

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価およびリスク低減化に関する研究

### ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長  
研究協力者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長  
研究協力者 小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
研究協力者 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官

研究要旨：物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の二次粒子径が異なる酸化ニッケル (NiO) ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。まず、LabCyte EPI-MODEL による細胞毒性試験の実施方法について、OECD TG439 に記載されている LabCyte EPI-MODEL を用いた化学物質の皮膚刺激性評価法及び医療材料に対する皮膚刺激性 *in vitro* 試験方法 (EpiDerm EPI-200 RhE、SkinEthic RHE) を参照して、ナノマテリアルの評価に適する形に改良した。細胞毒性試験を実施した結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/mL において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC<sub>50</sub> 値が 3-30 µg/mL であった。ZnO では、ZnO(sigma) が ZnO(alfa) に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、1% SDS で IL-1α、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

#### A. 研究目的

近年ナノマテリアルが我々の周りで広く使われるようになってきた。しかしながら、新規材料であるためその安全性は未知の部分が多く、生体影響の評価については、試験法や評価基準などが定められていない。ナノマテリアルの生体影響には、化学組成に加えて、形状、粒子径、凝集状態、表面

積、表面荷電など、様々な物理化学的要因が関与している。我々は、培養細胞を用い、十分にキャラクタリゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ヒト由来細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系構築を目指すと共に、ナノマテリアルの細胞応答に及ぼす影響を解明するための基礎的検討を行ってきた。

平成 29 年度は、物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の酸化ニッケル (NiO) ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。また、培養上清中のサイトカインを測定し免疫応答への影響について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 材料及び物理化学的特性の測定

酸化亜鉛ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich 及び NanoTeK Alfa Aesar のナノ分散製品を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。注射用水にて 10 mg/mL に調製し、懸濁原液とした。NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (一次粒子径 : <50 nm) を用い、サイズの異なる粉砕用ジルコニアボール (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) と遊星ボールミル型粉砕機 NP-100 (シンキー) にて、二次粒子径の異なる NiO 懸濁原液 (10 mg/mL) を調製した。これらの懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁原液及び培地懸濁液中での平均粒子径、粒径分布等を、動的光散乱光度計 ELSZ-2NPA (大塚電子) により測定した。

### 2) 細胞株及び培養方法、細胞毒性試験方法

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 (JCRB) は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS) を含む MEM (GIBCO) にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。細胞株は、3-4 日ごとに継代培養した。コロニー形成試験は、ISO 10993-5:2009 に従い、24-well プレートに細胞を播種し (50 cells/well)、24 時間後に培地を除き、被験液を添加し、さらに 4 日間培養した。培養終了後、培地を除去し、

MeOH を添加して細胞を固定後、ギムザ染色液によりコロニーを染色した。陰性対照材料として PE シート、陽性対照材料として A (0.1% zinc diethyldithio-carbamate (ZDEC)-PU シート)、B (0.1% zinc dibutyldithio-carbamate (ZDBC) -PU シート) (食品薬品安全センター秦野研究所) を用いた。

### 3) 再構築ヒト皮膚モデル及び培養方法、細胞毒性試験方法

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC)) を用いた。前培養は、LabCyte EPI-MODEL を、維持培地が入った 4-well プレートへ移し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 15-30 時間、前培養した。試験液の添加は、溶媒コントロール、陽性対照、各試験液を 100 µL ずつ皮膚モデルの上に添加し、新しい維持培地が入った well へ皮膚モデルを移し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 18 時間、培養した。皮膚モデルを、維持培地が入った新しい 24-well プレートに移した後、培養上清を蛋白低吸着チューブに移し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。皮膚モデルは、PBS で 10 回、ピペットを用いて洗浄し、MTT 溶液が入った 24-well プレートに移し、37°C、3 時間、反応させた。皮膚モデルを、0.5 mL のイソプロパノールが入った 1.5 mL tube に移し、2 時間、振とうしながら色素を抽出した。96-well プレートへ抽出液 200 µL を移し、OD 570 nm/ 650 nm を測定した。

### 4) 培養上清中のサイトカインの測定

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL の培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1β、Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)、IL-1α、MIF を ELISA により測定した。測定キットは、IL-8 (Human IL-8 ELISA Kit、Invitrogen)、

IL-1 $\beta$  (Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit、Invitrogen), TNF- $\alpha$ (Human TNF- $\alpha$ ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1 $\alpha$ (Human IL-1 $\alpha$ /IL-1F1 Quantikine ELISA kit、R&D systems)、MIF(Human MIF Quantikine ELISA kit、R&D systems)を用いた。(検出限界 IL-8 ; 1.0 pg/mL、IL-1 $\beta$  ; 5.0 pg/mL、TNF- $\alpha$  ; 1.7 pg/mL、IL-1 $\alpha$  ; 1.0 pg/mL、MIF ; 0.068 ng/mL)

(倫理面への配慮)  
該当なし。

## C. 結果

### 1) 再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた細胞毒性試験系の構築

化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、既に動物試験代替法として適用されている (OECD TG439) (表 1)。医療機器及び医用材料の刺激性はウサギを利用した皮膚刺激性試験及び皮内反応試験により評価されているが、動物愛護の観点より再構築ヒト皮膚モデルによる評価の検討が進められてきた。ISO/TC194/WG8 において、2 種類の皮膚刺激性 *in vitro* 試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)を実施することになり、当部は昨年度、EPI-200 を用いた RRS に参加し (MatTek 社製 EpiDerm™ EPI-200 RhE モデル : 22 施設、EPISKIN 社製 SkinEthic™ RHE モデル : 7 施設が参加)、ISO 10993-23, Biological evaluation of medical devices -- Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE)に収載準備中である。一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 におい

て検討がなされ、本年 4 月に、ISO 10993-22, Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials が発出された。その中では、*in vitro* 評価法として従来の細胞毒性試験、遺伝毒性試験、刺激性試験法が引用されているが、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、新規評価法の有用性が検証されれば、参照される可能性がある。

再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は、J-TEC により開発された日本製の培養表皮モデルである。RRS で用いられたモデルにおいては、医療機器の皮膚刺激性試験用としてそれぞれ試験プロトコルの改良が行われたことから、当部と J-TEC で LabCyte EPI-MODEL 24 の医療機器試験用に向けたプロトコルの改良を行った。(表 2)。LabCyte EPI-MODEL は EpiDerm™ EPI-200、SkinEthic™ に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、被験物質暴露後の細胞の洗浄の際に、他のモデルと同様に洗浄瓶を用いて洗浄を行うと、陽性対照物質として用いた 1% SDS では、三次元皮膚モデルが剥がれ、組織がボロボロになってしまったため、ピペットを用いて洗浄を行う方法に変更した。

### 2) ZnO ナノマテリアルの物理化学的性質と A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進めるため、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を対象として、その物理化学的性質について明らかにすると同時に (ナノマテリアル溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。)、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系

細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて細胞毒性を評価した (平成 27 年及び平成 28 年の報告書参照)結果を表 3 に示した。2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma 及び alfa)は、一次粒子径がそれぞれ <35 nm, 40 nm、水懸濁液中(10 mg/mL)での平均粒子径は、それぞれ 66 nm, 165 nm、ゼータ電位は 44.9 mV, -7.5 mV であった。血清含有培地懸濁液中 (0.2 mg/mL)では、ZnO(sigma)は粒径が変化したが、ZnO(alfa)は殆ど変化せず、ゼータ電位は共に血清含有培地に近い値を示した。A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性は、共に ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。

### 3) ZnO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により ZnO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、ZnO(sigma)の IC<sub>50</sub> は 9.8 µg/mL、ZnO(alfa)の IC<sub>50</sub> は 12.6 µg/mL で、ZnO(sigma)の方が ZnO(alfa)より細胞毒性が強かった (図 1)。IC<sub>50</sub> の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

### 4) ZnO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (J-TEC)に、2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma, alfa)を、100 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、

ZnO では今回実施した最高濃度 400 µg/mL においても細胞毒性を示さなかった (図 2)。

### 5) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL における ZnO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

ZnO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により、5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1α、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった (図 3)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照(1% SDS)、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)の暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)の暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)では、産生量の上昇は観察されなかった。

### 6) NiO ナノマテリアルの物理化学的性質と A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

次に、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、その物理化学的性質について明らかにすると同時に (ナノマテリアル溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。)、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて細胞毒性を評価した (平成 27 年及び平成 28 年の報告書参照)結果を表 4 に示した。3 種類のジルコニアボールを用いて調製した NiO 懸濁原液 (10 mg/mL)の平均粒子径は、それ

ぞれ 102, 172, 310 nm であった。培地中では懸濁原液より若干平均粒子径は大きくなったものの、同様の傾向を示した。粒径分布も同様の傾向を示した。A549 及び THP-1 細胞を用いて、細胞毒性試験を実施した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。

#### 7) NiO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm) の IC<sub>50</sub> は 29.5 µg/mL、NiO (同直径 0.1mm) の IC<sub>50</sub> は 13.3 µg/mL、NiO (同直径 0.5mm) の IC<sub>50</sub> は 2.7 µg/mL で、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた (図 4)。IC<sub>50</sub> の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

#### 8) NiO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100% として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、今回実施した最高濃度 400 µg/mL において

も細胞毒性を示さなかった (図 5)。

#### 9) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL における NiO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

NiO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により 5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1α、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった (図 6)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照 (1% SDS)、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルの暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルの暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS) において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルにより、産生量の上昇は観察されなかった。

#### D. 考察

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進める上で、再構築ヒト皮膚モデル用いた評価系は有用であると考えられる。化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、OECD TG439 が、動物試験代替法として適用されている。一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 において検討がなされて

おり、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、再構築ヒト皮膚モデルを用いた新規評価法の有用性が注目されている。再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は国内の J-TEC により開発された培養表皮モデルで OECD TG439 に記載されている。LabCyte EPI-MODEL は、同じく OECD TG439 に記載されている EpiDerm™ EPI-200、SkinEthic™ に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、LabCyte EPI-MODEL を用いた化学物質の皮膚刺激性評価法及び、医療材料に対する皮膚刺激性 *in vitro* 試験方法 (EpiDerm EPI-200 RhE、SkinEthic RHE) を参照して、ナノマテリアルの評価に適する形に改良し、今回ナノマテリアルの評価を行った。

本研究では、物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO ナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC<sub>50</sub> 値が 3-30 µg/ml であった。ZnO では、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、A549、THP-1 細胞と同様の結果を示した。LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

また、LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、1% SDS で IL-1α、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察

されず、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった。ヒト白血由来単球細胞株 THP-1 においては、ZnO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、その量は、ZnO(sigma)の方が多かった。NiO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、TNF、IL-1β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。□ これらは、再構築ヒト皮膚モデルと血球系細胞株では、共にヒトの細胞由来であるが、由来の組織が異なるため、ナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることが予想される。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

## E. 結論

1. 物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の二次粒子径が異なる酸化ニッケル (NiO) ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC<sub>50</sub> 値が 3-30 µg/ml であった。ZnO では、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。
2. LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、1% SDS で IL-1α、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO

によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。

以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K.

Komoriya, R. Kato, Y. Haishima, K. Isama, Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses, EuroTOX 2017, ブラチスラヴァ, 2017年9月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1 OECD TG439における各試験法のプロトコルパラメータ

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte E PI-MODEL2 4 SIT
<b>A) インキュベーション前</b>				
インキュベーションの時間	18~24 時間	18~24 時間	2 時間未満	15~30 時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
<b>B) 化学物質の適用</b>				
液体の場合	10 µL (26 µL/cm <sup>2</sup> )	30 µL (47 µL/cm <sup>2</sup> )	16 µL (32 µL/cm <sup>2</sup> )	25 µL (83 µL/cm <sup>2</sup> )
固体の場合	10 mg (26 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm <sup>2</sup> ) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm <sup>2</sup> ) + DW (25 µL)
ナイロンメッシュの使用	使用しない	適宜使用する	使用する	使用しない
総適用時間	15 分間	60 分間	42 分間	15 分間
適用温度	室温	a) 室温で 25 分間 b) 37°C で 35 分間	室温	室温
<b>C) インキュベーション後の量</b>				
培地量	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
<b>D) 最大許容変動</b>				
連間の標準偏差	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

表2 ISO/TC194 WG8 Round Robin Studyにおける各試験法のプロトコルパラメータ

	MatTek	Episkin	J-TEC
	EPI-200-SIT	SkinEthic	LabCyte
	0.63 cm <sup>2</sup>	0.5 cm <sup>2</sup>	0.32 cm <sup>2</sup>
前培養	preincubation 1 : 60 ± 5 min	2 hr / 0.3 ml or -24 hr / 1 ml	15-30 hr
	preincubation 2 : 18-24 hr		
被験物質容量	100 µl	100 ± 2 µl	100 µl
共培養時間	18 hr ± 30 minutes	24 hr ± 1 hr	18 hr ± 1 hr
適用温度	37 ± 1°C	37°C	37°C
CO <sub>2</sub>	5 ± 1%	5%	5%
RH	95%	95%	high humidity
MTT	1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate	1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate	1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate
	37 ± 1°C, 5 ± 1% CO <sub>2</sub> , 95% RH	37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , 95% RH	37°C, 5 % CO <sub>2</sub> , high humidity
	3 hr ± 5 minutes	3 hr ± 15 minutes	3 hr
Extraction	2 ml isopropanol/well of 24 well plate	1.5 ml isopropanol/well of 24 well plate	0.5 ml isopropanol in 1.5 ml tube
	2 hr at RT with shaking (-120 rpm)	2 hr ± 5min at RT with shaking (-150 rpm)	2 hr at RT with shaking



表3 ZnOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

種類	製造(販売)元	懸濁液中平均粒子径* (nm ± SD) <sup>°</sup> 1次粒子径 <sup>°</sup> (nm)	懸濁液中平均粒子径* (nm ± SD) <sup>°</sup>		Zeta電位* (mV ± SD) <sup>°</sup>		細胞毒性 (IC50)		遺伝毒性 A549細胞 小核試験 (20 µg/ml)
			注射用水	10%FBS-MEM培地	注射用水	10%FBS-MEM培地	A549細胞	THP-1細胞	
			(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	MTS法 (48h) (µg/ml)	ATP法 (48h) (µg/ml)	
ZnO <sup>°</sup>	Sigma-Aldrich	<35	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	31.7	49.4	陽性
ZnO	Alfa Aesar	40	164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	72.5	63.0	陽性

\*測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA °カタログより °cumulant法より算出 °10%FBS-MEM培地のZeta電位(-9.6±1.6 mV) °2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

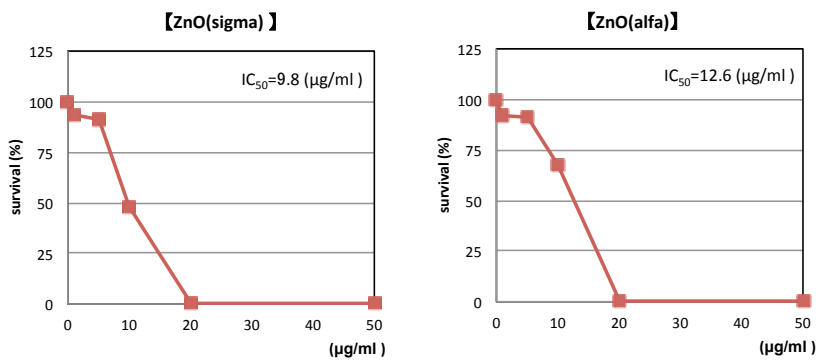


図1 ZnO処理によるV79細胞の細胞毒性(コロニー法)

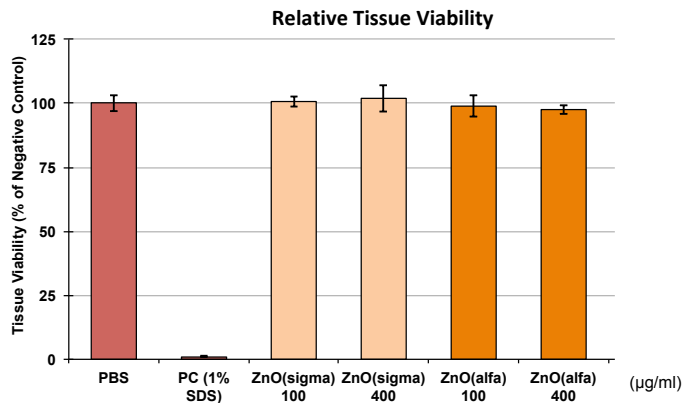
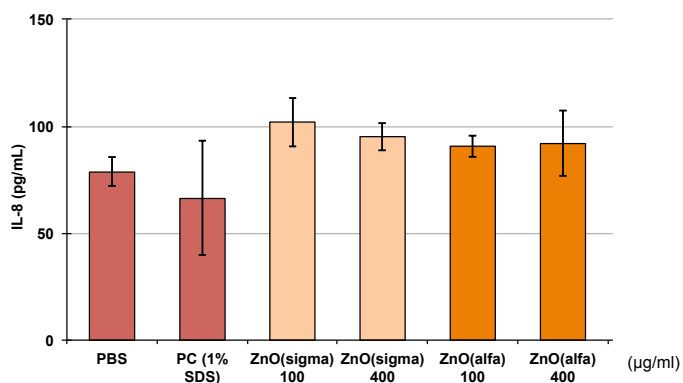
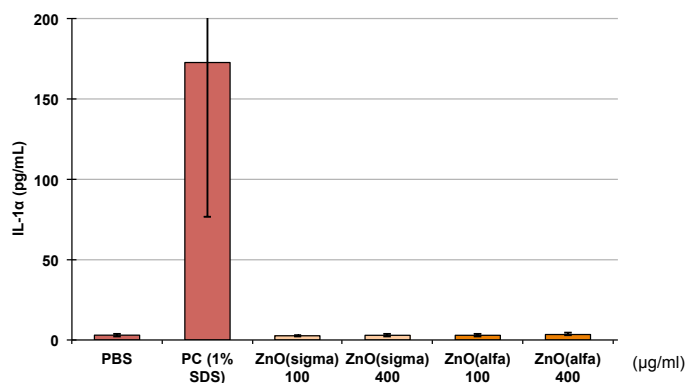


図2 ZnO処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

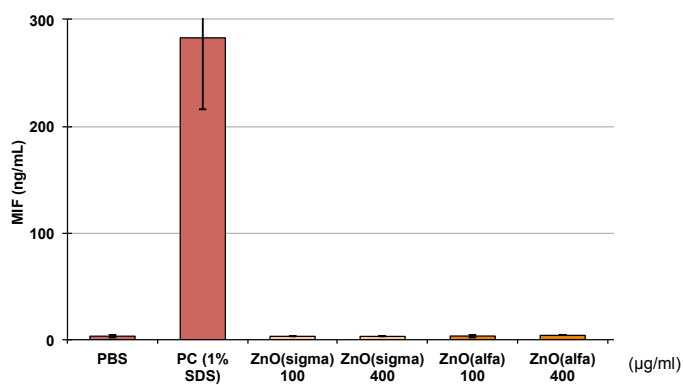


図3 ZnO処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

表4 NiOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

	懸濁液中平均粒子径 <sup>a</sup> (nm ± SD) <sup>c</sup>					細胞毒性 (IC50)	
	注射用水	10%FBS-MEM培地				A549細胞	THP-1細胞
	(10 mg/ml)	(0.4 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(0.1 mg/ml)	(0.05 mg/ml)	MTS法 (48h) (μg/ml)	MTS法 (48h) (μg/ml)
<b>NiO (φ0.05nm)<sup>b</sup></b>	102.0 ± 0.5	154.8 ± 1.2	152.6 ± 2.5	151.2 ± 3.0	135.2 ± 1.5	147.5	35.8
<b>NiO (φ0.1nm)<sup>b</sup></b>	172.0 ± 2.8	234.7 ± 2.2	249.9 ± 4.2	258.0 ± 1.5	234.5 ± 17.8	83.5	34.2
<b>NiO (φ0.5nm)<sup>b</sup></b>	310.4 ± 6.7	373.1 ± 0.6	411.9 ± 13.1	345.1 ± 15.4	414.2 ± 5.8	33.4	30.0

<sup>a</sup>測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA <sup>b</sup>粉体を秤量後、各サイズのジルコニアボールを用い遊量ボールミル型湿式破砕処理により調製。Tween80(0.1%(w/v)含有。  
<sup>c</sup>cumulant法より算出

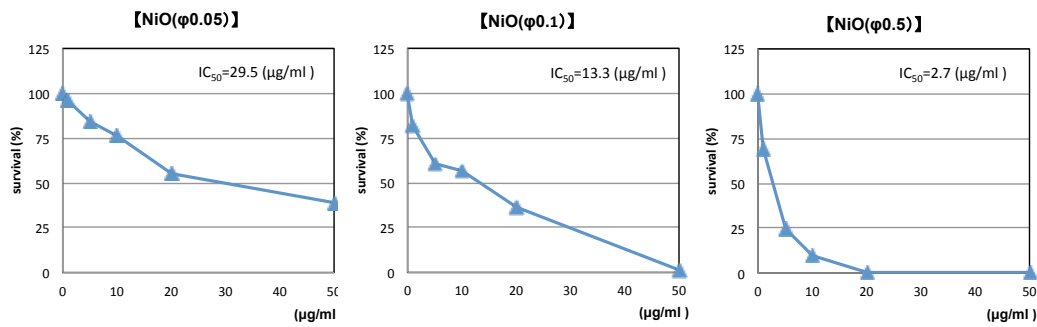


図4 NiO処理によるV79細胞の細胞毒性(コロニー法)

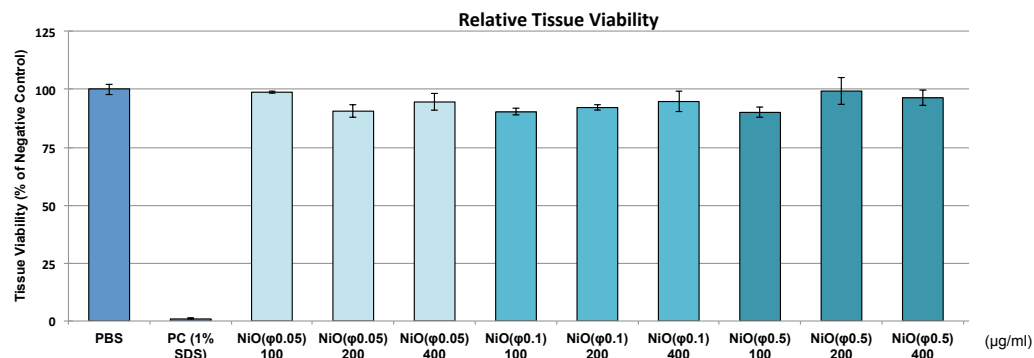
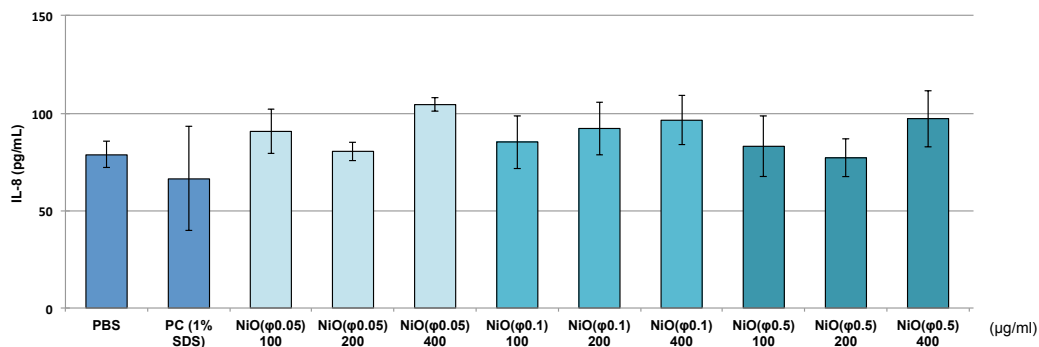
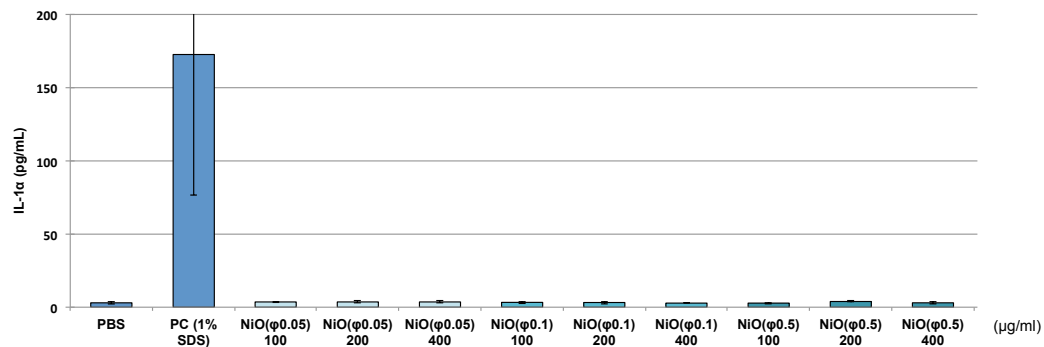


図5 NiO処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

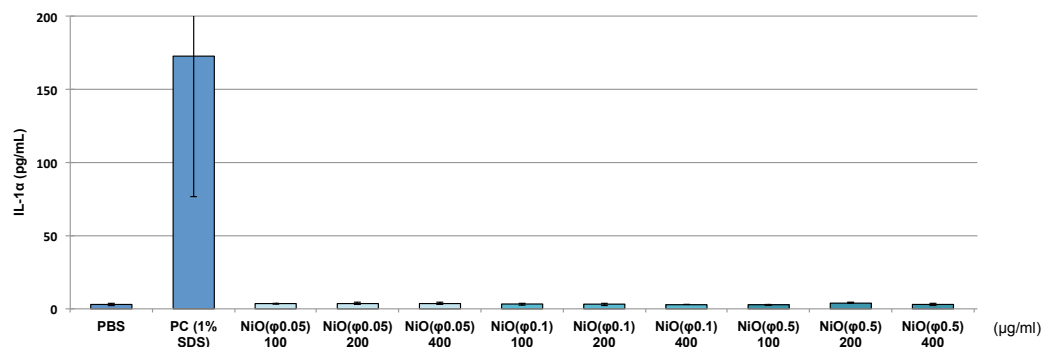


図6 NiO処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生