

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21540517

研究課題名（和文）生細胞への高効率な X 線照射を実現する光源一体型試料ホルダーの開発

研究課題名（英文）Development of a specimen holder with a light source to realize highly efficient x-ray irradiation on biological cells

研究代表者

加道 雅孝（KADO MASATAKA）

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹

研究者番号：30360431

研究成果の概要（和文）：金の極薄膜ターゲットを用いた新型試料ホルダーを開発し、生細胞への高効率な X 線照射を実現することにより、培養中の生細胞の瞬時撮像を行った。細胞の位相差顕微鏡像、蛍光顕微鏡像、軟 X 線顕微鏡像を直接比較することにより、細胞内小器官の詳細な構造の解析を行った。その結果、細胞骨格とミトコンドリアの相関関係や細胞核内のクロマチン構造等が明らかとなった。このように、生きている細胞の生の状態での詳細な内部構造を高解像度で直接観察する手段を世界で初めて開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new specimen holder with a thin filmed gold target and observed live biological cells with flash exposure by realizing highly efficient x-ray irradiation. Comparing phase contrast images, fluorescent images, and soft x-ray images of the same biological cells directory, fine structures of cellular organelles have been analyzed. As a result strong correlation between cytoskeleton and mitochondria has been found and chromatin structures have been observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年			
度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：プラズマ科学

キーワード：プラズマ応用・X線顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の構造解析が盛んに行われ、生命現象を支えるタンパク質の分子レベルにおける構造と機能の解明が進んでいる。生命科学における次の課題は、その分子を機能的な構成要素とし、全体として高度の生命活動を営んでいる生命体そのものの構造と機能の解明である。そのためには、生きている試料を高い

空間分解能と時間分解能で観察する必要がある。レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡には高輝度で短時間露光が可能という特徴があり、その開発に成功すれば、電子顕微鏡や従来の X 線顕微鏡では困難であった細胞の全体像をナノ秒で瞬時に観察することが可能となる。

レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡の開発には、(a) X 線源の高輝度化、(b) X 線の効率的な細胞

照射が重要な開発課題である。(a)の X 線源の高輝度化に関する研究は、平成 18 年度の科研費基盤研究(C) (課題番号 18540398) において実施した。その研究成果は、2008 年 7 月 21 日から 25 日にスイスで開催された 9th International Conference on X-Ray Microscopy において発表を行った。残る課題は、(b)の効率的な細胞照射を実現することである。この問題を解決するため、レーザープラズマ軟 X 線源と一体となった試料ホルダーを開発することにより、従来にない高い効率での X 線の試料照射を実現する方法を提案した。

2. 研究の目的

X 線の瞬間露光による撮像の実現には大きく二つの利点がある。一つは、動きのある試料を固定することなく高い空間分解能で撮像出来ると言う点である。従来の光源では、細胞の撮像に数秒の時間を要するため、試料の動きによる空間分解能の低下が避けられず、試料の凍結や固定法等を用いる必要があった。二つ目は、放射線損傷の影響を受けないと言う点である。被写体である細胞は X 線の照射による損傷を免れない。レーザープラズマ X 線源による瞬間露光は、放射線損傷の影響が X 線像に現れるよりも早く撮像出来るため、放射線損傷の影響の無い像の取得が可能となる。

軟 X 線顕微鏡で水溶液中の生細胞を観察する場合、厚さ 100nm 程度の 2 枚の窒化シリコン薄膜で挟むことにより真空中で保持する。従来は、レーザープラズマ X 線源からの水の窓波長域軟 X 線をフレネルゾーンプレート等の X 線光学素子により試料上に集光照射していたが、集光光学素子による光量の損失が無視出来ない。X 線光学素子を使用せず、X 線源と試料ホルダーを一体化する方法を提案し、試料へのこれまでにない高い照射効率を実現する。この方法により、試料上において約 4 桁(1 万倍)の X 線光量の向上が見込まれる。この新しい方法を用いることにより水溶液中の生細胞の X 線瞬間撮像を実現する。

3. 研究の方法

(1)光源用ターゲット厚さの最適化

光源一体型試料ホルダーの開発に当たっては、窒化シリコン薄膜上に貼り付ける光源部分(炭素または金)の厚さの最適化が重要な研究課題となる。レーザーをターゲットに照射し、プラズマを生成したとき、発生した軟 X 線はターゲットを通過して試料に照射されるため、ターゲット部分が薄いほど効率良く照射出来る。しかし、ターゲットが薄すぎると、レーザーのパルス内ですべてプラズマ化してしまい、レーザーが直接試料を照射することになり試料が破壊されるという問題が生

じる。一方、ターゲットが厚すぎると光源表面に生成されたプラズマから発生した軟 X 線が吸収され、試料に到達出来ないだけでなく、ターゲットに吸収されたレーザーエネルギーが電子熱伝導によりターゲット内に拡散し、プラズマを効率良く加熱生成できないという問題が生じる。そこで、最大限の効率で軟 X 線を発生するためのターゲットの厚さの最適化を行う。

(2)軟 X 線源の計測

光源一体型試料ホルダーに用いる極薄膜ターゲットの表面にレーザーを集光照射し、プラズマを生成し、発生した軟 X 線の輝度を測定する。測定には、軟 X 線源の画像計測用に軟 X 線プラズマカメラと、スペクトル計測用に軟 X 線斜入射分光器を用いる。軟 X 線プラズマカメラは、独自に開発したもので、対物レンズに直径 1mm の大口径のフレネルゾーンプレートを用い、銀とチタンと窒化シリコンの三層のバンドパスフィルターを組み合わせたもので、従来の X 線ピンホールカメラに比べ 1000 倍以上の感度と 10 倍以上の空間分解能を持ち、軟 X 線源の詳細な計測が可能である。様々な厚さのターゲットをレーザー照射した際の軟 X 線輝度を計測することにより最適なターゲットの厚さを求める。

(3)生きた細胞の観察

光源一体型試料ホルダーを用いたレーザープラズマ軟 X 線顕微鏡を製作し、水溶液中の生細胞の X 線瞬間撮像を実施する。金の極薄膜ターゲットに関西光科学研究所の所有するパルス幅 600ps、波長 1.053 μm 、出力 20J の Nd:glass レーザーを集光照射して水の窓波長 X 線を発生させ、実際に X 線を細胞に照射することにより X 線瞬間撮像の実証実験を行う。試料として、マウスの精巣ライディッヒ細胞を用いる。

4. 研究成果

(1)光源一体型試料ホルダーの開発

生きたままの細胞の高い空間分解能での瞬間撮像を実現するために、レーザーのエネルギーを効率よく注入できる極薄膜ターゲットの開発を行った。厚さ 100nm の窒化シリコン薄膜上に厚さ 10nm から 50 μm まで段階的に厚さを変えて金を蒸着した極薄膜ターゲットの製作を行った。日本原子力研究開発機構が保有するパルス幅 600ps、出力 10J、波長 1.053 μm の Nd:glass レーザーを極薄膜ターゲットの金表面に集光照射し、発生する水の窓波長域(2.3~4.4nm)の軟 X 線の強度と光源のサイズ及び形状を斜入射型軟 X 線分光器と軟 X 線プラズマカメラにより計測を行った。ターゲット上でのレーザー強度は、約 $2 \times 10^{14} \text{W/cm}^2$ と見積もられた。通常、ターゲットの厚さが薄いほど効率良くレーザーのエネルギーをターゲットの極小領域に注入する

ことが可能であるが、レーザーパルスのコントラスト（レーザーパルスのピークとバックグラウンドの強度比）が小さい場合、パルスの主要部分が到達する前にターゲットが破壊されてしまうため、十分な薄さの実現が困難であった。我々が使用したレーザーシステムは前段部に OPCPA システムを導入することにより 10^6 以上の高いパルスコントラストを実現し、ターゲットの破壊を防いだ。図 1 に厚さ $50\mu\text{m}$ と厚さ 20nm の金ターゲットを高強度レーザーで照射し、生成したプラズマから発光する軟 X 線像を示した。その結果、金の厚さが 20nm の時に最大の X 線強度が得られることがわかった。

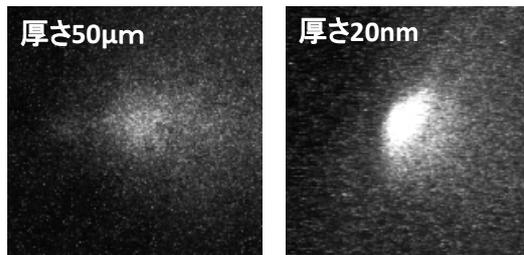


図 1. 厚さ $50\mu\text{m}$ (左)と厚さ 20nm (右)の金ターゲットからの軟 X 線発光

この極薄膜ターゲットを用いた試料ホルダーを製作した。その構造と写真を図 2 に示した。ステンレス製試料ホルダーは、生きたままの細胞をセットした状態で位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡、軟 X 線顕微鏡の各種顕微鏡により高解像度で観察出来るよう工夫を行った。

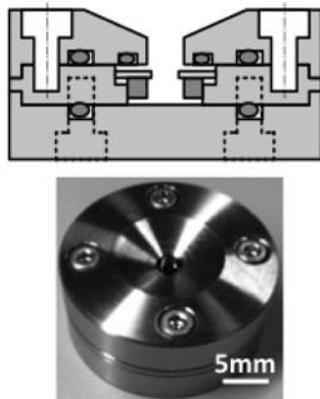


図 2. ステンレス製試料ホルダー

(2) 金の極薄膜ターゲットの性能試験

金の極薄膜ターゲットに関西光科学研究所の所有するパルス幅 600ps 、波長 $1.053\mu\text{m}$ 、出力 20J の Nd:glass レーザーを集光照射して水の窓波長 X 線を発生させ、実際に X 線を

細胞に照射することにより X 線瞬間撮像の実証実験を行った。試料として、マウスの精巣ライディッチ細胞を用いた。ライディッチ細胞は PMMA 上に直接細胞を培養した。図 3 に、生きたライディッチ細胞の X 線像を示す。細胞質の微細な構造や、核や核膜、核内部のヘテロクロマチンの構造などを明瞭に認めることが出来る。さらに核膜の部分拡大した写真を図 4 に示す。二つの矢印の先端に挟まれた核膜のもっとも薄い部分の厚さは、この写真から約 90nm であることがわかる。この結果から、少なくとも 90nm 以下の空間分解能が実現できていることがわかる。



図 3. 生きたライディッチ細胞の X 線像

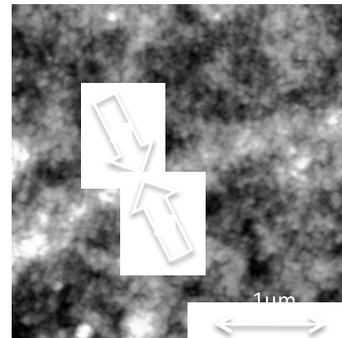


図 4. 核膜部分の拡大写真

(3) レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡の開発

X 線瞬間撮像で得られた細胞の細胞内器官を特定するために、同一細胞の軟 X 線像と蛍光像を取得し直接比較を試みた。細胞を窒化シリコン薄膜上に直接培養し、特定の細胞内器官を染色する蛍光染色を施した後、蛍光顕微鏡により観察を行った。蛍光色素として、アクチンフィラメントを特異的に染色するファロイジンとミトコンドリアを特異的に染色するマイトトラッカーを用いた。蛍光像を取得後、細胞を試料ホルダー内に封入し X 線照射を行った。得られた軟 X 線像をあらかじめ取得しておいた蛍光顕微鏡像と直接比較することにより、軟 X 線像で得られた細胞内構造

がどの細胞内器官に対応するのかを調べた。その結果を図5に示した。細胞は、あらかじめマイトラッカーで蛍光標識を施してあったので、蛍光顕微鏡像で明るく見えている構造はミトコンドリアに対応する。蛍光顕微鏡像と軟X線顕微鏡像を注意深く比較すると、どちらにも同じ場所に粒状の構造が確認でき、蛍光顕微鏡像の情報からこれらがミトコンドリアであることがわかった。蛍光顕微鏡では、蛍光標識を施した構造しか可視化されないのに対して、軟X線顕微鏡では原理的に全ての細胞内小器官が可視化される。例えば、この軟X線顕微鏡像では、蛍光顕微鏡像との比較から特定されたミトコンドリアの他に格子状の構造が確認されたが、これらはこれまでの観察から細胞骨格であることがわかった。図6に、軟X線顕微鏡像の拡大像を示した。この像では、ミトコンドリアと細胞骨格の構造を明瞭に確認することができる。この像から、ミトコンドリアと細胞骨格が密接に結びついている様子がわかった。

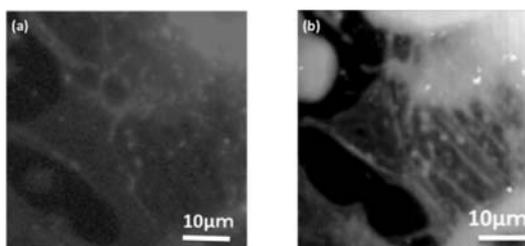


図5. マウスの精巣ライディッヒ細胞の蛍光顕微鏡像(a)と軟X線顕微鏡像(b)

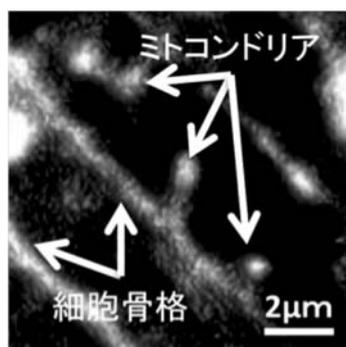


図6. 軟X線顕微鏡像の拡大像

(4)今後の展開

高強度レーザーを金の極薄膜ターゲットに集光することによって発生させた高輝度軟X線源とX線感光材上に細胞を直接培養し、軟X線光量の減衰の原因となるX線光学素子を用いずに細胞に軟X線を直接照射する密着型軟X線顕微鏡を組み合わせることにより、

世界で初めて、培養中の生きている細胞の細胞内小器官の詳細な構造を高解像度で観察できるレーザープラズマ軟X線顕微鏡を開発した。

レーザープラズマ軟X線顕微鏡の開発は、放射線を照射された細胞内の構造変化の観察による放射線影響の解明や、細胞の免疫機能発現、細胞内情報変換機構、たんぱく質の合成、染色体の遺伝情報の伝達等、広く生命現象を細胞レベルで理解する研究に役立つことが期待できる。さらに、これらの生命科学の基礎的な分野での利用だけでなく、癌細胞や神経細胞の変性過程等、病理学や薬理学などの医療の分野への利用も期待できる。将来的には分子レベルから組織レベルにまで対象を広げることにより、これまで、光学顕微鏡によって細胞が、電子顕微鏡によってウイルスが発見されたように、軟X線顕微鏡という新たな技術の開発は、生命の起源の解明にせまる、多くの新しい知見をもたらすと期待できる。

本研究成果は、平成23年8月17日に新聞発表を行い、朝日新聞、読売新聞、日本経済新聞、産経新聞、科学新聞等の主要各紙をはじめ、多数の新聞に掲載された。

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)

〔雑誌論文〕 (計6件)

- ① 石野雅彦、加道雅孝、他、Development of a specimen holder combined with ultra thin film laser plasma x-ray source for compact contact-type soft x-ray microscope to observe hydrated living biological cells、Proceeding of SPIE、査読無し、Vol.8139、2011、pp.81390R1-7、DOI:10.1117/12.892864.
- ② 加道雅孝、他、Observation of Organelles in Leydig Cells by Contact Soft X-Ray Microscopy with a Laser Plasma X-Ray Source、AIP Conference Proceeding、査読有り、Vol.1365、2011、pp.391-394、DOI:10.1063/1.3625385.
- ③ 加道雅孝、他、Flash imaging of fine structures of cellular organelles by contact x-ray microscopy with a high intensity laser plasma x-ray source、Proceeding of SPIE、査読無し、Vol.8139、2010、pp.81390O1-7、DOI:10.1117/12.892438.
- ④ 石野雅彦、加道雅孝、他、Observations of the intense soft x-ray emissions from ultra thin Au films irradiated

with high contrast laser pulses、
Proceedings of SPIE、査読無し、
Vol.7589、2010、pp.75891B-75891B-8、
DOI:10.1117/12.839945.

- ⑤ 加道雅孝、石野雅彦、他、Observation of actin filaments in Leydig cells with a contact-type soft x-ray microscope with laser plasma x-ray source、電気学会論文誌C、査読有り、Vol.130、2010、pp.1774-1778、
DOI:10.1088/1742-6596/130/1/012031 .
- ⑥ 加道雅孝、他、Development of a soft x-ray plasma camera with a Fresnel zone plate to image laser produced plasmas、Journal of Physics: Conference Series、査読無し、Vol.186、2009、pp. 012031-012034、
DOI: 10.1541/ieejieiss.130.1774.

〔学会発表〕（計13件）

- ① 加道雅孝、極薄膜ターゲットを用いた高輝度軟 X 線源の開発、日本物理学会第 67 回年次大会、2012 年 3 月 25 日、兵庫県西宮市。
- ② 加道雅孝、水の窓波長 X 線を用いた軟 X 線顕微鏡による生細胞のその場観察、電顕技術開発若手研究部会 第 3 回ワークショップ、2012 年 1 月 6 日、愛知県名古屋市（招待講演）。
- ③ 加道雅孝、レーザープラズマ軟 X 線を用いた密着型顕微鏡による細胞内小器官の観察、平成 23 年度レーザー励起 X 線源とその応用研究会、2011 年 12 月 9 日、静岡県熱海市。
- ④ 加道雅孝、レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡による細胞内器官の構造解析 II、日本物理学会 2011 年秋季大会、2011 年 9 月 21 日、富山県富山市。
- ⑤ 加道雅孝、Flash imaging of fine structures of cellular organelles by contact x-ray microscopy with a high intensity laser plasma x-ray source、SPIE 2011 Optics+Photonics、2011 年 8 月 24 日、サンディエゴ（米国）。
- ⑥ 石野雅彦、Development of a specimen holder combined with ultra thin film laser plasma x-ray source for compact contact-type soft x-ray microscope to observe hydrated living biological cells、SPIE 2011 Optics+Photonics、2011 年 8 月 24 日、サンディエゴ（米国）。
- ⑦ 加道雅孝、レーザープラズマ軟 X 線による細胞内器官の観察、レーザー学会専門委員会 第 5 回委員会、2011 年 6 月 24 日、大阪府吹田市（招待講演）。

- ⑧ 加道雅孝、レーザープラズマ X 線源を用いた密着型軟 X 線顕微鏡による細胞内器官の観察、第 24 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、サテライトシンポジウム、2011 年 1 月 11 日、茨城県つくば市（招待講演）。
- ⑨ 加道雅孝、極薄膜ターゲットを用いた高輝度軟 X 線源の開発、平成 22 年度レーザープラズマ粒子加速研究会、2010 年 12 月 7 日、静岡県浜松市。
- ⑩ 加道雅孝、Recent progress on plasma x-ray laser and its application at JAEA、3rd Photonics and OptoElectronics Meetings、2010 年 11 月 4 日、武漢（中国）（招待講演）。
- ⑪ 加道雅孝、Observation of Organelles in Leydig Cells by Contact Soft X-Ray Microscopy with a Laser Plasma X-Ray Source、10th International Conference on X-Ray Microscopy、2010 年 8 月 19 日、シカゴ（米国）。
- ⑫ 加道雅孝、軟 X 線による生体試料イメージング II 細胞内器官のイメージング、日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会、2010 年 5 月 25 日、愛知県名古屋市。
- ⑬ 石野雅彦、Observations of the intense soft x-ray emissions from ultra thin Au films irradiated with high contrast laser pulses、SPIE Photonics West 2010、2010 年 1 月 23-29 日、サンフランシスコ（米国）。

〔その他〕

- ① プレス発表：
「初めて見た 生きた細胞の超微細構造の観察に成功 -夢の顕微鏡：レーザープラズマ軟 X 線顕微鏡の開発で実現-」、2011 年 8 月 17 日、大阪科学・大学記者クラブ
(<http://www.jaea.go.jp/02/press2011/p11081701/index.html>)
- ② 平成 23 年度大阪ニュークリアサイエンス協会賞（応用研究・開発部門）受賞
「レーザー励起 X 線源を用いた軟 X 線顕微鏡による細胞内小器官のその場観察技術の開発」
(<http://homepage2.nifty.com/onsa/jusyousya.htm>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加道 雅孝 (KADO MASATAKA)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号：30360431

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
石野 雅彦 (ISHINO MASAHIKO)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量
子ビーム応用研究部門・研究副主幹
研究者番号：80360410