

2012/2003A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

(H22-低侵襲-一般-003)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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

(H22-低侵襲-一般-003)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成25(2013)年3月

目次

I. 総括・分担研究報告

(1) 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	・・・ 1
(2) 過酸化チタンナノ粒子と X 線照射の併用による細胞損傷効果	・・・ 7
(3) 酸化物ナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究	・・・ 15
(4) スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線治療の併用による膵臓がん治療に関する研究	・・・ 27
(5) 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	・・・ 35
II 研究成果の刊行に関する一覧表 (別紙 4)	・・・ 41
III 別刷	・・・ 46

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）研究 平成24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

研究代表者 近藤 昭彦 神戸大学大学院工学研究科 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。本研究では、[1]高いQOLを維持できる高精度放射線治療の効果を相乗的に増加させ、[2]細胞レベルでの癌の発見をも可能にする認識能を有する、スーパーハイブリッド・ナノ粒子の構築を目指し、ナノ粒子・放射線併用療法の確立を目指す（図1）。

診断と治療の一体化を目指す。無機ナノ粒子を包括するバイオナノカプセルを表面加工するによって、膵臓癌細胞を特異的に認識可能になれば、MRIやCT等の診断技術を応用で、高感度な初期膵臓癌を診断に期待ができる。同時にナノ粒子が放射線の増感剤として機能すれば、相乗効果が期待でき、ナノ粒子に2役の効果を期待できる（図2）。今回提案する“スーパーハイブリッド・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”において有効な相乗効果が発揮できれば、同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減も可能であり、腫瘍部近傍の正常組織への非照射線量を極力低減し、より低侵襲な非外科的・新規治療法を確立できる。その点で、同時に患者のQOL維持にも多いに寄与するものと考えられる。放射線治療は本邦だけでなく、世界中で広く利用されているがん治療法であり、更に、臨床応用に移行する際に機器的環境の拡充や予算を必要としない点も大きな特徴である。以上より、ナノテクノロジー技術を有効に非侵襲治療に適用するものであり、厚生労働行政のナノメディシン研究事業に非常に合致する。

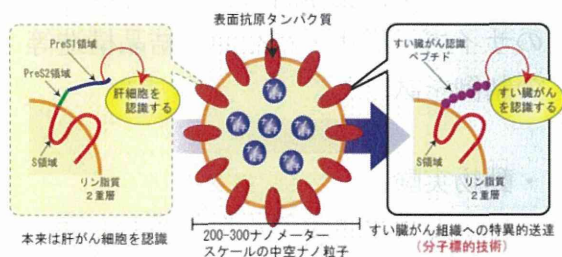


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

本研究の特色は、多分野の専門的知識を融合させ、開発したバイオナノカプセル及びナノカプセル表面への標的分子提示技術、無機ナノ粒子、高精度放射線治療を階層的に組み合わせることによって、これまでの早期診断が極めて困難であった初期の膵臓癌の細胞レベルでの高感度診断と、高精度放射線治療とを同時に可能にし、癌

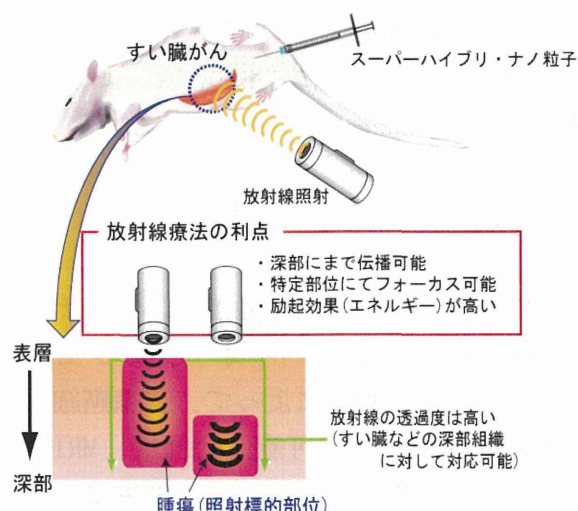


図2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併

B. 研究方法

詳細はそれぞれの分担者の項を参照

・ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

昨年度までに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し、細胞を死滅させることは明らかとなっている。そこで、今年度は以下に効率良く細胞死を誘導させるのか?この点について、細胞取込効率の観点から検討を行った。

多くの細胞はエンドサイトーシス経路によって液体や巨大分子、小型分子を常時取り込んでいる。摂取された物質は細胞膜の一部に取り込まれ、そこが内側にくびり切れて細胞内にエンドサイトーシス小胞ができ、さらに内部に送られる。この作用を利用して細胞内にチタン粒子を取り込ませる。その取り込みに必要な時間を評価する。

本実験では、細胞内に粒子が内在していることを確認するために、用いるチタン粒子の化学的性質に類似した蛍光ナノ粒子を細胞内に取り込ませ、評価した。

・{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の合成

過酸化チタンナノ粒子は、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、過氧化物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。

・動物実験

担がんマウスモデルを作成し、TiO_xナノ粒子とX線の併用による抗腫瘍効果を評価した。BALB/cヌードマウス(4週令オス)の大腿部皮下にMIAPaCa2細胞株(2×10⁶個)を移植した。移植後7日目に8.7wt%のPAA修飾TiO_xナノ粒子150μlを腫瘍局注し、その後X線5Gyを腫瘍に照射した。照射装置はMBR-1505R2を使用し、照射中、腫瘍部以外は鉛ブロックによりシールドされた。照射後一定期間、腫瘍体積を測定した。評価は、ナノ粒子X線併用群、

ナノ粒子単独群、X線単独群、そして無処置（コントロール）群の4グループ（3匹/グループ）で行った。

さらにマウスの腫瘍組織の病理学的評価を行うため、同様にMIAPaCa2細胞株を移植した別のマウス群に対して、1.5wt%のPAA修飾TiO_xナノ粒子150 μlを腫瘍局注し、その後X線10Gyを腫瘍に照射した。照射後24時間で腫瘍を切除し、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色、TUNELアッセイを行った。

・培養細胞実験

TiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の特定等、動物実験において評価が困難であった項目に関して、in vitroでの評価を行った。細胞はヒト膀胱癌由来であるMIAPaCa2細胞株を用い、血清を加えたRPMI-1640培地（Sigma-Aldrich社）中37°C、5%CO₂条件下で培養した。最初にTiO_xナノ粒子とX線の併用による殺細胞効果を評価した。24ウェルプレート上にMIAPaCa2を播種し、1.5wt%のTiO_xナノ粒子を100 μl加え、X線を照射した。照射後、遠心分離機により上清を除去し、5mlの培地で置換した。ディッシュ上に必要な細胞数を播種し、37°C、5%CO₂条件下で14日間インキュベートし、その後コロニーアッセイ法により細胞の生存数を評価した。また、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いてTiO_xナノ粒子の作用させた状態での顕微鏡的観察を行った。

次にTiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の評価を用いて

行った。染色試薬として、OHラジカル検出にAPF、O₂-ラジカル検出にHE、H₂O₂検出にcDCFを用いた。培地を加えた96ウェルプレート上にMIAPaCa2を播種し、37°C、5%CO₂条件下で24時間インキュベートした。その後、TiO_xナノ粒子を100 μl加え、1時間インキュベートした後に各染色試薬を添加し、X線を照射した。照射後、FACSで解析を行った。

（倫理面への配慮）

研究代表者及び研究分担者はそれぞれの施設における生命倫理規定、実験動物取り扱い規定に忠実に従い、生命倫理への配慮を十分に行って研究を進めた。

C. 研究結果

詳細はそれぞれの分担者の項を参照

・ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

モデルナノ粒子を用いる事で、放射線照射時に必要とされるナノ粒子の取り込みに必要な培養時間を決定した。

・{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の合成

6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。また、TEM写真より、2種類の形状の粒子が観察された。一つは四角形状（{001}面：

図6b)で、もう一つは棒状（{101}面：図6c）であるが、この棒状粒子は横方向から見た四角形状粒子である。なお、本研究で合成された20nmサイズの{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子は世界最小である。

・動物実験

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。TiO_x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。全観察期間は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、TiO_xナノ粒子に毒性がないことを示唆する。

・培養細胞実験

*In vitro*におけるTiO_xナノ粒子とX線照射の併用による殺細胞効果を評価した。TiO_xナノ粒子併用により細胞の生存率に差を認め、動物実験と同様に*In vitro*においてもTiO_xナノ粒子とX線の併用による殺細胞効果が示された。また、TiO_xナノ粒子が細胞内に十分に取り込まれていることが観察された。

D. 考察

達成度について

以上の結果の項で示したように、平成23年度の研究は当初の計画通り進行し、有用な知見を得るとともに技術開発がなされているといえる。過酸化チタンナノ粒子を基盤とし、放射線

照射と併用することで腫瘍細胞を特異的に傷害する技術が、メカニズム解明と技術開発の両面において確立されつつあると言える。

研究成果の学術的意義、社会的意義について

チタンナノ粒子と放射線照射を併用したガン細胞特異的傷害技術は、当研究グループオリジナルであり世界初の技術である。この境界領域からなる研究は学術的、国際敵に見ても先進的なものである。この手法は非侵襲的であるため、患者のQOLを維持したまま治療が可能であるという特長を持ち、その社会的な意義は極めて大きい。本年度は、チタンナノ粒子と放射線照射を併用したガン治療法の開発における重要かつ基礎的な成果が得られたといえる。本技術の実用化に大きな弾みがつくものと期待される。

今後の展望について

これまでに得られた研究成果を基に、今後もマウスなどを用いたより臨床に近い研究の推進が必要とされる。そして今後、両者の研究を融合させることで、実用化に向けて加速的に研究を進めることができると期待される。

E. 結論

本年度は、過酸化チタンナノ粒子に放射線を照射するとラジカルを発生することを見出し、これを基としたメカニズムの解明から動物実験にわたり基礎的な知見を得る事に成功した。

今後も研究を進めることで、本技術を確立し実用化できると期待される。

F. 研究発表

論文発表及び研究発表は、分担者の項を参照。

G. 知的所有権の取得状況

知的所有権は、分担者の項を参照。

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）研究年度終了報告書

過酸化チタンナノ粒子とX線照射の併用による細胞損傷効果

研究代表者	近藤 昭彦	神戸大学大学院工学研究科	教授
研究分担者	荻野 千秋	神戸大学大学院工学研究科	准教授
研究分担者	田中 勉	神戸大学大学院工学研究科	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。本研究では、[1]高いQOLを維持できる高精度放射線治療の効果を相乗的に増加させ、[2]細胞レベルでの癌の発見をも可能にする認識能を有する、スーパーハイブリ・ナノ粒子の構築を目指し、ナノ粒子・放射線併用療法の実現を目指す（図1）。

本研究の特色は、多分野の専門的知識を融合させ、開発したバイオナノカプセル及びナノカプセル表面への標的分子提示技術、無機ナノ粒子、高精度放射線治療を階層的に組み合わせることによって、これまでの早期診断が極めて困難であった初期の膵臓癌の細胞レベルでの高感度診断と、高精度放射線治療とを同時に可能にし、癌診断と治療の一体化を目指す。無機ナノ粒子を包括するバイオナノカプセルを表面加工することによって、膵臓癌細胞を特異的に認識可能になれば、MRIやCT等の診断技術を

応用で、高感度な初期膵臓癌を診断

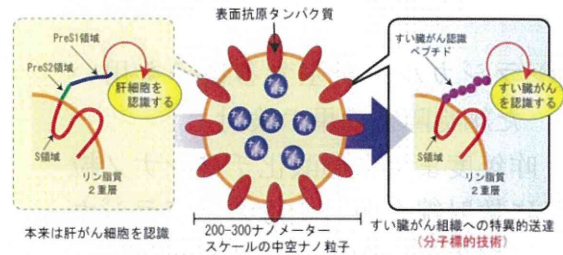


図1. 『スーパーハイブリ・ナノ粒子』構築

に期待ができる。同時にナノ粒子が放射線の増感剤として機能すれば、相乗効果が期待でき、ナノ粒子に2役の効果を期待できる（図2）。今回提案する“スーパーハイブリ・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”において有効な相乗効果が発揮できれば、同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減も可能であり、腫瘍部近傍の正常組織への非照射線量を極力低減し、より低侵襲な非外科的・新規治療法を確立できる。その点で、同時に患者のQOL維持にも多いに寄与するものと考えられる。放射線治療は本邦だけでなく、世界中で広く利用されているがん治療法であり、更に、臨床応用に移行する際に機器的環境の拡充や予算を必要としない点も大きな特徴である。以上より、ナノテクノロジー技術を有効に非侵

襲治療に適用するものであり、厚生労働行政のナノメディシン研究事業に非常に合致する。本年度は、放射線を照射

してラジカルを生成する粒子の探索とその評価、及びラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討を行った。

B. 研究方法

① ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

昨年度までに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し、細胞を死滅させることは明らかとなっている。そこで、今年度は以下に効率良く細胞死を誘導させるのか?この点について、細胞取込効率の観点から検討を行った。

多くの細胞はエンドサイトーシス経路によって液体や巨大分子、小型分子を常時取り込んでいる。摂取された物質は細胞膜の一部に取り込まれ、そこが内側にくびり切れて細胞内にエンドサイトーシス小胞ができ、さらに内部に送られる。この作用を利用して細胞内にチタン粒子を取り込ませる。その取り込みに必要な時間を評価する。本実験では、細胞内に粒子が内在していることを確認するために、用いるチタン粒子の化学的性質に類似した蛍光ナノ粒子を細胞内に取り込ませ、評価した。

② エンドソーム脱出を可能とする

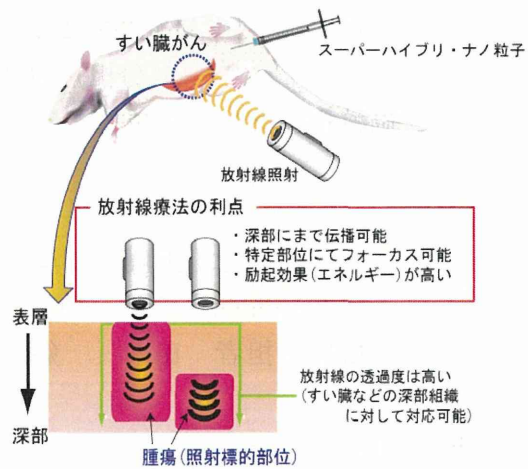


図2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併用利用の利点

BNCの開発

癌治療や遺伝子治療の分野において副作用を軽減するために、薬剤を標的細胞のみに送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目されている。これまでに我々はDDSのキャリアとして、B型肝炎ウイルスの表面抗原Lタンパク質から成るバイオナノカプセル (BNC) を開発して来ている。BNCは直径約100 nmの中空ナノ粒子で、内部に封入した薬剤などをヒト肝細胞特異的に送達できる。この技術を用いて我々は、BNCのLタンパク質の肝細胞特異性部位を遺伝子工学的に削除し、Affibody分子 Z_{HER2} を挿入することで、乳癌細胞などに発現している受容体HER2を特異的に標的化することに成功している (Z_{HER2} -BNC)。本研究では、この Z_{HER2} -BNCに二つの新しい機能を付与することを目的とした。一つ目は精製工程の簡略化機能である。従来の精製法である超遠心勾配法は作業工程が多く煩雑で、精製効率も高くな

いことから研究の進展を妨げていた。そこで金属イオンとアフィニティを持つ6×ヒスチジンペプチド (His-tag) を融合したBNC (His-ZHER2-BNC) を作製し (図3)、より簡便で効率のよい新規精製法 (His-tag精製法) の開発を目指した。二つ目はエンドソームからの脱出機能である。ZHER2-BNCは細胞表面の受容体に結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に導入され、エンドソームを経てリソソームにより分解されるため、薬剤などの導入効率が低い。そこで本研究ではpH応答性の膜融合ペプチドGALAを用いることで、エンドソームから脱出可能なBNC (GALA-His-ZHER2-BNC) の開発を目指した (図3)。以上のような二つの機能を持つ新規機能性ZHER2-BNCを開発し、その機能の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は本研究計画では、神戸大学遺伝子組換え実験実施規則、神戸大学動物実験実施規則を忠実に遵守し、細心の注意を払って行った。

C. 研究結果・D. 考察

① ラジカルを発生する粒子を用いた細胞障害効果の検討

チタン粒子を細胞内に導入する際に必要とする培養時間を評価するために、粒子径、表面電位が比較的良好似た蛍光粒子を用いて細胞内に粒子が内在する様子を観察した結果を図4に示す。細胞への導入時間が0時

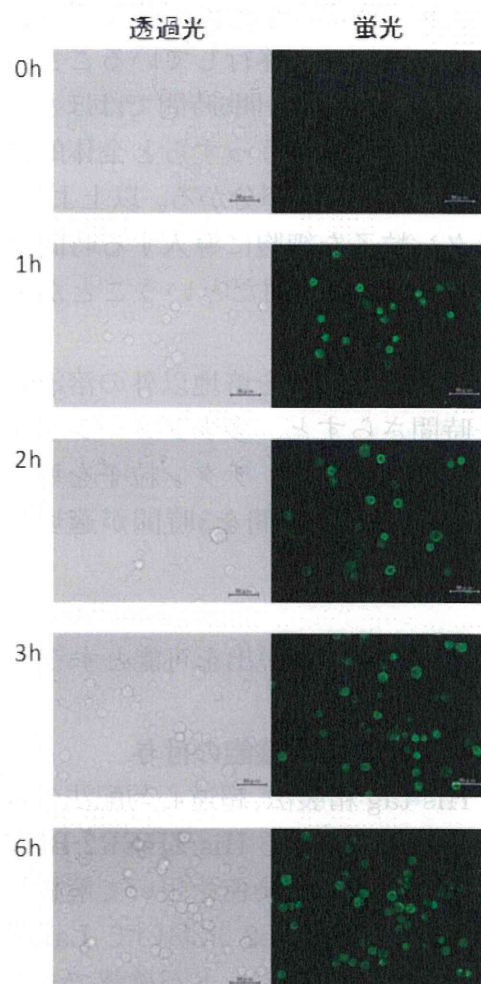


図4 蛍光粒子を用いた細胞内への取り込みの観察

間の時、細胞内への粒子の移行はほぼ見られなかった。1時間以降では、少なくとも細胞表面に粒子が接着していることがわかる。蛍光顕微鏡は、細胞を横に切ったように観察できるので、蛍光が輪のように見えるものは細胞の表面に粒子が付着しているが、内部までは移行していないということが観察できる。導入時間1, 2時間では内部まで粒子が移行していないことが分かる。導入時間3時間で

は、輪の内部にも蛍光が確認でき、内部まで粒子が移行していることが分かった。導入時間6時間ではほとんどの細胞内部がうっすらと全体的に着色しているのが分かる。以上より、チタン粒子を細胞に導入する時間は、3時間以上が適切だということが分かった。

しかし、細胞を培地以外の溶液に長時間さらすと、多少ダメージを受けてしまうので、チタン粒子を導入する際は導入時間を3時間が適切とする。

②エンドソーム脱出を可能とする

BNCの開発

精製工程簡略化機能の付与

His-tag 精製法、超遠心勾配法の各ステップにおける His-ZHER2-BNC の精製度を、銀染色を用いて解析した (図 5)。Lane2 において Lane8 と同様に目的のバンドが確認できたことから、His-tag 精製法によりわずかに 1 ステップでの効率的な精製に成功したと言える。この His-tag 精製法を用いることで、従来は 5 日間要していた精製日数を 1 日に短縮できる。また取得した粒子の収率は、超遠心勾配法が 0.61 % に対して His-tag 精製法は 1.52 % と、約 2.5 倍に向上した。以上から His-tag 精製法は ZHER2-BNC の精製法として非常に有効であることが示され、他の様々な改変型 BNC にも適用できると考えられるため、今後の研究の発展への貢献が期待される。

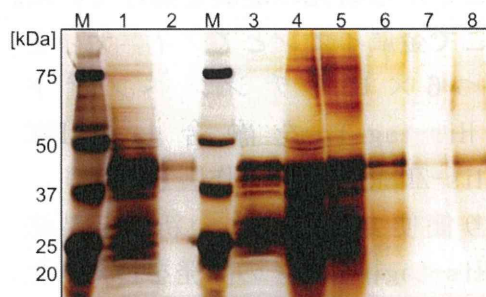


図 5 2 種類の方法で生成した His-Z_{HER2}-BNC の銀染色分析

(M: molecular-weight marker, Lane 1, 3; Crude extract, Lane 2: After His-tag affinity purification, Lane 3: After PEG precipitation, Lane 4: After ultracentrifugation 1, Lane 5: After ultracentrifugation 2, Lane 6: After ultracentrifugation 3, Lane 7: After ultracentrifugation 3, Lane 8: After condensation)

エンドソーム脱出機能の付与

カルセインを封入した二種類の BNC/LP 複合粒子を標的細胞 SKBR3 へ添加し、48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 6)。左から順番に細胞透過像、カルセイン (緑)、Lysotracker (赤)、カルセインと Lysotracker の Merge 画像を示している。上段の His-ZHER2-BNC/LP のカルセインの蛍光 (緑) は、Lysotracker (赤) と同様にドット状のパターンを示した。また Merge 画像において蛍光が重なって黄色を示したことから、複合粒子はエンドソームから脱出していないと考えられる。一方下段の GALA-His-ZHER2-BNC/LP の場合は His-ZHER2-BNC/LP とは異なり、カルセインの蛍光が細胞質全体に拡散した様子が確認できる。また

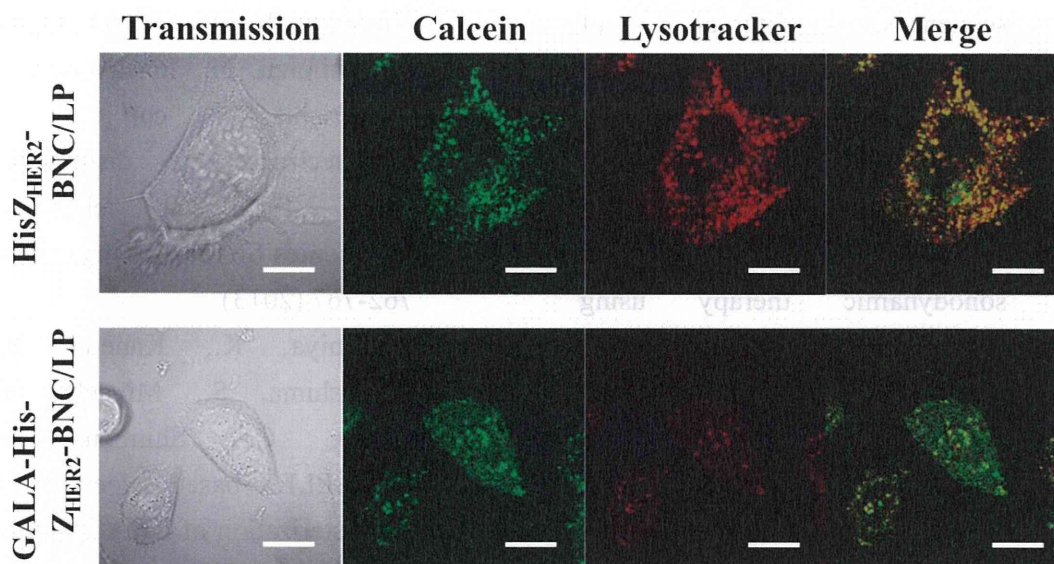


図6 これまでのバイオナノカプセル His-ZHER2-BNC/ LP (upper) とエンドソーム脱出可能なバイオナノカプセル GALA-His-ZHER2-BNC/LP (lower) による細胞への取込の観察 (Scale bars; 20 μ m)

Merge 画像を見ても Lysotracker との共局在は少なく、エンドソームからの脱出に成功したと言える。今後は生理活性分子を封入し、*in vitro* と *in vivo* においてその機能を効果的に発現可能か解析していく必要がある。

E. 結論

細胞への効率的な過酸化チタンナノ粒子の取込方法について条件を見出した。この条件で細胞死滅効果も併せて検討し、細胞死の効率的な誘導も確認できた。

また一方で、酸化物ナノ粒子をカプセル化できる可能性があるバイオ中空ナノ粒子の開発も進行しており、遺伝子工学的手法により培養細胞ないにおいて効率的にエンドソームから脱出し、細胞質内へと標的ナノ粒

子を送りこむ事が出来るバイオ中空ナノ粒子の構築にも成功した。更には、細胞特異的な標的化も可能であることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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(1), 124-129 (2012)
3. Ninomiya, K., Ogino, C., Oshima, S., Sonoke, S., Kuroda, S., Shimizu, N., Targeted sonodynamic therapy using protein-modified TiO₂ nanoparticles, *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 607-614 (2012)
 4. Nishimura, Y., Ishii, J., Okazaki, F., Ogino, C., Kondo, A., Complex carriers of affibody-displaying bio-nanocapsules and composition-varied liposomes for HER2-expressing breast cancer cell-specific protein delivery, *Journal of Drug Targeting*, 20(10), 897-905 (2012)
 5. Nishimura, Y., Mimura, W., Fahimuddin, I., Amino, T., Ishii, J., Ogino, C., Kondo, A., Granting specificity for breast cancer cells using a Hepatitis B core particle with a HER2-targeted affibody molecule, *Journal of Biochemistry*, 153(3), 251-256 (2013)
 6. Nishimura, Y., Takeda, K., Ishii, J., Ogino, C., Kondo, A., An affinity chromatography method used to purify His-tag-displaying bio-nanocapsules, *Journal of Virological Methods*, 189(2), 393-396 (2013)
 7. Ninomiya, K., Aikawa, M., Ogino, C., Shimizu, N., Inactivation of *Escherichia coli* by sonoelectrocatalytic disinfection using TiO₂ as electrode, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(2), 762-767 (2013)
 8. Ninomiya, K., Kaneda, K., Kawashima, S., Miyachi, Y., Ogino, C., Shimizu, N., Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(6), 1797-1802 (2013)
 9. Srivastava, S.K., Yamada, R., Ogino, C., Kondo, A., Sidewall modification of multiwalled carbon nanotubes by *Allium sativum* (garlic) and its effect on the deposition of gold nanoparticles, *Carbon*, 56, 309-316 (2013)
 10. Srivastava, S.K., Yamada, R., Ogino, C., Kondo, A., Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol, *Nanoscale Research Letter*, 8(1), 70 (2013)

2. 学会発表

1. 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, ラジカルを発生する金属酸化物粒子に対する XAFS による非破壊状態分析, 第 72 回分析化学討論会(日本分生化学会), 2012 年 5 月 19 日～20 日(鹿児島大学郡元キャンパス)
2. Chiaki Ogino, Tomokazu Amino, and Akihiko Kondo, DNA aptamer screening and evaluation by AFM, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering (酵素工学研究会), 2012 年 5 月 28 日～30 日(金沢エクセルホテル東急)
 3. 荻野 千秋, AFM を用いた新規核酸分子の探索, 21 世紀を拓くバイオテクノロジーシンポジウム(YABEC2012 実行委員会), 41082(徳島大学工学部)
 4. Yuya Nishimura, Jun Ishii, Fumiyoshi Okazaki, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo, Complex carriers of affibody-displaying bio-nanocapsule and composition-varied liposomes for HER2-expressing breast cancer cell-specific protein delivery, The 15th International Biotechnology Symposium (IBS 2012)(The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering), 2012 年 9 月 16 日～21 日(Daegu Exhibition Convention Center)"
 5. 川嶋 聡, 仁宮 一章, 荻野 千秋, 清水 宣明, Cell SELEX 法により選抜したヒト肝臓由来がん細胞に対する DNA アプタマーの評価, 第 64 回日本生物工学会大会(日本生物工学会), 2012 年 10 月 23 日～26 日(神戸国際会議場)

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24年度終了報告書

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、本年度は以下の研究を中心に行う。

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。

B. 研究方法

1. {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の合成

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、過酸化物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。

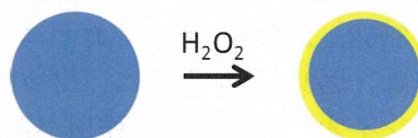


図1. 二酸化チタンから過酸化チタンの合成

アナターゼ型の二酸化チタンでは、{101}面の表面エネルギーは 0.49 J/m^2 、また、{001}面は 0.98 J/m^2 であり、{101}面の2倍となる (*Phys. Rev. B* 63, 155409, 2001)。そのため、{001}面は{101}面より反応性が高いと予想される (*Nat. Mater.* 7, 613, 2008)。一方、図2に示すように、{001}面は高い表面エネルギーを有するため熱力学的安定性が低く、その結晶面制御が非常に困難であることが分かる。

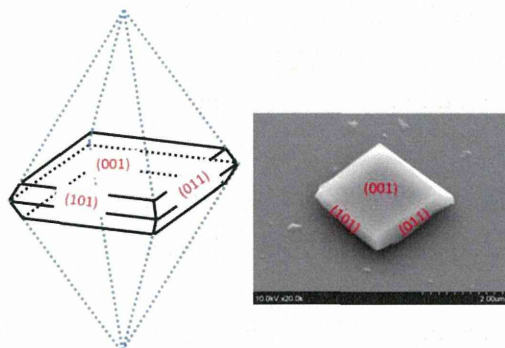


図2. アナターゼ型二酸化チタンの {101} 結晶面と {001} 結晶面

これまでの報告によると、フッ酸をキャッピング剤として用いることで {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の合成が可能である (*Nature*, 453, 638, 2008; *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 3152, 2009)。そのメカニズムとしては、図3に示すように、フッ酸はチタンイオンと強い相互作用があり、チタン粒子の表面に吸着することで {001} 面の結晶成長が抑制されたと考えられる。

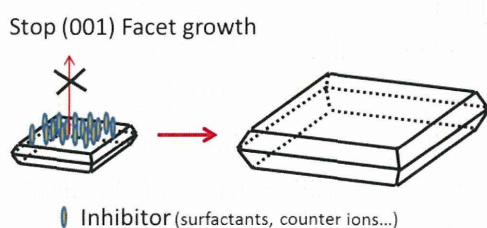


図3. {001} 面の成長メカニズム

一方、フッ酸は危険性が非常に高く、また、これまでの報告によると、キャッピング剤としてフッ酸を用いた場合でも {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御は非常に困

難であった。

そこで本研究では、フッ酸を用いずに、より安全・安心な条件で二酸化チタンナノ粒子のサイズ・形状・結晶面の制御を試みた。具体的に、フッ素を含む有機物をキャッピング剤として選定し、二酸化チタン原料に添加した。なお、TiとFとの割合は1:1とした。攪拌により十分に混合し、白い二酸化チタン前駆体ゾルを得た。この二酸化チタン前駆体ゾルをテフロン反応管中に入れて、180°Cの条件下で水熱反応を6時間で行い、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回行い、その後、80°C・空气中で乾燥し、二酸化チタンナノ粒子を回収した。

2. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御

粒子サイズが減少すると、反応サイトの増大に伴い、放射線照射によるラジカルの更なる発生量の向上が期待できる。本研究ではTiとFとの割合等の諸因子が二酸化チタンのサイズ・形態等に及ぼす影響も併せて検討した。また、コントロール実験として、純水を用いた二酸化チタンの合成も行った。TiとFとの割合としては、1:1、1:1.2、1:1.5、1:1.8、1:2、1:3、1:4、1:6等の合成条件を検討した。なお、以上の合成実験に関しては、全て180°C-6時間の水熱反応を行った。

3. 【001】面を有する二酸化チタン ナノ粒子の触媒活性の評価

これまでの理論計算および実験結果から、{001}面を持つアナターゼ型二酸化チタンナノ粒子は高い触媒活性を有することが確認されている。但し、これまでの報告では、サイズ制御が出来ていないため、更に詳しく検討する必要がある。

そこで本研究では、水熱法で合成した{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の触媒活性を検討した。触媒活性のメカニズムを図4により説明する。太陽光、或いは紫外光を照射すると、二酸化チタンの内部では387 nmより短波長の光が吸収され、価電子帯の電子が伝導帯に励起され、自由電子と正孔を生成する。自由電子と溶液中に溶けた一部の酸素は反応して、酸素ラジカル・ O_2^- を形成する。一方、正孔はOHと結合して水酸化ラジカル・OHを形成する。このように、酸素ラジカルと水酸化ラジカルにより還元・酸化反応が行われ、二酸化チタン表面に吸着した有機色素等が分解される。

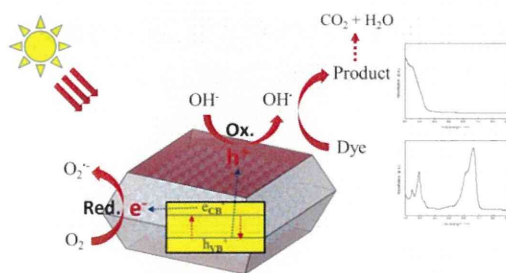


図4. 二酸化チタンの光触媒反応メカニズム

実験としては、200mgの二酸化チタ

ンナノ粒子を200mlの有機色素水溶液(5 mg/l)中に加えて超音波で分散させ、その後、混合溶液に低圧水銀ランプ下で紫外光照射を行った。水銀ランプの出力は210Wである。溶液中に有機色素の濃度の経時変化は吸収スペクトルにより測定した。紫外光照射の開始から5時間の間、各30間隔で吸収スペクトル測定を行い、有機色素の分解速度により二酸化チタンナノ粒子の光触媒性能を評価した。本実験では、図5に示すように、メチレンブルー(methylene blue)、フェノールレッド(phenol red)、クレゾールレッド(cresol red)、ブロモチモールブルー(bromothymol blue)等の4種類の有機色素分子を用いて評価を行った。

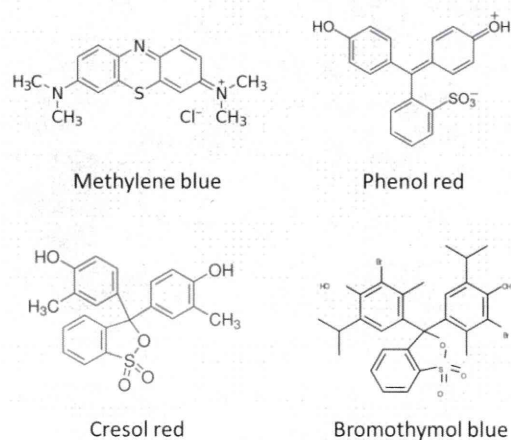


図5. 二酸化チタンナノ粒子の光触媒性能評価に用いた色素分子

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. {001} 面を有する二酸化チタン ナノ粒子の合成

図6aに合成したナノ粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真を示す。6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。また、TEM写真より、2種類の形状の粒子が観察された。一つは四角形状（{001}面：図6b）で、もう一つは棒状（{101}面：図6c）であるが、この棒状粒子は横方向から見た四角形状粒子である。なお、本研究で合成された20nmサイズの{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子は世界最小である。

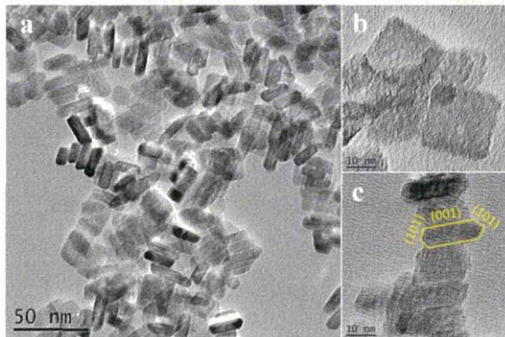


図6. 水熱法で合成した二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti = 1:1、水熱温度 = 180°C、反応時間 = 6 h)

水熱法で合成した {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のX線回折パターンを図7に示す。アナターゼ型の結晶構造が単相で確認できた。

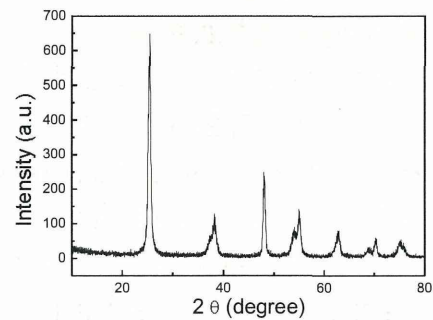


図7. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の粉末回折パターン

図8に得られた二酸化チタンナノ粒子のラマンスペクトルを示す。アナターゼ構造由来の特徴的な E_g 、 B_{1g} 、 A_{1g} 等ピークがはっきりと確認できる。以上の結果により、高反応活性の{001}面を持つアナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の合成に成功した。

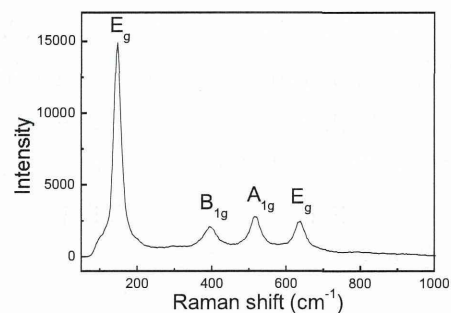


図8. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のラマンスペクトル

2. {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御

F : Ti比を変化させ合成した {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子のTEM写真を図9に示す。F : Ti = 1の場合、約20nmサイズの粒子を合成した。F : Ti比の増大に伴い、粒子サイズも増大することが分かった。F : Ti = 1.2、1.5、1.8、2の場合、得られた粒子サイズは30、50、120、550nmであった。図9fにその変化をまとめた。以上、F : Ti比の制御により {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御に成功した。

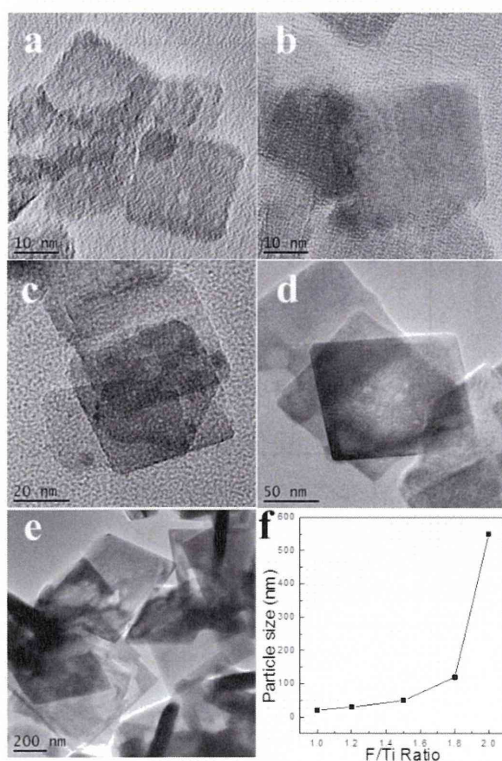


図9. F : Ti比を変化させ合成した {001}面を持つ二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti = a) 1、 b) 1.2、 c) 1.5、 d) 1.8、 e) 2)

3. {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の触媒活性の評価

有機色素の多くは、共役 π 電子系が置換効果によりその吸収スペクトルを移動させたり、また、吸収強度を増大させることで物質の可視領域の吸収が増大すると考えられている。その吸光度は低濃度領域では溶液濃度とリニアな関係を有するため、吸光度から溶液濃度を求めることができる。そのため、二酸化チタンによる有機色素の分解反応は、近紫外-可視光吸収スペクトル測定が最適と考えられる。

図10にはメチレンブルーの近紫外-可視光吸収スペクトルを示した。メチレンブルーは650nm波長付近で特徴的の吸収が現れる。二酸化チタンを触媒として光分解させると、このピークが徐々に弱くなり、最後には消滅した。本研究で合成した {001}面を有する二酸化チタンを用いた場合、光分解反応の速度は速く、約2時間で完全に分解した。一方、市販の代表的な光触媒用二酸化チタンナノ粒子であるP25とST01を用いた場合、どちらも完全分解には約4時間が必要であった。そのため、合成した {001}面を有する二酸化チタンナノ粒子は市販品より優れた触媒性能を持つことが明らかとなった。