

6. 研究活動実績

6.1 生体細胞観察のための超高精度X集光線ミラーの作製と硬 X 線ナノ分光イメージングシステムの開発

(1) 研究の背景と目的

細胞観察において一般的に、光学顕微鏡が用いられているが、波長の大きさが数百 nm であるためミトコンドリアやゴルジ体といった細胞小器官の内部を観察することは不可能である。また、電子顕微鏡は 1nm 以下の分解能を持っており、その高い分解能から医学、生物学分野において様々な新しい発見が見出されたが、試料を真空中に配置する必要があるため試料の種類や状態が制約される。このような背景から現在、高分解能かつ大気圧下で測定可能な顕微鏡の開発が求められている。

これらの要求を答えるツールの一つとして硬 X 線顕微鏡が挙げられている。硬 X 線顕微鏡は大気圧下で測定可能であり、分解能の点でも 10nm 以下が期待されている。また観察と同時に試料の X 線分析が可能であるため、電子顕微鏡よりも多くの情報を得ることができる。

本研究では、これまで研究されてきた超精密加工技術と超精密計測技術を用いて超高精度X集光線ミラーの作製を行い、それらを集光光学系として用いることで、細胞内の元素分布を高感度かつ高分解能で可視化可能な走査型蛍光 X 線顕微鏡の開発を目指した。

(2) 超高精度 X 線集光ミラーの作製

高分解能かつ高感度を実現するためには、ミラーの形状をナノメートルレベルで作製することが不可欠である。大面積の超精密加工である EEM(Elastic Emission Machining)、光干渉計を用いたステッチング計測法である MSI (Microstitching Interferometry)と RADSI (Relative Angle Determinable Stitching Interferometry)を応用したミラー製作システム[6.1-1,2]を独自に構築することで、非球面ミラーの形状を形状精度 1nm レベルで作製することに成功した(図 6.1.1)[6.1-3]。

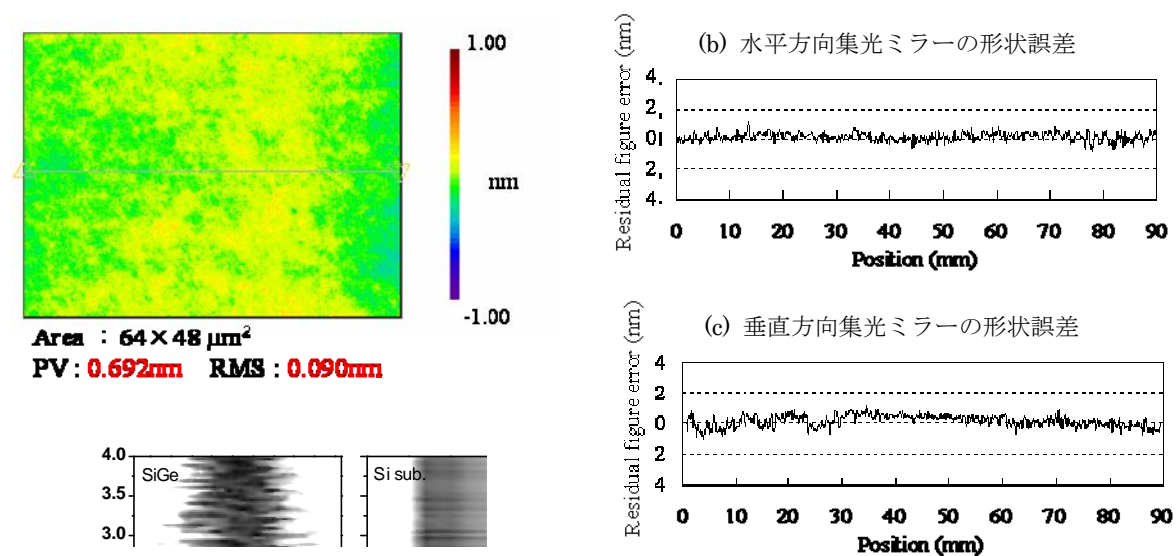


図 6.1.1 作製した X 線集光ミラーの特性

(3) 走査型蛍光 X 線顕微鏡の開発

作製した X 線集光ミラーを高精度のアライメントすることが可能なミラーマニピュレータを開発し、高分解能で試料を走査可能なステージと蛍光 X 線の検出系を組み合わせることで走査型蛍光 X 線顕微鏡シ

システムを構築した(図 6.1.2)[6.1-3,4]。

SPring-8 BL29XULにて性能を評価した結果、本集光システムによって30nm×50nm(H×V, 半値幅)の硬 X 線ナノプローブを実現できることを確認した(図 6.1.3)。また実際に本顕微鏡システムを用いて、約60nmの線幅で描かれた微小なテストチャート内に埋め込まれたガリウム元素を最小ビーム径程度の分解能で可視化できることを実証した(図 6.1.4)[6.1-3]。

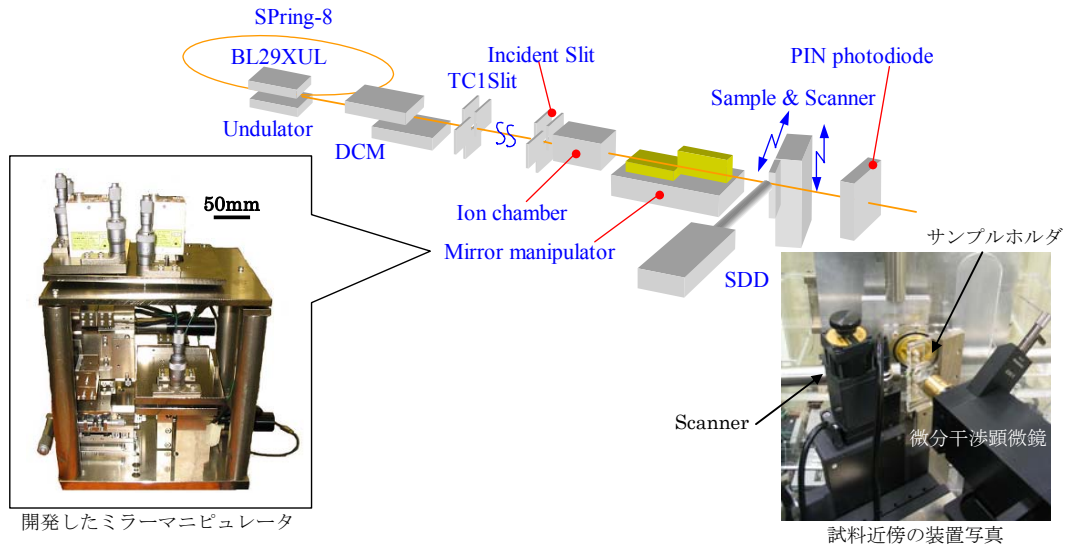
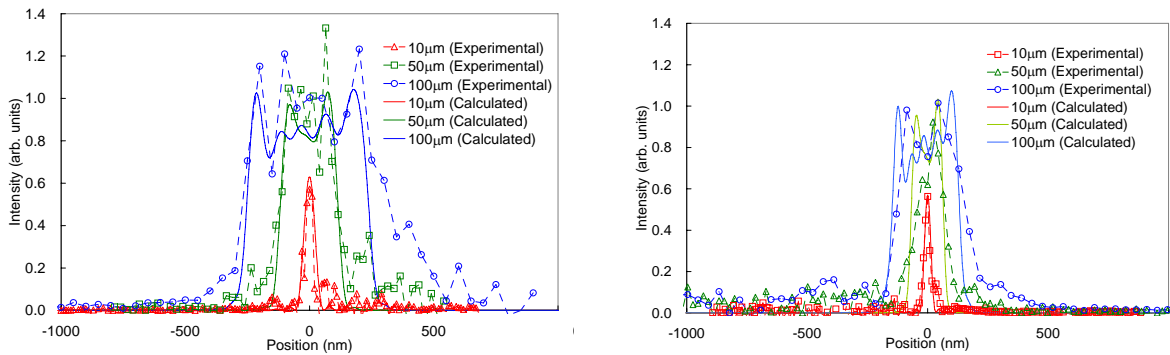


図 6.1.2 開発した走査型蛍光 X 線システム



(a) 垂直方向集光ミラー

(b) 水平方向集光ミラー

図 6.1.3 得られた硬 X 線ナノビームのビームプロファイル(エネルギー:15keV)

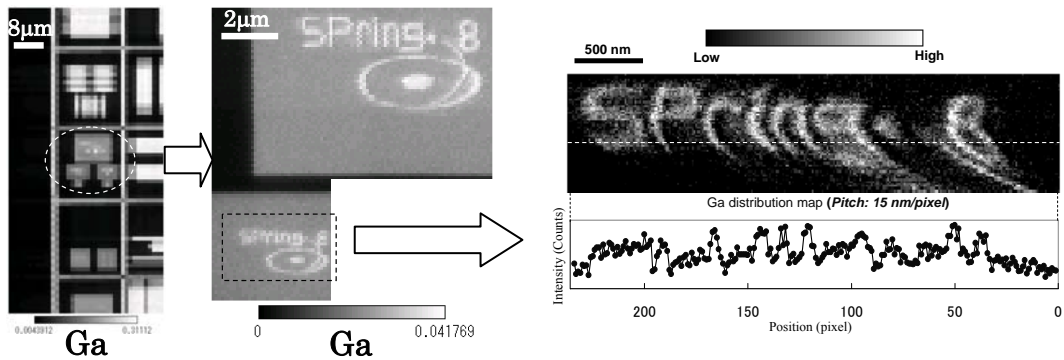


図 6.1.4 テストチャート内に埋め込まれたガリウム元素を観察した結果

(4) 細胞内元素分布の観察

細胞内の元素分布を測定可能であることを実証するために、本顕微鏡を用いて培養細胞内の元素分布を観察した。試料は $4\mu\text{m}$ 厚の高分子フィルム上に直接マウス繊維芽細胞を培養し、ミトコンドリアに直径 5nm の金コロイドと蛍光色素である FITC をラベルした。観察の結果、ミトコンドリアにラベルした金の分布だけでなく、鉄、亜鉛、銅、カリウム、カルシウム、塩素、リンなどを明瞭に可視化することに成功した [6.1-5]。さらにこの時の元素含有量を解析した結果、検出下限は $1\sim 0.005\text{fg}/\mu\text{m}^2$ と超高感度を達成できていることがわかった。

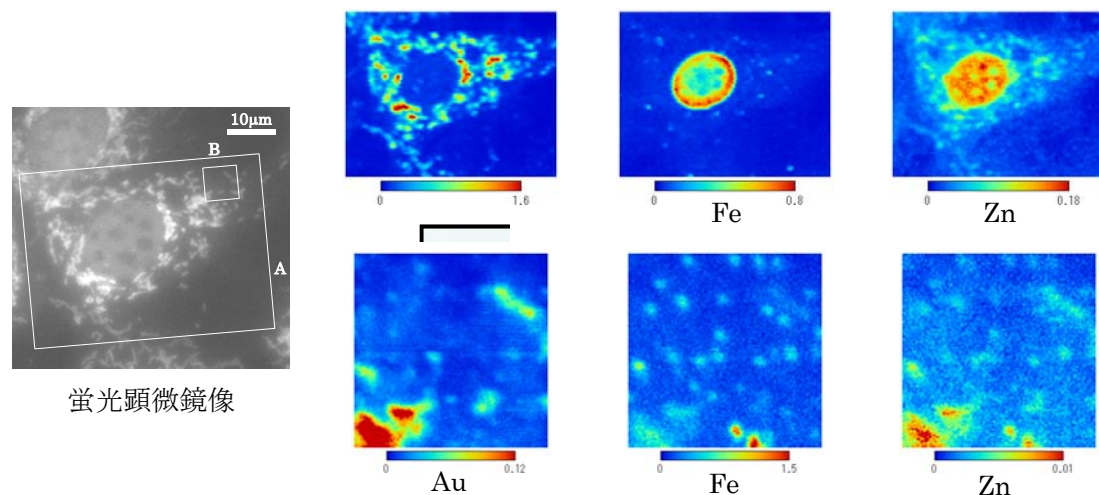


図 6.1.5 測定した細胞内元素分布。上段が領域 A を、下段が領域 B の元素分布を可視化した結果である。カラーバーは元素含有量($\text{fg}/\mu\text{m}^2$)を示している。

(5) 総括と今後の展望

開発した走査型蛍光 X 線顕微鏡はこれまで誰も見ることができなかったナノレベルでの元素分布という世界を、 fg オーダという超高感度で観察することを可能にした。本顕微鏡を用いることで、材料分野、環境分野、医学生物分野など様々な分野において、今後、これまで誰も知ることのできなかつた新たな知見が見出されると予想される。特に、高分解能かつ高感度が要求される生物分野では、その力を最大限発揮し、本研究が癌や難治性の病気の解明に貢献していくことを期待している。また、ハード面においては分解能を向上させることで、電子顕微鏡に迫る分解能で元素イメージングが行える顕微鏡の開発に今現在挑戦している。

参考文献

- [6.1-1] K. Yamauchi et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, 7129-7134 (2003).
- [6.1-2] H. Mimura et al., *Appl. Phys. Lett.*, **90**, 051903 (2007).
- [6.1-3] S. Matsuyama et al., *Rev. Sci. Instrum.*, **77**, 103102 (2006).
- [6.1-4] S. Matsuyama et al., *Rev. Sci. Instrum.*, **77**, 093107 (2006).
- [6.1-5] S. Matsuyama et al., *Proc. SPIE*, **6317**, 631719 (2006).