

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発  
(H22-化学-若手-009)

血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の血管透過性に関する研究

研究分担者：花田 三四郎 国立国際医療研究センター・研究所・研究員

研究代表者：藤岡 宏樹 東京慈恵医科大・分子生物学研究部・助教

研究分担者：井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学生体構造学分野・助教

研究協力者：山本 健二 国立国際医療研究センター・研究所・副所長

研究協力者：馬目佳信 東京慈恵医科大・分子生物学研究部・教授

### 研究要旨

ナノ粒子は、その粒子サイズ・表面特性の特殊性により、脳内移行の可能性が危惧される。そこで、薬効評価試験に採用されている *in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデルを活用することで簡便かつ定量的な指標の確立を目的とした。本研究では、蛍光シリカおよび表面修飾の異なるセレン化カドミウム量子ドットのナノ粒子透過性試験を実施した。

シリカナノ粒子としては、30-1500 nm の計 4 種類について検討を行った。結果、30 nm において BBB 透過性が確認され、100 nm 以上の粒子では透過しなかった。蛍光顕微鏡により観察すると細胞層にシリカナノ粒子が蓄積していることが確認された。

次に 30 nm について、その濃度依存性を検討した。0.1 mg/mL では、透過係数が低いものに対して、1.0 mg/mL の高濃度では透過係数が亢進していることから、細胞の障害により細胞間透過性の亢進や細胞内取込みに影響を与え、BBB の透過に関与している可能性が考えられる。

今後は、様々なナノ粒子に関して検討を行い、ナノ粒子の低濃度暴露における分析法について検討する予定である。

### A:研究目的

ナノ粒子は、その粒子サイズや特殊な表面性状により、生体内への選択的な蓄積が危惧されている。とくに、脳内への移行性については、マウスモデルにおいて大阪大学の堤らによりシリカ粒子の血

液脳関門（以下、BBB）透過性が報告されている。同様に、京都府立医大の伏木らは、量子ドットに特殊な表面修飾を施すことで、マウス投与において脳内への移行することを示した。これらの結果から、ナノ粒子の脳内移行そのものが、生

体にどのような現象をもたらすかに関しては十分には理解することはできないが、脳疾患への影響に関して検討の余地があることを示唆している。

一方で、動物試験によるナノ粒子試験法は、実験が長期にわたること、エンドポイントの設定など予測不能な点が多い。

本研究では、薬効評価試験に採用されている *in vitro* BBB モデルを活用し、ナノ粒子の BBB 透過性に関する簡便かつ定量的な指標の確立を目的とした。本研究の対象材料には、蛍光シリカ、および表面修飾の異なるセレン化カドミウム量子ドットを用いた。

## B:研究方法

薬剤透過性試験に用いられる、血管内皮細胞とペリサイトによる二層細胞層で構成された BBB 透過モデル (ファーマコセル社) を用い、ナノ粒子透過試験を実施した。ナノ粒子は蛍光シリカナノ粒子および量子ドットを用いた。細胞透過係数は、 $P_{app}$  [cm/sec] を用いた。計算式は以下のとおりである。

$$P_{app} = \frac{V_{\text{脳側}}}{S \times C_{\text{血管側}}} \times \frac{\Delta C_{\text{脳側}}}{\Delta t}$$

$C$ : 濃度

$S$ : 膜面積

$V$ : (脳側) 培養液体積

各種サイズの蛍光シリカナノ粒子 (30

nm, 100 nm, 400 nm, 及び 1500 nm) を用い、添加濃度 0.1-1 mg/mL、培養時間 30 分の培養後、透過側培養液を回収し、蛍光強度から透過係数を算出し、比較検討した。同様に、表面電荷の異なる (正電荷: アミノ基、負電荷: カルボキシル基、電荷なし: ポリエチレングリコール基 (PEG)) セレン化カドミウム量子ドット (25 nm) について、40 nM 添加条件において、透過性試験を実施した。

(倫理面への配慮)

特になし。

## C:研究結果

粒子サイズの異なるシリカナノ粒子の BBB 透過係数の結果を図 1 に示す。粒径 30 nm では、BBB 透過が確認された (透過係数  $4.17 \times 10^{-6}$  cm/sec)。一方、100 nm では、透過係数はわずかだった ( $0.157 \times 10^{-6}$  cm/sec)。

蛍光顕微鏡により確認したところ、粒径 30 nm では細胞層に粒子の蓄積が確認された (図 2)。一方、100 nm, 400 nm では、粒子の蓄積はわずかであり、1500 nm では粒子が沈降し、細胞上面に蓄積したのみであった。

蛍光シリカナノ粒子 30 nm について、各種濃度 (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL) における BBB 透過試験を実施した。細胞透過係数は、添加濃度依存的に亢進する傾向を示した (図 3)。

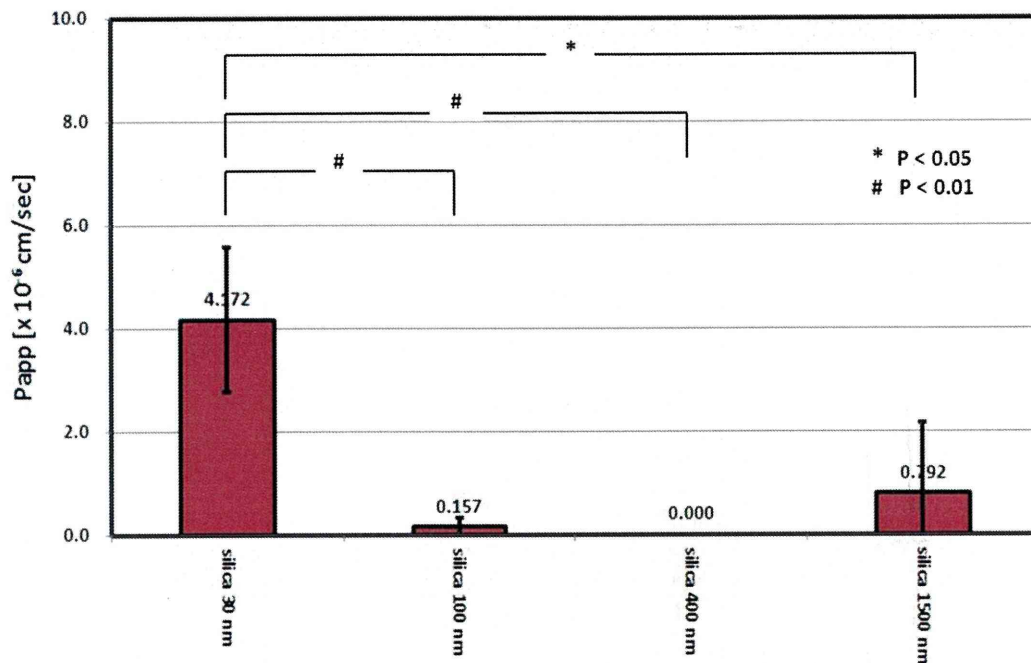


図1 蛍光シリカナノ粒子のサイズ依存的透過性

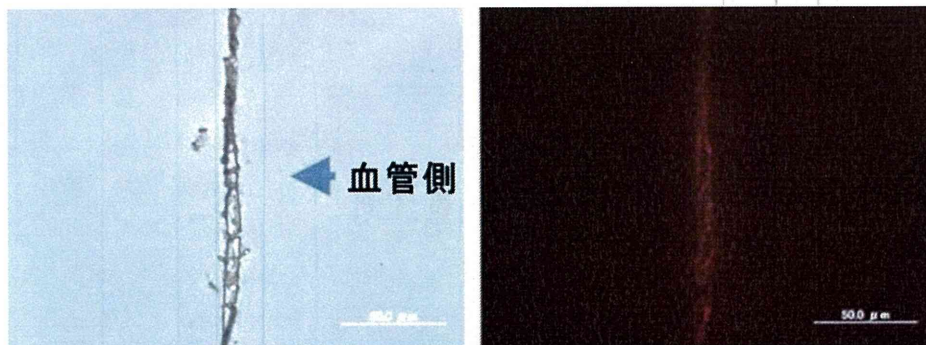
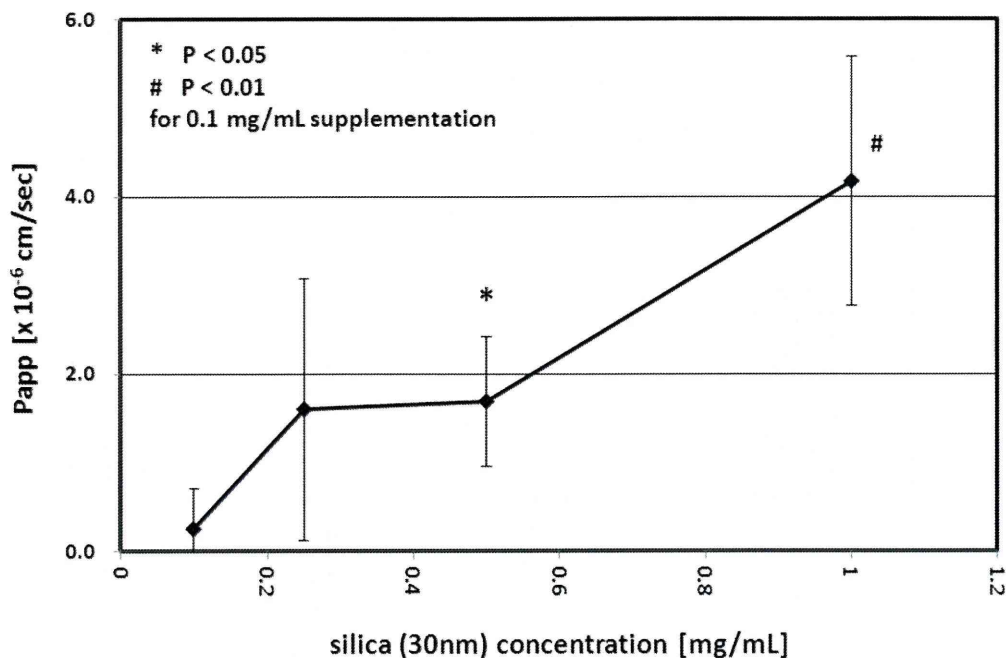


図2 蛍光シリカナノ粒子 (30nm) の細胞層への蓄積

次に、3種類の表面電荷（正、負、なし）の異なる粒子径 25 nm の量子ドットを用いた BBB 透過性試験を実施した。正電荷のアミン表面量子ドットにおいては、粒子透過係数が  $7.82 \times 10^{-6}$  cm/sec と負電荷カルボキシル基表面および電荷のない PEG 表面に比べて高い傾向を示した（図 4）。

#### D:考察

蛍光シリカナノ粒子の血液脳関門透過性について、粒子サイズ 100 nm と 30 nm の間にナノ粒子透過性のしきい値があることが有意に確認された。この値は、薬剤の透過を指標とした場合、「わずかに透過する」レベルである。動物実験においても、BBB 透過の報告がなされており、



**図3 蛍光シリカナノ粒子 (30 nm) 濃度依存的透過性**

本 BBB モデルは、ナノ粒子の透過性を検討するうえで有用であると考えられる。

BBB 透過のメカニズムについては、細胞間の通過、細胞内の通過の 2 点が考えられる。蛍光観察から 30 nm 粒子が特異的に細胞内に蓄積しており、細胞内を介したナノ粒子の移行性の可能性が示唆される。

一方、細胞間においては、30-100 nm のギャップが存在する可能性が示唆されるが、一般に、細胞間のタイトジャンクションははるかに小さいと考えられる。ナノ粒子の濃度を変えて透過係数を算出したところ、濃度依存的な透過係数の亢進が確認された。このことは、細胞とナノ粒子が短期的な接触により障害を受けることで細胞間の接着が低下している可能性も示唆している。

粒子表面の違いによる BBB 透過性について、表面電荷の違う量子ドットを用いて透過係数を算出したところ、有意ではないが、正電荷のナノ粒子に関して透過性が高い傾向が確認された。これは、細胞表面が相対的に負電荷であることで、粒子の接着性が高まるためと考えられる。

本研究で用いたナノ粒子の添加濃度 0.1-1.0 mg/mL は、外界から生体に取り込まれると予測される濃度と比べて極めて高いと考えられるが、長期的なナノ粒子の蓄積や、ナノ粒子の過剰暴露により、ナノ粒子がわずかでも脳内通過を引き起こす可能性があることは、十分に考慮すべきであろう。

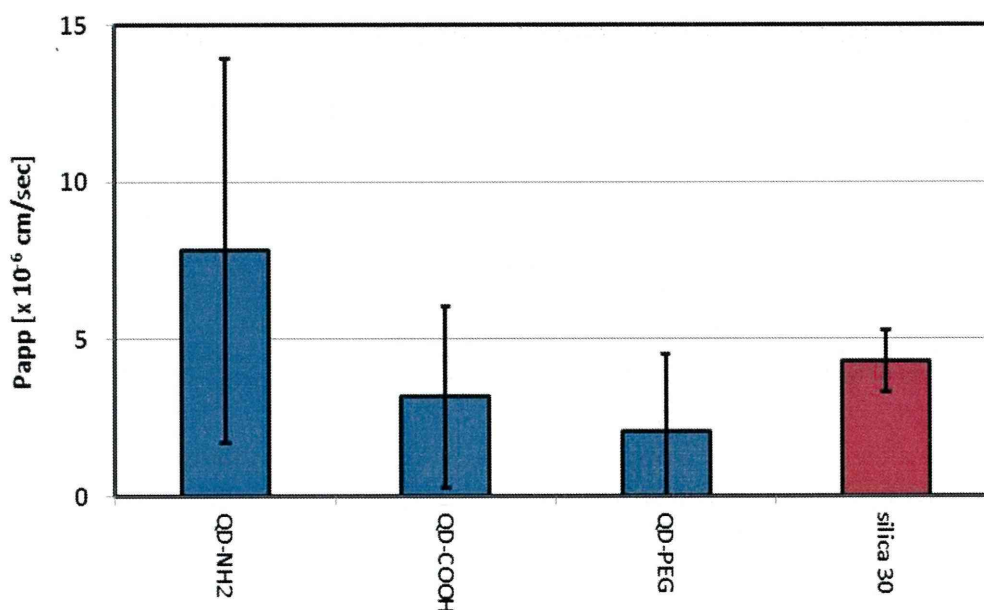


図4 表面修飾の違う量子ドットの透過性

#### E:結論

ナノ粒子の脳内移行性を、薬剤透過性試験で使用されている血液脳関門モデルにより評価した結果、30 nm シリカナノ粒子による透過性を確認し、その暴露濃度依存的な透過性の違いを確認した。また、表面電荷の異なる量子ドットを用いて、正電荷ナノ粒子において BBB 透過性が高い傾向を示した。

実際に生体に暴露されると予想されるナノ粒子濃度に比べると本実験の濃度はかい離があるが、長期的なナノ粒子の暴露が最終的に脳内への通過を促す可能性を考慮すべきであることが示された。

今後は、酸化チタンナノ粒子などを含めた他のナノ粒子について同様の検討を行い、材料依存的な毒性を検討する必要がある。また、ナノ粒子の暴露濃度に関

してより低濃度暴露の分析法について検討する。

#### F:健康危機情報

特になし。

#### G:研究発表

##### 1. 論文発表

- Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications. Arch. Toxicol. 2011 Jul; 85(7) : 707-20.
- Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe

N, Yamamoto K, Manome Y,  
Toxicity test: Fluorescent  
silicon nanoparticles. *J Phys:  
Conf Ser* 2011, **304**, 012042

2. 学会発表  
なし

3. その他の業績  
なし

H:知的所有権の出願・取得状況（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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書  
中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発に関する研究  
(H22-化学-若手-009)

大脳初代培養細胞を用いたナノ粒子影響評価法の開発

研究分担者 井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学講座・助教  
研究代表者 藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・助教  
研究分担者 馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・教授  
研究分担者 花田 三四郎 国立国際医療研究センター・流動研究員  
研究分担者 叶谷 文秀 国立国際医療研究センター・流動研究員  
研究協力者 佐藤 二美 東邦大学・医学部解剖学講座・教授

## 研究要旨

本研究は、人体への影響が明らかでないナノマテリアルが中枢神経に与える毒性学的な影響の評価法を構築するものである。私は、本分担研究において、「細胞を使った評価法」を中枢神経細胞の性状から開発することを目的とした。

細胞を使った評価法を開発するにあたり、ナノ粒子には血液脳関門（BBB）の透過が予測されるシリカナノ粒子 2 種類を用いた。また、細胞にはラット大脳皮質初代培養細胞を用いた。ナノ粒子共培養後、細胞毒性評価を樹状突起の形態を示す微小管タンパク質 MAP2、及び細胞が障害された際に起こるアポトーシスカスケードの Caspase3/7 から評価した。共培養するナノ粒子の濃度には、0、0.1、0.01、及び 0.001 mg/mL の 4 つの濃度を用いて 1 時間培養し細胞毒性を評価した。共培養後の結果から、濃度依存的な神経細胞毒性が示唆された。

現在、同一ナノ粒子を用いた細胞、脳スライス培養、動物個体での評価を進めており、最終年度にこれらの成果を統合することで、評価法の有用性と限界点を検証する。

### A:研究目的

本研究は化学物質、特にナノ粒子が与える神経細胞に対する影響を評価する試験法の開発を目的として研究を行っている。

現在までに、高濃度のナノ粒子は、中枢神経系に到達する事が示唆されているが、標準的な評価法は構築されていない。従来法では、実験動物にナノ粒子を投与する等の実験を行い、ナノ粒子の体内への影響を直接観察す

る事が必要になる。しかしながら、以下の3点においてナノ粒子を使った動物実験では困難が生じる。

1. 安全性が明らかでないため、試験をできる施設が限られてしまう。
2. 脳内に侵入することは明らかになっているが、中枢神経レベルで何が起きているか報告が少ない。
3. 何を、どのように解析すればよいのか標準的な手法が明らかになっていない。

このため、本研究において、細胞レベルの影響を解析することは、今後の動物実験での標的を明らかにすることにつながると共に、動物実験の代替法として活用につながると考えられる。

そこで、本研究では、ラットの大脳皮質の初代培養細胞を分離培養し、細胞とナノ粒子を共培養して観察を行った。評価法としては、ナノ粒子共培養時の神経細胞の形態、特に MAP2 の染色像を観察する方法を用いた。

## B:研究方法

細胞は、ラット胎児（18日目）の Cortex primary culture（大脳皮質）の初代培養細胞を用いた。同細胞を21日間培養後、ナノ粒子共培養実験を行った。細胞と粒子を1時間共培養後、抗体染色を行い蛍光観察した。細胞像の観察には、微小管タンパクの骨格を染色し、樹状突起の形態を観察できる MAP2（Chemicon）に対する抗体を用いた。また、細胞障害機構の解明を

目的として、死細胞のカスケードで見られる Caspase3/7（Invitrogen）を用いて染色した。

シリカナノ粒子にはローダミン含有シリカ（30nm）、及びシリカ（12nm）の2種類を用いた（研究分担者：国際医療研究センターの花田三四郎先生より提供）。また、共培養濃度は、4種類 0、0.1、0.01、及び 0.001 mg/mL の濃度に設定し、細胞と1時間培養を行った。



図1：ローダミン含有シリカ粒子の概略図。

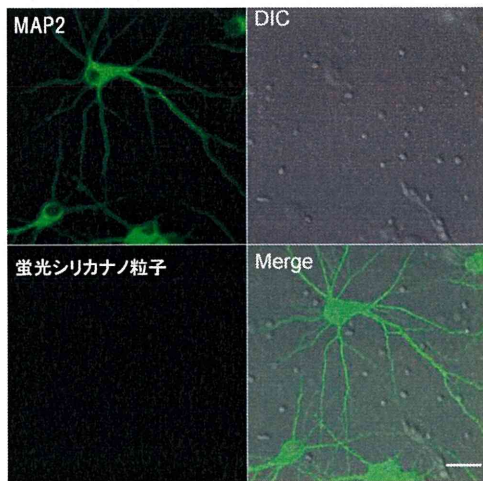
## C:研究結果

### 1. ナノ粒子共培養時における神経樹状突起への影響

ナノ粒子が神経細胞と接触した際に、どのような影響を与えるかは明らかになっていない。本項目では、MAP2を染色することで、ナノ粒子共培養時の樹状突起の形状を観察、神経細胞への影響を定量的に評価した。



(A)



(B)

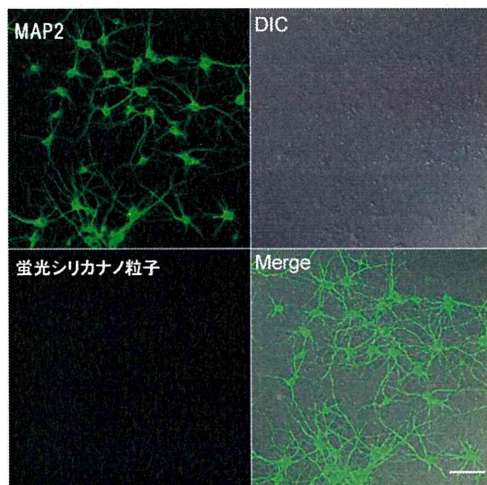


図 2 : 蛍光シリカ非共培養時 (対照実験) における神経細胞の観察像 (A:20×、B:10×)。左上 : MAP2 染色、右上 : 明視野、左下 : ローダミンシリカナノ粒子、右下 : 統合像。

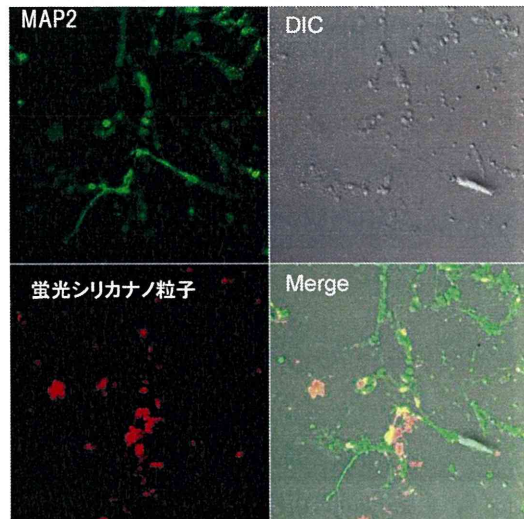


図 3 : 蛍光シリカナノ粒子 (30nm) を 0.1 mg/mL の濃度で 1 時間共培養。

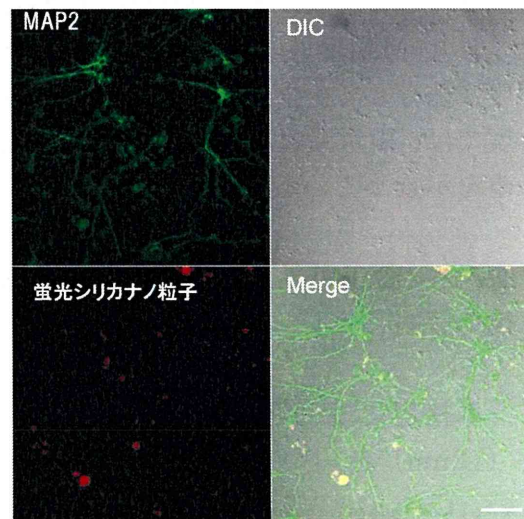


図 4 : 蛍光シリカナノ粒子 (30nm) を 0.01 mg/mL の濃度で 1 時間共培養。

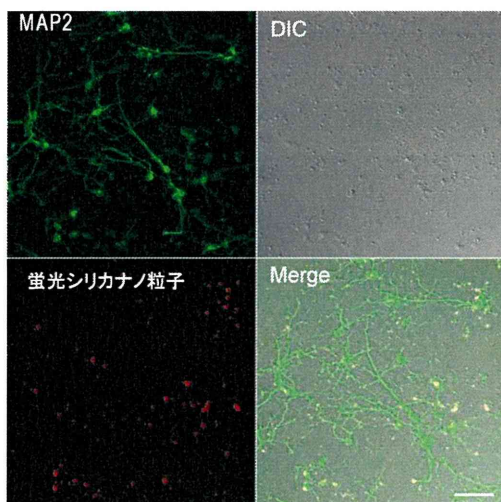


図 5 : 蛍光シリカナノ粒子 (30nm) を 0.001 mg/mL の濃度で 1 時間共培養。

図 2～5 の結果から、神経細胞で染色された MAP2 がシリカナノ粒子の濃度に依存して少なくなっており、高濃度では、樹状突起形成への影響が強い事を示唆している。

## 2. ナノ粒子が与える神経細胞障害機構の解明

本検討では、無蛍光のシリカ粒子 (12nm) を用いて、共培養実験を行い、Caspase 3/7 の発現を観察した。Caspase とは、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する一群のシステインプロテアーゼである。

図 6～8 の結果から、濃度に依存した樹状突起形成異常と、全ての濃度における Caspase 3/7 の染色像が見られる。

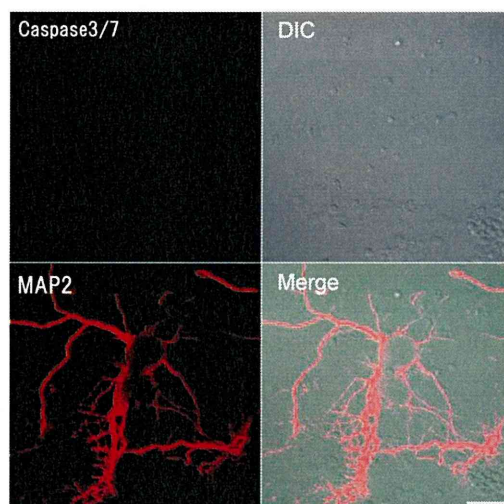


図 6 : 無蛍光シリカ非培養時における観察像。左上 : Caspase 3/7、右上 : 明視野、左下 : MAP2、右下 : 統合像。MAP2 の染色がしっかりしていて細胞状態はいい。

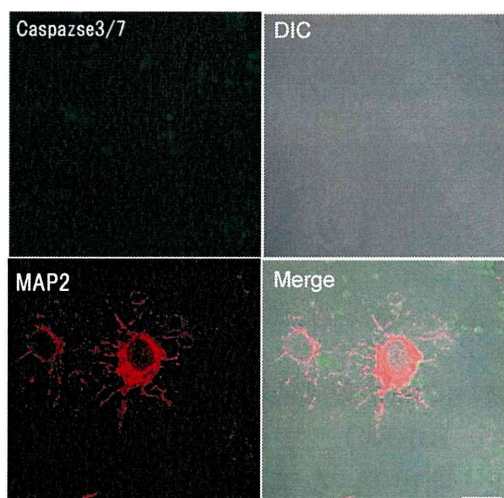


図 7 : シリカナノ粒子 (12nm) 0.001 mg/mL の濃度で 1 時間共培養した像。MAP2 の染色像から細胞状態が悪く、樹状突起が切れてなくなり、細胞体のみが残っている。また、Caspase 3/7 の染色が見られる。

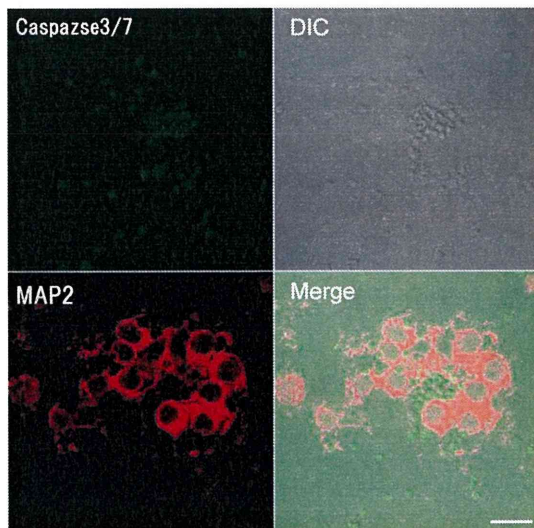


図 8 : シリカナノ粒子 (12nm) 0.01 mg/mL で 1 時間共培養した像。MAP2 の染色像から細胞状態が悪い事がわかる。樹状突起が切れてなくなり、細胞体のみが残っている事が顕著である。また、Caspase の染色も多く見られる。

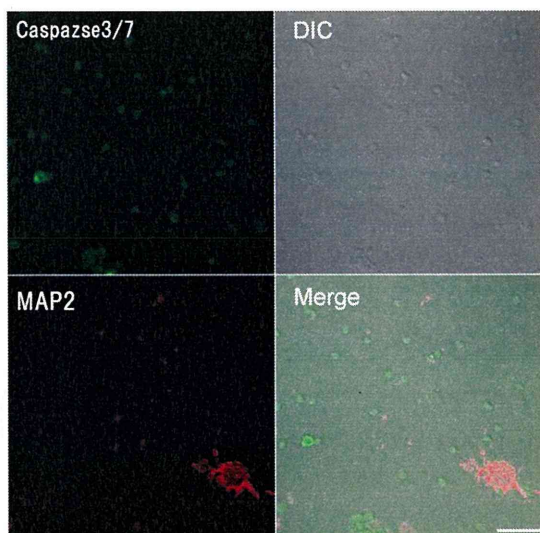


図 9 : シリカナノ粒子 (12nm) 0.1 mg/mL で 1 時間共培養した像。MAP2 で染色される細胞は、ほとんどない。

また、本検討で用いた大脳皮質初代培養細胞におけるステージを以下に示した。共培養試験に用いた 21 日培養細胞には神経ネットワークができることが示唆される。



図 10 : 7 日間培養像。

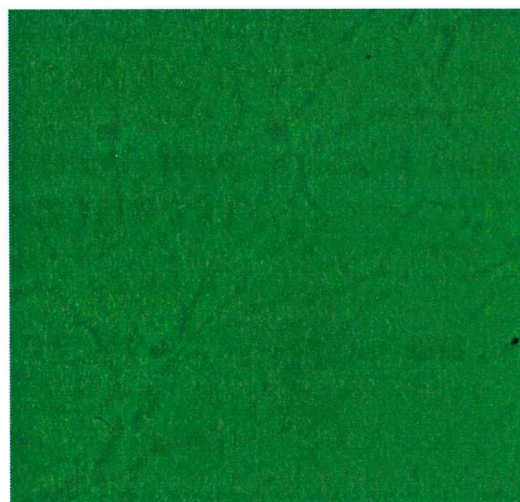


図 11 : 21 日間培養像。神経ネットワークを形成している。樹状突起が、7 日間培養に比べて太い事がわかる。

#### D:考察

ローダミン含有(サイズ 30 nm)シリカナノ粒子、蛍光色素を持たないシリカナノ粒子(12 nm)を用いて神経細胞と共培養する実験を行った。粒子の培養液濃度に応じて、神経細胞死が増加する傾向が得られた。また蛍光観察像から粒子が神経細胞内に取り込まれることが示唆された。

神経細胞死に注目すると、まず樹状突起が切断され、細胞体のみが残る像が観察された。この事は、神経細胞同士のネットワークが遮断されている事が示唆される。

さらに、カスパーゼ 3/7 の染色像は、アポトーシスを示唆しており、ナノ粒子との共培養によって、細胞死が誘導されることが考えられる。

今後は、濃度と神経細胞死の誘導との関連性を定量的に検討することで、中枢神経へ影響を与える基準値の設定に貢献すると共に、樹状突起の切断機構や神経細胞死の機構を検討することで、ナノ粒子が与える毒性の軽減に貢献したい。

#### E:結論

2種類のシリカナノ粒子を使って、ナノ粒子が与える中枢神経系への毒性学的な影響を検討した。共培養時の細胞像から、高濃度のシリカナノ粒子が脳内に侵入した際には、神経細胞の状態やネットワーク形成に影響を与える可能性が高いと考えられた。今後は、毒性を与える濃度の設定や、詳細な機構の解明を行いたい。

#### F:健康危機情報

特になし。

#### G:研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし
3. その他の業績  
なし

#### H:知的所有権の出願・取得状況(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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発  
(H22-化学-若手-009)

新規試験法の有用性の検証、国際的な基準策定への働きかけ  
Efficacy of novel testing methods and facilitating international guidelines

分担研究者

Fumihide Kanaya<sup>\*1), 2)</sup>, Sanshiro Hanada<sup>2)</sup> and Kouki Fujioka<sup>3)</sup>

### Abstract

This group facilitated the second-year outcomes of a Japanese nanotoxicity research network for globally standardized guidelines to the international nanoparticle and regulation community. Its novel approach investigation in surface modification and BBB communicated well and drew interests from regulatory networks of EU and United States this year. This project summarizes lessons learned and international methods developed in informatics process.

#### A: Purpose

In the first year of this project, this project obtained new knowledge mainly from *in vitro* investigation and also from model animal analysis in *in vivo* study, both done for the first time. For the second year of the project, a main objective was how to translate these study outcomes with

each other in order to compare, interpret, and analyze the data. This translational communication between model animal information and basic laboratory results for the future application in cytotoxicity and health regulation is an integral process for understanding low toxicity with long exposure. In examining nano-toxicity testing methods, this project evaluated feasibility for a Japanese research network to become an effective site of site-participatory global consortium of nano-toxicity testing network to solve the limitation of areas of expertise and research resource. Although there have been various efforts in establishing new

---

\*Research Fellow at:

- 1) AIDS Clinical Center, National Center for Global Health and Medicine (NCGM)
- 2) Research Institute, NCGM
- 3) Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine

systemic monitoring and regulatory frameworks for nanotoxicology throughout different regions of the world, Japanese testing research has revolved around for the sake of how to detect higher toxicity level out of the same source material and showed delays in international participation in those movements.

This study group initiates a multiyear participatory research attempt in reaching out to oversea networks and having them involved in integration of new detection techniques to create realistic, comparable exposure – hazard standards that make sense for international nano particle development and occupational health.

## **B: Methods**

1. Disseminating latest various *in vivo* and *in vitro* outcomes. Coordinating the research data into internationally communicable format.
2. Taking our approaches to international forums, engaging in proposal facilitation for feasibility investigation to integrate our novel methods into different networks. Communicating our protocols for international regulatory format.
3. Feeding back international input from 1 and 2, bringing the new network into an effective consortium.

For Step 1, this global facilitation group requested to each investigator to summarize outcomes, disseminated and transformed cumbersome data into analyzable format. With these outcomes, the facilitation group approached to each research population of interest and international agencies to determine the match by a) having data informatics, b) having cytotoxicity testing capacity and c) can participate, and implement the research protocol, regulated by international agencies?

For Step 2, we proposed a vision for a consortium model to foreign agencies, and when an agreement is obtained, we requested the participation in the consortium, facilitated the regulatory process to start the research network in respective agencies and coordinated the clinical/basic information and testing procedures for chemical toxicity evaluations.

Step 3 entailed active support for public health informatics and policies, in which each country had different regulation and procedure culture; we gathered help from local embassy, its ministry of foreign affairs and other outside consultant for fine tuning and customizing protocols for each country.

By allocating our MHLW special research grant for international collaborative works such as inviting top investigators to be a research partner and future testing and transporting the

study samples, this Japanese network played a leadership in this consortium and continues to offer strategic support.

All figures were referred to the hand out of Education Course Toxicology and Health in the international Symposium on Nanotechnology Occupational and Environmental Health, 2011.

### C: Results

1. K. Fujioka and S. Hanada respectively disseminated the outcomes of silicon quantum dots from our group. It consisted of its fluorescence, gene delivery system, safety over heavy-metal derivatives, gas- and liquid-phase methods, WST and LDH assays, Luminol and liquid peroxide assays, radical chain reaction model, surface dependent mitochondrial activities, oxy-radical generation and anti oxidant Si-Dots with aminopropfen.
2. F. Kanaya brought a network proposal to NanOHS 2011 in Boston, USA on August 10<sup>th</sup>. Fine tuned the disseminated outcomes and tweaked out effective discussion points that should endure international investigation. Researched and approached different networks of scholars from a) academia b) industrial medicine and c) nano-industry that were developing own toxicity testing standard in each region of world. That included Dr. Christine Sayers at

RTI.org, CEA France (M. Carriere), NIOSH CHN (M. Ellenbecker), Nano-EHS (G. Oberdorster), EMPA Swiss (JP Kaiser), KUL BE (P. Hoet), NanoImpactNet (M. Riedliker) and TITNT (C. Emond).

3. As result, NSF-funded Center for High Rate Nanomanufacturing (CHN), The International Team in Nanosafety and NanoImpactNet gave integral feedbacks for the next phase of the study and invited this group back to their meetings in the next year. Dr. Sayers requested continuing communication for Nanosafe 2012.

With the outcome of the two-year research, the study group learned especially international aspect of nanotechnology in occupational and environmental health. On toxicology and health, we obtained new knowledge on relationship between toxicity screening techniques and biomarkers of exposure in epidemiology. Reviewed nano-environmental health and safety data and found a trend in environment, cytotoxicity and workers. Within the environment, health and safety.

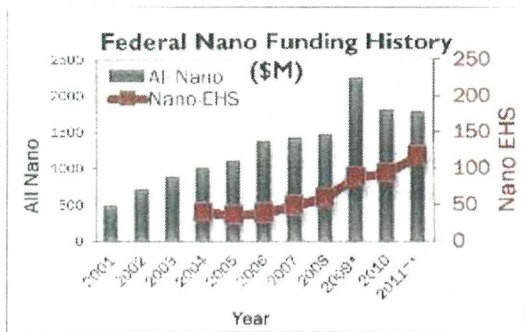
### D: Discussion

With the same particles, comparative organ tissue toxicity assessment can find differences in *in vivo* toxicity in contrast to *in vitro* profiles.

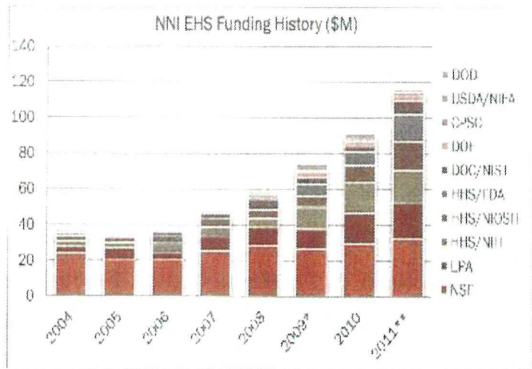
We learned that nano-environmental health and safety are public policy and regulatory matters:

**Federal Investment in NanoEHS Research**

Here is the same graph showing total NNI funding since its inception. At the top of that are the portions of those dollars that went toward NanoEHS. NanoEHS numbers correspond to the right-hand y axis which is the right-hand y axis. The bottom line is that NanoEHS research has made up a significant portion of the NNI budget.



**NanoEHS Funding by Federal Agency**



OSHA does not fund nanoEHS research. Though the regulatory side of HHS/FDA had been in nanotechnology issues for several years prior, FDA only began to fund NanoEHS research in 2009.

Our new International collaborators shared evidence and trends in government entity involvement.

We also earned new outlook upon health hazard of ultrafine materials' toxicity. Toxicity screening techniques, biomarkers of exposure and epidemiology should be considered in comprehensive manners.

Multiple sources shared with us that Japanese nano-toxicity groups had been using extreme systems for assessment.

International community is searching realistic model such as inhalation systems, but not "force-feeding" systems. Furthermore in reality, exposure mostly comes in heterogeneous composition of particles.

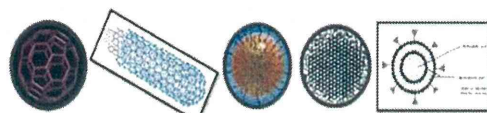
For carcinogenicity, physical features of the particle (tubular vs. ball) are as important for longtime exposure health consequence.

Through the active participation in international community of environmental, health and safety of nanomedical research (Nano-EHS), the group learned valuable lessons:

**Different Types of Nanomaterials**

Naturally Occurring	Human Origin (Incidental)	Human Origin (Engineered)
Forest fires	Cooking smoke	Metals
Sea spray	Diesel exhaust	Quantum dots
Mineral composites	Welding fumes	Buckyballs/Nanotubes
Volcanic ash	Industrial effluents	Sunscreen pigments
Viruses	Sandblasting	Nanocapsules

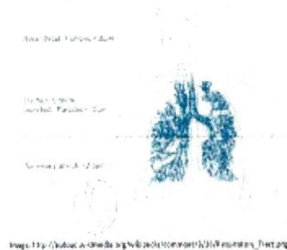
Category	Chemical Composition	Product example
Fullerenes, Nanotubes, Nanowires	carbon, boron nitrides	Anti-static fabrics
Metals	silver, gold, iron, copper	Anti-microbial wound dressings
Ceramics (metal oxides)	titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide	Sunscreen filters, self-cleaning glass
Semiconductors (Quantum dots)	cadmium selenide, cadmium telluride	Medical imaging agents
Polymeric	hydrocarbon polymers	Drug delivery devices





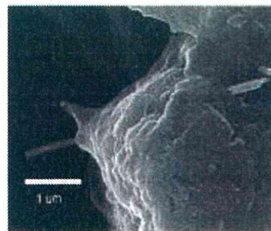
Inhalation has been a major focus of the nanotoxicology community. NP penetration into the lung depends on its aggregation state

- Airborne NPs can be inhaled and deposit in the respiratory tract
- Inhaled NPs may enter the blood stream and translocate to other organs



Certain nanomaterials can

- Induce cancers, including mesothelioma
- Cause rapid and persistent pulmonary fibrosis
- Cause cardiovascular dysfunction
- Migrate along the olfactory nerve into the brain



Alveolar Epithelial Penetration by Multi-walled Carbon Nanotube  
Courtesy of R. Messersmith

Universal standardized guidelines for evaluation and assessment of Nanomaterial toxicology is in its starting phase and there has not been much effective networking effort out of Japan other than independent toxicology evidences.

1. Universal standardized guidelines for evaluation and assessment of Nano-toxicity and its testing are in the starting phase in other countries as well. There has not been much effective networking effort from Japan other than independent *in vivo* and model animal evidences. Because of this study and participating agencies, we captured the global needs for

nanotoxicity guidelines for the first time within the international community of researchers, manufacturers and health policy makers

2. One very effective way to communicate data for international discussion was to fine-tune our results to make our case and have our effort recognized. As result in this process, we learned our surface modification and BBB tests and results were original and unique. New colleagues from our international counterparts, proposed to integrate our protocol into their larger-scale trials.
3. It is integral to have *in vitro* data accompanied by *in vivo* validation to communicate effectively in international community; an internationally coordinated informatics system would enable realistic analysis of dose-response data for the translation, real life application for standardized guidelines and nanotoxicity meta-analysis.

## E: Conclusion

For exposure assessment, this group grew mindful with the combination of medical surveillance and nano informatics for examining efficacy of novel testing methods and facilitating

to establish international guidelines.

The current international trend we found this year in academic, medical and industry interests is realistic Exposure – Hazard relationship, especially low-level long-term exposures. Informatics of nanomaterial related Adverse Health Effects would be the next phase of this development and this group should participate in this international movement during the final year of this study.

**F: Health Safety Information**

Not applicable this year.

**G: Publications and presentations**

1. Publication

Fujikoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Hirakuri K, Sato K, Shiohara A, Tilley RD, Manome Y. “Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles.” *Journal of Physics Conference Series 2011*

2. Conference Presentation

Not applicable this year.

3. Others

Not applicable.

This group proposed 7-module schema for standardized guidelines:

module 1	module 2	module 3	module 4	module 5	module 6	module 7
Particle Type	Production Method	Exposure Pathway	Study Design	Hazard Target	Risk Group	Audience
Carbon	Engineered	Oral/Ingestion	Synthesis	Aquatic Ecosystem	Industrial/Research Worker	Technical Research
Metal	Incidental	Dermal/Mucous Membrane	Material Analysis and Applications	Mammalian	Consumers	General Public
Organic/Polymers	Both	Inhalation	System Modeling	Soil Ecosystem	General Population	Public Policy
Semiconductor		Injection	In Vitro	Atmospheric Ecosystem	Ecosystem	Other
Oxide		Multiple	In Vivo	Multiple	Other/Unspecified	
Multiple		Other/Unspecified	Ex-vivo	Other/Unspecified		
Other/Unspecified		Multiple	Environmental Study			

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 1. 出版業績

著者氏名	論文タイトル	書籍名	出版年度	掲載ページ
Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K	Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications	Arch. Toxicol.	2011	85(7):707-20
Fujioka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y.	Toxicity test:Fluorescent silicon nanoparticles	Journal of Physics: Conference Series	2011	304: 012042
Fujioka K, Fujii N, Sato K, Hirakuri K, Kim, S.U., Manome Y.	Effect of Co-cultured Silicon Particles on Neural Stem Cell	KURRI Prog. Rep. 2010.	2011	262

## 2. 発表業績

藤岡宏樹，花田三四郎，叶谷文秀，井上由理子，Seung KIM，馬目佳信，

ナノ粒子共培養時における、中枢神経幹細胞株への影響。

日本薬学会第132年会（札幌），2012年3月（予定）。