

京都大学	博士（工学）	氏名	外 間 進 悟
論文題目	APPLICATION OF NANODIAMONDS FOR BIOLOGICAL INVESTIGATION （ダイヤモンドナノ粒子の生体計測応用に関する研究）		
（論文内容の要旨） 本論文はナノダイヤモンドを生体計測に用いるための方法論について研究した成果をまとめたものである。第1部は序論であり、ナノダイヤモンドを用いたバイオイメージングの現状と問題点、それを解決するために本研究で注目したイオン照射、焼成、表面修飾について論じている。第2部1章ではイオン照射によるナノダイヤモンド中におけるNV⁻濃度改善に関する研究について報告している。通常、ナノダイヤモンド内部には不純物として100ppm程の窒素原子が含まれているが、空孔は少ない。空孔を作成するためにはイオン照射が必須であり、照射によって作られた空孔と窒素原子を結合させることによってNV⁻は生成する。しかし、NV⁻を作成するための適切なイオン照射条件は分かっていない。本研究では粒子径が26nmのナノダイヤモンドをシリコンウエハ上にスピコートし、H⁺、He⁺、Li⁺、N⁺イオンを様々なエネルギー、ドーズ量（20～200keV、$1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{16}$ions/cm²）で照射し、NV⁻の生成に最も適切な照射条件の検討を行った。NV⁻の検出は当研究室で開発したODMR顕微鏡によって行った。NV⁻を含蓄するナノダイヤモンドの濃度は、イオン照射量に応じて単調に増加するのではなく、ある最大生成量を示し、それ以上の照射ではNV⁻を含蓄するナノダイヤモンドの濃度は減少していくことが分かった。結果として、ドーズ量1×10^{14}でのH⁺イオン照射及び1×10^{13}でのHe⁺イオン照射が非常に効果的であり、未照射ではほとんど存在しないNV⁻を含蓄するナノダイヤモンドの濃度を200ppm程度まで上昇させることに成功した。更に、各条件によって作られたナノダイヤモンドからODMRスペクトルを取得し、その質についても検討を行った。得られたナノダイヤモンドのODMRスペクトルをガウス関数にフィットしスペクトルの強度と半値幅を算出、5%以上の強度を示しかつ15MHz以下半値幅を示すナノダイヤモンドが存在する割合を各サンプルで比較した。その結果、60keV、1×10^{13}、He⁺イオン照射が最も高い割合を示し、44%のナノダイヤモンドがこの領域に存在した。同時に、ラマン分光法による実験からイオン照射は空孔の生成のみならず、結晶構造の崩壊を誘起することを明らかにした。2章では爆轟ダイヤモンド中に存在するシングルNV⁻による外部磁場センシングに関する研究について報告している。ナノダイヤモンドを生体計測に用いる際、その粒子径は小さいことが好ましい。しかしながら現在の研究のほとんどが50nm以上の粒子径のナノダイヤモンドを用いている。そこで、本研究では爆轟ナノダイヤモンドに着目した。爆轟ナノダイヤモンドは爆薬を密閉容器中で爆発させ、その衝撃派と圧力のエネルギーでナノダイヤモンドを作製する方法である。この方法で作成されたナノダイヤモンドは粒子径が5 ± 1nmと非常に小さく均一である。生体計測に利用するナノダイヤモンドとして爆轟ナノダイヤモンドは理想的であるが、爆轟ナノダイヤモンドからODMR信号を検出した研究は報告されていない。研究では表面修飾によってこのODMR信号を増強させる手法を用い、爆轟ナノダイヤモンド1分子を用いた外部磁場センシングに成功した。爆轟ナノダイヤモンド中に存在するNV⁻での磁場センシングは世界初であり、現状最も小さいナノダイヤモンドでの磁場センシングの			

京都大学	博士（工学）	氏名	外 間 進 悟
成功例である。3章ではアニーリング、焼成過程によるナノダイヤモンドの物理・化学的状態及び粒子物性の変化について報告している。ナノダイヤモンド内部にNVCを導入し蛍光性のナノダイヤモンドを作るためには、アニーリングと酸化処理が不可欠である。アニーリングは真空中800度でナノダイヤモンドを処理する工程であり、これによって空孔が窒素と結合する。酸化処理はナノダイヤモンドを空气中500度以上で焼成する過程でありこの処理によって、表面に存在するグラフェン層を除去し効率的に発光させる事ができる。このようにして導入されたNVCの蛍光特性についてはよく研究されているにも関わらず、この工程によって変化するであろうナノダイヤモンドの物理・化学的な状態についてはほとんど知られていない。加えて、これらの状態が粒子の分散性・ODMR特性に与える影響については全く知られていない。本研究では、粒子径が50nmのナノダイヤモンドに対して、アニーリング、様々な条件での酸化処理（500～600度、1～5時間）を施して、これら物性や性質がどのように変化するかを明らかにした。ナノダイヤモンドの質量損失はアニーリング及び500度以上の酸化処理において確認され、その度合いは温度依存的に大きくなる。表面に存在するグラフェン層は500度以上の酸化処理で除かれる。結晶のひずみは525－550度の焼成によって発生し、同時に粒子径の減少が起こる。ナノダイヤモンドに存在するsp^3、sp^2炭素の割合は酸化焼成温度依存的に増加し、表面に存在するCOOH基の割合も同時に増加するが、過剰な酸化は粒子間もしくは粒子内においてCOOHの脱水（酸無水物の形成）を促し、粒子のゼータ電位を減少させ、分散性に大きな影響を与える。ナノダイヤモンド表面に存在するグラフェン層はNVCに由来する蛍光を著しく減少させるが、酸化処理によって取り除かれた後は、物理・化学的状態が蛍光スペクトルに与える影響はほとんどない。表面に存在するグラフェン層はODMR強度も著しく低下させる。4章では表面修飾による分散性の向上及び生体分子の非特異的吸着抑制について報告している。ナノダイヤモンドの表面は疎水性が高いため生理溶液への分散性が低く、非特異的に生体高分子を吸着してしまう。ナノダイヤモンドを生体イメージングに応用する際、こういった問題はイメージングの選択制・信頼性を低下させてしまう。この問題を解決するためにナノダイヤモンドの表面修飾を行った。申請者は粒子が50nmのナノダイヤモンドに対して、ナノ粒子の表面修飾に一般的に用いられる、COOH修飾、ポリエチレングリコール（PEG）修飾、高分岐鎖ポリグリセロール（HPG）修飾を施し、分散性・非特異的吸着に関する実験を行った。COOH修飾、PEG修飾に関しては生理食塩水（PBS）中1mg/mlの濃度において、すぐに凝集・沈殿を生成してしまったが、HPG修飾は120分経過しても全く分散性の低下は見られなかった。また非特異的吸着に関しても、COOH、PEG修飾ナノダイヤモンドは表面に4000分子程のタンパク質を吸着し、また、細胞表面への非特異的吸着も確認された。これは、ナノダイヤモンドの表面に存在する親水基がおよそ7%程度と低いため、粒子－粒子、あるいは粒子－タンパク質間疎水性相互作用を相殺できないためであると考えられる。一方、HPG修飾ナノダイヤモンドに関しては、タンパク質、細胞表面共に非特異的な吸着は確認できなかった。HPG修飾ナノダイヤモンドに対して抗体修飾を施すことによって、非特異的な生体分子の吸着を排し、目的の生体分子のみを選択的に標識する方法を確立した。第3部は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文はナノダイヤモンドを生体計測に用いる際に抱える種々の問題を、イオン照射、高温焼成、表面修飾といった技術を用いて解決するための方法について論じている。

1. イオン照射によってナノダイヤモンド内部に効果的に、NV⁻を導入するための最適条件の検討について記述している。研究では粒子径が26 nmのナノダイヤモンドにH⁺、He⁺、Li⁺、N⁺イオン照射を施し、NV⁻を持つナノダイヤモンドの生成数を評価した結果、60 keV、 1×10^{13} でのHe⁺イオン照射が最適であることを明らかにした。

2. 表面修飾によるODMR信号増強効果について論じている。ナノダイヤモンド表面をOH基で修飾することでODMR信号を増強させることに成功し、粒子径が5ナノメートルのナノダイヤモンドにこの修飾を施すことによって、1つのNV⁻のスピンを用いて外部磁場のセンシングに成功した。

3. アニールリング、焼成といった工程によってナノダイヤモンドの物理化学的状態がどのように変化するかを包括的、定量的に論じている。また、このような状態の変化によって分散、性蛍光特性、ODMR特性がどのように変化するのも明らかにしている。

4. ナノダイヤモンドに表面修飾を施すことによる、分散性の向上及び生体分子の非特異的な吸着の抑制について論じている。高分岐鎖グリセロール修飾によるナノダイヤモンド表面修飾は、分散性の向上及び非特異的な吸着を大幅に抑制し、これをプラットフォームとすることで非特異的な生体分子の吸着を排し、目的の生体分子のみを選択的に標識する方法を確立した。

以上、ナノダイヤモンドの生体計測応用上の問題点を解決しだけでなく、ODMR計測という全く新しい方法論の確立に貢献した本論文の内容と成果は、学術上の意義に加えて、工学的な応用への基礎に資する意義を認めることができ、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、(平成37年3月31日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。