

解 説

磁気ナノ微粒子の交流磁化率と熱散逸による ハイパーサーミア効果

一柳 優子

横浜国立大学大学院工学研究院物理情報工学専攻

(受取日: 2015 年 6 月 9 日, 受理日: 2015 年 10 月 5 日)

Hyperthermia Effect by AC Magnetic Susceptibility and Heat Dissipation of Magnetic Nanoparticles

Yuko Ichiyanagi

^a Department of Physics, Graduate School of Engineering,
Yokohama National University

(Received Jun. 9, 2015; Accepted Oct. 5, 2015)

We have proposed magnetic hyperthermia treatment using our magnetic nanoparticles. Hyperthermia treatment is one of cancer therapy using heat effect. Mn-Zn ferrite, $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles encapsulated in amorphous SiO_2 were prepared using our original wet chemical method. X-ray diffraction patterns confirmed that the diameters of these particles were within 7–30 nm. Magnetization measurements for various sample compositions revealed that the saturation magnetization (M_s) of 7 nm particles was maximum for the $x = 0.2$ sample. AC magnetic susceptibility measurements were performed for $\text{Mn}_{0.8}\text{Zn}_{0.2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($x = 0.2$) samples with 13–30 nm particles. The peak of the imaginary part of the magnetic susceptibility χ'' shifted to higher temperatures as the particle size increased. From the result of AC magnetic measurements, sample of 18 nm would exhibit highest temperature increase. Measurement system of heating samples by AC field was constructed and observed temperature increase. An AC field was found to cause the increase in highest temperature with the 18 nm particles as expected. Finally, in vitro experiments were carried out to study the hyperthermia effects of $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($x = 0.2$, 18 nm) particles on human cancer cells.

Keywords: nanoparticle, magnetization, ac magnetic susceptibility, heat dissipation, hyperthermia.



一柳 優子
Yuko Ichiyanagi
E-mail: yuko@ynu.ac.jp

1. はじめに

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。昨今はライフサイエンスの分野と、物理的手法開拓を融合させた新しい科学技術の一端として、具体的な応用が様々なかたちで考えられつつある。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について紹介する。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沈殿物が得られ、この中にアモルファス SiO_2 のランダムネットワークに覆われた、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が期待できる。

2. 磁気ナノ微粒子の生成と機能化

近年独自の製法により新しい磁気ナノ微粒子を作製してきた。金属塩化物とメタ珪酸ナトリウムの水溶液の混合により、沈殿物が生じる。この沈殿物を十分洗浄したのち、乾燥させて電気炉で焼成するとアモルファス SiO_2 に内包された粒径が約 2 - 30 nm 程度の磁気クラスターが生成される。この形状の模式図を Fig.1 に示す。同図の TEM 写真は粒径が約 3 nm の酸化鉄 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ である。この方法で得られた磁気微粒子はアモルファス SiO_2 により分散性を良くしており、磁気クラスターの凝集を抑えることができる。さらに表面に Si が存在しているため、アミノシランカップリングにより絶縁体酸化物である磁性体に官能基を修飾することを可能にしている。バルクの強磁性体はいくつもの磁区を作って静磁エネルギーを安定に保っている。磁性体を小さくしていくと次第に磁区の数減ってゆき、ついには単磁区構造をとるようになる。微粒子内の異方性エネルギーは、式

$$Kv=k_B T \quad (1)$$

のように異方性定数 K と体積 v で表されるので、単磁区構造をとっているナノサイズの磁性体では、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り、強磁性を失ってしまう。ここで k_B はボルツマン定数、 T は温度である。つまりナノサイズで強磁性を保つのは困難といえる。ナノサイズで大きな磁化を得るために、異方性の大きなイオンをドーピング、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。¹⁻³⁾ 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 をドーピングすることで磁化の増大が見られた。⁴⁾ この現象は A,B 副格子のスピンの反強磁性配列していることに由来する。Cu-ferrite (銅フェライト) はヤーンテラー歪みを起こす物質として良く知られているが、この歪を解消した立方晶では磁化が増大することも見出している。³⁾ 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。^{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、⁵⁾ カルボキシル基、⁶⁾ チオール基の修飾に成功し機能性磁気ナノ微粒子を生成した。それぞれの結合は赤外線吸収 (FT-IR) スペクトルで確認した (Fig.2)。スペクトルを見ると、それぞれにおいて S-H, C=O および O-H, C-N の結合に由来した吸収がみられ微粒子にこれらの機能部位が確かに結合していることがわかる。これにより磁性酸

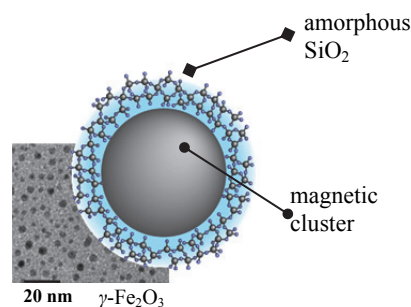


Fig.1 Schematic description of magnetic nanocluster surrounded by amorphous SiO_2 obtained by original wet chemical method and TEM image of iron oxide particles. (This a conceptual drawing consisting of a TEM picture and a schematic illustration of a cluster).

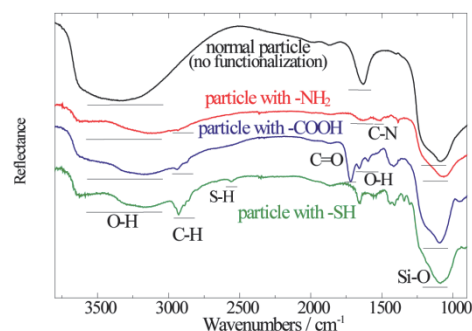


Fig.2 FT-IR spectra of iron oxide nanoparticles after modification of amino group, carboxyl group and thiol group.

化物絶縁体に薬剤やタンパクなどの化学物質を結合することが可能になった。

3. 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。マウスの耳を用いた実験では、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。上述の機能化を施した鉄酸化物微粒子に赤い蛍光物質ローダミンを修飾し、マウスの耳の表面に塗布し、耳の裏側に外部磁場としてマグネットを固定した。比較のために非磁性のアルミを固定したものも用意した。24 時間後、サンプルの断面を共焦点顕微鏡で観察したところ、マグネットの位置でのみ強い蛍光が見られ生体内での局在化が確認できた。蛍光微粒子は表皮、真皮などの生体組織を通過し、軟骨の手前で止まっていることがわかった⁷⁾。さらにがん細胞選択性を持った磁気微粒子の開発を試みた。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、先の機能化した磁気微粒子にさらに葉酸を修飾した。これによりがん細胞にのみ選択的に微粒子が導入されることが期待できる。緑の蛍光物質も付加して、がん細胞 (KB 細胞)、正常細胞、葉酸を修飾しないがん細胞で微粒子の導入を試みたところ、結果的に、葉酸を修飾した場合のみ、がん細胞に選択的に導入されることを確認した。⁸⁾

4. 磁気パラメータとハイパーサーミア用磁気微粒子の最適化

これらの技術を踏まえ、磁気微粒子を用いたがん温熱療法（磁気ハイパーサーミア）を提案した。細胞は約 43℃ で死滅するといわれており⁹⁾、温熱療法も有望視されている¹⁰⁻¹³⁾。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 P は式(2)

$$P = f\Delta U = \mu_0 \pi \chi'' f h^2 \quad (2)$$

のように表わされ¹⁴⁾、磁性体の特性によって異なる。ここで f は周波数、 μ_0 は真空の透磁率、 χ'' は交流磁化率の虚数成分、 h は磁場強度である。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、つまり

$$m = (\chi' - i\chi'')h_0 \exp(i\omega t) \quad (3)$$

の式中の虚部 χ'' がネール緩和に関するパラメータとなっている。 χ' は交流磁化率の実部、 h_0 は交流磁場強度、 ω は角振動数である。この m 中の 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。

そこで、最適条件を見つけるために、ネール緩和に従う系として、Mn-Zn ferrite（マンガン亜鉛フェライト、 $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ ）を選んだ。磁化の値が大きく、ヒステリシスの無い、超常磁性が好ましい。前述の試料作成方法でマンガン塩化物、亜鉛塩化物とメタ珪酸ナトリウムの水溶液を湿式混合して前駆体を得たのち電気炉で焼成し、目的物の磁気クラスターを得た。Zn の量 x を調整して、組成を変化させることができる。粒子径は 1073–1223 K のアニール温度で制御し、Fig.3 に示すように X 線回折パターンから、約 7 nm に揃えた単相のスピンル構造であるフェライトがアモルファス SiO_2 中に生成していることが確認できた。¹⁵⁾

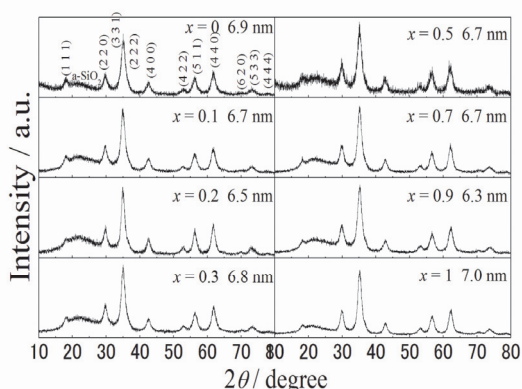


Fig.3 XRD patterns for $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($x = 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1$) samples.¹⁵⁾

磁化測定の結果からは、Fig.4 に示すように ± 50 kOe の磁場中では、ほぼすべての試料が室温で超常磁性を示し、Zn のドーピング量 $x = 0.2$ の組成で最大の磁化の値を示した。¹⁵⁾ Zn ドーピング量を横軸にしたものを Fig.5 に示す。

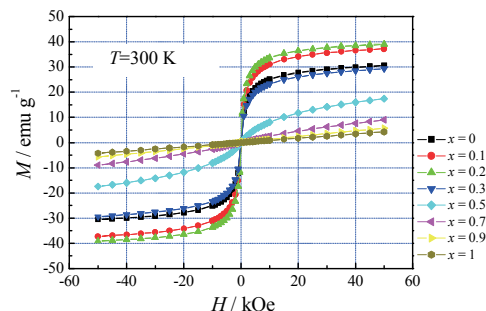


Fig.4 Magnetization curves for $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ for particle sizes of 7 nm.¹⁵⁾

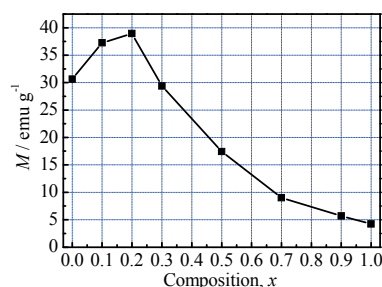


Fig.5 The maximum magnetization value of each composition of ($x=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0$).¹⁵⁾

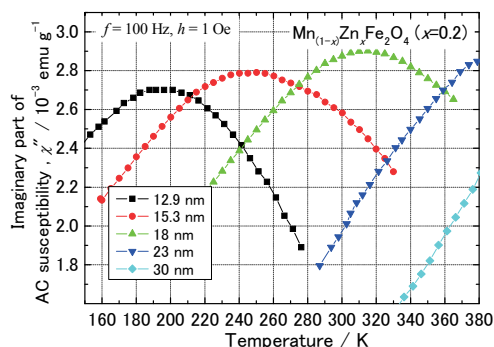


Fig.6 Temperature dependence of the imaginary part of the AC magnetic susceptibility, χ'' , for different particle sizes of $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($x=0.2$).¹⁵⁾

上述のように DC（直流）磁化率の測定から、もっとも熱散逸効果が高いと期待できる $\text{Mn}_{0.8}\text{Zn}_{0.2}\text{Fe}_2\text{O}_4$ の試料について、今度は粒径を 30 nm まで変化させて交流磁化率の測定を行った。交流磁場周波数は 100 Hz、1 Oe で、測定温度は 150–380 K である。Fig.6 に交流磁化率虚数部 χ'' の温度依存性を示す。 χ'' は粒径が大きくなるに従いピークは高温側にシフトし、周波数、磁場強度によってもピークがシフトした。¹⁵⁾ 周波数が 1 Hz から 1000 Hz の範囲の実験結果では磁場強度が大きくなるにつれて、ピークは高温側へシフトし、絶対値は増加した。体温である 310 K 付近に注目すると、18 nm の試料がピークを示しており、この条件で熱散逸が最も効果的に得られると期待できる。

5. 交流磁場中の昇温測定と *in vitro* 実験におけるハイパーサーミア効果

そこで、交流磁場発生装置を製作し、試料の元の温度か

らの上昇を観察した。試料を置く管にコイルを巻き、ファンクションジェネレーターで正弦波を発生させ、パイプアンプで増幅して交流磁場を印加した。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、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。コイルの径は 5.2 mm, 50 turn を 2 層, 0.26 mm の銅線で巻いた。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。作製したコイルによる最大の磁場は 15 kHz, 151 Oe であった。

SQUID による磁化測定の際の実験系での周波数は 100 Hz であるが、 χ'' の温度依存性はアレニウス型の変化であるため、ピーク位置はある程度ずれるものの、室温付近が大きく外れることはないと考えられる。Fig.7 に 100, 500, 1000 Hz における χ'' の温度依存性と、この値から温度の逆数と周波数の対数をとったアレニウスプロットした図を Fig.8 に示す。外挿してみると 100 Hz から 15 kHz に変化する場合のピーク温度のシフトは 20 K 程度であると予想できる。

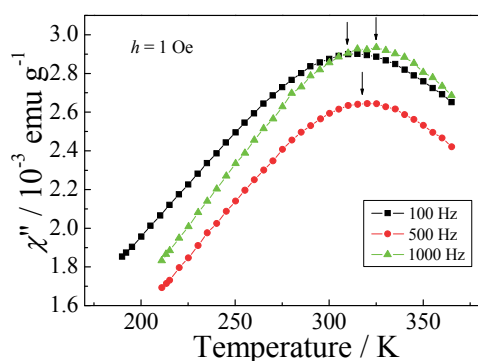


Fig.7 Temperature dependence of the imaginary part of the AC magnetic susceptibility, χ'' , for frequency at 100, 500 and 1000 Hz,

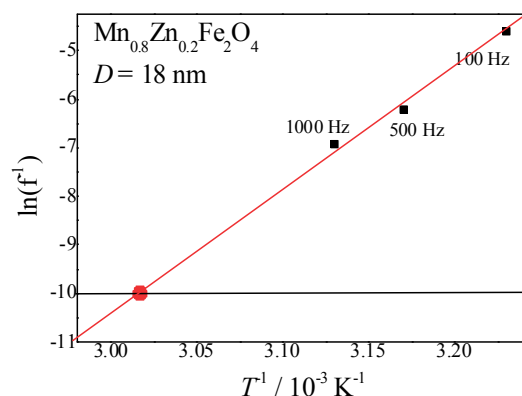


Fig.8 Plot of $\ln$ inverse frequency vs $1/T$. The solid line indicates extrapolation.

また、磁場強度については実験条件の問題から 151 Oe を選択したが、少なくとも 1 Oe から 151 Oe までの磁場強度範囲でのピーク温度のシフトはそれほど大きくなく、(2)式でわかるように熱散逸量は磁場の 2 乗に比例した増強も伴うため、18 nm の試料での室温領域では χ'' によるハイパーサーミア効果が十分に発現することが期待できる。Fig.9 に 5 分間における試料の温度上昇の変化を示した。

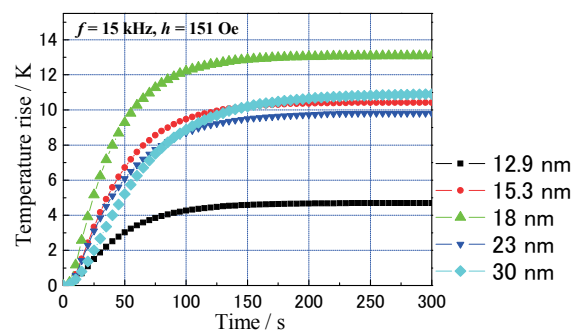


Fig.9 Rise in temperature as a function of time in the AC magnetic field for the samples¹⁵⁾.

交流磁化率の測定結果から予想したとおり、18 nm の試料が最も発熱しており、13 K ほど上昇している。粒径のより大きな 23 nm や 30 nm よりも優れているというのは興味深い。この結果はこの微粒子がネール緩和に従う系であることを示している。体温が約 37 °C だとすると、この 13 K という温度上昇はがん細胞を死滅させるのに十分な温度といえる。この温度上昇のカーブを指数関数で近似して $y = y_0 A \exp(-t/K)$ に従うとして、グラフの勾配にあたる温度変化 ΔT 、比熱 c などを用いて $P = c \Delta T / K$, $\Delta T = T_{\max} - T_0$ の関係より熱散逸量 P を定量的に求めることができる。その結果、18 nm の粒子の発熱量は単位重さあたり 0.28 W·g⁻¹ となった。この熱散逸量を粒径に対してプロットしたものが Fig.10 であるが、(1)式のネール緩和による式から算出した値とよく一致していることも確認できる。さらにこの事実は Fig.11 に見られるように、熱散逸量が交流磁場 h の 2 乗に比例していることから裏付けられる。

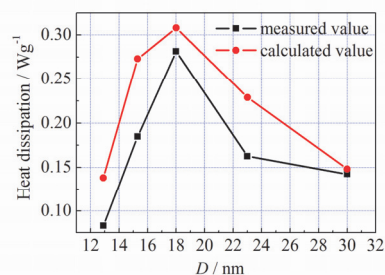


Fig.10 Measured value and calculated value of the heat dissipation versus particle size.¹⁵⁾

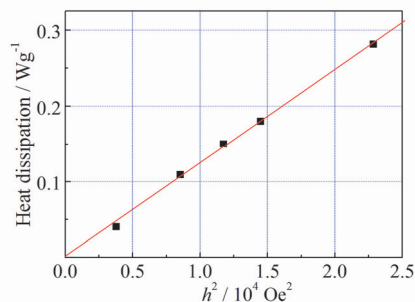


Fig.11 Magnetic field dependence of heat dissipation for the sample of 18 nm.¹⁵⁾

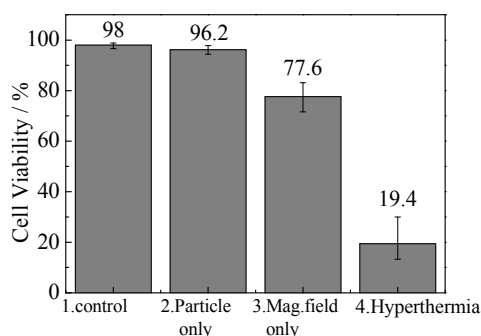


Fig.12 Cell viability of the human prostate cancer cell (DU145).¹⁵⁾

この試料を用いて、実際にがん細胞が死滅することを実証するため、*in vitro* の細胞実験を行った。ヒト前立腺がん細胞 DU145 を 35 mm シャーレの中で 24 時間培養した。この大きさのシャーレを覆えるよう、コイルにも改良を加え径を大きくし、コンデンサーを適宜回路に組み込んだ。培養したシャーレの中に 1 mg/ml 濃度の磁気微粒子を撒布し、本コイルで出力可能な最大磁場である 31 kHz, 90 Oe の交流磁場を 30 分間印加した。その後、細胞をトリパンブルーで染色し、生存細胞をカウントした。設定した条件は (1) コントロール (バックグラウンド)、(2) 微粒子のみ、(3) 磁場のみ、(4) 磁気ハイパーサーミアの 4 つである。**Fig.12** にそれらの細胞生存率の結果を示す。(1)、(2) で微粒子のみではほとんど変わらない結果に対して、(4) ではがん細胞の生存率が 20 %以下にまで激減しており、ハイパーサーミアの効果がはっきりと観察できた。(1)、(2) で変化がないことから、微粒子には毒性がないこともわかる。別の実験では、本微粒子がアモルファス SiO₂ で覆われている特徴を持つため、毒性が少なくなるという結果も得ている。前立腺がん以外にも、乳がん細胞 KPL4, MCF7, MDA-MB231 の 3 種類について同様な実験を行ったところ、やはり磁気ハイパーサーミアによりがん細胞が 20 %程度まで死滅することを確認している¹⁵⁾。これらの結果をふまえ、*in vivo* の実験へと発展させていきたい。

謝 辞

本研究は JST さきがけ、科学研究費補助金基盤 (B)No.23656013、磁気健康科学財団 (2012) 等の助成金をもとに行った。磁化測定には大阪大学の MPMS を使用させていただき、宮崎裕司准教授、中澤康浩教授に大変お世話になった。前立腺がん細胞は本学大学院バイオコースの渡邊昌俊教授からご提供いただき、細胞培養の手法は東北大学大学院医学研究科の大内憲明教授、権田幸祐教授より教授いただいた。ここに感謝申し上げます。

文 献

- 1) M. Kubota, Y. Kanazawa, K. Nasu, S. Moritake, H. Kawaji, T. Atake, and Y. Ichiyanagi, *J. Therm. Anal. Calorim.* **92-2**, 461-463 (2008).
- 2) Y. Moro, H. Katayanagi, S. Kimura, D. Shigeoka, T. Hiroki, T. Mashino, and Y. Ichiyanagi, *Surf. Interface Anal.* **42**, 1655-1658 (2010).

- 3) Shinji Kimura, Toshiyuki Mashino, Tomoyuki Hiroki, Daiki Shigeoka, Naoki Sakai, Liming Zhu, and Yuko Ichiyanagi, *Thermochimica Acta* **532**, 119-122 (2012).
- 4) Yuko Ichiyanagi, Tetsuya Uehashi, and Saori Yamada, *phys. stat. sol. (c)* **1**, 3485-3488 (2004).
- 5) Yuko Ichiyanagi, Shinji Moritake, Shu Taira, and Mitutoshi Setou, *J. Magn. Mang. Mater.* **310**, 2877-2879 (2007).
- 6) Tomoyuki Hiroki, Shu Taira, Hikaru Katayanagi, Yuki Moro, Daiki Shigeoka, Shinji Kimura, Toshiyuki Mashino, and Yuko Ichiyanagi, *J. Phys. Conf. Ser.* **200**, 122003 (2010).
- 7) Shinji Moritake, Shu Taira, Yuko Ichiyanagi, Nobuhiro Morone, Si-Young Song, Takahiro Hatanaka, Shigeki Yuasa, and Mitsutoshi Setou, *J. Nanosci. Nanotech.* **7**, 937-944 (2007).
- 8) Shu TAIRA, Shinji MORITAKE, Yukino KAI, Takahiro HATANAKA, Yuko ICHIYANAGI and Mitsutoshi SETOU, *eJ. Surf. Sci. Nanotech.* **5**, 23-28 (2007).
- 9) W.C. Dewey, "Hyperthermia and oncology" Vol 2 Biology of Thermal Potentiation of Radiotherapy, VSP BV, Netherlands (1989).
- 10) M. Suto, Y. Hirota, H. Mamiya, A. Fujita, R. Kasuya, K. Tohji, B. Jeyadevan, *J. Mag. Mag. Mater.* **321**, 1493-1496 (2009).
- 11) Jung-tak, Hyunsoo Nah, Jae-Hyun Lee, Seung Ho Moon, Min Gyu Kim and Jinwoo Cheon, *Angew. Chem.* **121** 1260-1264 (2009).
- 12) A. A. M. Elsherbini, M. Saber, M. Aggag, A. El-Shahawy, and H. A. A. Shokier, *Mag. Reson. Imaging* **29**, 272-280 (2011).
- 13) S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, and M. Mahmoudi, *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**, 8-23 (2011).
- 14) R. E. Rosenweig, *J. Mag. Mag. Mater.* **252**, 370-374 (2002).
- 15) T. Kondo, M. Hachisu, K. Mori, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takano, N. Ohuchi, and Y. Ichiyanagi, *J. Appl. Phys.* **117**, 17D157 (2015).