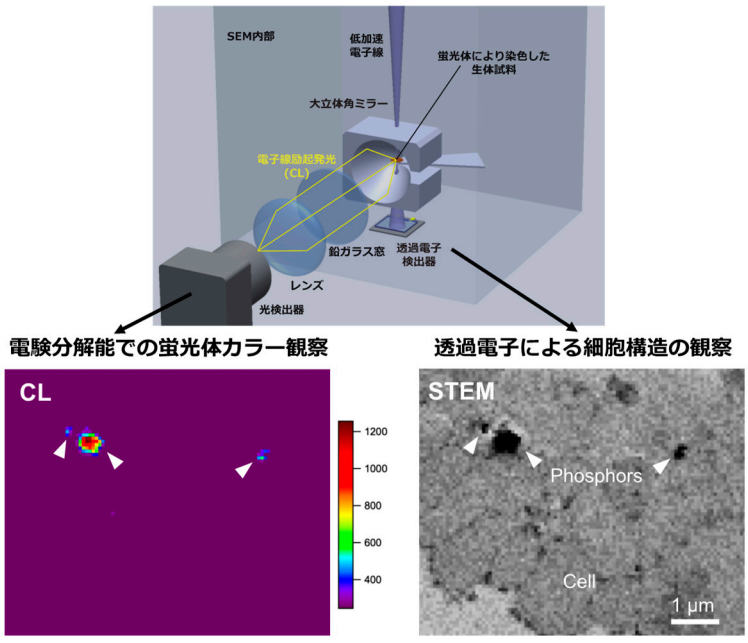
225　低加速STEM-CL相関バイオイメージング法の開発	古川　太一

【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



225. 低加速 STEM-CL 相関バイオイメージング法の開発

古川　太一

横浜国立大学 大学院工学研究院 システムの創生部門

Key words：カソードルミネッセンス，バイオイメージング，STEM，希土類蛍光体

緒　言

生体内では、数万種を超える分子が密接に相互作用し、その機能を発現しているため、分子種や細胞微細構造などの位置情報を正確に知ることは、分子生物学的･形態学的に生命機能を解明していく上で極めて重要である。現在、それらを観察する手法として、同一箇所の蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像を重ね合わせることで目的分子の分布とその周囲の細胞微細構造を網羅的に観察する光･電子相関顕微法（CLEM）が注目され、広く用いられる手法となった［1］。また、超解像顕微鏡による蛍光像を用いることで、蛍光像と電子顕微鏡像の空間分解能のギャップを小さくし、より正確な分子種局在を観察できるようになってきた［2］。しかしながら、空間分解能のギャップが十分には解消されていないこと、超解像蛍光像と電子顕微鏡像の正確な位置合わせが必要なこと、複雑な撮像プロセスかつ高価な顕微鏡を使用する点などで、多くの研究者が一般的に用いる手法になるためには、これらの課題克服が必要である。

これまでに我々は、それらの課題を克服する方法の一つとして、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有効であることを示してきた［3］。ここで、CL は電子線励起による物質からの発光のことである。この手法は、電子線を走査してその発光をマッピングするため、電子顕微鏡の空間分解能かつカラーで画像得られる。世界においても、装置や材料の両側面から技術開発が進んでおり、高開口数（NA＝0.95）の対物レンズにより高効率に CL を取得可能な装置開発［4］や、高 CL 輝度のナノ粒子の開発などが行われている［5］。しかしながら、CL 検出系の感度不足や蛍光体の輝度不足･褪色などにより、生体分子のサイズに近い蛍光体で分子種のカラーCL イメージングを行うことは、未だチャレンジングな課題であるだけでなく、それと同時に細胞内の微細構造像を取得した例は知る限りでは存在しない。

そこで本研究では、高効率な CL 検出系、透過電子検出系、低加速電子線を用いること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、蛍光体の分布と細胞内微細構造の同時観察を高感度かつ電子顕微鏡の空間分解能で実現することを目的とする。

方　法

1. 高感度 STEM-CL イメージングシステムの作製

高感度 STEM-CL イメージングシステムの開発を行った。図 1a に開発したイメージングシステムの概略図を示す。走査電子線を用いて蛍光体標識された細胞切片を励起することで、蛍光体が存在する場所では CL が生じる。CL は、放物面ミラー、SEM 外部へ光を取り出す鉛ガラス窓、バンドパスフィルター、レンズを通って検出器に集光される。放物面ミラーに試料の上下を包み込む大立体角ミラーを用いることで、一般的に用いられる上片側にミラーがあるものよりも高効率に CL を回収することができる。また、透過電子は試料と電子が相互作用しやすいため、二次電子検出では難しい高コントラストな細胞構造の観察を可能にする。これらの STEM 像と CL 像は全く同じ場所を励起し、同時に観察しているので、CLEM のような蛍光像と微細構造像の位置合わせを

する必要もない。さらに、低加速電子線の使用は、TEM などの高加速電子の照射と比較して、細胞を標識する蛍光体の化学構造の変化で退色してしまうことを抑制し、電子線照射に弱いフッ化物ベースの希土類蛍光体［6］や量子ドットなどの発光効率の高く分子サイズに近い蛍光体を用いた CL イメージングの可能性がある。

図 1b に開発した CL ミラーユニットの外観図を示す。放物面ミラーを使用するときのみ所望の位置に挿入できる機構になっている。また、ミラーの位置や角度を微調整可能な機構を設計・作製した。図 1c に放物面ミラーと透過電子検出器を電子線の光軸下に挿入した状態を示す。対物レンズ直下に放物面ミラーの上部に設けた電子線透過用の穴がくるように配置される。試料は放物面ミラーのスリット部分から放物面の焦点に配置することができる。電子線で励起された CL は放物面ミラーで回収し、電子顕微鏡の外へ伝送され、光電子増倍管で検出される。放物面ミラーの下部の穴からは透過電子が通り、透過電子検出器で検出される。透過電子検出器から出力される電流はアンプを通して信号の増幅と電流 - 電圧変換を行い検出される。

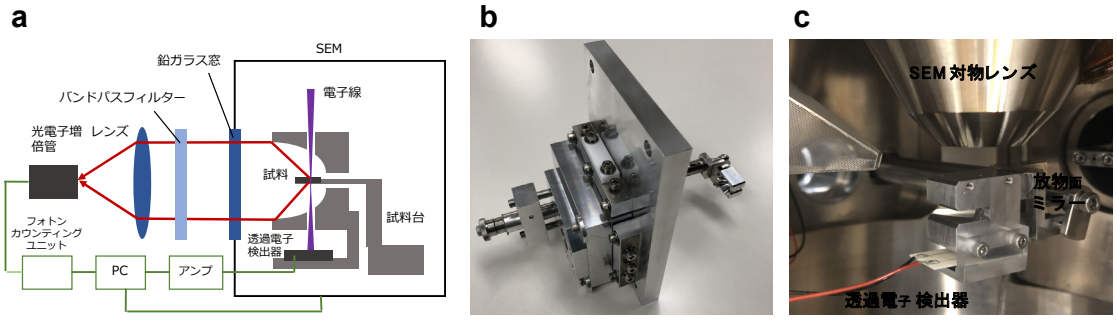


図 1. 開発した高感度 STEM-CL 相関バイオイメージングシステム

a） 低加速 STEM-CL イメージングシステムの概略図。

b） 開発した CL ミラーユニットの外観図。

c） STEM-CL イメージングシステムを電子顕微鏡内に組み込んだ様子。

2. 希土類ナノ蛍光体の作製

STEM-CL イメージングに用いる蛍光体は、カラーイメージングの際の分光のしやすさ（鋭い波長幅）、高輝度発光という観点から、希土類元素を添加したナノ蛍光体を合成した。本研究では、電子線照射耐性が高い蛍光体として Y_2O_3:Eu をゾルゲル法で、電子線照射耐性が酸化物蛍光体と比較して低いものの粒径が小さく発光効率高い蛍光体として $NaGdF_4$:Eu を熱分解法で合成した。

3. 細胞試料の作製

STEM-CL イメージングのための細胞切片サンプルとしてはマクロファージに Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体をエンドサイトーシスで取り込ませたものを用いた。サンプル作製の詳細を以下に記す。

超純水に Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体を分散させ、培養中のマクロファージに添加し、24 h 培養することで細胞にナノ蛍光体を取り込ませた。細胞はグルタルアルデヒドで固定し、四酸化オスミウムで染色、タンニン酸媒染、酢酸ウランで染色を行った。その後、エタノールによる脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した。最後に、ウルトラミクロトームを用いて 100 nm の細胞切片を作製し、TEM 観察用の Cu グリッドに切片を載せ、STEM-CL イメージングに供した。

結果および考察

1. Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体の STEM-CL イメージング

まず始めに、Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体を用いて開発したシステム（大立体角放物面ミラー）と従来のシステム（上片側のみの楕円面ミラー）の CL 検出感度を比較した。CL イメージングはユウロピウムからの発光波長に合わせ中心波長　615 nm、バンド幅 20 nm のバンドパスフィルターを用いて行った。それぞれのシステムで同一の Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体をイメージングした結果から得た信号とバックグラウンドの比 (S／B 比) を図 2a に示す。この結果より、従来のシステムと比較して約 5 倍の S／B 比が得られていることがわかる。図 2b、c は開発したシステムと従来のシステムでの電子線イメージングと CL イメージング結果である。開発したシステムでは粒径 100 nm 以下のナノ蛍光体の CL イメージングができているのに対し、従来のシステムではイメージングができていないことがわかる。また、ナノ蛍光体 CL 像は STEM 像と同等の空間分解能であることを示した。これらの結果より、高感度な CL イメージングが可能なシステムの構築に成功したと言える。また、STEM 像と SEM 像を比較すると、STEM 像の方が高いコントラストで小さな粒子のイメージングができていることもわかった。

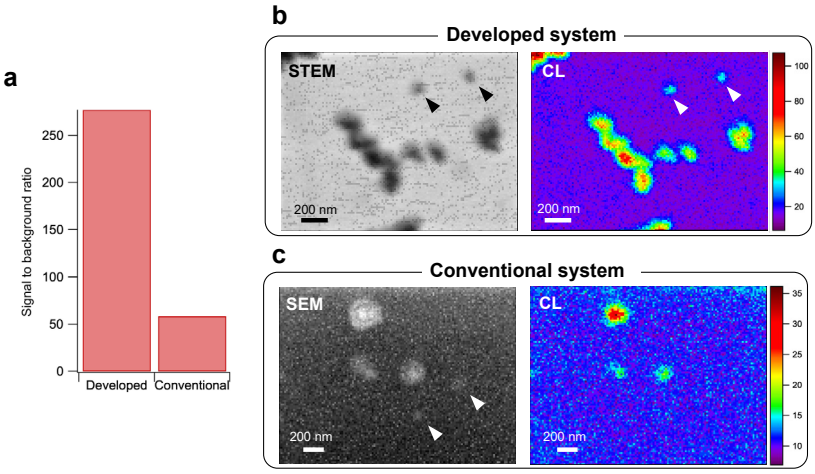


図 2.　開発した STEM-CL イメージングシステムと市販装置の SEM-CL イメージングの比較

a)　開発したシステムと従来システムの CL イメージングによる S／B 比の比較。

b)　Y_2O_3:Eu の開発システムでのイメージング結果 (加速電圧 : 15 kV、露光時間 : 10 ms/pixel、CL 取得波長 : 615 nm)。

c)　Y_2O_3:Eu の従来システムでのイメージング結果 (加速電圧 : 15 kV、露光時間 : 10 ms/pixel、CL 取得波長 : 615 nm)。

2. 重金属染色された細胞切片の STEM イメージングと SEM イメージングの比較

図 2 でイメージングしたナノ蛍光体の STEM 像と SEM 像において、STEM 像の方が高いコントラストでイメージングできていた結果を受けて、先に説明した重金属染色された細胞切片において STEM イメージングと SEM イメージングの比較を行った。図 3a は開発したシステムで得た STEM 画像、図 3b は同一箇所での SEM 画像を示す（SEM 画像の撮像時に CL ミラーは挿入していない）。これらの結果から、STEM 像は SEM 像と比較して高いコントラストで核や小胞、ミトコンドリアなどの構造をイメージングできることを示した。

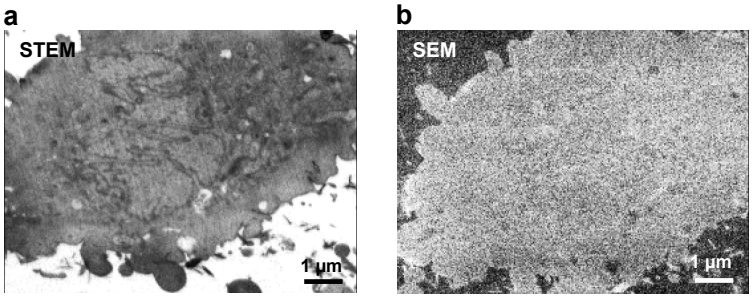


図 3. 重金属染色された細胞切片の電子線イメージングの結果

a） STEM 像（加速電圧：15 kV、露光時間：10 ms/pixel）。

b） SEM 像（加速電圧：30 kV、露光時間：10 ms/pixel）。

3. 重金属染色された細胞切片の STEM-CL イメージング

重金属染色された細胞切片の STEM-CL イメージングを行った。図 4a に STEM 像、図 4b に CL 像を示す。これらの結果より、細胞の構造を示す STEM 像と、細胞内の Y_2O_3:Eu ナノ蛍光体を同時にイメージングできることを示した。また、CL 像空間分解能は STEM と同等の空間分解能であり、CLEM と比較して高い空間分解能で分子種をイメージングできることを示唆している。

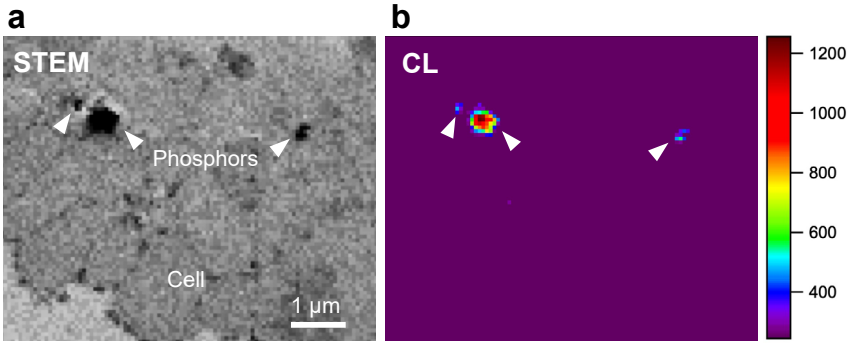


図 4. 重金属染色された細胞切片の STEM-CL イメージングの結果

a） STEM 像（加速電圧：15 kV、露光時間：10 ms/pixel）。

b） CL 像（加速電圧: 30 kV、露光時間：10 ms/pixel、CL 取得波長：615 nm）。

4. 直径約 10 nm の $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体の STEM-CL イメージング

最後に直径約 10 nm の $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体の STEM-CL イメージングの結果を示す。これまでにイメージングを行った Y_2O_3:Eu 蛍光体は 1 次粒径が 30～40 nm であったものの、合成法の都合上、凝集している蛍光体が多く、1 次粒径で単分散したものが少なかった。一方、熱分解法で作製した $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体は、図 5a の TEM 像に示す通り、直径約 10 nm の単分散した蛍光体を得ることができている。将来的に細胞の特定のタンパク質を免疫染色し、STEM-CL イメージングを行うためには、単分散かつ直径ができる限り小さい蛍光体が必要であるために、$NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体は STEM-CL イメージングに好適であるといえる。図 5b、c に $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体の STEM 像と CL 像をそれぞれ示す。今回 STEM-CL イメージングに使用した電子顕微鏡はタングステンフィラメントを用いたものであるため、粒子一つ一つを観察可能な空間分解能はないものの、粒子の CL イメージングに成功した。今後、この粒子を用いて細胞内の特定のタンパク質を染色し、STEM-CL イメージングを行う予定である。

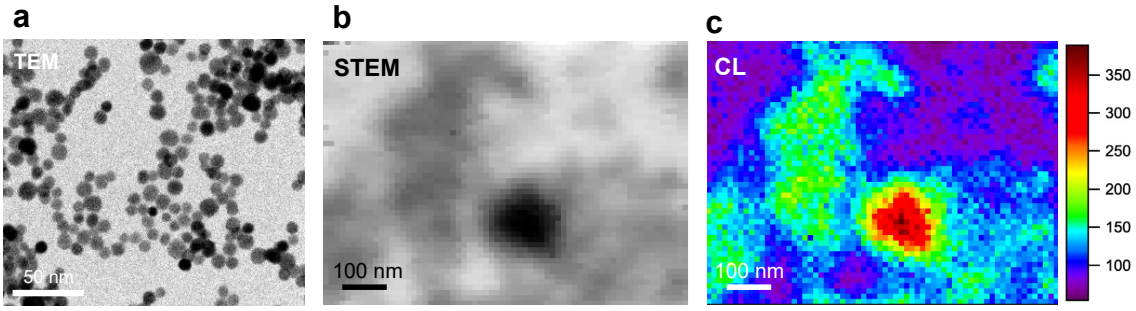


図 5. $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体の STEM-CL イメージングの結果

a) 合成した $NaGdF_4$:Eu ナノ蛍光体の TEM 像。

b) STEM 像（加速電圧：15 kV、露光時間：10 ms/pixel）。

c) CL 像（加速電圧：15 kV、露光時間：10 ms/pixel、CL 取得波長：615 nm）。

共同研究者・謝辞

本研究は、横浜国立大学大学院工学研究院の丸尾昭二教授、大阪大学データビリティフロンティア機構の新岡宏彦特任准教授、横浜国立大学機械工場の高橋龍太郎氏にご協力いただいた。この場を借りてお礼を申し上げます。

文　献

1) de Boer P, Hoogenboom JP, Giepmans BN. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! Nat Methods. 2015 Jun;12(6):503-13. doi: 10.1038/nmeth.3400. PMID: 26020503.

2) Joosten B, Willemse M, Fransen J, Cambi A, van den Dries K. Super-Resolution Correlative Light and Electron Microscopy (SR-CLEM) Reveals Novel Ultrastructural Insights Into Dendritic Cell Podosomes. Front Immunol. 2018 Aug 22;9:1908. doi: 10.3389/fimmu.2018.01908. PMID: 30186284; PMCID: PMC6113363.

3) Niioka H, Furukawa T, Ichimiya M, Ashida M, Araki T, Hashimoto M. Multicolor Cathodoluminescence Microscopy for Biological Imaging with Nanophosphors. Appl. Phys. Express. 2011 Nov 2;4:112402. doi: 10.1143/APEX.4.112402.

4) Garming MWH, Weppelman IGC, de Boer P, Martínez FP, Schirhagl R, Hoogenboom JP, Moerland RJ. Nanoparticle discrimination based on wavelength and lifetime-multiplexed cathodoluminescence microscopy. Nanoscale. 2017 Aug 31;9(34):12727-12734. doi: 10.1039/c7nr00927e. PMID: 28829093.

5) Prigozhin MB, Maurer PC, Courtis AM, Liu N, Wisser MD, Siefe C, Tian B, Chan E, Song G, Fischer S, Aloni S, Ogletree DF, Barnard ES, Joubert LM, Rao J, Alivisatos AP, Macfarlane RM, Cohen BE, Cui Y, Dionne JA, Chu S. Bright sub-20-nm cathodoluminescent nanoprobes for electron microscopy. Nat Nanotechnol. 2019 May;14(5):420-425. doi: 10.1038/s41565-019-0395-0. Epub 2019 Mar 4. PMID: 30833691; PMCID: PMC6786485.

6) Sun X, Wang B, Kempson I, Liu C, Hou Y, Gao M. Restructuring and remodeling of $NaREF_4$ nanocrystals by electron irradiation. Small. 2014 Nov;10(22):4711-7. doi: 10.1002/smll.201401101. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24948042.