

奈米黏土之細胞毒性評估

---摘錄自工業技術研究院 生物醫學工程中心之

「奈米黏土之抗菌性及細胞毒性評估報告」

一、計畫緣起

目前常用的抗菌劑包括了人工合成抗菌劑及天然抗菌劑，雖然皆有不同程度的抗菌效果，但是卻也產生不同程度的副作用，包括了如對人體產生毒性反應、對微生物產生抗藥性及對大自然的環境造成了嚴重的破壞等等。為了解決上述的問題，研發單位開發了以奈米黏土為原料的抗菌劑，奈米黏土原料完全取自天然礦物，經過高度純化加工分散於水溶液中，本身純淨無味且不含任何有害溶劑，並具有奈米結構的特性。

基於上述奈米黏土的特性及奈米黏土在未來的推廣應用與發展的潛力，工研院進一步針對奈米黏土的抗菌性質及細胞毒性做一較完整的測試，有系統並深入探討其抗菌效果。

二、計畫目標

本計劃將以直接接觸的方式來測試三種不同樣品編號之奈米黏土溶液的抗菌性質。在實驗中我們選用了格蘭氏陽式菌的*S. aureus*、*S. pneumoniae*；格蘭氏陰式菌的*E. coli*、*P. aeruginosa*來做為抗菌測試的菌種，以評估奈米黏土溶液對微生物之抗菌能力。另外在本計畫中也以體外細胞培養的方式來評

估奈米黏土的細胞毒性。

三、計畫內容

細胞毒性測試(Cytotoxicity)

由於細胞培養方法已被證明與動物試驗有良好之關聯性，並對較毒性物質(cytotoxic agents)顯示出較高之敏感度。因此，根據ASTM F895 Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture for Cytotoxicity細胞毒性檢驗測試方法檢測材料生物適應性，此測試方法可對新材料(new materials)及新配方提供評估潛在細胞毒性，並可作為已完成之醫用元件(medical devices)及組件(components)品質管制工作(quality control program)之一部份，並提供有用之資料以幫助預測生醫應用之潛力。

本試驗檢測材料為不同量0.007, 0.015, 0.03克之PK-805材料，對照材料negative control為Teflon；positive control為Latex rubber。詳細試驗步驟如下所列：

1. 於培養皿(culture dishes)中進行細胞培養以成長出融合單層(Confluent monolayer)。
2. 培養基(medium)被吸出並以含瓊脂之培養基取代之並使其固化。
3. 試驗用材料置於Agar表面，受測物件之毒性成份會擴散進入培養基內，以形成一濃度梯度並由距離試驗物件不同之距離影響細胞之生長。

4. 以中性紅(Neutral Red)染色分析評估及記錄。

本試驗所用之實驗設備如下所示：

1. 細胞培養箱(Incubator)可維持細胞培養於 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $5 \pm 1\%$ CO_2 ，且超過90%相對濕度。

2. 水浴槽：可保溫 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，及 $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

3. 顯微鏡：倒立式相位差光學式，倍率：40X, 100X, 200X。

4. 臨床用離心機：可達到1000個重力加速度。

5. 無菌操作檯。

6. 高壓滅菌鍋。

試驗環境：

Laminar flow工作區域具有濾除99.99% $0.3\mu\text{m}$ 直徑的所有粒子，或class 100 之無塵室，避免於細胞培養過程中污染所必須具有之設備。

測試溫度: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (tolerances $\pm 1^{\circ}\text{C}$)

測試環境溼度: $50 \pm 5\%$ (tolerances $\pm 2\%$)

數量：測試數量3重複。

測試允收基準：

在不同的細胞毒性試驗法中，判定細胞毒性程度並予以分級之判定基準

並不盡相同，然而對於細胞毒性程度之分類，基本上是依下述所列細胞變異程度來做一區分。

- (1) 細胞死亡(cell death)
- (2) 細胞膜完整性受損(loss of cell membrane integrity)
- (3) 細胞粘著性降低(reduced cell adhesion)
- (4) 細胞形態學改變(altered cellular morphology)
- (5) 細胞增值降低(reduced cell proliferation)
- (6) 細胞生化合成活性降低(reduced biosynthetic activity)

本試驗方法依據表一及表二指數來判斷測試材料毒性有否，其中區域指數為量度細胞無法以中性紅(Neutral Red)染色之清楚區域，溶解指數(Lysis Index)為量度於毒性區域內受到影響之細胞數目，一細胞培養若於顯微鏡下檢視顯示細胞於區域內發生畸形(malformation)、退化(degeneration)、崩解(sloughing)或溶解現象，或中度至嚴重細胞層密度減少，皆可視為有毒反應。Response Index決定，可經由分數方法示之，亦即對每一個試樣 Zone index列於分子，將 Lysis Index 列於分母

(RI=ZI/LI)如下所示:

Response Index=Zone Index(0~5)/Lysis Index (0~5)

如果對一組試樣，對負控制試樣觀察到呈現細胞毒性效果，或對一正控制試

樣呈無細胞毒性效果，則對此種試樣之試驗結果需視為無效。

(表二) 區域描述(Zone Description)

區域指數	區 域 描 述
0	於試樣附近或試樣之下沒有可檢測出之區域
1	區域限制於試樣下之面積
2	區域超過試樣但小於0.5 公分
3	區域超過試樣0.5~1.0 公分
4	區域超過試樣1.0公分以上但並未發生於整個盤內
5	區域發生於整個盤內

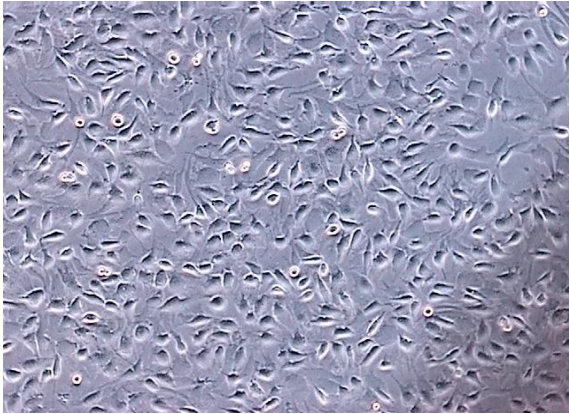
(表三) 溶解描述(Lysis Description)

溶解指數	區 域 描 述
0	沒有可觀測到之細胞毒性
1	小於20% 區域受到影響
2	20% ~ 39% 區域受到影響
3	20% ~ 59% 區域受到影響
4	20% ~ 80% 區域受到影響
5	大於80% 區域受到影響

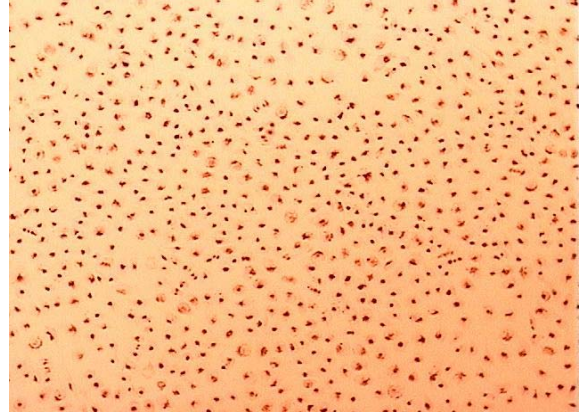
四、實驗結果

細胞毒性測試結果

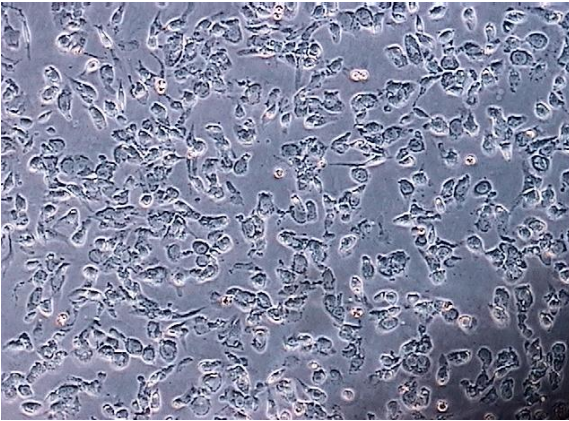
根據ASTM F895 Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture for cytotoxicity細胞毒性檢驗測試方法檢測不同量PK-805型號材料生物適應性，測試觀察結果如(表七)及(圖十七) 所示，相對於控制組材料對比結果可以得知，PK-805型材料**不具有細胞毒性，生物親和性良好**。



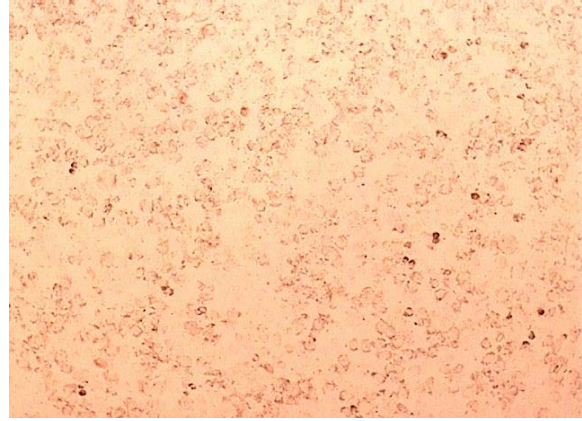
(a)



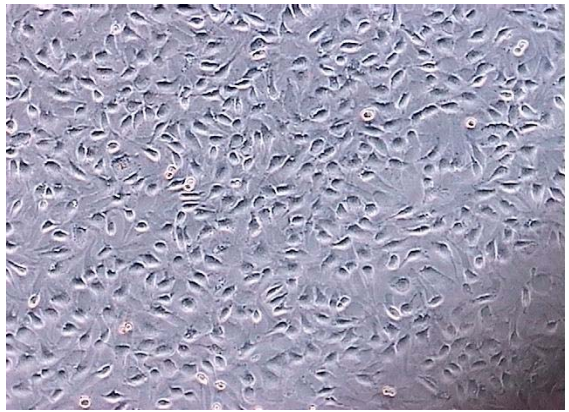
(b)



(c)



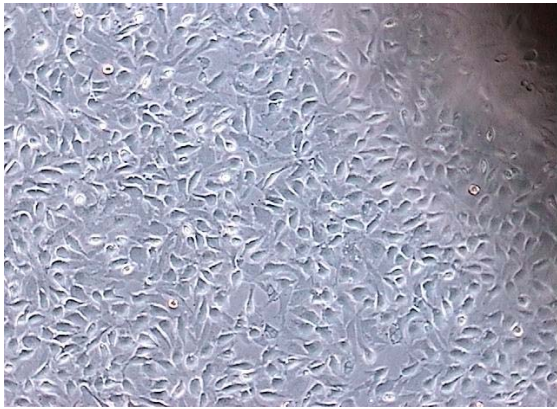
(d)



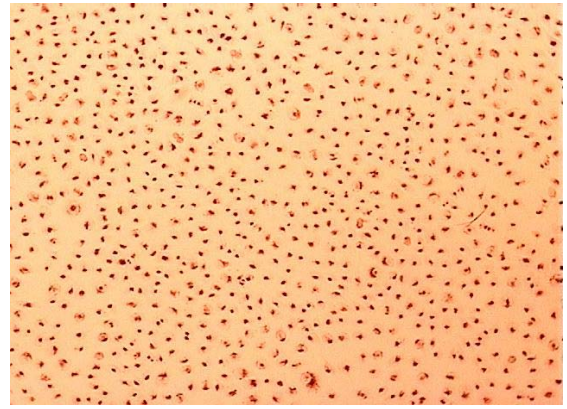
(e)



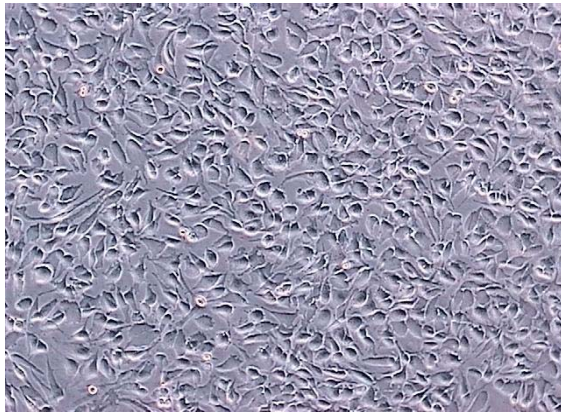
(f)



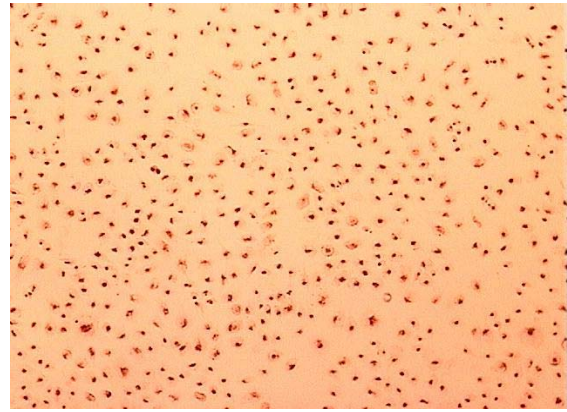
(g)



(h)



(i)



(j)

(圖十七)、以ASTM F895測試規範對不同量之PK-805型號材料之細胞毒性測試顯微形態(a) Negative control 材料Teflon周圍細胞形態；(b) Negative control 材料Teflon周圍細胞中性紅染色形態；(c) Positive control材料材料Latex rubber周圍細胞形態；(d) Positive control 材料Latex rubber周圍細胞中性紅染色形態；(e) 0.007 克PK-805材料周圍細胞形態；(f) 0.007 克PK-805材料周圍細胞中性紅染色形態；(g) 0.015 克PK-805材料周圍細胞形態；(h) 0.015 克PK-805材料周圍細胞中性紅染色形態；(i) 0.03 克PK-805材料周圍細胞形態；(h) 0.03 克PK-805材料周圍細胞中性紅染色形態；(放大倍率100倍)。