

磁気ハイパーサーミア用窒化鉄の開発

東京科学大学 総合研究院 生体材料工学研究所 川下将一

Development of Iron Nitride for Magnetic Hyperthermia

Masakazu Kawashita

Laboratory for Biomaterials and Bioengineering, Institute of Integrated Research,
Institute of Science Tokyo

磁気ハイパーサーミアの温熱種としてマグネタイト(Fe_3O_4)が一般的に使用されているが、窒化鉄を温熱種として使用することに焦点を当てた研究はほとんど行われていない。本研究では、窒化鉄、特に $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ に注目し、ヘマタイト(Fe_2O_3)とナトリウムアミド(NaNH_2)を混合し、種々の条件下で加温することにより、 $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子を合成した。得られた微粒子の発熱特性を調べ、顕著な発熱性能を示す微粒子の合成条件を調べた。その結果、250°C、12時間の加温条件で合成された $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子が、100kHz、125Oeの交流磁場下で寒天ファントムの温度を10分以内に約20°C上昇させ、同微粒子が磁気ハイパーサーミアに使用できる可能性が明らかとなった。また、種々の条件下で合成された同微粒子の分析結果から、 $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ の発熱特性は、窒素含有量、粒子サイズ、結晶子サイズ、飽和磁化、保磁力等のいくつかの要因によって影響を受けることが明らかとなった。さらに、細胞適合性試験の結果から、 $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子をそのまま磁気ハイパーサーミアに使用する場合は、細胞毒性を示さない程度に投与量を制御する必要があることが明らかとなった。

Little research has focused on using iron nitride as thermoseed particles in magnetic hyperthermia, although magnetite (Fe_3O_4) is commonly used for this purpose. In the present study, we focus on iron nitride, especially $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$. $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ particles were synthesized from hematite (Fe_2O_3) and sodium amide (NaNH_2) under various synthesis conditions, and the heat generation properties of the particles were investigated to reveal the synthesis conditions that lead to particles with notable heat-generation performance. The particles synthesized at 250°C for 12 h increased the temperature of an agar phantom by approximately 20°C under an alternating magnetic field (100 kHz, 125 Oe, 600 s), suggesting that $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ particles can be used for magnetic hyperthermia. The analysis results for the particles synthesized under different conditions suggest that the heat-generation properties of $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ were affected by several factors, including the nitrogen content, particle size, crystallite size, saturation magnetization, and coercive force. Furthermore, the results of the cytocompatibility test revealed that when the $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ particles are used directly for magnetic hyperthermia, the dosage must be controlled to a level that does not cause cytotoxicity.

1. はじめに

正常組織内の細胞は約 48°C まで耐え得るが、悪性腫瘍組織内のがん細胞は熱に弱く、43°C 以上に加温されると死滅する。従って、患部を 43~48°C に加温すれば、がん細胞のみを死滅させることができる(温熱療法：ハイパーサーミア)。近年、温熱療法の一つとして、交流磁場の下で発熱する磁性材料を患部に埋入し、体外から交流磁場を印加して、がんを局所加温することによって治療する「磁気ハイパーサーミア」が注目されている。欧州では、マグネタイト(Fe_3O_4)ナノ粒子の磁性流体(NanoTherm[®] liquid)を用いた磁気ハイパーサーミアが脳腫瘍の治療に用いられ、現在、膵臓がん、前立腺がん、乳がん、および食道がんに対する磁気ハイパーサーミアの臨床研究が進められている。

NanoTherm[®] liquid は脳腫瘍の磁気ハイパーサーミアを実現した点において画期的であるが、 Fe_3O_4 よりも高い発熱効率を示す磁性材料を用いれば、患部への磁性材料の投与量を低減できるだけでなく、従来よりも小型、即ち安価な交流磁場発生装置を使えるため、患者に優しいだけでなく、より低コストの磁気ハイパーサーミアを実現できる可能性がある¹⁾。これまでの申請者らの研究により、 $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ 、 $\varepsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 、 $\gamma'\text{-Fe}_4\text{N}$ などの窒化鉄は磁気ハイパーサーミアに有用である可能性がある¹⁾。これまでの申請者らの研究により、 $\alpha''\text{-Fe}_{16}\text{N}_2$ に関しては基礎的知見が得られた^{2,3)}が、 $\varepsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ や $\gamma'\text{-Fe}_4\text{N}$ といった、他の窒化鉄の特性は明らかでない。

本研究では、種々の条件で $\varepsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ を作製し、その構造、磁氣的性質、交流磁場下における発熱特性、および細胞適合性を明らかにすることを目的とする^{4,5)}。これにより、磁気ハイパーサーミアに適した窒化鉄を得る条件を明らかにし、窒化鉄の構造・磁氣的性質・発熱特性・細胞適合性との関係を基礎的に明らかにする。

2. 実験方法

2.1 試料の作製

既報⁶⁾に基づき、 $\varepsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ を合成した。具体的には、窒素雰囲気グローブボックス内でヘマタイト(Fe_2O_3 ; 高純度化学研究所)と NaNH_2 (シグマアルドリッチ)を混合し、これを高圧用反応分解容器(三愛科学)に封入した。この容器を恒温器内で 230~260°C で 6~96 時間加熱した後、容器から試料を取り出し、エタノールで洗浄し、一晩乾燥させて試料を得た。なお、参照試料として、市販の Fe_3O_4 (シグマアルドリッチ)を用いた。表 1 に各試料名および合成条件を記す。

Table 1. Synthesis conditions for samples

Sample	Temperature (°C)	Time (h)
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_6\text{h}}$	240	6
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	240	12
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{96\text{h}}}$	240	96
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{230^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	230	12
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{250^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	250	12
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{260^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	260	12

2.2 試料の構造解析および磁気特性評価

試料の形状、粒径、および粒度分布を、エネルギー分散型 X 線分光装置(EDS)付き電界放射型走査電子顕微鏡(FE-SEM)により調べた。また、試料の結晶相を粉末 X 線回折法(XRD)によって調べた。さらに、試料の飽和磁化(M_s)および保磁力(H_c)を試料振動型磁力計により調べた。

2.3 試料の発熱特性評価

試料 80mg を 1.1wt% 寒天水溶液 1mL に分散させ、ゲル化させることにより、寒天ファントムを得た。これを 100kHz、125Oe の交流磁場下に 10 分間置き、その温度変化を光ファイバー温度計により測定した。

2.4 試料の細胞毒性評価

試料 ($\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$ 、 $\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{250^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$ 、 $\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{260^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$ 、あるいは Fe_3O_4) を 10% ウシ胎児血清 (細胞用培地) に 10mg/mL の濃度で 24 時間浸漬させて得た抽出液を 1~10,000 倍に段階希釈し、それをマウス線維芽細胞 (L929 細胞) に 24 時間曝露し、L929 細胞の生存率を測定した (抽出液曝露法)。また、 $\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{250^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$ あるいは Fe_3O_4 を $1\mu\text{g}\sim 10\text{mg/mL}$ 含む細胞用培地中において L929 細胞を 24 時間培養し、L929 細胞の生存率を測定した (直接接触法)。

3. 結果と考察

試料の FE-SEM 写真と EDS マッピング像を Fig.1 に示す。試料は 250~350nm の球状粒子からなっており、原料の Fe_2O_3 や参照試料の Fe_3O_4 の表面は平坦であったが、今回作製した Fe_{2-3}N 試料は粗い表面を有していた。また、いずれの Fe_{2-3}N 試料にも、鉄、酸素、および窒素の EDS シグナルが検出されたことから、同試料の表面は一部酸化していることが分かった。FE-SEM 写真から求めた、 Fe_{2-3}N 試料の平均粒径を Table2 に示す。

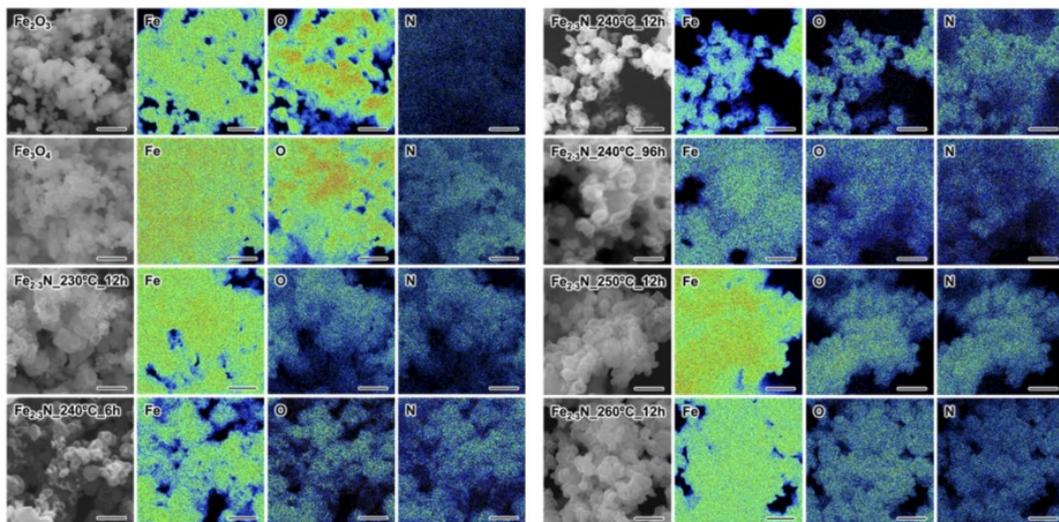


Fig. 1 FE-SEM images and corresponding EDS mapping images of samples. Scale bars: 1 μm .

Table 2. Mean particle size, unit cell volume, and estimated compositions for samples.

Sample	Mean particle size (nm)	Unit cell volume (\AA^3)	x in Fe_{2+x}N	Estimated composition
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{6\text{h}}}$	279	87.9	0.0241	$\text{Fe}_{2.02}\text{N}$
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	306	86.5	0.334	$\text{Fe}_{2.33}\text{N}$
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{240^\circ\text{C}_{96\text{h}}}$	298	83.5	0.999	$\text{Fe}_{3.00}\text{N}$
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{230^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	242	87.2	0.177	$\text{Fe}_{2.18}\text{N}$
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{250^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	328	86.2	0.385	$\text{Fe}_{2.39}\text{N}$
$\text{Fe}_{2-3}\text{N}_{260^\circ\text{C}_{12\text{h}}}$	358	85.6	0.514	$\text{Fe}_{2.51}\text{N}$

これより、加熱処理温度が 230°C から 260°C に上昇すると、試料の平均粒径は 242 nm から 358 nm へと増大するが、加熱処理温度が 240°C と一定の場合、加熱処理時間を 6 時間から 96 時間と長くしても、試料の平均粒径はあまり変化しないことが明らかとなった。

試料の XRD パターンを Fig.2 に示す。いずれの試料も ϵ -Fe₂₋₃N からなっていることが明らかとなった (Fig.2A および 2C)。また、加熱処理時間が長くなるにつれ (Fig.2B)、あるいは加熱処理温度が高くなるにつれ (Fig.2D)、 ϵ -Fe₂₋₃N の主回折ピークが高角度側にシフトした。試料の回折ピークの位置から単位格子パラメータを算出し、既報⁷⁾に基づいて試料の組成を見積もったところ、Table2 のようになった。これより、試料の結晶相は、加熱処理時間が長くなる、あるいは加熱処理温度が高くなるにつれ、 ϵ -Fe₂N から ϵ -Fe₃N に徐々に変化することが明らかとなった。

試料の磁気特性を Table3 に示す。Fe₂₋₃N_250°C_12h 以外の試料において、加熱処理温度の上昇、あるいは加熱処理時間の増加に伴って、 M_s と H_c が増加する傾向が認められた。これは、加熱処理温度の上昇、あるいは加熱処理時間の増加に伴って、試料の結晶相が ϵ -Fe₂N (M_s :22.2 emu/g, H_c :55 Oe) から ϵ -Fe₃N (M_s :134 emu/g, H_c :122 Oe) へと変化した (Fig.2B および 2D) ためと考えられる。

試料の発熱特性を Fig.3 に示す。Fe₂₋₃N_240°C_6h および Fe₂₋₃N_230°C_12h 以外の試料は Fe₃O₄ よりも高い発熱特性を示した。全ての試料の中で Fe₂₋₃N_250°C_12h が最も優れた発熱特性を示した。以上の結果から、 ϵ -Fe₂₋₃N の発熱特性は、窒素含有量、粒子サイズ、結晶子サイズ、飽和磁化、保磁力等のいくつかの要因によって影響を受けることが明らかとなった。

試料の細胞毒性評価結果を Fig.4 に示す。抽出液曝露法 (Fig.4A) および直接接触法 (Fig.4B) のいずれの場合も、 ϵ -Fe₂₋₃N は Fe₃O₄ よりも低濃度で L929 細胞の生存率を低下させたことから、 ϵ -Fe₂₋₃N は Fe₃O₄ よりもやや強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。これは、 ϵ -Fe₂₋₃N が Fe₃O₄ よりも多量の鉄を溶出する (データ省略) ためであると

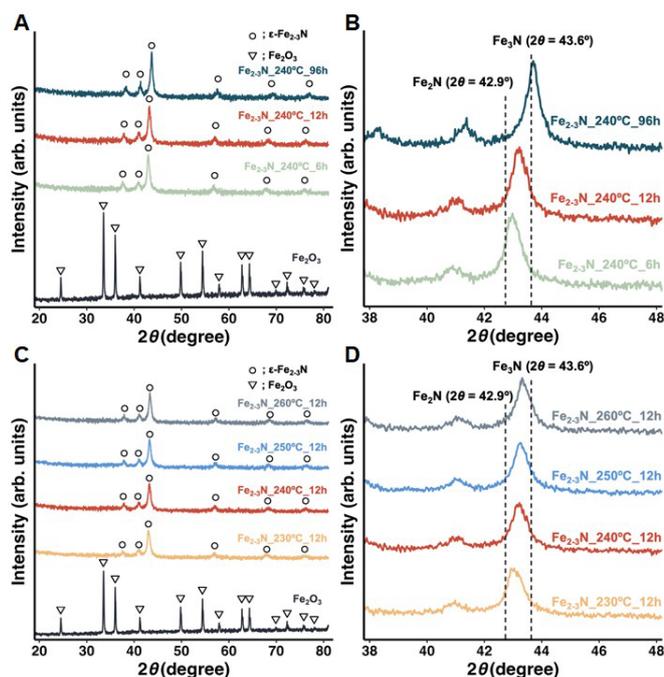


Fig.2 XRD patterns for samples synthesized at 240°C for different synthesis times (A, B) and those of samples synthesized at different temperatures for 12 h (C, D). XRD peak positions for ϵ -Fe₂N, and ϵ -Fe₃N are shown by dashed lines in Figs. 2B, D.

Table 3. M_s , M_r , and H_c values for samples.

Sample	M_s (emu/g)	H_c (Oe)
Fe ₂₋₃ N_240°C_6h	14.0	71.6
Fe ₂₋₃ N_240°C_12h	30.9	10.0
Fe ₂₋₃ N_240°C_96h	78.1	170
Fe ₂₋₃ N_230°C_12h	13.0	-
Fe ₂₋₃ N_250°C_12h	29.4	8.8
Fe ₂₋₃ N_260°C_12h	45.9	51.0

-: under detection limit

考えられる⁵⁾。これより、 ϵ - Fe_{2-3}N 微粒子をそのまま磁気ハイパーサミアに用いる場合は、毒性を示さない程度に投与量を制御する必要があることが明らかとなった。また、投与可能な ϵ - Fe_{2-3}N 微粒子の量を増やすには、鉄の溶出を低減させるような微粒子の表面改質が必要であることが分かった。

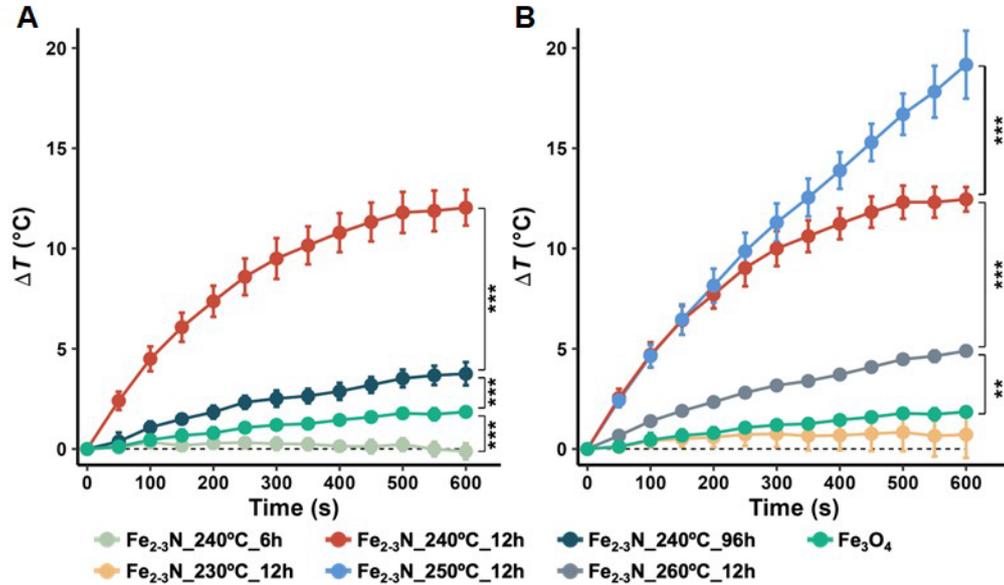


Fig.3 Temperature increase (ΔT) in agar phantom with samples dispersed and placed under alternating magnetic field. The ΔT for samples synthesized at 240°C for different synthesis times and those synthesized at different temperatures for 12 h are shown in (A) and (B), respectively. Each data point is presented as the mean \pm standard deviation (SD) from four independent experiments, and the statistical significance (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) was computed via Tukey's HSD test.

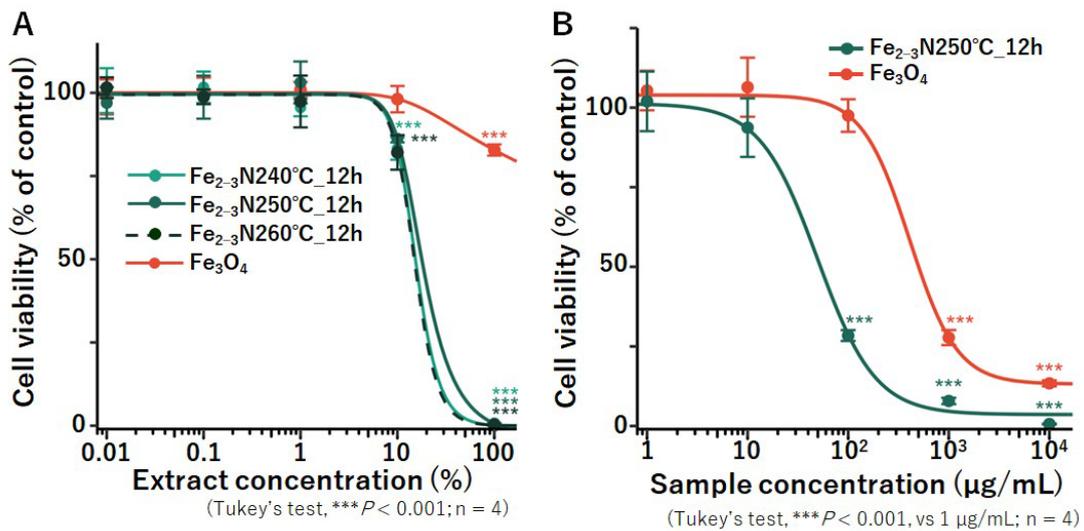


Fig.4 Cytotoxicity of samples against L929 cells (A: extract exposure method, B: direct contact method).

4. 結論

本研究では、 Fe_2O_3 と NaNH_2 から種々の条件で $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子を合成し、試料の組成、構造、あるいは磁気特性等が発熱特性に与える影響を調べた。その結果、 250°C 、12 時間の加温条件で合成された $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子が最も優れた発熱性能を示し、 $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ の発熱特性は、窒素含有量、粒子サイズ、結晶サイズ、飽和磁化、保磁力などの複数の要因によって複雑に変化することが明らかとなった。また、細胞適合性試験の結果から、 $\epsilon\text{-Fe}_{2-3}\text{N}$ 微粒子をそのまま磁気ハイパーサミアに使用する場合は、細胞毒性を示さない程度に投与量を制御する必要があることが明らかとなった。

5. 謝辞

本研究は、令和 4 年度(第 44 回)日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) K. Wu, J. Liu, R. Saha, B. Ma, D. Su, C. Peng, J. Sun, and J. P. Wang, *ACS Omega*, 5, 11756 (2020).
- 2) M. Shibata, T. Ogawa, and M. Kawashita, *Ceram. Int.*, 45, 23707 (2019).
- 3) M. Shibata, H. Kanetaka, M. Furuya, K. Yokota, T. Ogawa, and M. Kawashita, *J. Biomed. Mater. Res.*, 109, 1784 (2021).
- 4) 白杵壮一郎, 小川智之, 島袋将弥, 横井太史, 川下将一, 日本セラミックス協会第 36 回秋季シンポジウム予稿集, 1A14 (2023).
- 5) 白杵壮一郎, 小川智之, 島袋将弥, 横井太史, 川下将一, 第 45 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, p. 381 (2023).
- 6) A. Miura, T. Takei, and N. Kumada, *Inorg. Chem.*, 52, 11787 (2013).
- 7) S. E. O' Sullivan, S.-K. Sun, S. M. Lawson, M. C. Stennett, F. Chen, Y. Masubuchi, C. L. Corkhill, and N. C. Hyatt, *Inorg. Chem.*, 60, 2553 (2021).