 酸化による蛍光強度の増加 (ΔPL) により評価した (Figure 9c)。Alb-MB-AuNCs複合体のMBモル当たりの $^1\text{O}_2$ 生成効率との尺度となる ΔPL は、AuNCsとMBを複合化することで増大し、0.1:1 (AuNCs:MB)の組成において、最も高い $^1\text{O}_2$ 生成効率を示した (Figure 9d)。 $^1\text{O}_2$ の生成量子収率 Q は、AuNCs ($Q=0.4\%$)、MB ($Q=55\%$)、Alb-MB-AuNCs複合体 (0.1:1) ($Q=73\%$)となり、MB単独より大きくなった。また、Alb-MB-AuNCs複合体のa-PDT活性を *Streptococcus mutans* に対する1分間の白色LED照射により確認できた。

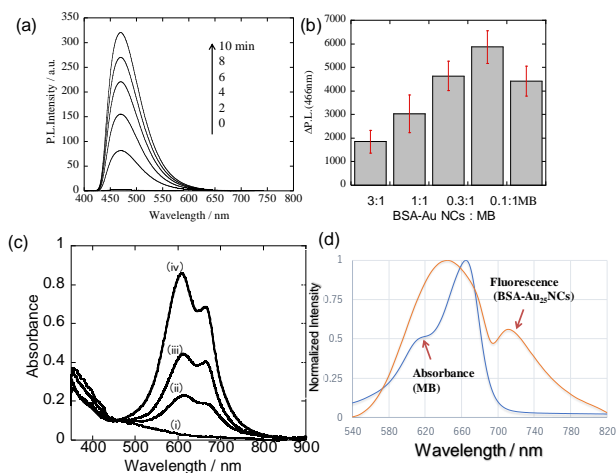


Figure 9. (a) Fluorescence spectra of MTX at an excitation wavelength of 370 nm in the presence of BSA-Au NCs-MB (0.3:1) under white-light LED irradiation. (b) Increase of the fluorescence intensity under irradiation for 10 min normalized by the absorbance of MB in the BSA-Au NCs-MB conjugate (ΔPL). (c) UV-vis spectra of Alb-Au NCs and Alb-Au NCs-MB conjugates with various ratios of AuNCs to MB: (i) AuNCs (ii) AuNCs:MB = 3:1, (iii) AuNCs:MB = 1:1, and (iv) AuNCs:MB = 0.3:1. (d) UV-vis absorption spectrum of MB and fluorescence emission spectrum of AuNCs in aqueous solution.

7. 樹脂用途向けの銀ナノクラスター-抗菌剤

近年、生活用品、自動車、住宅用品などの生活用品、デンタルインプラント材料等の医療製品に抗菌能を付与する抗菌剤の需要が高まっている。抗菌剤の主成分の一つである銀は、古くから微生物感染症を防ぐために使われてきた。金属銀、銀塩、そして銀ナノ粒子は肺炎、チフス、下腿潰瘍を含む多くの感染症の治療に用いられており、医学的応用で広く受け入れられてきた。近年、銀ナノクラスターが優れた抗菌性を有することが示されている²⁴⁻²⁶。生活用品や医療製品などのプラスチック素材 (樹脂) へ抗菌能を付与するためには、プラスチック (樹脂) への高い分散性と抗菌能付与の両立が必要となる。ここでは光硬化性歯科用レジン材への高い分散性、安全性、抗菌能付与を両立できるジヒドロリポ酸 (DHPLA) 保護銀ナノクラ

スター($\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$)と疎水性カチオン(テトラオクチルアンモニウムイオン:TOA)とのハイブリット型抗菌剤 [TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$] について紹介する (Figure 10) ²⁷.



銀クラスター単独の $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ は樹脂に分散せず分離しなかったが, TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ は, その疎水性カチオン TOA の効果で樹脂に高い分散性を示した。銀ナノクラスターは光照射で分解するが ²⁸, TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ は光安定性が高く, 樹脂を光硬化した後も, TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ は安定であった。

TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ 単体の抗菌性を, 黄色ブドウ球菌 (グラム陽性) 及び肺炎桿菌 (グラム陰性) に対して調べた。対照の試験片 (銀クラスター無し) は, その生菌数は接種時と比較して, 24 時間後にそれぞれ約 140 倍, 30 倍増加した。一方, 0.005 wt% の TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ 溶液をスピコート塗布 (試験片にクラスター溶液を 0.2 mL 滴下, 400rpm, 45s スピコート) して乾燥させた試験片では, 24 時間後の生菌数は検出限界以下であり, 黄色ブドウ球菌及び肺炎桿菌の両方に対して, 高い抗菌作用を示すことがわかった (Figure 11a)。TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ は, その構成成分である TOA 単独 (Figure 11b), 及び $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ 単独よりも高い抗菌能を示し, TOA と $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ の複合化による協奏的な抗菌効果が見られた。TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ を混練し光硬化した樹脂においては, 0.3 wt% で黄色ブドウ球菌及び肺炎桿菌において十分な抗菌性を示した。

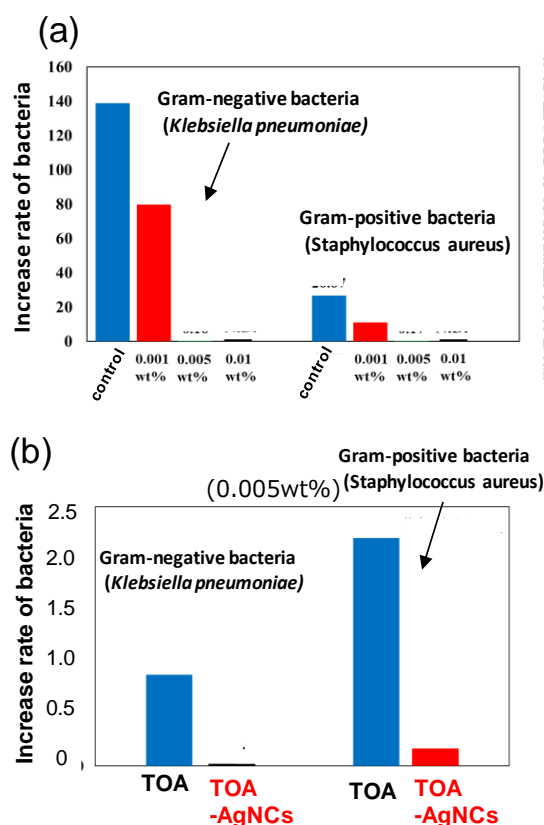


Figure 11. Antibacterial tests of glass plate coated with (a) TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ NCS and (b) comparison of antibacterial activity of TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ NCS and TOA.

TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ を含む抗菌性樹脂 (1 wt%) を 18 時間水への浸漬を計 4 回実施し (各回では新しい水を入れ替える), 抗菌持続性試験を行った。4 回浸漬後 (計 72h) の抗菌性樹脂 (1 wt%) の抗菌能を評価したところ, 肺炎桿菌の生菌数が検出限界以下となり, TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ を含む抗菌性樹脂は長時間の水への暴露後も抗菌能を維持しており, 優れた抗菌持続性が確かめられた。

TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ を含む抗菌性樹脂 (1wt%) は, マウス胎児皮膚から分離された NIH3T3 細胞による毒性実験では, その大きな影響はなく (吸光度が経時的に増大), 細胞毒性は認められなかった (Figure 12)。TOA- $\text{Ag}_{25}(\text{DHHLA})_{14}$ を分散させた抗菌性樹脂は, 高い抗菌性, 低い細胞毒性, 及び抗菌持続性を両立し, 樹脂用途向け抗菌剤として優れた特性を示した。

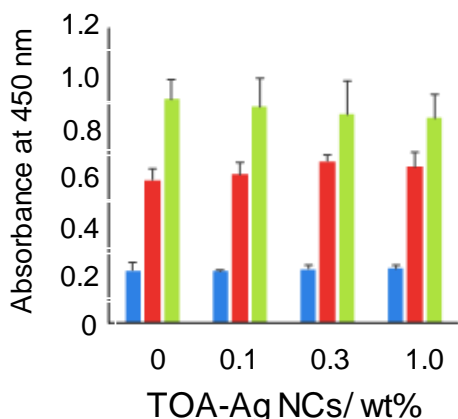


Figure 12. Cytotoxicity test of TOA-Ag₂₅ (DHLA)₁₄ on NIH3T3 cells [Left (after 1 day), center (after 3 days), right (after 5 days)]

8. 銀ナノクラスター/ローズベンガル複合体による“抗菌+光増感のダブルアクション作用”

上述の通り、金ナノクラスターや金ナノクラスター/有機色素複合体は、a-PDT のための光増感剤として有用である。しかし、a-PDT の原理から、光を照射した時のみ抗菌作用が現れる。歯周病原菌やミュータンス菌など口腔内細菌を目的とする a-PDT では、光殺菌した後のダーク条件（光を照射していない条件）でも、先の口腔内細菌の増殖を抑制できることが望ましい。

他方、我々は、グルタチオン保護銀ナノクラスターは、口腔内細菌であるミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*) に対して、増殖を抑制する抗菌作用があることを見出した(Figure 13)²⁹。

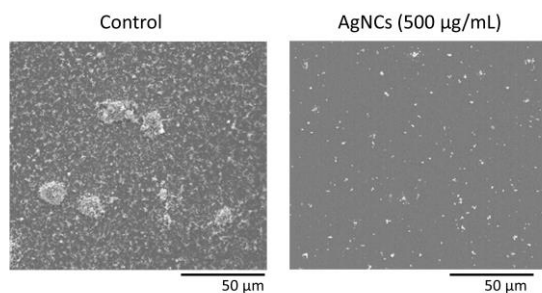


Figure 13. Antibacterial characterization of Ag NCs: SEM observation of *S. mutans* after 24 h incubation in control and Ag NCs groups.

そこで我々は、有機系光増感剤であるローズベンガル (RB) に抗菌能を有するグルタチオン保護銀ナノクラスター (Ag₃₂(SG)₁₉) を複合化さ

せた Ag NCs /RB 複合体を合成した。

この Ag NCs /RB 複合体は Ag NCs 単体に比較して、分散安定性が向上し、白色 LED 光照射によって Ag⁺イオンの水溶液への溶出量が増加した³⁰。Ag NCs /RB 複合体では、光照射によって RB により生成する ¹O₂ によって Ag NCs が酸化されたことにより、銀イオン溶出量が増大したと考えられた。従って、Ag NCs /RB 複合体を用いた a-PDT では、“抗菌+光増感のダブルアクション作用”による高い抗菌・殺菌効果が期待される(Figure 14)。

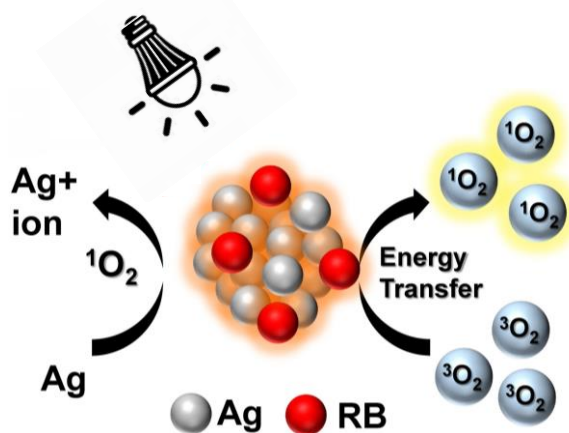


Figure 14. Silver nanoclusters/rose bengal (AgNCs/RB) nanocomposite-based photosensitizer with dual antibacterial effects (¹O₂ and Ag⁺ ions).

AgNCs/RB 複合体を用いた a-PDT 効果を口腔内細菌懸濁液 (*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) に対して調べた。この懸濁液の濁度測定において、Ag NCs /RB 複合体と RB 単体の添加したグループでは、いずれも白色光照射によって大幅な濁度の低下を示した。Ag NCs /RB 複合体は RB 単体に対して、更に低い値を示し、白色光照射による高い殺菌能が示された。SEM 観察でも Ag NCs /RB 複合体の添加したグループへの光照射後では、細菌の集塊形成が少なく、TEM 観察、LIVE/DEAD 染色において多くの死菌を観察した(Figure 15)。白色光照射による Ag NCs /RB 複合体の口腔内細菌に対する高い殺

菌効果は、光励起されることでRBが産生した一重項酸素に加えて、酸化力の強い一重項酸素によりAgナノクラスターが酸化されてAg⁺イオンの放出が促進されることで、白色光照射によって強い抗菌性が発揮されたと考えられた。更に、光照射で放出されたAg⁺イオンが残留し、光照射後も抗菌能が持続することがわかった。

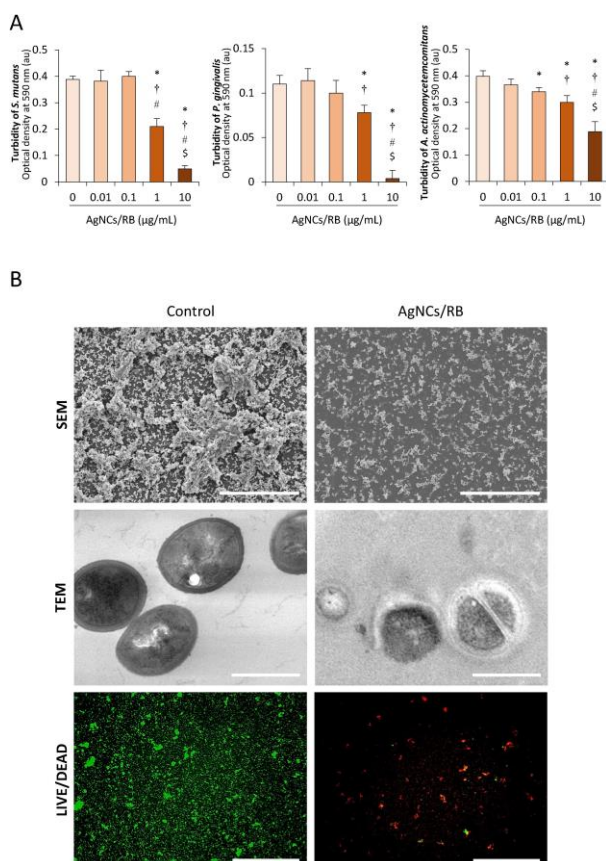


Figure 15. Evaluation of antibacterial activity of AgNCs/RB. (A) Antibacterial effects of AgNCs/RB on oral bacteria after 24-h incubation (n = 5, mean ± SD). Turbidities of *S. mutans*, *P. gingivalis*, and *A. actinomycetemcomitans*. (B) SEM and TEM observation and LIVE/DEAD BacLight staining of *S. mutans* after 24-h incubation in control (no application of AgNCs/RB) and AgNCs/RB groups. Reprinted with permission from reference [30], Copyright © 2020 ELSEVIER.

線維芽細胞のWST-8及びLDH活性による細胞毒性評価を行った。24時間のインキュベーション後、全てのグループで同等であり、AgNCs/RB複合体の細胞毒性は見られなかった(Figure

16A)。LIVE/DEAD染色によって(緑色 カルセイン AM:生細胞, 赤色 エチジウムホモダイマー1:死細胞), 対照群(複合体塗布なし)およびAgNCs/RB塗布群において、培養細胞が緑色蛍光(生細胞)を示した(Figure 16B)。また、AgNCs/RB塗布群および白色LED照射群にかかわらず、vinculin/F-actin染色によって細胞の接着および伸展が見られ、細胞成長に悪影響を与えることはなかった(Figure 16B)。

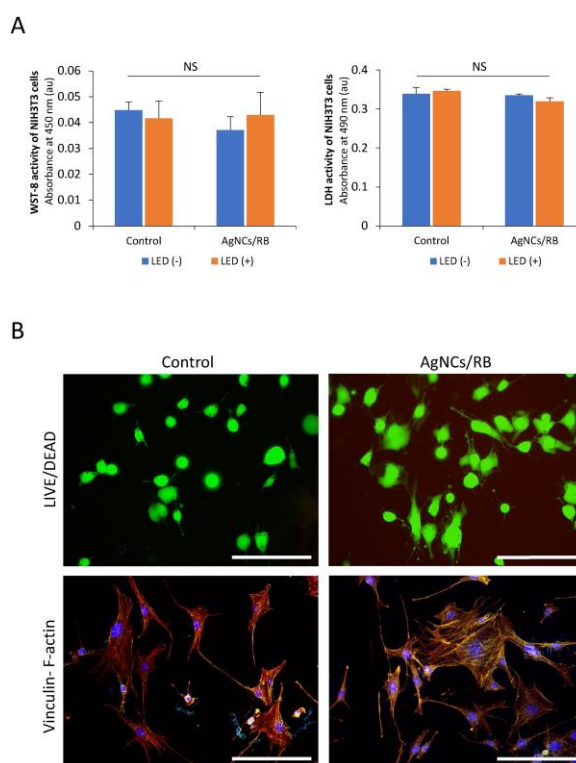


Figure 16. Assessments of cytotoxic effects of AgNCs/RB.(A)WST-8 and LDH activities of NIH3T3 cells in control (no application) and AgNCs/RB groups (n = 6, mean ± SD). (B) LIVE/DEAD BacLight staining and vinculin/F-actin double staining of NIH3T3 cells after 24-h incubation in control and AgNCs/RB groups. Scale bar represents 50 µm. AgNCs, silver nanoclusters; au, arbitrary unit; LDH, lactate dehydrogenase; LED, light-emitting diode; NS, not significant; RB, rose bengal; SD, standard deviation; WST, water-soluble tetrazolium salt. Reprinted with permission from reference [30], Copyright © 2020 ELSEVIER.

以上の結果から、AgNCs/RB複合体は、光照射による“抗菌+光増感のダブルアクション作用”による高い抗菌作用を示しながら、低い細胞毒

性と抗菌持続性を有する a-PDT 用の光増感剤として優れた特徴を有することがわかった。

9. まとめ

本稿ではチオラート保護金属(金, 及び銀)ナノクラスターの抗菌/光増感作用と抗菌光線力学療法(a-PDT)や抗菌性樹脂を含むバイオメディカル応用について概説した. 本稿で紹介したように, 金属ナノクラスターのユニークな特性と高分子や有機色素等との特性を組み合わせた複合体を形成することで, それぞれ単独では得られない相乗機能の発現が可能であることも概説した. 最近, 我々は光増感作用だけでなく, 超音波照射によっても金ナノクラスターが活性酸素(一重項酸素)を生成する音増感作用を見出した¹⁹. 光+超音波ダイナミック療法による歯周病治療に向けた金ナノクラスターの応用展開も期待される.

近年, 更に原子数レベルでサイズ(化学組成)が精密制御された金, 銀, 及び銅の金属ナノクラスターの合成や様々なナノ材料との複合体の創成が進んでいる. 原子数レベルで精密制御された金属ナノクラスターでは, その化学組成に依存した新たな幾何/電子構造, 物性が見いだされ, 計算化学を用いることで金属ナノクラスターの機能理解がより進むと期待される. そして, 金属ナノクラスターは, 本稿で紹介したバイオメディカル分野だけでなく, 触媒, エネルギー材料, エレクトロニクスなどにおいて, 今後, 更なる発展が期待される.

10. 謝辞

本研究の一部は, 科学研究費助成事業 基盤研究(B)(15H03520/19H02564), 基盤研究(C)(19K10102), 及び田中貴金属記念財団の助成を受けて実施された. ここに感謝の意を記す.

参考文献

- 1) T. Higaki, Q. Li, M. Zhou, S. Zhao, Y. Li, S. Li, R. Jin, *Acc. Chem. Res.*, **2018**, *51*, 2764-2773.
- 2) Q. Yao, T. Chen, X. Yuan and J. Xie, *Acc. Chem.*

- Res.*, **2018**, *51*, 1338-1348.
- 3) Y. Du, H. Sheng, D. Astruc, M. Zhu, *Chem. Rev.*, **2020**, *120*, 526-622.
- 4) S. Maity, D. Bain, A. Para, *Nanoscale*, **2019**, *11*, 22685-22723.
- 5) T. Kawawaki, Y. Negishi, H. Kawasaki, **2020**, *Nanoscale Adv.*, *2*, 17-36.
- 6) M. Zhu, C. M. Aikens, F. J. Hollander, G. C. Schatz, R. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5883-5885.
- 7) J. Zheng, P. R. Nicovich, R. M. Dickson, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2007**, *58*, 409-431.
- 8) H. Kawasaki, K. Hamaguchi, I. Osaka, R. Arakawa, *Adv. Funct. Mater.*, **2011**, *21*, 3508-3515.
- 9) H. Yamamoto, H. Yano, H. Kouchi, Y. Obora, R. Arakawa, H. Kawasaki, *Nanoscale*, **2012**, *4*, 4148-4154.
- 10) J. Yoshimoto, N. Tanaka, M. Inada, R. Arakawa, H. Kawasaki, *Chem. Lett.*, **2014**, 46,793-794.
- 11) J. Yoshimoto, A. Sangsuwan, I. Osaka, K. Yamashita, Y. Iwasaki, M. Inada, R. Arakawa, H. Kawasaki, *J. Phys. Chem. C.*, **2015**, *119*, 14319-14325.
- 12) K. Kawamura, D. Hikosou, A. Inui, K. Yamamoto, J. Yagi, S. Saita, H. Kawasaki, *J. Phys. Chem. C*, **2019**, *123*, 26644-26652.
- 13) S. Kwon, H. Ko, D. G. You, K. Kataoka and J. H. Park, *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 1771-1782.
- 14) B. Yang, Y. Chen and J. Shi, *Chem. Rev.*, **2019**, *119*, 4881-4985.
- 15) X. Dou, X. Chen, H. Zhu, Y. Liu, D. Chen, X. Yuan, Q. Yao, J. Xie, *Dalton Trans.*, **2019**, *48*, 10385-10392.
- 16) B. Du, X. Jiang, A. Das, Q. Zhou, M. Yu, R. Jin, J. Zheng, *Nat. Nanotechnol.*, **2017**, *12*, 1096-1102.
- 17) J. Wang, G. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2018**, *57*, 3008-3010.
- 18) Y. Changlin, L. Gao, S. Kumar, H. Kawasaki, J. Rongchao, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, *4*,

- 2847-2852.
- 19) H. Kawasaki, S. Kumar, G. Li, C. Zeng, D. Kauffman, J. Yoshimoto, Y. Iwasaki, R. Jin, *Chem. Mater.*, **2014**, *26*, 2777-2788.
 - 20) S. Miyata, H. Miyaji, H. Kawasaki, M. Yamamoto, E. Nishida, K. Shitomi, S. Tanaka, H. Tanaka, T. Iizuka, T. Akasaka, A. Saeki, K. Shibata, N. Ushijima, T. Iwanaga, T. Sugaya, *Int. J. Nanomed.*, **2017**, *12*, 2703-2716.
 - 21) D. Hikoso, S. Saita, S. Miyata, H. Miyaji, T. Furuike, H. Tamura, H. Kawasaki, *J. Phys. Chem. C*, **2018**, *122*, 12494-12501.
 - 22) M. Yamamoto, I. Osaka, K. Yamashita, H. Hasegawa, R. Arakawa, H. Kawasaki, *J. Lumin.*, **2016**, *180*, 315-320.
 - 23) M. Yamamoto, K. Shitomi, S. Miyata, H. Miyaji, H. Aota, H. Kawasaki, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **2018**, *510*, 221-227.
 - 24) K. Zheng, M. I. Setyawati, D. T. Leong, J. Xie, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *357*, 1-17.
 - 25) A. Sangsuwan, H. Kawasaki, Y. Matsumura, Y. Iwasaki, *Bioconjugate Chemistry*, **2016**, *27*, 2527-2533.
 - 26) C. Tominaga, D. Hikosou, I. Osaka, H. Kawasaki, *Acta Physico-Chimica Sinica*, **2018**, *34*, 805-811.
 - 27) C. Tominaga, K. Shitomi, H. Miyaji, H. Kawasaki, *ACS Applied Nano Materials*, **2018**, *1*, 4809-4818.
 - 28) C. Tominaga, H. Hasegawa, K. Yamashita, R. Arakawa, H. Kawasaki, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 73600-73604.
 - 29) K. Shitomi, H. Miyaji, S. Miyata, E. Nishida, K. Mayumi, T. Sugaya, H. Kawasaki, *Nano Biomedicine*, **2019**, *11*, 21-28.
 - 30) K. Shitomi, H. Miyaji, S. Miyata, T. Sugaya, N. Ushijima, T. Akasaka, H. Kawasaki, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2020**, *30*, 101647-101647.