結像型 X 線顕微鏡による生きた生物像観察の可能性

関西医科大学 木 原 裕

Imaging x-ray microscopy and its capability of observing live biospecimens are reviewed. Wet biospecimens can be monitored with the resolution of 19 nm. Phase contrast method may open the capability of observing live cells.

x-ray microscopy/zone plate/phase contrast/synchrotron radiation

1. はじめに

X 線顕微鏡は、(1)光学顕微鏡より分解能が高く、10nm のオーダーの像を観察することができる、(2)ウェットな試料を染色などをしないで、そのまま観察することができる、(3)数 μm の厚さまで分解能を落とさず観察することができる、などの特徴があり、特に生きた細胞内構造を、10nm スケールで観察することができる可能性が最も注目されている。

現在、種々の方式の X 線顕微鏡が開発されつつあるが、最も代表的で最も高い解像度を与えているのは、ゾーンプレートを用いた結像型、走査型の顕微鏡である。結像型は、Göttingen 大学の Schmahl らによって開発され、Berlin の BESSY に常備されている (図 1)³⁾。大気中のウェットな試料の像を数秒～数十秒の観測時間で得ることができ、大変使いやすい。試料はあらかじめ光学顕微鏡で観測し、見たいところをピックアップできる。

走査型は、ニューヨーク州立大の Kirz らにより、Brookhaven の NSLS のアンジュレータラインに常備されている¹⁾。走査型はコヒーレントな照明を要求するので、通常の偏向磁石型の SR 光よりアンジュレータを利用する方が有利である。その他カリフォルニア大の Advanced Light Source でも、ゾーンプレートを用いた結像型 X 線顕微鏡を重要課題として開発している⁴⁾。

以下に X 線顕微鏡の特徴、最近の発展等について、順を追って述べる。なお X 線顕微鏡の総説としては、最近 Kirz により X 線顕微鏡についての優れた総説が著された¹⁾。国際会議のまとめ²⁾などと併せて参照されたい。

2. X 線顕微鏡の特徴

2.1. 高い分解能

X 線顕微鏡の解像力は、原理的には、その波長で決められる。軟 X 線の場合、数 nm に及ぶわけだが、現実には用いる光学素子などがその分解能を決めていて、密着型の場合 10nm、光学素子を用いる場合で 19nm が最もよい発表値となっている。

2.2. 水の窓での観察

軟 X 線の酸素と炭素の吸収端の間 (2.4nm～4.3nm、水の窓と呼ばれる) では、水に比べて、蛋白質、核酸等の生体物質の吸収係数が 1 桁以上大きく、事実上水の存在がほとんど解像力に影響しない。したがって、電子顕微鏡などと違って、X 線顕微鏡は、水の中にある観察対象をそのまま観察することができる。Sayre らの計算によれば、X 線顕微鏡による観察は、2～3 μm の厚さまで、あまり分解能を落とさずに観察することができる。このことは、細胞をまるごと観察するのに適していることになる。

1990年の London で開かれた X 線顕微鏡の国際会議は、X 線顕微鏡開発の歴史の中で、一つの里程碑を与える会議であった。Schmahl ら、Kirz らが、それぞれ結像型、走査型の X 線顕微鏡により、50nm の分解能で、水の中の染色体像を報告した²⁾。爾来 5 年、X 線顕微鏡は、確実に進歩を遂げてきた。

図 1. BESSY に常備されている結像型 X 線顕微鏡概念図

Is it possible to observe live biospecimen by imaging x ray microscopy ?

Hiroshi KIHARA

Physics Laboratory, Kansai Medical University, 18-89
Uyamahigashi, Hirakata, Osaka 573

2.3. 特定元素の選択的マッピング

X 線の特徴は、その吸収スペクトルの波長依存性にある。特に吸収端の前後では、吸収係数が 1 桁以上異なる。したがって、吸収端の前後で観察した像の差をとれば、特定の元素のマッピングをすることができる。(この項については、篠原の原稿を参照されたい。)

また、生体中に水銀、鉛等の重元素が存在する場合、高いコントラストで観察できる。さらにそれを積極的に利用すれば、特定の蛋白質に金コロイドでラベルした抗体を選択的に吸着させることにより、当該の蛋白質の体内マッピングをさせることができる。我々は、BHK 細胞のチューブリンを金コロイド抗体で染め、50nm の太さまで観察することに成功した⁷⁾。この方向の仕事は、これからますます重要になってくるものと思われる。

3. 生体機能と放射線損傷

X 線顕微鏡を用いる場合の最も検討を要する点の一つは、放射線損傷の問題である。Buckley らは、筋収縮機能に与える放射線損傷の影響を検討し、高分解能で観察するときには、収縮機能が失われる可能性があることを示した。放射線損傷を避ける一つの方法は、パルス X 線を用いることであるが、これは特に密着型の場合には、よく用いられている。その他短波長での測定により、位相コントラストをプローブとすれば、放射線損傷の影響を少なくできるという計算もある。

Schmahl らは、試料を低温に保持することにより、照射線量を著しく増やしても像の放射線損傷が観測されないことを見いだした。この結果、2 時間ほどの間であれば、観測し続けても問題ないことを示した⁶⁾。

4. 位相コントラスト法と短波長での測定

生物試料をコントラスト良く観察するためには、実は吸収の差を用いて、水の窓の波長領域で測定するのが唯一の方法ではない。結像ゾーンプレート焦点の位置に 1/2 波長板を入れることにより、位相差を測定することができるようになる。測定例を図 2 に示す。図から明らかになように、位相コントラストの方がエッジが強調されるようである。

位相コントラストで見える場合、コントラストは、1 ~ 5 keV の短波長領域でもあまり悪くならない (図 3)⁷⁾。それだけでなく、短波長で観測することには、いくつかの利点がある。

- (1) 放射線損傷が相対的に少ない。
- (2) 透明度が高くなるので、より厚い試料を観測できる。
- (3) アルミニウムなどの吸収端前後の差像を観測することができる。

図 2. ネズミ 肝臓の Kupffer 細胞, 倍率 1,000 倍, 波長 2.4nm. (a) 吸収モード, (b) 位相コントラストモード

したがって、位相コントラストで短波長で測定するのが、X 線顕微鏡の特徴を最も良く生かすことになる。

5. X 線顕微鏡の生物学・医学への応用

軟 X 線顕微鏡の利用は、まず第一に細胞生物学への応用である。10nm 付近の分解能で、細胞をそのまま見ることができる点が最も注目される点である。

軟 X 線顕微鏡の第 2 の利用は、医学診断への応用である。これは、まだ始まっていないが、次のいくつかのテーマについては、重要な貢献がされうる可能性がある。

- (a) 癌の早期診断 (b) 重元素の細胞内マッピング
- (c) ウイルスの観察 (d) 染色体内部構造の観察

実際、マラリア感染赤血球の形態変化の観測⁴⁾等、X 線顕微鏡の観測が医学とタイアップし始めている。

6. 細胞の生きた運動を見ることができるか

X 線顕微鏡にかけられた期待の最も大きなものは、生きた生体の運動を見ることができる可能性についてである。第 3 世代の光源があれば、技術的には、ミリ

図3. 吸収モードと位相モードの時のコントラストの比較⁸⁾. 水の窓の吸収モードと比べても、短波長の位相モードは、コントラストは悪くない。

秒のオーダーで、動画を撮ることは可能である。したがって問題は放射線損傷の問題に集約される。結論から言えば、最も単純な形でこれが実現するかどうかは別にして、私はこれは可能であると信じている。その方法は、まだストレートには見えてこないが、その方向での努力は、数多く続けられている。

1) 検出効率の向上：特に現在光学素子として用いられているゾーンプレートは、試料を通過したX線の一部（最も単純な場合は、約9%）しか結像に利用できない問題があった。しかし、位相ゾーンプレートなどの発達により、現在は20~30%まで向上している。さらに原理的には、100%にまで向上しうる。

2) 短波長化：前述のように短波長で位相差で観察することが、最も放射線損傷を減らす道である。さらに観測に不必要な光を効率よくカットする事も必要であろう。

3) ラジカル・スカベンジャーの利用：これにより、溶媒を通して起こる損傷を避けることができる。実際の測定では、スカベンジャーの利用により、2倍の照射線量まで筋収縮機能が保たれることが報告されている。

4) 放射線に強い試料を観測する：これは、邪道であるとの声が聞こえてきそうであるが、やはりまずX線顕微鏡にとって最も見やすい試料を選ぶことに何の躊躇もないではないか。

5) 選択的ラベリングによるコントラストの増強：金コロイド等を利用することにより、同じコントラスト

を得る必要なX線を一倍以上減らすことができる。

6) 低温測定：低温にすることにより、安定した像が撮れることは、Schmahlらが示した。しかし、低温にすると動きが止まってしまう。このジレンマを避ける方法は二つ考えられる。一つは、動きの瞬間々々で止めて観測するストロボ法である。今一つは、低温化で、凍結防止剤を入れて、動きを見ることである。この方法により、動きを観測することができるかどうか、できたとしてもそれが生理的な動きとは全く異なっているのではないかと、課題は多いが、チャレンジしてみる価値はあると思う。

7. おわりに

X線顕微鏡は、今やと生物学・物性学研究のルーチン手段に仲間入りしようとしている所である。偏向磁石を使う限り、数秒かかって20nmの分解能で細胞内構造を観察する、というのが現在の到達点である。SPRING-8が実現した場合、強力線源を使った時分割測定、特異的プローブによる測定、などまだ多くの課題が残されている。

我々は細胞の特異的染色の方法を開発する目的で、最近過マンガン酸カリ溶液中で培養したCOS細胞を観測し、小胞体、ミトコンドリアなどがコントラスト良く観測できることを見いだした⁹⁾。今後このような特異的染色の技術を追求することも重要であると考えている。

文 献

- 1) J. Kirz, C. Jacobsen, and M. Howells (1995) *Q. Rev. Biophys.*, **28**, 33-130.
- 2) A. G. Michette, G. R. Morrison, C. J. Buckley ed. (1992) *X-Ray Microscopy*, III, Springer-Verlag.
- 3) G. Schmahl, D. Rudolph, P. Guttmann, G. Schneider, J. Thieme, B. Niemann and T. Wilhelm (1994) *SR News*, **7** (4), 19-22.
- 4) W. Meyer-Ilse, H. Medeck, L. Jochum, E. Anderson, D. Attwood, C. Magowan, R. Balhorn, M. Moronne, D. Rudolph, and G. Schmahl (1995) *SR News*, **8** (3), 29-33.
- 5) P. M. Bennett, G. F. Foster, C. J. Buckley and R. E. Burge (1993) *J. Microscopy*, **172**, 109-119.
- 6) G. Schneider, B. Niemann, P. Guttmann, D. Rudolph and G. Schmahl (1995) *SR News*, **8** (3), 19-28.
- 7) 木原裕ら, 未発表
- 8) 渡辺紀生 (1994) 学位論文
- 9) H. Kihara, A. Yamamoto, P. Guttmann, and G. Schmahl, *J. Elect. Rel. Phenom.*, in press.