

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

MRI・蛍光同時計測による生体内分子・細胞イメージング法の開発

### 2. 氏名

森田 将史

### 3. 研究のねらい

ゲノム情報が明らかになりつつある現在、再生医療や免疫療法での移植細胞や疾患における異常細胞での重要なバイオマーカー分子の生体内での時間的、空間的な振舞いを知ることは、治療の効果や病態変動を知るうえで重要である。とくに、再生医療や細胞治療を効率的に行うためには、まず生体外から投与した細胞が生体内のどこに位置するか確認し、その後、検出部位での生理的機能の発現を低侵襲的手法により分子レベルで確認する必要がある。低侵襲的なラベリング手法としては、超常磁性微粒子を用いたMRIによる方法があるが、この方法で長期に細胞追跡を行うと、鉄微粒子の被膜が分解されて毒を発生し、安全性に問題が生じることが分かってきている。また、分子・細胞レベルの解析は個体でなく取り出した組織切片で行う必要がある。T<sub>2</sub>ブロードニング効果により、細胞トラッキングはできても、生体機能の指標となる化合物のMR信号が低下してしまい、メタボミクス解析ができない、等の問題点があることも分かった。そこで、投与した細胞の体内動態を臓器レベル、および標的組織での細胞レベルで同時に確認するため、MR信号増強(T<sub>1</sub>短縮)効果を保持し、かつ近赤外蛍光する生体に毒性のない光・磁場応答性ナノ粒子バイオプローブを開発することが必要となってくる。

上記プローブを開発するにあたり、本研究では、物理的、化学的に安定なダイヤモンドナノ粒子(ナノダイヤモンド; ND)に注目した。NDは、近年プリンキングのない蛍光プローブとしての利用や、いままでのMRIの時間・空間分可能を凌駕する磁力計への応用など、ナノバイオイメージング領域への展開を見せており、近年注目されているナノ粒子である。本研究では、ほぼ炭素原子だけからなるため生体適合性に優れ、かつ高い剛性を持つと期待されるND内部に、毒性の高い常磁性イオンをイオン注入法により閉じ込める技術を確立することを目指した。この技術を用いて、臓器レベルから細胞レベルまでのマルチスケールでの分子イメージングを可能にする磁場・光応答性マルチモーダルダイヤモンドナノ粒子を創製し、マルチモーダル分子・細胞イメージングへの応用を図ることを目指した。

### 4. 研究成果

#### (1) ND への効率的イオン注入法の確立と注入後処理によるマルチモーダル ND の合成

NDへのイオン注入は、主にHイオン、Heイオン、およびNイオンなど軽元素で主に行われてきたが、常磁性イオン注入に関しては、技術が確立していなかった。そこでまず常磁性遷移金属イオンであるMn<sup>+</sup>イオン注入技術の確立を目指した。バルクダイヤモンドへのMnイオン注入深度を、イオン注入でよく使用されるシミュレーションソフトであるSRIMにより予測した。その結果、1段注入(例えば、緑線の100keV)では、表面から80nm程度までしか侵入せず、50nm前後にMn<sup>+</sup>イオンが局在するが、注入エネルギーを50、100、160KeVの3種類で行うと、深さ方向により均一にイオン注入でき、130nm程度まで侵入できることが分かった。そこで、4インチのシリコンウエハ上にNDが約200、または400nm程度の膜厚になるようにスピコーターで薄膜化し、それぞれ3段注入、および1段注入で1x10<sup>16</sup>/cm<sup>2</sup>の濃度の

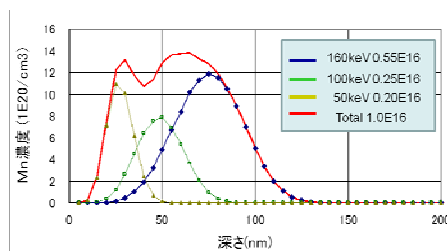


図1. SRIMによる効率的イオン注入条件の予測

Mn<sup>+</sup>イオンを注入した。本研究では、両者の Mn<sup>+</sup>イオン注入方法で得られた ND(Mn-ND)サンプルを使用した。Mn<sup>+</sup>イオン注入後、真空中で、700°C、2 時間、および空气中で 425°C、5 時間で処理したのち回収した。TEM 画像から、イオン注入直後の Mn-ND、および注入後アニールと空気酸化処理した Mn-ND は、いずれも大きな構造変化は起こしていないことが分かった。

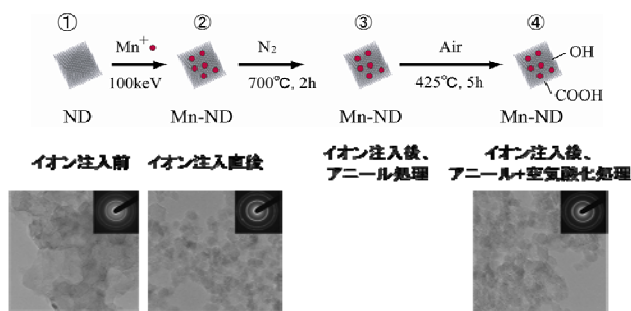


図 2. マルチモーダルナノダイヤモンドの合成方法

(2)マルチモーダルナノダイヤモンドの磁性評価方法の確立

合成した Mn-ND が、目的とするマルチモーダル造影剤として機能するかを調べるため、まず磁性機能を調べる方法の確立を目指した。MRI、および ESR による磁性評価、放射光分光による注入したイオンの注入後の処理による電子状態、および構造の変化の評価、および第一原理計算によるその評価を組み合わせる方法を確認した。

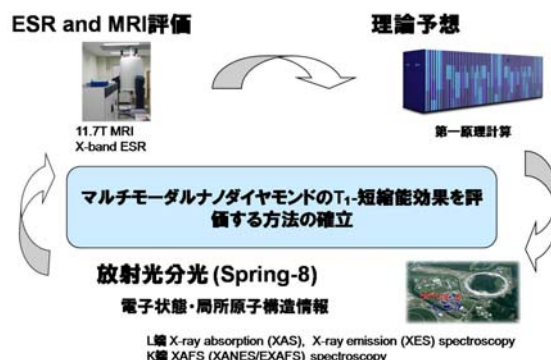


図 3. マルチモーダルナノダイヤモンドの磁場応答性の評価方法

まず、イオン注入、およびその後の処理サンプルの ESR 測定、および T<sub>1</sub> 強調画像撮影を行った。その結果、アニールと空気酸化した Mn-ND のみで、Mn<sup>2+</sup> イオンに由来する 6 本の ESR 信号、及び MRI での最も強い T<sub>1</sub> 短縮効果が見られた。この事実は、1 価で注入した Mn イオンが、ND 内部のダイヤモンド構造中で、2 価

Mn イオンとして安定に存在することを意味している。実際、MRI に効果を持つのは、いずれも 2 価の常磁性イオンになった場合のみであり、その 2 価イオンとしての安定性の原因を解明することは、効率的なイオン注入法の開発に役に立つと考えられる。そこで、放射光分光を用いた C の電子状態解析、Mn の電子状態と局所構造情報解析、および第一原理計算による ND 中に Mn イオンがエネルギー的に安定に存在できるかを理論予測を行った。まず、ダイヤモンド骨格そのものの安定性をより詳細に調べるため、炭素の K 殻励起吸収スペクトルを取得し、注入後のダイヤモンド構造の維持、および注入後処理の影響を探ることを目的とした。その結果、1. 285eV 付近の sp<sup>2</sup> 成分について、イオン注入後(青)でも、イオン注入前(緑)より、大きく増えない。2. 288eV 付近の sp<sup>3</sup> 成分は、どの条件でも大きく変化しない。3. アニール処理、空気酸化処理した後のサンプルでは、286.5eV 付近の酸素の成分が増えている、ことが分かった

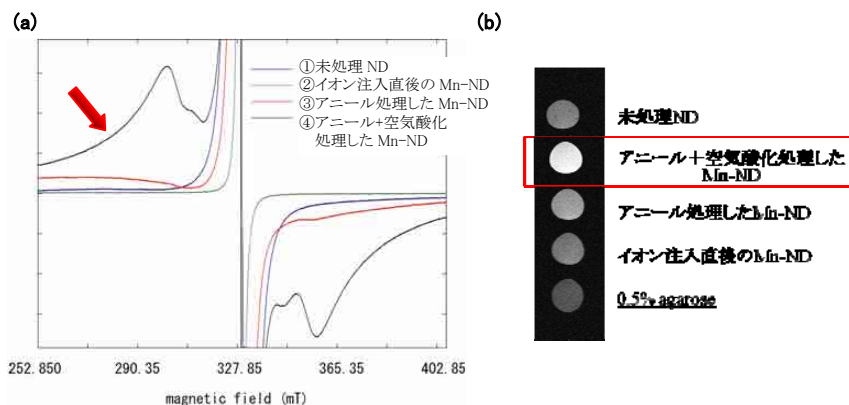


図 4. (a) X-band ESR アニール+空気酸化処理した Mn-ND(④; 矢印)のみ 6 本の高スピン信号が見られた。(b) 各処理後の各 T<sub>1</sub> 強調 MRI 画像 アニールと空気酸化した Mn-ND(□)が最も T<sub>1</sub> 短縮能が高かった。

(図 5)。以上の結果から、Mnイオン注入は、ナノダイヤモンド構造に対して、構造変化を引き起こさず、内部に滞留できていると考えられる。

次に、注入された Mn イオンの電子状態、およびダイヤモンドの C 原子との混成状態を構造情報から探ることとした。まず、Mn の電子状態については、以下のことが分かった。すなわち、イオン注入直後の Mn イオンは、2 価と 3 価が共存した(黒)が、アニールにより、MnO のスペクトル(青)とピークが一致した(赤)ことから、ほぼすべての Mn イオンが 2 価の状態になり、さらに空気酸化を施しても、Mn イオンは 2 価のまま、変化しなかった(緑)(図 6 (a))。以上の結果

から、MRI に効果がある 2 価の Mn イオンにするには、アニールが必要で、その結果形成された磁性センターは、非常に安定であることが分かった。

次に、Mnイオンが 2 価に安定に存在できることが理論的にも示唆されるかを調べるため、第一原理計

算によるスピン密度分布とその構造予想を行った(NIMS館山佳尚博士からの協力)。その結果、Mnは、歪んだ三方晶系六配位構造にある[V2:Mn]構造を取ることが分かった。また、スピン密度は、Mn原子に局在していた(図 6 (b))。このため、CとMnの混成が弱いため、電子緩和時間の長くなり、 $T_1$ 短縮能の増強に効果を持つと考えられた。

この予想を確認するため、イオン注入後の ND 内部での Mn イオンの炭素原子との結合状態を調べるために、Mn の K 殻 XAFS スペクトルを取得し、その安定性の構造基盤を探ることを目的とした。測定の結果、以下のことが分かった。1. イオン注入直後の動径分布関数は、1つのピークしか見られなかった(緑) 2. 真空中での 700℃、2 時間のアニールにより、第一、および第二近接のピークが見られ(青)、 3. アニール後の 425℃、5 時間の空気酸化でも、この傾向は変わらなかった(赤)。MRI に効果のある Mn-ND<sub>ao</sub> のデータを基に、DFT 計算により、求め ND 中の Mn イオンがもっとも安定な構造をモデル座標として、Artemis によるフィッティングを行ったところ、第一近接が、約 1.88 Å、第二近接が、2.67 Å であることが分かった。以上の結果からも、MRI に効果があると期待される常磁性イオンである 2 価の電子状態をとるようするにはアニールが必要であり、その構造は、理論から予想されたとおり、Mn イオンが周りの C と 6 配位を取ることにより安定していることが分かった(図 6 (c))。

### (3)マルチモーダルナノダイヤモンドの光学特性の評価

Mn-ND の光学特性を調べるために、単粒子蛍光解析を行った。その結果、NV センターと同様の退色のない蛍光特性を示すことが分かった(図 7)。このことは、Mn イオン注入のみで、マルチモーダルナノダイヤモンドが合成できたことを意味する。

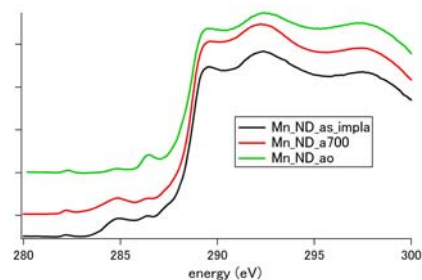


図 5. 放射光分光によるナノ粒子の C 原子骨格の電子状態

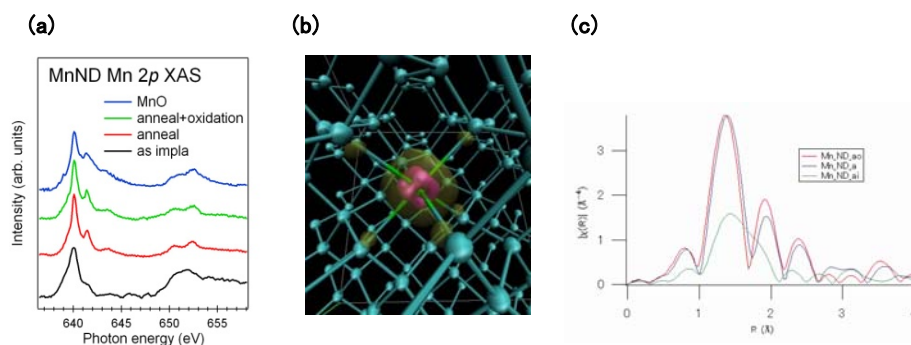


図 6. 放射光分光と理論計算によるナノ粒子内部での Mn イオンの電子状態、構造解析および安定構造予測 (a)SPRING-8 で取得した Mn2p 吸収スペクトル(XAS) (b)第一原理計算から予想されるスピン密度分布と[V2:Mn]構造 (c) イオン注入後の各処理による動径分布関数の変化

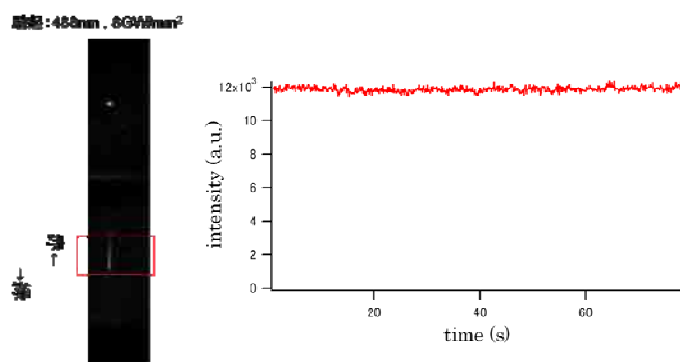


図 7. Mn イオン注入ナノダイヤモンドナノ粒子の蛍光画像と分光情報  
左図上部にある輝点 1 個が、Mn-ND1 個の蛍光で、その下がその分光画像である。右図から、退色がないことが分かる。

以上の結果から、ND 内部に 1 価で注入した Mn イオンは、アニールと空気酸化処理を施すことでほぼ 100%、2 価の高スピン状態に活性化させることができると同時に、元々含まれた N とイオン注入時に生じた欠陥との NV カラーセンターを作成できる効率的なマルチモーダルナノ粒子合成法を確立したことを意味する。

## 5. 自己評価

本研究では、磁場・光応答性マルチモーダル造影剤の開発と MRI・蛍光内視鏡マルチモーダルイメージングデバイスを開発することを目指した。前者は、ダイヤモンドナノ粒子(ND)への常磁性イオン注入法を確立し、Mnイオンのみで、NDへの磁場・光応答性を付与させることに成功した。当初は、MRI造影剤としては、 $T_2$ 短縮能を持つと思われたが、イオン注入技術の改善や放射光分光、および第一原理計算による物性理論的な観点からも検討を行い、 $T_1$ 短縮能を持たせることに成功した。さらには、当初予想していなかった単一Mnイオン注入のみでの磁場・光応答性マルチモーダル造影剤が合成できたことは、大きな成果と考えられる。後者のデバイス開発に関しては、おもに蛍光内視鏡に必要な基盤技術の確立には、一応の成果は見られたものの、実際にマルチモーダル画像を取得するところまでには至らなかった。今後の課題としたい。

## 6. 研究総括の見解

常磁性 Mn イオンをナノダイヤモンド(ND)に注入し、蛍光性でかつ MRI 適用可能性を示したことは評価する。マルチモーダル造影剤である ND がともかく開発された。しかしながら、生体適応性や感度の検討、さらには本来の目標である生体への適用は今後の課題として残された。今後の進展を期待したい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)特許出願

研究期間累積件数: 3件(うち1件は出願公開前)

発 明 者: 森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、佐々木玄

発明の名称: MR 画像法に利用する生体標識用ナノダイヤモンド

出 願 人: 株式会社イオン工学研究所

出 願 日: 平成18年9月27日

発 明 者： 森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、川野輪仁、西田幸子  
発明の名称：微細粉末へのイオン注入方法  
出 願 人：国立大学法人滋賀医科大学、株式会社イオン工学研究所  
出 願 日：平成 20 年 7 月 7 日

(2) 著書

・森田将史、マルチモーダル生体分子・細胞イメージングへの応用、p262-269 ”ナノ蛍光体の開発と応用” シーエムシー出版 (2007)

(3) 招待講演

招待講演(国内)

・Morita M., MRI and its application to visualization of physiological processes, The 84th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2007 年 3 月 20 日

・森田将史 ,MRI・蛍光による分子・細胞イメージング技術、第 64 回日本放射線技術学会シンポジウム、2008 年 4 月 4 日

・森田将史 ,分子・細胞イメージングのためのマルチモーダルイメージング技術、第 82 回日本生化学会学会シンポジウム、2009 年 10 月 21 日