

蛍光X線顕微鏡システムによる 細胞内元素イメージングと医学応用

松山智至^{1, 3)} ● 志村まり^{2, 3)} ●

●名古屋大学大学院工学研究科 物質科学専攻¹⁾

●国立国際医療研究センター研究所 難治性疾患研究室²⁾

●理化学研究所 SPring-8³⁾

要約

筆者らはSub-100nmのシンクロトン放射光プローブを用いた、細胞内元素イメージング用走査型蛍光X線顕微鏡システム (Scanning X-ray Fluorescence Microscopy: SXFM) の開発を行い、現在も生物・医学応用を展開している。本稿ではこれまで行ってきたSXFMによる元素マッピングの生物医学応用、および、亜鉛に焦点を絞った生物・医学領域での有用性を議論したい。

KEY WORDS

蛍光X線, シンクロトン放射光, 元素マッピング, 細胞, 医学応用

1 レントゲンから現在まで

1895年のレントゲンのX線発見以来、X線の透過性を生かし、医学分野では、CTや胸部X線など多様な診断に利用されてきた。一方、細胞観察では“microradiography”¹⁾がX線発見から数年以内に発表され、集光技術^{2,3)}により急速に分解能は改善された。1970年代には、走査型透過X線顕微鏡 (scanning TXM: STXM) の研究が集約的に行われ^{4,7)}、細胞の骨格や構造 (細胞核、核小体、細胞膜、染色体など) の観察を可能とした。さらに、特定の細胞内構造を画像化するために銀染色や2次抗体にランタノイドを使用するなど様々な応用が実施された^{7,9)}。2000年代に、第3世代シンクロトン放射光施設の供給する強度X線により、X線顕微鏡はブレイクスルーを遂げる¹⁰⁻¹⁴⁾。第3世代シンクロトン放射光施設の硬X線はマイクロレベルでのプローブを可能とし¹⁵⁻¹⁷⁾、集光技術によりナノレベルのプローブが可能となり²⁾、現在、細胞内小器官レベル (100nm以下) の高分解イメージングが可能となっている¹⁸⁾。

様々なエネルギー線を解析することで、構造、元

素、DNA、RNA、脂質、蛋白質、糖質、それらの修飾状態 (価数、酸化) の検出が可能である (図1)。回折による結晶構造解析が創薬事業に貢献しているように、放射光エネルギー線各種は、元素を含む細胞内小分子をターゲットにした診断、薬剤評価など、多様な医学応用が期待できる段階に至っている。

走査型蛍光X線顕微鏡

2 (Scanning X-ray Fluorescence Microscopy: SXFM)

シンクロトン放射光によるプロトタイプ of XRF顕微鏡はこれまでも存在していたが、特に生物や医学領域での貢献を期待して、哺乳類細胞観察に焦点を置いた走査型蛍光X線顕微鏡システム (以下SXFM, 図2) の開発に取り組んだ。SXFMの主な構成は、X線集光光学系 (KBミラー集光光学系) と試料走査システム、蛍光X線検出システム (エネルギー分散型X線検出器) である。光源であるSPring-8のアンジュレタ光は実験室のX線 (X線管) に比べ約10億倍以上明るい。ため、哺乳類細胞内の極微量な元素の高感度検出

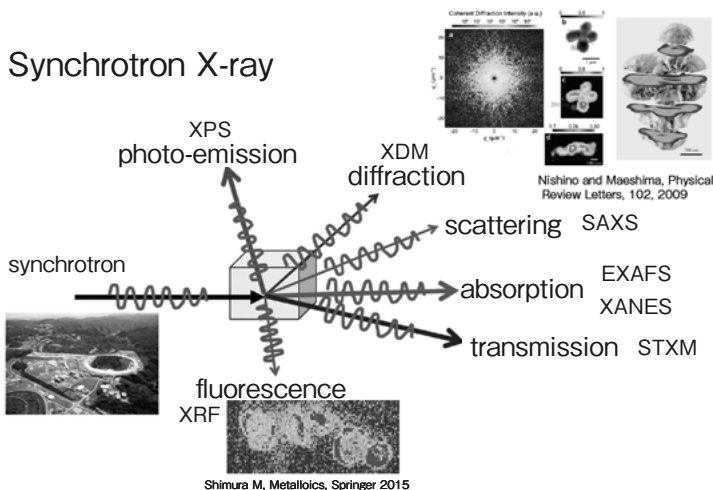


図1 シンクロトロン放射光の利用

Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用.

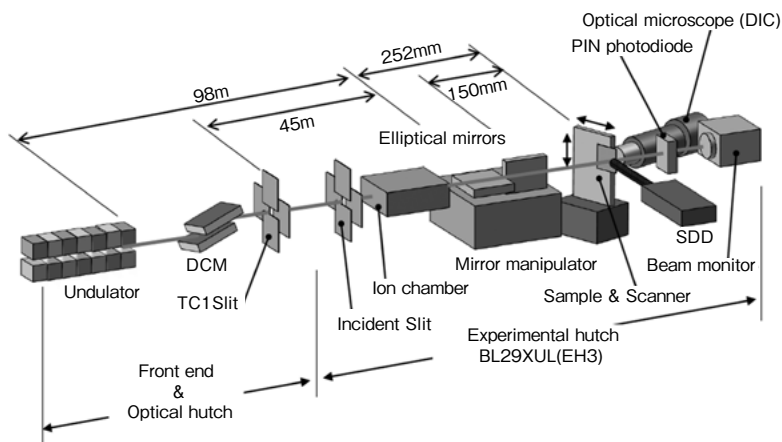


図2 走査型蛍光 X 線顕微鏡装置 (SXFEM) の概要図

Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用.

を期待した。光源は平行度が高く細いので、集光光学系と相性も良い。

しかし、X線の集光は可視光と比べてはるかに難しく、わずかな集光ミラーの凹凸や作製誤差でも容易に散乱される。そこで集光ミラーは、数ナノメートルレベルの精度で、光学素子を作製する必要があった。大阪大学では、約2nmの形状誤差

(設計形状と実際の形状の差)の全反射集光ミラー(楕円鏡)の開発に成功している^{19,20)}。こうした技術をもとに、SXFEM用に開発した高精度集光ミラーを用いることで、回折限界の約40nm~1000nmまでサイズ可変の集光が実現し、細胞内の100nm以下の構造体も検出できる世界最高レベルの分解能に至ることが可能となった(図3)²¹⁾。

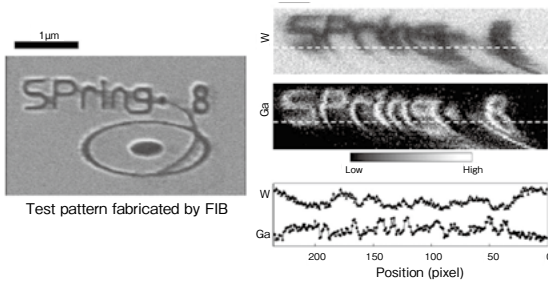


図3 タングステン (W) 及びガドリニウム (Ga) の高分解テストパターン

左: focused ion beam による Ga テストパターン。
 右: SXFM による W と Ga 高分解テストパターン。露光時間, 1 sec/pixel; スキャンングステップ, 15nm/pixel; X線エネルギー, 15keV. Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用。

3 顕微鏡のユーザーフレンドリー化

細胞の放射光測定を迅速に進めるためには、いくつかの工夫が必要であった。そこで次に、SXFM による細胞観察におけるハード面、ソフト面のユーザーフレンドリー化を進めた。①検出器 (SDD): SDDと Multi-channel analyzer (MCA) を組み合わせることにより、検出しているすべての元素 (X線スペクトラム) を、測定領域のピクセル毎に保存可能とした。これにより、後に必要な元素について、保存データから元素マッピングが可能となり、結果的にノイズ除去も容易となった。②走査ステージ: リニアエンコーダー搭載の XZ stage (最小step: 1nm; 移動範囲: 25mm) を採用することで、テストパターンイメージングで 30-50nm の分解能を得ることができた²¹⁾。③温度調整システム: 大型フィルムヒーターと白金測温抵抗体によって構成された温度調整システムの開発 (JASRI 光源・光学系部門) により、無振動且つ室温変動 0.1°C 以下に安定させたことで、X線集光制御系の熱膨張歪みが抑制され、頻用な 500nm 集光ビームを 1週間程度維持することが可能となった。④細胞試料の座標化: 微分干渉顕

微鏡 (DIC) を SXFM に設置することで、細胞組織の位置決めや座標化が可能となった (図4a)。⑤アルゴンの排除: 細胞観察に有用な元素 (Ca, P など) のバックグラウンドとなる空气中アルゴンを極力排除するために、真空後ヘリウム置換を取り入れた。⑥回転ステージ: アルゴンの排除操作に 1回30分程度を有するために、ハッチの開閉をできるだけ少なく、多くの試料を設置する必要があった。そこで、回転ステージを設置し、一度に 12試料の取り付けを可能とした。測定中の温度変化も最小となり、より安定な測定が可能となった。⑦ズーム機能: 光学顕微鏡では対物レンズ変更により拡大可変であるが、X線顕微鏡では同様の機能は報告されていなかった。そこで、仮想光源位置 (ミラーから 45m 上流) にコントロールスリットを加えることで、X線ビーム幅は回折限界の 40nm から 1000nm まで可変となり、ズーム機能が可能となった (図4b)^{22,23)}。⑧ソフトウェアの開発: X線集光, X線検出システム, 走査ステージ, 試料交換や DIC 操作などが、操作パネル上で可能となり、迅速な測定を実現している。モニター上で測定したい箇所を選択するなど、自在な操作が可能となった。

4 放射光イメージングのための細胞準備

様々な顕微鏡システムにおいて、生きた状態の細胞観察が目標とされており、X線顕微鏡システムにおいても同様であるが、実は難しい²⁴⁾。1990年では X線顕微鏡による、生きた状態での細胞観察は試みられたが、水分子がフリーラジカルを発生し放射線障害を誘導するため、特に細胞の微細形態は著しく破壊された²⁵⁾。細胞に 2%ホルムアルデヒド化学固定を施すことで、放射線障害は減弱することが見出されたが、複数回照射 (溶液中) には耐えられない²⁶⁻²⁹⁾。1990年代に Kirz らが議論していたように²⁶⁾、生きた状態もしくはそれに近い細胞観察は、今日においても大きな課題である。

シンクロトロン放射光においてもフリーラジカルは発生するため、生きた細胞の観察は通常行われていない。化学固定を行った細胞の溶液中での観

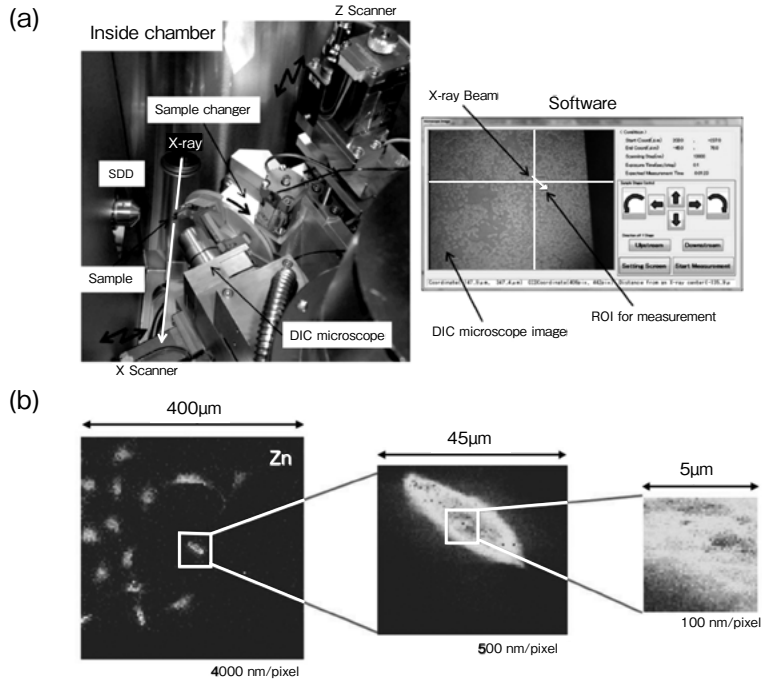


図 4 ユーザーフレンドリー化した SXFM

(a) 左：ユーザーフレンドリー化した SXFM ハッチ内部，右：開発したソフトウェアモニター上の試料（微分干渉像）．(b) SXFM による細胞のズーム例．Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾，Royal Society of Chemistry より引用．

察も同様にラジカルが発生するため，行われていない．一方，化学固定後，乾燥処置を行った場合は，1990年代に見られたような著しい放射線障害は認められない．しかし，細胞内カリウム，カルシウムのようなフリーイオンは，化学固定後ほぼ消失してしまう³⁰⁾．一方，亜鉛や銅は概ね温存される(図5)．蛋白質など細胞内分子と結合する元素は，ホルムアルデヒド架橋により温存される傾向があるようである．私たちは，瞬間凍結細胞をクライオ顕微鏡システムで観察する方法を推奨している^{18,30)}(図6)．瞬間凍結法は生きた細胞の状態を極力温存するため，電子顕微鏡や Laser Aberration Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) でも利用されている^{24,31)}．また，瞬間凍結はラジカルの発生を抑制する点でも望ましい．さらに私たちは，瞬間凍結 (FF) + 凍結乾燥法 (FD) を行うことで，化学固

定で喪失する元素や微細な構造形態も保持できることを見出している．FFFD は長期保存，運搬，室温での X 線顕微鏡測定が可能で利便性も高い³²⁾．

一方，化学固定後の試料が，測定に適していないというわけではない．化学固定においても，適切なコントロールや再現性が得られるのであれば，有用な細胞情報と言える．例えば，臨床検体はホルマリン固定試料が多く，希少な臨床検体を測定しない選択は考えられない．上述のように，亜鉛や銅は化学固定の影響を受けにくいことから，化学固定を第一選択肢としても考え得る．細胞がどのような状況にあるかを理解した上で，観察を展開することが肝要である．

近年，X-ray free-electron lasers (XFELs) による，生きた細胞の回折像による観察が可能となっている³³⁾．XFELs の X 線回折データでは，細胞が放射線障害を起こす前 (原子の coulomb

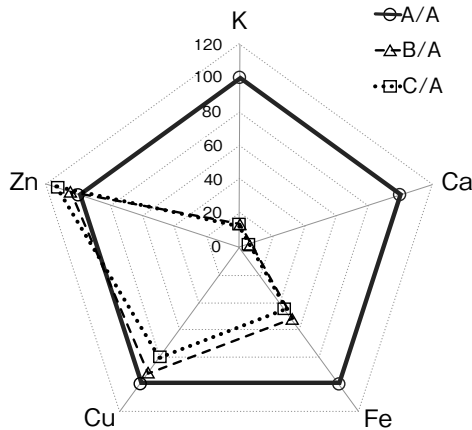


図5 化学固定における細胞内元素量

A-A (実線)：化学固定前の細胞内各元素濃度を ICP-MS で測定し、細胞当たりの各元素濃度を 100% とした；B-A (破線)：4% パラホルムアルデヒド / PBS 固定後の細胞当たりの各元素濃度；C-A (点線)：4% パラホルムアルデヒド / PBS 固定後に 0.2% 界面活性剤 (TritonX-100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) / PBS による洗浄を行った細胞当たりの各元素濃度。亜鉛や銅は化学固定の影響を受けにくい。Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用。

→ 115 ページにカラー掲載

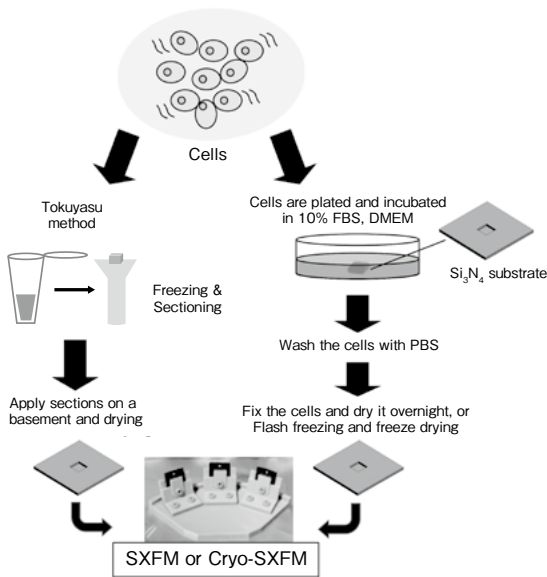


図6 SXFM の試料準備法のまとめ

写真は回転ステージ用試料ホルダー (顕微鏡のユーザーフレンドリー化参照)。Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用。

爆発前7フェムト秒内) に情報を得ることが可能である。著者らも、生細胞の観察に挑戦中である。一方、現在のXRFは7フェムト秒内にデータを得ることは難しい。しかし、近年開発された full-field X-ray fluorescence microscopy (FXFM)³⁴⁾ は走査を必要としない顕微鏡であるため、原理的にはワンショットで蛍光X線を可視化することが可能である。このようなワンショット技術を使えば将来この問題を解決するかもしれない。

5 シンクロトロン蛍光 X 線の生物医学応用

2000年代の第3世代シンクロトロン放射光施設の開発以降、結晶構造解析は創薬分野で貢献し、元素イメージングによる生物応用も展開しつつある。しかし、元素分析研究は、生物医学領域において特定の金属汚染の評価、特定の蛋白質結合金属や白金製剤のような研究に集まる傾向がある。生物医学領域において蛋白質イメージングは、抗体やペプチドなど特異性の高いラベル技術によりシ

STEM化され、検出感度も高く普及している。同じ解析のために、苦勞して放射光施設に行く必要はない。しかし、シンクロトロン放射光は、蛋白質以外の小分子を可視化する潜在能が高い点は魅力的である。

私たちはSXFМによる小分子(脂肪酸)の細胞内高分解イメージングに挑戦してきた。脂肪酸の質量分析は発展している一方で、その細胞内分布については不明な点が多い。これまで、脂肪酸などの小分子を観察するために、多くの工夫と努力が展開されてきた。蛍光分子蛍光ラベル体自体の大きさゆえに、小分子の本来機能を損なう。また、放射性アイソトープラベルやDESI-MSやMALDI-MSイメージングの分解能には限界があり、小分子の高分解像取得はなかなか実現しなかった。私たちは、脂肪酸の一原子ラベルとSXFМを組み合わせることにより、細胞内脂肪酸イメージングに成功している(図7)。臭素(Br)をラベルした脂肪酸は細胞内に取り込まれ、少なくとも細胞分裂後3世

代まで継代され、細胞内で多様な飽和や不飽和脂肪酸からなるリン脂質や中性脂質に代謝されることを、LC-MSにより確認している³⁵⁾。SXFМの分解能を250nm/pixelに増大すると、細胞質内にBr脂肪酸代謝産物を伴う長径100nm以下の点状構造が明らかとなった(図7b)。脂肪酸の合成酵素が多数局在するER/Golgiと共局在の傾向がある(図8a-b)。細胞基板にグリッドをレーザー加工し基準とすることで、明視野蛍光像などの他の顕微鏡像との重ね合わせが容易となった(図8c)。

1原子ラベル法は、細胞がラベルを許容し、本来の機能を維持できるかどうかを見極めることが肝要である。1原子でもラベル位置によって、小分子の本来の機能を損なう場合があるからである。一方、小分子の機能を知る上で興味深い。1原子ラベルとSXFМを組み合わせる方法は、他の細胞内小分子についても応用できる。これら小分子像と既存の蛋白質像などを組み合わせることで、多角的な視点から細胞内機能を明らかにできると期待し

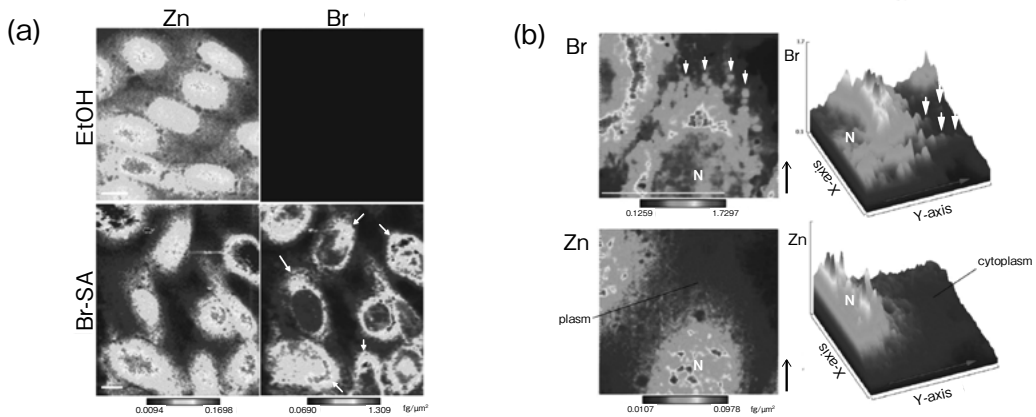


図7 Br SXFM によるラベル脂肪酸の細胞像

(a) Br ラベルステアリン酸 (Br-SA), 及び溶媒のエタノール処置した CHO-K1 細胞での亜鉛, 臭素シグナル分布 (600nm/pixel). 白矢印: 亜鉛が細胞核に存在する傾向とは対照的に、細胞質で特徴的な集積を示す Br 脂肪酸シグナル. (b) Br ラベルパルミチン酸 (Br-PA) の高分解像像. 左: Br-PA を 24h 処置した CHO-K1 細胞の臭素, 亜鉛像 (250nm/pixel). 右: 左図のサーフィスプロット. 矢印:サーフィスプロット方向. 白矢印:スポット状の Br 分布. Br, BrK α シグナル; カラーバー, fg/μm²; スケールバー, 10μm. M Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸⁾, Royal Society of Chemistry より引用.

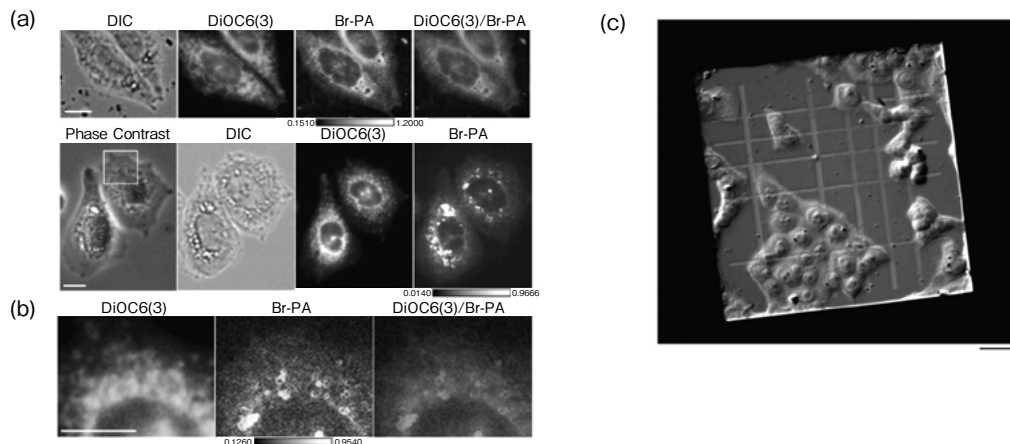


図8 CHO-K1細胞のSXM像と蛍光像

(a)ER(endoplasmic reticulum) マーカー (DiOC6(3)) 蛍光像とSXMによるBrシグナル像(500nm/pixel) (b) (a)の黄色フレーム領域の高分解像(250nm/pixel). DIC, 微分干渉像; Br-PA, BrK α シグナル; Phase Contrast, 位相差像. カラー像: 赤, DiOC6(3); 緑, Br-PA; スケールバー, 10 μ m; カラーバー, fg/ μ m² (c) 200nmグリッドを加工したSiN基板に培養したHeLa細胞の微分干渉像. スケールバー, 20 μ m. Matsuyama et al., JAAS. 2020¹⁸, Royal Society of Chemistryより引用.

→ 116 ページにカラー掲載

ている。医学応用では、疾患モデル細胞での細胞内小分子の増減や局在の変動、薬剤による代謝変動など多くの解析が期待できると考える。

6 放射光測定今後の展望

将来の光源や光学系の性能向上によって、SXMによる医学応用にはどのような未来が待っているだろうか。第一に、近い将来のSPring-8アップグレードにより、光源サイズの微小化と輝度の向上が達成されると考える。X線集光光学系はこの恩恵を受けて、高強度ナノビーム生成が可能となる。試算では、アンジュレータ光源からのX線放射をそのままロスなく集光ミラーで受けて集光することで、現在の1000倍の強度を持つ100nmビームの生成が可能となる³⁶⁾。今後アップグレードされるSPring-8では光軸上に低エネルギーX線はなくなり、最適化された多層膜モノクロメータによって蛍光X線分析に最適な単色度

1%のX線を得ることができるようになる。これは、既存の100倍の強度向上に寄与する。

以上の光学系の性能向上を考えると、100nm X線ビームにおいておおよそ10⁵倍の強度向上を達成できそうである。一方、これらの代償として、試料損傷や検出器飽和、試料の高速走査問題(高速試料走査で発生するデッドタイムによる測定効率の悪化)が懸念される。試料損傷は、瞬間凍結やFFFDの導入により軽減されると考える(第4項:放射光イメージングのための細胞準備参照)。検出器飽和に対しては、CUBEというプリアンプ技術を用いた最新の検出³⁷⁾の利用や、検出器の並列化(多数を並べることで1台あたりが検出・処理を担当するX線の量を減らす)が有効となる。走査問題については、フライスキャン³⁸⁾という試料を止めずに走査し続ける技術が有効である。もしくは、これまでは試料を走査していたが、ビームを高速走査するという技術も開発中である。

医学生物応用では、将来どのような試料を観察することができるようになるだろうか? サブppm

濃度の薬剤が細胞へ与える影響を調べる実験では、現状では濃度が低すぎるために、詳細な分布を調べるには至っていない。今後は極少濃度の元素を苦も無く調べることができるようになり、これまで不明だった細胞内動態の解明が期待される。また、ビーム強度向上を感度ではなく測定面積に振り分けるなら、現行よりも短時間で、1mm²程度の領域を測定することも夢ではない。これにより、生物統計に適した100個程度の細胞に対する高分解像の取得は、一度の測定で可能となりそうである。

このように汎用な元素分布イメージングが可能なら、他手法を相補的に利用し、複合的に生命現象の理解を進める研究が促進するのではないだろうか。例えば電子顕微鏡との連携は有意義である。中でも電顕のSTEM-EDSは原子レベルの空間分解能で元素識別が可能な技術である。一方、STEM-EDSの試料厚みや元素検出感度に制約

がある点を、放射光イメージングが貢献する。軽元素や高分子も同定できる質量顕微鏡や、軽元素検出が適正な軟X線顕微鏡と硬X線顕微鏡(SXFM)とを組み合わせることで、各々の利点を生かしつつ、制約の突破が可能となるかもしれない。

7 臨床医学応用

血液、尿や腫瘍臨床検体のICP-MS解析による元素分析報告は、多くのグループから発表され、疫学や臨床的診断意義も議論されてきた。近年では、元素濃度のみならず、血漿中亜鉛と銅の安定同位体比率の変動が、癌症例、肝臓、腎臓、骨疾患などで報告されるようになってきている。私たちは、血液がんの死亡リスクに安定同位体比率が関連することを発見している(図9)³⁹⁾。

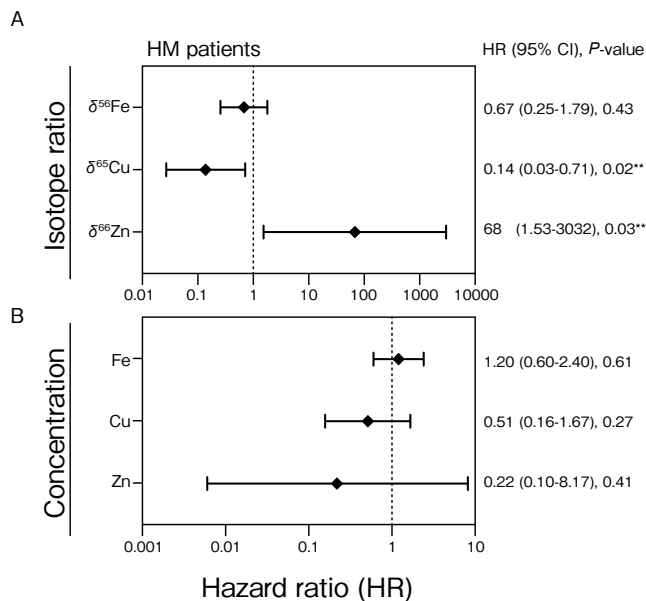


図9 血液がん (HM) 血漿を用いた5年生存ハザード比

A. 血漿中鉄、銅と亜鉛の各安定同位体比率と5年生存ハザード比, B. 鉄、銅、亜鉛濃度と5年生存ハザード比 HR, ハザード比; 95% CI, 95% confidence interval. **, P<0.05. 銅と亜鉛の安定同位体比率において, HRに有意差が認められた。一方, 各濃度では, 有意差は認められない。Hastuti et al., Scientific Rep.2020³⁹⁾より引用。

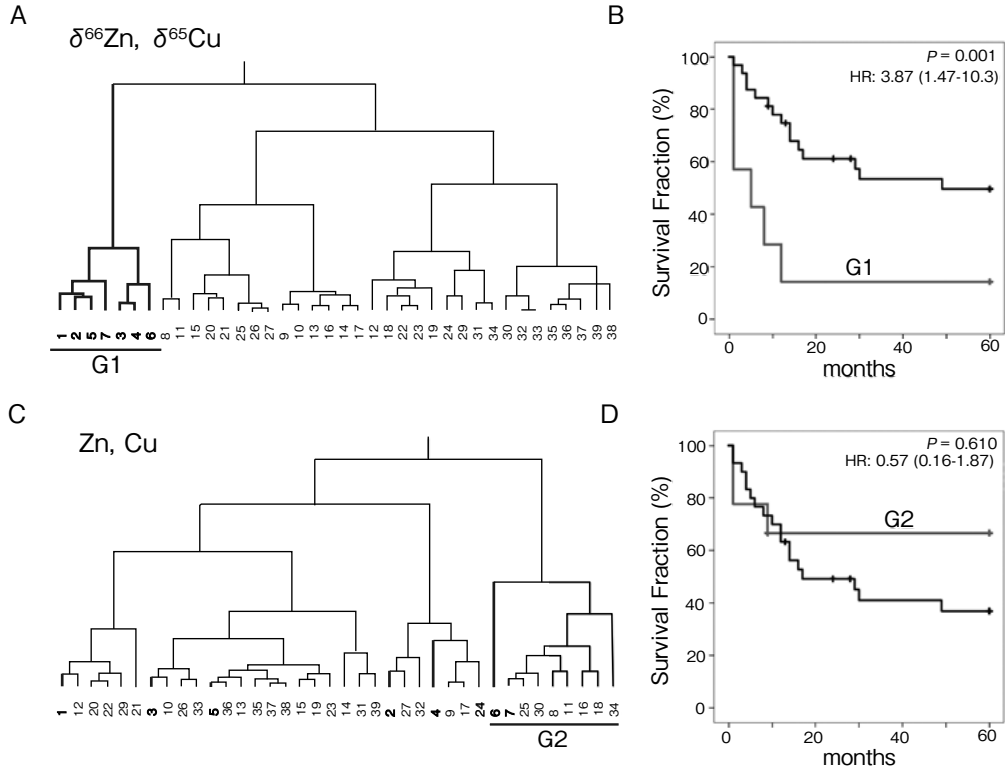


図 10 血液がん (HM) 血漿を用いた銅, 亜鉛情報による階層的クラスタ解析と5年生存率

A: 血漿中銅, 亜鉛の安定同位体比率による階層的クラスタ解析と B: 5年生存率. C: 銅, 亜鉛濃度による階層的クラスタ解析と D: 5年生存率. HR, ハザード比 (95% confidence interval). **, P<0.05. 銅, 亜鉛の安定同位体比率において, 高次階層で G1 グループが分類された. G1 は 1 年以内に 80%以上が死亡するハイリスク群である. 一方, 銅, 亜鉛濃度において, G2 グループが分類されたが, 生存率において G2 とその他のグループ間で有意差は認められなかった. Hastuti et al., Scientific Rep.2020³⁹⁾ より引用.

亜鉛の安定同位体比率の変動が大きいほど, 死亡リスクは3000倍程度に増大することが示唆された. 事実, 亜鉛の安定同位体比率変動を示すトップグループG1は, 1年以内に80%強の死亡率を示すハイリスク群であった (図10)³⁹⁾. 興味深いのは, 腎機能障害の2名以外, 死亡リスクを裏打ちする情報は臨床検査からは得られなかった. 死亡リスク群の背景には, 検査情報以外の亜鉛結合分子が関連している可能性は否めない. 現時点で, 亜鉛の安定同位体解析から亜鉛結合分子 (蛋白質) を見出すことはできないが, 未知のがんによる死亡ハ

イスルマーカーは複数存在しているかもしれない.

以上のように, 亜鉛を測定解析する臨床的意義は, 未知の部分を含めても高いと考える. 臨床検体試料を用いた放射光利用はまだ少ないが, 放射光イメージングは, 細胞中の元素変動を少量検体で, 概ね非破壊的に見出すことができる点で有利である. 上述のように, 今後の放射光の高速, 高分解測定が可能になることを考えると, 測定時間や検体数の制限も緩和され, 臨床的医学の発展が期待される.

8 おわりに

本稿では、シンクロトロン放射光による生物医学応用を紹介し、生物・医学領域でのさらなる可能性を述べてきた。シンクロトロン放射光による新たな視点から、未知の生命機能や疾患解明に貢献できることを切に望んでいる。本分野の発展には、多くの専門家の協力は不可欠であり、今後も分野を超えた研究が重要と考える。

謝辞

本研究は、東レリサーチセンター飯田豊博士、一ノ瀬尊之氏、白瀧絢子氏、故中山明弘博士、大阪大学大学院工学研究科齋藤彰博士、山内和人博士、東京大学工学部物性研究所木村隆志博士、三村秀和博士、理化学研究所播磨研究所/SPring-8

Lukasz M. Szyrwił博士、玉作賢治博士、矢橋牧名博士、石川哲也博士、高輝度光科学研究センター光源・光学系部門光学系グループ湯本博勝博士、大橋治彦博士、北海道大学電子科学研究所西野吉則博士、国立国際医療研究センター松永章弘博士、進藤英雄博士、清水孝雄博士、石坂幸人博士、国立遺伝学研究所生体高分子研究室前島一博博士よりなる研究グループで行った。本研究開発は、厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業(ナノメディシン研究)、内藤記念科学奨励金、文部科学省科学研究費補助金(特別推進研究)(18002009)、グローバルCOEプログラム「高機能化原子制御製造プロセス教育研究拠点」、国立研究開発法人科学技術振興機構、CREST研究、国立国際医療研究センター基金(29a1020)、文部科学省科学研究費補助金挑戦的萌芽研究(17K19417)により行われた。

文 献

- 1) Goby P. Une application nouvelle des rayons X, la microradiographie. Gauthier-Villars, Paris, 1913
- 2) Kirkpatrick P, Baez AV. Formation of optical images by x-rays. *J Opt Soc Am* 38: 766-774, 1948
- 3) Wolter H. Spiegelsysteme streifenden Einfalls als abbildende Optiken für Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik* 445: 94-114, 1952
- 4) Niemann B, Rudolph D, Schmahl G. Soft x-ray imaging zone plates with large zone numbers for microscopic and spectroscopic applications. *Opt. Commun.* 12: 160-163, 1974
- 5) Niemann B, Rudolph D, Schmahl G. X-ray microscopy with synchrotron radiation. *Appl Opt* 15: 1883-1884, 1976
- 6) Schmahl G, Rudolph D. Lichtstarke Zonenplatten als abbildende Systeme für weiche Röntgenstrahlung (High power zone plates as image forming systems for soft x-rays). *Optik* 29: 577-585, 1969
- 7) Jacobsen C, Kirz J, Williams S. Resolution in soft x-ray microscopes. *Ultramicroscopy* 47: 55-79, 1992
- 8) Schmahl G, Rudolph D, Guttman P, et al. Phase contrast studies of biological specimens with the x-ray microscope at BESSY. *Rev Sci Instrum* 66: 1282-1286, 1995
- 9) Moronne M. Development of X-ray excitable luminescent probes for scanning X-ray microscopy. *Ultramicroscopy* 77: 23-36, 1999
- 10) Yun W-B, Viccaro PJ, Lai B, et al. Coherent hard x-ray focusing optics and applications. *Rev Sci Instrum* 63: 582-585, 1992
- 11) Lai B, Yun WB, Legnini D, et al. Hard x-ray phase zone plate fabricated by lithographic techniques. *Appl Phys Lett* 61: 1877-1879, 1992
- 12) Krasnoperova A, Xiao J, Cerrina F, et al. Fabrication of hard x-ray phase zone plate by x-ray lithography. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena* 11: 2588-2591, 1993
- 13) Bilderback DH, Hoffman SA, Thiel DJ. Nanometer spatial resolution achieved in hard x-ray imaging and Laue diffraction experiments. *Science* 263: 201-203, 1994
- 14) Bilderback DH, Thiel DJ, Pahl R, et al. X-ray applications with glass-capillary optics. *J of Synchrotron Radiat* 1: 37-42, 1994

- 15) Buckley CJ, Foster GF, Burge RE, et al. Elemental imaging of cartilage by scanning x-ray microscopy. *Rev Sci Instrum* 63: 588-590, 1992
- 16) Nakai I, Terada Y, Itou M, et al. Use of highly energetic (116 keV) synchrotron radiation for X-ray fluorescence analysis of trace rare-earth and heavy elements. *J Synchrotron Rad* 8: 1078-1081, 2001
- 17) Kawai J, Takagawa K, Fujisawa S, et al. Microbeam XANES and X-ray fluorescence analysis of cadmium in kidney. *J Trace Microprobe Tech* 19: 541-546, 2001
- 18) Matsuyama S, Maeshima K, Shimura M. Development of X-ray imaging of intracellular elements and structure. *JAAS*, 35: 1279, 2020
- 19) Yamauchi K, Mimura H, Inagaki K et al. Figuring with subnanometer-level accuracy by numerically controlled elastic emission machining. *Rev Sci Instrum* 73: 4028-4033, 2002
- 20) Matsuyama S, Mimura H, Yumoto H, et al. Development of mirror manipulator for hard-x-ray nanofocusing at sub-50-nm level. *Rev of Sci Instrum* 77: 093107, 2006
- 21) Matsuyama S, Mimura H, Yumoto H, et al. Development of scanning x-ray fluorescence microscope with spatial resolution of 30nm using Kirkpatrick-Baez mirror optics. *Rev of Sci Instrum* 77: 103102, 2006
- 22) Matsuyama S, Mimura H, Katagishi K, et al. Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Surf Interface Anal* 40: 1042-1045, 2008
- 23) Matsuyama S, Shimura M, Mimura H, et al. Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Xray Spectrom* 38: 89-94, 2009
- 24) Walther P, Studer D, McDonald K. High Pressure Freezing Tutorial. *Microsc Microanal* 13: 440-441, 2007
- 25) Bennett P, Foster G, Buckley C, et al. The effect of soft X-radiation on myofibrils. *J Microsc* 172: 109-119, 1993
- 26) Kirz J, Jacobsen C, Howells M. Soft X-ray microscopes and their biological applications. *Q Rev Biophys* 28: 33-130, 1995
- 27) Sakai K, Okada S. Radiation-Induced DNA Damage and Cellular Lethality in Cultured Mammalian Cells. *Radiat Res* 98: 479-490, 1984
- 28) Stead AD, Cotton RA, Page AM, et al. Visualization of the effects of electron microscopy fixatives on the structure of hydrated epidermal hairs of tomato (*lycopersicon peruvianum*) as revealed by soft x-ray contact microscopy. *Proc SPIE* 1741: 351-362, 1993
- 29) Williams S, Zhang X, Jacobsen C, et al. Measurements of wet metaphase chromosomes in the scanning transmission X-ray microscope. *J Microsc* 170: 155-165, 1993
- 30) Matsuyama S, Shimura M, Fujii M, et al. Elemental mapping of frozen-hydrated cells with cryo-scanning X-ray fluorescence microscopy. *Xray Spectrom* 39: 260-266, 2010
- 31) Debeljak M, Elteren JTV, Vogel-Mikus K. Development of a 2D laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry mapping procedure for mercury in maize (*Zea mays* L.) root cross-sections. *Anal Chim Acta* 787: 155-162, 2013
- 32) Matsuyama S, Matsunaga A, Sakamoto S, et al. Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence. *Metallomics* 5: 492-500, 2013
- 33) Kimura T., Joti Y, Shibuya A, et al. Imaging live cell in micro-liquid enclosure by X-ray laser diffraction. *Nat Commun* 5: 3052, 2014
- 34) Matsuyama S, Yamada J, Kohmura Y, et al. Full-field X-ray fluorescence microscope based on total-reflection advanced Kirkpatrick-Baez mirror optics. *Opt Express* 27: 18318-18328, 2019
- 35) Shimura M, Shindou H, Szyrwiel L, et al. Imaging of intracellular fatty acids by scanning X-ray fluorescence microscopy. *FASEB J* 30: 4149-4158, 2016
- 36) Yabashi M, Tono K, Mimura H, et al. Optics for coherent X-ray applications. *J Synchrotron Rad* 21: 976-985, 2014
- 37) Bombelli L, Fiorini C, Frizzi T. CUBE: The SDD preamplifier for excellent energy-resolution and high count-rate performance. *Microsc Microanal* 24 (Suppl 1): 710-711, 2018
- 38) Medjoubi K, Leclercq N, Langlois F, et al. Development of fast, simultaneous and multi-technique scanning hard X-ray microscopy at Synchrotron Soleil. *J Synchrotron Rad* 20 (Pt 2): 293-299, 2013
- 39) Hastuti AAMB, Costas-Rodríguez M, Matsunaga A, et al. Cu and Zn isotope ratio variations in plasma for survival prediction in haematological malignancy cases. *Sci Rep* 10: 16389, 2020

Intracellular elemental mapping using X-ray fluorescence microscopy and the medical application

Satoshi Matsuyama^{1, 2)}, Mari Shimura^{2, 3)†}

Department of Precision Science and Technology,
Graduate School of Engineering, Osaka University¹⁾
Department of Intractable Diseases, Research Institute,
National Center for Global Health and Medicine²⁾
RIKEN SPring-8 Center³⁾

In this review, we describe the scanning X-ray fluorescence microscopy (SXFM) using synchrotron radiation by means of a sub-100 nm focusing system, which facilitates the determination of the cellular elemental distribution in biological and medical fields. We introduce our representative studies and discuss about zinc related applications.

Keyword: X-ray fluorescence, Synchrotron radiation,
Elemental mapping, Cells, Medical application

Address for correspondence

1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 1628655

E-mail address: mshimura@ri.ncgm.go.jp

■ 松山智至 略歴

2003年 ● 大阪大学工学部 卒業
2007年 ● 大阪大学大学院工学研究科精密科学専攻 修了, 工学博士
2007年 ● 大阪大学大学院工学研究科精密科学専攻 助教
理化学研究所 客員研究員兼務
2020年 ● 名古屋大学大学院工学研究科物質科学専攻 准教授



■ 志村まり 略歴

1986年 ● 日本大学歯学部 卒業
1990年 ● 日本大学大学院博士課程 歯学専攻科卒業, 歯学博士
1990年 ● 日本大学歯学部 勤務 助手
1996年 ● 宇宙開発事業団宇宙環境利用システム本部宇宙実験グループ勤務 招聘研究員
1996年 ● 国立国際医療センター研究所 流動研究員
2004年 ● 同研究所難治性疾患研究部難治性疾患研究室 室長, 理化学研究所 客員研究員

