

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656050

研究課題名(和文)電子線励起プラズモンを用いたバイオイメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of a Bio-imaging Assisted by Electron-Beam-Induced Plasmon

研究代表者

新岡 宏彦(Niioka, Hirohiko)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：70552074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：CL顕微鏡を用いたバイオイメージングのために、蛍光体プローブの高輝度化について研究を行った。CL顕微鏡の作製、PLD(pulsed laser deposition)による蛍光体薄膜の作製、蛍光体ナノ粒子の作製を行なった。また、プラズモンによる発光増強とは異なるが、Y2O3:Eu蛍光体ナノ粒子にZnを添加し、Znを加えない場合に比べて数倍の発光増強に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed CL microscope, phosphor thin films and phosphor nano particles to investigate enhancement of CL intensity by using plasmon for CL bio-imaging. And we increased CL intensity of nanophosphor particles (Y2O3:Eu) by Zn doping. This is not related to enhancement due to plasmon, the CL intensity was increased several times.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用光学・量子光工学

キーワード：バイオイメージング プラズモン カソードルミネッセンス

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の機能は、複数種の蛋白質が相互作用することによって発現しており、それぞれの蛋白質の位置情報を同時に、正確に取得する事は細胞の機能を知る上で非常に重要である。電子顕微鏡を用いた場合、数 nm の空間分解能でイメージングが可能であり、蛋白質種の同定手法として免疫金染色法が知られているが、この手法では、蛍光顕微鏡のようにカラーで複数の蛋白質種を見分ける事は不可能であった。

以上の背景を踏まえて、研究を計画し、実施した。

### 2. 研究の目的

電子線励起発光(カソードルミネッセンス(CL))を用いて、複数種の標的分子種の分布を同時に観察する事ができ、且つ、蛋白質一分子レベルの高分解能で生体細胞・組織の観察ができる顕微鏡手法の実現を目的とする。CLとは物質に電子線を照射した際に誘起される光である。励起に電子線を用いるので空間分解能が高いイメージングが可能である。異なるCLスペクトルを持つナノ蛍光体粒子をそれぞれ目的の蛋白質に修飾後CLイメージングすることにより、蛋白質種を見分ける事が可能であると考えられる。

これまでは、プローブとして用いていた蛍光体が暗いために、イメージのコントラストが低く、イメージングに時間を要していた。本研究では、電子線励起表面プラズモンを利用した高効率発光蛍光体プローブを作製し、高コントラストなイメージの取得とイメージング時間の短縮を実現することを目指す。

### 3. 研究の方法

CL発光強度を評価するため、CL顕微鏡の作製を行なう。次に、CLを発する蛍光体薄膜および粒子を作製し、金や銀の金属ナノ粒子を用いてCL発光像強及びCL発光増強度を評価する。蛍光体材料として希土類を添加した $Y_2O_3$ を用いる。

### 4. 研究成果

#### SEM-CL顕微鏡光学系の作製

はじめに、SEM (JEOL, JSM-6060LV) にCL測定系を連結させた装置を作製した(図1)。電子線照射によって得られたCLは試料上方に設置された楕円面鏡にて集められ、光ファイバーを通して分光器に導入される。CLスペクトルは冷却CCDによって取得、CLイメージングは光電子増倍管(PMT)にて行なう。

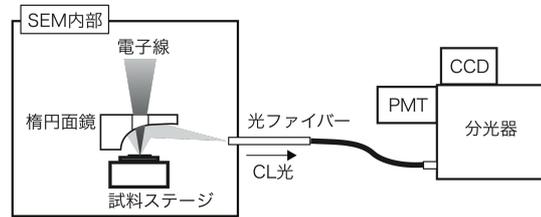


図1 SEM-CL顕微鏡。楕円面鏡には電子線を通す穴がついている。

#### 蛍光体薄膜の作製

PLD(pulsed laser deposition)法により希土類添加蛍光体の薄膜を作製した。ゾルゲル法で作製した $Y_2O_3:Tb$  蛍光体粉末をペレット状に圧縮し、 $1000^\circ C$  12時間大気焼成したものをターゲットとして使用した。また、PLD用の光源として、ナノ秒Nd:YAGレーザーの四倍波(波長266 nm)を用いた。図2に作製した蛍光体薄膜の及びCL像を示す(図1のCL顕微鏡により計測)。薄膜からのCL計測には成功したが、CL発光強度が均一ではなかった。また、60 nmの直径を持つ金ナノ粒子を散布してCL計測を行なったが、発光増強は観察されなかった。

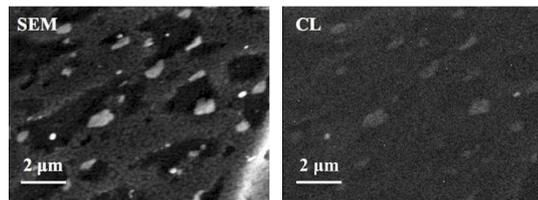


図2 PLDによって作製した蛍光体薄膜のSEM像(左)とCL像(右)

#### コアシェルナノ粒子の作製

蛍光体に直接金属をコートすると、蛍光体からの発光が消光されてしまう可能性があるため、間にスペーサーを介在させる必要がある。そのため、蛍光体表面へのガラスコーティングを試みた。

希土類添加蛍光体( $Y_2O_3:Eu$ )のナノ粒子をゾルゲル法により作製し、さらに、APTES(3-aminopropyltrimethoxysilane)を用いてガラスコーティングを行なった。図3はAPTES処理後の蛍光体のTEM像であり、数nmのガラスの層が確認できる。APTES処理を施さないと蛍光体をTEM観察した場合、図3で観察されるような層は観察されなかった。今後、ガラスコートをした蛍光体薄膜及び蛍光体ナノ粒子上に金属ナノ粒子付加もしくは金属コートをし、CL発光増強度を評価する。

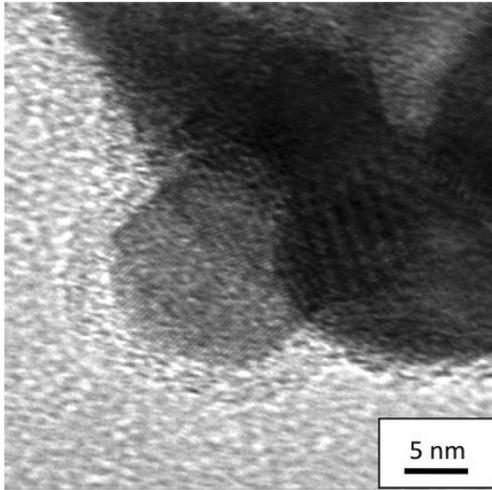


図 3 APTES 処理によりガラスがコーティングされた希土類添加蛍光体( $Y_2O_3:Eu$ )

#### Zn の添加による蛍光体の発光増強

プラズモンによる発光増強を利用する場合、金属コートが必要であり、蛍光体のサイズが大きくなってしまふ事が懸念される。生体 1 分子レベルのイメージングを達成するためには 50 nm 以下のサイズをもつ蛍光体が必要である。そのため、金属を使わず、小さくても明るく光る蛍光体の作製にも挑戦した。

$Y_2O_3:Eu$  に Zn を 5~30% のモル濃度で添加し、発光強度の比較を行なったところ、Zn の添加量が多い程高い CL 発光強度が得られた。30% 濃度で Zn を添加した場合、添加しない場合に比べ 6~7 倍程度の CL 発光強度が得られた。(図 4)

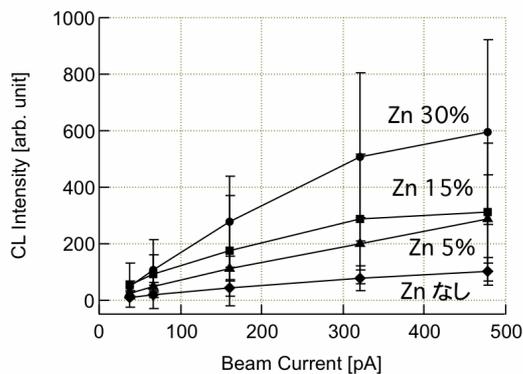


図 4 Zn 添加濃度を変化させた際の、電流値と発光強度の関係。Eu の濃度は全て 5%。縦軸は CL 発光強度。横軸はビーム電流。

Zn を添加した  $Y_2O_3:Eu$  蛍光体( $Y_2O_3:Eu,Zn$ ) の CL 観察を行なったところ、粒径 30 nm の微小蛍光体の観察に成功した(図 5)。従って本蛍光体により個々の生体分子を染色できれば、30 nm 程度の空間分解能で生体分子を観察可能である事が示された。このとき、FE-SEM (JEOL, JSM-6500F) をベースとする CL 顕微鏡を用いた。

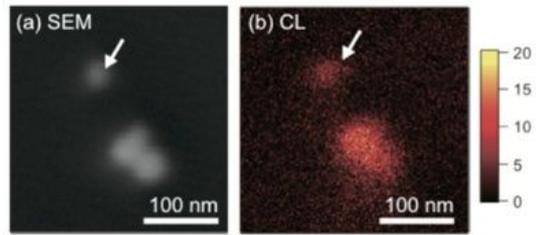


図 5 Zn を添加した  $Y_2O_3:Eu$  蛍光体の SEM 像 (a) と CL 像 (b)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Taichi Furukawa, Hirohiko Niioka, Tsutomu Araki, Mamoru Hashimoto et al., “High-resolution microscopy for biological specimens via cathodoluminescence and Eu- and Zn-doped  $Y_2O_3$  nanophosphors”, Optics Express, **21**, 25655-25663 (2013)  
doi: 10.1364/OE.21.025655.

新岡宏彦, 古川太一, 橋本守, “希土類添加ナノ蛍光体粒子を用いたカソードルミネッセンス・蛍光細胞イメージング” 顕微鏡, Vol. 49, 1, 59-63(2014)

〔学会発表〕(計 35 件)

新岡宏彦, 古川太一, 福島昌一郎, 一宮正義, 三宅淳, 芦田昌明, 荒木勉, 橋本守 “カソードルミネッセンス顕微鏡と光学顕微鏡の融合”, 顕微鏡学会分科会バイオメディカルニューマイクروسコープ (帝京大学医学部, 2014/3/6)

Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Syoichiro Fukushima, Masayoshi Ichimiya, Jun Miyake, Masaaki Ashida, Tsutomu Araki, and Mamoru Hashimoto, “Rare-earth doped  $Y_2O_3$  nanophosphors for biological cathodoluminescence imaging”, (International Conference on Small Science, Las Vegas, USA, 2013/12/15-18)

新岡宏彦

“Correlative cathodoluminescence and fluorescence biological imaging” 応用物理学会論文奨励賞受賞記念講演 第 74 回 応用物理学会 秋季学術講演会 (2013/9/16(月)-20(日), 同志社大学京田辺キャンパス).

新岡宏彦, 古川太一, 一宮正義, 永田智啓,  
芦田昌明, 荒木勉, 橋本守  
“希土類添加ナノ蛍光体粒子を用いた  
蛍光・CL細胞イメージング”,  
生理研研究会 (生理学研究所,  
2012/10/24-25).

新岡宏彦, 荒木勉, 橋本守 他  
“ナノ蛍光体粒子とカソードルミネッセ  
ンス顕微鏡を用いたマルチカラー生体イメ  
ージング”, 日本顕微鏡学会 (つくば国際会議  
場, 2012/5/14-16).  
他 30 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: カソードルミネッセンス用標識試薬  
発明者: 新岡宏彦, 橋本守, 古川太一  
権利者: 国立大学法人大阪大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-121380  
出願年月日: 平成 24 年 5 月 28 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
大阪大学大学院・基礎工学研究科  
三宅研究室ホームページ  
[http://miyake.bpe.es.osaka-u.ac.jp/ban\\_da\\_san\\_zhai\\_yan\\_jiu\\_shi/HOME.html](http://miyake.bpe.es.osaka-u.ac.jp/ban_da_san_zhai_yan_jiu_shi/HOME.html)

大阪大学大学院・基礎工学研究科  
荒木研究室ホームページ  
[http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/araki\\_lab/](http://sml.me.es.osaka-u.ac.jp/araki_lab/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新岡 宏彦 (NIIOKA, Hirohiko)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号: 70552074

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし