

蛍光像を同時に計測可能な新規走査型電子顕微鏡の研究

金丸, 孝昭

<https://doi.org/10.15017/1785424>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

(別紙様式2)

氏 名 : 金丸 孝昭

論文題名 : 蛍光像を同時に計測可能な新規走査型電子顕微鏡の研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

電子顕微鏡を利用した生体細胞の観察は、医学研究とくに組織・細胞の形態学分野において非常に重要な情報を提供することは従来から知られており、近年は特に免疫組織化学や腎疾患の分野などにおいては、免疫電子顕微鏡法や腎組織診断などにおいても電子顕微鏡像が利用されている。例えばマウス間葉系幹細胞の分化の研究では、マウスへ移植した**Green Fluorescent Protein (GFP)** が発現する幹細胞が、マウスの全身の各組織へ分化する様子は電子顕微鏡が必要とされる。この際、従来の方法では**GFP**陽性細胞を同定するためには、蛍光光学顕微鏡で確認した顕微鏡像と電子顕微鏡で観察した電子線による高解像度像を対比させ、人為的に同定を行うには多大な労力を必要とし、その成功率も低い。

本論文では、上記の問題を工学的に解決するため、蛍光像と同じ位置・同じ角度で、電子顕微鏡にても観察する事が可能な電子顕微鏡(**FL-SEM**)に関する統合的システム構築及び、それに帰する要素技術の研究開発結果について論じている。詳細な成果を以下に示す。

- 従来の電子顕微鏡に挿入可能な蛍光励起・観察用光学ユニットを組みあわせ、**FL-SEM**を世界ではじめて実現し、続いてその発展形として光学顕微鏡を電子顕微鏡内に固定的に設置した**FL-SEM**を基礎から開発した。多波長化を行い、実際の医療における知見を明らかにする為の情報得られることをはじめて実証した。
- レーザーアブレーションを利用して試料表面をnmオーダーで掘削して観察する方法をはじめて提案し、実証研究を行なった。
- 新蛍光修飾色素を**FL-SEM**に適用するための研究を行い、試料作製プロトコルを開発した。

第一に**FL-SEM**の提案と研究である。**FL-SEM**の前身となる挿入型光学ユニットの開発では、電子顕微鏡の基本構成を損なわずに、鏡筒内に蛍光励起ランプの導光と、蛍光観察光学系を挿入し、走査型電子顕微鏡像と蛍光像をスーパーインポーズすることで、**GFP**を利用した蛍光発光と生体の微細な器官の相関を正確に捉える上で医学上有効な情報を提供できることをはじめて明らかにした。続いて、再現性と安定性の向上のため、電子顕微鏡に固定的なカセグレン光学系を設置し、3つの波長(405nm, 473nm, 532nm)のレーザーを導入して本格的な多色観察が可能な**FL-SEM**を構成した。五章で論じる新規蛍光色素ふくむ最大3色を利用し、位置再現性や輝度の向上も相まって、眼科における新生血管の観察などに於いて重要な医学的知見を明らかにする観測結果を得ることに成功した。

第二には、**FL-SEM**での観察に於いて、有機物試料を掘削しながら3次元情報を得る為の手法として、紫外レーザーアブレーションを照射することで、10nmオーダーで試料を掘削しながら**SEM**観察をする手法 ; **Light Ablation Nano Tome (LANTome)** を世界ではじめて提案・実証した。波長193nmの**ArF**エキシマーレーザーを利用し、包埋剤としてエポキシ樹脂を利用した試料で1ショット当たり数10nmの掘削を、一切の熱変成無しに行えることをしめした。1)入射角を最適化す

(別紙様式2)

る事で、表面の凹凸を低減するフラット化が可能であること、2)波長193nmは、有機体を構成する結合でもっとも強固なC=C結合よりも大きい光子エネルギー6.42eVを有しており、生体材料で起きやすいとされる熱変性が、SEM観察レベルでもほぼ無いこと、さらに、3)光解離により従来の誘電体SEM観察で問題とされるチャージアップ減少もが予防されること、という3つの知見を明らかにすると同時に、腎臓の細胞核を連続掘削から、1 shot当たり約19nmという薄さでの掘削を達成した。

第三に、ベンゾジアゾール誘導体を利用した新しい蛍光色素FluoridをFL-SEMで利用するために、電子顕微鏡観察用のプロトコル開発研究を行った。二次抗体に修飾したFluoridこの新しい色素ではpHや温度、電子線照射による耐性に調査を行い、その全てにおいて実用レベルでほぼ劣化がない事を示した。

このように、本論文は、蛍光画像と反射電子線像を高いレベルで統合可能である事を示し、さらには3D観察するための基盤的な要素技術の知見を明らかにしている。本論文成果により、蛍光発光と生体の微細な器官の相関を正確に捉えることで、生体の機能と形態の関連を裏付ける手法をこれまでのレベルを超える速さ・精度で実施する事が可能となり、生体のナノレベルでの医学・工学的理解に大いに寄与することが期待される。さらには、医学分野のみならず、農学・生物学などの生命科学研究をはじめ食品・化粧品・樹脂・炭素を含む繊維など幅広い多彩な産業領域での分析研究に活用でものもであり、工学上、非常に重要な成果である。