

「先端光源を駆使した光科学・光技術の融合展開」
平成21年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

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の設計・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ニクス研究センター、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

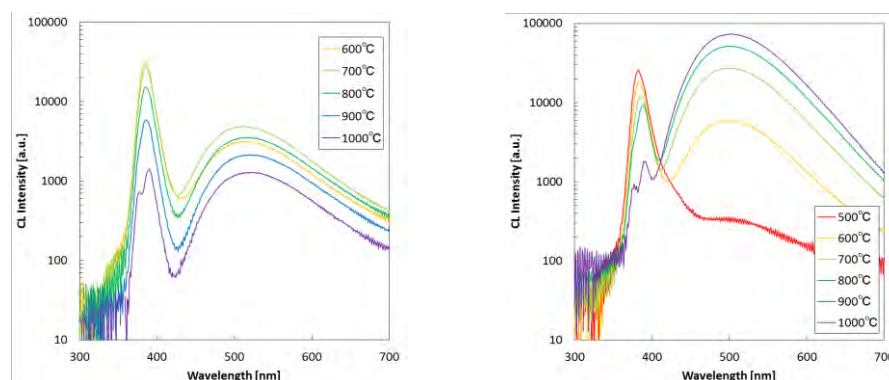
(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究項目: 光電変換膜の作製・評価・高機能化

本研究では、光を用いて試料の微細構造を観察でき、10 ナノメートルの空間分解能を有する実時間・ナノイメージング法を実現することを目的として研究を進めている。この顕微鏡を実現するために、電子線ビームを蛍光薄膜に照射し、微小光源を励起し走査するシステムを開発した。本手法では、走査型電子顕微鏡光学系を用いて電子ビームを収束して蛍光を励起するため、光の回折限界によらない微小光源を励起することができる。

電子線照射による微小光源を実現するための蛍光薄膜の開発を行なった。電子線照射により高輝度・高効率に発光する材料について検討し^{1,4,8-15)}、希土類元素をドーパした材料、ZnO をベースとした新規な蛍光材料の開発を行なった。最適な温度でアニーリングを行なうことによって、可視域で発光することを確認した。ZnO 材料は、電子線照射により高輝度で発光することを既に確認しており、本年度は、ZnO 蛍光膜の作製プロセスを最適化するために、まず ZnO 粒子の作製条件、アニーリング温度を最適化するとともに、結晶性を有する薄膜の成膜についても検討した。

図 1(a)および(b)に大気および還元性の雰囲気中でアニーリングした場合のカソードルミネッセンスの発光スペクトルを示す。アニーリング温度は 500°C から 1000°C の間で変化させている。両雰囲気中において、ともに 400nm 以下の発光ピークは、アニーリング温度が高くなるにつれてその強度が減少している。一方、450-600nm の可視域における幅の広い発光ピークの強度では、大気雰囲気中ではアニーリング温度の上昇とともに減少するが、還元性の雰囲気中では、逆に発光強度が向上していることがわかる。これは還元系の雰囲気中では、ZnO の酸素が抜けやすくなったために、格子欠陥の密度が増え、可視域での発光が増強されたものと考えられる。これらの材料を大気および還元性の雰囲気中でアニーリングした ZnO 粒子の加速電圧によるカソードルミネッセンス強度の依存性を測定した。大気雰囲気中ではアニーリング温度を変化させても、カソードルミネッセンスの発光強度はあまり変化しないが、還元性の雰囲気中ではアニーリング温度に依存してカソードルミネッセンスが大きく向上していることを確認した。ZnO 材料では、アニーリングによりカソードルミネッセンスの強度を大きく向上することができ、その温度特性についても明らかにすることができた。



(a) 大気雰囲気中

(b) 還元性雰囲気中

図 1. アニーリング温度による発光スペクトルの変化

研究項目：微小光源励起システム的设计・製作・評価

走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡を融合した光ナノイメージングシステムを設計・試作した⁵⁻⁷⁾。本システムにより、提案手法の分解能、信号対雑音比、走査速度などの実験条件を最適化することが可能となった。本年度は、光ナノイメージングシステムのためのプロトタイプ的设计・試作・改良を行なった。電子線励起微小光源を用いた光学顕微鏡では、微小光源を励起するための電子線とその発光を検出するための光学系の光軸を一致させる必要がある。光軸が一致していないと、画像の明るさが均一ではなくなるからである。そこで、微小光源の発光を検出する光学系を面内に動かすためのXYステージを導入した。それぞれの光軸を合わせる機構を導入し、システムを改良したことにより、より効率的に光信号を集めることが可能となった。

開発したシステムを用いて、液中の酸化亜鉛(ZnO)粒子の動的観察を行った。電子線でZnOを直接励起し、その発光を取得した。図2に取得した画像を示す。取得した動画のうち、0.5秒間のフレームを抜き出した。フレームレートは、30フレーム/秒である。ZnO粒子が液体の流れに乗って、右下から左上へ移動する様子が観察できた。0.266秒からZnO粒子の光強度が弱くなっていることが分かる。これは、ZnO粒子が焦点面から外れたためである。0.366秒では、再びZnO粒子が焦点面に戻ったことが分かる。このように、高速な動きが観察できることを示した。高速かつ高分解能にデータを取得することは、細胞の機能を解明のために非常に重要であると考えている。

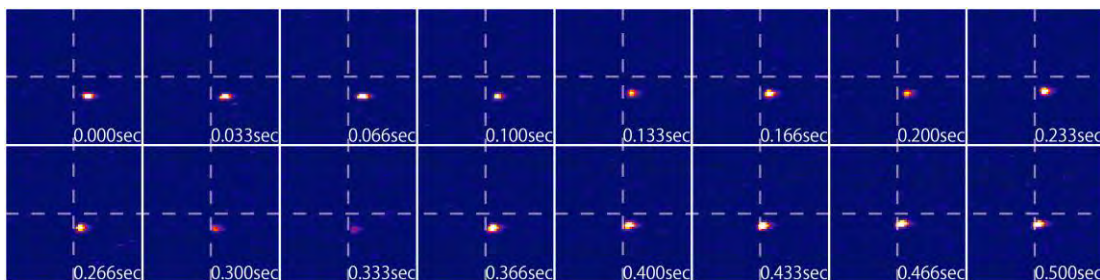


図2. ZnOの動画観察結果。30フレーム/秒。

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

開発した光ナノイメージングシステムのプロトタイプを用いて、SiN膜の上で直接培養した生きた細胞を観察した。紫外線処理、ポリリジン処理、コラーゲン処理などの手法で、HeLa細胞(ヒトの腫瘍細胞)、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、およびMARCO細胞(GFP-MARCO発現CHO細胞)などを、狭い面積のSiN基板上において接着培養するのに成功し、それらのマニピュレーションを行なった^{16,17)}。

SiN膜上に細胞培養を行なうために、SiN膜表面の親水性を向上させるための方法を検討した。SiN表面の親水性は低いことが知られている。そのため、親水性の高い化学物質を基板表面に結合させて単分子層を生成した。親水性が高く比較的結合させやすい化学物質としてカルボキシ基(COOH基)を用いた。親水性の評価として、COOH基の結合させた基板の親水性を水滴の接触角の測定を用いて評価した。この結果よりCOOH基の結合により親水性が向上していることが確認できた。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. T. Ushiki, M. Nakajima, M. Choi, S. J. Cho and , F. Iwata, “Scanning ion conductance microscopy for imaging biological samples in liquid: A comparative study with atomic force microscopy and scanning electron microscopy”, *Micron*, Vol. 43 (2012) 1390–1398, (DOI:10.1016/j.micron.2012.01.012)
2. W. Inami, J. Fujiwara, M. Fukuta, A. Ono, Y. Kawata, “Analysis of electron and light scattering in a fluorescent thin film by combination of Monte Carlo simulation and finite-difference time-domain method,” *Applied Physics Letters*, Vol. 101, No. 15, pp. 151104-151107, 2012, (DOI: 10.1063/1.4758290)
3. H. Nakao, S. Tokonami, T. Hamada, H. Shiigi, T. Nagaoka, F. Iwata, and Y. Takeda, “Direct observation of one-dimensional plasmon coupling in metallic nanofibers prepared by evaporation-induced self-assembly with DNA”, *Nanoscale*, Vol. 4, pp. 6814-6822, (2012) (DOI: 10.1039/C2NR32076B)
4. 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*, Vol. 536C pp. 42-45 (2012) (DOI:10.1016/j.cplett.2012.03.057).
5. A. Chiba, S. Tanaka, W. Inami, A. Sugita, K. Takada, Y. Kawata, “Amorphous silicon nitride thin films implanted with cerium ions for cathodoluminescent light source,” *Optical Materials*, 2013, (DOI:10.1016/j.optmat.2013.02.018)
6. W. Inami, N. H. Viet, A. Miyakawa, Y. Kawata, "Intracellular calcium ion concentration measurement using a phase-modulation fluorescence lifetime method with compensation for phase shift due to the presence of proteins", *Analytical Science*, Vol. 29, No. 2, pp. 199-203, 2013, (DOI: 10.2116/analsci.29.199)
7. F. Iwata, Y. Mizuguchi, H. Ko and T. Ushiki, “A compact nano manipulator based on an atomic force microscope coupling with a scanning electron microscope or an

inverted optical microscope”, *J Micro-Bio Robot* 8 (2013) 25-32, (DOI: 10.1007/s12213-013-0063-7)