

図18 簡易超音波法で表面修飾した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 (修飾剤: A=SDS、B=SDC、C=PAA2000)

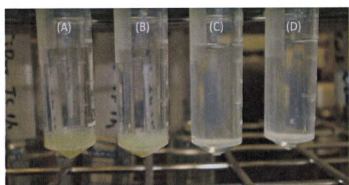


図19 熱処理法で表面修飾した過酸化チタンナノ粒子のリン酸バッファ中での分散挙動 (修飾剤: A=PAA-NH<sub>4</sub>、B=PAA-Na、C=PAA2000、D=PAA5000)

## D. 考察

### 1. 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

二酸化チタンはアナターゼ、ルチルおよびブルッカイトの三種類の結晶構造を一般にとる。アナターゼ構造は低温安定相であるため、低温の水熱反応法ではアナターゼ構造を合成しやすい。一方、ルチル構造は高温安定相であるため、アナターゼ構造の高温相転移によって合成できる。なお、ナノシート構造は従来層状結晶の単層剥離によって合成される場合が多い。図20にはアナターゼとナノシートの結晶構造を示した。

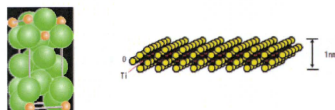


図20 二酸化チタンのアナターゼとナノシート結晶構造

今回、我々は水熱反応法により二酸化チタンナノシートの合成に成功した。四塩化チタンをチタン前駆体とした場合、得られた二酸化チタンの結晶構造の経時変化を図21に示す。反応の最初段階ではナノシートのみ生成された。反応時間の増加に伴い結晶はz軸方向にも成長し、結晶は次第にアナターゼ構造へと変化した。その結果、長時間の反応では完全なアナターゼ構造が得られた。一方、チタンイソプロポキシド、チタンn-ブトキシドを用いた場合、24時間の水熱反応後もナノシート構造のみが得られた。これは、イソプロポキシドとn-ブトキシドは有機分子であり、アルカリ環境中で生成した水酸化チタン [Ti(OH)<sub>4</sub>] ゲルの表面に吸附し、z軸方向の結晶成長が抑制されたためと考えられる (図22参考)。



図21 二酸化チタンの結晶構造の水熱反応時間に対する経時変化

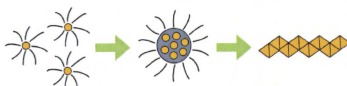


図22 有機分子共存下での二酸化チタンナノシートの生成メカニズム

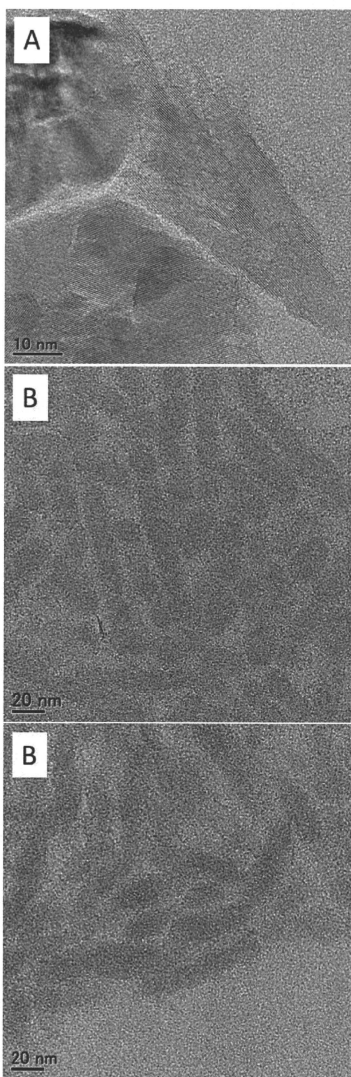


図23 過酸化チタンの高分解能TEM写真 (チタン前駆体: A=TC、B=TP、C=TB。水熱反応条件=125°C-12 h)

一般に、ナノシートは数原子層のみの厚さのため、同じ程度の大きさのナノ粒子よりも大きな比表面積を有すると考えられる。そのため、ナノシートの適用により、より効率的にラジカルが発生することが期待できる。また、ラジカルの発生機構を解明するうえでも、ナノシートの詳細な構造解析は重要である。過酸化チタンナノシートの高分解能TEM写真を図23に示した。四塩化チタンから作ったナノシートは、図23Aに示すように、結晶格子がはっきりと観察され、その結晶構造は図8に示したようにアナターゼ構造であった。一方、図23BとCに示すように、チタンイソプロポキシド、チタン $n$ -ブトキシドを用いた場合、得られた過酸化チタンナノシートは格子像が殆ど見られず、アモルファスに近い状態であることが分かった。この結果は、図10と図12のX線回折パターン結果と一致した。

また、本水熱反応法により合成される過酸化チタンは、サイズのコントロールも可能である。図24には水熱反応時間と粒子サイズとの関係をまとめた。反応時間の増加に伴い、粒子のサイズ (TCは動的光散乱より得られた値。TPとTBの場合はTEMから求めた粒子の長さ) は徐々に大きくなるのが分かる。その結果、反応時間を制御することで、過酸化チタンナノ粒子のサイズがコントロール可能である。

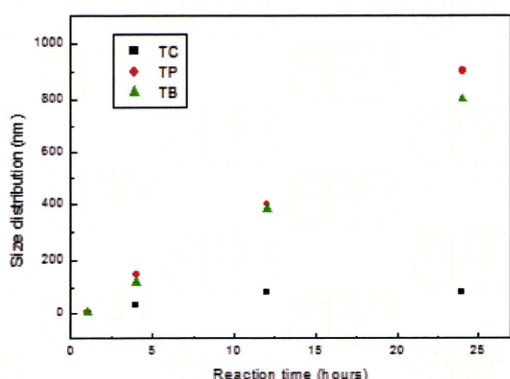


図24 過酸化チタンナノ粒子のサイズと水熱反応時間との関係

## 2. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾と分散挙動

表1 過酸化チタンナノ粒子の表面電位と pH 値

Sample*	Z-potential (mV)	pH value
TiO <sub>2</sub> (TC)	-47.74	8.73
TiO <sub>2+x</sub> (TC)	-58.57	8.41
TiO <sub>2+x</sub> (TP)	-0.11	11.89
TiO <sub>2+x</sub> (TB)	-0.83	12.22
TiO <sub>2+x</sub> -SDS (mix)	-22.22	9.78
TiO <sub>2+x</sub> -SDC (mix)	0.37	9.33
TiO <sub>2+x</sub> -PAA (mix)	-68.06	9.38
TiO <sub>2+x</sub> -PAA2000	-29.38	3.72
TiO <sub>2+x</sub> -PAA5000	-35.62	3.75
TiO <sub>2+x</sub> -PAANa	-57.08	7.77
TiO <sub>2+x</sub> -PAANH <sub>4</sub>	-60.87	7.46

\*すべてのナノ粒子は125°C-1時間の水熱反応条件で合成。

ナノ粒子の分散性は粒子の表面電位状態やサイズ、溶媒の誘電率、共存イオン種等、種々の因子に影響を受けることが知られている。図17~19の実験結果によると、PAAを表面修飾し

た過酸化チタンナノ粒子はリン酸バッファ中でも安定に分散できることが分かった。この実験に用いた過酸化チタンナノ粒子は、サイズや溶媒等はほぼ同じ条件であり、その分散性挙動の違いは粒子の表面電位状態に起因するものと推測できる。

表1には種々の過酸化チタンナノ粒子の表面電位 (Z-Potential) と pH 値をまとめた。二酸化チタンナノ粒子はアルカリ性であり表面電位は約-48mVである。その高い表面電位により二酸化チタンナノ粒子は水中で高い分散性を有すると考えられる。一方、二酸化チタンナノ粒子はリン酸バッファ中では分散状態を保持できず凝集した。表1の実験結果を見てみると、殆どの過酸化チタンはアルカリ性であることを分かる。但し、PAA酸を修飾した過酸化チタンナノ粒子だけは酸性である。図17~19の実験結果と併せて考察すると、酸性を持つPAA修飾した過酸化チタンナノ粒子のみ、リン酸バッファ中に良分散する。一方、他の過酸化チタンは表面電位とは関わらず全て凝集した。以上の結果、リン酸バッファ中での分散性に関しては、pHの値が表面電位より大きく影響することが分かった。今後は、他の分散剤 (例えばリポソン修飾等) を用いて過酸化チタンナノ粒子を表面修飾し、表面電位と pH 値の影響を引き続き検討する予定である。

## E. 結論

以上の研究結果と考察に基づいて、結論をまとめると以下の通りである。

1. 水熱反応法により過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御に成功した。水熱反応時間の増加に伴い、粒子サイズが大きくなることを確認した。また、チタンイソプロポキシド、チタン $n$ -ブトキシドをチタン前駆体とした場合、異方性の非常に大きいナノベルトが合成できた。

2. 水熱反応法により過酸化チタンナノシートの合成にも成功した。四塩化チタンをチタン前駆体に用いた場合、反応の初期段階ではナノシートが生成し、水熱反応時間の増加に伴いアナターゼ構造が合成された。なお、チタンイソプロポキシド、チタン $n$ -ブトキシドを前駆体に用いた場合は、ナノシートが選択的に生成した。

3. 過酸化チタンナノ粒子は350nm近辺で吸収を持つことが分かった。また、この吸収ピークは粒子サイズが大きくなるに伴い長波長側にレッドシフトする傾向が見られた。

4. 過酸化チタンナノ粒子にPAAを表面修飾することで、リン酸バッファ中における分散安定性が改善できることが分かった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) D. Rangappa, T. Naka, S. Ohara, and T. Adschiri, "Preparation of Ba-Hexaferrite Nanocrystals by an Organic Ligand-Assisted

Supercritical Water Process", *Crystal Growth & Design*, 10, p. 11-15, (2010).

(2) T. Mousavand, S. Ohara, T. Naka, M. Umetsu, S. Takami, and T. Adschiri,

"Organic-Ligand-Assisted Hydrothermal Synthesis of Ultrafine and Hydrophobic ZnO Nanoparticles", *J. Mater. Res.*, 25, p. 219-223, (2010).

(3) K. Sato, H. Abe, and S. Ohara, "Selective Growth of Monoclinic and Tetragonal Zirconia Nanocrystals", *J. Am. Chem. Soc.*, 132, p. 2538-2539, (2010).

(4) T. Sasaki, S. Ohara, T. Naka, J. Vejpravova, V. Sechovsky, M. Umetsu, S. Takami, B. Jeyadevan, and T. Adschiri, "Continuous Synthesis of Fine  $MgFe_2O_4$  Nanoparticles by Supercritical Hydrothermal Reaction", *J. Supercrit. Fluids*, 53, p. 92-94, (2010).

(5) Z. Tan, H. Abe, M. Naito, and S. Ohara, "Arrangement of Palladium Nanoparticles Templated by Supramolecular Self-assembly of SDS Wrapped on Single-Walled Carbon Nanotubes", *Chem. Comm.*, 46, p. 4363-4365, (2010).

(6) Z. Tan, H. Abe, M. Naito, and S. Ohara, "Oriented Growth Behavior of Ag Nanoparticles using SDS as a Shape Director", *J. Colloid Interface Sci.*, 348, p. 289-292,

(2010).

(7) J. Zhang, H. Kumagai, K. Yamamura, S. Ohara, S. Takami, A. Morikawa, H. Shinjoh, K. Kaneko, T. Adschiri, and A. Suda, “Extra-Low Temperature Oxygen Storage Capacity of CeO<sub>2</sub> Nanocrystals with Cubic Facets”, Nano Lett., 11, p. 361-364, (2011).

## 2. 学会発表

(1) 大原 智, 佐藤和好, 譚 振権, 梅津光央, “医療用セラミックスナノ粒子の水熱合成とバイオ分子接合”, 粉体工学会第46回夏期シンポジウム, 8月9-10日(2010) 京都.

(2) S. Ohara, K. Sato, Z. Tan, and M. Umetsu, “Joining of Ceramic Nanocrystals and Bio-molecules towards Bio-medical Applications”, Visual-JW2010, November (2010), Osaka, Japan.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

無し。

### 2. 実用新案登録

無し。

### 3. その他

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）

（総括・分担）研究年度終了報告書

新規ナノ粒子の開拓と放射線励起によるラジカル生成機構解明に関する研究

研究分担者 佐藤 和好 群馬大学大学院工学研究科 助教

研究分担者 沼子 千弥 徳島大学総合科学部 准教授

研究分担者 高見 誠一 東北大学多元物質科学研究所 准教授

## 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新規ナノ粒子の開拓と、そのラジカル生成メカニズム解明を目的とした物質の微細構造解析を実施する。本分担研究で得られる知見は、チタン酸化物の構造制御や、今後の新規材料の設計に寄与するものと期待され、これにより、高精度かつ高効率の難治性がん新規治療法の確立に貢献する。

これまでに、酸化ケイ素、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化スズ、酸化チタン、酸化セリウム、酸化亜鉛、過酸化ニッケル、過酸化チタンを合成し、その放射線励起による活性酸素ラジカルの生成を調べたところ、酸化物ではラジカル生成が認められなかった。

これに対して、過酸化チタンでは、放射線照射によってラジカルの放出が認められた。また、過酸化ニッケルでは、それ自身が水溶液中で分解しラジカルを発生するものの、放射線照射により、そのラジカル生成量が増加す

る傾向が認められた。

これらの結果より、過酸化物が有力な候補材料であると考えた。大気中で安定な過酸化物として、過酸化カルシウム( $\text{CaO}_2$ )、過酸化ストロンチウム( $\text{SrO}_2$ )、過酸化バリウム( $\text{BaO}_2$ )、過酸化亜鉛( $\text{ZnO}_2$ )、過酸化カドミウム( $\text{CdO}_2$ )、過酸化水銀( $\text{HgO}_2$ )が挙げられるが、中でも比較的毒性が低いと考えられる $\text{CaO}_2$ および $\text{ZnO}_2$ ナノ粒子の合成を試み、その放射線照射によるラジカル生成挙動を評価した。

また、高エネルギー加速器研究機構における放射光共同利用課題「過酸化チタンナノ結晶のTi-Oクラスターに関するXAFS分析（課題番号：2010G636）」が採択され、これまでに放射線励起によるラジカル生成が確認されている過酸化チタンについて、X線吸収分光法(X-ray Absorption Fine Structure; XAFS)による微細構造解析や長時間の放射光X線照射による構造変化の有無等の解析を実施した。

## B. 研究方法

### B-1. $\text{CaO}_2$ および $\text{ZnO}_2$ 粒子の合成

図1に $\text{CaO}_2$ 粉体の合成法を示す。まず、0.2molの $\text{CaCl}_2$ を410mlの蒸留水

に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが11になるまで添加した。その後、30%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpHが中性になるまでろ過洗浄し、エタノールで溶媒置換後80℃で24時間乾燥させ、試料とした。

図2にZnO<sub>2</sub>粉体の合成法を示す。0.2molのZnCl<sub>2</sub>を410mlの蒸留水に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが13になるまで添加した。その後、30%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpHが中性になるまでろ過洗浄し、エタノールで溶媒置換後80℃で24時間乾燥させ、試料とした。

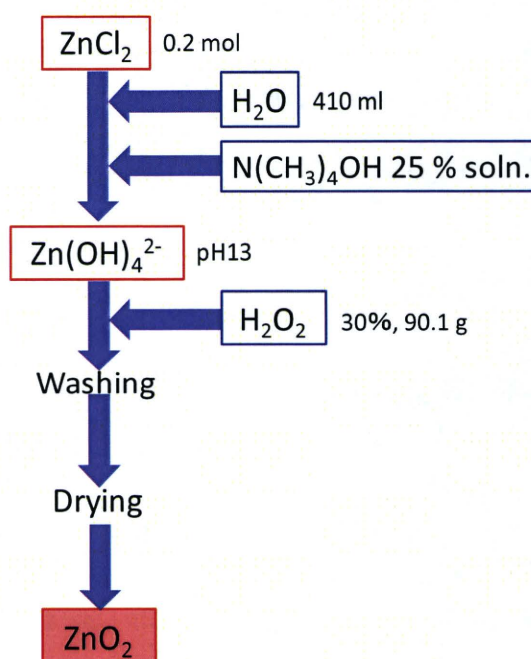


Fig. 2 ZnO<sub>2</sub>粒子の合成法

## B-2. CaO<sub>2</sub>およびZnO<sub>2</sub>粒子の構造ならびにラジカル生成特性評価

粉末の生成相をX線回折(Mac Science社製 M03XHF)で評価した。また、ピークの半値幅より生成相の結晶子径を見積った。X線源にはCuK $\alpha$ を用い、管電圧および管電流をそれぞれ40kV、30mAとし、ステップ角0.01°で2 $\theta$ =20-60°で測定を行った。

ラジカル生成特性の評価には、蒸留水にCaO<sub>2</sub>またはZnO<sub>2</sub>粒子を添加したものをを用いた。ここに、25 $\mu$ MになるようにAminophenyl Fluorescein (APF)を添加し、タングステン管球を備えた放射線照射装置にて、0から60Gyまで放射線を照射した後、APF蛍光強度を測定して、ラジカル生成特性を評価した。

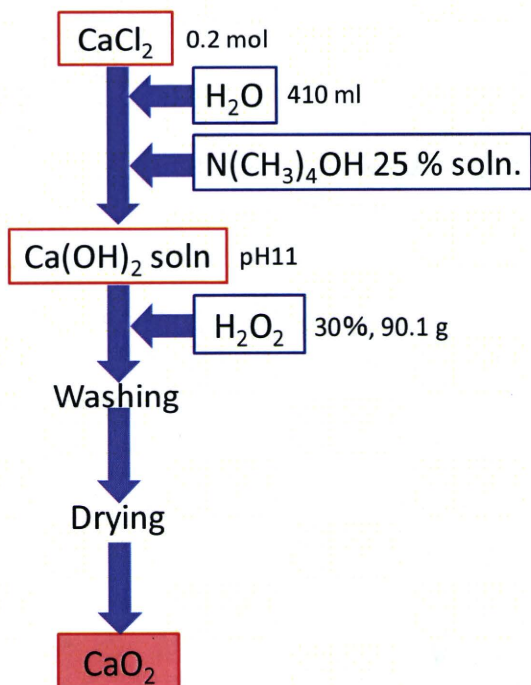


Fig. 1 CaO<sub>2</sub>粒子の合成法

### B-3. 放射光を用いた過酸化チタンナノ粒子の構造解析

過酸化チタンナノ粒子の微細構造解析は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのビームラインBL-9Aを用いたXAFS分析により行った。測定はライト型検出器を用いた蛍光モードで行った。得られたXAFSスペクトルより、Ti-K吸収端のXANES領域の波形を、既知の化学状態を有するリファレンスと比較することにより、過酸化チタン中のチタン原子の価数や電子状態等を評価した。なお、リファレンスには金属チタン、 $\text{TiH}_2$ 、 $\text{Ti}(\text{OH})_4$ 、 $\text{TiO}_2$ (アナターゼ)、 $\text{TiO}_2$ (ルチル)を用い、実試料には、沈殿法により合成した過酸化チタン粉末、水熱法で合成した $\text{TiO}_2$ 分散液を $\text{H}_2\text{O}_2$ で処理した過酸化チタン分散水溶液(固体含有率0.36 wt%)ならびに、酸性および塩基性過酸化チタン錯体を用いた。

また、上記過酸化チタンナノ粒子分散液に連続的に100分間放射光X線を照射しながらTi-K吸収端のXANESスペクトル測定を行い、放射線照射による構造の変化の有無を評価した。

## C. 研究結果と考察

### C-1. $\text{CaO}_2$ および $\text{ZnO}_2$ 粒子の構造

図3に得られた $\text{CaO}_2$ 粒子のXRDパターンを示す。本粒子は主に $\text{CaO}_2$ からなることがわかった。ピークの半値幅よりシェラーの式を用いて $\text{CaO}_2$ の結晶子径を見積ったところ、約11nmと微細であった。

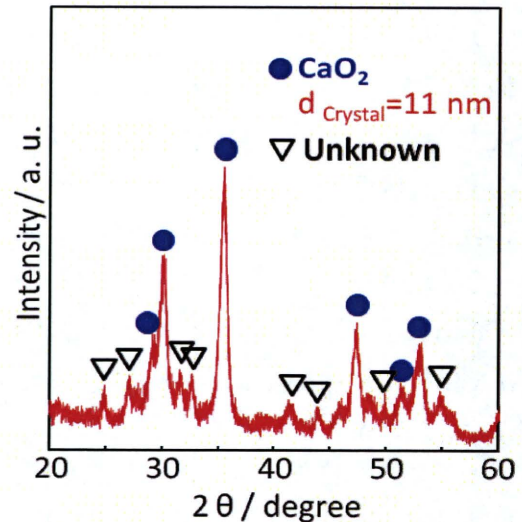


Fig. 3  $\text{CaO}_2$ 粒子のXRDパターン

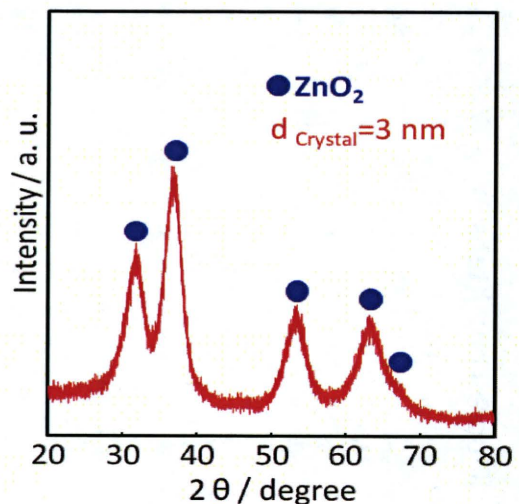


Fig. 4  $\text{ZnO}_2$ 粒子のXRDパターン

図4に得られた $\text{ZnO}_2$ 粒子のXRDパターンを示す。得られた粒子は単相の $\text{ZnO}_2$ であることがわかった。また、ピークの半値幅より見積った結晶子径は約3nmと極めて微細であった。

### C-2. $\text{CaO}_2$ および $\text{ZnO}_2$ 粒子における放射線励起によるラジカル生成特性

図5に $\text{CaO}_2$ 粒子を添加した水溶液に放射線を照射した際のAPF蛍光強



度と放射線照射量との関係を示す。飽和水溶液を除いて、放射線照射量の増大とともに、APF蛍光強度は増加し、 $\text{CaO}_2$ も過酸化チタン同様、放射線励起により酸素ラジカルを生成することがわかった。

図6に $\text{ZnO}_2$ 粒子を添加した水溶液に放射線を照射した際のAPF蛍光強度と放射線照射量との関係を示す。いずれの粒子濃度でも放射線照射量の増大とともに、APF蛍光強度は増加し、 $\text{ZnO}_2$ も過酸化チタンや $\text{CaO}_2$ と同様、放射線励起により活性な酸素ラジカルを生成することがわかった。

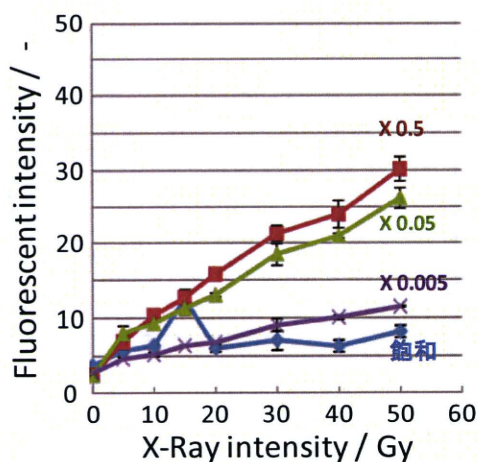


Fig. 5  $\text{CaO}_2$ 粒子のラジカル生成特性

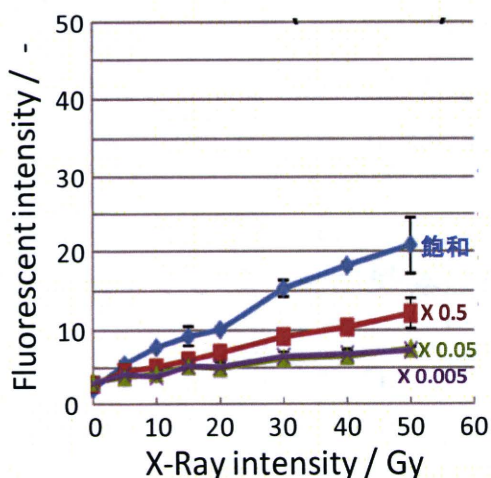


Fig. 6  $\text{ZnO}_2$ 粒子のラジカル生成特性

上記の放射線照射による活性ラジカル種の生成挙動評価より、金属過酸化物は放射線励起により、活性な酸素ラジカル種を生成する有力な候補材料であることがわかった。これらの粒子と過酸化チタン粒子の構造における共通点を明らかにできれば、放射線励起による活性ラジカル種生成メカニズムを明らかにするための足がかりが得られると考えられ、より効率良くラジカルを生成する粒子の設計に繋がるものと期待される。また、今回合成した粒子は一次粒子径は極めて微細であるものの、これらが数マイクロンレベルの粗大な凝集体を形成している。患部へのデリバリーの観点からは、今後、これらの粒子を分散させるための、プロセスの改良を行う必要がある。

### C-3. 過酸化チタンの微細構造評価

図7に過酸化チタン実試料ならびにリファレンス試料における、Ti-K吸収端のXANESスペクトルを示す。吸収端エネルギーはチタンの価数が大きくなるほど高くなるが、実試料である過酸化チタン粉末、過酸化チタン分散液、過酸化チタン錯体の吸収端位置はチタンの価数が+4である $\text{Ti}(\text{OH})_4$ 、 $\text{TiO}_2$ (アナターゼ)および $\text{TiO}_2$ (ルチル)と変わらないことがわかる。このことから、少なくともこれら実試料中のチタンの価数は4価であることがわかる。また、これらの試料のスペクト

ルは各々異なっており、いずれのリファレンスとも一致しないことから、放射線励起によるラジカル生成メカニズムの解明には、得られたXAFS振動の解析によるチタン原子の周辺構造の評価ならびに、転換電子収量法等による粒子極表面の構造解析を行う必要があり、次年度はこれらについて実施する予定である。

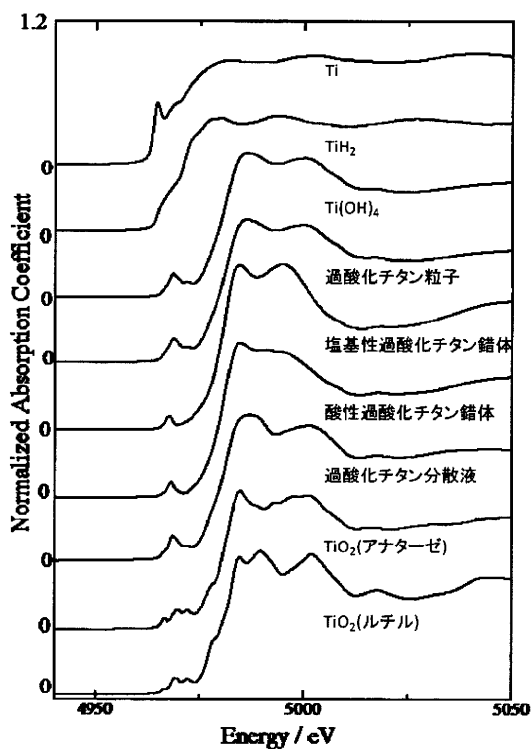


Fig. 7 過酸化チタン実試料およびリファレンス試料におけるTi-K吸収端のXANESスペクトル

図8に過酸化チタン分散液に放射光X線を連続的に100分間照射して測定したTi-K吸収端のXANESスペクトルを示す。スペクトルには大きな変化は見られず、少なくとも100分間の照射

によりTiの価数やその電子状態に大きな変化が無いことを示しており、放射線励起による活性酸素ラジカル種生成は過酸化チタンナノ粒子の分解によるものではなく、これらの触媒的な効果によるものであることが示唆される。

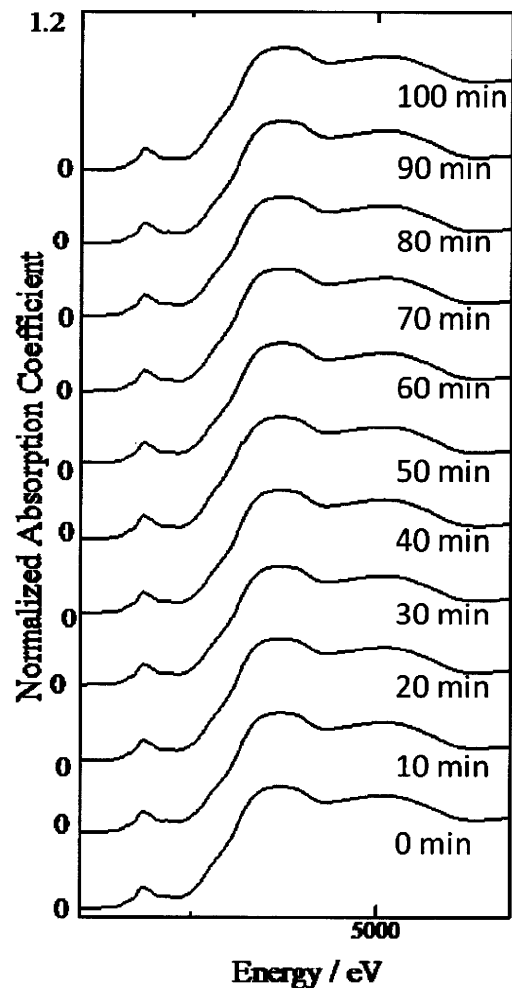


Fig. 8 放射光X線の連続照射による過酸化チタンナノ粒子分散液(0.36 wt%)におけるTi-K吸収端のXANESスペクトル変化

#### D. 結論

CaO<sub>2</sub>、ZnO<sub>2</sub>、過酸化チタンを含む金属過酸化物は放射線照射により活性酸素ラジカル種を高効率で生成することを見出した。

放射線照射により活性ラジカル種を生成する過酸化チタン中のTiの価数は、ラジカル生成が認められないTiO<sub>2</sub>やTi(OH)<sub>4</sub>と同様、4価であったが、その微細構造は明らかに異なっており、放射線励起による活性ラジカル種の生成メカニズム解明には、XAFS振動のより詳細な解析とともに、過酸化チタンとCaO<sub>2</sub>やZnO<sub>2</sub>に共通する構造の解明が必須である。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

1. K. Sato, H. Abe and S. Ohara, "Selective Growth of Monoclinic and Tetragonal Zirconia Nanocrystals", J. Am. Chem. Soc., **132** (2010) 2538-2539
2. K. Sato, T. Kinoshita, H. Abe, "Performance and Durability of Nanostructured LSM/YSZ Cathode for Intermediate Temperature Solid Oxide Fuel Cells", J. Power Sources, **195** (2010) 4114-4118
3. K. Sato, T. Kinoshita, H. Abe, "Fine-microstructure Mediated Efficient Hydrogen Oxidation in Ni/YSZ Anode Fabricated from Novel Co-precipitation Derived Nanocomposites", Fuel Cells, **10** (2010) 320-324
4. T. Togashi, T. Naka, S. Asahina, K. Sato,

S. Takami, T. Adschiri, "Surfactant-assisted one-pot synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticle clusters with tunable cluster size and magnetic field sensitivity", Dalton Trans., **40**, 1073-1078, 2011.

5. V. Singh, S. Takami, K. Minami, D. Hojo, T. Arita, T. Adschiri, "Hybridisation of Sebaic Acid onto the Surface of gamma-Alumina Nanoparticles in Sub- and Supercritical Water", Z. Naturforsch., B: Chem. Sci., **65b**, 1045-1050, 2010.

## 2. 学会発表

1. K. Sato, H. Abe and S. Ohara, "Selective Growth of Monoclinic and Tetragonal Zirconia Nanocrystals", International Ceramic Congress 3 (ICC-3), 14-18, November 2010, Osaka
2. K. Sato, T. Takarada, S. Ohara and H. Abe, "Selective Growth of Monoclinic and Tetragonal Zirconia Nanocrystals in Aqueous Solution", The American Chemical Society 241st National Meeting & Expositions, Anaheim, CA

## F. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 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

## （セラミックス基蛍光体のリポソームとの複合化及びその体内挙動）

研究分担者 東京理科大学基礎工学部 材料工学科 准教授 曾我 公平

マウス体内におけるハイブリッドナノ粒子の体内挙動およびその機能性高分子による修飾の効果を明らかにすることを目的として、近赤外蛍光を示すセラミックス基蛍光体とリポソームの複合化を行い、そのマウス体内挙動を、近赤外蛍光バイオイメージングシステムを用いて検討した。

### 1. 研究目的

現行の蛍光バイオイメージングには蛍光体として主に蛍光タンパク質や蛍光色素、量子ドットが用いられているが、光散乱が比較的強い可視光領域での蛍光を観察に用いるため、生体深部のイメージングが難しい。また励起光として紫外光を用いた場合、蛍光体の退色、生体への光毒性、バックグラウンドの原因となる自家蛍光が問題となる。一方、波長が0.8~2 μmの近赤外域は可視光帯域よりも光散乱が少なく、また分子振動による赤外吸収が強い「生体の窓」として知られる波長域であり<sup>1)</sup>、YbやErなどの希土類（RE）を含有するセラミックスは、この近赤外域で発光特性を持つ蛍光体として知られている。この近赤外蛍光体は、短波長励起光に起因する上記の問題を解決するとともに、生体深部のイメージングが可能な蛍光標識として近年注目を集めている。

一方、リポソームは生体の細胞膜と共通の構造であるリン脂質の二重膜からなる人工の微小カプセルである。そのためリポソームは生体適合性や生分解性に優れ、その内水相に水溶性物質を内包したり、脂質二重膜中に疎水性の物質を担持したりすることが可能である。また構成する素材の選択によって標的指向性を持つ糖鎖や抗体を膜表面に容易に導入できるため、生体内の特定部位に薬物を選択的に送達させるドラッグデリバリーシステム（DDS）における薬物キャリアとして多くの

研究が進められている。このリポソームに付加する物質として薬物のみならず蛍光体を選択することにより蛍光体とリポソームの複合化が可能であり、蛍光バイオイメージングにおけるイメージング部位への蛍光体の送達や、DDSキャリアの動態観察用マーカーとしての応用が期待される。そこで本研究では、近赤外蛍光ナノ粒子とリポソームを複合化した近赤外蛍光ラベル化リポソームを製し、生体内におけるリポソームの臓器への集積挙動を近赤外蛍光により観察することを目的とした。

リポソームを静脈内投与した際の集積挙動は、リポソームのサイズと表面修飾により様々に変化することが知られており、特にサイズが約200 nm以下で膜表面にポリエチレングリコール（PEG）を修飾したものは、肝臓や脾臓に存在するマクロファージ系細胞（細網内皮系：RES）による捕捉を回避するため血中滞留性が高く、これよりサイズが大きいものやPEG修飾を施していないものはRESによる捕捉が顕著になる。またリポソームのサイズは薄膜法や超音波処理法、マイクロカプセル化法など調整方法により大きく異なることが知られている。

本研究では親水性表面をもつPEG修飾Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>：RE粒子をリポソーム水相中に内包した試料と、オレイン酸共存下での水熱合成によって得られた疎水性表面を持つNaYF<sub>4</sub>：RE粒子を脂質二重膜

中に担持した試料の 2 種類の複合体を作製し、生体内に静脈投与した際の集積挙動の違いを近赤外蛍光画像により観察した。

## 2. 研究方法

リポソームに付加した近赤外発光蛍光体として、PEG-PAAC 修飾を施した  $Y_2O_3$  (Yb 1, Er 1 mol%) 蛍光粒子を均一沈殿法前駆体の焼成により、オレイン酸修飾を施した  $NaYF_4$  (Yb 20, Er 2 mol%) 蛍光粒子を水熱合成法によりそれぞれ作製した。これらについては、粉末 XRD 測定、SEM 像観察、粒径分布測定 (DLS) により、結晶相の同定、試料形状、粒径分布の評価を行った。

次に親水性表面を持つ PEG-PAAC 修飾を施した  $Y_2O_3$  粒子の分散水溶液とクロロホルム/リン脂質溶液 (Dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) : Cholesterol : Distearoyl-glycerol-PEG (DSG-PEG) = 6:3:1) を用い、マイクロバブル化法により  $Y_2O_3$  粒子をリポソーム内水相に内包した複合体 ( $Y_2O_3$ -Lipo) の作製を行った。得られた試料は SEM 観察、粒径分布測定 (DLS)、近赤外蛍光顕微鏡観察、細胞生存率測定により、リポソームの粒径分布、近赤外蛍光特性、細胞毒性を評価した。またリポソーム分散液をマウス経尾静脈中に投与し、1 時間後と 24 時間後にマウス胴体の近赤外蛍光画像を観察した。その後マウスをサクリファイし、肺、肝臓、脾臓、腎臓の近赤外蛍光画像を観察した後、臓器切片を作製し、近赤外蛍光顕微鏡によって臓器の観察を行った。

さらに疎水性表面を持つオレイン酸修飾を施した  $NaYF_4$  粒子 (Yb 20, Er 2 mol%) をクロロホルム/リン脂質溶液 (DPPC : Cholesterol : DSG-PEG = 6:3:1) と混合し、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した後、HEPES バッファーを添加し、50°C で超音波処理した後、遠心回収した。得られた試

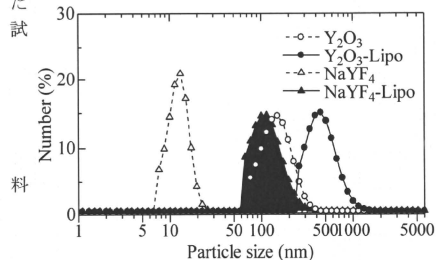


Fig. 1 Particle size distributions of  $Y_2O_3$ ,  $NaYF_4$ ,  $Y_2O_3$  or  $NaYF_4$  nanoparticles-encapsulating liposomes. The solvent of  $NaYF_4$  is cyclohexane and those of the others are HEPES buffer.

( $NaYF_4$ -Lipo) は  $Y_2O_3$  粒子内包リポソームの場合と同様に粒径分布、近赤外蛍光特性、細胞毒性を評価した。またリポソーム分散液をマウス経尾静脈に投与し、マウス胴体及び取り出した臓器の近赤外蛍光像及び臓器切片の近赤外蛍光顕微鏡観察を行った。

## 3. 実験結果及び考察

均一沈殿法により作製した試料は粉末 XRD 測定、SEM 像観察、DLS 測定から、粒径  $140 \pm 53$  nm の  $Y_2O_3$  粒子であることがわかった。SEM 観察、DLS 測定から、 $Y_2O_3$ -Lipo の大きさは  $450 \pm 170$  nm であり、近赤外蛍光顕微鏡観察により近赤外発光像が観察できた ( $\lambda_{ex} = 978$  nm)。水熱合成により作製した試料は XRD 測定、SEM 観察、DLS 測定

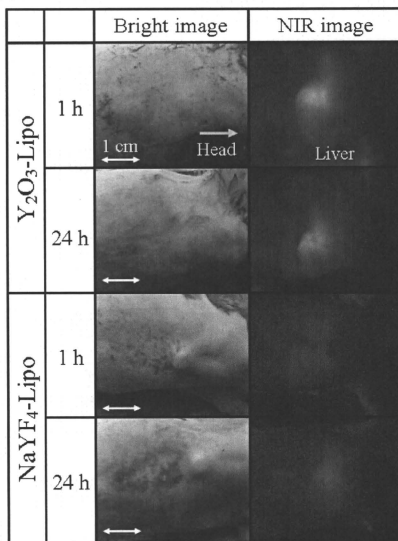


Fig. 2 *In vivo* NIR images ( $\lambda_{ex} = 975$  nm) of mice at 1 h or 24 h after injection of  $Y_2O_3$  or  $NaYF_4$  nanoparticles-encapsulating liposomes.

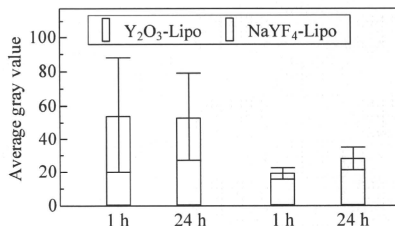


Fig. 3 Average gray value of *In vivo* NIR images of mice at 1 h or 24 h after injection of  $Y_2O_3$  or  $NaYF_4$  nanoparticles-encapsulating liposomes.

から、粒径  $12 \pm 3.0$  nm の  $\alpha$ - $\text{NaYF}_4$  粒子であることがわかった。SEM 観察、DLS 測定から  $\text{NaYF}_4$ -Lipo の大きさは  $110 \pm 44$  nm であり、近赤外蛍光顕微鏡観察により近赤外発光像が観察できた。細胞生存率測定においては、ガン細胞由来の PK136 の場合、どちらの試料も試料濃度に依存せず生存率 100%前後に対し、マクロファージ由来の J774 の場合、 $\text{NaYF}_4$ -Lipo は試料濃度に依存せず生存率 100%前後であり、 $\text{Y}_2\text{O}_3$ -Lipo は濃度の増大に伴い生存率が低下する傾向があることがわかった。 $\text{Y}_2\text{O}_3$ -Lipo 及び  $\text{NaYF}_4$ -Lipo のマウス経尾静脈投与後の *In vivo* 近赤外蛍光観察では、1 時間後、24 時間後ともに両方のマウスより肝臓からの発光が観察できた (Fig. 2)。また画像解析により算出した近赤外蛍光像における発光部位の各平均濃度値を Fig. 3 に示す。1 時間後の平均濃度値に対する 24 時間後の値の割合を計算すると、 $\text{Y}_2\text{O}_3$ -Lipo の場合 98% とほぼ変化していないのに対し、

$\text{NaYF}_4$ -Lipo の場合、150% に増大していることがわかった。これはリポソームの大きさが  $\text{Y}_2\text{O}_3$ -Lipo は約 450 nm に対し、 $\text{NaYF}_4$ -Lipo は約 110 nm と小さいため、肝臓へ集積する時間に遅延が生じたと考えられる。取り出した臓器の近赤外蛍光像を観察した結果、どちらのマウスも静脈投与したリポソームは脾臓、肝臓、肺に集積していることがわかった。また臓器切片の近赤外蛍光顕微鏡像観察でも同様に脾臓、肝臓、肺から近赤外発光を観察することができた。

#### 4. 結言

二種の近赤外蛍光体付加リポソームの作製に成功し、これらをマウスの静脈に投与した際の *in vivo* 近赤外蛍光像の観察を行うことにより、その臓器への集積挙動を明らかにすることができた。

#### 5. 参考文献

- 1) R. Anderson *et al.*, *J. Investigative Dermatology*, **77** [1] (1981) 13-19.

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

### （イットリアナノ粒子へのPEG-b-PAAc修飾条件の最適化）

研究分担者 東京理科大学基礎工学部 材料工学科 准教授 曾我 公平

セラミックスナノ粒子表面への親水性高分子の導入は、その粒径維持のために不可欠である。我々はポリエチレングリコールとポリアクリル酸のブロックコポリマーを用いたセラミックスナノ粒子表面への親水性高分子の修飾方法を提案してきた。本研究ではその条件の最適化により、これまでに報告されている導入量を一桁上回る導入に成功するとともに、その限界修飾量について明らかにした。

#### 1. はじめに

希土類含有イットリア( $Y_2O_3$ )ナノ粒子は近赤外光を励起光として近赤外発光を示す特性があり、蛍光バイオイメージングにおける蛍光プローブとしての応用が期待されている。この応用には、水溶液における分散性安定性と観察対象における非特異的な吸着の抑制を目的として、粒子表面にポリエチレングリコール(PEG)などの機能性高分子を修飾する必要がある。PEG 修飾方法の一つに、PEG 鎖の末端にポリアニオンブロック構造を持つ PEG-b-Poly(Acrylic Acid)(PEG-b-PAAc)を  $Y_2O_3$  粒子表面に静電的に相互作用させる方法があり、PEG-b-PAAc 修飾量の増大に伴う前述の機能の向上が報告されている<sup>1)</sup>。先行研究では4℃の Tris-塩酸バッファー(10 mM、pH 7.4)中で、PEG-b-PAAc と粒子の混合比を 10 wt/wt とし、24 時間攪拌することで最大  $1.9 \times 10^{-2}$  chains/nm<sup>2</sup> の PEG-b-PAAc を修飾しているが<sup>1)</sup>、修飾条件の最適化は行われておらず、溶液種、温度、時間、濃度などの条件の最適化を行うことで PEG 修飾量の向上が期待できる。そこで本研究では、 $Y_2O_3$  ナノ粒子に対する PEG-b-PAAc 修飾条件を変化させることで修飾量を増大させることを目的とした。

#### 2. 実験方法

所定量の PEG-b-PAAc [分子量 5000(PEG)/3200(PAAc)] を所定温度、所定時間、均一沈殿法で作製した  $Y_2O_3$  粒子と共に蒸留水中

で攪拌して試料を作製した。粒子と高分子の混合比を重量比 1:2 に固定し、反応温度は 35, 50℃、反応時間は 1~48 時間で変化させて試料を作製した。次に温度と時間は 50℃、6 時間に固定し、粒子と高分子の混合比を重量比で 1:x ( $x=0.05\sim 4.0$ ) に変化させて試料を作製した。PEG-b-PAAc 修飾

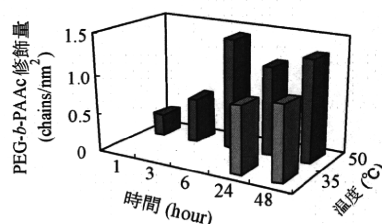


図1 反応時間、反応温度と PEG-b-PAAc 修飾量の関係

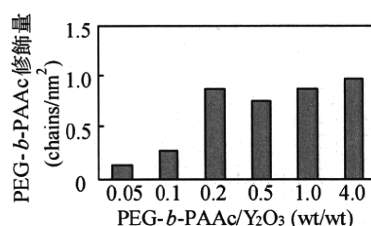


図2 粒子と PEG-b-PAAc の混合比と PEG-b-PAAc 修飾量の関係

量の変化は、試料の熱重量減少率、赤外吸収スペクトルにより評価した。

### 3. 結果及び考察

図1に反応時間と反応温度を変化させた場合の PEG-*b*-PAAc 修飾量を示す。反応温度が 50 °C の場合、35 °C に比べ PEG-*b*-PAAc 修飾量は増大した。また反応時間が 6 時間以上では反応時間を延ばしても修飾量の増大は見られなかった。これは、粒子表面の PEG-*b*-PAAc が飽和したためであると考えられる。

図2に粒子に対する PEG-*b*-PAAc の混合比を変化させた場合の PEG-*b*-PAAc 修飾量の変化を示す。混合比が 0.2 wt/wt 以上で、温度を変化させた場合と同様 1 chain/mm<sup>2</sup> 程度から PEG-*b*-PAAc が増大しないことが分かった。また赤外吸収スペクトル測定からも、図1, 2と同様に修飾量の飽和傾向が見られた。

以上より、本研究で検討した範囲内では蒸留水中で反応温度を 50 °C、反応時間を 6 時間以上、PEG-*b*-PAAc と粒子の混合比を 0.2 wt/wt 以上とすることで、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粒子に対する PEG-*b*-PAAc 修飾量が 1.0 chains/nm<sup>2</sup> 程度で飽和することが分かった。この値は既往の研究に対して 70 倍程度の PEG-*b*-PAAc 修飾量に相当する<sup>1)</sup>。

### 4. まとめ

PEG-*b*-PAAc を Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粒子表面に修飾する際に本研究で示した条件を用いることにより、その修飾量を従来法の約 70 倍程度に増大させることができた。また、その修飾量は 1.0 chains/nm<sup>2</sup> 程度で飽和することがわかった。

### 5. 参考文献

1) M. Kamimura *et al.*, *Langmuir*, **24** (2008) 8864



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

（バイオナノカプセルへの分子標的化機能付加へ向けた  
抗体分子デザインと提示プロセス開発）

研究分担者 梅津 光央 東北大学大学院工学研究科 准教授

## A. 研究目的

抗体分子は分子量15万を超える巨大分子であるが、分子標的機能としては、可変領域断片と言われる分子量1～3万程度のドメインが役割を担っている。それらだけを独立して調製した抗体は低分子抗体と言われ、他のタンパク質との融合や積み木細工的分子デザインの単位ユニットとして用いることができる。本提案研究では、低分子抗体をバイオナノカプセルなどのナノ粒子を包容し生体内でデリバリーできるタンパク質カプセル表層に抗体の結合サイトを提示させるプロセスを開発する。

そのために、まず、膵臓がんをはじめとする腫瘍がん組織細胞表面に過剰に発現している上皮増殖因子受容体(EGFR)に特異性を示す抗体分子を用いてタンパク質カプセル表層に提示可能な低分子抗体の構造設計をする。

## B. 研究方法

### 会合ペプチドユニットによる低分子抗体の提示プロセス

ナノ粒子を内包可能なタンパク質カプセルへの抗EGFR低分子抗体の提示プロセスの開発として、本年度は、抗EGFR抗体としては、可変領域がヘテロ二量体であるヒト由来抗体分子と比較して構造が単純であり、かつ、ヒトのVH断片と相同性が高い、可変領域が単量体であるラクダ由来抗体分子(VHH)を利用した。そして、タンパク質カプセルとしては、24個の分子量約21kDaのサブユニットが会合し、内部にナノ粒子を内包でき空孔を持つフェリチンタンパク質を利用した。このフェリチンを形成する各サブユニットのN末端は界面へ露出している。そのN末端を利用した、蛋白質の融合もしくは蛋白質間相互作用を利用した連結により、抗体分子を、活性を低下させずに、かつ、高密度にフェリチン表面へクラスター化できると考えた。

具体的には、コイルドコイル相互作用を利用して上皮増殖因子受容体(EGFR)特異的ラグダ抗体の可変領域断片(VHH)をクラスター化させるために、金属イオン依存的にヘテロコイルドコイル2量体を形成するペプチドの一方(pepA : EIEAHEQEHEAIEQEIEA HEQEHEA IEQ)をN末端に融合したフェリチンタンパク質と、もう一方のペプチド(pepB : IEAHKQKHEA IKQKIEAHKQKHEAIKQK)をC末端に融合した抗EGFR VHH断片を大腸菌発現によって調製し、ニッケルイオン存在下でクラスター化させた(図1)。

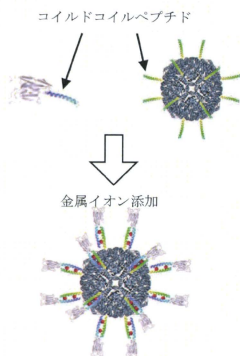


図1 会合ペプチドを利用した抗体提示プロセス

## 大腸菌を用いた大量調製

### ・フェリチン

図2の発現ベクター(pET pepA-フェリチン)を用い、大腸菌BL21(DE3)株をそれぞれ形質転換した。

次に、形質転換した大腸菌を100 µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培

地にプレーティングし、28 °Cで一晩培養した。プレート培地に形成されたコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含む3 mlのLB試験管培地に植菌し、

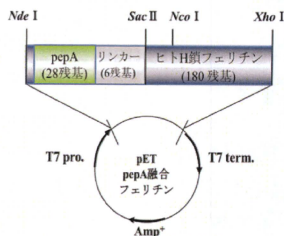


図2 pepA 融合フェリチン発現ベクター

28 °Cで12 h振盪培養した。その後、試験管で培養した培養液を100 µg/mlのアンピシリンを含む50 mlのLB培地(坂口フラスコ)に植え継ぎ28 °Cで振盪培養を行った。その後、坂口フラスコで培養した培養液を100 µg/mlのアンピシリンと1.5 mlの消泡剤を含む3 lのLB培地(ジャーファーマンター)に植え継ぎ、37 °C、200 rpmで攪拌培養を行った。600 nm のO. D. が0.6に達した時点で、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を終濃度1 mMとなるように添加し、継続して4 h攪拌培養を行った。その後、培養液を遠心分離することで菌体を回収し、トリス緩衝水溶液[50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8.0)]で懸濁後、超音波破碎を行い、遠心分離により上清を回収した。その後、フェリチン分子が熱に安定である性質を利用して、ウォーターバスを用い60 °Cで20 min加熱処理を行い、夾雑

タンパク質を熱変性させた。その後、水中にて冷却し、遠心分離を行い上清を回収した。回収した上清をゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。その後、SDS-PAGEにより回収する画分を決定した。

#### ・抗EGFR VHH断片

図3の発現ベクター(pRA 抗EGFR VHH-pepA, pRA 抗EGFR VHH-pepB, pRA 抗GFP VHH-pepB)を用い、大腸菌BL21(DE3)株をそれぞれ形質転換した。次に、形質転換した大腸菌を100 µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレーティングし、28 °Cで一晩培養した。プレート培地に形成されたコロニーを100 µg/mlのアンピシリンを含む3 mlのLB試験管培地に植菌し、28 °Cで一晩振盪培養した。その後、試験管で培養した培養液を100 µg/mlのアンピシリンを含む250 mlのLB培地(坂口フラスコ)に植え継ぎ28 °Cで振盪培養を行った。600 nmのO. D. が0.8に達した時点で、IPTGを終濃度1 mMとなるように添加し、継続して一晩攪拌培養を行った。その後、培養液を遠心分離することで培地を回収し、

図3 pepB 融合抗EGFR VHH 発現ベクター

菌体はトリス緩衝水溶液[50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8.0)]で懸濁後、Osmotic Shockを行い、遠心分離により上清を回収した。回収した培地、Osmotic Shock後上清に対し、ÅKTA cross flowを用い、濃縮・透析を行った。その後、Strep-Tactin Sepharoseによるアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った。SDS-PAGEにより精製度を確認した。

#### ・クラスター化と機能評価

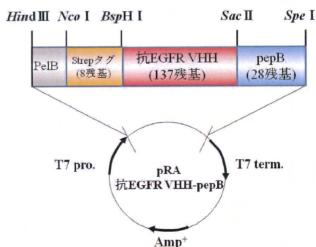
pepA融合フェリチンとpepB融合抗EGFR VHH断片を混合し、Ni<sup>2+</sup>イオンを添加することで複合体の作製を試みた。ゲル濾過クロマトグラフィーによって、フェリチンとVHHの複合体形成を評価した。

複合体形成を確認した条件については、A431細胞上のEGFRに対する結合活性を、フローサイトメトリーを用いて評価し、さらに、蛍光顕微鏡を用いたイメージングも行った。

### C. 研究結果

#### ・ pepA 融合フェリチンの調製

発現ベクター(pET pepA融合フェリチン)を用い、大腸菌BL21(DE3)株をそれぞれ形質転換した。形質転換した大腸菌は、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレーティングし



28 °Cで一晩培養した後、プレート培地に形成されたコロニーから試験管培養を経て、100 µg/mlのアンピシリンを含む50 mlのLB培地(坂口フラスコ)に植え継ぎ28 °Cで振盪培養を行った。その後、坂口フラスコで培養した培養液を100 µg/mlのアンピシリンと1.5 mlの消泡剤を含む3 lのLB培地(ジャーファーマンター)に植え継ぎ、37 °C、200 rpmで攪拌培養を行った。600 nmのO. D. が0.6に達した時点で、isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を終濃度1 mMとなるように添加し、継続して4 h攪拌培養を行った。その後、培養液を遠心分離することで菌体を回収し、トリス緩衝水溶液[50 mM Tris-HCl、200 mM NaCl (pH 8.0)]で懸濁後、超音波破砕を行い、遠心分離により上清を回収した。その後、フェリチン分子が熱に安定である性質を利用して、ウォーターバスを用い60 °Cで20 min加熱処理を行い、夾雑タンパク質を熱変性させた。

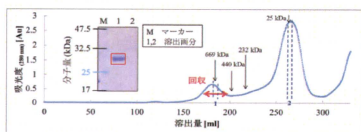


図4 ゲル濾過クロマトグラフィーによる pepA 融合フェリチンの精製

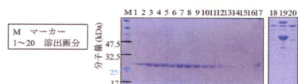
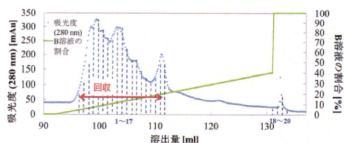


図5 陰イオン交換クロマトグラフィーによる pepA 融合フェリチンの精製

A 液: 50 mM Tris-HCl (pH9.0)

B 液: 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl (pH9.0)

い上清を回収した。回収した上清をゲル濾過クロマトグラフィー(図4)、陰イオン交換クロマトグラフィー(図5)により精製を行った。その結果、SDS-PAGEによって単バンドを確認できるまで精製された pepA 融合フェリチンを調製することに成功した。

#### • pepB 融合抗EGFR VHHの調製

発現ベクター(pRA pepB 融合抗EGFR VHH)を用い、大腸菌BL21(DE3)株をそれぞれ形質転換した。次に、形質転換した大腸菌は100 µg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地にプレティングし28 °Cで一晩培養した後、プレート培地に形成されたコロニーから試験管培地を経て、100 µg/mlのアンピシリンを含む250 mlのLB培地(坂口フラスコ)に植え継ぎ28 °Cで振盪培養を行った。600 nmのO. D. が0.8に達した時点で、IPTGを終濃度1 mMとなるように添加し、継続して一晩攪拌培養を行った。その後、培養液を遠心分離することで培地を回収し、菌体はトリス緩衝水溶液[50 mM Tris-HCl、200 mM NaCl (pH 8.0)]で懸濁後、Osmotic Shockを行い、遠心分離により上清を回収した。回収した培地、Osmotic Shock後上清に対し、ÄKTA cross flowを用い、濃縮・透析を行った。その後、Strep-Tactin Sepharoseによるアフィニテ