

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18500362

研究課題名（和文）ヘルスケアにつなげる光触媒型活性酸素パッチの開発

研究課題名（英文）Development of a patch test kit to estimate ROS sensitivities in human body

研究代表者

甲谷 繁 (KOHTANI SHIGERU)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：00242529

研究成果の概要：本研究では、ヒト個人の活性酸素感受性をトータルかつ簡便に測定するための活性酸素パッチの開発において、二つの光触媒材料の適格性を評価した。酸化チタン光触媒はヒト表皮細胞への毒性がなく安全な材料であるが、可視光下で利用できないという欠点がある。一方、バナジン酸ビスマス光触媒は可視光下での活性酸素発生能に優れた特長を有する半面、ヒト表皮細胞への毒性が強い。結局、両者は相反する特性を持つことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	540,000	4,140,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：医用材料・光触媒・活性酸素

1. 研究開始当初の背景

生体内で生じる活性酸素は、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を起源として過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などが知られており、老化やがん化の原因として知られている。ヒトをはじめとする生体は酸素を利用してエネルギーを得ている以上、有害な活性酸素の生成は避けることができないために、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) をはじめとする活性酸素除去系を獲得、進化させてきた。活性酸素に対する応答は個人の老化やがん化のリスクを推定する上で貴重なデータとなるはずだが、精度はともかく、手軽に生体中の活性酸素を測定したり、DNA中の傷害の量を測定できる系は提案あるいは

実用化されているものの、個人それぞれの活性酸素に対する抵抗性を測定する系の報告はなかった。

一方、光触媒は、表面に吸着した水と酸素に対する酸化還元反応を介して、活性酸素を人工的に発生させることができる (図1)。

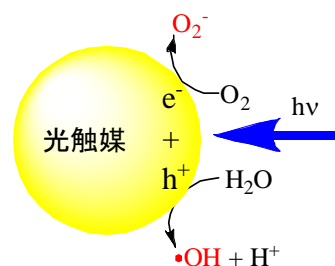


図1
光触媒からの
活性酸素発生

中でも、我々がこれまでに光触媒としての有用性を確認してきたバナジン酸ビスマス (BiVO_4)をはじめとする可視光応答型光触媒は、皮膚に有害な紫外線を当てることなく、害の少ない可視光で活性酸素を放出することができる点において注目に値する。つまり、この型の光触媒をヒトの皮膚に貼り付けたうえで可視光を照射すると、活性酸素がその表面から放出されるので、活性酸素の感受性に対する個体差を簡便に評価するのに役立つであろうと予想した。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト個人の持つ活性酸素感受性をトータルかつ簡便に測定できる系を確立するために、アレルギーパッチテストのように各種光触媒が活性酸素の感受性を簡単にテストできる系へと適用可能であるかを化学的な観点と生物学的な観点の両面から検討した。すなわち、 BiVO_4 と酸化チタン (TiO_2) および TiO_2 を可視光応答性に改変した光触媒 ($\text{TiO}_2\text{-VIS}$: 某社提供) の3種類の光触媒材料について、可視光下での活性酸素発生能を化学的に評価し、また、光の照射の有無に対して、ヒト表皮細胞に与える毒性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 光触媒の活性酸素発生能の化学的評価

光触媒への光照射は、室温下 pH12 水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液中にて行った。発生した O_2^- と $\cdot\text{OH}$ の分析には、以下に示すルミノール化学発光法とスピントラップ蛍光法をそれぞれ用いた。

<ルミノール化学発光法>

O_2^- とルミノールとの反応で発生する化学発光の強度を測定し、 O_2^- 発生量を評価した。

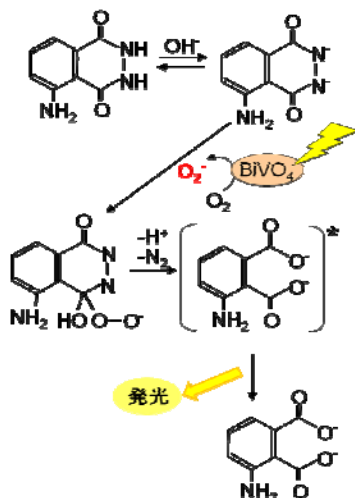


図2 O_2^- 検出のためのルミノール化学発光法

<スピントラップ蛍光法>

$\cdot\text{OH}$ とテレフタル酸と反応して生成する蛍光性の T A O H を定量することにより、 $\cdot\text{OH}$ の発生量を評価した。

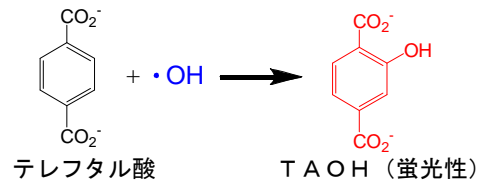


図3 $\cdot\text{OH}$ 検出のためのスピントラップ蛍光法

(2) 光触媒のヒト細胞に対する毒性評価

ヒト表皮株化細胞 HaCaT を光触媒粉末を直接添加した10%牛胎児血清添加 DMEM 培養液とともに培養し、14日後のコロニー数を計数して、活性酸素発生のない無毒性のアルミナ粉末 (対照) と比較して毒性を評価した。なお、培養法として以下の2法を比較検討した。

(第1法) シャーレにあらかじめ細胞を付着させ、その上から光触媒粉末を懸濁した培養液 (懸濁培養液) を加えて培養した系 (I 群)。

(第2法) 細胞が培養液に浮遊した状態で、上記懸濁培養液を加えて培養した系 (II 群)。

4. 研究成果

(1) 光触媒の活性酸素発生能の化学的評価

図4は、代表的な光触媒である酸化チタン ($\text{TiO}_2\text{-P25}$) と可視光応答型に改変した酸化チタン ($\text{TiO}_2\text{-VIS}$) および BiVO_4 の各光触媒懸濁液から観測されたルミノール化学発光強度の時間変化を示す。

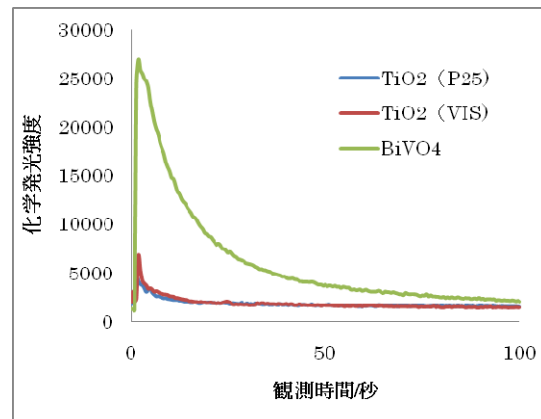


図4 光触媒懸濁液の化学発光強度の時間変化

BiVO_4 では明らかに他の二つよりも強い化学発光が観測されている様子が分かる。なお、これら光触媒懸濁液から観測された化学発光は、 O_2^- を特異的に消去するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の存在で消失する

ことから、観測された発光シグナルが O_2^- 由来であることを確認している。従って、 $BiVO_4$ から発生する O_2^- の量は、 TiO_2 -P25 と TiO_2 -VIS のそれよりもそれぞれ約8倍と2倍も多いことが明らかとなった。さらに、 TiO_2 -VIS からの O_2^- 発生量は、従来の酸化チタン TiO_2 -P25 のそれよりも2倍多く発生するといえる。

スピントラップ蛍光法により OH ラジカルの生成量を比較すると、 $BiVO_4$ からの発生量は、 TiO_2 -P25 と TiO_2 -VIS の光触媒懸濁液からのそれよりも3桁も小さく、 $BiVO_4$ からの OH ラジカルの発生はほとんどないと言える。一方、 TiO_2 -VIS からの OH ラジカル産生は、 TiO_2 -P25 よりも少ないが、かなりの発生量が観測された。

(2) 光触媒のヒト細胞に対する毒性評価

従来から汎用されている酸化チタン(TiO_2 -P25) 光触媒は、光を照射しない条件下でヒト培養細胞に対する毒性が全くないことを確認できた。そこで、次に可視光応答型に改良した TiO_2 光触媒 (TiO_2 -VIS) について、ヒト細胞毒性について詳細に検討を加え、このものが活性酸素パッチの材料として適当であるかどうかを評価した。コントロールとして使用したアルミナや TiO_2 -P25 が光照射時にも未照射時にも全く毒性を示さなかったのに対して、数日間培養液に分散させた TiO_2 -VIS の場合、光を全く照射しない条件下であっても、ヒト培養細胞に対する毒性が発現してくることを見出した。これは、 TiO_2 を可視光応答型にするために TiO_2 結晶内に微量にドーブした材料が、培養液内にゆっくりと溶出して毒性を現わすものと考えられる。これらの事実から、 TiO_2 -VIS 光触媒は、活性酸素を発生しなくてもそれ自身がヒト細胞に対して直接毒性を与える危険性があることが分かった。代表的なコロニー形成の

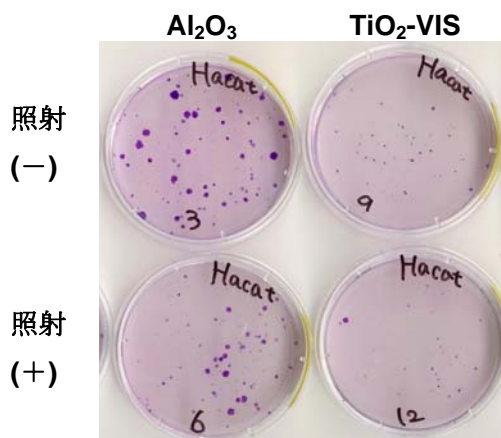


図5 ヒト表皮細胞に対する TiO_2 -VIS の毒性効果

写真を図5に示す。コントロールの Al_2O_3 を添加した状態では多数の紫に色に染まったコロニーが観察される。一方全く同じ条件下で触媒を添加した状態ではほとんどコロニーが形成されていない(図5参照)。

続いて $BiVO_4$ 光触媒のヒト細胞毒性について検討した結果、光を全く照射しない条件下においてもヒト培養細胞に対する強い毒性が観察された。従来汎用されているコロニー形成法では単個細胞に対して処理するために毒性が強く現れた可能性を考え、細胞を増殖させてシート状になった時点で毒性を調べても、やはり同様の結果であった。これらの事実から、 $BiVO_4$ 光触媒は、活性酸素を発生しなくても、それ自身がヒト細胞に対して直接毒性を与える可能性が高いことが分かり、現時点で活性酸素パッチの材料として適当とは言えないとの結論に達した。

(3) 光触媒材料の総合評価と今後の展望

活性酸素パッチへの適用を想定した場合、本研究で用いた3種類の光触媒材料の特性の比較を以下の表1にまとめた。

表1 光触媒材料の特性比較

	TiO_2 -P25 (従来型)	TiO_2 -VIS (可視光型)	$BiVO_4$
可視光応答	なし	弱	強
O_2^- 発生量	小	中	大
OH 発生量	大	小	なし
細胞毒性	なし	徐々に発現	強

化学的な観点から言えば、活性酸素パッチに最も適しているのは、 $BiVO_4$ であるといえる。しかしながら、この材料はそのままではヒト表皮細胞への毒性が強く、活性酸素パッチへと適用することができない。それに対して、従来型の TiO_2 -P25 は、ヒト表皮細胞への毒性が全くないので、紫外光が存在しない環境で安全に使用できる材料といえる。しかし、 TiO_2 -P25 は紫外線によって活性酸素の発生を誘発する物質であり、ヒトの皮膚への紫外線照射の影響を考えると、そのまま活性酸素パッチとして利用することはできない。可視光応答型の TiO_2 -VIS は、 $BiVO_4$ と TiO_2 -P25 のそれぞれの欠点を克服できる材料として期待していたが、可視光を当てるとOHラジカルの産生を伴い、スーパーオキシドアニオンによる活性酸素感受性の評価を困難なものにする予想される。さらに、 TiO_2 -VIS は光を当てなくてもヒト表皮細胞への毒性を徐々に発現するといった欠点があることも分かった。

活性酸素パッチの開発に向けての今後の方向性としては、 BiVO_4 のヒト細胞毒性の原因を明らかにし、毒性を軽減する方策を講じること。一方で、 $\text{TiO}_2\text{-VIS}$ については、 TiO_2 結晶内にドーパした材料が溶けださないように工夫を加えること、さらにOHラジカルの産生を抑えるように工夫すること、などが挙げられる。

最後に、本研究により得られた重要な知見として、 BiVO_4 は、可視光照射下でOHラジカルを産生することなしにスーパーオキシドアニオン (O_2^-)を大量に発生するという特長を有することが明らかとなった。この特長を生かすとするなら、レーザー等の可視光源と共に使用することで、光強度で O_2^- 発生量を自由自在に制御でき、かつ O_2^- 発生領域を非常に狭い範囲に限定するといった新しい応用展開が考えられる。したがって、 BiVO_4 は、生命科学や医学等の研究分野でユニークな O_2^- 発生源としての利用価値が大いに期待できる材料といえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

S. Kohtani, K. Yoshida, T. Maekawa, A. Iwase, A. Kudo, H. Miyabe, R. Nakagaki; Loading effects of silver oxides upon generation of reactive oxygen species in semiconductor photocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10(20)**, 2986-2992 (2008), 査読あり

[学会発表] (計 4件)

① 甲谷繁、吉岡英斗、宮部豪人；酸化チタンによる芳香族ケトン類の光触媒的還元反応 (第一報)
日本薬学会第129年会、2009年3月26-28日、国立京都国際会館。

② 横手悠美、岩瀬顕秀、齋藤健二、甲谷繁、工藤昭彦； BiVO_4 における活性酸素種生成と光触媒特性の関連性
日本化学会第89春季年会、2009年3月27-30日、日本大学船橋キャンパス。

③ 甲谷繁、吉田宗弘、前川敏康、岩瀬顕秀、工藤昭彦、宮部豪人、中垣良一；光触媒からの活性酸素発生に対する酸化銀種の担持効果
日本薬学会第128年会、2008年3月26-28日、パシフィコ横浜。

④ 甲谷繁、吉田宗弘、前川敏康、中垣良一； BiVO_4 光触媒からの活性酸素発生に及ぼす酸化銀と過酸化銀の担持効果
2006年光化学討論会、2006年9月10-12日、東北大学。

[その他]

ホームページ等

<http://www2.huhs.ac.jp/~h070012h/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲谷 繁 (KOHTANI SHIGERU)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：00242529

(2) 研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：20232275

(3) 連携研究者

高橋 光信 (TAKAHASHI KOHSHIN)

金沢大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：00135047

勝田 省吾 (KATSUTA SHOGO)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：40110613