



ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子を用いた 新規放射線増感治療の開発

森田, 健太

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2018-09-07

(Date of Publication)

2019-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3357号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003357>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

ポリアクリル酸修飾過酸化チタン
ナノ粒子を用いた
新規放射線増感治療の開発

平成 30 年 7 月

神戸大学大学院
工学研究科 応用化学専攻

森田 健太

目次

緒言

1. 現代における放射線がん治療
2. 放射線治療の仕組み
3. 放射線増感治療の仕組み
4. 放射線増感治療におけるナノ粒子の立ち位置
5. ナノ粒子の分析技術
6. 二酸化チタンの医療応用
7. 本研究の目的：放射線増感剤としての過酸化チタンナノ粒子の確立

摘要

第一章

新たな放射線増感剤としてのポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の物性評価

第二章

ポリアクリル酸修飾二酸化チタンナノ粒子の持つ過酸化水素スポンジ効果の解析

第三章

ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞内過酸化水素濃度の上昇とそれに伴う放射線増感効果

第四章

ヒト臍臓がん担がんマウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の体内動態および急性毒性評価

総括

出版論文

謝辞

緒言

1. 現代における放射線がん治療

現在、がんは日本人の死亡理由の一位を占めている。しかし、他の疾病と異なり、その発生や進行のメカニズムが自個体の細胞増殖という生体に本来備わっているシステムに由来するため、人類にとってがん治療は有史以来の課題であり、医療技術の発達した現代に至り益々その難しさが際立ってきている。特にすい臓がんはがんの王様と呼ばれるほど治療の難しいがん種である。2006年から2008年において、がんと診断された日本人全体での5年生存率の平均は62.1%であるのに対し、すい臓がんに限ってみると男性で7.9%、女性では7.5%にすぎず、次に低い部位別がん種である胆のう・胆管がんのそれぞれ23.9%、21.1%に比べて圧倒的に低くなっている[1]。その理由としては、まず診断においては自覚症状が現れにくく発見が遅れ、ステージが進んでからの治療になること、また治療においても患部が生体の深部に存在することから従来のがん治療法では十分な効果が期待できないことが挙げられる。現在のがん治療では、外科的切除、抗がん剤による化学療法、放射線治療の3つの治療法が組み合わせて用いられる。しかし、深部がんは単純に生体表面から遠く、脊髄など敏感で重要な部位が周囲に多いことから外科的切除も放射線治療も難しい。さらに、酸素の供給が血流からに限られるため、腫瘍内部が低酸素症を発症しており、これは化学療法と放射線治療に耐性を持つ原因となっている。

19世紀の終わりにレントゲンがX線を発見して以来、放射線が高い生体透過性と細胞傷害性を持つことが見出され、放射線治療は外科的切除、抗がん剤治療と共に現代のがん治療の重要な一角を担ってきた[2,3]。放射線治療はその性質から、外科手術と化学療法の間的な立ち位置といえる。外科手術のように特定の部位のみを攻撃できる指向性を持ち、化学療法のように切創を一切作らない非侵襲的治療である。しかし同時に、両者の中間的なデメリットも存在する。生体の深さ方向へのエネルギー付与が制御できないため、生体の深部腫瘍や造血組織周辺を標的する際には放射線感受性の高い表皮や造血組織が高リスクに晒される。とはいえ、研究者たちによる熱心で継続的な臨床データの蓄積と後に述べる科学技術の進歩によって、現在では癌を罹患した患者の約半数に放射線治療が何らかの形で適用されている。

2. 放射線治療の仕組み

放射線とは高エネルギーの電磁波（X線、 γ 線）やヘリウム原子核（ α 線）、電子（ β 線）、中性子、あるいはその他の原子の流れの総称である。いずれも物質に照射されると物質と相互作用することでエネルギーを付与し原子を電離することから、電離放射線とも呼ばれる。また、電磁波以外は重量を持つ粒子の流れを表すため粒子線と呼ばれ、特に炭

素等の α 線と比べると重い原子の場合は重粒子線と分類されることがある（電磁波も光子の流れなので広義の粒子線と言うこともできると思うが一般的には放射線とのみ表現される）。さらに、現在で一般的に放射線治療と言った場合、電子線を金属ターゲットに衝突させた際に生じる電磁波である X 線を用いる。その際、表皮への副作用を避けるため、低エネルギーの X 線は金属板を用いてフィルターされる。放射性同位体が崩壊する際に放出される電磁波である γ 線は、放射性同位体自体の管理の難しさから現在では主に脳腫瘍を治療するガンマナイフや前立腺がんに応用される小密封線源療法等、限られた分野でのみ使用されている。

放射線が生体に照射されると、放射線の直接作用と間接作用によって細胞が傷害される。直接作用とは高エネルギーの光子が細胞内の DNA、または細胞膜を含む細胞小器官を構成する原子を電離、傷害することを表す。一方で、間接作用では放射線が水分子、酸素分子、または生体分子を電離することで生じる様々なラジカル種が存在する。特に、放射線治療において細胞死を導くトリガーとしては反応性の高い活性種である活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が目されている。ROS にはヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) やスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素イオン (HOO^{\cdot})、酸素原子 (O)、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、オゾン (O_3)、過酸化水素 (H_2O_2) 等がある。その中でも、生化学的な文脈ではヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、過酸化水素に関する研究が多く行われている。理由としては、生物のほとんどの細胞が生命活動の過程においてこれらの ROS を産生し、また逆に分解する機構を有しているからであろう。放射線照射によって細胞は次のようないくつかのモードで細胞死に陥る：ネクローシス、増殖死、アポトーシス。細胞近傍で発生した ROS や二次電子が細胞膜を物理的に破壊した場合、細胞は細胞質を細胞外に漏出してネクローシス死を起こす。さらに、古典的な放射線生物学に従えば、ROS は DNA の二重らせんを二本鎖切断 (DSB)、あるいは一本鎖切断 (SSB) する。細胞は本来、DNA に起きた障害を修復する機構を有している。しかし、過度の DSB によって DNA 修復が不可能になると、増殖死かアポトーシスを起こして自死に至る。増殖死の場合は、細胞は幾度かの分裂を繰り返したのちに死に至るか、そもそも増殖が不可能になる。アポトーシスは、細胞に内在的にプログラムされている自死機構のモードである。アポトーシスに関わる複雑なシグナル経路はこの数十年非常によく研究されてきた [4,5]。近年では、X 線照射によって新たな細胞死のモードである免疫性細胞死を起こすことも明らかになってきた [6]。

放射線治療では腫瘍に対して限定的な放射線照射を行うことでできるだけ腫瘍組織のみを傷害する治療法である。しかし、他の治療法と同様にすべてのがん種に適用できるわけではない。例えば、脊髄や生殖器など極めて放射線感受性の高い組織周辺の腫瘍では正常組織の保護が実質不可能である [2,7]。また一方で、放射線耐性がん種においては腫瘍に対する実効線量が周辺組織より小さくなるため副作用が大きくなってしまう。そのため、放射線の外部照射を行う放射線治療はこれまでに様々な改善が試みられ、実現されてきた。 [8,9]

放射線治療の改善としては、そもそもの放射線種を変える研究も盛んに行われている。従来の一般的な放射線治療で用いられている X 線、 γ 線以外に、陽子、重イオン（特に炭素イオンがよく研究されている）、中性子などのビームを用いた放射線治療である。これらは光子よりも粒子性の高い放射線であることから、「粒子線治療」と一般的に呼ばれている。粒子線治療でのメリットは、粒子線の物理学的特徴から生体の深さ方向にターゲット能を持たせることができる点にある。放射線は物質を透過する際、物質の構成元素と相互作用してエネルギーを付与するが、放射線が停止する直前に特に大きなエネルギー付与が行われる。この効果はブラッグピークと呼ばれている。すなわち、粒子線のエネルギーと距離を適切に調整し、生体内の腫瘍部位で粒子が停止するような条件で照射を行うことで、生体深部の腫瘍であっても特異的に傷害することが可能となる。一方、従来の放射線治療で用いられている X 線、ガンマ線は低 LET (linear energy transfer) 放射線と呼ばれ、生体へのエネルギー付与が少ないことから、容易に患者の体内を透過してしまい、ブラッグピークの恩恵を受けることができない。そのため、必然的に生体表面（皮膚）への副作用が大きくなり、放射線入射角度の分散照射、時間的分割照射が不可欠となっている。さらに、中性子線は特に、ホウ素化合物の投与と組み合わせた中性子線捕捉療法 (boron neutron capture therapy; BNCT) が最近よく研究されている。熱中性子と呼ばれる停止直前の中性子はホウ素原子 (^{10}B) と核反応し、 α 線を生成する。 α 線は高 LET 放射線であり、生体内での飛程が 10~14 μm と非常に短い。そこで、ホウ素化合物を腫瘍に蓄積し適切な条件で中性子線照射を行うことで、ブラッグピークによる中性子線単体の腫瘍選択性以上の、細胞特異的な腫瘍傷害を目指したものである。

放射線治療の改善研究における最終的な目的は、放射線のエネルギー付与を腫瘍組織のみに限定することである。従来と同じ X 線を用いた放射線治療であっても、現代の高精度放射線治療では放射線照射装置の照射窓に可動式のフレームが採用されており、可能な限り腫瘍の形に添った照射が行える。照射野の最適化のみならず、腫瘍の照射位置によって放射線の強度の変調を伴う IMRT (intensity-modulated radiotherapy) も行われている。こうした高精度の放射線治療を実現するためには患者の腫瘍の位置、大きさを精確に把握することが不可欠であるが、近年の CT、MRI による腫瘍のイメージング技術の目覚ましい発展がこれを可能にした。さらには、治療寝台上にセットアップされた患者の腫瘍を可視化したイメージング装置と放射線照射装置を連動し、腫瘍位置と照射野のずれをリアルタイムで補正する IGRT (image-guided radiotherapy) も実現している [3,10]。ただし、これらの高精度放射線治療でも腫瘍の生化学的性質が変わるわけではないため、放射線感受性の低いがん種には高線量の照射が必要となってしまう。そこで、放射線増感剤と呼ばれる薬剤の投与によって腫瘍細胞の放射線感受性を増補し、従来よりも低線量の放射線照射によって高い治療効果を期待する治療スキームが「放射線増感治療」である。

3. 放射線増感治療の仕組み

放射線耐性がん種の放射線に対する低感受性の因子は様々であり、まだ完全に解明されているとは言えない。それでもこの数十年に非常に多くの放射線増感剤が研究されてきた。放射線増感治療は、作用機序の観点でいくつかの種類に分けることができる。まず大きく二つに分けると、ひとつは (i) 単体でも抗腫瘍効果を有する、いわゆる抗がん剤と放射線照射を併用する場合[11-14]、もうひとつは (ii) 単体では効果はないが放射線の効果を増幅する薬剤、または粒子を併用する場合である。後者はさらに以下に細分化できる。(a) 高原子番号の素材に対して放射線照射を行い主に光電効果により放射線の電離効果を高める[15,16]、(b) 腫瘍の低酸素症 (hypoxia) を緩和し、酸素効果、あるいは疑似 (mimetic) 酸素効果により放射線で生じる ROS を増幅する[17-19]、(c) 腫瘍細胞の自己修復能を阻害して放射線照射のダメージを増幅する[20-24]。以下に、それぞれを概説する。

(i) 抗がん剤

放射線治療と抗がん剤を併用する治療は「放射線化学療法」と呼ばれる。すでに臨床で確立されている放射線治療と化学療法は共に安全性が担保されているため、これらを併用することは頻繁に行われている。Milas L.らは一般的な抗がん剤であるパクリタキセルと放射線治療を併用することでがんを効果的に治療することを *in vivo* で報告し[25]、その後、Tao S.らはパクリタキセルに加えてさらにシスプラチンを放射線治療に併用することでより効果的に食道がんを治療することを臨床において報告した[12]。

(ii)-a 重元素

原子番号の大きい素材が放射線を増感することは、放射線治療を行った際に患者の固定具に触れていた皮膚がやけどのような状態になることから、比較的古くから知られていた。X線が原子に照射されると、光電効果によって原子の外殻電子が放出される。そして軌道に空いた空孔にさらに外殻の電子が落ち込むことにより安定化されたエネルギーと同じエネルギーを持った特性 X線の放出が起こる、あるいは外殻電子がオージェ電子として放出される。こうして副次的に生じた電子や X線は周囲の原子とさらなる連鎖反応を起こし、入射 X線の持っていたエネルギーを効果的に付与することができる。さらに、光電効果の起こる確率は、ターゲット原子の原子番号を Z 、入射 X線のエネルギーを E とすると $(Z/E)^3$ に比例するため、原子番号の大きい素材ほど入射 X線のエネルギーを周囲に与える力は大きい[26]。以上が、重元素が放射線を増感する仕組みである。重元素の放射線増感治療への応用においては、まず重元素素材を腫瘍に接触させ、その後に放射線の照射を行う必要がある。そのため、非侵襲的な治療の観点からバルクの素材は使用されず、重元素ナノ粒子としてのアプリケーションがほとんど全てである。また、生体適合性の観点から、金やプラチナといった貴金属が良く研究されてきた。こうした重元素ナノ粒子を用いた放射線増感治療については、後に別章を設け詳述する。

(ii)-b 低酸素症緩和剤

腫瘍組織、細胞に含まれる酸素分圧が下がることは低酸素症と呼ばれ、腫瘍の放射線感受性が下がる大きな原因となっている。上で述べたように、放射線の細胞毒性は直接効果と間接効果に由るが、その大部分を間接効果が占める。ゆえに、組織内酸素分圧が下がり、放射線で電離される酸素分子が減る、すなわち生成される酸素ラジカルが減ると、放射線の治療効果は最悪の場合三分の一にまで下がってしまう。そして、実際には、培養細胞、同所性移植腫瘍、ゼノグラフトのすべてのケースで低酸素細胞は存在している。すなわち、どんなに放射線照射を行い易い症例であったとしても、すべてのがん細胞を死滅させるには低酸素状態の放射線耐性が高い細胞の存在を前提にしなければならない。そのため、腫瘍組織の酸素分圧を上げるための薬剤が研究されてきた。最も原始的には、患者を高圧酸素下においての放射線治療が行われた。腫瘍組織へ血液を介して酸素を送達するため、酸素を運搬するヘモグロビンや人工赤血球の直接投与、輸血、血流を増大する試薬も試みられた。比較的最近では、低酸素分圧の細胞内でのみ作用し、放射線が照射されると酸素効果様 (mimetic oxygen effect) の放射線増感効果を示すイミダゾール系の増感剤が良く研究されてきた。さらに、現在では、ROS の一種である過酸化水素も低酸素症緩和剤として働くことがわかっている。Y. Ogawa らの研究グループは過酸化水素を放射線増感剤として用いた臨床試験を続けている。

(ii)-c 生化学的薬剤

すでに述べたように、放射線照射を受けた細胞はいくつかのモードで死滅する。その中で、ネクローシス以外はなんらかの生化学的な経路に従っている。例えば、アポトーシスや増殖死は細胞周期におけるチェックポイントにおいて、DNA 損傷の多寡と修復可能性を判断して増殖や自死の決定がされる。すなわち、がん細胞においても DNA 修復機構を阻害するかストレス耐性を下げることで、アポトーシスや増殖死を誘導しやすくなると考えられる。直接的には、いくつかの化合物が DNA の修復機構を阻害することで放射線感受性が増大したと報告されている [20,21,24]。近年きかんに研究されているヒートショックプロテイン (HSP) は本来熱ストレスから細胞を守るタンパク質として発見されたが、HSP の阻害剤は放射線増感剤としてもはたらくことが示されている [22,23]。また、(ii)-b で例示した過酸化水素は ROS の除去機構を担う酵素を不活化することが知られているので、間接的にこの項目にも分類されるといえる。

4. 放射線増感治療におけるナノ粒子の立ち位置

ナノテクノロジーの発展は医療分野においても大きな影響を与えてきた。特にナノ粒子の分野に限ると診断応用 (バイオイメージング) と治療応用に分けることができるが、

そのいずれにおいてもナノ粒子はドラッグデリバリーシステム (DDS) の薬剤キャリアとしての適用がほぼすべてといって過言ではない。すなわち、ナノ粒子自体はできるだけ生体適合性、安定性、ステルス性が高く、担持する薬剤だけを目的組織に高効率で送達できるキャリアであれば良く、加えて徐放性能や薬剤封入効率の高さを求められることもある。そのため、リポソームや高分子ミセル、高分子カプセルといった非常にソフトかつ生体内で分解あるいは排出可能な素材が好んで用いられる。近年では新規な素材として、デンドリマー、ナノゲル、ナノバブル、ハードなものではカーボンナノチューブ、多孔性セラミックナノ粒子なども研究されている[27]。

一方で、疾病治療薬だけでなく外部エネルギー照射を併用したがん治療では、ナノ粒子自体が外部エネルギー照射のエネルギーを受け取る薬剤として応用されることがある。表 1 に利用する物理エネルギーの種類とその医療応用、さらに診断・治療効果を高めるための DDS の例について紹介する。この中で最近注目を集めているのは光線力学療法(PDT)である。本来、X線より低エネルギーな光(電磁波)は生体を透過しないが、近赤外領域においてのみ比較的高い組織透過性を有する。この近赤外光は生体への副作用をほぼ及ぼすことなく光増感剤を励起することができる。励起された光増感剤は酸素ラジカルを発生させるか、または同時に熱を発生させることで周囲の組織を傷害することができる。光増感剤は低分子色素や金ナノシェルが期待されている。

放射線も外部エネルギー照射の一種である。PDT と比べて歴史は古く、前項で述べたように様々な放射線増感剤の開発が試みられてきた。ナノ粒子の応用に限って言うと、放射線増感剤としての抗がん剤、低酸素症緩和剤、生化学的薬剤は DDS キャリアとしてナノ粒子に担持することも行われるが、重元素(重金属)ナノ粒子はそれ自体が放射線と相互作用することで放射線の治療効果を増感する薬剤として扱われてきた。特に金ナノ粒子(金コロイド)は最も広く研究された素材であろう[28,29]。金は重金属でありながら非常に生体適合性が高いため、X線治療の黎明期から有望な放射線増感剤と目されてきた。さらに、表面がチオール基と容易に共有結合するため、抗体やペプチドといった腫瘍標的分子を修飾することで腫瘍特異的な送達も多く試みられてきた[30,31]。生体不活性な重金属を用いた放射線増感剤としての研究は白金のナノ粒子を用いても行われているが、金よりも高価であり表面修飾の容易さも金に譲るため、金ナノ粒子にとってかわることはなかった。しかし近年、NBTXR3 と名付けられたハフニアのナノ粒子が開発され、フランスで臨床試験が開始されている[32,33]。他にひとつ特殊な例を挙げると、世界で最初に実用化された癌の局所放射線治療材料である $Y_2O_3-Al_2O_3-SiO_2$ 系ガラスの微小粒子がある。これに熱中性子線を照射すると、ガラス中の ^{89}Y が ^{90}Y に変化し、半減期 64.1 時間の β 線放射体となる。 β 線は生体を 2.5mm しか貫通しないので、この粒子を腫瘍組織に注入すると周囲の正常組織へのダメージを最小限にとどめた放射線治療が可能となる。このガラス粒子は TheraSphere という商品名で既にアメリカ、カナダ、ドイツ、シンガポールおよび南アフリカなどにおいて、手術不可能な肝臓がん治療のために実用化されている。とはいえ、これは放射線の増感

剤というよりは小密封線源治療の一種というべきだろう。

ナノ粒子を医療応用する際には様々な物性が厳しく制御されなければならないが、その粒径も大きな要素の一つである。静脈投与によって全身を循環させるイメージングプローブとして用いる場合は、観察する信号強度の許す限り小さい粒子が好ましい。なぜなら、大きな粒径の粒子は毛細血管で血栓を生じる恐れがあり、また、 10nm >の粒子であれば尿から排泄可能であるためだ。ただし、粒子を小さくしてあまりに半減期が短くなる場合はその限りではない。一方で、抗がん剤や増感剤を腫瘍に送達する場合は $50\text{-}200\text{nm}$ のナノ粒子が用いられることが多い。その理由は、正常組織にはなく腫瘍組織だけが持つ enhanced permeability and retention (EPR) 効果の恩恵を受けるためである。がん細胞は自らを増幅するためだけに活動するので、腫瘍組織を形成する際に血管新生因子を過剰に発生し無秩序な血管を新生する。こうして作られた血管は潤沢な栄養を腫瘍細胞に供給するが、血管上皮細胞が完全に密でなく、数百 nm の物質でも透過してしまう。これを EPR 効果と呼ぶが、この効果により $50\text{-}200\text{nm}$ のナノ粒子は表面に腫瘍標的分子等を修飾しなくても、全身投与だけで受動的に腫瘍組織に蓄積しやすくなるとされている。

ナノ粒子の性状としては、表面電荷についてもよく議論される。分散液中での表面電荷は、ナノ粒子の血中安定性と細胞、組織への親和性に関わる。ナノ粒子、特に無機ナノ粒子は表面電荷が中性だと、純水中ですら容易に凝集して粒子塊を形成してしまう。さらにそれは直径数 nm といった小さなナノ粒子で顕著であり、一度凝集してしまったナノ粒子は超音波や機械的に剪断力を与えても再分散させることは非常に難しい。しかし、絶対値の大きな表面電荷を付与すると静電反発によってイオン性の水溶液中でも単分散させることが可能となる。あるいは、電氣的に中性の分子であっても親水性が高く、かさ高い高分子をナノ粒子表面に修飾することでも、表面修飾分子の体積排除によってナノ粒子を水溶液中で分散することができる。そこで、無機ナノ粒子を医療応用する際には表面改質がしばしば行われる。最もポピュラーで効果的な表面修飾剤はポリエチレングリコール (PEG) である。PEG は電氣的に中性だが、水中で高い分散性を付与することができる。さらに、PEG 修飾されたナノ粒子は免疫ステルス性を有するため、肝臓や脾臓といった網内系に多く存在する貪食細胞の捕食から逃れることができる。その結果、血中滞留性が格段に上がり、網内系への過度な蓄積を避けながら標的組織への粒子送達が可能となる。表面電荷を与えることで分散安定性を良くするような修飾分子としては、側鎖に大量のカルボキシル基を有するポリアクリル酸 (PAA) が挙げられる。PAA については、金ナノ粒子に表面修飾すると血中の低分子タンパク質を回収できるという報告もある。一方で、高分子表面電荷の正負についても異なった生体応答を見せる。一般的に細胞表面はリン脂質による負電荷を帯びているため、表面電荷が正のナノ粒子は正常細胞への非特異的な結合や取り込みを考慮しなければならない。すなわち、全身投与を行う場合は正常組織への副作用が見られる可能性がある。そのため、特定組織への DDS キャリアの場合は表面が負電荷のナノ粒子が好んで用いられる。

物理エネルギーの種類	医療応用	DDS の例
磁場	磁場誘導、交流磁場を利用した温熱療法	磁性微粒子
超音波	超音波診断、キャビテーション効果による薬剤・遺伝子デリバリー	マイクロバブル
電磁波 ラジオ波 (1m 以上) 近赤外線 (800-2500nm) 可視光線 (400-800nm) 紫外線 (200-400nm) X 線、 γ 線 (10nm 以下)	核磁気共鳴画像 (MRI) 診断 温熱療法、近赤外イメージング 光線力学療法 (PDT)、蛍光イメージング 光増感治療 放射線診断・治療	マグネタイト微粒子、デンドリマーなど 金ナノシェルなど ポリマーコンジュゲート、リポソーム、ミセルなど 二酸化チタンナノ粒子 金コロイド

表 1 物理エネルギーの種類とその医療応用、さらに診断・治療効果を高めるための DDS の例。片岡一則著、医療ナノテクノロジー -最先端医学とナノテクの融合-より一部改変[34]。

5. ナノ粒子の分析技術

ナノ粒子は概ね 100nm>の直径を持つ微粒子であるため、光学顕微鏡で直接観察することはほとんど不可能である。また、その形状だけでなく、性質について分析する場合、単なるバルク素材とは異なった構造物であることを理解して行わなければならない。この項では、本研究で用いた機器分析的な手法について原理を解説する。

(i) 動的光散乱法 (DLS) による粒子径測定[35]

懸濁溶液や溶液中に分散した微粒子は、溶液分子からの衝突を受けてブラウン運動をしている。その動きは流体力学的直径（ストークス径）が大きな粒子では遅く、小さな粒子になるほど早くなる。このストークス径とブラウン運動の活発さ（拡散係数）の関係は、式(1)に示すストークス-アインシュタインの式で表すことができる。

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta_0 D} \quad \text{式(1)}$$

ここで、 d はストークス径、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 η_0 は分散媒の粘度、 D は拡散係数である。ブラウン運動をしている粒子にレーザー光を照射すると、粒子からの散乱光はそれぞれのブラウン運動の速度に対応した揺らぎが観測される。DLS では、溶液中に分散している粒子にレーザー光を照射し、その散乱光を光子検出器で観測する。その際にピンホールや光ファイバー系の光学系を用いると、ブラウン運動の様子を散乱光強度の揺らぎとして観測することができる。

散乱光から粒子径を求めるための演算手法として、光子相関法または周波数解析法が用いられる。ブラウン運動する粒子からの散乱光強度の時間揺らぎを、光子相関法では時間領域で解析して時間相関関数で表し、数解析法では周波数領域で解析してパワースペクトルで表す。ここでは多くの DLS 測定装置に搭載されている光子相関法について解説する。光子相関法では、まず散乱光の強度ゆらぎを光子相関計で演算し、自己相関関数を求める。この自己相関関数を数値解析することで粒子径を求めることができる。散乱強度の時間変化から直接求められるのは二次の自己相関関数 $G_2(\tau)$ で、式(2)で表される

$$G_2(\tau) = 1 + \beta |G_1(\tau)|^2 \quad \text{式(2)}$$

ここで、 $G_1(\tau)$ は一次の自己相関関数、 β は測定する工学系に依存する定数である。粒子が単分散の場合には $G_1(\tau)$ は単一指数減衰曲線となり、減衰定数 Γ を用いて式(3)と表される。

$$G_1(\tau) = \exp(-\Gamma\tau) \quad \text{式(3)}$$

Γ は並進拡散係数 D を用いて次のように表される。

$$\Gamma = q^2 D \quad \text{式(4)}$$

$$\mathbf{q} = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \times \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{式(5)}$$

ここで \mathbf{q} は散乱ベクトル、 n_0 は液体の屈折率、 λ_0 はレーザー光の波長である。得られた拡散係数 D から、式(1)を用いて、粒子径 d が求められる。

多分散では単分散とは異なり、多くの単一指数減衰曲線が組み合わさるので、さらにキュムラント法解析を用いて平均粒子径を、ヒストグラム法を用いて粒度分布の解析を行う。

(ii) フーリエ変換赤外吸収分光法およびラマン分光法[36]

<赤外吸収スペクトル>

赤外線とは波長が 3-16 μm の範囲の電磁波をさし、この振動数に相当するエネルギーは 10^3 - 10^4 cal/mol であり、分子の振動エネルギー準位間のエネルギーに相当する。それゆえ、ある分子に赤外線を照射すると、その分子の基底振動エネルギー準位が励起されて一段階だけ高められ、この繊維に必要な振動数の赤外線が吸収される。振動エネルギーとは、原子間の共有結合（配位結合を含む）の軸方向に結合距離が伸びたり縮んだりする伸縮振動、結合軸のひねりと揺れの変角振動、多原子分子では原子間の結合角度がはさみ状に開閉する変角振動などに必要なエネルギーからなっている。ただし、振動エネルギー準位間の遷移には回転エネルギー準位間の遷移も伴うため、観測された赤外吸収スペクトルは純粋な振動エネルギー準位間の遷移だけに基づく線スペクトルにはならず、ある振動数の前後に狭い幅を持った帯スペクトルとなる。このように赤外吸収は分子内の特定の官能基と骨格構造に固有の振動スペクトルを示し、各特性吸収の位置と強度とを同族体ごとの原子団の振動の種類に帰属させたデータ表があるので、それらと照合して原子団の推定やその相互作用の検出を行うことができる。

赤外分光光度計には、分散型とフーリエ変換型がある。分散型とは、光源からの光をプリズムや回折格子によって分光し、波長を変化させて順に試料に照射し、透過率を測定して赤外吸収スペクトルを求める。一方、フーリエ変換型(Fourier transformation-IR; FT-IR)とは干渉計によって光源からの連続光の一部に光路差を与えて、得られる干渉波(インターフェログラム)をフーリエ変換して成分波のスペクトルを得る方法である。FTIR の特徴は、分散型の分光光度計と比較すると測定時間が大幅に短縮でき、さらに高感度分析が可能ということがあげられる。その原理は以下のようなになる。

(1)干渉波を得るためのマイケルソン干渉計は半透鏡(ビームスプリッター)で入射光を二分し、反射光を固定鏡に透過光を移動鏡にあて、両鏡からの反射光を一つにして干渉波を得るものである。光源からの赤外線は試料を透過して一部の波長が吸収され、干渉計を通ると光路差によって変化する干渉波を得ることができる。

(2)干渉波が波長 λ の単色光で表される場合、光路差が $n\lambda$ ($n=0, 1, 2, \dots$) (同位相)のとき強度が最大になり、この他の光路差では位相がずれるため互いに弱め合い、 $(n+1/2)\lambda$ (逆位相)

のとき強度が最小になるので正弦波を得る。波長 λ_1 と λ_2 の二色光では、光路差によって波長のずれが生じ、両波長の合成波はランダムになる。連続光の場合、光路差 0 のときは入射光の強度を示すが、光路差が大きくなると波の高さが減少して直線状になる。

(3) n 個の三角関数の一次結合による合成波に n 個の測定点があると、元の三角関数を求めることができる。これは、光路差ごとの強度を求めて干渉波を描き、干渉波をデジタル化してから、コンピュータを用いてフーリエ変換で解析を行う。

(4) 干渉波の測定は、光路差が少し負の位置から行う。負側の波形は光路差 0 に対し、正側の波形と対称となっている。このアナログ干渉波を一定間隔でサンプリングし、AD 変換器でデジタル値にする。この測定を所定回数積算すると精度の高いデジタル干渉波を得ることができる。

(5) デジタル干渉波をフーリエ変換し、波数に対する吸光度を求め、これを透過率になおすと目的のスペクトルを得ることができる。

<ラマンスペクトル>

レーザー光などからの単色光(振動数 ν)を試料の分子に照射すると、電磁波の電気ベクトルは分子内の電子を周期的に振動させる(強制振動という)ので、入射光と同じ振動数 ν で振動する電気双極子 μ の大きさは、電気ベクトルの大きさと分極率との積に等しい。分極率とは電場による分子のゆがみを表し、振動の際の体積変化の有無と見なせる、その分子に固有の量である。一方、この分子を構成している原子間の振動数を ν_i ($i=1\sim n$) とすると、その振動に伴って分子の電子配置も振動数 ν_i で周期的に変化している。分極率は分子中の電子に依存する量であるから、分極率にも振動数 ν_i の変化が起こることになる。上記の 2 点から、固有振動数 ν_i の分子が ν の単色光で励起され分子内の電子が強制振動された場合、振動双極子 μ は ν , $\nu-\nu_i$, $\nu+\nu_i$ で振動する三つの部分からなる。このような双極子の生成はその分子を光源として働かせ、入射光束の方向とは異なった方向に入射光を反射させる原因となる。散乱光が入射光と同一の振動数 ν のときをレーリー散乱、分子の固有振動のために入射光とは異なる振動数 $\nu\pm\nu_i$ の散乱光が生じたときをラマン散乱が起こったという。ラマン散乱のうち入射光よりもエネルギーの小さい光($\nu-\nu_i$)をストークス散乱光、エネルギーの大きい光($\nu+\nu_i$)を反ストークス散乱光と呼ぶ。測定したデータは、横軸にラマンシフト [cm^{-1}]、縦軸に散乱強度をプロットし、ラマンスペクトルを得る。このスペクトルから得られるピーク位置 ν_i は、赤外吸収スペクトルと同様に振動の種類に帰属させたライブラリがあるので、それらと照合して構造の推定やその相互作用の検出を行うことができる。また、赤外吸収は双極子モーメントが変化する場合に活性であるのに対し、ラマン分光は分極率が変化する場合に活性である。そのため、二酸化炭素のような直線分子では、変角振動と逆対称伸縮は赤外吸収で活性、逆にラマンでは不活性、また、対称伸縮は赤外吸収で不活性、逆にラマンでは不活性と選択律が異なる。このように、赤外吸収スペクトルとラマンスペクトルはその活性・不活性に関して相補的な役割を持つ。

(iii) 電子スピン共鳴法(ESR)[37,38]

電子スピン共鳴法は電子スピン（不対電子）を観測する唯一の分光法である。スピンのもった電子に磁場を与えるとゼーマン効果によって物質のエネルギー準位が分割される（ゼーマン分裂）。この二つのエネルギー差に相当するエネルギー（周波数によってマイクロ波や近赤外光が使われる）を外部から加えることで共鳴を起こす。このエネルギーの吸収量を検知することで ESR スペクトルを得ることができる。この共鳴現象を利用し、得られた ESR スペクトルを解析することで、ラジカルや遷移金属などの物質中の電子スピンの状態とその量を調べることができる。

<共鳴条件—孤立電子>

電子は、電荷 $-e=-1.6022 \times 10^{-19}$ [C]、静止質量 $m=9.1095 \times 10^{-31}$ [kg]を持つ素粒子である。空間に孤立した電子が一個ある状態を考えると、電子は空間に広がりを持ち、全体として $-e$ の電荷を持つ。そしてある軸の周りに自転運動している。そのために電子は磁気モーメント μ_e を持つ。孤立電子の場合 μ_e の大きさは式(6)のように表される。

$$|\mu_e| = \frac{e\hbar}{4\pi m} \equiv \mu_B \quad \text{式(6)}$$

ここで、 μ_B はボーア磁子と呼ばれる磁気モーメントの単位素量である。 e, m, \hbar （プランク定数）および光の速さを式(6)に代入すると、 $\mu_B=9.2741 \times 10^{-24}$ [J/T]となる。このような微小な磁気モーメントを持つ磁石である電子に低磁場 H が加えられると、磁気モーメントは磁場の方向に対して平行になろうとする。磁気モーメント \mathbf{M} を有する磁石のエネルギーは一般に、

$$E = -\mathbf{M} \cdot \mathbf{H} = -MH \cos \theta \quad \text{式(7)}$$

で表される。ここで、 θ は磁場の方向と磁針の方向とがなす角度を意味し、磁場と方向が一緒だと $\theta=0^\circ$ で最も安定になる。逆に $\theta=180^\circ$ の時最も不安定な状態となる。電子の磁石の場合、そのエネルギーは量子化され、離散的、すなわち磁場の方向に対して磁気モーメントの方向は平行か反平行か、二つのエネルギー状態しか取れなくなる。これを式(1-7)と同じような書き方をすれば式(8)のようになる。

$$E = \mu_B H (2m_s) \quad \text{式(8)}$$

ここで、 m_s は磁気量子数と呼ばれ、 $m_s=-1/2$ （磁気モーメントは磁場に平行）と $+1/2$ （反平行）しか取れない。

m_s は磁場という外界からの作用に対して変化しうる一種の自由度であって、その大きさは $1/2$ の大きさである。このような自由度を演算子 S というベクトルに書き直す。これをスピン演算子、あるいはスピンのと定義する。すると電子の磁気モーメントは式(9)のように方向の自由度を含めた量として表現できる。

$$\mu_e = -\mu_B S \quad \text{式(9)}$$

原子内に2個以上の電子が存在すると、それぞれのスピンの合成によって合成スピン S が

できあがる。例えば2個あると、 $S=1$ と $S=0$ の状態ができる。それぞれに磁場がかかると、前者は $m_s=1,0,-1$ 、後者は $m_s=0$ と表される。式(8)にそれぞれの m_s を代入してEをHの関数とすると、2つの m_s に対応して2つのエネルギー状態がHno大きさと共に乖離していく。このような電子スピンによるエネルギー準位の分裂をゼーマン分裂と呼ぶ。電子は通常、安定なエネルギー状態を選ぶから、下の状態($m_s=-1/2$)に入っている。ここで、外部から周波数 ν をもつ電磁波を電子に与えると、電磁波のエネルギー $h\nu$ が二つのエネルギー間隔 $2\mu_B H$ に等しくなったとき電子は $h\nu$ を吸収し、上の反平行向きの状態($m_s=1/2$)に遷移する。この現象をESRと呼ぶ。このときの共鳴条件は式(9)のように表される。

$$h\nu = 2\mu_B H_0 \quad \text{式(9)}$$

これは、共鳴周波数と共鳴磁場とが比例関係にあることを示しており、ESRの基本的関係式である。

<共鳴条件—n個の電子>

原子や分子の中の電子は原子核の周囲を軌道運動している。この軌道運動による寄与は、共鳴条件式(9)の右辺の定数への補正となって表れる。まず一般的には2の代わりに $g=g_e+\Delta g$ を用いる。ここで g_e とは、孤立電子の場合に相対論的補正が加えられた時の値で、 $g_e=2.002316$ のような半端な数となる。また、 Δg は不対電子の軌道運動、他の電子からの影響などをすべて含んでいる。このような一般的な g を用いて書き直すと、

$$h\nu = g\mu_B H_0 \quad \text{式(10)}$$

となる。この式をESRの共鳴条件式という。

<g値>

ある不対電子が軌道運動や自転によって角運動量を持つ場合、磁気モーメントが生まれることで外部磁場の影響を受ける。このときゼーマン効果によって生じる、電子のエネルギー準位間のエネルギー差 ΔE を $g\mu_B H_0$ と書くとき、比例定数 g を g 値(スペクトル分岐因子)と呼ぶ。ESRでは周波数既知のマイクロ波の波長を掃引して共鳴条件式(10)を満足する磁場を求めるので、 g 値とはどのような磁場で共鳴が観測されるかを表す因子と解釈することができる。通常、ESRでは周波数を固定するので、 g 値と共鳴磁場とは反比例関係にある。角運動量が純粋に電子の軌道運動だけであれば $g=1$ 、また、純粋に自転によるものだけであれば $g=2$ となる。物質の不対電子は一般にこのような理想的な値からずれており、そのずれ Δg がどの程度であるかが物質の電子状態を探る重要な手掛かりとなる。有機ラジカルや多くの遷移金属イオンの g 値は軌道運動がほとんど寄与していないので2に近い値になる。一方、気相のラジカルや多くの希土類金属イオンなどでは軌道運動の寄与が大きく、2から大きくずれた値となることが多い。このように g 値は不対電子種に特有の値となっており、これを用いて物質が持つ不対電子種の特定ができる。

(iv) X線吸収微細構造 (XAFS) [35]

原子は、それぞれ特有のエネルギーでX線を吸収し、内殻電子を光電子として放出し、急激に吸収係数が増大する。この吸収係数の急激な増大を吸収端と呼ぶ。放出された光電子は式(11)で表されるエネルギーを持つ。

$$E_{kin} = h\nu - E_B - \phi \quad \text{式(11)}$$

ここで E_{kin} は光電子の運動エネルギー、 $h\nu$ は入ってきたX線のエネルギー、 E_B は内殻電子の束縛エネルギー、 ϕ は仕事関数である。吸収端は、内殻電子の準位により、K吸収端、L吸収端、M吸収端と分類され、それぞれ主量子数 1, 2, 3 に対応する。主量子数には、方位量子数が異なる副殻が存在し、方位量子数の違いに応じて、いくつかの吸収端が表れる。さらに、軌道-スピン相互作用により、0 以外の方位量子数 L は、全角運動量 J の異なる 2 つの準位に分裂する。すなわち、 $2p$ (方位量子数 $L=1$) はスピン量子数 ($s=1/2$) により、全角運動量 $3/2$ (=方位量子数 $L(1)+$ スピン量子数 $s(1/2)$) と全角運動量 $1/2$ (=方位量子数 $L(1)-$ スピン量子数 $s(1/2)$) の二つに分裂する。このため、L吸収端には、 $2s$, $2p_{1/2}$ と $2p_{3/2}$ の 3 つの吸収端が表れる。この 3 つの吸収端のことをそれぞれ L_I , L_{II} , L_{III} 吸収端と呼ぶ。M吸収端 (主量子数 3) にも同様に $3s$, $3p_{1/2}$, $3p_{3/2}$, $3d_{3/2}$, $3d_{5/2}$ の 5 つの吸収端が表れ、それぞれ M_I , M_{II} , M_{III} , M_{IV} , M_V 吸収端と呼ぶ。原子番号が大きくなるに従い、それぞれ同じ主量子数に属する吸収端のエネルギー分裂が大きくなる。吸収端より高いエネルギーでは、吸光度 μt (= $\ln(I_0/I)$) が単調に減少するだけでなく、微細構造が表れる。これが XAFS である。XAFS は吸収端からのエネルギー差により 2 つの領域に分けられる。吸収端前後から 40eV 付近までに現れる微細構造を XANES または NEXAFS と呼ぶ。また、それ以上高いエネルギーに現れる微細構造を EXAFS と呼ぶ。XANES は X線吸収に伴い励起された電子の空の束縛準位への遷移あるいは周りの電子による多数回散乱により出現する微細構造であり、吸収原子の電子構造や周りの幾何構造を強く反映した吸収ピークや微細構造を与える。それに対して、EXAFS は、周りの原子による一回散乱により出現する微細構造であり、中心原子から周りの原子までの結合距離や配位数の情報を与える。

<EXAFS の原理>

電子は粒子としてだけでなく、波としても記述される。飛び出した電子は周りの原子により散乱され、元の X線吸収原子に戻るが、この散乱されて戻ってきた電子とこれから飛び出そうとしている光電子とが波として干渉しあう。この干渉はどのように表せるかを考える。まず、両者の位相差を調べるには、行路差と波長の関係を使えばよい。行路差 d が波長 λ の整数倍の時には強め合い、半波長分ずれているときには弱めあう。行路差は、光電子が周辺の原子まで行って戻ってくるのに必要な距離に等しいから、結合距離 r の 2 倍になる。したがって、

$$d = \frac{2r}{\lambda} = \begin{cases} n & \text{強め合う} \\ n + \frac{1}{2} & \text{弱めあう} \end{cases} \quad \text{式(12)}$$

となる。この周期性は sin 関数と同じである（ただし、位相は $\pi/2$ ずれている）。そこで、散乱に伴う位相のずれも含めて、すべての位相のずれを ϕ とすると、sin 関数で干渉による電子波の振幅は、

$$\sin\left(2\pi \frac{2r}{\lambda} + \phi\right) = \sin(2kr + \phi) \quad \text{式(13)}$$

と書くことができる。ここで、波数 $k=2\pi/\lambda$ を導入した。波数の意味は単位長さにある山の数である。干渉の結果、吸収確率は式(13)に比例して変化する。また、同じ距離に散乱する原子が N 個あれば、干渉が N 倍強調される。それでは、光電子の波長 λ あるいは波数 k はどのように制御することができるだろうか。電子の波数 k と電子の運動エネルギー E_{kin} の間には、量子論で知られている

$$E_{kin} = \frac{\hbar^2 k^2}{2m} \quad \text{式(14)}$$

の関係がある。ここで、 $\hbar = h/2\pi$, h はプランク定数、 m は電子の質量である。 E_{kin} は、光のエネルギーと式(11)の関係にあるから、光のエネルギーを変化させると、光電子の波数が変化して、スペクトルに式(13)で与えられる微細構造が表れる。EXAFS の振幅の大きさ χ は、吸収係数 μ から吸収原子が孤立しているときの吸収係数 μ_0 を引き、この μ_0 で割ることで表す。より詳細なハンケル関数と平面波近似および小原子散乱を用いた理論によると、

$$\chi(k) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)} = S_0^2 \sum_i \frac{N_i F_i(k_i)}{k_i r_i^2} e^{-2k_i^2 \sigma_i^2} \sin(2k_i r_i + \phi_i(k_i)) \quad \text{式(15)}$$

のように書くことができる。ここで、異なる結合距離ごとにまとめて、 i という添字をつけ、これを i 番目の配位圏と呼ぶ。また、 $F_i(k)$ は核配位圏が光電子を散乱する強さ（後方散乱因子）であり、 $\phi_i(k)$ は位相のずれである。また、 S_0^2 は EXAFS の振幅の補正項であり、 σ_i は熱振動などによる結合の揺らぎを表すデバイーワラー因子である。

<XANES の原理>

X 線吸収端近傍には、XANES と呼ばれる微細構造が表れる。吸収端は電子が光電子として飛び出すことにより生じる。吸収端より少しエネルギーの高い X 線で励起すると、飛び出した電子はエネルギーも小さいため、周りの原子より多数回散乱される。すると、干渉の仕方も複雑になり、その周辺の原子配置や電子状態により大きく微細構造が変化する。また、吸収端の現れる位置は中心原子の価数にも依存し、吸収端の立ち上がりの位置は中心原子の酸化数を反映する。さらに、吸収端の直前や直後には、まだ中心原子に束縛された空軌道への遷移が起こり、対称性や空き準位の状態密度を与える。測定法は

EXAFS のときと全く同じで良い。

6. 二酸化チタンの医療応用

二酸化チタンという素材は我々の日常生活にもなじみ深いものとなってきた。古くから白色顔料として用いられており、ルチル型の二酸化チタンが生体に不活性であることが判明してからは食品添加物や化粧品にも応用されている。一方でアナターゼ型の二酸化チタンは光触媒としてよく知られており、太陽電池、コーティング剤といった環境分野で一つの産業を築き上げている[39]。

二酸化チタンには、ルチル型、アナターゼ型、ブルッカイト型の3種の結晶構造があるが、工業製品として応用されているのはルチル型とアナターゼ型がほとんどである。両結晶構造は正方晶系に属し、ルチル型の方が熱的に安定なため、900°C以上で焼成するとすべての二酸化チタンはルチル型に転移する。さらに、二酸化チタンは無機材料の中では最も高い屈折率を持ち、安定的に粒度分散の良い粒子が工業的に得られるため、隠ぺい力および着色力が優れ、200-300nmの粒径を持つルチル型二酸化チタンが白色顔料として塗料やインキ、紙、プラスチック、繊維、ゴムなどに幅広く使用されている。特に、100nm以下の二酸化チタンをナノ二酸化チタンと呼び、顔料酸化チタンより可視光の散乱が少なく透明性が高い、単位重量当たりの粒子数が多く紫外線の遮蔽能が高い、比表面積が大きいので触媒能が高いなど、顔料酸化チタンとは異なった性質を示す。そのため、透明フィルムやコーティング剤、日焼け止め、光触媒などの分野で注目されている。

化粧品や食品添加物としても応用されていることからわかるように、二酸化チタンは生体に非常に不活性である[27,40,41]。一般的には、金属チタンが軽く丈夫で人体に影響を与えないことから人工関節や義足の素材として使われていることは良く知られているが、実際には金属チタンと生体の境界、あるいは空気との固気界面ですら金属チタンは直ちに酸化され二酸化チタン被膜を形成している[42]。すなわち、生体不活性なのは金属チタンというよりむしろ酸化チタンである。例えば、顔料酸化チタンをラットに0-10%で経口投与した場合、13週間、最大投与量において混餌しても生存率、体重への影響、投与に関連した病変や組織の変性は見られなかったという報告がある[43]。また、経皮吸収にも問題はないと言われている[44,45]。とはいえ、このような安全性が社会的に担保されているのはサブミクロンオーダーより大きなバルク素材についてだけである。近年、バルクでは生体に目立った毒性を与えない物質でもナノ構造物になると毒性のリスクが存在することが問題となり、「ナノリスク」と呼ばれている[46]。ゆえに、例えば金[47]、銀[48]、シリカ[49]、カーボン[50]、酸化亜鉛[51]、チタニア[52,53]といった比較的生体不活性な物質であっても、ナノ構造物の体内動態と毒性については調べる価値があり、実際盛んに調査が続けられている。

二酸化チタンを語る上で光触媒能については避けて通れない。光触媒は光が当た

った時に実際に起こる化学反応で、これを光誘起分解反応ともいう。アナターゼ型の二酸化チタンは価電子帯と伝導帯のバンドギャップが 3.2eV であるため、このエネルギーと同等かそれ以上の紫外線 (UV) が当たると光子からエネルギーを受け取り、価電子帯の電子が伝導帯に励起される [54]。その結果、価電子帯には非常に酸化力の高い正孔が、伝導帯には還元力のある電子が生まれることになる。この正孔の酸化力はオゾンよりも高く、二酸化チタン表面に接している物質を酸化してしまう。それが有機物だった場合、最終的に二酸化炭素まで分解することができる。現在では、この光触媒能を利用して、光が当たると表面に付着した有機物を分解するセルフクリーニングコーティング、空気中の臭い分子を分解するための脱臭コーティング、あるいは表面に付着した病原菌やウイルスを分解するための抗菌コーティングを施した工業製品が多く普及している。一方で、水や土壌の純化処理にも応用が期待されているが、光触媒は表面反応であることから未だ完全に実用化されているとは言えない。また、二酸化チタンには紫外線照射を受けると表面の濡れ性が格段に上昇するという超親水性素材という側面があるが、これもまた塩ビテナ材や建築物の壁面クリーニング処理に応用される理由となっている。

光触媒の有機物分解反応を医療応用しようという試みはいくつかなされてきた。すなわち、がん細胞に二酸化チタンを接触させたうえで UV 照射を行い、光触媒の酸化力をもってがん細胞を傷害するという治療スキームである。R. Cai らは *in vitro*, *in vivo* の両方において、二酸化チタン粒子と UV を併用した抗がん治療の可能性を示した [55]。さらに、私の研究グループでは、二酸化チタンナノ粒子の表面にポリアクリル酸 (PAA) を修飾することで血中での単分散を可能にし、さらに、一部のがん種の表面抗原として提示されている EGFR と特異的に結合する抗 EGFR 一本鎖抗体を修飾することに成功した。これと UV 照射を併用することで、*in vitro* においてがん細胞のみを特異的に死滅させることに成功した [56]。ところで、光触媒の抗菌、抗がん作用のメカニズムについて、光触媒表面に接触した細胞の界面を逐一酸化・分解しているとは考えにくい。光触媒は水や酸素と接している場合、励起電子 (e^-) は表面吸着した酸素と反応し、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) を生成する。この活性酸素は H^+ と反応して、より高活性な $HO_2 \cdot$ ラジカルを形成したり、過酸化水素を経て酸化反応に関与する。一方、正孔 (h^+) は表面に存在する吸着水や表面 OH 基を酸化して、酸化力の高い $\cdot OH$ ヒドロキシラジカルを生成する。つまり、実際には放射線の細胞毒性メカニズムのように、ROS が介在していると考えるのが自然である。

酸化チタン表面に H_2O_2 を反応させると H_2O_2 が吸着し、表面にスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、ペルオキシドアニオン (O_2^{2-})、ヒドロペルオキシド ($-OOH$) といった (広義の) 活性酸素種が安定に存在することが知られている [57–59]。また、純粋酸化チタンではなく他の元素をドーパされた素材でも同様の現象が確認され [60]、あるいは、チタニウム塩に過酸化水素を加えて作成された酸化チタンゲル (過酸化チタンゲル、perotitanium gel とも) からも同様の活性酸素種が検出されている [61][62]。こうした活性酸素種を持つ酸化チタンは可視光型光触媒としてや [63,64]、有機合成触媒として [62][65]

研究がおこなわれている。一方で、金属チタン製のインプラントや人工骨が体内で産生される H₂O₂ に浸食されて過酸化チタン種が生成することも報告されている[66]。

7. 本研究の目的：放射線増感剤としての過酸化チタンナノ粒子の確立

私の研究グループでは本来、アナターゼ型二酸化チタンと UV[56]や超音波[67]といった外部エネルギー照射を併用したがん治療を目指してきた。その治療スキームとしては、前項で述べたように、二酸化チタンナノ粒子表面に腫瘍細胞認識分子を修飾し、腫瘍組織に二酸化チタンを集積したうえで外部エネルギー照射によって ROS を発生させ、非侵襲的ながん治療を行うというものである。しかし、UV や超音波は、すい臓がんをはじめとする生体の深部に存在する腫瘍組織までエネルギーを送達することが難しいという問題があった。UV はせいぜい数センチ、超音波でも生体深部に届くまでにはエネルギーはかなり減衰してしまう。そこで、我々は、より生体透過性の高いエネルギー照射である X 線と相互作用して放射線増感効果を示すナノ粒子を探索した。その結果、アナターゼ型の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) に過酸化水素を処理して得られた黄色い粉末である過酸化チタンのナノ粒子 (PAA-TiO_x NPs) が有望であることを突き止めた。図 1 に PAA-TiO_x NPs の合成手順を示す。

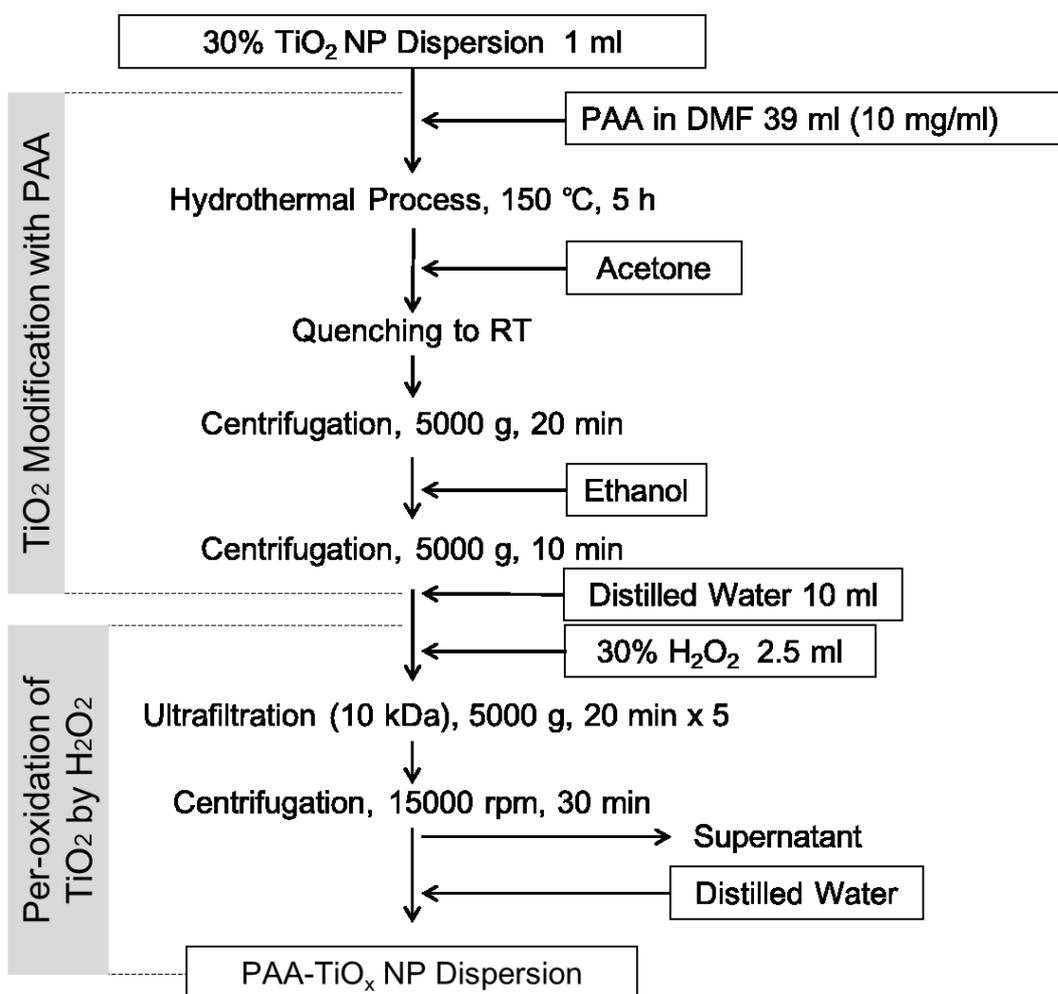


図1 PAA-TiO_x NPs の合成手順

ポリアクリル酸修飾した過酸化チタンナノ粒子は、ヒト膵臓がん細胞株 (MIAPaCa-2) ゼノグラフトマウスを用いて *in vivo* で放射線増感効果を示し、放射線照射単体よりも有意に固形腫瘍の成長を阻害した[68]。しかし、PAA-TiO_x NPs が如何にして放射線の治療効果を増感するかは不明であった。すでに上で述べた通り、それ自身を放射線増感剤として開発が行われている無機ナノ粒子は、原子番号の大きい原子が放射線と相互作用することによって二次電子や特性 X 線を副次的に生じ、連鎖的に増幅された ROS が細胞を傷害するという作用機序であった。しかし、PAA-TiO_x NPs は最も重い原子でも Ti であり、ほとんど X 線と相互作用しないことが明白である。また、実際、TiO₂ NPs に放射線照射しても ROS を増幅しなかった。ゆえに、PAA-TiO_x NPs は全く新しい作用機序で放射線の治療効果を増幅していると予想された。

そもそも、産業ベースで活発に研究、実用化がなされている二酸化チタンに対して、本研究の対象となっている過酸化チタン (peroxotitanium) について言及されている文献はそう多くない。例として、一ノ瀬らは四塩化チタンとアンモニア、過酸化水素を反応させた

後加熱し、ペルオキシ改質アナターズゾルを得ることに成功している[69]。これは建築物や各種金属、プラスチックの各種原料や製品に直接光触媒膜をコーティングするバインダー剤として一部産業応用されている。また、バルクの二酸化チタン板、または粉末表面に過酸化水素を処理し、生じるラジカル種を ESR を用いて分析した報告もいくつか存在する[57,66]。しかし、過酸化チタンのナノ粒子が放射線増感作用を有するという報告は我々が初出である。ゆえに、PAA-TiO_x NPs と放射線照射の併用治療は全く新しい作用機序によって、従来の金に代表される重金属ナノ粒子を用いた放射線増感治療のデメリットを払拭し、新たな放射線治療のスタンダードにとってかわる可能性がある (図2)。

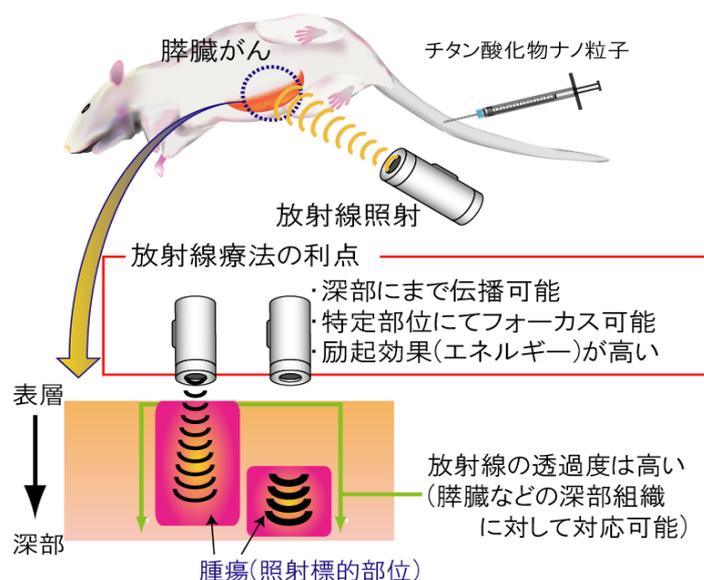


図2 提案する PAA-TiO_x NPs と放射線の併用療法

さらに、私の研究グループでは無機ナノ粒子表面に修飾した PAA に腫瘍標的化抗体や診断プローブを修飾する技術を確認している。あるいは、私の研究室で開発しているバイオナノカプセル (BNC) と呼ばれる DDS キャリアを用いることもできる。BNC は B 型肝炎ウイルス (HBV) の外皮タンパク質と脂質二重層から成る中空ナノ粒子であり、遺伝子組み換え技術によって様々な組織に標的化した BNC を酵母に産生させることに成功している。そこで、PAA-TiO_x NPs には診断プローブを修飾し、このハイブリッド粒子を BNC に包含して腫瘍部位に送達することも考えられる (図3)。

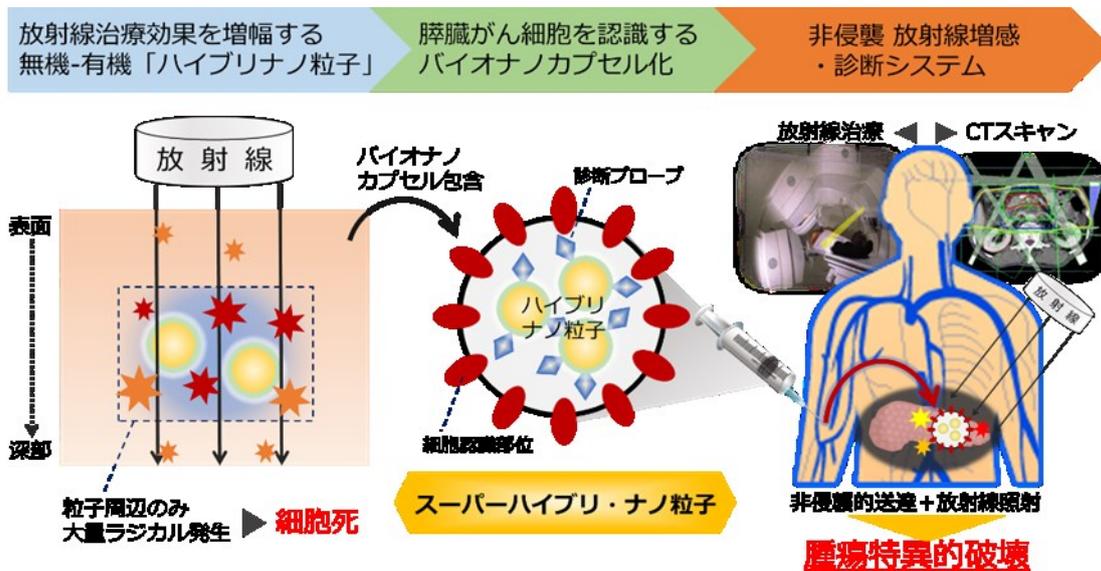


図3 PAA-TiO_x NPs を BNC で標的化した「スーパーハイブリナノ粒子」と従来型の放射線治療を併用した新規放射線治療スキーム

しかし、いずれにせよ、PAA-TiO_x NPs を実用化するためには放射線増感作用の機序解明は不可欠である。過酸化チタンという素材の作用機序を考えるうえで、過酸化水素の寄与は非常に重要と思われる。なぜなら、過酸化水素は過酸化チタンの原料のひとつであり、過酸化水素自体が放射線増感効果を有するからである。Y.Ogawa らは過酸化水素を放射線増感剤として臨床試験を行い、目覚ましい治療実績を残している。KORTUC-I と名付けられたこの治療スキームは、放射線治療を行う対象の患部に直接過酸化水素を塗布、浸透し、その上で従来型の放射線照射を行うというシンプルなものである[70]。そして、乳がんや皮膚がんにおいて、切除不可能なレベルの症例を寛解した。ただし、過酸化水素は低分子なため、組織浸透性が高く患部周囲の組織にまで拡散してしまうという問題があった。また、その際、過酸化水素が浸透した正常組織には非常な疼痛が引き起こされた。そのため、過酸化水素の浸透を制御できる乳がんや皮膚がんに適用が制限されていた。現在は、これを改善するために過酸化水素水をヒアルロン酸ゲルと混合して患部に注射することで、従来のKORTUC-I よりも過酸化水素の浸透を遅らせ、また、保持時間も延長するという新しい治療スキーム (KORTUC-II) も試みられている[71,72]。彼らの提唱する過酸化水素の放射線増感作用機序は次のようである。酸素欠乏に陥っている腫瘍内に過酸化水素が導入されると、腫瘍細胞内のペルオキシダーゼが過酸化水素を代謝し酸素に変えることで細胞内酸素濃度が上昇する。一方で、ペルオキシダーゼは高濃度の過酸化水素によって不活化されてしまうという[71]。その結果、過剰に発生した酸素による酸素効果で電離放射線の ROS 産生効率が上がり、治療効果が向上する。一見矛盾した説明に見えるが、彼らの研究グループによって少しずつその全貌が確かめられてきている。

本研究では、PAA-TiO_x NPs を放射線増感剤として実用化するうえで解明しなければならない要素について検証することを目的としている。第一章では、PAA-TiO_x NPs の持つ化学的物性評価を通して放射線増感作用機序解明を試みた。第二章では、PAA-TiO_x NPs が *in vivo*, *in vitro* において生体に与える毒性評価、体内動態評価を行った。第三章では、過酸化水素水を対照とすることで PAA-TiO_x NPs が *in vitro* において細胞に与える影響を解明し、さらなる作用機序の理解を進めた。

8. 引用文献

- [1] 国立がん研究センター がん情報サービス. <https://GanjohoJp/Public/IndexHtml> no date;
- [2] Barnett GC, West CML, Dunning AM, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 2009;9:134–142.
- [3] Baskar R, Lee KA, Yeo R, et al. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* 2012;9:193–199.
- [4] Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol* 2015;5:1–13.
- [5] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2010;461:1071–1078.
- [6] Kepp O, Senovilla L, Vitale I, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014;3:e955691.
- [7] Emami B. Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Radiation. *Reports Radiother Oncol* 2013;1:36–48.
- [8] Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, et al. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 2009;9:442–458.
- [9] Harrison LB, Chadha M, Hill R, et al. Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes. *Oncologist* 2002;7:492–508.
- [10] Verellen D, Ridder M De, Linthout N, et al. Innovations in image-guided radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:949–960.
- [11] Briggs B, Ververis K, Rodd AL, et al. Photosensitization by iodinated DNA minor groove binding ligands: Evaluation of DNA double-strand break induction and repair. *J Photochem Photobiol B Biol* 2011;103:145–152.
- [12] Song T, Zhang X, Fang M, et al. Concurrent chemoradiotherapy using paclitaxel plus cisplatin in the treatment of elderly patients with esophageal cancer. 2015;3087–3094.
- [13] Niyazi M, Harter PN, Hattingen E, et al. Bevacizumab and radiotherapy for the treatment glioblastoma : brothers in arms or unholy alliance ? of. *Oncotarget* 2015;

- [14] Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, et al. Chemoradiotherapy of Locally Advanced Esophageal Cancer. *Jama* 1999;281:1623–1627.
- [15] Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Futur Oncol* 2012;8:1167–1181.
- [16] Jain S, Ch B, Coulter JA, et al. Europe PMC Funders Group Author Manuscript CELL-SPECIFIC RADIOSENSITIZATION BY GOLD NANOPARTICLES AT MEGAVOLTAGE RADIATION ENERGIES. 2011;79:531–539.
- [17] Kohshi K, Kinoshita Y, Imada H, et al. Effects of radiotherapy after hyperbaric oxygenation on malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999;80:236–241.
- [18] Yang Y, Jin C, Li H, et al. Improved radiosensitizing effect of the combination of etanidazole and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vivo. *Exp Ther Med* 2012;3:299–303.
- [19] Bussink J. Clinical Outcome and Tumour Microenvironmental Effects of Accelerated Radiotherapy with Carbogen and Nicotinamide. *Acta Oncol (Madr)* 1999;38:875–882.
- [20] Hehlhans S, Oppermann J, Reichert S, et al. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis. *Radiat Oncol* 2015;1–11.
- [21] Cheng J, Liu W, Zeng X, et al. XRCC3 is a promising target to improve the radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2015;n/a-n/a.
- [22] Schilling D, Kühnel A, Konrad S, et al. Sensitizing tumor cells to radiation by targeting the heat shock response. *Cancer Lett* 2015;360:294–301.
- [23] He S, Smith DL, Sequeira M, et al. The HSP90 inhibitor ganetespib has chemosensitizer and radiosensitizer activity in colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2014;32:577–586.
- [24] Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, et al. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells : Implications for more effective radiation therapy. no date;6:.
- [25] Milas L, Mason K, Hunter N, et al. In Vivo Enhancement of Tumor Radioresponse by C225 Antiepidermal Growth Factor Receptor Antibody. *Clin Cancer Res* 2000;6:701–708.
- [26] Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy : a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl Cancer Res* 2013;2:330–342.
- [27] 岡野光夫, 田畑泰彦, 埴隆夫. バイオマテリアル その基礎と先端研究への展開. 1st ed. 東京化学同人; 2016.
- [28] Cui L, Her S, Borst GR, et al. Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic? *Radiother Oncol* 2017;124:344–356.

- [29] Chang MY, Shiau AL, Chen YH, et al. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci* 2008;99:1479–1484.
- [30] Dam DHM, Culver KSB, Kandela I, et al. Biodistribution and in vivo toxicity of aptamer-loaded gold nanostars. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2015;11:671–679.
- [31] Chattopadhyay N, Cai Z, Pignol J-P, et al. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm* 2010;7:2194–2206.
- [32] Pottier A, Borghi E, Levy L. New use of metals as nanosized radioenhancers. *Anticancer Res* 2014;34:443–453.
- [33] Marill J, Anesary N, Zhang P, et al. Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect? *Radiat Oncol* 2014;9:150.
- [34] 片岡一則. 医療ナノテクノロジー -最先端医学とナノテクの融合-. 杏林舎; 2007.
- [35] 米澤徹, 朝倉清高, 幾原雄一. ナノ材料解析の実際. 1st ed. 講談社; 2016.
- [36] 長瀬雄三. 基礎分析化学通論 [下] 13刷. 廣川書店; 1998.
- [37] 大矢博昭, 山内淳. 電子スピン共鳴 第2刷. 2nd ed. 講談社; 1990.
- [38] 桜井弘. ESRスペクトルの実際. 1st ed. 廣川書店; 1989.
- [39] 橋本和仁, 坂井伸行, 入江寛, et al. 光触媒応用技術. 1st ed. 東京図書; 2007.
- [40] Sidambe AT. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants-A review. *Materials (Basel)* 2014;7:8168–8188.
- [41] Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, et al. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol* 2009;87:133–170.
- [42] Quinn RC, Zent AP. PEROXIDE-MODIFIED TITANIUM DIOXIDE : A CHEMICAL ANALOG OF PUTATIVE MARTIAN SOIL OXIDANTS Since the return of data from the Viking Landers in 1977 , numerous hypotheses have been presented to explain the results of the Labeled Release (LR) and Gas Exchan. 1999;59–72.
- [43] 環境省 化学物質の環境リスク評価 第7巻、第2編、化学物質の環境リスク評価関連の調査研究等 化学物質の健康影響に関する暫定的有害性評価シート (34) 二酸化チタン. no date.
- [44] 木村恵理子. ナノ酸化チタンの皮膚浸透・透過と安全性の評価. 博士論文 (城西大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻) (甲 第52号) 2012;
- [45] 日本化粧品工業連合会. 平成16年度「ナノ原料を使用した化粧品の安全性評価システムに関する基礎調査」報告書 平成17年3月18日. 2005;
- [46] Utembe W, Potgieter K, Stefaniak AB, et al. Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 2015;12:11.
- [47] Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, et al. Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to

- spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice. *Nanoscale Res Lett* 2012;7:565.
- [48] Recordati C, De Maglie M, Bianchessi S, et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:12.
- [49] Borak B, Prescha A, Baszczuk A, et al. In Vivo Study on the Biodistribution of Silica Particles. *Adv Clin Exp Med* 2012;21:13–18.
- [50] Fufă MOM, Mihaiescu DE, Mogoantă L, et al. In vivo biodistribution of CNTs using a BALB ÷ c mouse experimental model. *Rom J Morphol Embryol* 2015;56:1481–93.
- [51] Xia Y, Huali S, Weirong L, et al. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO nanoparticle-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2015;234:40–49.
- [52] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol* 2008;82:151–157.
- [53] Xu J, Shi H, Ruth M, et al. Acute Toxicity of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles in Mice. *PLoS One* 2013;8:1–6.
- [54] Fujishima a, Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 1972;238:37–38.
- [55] Cai R, Kubota Y, Shuin T, et al. Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO₂ Particles Advances in Brief. *Cancer Res* 1992;52:2346–2348.
- [56] Matsui K, Karasaki M, Segawa M, et al. Biofunctional TiO₂ nanoparticle-mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation. *Medchemcomm* 2010;1:209.
- [57] Boonstra a H, Mutsaers C a H a. Adsorption of Hydrogen Peroxide on the Surface of Titanium Dioxide. 1975;1940–1943.
- [58] Anpo M, Che M, Fubini B, et al. Generation of Superoxide Ions at Oxide Surfaces. *Top Catal* 1999;8:189–198.
- [59] Klissurski D, Hadjiivanov K, Kantcheva M, et al. Study of peroxide-modified titanium dioxide (anatase). *J Chem Soc Faraday Trans* 1990;86:385–388.
- [60] Antcliff KL, Murphy DM, Griffiths E, et al. The interaction of H₂O₂ with exchanged titanium oxide systems (TS-1, TiO₂, [Ti]-APO-5, Ti-ZSM-5). *Phys Chem Chem Phys* 2003;5:4306–4316.
- [61] Ragai J. Trapped radicals in titania gels. *Nature* 1987;325:703–705.
- [62] Dewkar GK, Nikalje MD, Ali IS, et al. An exceptionally stable Ti superoxide radical ion: A novel heterogeneous catalyst for the direct conversion of aromatic primary amines to nitro compounds. *Angew Chemie - Int Ed* 2001;40:405–408.
- [63] Etacheri V, Seery MK, Hinder SJ, et al. Oxygen rich titania: A dopant free, high

- temperature stable, and visible-light active anatase photocatalyst. *Adv Funct Mater* 2011;21:3744–3752.
- [64] Ogino C, Dadjour MF, Iida Y, et al. Decolorization of methylene blue in aqueous suspensions of titanium peroxide. *J Hazard Mater* 2008;153:551–556.
- [65] Bordiga S, Damin A, Bonino F, et al. The structure of the peroxo species in the TS-1 catalyst as investigated by Resonant Raman spectroscopy. *Angew Chemie - Int Ed* 2002;41:4734–4737.
- [66] Tengvall P, Lundström I, Sjöqvist L, et al. Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomaterials* 1989;10:166–175.
- [67] Ninomiya K, Fukuda A, Ogino C, et al. Targeted sonocatalytic cancer cell injury using avidin-conjugated titanium dioxide nanoparticles. *Ultrason Sonochemistry* 2014;21:1624–8.
- [68] Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, et al. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016;11:91.
- [69] ICHINOSE H, TERASAKI M, KATSUKI H. Synthesis of Peroxo-Modified Anatase Sol from Peroxo Titanic Acid Solution. *J Ceram Soc Japan* 1996;104:715–718.
- [70] Ogawa Y, Ue H, Tsuzuki K, et al. New radiosensitization treatment (KORTUC I) using hydrogen peroxide solution-soaked gauze bolus for unresectable and superficially exposed neoplasms. *Oncol Rep* 2008;19:1389–1394.
- [71] Ogawa Y. Paradigm shift in radiation biology/radiation oncology—Exploitation of the “H₂O₂ effect” for radiotherapy using low-let (Linear energy transfer) radiation such as X-rays and high-energy electrons. *Cancers (Basel)* 2016;8:1–12.
- [72] Morita-tokuhiro S, Ogawa Y, Yokota N, et al. Radiosensitizer (New KORTUC) Using a Gelatin-Based Hydrogel Instead of a Sodium Hyaluronate. 2016;

摘要

第一章

我々のグループでは以前に、PAA-TiO_x NPs が放射線増感効果を持つことを見出した。しかし、未だにその作用機序は解明されていない。そこで、まず、いくつかの機器分析を用いて PAA-TiO_x NPs の物性評価を行った。具体的には DLS、FE-SEM、FT-IR、XAFS、及び Raman 分光を用いた。また、PAA-TiO_x NPs に放射線を照射した際に発生する hROS の定量を、化学蛍光法、及び EPR スピントラッピング法を用いて定量した。結果として PAA-TiO_x NPs は PAA-TiO₂ NPs と同じ性質を持っており、hROS の発生量もほぼ同等であった。しかし、PAA-TiO_x NPs は放射線を照射していない状態でも hROS を継続的に発生していることを見出した。その原因として H₂O₂ の存在が疑われたため、限外ろ過を用いた更なる実験を行った結果、PAA-TiO_x NPs は H₂O₂ を分散液相中に継続的に放出していることが判明した。以上の結果から、PAA-TiO_x NPs は過酸化水素の放出によって間接的に放射線の増感に寄与していることが示唆された。

第二章

PAA-TiO₂ NPs は粒子内に吸着した H₂O₂ を腫瘍内の微小周囲環境に放出することで、低酸素症を緩和し放射線の治療効果を増幅する「放射線増感剤」としてはたらく。しかし、その吸着・脱着プロファイルや、吸着の仕組みについてはよく調べられてこなかった。そこで、H₂O₂ の脱着をモデル化して速度定数を求め、PAA-TiO₂ NPs の放射線増感剤としての性能を定量的に解析した。また、H₂O₂ を吸着した PAA-TiO₂ NPs の XPS とラマン散乱スペクトルを取得し、標準試料や過去の報告と比較しながら H₂O₂ の吸着モードについて議論した。結果として H₂O₂ の吸着・脱着は原料である TiO₂ NPs の性質であり、脱着速度は粒子内 H₂O₂ 濃度に一次で比例していた。PAA の修飾は吸着サイトを被覆し、H₂O₂ の吸着量を少なく、脱着速度を上げる方向に働いた。PAA-TiO₂ NPs に吸着した H₂O₂ の 42.2% が不可逆吸着に与し、その多くはペルオキシドの形で存在していることが示唆された。

第三章

PAA-TiO_x NPs は H₂O₂ を周囲環境に徐放することで組織の放射線感受性を高めていることが示唆されている。まず、粒子の H₂O₂ 放出がどれくらいの時間継続されるのかを調べた結果、少なくとも 7 時間は放出を続けていた。次に、PAA-TiO_x NPs と H₂O₂ が最も効率よく放射線の細胞毒性を向上する濃度を、放射線増感係数 (RE) を定義することで評価した。それぞれ、膀胱がん細胞 (BxPC3) に対して、1 mg/ml、200 μM で最も RE が高かった。さらに、PAA-TiO_x NPs は H₂O₂ を徐放していることから、この粒子が細胞内に

取り込まれた際に細胞内の H_2O_2 濃度を上昇させるのではないかと考えた。その結果、PAA- TiO_x NPs を処理した細胞は洗浄しても H_2O_2 濃度が上昇しており、一方で過酸化水素水を処理した細胞は洗浄後には H_2O_2 濃度は下がってしまっていた。最後に、PAA- TiO_x NPs の取り込みによって細胞内 H_2O_2 濃度が上昇した細胞に放射線照射を行ったところ、過酸化水素水を処理して洗浄後の細胞よりも RE が高かった。以上から、PAA- TiO_x NPs は細胞内に取り込まれることで細胞内 H_2O_2 濃度を上昇させ、粒子が細胞内に留まることで浸透性の高い H_2O_2 が細胞外に拡散してしまうことを防いでいることが示唆された。すなわち、PAA- TiO_x NPs は H_2O_2 の効率的な細胞デリバリーを成功していると結論付けられた。

第四章

PAA- TiO_x NPs を放射線増感剤として実用化するためには生体に与える毒性と体内での挙動の解明が不可欠である。そこで、オスとメスの健常マウス、及びヒト膀胱がん担がんマウスを用いて PAA- TiO_x NPs の体内動態と急性毒性を評価した。マウスの種類と粒子の導入、すべての条件において、体内に導入した PAA- TiO_x NPs はその約半量が最終的に肝臓に蓄積した。また、腫瘍へ局所注射した場合だけでなく静脈注射で全身へ導入した場合でも、有意な量の PAA- TiO_x NPs が EPR 効果によって腫瘍に蓄積した。少なくとも 25 mg/kg (mouse) の導入においては、肝臓マーカーにかすかな変動はあったものの、急性毒性はないと判断できた。

第一章

新たな放射線増感剤としてのポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の物性評価

1-1. 緒言

近年、放射線増感治療と呼ばれる新しいがん治療が研究されている。放射線治療は外科治療、化学療法と並び、古くからがん治療の主要な位置を占めてきた[1,2]。しかし、他の治療法と同様にすべてのがん種に適用できるわけではない。例えば、脊髄など放射線感受性の高い正常組織周辺の腫瘍[1,3]や、酸素飽和度が正常組織よりも低くなっている放射線耐性がん種[4,5]には正常組織への副作用のリスクが大きくなってしまいう問題点があった。そこで、患部への放射線照射の前に局所的あるいは全身に放射線の治療効果を増幅する物質を投与、腫瘍内に蓄積することで、その後に行われる放射線照射の効果を高めたり、従来よりも低線量での治療を可能にするのが放射線増感治療である。放射線治療の代替としては他に重粒子線や中性子線も研究が盛んに行われているが、放射線増感治療の最大の利点は導入コストの低さにある。すなわち、病院に既に設置されている従来の放射線照射装置を引き続き使用できる点である。新たに高価で巨大な設備も必要とせず、これまで放射線治療を行ってきた病院や患者は放射線増感剤を付け加えるだけでより効率的ながん治療を実現できる。

放射線増感治療は、作用機序の観点からいくつかの種類に分けられる。まず、単体でも抗腫瘍効果を有する抗がん剤と併用する場合[6-9]、単体では効果はないが放射線の効果を増幅する薬剤、粒子を併用する場合。後者はさらに細分化でき、①高原子番号の金属原子に対して照射して制動放射により放射線の電離効果を高める[10,11]、②腫瘍の酸素欠乏症を緩和し、酸素効果、あるいは疑似酸素効果により放射線で生じる活性酸素種を増幅する[12-14]、③腫瘍細胞の自己修復能を阻害して放射線照射のダメージを増幅する[15-19]、など、その作用機序は多岐にわたる。そして、以上いずれの放射線増感治療においても細胞死を導くトリガーとしてはヒドロキシルラジカルをはじめとする反応性の高い活性酸素種 (highly reactive oxygen species: hROS) が目されている。X線は生体に照射されると生体内の水や溶存している酸素、生体分子を電離することで hROS が発生する。このとき、細胞は次のようないくつかのモードで細胞死に陥る：ネクローシス、増殖死、アポトーシス。細胞近傍で発生した hROS や二次電子が細胞膜を物理的に破壊した場合、細胞は細胞質を細胞外に漏出してネクローシス死を起こす。さらに、古典的な放射線生物学に従えば、hROS

は DNA の二重らせんを二本鎖切断(DSB)、あるいは一本鎖切断(SSB)する。細胞は本来、DNA に起きた障害を修復する機構を有している。しかし、過度の DSB によって DNA 修復が不可能になると、増殖死かアポトーシスを起こして自死に至る。増殖死の場合は、細胞は幾度かの分裂を繰り返したのちに死に至るか、そもそも増殖が不可能になる。アポトーシスは、細胞に内在的にプログラムされている自死機構のモードである。アポトーシスに関わる複雑なシグナル経路はこの数十年非常によく研究されてきた[20,21]。近年では、X 線照射によって新たな細胞死のモードである免疫性細胞死を起こすことも明らかになってきた[22]。

一方、我々を含むいくつかの研究グループでは、エネルギー照射として UV 照射をがん細胞に行い、そこに光増感剤として PAA-TiO₂ NP を共存させることで hROS を発生し、がん細胞を効率的に死滅させることを *in vitro* およびヒト臍臓がんゼノグラフトマウス系を用いて成功している[23]。TiO₂ は光触媒として知られる。特にアナターゼ結晶構造を持つ TiO₂ は、TiO₂ の持つ 3.2eV のバンドギャップに相当する、あるいはそれ以上のエネルギーを持つ光や超音波といったエネルギー照射を行うことで、TiO₂ 表面に強い酸化還元力を示す[24]。その際の高い反応性によって水や溶存酸素を電離し、hROS を生成していると考えられる。

しかし、UV は生体透過性が低く、その主な標的は表皮細胞等、生体の外部に面した部分が主であった。したがって、生体の深部に存在する腫瘍に対しては完全非侵襲的に適用できないという問題があった。そこで、ナノ粒子とエネルギー照射を併用するというがん治療スキームを、X 線を用いて行うためのナノ粒子スクリーニングを行った。その結果、PAA-TiO_x NPs は放射線治療と併用すると顕著な併用治療効果を示すことが *in vivo* で示された[25]。

TiO₂ への H₂O₂ の処理はいくつかの報告でなされていて、表面構造の解析が行われたり[26–28]、TiO₂ より光触媒能が向上した[29–32]、あるいは励起光を必要とせず酸化力を発揮した[33,34]とある。しかし、その形状、製法や処理も統一はされていないため、我々の用いている素材に直接参照することは難しく、TiO₂ と H₂O₂ 系における表面反応の体系的な解析は未だなされていない。

これまでに、我々は PAA-TiO_x NPs を担がんマウスに局所注射し、放射線照射を行うことで、腫瘍組織の体積を減らすことに成功してきている。しかしながら、その作用機序は未だ明らかにされていない。今後、PAA-TiO_x NPs の実用化に向けた臨床研究に先駆けて粒子の化学的および物理的物性を詳細に検証する事は非常に重要である。そこで、本報では PAA-TiO_x NPs の各種物性評価を機器分析的に行うことで、放射線治療との併用効果の作用機序の一つの可能性を示すことを検討した。

1-2. 実験方法

PAA-TiO_x NPs の合成

N,N-ジメチルホルムアミド(DMF; 和光純薬工業, 大阪, 日本)48.75 cm³とポリアクリル酸; PAA(和光純薬工業) 0.5 g の混合溶液に、約 30 wt%のアナターゼ型酸化チタン(TiO₂)懸濁液(STS-01; 石原産業, 大阪, 日本) 1.25 cm³を添加し十分攪拌した。この混合液を水熱反应用密閉容器 HU-50(三愛科学, 愛知, 日本)に入れ、150 °Cで 5 時間反応させ、ポリアクリル酸修飾を施した。その後、クエンチングを行い、アセトン(和光純薬工業)150 cm³に反応液を添加、遠心分離(5,000×g, 20 min)により粒子と上澄みを分離し、上澄みを取り除き、粒子を少量の蒸留水で分散させた。さらに、これを 99.5 wt%エタノール(和光純薬工業)150 cm³に添加し、遠心分離(5,000×g, 10 min)を行い、上澄みを取り除いた。この洗浄後の粒子に 10 cm³の蒸留水を加え分散させた後、30 wt% 過酸化水素(H₂O₂)(和光純薬工業) 2.5 cm³を添加した。これを VIVASPIN20 10,000 MWCO PES (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, ドイツ)を用いて限外濾過(5,000×g, 20 min)を 5 回を行い、余剰の H₂O₂を除いた。限外濾過で得られた懸濁液を遠心分離(15,000 rpm, 30 min)し、上澄みを除いてから 12 cm³の蒸留水を加え、超音波洗浄機で 30 分間分散させた。ここで得られた淡黄色の懸濁液をポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子(PAA-TiO_x NPs)分散液と呼ぶ。

粒径測定、及び外観観察

合成した PAA-TiO_x NPs は走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-5610LV; JEOL, 東京, 日本)を用いて観察した。PAA-TiO_x NPs のコロイド分散液をスライドガラス上に滴下し、80°Cで乾燥させた。形成したフィルムをパウダー状にはがし、カーボンテープ状にマウントした。サンプルは AUTO FINE COATER (JFC-1600; JEOL) を用いて白金パラジウムを 10 mA、30 秒の条件でコートした。観察には LEI モードを使用し、加速電圧は 7 kV、電流は 10μA であった。粒径測定には動的光散乱法 (DLS)を用いた。Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) を使用して PAA-TiO_x NPs の動的直径とゼータ電位を測定した。

ラマン分光法

ラマンスペクトル測定は、ポータブルラマン測定システム(BWTek, MiniRam™, BTC111-RAMAN-785)を用いて行なった。785 nm 単色光のレーザーを試料に 3-50 秒間照射し、試料からの散乱光を分光・検出し、横軸にラマンシフト、縦軸に散乱強度をプロットすることでラマンスペクトルを得た。化学組成・結晶構造既知の標準試料として、酸化チタン(TiO₂)の Anatase と Rutile 型粉末試薬を用いた。また、実試料として、STS01、TiO_x NPs、PAA-TiO_x NPs の懸濁液を凍結乾燥させた粉末試料を用いた。粉末試料は乳鉢で粉碎したのち、薬さじ 1 杯分をスライドガラスに乗せ、薬さじで表面を平らにして測定した。

XAFS

Ti K-edge XAFS スペクトル測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設 (Photon factory) の BL-9A および BL-9C において蛍光モードで行った。2.5 GeV 蓄積光源からのシンクロトロン放射光は Si(111)2 結晶モノクロメータで単色化し、スリットで $0.5 \times 2.0 \text{ mm}^2$ に成形し試料に照射した。Ti K-吸収端 4966 eV 近傍、4559-5944 eV の範囲を走査しながら、QXAFS 測定モードで試料に X 線を入射し、入射 X 線強度をイオンチャンバーで、試料からの蛍光 X 線強度を Lytle 型検出器を用いて検出し、横軸に入射 X 線のエネルギー、縦軸に入射 X 線強度で規格化した蛍光 X 線強度をプロットすることで、Ti K-edge XAFS スペクトルを得た。また、高次光を除去するために、BL-9A での測定においては、Rh-Ni 高次光除去ミラーを使用した。化学組成・結晶構造既知の標準試料として、酸化チタン (TiO_2) の Anatase と Rutile 型粉末試薬を用いた。また、実試料として、STS-01、 TiO_x NPs、PAA- TiO_x NPs の懸濁液を測定に用いた。すべての試料について放射線照射の影響を調べるために、さらに 16 Gy の放射線照射を施したものも用意し、比較検討を行った。試料調製は、粉末試料に対しては、乳鉢で粉砕したのち、粘着テープの粘着面に薄く塗布し、液体試料については、そのまま、30 μm 厚みのポリエチレン袋に封入して測定に用いた。XAFS 解析は XAFS 解析プログラム REX2000(Rigaku, 東京, 日本)を用いて行った。

FT-IR

赤外吸収スペクトル測定は、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-4000 typeA; JASCO, 東京, 日本)を用いて行なった。400-4000 cm^{-1} の赤外光を試料に照射し、4 cm^{-1} ステップで試料を透過した赤外光を TGS(集電型)検出器で検出し、横軸に照射した赤外光の波数、縦軸に透過率をプロットすることで、赤外吸収スペクトルを得た。測定は室温で、50 回積算して行なった。試料として、STS-01、 TiO_x 、PAA- TiO_x の懸濁液を凍結乾燥させた粉末試料を KBr 錠剤成型したものを用いた。スパーテル 1 杯分の粉末試料と粉砕した KBr 0.2 g を乳鉢で混合し、10 mm ϕ の錠剤成型器 (JASCO) に充填した後、真空ポンプで空気を抜きながら油圧加圧器 (RIKEN) で 40 MPa の圧力を 10 分間かけることで錠剤成形を行った。

ナノ粒子分散液中の ROS 定量

(化学蛍光法)

終濃度 25 μM の Aminophenil fluorescein (APF) (積水メディカル, 東京, 日本) を 5mg/ml の粒子と 96 ウェルプレート内で混合した。サンプルに TR-01 (Techno-X, 大阪, 日本) を用いて 0.60 Gy/min, 80 kVp, 1 mA の条件で X 線照射し、生じたフルオレセインの蛍光をプレートリーダー (ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER; PerkinElmer, Inc., Waltham, マサチューセッツ州) で測定した (Ex/Em: 485 nm/538 nm)。APF は自然酸化を防ぐために水で溶解後は直ちに使用した。

(EPR スピントラッピング法)

終濃度 1.345 M の 5, 5-ジメチル-1-ピロリンオキシド (DMPO) を粒子分散液 10mg/ml と混合し、直ちに X 線照射を行った。サンプルをチューブから水溶液用 EPR 試料管に移し、照射終了から 7 分後に X バンド EPR 装置(JES-TE-300; JEOL, 東京, 日本)を用いて測定した。測定条件は以下のようであった: sweep range, 331.5-341.5 mT; amplitude, 320; sweep time, 1 min; time constant, 0.1 sec; microwave frequency, 9.448 GHz; power, 3 mW; modulation width, 0.2 mT. 測定は暗所で 3 度繰り返した。DMPO の半減期は事前の実験により 41.3 min と算出された。これより、スピン数は以下の式で求められた: $N=0.152 \times X$. ここで、N [nmol] はスピン数、X はシグナルの二重積分を Mn マーカーの二重積分の値で割った数である。以上のスピン数の校正は標準物質として TEMPOL(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, テキサス州)を用いて行った。

過酸化水素の電気化学的定量

8ml の KCl 水溶液(0.1M)で反応槽を満たし、ポテンシオスタット (electrochemical analyzer (HSV-100; 北斗電工, 東京, 日本))を用いて 800mV を印加して攪拌しながらクロノアンペロメトリーを行った。作用電極、対極には 1 cm²の研磨したプラチナ板を、参照極には Ag/AgCl 電極を用いた。電流測定開始から 400 秒時に PAA-TiO_x NPs 分散液 (1 mg/ml) (終濃度 0.074mg/ml) または KCl バッファーを 320μl, または H₂O₂ 水溶液(1 mM)を 40 μl (終濃度 5nM) 添加した。またその後、600 秒時にカタラーゼ(1mg/ml, 320μl)(ナカライテスク, 京都, 日本)を添加して 800 秒まで観察を行った。

過酸化水素の酵素-化学蛍光系を用いた定量

過酸化水素の濃度定量は Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, US)を用いて行った。PAA-TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs, 0.05 mg/ml と検出液を 50μl ずつ 96well プレート内で混合し、生じたレゾルフィンの蛍光をプレートリーダーで測定した(Ex: 490 nm / Em: 572 nm)。検量線は H₂O₂ で 0~10 μM の範囲で 7 点測定を行い、作成した。

繰り返しろ過実験

ここでの過酸化水素検出はすべて上で述べた化学蛍光法を用いている。まず、①粒子分散液全体の過酸化水素濃度測定を行い、②次に Amicon Ultra 10 kDa (MerkMillipore, Burlington, マサチューセッツ州)を用いて限外ろ過し、③得られたろ過液の過酸化水素濃度測定を行った。④さらにフィルター上に残った粒子に水を加えて元の濃度までフィルアップした。そして 24 時間後に再び①~④を行うことを 4 サイクル行った。

1-3. 結果

PAA-TiO_x NPs の物性評価

TiO₂ NPs の表面に水熱処理で PAA を修飾することで PAA-TiO₂ NPs を得、さらに過酸化水素で処理して PAA-TiO_x NPs を得た。TiO₂ NPs は中性溶液中で分散できず沈殿するが、PAA を修飾した粒子は PBS に分散できるようになった。

合成した粒子の微視的物性を調べるために、いくつかの機器分析を行った。TiO₂ NPs, PAA-TiO₂ NPs, PAA-TiO_x NPs について DLS で粒径を調べた結果を Fig.1A, ゼータポテンシャルを調べた結果を Fig.1B に示す。PAA-TiO_x NPs の原料である TiO₂ NPs は硝酸酸性中で分散しており、その粒径は 75 ± 27 nm。水酸化ナトリウムで中和して中性にすると、凝集が見られて動的粒径が大きくなった。表面を PAA 修飾した PAA-TiO₂ NPs, PAA-TiO_x NPs はそれぞれ、 135 ± 65 , 125 ± 65 nm となり、元の TiO₂ NPs よりも少し大きな直径となった。

それぞれの粒子のゼータポテンシャルも測定した。PAA 未修飾の粒子はほぼ中性に近いカチオン性粒子で、PAA を修飾すると PAA のカルボキシル基の影響で大きくアニオン性になる。PAA 修飾粒子が中性の塩溶液中で良好な分散性を示すのはこの大きな表面電荷によると考えられる。

PAA 未修飾粒子と修飾粒子の代表として TiO₂ NPs と PAA-TiO_x NPs の SEM 像を Fig. 1-1C に示す。過酸化水素処理、PAA 修飾いずれによっても、大きな形態変化は見られなかった。どの粒子も、数 nm の一次粒子が数十 nm の凝集体を形成し粒子として振舞っている様子が見られた。PAA 修飾粒子については、未修飾のものに比べると、若干大きな凝集体が多い印象を受ける。以上は DLS の結果と一致する。

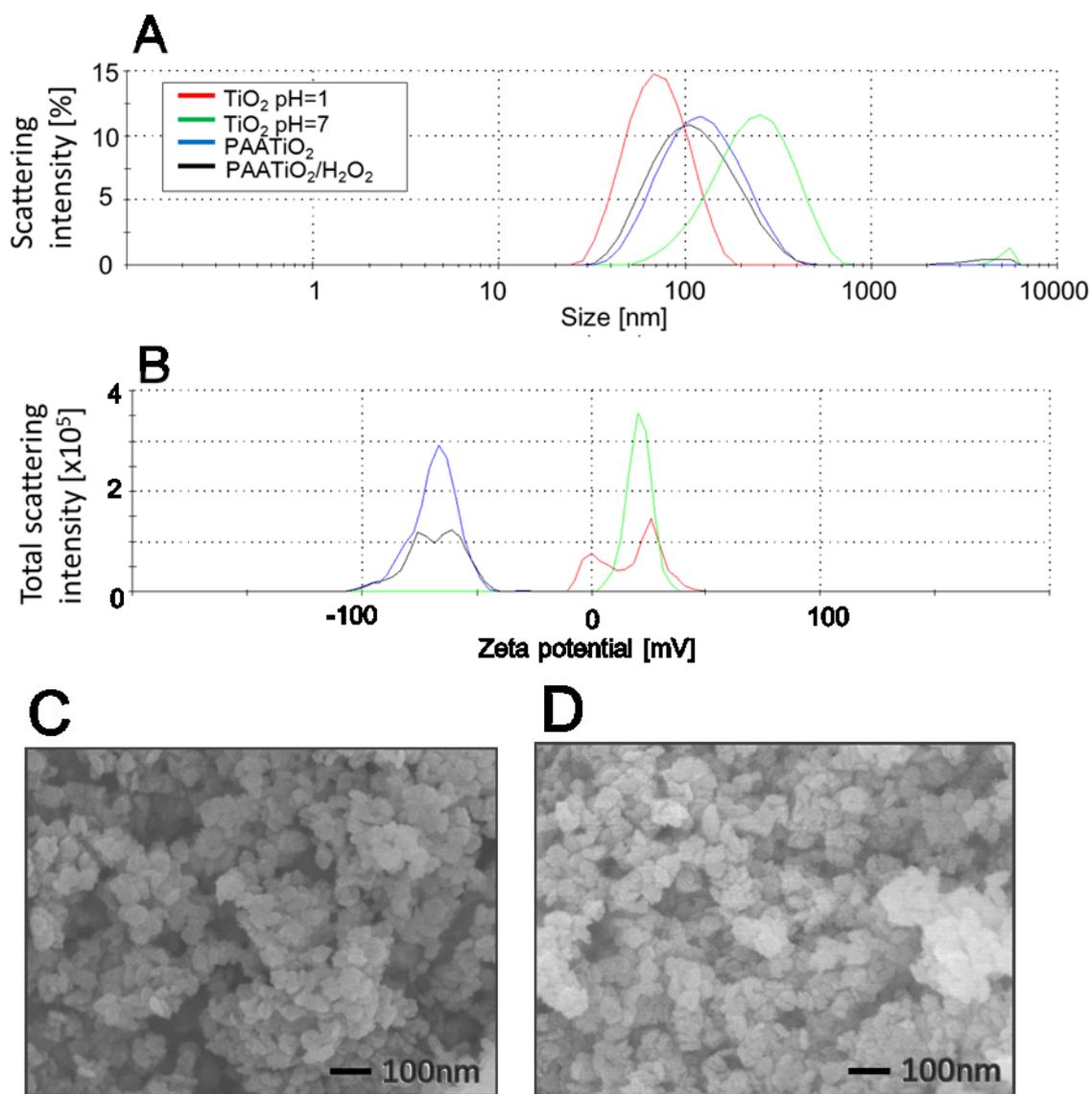


Figure 1-1. Characterization of PAA-TiO_x NPs. (A) particle size and (B) zeta potential distribution measured by dynamic light scattering. The topological images of (C) TiO₂ NPs and (D) PAA-TiO_x NPs as observed by scanning electron microscopy.

粒子の過酸化水素処理の有無、PAA 修飾の有無によって表面官能基の変化を調べるため、FT-IR による分析を行った。過酸化水素処理によって FT-IR 吸収スペクトルに変化は見られなかった。一方、PAA 修飾を行った粒子には、原料の粒子スペクトルに加えて PAA のスペクトルが見られたため、PAA の存在が確認された (Fig. 1-1E)。

各粒子の微視的な結晶構造を調べるため、XAFS による解析を行った。原料である TiO₂ NPs (STS-01) はアナターゼ型の結晶構造を持っているが、過酸化水素処理、PAA 修

飾の有無によって結晶構造の変化は見られなかった (Fig. 1-1F)。ラマン分光法による解析でも同様の結果が得られた (Fig. 1-1G)。

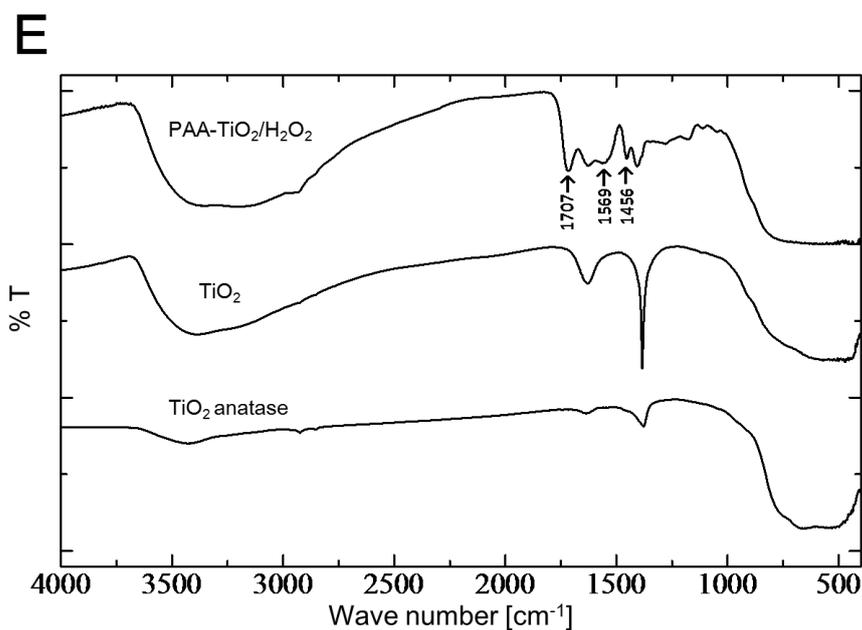


Figure 1-1. Characterization of PAA-TiO_x NPs. (E) FT-IR spectra of each titanium oxide particle. Absorption peaks derived from PAA are indicated by arrows.

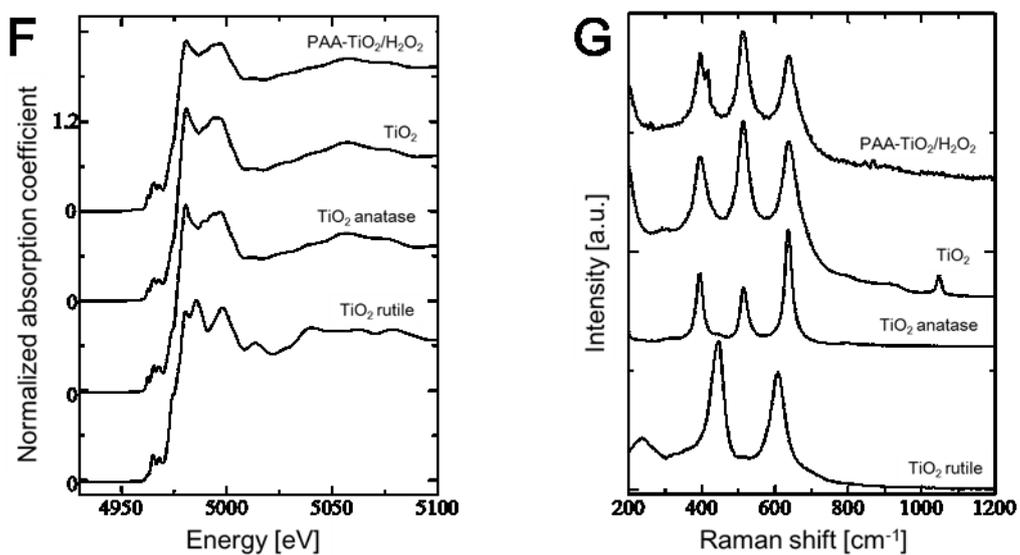


Figure 1-1. Characterization of PAA-TiO_x NPs. (F) XAFS spectra and (G) Raman spectra of titanium oxide particles.

X線照射時にナノ粒子分散液中に生じる ROS の定量

我々の以前の研究で、PAA-TiO₂ NPs は UV 照射によって ROS を生成し細胞毒性を発揮することを示した[23]。In vivoで放射線増感作用を持つ PAA-TiO_x NPs も同様に放射線と相互作用し ROS を生成し、抗腫瘍効果の原因となっているのではないかと考えた。そこで、この仮説に基づき、放射線を粒子分散液に照射し発生した hROS を APF と反応させ、生じたフルオレセインの蛍光を測定することで検出、定量した。APF は OH ラジカルに代表される hROS と特異的に反応して蛍光物質を生じる。その結果、PAA-TiO₂ NPs, PAA-TiO_x NPs 分散液中で発生する hROS の量は純水中とほとんど変わらなかった (Fig. 1-2A)。

さらに、hROS の一種である OH ラジカルを DMPO にトラップさせ、DMPO-OH アダクトの量を EPR で測定することで、OH ラジカルの量を調べた (Fig. 1-2B)。OH ラジカルはその寿命の短さから EPR による直接測定が難しいため、DMPO を用いたトラッピング法により生じた DMPO-OH アダクトの定量をもって OH ラジカルの発生量を推定することが一般的である。その結果、PAA-TiO_x NPs 分散液は X 線未照射でも DMPO-OH を生成しており、PAA-TiO₂ NPs や純水中に比べて、X 線照射時間を増やしてもラジカル量があまり増えなかった。

以上2つの手法によって X 線照射時に PAA-TiO_x NPs 分散液中に生じる hROS 量を調べたが、純水に対して照射を行った場合と有意な差はなかった。しかし一方で、PAA-TiO_x NPs が X 線照射をせずとも自発的に hROS を発生していることを発見した。そこで、PAA-TiO_x NPs から発生している hROS の定量も行った。

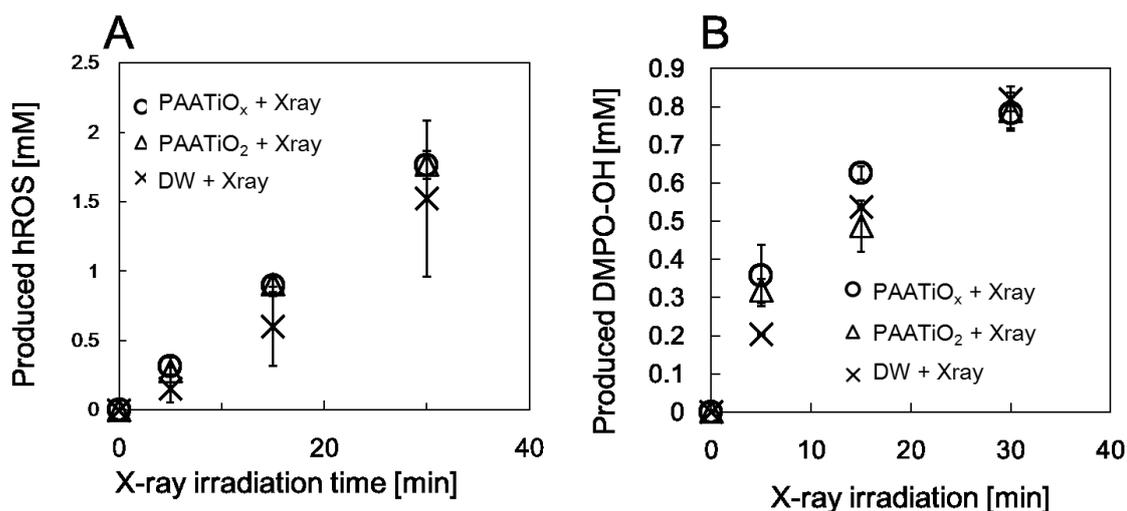


Figure 1-2. hROS detection from PAA-TiO₂ NPs and PAA-TiO_x NPs dispersions with X-ray irradiation using (A) chemiluminescence method and (B) EPR spin-trapping method. In both experiments, each data was subtracted by unirradiated values as a control. Data represent the

mean \pm STDEV derived from three individual experiments.

ナノ粒子分散液中で自発的に生じる ROS の定量

X線、ならびに可視光を遮光した暗所条件において、PAA-TiO_x NPs 分散液中に生じる hROS を化学蛍光法と EPR スピントラッピング法で定量した。その結果、APF を用いた化学蛍光法では PAA-TiO_x NPs からは PAA-TiO₂ NPs より多くの hROS が観測された (Fig. 1-3A)。また、EPR スピントラッピング法によっても PAA-TiO_x NPs、PAA-TiO₂ NPs から同様の割合で OH ラジカルが観測された (Fig. 1-3B)。

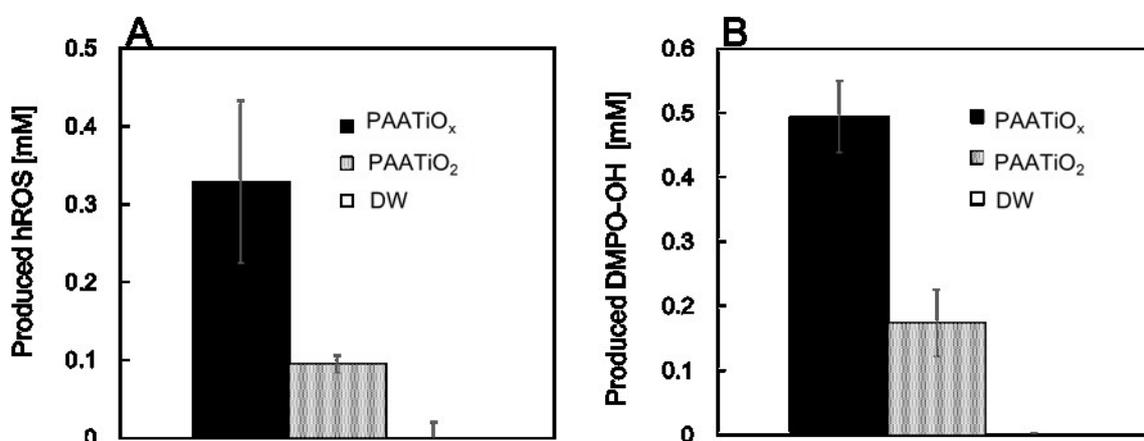


Figure 1-3. Spontaneously produced radicals in PAA-TiO₂ NPs and PAA-TiO_x NPs dispersions were detected WITHOUT X-ray irradiation and any lights, using (A) chemiluminescence method and (B) EPR spin-trapping method. Data represent the mean values after 15 min from mixed with detection probes, with the values of DW subtracted as controls, which were of individual triplicated experiments.

ナノ粒子分散液に含まれる過酸化水素の電気化学的検出

サンプル溶液に過酸化水素が存在する場合、化学蛍光法, EPR スピントラッピング法いずれの方法においても OH ラジカルが検出される。この OH ラジカルの由来について、H₂O₂ の存在する系では DMPO-O アダクトが生成することが知られている。そこで、PAA-TiO_x NPs の合成時に添加した過酸化水素は理論上十分に洗浄されているはずだが、分散液中に H₂O₂ が残留している可能性を考え、電気化学的に過酸化水素の検出を試みた。

PAA-TiO_x NPs 分散液に電圧を印加すると、H₂O₂ の酸化電流が観測された (Fig. 1-4A)。また、その後カタラーゼを反応槽に添加すると、過酸化水素の分解と共に酸化電流の低下がリアルタイムに観察された。さらに、X線照射によって過酸化水素濃度の変化が見られるか観察した。観測開始から 600 秒に X線照射を開始し、800 秒に終了したが、過酸化水素濃度に変化はない、あるいは微増した (Fig. 1-4B)。

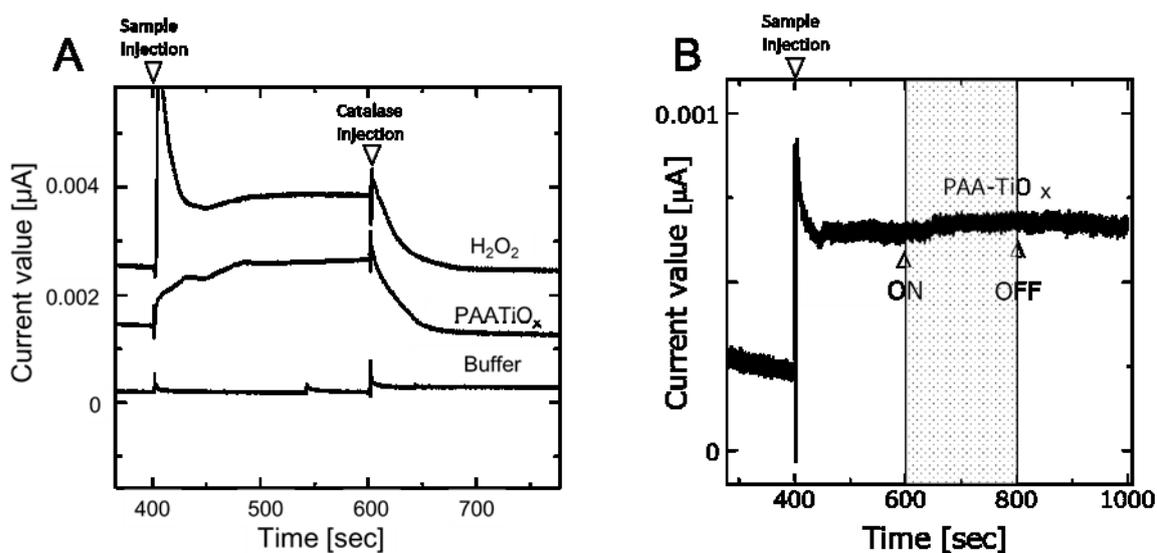


Figure 1-4. H₂O₂ detection from PAA-TiO_x NPs dispersions using electrochemical analyses (chronoamperometry). (A) The sample solutions were injected to the detection system at 400 s and Catalase solution were injected at 600 s. (B) PAA-TiO_x NPs dispersion was injected at 400 s and X-rays were irradiated to the reactor from 600 to 800 s.

ナノ粒子分散液中に含まれる過酸化水素の酵素-化学蛍光系を用いた検出
 粒子分散液中に含まれる過酸化水素を定量するために酵素-化学蛍光系を用いた比色測定
 による定量も行った。すると、通常ここで用いている酵素反応系は数分以内に充分過酸化水
 素と反応し終わるのだが(Fig.S1)、PAA-TiO_x NPs 分散液との反応では 60 分経過しても反
 応が終了せず、蛍光の継続的な増加が見られた (Fig. 1-5)。この結果は、粒子が過酸化水素
 を放出しているか、過酸化水素を生成していることを示している。

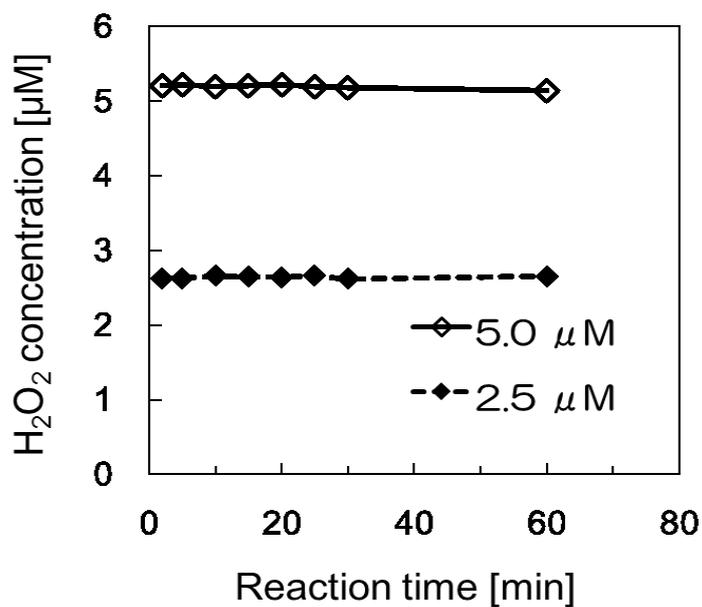


Figure 1-S1. The time course of a reaction with H₂O₂ that was applied to the enzyme-linked chemiluminescence assay. The H₂O₂ molecule solution reacted with the enzymes much faster than the PAA-TiO_x NPs dispersion.

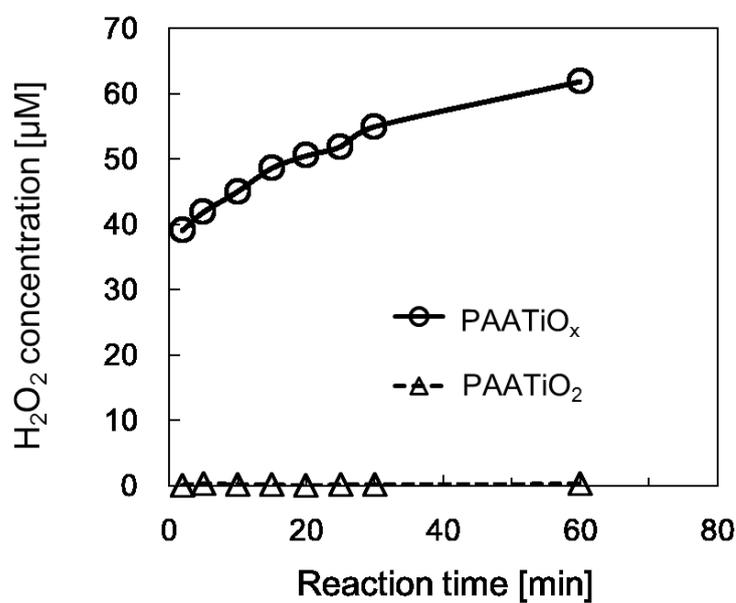


Figure 1-5. H₂O₂ detection from PAA-TiO₂ and PAA-TiO_x NPs dispersions using enzyme-linked chemiluminescence assay. The remarkably slow reaction velocity of enzymes with PAA-TiO_x NPs dispersion was observed.

PAA-TiO_x NPs の過酸化水素放出能

以上の粒子分散液からの過酸化水素検出実験では、過酸化水素は液相中に溶存しているのか粒子表面に局在しているのかが不明だった。そこで、限外ろ過を用いて粒子分散液を粒子と液相に分離し、液相からも過酸化水素が検出されるかを検討した。さらに、粒子をもう一度元の濃度までフィルアップして過酸化水素検出を行い、24 時間後に限外ろ過によって粒子と液相を分離するサイクルを繰り返した (Fig. 1-6)。最初のろ過試行で、分散液全体に対して約半分がろ過液から検出されたことから、過酸化水素は粒子に保持されているだけでなく、分散液相にも存在していることが分かった。その際、DLS 測定によってろ過液には粒子が存在しないことが確かめられている (data not shown)。それ以降のろ過試行では分散液全体、ろ過液ともに過酸化水素の減少が見られたが、ろ過を繰り返しても分散液相の過酸化水素は完全に消失せず、ある程度の濃度が粒子から供給されてくることが示された。一方で、分散液全体の過酸化水素濃度もサイクルに従って減少しているため、粒子は過酸化水素を生成しているというよりはむしろ、保持している過酸化水素を徐放していると考えられる。

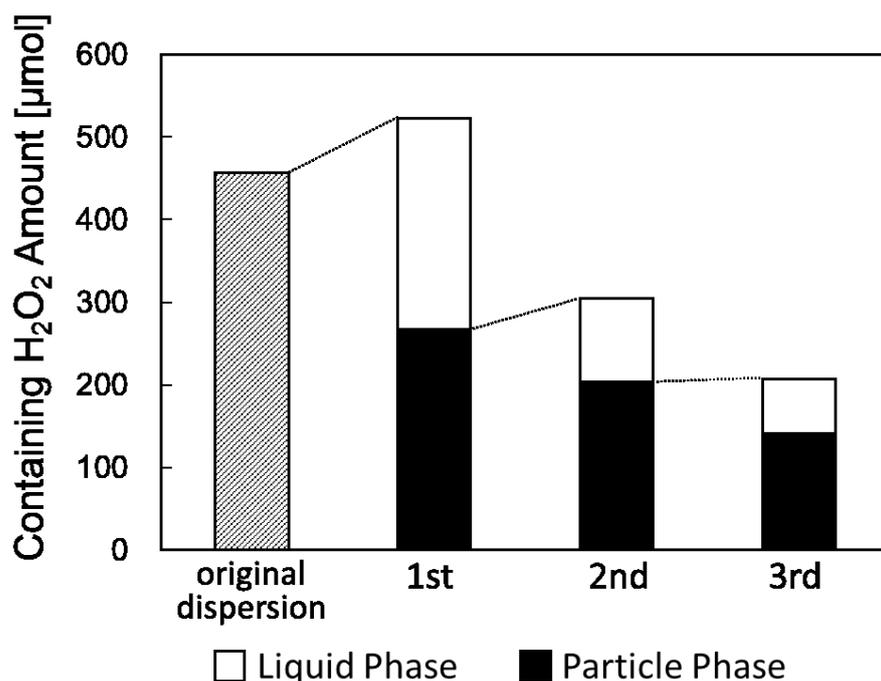


Figure 1-6. Determining the distribution of H₂O₂ in PAA-TiO_x NPs dispersions and characterization of the repeated release of H₂O₂ using enzyme-linked chemiluminescence assay.

1-4.考察

今回我々が合成した PAA-TiO_x NPs の原料である TiO₂ NPs は等電点が中性付近であり、本来では塩溶液中はおろか、純水中ですら分散できない。しかし、TiO₂ NPs 表面に水熱処理によって PAA を修飾することで、PBS のようなかなり濃い塩溶液中でも分散することに成功した。また、さらなる H₂O₂ の機能化によってもその分散能は失われなかった。この優れた分散能は、PAA-TiO_x NPs をナノ粒子として生体内で凝集せず安定に存在することを可能にした。

機器分析による構造解析の結果から、PAA-TiO_x NPs は TiO₂ NPs と同じアナターゼ結晶構造を変わず持っていた (Fig. 1-1 C-G)。しかし、分散液、乾燥粉末の色は白から黄色に変わっているため、ナノ粒子表面では H₂O₂ と反応し、局所的に電子状態が変化していることは明白である。この表面の変化は非常に局所的であるため、機器分析的に変化を観測できなかったと考えられる。

我々は以前に PAA-TiO_x NPs が放射線増感効果を持つことを示した。そこで、PAA-TiO_x NPs から生じる hROS の量を放射線照射がある場合、ない場合において定量した。しかし、化学蛍光法と EPR スピントラッピング法を用いた実験から、PAA-TiO_x NPs は X 線を照射しても X 線の効果を増幅して hROS の量を増やすことはなかった (Fig. 1-1-2)。これは非常に意外な事実である。なぜなら、我々の以前の報告では PAA-TiO₂ NPs と UV を併用した場合にも OH ラジカルが検出されているし、多くの放射線増感治療で hROS の生成が作用機序として謳われているためだ。

一方で、PAA-TiO_x NPs 分散液から過酸化水素が検出され、PAA-TiO_x NPs は分散液相中に過酸化水素を放出することが見出された。アナターゼ TiO₂ に紫外線を照射することで過酸化水素の生成も報告されている [35] が、今回の実験は暗所で行っていることから可視光を含むいかなる波長の光も影響しない。過酸化水素は TiO₂ 表面に吸着し、色が黄色くなることが知られている [26]。SEM 像からも見られるように、PAA-TiO₂ NPs は一次粒子が非常に小さく、表面積の大きな粒子となっている (Fig. 1-1-1C-D)。ゆえに、スポンジのように粒子表面に多くの過酸化水素が吸着でき、吸着した過酸化水素が分散液相に徐放されていると考えられる。酵素を用いて分散液中の過酸化水素を定量した際に反応速度が非常に遅かったのは、入り組んだ粒子内部に存在していた過酸化水素が拡散するのに時間がかかった、もしくは逆に酵素が粒子内部まで拡散して反応しにくかったのだろう (Fig. 1-5)。あるいは、PAA-TiO_x NPs 表面に修飾している PAA が過酸化されることで H₂O₂ 放出に寄与している可能性がある。有機過酸と過酸化水素は平衡状態にあるため、過酸化 PAA が分解を伴って H₂O₂ 濃度が低い分散液相に H₂O₂ を放出することが考えられる。しかし、PAA を修飾していない TiO₂ NPs でも過酸化水素の吸収と放出が見られるため、過酸の寄与はあったとしてもそれほど重要ではないようだ (data not shown)。ただし、H₂O₂ を処理した TiO₂ 表面は TiOOH マトリックスを形成しているとの報告もある [36] ため、TiOOH 基が有機過

酸と同様に過酸化水素と平衡関係にあり、 H_2O_2 放出のキーとして働いている可能性はある。以上より、 $TiOOH$ 基の寄与と、粒子表面に吸着している H_2O_2 からの放出とが共存していると考えられる。

我々は、この徐放される過酸化水素が放射線増感効果の正体と考えた。過酸化水素はそれ自体が放射線増感剤であるという報告があり、一部で臨床試験も行われている。酸素欠乏に陥っている腫瘍内に過酸化水素が導入されると、腫瘍細胞内のペルオキシダーゼが過酸化水素を代謝し酸素に変えることで細胞内酸素濃度が上昇する。一方で、ペルオキシダーゼは高濃度の過酸化水素によって不活化されてしまうという[37]。その結果、過剰に発生した酸素による酸素効果で電離放射線の ROS 産生効率が上がり、治療効果が向上するというのが、臨床試験を行っている Ogawa らの主張する放射線増感の作用機序である[38,39]。これから *in vivo*において、過酸化水素単体を用いた放射線増感治療との比較を行っていかなければならない。過酸化水素を担持したナノ粒子としての PAA- TiO_x NPs を用いることによって考え得る利点としては、過酸化水素をナノ粒子として扱えることにある。過酸化水素は低分子であるため、腫瘍に局所注射しても長く滞留せず拡散してしまうが、PAA- TiO_x NPs は分子より格段に大きなサイズを持った粒子なので拡散速度を抑えられる。また、現在は腫瘍への局所注射を用いた粒子の導入をしているが、 TiO_2 NPs の表面に修飾した PAA の持つカルボキシル基を介して任意の標的分子—抗体のような—を修飾できるため、患部上流からの静脈注射によって腫瘍内に PAA- TiO_x NPs を蓄積することも考えられる「。

結論として、本研究では PAA- TiO_x NPs の持つ放射線増感効果の作用機序が PAA- TiO_2 NPs 表面に吸着した過酸化水素であることが示唆された。PAA- TiO_x NPs は腫瘍内で安定した過酸化水素供給体として働くことで、放射線治療と併用することで有望な放射線増感治療の開発が期待される。今後はさらに実用化に向け、*in vivo*で PAA- TiO_x NPs が生体に与える毒性評価を行うほか、低酸素培養を用いて低酸素腫瘍内環境を再現することで *in vitro*において PAA- TiO_x NPs の放射線増感効果を再現したい。

参考文献

- [1] Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD, Burnet NG. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 2009;9:134–142.
- [2] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* 2012;9:193–199.
- [3] Emami B. Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Radiation. *Reports Radiother Oncol* 2013;1:36–48.
- [4] Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med*

- 2009;9:442–458.
- [5] Harrison LB, Chadha M, Hill R, Hu K, Shasha D. Impact of Tumor Hypoxia and Anemia on Radiation Therapy Outcomes. *Oncologist* 2002;7:492–508.
- [6] Briggs B, Ververis K, Rodd AL, Foong LJL, Silva FM Da, Karagiannis TC. Photosensitization by iodinated DNA minor groove binding ligands: Evaluation of DNA double-strand break induction and repair. *J Photochem Photobiol B Biol* 2011;103:145–152.
- [7] Song T, Zhang X, Fang M, Wu S. Concurrent chemoradiotherapy using paclitaxel plus cisplatin in the treatment of elderly patients with esophageal cancer. 2015;3087–3094.
- [8] Niyazi M, Harter PN, Hattingen E, Rottler M, Baumgarten V, Proescholdt M, Belka C, Lauber K. Bevacizumab and radiotherapy for the treatment glioblastoma : brothers in arms or unholy alliance ? of. 2015;
- [9] Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, Macdonald JS, Martenson, Jr JA, Al-Sarraf M, Byhardt R, Russell AH, Beitler JJ, Spencer S, Asbell SO, Graham M V., Leichman LL. Chemoradiotherapy of Locally Advanced Esophageal Cancer. *Jama* 1999;281:1623–1627.
- [10] Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, Borghi E, Levy L. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Futur Oncol* 2012;8:1167–1181.
- [11] Jain S, Ch B, Coulter JA, Ph D, Hounsell AR, Karl T. Europe PMC Funders Group Author Manuscript CELL-SPECIFIC RADIOSENSITIZATION BY GOLD NANOPARTICLES AT MEGAVOLTAGE RADIATION ENERGIES. 2011;79:531–539.
- [12] Kohshi K, Kinoshita Y, Imada H, Kunugita N, Abe H, Terashima H, Tokui N, Uemura S. Effects of radiotherapy after hyperbaric oxygenation on malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999;80:236–241.
- [13] Yang Y, Jin C, Li H, He Y, Liu Z, Bai L, Dou K. Improved radiosensitizing effect of the combination of etanidazole and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vivo. *Exp Ther Med* 2012;3:299–303.
- [14] Bussink J. Clinical Outcome and Tumour Microenvironmental Effects of Accelerated Radiotherapy with Carbogen and Nicotinamide. *Acta Oncol (Madr)* 1999;38:875–882.
- [15] Hehlhans S, Oppermann J, Reichert S, Fulda S, Rödel C, Rödel F. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis. *Radiat Oncol* 2015;1–11.
- [16] Cheng J, Liu W, Zeng X, Zhang B, Guo Y, Qiu M, Jiang C, Wang H, Wu Z, Meng M,

- Zhuang H, Zhao L, Hao J, Cai Q, Xie D, Pang Q, Wang P, Yuan Z, Qian D. XRCC3 is a promising target to improve the radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2015;n/a-n/a.
- [17] Schilling D, Kühnel A, Konrad S, Tetzlaff F, Bayer C, Yaglom J, Multhoff G. Sensitizing tumor cells to radiation by targeting the heat shock response. *Cancer Lett* 2015;360:294–301.
- [18] He S, Smith DL, Sequeira M, Sang J, Bates RC, Proia D a. The HSP90 inhibitor ganetespib has chemosensitizer and radiosensitizer activity in colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2014;32:577–586.
- [19] Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, Ozsvari B, Reeves KJ, Smith DL, Clarke RB, Howell SJ, Cappello R, Martinez-outschoorn UE, Peiris-pagès M. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells : Implications for more effective radiation therapy. no date;6:
- [20] Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol* 2015;5:1–13.
- [21] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2010;461:1071–1078.
- [22] Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, Apetoh L, Aranda F, Galluzzi L, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology* 2014;3:e955691.
- [23] Matsui K, Karasaki M, Segawa M, Hwang SY, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Biofunctional TiO₂ nanoparticle-mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation. *Medchemcomm* 2010;1:209.
- [24] Fujishima a, Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature* 1972;238:37–38.
- [25] Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Tanaka T, Morita K, Umetsu M, Ohara S, Tan Z, Nishimura Y, Akasaka H, Sato K, Numako C, Takami S, Kondo A. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016;11:91.
- [26] Boonstra a. H, Mutsaers C a. H a. Adsorption of hydrogen peroxide on the surface of titanium dioxide. *J Phys Chem* 1975;79:1940–1943.
- [27] Lee M-C, Yoshino F, Shoji H, Takahashi S, Todoki K, Shimada S, Kuse-Barouch K. Characterization by Electron Spin Resonance Spectroscopy of Reactive Oxygen Species Generated by Titanium Dioxide. *J Dent Res* 2005;84:178–182.
- [28] Etacheri V, Seery MK, Hinder SJ, Pillai SC. Oxygen rich titania: A dopant free, high

- temperature stable, and visible-light active anatase photocatalyst. *Adv Funct Mater* 2011;21:3744–3752.
- [29] Doong R, Chang W. Photoassisted titanium dioxide mediated degradation of organophosphorus pesticides by hydrogen peroxide. *J Photochem Photobiol A Chem* 1997;107:239–244.
- [30] Doong R a, Chang WH. Photodegradation of parathion in aqueous titanium dioxide and zero valent iron solutions in the presence of hydrogen peroxide. *J Photochem Photobiol a-Chemistry* 1998;116:221–228.
- [31] Zou J, Gao J, Wang Y. Synthesis of highly active H₂O₂-sensitized sulfated titania nanoparticles with a response to visible light. *J Photochem Photobiol A Chem* 2009;202:128–135.
- [32] Wong CC, Chu W. The Hydrogen Peroxide-Assisted Photocatalytic Degradation of Alachlor in TiO Suspensions The Hydrogen Peroxide-Assisted Photocatalytic Degradation of Alachlor in TiO₂ Suspensions. 2003;37:2310–2316.
- [33] Ogino C, Dadjour MF, Iida Y, Shimizu N. Decolorization of methylene blue in aqueous suspensions of titanium peroxide. *J Hazard Mater* 2008;153:551–556.
- [34] Sánchez LD, Taxt-Lamolle SFM, Hole EO, Krivokapić A, Sagstuen E, Haugen HJ. TiO₂ suspension exposed to H₂O₂ in ambient light or darkness: Degradation of methylene blue and EPR evidence for radical oxygen species. *Appl Catal B Environ* 2013;142–143:662–667.
- [35] Harbour JR, Tromp J, Hair ML. Photogeneration of hydrogen peroxide in aqueous TiO₂ dispersions. *Can J Chem* 1985;63:204–208.
- [36] Tengvall P, Lundström I, Sjöqvist L, Elwing H, Bjursten LM. Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants. *Biomaterials* 1989;10:166–175.
- [37] Ogawa Y. Paradigm shift in radiation biology/radiation oncology—Exploitation of the “H₂O₂ effect” for radiotherapy using low-let (Linear energy transfer) radiation such as X-rays and high-energy electrons. *Cancers (Basel)* 2016;8:1–12.
- [38] Ogawa Y, Ue H, Tsuzuki K, Tadokoro M, Miyatake K, Sasaki T, Yokota N, Hamada N, Kariya S, Hitomi J, Nishioka A, Nakajima K, Ikeda M, Sano S, Inomata T. New radiosensitization treatment (KORTUC I) using hydrogen peroxide solution-soaked gauze bolus for unresectable and superficially exposed neoplasms. *Oncol Rep* 2008;19:1389–1394.
- [39] Ogawa Y, Kubota K, Ue H, Tadokoro M, Matsui R, Yamanishi T, Hamada N, Kariya S, Nishioka A, Nakajima H, Tarutani M, Sano S. Safety and effectiveness of a new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC II) for intratumoral

injection for low-LET radioresistant tumors. *Int J Oncol* 2011;39:553–560.

第二章

ポリアクリル酸修飾二酸化チタンナノ粒子の持つ過酸化水素スポンジ効果の解析

2-1. 緒言

すい臓がんはがんの王様と呼ばれるほど治療の難しいがん種である。2006年から2008年において、がんと診断された日本人全体での5年生存率の平均は62.1%であるのに対し、すい臓がんに限ってみると男性で7.9%、女性では7.5%にすぎず、次に低い部位別がん種である胆のう・胆管がんのそれぞれ23.9%、21.1%に比べて圧倒的に低くなっている[1]。その理由としては、まず診断においては自覚症状が現れにくく発見が遅れ、ステージが進んでからの治療になること、また治療においても患部が生体の深部に存在することから従来のがん治療法では十分な効果が期待できないことが挙げられる。現在のがん治療では、外科的切除、抗がん剤による化学療法、放射線治療の3つの治療法が組み合わせて用いられる。しかし、深部がんは単純に生体表面から遠く、脊髄など敏感で重要な部位が周囲に多いことから外科的切除も放射線治療も難しい。さらに、酸素の供給が血流からに限られるため、腫瘍内部が低酸素症を発症しており、これは化学療法と放射線治療に耐性を持つ原因となっている。

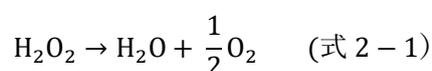
放射線治療が実用化されて以来、放射線に耐性を持つがん種の放射線感受性を高めるような薬剤やナノ粒子は放射線増感剤と呼ばれ、さかんに研究されてきた。その作用機序はいくつか存在するが、特に腫瘍内の低酸素症を解消するための薬剤は低酸素症緩和剤と呼ばれ[2]、最も原始的には、患者を高圧酸素下においての放射線治療が行われた[3]。比較的最近では、低酸素分圧の細胞内でのみ作用し、放射線が照射されると酸素効果様(mimetic oxygen effect)の放射線増感効果を示すイミダゾール系の増感剤が良く研究されてきた[4,5]。さらに、現在では、活性酸素(ROS)の一種である過酸化水素(H_2O_2)も低酸素症緩和剤として働くことがわかっており[6]、Y. Ogawaらの研究グループは H_2O_2 を放射線増感剤として用いた臨床試験を行い、乳がんと皮膚がんにおいて目覚ましい成果を上げている[7,8]。

H_2O_2 は放射線増感剤として優秀であるが、低分子であることから生体内でも拡散が早く、目的部位に送達することが難しいという問題があった。そこで我々は、ポリアクリル酸を表面修飾して生体内での分散性を高めた二酸化チタンナノ粒子に H_2O_2 を担持させた「ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子(PAA- TiO_x NPs)」を開発した。

酸化チタン表面に H_2O_2 を反応させると H_2O_2 が吸着し、表面にスーパーオキシド

アニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、ペルオキシドアニオン (O_2^{2-})、ヒドロペルオキシド ($-OOH$) といった (広義の) 活性酸素種が安定に存在することが知られている [9–11]。また、純粋酸化チタンではなく他の元素をドーピングされた素材でも同様の現象が確認され [12]、あるいは、チタニウム塩に過酸化水素を加えて作成された酸化チタンゲル (過酸化チタンゲル、perotitanium gel とも) から同様の活性酸素種が検出されている [13,14]。こうした活性酸素種を持つ酸化チタンは可視光型光触媒としてや [15,16]、有機合成触媒として [14,17] 研究がおこなわれている。一方で、金属チタン製のインプラントや人工骨が体内で産生される H_2O_2 に浸食されて過酸化チタン種が生成することも報告されている [18]。

酸化チタン表面に H_2O_2 蒸気を吸着させた場合、その後サンプルを加熱しても気固界面から再び H_2O_2 が遊離してくることはなく、式(2-1)に従って、吸着した H_2O_2 の 1/2 等量にあたる O_2 が遊離することが知られている。



しかし、我々の合成した PAA-TiO_x NPs はあらかじめ担持した過酸化水素を生体内の周囲環境に徐放することができ、腫瘍への局所投与と放射線照射を併用することで顕著な放射線増感効果を発揮することが *in vivo* で示されている [19]。また、生体内での拡散の早さという問題についても、細胞内に取り込まれて H_2O_2 を継続的に放出することで過酸化水素水の直接投与よりも優位性を有していることが示された。しかし、PAA-TiO_x NPs がどのようにして H_2O_2 を担持し、そして放出しているかはわかっていなかった。そこで、本研究では限外ろ過と透析を用いてナノ粒子と H_2O_2 分子を分離することで H_2O_2 の粒子への吸着挙動を明らかにした。また、吸着した H_2O_2 がどのような分子種で表面に存在しているのかを機器分析を用いて解析し、検討した。

2-2. 実験方法

ナノ粒子の準備

実験に使用したナノ粒子は、すでに報告した論文と同様に合成した [20]。詳しくは参考文献を参照されたい。石原産業 (大阪, 日本) から購入したアナターゼ二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) の硝酸酸性溶液分散液 (STS-01) をポリアクリル酸 5000 (PAA; 和研純薬, 大阪, 日本) と混合し、水熱処理を行うことで粒子表面に PAA を修飾した。これを PAA-TiO₂ NPs とする。また、TiO₂ NPs と PAA-TiO₂ NPs に H_2O_2 水溶液 (ナカライテスク, 京都, 日本) を加えることで得られる黄色い分散液を PAA-TiO_x NPs と呼ぶことにする。

標準試料として、アナターゼ型二酸化チタン (純度 99.6%) とルチル型二酸化チタン (純度 99.99%) の粉末をレアメタリック (東京, 日本) から購入した。それぞれを Anatase, Rutile と呼ぶことにする。

SEM (Scanning electron microscope) 観察

試料はカーボンテープに固定し、JSM-7500F (JEOL, 東京, 日本) を用いて観察した。加速電圧は 5 kV、SEI モードを用いた。

H₂O₂ 濃度の定量

すべての溶液中の H₂O₂ 濃度は Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, ニューヨーク州) を用いて説明書に従い定量した。蛍光測定には Multi-label plate reader (Wallac 1420 ARVOSx; Parkin Elmer, マサチューセッツ州) を用いた (Ex: 490 nm/Em: 572 nm)。

H₂O₂ 吸着実験

TiO₂ NPs 分散液または PAA-TiO₂ NPs 分散液と、過酸化水素水を 50ml コニカルチューブ内で混合し、電動ローテーターを用いて室温、約 20rpm で継続的に混合した。混合液は経時的にサンプリングし、3 kDa カットオフ限外ろ過フィルター (MerkMillipore, Burlington, マサチューセッツ州) を用いて 12000 rpm, 5 min の条件で限外ろ過した。その後、ろ液に残留している H₂O₂ 濃度を定量した。

H₂O₂ 放出実験

孔径 50 Å のセルロース透析チューブ (Viskase Companies, イリノイ州) にサンプルを 1ml 入れ、クリップで密閉した。これを、PBS200ml を入れたバッフル付き 300ml 三角フラスコに投入し、シェーカーで 120rpm, 37°C で回転振盪した。透析液を経時的に 200 µl ずつサンプリングし、H₂O₂ 濃度を定量した。

XPS (X 線光電子分光スペクトル) 測定

二酸化チタンサンプルの Ti に対して H₂O₂ がモル比で 10 倍となるように過酸化水素水を加え、その分散液を室温で一晩乾燥した。サンプルはカーボンテープにマウントし、HI X-tool (アルバック・ファイ, 神奈川, 日本) を用いて XPS 測定した。X 線源は Al の K α 線を用いた。取得した酸素の 1s 軌道由来のスペクトルは、ピークトップ 529-530 eV の信号を Ti(IV)-O、531 eV をヒドロキシ基(OH)、532 eV をペルオキシド (O-O)、533-534 eV を硝酸イオンまたは水由来として波形分離を行った[21]。

ラマン散乱スペクトル測定

二酸化チタンサンプルの Ti に対して H₂O₂ がモル比で 10 倍となるように過酸化水素水を加え、その分散液を室温で一晩乾燥した。サンプルはカーボンテープにマウントし、NRS-7000 (JASCO, 東京, 日本) を用いて顕微ラマン散乱光のスペクトルを測定した。照

射光の波長は 532 nm を用いた。

2-3. 結果

二酸化チタン粉末の形態観察

合成した TiO_2 、PAA- TiO_2 と、標準試料の Anatase、Rutile を SEM を用いて形態観察した。 TiO_2 は粒子径が 10 nm 以下の一次粒子が凝集して約 50 nm の二次凝集体として振る舞っている様子が観察された (Fig. 1A)。表面をポリアクリル酸で修飾された PAA- TiO_2 NPs は二次凝集体としての粒径はほとんど変わらなかったが、ポリアクリル酸の修飾による影響で表面の起伏が大きくなっていることがわかる (Fig. 1B)。Anatase は滑らかな表面を持ち一次粒子が 100-200 nm であった (Fig. 1C)。Rutile はやはり表面が滑らかで、200 nm - 1 μm と最も大きな粒径を持っていた。

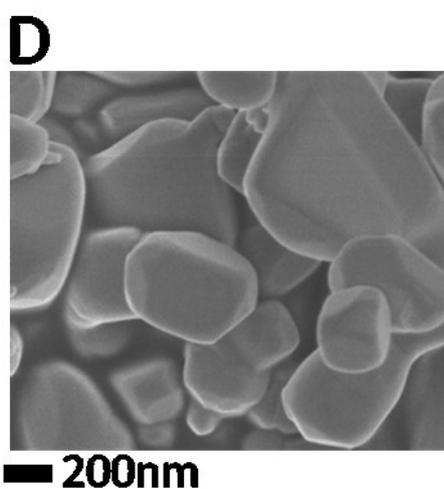
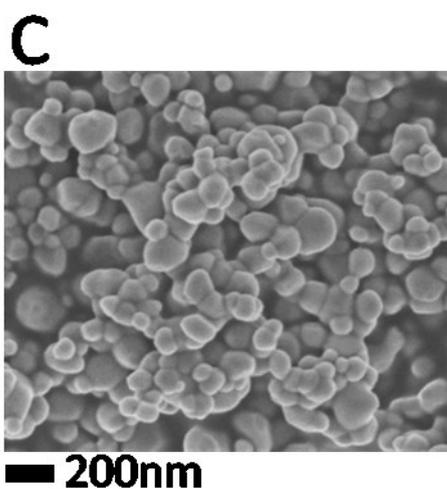
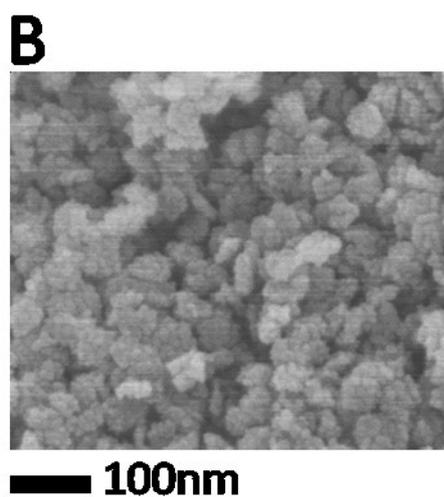
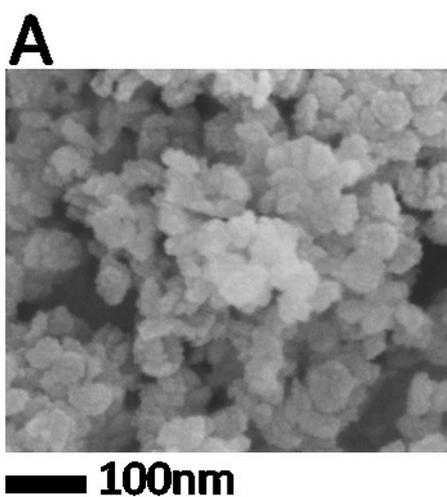


Fig. 2-1 Morphological observation of (A) TiO₂ NPs, (B) PAA-TiO₂ NPs, (C) Anatase and (D) Rutile with FE-SEM. Large variety of particle size and morphology between the samples can be conceived.

H₂O₂ 吸着・放出プロフィール

これまでの研究で TiO₂ NPs および PAA-TiO₂ NPs は過酸化水素水を処理することで H₂O₂ を吸着し、周囲に H₂O₂ のない環境に移されると吸着した H₂O₂ を徐放することが見出されている。そこで、これらの NPs に吸着、脱着する H₂O₂ 量を定量した。TiO₂ NPs または PAA-TiO₂ NPs と過酸化水素水をそれぞれ終濃度 1 mg/ml, 1000 μM となるように混合し、継続的に攪拌しながら粒子に吸着する H₂O₂ 量を測定した。対照として、粒子を含まない群と、H₂O₂ を含まない群についても同様の操作を行った。その結果、PAA 修飾の有無によって吸着速度は大きく変わらず、最終的に粒子に吸着した H₂O₂ 量は TiO₂ NPs と PAA-TiO₂ NPs ではそれぞれ、477, 385 μmol/g と算出された (Fig. 2-2)。

次に、H₂O₂ を吸着させたこれらのナノ粒子分散液、および粒子を含まず H₂O₂ のみを含む対照サンプルを透析チューブに 1 ml ずつ密封し、200 ml のバッファー中で透析した。そして、透析液に放出されてきた H₂O₂ 濃度を経時的に測定した。ナノ粒子は透析膜を通過できないため、透析液には、分散液相中に遊離していた H₂O₂ と粒子表面から脱着した H₂O₂ が放出されてくる。その結果、過酸化水素水のみを含む透析チューブからは 30 分で全ての H₂O₂ が透過してきたのに対し、H₂O₂ を吸着した TiO₂ NPs, PAA-TiO₂ NPs 分散液からは 6 時間後まで H₂O₂ の放出が続き定常に達した (Fig. 2-3)。すなわち、粒子表面からの H₂O₂ の脱着が 6 時間続いたことになる。さらに興味深いことには、粒子表面に吸着された H₂O₂ は全てが脱着してくることはなかった。H₂O₂ を吸着した TiO₂ NPs 分散液と PAA-TiO₂ NPs 分散液からはそれぞれ、564, 838 μmol/g の H₂O₂ が透析液に放出された。すなわち、H₂O₂ 吸着実験で粒子に吸着した H₂O₂ 量と比較すると、それぞれ 41.4, 222.3 μmol/g の H₂O₂ が脱着してきた計算になる。

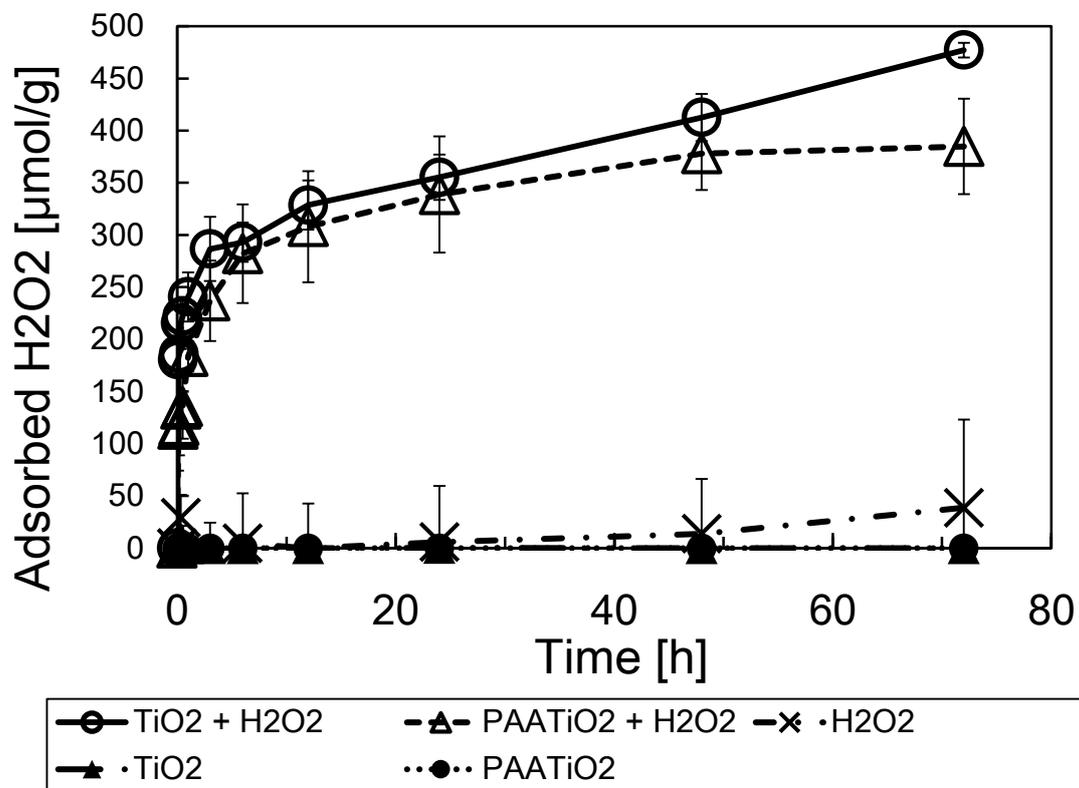


Fig. 2-2 Adsorbed H₂O₂ concentration on titanium dioxide NPs when NPs and H₂O₂ were mixed in 1 mg/ml and 1000 μM, respectively. Data represent the mean ± STDEV derived from three series of individual experiments.

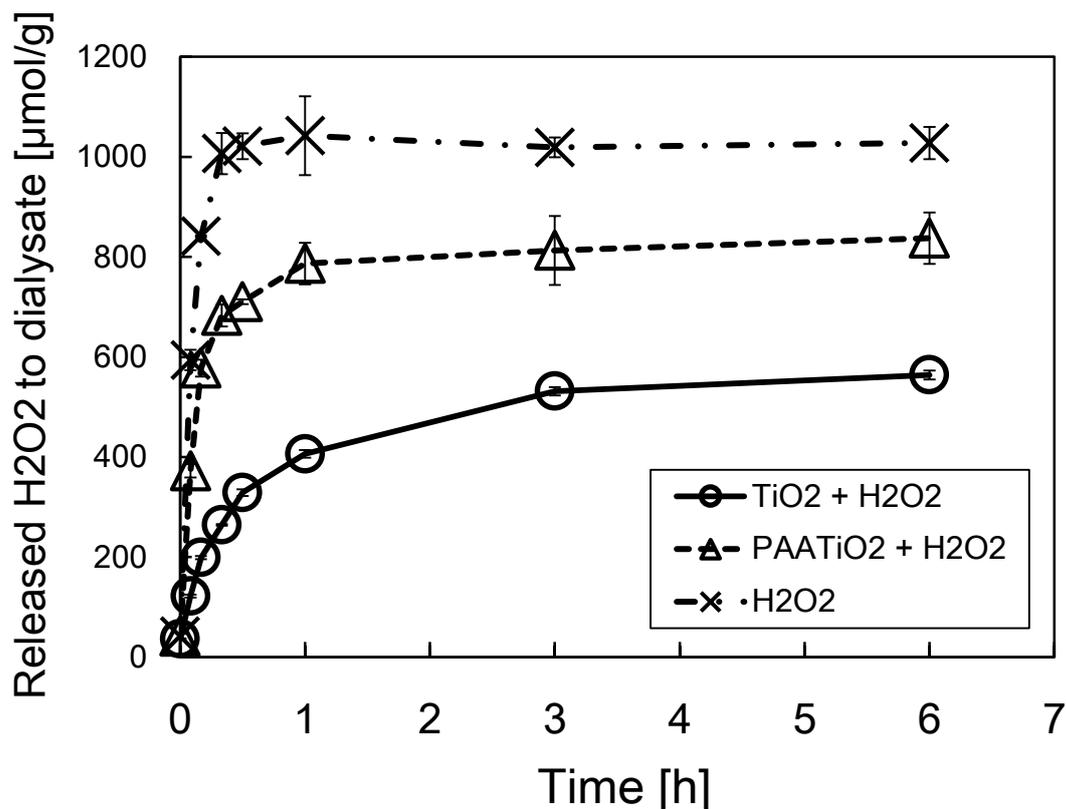


Fig. 2-3 Total H₂O₂ concentration diffused from dialysis tube filled with the NPs dispersions which had adsorbed H₂O₂ in previous experiment (Fig. 2-2). The terminal concentration contained both H₂O₂ molecules that desorbed from NPs' surface and that were free in a liquid phase of the dispersion. Data represent the mean ± STDEV derived from three series of individual experiments.

H₂O₂ 放出プロファイルのモデル化

TiO₂ NPs と PAA-TiO₂ NPs の H₂O₂ 脱着特性を評価するために、Fig. 2-4 のように H₂O₂ 放出実験をモデル化した。ここで、C_p [μM] はナノ粒子内 H₂O₂ 濃度、C_l [μM] は透析チューブ内 H₂O₂ 濃度、C_{out} [μM] は透析液内 H₂O₂ 濃度である。ここで、ナノ粒子から透析チューブ内への H₂O₂ 流出速度 r₁ [μM/s] が C_l と C_p の差に比例すると仮定すると、速度定数を k₁ として

$$r_1 = k_1(C_l - C_p) \quad \text{式(2-2)}$$

また、同様に透析チューブ内から透析液への流出速度 r₂ を定義し、透析液の H₂O₂ 濃度が充分小さいと仮定すると、

$$r_2 = k_2 C_l \quad \text{式(2-3)}$$

このとき、次の方程式が成り立つ。

$$\frac{dC_l}{dt} = k_1(C_p - C_l) - k_2 C_l \quad \text{式(2-4)}$$

さらに、 $k_2 \gg k_1$ を仮定すると、

$$\begin{cases} C_p = C_{p0} e^{-k_1 t} \\ C_l = C_{l0} e^{-k_2 t} \end{cases} \quad \text{式(2-5)}$$

過酸化水素水のみを透析した場合の実験値を式(2-5)にあてはめて、 $k_2=10.9$ [1/s]と求まる。これと TiO_2 NPs, PAA- TiO_2 NPs の実験値から k_1 のフィッティングを行うと、PAA- TiO_2 NPs の場合は $C_{p0}=C_{l0}=615$ [μM], $k_1=1.2$ [1/s]のとき実験値とよく合致する (Fig. 2-5)。しかし、 TiO_2 NPs の場合は k_1 をどのようにとっても良いモデルとならない。そこで、 C_{p0} (C_{l0}) を含めて実験値とフィッティングすると、 $C_{p0}=C_{l0}=190$, [μM], $k_1=0.8$ [1/s]のとき実験値とよく合致した。モデル計算から得られた TiO_2 NPs と PAA- TiO_2 NPs についての H_2O_2 吸着・脱着量、および、脱着速度定数を Table 2-1 に示した。

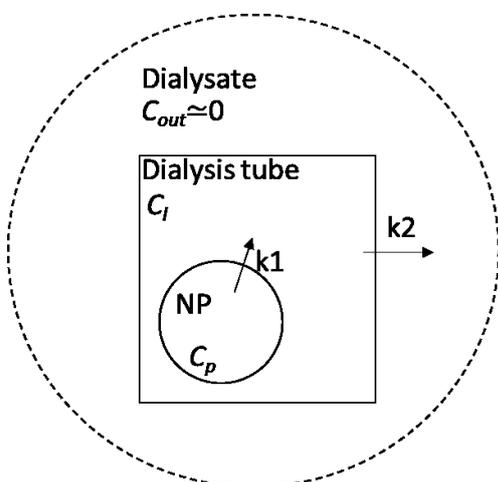


Fig. 2-4 Schematic image for modeling a desorption of H_2O_2 molecules from NPs.

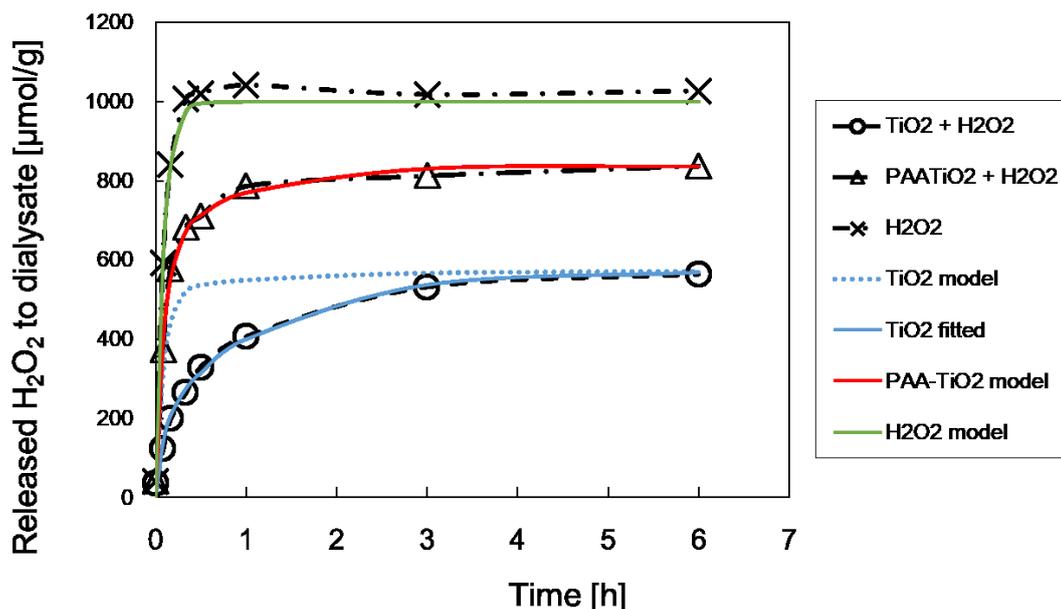


Fig. 2-5 Model calculation and re-drawing for desorption of H₂O₂ from NPs.

Table. 2-1 H₂O₂ concentrations adsorbed on and desorbed from NPs and desorption rate constant calculated from modeling analyses.

sample	totally adsorbed [μ mol/g]	desorbed during dialysis [μ mol/g]	irreversibly adsorbed [μ mol/g]	desorption rate constant [1/s]
TiO ₂ NPs	810.0	374.2	435.8	0.8
PAA-TiO ₂ NPs	384.8	222.3	162.5	1.2

XPS 測定

表面に吸着した H₂O₂を確認するために、二酸化チタン粉末に H₂O₂処理をする前と後で XPS 測定を行った。準備したサンプルのうち、シングルナノオーダーの一次粒子を持つ TiO₂ NPs と PAA-TiO₂ NPs は H₂O₂を処理すると直ちに特徴的な黄色を呈した。一方、一次粒径が 100 nm 以上である Anatase, Rutile 粉末の分散液は H₂O₂を加えても白色のまま、その後 Anatase について分散液を風乾したものは若干の乳白色を示した (Fig. 2-6A)。取得した酸素 1s 軌道の XPS スペクトルは Ti(IV)との結合、ヒドロキシ基、および酸素同士の単結合由来のピークに波形分離し (Fig. 2-6B,C)、各サンプルにおけるそれぞれのピーク面積を Fig. 2-6D に示した。全ての二酸化チタンサンプルで H₂O₂を処理すると表面

に酸素同士の単結合が現れた。ただし、この結合が過酸化水素由来であるか、あるいはスーパーオキシド、ペルオキシド由来であるかを判断する分解能は得られなかった。また、TiO₂ NPs には分散材である硝酸イオンが吸着していると考えられ、実際に XPS 測定によって窒素 1s 軌道周りのスペクトルが得られている。一方、TiO₂ NPs を原料とした PAA-TiO₂ NPs からはほとんど窒素が検出されなかったが、O1s 軌道の結合エネルギーに関していうと硝酸イオンにおける N-O 結合と水分子 (H₂O) の結合エネルギーがほぼ同じのため、PAA-TiO₂ にみられた 533 eV のピークは吸着水由来と考えられる。

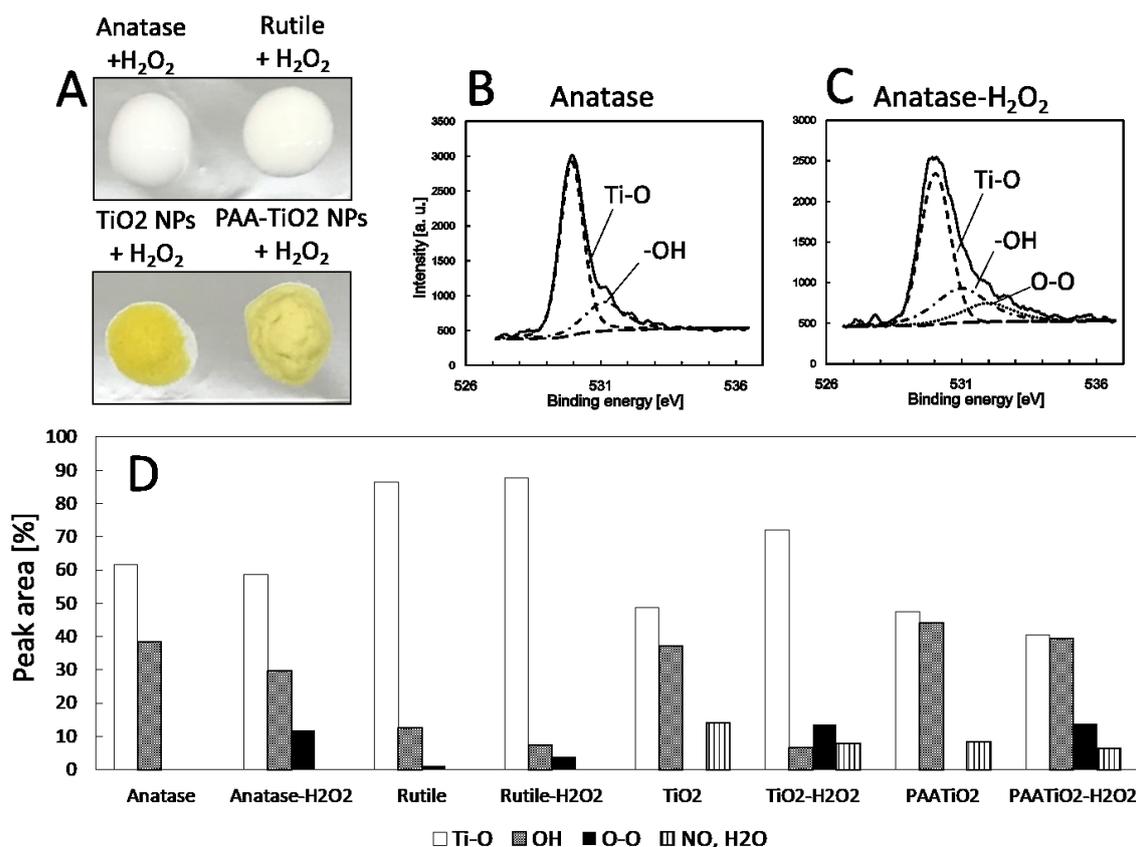


Fig. 2-6 XPS analyses of H₂O₂ modified titanium dioxide samples. (A) Only H₂O₂ modified titanium dioxide nanoparticles showed a characteristic yellow coloring. XPS spectrum for 1s orbital of oxygen varied from (B) pure titanium dioxide surface to (C) H₂O₂ modified surface producing single bonds of dioxygen species. (D) The same reaction occurred in the every prepared sample.

ラマン散乱スペクトル測定

XPS 測定で得られた酸素同士の単結合が何の分子種に由来するかを調べるため、同じサンプルについてラマン散乱スペクトルを取得した。TiO₂ NPs に見られる 1047 cm⁻¹ の鋭いピークは、表面に吸着している分散媒の硝酸イオンである。PAA-TiO₂ NPs では PAA

修飾の過程でかなり失われている (Fig. 2-7A)。遊離の H_2O_2 は 875 cm^{-1} にピークが見られるが[22]、 TiO_2 NPs と PAA 由来のバンドに埋もれて確認しづらい。一方で、Anatase に H_2O_2 を処理した場合は表面に吸着した H_2O_2 が明確に確認できた(Fig. 2-7B)。このピークは、真空でしばらく乾燥すると失われた。注目したいのは、 TiO_2 NPs, PAA- TiO_2 NPs, Anatase とともに H_2O_2 処理をすると現れる $845 - 850\text{ cm}^{-1}$ と、 TiO_2 NPs, PAA- TiO_2 NPs のみに現れる 1002 cm^{-1} のピークである (Fig. 2-7A)。前者は酸化チタン結晶間の Ti^{4+} に配位結合した O_2^{2-} と考えられるが[23]、後者のピークはこれまでに報告されていない。

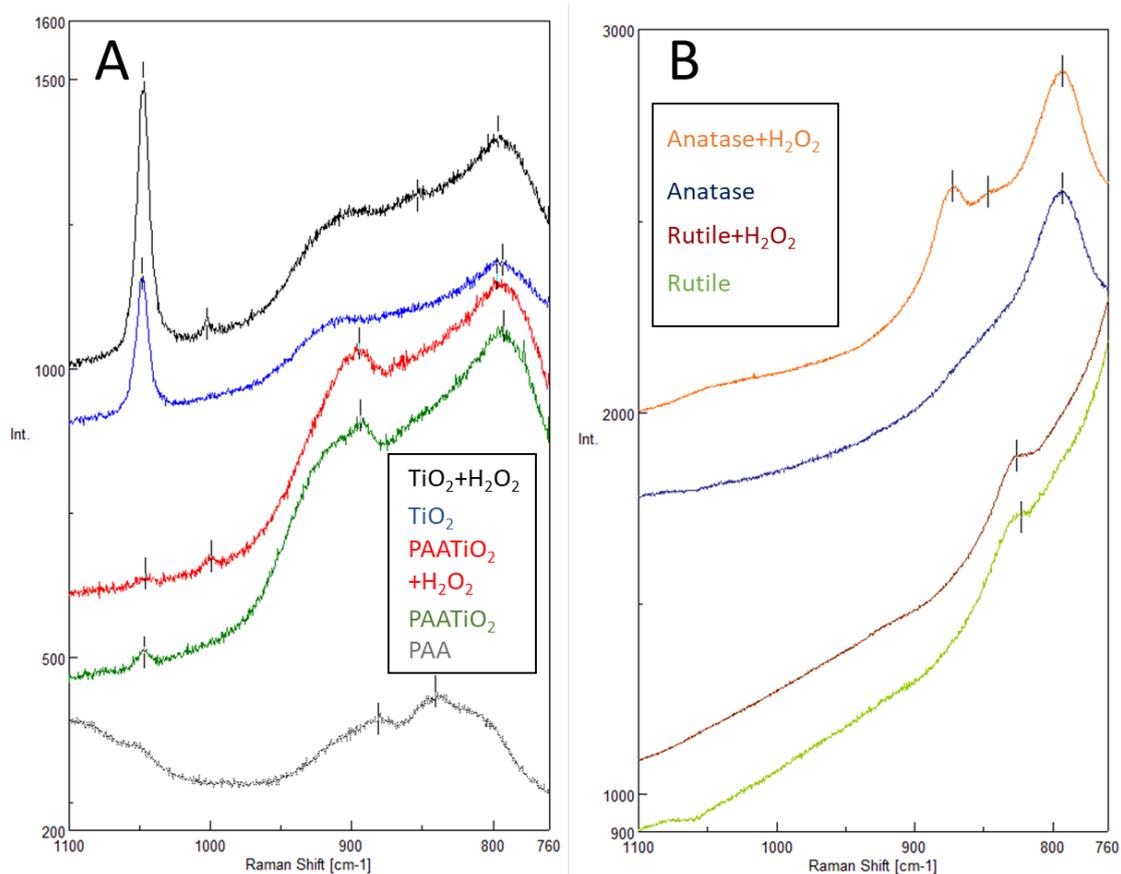


Fig. 2-7 Raman spectra of (A) TiO_2 and PAA- TiO_2 NPs, and (B) purely manufactured Anatase and Rutile titanium dioxide powders, with or without an H_2O_2 modification.

2-4. 考察

我々はこれまで、 TiO_2 NPs を原料として表面に PAA を修飾した PAA- TiO_2 NPs を作製し、ここに約 2 M の H_2O_2 を処理することで PAA- TiO_x NPs を合成してきた。しかし、PAA- TiO_x NPs が粒子のどこに、どれだけの H_2O_2 を吸着、放出し得るのか、また、その速度についてもわかっていなかった。結局、 H_2O_2 は PAA を修飾していない TiO_2 NPs の表面にも吸着・脱着でき、その量は PAA- TiO_2 NPs よりも多かった。まず、NPs に対する

H₂O₂の吸着は非常に長時間続いた。PAA-TiO₂ NPs の場合は 72 h 後には定常に達したが、TiO₂ NPs はその後も H₂O₂の吸着が続いた。H₂O₂が TiO₂ NPs に吸着する速度がこれほど遅くなったのは、予想以上に TiO₂ NPs に吸着する H₂O₂量が多く、分散液相中の H₂O₂分圧が下がってしまったことが理由と考えられる。最終的にどれだけの H₂O₂が吸着したかは後の脱着モデル実験で明らかにした。H₂O₂の吸着速度は、PAA-TiO₂ NPs の吸着サイトが飽和するまでどちらの NPs でも等しかった (Fig. 2-2)。つまりそれは、吸着が反応律速ではなく拡散律速であることを表す。TiO₂ NPs のメソポーラスな部分は PAA の修飾によって埋まってしまう、PAA-TiO₂ NPs の方は粒子内部に存在した吸着サイトに H₂O₂がアプローチできず、吸着反応が早く終わってしまったと考えられる。よって、吸着反応にはより高濃度の H₂O₂を用いれば、もっと早く定常に達するはずである。

H₂O₂の脱着はいずれの粒子も 6 h でほぼ完了した (Fig. 2-3)。脱着プロファイルはモデルを用いて解析した。粒子からの脱着速度は相対的 H₂O₂濃度の一次モデルで表し、また透析チューブからの流出速度も同様に濃度の一次モデルで表した[24]。このモデルを用いることで、粒子表面からの H₂O₂脱着速度定数、さらに粒子表面に吸着していた H₂O₂濃度を求められた (Fig. 2-5)。PAA-TiO₂ NPs は TiO₂ NPs の半分以下の H₂O₂しか吸着できていないことがわかった (Table 2-1)。

吸着した H₂O₂はそのすべてが脱着できるわけではなかった。具体的には、TiO₂ NPs に吸着した H₂O₂の 53.8%, PAA-TiO₂ NPs では 42.2%が不可逆的な吸着を起こした。PAA 修飾によって H₂O₂の総吸着量が半分以下になっているにもかかわらず、非可逆吸着を起こす H₂O₂分子の割合があまり変わらないため、粒子の外側と内側で吸着サイトの質は同じと考えられる。あるいは、若干粒子の内側のサイトの方が不可逆吸着に与しやすいといえる。不可逆吸着と可逆吸着の割合について、Klissurski らは可逆吸着の方が 10 倍多いと結論付けているが、処理している H₂O₂濃度が彼らの方が 330 倍高いので、単純には比べられないだろう[11]。

不可逆吸着した H₂O₂はどのような状態で酸化チタン表面に結合しているのだろうか。その理解にはサンプルの呈する色も一つの助けとなる。TiO₂は Rutile 型結晶も Anatase 型結晶も、Anatase 型ナノ粒子である TiO₂ NPs も全て白色である。また、PAA を表面修飾した PAA-TiO₂ NPs も白色をしている。しかし、TiO₂ NPs あるいは PAA-TiO₂ NPs に過酸化水素を処理すると鮮やかな黄色を呈する (Fig. 2-6A)。これは古くから溶液中に Ti イオンが含まれるかどうかを調べるために H₂O₂を加え、黄色の呈色を見る反応に似ている。ただし、STS-01 よりも一次粒径の大きい、サブミクロンオーダー粒子の Anatase 型結晶、Rutile 型結晶に過酸化水素を加えても黄色の呈色は見られない。これは少々意外であったが、手元にある参考文献を見返してみると、酸化チタンと活性酸素種の反応で黄色を呈したという報告は全てペルオキシチタンゲルか酸化チタンナノ粒子を用いており、バルクでの呈色は報告されていない。黄色の呈色は、過酸化水素が酸化チタン表面と反応してできたペルオキシ種に由来すると考えられている[12]。

酸素の XPS スペクトルを取得すると、過酸化水素処理をした後の全てのサンプルはペルオキシドが生成されていることがわかった (Fig. 2-6D)。Rutile のみ、粒子表面のペルオキシドがほとんど生成されなかったが、実際に過酸化水素水と反応させる際にも Rutile は親水性が低く、活性酸素種の吸着も少ないであろうことが予想された。XPS では二酸素の活性種がスーパーオキシドかペルオキシドかを判断することはできなかった。一方で、ラマン分光を用いた解析では、表面に存在するペルオキシドが特定できた。しかし、これまでの報告で酸化チタン表面に H_2O_2 を処理した際に存在が確認されている分子種である $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($1075 - 1195 \text{ cm}^{-1}$) を確認することはできなかった。それはラマンだけではなく、IR を用いても検出できなかった。ただ、実際には ESR を用いて、微量な $\text{O}_2^{\cdot-}$ の存在を確認している。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ がラマン分光を用いて検出できなかった理由としては、単純に濃度が低かったのだろうと考えられる。Kanezaki らによれば、格子間に存在する $\text{O}_2^{\cdot-}$ は 600°C でも安定に存在でき、ペルオキシドと違って黄色を発色しない[25]。また、Klissurski らによると、アナターゼ酸化チタンナノ粒子に H_2O_2 を処理した際に生じる $\text{O}_2^{\cdot-}$ は、不可逆吸着した活性酸素種のうちの 0.01% に過ぎないことが示されている[11]。

2-5. 結論

本研究では PAA-TiO₂ NPs の持つ H_2O_2 吸着・脱着能力、および、 H_2O_2 吸着時の表面化学状態を、原料である TiO₂ NPs と標準試料の Anatase, Rutile と比較しながら解析した。その結果、PAA-TiO₂ NPs は原料である TiO₂ NPs よりも H_2O_2 の吸着・脱着容量は少なくなっていた。モデル解析によって、吸着速度定数は変わらなかったが、一方で脱着速度定数は大きくなっていることがわかった。吸着した H_2O_2 はその一部が不可逆的に酸化チタン表面と反応し、多くのペルオキサイドとごく微量の $\text{O}_2^{\cdot-}$ として存在していることが示唆された。以上から、PAA-TiO₂ NPs がより効率的な H_2O_2 のデリバリーを目指すためには、 H_2O_2 の可逆的吸着サイトをできるだけ覆わないように最低限の PAA を修飾し、できるだけ高い濃度の H_2O_2 を長時間処理することが望ましいと結論付けられた。

引用文献

- [1] 国立がん研究センター がん情報サービス. <https://GanjohoJp/Public/IndexHtml> no date;
- [2] Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, et al. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 2009;9:442–458.
- [3] Kohshi K, Kinoshita Y, Imada H, et al. Effects of radiotherapy after hyperbaric oxygenation on malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999;80:236–241.
- [4] Yang Y, Jin C, Li H, et al. Improved radiosensitizing effect of the combination of

- etanidazole and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vivo. *Exp Ther Med* 2012;3:299–303.
- [5] Bussink J. Clinical Outcome and Tumour Microenvironmental Effects of Accelerated Radiotherapy with Carbogen and Nicotinamide. *Acta Oncol (Madr)* 1999;38:875–882.
- [6] Kariya S, Sawada K, Kobayashi T, et al. Combination Treatment of Hydrogen Peroxide and X-Rays Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;75:449–454.
- [7] Ogawa Y. Paradigm shift in radiation biology/radiation oncology—Exploitation of the “H₂O₂ effect” for radiotherapy using low-LET (Linear energy transfer) radiation such as X-rays and high-energy electrons. *Cancers (Basel)* 2016;8:1–12.
- [8] Ogawa Y, Ue H, Tsuzuki K, et al. New radiosensitization treatment (KORTUC I) using hydrogen peroxide solution-soaked gauze bolus for unresectable and superficially exposed neoplasms. *Oncol Rep* 2008;19:1389–1394.
- [9] Boonstra H, Mutsaers C a H a. Adsorption of Hydrogen Peroxide on the Surface of Titanium Dioxide. 1975;1940–1943.
- [10] Anpo M, Che M, Fubini B, et al. Generation of Superoxide Ions at Oxide Surfaces. *Top Catal* 1999;8:189–198.
- [11] Klissurski D, Hadjiivanov K, Kantcheva M, et al. Study of peroxide-modified titanium dioxide (anatase). *J Chem Soc Faraday Trans* 1990;86:385–388.
- [12] Antcliff KL, Murphy DM, Griffiths E, et al. The interaction of H₂O₂ with exchanged titanium oxide systems (TS-1, TiO₂, [Ti]-APO-5, Ti-ZSM-5). *Phys Chem Chem Phys* 2003;5:4306–4316.
- [13] Ragai J. Trapped radicals in titania gels. *Nature* 1987;325:703–705.
- [14] Dewkar GK, Nikalje MD, Ali IS, et al. An exceptionally stable Ti superoxide radical ion: A novel heterogeneous catalyst for the direct conversion of aromatic primary amines to nitro compounds. *Angew Chemie - Int Ed* 2001;40:405–408.
- [15] Etacheri V, Seery MK, Hinder SJ, et al. Oxygen rich titania: A dopant free, high temperature stable, and visible-light active anatase photocatalyst. *Adv Funct Mater* 2011;21:3744–3752.
- [16] Ogino C, Dadjour MF, Iida Y, et al. Decolorization of methylene blue in aqueous suspensions of titanium peroxide. *J Hazard Mater* 2008;153:551–556.
- [17] Bordiga S, Damin A, Bonino F, et al. The structure of the peroxo species in the TS-1 catalyst as investigated by Resonant Raman spectroscopy. *Angew Chemie - Int Ed* 2002;41:4734–4737.
- [18] Tengvall P, Lundström I, Sjöqvist L, et al. Titanium-hydrogen peroxide interaction: model studies of the influence of the inflammatory response on titanium implants.

- Biomaterials 1989;10:166–175.
- [19] Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, et al. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016;11:91.
- [20] Morita K, Miyazaki S, Numako C, et al. Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂ for use as a novel radiosensitizer. *Free Radic Res* 2016;50:1319–1328.
- [21] Kong X, Zeng C, Wang X, et al. Ti-O-O coordination bond caused visible light photocatalytic property of layered titanium oxide. *Sci Rep* 2016;6:29049.
- [22] Venkateswaran S. Raman Spectrum of Hydrogen Peroxide. *Nature* 1931;127:406.
- [23] Zecchina A, Berlier G. MIGRATION OF TI AND FE FROM FRAMEWORK TO EXTRAFramework POSITIONS IN ZEOLITIC MATERIALS: SPECTROSCOPIC STUDIES. In: Centi G, Wichterlova B, Bell AT, editors. *Catalysis by Unique Metal Ion Structures in Solid Matrices From Science to Application*. 2000. p. 135–147.
- [24] Dash S, Murthy PN, Nath L, et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 2010;67:217–23.
- [25] Kanezaki E, Sakamoto T, Ookubo A, et al. Thermally induced colour change due to formation and decomposition of peroxide associated with formation of superoxide radical anion in synthetic hydrous titanium oxide from titanium(III) trichloride. *J Mater Sci Lett* 1993;12:669–670.

第三章

ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子による細胞内過酸化水素濃度の上昇とそれ に伴う放射線増感効果

3-1. 緒言

がん治療という文脈において、放射線治療は X 線の発見以来、常に重要な地位を占めてきた[1,2]。放射線治療は、外科手術のような指向性と、化学療法のような非侵襲性を併せ持つ治療法である。ただし、もちろん、この二つの治療法と同じく副作用は避けがたい[3,4]ため、様々な改善が試みられてきた[5-9]。

その一つが放射線増感剤の併用である。放射線増感剤とは、放射線の治療効果を増幅する薬剤のことを表す。素材は様々で、有機化合物[10-13]、たんぱく質[14-16]、無機ナノ粒子[5,17-20]などがある。これを放射線治療の際に予め患者に投与して腫瘍に蓄積しておくこと、従来よりも少ない線量で治療が可能となる。ひいては、これまで放射線治療を適用できなかったような進行がん、悪性度の高いがんを治療できる可能性がある。

これまでも無機ナノ粒子は放射線増感剤として盛んに研究されてきた。例えば、金ナノ粒子は原子番号の大きな素材のため放射線増感作用を持つ。さらに、元素の生体適合性の高さから最も研究された素材であろう[21,22]。表面修飾によって腫瘍へのターゲット能力の付与も盛んに行われてきた[23,24]。しかし、数多くの科学者による長年の研究にもかかわらず、現在でも実用化には至っていない。一方で、近年では NBTXR3 と呼ばれるハフニアのナノ粒子が放射線増感剤として開発され、臨床試験に入っている[25]。こうした原子番号の大きなナノ粒子は、放射線と強く相互作用して二次電子や特性 X 線を生じ放射線単体よりも多くの活性酸素種 (ROS) を生成することで細胞傷害を増幅すると言われている。

そのうえで、我々は PAA-TiO_x NPs に着目して研究を行ってきた。我々は、放射線腫瘍科医の協力を得て PAA-TiO_x NPs は放射線増感剤として有望であることを *in vivo* で見出している[26]。PAA-TiO_x NPs をヒト膵臓がん (MIAPaCa-2) 担がんマウスの腫瘍に直接局所注射し、その後で放射線照射を行うと有意に放射線の治療効果が増感された。さらに、我々の以前の研究において、PAA-TiO_x NPs は従来研究されてきた無機ナノ粒子とは全く違う放射線増感機序を持つことが示唆された[27]。PAA-TiO_x NPs は放射線と直接相互作用して ROS を生じることではなく、ナノ粒子内に吸蔵されている過酸化水素を周囲の環境

に放出することで放射線の治療効果を間接的に増幅していると考えられる。この過酸化水素については、細胞内の過酸化水素濃度が上昇すると放射線感受性が上昇するという報告があり[28-30]、また、過酸化水素水を直接皮膚がん塗布することで放射線治療効果を高めるという放射線増感治療(KORTUC)も臨床で行われている[9,31,32]。そこで、私は PAA-TiO_x NPs が細胞内にエンドサイトーシス経路等によって取り込まれると、細胞内過酸化水素濃度を上昇させているという仮説を立てた。これに基づき、PAA-TiO_x NPs の持つ過酸化水素の放出プロファイルを明らかにし、放射線増感剤としての性能を過酸化水素単体と *in vitro* で比較した。

3-2. 実験方法

ナノ粒子の合成

実験に使用したナノ粒子は、すでに報告した論文と同様に合成した[27]。詳しくは参考文献を参照されたい。石原産業(大阪, 日本)から購入したアナターゼ二酸化チタンナノ粒子の硝酸酸性溶液分散液(STS-01)をポリアクリル酸5000(PAA; 和研純薬, 大阪, 日本)と混合し、水熱処理を行うことで粒子表面にPAAを修飾した。その後、H₂O₂水溶液(ナカライテスク, 京都, 日本)を加えることでPAA-TiO_x NPsを得た。一方、H₂O₂を加えずに同じ精製を行ったものをPAA-TiO₂ NPsとした。

DLS (dynamic light scattering) 測定

合成したナノ粒子は Zetasizer nano ZS (Malvern Instr μ Ments, Worcestershire, UK)を用いてゼータ電位と動的直径を測定した。

TEM (transmission electron microscopy) 観察

TEM 観察の前処理として、1 mg/ml の PAA-TiO_x NPs 分散液をポリスチレン支持膜を張った Cu グリッドに一滴滴下した。JEM-2100F (JEOL, 東京, 日本)を用い、加速電圧 200 kV で観察した。

H₂O₂ 放出実験

孔径 50 Å のセルロース透析チューブ (Viskase Companies, イリノイ州) に 200 μ M の過酸化水素、または 1 mg/ml の PAA-TiO_x 分散液を 1 ml 入れ、クリップで密閉した。これを、PBS 200 ml を入れたバッフル付き 300 ml 三角フラスコに投入し、シェーカーで 120 rpm, 37°C で回転振盪した。透析液を経時的に 200 μ l ずつサンプリングし、Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, ニューヨーク州)を用いて説明書に従い過酸化水素濃度を定量した。蛍光測定には Multi-label plate reader (Wallac 1420 ARVOsx; Parkin Elmer, マサチューセッツ州)を用いた (Ex: 490 nm/Em: 572

nm)。

細胞毒性評価

1x10⁴ cells の BxPC-3 を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間インキュベートした。サンプルを RPMI1640 培地 (ナカライテスク) で目的濃度に希釈し、1, 24, 48 時間細胞に処理した。その後、細胞を二度 PBS で洗い、100 µl の培地と置換した。Cell Counting Kit-8 試薬(DOJINDO LABORATORIES, 熊本, 日本)を 3 µl ずつ加え、1 時間 37°Cでインキュベートした後、Multi-label plate reader で Ex/Em=488 nm/515 nm の蛍光を測定した。

細胞への放射線照射

細胞への放射線照射は TR-01 (Techno-X, 大阪, 日本)を用いた。照射条件は 80 kVp, 1mA であった。細胞は 35 mm のディッシュに 1x10⁴ で播種し、24 時間後に培地とサンプルを置換して照射を行った。サンプルの処理時間中は 37°Cインキュベータ内に静置した。照射後は直ちにサンプルを培地と置換した。

コロニーアッセイ

細胞に放射線照射を行った後、アキュターゼ (ナカライテスク) 処理でディッシュからはく離した。懸濁した細胞をカウントし、コロニーの数が 50 以下となるように 6 ウェルプレートに再播種した。12~14 日後に 20 細胞以上からなるコロニー数をカウントし、Plating Efficiency (PE), Survival Fraction (SF), Radiosensitizing Efficiency (RE)を計算した。PE, SF, RE の定義は以下の式より行った。

$$PE = \frac{\text{NµMber of colonies counted}}{\text{NµMber of cells plated}}$$
$$SF_{S,x} = \frac{\text{PE of treated group (Sample; x Gy)}}{\text{PE of control group (PBS; 0 Gy)}}$$
$$SF_{C,x} = \frac{\text{PE of treated group (PBS; x Gy)}}{\text{PE of control group (PBS; 0 Gy)}}$$
$$RE_x = \left[\frac{SF_{S,x}/SF_{S,0}}{SF_{C,x}/SF_{C,0}} \right]^{-1}$$

簡単に説明すると、SF_{S,x}とは、サンプルと共存した細胞に x Gy の放射線を当てたときに、どれだけの割合の細胞がコロニーを形成するかを表す。SF_{C,x}とは、サンプルを加えていない細胞に x Gy の放射線を当てたときに、どれだけの割合の細胞がコロニーを形成するかを表す。RE_xとは、サンプルと共存した細胞に x Gy の放射線を当てた時に、(サンプル自体の毒性を排除した)放射線単体の毒性が何倍になったか、を表す指標である。

ナノ粒子の細胞取り込み確認

蛍光分子修飾した PAA-TiO_x NPs (Alexa-PAA-TiO_x NPs) を作成するために、Alexa Fluor 488 hydrazide, sodium salt (Thermo Fischer Scientific, マサチューセッツ州) を用いた。PAA-TiO_x NPs : Alexa = 20 : 1 (weight) となるように混合し、ゆるやかに攪拌しながら室温で 1 時間静置した。その後、3 L の DW 中で、4°C で一晩透析を行った。

BxPC3 を 5x10⁴ cells で 35 mm ガラスベースディッシュに播種し、24 時間、37°C でインキュベートした。その後、PBS で希釈した Alexa-PAA-TiO_x NPs (1mg/ml) の 500 μl で培地と置換し、所定の時間だけ 37°C でインキュベートした。粒子の処理後は PBS で 2 回洗い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, ドイツ) で 488/505=Ex/Em の蛍光を観察した。

細胞内 H₂O₂ 濃度測定

BxPC3 を黒色 96 ウェルプレートに 1x10⁴ cells 播種した。24 時間後、培地を 1mg/ml の PAA-TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs、あるいは 200 μM の H₂O₂ と交換した。所定の時間のち、PBS で 1 度洗い、50 μl の PBS で満たした。Hydrogen Peroxide Fluorometric Detection Kit の説明書に従い、Multi-label plate reader を用いて過酸化水素濃度を定量した。

3-3. 結果

ナノ粒子の合成

PAA-TiO_x NPs は市販の TiO₂ NPs に PAA と H₂O₂ を処理することで合成した。DLS によって動的粒径を測定すると、PAA-TiO₂ NPs と PAA-TiO_x NPs はそれぞれ、平均で 120 nm と 140 nm だった (Fig. 3-1A)。ゼータ電位も DLS を用いて測定し、それぞれ -28 mV と -30 mV であった (Fig. 3-1B)。TEM 観察を行うと、数ナノメートルの一次粒子が凝集し、50 nm 程度の二次粒子として振る舞っているようすが可視化された (Fig. 3-1C)。二次粒子はしばしば三次粒子として凝集塊を形成していた。

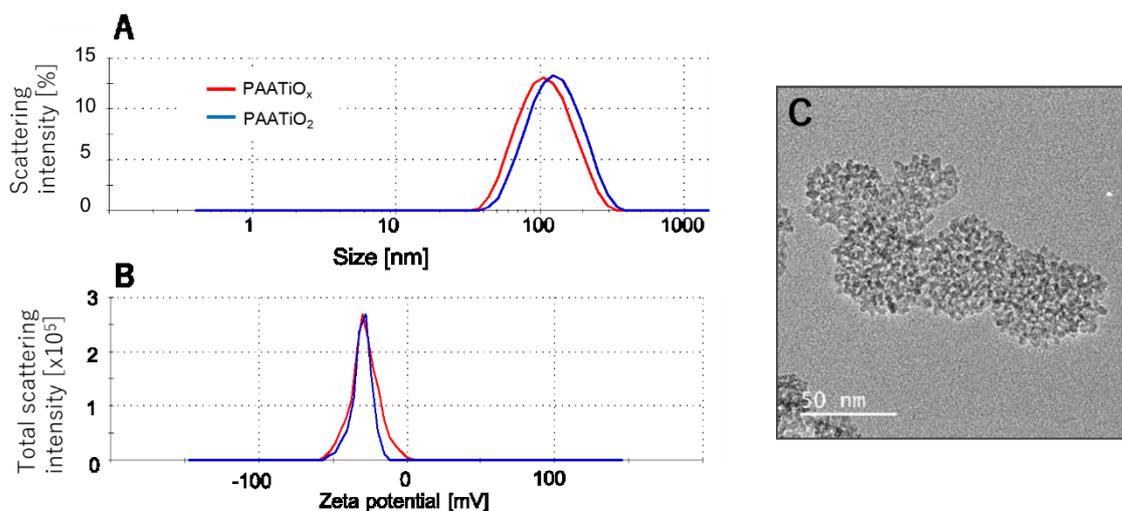


Fig. 3-1. Characterization of PAA-TiO_x NPs and PAA-TiO₂ NPs. (A) particle size and (B) zeta potential distribution were measured by using dynamic light scattering. (C) Their morphology were observed by using transmission electron microscopy.

H₂O₂ 放出実験

我々の以前の研究によって PAA-TiO_x NPs は粒子に内包する過酸化水素を分散液相中に継続的に放出することが示唆されている。そこで、PAA-TiO_x からの H₂O₂ 放出プロファイルを透析を用いて明らかにした。PAA-TiO_x NPs 分散液の 1 ml を透析チューブに満たし、これを PBS 中で振盪しながら経時的に透析液をサンプリングした。コントロールには過酸化水素水を用いた。透析液に含まれる H₂O₂ は酵素と化学蛍光物質の共役検出系によって計測した。結果、単なる過酸化水素水を透析した場合は 30 分以内にすべての過酸化水素が透析液に漏出したのに対し、PAA-TiO_x NPs 分散液の場合は少なくとも 7 時間は過酸化水素が透析液中に放出されていた。また、どちらのサンプルの透析液でも過酸化水素の分解は見られず、24 時間後にもほとんど同じ量の過酸化水素が残っていた。

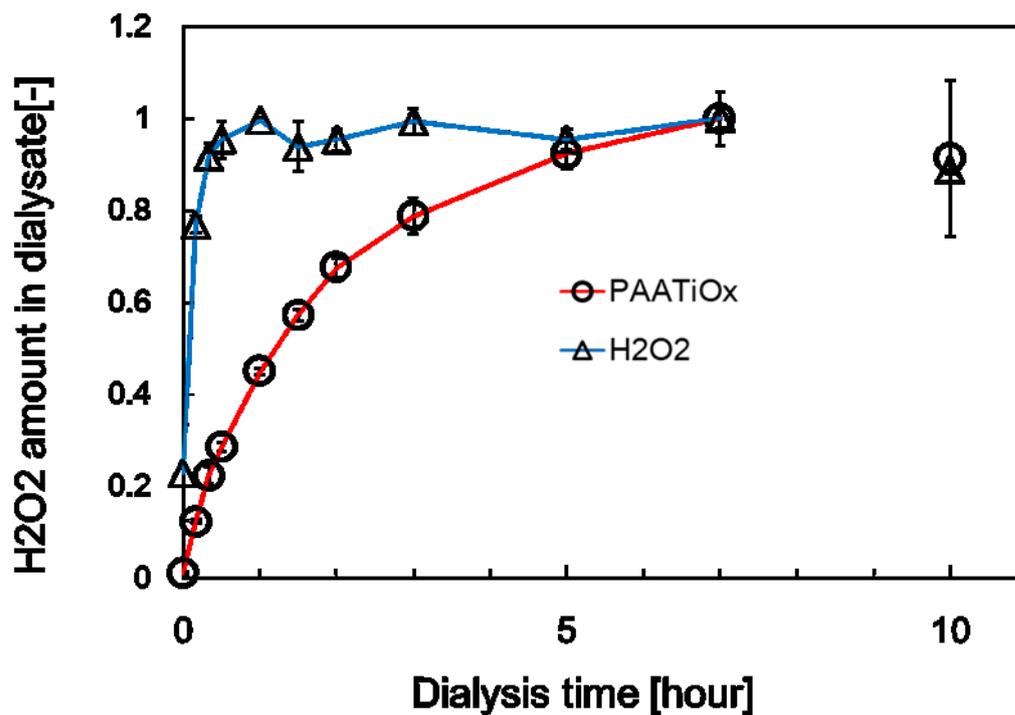


Fig. 3-2. $\text{Acc}\mu$ Mulative release profiles of H_2O_2 from PAA- TiO_x NPs. PAA- TiO_x NPs dispersion was dialyzed in PBS and the H_2O_2 concentration of the dialysate was quantified as time passed. Data were normalized by the value at 7 h. Data represent the mean \pm STDEV derived from three individual experiments.

細胞毒性評価

過酸化水素を放出するナノ粒子を医療応用する場合において、まずはその毒性を *in vitro* レベルで知る必要がある。そこで、PAA- TiO_x NPs の放射線増感効果を調べる前に、PAA- TiO_x NPs 自体の持つ細胞毒性を調べるため、ヒトすい臓がん細胞(BxPC3)に対して WST-8 アッセイを行った。PAA- TiO_x NPs, H_2O_2 , PAA- TiO_2 NPs を 24 時間以上処理した場合、サンプル濃度依存的な毒性が確認された。それぞれを 24 時間処理した場合の半致死濃度(LC₅₀)は 0.895 mg/ml, 341 μ M, 6.60 mg/ml と算出された(Fig. 3-3)。

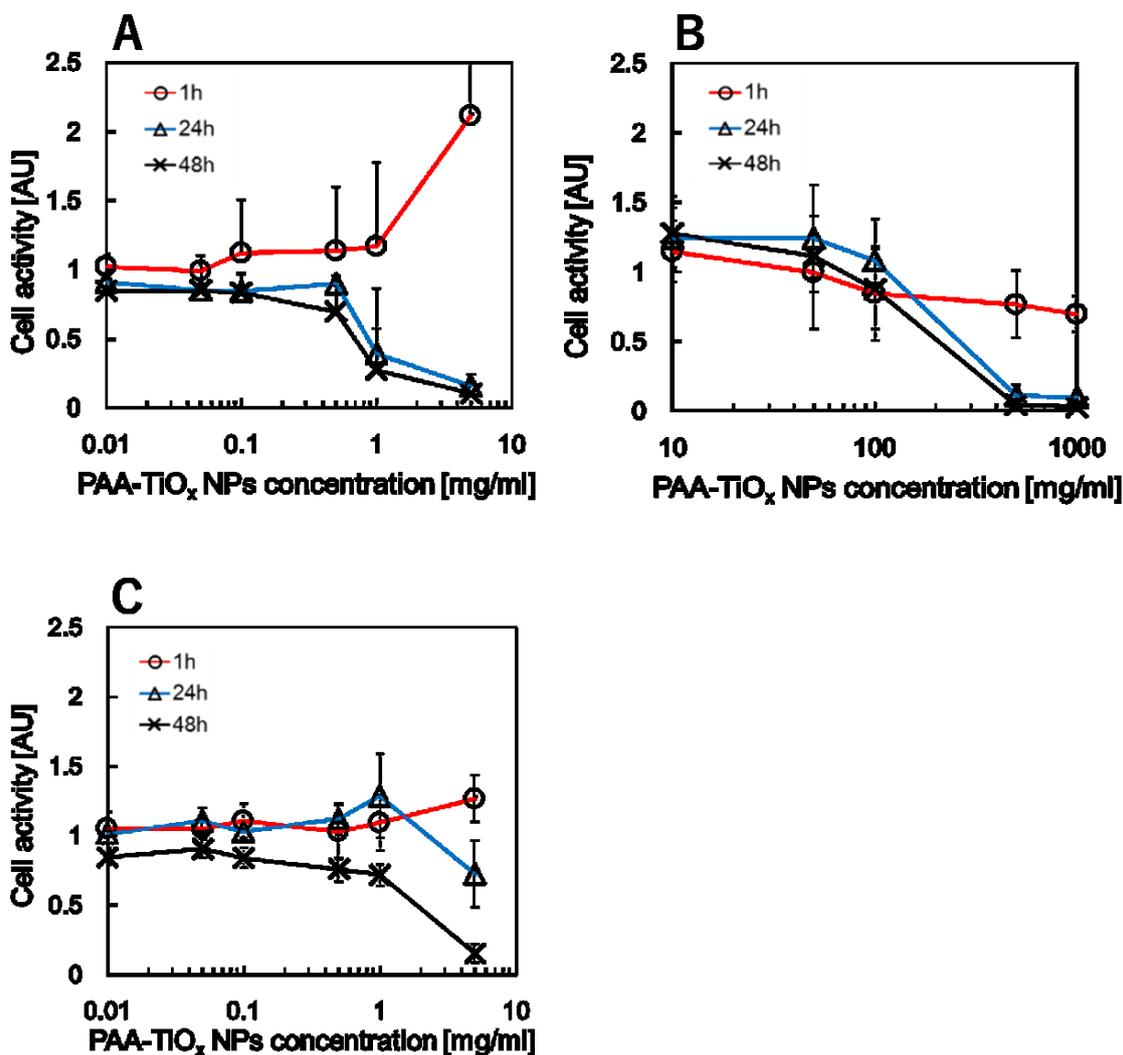


Fig. 3-3. Cellular toxicity assessments using WST-8 assay for (A) PAA-TiO_x NPs dispersion, (B) hydrogen peroxide solution and (C) PAA-TiO₂ NPs. Cell activities were normalized by a non-treated cell group. Data represent the mean ± STDEV derived from three individual experiments.

放射線増感効果の評価

次に、PAA-TiO_x NPs を放射線と併用した場合の細胞毒性を *in vitro* で評価するため、コロニーアッセイを行った。これまでに PAA-TiO_x NPs の *in vitro* での放射線増感効果は確認されていたが、H₂O₂ と比較しながらより詳細な検討を行った。最初に線量依存性を調べるため、PAA-TiO_x NPs と PAA-TiO₂ NPs は 1 mg/ml、H₂O₂ は 200 μM を BxPC3 に処理し、直ちに放射線照射を行った。結果として、PAA-TiO_x NPs と H₂O₂ には PBS に対して優位な放射線増感効果が認められたが、PAA-TiO₂ NPs は PBS とほとんど変わらなかった (Fig. 3-4A)。Fig. 3-4B に、BxPC3 に PAA-TiO_x NPs を 1mg/ml 処理して放射線を 5

Gy 照射した場合の典型的なシャーレを示す。PAA-TiO_x NPs と H₂O₂ が放射線の治療効果を高め、形成されたコロニー数が明らかに少ないことがわかる。

つづいて、サンプルの濃度が増感効果に与える影響を調べた。放射線照射はすべて 5 Gy で行った。その際、放射線の細胞傷害効果がどれだけ増幅されたかを純粋に評価するため、サンプル自身の細胞毒性を排除した係数である Radiosensitizing Efficiency を導入した。すなわち、サンプル処理群では、サンプルの毒性ではなく放射線で死んだ細胞が PBS と比べて何倍多いかを表す。その結果、PAA-TiO_x NPs または H₂O₂ と、5Gy の放射線照射の併用処理において、それぞれ 1 mg/ml と 200 μM で最も RE が高かった(Fig. 3-5)。また、3 Gy の照射においても同様の傾向が見られた(Fig. 3-S1)。

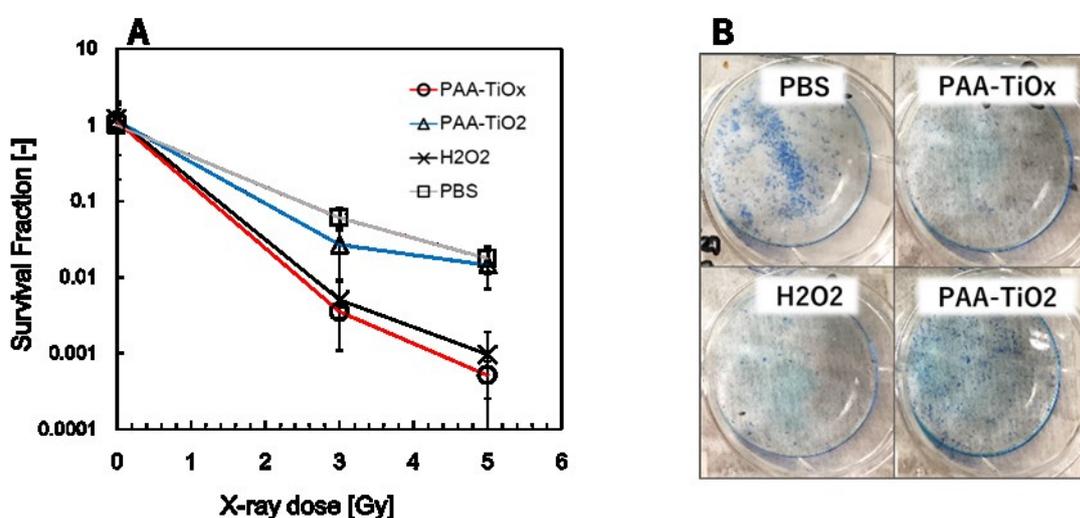


Fig. 3-4. Radiosensitizing effect of PAA-TiO_x NPs. (A) a dose-dependent curve and (B) typical example images of clonogenic assay displayed significantly higher combination effects of X-ray irradiation with PAA-TiO_x NPs or H₂O₂ contrary to a control group. Data represent the mean ± STDEV derived from three individual experiments.

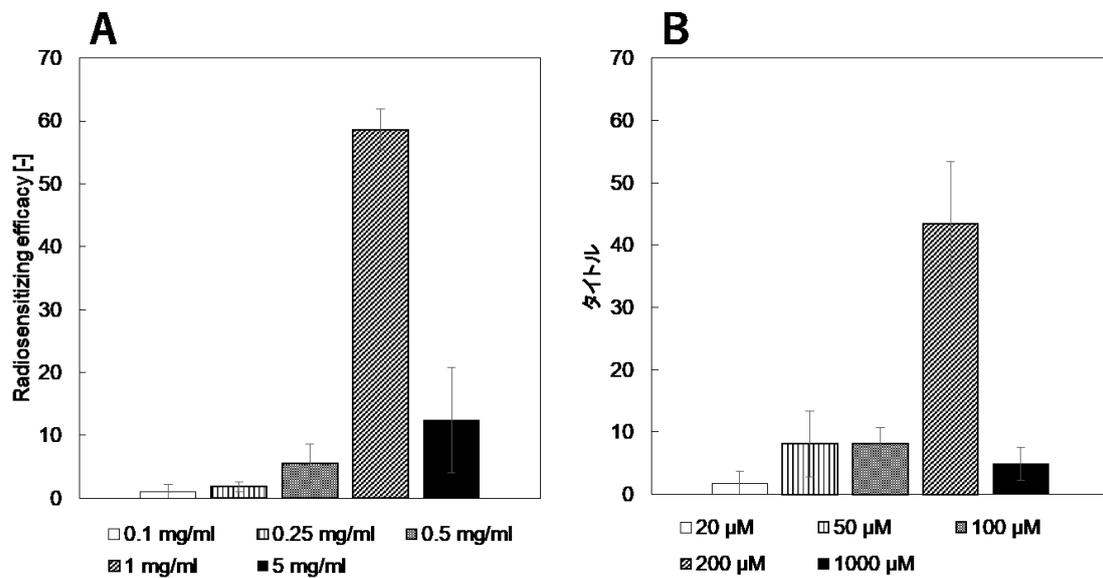
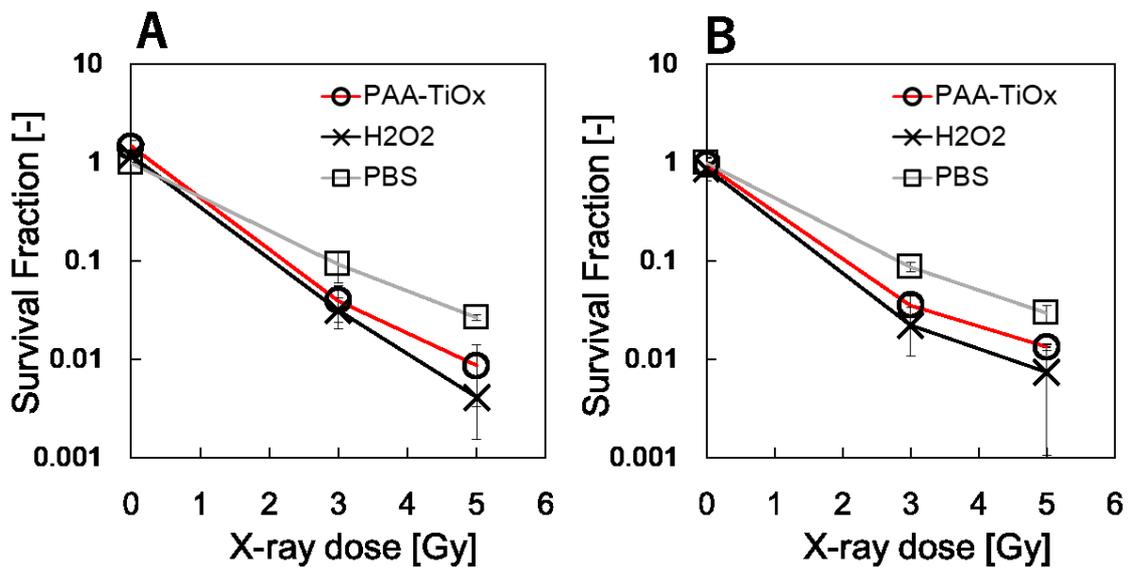


Fig. 3-5. Dose response study of PAA-TiO_x NPs and H₂O₂ solution *in vitro*. Radiosensitizing efficiency of (A) PAA-TiO_x NPs and (B) H₂O₂ solution were calculated from the result of clonogenic assay in the range of 0.1-5.0 mg/ml and 20-1000 μM, respectively. Data represent the mean ± STDEV derived from three individual experiments.



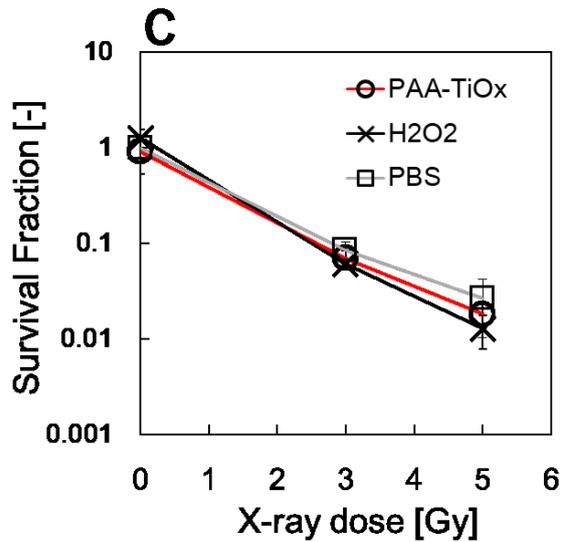


Fig. 3-S1. Dose response study of PAA-TiO_x NPs *in vitro*. The efficiency of (A) 0.50 mg/ml, (B) 0.25 mg/ml and (C) 0.10 mg/ml of PAA-TiO_x collaborating with X-ray irradiation were assessed by using a clonogenic assay.

細胞内 H₂O₂ 濃度の上昇

以上の実験で、PAA-TiO_x NPs は H₂O₂ と同様の放射線増感効果を持つことが示唆された。しかし、透析を用いた H₂O₂ 放出実験から、PAA-TiO_x NPs は過酸化水素水と違って長い時間スパンで過酸化水素を放出し続けることは事実である。そこで、筆者は PAA-TiO_x NPs は細胞に取り込まれると、細胞内で過酸化水素を放出することで細胞内 H₂O₂ 濃度を上昇させるのではないかと仮説を立てた。

まず、PAA-TiO_x NPs が細胞内に取り込まれるかを調べた。そのために、PAA-TiO_x NPs のカルボキシル基に蛍光色素を修飾して FI-PAA-TiO_x NPs を作製し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内でトラッキングできるようにした。その結果、BxPC3 に FI-PAA-TiO_x NPs を 10 min 以上処理すると細胞内化が見られた (Fig. 3-6)。

次に、PAA-TiO_x NPs を細胞に処理した際に細胞内の過酸化水素濃度が上昇しているかを、蛍光一酵素系を用いて調べた。1 mg/ml の PAA-TiO_x NPs を処理すると細胞内過酸化水素濃度が上昇した。200 μM の過酸化水素はそれよりも少ない上昇にとどまった (Fig. 3-7)。PAA-TiO₂ NPs は細胞内の過酸化水素濃度を上昇しなかった。以上から、PAA-TiO_x NPs は細胞内に取り込まれ、細胞内の過酸化水素濃度を上昇することが示された。

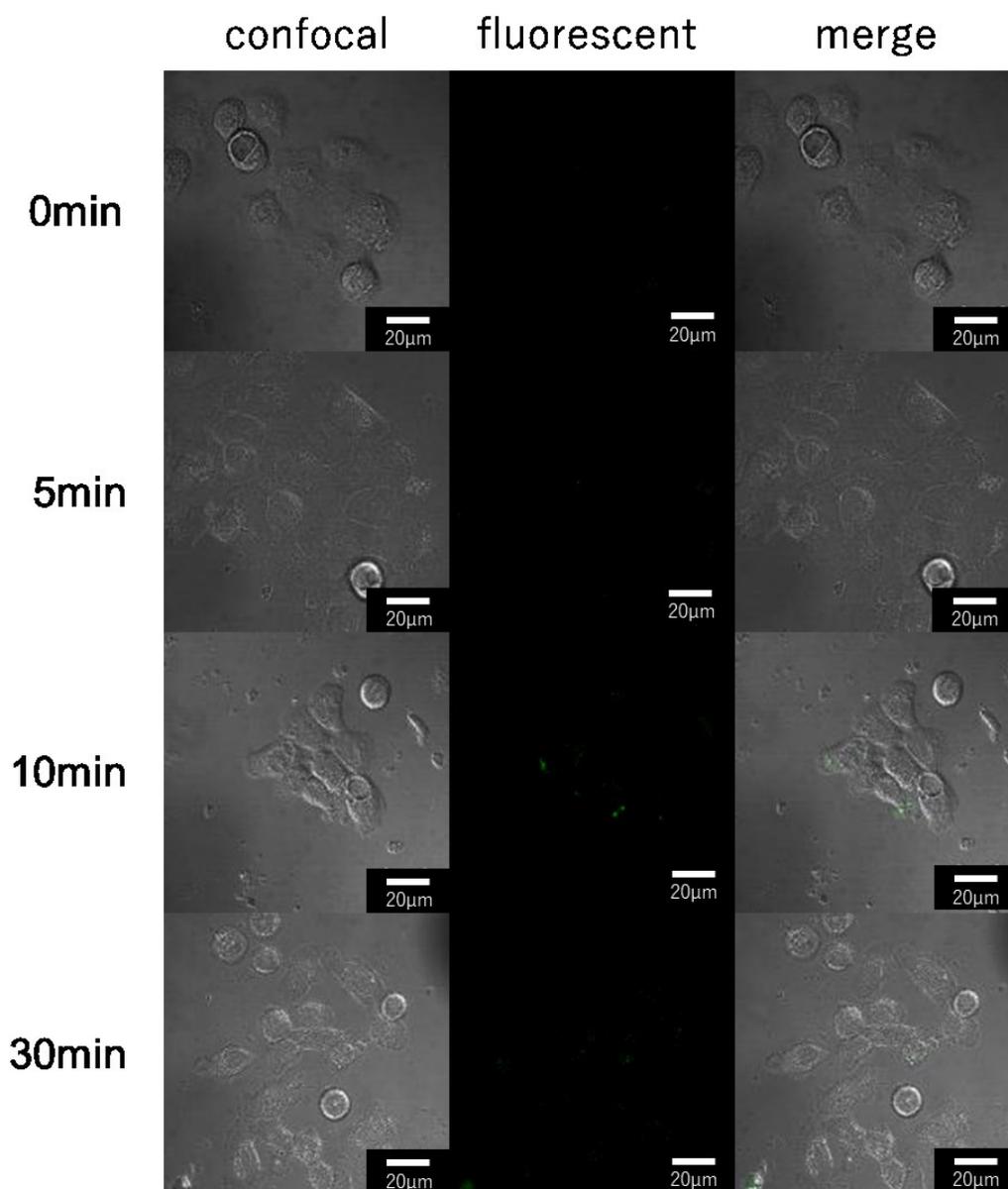


Fig. 3-6. Cellular internalization of PAA-TiO_x NPs. PAA-TiO_x NPs were modified with fluorescent probe. BxPC3 cells took NPs up from 10 minutes and show fluorescence of internalized NPs.

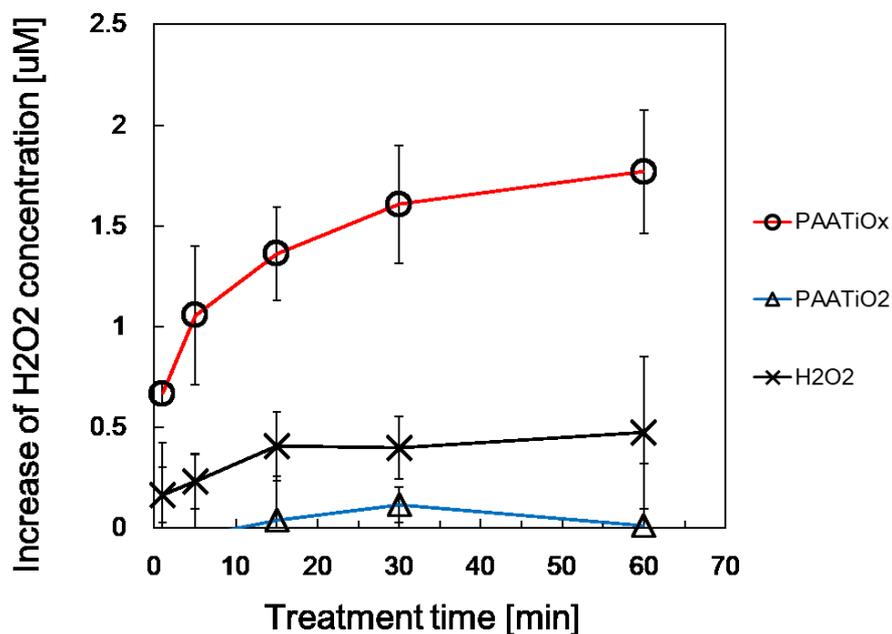


Fig. 3-7. H_2O_2 concentration in the cells that were treated with PAA- TiO_x NPs dispersion. A treatment of PAA- TiO_x NPs increased intracellular H_2O_2 concentration more than that of H_2O_2 solution. Data represent the mean \pm STDEV derived from three individual experiments.

PAA- TiO_x NPs による効果的な放射線増感

前章で、PAA- TiO_x NPs は細胞内過酸化水素濃度を効果的に上昇することを示したが、過酸化水素濃度の上昇が放射線治療効果に与える影響をコロニーアッセイで調べた。ナノ粒子、または過酸化水素を BxPC3 に 10 分間処理し、その後細胞を洗浄してから放射線の照射を行った。すなわち、PAA- TiO_x NPs を処理した細胞は細胞内過酸化水素濃度が高い状態で、一方、過酸化水素を処理した細胞は細胞内過酸化水素が周囲に拡散してしまった状態で放射線の照射を行った。結果として、PAA- TiO_x NPs は細胞を洗浄しても平均で 15 と高い RE を保っていたが、 H_2O_2 は約 4 と低い値になった。サンプル処理の後そのまま放射線照射した場合は PAA- TiO_x NPs と過酸化水素を処理した群には RE の大きな差がなかったが、サンプル処理後に細胞を洗浄すると放射線増感効果に大きな差がついた。

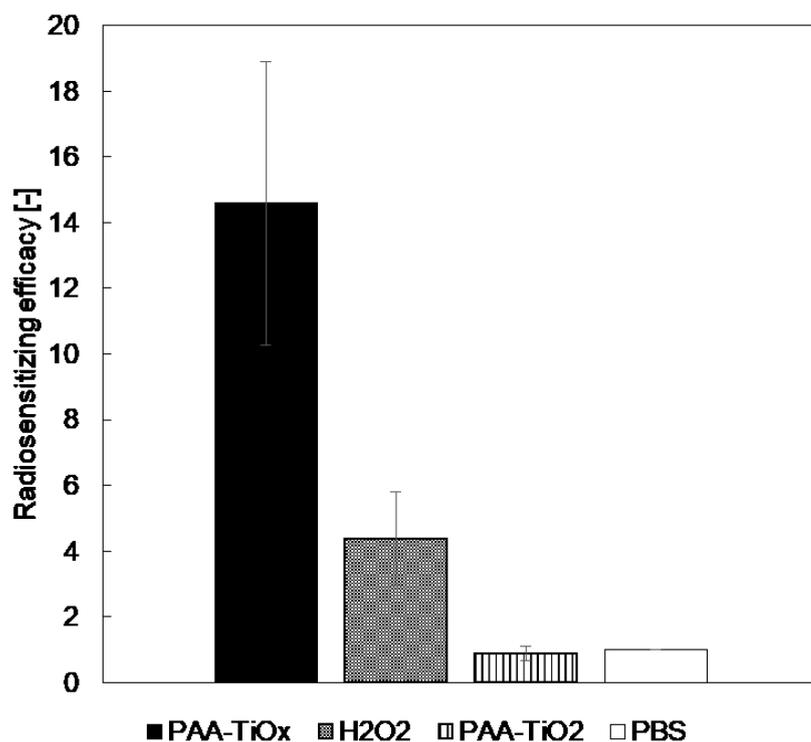


Fig. 3-8. An advanced radiosensitizing effect of PAA-TiO_x NPs with a retention of increased intracellular H₂O₂ concentration. Even after cells washed, the PAA-TiO_x NPs treated group preserved a higher radiosensitizing efficacy than the H₂O₂ solution treated group.

3-4. 考察

過酸化水素は一部の臨床で実際に使用されるほど有効な放射線増感剤である。しかし、分子量が非常に小さいことから体内で容易に拡散し、患部に留めることが難しい。また、その浸透性から腫瘍周囲の組織で疼痛が起こることが問題となっていた。PAA-TiO_x NPs は粒子内に吸蔵する過酸化水素を分散液相中に放出する能力を持つことが示唆されている。そこで、このナノ粒子を過酸化水素のデリバリーカーゴとして用いることで過酸化水素単体が持つこれらの問題を解決できる可能性がある。

DLS での測定によって、PAA-TiO_x NPs は表面に修飾されたポリアクリル酸の負電荷により、塩を含む溶液中でも良く分散していることが確認された (Fig. 3-1B)。とはいえ、動的直径に関してブロードなピークが得られることから、単分散はしていないと考えられた (Fig. 3-1A)。実際に TEM によって観察を行うといくつかの 50 nm 程度の二次粒子が凝集している様子が見られ、100nm 程度の三次粒子として振る舞っていることが確認できた。また、以前の SEM 観察に比べて、TEM では数ナノメートルの一次粒子が明確に確認できた (Fig. 3-1C)。この一次粒子が非常に小さいので、実際に水中で分散体として振る舞ってい

る粒径に比べると大きな表面積となっている。その結果、表面反応として吸着している過酸化水素が多く、ある程度長い時間での過酸化放出能力を実現しているのだろう。

H₂O₂放出実験によって、PAA-TiO_x NPs が少なくとも7時間過酸化水素を放出することがわかった(Fig. 3-2)。この時間は一回の放射線照射を行う上では十分な時間と言える。少なくとも単なる過酸化水素水よりも組織中での過酸化水素の拡散は抑えられると考えられるので、過酸化水素水で行っていた放射線増感治療に比べると患者にとって苦痛の少ない術式となるだろう。今後は PAA-TiO_x NPs に過酸化水素がどのような結合様式で担持され、放出されているかを確かめることで、過酸化水素の自由自在なリリースを目指すことも可能となるはずである。

過酸化水素を放出するナノ粒子の細胞毒性については誰もが当然の興味である。PAA-TiO_x NPs の保有する過酸化水素と同程度の濃度の過酸化水素水と比較すると、24時間以上処理すると PAA-TiO_x NPs のほうが若干細胞毒性が高かった(Fig. 3-3)。これは PAA-TiO_x NPs の持つ過酸化水素の毒性にナノ粒子由来の毒性が加わるためと考えられる。実際、PAA-TiO₂ NPs も弱くはあるが細胞毒性を有している(Fig. 3-3C)。一方で、サンプルを1時間処理すると、H₂O₂を処理した群では濃度が高まるにつれて若干の毒性が見られているのに対し、PAA-TiO_x NPs では見られない。これは、1h では PAA-TiO_x NPs からはまだ過酸化水素が放出しきっておらず、過酸化水素由来の細胞毒性があまり与えられないためと考えられる。PAA-TiO_x NPs のデータで誤差が大きくなるのは、短時間での劇的な H₂O₂ の放出により、小さな処理時間の誤差でもアーティファクトが大きくなってしまうためだろう。

以前より、ヒトすい臓がん細胞である MIAPaCa-2 を用いた PAA-TiO_x NPs の *in vitro* での放射線増感効果は報告されていた。今回は異なったすい臓がん細胞である BxPC3 を用いてより詳細な *in vitro* 実験を行った。そのために、本報告では放射線単体照射に比べて増感剤共存下では放射線の毒性が何倍になったかを、RE を定義することで定量した。一般的にコロニーアッセイの細胞毒性は SF によって評価するが、放射線増感効果の評価の場合、放射線増感剤自体の毒性と放射線の毒性という二つのファクターが存在する。細胞生存率に対してこの二つのファクターが積で効いてくると仮定すると、増感剤の毒性を排除して放射線単体の毒性を評価することができる。すなわち、RE を比較することで放射線増感剤の性能を定量化することができると言える。コロニーアッセイによると PAA-TiO_x NPs と H₂O₂ だけが放射線増感効果を有していたことから、PAA-TiO_x NPs の放射線増感効果は PAA-TiO_x NPs に含まれる H₂O₂ に大部分が由来すると考えられる (Fig. 3-4)。また、濃度依存的な実験では PAA-TiO_x NPs は 1 mg/ml、H₂O₂ は 200 μM で RE が極大となった (Fig. 3-5)。この事実は、H₂O₂ や PAA-TiO_x NPs を生体内に導入する際の用量を決定する目安となる。

今回の調査で最も重要なのは、PAA-TiO_x NPs は細胞に取り込まれ、細胞内過酸化水素濃度を上昇したことである (Figs. 6, 7)。一方で、H₂O₂ は処理した瞬間は細胞内過酸化水素濃度を上昇するが、拡散性が高いため、細胞を洗浄すると細胞外に拡散してしまい、細

胞内濃度が維持できなかつたと考えられる。この結果は PAA-TiO_x NPs が細胞内に H₂O₂ をデリバリーし、保持する能力を有していることを示している。細胞内の過酸化水素濃度は放射線増感治療の歴史において、一部で重要視されてきた。T. Kondo らはいくつかの放射線増感剤を細胞に処理し、細胞内 ROS 濃度の変化を調べた。その結果、いずれの薬剤においても細胞内過酸化水素濃度の上昇が見られた[28,29,33]。また、背景の章でも述べたように Y. Ogawa らは放射線照射に過酸化水素の塗布を併用することで皮膚がんや乳がんの治療に成功している[9,32,34]。本研究では、PAA-TiO_x NPs、もしくは過酸化水素水を BxPC3 に処理して取り込ませ十分に洗浄した後では、PAA-TiO_x NPs のほうが明らかに細胞内過酸化水素濃度が高かつた(Fig. 3-7)。その後放射線照射を行うと PAA-TiO_x NPs を処理した群のほうが H₂O₂ 処理群より RE が高かつた (Fig. 3-8)。すなわち、細胞内過酸化水素濃度が実際に放射線の治療効果に影響を与えた結果である。以上から、PAA-TiO_x NPs は細胞内の過酸化水素濃度を直接、局所的に上げるという稀有な作用機序を持った放射線増感剤として成功し得ると考える。

3-5. 結論

PAA-TiO_x NPs をアナターゼ TiO_x NPs とポリアクリル酸、過酸化水素処理によって合成した。in vitro 実験によって、PAA-TiO_x NPs は過酸化水素を少なくとも 7 時間、周囲の環境に放出していた。それによる細胞毒性と放射線増感作用は、対応する濃度の過酸化水素水とほとんど一致していた。PAA-TiO_x NPs は細胞内に取り込まれ過酸化水素を放出することで、過酸化水素単体より安定的に細胞内過酸化水素濃度を上昇した。そして、その後放射線照射を行うと、H₂O₂ より高い RE が見られた。以上から、PAA-TiO_x NPs を患部に局所注射すれば、拡散を最小限に留めつつ H₂O₂ を局所的に長時間供給することで放射線増感剤としてはたらくことがわかつた。さらに、PAA-TiO_x NPs は表面官能基に抗体に代表される標的化分子を化学修飾することができる。そうすれば、PAA-TiO_x NPs は尾静脈注射によって、望む部位に H₂O₂ を送達することができる強力なツールとなり、これまで放射線治療では十分な効果が得られなかつたすい臓がんのような腫瘍にも適応できる可能性がある。

引用文献

- [1] Röntgen WC. Über eine neue Art von Strahlen. Sitzungsberichte Der Phys Gesellschaft Zu Würzburg 1895;9:132-141.
- [2] Sgantzos M, Tsoucalas G, Laios K, Androustos G. The physician who first applied radiotherapy, Victor Despeignes, on 1896. Hell J Nucl Med 2014;17:45-46.
- [3] Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal

- tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003;4:529–536.
- [4] Barnett GC, West CML, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD, Burnet NG. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 2009;9:134–142.
- [5] Su X-Y, Liu P-D, Wu H, Gu N. Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy. *Cancer Biol Med* 2014;11:86–91.
- [6] Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 2009;9:442–458.
- [7] Xu XG. An exponential growth of computational phantom research in radiation protection, imaging, and radiotherapy: A review of the fifty-year history. *Phys Med Biol* 2014;59:.
- [8] Verellen D, Ridder M De, Linthout N, Tournel K, Soete G, Storme G. Innovations in image-guided radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:949–960.
- [9] Ogawa Y. Paradigm shift in radiation biology/radiation oncology—Exploitation of the “H₂O₂ effect” for radiotherapy using low-LET (Linear energy transfer) radiation such as X-rays and high-energy electrons. *Cancers (Basel)* 2016;8:1–12.
- [10] Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, Ozsvari B, Reeves KJ, Smith DL, Clarke RB, Howell SJ, Cappello R, Martinez-outschoorn UE, Peiris-pagès M. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes μ Mor initiating cells : Implications for more effective radiation therapy. no date;6:.
- [11] Yang Y, Jin C, Li H, He Y, Liu Z, Bai L, Dou K. Improved radiosensitizing effect of the combination of etanidazole and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vivo. *Exp Ther Med* 2012;3:299–303.
- [12] Michael E. Werner, PhD*, †, Natalie D. C μ Mmings, BS*, †, Manish Sethi, PhD*, †, Edina C. Wang, BS*, †, Rohit Suk μ Mar, BS*, †, Dominic T. Moore, MPH ‡, and Andrew Z. Wang M. Preclinical Evaluation of Genexol-PM, a Nanoparticle Formulation of Paclitaxel, as a Novel Radiosensitizer for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer Michael. 2013;18:1199–1216.
- [13] Hehlhans S, Oppermann J, Reichert S, Fulda S, Rödel C, Rödel F. The SMAC mimetic BV6 sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation by interfering with DNA repair processes and enhancing apoptosis. *Radiat Oncol* 2015;1–11.
- [14] He S, Smith DL, Sequeira M, Sang J, Bates RC, Proia D a. The HSP90 inhibitor ganetespib has chemosensitizer and radiosensitizer activity in colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2014;32:577–586.
- [15] Niyazi M, Harter PN, Hattingen E, Rottler M, Ba μ Mgarten V, Proescholdt M, Belka C, Lauber K. Bevaciz μ Mab and radiotherapy for the treatment glioblastoma : brothers in

arms or unholy alliance ? of. 2015;

- [16] Milas L, Peters LJ, Hunter NR, Mason KA, Kurdoglu B. Enhancement of T μ Mor Radioresponse of a Murine Mammary Carcinoma by Paclitaxel. *Cancer Res* 1994;54:3506–3510.
- [17] Babaei M, Ganjalikhani M. The potential effectiveness of nanoparticles as radio sensitizers for radiotherapy. *BioImpacts* 2014;4:15–20.
- [18] Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy : a s μ Mmary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl Cancer Res* 2013;2:330–342.
- [19] Wang AZ, Tepper JE. Nanotechnology in Radiation Oncology. *J Clin Oncol* 2014;
- [20] Shevtsov M a., Nikolaev BP, Yakovleva LY, Marchenko YY, Dobrod μ Mov A V., Mikhrina AL, Martynova MG, Bystrova O a., Yakovenko I V., Ischenko AM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain t μ Mors. *Int J Nanomedicine* 2014;9:273–287.
- [21] Cui L, Her S, Borst GR, Bristow RG, Jaffray DA, Allen C. Radiosensitization by gold nanoparticles: Will they ever make it to the clinic? *Radiother Oncol* 2017;124:344–356.
- [22] Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HHW, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on t μ Mor-bearing mice. *Cancer Sci* 2008;99:1479–1484.
- [23] Dam DHM, Culver KSB, Kandela I, Lee RC, Chandra K, Lee H, Mantis C, Ugolkov A, Mazar AP, Odom TW. Biodistribution and in vivo toxicity of aptamer-loaded gold nanostars. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2015;11:671–679.
- [24] Chattopadhyay N, Cai Z, Pignol J-P, Keller B, Lechtman E, Bendayan R, Reilly RM. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm* 2010;7:2194–2206.
- [25] Pottier A, Borghi E, Levy L. New use of metals as nanosized radioenhancers. *Anticancer Res* 2014;34:443–453.
- [26] Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Tanaka T, Morita K, MMets μ M, Ohara S, Tan Z, Nishimura Y, Akasaka H, Sato K, N μ Mako C, Takami S, Kondo A. Titani μ M peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016;11:91.
- [27] Morita K, Miyazaki S, N μ Mako C, Ikeno S, Sasaki R, Nishimura Y, Ogino C, Kondo A. Characterization of titani μ M dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂ O₂ for use as a novel radiosensitizer. *Free Radic Res* 2016;50:1319–1328.
- [28] Cui Z-G, Kondo T, Ogawa R, Feril LB, Zhao Q-L, Wada S, Arai T, Makino K.

- Enhancement of radiation-induced apoptosis by 6-formylpterin. *Free Radic Res* 2004;38:363–373.
- [29] Yu DY, Zhao QL, Wei ZL, Nomura T, Kashiwakura I, Kagiya T V., Kondo T. Enhancement of radiation-induced apoptosis of h μ Man lymphoma U937 cells by sanazole. *Apoptosis* 2009;14:655–664.
- [30] Tong Q, Zhu Y, Galaske JW, Kosmacek EA, Chatterjee A, Dickinson BC, Oberley-Deegan RE. MnTE-2-PyP modulates thiol oxidation in a hydrogen peroxide-mediated manner in a h μ Man prostate cancer cell. *Free Radic Biol Med* 2016;101:32–43.
- [31] Ogawa Y, Ue H, Tsuzuki K, Tadokoro M, Miyatake K, Sasaki T, Yokota N, Hamada N, Kariya S, Hitomi J, Nishioka A, Nakajima K, Ikeda M, Sano S, Inomata T. New radiosensitization treatment (KORTUC I) using hydrogen peroxide solution-soaked gauze bolus for unresectable and superficially exposed neoplasms. *Oncol Rep* 2008;19:1389–1394.
- [32] Morita-tokuhiro S, Ogawa Y, Yokota N, Tsuzuki A, Oda H. Radiosensitizer (New KORTUC) Using a Gelatin-Based Hydrogel Instead of a Sodi μ M Hyaluronate. 2016;
- [33] Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, Ahmed K, Wei ZL, Hori T, Nemoto H, Kondo T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of benzocycloalkene compounds. *Apoptosis* 2008;13:448–461.
- [34] Kariya S, Sawada K, Kobayashi T, Karashima T, Shuin T, Nishioka A, Ogawa Y. Combination Treatment of Hydrogen Peroxide and X-Rays Induces Apoptosis in H μ Man Prostate Cancer PC-3 Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;75:449–454.

第四章

ヒト膵臓がん担がんマウスを用いたポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子の体内

動態および急性毒性評価

4-1. 緒言

放射線治療は X 線の発見以来、外科治療、化学療法と並んでがん治療における主要な位置を占めてきた。また同時に、放射線増感治療と呼ばれる、放射線の治療効果を増幅する薬剤および物質を併用した改善放射線治療も多くの研究者によって企図されてきた[1-3]。

その中でも、金属や金属酸化物ナノ粒子を用いた放射線増感治療は特に広く研究されてきた[4-9]。ナノ粒子を放射線増感剤に用いた場合には、その増感機序は X 線と金属原子の相互作用(光電効果)によって生じる副次的な特性 X 線と二次電子に依るとされる。そのため、より X 線との相互作用を大きく得られる原子番号の大きな元素が用いられている。例えば、金ナノ粒子は放射線増感効果を持つことが古くから知られ、実用化に向けて様々な研究がなされてきた[10,11]。また、NBTXR3 と呼ばれるハフニウムを素材としたナノ粒子を用いた放射線増感剤が臨床段階に入っている[12,13]。

一方で我々は、放射線増感剤として PAA-TiO_x NPs を開発してきた。PAA-TiO_x はアナターゼ TiO₂ NPs の表面を PAA で修飾した PAA-TiO₂ NPs の分散液に H₂O₂ を加えて合成した。我々は以前に、PAA-TiO_x NPs は放射線治療と併用すると顕著な併用治療効果を示すことを、ヒト膵臓がんを担がんしたゼノグラフトマウスを用いた *in vivo* 実験で示した[14]。Ti は軽金属元素であることから、前述したような制動放射による二次放射線の発生は期待できないはずである。しかし、我々は PAA-TiO_x NPs が従来の金属ナノ粒子とは全く異なった作用機序で放射線増感効果を発揮することを突き止めた。すなわち、PAA-TiO_x NPs はメソポーラスな内部表面に過酸化水素が担持されており、この過酸化水素を継続的に周囲環境に放出することで放射線増感効果を実現していることを見出した[15]。

金属 Ti や酸化物 TiO₂ は比較的生体適合性の高い素材であると報告されている[16,17]。とはいえ、近年、バルクでは生体に目立った毒性を与えない物質でも、サブミクロンオーダーの構造物になると毒性のリスクが存在することが問題となっている[18]。ゆえ

に、例えば金[19]、銀[20]、シリカ[21]、カーボン[22]、酸化亜鉛[23]、チタニア[24,25],であつても、ナノ構造体の体内動態と毒性は調べる価値があり、実際盛んに調査されている。そして、素材としての PAA-TiO_x NPs の体内挙動や毒性を評価した報告はなく、放射線増感剤としての将来的な実用化において、PAA-TiO_x NPs の体内挙動、毒性の評価は避けて通れないものである。そこで、今回の報告では、PAA-TiO_x NPs の体内動態、および急性毒性を担がんマウスと健常マウスを用いて評価した。

4-2. 実験方法

PAA-TiO_x NPs の合成と性質

アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs; STS-01) を石原産業 (大阪, 日本) から購入した。PAA-TiO_x NPs の詳細な合成法は以前の報告を参照されたい[14]。ここでは簡潔な記述に留めることにする。まず、TiO₂ NPs をポリアクリル酸 5000 (PAA; 和研純薬, 大阪, 日本) と耐熱容器内で混合し水熱処理を行うことで PAA-TiO₂ NPs を合成した。これを過酸化水素 (H₂O₂) (ナカライテスク, 京都, 日本) に浸漬し、余剰の過酸化水素を限外ろ過によって除き精製することで PAA-TiO_x NPs を得た。

得られた PAA-TiO_x NPs はその分散性と形態学的な均質性を確認するために、DLS による動的粒径、ゼータ電位の測定、SEM による外観観察を行った。

使用した細胞、動物種

健常マウスモデルとして 4 週齢の Balb/cJcl を、ヒト膵臓がんゼノグラフトマウスモデル作出のため Balb/cJcl-nu/nu を日本クレア (東京, 日本) から購入した。動物は IVC システムケージ (2GM140; TECNIPLAST S.P.A., BUGUGGIATE (VA), イタリア) で飼育した。飼育環境は湿度と温度を 55 ± 10% および 23 ± 2°C、換気速度 5-6 cycle/h、そして明暗周期は 12:12 時間に管理した。食餌は日本クレアの標準飼料を用い、飲料水と共に供した。この動物実験は動物実験承認委員会の承認を得た上 (承認番号: 25-22-01)、神戸大学の動物実験規則に従って行われた。

ヒト膵臓がん細胞は MIAPaCa-2 を American Type Culture Collection (Rockville, メリーランド州) から購入したものを医学部から譲り受けた。培養条件として、CO₂: 0.5%, 37°C、培地は RPMI1640 (ナカライテスク) に 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, マサチューセッツ州), 100 U/ml ストレプトマイシン, 100 µg/ml ペニシリン, 0.25 µg/ml アムホテリシン B の三種混合抗生物質 (ナカライテスク) を加えた。

ヒト膵臓がん (MIAPaCa-2) ゼノグラフトマウスの作出

MIAPaCa-2 の 2 × 10⁶ cells を Matrigel Basement Membrane Matrix (Corning, NY, USA)

に分散して、ヌードマウスの下腿に皮下注射した。作出されたゼノグラフトマウスは 4 週間後にサンプルの投与実験を行った。

NP 分散液の投与

PAA-TiO_x NP は、ICP-AES の検出感度と以前の実験で放射線治療との併用効果を得られた濃度を鑑みて[14]、5 mg/ml (PBS) の粒子分散液を 25 mg/kg (mouse) で尾静脈注射した (n=7)。ゼノグラフトマウスでの実験では腫瘍への局所注射も同様に行った。コントロールとして PAA-TiO₂ NPs, PBS を選択し、上記と同様に投与した (それぞれ n=7,5)。

ICP-AES を用いた臓器中のナノ粒子重量解析

サンプル投与処理したマウスから 1 時間後、1 日後、または 1 週間後に、血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、腫瘍を摘出した。血液は麻酔後頸椎脱臼による安楽死後直ちに心臓採血を行った。摘出した臓器は解析まで 10% ホルマリン液 (ナカライテスク) 中で保存した。臓器、血液はるつぼ内で細かく刻んだあと、マッフル炉 (300-Plus; DENKEN-HIGHDENTAL, 京都, 日本) で 1000°C、1 時間燃焼し、有機成分を完全に分解した。残渣は濃硝酸:濃硫酸=1:1 を加え 230 度で 2 時間加熱することで溶解し、最終的にチタニウムイオンを 0.5M 塩酸 10mL に取り出した。その後、ICP-AES (SPS-3100; Hitachi High-Tech Science, 東京, 日本) を用いて、得られた塩酸溶液中の Ti イオンの定量を行った。条件を以下に記す。校正:外部標準、ネブライザ:Conical U-Series 2 mL/min (Glass Expansion, Melbourne, オーストラリア)、測定波長:Ti 337.800 nm。臓器内から得られた Ti イオンは全て投入した TiO₂ 由来とみなして、各臓器内に蓄積していたナノ粒子の質量を算出した。

血液マーカー解析

PAA-TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs, H₂O₂, PBS を尾静脈注射した健常マウスから一日後と一週間後に採血した血液を遠心して血清を採取し、生化学マーカー検査をオリエンタル酵母(東京, 日本)に委託した(n=3)。検査項目を以下に記す。総ビリルビン (TBIL)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、尿酸値 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、塩化物イオン (Cl)、リン (IP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アミラーゼ (AMY)、総コレステロール (T-CHO)、トリグリセリド (TG)、高比重脂質タンパクコレステロール (HDL-C)、及び、グルコース (GLU)。

薬剤送達効率(DE)の算出

定量的解析のため、ナノ粒子の DE を以下の式(a)-(c)に従って算出した。

$$\text{Trapezoidal area } (T_i) = 0.5(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1}) \quad (\text{a})$$

$$AUC_{Tumor} = \sum_{i=1}^n T_i \quad (b)$$

$$\text{Delivery efficiency (DE)} = \frac{AUC_{Tumor}}{t_{end}} (m_{Tumor}) \quad (c)$$

Area-under-the-curve (AUC) は投与後の時間 [h] に対する腫瘍内ナノ粒子濃度 [%ID/g(tissue)] のグラフにおいて、隣り合う2つの測定点と X 軸で囲まれる台形の面積を積分した値である。まず、腫瘍内のナノ粒子濃度を投与量 (ID) で規格化して C_i [%ID/g(tissue)] とする。次に、 $t=i-1$ と $t=i$ の間の台形面積 (T_i) を計算する (式(a))。 T_i を $i=1$ から $i=n$ まで足し上げ、 AUC_{Tumor} とする (式(b))。そして、DE は AUC_{Tumor} を実験のエンドポイント時間 (t_{end}) で割り、腫瘍の平均重量 (m_{Tumor}) を掛けることで求められる (式(c))。視覚的な理解のため Fig. 4-S1 を参照されたい。

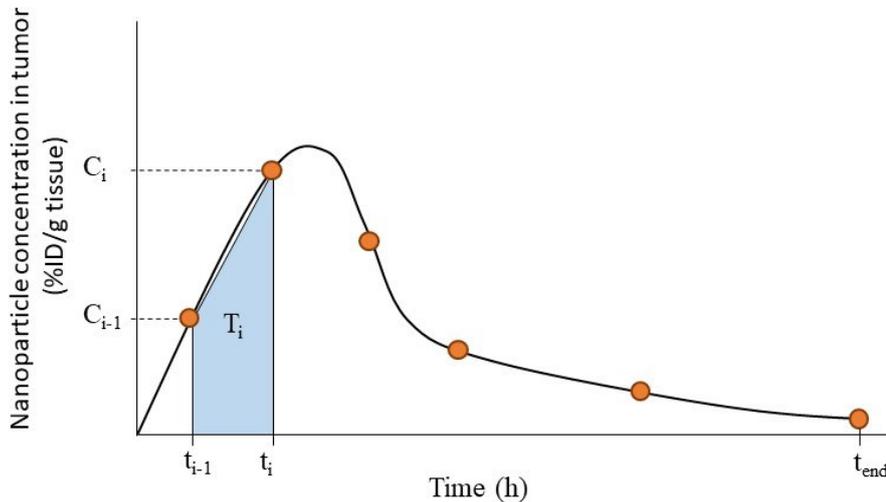


Fig. 4-S1. An image to help understanding the definition of DE. Area-under-the-curve (AUC) in the plot of NPs concentration in the tumor versus passed time could be approximated by the non-compartmentalized linear trapezoidal analysis model. First, NPs concentration in the tumor was standardized by injected doze (ID) of NPs as C_i [%ID/g tissue] and a trapezoid area (T_i) between $t=i-1$ and $t=i$ was calculated (Eq. (a)). The T_i was summed from $i=1$ to $i=n$ to calculate AUC_{Tumor} (Eq. (b)). At last, DE was derived by dividing AUC_{Tumor} by the time of the end-point of the study (t_{end}) and multiplying by the average tumor mass of the group (m_{Tumor}) (Eq. (c)).

動物への放射線照射実験

実験動物への放射線照射は MBR-1505R2 (日立、東京、日本) を用いて行った。照射条件は、管電圧 150 kV、管電流 5 mA、Al 1mm フィルターを用いて 0.5 Gy/min であった。照射の際はソムノベンチルを 0.1 mg/g(body weight) で腹腔内投与して不動化し、鉛

スカートを用いて患部以外に放射線が照射されないようにした。

腫瘍体積は楕円球に近似して計算した。すなわち、腫瘍の長軸を L [mm]、短軸を W [mm] とすると、 $L \times W^2/2$ [mm²] で求められた。

4-3. 結果

ナノ粒子の合成

まず、合成した PAA-TiO_x, PAA-TiO₂ NPs の物性評価を行った。PAA-TiO_x NPs は TiO₂ NPs の表面に水熱処理を用いて PAA を修飾して得られた PAA-TiO₂ NPs を、過酸化水素に浸漬することで機能化して得られた。PAA-TiO_x NPs の動的粒径とゼータ電位は DLS を用いて測定した。PAA-TiO₂ NPs と PAA-TiO_x NPs の動的直径はそれぞれ、平均で 109 nm と 101 nm であった (Fig. 4-1B)。粒子は表面に修飾された PAA のカルボキシル基によって負の電荷を帯び、ゼータ電位はそれぞれ、 -48.1 ± 14.2 と -44.0 ± 10.6 であった (Fig. 4-1B)。ナノ粒子の医療応用において血中安定性の担保は不可欠である。PAA-TiO₂ NPs と PAA-TiO_x NPs は大きな負電荷によって高濃度の塩やタンパクを含む溶液中での高い分散性を確保している。各粒子の pH はどちらも 6.4 であった。また、2つの粒子は SEM を用いての観察も行った。得られた顕微鏡像を Figs. 1C, 1D に示す。

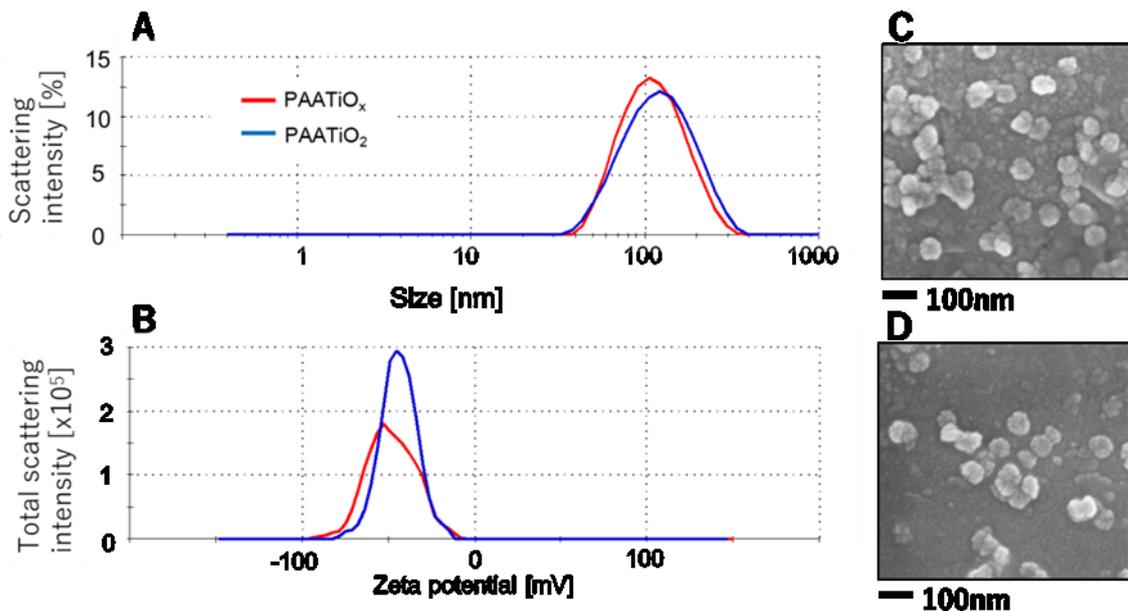


Fig. 4-1. Characterization of PAA-TiO_x NPs and PAA-TiO₂ NPs. (A) Particle size and (B) zeta potential distribution were measured by DLS. SEM images of (C) PAA-TiO_x NPs and (D) PAA-TiO₂ NPs.

ヒト膵臓がんゼノグラフトマウスモデルを用いた *in vivo* での放射線照射と PAA-TiO_x NPs 局所注射の併用治療において、PAA-TiO_x NPs は有意な放射線増感効果を示した。

今後、これを放射線増感剤として実用化するために、健常マウスと担がんマウスに対して PAA-TiO_x NPs の体内動態解析を行った。

健常マウスの体内動態

健常マウスに対して PAA-TiO_x NPs or PAA-TiO₂ NPs を 25mg/kg(mouse)で尾静脈注射し、1 時間、1 日、1 週間後に各腫瘍臓器と血液に蓄積した粒子重量を ICP-AES を用いて解析した (Fig. 4-2)。蓄積量はコントロール群の値で減算し、縦軸は注入粒子量に対する比で表している。ナノ粒子の体内動態の傾向は H₂O₂での機能化による差はみられなかった。いずれの粒子も注入した半量近くが肝臓に蓄積し、粒子注入から経時的に蓄積量が上昇することがわかった。一方で、その他の臓器には多くても 1%までしか蓄積せず、実験手技の誤差を考えると定量性は得られなかった。また、マウスの性別による体内動態の大きな差は見られなかった。

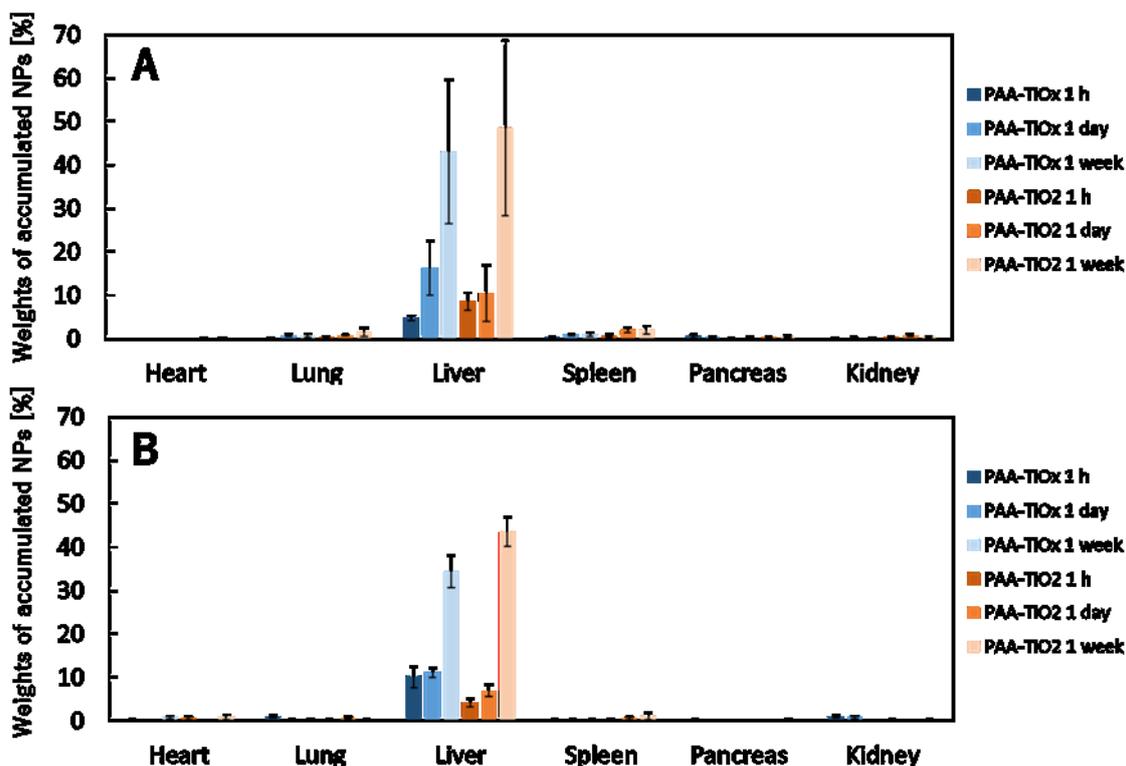


Fig. 4-2. Weight of PAA-TiO_x NPs or PAA-TiO₂ NPs accumulated in major organs 1 hour, 1 day, and 1 week after intravenous injection in (A) male healthy mice or (B) healthy female mice. Data represent the mean \pm STDEV (n=7) after subtraction of control group (n=5) values.

ナノ粒子の毒性検査

体内動態だけでなく、PAA-TiO_x NPs が生体に与える毒性を調査するため、PAA-

TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs, H₂O₂を尾静脈投与した健常マウスから血液採取を行い、総合的な疾病検査に使われる血液マーカーの検査を行った。我々の以前の報告で PAA-TiO_x NPs が継続的に H₂O₂ を放出していることが示唆されたので、コントロールとして PAA-TiO₂ NPs だけでなく H₂O₂ も選択した。サンプルが生体に与える影響について幅広くスクリーニングを行うための血液マーカーを 17 項目選択した。全ての検査数値は Tables S1, S2 に表した。結果として、投与から 1 日後に AST と ALT, LDH, T-BIL の値がコントロール群と比べて若干上昇したが、有意な差ではなかった。(Table 1)。これらはいずれも肝臓の機能障害に関するマーカーである。AST と LDH はナノ粒子が投与されたときに上昇し、一方で T-BIL は過酸化水素を含むサンプルが投与されると比較的大きく上昇した。これらの血液マーカーは投与から 1 週間後にももう一度検査を行ったが、AST, ALT の値はコントロール群と比べて減少し、T-BIL 値はナノ粒子を含む群についてはコントロールに対して少し高い状態を保っていた。

Group	1 day				1 week			
	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	T-BIL (mg/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	T-BIL (mg/dL)
PAA-TiO _x	127.3 ± 15.7	23.3 ± 2.0	539 ± 60	0.060 ± 0.009	117.3 ± 28.8	22.7 ± 3.3	539 ± 83	0.067 ± 0.014
PAA-TiO ₂	129.3 ± 18.4	26.7 ± 1.1	628 ± 111	0.040 ± 0.009	96.7 ± 22.6	19.3 ± 1.4	341 ± 59	0.067 ± 0.005
H ₂ O ₂	86.7 ± 2.2	32.0 ± 2.5*	401 ± 19	0.060 ± 0.009	190.0 ± 79.3	25.0 ± 2.9	572 ± 225	0.027 ± 0.011
PBS	94.7 ± 3.8	22.0 ± 0.9	415 ± 40	0.033 ± 0.005	159.3 ± 20.3	23.3 ± 2.7	401 ± 68	0.047 ± 0.005

Table 1. Values of biochemical marker tests (AST, ALT, LDH, T-BIL) of normal mice after treatments with PAA-TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs, H₂O₂, or PBS. These markers which generally reflect the status of the liver invoked slight changes of the mean values after 1 day from the injection, but the changes were recovered at 1 week after.

*Significantly different compared to PBS treated group by Student's t-test.

A

Group	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	IP (mg/dL)
PAA-TiO _x	4.87 ± 0.05	3.47 ± 0.05	20.5 ± 1.3	0.127 ± 0.005	150.7 ± 0.5	5.47 ± 0.05	100.7 ± 0.5	6.20 ± 0.25
PAA-TiO ₂	4.80 ± 0.09	3.47 ± 0.05	23.9 ± 2.3	0.113 ± 0.005	153.3 ± 0.5	5.73 ± 0.24	100.7 ± 0.5	7.80 ± 0.09
H ₂ O ₂	5.13 ± 0.11	3.73 ± 0.05	25.5 ± 1.3	0.100 ± 0.000	152.7 ± 0.5	5.13 ± 0.05*	99.3 ± 0.5	6.27 ± 0.36
Control	4.93 ± 0.05	3.67 ± 0.05	23.6 ± 2.5	0.107 ± 0.005	152.0 ± 0.9	5.53 ± 0.05	99.3 ± 0.5	7.27 ± 0.48

AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	AMY (IU/L)	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)
127 ± 16	23.3 ± 2.0	539 ± 60	1879 ± 45*	101 ± 3	143 ± 10	61.3 ± 2.0	0.060 ± 0.009	177 ± 6
129 ± 18	26.7 ± 1.1	628 ± 111	1879 ± 69*	93 ± 2	121 ± 29	57.3 ± 1.1	0.040 ± 0.009	183 ± 6
87 ± 2	32.0 ± 2.5*	401 ± 19	2137 ± 85	105 ± 5	142 ± 26	70.0 ± 2.5*	0.060 ± 0.009	160 ± 13
95 ± 4	22.0 ± 0.9	415 ± 40	2143 ± 18	98 ± 3	120 ± 7	58.0 ± 1.6	0.033 ± 0.005	199 ± 7

B

Group	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)	IP (mg/dL)
PAA-TiO _x	4.53 ± 0.11	3.33 ± 0.11	17.4 ± 0.7	0.113 ± 0.005	151.3 ± 1.1	5.33 ± 0.20	98.7 ± 0.5	5.40 ± 0.49
PAA-TiO ₂	4.53 ± 0.05	3.27 ± 0.05	16.5 ± 0.1	0.120 ± 0.009	151.3 ± 0.5	4.87 ± 0.14	99.3 ± 0.5	7.00 ± 0.43
H ₂ O ₂	4.60 ± 0.00	3.30 ± 0.06	17.4 ± 0.0	0.100 ± 0.000	110.3 ± 31.6	5.60 ± 0.46	100.0 ± 0.0	3.77 ± 1.17
Control	4.40 ± 0.00	3.20 ± 0.00	20.5 ± 0.5	0.120 ± 0.012	154.0 ± 1.6	4.87 ± 0.05	102.7 ± 1.1	6.47 ± 0.39

AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LDH (IU/L)	AMY (IU/L)	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	T-BIL (mg/dL)	GLU (mg/dL)
117 ± 29	22.7 ± 3.3	539 ± 83	1644 ± 133	79 ± 4	88 ± 11	49.3 ± 2.9	0.067 ± 0.014	175 ± 10
97 ± 23	19.3 ± 1.4	341 ± 59	1649 ± 31	81 ± 1	110 ± 3	47.3 ± 0.5	0.067 ± 0.005	195 ± 7
190 ± 79	25.0 ± 2.9	572 ± 225	1199 ± 377	51 ± 16	67 ± 19	29.3 ± 9.5	0.027 ± 0.011	149 ± 49
159 ± 20	23.3 ± 2.7	401 ± 68	1666 ± 48	81 ± 4	106 ± 2	48.0 ± 3.3	0.047 ± 0.005	215 ± 18

Table S1. All values of biochemical marker tests of normal mice at (A) one day (B) one week after treatments with PAA-TiO_x NPs, PAA-TiO₂ NPs, H₂O₂, or PBS.

*Significantly different compared to PBS treated group by Student's t-test.

担がんマウスに腫瘍内局所投与した際の PAA-TiO_x NPs の体内動態

PAA-TiO_x NPs は担がんしたヌードマウスの腫瘍内に局所注射を行った後放射線照射を行うと、放射線の治療効果を増幅することが知られている。そこで、ナノ粒子を体内に導入した際に腫瘍に蓄積する粒子の定量を行うため、ヒト膵臓がんゼノグラフトマウスでも PAA-TiO_x NPs と PAA-TiO₂ NPs の体内動態を調査した。まず、PAA-TiO_x NPs はこれまでに局所注射によって放射線増感効果が見られていることから、粒子を腫瘍に局所注射することによって導入した。PAA-TiO_x NPs 分散液の濃度と体積は健常マウスを用いた実験と同じ値で行った。腫瘍内に注入された粒子は経時的に減少し（40%から 10%）、逆に肝臓には蓄積量が増加した（<5%から 40%）（Fig. 4-3A）。注射から 1 時間後には腫瘍に残留している PAA-TiO_x NPs は導入量の 40%まで減少した（Fig. 4-3A）。腫瘍内の NPs 蓄積量はさらに経時的に減少し、1 week 後には導入量の 10%まで減少した。一方、経時的に最も粒子の蓄積量が上昇したのは肝臓で、粒子導入から 1 時間以内では蓄積量は導入量の 5%未満だったものが、1 week 後には約 40%まで上昇した。その他の臓器に関しては、健常マウスに対する尾静脈注射の結果と同様にほとんど有意な蓄積は見られなかった。

各臓器内に蓄積した粒子濃度も算出した。その際、全血液のデータも付け加えた（Fig. 4-3B）。腫瘍内の粒子濃度は投与から 1 日後までは肝臓の濃度よりも高かった。腫瘍への局所投与なので、ごく自然な結果と言える。1 週間後まで高い腫瘍内濃度を保っている PAA-TiO_x NPs は PAA-TiO₂ NPs よりも腫瘍組織に対して強い親和力があるのかもしれない。血液内の粒子は投与から 1 日後でしか検出されなかった。

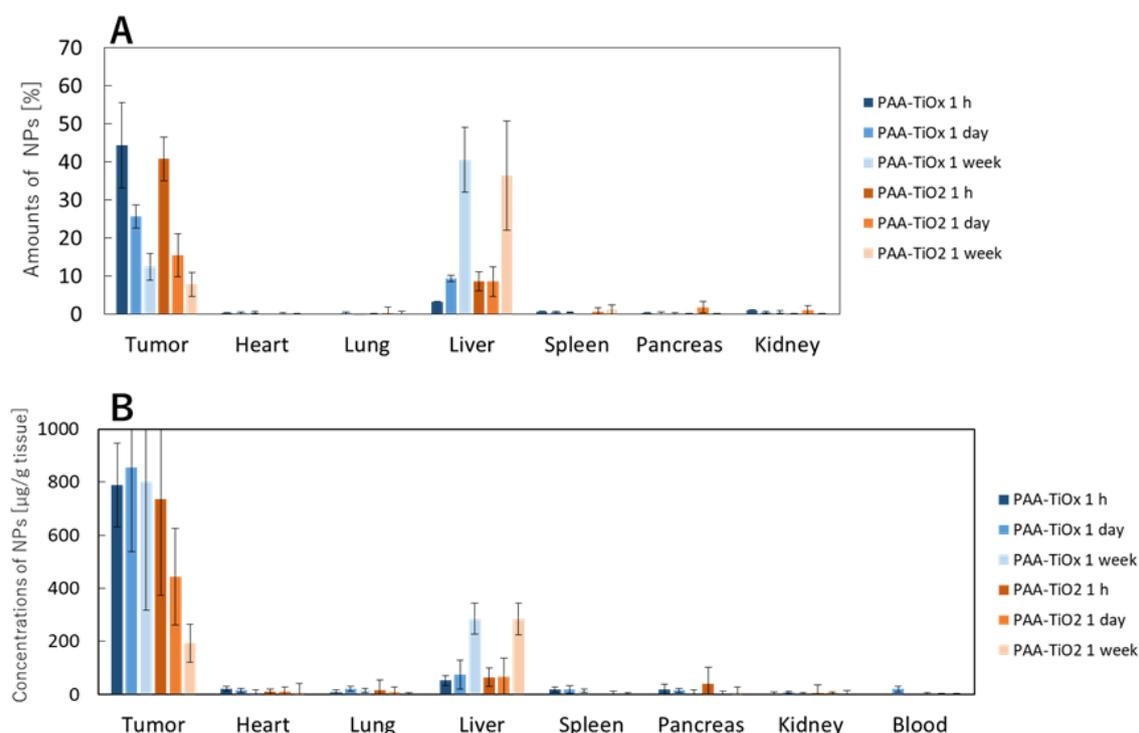


Fig. 4-3. (A) Whole weight of PAA-TiO_x NPs or PAA-TiO₂ NPs accumulated in major

organs and (B) weight of NPs per unit organ weight 1 hour, 1 day, and 1 week after local injection to a human pancreatic cancer tumor in a xenograft mouse. Data represent the mean \pm STDEV (n=7) after subtraction of control group (n=5) values.

担がんマウスに尾静脈投与した際の PAA-TiO_x NPs の体内動態

同様に、ヒト膵臓がんゼノグラフトマウスに PAA-TiO_x NPs を尾静脈投与した場合の体内動態を調べた。最も粒子が蓄積したのはやはり肝臓で、健常マウスに対して尾静脈投与した場合と同様に投与から 1 週間までに約半量が肝臓にトラップされた。また、他の主要臓器には蓄積が見られなかったが、興味深いことに腫瘍に比較的多くの粒子の蓄積が見られた。粒子の投与から 1 時間では投与量の 10%が蓄積しており、肝臓以外の他臓器と比べると桁違いに多かった。ただし、腫瘍内に蓄積した粒子量は経時的に減少し、1 週間後には 3%以下にまで流出した。DE を計算すると、PAA-TiO_x NPs は 5.8%、PAA-TiO₂ NPs は 2.4%であった。

臓器内粒子濃度に関していうと、粒子の投与後 1 時間において肝臓よりも腫瘍に優先的に堆積していた。ただし、腫瘍への蓄積は一時的であり、その後は 1 日から 1 週間かけて血液に流れ出し、肝臓への再蓄積が見られた。血液内の粒子濃度のデータを見ると、一度臓器に分配された粒子がもう一度血液中に流れ出す様子が示唆されている。主要臓器への粒子の分布は 1 週間で完了している。しかし、尾静脈投与した粒子濃度 (5000 μ g/ml) に比べると 1 日後の血中滞留粒子濃度は低すぎるため、投与から 1 時間後までにほとんどの臓器への分布は完了したと考えられる。PAA-TiO_x NPs の血中半減期はデータの不足により計算できなかった。

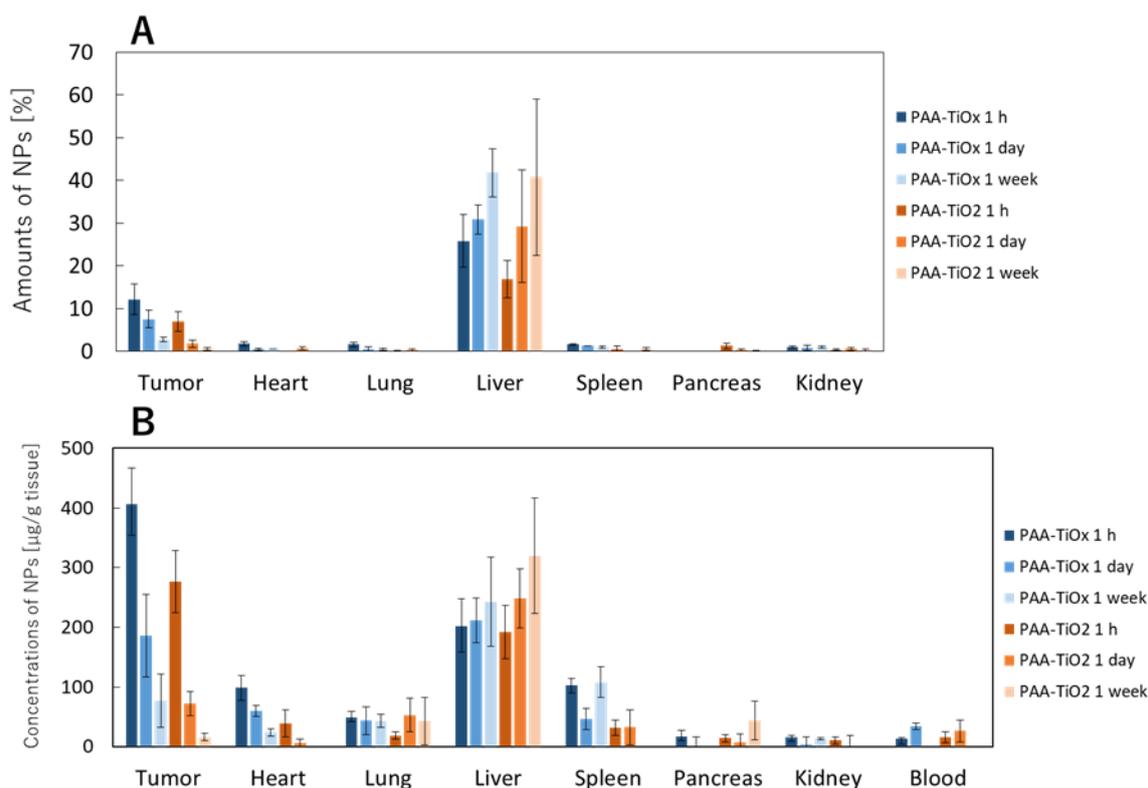


Fig. 4-4. (A) Weight of PAA-TiO_x NPs or PAA-TiO₂ NPs accumulated in major organs and (B) weight of NPs per unit organ weight 1 hour, 1 day, and 1 week after intravenous injection into human pancreatic cancer xenograft mice. Data represent the mean ± STDEV (n=7) after subtraction of control group (n=5) values.

放射線照射併用実験

PAA-TiO_x NPs は尾静脈投与でもかなりの濃度で腫瘍に滞留することが判明したため、粒子を尾静脈投与で腫瘍に蓄積したのち放射線治療を行うことで、放射線の治療効果を増幅するか確かめた。ただし、PAA-TiO_x NPs は局所注射では放射線増感効果が認められているが、当然ながら局所注射と尾静脈注射では粒子の腫瘍への滞留量が大幅に異なるため (Figs. 4-3, 4-4)、ここまでの投与量より多い条件で尾静脈投与を行った。放射線照射はサンプルの尾静脈投与から 1 h 後に 5 Gy の線量で行い、照射日を 0 day として経時的に腫瘍体積の測定を行った。その結果、PAA-TiO_x NPs の導入濃度が 25 mg/kg(mouse) 以上では放射線照射単体処置より有意に腫瘍体積の増大を抑制した (Fig. 4-5A)。しかし、25 mg/kg よりも濃度を上げて平均値で見ると腫瘍の縮小は見られなかった。また、各処理群での放射線照射時の、腫瘍内 PAA-TiO_x NPs 濃度は粒子の導入量によく相関していた (Fig. 4-5B)。ここで、Fig. 4-5A の未照射群、50 mg/kg(mouse) の群については、見やすさを考慮してエラーバーをあえて省略している。

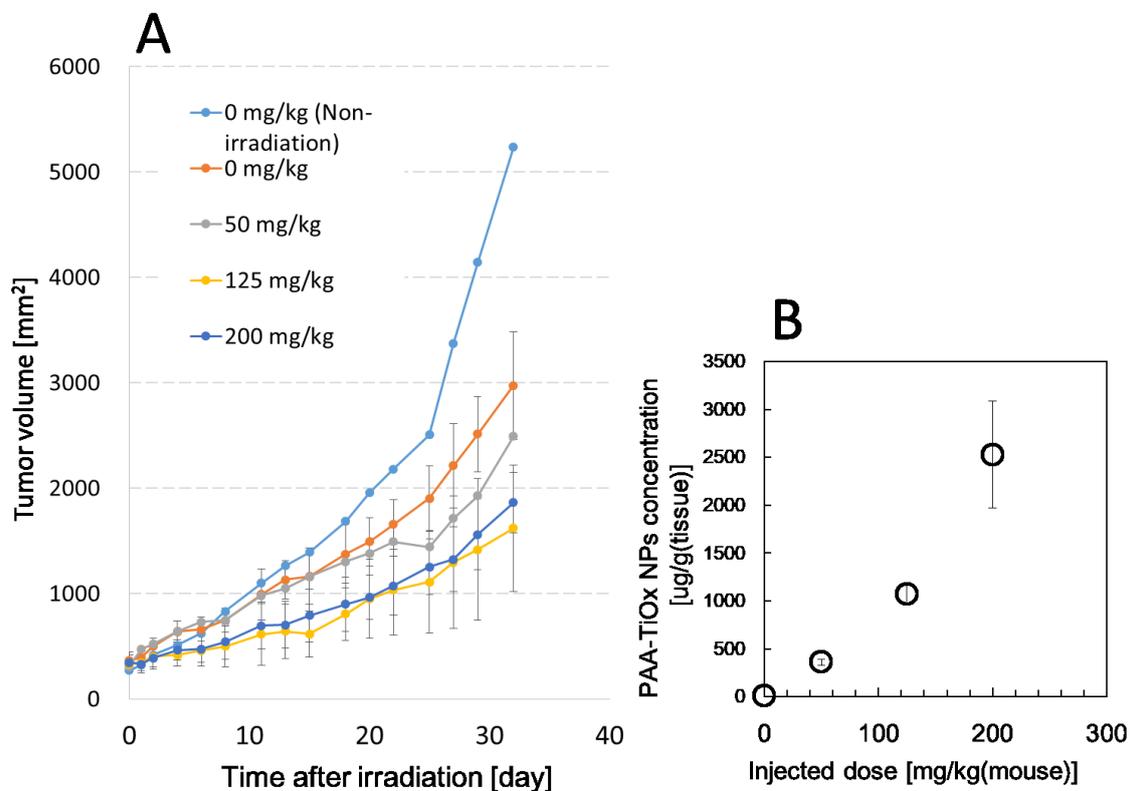


Fig. 4-5 (A) Enhancement of therapeutic effect of radiotherapy and (B) the concentration of PAA-TiO_x NPs in the tumor after an interventional injection in various concentrations.

4-4. 考察

我々は PAA-TiO_x NPs を放射線増感剤として実用化するため、体内動態と毒性の評価を *in vivo* で行った。マウスを用いた体内動態解析の結果、PAA-TiO_x NPs は局所注射、尾静脈注射どちらにおいてもその半量近くが最終的に肝臓に堆積することを見出した (Figs. 4-4)。他の臓器には目立った蓄積は見られなかった。また、血流に乗って体内を循環している粒子は注射後 1 h 後にはほとんど残っていなかった。ゆえに、肝臓や腎臓にトラップされなかった粒子は尿や糞便として排泄されたか、筋肉や皮膚組織に分布したのだろう。興味深いのは、脾臓と腎臓にほとんど蓄積が見られなかったことである。脾臓は肝臓と共に体内の異物をトラップする網内系として知られているし、腎臓は毒素を濾しとって尿として排出することから、ナノ粒子の蓄積がかなり見られると想定していた。実際、ラットとマウスを用いた実験で、TiO₂ NPs を尾静脈注射したところ脾臓と腎臓に蓄積が見られたという論文は存在する (ただし腎臓には一時的に) [24,26]。しかし、いずれも未修飾の TiO₂ NPs を用いた実験である。我々の用いている PAA-TiO_x NPs は単分散性が高いため血液中でも凝集せず、比較的大きなフィルターを有する腎臓では濾しとることができなかったのであ

ろう。肝臓のみに蓄積が見られた理由は、臓器の中で肝臓が最も小さな粒子をトラップする能力を有しているのかもしれないし、粒子に修飾された PAA が肝臓と親和性を有しているのかもしれない。

本報告で最も重要な知見は、PAA-TiO_x NPs は尾静脈から投与してもかなりの量が腫瘍に蓄積したことである (Fig. 4-4)。もちろん、粒子を腫瘍内に局所投与した場合には腫瘍内にかかなりの量の粒子が残留することが予想されたが (Fig. 4-3)、尾静脈から投与しているにもかかわらず、一時的ではあれ、肝臓と同程度の蓄積が腫瘍に見られたことは驚くべきことである (Fig. 4-4A)。PAA-TiO_x NPs は無機ナノ粒子と高分子のみで構成された、ドラッグデリバリーの観点から見るといわゆる”passive”な粒子である。ゆえに、PAA-TiO_x NPs は EPR (enhanced permeability and retention)効果でのみ腫瘍に蓄積したと考えられる。一般的に 200 nm 以下のナノ粒子は EPR 効果によって固形腫瘍に蓄積しやすいことが知られているので、動的直径が 100nm である PAA-TiO_x NPs もこれによって腫瘍に蓄積したと考えるのが自然である。我々が知る限りチタン原料のナノ粒子による EPR 効果を確認したのはこれが初めてである。この結果は PAA-TiO_x NPs の静脈注射での導入による放射線増感治療を目指すうえで非常に有利と言える。

Wilhelm らはナノ粒子の固形腫瘍へのデリバリーに関する論文を過去 10 年に及び 117 編参照し、薬物動態分野で頻繁に使用される DE という指標を用いて比較を行った[27]。彼らによると、無機ナノ粒子を用いた報告についての DE のメジアンは 0.8%ID であり、passive なナノ粒子を用いた場合は 0.6%ID と算出された。それに対し、我々の報告した PAA-TiO_x NPs は 5.8%ID と非常に高い数値であった。グラフを一見するとあまり腫瘍への蓄積が見られないように見える PAA-TiO₂ NPs ですら 2.4%ID と算出された。すなわち、PAA-TiO_x NPs は腫瘍組織へ大きな親和性を持ち、EPR 効果の恩恵を非常に受けやすい粒子と言える。さらなる可能性として、PAA-TiO_x NPs 表面の PAA が体内の生化学物質のうち腫瘍を認識できるような化合物と結合することで腫瘍へのデリバリーを実現しているのかもしれない。実際、Khoury らによると、金ナノ粒子の表面に PAA を修飾することで正電荷を帯びた低分子量たんぱくを表面に収集できることを示唆している[28]。いずれにせよ、PAA-TiO_x NPs がなぜ腫瘍特異的に蓄積するのかはこれから調べる必要がある。

血液検査によって PAA-TiO_x NPs の毒性も評価した。静脈注射から 1 日後には肝臓の機能障害の可能性を示すマーカーに変化が見られた (Fig. 4-2)。体内に蓄積された粒子のほとんどが肝臓に蓄積していたことを考えると納得できる。しかし、いずれの数値もコントロールと 2 倍も変わらず、1 週間後には同様の傾向が見られない (Table 1) ことから、いずれの検査項目も肝機能に異常があると判断できるレベルではなかった。実際、Jiaying Xu らによると、TiO₂ ナノ粒子において 140mg/kg (body weight) までは静脈注射しても尿酸値以外には血液マーカーに有意な変化が見られなかった。我々の研究で使用した 25mg/kg はそれに比べるとかなり低濃度だが腫瘍への局所注射によって充分治療効果が認められるため、実使用において生体への急性毒性は起こり難いと考えられる。

最後に、いくつかの粒子濃度で尾静脈投与を行った後、放射線照射を行うと、25 mg/kg(mouse)の投与量以上では放射線単体よりも治療効果が増大した (Fig. 4-5A)。一見、125 mg/kg と 200 mg/kg の投与量では効果に違いが見えないが、200 mg/kg の投与を行うと腫瘍体積の誤差範囲が狭くなっていることから、より高濃度での投与は安定した放射線増感効果を得られると考えられる。一方で、照射時の腫瘍内の粒子濃度を調べると、投与粒子濃度が高いほど腫瘍への蓄積も相関して増えていた (Fig. 4-5B)。すなわち、これらの事実から、PAA-TiO_x NPs には効果の上限がある可能性が導かれる。我々は以前の研究で PAA-TiO_x NPs の放射線増感機序の解析を試みたが、その際に粒子が担持している過酸化水素の寄与が示唆された。過酸化水素は既に一部の臨床で放射線増感剤として使用されているが、その作用機序の一つに酸素効果があるとされている。ほとんどの腫瘍は細胞レベルで酸素欠乏症を発症しており、ここに放射線照射を行っても電離する酸素が少ないため ROS の発生量が減少し、十分な治療効果が得られないという問題がある。H₂O₂ は細胞内のペルオキシダーゼやカタラーゼによって酸素に分解されるため、放射線の治療効果を高めるといえる。逆に言えば、H₂O₂ は飽和酸素濃度に達した時点で酸素効果の寄与は得られないということになる。この仮説が正しいか確かめるには、今後、酸素分圧を厳密に制御した *in vitro* 実験が望まれる。

背景の章でも述べた通り、放射線増感治療というスキームは少なからず検討され、有用な放射線増感剤が求められてきた。しかし、実際には想定した増感効果が得られなかったり、十分な効果が見られても放射線増感剤自身の毒性が無視できない、あるいは体内リスクが懸念されるために広く実用化に至った素材は開発されていない。生体に対するリスクに関しては、PAA-TiO_x NPs は実用への問題を克服したといえるだろう。しかし、尾静脈からの投与によって腫瘍に蓄積する量は今のままでは多いとは言えない。PAA-TiO_x NPs はさらに抗体[11,29]やペプチド[30,31]、リポソーム[32,33]といった腫瘍親和性を持つ化合物との組み合わせによってより多くの PAA-TiO_x NPs を腫瘍に蓄積させることが必要であろう。

4-5. 結論

我々は放射線増感剤として有望な PAA-TiO_x NPs を合成し、健常マウスへ静注で導入した場合、担がんマウスへ静注と局注で導入した場合での体内動態を初めて解析した。さらに、血液検査によってその際の急性毒性も調査した。結果、PAA-TiO_x NPs はどのように導入した場合でも肝臓に顕著に蓄積し、1週間後には導入量の約半分が肝臓に堆積していた。また、PAA-TiO_x NPs は腫瘍に対して局注だけでなく静注した場合でも EPR 効果によってある程度蓄積することを見出した。そして、PAA-TiO_x NPs は 25 mg/kg body weight において、いくつかの肝機能マーカーの変化を誘起したが、肝機能への障害を判断できるレベルではなかった。以上から、PAA-TiO_x NPs は局所注射での放射線増感治療に必要な濃度

において顕著な急性毒性は見られなかった。一方で、PAA-TiO_xNPs を静脈注射し EPR 効果で滞留した粒子濃度で放射線増感治療を行うとすると、少なくとも 125 mg/kg(mouse)の全身投与が必要であった。とはいえ、粒子の修飾等によって腫瘍内への蓄積量を向上させることができれば、放射線増感剤の有望な候補になり得ると考えられる。

4-6. 引用文献

- [1] Röntgen WC. Über eine neue Art von Strahlen. Sitzungsberichte Der Phys Gesellschaft Zu Würzburg 1895;9:132–141.
- [2] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci* 2012;9:193–199.
- [3] Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 2009;9:442–458.
- [4] Coulter J a., Hyland WB, Nicol J, Currell FJ. Radiosensitising nanoparticles as novel cancer therapeutics - Pipe dream or realistic prospect? *Clin Oncol* 2013;25:593–603.
- [5] Kwatra D, Venugopal A, Anant S. Nanoparticles in radiation therapy : a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl Cancer Res* 2013;2:330–342.
- [6] Su X-Y, Liu P-D, Wu H, Gu N. Enhancement of radiosensitization by metal-based nanoparticles in cancer radiation therapy. *Cancer Biol Med* 2014;11:86–91.
- [7] Babaei M, Ganjalikhani M. The potential effectiveness of nanoparticles as radio sensitizers for radiotherapy. *BioImpacts* 2014;4:15–20.
- [8] Wang AZ, Tepper JE. Nanotechnology in Radiation Oncology. *J Clin Oncol* 2014;
- [9] Retif P, Pinel S, Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, Barberi-Heyob M. Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. 1 Retif P, Pinel S, Toussaint M, Frochot C, Chouikrat R, Bastogne T, *Al Nanoparticles Radiat Ther Enhanc Key Parameters Theranostics* [Internet] 2015;5:1030–44 Available from [Http://Www.ThnoOrg/V05p1030HtmTheranostics](http://www.thno.org/V05p1030HtmTheranostics) 2015;5:1030–1044.
- [10] Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HHW, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci* 2008;99:1479–1484.
- [11] Chattopadhyay N, Cai Z, Pignol J-P, Keller B, Lechtman E, Bendayan R, Reilly RM. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm* 2010;7:2194–

2206.

- [12] Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, Borghi E, Levy L. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Futur Oncol* 2012;8:1167–1181.
- [13] Marill J, Anesary N, Zhang P, Vivet S, Borghi E, Levy L, Pottier A. Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect? *Radiat Oncol* 2014;9:150.
- [14] Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Tanaka T, Morita K, Umetsu M, Ohara S, Tan Z, Nishimura Y, Akasaka H, Sato K, Numako C, Takami S, Kondo A. Titanium peroxide nanoparticles enhanced cytotoxic effects of X-ray irradiation against pancreatic cancer model through reactive oxygen species generation in vitro and in vivo. *Radiat Oncol* 2016;11:91.
- [15] Morita K, Miyazaki S, Numako C, Ikeno S, Sasaki R, Nishimura Y, Ogino C, Kondo A. Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂ for use as a novel radiosensitizer. *Free Radic Res* 2016;50:1319–1328.
- [16] Sidambe AT. Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants-A review. *Materials (Basel)* 2014;7:8168–8188.
- [17] Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Prog Neurobiol* 2009;87:133–170.
- [18] Utembe W, Potgieter K, Stefaniak AB, Gulumian M. Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 2015;12:11.
- [19] Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice. *Nanoscale Res Lett* 2012;7:565.
- [20] Recordati C, De Maglie M, Bianchessi S, Argenti S, Cella C, Mattiello S, Cubadda F, Aureli F, D'Amato M, Raggi A, Lenardi C, Milani P, Scanziani E. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol* 2016;13:12.
- [21] Borak B, Prescha A, Baszczuk A, Pluta J. In Vivo Study on the Biodistribution of Silica Particles. *Adv Clin Exp Med* 2012;21:13–18.
- [22] Fufă MOM, Mihaiescu DE, Mogoantă L, Bălșeanu TA, Mogoșanu GD, Grumezescu AM, Bolocan A. In vivo biodistribution of CNTs using a BALB/c mouse experimental model. *Rom J Morphol Embryol* 2015;56:1481–93.
- [23] Xia Y, Huali S, Weirong L, Weizhong G, Xiaoli S, Yiqun M, Xuejun C, Qunwei Z, Mizu J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress are involved in ZnO

- nanoparticle-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2015;234:40–49.
- [24] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, Van Ravenzwaay B. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch Toxicol* 2008;82:151–157.
- [25] Xu J, Shi H, Ruth M, Yu H, Lazar L, Zou B, Yang C, Wu A, Zhao J. Acute Toxicity of Intravenously Administered Titanium Dioxide Nanoparticles in Mice. *PLoS One* 2013;8:1–6.
- [26] Sugibayashi K, Todo H, Kimura E. Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. *J Toxicol Sci* 2008;33:293–298.
- [27] Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, Chan WCW. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater* 2016;1:16014.
- [28] Khoury LR, Goldbart R, Traitel T, Enden G, Kost J. Harvesting Low Molecular Weight Biomarkers Using Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 2015;9:5750–5759.
- [29] Matsui K, Karasaki M, Segawa M, Hwang SY, Tanaka T, Ogino C, Kondo A. Biofunctional TiO₂ nanoparticle-mediated photokilling of cancer cells using UV irradiation. *Medchemcomm* 2010;1:209.
- [30] Kim J, Shirasawa T, Miyamoto Y. The effect of TAT conjugated platinum nanoparticles on lifespan in a nematode *Caenorhabditis elegans* model. *Biomaterials* 2010;31:5849–5854.
- [31] Johnson NR, Wang Y. Coacervate delivery systems for proteins and small molecule drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11:1829–32.
- [32] Jung J, Kasuya T, Tanizawa K, Kuroda S. Bio-nanocapsules for in vivo pinpoint drug delivery. *Yakugaku Zasshi* 2007;127:797–805.
- [33] Nishimura Y, Mieda H, Ishii J, Ogino C, Fujiwara T, Kondo A. Targeting cancer cell-specific RNA interference by siRNA delivery using a complex carrier of affibody-displaying bio-nanocapsules and liposomes. *J Nanobiotechnology* 2013;11:19.

出版論文

第一章

Morita K, Miyazaki S, Numako C, Ikeno S, Sasaki R, Nishimura Y, Ogino C, Kondo A
Characterization of titanium dioxide nanoparticles modified with polyacrylic acid and H₂O₂
for use as a novel radiosensitizer
Free Radical Research. **50**, 1319–1328 (2016).

第二章

Kenta Morita, Yuya Nishimura, Yuki Arai, Chiya Numako, Kazuyoshi Sato, Masao Nakayama,
Ryohei Sasaki, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo.
“Direct increase of intracellular hydrogen peroxide and enhancement for radiosensitivity with
polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles”
Under preparation

第三章

Morita K, Nishimura Y, Arai Y, Numako C, Sato K, Nakayama M, Sasaki R, Ogino C, Kondo
A
Direct increase of intracellular hydrogen peroxide and enhancement for radiosensitivity with
polyacrylic acid-modified titanium peroxide nanoparticles
Under preparation

第四章

Morita K, Suzuki T, Nishimura Y, Matsumoto K, Numako C, Sato K, Nakayama M, Sasaki R,
Ogino C, Kondo A
In vivo tissue distribution and safety of polyacrylic acid-modified titanium peroxide
nanoparticles as novel radiosensitizers
Journal of Bioscience and Bioengineering. **126**, (2018), in press

総括

本研究では、PAA-TiO_x NPs を放射線増感剤として実用化するうえで解明しなければならない要素について、いくつか検証を行った。第一章では、PAA-TiO_x NPs の持つ化学的物性評価を通して放射線増感作用機序の解明を試みた。第二章では、PAA-TiO_x NPs が *in vivo*, *in vitro* において生体に与える毒性評価、体内動態評価を行った。第三章では、過酸化水素水を対照とすることで PAA-TiO_x NPs が *in vitro* において細胞に与える影響を解明し、さらなる作用機序の理解と PAA-TiO_x NPs の持つ放射線増感剤としての可能性に迫った。以上の検討から、PAA-TiO_x NPs は直接放射線とは相互作用しない、あるいはしてもほとんど影響を与えず、その放射線増感効果は粒子内部から周囲環境に徐放される H₂O₂ に由来すると結論付けられた。これは、PAA-TiO_x NPs という粒子は、その素材自体が放射線増感剤というよりはむしろ、H₂O₂ という放射線増感剤を PAA-TiO₂ NPs という担体を用いて腫瘍組織に送達し、腫瘍内部で徐放させるという DDS と表現できる。ただし、今のところ、その効果を十分に確認できているのは腫瘍に直接注射した場合のみである。しかし、PAA-TiO_x NPs を静脈注射すると、パッシブな無機ナノ粒子としては他の粒子に比べて格段に腫瘍への選択的蓄積が見られた (第二章)。さらに、PAA-TiO_x NPs は細胞内に取り込まれてからも H₂O₂ を放出することで細胞内の H₂O₂ 濃度を直接上昇することができ、それは細胞内外の分子拡散が非常に動的な環境であっても保たれるので過酸化水素水よりも効果的な放射線増感効果を示すことが示唆された (第三章)。以上から、PAA-TiO_x NPs は H₂O₂ の DDS キャリアという全く新しい放射線増感剤として、今でも有望な薬剤だと言える。

とはいえ、PAA-TiO_x NPs の実用化に向けてはまだまだ途上と言わざるを得ない。具体的な今後の解決すべき問題としては以下の点が挙げられる。

- (1) ナノリスクの回避
- (2) 腫瘍特異的送達の完成
- (3) 任意のタイミングでの H₂O₂ 放出
- (4) 十分な放射線増感効果の保証

まず、(1)について、本研究では既に第二章で PAA-TiO_x NPs の生体に対する毒性を議論した。その結果、かなり高濃度の粒子を静脈へ直接投与しても、主要な血液マーカーに対して目立った変化は見られなかったことから、この粒子に急性的な肝毒性・腎毒性はほとんどないと判断した。しかし、近年叫ばれているナノリスクとは、慢性的な影響までを含んでいる。現に、アスベストの肺への蓄積が、後年の肺がんリスクとなった問題は記憶に新しい。つまり、最終的に PAA-TiO_x NPs は肝臓やその他の臓器に沈着せず、全て体内で分解されるか排出されることが望ましい。しかし、残念ながら酸化チタンは非常に安定なため (そのおかげで非常に生体不活性なのだが)、生体触媒による分解は望めない。そこで現在は、過酸化

チタンのナノ粒子に PAA ではなく PEG を修飾してステルス性を向上することを検討している。緒言の第 4 項でも述べたが、PEG を修飾されたナノ粒子は肝臓や脾臓といった貪食細胞が豊富な網内系で捕らわれることなく血中に滞留することが可能となる。また、他の検討として、PAA-TiO_x NPs の粒径を小さくすることも試みている。現在の原料である TiO₂ NPs は一次粒子が 10nm>で二次凝集体が平均 50nm のものを用いている。ナノ粒子は 10nm>であれば腎臓から尿に排泄することが可能となるため、非常に微細なアナターゼ TiO₂ NPs を用いて PAA-TiO_x NPs を作製している。ただし、PAA-TiO₂ NPs と H₂O₂ の吸着は表面反応である可能性が高く、分散粒径を小さくすると、単位重量当たりの表面積は変わらないが二次粒子の持つメソポーラスな構造が得られないので容易に分散媒の対流にさらされ、H₂O₂ の徐放能が失われてしまうかもしれない。

次に、(2)について、PAA-TiO_x NPs はパッシブな粒子としては腫瘍組織に親和力を持っていたが、もちろん充分ではない。(1)にも関連するが、表面修飾を変化させて血中滞留性を向上しても、完全な腫瘍組織への標的は望むべくもないだろう。つまり、表面改質によって腫瘍組織へのさらなる親和性を付与しなければならない。緒言第 7 項でも述べたように、我々はいくつかの腫瘍を標的として DDS を有している。もっとも単純には PAA-TiO_x NPs 表面への抗体やペプチドの修飾である。あるいは、BNC を用いて脂質膜に包含するということも考えられる。しかし、PAA-TiO_x NPs をこうしたバイオコンジュゲートとして製剤化するには新たな問題が立ち上がる。PAA-TiO_x NPs は、上市されれば世界初の無機ナノ粒子を用いた放射線増感剤となるため、逆に言えば製剤化の前例がない。すなわち、PAA-TiO_x NPs だけでも上市への道筋が遠いうえに、医薬品として認可されていない抗体や BNC といった新たなバイオ製剤を表面修飾してしまうと実用化がさらに困難になってしまう。ゆえに、PAA-TiO_x NPs を標的化する際の表面修飾分子は慎重に選択しなければならない。

(3)は、PAA-TiO_x NPs をより優れた DDS キャリアに改善する必要があるということである。本研究第三章で PAA-TiO_x NPs は少なくとも 7 時間の H₂O₂ 放出が見られることを示した。これは確かに、投与から放射線治療を行う時間を考えれば十分である。しかし、現在では単なる吸着-解離平衡、あるいは拡散によって徐放されているだけであり、投与されて生体内で希釈された瞬間から H₂O₂ 放出は始まっており、患部に送達された時点ではかなり H₂O₂ 放出能は下がっている。より望むらくは、粒子を患部に送達したのちに何らかの物理的刺激によって放出を開始するほうが良い。DDS の分野ではたいへん盛んに研究されている技術であるが、H₂O₂ は低分子であり、さらに不安定なので、徐放制御は難しいと考えられる。発想としては、脂質のような膜で完全に PAA-TiO_x NPs を密封してしまうか、ナノ粒子表面の改質、メソポーラス構造の変化、あるいは表面積の変化によって PAA-TiO₂ NPs の H₂O₂ 担持力を改善するかが考えられる。

最後に、(4)についてだが、PAA-TiO_x NPs が実用化できるかどうかは、極論ではこの一点に回帰する。すなわち、PAA-TiO_x NPs にどのようなリスクがあり、どれほどのコ

ストがかかったとしても、従来のがん治療で根治できなかった悪性腫瘍を治療できるだけの効果があれば社会的に受け入れられる可能性がある。これまでの我々の研究において、PAA-TiO_x NPs は確かに放射線増感作用を有するが、静脈投与と放射線の組み合わせでは限られた条件でしかその効果を確認できていない。(1)-(3)の問題を解決することで、実際の効能の改善を目指していく必要がある。

さて、以上は、PAA-TiO_x NPs を放射線増感剤として実用化することを前提とした議論である。しかし、我々は「H₂O₂を腫瘍に送達する DDS」としての放射線増感剤開発を始めたばかりである。つまり、この治療スキームを実現する上で PAA-TiO_x NPs が最善である保証は全くなく、むしろ、まず H₂O₂ の DDS キャリアとして他素材の担体を探索することの方が優先されるべきかもしれない。いずれにせよ、我々は放射線増感剤としての H₂O₂ を、無機ナノ粒子を用いて特定組織に送達可能であることを初めて示した。今後、この新しい分野の DDS および放射線増感治療がどのように発展するか楽しみである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、神戸大学大学院工学研究科の荻野千秋教授、近藤昭彦教授、田中勉准教授、西村勇哉助教、神戸大学医学部放射線腫瘍科の佐々木良平教授、中山雅央博士、千葉大学の沼子千弥准教授、九州工業大学の池野慎也准教授、群馬大学の佐藤和好准教授に厚くお礼申し上げます。

特に、荻野千秋教授には、自主性を尊重して頂き、資金面でも不自由のない研究を任せて頂いたことに大変感謝しております。また、西村勇哉助教には細胞培養技術、遺伝子改変技術について長い期間直接の指導を賜りました。公私ともにお世話になりありがとうございました。お二方は私の最も重要な恩師として筆舌に尽くせぬ感謝を感じております。

そして、本論文の審査に当たりご尽力いただきました神戸大学大学院工学研究科の西野孝教授、西山覚教授に深く感謝を申し上げます。

松井かずささん、唐崎美樹さんには研究グループの先輩として面倒を見て頂きました。できの悪い後輩で迷惑をおかけしました。

同研究室の坂本崇幸さん、吉田渉悟さん、高谷倫弘さん、和田悟志さん、小坂徹也さん、山本一寛さんとは卒業後も親交があり、精神的に支えて頂きました。

私の後輩の田野亜都里さん、鈴木貴弘さんは私の指導力不足から苦勞をされたと思います。それでも私の手の届かない部分の実験を真面目に行っていただき、うまくいった部分もうまくいかなかった部分も本研究の糧となっております。

私の博士後期課程での同期である番場崇弘博士、竹中武蔵博士は、毎日接することはなくとも課程中での心の支えになっておりました。

小野（旧姓：室田）尚子さん、中村聡子博士、上坂典子さんは本研究の実験助手としてお世話になりました。安心して実験を任せられる素晴らしい技術者でした。

神戸大学医学部の佐々木良平教授、中山雅央博士、赤坂浩亮博士は医学的見地から本研究の方向付けと、具体的な動物実験技術についてもご助言頂きました。また、岩下美里さんと共に、細胞の分与や実際的な動物実験のお手伝いをして頂きました。

千葉大学の沼子千弥准教授は機器分析の専門家として、ナノ粒子の分析について何度も討論していただき、大変参考になりました。また、同研究室の宮寄世里加さん、松本和久さん、荒井優紀さんにはナノ粒子の合成を何度も依頼しましたが、毎度快く承知していただきました。特に宮寄さんはナノ粒子の分析データをご提供の上、その解釈についても議論させていただきました。

九州工業大学の池野慎也准教授は、遠路はるばる神戸大学までお越しいただいて電気化学的実験手法についてご教授頂いたとともに、実際に実験を行ってデータの提供を頂きました。その後も本研究を気にかけて頂いて感謝しております。

加古川医療センターの小川恭弘博士とは二度しかお話を伺う機会がありませんでしたが、ナノ粒子の作用機序解明について、本研究の最も重要な方向付けに確信を抱かせていただきました。

富山大学医学部の近藤隆教授はがん細胞の放射線に対する応答性とそのアッセイ法についてご教授いただきました。ほとんど飛び込みでお伺いしたにもかかわらず、私たちに欠けていた細胞死に関する基本的な知見を与えてくださり、大変参考になりました。

大阪大学の大原智教授には本研究が開始された当時のプロジェクトが解散してからも学会等でアドバイスを頂きました。

動物実験を行うに際しては、神戸大学ライフサイエンスラボラトリーに動物の維持をしていただきました。星信彦教授、横山俊史准教授、高見亜希子さんにお礼を申し上げます。

また、星信彦教授と横山俊史准教授には、私が動物実験 2 級技術者の資格を取得する際に手厚い指導と支持を頂きました。

神戸大学研究基盤センター機器分析部門にはナノ粒子の分析において共用機器を貸与いただきました。海津利行助教と橋本亨昌技術員には私が使用した機器の保守管理と利用補助をしていただきました。のみならず、私が同部門に技術員として配属されて後も、上司、または先輩としてご指導を賜りました。お二方に加えて、私が研究基盤センターに着任した当時のセンター長であった藤井稔教授、共用設備サポート推進室統括マネージャであった朴杓允教授、機器分析部門長であった森敦紀教授、本研究の遂行にご理解とご支持を頂いて本当にありがとうございました。

最後に、近藤昭彦教授は私が当研究室を志望するきっかけとなった先生です。直接お話しする機会は多くありませんでしたが、遠くから温かい目で見守って頂きました。近藤研の一員として研究室生活を送れたことを幸せに感じております。ありがとうございました。

神戸大学博士論文「ポリアクリル酸修飾過酸化チタンナノ粒子を用いた新規放射線増感治療の開発」全 105 頁

提出日 2018年 7月13日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

© 森田 健太

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。