(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4949041号
(P4949041)

(45)発行日　平成24年6月6日(2012.6.6)　(24)登録日　平成24年3月16日(2012.3.16)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| C01G 49/08 | (2006.01) | C01G | 49/08 | Z |
| C01G 49/06 | (2006.01) | C01G | 49/06 | Z |
| B82B 1/00 | (2006.01) | B82B | 1/00 | |
| B82B 3/00 | (2006.01) | B82B | 3/00 | |
| C08J 3/20 | (2006.01) | C08J | 3/20 | CEWB |

請求項の数 23　(全 47 頁)

(21)出願番号　特願2006-545509 (P2006-545509)
(86)(22)出願日　平成16年12月20日 (2004.12.20)
(65)公表番号　特表2007-521220 (P2007-521220A)
(43)公表日　平成19年8月2日 (2007.8.2)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/042590
(87)国際公開番号　WO2005/063617
(87)国際公開日　平成17年7月14日 (2005.7.14)
審査請求日　平成19年11月16日 (2007.11.16)
(31)優先権主張番号　60/530,862
(32)優先日　平成15年12月18日 (2003.12.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　596060697
マサチューセッツ　インスティテュート　オブ　テクノロジー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１３９ケンブリッジ，マサチューセッツ・アヴェニュー・７７
(74)代理人　100073184
弁理士　柳田　征史
(74)代理人　100090468
弁理士　佐久間　剛
(72)発明者　ブロムバーグ，レヴ　イー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　０１８０７　スワンプスコット　シャーウッド　ロード　１５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】磁性ナノ粒子によって促進されたバイオプロセス

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

フッ素含有ポリマーと会合した無機化合物を含むナノ粒子であって、

前記無機化合物が、第８～第１０族の遷移金属酸化物であり、かつ前記フッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれており；さらに

前記フッ素含有ポリマーが、パーフルオロポリエーテル、ポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸、パーフルオロスルホン酸／テトラフルオロエテン、２－（パーフルオロアルキル）エチルメタクリレートとメタクリル酸とエチレングリコールジメタクリレートとのコポリマー、およびパーフルオロアルキルメタクリルコポリマーよりなる群から選択されることを特徴とするナノ粒子。

【請求項２】

前記無機化合物が第８族の遷移金属酸化物であることを特徴とする請求項１記載のナノ粒子。

【請求項３】

前記無機化合物が酸化鉄であることを特徴とする請求項２記載のナノ粒子。

【請求項４】

前記無機化合物が$Fe_2O_3$および$Fe_3O_4$よりなる群から選択されることを特徴とする請求項３記載のナノ粒子。

【請求項５】

前記無機化合物が$Fe_3O_4$であることを特徴とする請求項４記載のナノ粒子。
【請求項６】
磁性を有することを特徴とする請求項１から５いずれか１項記載のナノ粒子。
【請求項７】
前記フッ素含有ポリマーが、酸素および$CO_2$よりなる群から選択される気体を可逆的に可溶化可能であることを特徴とする請求項１から６いずれか１項記載のナノ粒子。
【請求項８】
前記フッ素含有ポリマーがコポリマーであることを特徴とする請求項７記載のナノ粒子。
【請求項９】
前記フッ素含有ポリマーが、フッ素化部分と非フッ素化部分とを有するコポリマーであることを特徴とする請求項８記載のナノ粒子。
【請求項１０】
前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で酸素ガスを可逆的に結合させることが可能であることを特徴とする請求項７から９いずれか１項記載のナノ粒子。
【請求項１１】
前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で$CO_2$ガスを可逆的に結合させることが可能であることを特徴とする請求項７から９いずれか１項記載のナノ粒子。
【請求項１２】
直径が１０～１００ｎｍであることを特徴とする請求項１から１１いずれか１項記載のナノ粒子。
【請求項１３】
請求項１から１２いずれか１項記載のナノ粒子を含む組成物。
【請求項１４】
水性コロイドであることを特徴とする請求項１３記載の組成物。
【請求項１５】
フッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれた無機化合物を含むナノ粒子を調製する方法であって、
（ａ）フッ素含有ポリマーの存在下、水溶液中で無機塩を共沈殿させ、ここで、該無機塩が第８～１０族の遷移金属塩であり、かつ前記フッ素含有ポリマーが、パーフルオロポリエーテル、ポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸、パーフルオロスルホン酸／テトラフルオロエテン、２－（パーフルオロアルキル）エチルメタクリレートとメタクリル酸とエチレングリコールジメタクリレートとのコポリマー、およびパーフルオロアルキルメタクリルコポリマーよりなる群から選択され；
（ｂ）前記工程（ａ）で得られた混合物を超音波処理し、さらにナノ粒子を単離する；工程を含むことを特徴とする方法。
【請求項１６】
前記無機塩が第８族の遷移金属塩であることを特徴とする請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
前記無機塩が鉄塩であることを特徴とする請求項１６記載の方法。
【請求項１８】
前記無機塩が鉄－塩化物塩であることを特徴とする請求項１７記載の方法。
【請求項１９】
前記無機塩が塩化Ｆｅ（II）及び塩化Ｆｅ（III）の混合物を含むことを特徴とする請求項１８記載の方法。
【請求項２０】
媒体中への気体の移動量を増加させる方法であって、請求項１から１１いずれか１項記載のナノ粒子を媒体に導入することを含むことを特徴とする方法。
【請求項２１】

発酵処理における細胞の増殖を促進する方法であって、培養細胞を含む発酵培地に請求項１から１１いずれか１項記載のナノ粒子を導入することを含み、それによって発酵培地への酸素の移動量を増加させることを特徴とする方法。

【請求項２２】

酸素移動量が４００％よりも増加することを特徴とする請求項２０または２１記載の方法。

【請求項２３】

前記ナノ粒子が磁性を有し、前記培地を磁場に暴露して移動させることによってナノ粒子を培地から分離することを特徴とする請求項２０から２２いずれか１項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本願はここにその全容を援用する２００３年１２月１８日に出願された米国仮特許出願シリアル番号第６０／５３０，８６２号に基づく優先権の利益を主張するものである。

【背景技術】

【０００２】

磁性ナノ粒子は広く研究されている（非特許文献１）。磁性ナノ粒子は臨界粒径以下では強磁性から超常磁性へとその磁性を変化させることが知られている。液体磁石や強磁性液体の製造に磁性酸化物の超微粒子を使用することができる（非特許文献２および３）。一般的にはこうした粒子を水や非極性溶媒（炭水化物）に分散する。磁性ナノ粒子は液体の流れを必要とする多くの種類の装置で使用されることから、流れることができるよう、また、即座に追従できるよう、また外部からの磁場の作用に対して磁性ヒステリシスを起こすことのないよう、分散液は凝集や沈降につい高い安定性を有さなければならない（非特許文献１－３、および特許文献１－４）。

【０００３】

溶液中で磁性ナノ粒子を調製するための異なる方法が当該技術分野で知られている。水溶液中での合成法ならびに長時間の粉砕による方法では、粒径及び粒度分布の制御が難しい。ガス蒸発やスパッタリングなどの他の方法は複雑な装置を必要とし、コストが嵩む。一般的に用いられているこれらの方法の難点は、粒子の寸法制御が粒径及び粒度分布の両方において困難であることである。特にこれらの方法では凝集現象が生じる問題がある。

【０００４】

磁性ナノ粒子は、水性環境下で必要なコロイド安定性を与えるものであり、磁気記録から生体診断、治療薬にいたる広範な分野におけるその重要な技術的応用のために大きな関心を集めている。界面活性剤でコーティングした金属酸化物の磁性ナノ粒子が報告されている（非特許文献４）。ナノ粒子上での自己集合多層コーティングの合成とその特徴づけを記載した文献は、ナノ構造材料および素子の新たに認識された重要性の点から重要な新たな分野である。二重層コーティングを用いたマグネタイトの安定化がＨａｔｔｏｎ等により述べられている（非特許文献５）。

【０００５】

表面のコーティングは、ナノ粒子の本来の物理化学的性質をしばしば変化させる。ナノ構造を有する粉末の表面に施されるコーティングは、これにより表面の電荷、機能性、及び反応性が変化し、自己集合法を用いてマグネタイト（$Fe_3O_4$）ナノ粒子上に水中で調製された一重層及び二重層界面活性剤コーティング中でのナノ粒子の安定性及び分散性が向上するため、多大な関心を集めている（非特許文献６－９）。共有結合、イオン結合、配位結合、ファンデルワールス力、及び／または水素結合を介した磁性ナノ粒子と各種官能基との反応は当該技術分野ではよく知られている（非特許文献１０－１５）。有機相の存在によって物質移動係数及び界面積の両方が変化する。その場合、有機薄膜層、好ましくは炭水化物またはポリマー層を微小な固体磁性ナノ粒子に結合させることによって界面積が増大する。コーティングされた磁性粒子は酸素などの気体を可溶化することが可能

であり、発酵プロセスに使用することができる。

【０００６】

一般に溶解度の低い気体の液体中への吸収率は、物質移動の速度によって制限される。このことは、触媒反応（例、水素化及び酸素化反応）、バイオプロセス（例、好気性発酵、血液の酸素化における酸素移送）、及び有毒排気ガス処理の分野で問題となる。例えば、バイオプロセスの分野では、酸素移動速度によって培養細胞の生産性が制限される。微小分散（マイクロディスパージョン）有機層を酸素溶解度が向上した発酵液に加えることによって、酸素不足が緩和されることが示されている（非特許文献１６－１８）。マイクロディスパージョンの代わりにＰＦＣコーティングまたは炭化水素コーティングしたナノ粒子を使用することで、物質移動係数及び物質移動で利用可能な界面積が変化するためにこうした分散層の効率は高くなる。

【０００７】

気体を可溶化することができる炭化水素基を含む有機薄膜層でコーティングした微細な磁性粒子の製造方法は当該技術分野では周知である。特許文献５（１９８９年９月１９日付与、Ｍｅｇｕｒｏ等）には、炭化水素基を有する有機層が磁性粒子に結合した強磁性流体組成物が開示されている。この有機層は、少なくとも１個の極性基及び少なくとも１０個の炭素原子を有する陰イオン性界面活性剤であって、オレイン酸などの不飽和脂肪酸またはその塩、スルホン酸石油またはその塩、合成スルホン酸エステルまたはその塩、ポリブテンコハク酸またはその塩、ポリブテンスルホン酸またはその塩、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルなどの陰イオン性界面活性剤からなる群から選択することができる。しかしながらこの強磁性流体組成物によって与えられる磁性粒子は有機溶媒中でのみコロイドとして安定であり、発酵液などの水性媒体中では凝集、沈殿、沈降してしまう。同様に特許文献６（２００４年８月２４日付与、Ｈａｔａ等）には、安定した分散液である磁性粘性流体が開示されている。この流体では、１～２２個の炭素原子を有する炭化水素からなる界面活性剤に磁性粒子のコアを結合させることで磁性粒子を有機媒体中に分散させている。１～２２個の炭素原子を有する炭化水素の好ましい例としては、１～１８個の炭素原子からなるアルキル基、６～１４個の炭素原子からなるアリール基、及び７～２２個の炭素原子からなるアリールアルキル基又はアルキルアリール基が挙げられる。より好ましい例として、メチル、エチル、ｎ－ブチル、オクチル、ドデシル基などが挙げられている。この磁性組成物もやはり水性媒体中で不安定である。

【０００８】

水性媒体中で安定な、炭化水素基を有する磁性微粒子もまた当該技術分野では周知である。例えば特許文献７（１９７８年６月１３日付与、Ｓｈｉｍｏｉｉｚａｋａ）には水ベースの磁性流体の製造方法が開示されている。この磁性流体は、１８個の炭素原子からなる不飽和脂肪酸またはその塩を、強磁性酸化物粉末のコロイド溶液に水中で加え、次いで８～３０個の炭素原子を有する陰イオン性界面活性剤または８～２０個の炭素原子を有する非イオン性界面活性剤を加えることによって調製される。流体中の強磁性粉末の各粒子は、イオン化不飽和脂肪酸の単分子層、及びこの単分子層に吸着される非イオン性または陰イオン性界面活性剤層によってコーティングされるが、磁性粒子の表面上の陰イオン性界面活性剤上に、陰イオン性界面活性剤または陽イオン性界面活性剤が、更にその上に非イオン性界面活性剤が、化学結合または共有結合によらずに吸着されていることにより、得られる二重コーティング磁性粒子は不安定なものとなる。これは、発酵液中の微生物や細胞、金属イオンやこれらに類する成分の存在下では、質量作用の法則によって第２のコーティング層が第１のコーティング層から解離、脱離してしまうためである。発酵液中に脱離、溶解した第２のコーティング層の成分は、微生物や細胞に対する毒性を有し、更に界面活性能を有することからバイオプロセスに有害な過度の発泡をもたらす。

【０００９】

水性媒体中で安定な、炭化水素基を有する磁性微粒子で、第１と第２の炭化水素層が化学的に互いに結合していることにより粒子が水中に界面活性剤を放出しないような磁性粒子も当該技術分野では周知である。例えばＳｈｅｎ等（非特許文献１９）は、磁性ナノ粒

子と、ナノ粒子を包囲する、少なくとも一方が１０－ウンデセン酸またはウンデカン酸からなる第１または第２の脂肪酸界面活性剤の二重層とからなる磁性流体について述べている。構造中に含まれる、気体を可溶化することが可能なこうしたオレフィン単位は、外殻成分を重合化し、磁性流体の安定性を高めるためのサイトとして機能する。こうした粒子は外部の水性環境に界面活性剤を放出することはない。しかしながら本発明者等は、粒子のコロイド安定性をもたらす、第２のオレフィン層の表面に露出したカルボキシル基の好ましくないイオン化パターンのために、こうした粒子は、ｐＨ７．４を越えるｐＨで、コロイドとしての安定性を保つために充分な量の金属イオンを含まない水性媒体に加えなければならないことを見いだした。このため、重合化した脂肪酸によって安定化されたこうしたマグネタイトナノ粒子は、ｐＨ７．０以下で行われるバイオプロセスを行う用途や、カルシウム、マグネシウムなどの金属イオンの存在下での使用には適していない。

【００１０】

ポリマーで安定化された磁性粒子は、磁気分離が比較的速やかであることから細胞分離、イムノアッセイ、核酸の濃縮といった生体医療、生体工学分野で用いられてきた（非特許文献２０－２３）。更に、磁性ポリマー粒子は、生体液の解毒化や、特定の薬物送達プロセスでの粒子系の磁力による誘導など、異なる分野の領域で大きな可能性を有している（非特許文献２４）。Ｋａｗａｇｕｃｈｉ等はアクリルアミドを主モノマーとして用いた親水性の磁性ラテックスについて報告している（非特許文献２５）。Ｓａｕｚｅｄｄｅ等は、粒子凝集法を用いた別の種類の親水性磁性粒子について報告している（非特許文献２６－２８）。反対の電荷を有するポリスチレン－コア／ポリ（Ｎ－イロプロピルアクリルアミド）外殻に吸着させた酸化鉄ナノ粒子をカプセル化することによって親水性の感熱性ラテックスが得られる。カプセル化は水溶性モノマーのみを使用して行うことができる（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド、Ｎ，Ｎ’－メチレンビスアクリルアミド及びイタコン酸）。最終的な粒子は感熱性を示す。更に天然のポリマーやタンパク質を用いた独自の方法（従来とは異なる重合化による）について検討がなされている。しかしながら、磁性ポリマーラテックスのこれらの製造法では、酸化鉄を高含量で含むサブミクロンの粒径となってしまう（一般に５００ｎｍ以上）。

【００１１】

フッ化したポリマーは、化学的、生物学的な活性が極めて低く、また酸素溶解能が高いといった重要な性質を有しているが、上記の研究で、磁性粒子の安定化にフッ素含有ポリマーを利用したものはない。フッ化ポリマーは、臨床の現場で酸素供給を行う血液の代用として、また生物製造の効果を高めるなどの用途において効果的な酸素の運搬物質として使用されている（非特許文献２９－３４）。

【００１２】

特許文献８は、ナノサイズの磁性酸化鉄粒子の製造方法に関するものである。この方法では、分散相に含まれる鉄反応物質を塩基性反応物質と反応させ、酸素含有オキシダントの添加によって制御した酸化を行う。前駆粒子をマイクロエマルジョンの分散水相の液滴中で沈殿させる。前駆粒子は、慎重に制御した環境下で酸化して所望の磁性粒子を得ると同時に過酸化を防いでヘマタイトなどの望ましくない非磁性粒子が生成しないようにする。しかしながら、酸素を溶解するフルオロポリマーの存在によって、酸化の制御が不可能もしくは困難となる。

【００１３】

特許文献９は、磁性酸化鉄粒子を含む金属酸化物粒子の製造方法に関するものである。この方法では、油分としてＧａｌｄｅｎ　ＨＴ７０（高蒸気圧でフッ化したフッ化油）などを用い、水相中の金属イオンを気体もしくは蒸気反応物質を反応させた油中水マイクロエマルジョンが形成される。得られたナノ粒子は、パーフルオロポリエーテルの疎水性鎖を有し平均分子量が約３０００であるリン酸モノエステルなどのパーフルオロエーテルでコーティングされており、疎水性で非水溶性である。こうした疎水性は、コーティングされたナノ粒子をフッ化オイルエマルジョンから分離することが困難であることとあいまって、水性の生物学的環境において粒子を使用する障害となっている。

【００１４】
特許文献１０は、混合金属酸化物の粒子の製造方法に関するものである。この方法では、パーフルオロポリエーテル油分及びパーフルオロポリエーテル界面活性剤を含むマイクロエマルジョンを使用する。この方法では更に、第１の金属を水相に、第２の金属をパーフルオロポリエーテル油相に混合する。アルカリ溶液を添加するとともに加熱して所望の酸化物を得る。得られたコーティングナノ粒子は疎水性である。
【００１５】
工業的な発酵技術では、水中に浸漬された培養器への酸素の供給速度がしばしば制限因子となる。これは、拡散された空気からの酸素の移動速度が細胞による酸素の消費速度よりも小さい場合に問題となり、その場合、溶存酸素濃度が代謝活性の維持に必要な臨界濃度を下回ってしまう。従来の技術によって酸素供給されるバイオリアクターでは、酸素の溶解度が低いこと（２０℃で０．２８ｍｍｏｌ／ｄｍ$^3$）と、酸素の移動速度が小さいことによりしばしば細胞の増殖が阻害されたり、他の悪影響を細胞に及ぼす。
【００１６】
第２の拡散された有機相の存在下では、発酵プロセスなどのバイオプロセスで用いられる液媒中への酸素の吸収速度は、有機相中への酸素の高い溶解度及び拡散性のために大幅に大きくなる（非特許文献３５－３９）。培養液中での有機相の使用によって細胞の増殖及び生産性に悪影響がもたらされる場合がある（非特許文献４０）。長期の有機相との接触の後では、培養システムは、微生物細胞の失活、酸素運搬物質の毒性、及び／または水／油境界面での細胞吸着度が高いことによって不安定化してしまう（非特許文献４１－４３）。微粒子に酸素透過性を有する有機超薄膜層が共有結合により結合していることにより、細胞と有機液との直接的な混合が避けられ、これにより直接的な混合に伴う毒性の問題を回避することができる。
【００１７】
いずれの理論にも拘束されずに云えば、酸素容量が大きな固体微粒子や液滴は、気／液境界面の液体境界層における濃度勾配、ひいては気体吸収速度を変化させることが当該技術分野では知られている（非特許文献４４－５３）。
【特許文献１】米国特許第５，１４７，５７３号明細書
【特許文献２】米国特許第４，０９４，８０４号明細書
【特許文献３】米国特許第３，７６４，５４０号明細書
【特許文献４】米国特許第３，８４３，５４０号明細書
【特許文献５】米国特許第４，８６７，９１０号明細書
【特許文献６】米国特許第６，７８０，３４３号明細書
【特許文献７】米国特許第４，０９４，８０４号明細書
【特許文献８】米国特許第５，６９５，９０１号明細書
【特許文献９】米国特許第５，７２５，８０２号明細書
【特許文献１０】米国特許第５，６７０，０８８号明細書
【非特許文献１】Ｄ．Ｌ．Ｌｅｓｌｉｅ－Ｐｅｌｅｃｋｙ ａｎｄ Ｒ．Ｄ．Ｒｉｅｋｅ，Ｃｈｅｍ．Ｍａｔｅｒ．，１９９６，８，１７７０
【非特許文献２】Ｍ．Ｓａｙｎａｔｔｊｏｋｉ ａｎｄ Ｋ．Ｈｏｏｍｂｅｒｇ，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｌｕｂｒｉｃａｔｉｏｎ，１９９３，１０，１１９
【非特許文献３】Ｔ．Ｈｅｍｍｉ，Ｊａｐａｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｔｒｉｂｏｌｏｇｙ，１９９２，３７，１５５
【非特許文献４】Ａ．Ｕｌｍａｎ，Ｒ．Ｐ．Ｓｃａｒｉｎｇｅ，Ｌａｎｇｍｕｉｒ，１９９２，８，８９４
【非特許文献５】Ｌ．Ｓｈｅｎ，Ｐ．Ｅ．Ｌａｉｂｉｎｉｓ，Ｔ．Ａ．Ｈａｔｔｏｎ．，Ｊ．Ｍａｇｎ．Ｍａｔｔｅｒ．，１９９９，１９４，３７
【非特許文献６】Ｃ．Ｓ．Ｗｅｉｓｂｅｃｋｅｒ，Ｍ．Ｖ．Ｍｅｒｒｉｔ，Ｇ．Ｍ．Ｗｈｉｔｅｓｉｄｅｓ，Ｌａｎｇｍｕｉｒ，１９９６，１２，３７６３
【非特許文献７】Ｒ．Ｇ．Ｎｕｚｚｏ，Ｂ．Ｒ．Ｚｅｇａｒｓｋｉ，Ｌ．Ｈ．Ｄｕｂｏｉ

s, J. Am. Chem. Soc., 1987, 109, 733
【非特許文献8】C. J. Sandorff, S. Garoff, K. P. Leung Chem. Phys. Lett., 1983, 96, 547
【非特許文献9】L. Fu., V. P. Dravid, D. L. Johnson, Appl. Surf. Sci., 2001, 181, 173
【非特許文献10】M. Aoyagi, H. Sato, K. Yagi, N. Fukuda, S. Nishimoto, Colloid&Polymer Science, 2001, 279, 46
【非特許文献11】Pan, H. K., Meagher, A., Pineri, M., Knapp, G. S., Cooper, S. L. J., Chem. Phys., 1985, 82(3), 1529
【非特許文献12】Xulu, P. M.；Filipcsei, G.；Zrinyl, M., 2000, 33(5), 1716
【非特許文献13】Shcjukin, D. G., Radtchenko, I. L., Sukhorukov, G. B., J. Phys. Chem. B., 2003；107(1), 86
【非特許文献14】Shen, L., Laibinis, P. E., Hatton, T. A., Langmuir, 1999, 15(2), 447
【非特許文献15】Shen, L., Stachowiak, A., Hatton, T. A., Laibinis, P. E., Langmuir, 2000, 16(25), 9907
【非特許文献16】M. Elibol, F. Mavituna, Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(2), 206；
【非特許文献17】Rols, J., G. Goma, Biotechnology Advances, 1989. 7(1), p. 1－14；
【非特許文献18】Yamane, T., Yoshida, F., Journal of Fermentation Technology, 1974. 52(7), 445
【非特許文献19】Shen, L.；Stachowiak, A.；Hatton, T. A.；Laibinis, P. E.；Langmuir, 2000, 16(25), 9907
【非特許文献20】Y. Haik, V. Pai, C. J., Che J. Magn. Magn. Mater., 1999, 194, 254
【非特許文献21】K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai, Y. Kato, Chem. Pharm. Bull, 1977, 25, 3433
【非特許文献22】M. Mary In：U. Hafeli, W. Schutt and M. Zborowski, Editors, Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Plenum Press, New York(1977), p. 303.
【非特許文献23】A. Elaissari, M. Rodrigue, F. Meunier, C. Herve, J. Magn. Magn. Mater., 2001, 225, 127
【非特許文献24】P. K. Gupta, C. T. Hung, Life Sci., 1989, 44, 175.
【非特許文献25】H. Kawaguchi, K. Fujimoto, Y. Nakazawa, M. Sakagawsa, Y. Ariyoshi, M. Shidara, H. Okazaki, Y. Ebisawa, Colloid Surf. A, 1996, 109, 147
【非特許文献26】F. Sauzedde, A. Elaissari, C. Pichot, Collid Polym. Sci., 1999, 277, 846

【非特許文献２７】F. Sauzedde, A. Elaissari, C. Pichot, Collid Polym. Sci., 1999, 277, 1041
【非特許文献２８】K. Furusawa, K. Nagashima, C. Anzai, Colloid Polym. Sci., 1994, 272, 1104
【非特許文献２９】R. E. Banks, B. E. Smart, J. C. Tatlow Organofluorine Chemistry, Principles and Commercial Applications, Plenum Press, New York（１９９４）
【非特許文献３０】S. F. Flaim, Biotech., 1994, 22, 1043
【非特許文献３１】M. P. Krafft, J. G. Riess, J. G. Weers, The design and engineering of oxygen−delivering fluorocarbon emulsions, In：S. Benita, Editor, Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery, Harwood Academic Publ., Amsterdam（１９９８）, pp. ２３５−３３３
【非特許文献３２】G. Riess, M. Le Blanc, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1978, 17, 621
【非特許文献３３】Dixon, DD, Holland, DG., Fluorocarbons：properties and syntheses, Federation Proceedings, Volume 34, Issue 6, May 1975, Pages１４４４−１４４８
【非特許文献３４】McMillan, J. D., Wang, D. I., Ann NY Acad Sci., 1990, 589：２８３−３００
【非特許文献３５】Cho, M. H. and Wang, S. S., Biotechnol. Lett., 1988, 10, 855
【非特許文献３６】Hassan, I. T. M. and Robinson, C. W., 1977, Biotechnol. Bioengng, 1977, 19, 661
【非特許文献３７】Ho, C. S., Ju, L.−K. and Baddour, R. F., Biotechnol. Bioengng, 1990, 36, 1110
【非特許文献３８】Ju, L.−K., Lee, J. F. and Armiger, W. B., Biotechnol. Prog., 1991, 7, 323
【非特許文献３９】Junker, B. H., Wang, D. I. C. and Hatton, T. A., Biotechnol. Bioengng, 1990, 35, 586
【非特許文献４０】Nagy, E., Advances in Biochemical Engineering／Biotechnology, 2002, 75, 51
【非特許文献４１】Chandler, D., Davey, M. R., Lowe, K. C. &Mulligan, B. J., Biotechnol. Letters, 1987, 9, 195
【非特許文献４２】Lowe, L. C., King, A. T. &Mulligan, B. J.., Biotechnol., 1989, 7, 1037
【非特許文献４３】Wang, D. I. C., Junker, B. H. &Hatton, T. A., Biotehnol. Bioeng., 1990, 35, 578−585
【非特許文献４４】Alper, E.；Deckwer, W. D., Chem. Eng. Sci., 1981, 36, 1097
【非特許文献４５】Holstvoogd, R. D.；van Swaaij, W. P. M.；van Dierendonck, L. L., Chem, Eng. Sci., 1988, 43, 2181
【非特許文献４６】Demmink J. P.；Mehra, A.；Beenackers, A. A. C. M. Chem. Eng. Sci., 1998, 53, 2885
【非特許文献４７】Bruining, W. J.；Joosten, G. E. H.；Be

enackers, A. A. C. M. ; Hofman, H. , Chem. Eng. Sci. , 1986, 41, 1873
【非特許文献48】Rols, J. L. ; Condoret, J. S. ; Fonade, C. ; Goma, G. Biotechnol. Bioeng, , 1990, 35, 427
【非特許文献49】Junker, B. H. ; Hatton, T. A. ; Wang, D. I. C. Biotechnol. Bioeng, , 1990, 35, 578
【非特許文献50】Junker, B. H. ; Wang, D. I. C. ; Hatton, T. A. Biotechnol. Bioeng. , 1990, 35, 586
【非特許文献51】Van Ede, C. J. ; van Houten, R. ; Beenackers, A. A. C. M. , Chem. Eng. Sci. , 1995, 50, 2911
【非特許文献52】Chaudhari, R. V. ; Jayasree, P. ; Gupte, S. P. ; Delmas, H. , Chem. Eng. Sci. , 1997, 52, 4197
【非特許文献53】Beenackers, A. A. C. M. ; Van Swaaij, W. P. M. , Chem. Eng. Sci. , 1993, 48, 3109.

【発明の開示】
【課題を解決するための手段】
【0018】
発明の概要

本発明の一側面は、有機相と会合した無機化合物を含むナノ粒子であって、有機相が気体を可逆的に可溶化可能であるナノ粒子に関するものである。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が無機酸化物である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が遷移金属酸化物である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８～第１０族遷移金属の酸化物である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８族の遷移金属酸化物である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が酸化鉄である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_2O_3$または$Fe_3O_4$である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_3O_4$である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、磁性を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、無毒性である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が$CO_2$である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物がフッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれている前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーがコポリマーである前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーが、フッ素化部分と非フッ素化部分とを有するコポリマーである前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素であり、前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で酸素を可逆的に結合させることが可能である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が$CO_2$であり、前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で$CO_2$を可逆的に結合させることが可能である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記有機相が互いに化学的に結合された第１及び第２の炭化水素層を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がカルボニル官能基を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層が脂肪酸を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がオレイン酸を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素層が親水性基を含む前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素層が非イオン性及び陰イオン性の親水性基を有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素層が、ポリオキシアルキレンスルホネート部分を

有する前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、第１及び第２の炭化水素層が炭素－炭素一重結合を介して互いに結合している前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素であり、前記有機相が水性媒体中で酸素を可逆的に結合させることが可能である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、水性コロイドを形成可能な前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、直径が約１～約１０００ｎｍである前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、約１０～約１００ｎｍである前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素である前記ナノ粒子に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が$CO_2$である前記ナノ粒子に関する。

【００１９】

特定の実施形態において本発明は、前記ナノ粒子のいずれかの実施形態を含む組成物に関する。特定の実施形態において前記組成物は水性コロイドである。

【００２０】

本発明の別の一側面は、フッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれた無機化合物を含むナノ粒子を調製するための方法であって、（ａ）フッ素含有ポリマーの存在下、水溶液中で無機塩を共沈殿させることと、（ｂ）工程（ａ）で得られた混合物を超音波処理することと、ナノ粒子を単離することとからなる方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記水溶液が不活性ガスによって脱気される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記水溶液が$N_2$ガスによって脱気される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が第８～１０族の遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が第８族の遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が鉄塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が塩化物塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が鉄－塩化物塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が塩化Ｆｅ（II）及び塩化Ｆｅ（III）の混合物からなる前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約６５℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約７０℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約７５℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約８０℃に加熱される前記方法に関する。

【００２１】

本発明の別の一側面は、第１の炭化水素層と、第１の炭化水素層に化学的に結合した第２の炭化水素層とを含む炭化水素二重層と会合した無機化合物を含むナノ粒子を調製するための方法であって、（ａ）前記無機化合物と結合可能な第１の炭化水素部分の存在下、水溶液中で無機塩を共沈殿させることと、（ｂ）工程（ａ）で得られた生成物を、親水性基を有する第２の炭化水素部分と反応させることとを含み、第１の炭化水素部分が第２の炭化水素部分と化学的に結合して炭化水素二重層を形成する方法に関するものである。特定の実施形態において本発明は、前記水溶液が不活性ガスによって脱気される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記水溶液が$N_2$ガスによって脱気される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が第８～１０族の遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が第８族の遷移金属の塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が鉄塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が塩化物塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が鉄－塩化物塩である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機塩が塩化Ｆｅ（II）及び塩化Ｆｅ（III）の混合物からなる前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素部分がカルボニル官能基を有する前記方法に関する。特定の実

施形態において本発明は、第１の炭化水素部分が脂肪酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素部分がオレイン酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素部分が親水性基を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基が非イオン性及び陰イオン性基である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシエチレンスルホネートである前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシエチレンスルホネート部分を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１及び第２の炭化水素部分が炭素－炭素一重結合で互いに結合している前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約６５℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約７０℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約７５℃～約８５℃に加熱される前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、無機塩の前記水溶液が約８０℃に加熱される前記方法に関する。

【００２２】

本発明の別の一側面は、媒体中への気体の移動量を増加させるための方法であって、有機相と会合した無機化合物を有するナノ粒子を媒体に導入することを含み、前記有機相は気体を可逆的に可溶化することが可能なものである方法に関するものである。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が遷移金属酸化物である前記方法に関するものである。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８～１０族の遷移金属酸化物である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８族の遷移金属酸化物である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が酸化鉄である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_2O_3$または$Fe_3O_4$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_3O_4$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、気体の移動量が約４００％よりも増加する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記ナノ粒子が磁性を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が$CO_2$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物がフッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれている前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーがコポリマーである前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーが、フッ素化部分と非フッ素化部分とを有するコポリマーである前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で気体を可逆的に結合させることが可能である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記有機相が互いに化学的に結合された第１及び第２の炭化水素層を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がカルボニル官能基を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層が脂肪酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がオレイン酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素層が親水性基を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基が非イオン性及び陰イオン性基である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシアルキレンスルホネート部分を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシエチレンスルホネート部分を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１及び第２の炭化水素層が炭素－炭素一重結合を介して互いに結合している前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が酸素である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記気体が$CO_2$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、媒体を磁場に暴露して移動させることによってナノ粒子を媒体から分離する前記方法に関する。

【００２３】

本発明の別の一実施形態は、発酵プロセスにおける細胞の増殖を促進するための方法であって、培養細胞を含む発酵培地に有機相と会合した無機化合物を有するナノ粒子を導入することを含み、前記有機相が可逆的に酸素を可溶化可能であることによって発酵培地への酸素の移動量が増大する方法に関するものである。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が遷移金属酸化物である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８～１０族の遷移金属酸化物である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が第８族の遷移金属酸化物である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が酸化鉄である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_2O_3$または$Fe_3O_4$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物が$Fe_3O_4$である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、酸素移動量が約４００％よりも増加する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記ナノ粒子が磁性を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記無機化合物がフッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれている前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーがコポリマーである前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーが、フッ素化部分と非フッ素化部分とを有するコポリマーである前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記フッ素含有ポリマーが水性媒体中で酸素を可逆的に結合させることが可能である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記有機相が互いに化学的に結合された第１及び第２の炭化水素層を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がカルボニル官能基を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層が脂肪酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１の炭化水素層がオレイン酸を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第２の炭化水素層が親水性基を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基が非イオン性及び陰イオン性基である前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシアルキレンサルフェート部分を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、前記親水性基がポリオキシエチレンサルフェート部分を有する前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、第１及び第２の炭化水素層が炭素－炭素一重結合を介して互いに結合している前記方法に関する。特定の実施形態において本発明は、発酵培地を磁場に暴露して移動させることによってナノ粒子を発酵培地から分離する前記方法に関する。

【００２４】

本発明の上記の実施形態、他の実施形態ならびにその特徴は以下の詳細な説明、図面及び特許請求の範囲から明らかとなろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２５】

本発明は、水性媒体中で安定な、発酵などのプロセスにおいて有用な高い酸素供給能を与える有機相と会合した無機化合物に一部関するものである。この有機相としては、可逆的に気体を結合させることが可能なフルオロポリマーを使用することができる。有機相としては更に、互いに化学的に結合した第１と第２の炭化水素層を備え、可逆的に気体を結合させることが可能な炭化水素二重層を使用することができる。粒子は実用的なｐＨの範囲で金属イオンの存在下でコロイドとして安定である。

【００２６】

別の一実施形態では、本発明は本発明のナノ粒子を有する組成物に関する。更なる別の実施形態では、この組成物は水性コロイドである。

【００２７】

本発明の組成物は更に、発酵の分野では一般的に用いられている好適な無機塩、グルコース及び他の賦形剤を含んでいてもよい。表面の改変によって、粒子と流体の適合性を調整可能に調節して、酸素ならびに必要に応じて他の気体の溶解度を、毒性を発現することなく有利に向上させることが可能である。改変された磁性ナノ粒子は、磁力を利用して発

酵液から容易に回収することが可能であり、発酵液で再利用するのに適している。コーティングを施したナノ粒子は、ナノ粒子の分離プロセスを有利にする好ましいナノ粒子径及び表面／体積比によって更に特徴付けられる。

【００２８】

本発明の磁性粒子は、無機塩の沈殿による計測可能なプロセスによって製造可能である。別の一実施形態では、本発明は、フッ素含有ポリマーの隙間に取り込まれた無機化合物を含むナノ粒子を調製するための方法であって、ａ）フッ素含有ポリマーの存在下、水溶液中で無機塩を共沈殿させることと、ｂ）工程（ａ）で得られた混合物を超音波処理することと、ナノ粒子を単離することとからなる方法に関する。

【００２９】

別の一実施形態において本発明は、第１の炭化水素層と、第１の炭化水素層に化学的に結合した第２の炭化水素層とを含む炭化水素二重層と会合した無機化合物を含むナノ粒子を調製するための方法であって、（ａ）前記無機化合物と結合可能な第１の炭化水素部分の存在下、水溶液中で無機塩を共沈殿させることと、（ｂ）工程（ａ）で得られた生成物を、親水性基を有する第２の炭化水素部分と反応させることとを含み、第１の炭化水素部分が第２の炭化水素部分と化学的に結合して炭化水素二重層を形成する方法に関するものである。

【００３０】

別の一実施形態において本発明は、媒体中への気体の移動量を増加させるための方法であって、有機相と会合した無機化合物を含むナノ粒子を媒体に導入することを含み、前記有機相は気体を可逆的に可溶化することが可能なものである方法に関するものである。更なる実施形態では、有機相はフルオロポリマーである。更なる実施形態では、有機相は、互いに化学的に結合した第１の炭化水素部分と第２の炭化水素部分とを含む炭化水素二重層である。

【００３１】

別の一実施形態では本発明は、発酵プロセスにおける細胞の増殖を促進するための方法であって、培養細胞を含む発酵培地に有機相と会合した無機化合物を含むナノ粒子を導入することを含み、これにより発酵培地への酸素の移動量が増大する方法に関するものである。更なる実施形態では、有機相はフルオロポリマーである。更なる実施形態では、有機相は、互いに化学的に結合した第１の炭化水素部分と第２の炭化水素部分とを含む炭化水素二重層である。

【００３２】

本発明の方法によれば、前記気体の前記有機相に対する溶解度が前記気体の水に対する溶解度よりも大きいことから、前記混合物中への気体の溶解度が高められる。例えば、ＰＦＣへの酸素の溶解度は水への溶解度の１２～１６倍高く、炭化水素への酸素の溶解度は水への溶解度の４～７倍高い。更に、気体の可溶化は一般に可逆的な過程であることから、ナノ粒子は周囲の濃度勾配に応じて、媒体から気体を吸収するか、あるいは媒体に気体を放出することができる。

【００３３】

用語の定義

理解を助けるため、本発明を更に説明するのに先立って、明細書、実施例ならびに特許請求の範囲で使用する特定の用語をここに集めた。これらの定義は、本開示の残りの部分に照らして読まれるべきものであり、当業者であれば理解されるべき内容である。特に定義をしない限り、ここで使用する技術的、科学的用語のすべては当業者によって一般的に理解されるものと同様の意味を有するものである。

【００３４】

本明細書で用いる「ａ」及び「ａｎ」なる冠詞は、一または一よりも多い（少なくとも一つの）その冠詞の文法的目的語を指して云うものである。例えば、「要素（ａｎ　ｅｌｅｍｅｎｔ）」と云う場合、一つの要素もしくは一よりも多い要素を意味する。

【００３５】

例えば「有機相と会合した無機化合物」などの語句において本明細書で用いる「～と会合した」なる語句は、分子間に弱い、または強い、または両方の相互作用が存在する状態のことを云う。弱い相互作用の例としては、静電気、ファンデルワールス力、水素結合による相互作用が挙げられる。強い相互作用とはやはり化学的に結合した状態であり、その例としては、２個の分子間の共有結合、イオン結合や配位結合が挙げられる。「会合した」なる語句には、上記の種類の結合のいずれも存在しない場合であっても、別の分子の折り畳み構造の内部で物理的に絡み合った化合物も含まれる。例えば、ある無機化合物は、フルオロポリマーの隙間の内部に存在しているときにフルオロポリマーと会合しているとみなすことができる。

【００３６】

「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」及び「～を有する（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」なる語句は、包含的かつ開放的な意味合いで用いられ、更なる要素が含まれる可能性を示唆するものである。

【００３７】

「～を含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」なる語句は「限定することなく含む」ことを意味する。「～を含む」と「限定することなく含む」とは互換可能に用いられる。

【００３８】

「ポリマー」なる語は、繰り返し単位（モノマー）の結合によって形成される大型分子を意味する。ポリマーなる語にはコポリマーも含まれる。

【００３９】

「コポリマー」なる語は２以上の異なるモノマーからなるポリマーを意味する。

【００４０】

本明細書で用いる「フルオロ炭素」なる語は、一部または全部の水素原子がフッ素によって置換されたハロゲン化炭素化合物を意味する。

【００４１】

「フッ素含有ポリマー」は「フルオロポリマー」とも呼ばれているが、フッ素を含有するポリマーを意味する。好ましくは、フッ素含有ポリマーとは、フルオロ炭素含有ポリマーを意味する。

【００４２】

「ルイス塩基」及び「ルイス塩基性」なる語は、当該技術分野では周知の用語であり、一般に所定条件下で電子対を供与することのできる化学的部分、構造断片や置換基を含むものである。ルイス塩基は、ルイス塩基及び金属イオンの種類に応じて、特定の錯体において１個の電子を供与するものとして定義される場合もあるが、多くの場合、ルイス塩基とは、２個の電子の供与体として理解されている。ルイス塩基性の部分の例としては、アルコール、チオール、及びアミンなどの非帯電化合物、アルコキシド、チオレート、カルバニオン及び他の各種有機陰イオンなどの帯電部分が挙げられる。ルイス塩基は、金属イオンに対して配位した場合、しばしば配位子と呼ばれる。

【００４３】

「ルイス酸」及び「ルイス酸性」なる語は、当該技術分野では周知の用語であり、上記で述べたルイス塩基から電子対を受け取ることができる化学的部分のことを云う。

【００４４】

「粒径」なる語は、例えば動的または静的光散乱法、沈降フィールドフローフラクショネーション、光子相関分光法や、ディスク遠心法などの当業者には周知の従来の粒径測定法によって測定される数または重量平均粒径を意味する。「約１０００ｎｍよりも小さい平均粒径」とは、上記の方法で測定した場合に、粒子の少なくとも約９０％が約１０００ｎｍよりも小さい重量平均粒径を有することを意味する。

【００４５】

「隙間」なる語は、物体や部分間の空間、特に微小または狭い空間を意味する。

【００４６】

「脂肪族」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、直鎖、分枝、及び環状のアル

カン、アルケンまたはアルキンを含む。特定の実施形態では、本発明の脂肪族基は、直鎖または分枝状で１～約２０個の炭素原子を有するものである。

【００４７】

「アルキル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、直鎖状アルキル基、分枝状アルキル基、シクロアルキル（脂環式）基、アルキル置換シクロアルキル基、及びシクロアルキル置換アルキル基などの飽和脂肪族基を含む。特定の実施形態では、直鎖または分枝状アルキルは、その主鎖が約３０個以下（例、直鎖では$C_1$～$C_{30}$、分枝鎖では、$C_3$～$C_{30}$）あるいは約２０個以下の炭素原子を有する。同様にシクロアルキルは、約３個～約１０個の炭素原子をその環状構造中に有するか、あるいは約５、６または７個の炭素原子をその環状構造中に有するものである。

【００４８】

炭素原子の数について特に断りがない限り、「低級アルキル」とは、上記に定義したアルキル基で１～１０個の炭素原子、あるいは１～約６個の炭素原子をその主鎖構造中に有するアルキル基のことを云う。同様に「低級アルケニル」及び「低級アルキニル」は同様の鎖長を有するものである。

【００４９】

「アラルキル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、アリール基（例、芳香族またはヘテロ芳香族基）で置換されたアルキル基を含む。

【００５０】

「アルケニル」及び「アルキニル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、その長さと可能な置換基において上述のアルキル基と同様であるが、それぞれ少なくとも１個の２重または３重結合を有する不飽和脂肪族基を含む。

【００５１】

「ヘテロ原子」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、炭素または水素以外のあらゆる元素の原子を含む。ヘテロ原子の例としては、ホウ素、窒素、酸素、リン、硫黄、及びセレン、または酸素、窒素、硫黄が挙げられる。

【００５２】

「アリール」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、例えば、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ピレン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、及びピリミジンなどの０～４個のヘテロ原子を含み得る５、６、及び７員の単環の芳香族基を含む。環状構造にヘテロ原子を有するこれらのアリール基は、「ヘテロアリール」または「ヘテロ芳香族」と呼ばれる。芳香族環は、その環構造の１以上の位置において例えば上記で述べたような、ハロゲン、アジド、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アルコキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、スルホンアミド、ケトン、アルデヒド、エステル、複素環、芳香族またはヘテロ芳香族部分、－$CF_3$、－ＣＮなどの置換基で置換されていてもよい。「アリール」なる語には、少なくとも一方が芳香族である（他方の環構造としてはシクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び／または複素環など）２個の隣接した環構造（これらの環構造は「縮合環」である）が２個以上の炭素原子を共有する多環式システムが更に含まれる。

【００５３】

オルト、メタ、及びパラなる語は当該技術分野では周知の用語であり、それぞれ１，２－、１，３－、及び１，４－の二置換ベンゼンのことを云う。例えば１，２－ジメチルベンゼンとオルト－ジメチルベンゼンとは同義語である。

【００５４】

「複素環の」及び「複素環基」なる語には当該技術分野では周知の用語であり、その環構造が１～４個のヘテロ原子を有する、例えば３～約７員環の３～約１０員環構造が含まれる。複素環は多環構造であってもよい。複素環基の例としては、チオフェン、チアント

レン、フラン、ピラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサンテン、フェノキサチン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シノリン、プテリジン、カルバゾール、カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、ピリミジン、フェナントロリン、フェナジン、フェナルサジン、フェノチアジン、フラザン、フェノキサジン、ピロリジン、オキソラン、チオラン、オキサゾール、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、ラクトン類、アゼチジノン及びピロリジノンなどのラクタム類、スルタム類及びスルトン類などが挙げられる。複素環はその１以上の位置において例えば上記で述べたような、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、複素環、芳香族またはヘテロ芳香族部分、－ＣＦ$_3$、－ＣＮなどの置換基で置換されていてもよい。

【００５５】

「多環の」及び「多環基」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、２個の隣接した環構造（これらの環構造は「縮合環」である）が２個以上の炭素原子を共有する、２個以上の環構造（例、シクロアルキル、シクロアルケニル、シクロアルキニル、アリール及び／または複素環）を有する構造が含まれる。環構造が、隣接していない原子によって連結されている（両環構造が３個以上の原子を共有している）場合、これを「架橋」環と呼ぶ。多環構造の各環が例えば上記で述べたような、ハロゲン、アルキル、アラルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヒドロキシル、アミノ、ニトロ、スルフヒドリル、イミノ、アミド、ホスホネート、ホスフィネート、カルボニル、カルボキシル、シリル、エーテル、アルキルチオ、スルホニル、ケトン、アルデヒド、エステル、複素環、芳香族またはヘテロ芳香族部分、－ＣＦ$_3$、－ＣＮなどの置換基で置換されていてもよい。

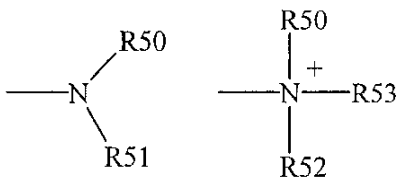
【００５６】

「カルボサイクル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、環構造の各原子が炭素である芳香族及び非芳香族環が含まれる。以下の当該技術分野では周知の用語は、以下の意味を有する。すなわち、「ニトロ」なる語は－ＮＯ$_2$を意味し、「ハロゲン」なる語は－Ｆ、－Ｃｌ、－Ｂｒまたは－Ｉを指し、「スルフヒドリル」なる語は－ＳＨを意味し、「ヒドロキシル」なる語は－ＯＨを意味し、「スルホニル」なる語は－ＳＯ$_2^-$を意味する。

【００５７】

「アミン」及び「アミノ」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分として置換または非置換のアミンを含む。

【化１】




【００５８】

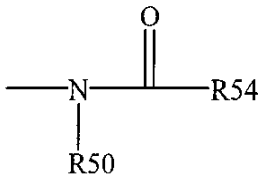
式中、Ｒ５０、Ｒ５１及びＲ５２はそれぞれ独立に水素、アルキル、アルケニル、－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１を表すか、あるいはＲ５０とＲ５１がそれらが結合する窒素原子とともに環構造中に４～８個の原子を有する複素環を形成し、Ｒ６１はアリール、シクロアルキル、シクロアルケニル、複素環または多環構造を表し、ｍは０または１～８の範囲の整数

である。特定の実施形態では、Ｒ５０またはＲ５１のいずれか一方のみがカルボニルである（Ｒ５０、Ｒ５１、及び窒素原子が互いにイミドを形成しない）。別の実施形態では、Ｒ５０及びＲ５１（及び場合によりＲ５２）はそれぞれ独立に水素、アルキル、アルケニルまたは－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１を表す。したがって「アルキルアミン」なる語には、置換または非置換のアルキルが結合した上記に述べたようなアミン基が含まれる（Ｒ５０及びＲ５１の少なくとも一方がアルキル基である）。

【００５９】

「アシルアミノ」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。

【化２】



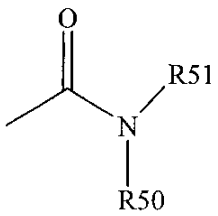

【００６０】

式中、Ｒ５０は上記と同様であり、Ｒ５４は水素、アルキル、アルケニル、または－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１を表し、m及びＲ６１は上記と同様である。

【００６１】

「アミド」なる語はアミノ基で置換されたカルボニル基として当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分を含む。

【化３】




【００６２】

式中、Ｒ５０及びＲ５１は上記と同様である。本発明のアミドの特定の実施形態では、不安定なイミドは含まれない。

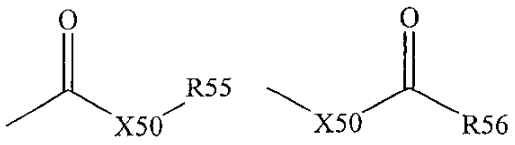
【００６３】

「アルキルチオ」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、硫黄ラジカルが結合した上記に述べたようなアルキル基が含まれる。特定の実施形態では、「アルキルチオ」部分は、－Ｓ－アルキル、－Ｓ－アルケニル、－Ｓ－アルキニル、及び－Ｓ－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１のいずれかによって表されるものである（m及びＲ６１は上記と同様）。代表的なアルキルチオ基としてはメチルチオ、エチルチオなどが挙げられる。

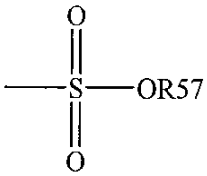
【００６４】

「カルボニル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。

【化４】

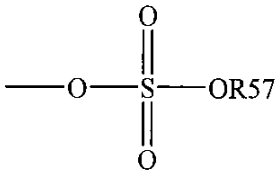



【００６５】
式中、Ｘ５０は結合を示すか、または酸素または硫黄であり、Ｒ５５は水素、アルキル、アルケニル、－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１、または薬学的に許容される塩であり、Ｒ５６は水素、アルキル、アルケニルまたは－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１である（ｍ及びＲ６１は上記と同様）。Ｘ５０が酸素であり、かつＲ５５またはＲ５６のいずれかが水素ではない場合、上記式は「エステル」を表す。Ｘ５０が酸素であり、Ｒ５５が上記と同様である場合、当該部分はカルボキシル基と呼ばれ、特にＲ５５が水素である場合には上記式は「カルボン酸」を表す。Ｘ５０が酸素であり、Ｒ５６が水素である場合、上記式は、「蟻酸エステル」を表す。一般に上記式の酸素原子が硫黄によって置換されている場合、上記式は「チオカルボニル」基を表す。Ｘ５０が硫黄でありＲ５５またはＲ５６のいずれかが水素でない場合、上記式は「チオエステル」を表す。Ｘ５０が硫黄でありＲ５５が水素である場合、上記式は「チオカルボン酸」を表す。Ｘ５０が硫黄でありＲ５６が水素である場合、上記式は「チオ蟻酸エステル」を表す。一方、Ｘ５０が結合を示し、Ｒ５５が水素でない場合、上記式は「ケトン」基を表す。Ｘ５０が結合を示し、Ｒ５５が水素である場合、上記式は「アルデヒド」基を表す。
【００６６】
「アルコキシル」または「アルコキシ」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、酸素ラジカルが結合した上記で述べたようなアルキル基が含まれる。代表的なアルコキシル基としては、メトキシ、エトキシ、プロピルオキシ、ｔｅｒｔ－ブトキシなどが挙げられる。「エーテル」とは、酸素を介して共有結合した２個の炭化水素のことである。したがって、アルキルをエーテルとするアルキルの置換基は、－Ｏ－アルキル、－Ｏ－アルケニル、－Ｏ－アルキニル、－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_m$－Ｒ６１のいずれかで表されるようなアルコキシルであるか、またはこれに類似したものである（ｍ及びＲ６１は上記と同様）。
【００６７】
「スルホネート」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。
【化５】

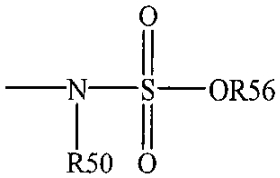



【００６８】
式中、Ｒ５７は電子対、水素、アルキル、シクロアルキルまたはアリールである。
【００６９】
「サルフェート」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すこと

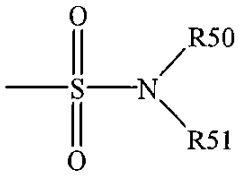
が可能な部分が含まれる。
【化６】



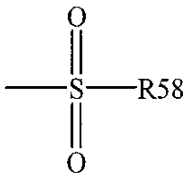
【００７０】
式中、Ｒ５７は上記と同様である。
【００７１】
「スルホンアミド」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。
【化７】



【００７２】
式中、Ｒ５０及びＲ５６は上記と同様である。
【００７３】
「スルファモイル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。
【化８】



【００７４】
式中、Ｒ５０及びＲ５１は上記と同様である。
【００７５】
「スルホニル」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。
【化９】



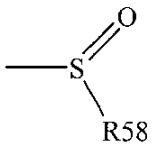
【００７６】

式中、Ｒ５８は下記のいずれかである。すなわち水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、複素環、アリールまたはヘテロアリール。

【００７７】

「スルホキシド」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。

【化１０】



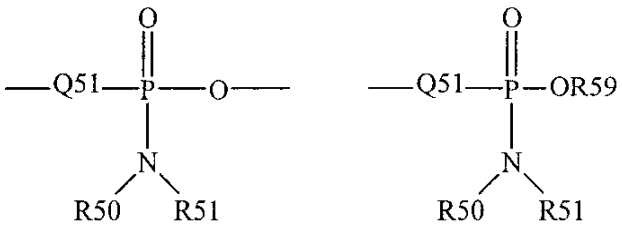

【００７８】

式中、Ｒ５８は上記と同様である。

【００７９】

「ホスホアミダイト」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。

【化１１】



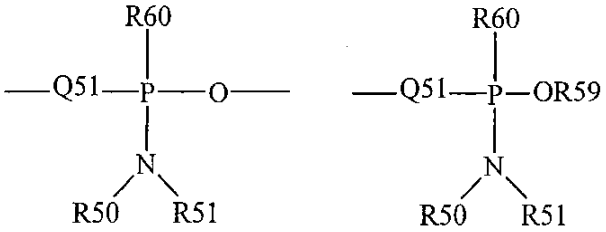

【００８０】

式中、Ｑ５１、Ｒ５０、Ｒ５１及びＲ５９は上記と同様である。

【００８１】

「ホスホンアミダイト」なる語は当該技術分野では周知の用語であり、下記一般式で表すことが可能な部分が含まれる。

【化１２】




【００８２】

式中、Ｑ５１、Ｒ５０、Ｒ５１及びＲ５９は上記と同様であり、Ｒ６０は低級アルキルまたはアリールを表す。

【００８３】

アルケニル及びアルキニル基に対して同様の置換を行うことによって、例えば、アミノアルケニル、アミノアルキニル、アミドアルケニル、アミドアルキニル、イミノアルケニル、イミノアルキニル、チオアルケニル、チオアルキニル、カルボニル置換アルケニルまたはアルキニルを得ることが可能である。

【００８４】

アルキル、ｍ、ｎなどの各表現の定義は、これらの表現がいずれかの構造において２度以上用いられる場合、特に明言するか、内容的に明らかでない限り、それ以外の部分での同様の構造の定義とは独立なものとする。

【００８５】

本発明の目的では、化学元素は元素の周期表にしたがって同定した（Ｐｅｒｉｏｄｉｃ Ｔａｂｌｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｅｌｅｍｅｎｔｓ，ＣＡＳ ｖｅｒｓｉｏｎ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｙｓｉｃｓ，６７ｔｈ Ｅｄ．，１９８６－８７，ｉｎｓｉｄｅ ｃｏｖｅｒ）。

【００８６】

無機化合物

本発明のナノ粒子の調製に使用する無機化合物は一般に水性媒体中で調製されるいずれの無機化合物であってもよい。別の一実施形態では、この無機化合物は金属塩の前駆物質を水性媒体に溶解することによって調製される金属酸化物である。金属としては、周期表の第１～１５族に属する陽イオンを使用することができる。これらの金属の例としては、Ｌｉ、Ｎａ、Ｋ、Ｍｇ、Ｃａ、Ｓｒ、Ｂａ、Ｓｃ、Ｙ、Ｌａ、Ｔｉ、Ｚｒ、Ｈｆ、Ｖ、Ｎｂ、Ｔａ、Ｃｒ、Ｍｏ、Ｗ、Ｍｎ、Ｔｃ、Ｒｅ、Ｆｅ、Ｒｕ、Ｏｓ、Ｃｏ、Ｒｈ、Ｉｒ、Ｎｉ、Ｐｄ、Ｐｔ、Ｃｕ、Ａｇ、Ａｕ、Ｚｎ、Ｃｄ及びＨｇが挙げられる。「金属」なる語は第１３～第１５族に属するメタロイドも含まれる。これらのメタロイドとしては、Ｂ、Ａｌ、Ｇａ、Ｉｎ、Ｔｌ、Ｓｉ、Ｇｅ、Ｓｎ、Ｐｂ、Ａｓ、Ｓｂ、及びＢｉが含まれる。金属陽イオンは、Ｆｅ、Ｒｕ、Ｏｓ、Ｃｏ、Ｒｈ、Ｉｒ、Ｐｄ及びＰｔを含む第８～第１０族に属するものであることが好ましい。好ましくは金属酸化物は磁性金属酸化物である。磁性金属酸化物はＦｅをＦｅ（II）、Ｆｅ（III）、またはＦｅ（II）／Ｆｅ（III）の混合物として含有していればよい。こうした酸化物の非限定的な例として、ＦｅＯ、$Fe_2O_3$、$Fe_3O_4$が挙げられる。無機化合物は$M1_XM2_{3-X}O_4$型の混合酸化物であってもよい（ただしＭ１は２価の金属イオンを表し、Ｍ２は３価の金属イオンを表す）。例えば、無機化合物として式$M1Fe_2O_4$で表される磁性フェライトを使用することが可能である（ただしＭ１は以下から選択される２価の金属イオンである：Ｍｎ、Ｃｏ、Ｎｉ、Ｃｕ、Ｚｎ、またはＢａ。これらは単独、もしくは互いの混合物として、もしくは鉄イオンとの混合物として用いられる）。

【００８７】

フッ素含有ポリマー

本発明で用いるフッ素含有ポリマーは、少なくとも１個の水素原子がフッ素原子によって置換された任意のポリマーまたはコポリマーであり、水性$NH_4OH$中で分散液を形成するものである。このようなポリマーの例としては、下記から選択される繰り返し単位を含むフッ素含有ポリマーが挙げられる。すなわち、$(CF_2CF_2O)_n$、$(CF_2O)_n$、$(CF_2CF_2CF_2O)_n$、$(CF_2CF_2)_n$、$(CF_2CF_2CH_2O)$、$(CF(CF_3)CF_2O)_n$、$(CF(CF_3)O)_n$またはこれらの組合せ。これらの繰り返し単位は、水性$NH_4OH$中への分散性を高める官能基で更に置換されていてもよく、あるいは分散性を高める官能基でエンドキャッピングされていてもよい。フッ素含有ポリマーがコポリマーである場合、各繰り返し単位はコポリマー全体にわたって統計的またはランダムに分布していてもよい。コポリマーの場合には、非フッ素化部分が水性$NH_4OH$中への分散性を高めるようにしてもよい。

【００８８】

フルオロポリマーまたはフルオロコポリマーの一般的な例としては、パーフルオロポリエーテル、ヘキサフルオロプロピレンオキシド、ヘキサフルオロプロペンオキシド、ヘキ

サフルオロプロピレンエポキシド、ヘキサフルオロプロペンエポキシド、ヘキサフルオロプロピレン、ヘキサフルオロプロペンが挙げられる。好適なフルオロポリマー及びフルオロコポリマーは、ＦＯＭＢＬＩＮ　Ｙ（登録商標）、ＦＯＭＢＬＩＮ　Ｚ（登録商標）、及びＧＡＬＤＥＮ（登録商標）（以上すべてＡｕｓｉｍｏｎｔＵＳＡ社）、ＫＲＹＴＯＸ（登録商標）、ＺＯＮＹＬ（登録商標）ＦＳＡ、及びＮＡＦＩＯＮ（登録商標）（以上すべてＤｕｐｏｎｔ社）及び３Ｍ社のＤＹＮＥＯＮ（商標）の商品名で市販されてもいる。

【００８９】

粒子の特徴付け

実施例１で述べる磁性ナノ粒子は、その粒径に関しては動的光散乱装置（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ社）によって、その電気泳動特性についてはＳｍｏｌｕｃｈｏｗｓｋｉζ電位モデルを用いたビルトインソフトウェアを有するＺｅｔａＰａｌｓゼータ電位分析器（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ社）によって、特徴付けることができる。この結果を図１に示した。図に示されるように、粒子は約１５０ｎｍの重量平均径と、バイオプロセスに適したｐＨ範囲において負の表面電荷を示した。したがってこの粒子は電荷的に安定であり、永続的に分散状態に保たれる。

【００９０】

ナノ粒子の粒径は好ましくは０．００１～１００μｍである。粒径が約１０ｎｍよりも小さい場合、ブラウン運動の影響のために、磁場を作用させた場合に磁性粒子を充分に運動させることが困難となる。粒径が１０００ｎｍを上回る場合、磁性粒子は分散媒体中で沈降し、分散安定性が損なわれる。より好ましい粒径の範囲は１０～１００ｎｍである。

【００９１】

フルオロポリマーでコーティングされたナノ粒子及び該ナノ粒子を含む磁性流体の無害性

弱酸性電荷を有するフルオロポリマーによって安定化された$Fe_3O_4$ナノ粒子

実施例１で述べるような、弱酸性電荷を有する予め調製されたフルオロポリマー（Ｆｌｕｏｒｏｌｉｎｋ（商標））を用いて合成されたナノ粒子のＥ．ｃｏｌｉ細胞に対する毒性について、実施例２で述べる振盪フラスコバッチ実験を行って試験した。図２に示されるようにフルオロポリマーでコーティングした磁性粒子は無毒性であり、細胞の増殖を阻害しなかった。

【００９２】

強酸性電荷を有するフルオロポリマーによって安定化された$Fe_3O_4$ナノ粒子

実施例６で述べるように、強酸性電荷を有するフルオロポリマーを用いてナノ粒子を調製した。この粒子が細菌細胞の増殖に与える潜在的影響について評価を行った。振盪フラスコバッチ実験を行って粒子のＥ．ｃｏｌｉ細胞に対する毒性について試験した。試験の条件は実施例２に述べたとおりである。図５及び図６に示されるように、フルオロポリマーでコーティングした磁性粒子は無毒性であり、細胞の増殖を阻害しなかった。細胞／粒子懸濁液に発泡は見られなかった。

【００９３】

一連の個別の実験において、所定重量の磁性粒子を所定重量の発酵及び培養原液に加えて、振盪実験を行った（発酵液及び振盪実験の説明は実施例２を参照）。次いで細胞及び磁性ナノ粒子が入った１５ｍｌポリプロピレン製容器を、Ｍｏｄｅｌ　Ｌ１　Ｆｒａｎｔｚ等力磁力分離器を使用して分離にかけた（Ｓ．Ｇ．Ｆｒａｎｔｚ社、ニュージャージー州トレントン）。フルオロポリマーでコーティングした粒子は、強力な磁場をかけると速やかに容器の底に沈降し、浮遊細胞が上部に残る。暗褐色の粒子の層と黄色味がかった浮遊細胞層とは明らかに区別される。浮遊細胞を含んだ液層をピペットで静かに取り除き、等量の脱イオン化水を加えた。粒子の懸濁液を振盪し、再び磁場により分離にかけた。この液体置換、分離及び除去の手順を３回繰り返した。分離と洗浄を繰り返した後、磁性粒子をオーブンに入れて重量が一定となるまで９０℃で乾燥し、最終重量を同様のサンプルの最初の粒子含量と比較した。５つのサンプルについて粒子の回収率を試験したところ、９９±５％であった。すなわち磁性粒子を完全に回収することができた。

【００９４】

フッ素化コポリマーとしてポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸を用いた磁性流体

フッ素化コポリマーとしてポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸（Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社より入手）を用いて実施例４に述べるようにナノ粒子を調製した。ナノ粒子の毒性について実施例５に述べるように試験を行った。図４に示されるように、磁性流体を用いない対照実験では、磁性流体を用いた実験と比較して細胞の増殖が早かった。これは媒体中に存在するモノマーによって導入されたなんらかの毒性による結果と考えられる。しかし、粒子存在下の細胞もやがて増殖し、より高い細胞密度に達した。この現象は、磁性粒子存在下での細胞数が明らかにより多かった第２の実験においてより明確に観察された。

【００９５】

発酵プロセスにおけるフルオロポリマーコーティングを有するナノ粒子によるＥ．ｃｏｌｉ増殖の促進

本発明の粒子の促進効果を調べるための発酵実験を行った。実施例１で合成した粒子を用いて実施例３に示す実験状況下で発酵を行った。本発明のナノ粒子の細胞増殖促進効果を実証する主な結果を図３に示した。

【００９６】

フルオロポリマー改変磁性ナノ粒子を用いた他の発酵実験を更に行った。酸素移動速度（全体の質量移動係数によって測定される）が大幅に増大するという重要な結果が得られた。これらの発酵の結果を下記に表１にまとめて示した。表１の結果から、２％（ｗ／ｖ）のフルオロポリマー改変磁性ナノ粒子を使用した場合、対照発酵実験（０％）と比較して全体の酸素移動量で４２５％の増加が、４％（ｗ／ｖ）のフルオロポリマー改変磁性ナノ粒子を使用した場合、全体の質量移動係数で４４３％の増加が見られたことが分かる。酸素移動係数におけるこうした増加は、組換え細胞や一次及び二次代謝産物を産生する細胞による生産物の濃度の増大につながる。

【表１】

表１．酸素移動係数の比較

| | 粒子 (w/v) | 空気の流速 (L/分) | OTR=OUR (7－10時間) [mmol $O_2$/(L-h-Atm $O_2$) | $K_La$ (7-10時間) [mmol $O_2$/(L-h-Atm $O_2$) | 標準化した $k_La$ (空気の流速=2L/分) [mmol $O_2$/(L-h-Atm $O_2$) |
|---|---|---|---|---|---|
| 発酵III | 無し | 2.0 | 26.68 | 127.0 | 127.0 |
| 発酵I | 無し | 3.0 | 36.60 | 172.9 | 131.8 |
| 発酵II | 2% | 1.0 | 74.04 | 352.6 | 561.0 |
| 発酵IV | 4% | 2.0 | 122.84 | 585.0 | 585.0 |

$OTR=K_La(C^*-C_L)$; $K_La=K\cdot(V_S)^{0.67}$; $C^*=0.21$ atm; K=定数; $C_L=0$(7-10時間、DO=0)；
$V_S$=見かけの気体速度

【００９７】

この方法にはいくつもの効果がある。第一に、従来の攪拌、通気型の発酵器において何らの機械的変更を行うことなく酸素移動速度の増加を実現できることである。第二に、いずれのタイプの発酵器を使用しても酸素移動速度の増加が期待できると考えられることである。例えば、別のタイプの発酵器としては、機械的攪拌を行わない従来の気体拡散式発酵器や、ドラフト管を有するエアリフト式発酵器がある。これらの結果は、本発明の磁性ナノ粒子による細胞増殖の促進効果を実証するものである。

【００９８】

実施例８で調製したＺＯＮＹＬ８７４０で改変した磁性ナノ粒子に関しても、２％の粒子固形分濃度で振盪フラスコ実験を行って細胞増殖に対するナノ粒子の影響について試験した。この粒子試験の詳細は実施例５に述べた。この粒子試験の結果を図９に示した。この結果は、対照と比較して吸光度が３倍高かったことに示されるように、フルオロポリマ

ー改変マグネタイト粒子によって細胞増殖が促進されることを示すものである。

【００９９】

走査電子顕微鏡法（ＳＥＭ）

実施例７で調製したフルオロゲルでコーティングした磁性ナノ粒子、及び凍結乾燥したフルオロゲルをＳＥＭによって調べた。乾燥させたサンプルをＳＥＭのスタブに非導電性の接着剤とともに載せ、１００～２００ÅのＡｕ／Ｐｄをスパッタリングでコーティングした。粒子の画像をＪＥＯＬ６３２０　ＦＥ－ＳＥＭ顕微鏡で異なる倍率で撮影した。磁性粒子なしのフルオロゲルの写真を図７に示した。

【０１００】

図に示されるようにフルオロゲルは高次の多孔構造を有し、水中で膨潤する。こうした構造のために、溶存酸素及び他の溶質のフルオロポリマー層を通じた浸透が妨げられることがなく、発酵プロセスにおける酸素供給が促進される。

【０１０１】

図８は、凝集したフルオロゲル構造中で沈殿したマグネタイト粒子の構造を示したものである。このマグネタイト粒子は結晶性が高く、より大きなポリマー性凝集塊中でクラスター構造として観察される（図８の右側の写真）。

【０１０２】

炭化水素二重層：第１の炭化水素部分

フルオロポリマー以外に、本発明のナノ粒子の有機相としては炭化水素二重層を用いることができる。炭化水素二重層は、互いに化学的に結合した第１及び第２の炭化水素部分を含む。

【０１０３】

第１の炭化水素部分としては、無機粒子に結合可能であるとともに第２の炭化水素部分に化学的に結合可能なあらゆる炭化水素を用いることができる。第１の炭化水素部分を無機粒子に結合させる結合基は、当該無機化合物に対して共有結合、イオン結合、または配位結合（ルイス塩基とルイス酸との相互作用）を形成することができるいかなる官能基であってもよい。無機化合物が金属酸化物を含む場合、金属は正の酸化状態にある。正の酸化状態にある金属はほとんどすべての場合においてルイス酸性であり、したがってルイス塩基として働く異なる部分に対して結合できる。一般にルイス塩基として働く部分はｐＫａが約７よりも小さく、より好ましくは５よりも小さい強酸性基であり、適当な条件下で金属イオンに電子対を供与して配位結合を形成するだけの充分に強いルイス塩基として働く共役塩基を生ずる。このルイス酸／ルイス塩基の相互作用の強さは、特定の金属イオンだけではなく、配位する部分自体の関数である。これは配位部分は、塩基性度、サイズ、及び立体的アクセシビリティーにおいて異なるためである。

【０１０４】

第１の炭化水素部分に含まれうる、酸素含有部分からなるルイス塩基部分の例には、酸、アルコール、アルコキシド、ケトン、アルデヒド、エステル、エーテル、無水物などが含まれる。

【０１０５】

第１の炭化水素部分に含まれうる、硫黄含有部分からなるルイス塩基部分の例には、チオール、スルフィド、チオカルボニル（例、チオールカルボキシル、チオエステル及びチオホルミル基）、チオエーテル、メルカプタン、スルホン酸、スルホキシド、硫酸塩、スルホン酸塩、スルホン、スルホンアミド、スルファモイル、スルフィニルなどが含まれる。

【０１０６】

第１の炭化水素部分に含まれうる、窒素含有部分からなるルイス塩基部分の例には、アミン（１級、２級及び３級）及び芳香族アミン、アミノ基、アミド基、ニトロ基、ニトロソ基、アミノアルコール、ニトリル、イミノ基、イソニトリル、シアネート、イソシアネート、カルバモイル基などが含まれる。

【０１０７】

第１の炭化水素部分に含まれうる、リン含有部分からなるルイス塩基部分の例には、リン酸塩、ホスホン酸塩、亜リン酸塩、ホスフィン、酸化ホスフィン、ホスホロチオエート、ホスホアミダイト、リン酸エステルなどが含まれる。

【０１０８】

第１の炭化水素部分に含まれうる他の好適なルイス塩基としては、下記のルイス塩基が挙げられる。すなわち、アルシン、スチルビン、チオエーテル、セレノエーテル、テルロエーテル、チオケトン、イミン、ホスフィンイミン、ピリジン、ピラゾール、イミダゾール、フラン、オキサゾール、オキサゾリン、チオフェン、チアゾール、イソキサゾール、イソチアゾール、アミド、アルコキシ、アリオキシ、セレノール、テルロール、シルオキシ、ピラゾイルボレート、カルボキシレート、アシル、アミデート、トリフレート、チオカルボキシレートなどが含まれる。

【０１０９】

第１の炭化水素部分の炭化水素鎖は、分枝状または非分枝状炭化水素であってよい。炭化水素鎖は、その鎖中にヘテロ原子を含んでもよく、鎖に一般的な有機基が結合していてもよい。炭化水素鎖中の炭素原子量は、炭素原子約４～約５０個、または約１０～約４０個、または約１５～約３０個である。炭化水素鎖はさらにアリール基のような芳香族部分を有していてもよい。第１の炭化水素部分を第２の炭化水素部分に結合させる結合基は、第２の炭化水素部分に対して共有結合、イオン結合、または配位結合を形成することができるいかなる官能基であってもよい。この結合基は求核性または求電子性のものであってよい。この結合基が求核性のもの（例、アミン、水酸基、チオールなど）である場合、第２の炭化水素部分上の化学結合を形成する結合基は求電子性である。逆に、この結合基が求電子性のもの（例、アルデヒド、ケトン、エステルなど）である場合、第２の炭化水素部分上の化学結合を形成する結合基は求核性である。第１の炭化水素部分を第２の炭化水素部分に結合させる結合基は、不飽和の炭素－炭素結合であってもよい。例えば、第２の炭化水素部分上の結合基は求核性基であってもよく、あるいは別の不飽和炭素－炭素結合であってもよい。前者の例では、炭素とヘテロ原子間に共有結合が形成され、後者の例では、炭素－炭素結合が形成される。

【０１１０】

炭化水素二重層：第２の炭化水素部分

第２の炭化水素部分は、第１の炭化水素部分の結合基に結合可能な結合基を有し、約３～約５０個の炭素原子からなる炭化水素部分からなる点は第１の炭化水素部分と同様であるが、無機化合物に結合可能な結合基の代わりに親水性基を有する点で異なっている。親水性基は当該技術分野で一般的に知られるいずれの親水性基であってもよい。親水性基は一般に極性基であり、陰イオン性、陽イオン性、非イオン性及び双性イオン性の４つのカテゴリーのいずれかに該当する。陰イオン性基の非限定的な例としては、カルボン酸塩、スルホン酸塩、硫酸塩、カルボン酸塩、及びリン酸塩が挙げられる。陽イオン性基の非限定的な例としては、アンモニウム及び４級アンモニウムが挙げられる。非イオン性基の非限定的な例としては、水酸基、ケトン及びアルデヒドなどのカルボニル基、ポリオキシエチレンなどのポリオキシアルキレン、スクロース、ソルビタン、グリセロール及びエチレングリコールなどのポリオールが挙げられる。双性イオン性基の非限定的な例としては、ベタイン、スルホベタイン、アミノ酸、及びポリペプチドが挙げられる。２以上のカテゴリーから選ばれる２以上の親水性基を組合わせて親水性基を形成することも可能である。例えば一実施形態では、親水性基はスルホネート基を末端に有するアルキレンオキシドであってもよい。この親水性基は、ナノ粒子の水性懸濁液中でのコロイド安定性に寄与していると考えられている。

【０１１１】

気体の可逆的可溶化

本発明のナノ粒子の特徴として、可逆的に気体を可溶化することが可能な有機相を有する点がある。この有機相は、こうした特性を有するいかなる有機相であってもよい。有機相は、ポリマーやコポリマーなどの１種類の化合物からなる均質なものであってもよい。

こうした有機相の例として、フルオロポリマーやフルオロコポリマーがある。有機相は炭化水素二重層のような２以上の化合物からなる２以上の異なる相を含んでいてもよい。重要な点として、異なる種類の有機相に共通の特性として、例えば酸素などの気体を可逆的に可溶化できることがある。気体を可逆的に可溶化可能なこうした性質のために本発明のナノ粒子は発酵などの各種のバイオプロセスにおいて理想的である。

【０１１２】

気体を可逆的に可溶化する性質を測定する幾つかの方法が当該分野で知られている。以下はこの性質の同定及び定量化に用いることができる方法の非限定的な例である。

【０１１３】

第１の方法は、電極法（Ｇａｓｓｉｎｇ－ｏｕｔ法）の使用によって無細胞媒体中での酸素移動の促進を測定する技術を利用したものである（実施例１１）。

【０１１４】

この方法の目的は、簡単な電極法を用い、溶存酸素濃度を測定することによって、実験室系で、有機相が酸素の物質移動容積係数（$k_L a$）にどのような影響を与えるかを評価することである。

【０１１５】

実験に使用する器具は、溶液（水のみ、または水と有機相含有物質）を充填した円筒形のビーカーである。溶存酸素は、データ取得計（ＹＳＩ５１００）に接続された溶存酸素ポーラログラフィックセンサー（ＹＳＩ５０１０）によって測定する。この溶存酸素計は、各測定間での若干の大気圧の変動を補正する内蔵型の気圧計を有している。ビーカーの温度は水浴によって３７±０．５℃に調節され、溶液のｐＨは実験開始前に７，０に調整される。

【０１１６】

本発明のナノ粒子の有機相について、この方法における応答曲線を図１２に示した。この応答曲線は、第１の工程において、溶存酸素濃度が０に低下するまで窒素をスパージし、次いで第２の工程において、液体の自由面が室内の空気に触れることによる溶存酸素濃度の増加を観測することによって得られたものである（図１２にはこの第２工程のみを示した）。一定の気液界面を確保して実験を容易に行うために、第２工程では空気のスパージングを行わなかった。比較的長時間（～１時間）で実験を行うことで、プローブの時定数によって応答曲線が影響されることがない。

【０１１７】

図１１のデータは、粒子濃度の増大にともなって応答時間が減少することを示している。

【０１１８】

物質移動係数の促進率を定量化するため、以下の分析を行った。

【０１１９】

液相への酸素移動速度は、下記一般式によって表される。

【数１】

$$O.T.R. = k_L a\left(C^* - C_L\right) \qquad [1]$$

【０１２０】

式中、Ｏ．Ｔ．Ｒ．は酸素移動速度であり、$k_L$は液相の物質移動係数であり、ａは界面の比表面積であり、$C^*$は気液界面における酸素濃度であり、$C_L$は液相中の酸素濃度である。

【０１２１】

式［１］の積分形を用いて図１２に示した応答曲線のデータから$k_L a$を計算すること

ができる。
【数２】

$$ln\left(C^{*}-C_{L}\right)=-k_{L}a\left(C^{*}-C_{L}\right)+R \qquad [2]$$

【０１２２】
ただしｔ＝０のときＣ$_{L}$＝０であり、Ｒは積分定数である。時間に対してｌｎ（Ｃ＊－Ｃ$_{L}$）をプロットした対数グラフの負の傾きがｋ$_{L}$ａの値である。
【０１２３】
図１２の傾きを調べることによって、０．５％及び１％の粒子を使用することにより、それぞれ物質移動係数が３７％及び８０％の促進率で促進されたことが分かる。これらの図は、０．５％及び１％の曲線を対照の傾きで割ることによって得られたものである。
【０１２４】
別の方法は、亜硫酸塩酸化法（実施例１３）を用いることによって実験室スケールの発酵器における酸素移動の促進を調べるものである。
【０１２５】
この方法の目的は、発酵の分野ではよく知られた方法である亜硫酸ナトリウム法を用いることによって、実験室スケールの通気発酵器において、有機相が酸素の物質移動容積係数（ｋ$_{L}$ａ）にどのような影響を与えるかを評価することである。この方法は亜硫酸ナトリウム溶液を使用して行った。亜硫酸ナトリウム溶液はＣｕ$^{2+}$触媒の存在下では下記反応によって酸化される。
【数３】

$$Na_{2}SO_{3}+\frac{1}{2}O_{2}\xrightarrow{Cu^{2+}}Na_{2}SO_{4} \qquad [3]$$

【０１２６】
本反応の速度論は亜流酸塩濃度とは独立であり、酸素の消費速度が充分に大きいことから、化学的反応ではなく、気体から液体への酸素の輸送速度が律速段階となる。したがって、反応の速度を測定することによりｋ$_{L}$ａを計算することが可能である。本発明のナノ粒子を用い、オフガス組成を測定し、反応器中の酸素に質量バランスを行うことによってこれを行った。
【数４】

$$\text{酸素吸収速度}=\frac{\left(F_{N_2}\right)_{in}\left[\left(\frac{C_{O_2}}{C_{N_2}}\right)_{in}-\left(\frac{C_{O_2}}{C_{N_2}}\right)_{out}\right]}{V}$$

【０１２７】
式中、（Ｆ$_{Ｎ２}$）$_{ｉｎ}$は反応器に供給されるＮ$_{2}$の流速であり、Ｃ$_{Ｏ２}$及びＣ$_{Ｎ２}$は、反応器に供給される、あるいは反応器から排出される酸素及び窒素の濃度であり、Ｖは作用容積である。

【０１２８】
これにより物質移動容積係数は下式によって求められる。
【数５】

$$k_L a = \frac{\text{酸素吸収速度}}{C^{\bullet} - C_L}$$

【０１２９】
ただし、式［５］中のすべての項は式［１］において先に定義したものである。気液界面における平衡濃度であるＣ＊の値は、排気口での平衡値に相当する。したがってこの値を用いることにより液相が完全に混合されているものと仮定することができる。
【０１３０】
表２に、一方は粒子なしの対照として行い、他方は１．４％（ｗ／ｖ）の粒子を用いて行った本発明のナノ粒子に関する２つの実験において得られた結果をまとめた。用いた攪拌速度及び通気速度の範囲において物質移動係数が顕著に促進されたことが分かる。
【表２】

表２．様々な遥動及び通気速度で亜硫酸ナトリウム法によって測定した磁性ナノ粒子の使用による物質移動係数の促進率

| 遥動 (RPM) | 空気の流速 (VVM) | $K_LA$ 対照 | $K_LA$ 1.4% 粒子 | 促進率 $\frac{(K_La)_p-(K_La)_c}{(K_La)_c} x100$ |
|---|---|---|---|---|
| 300 | 1 | 216 | 383 | 77% |
| 300 | 0.5 | 182 | 417 | 130% |
| 400 | 1 | 422 | 1010 | 139% |
| 500 | 1 | 685 | 2008 | 193% |
| 600 | 1 | 1156 | 3219 | 178% |

【０１３１】
ｋ$_{L}$ａの測定値は一定の通気速度において単位容積当りの入力との相関が見られた。得られた機能性を図１５に示した。
【０１３２】
気体を可溶化する性質を測定及び定量化するための第３の方法では、発酵実験を行って有機相の酸素物質移動促進性能を調べる。この実験では、発酵プロセスにおける例えばＥ．ｃｏｌｉなどの細胞の増殖の促進能を測定する。対照及び実験的発酵プロセスを行う。実験的プロセスで有機相含有物質を用いる（実施例１４）。
【０１３３】
本発明のナノ粒子を用いた発酵プロセスの結果を図１６～１８に示した。これらの結果は、粒子が酸素の物質移動を促進することによって細胞増殖を促進する能力を有することを示すものである。図１６は、わずか０．５６％（ｗ／ｖ）の磁性ナノ粒子を使用することによって、酸素移動が制限された条件下で細胞を培養した場合に高い細胞増殖速度が維持されることを示している（図１６では、酸素制限下での増殖開始は約５時間であり、いずれの培養細胞も酸素制限条件下で実験終了まで増殖した。）。図１７は、培養細胞が酸素制限条件下で培養された場合、５時間後では、細胞の増殖率の指標であるグルコース消費が磁性ナノ粒子の存在下でより早いことを示しており、図１６のデータを裏づけするも

のである。最後に図１７は、質量分析器（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＭＧＡ１６００）によって測定される、オフガス分析の指示値から計算した上記２実験における酸素吸収速度を示したものである。酸素制限培養期間中、０．５６％（ｗ／ｖ）の粒子の存在下で培養した培養細胞によって吸収された酸素の全体量は、対照におけるよりも５０％大きい。したがって酸素の物質移動容積係数は磁性ナノ粒子の存在下では５０％大きい。

【０１３４】

酸素移動係数のこうした増大は、組換え細胞や一次及び二次代謝産物を産生する細胞による生産物の濃度の増大につながる。

【０１３５】

したがって、酸素移動速度の増加が、従来の攪拌、通気型の発酵器において発酵器に何らの機械的改変を行うことなく実現されたことになる。第二に、いずれのタイプの発酵器を使用しても酸素移動速度の増加が期待できると発明者等は確信している。例えば、機械的攪拌を行わない従来の気体拡散式発酵器や、ドラフト管を有するエアリフト式発酵器である。これらの結果は、本発明の磁性ナノ粒子による細胞増殖の促進効果を実証するものである。

【０１３６】

酸素などの気体を可逆的に可溶化することが可能な有機相の非限定的な例としては、少なくとも１個の極性基を有すると共に少なくとも１０個の炭素原子を有する陰イオン性及び陽イオン性界面活性剤、オレイン酸などの不飽和脂肪酸またはその塩、スルホン化油またはその塩、合成または天然スルホネートまたはその塩、ポリブテンコハク酸またはその塩、ポリブテンスルホン酸またはその塩、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルなどの非イオン性界面活性剤、アクリルアミドやパーフルオロポリマーなどのポリマーが挙げられる。

【０１３７】

更なる応用例

酸素移動促進剤以外にも、本発明の磁性ナノ粒子とその水性コロイドには、医療科学やバイオテクノロジーの分野において有望な応用例が考えられる。こうした応用例としては、これらに限定されるものではないが、磁力によって促進された細胞分離や、ｉｎ　ｖｉｖｏでの薬剤のターゲティングなどがある。Ｉｎ　ｖｉｖｏでの薬剤のターゲティングは、磁性粒子のコーティングに薬剤を選択的に吸着させ、これに外部から磁場を作用させて体内の特定の組織に集中させることによって行うことが可能である。このように組織の特定部位に磁性流体を誘導する方法は、網膜修復治療などにおける利用が期待されている。

【０１３８】

同様に興味深い応用例として、磁性ナノ粒子及び磁性ナノ粒子を用いた磁性流体を利用した多くの機械的用途がある。磁性流体はその優れた性質（長期安定性、高い磁気飽和及び初期の磁化率、低粘度及び蒸気圧、顕著な凝集を起こさない、重力場中での安定性、適正な熱伝導率）のために下記のような多くの応用例が考えられる。

【０１３９】

１．熱伝達の集中；

２．ハードディスクドライブ用などの、連結部がなく保守の要らない高速回転シール（液体Ｏ－リング）；

３．ラウドスピーカーシステムの音声コイル用の制動素子；

４．熱担体；

５．磁気記録技術によって読み取られる署名やバーコード用のインクジェット印刷用の磁気インク；

６．非磁性材料の磁気分離（リサイクリング技術）；及び

７．測定機器、トランスデューサ、センサーなど。

【０１４０】

例として、磁気流体によって機械的、電磁気的、及び航空力学または流体力学的計測用の異なる種類のセンサーの製造において多くの利用が考えられる（Ｒｏｓｅｎｚｗｅｉｇ

, R. E., Ferrohydrodynamics, Cambridge Univ. Press 1985；I. Anton, I. De Sabata, L. Vekas, Application oriented researches on magnetic fluids, Jour. Mag. Mag. Mater. 85, 219, 1990；K. Raj, B. Moskowitz, R. Casciari, Advances in ferrofluid technology, Jour. Mag. Mag. Mater. 149, 174, 1995）。特に、必要とされる加速度計素子の特定の磁気流体条件（質量サスペンション、弾性定数、慣性質量、比例減衰、磁気流体浮上サーボループ）を満たすことから、加速度計の設計及び製造における磁性流体の利用が好ましい（M. I. Piso, Magnetic Liquid Accelerometers, Rom. Jour. Phys. 47, 437, 1995）。幾つかのタイプの加速度計及び傾角計が実現され、その応用分野は油田探索から基礎研究分野にまで亘っている。$10^{-10}$～$100ms^{-2}$の範囲の感度、静止状態から数$10^{3}$Hzの周波数領域、及び最大で16ビットの精度が実現されている（K. Raj, B. Moskowitz, R. Casciari, Advances in ferrofluid technology, Jour. Mag. Mag. Mater. 149, 174, 1995：M. I. Piso, Magnetic Liquid Accelerometers, Rom. Jour. Phys. 47, 437, 1995）。

【0141】

この種のセンサーの主な特徴は、準静的及び低周波数の慣性及び重力変動に対する顕著な応答であり、これは多くの一般的センサーにとっては困難な課題である。高感度及び直線性計測の分野において必要とされる性能が実現可能であり、慣性磁性流体センサーによって同等の性能で小型化及び省コスト化が可能である。地球潮汐や地震観測、地球物理学的調査、慣性誘導などの先進的な応用例では、これらのセンサーは超伝導素子と性能において競合するものである。磁性流体を用いたセンサーや、場合によっては磁性流体材料の特定の内在的効果によって直線及び角運動の双方を感知することが可能である。

【0142】

更に磁性ナノ粒子には、複写用途用の磁性インクトナーとしての用途が考えられる。複写プロセシングでは、紙などのシート状基材に印刷イメージを形成する。複写プロセシングの例としては、ファクシミリ通信、コピーの作成、コンピューターに電子的に保存された情報の印刷などがある。過去数年間の技術的進歩によって高品質かつ比較的低コストの白黒印刷用途のファクシミリ、コピー機やプリンターが普及してきた。しかしながらカラー印刷用途では同様の低コスト、高品質の機器は開発されていない。

【0143】

近年、高品質のカラーインクジェットプリンターが登場した。こうしたプリンターでは、液体のジェット噴射を利用して紙にカラーイメージを形成している。印刷されたイメージは高品質であるものの、この印刷プロセスはスピードが遅く、特殊な紙を必要とするためにコストが嵩む。

【0144】

カラーレーザープリンターも登場した。カラーレーザープリンターでは、乾燥トナーをドラムに機械的に塗布して所望のイメージを現像する。しかしながらこうしたカラーレーザープリンターは多重現像方式であり、各色を個別に現像して最終的な所望の複合カラーイメージを形成しなければならない。多重現像方式では個別のカラーイメージは中間装置に転写されて保存され、ここで個別のカラーイメージを重ね合わせることによって複合イメージが形成される。完成した複合イメージは紙に転写されて印刷される。したがって各色は個別の工程で現像されるため、印刷動作が非常に遅くなり、中間保存装置のためにコストが嵩み装置が複雑化してしまう。

【0145】

ドラムに機械的にトナーを塗布する必要のない白黒印刷では、高速で比較的安価なレーザープリンターが普及している。こうしたプリンターでは、トナー粒子中に包埋された磁

性粒子の働きによってトナー粒子がギャップを「ジャンプ」してドラムに到達し、イメージが現像される、「ジャンプギャップ」技術を用いている。このようなジャンプギャッププロセシングではドラムにトナーを機械的に塗布する必要がない。したがって現在のカラーレーザープリンターの多重現像方式の負担やコストをともなわずに、こうしたレーザープリンターでカラー印刷を実現できる可能性がある。しかしながら、ジャンプギャップ技術をカラー印刷に適用する際に問題となる点として、トナーに使用される磁性粒子の本来の色によって、所望の色を与えるためにトナーに用いられる顔料や色素の鮮明度がぼやけたり、歪んだりしてしまうことがある。

【０１４６】

磁性粒子による色のぼやけや歪みを低減させる一つの提案として、磁性粒子としてγ－$Fe_2O_3$ナノ粒子を使用することがある（R. F. Ziolo et al., Matrix-Mediated Synthesis of Nanocrystalline gamma-Fe2O3: A New Optically Transparent Magnetic Material, Science, vol257, July 1992, pp. 219-223）。こうした粒子は粒径が小さいことから、トナー組成物に現在用いられている大型の磁性粒子よりも透明性が高いと考えられ、現在用いられている磁性粒子ほどには色の歪みがないと考えられている。

【０１４７】

ナノ粒子技術及び磁性分野の当業者であれば上記に述べたものよりも更に多くの応用例が想到されよう。上記の応用例は、飽くまで例示的なものであっていかなる意味でも発明を限定するものではない。

【実施例】

【０１４８】

ここまで本発明を一般的に説明してきたが、本発明は以下の実施例を参照することでより容易に理解されよう。以下の実施例は、飽くまで本発明の特定の側面及び実施形態の説明を目的として記載するものであって本発明の範囲を限定することを目的とするものではない。

【０１４９】

実施例１

弱酸性電荷を有するフルオロポリマーによって安定化された$Fe_3O_4$ナノ粒子の合成

以下の化学反応はナノ粒子の合成を説明したものである。

【化１３】

$$2FeCl_3 + FeCl_2 + 8NH_3 + 4H_2O \xrightarrow{\text{フルオロポリマー}} Fe_3O_4\downarrow + 8NH_4Cl$$

【０１５０】

容量１０００mlの三口フラスコ中で脱イオン化水（１００mL）を室温で攪拌しながら窒素をバブリングして脱気した。次いで４７gの塩化鉄（III）六水和物（Aldrich, ９７%, CAS１００２５－７７－１, Cat. No. ２３, ６４８－９, Lot ０６０２９HU, MW２７０. ３０ $FeCl_3 . 6H_2O$）と１７. ２gの塩化鉄（II）四水和物（Aldrich, ９９%, CAS１３４７８－１０－９, Cat. No. ２２, ０２９－９, Lot#１９３２９LI, MW１９８. ８１ $FeCl_2 . 4H_2O$）を加え、各塩が溶解するまで窒素気流下でフラスコを攪拌し、油浴中で８０℃に昇温した。窒素のバブリングを停止した。８０℃に達した時点で、７２０mLのFluorolink（商標）（pH１４、分散液：３０%$NH_4OH$＝１：１v／v）の１２. ５%溶

液を激しく攪拌しながら一度に加えた。溶液は直ちに黒色に変化した。この混合物を攪拌しながら８０℃に３０分保ち、室温にまで冷却して装置を分解した。粒子の懸濁液を約６分間超音波処理した。得られた分散液は磁性を有し、室温で一晩静置したところ不安定であった。この合成を５回繰り返し、得られたフルオロポリマー改変粒子を大きなバッチで回収した。

【０１５１】

各バッチを加え合わせ、室温で静置して沈殿させた。沈殿物を上清から分離して６０℃で３時間乾燥した。得られた粒子の黒色の塊をＺｏｎｙｌＦＳＡで希釈し（粒子：Ｚｏｎｙｌ＝１：１ｗ／ｗ）、混合物を４日間、時折攪拌しながら放置して平衡化させた。

【０１５２】

得られた粘性溶液を透析管（ＭＷＣＯ６～８ｋＤａ）に流し、脱イオン化水に対して一週間、毎日５回水を交換して透析した（毎回の交換での水の量＝２０Ｌ（バケツで））。

【０１５３】

得られた粒子懸濁液を１０分間超音波処理し、室温で少なくとも１週間静置したところ粒子の沈降はまったく見られず安定であった。粒子は高フッ素含量（４４ｗｔ％）であり、鉄を含有していた（５ｗｔ％）。粒子は非常に強い磁性を有していた。

【０１５４】

実施例２

フルオロポリマーでコーティングされたナノ粒子の無害性

以下の細胞株と培地を用いて振盪フラスコバッチ実験を行い、実施例１で調製したナノ粒子の毒性を試験した。

【０１５５】

・菌株：コラーゲン様ポリマーＣＬＰ３．１を発現させるためにｐＥＴ－１５ｂ（ＣＬＰ３．１）を導入したＥ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１（ＤＥ３）。

【０１５６】

・種培養（／Ｌ）用のＬＢ培地

| | |
|---|---|
| ＮａＣｌ | １０ｇ |
| トリプトン | １０ｇ |
| 酵母抽出物 | ５ｇ |

・発酵培養（／Ｌ）用のＭＲ培地

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | １３．５ｇ |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | ４．０ｇ |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | ０．７ｇ |
| クエン酸 | ０．８５ｇ |
| １０ｇ／Ｌ　$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | １０．０ｍＬ |
| 微量金属溶液（ＴＥ） | １０．０ｍＬ |
| ２０ｇ／Ｌ　$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | １．０ｍＬ |

試験では以下の手順を行った。

【０１５７】

・種培養

－５００ｍＬ振盪フラスコ中１００ｍＬ　ＬＢ

－３７℃、２２０ｒｐｍで一晩培養

・発酵培養

－振盪フラスコでのバッチ培養

－５００ｍＬ振盪フラスコ中、２０ｇ／Ｌグルコースを加えた１００ｍＬ　ＭＲ培地

－１０％（ｖ／ｖ）播種容積

－ＰＣＭＰの量：０、０．５、１．０、２．０、４．０％（ｗ／ｖ）

－３７℃、２２０ｒｐｍ

実施例３

発酵プロセスにおけるフルオロポリマーコーティングを有する磁性ナノ粒子によるＥ．ｃ

ｏｌｉ増殖の促進

本発明の粒子の促進効果を調べるための発酵実験を行った。実施例１で合成した粒子を用いて下記に示す実験状況下で発酵を行った。

【０１５８】

・種培養

－５００ｍＬ振盪フラスコ中１００ｍＬ　ＬＢ

－３７℃、２２０ｒｐｍで一晩培養

・発酵培養（７．５Ｌ　発酵器）

－播種容積：１０％（ｖ／ｖ）

－初期発酵容積：３Ｌ

－温度：３７℃

－遥動速度：６００ｒｐｍ

－ｐＨ＝６．８－６．９、４Ｍ（$NH_4OH$：ＭａＯＨ＝２：２）にて調整

発酵は以下のように二段階で行った。

【０１５９】

・第１段階：グルコースが０に低下するまでバッチ培養（８～９時間）

・第２段階：（５００ｇ／Ｌ　フルコース＋１０ｇ／Ｌ　$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）を与えたｐＨ安定栄養供給バッチ培養。

【０１６０】

実施例４

フッ素化コポリマーとしてポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸を用いた磁性流体の調製

酸化鉄粒子の改変に用いたポリマーは、Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社から入手したポリ（テトラフルオロエチレンオキシド－コ－ジフルオロメチレンオキシド）α，ω－ジカルボン酸である。このポリマーは、その鎖の両端に２個のカルボン酸基を有している。ポリマーは非水溶性であるが、２８～３０％$NH_4OH$には完全に溶解する。

【０１６１】

３５ｍＬのＭｉｌｌｉ－Ｑ水を激しく攪拌しながら約２０分間$N_2$ガスを通気して脱気した。窒素雰囲気下で２．３５ｇの$FeCl_3$と０．８６ｇの$FeCl_2$を加え、熱電対で制御された油浴中で溶液を７２℃に昇温した。温度が７２℃に達した時点で$N_2$ラインを外し、１０ｍＬの濃$NH_4OH$に溶解した６ｇのポリマーを素早く溶液に加えた。激しく攪拌しながら８０℃で３０分間反応を行い、磁性流体を得た。

【０１６２】

この懸濁液を希釈し、磁気フィルターに通して未反応の望ましくない遊離ポリマーを媒体から除去した。この磁性流体溶液を濃縮するため、分子量１０，０００をカットオフ値とする超遠心透析膜を用いた。

【０１６３】

実施例５

実施例４で調製した磁性流体を用いた毒性試験

対照１

３本の２５０ｍＬ培養フラスコにそれぞれ２５ｍＬのＭＲ培地（実施例２及び３で述べたもの）を入れ、各フラスコをオートクレーブにかけた。オートクレーブ終了後、２ｍＬの濾過（１μｍの孔による）グルコース（５００ｇ／Ｌ）を各フラスコに加えた。各フラスコに５０μＬの抗生物質を加えた。３ｍＬの種培養（実施例３及び４）を各フラスコに加えて１０％溶液とした。

【０１６４】

粒子１

２５ｍＬのＭＲ培地に代えて、２２ｍＬのＭＲ培地と３ｍＬの１ｗｔ％ＭＦを加えた以外は、対照１と同様に調製した。

【０１６５】

対照２

３本の２５０ｍＬフラスコのそれぞれに入れられた２７ｍＬのＭＲ培地をオートクレーブにかけた。１０時間後の対照１溶液を３ｍＬ、ＭＲ培地に加えた。

【０１６６】

粒子２

２４ｍＬのＭＲ培地と３ｍＬのＭＦ溶液が入れられた３本の２５０ｍＬフラスコのそれぞれをオートクレーブにかけた。１０時間後の粒子１溶液を３ｍＬ、ＭＲ培地に加えた。

【０１６７】

実施例６

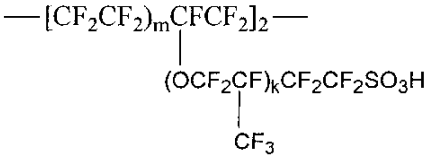
強酸性電荷を有するフルオロポリマーによって安定化された$Fe_3O_4$ナノ粒子の合成

この実施例は、強酸性のスルホン基を有する予め調製されたフルオロポリマーによって改変された磁性ナノ粒子の合成法ならびに性質を説明するためのものである。

【０１６８】

この合成法を説明する化学反応は実施例１の化学反応と概ね同様である。すなわち、アンモニアと特定のフルオロポリマーの存在下で$Fe^{3+}$／$Fe^{2+}$水溶液から沈殿させることによってマグネタイトナノ粒子を合成する。本実施例で用いたフルオロポリマーは、Ｄｕｐｏｎｔ　Ｆｌｕｏｒｏｐｒｏｄｕｃｔｓ社（デラウェア州ウィルミントン）からＮａｆｉｏｎ　Ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎの商標名で販売されているパーフルオロスルホン酸／テトラフルオロエテンコポリマーである。Ｎａｆｉｏｎ樹脂は、テトラフルオロエテン（ＴＦＥ）と、パーフルオロアルキルスルホニルフルオリド側鎖を有するトリフルオロビニルエーテルとの共重合反応による生成物である。パーフルオロアルキルスルホニルフルオリド側鎖は、加水分解後にスルホン酸生成物に変えられる。

【化１４】



【０１６９】

合成反応の条件下で、磁性ナノ粒子の顕著な凝集を引き起こさない最も適当なＮａｆｉｏｎ樹脂を評価するために一連の合成反応を行った。低級脂肪族アルコールと水の混合物にＮａｆｉｏｎ（登録商標）（ｅｑＭＷ１，１００）を溶解した溶液（Ａｌｄｒｉｃｈ　５２，７１２－２，ｌｏｔ＃１０７２３ＥＯ，ＣＡＳ３１１７５－２０－９）を用いた場合、得られた粒子は大型（直径数ミリメートル）のゴム状の粉砕不能な凝集物であり、ほとんど水に分散しないものであった。しかしながら、Ｎａｆｉｏｎ（登録商標）（Ｔｙｐｅ　ＤＥ１０２１，ｌｏｔ＃ＳＧ０１－００２）の水性分散液では下記に述べるような好適な生成物が得られることが判明した。

【０１７０】

容量５００ｍｌの三口フラスコ中で脱イオン化水（３０ｍＬ）を室温で攪拌しながら窒素をバブリングして脱気した。次いで１４．１ｇの塩化鉄（III）六水和物（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，９８％，ＣＡＳ１００２５－７７－１，Ｃａｔ．Ｎｏ．２０７９２６，ｂａｔｃｈ＃１２８０６ＢＡ，ＭＷ２７０．３０　$FeCl_3.6H_2O$）と５．１６ｇの塩化鉄（II）四水和物（Ａｌｄｒｉｃｈ，９９％，ＣＡＳ１３４７８－１０－９，Ｃａｔ．Ｎｏ．２２，０２９－９，Ｌｏｔ＃１６３２４ＪＯ，ＭＷ１９８．８１　ＦｅＣｌ

$_2$．４$H_2$Ｏ）を加え、各塩が溶解するまで窒素気流下でフラスコを攪拌し、油浴中で８０℃に昇温した。窒素のバブリングを停止した。８０℃に達した時点で、Ｎａｆｉｏｎ（登録商標）の１２％溶液（２００ｍｌ，ＤｕＰｏｎｔ　Ｔｙｐｅ　ＤＥ１０２１，ｌｏｔ＃ＳＧ０１－００２）と５０ｍＬの２８％$NH_4$ＯＨ水溶液の混合物を激しく攪拌しながら一度に加えた。溶液は直ちに黒色に変化した。この混合物を攪拌しながら８０℃に２時間（分）保ち、室温にまで冷却してフラスコを分解した。粒子の懸濁液を約１５分間超音波処理した。得られた微小分散液を重量が一定となるまで９０℃で乾燥した。得られた粒子は強い磁性を有し、平均径は約２～１０μｍであった。走査電子顕微鏡によって、フルオロ炭素コーティングされた粒子の内部に粒径が８～１０ｎｍの磁性沈殿物の塊が観察された。室温で１ｍＭ　ＫＣｌに懸濁した２００ｐｐｍマイクロ粒子懸濁液で、ｐＨを５Ｍ　ＨＣｌ及びＮａＯＨで調整してζ電位を測定した。ζ電位の測定値は、ｐＨ１．９、６．５、及び１２．４でそれぞれ－１８．３５±０．６７、－１７．９５±０．５０、及び－１９．０５±０．６５ｍＶであった。すなわち、ζ電位は負の値であってｐＨに依存していた。このことは粒子表面に強酸性基があることを示すものである。負の電荷によって懸濁液は発酵実験の間、コロイドとして安定化した。

【０１７１】

実施例７

Ｉｎ　ｓｉｔｕで調製したフルオロポリマーで改変された$Fe_3O_4$ナノ粒子の合成

この実施例は、磁性ナノ粒子の沈殿と同時に起こるフリーラジカル重合反応によって調製されるコポリマーで改変された磁性ナノ粒子の調製方法を説明するためのものである。

【０１７２】

このコポリマーの構造には幾つかのビニルモノマーが含まれる。すなわち、疎水性のフッ素含有モノマー、２－（パーフルオロアルキル）エチルメタクリレート（Ｚｏｎｙｌ（登録商標）　ＴＭ）、帯電性モノマー、メタクリル酸（ＭＡ）、及び架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレート（ＥＧＤＭＡ）である：

$CH_2=C(CH_3)COOCH_2CH_2(CF_2)_nF$

ＺＯＮＹＬ（登録商標）；ｎ＝８、$M_n$５３４、フッ素含量６０％

$CH_2=C(CH_3)COOH$

メタクリル酸

$[CH_2=C(CH_3)COOCH_2-]_2$

エチレングリコールジメタクリレート

【０１７３】

合成は、共通の溶媒として良好であることが示されたクロロホルムにすべてのモノマーを溶解して行う。この溶液を乳濁安定化剤としてパーフルオロドデカン酸を用いて水中に乳濁する。重合化反応はアゾビスイソブチロニトリル（ＡＩＢＮ）によって開始する。得られるコポリマーは架橋されたゲルである。合成法を下記に詳細に述べる。

【０１７４】

容量１０００ｍｌの三口フラスコ中で脱イオン化水（２０ｍＬ）を室温で攪拌しながら窒素をバブリングして脱気した。次いで１．４１ｇの塩化鉄（III）六水和物（Ａｌｄｒｉｃｈ，９８％，ＣＡＳ１００２５－７７－１，Ｃａｔ．Ｎｏ．２３，６４８－９，Ｂａｔｃｈ　１２８０６ＢＡ，ＭＷ２７０．３０　$FeCl_3.6H_2O$）と０．５１６ｇの塩化鉄（II）四水和物（Ａｌｄｒｉｃｈ，９９％，ＣＡＳ１３４７８－１０－９，Ｃａｔ．Ｎｏ．２２，０２９－９，Ｌｏｔ＃１９３２４ＪＯ，ＭＷ１９８．８１　$FeCl_2.4H_2O$）を加え、各塩が溶解するまで窒素気流下でフラスコを攪拌し、油浴中で８０℃に昇温した。

【０１７５】

一方、３．０ｇのＺｏｎｙｌ（登録商標）　ＴＭ（ＣＡＳ　６５５３０－６６－７，Ｃａｔ．＃４２，１４８－０，ｌｏｔ＃Ｃ５２２３ＢＵ）、４００μＬのメタクリル酸、４００μＬのエチレングリコールジメタクリレート、１５０ｍｇのアゾイソブチロニトリル（すべてＡｌｄｄｏｒｉｃｈ）、２ｍＬのクロロホルム、１０ｍｇのパーフルオロドデカ

ン酸（ＰＮ２１２１－３－２９，Ｌｏｔ＃７Ｃ－６７，ＣＡＳ３０７－５５－１）及び３ｍＬのＮＨ$_4$ＯＨ（２８％）の混合物を調製した。混合後、溶液を短時間超音波処理して乳濁液とした。

【０１７６】

８０℃に達した時点で、乳濁液を前述の塩化鉄溶液に窒素ブランケット下で激しく攪拌しながら加えた。溶液は直ちに黒色に変化した。この混合物を攪拌、窒素バブリングを行いながら８０℃に２時間保ち、室温にまで冷却して反応装置を分解した。

【０１７７】

黒色かつ粉末状のほぼ乾燥した沈殿物が生成した。この沈殿物を１０ｍＬの脱イオン化水に懸濁して、超音波処理によって均質な懸濁液とした。この懸濁液は数時間にわたって安定であった。懸濁液は強い磁性を示した。懸濁液を一定の重量となるまで９０℃で乾燥し、乳鉢と乳棒で粉砕し、室温で保存した。

【０１７８】

別の一連の実験を、塩化鉄を添加しないことを除いて同様の手順で行って、高強度の透明なゲル粒子を得た。このゲル粒子を乾燥し、乳鉢と乳棒で粉砕し、水に懸濁して凍結乾燥した。

【０１７９】

室温で１ｍＭ　ＫＣｌに懸濁した２００ｐｐｍマイクロ粒子懸濁液で、ｐＨを５Ｍ　ＨＣｌまたはＮａＯＨで調整してζ電位を測定した。フルオロゲル改変粒子の懸濁液のζ電位の測定値は、ｐＨ１．９、６．５、及び１２．４でそれぞれ０．３５±０．４２、－１２．５６±０．７８、及び－１８．０５±１．２４ｍＶであった。すなわち、ζ電位は中性ｐＨでは負の値であった。このことは発酵プロセスでは一般的なｐＨでのコロイド安定性を示すものである。ζ電位のｐＨ依存性は、粒子表面に弱酸性のカルボキシル基が存在することを示している。

【０１８０】

実施例８

市販のフルオロポリマーで改変されたＦｅ$_3$Ｏ$_4$ナノ粒子の合成

１００ｇの脱イオン化水に７０．５ｇのＦｅＣｌ$_3$・６Ｈ$_2$Ｏと２５．８ｇのＦｅＣｌ$_2$・ｎＨ$_2$Ｏを加えた溶液を窒素で連続的にパージしながら８０℃に昇温した。次いで水にＺＯＮＹＬ８７４０（パーフルオロアルキルメタクリルコポリマー、３０％固形分）を分散させた分散液（Ｄｕｐｏｎｔ，Ｌｏｔ＃６６，ｐＨ４）３３０ｍＬを加え、得られた懸濁液を８０℃に１時間保った。この分散液にＮＨ$_4$ＯＨの水溶液（２８％、２００ｍＬ）を加えると黒色の沈殿物の生成が直ちに見られた。沈殿物を８０℃で乾燥して乳鉢と乳棒で粉砕した。

【０１８１】

実施例９

共有結合した有機層によってコーティングされた磁性ナノ粒子の合成

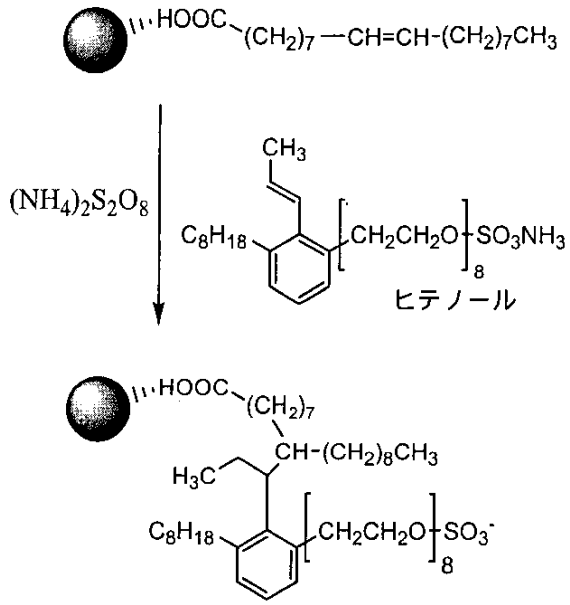
この実施例は、コロイドとして安定した磁性ナノ粒子の調製法を説明するためのものである。この高いコロイド安定性は、第１の炭化水素層に共有結合した第２の有機層中に、ポリ（エチレンオキシド）とスルホネート基を有する親水性部分が存在することによるものである。

【０１８２】

１００ｇの水に９４ｇのＦｅＣｌ$_3$・６Ｈ$_2$Ｏと３４．４ｇのＦｅＣｌ$_2$・４Ｈ$_2$Ｏを加えた溶液を窒素ブランケット下、８０℃で３０分攪拌した。次いで水に４０％オレイン酸カリウムを分散したペースト状分散液（Ａｌｄｒｉｃｈ，ＣＡＳ　１４３－１８－０，ｐＨ１２．５）を加え、得られた混合物を８０℃で３０分攪拌した。粘性を有する茶色の懸濁液が得られた。次いでＮＨ$_4$ＯＨの２８％水溶液（１００ｍＬ）を混合物に加えると、黒色で、オレイン酸のコーティングを有する磁性ナノ粒子が沈殿した。攪拌、窒素バブリングを行いながら８０℃で３０分反応を行った。この後、Ｈｉｔｅｎｏｌ　ＢＣ－１０の分散液（Ｄａｉｉｃｈｉ　Ｋｏｇｙｏ　Ｓｅｉｙａｋｉ，Ｌｏｔ＃０４４７６０）（１

００ｇ）をコーティングされた磁性粒子に加えた。攪拌とバブリングを継続し、新たに調製した過硫酸アンモニウムの溶液（２０ｍＬの水に５ｇ）を反応混合物に加えた。窒素ブランケット下、激しく攪拌しながら８０℃で２時間反応を行い、Ｈｉｔｅｎｏｌのプロペニル基の共有結合と、オレイン酸のアルキル鎖の二重結合を反応させた。次いで反応装置を室温にまで冷却して分解した。強い磁性を有し、コロイド安定性が高い黒褐色の液体が生成した。この分散液を透析水に対して透析し、７０℃で乾燥した。得られた粒子を水に再分散すると、この分散液は任意のｐＨにおいて水中でのコロイド安定性が高く、発酵液の存在下でのコロイド安定性が高かった。Ｈｉｔｅｎｏｌ　ＢＣ－１０の化学式をスキーム１に示す。スキーム１には、合成マグネタイトのコロイド安定性を与えるポリ（エチレンオキシド基）とスルホネート基が示されている。

【化１５】




**スキーム１．コロイド安定磁性粒子の構造**

【０１８３】

実施例１０

実施例９で述べたナノ粒子の特徴付け

実施例９で述べた磁性ナノ粒子を、その粒径に関しては動的光散乱装置（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ社）によって、その電気泳動特性についてはＳｍｏｌｕｃｈｏｗｓｋｉζ電位モデルを用いたビルトインソフトウェアを有するＺｅｔａＰａｌｓゼータ電位分析器（Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ社）によって、特徴付けを行った。この結果を図１０に示した。図に示されるように、粒子は約２０ｎｍの数平均径を有し、バイオプロセスに典型的なｐＨ（約７）を含む非常に広範囲のｐＨにおいて負の表面電荷を示した。したがってこの粒子は電荷的に安定であり、永続的に分散状態に保たれる。室温にて１ｍＭ　ＫＣｌに懸濁した１０００ｐｐｍナノ粒子懸濁液で、ｐＨを酢酸またはＮａＯＨで調整してζ電位を測定した。

【０１８４】

実施例１１

電極法（Ｇａｓｓｉｎｇ－ｏｕｔ法）による無細胞培地における酸素移動促進の特徴付け

実験に使用する器具は、２００ｍＬの溶液（水のみ、または水と磁性ナノ粒子）を充填した２５０ｍＬの円筒形のビーカーである。溶存酸素は、データ取得計（ＹＳＩ５１００

）に接続された溶存酸素ポーラログラフィックセンサー（ＹＳＩ５０１０）によって測定する。この溶存酸素計は、各測定間での若干の大気圧の変動を補正する内蔵型の気圧計を有している。ビーカーの温度は水浴によって３７±０．５℃に調節され、溶液のｐＨは実験開始前に７，０に調整される。

【０１８５】

結果を図１２に示す。この結果は、第１の工程において、溶存酸素濃度が０に低下するまで窒素をスパージし、次いで第２の工程において、液体の自由面が室内の空気に触れることによる溶存酸素濃度の増加を観測することによって得られたものである（図１２にはこの第２工程のみを示した）。一定の気液界面を確保して実験を容易に行うために、第２工程では空気のスパージングを行わなかった。比較的長時間（～１時間）で実験を行うことで、プローブの時定数によって応答曲線が影響されることがなくなる。

【０１８６】

図１１のデータは、粒子濃度の増大にともなって応答時間が減少することを示している。

【０１８７】

実施例１２

炭化水素コーティングを有する磁性ナノ粒子の無害性

実施例９で合成したナノ粒子のＥ．ｃｏｌｉ細胞に対する毒性について振盪フラスコ実験で試験した。使用したＥ．ｃｏｌｉ菌株は、ＢＬ２１（ＤＥ３）［ｐＵＣ１８］である。初めにＬＢ培地で種培養を行った。ＬＢ培地の組成（／Ｌ）は下記のとおり。１０ｇＮａＣｌ、１０ｇトリプトン、５ｇ酵母抽出物。Ｅ．Ｃｏｌｉ細胞を、５００ｍＬの振盪フラスコに入れた１００ｍＬのＬＢ培地中で、３７℃、２２０ｒｐｍで一晩培養した。その後、発酵培養用のＭＲ培地が入れられた５００ｍＬ振盪フラスコに種培養をピペットで加えた。各フラスコには１５ｇ／Ｌのグルコースと１０％（ｖ／ｖ）の播種された種培養を含む１００ｍＬのＭＲ培地が入れられている。ＭＲ培地の組成（／Ｌ）は次のとおり。１３．５ｇ$KH_2PO_4$、４．０ｇ$(NH_4)_2HPO_4$、０．７ｇ$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、０．８５ｇクエン酸、１０．０ｍＬの１０ｇ／Ｌ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$、１０．０ｍＬの微量金属溶液（ＴＥ）、及び１．０ｍＬの２０ｇ／Ｌ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$。各フラスコには更に以下の濃度で異なる量の磁性ナノ粒子が加えられている。すなわち全部で４本のフラスコに対して０％（対照）、０．５％、１％、２％である。４本のフラスコを用いて３７℃、２２０ｒｐｍで発酵培養を行った。分光光度計（Ｈｅｗｌｅｔｔ Ｐａｃｋａｒｄ８４５２Ａ）で６００ｎｍの光学密度を測定し、細胞増殖の指標とした。

【０１８８】

図１３及び１４に示されるように、炭化水素コーティングを有する磁性粒子は無毒性であり、細胞増殖を阻害しない。

【０１８９】

実施例１３

実験室スケールの発酵器における酸素移動促進の亜硫酸塩酸化法による特徴付け

Ｉｎｇｏｌｄ型のｐＨ電極、溶存酸素電極（Ｂｉｏａｆｉｔｔｅ）及び温度プローブを備えた２０Ｌ（５．５Ｌ作用容積）攪拌槽型反応装置（Ｂｉｏａｆｉｔｔｅ ｆｅｒｍｅｎｔｏｒ ｓｙｓｔｅｍ，ｍｏｄｅｌ ＢＬ２０．２）で実験を行った。攪拌槽は、４基のブランド回転式スパージャーからなる底部通気部を有し、３枚羽タービン型遥動器によって遥動させた。初めに反応装置に０．６７Ｍの亜硫酸ナトリウム溶液を供給し、次いで硫酸銅触媒の$1 \times 10^{-3}$Ｍ溶液を加えた。初めに硫酸でｐＨを約８．０程度に調整して高ｐＨの亜硫酸ナトリウム溶液で通常見られる反応の加速を防止した。温度は３７±０．５℃に維持した。添加した亜硫酸ナトリウムの量は溶存酸素濃度を長時間にわたって０に近い値に保つのに充分な量である。本実験では所定の遥動速度と所定の通気速度として定義される実験条件を選択し、質量分析器（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ ＭＧＡ１６００）を用いてオフガス組成を記録した。オフガス組成の値が安定化した時点で、式［４］及び［５］を用いて物質移動係数の値を計算した。この手順を異なる実験条件について繰り

返した。

【０１９０】

実施例１４

発酵プロセスにおける炭化水素コーティングを有する磁性ナトリウムによるＥ．ｃｏｌｉ増殖の促進

発酵実験を行って本発明の粒子の酸素に対する物質移動促進能を調べた。実施例９で合成した磁性ナノ粒子を０．５６％（ｗ／ｖ）の濃度で発酵実験に用い、下記の実験条件で実験を行った。

【０１９１】

－最初にそれぞれ１００ｍｌのＬＢ培地が入れられた５本の５００ｍｌの振盪フラスコ中、３７℃、２２０ｒｐｍで一晩種培養を行った。

【０１９２】

－次に２０Ｌ発酵器（５．５Ｌ作用容積）で発酵培養を行った。

【０１９３】

接種容積は種培養から１０％（ｖ／ｖ）とし、温度、ｐＨ、通気速度及び遥動はそれぞれ３７℃、７．０±０．１、５．０ｓｌｐｍ及び３００ｒｐｍとした。発酵は、５０ｇ／Ｌのグルコース濃度から開始してバッチモードで行い、この濃度が０に低下するまで行った。使用した培地は実施例１２で使用したものと同じＭＲ培地に５０μｇ／ｍｌのアンピシリンを添加したものを用いた。実験全体を通じ、細胞の代謝によって生成する細胞外生成物や粒子による発泡を、ＤＯＷ　ＣｏｒｎｉｎｇＱ７－２２４３及びＳＩＧＭＡ２０４消泡剤の組合せを用いて制御した。

【０１９４】

実施例１５

二酸化炭素の移動が可能な共有結合有機層によってコーティングされた磁性ナノ粒子の合成

１００ｇの水に４７ｇのＦｅＣｌ$_3$・６Ｈ$_2$Ｏと１７．２ｇのＦｅＣｌ$_2$・４Ｈ$_2$Ｏを加えた溶液を窒素ブランケット下、８０℃で３０分攪拌した。次いで水にオレイン酸カリウムを加えた溶液（１００ｇ、２０％）（Ａｌｄｒｉｃｈ，ＣＡＳ　１４３－１８－０，ｐＨを氷酢酸によって１２．５から７．０に調整）を加え、得られた混合物を８０℃で３０分攪拌した。粘性を有する茶色の懸濁液が得られた。次いで［２－（メタクリルオキシ）エチル］－トリメチルアンモニウムクロリド（Ａｌｄｒｉｃｈ，ＭＷ　２０７．７，ｄ＝１．１０５，ＣＡＳ　５０３９－７８－１）の７５％溶液を混合物に加えた。撹拌とバブリングを継続し、４ｇ過硫酸アンモニウムの水溶液（全体で１０ｍＬ）を混合物に加え、得られた懸濁液を撹拌下、８０℃に１時間保った。次いでＮＨ$_4$ＯＨの２８％水溶液５０ｍＬを加えると、分散液は黒色に変化した。撹拌及び窒素バブリングを行いながら８０℃で３０分反応を行い、反応装置を室温にまで冷却し、分解した。強い磁性を有する磁性流体が生成した。磁性流体は室温で永続的なコロイド安定性を示した。

【０１９５】

実施例１６

磁性粒子による二酸化炭素の移動

実施例１５で合成した磁性ナノ粒子の、１００ｍＭ　ＮａＣｌを含む１０％水溶液を調製した。溶液のｐＨは最初にＮａＯＨで１２．５に調整した。この溶液５００ｍＬを、６００ｍＬのビーカー中で、２３．４℃の一定温度にて撹拌下、ＣＯ$_2$（識別番号：ＵＮ１０１３）でスパージングし、ＣＯ$_2$の吸収によるｐＨの変化をｐＨプローブ（Ｂｅｃｋｍａｎ　ｆＴＭ４０）にて記録した。水溶液中では、二酸化炭素は異なる形態で存在する。まず二酸化炭素は水に溶解する：

ＣＯ$_2$（ｇ）→ＣＯ$_2$（ａｑ）

次に溶存ＣＯ$_2$とＨ$_2$ＣＯ$_3$（炭酸）との間に平衡状態が確立される。

【０１９６】

ＣＯ$_2$（ａｑ）＋Ｈ$_2$Ｏ（ｌ）→Ｈ$_2$ＣＯ$_3$（ａｑ）

図１９は、上記に述べた磁性ナノ粒子溶液のＣＯ$_2$スパージングによるｐＨの低下を対照のｐＨ低下と比較して示したものである。対照は水に１００ｍＭ　ＮａＣｌが溶解したもので磁性粒子を加えていないものである。系におけるＣＯ$_2$の流速が同じである場合、ｐＨの変化は磁性ナノ粒子で大幅に遅いことが観察される。

【０１９７】

こうしたｐＨの遅い変化は、ナノ粒子の炭化水素コーティングにＣＯ$_2$が選択的に可溶化した結果と考えられる。

【０１９８】

文献援用

本明細書で引用した特許ならびに刊行物をすべてここに援用するものである。

【０１９９】

均等物

当業者であれば、通常の実験以上のことを行わずしてここに述べた発明の特定の実施の形態に多くの均等物が存在することが認識されるか、もしくはそれを実証することが可能である。こうした均等物は特許請求の範囲に包含されるものである。

【図面の簡単な説明】

【０２００】

【図１】図１は、実施例１で述べる、フルオロポリマーによって改変された磁性ナノ粒子のζ電位及び重量平均径をｐＨの関数として示す図である。

【図２】図２は、実施例１で合成したフルオロポリマー改変磁性ナノ粒子の毒性試験の結果を示す図である。Ｅ．ｃｏｌｉの細胞の増殖を６００ｎｍでの光学密度を測定することによって観測した。ナノ粒子の重量比率を図に示す。

【図３】図３は、フルオロポリマー改変磁性ナノ粒子（発酵培地中４ｗｔ％）が、発酵プロセスにおけるＥ．ｃｏｌｉの増殖に与える影響を示す図である。

【図４】図４は、実施例５で調製した磁性液体の毒性試験の結果を示す図である。

【図５】図５は、実施例７で合成したフルオロポリマー改変磁性ナノ粒子の毒性試験の結果を示す図である。Ｅ．ｃｏｌｉの細胞の増殖を６００ｎｍでの粒子／細胞懸濁液の光学密度を測定することによって観測した。粒子の含量を容量比率で図に示す。

【図６】図６は、実施例７で合成したフルオロポリマー改変磁性ナノ粒子の毒性試験の結果を、細胞増殖及び分裂の指標であるグルコース消費量の観点から示す図である。粒子の含量を容量比率で図に示す。

【図７】図７は、Ｚｏｎｙｌ（登録商標）ＴＭ、ＭＡ、及びＥＧＤＭＡからなるフルオロゲルを破砕後、水中で膨潤させ、凍結乾燥したもののＳＥＭ顕微鏡写真である。

【図８】図８は、Ｚｏｎｙｌ（登録商標）ＴＭ、ＭＡ、及びＥＧＤＭＡからなるフルオロゲルを破砕後、水中で膨潤させ、凍結乾燥したものの内部のマグネタイト粒子のＳＥＭ顕微鏡写真である。

【図９】図９は、フルオロポリマー（Ｚｏｎｙｌ８７４０）でコーティングした磁性粒子について「振盪フラスコ」実験を行った試験結果を示す図である。粒子を加えない標準的増殖培地で対照試験を行った。Ｅ．ｃｏｌｉ細胞の増殖は、６００ｎｍでの相対吸光度の増加で示される。

【図１０】図１０は、実施例９で述べる、炭化水素及びＨｉｔｅｎｏｌによって改変された磁性ナノ粒子のζ電位及び数平均径をｐＨの関数として示す図である。

【図１１】図１１は、磁性ナノ粒子濃度の上昇にともなう溶存酸素の応答曲線である。

【図１２】図１２は、異なる粒子濃度における溶存酸素の応答曲線の線形化を示す図である。傾きの絶対値は$k_L a$値を示す。

【図１３】図１３は、実施例９で合成した粒子の毒性試験を示す図である。Ｅ．ｃｏｌｉの細胞増殖を６００ｎｍでの光学密度を測定することによって観測した

【図１４】図１４は、実施例９で合成した粒子の毒性試験を示す図である。グルコースの消費量は細胞の増殖を示している。

【図１５】図１５は、対照（０％粒子）と比較した場合の、１．４％（ｗ／ｖ）の粒子の

存在下での$k_L a$と単位体積当りの入力（Ｐｇ／ＶＬ）との相関を示す図である。$k_L a$の単位はｍｍｏｌ（Ｌ＊ｈｒ＊ａｔｍ）であり、Ｐｇ／$V_L$の単位はＨＰ／１０００Ｌである。気体化入力は通気数相関を用いて算出した（Ｏｙａｍａ，　Ｕ．，　Ｅｎｄｏｈ，　Ｋ．，　Ｃｈｅｍ．　Ｅｎｇ．，　１９５５，　１９，　２）。

【図１６】図１６は、粒子を用いずに行った発酵と比較した場合の、０．５６％（ｗ／ｖ）の炭化水素でコーティングした磁性ナノ粒子を用いた発酵の、時間に対する光学密度を示す図である。

【図１７】図１７は、粒子を用いずに行った発酵と比較した場合の、０．５６％（ｗ／ｖ）の炭化水素でコーティングした磁性ナノ粒子を用いた発酵の、時間に対するグルコース濃度を示す図である。

【図１８】図１８は、粒子を用いずに行った発酵と比較した場合の、０．５６％（ｗ／ｖ）の炭化水素でコーティングした磁性ナノ粒子を用いた発酵の、時間に対する酸素吸収量を示す図である。

【図１９】図１９は、実施例１６で調製した磁性ナノ粒子の１０％水溶液における、$CO_2$スパージによる経時的ｐＨの変化を示す図である。

【図２０】図２０は、発酵における酸素移動量と、幾つかの関連したパラメータ及び測定値を示す図である。

【図２１】図２１は、コアが炭化水素二重層をともなっている本発明の一実施形態を示す図である。

【図２２】図２２は、コアが酸化鉄であり、炭化水素二重層がオレイン酸コーティング及びＨｉｔｅｎｏｌコーティングを有する本発明の一実施形態を示す図である。

【図２３】図２３は、粒子が存在する場合の水中の$O_2$濃度の初期の物理的状態を粒子が存在しない場合と比較した図である。

【図２４】図２４は、遥動ビーカーで物質移動の特徴付けを行うための実験装置を示す図である。この装置では、簡単なシステムで粒子をスクリーニングして物質移動を促進することが可能である。この装置の利点としては、１）初めにパージしたシステムの表面の通気による酸素吸収を調べることができる、２）緩慢な速度論を簡単に調べることができる、３）境界層効果のみであり、気泡のサイズやホールドアップ効果による問題がない、といった点が挙げられる。

【図２５】図２５は、式：促進率＝（$k_L a$）粒子／（$k_L a$）水　によって測定される、異なる粒子の比率及び異なるＲＰＭで得られる酸素促進率を示す図である。

【図２６】図２６は、経験的ラングミュア型等温線と促進率データとのフィットを示す図である。

【図２７】図２７は、亜硫酸酸化法の物質移動の特徴付けを行うための実験装置と異なるパラメータを示す図である。亜硫酸酸化反応は、式［３］によって説明される。酸素吸収速度は式［４］を用いて計算される。［$SO_3^{2-}$］＝０．６７Ｍ、及び［$Cu^{2+}$］＝$1 \times 10^{-3}$Ｍである。

【図２８】図２８は、亜硫酸酸化法におけるｌｎ（ｋａ）とｌｎ（Ｐｇ／$V_L$）及びｌｎ（$V_S$）を示す図である。Ｐｇ／$V_L$は、単位体積当りの入力であり、$V_S$は、見かけの速度である。

【図２９】図２９は、亜硫酸酸化法における一定の見かけ速度及び一定の単位体積当りの入力における促進効果を示す図である。

【図３０】図３０は、提案された促進効果の機構を示す図である。

【図３１】図３１は、ナノ粒子の界面活性を確立するための方法を示す図である。ナノ粒子を以下の方法によって精製して、すべての遊離界面活性剤を除去した。すなわち、１）４８時間の透析（微量の遊離界面活性剤が残留する）及び、２）浸透液に界面活性が見られなくなるまで遠心濾過のサイクルを繰り返す。

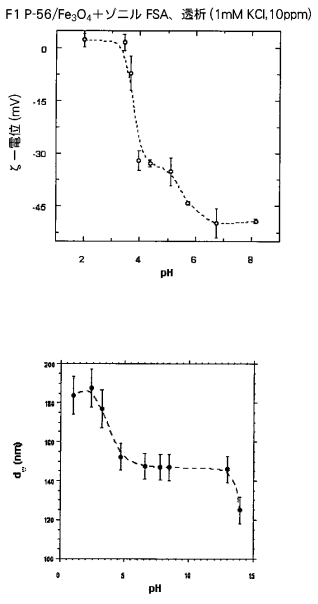
【図３２】図３２は、平衡状態の表面張力の濃度依存度を測定し、ギブズ吸収等温線を用いたデータを分析することによって表面過剰性を推定するための方法を示す図である。

【図３３】図３３は、粒子のＧＬ界面への拡散の特徴的時間スケールの算出法を示す図で

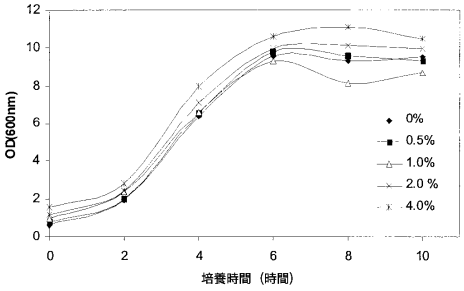
ある。

【図３４】図３４は、Ｅ．ｃｏｌｉを供給して行ったバッチ発酵プロセスの結果を示す図である。

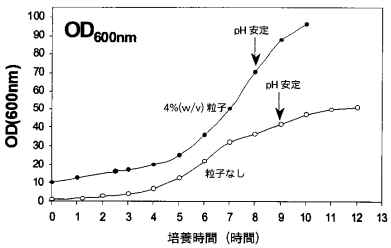
【図１】



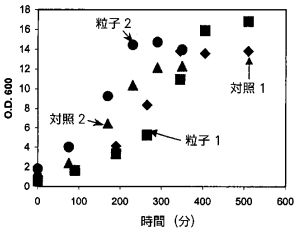

【図２】



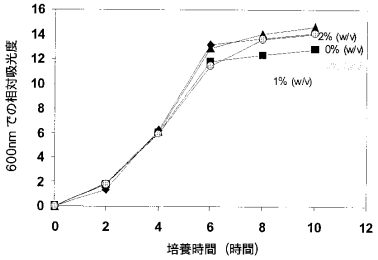

【図３】



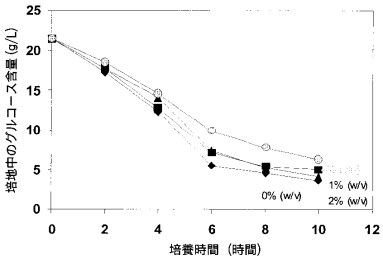
【図４】




【図５】




【図６】



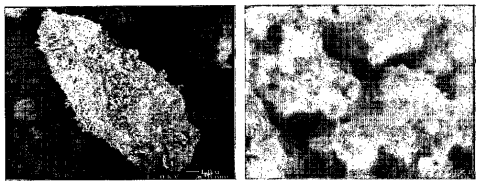

【図７】

Figure 7

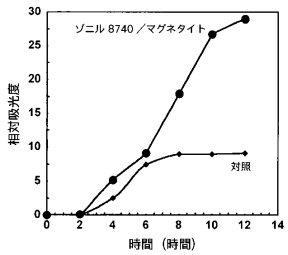


【図８】

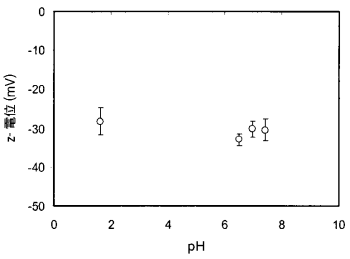
Figure 8

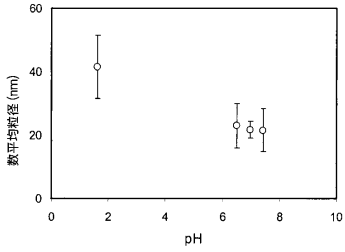


【図９】

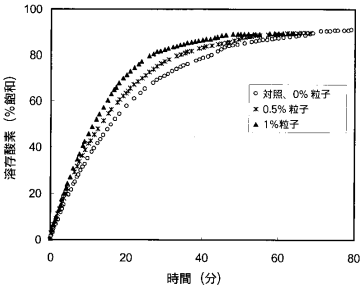



【図１０】

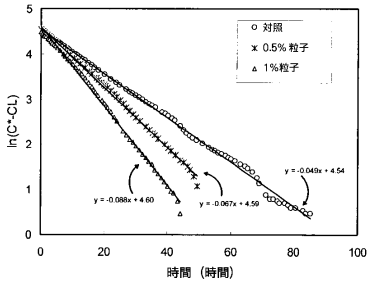


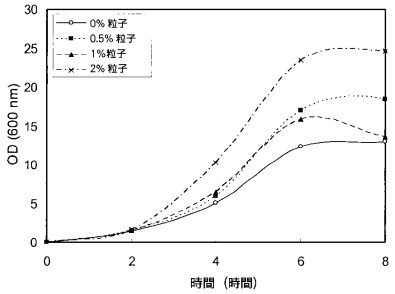
【図１１】



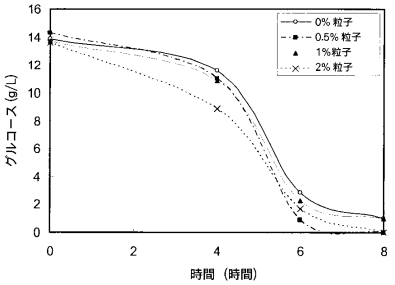

【図１２】



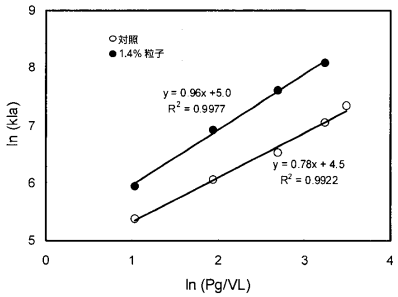

【図１３】



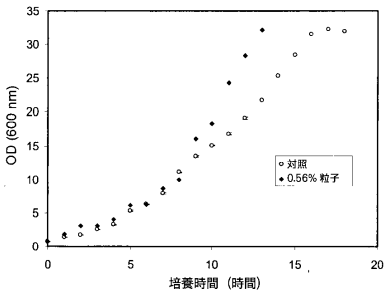

【図１４】



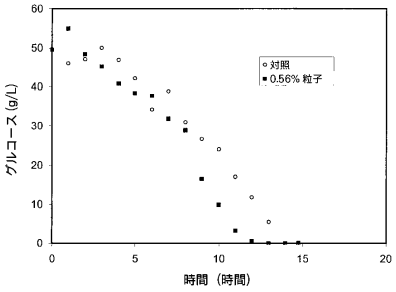

【図１５】



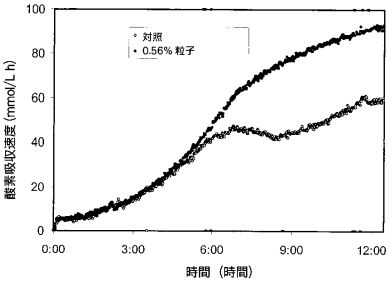

【図１６】



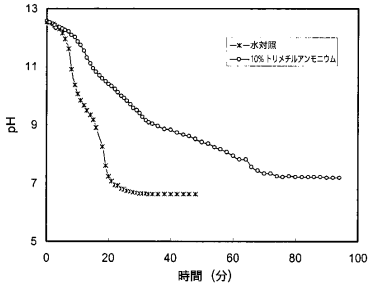

【図１７】



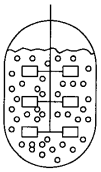

【図１８】



【図１９】




【図２０】



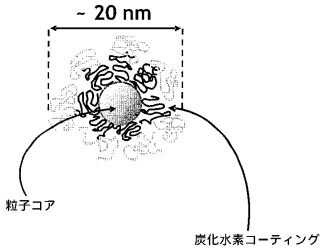
$$X_{max} = X_0 e^{\mu t}$$

$$N_A = X_{max}\mu / Y_{C/O} \sim 425 \text{ mmole } O_2/\text{L hr}$$

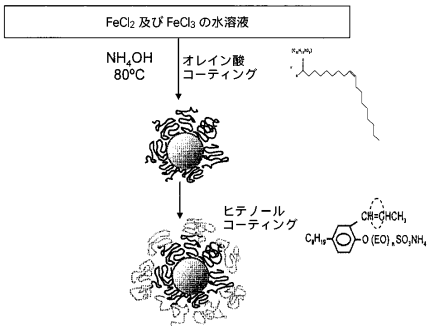
$$= k_L a(C^* - C_L) \sim 105 \text{ mmole } O_2/\text{L hr}$$

$(D_{O2}/\delta)$　気泡径　ヘンリーの法則定数に依存

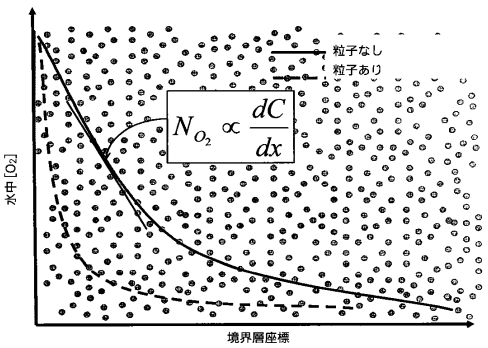
【図２１】



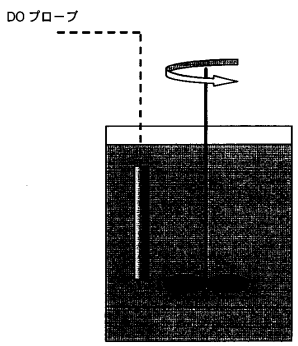

【図２２】



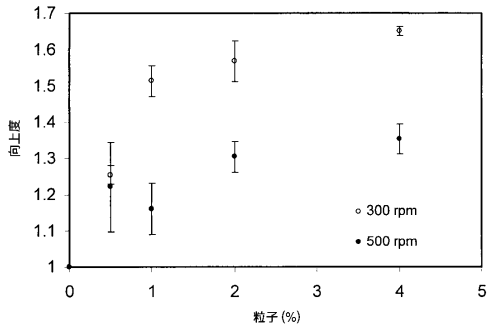

【図２３】



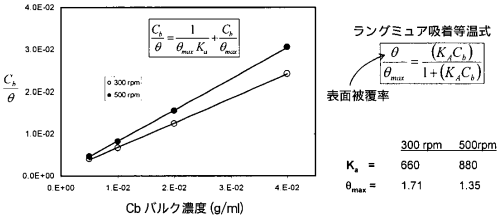

【図２４】




【図２５】

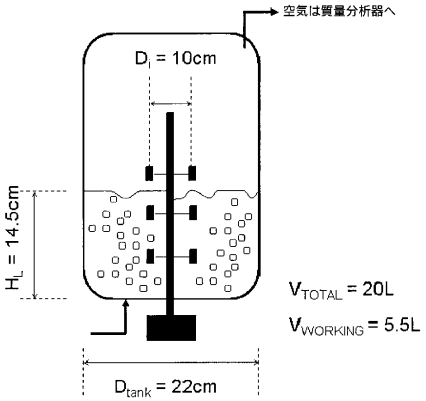



【図２６】

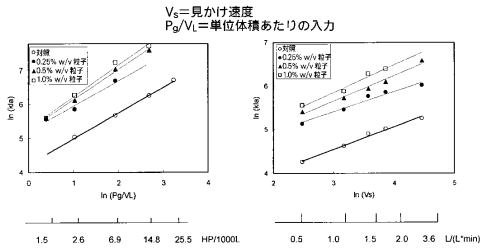



| | 300 rpm | 500rpm |
|---|---|---|
| $K_a$ = | 660 | 880 |
| $\theta_{max}$ = | 1.71 | 1.35 |

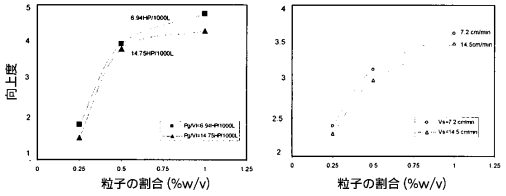
【図２７】



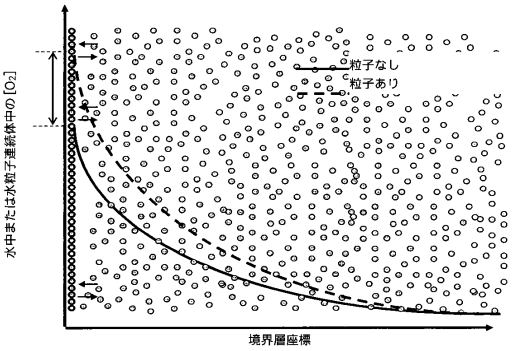

【図２８】



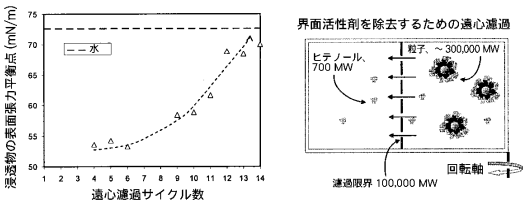

【図２９】



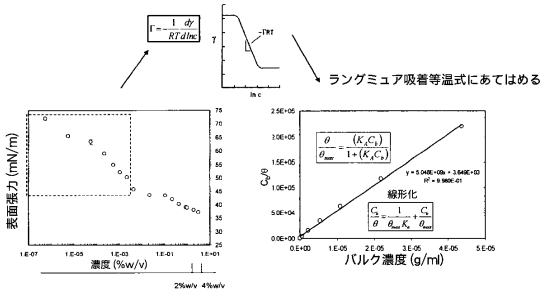

【図３０】




【図３１】

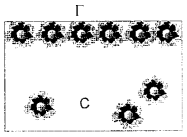



【図３２】




【図３３】

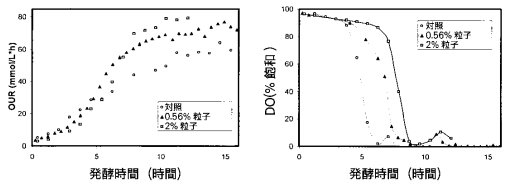
$$\tau_D = \frac{\ell^2}{D} = \frac{\Gamma^2}{c^2 D} \qquad \ell = \frac{\Gamma}{c}$$




$$\tau_D(\phi_p = 2\%\,{}^{w}\!/_{v}) = \frac{\left(1.98\cdot10^{-10}\,\frac{cm^2}{mol}\right)^2}{\left(3.94\cdot10^{-6}\,\frac{mol}{cm^3}\right)^2 2.4\cdot10^{-7}\,\frac{cm^2}{s}} = 10\,msec$$

無細胞系及び発酵系の関連した時間尺度 ＝～１秒

【図３４】



フロントページの続き

(72)発明者 ハトン，アラン ティー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０１７７６ サドバリー ウィラード グラント ロード ２０
(72)発明者 ワン，ダニエル アイ シー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４５９ ニュートン ナハントン ストリート ２７１
(72)発明者 イン，ジン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２４４－１８０４ サマーヴィル アーヴィング ストリート ２２ ナンバー３
(72)発明者 オッレ，ベルナット
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ０２１３９ ケンブリッジ パシフィック ストリート ７０ アパートメント ９３３エイ

審査官 横山 敏志

(56)参考文献 特開平０６－２０００４０（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０６３５３０３７（ＵＳ，Ｂ１）
特表平０８－５０６０８０（ＪＰ，Ａ）
特表２０００－５０４３００（ＪＰ，Ａ）
特開平０９－１００１１２（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５２６７１９（ＪＰ，Ａ）
Kwon Taek LIM, et al., Formation of TiO2 nanoparticles in water-in-CO2 microemulsions, Chemical Communications, 21 July 2002, No.14, pp.1528-1529

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C01G1/00-99/00
C08J3/20
B82B1/00
B82B3/00
CAplus(STN)
JSTPlus(JDreamII)
Science Direct