

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-156411

(P2014-156411A)

(43) 公開日 平成26年8月28日(2014.8.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	4 C 0 7 6
A 6 1 K 33/26 (2006.01)	A 6 1 K 33/26	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 5	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-27166 (P2013-27166)  
 (22) 出願日 平成25年2月14日 (2013.2.14)

(71) 出願人 000166443  
 戸田工業株式会社  
 広島県大竹市明治新開1番4  
 (71) 出願人 504132272  
 国立大学法人京都大学  
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1  
 (72) 発明者 小原 香  
 広島県大竹市明治新開1番4 戸田工業株  
 式会社大竹創造センター内  
 (72) 発明者 小林 齊也  
 広島県大竹市明治新開1番4 戸田工業株  
 式会社大竹創造センター内  
 (72) 発明者 ポルワッタ・ルワン・ガラゲ  
 広島県大竹市明治新開1番4 戸田工業株  
 式会社大竹創造センター内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合磁性微粒子粉末、分散体

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、容易な修飾による均質な機能性を発揮でき、水系溶液に高分散な診断用・治療用などの磁性粒子含有医薬を生成できる磁性粒子含有水分散単を提供する。

【解決手段】 一次粒子径が10～100nmの磁性ナノ粒子の粒子表面が一層目、二層目及び三層目の順で被覆されており、前記一層目が酸化ケイ素であり、前記二層目はアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するシランカップリング剤、アミノ酸、多糖類であり、前記三層目は、二層目の表面の官能基とアミド結合、エステル結合、クリック反応で修飾可能なアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類である複合磁性微粒子粉末である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一次粒子径が10～100nmの磁性ナノ粒子の粒子表面が一層目、二層目及び三層目の順で被覆されており、前記一層目が酸化ケイ素であり、前記二層目はアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するシランカップリング剤、アミノ酸、多糖類の一種以上であり、前記三層目は、二層目の表面の官能基とアミド結合、エステル結合、クリック反応で修飾可能なアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類の一種以上であることを特徴とする複合磁性微粒子粉末。

## 【請求項 2】

請求項1記載の複合磁性微粒子粉末において、前記三層目の表面にさらに四層目を形成した複合磁性微粒子粉末であり、前記四層目は、アミド結合、エステル結合で修飾可能なアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、NO類、蛍光色素、標準タンパク質からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類の一種以上である複合磁性微粒子粉末。

## 【請求項 3】

請求項1又は2記載の複合磁性微粒子粉末において、前記磁性ナノ粒子が、金属鉄、酸化鉄、窒化鉄、炭化鉄、ホウ化鉄のうち少なくとも1種以上である複合磁性微粒子粉末。

## 【請求項 4】

請求項1～3のいずれかに記載の複合磁性微粒子粉末の飽和磁化値が $15 \sim 230 \text{ A m}^2 / \text{kg}$ である複合磁性微粒子粉末。

## 【請求項 5】

請求項1～4のいずれかに記載の複合磁性微粒子を含有する分散体。

## 【請求項 6】

請求項5記載の分散体において、分散媒体が、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリスバッファースル水溶液、ヘプスバッファースル水溶液、血清及び細胞培養培地から選ばれる少なくとも一種である分散体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、医療技術分野において、薬物の送達法であるドラッグデリバリーシステム（以降、DDSと記す）、MRI（磁気共鳴）診断及び温熱治療法などの治療用の磁性粒子含有医薬に用いる磁性材料に関するものである。

## 【0002】

詳述すれば、本発明は、磁性微粒子の病変組織や細胞への送達指向性、MRI診断時の造影感度及び温熱治療時の発熱性等の性能を向上させることを目的とする磁性微粒子含有医薬用原薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

近年、磁性体として磁性酸化鉄微粒子を用い、酸性多糖、タンパク質及び水溶性ポリマー等の生体適応物質と複合化した磁性粒子含有医薬品が検討されている。

## 【0004】

また、磁性酸化鉄微粒子の単分散水溶液を調製するために、アミノ酸を粒子表面に固定する方法、酸性多糖を被覆する方法、または有機金属ポリマーで被覆する方法、あるいはタンパク質及びペプチドを固定し単分散水溶液を調製する方法等が知られている。

## 【0005】

さらに、生体分子との結合を容易にするために、アミノ基やカルボキシキル基、スルホン基等の官能基を有する表面修飾分子を磁性酸化鉄粒子の表面に被覆したものが報告されて

10

20

30

40

50

いる。

【0006】

これらはいずれも一旦酸化鉄の水性ゾルを調製した後に、それぞれ高分子や多糖類と混合して調製している。よって、磁性粒子の粒子径が凝集により大きくなってしまふことや、磁性粒子とこれら表面修飾分子との結合が弱く、血液中で解離しやすく、加熱滅菌時の安定性や経時安定性も良くない。

【0007】

また、磁性粒子の粒子径が凝集により大きくなってしまふことは、安定した分散状態を保つことができない。

【0008】

また、血液安定性、血中対流性に優れ、さらに腫瘍集積性を考慮し、特定のターゲット分子に対して特異的な親和結合を形成するような診断用及び治療用の磁性粒子含有医薬を再現性良く生成できる磁性粒子を含有する医薬原薬の開発が求められている。

【0009】

酸化鉄の合成と同時に酸化鉄表面に高分子を修飾する方法も知られている。この表面はカルボキシル基に覆われており、反応点は多く存在するが、微粒子サイズが小さいため使用用途が限定される。

【0010】

医療用途として酸化鉄微粒子の安全性は高いが、飽和磁化が小さいことから扱いは限定されることより、シリカで酸化鉄を被覆し、内部の酸化鉄を還元鉄にすることにより磁化を高める手法もある。

【0011】

これまで、種々の化合物を表面に付着させた磁性粒子が知られている（特許文献1～6）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際公開第95/31220号パンフレット

【特許文献2】特開2003-112925号公報

【特許文献3】特開2007-216134号公報

【特許文献4】特開2007-220867号公報

【特許文献5】特開2007-217331号公報

【特許文献6】特開2011-126876号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

上述したように、均質な特性を有した磁性粒子を再現性良く得るためには、磁性粒子を含有する医薬の製薬時において、生体適応性物質と磁性微粒子とを均一に分散混合させることが不可欠な条件であり、そのためには原薬中の磁性微粒子は微細で粒度が均一な磁性微粒子からなる単分散コロイド水溶液であることが必要である。

【0014】

また、血液中での安定性を保つために、中性pH領域での分散安定性が必要である。

【0015】

さらに、抗体等の生体分子と強い結合をつくるように、磁性粒子表面に官能基を持たせることが必要である。

【0016】

本発明は、上記従来の問題点に鑑みてなされたものであり、磁性微粒子の粒子表面が表面修飾層にはアニオン性、カチオン性もしくは中性からなるポリマーで粒子表面が修飾されており、均一な粒度からなる磁性微粒子の分散コロイド水溶液を提供することを技術的課題とする。

10

20

30

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0017】

即ち、本発明は、一次粒子径が10～100nmの磁性ナノ粒子の粒子表面が一層目、二層目及び三層目の順で被覆されており、前記一層目が酸化ケイ素であり、前記二層目はアミノ基、カルボキシ基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するシランカップリング剤、アミノ酸、多糖類の一種以上であり、前記三層目は、二層目の表面の官能基とアミド結合、エステル結合、クリック反応で修飾可能なアミノ基、カルボキシ基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類の一種以上であることを特徴とする複合磁性微粒子粉末である（本発明1）。

10

## 【0018】

また、本発明は、本発明1記載の複合磁性微粒子粉末において、前記三層目の表面にさらに四層目を形成した複合磁性微粒子粉末であり、前記四層目は、アミド結合、エステル結合で修飾可能なアミノ基、カルボキシ基、水酸基、NO類、蛍光色素、標準タンパク質からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類の一種以上である複合磁性微粒子粉末である（本発明2）。

## 【0019】

また、本発明は、本発明1又は2記載の複合磁性微粒子粉末において、前記磁性ナノ粒子が、金属鉄、酸化鉄、窒化鉄、炭化鉄、ホウ化鉄のうち少なくとも1種以上である複合磁性微粒子粉末である（本発明3）。

20

## 【0020】

また、本発明は、本発明1～3のいずれかに記載の複合磁性微粒子粉末の飽和磁化値が $15 \sim 230 \text{ Am}^2 / \text{kg}$ である複合磁性微粒子粉末である（本発明4）。

## 【0021】

また、本発明は、本発明1～4のいずれかに記載の複合磁性微粒子を含有する分散体である（本発明5）。

## 【0022】

また、本発明は、本発明5記載の分散体において、分散媒体が、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリスバッファー塩水溶液、ヘプスバッファー塩水溶液、血清及び細胞培養培地から選ばれる少なくとも一種である分散体である（本発明6）。

30

## 【発明の効果】

## 【0023】

本発明に係る複合磁性微粒子粉末は、毒性が低く、水溶液中での分散性に優れたものである。また、本発明に係る複合磁性微粒子を含有する分散体は、毒性が低く、水溶液中で複合磁性微粒子が安定に分散できるものである。さらに複合磁性微粒子の粒子表面の電位を自在に調節できる官能基を有することにより、磁性粒子を生体適合物質に均質に分散させた複合物からなる医薬を容易に合成することができる。さらに、液媒が界面活性剤などを含有しない原薬であるので、生体への安全性に与える影響は極めて少ないものである。

また、用途に合わせ製薬造粒工程において、微粒子の集合状態を調節することにより造粒粒子に強磁性体の機能を付与することができる。

40

また、微粒子は投与後体内から排泄を容易にすることができる。さらに、大きな粒子が有する高い磁化は、外部磁場による効果的な温熱療法、薬剤を目的の場所に輸送するDDS技術に用いることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0024】

【図1】実施例1で得られた複合磁性微粒子の適用例の結果を示したグラフである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0025】

本発明の構成をより詳しく説明すれば次のとおりである。

## 【0026】

50

本発明に係る複合磁性微粒子粉末は、一次粒子径が10～100nmの磁性ナノ粒子の粒子表面が一層目、二層目及び三層目の順で被覆されている。前記一層目が酸化ケイ素である。前記二層目はアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するシランカップリング剤、アミノ酸、多糖類である。前記三層目は、二層目の官能基とアミド結合、エステル結合、クリック反応で修飾可能なアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類である。

【0027】

磁性ナノ粒子の一次粒子径（一次粒子の平均粒子径）は10nm～100nmである。一次粒子の平均粒子径が10nm未満では非晶質であり好ましくない。また、一次粒子径が100nmを超えると、磁氣的凝集点で好ましくない。一次粒子径は12～90nmがこのましく、より好ましくは15～80nmである。

10

【0028】

本発明における磁性ナノ粒子は、マグネタイト( $Fe_3O_4$ )、マグヘマイト( $Fe_2O_3$ )、ウスタイトなどの酸化鉄、金属鉄、窒化鉄、炭化鉄、ホウ化鉄から選ばれる1種以上である。前記各化合物は異種金属元素を含有してもよい。金属鉄には、金属鉄又は鉄と異種元素の合金( $FeCo$ ,  $FePt$ 等)でもよい。窒化鉄は、 $Fe_{3-x}N$ ,  $Fe_4N$ ,  $Fe_{16}N_2$ などであり、 $Co$ ,  $Ni$ などの異種元素で置換してもよい。炭化鉄、ホウ化鉄でも相互に置換してもよい。また、表面酸化層を有していてもよい。

20

【0029】

本発明における磁性ナノ粒子は超常磁性体、強磁性体であることが好ましいが、飽和磁化値は5～230  $Am^2/kg$ であることが好ましい。磁性酸化鉄微粒子の飽和磁化値  $s$  は15～220  $Am^2/kg$ である。5  $Am^2/kg$  未満の飽和磁化値では磁性が不足している。より好ましい飽和磁化値  $s$  は25～200  $Am^2/kg$ である。

【0030】

本発明における磁性ナノ粒子は、一層目、二層目、三層目の順で磁性ナノ粒子の粒子表面から外側に向かって表面被覆されている。

【0031】

本発明における一層目はケイ素化合物であり、被覆する化合物の状態としては、シリカなどが挙げられ、シリカは結晶及び非結晶いずれでもよい。

30

【0032】

前記一層目の被覆量は、磁性ナノ粒子に対して5～60wt%が好ましい。磁性ナノ粒子の一次粒子径が20nm未満であれば40～60wt%がより好ましく、20～150nmであれば5～15wt%がより好ましい。

【0033】

前記二層目はアミノ基、カルボキシキル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するシランカップリング剤、アミノ酸、又は、多糖類である。

【0034】

具体的には、N-(トリメトキシプロピル)エチレンジアミン・3酢酸, 3ナトリウム塩( $COOH$ )、3-アミノプロピルトリエトキシシラン( $NH_2$ )、3-アミノプロピルトリメトキシシラン( $NH_2$ )、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン( $NH_2$ )、N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン( $NH_2$ )、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシラン(エポキシ)、3-グリシドキシプロピルトリエトキシシラン(エポキシ)、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン(イソシアネート)、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン(イソシアネート)、アジドホモアラニン、 $Boc-Lys(N_3)-OH$ 、 $Fmoc-Azido\ homoalanine$ 、2-Amino-3-Mercapto-N-(Prop-2-ynyl) Propionamide、 $Boc-D-Propargylglycine\ Dicyclohexylammonium\ Salt$ 、 $Boc-L-Propargylglycine\ Dicyclohexylammoni$

40

50

um Salt、Fmoc-D-Propargylglycine、Fmoc-L-Propargylglycine、カルボン酸シランカップリング剤などである。より好ましくは、カルボン酸シランカップリング剤、である。なお、結合剤としてカルボジイミドなどを含有させてもよい。

【0035】

前記二層目の被覆量は、磁性ナノ粒子に対して5～15wt%が好ましい。

【0036】

前記三層目は、二層目の表面の官能基とアミド結合、エステル結合、クリック反応で修飾可能なアミノ基、カルボキシル基、水酸基、アジド類、アルキン類からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類である。

10

【0037】

具体的には、ポリエチレンイミン、デキストラン、カルボキシメチルデキストリン、2-Amino-3-Mercapto-N-(Prop-2-ynyl) Propionamide、Boc-D-Propargylglycine Dicyclohexylammonium Salt、Boc-L-Propargylglycine Dicyclohexylammonium Salt、Fmoc-D-Propargylglycine、Fmoc-L-Propargylglycine、アジドホモアラニン、Boc-Lys(N3)-OH、Fmoc-Azido-homo-alanine、などである。より好ましくはデキストラン、ポリエチレンイミンである。なお、結合剤としてカルボジイミドなどを含有させてもよい。

20

【0038】

前記三層目の被覆量は、磁性ナノ粒子に対して5～15wt%が好ましい。

【0039】

本発明において、必要により、前記三層目の表面にさらに四層目を形成してもよい。前記四層目は、アミド結合、エステル結合で修飾可能なアミノ基、カルボキシル基、水酸基、NO類、蛍光色素、標準タンパク質からなる群から選ばれた官能基を有するアミノ酸、多糖類、イミン類の一種以上である。

【0040】

具体的には、NaNO<sub>2</sub>、フルオレセインイソチオシアネート、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステルなどである。

30

【0041】

本発明に係る複合磁性微粒子粉末の飽和磁化値は15～230Am<sup>2</sup>/kgが好ましい。複合磁性微粒子粉末の飽和磁化値が15Am<sup>2</sup>/kg未満の場合には、磁性が不足しているのが好ましくない。また、複合磁性微粒子粉末の飽和磁化値が230Am<sup>2</sup>/kgを超えるナノ粒子は工業的に生産することが困難である。より好ましい飽和磁化値は20～150Am<sup>2</sup>/kgである。

【0042】

本発明に係る磁性酸化鉄微粒子の二次粒子の平均粒子径は10～200nmが好ましい。二次粒子の平均粒子径が10nm未満の場合には、癌の温熱療法に用いた場合に交番磁場による発熱性が低くなる。一方、二次粒子の平均粒子径が200nmではクッパー細胞の貪食作用により細胞内に効率的に取り込まれる。好ましい二次粒子の平均粒子径は20nm～200nmである。

40

【0043】

次に、本発明に係る複合磁性ナノ粒子の製造方法について述べる。

【0044】

本発明においては、まず、磁性ナノ粒子を製造した後、順に、被覆層を形成していく。

【0045】

本発明における金属鉄は、例えば、以下のとおりの製造方法によって得ることができる。

50

## 【0046】

鉄を含む酸化物、水酸化物などの鉄化合物粉末と水素化カルシウム等の還元剤とを混合し、熱処理して得ることができる。ここで、鉄化合物粉末はあらかじめケイ素化合物によって被覆されている。

## 【0047】

本発明における窒化鉄は、例えば、以下のとおりの製造方法によって得ることができる。

## 【0048】

本発明における窒化鉄は、酸化鉄又はオキシ水酸化鉄などの鉄化合物粒子粉末に還元処理を行い、次いで、窒化処理を行って得ることができる。なお、鉄化合物粒子粉末の粒子表面は、あらかじめ、ケイ素化合物で被覆しておく。

10

## 【0049】

本発明におけるマグネタイト ( $Fe_3O_4$ ) は、鉄塩水溶液とアルカリ水溶液とを用いる水溶液反応 (湿式法という。) で合成することができる。

## 【0050】

一般的に、水溶液反応には、共沈法と酸化反応法がよく用いられる。

## 【0051】

共沈法とは、第一鉄塩水溶液  $Fe(II)$  1モルと第二鉄塩水溶液  $Fe(III)$  2モルとの混合水溶液にアルカリ水溶液を攪拌しながら加えると、 $Fe(II)$  と  $2Fe(III)$  の共沈反応が生起して黒色スピネル型磁性酸化鉄であるマグネタイト粒子が生成する反応である。この反応において  $Fe$  以外の2価金属、例えば、 $Mg$  を添加した場合には  $Mg$  を含有したスピネル型磁性酸化鉄微粒子が得られる。また、鉄塩濃度や混合温度などの反応条件により生成粒子の大きさが制御できるので、これらの反応条件を組み合わせることにより磁性酸化鉄微粒子を合成することができる。

20

## 【0052】

本発明における第一鉄塩水溶液としては、硫酸第一鉄水溶液又は塩化第一鉄水溶液等を使用することができる。本発明における第二鉄塩としては、硫酸第二鉄水溶液又は塩化第二鉄水溶液等を使用することができる。

## 【0053】

本発明におけるアルカリ水溶液としては、アンモニア水、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属の水酸化物の水溶液、水酸化マグネシウム、水酸化カルシウム等のアルカリ土類金属の水酸化物の水溶液を使用することができる。より好ましくはアンモニア水である。

30

## 【0054】

本発明においては、第一鉄及び第二鉄に対して当量となる量のアルカリ水溶液を添加すればよい。

## 【0055】

本発明においては、マグネタイトの反応にあたり、反応溶液にあらかじめポリアクリル酸などのカルボキシル基を有するポリマーを溶解しておくことが好ましい。反応溶液に事前にカルボキシル基を有するポリマーを存在させておくことによって、反応により生成するマグネタイト粒子の粒子表面が直ぐにポリアクリル酸によって被覆され、粒子同士の凝集を抑制できる。

40

## 【0056】

反応溶液中のカルボキシル基を有するポリマーの濃度は、反応溶液中の全ての鉄 ( $Fe$ ) に対するモル比で  $0.3 \sim 3.0$  となる量を存在させておく。ポリマーの濃度が  $0.3$  未満の場合、濃度が希薄なため磁性酸化鉄微粒子の凝集を抑制できる程度にポリマーを被覆することができない。ポリマーの濃度が  $3.0$  を超える場合、効果が飽和するため、必要以上に存在させる意味がない。より好ましいポリマーの濃度は  $0.8 \sim 2.5$  である。反応溶液中のカルボキシル基を有するポリマーの濃度を前記範囲とすることによって、ゼータ電位を  $-20\text{ mV}$  以下とすることができる。

50

## 【0057】

本発明における反応温度は90～100 が好ましい。90 未満である場合には、ゲータイトが混在してくる。100 を越える場合もマグネタイト粒子は生成するが、オートクレーブ等の装置を必要とするため工業的に容易ではない。

## 【0058】

本発明においては、磁性粒子含有水分散体の水洗は、次のように行なう。すなわち、室温まで冷却した反応後の溶液をビーカーなどに移し、スターラー攪拌しながら沈殿が生じるまでほぼ等量のエタノールを添加する。上澄みを捨て、イオン交換水を添加し分散させる。再度、エタノールを添加し、遠心分離で上澄みを除去する。この操作を再度繰り返し、最終的に得られた沈殿物をイオン交換水に分散させる。必要に応じて、エバポレーターで濃縮する。

10

## 【0059】

次に、水に可溶した塩類を除去するために透析膜を用いて透析を行なう。エバポレーターで濃縮した後、遠心分離機で上澄みを回収し、残った凝集粒子を除去する。

## 【0060】

次に、上澄みの磁性粒子含有水分散体を - 20 以下の冷凍庫内に5時間以上放置することで凍結させ、減圧下での凍結乾燥を行うことで、本発明における磁性酸化鉄微粒子を得ることができる。

## 【0061】

一方、磁性粒子含有水分散体の濃度を5～50mg/mlに希釈調整して磁性酸化鉄微粒子がイオン交換水に分散している磁性粒子含有水分散体を得ることができる。

20

## 【0062】

また、得られた磁性酸化鉄微粒子はアミノ基を有するポリエチレンジアミンとの架橋反応により表面電位を変化させ、さらに水酸基を有し毒性の比較的低いポリエチレングルコールとも反応することができ、表面電位を自在に扱えることができる。

## 【0063】

さらに、本発明におけるマグネタイトは、脂肪酸第二鉄と有機溶媒とを用いる反応で合成することができる。

## 【0064】

合成方法は、例えば、脂肪酸第二鉄Fe<sub>2</sub>・9ミリモルと有機溶媒91・5ミリモル、脂肪酸4・2ミリモルとの混合水溶液を攪拌しながら加熱すると、Fe(III)が生起して黒色スピネル型磁性酸化鉄であるマグネタイト粒子が生成する反応である。また、脂肪酸鉄濃度や混合温度などの反応条件により生成粒子の大きさが制御できるので、これらの反応条件を組み合わせることによりマグネタイトを合成することができる。

30

## 【0065】

本発明における脂肪酸第二鉄Fe(III)としては、ラウリン酸鉄(III)、ステアリン酸鉄(III)、オレイン酸鉄(III)等を使用することができる。

## 【0066】

本発明における有機溶媒としては、トリnオクチルアミン、n-オクチルエーテルが好ましい。

40

## 【0067】

本発明における脂肪酸は、オレイン酸を使用することが好ましい。

## 【0068】

本発明における反応温度は300～370 が好ましい。300 未満である場合には、粒子サイズが均一にならない。370 を越える場合もマグネタイト粒子は生成するが、有機溶媒の沸点よりも高いため現実的ではない。

## 【0069】

本発明においては、磁性粒子の回収は、次のように行なう。すなわち、50 まで冷却した反応後の溶液にクロロホルムを添加し遠心管などに移し、遠心分離にて上澄みを捨て、ヘキサン、シクロヘキサンなどに分散させる。

50



## 【0070】

本発明において、第一層である酸化ケイ素による被覆層を形成させるためには、界面活性剤を溶解したシクロヘキサン溶液にアルカリ溶液を添加し逆ミセルを形成させた後、テトラエチルオルトケイ酸とともに磁性粒子分散体を加え攪拌させ、遠心分離にて上清を捨て回収して製造することができる。

## 【0071】

本発明におけるアルカリは、アンモニアが好ましい。

## 【0072】

本発明で得られたシリカ層を有するマグネタイトは、還元剤を用いて金属鉄微粒子へ変換する手法なども用いることができる。

10

## 【0073】

磁性ナノ粒子を含有する分散液を用いて、第二層、第三層の形成を行う。

## 【0074】

第二層は、第一層を形成した磁性ナノ粒子を所定の溶媒に分散させ、第二層を形成する化合物を添加して加熱・攪拌することで形成することができる。例えば、シリカ層を形成した磁性ナノ粒子とカルボン酸シランカップリング剤をエタノール溶媒に添加し、80でリフラックスさせて得ることができる。

本発明においては第二層の化合物と第一層であるシリカ表面との架橋反応が進行し、層状に表面修飾することができる。

20

## 【0075】

第三層は、第二層を形成した磁性ナノ粒子を酸性水溶液に分散させ、第三層を形成する化合物を添加し、必要により、更に、架橋剤を添加し混合・攪拌して、第三層を形成することができる。必要により、反応溶液のpHを調整してもよい。架橋剤としては、例えば、カルボジイミド、ヒドロキシスクシンイミドなどを用いることができる。

本発明においては第三層の化合物と第二層の化合物との架橋反応が進行し、層状に表面修飾することができる。

## 【0076】

必要により、第四層を形成する場合には、第三層を形成した磁性ナノ粒子を酸性水溶液に分散させ、第四層を形成する化合物を添加し、必要により、更に、架橋剤を添加し、混合・攪拌して第四層を形成することができる。

30

本発明においては第四層の化合物と第三層の化合物との架橋反応が進行し、層状に表面修飾することができる。

## 【0077】

本発明においては、前記複合磁性微粒子を含有する分散体とすることが好ましい。

## 【0078】

本発明に係る分散体は、分散媒体が、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、トリスバッファ塩水溶液、ヘプスバッファ塩水溶液、血清及び細胞培養培地から選ばれる少なくとも一種であることが好ましい。

## 【0079】

本発明に係る磁性ナノ粒子を含有する水分散体のpH6~8の範囲におけるゼータ電位は-60mV~60mVである。

40

## 【0080】

本発明に係る磁性粒子含有水分散体の複合磁性微粒子の濃度は、5~50mg/mlが好ましい。50mg/mlを越える場合には、粒子間に働くファンデアワールス力の影響が大きくなって凝集が生起し易くなり好ましくない。5mg/ml未満では濃度が希薄すぎて実用的でない。好ましい濃度は10~40mg/mlである。

## 【0081】

本発明に係る複合磁性微粒子又は分散体は、生体医療用として、ドラッグデリバリーシステム、MRI造影剤、ハイパーサーミアシステムなどに用いることができる。

## 【0082】

50

このように得られた磁性酸化鉄微粒子や磁性微粒子は、さらにリン脂質、多糖類、蛋白質あるいはデキストリン類との複合体の形で、種々の用途に用いることができ、例えば、薬物の送達法であるDDS、レントゲンやMRI（磁気共鳴）等で用いられるCT診断及び温熱治療法などの治療用等である。

【0083】

<作用>

本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、磁性ナノ粒子の表面がカルボキシル基、アミノ基、水酸基を有するポリマーで被覆された超常磁性酸化鉄微粒子、磁性微粒子からなる磁性粒子含有水分散体の分散安定条件を見出した。

【0084】

また、磁性粒子として磁性酸化鉄微粒子を用いるのは、酸化鉄には生体適応性があるからであり、微粒子ほど生体内からの排泄が容易となる。

【実施例】

【0085】

以下、実施例により本発明を具体的に説明する。但し、本発明は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

【0086】

尚、生成物の構造解析にはX線回折装置を用いた。

【0087】

一次粒度のサイズは透過型電子顕微鏡TEMで観測した。

【0088】

磁気特性の測定にはPPMS-VMSを用い300k(50kOe)の磁場で測定した。

【0089】

ゼータ電位はZetasizer-2(MALVERN製)により測定した。

【0090】

攪拌装置及び加熱装置を備えた1000mlの反応容器を用い、原料鉄塩と苛性ソーダは試薬特級を用い、また水はミリQ水を用いた。

【0091】

実施例1

<(1)磁性酸化鉄微粒子の合成工程>

ステアリン酸鉄7.2gとオレイン酸1.14g、トリnオクチルアミンをフラスコに入れ、攪拌しながら370℃まで加熱させる。その後、50℃まで冷却しクロロホルムを加え、生成した酸化鉄微粒子の分散体を得たのち、遠心分離にて上清を除去し沈降物をヘキサンに分散させた。得られたこの酸化鉄微粒子のTEMによる一次粒子の平均粒子径は20nm、また、磁気特性は飽和磁化値が43Am<sup>2</sup>/kgの磁性酸化鉄微粒子であった。

【0092】

<(2)磁性酸化鉄微粒子のシリカ被覆処理>

Igepal CO-520を溶解したシクロヘキサン溶液に、28%アンモニア水を添加し逆ミセルを形成させた後、テトラエチルオルトケイ酸(TEOS)と得られた磁性酸化鉄微粒子を添加し、20hr攪拌した。その後、遠心分離で回収し、シリカ被覆厚はTEM観察より6nmであった。

【0093】

<(3)磁性酸化鉄微粒子の金属鉄への還元処理>

シリカ被覆磁性酸化鉄微粒子は凍結乾燥し、グローブボックス内で磁性酸化鉄微粒子乾燥粉体の4倍量の水素化カルシウムと混合し、ガラス管(内径6mm×210mm)に入れ、ガラス管をパナーにて封じ閉じた。そのガラス管を炉に入れ400℃、48時間反応させた。還元処理後はガラス管から取り出し、塩化アンモニウム入りメタノール溶液で洗浄し乾燥した。

10

20

30

40

50

ここに得た還元鉄粒子の一部を採取し、分析した結果、XRDは金属鉄を示すパターンであり、磁気特性は飽和磁化値  $s$  が  $100 \text{ A m}^2 / \text{kg}$  のシリカ被覆金属鉄粒子であった。

#### 【0094】

< (4) 金属鉄微粒子への表面修飾 >

得られた金属鉄微粒子を  $30 \text{ mL}$  のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、 $80^\circ\text{C}$  でリフラックスさせ修飾した。このときのゼータ電位は  $-50 \text{ mV}$  であった。

さらに分子量  $10000$  のポリエチレンジアミンと  $160 \text{ mg}$  のカルボジイミドを添加し、 $\text{pH } 4.5$  で一晩攪拌し、 $12000 \times g$  の遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。この時のゼータ電位は  $50 \text{ mV}$  であった。

#### 【0095】

##### 実施例 2

< 金属鉄微粒子への表面修飾 >

実施例 1 と同様にして製造したシリカ被覆金属鉄粒子を  $30 \text{ mL}$  のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、 $80^\circ\text{C}$  でリフラックスさせ修飾した。この時のゼータ電位は  $-50 \text{ mV}$  であった。

さらに低分子量のデキストランと  $160 \text{ mg}$  のカルボジイミドを添加し一晩攪拌し、 $12000 \times g$  の遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。この時のゼータ電位は  $-30 \text{ mV}$  であった。

#### 【0096】

##### 実施例 3

< 金属鉄微粒子への表面修飾 >

実施例 1 と同様にして製造したシリカ被覆金属鉄粒子を  $30 \text{ mL}$  のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、 $80^\circ\text{C}$  でリフラックスさせ修飾した。この時のゼータ電位は  $-50 \text{ mV}$  であった。

さらに分子量  $10000$  のポリエチレンジアミンと  $160 \text{ mg}$  のカルボジイミドを添加し、 $\text{pH } 4.5$  で一晩攪拌し、 $12000 \times g$  の遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。さらに、 $\text{NaNO}_2$  とカルボキシメチルデキストランを加え、カルボジイミドを添加した。遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。この時のゼータ電位は  $-60 \text{ mV}$  であった。

#### 【0097】

##### 実施例 4

< 金属鉄微粒子への表面修飾 >

実施例 1 と同様にして製造したシリカ被覆金属鉄微粒子を  $30 \text{ mL}$  のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、 $80^\circ\text{C}$  でリフラックスさせ修飾した。この時のゼータ電位は  $-50 \text{ mV}$  であった。

さらに分子量  $10000$  のポリエチレンジアミンと  $160 \text{ mg}$  のカルボジイミドを添加し、 $\text{pH } 4.5$  で一晩攪拌し、 $12000 \times g$  の遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。

さらに、フルオレセインイソチオシアネートとカルボキシメチルデキストランを加え、カルボジイミドを添加した。遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。

#### 【0098】

##### 実施例 5

< 金属鉄微粒子への表面修飾 >

実施例 1 と同様にして製造したシリカ被覆金属鉄微粒子を  $30 \text{ mL}$  のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、 $80^\circ\text{C}$  でリフラックスさせ修飾した。この時のゼータ電位は  $-50 \text{ mV}$  であった。

さらに分子量  $10000$  のポリエチレンジアミンと  $160 \text{ mg}$  のカルボジイミドを添加し、 $\text{pH } 4.5$  で一晩攪拌し、 $12000 \times g$  の遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に

10

20

30

40

50

分散させた。

さらに、カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステルとカルボキシメチルデキストランを加え、カルボジイミドを添加した。遠心分離にて上清を取り除き沈降物を水に分散させた。

【0099】

比較例 1

< 磁性酸化鉄微粒子の合成工程 >

ステアリン酸鉄 7.2 g とオレイン酸 1.14 g、トリ n オクチルアミンをフラスコに入れ、攪拌しながら 370 まで加熱させる。その後、50 まで冷却しクロロホルムを加え、生成した酸化鉄微粒子の分散体を得たのち、遠心分離にて上清を除去し沈降物をヘキサンに分散させた。得られたこの酸化鉄微粒子の TEM による一次粒子の平均粒子径は 20 nm、また、磁気特性は飽和磁化値が  $43 \text{ Am}^2 / \text{kg}$  の磁性酸化鉄微粒子であった。

10

【0100】

< 磁性酸化鉄微粒子の金属鉄への還元処理 >

磁性酸化鉄微粒子は凍結乾燥し、グローブボックス内で磁性酸化鉄微粒子乾燥粉体の 4 倍量の水素化カルシウムと混合し、ガラス管（内径 6 mm × 210 mm）に入れ、ガラス管をバナーにて封じ閉じた。そのガラス管を炉に入れ 400、48 時間反応させた。処理後はガラス管から取り出し、塩化アンモニウム入りメタノール溶液で洗浄し乾燥した。

ここに得た還元鉄粒子の一部を採取し、分析した結果、XRD は還元鉄を示すパターンではなく酸化鉄を示すピークであり、飽和磁化値  $s$  は  $40 \text{ Am}^2 / \text{kg}$  と還元されていない。

20

【0101】

比較例 2

< 磁性酸化鉄微粒子への表面修飾 >

比較例 1 で得られた磁性酸化鉄微粒子を 30 mL のエタノール水溶液中に分散させた後、カルボン酸シランカップリング剤を添加し、80 でリフラックスさせ修飾させたが、修飾していなかった。

【0102】

使用例

実施例 1 で得られた複合磁性ナノ粒子を用いて、CHO：チャイニーズハムスター卵巣細胞に対する適用実験を行った。その結果を図 1 に示す。実験の条件は、以下のとおりである。

30

【0103】

Ham's F-12 液体培地 (Wako) に抗生物質の PSG (Wako) を 1 wt%、牛胎児血清 (Gibco) を 10% 添加した液体培地に CHO を加え、96 穴プレート (Corning) の 1 穴毎に CHO を  $1.0 \times 10^4$

個添加し、37 で 20 時間あらかじめ前培養した。次に実施例 1 で得られた複合磁性ナノ粒子は Ham's F-12 液体培地で 0.1 mM、1.0 mM に調整し、前培養した CHO が入っている 96 穴プレートに加え、20 時間 37 で培養した。Cell Titer-Glo (Promega) キットを用いて、実施例 1 で得られた複合磁性ナノ粒子の細胞毒性評価を行い、実施例 1 で得られた複合磁性ナノ粒子を加えていない対照を生存率 100% として比較した。

40

【0104】

この結果、実施例 1 で得られた複合磁性ナノ粒子は、医療用のナノ材料として好適であることが確認された。

【産業上の利用可能性】

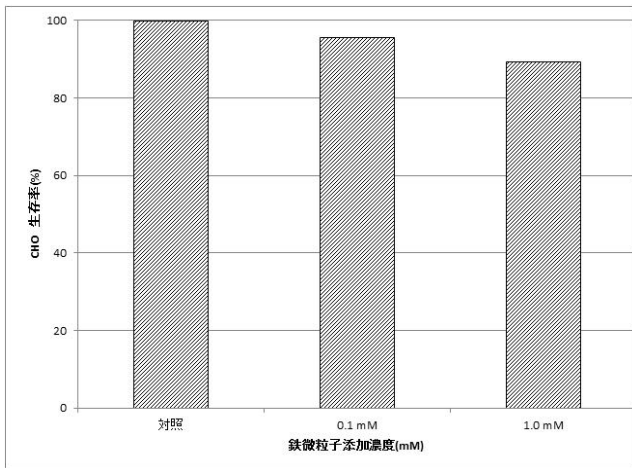
【0105】

本発明に係る複合磁性微粒子及び該複合磁性微粒子を含有する分散体は、磁性微粒子の容易な修飾によって均質な機能性を発揮でき、水系溶液に高分散な診断用・治療用などの

50

磁性粒子含有医薬を生成することができる。

【 図 1 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 49/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	49/00	A
<b>A 6 1 K 41/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	41/00	

(72)発明者 山本 真平  
 京都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 高野 幹夫  
 京都市左京区吉田本町 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4C076 AA16 AA65 AA95 CC37 DD27H DD29 DD48H DD51H EE27L EE30H  
 FF43  
 4C084 AA11 MA21 NA03 ZC711 ZC712  
 4C085 HH20 KA28 KB08  
 4C086 AA02 HA11 HA21 MA01 MA21 NA03 NA13 ZC71