パルスレーザーでコントロールする銀ナノプレートの抗菌活性

市丸 裕晃¹, Kaung KYAW¹, 川越 嵩之¹, 寺川 光洋², 宮澤 雄太³,
溝口 大剛³, 津志田 雅之⁴, 新留 琢郎¹

¹熊本大学大学院 先端科学研究部 (〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1)

²慶應義塾大学 理工学部 (〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1)

³大日本塗料株式会社 (〒324-8516 栃木県大田原市下石上1382-12)

⁴熊本大学 工学部 (〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1)

Antibacterial Activities of Silver Nanoplates Controlled by Pulsed Laser

Hiroaki ICHIMARU,¹ Kaung KYAW,¹ Takayuki KAWAGOE,¹ Mitsuhiro TERAOKA,² Yuta MIYAZAWA,³
Daigou MIZOGUCHI,³ Masayuki TSUSHIDA,⁴ and Takuro NIIDOME¹

¹Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555

²Department of Electronics and Electrical Engineering, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522

³Dai Nippon Teryo Co., Ltd. 1382-12 Shimoishigami, Otawara, Tochigi 324-8516

⁴Technical Division, Faculty of Engineering, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555

(Received June 15, 2017)

Silver nanoplates coated with gold, when subjected to pulsed laser irradiation, changed their shape from triangular to spherical structure along with the shift of their extinction spectra. Simple crystal structure of the silver nanoplates changed to multiple small crystal domains. The ratio of silver to gold on the surface also changed from 22:1 to 4.5:1 enabling more silver to be released. As a result, the antibacterial activity of gold-coated silver nanoplates was significantly increased after pulsed laser irradiation.

Key Words: Pulsed laser, Silver nanoplate, Antibacterial activity, Gold coating

1. 緒 言

金属ナノ粒子はバルク材料では見られない独特の性質を持つことから、様々な産業での応用が期待されている^{1,2)}。特に、金ナノ粒子は大きさ、形状を変えることで光学特性が変化することが知られており、バイオイメージングや診断薬、治療などの医療材料として応用されている^{3,4)}。その中でも、金ナノロッドは、光を熱に変換するフォトサーマル効果を有しており、新しい医療材料として期待されている。以前、我々は金ナノロッド溶液に近赤外域の連続波レーザーを照射すると温度上昇が起こるが、パルスレーザー照射では溶液の温度上昇が起こらないことを見出した^{5,6)}。これは、パルスレーザーによりロッド状の形状が球状に変化し、するともはや近赤外域に吸収をもたず、さらなる発熱が起こらないためである。溶液全体の温度上昇は起こさずに、瞬間的かつ局所的な発熱とナノ粒子の形状変化を起こすこの現象は、薬物放出を量的、空間的、時間的にコントロールするドラッグデリバリーシステム(DDS)のデバイスとして期待されている。

銀ナノ粒子は抗菌剤として機能することが古くから知

られている^{7,8)}。銀ナノ粒子から放出される銀イオンが細菌のタンパク質等に結合し、その増殖を抑え、様々な菌に対して、効果的な抗菌活性を示す。しかし、極まれに銀に耐性を持った細菌も報告されている⁹⁾。粒子からの銀イオンの放出量や放出速度はその粒子の作り方によって異なっており、粒子の表面構造が関係していると言われている¹⁰⁾。これまで衛生用品として実用化されている銀ナノ粒子であるが、感染症治療のための抗菌剤としての応用は進んでいない。その理由の一つとして、銀ナノ粒子は体内で凝集しやすく、その結果、抗菌活性がすぐに低下してしまうことが挙げられる。

我々はこれまで三角形プレート状の銀ナノ粒子を金でコートし、分散安定性を高めることに成功している(未発表データ)。分散安定性を高める以外にも、金表面はチオール基を介し、ポリマーや核酸、タンパク質など様々な機能性修飾ができる。金原子が平均2層となるようにコートした場合、分散安定性を保ちつつ、高い抗菌活性を示したが、4層コートした場合、抗菌活性が大きく低下し、これは金層が厚すぎて、銀イオンが放出されなくなっているからと考えられる。

銀ナノプレートは異方性のナノ粒子である。前述の金

ナノロッドのようにパルスレーザーを照射すると、球状に変形することが期待される。また、抗菌活性を示さない金4層コート銀ナノプレートにパルスレーザーを照射すれば、変形の過程で内部の銀が表面に現れ、銀イオンが放出されれば、抗菌活性が表れるのではないかと着想した。これは抗菌活性を光照射でコントロールするシステムとなる。そこで本研究ではこの金コート銀ナノ粒子へのパルスレーザー照射による形状変化と抗菌活性の変化について調べた。

2. 金コート銀ナノプレートのパルスレーザー照射による形状変化

銀ナノ粒子およびその金コートはAherneら、あるいは、Gaoらの方法にしたがって作製した^{11,12)}。その金コート銀ナノ粒子を細胞培養用の24穴プレートに入れ、パルスレーザー(Q-switched Nd:YAG laser, 532 nm, 6 ns, 10 Hz, 25 mJ/pulse, ビーム径6 mm)で1分間照射した。その結果、青色だった金コート銀ナノ粒子が黄色に変化し(Fig. 1, inset), 分光光度計を用いて、消失スペクトルを測定した結果、パルスレーザー照射前の630 nmのピークが低下し、新たに、450 nmのピークが現れた(Fig. 1)。このことから、大きな形状変化が起こったことがわかり、実際に透過型電子顕微鏡(JEOL, JEM-1400 Plus)で観察してみると、三角形のナノプレートが球状へ変化したことが確かめられた(Fig. 2)。パルスレーザー照射前後のTEM画像から各形状の割合を算出した結果、レーザー照射前では三角プレート状の粒子の割合は48%であったが、照射後では6%まで減少した(標本数: 照射前138個, 照射後125個)。

3. パルスレーザー照射による硝酸耐性の変化

パルスレーザー照射による変形後、表面の金層がどのようになっているかを調べるために、粒子の硝酸耐性を評価した。4原子層の金コートが維持されていれば硝酸耐性に变化はなく、金と銀が合金となって、銀が表面に存在すれば、耐性が減少しているはずである。パルス

Fig. 1 Extinction spectrum of gold-coated silver nanoplates (a) before and (b) after pulsed laser irradiation. The inset shows color change (a) before and (b) after pulsed laser irradiation.

Fig. 2 Shape changes of gold-coated silver nanoplates shown by TEM images of (a) before and (b) after pulsed laser irradiation.

レーザー照射前後のサンプル100 μ Lに2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM硝酸900 μ Lを混合し、室温で30分間静置し、分光光度計で吸収スペクトルを測定した(Fig. 3)。その結果、パルスレーザー照射前後において、ほぼ同様な耐性を示した。金コート銀ナノプレートのコアシェル構造を保ったまま球状へ変化したものと考えられる。

4. パルスレーザー照射による銀/金比の変化

金コート銀ナノ粒子のパルスレーザー照射前後における粒子の銀と金の量比をエネルギー分散型X線分析(EDX; FEI TECNAI F20)で解析した。その結果、照射前は銀と金の比が22:1であったのが、照射後は4.5:1になっていた。金に対して、銀が減少していることから、パルスレーザー照射による変形で、一部の銀が粒子から放出されていることが示された。

5. パルスレーザー照射による抗菌活性の変化

レーザー照射前後の金コート銀ナノプレートの大腸菌(DH-5 α)に対する抗菌活性をコロニーカウント法を用いて評価を行った(Fig. 4)。まず、試料中の分散安定剤を取り除くため、遠心分離機で遠心し(12,000g, 10 min, 4°C), 上清を取り除いた後、超純水に再分散させた。一方で、37°Cで16時間培養した大腸菌を10,000倍希釈したものを大腸菌液として抗菌活性試験に用いた。この大腸

Fig. 3 Spectrum change of gold-coated silver nanoplates (a) before and (b) after pulsed laser irradiation after addition of several concentration of nitric acid.

菌液200 μL とサンプルを50 μL を96 穴マイクロプレート上で混合し、37°Cで16 時間培養した。その後、その中に含まれている大腸菌数をカウントするために、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 10^3 、 10^4 、 10^5 倍に希釈し、寒天培地上に100 μL ずつ均等にまき、さらに16時間培養後、寒天培地上に生成したコロニー数をカウントし、大腸菌数とした。そして、それぞれのサンプルの大腸菌に対する抗菌活性を評価した。

その結果、パルスレーザー照射前の粒子では40%程度の大腸菌の減少が認められたが、パルスレーザー照射後ではすべての大腸菌が死滅していた。

6. ナノ粒子からの銀イオン放出評価

レーザー照射前後の金コート銀ナノプレートからの銀イオンの放出をイオンを誘導結合プラズマ発光分光分析法(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry: ICP-OES)で定量した。その結果、パルスレーザー照射前の金コート銀ナノプレートからの銀イオン放出量は0.035 ppmであったのに対し、パルスレーザー照射後の銀イオン放出量は0.2 ppmとおおよそ6倍増加した(Fig. 5)。硝酸耐性試験の結果と合わせると、金コート銀ナノプレートにパルスレーザーを照射すると、金コートのおよその厚さは変わらないが、その過程で、一部の銀が粒子外に放出され、それが抗菌活性を示したものではないかと考えている。

7. 結 語

本研究では、金コート銀ナノプレートにパルスレーザー照射すれば、球状に変形し、同時に銀イオンが放出

Fig. 4 Antibacterial activity of gold-coated silver nanoplates with or without pulsed laser irradiation.

Fig. 5 Comparison of silver ion release of gold-coated silver nanoplates before and after pulsed laser irradiation.

されることを明らかにした。この銀イオンが抗菌活性を示し、これは光で活性をコントロールできる抗菌剤と言える。このシステムが実際にどのように応用できるかはわからないが、少なくとも銀の抗菌活性を理解するためのツールにはなると期待している。今後はパルスレーザーの照射条件と形状変化、物性変化、そして、抗菌活性、抗カビ活性、細胞傷害性変化など多面的な評価を進めていきたい。

謝 辞

本研究は独立行政法人国際協力機構(JICA)および熊本大学拠点研究Bのサポートの下で行われた。

参考文献

- 1) V. Mody, R. Siwale, A. Singh, and H. Mody: J. Pharm. Bioal. Sci. **2** (2010) 282.
- 2) J. Conde, G. Doria, and P. Baptista: J. Drug Del. **2012** (2012) ID 751075.
- 3) M. S. Khan, G. D. Vishakante, and H. Siddaramaiah: Adv. Col. Interdace Sci. **199-200** (2013) 44.
- 4) Y. Niidome, A. T. Haine, and T. Niidome: Chem. Lett. **24** (2016) 488.

- 5) S. Yamashita, Y. Niidome, Y. Katayama, and T. Niidome: Chem. Lett. **38** (2009) 226.
- 6) H. Tang, H. Kobayashi, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, and T. Niidome: J. Controlled Release **171** (2013) 178.
- 7) M.K. Rai, S.D. Deshmukh, and A.P. Ingle: J. Appl. Micro. **112** (2012) 841.
- 8) D. Manikprabhu and K. Lingappa: J. Phar. Res. **6** (2013) 255.
- 9) I. Chopra: J. Antimicro. Chemo. **59** (2007) 587.
- 10) B. Molleman and T. Hiemstra: Langmuir **31** (2015) 13361.
- 11) D. Aherne, D. M. Ledwith, M. Gara, and J. M. Kelly: Adv. Funct. Mater. **18** (2008) 2005.
- 12) C. Gao, Z. Lu, Y. Liu, Q. Zhang, M. Chi, Q. Cheng, and Y. Yin: Angew. Chem. Int. Ed.z **51** (2012) 5629.