

氏名	金平 幸輝
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第988号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	表面修飾による酸化チタンナノ粒子の分散安定性制御と医療・環境分野への応用
論文審査委員(主査)	清水 宣明(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	大谷 吉生(自然科学研究科・教授), 国本 浩喜(自然科学研究科・教授), 高橋 憲司(自然科学研究科・准教授), 荻野 千秋(神戸大学・准教授)

### Abstract

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) / poly-acrylic acid (PAA) (TiO<sub>2</sub>/PAA) particles were formed by mixing PAA and an acidic solution of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in dimethylformamide (DMF) followed by heat treatment. The colloid was very stable and aggregation was not observed over a wide pH range (3 to 9), at high salt concentration or even in protein solution. The residual carboxylic group of PAA could be modified *via* EDC/NHS activation to form an amide bond with a protein. An antibody was attached to TiO<sub>2</sub>/PAA (TiO<sub>2</sub>/PAA-Ab) and specific binding to antigen was monitored by surface plasmon resonance. Furthermore, TiO<sub>2</sub>/PAA-Ab hybrid nanoparticle could decompose the antigen, 17β-estradiol by UV irradiation. It seemed that TiO<sub>2</sub>/PAA were candidates as the base component of a photocatalytic system with potential for substrate selectivity.

More over, the author examined the medical applications of TiO<sub>2</sub>/PAA. TiO<sub>2</sub>/PAA indicated anticancer activity upon photoexcitation *in vitro*. Thus, it can be used for implementation of alternative photodynamic therapy (PDT) instead of existing organic photosensitizers. In order to use TiO<sub>2</sub>/PAA as a drug carrier of anticancer agents, TiO<sub>2</sub>/PAA and adriamycin (ADM) hybrid was constructed (TiO<sub>2</sub>/PAA-ADM). Loss of fluorescence derived from ADM of TiO<sub>2</sub>/PAA-ADM hybrid nanoparticles under UV irradiation were observed on photocatalytic self-degradation. After administration of TiO<sub>2</sub>/PAA-ADM hybrid nanoparticle to normal rat tongue mucosa, the adverse effect was strongly suppressed only with UV irradiation. In addition, TiO<sub>2</sub>/PAA-ADM hybrid nanoparticles exhibited anticancer effect *in vitro* and *in vivo* as well as ADM by itself. TiO<sub>2</sub>/PAA-ADM hybrid nanoparticles were potential drug carrier of anticancer agents, which to be able to control strong adverse effect of the drugs by photocatalytic self-degradation.

酸化チタンは、古くから白色顔料として使われる一方で、光電極反応による水分解に酸化チタンを用いた本多・藤島による発表以降、酸化チタンに強い紫外線を照射することで様々な化学反応を起こし、有機物の分解等に寄与する光触媒としての機能を利用する検討がされてきた。例えば、水や大気中の環境汚染物質の分解を目的とした、酸化チタンと活性炭やゼオライトなどの無機吸着剤との複合化がある。また、表面に付着している汚れや菌を分解する、いわゆるセルフクリーニング材料として着目され、光誘起親水化現象の発見と相まって建材等の分野で応用が進み、実用化が飛躍的に伸長した。他にも、医療用材料として抗菌を目的としたカテーテル表面へのコーティング検討や、抗腫瘍効果の発見によりがん治療への応用研究も取り組まれている。我々の身近に多く存在する材料のひとつであり、塗料、建材、生活用品、自動車部品、食品、化粧品や医療用材料等、その利用範囲は広く、今後さらなる実用化検討が進むものと期待されている。

光触媒作用による様々な反応は、紫外線のような強いエネルギー光を与えた時に、酸化チタン表面近傍で生じる。そのため実用化検討においては、反応効率を向上させるための様々な工夫が試みられている。例えば白金との複合化による酸化還元反応の促進や、窒素等のドーパント導入による可視光の利用等、材料の半導体特性を変えてエネルギー光の利用効率を改良する報告がある。これらは特性が変化する反面、量子効率や活性点が犠牲になる等の課題もあり、更に検討が続けられている。

一方、反応場という観点から反応効率の向上を考えた場合、いかにして対象物質と酸化チタンの接触を増やすかということが重要になる。特に溶液系で酸化チタン粒子を反応させる場合は、ナノ粒子を系中によく分散させた状態で用いることが望ましい。このような分散性のよいナノ粒子を用いることができれば、拡散によって対象物質との接触が増えるだけでなく、表面積増大に伴う反応サイトの増加、反応エネルギーの増大、電荷分離後の再結合確率低下に対する反応確率の増大等、光触媒作用による反応に有利な多くの利点を得ることを期待できるからである。そのためこれまでも酸化チタンナノ粒子の分散性向上を目的とした様々な検討がなされてきた。それぞれの方法には反応性の低下や分散安定性等の課題も存在し、その用途を限定している面がある。

また、酸化チタンは光触媒反応において対象物質に対する選択性をもっていない。対象物質と酸化チタンの接触を増やすためにはこの選択性も重要である。目的とする対象物質を選択的に表面へ濃縮すれば、反応効率のアップが期待できるためメリットも大きい。そのため、構造制御や表面修飾によって選択性を付与するような研究がいくつか報告されている。いずれも対象物質に対する接触効率を上げることで分解性能の向上に成功しているが、一方で対象物質以外と相互作用する可能性も残っている。酸化チタンにより選択性をもたせることができれば、さらなる反応性の向上や他への用途展開も期待できると考えられる。

そこで本研究は、中性条件下で安定した分散性と選択性の機能をもつ酸化チタンナノ粒子の創製と、それを用いた医療・環境分野への応用を目的とした。

本研究では、従来の表面処理技術を改良し、酸化チタンナノ粒子を中性の条件下で良好に分散させること、さらには対象物質に対する選択性の機能を付与することを検討した。また、作製したナノ粒子と光照射による抗腫瘍効果の確認や、環境汚染モデル物質の分解、さらには抗癌剤との複合化による薬効と毒性の制御検討を行い、医療・環境分野で用いることができる新たなナノ材料としての可能性を探索した。

第1章は序論であり、まず酸化チタンの特性とナノ粒子の分散性について触れ、酸化チタンナノ粒子を用いて溶液中で光触媒反応を行う場合に必要とされる要件や技術的な課題について詳しく述べた。次に、無機ナノ粒子の利用として、様々な分散性向上の方法や生体分子等との複合化による選択性の機能付加例を示し、利用分野の可能性について考察し、これらをふまえた上で、本研究の目的と意義について最後に述べた。

第2章では、非プロトン製極性溶媒であるジメチルホルムアミド (DMF) を用いて、酸化チタンとポリアクリル酸 (PAA) の反応温度や濃度の条件について検討した。ポリアクリル酸 (Polyacrylic acid, PAA) は代表的な酸化チタンの分散剤のひとつである。PAA は酸化チタンと混合することで表面に水素結合を介して結合し、静電的な反発力もしくは立体障害効果により中性条件下でも酸化チタンの分散が可能となる。このコーティングに際しては溶媒である水の pH が重要な要素であり、プロトン量の変化に伴う酸化チタン表面および PAA の電荷が結合量に影響を及ぼす。酸化チタンに接近しやすくなる PAA の等電点付近が最適な pH 条件であると同時に、水溶液中で結合させる方法の限界点でもある。そこでポリアクリル酸が溶解でき、なおかつ酸化チタン粒子が分散可能な非プロトン性極性溶媒中で混合し、加熱することで既存の方法とは異なる結合効果が得られるのではないかと考えたこのような有機溶媒中での熱アニーリング処理によって、分散性の高い酸化チタン/ポリアクリル酸ナノ粒子 (TiO<sub>2</sub>/PAA) の創製を試みた。10 g/L の酸性酸化チタンゾルに対して分子量 5000 の PAA を 4.0~10 g/L となるよう混合し、DMF 中にて熱アニーリングを行うことで良好に分散する TiO<sub>2</sub>/PAA を得ることができた。また、水溶液に置換する方法の検討や、作製した TiO<sub>2</sub>/PAA の分析を行った。DMF 中で加熱して得た TiO<sub>2</sub>/PAA に対して 2-プロパノールを 2 倍量加えることで、容易に酸化チタンが沈殿を形成し、水を加えると再び良好に分散することから、簡便な方法で溶媒交換が可能であった。さらに、熱アニーリング温度が上がるに従い、結合ポリマーの量が増加し、150 °C で 6 h 加熱することが適した条件であった。また、系中に水が存在することで熱アニーリングの反応に影響を及ぼすことが確認された。TEM 観察の結果、熱アニーリングを行うことで TiO<sub>2</sub>/PAA が 10 nm 程度増大することが示された。

第3章では、2章で作製したTiO<sub>2</sub>/PAAの分散性を評価するため、水溶液のpHに対する粒子径の変化を確認した。さらに、医療分野への応用の可能性を検討するため、生体内のような及び塩やタンパク質が共存する溶液中での粒子径の変化を確認した。特に塩濃度に対する分散性の確認においては、熱アニーリング前後での酸化チタンナノ粒子の比較検討を行った。また、TiO<sub>2</sub>/PAAにおいても酸化チタンのもつ光触媒反応の反応性を示すか確認するため、色素の分解を指標として検討を行った。その結果、TiO<sub>2</sub>/PAAはpH3~10の広い範囲で分散可能であった。また、熱アニーリング処理を行うことで、塩濃度に対する分散性が向上した。さらに、TiO<sub>2</sub>/PAAはタンパク質水溶液において経時的に安定して分散した。また、UV照射を行うと光触媒反応を生じ、MBを分解することが示された。

第4章では、培養した腫瘍細胞にTiO<sub>2</sub>/PAAを加えて、UV照射による殺傷効果の検討を行った。色素と光照射による抗腫瘍効果を利用したがん治療法は光線力学的療法(Photodynamic Therapy:PDT)と呼ばれており、用いられる色素は製剤としてすでに実用化されている。一方、酸化チタンとUV照射による抗腫瘍効果は、これまでも*in vitro*および*in vivo*において光触媒反応によって効果を得ることが確認されている。しかしながら、これらの検討には生体への投与に適した分散性の高い酸化チタンナノ粒子が必要であり、実用化への課題となっていた。3章の検討においてTiO<sub>2</sub>/PAAは生体的環境の条件下においても良好な分散安定性を示すことを確認している。酸化チタンを生体に投与するためには分散性と光触媒反応による抗腫瘍効果を両立させる必要があることから、本章ではTiO<sub>2</sub>/PAAの抗腫瘍効果について確認検討を行った。その結果、TiO<sub>2</sub>/PAA存在下でUV照射を行った細胞は形態が崩壊し、照射エネルギー強度の増加とともにコロニー形成率が抑制された。また、TiO<sub>2</sub>/PAAの濃度は0.1g/Lより0.5g/Lにおいて抑制効果が高かった。TiO<sub>2</sub>/PAA存在下でUV照射を行った細胞は、照射エネルギー強度の増加とともに殺傷効果を示すことがATPアッセイによっても確認された。

第5章では、TiO<sub>2</sub>/PAAのカルボキシル基を介して抗体を導入したTiO<sub>2</sub>/PAA-Abを作製し、分離精製後に表面プラズモンセンサを用いて抗原に対する結合評価を行った。3章の検討結果から、TiO<sub>2</sub>/PAAは従来法の課題である分散性と光触媒反応における反応性のバランスを両立することができ、溶液中での様々な応用検討に用いることが可能である。そこで、このTiO<sub>2</sub>/PAAに生体分子である抗体を複合化してさらに機能を付与することを検討した。酸化チタンに結合したPAAのカルボキシル基を介して抗体のアミノ基を結合することを試みる。カルボキシル基とアミノ基の結合には、ペプチド合成等で一般的なカルボジイミドによる活性化反応を用いた。水溶性カルボジイミドであるEDCによってカルボキシル基のスクシンイミド化を行い、さらに副反応の抑制のためNHSを混合して行った。また、エタノールアミンによって未反応のスクシンイミド基のブロック処理を行った。検討の結果、TiO<sub>2</sub>/PAAのカルボキシル基活性化によって抗体等の分子を結合可能であった。また、作製したTiO<sub>2</sub>/PAA-Abは溶液中で良好な分散性を示し、ゲルろ過操作によって容易に分離・回収が可能であった。

次に、上記方法で作製したTiO<sub>2</sub>/PAA-AbをHPLCによって分離精製後に、表面プラズモンセンサを用いて抗原(ヒト血清アルブミン(HSA))に対する結合評価を行った。対照としてストレプトアビジン(SA)を結合したTiO<sub>2</sub>/PAA(TiO<sub>2</sub>/PAA-SA)を用いた。SPRセンサ表面に結合した抗原に対し、TiO<sub>2</sub>/PAA-Abは強い相互作用を示すことが確認された。さらに、環境汚染物質として17β-エストラジオールを対象とし、TiO<sub>2</sub>/PAA-Abを用いて光触媒反応による環境汚染物質の分解を検討した。TiO<sub>2</sub>/PAA-E2AbとE2の混合溶液に対しUV照射を行うとE2の吸着量増大と分解を生じ、選択性をもつ光触媒として機能することが示唆された。

第6章では、TiO<sub>2</sub>/PAAのカルボキシル基を介して抗癌剤(アドリアマイシン、ADM)を結合し、光によって薬効と毒性の制御を行う検討を行った。ADMはアントラサイクリン系抗腫瘍薬の代表的薬剤として1960年代から臨床に広く使用されてきた抗腫瘍性薬剤の1つである。アントラサイクリン系抗腫瘍薬の分子はほぼ平面構造を有しており、隣接する核酸塩基対間へのインタカレーションが起こると考えられる。ADMの抗腫瘍作用はこのようなDNAとの相互作用に基づくと考えられている。一方、核酸塩基対間へのインタカレーションは正常細胞においても起こると考えられ、大きな副作用の原因となっている。さらに生体内においてADMはフェリチンから鉄を引き抜いて細胞膜の脂質過酸化を惹起したり、ペルオキシダーゼとの反応によってADMは直接ミトコンドリア膜酵素の不活性化を引き起こし、エネルギー代謝の変調を招来して心臓毒性の発現につながるという報告もある。このような副作用は抗癌剤を使用する上で重要な問題であり、患者のQOLの観点からもできるだけ副作用が低減されることが望まれている。そこで、TiO<sub>2</sub>/PAAのカルボキシル基を介して抗癌剤(アドリアマイシン、ADM)を結合し、光によって薬効と毒性の制御を行う検討を行った。ADMをTiO<sub>2</sub>/PAAに対してアミド結合で複合化したTiO<sub>2</sub>/PAA-ADMは水溶液中で良好に分散した。UV照射によってTiO<sub>2</sub>/PAA-ADMは退色し、結合したADMが分解されることが示唆された。また、TiO<sub>2</sub>/PAA-ADMはADMと同様に*in vitro*および*in vivo*において抗癌作用を示した。これらの結果を踏まえ、ラット舌粘膜モデルを用いて光スイッチによる毒性の制御を試みた結果、TiO<sub>2</sub>/PAA-ADMを投与後に光照射を行うことで毒性が低減されることが確認された。

最後に総括として、本研究で得られた知見をまとめ、成果と課題についてそれぞれ述べた。

## 学位論文審査結果の要旨

提出論文について平成 20 年 1 月 7 日の予備審査、さらに同 2 月 5 日の口頭発表および質疑応答の結果を踏まえ、同日開催した論文審査委員会において下記のとおり判定した。

酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )ナノ粒子は中性付近に等電点をもち水溶液中で凝集を起こすため、粒子を溶液中での光触媒反応等に用いるためには分散性の向上が必要である。ポリアクリル酸 (PAA) を酸化チタンゾルに対して非プロトン性極性溶媒中で熱アニリング処理することで、分散性の高い PAA コート酸化チタンナノ粒子 ( $\text{TiO}_2/\text{PAA}$ ) を作製した。作製した  $\text{TiO}_2/\text{PAA}$  は広い pH 範囲において分散可能であり、また高塩濃度溶液に対する分散安定性も非常に優れている。さらに、 $\text{TiO}_2/\text{PAA}$  がもつカルボキシル基を介して抗 17 $\beta$ -エストラジオール抗体をアミド結合させることにより、17 $\beta$ -エストラジオールへの特異的な結合能を付与できた。これを用いて紫外線照射による 17 $\beta$ -エストラジオールの分解を行い、高選択的な光触媒反応が起こることを示した。さらに医療分野へ応用することを目的とし、紫外線照射による  $\text{TiO}_2/\text{PAA}$  の抗腫瘍活性さらに抗癌剤であるアドリアマイシン (ADM) を結合した  $\text{TiO}_2/\text{PAA}$  ( $\text{TiO}_2/\text{PAA-ADM}$ ) を用いて、光スイッチングによる薬効と毒性の制御が可能であることを示した。

以上の研究成果の学術的な価値は極めて高く、博士(工学)論文に十分値するものと判断した。