

電子線励起による超解像光学顕微鏡

Super Resolution Optical Imaging with Electron Beam Excitation

川田 善正, 名和 靖矩, 居波 涉

Yoshimasa Kawata, Yasunori Nawa and Wataru Inami

静岡大学電子工学研究所

要旨 電子線励起による超解像光学顕微鏡 (EXA 顕微鏡) の原理と開発した顕微鏡が 50 nm 以下の分解能を有することを示した実験結果を紹介する。本顕微鏡では、蛍光膜上に集束電子線を照射し、回折限界以下の微小な光源を励起する。電子線の走査により微小光源を走査し、蛍光膜上の試料を観察する。蛍光膜より真空と大気圧を分離すれば、試料側に真空は必要ではなく、生きた生物試料の動態観察を行なうことが可能である。本手法を用いれば試料の吸収分布や屈折率分布を動的に観察することができる。微小光源励起による分解能評価のためにモンテカルロシミュレーションと有限差分時間領域法を組み合わせた数値解析により分解能を評価した結果、生物細胞の動態観察を行なった結果を示す。

キーワード：光学顕微鏡，電子顕微鏡，超解像，バイオイメージング，モンテカルロシミュレーション

1. はじめに

光学顕微鏡は、16 世紀ごろに発明されたといわれており、その歴史は古いものの、現在でもバイオ試料を高分解能に観察する方法として中心的に用いられている。光を用いて試料をプローブするため、試料にダメージを与えることなく、大気圧や液中など使用環境への制限も少ないからである。分光測定と組み合わせれば定性分析もできる¹⁻³⁾。生体機能を解明するためのバイオイメージングでは、試料を生きたまま動態観察を行なうことが必須であり、光学顕微鏡はこの目的に最も適しているといえる。

光学顕微鏡の空間分解能は回折限界により決定され、波長程度 (数 100 ナノメートル) であることはよく知られている。したがって、複数の分子間または微小器官の間における相互作用、情報の伝達機構の解明には、より高い空間分解能を有する光学顕微鏡を開発することが必要である。この限界を超えた分解能を実現するために、電子線で微小光源を励起する超解像技術を開発した⁴⁻⁸⁾。

TEL: 053-478-1069; FAX: 053-471-1128

E-mail: kawata@eng.shizuoka.ac.jp

2015 年 8 月 21 日受付

2. 電子線励起による超解像顕微鏡の原理と特徴

図 1 に開発した電子線励起による超解像光学顕微鏡の構成を示す。開発したシステムでは、倒立型のコンパクトな走査型電子顕微鏡を用い、蛍光膜上に電子線を数ナノメートルの領域に照射する。励起された蛍光は、蛍光膜上の試料によって吸収、散乱され、上部の光学顕微鏡によって検出される。電子線を走査し、試料の 2 次元画像を得る。

本顕微鏡では、集束電子線により蛍光膜上に微小な点光源を励起する。蛍光薄膜上に試料を直接配置し、蛍光膜上の微小光源により試料を照明する。試料と蛍光薄膜の距離が波長程度と十分小さい場合、電子線励起によって生じた微小光源のエバネッセント波で試料を観察することができ、回折限界を超えた分解能を実現することが可能となる。電子線を走査することにより、蛍光発光の領域を走査し、画像を取得する。

本システムでは、試料を配置する蛍光薄膜の部分で光学顕微鏡部と電子顕微鏡部が分離されるため、試料を配置する部分には真空や金属膜の蒸着などは全く必要なく、通常の光学顕微鏡と同様の環境で使用することが可能である。

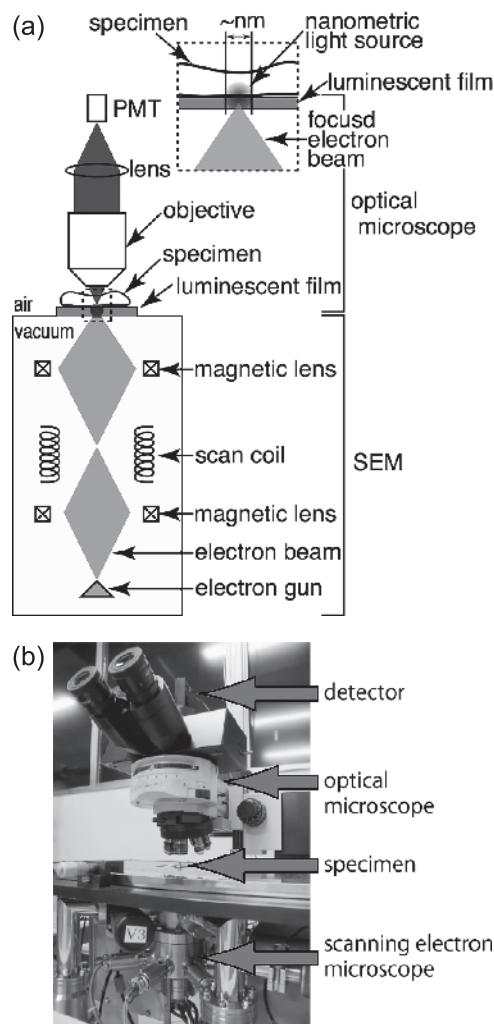


図 1 EXA 顕微鏡の構成。(a) 模式図 (b) 開発したプロトタイプ

本手法は次のような利点を有する^{9~12)}。

a. ナノメートルオーダーの分解能を実現可能

電子線ビームを集光して蛍光薄膜を励起するため、光の回折限界によらない微小な点光源を実現することが可能である。そのため従来の光学顕微鏡の分解能を大きく超えた分解能を実現することが可能となる。

b. 吸収や屈折率分布などの光学定数を観察可能

本システムで検出されるのは、微小光源から試料を透過した光、または微小光源によって励起された蛍光強度分布である。したがって、本システムでは試料の吸収分布や屈折率分布など光学定数分布を測定することが可能である。これは、蛍光試料にのみ適用可能なPALM (Photo-activated localization microscopy) 顕微鏡, SAX (Saturated excitation) 顕微鏡, STED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡など、他の超解像顕微鏡法に比べて大きな特徴となる。また、X線による透過画像や電子顕微鏡による観察像、原子間力顕微鏡で試料の凹凸を観察するのは、全く得られる情報が異なる。

c. 電子線を走査するため高速な観察が可能

電子線を走査することにより、容易に微小光源を走査することができ、高速な観察が可能である。通常の近接場光学顕微鏡では、微小開口を試料表面近傍において高精度に走査するため、観察速度が制限される場合が多い。

d. 蛍光薄膜材料の選択による高機能化

いろいろな機能を持つ蛍光薄膜 (発光波長特性, 偏光特性, 非線形光学応答など) を用いることによって、様々な機能を持つ光ナノイメージング手法を実現することが可能である。

3. モンテカルロシミュレーションとFDTDによる分解能推定および標準試料による分解能評価

我々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に、有限差分時間領域法 (Finite-differential time-domain method: FDTD 法) による光伝搬解析を組み合わせ、電子線励起によるカソードルミネッセンス (CL) の発光分布を解析した¹³⁾。この解析手法により、モンテカルロシミュレーションのみによる CL 発光分布解析では考慮できなかった光伝搬による分解能の評価や蛍光膜外での発光強度分布、多層膜構造における反射や吸収の解析が可能となる。

図2は、モンテカルロシミュレーションとFDTD法を組み合わせたCLの発光分布の解析法の原理図を示す。まずモンテカルロシミュレーションを用いて電子線散乱を解析し、

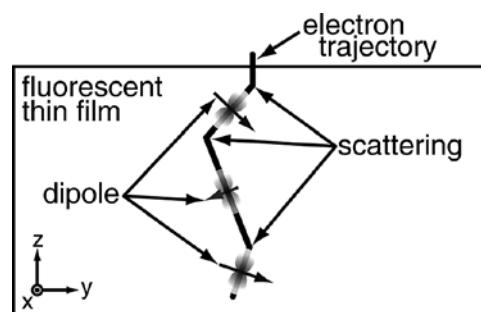


図2 モンテカルロシミュレーションと有限差分時間領域法を組み合わせたカソードルミネッセンスの解析手法

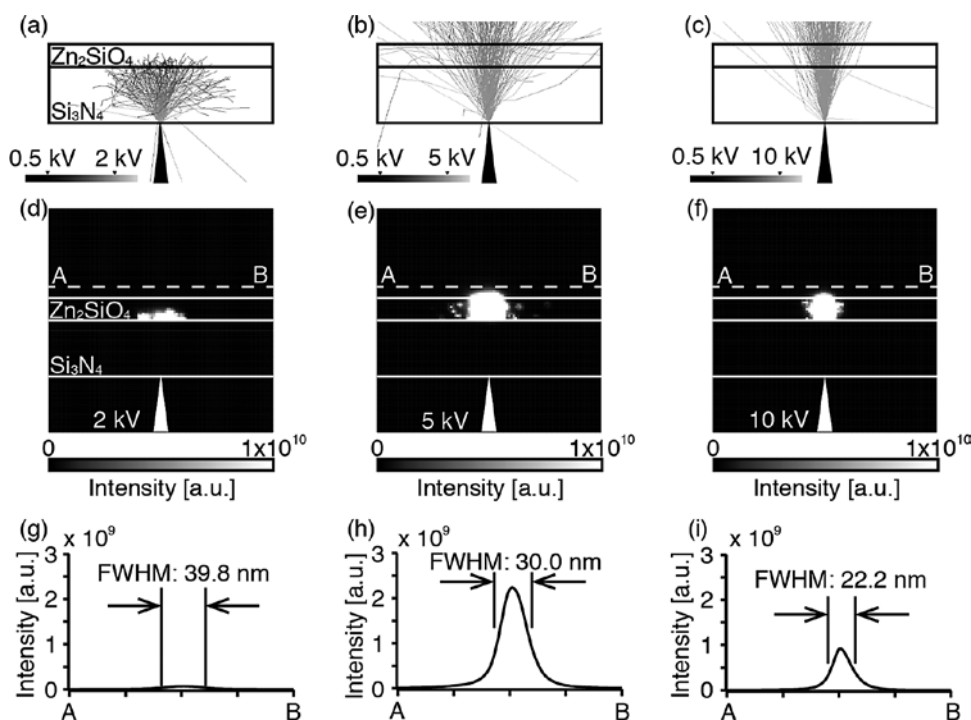
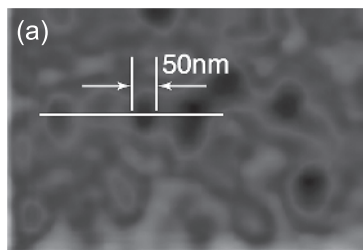


図3 カソードルミネッセンスのモンテカルロシミュレーション-FDTD法による解析結果。(a)-(c) 加速電圧2, 5, 10 kVのときの電子線散乱の結果。(d)-(f) 加速電圧2, 5, 10 kVのときのCL発光分布強度。(g)-(i) 加速電圧2, 5, 10 kVのときの膜表面から10 nm離れた位置での電場強度プロファイル



EXA microscope image

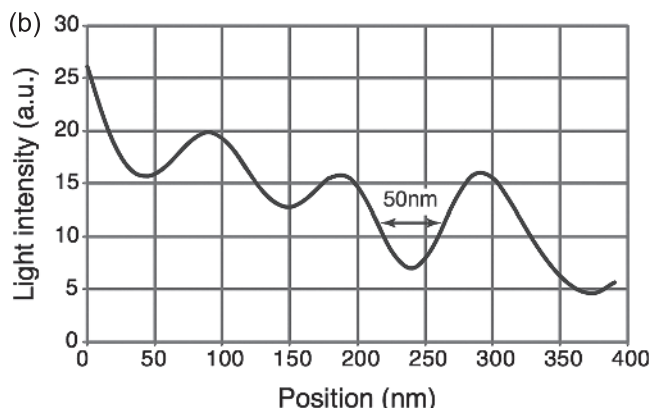


図4 EXA顕微鏡による50 nm微粒子の観察結果. (a) EXA顕微鏡の観察結果, (b) 白線部分の強度分布

その散乱によるエネルギー損失からカソードルミネッセンスの発光位置および強度を計算する. それぞれの発光位置では双極子による発光を仮定した. すべての双極子からの光伝搬をFDTD法を用いて重ねあわせることにより, 蛍光膜内外での光強度分布を求めた.

図3(a)から(c)に加速電圧が2 kV, 5 kV, 10 kVの場合の電子線散乱の結果を示す. 蛍光膜は, 厚さ50 nmの Si_3N_4 膜上に厚さ20 nmの Zn_2SiO_4 膜がコートされた構造とした. 加速電圧が大きくなるにしたがい, 蛍光膜内での電子線散乱による拡がりが少なくなっていることがわかる. これは, 加速電圧が大きくなるにつれて, 電子の平均自由行程が大きくなるためである. 加速電圧が2 kV, 5 kV, 10 kVの場合の平均自由行程はそれぞれ4.7 nm, 50.0 nm, 112 nmとなる.

図3(d)から(f)に蛍光膜内外のCLの発光強度分布を示し, 図3(g)から(i)に蛍光膜の表面から10 nm離れた位置での電場強度プロファイルを示す. 膜内での光伝播により, 電子線で発生したCLが伝搬し, 広がっている様子が確認できる. 蛍光膜表面から10 nm離れた位置での電場強度プロファイルの半値全幅の大きさは加速電圧2 kV, 5 kV, 10 kVでそれぞれ39.8 nm, 30.0 nm, 22.2 nmとなった. 光源の波長以下の微小なナノ光源が励起されることが計算により確認できる.

図4に分解能評価の基礎実験として, 直径50 nmのラテックスを観察した結果を示す. 蛍光膜上に直接ラテックスを配置し, 電子線で蛍光を励起した. 図4(a)は検出した蛍光による観察画像, (b)は白線部分の強度プロファイルである.

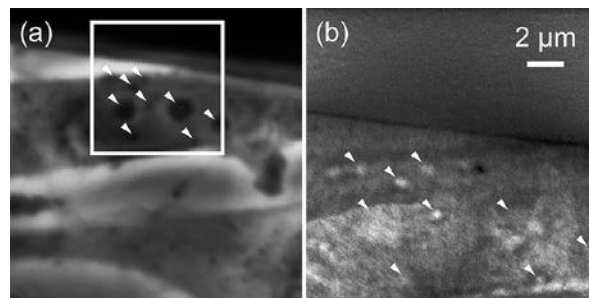


図5 EXA顕微鏡によるMARCO細胞の観察結果. (a) 位相差顕微鏡像, (b) (a)の白線部分をEXA顕微鏡で観察した結果

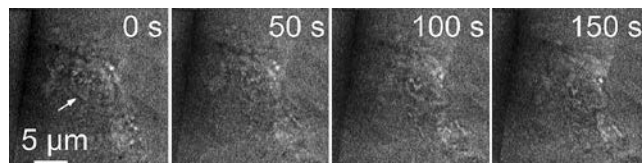


図6 EXA顕微鏡によるMARCO細胞の動態観察結果. 左から観測開始直後, 50秒後, 100秒後, 150秒後の観察像

図4(a)では, 黒色部分が低強度, 白色部分が高強度を示している. 図4(a)の白線上に存在する4つの粒子が4つの低強度部分として分離して観察されており, その強度分布も50 nmの半値幅となっている. この結果より本顕微鏡システムは50 nm以下の分解能を有することを確認した.

4. 電子線励起光学顕微鏡による生物試料の観察

図5に開発した蛍光膜を用いて, 生きた生物試料の観察に成功した結果を示す. 図5(a)はMARCO細胞を通常の位相差顕微鏡で観察したもの, (b)は(a)の白枠部分を拡大したEXA顕微鏡の観察結果である. 図5(a)と(b)において矢印で示した顆粒がそれぞれ対応しており, EXA顕微鏡を用いることにより高い分解能で観察できていることがわかる. この試料では, 蛍光色素などによる染色は行なっておらず, 電子線励起によって細胞内のタンパク質や顆粒などの自家蛍光を検出したものである. したがって, 電子線で励起することによって, 生物試料を非染色で観察することが可能であることがわかる.

図6には, MARCO細胞が時間とともに移動する様子をEXA顕微鏡で観察した結果を示す. 本結果は, 連続して動態を観察した動画の中から, 観測開始直後, 50秒後, 100秒後, 150秒後の観察像を抽出したものである. 細胞全体が時間とともに, 右上方向に移動している様子を確認することができる.

5. まとめ

光学顕微鏡は, 光学部品およびレーザー光源の高品質・高機能化による進展だけではなく, 全く新しい原理に基づく高分解能化, 高機能化が進められている. 材料科学, 電子線,

超音波、プラズモン光学、画像処理など様々な技術を組み合わせることにより、新しい進展が進められている。

我々が開発を進めている EXA 顕微鏡システムは、生物に優しい光学顕微鏡の特徴と非常に高い分解能を持つ電子顕微鏡のそれぞれの利点を融合した新しいイメージング手法である。収束電子線を蛍光体に照射し、光の回折限界より小さいナノ光源を生成する。光を利用するため、試料の屈性率、吸収係数、偏光特性の情報を取得することができる。また、蛍光薄膜を高機能化することで、試料の様々な光学情報を取得することが可能となる。また、白色光を発光させれば、分光特性を測ることも可能である。

このような特徴を有する超解像光学顕微鏡により、これまで観察できなかった微小な領域の生命現象を明らかにすることが可能となり、ナノ・バイオテクノロジーに大きく寄与するものと期待している。さらに、液中のコロイド状態、ファインバブル、分離フィルターの直接観察など工業的な応用分野への展開も期待できるものと考えている。

また、本研究ではモンテカルロシミュレーションと FDTD 法を組み合わせた CL 発光分布の解析法を開発した。本解析法により蛍光膜外の CL の強度分布についても計算することが可能となった。開発した CL の発光分布解析手法は、ディスプレイ光源の膜厚や多層膜構造の設計、蛍光体の品質評価時の分解能の指標など、さまざまな分野に応用可能である。

- 1) Wilson, T. and Sheppard, C.J.R.: Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy, Academic Press (1984)
- 2) 川田善正：顕微分光法—ナノ・マイクロの世界を見る分光法、分光測定法入門シリーズ、講談社サイエンティフィック (2009)
- 3) 川田善正：はじめての光学、講談社サイエンティフィック (2014)
- 4) Inami, W., Nakajima, K., Miyakawa, A. and Kawata, Y.: *Opt. Exp.*, **18**, 12897–12902 (2010)
- 5) Nawa, Y., Inami, W., Chiba, A., Ono, A., Miyakawa, A., Kawata, Y., Lin, S. and Terakawa, S.: *Opt. Exp.*, **20**, 5629–5635 (2012)
- 6) Nawa, Y., Inami, W., Lin, S., Kawata, Y., Terakawa, S., Fang, C.-Y. and Chang, H.-C.: *Chem Phys Chem*, **2014**, 721–726 (2014)
- 7) Nawa, Y., Inami, W., Miyake, A., Ono, A., Kawata, Y., Lin, S. and Terakawa, S.: *Biomed. Exp.*, **5**, 378–386 (2014)
- 8) Nawa, Y., Inami, W., Lin, S., Kawata, Y. and Terakawa, S.: *Opt. Exp.*, **23**, 14561–14568 (2015)
- 9) Furukawa, T., Kanamori, S., Fukuta, M., Nawa, Y., Kominami, H., Nakanishi, Y., Sugita, A., Inami, W. and Kawata, Y.: *Opt. Exp.*, **23**, 18630–18637 (2015)
- 10) Miyake, A., Kanamori, S., Nawa, Y., Inami, W., Kominami, H., Kawata, Y. and Nakanishi, Y.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **53**, 04EH11 (2014)
- 11) Sugita, A., Kamiya, M., Morita, C., Miyake, A., Nawa, Y., Masuda, Y., Inami, W., Kominami, H. and Nakanishi, Y.: *Opt. Mater. Exp.*, **4**, 155 (2014)
- 12) Masuda, Y., Nawa, Y., Inami, W. and Kawata, Y.: *Biomed. Opt. Exp.*, **6**, 3128–3133 (2015)
- 13) Inami, W., Fujiwara, J., Fukuta, M., Ono, A. and Kawata, Y.: *Appl. Phys. Lett.*, **101**, 151104 (2012)