

図6. 動物実験によるTiO<sub>x</sub>ナノ粒子の抗腫瘍効果(腫瘍体積の変化)、\* $p < 0.05$ , IR=irradiation

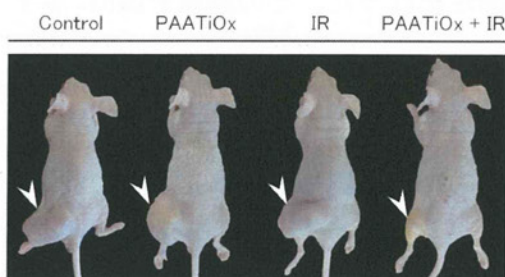


図7. 動物実験によるTiO<sub>x</sub>ナノ粒子の抗腫瘍効果、処置後43日目における腫瘍サイズの比較(矢印)

## 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用いてTiO<sub>x</sub>粒子とX線の併用による抗腫瘍効果の評価した。図6は、X線照射後からの腫瘍体積の変化を示す。TiO<sub>x</sub>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<sub>x</sub>ナノ粒子に毒性がないことを示唆する。図7は照射後43日目の各群マウスの腫瘍の様子を示す。

次にコントロール群とTiO<sub>x</sub>ナノ粒子局注群において、腫瘍組織のHE染色像を比較した結果を図8に示す。TiO<sub>x</sub>ナノ粒子群では細胞内までナノ粒子が一樣に分布している様子が観察できる。

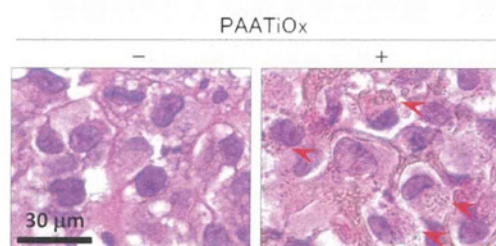


図8. 腫瘍組織のHE染色像、左がコントロール群、右がPAA修飾TiO<sub>x</sub>ナノ粒子局注群。局注群において細胞内にナノ粒子が認められる(赤矢印)

続いてTiO<sub>x</sub>粒子とX線の併用によるアポトーシスの評価を行った。図9にTUNELアッセイの染色像、図10にTUNEL陽性の細胞をカウントした結果を示す。腫瘍体積の結果と同様に、この結果においても、TiO<sub>x</sub>ナノ粒子・X線の併用群ではX線照射単独群と比べて有意なアポトーシス細胞の増大がみられ、TiO<sub>x</sub>ナノ粒子の作用が抗腫瘍効果に寄与していることが示された。

## 3. In vitro実験によるラジカル種の同定

まずIn vitroにおけるTiO<sub>x</sub>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。図11にコロニーアッセイの

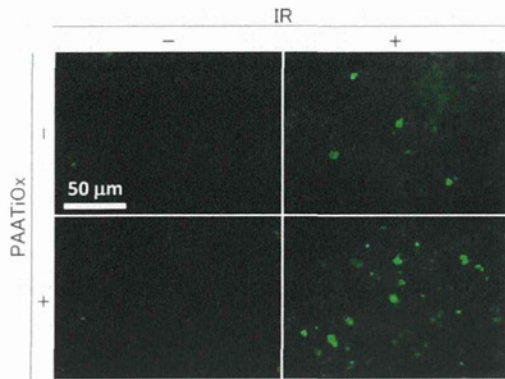


図9. TUNELアッセイによる腫瘍組織内のアポトーシス細胞の評価

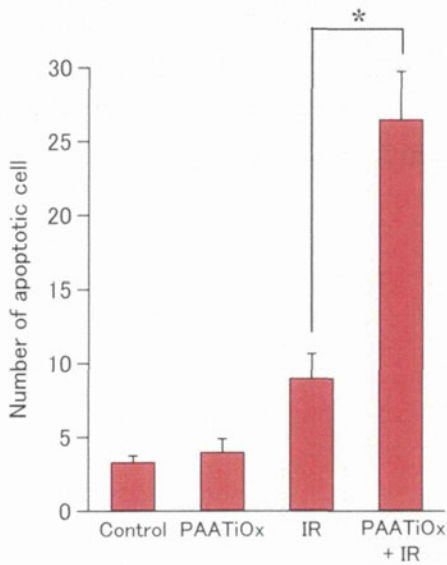


図10. TUNELアッセイによる腫瘍組織内のアポトーシス細胞の評価、TiOxナノ粒子・X線併用群でアポトーシス細胞の増大を認めた (\* $p < 0.05$ )

結果を示す。TiOx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TiOxナノ粒子とX線の併用による殺細胞効果が示された。

図12はIn vitroでTiOxナノ粒子を作

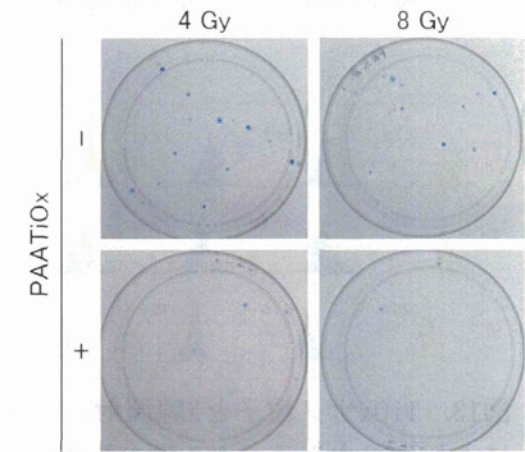
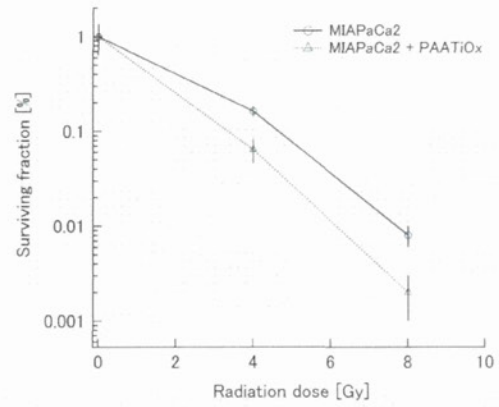


図11. In vitroにおけるTiOxナノ粒子とX線照射の併用による殺細胞効果、(上)細胞生存曲線、(下)コロニーの様子

用させた細胞のTEMイメージである。図8で示した結果と同様、TiOx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。

In vitroにおいてTiOxナノ粒子の作用により生成するラジカル種の評価を行った結果を図13に示す。この結果から、TiOxナノ粒子とX線の併用により細胞内でOHラジカルおよび $H_2O_2$ が増強することが示された。

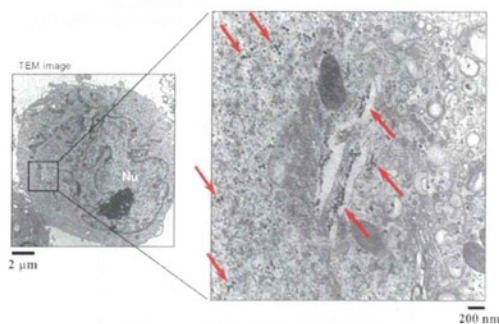


図12. 細胞内のTiO<sub>x</sub>ナノ粒子、細胞内にナノ粒子が認められる（赤矢印）

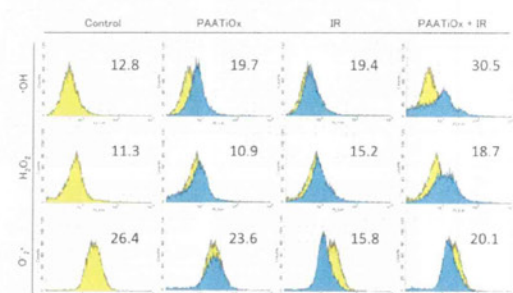


図13. TiO<sub>x</sub>ナノ粒子とX線照射の併用により生成するラジカル種の評価、図中の数値は分布の平均値を示す。

#### 4. TiO<sub>x</sub>ナノ粒子のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>類似性

##### ①カタラーゼとの酵素反応

TiO<sub>x</sub>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べた。TiO<sub>x</sub>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14に示す。TiO<sub>x</sub>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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との酵素反応としてよく知られており、このことから、TiO<sub>x</sub>ナノ粒子はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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<sub>x</sub>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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のコンタミネーションは無視できる。

##### ②Fe<sup>2+</sup>との反応

図15は、TiO<sub>x</sub>とFe<sup>2+</sup>との反応をESRにより解析した結果である。TiO<sub>x</sub>粒子だけではESR信号が得られなかったが、Fe<sup>2+</sup>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<sub>x</sub>ナノ粒子は、Fe<sup>2+</sup>と反応しOHラジカルを生成することがわかった。Fe<sup>2+</sup>のOHラジカル発生反応として、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とのFenton反応がよく知られており、TiO<sub>x</sub>ナノ粒子のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>類似性が示された。

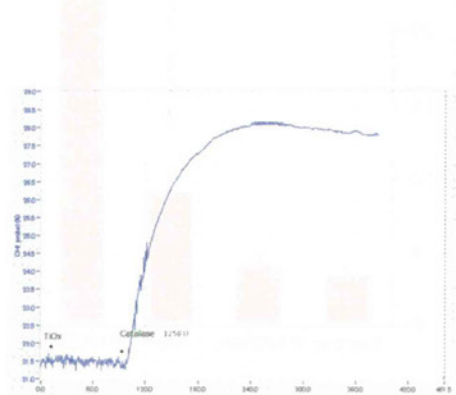


図14. TiO<sub>x</sub>ナノ粒子とカタラーゼとの反応による酸素の発生

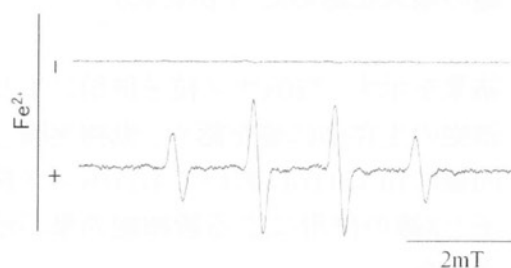


図15. TiO<sub>x</sub>ナノ粒子とFe<sup>2+</sup>との反応に



## よるOHラジカルの生成

### D. 考察

本研究で新規に新規開発した過酸化チタンナノ粒子は、X線照射によりラジカルを生成することに加え、それ自身が $\text{H}_2\text{O}_2$ 類似性の特性をもつことが示唆された。

動物実験および細胞実験においては、腫瘍に投与された $\text{TiO}_x$ ナノ粒子は細胞内に取り込まれ、X線照射により抗腫瘍効果を得るだけの十分なOHラジカルや $\text{H}_2\text{O}_2$ を生成していると考えられる。また、本研究の動物実験において $\text{TiO}_x$ ナノ粒子の投与が原因で死亡したマウスはおらず、このことは $\text{TiO}_x$ ナノ粒子の急性的な毒性がないことを示唆する。

今後長期の長期的かつ厳密な毒性評価試験、投与方法の検討、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などのさらなる実験が必要であるが、この併用療法が新しい治療法になり得る可能性があると考えられる。

### E. 結論

膵臓がんを導入した担がんマウスを用いて、新規開発した $\text{TiO}_x$ 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。 $\text{TiO}_x$ 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。また、 $\text{TiO}_x$ ナノ粒子は、カタラーゼや $\text{Fe}^{2+}$ との反応から $\text{H}_2\text{O}_2$ と類似の挙動を示すことを見出した。

#### (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

##### 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。

これまでに、酸化ケイ素、酸化アルミニウム、酸化ジルコニウム、酸化スズ、酸化チタン、酸化セリウム、酸化亜鉛、過酸化ニッケル、過酸化チタンを合成し、その放射線励起による活性酸素ラジカルの生成を調べたところ、酸化物ではラジカル生成が認められなかった。

これに対して、過酸化チタンでは、放射線照射によってラジカルの放出が認められた。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の一つである考え、まず、大気中で安定かつ比較的毒性が低い

と考えられる $\text{CaO}_2$ および $\text{ZnO}_2$ ナノ粒子の合成を試み、その放射線照射によるラジカル生成挙動を評価するとともに、新規材料の開拓を進め、水中完全分散 $\text{HfO}_2$ 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、 $\text{HfO}_2$ 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。

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解明するため、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。加えて、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を評価した。

##### B. 研究方法

### B-1. CaO<sub>2</sub>およびZnO<sub>2</sub>粒子の合成

図1にCaO<sub>2</sub>粉体の合成プロセスを示す。まず、0.2molのCaCl<sub>2</sub>を410mlの蒸留水に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが11になるまで添加した。その後、30%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpHが中性になるまでろ過洗浄し、エタノールで溶媒置換後80℃で24時間乾燥させ、試料とした。

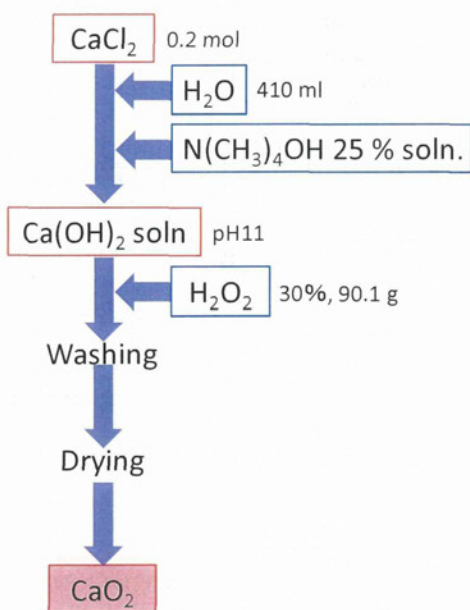
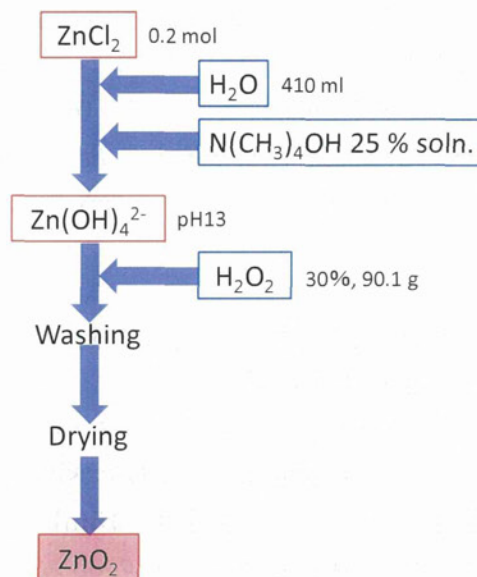


Fig. 1 CaO<sub>2</sub>粒子の合成法

図2にZnO<sub>2</sub>粒子の合成プロセスを示す。0.2molのZnCl<sub>2</sub>を410mlの蒸留水に溶解し、ここに25%の水酸化テトラメチルアンモニウム水溶液をpHが13

になるまで添加した。その後、30%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液を90.1g添加して沈殿を得た。得られた沈殿は、蒸留水でpH



が中性になるまでろ過洗浄し、エタノールで溶媒置換後80℃で24時間乾燥させ、試料とした。

Fig. 2 ZnO<sub>2</sub>粒子の合成法

### B-2. CaO<sub>2</sub>およびZnO<sub>2</sub>粒子の構造ならびにラジカル生成特性評価

粉末の生成相をX線回折(Mac Science社製 M03XHF)で評価した。また、ピークの半値幅より生成相の結晶子径を見積った。X線源にはCuK $\alpha$ 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 $\theta$ =20-60°で測定を行った。



ラジカル生成特性の評価には、蒸留水にCaO<sub>2</sub>またはZnO<sub>2</sub>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60Gy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. HfO<sub>2</sub>ナノ粒子の合成とそのラジカル生成特性評価

図3にHfO<sub>2</sub>ナノ粒子の合成プロセスを示す。0.02molのHfCl<sub>4</sub>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(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>: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、HfO<sub>2</sub>ナノ粒子分散液を得た。HfO<sub>2</sub>のラジカル生成特性の評価には、蒸留水にHfO<sub>2</sub>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。

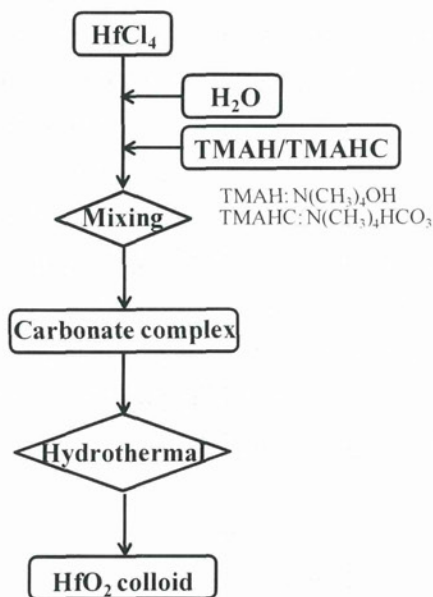


Fig. 3 HfO<sub>2</sub>ナノ粒子の合成プロセス

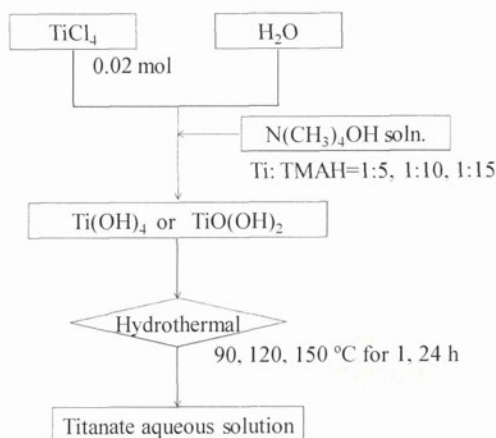


Fig. 4 TiO<sub>2</sub>ナノ粒子の合成プロセス

### B-4. 酸化チタンナノ粒子の合成と構造評価

図4に酸化チタンナノ粒子の合成プロセスを示す。0.02molのTiCl<sub>4</sub>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(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>OH: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、50~850 $\text{cm}^{-1}$ 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Cu $\alpha$ 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 $2\theta=5\text{--}65^\circ$ で測定を行った。

#### B-5. 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。得られたXAFSスペクトルより、Ti-K吸収端のXANES領域の波形を、既知の化学状態を有するリファレンスと比較することにより、過酸化チタン中のチタン原子の価数や電子状態等々を評価した。

なお、リファレンスには金属チタン、TiH<sub>2</sub>、Ti(OH)<sub>4</sub>、TiO<sub>2</sub>(アナターゼ)、TiO<sub>2</sub>(ルチル)を用い、実試料には、沈殿法により合成した過酸化チタン粉末、水熱法で合成したTiO<sub>2</sub>分散液をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理した過酸化チタン分散水溶液(固体含有率0.36 wt%)ならびに、酸性および塩基性過酸化チタン錯体を用いた。

また、上記過酸化チタンナノ粒子分散液に連続的に100分間放射光X線を照射しながらTi-K吸収端のXANESスペクトル測定を行い、放射線照射による構造の変化の有無を評価した。加えて、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についても評価を行った。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. CaO<sub>2</sub>およびZnO<sub>2</sub>粒子の構造

図5に得られたCaO<sub>2</sub>粒子のXRDパターンを示す。本粒子は主にCaO<sub>2</sub>からなることがわかった。ピークの半値幅よりシェラーの式を用いてCaO<sub>2</sub>の結晶子径を見積ったところ、約11nmと微細であった。



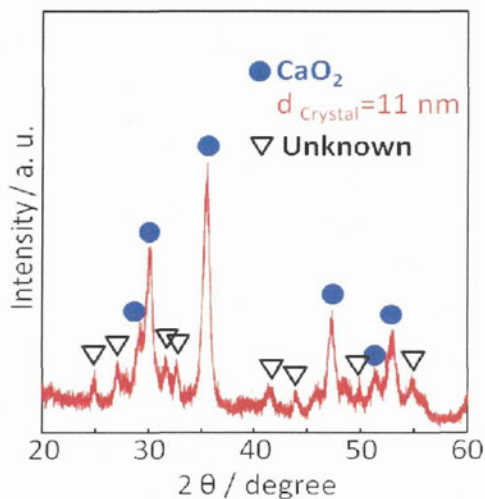


Fig. 5 CaO<sub>2</sub>粒子のXRDパターン

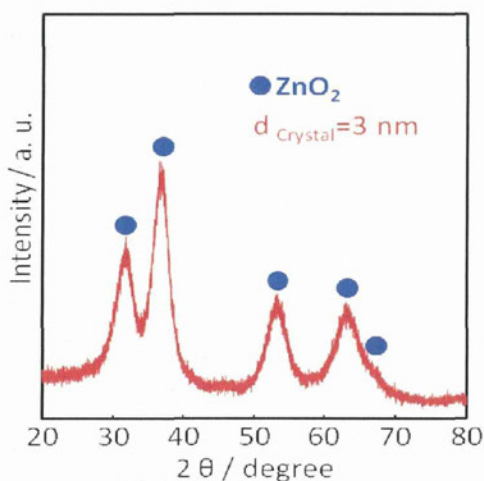


Fig. 6 ZnO<sub>2</sub>粒子のXRDパターン

図6に得られたZnO<sub>2</sub>粒子のXRDパターンを示す。得られた粒子は単相のZnO<sub>2</sub>であることがわかった。また、ピークの半値幅より見積った結晶子径は約3nmと極めて微細であった。

### C-2. CaO<sub>2</sub>およびZnO<sub>2</sub>粒子における放射線励起によるラジカル生成特性

図7にCaO<sub>2</sub>粒子を添加した水溶液

に放射線を照射した際のAPF蛍光強度と放射線照射量との関係を示す。飽和水溶液を除いて、放射線照射量の増大とともに、APF蛍光強度は増加し、CaO<sub>2</sub>も過酸化チタン同様、放射線励起により酸素ラジカルを生成することがわかった。

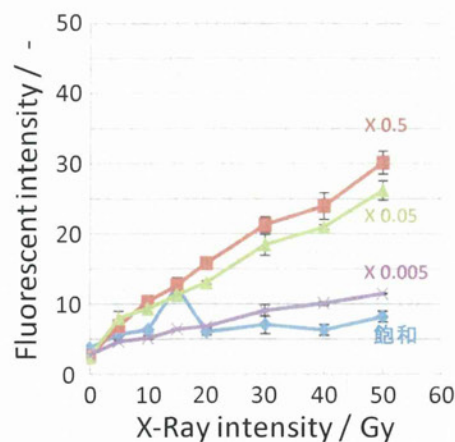


Fig. 7 CaO<sub>2</sub>粒子のラジカル生成特性

図8にZnO<sub>2</sub>粒子を添加した水溶液に放射線を照射した際のAPF蛍光強度と放射線照射量との関係を示す。いずれの粒子濃度でも放射線照射量の増大とともに、APF蛍光強度は増加し、ZnO<sub>2</sub>も過酸化チタンやCaO<sub>2</sub>と同様、放射線励起により活性な酸素ラジカルを生成することがわかった。

上記の放射線照射による活性ラジカル種の生成挙動評価より、金属過酸化物は放射線励起により、活性な酸素ラジカル種を生成する有力な候補材料であることがわかった。これらの粒子と過酸化チタン粒子の構造における共通点を明らかにできれば、放射線

励起による活性ラジカル種生成メカニズムを明らかにするための足がかりが得られると考えられ、より効率良くラジカルを生成する粒子の設計に繋がるものと期待される。また、今回合成した粒子は一次粒子径は極めて微細であるものの、これらが数ミクロンレベルの粗大な凝集体を形成している。患部へのデリバリーの観点からは、今後、これらの粒子を分散させるための、プロセスの改良を行う必要がある。

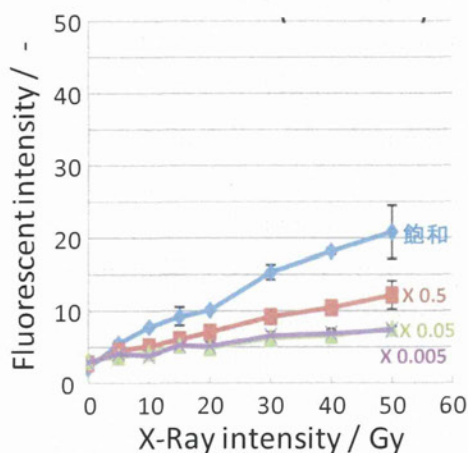


Fig. 8 ZnO<sub>2</sub>粒子のラジカル生成特性

### C-3 HfO<sub>2</sub>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<sub>2</sub>ナノ粒子のXRDパターンを示す。合成したHfO<sub>2</sub>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<sub>2</sub>はZrO<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sup>+</sup>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<sub>2</sub>においても単斜晶が合成されたことから、ZrO<sub>2</sub>同様、TMA<sup>+</sup>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。

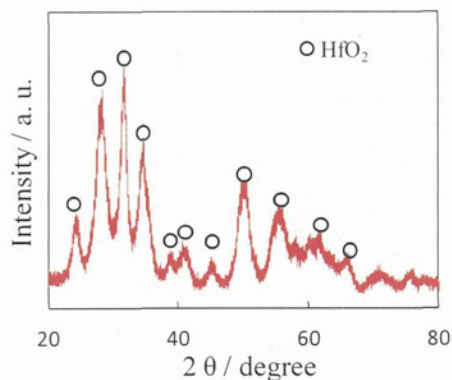


Fig. 9 HfO<sub>2</sub>粒子のXRDパターン

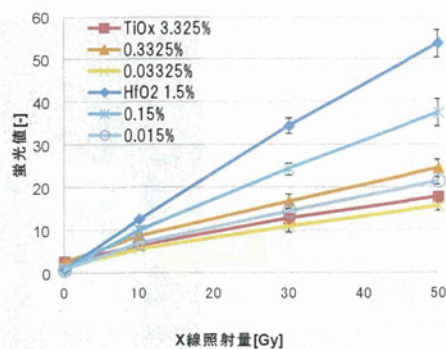


Fig. 10 HfO<sub>2</sub>ナノ粒子と過酸化チタンナノ粒子における放射線励起によるラジカル生成特性比較

図10にHfO<sub>2</sub>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、 $\text{HfO}_2$  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)、 $\text{HfO}_2$ 自身は酸やアルカリにほとんど溶解しないことから、 $\text{HfO}_2$ 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ホスト材料であり、希土類添加により、蛍光特性を示す $\text{HfO}_2$ 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 $\text{HfO}_2$ (以下、Tb: $\text{HfO}_2$ )の合成を試みた。

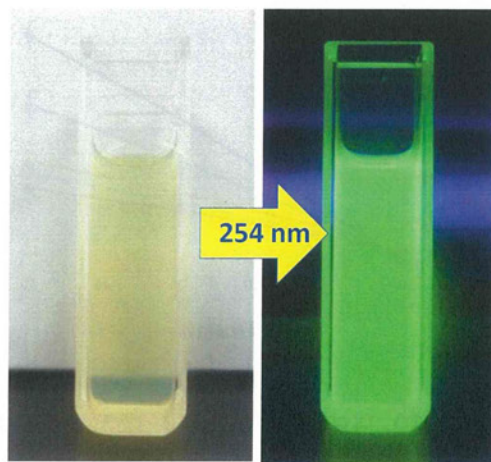


Fig. 11 Tb: $\text{HfO}_2$ ナノ粒子の蛍光特性

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。

#### C-4 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12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 $640\text{cm}^{-1}$ 付近にピークが認められた。処理温度が $500^\circ\text{C}$ においては $274$ および $287\text{cm}^{-1}$ 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、 $90^\circ\text{C}$ 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。 $120^\circ\text{C}$ 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。 $150^\circ\text{C}$ 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。



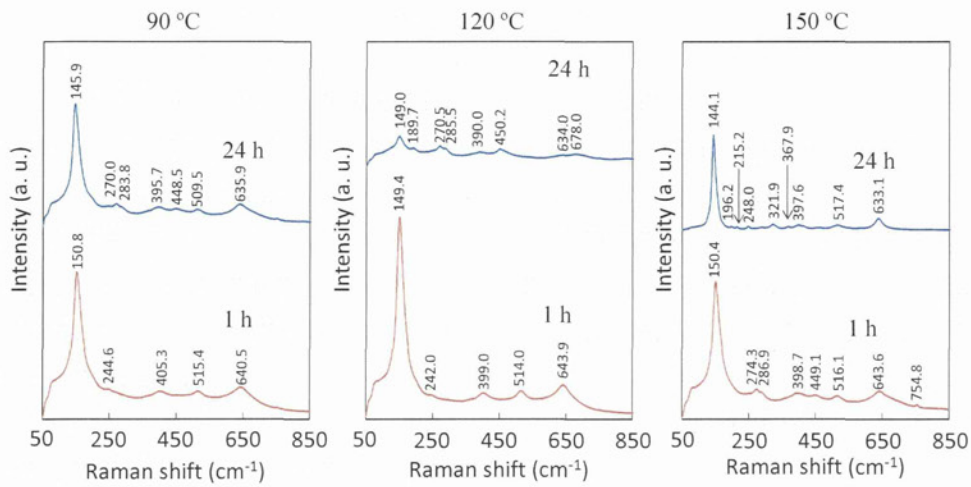


Fig. 12 Ti:TMAH=1:5において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

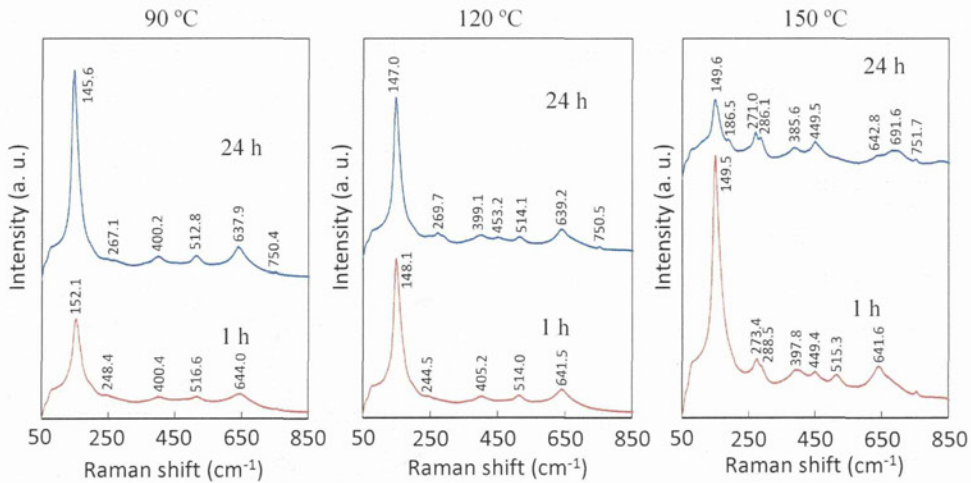


Fig. 13 Ti:TMAH=1:10において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

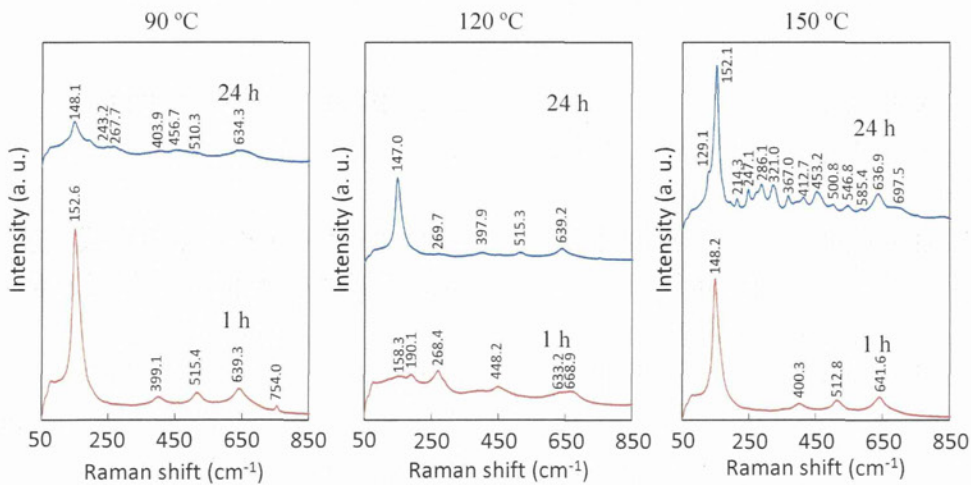


Fig. 14 Ti:TMAH=1:15において種々の条件で合成した酸化チタンのラマンスペクトル

図13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14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。

図15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、繰返し洗浄することによって、層内のTMA<sup>+</sup>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。

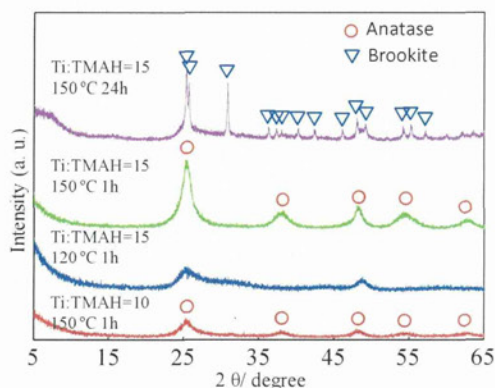


Fig. 15 種々の条件で合成した酸化チタン試料のXRDパターン

### C-5. 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12～14で得られた試料に対してH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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16にTi:TMAH=1:5で90°C1h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を示す。図12の結果と変わらないことがわかる。

図17にTi:TMAH=1:15で150°C1h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18にTi:TMAH=1:5で90°C1h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。

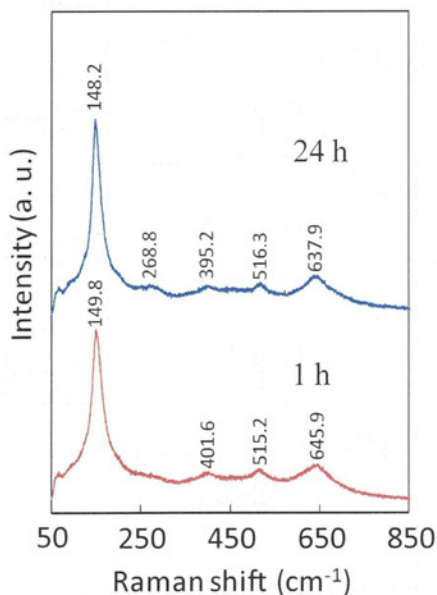


Fig. 16 Ti:TMAH=1:5で90°C1hおよび24h処理した試料の、 $H_2O_2$ 処理後のラマンスペクトル

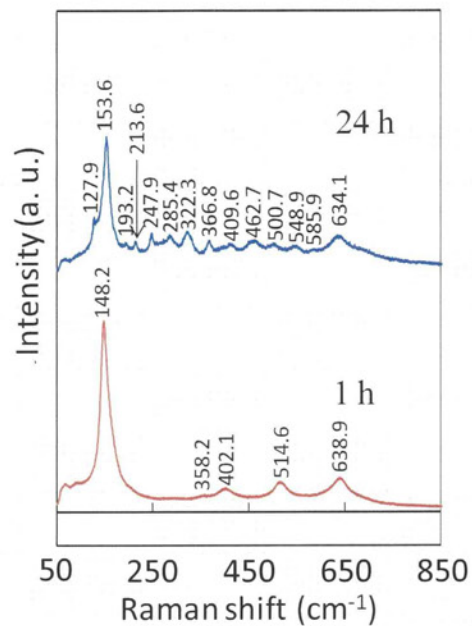


Fig. 17 Ti:TMAH=1:15で150°C1hおよび24h処理した試料の、 $H_2O_2$ 処理後のラマンスペクトル

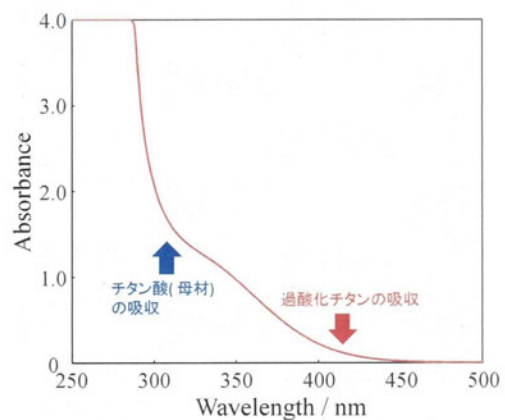


Fig. 18 Ti:TMAH=1:5で90°C1h処理した試料を $H_2O_2$ 処理した際の紫外-可視吸収スペクトル

### C-6 過酸化チタンの微細構造評価

図19に過酸化チタン実試料ならびにリファレンス試料における、Ti-K吸



吸収端のXANESスペクトルを示す。吸収端エネルギーはチタンの価数が大きくなるほど高くなるが、実試料である過酸化チタン粉末、過酸化チタン分散液、過酸化チタン錯体の吸収端位置はチタンの価数が+4である $\text{Ti}(\text{OH})_4$ 、 $\text{TiO}_2$ (アナターゼ)および $\text{TiO}_2$ (ルチル)と変わらないことがわかる。このことから、少なくともこれら実試料中のチタンの価数は4価であることがわかる。また、これらの試料のスペクトルは各々異なっており、いずれのリファレンスとも一致しないことから、過酸化チタンナノ粒子中のTiの周囲の構造はリファレンス試料と大きく異なっていることがわかる。

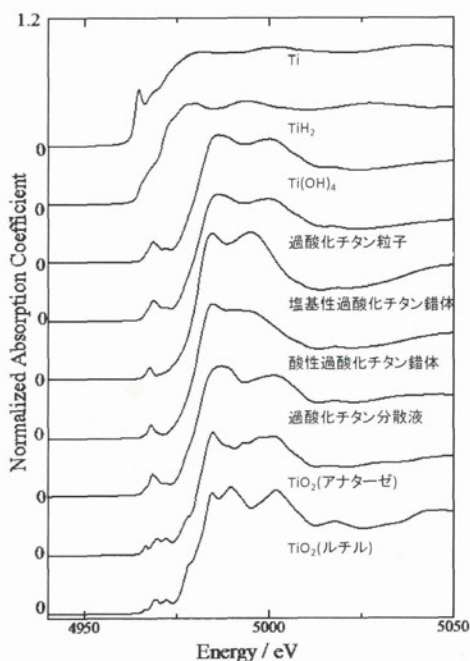


Fig. 19 過酸化チタン実試料およびリファレンス試料におけるTi-K吸収端のXANESスペクトル

図20に過酸化チタン分散液に放射光X線を連続的に100分間照射して測定したTi-K吸収端のXANESスペクトルを示す。スペクトルには大きな変化は見られず、少なくとも100分間の照射によりTiの価数やその電子状態に大きな変化が無いことを示しており、放射線励起による活性酸素ラジカル種生成は過酸化チタンナノ粒子の分解によるものではなく、これらの触媒的な効果によるものであることが示唆される。

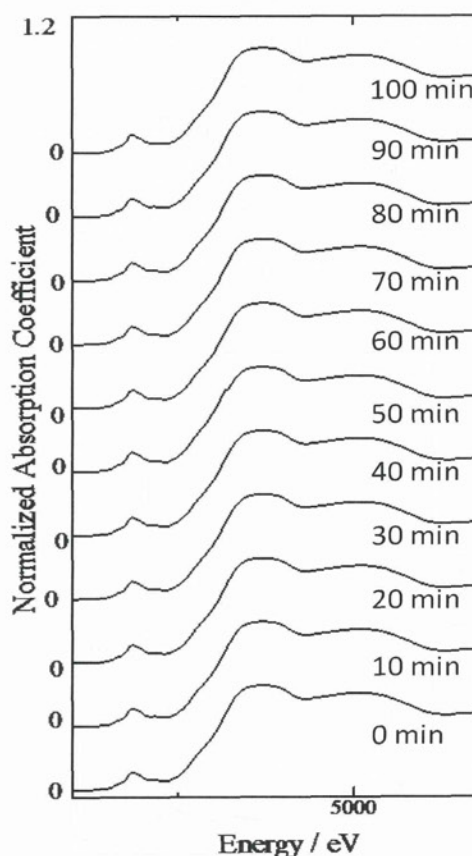


Fig. 20 放射光X線の連続照射による過酸化チタンナノ粒子分散液(0.36 wt%)におけるTi-K吸収端のXANESスペクトル変化

図21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。

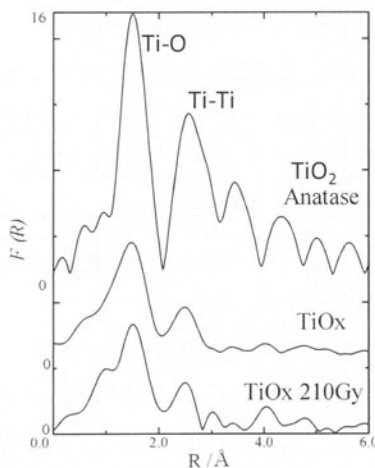


Fig. 21 酸化チタン、過酸化チタンおよび放射線を照射した過酸化チタンの動径分布曲線

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 <sub>2</sub> Anatase	4.22(6)	1.97(1)	0.07(1)
TiO <sub>x</sub>	3.72(5)	1.97(1)	0.12(1)
TiO <sub>x</sub> 210Gy	3.38(3)	1.99(1)	0.11(1)

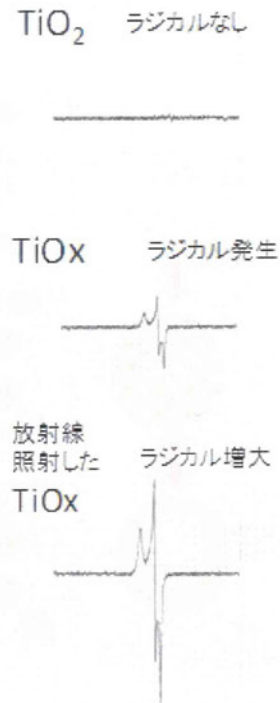


Fig. 22 酸化チタン、過酸化チタンおよび放射線を照射した過酸化チタンにおけるESRスペクトル

図22に上記試料のESRスペクトルを示す。TiO<sub>2</sub>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23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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理により表面層にラジカルが生成し(おそらくO<sub>2</sub><sup>•-</sup>に起因)、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。

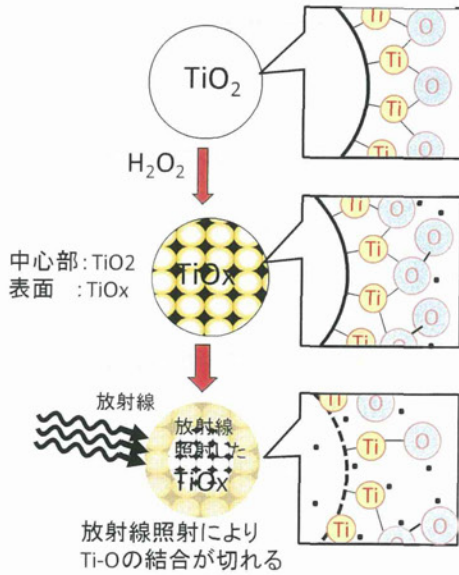


Fig. 23 微細構造解析より予測される過酸化チタン粒子における放射線照射によるラジカル生成機構

#### D. 結論

1.  $\text{CaO}_2$ 、 $\text{ZnO}_2$ 、過酸化チタンを含む金属過酸化物は放射線照射により活性な酸素ラジカル種を高効率で生成することを見出した。
2.  $\text{HfO}_2$ 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。

3. 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 $\text{TiO}_2$ 、層状チタン酸塩およびブルッカイト型 $\text{TiO}_2$ の選択成長に成功した。
4. 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 $\text{H}_2\text{O}_2$ 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。
5. 放射線照射により活性ラジカル種を生成する過酸化チタン中のTiの価数は、ラジカル生成が認められない $\text{TiO}_2$ や $\text{Ti}(\text{OH})_4$ と同様、4価であったが、その微細構造は明らかに異なっていた。
6. 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。



(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

**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、本研究では、そこで本年度は、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ると共に、可視・近赤外発光ナノ粒子を内包したリポソーム表層への提示し、がん細胞に対する特異性を評価した。

**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トティングやフローサイトメトリーでの検出に使うC-mycタグ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。

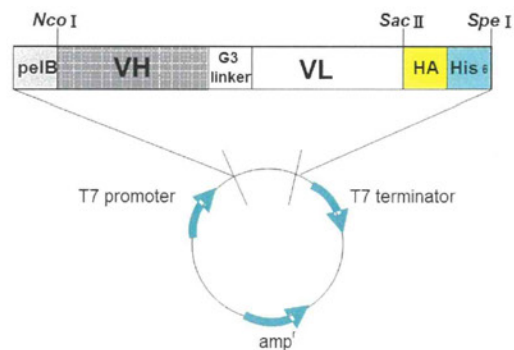


図 1. h528 scFv の発現ベクター

scFvの調製は、まず、上記発現ベクターで大腸菌BL21(DE3)を形質転換することによって発現させた。そして、大腸菌を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。

② マイクロカプセル化法によるNIR

### 蛍光リポソームの調製

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-PEG<sub>2000</sub> (L- $\alpha$ -distearoyl-phosphatidyl ethanolamine), DSPE-PEG<sub>2000</sub>-NHS, 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  $\mu\text{mol/mL}$ となるようにクロロホルムに溶解した。そして、その30  $\mu\text{mol/mL}$ に調製したリン脂質/クロロホルム溶液中に希土類含有イットリアナノ粒子(RE-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)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 scFv修飾による標的特異性の付与  
マイクロカプセル化法により、NHS基がPEG末端に修飾されたNIR蛍光リポソームを作製した。得られたNIR蛍光リポソームとscFvを、NHS基と抗体中のNH<sub>2</sub>基のmol比が10 : 1となるように20 mM HEPES バッファー (pH8.3, 150 mM NaCl) 中で混合し、12時間反応させることでscFv修飾NIR蛍光リポソームを作製した。得られたscFv修飾NIR蛍光リポソームを

標的細胞であるA431細胞と非標的細胞であるJurkat細胞に添加し、それぞれの細胞についてNIR蛍光顕微鏡観察を行った。

④ リポフェクションによる細胞内へのRE-Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の導入

マイクロカプセル化法により、カチオン性NIR蛍光リポソームを作製した。得られたカチオン性NIR蛍光リポソームをHeLa細胞、Huh-7細胞に添加し、それぞれの細胞について経時的にNIR蛍光顕微鏡観察を行った。

### 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、赤色可視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2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3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。

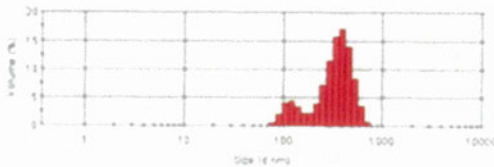


図2. CdSe ナノ粒子封入 PEG 導入リポソームの DLS 結果

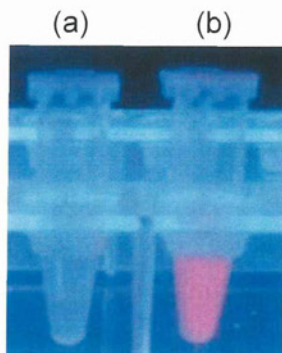


図3. CdSeナノ粒子封入PEG導入リポソームへの紫外線(365 nm)照射  
(a) 遠心分離操作後の上清画分  
(b) 遠心分離操作後の沈殿画分を再分散

## 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の粒径分布をDLSで評価した結果を図4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-PEG<sub>2000</sub>-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

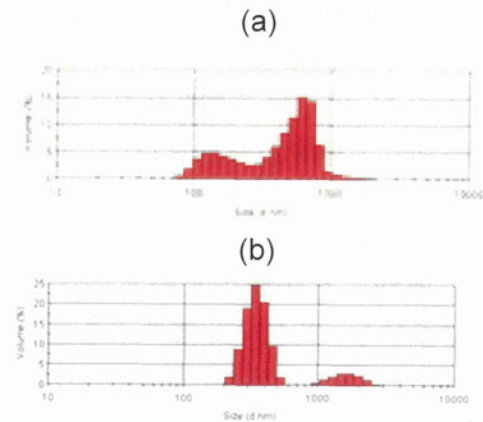


図4. CdSe ナノ粒子封入 PEG 導入リポソームの DLS 結果  
(a)手順①で作製したリポソーム  
(b)手順②で作製したリポソーム

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