

その場観察可能な密着型軟X線顕微鏡の開発 Development of contact SX microscope for in-situ observation of bio-cells

江島丈雄^{1*}、根市侑太郎¹、柳原美廣¹

¹ 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

可視光学顕微鏡は、結像光学系の回折限界から、生物細胞中の 200 nm より小さな構造の観察は難しい。そのため可視領域で 200nm 以下の構造を観察するに、様々な間接的な観察手法が開発されてきた。例えば蛍光法は、特定のタンパク質を染色しオルガネラの種類とその位置をその発光色により特定することができる。また透明でコントラストの弱い細胞については、位相差を観察することにその形状を明らかにする微分干渉法が考えられてきた。また市販の可視光学顕微鏡ユニットの多くには、透過像、反射像、暗視野像、微分干渉像、蛍光像などの複数の観察手法が搭載されている。これらの観察手法を用いた観察により、可視領域では多くの生物細胞内のオルガネラ構造とその機能に対する知見の蓄積がある[1]。

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。最近では、放射光光源を用いた Zone Plate 型顕微鏡(ZPM)により、数 10nm の空間分解能が達成されるようになった[2]。これらの顕微鏡を用いて「水の窓」や「炭素の窓」波長領域において生物細胞を観察すると、この波長域では水に対して透明で炭素、窒素による吸収が大きく、そのコントラストにより対象を観察するので、大きな構造は可視領域と同じ形状を示すものの、小さいオルガネラ構造は可視領域と軟X線領域で異なる形状を示すことが多い。先に述べたように、数多くの生物細胞試料は可視光学顕微鏡を用いて観察されてきたため、軟X線顕微鏡により構造の同定を行う場合でも、これらの可視光学顕微鏡観察の知見が利用できることが望ましい。

一方で、物質を構成する原子の内殻吸収端近傍では、物質の電子状態に応じて、吸収スペクトルが固有のピーク位置と固有のスペクトル形状を示す。水の窓領域の C, N, O 原子の K 殻吸収端近傍でも同様と考えられ、生物細胞内のオルガネラの吸収スペクトルが測定できれば、オルガネラ毎に異なる吸収スペクトルが得られるものと考えられる。そのためにはオルガネラのサイズに合わせて ϕ 1 μ m 以下の軟X線ビームをオルガネラに照射する必要があるが、そのようなマイクロビームを作り出すことは困難である。また、波長ごとの像から吸収スペクトルを得る方法も存在するが、ZPM 型の結像光学系は波長に

よりその焦点位置が変わるため[3]、同一試料に対する波長を変えた測定は手間が必要である。

我々は可視像と軟X線像の比較がし易くかつ波長を変えた測定が容易な軟X線顕微鏡として、これまで開発してきた軟X線用 2 次元検出器 (SXV-IC) [4]を基に、新たに密着型の軟X線顕微鏡を開発した。開発した顕微鏡は、軟X線に対する結像光学系が省略されており、軟X線を用いる動機のひとつである高い空間分解能を備えていない。一方で、可視顕微鏡との共存が可能であること、観察波長に高い柔軟性を持つことから、これまでの知見に基づいた軟X線によるオルガネラ構造観察が可能である。本稿では、その詳細について述べる。

2 密着型軟X線顕微鏡の性能評価

開発した顕微鏡の概略を図1に示す。まず図の左側から試料に向かって軟X線を照射する。試料を透過して場所ごとに異なる強度の軟X線は、シンチレーターにより可視像に変換される。さらに変換された可視像はシンチレーターを透過して可視用の対物レンズにより拡大・結像され、CCDにより画像として取得される。照射光を可視光にした場合もほぼ同様に像を読みだすことが可能である。

密着型顕微鏡では、測定する試料をシンチレーターに押し付けて、軟X線を照射してできた影を観察する。試料とシンチレーターが密着する程度により得られる像の鮮明度が異なるので、試料とシンチレーターは極力密着していることが望ましい。培養液中の生物細胞などの液体試料を計測するために新たに試料ホルダーを作製した。

図1に示すように、作製した試料ホルダーは測定する試料を SiN メンブレンとシンチレーターで挟む構造をしている。ステンレス板に接着したメンブレン

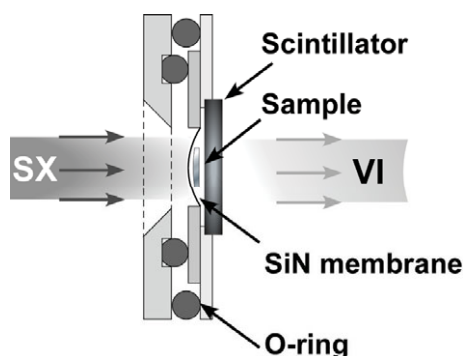


図1：作製した試料ホルダー概略

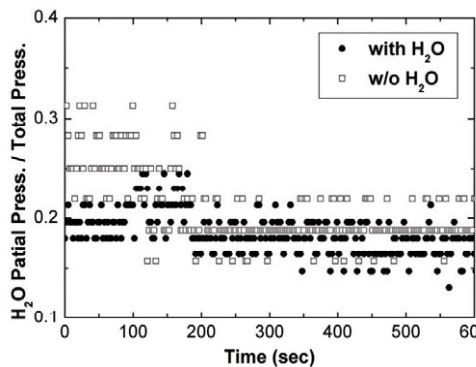


図2：試料ホルダーからのリーク量測定

ンとシンチレーターをO-リングを介して試料台に押し付け、試料となる液体が漏れないようにした。

試料ホルダーから溶液のリークの有無を確かめるために、試料ホルダー内に水を入れ真空槽内に置いて、真空槽内の水分子の分圧の変化を測定した。測定は、エントリーロックを備えた真空槽内に4重極質量分析計(CANNON-ANELVA, M-101QA-TDM)を取り付け、試料ホルダーを入れる前の水分子の分圧と、エントリーロックを通して試料ホルダーを入れた後の水分子の分圧を測定した。真空槽内の圧力は、試料ホルダーを入れる前が 2.3×10^{-6} Paで、入れた後が 4.4×10^{-6} Paであった。また測定後に試料ホルダー内に封入した水が残留していることを確認した。

測定した水分子の分圧の変化を、全圧に対する分圧の割合としてプロットしたグラフを図2に示す。横軸は、試料ホルダーの導入直後を0分として経過した時間を示す。グラフから、導入直後の圧力の安定しない時間帯を除くと、試料ホルダーの有無による全圧に対する水分子の圧力の変化は無視できる。

試料を透過してできた軟X線像は、シンチレーターにより可視像に変換され、変換された可視像を光学顕微鏡により読みだす。波長 λ_{sx} の軟X線に対する顕微鏡の感度 $Q(\lambda_{\text{sx}})$ は、シンチレーターの量子効率 $q(\lambda_{\text{sx}})$ 、対物レンズの開口数 NA 、シンチレーターの発光波長 λ_s に対する対物レンズの透過率 $T_{\text{obj}}(\lambda_s)$ 、光学窓の透過率 $T_w(\lambda_s)$ 、結像レンズの透過率 $T_l(\lambda_s)$ 、CCDの量子効率 $q_{\text{CCD}}(\lambda_s)$ を用いて、

$$Q(\lambda_{\text{sx}}) = q(\lambda_{\text{sx}}) T_{\text{obj}}(\lambda_s) T_w(\lambda_s) T_l(\lambda_s) q_{\text{CCD}}(\lambda_s) \times \{1 - (1 - NA^2)^{1/2}\}$$

と与えられる。このうち、 $q(\lambda_{\text{sx}})$ 以外のパラメータは既知で、かつ対物レンズの透過率 $T_{\text{obj}}(\lambda_s)$ 、光学窓の透過率 $T_w(\lambda_s)$ 、結像レンズの透過率 $T_l(\lambda_s)$ は十分に高く無視できる。またシンチレーターの発光波長に対するCCDの量子効率 $q_{\text{CCD}}(\lambda_s)$ は63%と分かっている[6]。従って、顕微鏡全体の量子効率はほぼシンチレーターの量子効率に依存と考えられる。

潮解性がなく、軟X線領域における量子効率の高いシンチレーターとしてCe:LYSO(株式会社オキサ

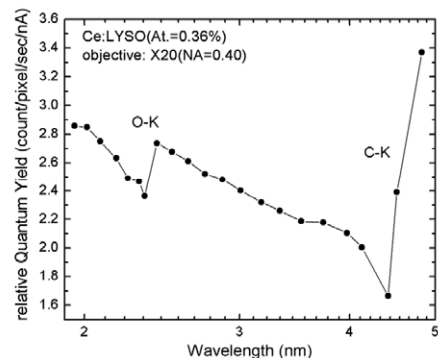


図3：Ce:LYSOの相対量子効率

イド)を選び、両面を光学研磨して用いた。軟X線を照射して発光した光を無限遠補正の対物レンズ(20 \times , NA=0.4)(ユニオン光学)と結像レンズ(ユニオン光学)を用いて拡大し、CCDカメラ(浜松ホトニクス)により像を得た。顕微鏡の感度測定にはPhoton Factory BL11Dビームラインを用い、波長分解能500、露光時間は5~30秒、波長は2~20nmで測定を行った。

得られた相対量子効率を図3に示す。得られた曲線の形状は、波長2.3nm付近で不連続なギャップ構造を示し、波長3~3.7nmの範囲では大きなディップ構造を、波長4.3nm付近では再びギャップ構造を示した。さらに測定曲線は、7nm付近で最大値を示したのち、20nmにかけて緩やかに減少した。このうち、波長2.3nmで観察されたギャップは酸素のK吸収端、波長3~3.7nmで見られるディップ構造はYのM吸収端、波長4.3nmのギャップ構造は炭素のK吸収端と考えられる。このうち酸素とY原子はそれぞれシンチレーターに含まれるため、intrinsicな構造である。一方で、炭素は基板洗浄の際に用いた有機溶剤が表面に残ったためextrinsicな構造、と考えられる。また相対量子効率が波長7nm付近で最大値を示し、長波長側に向かってなだらかに減少していくのは、過去の測定結果と一致した[4]。

次に空間分解能を評価するため、水中のポリスチレン球(平均粒径0.52 μ m)の観察を行った。測定は相対量子効率測定と同様に行い、観察波長範囲は4.4nm~2.1nm、波長分解能 $\lambda/\Delta\lambda=500$ 、露光時間は240~300secであった。540eVで撮像したポリスチレン球の像を図4(a)に示す。図の白い部分が水で、黒い点がポリスチレン球である。露光している間黒点が移動しなかったことから、ポリスチレン球はシンチレーターに付着しているものと考えられる。

図4(a)の黒点の強度プロファイルを作製し、平均処理した結果を図5(b)中の黒点で示す。また得られた強度プロファイルをGaussianでフィッティングした結果が図2(b)中の実線である。フィッティング結果からGaussianの半値半幅は0.72 μ mとなった。この値は、対物レンズの開口数0.4とシンチレーターの発光波長450nmを用いてレーリー条件から推定さ

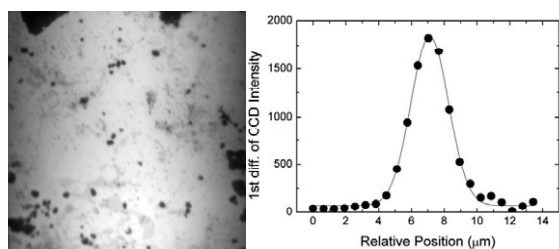


図4：a) 520eV で撮像したポリスチレン球 (右)、b) ポリスチレン球の強度プロファイルから求めた空間分解能 (左)

れる対物レンズの回折限界における空間分解能の値 $0.69 \mu\text{m}$ とほぼ一致する。

3 測定例

作製した密着型顕微鏡を使用して、得られた像から吸収スペクトルを求めた例を示す。用いた試料は空間分解能評価に用いたポリスチレン球で、空間分解能評価と同じ測定条件で撮影を行った。光源を直接観察して光強度を求め、次に水中のポリスチレン球を観察したのち、それぞれの測定結果からバックグラウンドを差し引き、露光時間と光強度で規格化したポリスチレン球の透過率像を求めた。次に、試料に干渉がないと仮定して透過率像を求めた後、図4に示した黒い点の部分、白い部分の水について透過率を波長ごとに求めて、透過スペクトルを求めた。

得られた透過スペクトルを図5に示す。それぞれ低エネルギー側から C, N, O の K 殻吸収端であり、ポリスチレン球、水のどちらにも観測された。水で観測された C-K 吸収端の位置はポリスチレン球のエネルギー位置と異なっており、ポリスチレン球の C 吸収端はポリスチレン (polystyrene) の C-H 結合に由来すると考えられることから、水の C-K 吸収端は、SiN メンブレンないしはシンチレーターに付着した C と考えられる。N-K 吸収端は、どちらの物質に於いても同じエネルギー位置で観測されることから、試料ホルダーの窓材である SiN メンブレンの N 原子に由来すると考えられる。また O-K 吸収端も同じエネルギー位置に観測されることから、どちらも水に由来する酸素と考えられる。

4 まとめ

軟 X 線領域で高い量子効率を示す Ce:LYSO シンチレーターを 2 次元検出器として用いた密着型軟 X 線顕微鏡を新たに作製した。作製した顕微鏡の相対量子効率を調べた結果、おおよそ 2nm から 5nm の波長領域で高い量子効率を示した。また、平均粒径 $0.52 \mu\text{m}$ の水中のポリスチレン球を用いて空間分解能を評価した結果、倍率 20 (NA=0.4) の対物レンズを用いた場合で、 $0.72 \mu\text{m}$ とほぼ回折限界の空間分解能を示した。最後に、波長ごとにポリスチレン球を撮像した透過像から透過率像を求め、さらに像の各部分について透過率を波長ごとにプロットした結果、ポリスチレン球と水の透過率スペクトルを得ることに

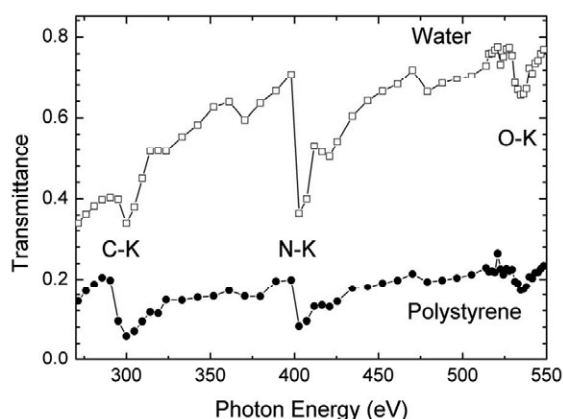


図5：ポリスチレン球の吸収スペクトル

成功した。以上の結果から、水中の生物細胞試料の各オルガネラに対して、透過率スペクトルないしは吸収スペクトルを求めることが可能となった、と考えられる。

謝辞

密着法全般に関して日本原子力研究機構の加道雅孝博士、石野雅彦博士に色々ご教示頂きました。また顕微鏡作製に当たっては、東北大学多元物質科学研究所技術室の朝倉和也氏、中村義浩氏、田中勇氏にたいへんお世話になりました。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- [1] B. Alberts *et al.*, Molecular Biology of The Cell, 5th (Garland Science, 2010, New York & Abingdom) Chap. 9.
- [2] W. Chao, *et al.*, Nature 435, (2005) 1219.
- [3] D. Attwood, Soft X-rays and extreme ultraviolet radiation, (Cambridge University Press, Cambridge, 2000) Chap.9.
- [4] T. Ejima *et al.*, CP 1234, AIP(2010) pp. 811-814..

* ejima@tagen.tohoku.ac.jp