

56. 放射線治療に用いる極低侵襲金マーカの構築

北海道大学大学院工学研究院 教授 米澤 徹

概要

本研究は、放射線治療に用いる、X線用病変識別マーカとして、レーザーアブレーション法を用いたアルギン酸保護金ナノ粒子（Alg-AuNP）の合成と特性評価、およびその応用に関する研究である。

まず、レーザーアブレーション法を用いて、金粉末とアルギン酸ナトリウムから Alg-AuNP を合成した。合成条件の最適化として、レーザー照射方法や攪拌方法の改良を行い、減圧下でバブリングしながらレーザー照射を行う方法を採用した。合成溶媒には水／エタノール混合系を使用し、アルギン酸ナトリウムは合成前に添加することで、再分散性の高い平均粒径約 3.7 nm の球状 Alg-AuNP が得られた。これは他の合成法と比較してより小さかった。合成された Alg-AuNP を用いて、X線用病変識別マーカゲルが作製されました。人肌ゲル内に Alg-AuNP を注入し、塩化カルシウム水溶液で固化して作製し、その視認性を検証した。

この研究は、実際の医療に用いられることを目指したアルギン酸保護金ナノ粒子合成の新しい安全な方法を提案し、その特性評価と応用可能性を示した。特に、X線用病変識別マーカへの応用は、医療分野での潜在的な利用を示唆している。

背景および目的

背景：ナノ粒子とは 1～100 nm の粒子径を有する粒子を指す。そのなかで、金ナノ粒子（AuNP）は、その特異な物理化学的特性から、色材、医療、センシング、触媒など様々な分野で注目されている。色材としては、AuNP のもつプラズモン吸収による特色のある赤色がよく知られている。また、金はそれ自体生体親和性が高い上に、さらに生体適合性の高いアルギン酸で保護された金ナノ粒子（Alg-AuNP）は、バイオメディカル分野での応用が期待される。特にアルギン酸はカルシウムなどのイオンによって架橋してゲル化できる利点がある。

AuNP の合成法には、化学還元法や液中プラズマ法などがある。化学還元法では、還元剤が用いられ、それが有害である可能性があるほか、劇物としての塩化金酸が原料として用いられることが多い。また、液中プラズマ法では、粒子径の制御が難しいほか、金棒を原料とするとき投入するプラズマ電力の適切な制御が必要となる。また有害な還元剤や安定剤を使用する必要があった。一方で、レーザーアブレーション法は、化学的に純粋なナノ粒子を、金粉や金板などバルクな金から合成できる方法である。この方法では、有害な化学物質を使用せず、また微細な粒子径の者を得られる可能性がある。

研究目的：こうした背景をもとに本研究を以下の目的に沿って行った。まず、レーザーアブレーション法を用いて、アルギン酸保護金ナノ粒子（Alg-AuNP）を合成する手法を確立する。この方法により、より小さく均一な粒子径を持つ Alg-AuNP の合成を目指す。また、レーザー照射方法、攪拌方法、溶媒組成、アルギン酸ナトリウムの添加タイミングなど、様々な合成条件を検討し、大量合成に向けて合成条件を最適化する。そして、合成された Alg-AuNP の粒子径、形状、分散性などの特性を評価し、従来の方法で合成された AuNP と比較する。そののち、ゲル化可能な X線用病変識別マーカの作製を試みています。これにより、医療分野での実用化の可能性を探る。

これらの目的を達成することで、より安全で効率的な Alg-AuNP の合成方法を確立し、X 線用病変識別マーカーをはじめとするバイオメディカル分野を中心とした様々な応用分野での利用可能性を広げることを目指す。

方法

本研究では、アルギン酸ナトリウム (Alg-Na) によって保護された金ナノ粒子 (Alg-AuNP) をレーザーアブレーション法により合成し、X 線病変識別マーカーとして利用することを目的として、以下の手順で実験を行った。

まず、金粉末 (田中貴金属工業製) とアルギン酸ナトリウム (粘度 1000 mPa·s、10 mg) を水とエタノールの混合溶媒 (H₂O 50 mL、EtOH 45 mL) に加え、アルギン酸ナトリウムが完全に溶解するまで超音波を照射した。超音波照射時間は約 10 秒である。この操作により得られた混合液を、200 mL の二口ナスフラスコに移し、攪拌子を挿入した後、ダイヤフラムポンプを用いて系内を減圧した。減圧はプラズマブルームが立ちやすくなる条件の一つである。そして、フラスコの口からその中央に設置したガラス管を通して、液中に 1~2 秒に 1 回程度のバブリングが生じるように減圧度を調整し、ガラス管を通して赤色 Nd:YAG パルスレーザー (波長 532 nm、繰り返し周波数 20 Hz、レンズによる集光) による照射を 24 時間連続して行った。この反応系では、攪拌子が投入されており、その攪拌子がガラス管の外周を回転する構造としたことで、生成した金ナノ粒子は液中に均一に分散できるものの、レーザー照射されるべき金粉末は攪拌子が巻き込まず、ガラス管の下部に金粉末を集めやすくなり、レーザーアブレーションによるナノ粒子生成効率を高めている。さらには攪拌子自体にレーザーは照射されないため、攪拌子からのコンタミネーションは生じない。

反応後、溶液は 35℃ のエバポレーターで約 20 mL まで濃縮し、6000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。得られた沈殿物を水およびエタノールでそれぞれ 3 回ずつ洗浄し、再度遠心分離した後、ガスフローによる乾燥装置 (コンビエバポレーター・38℃ 設定) でさらに濃縮し、一晚減圧乾燥させた。乾燥後の Alg-AuNP は薄いアルギン酸を含んでいるためパリパリとした塊状で、水に対しては良好に再分散可能であったが、エタノールには分散せず凝集する傾向が見られた。これはアルギン酸ナトリウムの性状そのままであり、アルギン酸ナトリウムに包埋された金ナノ粒子が生成したことを意味する。

さらに、比較として EtOH 還元法による Alg-AuNP の大量合成も試みた。この方法では、アルギン酸ナトリウムを超純水に溶解させた後、そこに塩化金酸四水和物 (HAuCl₄·4H₂O) を超純水に溶かした金源溶液を加え、アルミホイルで蓋をして簡易還流状態とし、2 時間加熱攪拌した。本条件は一般的なエタノール/水混合系を用いた塩化金酸の化学還元法の条件である。反応終了後、生成物は室温まで冷却し、遠心分離を行い、上澄みを除去した。沈殿物は水で 3 回、エタノールで 2 回洗浄した後、再び遠心し、遠沈管壁面の付着物をボルテックスミキサーで処理した。最後に、一晚減圧乾燥を行い、Alg-AuNP の乾燥粉末を得た。

これらの手法を比較することで、レーザーアブレーション法により得られる Alg-AuNP は、EtOH 還元法で得られたものよりも粒径が小さく、再分散性にも優れていることが確認された。

結果および考察

本研究では、アルギン酸ナトリウム (Alg-Na) を用いた金ナノ粒子 (AuNP) のレーザーアブレーション合成法の反応系を工夫し、安定的に微細な Alg-AuNP を得ることを目的として検討を行った。初期の合成条件では、レーザー照射が金粉末に効率的に当たらないという問題が顕著であった。金粉末のほうが板よりも表面積が多いため効率が高くなる可能性があったが、粉末が浮遊してしまうことが多いほか、上方からの照射では、溶液中に浮遊するごく一部の金粉末にしかレーザーが届かず金ナノ粒子の生成量が少なくなる一方で、多くの金粉末が底に沈殿・凝集してしまい、照射効率が著しく低下した。さらに、反応により溶液の色 (赤色・金コロイドの色) が濃くなると、光の透過性が低下し、反応効率がさらに悪化した。一方、下方からの照射においても、ガラスを通じて照射するため、攪拌を伴わないことで反応物が光路上からなくなるとアブレーションが進行せず、加えて最初にレーザーがガラス容器の底に当たることで、ガラス自体がアブレーションされてコンタミネーション

ならびに容器破損の原因となることが判明した。攪拌に関しても、金と溶媒との密度差の大きさから、強く攪拌しても金粉末が容器底部の中心に集まりやすく、レーザー照射を妨げる要因となっていた。

これらの課題を解決するために、新たに設計された反応系では、中央に設置したガラス管を通じてレーザー照射を行い、さらにダイヤフラムポンプにより系内を減圧することで、1秒に1~2回のバブリングを発生させるようにした。この設計によって、液面を通常よりも低く保ちながらレーザーを照射することが可能となり、反応効率が向上した。また、攪拌子がガラス管に沿って回転する構造とすることで、攪拌子が金粉末を巻き込まず、金粉末がガラス管下部に自然に集まりやすくなったため、照射効率の改善にも寄与した。実際に24時間放置した状態でも、アブレーション音が断続的に確認され、時間が経っても反応が継続して進行していることが示された。

反応後に得られた Alg-AuNP の乾燥体は、パリパリとした薄い塊状であったが、水に対しては良好に再分散し、安定したコロイド分散液が形成された。これに対し、アルコール類には分散せず凝集する傾向を示したため、アルギン酸ナトリウムの溶けにくい EtOH を利用して沈殿物を一箇所に集めた後に乾燥させる手法が用いられた。

溶媒の種類と比率についても検討が行われ、水のみを使用した場合には金粉末の濡れ性が悪く、表面張力により液面に浮いたり、容器壁面に付着したりすることでレーザーが十分に当たらない問題があった。これに対処するため、水と EtOH の混合溶媒が用いられ、EtOH が 50%以上含まれることで金粉末が浮く現象は抑えられた。ただし、EtOH の比率が高すぎるとアルギン酸ナトリウムが溶解しにくくなるため、50~70%の比率が最適であると判断された。

また、アルギン酸ナトリウムの添加タイミングに関しては、レーザーアブレーション時に Alg-Na を含む溶媒を使用した場合と、アブレーション後に後添加する方法の2通りを比較した。前者の方法では、乾燥後に水を加えるとすぐに再分散可能な粒子が得られたが、後者では再分散性が悪く、一部に凝集塊が残る結果となった。したがって、アルギン酸ナトリウムはアブレーション時にすでに溶媒中に含めておくことが重要であると結論付けられた。

合成した Alg-AuNP の UV-vis 吸収スペクトルを測定した結果、吸収極大が 520 nm 以下に位置しており、これにより粒径が非常に小さく、分布の狭い球状ナノ粒子が生成されたことが示唆された。実際に TEM 観察でも、10 nm 以下の粒子が観察され、粒径分布解析の結果から平均粒径は 3.7 nm と算出された。この粒径は、液中プラズマ法（平均 35 nm）や EtOH 還元法（約 18 nm）と比較しても格段に小さく、レーザーアブレーション法の優位性を示す結果となった。

得られたアルギン酸ナトリウムに包埋された金ナノ粒子はカルシウムによってゲル化が可能であった。得られたアルギン酸ナトリウムを注射器で人体を模倣したゲルに投入しカルシウム液を導入することで固めることが可能であった。そして、X線CTを模擬したX線照射装置を用いて、X線感受性を評価したところ、病変識別マーカーとしての使用が可能な程度の視認性が得られることが明らかとなった。今後より濃厚なゲルにできるように、また簡便な手法で得られるよう合成手法をさらに工夫するとともに、実際のがん治療に用いられるよう、使用法についても医療従事者とともに検討していく予定である。

(完)