

図13 チタンイソプロポキシド (TP) から合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (合成時間: A=1 h、B=4 h、C=12 h、D=24h、合成温度=125°C)

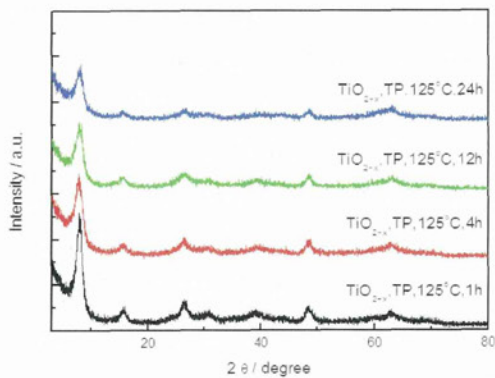


図14 チタンイソプロポキシド (TP) から合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

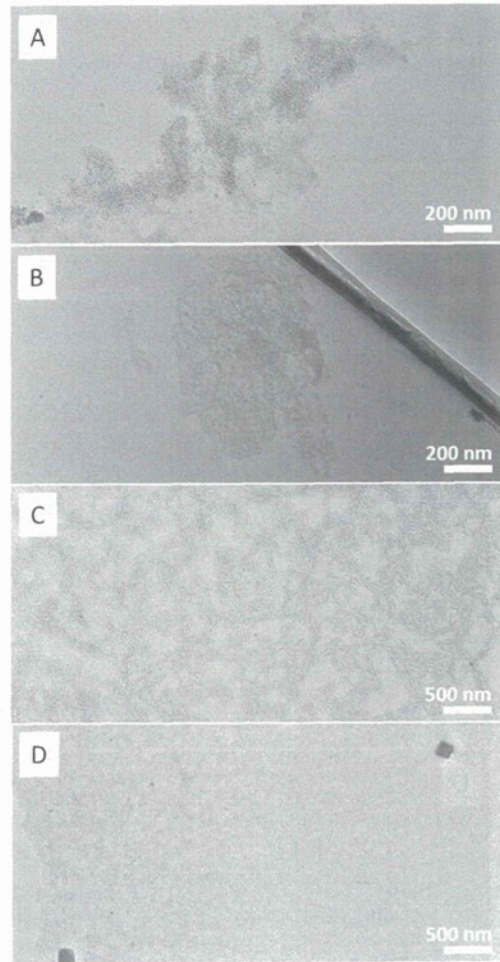


図15 チタンn-ブトキシド (TB) から合成した過酸化チタンナノ粒子のTEM写真 (合成時間: A=1 h、B=4 h、C=12 h、D=24h、合成温度=125°C)

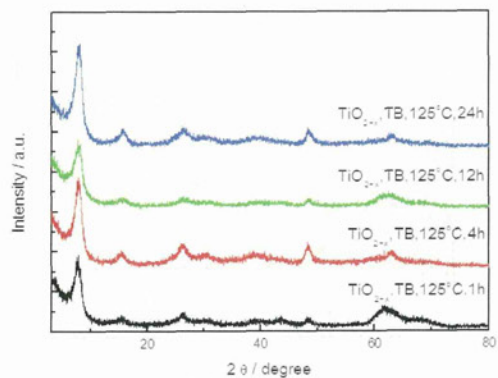


図16 チタンn-ブトキシド (TB) から合成した過酸化チタンナノ粒子のX線回折パターン

4. {001} 面を有する二酸化チタン ナノ粒子の合成

図17a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17b）で、もう一つは棒状（{101} 面：図17c）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。

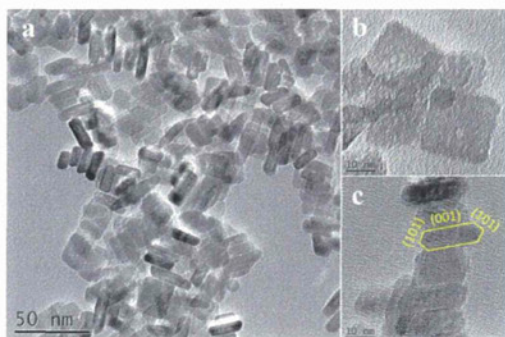


図17 水熱法で合成した二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti = 1:1、水熱温度 = 180°C、反応時間 = 6 h)

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18に示す。アナターゼ型の結晶構造が単相で確認できた。

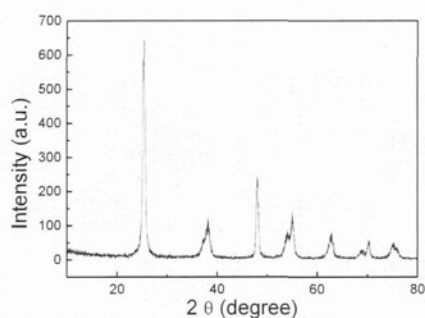


図18 {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の粉末回折パターン

5. {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19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。

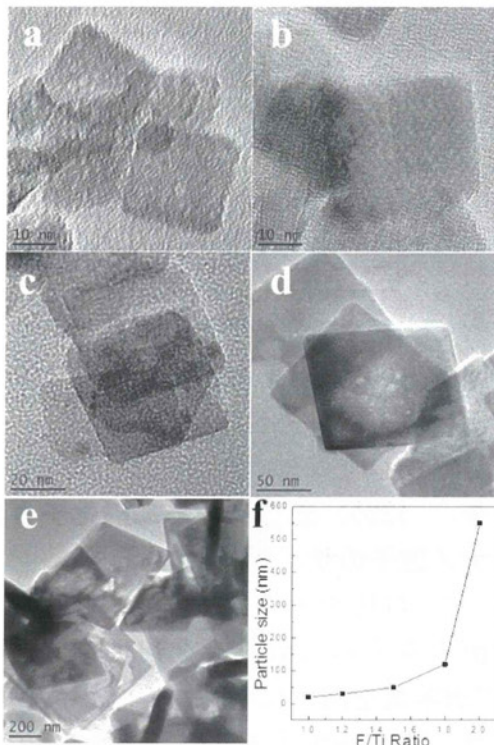


図19 F : Ti比を変化させ合成した {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti=a) 1、 b) 1.2、 c) 1.5、 d) 1.8、 e) 2)

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

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20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。

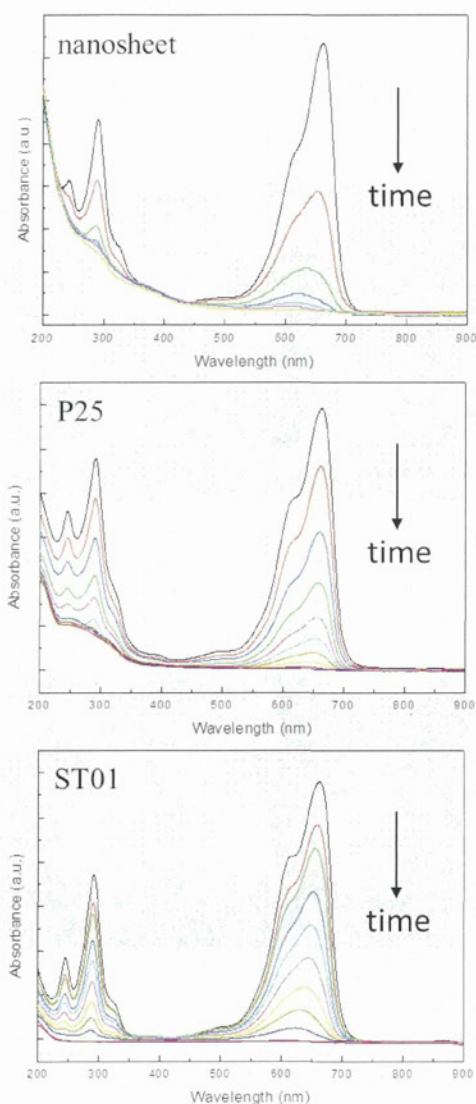


図20 メチレンブルーの近紫外-可視光吸収スペクトル (Nanosheetは{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti=1)。P25とST01は市販の光触媒用二酸化チタンナノ粒子)

合成した {001} 面を有するサイズの異なる二酸化チタンナノ粒子とP25及びST01ナノ粒子によるメチレンブルーの分解反応速度を図21にまとめた。合成した二酸化チタンナノ粒子は、

サイズが小さい程、反応速度が速いことが明らかとなった。また、殆どの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子は、市販品のP25及びST01より高性能であることが分かった。なお、P25とST01は市販の二酸化チタンナノ粒子の中でも、特に性能の良いものであり、サイズはP25は25 nm、ST01は数nmと、どちらも極めて小さい。しかしながら、その性能はサイズが120nmの {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のものより低く、そのため、{001} 面は非常に高い触媒活性を有すると考えられる。

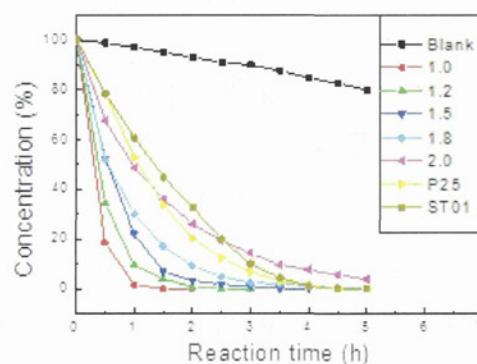


図21 種々の二酸化チタンナノ粒子によるメチレンブルーの光分解

7. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾

本研究で合成される過酸化チタンナノ粒子は、水中ではpH制御により良好分散が可能である。一方、生体環境中ではリン酸基等の各種イオンが存在するため、その分散挙動の把握が必要となる。そこで本研究ではまず、リン酸バッファ中での過酸化チタンナノ粒子の分散性を評価した。具体的な実

験方法としては、10vol%の過酸化チタンナノ粒子分散液を90vol%のリン酸バッファ中に注入し、超音波で分散した後の過酸化チタンナノ粒子の沈殿・凝集挙動を観察した。

図22は表面が未修飾の過酸化チタンナノ粒子の分散挙動の結果である。それぞれ、四塩化チタン、チタンイソプロポキシド、チタンn-ブトキシドから水熱反応1時間で合成した過酸化チタンナノ粒子である。未修飾の過酸化チタンナノ粒子は全て、リン酸バッファ中では容易に凝集することが確認された。

次に、表面修飾した過酸化チタンナノ粒子の分散挙動を図23に示す。なお、本実験ではまず、表面修飾法として過酸化チタンナノ粒子と表面修飾剤を超音波で単純に混合する簡易な手法を採用した。表面修飾剤としては、SDS、SDC、PAAといったいずれもアニオン性界面活性剤を用いた。図18の結果から、本超音波表面修飾法では過酸化チタンナノ粒子と界面活性剤の接合が上手く達成できず、リン酸バッファ中の分散性はあまり改善されなかった。

そこで、熱処理表面修飾法（詳細は本報告書のB研究方法に記述）によりPAAを過酸化チタンナノ粒子に接合させた。PAA2000（平均分子量=2000）とPAA5000（平均分子量=5000）、PAANH₄（平均分子量=7000）とPAANa（平均分子量=8000）の4種類のPAA誘導体を用いた。PAA2000とPAA5000は有機酸であり、また、PAANH₄とPAANaはニュートラルに近い有機塩である。図24の結果、

PAA酸を表面修飾した場合、過酸化チタンナノ粒子はリン酸バッファ中でも殆ど凝集せず、良好な分散挙動を示すことが分かった。

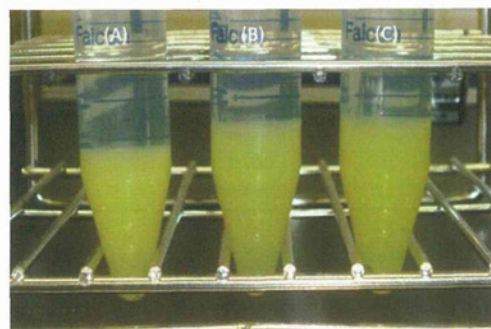


図22 表面未修飾の過酸化チタンナノ粒子のリン酸バッファ中での分散挙動（異なるチタン前駆体から合成：A=TC、B=TP、C=TB）

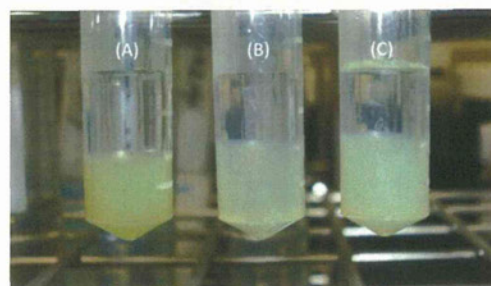


図23 簡易超音波法で表面修飾した過酸化チタンナノ粒子のリン酸バッファ中での分散挙動（修飾剤：A=SDS、B=SDC、C=PAA2000）

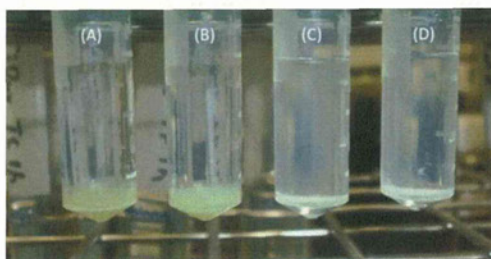


図24熱処理法で表面修飾した過酸化チタンナノ粒子のリン酸バッファ中での分散挙動（修飾剤：A=PAA-NH₄、B=PAA-Na、C=PAA2000、D=PAA5000）

8. 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=1h）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25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。

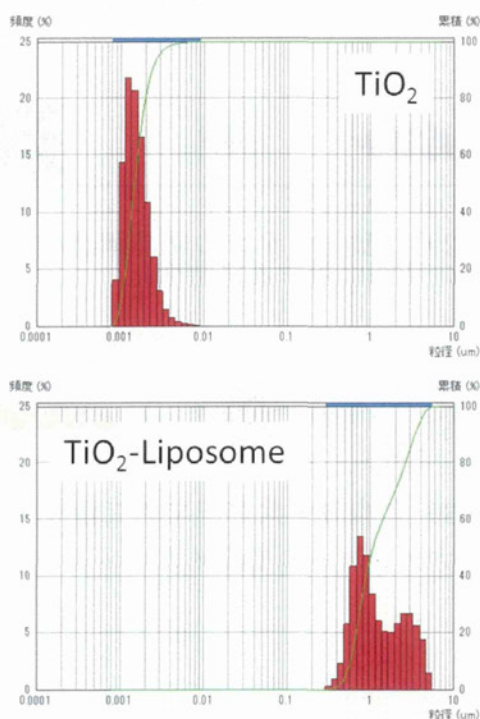


図25 動的光散乱法により評価した過酸化チタンナノ粒子とナノ粒子を内包させるリポソームのサイズ分布

実際にナノ粒子を内包せたりポソーム水中分散液の光学顕微鏡写真

は図26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。

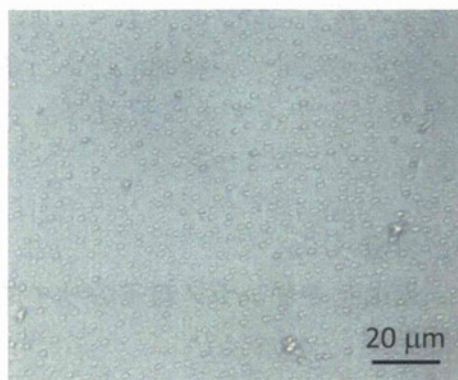


図26 ナノ粒子を内包せたりポソームの光学顕微鏡写真

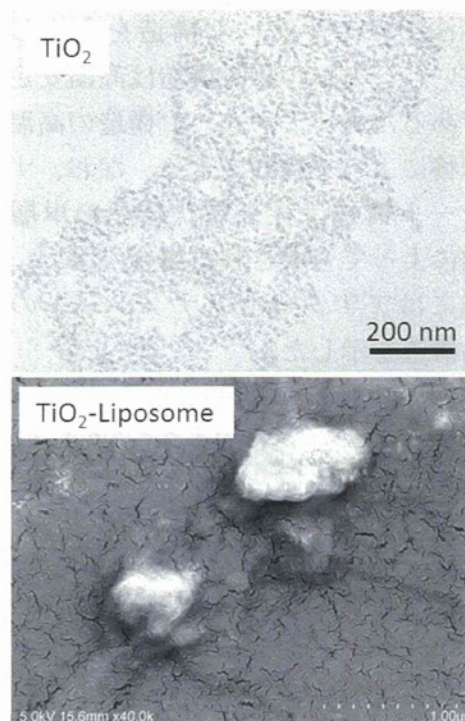


図27 過酸化チタンナノ粒子（写真上）を内包せたりポソームの走査型電子顕微鏡写真

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27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25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. 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28にはアナターゼとナノシートの結晶構造を示した。

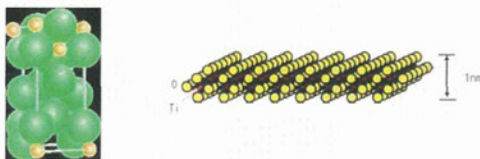


図28 二酸化チタンのアナターゼとナノシート結晶構造

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29に示す。反応の

最初階段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 $[Ti(OH)_4]$ 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30参考）。



図29 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

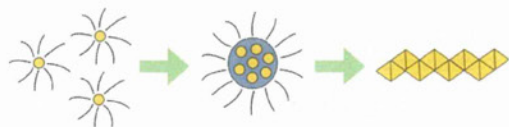


図30 有機分子共存下での二酸化チタンナノシートの生成メカニズム

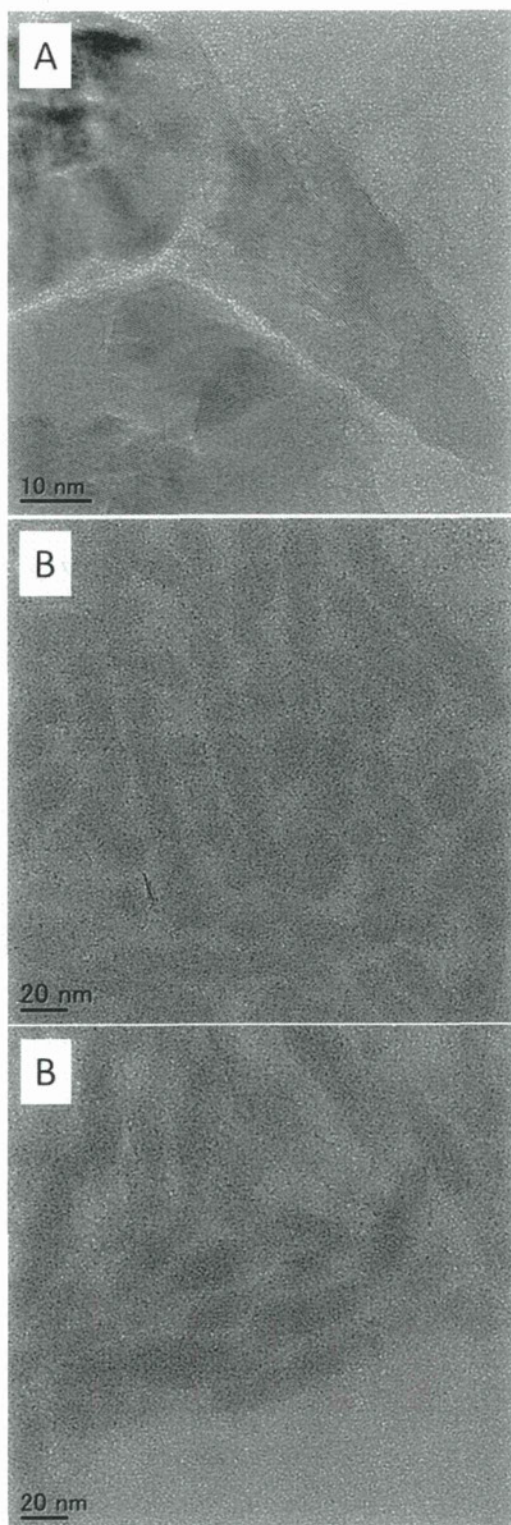


図31 過酸化チタンの高分解能TEM写真(チタン前駆体:A=TC、B=TP、C=TB。水熱反応条件=125°C-12h)

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31に示した。四塩化チタンから作ったナノシートは、図31A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14と図16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32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事が分かる。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。

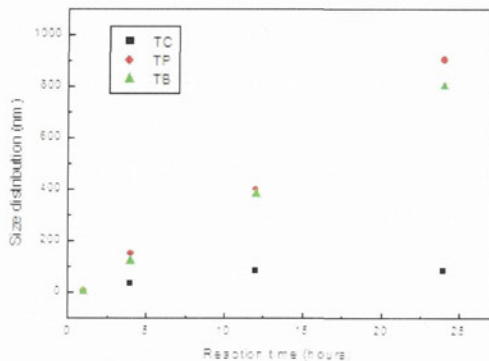


図32 過酸化チタンナノ粒子のサイズと水熱反応時間との関係

2. {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御

フッ素が二酸化チタンの {001} 面に優先的に吸着するため {001} 面が保持できるとも考えている。そこで、フッ素の {001} 面への吸着量を検討した。

フッ素の吸着量は二つの方法で測定した。一つはEDS定量分析法で、もう一つは熱重量分析法 (TG-DTA) を用いた。図33に合成した二酸化チタンナノ粒子のDG-DTA結果を示す。二つの重量損失が確認できる。100°C前後の重量損失は表面に吸着した水分に由来するもの、また、200°Cから700°Cまでの損失はフッ素に由来するものと考えられる。

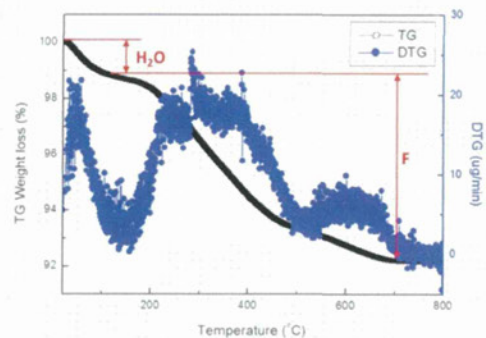


図33 合成した二酸化チタンナノ粒子のDG-DTA曲線

これら二つ方法で測定したフッ素の吸着量を図34にまとめた。フッ素の吸着量は約5-10wt%であることが分かった。また、TG-DTA法を用いた場合、フッ素の吸着量はF/Tiの増大に伴い減少する傾向を示した。一方、EDSを用いた場合、フッ素の吸着量はばらついた。そのためフッ素吸着量の定量分析にはTG-DTA法が適していると考えられる。

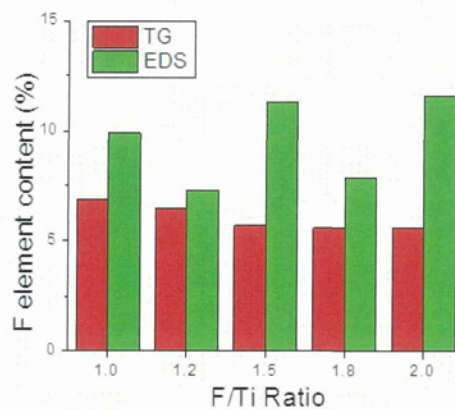


図34 F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子のフッ素吸着量

比表面積が大きくなると、反応サイトが多くなり触媒性能は一般的に向上する。そこで、合成した二酸化チタンナノ粒子の比表面積を測定した。測定はBET法により行った。結果を図35に示す。F : Ti比が1の時、粒子サイズは約20nmであり、その比表面積は約120 m²/gがあった。F : Ti比の増大に伴い、粒子サイズが大きくなり、比表面積も大きくなった。

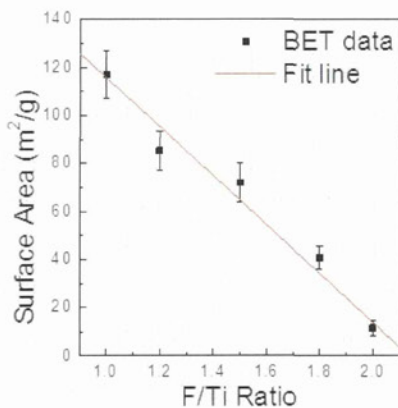


図35 F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子の比表面積

一般的に、{001}面は{101}面より表面エネルギーが高く、また、反応活性も高い。そのため、触媒性能への影響を考えると、{001}面の割合は非常に重要なパラメーターである。そこで、ナノ粒子の全表面積に対して{001}面の占める割合を試算した。試算方法は、図36に示すように、高分解能TEMで一つ一つの粒子を観察しながら、粒子の各辺の長さを測定して面積を算出した。F : Ti比を変化させ水熱反応で合成した二酸化チタンナノ粒子の

{001}の割合を図37にまとめた。粒子サイズの増大に伴い、{001}面の割合も増加することが分かった。20nmの粒子(F : Ti=1)は{001}の面積割合は約52%であり、また、550nmの場合(F : Ti=2)は76%であった。

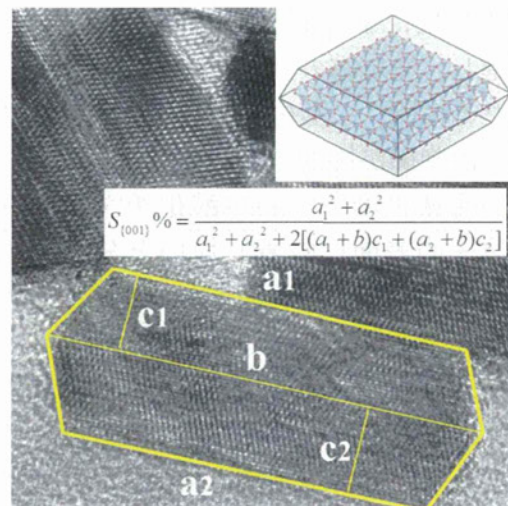


図36 ナノ粒子の高分解能TEM写真と面積の試算方法

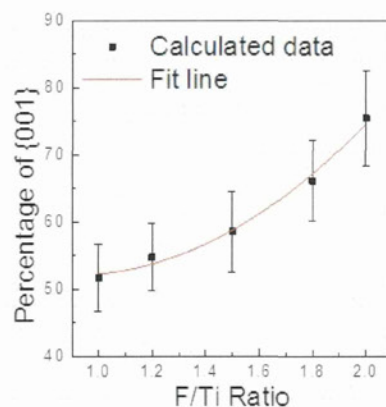


図37 F : Ti比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子の{001}面の割合

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

光照射で励起された電子と空孔は、通常は直ちに再結合し熱に変わり光反応の効率を下げってしまう。但し、空孔は {001} 面に、電子は {101} 面に優先的に存在するため、結晶面の空間的効果により電子と空孔の分離を促進し、光反応の効率を向上でき、そのためには、二酸化チタンナノ粒子の結晶面制御が極めて重要である。

有機色素分子が二酸化チタンナノ粒子の表面に吸着しないと分解反応は進まない。二酸化チタン表面への色素分子の吸着は、Langmuir-Hinshelwood modelで理論的に理解されている。それによれば、色素分子の濃度が非常に薄い場合、反応の動力学速度は下記の式で表される：

$$\ln(C_0/C) = kKt = K_{app}t$$

ここで、 t は反応時間、 C_0 は初期濃度、 C は反応時間 t 時の濃度、 K_{app} は擬一次速度定数である。各反応時間の色素濃度を測定することで、 K_{app} が導かれる。一般的に、二酸化チタンの光触媒の反応活性は、この擬一次速度定数により評価できる。

F : Ti 比を変化させ合成した二酸化チタンナノ粒子のメチレンブルーの光分解反応に関する $\ln(C_0/C)$ の経時変化を図 38 に示す。各直線の斜率は擬一次速度定数 K_{app} である。この図 38 より、{001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子は、市販の P25 と ST01 の触媒性能を凌駕することが再確認できた。

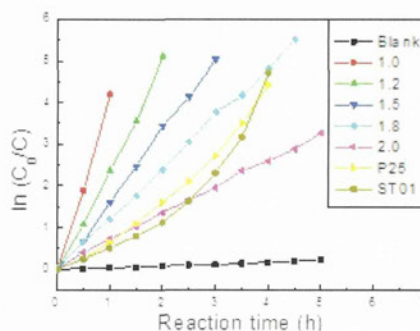


図 38 種々の二酸化チタンナノ粒子の $\ln(C_0/C)$ と t の関係

また、触媒活性は比表面積と深く関係がある。図 38 より得られた K_{app} は重量当たりの値である。そこで、表面積当たりの性能比較も検討した。図 39 に、種々の二酸化チタンナノ粒子の比表面積 SA、 K_{app} 、 K_{app}/SA をまとめた。ST01 は比表面積が圧倒的に大きいにも関わらず、重量当たり (K_{app}) と表面積当たり (K_{app}/SA) の性能はどちらも相対的に低いものとなった。重量当たりの触媒性能に関しては、20nm サイズの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子 (F : Ti=1) が最も優れた。一方、表面積当たりの性能に関しては、550nm サイズのものが最も優れた。その理由としては、{001} 面の割合は最も多いためと考えられる。

図 40 には、20nm サイズの {001} 面を持つ二酸化チタンナノ粒子と市販の ST01 に関して、4 種類の有機色素に対する分解反応の K_{app} と K_{app}/SA を示した。これからも、合成した {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子は

ST01 より性能が優れていることが確認できた。

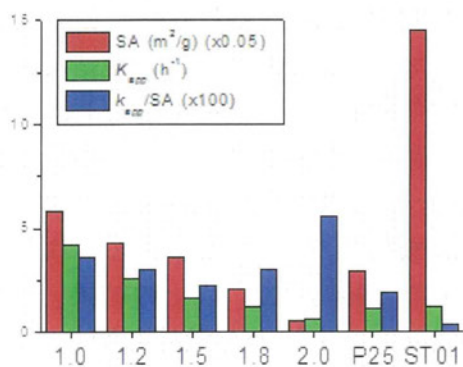


図 39 種々の二酸化チタンナノ粒子の比表面積 SA、 K_{app} 、 K_{app}/SA の比較

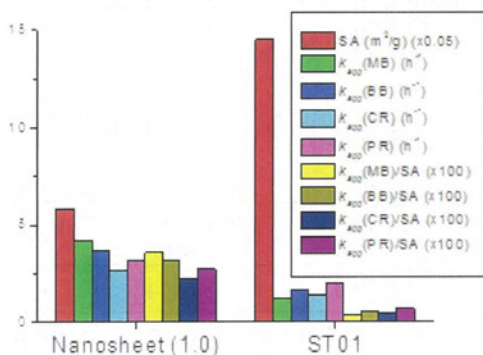


図 40 4 種類の有機色素に対する分解性能 (Nanosheet は {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子 (F:Ti=1)。ST01 は市販の光触媒用二酸化チタンナノ粒子)

なお、応用の観点から触媒の安定性は非常に重要である。そこで本研究では、二酸化チタンの触媒安定性を検討した。安定性は一つのサンプルに関して繰り返し実験を 5 回行った。図 41 に示すように、サイズが 100nm 以下の

場合、合成したナノ粒子 (F:Ti=1.0, 1.2, 1.5) 及び市販のナノ粒子に関して、どちらも共に色素分解の半減期がほぼ一定に維持し、触媒としての高い安定性が確認できた。一方、サイズが 100nm 以上の二酸化チタン (F:Ti=1.8, 2.0) の場合、半減期が繰り返しサイクルが増加するに伴い長くなる傾向が明らかに見られた。

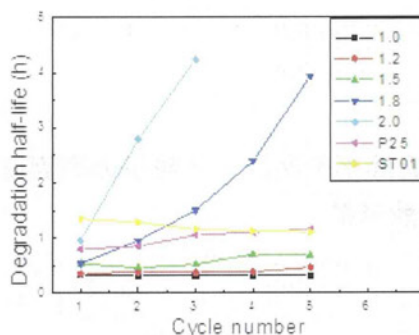


図 41 メチレンブルー分解に対する種々の二酸化チタンナノ粒子の安定性

さらに、それぞれ四種有機色素に対して、サイズが 20nm の {001} 面を有する二酸化チタンナノ粒子の触媒安定性を図 42 に示している。全ての色素に対して非常に高い安定性が確認された。

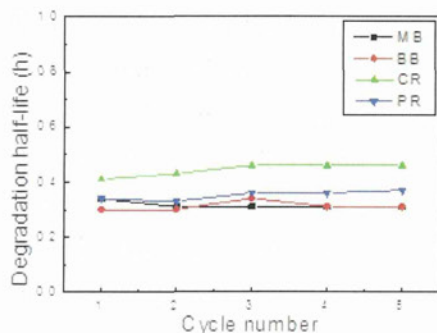


図 42 4種類の有機色素に対する{001}面を持つチタニアナノ粒子（サイズ＝20nm）の安定性

4. 過酸化チタンナノ粒子の表面修飾と分散挙動

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 22～24 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 22～24 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（例えばリポソーム修飾等）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。

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 ₂ (TC)	-47.74	8.73
TiO _{2+x} (TC)	-58.57	8.41
TiO _{2+x} (TP)	-0.11	11.89
TiO _{2+x} (TB)	-0.83	12.22
TiO _{2+x} -SDS (mix)	-22.22	9.78
TiO _{2+x} -SDC (mix)	0.37	9.33
TiO _{2+x} -PAA (mix)	-68.06	9.38
TiO _{2+x} -PAA2000	-29.38	3.72
TiO _{2+x} -PAA5000	-35.62	3.75
TiO _{2+x} -PAANa	-57.08	7.77
TiO _{2+x} -PAANH ₄	-60.87	7.46

*すべてのナノ粒子は 125℃-1 時間の水熱反応条件で合成。

5. 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43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

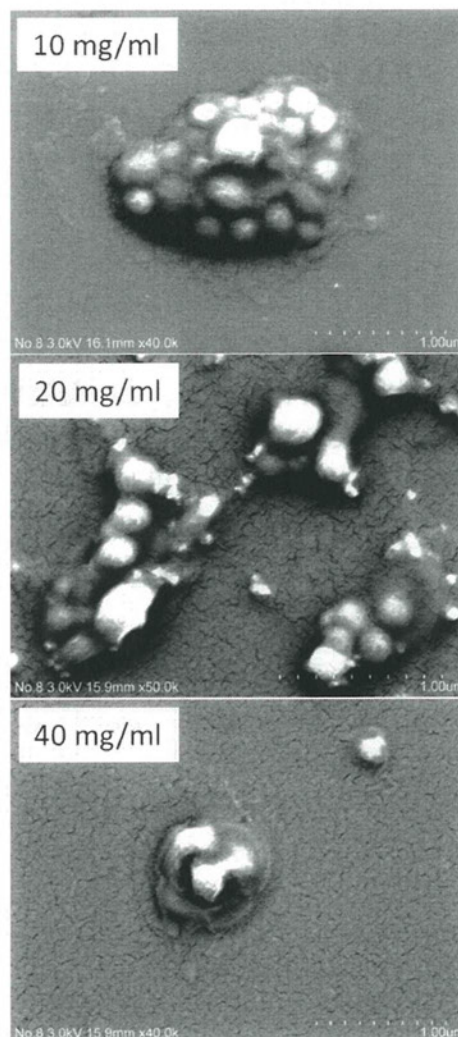


図43 種々の粒子濃度下で作製した粒子内包リポソームの走査型電子顕微鏡写真

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44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に内包されていることが分かった。

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。

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

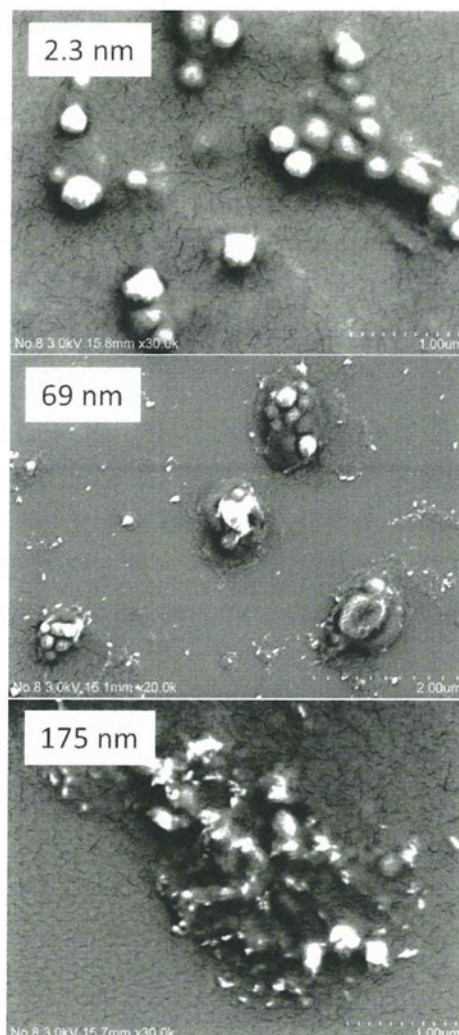


図 44 種々のサイズのナノ粒子から作製した粒子内包リポソームの走査型電子顕微鏡写真

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. フッ素を含む有機物をキャッピング剤として水熱反応場に共存させた場合、{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子（結晶構造はアナターゼ）の合成に成功した。また、フッ素とチタン原料の割合を変化させることで、20nmからサブミクロンまでのオーダーで、二酸化チタンナノ粒子のサイズ制御にも成功した。

4. 合成した{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子の有機色素に対する光分解の触媒性能を検討した。その結果、{001}面を有する二酸化チタンナノ粒子は市販のナノ粒子よりも優れた触媒性能を持つことを明らかにした。特に20nmサイズのものに関し

ては、世界最高の触媒性能が確認できた。

5. 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。

6. 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良分散した。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。

7. 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。

(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

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がんなどの難治性がんの飛躍的な治療率向上を目指す。その一環として本分担研究では、ナノ粒子による放射線治療との併用について検討を行う。

放射線の生物に対する影響には、直接作用と間接作用がある。放射線によるDNA分子の電離が直接にDNAの化学結合を切断するような作用が「直接作用」である。一方「間接作用」とは、電離放射線によって水から反応性の高いOHラジカル（ヒドロキシラジカル）などの活性種（水和ラジカル、Hラジカル、過酸化水素）が生成され、これらがDNAと化学反応することで損傷を引き起こすことである。X線照射の場合、生物学的損傷の約1/3は直接作用、約2/3は間接作用の結果と考えられている。

このことから、本研究によりナノ粒子が“ラジカル発生源”になり放射線増感の機能を果たせば、従来と同等の抗腫瘍効果を維持した上で照射線量の低減が可能であり、その結果、腫瘍近傍の正常組織への非照射線量を低減でき、より低侵襲な非外科的新規治療法を確立できると考えられる。

これまで複数のナノ粒子にX線を照射して検討した結果、過酸化チタン

(TiO_x) ナノ粒子がX線照射により十分にラジカルを生成することを見出した。ただし、TiO_xナノ粒子自身は、細胞外液に近い組成であるリン酸バッファーをはじめ多くの溶媒中で凝集する性質があった。そこで、動物実験を行う上で、粒子表面をポリアクリル酸 (PAA) で修飾した粒子を作成した。表面修飾を施した粒子でラジカルの生成を調べたところ、未修飾状態と同様にラジカルの生成が認められた。また、異なるロット間でのラジカル生成の再現性も確認した。

本分担研究では、このTiO_xナノ粒子のラジカル生成能を評価し、さらに膵臓がんを導入した担がんマウスを用いて、TiO_xナノ粒子と放射線治療の併用によるがん組織の抗腫瘍効果を検証した。なお、以下の本分担研究の動物実験および細胞実験で使用したナノ粒子は全てPAA修飾を施したTiO_xナノ粒子である。

B. 研究方法

1. X線照射によるTiO_xナノ粒子のラジカル生成能評価

ラジカルの検出にはAminophenyl Fluorescein (APF) 試薬（積水メディカル社製）を用いた。APFは中性溶液中でほとんど蛍光を持たないが、OHラジカルなどプローブが強い活性を持つ活性酸素種と反応すると、強蛍光性

化合物であるフルオレセイン（励起波長490nm、蛍光波長515nm）が生成し、蛍光強度の増大が観測される。これにより、蛍光を観測することで、ラジカルの発生量を測定できる。

96ウェルプレート上で100 μ Lの試料に5 μ MのAPFを添加し、X線照射を行った。X線照射には、細胞・小動物照射用のX線照射装置 MBR-1505R2（HITACHI社）を使用し、管電圧150kVp、管電流5mAとした。照射後、励起波長485nm、蛍光波長538nmで蛍光強度を測定した。

2. 動物実験による抗腫瘍効果の評価

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の評価した。

BALB/cヌードマウス（4週令オス）の大腿部皮下にMIAPaCa2細胞株（ 2×10^6 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150 μ l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 μ l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。

3. 生成されるラジカル種の同定

TiO_xナノ粒子の作用により生成されるラジカル種の同定等は、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の評価した。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 μ l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 μ l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。

4. TiO_xナノ粒子の酸化還元反応の評価

ラジカル発生機構解明のための評価の1つとして、TiO_xナノ粒子のカタラーゼとの反応および二価鉄イオン(Fe²⁺)との反応を調べた。

カタラーゼとの反応は、酸素発生量を評価した。37℃条件下の酸素モニター用チェンバー内で2mlの0.6wt% TiO_xナノ粒子または0.1mM H₂O₂に50 μl、50000U/mlのカタラーゼを反応させ、酸素発生量を測定した。

Fe²⁺との反応は、ESRを用いてラジカル生成を評価した。0.3wt% TiO_xナノ粒子または0.1mM H₂O₂に0.1mM FeSO₄および10mM DMPOを添加し、ESRにて測定を行った。

5. 倫理面への配慮

本分担研究における動物実験は、神戸大学の動物実験倫理委員会の許可を得た上で、神戸大学の動物実験実施規則に基づいて実施する。なお、本分担研究に組換えDNA実験やヒト遺伝子解析研究等は含まれない。

C. 研究結果

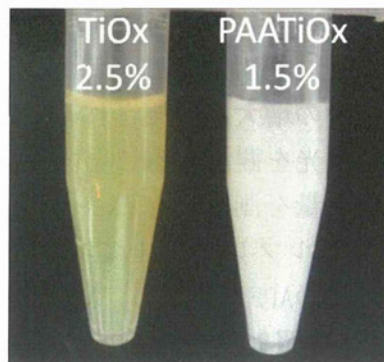


図1. TiO_xナノ粒子およびPAA修飾TiO_xナノ粒子の分散液

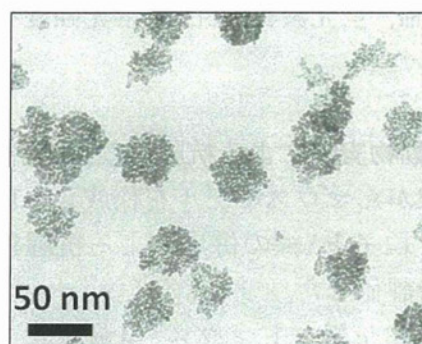


図2. PAA修飾TiO_xナノ粒子の分散液の電子顕微鏡像

1. TiO_xナノ粒子のラジカル生成

図1は本分担研究で使用したTiO_xナノ粒子およびPAA修飾TiO_xナノ粒子である。さらに図2はPAA修飾TiO_xナノ粒子の電子顕微鏡像(TEM)イメージ、図3は動的光散乱(DLS)による粒子径の測定の結果である。これらからPAA修飾した状態でのTiO_xナノ粒子は粒子径約50nmであり、溶液中で凝集なく十分に分散していることを確認した。

図4は、X線照射を行ったTiO_xナノ粒子およびPAA修飾TiO_xナノ粒子のAPFによる蛍光強度測定の結果を示す。また、TiO_xナノ粒子の原料である二酸化

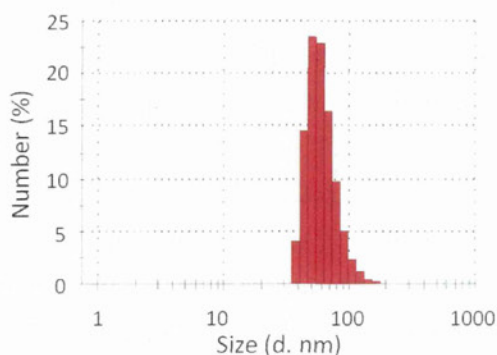


図3. 動的光散乱法によるPAA修飾TiOxナノ粒子の粒子径分布

チタン (TiO₂) ナノ粒子に対する結果も示す。TiO₂ナノ粒子では、X線照射によりラジカルの生成を認めなかったことに対して、TiOxナノ粒子はX線線量およびナノ粒子濃度に依存した蛍光量の増加、すなわちラジカル生成が確認された。PAA修飾状態であっても未修飾状態と同様にラジカルを生成することが確認された。

次に、試料にラジカルスカベンジャーであるビタミンC (Vit. C) またはグルタチオン (GSH) を添加し、同様の

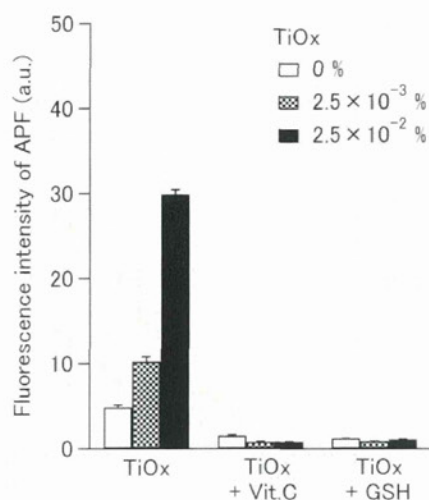


図5. スカベンジャーによるラジカルの抑制、CTL=コントロール、Vit. C=ビタミンC、GSH=グルタチオン

測定を行った。その結果を図5に示す。スカベンジャーを入れていない群ではラジカルの生成が見られたのに対して、Vit. C群およびGSH群では蛍光強度の増加は認めなかった。これは、スカベンジャーにより生成されたラジカルが酸化還元反応を起こしているためであると考えられる。

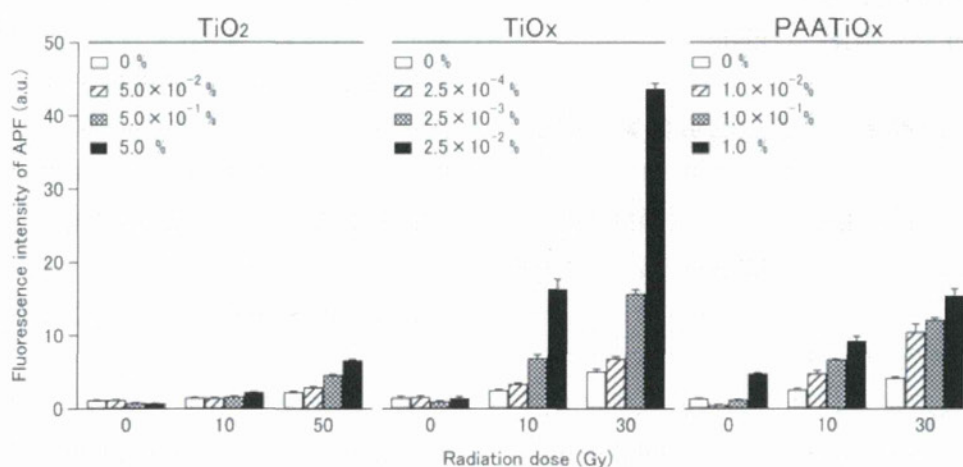


図4. TiO₂, TiOx, PAA 修飾 TiOx ナノ粒子のラジカル生成能