

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16323

研究課題名(和文)希土類添加ナノ蛍光体の電子線励起発光を利用した液中ナノバイオイメージング

研究課題名(英文)Biological nano imaging in wetcondition using cathodoluminescence of rare-earth doped nanophosphors

研究代表者

古川 太一 (Furukawa, Taichi)

大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：70749043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カソードルミネッセンス(CL)顕微鏡による液中バイオイメージングを達成するために、液中観察用チャンバーの作製、高輝度かつ数十nmのサイズを持つ蛍希土類添加ナノ蛍光体の作製、CLイメージング検出系の改善を行った。SiN薄膜基板を用いた液中観察用チャンバーを作製することで、細胞の液中CLイメージングに成功した。また、沈殿剤を多量に添加した均一沈殿法により、平均粒径40 nm程度の粒子の作製に成功し、その単一粒子の液中CLイメージングに成功した。更に感度の高いCLイメージングを達成するためにCLを高効率に集めることが可能な放物面ミラーを作製し、システムに組み込んだ。

研究成果の概要(英文)：We developed specimen chamber, rare-earth doped nanophosphors, and new CL detection system for CL bioimaging in liquid condition. Biological CL imaging in liquid condition was achieved by developing specimen chamber having SiN thin membrane. Mono-dispersed nanophosphors with size of about 40 nm were obtained by homogeneous precipitation method using excess urea. In addition, we developed new mirror for efficient CL detection, and the mirror was mounted in SEM.

研究分野：応用光学

キーワード：カソードルミネッセンス バイオイメージング 希土類 ナノ粒子

### 1. 研究開始当初の背景

生命機能は複数生体分子種の相互作用により発現している。その発現機構を明らかにするためには、どの生体分子種がどこに局在しているのかを観察することが重要である。そのため、古くから様々な生体分子種のイメージング手法が開発されてきた。生体試料のイメージング手法で用いられる代表的なものは光学顕微鏡と電子顕微鏡である。

光学顕微鏡は生きた細胞を観察でき、蛍光分子や蛍光蛋白等のプローブを用いることで生体分子種の種類を蛍光の色によって見分けることが出来るものの、一分子オーダーの空間分解能でその局在を観察することは難しい。一方、電子顕微鏡は、細胞内小器官や細胞膜などの微細構造をナノスケールで観察することが可能であり、免疫染色技術を用いれば特定の生体分子を観察可能である。しかしながら、複数の生体分子種を一度に見分けるのは容易ではない。

電子線励起発光であるカソードルミネッセンス(CL)を利用した顕微鏡は、光学顕微鏡と電子顕微鏡の利点を併せ持つイメージング手法である。電子線はナノサイズに容易に集束可能なため、高い分解能が期待出来る。また、異なる色の CL を発する蛍光体を用いることで、カラーイメージングが可能となる。

この CL 顕微鏡を蛍光顕微鏡のように、液中で観察出来るようになれば、生きた細胞に近い状態で生体分子種の局在を知ることが可能になり、新たな生命機能解明が期待できる。

### 2. 研究の目的

液中における複数分子種の局在を蛋白質一分子スケールかつマルチカラーで可視化するバイオイメージング法の確立を目的とする。

CL イメージングは電子顕微鏡を用いて行うため、液中にある試料を観察することが出来なかったが、それを実現するためのチャンバーを作製する。また、CL 顕微鏡の高い空間分解能を生かすため、蛋白質と同程度の大きさかつ高輝度な蛍光体の作製や高効率な CL 検出系を作製し、目的の液中一分子マルチカラーバイオイメージングを目指す。

### 3. 研究の方法

研究は以下の3点の開発を中心に行った。

液中 CL イメージングチャンバーの作製

本イメージング手法では、電子顕微鏡を用いて、蛍光体標識された生物試料を生きた環境に近い液中で観察する。そのため、真空から液体を隔離しつつ、光を効率良く取り出せる液中観察用のチャンバーが必要である。そこで本研究では、機械的強度に優れ、数十 nm 程度に薄膜化可能な SiN 薄膜を用いて、液中からの CL を効率よく取得するチャンバーを作製した。

液中 CL 観察には図 1(a)で示すような厚さ

50nm の SiN 薄膜を貼り付けたチャンバーを用いて、真空から液中環境を隔離した。また、マルチカラーで CL を取得できる検出系を構築し、走査型電子顕微鏡(JEOL, JSM-6060LV)に連結させることで CL 観察を行った(図 1(b))。

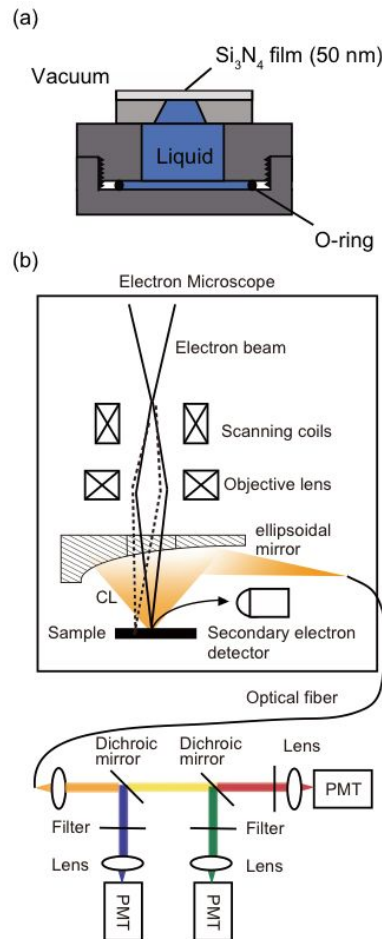


図 1 液中チャンバーと CL 顕微鏡。

#### 高輝度かつ数十 nm の CL 蛍光体作製

蛋白質の一分子の大きさは 10 nm 程度であるため、それと同程度のサイズかつ高輝度な蛍光体が必要である。本研究では、均一沈殿法を用いる事で目的の蛍光体作製を行った。

均一沈殿法は均一な粒径と形状のナノ蛍光体を作製するのに有効な方法である。この方法では、尿素の加水分解で生じるアンモニアによって溶液の pH を均一に上昇させ、希土類水酸化塩の沈殿を得る。

原料となる希土類硝酸塩と尿素を溶解した原料水溶液を 80 °C に加熱しながら攪拌し、沈殿物を得た。得られた沈殿物を遠心分離機で洗浄後、900 °C で 1 時間大気焼成し、酸化物ナノ蛍光体  $Y_2O_3:RE$  (RE は発光に寄与する希土類元素)を得た。

#### 高効率 CL 検出系の作製

本研究では、蛋白質一分子と同程度のサイズの蛍光体からの発光を検出する必要がある。効率良く試料からの発光を取得するために、試料の上下を覆うように放物面鏡を配置

し、その光をファイバーで伝送せずに直接検出する構造にする。これにより、ファイバーのNAとのマッチングやファイバーでの光伝送口スを気にする必要がなくなる。以上の検出系により、蛋白質一分子程度の大きさの蛍光体でもCLイメージングが可能な検出系にした。

#### 4. 研究成果

##### 液中CLイメージング

均一沈殿法で作成した  $Y_2O_3:Eu$ (赤色CL発光)と  $Y_2O_3:Tb$ (緑色CL発光)を分散させた超純水をチャンバー内に滴下し、蛍光体のマルチカラー液中CL観察を行った。図2に示すように、SEM像では白黒画像のため粒子の種類を識別することが出来ないが、CL像では赤・緑それぞれの色に発光する蛍光体の種類を識別出来ている。また、その空間分解能はSEM画像とほぼ同等である事が分かる。

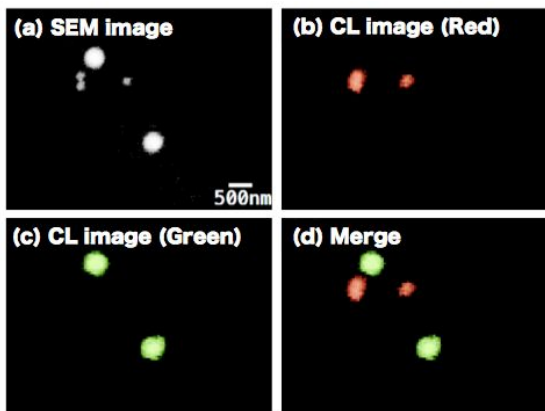


図2  $Y_2O_3:Eu$ (赤色CL発光)、 $Y_2O_3:Tb$ (緑色CL発光)蛍光体のSEM像とCL像。

続いて、液中における細胞のCLイメージングを行った。チャンバー内にHeLa細胞を培養し、 $Y_2O_3:Tb$ 蛍光体(粒径500nm)を細胞の食作用を利用して細胞内に導入した。アルデヒド固定、四酸化オスミウムによる重金属染色の後、リン酸緩衝液中でCLイメージングを行った。液中における細胞の構造と蛍光体の局在を同時にイメージング出来る事が分かる(図3)。CL画像においては、SEMと同等の空間分解能を持つことが確認できた。また、脂肪滴などの細胞構造からのCLは確認されず、蛍光体のみが得られた。

今後は免疫染色を用いて、分子種の局在とその周辺の膜構造などの微細構造を同時にイメージングし、本手法を確立していく必要がある。

##### 高輝度かつ数十nm程度の蛍光体作製

図4(a)に均一沈殿法で作製した蛍光体前駆体のTEM像を示す。尿素の濃度を極端に高くすることで、球形かつ数十nm程度の粒子の作製に成功した。前駆体の段階では平均粒径が61nmであるが、焼成後の平均粒径は43

nmであった(図4(b))。

また、均一沈殿法では希土類イオンの溶解度の違いにより前駆体として析出する速度が異なる。そのため、発光に寄与する希土類元素を正確な濃度で粒子の中に入れることが難しかったが、高濃度の尿素で前駆体の析出を行うと、この問題を解決出来る事が分かった。これにより、所望の濃度で発光に寄与する元素を導入することが可能となり、40-50nm程度の単一粒子であれば液中でCLイメージングが可能となった(図5)。

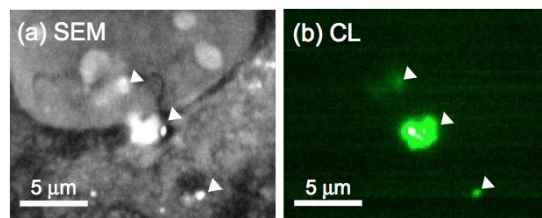
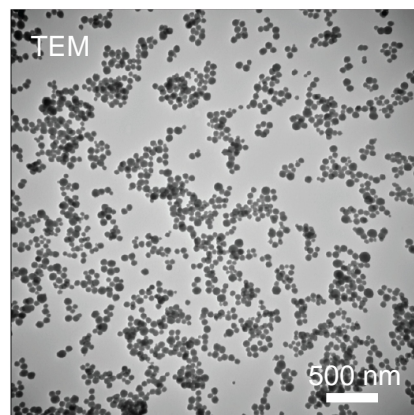


図3 液中CLバイオイメージング。細胞内に導入した  $Y_2O_3:Tb$ (緑色CL発光)蛍光体のSEM像とCL像。

(a)



(b)

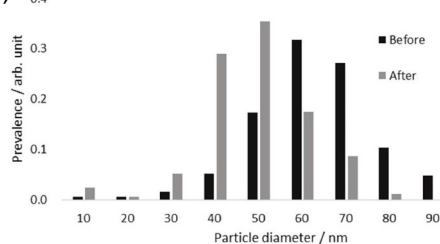


図4 過剰尿素の添加による均一沈殿法で作製した  $Y_2O_3:Eu$  前駆体粒子のTEM像(a)と焼成前後の粒径(b)。

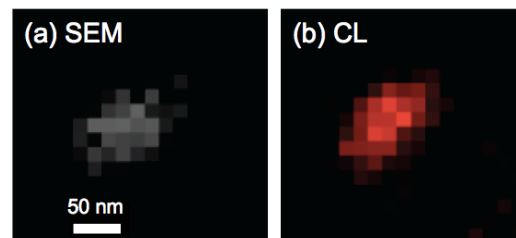


図5 過剰尿素の添加による均一沈殿法で作製した  $Y_2O_3:Eu$  単一粒子の液中SEM像とCL像(取得波長610nm)。



## 高効率な CL 検出系の作製

図 1(b)に示したような従来の CL 顕微鏡で用いられている軸はずし楕円面鏡と光ファイバーを組み合わせた検出システムでは、蛍光体からの発光検出効率が悪く、本イメージング手法の達成に不十分であった。そこで、図 5 に示すように、試料の上下を覆うように放物面鏡を配置し、その光をファイバーで伝送せずに直接検出する構造にするミラーの作製を行った(図 6)。また、このミラーを使用する際の液中チャンバーは前述の SiN 薄膜基盤を 2 枚貼り合わせたものを用いることで、上下からの CL を取り出せるようにした。

この放物面ミラーを用いて 30 nm 以下の単一粒子の CL イメージングを試みたが、現在のところイメージングに十分な輝度を得られていない。今後、ミラーの角度と位置を精密に調整可能なアライメント機構などを再設計し、30 nm 程度の単一粒子からの CL 検出を試みる。



図 6 作製した放物面ミラー

## 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 3 件)

Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Ichimiya M., Sannomiya T., Miyake J., Ashida M., Araki T., and Hashimoto M., “Synthesis of  $Y_2O_3$  nanophosphors by homogeneous precipitation method using excessive urea for cathodoluminescence and upconversion luminescence bioimaging”, *Optical Materials Express*, 6, 831-843 (2016).

DOI: [10.1364/OME.6.000831](https://doi.org/10.1364/OME.6.000831)

Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Ichimiya M., Sannomiya T., Tanaka N., Onoshima D., Yukawa H., Baba Y., Ashida M., Miyake J., Araki T., and Hashimoto M., “Correlative near-infrared light and cathodoluminescence microscopy using  $Y_2O_3:Ln$ , Yb (Ln = Tm, Er) nanophosphors for multi-scale, multi-colour bioimaging”, *Scientific Reports*, 6, 25950 (2016).

DOI: [10.1038/srep25950](https://doi.org/10.1038/srep25950)

Dung D. T. K., Fukushima S., Furukawa T., Niioka H., Sannomiya T., Kobayashi K., Yukawa H., Baba Y., Hashimoto M., and Miyake J., “Multispectral Emissions of Lanthanide-Doped

Gadolinium Oxide Nanophosphors for Cathodoluminescence and Near-Infrared Upconversion/Downconversion Imaging”, *Nanomaterials*, 6(9), 163 (2016).

DOI: [10.3390/nano6090163](https://doi.org/10.3390/nano6090163)

〔学会発表〕(計 5 件)

○T. Furukawa, S. Fukushima, H. Niioka, M. Ichimiya, J. Miyake, M. Ashida, T. Araki, M. Hashimoto, “Biological high-resolution imaging in wet condition using cathodoluminescence microscopy”, (OPIC2015 APBP’15, Proceedings APBP7-4, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Kanagawa, Japan, Apr. 22-24, 2015).

○D. T. K. Dung, S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, M. Ichimiya, M. Ashida, Y. Mori, Y. Yoshioka, M. Hashimoto, and J. Miyake, “Tri-modal imaging techniques Cathodoluminescence (CL) Near Infrared (NIR) and Magnetic resonance imaging (MRI) with lanthanides doped  $Gd_2O_3$ ”, (The 2nd East-Asia Microscopy Conference, The Himeji Chamber Commerce and Industry (HCCI), Himeji, Hyogo, Japan, Nov. 24-27, 2015).

○古川太一, 福島昌一郎, 新岡宏彦, 一宮正義, 芦田昌明, 三宅淳, 橋本守, “希土類添加蛍光体の電子線励起発光を用いた液中生体ナノイメージング”, (日本機械学会第 13 回医用分光学会, ホテルグランドヒル市ヶ谷, 東京, 12 月 3-4 日 2015 年) .

○古川太一, 福島昌一郎, 新岡宏彦, 一宮正義, 芦田昌明, 三宅淳, 橋本守, “カソードルミネッセンス顕微鏡を用いた液中ナノバイオイメージング”, (第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 東京工業大学, 東京, 1 月 9-10 日 2016 年) .

○D. T. K. Dung, S. Fukushima, T. Furukawa, H. Niioka, Y. Mori, Y. Yoshioka, M. Hashimoto, and J. Miyake, “Imaging of 3D cellular spheroids by trimodalities CL-NIR-MRI”, (NFO-14, Shizuoka University, Hamamatsu, Shizuoka, Japan, Sep. 4-8, 2016).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学基礎工学研究科

生体光計測研究室

[http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp/old/Araki\\_Lab/index.html](http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp/old/Araki_Lab/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 太一 (FURUKAWA, Taichi)  
大阪大学・ナノサイエンスデザイン教育研  
究センター・特任助教  
研究者番号：70749043

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし