

川田 善正

静岡大学工学部機械工学科・教授

## 電子線励起微小光源による光ナノイメージング

### §1. 研究実施の概要

本研究では、光を用いて生きた生物試料を実時間で観察でき、数 10 ナノメートルの空間分解能を有する実時間観察可能なナノイメージング法を実現することを目的とし、実際にシステムを試作し、生きた生物試料を実時間で高分解能に観察するための技術開発および理論構築を行なう。実時間で観察可能な高分解能光学顕微鏡を実現することによって、分子・たんぱく質レベルでの機能解析から細胞・臓器レベルでの機能解析まで、統一的な観察を行うことが可能となる。また、液晶分子やコロイド粒子など、走査型電子顕微鏡では観察が困難であった試料のダイナミクス解析・観察を行なうことも可能となる。

平成 22 年度は、蛍光膜として希土類元素を添加した蛍光薄膜を作製した。PLD (Pulsed Laser Deposition) 法を用いて YAG を母材とした 0.5at% の Ce を添加した基板を作製した。電子線に対する発光効率、発光波長、耐性などの評価を進め、Ce 元素を添加することにより発光強度が向上することを確認した。現状では、希土類元素の濃度が低かったために、発光強度の向上は限定的であったが、濃度を高くすることにより、より発光強度が向上すると考える。様々な濃度で Ce 元素をドーピングした材料を評価するとともに、Sm 元素をドーピングした材料について評価を行なった。

微小光源励起システムの基本構成について検討した。現有のタングステンを用いた走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、試料ステージ部分を改造し、ナノイメージングシステムの基礎システムを試作した。微小球ラテックスを標準試料として分解能を評価した。隣接した直径 50nm の微小球を分離して観察することができ、開発したシステムが 50nm 以下の分解能を有することを確認した。固定したチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞を観察し、生物試料においても 100nm 以下の分解能で観察可能であることを確認した。また、水中を移動するナノ粒子の動的な挙動を観察することに成功した。今後は、電界放出型の走査型電子顕微鏡を基礎システムとして利用することにより、より高分解能化が実現できるものと考えられる。一方、実験中に真空と大気圧の分離薄膜が破れ SEM に損傷を与える場合が複数回あった。電子線走査による分離膜へのダメージを評価する必要があり、今後の課題となる。

開発した光ナノイメージング法を用いて生きた生物試料を高分解能で観察するための、生物試料の培養法について検討した。これまでの基礎実験により、SiN 薄膜はそれほど生体適合性が悪くないが、条件によっては HeLa 細胞や CHO 細胞を培養するのが困難であることを確認している。そこで、生体適合性のより良い材料を SiN 基板にコートし、基板表面の親水性を向上させることを検討し、細胞培養の安定性が向上することを確認した。基板にコートする材料を検討することにより、より生体適合性の高い材料基板を開発することが必要である。

## §2. 研究実施体制

### (1)「静大」グループ

① 研究分担グループ長:川田 善正 (静岡大学工学部機械工学科、教授)

#### ② 研究項目

- ・光電変換膜の作製・評価・高機能化
- ・微小光源励起システム的设计・作製・評価

### (2)「浜医大」グループ

① 研究分担グループ長:寺川 進 (浜松医科大学光量子医学研究センター、教授)

#### ② 研究項目

- ・光ナノイメージングのための生物試料のマニピュレーション法の確立と評価

### §3. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(4-1)に対応する)

本研究では、光を用いて生物試料を実時間で観察でき、10ナノメートルの分解能を有する、光学顕微鏡を実現することを目的とし、実際にシステムを試作し、生きた生物試料を実時間で高分解能に観察するための技術開発および理論構築を行なうことを目的としている。本研究は、静岡大学で開発した顕微鏡システム[1]に、同じく静岡大学で開発した蛍光膜[9-12]を用いて、高分解能イメージングシステムの基本システムを構成している。共同研究者の浜松医科大学で蛍光膜上に生物試料を培養する技術を開発し[3,13-15]、その試料の観察結果をシステム開発、材料開発および細胞培養の技術開発にフィードバックしている。これらの目的を実現するために、次の研究項目を実施している。

#### ○光電変換膜の作製・評価・高機能化

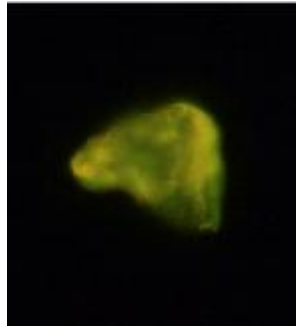
電子線照射により発光する材料として、無機材料および有機材料など多くの材料について可能性を検討した[9-12]。可能性の高い材料として希土類元素を添加した基板材料について検討した。希土類元素を添加することにより発光効率の向上が期待できるとともに、添加する元素の種類を選択することにより発光波長を制御することも可能となる。希土類元素を添加した材料は PLD (Pulsed Laser Deposition)法による製膜と SiN 薄膜へのイオン注入法の2つについて検討した。PLD 法は簡単に様々な希土類元素を添加することができ、また薄膜材料を作製することも可能である。PLD 法を実施するための装置を試作し、成膜条件の最適化を行なった。

図1に作製した蛍光薄膜に電子線を照射した場合の発光強度を測定した結果を示す。図1(a)に PLD 法で作製した Ce:YAG のフォトルミネッセンス像を示す。高い強度で発光していることが確認できる。図1(b)は PLD 法を用いて 0.5at%の Ce 元素をドープした YAG 基板、図1(c)はイオン注入法を用いて SiN に 0.05at%の Sm 元素をドープした基板である。それぞれの基板において、希土類元素を添加することにより、発光強度が増加していることが確認できる。両方の基板ともに、希土類元素のドープ量が非常に少なかったため、発光強度の増強は限定的であったが、希土類元素をドープすることの有効性が確認できた。発光膜の表面および希土類イオンの分布の均一性が今後の課題となる。また、様々な濃度で Ce 元素をドープした材料を評価するとともに、Sm 元素をドープした材料について評価を行なった。また、今後の可能性として、表面プラズモンを利用して、蛍光材料の発光強度を増強する手法についても検討を行なった[2,4]。

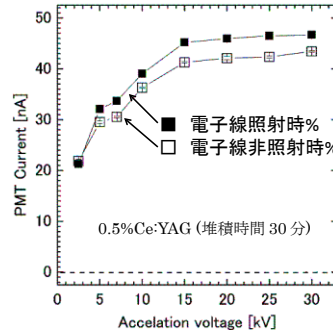
#### ○微小光源励起システムの設計・作製・評価

電子線による微小光源を励起するための基礎システムを検討した。現有の電子源にタンダムステーションによる熱電子放出を用いた走査型電子顕微鏡(SEM)の試料台ステージ部分を改造し、電子線励起で形成した微小光源からの光強度を高感度に検出できるシステムを試作した[1]。図2(a)に試作したイメージングシステムの構成を示す。SEM の試料台に高開口数非球面レンズ、光電子増倍管を設置し、光強度を検出した。外部インターフェースを取り付け、電子線を任意に走査可能なシステムとした。また、図中には示していないが、蛍光膜の発光スペクトルを測定するために分

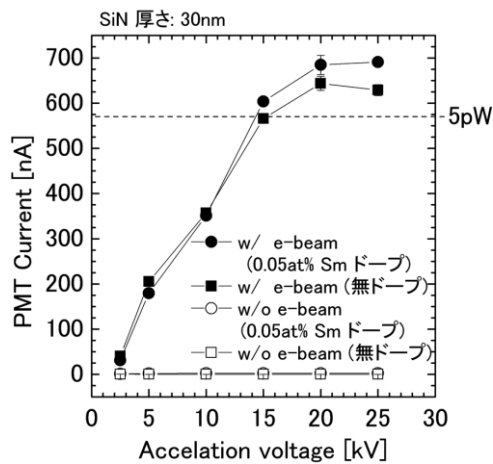
光器を設置可能な構成とした。



(a) Ce: YAG の発光像



(b) PLD 法による Ce: YAG



(c) イオン注入法による Sm: SiN

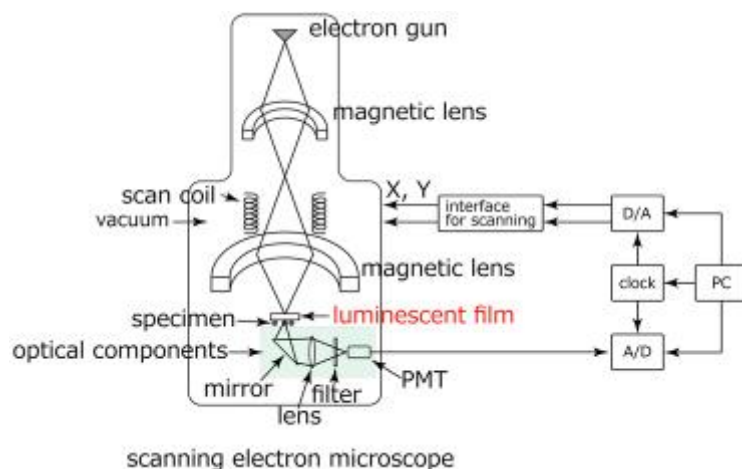
図 1. 希土類元素をドープした基板の発光強度

図 2(b)に開発したシステムを用いて、液中のナノ粒子を動的に観察した結果を示す。これは直径 100nm 以下の金微粒子を含む溶液を試料台の上に垂らし、水中内での微粒子を動的に観察したものである。図 2(b)中の(i)-(vi)は時間経過の順に画像を並べたものであり、各画像は 10sec/flame で取得している。図中の楕円で示した部分に水中を移動していたナノ粒子が時間経過と共に付着し、その数が増えていることが確認できる。また図 2(c)は乾燥固定した CHO 細胞(チャイニーズハムスターの卵巣細胞)を観察した結果を示す。細胞核の周囲に存在する微小器官が 100nm 以下の高分解能で観察できていることが確認できる。

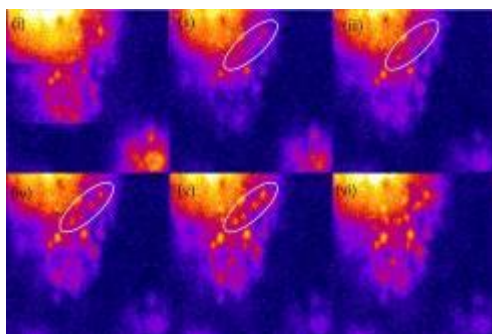
実験中に大気圧と真空を分離する薄膜が破れ、SEM が損傷する場合は複数回あった。そのため、SEM 内の真空度が低下したときに自動的に電子線源からの電子放出を止める安全装置を検討し、設計した。また、電子線照射による分離薄膜のダメージを定量的に評価することが今後の課題となる。

熱電子放出の電子源では、光源サイズが大きいため空間分解能が制限されるとともに、輝度をあげる点についても限界がある。より高分解能、より高速な電子線走査を実現するために、電界放出型 SEM(FE-SEM)を基礎システムに用いることを検討し、そのベースとなる SEM を購入した。

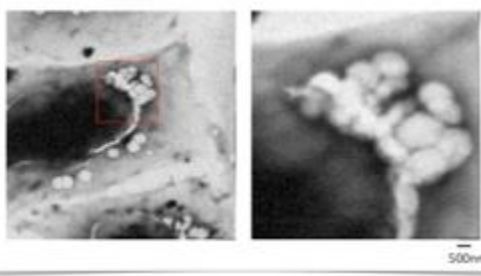
購入した FE-SEM のステージ部を設計し、蛍光薄膜および試料台、光検出部の試作を検討した。



(a) 試作システム



(b) 水中のナノ粒子の動態観察結果



(c) CHO 細胞の観察結果

図2. 光ナノイメージングシステムの構成と観察結果

#### ○光ナノイメージングのための生物試料のマニピュレーション法の確立と評価

電子線照射をするための SiN 薄膜上に、標準的な細胞を培養する条件を探った。この基質は負に帯電しており、細胞膜に存在する陰性電荷を持つ分子との反発が起こり、接着しにくい。また基板の親水性も生体適合性を向上させる大きな要素となる。本年度は、基板の親水性を向上させるために、アミド結合を用いて SiN 基板にカルボキシル基をコートする方法を開発した。開発した SiN 基板上で HeLa 細胞を培養し、その生体適合性の向上を確認した。HeLa 細胞がカルボキシル基をコートした基板上で安定して培養可能であることを確認した。基板の生体適合性を測定する手法とともに、細胞を観察位置に操作するためのマニピュレーション技術についても検討を行った[5-8]。

また、電子顕微鏡的観察方法と光学顕微鏡的観察方法を融合させる際の課題として、電子線照射は真空中で、光学観察は一気圧の水で行なう必要がある。この点を解決する可能性として、薄膜上に培養した細胞をイオン液体で覆って真空中に露出するという方法を検討している。さらに、電子線照射によってコントラストの高い光信号を得るため、金のコロイドおよび ZnO 粒子で標識する方法も検討した。マクロファージを生物試料として用い、金粒子および ZnO を細胞内に取り

込ませるための最適条件について検討した。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. W. Inami, K. Nakajima, A. Miyakawa, Y. Kawata, "Electron beam excitation assisted optical microscope with ultra-high resolution," *Optics Express*, vol. 18, no. 12, pp. 12897-12902, 2010. (DOI: 10.1364/OE.18.012897)
2. Y. Watanabe, W. Inami, Y. Kawata, "Deep-ultraviolet light excites surface plasmon for the enhancement of photoelectron emission," *J. Appl. Phys.* Vol. 109, no. 2, pp. 023112, 2011. (DOI:10.1063/1.3537823)
3. Y. Matsumura, W. Inami, and Y. Kawata, "Laser light control of self-organization process," *Journal of Nonlinear Optical Physics & Materials (JNOPM)*, vol. 19, no. 4, pp. 745-751, 2010. (DOI: 10.1142/S0218863510005716)
4. K. Kato, A. Ono, W. Inami, Y. Kawata, "Plasmonic nanofocusing using a metal-coated axicon prism," *Optics Express*, vol. 18, no. 13, pp. 13580–13585, 2010. (DOI: 10.1364/OE.18.013580)
5. C. Moriguchi, W. Inami, C. Egami, Y. Kawata, S. Terakawa, M. Tsuchimori, O. Watanabe, "Near-field recording technique for high-resolution fluorescent imaging," *Applied Physics Letters*, vol. 96, no. 24, pp. 243103-1-3, 2010. (DOI: 10.1063/1.3455095)
6. S. Ito, T. Keino, and F. Iwata, "Volume control of metal-plating deposition using a nanopipette probe by controlling electric charge," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 49, no. 8, pp. 08LB16-08LB16-5, 2010. (DOI: 10.1143/JJAP.49.08LB16)
7. F. Iwata, Y. Mizuguchi, K. Ozawa, and T. Ushiki, "Operation of self-sensitive cantilever in liquid for multiprobe manipulation," *Japanese Journal of Applied Physics*, vol. 49, no.8, pp. 08LB14-08LB14-5, 2010. (DOI: 10.1143/JJAP.49.08LB14)
8. R. Kakei, A. Ogino, F. Iwata, M. Nagatsu, "Production of ultrafine atmospheric pressure plasma jet with nano-capillary," *Thin Solid Films*, vol. 518, no.13, pp. 3457-3460, 2010. (DOI:10.1016/j.tsf.2009.11.055)
9. A. Sugita, M. Morimoto, N. Mase, Y. Kawata, "Linear and nonlinear optical properties of disperse red dyes in poly-(cyano phenylene sulfide)," *Chemical Physics Letters*, vol. 501, no.1-3, pp. 39-43, 2010. (DOI:

10.1016/j.cplett.2010.10.053)

10. Y. Matsuda, Y. Hayashi, A. Sugita, S. Tasaka, "Optically anisotropic structure of amides formed by the reformation of the hydrogen bonds induced by high frequency electric field," *Journal of Molecular Liquid*, vol. 152, no. 1-3, pp. 53-56, 2010. (DOI: 10.1016/j.molliq.2010.01.002)
11. E. V. A. Premalal, G. R. R. A. Kumara, R. M. G Rajapakse, M. Shimomura, K. Murakami and A. Konno, "Tuning chemistry of CuSCN to enhance the performance of TiO<sub>2</sub>/N719/CuSCN all-solid-state dye-sensitized solar cell," *Chem. Commun.*, vol. 46, pp. 3360-3362, 2010. (DOI: 10.1039/B927336K)
12. A. Konno, E.V.A. Premalal, "Recent development of dye-sensitized solid-state solar cell," *J. Photopolym. Sci. Tech.*, vol. 23, no. 2, pp. 279-282, 2010. (DOI: 10.2494/photopolymer.23.279)
13. 伊東 聡、岩田 太、中尾 秀信、七里 元晴, "マイクロ磁気プローブで操作された磁性体微粒子による生体試料のマニピュレーション," *精密工学会誌*, vol.76, pp. 64-68, 2010.
14. 松村 行真, 居波 渉, 川田 善正, "自己組織多孔膜のナノ秒パルスレーザー照射による構造制御," *レーザー研究*, vol. 39, no. 2, pp. 129-132, 2010.
15. 宮川厚夫, 石川達也, 川田善正, "レーザーによる単一細胞分離の基礎的検討," *レーザー研究*, vol. 39, no. 2, pp. 123-128, 2010.

#### (4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)