

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 糸日谷洋大(千葉県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 乙第268号
学位授与年月日 令和2年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
学位論文題目 Organic resolution function and effects of platinum nanoparticles on bacteria and organic matter
(細菌と有機物に対する白金ナノ粒子の効果と有機質分解能について)
PLOS ONE 第14巻 第9号 e0222634. doi:10.1371/journal.pone.0222634. eCollection 2019.
2019年9月19日発行
論文審査委員 主査 教授 山本雄嗣
副査 教授 友成博 副査 教授 五味一博

内容の要旨

【緒言】

金属を粒径数十nm以下の微粒子にすることで得られた金属ナノ粒子は表面積が大きくなり、また量子サイズ効果(quantum size effect)によって、バルク金属とは異なる性質を示す。近年、化学、生物、材料科学や医療など多くの分野で金属ナノ粒子の研究が進められ急速な進歩を遂げている。特に銀ナノ粒子(AgNPs)では優れた広域スペクトルの抗菌活性を有することから多くの分野において興味もたれている。一方、白金ナノ粒子(PtNPs)についても抗菌活性が存在すること、触媒活性が強いこと、炎症抑制能力があることなどが報告されている。白金はアレルギーを起こしにくい金属であり遺伝毒性も示されておらず、臨床应用到していることから、本研究ではPtNPsの歯科への応用を検討するために有機質分解能と抗菌作用に焦点を当て調べることを目的とした。

【材料および方法】

本研究では、2-19nmのパーティクルサイズのPtNPs溶液100ppmを用いた。このPtNPsは液体中の白金に赤外線パルスレーザーを照射することで白金から直接調整された。直射日光を避け、室温の暗室で保管し使用時にそのつど滅菌精製水にて希釈し使用した。

抗菌作用の評価

PtNPsの抗菌試験には下記の3菌種を用いた。

S.mutans (グラム陽性球菌, う蝕病原因菌)

E.faecalis (グラム陽性球菌, 難治性根管内細菌)

P.gingivalis (グラム陰性嫌気性桿菌, 歯周病原細菌)

・抗菌試験

100 μ l of 1×10^4 CFU/mlの細菌溶液に、最終濃度が1, 5, 10, 20ppmになるようにPtNPsを培地に添加し10日間培養した。抗菌作用は培地上のコロニー形成の有無により評価した。

有機質への作用の検討

・アルブミン分解能の評価

PtNPsのアルブミンの分解能を評価するため、PtNPsを2mg/mlのアルブミン溶液に最終濃度が10ppmになるように添加し、混合液を攪拌し室温で1, 10, 30, 60分反応させたものを試料とし電気泳動とBCAプロテインアッセイで有機質の状態を評価した。

・LPS分解能の評価

歯周病原細菌の発炎因子であるLPS（菌体外多糖体）がPtNPsによって分解されるかどうかを評価した。PtNPsを0, 10, 50 ppmの濃度で0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 EU/mlのLPSに添加し、混合液を室温で10分反応させ試料とし、LPS検出キットを用いて実験を行った。

統計解析

アルブミンおよびLPSの分解作用の比色定量において、得られた値は一元配置分散分析（one way ANOVA）および、Tukeyの多重比較を行った。

【結 果】

白金ナノ粒子の抗菌作用

コロニー形成は5 ppm以上の濃度のPtNPsにおいて、全ての菌種において完全な抑制が認められた。しかし1 ppmの濃度では、ネガティブコントロールと同程度のコロニー形成が認められた。

白金ナノ粒子の有機質への作用

・アルブミン分解能

10 ppmのPtNPsを添加した群では、経時的にアルブミンのバンド幅が減少し、下層に分解産物であると考えられるスメア層が見られた。BCAプロテインアッセイで吸光度を測定したところコントロール群と実験群で比較すると、1分以上の反応で有意に減少した。またPtNPsを添加したアルブミンの試料を電子顕微鏡像で確認したところ、PtNPsの形態学的な変化は見られなかった。

・LPS分解能について

各濃度のLPSに10 ppmおよび50 ppmのPtNPsを添加した全ての群で、コントロールと比較して減少した。またPtNPsの有効濃度を調べた実験では0.125 ppmの濃度のPtNPsを添加した群で、コントロールと比較し有意に吸光度が減少し、0.25 ppm以上の濃度で吸光度がネガティブコントロールと同等となった。LPSに添加したPtNPsは電子顕微鏡像より、形態的を認めなかった。

【考 察】

本研究では物質的に安定し、アレルギーを起こしにくい白金に着目し、PtNPsの抗菌作用および有機質分解作用について調べる為に実験を行った。

PtNPsは5 ppm以上の濃度で口腔内細菌に対し明らかな抗菌作用をみせた。これまでにPtNPs（2-19 nm）を15分作用させることで本研究と同様な結果を示すことが報告されている。これまでの研究ではグラム陰性菌においてグラム陽性菌より強い抗菌活性を示すと報告されているが、本研究では、グラム陰性菌である*P. gingivalis*だけでなく、グラム陽性菌の*S. mutans*や*E. faecalis*にも同等の抗菌作用を示した。抗菌性を発揮するメカニズムとしては、細胞壁あるいは細胞膜が破壊され細菌の細胞質が流出すること、細胞内に白金粒子が侵入しタンパク質等に結合し細胞の機能を停止させ菌を死滅させること、などが考えられる。

電気泳動においてはPtNPsを添加したアルブミンのグループが、ポジティブコントロールと比較して経時的にバンド幅が減少したという結果が得られた。反応時間の1分後にバンド下層にアルブミンの分解産物であるスメア層が現れ、バンド幅は時間が経過するにつれ減少していき、スメア層は徐々に消失していった。それゆえ、アルブミンは時間の経過とともに分解されていくことが示唆された。またBCAプロテインアッセイの結果、コントロール群と比較して実験群で30分までは時間の経過とともにタンパク量が有意に減少し、30分以降ではタンパク量の変化を認めなかった。電気泳動でのバンド幅の減少と同じようにBCAプロテインアッセイでも経時的にタンパク量が減少したことは、PtNPsによりアルブミンが分解されたことを示している。

次にLPSに対するPtNPsの効果を調べた。各濃度のLPSはコントロール群と比較し、全ての実験群において有意に減少した。グラム陰性細菌の細胞壁の一部であるLPSはマイナスに帯電しており、PtNPsと高い親和性を持ち強く結合することでPtNPsはLPSとの物理的相互作用によりLPSを破壊すると考えられる。次にLPS破壊にかかわるPtNPsの最低濃度を測定した実験では、0.25 ppm以上でネガティブコントロールと同等となり、逆に0.0625 ppm以下ではポジティブコントロールと有意な差は見られなかった。PtNPsと接触したアルブミン、LPSは、酸化分解反応もしくはROSの発生により引き起こされる物理的相互作用によりタンパク骨格が破壊されることで分子量が減少すると考えられる。しかしながらその詳細なメカニズムは不明である。

菌周疾患はグラム陰性細菌からなる菌周病原菌の感染によるものである。さらに菌周病原菌が死滅した後も、細菌の構成要素である LPS が菌周組織に残留し炎症を引き起こす。PtNPs の歯科への臨床応用を考えた場合、菌周病菌に対し殺菌性があること、また炎症を惹起する LPS といった有機質の分解作用が認められることが歯科治療に応用するための 1 つの指標となる。本実験から 1-19 nm の PtNPs に抗菌性および有機質分解能を認め、極めて低い濃度で効果的に有機質、特に LPS を分解することができる特徴があることが示されたことから、菌周治療において有効的なツールになりうることが考えられた。また、歯内治療においてもこれまで象牙細管内に入り込んだ細菌を殺菌することは困難であったが、PtNPs を根管内に応用することで、ナノ粒子が象牙細管内にまで入り込み根管を殺菌できることが考えられる。しかしながら、本研究は限られた基礎的研究であり、臨床応用にはさらなる研究が必要である。

【結 論】

PtNPs はう蝕、歯内病変、歯周病に関連する細菌に対し殺菌性が認められた。また、タンパク質の分解能があり、特にグラム陰性菌の細胞壁成分である LPS に対して強い分解能を有した。

審査の結果の要旨

粒径が数十 nm 以下の金属ナノ粒子は、量子サイズ効果によって一塊の状態とは異なる性質を示す。白金ナノ粒子は抗菌活性や炎症抑制能力を示すことが報告されており、加えて白金はアレルギーを起こしにくく遺伝毒性も示さないため、臨床応用に適していると考えられる。そこで本研究では歯科領域での白金ナノ粒子の臨床応用を検討することを目的として、その抗菌作用と有機質分解能を評価した。

粒径 2 ~ 19 nm の白金ナノ粒子を含有する溶液を数種類の濃度で準備し、下記の実験を行った。

①う蝕病原菌の *S. mutans*、難治性根管細菌の *E. faecalis*、歯周病原細菌の *P. gingivalis* に対する抗菌作用をコロニー形成の有無から評価した。

②作用時間を変化させて本溶液をアルブミン溶液に混合し、電気泳動と BCA プロテインアッセイを用いてアルブミン分解能を評価した。

③歯周病原細菌の発炎因子である LPS に本溶液を添加し、LPS 検出キットを用いて LPS 分解能を評価した。

その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 5 ppm 以上の白金ナノ粒子で三菌種のコロニー形成を抑制した。グラム陰性菌への効果はすでに報告されているが、本実験によりグラム陽性菌に対しても同様な抗菌効果を示すことが判明した。

2. 10 ppm の白金ナノ粒子を 1 分以上作用させることによって、アルブミンを有意に分解し、この分解は 30 分経過時まで継続した。

3. 10 ppm 以上の白金ナノ粒子は LPS に対して強い分解能を示した。また LPS 分解に関わる最小有効濃度は 0.25 ppm であった。

白金ナノ粒子と接触したアルブミンと LPS は、酸化分解反応もしくは活性酸素の発生により惹起される物理的相互作用により骨格が破壊されると推測された。

以上より、本研究にて白金ナノ粒子がう蝕、歯内病変、歯周病の関連細菌に対して殺菌効果ならびに有機質分解効果を有することが提示された。口腔内環境改善のための新材料・新技法への白金ナノ粒子応用の可能性を示した本論文は、歯科臨床の発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。