

# ダイヤモンドを用いた光検出磁気共鳴顕微鏡: 新しい *in vivo* イメージング技術

五十嵐龍治

科学技術振興機構 / 京都大学

## 1. はじめに

生命科学者にとって最大の関心事は、今も昔も、生体内や細胞内の「どこで」「いつ」「何が」「どれくらい」起こっているかである。この疑問に答えるため、人類は「イメージング」という観察・解析手法を古くから用いてきた。たとえば中国では宋の時代に、火薬や羅針盤だけではなく、解剖図なるものが発明され、生命科学の大きな疑問にイメージングで答えようとした。17世紀以降は顕微鏡の性能が飛躍的に向上し、更に19世紀以降に染色技術が発達すると、細胞サイズでのイメージングも行えるようになった。20世紀以降はオルガネラサイズから分子サイズの蛍光イメージング技術が進歩し、更にビデオイメージングや超解像イメージング、深部観察などの技術革新によって「どこで」「いつ」という生命科学者の飽くなき探究心を満たし続けてきた。

ところが、イメージングを使って研究を進めると、私たちは必ずと言っていいほど巨大な壁に突き当たる。「で、結局何が起きているんだ?」と。実際、最近になってようやく、観たい現象や観たい物理量のみを画像化できる様々な分子プローブが開発され始めている。だが「どれくらい起きているか?」という疑問の根は更に深い。既存のイメージング技術を使う限り、運良く大きい／小さい、高い／低いといった粗い見積りができたとしても、位置以外の物理量について「~ケルビン」「~ミリボルト」「~ピコニュートン」などの具体的な値を示すことはほとんど不可能である。

この数年、量子センサーと光イメージングを組み合わせた新しい計測手法が密かに注目され始めている。…量子センサー? 私たち生命科学者には耳慣れない言葉である。一体何者だろう。量子センサーとは、難しいことは抜きにして言えば、「量子現象」を介して温

度、電場、磁場、圧力といった様々な物理量を私たちに与えてくれる万能センサーである。これまで私たちは、観たい現象に合わせてプローブの化学特性を設計し、場合によってはFRETやスプリットGFPなどを駆使してようやく計測したい物理量を「ザックリと」見積もることができずに過ぎなかった。しかし量子センサーを使えば、そんなことをせずとも、あたかも細胞に分子サイズの温度計や電圧計を取り付けるかのごとく、知りたい物理量を直接計測できる。多少大げさに言えば、そういったものである。

この量子センシング技術が生命科学者にとって手の届くものとなったのは1997年、実は20年も前の話である。今もこの分野を牽引するWrachtrupのグループは、この年、高感度のレーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いることで、ダイヤモンド窒素-空孔中心(Nitrogen-Vacancy center; NV中心)の量子現象が常温・常圧で観測可能であることを証明した<sup>1)</sup>。それ以前は、量子センサーと言えれば極低温など極端な条件でなければ使えない物にならない、というのがほとんど常識となっていた。しかし、彼らの報告以降は生命が生存可能な環境で量子センサーが使えるようになり、これ以降、生命応用への道が一気に拓けたのである。

## 2. どうやって物理量を計測するのか?

「一気に拓けた」と鼻息荒く言ってみたものの、実際のところ、生命科学者の腰はまだ重い。これは生命科学者に花粉症のごとく蔓延する「量子アレルギー」「ハミルトニアン過敏症」のせいではないか。そこで、「量子センサーを使って物理量を計測する」とはどういうことなのか、専門知識が無くとも理解できるように、NV中心を例として簡単なチャートで示してみた(図1)。まず物理量を計測する前に、私たちは①量子を「冷やす」必要がある。と言っても、本当に極低温

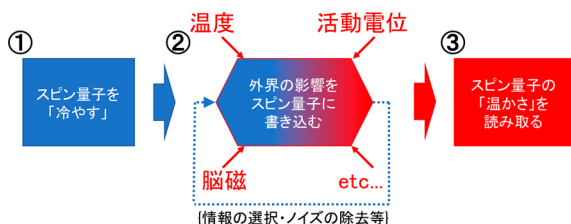


図 1

NV 中心を量子センサーとして物理量を計測する際のフローチャート。①初期化で量子を冷やし、②書き込みでの量子の温まり具合を③読み出しで観測する。この②書き込みをどう行うかによって、既存の光イメージングでは実現不可能な幅広い応用が考えられる。

に冷やしてしまったら生命現象は測れない。そこで、レーザーを使って量子の状態だけを冷やすのである。このステップを“初期化”“イニシャライズ”“偏極”などと呼んだりする。次にすべきことは、②外界の影響を量子に書き込むことである。温度、電場、磁場など外界の様々な影響を受けることで、量子の状態は変化し、冷やした量子が徐々に温まっていく。この「温まり方」が刻む指紋こそが量子に書き込まれた外界の情報なのである。そしてこの書き込み方法を工夫することで、私たちは欲しい情報だけを選択的に、高感度で取り出すことができる。このステップの制御は、NV 中心の様なスピン量子ならばマイクロ波やラジオ波で行い、“スピン制御”“サブレベルコントロール”“パルス系列”など我々にとっては耳慣れない言葉で呼ばれる。そして最後に、量子に書き込まれた情報を取り出すために、③量子の「温かさ」を読み取る必要がある。この「温かさ」の質と量を光で検出することで、私たちは欲しい物理量に直接触れることができる。このステップは“読み出し”“リードアウト”という平易な言葉で呼ばれるから、少しホッとする。

この技術が生命科学者にとってありがたいのは、光で検出する測定原理であるために、既存の光イメージング技術との親和性が極めて高い点である。①初期化と③読み出しに関しては普段の蛍光観察実験で使っている蛍光顕微鏡をそのまま、ほとんど手を加えずに使える。騙されたと思って、とりあえず私たちの作った装置「光検出磁気共鳴顕微鏡」を見ていただきたい(図 2a)<sup>2)</sup>。私自身はこれまでに 3~4 台ほどこういった装置を作っているが、全てベースはニコンさんの ECLIPSE やオリンパスさんの IX, BX といった一般的な蛍光顕微鏡である。こんな優秀な光学系が手頃な価格で市販されているのだから、もちろん使わない手はない。レーザーだって 100 mW 程度の一般的なものである。ただし、とにかく検出感度はいくらでも欲しい

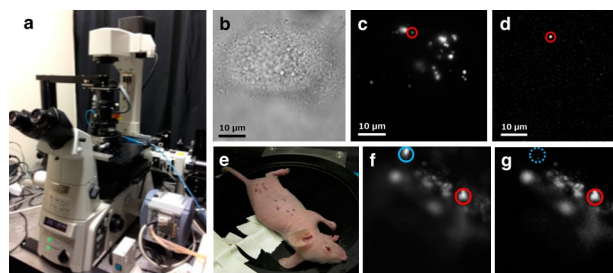
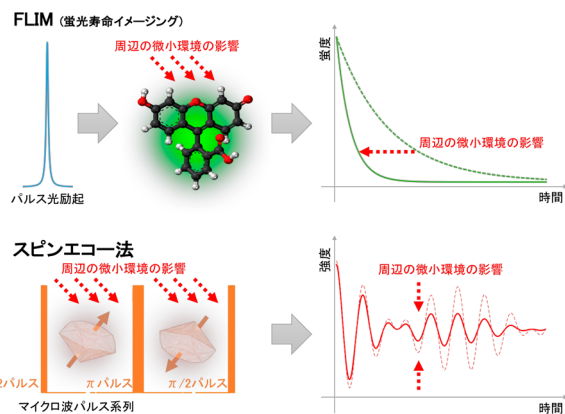


図 2

光検出磁気共鳴顕微鏡の一例。a, ニコンの顕微鏡に EMCCD とマイクロ波発振器を設置。b, c, d, 細胞 (b) での蛍光イメージ (c) とスピンイメージ (d)。e, f, g, マウス皮内 (e) での蛍光イメージ (f) とスピンイメージ (g)。いずれもナノダイヤモンドを導入して、(d) と (g) では NV 中心のスピン量子の状態のみを選択的に画像化している。

ので、検出器だけはフォトマルや普通の CCD ではちょっと心細い。市販品で十分だが、できればフォトンカウンターや EMCCD, 少なくとも sCMOS や冷却 CCD は使う必要がある。いずれにせよ、手許に高感度の蛍光顕微鏡があれば、量子センシングのためのイメージング装置は半分できたも同然である。

ところが、私たち生命科学者にとって最も敷居が高いのは②スピン制御の部分である。ここで私たちの量子アレルギーが再発してしまう。しかし、いくつかの基本的な方法は既に知られている。たとえばスピンエコー法では、マイクロ波を使って量子を操作し、しばらくそっとしておくという操作を繰り返すことで周辺の微小環境の影響(たとえば活性酸素濃度など)を電子スピンの緩和時間の変化として計測することができる(図 3)。生命科学者に馴染みのイメージング技術で言えば、感覚的には FLIM (蛍光寿命イメージング) とかなり似ているかもしれない。ただし量子センサーは、蛍光色素等よりも圧倒的に複雑な量子操作が可能であり、量子状態の寿命も非常に長く、蛍光寿命のみに頼る FLIM よりも多くのパラメータを与えてくれる。従ってスピンの制御方法を変えることで、極めて汎用性の高い計測センサーとして、多種多様な物理量の計測に適用できる。とは言え、やはりスピン制御は生命科学者にとって敷居が高すぎるかもしれない。ただ、これだけは知っておいていただきたい。「どんなスピン制御をすればよいのか?」という疑問は、生命科学者のみならず、量子技術の研究者にとっても未だ試行錯誤中の難題であり、まだまだ発展途上の段階にあると言える。だからこそ、ここで生命科学者が臆する必要はない。私たちが量子技術の研究者に意見と要求と課題をぶつけることで、量子センシング技術が大きく前へ進むチャンスが生まれるはずである。



**図 3** FLIM (蛍光寿命イメージング) とスピンエコー法の比較 (概念図). FLIM (上段) ではパルス光 (上段左) により蛍光色素が励起され (上段中), その蛍光緩和時間の変化を計測することで周辺微小環境の影響を検出する (上段右). これに対してスピンエコー法 (下段) では, 光偏極した NV 中心に対してマイクロ波パルスを  $\pi/2$ - $\pi$ - $\pi/2$  と等間隔で印加するが (下段左), この印加間隔に依存した蛍光信号の変化を計測することで周辺微小環境の影響を検出する (下段右). 右下の図はその一例を示す減衰振動信号 (模式図) で, 外界の影響で横緩和時間が短くなった場合にはこの様に信号の減衰速度が大きくなる.

### 3. どうやって生命計測に応用するのか?

では, ダイヤモンドをどう使えば NV 中心を量子センサーとして生命計測に応用できるのだろうか. それには大きく分けて 2 つのアプローチが用いられる. 1 つはダイヤモンド基板上に計測対象を置いて測る方法, もう 1 つはダイヤモンド自体をナノ粒子化して計測対象に導入する方法である. 何れも何れかが優れているというのではなく, お互い補完関係にある手法と言っていいたい.

まずダイヤモンド基板を用いる方法では, あたかも CCD で撮影する様な感覚で, 生体組織や細胞など計測サンプル全体の物理量を 2 次元イメージングすることが可能である. これにより, たとえば将来的には細胞レベルでの神経発火や, 細胞膜近傍における物理量の不均一性 (温度プロファイルや電場プロファイル, オルガネラ活性プロファイルなど) も高精度で定量できるようになるはずである. この様な細胞内生命現象の精密解析が実現すれば, 「分子生物学が与えてきた理想系の定量値」と「現実の細胞・生命現象」との間に横たわる深い溝をいずれ埋めてくれるかもしれない. また, この方法ではダイヤモンド基板表面から数十ナノメートル以内の影響のみが検出されるため, TIRF (全反射照明蛍光顕微鏡) の様に, 光学顕微鏡の解像度を遥かに超えた観察にも応用可能である. ただし, もちろんこれは別の側面から見れば大きな弱点で

もあり, 計測対象がサンプル深部にある場合には利用できないという限界もある.

ナノダイヤモンドを用いる方法では, ナノ粒子を組織内や細胞内に導入し, NV 中心をイメージングプローブとして用いることができる. この場合, ダイヤモンド基板を用いたときの様な視野全体のイメージを取得することはできない. その代わりに, 励起光が到達する範囲であれば, 注目する計測対象がサンプル深部に存在しても NV 中心の量子状態を観測することが可能である (図 2b-g). 更に, マイクロワイヤー上にナノダイヤモンドを配置して位置をマニピュレートする方法や, 計測対象を生化学的な手法でナノダイヤモンド標識する方法なども開発されている. これにより, 細胞膜の特定の空間, ミトコンドリアなど特定のオルガネラ, あるいは特定のチャンネルタンパク質といった具合に観たいオルガネラや生体分子を実験者が選んで計測することもできる. この様に, ナノダイヤモンド量子センシングとナノ粒子の位置制御技術を組み合わせることで, 細胞内の特定の微小空間において, 温度だけではなく, 電場, 磁場, 粘度などといった様々な物理量を直接計測できるようになるはずである. また, 計測対象のナノレベルの構造変化もトラッキング可能であり, これにより細胞内分子機構の解明に大きく寄与することが期待できる.

量子センサーによる物理量計測の事情は近年になって大きく動き始めている. NV 中心の話で言えば, たとえば細胞内における温度計測が技術的に可能であることは既に証明されており<sup>3)</sup>, 更なる高精度化・高速化と並行して<sup>4)</sup>, 「じゃあ, 次はこれを使ってどの様な謎を解明しようか?」という段階に至っている. また, 電場計測についても技術開発が進められており, 電場の強さをナノメートルスケールで直接定量可能であることは既に実証されている<sup>5)</sup>. 更に高感度化が進めば, 生化学的ターゲティングと組み合わせることによって, たとえばミトコンドリア活性の定量や, その異常に伴う病理の解明にも寄与するはずである. 細胞内のナノ動態計測についても既に研究が進んでいる<sup>6)</sup>. こうした技術が分子構造変化の精密決定に応用されれば, 細胞内における動的構造生命科学への道が大きく拓けるのではないだろうか. 構造生物学において, 細胞内構造動態は未だミッシングピースとされる領域であり, その知見が蓄積されればひとつのパラダイムシフトへの原動力となるだろう. また近年では, NV 中心以外にもケイ素-空孔<sup>7)</sup> やゲルマニウム-空孔<sup>8)</sup> など, 多様な格子欠陥についてその個性が明らか

になってきており、マテリアルサイエンスからのブレークスルーも期待できる。

#### 4. さいごに

執筆日からは昨日にあたる某日、私の恩師であり上司でもある白川昌宏教授が、2人で行った出張先でボソッと「今の量子センシング分野はNMRの黎明期と似てるかもしれない」とおっしゃっていた。私は、勝手にいろんな深みをもってこの言葉を受け止めている。まず、そこには技術的な黎明期であるという意味が込められているのだろう。まだ量子センサーを使った計測技術は荒削りであり、発展の余地はいくらでもある。そして、その発展に私たちが貢献する余地も同じだけ残っている。NMR技術は直接8人のノーベル賞受賞者を生んだが、量子センシング技術もいずれそうなるしていくのかもしれない。更に、NMRの発展が技術研究者のみによって成し遂げられたものではない、という意味も含んでいるのではないだろうか。生命学者が技術研究者に要望を投げかけ、そのフィードバックとして生体分子の構造解析技術やMRI画像診断技術なども発展を遂げた。そして技術発展は再び生命科学へとフィードバックされて、生体内や細胞内の「どこで」「いつ」「何が」「どれくらい」を考えるヒントを惜しみなく与え続けてくれた。その結果、8人の受賞者の子や孫とも言える生命学者がNMRによって多数輩出されてきた。量子センサーが生命学者に与えてくれる情報は、質・量共にNMRを遥かに

超えるものとなる可能性を秘めている。「今の量子センシング分野はNMRの黎明期と似てる」という先生の言葉は、もしかしたら「量子センシング分野もそう育ってほしい」という強い願いであり、激励の言葉なのかもしれない。

#### 文献

- 1) Gruber, A. *et al.* (1997) *Science* **276**, 2012-2014. DOI: 10.1126/science.276.5321.2012.
- 2) Igarashi, R. *et al.* (2012) *Nano Lett.* **12**, 5726-5732. DOI: 10.1021/nl302979d.
- 3) Kucsko, G. *et al.* (2013) *Nature* **500**, 54-58. DOI: 10.1038/nature12373.
- 4) Tzeng, Y. K. *et al.* (2015) *Nano Lett.* **15**, 3945-3952. DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b00836.
- 5) Iwasaki, T. *et al.* (2017) *ACS Nano* **11**, 1238-1245. DOI: 10.1021/acsnano.6b04460.
- 6) McGuinness, L. P. *et al.* (2011) *Nat. Nanotech.* **6**, 358-363. DOI: 10.1038/nnano.2011.64.
- 7) Lui, Y. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**, 12244. DOI: 10.1038/srep12244.
- 8) Iwasaki, T. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**, 12882. DOI: 10.1038/srep12882.



五十嵐龍治 (いがらし りゅうじ)

科学技術振興機構さきがけ研究者  
2012年京都大学工学研究科博士課程修了, 工学博士, 14年10月より現職.  
研究内容: 磁気共鳴法による生命計測  
連絡先: 〒615-8246 京都市西京区京都大学桂  
E-mail: igarashi.ryuji.78r@st.kyoto-u.ac.jp

五十嵐龍治