

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600044

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子内包CNT複合体の創製とラジオ波ハイパーサーミアへの展開

研究課題名(英文) Development of the novel carbon nanotube encapsulated with magnetic nanoparticle for radio-wave therapy.

研究代表者

藤ヶ谷 剛彦 (Fujigaya, Tsuyohiko)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30444863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：CNTに、磁性ナノ粒子(MRI造影剤として臨床応用されているガドリニウムや酸化鉄など)を内包させることでラジオ波吸収効率を高める高機能化を行った。短尺化CNTの使用や高沸点溶媒の使用により高い内包率を持つ鉄内包CNTの作製に成功した。収率向上に課題が残った。体内導入のために、ラジオ波応答性CNT複合体へ生体親和性を付与する必要がある。そこでSWNTを溶液中に均一に分散させるために、CNTを分散した界面活性剤ミセル内部空間を利用して重合を行うことにより、表面が強固なポリマーネットワーク構造で被覆された新規CNT複合体作製法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed the preparation method of carbon nanotube encapsulated with magnetic metal nanoparticles for radio-wave therapy. High temperature reaction was found to yield the Fe₂O₃ encapsulation in the presence of capping agent such as octadecylamine. In separately, we also developed the coating method of the carbon nanotube by micelle polymerization of N-isopropyl acrylamide. This novel coating method enable the highly stable coating of the carbon nanotube in aqueous media, which is necessary for the bio-applications. Radio-wave irradiation of the carbon nanotube aqueous dispersion led the immediate increase of the temperature. Therefore, the combination of the above two technology to create the metal encapsulated carbon nanotube coated with highly stable wrapping layer open promising load to develop the radio-wave therapy.

研究分野：高分子材料

キーワード：カーボンナノチューブ 温熱療法 ラジオ波

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える我が国においては患者への治療負担を軽減した(非侵襲的な)がん治療の必要性は高まるばかりであるが、効果的な方法の確立には至っていない。様々なアプローチの中で温熱療法(ハイパーサーミア)は、がん組織を加温し根治する体に負担の少ない治療法として注目されている。がん特異的加温のために、発熱体を導入することが検討されている。現在、発熱体への近赤外光照射によるハイパーサーミアが研究されているが、近赤外光の生体深度は極めて浅く、実際には生体表層までの治療しか行えない(図1)。

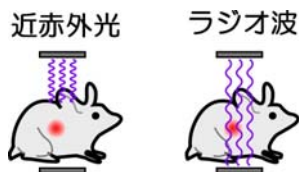


図1. 電磁波の生体透過性

2. 研究の目的

そこで、電磁波の中でも格段と生体透過性が高いラジオ波(P. Roschmann, AM. Assoc. Phys. Med. 1987, 12, 922.)に注目した。ラジオ波はMRIなどですでに医療現場で使われていることから実用化への移行ハードルが低いのも利点である。現在研究されているラジオ波照射によるハイパーサーミアでは、生体組織そのものをラジオ波吸収体として利用しているため、正常組織と癌組織の区別なく加熱されることになり、患者の負担が大きい(H. Muranaka et al., Magn. Reson. Med. Sci. 2011, 10, 11.)。そのため、非侵襲的治療のためには癌組織にラジオ波応答性発熱体を導入し、局所的に加熱する必要がある。

そこで、ラジオ波を効率よく吸収する高度機能化物質を開発し、生体適合性および腫瘍集積性を付与した後にラジオ波ハイパーサーミアに用いることで非侵襲的治療を実現することが本研究の目的である。

高いラジオ波吸収(および、それに伴う熱放出)を得るためには、高い導電性を持つ物質を用いることが有効である(C. S. S. R. Kumar et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 2011, 63, 789. C. J. Gannon et al., Cancer 2007, 110, 2654.)。既存の物質の中で、カーボンナノチューブ(CNT)は最も高い電子伝導性を持つ物質であることからラジオ波吸収体になりうる可能性を秘めている(C. Hou et al., Materials and Design 2012, 33, 413. Nair et al., Bioelectromagnetics 2012, 33, 134.)。CNTが吸収した電磁波を効率よく熱に変換する性質を持つことを利用し(図2)、ハイパーサーミア発熱体として用いる戦略である。本研究では、より短時間に効率的にラジオ波を吸収するため、同様にラジオ波吸収能

を有する磁性ナノ粒子をCNTに内包させたラジオ波応答性CNT高度機能化複合体を開発する。磁性ナノ粒子は内包により、ラジオ波吸収効率増加だけでなく、MRI造影効果も付与でき、診断と治療とを一度にできる高度機能化という極めて魅力的なシステムを構築できる。これまでの磁性粒子を内包した過去の研究においては、分散度や粒径均一性も悪いという欠点があった。粒子の密度も低い状態では高い変換効率が期待できないために、狭い粒径分布のナノ粒子を高密度に内包する条件検討を行った。

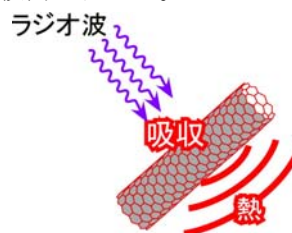


図2. ラジオ波応答性CNT高機能化複合体のコンセプト

3. 研究の方法

ステップ① ラジオ波応答性CNT複合体のデザイン・開発

CNTに、磁性ナノ粒子(MRI造影剤として臨床応用されているガドリニウムや酸化鉄など)を内包させることでラジオ波吸収効率を高める高機能化を図った。CNTへ内包させることにより生体と直接触れることなく磁性粒子を患部へ生体負担なく送達可能にする点が特徴である。

ステップ② ラジオ波応答性CNT複合体への生体親和性基の修飾

体内導入のために、ラジオ波応答性CNT複合体へ生体親和性を付与する必要がある。CNTは互いに強い相互作用が働くため溶媒に溶けず、その利用が制限されているという問題がある。そこでSWNTを溶液中に均一に分散させるために、様々なポリマーとの複合体を形成する方法が多く研究されている。これまでの分散剤は弱い物理的相互作用で安定化されているために、何らかの刺激や、夾雑物の影響で脱離することが知られていた。そこで、本研究では、CNTを分散した界面活性剤ミセル内部空間を利用して重合を行うことにより、表面が強固なポリマーネットワーク構造で被覆された新規CNT複合体を作製することを目的とした。修飾する生体親和基としては、ポリエチレングリコール(PEG)化リン脂質、PEGグラフトポリ-L-リジン(PLL)などを検討した。また、癌の指向集積性の高いとされる数百nmの粒径をめざし、長さ数百nmのCNT複合体作製を目指した。

ステップ③ ラジオ波照射装置の開発

これまで医療用周波数帯を発振するラジオ波照射装置は市販されていない。そこでラジオ波照射装置のセットアップも行った。

4. 研究成果

ステップ① ラジオ波応答性 CNT 複合体のデザイン・開発

一次元の細孔を持つカーボンナノチューブ (CNT) への物質内包は、その“閉じ込め効果”により内包物質及びCNTの性質を変化させるとして注目されている。特にナノ粒子を内包した場合、酸化還元特性の変化 (W. Chen et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 7421.)・触媒機能の向上 (X. Pan et al., Nat. Mater. 2007, 6, 507.) 等が報告されている。

一般的にナノ粒子内包CNTは、水溶液中で粒子前駆体として金属イオンを内包させ、ろ過による回収・洗浄の後、ナノ粒子前駆体内包CNTの高温加熱処理を行うことで得ることができる。しかし、この方法では粒子前駆体量に制限があるため、①粒子が低密度でしか内包されない、②内包粒子のサイズが不均一といった問題がある。そこで、高沸点溶媒を使用し、保護剤存在下 *in situ* でCNT内でのナノ粒子合成及び内包を試みた。

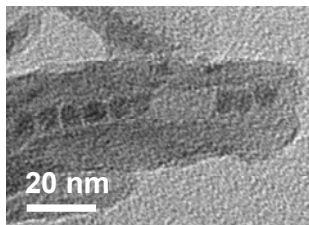


図3. Fe ナノ粒子内包CNTのTEM画像

まずCNTの先端の開端、およびCNTの短尺化をボールミルにより行った。この処理により内部への物質拡散がより速やかになり、内包率が従来法より向上すると期待した。ボールミル精製して得られた。

CNTをshort-CNTとした。透過型電子顕微鏡像(TEM)観察から平均長さは124 nmであった。

内包操作には鉄前駆体としてFe(acetylacetonate)₃ (0.5 mmol)、保護剤としてlauric acid (1.5 mmol)、高沸点溶媒としてoctadecene (沸点 317 °C) (10 mL)として使用した。窒素フロー下 Short CNT (10 mg) と上記試薬を還元剤として Hexadecanediol (3.75 mmol) の存在下 150°C 1時間攪拌し均一に溶解させた後、275°C 2時間加熱で鉄前駆体の加熱還元により粒子生成を行った。溶液を冷却の後、ろ過で固体を回収した。得られた固体をイソプロパノールに超音波分散し、ネオジウム磁石を用いて分離作業を行った。得られた成分は繰り返し磁石に引き寄せられる性質を有していたため、磁性ナノ粒子を持ったフラクションであることが示唆された。図3に上記操作の後得られた固体の透過型電子顕微鏡像(TEM)画像を示す。驚くべきことに、外壁に担持されたナノ粒子は見られず、サイズ6-8 nmの鉄ナノ粒子がCNTに内包されている様子が観察された。保護剤で覆

われている磁性粒子とCNT外壁の相互作用が弱いことに由来すると考えている。一方、CNTに内包された粒子は多点で吸着できるので、比較的強く相互作用しこのように安定に内包しているCNTが得られたと考えられる。熱重量分析(TGA)測定の結果、回収された内包CNT中の鉄は5.4 wt%であり、内包率は向上の余地がある。今後反応条件や試薬を最適化する必要がある。

ステップ② ラジオ波応答性 CNT 複合体への生体親和性基の修飾

官能基を共有結合で導入する化学修飾法はCNTの表面構造に欠陥形成を伴い、その特性を劣化させるため、物理修飾法がより好ましい。しかし物理修飾法では、生体内のように他の吸着物質が大量に存在する環境では分散剤が表面から脱離し、CNTの再凝集が起こることがある。CNT凝集体は毒性が知られており、さらにサイズが大きいため循環や排出に問題が生じる恐れがある。従って、生体内への応用には構造を維持したまま極めて高い被覆安定性を付与する新たな修飾法が必要である。近年、単層カーボンナノチューブ(SWNT)を分散した界面活性剤間を架橋することで、複合体の安定性の向上が達成されている (C. Mioskowski et al., Nat. Nanotechnol. 2008, 3, 743.)。しかし、利用できる分子構造が限定され、機能化が困難という欠点がある。そこで申請者は、SWNTを分散した界面活性剤ミセル内部の疎水空間に有機溶媒が取り込まれるという報告 (K. J. Ziegler et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 2010, 12, 6990.) に着目し、ミセル内部空間を重合場として架橋高分子を合成することを考えた(図4)。高分子はSWNTを包み込むように架橋構造を形成するため、脱離せずに高い被覆安定性の付与が期待できる。SWNTを分散したミセル内部空間での架橋高分子合成という新たな手法を用いて、架橋修飾によるSWNTの被覆安定性の向上を目的とした。

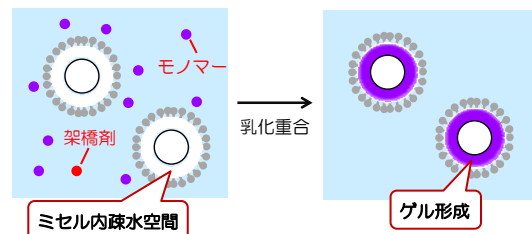


図4. ミセル内部空間を利用した架橋修飾SWNT作製の模式図

重合温度で疎水性になる poly(N-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) を用いる戦略を検討した。すなわち重合開始後に疎水性に相転移したPNIPAMがミセル内部に侵入し、重合場をミセル内部空間に制限し、SWNT表面を被覆出来ると予想した(図5)。PNIPAM被覆SWNTを作製後にはSWNTの表面構造を評価し、続い

て被覆安定性の評価を行った。

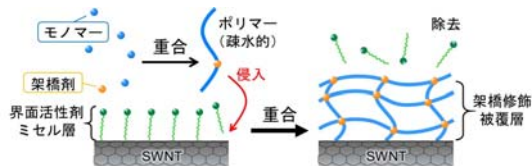


図 5. SWNT 表面被覆過程の模式図

0.2 wt% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 水溶液 (60 mL) に SWNT (6 mg) を 1 時間超音波処理することで分散させ、1 時間遠心分離を行った。上澄み液 (25 mL) にモノマーとして N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) (130 mg)、架橋剤として N, N-メチレンビスアクリルアミド (10 mg) を加え、室温で 1 時間窒素バブリングを行った。続いて反応開始剤として 20 wt% 過硫酸アンモニウム水溶液 (29 · L) を加え、70 °C、窒素雰囲気下で 7 時間攪拌した。反応後の溶液は濾過により凝集物を分離し、さらに上澄み液に対してフィルター過 (分画分子量: 10000) を 7 回繰り返すことで SDS の除去を行った。この溶液に対してさらに超遠心分離を行い、沈殿物を再分散させた。

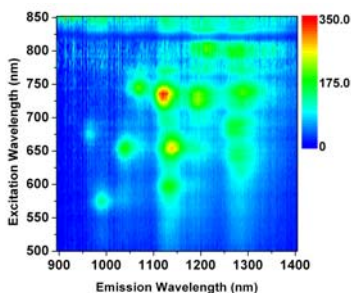


図 6. SWNT/PNIPAM 複合体の PL マッピング

得られた溶液に対して近赤外フォトルミネッセンス (PL) 測定を行った結果、SWNT 由来の発光が見られ、SWNT が孤立分散していることがわかった (図 6)。これは SWNT 表面がゲルにより被覆されたために、可溶化剤である SDS を除いた後であっても分散状態の維持が可能となったためであると考えられる。また、原子間力顕微鏡 (AFM) 測定からは、多くの棒状粒子が観察された。この棒状の粒子は SWNT 表面にゲルが被覆された複合体であると考えられる。AFM 像からも SWNT は孤立分散状態を維持していることがわかった。この手法は共重合にも適応可能で、実際に共重合モノマーとして PEG に連結されたアクリレート基を用いたところ、表面が NIPAM と PEG アクリレート基の共重合ポリマーネットワークにより覆われた複合体を得ることに成功した。PEG は生体適合性の高いユニットとして知られているため、生体適合機能化の手法として有望であることが明らかとなった。得られた粒子は凍結乾燥を行なっても簡単に再分散可能であり、高い分散安定性を有し

ていることが分かった。さらに、より厳しい条件の安定性試験として、大過剰の分散剤 (SDS) を添加する実験を行った。比較対象として、現在 SWNT のバイオテクノロジー応用の際に最もよく用いられているポリエチレンオキシド修飾リン脂質 (PEG-PL) を分散剤として用いた場合の比較を行った。なお PEG-PL 分散 SWNT は非常に多くの研究例が報告され、in vivo 研究にも用いられている実績ある分散剤である。これら 2 つの種類の分散剤を用いた SWNT 溶液を調整した。それぞれに大過剰の SDS を添加し、ろ過作業を行うことで再び過剰の SDS を除去する作業を行った。その結果、PEG-PL 分散 SWNT 溶液においては多くの凝集体が見られたのに対し、SWNT/PNIPAM 複合体は同様のプロセスにおいても全く凝集を示さなかった。PEG-PL は大過剰の SDS の存在により表面から追い出され、脱離することで SWNT が分散能を失ったためと考えられる。従って今回開発した複合体はこれまで報告されたいかなる複合体より安定であると言える。この安定性は体内環境に移行した際にも有用になると期待され、バイオアプリケーションに向けて重要な技術を獲得できたと言える (RCS Advanced 4, 6318 (2014) に掲載済み)。

ごく最近、超遠心プロセスにおいて処理条件の異なるサンプルの原子間力顕微鏡 (AFM) 像を調べたところ、極めて長さの揃った短い CNT で同様の研究ができることを見出した。今回、確立した内包技術を金属ナノ粒子包 Short-CNT を用いて行うことで、生体適合性を付与できると考え、現在 2 つの技術の融合研究に着手している。

ステップ③ ラジオ波照射装置の開発

本研究では医療用周波数である 13.8 MHz を発振するラジオ波照射装置を開発した (図 7)。カーボンブラックを分散したエタノール溶液 (50mg/mL) では瞬時に沸騰される様子が観察され、物質発熱能力を有することが確認された。さらにステップ①で合成した Fe 内容 CNT についてラジオ照射したところ、空の CNT より大幅な温度上昇がみられた。さらに濃度や照射時間の最適化を進めている。



図 7. ラジオ波照射装置の写真

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 2 件)

1. 藤ヶ谷剛彦、ミセル可溶化カーボンナノチューブ表面での重合による高分子複合化の作製、Colloid & Interface communication, 39, 24-26 (2014). 査読有
2. Yusuke Tsutsumi, Tsuyohiko Fujigaya, Naotoshi Nakashima, “Polymer Synthesis Inside a Nanospace of a Surfactant-Micelle on Carbon Nanotubes: Creation of Highly-Stable Individual Nanotubes/Ultrathin Cross-linked Polymer Hybrid” RSC Advanced, 4, 6318-6323 (2014). 10.1039/C3RA46841K 査読有

[学会発表] (計 件)

1. 藤ヶ谷 剛彦、「カーボンナノチューブ被覆技術と被覆カーボンナノチューブの用途展開」、カーボナノ材料研究会、2015年1月15日
2. 佐田 貴生、藤ヶ谷 剛彦、中嶋 直敏、「ポリアニオンと金属イオンのナノポア内への交互積層」、第63回高分子討論会、長崎大学 文教キャンパス、2014年9月26日
3. 堤 優介、藤ヶ谷 剛彦、中嶋 直敏、「ミセル内部空間を利用したカーボンナノチューブ架橋高分子被覆とその生体応用に向けた高機能化」、第51回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(福岡)、2014年6月28日
4. 堤 優介、藤ヶ谷 剛彦、中嶋 直敏、「ミセル内部空間を利用したカーボンナノチューブ架橋高分子被覆法の開拓とその高機能化」、第4回CSJ化学フェスタタワーホール船堀、2014年10月14日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤ヶ谷 剛彦 (FUJIGAYA Tsuyohiko)
九州大学大学院工学研究院・応用化学部門・准教授
研究者番号：30444863

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

佐田 貴生 (SADA Takao)
九州大学工学府化学システム工学専攻

研究者番号：

堤 優介 (TSUTSUMI Yusuke)

九州大学工学府化学システム工学専攻