

# 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

## Cathodoluminescence and Fluorescent Bioimaging with Using Rare-Earth Doped Nanophosphors

新岡 宏彦, 古川 太一, 橋本 守

Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa and Mamoru Hashimoto

大阪大学基礎工学研究科

**要旨** 蛍光顕微鏡を用いた細胞観察では、様々な色の蛍光プローブを用いることにより生体分子を染め分け、色によって様々な種類の生体分子を見分ける。もし、電子顕微鏡で蛍光顕微鏡のように色を付け観測することができたなら、1個1個の蛋白質の種類を見分けながらのイメージングも夢ではないだろう。電子顕微鏡を用いた細胞のカラーイメージングを目指し、電子線照射によってカソードルミネッセンス (CL: cathodoluminescence) を呈する3色の希土類添加  $Y_2O_3$  ナノ蛍光体を作製した。また、作製したナノ蛍光体はUV光照射によっても蛍光発光を呈するので蛍光顕微鏡による観察も可能である。本稿では、これら希土類添加  $Y_2O_3$  ナノ蛍光体の作製と、電子顕微鏡及び蛍光を用いた培養細胞観察への応用について概説する。

キーワード：カソードルミネッセンス顕微鏡, 蛍光顕微鏡, バイオイメージング, 蛍光プローブ

### 1. はじめに

細胞は細胞内小器官や細胞骨格等の複雑な細胞内構造を持っており、その中で様々な種類の生体分子が相互に作用することにより生命機能を維持している。生命機能を解き明かすためには生体分子がそれぞれ何処で作用しているかが重要な手がかりになり、それらを観察するために光学顕微鏡や電子顕微鏡が非常に強力なツールとして用いられてきた。光学顕微鏡は生きた細胞試料を観察でき、蛍光分子や蛍光蛋白等のプローブを用いる事で生体分子種を蛍光の色で見分ける事が可能である。近年、STED, PALM, SIMに代表されるような超解像顕微鏡と呼ばれる空間分解能の高い光学顕微鏡が開発されているものの<sup>1)</sup>、一般的な光学顕微鏡の空間分解能は光の回折限界による制約をうけ、波長の半分程度である200 nm ~ 300 nm程度に限定される。一方で、電子顕微鏡を用いた観察では空間分解能が高く、細胞内の小器官や膜構造を詳細に観察することができ、免疫金染色技術を用いれば特定の生体分子を観察する事が可能である。しかしながら、これまで複数の生体分子種を一度に見分けるのは容易ではなかった。例えば、異なったサイズのプローブを用いて生体分子を染め分け、電子顕微鏡像からプローブのサイズを読み取ることによって分子種を判断する手法が報告されているが、一つ一つプローブのサイズを見分けるのは手間の

かかる方法であった<sup>2,3)</sup>。

そこで著者らは、電子顕微鏡を蛍光顕微鏡のようにマルチカラー化することで、電子顕微鏡の高い空間分解能を維持しながら生体分子種を見分ける手法の開発を行っている。この研究で鍵となるのが、CLイメージングとCL用プローブである。電子線照射によって誘起される発光であるカソードルミネッセンス (CL: Cathodoluminescence) は、励起に電子線を用いているため空間分解能が高く、CL光を分光する事により複数種の生体分子を見分ける事が可能であり、さらに、CL像を取得するとともに電子顕微鏡観察により細胞内構造をイメージングする事のできる技術と成り得る。

CL顕微鏡を用いた細胞イメージングは、その初期の段階において、細胞中の生体分子が発するCL光を直接検出してイメージングを行っていた<sup>4,5)</sup>。その後、近年になって、無機の粒子や有機分子のCL用プローブ探索の試みがなされたがサイズや耐退色性に問題があった<sup>6,7)</sup>。

本講座では、電子線照射によりCL光を発し、紫外光照射によって蛍光を発するナノサイズのCL用プローブの作製、および、それらプローブを用いた細胞のCLイメージング及び蛍光イメージングについて著者らの研究をもとに概説する。

### 2. 希土類添加 $Y_2O_3$ ナノ蛍光体

希土類添加  $Y_2O_3$  ナノ蛍光体 (以下、ナノ蛍光体) はもともとフィールドエミッションディスプレイ用蛍光材料への応用が検討されていた物質であり<sup>8,9)</sup>、数kVの低い加速電圧でも強いCL発光を示す。ナノ蛍光体のCL波長は希土類イオンの電子遷移エネルギーに依存しており、添加する希土類イ

〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町1-3  
TEL: 06-6850-6550; FAX: 06-6850-6557  
E-mail: niioka@bpe.es.osaka-u.ac.jp  
2014年2月12日受付

オンの種類を変える事で発光波長を変更することができる。図1はゾルゲル法で作製した $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$ のCLスペクトルであり、それぞれ、青色、緑色、赤色で発光する<sup>8,10</sup>。3価の希土類イオンの4f軌道は不完全充填であり、発光はこの4f軌道間の電子遷移によるものである。4f軌道の外部には電子の充填された5s, 5p軌道が存在するため、外部の環境の影響を受けにくく非常に先鋭なスペクトルを示す<sup>11</sup>。

また、これらのナノ蛍光体は紫外線照射により蛍光を発する(図2)。従って、ナノ蛍光体をプローブとして細胞観察する場合、あらかじめ細胞試料を蛍光顕微鏡で観察し、その後、CL顕微鏡で同じ箇所をより詳細に観察するということが可能になる。CL顕微鏡で細胞試料を観察するには当然の事ながら、一般的な電子顕微鏡観察時と同様に固定や脱水等の複雑な手順を経る必要があるので数時間から数日の時間を要する。そのため、事前に蛍光顕微鏡にて試料をスクリーニングし、観察領域を定めることができれば、実験の効率を向上させることが可能である。

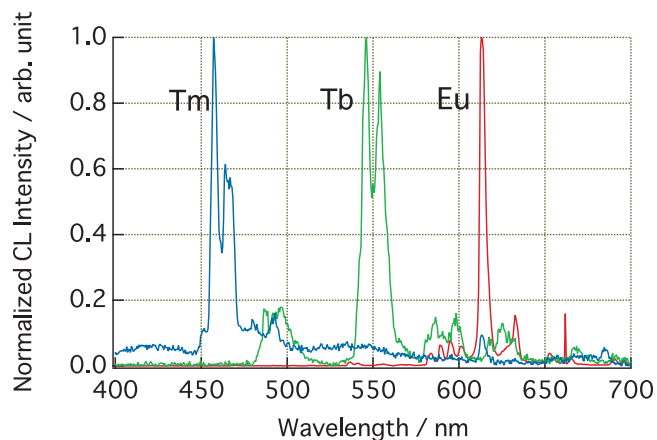
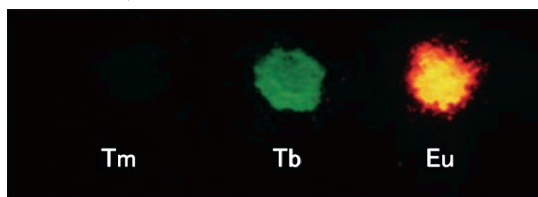


図1  $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$ のCLスペクトル

(a) 励起波長 254 nm



(b) 励起波長 365 nm

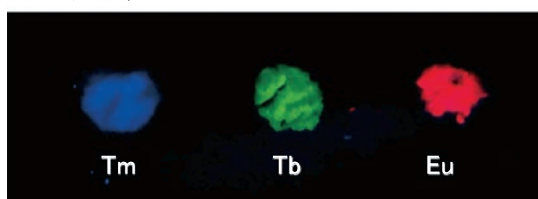


図2  $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$ の蛍光発光。励起光の波長は(a) 254 nmおよび、(b) 365 nm。 $Y_2O_3:Tm$ は254 nm励起では殆ど蛍光を発しない。

希土類添加 $Y_2O_3$ ナノ蛍光体の作製にはこれまでに様々な手法が報告されており、ゾルゲル法<sup>8</sup>、均一沈殿法<sup>12,13</sup>、酵素沈殿法<sup>13</sup>、逆ミセル法<sup>14</sup>、ソルボサーマル法<sup>15</sup>、バルクの希土類添加 $Y_2O_3$ を液相レーザーアブレーション法によりナノ粒子化する等の手法がある<sup>16</sup>。以下、均一沈殿法と液相レーザーアブレーション法によるナノ蛍光体作製について、蛍光体の発光増強及び耐退色性について述べる。

### 2.1 均一沈殿法によるナノ蛍光体の作製

均一沈殿法では、イットリウムと希土類の水溶液に沈殿材として尿素を加えた溶液を加熱し、尿素の熱分解によるpHの上昇により、ナノ蛍光体の前駆体の沈殿を得る。このとき、pHの上昇が溶液内で均一に起こり、前駆体の核形成と成長が一斉に起こるため、粒径の揃った球形の前駆体粒子を得ることができる。前駆体粒子は結晶性が悪くCL発光強度が低いため、電気炉等を用いた焼成により結晶性を向上させることが必要である。図3は均一沈殿法で作製した $Y_2O_3:Eu$ のTEM像である。熱分解の温度やイットリウム、希土類、尿素の濃度を変えることにより粒径を数十nmから数百nm程度まで変化させる事が可能である。

### 2.2 液相レーザーアブレーション法によるナノ蛍光体の微細化

液相レーザーアブレーション法では、溶液中の蛍光体試料に高強度のレーザーパルスを集光し、焦点で誘起されるアブレーションによりナノ蛍光体を得る。ゾルゲル法で作製した $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体を水中に分散させ、スターラーで攪拌しながら、ナノ秒Nd:YAGレーザー(New wave research, Tempest)の2倍波(532 nm, 10 Hz, 20 mJ/pulse)を単レンズ( $f=100$  mm)により3時間集光した。図4に液相レーザーアブレーション処理前後のナノ蛍光体のSEM像およびTEM像を示す。図より、ナノ蛍光体の微細化に成功している事がわかる。また、TEM像より、粒径20 nmから50 nmの球形の粒子が作製されていることがわかる。

### 2.3 ナノ蛍光体の発光増強

CL顕微鏡は高い空間分解能を有するが、ナノ蛍光体を介して蛋白質等生体分子を観察する場合、ナノ蛍光体のサイズが大きいと目的の生体分子の位置を正確に知ることはできな

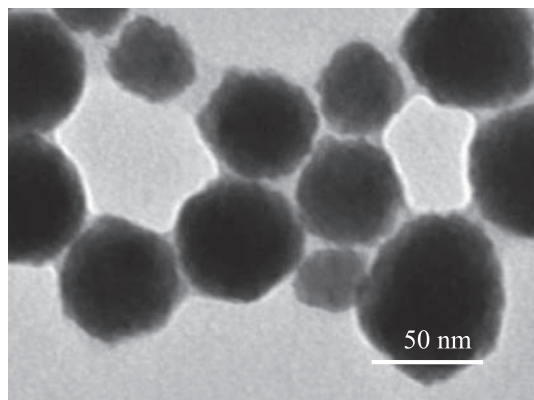


図3 均一沈殿法で作製したナノ蛍光体( $Y_2O_3:Eu$ )のTEM像

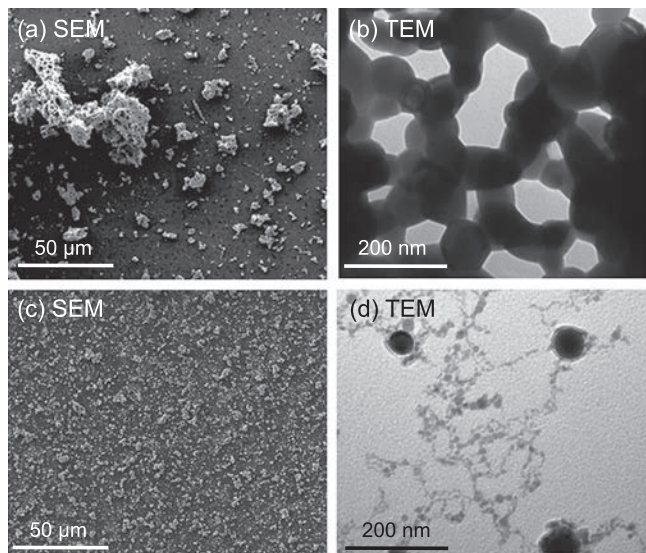


図4 ナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu$ ) のSEM像およびTEM像。(a) (b) は液相レーザーアブレーション処理前。(c) (d) は処理後。

くなる。つまり、ナノ蛍光体のサイズが200 nm程度であるとすると、目的の生体分子はそのナノ蛍光体の周囲のどこか、直径200 nm程度の領域のどこかであるとしか分からない。従って、目的の生体分子の位置を正確に知るためには、ナノ蛍光体のサイズを小さくすれば良いことになる。しかし、粒径が小さくなると発光する希土類イオンの数が減りCL光の発光強度が減少するという問題が生じるため、小さくても明るく発光するナノ蛍光体の作製が必要になる。

$Y_2O_3:Eu$  に Zn を添加することにより CL 光の発光強度を上昇させる事が可能である<sup>17,18)</sup>。これは、 $Y_2O_3:Eu$  のような絶縁体に Zn を添加することにより導電性を付与し、チャージアップを防ぐことに起因する。数 kV で加速された電子は、チャージアップにより蛍光体表面に存在する電子による斥力を受け、蛍光体奥まで侵入する事ができない。従って、チャージアップを防ぐことにより入射電子が蛍光体奥まで侵入し効率的に蛍光体を励起することができる。

図5はCL発光強度と入射電子線の電流値とZnの添加量の関係を示している。粒径200 nm程度のナノ蛍光体を選択的に計測した。Zn濃度を上昇させることによりCL光強度が上昇していることが分かる。またZnの濃度が30%のとき、添加しない場合に比べて数倍のCL光増強が確認された。またこのとき、単一のナノ蛍光体に対して10回のCLイメージングを行なったところ、電子線照射に伴うコンタミネーションが原因と考えられるCL光強度の減衰は見られたが、10回目のCLイメージングにおいても十分にナノ蛍光体の像は観測されたことから、CLイメージング用のプローブとして使用可能であると考えられる。さらに、Znの濃度が15% ( $X=0.15$ ) のナノ蛍光体のCLイメージングを行なったところ、粒径約30 nmの微小ナノ蛍光体のイメージングに成功した<sup>19)</sup> (図6)。この結果は、CL顕微鏡を用いた高空間分解能生体分子イメージングが可能であることを示している。

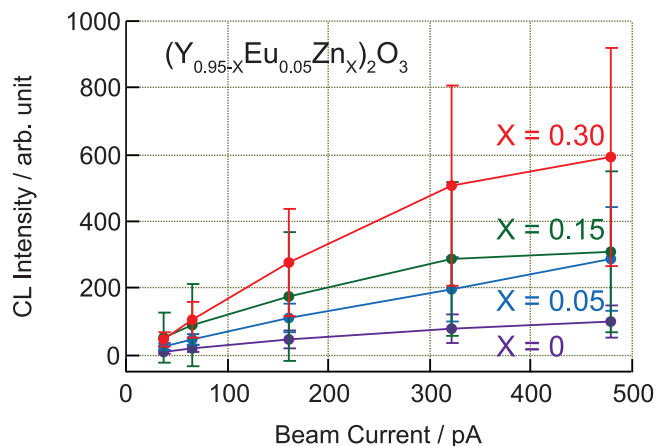


図5 Zn濃度とビーム電流とCL発光強度の関係。Zn添加量が30%のとき ( $Y_{0.95-x}Eu_{0.05}Zn_x$ ) $_2O_3$ ,  $X=0.30$  で表わされる。加速電圧は3 kV で計測。

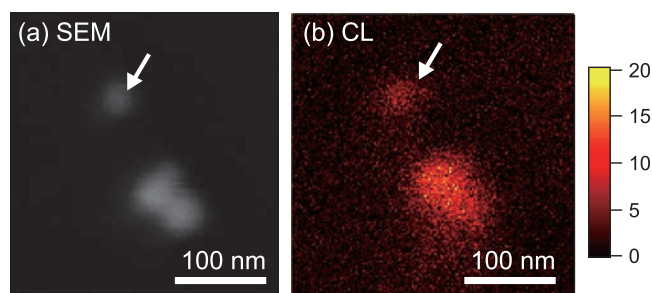


図6 ナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu, Zn$ ) のSEM像 (a) とCL像 (b)。加速電圧は3 kV, 計測時間は1 ms/pixel。

Znの添加以外にもLiを添加することによるCL発光増強が報告されている<sup>20)</sup>。また、励起エネルギーはナノ蛍光体の表面欠陥により熱として失われてしまうため、コアシェル構造とする事で欠陥でのエネルギーロスを軽減し、発光増強を行なったという報告もある<sup>21)</sup>。今後更に明るいナノ蛍光体の作製が可能になると考えられる。

### 3. 細胞中ナノ蛍光体のCLイメージング

液相レーザーアブレーション法で微細化・分散化した  $Y_2O_3:Eu, Zn$  (Znの濃度は15%) ナノ蛍光体を細胞内に導入し、CLイメージングを行なった。観測にはFE-SEM (JEOL, JSM-6500F) をベースとした顕微鏡 (SEM-CL 顕微鏡) を用いた。ナノ蛍光体の導入には細胞の食作用であるエンドサイトーシスを利用した。細胞試料として培養 HeLa 細胞を用い、培養液にナノ蛍光体を混入し、24 時間後に細胞を固定した。その後、エタノールによる脱水、エポキシ樹脂包埋、100 nm の厚さで薄切し、Si 基板上に細胞切片を用意した。エポキシ樹脂は飽和 KOH/ethanol 溶液にて溶解させた後、試料を観察した。図7のSEM像よりエンドサイトーシス小胞が観察され、その内部に二つのナノ蛍光体があるのがわかる。ナノ蛍光体の大きさはおよそ200 nm程度であり、液相レーザーアブレーション法で微細化したナノ蛍光体が凝集してしまっ



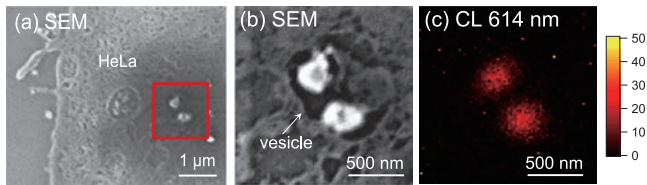
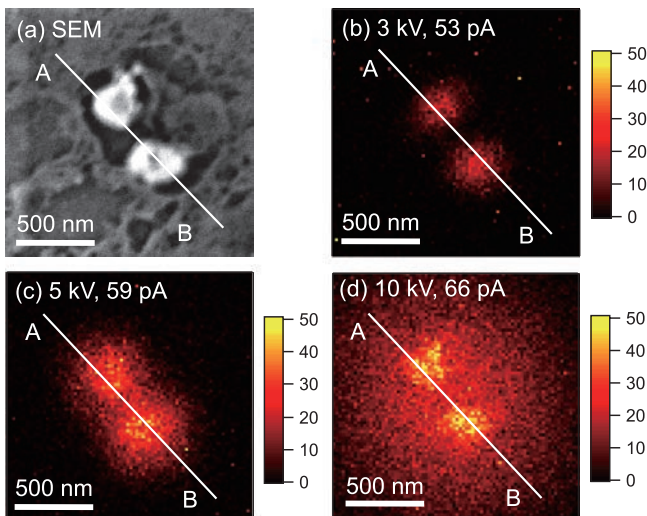


図7 HeLa 細胞中のナノ蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu, Zn$ ) SEM 像 (a), (a) の赤四角部分の拡大図 (b) 及び CL 像 (c). 加速電圧は 3 kV, 計測時間は 100 ms/pixel.



(e)

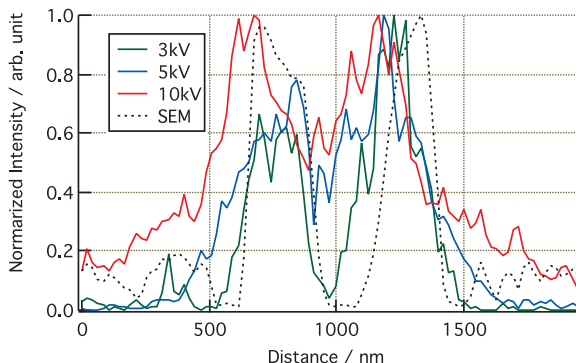


図8 加速電圧と CL 像の関係. (a) は SEM 像, (b) (c) (d) はそれぞれ加速電圧が 3 kV, 5 kV, 10 kV のときの CL 像である. (e) は図中 AB 間の強度プロファイル.

たものであると思われる。CL 像でも SEM 像と同様にナノ蛍光体の観察が可能であり、細胞内のナノ蛍光体を CL 顕微鏡により観察できる事が示された。

### 3.1 電子線の加速電圧と CL 像のコントラスト

図7のように薄切した細胞試料を Si 基板の上に載せ、CL イメージングを行なった場合、加速電圧によって CL 像が変化する。図8は加速電圧を変えながら同一試料を観察した際の CL 像である。加速電圧が 3 kV 程度では試料の表面のみが観察されるために画像はぼやけないが、5 kV を越えると画像がぼやけてコントラストが低下する。これは、Si 基板からの反射電子が蛍光体を励起しているためであると考えられる。

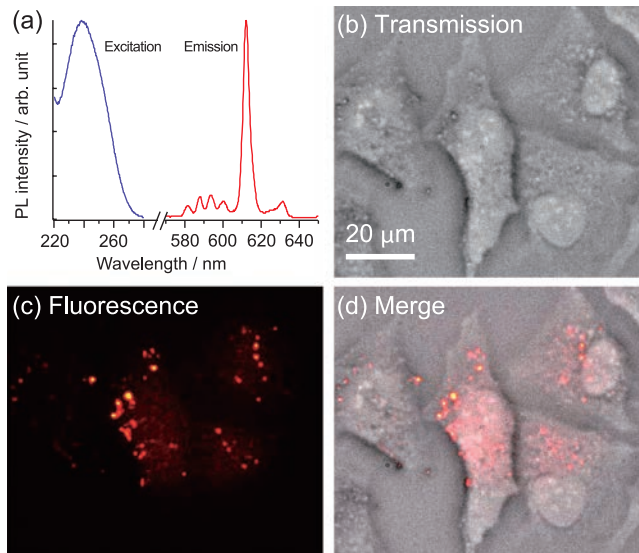


図9  $Y_2O_3:Eu, Zn$  の励起蛍光スペクトル (a) と  $Y_2O_3:Eu, Zn$  を導入した培養 HeLa 細胞中の透過像 (b), 蛍光像 (c), マージ像 (d).

## 4. 細胞中ナノ蛍光体の蛍光イメージング

CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) は、光学顕微鏡と電子顕微鏡で同一の試料を観察することで、どちらか一方の顕微鏡を用いた場合よりも詳細な情報が得られる顕微鏡法である。 $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$  のナノ蛍光体は UV 光の照射によっても蛍光を発生し、Zn を添加しても同様の蛍光を示す。そのため、これらのナノ蛍光体は細胞の蛍光カラーイメージングにも応用が可能である。図9(a)は $Y_2O_3:Eu, Zn$  の励起蛍光スペクトルであり、240 nm 付近の波長をもつ UV 光によって励起され、Eu に起因した波長 614 nm 程度の蛍光を示す。したがって、本ナノ蛍光体は CLEM にも応用可能であることが分かる。

CL イメージングの際と同様に、液相レーザーアブレーション法により微細化した  $Y_2O_3:Eu, Zn$  ナノ蛍光体を培養 HeLa 細胞に導入した。その後細胞を固定し、蛍光観察を行なった。励起光源として水銀ランプの 254 nm の輝線を用い、カメラは EMCCD (Andor, Luca) を用いた。図9(b)(c)(d)はそれぞれ、HeLa 細胞の透過像、蛍光像、マージ像を示す。細胞内に取り込まれた  $Y_2O_3:Eu, Zn$  ナノ蛍光体ははっきり観察されている。

## 5. まとめと今後の展開

電子線照射でも UV 光照射でも発光する蛍光体の作製を行なった。 $Y_2O_3:Tm$ ,  $Y_2O_3:Tb$ ,  $Y_2O_3:Eu$  の蛍光体はそれぞれ青、緑、赤に発光し、電子顕微鏡でも蛍光顕微鏡でもカラーイメージングが可能である事を示した。また、Zn を添加することにより、 $Y_2O_3:Eu$  蛍光体の発光増強を行なった。さらに、 $Y_2O_3:Eu, Zn$  を細胞へ導入し CL イメージングおよび蛍光イメージングに成功した。希土類添加  $Y_2O_3$  ナノ蛍光体以外で

も、最近 Harvard 大の D. R. Glenn らは窒素欠陥を含んだナノサイズのダイヤモンド（蛍光ナノダイヤモンド）を用いた CL イメージング法について報告しており、粒径 30 nm 程度の蛍光ナノダイヤモンドのカラーイメージングに成功している<sup>22)</sup>。また、静岡大の名和らは水溶液中試料の電子顕微鏡観察が可能な D-EXA 顕微鏡を開発し、水溶液中 ZnO のナノ粒子の CL イメージングについて報告している<sup>23)</sup>。今後、より小さく、かつ高輝度な CL イメージング用のナノ蛍光体の研究開発が重要な課題となるだろう。

また、これらのナノ蛍光体は大気圧 SEM<sup>24,25)</sup>でも観察可能であると考えられる。この場合、細胞試料の薄切等の処理をする事無く、液中の細胞に電子線を照射してカラーで観察する事が可能になるだろう。また、現在はエンドサイトーシスにより細胞内に導入したナノ蛍光体の観察を行なっているが、抗体分子やアプタマー等をナノ蛍光体表面に取り付けることで、特定の生体分子をターゲットとしたイメージングが可能になる。さらに、TEM と CL 計測を組み合わせることにより、細胞内小器官等の細胞内膜構造を TEM で観察しつつ、複数種の生体分子位置を CL にて観察する等の応用が可能になる<sup>26)</sup>。CL 顕微鏡を用いた細胞イメージングはこれまでにほとんど報告が無いが、今後の更なる発展により細胞の高空間分解能イメージングにおいて広く応用されると考える。

## 謝 辞

本研究は、財団法人立石科学振興財団の平成 23 年度研究助成 B および財団法人中谷電子計測技術振興財団の第 28 回奨励研究助成によって行なわれました。ここに深く感謝の意を表明致します。

## 文 献

- 1) Schermelleh, L., Heintzmann, R. and Leonhardt, H.: *J. Cell Biol.*, **190**, 165–175 (2010)
- 2) Giepmans, B.N.G., Deerinck, T.J., Smarr, B.L., Jones, Y.Z. and Ellisman, M.H.: *Nat. Methods*, **2**, 743–749 (2005)
- 3) Wang, B.-L. and Larsson, L.-I.: *Histochemistry*, **83**, 47–56 (1985)
- 4) Pease, R.F.W. and Hayes, T.L.: *Nature*, **210**, 1049 (1966)
- 5) Itoh, T., Fujimoto, T., Koike, H., Inoue, T. and Ogawa, K.: *Acta Histochem. Cytochem.*, **19**, 621–633 (1986)
- 6) Kimura, E., Sekiguchi, T., Oikawa, H., Niitsuma, J., Nakayama, Y., Suzuki, H., Kimura, M., Fujii, K. and Ushiki, T.: *Arch. Histol. Cytol.*,

- 7) Niitsuma, J., Oikawa, H., Kimura, E., Ushiki, T. and Sekiguchi, T.: *J. Electron Microsc.*, **54**, 325–330 (2005)
- 8) Nagata, T., Nakayama, T. and Murakami, H.: *SID Int. Symp. Dig. Tech. Pap.*, **38**, 1328–1331 (2007)
- 9) Wakefield, G., Holland, E., Dobson, P.J. and Hutchison, J.L.: *Adv. Mater.*, **13**, 1557–1560 (2001)
- 10) Niioka, H., Furukawa, T., Ichimiya, M., Ashida, M., Araki, T. and Hashimoto, M.: *Appl. Phys. Express*, **4**, 112402–112404 (2011).
- 11) 足立吟也監修, 足立研究室編集: 希土類物語, 産業図書
- 12) Zhang, M., Wang, X., Ding, H., Li, H., Pan, L. and Sun, Z.: *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, **8**, 752–758 (2011)
- 13) Venkatachalam, N., Saito, Y. and Soga, K.: *J. Am. Ceram. Soc.*, **92**, 1006–1100 (2009)
- 14) Hirai, T., Asada, Y. and Komasa, I.: *J. Colloid Interf. Sci.*, **276**, 339–345 (2004)
- 15) Yang, J., Quan, Z., Kong, D., Liu, X. and Lin, J.: *Cryst. Growth Des.*, **7**, 730–735 (2007)
- 16) Ledoux, G., Amans, D., Dujardin, C. and Masenelli-Varlot, K.: *Nanotechnology*, **20**, 445605 (2009)
- 17) Shin, S.H., Kang, J.H., Jeon, D.Y., Choi, S.H., Lee, S.H., You, Y.C. and Zang, D.S.: *Solid State Commun.*, **135**, 30–33 (2005)
- 18) Jung, K.Y., Han, K.H. and Ko, Y.S.: *J. Lumin.*, **127**, 391 (2007)
- 19) Furukawa, T., Niioka, H., Ichimiya, M., Ashida, M., Nagata, T., Araki, T. and Hashimoto, M.: *Opt. Express*, **21**, 25655–25663 (2013)
- 20) Bae, J.-S., Hong, T.E., Yoon, J.H., Lee, B.S., Won, M.-S., Kim, J.P., Kim, Y.S. and Jeong, J.H.: *J. Anal. Sci. Technol.*, **1**, 92–97 (2010)
- 21) Han, J.K., Hirata, G.A., Talbot, J.B. and McKittrick, J.: *Mater. Sci. Eng. B*, **176**, 436–441 (2011)
- 22) Glenn, D.R., Zhang, H., Kasthuri, N., Schalek, R., Lo, P.K., Trifonov, A.S., Park, H., Lichtman, J.W. and Walsworth, R.L.: *Sci. Rep.*, **2**, 865 (2012)
- 23) Nawa, Y., Inami, W., Chiba, A., Ono, A., Miyakawa, A., Kawata, Y., Lin, S. and Terakawa, S.: *Opt. Express*, **20**, 5629–5635 (2012)
- 24) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **169**, 438–449 (2010)
- 25) Morrison, I.E.G., Dennison, C.L., Nishiyama, H., Suga, M., Sato, C., Yarwood, A. and O’Toole, P.J.: *Methods Cell Biol.*, **111**, 307–324 (2012)
- 26) Furukawa, T., Fukushima, S., Niioka, H., Yamamoto, N., Araki, T. and Hashimoto, M.: Biological cathodoluminescence imaging using transmission electron microscopy, 平成 25 年度日本分光学会年次講演会, 2013 年 11 月 19 日～21 日, 大阪.