

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5476620号
(P5476620)

(45) 発行日 平成26年4月23日 (2014. 4. 23)

(24) 登録日 平成26年2月21日 (2014. 2. 21)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 5/078 (2010. 01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 J	
C 1 2 N 5/00 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00 2 O 1	
A 6 1 K 41/00 (2006. 01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 K 33/26 (2006. 01)	A 6 1 K 33/26	
A 6 1 K 49/00 (2006. 01)	A 6 1 K 49/00	C
請求項の数 8 (全 8 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-36764 (P2008-36764)	(73) 特許権者	899000068
(22) 出願日	平成20年2月19日 (2008. 2. 19)		学校法人早稲田大学
(65) 公開番号	特開2008-228728 (P2008-228728A)		東京都新宿区戸塚町1丁目104番地
(43) 公開日	平成20年10月2日 (2008. 10. 2)	(73) 特許権者	590002389
審査請求日	平成23年2月17日 (2011. 2. 17)		静岡県
(31) 優先権主張番号	特願2007-37625 (P2007-37625)		静岡県静岡市葵区追手町9番6号
(32) 優先日	平成19年2月19日 (2007. 2. 19)	(74) 代理人	100079304
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 小島 隆司
		(74) 代理人	100114513
			弁理士 重松 沙織
		(74) 代理人	100120721
			弁理士 小林 克成
		(74) 代理人	100124590
			弁理士 石川 武史
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 磁気微粒子包含細胞及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内に平均粒径が 10 ~ 40 nm のアミン化合物で表面が修飾された合成磁気微粒子及び / 又は該合成磁気微粒子の凝集粒子を内包してなることを特徴とする磁気微粒子包含細胞。

【請求項 2】

上記細胞が、免疫細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の磁気微粒子包含細胞。

【請求項 3】

上記アミン化合物がアルキルジアミンであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の磁気微粒子包含細胞。

【請求項 4】

上記合成磁気微粒子が、水溶性鉄塩を、アミン化合物を含む水溶液中で加水分解させることにより生成したマグネタイトであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の磁気微粒子包含細胞。

【請求項 5】

平均粒径が 10 ~ 40 nm のアミン化合物で表面が修飾された合成磁気微粒子と、細胞とを混合して培養することにより、上記合成磁気微粒子を細胞内に導入することを特徴とする請求項 1 記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

【請求項 6】

上記細胞が、免疫細胞であることを特徴とする請求項 5 記載の磁気微粒子包含細胞の製

造方法。

【請求項 7】

上記アミン化合物がアルキルジアミンであることを特徴とする請求項 5 又は 6 記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

【請求項 8】

上記合成磁気微粒子が、水溶性鉄塩を、アミン化合物を含む水溶液中で加水分解させることにより生成したマグネタイトであることを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、免疫細胞療法などの医学的治療、磁気共鳴画像診断(MRI)などの医療診断などに用いることができる磁気微粒子包含細胞及びその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、磁気微粒子を、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、核磁気共鳴画像診断(MRI)、温熱療法などの医療に応用することが提案されている。そのなかでも、免疫細胞等の細胞に磁気粒子を導入又は結合させ、これを体内に導入し、免疫細胞の作用によりがん細胞等のターゲットに到達した磁気粒子に、外部から磁気を与えて、磁気誘導による発熱させてがん細胞等のターゲットを治療する手法や、体内に導入した免疫細胞の位置を、磁気粒子を利用してMRIにより特定する手法などが考えられている。

20

【0003】

このような手法に用いる磁気粒子は、体内での拒絶反応を避けるため細胞に内包される必要があり、細胞より小さいサイズであることが必要である。また、磁気誘導や検出に有効な磁気を有するサイズ以上であることも必要である。このようなサイズ範囲の中でより小さいものを用いることが、免疫細胞の利用効率や、体内での負荷の点からも好ましい。

【0004】

従来、このような手法において用いることを想定した磁気微粒子包含細胞の磁気粒子としては、例えば、走磁性細菌が有するマグネトソームと呼ばれる磁気微粒子鎖を利用する方法(特開昭62-275679号公報(特許文献1))などが報告されているが、この

30

【0005】

一方、化学的合成手法により磁気粒子を製造する手法によれば、磁気粒子の大量製造は可能であるが、ミクロンからサブミクロンサイズの粒子を導入しようとする、細胞内に効率よく分散させることができないという問題があるため、より小さい合成磁気粒子を利用することが望まれるが、分散性の高い小粒径の磁気微粒子を、粒径を制御して効率よく製造することができていなかった。

【0006】

【特許文献1】特開昭62-275679号公報

【特許文献2】特開昭2006-325600号公報

40

【非特許文献1】Q A Pankhurst, et Al., J. Phys. D: Appl. Phys., 36(2003)R167-R181

【非特許文献2】Tobias Neuberger, et al., Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293(2005)483-496

【非特許文献3】David Portet, et al., Journal of Colloid and Interface Science, 238, 37-42(2001)

【非特許文献4】Akira Ito, et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, No.1, 1-11.2005

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記事情に鑑みなされたもので、免疫細胞療法などの医学的治療、磁気共鳴画像診断（MRI）などの医療診断などにおいて有効に用いることができる磁気微粒子包含細胞、及びこのような磁気微粒子包含細胞を効率よく製造することができる方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者は、上記目的を達成するため鋭意検討を重ねた結果、平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子と、免疫細胞等の細胞とを混合して培養することによって、上記合成磁気微粒子を細胞内に導入することにより、合成磁気微粒子が効率よく、また分散性よく細胞内に内包され、平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子及び/又は該合成磁気微粒子の凝集粒子を内包した磁気微粒子包含細胞を製造することができることを見出し、本発明をなすに至った。

【 0 0 0 9 】

従って、本発明は、下記の磁気微粒子包含細胞及びその製造方法を提供する。

請求項 1 :

細胞内に平均粒径が10～40nmのアミン化合物で表面が修飾された合成磁気微粒子及び/又は該合成磁気微粒子の凝集粒子を内包してなることを特徴とする磁気微粒子包含細胞。

請求項 2 :

上記細胞が、免疫細胞であることを特徴とする請求項1記載の磁気微粒子包含細胞。

請求項 3 :

上記アミン化合物がアルキルジアミンであることを特徴とする請求項1又は2記載の磁気微粒子包含細胞。

請求項 4 :

上記合成磁気微粒子が、水溶性鉄塩を、アミン化合物を含む水溶液中で加水分解させることにより生成したマグネタイトであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の磁気微粒子包含細胞。

請求項 5 :

平均粒径が10～40nmのアミン化合物で表面が修飾された合成磁気微粒子と、細胞とを混合して培養することにより、上記合成磁気微粒子を細胞内に導入することを特徴とする請求項1記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

請求項 6 :

上記細胞が、免疫細胞であることを特徴とする請求項5記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

請求項 7 :

上記アミン化合物がアルキルジアミンであることを特徴とする請求項5又は6記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

請求項 8 :

上記合成磁気微粒子が、水溶性鉄塩を、アミン化合物を含む水溶液中で加水分解させることにより生成したマグネタイトであることを特徴とする請求項5～7のいずれか1項記載の磁気微粒子包含細胞の製造方法。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、免疫細胞療法などの医学的治療、磁気共鳴画像診断（MRI）などの医療診断などにおいて有効に用いることができる磁気微粒子包含細胞として、小粒径の微粒子及び/又はその凝集粒子が分散性よく内包された磁気微粒子包含細胞を提供することができ、また、このような磁気微粒子包含細胞を効率よく製造することができる。本発明の磁気微粒子包含細胞は、磁気誘導を利用した温熱療法等にも応用が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 1 】

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明の磁気微粒子包含細胞は、細胞内に合成磁気微粒子を内包するものであり、合成磁気微粒子は、平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子の単一粒子として、また上記合成磁気微粒子の凝集粒子、例えば、平均長さが1μm以下、好ましくは0.1～1μmの鎖状等の凝集体として内包されている。

【 0 0 1 2 】

本発明において対象とする細胞としては、例えば免疫細胞が好適であり、免疫細胞としては、腫瘍抗原特異的な細胞傷害性T細胞（CTL細胞）、活性化リンパ球、正常リンパ球等のリンパ球細胞、樹状細胞、B細胞などを挙げることができる。このような免疫細胞にマグネタイト等の磁気微粒子を取り込ませることにより、例えば、マグネタイトを内包した高機能性がん特異的キラー細胞を製造し、磁力によりがん局所へ集積させることによる治療効果が期待できる。また磁気微粒子を取り込んだキラー細胞のがん局所への集積により、磁気微粒子をがん局所へ到達させ、磁気誘導を利用した誘導加熱により、局所的にがん細胞のみを死滅させる高効率ながん免疫細胞療法も可能となる。また、磁気微粒子を内包したキラー細胞が到達したがん部位を、磁性微粒子をマーカーとして、MRIによりモニタリングすることが可能であり、これにより発見が難しい微小ながんの早期発見も可能である。

10

【 0 0 1 3 】

本発明において、磁性微粒子としては、酸化鉄、特に、マグネタイト（ Fe_3O_4 ）が好適である。平均粒径が10～40nmのマグネタイトは、例えば、水溶性鉄塩を、アミン化合物を含む水溶液中で加水分解させることにより製造することができる。

20

【 0 0 1 4 】

この場合、水溶性鉄塩としては、硫酸鉄[II]（ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ など）、硫酸鉄[III]（ $Fe_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$ ）、塩化鉄[II]（ $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ など）、塩化鉄[III]（ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ など）などを用いることができる。

【 0 0 1 5 】

一方、加水分解反応においてアルカリとして作用するアミン化合物としては、1,6-ヘキサジアミン等のアルキルジアミンなどを用いることができる。アミン化合物は、生成したマグネタイト微粒子の表面を修飾して粒子同士の凝集を抑制する作用も有し、これにより、マグネタイト粒子をより分散性よく生成させることが可能となる。

30

【 0 0 1 6 】

本発明においては、水溶性鉄塩とアミン化合物とを混合した水溶液を、必要に応じて攪拌しながら20～25程度の温度で20～24時間程度熟成することによりマグネタイトを生成させることが可能である。例えば、水溶性鉄塩水溶液の濃度を0.04～0.06mol/L、アミン化合物水溶液の濃度を0.24～0.26mol/Lとして、水溶性鉄塩に対してアミン化合物を5当量程度となるように両水溶液を混合すればよい。

【 0 0 1 7 】

生成したマグネタイト粒子は、必要に応じて、ろ過、洗浄、乾燥等の工程を経て、回収される。このような方法でマグネタイトを製造すれば、平均粒径が10～40nmのマグネタイトを分散性よく製造することができ、また、例えば、水溶性鉄塩（ Fe イオン）の濃度を調整することにより、所望の平均粒径のマグネタイト微粒子を製造することが可能である。

40

【 0 0 1 8 】

このような方法でマグネタイト微粒子を製造すれば、40～90emu/g（ $A \cdot m^2 / kg$ ）、特に70～90emu/g（ $A \cdot m^2 / kg$ ）の飽和磁化、10～1000e、特に50～1000eの保磁力を示す良好な磁気特性を示すマグネタイト微粒子を得ることができる。

【 0 0 1 9 】

次に、磁性微粒子を細胞に導入する方法について説明する。例えば、上述した方法によ

50

り製造した平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子及び/又は該合成磁気微粒子の凝集粒子を用い、この合成磁気微粒子(凝集粒子)を、リン酸緩衝生理食塩水等の生理食塩水中に、必要に応じて超音波等を使用して、分散させて分散液を調製し、この分散液と、従来公知の方法で採取、調製したリンパ球細胞等の免疫細胞と、必要に応じて生理食塩水とを混合し、磁気微粒子が100～200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、免疫細胞が $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個/ ml 程度の混合液とし、これを例えばヒトの免疫細胞であればその体温前後の温度、例えば37 $^{\circ}\text{C}$ 程度の温度で、磁性微粒子の内包に必要な所定時間、例えば4時間程度培養すれば、磁性微粒子を細胞に導入することが可能である。特に、上述した方法により製造した合成磁気微粒子(凝集粒子)は、合成磁気微粒子(凝集粒子)であるが、免疫細胞との適合性がよく、粒子の内包がスムーズに進行すると共に、粒子の内包によって免疫細胞自身の機能(活性)が損なわれることがない。

10

【0020】

このような方法により、本発明の磁気微粒子包含細胞を製造することが可能であるが、培養の条件を変更、例えば、濃度を変更したり、培養温度や培養時間を選択したりすることにより、得られた磁気微粒子包含細胞の細胞内に、平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子が単一で分散したもの、平均粒径が10～40nmの合成磁気微粒子が、平均長さが1 μm 以下、特に0.1～1 μm の鎖状等の凝集粒子として分散したもの、双方が分散したものを製造することが可能である。

【実施例】

【0021】

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

20

【0022】

[実施例1]

水溶性鉄塩として、硫酸鉄[II]を0.05mol/Lで含有する水溶液100mlに、1,6-ヘキサジアミンを0.25mol/Lで含有する水溶液100mlを加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で24時間強撹拌することにより、黒色の沈殿物を得た。得られた沈殿物をろ過により分離し、水洗後、室温で乾燥して微粒子を得た。

【0023】

得られた微粒子は、X線回折法により酸化鉄(マグネタイト)であることが確認された。また、微粒子の粒径を透過型電子顕微鏡像から計測したところ、平均粒子径が40nmのナノ粒子であることが確認された。更に、得られたマグネタイトの飽和磁化は87A $\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ 、保磁力は660eであり、良好な磁気特性を有する磁気粒子であることが確認された。

30

【0024】

次に、得られた酸化鉄(マグネタイト)ナノ粒子を、リン酸緩衝生理食塩水中に10～20mg/mlの濃度となるように混合し、超音波処理により分散させた分散液を調製した。その後、 2×10^6 個/mlのヒト由来正常リンパ球細胞に対して、マグネタイトの添加量が200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように混合(リン酸緩衝生理食塩水により希釈)し、緩やかに撹拌しながら、37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間培養することによって、リンパ球細胞に酸化鉄(マグネタイト)ナノ粒子を導入する処理を実施した。

40

【0025】

培養後の培養液よりリンパ球細胞のみを遠心分離によって分離し、細胞内に取り込まれた鉄イオン濃度より、マグネタイトナノ粒子の取り込み量を見積もったところ、添加量に対して10～20質量%のマグネタイトナノ粒子がリンパ球細胞中に取り込まれていることが確認された。

【0026】

更に、リンパ球細胞中へのマグネタイトナノ粒子の取り込みを確認するために、透過型電子顕微鏡による細胞観察を行った。その結果、図1に示されるように、リンパ球中へベシクルの形成(図中の矢印で示した部分)を伴って、マグネタイトナノ粒子が数マイクロ

50

メートルのベシクル中に凝集体として取り込まれている様子が確認された。

【0027】

[実施例2]

実施例1と同様の方法により得た酸化鉄(マグネタイト)ナノ粒子を用い、ヒト由来正常リンパ球細胞の代わりに、メラノーマ抗原であるgp100-A2ペプチド(gp100₂₀₉₋₂₁₇:IMDQVPFSV)に特異的なCTL line(CTL細胞株:gp100ペプチドHLA-A2 tetramer 44%)を用いて、CTL細胞に酸化鉄(マグネタイト)ナノ粒子を導入する処理を実施した。

【0028】

培養後の培養液よりリンパ球細胞のみを遠心分離によって分離し、細胞内に取り込まれた鉄イオン濃度より、マグネタイトナノ粒子の取り込み量を見積もったところ、添加量に対して3回の平均で27.6質量%のマグネタイトナノ粒子がCTL細胞中に取り込まれていることが確認された。

10

【0029】

更に、リンパ球細胞中へのマグネタイトナノ粒子の取り込みを確認するために、透過型電子顕微鏡による細胞観察を行った。その結果、CTL細胞中へベシクルの形成を伴って、マグネタイトナノ粒子が数マイクロメートルのベシクル中に凝集体として取り込まれている様子が確認された。

【0030】

次に、マグネタイトナノ粒子を取り込んだCTL細胞株をgp100-A2ペプチド(50µg/ml)にて処理したT2細胞(ヒトT/B細胞のハイブリッドであり、HLA-A2分子のみ発現する細胞株)と24時間インキュベートした。細胞数は、 1×10^5 ずつに調整(96-wellマイクロプレート)し、培地はRPMI1640+10%FBSを用いた。培養後、上澄みを回収し産生されたIFN- γ の量を測定した。

20

【0031】

マグネタイトナノ粒子を取り込んだCTL細胞株は、gp100-A2ペプチドに特異的に反応し、高濃度のIFN- γ を産生した。マグネタイトナノ粒子を取り込ませていない細胞との比較では、明らかな差は認められなかった。結果を図2に示す。これによりマグネタイトナノ粒子を取り込んだCTL細胞において、ペプチド特異的な細胞障害活性は損なわれないことが確認された。なお、ペプチドの陰性コントロールとして同じHLA-A2拘束性をもつインフルエンザMPペプチド(Flu-MP₅₈₋₆₆:GILGFVFTL)を使用して評価した。

30

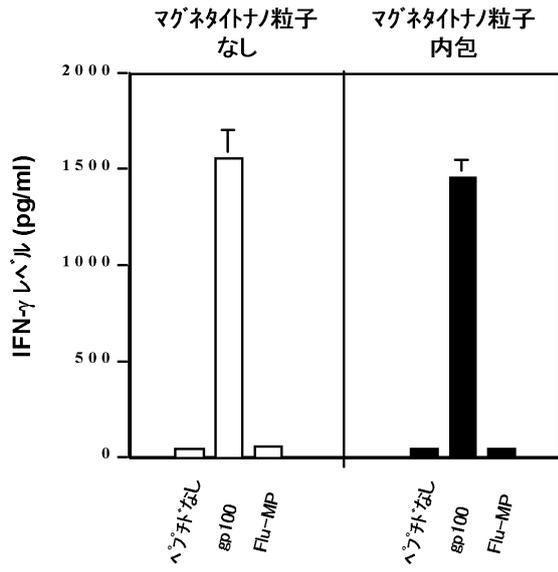
【図面の簡単な説明】

【0032】

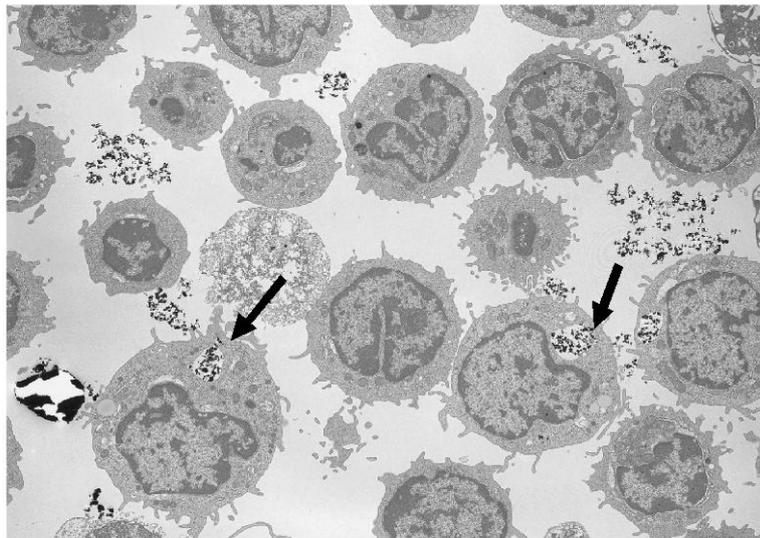
【図1】実施例1において得られたマグネタイトを取り込んだリンパ球の透過型電子顕微鏡像である。

【図2】実施例2において得られたマグネタイトを取り込んだCTL細胞の刺激時のIFN- γ 産生量を示すグラフである。

【 図 2 】



【 図 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

- (72)発明者 逢坂 哲彌
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学理工学部内
- (72)発明者 飯田 広範
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学理工学部内
- (72)発明者 中西 卓也
東京都新宿区大久保三丁目4番1号 学校法人早稲田大学理工学部内
- (72)発明者 秋山 靖人
静岡県駿東郡長泉町下長窪1007 静岡県立静岡がんセンター内

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 国際公開第2004/101774(WO, A1)
特開平06-261745(JP, A)
特開2006-288384(JP, A)
特開2006-314314(JP, A)
Biomaterials Vol.26 No.13 Page.1565-1573 (2005.05)
Biomaterials Vol.24 No.25 Page.4551-4557 (2003.11)
Biomacromol Vol.7 No.3 Page.809-816 (2006.03)
J Immunol Methods Vol.256 No.1/2 Page.89-105 (2001.10.01)
J Am Chem Soc Vol.125 No.51 Page.15702-15703 (2003.12.24)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Thomson Innovation