

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23241038

研究課題名(和文) 高効率シンチレータを用いた密着型軟X線顕微鏡による「生きた」細胞の高速動画撮影

研究課題名(英文) Development of contact-type SX microscope with high efficiency scintillator plate and SX imaging of "living" bio-cell

研究代表者

江島 丈雄 (Ejima, Takeo)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：80261478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,500,000円、(間接経費) 11,550,000円

研究成果の概要(和文)：水を含む「生きた」生物細胞を観察するために、シンチレーターを軟線-可視変換素子として、光学顕微鏡を読み出し光学系に用いた密着型の軟線顕微鏡を新たに開発し、その場で波長を変えて軟線像を観察できる簡便な軟線顕微鏡の開発に成功した。同時にレーザープラズマ光源を用いた密着型軟線顕微鏡により「生きた」生物細胞の軟線像の観察を行った。得られた結果を蛍光顕微鏡像と比較した結果、「水の窓」領域における軟線像に写る構造を明らかにした。また、「水の窓」領域における最適波長を決定するために含水生物細胞の分光顕微鏡像を撮像した。

研究成果の概要(英文)：A contact-type microscope was successfully developed and SX images can be instantly obtained without any SX imaging optics by the microscope. In the microscope, a SX image is converted to a visible (VI) image with the use of the scintillator plate, and the VI image is read out by a VI optical microscope installed in the microscope. The microscope can be adaptable to any SX light sources, such as synchrotron light source and laser produced plasma (LPP) light source. In the study, a "living" bio-cell was observed by a contact-type SX microscope using LPP light source, and the obtained images were compared with VI luminescence images taken at the same position. Origins of the structures contained in the SX images are clarified by the comparison between the two. Spectromicroscopic images by the use of a synchrotron light source were also obtained for investigating high contrast SX images in Water-window wavelength region.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料 ナノバイオサイエンス

キーワード：軟X線顕微鏡 水の窓 炭素の窓 密着法 シンチレーター 生物細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞観察には、装置の限界に伴う未知の現象がまだたくさんあると考えられる。限界のひとつは、顕微鏡の空間分解能(～210nm)である。軟X線は、波長が可視光より1桁以上短く、この波長の短さを利用する軟X線顕微鏡は、可視光学顕微鏡より一桁以上高い空間分解能を持つが、物質と強く相互作用するため空气中を透過せず、特異的に「水の窓」と呼ばれる波長域(2.3～4.4nm)の軟X線だけが、厚さ10μm程度の水分を含む生物試料を透過し、像を得ることが出来る。一方で、これまでに開発された「水の窓」波長域で動作する軟X線顕微鏡は、走査型のため動きの伴う観察はほとんど行われていない。

レントゲン写真のように試料とフィルムを密着させて撮像する密着型軟X線顕微鏡は、結像光学系が省略できる軟X線顕微鏡として多く研究されてきたが、撮像後にフィルムを「現像」をする必要があるため、動きを伴う観察には不向きであると考えられてきた。申請者の江島は、これらの困難を解決する方法のひとつとして、フィルムの代わりにシンチレータを用いることで現像過程を省略し、その場観察が可能となることを示した。申請者の加道らは、高輝度レーザープラズマ軟X線源を用いて生体の軟X線観測をするために、PMMA フォトリソグレイド上に直接培養した細胞を真空中で「生きた」まま長時間保持できる密封型試料セルの開発を行い、生理活性下にある細胞の軟X線像の取得に成功した。

本研究では、これらの結果を組み合わせ、その場観察の可能な密着型X線顕微鏡により、これまで実現が難しかった高い空間分解能で、「生きた」ままの細胞の動きを観察することを発想した。

## 2. 研究の目的

「生きた」細胞をシンチレータに密着・封入し、かつシンチレータを光らせるのに十分な光量を得るために、a:試料セルの開発、b:鮮明な画像を得るためのセルに密着した細胞周辺の水の層の厚さの制御、c:使用波長の最適化、の3つが必要である。試料セルに関しては、これまでに開発した試料セルを密着型軟X線顕微鏡用に改良し最適化を行う。その後、放射光施設を利用して「水の窓」波長域周辺での透過率を測定し、

観察に用いる波長の最適化を行う。

また、細胞内小器官(オルガネラ)を同定した撮影を行うために、蛍光顕微鏡と密着型軟X線顕微鏡の2つを用いて同一細胞を観察することにより、軟X線像に現れるオルガネラの同定を行う。さらに「生きた」細胞をアンジュレータを光源として観測し、動画撮影を試みる。

## 3. 研究の方法

研究目的を遂行するために、その場観察可能なシンチレータを撮像素子として用いた密着型顕微鏡を開発した。装置は、細胞の透過軟X線像を細胞に密着させたシンチレータで可視光に変換し、変換された可視像を読み出し記録する。開発した密着型顕微鏡の概略図を図1に示す。左から軟X線を入射し、試料からの透過光をシンチレータで可視光に変換する。変換した可視像は可視光学系で読み出し、CCDカメラで記録する。可視像と軟X線像が同一光学系で観測できるので、軟X線像と可視像の比較が容易となった。

一方で「生きた」細胞を観察するには、生体活性を保持する細胞試料を真空中でシンチレータに密着させる必要がある。そのために、新たに:試料セルを開発し、:密着した細胞周辺の含水層を正確に制御した。セルには100～200nm厚のSiN膜を用い、膜とシンチレータで挟んだ細胞を観察した。細胞周辺の培養液層の厚さを制御するために、膜周辺に半導体描画の際に用いる樹脂を用いて5～10μm厚のスペーサーを設け、厚さを制御した。使用波長の最適化を行うために、開発した装置を放射光施設に持ち込み、波長を変えて、細胞の軟X線像を観察した。

一方で、得られたX線像の中の細胞内構造がどの小器官に対応するのかを明らかにするために、同様に密着型の軟X線顕微鏡を用いて、可視蛍光顕微鏡との比較観察実験を行った。同様に開発したSiN膜の試料セルを用いて細胞を「生きた」まま封入し、可視蛍光像を観察した後に、軟X線像を撮像した。同じ資料を比較することにより、軟X線顕微鏡像中の様々な微細構造の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 密着型軟 X線顕微鏡の開発

開発した顕微鏡の概略を図1に示す。波長 $\lambda_{sx}$ の軟 X線に対する顕微鏡の感度 $Q(\lambda_{sx})$ は、シンチレータの量子効率  $q(\lambda_{sx})$ 、対物レンズの開口数 NA、シンチレータの発光波長 $\lambda_s$ に対する対物レンズの透過率  $T_{obj}(\lambda_s)$ 、光学窓の透過率  $T_w(\lambda_s)$ 、結像レンズの透過率  $T_t(\lambda_s)$ 、CCDの量子効率  $q_{CCD}(\lambda_s)$ を用いて、

$$Q(\lambda_{sx}) \sim q(\lambda_{sx})T_{obj}(\lambda_s)T_w(\lambda_s)T_t(\lambda_s)q_{CCD}(\lambda_s) (1 - (1 - NA^2)^{1/2})$$

と与えられる。このうち、 $q(\lambda_{sx})$ 以外のパラメータは既知であり、かつすべての値が1に近い定数であるため、全体の効率はほぼシンチレータの量子効率に依存する。調べた量子効率を図2に示す。7~8nm 付近をピークとする量子効率を示すことが分かった。

作製した顕微鏡の空間周波数応答 (MTF) を調べるために、0.2mm 厚の Si ウェハ上に作製した 100nm 厚の SiN メンブレンを撮像し、その Si ウェハとメンブレンの境界をエッジとして、そのエッジレスポンスから計算により MTF を求めた。得られた結果 (図 3) から、おおよそ高空間周波数の値で 300 を超えたあたりから点のバラつきが大きく、コントラストが 0.1 以下となった。波長 550nm、対物レンズの実効的な開口数 0.22 として考えられる MTF の cutoff 周波数は 800(LP/mm)であるから、全体的にコントラストの

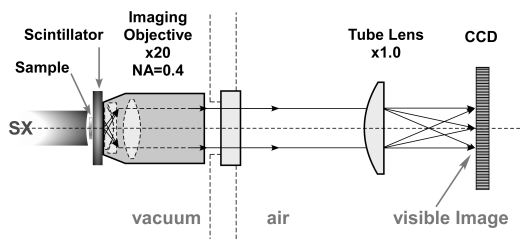


図 1：開発した密着型軟 X線顕微鏡の概略

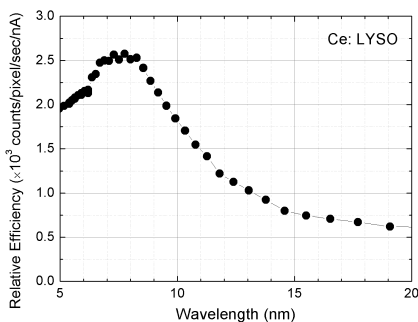


図 2：シンチレータの量子効率

低いシステムとなった。これは、シンチレータ内の散乱光が多いため、と考えられる。

(2) 密着型軟 X線顕微鏡と蛍光顕微鏡の比較による軟 X線像の特徴

軟 X線像に写る構造を明らかにするために、観察した細胞を染色しあらかじめオルガネラを特定したうえで、軟 X線像で得られる構造がどのオルガネラに相当するかの分別を試みた。

撮影に用いた顕微鏡は、レーザー生成プラズマ光源を軟 X線源とする密着型軟 X線顕微鏡で、空間分解能は 80nm、レーザーパルス幅に比例する露光時間は 600psec の瞬間露光で撮像した。ターゲットとして金薄膜を用い、「水の窓」波長域 2.3~4.4nm の軟 X線を用いた。観察した細胞はマウス精巣ライディッヒ細胞で、接着性の細胞として薄く広がる性質を持っているため、オルガネラ同士の重なりが少なく分別して観察するのに都合が良い。感光材上に培養した細胞を真空中で培養液が漏れないように工夫した試料セルに生きたまま封入した。感光剤には PMMA を用いた。通過した軟 X線の強度に応じて PMMA 表面に凹凸がつくため、この凹凸を AFM により読み出し、軟 X線像とした。蛍光染色は、クロマチンに良く染まる DAPI、細胞骨格に良く染まる Phalloidin、ミトコンドリアに良く染まる Mito-tracker を用いた。観察は、まず蛍光顕微鏡観察を行い、その直後に同じ部位の軟 X線顕微鏡観察を行った。

Mito-tracker による蛍光像と同じ部位を軟 X線像により比較観察した結果を図4に示す。図4 (a)が「水の窓」波長で観察した軟 X線像で、その中心部に観察される粒構造がミトコンドリアである。これは同じ部位を蛍光像で撮像した図4 (b)において、図の中心部の点がほぼ同じ構造

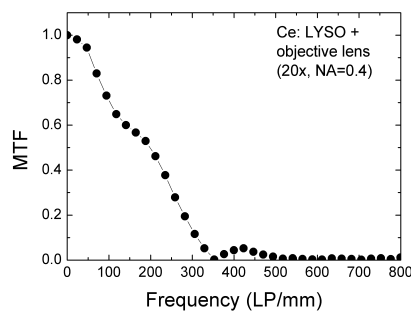


図 3：開発した密着型顕微鏡の MTF

を示していることから分かる。一方で、軟線像にはミトコンドリア以外の構造も反映されるため、すべての構造が対応するわけではない。同様の手法でミトコンドリアを特定し、より詳細な構造を観察した結果を図5に示す。こちらではミトコンドリアが粒状の構造としてはっきりと分別できることが示された。

### (3) 分光顕微像による構造とスペクトルの同定

水を含む「生きた」生物細胞の軟線像を撮像するために、最適な波長を決定するための分光顕微像実験を行った。実験は、4節と同様に細胞をSiNメンブレン上に培養・固定した後に、別なSiNメンブレンで覆い、細胞をメンブレンで封入した試料セルを用いて観察した。観察には、分子科学研究所 UVSOR の BL4U の走査型軟

線顕微鏡を用いた。封入した培養液が圧力差で漏れないように、測定真空槽内をHeで満たして観察した。光源としてアンジュレータを用い、分光器により単色化した軟線を Zone Plate 光学系により集光し、透過した光を光電子増倍管で検出する。Zone Plate の最外輪帯幅により集光径が決まり、ビームのスキャン幅により像の解像度が決まる。観察条件は、Step 幅: 300nm、波長: 2.9 ~ 3.1nm (395 ~ 430eV)、Exposure time: 5 sec/pixel、波長分解能:  $\frac{\Delta\lambda}{\lambda} \approx 2000$  であった。

397.8eV で撮像した透過軟線像を図6(a)に示す。細胞の周りの培養液での軟線の透過強度を入射強度として光学密度を求め、得られた結果をグレースケールで示した。星形に伸びた細胞膜とその中心にいくつかの大きなオルガネラと更にその周辺から右下の細胞膜にかけてたくさんの微小構造が存在するように見える。短波長のみでの撮影ではオルガネラの吸収コントラストに起因する構造が撮影されるが、試料の状

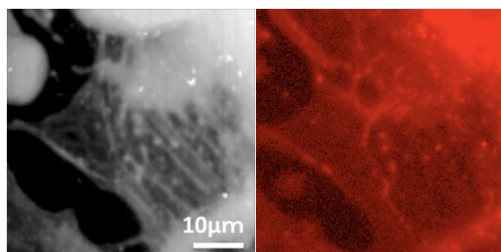


図4：左)細胞(精巢ライディッヒ細胞)の軟X線顕微鏡像、右)Mito-tracker染色後の同じ部位の蛍光顕微鏡像

態によってはコントラストが弱くなる。ここでは細胞や培養液の厚さなどに起因して単波長の撮影ではオルガネラ構造を明らかにするのは難しいため、M.Leroticらの方法に従い、多変量解析で使用される主成分分析とクラスター分析をデータに適用し、細胞内の主要な構造の分離とスペクトル構造の抽出を試みた。

主成分解析により得られた結果を図6(b)に示す。複数波長からの主成分を抜き出すことで、実験に伴うノイズなどを分離することが出来、微細なオルガネラ構造を明らかにすることが出来た。さらに個体間の類似度を測る尺度としてユークリッド距離を用いてクラスター分析を行った結果を図6(c)に中心の粒状構造がミトコンドリアを示す。個々のクラスター構造を同じ色で示した。得られた結果から、おおよそ中心部の構造とその周辺部の構造に分類されることが分かる。

最後にクラスター構造に対応する吸収スペクトルを分離した結果を図7に示す。図は対応するクラスター構造を図中図として描いた。図7(a)の場合は細胞周辺の培養液層を表わしており、この透過強度を入射光強度としているため、光

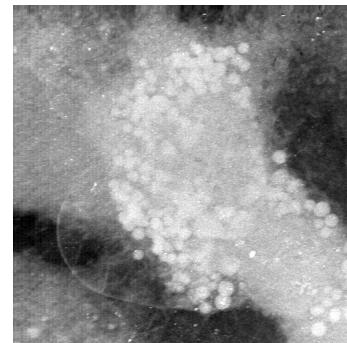


図5：詳細な軟線像。中心の粒状構造がミトコンドリア

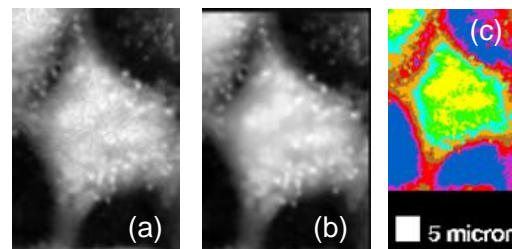


図6：a) 397.8eVでの透過軟線像、b) 窒素吸収端近傍の透過軟線像から得た主成分解析像。c) クラスター解析の結果得られた各クラスターの分布図。同色が同じクラスターを示す。

学密度として求めた場合にはほぼ0となり、得られた結果もそれに対応する。図 7(b)は細胞中心のオルガネラ構造を示しており、おおよそ細胞核に対応する構造と思われる。得られたスペクトル構造は、400eV 付近の鋭いピーク構造と404eV 付近に肩構造を伴う405eV を中心とする幅広いピーク構造を示す。その他に398eV 付近と402eV 付近に小さな構造が観察された。図 7(c)、図 7(d)では細胞核周辺の構造が分離されている。形状から、図 7(c)については細胞核周辺の構造をまとめたような構造となっており、形状からは対応するオルガネラを推定できなかった。図 7(d)の場合は細胞膜を主とする構造であると考えられる。いずれのスペクトル構造も図 7(b)で示した構造と類似するが、図 7(b)内で矢印により示した構造の強度に変化があることが分かる。

単体ヌクレオチドの N-K 吸収端における吸収

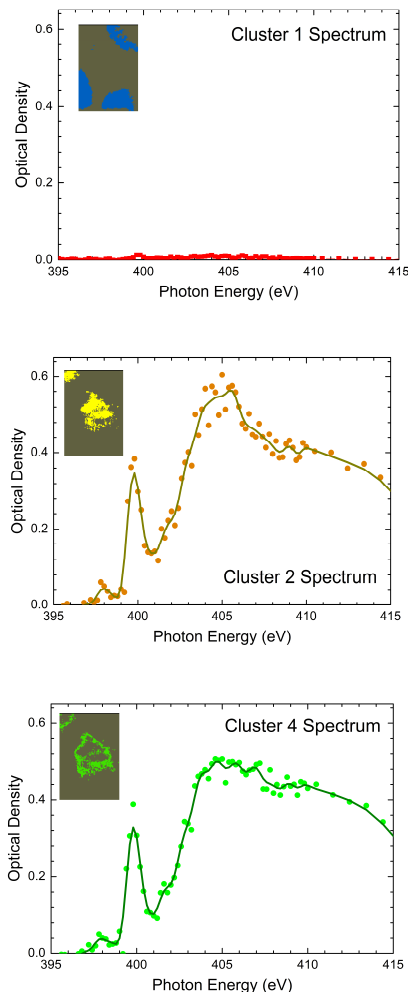


図 7: 各クラスターに対応する光学密度スペクトル。主要な構造のみ示した

スペクトルとの比較から、大きなピーク構造の同定を試みた。その結果、400eV 付近の構造は、窒素炭素間の結合に伴う構造であり、同様に405eV 付近の構造は構造と考えられる。一方で398eV、402eV、405eVの肩構造はそれらのa) 397.8eV での透過軟線像、b) 窒素吸収端近傍の透過軟線像から得た主成分解析像、c) クラスタ解析の結果得られた各クラスターの分布図。同色が同じクラスターを示す。構造に伴うサテライト構造と考えられるが、その起源についてはより詳細な解析が必要であることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

1. 江島丈雄、加道雅孝「「水の窓」波長域の軟線顕微鏡による生物細胞観測」O plus E 36(3), (2014) 296, 査読無.
2. K. Fukui, T. Ejima, et al., "Design and performance of a new VIS-VUV photoluminescence beamline at UVSOR-III", J. Synchrotron Rad. 21, (2014) 452-455, 査読有.
3. T. Ejima, et al., "Development of Soft X-ray Contact-type Microscope and Application to Micro-spectroscopy in Water-window", J. Phys.: Conf. Ser. 463, 012055 (2013). 査読有
4. T. Ejima, et al., "Chemical Shift Images of Organelles in Leydig cells of Mice Testes", J. Phys.: Conf. Ser. 463 012047 (2013), 査読有.
5. T. Ejima, et al., "Investigation of sample preparation methods for EUV imaging of fixed bio-cells", J. Phys.: Conf. Series, 425, 182007 (2013), 査読有.
6. T. Ejima, et al., "Development of soft X-ray contact microscope for in-situ identification of organelles", J. Phys.: Conf. Series, 425, 182008 (2013), 査読有.
7. M. Kado, et al., "Observation of organelle by a laser plasma X-ray microscope", AIP Conf. Proc. 1465,

- 246-250 (2012), 査読有.
8. 加道雅孝 「レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡で生きた細胞の内部を観る」、Isotope News、2012 年 8 月号、8-11, 査読無.
  9. 江島丈雄、「軟 X 線による超解像度光学顕微鏡の開発」、光アイアンス 23(4), (2012) pp. 1-4, 査読無.
  10. M. Kado, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda, et al., Proc. SPIE 8139, Advances in X-Ray/EUV Optics and Components VI, 81390O (September 28, 2011), 査読無.
  11. M. Kado, M. Ishino, S. Tamotsu, K. Yasuda, et al., AIP Conference Proceedings, 1365, 391-394 (2011), 査読無.
  12. M. Ishino, M. Kado, S. Tamotsu, K. Yasuda, et al., "Flash imaging of fine structures of cellular organelles by contact x-ray microscopy with a high intensity laser plasma x-ray source", Proc. SPIE 8139, Advances in X-Ray/EUV Optics and Components VI, 81390R (September 28, 2011) 査読無.

[学会発表](計 37 件)

1. T. Ejima, M. Yanagihara et al., "Development of a grazing-incidence condenser for large NA objective", The 12th Symposium on X-ray Imaging Optics, Osaka (Nov 18-20, 2013).
2. T. Ejima, M. Yanagihara, et al., "Development of a grazing-incidence condenser for SX microscope", The 38th International conference on Vacuum Ultraviolet and X-ray Physics, Hefei, China (12-19 July, 2013), H8.
3. T. Ejima, M. Yanagihara, et al., "Comparison of embedding and staining methods for bio-cell imaging in EUV region", The 11th international conference on x-ray microscopy, shanghai, China (Aug.

6-10, 2012), THU-P34

4. Y. Neichi, T. Ejima, F. Ishida, M. Yanagihara, M. Ishino, and M. Kado, "Development of SX contact microscope for in-situ observation of bio-cells", The 11th international conference on x-ray microscopy, shanghai, China (Aug. 6-10, 2012), THU-P35

以下省略

6. 研究組織

(1)研究代表者

江島 丈雄 (Ejima, Takeo)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：80261478

(2)研究分担者

加道 雅孝 (Kado, Masataka)

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究センター・研究主幹

研究者番号：30360431

柳原美廣 (Yanagihara, Mihiro)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：40174552

(3)連携研究者

保 智己 (Tamotsu, Satoshi)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・教授

研究者番号：60188448

安田恵子 (Yasuda, Keiko)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・准教授

研究者番号：80263424

石野 雅彦 (Ishino, Masahiko)

日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：80360410