

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

静岡大学博士論文

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

益田 有里子

大学院自然科学系教育部

ナノビジョン工学専攻

2016年12月

目次

第 1 章	はじめに	4
1.1	研究背景	4
1.1.1	超解像光学顕微鏡によるイメージング手法	5
1.1.2	電子顕微鏡による生きた生体試料のイメージング手法	6
1.2	電子線励起光を用いたイメージング手法	7
1.3	研究目的	8
1.4	本論文の概要	9
第 2 章	電子線直接励起蛍光顕微鏡の特性	10
2.1	電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理	10
2.2	電子線直接励起蛍光顕微鏡の構成	12
2.3	電子線直接励起蛍光顕微鏡の特徴	13
2.4	電子線直接励起蛍光顕微鏡の試料基板	14
2.4.1	Si ₃ N ₄ 基板の仕様	15
2.5	Si ₃ N ₄ 基板内における電子線散乱シミュレーション	16
2.5.1	電子線散乱による電子線直接励起蛍光顕微鏡の空間分解能の推定	18
第 3 章	蛍光体の電子線直接励起蛍光顕微鏡観察	20
3.1	電子線直接励起可能な蛍光体の選定	20
3.1.1	カソードルミネッセンス	20
3.1.2	カソードルミネッセンスの発生原理	21
3.1.3	電子線直接励起蛍光顕微鏡観察のための蛍光体の条件	22
3.2	蛍光ナノダイヤモンドの特性	23
3.2.1	蛍光ナノダイヤモンド粒子の仕様	26
3.3	蛍光ナノダイヤモンドの電子線励起発光特性	27
3.4	蛍光ナノダイヤモンドの電子線直接励起による観察	29
3.4.1	電子線直接励起と光励起の相関	29
3.4.2	電子線直接励起による高空間分解能観察	31
3.5	まとめ	34

第 4 章	蛍光体を用いた生体試料の電子線直接励起蛍光顕微鏡観察	35
4.1	電子線直接励起蛍光顕微鏡観察のための生体試料の作製	35
4.1.1	HeLa 細胞の特徴	37
4.1.2	HeLa 細胞への蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入	37
4.2	細胞内に導入した蛍光ナノダイヤモンド粒子の電子線直接励起による観察	39
4.3	蛍光ナノダイヤモンド粒子導入によるベシクルサイズの評価	41
4.4	まとめ	43
第 5 章	高 SN 比, 高空間分解能観察のための試料基板の表面改質	44
5.1	表面改質の種類と応用	44
5.2	表面処理方法の選択	45
5.2.1	プラズマ表面処理	46
5.2.2	化学的 surface 修飾	47
5.3	化学的 surface 修飾法における修飾基の選択	48
5.4	Si ₃ N ₄ 基板表面の親水性制御	49
5.4.1	Si ₃ N ₄ 基板表面におけるカルボキシ基分子層の生成	49
5.5	蛍光定量法によるカルボキシ基結合量の分析	51
5.5.1	蛍光物質の結合	51
5.5.2	検量線の作成	52
5.5.3	Si ₃ N ₄ 基板へのカルボキシ基結合量の測定	53
5.6	接触角による表面親水性の測定	54
5.6.1	水接触角の測定	54
5.7	表面改質基板への細胞培養	56
5.7.1	培養の手順	56
5.8	接着力の評価	57
5.8.1	細胞の接着力評価法の検討	57
5.8.2	Si ₃ N ₄ 基板に対する HeLa 細胞の接着力測定	59
5.9	まとめ	61
第 6 章	表面改質基板を用いた生体試料の電子線直接励起蛍光顕微鏡観察	62
6.1	改質基板を用いた HeLa 細胞の電子線直接励起による観察	62
6.2	HeLa 細胞自家蛍光画像の発光強度評価	64
6.2.1	電子の侵入長を用いた細胞-基板間の距離推定	65
6.3	HeLa 細胞自家蛍光画像の空間分解能評価	68
6.4	まとめ	70
第 7 章	おわりに	71

参考文献	73
本研究に関する業績	78
付録 A 光の回折と光学顕微鏡の空間分解能	81
A.1 光の回折	81
A.1.1 ホイヘンスの原理とフレネル回折	81
A.1.2 フラウンホファー回折	83
A.1.3 矩形開口のフラウンホファー回折	83
A.1.4 円形開口のフラウンホファー回折	84
A.2 光学顕微鏡の空間分解能	87
A.2.1 レーリーの分解能	87
A.2.2 光の回折限界と空間分解能	90
付録 B 蛍光顕微鏡の特性	92
B.1 蛍光の発光原理	92
B.2 蛍光顕微鏡の原理と特徴	94
B.2.1 蛍光顕微鏡の構成	94
B.2.2 光学部品の選択	95
B.3 レーザー走査蛍光顕微鏡の特徴	97

第 1 章

はじめに

1.1 研究背景

生命科学を理解する上でタンパク質や DNA・RNA, 細胞内小器官などの詳細な解析は必要不可欠である。例えば, 生物の主要な構成要素であるタンパク質は, 細胞の基本構造を構築したり, 細胞運動や機能をつかさどる重要な役割を果たしている。近年, 質量分析法 [1] やウェスタンブロッティング [2] など, 様々な手法でタンパク質の構造や機能が研究されている。これらの分析法の多くは検出限界があり, 数ナノグラムから数百ナノグラム以上の目的タンパク質が必要となる [3]。多量の目的タンパク質を得るには, 酵素や界面活性剤による溶解, 他にも, 超音波破碎やすりつぶしなどによって, 細胞集団から抽出する手法が一般的である。得られた成果は, ゲノム解析から推定されるタンパク質のアミノ酸配列データと比較され, 生命科学分野や医療分野の発展に大きく貢献している。上記のように *in vitro* での解析が進む一方, *in vivo* での詳細な解析結果は極めて少ない。現在では, 細胞内でのタンパク質や RNA の動態, 細胞内小器官の構造や働きなどを時間的・空間的に解析することに注目が集まっている。

細胞内物質などの動態や構造, 働きなどを解明する最も直接的なアプローチは, その物質が実際に機能する様子をイメージングすることである。これまで, バイオイメージング技術は様々な生体機能の解明に貢献し, 医学, 生物学, 薬学などを発展させてきた。生体試料の観察によく用いられる光学顕微鏡は液中や大気中での観察に優れる一方, その空間分解能は光の波としての性質により 200 nm 程度に制限される。したがって, タンパク質をはじめとする数十ナノメートルの大きさの生体分子や細胞内小器官などの詳細な構造や動態を光で直接観察することは難しかった。

この問題を解決すべく, 近年, 高空間分解能なバイオイメージング技術が開発されている。これらの手法は二つに大別され, 一つは光の回折限界を超えることを目的として開発された超解像光学顕微鏡, もう一つは電子顕微鏡を生きた生体試料観察のために改良した顕微鏡である。以下に超解像光学顕微鏡によるイメージング手法, 電子顕微鏡による生きた生体試料のイメージング手法について各観察手法の利点と課題を述べる。

1.1.1 超解像光学顕微鏡によるイメージング手法

超解像光学顕微鏡として、STED 顕微鏡 [4]、PALM [5]/STORM [6]、SIM [7]、SAX 顕微鏡 [8] などが挙げられる。STED 顕微鏡は非線形光学効果による誘導放出抑制を利用した顕微鏡である。図 1.1 に STED 顕微鏡の原理図を示す。STED 顕微鏡では励起光にドーナツ形状の STED 光を重ね合わせて試料に照射する。STED 光は励起された蛍光分子を蛍光発色させることなく基底状態に戻すことができるため、STED 光が照射された部分では蛍光の発生が抑制される。これにより、ドーナツ形状の中心からの蛍光のみが取得でき、高空間分解能が達成できる。STED 顕微鏡は現在市販化されており、生体試料の高空間分解能観察に貢献している。しかしながら、STED 顕微鏡で観察するためには、誘導放出を引き起こす特殊な蛍光体で試料を染色する必要があるため、その開発が求められる。

PALM/STORM はローカリゼーション法を用いた超解像光学顕微鏡である。光スイッチング可能な蛍光体を異なる時間で光らせ、単一分子の重心位置を測定することで、数十ナノメートルの空間分解能を達成できる。しかしながら、PALM/STORM は光スイッチング可能である特殊な蛍光体が必要であったり、測定時間が長いなど、生体反応の実時間観察に向けては課題も残っている。SIM は光の回折限界の 2 倍の分解能を実現している。干渉縞から画像を再構成する必要があり、多くの計算が必要である。

他に、非線形光学顕微鏡も開発が進んでおり、代表例として、多光子励起顕微鏡 [9] や SHG(第二高調波) 顕微鏡 [10]、CARS(コヒーレント・アンチストークスラマン散乱) 顕微鏡 [11] がある。非線形光学現象は光強度の 2 乗や 3 乗に比例して起こるため、通常のスポットサイズよりも小さい領域で蛍光や散乱が起こり、回折限界を超える分解能で観察できる。

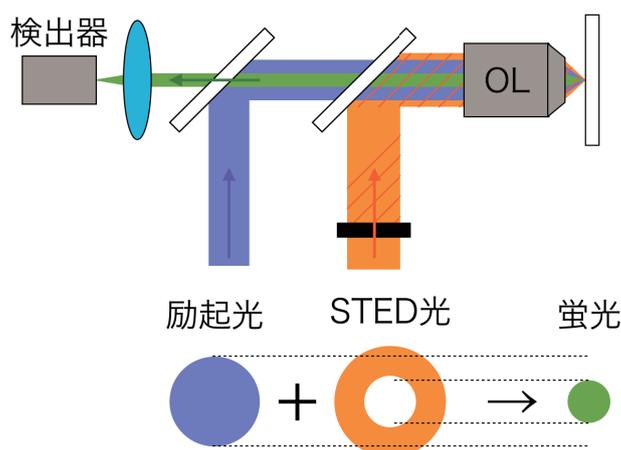


図 1.1 STED 顕微鏡の原理図

1.1.2 電子顕微鏡による生きた生体試料のイメージング手法

電子顕微鏡 [12] は高空間分解能観察に優れ、タンパク質の構造解析などにも利用されている。電子顕微鏡は電子線を試料に照射し、照射領域からの二次電子や透過電子を検出することで画像を取得する。電子の波長は光に比べて非常に短いため、より小さく集束することが出来る。これにより、電子顕微鏡の分解能は光学顕微鏡の分解能よりもはるかに高い、サブナノメートル～数ナノメートルとなる。しかしながら、電子は真空環境でのみ直進できるため、電子線を試料に照射するには試料を真空環境に配置する必要がある。したがって、生きた生体試料の観察は困難であった。

この問題を克服するために、Liquid STEM [13]、大気圧 SEM [14] などが開発されている。Liquid STEM は、半導体薄膜で作製したカプセルを用いることで試料環境を電子顕微鏡内の真空から分離して観察できる。図 1.2 に Liquid STEM の原理図を示す。Liquid STEM では、高速の電子線をカプセルに直接照射して貫通させる。カプセルを貫通した電子線はカプセル内で試料に衝突して散乱・透過しているため、試料の情報が検出できる。その空間分解能は数ナノメートルを達成できる。一方、試料がカプセルに封入されるため、生きた生体試料への酸素や養分の供給が十分でなく死滅するなどの問題を抱えている。また、カプセル内の試料の操作性が悪いことも、生体機能を観察する際には課題となる。

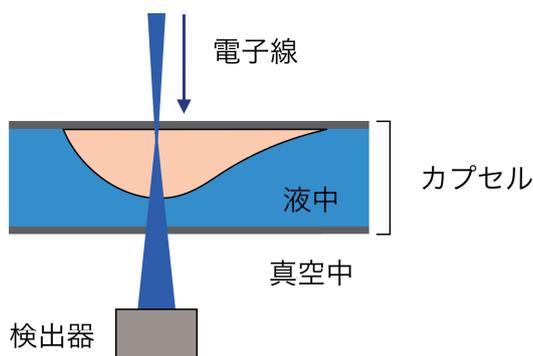


図 1.2 Liquid STEM の原理図

1.2 電子線励起光を用いたイメージング手法

現在開発されている上記の顕微鏡は高空間分解能を達成可能であるが、蛍光体の開発や試料環境など解決すべき課題が残っている。そこで、我々は電子線励起光源を用いた新たなイメージング手法を開発している。我々が開発している顕微鏡は、電子線励起微小光源による超解像光学顕微鏡 [15] と電子線直接励起による超解像蛍光顕微鏡 [16,17] の二つである。これらの顕微鏡は電子線で光を励起して生きた生体試料を高空間分解能に観察できる手法である。電子線励起微小光源を用いた光学顕微鏡は電子線で蛍光膜を励起して微小光源を生成し、これにより光源上部に配置した試料を観察する。本手法の空間分解能は励起される微小光源のサイズに依存し、微小光源のサイズは蛍光膜の膜厚や照射する電子線の加速電圧などに依存する。また、微小光源から試料が離れると光が減衰するため、試料の光軸方向に関する観察領域は微小光源の蛍光強度や蛍光波長などで決定される。これまで、電子線で強い発光を示す ZnO や Zn_2SiO_4 , $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ などの薄膜を蛍光膜として作製し、蛍光強度や得られる空間分解能を評価してきた。本手法では数十ナノメートルの空間分解能が達成でき、細胞内構造の動態観察も可能であることが示された。

それに対して、電子線直接励起による超解像蛍光顕微鏡は、試料内の蛍光体を電子線で直接励起することにより微小領域からの発光を観察する。図 1.3 に本手法の概念図を示す。本手法は大気圧に配置した試料に直接電子線を照射し、それにより励起されたカソードルミネッセンス (CL) を取得して画像化する。本手法の空間分解能は電子線スポットの大きさに依存し、電子線スポットの大きさは電子線の加速電圧によって制御できる。また、加速電圧により光軸方向への電子線の侵入深さが制御できるため、試料深部の観察も可能である。観察する蛍光体は、電子線励起発光体としてよく知られる希土類蛍光体など一般的に使用されているものを利用でき、さらに生体試料の自家蛍光を取得するといった応用も可能である。また、電子線が高速走査できるため高フレームレート観察が可能であり、生体反応の実時間観察も期待できる。本顕微鏡を用いれば、タンパク質などの生体分子や細胞内微細構造を直接的に動態観察することが期待できる。また、医学的な分野だけでなく、コロイド粒子の動態や、結晶の成長過程など、大気圧環境で観察すべき試料の解析・観察も可能となる。

これまでの電子線直接励起による超解像蛍光顕微鏡では、電子線が試料に到達しないことで生体試料を効率よく励起できなかつたり、電子線の散乱により空間分解能が低下するといった問題が生じていた。これらの問題を解決すべく、生体試料の高空間分解能観察に向けてシステムを改良し、観察条件を最適化する必要がある。

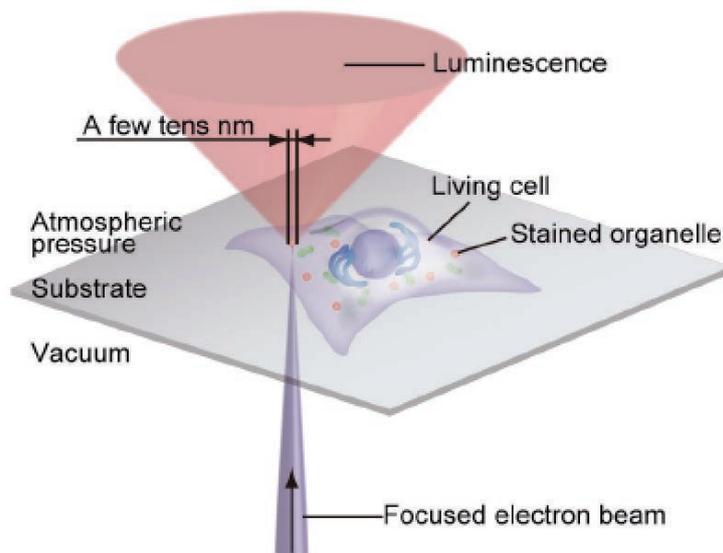


図 1.3 電子線直接励起蛍光顕微鏡の概念図 [16]

1.3 研究目的

本研究の目的は、電子線直接励起蛍光顕微鏡を機能化して、観察画像の SN 比・空間分解能を向上させることである。本研究では、観察試料に蛍光体を導入することで機能化し、観察画像の SN 比を向上させる。また、さらなる SN 比・空間分解能の向上のために、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り試料を励起する。そのために、試料基板の表面を改質することで機能化し、生体試料を試料基板に密着させる。基板に密着した試料は微小で高エネルギーな電子線スポットにより励起され、SN 比と空間分解能が向上すると期待できる。得られる画像の SN 比を向上させることは、高時間分解能観察を実現する上で重要である。

1.4 本論文の概要

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、生体試料の観察画像をSN比と空間分解能について評価する。本論文は全7章から構成される。以下に、本論文の概要について述べる。

第1章では、研究背景として細胞内微小物質の解析の必要性と現在開発されている高空間分解能なバイオイメーキング技術について説明し、本研究の目的を述べた。

第2章では、光の回折限界を超える新しい高空間分解能顕微鏡として、我々が開発する電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理、構成、特徴を述べる。また、モンテカルロシミュレーションを用いて電子線散乱を評価し、本顕微鏡で得られる空間分解能を議論する。

第3章では、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察する蛍光体を評価する。選定した蛍光体である蛍光ナノダイヤモンド粒子の特徴を説明し、発光特性を測定する。また、水中で高空間分解能に観察した結果を示す。

第4章では、生体試料に蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入し、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察する。蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞と導入していない細胞について、得られる画像のシグナル強度と空間分解能を比較して蛍光体導入の優位性を評価する。

第5章では、さらなるSN比・空間分解能の向上を目指し、試料基板の表面を改質した結果を示す。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となる。本章では細胞が密着できる試料基板を作製するための表面改質方法を検討し、細胞の付着力を向上させる。基板の表面改質による表面エネルギーの変化を考察し、作製した試料基板に細胞を培養することで接着力を評価する。

第6章では表面改質した試料基板を用いて生体試料を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察する。表面改質によるシグナル増強と空間分解能について議論する。

第7章では、本論文を総括し、電子線直接励起蛍光顕微鏡の今後の展望について述べる。

第 2 章

電子線直接励起蛍光顕微鏡の特性

本章では、電子線直接励起蛍光顕微鏡 [16, 17] の原理について説明する。本手法では大気圧環境に試料を配置し、電子線で直接励起して高空間分解能を達成する。また、本顕微鏡の構造、特徴、電子線による蛍光体の発光原理についても説明する。

2.1 電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理

本手法では試料内の蛍光体に電子線を直接照射し蛍光を検出する。図 2.1 にその原理図を示す。図 2.1 の下方から照射された電子線は、試料基板を透過して試料内の数十ナノメートルの領域を励起する。電子線を走査することで各点における蛍光を取得し画像化する。本顕微鏡では電子線発生部の真空環境を試料基板で分離しており、試料を大気圧環境に配置できる。これにより従来の蛍光顕微鏡と同様に生きた細胞の観察も可能となる。また、走査型電子顕微鏡の走査コイルで磁場を制御して電子線を走査するため、高速走査により生体試料の動態観察も期待できる。

ここで、光学顕微鏡と比較して電子線直接励起蛍光顕微鏡の空間分解能を議論する。図 2.2 に走査型レーザー蛍光顕微鏡の原理図を示す。図 2.1 と図 2.2 を比較するとわかるように、走査型である電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理は走査型レーザー蛍光顕微鏡と類似している。これらの顕微鏡の空間分解能は試料に照射する励起光スポット径の大きさで決定される。走査型レーザー蛍光顕微鏡では、光の回折限界により励起スポットのサイズが約 200 nm に制限される。この光の回折限界と一般的な光学顕微鏡の空間分解能については付録 A と B で導出する。一方、本手法では電子線による励起スポットのサイズが数十ナノメートルと微小にできるため、光学顕微鏡に比べて高空間分解能な蛍光画像が得られる。

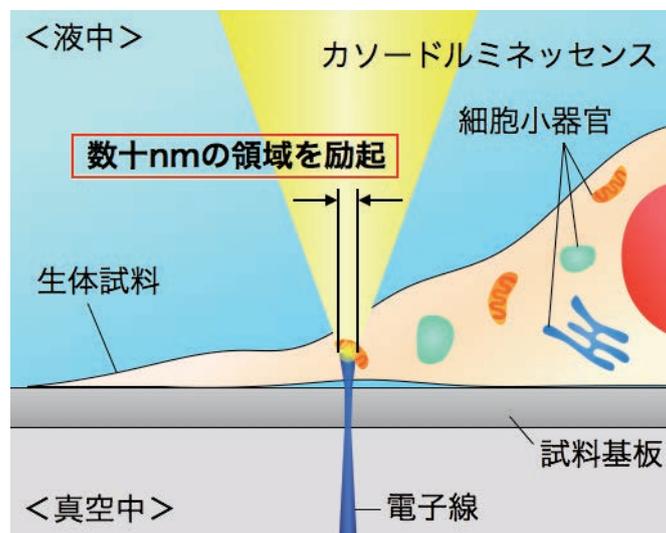


図 2.1 電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理

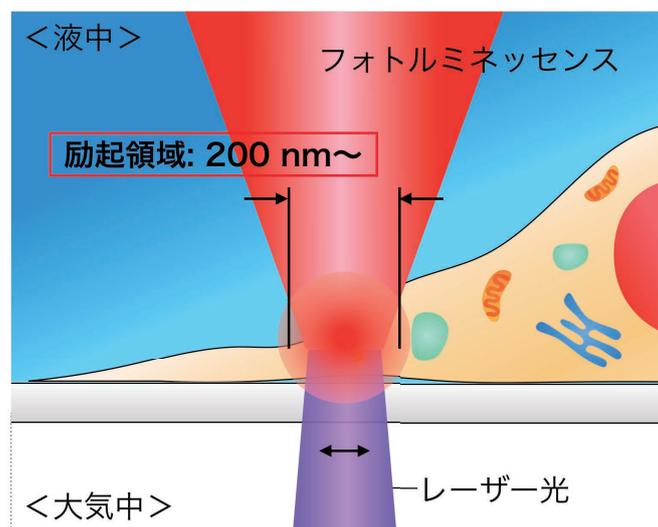


図 2.2 走査型レーザー蛍光顕微鏡の原理

2.2 電子線直接励起蛍光顕微鏡の構成

本顕微鏡は蛍光顕微鏡と走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscope: SEM) を上下に組み合わせた構造をとる。図 2.3 に電子線直接励起蛍光顕微鏡の構成を示す。図 2.3 a) に電子線直接励起蛍光顕微鏡試作機の写真、b) にその構成の模式図を示す。蛍光顕微鏡は OLYMPUS 製の落射蛍光顕微鏡 (BXFM) を、SEM は株式会社アプコ製の小型電子線鏡筒 (MINI-EOC) を用いた。SEM を用いて電子線を試料に照射し、蛍光顕微鏡で試料から出る蛍光を集光する。蛍光の検出には浜松ホトニクス株式会社製の光電子増倍管 (H5784-04) を用い、電子線走査によって得られた信号をコンピューター上で処理して画像を構成する。

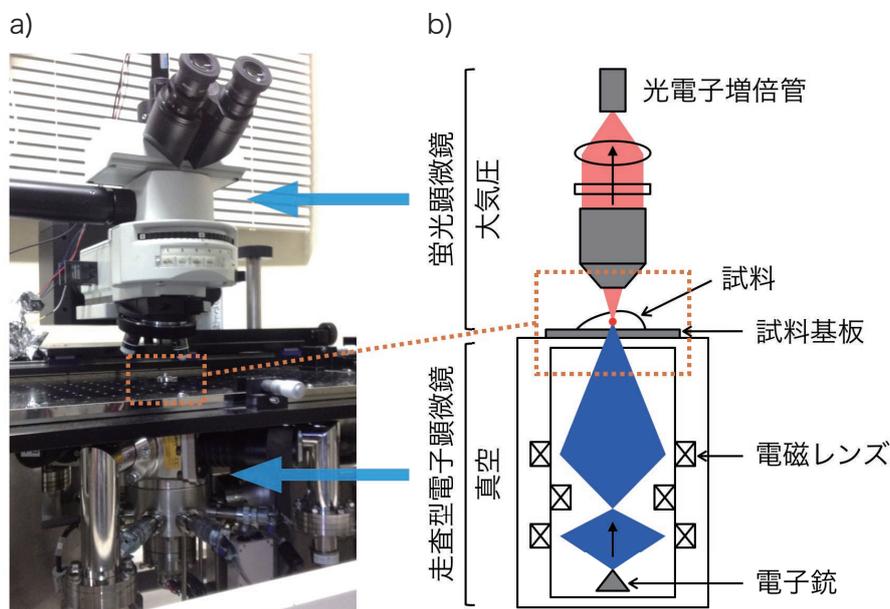


図 2.3 電子線直接励起蛍光顕微鏡の構成

a) 電子線直接励起蛍光顕微鏡の試作機, b) 顕微鏡構成の模式図

2.3 電子線直接励起蛍光顕微鏡の特徴

電子線直接励起蛍光顕微鏡の特徴を以下に示す。

a) 高空間分解能観察が可能

本手法では集束させた電子線で蛍光体を励起する。電子線は真空中で収束させると、ビームの直径を数ナノメートル以下にできる。試料基板の下面に集束された電子線は試料基板内を散乱しながら試料に侵入し、数十ナノメートルの微小領域で蛍光体を励起する。したがって、光の回折限界を超える高空間分解能を達成できる。電子線の散乱領域については次節で述べる。

b) 試料を大気圧環境に配置可能

本手法は試料基板で SEM の真空を分離するため、試料を大気圧環境に配置して観察できる。また、試料環境がオープンな状態であるため、細胞試料に刺激を加えて反応を観察するなどの応用も可能である。

c) 高フレームレート観察が可能

電子線は電磁場の変調により走査するため、高速に走査できる。したがって、電子線による励起効率が高い蛍光体を用いて十分な信号を得ることができれば、50 fps を超えるような高フレームレート観察も可能である。これにより、細胞の動態観察なども期待できる。

d) 細胞の深部が観察可能

電子線の加速電圧を高くすることで電子線スポットが細胞の深部まで侵入できる。これにより、光軸方向の観察領域を任意に変えることができる。

e) CL イメージング以外の解析が可能

本顕微鏡は検出器を分光器に取り替えることで分光観察も可能となる。また、光励起と電子線励起が両方可能な蛍光体を用いることで、光と電子線で同時に観察することも可能である。これにより、試料を光励起で観察してから目的の微小部分のみを電子線励起で観察でき、試料ダメージも低減できる。

2.4 電子線直接励起蛍光顕微鏡の試料基板

以下に電子線直接励起蛍光顕微鏡の試料基板に求められる条件を挙げる。

a) 真空環境を分離できる強度

本顕微鏡では、試料基板で電子線走査部の真空と試料側の大気圧環境を分離する。したがって、試料基板には真空を分離できる強度が必要である。

b) 薄さ

図 2.1 で示すように、電子線は試料基板を透過して試料に照射される。電子線は基板内を通過する際に散乱するため、試料基板が厚いほど散乱量が増えて電子線の径が広がってしまう。したがって、電子線の散乱を抑えてより高空間分解能な観察を達成するためには、できる限り薄い薄膜を用いる必要がある。

以上の条件を満たす基板として、本研究では窒化シリコン (Si_3N_4) を選択した。表 2.1 に Si_3N_4 の物性値を示す [18]。 Si_3N_4 は共有結合による強固で安定した構造を持ち、高硬度、耐熱性・対摩耗性に優れ、高温環境下でも機械的強度を失わないという特性を持つ。曲げ強度は他のセラミックスよりも高く、さらに強化することで曲げ強度は 1500 MPa に及ぶ。エンジニアリングセラミックスの中で最も耐熱衝撃性に優れ、 $\Delta t=400\text{ }^\circ\text{C} \sim 900\text{ }^\circ\text{C}$ の温度変化に耐えることも可能である。また、熱膨張しにくく、寸法安定性も優れている。

表 2.1 Si_3N_4 の材料特性

見かけ密度	3.2 [g/cm ³]
ビッカース硬度 HV1	13.9 [GPa]
三点曲げ強さ	580 [MPa]
ヤング率	290 [MPa]
破壊靱性	4~5 [MPam ^{1/2}]
熱膨張率 (40~800 °C)	3.2 [$\times 10^{-6}/^\circ\text{C}$]
熱伝導率 (20 °C)	25 [W/(m·k)]
比熱	0.64 [J/(g·K)]
耐熱衝撃温度	550 [°C]
体積抵抗率 (20 °C)	> 10 ¹⁴ [$\Omega \cdot \text{cm}$]

2.4.1 Si₃N₄ 基板の仕様

図 2.4 a) に Si₃N₄ 基板の SEM 画像, b) に本顕微鏡で使用した Si₃N₄ 基板の模式図を示す. Si₃N₄ 基板は silson 社 (“<http://www.silson.com/>”) で購入した. Si₃N₄ 基板の厚さは 50 nm であり, 50 μm 四方の窓が開いたシリコン基板に保持されている. 電子線はシリコン基板側から Si₃N₄ 基板側に向けて照射する. Si₃N₄ 基板のみが存在する窓の部分が試料の観察領域となる.

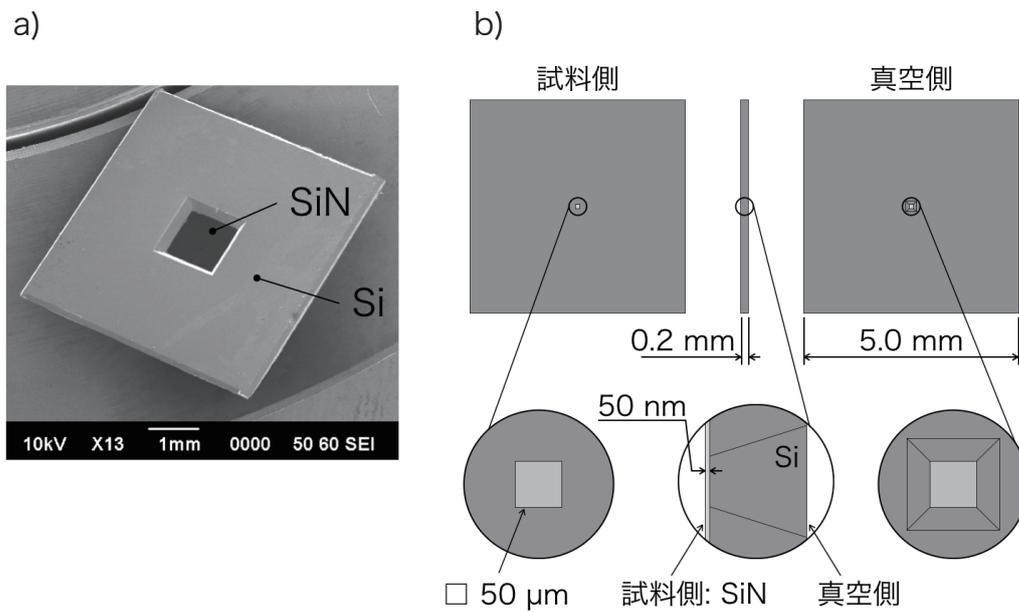


図 2.4 Si₃N₄ 基板

a) SEM 画像, b) 模式図

2.5 Si₃N₄ 基板内における電子線散乱シミュレーション

電子線は Si₃N₄ 基板表面で数ナノメートル以下の直径まで集束され、50 nm 厚の Si₃N₄ 基板内部を散乱しながら透過して試料まで到達する。試料に到達した電子線は、試料内で蛍光体を励起して発散する。電子線直接励起蛍光顕微鏡によって試料が励起される範囲を見積もるために、膜厚 50 nm の Si₃N₄ 基板内における電子線の散乱状態をモンテカルロシミュレーション法 [19] を用いて計算した。Si₃N₄ 基板の試料側表面に到達する電子線のビーム径を計算することでおおよそその空間分解能を見積もることができる。シミュレーションには CASINO (monte CARlo SIMulation of electroN trajectory in sOlids) [20] のフリーソフトを用いた。

図 2.5 に電子線散乱のシミュレーション結果を示す。Si₃N₄ 基板の組成は Si₃N₄、厚みは 50 nm とし、試料側には水 (H₂O) を配置した。水は生体の 70 % を構成すると言われるため、生体試料を模擬して計算するために配置した。電子線照射条件は加速電圧が 1, 2, 3, 4, 5, 10 keV、計算電子数が 200 個、電子ビームの直径が 2 nm の条件で計算した。図 2.5 において、右側は左側の Si₃N₄ 内部を拡大したものである。

加速電圧 1 keV では、電子は真空側から深さ約 20 nm の深さまで侵入した。電子は Si₃N₄ 基板に入射されると散乱を繰り返し、全ての電子が基板内でエネルギーを失った。加速電圧を大きくすると電子が持つエネルギーが高くなり、電子は長い距離を侵入できるようになる。加速電圧 2 keV では、電子が試料側まで到達して基板から数個飛び出すようになった。加速電圧 5 keV 以上では、90 % 以上の電子が Si₃N₄ 基板を透過していることが確認できた。

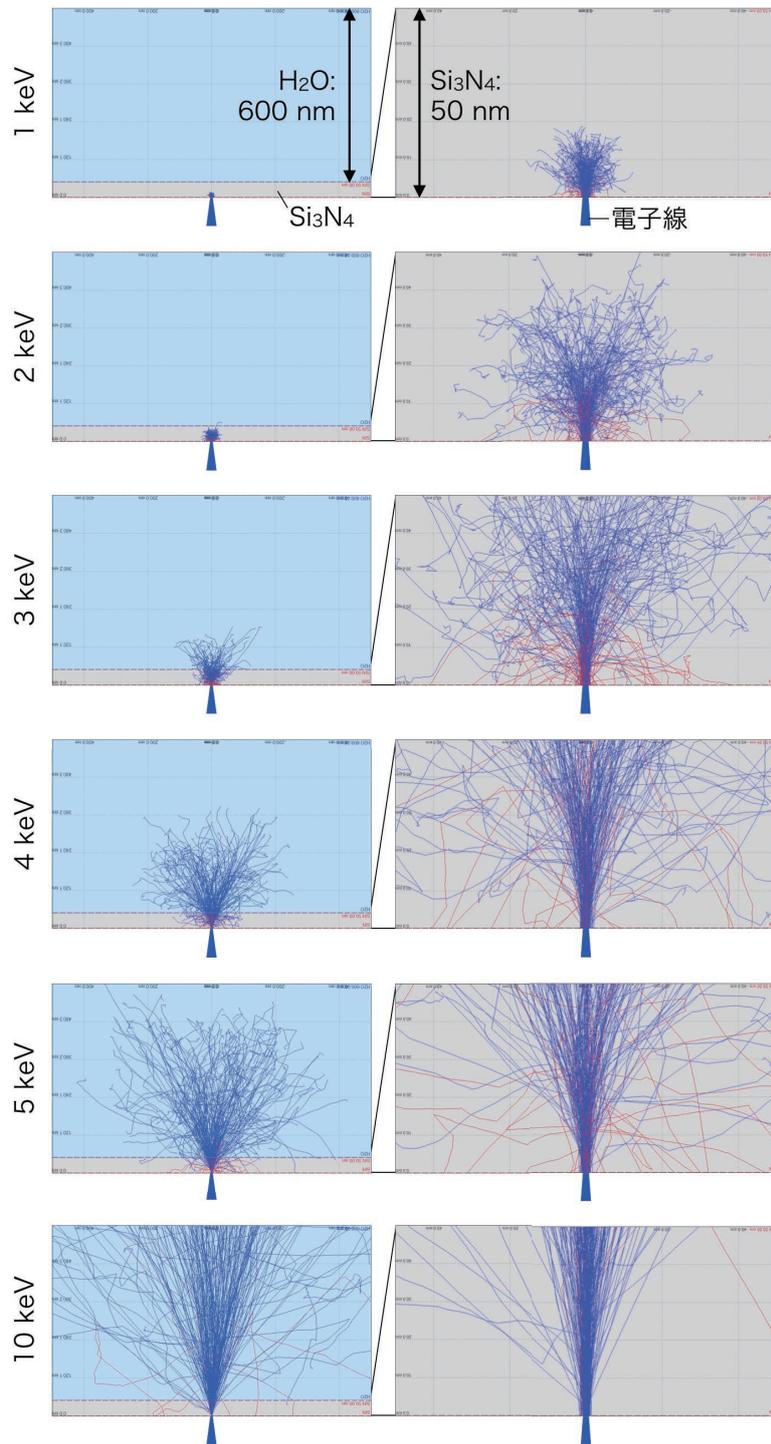


図 2.5 Si_3N_4 基板における電子線散乱のモンテカルロシミュレーション結果

2.5.1 電子線散乱による電子線直接励起蛍光顕微鏡の空間分解能の推定

Si_3N_4 基板内で散乱した電子線が Si_3N_4 基板から試料側に侵入する際にどの程度の広がっているかを調べることで、電子線で励起されるスポットサイズを推定できる。電子線散乱のモンテカルロシミュレーション結果から、 Si_3N_4 基板と水の境界における電子線の広がりを計算した。図 2.6 に電子の分布を計算した結果を示す。図 2.6 a) に図 2.5 での Si_3N_4 基板と水の境界における電子線の通過位置をプロットして示す。このとき、原点は電子線照射位置である。また、各電子の位置を X 軸に投影し、電子線の密度の半値幅を計算して電子線のスポット径とした。図 2.6 b) に各加速電圧における電子線のスポット径を示す。

加速電圧 5 keV の電子線を照射すると、基板の試料側では電子線の直径は 24 nm となった。また、加速電圧 10 keV では直径 12 nm であった。以上より、加速電圧を高くすると試料側に到達した電子線は数十ナノメートルの微小領域を励起できることがわかった。

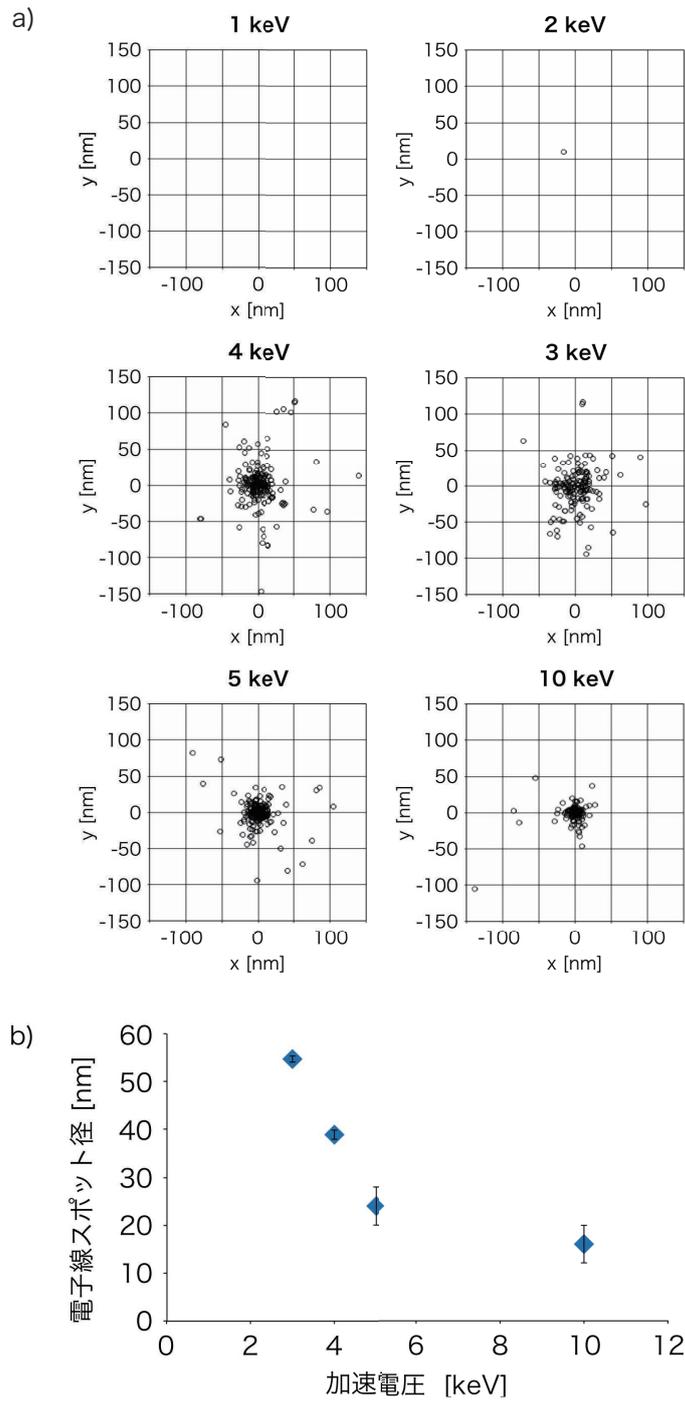


図 2.6 Si_3N_4 基板と水の境界における電子線の分布

a) 電子線の通過位置, b) 各加速電圧における電子線のスポット径

第 3 章

蛍光体の電子線直接励起蛍光顕微鏡 観察

本章では、電子線直接励起蛍光顕微鏡観察に適した蛍光体を選定する。まず、電子線励起による発光の原理を述べ、観察に適した蛍光体の条件を挙げる。また、選定した蛍光体の電子線励起による発光特性を測定した結果を示し、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。

3.1 電子線直接励起可能な蛍光体の選定

電子線直接励起蛍光顕微鏡による観察では一般的に用いられる蛍光体を使用できるが、より高い SN を実現するためにいくつかの条件を満たす蛍光体を選ぶ必要がある。以下にカソードルミネッセンスの原理と蛍光体を選定するための条件を示す。

3.1.1 カソードルミネッセンス

物質に電子線を入射すると、二次電子、反射電子、特性 X 線などの様々な信号を発する。この内に光信号があり、これをカソードルミネッセンス (Cathodoluminescence, CL) という。付録 B 中の図 B.1 に示すように、物質中にある基底状態の電子は励起エネルギーが加わると励起状態となり、電子が元の低いエネルギー準位に戻る際に発光が生じる。CL の場合、励起エネルギーは電子衝突によって与えられる。CL を分光することで化学結合状態を分析できたり、強度の違いを可視化することで画像が得られる。発光現象の研究のほか、格子欠陥を観察したり、不純物のエネルギー準位、試料の歪み量などの調査に使用されている。CL 画像の不均一性は発光の種類や欠陥準位の濃度に依存しており、試料が単結晶でない場合は粒界などによる内部電界の分布にも強く影響される [21]。生体試料のような有機物を観察した場合の空間分解能は電子プローブ径で決まり、半導体では電子・正孔対の拡がりで決まる。

3.1.2 カソードルミネッセンスの発生原理

高速の電子が試料に入射すると、電子は弾性散乱と非弾性散乱を起こす。弾性散乱は入射電子が試料内の結晶ポテンシャルに衝突することにより生じ、ほとんどの電子の軌道変化はこの弾性散乱により起こる。一方、非弾性散乱は入射電子が試料中の電子に衝突してエネルギーを与えることによって生じる。非弾性散乱では、入射電子がエネルギーを損失して二次電子や他の電磁波の励起を引き起こす。二次電子の発生は、電子のエネルギーが自由キャリアを作るための閾値を下回るまでねずみ算的に続けられ、その間も電子の散乱とともに光子放出による緩和が生じる。入射電子が損失したエネルギーの一部は、価電子帯やアクセプター準位にある電子をドナー準位や伝導帯に励起するのに使われ、これにより電子正孔対が生成される。生成した電子や正孔は結晶中を拡散し、局所準位に捕捉されるとそこで再結合する。

二次電子の発生部分は、真空紫外域の光子による励起過程と同等になる。図 3.1 に過剰な電子や正孔が再結合して発光する過程を示す。発光にはバンド間発光 (①) やドナー準位にとらわれた電子と価電子帯の正孔による発光 (②)、ドナー準位の電子とアクセプター準位の正孔によるペア発光 (③)、アクセプター準位の正孔と伝導体の電子による発光 (④)、自由励起子発光 (⑤)、欠陥の作る局在準位にとらわれた励起子による束縛励起子発光 (⑥、⑦) などがある。発光中心となる不純物や欠陥の種類、電子状態の違いが発光スペクトルの形状やピークのシフト、強度変化などに現れる [22-24]。

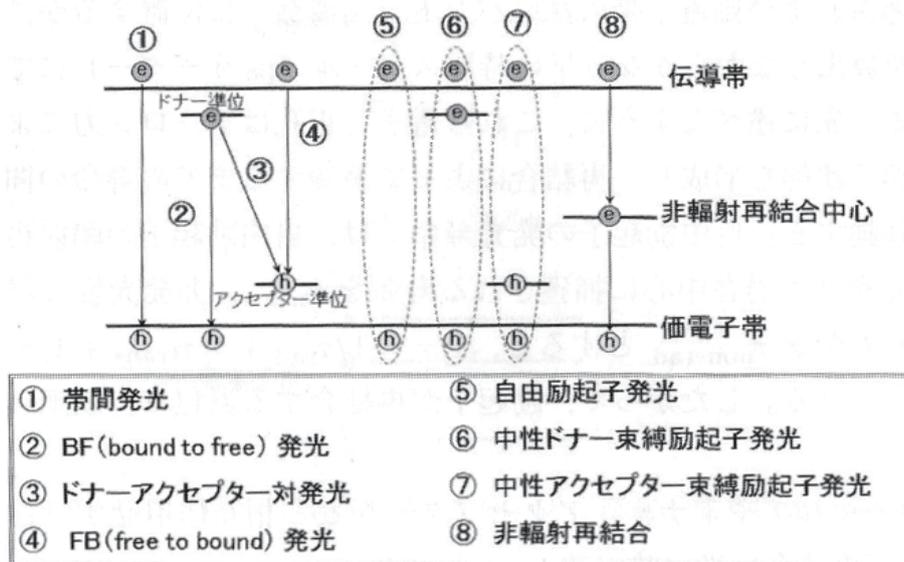


図 3.1 バンドギャップと発光過程 [22]

3.1.3 電子線直接励起蛍光顕微鏡観察のための蛍光体の条件

本顕微鏡では試料を電子線で直接励起して、高空間分解能な蛍光画像を得る。したがって、本研究では高い発光を得るために、電子線励起で強く発光する蛍光体を用いて試料を標識する。以下に本手法で用いる蛍光体に必要な条件を挙げる。

- ・電子線で励起可能
- ・蛍光の褪色がない
- ・蛍光体のサイズが微小である
- ・生体試料に応用しても害が少ない
- ・光励起の蛍光顕微鏡で観察可能

本手法に使用する蛍光体は、電子線で励起できる必要がある。また、安定して発光を発生し、褪色しないことも観察する上で必要な条件である。他にも、高空間分解能観察のために蛍光体のサイズが微小であること、バイオイメージングのために生体試料に応用しても害が少ないこと、本顕微鏡の評価のために光励起の蛍光顕微鏡で観察可能などが求められる。

本研究では使用する蛍光体として無機蛍光体を採用する。有機の蛍光分子は、電子線の高エネルギー照射により構造がすぐに破壊されてしまう。これにより、褪色が非常に速いことが分かっている。また、生体試料に応用することを考慮すると、有機の蛍光体の多くは生体試料に有害なベンゼン環を有しているため、生きた生体試料には有害であると考えられる。

3.2 蛍光ナノダイヤモンドの特性

蛍光ナノダイヤモンドは電子線直接励起で高輝度に発光できる蛍光体の一つで、細胞毒性を示さないことで知られている [25,26]。ダイヤモンドからの蛍光は、結晶構造内部に光学活性欠陥を形成することで得られる。また、その色中心は欠陥の状態によって異なる。代表的な光学活性欠陥として窒素-空孔中心がある。図 3.2 にダイヤモンド結晶構造内の窒素-空孔中心の模式図を示す。図 3.2 のように、窒素-空孔中心はダイヤモンド内の炭素原子が窒素原子と置き換わることで、空孔が窒素原子と隣接する状態を指す。

窒素-空孔中心はエネルギーを照射することで蛍光を発する。窒素-空孔中心の光学特性は二種類あり、一つは電荷のない窒素-空孔中心の光学特性、もう一つは負電荷を帯びた窒素-空孔中心の光学特性である。これら二つの型の存在比が蛍光ナノダイヤモンドの発光スペクトル特性を決定し、光励起の場合では 490~560 nm の励起波長に対して 600~800 nm の範囲の蛍光を発する [25,26]。図 3.3 に窒素-空孔中心の光励起によるスペクトルを示す。窒素-空孔中心は、中性の状態では 575 nm にゼロフォノン線に起因する発光を示し、負に帯電した状態では 638 nm にゼロフォノン線に起因する発光を示す。図 3.4 に窒素-空孔中心のエネルギー準位を示す。窒素-空孔中心には、励起前のスピン状態に依存した二つの緩和過程が存在する。一つは、スピン三重項基底状態のうち、 $S_Z = 0$ 状態から励起された電子が元の $S_Z = 0$ 状態に緩和する過程である。この時、電子は高い確率で蛍光を発する。もう一つは、 $S_Z = \pm 1$ から励起された電子が $S_Z = \pm 1$ と $S_Z = 0$ に緩和する過程である。電子が元の $S_Z = \pm 1$ に緩和する場合、電子は蛍光を発する。一方、 $S_Z = 0$ に緩和する場合は系間交差を引き起こし、無放射過程で遷移することにより蛍光を発しない。 $S_Z = \pm 1$ への緩和と $S_Z = 0$ への緩和は約 50 % の確率で生じる。

蛍光ナノダイヤモンド粒子の発光強度は、1 粒子中の窒素-空孔中心の数によって決定されるため、蛍光ナノダイヤモンドの粒子サイズや励起光の強度によって得られる発光強度とスペクトルが変化する。また、窒素-空孔中心の蛍光はきわめて安定であるが、粒子が小さくなると表面構造の影響を受けて不安定となる。これまでに、粒子の大きさが 5~7 nm 以上の場合では、窒素-空孔中心が高い蛍光安定性を示すことが報告されている [27]。

窒素-空孔中心は、高エネルギーを連続的に照射しても褪色や明滅がないという特徴を持つ。したがって、電子線直接励起と光励起の両方で同一の試料において観察画像を取得できる。さらに、ナノダイヤモンド粒子は細胞毒性が低く [28]、細胞内に取り込まれた後も小胞に内在できるため、生体試料観察への応用が期待されている [27]。タンパク質と結合させる [29] ことでがん細胞標識 [30] や移植細胞の生着を確認 [31] する研究で利用されている。

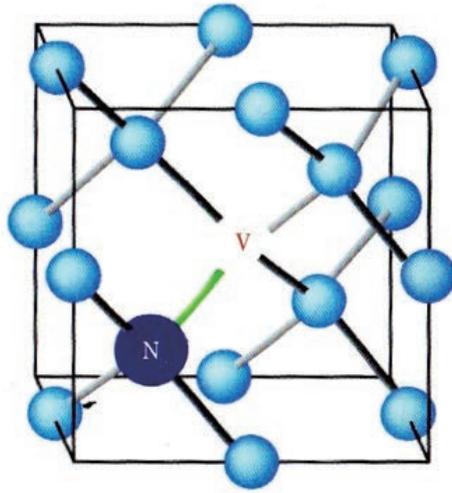


図 3.2 ダイヤモンド結晶構造内における窒素-空孔中心の模式図 [25]

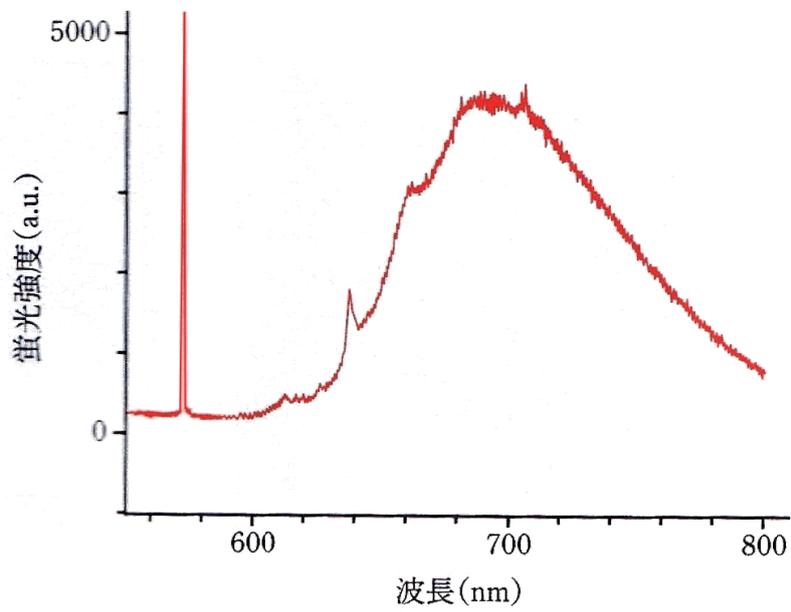


図 3.3 窒素-空孔中心の蛍光スペクトル [25]

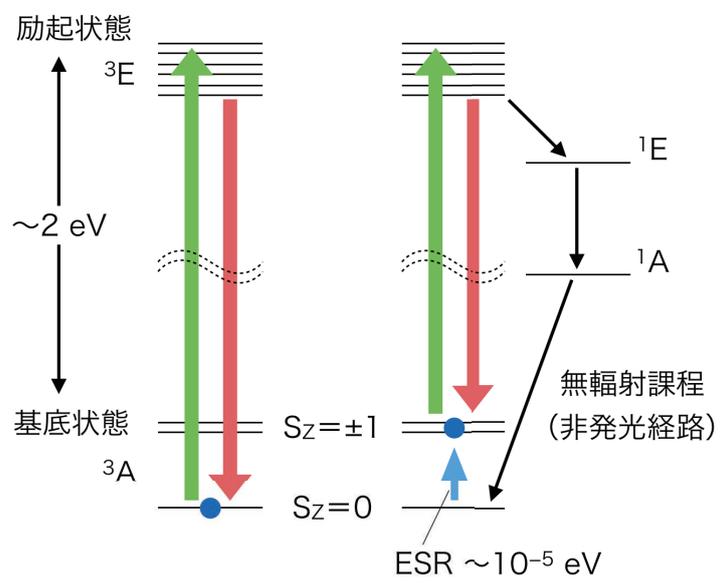


図 3.4 窒素-空孔中心のエネルギー準位

3.2.1 蛍光ナノダイヤモンド粒子の仕様

観察する蛍光ナノダイヤモンド粒子 [29] には、窒素-空孔中心が内在するものを使用する。本研究で用いた蛍光ナノダイヤモンド粒子は、台湾 Academia Sinica, Genomics Research Center より提供いただいた。このダイヤモンド粒子は強酸で処理されており、これにより表面がカルボキシ基化しているため水によく分散する。水に分散させた粒子をシリコン基板上で乾燥させて SEM で観察した。図 3.5 に蛍光ナノダイヤモンド粒子の SEM 画像を示す。図 3.5 より、蛍光ナノダイヤモンド粒子は角ばった形状であることがわかる。また、粒子の大きさは数十ナノメートルから 300 nm 程度までばらつきがあり、平均粒径は約 100 nm である。

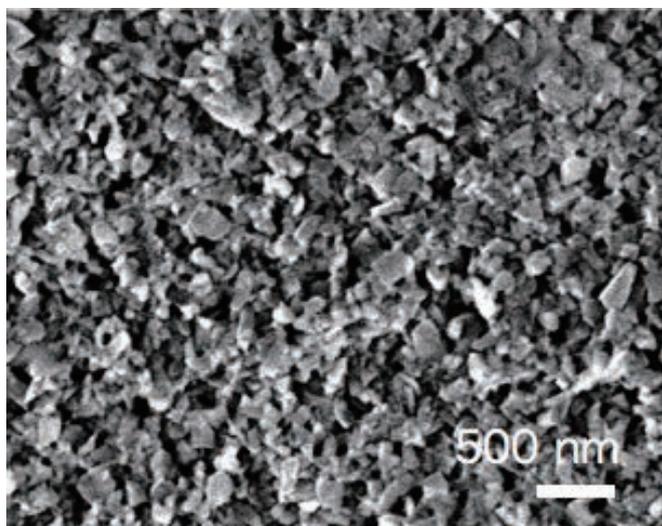


図 3.5 蛍光ナノダイヤモンド粒子の SEM 画像

3.3 蛍光ナノダイヤモンドの電子線励起発光特性

窒素-空孔中心を含むナノダイヤモンド粒子を電子線で励起し、発光スペクトルを測定した。図 3.6 に CL 測定系の概略図を示す。走査型電子顕微鏡 (JSM-7001F, 株式会社日本電子) を用いて CL を励起し、SEM 内に配置したミラー (LS-100-EM-TYPE2, 株式会社堀場製作所) を用いて CL をファイバーに集光する。ファイバーから分光器 (SP-2300i, Princeton Instruments) に CL を入れて分光し、光電子増倍管 (H11461-P11, 浜松ホトニクス株式会社) を用いて各波長における蛍光強度を測定した。光電子増倍管で取得した電流値の信号は、オペアンプで増幅して I-V 変換して検出した。

図 3.7 に平均粒径が 100 nm 蛍光ナノダイヤモンド粒子の CL スペクトルを示す。縦軸に CL 強度を、横軸に波長を示す。CL スペクトルにおける主な発光波長域は 550~700 nm であり、602 nm で最大強度を示した。また、測定中に電子線励起による褪色は見られなかった。以上より、電子線直接励起蛍光顕微鏡による長時間観察が可能であることが確認できた。

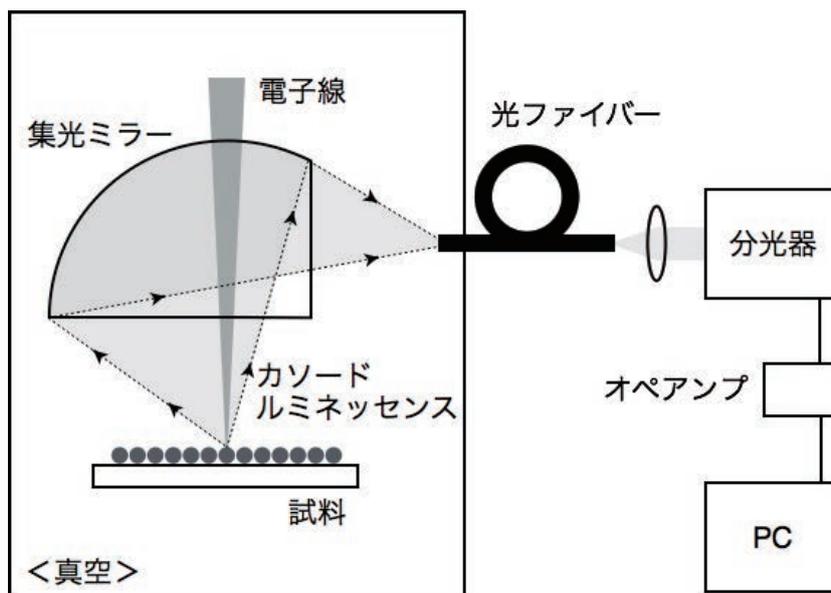


図 3.6 CL 測定系の概略図

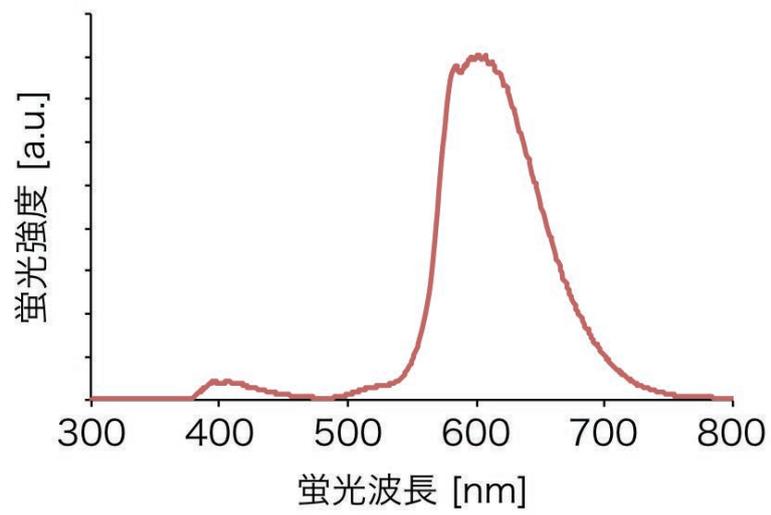


図 3.7 100 nm 蛍光ナノダイヤモンド粒子の CL スペクトル

3.4 蛍光ナノダイヤモンドの電子線直接励起による観察

蛍光ナノダイヤモンドの粒子を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。本節では、電子線直接励起と光励起の相関を確認した結果と、電子線直接励起による高空間分解能観察の結果を示す。

3.4.1 電子線直接励起と光励起の相関

蛍光ナノダイヤモンド粒子は電子線励起と光励起の両方で発光するため、まず、電子線直接励起と光励起で観察した画像における蛍光ナノダイヤモンドの位置の相関を確認した。同一の蛍光ナノダイヤモンド試料を電子線直接励起蛍光顕微鏡と共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡で観察した。蛍光ナノダイヤモンド粒子の凝集体が分散した純水を Si_3N_4 基板上に滴下して、 Si_3N_4 基板表面に蛍光ナノダイヤモンドが沈殿した試料を作製した。作製した試料を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。同一サンプルの同一箇所を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡 (SP8, Leica) で観察した。

図 3.8 に蛍光ナノダイヤモンド粒子の観察結果を示す。図 3.8 a) に共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡画像を示す。共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の観察には波長 552 nm の励起光を用いた。画像サイズは 1024×1024 pixel, ピクセルサイズは 81.1 nm, 画像取得時間は約 0.2 fps とした。図 3.8 b) に電子線直接励起蛍光顕微鏡画像を示す。電子線直接励起蛍光顕微鏡の観察には 4.8 keV の加速電圧を用いた。画像サイズは 1024×1024 pixel, ピクセルサイズは 59.1 nm, 画像取得時間は 0.05 fps で観察した。二つの画像中に示す矢尻は二つの画像において同じ位置を示しており、蛍光ナノダイヤモンド粒子からの蛍光の分布が一致していることが確認できた。また、二つの顕微鏡観察において、電子線照射、または、光照射による蛍光ナノダイヤモンドの光褪色は見られなかった。これらより、蛍光ナノダイヤモンドが電子線直接励起蛍光顕微鏡と共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡の両方においてイメージング用プローブに適応可能であることを確認した。

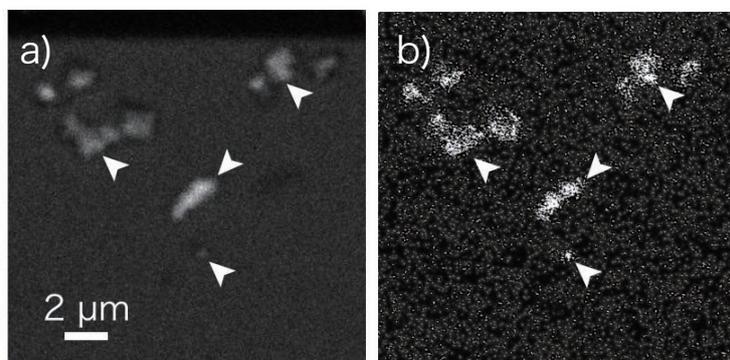


図 3.8 電子線直接励起と光励起による蛍光ナノダイヤモンドの観察画像

a) 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡画像, b) 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像

3.4.2 電子線直接励起による高空間分解能観察

電子線直接励起蛍光顕微鏡を用いて単一の蛍光ナノダイヤモンド粒子を観察した。前節のように粒子同士が凝集しないように、蛍光ナノダイヤモンドのコロイド溶液に超音波を当てて凝集体を分散させ、 Si_3N_4 基板上に滴下した。図 3.9 に電子線直接励起蛍光顕微鏡による蛍光ナノダイヤモンドの高空間分解能観察結果を示す。図 3.9 a) に電子線直接励起蛍光顕微鏡画像、b) に a) 中における赤い枠線内の拡大画像を示す。電子線の加速電圧を 4.8 keV とし、ピクセルサイズは 8.8 nm、画像取得時間は 0.05 fps として観察した。図 3.10 に図 3.9 b) 中の矢印間にある大小二つの粒子について、取得光子数のラインプロファイルを示す。raw データをガウスフィットした曲線の FWHM を計算すると、二つのうち大きい粒子は 114 nm、小さい粒子は 44 nm であった。これにより、電子線直接励起蛍光顕微鏡が光の回折限界を超える高空間分解能を達成できることが確認できた。

図 3.9 における観察条件である加速電圧 4.8 keV のときの電子線のスポットサイズをモンテカルロ法を用いてシミュレーションした。図 3.11 に電子線スポットサイズの計算結果を示す。a) に電子線の散乱状態の模式図、b) に Si_3N_4 基板表面における電子線通過位置を示す。電子線照射条件は加速電圧が 4.8 keV、計算電子数が 200 個、電子ビームの直径が 2 nm とし、 Si_3N_4 基板の組成は Si_3N_4 、厚みは 50 nm として計算した。図 3.11 b) の電子線通過位置を X 軸に投影し、電子密度の FWHM を計算すると、直径が約 24 nm となった。このことから、今回の観察では蛍光ナノダイヤモンド粒子の FWHM は 44 nm であるが、より小さいサイズの蛍光粒子を用いれば顕微鏡の空間分解能は向上すると考えられる。

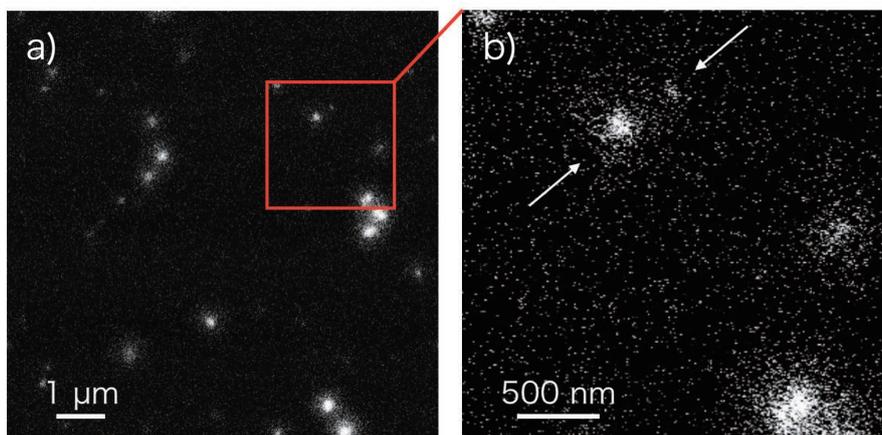


図 3.9 蛍光ナノダイヤモンドの高空間分解能観察結果

a) 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像、b) a) 中赤枠の拡大図

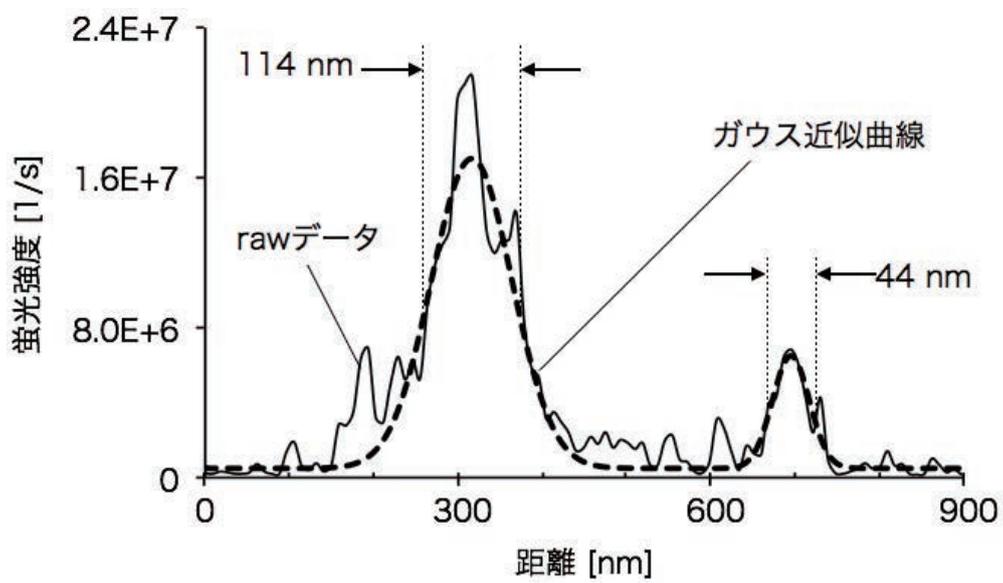


図 3.10 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像における取得光子数のラインプロファイル

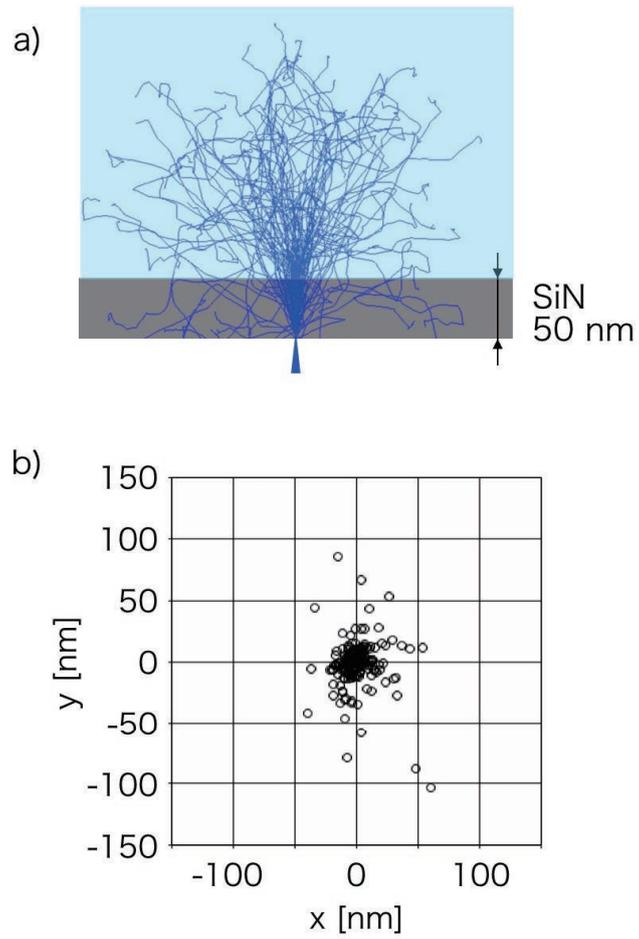


図 3.11 加速電圧 4.8 keV における電子線のスポットサイズの計算結果

a) 電子線散乱のシミュレーション結果, b) Si₃N₄ 基板表面の電子線通過位置

3.5 まとめ

本章では、窒素-空孔中心を含む蛍光ナノダイヤモンド粒子を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。電子線励起による蛍光ナノダイヤモンド粒子の発光特性を評価し、CL スペクトルが 550~700 nm であることを確認した。また、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡と電子線直接励起蛍光顕微鏡の両方で蛍光観察可能であることを確認し、同一の試料を光励起でも評価できることを示した。電子線直接励起蛍光顕微鏡による観察では、蛍光ナノダイヤモンド粒子の FWHM において 44 nm を達成した。これにより、電子線直接励起蛍光顕微鏡が光の回折限界を超えた高い空間分解能を達成できることを確認した。電子線散乱のシミュレーション結果から、 Si_3N_4 基板表面における電子線スポットサイズは約 24 nm と見積もられ、観察試料の粒子サイズを小さくすることでさらなる高空間分解能の達成も期待できる。

第 4 章

蛍光体を用いた生体試料の電子線直接励起蛍光顕微鏡観察

本章では、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た結果を示す。また、蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞と導入していない細胞について、取得した蛍光画像を比較した結果を示す。

4.1 電子線直接励起蛍光顕微鏡観察のための生体試料の作製

まず、電子線励起蛍光顕微鏡のための生体観察用の試料ホルダーを作製する。図 4.1 に電子線直接励起蛍光顕微鏡による生体試料観察のための培養基板の作製手順を示す。図 4.1 のように、試料ホルダーの培養液を保持する部分はガラス製容器であり、容器の中心には Si_3N_4 基板が入る穴をあけてある。 Si_3N_4 基板を支えるために、ガラス容器の底面にステンレスの薄い板を用いた。このステンレス薄板は電子線照射によるチャージアップを防ぐ役割もある。ステンレス薄板中心には、 Si_3N_4 基板のウィンドウに電子線を照射するための穴が開いている。ステンレス薄板とガラス容器を合わせて、 Si_3N_4 基板のウィンドウがステンレス基板の穴におさまるように乗せる。それぞれのパーツはエポキシ樹脂で接着する。専用のホルダーで固定して一晩置き、エポキシ樹脂が完全に乾くのを待つ。

作製した試料ホルダーをオートクレーブ (Super Clave FX-220, ヒルソン・デック) で 121°C において 30 分間加熱して滅菌した。滅菌した試料ホルダーに 200 個/mL の濃度に調整した細胞懸濁液を 2 mL 入れる。この試料ホルダーを CO_2 インキュベータ ($5\% \text{CO}_2$, 37°C) にいれて細胞を培養した。基板上に培養できた細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、PBS(リン酸緩衝液) と置換してから電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。

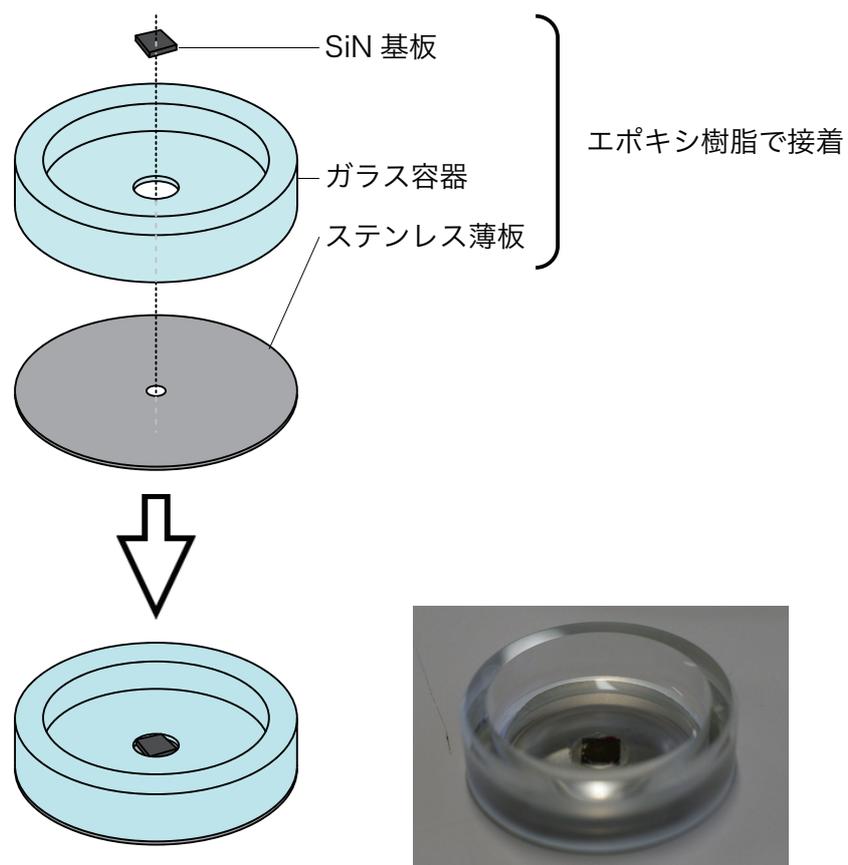


図 4.1 生体試料観察用の試料基板の作製手順

4.1.1 HeLa 細胞の特徴

本研究では観察する生体試料に HeLa 細胞を使用した。HeLa 細胞は最も一般的な細胞株の一つといわれ、*in vitro* での試験や研究に幅広く用いられる培養細胞である。入手が容易、培養のプロトコルが確立しているなどの理由で実験的に扱いやすい。HeLa 細胞はヒト子宮頸癌の腫瘍病変から分離されて株化された付着細胞であり、その形態は上皮様である。他の癌細胞と比較しても高い増殖能を持ち、足場非依存性増殖も可能であるなど癌細胞としての性質を持つ。HeLa 細胞の特徴として、細胞融合が自由に行えることや、様々な種類のウイルスに感受性であることなどが挙げられる。これらの性質を利用して、癌細胞の発生・増殖の仕組みの解明、細菌・ウイルスとヒト細胞の関係や遺伝子異常と病気の関係の解析、薬剤や放射線治療の効果の検証というように、多くの研究分野に貢献している [32,33]。

4.1.2 HeLa 細胞への蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入

本研究では、エンドサイトーシスによって蛍光ナノダイヤモンド粒子を HeLa 細胞に導入する。エンドサイトーシスは細胞が細胞外物質を取り込む作用のことであり、ほとんどの真核細胞で生じる作用である。細胞はエンドサイトーシスにより栄養物の摂取や微生物に対する防御の機能を果たす。図 4.2 にエンドサイトーシスの工程を示す。まず、細胞膜の一部が物質を含みながらしだいに細胞の内側へ陥入し、細胞膜が閉じられる。さらに、小胞を細胞膜から切り離すことで細胞外の物質や粒子を取り込む。このとき形成されるベシクルをエンドサイトーシス小胞と呼ぶ。固体を取り込む場合は、ほとんどがエンドソームと呼ばれる消化酵素を格納するベシクルと融合する。融合によってエンドサイトーシス小胞は消化酵素を入手し、細胞内へと運ばれながら細胞内の消化器官であるリソソームへと成熟する。バクテリアなどが取り込まれた場合、リソソーム中で加水分解酵素によって破壊される。

エンドサイトーシスは、取り込む物質の種類や機構の違いからファゴサイトーシスとピノサイトーシスに大別される。蛍光ナノダイヤモンド粒子は、固体の取り込み過程であるファゴサイトーシスで取り込まれると考えられる。巨大分子の凝集体や他の細胞の一部、微生物や粒子など、大きな物質の取り込みを貪食と呼ぶ。貪食はアメーバなどの単細胞真核生物にとって食餌を意味し、栄養をとるための行為である。人間のような複雑な生命体において、貪食は貪食細胞と呼ばれる特別な細胞に限定された行為である。貪食細胞には白血球やマクロファージなどがあり、体外から侵入した物質や微生物を消化している [32,34]。また、HeLa 細胞のようなガン細胞にも貪食が見られる。

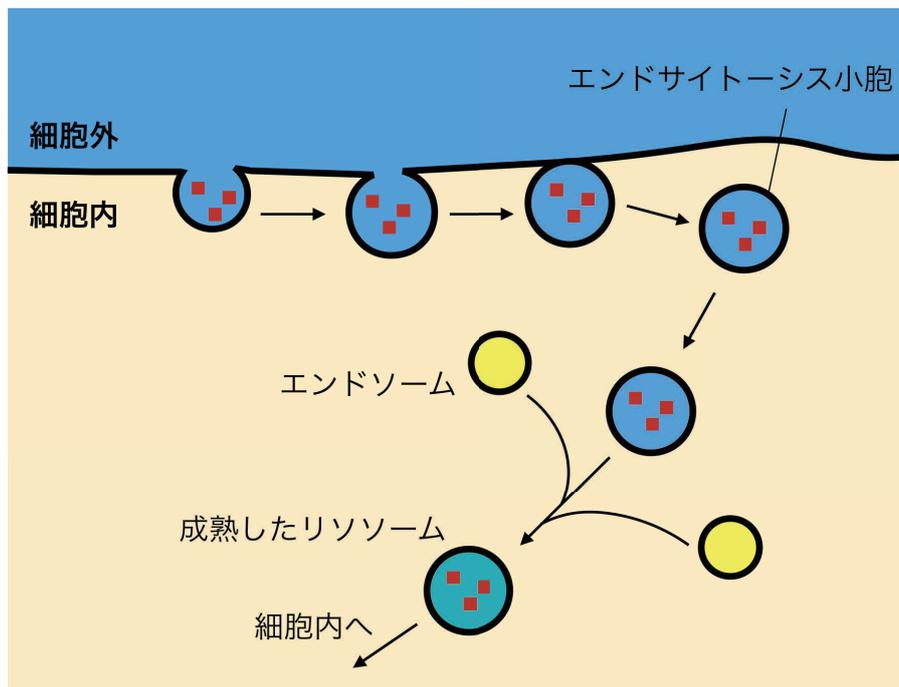


図 4.2 エンドサイトーシスの工程

4.2 蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞の電子線直接励起による観察

Si₃N₄ 基板に培養して蛍光ナノダイヤモンド粒子を取り込ませた HeLa 細胞を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。図 4.3 に HeLa 細胞の観察結果を示す。図 4.3 a) に電子線直接励起蛍光顕微鏡画像、b) に同一視野における位相差顕微鏡画像を示す。電子線直接励起蛍光顕微鏡では細胞内において粒子状の構造が強い発光で観察できた。この輝点は蛍光ナノダイヤモンドからの蛍光で、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた粒子が励起できたと考えられる。また、脂肪滴と呼ばれるベシクルは強い CL を発するため [35-37]、蛍光ナノダイヤモンドが含まれていないベシクルからも蛍光が取得できていると考えられる。輝点以外の発光強度の低い部分では、細胞質が電子線で励起されたことで細胞の自家蛍光が観察できていると考えられる。

また、図 4.3 a') と b') には、a) と b) で観察できた細胞をそれぞれ点線で囲んで示す。電子線直接励起蛍光顕微鏡画像の蛍光の位置と位相差顕微鏡画像の細胞の位置が一致したことがわかる。以上より、電子線直接励起蛍光顕微鏡を用いて蛍光ナノダイヤモンド粒子の発光と細胞の自家蛍光が観察できたことが確認できた。

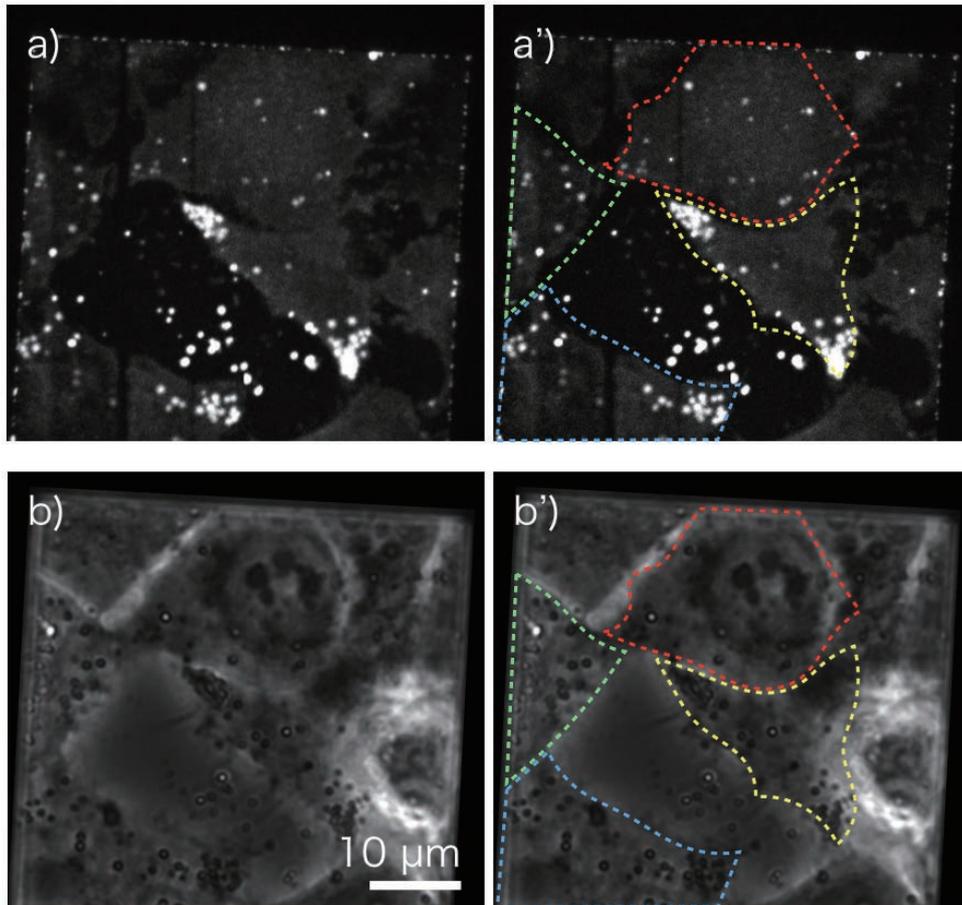


図 4.3 蛍光ナノダイヤモンドを導入した HeLa 細胞の観察結果

- a) 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像, a') a) 中の細胞を点線で囲んだ画像
 b) 位相差顕微鏡画像, b') b) 中の細胞を点線で囲んだ画像

4.3 蛍光ナノダイヤモンド粒子導入によるベシクルサイズの評価

本節では、蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入によって形成されるベシクルの大きさを評価した。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 細胞を電子線直接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。図 4.4 に蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入していない HeLa 細胞の観察結果を示す。a) に電子線励起蛍光顕微鏡画像、b) に同一視野における位相差顕微鏡画像を示す。a) の蛍光像では、細胞内の脂肪滴からの CL が輝点として観察できた。

図 4.5 に蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞と導入していない細胞の電子線直接励起蛍光顕微鏡画像における細胞内の輝点の FWHM を示す。横軸に輝点の FWHM、縦軸に蛍光強度を示す。図 4.5 における輝点について、FWHM を規格化して輝点の蛍光強度を比較すると、蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞内で観察された輝点は約 6.5 倍強く発光していた。蛍光ナノダイヤモンド粒子は細胞の自家蛍光よりも強い CL を発するため、エンドサイトーシスにより取り込まれた細胞内の蛍光ナノダイヤモンド粒子が観察できたことが示せた。また、図 4.5 より、蛍光ナノダイヤモンド粒子を取り寄せた細胞ではより小さい輝点が観察できており、サイズが小さい輝点でも強く光っていることがわかる。これは蛍光ナノダイヤモンドを導入させたことにより、より小さいベシクルが形成されたためであると考えられる。以上より、物質取り込み過程の動態を観察できる可能性を示唆した。

蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入によって輝点サイズは小さくなったが、輝点の FWHM は 200 nm 以上であり、前章で蛍光ナノダイヤモンド粒子のみを観察した場合よりも空間分解能が低下している。この原因としては、エンドサイトーシスの過程で蛍光ナノダイヤモンド粒子が含まれるベシクル同士が融合し、蛍光ナノダイヤモンド粒子がベシクル内で凝集していることが考えられる。この場合、高空間分解能観察にはエンドサイトーシスの時間や投入する粒子の濃度を最適化する必要がある。もう一つの原因として、蛍光ナノダイヤモンド粒子が細胞内部に取り込まれることで粒子が試料基板表面から離れて存在し、粒子のみを観察した場合と比較して、散乱により広がった電子線で励起されていることが考えられる。この場合、高空間分解能観察のためには、細胞を基板に密着させ、電子線散乱が少ない基板表面付近で蛍光体を励起する必要がある。

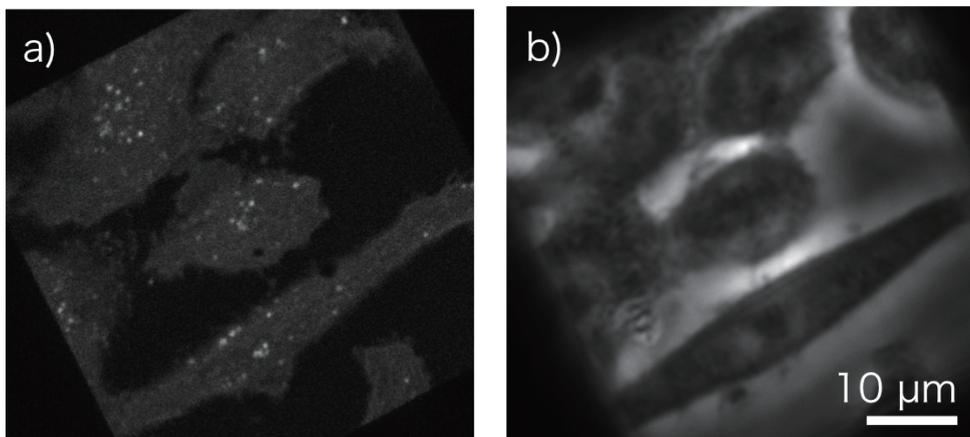


図 4.4 HeLa 細胞の観察結果

a) 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像, b) 位相差顕微鏡画像

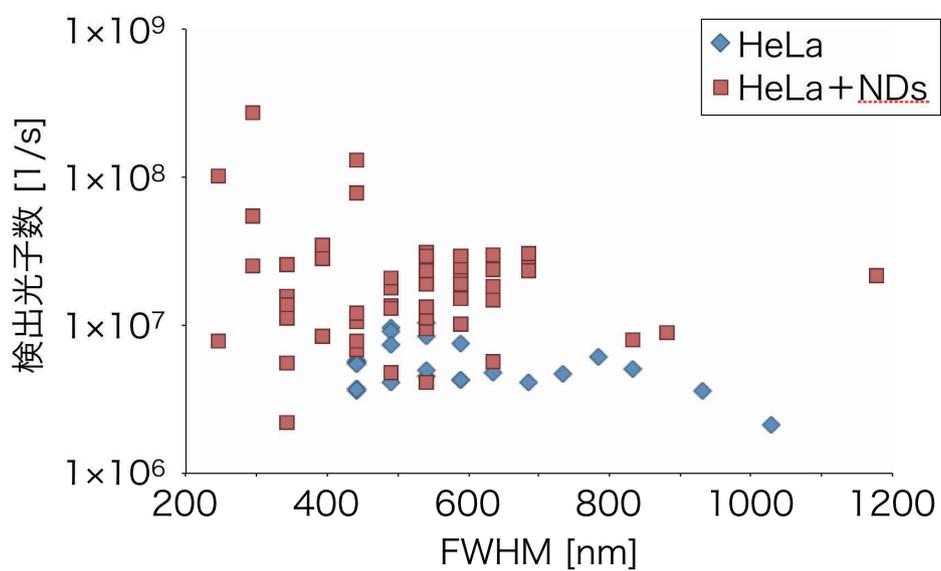


図 4.5 細胞内で観察された輝点の FWHM

4.4 まとめ

本章では、細胞内に蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入し、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。電子線直接励起蛍光顕微鏡では細胞内の粒子状構造が強い発光を示し、細胞内に取り込まれた粒子が観察できた。輝点以外にも、細胞質からの自家蛍光が観察できた。

また、蛍光ナノダイヤモンド粒子を導入した細胞と導入していない細胞について、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察できた細胞内の輝点の FWHM と蛍光強度を比較した。蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入により細胞内のベシクルが約 6.5 倍強く発光していることがわかった。蛍光ナノダイヤモンド粒子は細胞内のベシクルからの自家蛍光よりも強く発光するため、細胞内の蛍光ナノダイヤモンド粒子を観察できたことが示せた。また、蛍光ナノダイヤモンド粒子の導入により、より発光強度が高く、サイズの小さい輝点が観察できたことがわかった。以上より、物質取り込み過程の動態を観察できる可能性を示唆した。

第 5 章

高 SN 比，高空間分解能観察のための試料基板の表面改質

本章では，まず培養基板の改質技術について述べる．次に， Si_3N_4 基板を表面改質し，基板表面を評価した結果を示す．

5.1 表面改質の種類と応用

バイオテクノロジー分野で物質の表面改質が行われる目的は，物質の生体適合性を上げるためであることが多い．物体と生体の適合性を上げることで，人体に接触させたり，埋め込んだりする際に，炎症を最小限に抑えるためである．実際に，表面処理技術はペースメーカーやカテーテル [38]，人工骨や人工臓器など実際の医療機器に施されたり [39]，細胞培養実験の培養基板 [40] として利用されており，非常に重要な技術であるといえる．表面処理手法の具体例として，人工骨に用いられるチタン表面のアルカリ加熱処理 [41] や，ペースメーカーなどに使われるセラミックスやポリマーの表面をコラーゲンや MPC ポリマーでコーティングする手法 [42] などがある．表面処理技術を実際に応用するためには，表面処理をする物体の材質や形状，使用目的に応じて表面処理方法を選ぶ必要がある．

細胞を培養する基板についても，さまざまな改質方法が研究されている．例えば，サンドブラストやレーザー照射を用いて基板表面を削る手法 [43] や，基板上に物質を蒸着して表面に凹凸を作る手法など，表面粗さを変化させる方法がある．他にも，プラズマや UV，オゾンによる処理で基板表面を活性化させる方法 [44] や，修飾基を基板表面に化学的に結合させる方法 [40] がある．遺伝子操作や新薬の投与などを行う細胞培養実験や医療機器の開発では，これらの手法で生体適合性を上げた培養基板が利用されている．

5.2 表面処理方法の選択

本顕微鏡の試料基板である Si_3N_4 基板は、近年、培養基板としての利用が進んでいる。利用例として、バイオトランジスタ [45] や、liquid STEM [13], scanning-electron generation X-ray microscopy [46] のようなデバイスを挙げる。このように Si_3N_4 基板は様々なデバイスに培養基板として利用されているが、細胞によっては付着が困難であることを前章で経験的に確認した。そこで、本顕微鏡で使用する Si_3N_4 基板の改質手法を検討する。

以下に、本顕微鏡の Si_3N_4 基板を改質する上で求められる条件を記す。

a) 改質部分により電子線散乱が増加しない

基板上に金属などを蒸着することで表面を改質すると、蒸着する物質によっては電子線が大きく散乱して試料に到達した際の電子線スポット径が大きくなる。これにより、電子線で励起される領域が大きくなり空間分解能が低下するため、電子線ができるだけ散乱しない改質方法を選ぶ必要がある。

b) 改質部分の構造により電子線スポットの形が乱れない

例えば、凹凸を作る手法などにより表面を改質すると、基板表面の構造体により電子線スポットが変形し、電子線照射位置によって異なった散乱状態を示す。これにより、試料に当たる電子線の密度や分布も電子線照射位置に依存してしまう。したがって、電子線のスポットが円形の広がりを保てるような改質手法を選ぶ必要がある。

c) 改質後も Si_3N_4 基板の強度が保たれている

本顕微鏡は、 Si_3N_4 基板で真空と大気圧環境を分離する。表面改質の工程で Si_3N_4 基板の強度が低下してしまうと、真空を分離できなくなり電子線が照射できない。したがって、基板を削る手法や、基板自体の組成を変える手法は適切ではないといえる。

d) 作製が容易かつ安定している

本研究では、観察する対象は生体試料、特に培養細胞である。生体試料を用いた実験は試料の個体差により結果がばらつくため、再現性が出ないことが多い。十分な試行回数を満たすためには、改質基板を大量に、かつ、安定して簡便に作製する改質手法が好まれる。

以上の条件を満たす改質手法の中で、本研究ではプラズマ表面処理と化学的表面修飾について検討した。

5.2.1 プラズマ表面処理

プラズマを物質に触れさせることで、物質表面に新しい性質や機能を付与する研究は古くから行なわれてきた。プラスチック基板やガラス基板など、バイオで使用する研究用機器の多くもプラズマ表面処理が施されている。プラズマとは、原子・分子・化合物を構成する電子が、核の束縛から離れて自由に動き回っている状態をいう。すなわち、物質を構成する原子などから電子が離れ、正または負に帯電したイオンとなっている状態である。通常、個体物体にエネルギーを与えれば、その物質の状態は個体、液体、気体へと変化する。そして、気体にさらにエネルギーを与えて電離させると物質はプラズマとなる。つまり、プラズマとは、よりエネルギーの高い状態であると考えることができる。

プラズマ表面処理はガスの種類により二つに大別される。一つはヘリウム、アルゴンなどの不活性ガスで化学的に反応しないものである。不活性ガスのプラズマ中では、原子が励起されて一部がイオン化することで高エネルギーを得る。不活性プラズマ中での一般的な表面反応は、基板への高エネルギー粒子の衝突によるスパッタエッチングなどである。もう一方のプラズマには、酸素、窒素、アンモニア、四フッ化炭素などの、重合はしないが化学反応するガスが使用される。この反応性ガスプラズマによる主な効果は、物体表面への特定の官能基の付与である。例えば、酸素プラズマで物体表面を処理した場合、その物体表面の組成に依存して、ヒドロキシ基、カルボニル基、カルボキシ基といった官能基が生成される [47]。

以下にプラズマによる表面処理の代表的な特徴を挙げる。

- ・材料の表面のみが改質される
- ・ドライプロセスで処理が簡単である
- ・低温で処理できる
- ・物質の組成によっては官能基の種類を選択できる

これらの特徴から、プラズマ表面処理は湿式の化学処理においてメリットが多く実用的である。しかしながら、 Si_3N_4 基板に対するプラズマ表面処理の研究の多くは、エッチングに関するものである [48, 49]。本顕微鏡の場合、真空と大気を分離するために Si_3N_4 基板は強度を維持する必要があり、基板表面をエッチングすることはできない。プラズマ表面処理を用いる場合、基板のエッチングを抑え、かつ、細胞の接着力が向上する基板表面に改質できるプラズマ照射条件を新たに探す必要がある。

5.2.2 化学的表面修飾

化学的表面修飾は、基板表面に物質を化学的に結合させて修飾する方法である。この表面処理手法もプラズマ表面処理と同様にバイオ分野で応用されている。この手法は、表面に存在する原子と官能基を結合させることで表面を改質する。官能基はカルボキシ基、アミノ基をはじめとして様々なものが使用されている [40,50]。これにより、親水性を制御したり、生体適合性を向上させることが可能である。実際に、接着細胞の接着力を向上させたという多くの先行研究が報告されている。

化学的表面修飾の手法は基板自体を変質させるものではないため、 Si_3N_4 基板の強度低下もほとんどない。また、修飾に有機物質を用いた場合の改質後の基板の厚さは、修飾基 1 分子の高さが増えるのみであり、基板表面改質による電子線散乱の増大や変形は無視できる。以上より、本研究では化学的表面修飾を用いて Si_3N_4 基板の表面を改質する。

5.3 化学的表面修飾法における修飾基の選択

基板表面の修飾基は生体中によく見られる官能基の中から選択した。これは、生体と親和性の高い分子層を形成するためである。図 5.1 に生体中によく見られる官能基について示す [32]。図 5.1 に示すように、生体の表面にはカルボキシ基、リン酸基、アミノ基など様々な官能基が存在している。

培養細胞の最外表面は細胞膜という構造で覆われており、細胞膜は脂質二重膜で形成されている。この脂質二重膜は、リン脂質の親水部が外側に並んでいるため親水性であるといえる。また、

接着型の培養細胞は基板に接着する際に、細胞膜上に分布している接着タンパク質を使う。接着タンパク質は疎水性であり、基板が完全な親水性であると付着が難しいと言われている [32]。つまり、細胞は、液中から基板にアプローチする際には細胞膜と親和性の高い親水性の基板を好み、基板にしっかりと接着する際には接着タンパク質と親和性の高い疎水性の基板を好む。このことから、親水性に関して、細胞が接着するための最適値が存在すると考えられる。本研究では、適当な親水性の基板表面を実現するため、まずは解離定数の比較的小さなカルボン酸を基板修飾基として選択した。

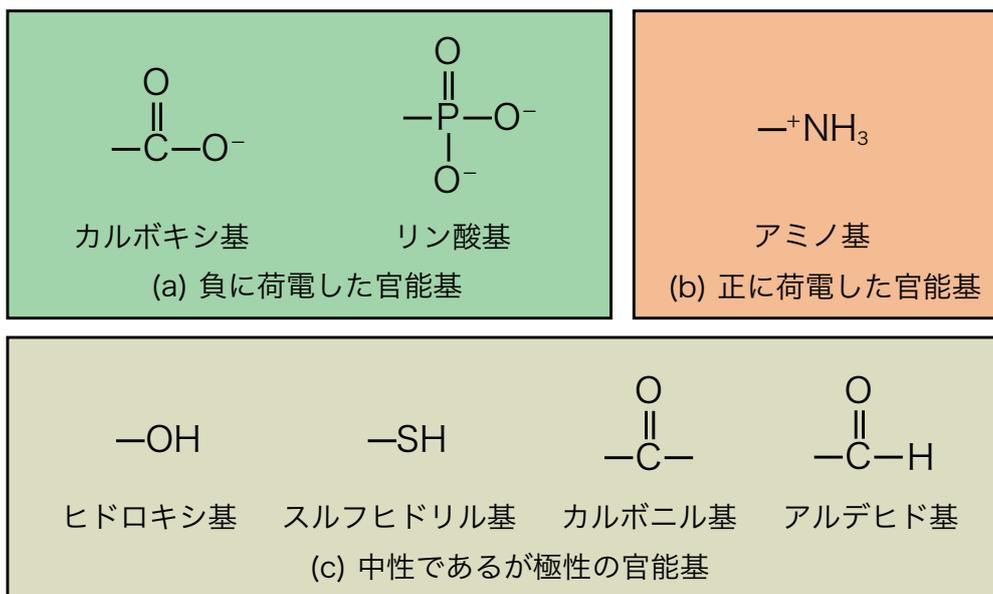


図 5.1 生体分子によく見られる官能基

5.4 Si₃N₄ 基板表面の親水性制御

Si₃N₄ 基板の中にはケイ素 (Si) と窒素 (N) が存在する。表面に存在する窒素は水素と結合することによりアミノ基 (NH₂ 基) となっている。カルボキシ基の分子層を生成するには酸化還元反応を用いて Si₃N₄ 基板表面に現れている N-H の結合部分を切り離し、カルボキシ基を終端基として持つ化学物質を共有結合させる手法が容易である。

5.4.1 Si₃N₄ 基板表面におけるカルボキシ基分子層の生成

以下に、本研究で用いた基板表面の化学的修飾法の手順を示す [50]。図 5.2 に、Si₃N₄ 基板表面でのカルボキシ基分子層生成における基板表面の変化を示す。以下に、Si₃N₄ 基板表面にカルボキシ基を結合する手順を示す。

はじめに、Si₃N₄ 基板上の汚れを除去するために洗浄を行う。表面の塵や油を除去するために、アセトン、イソプロパノール中にそれぞれ 5 分間浸して洗浄し、窒素気流で乾燥させる。次いで、0.1 % のフッ化水素酸溶液に 30 秒間入れて、Si₃N₄ 基板表面を溶かすことで化学的に洗浄を行い、直接水をかけて洗い流す。洗浄前は、Si₃N₄ 表面に N-O の結合などのカルボキシ基を結合するにあたって不要な物質が存在している。この洗浄処理で、強力な酸化剤であるフッ素が Si₃N₄ 表面の物質で還元される。それと並行して酸化還元反応が成立するために、水素が基板表面の N や Si と結合する。したがって、洗浄処理後の Si₃N₄ 表面上における N-H 基の濃度は増加する。

次に、洗浄して活性化した Si₃N₄ 基板にカルボキシ基を結合させる。0.08 M の 12 ブロモドデカン酸とトルエンの混合溶液に洗浄した Si₃N₄ 基板を入れ、110 °C で還流する。還流の時間は、0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 時間とした。この処理では、12 ブロモドデカン酸の Br を酸化剤として Si₃N₄ 基板表面にある N-H の結合部分と 12 ブロモドデカン酸が酸化還元反応する。Si₃N₄ 基板表面に 12 ブロモドデカン酸の Br 以降が結合するため、酸化還元反応が進めば進むほど Si₃N₄ 基板表面にカルボキシ基が結合する。この結合量は還流の時間に依存すると考えられ、Si₃N₄ 基板表面の全ての N-H 結合がカルボキシ基と反応したとすると、基板表面の約 57 % (Si₃N₄ 基板の N の割合) にカルボキシ基が結合すると考えられる。

その後、洗浄のために基板をジクロロメタン、アセトニトリル、純水、メタノールの順にそれぞれ 5 分間浸して窒素気流下で乾燥させる。この処理の目的は、基板表面に付着した疎水性の有機溶媒であるトルエンを除去することであり、疎水性の高い溶媒から少しずつ親水性の高い溶媒に変えて洗浄している。

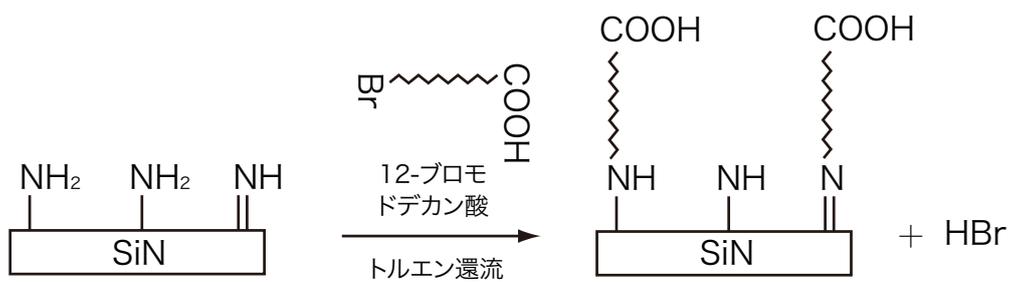


図 5.2 COOH 基単分子層生成

5.5 蛍光定量法によるカルボキシ基結合量の分析

前節で改質した Si_3N_4 基板にどの程度カルボキシ基が結合したかを蛍光物質を用いて定量した。実際には、基板に結合したカルボキシ基に蛍光物質を結合させて、その蛍光強度を測定することで Si_3N_4 基板に結合したカルボキシ基の分子数を概算する。本節では定量方法と結合量を概算した結果を示す。

5.5.1 蛍光物質の結合

図 5.3 に蛍光物質である 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) とカルボキシ基の縮合反応の模式図を示す。この反応は、カルボキシ基の-OH をアミド縮合反応により蛍光物質に置き換えるものである。つまり、一つのカルボキシ基に対して、蛍光物質は分子一つだけが結合する。基反応後は図中の青い四角の部分が励起されて発光する。

以下に、蛍光物質を結合する手順を記す [50]。

はじめに、5 mL のテトラヒドロフラン、5.5 mmol のトリエチルアミンの混合溶液に 5.5 mmol のクロロ蟻酸イソブチルを加える。この溶液に改質した Si_3N_4 基板を入れ、 -5°C において 5 分間攪拌する。12 cm^3 の N-N ジメチルホルムアミド (DMF) に AMC を 5.5 mmol 混合した溶液に基板を移し、 0°C で 1 時間静置する。その後、溶液温度を室温まで上げ、一晩静置する。この工程でカルボキシ基と蛍光物質が脱水縮合反応し、 Si_3N_4 基板表面に蛍光物質が結合した状態となる。

縮合反応が終了したら、基板に余分に付着している蛍光物質を取り除く。 Si_3N_4 基板をジクロロメタン、2 M の塩酸、20 %w/w の炭酸水素カリウムの順にそれぞれ 3 回ずつ浸して洗浄する。最後に、ジクロロメタン、メタノールでそれぞれ 5 分間浸して洗浄する。

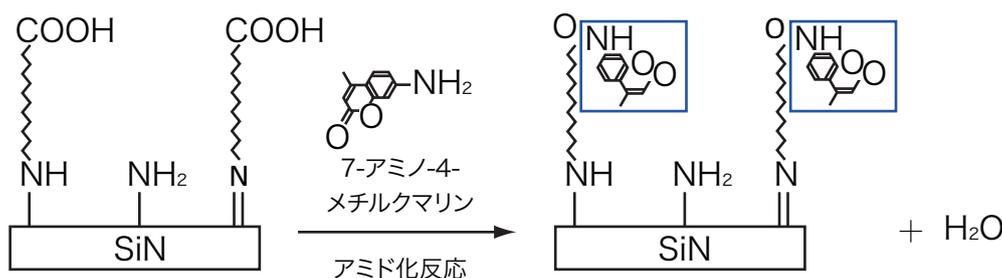


図 5.3 蛍光物質と COOH 基の縮合反応

5.5.2 検量線の作成

Si_3N_4 基板に結合した蛍光物質の数を概算するために、蛍光分子一つの蛍光強度がどの程度かを調べる。蛍光試薬の溶液を様々な濃度で作製し、検鏡プレート (厚さ: $70\ \mu\text{m}$) に入れて蛍光強度を取得した。

図 5.4 に検量線を示す。各濃度の溶液において AMC の蛍光強度を測定し、蛍光分子の含有量をそれぞれ計算した。最小二乗法を用いて近似直線を求めると次式のようにになった。

$$y = 4.63 \times 10^{-13}x - 1.00 \quad (5.1)$$

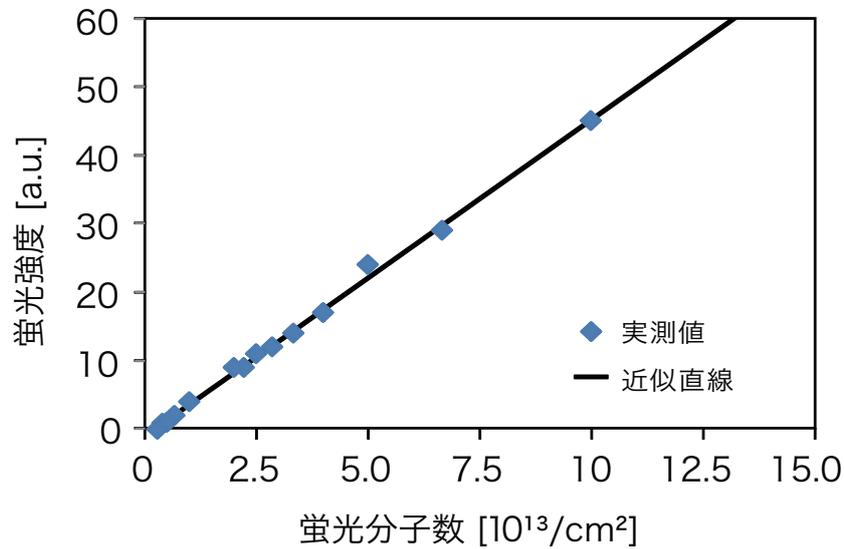


図 5.4 AMC 蛍光強度の検量線

5.5.3 Si₃N₄ 基板へのカルボキシ基結合量の測定

Si₃N₄ 基板に結合した蛍光物質の量を測定した。図 5.5 に各基板に結合しているカルボキシ基の個数と熱処理反応の時間の関係を表した結果を示す。図 5.5 から、熱処理反応時間の増加にともなって蛍光強度、つまりカルボキシ基の結合量が増加したことがわかった。Si₃N₄ 基板に結合したカルボキシ基は熱処理時間が 0.5 時間の時に 0.9×10^{13} 個となり、16 時間熱処理すると 6.4×10^{13} 個まで増加した。以上より、熱処理の時間によりカルボキシ基の結合量を制御することができたといえる。

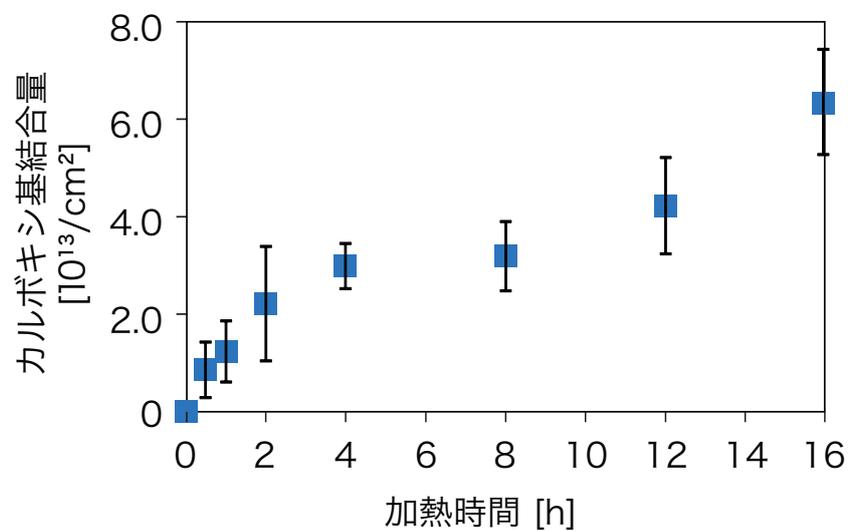


図 5.5 熱処理反応時間の増加による COOH 基結合量の増加

5.6 接触角による表面親水性の測定

改質した基板の表面は親水性が向上していると考えられる。前節で結合したカルボキシ基により親水性がどの程度向上したかを評価する。改質した各 Si_3N_4 基板の親水性を調べるために接触角を測定した。

5.6.1 水接触角の測定

図 5.6 に接触角測定の手順を示す。 Si_3N_4 基板を水平に置き、シリンジと先端を切った注射針を用いて基板表面に $0.5 \mu\text{L}$ の PBS(リン酸緩衝生理食塩水) を滴下した。一眼レフカメラ (D300, Nikon) に焦点距離 60 mm の接写レンズ (AF-S Micro NIKKOR 60mm f/2.8G ED, Nikon) を装着し、液滴を真横から撮影して接触角を測定した。接触角は液滴を球体の一部とみなすことで、図 5.6 中に示す液滴の高さ a と接触している辺の長さ b から概算できる。

図 5.7 に水接触角と基板の熱処理時間の関係を示す。接触角が小さいことは親水性が高いことを示すため、熱処理時間の増加により親水性が向上したことがわかる。図 5.7 で各基板の接触角の平均値を比較すると、 Si_3N_4 基板の水接触角は熱処理時間が 0.5 時間の時に 35.2° となり、16 時間熱処理すると 12.8° まで低下した。以上より、カルボキシ基の結合で基板表面の親水性を制御することができたといえる。

また、図 5.8 に概算したカルボキシ基結合量を横軸に、接触角を縦軸にとった結果を示す。カルボキシ基の結合量が増えるにしたがって接触角が減少していることがわかる。以上より、カルボキシ基の結合で表面の接触角が低下し、親水性が高くなったことを確認できた。

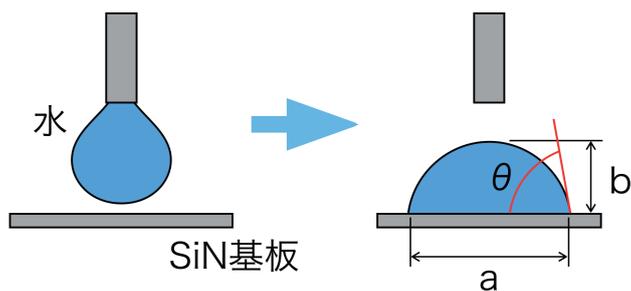


図 5.6 水接触角測定の手順

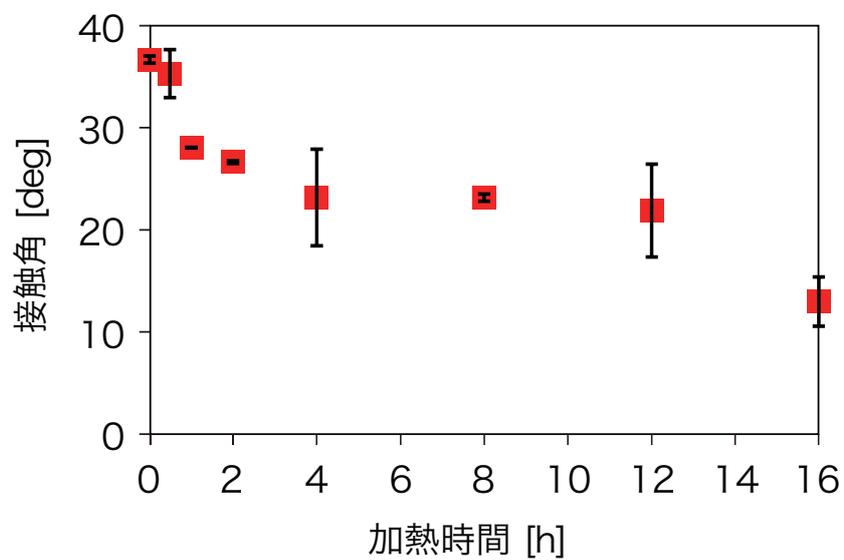


図 5.7 接触角測定結果

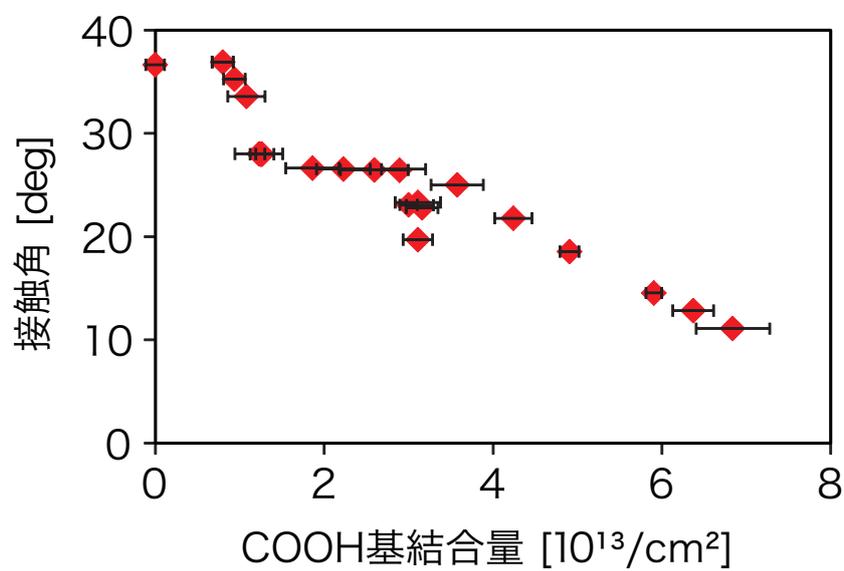


図 5.8 COOH 基結合による接触角減少

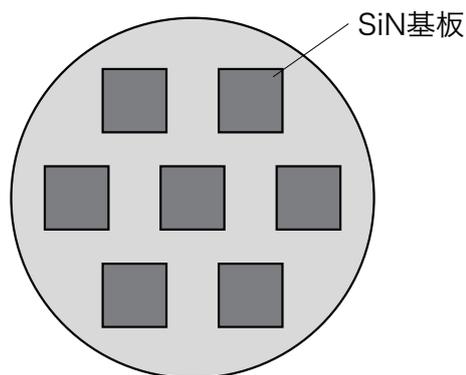
5.7 表面改質基板への細胞培養

本節では各 Si_3N_4 基板に HeLa 細胞を培養した結果を示す。位相差顕微鏡を用いて細胞を観察し、各基板における培養状態を比較することで細胞の接着性を評価した。

5.7.1 培養の手順

図 5.9 に培養の手順を示す。カルボキシ基で改質した Si_3N_4 基板と、ブランクテスト用の Si_3N_4 基板をオートクレーブ (Super Clave FX-220, ヒルソン・デック) を用いて滅菌した (121 °C, 30 分間)。60 mm のカルチャーディッシュに改質した Si_3N_4 基板をそれぞれ入れ、 0.2×10^3 cell/ml の HeLa 細胞懸濁液を 4 mL 入れた。一つのカルチャーディッシュに各条件で改質した基板を入れて同時に培養することで、懸濁液内に浮遊する細胞の濃度条件を一定にした。このカルチャーディッシュを CO_2 インキュベータ内 (5 % CO_2 , 37 °C) で培養し、24 h 毎に位相差顕微鏡で観察した。

- ① SiN基板をカルチャーディッシュに入れる。



- ② 細胞懸濁液を入れて培養する。

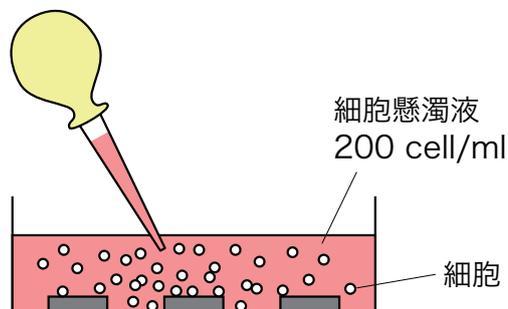


図 5.9 培養の手順

5.8 接着力の評価

本節では、改質した Si_3N_4 基板と改質していない Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の接着力について評価した。

5.8.1 細胞の接着力評価法の検討

細胞は接着する際、葉状仮足や糸状仮足を形成する [32] ため、仮足を伸ばして広がった細胞は付着力がより強くなる。一般的に、細胞接着力の評価には接着面積の大きさが指標となっていることが多い [40,51]。また、細胞の接着力を直接的に測定する方法も開発されており、マイクロピペット、光ピンセットやマイクロカンチレバーを用いた手法がある [52–61]。これらの研究結果では、細胞の接着面積が増加すると接着力も増加すると報告されている。

接着力と細胞面積の関係を示す研究結果として、橋本らの研究を示す [59,60]。彼らは、マイクロカンチレバーを用いて接着細胞を剥離する実験を行った。図 5.10 に彼らの作製した細胞の剥離力測定システムの模式図を示す。彼らは、カンチレバーを基板に対してほぼ垂直になるように配置し、細胞に横から力を加えて剥離する装置を開発した。この装置により、カンチレバーのたわみから細胞の剥離力を測定することが可能である。図 5.11 に剥離力測定システムにより測定した剥離力と細胞面積の関係を示す。この結果より、細胞の接着面積が大きくなると剥離力、つまり細胞の接着力が大きくなることが示された。この傾向は Yamamoto らの研究でも示されている [61]。

図 5.12 に本研究で Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の位相差顕微鏡画像を示す。図 5.12 a) にカルボキシ基を結合していない Si_3N_4 基板上の HeLa 細胞、b) にカルボキシ基を $3.1 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ の濃度で結合させた Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の位相差顕微鏡画像を示す。図中の点線は、それぞれ単一の細胞を示す。二つの画像を比較すると、改質した Si_3N_4 基板では細胞がよく広がり、接着面積を比較できることが確認できた。したがって、細胞接着力は、細胞の基板に対する接着面積を測定し評価する。

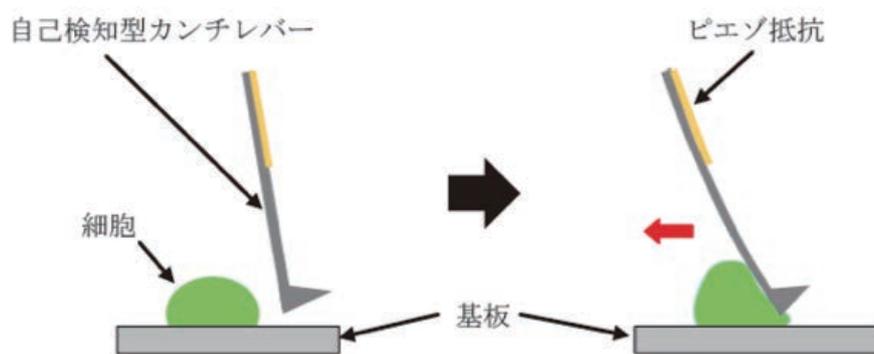


図 5.10 細胞の剥離力測定システム [60]

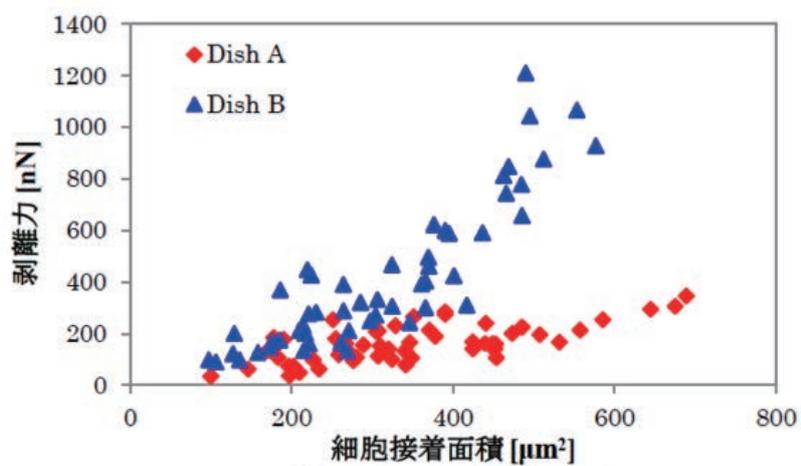


図 5.11 細胞の剥離力測定結果 [60]

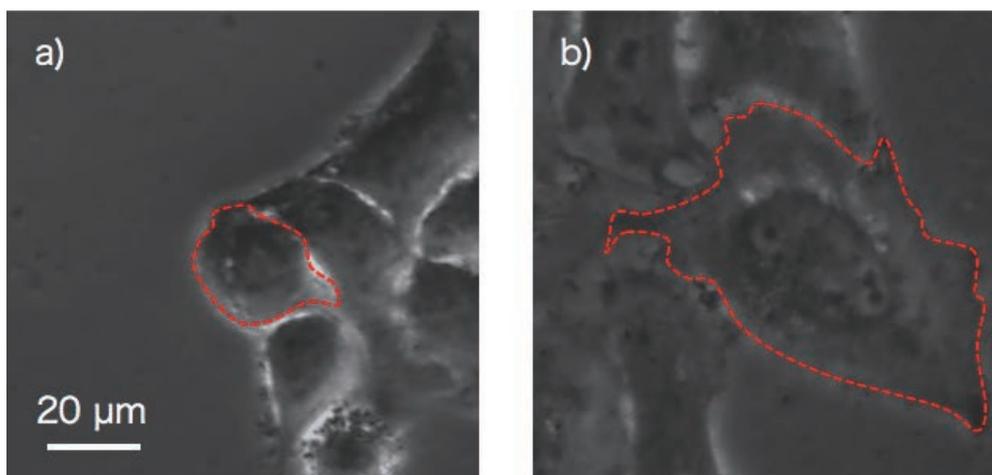


図 5.12 Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の位相差顕微鏡画像

a) 改質していない Si_3N_4 基板, b) $3.1 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ のカルボキシ基を結合した Si_3N_4 基板

5.8.2 Si₃N₄ 基板に対する HeLa 細胞の接着力測定

各基板における細胞の付着面積を、顕微鏡画像から測定した。細胞は分裂の周期により体積が異なるため接着面積に誤差が生じるが、基板上のすべての細胞について接着面積を計算して平均することで分裂周期による接着面積の誤差は考えなくて良いものとした。

図 5.13 に各基板における細胞の接着面積の測定結果を示す。横軸に各基板におけるカルボキシル基結合量、縦軸に細胞の接着面積の平均値を示し、市販のカルチャーディッシュに培養した細胞の接着面積も CD として合わせて示す。図 5.13 より、カルボキシル基の結合量が増加するにしたがって細胞の接着面積が増加していることがわかる。これは、Si₃N₄ 基板の表面親水性が向上し、細胞が付着しやすくなったためであると考えられる。

上記で親水性に関して、細胞が接着するための最適値が存在すると述べた。これは、細胞の外表面構造である細胞膜が親水性を好むのに対して、細胞接着に大きく関わる接着タンパク質は疎水性を好むためである [32]。図 5.13 より、市販のカルチャーディッシュを基準として考え、細胞が十分に接着するために必要なカルボキシル基の濃度を検討した。Si₃N₄ 基板における接着面積の平均値が、カルチャーディッシュにおける接着面積の標準誤差範囲内に収まったカルボキシル基の濃度は、図 5.13 より $2.2 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ 以上のときである。したがって、カルボキシル基が $2.2 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ 以上の濃度で結合した Si₃N₄ 基板では、細胞 1 つあたりの接着面積がカルチャーディッシュのそれと同程度まで広がり、強く接着していることが分かった。

また、図 5.14 に図 5.13 から約 1 細胞周期経過した後の HeLa 細胞の接着面積を示す。HeLa 細胞の 1 周期は約 24 時間である。細胞は 1 細胞周期経過したことで分裂が進むと、遊走して接着する領域を確保し、元の面積まで広がる。したがって、分裂後に元の面積まで広がった細胞は遊走できているといえる。図 5.14 から、カルボキシル基の結合量が多い基板では分裂後の細胞の接着面積が減少していることがわかる。これは、Si₃N₄ 基板の親水性が高すぎたことで細胞が遊走できなくなったのではないかと考えられる。細胞は遊走する際に仮足と呼ばれる突起を伸ばし、仮足の先端に接着タンパク質を形成して基板と付着する [32]。この接着タンパク質は疎水性であり、親水性の高すぎる基板上では接着タンパク質が基板に付着するのが困難である。

ここで、分裂後にも細胞接着面積が CD と同等まで広がった $2.2 \sim 4.2 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ の基板について、細胞接着面積の増減を評価した。カルボキシル基の結合量が $2.2 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ の基板では、細胞が 1 周期経過した時の面積が 4 % 増加していた。また、 $3.1 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ の基板では 2 %、 $4.2 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ では 6 % 減少していた。電子線直接励起蛍光顕微鏡の観察には 50 μm 四方の小さな観察領域に細胞をうまく培養する必要がある。したがって、遊走性が低下すると観察領域に細胞が移動しなくなり、観察試料の作製が難しくなる。本研究では、細胞面積の減少が 5 % 以内と小さく、遊走性の低下がほとんどないと考えられる、 $2.2 \sim 3.1 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ のカルボキシル基が結合した改質基板を電子線直接励起蛍光顕微鏡に最適な試料基板であると判断した。

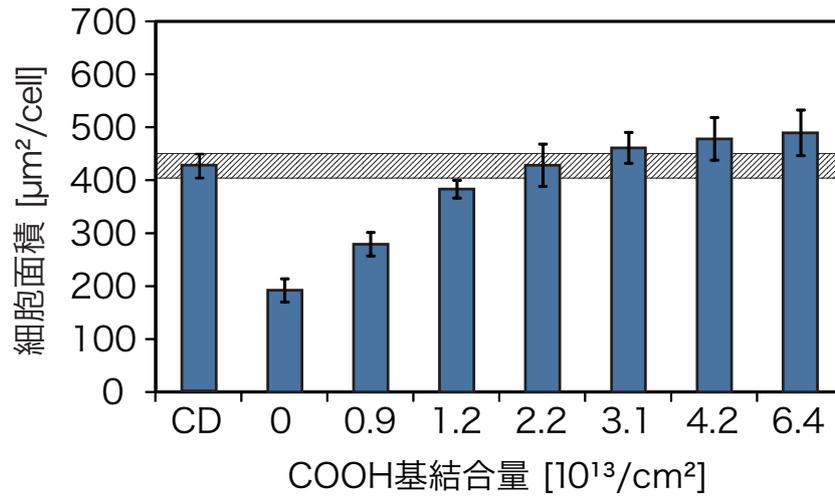


図 5.13 改質した Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の接着面積

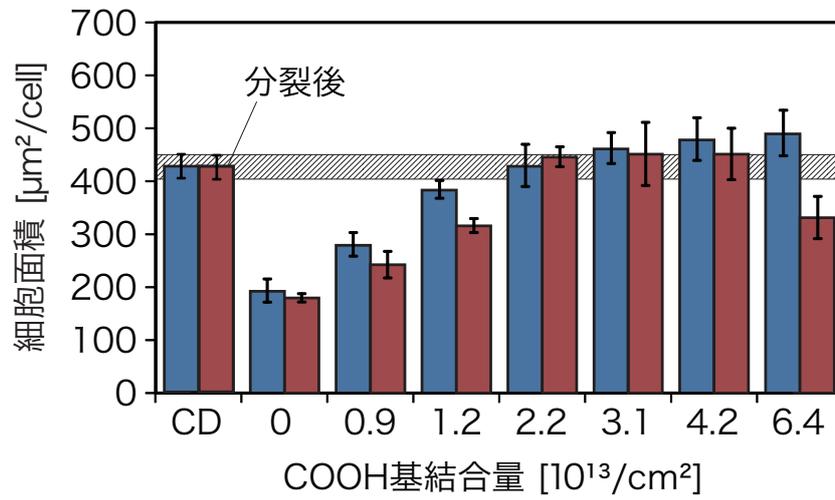


図 5.14 HeLa 細胞の 1 細胞周期後における接着面積

5.9 まとめ

本章では，細胞の試料基板への接着力を向上させるため，基板表面をカルボキシ基の結合により修飾した．修飾基には 12 ブロモドデカン酸を用い，基板への結合量を反応時間により制御した．カルボキシ基結合量は蛍光定量法で測定し，反応時間の増加により結合量が増加していることを確認した．また，表面の親水性を水接触角で測定し，カルボキシ基の結合量の増加に伴って親水性が増加していることを確認した．作製した基板に細胞が強く接着できるかを確認した．細胞面積の測定により，細胞が付着しやすい Si_3N_4 基板は $2.2 \sim 3.1 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ のカルボキシ基が結合した基板であるとわかった．

第 6 章

表面改質基板を用いた生体試料の電子線直接励起蛍光顕微鏡観察

本章では、カルボキシ基によって表面を改質した Si_3N_4 基板を用いて、電子線直接励起蛍光顕微鏡で細胞の自家蛍光を観察した。また、改質した Si_3N_4 基板を用いて得られた電子線直接励起蛍光顕微鏡画像について、空間分解能と SN 比を評価した。

6.1 改質基板を用いた HeLa 細胞の電子線直接励起による観察

まず、改質した Si_3N_4 基板にカルボキシ基が $3.0 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ 結合したことを水接触角測定により確認し、電子線励起蛍光顕微鏡観察用の培養基板を作製して HeLa 細胞を培養した。細胞は 4 % パラホルムアルデヒドで固定し、位相差顕微鏡と電子線直接励起蛍光顕微鏡を用いて観察した。

図 6.1 に改質した Si_3N_4 基板上で培養した HeLa 細胞の観察画像を示す。図 6.1 a) に電子線直接励起蛍光顕微鏡画像、b) に位相差顕微鏡画像を示す。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が確認できる。また、位相差顕微鏡画像において細胞内に見られる核と同じ位置に同様の形状を示す構造が電子線直接励起蛍光顕微鏡画像で確認できた。さらに、図 6.1 a') と b') に、a) と b) それぞれの細胞を点線で囲んで示す。a') で見られる蛍光の形状が、b') における細胞の形状と一致している。これにより、電子線直接励起蛍光顕微鏡で HeLa 細胞全体から自家蛍光が観察できていることがわかる。細胞内物質から発せられる自家蛍光は、励起された物質の発光効率や励起準位に依存して発光強度やスペクトルが変化しているため、それぞれの形状が観察できたと考えられる。

ここで、第 4 章で示した改質していない Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の観察結果 (図 4.4) と図 6.1 の電子線直接励起蛍光顕微鏡画像を比較した。図 4.4 の改質していない Si_3N_4 基板ではベシクルからの輝点のみが観察できる。一方、改質した Si_3N_4 基板に培養した細胞では、上記のようにベシクルだけでなく核や繊維構造が観察できた。これは、細胞が基板に密着することによって核や繊維などの細胞内構造が電子線で励起できる高さに存在できたためと考えられる。以上より、 Si_3N_4 基板の表面改質により、これまで励起できなかった細胞内構造の観察が可能となり、本手法が有用であることが示せた。

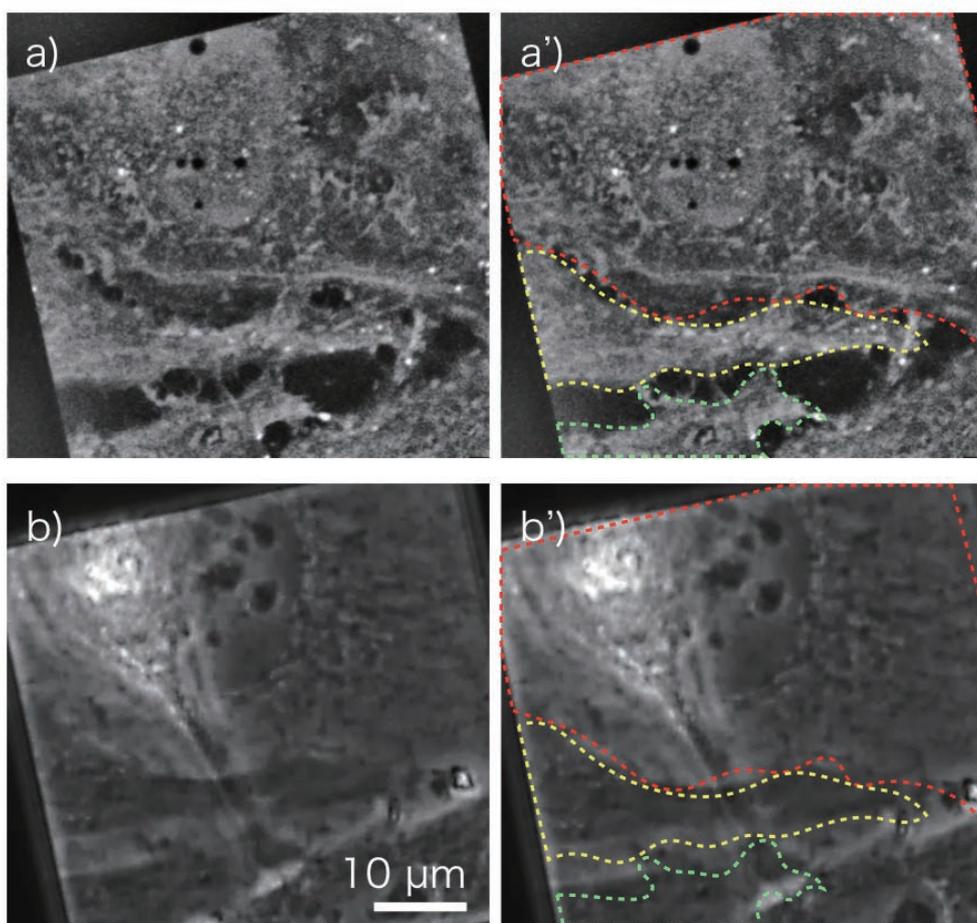


図 6.1 改質した Si_3N_4 基板上で培養した HeLa 細胞の観察画像

- a) 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像, a') a) 中の細胞を点線で囲んだ画像
 b) 位相差顕微鏡画像, b') b) 中の細胞を点線で囲んだ画像

6.2 HeLa 細胞自家蛍光画像の発光強度評価

試料基板の改質により、得られた細胞自家蛍光の強度がどのように変化するかを評価した。図 6.2 に図 6.1 と図 4.4 の電子線直接励起蛍光顕微鏡画像と画像中の実線における蛍光強度のラインプロファイルを示す。図 6.2 より、改質した Si_3N_4 基板上的細胞は、改質していない Si_3N_4 基板上的細胞よりも約 500 倍強く光っていることがわかった。蛍光強度が増加した理由として考えられる要因は、試料基板の表面改質によって細胞が Si_3N_4 基板に密着可能となったことである。細胞が基板に密着すると、細胞内物質が基板表面に近づく。これにより電子の侵入深さ範囲内に多くの細胞内物質が存在できるようになり、それらが細胞内物質が電子線で直接励起されることにより発光強度が増大したと考えられる。

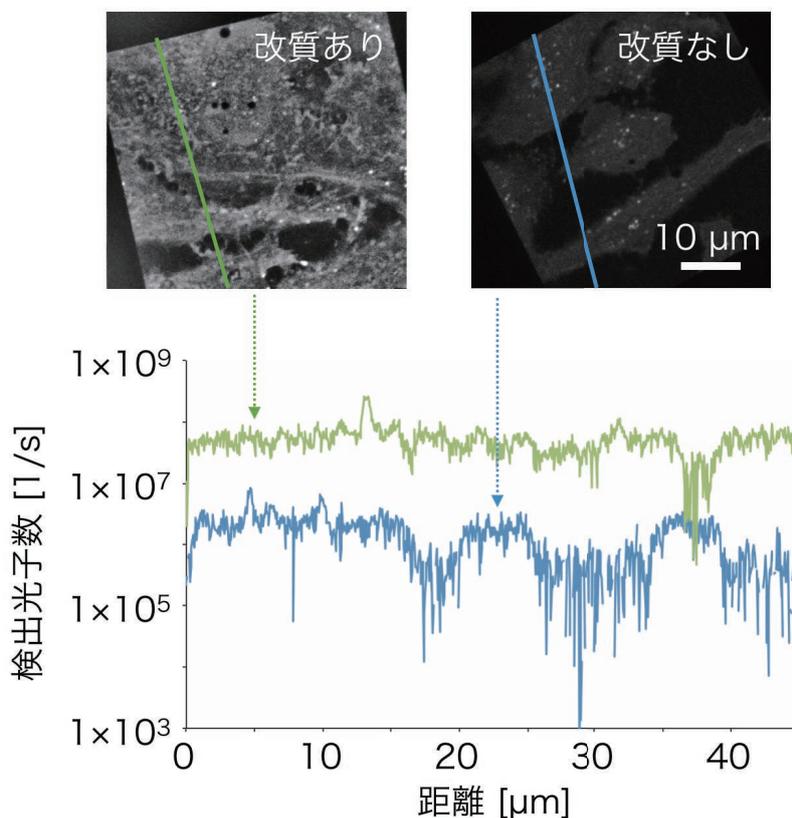


図 6.2 基板の表面改質による電子線直接励起蛍光強度の増加

6.2.1 電子の侵入長を用いた細胞-基板間の距離推定

電子の侵入長の計算

細胞と基板間の距離を推定するために、まず、電子の侵入長を計算した。ここでは、電子が試料中を最も進む場合（電子が直進する場合）について考える。ある点で E のエネルギーを持つ電子が、試料中を直進して全てのエネルギーを失ったとすると、電子の侵入長 R_e は次式で求められる [62].

$$R_e = \frac{0.0276A}{\rho Z^{0.889}} E^{1.67} [\mu\text{m}] \quad (6.1)$$

式 (6.1) において、 A は試料の原子量 [g/mol]、 ρ は密度 [g/cm³]、 Z は原子番号である。試料が化合物の場合、原子番号には平均原子番号 \bar{Z} を用いる。 \bar{Z} は次式で与えられる [63].

$$\bar{Z} = \frac{\sum_{i=1}^n c_i Z_i^2}{\sum_{i=1}^n c_i Z_i} \quad (6.2)$$

式 (6.2) において、 c_i は構成分子の重量分率、 Z_i は構成原子の原子番号である。

以下に、電子が試料中を進行するときの侵入長を計算した結果を示す。まず、生体の約 70 % を占める水で細胞試料を模擬して計算した。モンテカルロシミュレーションにより、電子は Si₃N₄ 基板を通過後に約 4.5 keV のエネルギーを持っていると算出された。水の分子量は $A_{H_2O} = 18$ [g/mol]、密度は $\rho_{H_2O} = 1$ [g/cm³]、平均原子番号は $\bar{Z}_{H_2O} = 7.9$ である。式 (6.1) より、4.5 keV のエネルギーを持つ電子の水中の侵入長は $R_{e(H_2O)} = 975$ [nm] となった。

次に、生体の構成物質を考慮して電子の侵入長を計算する。細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲン中を電子が進む場合を考える。コラーゲンは様々な分子で構成されており、その中で最も多いとされているのがグリシンという物質である。グリシンはコラーゲン分子の約 1/3 を占め、その分子式は C₂H₅NO₂ である。グリシンの分子量は $A_{glycine} = 75$ [g/mol]、密度は $\rho_{glycine} = 1.61$ [g/cm³]、平均原子番号は $\bar{Z}_{glycine} = 7.1$ である。式 (6.1) より、4.5 keV のエネルギーを持つ電子のグリシン中の侵入長は $R_{e(glycine)} = 2775$ [nm] となった。

ここで、生体の約 70 % が水であることから、細胞外マトリックスが水 70 %、グリシン 30 % で構成されているとすると、式 (6.1) より、4.5 keV のエネルギーを持つ電子の細胞外マトリックス中の侵入長は $R_{e(ECM)} = 1724$ [nm] と算出される。以上より、電子の侵入長は約 2 μm 以下と推測される。以上の計算結果は電子が散乱せずに試料中を進行した場合を考えている。実際には、電子は試料中で散乱しているため、深さ方向の侵入長は計算結果よりも短くなると考えられる。

エネルギー損失による細胞-基板間の距離推定

電子が物質中を進むとき、失われるエネルギーは電子の侵入深さに依存すると考えられている。電子の侵入深さを規格化した場合、電子のエネルギー損失の分布は次式で求めることができる [64,65].

$$g(L) = 0.60 + 6.21L - 12.4L^2 + 5.69L^3 \quad (6.3)$$

式 (6.3) において、 L は規格化した深さ方向の距離であり、

$$L = z/R_e \quad (6.4)$$

で与えられる。 z は入射面から電子までの深さ方向の距離である。図 6.3 に式 (6.3) から算出した損失したエネルギー ΔE と電子の侵入深さ z の関係を示す。電子の持つエネルギーは 4.5 keV、試料は水 70 %、グリシン 30 % で構成された物質とした。図 6.3 より、電子の侵入深さは 550 nm 付近となると ΔE が最も多くなり、さらに侵入することで ΔE が少なくなることがわかる。

次に、細胞が基板からどの程度離れているかを推定する。観察画像から、改質した Si_3N_4 基板上の細胞は改質していない Si_3N_4 基板上の細胞よりも約 500 倍強く発光する。発光強度は発光体の内部で損失したエネルギー量にほとんど比例するため、損失するエネルギーが 1/500 となる位置を計算した。実際に観察した試料では、蛍光を発しない細胞外の物質の上に自家蛍光を発する細胞内物質が存在すると考えられるが、ここでは、試料を水 70 %、グリシン 30 % で構成された物質で一定とし、ある電子の侵入深さ z_x から上部が発光すると仮定して計算した。

まず、改質した Si_3N_4 基板では、細胞が最も近い距離に存在すると仮定し、細胞と基板の距離を 5 nm とした。これは、 Si_3N_4 基板に結合した修飾基の厚みが約 3 nm であり、細胞接着の際には最低 2 nm のギャップが必要となるためである。図 6.3 より、基板から 5 nm 離れた細胞内で損失されるエネルギーは 4.47 keV であった。ここで、細胞内で損失されるエネルギーが 1/500 となる時、細胞は基板から z_x nm 離れているとすると、 $z_x = 1695$ [nm] となる。

ここで、HeLa 細胞のような上皮様の細胞は自らが細胞外マトリックスを分泌することで知られている。細胞外マトリックスの厚みは培養環境によって変化し、その主成分であるコラーゲン繊維の太さは $0.5 \sim 3 \mu\text{m}$ 以下であるとされる。上記で算出した電子の侵入長 1695 nm はこの細胞外マトリックスはコラーゲン繊維の太さの範囲に入っており、損失するエネルギーが 1/500 となる位置として妥当である。また、電子の侵入長は $R_{e(ECM)} = 1724$ [nm] であるため、改質していない Si_3N_4 基板では電子が細胞内に約 30 nm 侵入していることになる。細胞は表面に約 10 nm の細胞膜を有し、その内側にベシクルが存在する。したがって、改質していない Si_3N_4 基板を用いた場合、細胞膜の近傍に存在するベシクルが観察できていると考えられる。

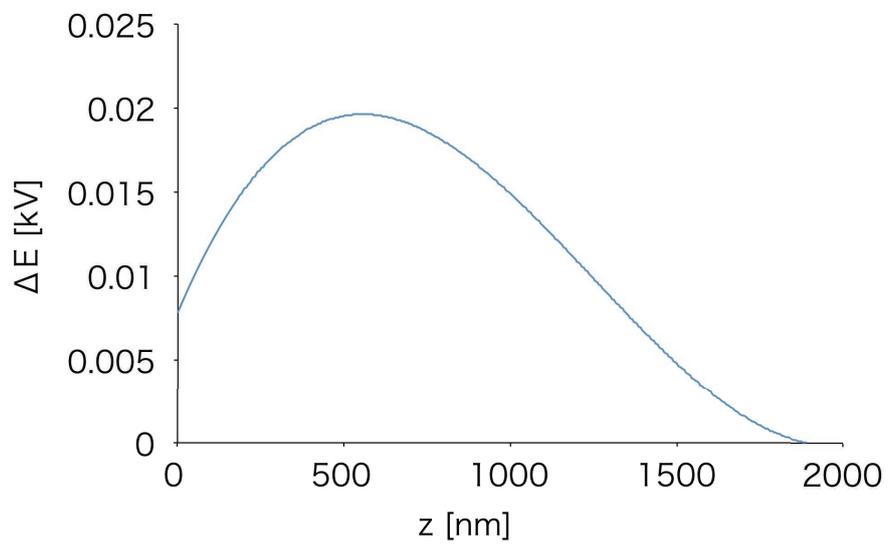


図 6.3 細胞と Si_3N_4 基板の距離の模式図

6.3 HeLa 細胞自家蛍光画像の空間分解能評価

図 6.4 に電子線直接励起蛍光顕微鏡画像における HeLa 細胞内の小胞について FWHM を計測してプロットした結果を示す。細胞内に存在する小胞は大きいものから小さいものまでばらつきがあるため厳密には評価できないが、改質した Si_3N_4 基板を用いて観察した小胞は総合的に見て小さいことがわかる。ここで、モンテカルロシミュレーションの計算結果から、水中での電子線の広がりをもとに求めた。図 6.5 に Si_3N_4 基板表面からの距離が 5 nm と電子が最も広がっている 300 nm の位置での電子線の広がりを示す。 Si_3N_4 基板表面からの距離が 300 nm の場合、電子線が散乱して面内方向に 400 nm 以上広がっている。一方、 Si_3N_4 基板表面からの距離が 5 nm まで近づくと、電子線の広がりや 50 nm 程度であり、電子が散乱する前の小さいスポットで励起できることがわかる。以上より、 Si_3N_4 基板の表面改質で細胞が基板に近づいたことで、細胞内の小胞の FWHM が減少したといえる。

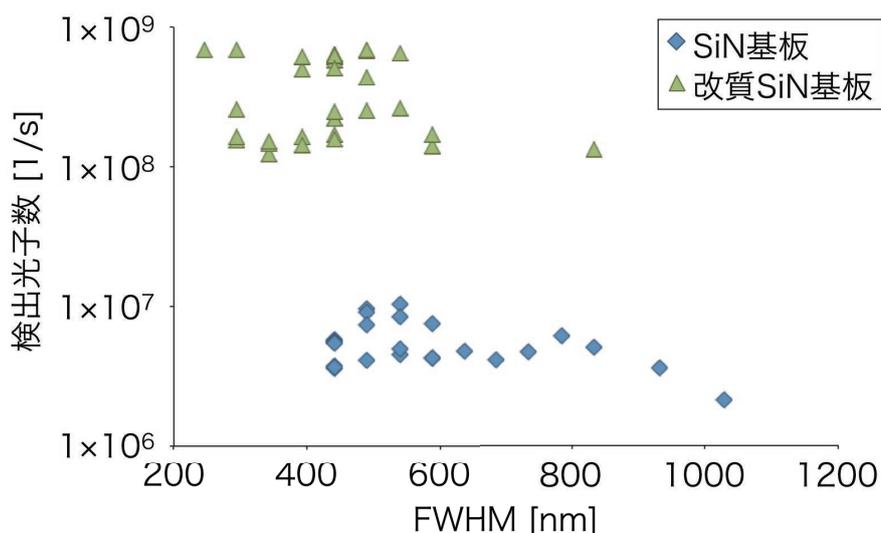


図 6.4 電子線直接励起蛍光顕微鏡画像における HeLa 細胞内の小胞サイズ

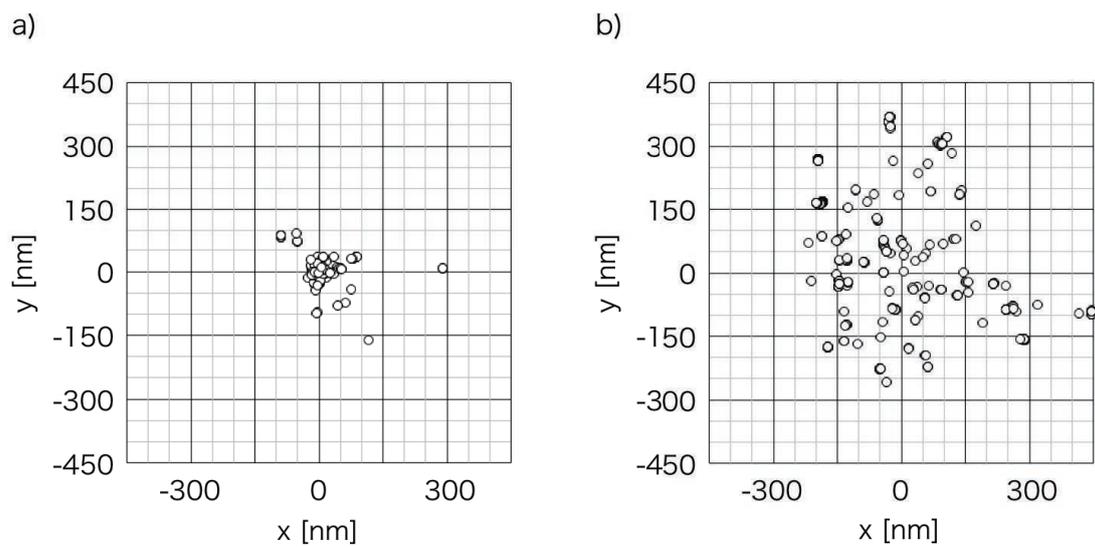
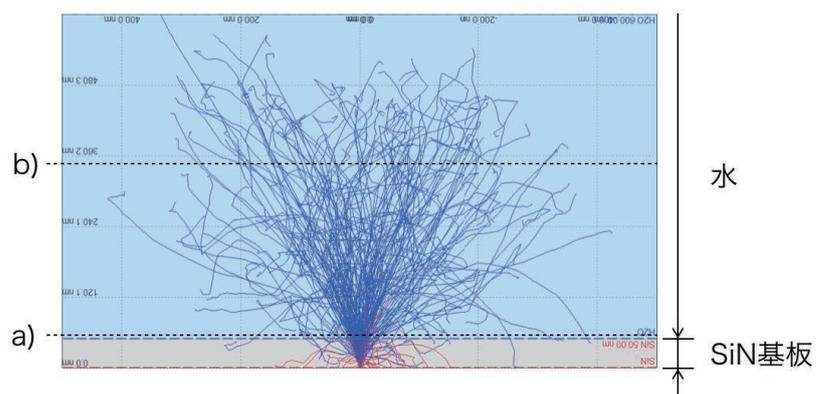


図 6.5 水中における電子線の広がり

a) Si_3N_4 基板表面からの距離: 5 nm, b) Si_3N_4 基板表面からの距離: 300 nm

6.4 まとめ

本章では、カルボキシ基で改質した Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞を電子線で直接励起して自家蛍光を観察した。カルボキシ基による改質で Si_3N_4 基板に細胞が密着できるようになると、電子線が細胞内部の小器官まで到達し、核や骨格繊維などの構造が観察できるようになることがわかった。観察画像から、細胞内小器官を構成する物質に依存して発光強度が異なることもわかった。これは、細胞内タンパク質や化学物質の電子線励起による発光効率の差であると考えられる。発光効率の違いによる細胞内小器官の同定などは今後の課題である。また、検出光子数と空間分解能について、改質していない Si_3N_4 基板に培養した HeLa 細胞の観察結果と比較して評価した。観察結果から、 Si_3N_4 基板の表面を改質することにより細胞が Si_3N_4 基板に近づき、より高い SN と空間分解能が達成できるようになったことが示せた。

第7章

おわりに

本研究では、試料基板を改質して生体試料を試料基板に近づけることにより電子線で励起される生体試料の領域を増加させ、電子線直接励起蛍光顕微鏡の観察で得られるシグナルの強度を向上させることに成功した。

第1章では、生命科学の発展のためにタンパク質やDNA・RNA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ことを述べた。生体試料の観察技術として光励起によるナノイメージング、電子線によるナノイメージング、電子線励起によるナノイメージングの大きく三つに分けて、それぞれの代表例を挙げて利点と課題を述べた。さらに、これを踏まえて、本研究の目的を述べた。第2章では、光学顕微鏡の空間分解能を制限する光の性質である回折効果について説明した。また、空間分解能の定義を示し、通常の光学顕微鏡の空間分解能を考察した。

第3章では、バイオイメージングに広く用いられる蛍光顕微鏡の原理を述べ、第2章で述べた光の回折から蛍光顕微鏡の空間分解能について考察した。また、コントラストの高い画像を取得できるレーザー走査蛍光顕微鏡について、その原理と特徴を述べた。

第4章では、電子線直接励起蛍光顕微鏡の原理、構成、特徴を述べた。本手法は、試料内の蛍光体に電子線を直接照射し蛍光を検出する、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。本手法は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。また、モンテカルロシミュレーションを用いて電子線の散乱を評価し、期待される空間分解能を議論した。

第5章では、電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察する蛍光体として蛍光ナノダイヤモンド粒子を選定し、蛍光体の形状や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平均粒径は100 nmであり、測定したCLスペクトルにおける主な発光波長域は550~700 nm、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、蛍光ナノダイヤモンド粒子蛍光像のFWHMが44 nmであった。期待される電子線のスポット径が34 nmであることからFWHMが妥当な値であることを示した。

第6章では、生体試料を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察し、シグナル強度と空間分解能を議論した。観察試料にはHeLa細胞を選び、4%パラホルムアルデヒドで固定してPBS中の細胞を電子線直接励起蛍光顕微鏡で観察した。観察画像では、細胞膜もしくは細胞質とみられる細胞の輪郭を現す発光と、脂肪滴とみられる粒子状の強い発光が確認できた。その他の細胞内器官はからの発

光は得られなかった。これは、電子線が細胞内構造まで到達しなかったためと考えられ、細胞内の構造を観察するには細胞が基板に近づく必要があるとわかった。また、蛍光ナノダイヤモンド粒子を細胞内に導入し、電子線直接励起蛍光顕微鏡で同様に観察した。通常の細胞とナノダイヤモンドを取り込ませた細胞について、得られた画像のシグナル強度を比較すると、ナノダイヤモンドを取り込ませた細胞から得られた発光の方が平均で 6.5 倍強いことがわかった。

第 7 章では、細胞を基板に近づけるために試料基板の表面修飾を検討し、細胞の接着力が向上する試料基板を作製した。基板の表面改質にはカルボキシ基を用いた化学的修飾法を採用し、親水性を制御した。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。また、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接着力を評価した。細胞が付着しやすい Si_3N_4 基板は $1.2 \sim 3.1 \times 10^2 / \text{cm}^{13}$ のカルボキシ基が結合した基板であることがわかった。

第 8 章では、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 $3.0 \times 10^{13} / \text{cm}^2$ 結合した Si_3N_4 基板と改質していない Si_3N_4 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。得られたシグナル強度を比較すると、改質した Si_3N_4 基板の細胞は改質していない Si_3N_4 基板の細胞よりも約 500 倍強く光っていることがわかった。これは、細胞が Si_3N_4 基板に近づき、電子線が細胞をより効率的に励起できるようになったためと考えられる。また、得られた電子線直接励起蛍光顕微鏡画像において、脂肪滴とみられる輝点の FWHM を測定した。FWHM の平均値は、改質した Si_3N_4 基板を用いた観察画像で 435 nm、改質していない Si_3N_4 基板を用いた観察画像で 579 nm であり、FWHM の平均値が Si_3N_4 基板の改質により約 20 % 小さくなっていることがわかった。細胞が Si_3N_4 基板に近づくことで電子線が散乱する前に試料を励起できるようになり、空間分解能が向上したため FWHM の平均値が減少したと考えられる。

結論として、カルボキシル基による表面修飾技術により、細胞は Si_3N_4 基板に強く付着できるようになった。これにより、電子線直接励起蛍光顕微鏡で高 SN かつ高空間分解能な画像が得られるようになった。

さらなる高空間分解能観察には、加速電圧を上げる必要がある。モンテカルロシミュレーションの結果から試料に侵入する電子線の広がり FWHM を計算すると、加速電圧 10 keV の場合には直径 16 nm まで減少する。現行の試作機では加速電圧 4.8 keV が限界であるが、今後システムを改良すれば、より高い空間分解能の達成が期待できる。

また、本顕微鏡は電子線を励起源としており、多量の電子線照射では有機物にダメージを与えることがわかっている。したがって、カルボキシ基で Si_3N_4 基板を修飾した場合の修飾基に対するダメージ、観察される生体試料に対するダメージをの評価する必要があると考える。

参考文献

- [1] 平野 久, “プロテオーム解析概論”, *ぶんせき* **7** (2005) 348-353.
- [2] タカラバイオ株式会社, “ウェスタンブロットティング実験ガイド”, (2013).
- [3] GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社, “ウェスタンブロットティングの蛍光検出”.
- [4] Stefan W. Hell and Jan Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”, *Optics Letters* **19** 11 (1994) 780-782.
- [5] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, Harald F. Hess, “Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”, *Science* **313** (2006) 1642-1645.
- [6] Michael J Rust¹, Mark Bates and Xiaowei Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, *Nat Methods* **3** (2006) 793-796.
- [7] Mats G. L. Gustafsson, “Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution”, *PNAS* **102** 37 (2005) 13081 – 13086.
- [8] Katsumasa Fujita, Minoru Kobayashi, Shogo Kawano, Masahito Yamanaka, and Satoshi Kawata, “High-Resolution Confocal Microscopy by Saturated Excitation of Fluorescence”, *PHYSICAL REVIEW LETTERS* **99** (2007) 228105.
- [9] 根本 知己, 日比 輝正, 川上 良介, “多光子励起レーザー顕微鏡を用いた生理機能の非侵襲的生体深部イメージング”, *ファルマシア* **47** 8 (2011) 724-728.
- [10] 福島 修一郎, 橋本 守, 荒木 勉, “SHG イメージングの組織診断への応用”, *京府医大誌* **122** 4 (2013) 189-198.
- [11] 橋本 守, “コヒーレントアンチストークスラマン散乱を用いた顕微鏡”, *分光研究* **49** 2 (2000) 51-61.
- [12] 日本顕微鏡学会電子顕微鏡技術認定委員会, “電顕入門ガイドブック”, 国際文献印刷社 (2011).
- [13] N. de Jonge, D. B. Peckys, G. J. Kremers, and D. W. Piston, “Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution”, *PNAS* **106** 7 (2009) 2159-2164.
- [14] Hidetoshi Nishiyama, Mitsuo Suga, Toshihiko Ogura, Yuusuke Maruyama, Mitsuru Koizumi, Kazuhiro Mio, Shinichi Kitamura, Chikara Sato, “Reprint of: Atmospheric scanning electron microscope observes cell and tissues in open medium through silicon

- nitride film”, *Journal of Structural Biology* **172** (2010) 191 – 202.
- [15] Wataru Inami, Kentaro Nakajima, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, *OPTICS EXPRESS* **18** 12 (2010) 12897-12902.
- [16] Yasunori Nawa, Wataru Inami, Akito Chiba, Atsushi Ono, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, Sheng Lin and Susumu Terakawa, “Dynamic and high-resolution live cell imaging by direct electron beam excitation”, *OPTICS EXPRESS* **20** 5 (2012) 5629-5635.
- [17] Yasunori Nawa, Wataru Inami, Aki Miyake, Atsushi Ono, Yoshimasa Kawata, Sheng Lin and Susumu Terakawa, “Dynamic autofluorescence imaging of intracellular components inside living cells using direct electron beam excitation”, *BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS* **5** 2 (2014) 378-386.
- [18] 京セラ株式会社, “CHARACTERISTICS OF KYOCERA TECHNICAL CERAMICS 材料特性”, (2016).
- [19] David C. Joy, “Monte Carlo Modeling For Electron Microscopy and Microanalysis”, OXFORD (1995).
- [20] Pierre Hovington, Dominique Drouin, Raynald Gauvin, “CASINO: A new monte carlo code in C language for electron beam interaction —part I: Description of the program, *SCANNING* **19** 1 (1997) 1 – 14.
- [21] 日本電子顕微鏡学会関東支部, “先端材料評価のための電子顕微鏡技法”, 株式会社 朝倉書店 (1991).
- [22] 小林 洋志, 中西 洋一郎, 波多腰 玄一, “発光と受光の物理と応用”, 株式会社 培風館 (2008).
- [23] Arnold Gucsik, “Cathodoluminescence and its Application in the Planetary Sciences”, Springer Berlin Heidelberg (2009).
- [24] 蛍光体同学会, “蛍光体ハンドブック”, 株式会社オーム社 (1987).
- [25] 原田 慶恵, “蛍光ナノダイヤモンド粒子を用いた生体イメージング技術の開発”, *応用物理* **84** 1 (2015) 56-60.
- [26] 竹内 貞雄, 村川 正夫, “カソードルミネッセンス分光分析によるダイヤモンド中の結晶欠陥の評価”, *表面技術* **52** 1 (2001) 120-124.
- [27] 枳尾 豪人, 外間 進悟, 原田 慶恵, “ナノダイヤモンド NVC を使った新しい生体・細胞計測法”, *生化学* **86** 2 (2014) 145-153.
- [28] Amanda M. Schrand, Houjin Huang, Cataleya Carlson, John J. Schlager, Eiji Ōsawa, Saber M. Hussain and Liming Dai, “Are diamond nanoparticles cytotoxic?”, *The Journal of Physical Chemistry B* **111** 1 (2007) 2 – 7.
- [29] Be-Ming Chang, Hsin-Hung Lin, Long-Jyun Su, Wen-Der Lin, Ruey-Jen Lin, Yan-Kai Tzeng, Reiko T. Lee, Yuan C. Lee, Alice L. Yu and Huan-Cheng Chang, “Highly Fluorescent Nanodiamonds Protein-Functionalized for Cell Labeling and Targeting”, *ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS* **23** 46 (2013) 5737-5745.
- [30] Bailin Zhang, Yingqi Li, Chia-Yi Fang, Cheng-Chun Chang, Chao-Sheng Chen, Yi-Ying

- Chen, Huan-Cheng Chang, “Receptor-Mediated Cellular Uptake of Folate-Conjugated Fluorescent Nanodiamonds: A Combined Ensemble and Single-Particle Study”, *Small* **5** 23 (2009) 2716 – 2721.
- [31] Tsai-Jung Wu, Yan-Kai Tzeng, Wei-Wei Chang, Chi-An Cheng, Yung Kuo, Chin-Hsiang Chien, Huan-Cheng Chang and John Yu, “Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds”, *Nature Nanotechnology* **8** (2013) 682 – 689.
- [32] Wayne M. Becker, Lewis J. Kleinsmith, Jeff Hardin, “細胞の世界 The World of the Cell”, 西村書店 (2005).
- [33] レベッカ スクルート, “不死細胞ヒーラ：ヘンリエッタ・ラックスの永遠なる人生”, *ウイルス* **61** 2 (2011) 275-276.
- [34] B. Devika Chithrani, Arezou A. Ghazani and Warren C. W. Chan, “Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells”, *NANO LETTERS* **6** 4 (2006) 662-668.
- [35] Monica Monici, “Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications”, *BIOTECHNOLOGY ANNUAL REVIEW* **11** (2005) 227-256.
- [36] Gary Nichols, “Applications of cathodoluminescence spectroscopy and imaging in the characterisation of pharmaceutical materials”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **45** 1 – 2 (2012) 19 – 42.
- [37] Tohru Nakano, Hirotami Koike and Kazuo Ogawa, “Analytical Color Fluorescence Electron Microscopy of Adrenal Cortex”, *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* **36** (1997) 454 – 462.
- [38] A.L. Lewis, L.A. Tolhurst, P.W. Stratford, “Analysis of a phosphorylcholine-based polymer coating on a coronary stent pre- and post-implantation”, *Biomaterials*, **23** 7 (2002) 1697 – 1706
- [39] 茂呂 徹, 石原 一彦, 京本 政之, “人工股関節の長寿命化に挑む！”, *JST News* **8** 7 (2011) 6-9.
- [40] Johan Gustavsson, George Altankov, Abdelhamid Errachid, Josep Samitier, Josep A. Planell, Elisabeth Engel, Email author, “Surface modifications of silicon nitride for cellular biosensor applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **19** 4(2008) 1839 – 1850.
- [41] 松下 富春, 小久保 正, D.K.Pattanayak, 山口 誠二, 竹本 充, 藤林 俊介, 中村 孝志, 土井 研児, 北垣 壽, “チタン多孔体を用いた脊椎固定術用椎間スペーサーの開発”, *生命健康科学研究所紀要* **5** (2009) 20-29.
- [42] 塙 隆夫, “機能分子・生体分子電着による金属の汎用的生体機能化”, *科学研究費助成事業 研究成果報告書*.
- [43] Makiko Goto, Takehiko Tsukahara, Kae Sato, Tomohiro Konno, Kazuhiko Ishihara, Ki-ichi Sato, Takehiko Kitamori, “Nanometer-scale Patterned Surfaces for Control of Cell

- Adhesion”, *ANALYTICAL SCIENCES* **23** 3 (2007) 245-247.
- [44] 吉成 正雄, “「生体多機能化インプラント」を目指して”, *歯科学報* **115** 3 (2015) 185-197.
- [45] 宮原裕二, “高度医療対応の次世代検査法「バイオトランジスタ」”, *NIMS NOW* **9** 5 (2009).
- [46] Toshihiko Ogura, “Direct observation of unstained wet biological samples by scanning-electron generation X-ray microscopy”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391** 1 (2010) 198 – 202.
- [47] 赤崎 正則, 村岡, 克紀, 渡辺, 征夫, 蛭原, 健治, “プラズマ工学の基礎”, 産業図書 (2001).
- [48] Haruhiko Abe, Yukio Sonobe, Tatsuya Enomoto, “Etching Characteristics of Silicon and its Compounds by Gas Plasma”, *Japanese Journal of Applied Physics* **12** 1 (1973) 154-155.
- [49] 日本学術振興会プラズマ材料科学第 153 委員会, “プラズマ材料科学ハンドブック”, オーム社 (1992).
- [50] Fabrizio Cattaruzza, Antonio Cricenti, Alberto Flamini, Marco Girasole, Gianni Longo, Alessio Mezzi and Tommaso Prosperi, “Carboxylic acid terminated monolayer formation on crystalline silicon and silicon nitride surfaces. A surface coverage determination with a fluorescent probe in solution”, *Journal of Materials Chemistry* **14** (2004) 1461-1468.
- [51] Yoshiaki Iwadate, Chika Okimura, Katsuya Sato, Yuta Nakashima, Masatsune Tsujioka, Kazuyuki Minami, “Myosin-II-Mediated Directional Migration of Dictyostelium Cells in Response to Cyclic Stretching of Substratum”, *Biophysical Journal* **104** 4 (2013) 748 – 758.
- [52] Kuo-Li P. Sung, Lanping A. Sung, Mary Crimmins, Steven J. Burakoff, Shu Chien, “Determination of Junction Avidity of Cytolytic T Cell and Target Cell”, *Science* **234** 4782 (1986) 1405-1408.
- [53] Christopher P. Palmer, Maria E. Mycielska, Hakan Burcu, Kareem Osman, Timothy Collins, Rachel Beckerman, Rebecca Perrett, Helen Johnson, Ebru Aydar, Mustafa B. A. Djamgoz, “Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA): application to cancer cell lines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression”, *Eur Biophys J* **37** (2008) 359 – 368.
- [54] F. Schaal, M. Warber, S. Zwick, H. van der Kuip, T. Haist, W. Osten, “Marker-free cell discrimination by holographic optical tweezers”, *JOURNAL OF THE EUROPEAN OPTICAL SOCIETY* **4** (2009).
- [55] Keir C. Neuman and Attila Nagy, “Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy”, *Nat Methods* **5** 6 (2008) 491 – 505.
- [56] Jonne Helenius, Carl-Philipp Heisenberg, Hermann E. Gaub and Daniel J. Muller, “Single-cell force spectroscopy”, *Journal of Cell Science* **121** 11 (2008) 1785-1791.
- [57] Daniel J Muller, Jonne Helenius, David Alsteens and Yves F Dufrene, “Force probing surfaces of living cells to molecular resolution”, *nature chemical biology* **5** 6 (2009) 383-

- [58] Gilles Weder, Nicolas Blondiaux, Marta Giazzon, Nadege Matthey, Mona Klein, Raphael Pugin, Harry Heinzelmann and Martha Liley, “Use of Force Spectroscopy to Investigate the Adhesion of Living Adherent Cells”, *Langmuir* **26** 11 (2010) 8180 – 8186.
- [59] Shigetaka Hashimoto, Makoto Adachi, and Futoshi Iwata, “Investigation of shear force of a single adhesion cell using a self-sensitive cantilever and fluorescence microscopy”, *Japanese Journal of Applied Physics* **54** (2015).
- [60] Shigetaka Hashimoto, Makoto Adachi, Futoshi Iwata, “自己検知型カンチレバーを用いた液中における単一吸着細胞の剥離力測定”, 第 62 回応用物理学会春季学術講演会 講演予稿集 (2015).
- [61] Akiko Yamamoto, Shuzo Mishima, Norio Maruyama and Masae Sumita, “A new technique for direct measurement of the shear force necessary to detach a cell from a material”, *Biomaterials* **19** (1998) 871-879.
- [62] K. Kanaya and S. Okayama, “Penetration of energy-loss theory of electrons in solid targets”, *Journal of Physics D: Applied Physics* **5** (1972) 43-58.
- [63] P. G. T. Howell, K. M. W. Davy, A. Boyde, “Mean Atomic Number and Backscattered Electron Coefficient Calculations for Some Materials with Low Mean Atomic Number”, *Scanning* **20** (1998) 35-40.
- [64] B. G. Yacobi and D. B. Holt, “Cathodoluminescence Microscopy of Inorganic Solids”, Plenum.
- [65] T. E. Everhart and P. H. Hoff, “Determination of Kilovolt Electron Energy Dissipation vs. Penetration Distance in Solid Materials”, *Journal of Applied Physics* **42** 13 (1971) 5837-5846.
- [66] 川田 善正, “はじめての光学”, 株式会社 講談社 (2004).

本研究に関する業績

論文発表

1. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Carboxylic monolayer formation for observation of intracellular structures in HeLa cells with direct electron beam excitation-assisted fluorescence microscopy", *Biomedical Optics Express* **6** 8 (2015) 3128-3133.
2. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, "Cell culture on hydrophilicity-controlled silicon nitride surfaces", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **31** (2015) 1977 – 1982.
3. 益田 有里子, 居波 涉, 川田 善正, "電子線直接励起蛍光顕微鏡による蛍光ナノダイヤモンドの観察", *レーザー研究* **44** 10 (2016) 668-671.

国際学会における発表

1. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, "HeLa Cell culturing on a hydrophilicity controlled silicon nitride surface", The 15th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, (Shizuoka, Japan/2013).
2. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, "HeLa cell culture on a hydrophilicity controlled silicon nitride surface", JTBS 2013, (Shizuoka, Japan/2013).
3. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Atsuo Miyakawa, Yoshimasa Kawata, "Cell culturing on hydrophilicity controlled silicon nitride surface for living cell imaging", Super Imaging 2013, (Shizuoka, Japan/2013).
4. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Surface hydrophilicity control of silicon nitride for cell culture", "Focus on Microscopy 2014, (Sydney, Australia/2014).
5. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "HeLa cell culturing on a hydrophilicity controlled silicon nitride surface", International Conference on Photonics 2014, (Kuala Lumpur, Malaysia/2014).
6. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Taichi Furukawa, Sheng Lin, Wataru Inami, Yoshimasa

- Kawata, "Surface Hydrophilicity Control of Silicon Nitride for Cell Culture", The 16th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, (Shizuoka, Japan/2014).
7. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Sheng Lin, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Cell Culturing on Hydrophilicity Controlled Silicon Nitride Surface for Cell Imaging", 2015 International Symposium toward the Future of Advanced Researches in Shizuoka University, (Shizuoka, Japan/2015).
 8. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Electron beam damage evaluation of the biocompatible film for D-EXA microscope", NFO-14, (Shizuoka, Japan/2016).
 9. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Estimation of electron beam damage in the biocompatible film by D-EXA microscope observation", International Symposium on Biomedical Engineering, (Tokyo, Japan/2016).
 10. Yuriko Masuda, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "Damage estimation of electron beam irradiation in the biocompatible film by D-EXA microscope observation", The 17th Takayanagi Kenjiro Memorial Symposium, (Shizuoka, Japan/2016).

国内における学会発表

1. 益田 有里子, 居波 涉, 宮川 厚夫, 川田善正, "バイオセンサのための培養基板の親水性制御", 第 72 応用物理学会秋季学術講演会 (山形大学/2011)
2. 益田 有里子, 居波 涉, 宮川 厚夫, 川田善正, "細胞培養のための窒化シリコン表面の親水性制御", 生物物理学会 第 49 回年会講演予稿集 (兵庫県立大学/2011)
3. 益田 有里子, 名和 靖矩, 居波 涉, 川田 善正, "高分解能蛍光顕微鏡のための培養基板の親水性制御", 2014 年第 61 回応用物理学会春季学術講演会 (青山学院大学/2014)
4. Yuriko Masuda, Yasunori Nawa, Sheng Lin, Taichi Furukawa, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, "電子線直接励起を用いた細胞の高コントラスト観察のための表面改質手法の開発", Optics & Photonics Japan 2014 日本光学会年次学術講演会 (筑波大学/2014)
5. 益田 有里子, 名和 靖矩, 居波 涉, 川田 善正, "電子線直接励起蛍光顕微鏡を用いた高分解能生体イメージング", 国際光年記念シンポジウム (東京大学/2015)

本研究に関する受賞

1. International Conference on Photonics 2014, Best paper award (Kuala Lumpur, Malaysia/2014)
2. NFO-14, The Best Poster Presentation Award (Shizuoka, Japan/2016)

謝辞

本研究は、静岡大学電子工学研究所教授、川田善正先生のご指導のもと行われた。川田善正先生には本研究を実施する機会を与えていただき、その遂行にあたって熱意あるご指導を賜った。ここに深謝の意を表する。

静岡大学工学部機械工学科教授の岩田太先生、静岡大学電子工学研究所教授の早川泰弘先生には、審査委員としてご助言をいただくとともに、本論文の細部にわたってご指導をいただいた。ここに深謝の意を表する。

静岡大学工学部機械工学科准教授の居波渉先生、化学バイオ工学科准教授の杉田篤史先生、電子物質科学科准教授の小野篤史先生には、本研究に関して惜しめないご指導とご助言を賜った。ここに深謝の意を表する。

川田研究室の学術研究員の皆様にも多大なるご指導をいただいた。特に、宮川厚夫博士には、本研究で基礎となる生物学、化学の実験で全面的にご指導いただいた。名和靖矩博士には、本研究での試料観察に関して多大なるご指導をいただいた。また、古川太一博士、三宅亜紀博士には蛍光体に関して意義深いご助言と激励をいただいた。ここに皆様への深謝の意を表する。

博士後期過程を共に過ごした福田真大氏をはじめ、川田研究室の学生の皆様、並びに、川田研究室の卒業生の皆様には、公私共に支えていただき感謝する。また、川田研究室テクニカルアシスタントの藤森みどり氏、鶴藺朋子氏、森永結実氏、飛世倫子氏、岩浪あかね氏には、研究室の運営をサポートいただき感謝する。

最後に、故郷から学生生活を支えてくれた家族に心から感謝する。

2017年3月
益田 有里子

付録 A

光の回折と光学顕微鏡の空間分解能

光学顕微鏡は液中や大気中での試料観察が可能であり、生きた生体試料内の小器官や生体分子の形状・動態を直接観察できる。光学顕微鏡の空間分解能は、光の波としての性質により 200 nm 程度に制限される。本章では、まず光学顕微鏡の空間分解能を制限する光の性質である回折効果について説明し、光学顕微鏡の空間分解能について説明する。

A.1 光の回折

光は波としての性質を持つため、スリットなどの隙間を通過すると遮蔽部の背後に回り込む現象が生じる。これを回折という。障害物の背後に回り込む角度を回折角と呼び、隙間や物体が小さいほど回折角は大きくなる。微小物体を観察する場合、回折角が大きくなるため結像できる限界が生じ、これにより光学顕微鏡の分解能が決定する。以下では、光学顕微鏡の分解能を議論する上で非常に重要な要素である回折の公式を導出する。

A.1.1 ホイヘンスの原理とフレネル回折

以下にホイヘンスの原理を示す。

ある時刻における波面上の各点から球面波 (素元波) が生じ、これらの素元波に共通に接する面が次の瞬間の波面となる。

このホイヘンスの原理を用いれば、不透明な物質に開けられた開口を通過した単色光が回折して罰の場所へ到達する場合を定義することができる。図 A.1 に開口を通過した光の模式図を示す。図 A.1 中の点 P_1 における波の振幅分布を $u_1(P_1)$ とおき、点 P_2 における振幅分布を $u_2(P_2)$ とおく。点 P_1 の存在する平面の座標を (ξ, η) 、点 P_2 の存在する平面の座標を (x, y) とおき、その二つの平面の距離を z 、二点の距離を r とおく。

点 P_1 から発生した球面波が伝搬して、点 P_2 に届くとき、その波を $\hat{u}_2(P_2; P_1)$ とすると、

$$\hat{u}_2(P_2; P_1) = \frac{u_1(P_1)}{r} e^{ikr} \quad (\text{A.1})$$

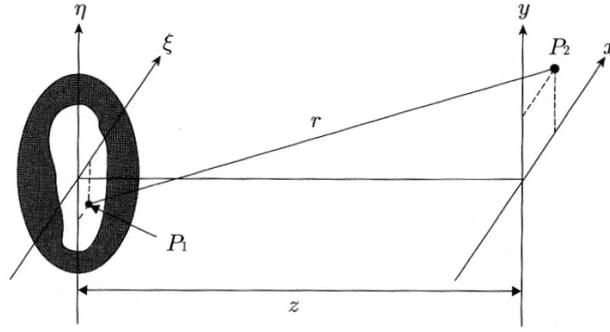


図 A.1 開口を通過した光の回折 [66]

となる。ここで、時間項 $e^{-i\omega t}$ は式全体にかければ良いので省略できる。

開口全体から点 P_2 に届く波は、

$$u_2(P_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{u_1(P_1)}{r} e^{ikr} d\xi d\eta \quad (\text{A.2})$$

と表され、点 P_1 と点 P_2 を、 (ξ, η) と (x, y) で書き直すと

$$u_2(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} \frac{u_1(\xi, \eta)}{r} e^{ikr} d\xi d\eta \quad (\text{A.3})$$

となる。この式を用いることで、 (ξ, η) 面上の振幅分布から (x, y) 面上の振幅分布を導出できる。

r は変数 ξ, η, x, y の関数であり、三平方の定理を用いて

$$r = \sqrt{z^2 + (x - \xi)^2 + (y - \eta)^2} \quad (\text{A.4})$$

と表すことができる。ここで、 z が ξ, η, x, y に比べて十分大きいとすると、

$$\begin{aligned} r &= z \sqrt{1 + \frac{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}{z^2}} \\ &\simeq z + \frac{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2}{2z} \\ &= z + \frac{x^2 + y^2}{2z} + \frac{\xi^2 + \eta^2}{2z} - \frac{x\xi + y\eta}{z} \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

と近似することができる。式 (A.3) に式 (A.5) を代入し、積分に関係ない係数を外に出すと、

$$u_2(x, y) = \frac{1}{z} e^{ikz} e^{ik \frac{x^2 + y^2}{2z}} \iint_{-\infty}^{\infty} u_1(\xi, \eta) e^{ik \frac{\xi^2 + \eta^2}{2z}} e^{-ik \frac{x\xi + y\eta}{z}} d\xi d\eta \quad (\text{A.6})$$

となる。式 (A.6) における係数は強度を議論する場合には定数となるため、相対的な強度分布を議論する場合は省略できる。

以上より、 (ξ, η) 面上の振幅分布 $u_1(\xi, \eta)$ から (x, y) 面上の振幅分布 $u_2(x, y)$ を求める式は、

$$u_2(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_1(\xi, \eta) e^{ik \frac{\xi^2 + \eta^2}{2z}} e^{-ik \frac{x\xi + y\eta}{z}} d\xi d\eta \quad (\text{A.7})$$

と与えられる。この式をフレネルの回折公式と呼ぶ。フレネル回折では、 ξ, η に対して 2 乗の項まで考慮して回折を近似している。

A.1.2 フラウンホファー回折

前節のフレネル回折では、距離 z が比較的短い場合において導出した。次に、距離 z が十分大きく、

$$e^{ik\frac{\xi^2+\eta^2}{2z}} \approx 1 \quad (\text{A.8})$$

と近似できる場合について考える。この近似が成り立つためには、

$$z \gg \frac{k(\xi^2 + \eta^2)_{max}}{2} \quad (\text{A.9})$$

を満たす必要がある。開口の大きさを 2 cm として、光の波長を 600 nm とすると、開口面と観察面が 1000 m 以上離れているときにこの近似が成り立つ。

式 (A.8) が成り立つとき、式 (A.7) は簡潔になり、

$$u_2(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_1(\xi, \eta) e^{-ik\frac{x\xi+y\eta}{z}} d\xi d\eta \quad (\text{A.10})$$

と表される。この式が成り立つ回折をフラウンホファー回折と呼ぶ。式 (A.10) より、フラウンホファー回折の領域では、 (ξ, η) 面上の振幅分布 $u_1(\xi, \eta)$ と (x, y) 面上の振幅分布 $u_2(x, y)$ がフーリエ変換の関係で結ばれていることがわかる。

通常、フラウンホファー回折を観察するには、開口面や光源と観測点が数十キロメートル離れている必要があり、実験室で再現することは難しい。しかし、レンズを適当な位置に配置することで、レンズの焦点面にフラウンホファー回折の強度分布を作り出すことができる。

A.1.3 矩形開口のフラウンホファー回折

図 A.1.3 に矩形開口とそれによる回折光の強度パターンを示す。図 A.1.3 のような $2a \times 2b$ の大きさの矩形開口での光の振幅分布 $u_1(\xi, \eta)$ は、

$$\begin{cases} u_1(\xi, \eta) = A & -a \leq \xi \leq a \text{ かつ } -b \leq \eta \leq b \\ 0 & \text{それ以外} \end{cases} \quad (\text{A.11})$$

となる。これを、式 (A.10) に代入すると、

$$\begin{aligned} u_2(x, y) &= A \int_{-a}^a \int_{-b}^b e^{-ik\frac{x\xi+y\eta}{z}} d\xi d\eta \\ &= A \left(\int_{-a}^a e^{-ik\frac{x\xi}{z}} d\xi \right) \left(\int_{-b}^b e^{-ik\frac{y\eta}{z}} d\eta \right) \\ &= 4Aab \operatorname{sinc}\left(\frac{ka}{z}\right) \operatorname{sinc}\left(\frac{kb}{z}\right) \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

となる。スクリーン上の強度 $I(x, y)$ は、 $u_1(\xi, \eta)$ の絶対値を二乗して、

$$I(x, y) = 16A^2 a^2 b^2 \text{sinc}^2\left(\frac{ka}{z}\right) \text{sinc}^2\left(\frac{kb}{z}\right) \quad (\text{A.13})$$

で与えられる。図 A.1.3 b) に示すように、スクリーン上の回折パターンは光軸上で極大となり、開口を通過した光のほとんどが中心ピークに集まっていることがわかる。簡単のため x 方向の成分だけ抜き出して考えると、開口を通過した光の強度が最初にゼロになる点は

$$x = \frac{\lambda z}{2a} \quad (\text{A.14})$$

で与えられる。ここで、回折角の広がりを θ とおくと、

$$\theta = 2\left(\frac{\theta}{2}\right) \simeq 2 \tan\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{\lambda}{a} \quad (\text{A.15})$$

となり、回折光の広がり角が波長 λ と開口の幅 a との比で与えられることがわかる。この式より、開口の幅が波長と同程度のときに回折角の広がり角 θ が大きく回折の現象が顕著に現れるといえる。よって、図 A.1.3 b) ではより狭い幅のスリットを通過した x 方向の光パターンの方が回折の効果により広がっている。

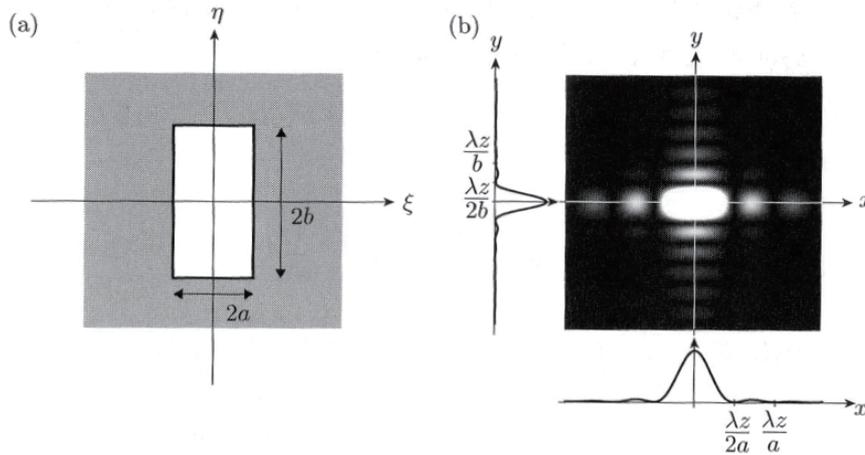


図 A.2 矩形開口によるフラウンホーファー回折 [66]

a) 矩形開口, b) 回折光の強度パターン

A.1.4 円形開口のフラウンホーファー回折

光軸を中心とする円形開口の場合、系が光軸に対して回転対称であるので極座標で表示する。

$$\xi = \rho \cos \phi, \eta = \rho \sin \phi \quad (\text{A.16})$$

$$x = r \cos \theta, y = r \sin \theta \quad (\text{A.17})$$

として、 (ρ, ϕ) 面と (r, θ) 面での振幅分布をそれぞれ $u_1(\rho, \phi)$, $u_2(r, \theta)$ と表す。このとき、開口である (ρ, ϕ) 面の強度分布は、

$$\begin{cases} u_1(\rho, \phi) = A & \rho \leq a \\ 0 & \text{それ以外} \end{cases} \quad (\text{A.18})$$

と表される。さらに、式 (A.10) を極座標で表示すると、

$$\begin{aligned} u_2(r, \theta) &= A \int_0^\infty \int_0^{2\pi} u_1(\rho, \phi) e^{-i(\frac{kr}{z})\rho \cos(\phi-\theta)} \rho d\rho d\phi \\ &= A \int_0^a \left\{ \int_0^{2\pi} e^{-i(\frac{kr}{z})\rho \cos(\phi-\theta)} d\phi \right\} \rho d\rho \end{aligned} \quad (\text{A.19})$$

となる。ここで、 ϕ に関する積分関数はベッセル関数になる。

ベッセル関数は

$$J_n(x) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\pi}^{\pi} e^{i(x \sin \alpha - n\alpha)} d\alpha \quad (\text{A.20})$$

で定義される。三角関数の公式 $\sin \alpha = -\cos(\alpha + \pi/2)$ を代入して、さらに、 $(\alpha + \pi/2)$ を新たに積分変数 α として定義すると、

$$J_n(x) = \frac{i^n}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{-i(x \cos \alpha + n\alpha)} d\alpha \quad (\text{A.21})$$

となり、特に $n = 0$ のとき

$$J_0(x) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{-ix \cos \alpha} d\alpha \quad (\text{A.22})$$

となる。つまり、式 (A.19) の ϕ に関する積分部分は

$$\int_0^{2\pi} e^{-i(\frac{kr}{z})\rho \cos(\phi-\theta)} d\phi = 2\pi J_0\left(\frac{kr}{z}\rho\right) \quad (\text{A.23})$$

と表される。 ρ に関する積分は、ベッセル関数の性質より、

$$x J_1(x) = \int_0^x x' J_0(x') dx' \quad (\text{A.24})$$

となる。以上を式 (A.19) に代入すると、

$$\begin{aligned} u_2(r, \theta) &= 2\pi A \int_0^a J_0\left(\frac{kr}{z}\rho\right) \rho d\rho \\ &= 2\pi A a^2 \left(\frac{J_1\left(\frac{kr}{z}a\right)}{\frac{kr}{z}a} \right) \end{aligned} \quad (\text{A.25})$$

となる。よって、スクリーン上の強度 $I(r)$ は、

$$I(x, y) = \pi^2 A^2 a^4 \left(\frac{2J_1\left(\frac{kr}{z}a\right)}{\frac{kr}{z}a} \right)^2 \quad (\text{A.26})$$

で与えられる。

図 A.1.3 に矩形開口とそれによる回折光の強度パターンを示す。原点上では最大値 $\pi^2 A^2 a^4$ をとる。また、一次のベッセル関数は $x = 1.220\pi$ で最初のゼロ点をとるため、一つ目の暗環の半径は

$$r_a = 0.61 \frac{\lambda z}{a} \quad (\text{A.27})$$

となる。この半径で与えられる円板状の部分をエアリーディスクという。エアリーディスク内には開口に入射する全光量の 84% が集中する。これを回折による広がり角 θ で表すと、

$$\theta = 1.22 \frac{\lambda}{a} \quad (\text{A.28})$$

となる。

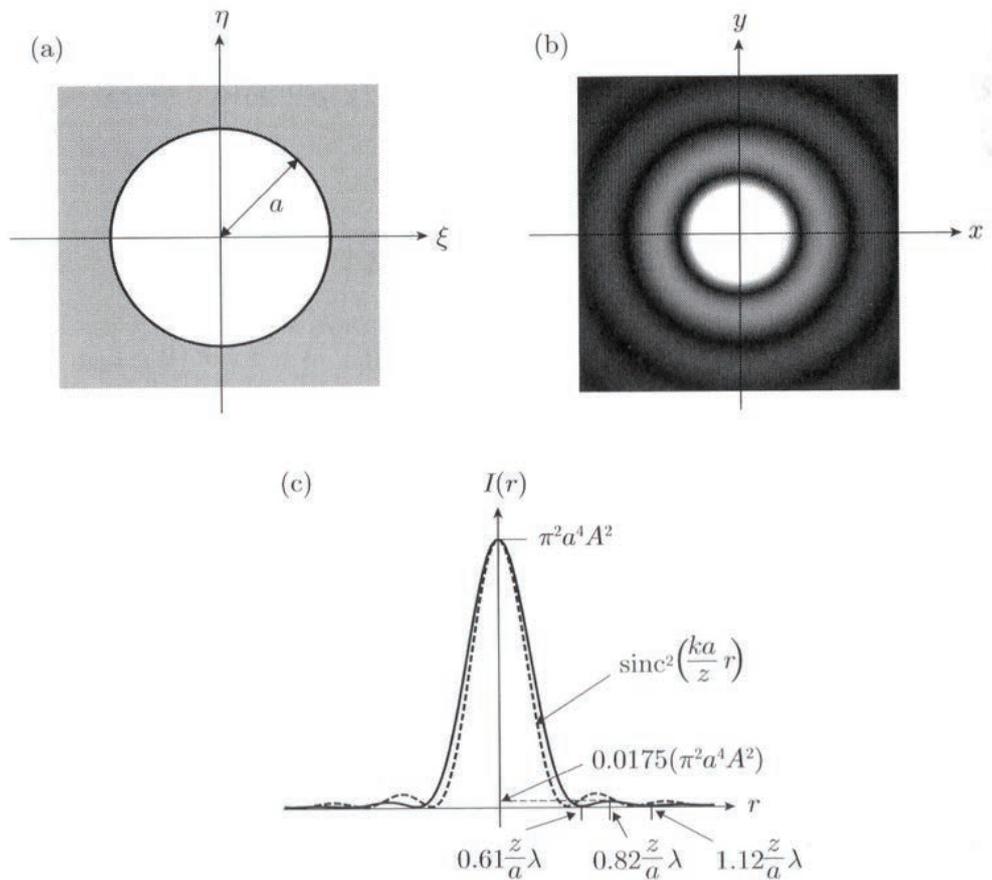


図 A.3 円形開口によるフラウンホーファー回折 [66]

a) 円形開口, b) 回折光の強度パターン, c) x 軸における強度分布

A.2 光学顕微鏡の空間分解能

空間分解能とは、位置的に接近した2点を独立した2点として区別する能力を指し、顕微鏡の能力を示す最も重要な指標の一つである。顕微鏡ではある距離よりも近くに存在する2点を区別することはできない。これは、結像の光学系が光の回折限界による制限をうけるため、光の波長やレンズの特性といった観察条件に応じて起こる回折現象で決定される。以下に、空間分解能の基準と結像光学系における回折限界について説明する。

A.2.1 レーリーの分解能

図 A.4 に二つの発光点を結像する様子を示す。二つの発光点は近接して並び、レンズ1の焦点位置に存在する。二つの発光点は2枚のレンズで結像され、スクリーン上に輝点を形成する。

図 A.5 に図 A.4 の二つの発光点同士の距離を変えて結像した場合のスクリーンに形成された像を示す。図 A.5 a) と d) は物体面で二つの発光点間の距離が十分に離れている場合である。このとき、スクリーン上では二つの輝点が観察でき、物体面に二つの発光点が存在することがわかる。一方、図 A.5 b) と e) は物体面で二つの発光点間の距離が小さくなった場合を示しており、スクリーン上では二つの輝点が大きく重なっている。このように、物体面での発光点間の距離が非常に小さくなると、実際にスクリーン上で観察される輝点は強度ピークを一つしか持たない。したがって、観察像からは発光点が二つあるかどうかを判断できない。

レーリーは空間分解能をエアリーディスクの半径で定義した。つまり、一方の主極大と他方の第一極小とが一致した時、ちょうど2つの像が分解されたと見なす。これをレーリーの分解能の基準と呼ぶ。図 A.5 c) と f) にレーリーの分解能を満たす場合においてスクリーン上に形成される像を示す。

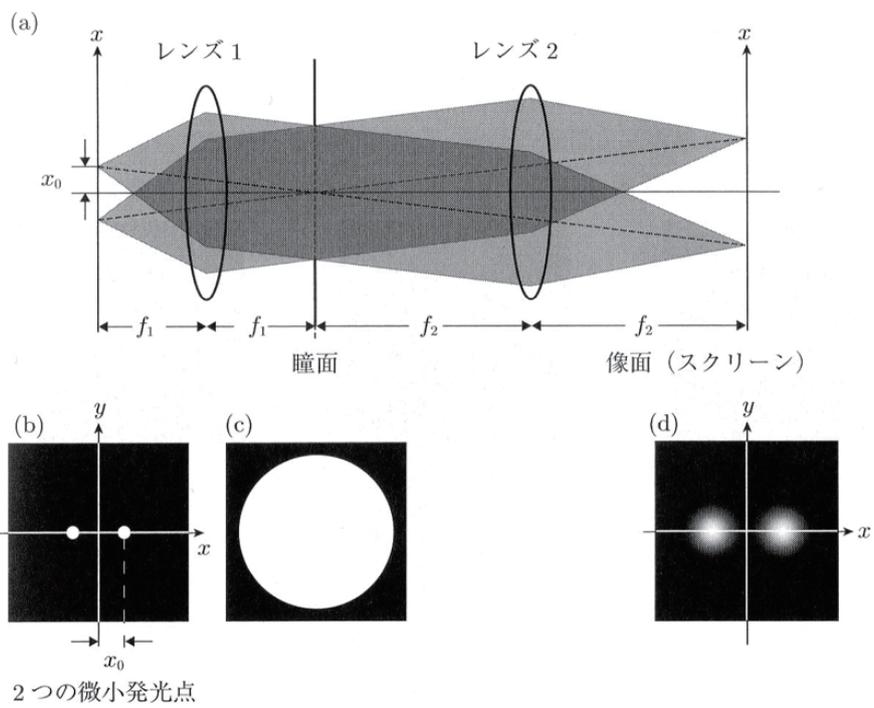


図 A.4 二つの点の結像 [66]

a) 結像光学系, b) 物体の位置, c) 瞳面の強度分布, d) スクリーンに形成された像

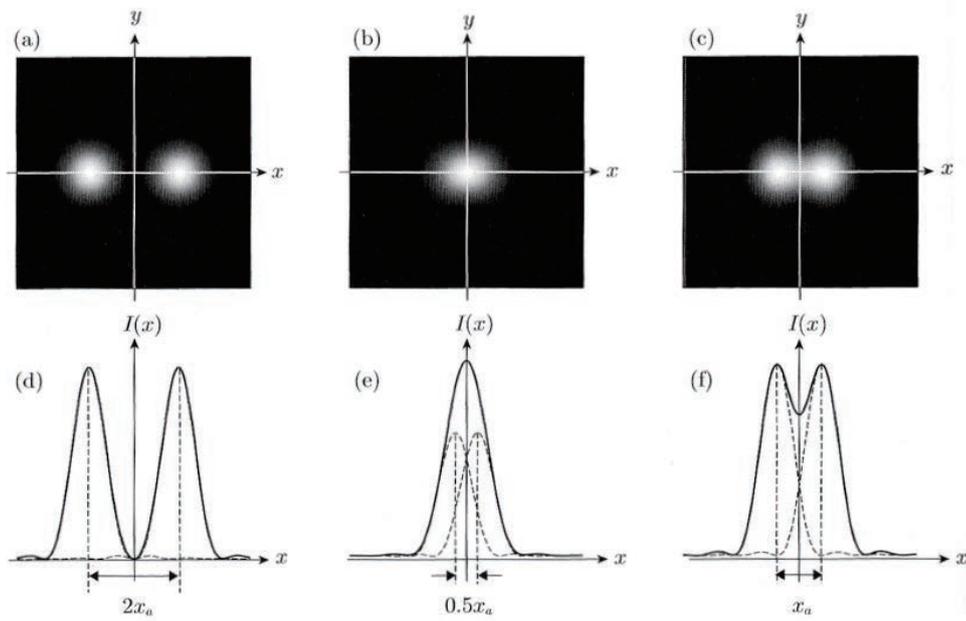


図 A.5 レーリーの分解能 [66]

a) 二つの物体が十分離れている場合, b) 二つの物体が非常に近い場合, c) 二つの物体がレーリーの分解能の基準を満たす場合

A.2.2 光の回折限界と空間分解能

光学顕微鏡を構成する最も重要な光学素子の一つはレンズである。レンズは開口から遠い距離に形成されるフラウンホーファー回折をレンズの焦点距離に形成することができる。現実世界のレンズは有限であり、フラウンホーファー回折が形成されているレンズの焦点位置には瞳関数と呼ばれる円形開口が存在する。

図 A.6 に微小発光点の結像の様子を示す。微小点光源の数は一つとし、もっとも基本的な場合を考える。微小発光点からの光はレンズ 1 を通って瞳面で様な強度となる。瞳面の円形開口を通過した光はレンズ 2 によってスクリーンに結像される。スクリーン上に形成される輝点は、発光点が無限小の場合でも必ず有限の大きさを持つ。これは、レンズの瞳面の開口が有限の大きさを持つためである。また、その強度分布は、前節で示した円形開口の回折光強度分布と同一となる。

簡単のため $f = f_1 = f_2$ とし、結像倍率を 1 とする。原点からの距離を r とおくと、図 A.6 d) の強度分布は、

$$I(x, y) = \left(\frac{2J_1(kN_a r)}{kN_a r} \right)^2 \quad (\text{A.29})$$

$$r = \sqrt{x^2 + y^2}, \quad k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{A.30})$$

で与えられる。 J_1 は第一種のベッセル関数、 λ は光の波長を表す。 N_a は開口数と呼ばれる値であり、光が伝搬する媒質の屈折率を n 、レンズに入射する光の最大角を θ_{\max} とすると、

$$N_a = n \sin \theta_{\max} \quad (\text{A.31})$$

で与えられる。

図 A.6 e) に微小発光点が結像されたときの強度分布を示す。原点から見て最初のゼロ点の位置は、

$$x_a = \frac{0.61\lambda}{N_a} \quad (\text{A.32})$$

で与えられ、この距離がエアリーディスクの半径となる。レーリーの定義した空間分解能はエアリーディスクの半径であるため、式 (A.32) で導かれた x_a が通常の光学顕微鏡の分解能を示す。

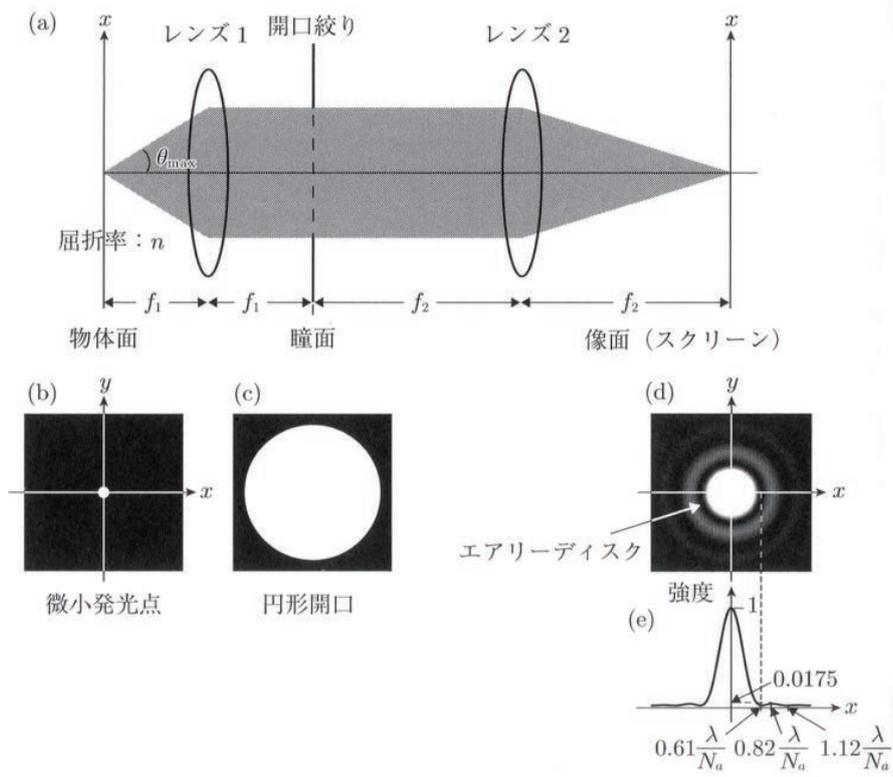


図 A.6 微小発光点の結像 [66]

a) 結像光学系, b) 物体, c) 瞳面の強度分布, d) スクリーンに形成された像, e) スクリーン x 軸上の強度分布

付録 B

蛍光顕微鏡の特性

蛍光顕微鏡はバイオ分野での観察に広く使われ、生体試料内の構造の形状を観察したり、生体機能の解明の研究で有効な手法である。本章では、蛍光顕微鏡の原理、蛍光顕微鏡の分解能について述べる。

B.1 蛍光の発光原理

蛍光顕微鏡は蛍光分子に励起光を照射し、発せられる蛍光を結像することで画像を得る。蛍光は、蛍光分子が励起光からエネルギーを受け取ることにより、蛍光分子内部の電子が遷移して起こる。図 B.1 にヤブロンスキーダイアグラムを示す。ヤブロンスキーダイアグラムは、物質の吸収、蛍光、リン光などの電子のエネルギー遷移を表すものである。図 B.1 に示すように、励起準位 S_1 から基底状態 S_0 への緩和に対応する電子遷移によって発光が生じるプロセスを蛍光と呼ぶ。蛍光を生じる物質に対して励起に必要なエネルギーを持つ光を照射すると、基底状態にある電子はエネルギーを吸収して励起される。励起された電子は、励起準位 S_1 の最低振動単位に緩和した後に発光しながら基底状態へ遷移する。この発光が蛍光である。

蛍光のプロセスでは、励起後に励起準位において熱的な緩和がある。したがって、蛍光の発光波長は励起光の波長よりもエネルギーが低い、つまり、長波長側のスペクトルを持つ。これをストークスシフトと呼び、これにより基底状態の電子遷移の構造を知ることができる。また、蛍光が緩和するのにかかる時間は、おおよそ $10^{-9} \sim 10^{-7}$ 秒程度である。

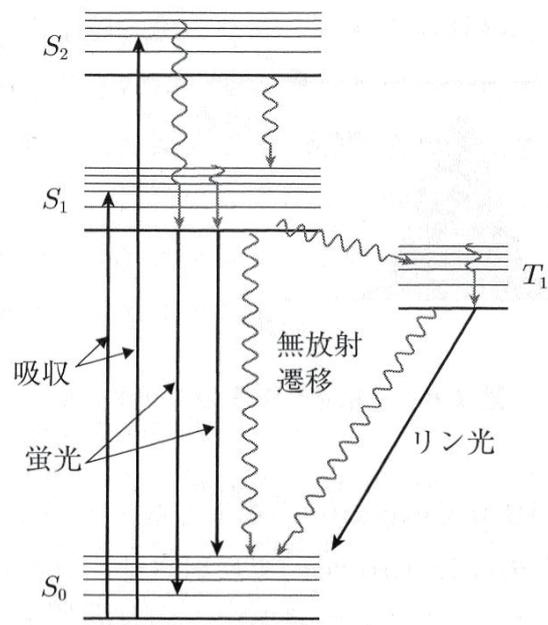


図 B.1 ヤブロンスキーダイヤグラム [66]

B.2 蛍光顕微鏡の原理と特徴

蛍光顕微鏡は、試料から発せられる蛍光のみを検出できるため感度よく観察できる。これは、励起光と蛍光の波長が異なるため、フィルターなどを用いることで余分な背景光を除去できるためである。完全に暗い中で微弱な蛍光を検出できるため、一分子の蛍光観察も可能である。ただし、励起光の照射、または、蛍光の結像にレンズを用いるため、空間分解能はレーリーの定義に従う。

B.2.1 蛍光顕微鏡の構成

図 B.2 に蛍光顕微鏡の構成を示す。図 B.2 に示すような落射照明は一般的に用いられる光学系であり、対物レンズ側から試料を照明して同一の対物レンズで蛍光を集光する構成を取る。光源からの光をダイクロイックミラーで反射させ、試料を照明する。試料から生じた蛍光はダイクロイックミラーを透過し、観察面上に結像される。通常、蛍光顕微鏡では蛍光分子の発する蛍光よりも短い領域で、狭い帯域の波長の励起光を使用する。光源の波長帯域が広いと、光源と蛍光が重なって観察が難しくなるためである。また、蛍光顕微鏡の光源には、水銀ランプが一般的に使用されている。水銀ランプは様々な波長の輝線スペクトルを持つため、蛍光顕微鏡では必要な波長のみをフィルターを用いて取り出して使用する。

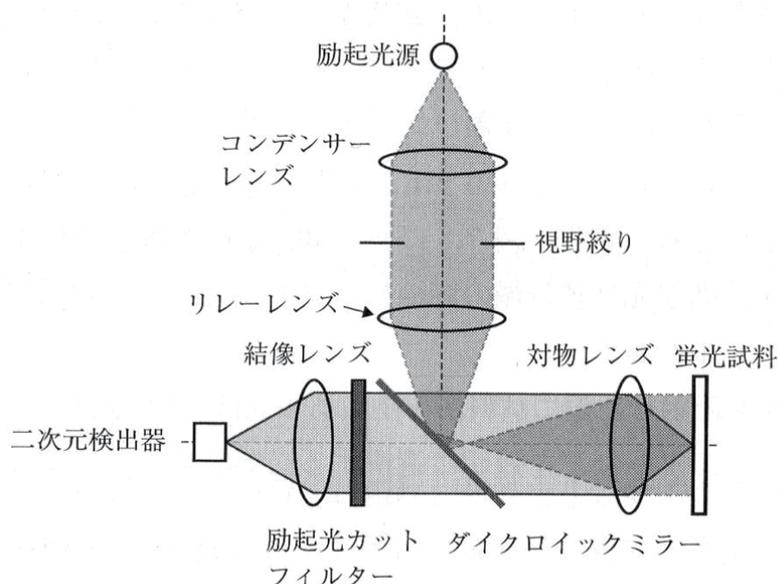


図 B.2 落射蛍光顕微鏡の構成 [66]

B.2.2 光学部品の選択

一般的に試料から生じる蛍光は強度が小さいため、蛍光のみを検出できるような構成にしなければ信号対雑音比 (signal-to-noise ratio, SN 比) が大幅に低下する。したがって、蛍光顕微鏡を構成する光学部品は適切に選択する必要がある。以下に、光学部品を選択する際の主な注意点を示す。

a) 適切なダイクロイックミラー、干渉フィルターの使用

励起光が検出器側に漏れると、それが蛍光検出の背景光になるため観察像のコントラストが低下する。したがって、励起光と蛍光に合うダイクロイックミラーおよび、励起光カットのための鑑賞フィルターは非常に重要な役割を持つ。図 B.3 に一般的な蛍光体の励起光と蛍光のスペクトルの関係を示す。散乱した励起光はダイクロイックミラーで光源側へ反射させ、干渉フィルターを検出器前に置くことで励起光を除去する。フィルターには、励起光がカットでき、蛍光をカットしない特性が必要である。

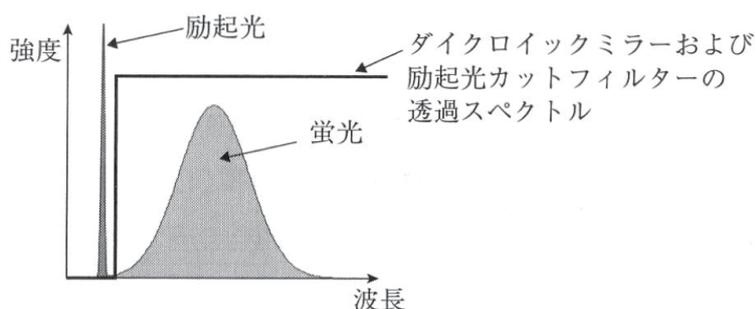


図 B.3 励起光・蛍光スペクトルと高 SN 比観察のためのフィルター [66]

b) 自家蛍光のない光学素子の使用

光学系を構成している光学部品は励起光を照射しても蛍光を発しないものを使用する必要がある。光学部品からの自家蛍光は観察像の背景光となり、コントラストを低下させてしまうためである。

c) 迷光、散乱光の除去

顕微鏡内で生じる迷光も観察像のコントラストを低下させる要因となるため、反射防止膜などをコートした光学素子を利用する必要がある。

d) 退色による蛍光強度の減少の防止

蛍光色素は、観察中にその分子が壊れて蛍光を生じなくなる、退色と呼ばれる現象がしばしば発

生する。実際の蛍光顕微鏡観察では問題点となる。退色は、励起光強度が大きく、かつ、照射時間が長い場合に起こりやすい。退色を避けるためには、検出に必要な蛍光強度が得られる最低の照射エネルギーで励起する必要がある。

B.3 レーザー走査蛍光顕微鏡の特徴

落射型蛍光顕微鏡では水銀ランプなどを主に光源として使用するが、レーザー走査顕微鏡は光源にレーザーを利用したシステムである。レーザーは輝度、単色性や集光性がよく、コントラストの高い画像を取得できるようになる。しかしながら、通常の光学顕微鏡の構成では、レーザーのスペckルノイズが重なり観察が難しい。この問題を解決するために、レーザー走査顕微鏡はレーザーを集光させて試料に照射する。図 B.4 にレーザー走査顕微鏡の構成を示す。レーザー光源からの光を試料の一点に集光し、試料から発せられた蛍光を検出する。レーザー光または試料を走査し、各点の蛍光強度を取得することで二次元像が得られる。

レーザー走査顕微鏡の分解能は試料に集光されるレーザー光のスポットサイズで決定される。集光スポットのサイズ x_a は光源に利用する励起光の波長を λ 、対物レンズの開口数を N_a とすると、 $x_a = 0.61\lambda/N_a$ で与えられ、通常の光学顕微鏡と同じ分解能を持つ。レーザー走査顕微鏡は構成上、走査中は試料上の一点のみに励起光が当たっており、集光点以外から蛍光が検出されることはない。したがって、空間分解能は通常の光学顕微鏡と同じであるが、コントラストは著しく向上する。

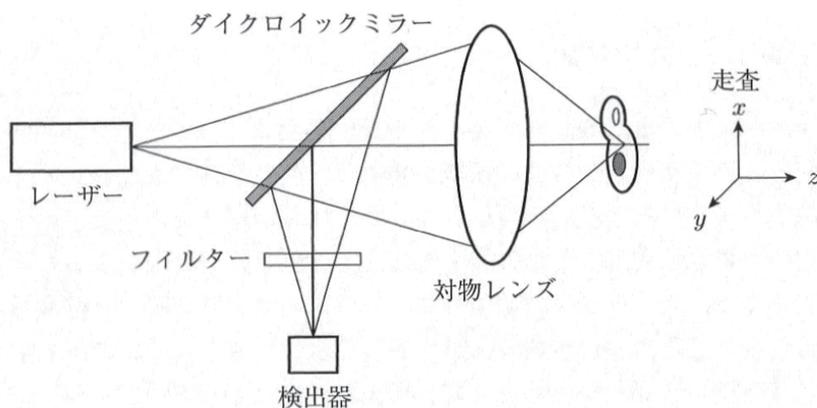


図 B.4 レーザー走査顕微鏡の構成 [66]