

## 生物細胞の極紫外イメージングのための固定試料作製法の検討 Investigation of fixed-sample preparation method for EUV imaging of bio-cells

江島丈雄\*、根市侑太郎、石田史彦、柳原美廣  
東北大学多元物質科学研究所、〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1

### 1 はじめに

極紫外領域における直入射反射光学系の収差は、直入射反射光学系が凹面鏡と凸面鏡を持っているため、容易に補正が可能である。そのため直入射反射光学系は、収差補正による広い視野と使用波長の短さによる高い空間分解能を両立させることができる。視野と空間分解能が両立可能であることから、極紫外領域における直入射反射光学系は半導体産業における縮小露光装置や天体観察用の望遠鏡などに応用されている[1]。

一方で視野と空間分解能が両立した顕微鏡は、生物観察においても非常に有用な観察ツールとなる。例えば、脳における神経細胞はシナプスを介して神経細胞同士が回路を構成し、その回路に基づき複雑な機能を実現している、と考えられている。しかしその回路を実現するには実際に脳を観察して回路を明らかにする必要がある(コネクトーム計画) [2]。このような観察を行うためには、固定した脳に対し、シナプスを分解するだけの空間分解能(数 10nm)と脳を観察できるだけ少ない画像で解析できる視野(数  $100 \times$  数  $100 \mu\text{m}^2$ )が必要となる。

既に開発された波長 13.5nm における露光機[3]や顕微鏡[4]は、この大脳皮質観察に必要な視野と空間分解能を十分に備えている。従来この波長域は、生物構成元素の吸収端から外れているため、観察には不向きであると考えられてきた。しかし、実際は生物構成元素の吸収断面積の差が大きいいため、観察に必要な透過像のコントラストは十分に確保できると考えられる[5]。一方で、酸素による吸収が強いため、細胞程度の厚さの試料を透過できない、という問題が存在する[5]。

強すぎる酸素の吸収を減らす簡便な方法は、細胞中に含まれる水を除去し、その薄切を行うことである。この方法を採用すれば、試料全体の透過率が上がり、かつ炭素と窒素によるコントラストが確保できる。一方で、この波長域での生物細胞観察例が少なく、十分なコントラストを確保するための試料厚さ、固定方法、染色方法が分からない。今回は、水分量を減らす試料作製法として電子顕微鏡観察用の試料作製方法を採用し、その中で最適な試料厚さ、固定方法、染色方法を比較する。

### 2 固定細胞観察のための条件探索

#### 2-1 最適試料厚さの決定

まず試料厚さと染色法の異なる試料を撮影し、コントラスト、透過率を評価し、最適な試料厚さを求めることにした。測定試料にはマウスの大脳皮質を用いた。2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、1%四酸化オスミウムによって固定し、Reynolds 法[6]によりブロック染色(以降、ブロック染色試料と呼ぶ)した。その後脱水・包埋後、ウルトラマイクロトームにより 200 nm と 500 nm に薄切した。薄切した後、ブロック染色のままの試料と、更に Reynolds 法で再度染色[6]を行った試料(以降、電子染色試料と呼ぶ)の計 4 種類の試料を用意した。

用意した試料はそれぞれ我々の開発した透過型の軟 X 線顕微鏡 TXM<sup>3</sup> を用いて[4]、YAG レーザー 20shot (10 shot/sec) 露光して得られた像を 5 枚撮像し、それらを平均して軟 X 線透過画像とした。得られた画像は、同様に撮影した I<sub>0</sub> 像で規格化し、透過率像とした。その結果、オルガネラの判別が可能でコントラストを得ることができた。

得られた透過率像からオルガネラとして核を、透過率の基準として血管を選び、それぞれの透過率から核のコントラストを求めた。さらに、得られた透過率と試料厚から、それぞれの吸収係数  $\alpha$  を求め、試料厚によるコントラスト C と透過率 T の変化を計算で算出した。得られた試料の透過率 T とコントラスト C を図 1 に示す。得られた結果から、透過率を高くするとコントラストが下がり、透過率を低くするとコントラストが上がるのが分かる。また、染色法が異なってもおおよそ 400nm 前後の厚さで透過率とコントラストが均衡した。

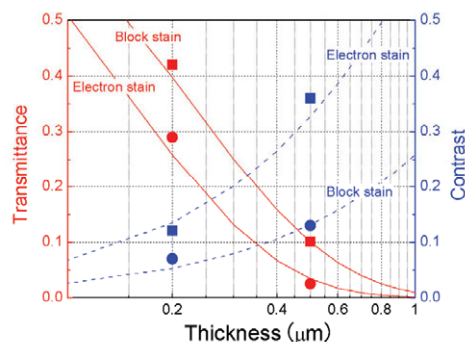


図 1: ブロック染色と電子染色したラット肝臓の 200nm 厚試料と 500nm 厚試料における生物核の透過率(赤実線)と血管に対するコントラスト(青破線)

2-2. 各オルガネラの透過率とコントラスト

2-1 節の結果に基づき厚さを 400 nm と固定し、2 つの異なる準備法で作製したラットの肝細胞の主要なオルガネラの透過率、コントラストの比較を行った。作製したラットの肝細胞は、酢酸ウラニル染色法を用いて染色した試料[7]と、染色を避けるために、染色作用のある重金属を含む薬剤を使用せずに固定、包埋した試料[8]、の 2 つである。測定には、我々の開発した密着型顕微鏡を用いた。光源には Photon Factory BL11D ビームラインを用い、 $\lambda/\Delta\lambda = 500$ 、露光時間 40 ~ 360 秒で、波長を変えて測定を行った。得られた透過像は露光時間で規格化した後、2-1 節と同様の手順により透過率像を得た。

それぞれの試料を観察した結果を図 2 に、すべての試料の透過率とコントラストを図 3 に示す。ウラニル染色試料では、非染色試料に比べて透過率のばらつきが小さくオルガネラ毎のコントラストの差の小さい 2 値画像のような像が得られた。一方、非染色試料ではオルガネラ毎に異なる透過率と異なるコントラストの像が得られた。

2-3. 細胞核における透過率の波長依存

2-2 節の結果から、オルガネラの相違より試料準備法の違いが像の質に与える影響が大きいと考え、比較するオルガネラを細胞核に絞って、各種の試料準備法の比較を行った。試料の作製法については、表中の reference を参照してほしい。

測定を行った試料を表 1 に示す。測定条件は 2-2 節と同じである。測定の結果、得られた細胞核の透過率を図 4 に示す。測定した試料のうち、サンプル D のエポキシ包埋を行って染色を行わなかった試料に関しては、オルガネラが区別できず、透過率を得ることができなかった。それ以外の試料は、すべて波長が長くなるにつれて、透過率が単調に減少した。これは、試料を構成する元素が測定した波長域で内殻準位を持たないことによる。酢酸ウラニルで染色した試料だけは、波長域 10nm 付近で透過率の減少の程度が増し、12~13nm で増減を繰り返し、ピーク構造を 2 つ示した。この構造は、染色に用いたウラン元素の内殻 O<sub>4,5</sub> 吸収端による構造と考えられる。

コントラストを求める際の比較対象とした血管の

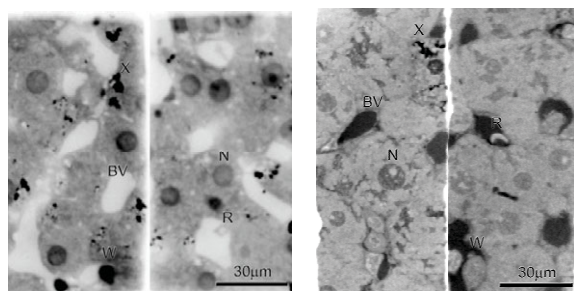


図 2 : a) TXM<sup>3</sup> で撮影した非染色のラット肝細胞 (左)、b) ウラニル染色したラット肝細胞 (右)。N:核、BV:血管、W:洞様血管壁細胞、R:赤血球、X:不明

透過率は、ほぼ図 4 の細胞核と同じスペクトル形状を示した。その中で酢酸ウラニルだけは比較的高い透過率を示した。しかし細胞核で観察された U-O<sub>4,5</sub> 吸収端構造はほとんど観測されなかった。

3 評価関数による試料作製法の評価

実験結果に基づき最適な試料条件を決定するための評価関数を導入する。今、CCD 上に結像された物体が像として認識される場合を考えると、その物体像は背景像に対してコントラストがついていなければならない。これを背景の光子数に対する物体の光子数の差で表し、両者のコントラスト  $C$  とその平均光子数  $\bar{N}$  を用いて

$$2C\bar{N}$$

と近似する。今、検出される光子数が十分多いと仮定すると、物体像のノイズは光子数の揺らぎ  $\sigma_N$  によって表される。検出される光子はポアソン分布に従うので、その標準偏差  $\sqrt{N}$  が光子数の揺らぎ  $\sigma_N$  を表す[27]。この時の SN 比は、

$$SN = \frac{2C\bar{N}}{\sqrt{N}} = 2C\sqrt{N}$$

と表される。平均光子数  $\bar{N}$  は、照明光強度、光学系のスループット、試料透過率  $T$ 、露光時間に依存するが、照明光強度、露光時間などを一定と仮定すると、平均光子数は試料の透過率に比例する。よって平均光子数を試料透過率  $T$  に置き換えると、SN 比は

$$SN \propto C\sqrt{T}$$

となり、コントラスト  $C$  と透過率  $T$  で表すことができる。以降これを評価関数と呼ぶ。

	Uranyl acetate stain	Lead citrate stain	Hematoxylin stain	Non stain
Epoxy embedding	A [7]	B [6]	C [9]	D [10]
Acrylic embedding	×	×	×	E [8]

表 1 : 測定したラットの肝細胞の包埋法、染色法一瞥。試料厚さはすべて 400nm。

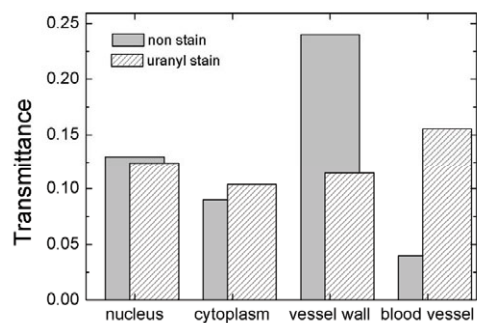


図 3 : 図 2 の軟 X 線像から求めた核、細胞質、血管壁細胞、血管の透過率。

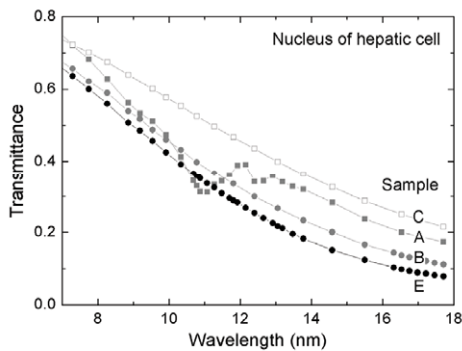


図4：各種試料における細胞核の透過率。

評価関数  $C\sqrt{T}$  を用いて最適な試料膜厚を評価する。図 1 に示した透過率と試料厚から、それぞれの染色法における生物核と血管の吸収係数  $\alpha$  を求め、試料厚によるコントラスト  $C$  と透過率  $T$  の変化を計算した。以降、コントラストの基準はすべて血管の透過率である。得られた結果から評価関数を求めた結果を図 4 に示す。得られた曲線は、膜厚が増えるに従って SN 比が良くなり、最大値を示した後に減少する。それぞれの試料における SN 比が最大となる試料厚  $d$  は、ブロック染色試料の場合が 300~700nm で、ブロック染色+電子染色試料が 200~500nm であった。両染色法に共通する試料厚さとして 300~500nm が得られた。

同様に、試料厚さ 400nm に固定したウラニル染色とアクリル包埋をした2つのマウス肝臓試料について、それぞれのオルガネラにおける評価関数  $C\sqrt{T}$  を算出した。得られた結果を図 5 に示す。アクリル包埋試料はウラン染色試料よりも、各小器官において高い SN 比が得られた。これは、波長 13.5nm の軟 X 線にはウラン染色を行った試料よりも非染色試料の方が観察に適していることを意味している。

図 6 の評価関数の比較から、オルガネラの差よりも染色法の差の方が大きな違いがみられたことから、図 4 の細胞核における各染色法の評価関数の違いを図 7 にプロットした。得られた結果から、アクリル包埋のみで染色を行わなかった試料が波長 7~14.5nm の範囲で高い値を示した。また 14.5~18nm

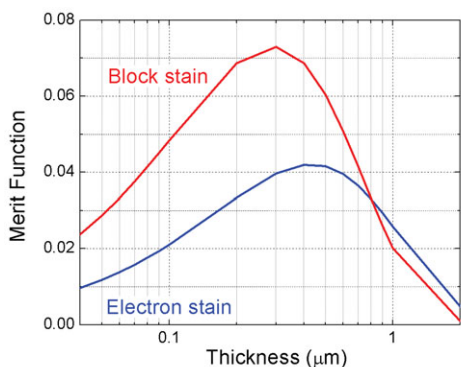


図5：図 1 から求めた各染色法の評価関数

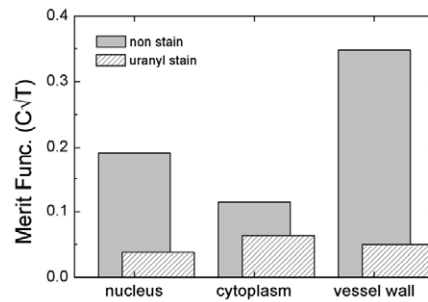


図6：図3から求めた波長13.5nmにおける評価関数

間では、Reynolds 法による鉛染色が良い値を示した。以上から、極紫外領域における透過像観察用の試料は、波長により最適な試料準備法が異なると考えられる。

#### 4 考察

2 節の実験結果から、極紫外域において透過像により生物細胞を観察する際に、①最適な試料厚さは、透過型電子顕微鏡を用いて観察する場合の最適な厚さより 6~7 倍程度厚いこと、②乾燥・固定のみで染色しない試料を用いた観察が、より高いコントラストと、バックグラウンドに対してより多い光子数を与えること、が明らかとなった。

最適な試料厚さは、当初実験結果に基づき透過率とコントラストがほぼ等しい膜厚を選択した結果である。その後、3 節において導入した評価関数による評価結果から、この選択が、検出器に到達する光子数がバックグラウンドに対して十分大きくかつオルガネラ間のコントラストが最も大きくなる条件であることを示した。以上から、像の評価をする際の簡便な指標として、図 1 のように透過率とコントラストが同程度に寄与する画像を選べばよいことが考えられる。

非染色試料が②のような結果を得たのは、もともと生物を構成する元素の吸収が極紫外域で大きいことと、かつ観察した生物細胞内のオルガネラ間に大きな密度の差があるためである。一方で酢酸ウラニルなどの重金属で染色した場合の試料観察は、金属による吸収が大きく、かつ金属が特定のタンパク質を通してオルガネラと結びつくため、得られた画像は 2 値画像のような像となった。

また②の結果を得た際に導入した評価関数は、任意の 2 つの物体間の光子数とコントラストのみに注目し、それらの物体間の空間的スケールは任意であった。今回は比較的視認しやすい大きなオルガネラを選んで評価したため、そのオルガネラ間の距離は空間分解能よりもかなり大きい。従って得られた結果は、比較的大きなオルガネラ間の視認性のみに基づいている。今後、サンプル作製法に空間分解能程度の視認性を要求する場合には、物体間の距離を含んだ評価関数の方が望ましい。そのような試料では、むしろ今回はあまり評価の高くなかった染色試料の

方が、よい結果を与える可能性もある。このような評価関数には、例えば空間周波数に対するパワー値などを用いると良いだろう。

に包埋。ウルトラマイクロトームにより 400nm に薄切した。

\* ejima@tagen.tohoku.ac.jp

## 5 まとめ

従来軟 X 線顕微鏡の開発の動機は「水の窓」波長域における「生きた」生物細胞観察であったが、得られた結果は、波長 13.5nm で動作する軟 X 線顕微鏡が固定生物細胞観察に応用できることを示している。このような顕微鏡は、EUVL 技術の進展により、徐々に入手可能になると考えられるので、今後生物系への応用が期待される。今回の結果は、そのような観察には単純な電子顕微鏡用試料で観察するよりもっと情報量の多い試料作製法があることを示した。このような観察はコネクトーム計画のような、多くの細胞試料を広視野、高空間分解能で撮像しなければならない分野に最適な方法となるだろう。

## 謝辞

東北大学医学系研究科の河和善准教授、東京大学総括プロジェクト機構の水谷治央助教には試料を提供していただきました。また東北大学医学系研究科共通機器室の皆様には、試料作製についての多大なる御指導と御支援をして頂きました。ここに記して深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] [1] D. Attwood, Soft X-rays and extreme ultraviolet radiation, (Cambridge University Press, Cambridge, 2000) Chap.4.
- [2] O. Sporns, G. Tononi, and R. Kötter, PLoS Comput. Biol. 1, (2005) e42.
- [3] P. P. Naulleau, K. A. Goldberg, E. Anderson, J. P. Cain, P. Denham, K. Jackson, A.-S. Morlens, S. Rekawa, and F. Salmassi, J. Vac. Sci. Technol. B 22(6), 2962-2965.
- [4] T. Ejima, F. Ishida, H. Murata, M. Toyoda, T. Harada, T. Tsuru, T. Hatano, M. Yanagihara, M. Yamamoto, and H. Mizutani, Opt. Exp. 18, (2010) 7203-7209.
- [5] <http://henke.lbl.gov/cgi-bin/mldata.pl>
- [6] E. S. Reynolds, J. Cell Biol., 17 (1963) 325.
- [7] 4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、1%四酸化オスミウムによって固定した後、1%酢酸ウラニルによりブロック染色する。その後エタノールにより脱水し、エポキシ樹脂に包埋後、ウルトラマイクロトームにより 400nm に薄切した。
- [8] 四酸化オスミウムによる固定を行った後、4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドによって更に固定し、アクリル樹脂に包埋した。
- [9] P. Mayer, Mitt Zool Stat Neapel, 10 (1981), 170-186.
- [10] 4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、1%四酸化オスミウムによって固定した後、エタノールにより脱水し、エポキシ樹脂