

2011年度 生物工学奨励賞（照井賞）受賞



酸化チタン粒子のバイオ応用

荻野 千秋



Multidisciplinary studies of inorganic nanoparticles and biomolecules for cell injury

Chiaki Ogino (*Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University, Rokkoudai-chou 1-1, Nada, Kobe 657-8501*) *Seibutsu-kogaku* 90: 110-114, 2012.

はじめに

二酸化チタン (TiO_2) は光触媒として認知されており、390 nm 以下の紫外線 (3.2 eV 以上のエネルギー) を照射することで活性酸素種を生成することが明らかとされている¹⁾。 TiO_2 の価電子帯の電子が紫外線で伝導帯に励起されると、還元力の強い電子と非常に酸化力の強い正孔が生成する (図1)。これらの電子と正孔から生成する種々の活性酸素種は非常に強い酸化力を示し、化学薬品やバクテリアなどに対して分解作用を示すために、有害物質の分解なども試みられている²⁾。一例として、病院などの公衆衛生維持を目的として、壁・床などを TiO_2 でコーティングして、ブラックライト (紫外光ランプ)

を照らすだけで殺菌処理を行うことを可能としている。このように、 TiO_2 の特性を利用した製品群はすでに多方面で利用されている。

しかしながら、紫外線照射では遮蔽物が存在するような場合や、体内などの深部への照射などの場合では照射効率が低下し、活性酸素種の発生頻度 (すなわち酸化分解効率) が低下することが明らかである。そこで、2000年ごろから筆者と金沢大学の清水宣明教授は、 TiO_2 の励起方法として別の手段の模索を行い、 TiO_2 に対して超音波照射法を行うことで、紫外線照射と同様に活性酸素種を発生させることができる条件を見出すことに成功した^{3,4)}。最初、粒径2 mm のセラミック状に焼成されたペレット状 TiO_2 を加えたメチレンブルー色素溶液に低周波超音波を照射し、メチレンブルーの青色色素が分解される現象を発見した。 TiO_2 の対照実験として酸化アルミニウム (Al_2O_3) を用いて同様の超音波照射実験を行っても色素は青いままであり、この現象は超音波照射時に TiO_2 にのみ特異的に観察された (図2)^{5,6)}。

筆者らはこの「二酸化チタン/超音波照射法」によるラジカル発生を、 TiO_2 粒子をナノ粒子化することでバイオテクノロジー分野での応用が可能になると考え、本領域の研究を行うに至った。本稿では、まず「二酸化チタン/超音波照射法」に関して環境応用事例を紹介する。そして、従来法の光触媒の励起法である紫外線照射法との比較によって、がん細胞への照射がどのような損傷効果をもつか、筆者らの研究成果を紹介したい。さらに、紫外線や超音波照射に代わる新しい粒子励起方法 (放射線照射) に関しても最近の研究成果を紹介したい。

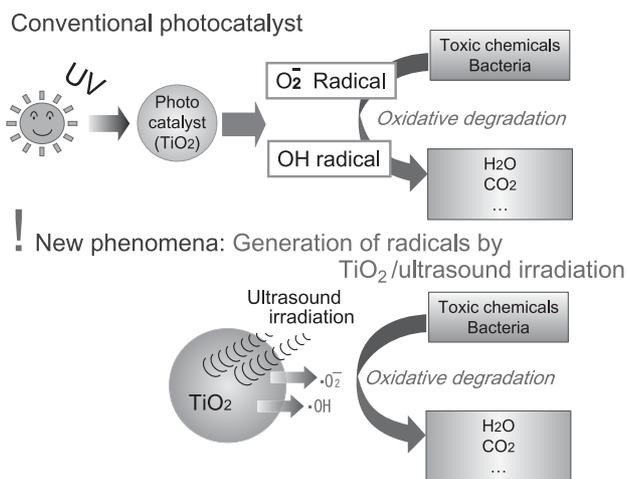


図1. 二酸化チタンの光触媒機能

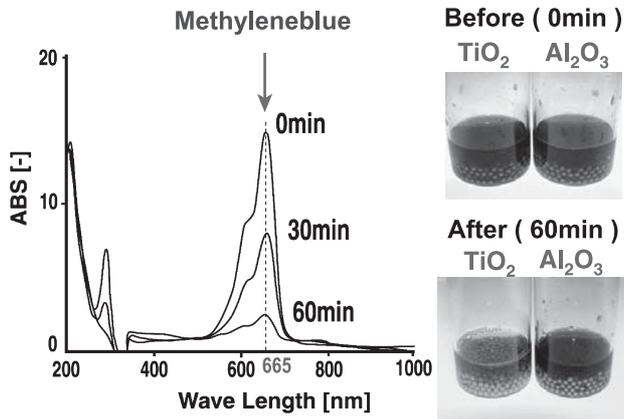


図2. 二酸化チタン/超音波照射法

「二酸化チタン/超音波照射法」の環境分野への応用

近年、強力な毒性を示す大腸菌O157株、そして公衆浴場などで報告されている日和見感染原因菌であるレジオネラなど、我々の身近なところにさまざまな有害微生物が報告されつつある。そのため優れた殺菌プロセスの開発が必要とされている。前述の様に、TiO₂を用いた殺菌方法では、TiO₂に390 nm以下の光を照射するとその表面に非常に強い酸化力を有するラジカルが生成し、有機化合物・細菌・ウイルスなどを無機物にまで分解することが可能である。しかしこの特徴は水の浄化などを考えた際は、光の到達距離に制限があり、処理槽のすべての部位に光を照射することは困難であり必ずしも利点とはならない。そこで、モデル微生物としてレジオネラを用いて「二酸化チタン/超音波照射法」による殺菌検討を行った⁷⁾。超音波照射は出力200 W、発振周波数39 kHzで実施した。また、超音波照射による装置内水温の上昇を制御するために、冷却装置を用い水温を20°Cに保った。また、照射中の光照射影響（光触媒効果の排除を目的として）がないように装置上部に蓋を設置することで、超音波のみのTiO₂への効果を解析した。48時間培養したレジオネラ懸濁液を100倍希釈し、TiO₂粒子(φ = 2 mm, 10 g)の入ったバイアル瓶へ10 ml分注し、この試料に超音波照射(0, 30, 60分)を行った後、サンプルをプレートに蒔いた。

そのプレートを培養器にて37°Cで72時間培養し、超音波照射前と照射後のコロニーを観察した(図3)。その結果、超音波照射30分ではコロニー数が著しく減少し、照射60分では完全に殺菌され、まったくコロニーが形成されなかった。以上から、筆者らが見いだした「二酸化チタン/超音波照射法」は紫外線照射によるラジカル発生方法と同様に、細菌の殺菌に大きく貢献でき

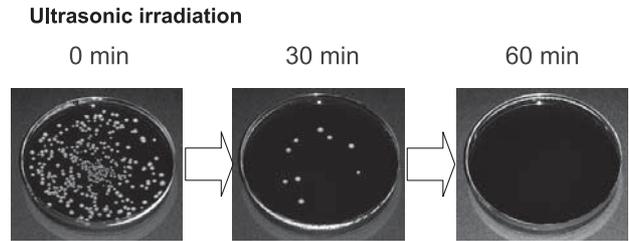


図3. 「二酸化チタン/超音波照射法」による殺菌

ることが明らかとなった。また、大腸菌を用いた検証実験により、殺菌された細菌においては、染色体DNAが最終的には超音波照射法によって完全に断片化されてしまうことも明らかとなった⁸⁻¹⁰⁾。

EGFR修飾二酸化チタンによるがん細胞損傷： 二酸化チタン/紫外線照射による粒子刺激

ナノ粒子はがん治療やドラッグデリバリーシステムにおいて、目覚ましい進歩を遂げている。現在治療用ナノ粒子としては、プラチナ(白金)、酸化亜鉛(ZnO)、量子ドット(QDs)、リポソームなどが研究されているが、その中でもTiO₂ナノ粒子は紫外線(UV)の照射によりラジカルを発生し、がん細胞を障害できる優れたナノ粒子である。そこで、本研究では、TiO₂ナノ粒子を用いてがん細胞を特異的に死滅させる技術の開発を目指した。本研究の戦略を図4に示す。TiO₂ナノ粒子をがん細胞特異的に集積させ、そこへ紫外光や放射線などのエネルギーを加えることで局所的にラジカルを発生させると、がん細胞を特異的に死滅させることができると期待される。本研究では、TiO₂ナノ粒子のラジカル発生能の評価およびがん細胞を標的とするTiO₂ナノ粒子の作製、そのがん細胞特異的障害性について検討した¹¹⁾。

TiO₂ナノ粒子として、平均粒径30 nmのSTS-01、10 nmのSTS-100(石原産業製)を用いた。まず、TiO₂ナノ粒子の中性付近での凝集を防ぐため、粒子の表面にポリアクリル酸(PAA)を修飾したポリアクリル酸修飾TiO₂(PAA-TiO₂)ナノ粒子を作製した¹²⁾。さまざまな

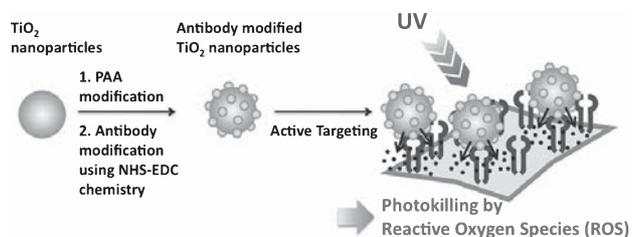


図4. 光触媒を用いた細胞損傷戦略

濃度に調整したこれらの粒子にUVを照射し、そのラジカル発生量はAminophenyl Fluorescein (APF) の蛍光を用いて評価した。がん細胞標的化タンパク質として、多くのがん細胞に過剰発現している上皮増殖因子受容体(EGFR) に対するラクダ由来抗EGFR抗体を用いた。PAA-TiO₂表面に存在するカルボキシル基とタンパク質内のアミノ基を用いて、タンパク修飾に一般的に用いられるアミノカップリング法によりPAA-TiO₂に抗EGFR抗体を固定化し、抗EGFR抗体修飾TiO₂ (PAA-TiO₂/Ia) を作製した。そしてPAA-TiO₂/IaのHeLa細胞特異性およびUV照射による影響を調べるため、蛍光顕微鏡により生細胞・死細胞の判別を行った。生細胞はCalcein AMにより緑色、死細胞はEthidium homodimer-1により赤色の蛍光で観察評価した。

まず、調製した抗EGFR抗体修飾TiO₂の粒子をSDS-PAGEで評価したところ、抗EGFR抗体が固定化された粒子が濃縮ゲル相に凝縮されていることが確認できた。固定化後の抗EGFR抗体は抗原結合活性を有していることが確認され、また固定化後の粒子のラジカル発生能も確認された。続いて、抗EGFR抗体修飾TiO₂ (PAA-TiO₂/Ia) ナノ粒子をHeLa細胞に添加し、UV照射を行った(図5)。UV照射量はPAA-TiO₂/Iaが最も多量のラジカルを発生する3 J/cm²とし、照射直後に観察を行った。UV照射とPAA-TiO₂/Iaを併用した場合にのみ、赤色の死細胞が観察されたことから、PAA-TiO₂/Iaはがん細胞特異性を有し、UV照射により発生したラジカルが細胞の生存に影響を与えることが確認された。また、UV照射のみ、TiO₂添加とUV照射、TiO₂と抗EGFR抗体の混合物を添加しUVを照射した細胞では、死細胞はほとんど見られなかった。さらにUV照射量を1 J/cm²とし、PAA-TiO₂/Ia添加24時間後に観察した場合も、死細胞

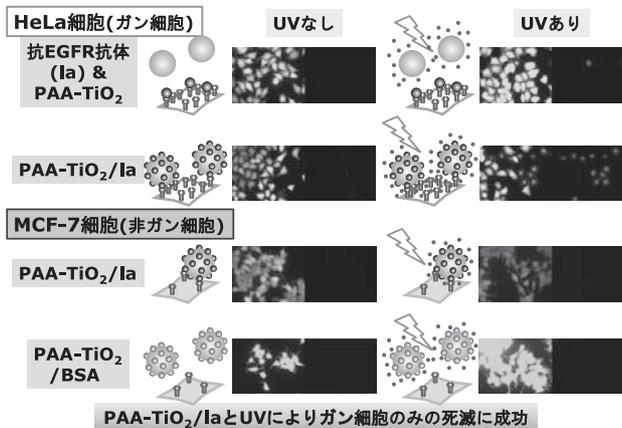


図5. ターゲティング機能を有するTiO₂ナノ粒子による細胞損傷

が観察された。

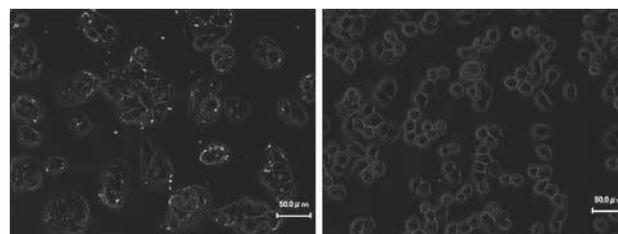
以上よりTiO₂ナノ粒子に抗体を固定化し、がん細胞特異性を付加する技術の開発に成功した。また、作製したナノ粒子とUVの照射を併用することで、がん細胞のみを特異的に死滅させる技術の開発に成功した。

肝細胞認識ペプチド修飾二酸化チタンによるがん細胞損傷： 二酸化チタン/超音波照射による粒子刺激

前述のように、筆者らはTiO₂粒子が紫外線のみならず、超音波照射によっても活性酸素種を生成することを見いだしている。そこで本研究では、B型肝炎ウイルス由来の肝細胞認識タンパク質(preS1/S2)を固定化したTiO₂ (preS1/S2-TiO₂) ナノ粒子を用いて、*in vitro*での培養がん細胞への取込み、およびTiO₂と超音波照射法によるがん細胞損傷メカニズムを検討した¹³⁾。

免疫染色法によってpreS1/S2固定化TiO₂の肝細胞認識能を調べた。preS1/S2固定化TiO₂を培養細胞に添加した場合、ヒト肝臓がん由来細胞であるHepG2において強い赤色蛍光を示した(図6)。また、preS1/S2タンパク質を添加した場合も、同じく赤色蛍光を示した。一方で、ヒト大腸がん由来細胞であるWiDrの場合、preS1/S2固定化TiO₂およびpreS1/S2タンパク質のいずれを添加しても赤色蛍光は示さなかった(図6)。よって、TiO₂ナノ粒子表面に修飾したpreS1/S2タンパク質は、肝細胞に特異的な領域を有するタンパク質で、かつpreS1/S2固定化TiO₂は肝細胞に特異的に取り込まれることが明らかとなった。

以上の検討を踏まえ、preS1/S2固定化TiO₂ナノ粒子に対して、「二酸化チタン/超音波照射法」によって生成されるラジカル量の超音波照射出力による影響を調べた。0~1.0 [W/cm²]の間においては、粒子無添加の時と比較して、PAA-TiO₂を添加した時の方が生成されたラジカル量が増加することが明らかとなった。一方、1.0 W/cm²以上の出力においては、PAA-TiO₂を添加した時の方がラジカル生成量は抑制された。また、粒子無添加



HepG2

WiDr

図6. 肝細胞へのTiO₂ナノ粒子のターゲティング

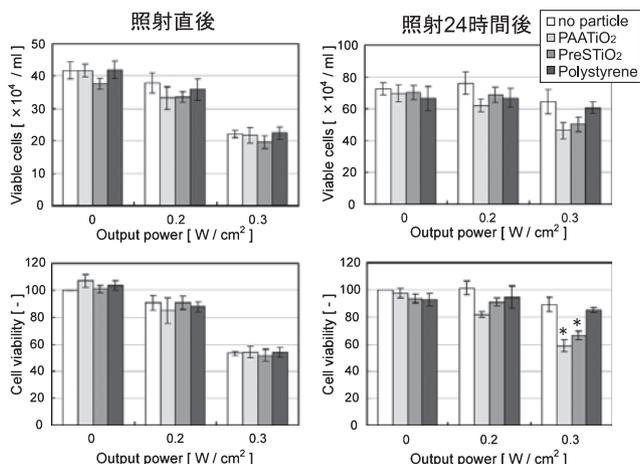


図7. 「二酸化チタン/超音波照射法」による細胞損傷

の際、出力に依存してラジカル生成量は増加した。これらのことから、今回の照射条件においては、低出力の際に「二酸化チタン/超音波照射法」の細胞損傷効果が発揮できる可能性を見いだした。そして、preS1/S2固定化TiO₂ナノ粒子の比較対照に、表面にカルボキシル基を付与し単分散可能なPAA-TiO₂およびポリスチレン粒子（粒径100 nm）を用い、培養細胞中での損傷効果を検討した（図7）。

照射直後において、どの粒子を添加した際にも生細胞数はほぼ一定であった。それに対して、照射後24時間後においては、PAA-TiO₂ナノ粒子およびpreS1/S2固定化TiO₂ナノ粒子を添加し0.3 [W/cm²]の出力で超音波を照射した場合、ポリスチレン粒子を添加した場合と比較して細胞増殖の抑制効果が得られた。これにより、照射直後においては、「二酸化チタン/超音波照射法」により生成される活性酸素種（OHラジカル）は細胞を壊死させるほどの酸化力はなく、むしろ細胞数の減少は超音波エネルギーの効果の方が大きかったと考えられる。ただ、照射後24時間後においてTiO₂を添加し超音波を照射した細胞が最も増殖の抑制効果が見られたことは、24時間の間にOHラジカルの酸化力による細胞への影響により、アポトーシスによる細胞死が進行している可能性が考えられる¹⁴⁾。

過酸化チタンナノ粒子による新しい細胞損傷方法の提案： 過酸化チタン—放射線励起による粒子刺激

前述の項まで、TiO₂ナノ粒子の光触媒活性、および超音波照射法による活性酸素種発生の現象を利用したが、がん細胞損傷効果に関して検討を行ってきた。しかしながら筆者は、紫外線照射、超音波照射よりも透過度の高い外部刺激によってナノ粒子を励起し、活性酸素種を生成

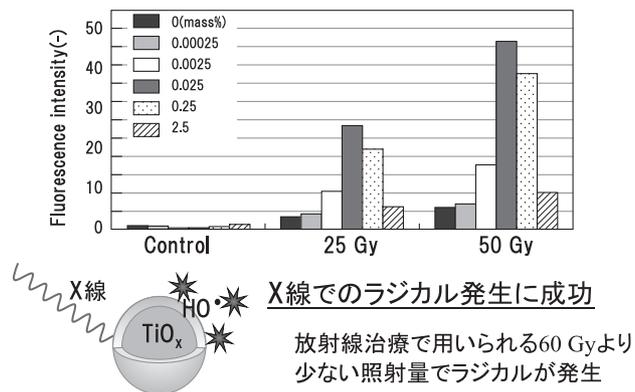


図8. 過酸化チタンナノ粒子における活性酸素種生成

することが可能となれば（図1）、体内の深部に存在するがん組織に対して治療効果を発揮することが可能になると考えた。そこで本研究では、生体に対して非常透過度の高い放射線を外部刺激手法として採用し、放射線照射によって活性酸素種を生成する粒子を探索し、がん治療へと応用することを目指した。

まず、放射線照射によって活性酸素種を発生する新しい無機粒子の探索を行った。さまざまな無機粒子を調製し、放射線照射によるラジカル発生能を評価した。なお照射により発生した活性酸素種は、APFを用いてその生成量を相対評価した。結果、過酸化チタンナノ粒子において、放射線の照射量に応じて活性酸素の生成が増加することを見いだした（図8）。放射線照射量の増加とともにAPFの蛍光が増加し、また粒子濃度が増加するとともにAPFの蛍光が増加した。以上より、過酸化チタンナノ粒子は放射線照射によりラジカルを発生することを新たに見いだした¹⁵⁾。

過酸化チタンナノ粒子は、その表面の特性により純水な溶液中では分散しているが、生理食塩水などのイオンが存在する溶液中では凝集して沈殿してしまい、生体内への応用は難しい。そこで、前述同様、表面修飾剤としてPAAを用い、表面修飾を行った。この方法により、過酸化チタンナノ粒子の表面をPAA高分子が覆う形になり、塩存在下での凝集を防ぐことが可能となった。修飾した過酸化チタンナノ粒子は、生理食塩水や培地中에서도分散状態を保ち、沈殿しないことが明らかとなった。また、これらPAAを修飾した過酸化チタンナノ粒子の放射線照射に同様に放射線を照射したところ、粒子濃度および照射強度に応じてラジカルを発生することも確認できた。以上より、生体条件下でも凝集せず分散性を保っている粒子を創製することに成功した。そのラジカル発生量は未修飾のチタンと比較してわずかに減少していたが、これはPAAの影響によるものと考えられる。

現在、培養細胞を用いた本手法による損傷効果を検討している状況であり、細胞損傷効果に関しては追って論文報告を行いたいと計画している。今後、前述の様なタンパク質修飾によるターゲティング能力の付与などを行い、より細胞損傷効果の効果的な発生基盤技術を構築したいと考えている。

おわりに

以上述べてきたように、筆者らは無機ナノ粒子であるTiO₂ナノ粒子の医療応用に向けて、励起方法の探索、そしてナノ粒子材料の探索を推進してきた。これまでのTiO₂の研究をベースに、今後、さらなるナノ粒子の開発を推進し、今後は*in vivo*の治療効果に関しても医学研究者との連携を深めより詳細な検証を行い、がん治療に向けた基盤技術の確立を進めたいと考えている。

本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科（1999年～現在）、ならびに神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻（2007年～）において行われたものであり、多大な御指導、御鞭撻を賜りました。福田秀樹先生（神戸大学学長）、近藤昭彦先生（神戸大学大学院工学研究科教授）、清水宣明先生（金沢大学環日本海域環境研究センター教授）に心から御礼申し上げます。また、本研究を行うに当たり御助言、御協力を頂きました。黒田俊一先生（名古屋大学大学院農学研究科教授）、田中勉先生（神戸大学大学院工学研究科准教授）、佐々木良平先生（神戸大学大学院医学研究科准教授）、仁宮一章先生（金沢大学環日本海域環境研究センター助教）、梅津光央先生（東北大学大学院工学研究科准教授）、上田政和先生（慶應義塾大学医学部准教授）、そして曾根崎修司博士および金平幸輝博士（TOTO株式会社）に深く御礼申し上げます。そして、一緒に研究を行ってくれた神戸大学と金沢大学の所属研究室の学生の皆さんに感謝申し上げます。本研究の一部は、文部科学省、厚生労働省、科学技術振興機構（JST）、新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）からの助成を受けて行われました。

文 献

- 1) Fujishima, A. and Honda, K.: *Nature*, **238**, 37-38 (1972).
- 2) Ogino, C., Kanehira, K., Sasai, R., Sonezaki, S., and Shimizu, N.: *J. Bioeng. Biosci.*, **104**, 339-342 (2007).
- 3) Shimizu, N., Ogino, C., Mahmoud, F. D., Ninomiya, K., Fujihira, A., and Sakiyama, K.: *Ultrason. Sonochem.*, **15**, 988-994 (2008).
- 4) Shimizu, N., Ninomiya, K., Ogino, C., and Rahman, M. M.: *Biochem. Eng. J.*, **48**, 416-423 (2010).
- 5) Shimizu, N., Ogino, C., Mahmoud, F. D., and Murata, T.: *Ultrason. Sonochem.*, **14**, 184-190 (2007).
- 6) Ogino, C., Mahmoud, F. D., Iida, Y., and Shimizu, N.: *J. Hazard. Mater.*, **153**, 551-556 (2008).
- 7) Mahmoud, F. D., Ogino, C., Matsumura, S., and Shimizu, N.: *Water Res.*, **40**, 1137-1142 (2006).
- 8) Mahmoud, F. D., Ogino, C., Matsumura, S., and Shimizu, N.: *Biochem. Eng. J.*, **25**, 243-248 (2005).
- 9) Ogino, C., Mahmoud, F. D., Takaki, K., and Shimizu, N.: *Biochem. Eng. J.*, **32**, 100-105 (2006).
- 10) 荻野千秋：未来をつくるバイオ、日本生物工学会編、26-28、学進出版（2008）。
- 11) Matsui, K., Karasaki, M., Segawa, M., Hwang, S. Y., Tanaka, T., Ogino, C., and Kondo, A.: *Med. Chem. Commun.*, **1**, 209-211 (2010).
- 12) Kanehira, K., Banzai, T., Ogino, C., Shimizu, N., Kubota, Y., and Sonezaki, S.: *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **64**, 10-15 (2008).
- 13) Ogino, C., Shibata, N., Sasai, R., Takaki, K., Miyachi, Y., Kuroda, S., Ninomiya, K., and Shimizu, N.: *Med. Chem. Lett.*, **20**, 5320-5325 (2010).
- 14) Ninomiya, K., Ogino, C., Oshima, S., Sonoke, S., Kuroda, S., and Shimizu, N.: *Ultrason. Sonochem.* (in press)
- 15) 荻野千秋, 田中勉, 佐々木良平, 近藤昭彦: 特許出願 2010-032055.