

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成 23 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

川田 善正

静岡大学工学部・教授

電子線励起微小光源による光ナノイメージング

§1. 研究実施体制

(1)「静大」グループ

- ① 研究代表者: 川田 善正 (静岡大学工学部機械工学科、教授) (研究代表者)
- 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・製作・評価

(2)「浜医大」グループ

- ① 主たる共同研究者: 寺川 進 (浜松医科大学メディカルフォトンクス研究センター、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

§ 2. 研究実施内容

(文中の引用番号等は(3-1)に対応する)

研究項目: 光電変換膜の作製・評価・高機能化

高効率発光、高機能蛍光薄膜の開発を目指して、希土類元素を含む蛍光薄膜を検討した^{1,3,6,8)}。希土類元素を含む材料は、高い輝度でカソードルミネッセンスを生じることが知られており、材料を選択することにより、発光波長を選択できるなどの特徴を有する。希土類元素として **Sm**、**Ce**、**Eu** を、イオン注入法により **SiN** 膜へドーブした。図1(a)に加速電圧を変化させたときの蛍光薄膜の発光強度の変化を示す。いずれの蛍光薄膜においても加速電圧とともに、発光強度が増加していることが確認できた。加速電圧 5kVにおいて無ドーブの **SiN** 薄膜に比べて、13%の発光強度が増強していることが確認できた。さらに蛍光膜をアニーリング処理することにより、発光が25%増強することを確認している。図 1(b)にドーブした希土類元素による発光スペクトルを測定した結果を示す。**Ce** イオンでは波長 410nm 付近、**Sm** イオンでは 600nm 付近で発光ピークを有していることが確認できた。光量全体としては、**Ce** イオンをドーブしたもので260%、**Sm** イオンをドーブしたものでは 310%の発光増強されていることを確認した。また、面内の発光強度分布を測定し、ドーブイオンの均一性を評価した。

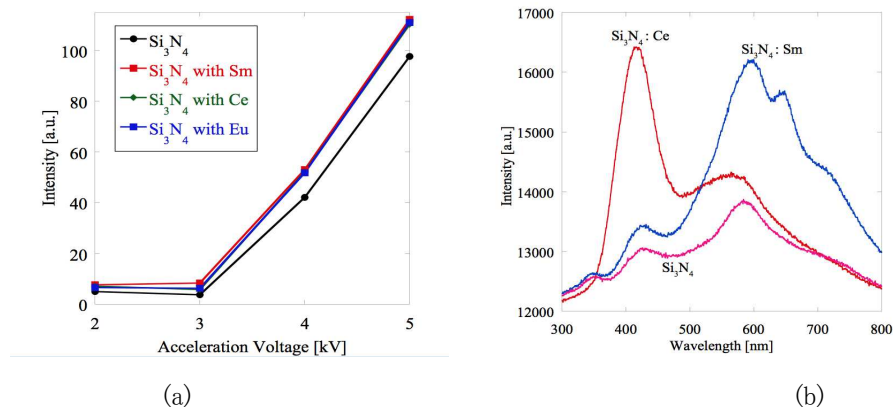


図 1 (a)電子線励起による発光強度および(b)発光スペクトル

研究項目: 微小光源励起システム的设计・製作・評価

試作したナノイメージングシステムのプロトタイプの最適化を行なった^{2,4,5,7)}。試作した電子線励起型イメージングシステムのプロトタイプを用いて標準試料を観察し、より高い空間分解能を実現するためにシステムの最適化を行なった。特に蛍光の発光強度が小さく、信号対雑音比が小さいため、高感度に信号を検出する方法を検討した^{2,5)}。フォトンカウンティング法およびロックイン検出法を導入することを検討するとともに、フレーム積算法、画像処理についても検討した。これらの手法を組み合わせることにより、水中の微粒子の挙動観察、生物試料の観察に成功した²⁾。

現状では、蛍光膜を透過した電子線により、生物細胞がダメージを受けている状態も観察されている。そのため加速電圧、電流量、電子ビームスポットサイズなどによる試料へのダメージを定

量的に評価し、実用化および生物試料観察時における問題点を明らかにし、それらの改良方法を検討し、システムを最適化する必要がある。また、多波長蛍光膜や広帯域発光膜を検討し、システムの高機能化を検討することも必要である。

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

開発している光ナノイメージング法では、SiN の薄膜基板に電子線を絞って照射し、発生するカソードルミネッセンスを微小光源として試料の観察をする。試料として、生体標本を用いることは、顕微鏡観察に様々な制限のある生体の研究に新しい手段を提供することになる。生体標本にカソードルミネッセンスを生ずる微小標識を付けることができれば、それらの局在を調べることによって、高い分解能での分子分布の研究が可能となる。これらのことを目指して、生体標本の観察のための手法開発の検討を行なった。

SiN の薄膜基板に細胞を付着させ、高い生理活性を保った状態で培養することを目指した。基板の洗浄、紫外線照射による滅菌、ポリリジンによるコーティングなどの条件を通常の培養より長い時間をかけて満たすことで、高い密度の培養ができるようになった。実際に基板は広いものではなく支持体に開けた小さな窓構造に貼り付けた形にして、真空の負圧力に抗するようにしてあるので、両面が対称ではない。当初、窓構造の枠の内部側に培養したところ、接着する基板に細胞の数が少なく、また、細胞側を一気圧に保つと、圧力のかかる方向が、基板を窓枠からはずす方向であるために、顕微鏡筒内の真空の破壊が頻繁に起きた。細胞を窓枠の外部側に培養すると、このような現象は大幅に減ることが分かった。

腫瘍細胞モデルとしてよく使用される HeLa 細胞や正常細胞のモデルである CHO 細胞を基板に培養し、何らの修飾なしに観察すると、基板に発生する光の輝点による影が捉えられ、細胞の厚いところが暗く、薄いところが明るくなる画像が捉えられた²⁾。100 nm に近い微小構造が観察されることが分かったが、像は暗く、ノイズが多いので、画質としては高いとはいえなかった。

また、細胞の損傷も容易に起こることが確認できた。加熱反応により、細胞内の微小構造の膨化が起き、それらが破裂するまでに至った。画質を上げるためには、明るい輝点が必要となったが、電子線の加速電圧や電流密度を上げて、発光強度を大きくすると、細胞の損傷が著しくなり、正常な構造が失われた。

顕微鏡用レンズの使用により集光効率を上げたところ、細胞全体が明るくなるような画像に変化した。明るさは、細胞の基板に接着している面全体に認められ、細胞内の構造は不明瞭となった。このことから、細胞の基板接着面において電子線が細胞膜近傍を直接的に励起しカソードルミネッセンスを生じさせていることを示していることが確認できた。光学顕微鏡における全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF-M) と類似の画像が得られた。このような画像は、細胞の種類または培養の条件によってその明るさが変わることが分かった。現在のところ、GFP-MARCO を強制発現させた細胞が最も明るいカソードルミネッセンス像を呈した。この細胞では長く細い(100nm)樹状突起を生ずることが多いが、その突起もかろうじて観察された。これらの観察できる時間は数秒と短く、時々刻々と細胞の形態が変化し、電子線照射の障害効果が現れることが確認できた。今後は、電子線照射による細胞へのダメージを軽減する手法について検討していく予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. K. Suto, A. Konno, Y. Kawata, S. Tasaka and A. Sugita, “Adsorption Dynamics of the N719 Dye on Nanoporous Titanium Oxides Studied by Resonance Raman Scattering and Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” *Chemical Physics Letters* (in press), 2012 (DOI: 10.1016).
2. Y. Nawa, W. Inami, A. Chiba, A. Ono, A. Miyakawa, Y. Kawata, S. Lin and S. Terakawa, “Dynamic and High-Resolution Live Cell Imaging by Direct Electron Beam Excitation,” *Optics Express*, Vol. 20, No. 5, pp. 5629-5635, 2012 (DOI: 10.1364).
3. A. Sugita, M. Morimoto, Y. Tamaki, N. Mase, Y. Kawata, S. Tasaka, “Self-Organizing Second-order Nonlinear Susceptibility in NLO-Chromophore Doped Amorphous Ferroelectric Polymers, Poly (Cyanophenylene Sulfide),” *Optical Material Express* Vol. 2, No. 1, pp. 1588-1596, 2012 (DOI: 10.1364).
4. S. Ito, K. Ito and F. Iwata, “Probe Type Micro Magnetic Manipulator Utilizing Localized Magnetic Field with Closed-Loop Magnetic Path,” *Int. J. Nanomanufacturing*, Vol. 8, No. 1/2, pp. 161-172, 2012 (DOI: 10.1504).
5. T. Takami, F. Iwata, K. Yamazaki, J. W. Son, J. K. Lee, B. H. Park, and T. Kawai, “Direct Observation of Potassium Ions in HeLa Cell with Ion-Selective Nano-Pipette Probe,” *J. Appl. Phys.*, Vol. 111, p. 044702, 2012 (DOI: 10.1063).
6. Y. Matsumura, W. Inami and Y. Kawata, “Laser Control of Self-Organized Micro-porous Structure by a Shock Wave Induced with a Nano-Second Pulse,” *International Journal of Optomechatronics*, Vol. 5, No. 2, pp. 97-106, 2011 (DOI: 10.1080).
7. F. Iwata, Y. Mizuguchi, H. Ko and T. Ushiki, “Nanomanipulation of Biological Samples Using a Compact Atomic Force Microscope Under Scanning Electron

Microscope Observation,”*Journal of Electron Microscopy*, Vol. 60, No. 6 pp. 359366, 2011 (DOI: 10.1093).

8. S. Ito, F. Iwata, “Nanometer-Scale Deposition of Metal Plating Using a Nanopipette Probe in Liquid Condition,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 50, p. 08LB15 (DOI: 10.1143).

(3-2) 知財出願

① 平成 23 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)