

論文の要旨

申請者 木之田 淳

研究論文題目

効果的な殺微生物活性をもつ銀ナノ粒子(Ag NPs)の細胞毒性とその軽減に関する研究

1 目的

すぐれた殺微生物活性をもつ Ag NPs の作用を最大限に発揮しながら副作用を可及的に抑制するために、Ag NPs の細胞毒性と軽減方法、作用メカニズムを検討する。このことにより、Ag NPs / CNFS 複合体の安全性を担保しながら、感染創への臨床応用させることを目的とした。

2 対象並びに方法

蒸留水と D-グルコースと銀含有ガラスをよく混合し、オートクレーブ後、遠心をかけてその上澄み液を Ag NPs 含有液とした。また、この含有液にキチンシートを浸漬させ、よく洗浄したものを Ag NPs / キチンナノファイバーシート(Ag NPs / CNFS)複合体とした。ヒト線維芽細胞を用いて銀ナノ粒子 (Ag NPs) の細胞毒性とその軽減法、酸化ストレスを検証し、皮膚欠損モデルマウスにおいて創への影響と酸化ストレスを検証した。

2-1 Ag NPs の細胞毒性に関する検討

線維芽細胞を用いて、i) 牛胎児血清(Fetal bovine Serum : FBS)の有無、Ag NPs 単独、Ag NPs / キチン複合体粉末の濃度による細胞毒性、ii) Ag NPs 単独、Ag NPs / CNFS 複合体の間接的な細胞毒性、iii) NO/NO₂測定について検討した。また、線維芽細胞増殖因子(FGF)-2+低分子量ヘパリン/プロタミンナノ粒子(LMWH / P NPs)による細胞毒性軽減効果を検討した。それぞれ 10%の FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)で培養後、それぞれの条件にて添加を行い、Immuno Mini plate reader で 450nm の Optical Density(OD)値により細胞増殖効果を計測し、評価を

行った。NO/NO₂は細胞溶解液で遠心を行った上澄み液を使用し、NO/NO₂測定キットを使用して評価を行った。

2-2 皮膚欠損モデルマウスにおける Ag NPs の細胞毒性に関する検討

皮膚欠損モデルを作成し、2日、4日、7日、9日目に i)創傷治癒に関する検討、ii)組織学的検討、iii)カルボニル化タンパク質の測定を行った。ii)における 8-hydroxy-guanosine(8-OHdG)免疫染色は創作成後、24時間後の組織を使用して検討を行った。

3 成績

3-1

10%FBS を添加した Ag NPs の濃度 $\leq 1.6 \mu\text{g/mL}$ 及び Ag NPs、Ag NPs / キチン複合体粉末を添加した群は毒性が軽減された。また、間接的接触においても、Ag NPs / CNFS 複合体群、Ag NPs 群において、コントロールと比較して有意に細胞数が減少した。また、コントロールと比較して、LMWH / P NPs + FGF-2 群は有意に細胞数が増加し、細胞毒性軽減効果を示した。Ag NPs / CNFS 複合体群および Ag NPs 群の細胞溶解物中の NO/NO₂の量は、コントロール群および CNFS 群と比較して有意に増加を示した。

3-2

CNFS 群と比較して Ag NPs / CNFS 複合体群は4日、7日目に明らかな創傷治癒の遅延が確認された。しかし、生理食塩水による洗浄を行った創においては創傷治癒の遅延が軽減した。8-OHdG 免疫染色において、Ag NPs / CNFS 複合体群は脂肪組織中の筋線維に 8-OHdG が観察された。

また、CNFS に付着した Ag NPs の量が多いほど、2日、4日目における浸出液中のカルボニル化タンパク質の量が有意に増加し、以降は漸減した。

4 考 察

皮膚欠損モデルマウスにおいて Ag NPs / CNFS 複合体は有意に創傷治癒の遅延をおこしたが、洗浄により創傷治癒は軽減した。そのことと *in vitro* の結果により、Ag NPs の細胞毒性は対処により軽減できることが分かった。また Ag NPs の効果のメカニズムとして、酸化ストレスの増大が示唆された。これらのことより、Ag NPs / CNFS 複合体は効果的な殺菌活性と副作用の可及的な抑制が両立できる可能性が高いことが示唆された。

5 結 論

Ag NPs / CNFS 複合体は Ag NPs と既存の創傷被覆材を組み合わせることにより作製できる新規創傷被覆材である。Ag NPs / CNFS 複合体は効果的な殺微生物活性と副作用の可及的な抑制が両立できる可能性が高く、臨床応用できる可能性が高い。