

研 究 報 告 書

「医療応用に向けた磁気ナノ微粒子の開発」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：一柳 優子

1. 研究のねらい

ナノメートルサイズの磁気微粒子は昨今、磁性材料のみならず、電子デバイスや医療などの各分野で注目を集めている。これからはライフサイエンス分野と、物理学的手法を融合させ、新しい科学技術の発展に貢献していきたい。ここでは独自の製法でナノサイズの磁気微粒子を生成し、医療応用へ向けた開発を行った。金属塩化物とメタ珪酸ナトリウムの水溶液を湿式混合することでアモルファスSiO₂ のランダムネットワーク中に、直径 2 nmから 30 nm程度の磁気クラスターが形成される。本研究は室温で強磁性あるいは超常磁性のナノ微粒子を生成し、官能基を修飾して機能化を施し医療へ応用することを目的とした。薬剤輸送やイメージング、温熱療法などに実現可能な磁気微粒子の開発を目指した。

2. 研究成果

2.1 ナノ微粒子の生成と機能化

強磁性体をナノサイズにすると、微粒子内の磁気異方性が熱揺らぎに負けて自発磁化を保てなくなる。ナノサイズで高い磁気パラメータを得るために、異方性の大きなイオンをドーブ、ヤーンテラーなどの構造変化、磁気モーメントの制御などの工夫をした^{1,9}。スピン制御の一例を挙げると、スピネル構造を持つフェライトのAサイトに非磁性のZnをドーブすることで磁化の増大が見られた。この現象はA,B副格子のスピンが反強磁性配列していることに由来する。独自の製法を用いて湿式混合によりアモルファスSiO₂ に内包された粒径が約 2-40 nmの磁気微粒子を創製した。この方法で得られた微粒子は、凝集を防ぎ分散を良くしていると同時に表面にSiが存在するため、シランカップリングに好都合な形状を持つ。微粒子の組成や粒径の制御も可能であり、磁気パラメータの評価を行いながら試料の最適化をはかった。これらの方法で得られた磁気クラスターはCo_xFe_{1-x}O₄, MnFe₂O₄, MnZnFe₂O₄, Fe₂O₃, MgFe₂O₄, Fe₂O₃-Si, CoTiFe₂O₄, CoTiZnFe₂O₄, CoZnFe₂O₄, CuFe₂O₄, CuZnFe₂O₄, Gd₂O₃, BiFeO₃, DyFeO₃, Fe₃O₄, NiFe₂O₄ などである。

3 nm の鉄酸化物にシランカップリング剤を用いてアミノ基、カルボキシル基⁷、チオール基の全ての官能基の修飾に成功し機能性磁気ナノ微粒子を生成した。それぞれの結合由来が確認できた赤外線吸収(FT-IR)スペクトルを図2に示す。これにより磁性酸化物絶縁体に薬剤やタンパクなどのあらゆる化学物質を結合することが可能になった。

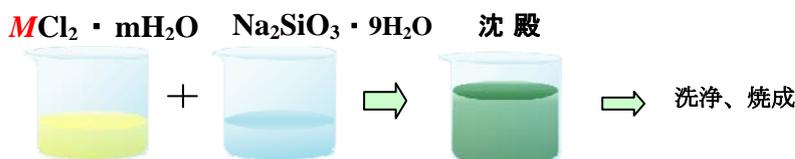


図1 磁気ナノ微粒子の生成方法

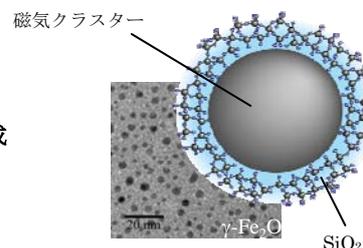


図2 アモルファスSiO₂に内包された磁気クラスターの模式図とTEM写真

2.2 生体内での局在化と細胞選択性

この機能性磁気ナノ微粒子を細胞内へ導入したところ、従来のようにカチオンで被覆することなしに導入できることも明らかにした。外部磁場を用いることにより、この磁気微粒子を生体組織内に局在化できることも確認している。さらにがん細胞には葉酸受容体が過剰に出現することに注目し、磁気微粒子に葉酸を修飾することで、がん細胞に選択的に導入されることを示した⁴。これらの特性を踏まえ、薬剤輸送(DDS)や温熱療法(ハイパーサーミア)への応用を検討した。

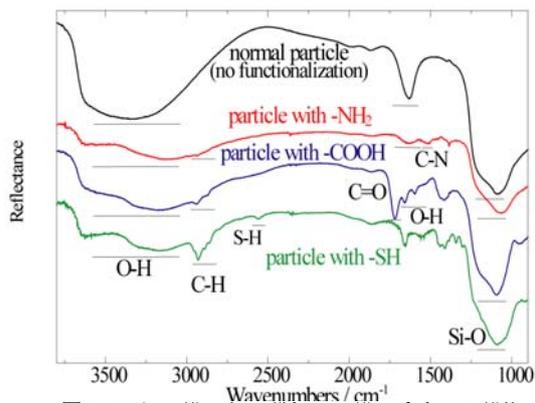


図3 アミノ基、カルボキシル基、チオール基修飾前後のFT-IRスペクトル

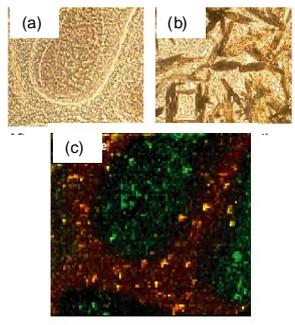


図4 本微粒子(a), 従来微粒子(b)の光学像とMSイメージングによる分布像(c)

2.3 質量分析(MS)イメージングとMRIイメージング

本磁気微粒子はイオン化支援機能を持っており、質量分析用のイオン化支援剤として有用であることがわかった。マコーレート型鉄酸化物では低分子量の薬剤から高分子量のインシュリンまで、幅広い質量領域でイオン化することができた³。本微粒子を生体細胞に噴霧し、各座標におけるスペクトルをマッピングすることで、物質の同定とともに分布イメージを得ることができた(図4)。また、ナノサイズであるため高解像度のイメージングが可能になった²。一方、機能化した γ -Fe₂O₃をラット脳梗塞モデルに注入しMRIの撮影を行ったところ、安定した画像が得られた。

2.4 ハイパーサーミア用磁気微粒子の最適化

がん細胞は約43℃で死滅するといわれており、温熱療法も有望視されている。磁性体は外部磁場を印加することで内部に熱エネルギーを蓄える性質を持つ。この熱エネルギーの量は式 $P = f \Delta U = \mu_0 \pi \chi'' f h^2$ のように表わされ磁性体の特性によって異なる。ここで f は交流磁場周波数、 h は磁場、 μ_0 は真空の透磁率である。磁気緩和現象については微粒子内の磁気モーメントが異方性と磁場の関係により緩和する様子を観察することが可能で、交流磁化 m を測定した場合、交流磁場と位相が90度遅れた成分、 $m = (\chi' - i\chi'')h_0 \sin(\omega t)$ の式の中の虚部 χ'' がネール緩和に関係するパラメータとなっている。この χ'' の温度依存性を見たとき、ピーク温度が最も熱をリリースする点を示すことになる。交流磁化率の温度依存性は周波数、磁場強度によってピークがシフトした⁶。実際に発熱がおこるか実証するため、交流磁場発生装置を製作し(図5)、試料の元の温

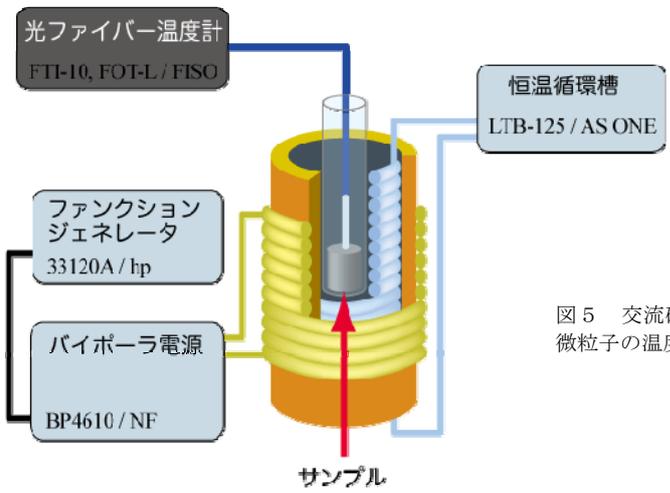


図5 交流磁場による磁気ナノ微粒子の温度上昇測定装置

度からの上昇を観察した。コイルを巻きファンクションジェネレーターで正弦波を発振させバイポー



ラースで増幅する。周波数は 100 Hz から 15 kHz 程度の範囲で調整し、上昇を測定する温度計には、放射温度計、白金抵抗温度計、光ファイバー温度計など磁場の影響を受けないものを選択した。コイルからの発熱と区別するため、コイルの冷却と断熱を十分に行った。異方性の大きい Co と非磁性の Zn をドーピングした Co-Zn フェライトでは粒径を 5-17 nm に制御し、昇温を測定して磁化の値と比較したところ、8 nm の試料で交流磁化率虚部 χ'' のピークが室温近くにあり(図6)、それを裏付けるように昇温も最も高くなった(図7)。この昇温カーブを exp で fitting し、その傾きと比熱の測定結果を元に発熱量を定量的に求めると、単位重さあたり $0.5 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ となった。比較のためにこの系と磁気ハイパーサーミアでよく議論されているマグネタイトについて同様に測定を行い、発熱量を粒径に対してプロットしてみると(図8)、マグネタイトでは市販のものより小さい 12 nm の粒子で大きな発熱量を得たことがわかる。Co(0.8)Zn(0.2)フェライトについては粒径がわずか 8 nm でマグネタイトと同等の発熱量を得られた。組成の異なる Co(0.5)Zn(0.5)フェライトでは 15 nm で大きな発熱量を観測した。試料の最適化が実現でき、周波数、交流磁場の条件により、小さい粒径サイズで自在に発熱量の制御が可能なナノ微粒子を創生することができた。

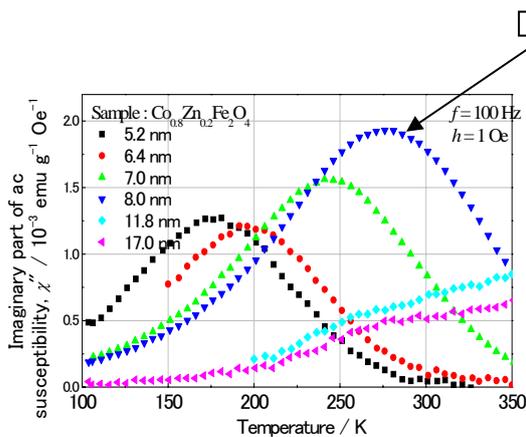


図6 交流磁化率の虚部 χ'' の温度依存性(CoZn フェライト)

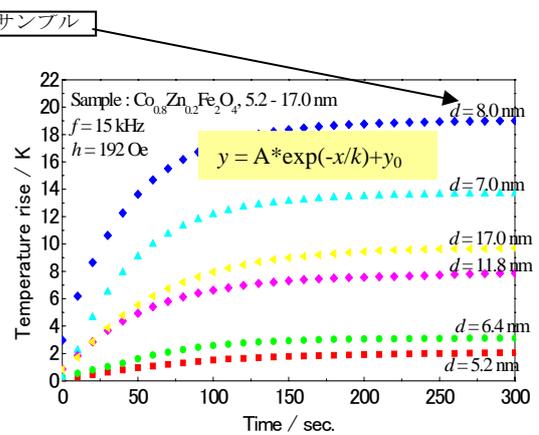
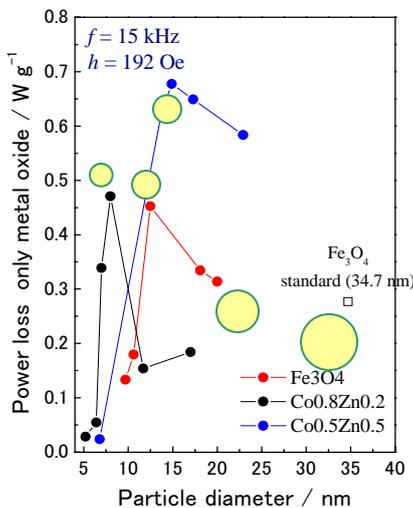


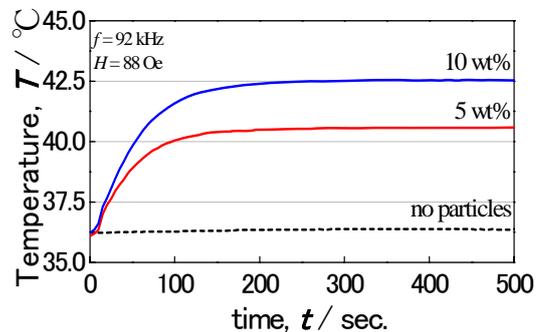
図7 周波数と磁場を固定した場合の各粒径別の温度上昇(CoZn フェライト)

2.5 生体擬似サンプルでの発熱特性

生体内における本微粒子のハイパーサーミアの有効性を確かめるため、脱イオン水、生理食塩水、粉末寒天を用いて、先の最適化を行った 8 nm の Co-Zn フェライトを分散させ温度上昇を測定した。図9に示すように $f=92 \text{ kHz}$, $h=88 \text{ Oe}$ のもとで微粒子が 10 wt% の場合、 37°C に保った状態から 42.5°C まで加温することができた。がん細胞を壊死させるのに十分な発熱量を得ることができた。



上 図9 生体擬似サンプル中の発熱特性



左 図8 各試料の発熱量の粒径依存性

3. 今後の展開

今後は磁気ハイパーサーミアについて *in vivo* の実験を期待したい。また、官能基全ての修飾は確立したため、目的を決めて薬剤の修飾も達成したい。体内でのステルス化についてはさきがけ内での共同研究を継続中である。イメージング質量分析については、H21年度 JST シーズに採択され独立した研究内容として発展する運びとなった。MRI イメージングについては、ようやく共同研究先でシグナルが得られることが確認できた。今後は磁性のサイズ効果との関連を追及したい。さらに本研究からバイオ応用に派生した課題が H22 年度 JST A-STEP に採択され、今後の展開が期待できる。

4. 自己評価

本研究期間において目標とした磁気パラメータの向上については、①ナノサイズで強磁性・超常磁性微粒子を創生および、②磁気パラメータの最適化を達成することができた。医療応用へ向けては①官能基の修飾を施し機能化に成功②蛍光物質やアミノ酸の修飾と細胞選択性を実現③ハイパーサーミア用微粒子の抽出と発熱量の定量化④市販のものより小さい粒子で大きな発熱量を得るナノ微粒子を創生⑤周波数、交流磁場、組成、粒径サイズの条件により発熱量を自在に制御可能、と多くの成果を得ることができた。しかしながら *in vivo* の実験が思うように進まず、医工連携の難しさを実感した。

5. 研究総括の見解

ナノサイズでの強磁性あるいは超常磁性の微粒子を生成し、その構造と磁気特性を明らかにし、さらには磁気ナノ微粒子に官能基を修飾して医療応用へ展開することを目標とした。その結果、独自の製法による湿式混合により、CoZnフェライトなど様々なアモルファスSiO₂に内包された2-40nm粒径の磁気ナノ微粒子を創製し、その磁気パラメータの最適化をはかることで、新たな多様な磁気ナノクラスターを得ることができた。さらに官能基としてアミノ基、カルボキシル基、チオール基などを修飾できることを確認し、機能性を有する磁気ナノ微粒子を生成できた意義は大きく、薬剤やタンパク質などで化学物質を結合することが可能となったことは、評価したい。そして具体的にこれらの機能性磁気微粒子を、生体内へ適用すべく、葉酸を修飾することで、癌細胞へ選択的に導入できること、また一方では、磁気ナノ微粒子のイオン化機能支援により、高解像度のイメージング技術への展開が可能なことも明らかにし、医療応用に対するいくつかの有用性が示された。さらには、発熱量の最適化や制御、ならびに生体擬似サンプルでの発熱特性等、癌細胞への温熱療法に向けた基礎データを取得できたことは、さきがけ研究者としての鋭意努力が認められる。ステルス化など今後の様々な課題解決を含めて、さらなる医療展開応用に期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. M. Kubota, Y. Kanazawa, K. Nasu, S. Moritake, H. Kawaji, T. Atake and Y. Ichianagi, "Effect of Heat Treatment on Magnetic MgFe₂O₄ Nanoparticles", *J. Therm. Anal. Calorim.*, **92-2** (2008) 461-463
2. S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, Y. Ichianagi and M. Setou, "Nanoparticle-Assisted Laser Desorption/Ionization Based Mass Imaging with Cellular Resolution" *Anal. Chem.*, **80** (2008) 4761-4766,
3. Shinji MORITAKE, Shu TAIRA, Yuki SUGIURA, Mitsutoshi SETOU and Yuko ICHIYANAGI, "Magnetic Nanoparticle-based Mass Spectrometry for the Detection of Biomolecules in Cultured Cells", *J. Nanosci. Nanotech.*, **9** (2008) 169-176
4. 一柳優子、「DDS へ向けた機能性磁気ナノ微粒子の開発」、「医学のあゆみ」 **230** (2009) 535-539
5. Daiki Shigeoka, Hikaru Katayanagi, Yuki Moro, Shinji Kimura, Toshiyuki Mashino and Yuko Ichianagi, "Production of Co-Ti Ferrite Nanoparticles for Use as Agents in Hyperthermia Treatment" *J. Physics Conf. Ser.*, **200** 122002. (2010)

6. Yuki MORO, Hikaru KATAYANAGI, Shinji KIMURA, Daiki SHIGEOKA, Tomoyuki HIROKI, Toshiyuki MASHINO, and Yuko ICHIYANAGI, “Size Control of Mn-Zn Ferrite Nanoparticles and Their XAFS Spectra”, *Surface and Interface Analysis*, **42**(2010) 1655-1658

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 国内出願1件

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

1. Yuko Ichiyanagi, “Functional Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications”, 3rd International Symposium on Nanomedicine, 2009/11/4 **招待講演**

2. 廣木知之、片柳洸、平修、一柳優子, “DDSへ向けた機能性磁気ナノ微粒子の作製” ナノ学会第7回大会 2009/5/10

3. Daiki Shigeoka, Hikaru Katayanagi, Yuki Moro, Shinji Kimura, Toshiyuki Mashino and Yuko Ichiyanagi, “Production of Co-Ti Ferrite Nanoparticles for Use as Agents in Hyperthermia Treatment”, International Conference on Magnetism, 2009/7/28

4. Yuko Ichiyanagi, “Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications”, 2nd International Symposium on Physics and IT Industry (ISPHTI'08), 4th International Symposium on Magnetic Industry (ISMI'08), 2008/10/14 **招待講演**

5. 一柳優子, “機能性磁気ナノ微粒子の創生とバイオ応用”, Topical symposium of Nano-Bio magnetics,(日本磁気学会・第22回ナノバイオ磁気工学専門研究会), 2007/10/30 **招待講演**

6. 重岡大輝、増野俊之、木村慎司、廣木知之、茂呂優希、片柳洸、一柳優子、“磁気ナノ微粒子の交流磁化率測定” 日本物理学会 2009 年秋季大会、2009/9/25

受賞

1. (M1) 廣木知之、「若手優秀発表賞」 ナノ学会第7回大会 (2009)

2. (M2) 茂呂優希 「Student Award」 “7th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '09”