

201212003B

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22～24年度 総合研究報告書

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 近藤 昭彦

平成25(2013)年3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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

近藤 昭彦(神戸大学) . . . 1

(1) 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

. . . 4

(2) 酸化物ナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究

. . . 10

(3) 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

. . . 34

(4) 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

. . . 42

(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

. . . 56

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

. . . 63

## 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

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した。

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精度放射線治療を可能とすることを目指した。今回提案した“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、有効な相乗効果が確認でき、マウスを用いた抗腫瘍効果でも十分な成果が確認できた。この手法では、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と期待できる。

### 研究分担者

佐々木 良平（神戸大学大学院 医学系研究科・教授）

荻野 千秋（神戸大学大学院工学研究科・准教授）

田中 勉（神戸大学大学院工学研究科・准教授）

梅津 光央（東北大学大学院工学研究科・准教授）

大原 智（大阪大学接合科学研究所・准教授）

佐藤 和好（群馬大学大学院工学研究科・助教）

高見 誠一（東北大学多元物質科学研究所・准教授）

曾我 公平（東京理科大学基礎工学部材料工学科・教授）

沼子 千弥（千葉大学大学院理学研究科基盤理学専攻化学コース・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・放射線併用療法の実現を目指す（図1）。

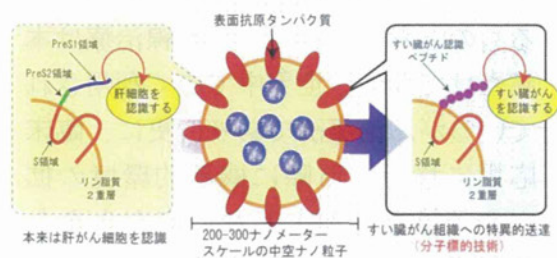


図1. 『スーパーハイブリッド・ナノ粒子』構築

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

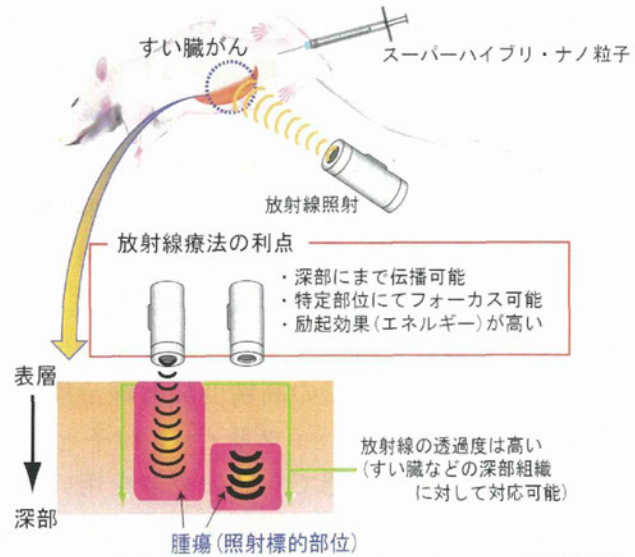


図2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併用利用  
メディシン研究事業に非常に合致する。

## B. 研究方法

本研究では、上記の研究目的を達成するために、以下の5項目について検討を行った。各項目における研究成果の詳細は、次項以降に記載した。

- (1) 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
- (2) 酸化物ナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究
- (3) 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
- (4) 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
- (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

## C. 評価

### 1) 達成度

本研究では、ほぼ当初の研究計画通りに進捗し、有用な知見を得られていると判断する。提案した“スーパーハイブリ・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”に関して、そのラジカル発生機構を解明し、培養細胞及びマウスを用いた抗腫瘍効果の知見が十分に蓄積、今後の臨床展開に向けた基礎知見が集積できたと考える。

### 2) 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。この手法は非侵襲敵であるため、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。

### 3) 今後の展望について

3年間で得られた研究成果を基に、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。

## D. 結論

提案した“スーパーハイブリ・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”に関して、そのラジカル発生機構を解明した。このラジカル発生機構はこれまでに全く報告が無い新規な機構によるものと判断できた。また、本手法を用いて、培養細胞及びマウスを用いた抗腫瘍効果の知見も十分に蓄積できた。今後の臨床展開に向けた基礎知見が集積できたと考える。

(1) 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

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・放射線併用療法の確立を目指す(図1)。

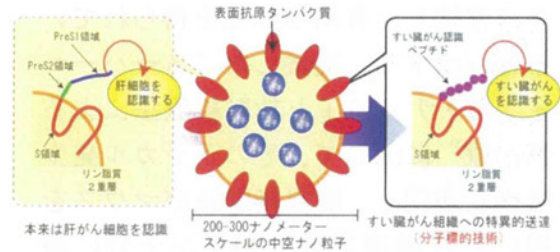


図1. 『スーパーハイブリ・ナノ粒子』構築

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

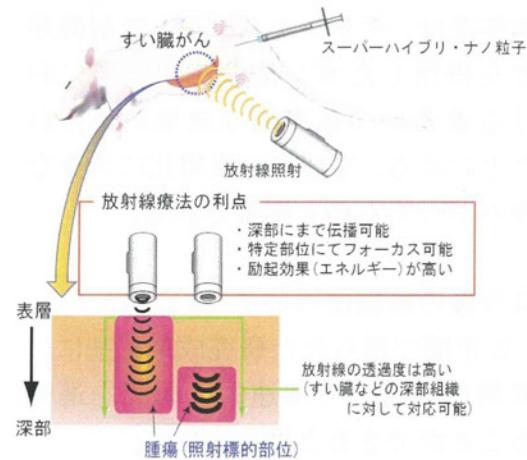


図2. ナノ粒子・放射線療法の *in vivo*での併用利用の利点

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. 実験方法

### 1. チタンナノ粒子のラジカル発生能の確認、評価

作製したチタンナノ粒子の、紫外線、X線を照射したときのラジカル発生能の評価を行った。本実験で用いたチタン粒子の種類は、二酸化チタン、過酸化チタン、ポリアクリル酸修飾過酸化チタンであり、それぞれ市販のSTS-01から作製したもの、四塩化チタンから調製したイオン由来のもの、計6種類の粒子を評価した。本実験では、ラジカル測定の方法としてAPFを用いた。APF(アミノフェニルフルオレセイン)は、ROSの中でもヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )、パーオキシナイトライト( $\text{ONOO}\cdot$ )のような強い活性を持つ活性酸素種を他の活性酸素種から区別して検出できる。

### 2. 細胞内への粒子取り込み時間の評価

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、標的の過酸化チタン粒子と化学的性質によく似た蛍光ナノ粒子を細胞内に取り込ませ、評価した。

### 3. X線照射による細胞毒性の評価

照射するX線の線量によって細胞に対するダメージが異なる。低線量の照射では、現行のレントゲンに代表されるように、細胞や身体には大きなダメージはない。しかし、高線量の照射を行うとDNA近傍で発生したラジカルによってDNAが破壊され、細胞が死滅する。ガンの放射線治療において、根治の為にはガン細胞に高線量のX線を照射が必要になるが、正常細胞へのダメージを考慮すると、できるだけ低線量の照射にとどめることが必要である。本実験ではできるだけ低線量のX線照射でチタン粒子の効果を評価するために、細胞のみに様々な線量のX線を照射し、細胞に対するダメージを評価した。また、細胞のD-PBS(-)の毒性を評価するために、X線照射前にインキュベートする時間を変えて、D-PBS(-)の効果も評価した。



#### 4. PAA-TiO<sub>x</sub>粒子とX線照射を併用した細胞実験

取り込み実験、細胞のみX線照射の実験で得られた取り込み時間、照射線量の条件で、細胞にチタン粒子を添加したときに求められる効果が得られるか、評価した。

### C. 研究結果

#### 1. チタンナノ粒子のラジカル発生能の確認、評価

様々な濃度の過酸化チタンナノ粒子にエネルギー照射を行い、照射量と濃度の関係について評価した。照射エネルギーは、紫外線とX線を用いた。まず、二酸化チタン粒子の一般的な励起源であるUV照射によるラジカル発生を測定した。

二酸化チタンであるTiO<sub>2</sub>(STS-01)ではラジカルはほぼ測定できなかったが、四塩化チタン由来のTiO<sub>2</sub>、TiO<sub>x</sub>はともに多量のラジカルを測定する

ことができた。しかし、UVは身体深部には透過できず、身体表面のガン治療にしか使用することができない。そこで、現在ガン治療でも用いられている放射線を用いて実験を進めた。

X線照射によるラジカル発生を測定した結果を図3に示す。STS-01由来のTiO<sub>2</sub>、TiO<sub>x</sub>は高線量のX線を照射してもラジカルはほとんど測定できなかったが、四塩化チタン由来のTiO<sub>x</sub>は、X線照射の時間を増やすごとにラジカル量が増加した。

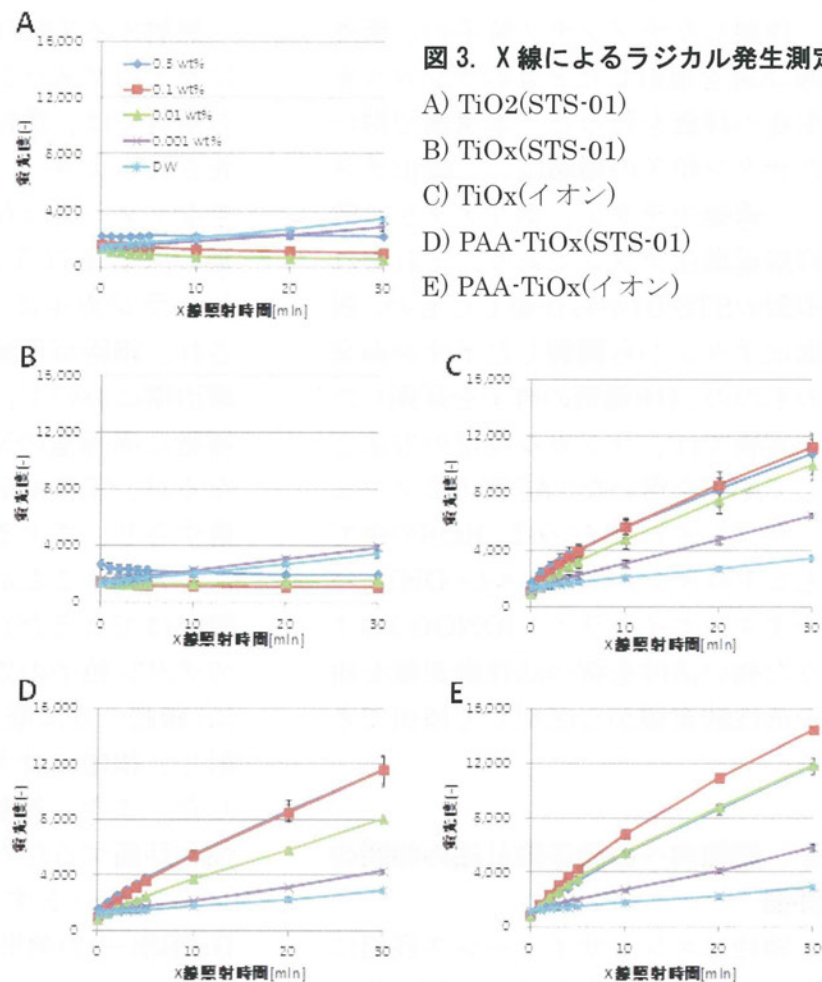


図3. X線によるラジカル発生測定

A) TiO<sub>2</sub>(STS-01)

B) TiO<sub>x</sub>(STS-01)

C) TiO<sub>x</sub>(イオン)

D) PAA-TiO<sub>x</sub>(STS-01)

E) PAA-TiO<sub>x</sub>(イオン)

また、PAA修飾したTiO<sub>x</sub>は、STS-01

由来、イオン由来のものともに X 線照射量に伴ってラジカル量が大きく増加した。濃度については、濃度依存的にラジカル量が多くなった。

TiO<sub>2</sub>(STS-01)、STS-01 由来の TiO<sub>x</sub>でラジカルがほとんど測定できなかったのは、構造が安定しているからだと考えられる。

TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>x</sub>は凝集しやすく、身体に導入すると血栓などの原因になってしまう。そこで、チタン粒子表面にマイナス電化を持つ-COOH基を修飾し、粒子同士の凝集を防いだ。しかし、構造的にPAA修飾した粒子のラジカル量は、修飾していない粒子に比べると減少するはずであるが、PAA-TiO<sub>x</sub>(STS-01)、PAA-TiO<sub>x</sub>(イオン)ともに修飾していない粒子よりもラジカルが発生しているという結果になった。この機構については解明できていないが、十分なラジカルが確認できたので、次に細胞に導入して評価を行った。

## 2. 細胞内への粒子取り込み時間の評価

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に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、

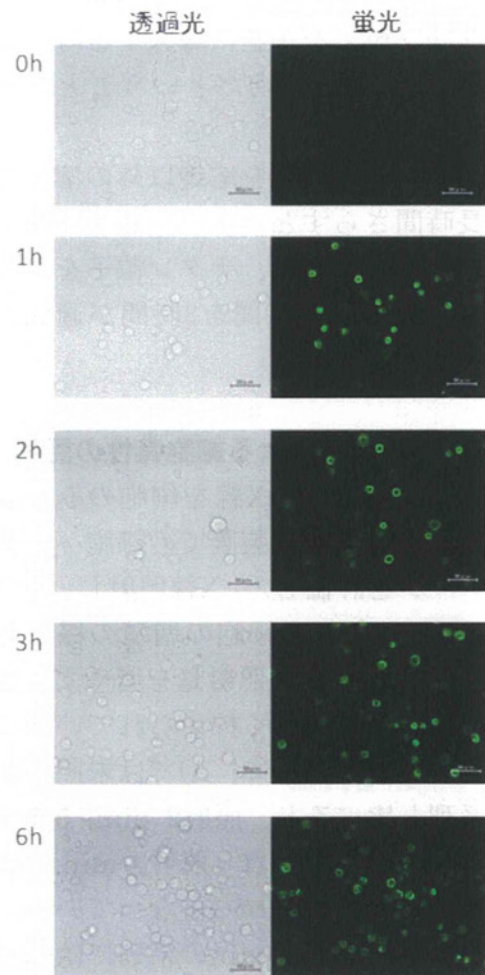


図4. 蛍光粒子を用いた細胞内への取り込みの観察

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。

### 3. X線照射による細胞毒性の評価

様々な線量のX線を細胞のみに照射し、使用する装置での細胞へのダメージを評価した。X線照射し、その後5日目までの細胞の増殖の様子を図5に示す。X線照射量を増やすと細胞の増殖が大きく抑えられていることが分かる。特に、A)では未照射の系列と比べると、照射2 min, 5日目の時点で約2分の1、照射3 min, 5日目の時点で約4分の1となっている。照射5 min, 10 minの系列では細胞の増殖はあまり見られなかった。照射10 minの系列については、2日目

をピークにどんどん細胞数が減少していることから、X線照射によって細胞がアポトーシスを起こしているのではないかと予想出来る。なお、チタン粒子を用いた実験を行う際、適量と判断される、2, 3 minの照射を主に行うこととする。以上より、本実験で用いたX線照射装置によるX線の細胞毒性は十分にあることが分かる。

### 4. PAA-TiO<sub>x</sub>粒子とX線照射を併用した細胞実験

ラジカルが発生することが確認された PAA-TiO<sub>x</sub>(STS-01), PAA-TiO<sub>x</sub>(イオン)を細胞に導入し、X線照射を行い、5日目までの細胞生存率を生菌数によって評価した。その結果、生菌数に差異が確認できた((3)項を参照)。従って、培養細胞系での本手法の適用性が立証できたと判断した。

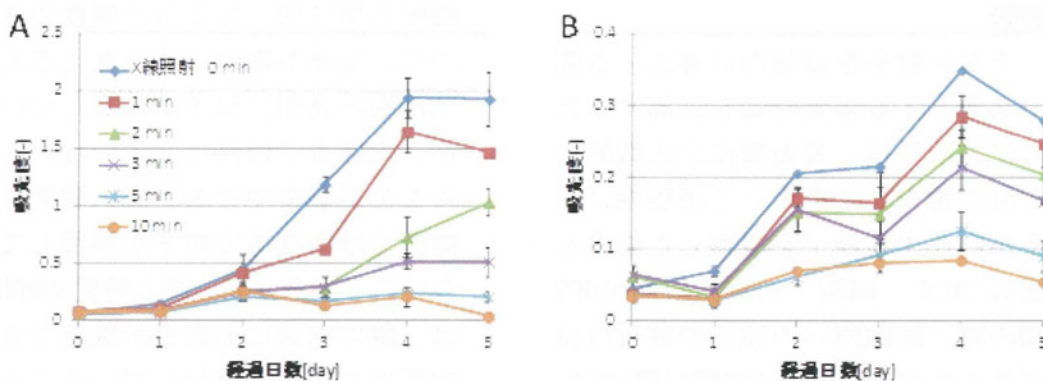


図 5. X線照射による細胞毒性の評価

A) X線照射前 1 h インキュベート B) X線照射前 3 h インキュベート

#### D. 考察

提案した“スーパーハイブリ・ナノ粒子と放射線療法による癌治療”に関して、これまで試験管内でラジカル発生は確認できたいたが、培養細胞での効果も確認できた。しかしながら、培養細胞への効果が、期待した程度まで現れておらず、評価系の今後の更なる軽量が必要であると考える。

#### E. 結論

UV、X線照射によって二酸化チタン、過酸化チタン、ポリアクリル酸修飾過酸化チタンの照射量や濃度に依存するラジカル発生能を確認した。また、蛍光粒子を用いた取り込み実験で、細胞が3時間以上かけてナノ粒子を取り込んでおり、その細胞がX線照射量に依存して細胞死を起こしており、5日目で細胞数を半減させるには2 minの照射量が必要なことを確認した。

今後、更に効率を向上させるために、細胞内にPAA-TiO<sub>x</sub>を導入しX線照射する条件を検討し、PAA-TiO<sub>x</sub>の細胞内におけるラジカル発生能の効果を確認していく。また、PAA-TiO<sub>x</sub>に抗EGFR抗体を固定化し、ガン細胞に特異的にチタン粒子を送達しX線照射を行うことで正常細胞のダメージをできるだけ小さくできるよう、ナノ粒子の再開発も必要と考える。

## (2) 酸化物ナノ粒子の高次構造と分散制御に関する研究

### A. 研究目的

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

二酸化チタンナノ粒子の合成は水熱合成法等の液相プロセスで主に行う。その代表的合成プロセスを図1に示す。まず、二酸化チタンの前駆体となる0.02モル量の四塩化チタンを10mlの蒸溜水中に加えた。次に、30ml

の水酸化テトラメチルアンモニウム (tetramethylammonium hydroxide, TMAH) と混合し、さらに適当量の水を添加することで、50mlの水酸化チタン分散液を得た。次に、この水酸化チタン分散液を50mlのテフロン反応管中に入れて、所定の条件下（例えば125°C-1時間）で水熱反応を行い、二酸化チタンナノ粒子を合成した。得られた二酸化チタン分散液は150mlのエタノールを使って洗浄し、その後、遠心分離を行った（遠心速度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。以上のプロセスにより、二酸化チタン粒子表面からTMAHを取り除いた。

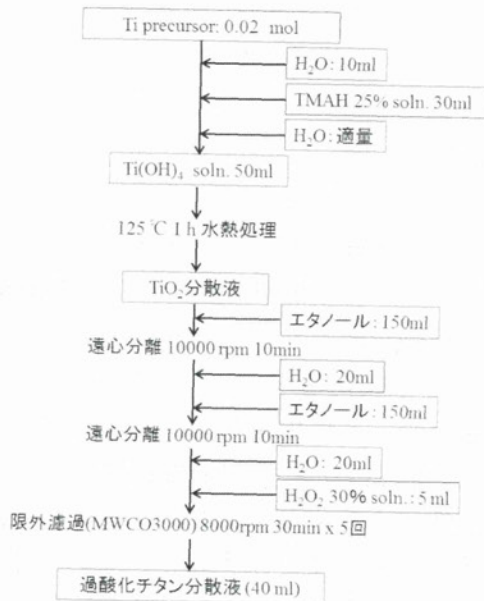


図1 二酸化および過酸化チタンナノ粒子の合成プロセス

## 2. 過酸化チタンナノ粒子の合成

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

## 3. 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

二酸化チタンから過酸化チタンへの合成ルートは、one-stepの酸化処理であり、その反応時のナノ粒子のサイズ・形態制御は非常に難しいことが予測された。そこでまず、二酸化チタン

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

## 4. {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。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。

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  $0.49 \text{ J/m}^2$ 、また、{001} 面は  $0.98 \text{ J/m}^2$  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。

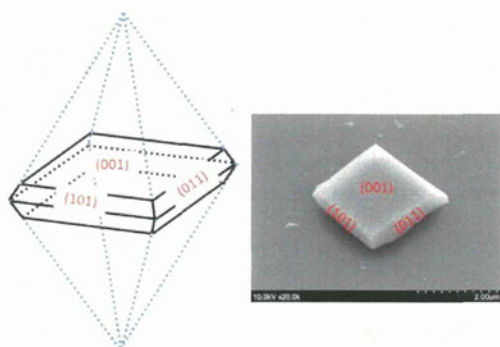


図2 アナターゼ型二酸化チタンの {101} 結晶面と {001} 結晶面

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。

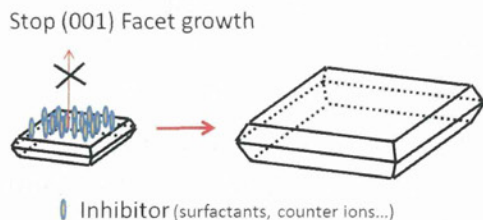


図3 {001} 面の成長メカニズム

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。

## 5. {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。

## 6. {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<sup>-</sup>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。

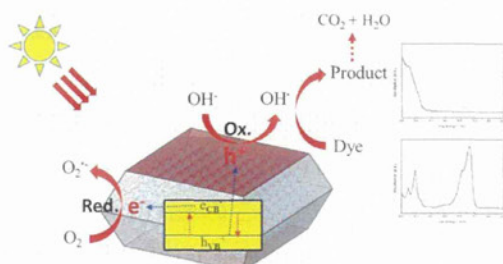


図4 二酸化チタンの光触媒反応メカニズム

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。

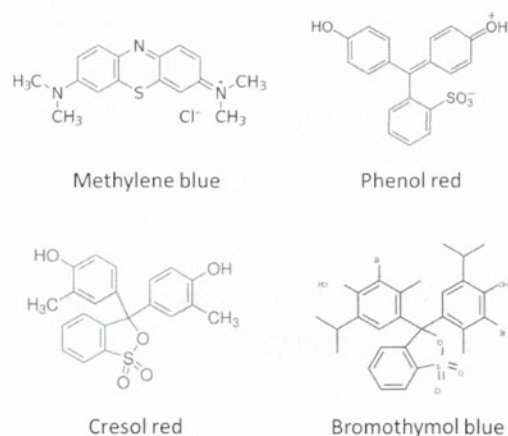


図5 二酸化チタンナノ粒子の光触媒性能評価に用いた色素分子



## 7. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾

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

## 8. 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6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  $\mu$ 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バッファー（pH7.4、NaCl 150 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4 mL中に過酸化チタンナノ粒子HEPES分散液2 mLを添加し、超音波で3分間の処理を行いwater/oil型のエマルションを形成させた。このwater/oil型のエマルションを200mLのHEPESバッファー中に素早く添加し、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。

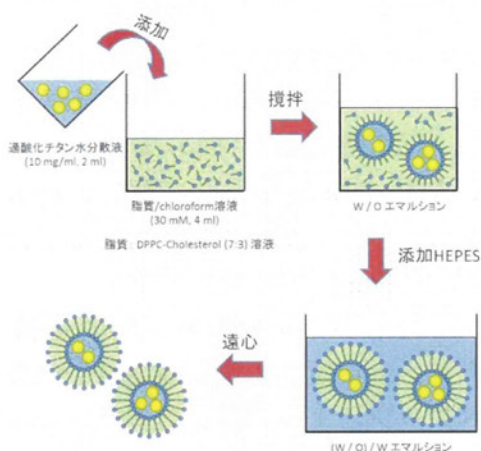


図6 過酸化チタンナノ粒子を内包したリポソームの作製プロセス

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、論理面へ配慮は特に必要とするものでない。

## C. 研究結果

### 1. 二酸化チタンナノ粒子の合成

図7に水熱反応法により合成した代表的な二酸化チタンナノ粒子の高分解能透過電子顕微鏡（TEM）写真を示す。なお、二酸化チタンの生成（結晶構造）は粉末X線回折パターンより確認した。TEM写真より格子像がはっきりと確認でき、合成したナノ粒子の結晶性は十分に高いものと思われる。ま

た、1時間の水熱反応で得られたナノ粒子のサイズは、図8に示すように、 $3 \pm 1.1 \text{ nm}$ であった。以上の結果、水熱反応法により単分散な二酸化チタンナノ粒子が合成できることが分かった。

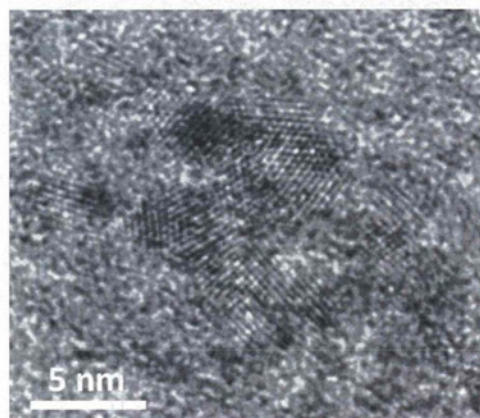


図7 二酸化チタンナノ粒子の高分解能TEM写真（チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h）

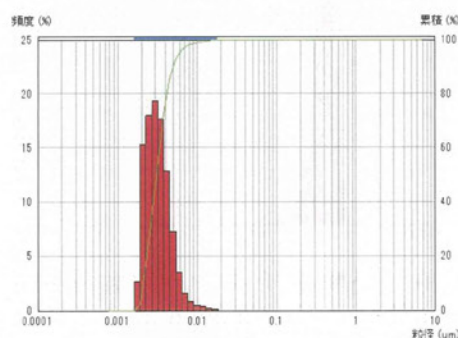


図8 動的散乱法により評価した二酸化チタンナノ粒子のサイズ分布（チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h）

### 2. 過酸化チタンナノ粒子の合成

図9に二酸化チタン（図7）の過酸化水素処理により得られた過酸化チタンの高分解能TEM写真を示す。粒子表面近傍には、過酸化チタン生成に起因する新規な結晶相やアモルファス相

は観察されなかった。また、過酸化チタンナノ粒子のサイズ分布を図10に示す。過酸化処理による粒子のサイズの変化はほとんど確認されなかった。

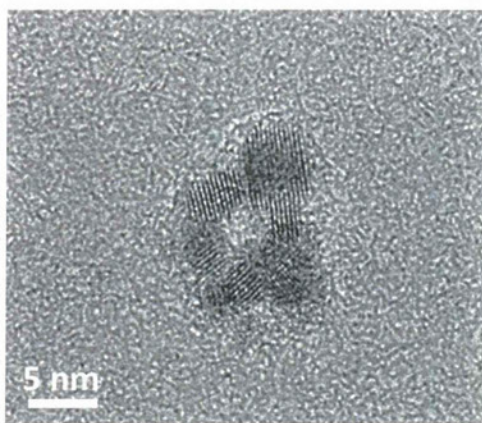


図9 過酸化チタンナノ粒子の高分解能TEM写真 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h)

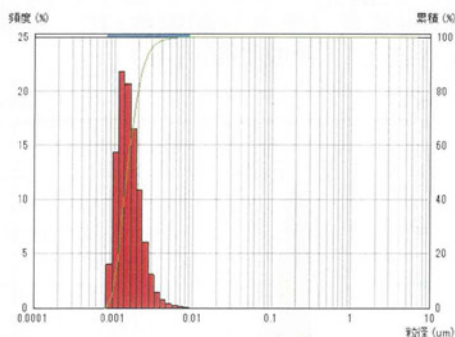


図10 過酸化チタンナノ粒子のサイズ分布 (チタン前駆体=TC、合成温度=125°C、合成時間=1 h)

### 3. 過酸化チタンナノ粒子のサイズ・形態制御

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

図11に四塩化チタンをチタン前駆体として用いて合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真を示す。水熱反応時間が1時間の場合、約2-3ナノメートルサイズの過酸化チタンナノ粒子 (図9、図11A) が生成したが、水熱反応時間が長くなるに従い、図11B-Dに示すようにサイズが段々と大きくなることが分かった。また、ナノ粒子の形状が棒状になることが観察された。反応時間が4時間の場合の粒子サイズは、動的光散乱法で解析した結果35nmであり、反応時間が12時間と24時間では83nmと85nmであった。

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

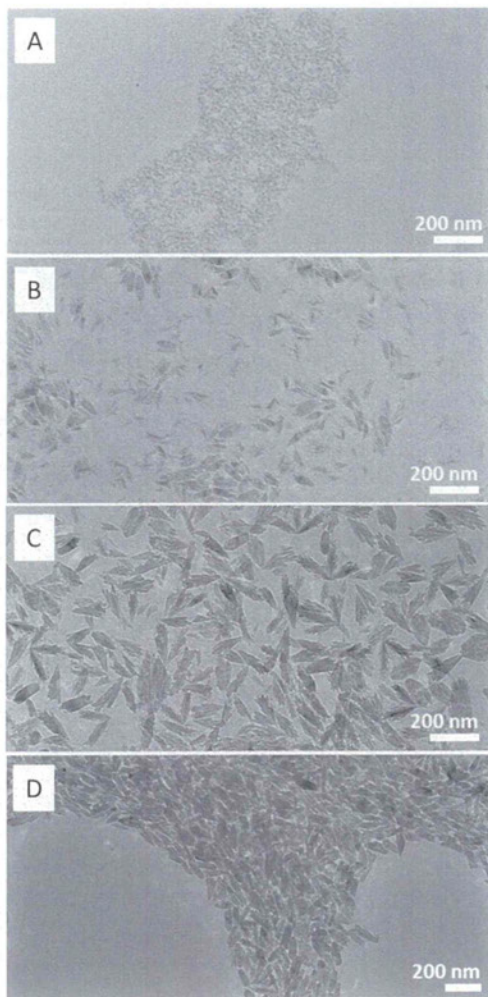


図11 水熱反応時間を変化させて合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (A=1 h、B=4 h、C=1 h、D=24 h)

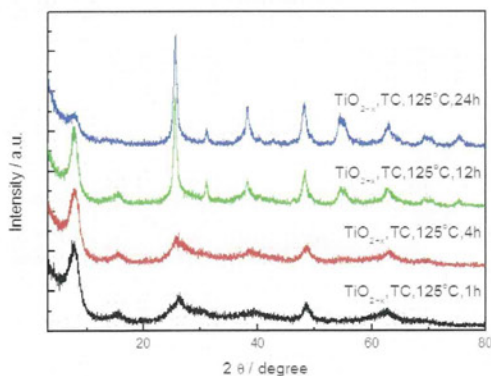


図12 水熱反応時間を変化させて合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

次に、チタンイソプロポキシド (TP) を前駆体として合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真を図13に示す。水熱反応が1時間の場合、四塩化チタンを用いた場合と同じように、約3nmサイズの過酸化チタンナノ粒子が得られた。また、水熱反応時間を長くすることで、ナノ粒子のサイズが大きくなることが確認された。さらに、反応時間が長くなるに従い、粒子の形状は異方性が大きくなり、24時間の反応で幅約10nm、長さミクロンオーダーのナノベルト (図13D) が合成できた。図14に得られた過酸化チタンのX線回折パターンを示す。いずれのサンプルも  $2\theta=8^\circ$  で強いピークが現れ、そのため、チタンイソプロポキシド (TP) を前駆体として合成した過酸化チタンは全てナノシート構造を有するものと考えられる。

さらに、チタンn-ブトキシド (TB) を前駆体として過酸化チタンナノ粒子の合成も試みた。図15にTEM写真を図16にX線回折パターンの結果をそれぞれまとめた。チタンn-ブトキシドを前駆体とした場合、チタンイソプロポキシドと同じ水熱条件下 (温度、時間) で合成すると、ナノ粒子のサイズ・形態・結晶構造等は、ほぼ同様な結果となることが分かった。これは、イソプロポキシドとブトキシドは有機分子であり、水熱反応時に同じような特異な微小反応場を創出しているものと思われる。