SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

電子線直接励起蛍光顕微鏡の高分解能・高機能化と生物試料観察への応用

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2017-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 益田, 有里子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00010193

（課程博士・様式７）（Doctoral qualification by coursework,Form 7）

学 位 論 文 要 旨

Abstract of Doctoral Thesis

専　　攻：ナノビジョン光学専攻　　氏　名：益田有里子
Course：　　Name：

論文題目：**電子線直接励起蛍光顕微鏡の高分解能・高機能化と生物試料観察への応用**
Title of　Thesis：

論文要旨：
Abstract：

本研究では，蛍光体の導入と基板表面の改質により電子線直接励起蛍光顕微鏡を高機能化し，生体試料の観察において SN 比と空間分解能を向上させることに成功した．

生命科学の発展のためにタンパク質や DNA・RNA，細胞内小器官などの詳細な解析が必要であり，近年では，これらの構造や働きなどをイメージングする技術が求められている．電子線直接励起蛍光顕微鏡は，光の回折限界を超える新しい高空間分解能顕微鏡である．試料内の蛍光体を電子線で直接励起することで，大気圧環境の試料を数十ナノメートルの高空間分解能で観察できる．

本論文では，電子線による励起で蛍光を発する蛍光ナノダイヤモンド粒子を観察し，蛍光体の発光特性を評価した．使用した蛍光ナノダイヤモンド粒子の大きさは数十ナノメートルから数百ナノメートルまでばらつきがあり，平均粒径は 100 nm であった．蛍光ナノダイヤモンドの CL スペクトルにおける主な発光波長域は 550～700 nm であり，最大強度を示す発光波長は 602 nm であった．電子線直接励起蛍光顕微鏡による観察では，FWHM が 44 nm の蛍光ナノダイヤモンド粒子が観察できた．

蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した生体試料を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察し，細胞内に取り込まれた蛍光ナノダイヤモンド粒子が観察できたことを確認した．また，蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した HeLa 細胞と導入していない HeLa 細胞を電子線励起蛍光顕微鏡で観察し，細胞内に観察されるベシクルのサイズと蛍光強度を比較した．ナノダイヤモンドの導入によって，細胞内により小さいベシクルが観察できるようになり，蛍光強度は平均で 6.5 倍強くなった．これにより，細胞が蛍光ナノダイヤモンド粒子を取り込むことによって小さいベシクルが形成される可能性が示せた．

さらなる SN 比と空間分解能の向上を目指し，試料基板の表面を改質した．試料基板の表面改質により基板に生体試料が密着することで，より微小な電子線スポットでかつ，高エネルギーな電子線による励起が可能になると考えた．細胞を基板に密着させるために試料

基板の表面をカルボキシ基で修飾し，基板の表面親水性を制御することで細胞の接着力が向上する試料基板を作製した．まず，カルボキシ基の結合量を反応時間で制御し，カルボキシ基の結合により表面親水性が向上することを確認した．改質した試料基板に細胞を培養し，その接着面積を測定することで細胞の付着力を評価した．細胞が強く付着し，遊走しやすい SiN 基板は 1.2～3.1×10^{13} /cm^2 のカルボキシ基が結合した基板であることがわかった．

表面修飾した試料基板に培養した HeLa 細胞を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した．カルボキシ基が 3.0×10^{13} /cm^2 の結合した SiN 基板と改質していない SiN 基板に HeLa 細胞を培養し，電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した．改質していない SiN 基板に培養した細胞の電子線直接励起蛍光顕微鏡画像では，細胞内のベシクルと細胞全体からの弱い蛍光が観察できた．一方，改質した SiN 基板に培養した細胞の電子線直接励起蛍光顕微鏡画像では，細胞内の脂肪滴以外に繊維状の構造や核も確認できた．また，二つの電子線直接励起蛍光顕微鏡画像で得られた蛍光強度を比較すると，改質した SiN 基板上の細胞は改質していない SiN 基板上の細胞よりも約 500 倍強く光っていることがわかった．ベシクルの FWHM を測定して比較すると，改質した SiN 基板を用いた観察画像ではより小さいベシクルが観察できたことがわかった．以上の結果は，細胞が SiN 基板に密着することで電子線が散乱する前に高エネルギーな電子線で試料を励起できるようになったためであると考えられる．

本研究により，蛍光体の生体試料導入とカルボキシル基による試料基板改質で電子線直接励起蛍光顕微鏡を機能化でき，高 SN 比かつ高空間分解能を達成できることがわかった．