

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

きのだ じゅん

木之田 淳

(口腔外科学専攻)

防衛医科大学校

平成29年度

## 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細胞毒性等の有害事象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銀ナノ粒子(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 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討した。

(木之田 淳)

## 2-1 殺微生物活性を有する濃度の 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 / NO<sub>2</sub> 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 / NO<sub>2</sub> は細胞溶解液を遠心した上澄み液を使用し、NO / NO<sub>2</sub> 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、4、7、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

(木之田 淳)

パク質量の測定を行った。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 群は、コントロールと比較して有意に細胞数が減少した。また LMWH / P NPs +FGF-2 群の細胞数は、コントロールと比較して有意に増加し、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 / NO<sub>2</sub> 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 Ag NPs / CNFS 複合体群は CNFS 群と比較して、4、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

(木之田 淳)

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

#### 4 考察

皮膚欠損モデルマウスにおいて殺微生物活性を有する Ag NPs 濃度を含む Ag NPs / CNFS 複合体群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 の細胞毒性は対策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微生物活性と細胞毒性等の有害事象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を維持したまま、細胞毒性等の有害事象の抑制が両立できる可能性を示しており、臨床応用できる可能性が高い。

## 目次

第1章 緒言	1 頁
1.1 研究の背景と意義	1 頁
1.2 研究目的	4 頁
第2章 殺微生物活性をもつ濃度の Ag NPs の細胞毒性とその軽減方法に関する基礎実験( <i>in vitro</i> )	6 頁
2.1 背景	6 頁
2.2 方法	9 頁
2.2.1 Ag NPs の作製	9 頁
2.2.2 Ag NPs / キチン複合体粉末の作製	9 頁
2.2.3 Ag NPs / CNFS 複合体の作製	10 頁
2.2.4 FGF-2&LMWH/P NPs の調製	10 頁
2.2.5 細胞毒性の検討および NO / NO <sub>2</sub> 測定、細胞毒性軽減に関する検討	10 頁
2.3 結果	13 頁
2.4 考察	14 頁
2.5 小括	16 頁
第3章 皮膚欠損モデルマウスにおける Ag NPs の細胞毒性とその軽減法に関する検討( <i>in vivo</i> )	18 頁
3.1 背景	18 頁
3.2 方法	18 頁
3.2.1 Ag NPs 及び Ag NPs / CNFS 複合体の作製	18 頁
3.2.2 皮膚欠損モデルマウスの作製	18 頁
3.3 評価方法	19 頁

3.3.1 肉眼的検討	19 頁
3.3.2 組織学的検討	19 頁
3.3.3 カルボニル化タンパク質量の測定	20 頁
3.4 結果	20 頁
3.4.1 肉眼的検討	20 頁
3.4.2 組織学的検討	21 頁
3.4.3 カルボニル化タンパク質量の測定	21 頁
3.5 考察	21 頁
3.6 小括	23 頁
第 4 章 考察	24 頁
第 5 章 総括	30 頁
第 6 章 謝辞	31 頁
参考文献	33 頁
図・表	46 頁

## 第 1 章 緒言

### 1.1 研究の背景と意義

近年、高齢化、医療技術の進歩に伴って、様々な難治性の創傷をもつ患者が問題となっている[1,2]。通常なら創傷が発生したとしても、正常な創傷治癒過程を経て、治癒するが、難治性創傷では、正常な治癒過程を経ることなく、創傷治癒は遷延する。さらに創傷が局所感染をおこし重篤化すると、生命をおびやかす疾患に発展することがある[3]。難治性創傷の原因の一つとして、局所感染が挙げられる。これを予防するためには局所で感染を制御する必要がある。そのための一つの手段として、殺微生物活性のある被覆材を使用することが挙げられる。ここで言う殺微生物活性とは、殺菌、殺真菌、ウイルスの不活化の総称である。今回我々は、被覆材に殺微生物活性を持たせるためのマテリアルとして、抗菌性があり、入手が簡単で人体への影響も少ないとされる銀に注目した。銀は医療分野においても、すでに臨床応用されているものがある。例として、抗菌性を有する創傷被覆材であるアクアセル®Ag、褥瘡等皮膚の細菌感染を制御するためのスルファジアジン銀等が挙げられる。銀の抗菌性に関して、Bergerらは大腸菌属、ブドウ球菌属、プロビデンシア属、セラチア属および緑膿菌属の細菌に対して、銀イオン濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  前後という比較的 low 濃度で発



育を阻止する効果があることを報告している[4]。しかし、銀イオンはハロゲン化物イオンと結合して沈殿を生じ、水溶性および抗菌活性を失うことが報告されているため[5]、使用するに当たっては、効果的な殺菌活性と安定性を両立する銀の形態に対策が必要である。そこで銀イオンより表面積が広く、銀の殺菌活性がより発揮されるとされる銀ナノ粒子(Ag NPs)に注目した[6,7]。Ag NPsは殺菌活性のみならず、ウイルスの不活化活性を有することが知られている。Ag NPsの作用メカニズムは非特異的と考えられるため、多くの種類の微生物に対して、比較的低濃度で強い殺微生物活性が期待できる。一方、安全性は高く、臨床で問題となっている抗菌薬の過剰投与による菌の薬剤耐性獲得のような現象は少ないと考えられる。しかしAg NPsを使用する場合、生物学的および環境へのリスクも存在し、魚類における細胞毒性や遺伝毒性、藻類における光合成の阻害など、複数の水生生物への悪影響が知られている[8]。またAg NPsが遺伝子、タンパク質などの細胞レベル、生体分子レベルで毒性を有することを示す報告がある[7,9]。特にAg NPsは、肺線維芽細胞[9]、神経膠芽腫細胞[9]、肺癌細胞株[10]、肝細胞[11]および間充織幹細胞を含む異なる細胞モデル[3]において、細胞毒性を有することが知られている[12]。Ag NPsの有する殺微生物活性および細胞毒性のメカニズ

μの一つとして、活性酸素種(ROS)の誘導によるものが考えられている[10,13]。

高濃度(1000 mg/kg)の Ag NPs のマウスへの腹腔内投与は、フリーラジカルによる酸化ストレスの増大により、遺伝子発現を変化させ、アポトーシスおよび神経毒性を生成することを報告されている[14]。さらに、Ag NPs の経口摂取に関するいくつかの報告がある。経口摂取後、Ag NPs は消化管から血流に移行し、炎症、皮膚変色、肝障害を誘発する可能性がある[15]。そのため、殺微生物活性をもつ創傷被覆材としての臨床応用の検討の前に、Ag NPs の環境中への拡散および人体への取り込みを防止する方策が必要である[7]。

一つの手段として、Ag NPs をキチン/キトサンに吸着させ、拡散を防ぐために固定化するものがある。キチン/キトサンは、創傷治癒促進等有用な生物学的活性および高い安全性のために、ハイドロゲル、マイクロ/ナノ粒子、膜、シート等の生体材料として応用が可能である [16]。さらにキチン/キトサンは、生体適合性、生分解性、無毒性[17]、殺菌性[18]、組織接着性[19]、止血[20,21]、および創傷治癒[22,23]等、多様な特性を有しており、天然のカチオン性生体高分子として広く研究され、応用されている。

Ag NPs はキチンナノファイバーシート(CNFS)に効率的

に吸着することが報告されている[16]。得られた銀ナノ粒子/キチンナノファイバーシート(Ag NPs / CNFS)複合体は Ag NPs の安定性を高め、より強力な殺微生物活性を示す[24,25]。これらの知見は Ag NPs / CNFS 複合体が殺微生物活性を持つ創傷被覆材として適用できる可能性を示しているが、細胞毒性および安全性に関する研究は行われていない。

## 1.2 研究目的

本研究の目的は、*in vitro* と *in vivo* 実験にて、殺微生物活性を有する Ag NPs の細胞毒性とその毒性を軽減する方法を検討することである。この研究により、すぐれた殺微生物活性をもつ Ag NPs の作用を発揮しながら、酸化ストレスによる細胞毒性等の有害事象を抑制することが可能となり、感染創傷への臨床応用に繋げる事ができる。

### 動物実験指針について

この研究は防衛医科大学校動物倫理委員会によって許可を受け、動物取り扱い指針に基づき実施した。

### 統計学的処理について

測定データの統計学的処理は市販の統計処理ソフト

(JMP® Pro for Windows、SAS Institute Inc、Cary、NC、米国)を使用して行った。条件により、ウイルコクソン検定、ダンネット検定、ステューデント  $t$  検定を用いて行った。データは平均±標準偏差で表し、条件により  $P < 0.05$  と  $P < 0.01$  を統計学的有意とした。

## 第 2 章 殺微生物活性をもつ濃度の Ag NPs の細胞毒性と その軽減方法に関する基礎実験 (*in vitro*)

### 2.1 背景

Ag NPs はその優れた殺微生物活性やドラッグデリバリーシステムなどの特性から様々な分野で応用され、殺微生物活性を有するマテリアルとしての注目を浴びている [6,7,25]。Ag NPs の持つ抗インフルエンザウイルス活性は粒径に依存し、粒径が 10 nm 以下であれば、高いインフルエンザウイルスの不活化活性をもつという報告がある [26]。Ag NPs のすぐれた殺微生物活性を発揮させるため、均一で 10 nm 以下のナノサイズにする必要がある。さらに Ag NPs の合成にあたり無害な材料で作製することが望ましい [27,28]。

Ag NPs の合成について、幾つかの方法が報告されているが、これらの方法は、還元剤や保護剤として有害な試薬を使用する必要があり、濃度、温度、pH 等の厳密な調整を必要とした。そのため、Ag NPs の粒径分布も広くなり、10 nm 以下の粒径制御は困難となる傾向があった [29,30,31]。我々は、AgNO<sub>3</sub> 含有ガラス粉末、グルコース、および水という安全な材料を用いて粒径が 10 nm 未満で粒径制御可能な Ag NPs を作製することができた (図 1)[32]。Ag NO<sub>3</sub> 含有ガラスは、水性環境への銀イオンの徐放を可能にする。

また、グルコースを加熱することによって形成されたカラメルは、Ag NPs の調製中に安定剤として機能する [32]。Ag NPs は、生体および環境に及ぼす細胞毒性等の有害事象があるため、臨床応用にあたっては Ag NPs の環境中への拡散や人体への取り込みを防ぐ手段を講じる必要性がある [8,33]。そのため、Ag NPs をキチン/キトサンに吸着、固定化させ、拡散および取り込みを防ぐ手法を試みた。キチンは N-アセチル-D-グルコサミンの直鎖状多糖で、キトサンはキチンを脱アセチル化して調製されるものである。この多糖体本体のみでも抗菌活性、生体適合性、止血効果等の効果があることから、既に臨床応用されている [34,35,36]。Ag NPs はナノスケールの線維様表面構造を有するキチンシートやキトサンに効率的に吸着し、複合体を形成する。この複合体は安定性を示し、より強力な殺微生物(ウイルスの不活化、殺菌および殺真菌)活性を示した [32,37,38,39]。

また、殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体の細胞毒性を軽減させる一つの方法として、線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)の局所投与が考えられる。FGF-2 は、造血組織形成、再上皮化、および難治性創傷における組織リモデリングを促進する刺激効果を有し、Ag NPs の細胞毒性を軽減する可能性がある。FGF-2 による組織損傷治癒の促進効果は、上皮組織および造血組

織の損傷、唾液低機能化、腸管前駆細胞/幹細胞のアポトーシス、中枢神経系の内皮細胞損傷等、様々な組織において報告されている[40]。

FGF-2 は熱およびトリプシンのようなタンパク質分解酵素に感受性があり、37℃および pH7.4 でシミュレートされたその半減期は約 12 時間以下と非常に短い[41]。局所的に十分な濃度の FGF-2 を維持し、活性を維持しながら持続放出を維持することが必要である[40,41,42]。

FGF-2 の持続効果を高めるために、高分子多電荷複合体として調製した低分子量ヘパリン/プロタミンナノ粒子(LMWH / P NPs)の添加が考えられる[43,44]。LMWH / P NPs は、局所的に注入される FGF-2[41,43]、肝細胞増殖因子[45]、多血小板血漿[46,47]に特異的に結合する。LMWH / P NPs は、*in vivo* で様々な組織の細胞表面およびマトリックス上に保持され、FGF-2 を保護および活性化することができる。さらに、FGF-2 および LMWH / P NPs の局所投与の効果のメカニズムは、FGF-2 および LMWH / P NPs から FGF-2 を安定化、活性化および徐放することによって、血管新生および線維組織形成を誘導するというものである[41,43,44]。

本章では、ヒト線維芽細胞を用いて、線維芽細胞に対する Ag NPs の細胞毒性を *in vitro* で検討し、Ag NPs におけ

る細胞毒性軽減のための局所キャリアとしての FGF-2 および LMWH / P NPs の有効性を検討した。このことにより細胞毒性等の有害事象を抑制することができれば、より効果的な殺微生物活性を有する Ag NPs / CNFS 複合体を使用できると考えられる。

## 2.2 方法

### 2.2.1 Ag NPs の作製

100 mL の蒸留水に 1g の D-グルコース(和光純薬工業株式会社、日本)と 1g の銀イオン含有ガラス(環境サイエンス株式会社、日本)を加えてよく攪拌した。この混合物を 121℃、200 kPa の条件で 20 分間オートクレーブ(IMC-30L、池本理化製、日本)を行い、室温にて冷却した。その後、その混合液を 1500 rpm、10 分の条件で遠心分離を行い、その上清を採取し、これを Ag NPs 分散液(約 60 µg/ mL)とした。保管は 4℃ の冷暗所にて行った。

### 2.2.2 Ag NPs / キチン複合体粉末の作製

キチン粉末 2 mg に条件に応じた濃度の Ag NP 含有液 1 mL を添加し、シェーカー(MildMixer PR-36;タイテック、東京、日本)でよく攪拌した。その混合物を遠心分離後、沈殿物を採取し、蒸留水で 2 回洗浄し、空気乾燥させたも



のを Ag NPs / キチン複合体粉末とした。

### 2.2.3 Ag NPs / CNFS 複合体の作製

キチンナノファイバーシート (chitin - nanofiber sheets : CNFS、ベスキチン W®、ユニチカ株式会社、日本) (70 mm × 55 mm) を 2 mL の様々な濃度の Ag NPs 含有液に浸して、余剰分を蒸留水にて洗浄することを 3 回繰り返した。その後、室温乾燥したものを Ag NPs / CNFS 複合体とした。

### 2.2.4 FGF-2 & LMWH/P NPs の調製

0.7 mL の低分子量ヘパリン/プロタミン (LMWH) 溶液 (Fragmin: 6.4 mg / mL; Kissei Pharmaceutical Co、東京、日本) に 0.3 mL のプロタミン溶液 (10 mg / mL; Mochida Pharmaceutical Co、東京、日本) を添加した。溶液を約 1 分間激しく攪拌した。FGF-2 および LMWH / P NPs を産生するために、0.5 mL の LMWH / P NPs (6 mg) を 0.5 mL の組換えヒト FGF-2 (50 µg/mL; Fiblast; Kaken Pharmaceutical Corp、東京、日本) を混合した<sup>48)</sup>。

### 2.2.5 細胞毒性の検討および NO / NO<sub>2</sub> 測定、細胞毒性軽減に関する検討

Promo cell 社(ドイツ)で樹立されたヒト線維芽細胞をタカラバイオ(滋賀、日本)から購入した。ドナーから研究目的での使用の許可を Promo cell 社(ドイツ)より得ている。この細胞を用いて、i)~iv)に関する検討を行った。

#### **i) FBS の有無、Ag NPs、Ag NPs / キチン複合体粉末の濃度による細胞毒性の検討**

24 - well の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培地(100 U/mL ペニシリン G、100 µg/mL ストレプトマイシン含有)のディッシュ(住友ベークライト株式会社、日本)に  $5 \times 10^4$  個播種した。その後、条件によりウシ胎児血清(FBS)、Ag NPs / キチン複合体粉末を添加し、2日間インキュベートを行った。

#### **ii) Ag NPs、Ag NPs / CNFS 複合体の間接的な細胞毒性に関する検討**

線維芽細胞を 6 - well ディッシュ上に約  $5 \times 10^4$  個播種し、10% FBS を含む 3 mL の DMEM 中で 2 日間培養した。Ag NPs (6 µg)/ CNFS 複合体または CNFS のみを丸型ストレーナー(40 µm ナイロン、BD Falcon、San Jose、CA、米国)上に置いた(図 2)。細胞とストレーナーとの間の距離は 2 mm であった。Ag NPs 群については、2.3 µg を含む Ag NPs 含有液をストレーナー上より 2.5 mL の培地に添加した。これらを FBS および抗生物質を含む 2.5 mL の DMEM 中で 1

日間インキュベートした。生存線維芽細胞を測定するために、新鮮な DMEM 培地 (2 mL) に WST-1 試薬 (Cell Counting Kit、株式会社 同仁化学研究所、熊本、日本) 200  $\mu$ L を添加し、37°C で 1 時間インキュベートし、Immuno Mini プレートリーダー (Nunc InterMed Japan、東京、日本) で 450 nm の Optical Density (OD) 値より測定した。

### iii) NO / NO<sub>2</sub> 測定に関する検討

NO / NO<sub>2</sub> 測定のために、ストレーナーおよび使用培地を除去し、細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で穏やかに洗浄した。その後、細胞を溶解液 (Affymetrix Japan K.K、東京、日本) を用いて回収した。次いで、溶解物を 1000  $\times$  g で 30 分間遠心分離し、上清中のタンパク質含量をタンパク質アッセイキット (Coomassie Protein Assay Kit、Thermo Scientific、米国) を用いて測定し、10  $\mu$ g / mL に調整した。全 NO / NO<sub>2</sub> 量は、NO / NO<sub>2</sub> 測定キット (R&D Systems、米国) を用いて測定した。

### iv) 細胞毒性軽減に関する検討

24-well の DMEM 培地に  $5 \times 10^4$  個播種し、2 日間インキュベートを行った。その後、条件により濃度の異なる各薬物を投与し、経時的に生存線維芽細胞を測定した。方法として、新鮮な DMEM 培地 (2 mL) に WST-1 試薬 200  $\mu$ L を添加し、37°C で 1 時間インキュベート後、Immuno Mini プ

レートリーダーで 450 nm の OD 値より測定した。

## 2.3 結果

### i) FBS の有無、Ag NPs、Ag NPs / キチン複合体粉末の濃度による細胞毒性の検討

生存線維芽細胞数は、10%FBS を添加しない場合、 $\geq 100$  ng/mL の Ag NPs 分散液を用いて調製した単独およびキチン複合体群において減少した。それに対して 10%FBS を添加した場合、 $\leq 1.6$   $\mu\text{g/mL}$  の Ag NPs 分散液を用いて調製した単独およびキチン複合体粉末を添加した群の生存細胞数は増加した(図 3)。

### ii) Ag NPs、Ag NPs / CNFS 複合体の間接的な細胞毒性に関する検討

Ag NPs / CNFS 複合体群および Ag NPs 群の生存線維芽細胞数は、コントロールと比較して、有意に減少した(図 4)。Ag NPs / CNFS 複合体群、Ag NPs 群の顕微鏡観察では、形態的に明確な変化が見られ、不健康な細胞および浮遊細胞が観察され、壊死による広範な細胞死が示唆された(図 5)。この実験では、線維芽細胞と Ag NPs / CNFS 複合体との間に直接の接触はなく、Ag NPs / CNFS 複合体からの培地への Ag NPs の検出可能な溶出はなかった。

### iii) NO / NO<sub>2</sub> 測定に関する検討

Ag NPs / CNFS 複合体群 ( $330 \pm 70 \mu\text{mol/mL}$ ) および Ag NPs 群 ( $340 \pm 50 \mu\text{mol/mL}$ ) の細胞溶解物中の NO / NO<sub>2</sub> の量は、コントロール ( $230 \pm 60 \mu\text{mol/mL}$ ) および CNFS 群 ( $220 \pm 50 \mu\text{mol/mL}$ ) と比較して有意に増加を示した (図 6)。

#### iv) 細胞毒性軽減に関する検討

LMWH / P NPs + FGF-2 群の生存線維芽細胞数は、コントロールと比較して有意に増加した。他方、LMWH 群とプロタミン群の細胞数は、有意に減少した。FGF-2 群と LMWH / P NPs 群の細胞数は、コントロールと比較して、有意差はないが、僅かに増加する傾向にあった。濃度を希釈すると、各群の差は減少傾向にあった (図 7)。

## 2.4 考察

細胞増殖アッセイおよび NO / NO<sub>2</sub> の測定を用いて、Ag NPs の持つ細胞毒性に関するメカニズムの一つとされる酸化ストレスの役割を検討した。線維芽細胞は、Ag NPs との直接接触により、強い細胞毒性を示した。この細胞毒性は、10% FBS 添加により、軽減することができた。またこの細胞毒性は、Ag NPs と線維芽細胞との間に直接の接触がない場合でも、観察された (図 3)。このことから、酸化ストレスの因子が細胞に直接ダメージを与えている可能性と、銀ナノ粒子表面の酸化により放出する銀イオンの細胞

毒性による作用が考えられる。Ag NPs から速やかに銀イオンが放出されることが報告されている [49,50,51]。そこで Ag NPs / CNFS 複合体から培地へ銀イオンの放出の有無について、銀イオン検出キットを用いて培地中の銀イオンを測定したが、検出限界以下であった。しかし、銀イオン検出キットの感度の問題があり、Ag NPs / CNFS 複合体から放出された銀イオンの直接的作用は、Ag NPs / CNFS 複合体の細胞毒性のメカニズムとして排除することはできなかった。Ag NPs / CNFS 複合体からの銀イオンの放出の面から、安全性に関してさらなる検討が必要である。

NO は酸化ストレスの主なエフェクター分子であり、非特異的感染防御機構において重要な働きをする。過剰に産生された NO は活性酸素種と反応し、活性酸化窒素種になり、細菌感染において、強力な殺菌活性を示す。一方、細胞に対して細胞毒性を有する [52]。NO は O<sub>2</sub> と触れると速やかに NO<sub>2</sub> に変化することから、NO / NO<sub>2</sub> 量として同時に測定を行った。NO / NO<sub>2</sub> 量の有意な増加が Ag NPs / CNFS 複合体群および Ag NPs 群の細胞溶解物の両方で観察された。Ag NPs / CNFS 複合体群または Ag NPs 群の NO / NO<sub>2</sub> レベルの増加は、酸化ストレスの増大由来の炎症を示唆する可能性がある [53]。

FGF-2 のようなヘパリン結合成長因子は、高親和性でヘ

パリノイドに結合することが知られている[54]。ヘパリノイドは、FGF-2の生物学的半減期を延長し、FGF-2を熱およびタンパク質分解酵素による分解不活化から保護する[54]。そこで、FGF-2に特異的に結合し、局所的に保持し、FGF-2活性を局所キャリアとして顕著に増強および安定化することができる高分子多電荷複合体として LMWH / P NPs を使用した[41,43,48]。この検討により、LMWH / P NPs + FGF-2 は、Ag NPs の細胞毒性軽減効果を有することが確認された。

以上のことにより、Ag NPs は殺微生物活性を示す濃度であったとしても、FBS や FGF - 2 の添加により、線維芽細胞毒性を軽減させる。このように、Ag NPs の細胞毒性等の有害事象を抑制することにより、安全な殺微生物活性を Ag NPs / CNFS 複合体に保持させることが可能になり、直接微生物に接触しなくても、殺微生物活性を発揮できる可能性があることが示唆された。

## 2.5 小括

・ Ag NPs は、殺微生物活性を持つ濃度であったとしても、線維芽細胞に対して致命的な毒性を有することはなく、FBS や LMWH / P NPs + FGF-2 の添加により、その細胞毒性を軽減させることができた。

- ・ Ag NPs は、線維芽細胞との間に直接的接触がなかったとしても、線維芽細胞に対する細胞毒性を有することが確認された。
- ・ Ag NPs の作用の一つとして、酸化ストレスにおける炎症反応の増大作用が示唆された。
- ・ 細胞毒性等の有害事象を抑制することにより、より安全な殺微生物活性を有する Ag NPs / CNFS 複合体の調製が可能となった。



## 第3章 皮膚欠損モデルにおける Ag NPs の細胞毒性とその軽減法に関する検討 (*in vivo*)

### 3.1 背景

前章で、*in vitro* での線維芽細胞に対して、Ag NPs の細胞毒性とその毒性に対する軽減効果を酸化ストレスの視点から検討した。臨床応用を考慮する場合、実際の生体における細胞毒性の程度、解決法を *in vivo* で検討する必要がある。本章では、殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体の生体への細胞毒性、酸化ストレスの評価、軽減方法を検討することを目的とした。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 Ag NPs 及び Ag NPs / CNFS 複合体の作製

*In vitro* と同様の方法で Ag NPs、Ag NPs / CNFS 複合体を作成した。

#### 3.2.2 皮膚欠損モデルマウスの作製

糖尿病マウス (C57BLKS/J *Iar*<sup>-</sup>+*Lepr* db/+*Lepr* db; クレア株式会社、東京、日本) を皮膚欠損モデルの作製のために使用した (週齢 12-16 週)。検討前にそれぞれのマウスの尿中のグルコースとタンパク質を尿検査薬 (ウリエース、テルモ株式会社、東京、日本) を用いて検査を行い、重度

の糖尿病の存在を確認した。マウスはセボフルラン (Sevoflen、アボットジャパン株式会社、大阪、日本)にて鎮静後、腹腔内注射を行った(ソムノペンチル®、64.8 mg/mL; 共立製薬、東京、日本)。麻酔後、背中を剃毛し生検トレパン(BIOPSY PUNCH、カイインダストリーズ株式会社、東京、日本)を用いて、背中の2か所に8 mmの創を作製した。創傷は条件に応じて殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPsを含んだ Ag NPs / CNFS複合体や CNFS単体をフィルム(クレラップ、クレハ株式会社、日本)を被覆材として使用し、弾性包帯(ハイラテ、イワツキ株式会社、日本)で固定した。そして、下記の事項の検討を行った。

### 3.3 評価方法

#### 3.3.1 肉眼的検討

創傷作成後、2、4、7、9日後に被覆材を除去し、創傷治癒の度合いを評価するために写真を撮った。また、創傷の計測を行い、創傷作成時点の面積を基準に欠損面積を%で表した：創傷面積 (Open wound area (%)) = 上皮化されていない面積 / 創傷作成時点の面積 × 100。

#### 3.3.2 組織学的検討

マウスの安楽死後、筋層を含む皮膚組織を採取し、4%パ

ラホルムアルデヒドにて4°C、12 hの条件で固定を行った。その後、パラフィン包埋、切片を行い、各種染色を行った。染色はヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色、抗8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン(8-OHdG)抗体 (anti-8-OHdG mouse monoclonal antibody、日本老化制御研究所、静岡、日本)を用いて8-OHdG染色を行った。

### 3.3.3 カルボニル化タンパク質量の測定

マイクロチューブ (1.5 mL)を加工して用いた。PBS (1 mL)にて2、4、7日目にやさしく創傷洗浄を行った(図8)。その洗浄した液体を採取し、10分、4°Cの条件で遠心分離(3000 rpm)を行ったのちにタンパク質計測キット(Coomassie Protein Assay Kit、Thermo Scientific 米国)にてタンパク質を計測し、濃度を10 µg/mLに調製した。これらをカルボニル化タンパク質計測キット(Oxiselect™ Protein Carbonyl ELISA Kit、Cell Biolabs、Inc.、San Diego、CA、米国)を用いてカルボニル化タンパク質量の計測を行った。

## 3.4 結果

### 3.4.1 肉眼的検討

Ag NPs / CNFS 複合体群は、CNFS 群と比較して、4、7

日目に有意に創傷治癒の遅延が確認された(図 9、10)。

しかし、2日目に Ag NPs を除去し生理食塩水による洗浄を行った創においては、Ag NPs / CNFS 複合体群においても創傷治癒の遅延がコントロールレベルに軽減した。

### 3.4.2 組織学的検討

H&E 染色において、炎症、肉芽組織において差は観察されなかったが(図 10)、8-OHdG 免疫染色において、Ag NPs / CNFS 複合体群はコントロールと比較して、脂肪組織中の筋線維に 8-OHdG が有意に観察された(図 11)。

### 3.4.3 カルボニル化タンパク質量の測定

浸出液中のカルボニル化タンパク質量は、CNFS に吸着した Ag NPs の量が多いほど、2、4日目において、有意に増加し、以降は漸減した(図 12)。またカルボニル化タンパク質量は、Ag NPs / CNFS 複合体群においても、生理食塩水洗浄群は、しない群と比較して有意に少なくなり、CNFS 群と同程度となった。

## 3.5 考察

殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体群において、糖尿病マウスの創傷治癒は、

CNFS 群と比較して 4、7 および 9 日目に有意に遅延した。しかし、2 日目に Ag NPs / CNFS 複合体を除去し、生理食塩水で創傷を洗浄した群においては、創傷治癒の遅延の改善が観察された（図 9）。すなわち、殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体は創傷に対して治癒の遅延をもたらすものの、創傷治癒遅延は適切な被覆期間と生理食塩水による洗浄により改善できることが明らかになった。同様に、Ag NPs / CNFS 複合体群におけるカルボニル化タンパク質量は、CNFS 群よりも 2 日目に有意に高かったが、Ag NPs / CNFS 複合体群においても、2、4 日目に生理食塩水で洗浄した群は、4、7 日目にカルボニル化タンパク質量は有意に低い値を示した（図 7）。

組織学的観察において、Ag NPs / CNFS 複合体群の 8-OHdG 免疫染色における陽性の数は、CNFS 群の陽性の数よりも有意に大きかった（図 11）。創傷におけるカルボニル化タンパク質も、コントロールと比較して 2 日目に有意に高かった（図 12）。このことより、Ag NPs の細胞毒性等有害事象のメカニズムの一つとして、酸化ストレスの増大があることが示唆された。

したがって Ag NPs / CNFS 複合体被覆剤の使用期間の短縮や生理食塩水での洗浄等の対策を講じて酸化ストレスによる細胞毒性等の有害事象を抑制すれば、Ag NPs / CNFS

複合体は殺微生物活性を持つ創傷被覆材として臨床応用できることが分かった。

### 3.6 小括

・ 殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体シートの創傷被覆により、創傷治癒遅延が発生したが、2日目の Ag NPs / CNFS 複合体シートの除去および生理食塩水による洗浄により軽減された。すなわち、適切な洗浄等対策を講じれば、細胞毒性等の有害事象を軽減し、Ag NPs の殺微生物活性を効果的に利用できる可能性が示唆された。

・ 8-OHdG 免疫染色、カルボニル化タンパク質量計測により、Ag NPs の殺微生物活性や細胞毒性のメカニズムとして、酸化ストレスの増大が考えられた。

## 第 4 章 考察

Ag NPs は低濃度でも強い殺微生物活性を有し、人体への影響が少なく、広い種類の殺微生物活性をもちながらも、微生物による耐性の獲得は少ないとされており、すぐれた特性を多く持つナノマテリアルである。しかし同時に、細胞内、生体組織、生体環境のそれぞれのレベルで細胞毒性を有することがよく知られている。したがって、Ag NPs の環境への拡散を防ぐ方法および人体への取り込みの予防手段の確立が、殺微生物活性を持つ被覆材として臨床応用するために必要である [39]。Ag NPs は、ナノスケールの線維様表面構造を有するキチン/キトサン粉末 [55,56] およびシート [25] に安定的に吸着される。そして、Ag NPs/キチン/キトサン複合体は Ag NPs の安定性を増強し、強力な殺微生物（殺ウイルス、殺菌および殺真菌）活性を示した。他の報告において、Ag NPs / CNFS 複合体の殺微生物活性が Ag NPs 吸着の量に比例して増加し、Ag NPs における安定剤および担体としての CNFS の臨床応用の可能性を示した [25,39]。一方、Ag NPs は様々な程度の *in vitro* および *in vivo* において細胞毒性を示している [12]。さらに、Ag NPs のための適切な生体適合性担体としてのキチン/キトサンは認知されているにも関わらず、Ag NPs/CNFS 複合体の臨床応用に向けた研究はされていない [25,39]。殺微生物活性を発

現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体の感染性創傷への臨床応用およびその作用機序、および細胞毒性のメカニズムを完全に理解することが必要である。そのことにより、殺微生物活性を持つ創傷被覆材としての安全性を示すことができる。

殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体及び Ag NPs 単体は、線維芽細胞において細胞毒性を示した。細胞毒性は、10% FBS の存在下で改善された。さらに、NO / NO<sub>2</sub> 量の有意な増加が、*in vitro* で Ag NPs / CNFS 複合体群および Ag NPs 群の細胞溶解物内で観察された。Ag NPs / CNFS 複合体群または Ag NPs 群における NO / NO<sub>2</sub> レベルの増加は、炎症の増強を示唆している [57]。

FGF-2 のようなヘパリン結合成長因子は、高親和性でヘパリノイドに結合することが知られている [54]。ヘパリノイドは、FGF-2 の生物学的半減期を延長し、FGF-2 を熱およびタンパク質分解不活性化から保護する [54]。LMWH / P NPs は、FGF-2 を特異的に吸着し、局所的に保持することができる高分子多電荷複合体であり、局所キャリアとして FGF-2 活性を有意に増強し、安定化することが報告されている [41,43]。また、FGF-2 は、血管新生因子である内皮細胞の DNA 損傷に対して保護作用を有することが



確認されている[58,59,60]。したがって、FGF-2+LMWH/P NPs の投与は、細胞毒性を軽減することが可能であることが示唆された。

NO は酸化ストレスの重要なマーカーであることが知られており[61]、細胞保護により、NO の減少による酸化ストレスの減少につながっていることも考えられる。

*In vivo* での Ag NPs / CNFS 複合体群における糖尿病マウスの創傷治癒は、CNFS 単独群と比較して 4、7 および 9 日目に有意に遅延した。しかし、2 日目に Ag NPs / CNFS 複合体を除去し、創傷を生理食塩水で洗浄した群においては、創傷治癒遅延が軽減され、CNFS 群と同様の創傷治癒が観察された。また、Ag NPs / CNFS 複合体を被覆したマウスの創から得られたカルボニルタンパク質量は、2 日目に CNFS 群より有意に高かった。しかし、Ag NPs / CNFS 複合体群で 2 日間創被覆し、その後定期的に生理食塩水で洗浄した洗浄群は、4 日目および 7 日目にカルボニル化タンパク質量が有意に低い値を示した(図 9,10)。組織学的観察において、Ag NPs / CNFS 複合体群における 8-OHdG 免疫染色の陽性数は、CNFS 群で観察されたものよりも有意に大きかった(図 11)。実験群においても、コントロールと比較してカルボニル化タンパク質は 2 日目に有意に高かった(図 12)。したがって、創傷に対する Ag NPs / CNFS 複

合体の連続被覆は、おそらく酸化ストレスの増大により創傷治癒の遅延をもたらすが、被覆した創傷を生理食塩水で2日目に洗浄すること、または FGF-2 の添加等薬物の使用により創傷治癒の遅延を軽減させることを確認した。したがって Ag NPs / CNFS 複合体は、有効な殺微生物活性を持つ創傷被覆材になる可能性がある。

Ag NPs はしだいに有毒なイオン形態に溶解する。Ag NPs からの銀イオン溶解の過程は数カ月以上かかる可能性が示唆されている [51]。従って、本研究において、2日以内に銀イオン溶解による有意な影響は見られなかったと考えられる。さらに、細胞増殖アッセイおよび NO / NO<sub>2</sub> 測定において、Ag NPs または Ag NPs / キチン複合体のいずれかへの直接接触した群と比較して、Ag NPs / CNFS 複合体に対する間接的接触においても同様の細胞毒性が観察された。したがって、Ag NPs の細胞への取り込みは、細胞毒性の主要なメカニズムとして排除されることが考えられる [55]。しかしながら、Ag NPs の溶解および細胞取り込みの可能性、そしてヒトおよび環境の両方における長期間の安全性に関してさらなる検討が必要である。また、Ag NPs の作用メカニズムが、他にも存在する可能性もある。そのため、さらなる作用メカニズムの解明が必要であると考えられる。

いくつかの報告は、ナノ粒子毒性における酸化ストレス

の増大によって果たされる作用を強調している [12,54]。酸化ストレスの増大は、タンパク質、脂質、および DNA に対する酸化的損傷を含む、細胞において特異的な効果を有する。本研究では、Ag NPs/ CNFS 複合体の細胞毒性における酸化ストレスの役割を検討するために、NO / NO<sub>2</sub> レベル、8-OHdG 免疫染色、およびカルボニル化タンパク質の量の測定を行った。Ag NPs / CNFS 複合体群または Ag NPs 群においての NO / NO<sub>2</sub> 量の増加は、NO が炎症性シグナル伝達において二次メッセンジャーとして機能し、直ちに NO<sub>2</sub> に変化するので、酸化ストレスの増大の原因としての炎症の増強を示唆している [50]。8-OHdG 染色は、核酸の過酸化状態を示し、抗酸化効果を評価することを可能にする [24]。酸化ストレスのバイオマーカーとしてのカルボニル化タンパク質の使用は、カルボニル化タンパク質の比較的初期の形成および安定性のような他の酸化生成物の測定と比較していくつかの利点を有する [57]。従って、Ag NPs の細胞毒性のメカニズムは、8-OHdG 染色の結果と NO / NO<sub>2</sub> 計測の結果により、酸化ストレスの増大による ROS の誘導と炎症の増強を示唆している。

本研究における殺微生物活性を持つ被覆材の臨床応用は治療範囲に応じた Ag NPs の吸着量、使用する期間を考慮する必要がある。Ag NPs によって活性酸素が発生し、効果

的な殺微生物活性を示す一方で治癒遅延という欠点につながるため、より効果的な作用とより治癒遅延を軽減させるバランスをとる必要がある。殺微生物活性を発現する吸着 Ag NPs 付着量を含んだ Ag NPs / CNFS 複合体を臨床応用する場合、今まで述べたことを考慮すれば安全に使用できる可能性が高いと言える。

## 第 5 章 総括

・本研究は、Ag NPs / CNFS 複合体は効果的な殺微生物活性を維持したまま、細胞毒性等の有害事象の抑制が両立できる可能性を示しており、臨床応用できる可能性が高い。

## 第 6 章 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において一貫してご指導いただきました防衛医学研究センター医療工学研究部門・石原雅之教授、防衛医科大学校歯科口腔外科・横江秀隆教授、佐藤泰則名誉教授、防衛医科大学校形成外科・清澤智晴教授、防衛医学研究センター異常環境衛生研究部門・藤田真敬教授に深く感謝いたします。また、本研究にあたり、研究方法、手技及び論文作成など広範に渡り直接ご指導を頂きました宮崎大学農学部応用生物科学科・服部秀美准教授、防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門・中村伸吾講師に心より感謝いたします。また動物の飼育、管理にあたり、ご指導いただきました福田孝一元准教授をはじめ動物実験施設の先生方に深く感謝いたします。さらに防衛医科大学校歯科口腔外科、防衛医学研究センター医療工学研究部門、動物実験施設の諸先生方、職員の皆様に深く感謝いたします。また、私を研究科へ導いた池野谷肇先生、河本哲先生、大嶋智先生、今美智子先生に深く感謝いたします。最後に陰ながら支えてくれた妻、木之田京子、長女、木之田唯に心から感謝いたします。

## 略語一覽

Ag NPs; silver nanoparticles

Ag NPs/CNFS 複合体; Ag NPs / Chitin Nanofiber Sheet  
複合体

8-OHdG; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS; heat-inactivated fetal bovine serum

FGF-2; Fibroblast growth factor-2

H&E; Hematoxylin-Eosin

LMWH / P NPs; Low-Molecular-Weight Heparin /

Protamine Nanoparticles

NO/NO<sub>2</sub>; nitric oxide/nitrogen dioxide

## 参考文献

1. Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Tanaka Y, Nakamura T, Nishimoto A, Murata T, Hosoyama T, Hamano K. Treatment of refractory cutaneous ulcers with mixed sheets consisting of peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts. *Sci Rep.* 2016; 6: 28538. doi: 10.1038/srep28538.
2. Ge K, Wu JJ, Qian L, Wu MJ, Wang FL, Xu B, Xie T. Bioinformatic analysis of the effect of type II diabetes on skin wound healing. *Genet Mol Res.* 2015; 14: 4802–11.
3. Mehmet OA, Ismail D, Ali Ö. Partial calcaneotomy and Ilizarov external fixation may reduce amputation need in severe diabetic calcaneal ulcers: *Diabet Foot Ankle.* 2017; 8: 1264699.
4. Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, Becker RO. Electrically generated silver ions: Quantitative effect on bacterial and mammalian cells: *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976; 9: 357-358
5. Gupta A, Maynes M, Silver S. The effect of halides on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 1998; 64: 5042-5045.



6. Ahmed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 233: 404–410.
7. DeLima R, Seabra AB, Duran N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol*. 2012; 32: 867–879.
8. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol*. 2008; 42: 8959–8964.
9. AshaRani PV, Mun GLK, Hande P, Valiyaveetti S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*. 2009; 3: 279–290.
10. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human lung cancer cell line, A549. *Arch Toxicol*. 2011; 85: 743–750.
11. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro*. 2008; 19: 975–983.

12. Hackenberg S, Scherzed A, Kessier M, Hummel S, Technau A, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Hagen R, Kleinsasser N. Silver nanoparticles: evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol Lett.* 2011; 201: 27–33.
13. Kim S, Choi JE, Cho J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol in Vitro.* 2009; 23: 1076–1084.
14. Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, Murdock RC, Schlager JJ, Hussain SM, Ali SF. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2009; 187: 15–21.
15. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev Toxicol.* 2010; 40: 328–346.

16. Ishihara M, Hattori H, Nakamura S. A review on biomedical applications of chitosan-based biomaterials. *Int J Pharma Bio Sci.* 2015; 6: 162–178.
17. Mi F.L, Tan YC, Liang HF, Sung HW. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable – chitosan – based implant. *Biomaterials.* 2002; 23: 181–191.
18. Dutta J, Tripathi S, Dutta PK. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides. A systematic study needs for food applications. *Food Sci Technol Int.* 2012; 18: 20–31.
19. Ono K, Ishihara M, Ozeki Y, Deguchi H, Sato H, Saito Y, Yura H, Sato M, Kikuchi M, Kurita A, Maehara T. Experimental evaluation of photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive with surgical application. *Surgery.* 2001; 130: 844–850.
20. Hattori H, Amano Y, Nogami Y, Takase B, Ishihara M. Hemostasis for severe hemorrhage with photocrosslinkable chitosan hydrogel and calcium alginate. *Ann Biomed. Eng.* 2010; 38: 3724–3732.
21. Horio T, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Kanatani Y, Ishizuka T, Nogami Y, Nakamura S, Tanaka Y,

- Maehara T. Hemostatic effects of photocrosslinkable chitosan hydrogel-mixed photocrosslinked chitosan sponges (PCM-S) on hepatic bleeding in rats. *Artif Org.* 2010; 34: 342–347.
- 22.Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials.* 1999; 20: 1407–1414.
- 23.Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, Suzuki S, Okada Y, Kikuchi M. The effect of chitosan hydrogel containing DMEM/F12 medium on full-thickness skin defects after deep dermal burn. *Burns.* 2007; 33: 642–648.
- 24.Nguyen VQ, Ishihara M, Kinoda J, Hattori H, Nakamura S, Ono T, Miyahira Y, Matsui T. Development of antimicrobial biomaterials produced from chitin-nanofiber sheet/silver nanoparticle composites. *J Nanobiotechnology.* 2014; 12: 49.
- 25.Ishihara M, Nguyen V.Q, Mori Y, Nakamura S, Hattori H. Adsorption of silver nanoparticles onto different surface structures of chitin/chitosan and correlations

- with antimicrobial activities. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 13973–13988.
26. 森康貴, 小野岳史, 宮平靖, 久野豊彦, 石原雅之, 松井岳巳. キトサン/銀ナノ粒子複合体の抗ウイルス活性. 防菌防黴. 2010; 38(10): 645–649
27. Raveendran P, Fu J, Wallen SL. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 13940–13941.
28. Vigneshwaran N, Nachane R.P, Balasubramanya R.H, Varadarajan PV. A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydr Res.* 2006; 341: 2012–2018.
29. Navaladian S, Viswanathan B, Viswanath RP, Varadarajan TK. Thermal decomposition as route for silver nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 2007; 2: 44–48.
30. Xu GN, Qiao XL, Qiu XL, Chen JG. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloid Surf A.* 2008; 320: 222–226.
31. Kassae MZ, Akhavan A, Sheikh N, Beteshobabrud R. C-ray synthesis of starch-stabilized silver

- nanoparticles with antibacterial activities. *Radiat Phys Chem.* 2008; 77: 1048–1074.
32. Mori Y, Tagawa T, Fujita M, Kuno T, Suzuki S, Matsui T, Ishihara M. Simple and environmentally friendly preparation and size control of silver nanoparticles using an inhomogeneous system with silver-containing glass powder. *J Nanopart Res.* 2011; 13: 2799–2806.
33. Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, Lee T, Schlager JJ, Hussain SM, Hofmann MC. Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicol Sci.* 2010; 116: 577–589.
34. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62: 3–11,
35. Kale TP, Singh AK, Kotrashetti SM, Kapoor A. Effectiveness of hemcon Dental Dressing versus Conventional Method of Haemostasis in 40 Patients on Oral Antiplatelet Drugs. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2012; 12: 330–335,
36. Arbel J, Rozenbaum E, Reges O, Neuman Y, Levi A, Erel J, Haskia AR, Caneti M, Sherf M, Mosseri M.

- Usage of chitosan for femoral (USF) haemostasis after percutaneous procedures: a comparative open label study. *EuroIntervention*. 2011; 6: 1104–1109.
37. Mori Y, Ono T, Miyahira Y, Nguyen VQ, Matsui T, Ishihara M. Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. *Nanoscale Res Lett*. 2013; 8: 88–93.
38. Xiang DX, Chen Q, Pang L, Zheng CL. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J Virol Methods*. 2011; 178: 137–142.
39. Nguyen VQ, Ishihara M, Mori Y, Nakamura S, Kishimoto S, Hattori H, Fujita M, Kanatani Y, Ono T, Miyahira Y. Preparation of size-controlled silver nanoparticles and chitin-based composites and their antimicrobial activities. *J Nanomater*. 2013; 693486: 7
40. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: Protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res*. 2000; 60: 321–327.
41. Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Nakamura S,

- Ohno C, Horio T, Masanori F, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M. Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 91: 814–23.
42. Cotrim AP, Soweres A, Mitchell JB, Baum BJ. Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands. *Mol Ther*. 2007; 15: 2101–2106.
43. Mori Y, Nakamura S, Kishimoto S, Kawakami M, Suzuki S, Matsui T, Ishihara M. Preparation and characterization of low-molecular-weight heparin/protamine nanoparticles (LMW-H/P NPs) as FGF-2 carrier. *Int J Nanomed*. 2010; 5: 147–55
44. Ishihara M, Kishimoto S, Takikawa M, Hattori H, Nakamura S, Shimizu M. Biomedical application of low molecular weight heparin/protamine nano/micro particles as cell- and growth factor-carriers and coating matrix. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(5): 11785–803
45. Kishimoto S, Ishihara M, Nakamura S, Fujita M, Takikawa M, Sumi Y, Kiyosawa T, Sato T, Kanatani Y. Fragmin/protamine microparticles to adsorb and



- protect HGF and to function as local HGF carrier in vivo. *Acta Biomater.* 2013; 9: 4763–4770.
46. Takikawa M, Nakamura S, Nakamura S, Nambu M, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Doumoto T, Yanagibayashi S, Azuma R, Yamamoto N, Kiyosawa T. Enhancement of vascularization and granulation tissue formation by growth factors in human platelet-rich plasma containing fragmin/protamine microparticles. *J Biomed Mater Res (B)*. 2011; 97B: 373 – 380.
47. Takikawa M, Ishihara M, Takabayashi Y, Sumi Y, Takikawa M, Yoshida R, Nakamura S, Hattori H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Kiyosawa T. Enhanced healing of mitomycin C-treated healing impaired wounds in rats with PRP-containing fragmin/protamine microparticles (PRP&F/P MPs). *J Plast Surg Hand Surg.* 2015; 49: 266–274.
48. Takikawa M, Sumi Y, Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Hattori H, Ryuichi Azuma, Yamamoto N, Kiyosawa T. PRP&F/P MPs improved survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats. *J Surg Res.* 2011; 170: 189–196.

49. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh, J.I, Wiesner M.R, Nel, A.E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 2006; 6: 1764–1807.
50. Dobias J, Bernier-Latmani R. Silver release from silver nanoparticles in natural waters. *Environ Sci Technol.* 2013; 47: 4140–4146.
51. Watanabe S, Fujita M, Ishihara M, Tachibana S, Yamamoto Y, Kaji T, Kawauchi T, Kanatani Y. Protective effect of inhalation of hydrogen gas on radiation-induced dermatitis and skin injury in rats. *J Radiat Res.* 2014; 55: 1107–1113.
52. 赤池孝章. 細菌感染における酸化ストレスシグナル制御と感染防御論. 2015; 70(3): 339–349
53. Crosswhite P, Sun Z. Nitric acid, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. *J Hypertens.* 2010; 28: 201–212.
54. Ishihara M. Structural requirements in heparin for binding and activation of FGF-1 and FGF – 2 are different from that for FGF-2. *Glycobiology.* 1994; 4:

817–824.

55. Nguyen VQ, Ishihara M, Nakamura S, Hattori H, Ono T, Miyahira Y, Matsui T. Interaction of silver nanoparticles and chitin powder with different sizes and surface structures: The correlation with antimicrobial activities. *J Nanomater.* 2013; 467534: 9 .
56. Dallea-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Mizani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: 23–38.
57. Hedberg J, Skoglund S, Karlsson ME, Wold S, Wallinder IO, Hedberg Y. Sequential studies of silver released from silver nanoparticles in aqueous media simulating sweat, laundry detergent solutions and surface water. *Environ Sci Technol.* 2014; 48: 7314–7322.
58. Marie M, Hafner S, Moratille S, Pierre V, Solène M, Odile Rigaud, Michèle T.M. FGF2 mediates DNA repair in epidermoid carcinoma cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2012; 88: 688–693.
59. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6: 389–395.

60. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz–Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*. 2001; 293: 293–297.
61. Zaki M.H, Akuta T, Akaike T. Nitric oxide-induced nitrate stress involved in microbial pathogenesis. *J Pharmacol Sci*. 2005; 98: 117–129.

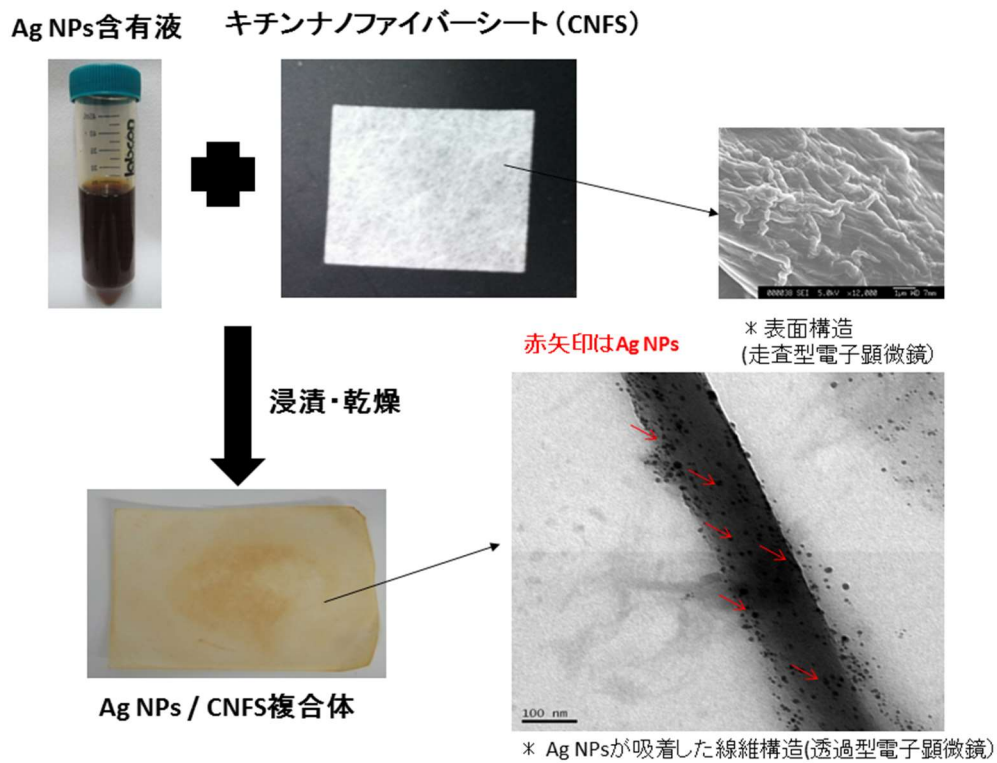


図 1. 銀ナノ粒子/キチンナノファイバーシート  
(Ag NPs / CNFS)複合体の作製

銀ナノ粒子含有液は、蒸留水、D-グルコース、銀含有ガラスを混合後、オートクレーブを行った。(電子顕微鏡写真は文献 24 より引用した。)

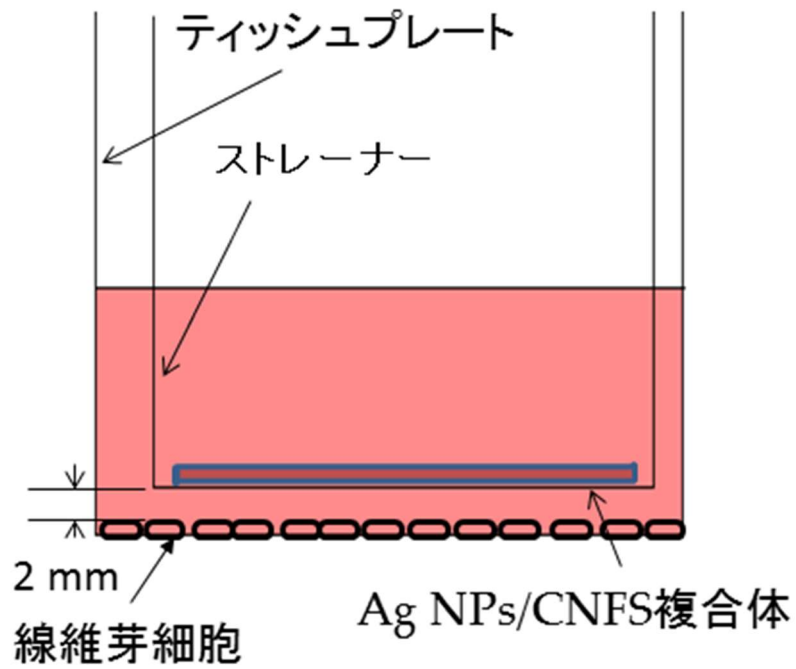


図 2. Ag NPs / CNFS 複合体の間接的細胞毒性測定のための  
模式図

線維芽細胞と Ag NPs / CNFS 複合体の間に直接接触は認められない。

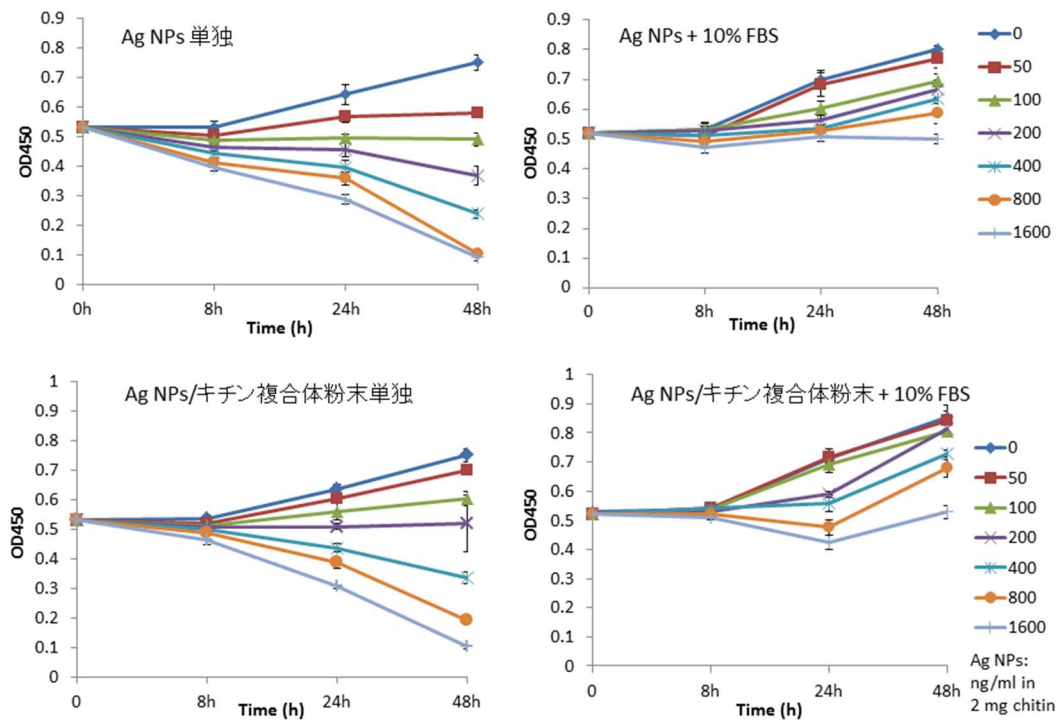


図 3. 細胞毒性の検討

(FBSの有無、Ag NPs、Ag NPs /キチン複合体粉末の濃度)

線維芽細胞数は 10%FBS を添加しない場合、Ag NPs の濃度  $\geq 100$  ng/mL、Ag NPs / キチン複合体粉末の濃度  $\geq 200$  ng の群において減少した。それに対して、10%FBS を添加した Ag NPs の濃度  $\leq 1.6$   $\mu$ g/mL 及び Ag NPs、Ag NPs / キチン複合体粉末を添加した群は細胞数が増加した。

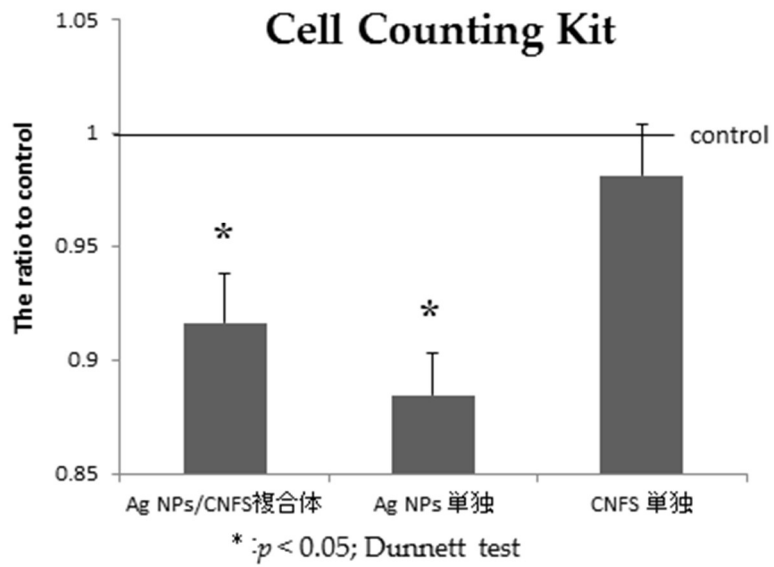


図 4. 細胞毒性の検討

(Ag NPs の間接的細胞毒性)

Ag NPs / CNFS 複合体群、Ag NPs 群の細胞数は、コントロール (CNFS 単独群) と比較して、有意に減少した。



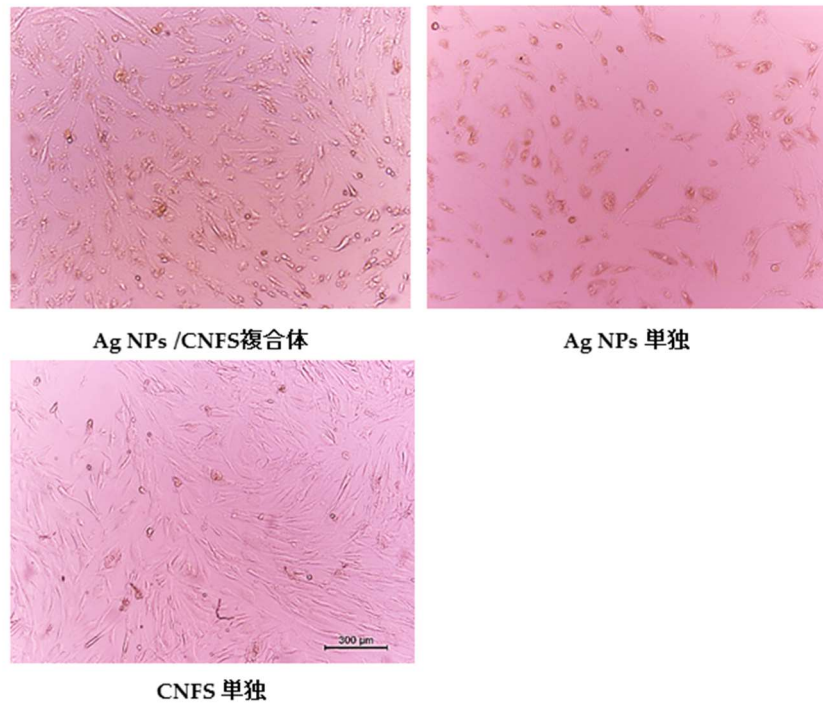


図 5. 細胞毒性の検討

(線維芽細胞顕微鏡像)

Ag NPs / CNFS 複合体群、Ag NPs 群の顕微鏡観察では、形態的に明確な変化が起きていた。不定型な細胞および浮遊細胞が観察され、壊死による広範な細胞死が示唆された。

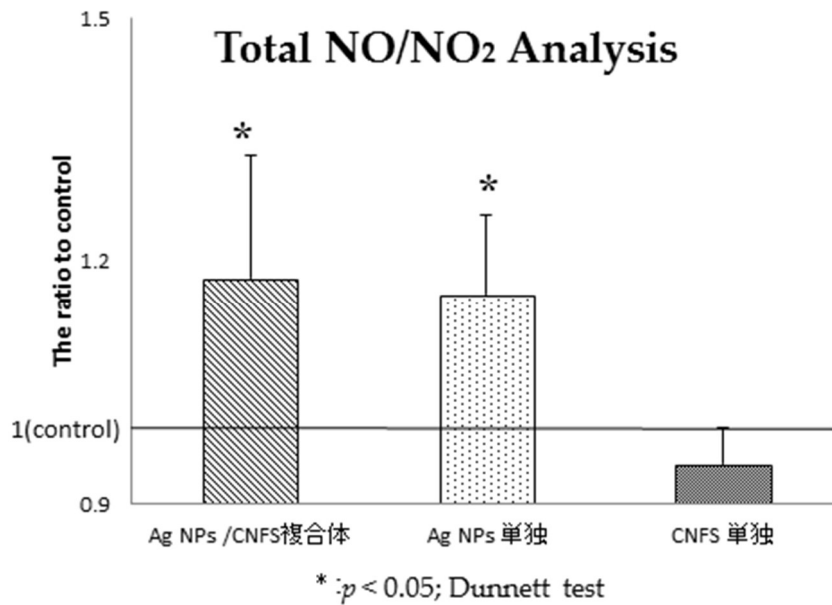


図 6. 細胞毒性の検討

(NO / NO<sub>2</sub> 測定に関する検討)

Ag NPs / CNFS 複合体群 ( $330 \pm 70 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ) および Ag NPs 群 ( $340 \pm 50 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ) の細胞溶解物中の NO / NO<sub>2</sub> の量は、コントロール ( $230 \pm 60 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ) および CNFS 群 ( $220 \pm 50 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ) と比較して有意に増加を示した。

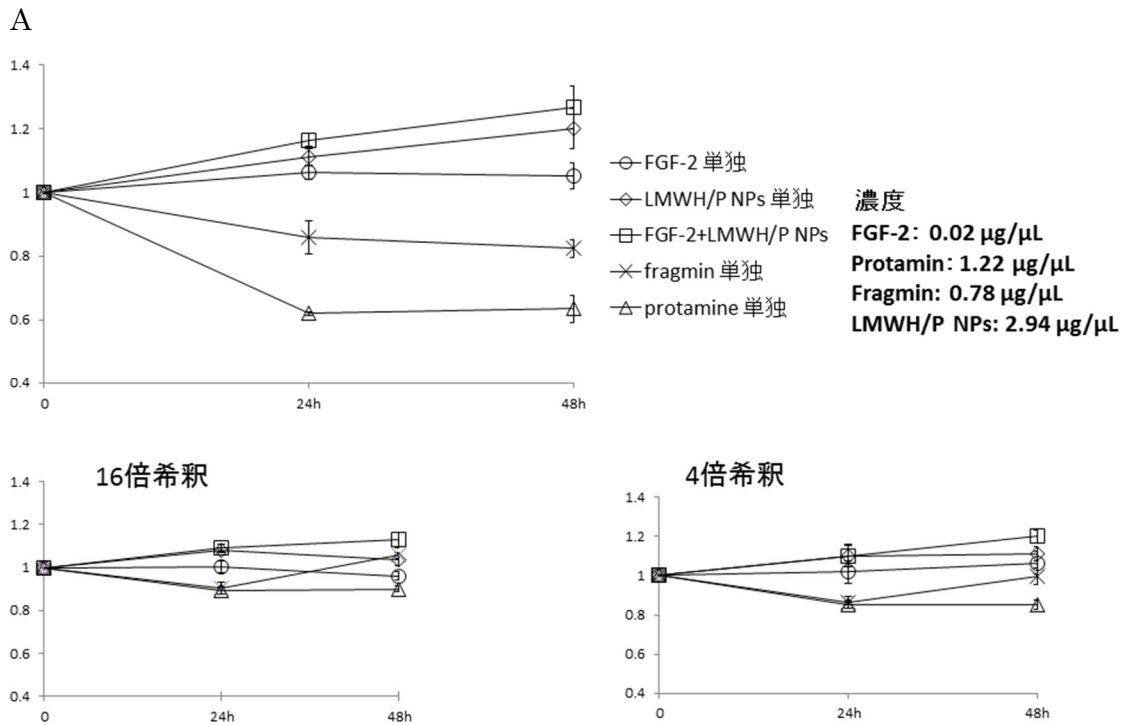


図 7. Ag NPs の細胞毒性に対する線維芽細胞増殖因子 (FGF) - 2+低分子量ヘパリン/プロタミンナノ粒子 (LMWH / P NPs) の毒性軽減効果

LMWH / P NPs +FGF-2 群の細胞数は、コントロールと比較して、濃度依存性に有意に増加した。FGF-2 群と LMWH / P NPs 群の細胞数は、コントロールと比較して増加する傾向にあった。

Carbonyl protein assay

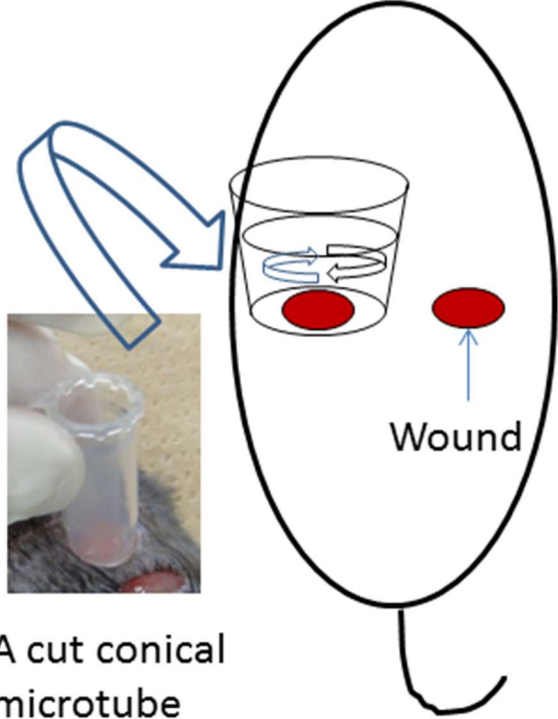


図 8. 浸出液採取のための模式図

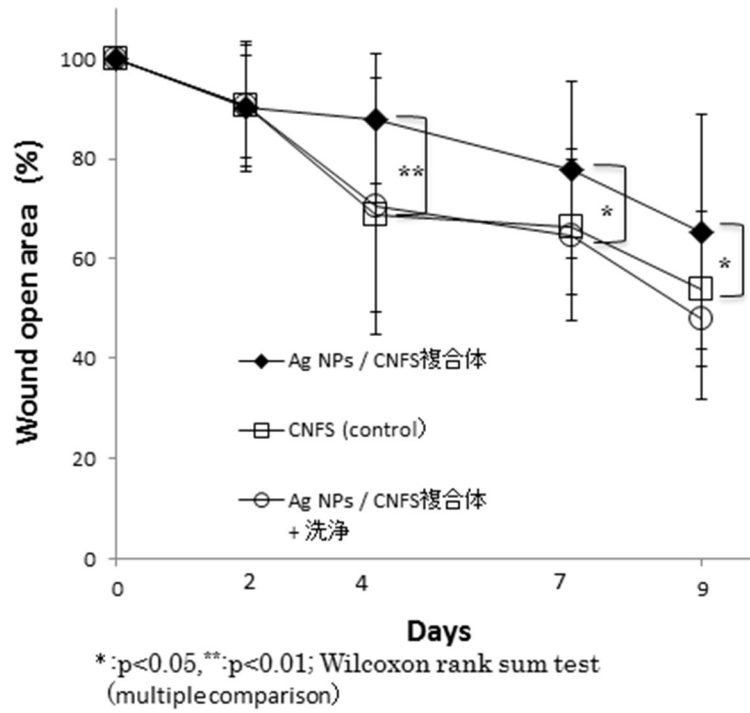


図 9. 肉眼的検討

Ag NPs / CNFS 複合体群は、CNFS 群と比較して、4、7 日に明らかな創傷治癒の遅延が確認された。

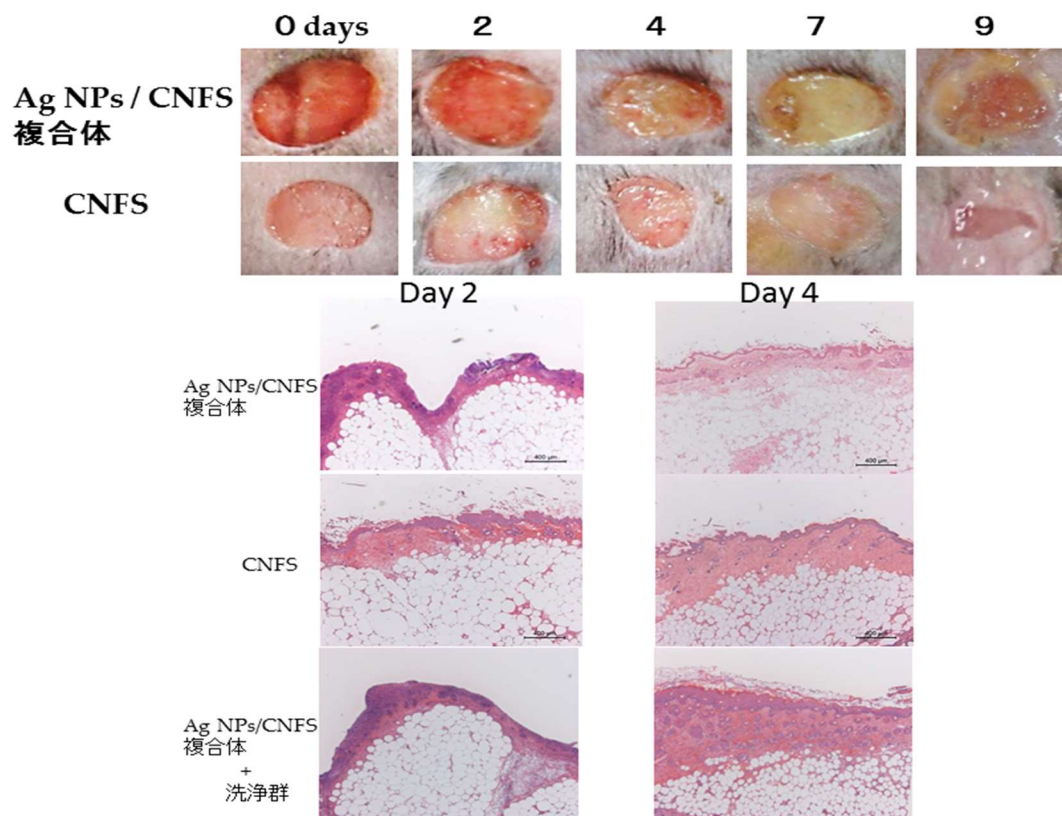


図 10. 肉眼的検討、H&E 染色

Ag NPs / CNFS 複合体群は、CNFS 群と比較して、4、7 日目に明らかな創傷治癒の遅延が確認された。H&E 染色においては有意差を認めなかった。

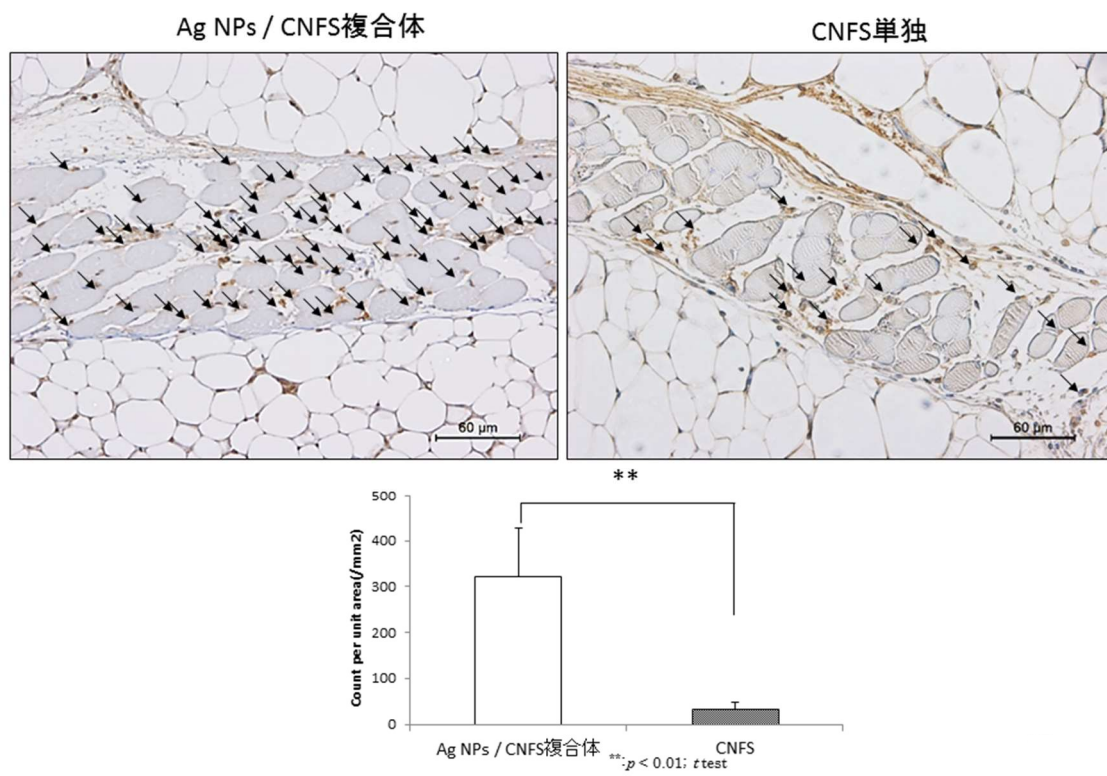


図 11. 免疫染色(8-OHdG)

Ag NPs / CNFS 複合体群の 8-OHdG 陽性数は、CNFS 群と比較して、脂肪組織中の筋線維に有意に増加した。

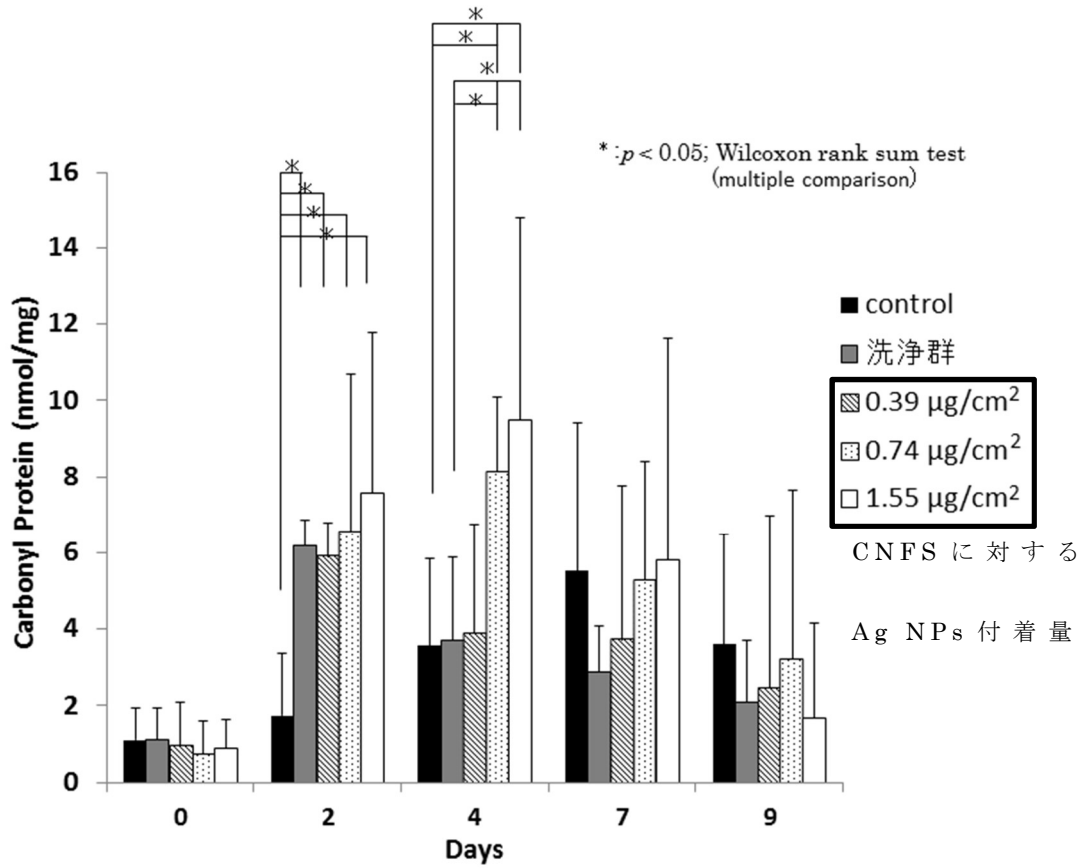


図 12. カルボニル化タンパク質量の測定

生成したカルボニル化タンパク質量は、CNFS に付着した Ag NPs の量が多いほど、2、4 日目における浸出液中に有意に増加し、以降は漸減し、7、9 日目でコントロールと同じレベルになった。また、Ag NPs / CNFS 複合体群において生理食塩水洗浄群は、しない群と比較してカルボニル化タンパク質量は有意に減少した。