

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04164

研究課題名(和文) 生体用デジタルEPR分光器の高速化

研究課題名(英文) Shortening of measurement time for in vivo digital EPR spectrometer

研究代表者

赤羽 英夫 (Hideo, Akaba)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：00552077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体用デジタル電子常磁性共鳴(EPR)分光器によるスペクトル取得の高速化を目指し、高速化に必要な要素技術の開発を実施した。ヨーク構造を持たないアレイ型のEPR用のマグネットを製作し、磁場の高速制御に適した低インダクタンスを有するコイルの実装に成功した。また、高速磁場掃引を可能にする振幅、位相の自動制御機構を開発し、10kHz～60kHz程度の磁場掃引を用いたEPRスペクトルの取得に成功した。その結果、フリーラジカル3D空間イメージングを181本の投影数でおよそ4秒程度での取得が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、デジタルEPR分光器の高速化に必要な磁気共鳴用マグネットを可搬可能な小型軽量に製作する技術や新しい磁場掃引制御方法を提案し実証した。今後、開発した高速なデジタルEPR分光器を用いた可搬型フリーラジカル分子イメージングシステムの開発に着手し、多くの生命科学研究者が生体用EPR技術を容易に応用できるようにしたい。

研究成果の概要(英文)：We have developed the technology needed to shorten spectral acquisition with a digital electron paramagnetic resonance (EPR) spectrometer for biological applications. Based on the results of electromagnetic simulation, a compact arrayed magnet without a yoke structure for EPR was fabricated. Low inductance gradient coils and sweep coil suitable for high speed control of the magnetic field have been successfully attached to the EPR magnet. We have also developed an automatic amplitude / phase control feedback system that enables high-speed magnetic field scanning, and succeeded in acquiring the EPR spectrum by magnetic field scanning at approximately 10kHz to 60kHz. As a result, it has become possible to acquire 3D spatial imaging of free radical molecules with 181 projections in about 4 seconds.

研究分野：センシング工学

キーワード：電子常磁性共鳴 電子スピン共鳴 デジタルEPR分光器 In vivo 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内における活性酸素やフリーラジカルに起因する酸化還元反応は、がん、脳梗塞などの生活習慣病と関連していることが示唆されている¹。そのため、生体組織の酸化還元状態(レドックス)を評価することは、これらの病気を解明する上で重要である。これまで、生体用サブ GHz フルデジタル EPR 分光イメージング技術が開発されている²。また、EPR マウス頭部におけるフリーラジカルを 10 秒間隔で可視化することで、脳内における酸化還元能の評価を進めている³。しかし、反応性の高いフリーラジカルをプローブとして用いることで、脳内の酸化還元状態をより正確に可視化できるようになるため、さらなる高速化が期待されている。現状の装置において、高速に EPR 吸収スペクトルを取得するには、磁場掃引を現状の 50ms より早くする必要があり、コイルの加熱、コイルのインダクタンスによる磁場掃引波形の歪み、ローレンツ力に起因する機械振動に伴う共振器の不整合などの様々な問題があり容易ではない。そこで、本課題では、高速に磁場掃引可能な空芯コイルを備えた磁気回路の設計とその駆動電源の開発、またデジタル EPR コンソールの最適化などによりスペクトルの取得についての高速化を実現する方法を検討し開発を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フリーラジカル分子 3 次元イメージングの高感度取得を可能にする生体用デジタル電子スピン共鳴(EPR)分光器の高速化である。現状では、各投影スペクトルの取得に最速でも 50 ms 掛かっている。しかし、生きた動物の生体組織における酸化還元状態をより正確に可視化するためには、さらなる高速化が必要である。連続波(CW)-EPR 吸収スペクトルは、磁場または、励起周波数が掃引され、磁気共鳴条件を満たすことにより観測される。そこで、掃引の高速化に伴う外乱を補正するバックグラウンド信号の除去、高速磁場掃引用空芯コイルを備えた磁気回路とその駆動電源の開発、高速にデータ通信可能な制御ボードの開発などにより、生体用デジタル EPR 分光器を用いたスペクトルの取得時間の高速化を目指した。

3. 研究の方法

(1)EPR 用磁気回路の開発

生体計測を目的とした EPR 用のマグネットは、EPR 周波数がおおよそ 1.2GHz 以下であることが多く、磁気共鳴を起こす磁場は、おおよそ 50 mT 以下である。本研究では EPR 周波数を 750MHz 程度としたため、電子スピン共鳴の条件から計算すると磁場は 27 mT と求まる。この程度の磁場強度であれば永久磁石を用いた設計が可能である。また、漏れ磁場の低減、磁場強度の増加、均質性の向上を目的としたヨーク構造を採用したマグネットは重量が大きくなることから、動物実験が可能な施設に移動して簡易に実験を行うには適していない。また、高速にスペクトルを取得するには、磁場掃引や磁場勾配などのコイルのインダクタンスは低い方が良い。そこで、高速磁場掃引を用いた EPR 法の実装に適した小型軽量のアレイ型マグネットを独自に開発した[図1参照]。特別な道具を必要とせず、取り扱いが容易な小型なネオジウム磁石を複数並べることで、生体イメージングに必要な磁場均質性を確保できるか電磁シミュレータ(FEMTET, Murata Software Co., Ltd.)を用いてその構造を最適化した。設計したモデルをもとに、主に 3D プリンタと CNC フライスにより作成したプラスチック筐体に磁石をはめ込むことで、ヘルムホルツ型のマグネットを試作した。試作したマグネットは、ネオジウム磁石を片面に 121 個配置し、磁極間の距離は約 10cm となっている。また、磁場均質性の評価は磁気プローブ(MLX91209, Melexis N.V.)とプロトン NMR による硫酸銅水溶液を計測することにより実施した。

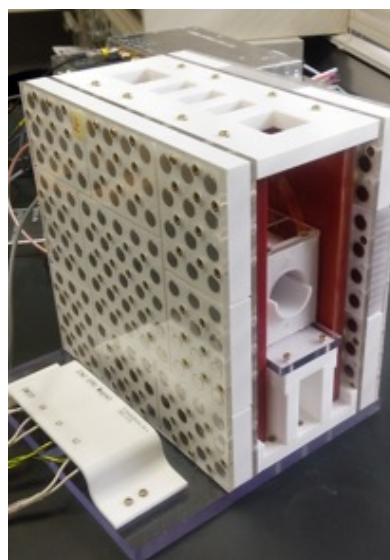


図1 アレイ型 EPR 用磁気回路
121 個の小型ネオジウム磁石を
磁石間距離 18 mm で配列したも
のを対向させた構造である。

(2) 高速磁場掃引用コイルの開発

従来の磁場変調法では、磁場変調の強度が空間的に変動しても、また正確な値でなくても低速な磁場掃引(20Hz程度)が正確で安定していれば、磁場変調強度の変動は計測される EPR 吸収スペクトルの歪みにほとんど影響を与えない。また、低速な磁場掃引は制御が容易なため、簡易な電圧電流変換回路を用いることができる。一方、磁場変調を用いない直接 EPR 検出法では、磁場掃引(10~100kHz)が空間的に変動していれば、測定される吸収スペクトルは歪むことになる。また、時間的に変動している場合も、同じように積算時にスペクトルが歪んでしまう。本研究では、コイルを配置する領域が限られているため、磁場均質性の影響は検討せず鞍型コイルを採用した。磁場均質性については、測定対象にも依存するため今後の課題とした。コイルにより発生する磁場強度を一定にするには、コイルに流れる電流を一定にする必要があるが、積算時のタイミングの変動もスペクトルを歪ませるため、振幅に加えて位相も制御する必要があった。

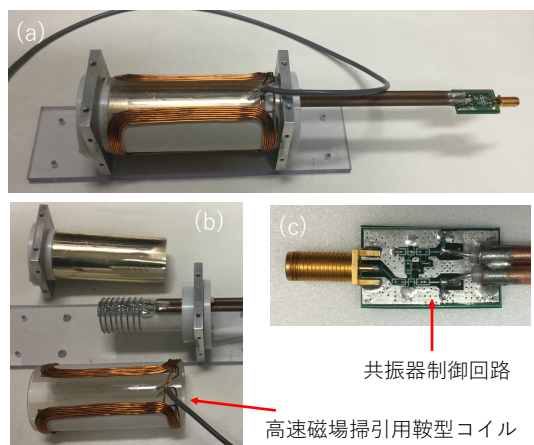


図 2 開発した EPR 共振器: (a) 全体像、(b)構成要素、(c) 共振器電子制御回路。

(3) EPR 用制御ボードの開発

本研究では、デジタル EPR 検出、分光器の制御、FPGA-PC 間の通信を行うボードを開発した。主に FPGA IC (5CEBA7F23C7N, Intel Corp.), USB-IO IC (FT601, FTDI), 8 個の 16bits DAC (DAC8811, Texas Instruments Inc.), 14bits ADC (LTC2314-14, Analog Devices Inc.), DC-DC コンバータ から構成している。電子回路基板の製作において設計と部品の実装は、研究室において実施し、基板の製造は外部に発注した。FPGA の内部は、主に USB-IO を用いた PC へのデータ送受信回路、RF-ADC 受信ボードからのデータ受信回路、反射波抑制制御信号の生成回路、各種周波数やタイミング信号の生成に用いる電圧制御発振器制御用の信号生成回路、磁場勾配制御用の信号生成回路、高速磁場掃引制御用の信号生成回路、静磁場のオフセット調整用の制御信号生成回路など多数のデジタル回路から構築している。FPGA-PC 間の通信には、まず PC と USB-IO の通信を行う PC 側のコマンドを作る必要がある。コマンドを実行する OS には macOS を選び、プログラム開発環境ソフトである Xcode (Apple Inc.)を用いて開発を行った。送受信用のコマンドは、FTDI 社が提供するライブラリ(D3XX)を用いて作成した。また、グラフィカルインターフェイスとして、LabVIEW (National Instruments Corp.)を用いることにより EPR スペクトル取得プログラムの開発時間を短縮した。



図 3 EPR コンソール用 FPGA 制御ボード

4. 研究成果

(1) アレイ型磁気回路

242 個の小型ネオジウム磁石 ($\phi 10 \text{ mm} \times 14.5 \text{ mm}$) を等間隔に並べる簡単な構造からなるヘルムホルツ型の EPR 磁気回路を製作した。サンプル領域において、電磁界シミュレーションの計算結果に近い 0.01 mT 程度の均質性を確保することができた。これは、生体イメージングで対象とするニトロキシドラジカルの EPR 吸収信号の線幅の 1/10 程度以下となっていることから、十分な性能であると判断できた。磁場勾配用コイルには、マクスウェル型のデザインを採用し、巻き数や大きさなど電磁場解析ソフトを用いて最適化した。その結果、コイルに流す電流 1A あたり 0.2 mT/cm 程度の線形な磁場勾配を XYZ それぞれの軸に対して中心から $\pm 15 \text{ mm}$ の間に生成することができた。インダクタンスの実測値は、シミ

ューレーション結果と変わらず $0.2 \sim 0.3$ mH と低く抑えることができた。勾配コイル駆動用電源と接続した場合に、コイルの時定数がおおよそ $100 \mu s$ となり目標としてるスペクトルの取得時間(10ms 程度)と比べて無視できる値となった。

(2) 高速磁場掃引の制御

高速磁場掃引用のコイルは、ヘルムホルツ型コイルとコンデンサを直列に接続したもから構成した。コンデンサの追加は、磁気回路が直列共振回路を形成し、共振周波数で駆動することにより、正弦波形での駆動と高調波の生成を低減できるようにするためである。また、発生する磁場を制御するために、コイルに流れる電流の振幅と位相を安定化するフィードバックデジタル制御回路をFPGA上に構築した[図4参照]。駆動信号は、FPGA上に構築したNCO(数値制御発振器)により生成し、本研究で開発したパワーアンプにより増幅したのちコイルに流れる。コイルに流れる電流は、高速応答が可能な電流センサーを用いて検出し、逐次型ADCを用いてデジタル化した後FPGAへ入力した。その後、デジタル位相検波処理を行い同相成分と直交成分を計算した。位相の制御は、一方の成分を積分したものを制御信号として、NCO(数値制御発振器)の位相入力ポートに負帰還することで行なった。また、もう片方の成分と振幅の制御目標との差を積分しものをNCOの出力のゲインにすることで、振幅の安定化を行った。その結果、周波数15 kHz、30kHz、60 kHz の正弦波による高速磁場掃引(3 mT)が可能となった。また、共振器自動制御の高速化を目指し、受信ADC-FPGAボードと信号処理FPGAボードの内部信号処理プログラムを改良した結果、フィードバック制御部のクロック周波数を約50MHzまで向上できた。

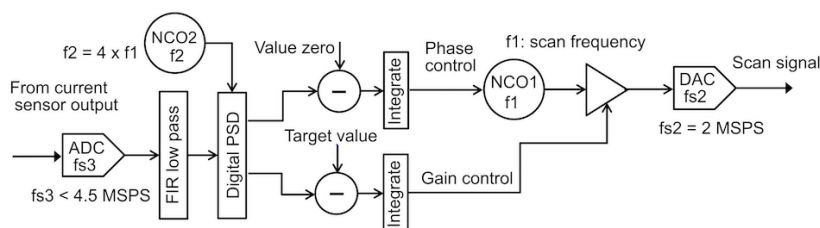


図 4 EPR 信号取得に必要な高速磁場掃引用の振幅と位相を自動制御するデジタル回路の概略。電流センサの出力を信号処理することにより、数値制御発振器 (NCO) の出力波形の振幅と位相を制御している。

(3) EPR 分光器制御プログラム

EPR周波数を固定して吸収スペクトルを計測するには、磁場を掃引する必要がある。そこで、高速磁場掃引に周波数10 kHzの正弦波形を用いた場合を考えると、1回の計測時間は磁場掃引の時間と等しく $100 \mu s$ となる。この計測時間の間に50MHzでベースバンド信号をFPGA上で再サンプリングすると、データ数は5000個となる。このデータを $100 \mu s$ の間にPCに転送することは難しいため、データの転送にかかる時間より長い時間の間FPGA上で信号の積算処理を行う。それは、データの転送を吸収スペクトル取得中に行うと実質的に通信によるオーバーヘッドタイムをゼロにできるからである。また、この通信時間を短くするには、高速にデータを転送できる制御ボードを開発する必要がある。従来は、FPGA ICとPC間のデータ転送に用いるUSB-IO ICとして、FTDI社製FT2232Hを採用しており、8本の線をFPGA ICに接続しデータを転送していたが、本研究では、FT601を用いることにより、32本の線をFPGA ICに接続してデータを転送できるように改良した。また、送信シーケンスと受信シーケンスの間に数クロックのデッドタイムしか必要のないMulti-Channel FIFO モードを採用することにより、EPR信号の計測開始前にPCから磁場制御のパラメータを毎回更新できるようになった。その結果、フリーラジカル(例えば、tempone-d16水溶液)の空間イメージングを投影数181 本の場合に約4秒毎に取得できるようになった。また、高速化した分光器の検証を小動物を用いて行うために、小型なEPRイメージングシステムの試作装置を製作し、現在研究協力機関の動物実験施設に仮に設置している。プロジェクト終了後も引き続き、研究協力者のもとで動物を用いた検証を行う予定である。

<引用文献>

- ① S. P. Hassan *et al.*, *Nature Rev. Cancer* 3, 276, 2003
- ② H. Sato-Akaba, *et al.*, *J. Magn. Reson.* 284, 48, 2017
- ③ M. C Emoto, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 4, 802, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Tseytlin Mark	4. 巻 304
2. 論文標題 Development of an L-band rapid scan EPR digital console	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 42～52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmr.2019.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujii Hirotsada G., Emoto Miho C., Sato-Akaba Hideo	4. 巻 5
2. 論文標題 Brain Redox Imaging Using In Vivo Electron Paramagnetic Resonance Imaging and Nitroxide Imaging Probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetochemistry	6. 最初と最後の頁 11～11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/magnetochemistry5010011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Emoto Miho C., Sato-Akaba Hideo, Matsuoka Yuta, Yamada Ken-ichi, Fujii Hirotsada G.	4. 巻 690
2. 論文標題 Non-invasive mapping of glutathione levels in mouse brains by in vivo electron paramagnetic resonance (EPR) imaging: Applied to a kindling mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 6～10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Okada Yuki, Tsuji Kentaro, Emoto Miho C., Fujii Hirotsada G.	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and Fabrication of Compact Arrayed Magnet for Biological EPR Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00723-020-01256-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大槻智也, 辻健太郎, 赤羽英夫
2. 発表標題 Lバンド・ラピッドスキャンEPRデジタル分光器の開発
3. 学会等名 第58回電子スピンスイエンズ学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田侑樹, 辻健太郎, 赤羽英夫
2. 発表標題 EPR生体イメージング用静磁場マグネットの設計
3. 学会等名 第58回電子スピンスイエンズ学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱垣 研太, 宮戸 祐治, 赤羽 英夫
2. 発表標題 電子スピン共鳴用L-band共振器の自動整合制御機構の開発
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱垣 研太, 宮戸 祐治, 赤羽 英夫
2. 発表標題 L-band CW-EPRにおける送受信干渉抑制機構の解析
3. 学会等名 第57回電子スピンスイエンズ学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------