

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592286

研究課題名（和文） 銀イオンが創傷治癒に及ぼす影響の分子生物学的解析-創傷治癒を促進させるか-

研究課題名（英文） Molecular biological analysis of the effect of Ag ion for wound healing

研究代表者

梶月 玲子（SATSUKI REIKO）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：50410311

研究成果の概要（和文）：

銀粒子や銀イオンは細菌の増殖を抑制する、または殺菌効果がある事は古くから知られていた。近年では銀イオンを添加した外用薬や創傷被覆材が開発され、注目を集めているが、銀イオンが持つ細胞毒性により創傷治癒の阻害を示唆する報告もある。一方で本邦では細胞増殖因子（bFGF）を有効成分とする製剤も開発された。bFGF 製剤と銀イオン製剤とを組み合わせた場合のこれらの相互作用についての知見は皆無である。われわれは塩化銀溶液および bFGF を単独または併せて添加し、ヒト線維芽細胞を培養した。その結果、①低濃度での銀イオンは細胞増殖に影響を及ぼさないが、高濃度では細胞毒性を有する。②bFGF の付加は銀イオンによる細胞毒性を緩和する可能性がある。③銀イオンは bFGF になんらかの作用をするが、これらの相乗効果により細胞毒性は高められる。ことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that silver and its ions suppress the bacterial growth and works as an anti bacterial reagent. Recently some dressing materials and ointments contains silver ions, however, some reports indicate its toxicity for human cells and may induce the delay of wound healing. Fibroblast growth factor (bFGF) is one of the cytokine that stimulates cell migration and recombinant bFGF is used as an external medicine. The purpose of this study is to confirm if the silver ion act as cytotoxic, if the silver ion affect to the protein such as bFGF. We prepared 4 models for fibroblast culture; model 1: only medium with 1% CFS, model 2: medium with bFGF and 1% CFS, model 3: medium with bFGF, 1% CFS and silver ions, model 4: medium with 1% CFS, bFGF which was incubated for 24 hours with silver ions, and silver ions. In this study, firstly, we confirmed that low concentration of silver ions doesn't affect to cell growth and high concentration of silver ions does. Second, Second, bFGF mitigate the cytotoxic effect of silver ion. Third, the silver ion directly interact with bFGF and interacted bFGF became more harmful to cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2200000	660000	2860000
2010年度	500000	150000	650000
2011年度	900000	270000	1170000
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒学

1. 研究開始当初の背景

銀粒子や銀イオンは細菌の増殖を抑制する、または殺菌効果がある事は古くから知られていた。近年では銀イオンを添加した外用薬や創傷被覆材が開発され、注目を集めているが、銀イオンが持つ細胞毒性により創傷治癒の阻害を示唆する報告もある。一方で本邦では細胞増殖因子 (bFGF) を有効成分とする製剤も開発された。bFGF はタンパク質であり、細胞表面にある受容体に結合してその作用を担う。金属イオンがタンパク質に及ぼす影響は解明されていない部分が多い。特に bFGF 製剤と銀イオン製剤とを組み合わせた場合のこれらの相互作用についての知見は皆無である。銀イオンの抗菌作用は古くから知られているが、近年医療分野でも注目されるようになり、数々の銀含有製剤が開発されてきている。本邦でも創傷被覆材のうち、銀イオンを徐放するものが発売されるようになった。同時に本邦では国内で開発された bFGF 製剤が創傷治療に用いられている。これらの併用は一見、創傷治療において極めて有効だと考えられがちであるが、銀イオンが bFGF をはじめとする創傷治療に関与するタンパク質へ、どのような相互作用をし、線維芽細胞をはじめとする細胞増殖に関与するのかについて、一定の見解は無い。われわれは、銀イオン存在下での線維芽細胞の増殖および銀イオンへの正ないしは負の遊走性の有無、さらには銀イオンの細胞増殖における bFGF への阻害作用の有無について検討を行いたく、本研究を開始した。

2. 研究の目的

銀粒子や銀イオンは細菌の増殖を抑制する、または殺菌効果がある事は古くから知られていた。近年では銀イオンを添加した外用薬や創傷被覆材が開発され、注目を集めているが、銀イオンが持つ細胞毒性により創傷治癒の阻害を示唆する報告もある。一方で本邦では細胞増殖因子 (bFGF) を有効成分とする製剤も開発された。bFGF はタンパク質であり、細胞表面にある受容体に結合してその作用を担う。金属イオンがタンパク質に及ぼす影響は解明されていない部分が多い。特に bFGF 製剤と銀イオン製剤とを組み合わせた場合のこれらの相互作用についての知見は皆無である。近年では bFGF 製剤を創傷被覆材に含有させ、徐放化させる事により創傷治癒を促進させるとの報告も有るが、銀含有創傷被覆材に bFGF を添加した場合、銀イオンが bFGF の作用に対して負に働く可能性もある。以上の背景をふまえて本研究課題では創傷治癒における銀イオン自体の影響を調べるのみならず、タンパク質としての bFGF への直接的な作用についても検討を行うこと

を目標とした。

① 銀イオンが線維芽細胞へ及ぼす影響
銀は極めて電離しにくい金属である。銀をイオン化させるため、硝酸銀溶液を用いて線維芽細胞への影響を検討した文献があるが、硝酸銀自体が細胞への毒性・腐食性を持つため、適切な実験系とは考えにくい。そこで我々は塩化銀を用いる事を検討した。カウンターイオンである塩化物イオンは体液中に相当量含まれている事も選択の基準となった。

② 銀イオンが bFGF に及ぼす影響
線維芽細胞の培養液中に銀イオンと bFGF を共存させる事で、もし、銀イオンが細胞増殖に影響を及ぼすとした場合に bFGF はその救済となり得るのか、また、銀イオンがタンパク質としての bFGF に直接的に作用することで、そのサイトカインとしての活性を阻害する可能性があるのか、を検討するため、bFGF と銀イオンを同時に細胞培養液に添加する実験系と、事前に銀イオンと bFGF を共存させておいた物を細胞培養液に添加する実験系を総合的に評価する事で、銀イオンと bFGF の相互関係を間接的に考察する事を目指した。

3. 研究の方法

①細胞培養

- i. 10cm ディッシュで 80%コンフルエントになるまで培養した線維芽細胞を、0.05%トリプシンで剥離し、セルカウンターで細胞数をカウントした。
- ii. 各条件の細胞密度になるように 96well プレートに細胞を播種した (培地:1%FBS となるように FBS を添加した D-MEM)。
- iii. 37°C, 5%CO₂ の条件下で 24 時間インキュベートした。
- iv. bFGF と銀イオンを各濃度条件になるように添加した 1%FBS D-MEM で培地を交換する (各 well につき培地は 100 μl) した。
- v. 37°C, 5%CO₂ の条件下で 24 時間インキュベートした。
- vi. 各 well に Cell counting-kit8 を 10 μl ずつ添加し、37°C, 5%CO₂ の条件下で 1 時間インキュベートした。
- vii. プレートリーダーを用いて 450nm の吸光度を測定した。

②銀イオン溶液の調整

- i. 滅菌容器に滅菌水と塩化銀を入れて遮光し、37°Cのインキュベーターで一晩シェイクした。

- ii. 25°Cのインキュベーターに移し、一晩静置した。
- iii. 50mlの遠心管に移し、1000rpm, 25°Cで5分間遠心した。
- iv. 上清を新しい容器に移し、使用するまで25°Cのインキュベーターで保存した。
- v. 銀イオン濃度測定装置を用いて銀イオンの濃度を測定した。

③銀イオン処理 bFGF の調整

- i. 銀イオン溶液と bFGF 溶液を、それぞれ最終濃度の 100 倍の濃度となるように混合した。
- ii. 25°Cで一晩静置した。
- iii. 1%FBS D-MEM に 100 倍希釈で加えた。

④塩化銀に暴露した bFGF の調整

- i. 最終濃度の 100 倍の濃度となるように bFGF 溶液を調製し、塩化銀を直接加えた。
- ii. 25°Cで一晩静置した。
- iii. 1500rpm, 25°Cで5分間遠心後、上清を 1%FBS D-MEM に 100 倍希釈で加えた。

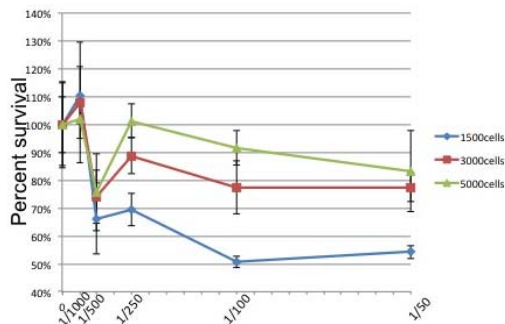
以上により下記の群をそれぞれ作成し、比較検討を行った。

- Ag(-) bFGF(-)
- Ag(-) bFGF(+)
- Ag(+) bFGF(-)
- Ag(+) bFGF(+)

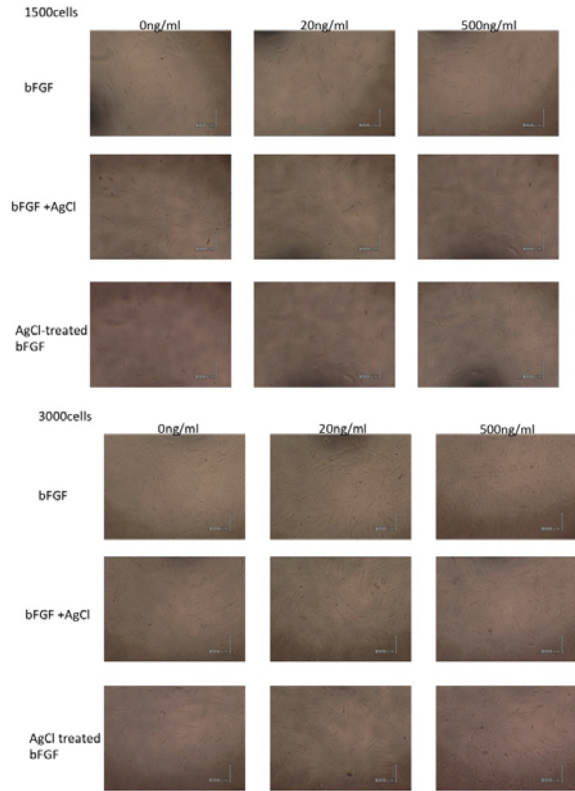
4. 研究成果

① 銀イオン添加下におけるヒト培養線維芽細胞の挙動解析

銀イオンを添加する事で細胞増殖に対して濃度依存的に負の影響を及ぼしたが、飽和量の 1/1000 の濃度までは細胞の生存に正の影響を及ぼした。また細胞の生存への影響はディッシュ内の細胞密度に依存し、特に 1500 細胞の時の影響は 5000 細胞の時の影響に比して強い傾向にあった。このことより、銀イオンの細胞の生存へ与える影響はイオン分子と細胞との数値的な比例関係があることが示唆された。



横軸は銀イオン濃度（飽和溶液を基準（1）とし、これを希釈したものを添加した時の数値とした。左より 1/1000, 1/500, 1/250, 1/100, 1/50, である。グラフに示される通り、細胞数が 1 ウェルあたり 1500, 3000, 5000 のいずれの場合も銀イオン量が増えるにつれて生存細胞数は減少した。ただしその影響は、細胞密度に影響されることが明らかとなった。



上図:1500 細胞での Ag イオンおよび bFGF の影響。下図: 3000 細胞での Ag イオンおよび bFGF の影響。上段数値は bFGF 濃度を示す。従来より報告されているように高濃度の bFGF は細胞増殖を阻害する (500ng/ml)。また銀イオンを添加する事で細胞増殖は抑制される。

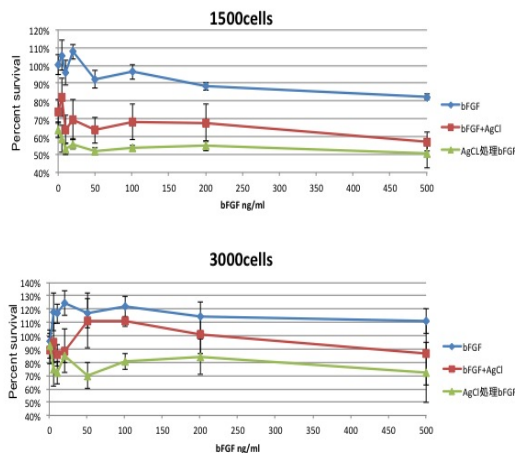
② 銀イオン添加による bFGF 活性への影響の解析

本研究項目では、本邦では臨床で bFGF 製剤が用いられることを想定して行っている。タンパク質は一般にその活性に金属イオンが影響する。ここでは銀イオンの存在により bFGF の活性は影響を受けるのか、検討を行った。

図に示す通り、銀イオンを添加する事で

線維芽細胞の増殖は濃度依存的に抑制されるが、bFGF を添加する事で僅かに銀イオンの細胞増殖抑制は改善される事が明らかとなった。また、この影響は1500細胞よりも3000細胞において顕著に現れた。

次に予め銀イオンに暴露させたbFGFを添加し、線維芽細胞の増殖を検討したところ(銀イオン処理bFGF)、細胞毒性は銀イオン単独よりも高まった。



以上より、銀イオンが高濃度で存在する事により細胞毒性を持つ事、また bFGF の添加によりその細胞毒性は緩和される事、さらには銀イオンを含む創傷被覆材等に bFGF を徐放性を期待して埋入することは細胞毒性を更に高める事が示唆された。

この銀イオン処理された bFGF が持つ細胞毒性については現時点でその根拠を示唆するデータは得られておらず、今後、本知見に対する解明も含め、発展させて行きたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①【ASOの診断と治療】 下肢・足趾切断術
榊原俊介、寺師浩人. Circulation 2012;
 2(3):100-106

②下肢難治性潰瘍 糖尿病性病変、重症下肢虚血・静脈うっ滞性潰瘍 糖尿病性足潰瘍と重症下肢虚血 その創傷概念と救肢の意義
寺師浩人. 医学のあゆみ. 2011;
 237(1):71-78

③糖尿病性足潰瘍(with/without PAD)の治療
寺師浩人. 創傷. 2010; 1(1):1-12

[学会発表] (計1件)

①今井 緑、榊原俊介、橋川和信、田原真也、寺師浩人
 銀イオンが細胞増殖に及ぼす影響—bFGF製剤との相関—
 第20回日本形成外科学会基礎学術集会 2011.10.6-7 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶月 玲子 (SATSUKI REIKO)
 神戸大学・医学研究科・医学研究員
 研究者番号: 50410311

(2) 研究分担者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)
 神戸大学・医学部附属病院・准教授
 研究者番号: 80217421

橋川 和信 (HASHIKAWA KAZUNOBU)
 神戸大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 90403237

榊原 俊介 (SAKAKIBARA SHUNSUKE)
 神戸大学・医学研究科・特命助教
 研究者番号: 50444592

江尻 浩隆 (EJIRI HIROTAKA)
 神戸大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 70529552