

# 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<sup>1, 3)</sup> ● 志村まり<sup>2, 3)</sup> ●●名古屋大学大学院工学研究科 物質科学専攻<sup>1)</sup>●国立国際医療研究センター研究所 難治性疾患研究室<sup>2)</sup>●理化学研究所 SPring-8<sup>3)</sup>

## 要約

筆者らはSub-100nmのシンクロトロ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, シンクロトロン放射光, 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”<sup>1)</sup>がX線発見から数年内に発表され、集光技術<sup>2,3)</sup>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<sup>4,7)</sup>、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<sup>7,9)</sup>。2000年代に、第3世代シンクロトロ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<sup>10-14)</sup>。第3世代シンクロトロン放射光施設の硬X線はマイクロレベルでのプローブを可能とし<sup>15-17)</sup>、集光技術によりナノレベルのプローブが可能となり<sup>2)</sup>、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<sup>18)</sup>。

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)

シンクロトロ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のアンジュレータ光は実験室のX線 (X線管) に比べ約10億倍以上明るい。そのため、哺乳類細胞内の極微量な元素の高感度検出

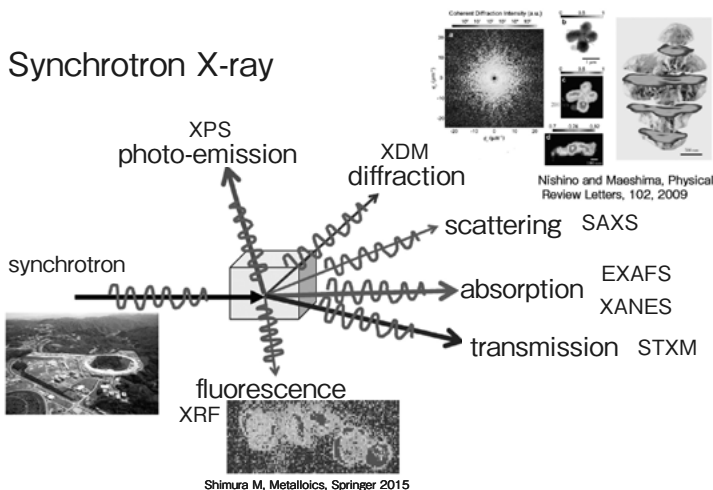


図1 シンクロトロン放射光の利用

Matsuyama et al., JAAS. 2020<sup>18)</sup>, Royal Society of Chemistry より引用.

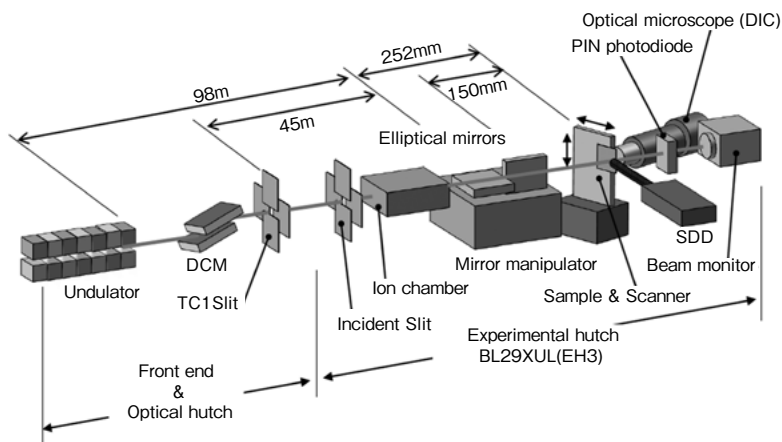


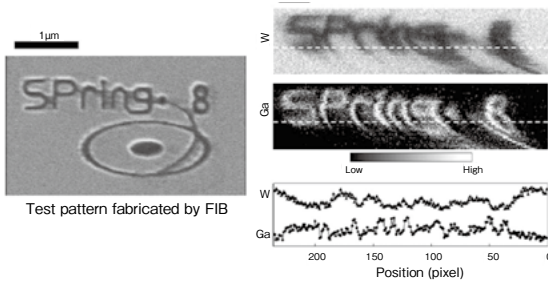
図2 走査型蛍光 X 線顕微鏡装置 (SXFEM) の概要図

Matsuyama et al., JAAS. 2020<sup>18)</sup>, 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<sup>19,20)</sup>。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)<sup>21)</sup>。



**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; スキャンニングステップ、15nm/pixel; X線エネルギー、15keV. Matsuyama et al., JAAS. 2020<sup>18)</sup>, 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<sup>21)</sup>。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℃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)<sup>22,23)</sup>。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<sup>24)</sup>。1990年代では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<sup>25)</sup>。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<sup>26-29)</sup>。1990年代にKirzらが議論していたように<sup>26)</sup>、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

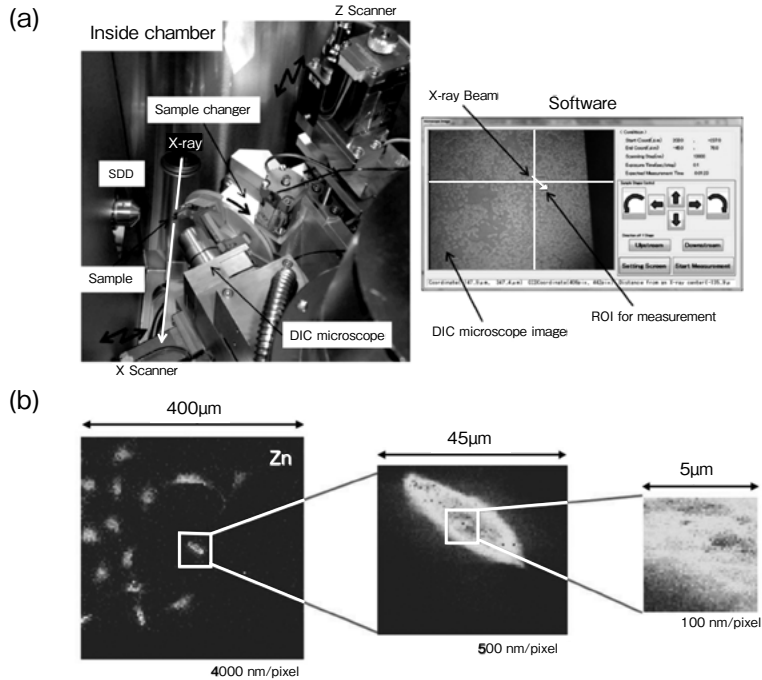


図 4 ユーザーフレンドリー化した SXFM

(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. 2020<sup>18)</sup>，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<sup>30)</sup>．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<sup>18,30)</sup>（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<sup>24,31)</sup>．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<sup>32)</sup>．

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<sup>33)</sup>．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