

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700380
 研究課題名（和文）
 細胞イメージングのための 30 nm の分解能を持つ硬 X 線照射型可視共焦点顕微鏡の開発
 研究課題名（英文）
 Development of hard X-ray-excited confocal microscopy with spatial resolution of 30nm for cellular imaging
 研究代表者
 松山 智至（MATSUYAMA SATOSHI）
 大阪大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：10423196

研究成果の概要：本研究の目的は、励起光に硬 X 線を用い検出を可視光で行うことができる硬 X 線照射型可視共焦点顕微鏡の開発を行い、細胞、組織を可視顕微鏡以上の空間分解能で観察することである。研究を行うに当たって、硬 X 線集光システムと可視光検出システムを組み合わせた顕微鏡システムを構築した。ヒト培養細胞の細胞質に CdSe-ZnS ナノ粒子を染色した試料を作製し観察したところ、500nm の分解能でイメージングすることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：X 線顕微鏡，共焦点顕微鏡，放射線，X 線，粒子，X 線ミラー，細胞イメージング

1. 研究開始当初の背景

細胞生物学など細胞を扱うさまざまな分野において、より高分解能で生きた状態の細胞やオルガネラの観察を行うことが望まれている。

レーザー共焦点顕微鏡は、可視光を用いた顕微法の中で最も高い分解能を達成できることが知られているが、現在のところ 100～200nm 程度の分解能が限界である。電子顕微鏡では 5nm 以下という超高分解能が可能であるが、試料を化学固定するか凍結するしかないため、ウェットな状態や生きた状態を観

察することは不可能である。走査型近接場光学顕微鏡(SNOM)では、微小なプローブを利用することで 100nm 以下の空間分解能が得られている。しかし、近接場を利用するという特性上、細胞などの厚みのある試料の内部を測定することは難しいため、観察できる試料が限られる。以上の手法において現状では、ウェットな状態や生きた状態の細胞に対して 100nm を切る分解能での観察はほとんど成功しておらず、様々な分野でそのような顕微鏡が切望されている。

2. 研究の目的

我々のグループではこれまで、高精度楕円ミラーを用いて硬X線のナノ集光の研究を行ってきた(H. Mimura et al., Part 2, 44 (18), L539-L542 (2005) 他多数). その成果を応用し, SPring-8 にて走査型蛍光 X 線顕微鏡の開発を行ったところ, 空間分解能 30nm で試料内部の元素分布を可視化することができた(S. Matsuyama et al., RSI, 77, 093107 (2006)., S. Matsuyama et al., X-ray Spectrometry 38, 89-94, (2009).). しかし, 走査型蛍光 X 線顕微鏡では測定時間が4時間/枚(1~10sec/pixel)を要するため, 生きた細胞への応用は測定時間, 長露光時間による X 線障害の点で難しかった.

本提案では, 硬 X 線集光技術と可視共焦点顕微鏡技術を組み合わせることで, 30nm 以下の空間分解能で可視蛍光像を得ることができる硬 X 線照射型可視共焦点顕微鏡の開発を目的としている. この顕微鏡の開発によって, ウェットな試料や生きた細胞に対して 30nm の分解能で観察することが可能となる.

3. 研究の方法

(1) 生物試料を超高分解能で観察するために, プローブとして硬 X 線集光ビームを用い, 検出には可視光用検出器を用いる顕微鏡システムを開発した.

(2) 高効率に発光する X 線エネルギー条件を検討するために, XAFS 測定を行った.

(3) 実際に試料を蛍光色素でラベルされた細胞試料を作製し, そのイメージングを行った.

4. 研究成果

(1) 本研究では, 生物試料を超高分解能で観察するために, プローブとして硬 X 線集光ビームを用い, 検出には可視光用検出器を用いる顕微鏡システムを開発することを目指している. まず, 硬 X 線集光ビームを得るために図 1 に示す既存 Kirkpatrick-Baez ミラー集光システムを用いた. これによって 15keV の硬 X 線を最小 30nm まで集光することが可能である. また, 検出器に光電子増倍管 (H8259, 浜松ホトニクス社製) と 10 倍対物レンズ (M Plan FL 20x, オリンパス社製) を用いたシステムを構築した. 10 倍対物レンズを選択した理由は, 実験の効率的な運用のためであり, より大 NA レンズを用いることで 20 倍以上の高速化が実現可能であると考えられる. 今後段階的に大 NA レンズを採用することを検討している. 図 1 に示すように硬 X 線照射型可視共焦点顕微鏡を開発することができた.

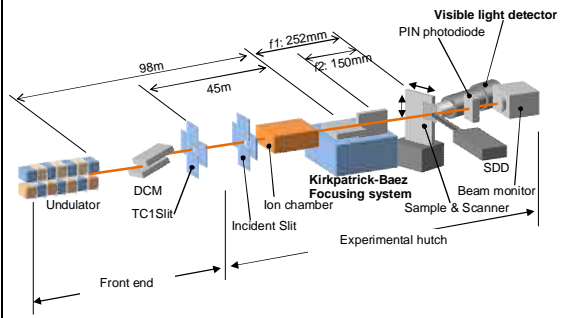


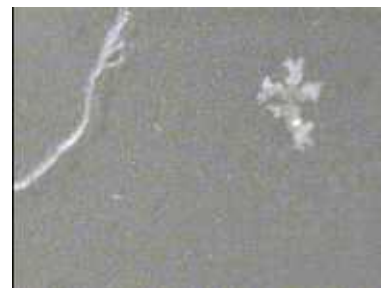
図 1 開発した顕微鏡システムの構成

(2) 予備実験として, Alexa の液滴に対して 1mm 径程度の SPring-8 の硬 X 線ビームを照射する実験を行った. 目視で発光を確認したところ, 図 2 に示すような強い発光を確認でき, 本顕微鏡の可能性を示した. また, この発光は放射光の高輝度 X 線を照射してもほとんど退光することはなかった.

(a)



(b)



(c)



図 2 Alexa 液滴への X 線照射の結果. (a)未照射, (b)X 線照射, (c)X 線照射かつ照明消.

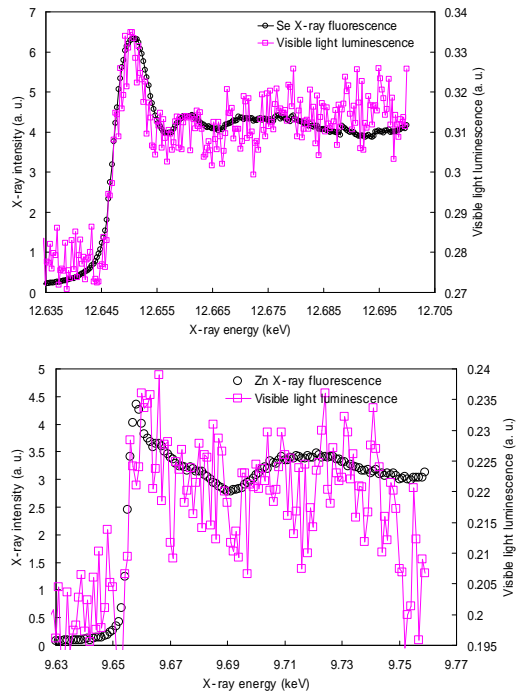


図3 入射 X 線エネルギーと発光強度(蛍光 X 線, 可視蛍光発光)の関係

(3) CdSe-ZnS 粒子(サイズ効果によって可視光で発光できる半導体)に対して SPring-8, BI29XUL 第二ハッチにおいて硬 X 線を照射し, その発光強度を X 線エネルギーに対して調べた. 一般的に, X 線エネルギーに対して吸収や発光分光を行う方法を XAFS (X-ray absorption fine structure) や蛍光 XAFS と呼ばれ, 内殻の電子軌道を調べる一般的な方法である. 図3は横軸に X 線エネルギー, 縦軸に光電子増倍管の光子カウント(入射 X 線強度で規格化)を表している. CdSe-ZnS の Se K1s (12.658keV) と Zn K1s (9.659keV) 吸収端近傍を調査した. 結果は Cd, Zn 蛍光 X 線と発光強度と相関があり, X 線照射による発光は X 線によって発生した電子によって励起されるカソードルミネッセンスであることが強く示唆された. つまり, X 線を物質に照射した際, 光電子が発生し, その光電子が新たな電子を発生させ, かつ, 非弾性散乱などによって減速してゆくことで, 大量の低速電子を発生させる. この結果, 高強度の発光が起こると思われる.

(4) 上記(3)で得られた結果をさらに詳細に調べるために, モンテカルロシミュレーションによって高速電子がどのように減速しながら拡散してゆくか計算によって追跡した. 条件としては, エネルギー15keV の電子を 0nm, 30nm, 50nm の領域に存在するとして水(静止していると仮定)中に配置した場合, その拡散距離半径(nm)で求めた.

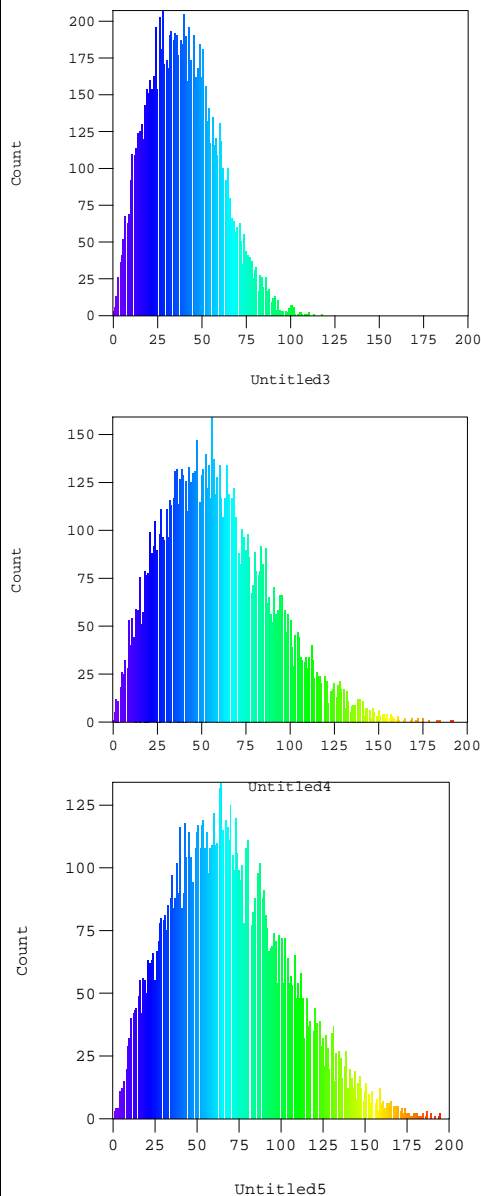


図4 高速電子(15keV)の滑走距離(半径, nm)の計算. 15keV の電子が 0nm, 30nm, 50nm 領域に存在するとして, その電子がエネルギーを失うまでに滑走する距離(半径, nm)をモンテカルロシミュレーションで計算した. グラフは, 横軸: 滑走距離(nm), 縦軸: 電子数(個)のヒストグラム.

計算の結果, 15keV の電子にはおよそ 100nm の拡散距離があり, 顕微鏡の分解能を著しく劣化させることが分かった(図4). 上述した(3)の結果と総合すると, 感度向上のためには励起 X 線のエネルギーを高くしなければならず, 分解能向上にはエネルギーを小さくしなくてはならないことが分かった. いくつかの試行の結果, 5~10keV 程度の硬 X 線ビームがもっともふさわしいことがわかった.

今後の課題として、発光ラベルに対して最適なエネルギーのX線を検討することでより効率的に発光させることが可能な励起波長を検討することである。

(5) 開発した顕微鏡システムのデモ実験を行った。試料はヒト培養細胞の細胞質にCdSe-ZnS ナノ粒子を染色し、その試料を凍結乾燥したものを用いた。実験は SPring-8 BL29XUL の第二ハッチで行った。ビームサイズは500nmとし、X-ray energyは15keV、測定範囲 $30 \times 40 \mu\text{m}^2$ とした。図5は本顕微鏡によって得られた CdSe-ZnS ナノ粒子からの発光分布である。現在のところ、本測定には80分を要しているが、今後対物レンズの大NA化によって20倍の高速化が期待できる。さらに、蛍光色素をより高強度に発光できるものを探すことで、1分程度で測定可能になると予想している。また、分解能においては、現状はX線集光光学系調整時間の制約から500nmとしたが、本硬X線集光光学系では最小30nmが達成できているため30~50nmの分解能が達成できると考えている。

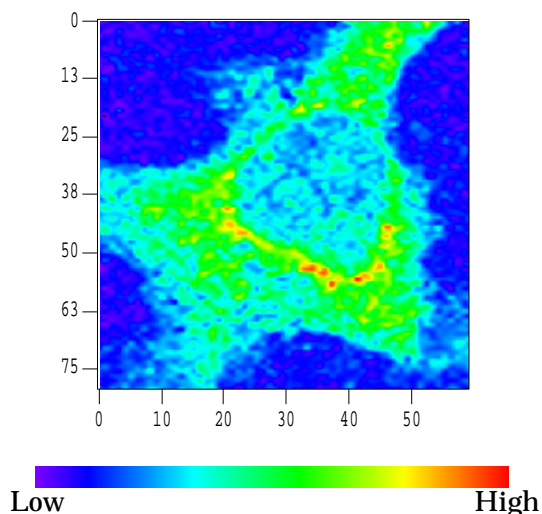


図5 ヒト培養細胞の細胞質を CdSe-ZnS ナノ粒子で染色した試料を本顕微鏡で観察した結果。中央の白く抜けている部分が核である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計5件)

(1) S. Matsuyama, M. Shimura, H. Mimura, M. Fujii, H. Yumoto, S. Handa, T. Kimura, Y. Sano, M. Yabashi, Y. Nishino, K. Tamasaku, T. Ishikawa and K. Yamauchi, Trace element mapping using hard X-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick Baez

mirror system, European Conference on X-ray Spectrometry (16-20 June 2008, Cavtat, Dubrovnik, CROATIA), Abstract p88(011-1).

(2) 松山 智至, 硬 X 線ナノビームを用いた細胞イメージング, 第7回高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト連携研究会, 2008年9月13日, 兵庫県 SPring-8.

(3) M. Fujii, S. Matsuyama, T. Wakioka, H. Mimura, Y. Sano, and K. Yamauchi, Development of Advanced Kirkpatrick-Baez System for X-ray Nano-Imaging, First International Symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology, p2.6, (Feb. 17, 2009).

(4) S. Matsuyama, H. Mimura, K. Katagishi, M. Shimura, M. Fujii, H. Yumoto, S. Handa, T. Kimura, Y. Sano, K. Tamasaku, Y. Nishino, M. Yabashi, T. Ishikawa, and K. Yamauchi, High-resolution and Highly Sensitive Scanning X-ray Fluorescence Microscopy Using Kirkpatrick-Baez Mirror Optics, Extended Abstracts of International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007, 81-82 (Oct 15-17, 2007, Osaka, Japan).

(5) 藤井正輝, 松山智至, 志村まり, 三村秀和, 前島一博, 片岸恵子, 湯本博勝, 半田宗一郎, 木村隆志, 佐野泰久, 西野吉則, 玉作賢治, 矢橋牧名, 石川哲也, 山内和人, 走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布の測定, 第9回X線結像光学シンポジウム, 中部大学(2007年11月2日).

[その他]

<http://www-up.prec.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 智至 (MATSUYAMA SATOSHI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 10423196

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者