

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 999 号	学位申請者	高橋 将世
審査委員	主査	中田 匡宣	学位
	副査	菊地 聖史	副査
	副査	玉木 直文	副査
			博士 (歯学)
			野口 和行
			犬童 寛子

主査および副査の5名は、令和7年2月17日、学位申請者 高橋 将世 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) 銀ナノ粒子は細胞内に入った後ミトコンドリア以外には移行しないのか？

(回答) 本研究では、銀ナノ粒子の大部分はミトコンドリアに移行している事を確認している。核やミトコンドリア以外の細胞質部分にも少数の銀ナノ粒子が存在していることを認識している。文献的に銀ナノ粒子は、ミトコンドリアに比べ少ないが、核やリソソームに移行することが報告されている。

質問 2) 銀ナノ粒子がエンドサイトーシスで細胞に取り込まれたあとミトコンドリアに移行することだが、どうやって入っているか？また、どこで銀イオンがリリースされるか？

(回答) 銀ナノ粒子はエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ、リソソームに移行して酸性条件下にて加水分解され銀イオンとなりリリースされるという報告がある。

質問 3) 銀がミトコンドリアで鉄にイオンを渡しているとのことだが、どうやって銀が鉄にイオンを渡しているのか、そのメカニズムは？

(回答) 推測ではあるが、イオン化傾向の違いではないかと考えている。ミトコンドリアに銀ナノ粒子が移動し、その際、銀ナノ粒子がミトコンドリア中に存在する、よりイオン化傾向の高い鉄から電子を奪い、銀イオンが銀に、鉄が鉄イオンになっていると考えている。

質問 4) 抗酸化系については何か確認をしているのか？

(回答) 今回、抗酸化系の遺伝子発現変化などはみていないが、銀ナノ粒子は抗酸化系の遺伝子発現制御ではなく、抗酸化に預かる分子のSH基と反応してその抗酸化能を低下させるという報告がある。今後、抗酸化系の発現や抗酸化能の変化なども解析し、銀ナノ粒子の生体内での作用についてさらに詳しく調べたいと考えている。

質問 5) 感染の研究を行うならまず上皮系を解析すべきだと思うがなぜ線維芽細胞で実験を行ったのか？

(回答) 一般にウイルスは上皮細胞だけでなく内皮細胞や線維芽細胞にも感染することが知られており、線維芽細胞が炎症を起こすことでその後の病状の悪化がみられることが報告されている。また、上皮系細胞への影響は既に動物実験などで安全性が十分に確かめられていること、当研究室にある上皮細胞はダブルタイムが1週間と増殖が非常に遅くアッセイに向かないことなどから、今回は線維芽細胞に注目して実験を行った。

質問 6) CCK-8 でのデータは細胞毒性ではなく生存率とってよいのか？また、細胞の生存率を調べるのには24時間で十分だと思うが、48時間まで待ったのはなぜか？

(回答) CCK-8 を用いて調べた結果を生存率とする報告が複数あること、生存している細胞の酵素反応で起きる発色度合いでアッセイすることから、今回の結果は細胞生存率とした。また、48時間待った理由は、アポトーシスが起きてDNAラダーが検出されるのが48時間後との報告があるため、銀ナノ粒子曝露後48時間後でアッセイすることとした。

質問 7) 今回の研究の成果は臨床にどう応用するのか？

(回答) 銀ナノ粒子を大気中や屋内に噴霧することを想定し、その噴霧された銀の安全性を考慮しての使用を考えているが、臨床応用として全身投与についても検討したい。

最終試験の結果の要旨

質問 8) 生存率から見ると銀ナノ粒子投与は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で安全性が担保されるとあり、これは抗菌作用を示す 0.01 $\mu\text{g/ml}$ と 10 倍程度の差しかないが、安全性の見地から、その程度の差で問題はないのか？

(回答) 銀ナノ粒子を大気中に噴霧した場合、肺の細胞に銀が吸収される割合は噴霧した濃度の 1/1000 程度であることが報告されていることから、安全性は十分であると考えられる。

質問 9) 銀の食品の使用は具体的に何があるか？アラザン以外にはなにかあるか？

(回答) 例えば仁丹がある。参考までに仁丹を 2 ヶ月で 3 万粒、銀量で 3g 摂取し、銀皮症になった症例があるが、その症例では短期間でそれだけ大量に摂取しても死亡するには至っていない。

質問 10) VA-13 と HPLF では mTOR と pAKT の反応が違うが、これはなにが理由なのか？

(回答) 細胞によって反応性が違う理由の一つとして、これら分子の発現量が考えられる。VA-13 と HPLF で比較すると、VA-13 においては mTOR が、HPLF においては pAKT の発現が優位になっており、これらがそれぞれの細胞でメジャーなシグナル伝達を担っていると考えている。ただし、mTOR と AKT は互いに影響し合っただけでシグナルを伝えることが分かっているため、今後、更なる解析をする必要がある。

質問 11) mTOR や AKT の影響で ROS が発生することはわかっているのか？

(回答) 文献的には mTOR も AKT も ROS の発生に関与することが知られている。

質問 12) 細胞培養の培地には血清が入っているのか？血清が入っていると銀ナノ粒子が血清に吸着されて効かなくなるのではないのか？

(回答) 細胞培養用の培地には牛胎児血清が入っており、ご指摘の通り銀ナノ粒子が血清に吸着される可能性がある。実際、培地中に銀ナノ粒子を入れて数十分程度放置すると銀ナノ粒子の効果が低下することを確認している。本実験は、銀ナノ粒子曝露直前に培地と銀ナノ粒子を混合し、その後速やかに細胞に投与する実験を行っている。

質問 13) 銀ナノ粒子はどのような状態で供給されているのか？粉末か、液体か？

(回答) 高濃度の銀ナノ粒子をリン酸緩衝液などに溶解すると沈殿が生じてしまうため、濃い水溶液の状態で供給されている。この状態で 3 年以上安定であることを確認している。

質問 14) 銀ナノ粒子を加え 2 時間で様々な細胞応答をみているが、例えばどのくらいの時間 ACE2 遺伝子発現は下がるものなのか？また、これらの細胞応答は、銀ナノ粒子の濃度依存的に起きるものなのか？より低濃度での実験をしているか？

(回答) 銀ナノ粒子処理による遺伝子発現変化の影響について、今回は細胞死に有意差が無い、最も高い濃度において行っているが、今後、どのくらいの濃度まで効果があるのか、また、どのくらいの時間その効果が持続するのかを検討したいと考えている。文献的には、銀ナノ粒子処理後の *c-jun* の遺伝子発現変化を調べ、3 時間程でピークを迎え、8 時間後であっても未処理に比べ有意に発現が増加し続けるとの報告がなされている。

質問 15) ミトコンドリアでの局在をみるためには蛍光顕微鏡ではなく、電顕や共焦点レーザー顕微鏡で観察した方がよいのではないのか？

(回答) 本研究で観察に用いた BZ-8000 は、共焦点レーザー顕微鏡で観察するのと遜色ない状態で非常にクリアな像を観察できる顕微鏡となっている。今後においては、銀ナノ粒子の局在をより高解像度で観察するために電子顕微鏡を用いた観察も行いたい。

質問 16) サプリメントデータ 2 はアクリルアミドを入れて実験をしているようだが、何のために行っている実験か？

(回答) 銀ナノ粒子の入ったアクリルアミドをガラスボトムディッシュ上で固めることで、銀ナノ粒子をアクリルアミド内で固定し、静止した状態にしている。その後、散乱光イメージング法を用いて本研究で用いた銀ナノ粒子を観察できる事を確認したデータである。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。