

博士論文要旨

紫外線照射下における銀ナノ粒子の殺菌効果と生体影響に関する研究

Study on the bactericidal and biological effects of silver nanoparticles
under ultraviolet radiation

2016 年 2 月

静岡県立大学大学院
薬食生命科学総合学府
環境科学専攻
博士後期課程
光環境生命科学研究室

趙 曉旭

銀の広域な抗菌特性は、水や空気の浄化、化粧品、衣類、家庭用製品など、多方面で利用されている。近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、サイズが 100 nm 以下の銀ナノ粒子 (AgNPs) が開発されている。従来の銀粒子に比べサイズが小さく、総表面積が増加するため、より顕著的な殺菌効果を示すことが期待される。一方、紫外線による殺菌は、全ての菌種に対して有効であり、特に水処理の分野で進められている。また、最近では、紫外線の殺菌効率を向上させるため、様々な金属ナノ粒子と紫外線の併用が殺菌に応用されている。しかし、AgNPs と紫外線の組み合わせによる殺菌効果の研究はほとんど行われていない。

第 1 章では、AgNPs と紫外線の組み合わせによる大腸菌 (*E. coli*) に対する殺菌効果とその殺菌メカニズムを中心に検討した。長波長紫外線 UVA (320–400 nm) 照射下における AgNPs 作用は、それぞれの単独作用に比して、劇的な殺菌効果を示した。また、顕著な殺菌効果を示すためには、*E. coli* 内への AgNPs の取り込みと、*E. coli* 内での持続的な Ag イオン (Ag^+) の放出の両方が必須であった。さらに、AgNPs と UVA の複合曝露が、菌体内グルタチオン量を有意に減少させたことより、UVA 照射下での AgNPs 作用では、*E. coli* 内に取り込まれた AgNPs が、その菌体内で UVA 照射されることにより多量の Ag^+ を放出、SH 基を有する分子と結合することで効果的な殺菌効果を示すことが明らかになった。

我々は、日常的に紫外線に曝露されている。紫外線存在下、高い殺菌効果を AgNPs が示すのであれば、我々ヒトにも何らかの影響を示すことが危惧される。第 2 章では、ヒト培養細胞を用いて、UVA 照射下での AgNPs 作用後の DNA 損傷生成を、DNA 損傷を高感度に検出できるバイオマーカーであるヒストン H2AX のリン酸化 ($\gamma\text{-H2AX}$) を指標に検討した。これまでに、AgNPs、UVA はそれぞれヒト細胞において DNA 損傷を引き起こすことが報告されており、生じた DNA 損傷は突然変異発生の原因となり、発がん等に結びつくとされている。本研究では 3 種類のヒト培養細胞に AgNPs を作用した後、UVA を照射した。AgNPs の作用濃度依存的に $\gamma\text{-H2AX}$ が観察され、UVA 照射下ではより顕著な $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導が示された。また、 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導はマイクロサイズの銀粒子では認められず、ナノサイズの AgNPs に特異的であった。 $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導は最も重篤な DNA 損傷である二本鎖切断 (DSBs) の形成が起因になる。バイアス正弦電場電気泳動法を用いた解析により、AgNPs 作用による DSBs の生成が、UVA 照射により亢進することが示された。さらに、DSBs とそれに伴う $\gamma\text{-H2AX}$ の生成は Ag^+ 除去剤の存在下で軽減されたことより、UVA 照射により AgNPs 表面から多量に放出された Ag^+ が、DSBs の亢進に関与していたと考えられた。

Ag^+ は、SH 基を有する分子に結合するだけでなく、DNA にも作用することが報告されている。 Ag^+ が結合した DNA では、短波長紫外線吸収領域が変化する可能性がある。第 3 章では、 Ag^+ 存在下での短波長紫外線 UVB (310 nm) 照射後の DNA 損傷生成を検討した。その結果、 Ag^+ の存在により、UVB 照射によって形成されるピリミジン

二量体が増加し、誘導される DSBs も増加した。以上、第 2 および 3 章において、紫外線、AgNPs それぞれ単独作用により誘導される数種類の DNA 損傷が、両者の複合曝露により増加することを明らかにした。

AgNPs と紫外線の複合曝露時に DNA 損傷が亢進する理由の一つとして、AgNPs により DNA クロマチン構造が変化し、紫外線に対する感受性が変化したことが考えられる。例えば、クロマチン構造中の主要蛋白質であるヒストンがアセチル化されると、クロマチン構造が緩んで、DNA 損傷の修復率を変化させる。そこで、第 4 章では、AgNPs によるヒストンの修飾変化について検討した。AgNPs によるヒストン H3 のリン酸化、アセチル化、メチル化を解析した結果、がん原遺伝子の転写制御に関わっているヒストン H3 セリン 10 番目のリン酸化 (p-H3S10) が強くまた、持続的に起こることを見出した。p-H3S10 の誘導は、マイクロサイズの銀粒子では起こらず、AgNPs 特異的であった。Ag⁺除去剤を用いた解析により、p-H3S10 が長時間にわたり誘導されるのは、サイズの小さい AgNPs が細胞内に取り込まれ、そこから Ag⁺が持続的に放出されるためと考えられた。以上、第 4 章において、AgNPs によって p-H3S10 が誘導されることが明らかとなり、AgNPs が DNA を取り巻く蛋白質にも影響し、DNA 損傷生成、修復を変化させる可能性が示唆された。

以上の結果からナノサイズの AgNPs がヒトに影響を与えることが懸念されるが、様々な種類の AgNPs が開発される中、AgNPs のヒトへの影響を評価可能な検出法は存在しない。そこで、第 5 章では、AgNPs によるヒストン修飾変化を利用して、AgNPs の影響を評価する簡易スクリーニング系の構築を試みた。AgNPs が DNA 損傷を誘導したり、ヒストンを修飾するには、細胞内に効果的に取り込まれることが必須であることが本研究で明らかになったので、粒子の取り込みを検出可能なフローサイトメトリの側方散乱光 SS 強度を第一の指標とした。そして、第 4 章で明らかにした p-H3S10 の誘導を第二の指標にして、フローサイトメトリで同時測定する系を考案し、両者の相関を検討した。細胞内に取り込まれ易い AgNPs は高い SS 強度を示し、それに対応して p-H3S10 が上昇した。一方、マイクロサイズの銀粒子では SS 強度、p-H3S10 とも上昇しなかった。本スクリーニング系は、粒子の取り込まれ易さと細胞応答を同時解析するシステムであり、今後細胞応答の指標を増やすことで、より効果的な簡易スクリーニング系が構築されることが期待された。

以上本研究において、紫外線照射下での AgNPs 作用は、効果の高い殺菌法の一つであることを明らかにした。一方、その作用は、ヒト細胞においては DNA 損傷の生成を亢進することを示し、AgNPs が紫外線照射下ではヒトに影響を与える危険性を提示した。銀はこれまで安全性が高いと考えられ、様々な分野に使用されてきたが、粒子サイズが小さくなること、また、紫外線をはじめとする別の環境要因と複合曝露されることにより、異なった影響を及ぼす可能性がある。今後、AgNPs の開発においては、それらを考慮し、利点とリスク、両方を考えて検討していく必要があると考える。