

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681022

研究課題名(和文) Feナノ粒子MRI造影剤の開発

研究課題名(英文) Development of a metallic iron nanoparticle-based MRI agent

研究代表者

山本 真平 (Yamamoto, Shinpei)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：20362395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属鉄の大きな飽和磁化を活かした新しい陰性造影剤の開発を目的として研究を行い以下の成果を得た：(a) 金属水素化物還元法を基に、世界最高の $M_s$ (170 emu/g以上)と優れた耐酸化性(大気曝露1000時間での $M_s$ 低下が10%未満)を併せ持つ酸化鉄被覆金属鉄ナノ粒子を合成する事に成功した。(b) 表面開始原子移動ラジカル重合法により、ポリエチレングリコール誘導体をナノ粒子表面にグラフト重合し、貪食細胞のレーダーをすり抜けるステルス性と分散安定性をナノ粒子に付与する事に成功した。

研究成果の概要(英文)：Development of a new magnetic resonance imaging agent based on metallic iron nanoparticles was conducted and following results were obtained: (a) successful synthesis of iron oxide-coated metallic iron nanoparticles having a very high saturation magnetization ( $M_s > 170$  emu/g) and excellent stability in air (decrement of  $M_s$  during exposure to air is less than 10 % up to 1000 hrs) and (b) successful atom transfer radical graft polymerization of polyethylene glycol monomethacrylate from the nanoparticles, giving dispersion stability and a "stealth" character.

研究分野：magnetic nano-materials

キーワード：iron nanoparticles

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因トップは依然がんであり、その割合は約 30%にもおよび(平成 21 年度)。がん患者の生存率向上・治癒には、がん組織の早期発見・治療が不可欠であり、現在の陽電子放射断層撮影法と比べて、より小さな(初期の)がん組織を検出できる診断法が切望されている。

非侵襲的な画像診断法である核磁気共鳴画像(MRI)法は、コントラストさえ充分であれば、細胞 1 個の検出も可能である(例えば *PNAS*, 2011, 108, 2662.)。しかし、現在の造影剤(Feridex 等)は、飽和磁化( $M_s$ )が小さく(50 emu/g 以下)、更にはがん組織への集積効率が低いため、がん部位に十分なコントラストを与えられず、MRI 法の高いポテンシャルが発揮できない。本研究では、造影剤の高性能化に不可欠な、ナノ粒子レベルの造影能改善、およびがん組織への集積率向上に関する基盤技術を開発する。ナノ粒子レベルの造影能は  $M_s$  の 2 乗に比例する事が知られている(陰性造影能)。生体に対して安全な元素であり、かつ Feridex の 4 倍以上もの 218 emu/g という高い  $M_s$  の金属鉄( $\alpha$ -Fe)を用いれば、造影能は劇的に向上するであろう。しかし、Fe ナノ粒子は水や酸素とすぐ反応して  $M_s$  の小さな非晶質酸化鉄になるため、ナノ医療分野での応用には耐酸化性の付与が不可欠である。

申請者は、最近、多孔性シリカ( $\text{SiO}_2$ )で被覆された酸化鉄ナノ粒子を金属水素化物( $\text{CaH}_2$ )で還元し、4 倍以上も高  $M_s$  な Fe ナノ粒子へ変換することに成功した(図 1)。しかし、保護膜のシリカが非磁性かつ多孔質のため、試料全体としての  $M_s$  向上は 2 倍程度(~ 100 emu/g)にとどまっていた。申請者はごく最近、強磁性物質である  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  で緻密かつ結晶化した保護膜を形成することで、より高い  $M_s$  と優れた耐酸化性が得られる可能性に思い至った。シリカ被覆 Fe ナノ粒子を大気中で加熱すると、シリカ被膜のメソ孔を透過した酸素によって  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  被膜が形成される。酸化条件を最適化すれば緻密かつ高  $M_s$  な  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  被膜

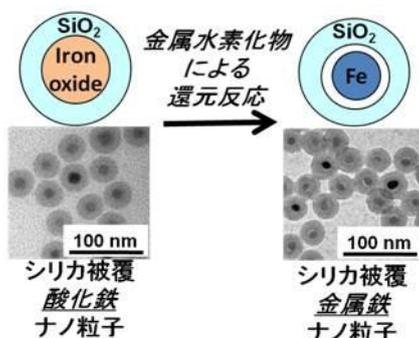


図 1. 金属水素化物を用いたシリカ被覆 Fe ナノ粒子合成

が得られるであろう。その後、シリカ被膜を溶解・除去することにより、Fe ナノ粒子コアと  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  シェルからなる  $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$  ナノ粒子が分散液として得られるはずである。

一方、上述したように、造影剤の高性能化には、高  $M_s$  化だけでは不十分であり、がん部位への集積率の向上も重要である。本研究では、貪食細胞のレーダーをすり抜けるストレス性を表面に付与することによりがん部位にナノ粒子を効率よく到達させる体内動態制御技術、およびがん部位に到達したナノ粒子をがん細胞内に効率よく蓄積させる細胞内動態制御技術も併せて開発することで、造影剤の高性能化を図る(図 2)。

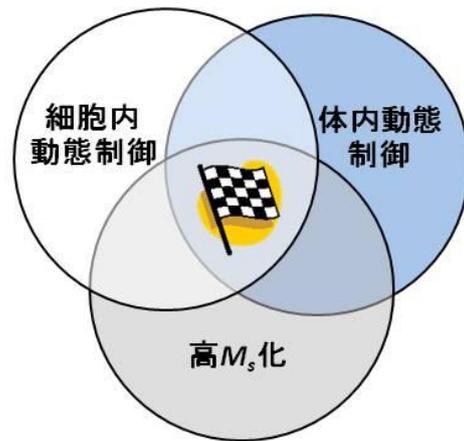


図 2. 目標とする造影剤の特徴

2. 研究の目的

本研究では、造影剤高性能化の基盤となる以下の 3 要素技術を開発する。

- A. 金属水素化物還元法を基に、世界最高の  $M_s$ (170 emu/g 以上)と優れた耐酸化性(大気曝露 1000 時間での  $M_s$  低下が 10%未満)を併せ持つ  $\text{Fe}@\text{Fe}_3\text{O}_4$  ナノ粒子を合成する技術。(高  $M_s$  化技術)
- B. 表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP)法により、ポリエチレングリコール誘導体(PEGMA)をナノ粒子表面にグラフト重合する技術(高密度高分子ブラシ化)。貪食細胞のレーダーをすり抜けるストレス性と分散安定性をナノ粒子に付与する。(体内動態制御技術)
- C. エンドソームの低 pH 環境(4.5~6.5)をトリガーとして細胞膜透過性表面を発現させ、がん細胞内への侵入・蓄積を促進する技術。(細胞内動態制御技術)

3. 研究の方法

- (A) 高  $M_s$  化技術

15 nm 程度の Fe ナノ粒子をモデル系として実験を行い、目的とする耐酸化性の確保に必要な  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  シェルの膜厚を決定する。続いて、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$  および Fe のバルク定数を用いたモデル計算を行い、目的の  $M_s$  ( $\text{Fe}@Fe_3\text{O}_4$  ナノ粒子として 170 emu/g 以上) に必要な Fe コアサイズを評価する。この指針に基づいて試料作製を行い、世界最高の  $M_s$  (170 emu/g 以上) と大気曝露 1000 時間での  $M_s$  低下が 10% 未満の耐酸化性を併せ持つ  $\text{Fe}@Fe_3\text{O}_4$  ナノ粒子を合成する。

#### (B) 体内動態制御技術

表面開始 ATRP 法により、ブラシ特性が明確な p(PEGMA) ブラシでナノ粒子を修飾する技術を確立するとともに、細胞毒性を含む各種基礎特性評価を行い、優れたステルス性と分散安定性を実現する p(PEGMA) ブラシ修飾条件を見いだす。

#### (C) 細胞内動態制御技術

pH = 5 で開裂するヒドラゾン結合部位 (-C=N-NH-) をもつ ATRP 開始剤を、細胞膜透過性に優れたポリエチレンイミン (PEI) で修飾されたナノ粒子に固定化し、PEGMA の表面開始 ATRP を試みる。

### 4. 研究成果

#### (A) 高 $M_s$ 化技術

はじめに、15nm 程度の Fe ナノ粒子をモデル系として実験を行い、目的とする耐酸化性の確保に必要な  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  シェル厚を評価した。具体的には、 $\text{CaH}_2$  を用いた固相還元反応にてシリカで被覆された状態の Fe ナノ粒子を調製し、それに対して酸化反応を行うことにより、Fe ナノ粒子の表面に  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  シェルを形成させる。続いて、シリカ被覆を溶解・除去して得られる  $\text{Fe}@Fe_3\text{O}_4$  ナノ粒子試料の  $M_s$  の大気曝露時間依存性を測定することにより、耐酸化性を評価した。

様々な酸化反応条件を検討した結果、図 3 に示すように、シリカで被覆された状態の Fe ナノ粒子を大気中に短時間曝露した後に、不活性ガス雰囲気下で 500°C 12 時間再酸化させた試料における 1000 時間経過後の  $M_s$  低下は 10% 未満であり、更にそれ以上の  $M_s$  低下がほとんど起こらないことを見いだした。それに対して、再酸化反応を行わない場合の 1000 時間経過後の  $M_s$  低下は約 20% にも達し、大気曝露時間の増加に伴う更なる  $M_s$  低下を示唆する結果となった。このように、再酸化処理を行うことにより、格段に優れた耐酸化性が得られたことが分かる。粉末 X 線回折 (XRD) 測定、および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察から、得られたナノ粒子が金属鉄および酸化鉄層から構成されており、酸化鉄シェルの膜厚が約 2 nm 程度である事が分かった (図 4)。更に、モデル計算を行うことにより、酸化鉄シェルが  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  で構成されている場合、

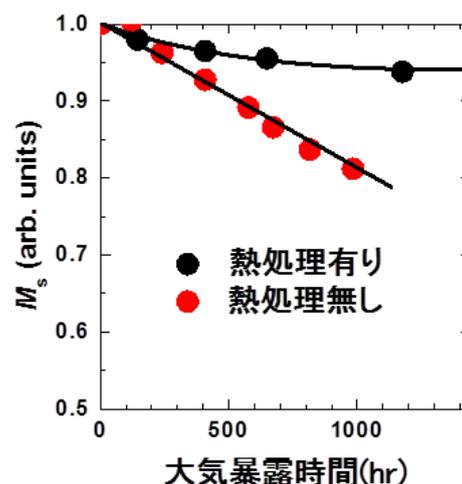


図 3. 熱処理の有無による試料の耐酸化性の違い

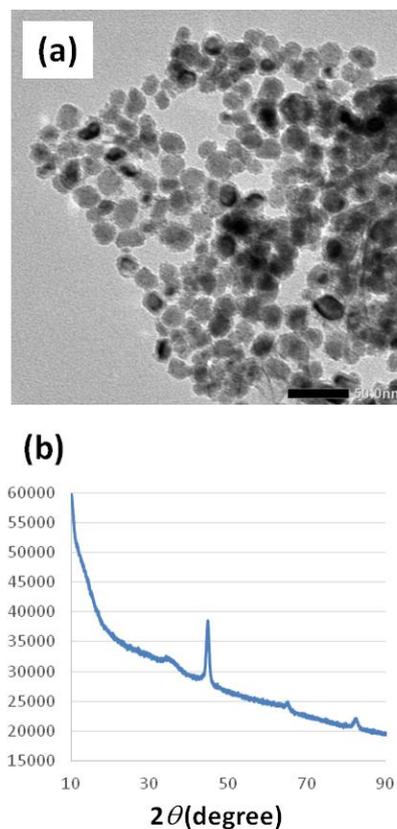


図 4. 熱処理後の試料の (a) TEM 像、および (b) XRD パターン

170 emu/g 以上の  $M_s$  を得るのに必要な Fe コアサイズは 17 nm ( $\text{Fe}@Fe_3\text{O}_4$  ナノ粒子として 21 nm) 程度以上であることが判明した。そこで、直径 100 nm 程度の Fe 粒子を用いて  $\text{Fe}@Fe_3\text{O}_4$  ナノ粒子試料を作製し、その磁気特性を評価した。得られた試料は、185 emu/g 程度の  $M_s$  を有すること、および 100 時間経過後の  $M_s$  低下が 10% 未満であることが実際

に確認できた。

### (B) 体内動態制御技術

はじめに、原子移動ラジカル重合(ATRP)を行うために必要となる ATRP 開始部位を有する化合物で酸化鉄ナノ粒子(直径約20nm)を修飾する事を試みた。アミノプロピルトリメトキシシランと 2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸クロライドでの反応で得られる化合物(図 5) によるナノ粒子表面修飾は可



図 5. 表面固定化 ATRP 開始化合物の一例

能であったが、修飾後のナノ粒子の各種溶媒への分散性は著しく低下した。その原因として、得られた化合物の鎖長が短いため、十分な分散性を得る事が難しかったことが考えられる。種々の方法による ATRP 開始部位の導入を検討した結果、細胞膜透過性に優れる化合物である PEI をナノ粒子表面に固定化し、その後 2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸クロライドあるいは 2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸を反応させることにより、優れた分散安定性と ATRP 開始能を併せ持つナノ粒子(NP-ini)を得る事に成功した。ナノ粒子表面に導入された ATRP 開始部位濃度は、元素分析測定で試料中の臭素濃度を決定することにより評価した。

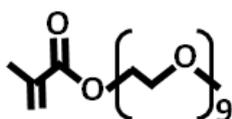


図 6. 本研究で使用した PEGMA の構造

続いて、ステルス性に優れたポリエチレングリコール鎖を持つメタクリレート誘導体(PEGMA, 図 6)の表面開始 ATRP を行い、p(PEGMA)鎖で修飾されたナノ粒子(NP-p(PEGMA))合成を試みた。表 1 に得られた NP-p(PEGMA)試料の特性を示す。ATRP 開始部位濃度の目安となる臭素濃度の増大に伴い、有機物含量が増加していることが分かる。またいずれの試料のゼータ電位値も PEGMA の ATRP グラフト重合前の状態(NP-ini, 約 40mV)と比較して小さくなっており、ナノ粒子が p(PEGMA)鎖によって均一に被覆されていることが分かる。また、いずれの試料も生理食塩水に対して優れた分散

表 1. NP-p(PEGMA)試料の特性

サンプル	臭素濃度(%)	ゼータ電位(mV)	有機物含量 <sup>a)</sup> (wt%)	生理食塩水への分散性
#1	0.26	9	15	◎
#2	0.4	14.1	18	◎
#3	1.41	26.1	32	◎

a) 熱重量分析測定により決定

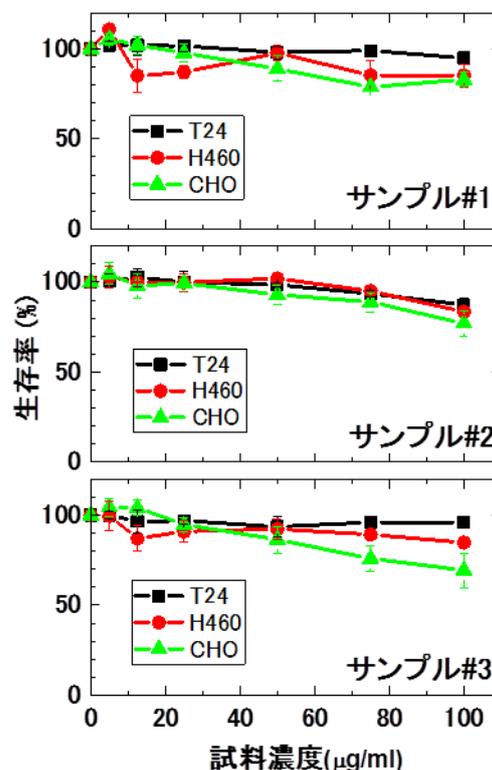


図 7. NP-p(PEGMA)試料の細胞毒性

安定性を示した。

得られた NP-p(PEGMA)試料の細胞毒性を、T24、H460 および CHO の 3 種類の細胞を用いて評価した(図 7)。いずれの試料も 100 μg/ml 程度の濃度まで比較低い毒性を示していることが分かる。

### (C) 細胞内動態制御技術

項目(B)の研究から、細胞膜透過性に優れる化合物である PEI、および食細胞のレセプターをすり抜けるステルス性を有する化合物である p(PEGMA)にて修飾された酸化鉄ナノ粒子が合成可能であり、得られた試料は低い細胞毒性と優れた安定分散性を示すことが明らかとなった。つづいて、がん細胞への取り込み効率を上昇させる細胞内動態制御技術の開発を試みた。具体的には、通常組織部では膨潤した p(PEGMA)ブラシが PEI を遮蔽している(ステルス状態)が、エンドソーム内の低 pH 条件(4.5~6.5)でヒドラジン結合

が開裂し、p(PEGMA)鎖を脱離させる表面の構築を目指した。p(PEGMA)鎖が脱離して細胞膜透過性に優れた PEI 部位が露出すれば、がん細胞内への侵入・蓄積の促進が期待できるためである。



図 8. ヒドラゾン結合部位を持つ ATRP 開始化合物の一例

pH = 5 で開裂するヒドラゾン結合部位をもつ ATRP 開始化合物(図 8)を PEI 上に導入することを試みたが、その合成は極めて困難であり、目的とする化合物を得る事ができなかった。ヒドラゾン結合部位をもつその他の ATRP 開始化合物についても合成を試みたが、残念ながら目的とするヒドラゾン結合部位をもつ ATRP 開始化合物を得る事はできなかった。

#### 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 4 件)

1. CaH<sub>2</sub>-assisted low temperature synthesis of metallic magnetic nanoparticle-loaded multiwalled carbon tubes  
Liis Seinberg, Shinpei Yamamoto, Masahiko Tsujimoto, Yoji Kobayashi, Mikio Takano and Hiroshi Kageyama  
*Chemical Communications*, **2014**, 50, 6866-6868.
2. Carboxylated SiO<sub>2</sub>-coated  $\alpha$ -Fe nanoparticles: towards a versatile platform for biomedical applications  
Kaori Kohara, Shinpei Yamamoto, Liis Seinberg, Tatsuya Murakami, Masahiko Tsujimoto, Tetsuya Ogawa, Hiroki Kurata, Hiroshi Kageyama, and Mikio Takano  
*Chemical Communications*, **2013**, 49, 2563-2565.
3. Reversible phase transfer of ferromagnetic L1<sub>0</sub>-FePt nanoparticles  
Shinpei Yamamoto, Yoshinori Tamada, Teruo Ono and Mikio Takano  
*Chemistry Letters*, **2012**, 41, 1581-1583.
4. Low Temperature Solventless Synthesis and Characterization of Ni and Fe Magnetic Nanoparticles

Liis Seinberg, Shinpei Yamamoto, Gallage Ruwan, Yoji Kobayashi, Masahiko Tsujimoto, Seiji Isoda, Mikio Takano and Hiroshi Kageyama  
*Chemical Communications*, **2012**, 48, 8237-8239.

[学会発表] (計 3 件)

1. 山本真平  
磁性金属ナノ粒子を含む多層カーボンナノチューブの CaH<sub>2</sub> を用いた低温合成  
粉体粉末冶金協会 H26 年度秋季大会  
2014 年 10 月 29 日～10 月 31 日  
大阪大学コンベンションセンター
2. 山本真平  
磁性金属ナノ粒子含有多層カーボンナノチューブの CaH<sub>2</sub> を用いた低温合成  
日本磁気学会第 38 回学術講演会  
2014 年 9 月 2 日～9 月 5 日  
慶應義塾大学日吉キャンパス
3. 山本真平  
Surface-modified  $\alpha$ -Fe@SiO<sub>2</sub> nanoparticles: towards a versatile platform for biomedical applications  
8<sup>th</sup> international conference on fine particle magnetism  
2013 年 6 月 24 日～6 月 27 日  
ペルピニアン(仏国)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 複合磁性微粒子粉末、分散体  
発明者: 小原香、小林齊也、ポルワッタ・ルワン・ガラゲ、山本真平、高野幹夫

権利者:

種類:

番号: 特願 2013-027165

出願年月日:

国内外の別:

名称: 複合磁性微粒子粉末、分散体  
発明者: 小原香、小林齊也、ポルワッタ・ルワン・ガラゲ、山本真平、高野幹夫

権利者:

種類:

番号: 特願 2013-027166

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
山本真平 (YAMAMOTO Shinpei)

研究者番号：20363295

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：