



Figure 20. Cecum and Lymph node of mouse.



Figure 21. Photograph of (a)Cecum, (b) and (c)Lymph node , 30 min. passed after magnetite injection.

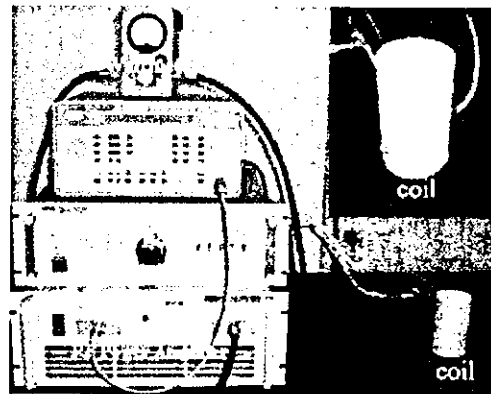


Figure 22. AC-magnetic field generator.

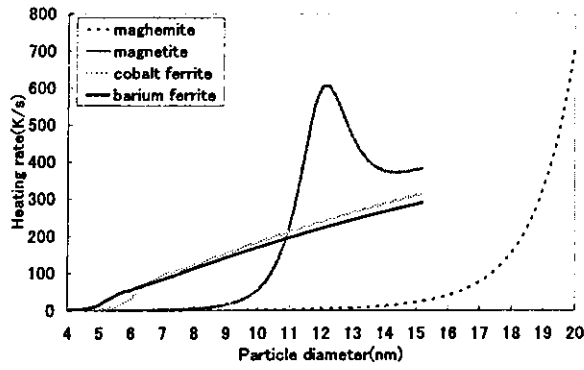


Figure 23. The calculated heating rate of various magnetic material as function of particle diameter. ($f=300$, $H_0=0.01$ T= 300 $\delta=3.2$ $\phi=0.071$ $\eta=0.000858$)



Figure 24. TEM photographs of magnetite particles (a) before and (b) after size classification.

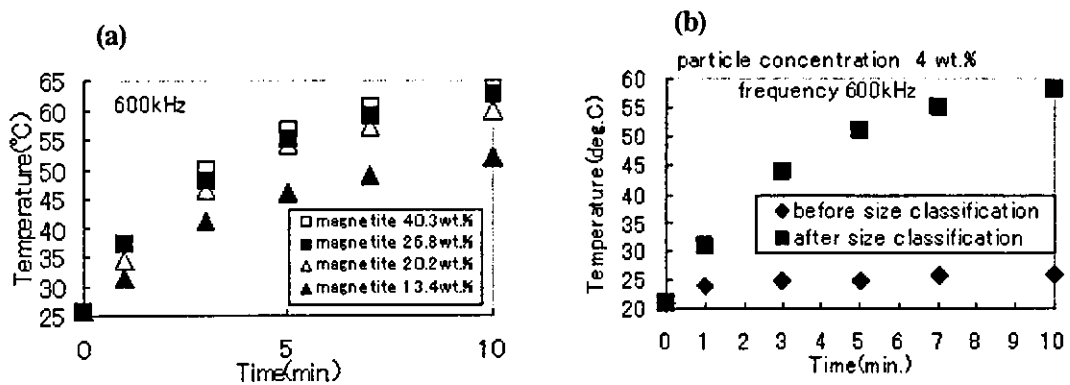


Figure 25. Temperature of magnetic fluids exposed to AC magnetic field as a function of time. (a) magnetite particles concentration, (b) magnetite size distribution.

ナノ微粒子の生成・物性および生体に与える電磁気的影響

分担研究者 羽田紘一（石巻専修大学理工学部情報電子工学科教授）

研究協力者 芳賀信幸（石巻専修大学理工学部生物生産工学科教授）

川村 暁（石巻専修大学理工学部情報電子工学科助手）

研究要旨 生体内に様々な形で存在する Fe 等の金属やそのイオンに着目し、主として Fe イオンで構成されるフェライト系磁性微粒子（液相反応法）や金属微粒子（希ガス中蒸発法）を中心に種々合成し、単細胞個体であるゾウリムシ等を対象に組織反応性とバイオ応用への適応について電磁気的影響の観点から調べるとともに、物性学的観点から殊にナノサイズ化に伴い顕現する特異磁性とその起因に着目して、メスbauer分光実験による特異物性の探索と計算機シミュレーション実験による検証もとりいれ研究の展開を図る。付随して磁性微粒子としての磁気工学的応用も視野に入れて進める。また本研究班共通の研究対象物質であるカーボンナノファイバー（CNF）等も含めてゾウリムシを対象に、体内摂取に際しての生体親和性について、細胞生存率や細胞増殖能力を指標に実験を行う。この結果 CNF については、他のナノ微粒子に比較して特段の有害性がないことを得ている。

A. 研究目的

医療技術の分野で磁気は、MRI、心磁測定、脳磁測定、また歯科でいえば口腔内インプラントにおける磁性アタッチメントなどの先端医療として活用されている。一方、ナノサイズの磁性微粒子は生物の体内組織においても合成（ Fe_3O_4 など）され、それぞれの生態上の機能（例えば biomagnetic compasses）をつかさどっていることが知られている。また医療検出用として磁性微粒子で標識した抗原抗体反応物を磁氣的に処理しウィルス類の検出への応用の試み（レーザー磁気免疫測定法）や、高周波磁界下での磁氣的発熱をベースにしたハイパーサーミア（温熱療法）への応用なども注目されており、磁性微粒子のバイオ応用への可能性が期待されている。

本研究では、磁気を帯びた微粒子を中心に、関連のナノ微粒子や本研究班共通の研究対象物質であるカーボンナノチューブ（CNT）等を含めて、バイオ応用展開を図るための基礎データを集積することを主要目的として、体内摂取に際しての生体親和性の観点から研究の展開を図る。殊に磁性微粒子は電磁气的観点からも生体組織内でのその影響と挙動が注目される点、および磁性微粒子はナノサイズ化に伴う物性面における異常現象や磁気工学的応用面でも広く関心が寄せられており、そのことも踏まえて研究を進める。

B. 研究方法

- ① 生体内に様々な形で存在する Fe 等の金属やそのイオンに着目し、主として Fe イオン

で構成されるフェライト系磁性微粒子（液相反応法）や金属微粒子（希ガス中蒸発法）を中心に種々合成する。

- ② 磁性微粒子に対しては、物性学的観点から殊にナノ化に伴い顕現する特異磁性とその起因に着目して、メスバウアー分光実験による特異物性の探索と計算機シミュレーション実験による検証もとり入れ研究の展開を図る。
- ③ 上記の微粒子に加え、本研究班共通の研究対象物質であるカーボンナノファイバー（CNF）等をも含めて、単細胞個体（生体の基本形）であるゾウリムシ等を対象に組織反応性とバイオ応用への適応を調査検討する。

このうち初年度目と2年度は①、②を重点に、2年度目と3年度は②、③を重点に進める。

③で研究対象とする単細胞個体（ゾウリムシ）は、古くから遺伝学、生理学、電気生理学、生化学などの分野で高等多細胞生物のモデル生物として用いられてきており、微粒子と生体との相互作用についての知見を得る上での有意な知見が得られることが期待される。

なお研究を進めるにあたっては、ナノ微粒子、マイクロ微粒子の（磁気）工学的応用の検討も視野に入れて展開を図る。

C. 研究結果

ナノ微粒子、マイクロ微粒子の生成に関しては、金属系微粒子については真空蒸着装置を改良した希ガス中蒸発法、また Fe イオン含有の酸化物系微粒子については液相反応法による合成を進めた結果、種々の物質について種々のサイズ領域の微粒子を生成するに至った。上記の②、③に関しては、生成された微粒子を対象に、磁気特性の測定およびナノ微粒子・マイク

ロ微粒子化により発現する特異磁性の究明に関して計算機シミュレーション実験やメスバウアー分光実験を昨年度に引き継いで更に進展させるとともに、これらの生成微粒子に CNF をも含め、単細胞個体（ゾウリムシ）での体内摂取に際しての生体親和性について、細胞生存率や細胞増殖能力を指標に実験を行った。この結果 CNF については、他のナノ微粒子に比較して特段の為害性がないことを得た。以下に詳細を示す。

C-1 ナノ微粒子、マイクロ微粒子の生成

金属系微粒子の生成については、現有の真空蒸着装置（真空機工製 VP-260）を改良し、希ガス（ヘリウムやアルゴン等）のガス導入機構とその圧力制御および圧力モニター機構の装着を行い、不活性ガス雰囲気下で意図する金属塊を加熱蒸発させ気相から固化させる方法、いわゆる「希ガス中蒸発法」を、また Fe イオン含有の酸化物系微粒子については、金属塩類とアルカリの液相中和反応に基づく「液相反応法」による合成を進めた結果、Ag, Cu, Fe, Co 金属微粒子（数 nm～数十 nm）や、 Fe_3O_4 , NiFe_2O_4 および CoFe_2O_4 等の立方晶系フェライトさらに $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 等の六方晶系フェライト微粒子（数 nm～数 μm ）等、種々の物質について種々のサイズ領域の微粒子を生成するに至った。

図1に液相反応法による Fe_3O_4 微粒子生成法の概要を示す。液相中和反応に基づく手法であるところから、水溶液中に単離・分散した微粒子を直接得ることができ、生体に投与した際の生体との直接の相互作用を調べるのに有用な手法と思われる。金属塩の種類や中和反応時の温度や PH 等の合成条件を変えることで、得られる平均粒子径が制御できる。生成を意図する物質によっては、ろ過・乾燥後の焼成が必要な

場合もあるが、その場合にはこの焼成温度を変えることで得られる平均粒子径が制御できる。

表1に、本手法により生成された Fe_3O_4 微粒子の反応温度と生成された粒子サイズ及び磁気特性値を示す。粒子径はX線回折のライン幅から得た値である。飽和磁化値は本来物質固有の物理量であるが、粒子サイズとともに低下した。また保磁力値はあるサイズ(表1では30 nm)以下になると増加することが示された。この手法は、そのまま MFe_2O_4 (M=2価の金属イオン)のスピネル型フェライト系磁性微粒子の合成に適用できる。このほか光触媒材料 TiO_2 も TiCl_4 の低温加水分解により水溶液中に懸濁した状態で生成できることが示された。

H16年度は特に「格子歪によるフェライト系微粒子の磁氣的硬質化(高保磁力化)の試み」に着目して微粒子の生成を実施し、「結晶構造的な格子歪の導入」が磁氣的硬質化(保磁力増強)に有効であることを確認した。具体的には、熱処理に伴う構造相転移(立方晶-正方晶)による格子歪を期してCuフェライト(CuFe_2O_4)や中間酸化状態の($\text{Fe}_3\text{O}_4-\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$)粒子、熱処理に伴うMnイオンの原子価変動による空格子生成による歪を期してMn-basedフェライト($\text{Mn}_y\text{Fe}_{3-y}\text{O}_4$, $\text{Co}_x\text{Mn}_y\text{Fe}_{3-x-y}\text{O}_4$)やMn doped $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 等で、格子歪の条件を整えると保磁力増大の傾向が観測された。

C-2 磁性ナノ粒子の特異な物性とその起因

ナノ微粒子、マイクロ微粒子化に伴い特異な物性が顕現することについては、これまで一連の論文で指摘してきた。これらの磁性がバルクの磁性と異なる所以は、サイズが極度に小さいことによるサイズ効果からの寄与がある点、及び粒子表面層の占める割合が大きいことによ

る表面効果からの寄与があることの2点である。

同一物質でありながら磁界を作用させた際の磁気特性(磁化過程・減磁過程)の違い、いわゆる技術磁化は、従前から確立されているように大方サイズ効果に起因するものである。これに対し物質定数と考えられてきた単位質量あたりの自発磁化値(または飽和磁化値)は、ナノ化によって大きく変わる(低下するケースが多い)が多くの論文で指摘されており、筆者らのこれまでの研究で、その起因は粒子表面層または表面構造においてバルク体とは異なる特異な磁気構造(spin canting構造と命名)が存在することによる表面効果であることが確立しつつある。またもう一つの表面効果として、微粒子の特異な表面構造・組織に起因するいわゆる表面磁気異方性顕現の可能性も示唆されている。

そのような観点から、これまでの関連データを見直すとともに、モデルに基づく計算機シミュレーション実験を行い、特異磁性の起因について実験データと照合し検証するという手法で研究を展開した。観測されている特異磁性の一例として、図2及び図3に CoFe_2O_4 微粒子のデータを示す。

C-2-1 表面磁気異方性付加に伴うマクロな磁気特性への影響

初年度から2年度目にかけて、磁性微粒子の表面・界面における特異構造が起因の「表面磁気異方性誘起」を想定して、「単磁区微粒子の磁化反転」について計算機シミュレーション実験を行い、実測の磁化特性データや既報の高磁場下Mossbauer分光測定データの分析結果(粒子表面層におけるspin canting構造の実証)と呼応する結果が得られた。

C-2-2 表面磁気異方性付加に伴うマクロな磁気特性への影響

ナノ化に伴い、個々の粒子における粒子表面層の占める割合が大きくなり、表面現象があるとすればそれは増強されて現れる。表面磁気異方性をとりあげて計算機実験を行なった。計算機実験には、米国 NIST が開発し public domain で公開している OOMMF (The Object Oriented Micro-Magnetic Frame-work), release 1.2 alpha 3, 30-Oct-2002) を用いた。本稿では、鉄系の微粒子の振る舞いについて以下の仮定を用いて計算機実験を行った。

実験設定として鉄系微粒子を対象物質に想定し、その粒子サイズは固定しておき、表面磁気異方性が develop (付与) した際に、マクロな磁気特性に如何なる影響が現れるかについて定量的に検討する。

図 4 に計算機実験で用いた試料の外観、表 2 に用いた物質定数、表 3 に計算機実験環境を示す。なお本実験では、材料形状は 50 nm × 50 nm × 50 nm の円柱状 (直径 50 nm, 高さ 50 nm) と仮定した。

材料表面第一層における結晶異方性定数が異なると仮定し、試料表面での結晶異方性定数 edge K1 [J/m³] をパラメータとして計算機実験を行った。本実験では、外部磁界 B は x 軸方向の Bx だけを印加した (図 5)。

本ソフトウェアでは、物質を cell と呼ばれる単位に分割し、式(1)により Bx に対する磁化変化を計算する。本実験では、cell は 1nm × 1nm × 50nm とした。式 (1) は、Landau-Lifshitz-Gilbert equation とも呼ばれる。

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \frac{-\omega}{1+\lambda^2} \mathbf{M} \times \mathbf{H}_{\text{eff}} - \frac{\lambda\omega}{(1+\lambda^2)M_s} \mathbf{M} \times (\mathbf{M} \times \mathbf{H}_{\text{eff}}) \dots\dots(1)$$

ここで

M = magnetization,

H_{eff} = effective field

$$\mathbf{H}_{\text{eff}} = -\frac{1}{\mu_0} \frac{\partial E}{\partial \mathbf{M}}$$

ω = gyromagnetic ratio

λ = damping coefficient

E = micro-magnetic energy

である。

異なる edge K1 毎に求めた磁化曲線を、図 6～図 11 に示す。表面磁気異方性定数と保磁力との関係を図 12 に示す。edge K1 = 4.8 × 10⁴ のときの Hc の値を Hc₀ とした、規格化した値で示した。実験結果より、試料表面での結晶異方性定数の増加に伴い、保磁力が増加する様子が示された。

本実験における試料の磁化の様子を図 13～図 16 に示す。これらより、材料表面から内部に 5 層程度 (5nm に相当) 磁化が弱くなっており、表面磁気異方性の影響を受けていると示唆される。

同様の仮定に基づき、試料サイズは Z 軸方向を Z=30 nm 一定とし、X 軸方向及び Y 軸方向については X=Y=30, 40, 50 nm として計算機実験を行った結果を図 17 に示す。本図は、横軸に表面磁気異方性定数を、縦軸に保磁力をとっている。それぞれの場合において、edge K1 (4.8 × 10³ ~ 4.8 × 10⁷ J/m³) を変数とした。本実験においても、edge K1 が内部の異方性定数に比べて増加するにしたがって保磁力が漸次に増加し、また単一磁区微粒子でも粒子サイズが小さいほど保磁力が高くなることが明らかとなった。

これらの結果より、結晶磁気異方性定数が材料内部と表面において異なる場合、表面の定数が内部の定数に比べて増加するに従って保磁力が大幅に増加することが明らかとなった。このことから、粒子表面層または表面構造において、バルク体とは異なる特異な磁気構造が顕現していることが計算機実験からも示唆された。

C-2-3 単磁区微粒子の粒子サイズと磁化

反転モード

2年度目から3年度にかけて、「表面磁気異方性の誘起を想定しない単磁区粒子領域」を対象に、マイクロマグネティクス計算を行ったところ、従来は保磁力 maximum でプラトー(plateau)を示すと考えられる単磁区粒子領域でも、保磁力値に粒子サイズ依存(小ほど大)があるとの結果を得た。単磁区粒子の磁化反転モード自体にも粒子サイズ依存があることを示す結果と考えられる。

磁性微粒子の表面・界面における「表面磁気異方性誘起」に加えて、単磁区粒子の磁化反転モード自体にも粒子サイズ依存があり、両者の機構が作用していることを示唆する結果を得た。

強磁性体粒子はその粒子径を減少させると、粒子内に磁区の境界(磁壁)が存在しないほうがエネルギー的により安定となり、一つの粒子が一つの磁区から成るいわゆる単一磁区粒子となる。単(一)磁区粒子の磁区内の磁化状態は、巨視的には磁化の向きは一様で磁気異方性エネルギーを最小にするような特定の方向に向いているとされているが、微視的には磁気に関与のエネルギーの総和(交換・異方性・磁歪・静磁エネルギー等)から導かれることとなる。斯様な単磁区微粒子について計算機実験を行った。

計算機実験の方法は、前項と同様の方法によった。すなわち、図1に示す円柱状試料を仮定し、対象試料を2次元格子状のセルに分割し、各セルにおける平均場から各セルでのスピンを計算するという手法によった。この2次元的な設定で、仮想的な鉄系強磁性物質(表2)を想定し、その単一磁区微粒子内の磁化の振る舞いについて計算機実験を行った。外部磁場(x軸方向)を印加し変化させたときの磁化曲線を求

めた(図2)。試料サイズはz軸方向を $z=30\text{ nm}$ 一定とし、x軸方向及びy軸方向については $x=y=30\sim 100\text{ nm}$ として実験を行った。結晶異方性定数 K_1 は、 $K_1=4.8\times 10^4\text{ [J/m}^3\text{]}$ の場合および $K_1=4.8\times 10^5\text{ [J/m}^3\text{]}$ について実験を行った。

C-2-4 単磁区微粒子の粒子サイズと磁化反転モードに関する計算機シミュレーション結果

計算結果で求めた保磁力値を、図18および図19に示した。従来は保磁力 maximum でプラトー(plateau)を示すと考えられる単磁区粒子領域であってもサイズが小さい粒子ほど保磁力値は大きくなる傾向にあることが、計算機実験で示された。この結果は、単磁区粒子の磁化反転モードにサイズ依存があることを示唆する結果と考えられる。既報のいくつかの実測値とも呼応する結果である。

C-3 単細胞個体(ゾウリムシ)での細胞機能探査

単細胞個体(ゾウリムシ)が種々のナノ粒子を体内摂取もしくは投与した際、その生存及び増殖に及ぼす影響に着目し、昨年度に引続きカーボンナノファイバー(CNF)および磁性微粒子(magnetic nanoparticles, MNP)を用いて、ゾウリムシに対する種々のナノ粒子との生体親和性を検証する実験系の確立を中心に、これらのナノ粒子の基本的な影響について引続き調べるとともに、今回は、大量入手が困難な貴重な微量ナノ粒子にも応用できるマイクロリッターサイズの実験系(キャピラリー培養法)を確立した。この方法を用いてゾウリムシ(単細胞個体)に対するCNFおよびMNPの粒子サイズ効果や磁性強度効果について引続き検討を進めている。

このうち本研究班共通の研究対象物質であ

る CNF に関しては、同一の遺伝的系統に属するゾウリムシを用いて、老化した細胞に対する影響について検討した結果、老化した細胞も若い細胞とほぼ同程度に細胞内に取り込むことが明らかになった。そして CNF を取り込んだ老化細胞は若い細胞と同様、行動や形態に異常を示すものは認められなかった。以下にデータを提示し概説する。

C-3-1 ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は世界中の淡水域に広く棲息する単細胞性真核生物 (Unicellular eukaryotic organism) で、細胞体は長軸約 180 μm 、短軸約 50 μm の回転楕円体をしている。細胞表面には約 5000 本の繊毛が生えており、この繊毛を用いて、遊泳、摂食、性的細胞認識などを行っている。ゾウリムシは古くから遺伝学、生理学、電気生理学、生化学などの分野で高等多細胞生物のモデル生物として用いられてきた。特に、電気生理学の分野では、「動く感覚細胞」・「動く神経細胞」と呼ばれ、神経興奮の分子メカニズムの解明も進んでいる。また、遺伝情報の保存及び発現システムも基本的にはヒトをはじめとする高等多細胞生物と同じ形式のものを備えている。

ゾウリムシは自然界では枯草菌や大腸菌の仲間を好んで餌とするが、完全合成培地での無菌培養も可能である。従って、外界からの栄養源の取り込みは、粒子性の物質を取り込む食作用 (phagocytosis) と可溶性の物質を取り込む飲作用 (pinocytosis) の両方を状況に応じて使い分けているものと考えられる。

本実験では、ナノ微粒子の影響を見る際、枯草菌を含む培養液と生理食塩水の2種類を用いた。培養液の場合には、ゾウリムシは約8時間おきに分裂するので、細胞増殖能力を評価する

のに適しており、生理食塩水の場合には細胞分裂が停止するので、分裂停止期の細胞のモデルになりうるものと考えられる。

C-3-2. 食胞形成能に対する影響

1) CNT

CNT (ナノロッド、メタル除去) を生理食塩水で3度洗い、最終濃度が 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調製し、ゾウリムシ 21 細胞を用いて細胞内への CNT の取り込みを経時的に測定した。CNT の取り込み量は、形成された食胞 (細胞口から取り込まれた粒子性物質を濃縮した膜で包まれた小胞) を数えることによって調べた (写真 a)。食胞形成能力は測定した3日間では、なんら阻害されることなく高いレベルにあることがわかった。

2) TiO_2

CNT と比較するために同じ濃度の TiO_2 を用いて同様の取り込み実験を行ったが、両者の間に大きな違いは認められなかった (写真 b)。

C-3-3 分裂停止期 (post-mitotic cell cycle) の細胞に対する影響

NiO および NiFe_2O_4 の分裂停止期の細胞に対する影響を図 20 (a), (b) に示した。CNT の場合には、調べた最大値である 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ でも3日間で100%の生存率を示したが、NiO と NiFe_2O_4 の場合にはグラフに見られるように濃度に依存して生存率は低下した。

次に、希釈シリーズの溶液を作り、各濃度における生存率を調べた結果、図 21 (a), (b), (c) に示す通り、生存率 50%濃度は NiO と NiFe_2O_4 ではおよそ 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 付近に認められた。

C-3-4 細胞増殖に対する影響

CNT、NiO および NiFe_2O_4 の細胞増殖に対する影響を見るために、それぞれのナノ微粒子を細菌を含む培養液に混合し、それぞれの溶液にゾウリムシを1細胞ずつ単離して細胞増殖を調

べた。CNT では $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ から増殖阻害効果が現われたが、阻害効果はコントロール比で40%付近で安定化した (図 22 (a))。その後、処理した細胞群を CNT を含まない新鮮な培養液に移して増殖能力を調べた結果、どの処理群でもコントロールレベルまで回復した (図 22 (b))。統計処理の結果、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の実験群でもコントロールとの間に有意な差はなかった。

NiO および NiFe_2O_4 は共に強い増殖阻害効果を示した (図 22 (c) , 8(d))。

次に、CNT ($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)、NiO ($25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) および NiFe_2O_4 ($40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) の阻害効果における可逆性を調べた。図 23 (a) , 9(b) に示すように、これら3種類のナノ微粒子の増殖阻害作用はいずれも可逆的なものであることが明らかになった。

C-3-5 単細胞個体 (ゾウリムシ) での細胞機能探査

単細胞個体 (ゾウリムシ) が種々のナノ粒子を体内摂取もしくは投与した際、その生存及び増殖に及ぼす影響に着目し、昨年度に引き続きカーボンナノファイバー(CNF) および磁性微粒子(magnetic nanoparticles、MNP)を用いて、ゾウリムシに対する種々のナノ粒子との生体親和性を検証する実験系の確立を中心に、これらのナノ粒子の基本的な影響について引き続き調べるとともに、今回は、大量入手が困難な貴重な微量ナノ粒子にも応用できるマイクロリッターサイズの実験系 (キャピラリー培養法) を確立した。この方法を用いてゾウリムシ (単細胞個体) に対する CNF および MNP の粒子サイズ効果や磁性強度効果について引き続き検討を進めている。

このうち本研究班共通の研究対象物質である CNF に関しては、同一の遺伝的系統に属するゾウリムシを用いて、老化した細胞に対する影響について検討した結果、老化した細胞も若

い細胞とほぼ同程度に細胞内に取り込むことが明らかになった。そして CNF を取り込んだ老化細胞は若い細胞と同様、行動や形態に異常を示すものは認められなかった。以下にデータを提示し概説する。

C-3-6 微量試料検定のためのキャピラリー培養法

ナノ粒子の中には製造上の制限等から、大量入手が困難なものもある。そこで、貴重な微量ナノ粒子にも応用できるマイクロリッターサイズの実験系であるキャピラリー培養法を確立し、各種のナノ粒子を用いて、有用性について検討した。

キャピラリー培養法はゾウリムシの交配反応活性を定量する方法として、既に報告していたが、今回はキャピラリーサイズをさらに微小化することによって、 $10 \mu\text{l}$ の培養液でも長期間ゾウリムシを継続的に培養し、観察することが出来るようになった。

以下にキャピラリー培養法の概略を述べる。内径 0.6 mm 、長さ 30 mm のキャピラリー (ガラス細管) を沸騰水中で約1時間煮沸消毒し、アルミホイル上でガスコンロの炎で乾燥した。 $10 \mu\text{l}$ のナノ粒子を含む培養液にゾウリムシを1細胞入れ、滅菌済みのキャピラリーに培養液と共にゾウリムシを取り込み、水を含むガーゼの入ったシャーレの中に静置して培養した。この方法では、ガーゼの水を補給することによってキャピラリー内の乾燥を防ぐことができ、約1週間の培養が可能となった。なお、キャピラリーの長さを変えることによって、 $50 \mu\text{l}$ 程度まで培養系を拡大することが可能である。

C-3-7 磁性ナノ粒子の分裂停止期の細胞に対する細胞外からの影響

磁性ナノ粒子の分裂停止期の細胞に対する致死濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) をキャピラリー培養法によ

って検討した。磁性ナノ粒子を含むゾウリムシの生理食塩水 (K-DS) 10 μ l にゾウリムシを 1 細胞入れ、キャピラリーの中に取り込んで、25°C でインキュベートした。その後、継時的に生存細胞数をカウントし、生存曲線を作成した ($n = 6$)。

NiO₂ の分裂停止期の細胞に対する生存曲線を図 24 に示す。若い細胞 (Young (50))、老化した細胞 (Old (750)) 共に、20 μ g/ μ l の NiO₂ 存在下では生存率の低下は認められなかった。一方、TiO₂ の場合には、20 μ g/ μ l では Young (50)、Old (750) 両者に対して強い致死作用を示した。また、分裂齢の異なる細胞間での比較では、2.0 μ g/ μ l で Old (750) に対しては明瞭な致死作用が認められた (図 26)。

次に、焼成温度の異なる 2 種類のフェライト、NiFe₂O₄、CoFe₂O₄ の致死作用について検討した。生存曲線は NiO₂ と同様の方法による。図 27 および図 28 に示すように、NiFe₂O₄ においては焼成温度 800°C の粒子の方が 700°C の粒子よりも約 10 倍強い致死作用を持つことが明らかになった。また、分裂齢の異なる細胞間での比較では、焼成温度 700°C による粒子で Old (750) に対する強い致死作用が認められた。

CoFe₂O₄ の存在下における生存曲線を図 10、図 29、図 30 に示す。CoFe₂O₄ の場合には NiFe₂O₄ とは逆に焼成温度が上昇するに従って致死作用は低下する傾向を示した。650°C で生成された粒子は 0.2 μ g/ μ l で Young (50)、Old (750) 両細胞に対して極めて強い致死作用を示したが、1100°C で生成された粒子の場合は 20 μ g/ μ l においても致死作用はまったく示さなかった。800°C で生成された粒子はこれらの中間の作用を示した。

表 3 に本研究で明らかになった磁性ナノ粒子の細胞毒性をまとめて示した。

C-3-8 CNF (カーボンナノファイバー) の分裂停止期の細胞に対する細胞外からの影響

分裂停止期の細胞に対して細胞外から与えた場合の CNF の影響をキャピラリー培養法によってテストし、濃度効果として図 31 に示した。数値はコントロール (CNF を含まない生理食塩水中での生存数) に対する割合で表してある。生存率は CNF 存在下での培養開始後 72 時間目の生存細胞数を基にして算出されたものである。ゾウリムシの生理食塩水中では、CNF は約 20 μ g/ml の濃度までは分散性の良い状態にあるが、この濃度では Young (50) に対してはまったく致死作用を示さなかったので、濃度を 40 μ g/ml まで上げて生存率を検討した。しかし、この場合にも致死作用はまったく認められなかった。一方、Old (750) の場合には、CNF の濃度が上昇するにつれて生存率が徐々に低下した。生存率低下の濃度依存性は 20 μ g/ml までとそれ以上の濃度では異なる効果を示した。

C-3-9 CNF の増殖期の細胞に対する細胞外からの影響

増殖期の細胞に対して細胞外から与えた場合の CNF の影響をキャピラリー培養法によってテストし、濃度効果として図 32 に示した。増殖率は CNF 存在下での培養開始後 96 時間目の細胞数を基にして算出されたものである。数値はコントロール (CNF を含まない培養液中での増殖) に対する割合で表してある。Young (50)、Old (750) 共に、50 μ g/ml ではやや低下の傾向を示しているが、コントロールと比較して統計的には有意の差は認められなかった。CNF の培養液中での分散性は生理食塩水の場合と同様であるので、50 μ g/ml では CNF は肉眼でも判るほどの凝集塊を形成していた。従

って、溶存状態の CNF の影響は 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までを判定の対象とするのが妥当であると思われる。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では CNF の増殖阻害作用は認められなかった。

次に、CNF の細胞増殖に対する影響の可逆性を検討するために、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CNF を含む培養液で 96 時間培養した細胞の増殖能力を CNF を含まない培養液を用いてテストした。図 33 に示すように、Young (50)、Old (750) 共に増殖率が回復することが認められた。Young (50) で若干の低下傾向があるように見えるが、多重比較による検定ではコントロールに対して有意の差は認められなかった。

C-3-10 マイクロインジェクションによる CNF の増殖期の細胞に対する影響

CNF が直接細胞内に進入した場合の細胞毒性を検討するため、マイクロインジェクション法で CNF 溶液を細胞内に注入し、その後の増殖能力についてテストした。注射には 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CNF 溶液を用い、それぞれの細胞に約 40 μl 注入した。注射した細胞は 100 μl の培養液中で 25 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養し、その間の細胞分裂回数を測定し、Growth rate とした。さらに、注射した個々の細胞のクローン形成能は注射後 1 週間の連続培養によって判定し、クローンを形成できた細胞の割合を viability (%) として表した。表 4 に示すように、約 4 ng の CNF の注射では細胞毒性はまったく検出されなかった。

D. 考察

D-1. ナノ微粒子、マイクロ微粒子の生成

液相反応法により、ナノサイズの Fe_3O_4 を生成できることが明らかとなった。生成温度と粒径そして磁気特性の間には相関関係があることが示唆される。

D-2 ナノ微粒子、マイクロ微粒子化により発現する特異物性の究明

D-2-1 磁性ナノ粒子の特異磁性

表面磁気異方性を仮定した計算機実験により、ナノサイズにおいて顕現する特異磁性は、粒子表面層または表面構造において、バルク体とは異なる特異な磁気構造が存在することがその原因（表面効果）であるという結果が示唆された。

D-2-2 磁性ナノ粒子の物性（単磁区微粒子の磁化反転モード）

磁性ナノ粒子の物性を明らかにするために計算結果を行った結果、従来は保磁力 maximum でプラトー (plateau) を示すと考えられる単磁区粒子領域であってもサイズが小さい粒子ほど保磁力値は大きくなる傾向にあることが示された。この結果は、単磁区粒子の磁化反転モードにサイズ依存があることを示唆する結果と考えられる。既報のいくつかの実測値とも呼応する結果である。

元来、保磁力値は単磁区粒子内の磁化の回転様式（一斉回転、バックリング、カーリング、ファニング等）を反映する量でもある（図 10）。図 9 の結果は、同一物質の単磁区粒子であってもサイズが小さい粒子ほど、バックリング更には一斉回転のモード指向にあることを示唆する結果である。

D-3-1 ナノ微粒子のゾウリムシの生存及び増殖に及ぼす影響

本実験で用いたナノ微粒子はどれも、ゾウリムシの食胞形成能に対して大きな影響を与えるものではなく、これらのナノ微粒子はゾウリムシの摂食行動に対しては有害な影響は与えないものと思われる。

分裂停止期の細胞に対する影響では、CNT の場合には今回実験した範囲内では生存率に顕

著な差は認められなかった。これに対し NiO および NiFe₂O₄ は、分裂停止期の細胞に対する影響が示唆された。

細胞増殖に対する影響では、CNT、NiO および NiFe₂O₄ いずれのナノ粒子においても増殖阻害効果が観察された。特に NiO および NiFe₂O₄ は共に強い増殖阻害効果を示した。

次に、CNT、NiO および NiFe₂O₄ の阻害効果における可逆性を調べた結果、これら3種類のナノ微粒子の増殖阻害作用はいずれも可逆的なものであることが明らかになった。

D-3-2 単細胞個体（ゾウリムシ）での細胞機能探査

微量試料の細胞毒性を検定するために開発したキャピラリー培養法は、10 μl の培養液で最低1週間は継続培養と観察が可能であることが明らかになった。また、この方法はナノ粒子の細胞毒性を検定する方法として検出感度の高い方法であることが確認された。

磁性ナノ粒子および CNF の細胞毒性を判定する項目（判定カテゴリー）と安全基準（致死濃度または致死量）について総合的に検討した結果、判定カテゴリーとしては、細胞周期（分裂停止期と増殖期）、投与条件（細胞外と細胞内）、および生活史における年齢（分裂年齢または生存期間）の3項目についてそれぞれ独立に評価できるような毒性試験をデザインすることが重要であることがわかった。また、安全基準としては、溶液中でのナノ粒子の存在様式（溶解、コロイド状、凝集塊形成など）を明確にした上で、致死条件を確定する必要がある。また、本研究では詳細に検討しなかったが、ナノ粒子の細胞内での滞留時間も重要で、今後判定項目に加える必要がある。

分裂停止期のゾウリムシに対する細胞外からの NiO₂ と TiO₂ の細胞毒性を比較すると、

Ni と Ti の特性が明瞭に現われており、Ti の方が Ni より 10 倍程度毒性が強いことを示している。また、TiO₂ を生体に使用するには細胞の老化程度にも十分考慮する必要がある。

NiFe₂O₄ と CoFe₂O₄ との比較実験からは、両ナノ粒子で製造過程における焼成温度が細胞毒性に大きな影響を与えていることが明らかになった。今後これらのナノ粒子の物理的特性を比較解析することによって磁性ナノ粒子の細胞毒性のメカニズムを解明できる可能性がある。磁性ナノ粒子を生体に使用するには焼成温度も十分に考慮する必要がある。

CNF の細胞毒性に関しては、水溶液中で良好な分散状態が維持される程度の濃度（20 μg/ml）範囲では、細胞毒性があるという明瞭な証拠は得られなかった。しかし、分裂停止期の老化した細胞に対しては細胞毒性が示唆されているので、老化した細胞に対しては使用条件を考慮する必要がある。

CNF のマイクロインジェクションによる細胞内投与実験では、細胞内毒性はまったく認められなかった。

以上の結果を基に CNF の細胞毒性を総合的に判断すると、CNF 自体に細胞毒性が内在している可能性は極めて低く、毒性作用が現われるのは他の代謝産物との相互作用によるものと考えられる。

E. 結論

ナノ微粒子・マイクロ微粒子の生体内摂取に際して、生体との親和性や生体に与える電磁気的影響を検討するために、ナノサイズ領域の種々の微粒子を単離・分散した形で直接得る方法について昨年度に引き継いで検討を行った。金属系微粒子については真空蒸着装置を改良した希ガス中蒸発法、また酸化物系微粒子につ

いては液相反応法による合成を進めた結果、種々の物質について種々のサイズ領域の微粒子を生成するに至った。本年度は特に「格子歪によるフェライト系微粒子の磁氣的硬質化の試み」に着目して実施し、「結晶構造学的な格子歪の導入」は磁氣的硬質化（保磁力増強）に有効であることを確認した。

前年度までに検討した表面磁気異方性の付与に加えて、歪磁気異方性の付与も磁性微粒子の磁氣的硬質化に有効であることが実験的に示された。生成された微粒子のうち磁性微粒子を対象に結晶構造や磁気特性について検討を加えた結果、ナノ粒子構造（有限原子数に伴う特異な原子配列—表面・界面において顕著）に起因すると考えられる特異磁性（飽和磁化値・保磁力値等）の顕現が明らかとなった。

これまで磁性微粒子の表面・界面における特異構造が起因の「表面磁気異方性誘起」の観点から、「単磁区微粒子の磁化反転」について計算機シミュレーション実験を行い、実測の磁化特性データや既報の高磁場下 Mossbauer 分光測定データの分析結果（粒子表面層における spin canting 構造の実証）と呼応する結果を得ている。今回、「表面磁気異方性の誘起を想定しない単磁区粒子領域」を対象に、マイクロマグネティクス計算を行ったところ、従来は保磁力 maximum でプラトー(plateau)を示すと考えられる単磁区粒子領域でも、保磁力値に粒子サイズ依存（小ほど大）があるとの結果を得た。上記の「表面磁気異方性誘起」に加えて、単磁区粒子の磁化反転モード自体にも粒子サイズ依存があることを示唆する結果と考えられる。

単細胞個体（ゾウリムシ）が種々のナノ粒子を体内摂取もしくは投与した際、その生存及び増殖に及ぼす影響に着目し、昨年度に引き続きカーボンナノファイバー(CNF) および磁性微粒

子(magnetic nanoparticles, MNP)を用いて、ゾウリムシに対する種々のナノ粒子との生体親和性を検証する実験系の確立を中心に、これらのナノ粒子の基本的な影響について引続き調べるとともに、今回は、大量入手が困難な貴重な微量ナノ粒子にも応用できるマイクロリッターサイズの実験系（キャピラリー培養法）を確立した。この方法を用いてゾウリムシ（単細胞個体）に対する CNF および MNP の粒子サイズ効果や磁性強度効果について引続き検討を進めた。このうち本研究班共通の研究対象物質である CNF に関しては、同一の遺伝的系統に属するゾウリムシを用いて、老化した細胞に対する影響について検討した結果、老化した細胞も若い細胞とほぼ同程度に細胞内に取り込むことが明らかになった。そして CNF を取り込んだ老化細胞は若い細胞と同様、行動や形態に異常を示すものは認められなかった。単細胞個体（ゾウリムシ）は古くから遺伝学、生理学、電気生理学、生化学などの分野で高等多細胞生物のモデル生物として用いられてきており、微粒子と生体との相互作用についての知見を得る上での有用性が実証された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) 羽田紘一“ナノ粒子における格子歪と磁気特性”日本応用磁気学会誌, Vol.27, No. 10, pp.993-999, 2003.
- 2) 川村 暁、羽田紘一“ナノ粒子の表面磁気異方性による磁氣的硬質化と計算機シミュレーションによる検証”2003 年度傾斜機能材料論文集 (FGM2003 in Sapporo),

PP.215-218, 未踏科学技術協会, 2004.

- 3) 川村 暁、羽田紘一“強磁性微粒子の保磁力に与える表面磁気異方性の効果—計算 vs. 実測—” 粉体および粉末冶金, 51 巻, 9 号, pp. 703-707, 2004.
- 4) N. Haga and K. Haneda “Cytotoxicity and biocompatibility of carbon nanofibers revealed by the Paramecium bioassay system”, to be submitted.
- 5) N. Haga and K. Haneda “Paramecium as a Model organism for Bioassay of Cytotoxicity and Biocompatibility of various Inorganic materials in nano-particle forms” in preparation.
- 6) S. Kawamura and K. Haneda “Micro-magnetic calculations of particle-size effect on coercivity of magnetic single-domain particles” to be submitted.
- 7) K. Haneda and S. Kawamura “Effect of surface anisotropy on magnetic property of ferromagnetic small particles: experimental observations and micro-magnetic calculations” to be submitted.
- 8) K. Haneda “Magnetic hardening of ferrite small particles by structural distortions” in preparation.

2. 学会発表

- 1) 羽田紘一 “ナノ組織構造粒子と孤立ナノ粒子における磁気機能の同等性— γ - Fe_2O_3 を例に” 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成 14 年度秋季大会) 3-15A, p.74, 2002.
- 2) 石垣郁也、羽田紘一 “La-Co 置換 Sr-フェライト微粒子における高保磁力化のもう一つ

の要因” 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成 14 年度秋季大会) 3-26B, p.153, 2002.

- 3) 川村 暁, 羽田紘一 “表面磁気異方性を仮定したナノ粒子の特異磁性に関する計算機シミュレーション” 平成 15 年度電気関係学会東北支部連合大会講演論文集, III, p.307, 2003.
- 4) 川村 暁, 羽田紘一 “強磁性微粒子の保磁力に与える表面磁気異方性の効果—計算機実験 vs. 実測値” 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成 15 年度秋季大会), 2-32A, p.131, 2003.
- 5) 川村 暁, 羽田紘一 “ナノ粒子の表面磁気異方性による磁氣的硬質化と計算機シミュレーションによる検証” 傾斜機能材料シンポジウム PM2003 講演概要集, B9, p.25, 2003.
- 6) 後藤綾子、羽田紘一 “格子歪によるフェライト系微粒子の磁氣的硬質化” 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成 16 年度秋季大会) 1-18A, p.30, 2004.
- 7) 川村 暁、羽田紘一 “マイクロマグネティクス計算による単磁区粒子の保磁力値における粒子径効果” 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成 16 年度秋季大会) 1-19A, p.31, 2004.
- 8) N. Haga and K. Haneda “Paramecium as a Model organism for Bioassay of Cytotoxicity and Biocompatibility of CNF” International Symposium of Tissue Response and Biomedical Application of Carbon Nanotubes, Nanofibers, and Nanoparticles, PO5, p.22, Matsusima, December, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし。

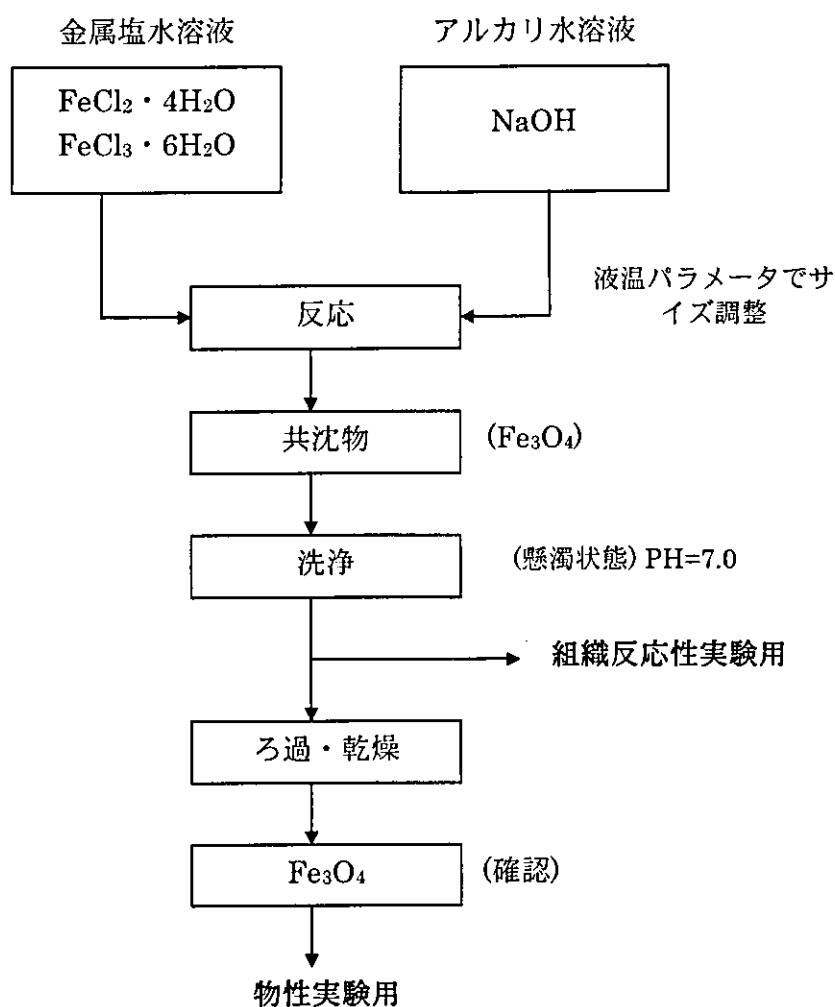


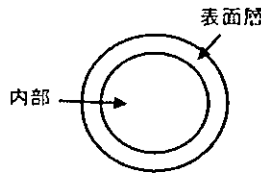
図1 Fe₃O₄微粒子（液相反応法）の概要

表1 Fe₃O₄の液温と、生成された粒子サイズ及び磁気特性値

生成温度(液温) [°C]	粒径	飽和磁化値 [emu / g]	保磁力 [Oe]
0	数 nm	46.7	24.0
30	10nm	50.2	20.8
60	20nm	54.1	17.9
90	30nm	59.8	30.0

CoFe₂O₄微粒子

磁化測定において



・結合が一部欠損している表面層と内部では磁気の振る舞いが違う (表面磁気異方性)
結晶サイズ 小
↓
表面層の割合 大
↓
表面磁気異方性 大

結晶子サイズ→小

飽和磁化の減少
保磁力の増加

表面磁気異方性が大きく寄与

メスbauer測定において

結晶子サイズ→小

A-site
B-site

ともに

内部磁場小さくなる
線幅に広がり

A-site

存在割合高くなる

図2 CoFe₂O₄微粒子における特異磁性

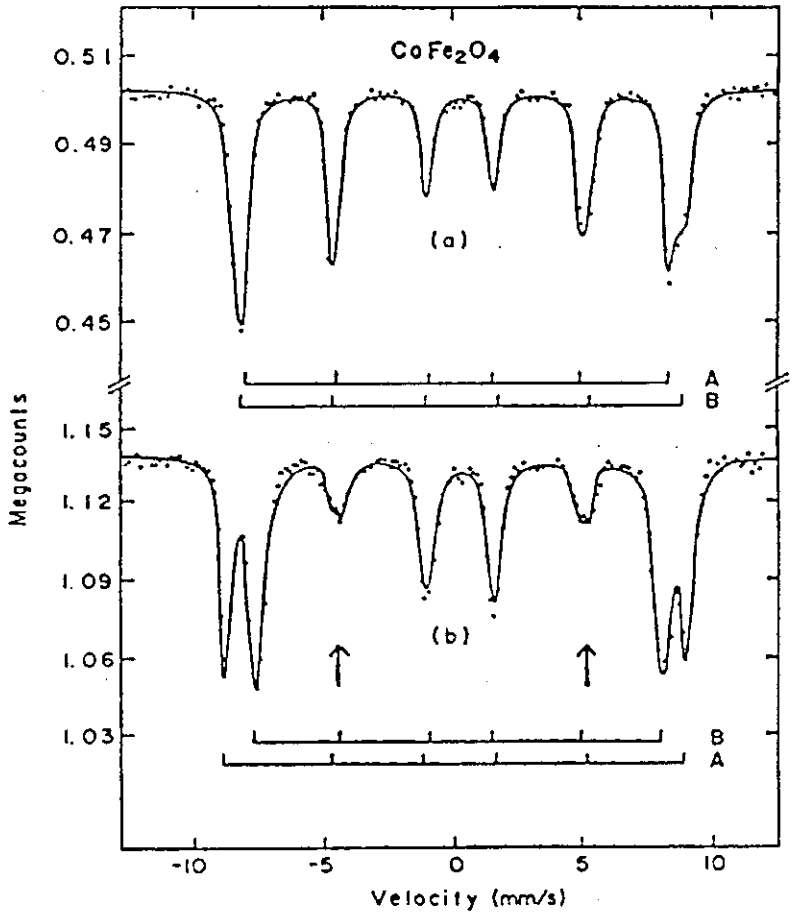


図3 CoFe₂O₄微粒子(50 nm)のメスbauerースペクトル
(a) 4.2 K での結果
(b) 4.2 K, 50 kOe の磁場下での結果
A, B-site における Fe のイオン分布のほか、高磁場下でも配向しない磁化成分 (矢印) が有ることを示す。

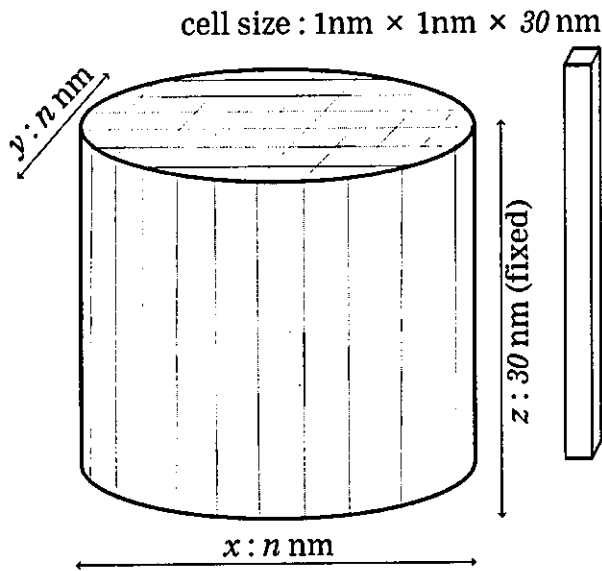


図4 計算機実験で想定した試料の模式図.

試料形状は円柱状で z 軸方向は $z=30$ nm とし, x 軸及び y 軸方向を $x=y=30\sim 100$ nm とした.

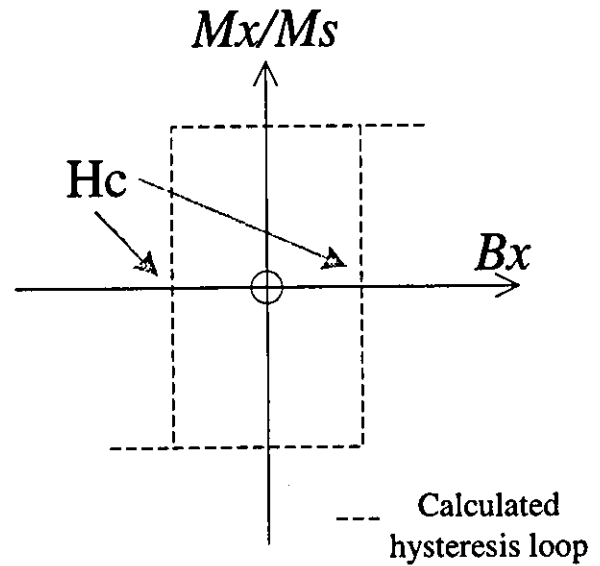


図5 得られた磁化曲線からの保磁力 H_c の推定.

表2 計算機実験に用いた試料定数

物質定数	値
飽和磁化 (M_s [A/m])	1700E3
交換スティフネス定数 (A [J/m])	21E-12
結晶異方性定数 (K_1 [J/m ³])	48E3
Anisotropy type	Uniaxial

表3 The environment of computer experiment.

計算機名称	Hp workstation zx2000
CPU	Intel Itanium2 900MHz
Memory	1.5Gbyte
OS	Red Hat Linux Advanced Workstation release 2.1AW
Compiler	gcc 2.96
Software	Object Oriented MicroMagnetic computing Framework (OOMMF) Release 1.2a3 (NIST)

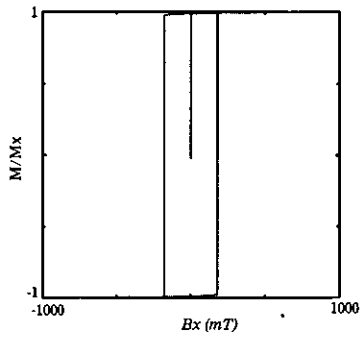


図 6 edge $K1 = 4.8 \times 10^2$ の場合. $Hc = 180$ mT.

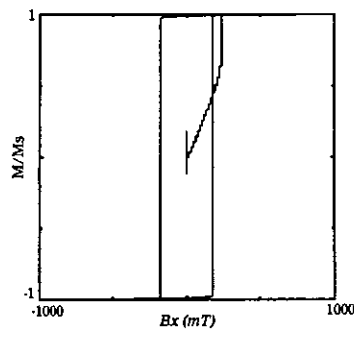


図 7 edge $K1 = 4.8 \times 10^4$ の場合. $Hc = 180$ mT.

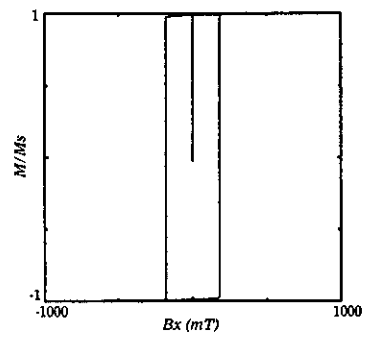


図 8 edge $K1 = 4.8 \times 10^5$ の場合. $Hc = 180$ mT.

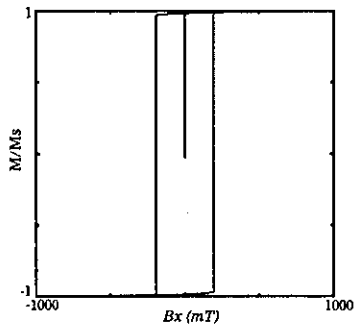


図 9 edge $K1 = 4.8 \times 10^6$ の場合. $Hc = 195$ mT.

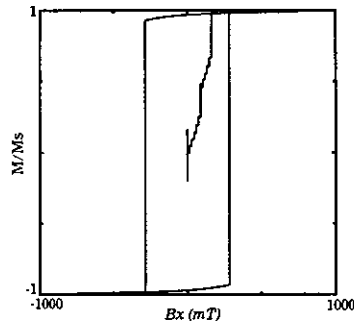


図 10 edge $K1 = 4.8 \times 10^7$ の場合. $Hc = 285$ mT.

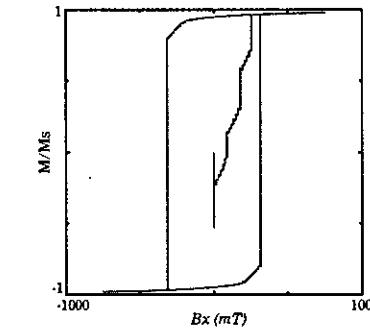


図 11 edge 2.4×10^8 の場合. $Hc = 315$ mT.

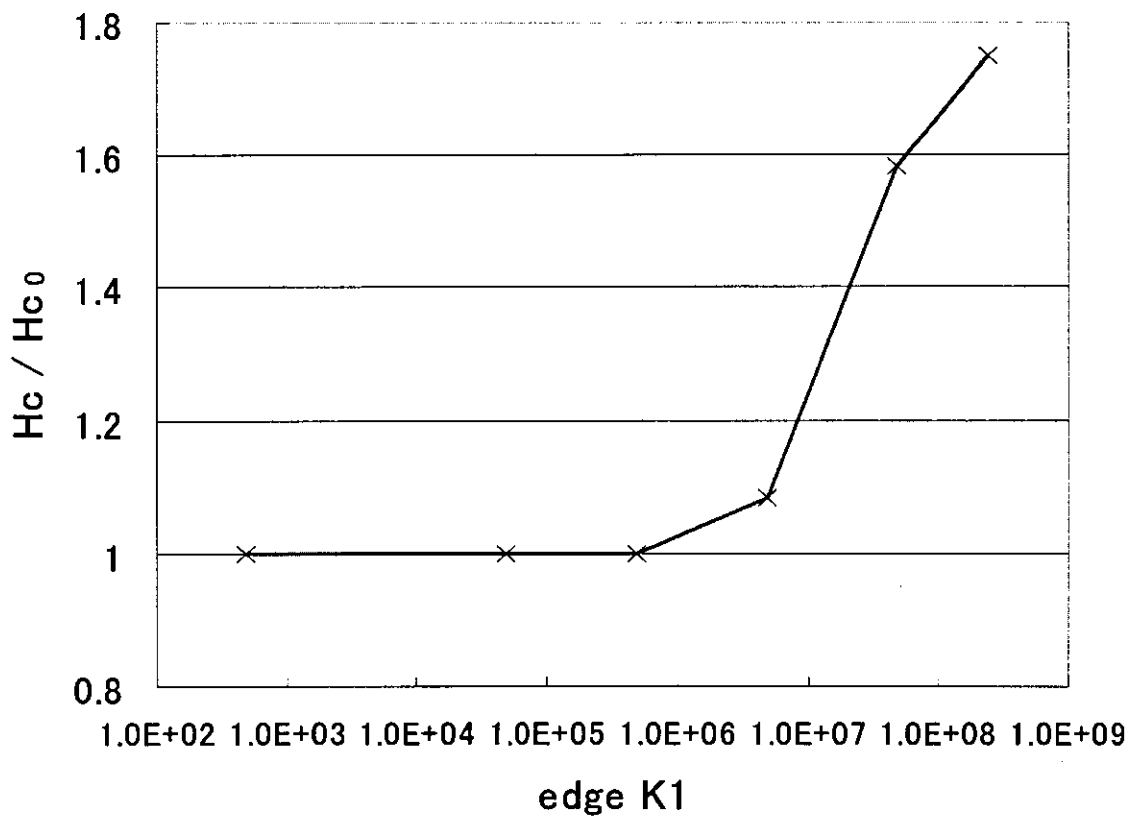


図 12 表面磁気異方性定数と保磁力との関係.

edge $K1 = 4.8 \times 10^4$ のときの Hc の値を Hc_0 とした, 規格化した値で示した.

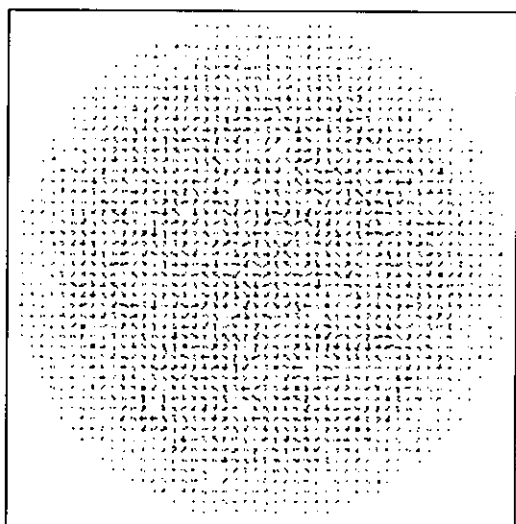


図13 初期の磁化状態. Time step=0. $B_x=0T$.

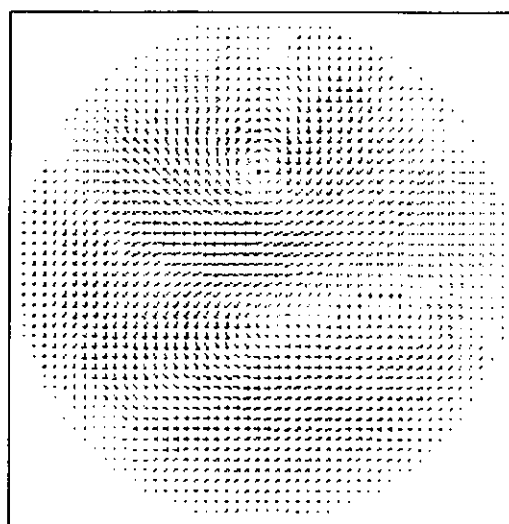


図14 500 step 経過後の状態. $B_x=0T$.

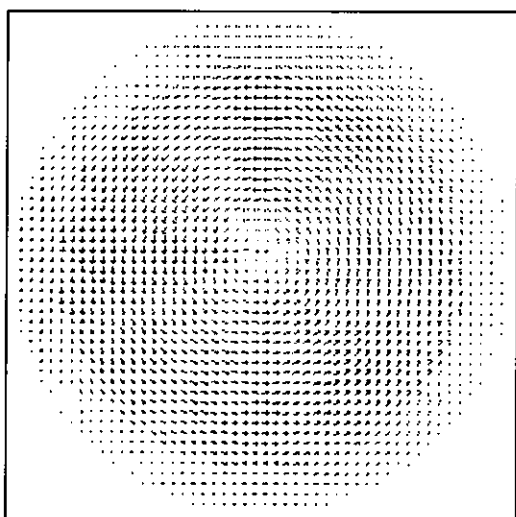


図15 10000 step 経過後の状態. $B_x=0T$.

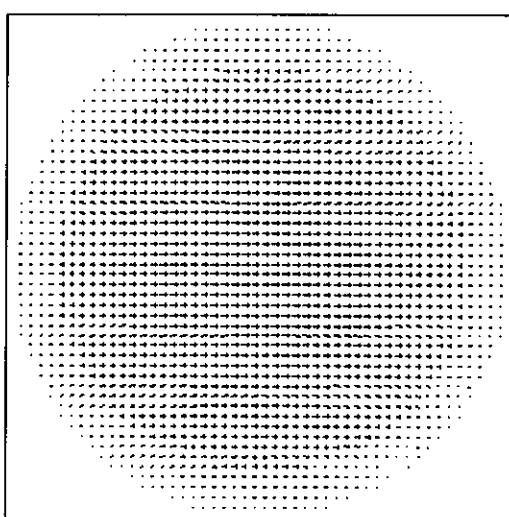


図16 266086 step 経過後の状態. $B_x=0.75T$.

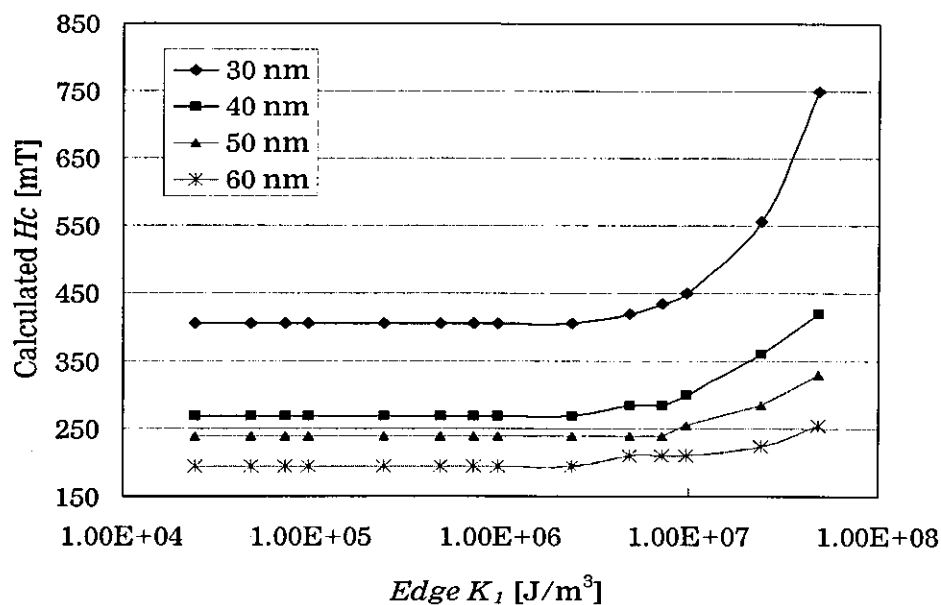


図17 粒子サイズ, 表面磁気異方性と保磁力値の計算機実験結果.