

Fig. 1 酸化チタンナノ粒子合成プロセス

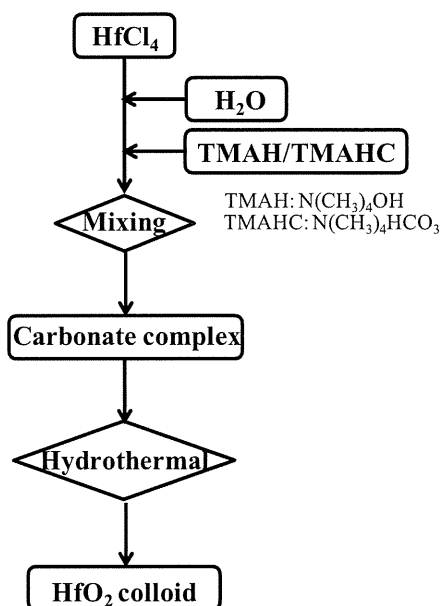


Fig. 2 HfO₂ナノ粒子合成プロセス

B. 研究方法

B-1. 酸化チタンナノ粒子の合成と構造評価

図1に酸化チタンナノ粒子の合成プロセスを示す。0.02molのTiCl₄を蒸留

水と混合し、得られた白濁水溶液に25%の水酸化テトラメチルアンモニウム(N(CH₃)₄OH：以下TMAH)水溶液をTi:TMAH=1:5、1:10および1:15(モル比)となるように添加し、水酸化チタン水溶液を作製した。さらに、水溶液の全量が50mlになるようにメスアップし、反応溶液とした。本反応溶液をテフロンインサート付きのオートクレーブに封入し、90、120および150°Cで1時間もしくは24時間反応させ、得られた試料中の未反応物や不純物を洗浄・除去し、酸化チタンナノ粒子を得た。

酸化チタンナノ粒子の内部構造を顕微ラマン分光法を用いて評価した。光源には633nmの励起レーザーを用い、50~850cm⁻¹におけるラマンシフトを計測した。粉末の生成相をX線回折(Mac Science社製 M03XHF)で評価した。X線源にはCuK α 線を用い、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 θ =5-65°で測定を行った。

B-2. HfO₂ナノ粒子の合成とそのラジカル生成特性評価

図2にHfO₂ナノ粒子の合成プロセスを示す。0.02molのHfCl₄を蒸留水と混合し、得られた水溶液に15mlの25%TMAH水溶液と15mlの65%炭酸水素テトラメチルアンモニウム(N(CH₃)₄HCO₃:以下TMAHC)水溶液の混合溶液を添加し、塩基性炭酸ハフニウム錯体水溶液を得た。さらに、水溶液の全量が50mlになるようにメス

アップし、反応溶液とした。続いて、本水溶液を150°Cで6時間水熱処理して、得られた試料中の未反応物や不純物を限外ろ過で洗浄し、HfO₂ナノ粒子分散液を得た。HfO₂のラジカル生成特性の評価には、蒸留水にHfO₂ナノ粒子を添加したものをを用いた。ここに、25 μM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50Gy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。

B-3. 放射光およびESRを用いた過酸化チタンナノ粒子における酸素ラジカル生成メカニズムの解明

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およびBL-9Cを用いたXAFS分析により行った。測定はライトル型検出器を用いた蛍光モードで行った。試料には酸化チタン、過酸化チタンならびに過酸化チタンに1回10Gyで総量210Gyの放射線を照射したものをを用いた。得られたXAFSスペクトルより、同径分布曲線を求め、これを解析することにより、Tiに対する酸素の配位数とその結合距離を算出し、上記試料における変化を評価した。また、上記試料に対するESR測定を実施し、ラジカル生成量の変化を評価した。また、これらの結果をもとに、過酸化チタンにおける放射線励起によるラジカル生成機構を考察した。

C. 研究結果と考察

C-1. 合成条件の制御による酸化チタンナノ粒子の構造制御

図3にTi:TMAH=1:5とし、種々の条件で合成した酸化チタンナノ粒子のラマンスペクトルを示す。いずれの温度においても1 hの反応でアナターゼ相に起因する150、405、515および640cm⁻¹付近にピークが認められた。処理温度が500°Cにおいては274および287cm⁻¹にピークが認められる。これらのピークは、層状チタン酸塩に起因する特徴的なピークであり、本条件では、アナターゼ相と層状チタン酸塩の混合体が合成されることが示唆された。処理時間24hでは、90°Cにおいてアナターゼに起因するピークに加えて、層状チタン酸塩に起因するピークが認められた。120°Cの場合、アナターゼに起因するピークはほとんど消失し、層状チタン酸塩に起因するブロードなピークが認められることから、処理時間1 hで生成したアナターゼはほとんど層状チタン酸塩に変態していることが示唆された。150°Cにおいては、アナターゼに起因するピークが強くなり、ピーク位置も低波数側へシフトした。また、粒子のほとんどが沈殿したことから、粗大なアナターゼ粒子が形成されることかが示唆された。

図4にTi:TMAH=1:10とし、種々の条件で合成した酸化チタンナノ粒子のラマンスペクトルを示す。90°Cおよび120°Cでは、Ti:TMAH=1:5とあまり変

わらなかったが、150°C24hでは粒子が良好な分散性を示し、明確な層状チタン酸塩のピークが認められた。この

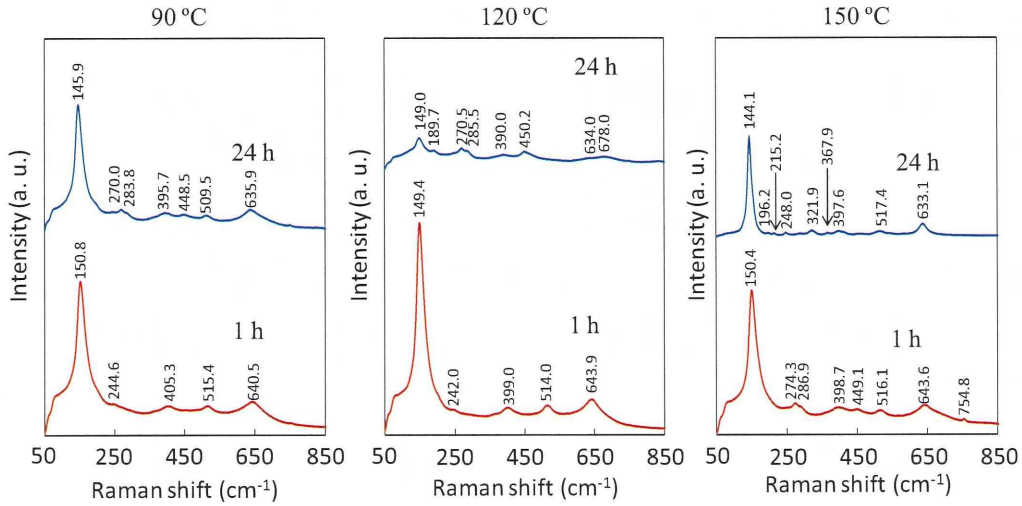


Fig. 3 Ti:TMAH=1:5において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

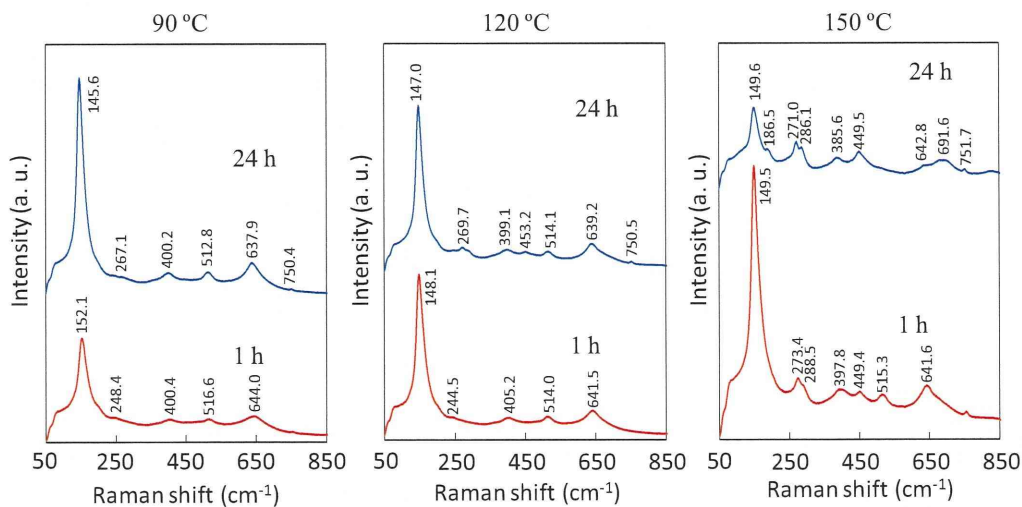


Fig. 4 Ti:TMAH=1:10において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

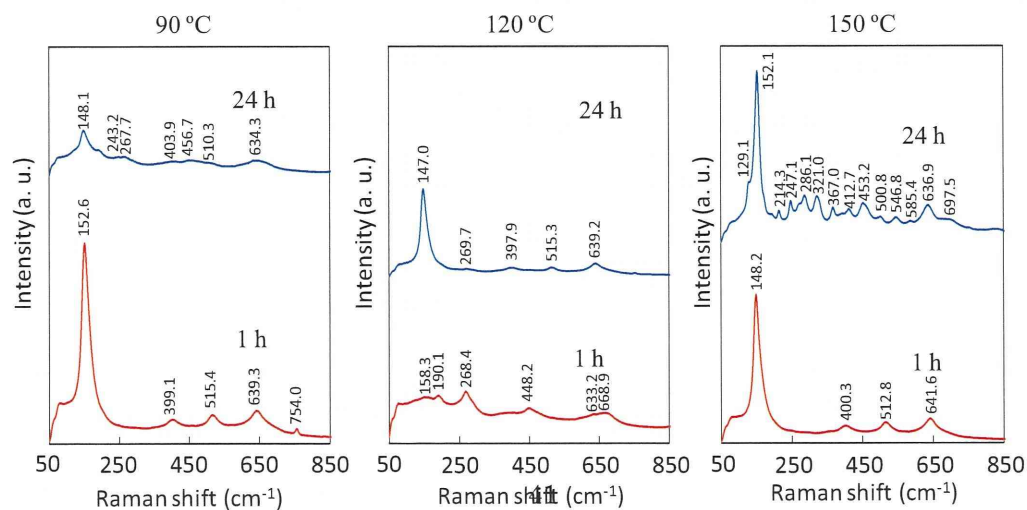


Fig. 5 Ti:TMAH=1:15において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

ことから、十分な量のTMAHが共存している場合、層状チタン酸塩が生成し、その凝集も抑制されることが示された。

図5にTi:TMAH=1:15とし、種々の条件で合成した酸化チタンナノ粒子のラマンスペクトルを示す。90°C24hにおいて、既に層状構造の発達が示唆されており、120°C1hの処理で、アナターゼに起因するピークは完全に消失し、ほぼ完全な層状チタン酸塩を形成していることがわかる。一方、120°C24hの処理では、一度形成された層状チタン酸塩がアナターゼ相に変態しており、他の条件とは異なる挙動を示した。150°C1hでは、アナターゼ相に起因するピークのみが認められた一方、24hでは多数のピークが認められた。これらのピークは全てブルッカイト相に帰属された。

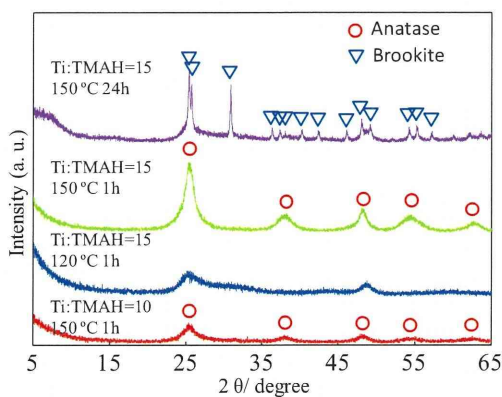


Fig. 6 種々の条件で合成した酸化チタン試料のXRDパターン

図6に種々の条件で合成した試料の

XRDパターンを示す。Ti:TMAH=1:10で150°C1h処理した試料ではアナターゼに起因するブロードなピークのみが認められた。Ti:TMAH=1:15で120°C1h処理した試料では、一部のピーク位置はアナターゼに類似しているものの、回折パターンは明らかに異なっており、ラマン分光の結果と良く一致した。一方、層状チタン酸塩に起因する低角のピークは認められなかった。これは、繰り返し洗浄することによって、層内のTMA⁺のほとんどが除去されたためではないかと考えられる。Ti:TMAH=1:15で150°C1h処理した試料では、明確なアナターゼのピークが認められ、150°C24h処理した試料では、単相のブルッカイトが得られており、いずれもラマン分光の結果と一致した。

また、これらの結果から、合成条件の制御により、アナターゼ、層状チタン酸塩ならびにブルッカイトの選択合成が可能であることが示された。

C-2. ラマン分光ならびに吸光度測定による過酸化チタンの構造評価

図3～5で得られた試料に対してH₂O₂を加え、得られた試料のラマン分光測定ならびに吸光度測定を行い、過酸化チタンの構造を評価した。

図7にTi:TMAH=1:5で90°C1hおよび24h処理した試料の、H₂O₂処理後のラマンスペクトルを示す。図3の結果と変わらないことがわかる。

図8にTi:TMAH=1:15で150°C1hおよび24h処理した試料の、H₂O₂処理後

のラマンスペクトルを示す。図6同様、 H_2O_2 処理前(図5)の結果と変わらないことがわかる。

図9に図6に $\text{Ti}:\text{TMAH}=1:5$ で $90^\circ\text{C}1\text{h}$ 処理した試料を H_2O_2 処理した際の紫外-可視吸収スペクトルを示す。酸化チタンの吸収に起因する紫外領域の吸収に加えて、 H_2O_2 処理後の黄色の発色に起因する400nm付近の可視領域における吸収が認められた。

これらの結果より H_2O_2 処理によって表面層のみが過酸化チタンへの構造変化を生じ、コア/シェル構造を形成することが強く示唆される。なお、今後は、これら結晶構造が異なる酸化チタンから作製した過酸化チタンナノ粒子の放射線励起によるラジカル生成挙動の解明を実施する。

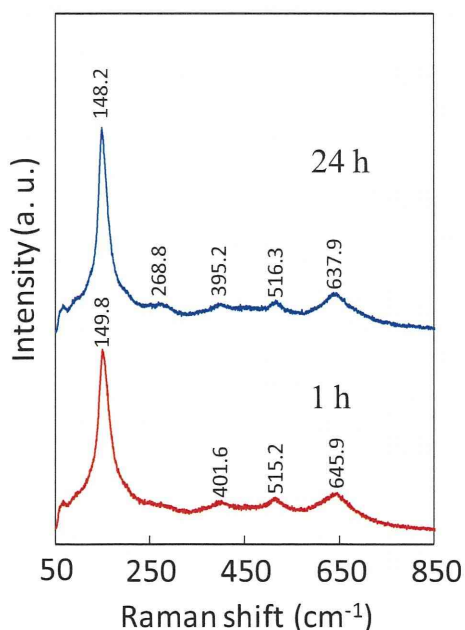


Fig. 7 $\text{Ti}:\text{TMAH}=1:5$ で $90^\circ\text{C}1\text{h}$ および24h処理した試料の、 H_2O_2 処理後のラマンスペクトル

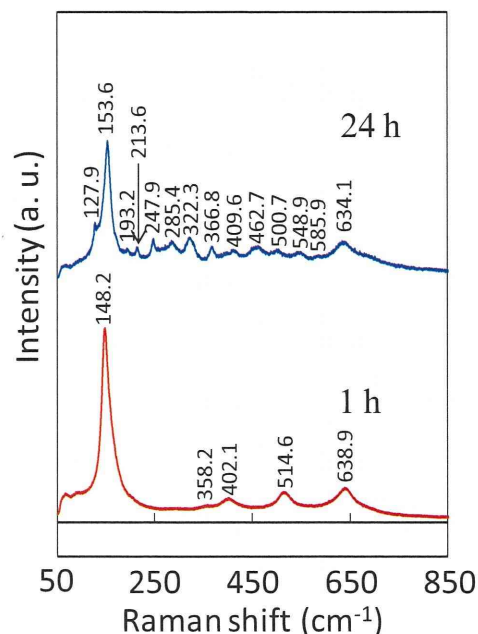


Fig. 8 $\text{Ti}:\text{TMAH}=1:15$ で $150^\circ\text{C}1\text{h}$ および24h処理した試料の、 H_2O_2 処理後のラマンスペクトル

C-4. HfO_2 ナノ粒子の合成とそのラジカル生成特性

図9に得られた HfO_2 ナノ粒子のXRDパターンを示す。合成した HfO_2 は単斜晶の結晶構造を有していることがわかる。 Hf は Zr 同様に第IV族に属し、 HfO_2 は ZrO_2 同様、単斜晶、正方晶ならびに立方晶の結晶構造を取り得る。 ZrO_2 の場合、ナノサイズでは正方晶が安定化されるが、分担者らの最近の研究より、表面を TMA^+ でキャッピングした場合、表面エネルギーの減少が生じ、欠陥の少ない単斜晶が生成することが報告されている。 HfO_2 においても単斜晶が合成されたことから、 ZrO_2 同様、 TMA^+ のキャッピングによる格子欠陥の減少が生じているものと考察される。

図10にHfO₂ナノ粒子とこれまで検討を進めてきた過酸化チタンナノ粒子における放射線励起によるラジカル生成特性を示す。放射線の照射量の増加とともにラジカル生成量は増加し、また、過酸化チタンと比べてより多くのラジカルが生成していることがわかる。このことから、HfO₂ナノ粒子は、放射線励起による活性ラジカル生成材料として極めて有望であることが示唆された。

Hfは重元素であり(原子量: 178.49)、HfO₂自身は酸やアルカリにほとんど溶解しないことから、HfO₂は造影剤としての機能を有していると言える。また、希土類添加の有望な宿主材料であり、希土類添加により、蛍光特性を示すHfO₂ナノ粒子が合成出来れば、イメージング医療への応用も可能になると予測される。そこで、FSとして出発原料溶液にTb塩を混合し、これを水熱処理することでTb添加HfO₂(以下、Tb:HfO₂)の合成を試みた。

図11に得られた水溶液ならびにこれに波長254nmの紫外光を照射した

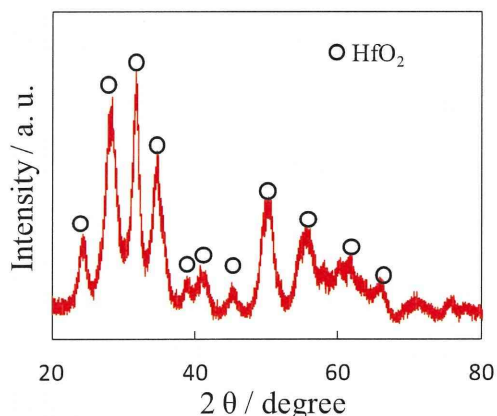


Fig. 9 HfO₂ナノ粒子のXRDパターン

際の試料外観を示す。水溶液は、高い透明性を有しており、ナノ粒子が極めて均一に分散していることを示している。また、紫外線励起により、粒子は緑色に発光した。これにより、本手法での治療と診断の双方を可能にするナノ粒子の合成可能性が示された。イメージングの観点から、今後はEr等の添加によるアップコンバージョン材料の創製を目指す。

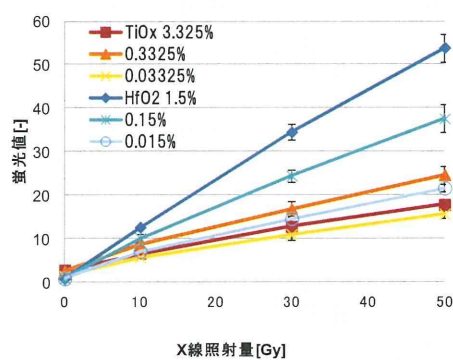


Fig. 10 HfO₂ナノ粒子と過酸化チタンナノ粒子における放射線励起によるラジカル生成特性比較

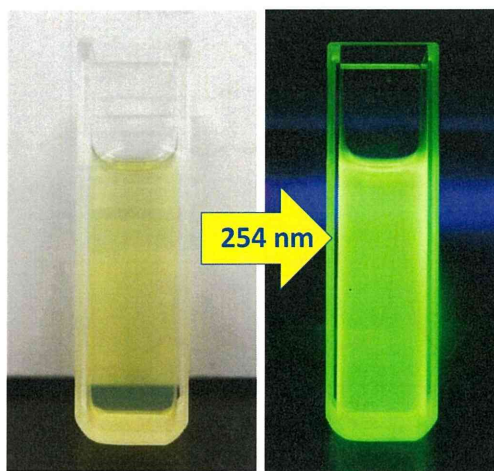


Fig. 11 Tb:HfO₂ナノ粒子の蛍光特性

C-5. 過酸化チタンの微細構造評価によるラジカル生成機構の解明

図12に酸化チタン(アナターゼ)、過酸化チタンおよび過酸化チタンに1回10Gyで総量210Gyの放射線を照射した試料のXAFSスペクトル解析により得られた動径分布曲線を、Table 1に本データを解析して得られた、Tiへの酸素の配位数と結合距離を示す。その結果、配位数はアナターゼで4.22なのに対して、過酸化チタンでは3.72と低く、さらに、放射線照射後では3.38まで減少した。一方、結合距離はいずれの試料においてもほとんど差異は認められなかった。

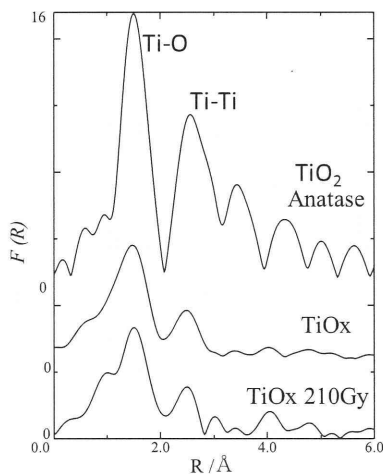


Fig. 12 酸化チタン、過酸化チタンおよび放射線を照射した過酸化チタンの動径分布曲線

Table 1 動径分布曲線より算出したTiへの酸素の配位数と結合距離

	CN	r(Å)	σ(Å)
TiO ₂ Anatase	4.22(6)	1.97(1)	0.07(1)
TiO _x	3.72(5)	1.97(1)	0.12(1)
TiO _x 210Gy	3.38(3)	1.99(1)	0.11(1)

TiO₂ ラジカルなし



TiO_x ラジカル発生



放射線照射した TiO_x ラジカル増大

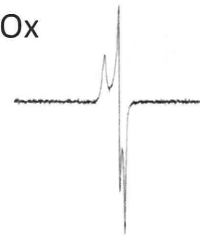


Fig. 13 酸化チタン、過酸化チタンおよび放射線を照射した過酸化チタンにおけるESRスペクトル

図13に上記試料のESRスペクトルを示す。TiO₂では、ラジカルの存在は認められなかったのに対して、過酸化チタンでは、ラジカルの存在を示すピークが認められ、さらに、放射線照射後はピーク強度が増加した。

これらの結果より、過酸化チタン粒子における放射線照射によるラジカル生成機構を考察し、図14に模式的に示した。酸化チタンはラジカルを有していないが、H₂O₂処理により表面層にラジカルが生成し(おそらくO₂²⁻起因)、さらに放射線照射によりTi-O-O-Ti結合の一部が開裂し、新たなラジカルが生成するものと考えられる。

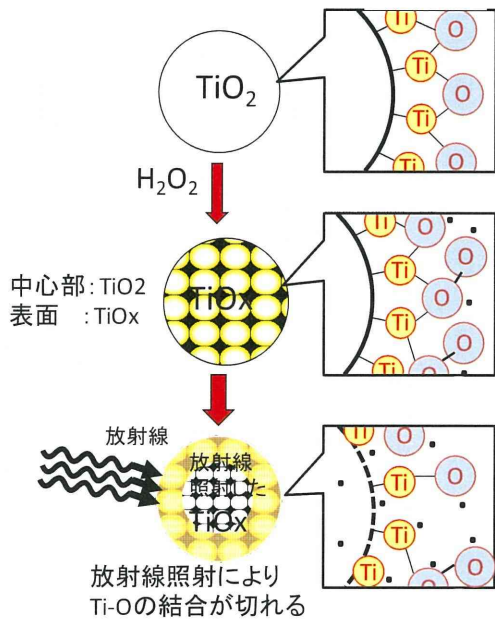


Fig. 14 微細構造解析より予測される過酸化チタン粒子における放射線照射によるラジカル生成機構

D. 結論

1. 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の合成において、TiとTMAHの濃度比、水熱処理温度および水熱処理時間を制御することによって、アナターゼ型TiO₂、層状チタン酸塩およびブルッカイト型TiO₂の選択成長に成功した。
2. ラマン分光法や光吸収特性の評価より、酸化チタンナノ粒子のH₂O₂処理により得られる過酸化チタンは、コア/シェル構造を有していることが強く示唆された。
3. HfO₂ナノ粒子分散液の合成に成功した。また、過酸化チタンを凌ぐラジカル生成特性を有することを見出した。

4. XAFSおよびESR分析より、過酸化チタンはその分子構造中にラジカルを含んでおり、放射線励起により、Ti-O等の開裂が進行し、新たなラジカルが生成することが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Togashi, S. Takami, K. Kawakami, H. Yamamoto, T. Naka, K. Sato, K. Abe, T. Adschiri, "Continuous Hydrothermal Synthesis of 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic Acid-Modified Magnetite Nanoparticles with Stealth-Functionality against Immunological Response", J. Mater. Chem., 22, 9041-9045, 2012.
2. M. Taguchi, S. Takami, T. Adschiri, T. Nakane, K. Sato, T. Naka, "Simple and rapid synthesis of ZrO₂ nanoparticles from Zr(OEt)₄ and Zr(OH)₄ using a hydrothermal method", CrystEngComm., 14, 2117-2123, 2012.
3. M. Taguchi, S. Takami, T. Adschiri, T. Nakane, K. Sato, T. Naka, "Synthesis of surface-modified monoclinic ZrO₂ nanoparticles using supercritical water", CrystEngComm., 14, 2132-2138, 2012.
4. A. Sahraneshin, S. Takami, D. Hojo, K. Minami, T. Arita, T. Adschiri, "Synthesis of shape-controlled organic-hybridized hafnium oxide

nanoparticles under sub- and supercritical hydrothermal conditions", *J. Supercrit. Fluids*, 62, 190-196, 2012.

5. J. Lu, K. Minami, S. Takami, M. Shibata, Y. Kaneko, T. Adschiri, "Supercritical Hydrothermal Synthesis and In Situ Organic Modification of Indium Tin Oxide Nanoparticles Using Continuous-Flow Reaction System", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 4, 351-354, 2012.

2. 学会発表

1. C. Numako, K. Sato, S. Ohara, M. Umetsu, S. Takami, R. Sasaki, C. Ogino, and A. Kondo, "Characterization of Titanium oxide nano-particle suspension by XAFS technique", E-MRS Spring Meeting, Nice, France, 2011.5.9-12.
2. 沼子千弥, 佐藤和好, 高見誠一, 梅津光央, 田中 勉, 荻野千秋, 近藤昭彦, "放射線照射によりラジカルを発生する金属過酸化物に対するXAFS分析", XAFS討論会, 分子化学研究所, 2012.9-11.
3. 沼子千弥, 佐藤和好, 高見誠一, 梅津光央, 岡上吉広, 横山拓史, 田中勉, 荻野千秋, 近藤昭彦, "放射線照射によりラジカルを発生する金属過酸化物のXAFS分析", X線分析討論会, 九州大学箱崎キャンパス, 2011.10.28-29.

4. 沼子千弥, 佐藤和好, 高見誠一, 梅津光央, 岡上吉広, 横山拓史, 田中勉, 荻野千秋, 近藤昭彦, "放射線照射によりラジカルを発生する金属過酸化物に対するXAFS分析", MRS-J, 横浜, 2011.12.19-22.
5. C. Numako, K. Sato, S. Ohara, M. Umetsu, S. Takami, R. Sasaki, C. Ogino, and A. Kondo, "Characterization of Titanium oxide nano-particle suspension by XAFS technique", BMMP-12, Nagoya, Japan, 2012.1.24-27.
6. S. Takami, "Synthesis of surface-modified metal oxide nanocrystals and their assembly to realize various materials", Zing Conference, Riviera Maya, 2011.11.29
7. 高見 誠一, "表面修飾金属酸化物ナノ結晶の水熱合成, 集積と機能化", 日本セラミックス協会 第24回秋季シンポジウム, 北海道大学, 札幌, 2011.9.8
8. S. Takami, "Synthesis and Ordered Assembly of Octahedral CeO₂ Nanocrystals by Using a Tubular Flow-type Hydrothermal Reactor", Supergreen 2011, Beijing, 2011.8.28
9. S. Takami, S. Asahina, O. Terasaki, T. Adschiri, "Hydrothermal Synthesis of Cubic Nanoassemblies Comprising Octahedral CeO₂

- Nanocrystals and Hexanedioic Acid", E-MRS 2011 Spring Meeting, Nice, France, 2011.5.12, France.
10. K. Sato, H. Abe, S. Ohara, " Selective Growth of Monoclinic and Tetragonal Zirconia Nanocrystals in Hydrothermal Condition", E-MRS Spring Meeting, Nice, France, 2011.5.9-12.
11. K. Sato, T. Takarada, S. Ohara, H. Abe, " Hydrothermal Synthesis of Single-crystalline Monoclinic Zirconia Nanocrystals", The 15th International Conference in Thin Films, Nagoya, 2011.11.11
12. 佐藤 和好, 宝田 恭之, 大原 智, 阿部 浩也, "単斜晶および正方晶ジルコニアナノ結晶の選択成長", 日本セラミックス協会 第24回秋季シンポジウム, 北海道大学, 札幌, 2011.9.8
- 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 (受賞)**
1. K.Sato, Award for Encouragement of Research in Thin Films, The 15th International Conference in Thin Films

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

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
曾我 公平 東京理科大学基礎工学部 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。また、完全長の抗体は、サイズが15 nmであり、10 nmを切るナノ材が提案されている現在では、ナノ材融合する分子としては、時には大きいことがある。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。

そこで本年度は、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低分子抗体を設計し、リポソーム表層への提示を試みた。

B. 研究方法

① 低分子抗体の調製

ヒト型化した抗EGFR抗体528(h528)の可変領域であるFv断片から一本鎖抗体scFvを作製した。一本鎖抗体は、重鎖(VH)のC末端にGGGSが三回繰り返したリンカーを介して軽鎖(VL)を融合し、さらにウェスタンブロッティングやフローサイトメトリーでの検出に使うHAタグ(YPYDVPDYA)とアフィニティー精製のためのポリヒスチジンタグ(HHHHHH)を融合した大腸菌発現ベクター(図1)を作製した。

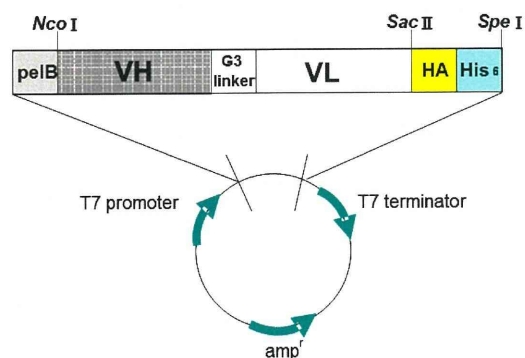


図1. H528 scFvの発現ベクター

scFvの調製は、まず、上記発現ベクターで大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含むLB寒天培地にプレーティングして、28°Cで20 hrインキュベートした。そして、寒天培地に形成されたコロニーを100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む3 mLのLB培地に植菌して、28°Cで22 hr振とう培養した後に、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む250 mLの2×YT培地に植え継ぎ、28°Cで振とう培養した。培養液のO.D.が0.8以上となったらイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド(IPTG)を終濃度1 mMとなるように添加して発現誘導を開始し、IPTG添加後28°Cで18 hr振とう培養した。培養後は、培養液を集菌瓶に回収して5000 G、4°Cで10 min遠心分離して菌体を回収し、PBSに懸濁後超音波破碎を行い、目的蛋白質を含む上清液を得た。その後、上清液を金属イオンアフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーによって精製することにより、目的scFvを調製した(図2)。

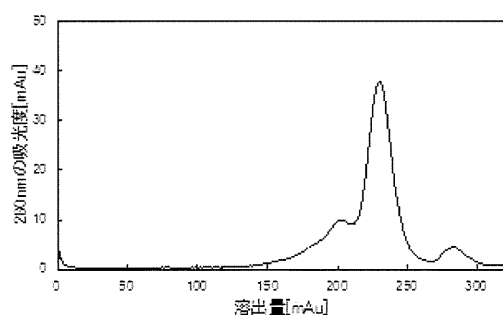


図2. h528 scFvのゲル濾過クロマトグラフィー

② マイクロカプセル化法によるリポソームの調製

まず、リポソームの構成成分とするリン脂質 (DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DSPE-PEG₂₀₀₀

(L- α -distearoyl-phosphatidyl ethanolamine), コレステロール)に2000 DaのPEGを接合したリン脂質)を、濃度が30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ となるようにクロロホルムに溶解した。そして、その30 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ に調製したリン脂質/クロロホルム溶液中に粒子分散液を添加して超音波処理を行い、Water in Oilエマルジョンを形成させる。その後、大容量の水もしくは緩衝水溶液を強く攪拌した状態でエマルジョンを全て添加し、約30 min攪拌することでWater in Oil in Water型エマルジョンを形成させた後、攪拌を弱め、12 hr程度攪拌することでクロロホルムを揮発除去し、得られたリポソームを遠心分離操作で精製する。精製したリポソームは、動的光散乱法によって粒子径を評価した。

③ リポソーム表面への低分子抗体接合

②で使用した、DSPE-PEG₂₀₀₀の代わりに同分子の末端にN-Hydroxysuccinimide (NHS)基を持つDSPE-PEG₂₀₀₀-NHSを使用して、リポソームを作製した。その際に、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHSをクロロホルム中に添加する場合(手順(1))とその後

のエマルジョン形成工程で添加する場合(手順(2))を行い、粒径を評価した。

そして1 mLのPBS(pH8.2 at r. t.)に溶解・分散させたリポソーム分散液に、リポソームに理論上存在するNHS基に対してh528 scFvが20 : 1 (mol比)となるように抗体を添加し、25°C、pH8.2で2 hr反応させた。反応終了後、20000 G、4°Cで10 min遠心精製を行って上清を除くことで遊離抗体の除去を行った。その後、PBSで懸濁して再度遠心精製を行う洗浄操作を計3回を行い、最後に遠心後沈殿にPBSを添加して懸濁・分散させた。分散させたh528 scFv提示リポソームは、FITC標識抗HA抗体を用いてフローサイトメトリーによりA431細胞への結合活性を評価した。

C. 研究結果

① マイクロカプセル化法によるリポソームの調製

粒子として、赤色発光を示すセレン化カドニウム(CdSe)ナノ粒子を封入したPEG導入リポソームの動的光散乱(DLS)による粒径分布評価の結果を図3に示す。遠心精製により沈殿には200~700 nm程度のリポソームを回収できた。CdSeナノ粒子は粒径が数10 nmであるが、CdSeナノ粒子封入リポソームの粒径分布には数10 nmの粒径を持つ粒子が確認されなかったことから、ほとんど粒子がリポソーム内部に封入されていること

が示された。また、遠心分離操作前、遠心分離操作後の上清・沈殿の各溶液に365 nmの紫外線波長の光を照射し、CdSeナノ粒子が実際に導入されているかを観察した結果を図4に示す。365 nm程度の紫外線を照射すると封入したCdSeナノ粒子は赤色の蛍光を示すが、遠心分離操作後の沈殿画分に強い赤色蛍光が見られたことから、CdSeナノ粒子が封入されたPEG導入リポソームの調製に成功したと言える。

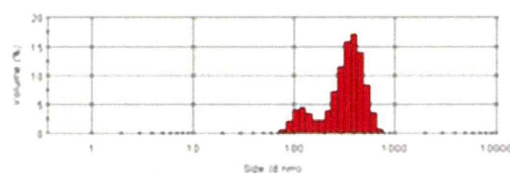


図3. CdSeナノ粒子封入PEG導入リポソームのDLS結果

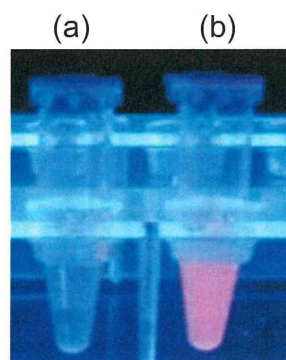
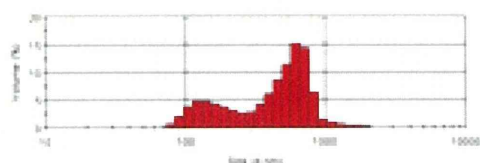


図4. CdSeナノ粒子封入PEG導入リポソームへの紫外線(365 nm)照射
(a) 遠心分離操作後の上清画分
(b) 遠心分離操作後の沈殿画分を再分散

② リポソーム表面への低分子抗体接合

DSPE-PEG2000-NHSをクロロホルム中に添加する場合(手順(1))とその後のエマルジョン形成工程で添加する場合(手順(2))で作製したリポソーム

(a)



(b)

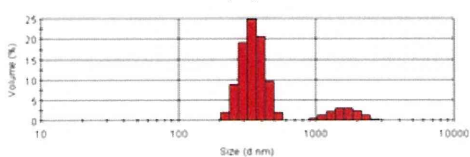


図5. CdSeナノ粒子封入PEG導入リポソームのDLS結果

(a)手順①で作製したリポソーム

(b)手順②で作製したリポソーム

ームの粒径分布をDLSで評価した結果を図5に示す。手順①では、遠心精製前において200 nm程度の比較的小さなリポソームと共に、800 nm以上の大きいリポソームも多く存在していたが、手順②のように、あらかじめ(Water in Oil) in Waterエマルジョンを形成させる際の緩衝水溶液中にDSPE-PEG₂₀₀₀-NHSを溶解させることによりPEGをリポソーム表面のみに導入した場合は、遠心精製前の粒径分布はほとんどが200 nm付近に集中しており、遠心後沈殿を回収したリポソームもそのほとんどが200 nm程度であり、生体利用には向かない1 μm程度のリポソームがほと

んど生じないことが分かる。これは、PEGが内部に導入されてしまうと、リン脂質単層の粒径が大きくなってしまい、その結果リン脂質二重膜となったリポソームの粒径も大きくなってしまいが、PEGを内部に導入されないようにするとリン脂質単層の粒径が小さくなり、結果として二重膜となった際の粒径が小さくなると考えている。以上より、リポソーム作製の際に、PEGをリポソーム表面のみに導入することは、粒径を小さくする上で重要であると言える。

次に、h528 scFvとDSPE-PEG₂₀₀₀-NHSの反応性を調べるために、h528 scFvの20、50、100、150、200、300倍となるようにDSPE-PEG₂₀₀₀-NHS添加し、pH8.2、25°Cで2 hr反応させた。その際、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHSをまず少量のDMSOにより溶解させ、その後PBSで希釈したものを反応に用いた。反応終了後、SDS-PAGEにより接合状態を確認した。SDS-PAGEにより接合状態の確認した結果を図6に示す。SDS-PAGEを行った結果、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHSをh528 scFvの200倍以上添加することにより、未反応h528 scFvはほとんど残らないことが分かった。理論分子量よりも高い位置にバンドが多く見られるが、これはh528 scFvのPEG化でも同様のことが起こっており、PEG鎖の長さや運動性の高さによりSDS-PAGEにおいて均一に泳動できないためと考えている。以上の結果より、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS : h528

scFv =200:1での反応条件を用いて、h528 scFvを提示したCdSeナノ粒子封入PEG導入リポソームを作製し、そのscFv提示リポソームの結合活性評価を、フローサイトメトリーを用いて行った(図7)。その結果、FITC標識抗HA抗体を2次抗体として検出したところ、結合活性が見られ、リポソームに抗原結合活性が付与されたことが分かった。

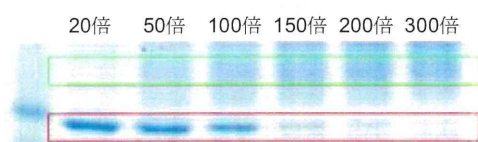


図 6. DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS を h528 scFv の各条件での接合反応後の SDS- PAGE

赤枠：未反応のscFv

緑枠：DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS反応したscFv

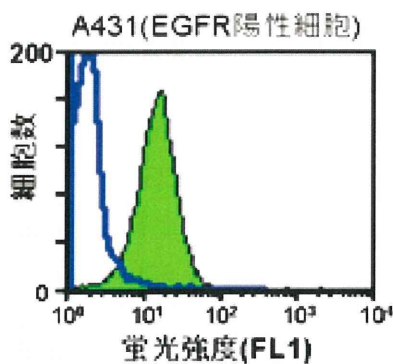


図7. フローサイトメトリーによるscFv提示リポソームの結合活性評価

青線：リポソーム未添加

緑領域：リポソーム添加

③近赤外蛍光粒子を内包するscFv提示リポソームの作製

次に、近赤発光性を持つイットリウム(Y₂O₃)を封入したNHS提示リポソームを作製し、それをBSAプレート、アミノ基プレートへ添加し近赤外(NIR)蛍光像を観測した(図8)。その結果、Y₂O₃粒子によるNIR蛍光がアミノ基プレートのみから確認できたことから、PEGが持つ非特異吸着抑制能を維持したままアミノ基と結合するNHS基を修飾できたことがわかった。次に、scFvとの反応前後におけるY₂O₃封入scFv提示リポソームに結合した二次抗体の蛍光強度を図9に示す。低分子抗体との反応により、試料の蛍光強度が著しく増大することが確認できた。二次抗体はscFvとのみ結合することから、Y₂O₃封入scFv提示リポソームに

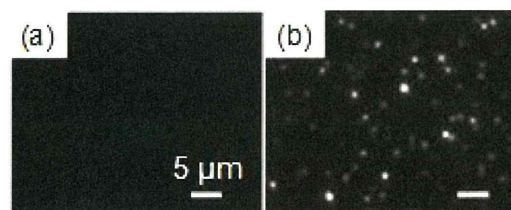


図8. Y₂O₃封入NHS提示リポソームを滴下したプレートのNIR蛍光像

(a) BSAプレート

(b) アミノ基プレート

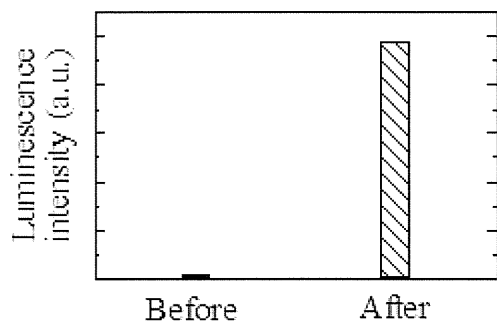


図9.scFvとの反応前後における Y_2O_3 封入NHS提示リポソームに結合した二次抗体の蛍光強度

低分子抗体を修飾できたことがわかった。以上の結果より、内包する粒子が変化してもscFv提示リポソームの作製に成功した。

D. 考察

マイクロカプセル化法によりPEGを導入したりポソームを作製した。その結果、PEGが導入され、かつ内部にナノ粒子を導入したりポソームの作製に成功した。そこで、次に、リポソーム表面への抗体提示を目指し、リポソーム作製方法および抗体接合方法の検討を行った。その結果、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHSをリポソーム外面にのみを導入することを目指し、DSPE-PEG₂₀₀₀-NHSを他のリン脂質のようにクロロホルムに溶解させず、リン脂質二重層の外側の層を作製する際の水溶液中に溶解させることによってリポソームを作製し、その後h528 scFvと反応させる手順により、抗体提示リポソームを作製した場合、粒径を小さなリポソームを

作製することに成功し、かつ、高い結合活性を示していることが分かった。

リポソームに導入する官能基をNHSではなくカルボキシル基として、第2章で行った手法と同様にEDCとスクシンイミドでカルボキシル基を活性化させ、その後h528 LK103 scFvを添加することにより、NHS基の活性を失うことなく、より効率的なh528 LK103 scFvのリポソーム表面への提示ができると考えている。

E. 結論

低分子抗体であるh528 LK103 scFvでも目的抗原を提示している細胞へリポソームを結合させ得る程度に化学接合することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takanari Togashi, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, Satoshi Ohara, Yoshiharu Hatakeyama, and Tadafumi Adschiri “One-pot Hydrothermal Synthesis of an Assembly of Magnetite Nanoneedles on a Scaffold of Cyclic-diphenylalanine Nanorods”, *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 3991-3999 (2011).
2. Hideki Watanabe, Kengo Kanazaki, Takeshi Nakanishi, Hidenori Shiotsuka, Satoru Hatakeyama, Masaru Kaieda Takeshi Imamura, Mitsuo Umetsu, and

- Izumi Kumagai, "Biomimetic engineering of modular bispecific antibodies for biomolecule immobilization", *Langmuir*, 27, 9656-9661(2011).
3. Ryutaro Asano, Keiko Ikoma, Ippei Shimomura, Shintaro Taki, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, "Cytotoxic enhancement of a bispecific diabody by format conversion to tandem single-chain variable fragment (taFv) THE CASE OF THE hEx3 DIABODY", *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 1812-1818 (2011).
4. Takanari Togashi, Nozomi Yokoo, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Takashi Naka, Seiichi Takami, Hiroya Abe, Izumi Kumagai, and Tadafumi Adschiri, "Material-binding peptide application -ZnO crystal structure control by means of a ZnO-binding peptide-", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 140-145 (2011).
5. S. Watanabe, H. Hyodo, H. Taguchi, K. Soga, Y. Takanashi, M. Matsumoto, "Calcination- and Etching-Free Photolithography of Inorganic Phosphor Films Consisting of Rare Earth Ion Doped Nanoparticles on Plastic Sheets," *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS*, 21 (2011) 4264-4269.
6. Hidehiro Yoshida, Koji Morita, Byung-Nam Kim, Kejiro Hiraga, Kohei Yamanaka, Kohei Soga and Takahisa Yamamoto, 'Low-Temperature Spark Plasma Sintering of Yttria Ceramics with Ultrafine Grain Size,' *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY*, 94 (2011) 3301-3307.
7. Masao Kamimura, Naoki Kanayama, Kimikazu Tokuzen, Kohei Soga and Yukio Nagasaki, 'Near-infrared (1550 nm) in vivo bioimaging based on rare-earth doped ceramic nanophosphors modified with PEG-b-poly(4-vinyl benzylphosphonate), *NANOSCALE*, 3 (2011) 3705-3713.

2. 学会発表

1. 梅津 光央, 抗体分子の低分子化デザインから見えるナノ工学, 2011 サテライト バイオメディカルインターフェースワークショップ, 磐梯熱海, 2011.8.26.
2. 織茂 遼太, 梅津 光央, 真田 英明 1、浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 高機能性二重特異性抗体の作製に向けた部位指定化学接合デザイン, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.13
3. 梅津 光央, 植田 朝美, 階上 健太郎, 中西 猛, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, 蛋白質工学的発想のピンポイント化学接合設計, 化学工学会 第77年会, 2012.3.15.
4. 植田 朝美, 梅津 光央, 階上 健太郎, 中西 猛, 浅野 竜太郎, 熊谷 泉, タンパク質工学的視点からの部

位特異的化学接合の設計, 第11回日本蛋白質科学会年会, 大阪, 2011.6.8.

5. Kohei SOGA, Hiroshi HYODO, Hidehiro KISHIMOTO, 'Over-1000-nm (OTN) Near Infrared Fluorescence Bioimaging by Using Rare-Earth Doped Ceramic Nanophosphors,' 4th International Workshop on PHOTOLUMINESCENCE IN RARE EARTHS: PHOTONIC MATERIALS AND DEVICES (PRE'12), Kyoto, 2012.3.27.

6. 山田忍, 兵藤宏, 曾我公平, 近赤外バイオイメージングのためのイットリア蛍光ナノ粒子のリン酸処理による表面改質,' セラミックス基礎科学討論会第50回記念大会 (国際ファッションセンター, 東京,

2012. 1. 12.

7. 曾我公平, 兵藤宏, 岸本英博, 希土類含有セラミックスナノ発光粒子によるOTN近赤外バイオイメージングセラミックスナノ粒子と生体機能高分子の融合による次世代バイオイメージングシステムの開拓ー, 第60回高分子討論会, 岡山, 2011. 9. 28.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
沼子千弥 ほか		日本放射光 学会	放射光が解き 明かす驚異の ナノ世界	講談社	日本	2011	111-114
沼子千弥 ほか		横山正孝	ヨウ素の化学 と最新応用技 術	CMC出版	日本	2011	39-44

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hiraiwa, K., Ueda, M., Takeuchi, H., Oyama, T., Irino, T., Yoshikawa, T., Kondo, A., Kitagawa, Y.	Sentinel node mapping with thermoresponsive magnetic nanoparticles in rats	Journal of Surgical Research	174	48-55	2012
Fukutani, Y., Nakamura, T., Yorozu, M., Ishii, J., Kondo, A., Yohda, M.	The N-terminal replacement of an olfactory receptor for the development of a yeast-based biomimetic odor sensor	Biotechnology and Bioengineering	109	205-212	2012
Matsumoto, T., Takase, R., Tanaka, T.,	Site-specific protein labeling with amine-containing	Biotechnology Journal	DOI 10.1002/biot.2011 00213		2012

Fukuda, H., Kondo, A.	molecules using <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> sortase				
Nishimura, Y., Shishido, T., Ishii, J., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A.	Protein-encapsulated bio-nanocapsules production with ER membrane localization sequences.	Journal of Biotechnology	157	124-129	2012
Ninomiya, K., Ogino, C., Oshima, S., Sonoike, S., Kuroda, S., Shimizu, N.	Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO ₂ nanoparticles	Ultrasonics Sonochemistry	19	607-614	2012
Nagaoka, H., ato, Y., Xie, X., Hata, H., Eguchi, M., Sakurai, N., Watanabe, T., Saitoh, H., Kondo, A., Sugita, S., Ohnishi, N.	Coupling stimuli-responsive magnetic nanoparticles with antibody-antigen detection in immunoassays	Analytical Chemistry	83	9197-9200	2011
Fukuda, N., Ishii, J., Kondo, A	G γ recruitment system incorporating a novel signal amplification circuit to screen transient protein-protein interactions	FEBS Journal	278	3086-3094	2011
Fukuda, N., Ishii, J., Kaishima, M.,	Amplification of agonist stimulation of human	Analytical Biochemistry	417	182-187	2011