

【目的】 生体内では、数万種を超える分子が相互作用して機能を発現しているため、複数分子種の分布とその周囲の細胞内微細構造を同時に分子スケールの空間分解能で可視化する手法は、分子生物学的・形態学的な生命機能解明において極めて重要である。この実現に有力な手法として、電子線励起による発光であるカソードルミネッセンス (CL) によるカラー分子種観察と二次電子もしくは透過電子による微細構造観察を同時に行う CL・電子相関顕微鏡法がある。しかしながら、この方法は、CL 検出系の感度不足や蛍光体の輝度不足、電子線照射での発光褪色が実用化への課題となっており、未だ基礎研究段階である。そこで本研究では、大立体角 CL 検出系、透過電子検出系、低加速電子線の 3 つを特徴とする高感度 STEM-CL イメージングシステムを開発することで、従来の課題を解決し、プローブである希土類蛍光体の発光分布と細胞内微細構造の同時観察を電子顕微鏡分解能で実現することを目的とする。

【方法】 1. 大立体角放物面ミラーを有する CL ミラーユニット、透過電子検出系、CL 検出系、制御系の設計と作製を行った。2. 作製した STEM-CL イメージングシステムと市販の SEM-CL イメージング装置を用いて、合成した $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の電子線イメージング及び CL イメージングを行い、イメージング特性の比較を行った。3. エンドサイトーシスで $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体を取り込ませた細胞切片を用いて、細胞内微細構造とナノ蛍光体の同時イメージングを行った。4. $Y_2O_3:Eu$ 蛍光体よりも小さい粒径と高い発光効率を有する $NaGdF_4:Eu$ ナノ蛍光体を合成し、STEM-CL イメージングを行った。

【結果】 開発した大立体角の放物面ミラーを有する STEM-CL イメージング装置を用いることで、市販装置の約 5 倍の S/B 比で CL イメージングが可能となった。これにより、粒径 100 nm 以下の $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の CL イメージングが可能となった。このときの CL 像の空間分解能は STEM 像とほぼ同等であることを確認した。細胞構造の STEM イメージングにおいては、細胞切片における細胞構造を SEM 像より高いコントラストでイメージング可能であることを確認した。また、同じ細胞試料を用いて CL イメージングを行った結果、細胞内に食作用で取り込まれた $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の STEM 像と CL 像の同時取得に成功した。さらに、より高い空間分解能での CL イメージングを目指して、直径約 10~20 nm の $NaGdF_4:Eu$ ナノ蛍光体の合成を行い、STEM 像と CL 像を取得することに成功した。

低加速 STEM-CL 相関バイオイメージング法のコンセプトとバイオイメージング結果

