

Title	Establishment of cathodoluminescence nano-bioimaging using rare-earth doped nanophosphors
Author(s)	古川, 太一
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34528
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (古川 太一)	
論文題名	Establishment of cathodoluminescence nano-bioimaging using rare-earth doped nanophosphors (希土類添加ナノ蛍光体を用いたカソードルミネッセンスナノバイオイメーキングの確立)
論文内容の要旨	
<p>複数分子種の識別能とナノスケールの空間分解能を併せ持つカソードルミネッセンス(CL)ナノバイオイメーキング法の確立を行った。CLは電子線励起による発光現象であるため、焦点スポットがナノスケールな電子線を用いることで、光を用いた顕微鏡と比較して高い空間分解能が期待できる。また、観測に光を用いるため、発光波長の異なるCLプローブを用いることができれば、生体分子を識別することが可能となる。そこで、このCLイメーキングを細胞内の生体分子種観察に応用するため、電子線励起に適したナノ蛍光体プローブを用いたCLイメーキング法を提案・開発し、開発したナノ蛍光体を用いたCLナノバイオイメーキングを行った。イメーキングは、走査型電子顕微鏡(SEM)や透過型走査電子顕微鏡(STEM)に試料からのCLを取得する検出系を組み合わせを行い、提案手法が分子種識別能と光の回折限界を越す空間分解を有するイメーキング手法であることを示した。具体的には以下の成果を得た。</p> <p>希土類元素を添加したY_2O_3ナノ蛍光体は、電子線に対する耐性が高いこと、添加希土類元素を変更する事で容易に発光色を制御が可能なこと、発光波長幅が非常にシャープであるため分光が容易なことなどの特徴を有しており、CLナノバイオイメーキングに適する事を見いだした。また、Y_2O_3ナノ蛍光体にZnを添加することで、CL強度が改善されることを示し、その蛍光体は30 nm程度の大きさでも十分CLイメーキングが可能であり、蛋白質一分子のイメーキングにも使用可能であることを示唆した。本研究において合成した希土類添加ナノ蛍光体は、紫外光でも励起可能であり、電子顕微鏡観測観察に必要な超薄切片にする前に蛍光顕微鏡による観察を行うことが出来る。同一蛍光体を用いて蛍光イメーキングとCLイメーキングを行うことで、マルチスケールでシームレスに細胞内分子種分布の観察が可能であることを示唆した。</p> <p>SEM/CL及びSTEM/CL顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた希土類添加ナノ蛍光体のイメーキングを行うことで、どちらにおいても光学顕微鏡を超える空間分解能を有すること、カラーイメーキングが可能であることを確認した。特に、STEM/CL顕微鏡においては、SEM/CL顕微鏡によるイメーキングよりも高い空間分解能で分子種のイメーキングが可能であること、80 kVという高い加速電圧で観察しているにも関わらず、使用した$Y_2O_3:Eu$と$Y_2O_3:Tb$ナノ蛍光体はほとんど褪色しないことを示した。さらに、細胞の液中観察が可能なチャンバーを用いて、CLバイオイメーキングを行い、液中でも光学顕微鏡を超える空間分解能を有することを確認した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (古 川 太 一)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 荒 木 勉
	副 査	教 授 三 宅 淳
	副 査	教 授 川 野 聡 恭

論文審査の結果の要旨

複数分子種の識別能とナノスケールの空間分解能を併せ持つカソードルミネッセンス(CL)ナノバイオイメージング法の確立を行った。CLは電子線励起による発光現象であるため、焦点スポットがナノスケールな電子線を用いることで、光を用いた顕微鏡と比較して高い空間分解能が期待できる。また、観測に光を用いるため、発光波長の異なるCLプローブを複数用いることができれば、複数の生体分子を識別することが可能となる。そこで、このCLイメージングを細胞内の生体分子種観察に応用するため、電子線励起に適したナノ蛍光体プローブを用いたCLイメージング法を提案・開発し、開発したナノ蛍光体を用いたCLナノバイオイメージングを行った。イメージングは、走査型電子顕微鏡(SEM)や透過型走査電子顕微鏡(STEM)に試料からのCLを取得する検出系を組み合わせを行い、提案手法が複数分子種の識別能と光の回折限界を越す空間分解を有するイメージング手法であることを示した。具体的には以下の成果を得た。

希土類元素を添加した Y_2O_3 ナノ蛍光体は、電子線に対する耐性が高いこと、添加希土類元素を変更する事で容易に発光色を制御が可能なこと、発光波長幅が非常にシャープであるため分光が容易なことなどの特徴を有しており、CLナノバイオイメージングに適する事を見いだした。実際に発光色の異なる複数種の Y_2O_3 ナノ蛍光体を細胞に取り込ませ、そのCLイメージングが可能であることを示した。また、 Y_2O_3 ナノ蛍光体にZnを添加することで、CL強度が改善されることを示し、その蛍光体は30 nm程度の大きさでも十分CLイメージングが可能であり、蛋白質一分子のイメージングにも使用可能であることを示唆した。本研究において合成した希土類添加ナノ蛍光体は、紫外光でも近赤外光でも励起可能であり、電子顕微鏡観測観察に必要な超薄切片にする前に蛍光顕微鏡による観察を行うことで観測の高効率化が可能となる。同一蛍光体を用いて蛍光イメージングとCLイメージングを行うことで、マルチスケールでシームレスに複数の細胞内分子種分布の観察が可能であることを示唆した。

SEM-CL及びSTEM-CL顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた希土類添加ナノ蛍光体のイメージングを行うことで、どちらにおいても光学顕微鏡を超える空間分解能を有すること、カラーイメージングが可能であることを確認した。特に、STEM-CL顕微鏡においては、SEM/CL顕微鏡によるイメージングよりも高い空間分解能で分子種のイメージングが可能であること、80 kVという高い加速電圧で観察しているにも関わらず、使用した $Y_2O_3:Eu$ と $Y_2O_3:Tb$ ナノ蛍光体はほとんど褪色しないことを示した。さらに、細胞の液中観察が可能なチャンパーを用いて、CLバイオイメージングを行い、液中でも光学顕微鏡を超える空間分解能を有することを確認した。

以上、本研究で得られた成果の工学的意義は大きく、また学術的にも高いレベルの内容を有しているため、博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。