

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究 平成22年度終了報告書

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による
難治性がんの新規治療法開発に関する研究

研究分担者 佐々木 良平 神戸大学大学院医学研究科 准教授

A. 研究目的

本研究では「高精度放射線治療」にナノ粒子を併用し、有効な治療法の確立されていない膵臓癌などの難治性癌の飛躍的な治癒率向上を目指す。実際に臨床に使用されるX線照射装置を用い、過酸化チタンナノ粒子の放射線照射によるラジカル発生能を評価した。更に、マウスを用いて過酸化チタンナノ粒子の毒性を評価した。続いて、放射線照射と併用することによる腫瘍抑制効果について検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験機器および実験材料

1) X線照射装置

本研究におけるX線の照射には、細胞・小動物用のX線照射装置MBR-1505R2 (HITACHI社) を用いた。

2) 腫瘍細胞

本研究におけるin vitroの実験では、ヒトの膵臓腺癌由来であるMIAPaCa-2細胞を用いた。

3) 実験動物

本研究の動物実験では、ヒトの膵臓細胞であるMIAPaCa-2細胞を移植したヌードマウスを用いた。

B-2. 実験方法

1) X線照射装置の物理的特性

本研究で使用したX線照射装置MBR-1505R2は培養細胞やマウスなどの小動物に対して大量のX線照射を必要とするときに簡便に利用できる。管電圧150kV、管電流5mAの最大定格で連続的にX線照射が可能である。

MBR-1505R2には複数の金属フィルターが付属しており、その選択によりX線のエネルギーや線量率が決まる。

本研究で行う細胞実験および動物実験を行うにあたり、適切な線量が照射されているか確認するため、照射装置の物理的な検証を行った。

線量測定の方法として、ファントムとフィルム法を用いた。

ファントムは放射線治療の線量測定において用いられる水等価の固体ファントムを利用した。

フィルムにはGafchromic dosimetry film EBT2 (IPS Technologies) を用いた。

管電流150kV、管電圧5mA、焦点標的間距離350mmの照射条件のもと、各金属フィルターに対してファントム中での相対的な深部線量を測定した。

フィルムに0~6Gyの線量を照射し、

あらかじめ線量とフィルム濃度の校正曲線を取得した。これによりフィルムの黒化度から線量への変換を行った。

2) X線照射によるラジカル発生の測定

ラジカル発生量の評価にはAPF試薬を用いた。

APFは中性水溶液中ではほとんど蛍光をもたないが、プローブがOHラジカルなどの強い活性をもつ活性酸素種と反応すると、強蛍光性化合物であるフルオレセイン（励起波長490 nm、蛍光波長515 nm）が生成し、蛍光強度の増大が観測される。これによりX線を照射した試料にAPFを加え、蛍光を観測することで、ラジカルの発生量が観測できる。

本研究では、96wellプレートに試料100 μ l、APF試薬100 μ l加えた。X線照射直前に試料にAPF試薬を加えた。X線は管電圧150kV、管電流5mA、金属フィルターを取り付けず線量率5~10Gy/minで照射した。照射後、励起波長485nm、蛍光波長538nmで蛍光強度を測定した。

3) 異なるX線源でのラジカル発生の測定

異なるX線源でもラジカル発生を確認するため、本研究で用いている照射装置MBR-1505R2とは別に、大型放射光施設SPring-8にて試料に照射を行った。

110Gy/secの高線量率の白色X線を

照射した。

実験操作2).と同様の操作でラジカルの発生を評価した。

4) リン酸バッファーとの反応

リン酸バッファー（PBS）は細胞外液に近い組成で構成されている。

細胞実験および動物実験を行うにあたり試料とPBSとの反応を確認した。試料100 μ lに対してPBS900 μ l加えた。

5) ラジカルの検出

FACSとH202ラジカル検出試薬c-DCFを用いてラジカル種の評価を行った。

Dishにヒト前骨髄性白血病由来の浮遊細胞HL60を 5.0×10^5 cells播種し、試料を添加した。24時間後にc-DCFを添加し、X線を10Gy照射した。照射1時間後にFACSで細胞のカウント数を計測した。

6) 細胞実験

細胞生存率の評価をWSTアッセイにより行った。

WST試薬は水溶性テトラゾリウム塩である。電子メディエーター存在下、細胞中の脱水酵素により還元され、460nm付近に極大吸収を持つ水溶性ホルマザンを生成する。細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあるため、このホルマザンの吸光度を測定することにより、生細胞数を計測することができる。

実験操作は以下である。

①腫瘍細胞を96wellプレートに細胞

数が 1×10^3 cells/wellになるように播種した。

②37°Cで24hインキュベートした。

③培地を除去し、PBSで洗浄した。

④試料を $100 \mu\text{l}$ /well加えた。

⑤X線を5Gyまたは10Gy照射した。X線は管電圧150kV、管電流5mA、1.0mm金属フィルターを使用し、線量率約1.0Gy/minで行った。

⑥試料を除去し、PBSで洗浄した。

⑦新しい培地を加えて37°Cで約2週間インキュベートした。

⑧WST試薬を $10 \mu\text{l}$ /well加えて、37°Cで3hインキュベートした。

⑨マイクロプレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。

7) 動物実験

生体に対する毒性および放射線との併用効果を調べるため、動物実験を行った。

動物はヌードマウスのオス、4週令を用いた。

腫瘍細胞はヒトの膵臓腺癌由来細胞であるMIAPaCa-2細胞を用いた。

MIAPaCa-2細胞 1.5×10^6 cellsをヌードマウス背部皮下へ移植し、生着させた。

移植後14日目に試料約 $200 \mu\text{l}$ を腫瘍に局所注射した。

試料局注後、腫瘍に対してX線を10Gy照射した。

X線照射は、管電圧150kV、管電流5mA、0.5mm金属フィルターを使用し、線量率約1.0Gy/minで行った。

X線照射時、ヌードマウスにはネン

ブータル約 $100 \mu\text{l}$ を腹腔内に注射し、鎮静させた。腫瘍部以外は鉛板で遮蔽し、限局した照射を行った。

照射後、40日間以上観察した。観察期間内は腫瘍体積と体重の変化を記録した。

腫瘍体積Vは以下で定義した。

$$[V=LW/2] \sim 2$$

ここで、Lは腫瘍の長径、Wは腫瘍の短径である。腫瘍径の測定にはデジタルノギスを用いた。

(倫理面への配慮)

B-3. 倫理面への対応

本研究で行う動物実験は、神戸大学の動物実験倫理委員会の許可を得た上で、神戸大学の動物実験実施規則に基づいて実施している。

本研究に組換えDNA実験やヒト遺伝子解析研究等は含まれない。

C. 研究結果 D. 考察

C-1. X線照射装置の物理的特性

各金属フィルターに対するファントム中での相対的な深部線量の測定結果を図1に示す。

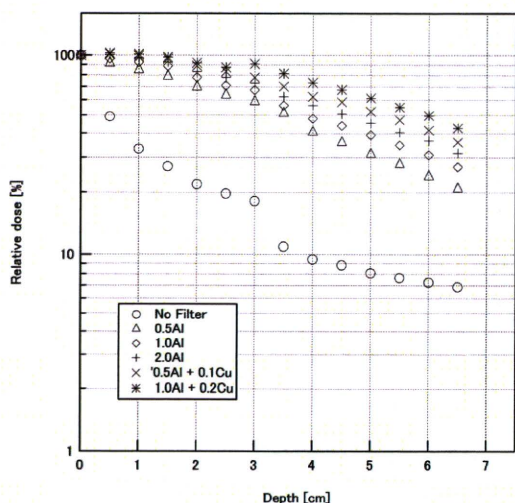


図1. X線照射装置の各金属フィルターに対する相対的な深部線量

照射時の線量率は、金属フィルターなし9.04Gy/min、0.5mmAlフィルター2.02Gy/min、1.0mmAlフィルター1.47Gy/min、2.0mmAlフィルター1.05Gy/min、0.5mmAl+0.1mmCuフィルター0.74Gy/min、1.0mmAl+0.2mmCuフィルター0.49Gy/minであった。

・照射系に金属フィルターを使用しない場合、深部線量が深さ1cmで約1/3、2cmでは約1/10に減衰することが確認された。

金属フィルターの使用により深部線量は高くなる。一方で線量率が下がるため、照射時間が長くなる。大線量照射は困難である。

この結果より、動物への照射に対して金属フィルターなしでは動物体内に適切な線量を与えることができないと考えられる。

これを踏まえて、本研究の細胞実験および動物実験においては、標的に適切な線量を得るため0.5mmAlまたは1.

0mmAlフィルターを使用した。

一方、試料への照射は、被照射体の厚みが数mm程度であること、また試料数や大線量照射を考慮して、金属フィルターなしで照射した。

C-2. X線照射によるラジカル発生の測定

図2は過酸化ニッケル、オキシ水酸化ニッケル、過酸化チタン水和物、アルミナ、ジルコニア、フェームドシリカの6試料に対して、UVおよびX線照射を行い、そのラジカル発生を測定した結果である。

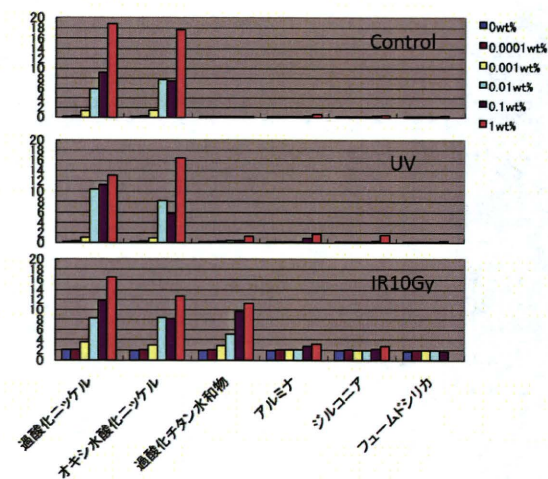


図2. いくつかの試料に対するUVおよびX線照射によるラジカル発生量の評価。UV=紫外線、IR=X線。

過酸化チタン水和物がX線照射によりラジカルを発生していることがわかった。

この結果より本研究では、試料を過酸化チタン (TiO₂・H₂O₂) ナノ粒子

として実験を進めることにした。

図3はTiO₂・H₂O₂のX線照射に対するラジカル発生測定の結果を示す。

図4はSPring8での高線量率白色X線照射に対するTiO₂・H₂O₂のラジカル発生測定の結果である。

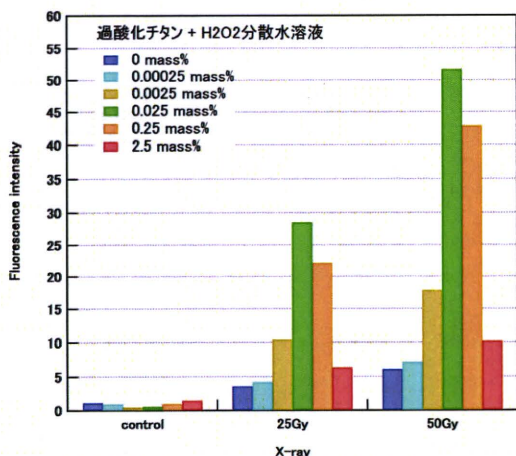


図 3. TiO₂・H₂O₂ の X 線照射に対するラジカル発生量

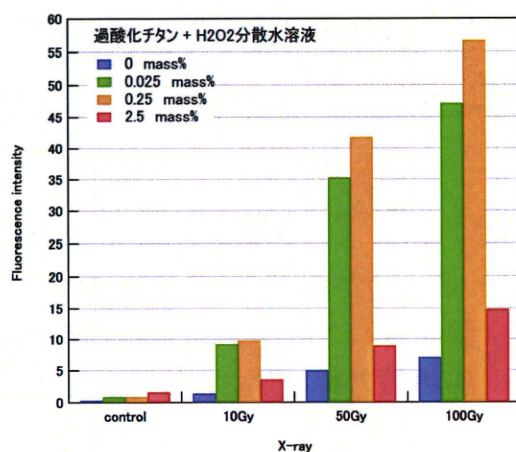


図 4. TiO₂・H₂O₂ の SPring8 での高線量率白色 X 線照射に対するラジカル発生量

これらの結果より、X線の種類によらず、照射線量および濃度に依存してラジカルが発生していることがわかる。

図5はポリアクリル酸 (PAA) 修飾を行ったTiO₂・H₂O₂に対するX線照射によりラジカル発生測定の結果である。

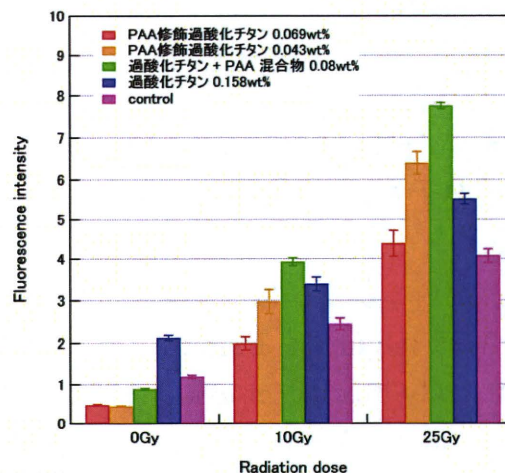


図 5. PAA 修飾を行った TiO₂・H₂O₂ のラジカル発生量

PAA修飾を行った粒子でも未修飾のものと同様にラジカルが発生が確認された。

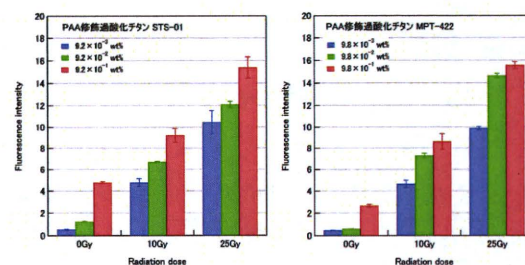


図 6. 異なる粒子 (STS-01 および MPT-422) から作製した PAA 修飾 TiO₂・H₂O₂ のラジカル発生量。(左) STS-01、(右) MPT-422

図6は異なる粒子（STS-01およびMP T-422）からPAA修飾TiO₂・H₂O₂を作製し、そのラジカル発生を測定した結果である。

異なる粒子で作製されたものであっても、同様にラジカルの発生が確認された。

また、図5および図6からラジカル発生再現性も確認できる。

C-3. PBSとの反応

図7は未修飾およびPAA修飾を行ったTiO₂・H₂O₂をPBSで希釈した結果である。

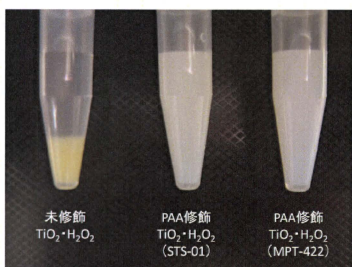


図 7. PBS との反応。左から未修飾 TiO₂・H₂O₂、PAA 修飾 TiO₂・H₂O₂ (STS-01)、PAA 修飾 TiO₂・H₂O₂ (MPT-422)

未修飾TiO₂・H₂O₂では、PBS中でうまく分散せず、凝縮を起こすことがわかった。

また未修飾ではpHの変化でも同様の凝集がみられた。

この結果より本研究の細胞実験および動物実験では、試料として凝集し

ないPAA修飾を行ったTiO₂・H₂O₂を使用することにした。

C-4. H₂O₂ラジカルの検出

図8はFACSを用いたPAA修飾TiO₂・H₂O₂に対するH₂O₂ラジカル検出の結果である。

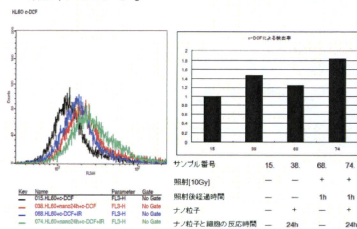


図 8. FACS によるラジカル検出の結果 (左) FACS によるカウント数 (右) ラジカルの検出量

コントロール、PAA修飾TiO₂・H₂O₂のみ、X線照射のみ、X線照射とPAA修飾TiO₂・H₂O₂の4群に対して計測を行った。

X線照射によりH₂O₂ラジカル量が増大していることがわかる。

C-5. 細胞実験

PAA修飾TiO₂・H₂O₂のin vitroにおけるX線との併用効果を調べるため、WSTアッセイを行った。細胞生存率の測定結果を図9に示す。

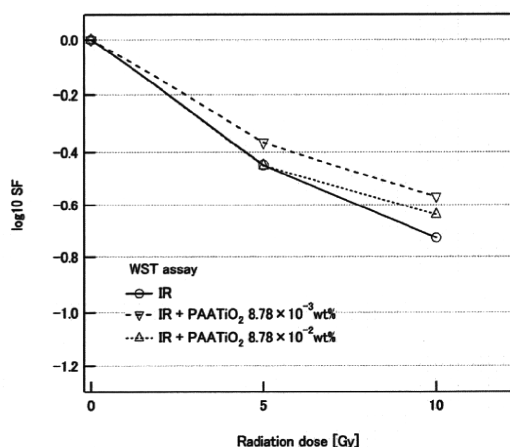


図 9. WST アッセイの結果。SF=細胞生存率、IR=X線照射

試料の希釈には10%FBSを加えた培地を使用した。

X線との併用効果はみられない。

一方、図10は細胞を用いずに、培地で希釈したPAA修飾TiO₂・H₂O₂のラジカル発生量をAPF試薬で測定した結果である。

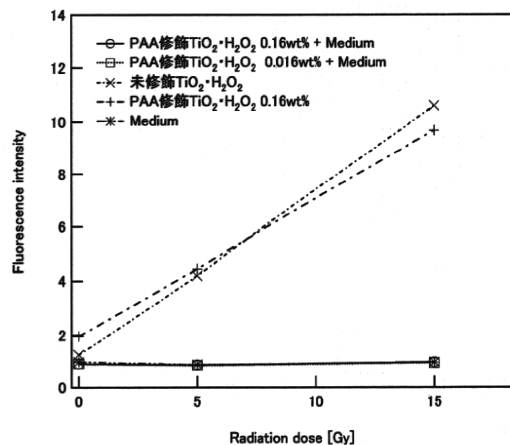


図 10. 培地で希釈した TiO₂・H₂O₂ のラジカル発生量

この結果より、培地中ではPAA修飾TiO₂・H₂O₂のラジカルの発生が抑制されているため、細胞死につながらな

かったと考えられる。

C-6. 動物実験

未修飾TiO₂・H₂O₂およびPAA修飾TiO₂・H₂O₂のin vivoにおけるX線との併用効果を調べた。毒性を確認するため、凝縮がみられた未修飾のものも使用した。

調べたグループはPBS局注のみ、未修飾TiO₂・H₂O₂局注のみ、PAA修飾TiO₂・H₂O₂局注のみ、X線10Gyのみ、未修飾TiO₂・H₂O₂局注+X線10Gy、PAA修飾TiO₂・H₂O₂局注+X線10Gyである。

1グループに対しヌードマウス2匹で行った。実験計画時は3匹/グループで予定していたが腫瘍細胞がうまく移植できなかったため、数を減少させた。

1) 未修飾TiO₂・H₂O₂の毒性

未修飾TiO₂・H₂O₂を局注した4匹は、局注後数分で全匹死亡した。

局注直後に全身が青ざめて死亡したこと、未修飾TiO₂・H₂O₂が凝集することを踏まえると、体内で血栓を生じて死亡したと考えられる。

一方PAA修飾TiO₂・H₂O₂を同様に局注したマウスに死亡例はなく、観察期間内でもTiO₂・H₂O₂によるものと思われる問題は一切確認されなかった。

死亡した未修飾群のマウスに対しては解剖を行い、腫瘍の組織を調べた。

図11(a)は未修飾TiO₂・H₂O₂を局

注した腫瘍の断面である。黄色のTiO₂・H₂O₂が溜まっているのが確認できる。

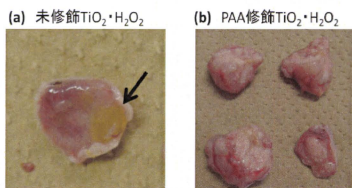


図 11. (a) 未修飾 TiO₂・H₂O₂ を局注した腫瘍の断面、(b) PAA 修飾 TiO₂・H₂O₂ を局注した腫瘍の断面 (局注から 40 日後、1 つの腫瘍をいくつかに分けている)

図11(b)はPAA修飾TiO₂・H₂O₂を局注した腫瘍の断面である。局注から40日間の観察後であるが、肉眼で観察する限りでは腫瘍断面にTiO₂・H₂O₂と思われる凝集は確認できなかった。

未修飾TiO₂・H₂O₂を局注したマウスに関して、外見上は体内にTiO₂・H₂O₂が入り込んでいる様子は観察されなかった。

図12はの未修飾TiO₂・H₂O₂を局注した腫瘍のHE染色の結果である。

これらの結果から、未修飾TiO₂・H₂O₂粒子は腫瘍内構造の表面に存在し、内部まで浸透していないように思われる。

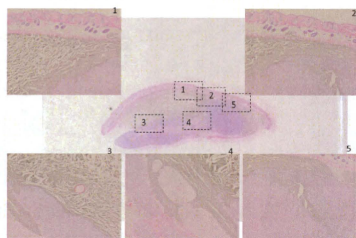


図12. 未修飾TiO₂・H₂O₂を局注した腫瘍のHE染色

TiO₂・H₂O₂粒子はナノレベルであるため、顕微鏡の解像度を超えていて観察できていないと考えられる。

したがって现阶段では死亡理由は断定できない。

2) PAA修飾TiO₂・H₂O₂のX線との併用効果

図13(a)はX線照射後の各グループの腫瘍体積の変化(平均値)を示す。ただし、局注時に死亡した未修飾TiO₂・H₂O₂群は除く。

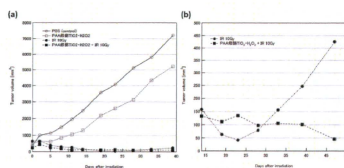


図 13. (a) X 線照射後の腫瘍体積の変化(平均値)、照射日を 0 日目としている。(b) X 線照射群のみでみた照射後 14 日目以降の腫瘍体積の変化(平均値)

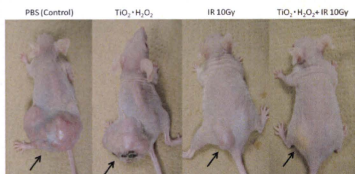


図 14. 腫瘍の外観。腫瘍移植後 54 日目、試料局注および X 線照射後 40 日目。

図14は腫瘍の外見である。

X線照射を行っていない2グループは腫瘍増大および潰瘍化がみられたが、PBS群に比べてTiO₂・H₂O₂群はその増大速度が抑えられている。別の分担研究グループがTiO₂・H₂O₂粒子はX線を照射していない状態でもラジカルを放出していることを示唆する結果を出しており、それゆえ局注のみでも腫瘍の増大が抑制されたのではないかと考えられる。

一方、X線照射を行った2グループには顕著な腫瘍縮小を認めた。照射後14日目以降は、縮小のため正確な腫瘍体積の測定が困難であった。

しかし、照射後20日目以降あたりから照射のみ群において腫瘍の再増大を認めた。図13(b)は照射した2グループにおける14日目以降の腫瘍体積の変化を示す。

PAA修飾TiO₂・H₂O₂局注+照射群においては腫瘍の再増大を認めておらず、TiO₂・H₂O₂の併用効果があったと考えられる。

各グループのマウスの体重の変化に関しては、グループ間での差はみら

れなかった。

E. 結論

過酸化チタンナノ粒子に放射線を照射することでラジカルが発生することを見出した。また、PAA修飾した過酸化チタンナノ粒子の毒性は無く、安全であることが確認できた。更に、放射線照射と過酸化チタンナノ粒子を併用することで、腫瘍の成長を抑制する効果が見られる可能性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shohei Komatsu, Takumi Fukumoto, Yusuke Demizu, Daisuke Miyawaki, Kazuki Terashima, Ryohei Sasaki, Yuichi Hori, Yoshio Hishikawa, Yonson Ku, Masao Murakami, Clinical results and risk factors of proton and carbon ion therapy for hepatocellular carcinoma, Cancer 2011, in press

2. Ryohei Sasaki, Koichi Yasuda, Eisuke Abe, Nobue Uchida, Mitsuhiro Kawashima, Takashi Uno, Masayuki Fujiwara, Yoshiyuki Shioyama, Yoshikazu Kagami, Yuta Shibamoto, Kensei Nakata, Yoshie Takada, Tetsuya Kawabe, Kazuyuki Uehara, Kenichi Nibu, Syogo Yamada, Multi-institutional Analysis of Solitary Extramedullary Plasmacytoma of the Head and Neck Treated with C

- urative Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
3. Yoshida K, Sasaki R, Nishimura H, Miyawaki D, Kawabe T, Okamoto Y, Nakabayashi K, Yoshida S, Sugimura K. Radiotherapy for Japanese elderly patients with cervical cancer: preliminary survival outcomes and evaluation of treatment-related toxicity. *Arch Gynecol Obstet*. 2010 Nov 30. Epub ahead of print
 4. Wakahashi K, Shimoyama M, Katayama Y, Minagawa K, Yoshida K, Sasaki R, Nakayama S, Yokozaki H, Yanagita E, Itoh T, Hayashi Y, Matsui T. Histiocytic sarcoma with two immunohistopathologically distinct populations. *Int J Hematol*. 2010 Oct 6. [Epub ahead of print]
 5. Ikushima H, Dong L, Erasmus J, Allen P, McAleer MF, Zhuang Y, Sasaki R, Komaki R. Predictive Value of (18)F-Fluorodeoxyglucose Uptake by Positron Emission Tomography for Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Radical Radiotherapy. *J Radiat Res*. 2010 May 28. [Epub ahead]
 6. Mukubou H, Tujimura T, Sasaki R, Yonson Ku, The role of autophagy in the treatment of pancreatic cancer with gemcitabine and ionizing radiation. *International Journal of Oncology* 2010 Oct 37 (4) 821-8.
 7. Amalia H, Sasaki R, Suzuki Y, Demizu Y, Bito T, Nishimura H, Okamoto Y, Yoshida K, Miyawaki D, Kawabe T, Mizushima Y, and Kazuro S. Vitamin K2-derived Compounds Induce Growth Inhibition in Radioresistant Cancer Cells. *Kobe J Med Sci*, 2010 56(2)38-49.
 8. Y. Kumamoto-Yonezawa, R. Sasaki, Y. Suzuki, Y. Matsui, T. Hada, K. Uryu, K. Sugimura, H. Yoshida, Y. Mizushima. Enhancement of human cancer cell radiosensitivity by conjugated eicosapentaenoic acid - a mammalian DNA polymerase inhibitor. *International Journal of Oncology* 2010 Mar;36; 577-584.
 9. Kenji Yoshida, Ryohei Sasaki, Hideki Nishimura, Yoshiaki Okamoto, Yoko Suzuki, Miki Saitoh, Naoki Otsuki, Yoshitake Hayashi, Toshinori Soejima, Kenichi Nibu, and Kazuro Sugimura. Nuclear Factor-kappa B Expression as a Novel Marker of Radioresistance: In Early Stage Laryngeal Cancer, Head Neck, 2010 May;32(5):646-55.

邦文論文

10. 佐々木良平, 橋本直樹, 赤坂浩亮, 放射線治療の有害事象, プロフェッショナルがんナーシング, 1, 63-73, 2011

11. 佐々木良平, 西村英輝, 椋本成俊, がん放射線治療の基礎知識, プロフェッショナルがんナーシング, 1, p42-55, 2011

12. 佐々木良平, PET診断と放射線治療, PET Journal 10,13-15 2010

著書

13. [編集、及び分担執筆] 佐々木良平、丹生健一（共同編集）、鈴木志津枝一（編集アドバイス）、佐々木良平、西村英輝、吉田賢史、宮脇大輔、他共同執筆

タイトル: カラーアトラス 放射線療法・放射線化学療法の有害反応と看護ケア

発行所、発行地、発行年月: 日本看護協会出版会、東京、2011、2月

14. [分担執筆] 佐々木良平、宮脇大輔（監修: 唐澤克之他）

タイトル: がん放射線療法・2010 下垂体腫瘍

発行所、発行地、発行年月: 篠原出版、東京、2010

ページ: p 625-632

15. [分担執筆] 佐々木良平、宮脇大輔（監修: 唐澤克之他）

タイトル: がん放射線療法・2010 別冊 下垂体腫瘍

発行所、発行地、発行年月: 篠原出版、東京、2010

ページ: p 18-19

16. [分担執筆] 佐々木良平(監修: 丹生健一他)

タイトル: 耳鼻咽喉科・頭頸部外科研修ノート; 放射線療法

発行所、発行地、発行年月: 診断と治療社、東京、2010

p 434-438

2. 学会発表

1. Authors: M. Murakami, Y. Demizu, Y. Niwa, O. Fujii, K. Terashima, M. Mima, D. Miyawaki, R. Sasaki, Y. Hishikawa, M. Abe

Title: Current state of proton and carbon-ion radiotherapy at the Hyogo Ion Beam Medical Center (HIBMC)

Meeting: CAARI

Meeting: Indiana USA, Aug 2010

2. Authors: K. Yoshida, H. Nishimura, D. Miyawaki, T. Kawabe, Y. Okamoto, K. Nakabayashi, S. Yoshida, R. Sasaki, K. Sugimura

Title: Radiotherapy for Elderly Patients with Cervical Cancer

Meeting: 52nd ASTRO

Meeting: San Diego USA, 2010/10/31-11/04

3. Authors: Y. Demizu,

K. Terashima, M. Mima, O. Fujii,
Y. Niwa, K. Morimoto, Y. Hishikawa,
M. Abe, M. Murakami

Title: Particle Radiotherapy using
Protons or Carbon Ions for Adenoid
Cystic Carcinoma of the Head and
Neck

Meeting: 52nd ASTRO

Meeting: San Diego USA,
2010/10/31-11/04

4. Authors: D. Miyawaki,
Y. Demizu, K. Terashima, M. Mima,
O. Fujii, Y. Niwa, K. Yoshida,
H. Nishimura, R. Sasaki, M. Murakami

Title: Particle-Beam Radiation
Therapy for Skull Base Chordomas: A
Retrospective Study

Meeting: 52nd ASTRO

Meeting: San Diego USA,
2010/10/31-11/04

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究 平成22年度終了報告書

チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による
難治性がんの新規治療法開発に関する研究

（酸化チタンナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究）

研究分担者 大原 智 大阪大学接合科学研究所 特任准教授

研究分担者 譚 振権 神戸大学大学院工学研究科 特命助教

A. 研究目的

「チタン酸化物を含有するバイオハイブリッドナノ粒子の放射線治療増感による難治性がんの新規治療法開発」の一環として、本分担研究では放射線照射によるラジカルを発生する酸化チタンナノ粒子の基盤研究を実施する。

具体的には、以下の二つの研究を中心に行う。

1. チタン酸化物をはじめとする放射線治療用候補酸化チタンナノ粒子に関して、放射線照射によるラジカルのさらなる発生量の向上を目指し、酸化チタンナノ粒子のサイズ・形状・結晶面・結晶構造等の制御を試みる。また、これにより酸化チタンナノ粒子からの放射線照射によるラジカル発生メカニズムの解明に貢献する。

2. 放射線照射によるラジカル発生機能を可能な限り保持したままで、酸化チタンナノ粒子が水中や体内等で良分散できる粒子の表面修飾とそのプロセスの検討を行う。

B. 研究方法

1. 二酸化チタンナノ粒子の合成

二酸化チタンナノ粒子の合成は水熱合成法等の液相プロセスで主に行う。その代表的合成プロセスを図1に示す。まず、二酸化チタンの前駆体となる0.02モル量の四塩化チタンを10mlの蒸留水中に加えた。次に、30mlの水酸化テトラメチルアンモニウム(tetramethylammonium hydroxide, TMAH)と混合し、さらに適量の水を添加することで、50mlの水酸化チタン分散液を得た。次に、この水酸化チタン分散液を50mlのテフロン反応管に入れて、所定の条件下（例えば125℃-1時間）で水熱反応を行い、二酸化チタンナノ粒子を合成した。得られた二酸化チタン分散液は150mlのエタノールを使って洗浄し、その後、遠心分離を行った（遠心速度1000rpm, 10分）。次に、回収した二酸化チタンナノ粒子を20mlの水中に超音波を用いて再分散させた。再分散液に150mlのエタノールで再度加え、遠心分離により再び二酸化チタンナノ粒子を回収した。以上のプロセスにより、

二酸化チタン粒子表面からTMAHを取り除いた。

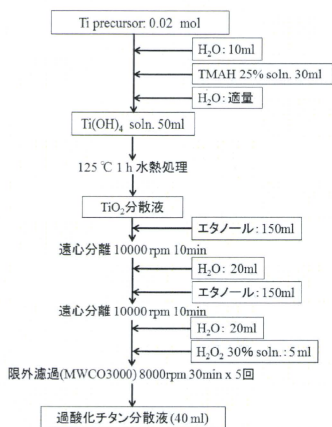


図1 二酸化および過酸化チタンナノ粒子の合成プロセス

2. 過酸化チタンナノ粒子の合成

上記プロセスで合成した二酸化チタンナノ粒子を20mlの水に加え、超音波で分散させた。次に、5mlの過酸化水素（質量濃度～30wt%）を添加し、攪拌下で2時間の酸化処理を行った。この反応により、乳白色の二酸化チタンは黄色へと変化し、過酸化チタンの生成が目視でも確認できた。限外濾過により生成物から未反応の過酸化水素を取り除き、最終的には過酸化チタンナノ粒子のみを得た。

3. 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

二酸化チタンから過酸化チタンへの合成ルートは、one-stepの酸化処理であり、その反応時のナノ粒子のサイ

ズ・形態制御は非常に難しいことが予測された。そこでまず、二酸化チタンのサイズ・形態制御を試みた。具体的には、チタン前駆体の種類や濃度、水熱反応の時間、反応場に添加する有機界面活性剤等の諸因子が二酸化チタンのサイズ・形態に及ぼす影響を検討した。チタン前駆体としては、四塩化チタン (TiCl_4 : 以下TC)、チタンイソプロポキシド ($\text{Ti}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_4$: 以下TP)、チタンn-ブトキシド ($\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$: 以下TB)の三種の原料を用いた。また、水熱反応時間としては、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間を検討した。

4. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾

未修飾な過酸化チタンナノ粒子は、高い表面ポテンシャルを持っているため、生体環境中（リン酸環境に近い液体中）では凝集しやすいことが予想された。そこで、放射線照射によるラジカル発生機能を保持したままで、凝集抑制可能なナノ粒子の表面修飾手法を検討した。表面修飾剤として用いた有機分子は、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate: SDC)、ポリアクリル酸 (polyacrylate: PAA) 等である。実験は10mlの過酸化チタン分散液（質量濃度10wt%）と有機分子を混合し、180度で2時間の処理を行った。処理後のサンプルからは遠心分離（15000rpm、30min）により余分な有機分子を取り

除き、表面修飾した過酸化チタンのみを得た。表面修飾した過酸化チタンナノ粒子の生体中での分散安定性の評価は、中性リン酸緩衝液 (PAA) 中で行った。

なお、以上のように、本分担研究で行う実験内容は、生体実験を一切含まないため、論理面へ配慮は特に必要とするものでない。

C. 研究結果

1. 二酸化チタンナノ粒子の合成

図2に水熱反応法により合成した代表的な二酸化チタンナノ粒子の高分解能透過電子顕微鏡 (TEM) 写真を示す。なお、二酸化チタンの生成 (結晶構造) は粉末X線回折パターンより確認した。TEM写真より格子像がはっきりと確認でき、合成したナノ粒子の結晶性は十分に高いものと思われる。また、1時間の水熱反応で得られたナノ粒子のサイズは、図3に示すように、 3 ± 1.1 nmであった。以上の結果、水熱反応法により単分散な二酸化チタンナノ粒子が合成できることが分かった。

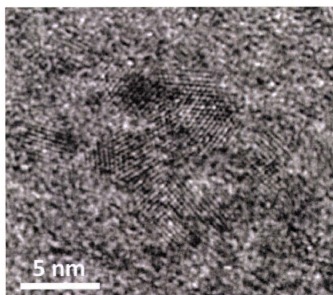


図2 二酸化チタンナノ粒子の高分解能TEM写真 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h)

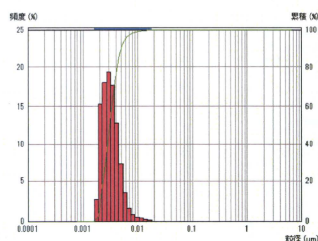


図3 動的光散乱法により評価した二酸化チタンナノ粒子のサイズ分布 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h)

2. 過酸化チタンナノ粒子の合成

図4に二酸化チタン (図2) の過酸化水素処理により得られた過酸化チタンの高分解能TEM写真を示す。粒子表面近傍には、過酸化チタン生成に起因する新規な結晶相やアモルファス相は観察されなかった。また、過酸化チタンナノ粒子のサイズ分布を図5に示す。過酸化処理による粒子のサイズの変化はほとんど確認されなかった。

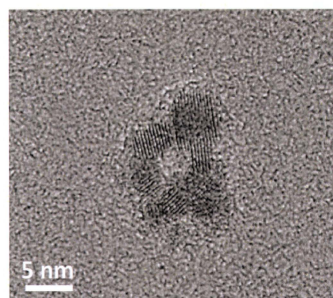


図4 過酸化チタンナノ粒子の高分解能TEM写真 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h)

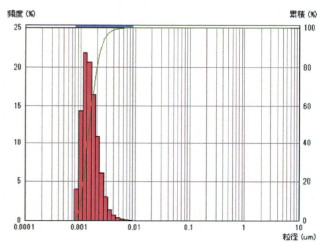


図5 過酸化チタンナノ粒子のサイズ分布 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1h)

次に、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて過酸化チタンナノ粒子を観察した。図6Aはマイカ基板上的のナノ粒子、Bはその3D像である。ナノ粒子の大きさは約2-3nm程度であり、TEM観察結果と良く一致した。

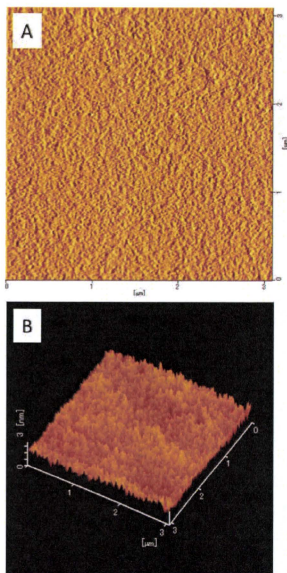


図6 過酸化チタンナノ粒子のAFM写真 (A : 平面像、B : 3D像)

3. 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

ナノ粒子のサイズが小さくなるに従いその比表面積は増加する。比表面積が大きい方が、放射線照射によるラジカルはより効率的に発生することが期待できる。そのため、過酸化チタンナノ粒子のサイズ制御は非常に重要と考えられる。

図7に四塩化チタンをチタン前駆体として用いて合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真を示す。水熱反応時間が1時間の場合、約2-3ナノメートルサイズの過酸化チタンナノ粒子 (図4、図7A) が生成したが、水熱反応時間が長くなるに従い、図7B-Dに示すようにサイズが段々と大きくなるのが分かった。また、ナノ粒子の形状が棒状になることが観察された。反応時間が4時間の場合の粒子サイズは、動的光散乱法で解析した結果35nmであり、反応時間が12時間と24時間では83nmと85nmであった。

四塩化チタンから合成した過酸化チタンナノ粒子の結晶構造をX線回折パターンにより評価した結果を図8に示す。水熱反応1時間の場合、 $2\theta = 8^\circ$ でピークを現れ、粒子はナノシート構造を持っていることが示唆された。また、反応時間の増加に伴い、アナターゼ型の結晶構造の生成が確認された。24時間の場合、ほとんどがアナターゼ構造となった。以上の結果、水熱反応時間を制御することで、粒子サイズに加え、結晶構造も変化させることが可能となるものと思われる。

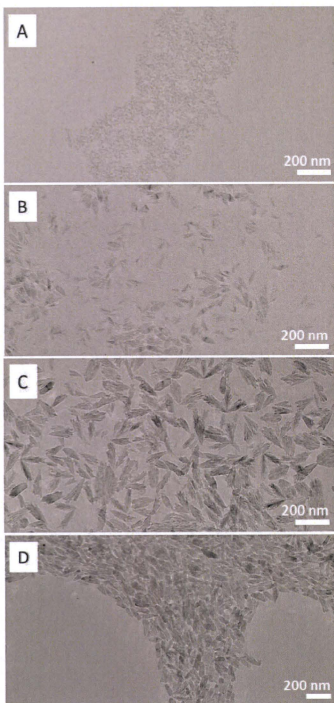


図7 水熱反応時間を変化させて合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (A=1h、B=4h、C=1h、D=24h)

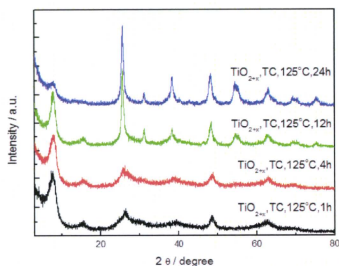


図8 水熱反応時間を変化させて合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

次に、チタンイソプロポキシド (TP) を前駆体として合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真を図9に示す。水熱反応が1時間の場合、四塩化チタンを用いた場合と同じように、約3nmサイズの過酸化チタンナノ粒子が得られた。また、水熱反応時間を長くすることで、ナノ粒子のサイズが大きくなることが確認された。さらに、反応時間が長くなるに従い、粒子の形状は異方性が大きくなり、24時間の反応で幅約10nm、長さミクロンオーダーのナノベルト (図9D) が合成できた。図10に得られた過酸化チタンのX線回折パターンを示す。いずれのサンプルも $2\theta = 8^\circ$ で強いピークが現れ、そのため、チタンイソプロポキシド (TP) を前駆体として合成した過酸化チタンは全てナノシート構造を有するものと考えられる。

さらに、チタンn-ブトキシド (TB) を前駆体として過酸化チタンナノ粒子の合成も試みた。図11にTEM写真を図12にX線回折パターンの結果をそれぞれまとめた。チタンn-ブトキシドを前駆体とした場合、チタンイソプロポキシドと同じ水熱条件下 (温度、時間) で合成すると、ナノ粒子のサイズ・形態・結晶構造等は、ほぼ同様な結果となることが分かった。これは、イソプロポキシドとブトキシドは有機分子であり、水熱反応時に同じような特異な微小反応場を創出しているものと思われる。

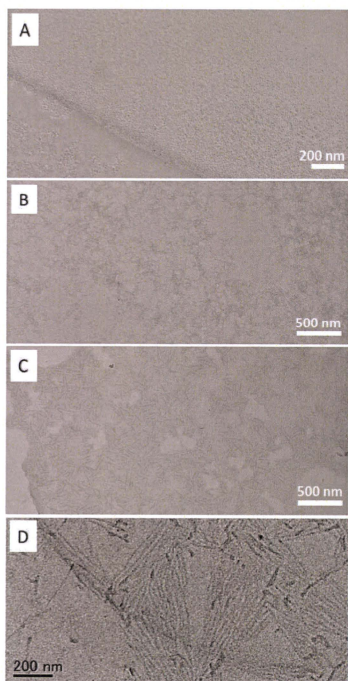


図9 チタンイソプロポキシド (TP) から合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (合成時間: A=1 h、B=4 h、C=12 h、D=24h、合成温度=125°C)

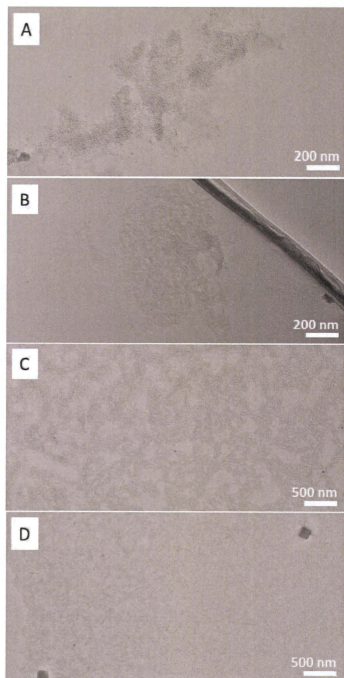


図11: チタンn-ブトキシド (TB) から合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (合成時間: A=1 h、B=4 h、C=12 h、D=24h、合成温度=125°C)

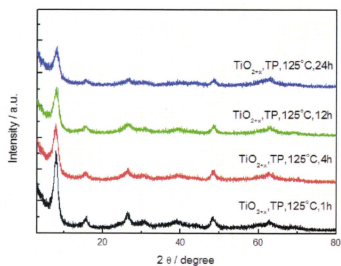


図10: チタンイソプロポキシド (TP) から合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

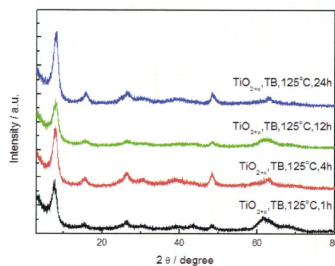


図12: チタンn-ブトキシド (TB) から合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

4. 過酸化チタンナノ粒子の吸収特性

四塩化チタンから合成した過酸化チタンナノ粒子の近紫外～可視光吸収スペクトルを図13に示す。二酸化チタンナノ粒子では吸収が見られなかったが、過酸化チタンナノ粒子では350nm付近で吸収ピークが確認された。

また、過酸化チタンナノ粒子の吸収特性のサイズ依存性を検討した。図14に異なる水熱反応時間で合成した過酸化チタンナノ粒子の吸収スペクトルを示す。350nm付近の吸収は粒子サイズが大きくなるに従い強くなり、また、吸収スペクトル全体は長波長側にレッドシフトするという現象が見られた。

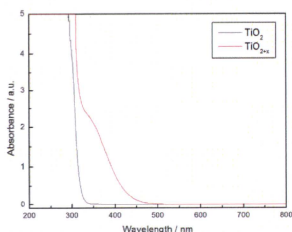


図13 過酸化チタンナノ粒子の近紫外～可視光吸収スペクトル

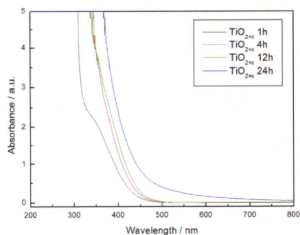


図14 粒子サイズの異なる過酸化チタンナノ粒子の近紫外～可視光吸収

スペクトル

図13と14には過酸化チタンナノ粒子の溶液中での吸収特性を示したが、過酸化チタンナノ粒子をスピコートすることにより作製した薄膜の吸収特性も解析・評価した。基板に用いたスライドガラスは、蒸留水、エタノール、さらに蒸留水中で、各30分間超音波洗浄した。次に、スピコートはスピ速度5000rpm、30秒間で実施した。得られた薄膜は空气中で乾燥した。過酸化チタンナノ粒子スピコート薄膜のSEM写真を図15に示す。過酸化チタンナノ粒子分散液の濃度を高くすると、薄厚は増加した。図16はそれぞれ得られた薄膜の吸収スペクトルである。過酸化チタンナノ粒子薄膜の吸収挙動は溶液中の場合とは異なり、約300nmの波長でピークが現れた。また、この吸収ピークは薄膜の厚みより長波長にシフトすることが確認された。

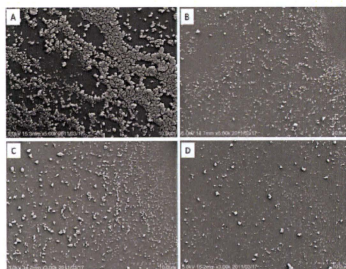


図15 スピコート法で作製した過酸化チタンナノ粒子薄膜 (ナノ粒子分散液濃度: A=0.25M, B=0.1M, C=0.05M, D=0.01M)

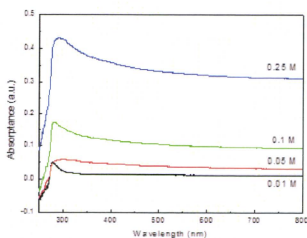


図16 過酸化チタンナノ粒子薄膜の近紫外-可視光吸収スペクトル

5. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾と分散挙動

本研究で合成される過酸化チタンナノ粒子は、水中ではpH制御により良好分散が可能である。一方、生体環境中ではリン酸基等の各種イオンが存在するため、その分散挙動の把握が必要となる。そこで本研究ではまず、リン酸バッファ中での過酸化チタンナノ粒子の分散性を評価した。具体的な実験方法としては、10vol%の過酸化チタンナノ粒子分散液を90vol%のリン酸バッファ中に注入し、超音波で分散した後の過酸化チタンナノ粒子の沈殿・凝集挙動を観察した。

図17は表面が未修飾の過酸化チタンナノ粒子の分散挙動の結果である。それぞれ、四塩化チタン、チタンイソプロポキシド、チタンn-ブトキシドから水熱反応1時間で合成した過酸化チタンナノ粒子である。未修飾の過酸化チタンナノ粒子は全て、リン酸バッファ中では容易に凝集することが確認された。

次に、表面修飾した過酸化チタンナノ粒子の分散挙動を図18に示す。なお、

本実験ではまず、表面修飾法として過酸化チタンナノ粒子と表面修飾剤を超音波で単純に混合する簡易な手法を採用した。表面修飾剤としては、SDS、SDC、PAAといったいずれもアニオン性界面活性剤を用いた。図18の結果から、本超音波表面修飾法では過酸化チタンナノ粒子と界面活性剤の接合が上手く達成できず、リン酸バッファ中の分散性はあまり改善されなかった。

そこで、熱処理表面修飾法（詳細は本報告書のB研究方法に記述）によりPAAを過酸化チタンナノ粒子に接合させた。PAA2000（平均分子量=2000）とPAA5000（平均分子量=5000）、 PAANH_4 （平均分子量=7000）と PAA Na （平均分子量=8000）の4種類のPAA誘導体を用いた。PAA2000とPAA5000は有機酸であり、また、 PAANH_4 と PAA Na はニュートラルに近い有機塩である。図19の結果、PAA酸を表面修飾した場合、過酸化チタンナノ粒子はリン酸バッファ中でも殆ど凝集せず、良好な分散挙動を示すことが分かった。

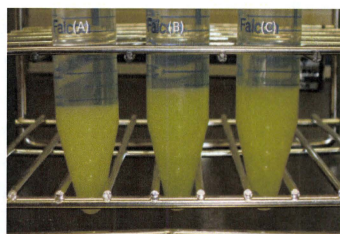


図17 表面未修飾の過酸化チタンナノ粒子のリン酸バッファ中での分散挙動（異なるチタン前駆体から合成：A=TC、B=TP、C=TB）