

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21680038

研究課題名（和文） 精密温度制御を目指した磁性温熱療法の技術開発

研究課題名（英文） Technical development of magnetic hyperthermia toward precise temperature control

研究代表者

粕谷 亮（KASUYA RYO）

独立行政法人産業技術総合研究所・サステナブルマテリアル研究部門・研究員

研究者番号：50509734

研究成果の概要（和文）：磁気温熱療法用の熱源であるマグネタイトナノ粒子(MNPs)を熱分解法により作製した。MNPsの合成温度を200℃から250℃へと増加させたところ、平均粒子径( $D_{av}$ )は6.6 nmから12.5 nmへと増大した。MNPsの発熱量は $D_{av}$ が12.5 nmの試料では22.5 W/gに達した一方、 $D_{av}$ が6.6 nmの試料では有意な発熱は見られなかった。合成したMNPsを両親媒性高分子で被覆することで、水やバッファ溶液に対して分散安定性を付与できた。

研究成果の概要（英文）：For the application of magnetic hyperthermia, the heat source of magnetite nanoparticles (MNPs) were synthesized by a thermal decomposition method. The average diameter ( $D_{av}$ ) of MNPs increased from 6.6 to 12.5 nm with increasing reaction temperature from 200 to 250 °C. The heat dissipation efficiency was 22.5 W/g for the MNPs with  $D_{av}$  of 12.5 nm, while those with  $D_{av}$  of 6.6 nm did not generate any significant heat. The surface modification of amphiphilic co-polymer was applied to disperse MNPs in water and buffer solution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
年度			
総計	5,300,000	1,590,000	6,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：構造・機能材料、ナノ材料、磁性、細胞・組織、ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 磁性温熱療法について

磁性温熱療法とは、熱源である磁性ナノ粒子をがん細胞へと集積させた後に交流磁場を印加し、がん細胞を含む生体組織を加熱する手法である。磁性温熱療法では、加熱する温度に応じて二種類の効果が得られる。一つは生体組織を40～42℃に加熱するマイルドハイパーサーミアと呼ばれる手法で、この領

域では主として生体の免疫活性が向上する。一方、43℃以上に加熱した場合には、がん細胞を熱的に壊死させることができる。これに対して、正常な組織では血管が拡張して熱を放出するため、細胞死には至らない。このように、磁性温熱療法では加熱温度が治療効果を決定づける重要な要因となる。これに対して、交流磁場の印加による磁性ナノ粒子の発熱は、その粒子サイズによっては粒子周辺

の粘度に依存する場合がある。このような発熱量の粘度依存性を抑制し、磁性ナノ粒子の発熱量が周囲の粘度によらず、かつ、可能な限り高い発熱量を示すことが望まれる。

さらに、磁性ナノ粒子のがん細胞への集積工程では、磁性ナノ粒子を生理食塩水などのバッファ溶液に分散させて静脈注射などを経て体内へと導入した後、抗原-抗体反応などによって磁性ナノ粒子をがん細胞の近傍に集積させる。そのため、磁性ナノ粒子には生体親和性と血中での分散性に加えて、がん細胞に対するターゲティング能力が求められる。しかし、これまでの磁性温熱療法では既存の酸化鉄微粒子などを熱源に用いて臨床試験へと応用した例が多く、上述のような要件を満たすにはほど遠い。このため、高い発熱効率、およびがん細胞へのターゲティング能力を有する磁性ナノ粒子を創製することが不可欠である。

## (2) 磁性ナノ粒子の発熱機構

磁性ナノ粒子の発熱は、交流磁場の位相変化に対して粒子内部の磁気モーメントの回転(緩和)が遅れることで生じる。磁性ナノ粒子の発熱機構は、磁気モーメントの緩和にともない粒子自身が回転するブラウン緩和と、磁気モーメントのみが緩和するネール緩和の二種類が存在する。磁性ナノ粒子が高粘度の環境におかれた場合、ブラウン緩和に由来する発熱は抑制される。これに対して、ネール緩和による発熱は周囲の環境に依存しないため、組織の種類によらず、常に一定の発熱効率を示すことが期待される。

また、磁性ナノ粒子の発熱量は、粒子サイズにも左右される。このことから、筆者らは磁性ナノ粒子の発熱量に対するネール緩和とブラウン緩和のそれぞれの寄与と、その粒子径依存性を理論計算により比較検討した。この結果、交流磁場の印加条件を周波数 600

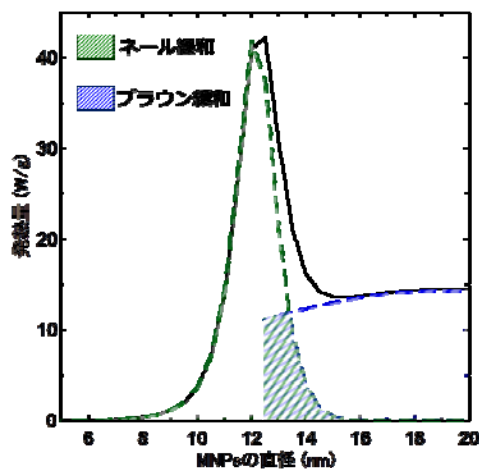


図1 MNPs の粒子径と発熱量.

kHz、磁場強度 40 Oe とした場合では、マグネタイトナノ粒子(MNPs)の直径が 12.5 nm の場合に発熱量が 42.2 W/g と極大値に達すること、および、その発熱量はネール緩和が支配的であることが明らかになった(図 1)。したがって、MNPs の発熱効率を最大とするには直径 12.5 nm の MNPs を選択的に得る必要があることがわかった。しかしながら、MNPs を共沈法などの水溶液を用いる方法で合成した場合、得られる MNPs の粒度分布が 8~16 nm と広く、発熱効率の向上が困難という問題があった。

## 2. 研究の目的

本研究では粒子サイズを精密に制御できる熱分解法を用いて、高い発熱効率を有する直径約 12 nm の MNPs の合成に取り組んだ。また、合成後の MNPs を両親媒性高分子(ACP)で表面修飾することで、水やバッファ溶液に対する分散安定性を付与できるかどうか検討した。これに加えて、本研究では抗原-抗体反応のモデル実験として、ACP 被覆後の MNPs を、クロスリンカー分子を介して抗体模倣物質であるウシ血清アルブミン(BSA)とコンジュゲートする試みを行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱分解法による MNPs の合成と評価

鉄原料である Fe(III)アセチルアセトナートをオレイン酸とオレイルアミンを等モルずつ混合した溶媒に加え、200°Cまたは 250°Cで 2 時間加熱することで MNPs を合成した。合成後の試料の結晶相は粉末 X 線回折法(XRD)により同定した。MNPs の平均粒子径は透過型電子顕微鏡(TEM)像から算出した。また、MNPs の発熱量を評価するため、所定量の合成試料をトルエンに分散させ、交流磁場(周波数 600 kHz、磁場強度 40 Oe)を 10 分間照射して温度変化をプロットした。

### (2) ACP による MNPs の表面被覆

熱分解法で合成した MNPs はトルエンなどの非極性の有機溶媒に対しては非常に高い分散性を示した一方、水や生理食塩水などの極性溶媒に対してはほとんど分散しなかった。そこで極性溶媒に対する分散性を向上するため、(1)で高い発熱量を示した試料を対象に両親媒性高分子(ACP)によって MNPs の表面を被覆した。

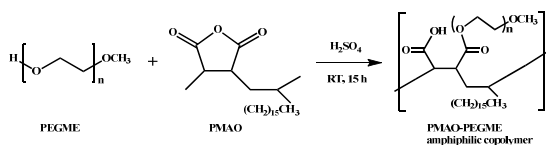


図2 ACP の合成スキーム.

ACPの合成とMNP<sub>s</sub>の被覆は次の手順で行った。Poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO, 平均分子量30,000-50,000)とポリエチレングリコールメチルエーテル (PEGME, 平均分子量5,000)をクロロホルムに加え、硫酸を加えた後に15時間攪拌した。反応後に残存している硫酸を水酸化ナトリウム水溶液で中和した後、MNP<sub>s</sub>を加えて室温で15時間攪拌した。攪拌終了後に過剰量の水を加え、エバポレーションによりクロロホルムを除去した。

### (3) ACP被覆MNP<sub>s</sub>とBSAとのコンジュゲーション

ACP被覆MNP<sub>s</sub>とBSAとのコンジュゲーションは、クロスリンカー分子であるN-(3-dimethylamino-propyl)-N'-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC)とN-Hydroxy-sulfosuccinimide (Sulfo-NHS)を用いて次の手順で行った。ACP被覆MNP<sub>s</sub>をバッファ溶液(MES)に分散させた後、EDCとSulfo-NHSを加え、室温で1時間攪拌した。PBS溶液による試料の洗浄と磁石による回収を3回繰り返した後、BSA含有PBS溶液を加えて2時間攪拌した。攪拌終了後に磁石を用いてMNP<sub>s</sub>を回収した。ACP被覆MNP<sub>s</sub>に結合したBSAの量を算出するため、MNP<sub>s</sub>回収後のPBS溶液に含まれるBSA量をビシンコニン酸法(BCA法)を用いて吸光光度法により定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 高い発熱効率を持つMNP<sub>s</sub>の合成に成功

鉄(III)アセチルアセトナートをオレイン酸とオレイルアミンの混合溶媒中、250℃で加熱することで、平均粒子径 $12.5 \pm 1.4$  nmのMNP<sub>s</sub>を合成できた(図3)。XRDから合成試料の結晶相はマグネタイト( $Fe_3O_4$ )に同定された。また、得られたMNP<sub>s</sub>の発熱量は22.5 W/gであり、試料の粒度分布から求めた発熱量とほぼ一致した。これに対して、加熱温度を200℃とした試料ではMNP<sub>s</sub>の平均粒子径は6.6 nmであり、有意な発熱は示さなかった。一方、水系で合成したMNP<sub>s</sub>の発熱量は最大でも15.7 W/gに留まった。以上の結果から、熱分解法を用いて加熱温度を250℃とした場合には、高い発熱量を有するMNP<sub>s</sub>を合成できたことがわかった。

### (2) MNP<sub>s</sub>の極性溶媒への安定分散に成功

合成後のMNP<sub>s</sub>を水に加えた場合はほとんど分散しなかったのに対して、トルエンに加えた場合は良好な分散性を示した(図4)。合成試料に含まれる有機物の状態をフーリエ変換赤外吸収分光法(FT-IR)で評価したところ、 $1704\text{ cm}^{-1}$ にカルボキシル基に由来するC=O伸縮振動のピークが確認された。このこ

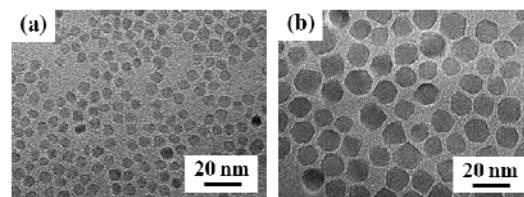


図3 合成したMNP<sub>s</sub>のTEM像。

(a) 200℃合成試料、(b) 250℃合成試料。

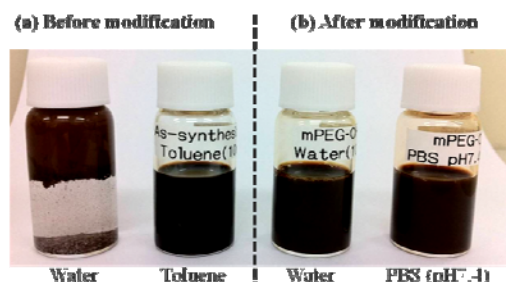


図4 MNP<sub>s</sub>分散液の外観。

(a) ACP被覆前、(b) ACP被覆後。

とから、熱分解法で作製したMNP<sub>s</sub>の表面には、合成溶媒に用いたオレイン酸が存在していることが示唆された。

次に合成試料に含まれる炭素、水素、窒素の重量を元素分析により評価した結果、合成溶媒であるオレイン酸、またはオレイルアミンに由来する炭素重量は試料全体の重量に対して8.60 wt%を占めること、オレイルアミンに由来する窒素重量は試料全体の重量に対して0.22 wt%を占めることがわかった。一方、ACP被覆後のMNP<sub>s</sub>では試料全体の重量に対する炭素重量は19.01 wt%へと増大したのに対して、窒素は検出限界以下だった。このことから、合成後のMNP<sub>s</sub>に含まれていたオレイルアミンはACP被覆の過程で除去されたこと、および、ACP被覆後のMNP<sub>s</sub>にはACPとオレイン酸が含まれていることが示唆された。

### (3) BSAとACP被覆MNP<sub>s</sub>とのコンジュゲーションに成功

ACP被覆によりMNP<sub>s</sub>に対して極性溶媒への分散性を付与できたことから、次に抗体模倣物質であるBSAとMNP<sub>s</sub>とのコンジュゲーションを行った。ACP被覆MNP<sub>s</sub>とBSAの重量を一定とし、クロスリンカー分子であるEDCとSulfo-NHSの添加量を変えることで、ACP被覆MNP<sub>s</sub>に対するBSAの吸着量がどのように変化するか検討した(表1)。

表1 ACP 被覆 MNPs に対する BSA 吸着量.

サンプル	試薬の重量 (mg)				BSA吸着量 (mg)	BSA吸着率 (%)
	ACP被覆 MNPs	EDC	Sulfo-NHS	BSA		
1	5.0	5.8	6.5	1.0	0.130 ± 0.031	13.0
2	5.0	11.5	13.0	1.0	0.086 ± 0.015	8.6
3	5.0	23.0	26.0	1.0	0.071 ± 0.008	7.1
4	5.0	-	-	1.0	0.149 ± 0.010	14.9

この結果、ACP 被覆 MNPs に結合させるクロスリンカー分子の添加量を増やすと、ACP 被覆 MNPs と結合する BSA の量は減少したことがわかった。一方、ACP 被覆 MNPs のみを BSA 含有 PBS 溶液に加えた試料 5 では、クロスリンカー分子を用いて作製した試料 1~4 よりも BSA 吸着量が高かった。これは、MNPs 表面に存在するオレイン酸分子、またはオレイン酸イオンが BSA と優先的に結合し、クロスリンカー分子の導入量増大に伴ってオレイン酸イオンと BSA との結合が阻害されたものと推察される。

以上の結果をまとめると、熱分解法を用いることで従来よりも高い発熱効率を有する MNPs の作製に成功した。合成後の MNPs を ACP で被覆することで、生理食塩水などのバッファ溶液に対する分散性を付与できた。また、MNPs に対する抗体修飾のモデル実験として、MNPs と BSA とをクロスリンカー分子を介して結合させることに成功した。

## 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 7 件)

- ① 粕谷亮、菊地徹平、バラチャンドラン ジャヤデワ、多井豊、Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles modified with PEG-based amphiphilic copolymers、Materials Research Society International Symposium Proceedings、査読有、Vol. 1386、2012、pp. D13-02-1-D13-02-6. DOI: 10.1557/opl.2012.688
- ② 菊地徹平、粕谷亮、遠藤章太、中村晃、高井俊行、N. Metzler-Nolte、田路和幸、バラチャンドラン ジャヤデワ、Preparation of magnetite aqueous dispersion for magnetic fluid hyperthermia、Journal of Magnetism and Magnetic Materials、査読有、Vol. 323、2011、pp. 1216-1222. DOI: 10.1016/j.jmmm.2010.11.009
- ③ 粕谷亮、菊地徹平、間宮広明、井奥洪二、遠藤章太、中村晃、高井俊行、バラチャンドラン ジャヤデワ、Heat dissipation characteristics of

magnetite nanoparticles and their application to macrophage cells、Physics Procedia、査読有、Vol. 9、2010、pp. 186-189.

DOI: 10.1016/j.phpro.2010.11.042

- ④ 須藤誠、廣田泰丈、間宮広明、粕谷亮、藤田麻哉、田路和幸、バラチャンドラン ジャヤデワ、磁性流体癌温熱療法のためのマグネタイトナノ粒子の発熱機構の検討、Journal of the Magnetics Society of Japan、査読有、Vol. 33、2009、pp. 391-395. DOI: 10.3379/msjmag.0905RH0009
- ⑤ 須藤誠、廣田泰丈、間宮広明、粕谷亮、藤田麻哉、田路和幸、バラチャンドラン ジャヤデワ、Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia、Journal of Magnetism and Magnetic Materials、査読有、Vol. 321、2009、pp. 1493-1492. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.02.070

[学会発表] (計 8 件)

- ① 粕谷亮、菊地徹平、バラチャンドラン ジャヤデワ、Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles Modified with PEG-Based Amphiphilic Copolymers、2011 MRS Fall Meeting、2011 年 11 月 29 日、ハイネスコンベンションセンター (アメリカ合衆国マサチューセッツ州ボストン市)。
- ② 菊地徹平、粕谷亮、バラチャンドラン ジャヤデワ、Preparation of Water-based Magnetite Suspension for Biomedical Application、Particles 2010、2010 年 5 月 23 日、リーガルサンリゾートホテル (アメリカ合衆国フロリダ州オーランド市)。
- ③ 粕谷亮、菊地徹平、間宮広明、井奥洪二、川下将一、バラチャンドラン ジャヤデワ、Characteristics of Magnetite Nanoparticles Dissipating Heat Through Neel Relaxation、第 33 回日本磁気学会学術講演会、2009 年 9 月 12 日、長崎大学 (長崎県長崎市)。
- ④ 粕谷亮、須藤誠、菊地徹平、廣田泰丈、間宮広明、藤田麻哉、バラチャンドラン ジャヤデワ、ナノオーダーでサイズ制御されたマグネタイトナノ粒子の発熱特性と磁気物性、第 26 回日本ハイパーサーミア学会、2009 年 9 月 1 日、千葉大学 (千葉県千葉市)。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕谷 亮 (KASUYA RYO)

独立行政法人産業技術総合研究所・サステ  
ナブルマテリアル研究部門・研究員  
研究者番号：50509734