

図3 スカベンジャーによるラジカルの抑制、CTL=コントロール、Vit.C=ビタミンC、GSH=グルタチオン

2. 細胞内でのラジカル生成

TiOxナノ粒子による細胞内でのラジカルを評価するためにFACS解析を行った。染色試薬として、OHラジカル検出にAPF、 $\cdot O_2^-$ ラジカル検出にHE、 H_2O_2 検出にcDCFを用いた。

図4は、X線照射を行わずTiOxナノ粒子のみを作用させ、各染色試薬で測定した結果である。X線照射をしていない状態でも、TiOxナノ粒子のみで細胞内で H_2O_2 とOHの発生があった。

図5は、TiOxナノ粒子とX線を併用した結果である。X線線量は10Gyおよび30Gyであった。X線照射によりOHラジカルの発生が増強されることがわかった。

3. カタラーゼとの酵素反応

TiOxナノ粒子のラジカル発生機構解明のため、カタラーゼとの反応を調

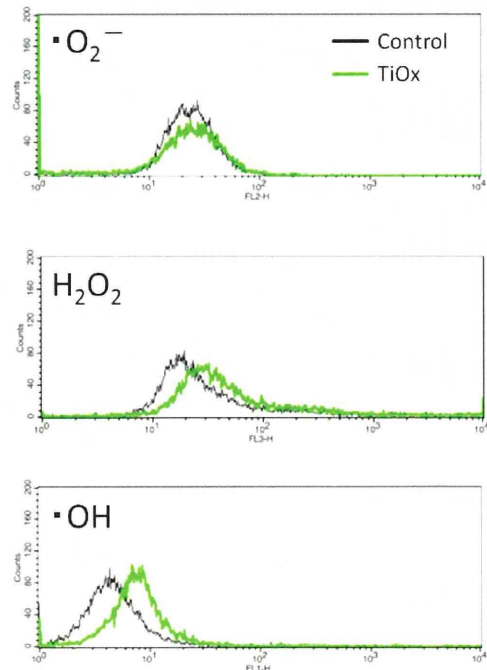


図4 TiOxナノ粒子の細胞内でのラジカルの生成

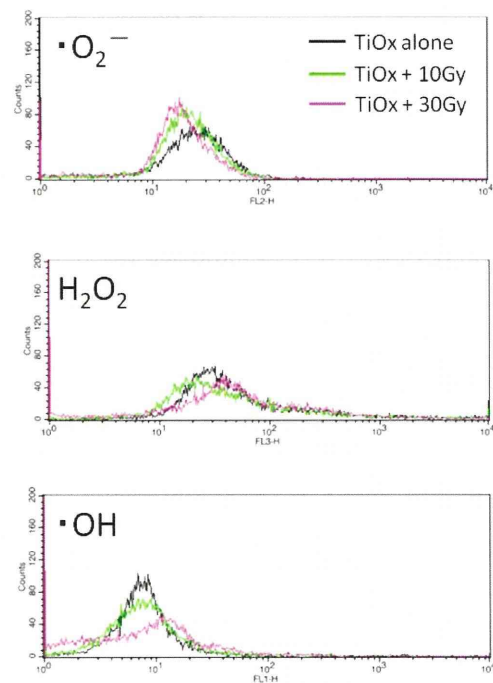


図5 TiOxナノ粒子とX線照射の併用による細胞内でのラジカルの生成

べた。TiO_xナノ粒子にカタラーゼを添加させ、酸素発生量を測定した。その結果を図6に示す。TiO_xナノ粒子はカタラーゼと反応して酸素を発生することがわかった。この反応は、カタラーゼとH₂O₂との酵素反応としてよく知られており、このことから、TiO_xナノ粒子はH₂O₂と類似の作用をすることが示唆される。なお、本実験で用いたTiO_xナノ粒子は実験前に十分な透析を行っており、粒子作成時に含まれるH₂O₂のコンタミネーションは無視できる。

4. Fe²⁺との反応

ラジカル発生機構解明のため、TiO_xナノ粒子のH₂O₂類似性を調べた。図7は、TiO_xとFe²⁺との反応をESRにより解析した結果である。TiO_x粒子だけではESR信号が得られなかったが、Fe²⁺の存在下では、OHラジカルのESR信号が得られた。すなわち、TiO_xナノ粒子は、Fe²⁺と反応しOHラジカルを生成することがわかった。Fe²⁺のOHラジカル発生反応として、H₂O₂とのFenton反応がよく知られており、TiO_xナノ粒子のH₂O₂

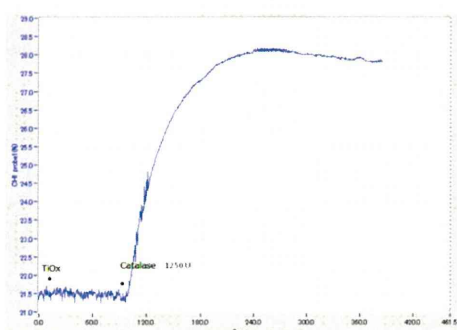


図6 TiO_xナノ粒子とカタラーゼとの反応



図7 TiO_xナノ粒子とFe²⁺との反応、ESRによる測定

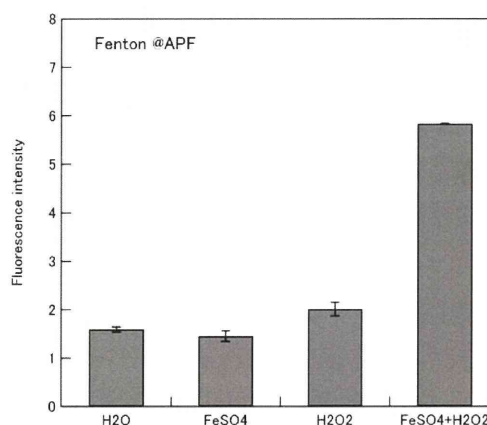


図8 TiO_xナノ粒子とFe²⁺との反応、APFを用いた蛍光発色法による測定

類似性が示された。

図8は同様の実験を、APFによる蛍光発色法を用いて測定した結果である。これにおいても、Fe²⁺と反応により蛍光強度の増大がみられ、OHラジカルが発生していることが示された。

5. 動物実験による抗腫瘍効果

担がんマウスモデルを用いてTiO_x粒子とX線の併用による抗腫瘍効果を評価した。図9aは、X線照射後からの腫瘍体積の変化を示す。全観察期間は

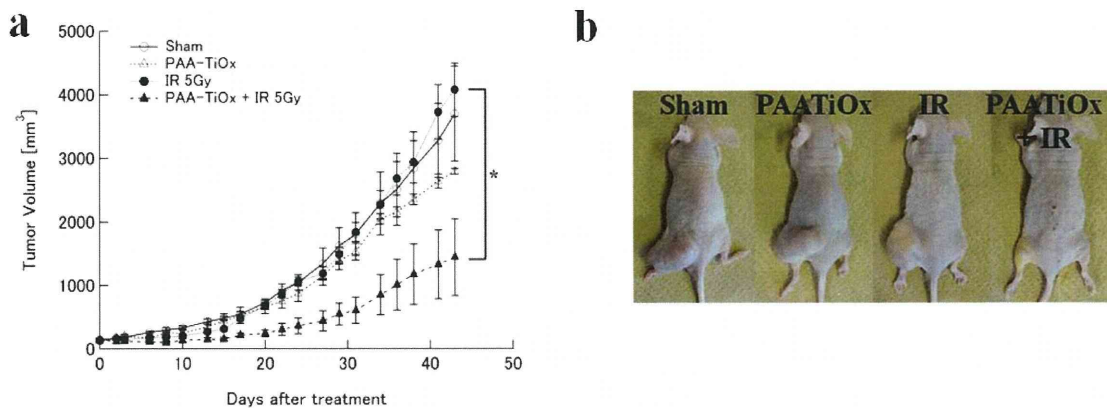


図9 動物実験によるTiOxナノ粒子の抗腫瘍効果、(a)腫瘍体積の変化、(b)処置後43日目における腫瘍サイズの比較、IR=irradiation

43日間であり、処置中および観察期間中に死亡したマウスはいなかった。このことは、TiOxナノ粒子に毒性がないことを示唆する。図9bは照射後43日目の各群マウスの腫瘍の様子を示す。TiOxナノ粒子とX線併用群は、X線照射のみ群と比べて有意な差がみられた。また、有意ではないが、TiOx粒子単独群は無処置群と差がみられた。これは、TiOxナノ粒子が生体内のFe²⁺と反応した結果、ラジカルが生成されたためと考えられる。

6. 動物実験における組織評価

TiOxナノ粒子の腫瘍内での分布を病理学および顕微鏡的に観察した。

図10は、腫瘍組織にHE染色のを行った結果である。TiOxナノ粒子を局注した群において、コントロール群でみられない染色像があり、これがTiOxナノ粒子であると考えられる。また、腫瘍内に粒子が一様に分布していることがわかる。

図11は、TEMによるミクロな観察結果である。コントロール群と比べてTiOxナノ粒子を局注した群では、細胞内に粒子が入り込んでいる様子が観察された(図11赤矢印)。エンドサイトーシスによりTiOxナノ粒子が細胞内に取り込まれていると考えられる。TiOxナノ粒子から発生するOHラジカルの飛程は極めて短いと考えられるため、細胞内に取り込まれたTiOxナノ粒子が抗腫瘍効果に寄与していると示唆される。

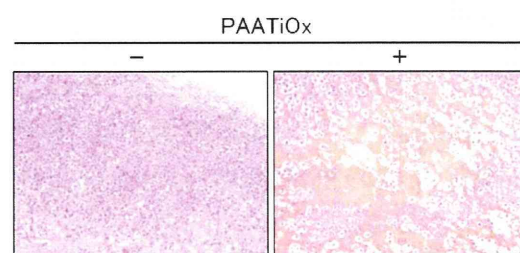


図10 腫瘍組織のHE染色像、左がコントロール群、右がPAA修飾TiOxナノ粒子局注群、スケールバー=200 μm

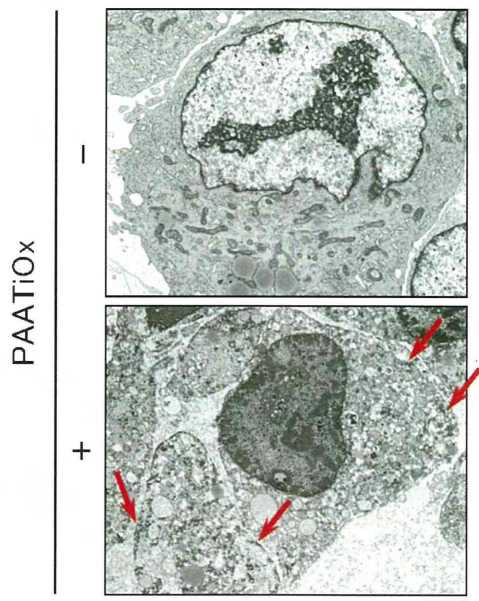


図11 腫瘍組織のTEMイメージ、上がコントロール群、下がPAA修飾TiO_xナノ粒子局注群、スケールバー=2 μm

D. 結論

TiO_xナノ粒子はX線照射により、抗腫瘍効果を得るだけの十分なラジカルを生成することを示した。さらに、TiO_xナノ粒子は、カタラーゼやFe²⁺との反応からH₂O₂と類似の挙動を示すことを見出した。

今後の動物実験において、腫瘍内または生体内での8-OHdGやHNEといったOHラジカル反応物質の探索、長期的かつ厳密な毒性評価試験、そしてMIAPaCa2とは異なる複数の膵臓がん細胞株での抗腫瘍効果の検討を行う予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto N, Sasaki R, Nishimura

H, Yoshida K, Miyawaki D, Nakayama M, Uehara K, Okamoto Y, Ejima Y, Azumi A, Matsui T, Sugimura K. Long-term outcome and patterns of failure in primary ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Mar15;82(4):1509-14

2. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Niwa Y, Mima M, Fujii O, Sasaki R, Yamada I, Hori Y, Hishikawa Y, Abe M, Ku Y, Murakami M. The effectiveness of particle radiotherapy for hepatocellular carcinoma associated with inferior vena cava tumor thrombus. *J Gastroenterol.* 2011 Jul;46(7):913-20

3. Komatsu S, Fukumoto T, Demizu Y, Miyawaki D, Terashima K, Sasaki R, Hori Y, Hishikawa Y, Ku Y, Murakami M. Clinical results and risk factors of proton and carbon ion therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2011 Nov 1;117(21):4890-904

4. Sasaki R, Yasuda K, Abe E, Uchida N, Kawashima M, Uno T, Fujiwara M, Shioyama Y, Kagami Y, Shibamoto Y, Nakata K, Takada Y, Kawabe T, Uehara K, Nibu K,

- Yamada S. Multi-institutional analysis of solitary extramedullary plasmacytoma of the head and neck treated with curative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Feb 1;82(2):626-34
5. 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.* 2011 Oct;284(4):1007-14
 6. Ishihara T, Yoden E, Konishi K, Nagase N, Yoshida K, Kurebayashi J, Sonoo H, Murashima N, Sasaki R, Hiratsuka J. Long-term outcome of hypofractionated radiotherapy to the whole breast of Japanese women after breast-conserving surgery. *Breast Cancer.* 2012 Feb 22
 7. Terashima K, Demizu Y, Hashimoto N, Jin D, Mima M, Fujii O, Niwa Y, Takatori K, Kitajima N, Sirakawa S, Yonson K, Hishikawa Y, Abe M, Sasaki R, Sugimura K, Murakami M. A phase I/II study of gemcitabine-concurrent proton radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer without distant metastasis. *Radiother Oncol.* 2012 Apr;103(1):25-31
 8. Soejima T, Yoden E, Nishimura Y, Ono S, Yoshida A, Fukuda H, Fukuhara N, Sasaki R, Tsujino K, Norihisa Y. Radiation therapy in patients with implanted cardiac pacemakers and implantable cardioverter defibrillators: a prospective survey in Japan. *J Radiat Res.* 2011;52(4):516-21
- 2. 学会発表**
1. 中山雅央、佐々木良平、西村英輝、吉田賢治、宮脇大輔、赤坂浩亮、椋本成俊、田中勉、荻野千秋、近藤昭彦、「過酸化チタンナノ粒子を用いた放射線感受性増感効果の基礎的研究」、第24回日本放射線腫瘍学術大会、2011年11月17日、神戸
- 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

酸化物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りラジカルを発生する酸化物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物ナノ粒子に関して、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、酸化物ナノ粒子のサイズ・形状・結晶面・結晶構造等の制御を試みる。また、これにより酸化物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、酸化物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

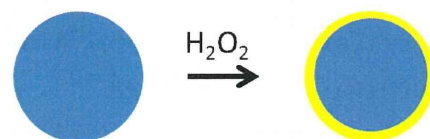


図1. 二酸化チタンから過酸化チタンの合成

過酸化チタンナノ粒子は、図1に示すように、二酸化チタンナノ粒子の酸化により合成できる。これまでの結果により、二酸化チタンナノ粒子の表面数原子層から数十原子層が、過酸化チタンに変化しているものと予想される。そのため、過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形状・結晶面・結晶構造等の制御は、二酸化チタンナノ粒子のサイズ・形状・結晶面・結晶構造等の制御により可能と考えている。そこで本研究では、水熱合成プロセス条件を検討し、二酸化チタンのサイズ・形状・結晶面・結晶構造等の制御を試みた。

1). TMAHを用いたナノ粒子の合成

二酸化チタンナノ粒子の合成プロセスを図2に示す。まず、二酸化チタ

ンの前駆体となる0.02 mole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 (tetramethyl ammonium hydroxide: 以下TMAH)と混合し、さらに適量の水を添加することで、50mlの水酸化チタンゾルを得た。次に、この水酸化チタンゾルを50mlのテフロン反応管中に入れて、125°Cの条件下で水熱反応を行い、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10000 rpm、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。

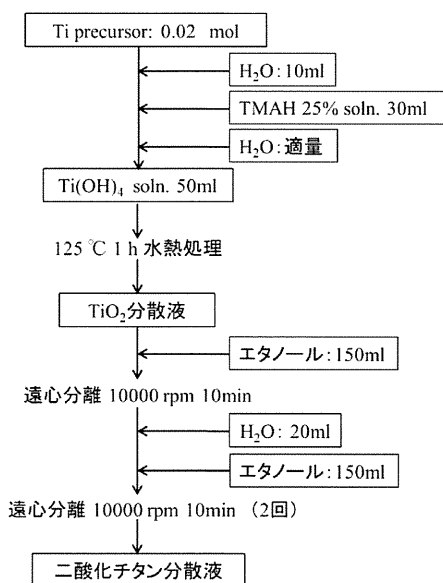


図2. TMAHを用いた二酸化チタンナノ粒子の合成プロセス

2). フッ酸を用いた二酸化チタンの合成

二酸化チタンの前駆体となる0.01 mole量のチタンイソプロポキシド (Ti[OCH(CH₃)₂]₄: 以下TP) を40mlのフッ酸 (1mol/l) 中に加えた。TiとFとの割合は1:4とした。攪拌により十分に混合し、水酸化チタンゾルを得た。この水酸化チタンゾルを50mlのテフロン反応管中に入れて、180°Cの条件下で水熱反応を24時間行い、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エタノール洗浄・遠心分離(遠心速度10000 rpm、10分)を3回行った。

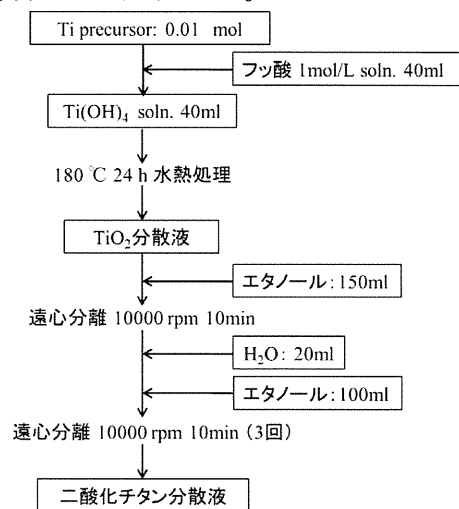


図3. フッ酸を用いた二酸化チタンの合成プロセス

3). ポリビニルピロリドン (以下PVP) を用いた二酸化チタンの合成

1.5グラムのPVP(平均分子量360000と55000の二種類を用いた: 以下PVP36、PVP55)を35mlのエタノール中に加え、超音波処理により溶解させた。次に、0.01 mole量のTPをPVPのエタノール溶液中に加え、超音波により2時間を処理し白色状のゾルを得た。その後、5ml

の酢酸を加え、クリアなゾルへと変化させた。このゾルを50mlのテフロン反応管中に入れ、150℃で反応させ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エタノール洗浄と遠心分離（遠心速度10000 rpm、10分）を3回行った。

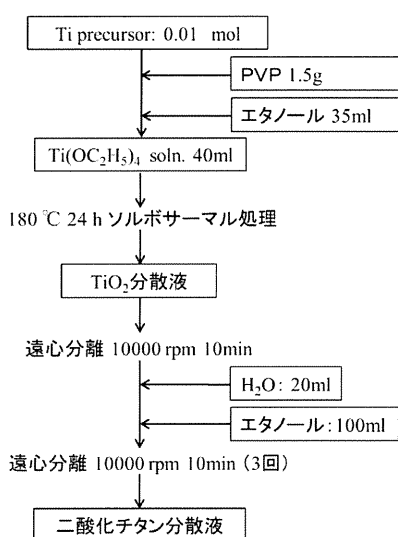


図4. PVPを用いた二酸化チタンの合成プロセス

また、本研究ではチタン前駆体の種類、水熱反応の時間等の諸因子が二酸化チタンのサイズ・形態に及ぼす影響も併せて検討した。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)、チタン(IV)ビス(アンモニウムラクタト)ジヒドロキシド ($[\text{CH}_3\text{CH}(\text{O})\text{CO}_2\text{NH}_4]_2\text{Ti}(\text{OH})_2$:以下TA)の四種類の原料を検討した。また、水熱反応時間としては、1時間、4時間、12時間、24時間を検討した。

2. 過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの作製

未修飾な過酸化チタンナノ粒子は、高い表面活性を持っているため、生体環境中では凝集しやすいことがこれまでに確認されている。昨年度は、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 (SDS)、デオキシコール酸ナトリウム (SDC)、ポリアクリル酸 (PAA) 等である。その結果、PAA修飾が優れた凝集抑制機能を示すことが分かった。

なお、ナノ粒子をどのようにして生体内の標的部位に選択的に送達するかは、依然として大きな技術課題である。そこで本研究では、リポソームという手法を検討した。リポソームとは、リン脂質からなる数十～数百nmの粒径をもつ微小なカプセルであり、その内部に様々な分子・粒子を封入することができる。また、生体適合性や生分解性にも優れていることから、その発見以来、薬物や生理活性物質の理想的な運搬体と考えられている。そのため、リポソームはそのサイズから体内の標的部位に薬物を選択的に送達するキャリアに適していると考えられる。

リポソームの作製プロセスを図5に示す。まず、ジパルミトイルホスファチジルコリン (以下: DPPC) : コレステロール=70 : 30 (モル比) のリン脂

質のクロロホルム溶液（濃度 $30 \mu\text{mol/mL}$ ）を調製した。次に、過酸化チタンナノ粒子を粒子濃度 10mg/mL となるように 20mM HEPESバッファ（ $\text{pH}7.4$ 、 $\text{NaCl } 150 \text{mM}$ ）中に分散させた。また、上記のリン脂質/クロロホルム溶液 4mL 中に過酸化チタンナノ粒子 HEPES 分散液 2mL を添加し、超音波で 3 分間の処理を行い water/oil 型のエマルジョンを形成させた。この water/oil 型のエマルジョンを 200mL の HEPES バッファ中に素早く添加し、 30 分間、協力に攪拌を行い、water/oil/water 型のエマルジョンを形成させた。なお、 12 時間の攪拌を続けることで膜中のクロロホルムを除去した。得られたリポソーム溶液から遠心分離（ 15000G 、 10 分間、 2 回）により余分な有機分子を取り除き、過酸化チタンを内包したリポソームを作製した。

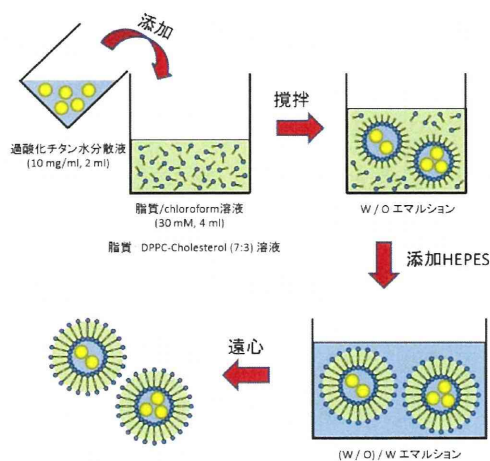


図5. 過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの作製プロセス

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、倫理面への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

1). TMAHを用いたナノ粒子の合成

図6にTMAHを用いた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透過電子顕微鏡（TEM）写真を示す。TCの場合は、リーフ状のナノ粒子が得られた。TBを用いた場合、非常に薄いリーフ状のナノ粒子（シート状ナノ粒子）が得られた。また、TPの場合、幅約 10nm 、長さミクロンオーダーのナノベルトが合成できた。

合成した二酸化チタンナノ粒子の結晶構造は粉末X線回折パターンより確認した。図7に示すように、TCを用いた場合、 24 時間の水熱処理により、結晶構造はアナターゼへと変化した。また、 $2\theta = 7.9^\circ$ 付近に弱いピークが現れ、粒子の一部はナノシート構造を有していることが示唆された。さらに、 $2\theta = 31^\circ$ 付近にはブルックイト構造の $\{121\}$ 面のピークも確認できた。TBとTPの場合、どちらの場合でも $2\theta = 7.9^\circ$ で強いピークが現れた。このピークは $\{001\}$ 面由来の回折ピークであり、計算した結果、 $\{001\}$ 面の面間距離は $d_{001} = 1.13\text{nm}$ となった。なお、アナターゼ構造二酸化チタンの従来の d_{001} は 0.95nm である。この面間距離の増大では、二酸化チタン結晶中に取り込まれたTMAH分子の影響と考えられる。また、 $2\theta = 15.8^\circ$ にもピークが見られ、これは $\{002\}$ 面の由来ピークであった。以上により、TBとTPの二つ

の試薬をチタン前駆体として合成した二酸化チタンは全てナノシート構造を有することが分かった。

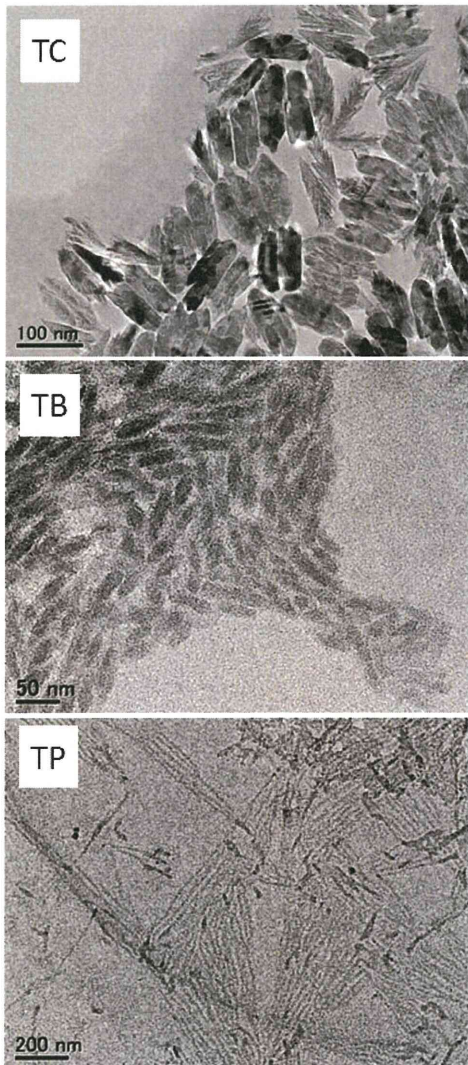


図6. TMAHを用いた水熱反応法により合成した二酸化チタンの透過電子顕微鏡写真（合成温度=125°C、反応時間=24 h）

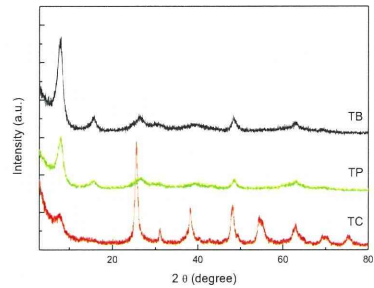


図7. TMAHを用いて合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン（合成温度=125°C、反応時間=24 h）

2) フッ酸を用いたナノ粒子の合成

フッ素はチタンイオンと強い相互作用があるため、チタン粒子の表面に吸着しやすいと考えられる。そのため、水熱反応時にフッ酸を共存させた場合、二酸化チタンナノ粒子の結晶成長に影響を及ぼすことが予想された。図8に合成したナノ粒子の走査型電子顕微鏡（SEM）写真を示す。24時間の水熱反応処理したサンプルは、全てサイズが20nm程度のナノ粒子であることが確認できた。この結果は、図6に示したTMAHを用いて水熱合成したサンプルの場合とは、全く異なるものである。

フッ素を用いて合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターンを図9に示す。このプロセスで合成したサンプルは、チタン前駆体原料の違いに係らず、アナターゼ構造を有していることが分かった（図7に示したX線回折パターンと比べて、 $2\theta = 7.9^\circ$ 及び $2\theta = 31^\circ$ にはピークが現れなかった）。また、フッ素を用いて合成した二酸化チタンナノ粒子は、シート構造とブル

ツカイト構造を一切含まないアナターゼ結晶であることが分かった。さらに、この方法で合成したサンプルは結晶サイズが小さいにも関わらず、結晶性は非常に高いことが分かった。

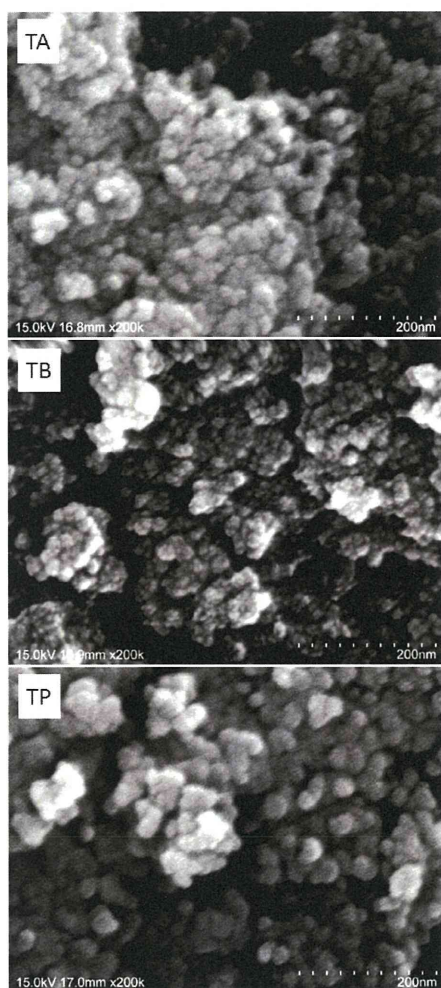


図8. フッ酸を用いて合成した二酸化チタンの走査型電子顕微鏡写真（合成温度=180°C、反応時間=24 h）

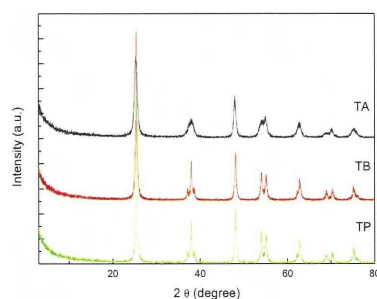


図9. フッ酸を用いて合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン（合成温度=180°C、反応時間=24 h）

3). PVPを用いたナノ粒子の合成

PVPはポリマー系界面活性剤の一つである。ここでは、PVPをチタンゾルの分散媒質として用いて二酸化チタンナノ粒子の合成実験を行った。

得られた二酸化チタンの走査型電子顕微鏡写真は図10に示す。PVP36を用いてTPチタン前駆体から作製したサンプルは球状の粒子が得られた。粒子のサイズは約2 μm であった。また、PVP36とTBチタン前駆体の場合も、球状の2 μm 程度の粒子が得られた。一方、PVPの分子量を360000 (PVP36) から55000 (PVP55) に変化させると、きれいな球状粒子が得られず、また、粒子のサイズにバラつきが出た。そのため、PVPの分子量の違いは二酸化チタン粒子のサイズ・形態へ、少なからず、影響を及ぼすことが分かった。

図11にPVPを用いて合成した二酸化チタン粒子のX線回折パターンを示す。PVPの分子量やチタン前駆体の違いに関係無く、アナターゼ構造が得られた。なお、球状粒子の結晶性はそのサイズがミクロンオーダーであるに

も係らず、フッ素を用いて合成したナノ粒子よりも悪いことが分かった。

タン粒子のX線回折パターン（合成温度=150°C、反応時間=24 h）

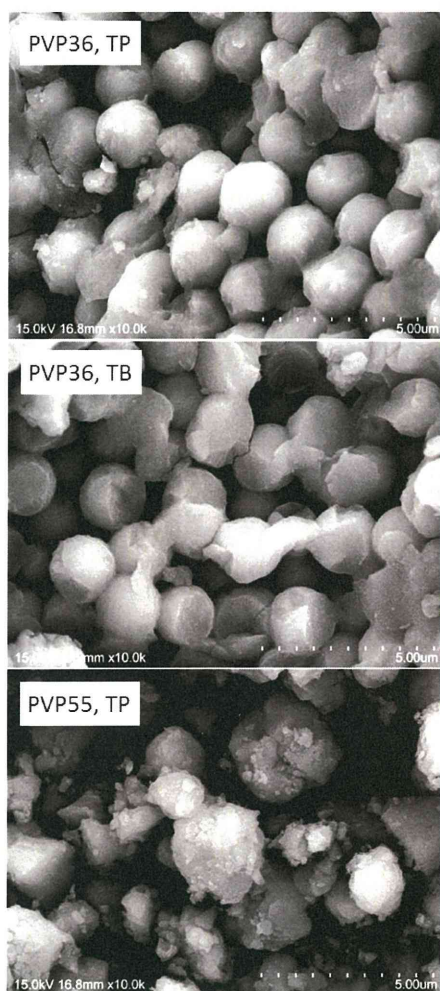


図10. PVPを用いて合成した二酸化チタンの走査型電子顕微鏡写真（合成温度=150°C、反応時間=24 h）

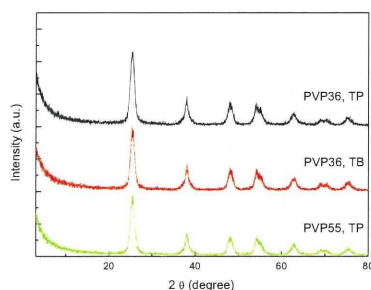


図11. PVPを用いて合成した二酸化チ

2. 過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの作製

実験には主に、TMAHを用いてTCから合成（合成温度=125°C、反応時間=1 h）した過酸化チタンナノ粒子を使用した。本ナノ粒子のサイズ分布を図12に示す。短時間で水熱処理することにより、約2nm程度のナノ粒子が得られている。なお、本実験で作製するリポソームのサイズはサブミクロンオーダーである。そのため、リポソームのサイズはナノ粒子により数百倍であり、一つのリポソームの中には多くのナノ粒子が含まれることが予想される。

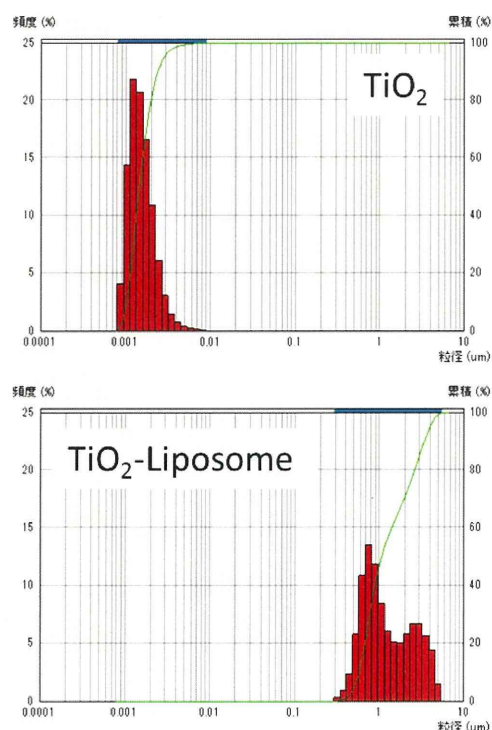


図12. 動的光散乱法により評価した過酸化チタンナノ粒子とナノ粒子を内包させるリポソームのサイズ分布

実際にナノ粒子を内包させたリポソーム水中分散液の光学顕微鏡写真は図13に示す。リポソームは殆ど凝集せず、一個一個が独立して水中に存在することが確認できた。また、リポソームは非常に優れた水中分散性を有していることが分かった。

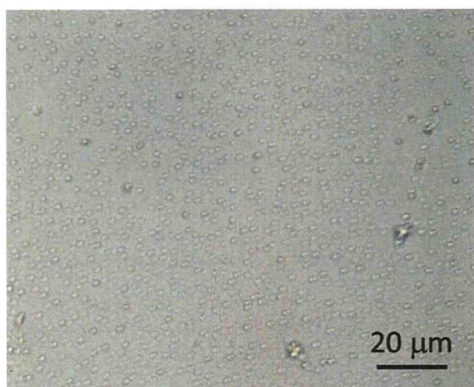


図13. ナノ粒子を内包させたリポソームの光学顕微鏡写真

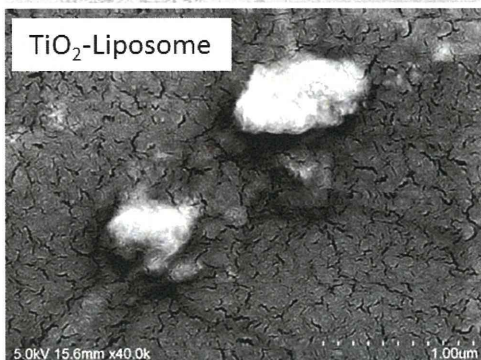
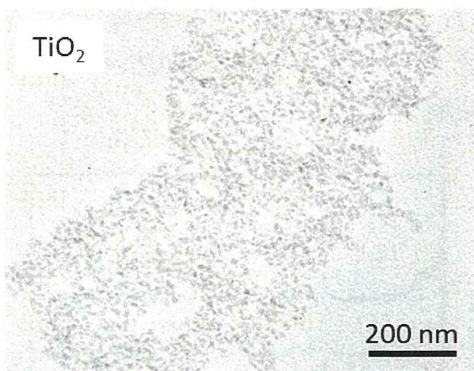


図14. 過酸化チタンナノ粒子（写真上）を内包させたリポソームの走査型電子顕微鏡写真

過酸化チタンナノ粒子を内包させたリポソームの電子顕微鏡写真を図14に示す。リポソームのサイズは数百nmであることが確認された。この観察結果は図12の動的光散乱法による解析結果と良く一致した。また、リポソームの中心部分は比較的白く、多数の過酸化チタンナノ粒子が内包されているものと考えられる。

D. 考察

1. 二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が代表的である。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15にはアナターゼとナノシートの結晶構造を示した。

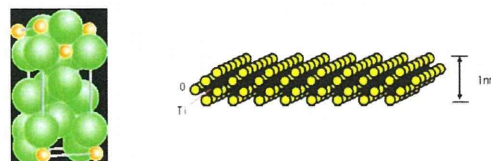


図15. 二酸化チタンのアナターゼとナノシート結晶構造

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。これまでの実験結果により、フッ酸とPVPを用いた場合にアナターゼ構造が合成できる。一方、TMAHを共存させると、図7に示すようにナノシートが得られた。ナノシートは非常に大きい比表面積を有する為、理想的なラジカル発生素材の候補の一つと考えられる。そこで次に、ナノシートの生成について議論する。

まず、三種類のチタン前駆体を用いて水熱反応を行った場合の、それぞれ得られた二酸化チタンの結晶構造の経時変化を図16～18に示す。図16に示すようにTBを前駆体として合成した二酸化チタンナノ粒子は、水熱反応の時間変化に関わらず、 $2\theta = 7.9^\circ$ で強い{001}ピークと $2\theta = 15.8^\circ$ で{002}ピークが現れた。また、いずれのサンプルでもアナターゼのピークが非常に弱いことが分かる。そのため、TB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。また、図17に示すように、TPをチタン前駆体とした場合、得られた二酸化チタンのX線回折パターンは、TBと全く同じであることが分かる。一方、TCを前駆体とした場合、水熱反応の時間によって結晶構造は変化した。反応の最初段階ではナノシートのみ生成したが、反応時間の増加に伴い結晶はc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。

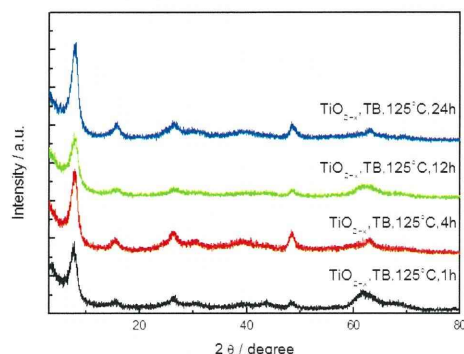


図16. TBをチタン前駆体として合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターンの経時変化

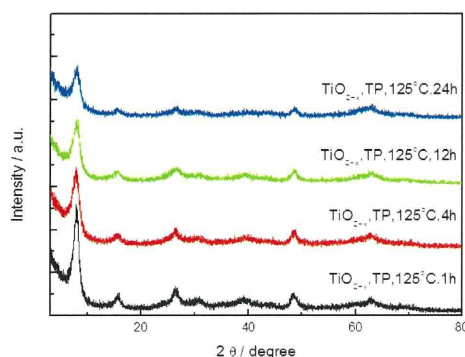


図17. TPを二酸化チタン合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターンの経時変化

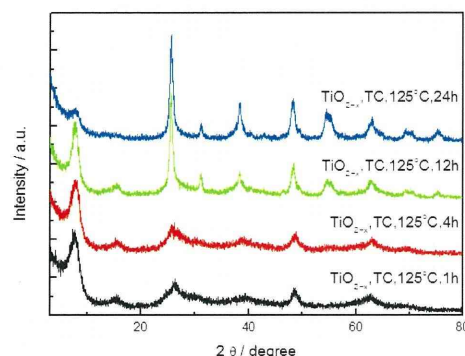


図18. TCを二酸化チタン合成した二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターンの経時変化

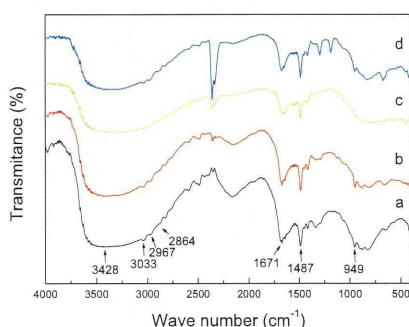


図19. TCから合成した二酸化チタンナノ粒子の赤外吸収スペクトル

次に、TCから合成した二酸化チタンナノ粒子の赤外吸収スペクトルを図19に示す。3033 cm^{-1} は $-\text{CH}_3$ 、また、2967 cm^{-1} 、2864 cm^{-1} 、1487 cm^{-1} は C-H に対応し、そのためTMAHに起因する吸収であることが分かった。また、3428 cm^{-1} と1671 cm^{-1} は H_2O の振動である。以上の結果から、二酸化チタン結晶中にはTMAHと水分子が含まれていることが示唆された。

そこで、結晶中に含有するTMAHと水の量を熱重量分析方法により測定した。その測定結果は表1にまとめた。水熱反応時間の増加に伴い、結晶中のTMAHと水分子は徐々に減少し、また、結晶構造はナノシートからアナターゼに変化する傾向を示した。

表1. 熱重量分析により測定した二酸化チタン結晶中のTMAH量

| Sample (Reaction time) | Mass percentage (%) | | | Molar ratio | | |
|---------------------------|----------------------|------|----------------|----------------------|------|----------------|
| | H_2O | TMAH | TiO_2 | H_2O | TMAH | TiO_2 |
| 1 h | 15.0 | 19.5 | 65.5 | 1.0 | 0.25 | 1 |
| 4 hs | 9.5 | 18.7 | 71.8 | 0.59 | 0.23 | 1 |
| 12 hs | 8.0 | 14.5 | 77.5 | 0.45 | 0.16 | 1 |
| 24 hs | 6.8 | 10.0 | 83.2 | 0.36 | 0.10 | 1 |

以上の結果をベースに、TMAH分子共存下でTCから合成した場合の、二酸化チタンナノシートの生成メカニズムを考察する。図20に示すように、TMAHはチタンとの相互作用によって表面に吸着する。二酸化チタンの $\{001\}$ 面は最も活性が高いので、TMAHはその面に優先的に吸着する。その結果として、c軸方向の結晶成長が抑制され、ナノシート構造が形成するものと考えられる。しかしながら、水熱反応時間の増加に伴い、TMAH分子は結晶中に徐々に取り込まれ、結晶は次第にアナターゼ構造へと変化したものと考えられる。

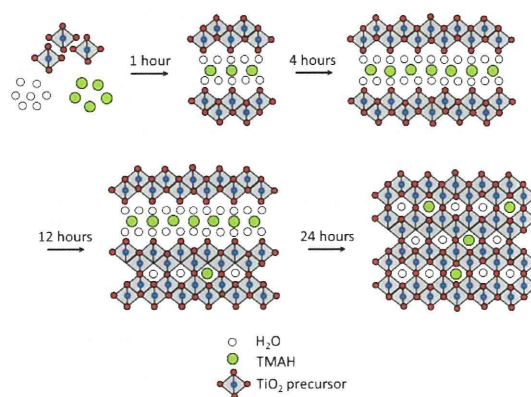


図20. TMAH分子共存下での二酸化チタンナノシートの生成メカニズム

2. リポソームのサイズ・形態制御

過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームを生体内の標的部位に選択的に送達するためには、リポソームのサイズ・形態制御が非常に重要と考えられる。そこで、過酸化チタンナノ粒子のサイズ等がリポソームのサイズ・形態へ及ぼす影響を検討した。

表 2. ナノ粒子の濃度とリポソームのサイズの関係

| | | | |
|----------------|-----|-----|-----|
| ナノ粒子濃度 (mg/ml) | 10 | 20 | 40 |
| リポソームサイズ (nm) | 337 | 331 | 240 |

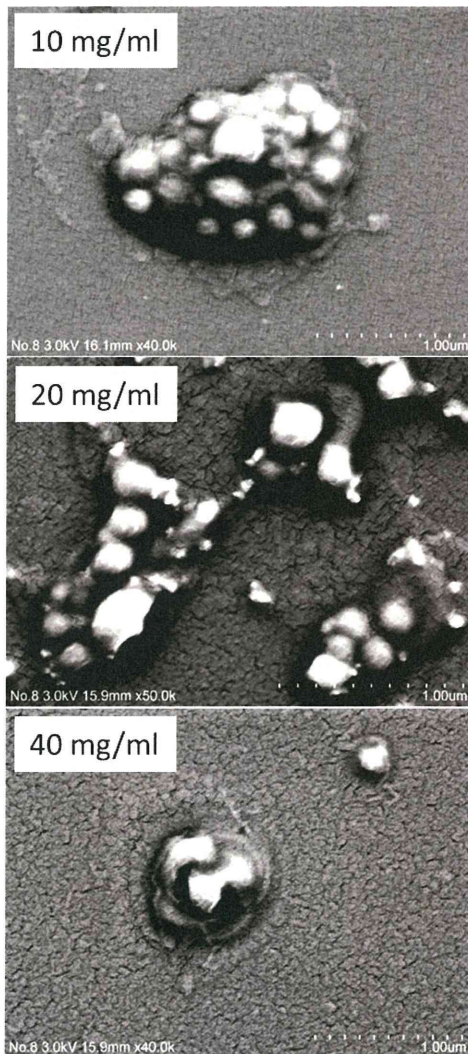


図 21. 種々の粒子濃度下で作製した粒子内包リポソームの走査型電子顕微鏡写真

表2はリポソームの前駆体であるリン脂質の量を一定とし(30 mM、4 ml)、過酸化チタンナノ粒子(1.6 nm、2 ml)

の濃度を変化させ作製したリポソームのサイズを示す。ナノ粒子の濃度が10mg/ml、20 mg/ml、40 mg/ml と増加するに伴って、リポソームのサイズは337nm、331nm、240 nm と減少する傾向が確認された。

図 21 に作製した粒子内包リポソームの走査型電子顕微鏡写真を示す。一つのリポソーム中に幾つかのナノ粒子が凝集し内包されている様子が観察できる。ナノ粒子の濃度が増大すると、粒子とリン脂質の割合は高くなり、結果的に余分のリン脂質の量が減少する。それにより、粒子内包リポソームのサイズが小さくなり、また、分散性もよくなるものと考えている。

表 3. ナノ粒子のサイズとリポソームのサイズの関係

| | | | |
|---------------|-----|-----|-----|
| ナノ粒子サイズ (nm) | 2.3 | 69 | 175 |
| リポソームサイズ (nm) | 394 | 545 | 675 |

次に、ナノ粒子のサイズがリポソームのサイズに及ぼす影響を検討する。数 nm、数十 nm 及び 200 nm 程度の三種類のサイズの過酸化チタンナノ粒子を用いた。表3に示すように、内包されるナノ粒子のサイズが大きくなるに従って、リポソームのサイズは明らかに大きくなった。

図 22 に種々のサイズのナノ粒子を用いて作製した粒子内包リポソームのSEM写真を示す。粒子のサイズに関わらず、これまでの結果と同様に、ナノ粒子は凝集した形態でリポソーム

ムに内包されていることが分かった。

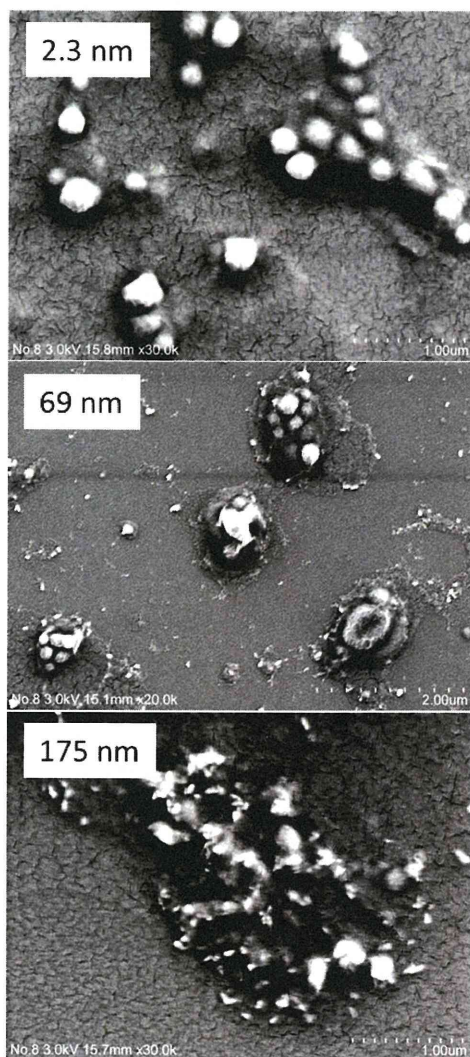


図 22. 種々のサイズのナノ粒子から作製した粒子内包リポソームの走査型電子顕微鏡写真

以上、過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの合成に成功した。ただし、ナノ粒子はリポソームの中では凝集体として存在する。この凝集構造の形成により、ナノ粒子の比表面積は大幅に減少するものと思われる。今後は、このリポソーム中でのナノ粒子の凝集抑制を検討する計画である。

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. 水熱反応プロセスを基盤とする二酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御に成功した。フッ酸を水熱反応場に共存させた場合、アナターゼ結晶構造を有する20nm程度のナノ粒子が得られた。また、TMAHを共存させた場合、異方性のナノシートが得られた。

2. TMAHを用いる二酸化チタンナノシートの合成に関して、TCをチタン前駆体とした場合、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生成した。なお、TBとTPを前駆体を用いた場合は、ナノシートのみ優先的に生成した。

3. 過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの合成に成功した。リポソームは水中に均一に分散した。また、過酸化チタンナノ粒子は凝集体としてリポソーム中に存在することが確認された。

4. 過酸化チタンナノ粒子の濃度が高くなると、リポソームのサイズが小さくなる傾向が示された。また、過酸化チタンナノ粒子のサイズが大きくなると、リポソームのサイズも大きくなることが分かった。以上、過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームのサイズ・形態制御の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) J. Zhang, T. Naka, S. Ohara, K. Kaneko, T. Trevethan, A. Shluger, and T. Adschiri, “Surface Ligand-Assisted Valence Change in Ceria Nanocrystals”, *Phys. Rev. B*, 84, p. 045411-1-9, (2011).

(2) Z. Tan, H. Abe, and S. Ohara, “Ordered Deposition of Pd Nanoparticles on Sodium Dodecyl Sulfate-Functionalized Single-Walled Carbon nanotubes”, *J. Mater. Chem.*, 21, p. 12008-12014, (2011).

(3) S. Ohara, Y. Hatakeyama, M. Umetsu, Z. Tan, and T. Adschiri, “Fabrication of Pd-DNA and Pd-CNT Hybrid Nanostructures for Hydrogen Sensors”, *Advanced Powder Technology*, 22, p. 559-565, (2011).

2. 学会発表

(1) S. Ohara, J. Han, Z. Tan, K. Sato and M. Umetsu, “DNA Templated Integration of Metal and Ceramic Nanoparticles”, *European Materials Research Society Spring Meeting 2011, Nice, France, May 9-13*, (2011).

(2) S. Ohara, “Mechanochemical Synthesis of Carbon and Ceramic Nanomaterials by a High-Speed Ball-Milling Process”, *The 4th International Symposium on Functional Materials, Sendai, Japan*,

August 5-7, (2011) [Invited lecture].

(3) 大原 智, “ナノハイブリッド材料創製のための特異構造無機ナノクリスタル合成と多元物質接合”, *日本セラミックス協会第24回秋季シンポジウム, 9月7日(2011) 札幌* [招待講演].

(4) 大原 智, “特異構造無機ナノクリスタルの合成とプロセス”, *第4回ワークショップ「固体材料合成および評価技術の新展開」, 9月13日(2011) 福島* [招待講演].

(5) 大原 智, “セラミックスナノ粒子の構造制御と機能創製—ナノから原子レベルへ—”, *第8回名古屋駅前イノベーション技術シーズ発表会, 9月16日(2011) 名古屋* [招待講演].

(6) S. Ohara and Z. Tan, “Novel Mechanochemical Synthesis of Fine Ceramic Nanoparticles by a High-Speed Ball-Milling Process”, *The 8th International Symposium on Applied Plasma Science, Hakone, Japan, September 26-30*, (2011).

(7) S. Ohara, “Tailor-Made Ceramic Nanocrystals by Organic-Ligand-Assisted Hydrothermal Synthesis”, *Materials Science & Technology 2011 Conference & Exhibition, Ohio, USA, October 16-20*, (2011) [Invited lecture].

(8) S. Ohara and Z. Tan, “Novel Mechanochemical Synthesis of Fine Ceramic Nano-Materials by a

High-Speed Ball-Milling Process” ,
ECO-Mates 2011, Osaka, Japan,
November 28-30, (2011).

(9) S. Ohara, Z. Tan and H. Abe,
“Novel Mechanochemical Synthesis
of Carbon and Ceramic Nanomaterials
by a High-Speed Ball-Milling
Process” , 2nd Nanotoday Conference,
Hawaii, USA, Decembaer 11-15,
(2011).

1. 特許取得

無し。

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

無し。

G. 知的所有権の取得状況

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23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。

これまでの検討より、過酸化チタンでは、放射線照射によってラジカルが生成することを見出した。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着眼し、平成22年度は、毒性が低くかつ大気中で比較的安定なCaO₂およびZnO₂ナノ粒子を合成し、これらが放射線照射により活性化ラジカルを生成することを見出

した。

今年度は、粒子の微細構造制御による過酸化チタンナノ粒子のラジカル生成機能の向上を目的とし、過酸化チタンナノ粒子のベースとなる酸化チタンナノ粒子を様々な条件で合成し、その条件と微細構造との関係性を評価した。また、新規材料の開拓を進め、水中完全分散HfO₂ナノ結晶の合成法開発とそのラジカル生成特性を評価するとともに、診断と治療の両立の可能性を検討するため、HfO₂ナノ結晶への希土類元素ドーピングによる蛍光特性付与を検討した。

さらに、昨年度から引続き、高エネルギー加速器研究機構の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）」において、過酸化チタンに対するX線吸収分光法(X-ray Absorption Fine Structure; XAFS)による微細構造解析、並びに九州大学理学部横山研究室の協力の下、電子スピン共鳴 (ESR) 測定を実施し、過酸化チタンナノ粒子の構造評価によるラジカル生成メカニズム解明を試みた。