

(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： ナノビジョン工学専攻 氏名： 福田 真大
Course : Name :

論文題目：電子線励起微小光源を用いた超解像光学顕微鏡の開発と生物細胞のナノイメージング

Title of Thesis :

論文要旨：

Abstract :

本論文は、蛍光薄膜内での電子線励起微小光源を用いた超解像光学顕微鏡を開発し、無染色の生物細胞を高空間分解能で観察した結果について記述した。光源励起用の蛍光薄膜を開発し、顕微鏡の空間分解能や信号対雑音比を評価した。電子線励起による微小光源によって、無染色の細胞を 100 nm 以下の空間分解能で観察した。

光学顕微鏡は、非接触、非侵襲観察が可能であり、水中や大気圧下など多様な環境下で使用可能であるため、生物や医学分野で重要なツールとして用いられる。現在まで、多くの生体機能が光学顕微鏡により解明されてきた。しかしながら、光学顕微鏡の空間分解能は、光の回折限界により、光の波長の半分程度が限界である。空間分解能が制限されるため、生体試料内の詳細な構造の観察は困難である。

本研究では、膜厚数十 nm の蛍光薄膜に電子線を照射することで生じる発光を光源とし、試料を観察することを試みた。蛍光薄膜内で電子線励起した光源により基板上的試料を走査することで、試料の観察像を取得する。電子線照射によって膜厚数十 nm の蛍光薄膜内に励起される光源の大きさは、数十 nm となるため、光の回折限界を超えた空間分解能での試料観察を可能にする。

基板と蛍光薄膜により大気と真空を分離することにより、試料観察環境と電子線使用環境を分離した。電子線励起微小光源を用いた超解像光学顕微鏡では、試料観察環境が大気中であるため、液中の生きた細胞試料を観察可能である。

本研究では ZnO のアニール条件を調整することにより、高輝度かつ均一強度の蛍光膜を形成した。ZnO は低加速電子線で高輝度発光を示す蛍光材料である。発光強度の均一性を向上させることにより、更なる高空間分解能化を試みた。ZnO を N₂ 雰囲気中、800 °C で 15 分アニールすることにより、発光強度の標準偏差は 11% となった。発光輝度を評価した結果、アニール前の ZnO と比較し、アニール後の ZnO の強度は 3.4 倍増強することを観測

した。

この ZnO により無染色の細胞試料を観察した結果、82 nm の空間分解能を達成した。また、電子線励起発光を光源とする超解像光学顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いて、構造染色した細胞について観察した。二つの観察結果を比較することにより、電子線励起発光を光源とする超解像光学顕微鏡の観察結果における細胞構造を特定した。電子線励起発光を光源とする超解像光学顕微鏡における細胞構造観察結果の知見を基に、無染色の細胞構造の観察結果においても細胞構造を同定できることを示した。

電子線励起発光に用いる蛍光体として Zn_2SiO_4 について検討した。本研究では ZnO を N_2 雰囲気中において 1000 °C で 60 分アニールすることにより、 Zn_2SiO_4 を形成する。膜厚 50 nm の ZnO をアニールすることで、膜厚 20 nm の Zn_2SiO_4 を得る。 Zn_2SiO_4 は 300 nm, 380 nm, 580 nm に電子線励起発光のピークを持ち、ZnO の 20 倍大きな発光強度であった。

Zn_2SiO_4 を光源とし、開発した超解像光学顕微鏡によって細胞試料を観察した。まず、空間分解能と信号対雑音比を評価し、空間分解能は 100 nm, また信号対雑音比は 10 という結果を得た。無染色の細胞を観察した結果、従来の光学顕微鏡では観察されない構造を、電子線励起微小発光を光源とする超解像光学顕微鏡で観察した。また、1 fps での動態観察により生細胞が動く様子を観察した。

原子層堆積法により成膜した ZnO についても電子線励起発光の特性を評価し、光源励起用の蛍光体に応用した。原子層堆積法によって成膜した ZnO は、アニールすることなく高輝度かつ均一強度の発光を示すことがわかった。原子層堆積法により成膜した ZnO により、細胞試料を観察した結果、樹状突起上の膜構造を 139 nm の大きさ、かつ、高コントラストで観察した。

最後に、数値解析法から電子線励起発光を光源とする超解像光学顕微鏡の深さ方向の観察領域を特定した。解析手法はモンテカルロシミュレーションによる電子線散乱解析と有限差分時間領域法による光伝搬解析を組み合わせた。モンテカルロシミュレーションは電子線散乱、そして、有限差分時間領域法は CL の伝搬をそれぞれ解析した。解析結果より、深さ方向の観察漁期は 50 nm 程度であることがわかった。また、解析精度は非常に高く、実験結果との一致度は 0.994 であった。

結論として、膜厚が数十 nm の蛍光薄膜内で電子線励起した微小光源を光源とする超解像光学顕微鏡を開発し、無染色の細胞試料を回折限界以下の高空間分解能で観察した。また、細胞試料の動態も観察可能なことを実証した。これにより、さらなる生命機能解明や光学顕微鏡の新たな応用が期待できる。