

いた。次いで浸潤の大きい臓器は肝臓、脾臓、腎臓、脳の順であった（図 3）。脳への集積は投与量全体の 0.1% 程度であった。

脳内におけるナノ粒子の分布を図 4 に示す。脳内においては、視床への集積が最も高く、次いで脳幹部、大脳皮質の順になっている。少量ながら海馬や小脳、嗅球内への分布も確認されている。

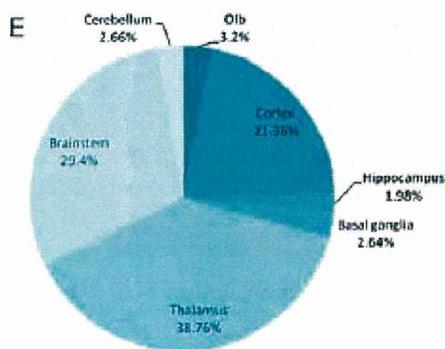


図 4 静脈内投与 6 時間後における脳内粒子分布

脳内では視床、脳幹、大脳皮質などにナノ粒子の集積が確認される。

一方、脳内各部位の乾燥重量あたりにおける粒子顔料を測定し比較すると、ナノ粒子の集積は、視床、脳幹部について嗅球への集積が顕著であることが判明した（図 5）。

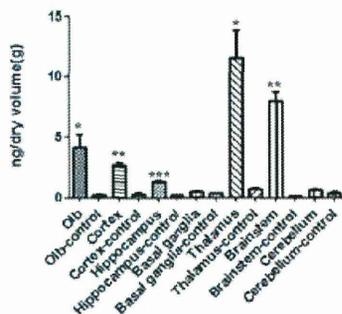


図 5 脳乾燥重量当たりナノ粒子含有量  
乾燥重量当りでは視床、脳幹、嗅球に集積が多い。

続いて、脳組織内における分布を組織切片により病理学的に検討した。ラミネンとの二重染色により、少なくとも脳内では脳血管ではなく組織内へと浸潤していることが確認された。

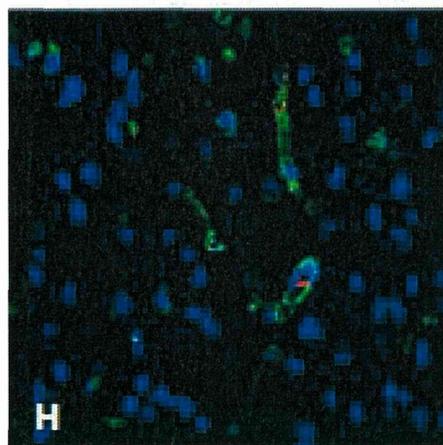
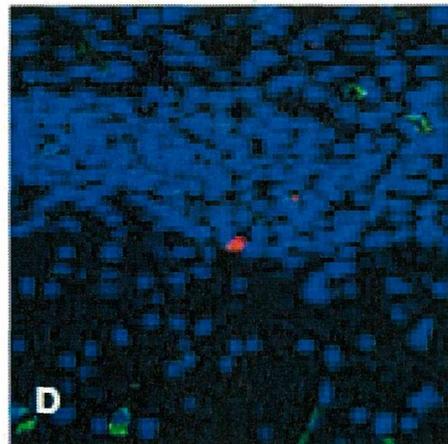


図 6 ナノ粒子の脳組織内における分布。

脳の組織切片を抗ラミネン抗体を用いて免疫染色（緑色）した。青色は核、赤色は浸潤した蛍光ナノ粒子を示す。上段は嗅球、下段は大脳皮質。

具体的には、海馬や脳幹部においては血管辺縁部に集積していた。また、大脳皮質や視床、嗅球においては集積は主として脳実質組織部位であることが判明した

(図 6)。なお、ナノ粒子投与の影響による具体的な脳細胞の障害性の有無についてあるいは行動異常など神経機能に対する影響は、この実験の範囲では明確には確認されなかった。

#### D:考察

##### (1) 達成度について

ナノ粒子は、同一の物質でありながら超微小化によって物理的・化学的性質が飛躍的に変化することが知られていた。また生物学的性質についても、*in vitro* 実験において粒子径や表面加工の差異によりその特性が変化することが示唆されていた。本研究では、マウス体内への投与によりナノ粒子が脳内へ移行することが確認された。また表面加工の違いにより体内分布が異なること、投与経路の違いにより脳内への移行の有無が変化することをそれぞれ確認した。この成果は 2010 年に *Nanotechnology* 誌に掲載(Kato S. *et al.*, 2010 Aug 20; 21(33): 335103)された。ナノ粒子の脳内移行の有無については世界的に報告がなされておらず、毒性学上の新規発見を論文として発表することができ、研究の達成度は高い。

##### (2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

従来から、既存物質について微小化に伴い毒性や生体内挙動といった生物学的反応性が変化することが懸念されていた。とりわけ、従来ならば血液脳関門によって物質の出入りが厳密に制御されていると考えられてきた脳内ナノ粒子の脳内移行が実際に起きていることが確認されたことの社会的意義は大きい。脳内への移

行と脳組織内への分布は、投与経路が腹腔内注入したときに限られているという現象は、今後ナノ粒子の生体内挙動や毒性の発現を検討する上で非常に大きな判断材料となりうる。また生体内分析において誘導結合プラズママスペクトル法が高感度に粒子を検出可能な技術として使用可能であることが実証されたことも大きな進歩といえる。

##### (3) 今後の展望

本年度の成果は、ナノ粒子を静脈内へ直接投与した際には脳内への移行が確認されていないことから、腹腔と中枢神経系を連絡するなんらかのシステムの存在を仄めかす結果であることから、これら経路に関する詳細な解析が望まれる。

今後はナノ粒子の化学物質リスクという観点から、マウスにおける中枢神経系の毒性、障害性あるいは脳の発達に及ぼす影響について、詳細な研究が遂行されることを期待している。

#### E:結論

本年度は、静脈内ならびに腹腔内という 2 つの経路でナノ粒子を投与し、その生体内挙動を比較検証した。腹腔内よりナノ粒子を投与されたマウスでは静脈内投与とは異なり、ナノ粒子が脳実質組織内へと移行することを確認した。

ナノ粒子の生体への影響を検討する上において、投与経路・暴露部位が正確なナノ粒子の暴露リスクを評価するために重要な要因のひとつであることを証明した。

#### F:健康危機情報

現在のところなし。

## G:研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K, Fushiki S. "Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain." *Nanotechnology*. 2010 Aug 20; 21(33): 335103.
2. Yamamoto K. "The Exposure of nanoparticles for Human Body." *J. Soc. Powder Technol. Jpn.* 2011;48(1): 34-38.
3. Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. "Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications" *Arch. Toxicol.* 2011, *in press*

### 2. 学会発表

1. Hanada S, Miyaoi K, Hoshino A, Yamamoto K. "Size- and structure-dependent toxicity of silica particulates." *Bios meeting, SPIE Photonic West*. Jan 22, 2011. San Francisco, CA, USA.
2. Fujioka K, Hanada S, Hoshino A, Yamamoto K, Hirakuri K, Sato K, Shiohara A, Tilley RD, Manome Y, Kanaya F. "Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles" *NanoSafe 2010*. Nov 18, 2010. Grenoble, France.
3. Fushiki S, Itoh K, Kato S, Yaoi T, Umekage M, Tozawa T, Yoshikawa Y,

Yasui H, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K. "Distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with reference to area-specific distribution in the brain" (Invited Paper) *Bios meeting, SPIE Photonic West*. Jan 24, 2011. San Francisco, CA, USA.

### 3. その他の業績 書籍等

## 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

### 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	掲載ページ
S. Hanada, K. Fujioka, Y. Futamura, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto.	Evaluation of Anti-Inflammatory Drug-Conjugated Silicon Quantum Dots: Their Cytotoxicity and Biological Effect	International Journal of Molecular Science	2013	14: 1323-1334
N. Manabe, S. Hanada, N. Aoki, Y. Futamura, K. Yamamoto, Y. Adschiri.	Flocculation and re-dispersion of colloidal quantum dots	Journal of Chemical Engineering Japan	2012	45(11): 917-923
K. Fujioka, S. Hanada, Y. Inoue, K. Shiraishi, F. Kanaya, Y. Manome.	Evaluation of nanotoxic effects on brain using in vitro models, Proceedings of the 25th Annual Meeting of Japanese Society for Alternative to Animal Experiments	Alternative Animal Test Experiment	2012	17(Suppl.) 156, 201
Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K.	Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications	Arch. Toxicol.	2011	85(7):721
Yamamoto K.	The Exposure of nanoparticles for Human Body.	J. Soc. Powder Technol. Jpn.	2011	48(1):34-38

<p>K Fujoka, S Hanada, F Kanaya, A Hoshino, K Sato, S Yokosuka, Y Takigami, K Hirakuri, A Shiohara, R D Tilley, N Manabe, K Yamamoto, Y Manome.</p>	<p>Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles</p>	<p>Journal of Physics: Confere nce Series</p>	<p>2011</p>	<p>304, 012042</p>
<p>Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K, Fushiki S.</p>	<p>Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain</p>	<p>Nanotech nology</p>	<p>2010</p>	<p>21(33): 335103</p>
<p>Yuriko Inoue, Masaaki Takayanagi, Hiroyuki Sugiyama.</p>	<p>Presynaptic protein Synaptotagmin1 regulates the activity-induced remodeling of synaptic structures in cultured hippocampal neurons</p>	<p>Journal of Neurosci ence Research</p>		<p>in Press</p>

## 2. 発表業績

- (1) 藤岡 宏樹、花田 三四郎、井上 由理子、白石 貢一、叶谷 文秀、馬目佳信、ナノマテリアルが脳に与える影響評価法の開発、日本動物実験代替法学会第 25 回大会（口演）、東京、2012 年 12 月.
- (2) Fumihide Kanaya, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Yoshinobu Manome, Kohki Fujioka, Communicating nanotoxicology: Three evaluations using in vitro central nerve models, Nanosafe 2012 (Oral), Grenoble, France, Nov., 2012.
- (3) Sanshiro Hanada, Kohki Fujioka, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Yoshinobu Manome, Kenji Yamamoto, Application of in vitro BBB model to measure permeability of nanoparticles, Nanosafe 2012 (Oral), Grenoble, France, Nov. 2012.
- (4) Yuriko Inoue, Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Toxicological influence of giving the silica nanoparticles on cultured central nerves cells, Nanosafe 2012 (Poster), Grenoble, France, Nov. 2012.
- (5) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Highly concentrated silica nanoparticles affect the activities of neural stem cell line, Nanosafe 2012 (Poster), Grenoble, France, Nov. 2012.
- (6) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Evaluation of nanotoxic effects using in vitro central nerve models, Nanotoxicology 2012 (Poster), Beijing, China, Sep. 2012.
- (7) 藤岡宏樹、池田恵一、馬目佳信、ナノ粒子が与える神経幹細胞への影響評価、第 11 回 Conference for BioSignal and Medicine(口演)、三重、2012 年 9 月.
- (8)白石貢一、濱野幹子、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、高分子ミセルMR I 造影剤の PEG に対する免疫現象、日本分子イメージング学会（ポスター）、浜松、2012 年 5 月
- (9)白石貢一、濱野幹子、川野久美、米谷芳枝、青枝大貴、石井健、横山昌幸、ABC 現象を担う IgM 抗体と PEG の認識領域の検証、日本 DDS 学会（口頭）、札幌、2012 年 6 月
- (10) 藤岡 宏樹、花田 三四郎、叶谷 文秀、井上 由理子、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(口演)、札幌、2012 年 3 月

- (11) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Keisuke Sato, Kenji Hirakuri, Amane Shiohara, Richard D. Tilley, Yoshinobu Manome, Fumihide Kanaya, Yuriko Inoue, and Kenji Yamamoto, Silicon Nanocrystal' Potential Effective Mechanisms on Cells, International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles (Poster), Essen, Germany, Sep. 2012
- (12) Hanada S, Miyaoi K, Hoshino A, Yamamoto K. Size-and structure- dependent toxicity of silica particules, Biomedical Optics Meeting, SPIE Photonics West Conference 2011 (Oral), San Francisco, CA, USA., Jan. 2011
- (13)Fushiki S, Itoh K, Kato S, Yaoi T, Umekage M, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K. Distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with reference to area-specific distribution in the brain, Bios meeting, SPIE Photonic West. (Invited Paper), San Francisco, CA, USA., Jan. 2011.
- (14) Fujioka K, Hanada S, Hoshino A, Hirakuri K, Sato K, Shiohara A, Tilley RD, Manome Y, Kanaya F. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Nanosafe 2010 (Oral), Grenoble, France, Nov. 2010.

