

X線顕微鏡 nano3DX の生体アプリケーション

国島 直樹*

1. はじめに

構造生物学は、生体の構造に基づいて生命現象を理解する学問であり、医療や創薬などの基盤として今後本格的な発展が見込まれる。生体構造には階層性があり、個体・組織レベルから分子・原子レベルまでのシームレスな構造観察が究極的には必要である。しかし、現状では生体の構造観察は様々な手法に分断されており、さらなる技術発展および連携が望まれる。リガクの nano3DX は、独自の高輝度 X 線発生装置と高解像度検出器による近接撮影方式を採用した、実験室

系の高分解能 X 線顕微鏡である⁽¹⁾。X 線顕微鏡の特長は、X 線の高い透過性を利用して分厚い試料の内部構造を観察できる点にある。したがって X 線顕微鏡は、超高分解能ながら分厚い試料の観察に向かない電子顕微鏡や、ライブイメージングに向くが蛍光ラベルされた物質しか見えない蛍光顕微鏡と相補的な関係にあり、今後特に生体アプリケーションへの展開が期待される。

2. nano3DX による観察の手順

X 線顕微鏡による観察で直接得られる画像データは 2 次元の投影画像であるが、CT (Computed Tomography) と呼ばれる計算手法により 3 次元画像が再構成される。nano3DX の近接撮影方式は、従来の拡大投影方式の X 線顕微鏡に比べて光源ドリフトの影響が少なく、理想的な条件ではサブミクロンレベルの高分解能観察が可能である⁽¹⁾。nano3DX では試料の X 線透過性に応じて 4 種類のターゲット (Cr, Cu, Mo, W) からの特性 X 線や連続 X 線を選択できるが、ほとんどの生物試料は Cu または Mo ターゲットでカバーできる。観察の理論的背景については別の報告を参照されたい⁽²⁾。生体試料の観察では多くの場合、画像コント

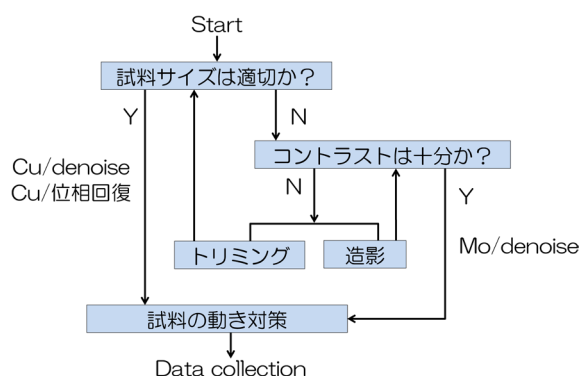


図1. 基本的な撮影のワークフロー。

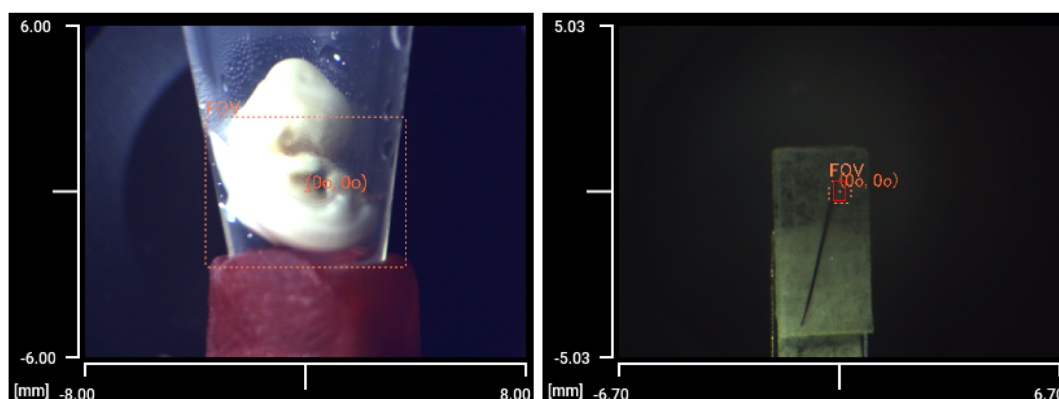


図2. 撮影試料のマウント法。

染色マウス胎児 (左; 理研・田村勝先生ご提供) および無染色ヒト毛髪 (右) のマウント例を示す。

* 株式会社リガク X 線研究所

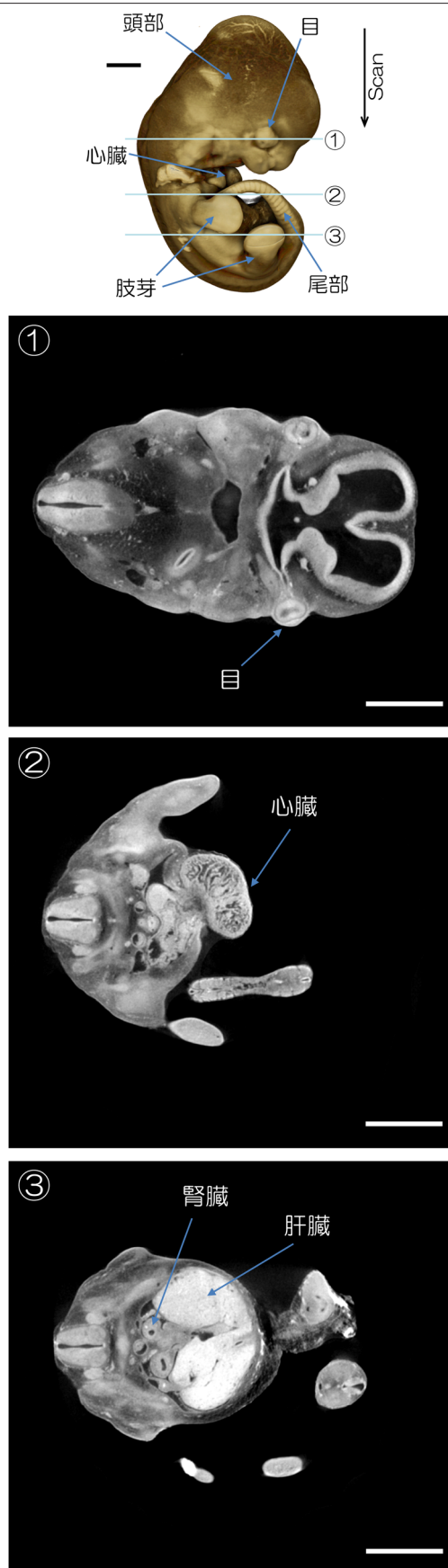


図3. 造影によるコントラスト増強。
PTA染色した12.5日目マウス胎児試料（理研・田村勝先生ご提供）をnano3DXで観察した。CT再構成像の全体の立体表示（上）および番号の位置の3枚のCTスライス（下）。スケールバー：1 mm。

ラストの低さが問題となるが、造影法や位相回復法によりコントラストを増強することができる。

X線顕微鏡による撮影の基本的なワークフローを図1に示す。試料サイズが適切かどうかは試料の構成元素と選択したX線のエネルギーからX線減衰長のグラフ（Web⁽³⁾で公開されている）を参照して判断する。例えば、主な構成元素が炭素の無染色生物試料でCuターゲットのX線を使う場合、光路長として2 mm以下（水を含む試料は含水量に依存して1～2 mm以下）のサイズが望ましい。造影試料などの場合はこの限りではない。コントラストが十分かどうかは投影像を1枚撮ってみることで判断でき、試料中の注目部分が入射X線の約半分を透過する状態がよい。コントラストが不十分であればトリミングしてサイズを調整するか、適切な重原子試薬により造影する。小サイズでコントラストが低い無染色試料の場合は、一般的なメジアン・ガウシアン補正によるノイズ低減（denoise）または位相回復によりコントラストを増強する。造影試料や骨など、吸収の大きい物質が観察対象の場合は、MoターゲットのX線を用い、必要に応じてdenoiseによりコントラストを増強する。撮影中の試料の動きによりCT再構成に失敗する場合は、試料のマウント法を検討する。

3. 撮影試料のマウント法

現状のCT再構成は撮影中の試料位置のドリフトを考慮しておらず、その影響が避けられない。特に生体アプリケーションでは、蒸発や熱伸縮による試料自体の変形がこのドリフトの主な原因となるため、試料のマウント法を慎重に検討する必要がある。現状で有効なマウント法としては、以下のようなものが挙げられる。ホルマリン固定された液浸試料では、プラスチックチューブ中にウェット状態でマウントする方法が推奨される（図2左；染色マウス胎児）。この方法では、蓋をして密閉することで蒸発による変形を防ぐ。市販の各種ディスプレイチューブが利用できるが、機器本体との接触に気をつける必要があり、チューブ蓋のフラップ部分を切除しておくリスクが軽減される。リガクがnano3DXのオプション器具として販売している試料連続測定アタッチメントを利用すると安全である。チューブ中の試料は重力および表面張力によってゆるく固定されているだけであるが、大抵の場合CT再構成に問題はない。問題がある場合は1%アガロース包埋⁽⁴⁾を検討するとよい。一方、含水量の低い毛髪や乾燥種子などの場合は、両面テープ固定が有効である（図2右；無染色ヒト毛髪）。両面テープで固定しにくい場合は、歯科用ワックス（例えばUtility Wax; GC Corporation）や接着剤などの使用を検討する。

4. 造影によるコントラスト増強

適切な重原子試薬を用いて染色することにより、生物試料の吸収コントラストを増強することができる。ホルマリン固定してリンタンゲステン酸 (PTA) で染色したマウス胎児を nano3DX で観察した例を図3に示す。発生12.5日目のマウス胎児は体長約8 mmの大きな試料であるが、PTA 染色し Mo ターゲットのX線で撮影することにより、全身の臓器の詳細構造が確認できた。なお、この例では2つのデータセットをつなぎ合わせて胎児全体のCT再構成像を得た。

5. 位相回復によるコントラスト増強

実験室系のX線源を使い nano3DX で撮影した吸収の弱い試料の投影像には、物質の境界にフリンジと呼ばれる屈折による特徴的なコントラスト構造が試料と検出器の距離に依存して現れる。このフリンジのプロファイルから位相情報を計算することが可能であり、これを位相回復と呼んでいる^{(5),(6)}。硬X線のエネルギー領域ではコントラストへの位相の寄与が吸収の寄与よりもはるかに大きいので、うまく位相回復できればコントラストは顕著に増強される⁽⁷⁾。位相回復によるヒト無染色毛髪試料のコントラスト増強例を図4に示す。この場合は試料と検出器の距離を4 mmに

セットし、0.63 μm の画素サイズで撮影した。位相回復のアルゴリズムはPaganinの方法を用い、試料が炭素でできていると仮定するパラメーター ($\delta/\beta=600$)で行った。元のCTスライス画像では物質境界にフリンジが見られるが、位相回復画像ではフリンジが消えコントラストがSN比で10倍以上増強されている。その結果、毛髪の中央にあるメデュラと呼ばれる低密度部分などがよりはっきり見えるようになった。このようにコントラストが増強されると、画像処理ソフトウェアを使い興味のある部分を自動抽出することも可能になる。別の例を図5に示す。無染色のパンジー種子を生きた状態で試料ステージに固定し撮影したものである。試料と検出器の距離は7 mm、その他の条件は図4と同じである。元のCTスライス画像ではほとんど何の構造も見られなかったが、位相回復によってコントラストが増強された結果、胚とその内部構造がはっきりと観察できた。

6. おわりに

X線顕微鏡は工業材料などへの適用⁽⁸⁾が進んでいるが、構造生物学への適用についてはこれからである。構造生物学の対象には階層性があり、X線顕微鏡は組織～細胞レベルの構造を観察する。本稿で示した

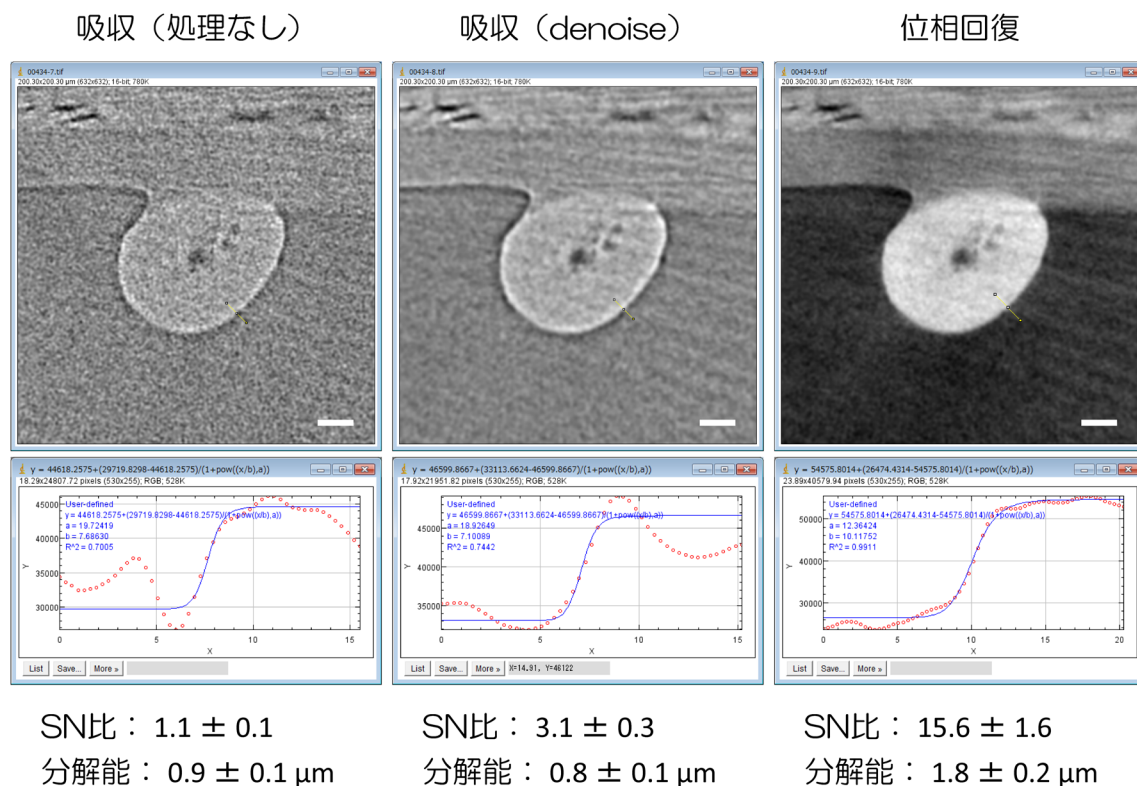


図4. ヒト毛髪の観察。

無染色のヒト毛髪 (まつ毛) を nano3DX で観察した。CT再構成像における毛髪断面の見える同位置のCTスライスを3通りの処理で比較した: 処理なし (左), 一般的な median/Gaussian ベースのノイズ低減処理 (中央), Paganin の方法による位相回復処理 (右)。スケールバー: 20 μm 。グラフは各々のCTスライスにおける黄線に沿った強度プロファイルと分解能を求めるフィッティング曲線を示す。各々のCTスライスから求めたSN比および分解能を平均値 $\pm$ 95%信頼範囲 ($n=5$) で記した。

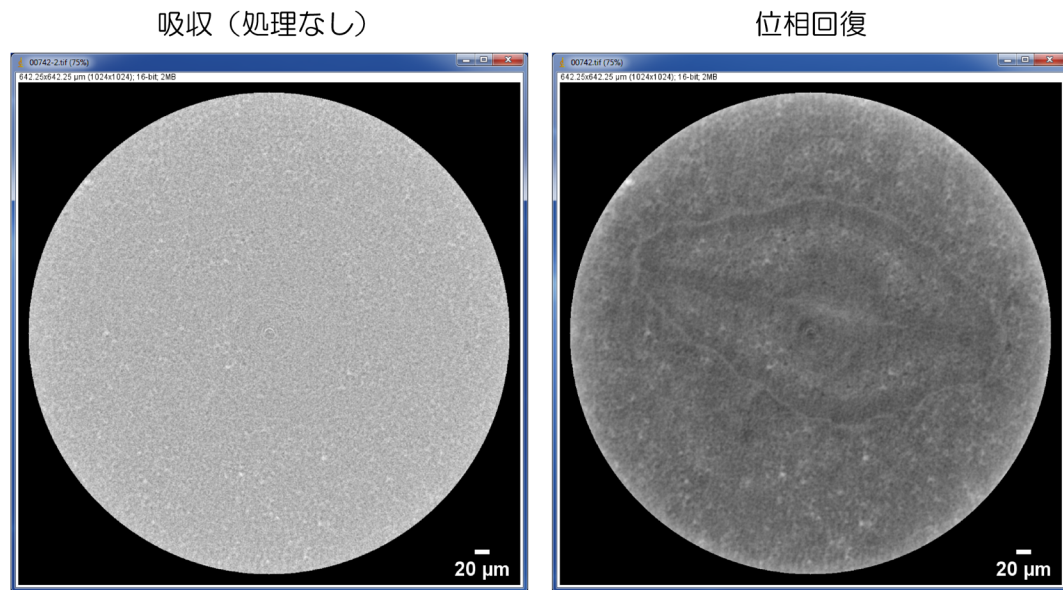


図5. パンジー種子の観察.

無染色のパンジー種子を nano3DX で観察した。CT 再構成像における胚断面の見える同位置の CT スライスを 2 通りの処理で比較した：処理なし（左）、Paganin の方法による位相回復処理（右）。

ように、マウス胎児のような大きな試料の場合は適切な造影によって組織レベルの立体構造観察が可能であり、毛髪や種子のような無染色試料の場合は位相回復により細胞レベルの立体構造観察が可能である。リガクでは医療応用を中心とした nano3DX の生体アプリケーションの開拓を進めており、また、細胞内小器官を観察できるレベルの次世代実験室系 X 線顕微鏡の開発を進めている。将来的には、X 線顕微鏡・蛍光顕微鏡・電子顕微鏡・X 線結晶構造解析の相補利用によるシームレスな生体試料観察を実現する必要がある。生物の階層構造のシームレスな観察は、構造生物学のみならず医療診断などにも極めて有用であろう。

参考文献

- (1) リガクジャーナル, **43** (2012), No. 2, 28–30.
- (2) 武田佳彦, 濱田賢作: リガクジャーナル, **45** (2014), No. 2, 7–12.
- (3) 例えば http://henke.lbl.gov/optical_constants/atten2.html
- (4) M. D. Wong, A. E. Dorr, J. R. Walls, J. P. Lerch and R. M. Henkelman: *Development*, **139** (2012), 3248–3256.
- (5) D. Paganin, S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller and S. W. Wilkins: *J. Microscopy*, **206** (2002), 33–40.
- (6) D. Kalasová, T. Zikmund, L. Pina, Y. Takeda, M. Horváth, K. Omote and J. Kaiser: *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, (2019), in press.
- (7) 百生 敦: 放射光, **10** (1997), No. 3, 273–285.
- (8) 武田佳彦: リガクジャーナル, **50** (2019), No. 1, 30–33.