

X線位相コントラスト顕微CTシステムによる細胞試料観察法の開発
(2005B0970)

実験責任者：伊藤 敦（東海大・工）

共同実験者：竹内晃久、大東琢治、鈴木芳生（JASRI）、香村芳樹（理研）、櫻井辰幸（姫路工大）

ビームライン：BL-20XU

研究背景・目的：

X線位相コントラストイメージングは、硬X線領域において軽元素に感度があるため、特に生体試料を中心に、放射線損傷が小さい、水溶液中での観察が可能など、そのポテンシャルが期待されている手法である。現在、空間分解能は、100 nm もしくはそれ以下に達し、細胞の内部構造観察が可能レベルとなってきている。細胞は軽元素から構成される薄い試料であるため、CT を用いた高分解能三次元観察は、従来より軟X線領域における吸収コントラストによって行われてきた。本課題において、硬X線領域での位相コントラスト観察が実現すれば、軟X線では観察が難しい試料への適用性を大きく広げることが可能となる。

本課題では、X線特有のイメージング技術であるトモグラフィ観察手法を併用することによって、細胞試料の3次元的な構造観察をはじめ硬X線領域にて試みるものである。

実験方法：

観察は、鈴木、竹内らによって開発されてきた屈折プリズムとフレネルゾーンプレート（FZP）を用いた二光束ホログラフィX線顕微鏡によった。光学系は図1の通りである。

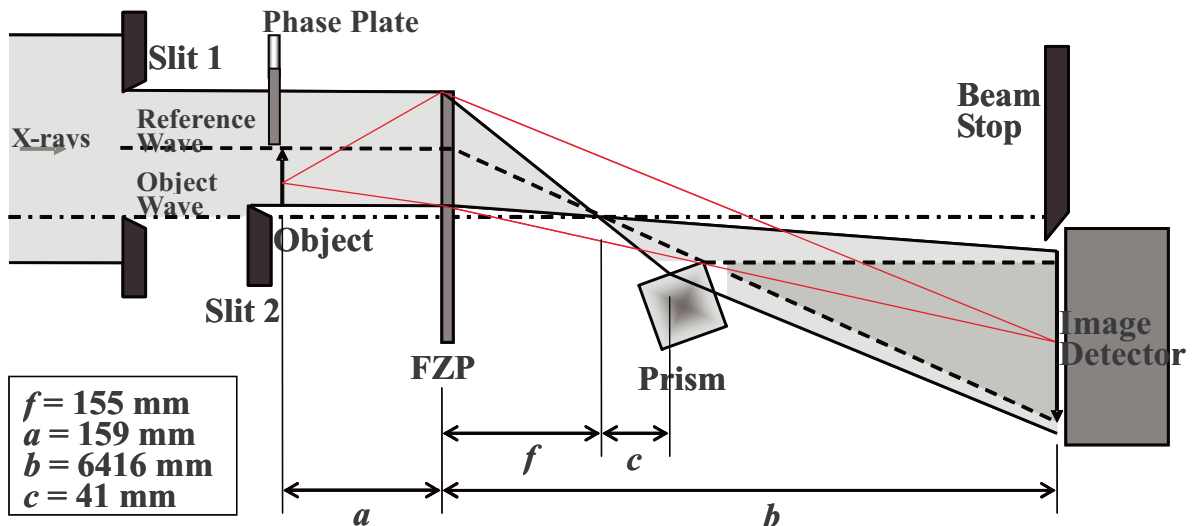


図1. 位相コントラストイメージングの光学レイアウト

実験は、BL-20XUの第二ハッチ（光源からの距離245 m）にて行い、利用波長は、0.1 nmである。用いたフレネルゾーンプレート（NTTアドバンステクノロジー社製）の仕様は以下の通りである：

最外輪帯幅 100 nm、直径 155 μm 、材質 Ta、厚さ 1 μm

検出器は、ピクセルサイズ 3.14 μm の可視光変換型 CCD（浜松ホトニクス社製）である。

アクリル製 X 線プリズムを、二光束干渉計として用いている。また、ホログラムの再構成は、位相板を用いた縞走査法によって行っている。

細胞試料は、ヒト HeLa 細胞を SiN 膜上に培養後、グルタルアルデヒド固定、ついで臨界点乾燥を行ったものを用いた。

実験結果：

1) 分解能評価

Ta 製の標準試料を用いた分解能評価を行った。その結果、同光学系で約 0.3 ミクロンの空間分解能が得られ、ほぼ理論値と一致することが確かめられた。

2) 位相感度の推定

軽元素の試料として、一様な密度もつポリスチレン球を様々な直径で観察した結果、直径 1 μm 以下の試料は観察できなかった。これにより位相感度は 3σ で $1/20$ 波長程度と見積もられた。これは、現状では縞走査の測定精度誤差により決まっていることがわかった。

3) 細胞観察

図 2 は、細胞の位相差光学顕微鏡像（パネル a）と赤枠で囲んだ領域の X 線位相コントラスト像（パネル b）である。細胞周辺部はおそらく 1 μm 以下の厚さと推定されるが、そのような薄い部分でも輪郭が硬 X 線によって検出されている。細胞内部構造としては、核領域とさらにその内部の核小体と思われる密度の高い部分が識別できることが判明した。また、縞走査の測定誤差による偽像が、図中で水平方向の筋状のノイズとして現れている。

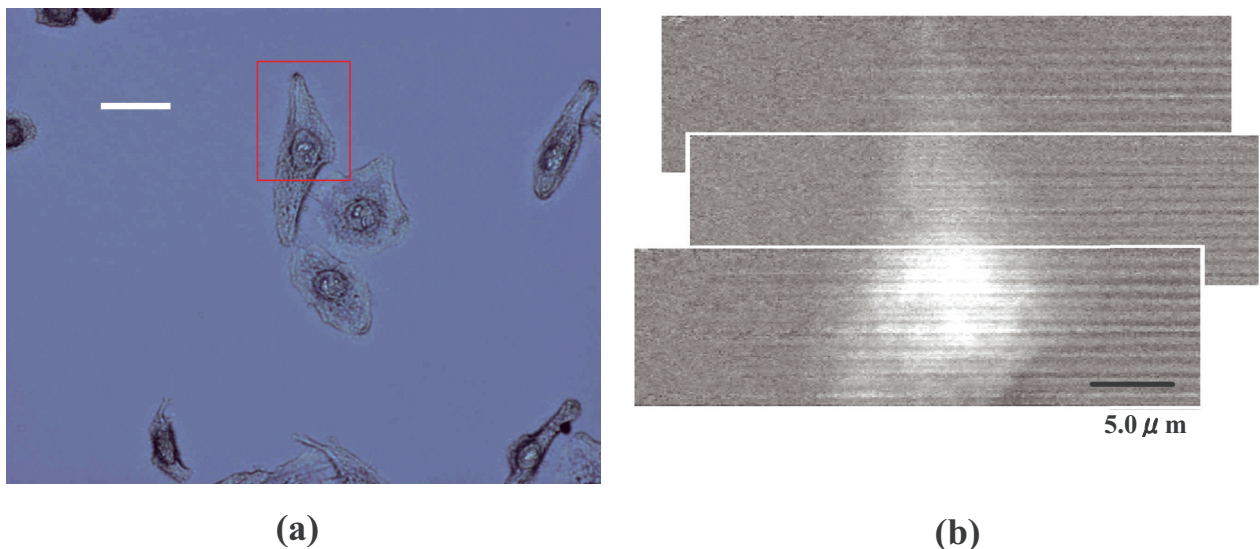


図 2. ヒト HeLa 細胞の観察。

(a)位相差光学顕微鏡像。スケールバーは 25 μm 。(b)X 線位相像。3 枚の位相像を繋ぎ合わせた。

図3は、分裂期直後と思われる細胞の位相差光学顕微鏡像（パネル a）と X 線位相コントラスト像（パネル b）である。細胞内の密度の濃淡が明らかである。また、パネル a において、細胞周囲に微絨毛（microvilli）が観察されるが、X 線位相コントラストでの検出は困難であった。

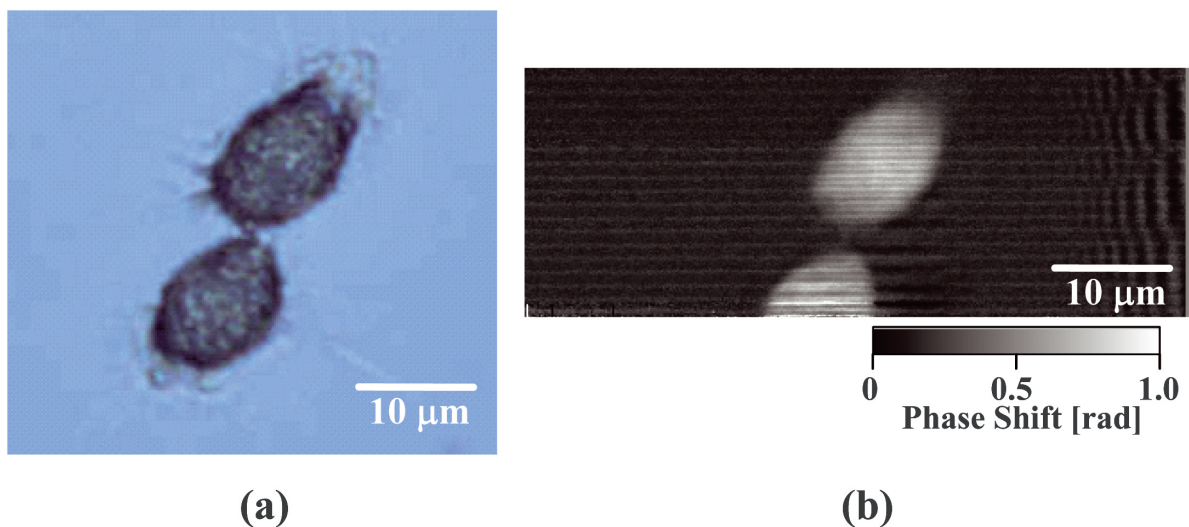


図3. ヒト HeLa 細胞（分裂期）の観察。
 (a)位相差光学顕微鏡像。(b)X 線位相像。

4) CT 観察

図4は、ポリスチレン球（ $8\ \mu\text{m}\phi$ ）の位相差 X 線顕微鏡像（パネル a）と X 線位相顕微 CT による AB 面での再構成断層像（パネル b）である。再構成像から、試料の位相分布の三次元的な概形が再構成できていることが確かめられた。試料の保持に用いたガラスキャピラリの断面も確認できる。しかしながら、二次元の X 線位相像同様に、縞走査の測定誤差が原因と思われるリングアーティファクトの影響により、一様な分布を示すはずのポリスチレン球内部のコントラストが大きく乱れてしまっており、今後改善すべき点である。

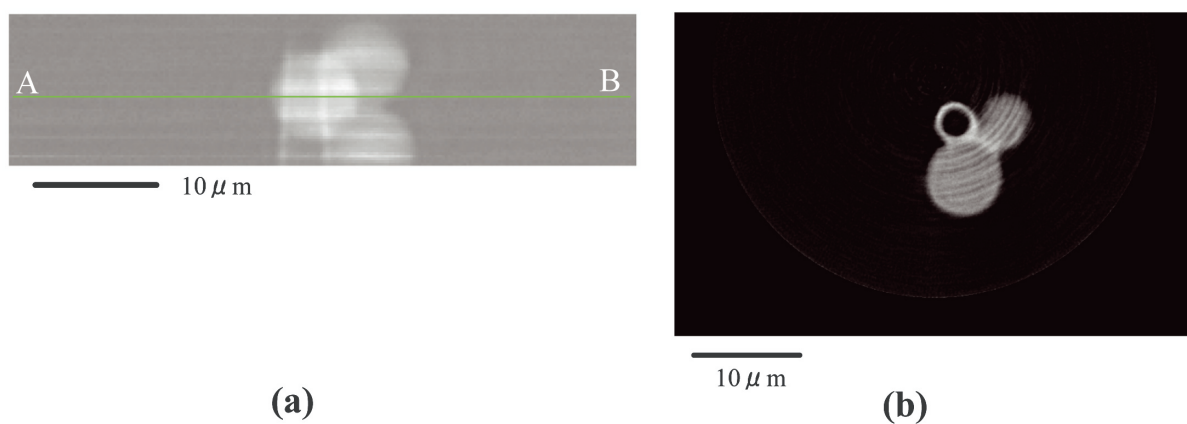


図4. ポリスチレン球（ $8\ \mu\text{m}\phi$ ）の X 線画像。
 (a)位相透過像。(b)CT による再構成断層像。

まとめと今後の課題：

波長 0.1 nm の硬 X 線領域にて、薄い細胞試料の形態観察の可能性が示された。内部構造は、核及び核小体の識別が可能であったが、さらに高分解能化が望まれる。今後の課題としては、位相感度を現状の 1/20 波長程度から向上させること（理想的にはさらに 10 倍程度）、縞状のアーティファクトを改善すること、があげられる。

CT 観察については、2 次元画像の分解能向上をふまえて再度試みたい。