

X線ライトシートと2次元のX線構造 光を用いた三次元イメージング

所属 理化学研究所

放射光科学研究所 物理・化学系ビームライ
ン基盤グループ 放射光イメージングチーム

氏名 香村 芳樹

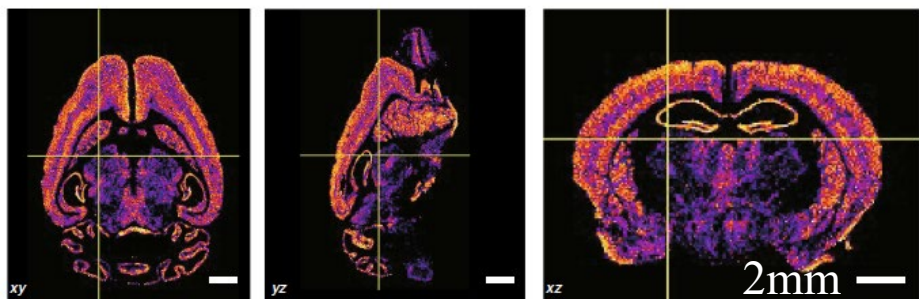
極薄X線ライトシートを使った三次元イメージング イントロダクション

可視光顕微鏡による3Dイメージング 非等方的な3Dの空間解像度 & 回折限界

| | 共焦点顕微鏡 | 二光子励起 顕微鏡 | 可視光ライト シート顕微鏡 |
|---------|------------------|------------------|------------------|
| 面内方向観察 | 二次元走査 | 結像 | 結像 |
| 奥行き方向観察 | z-走査 | z-走査 | z-走査 |
| 測定時間 | × | △ | ○ |
| 照射波長 | λ | 2λ | λ |
| 観測波長 | λ 可視光 | λ 可視光 | λ 可視光 |

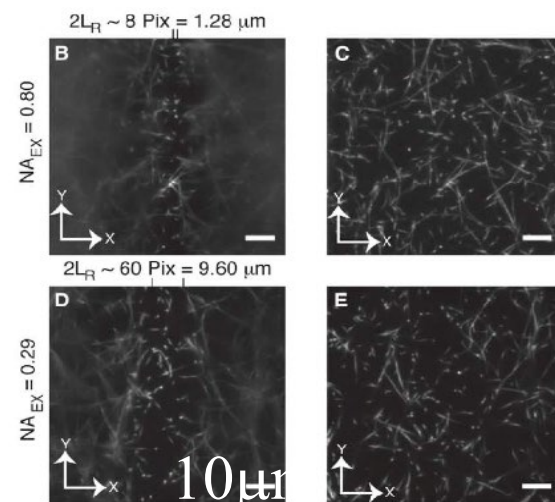
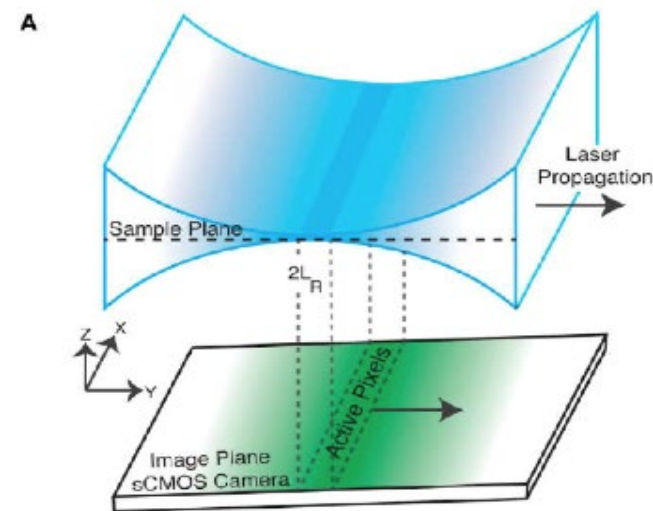
イントロダクション

可視光ライトシート顕微鏡
→ X線領域へ拡張



マウスの全脳(可視光
ライトシート顕微鏡)
Matsumoto et al.
Nature Protocols (2019)

| | 可視光ライトシート顕微鏡 | X線ライトシート顕微鏡 |
|---------------|--------------------|-----------------------|
| 集光サイズ (厚み) | ~0.4 μm | ~0.05 μm |
| 焦点深度 (FOV) | ~10 μm | $\geq 50 \mu\text{m}$ |
| 開口数(NA) | 0.2 | 0.002 |

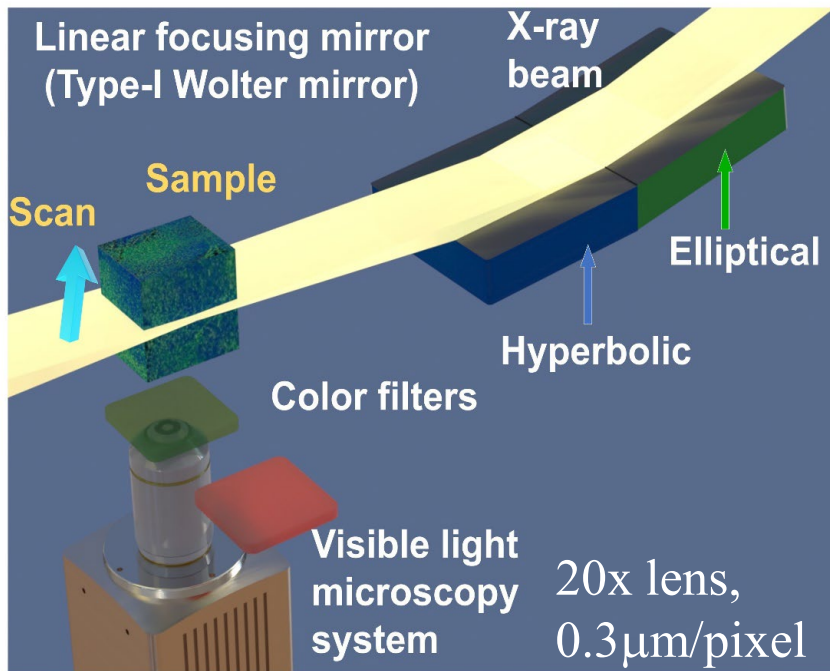


Dean et al.
BioPhysical Journal 2015

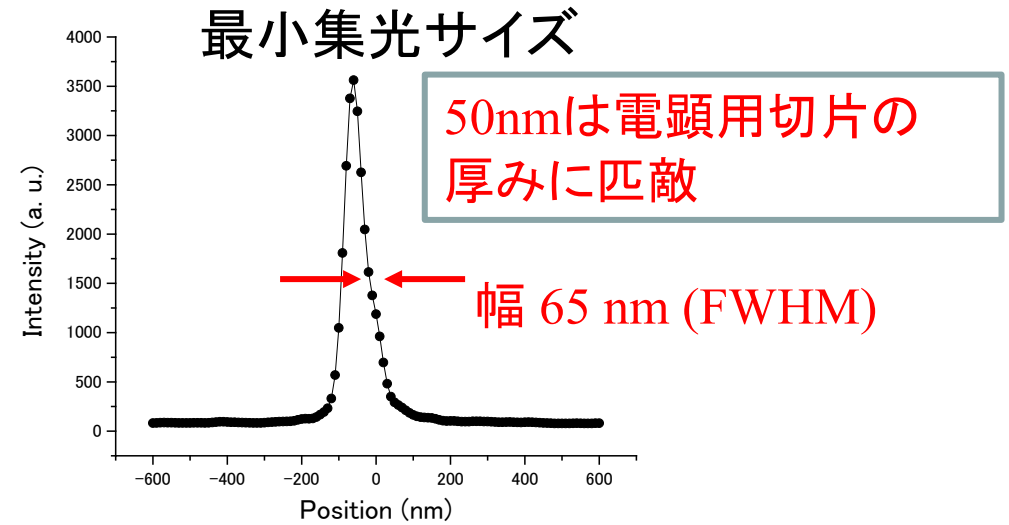
高解像度3Dイメージングでの 奥行解像度のブレークスルー

X線ライトシート顕微鏡

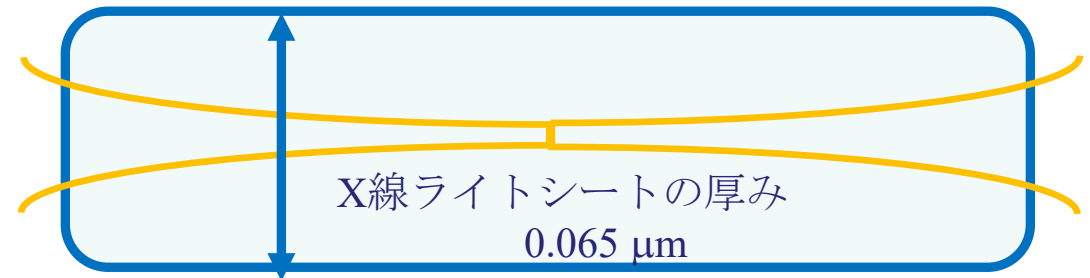
MAXWELL (Microscopy by Achromatic
X-rays With Emission of Laminar Light)



Y.Kohmura et al., Sci. Rep.
12:9668 (2022)



可視光顕微鏡の焦点深度
1.4 μm (20x), 1.1 μm (50x)

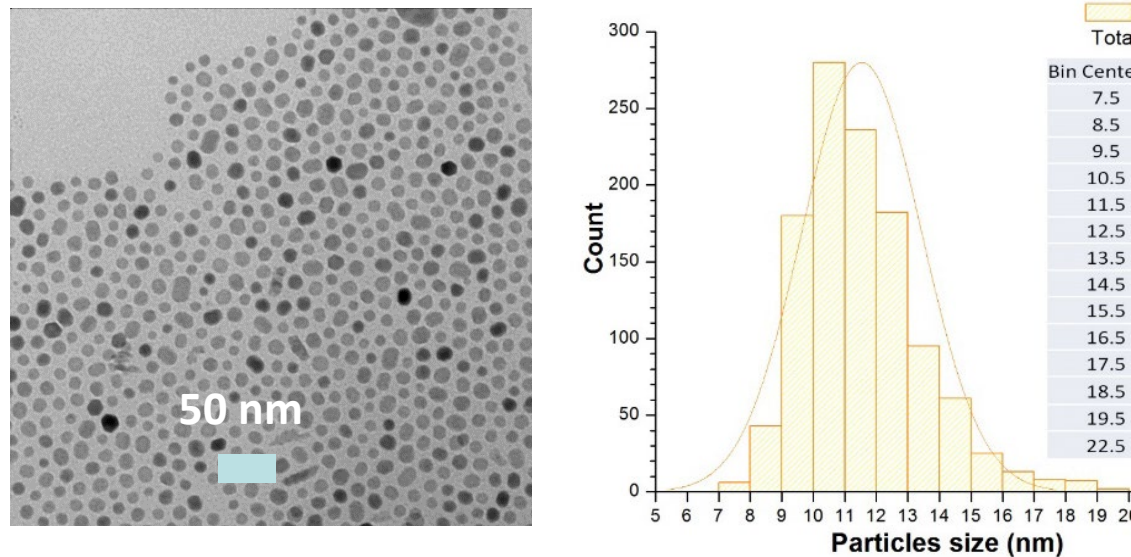


シンチレーターナノ粒子からの
可視発光の観察

シンチレーター微粒子の開発(I)

- 希土類(ランタナイド)元素微粒子: $\text{NaGdF}_4@\text{Tb}$, $\text{NaGdF}_4@\text{Eu}$ (Academia Sinica)

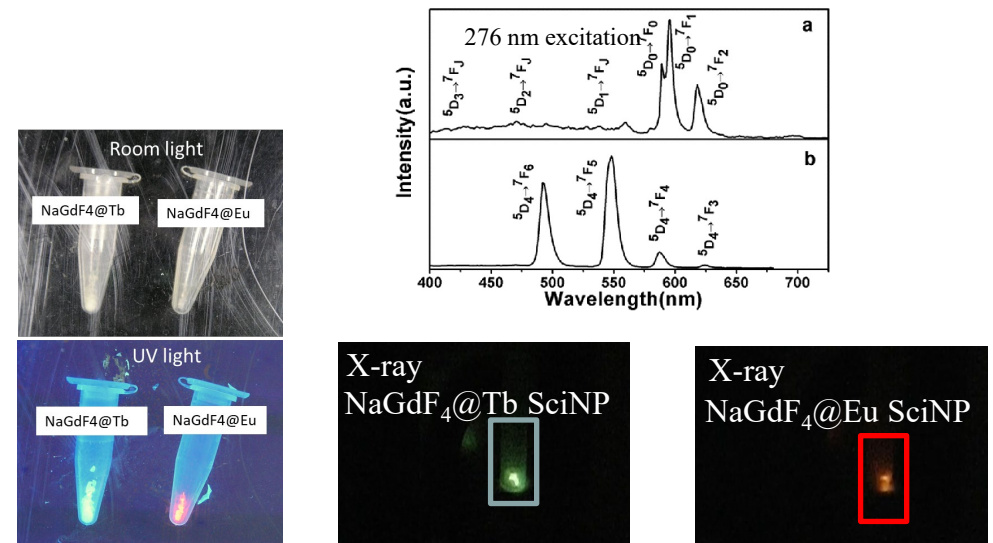
A.



$\text{NaGdF}_4:\text{Tb}$ の微粒子のサイズの分布
(Y.Kohmura et al., Sci. Rep. 2022, 12:9668).

B.

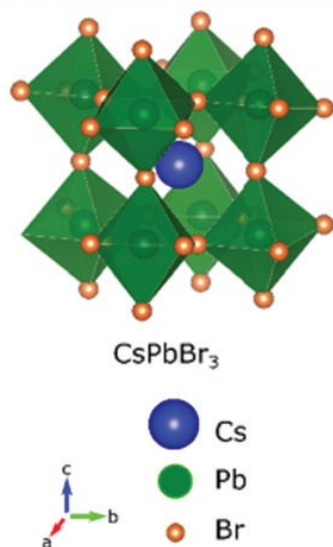
(a) $\text{NaGdF}_4@\text{Eu}$, (b) $\text{NaGdF}_4@\text{Tb}$
発光スペクトル
(Cryst. Eng. Comm.2017, 19, 2065)



シンチレーター微粒子の開発(II)

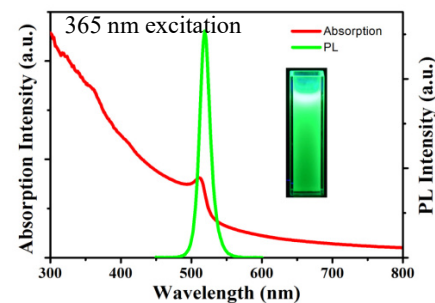
- Perovskite型量子ドットのナノ粒子, CsPbBr₃ (Quantum Corp., Academia Sinica)

A.



立方晶系のCsPbBr₃の結晶構造のシミュレーション結果. (J. Mater. Chem. C, 2020, 8, 17090)

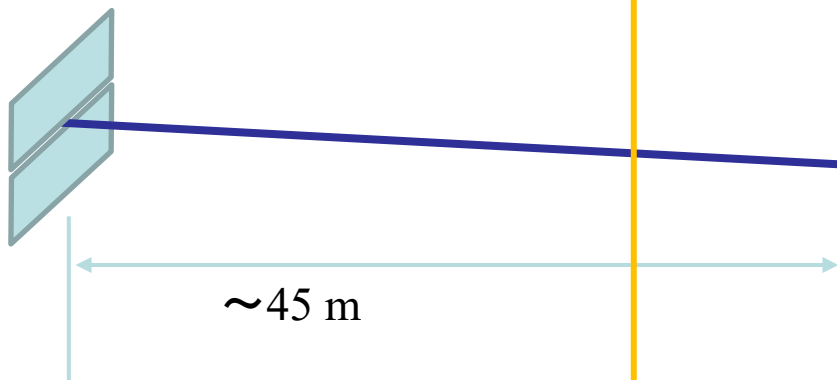
B.



CsPbBr₃の発光スペクトル.
(Optics Express, 2016, 24, 15071)

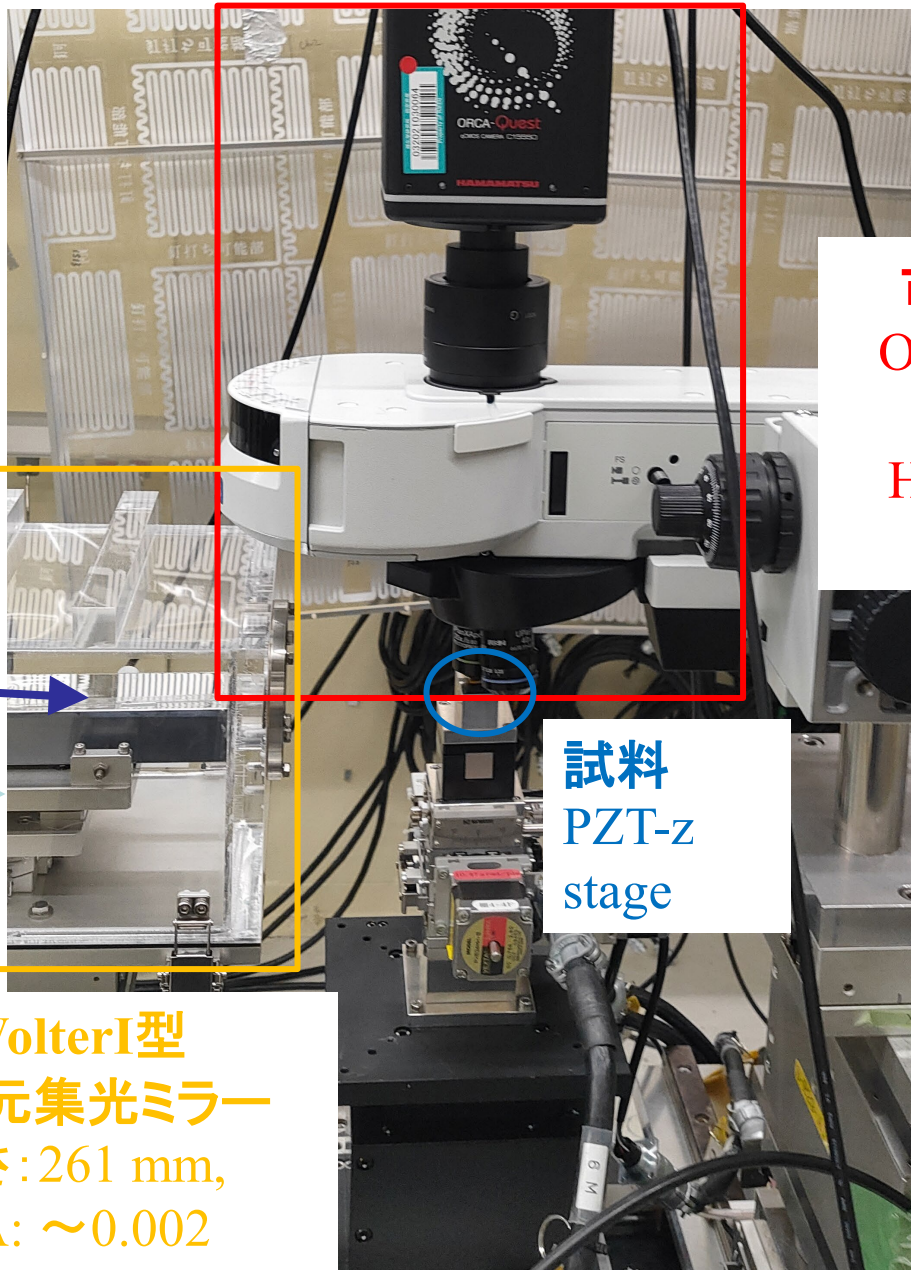
X線ライトシート顕微鏡システム @ BL29XUL-EH3 of SPring-8

硬X線アンジュレーター
ビームライン
9-11keV(典型例)



垂直制限スリット幅
10 ~ 30 μm (典型例)

Wolter I型
一次元集光ミラー
長さ: 261 mm,
NA: ~0.002

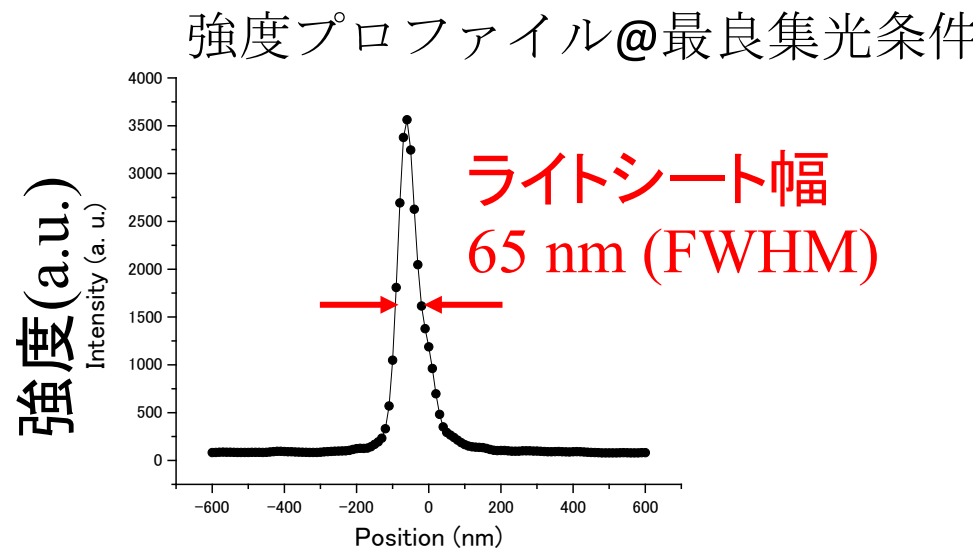
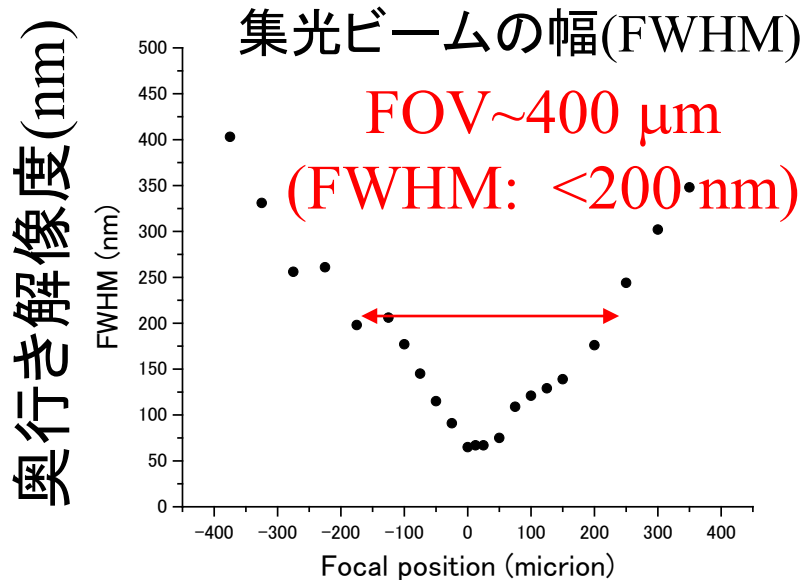
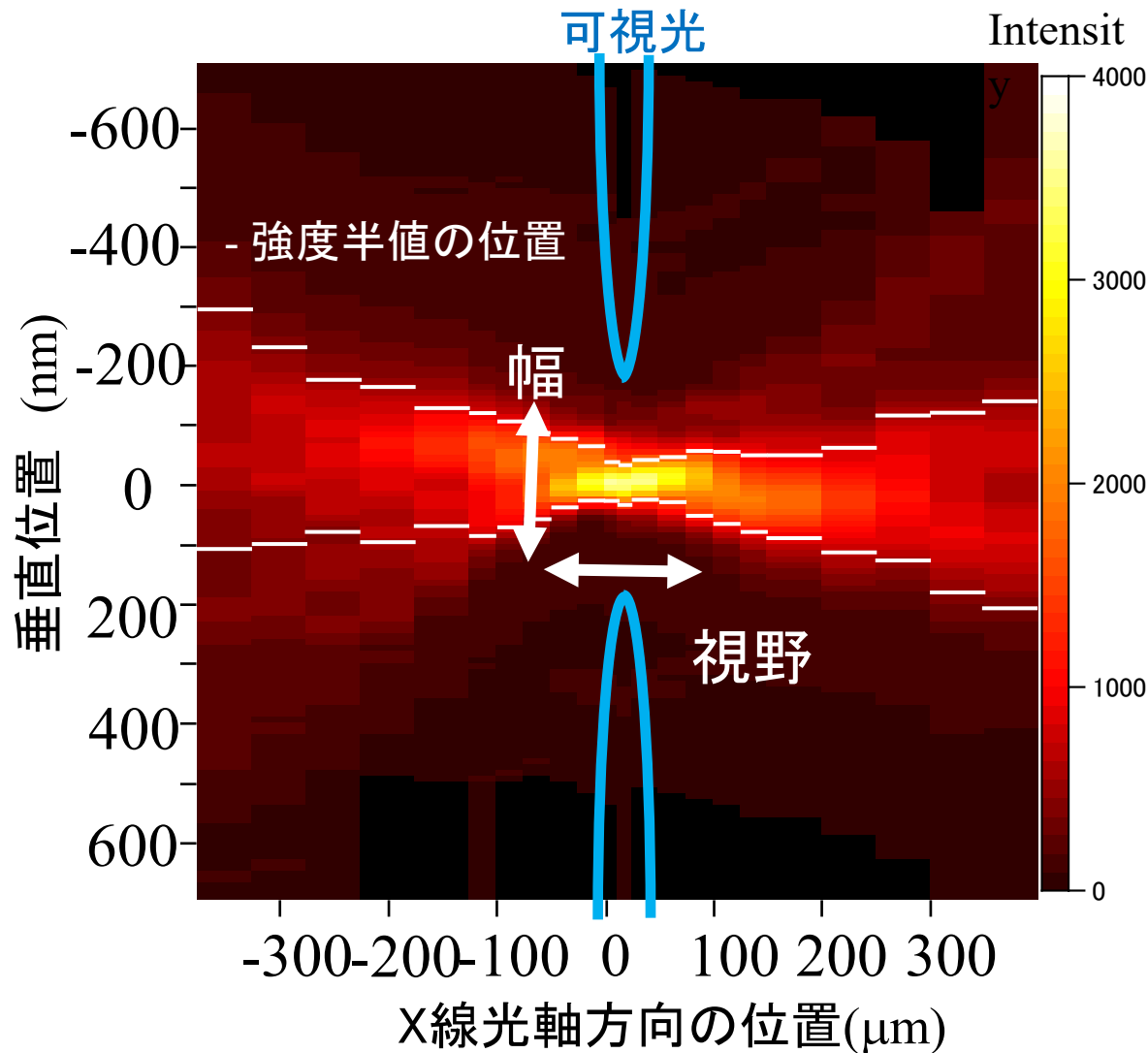


可視光顕微鏡
Olympus BX50 :
x5~50+
HAMAMATSU
ORCA Quest

試料
PZT-z
stage

X線ライトシートの評価

ナイフエッジスキャン結果, 9 keV



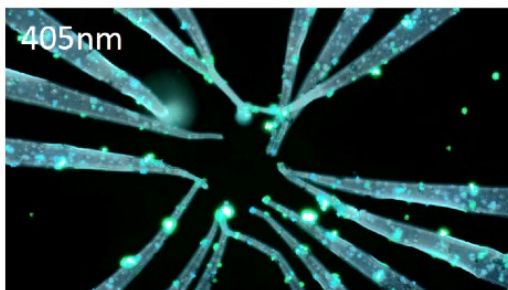
標準試料上の単一粒子イメージング

Perovskite型量子ドットのナノ粒子(CsPbBr_3) : サイズ ~ 20 nm

Y.Kohmura et al., Sci. Rep. (2022) 12:9668

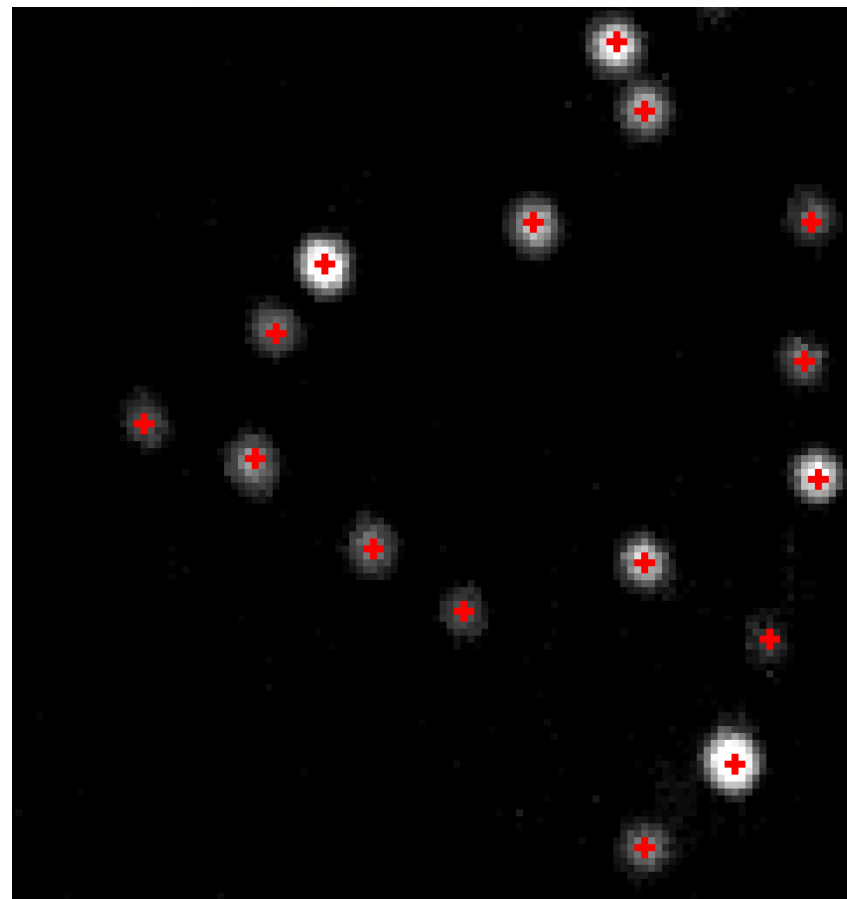
ライトシート顕微鏡実験

11 keV, 露光時間: 1秒
SU8 test pattern
(UV irradiated)

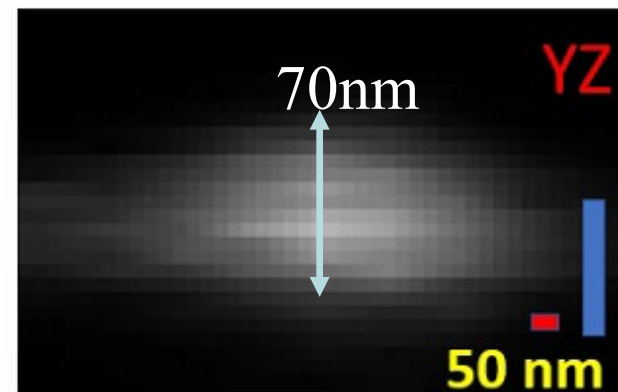
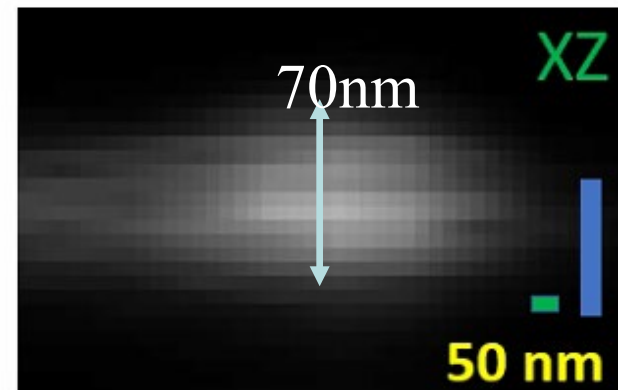


試料提供者
Hwu教授(AS, Taiwan)

3次元でほぼ等方的な
超解像性能!

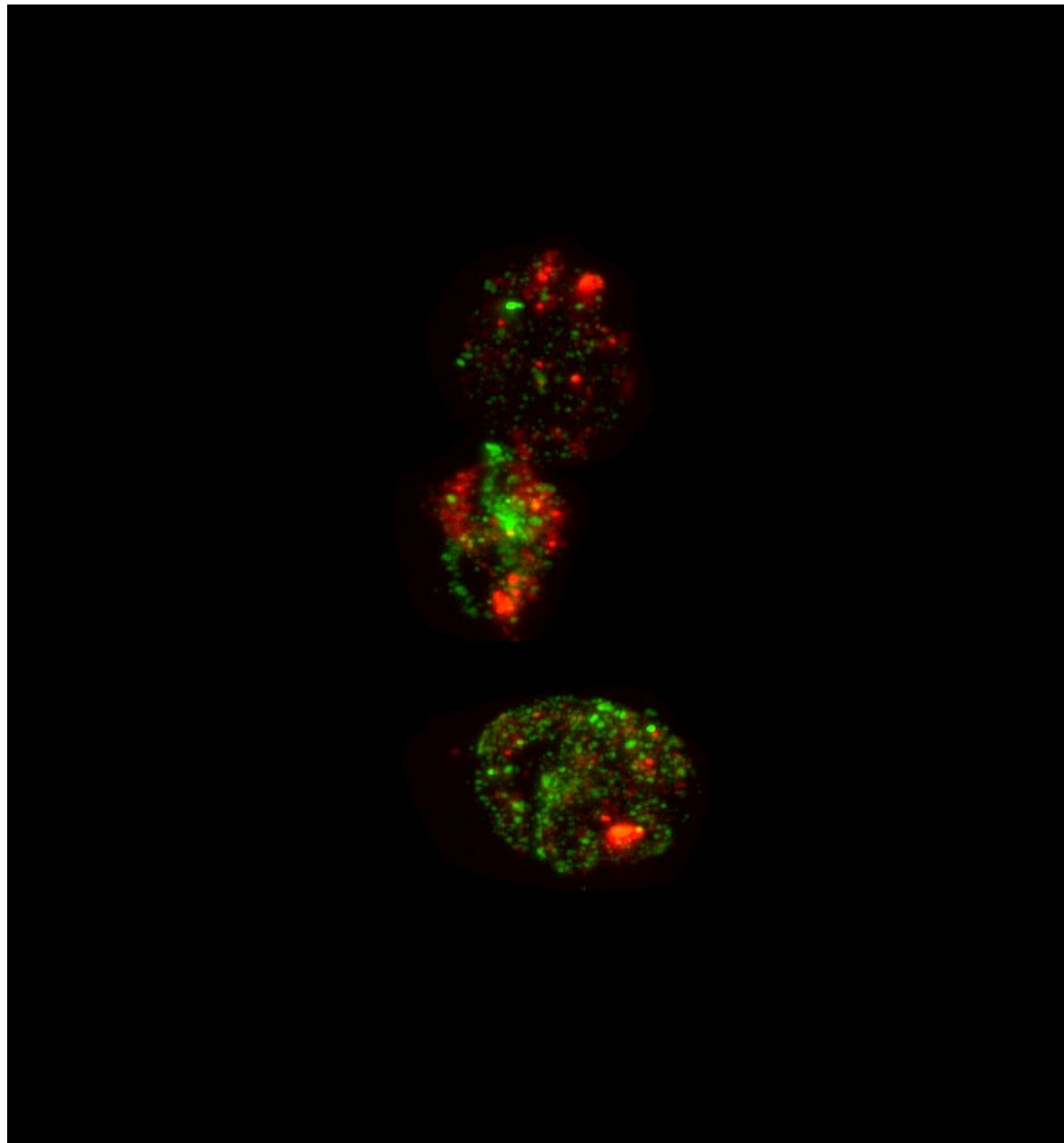


面内分解能 ~ 20 nm(STORM計
算利用による典型例)
 \sim 超解像性能



奥行き分解能 ~ 70 nm
 \sim 超解像性能

Eu & Tbをドーブした粒子を用いた二色の三次元イメージング



STORM法による面内超解像の向上

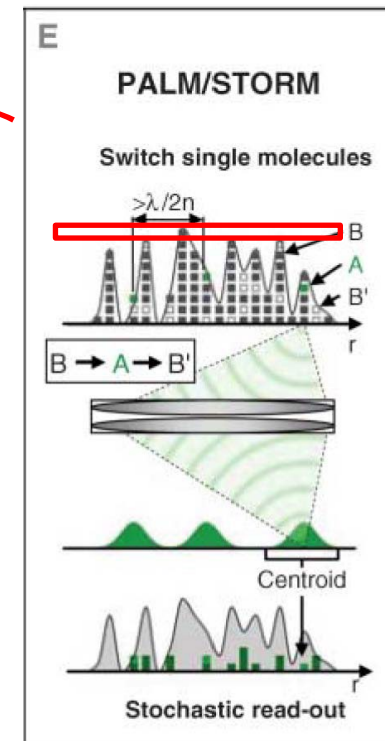
[面内分布]

可視光のSTORM法では、蛍光体の明滅によって、回折限界($0.6\lambda/NA$)内での、複数の蛍光の同時発生を防ぐ。

X線ライトシート



X線ライトシート顕微鏡でも、回折限界内での複数の蛍光の同時発生が防げてSTORM法の有用性が高い。



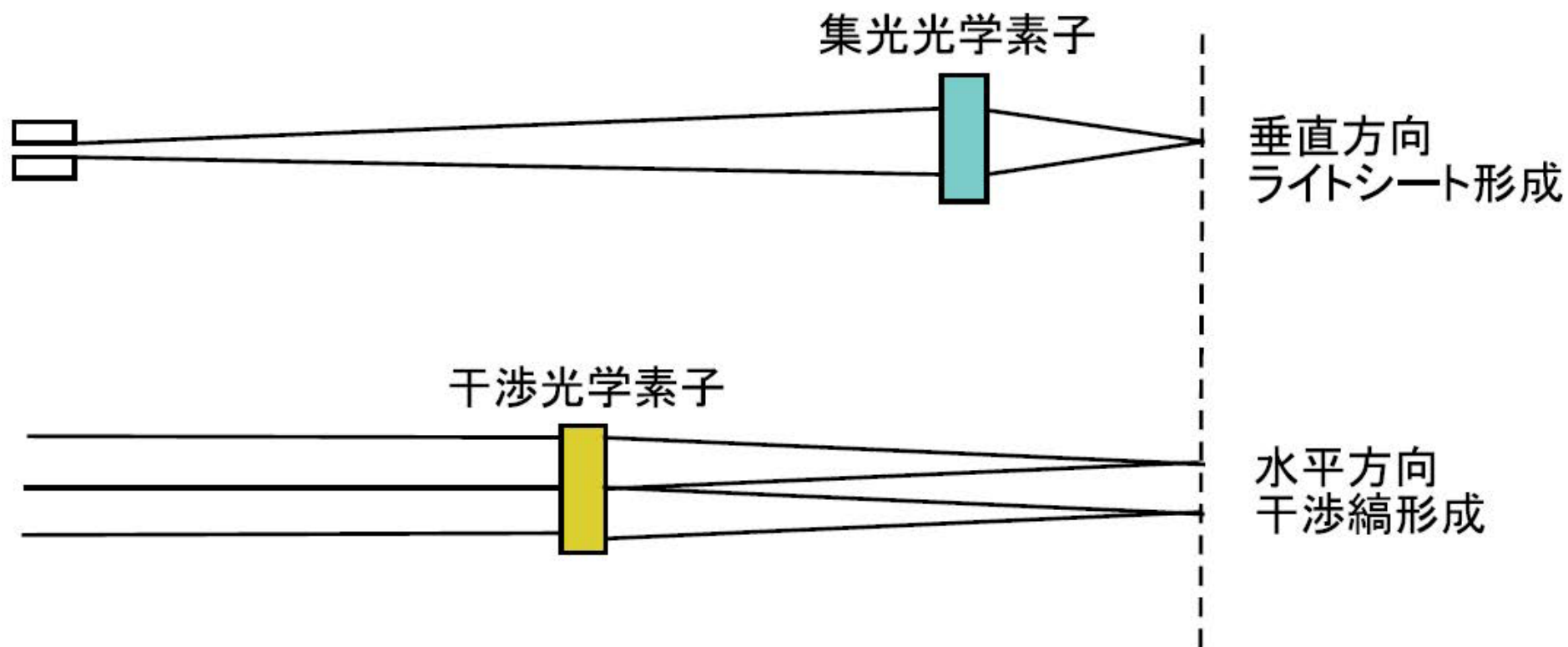
S. W. Hell,
Science, 316,
1153, 2007

等方的な超解像性能の方向性 (X線ライトシートの奥行き超解像 ⊗ライトシート内微細構造による面内超解像)

⊗ライトシート内微細構造による面内超解像)

ライトシート内の微細構造の形成法

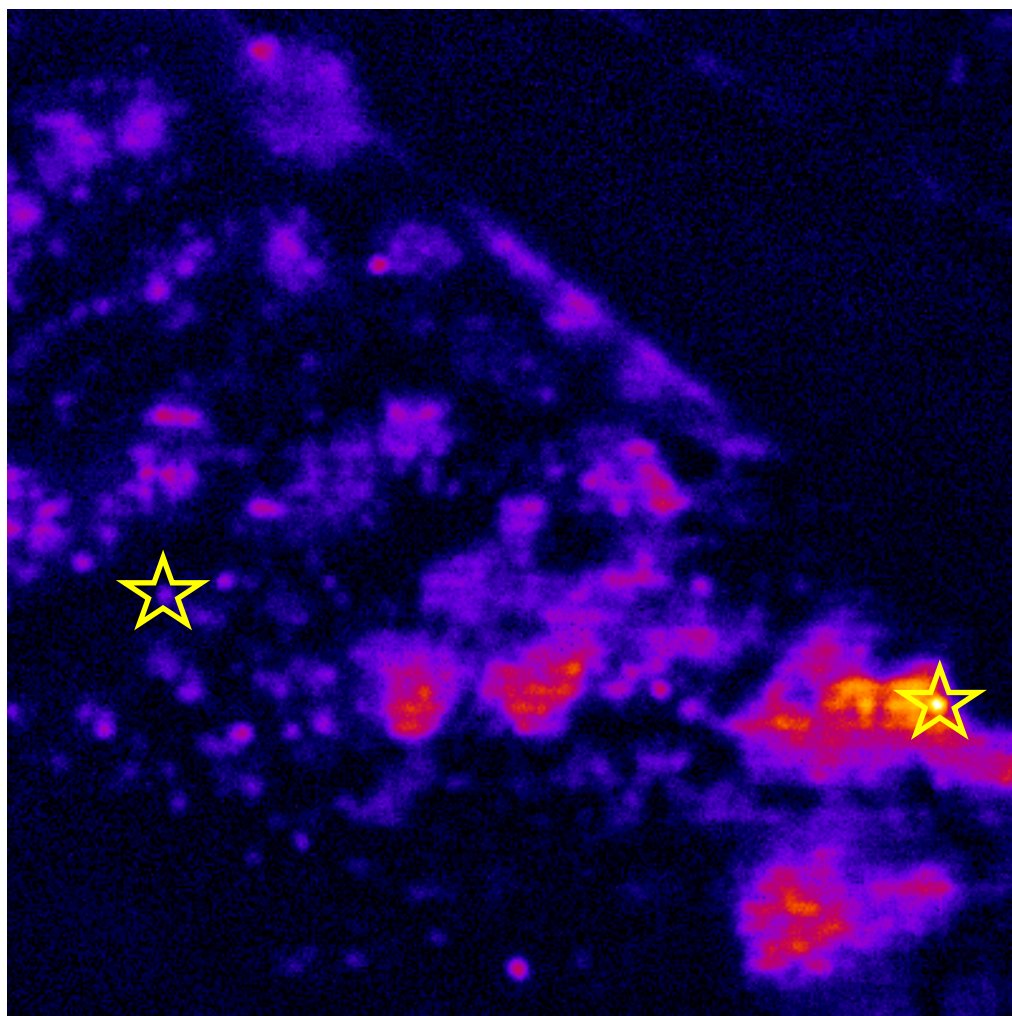
- 屈折光学素子を用いた干渉縞
- 回折光学素子を用いた干渉縞



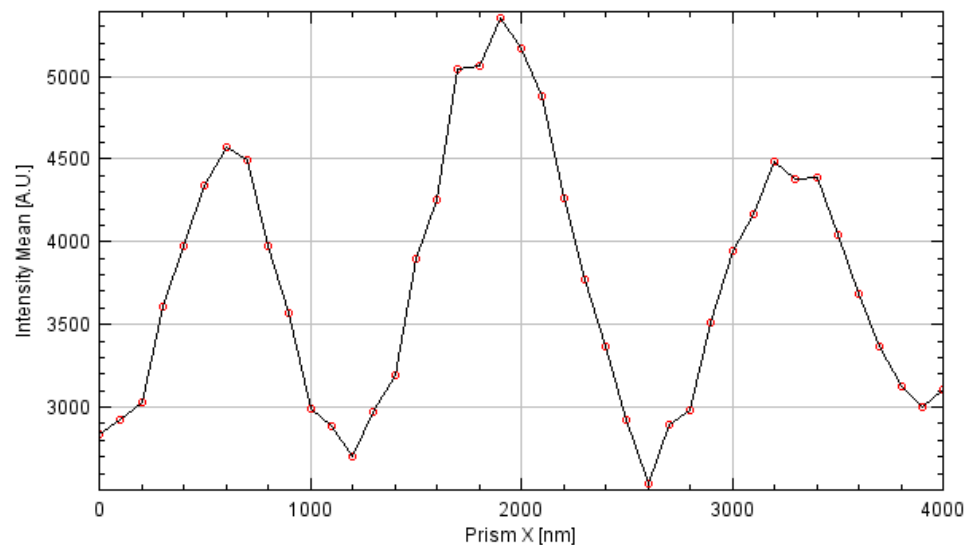
X線ライトシート面内の干渉縞

X線エネルギー = 9keV

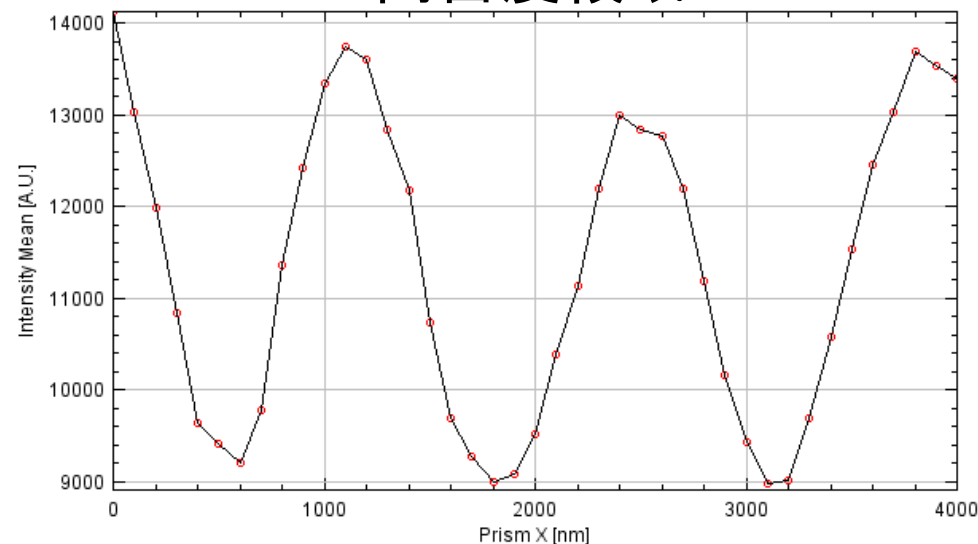
ピッチ = 2.6ミクロン



低密度領域



高密度領域



正弦波状→矩形波状の構造光
より微細・高コントラストの構造光

従来技術とその問題点

既に実用化されている可視光ライトシート顕微鏡、共焦点顕微鏡、X線ライトシート顕微鏡などの三次元顕微鏡では、面内分解能が悪い特徴がある。

孤立粒子が存在する場合のみ、重心計算により面内に超解像イメージングが可能。

→高密度に存在する粒子に対し面内分解能を上げる手法が必要。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の可視光蛍光顕微鏡技術では、試料中の蛍光粒子が孤立した場合のみ、重心演算による解像度改善が可能で、超解像イメージングが可能だった。
- 新技術では、粒子が密集した試料に対し、微細構造を与えたX線を照射し、重心演算無しでの微粒子の超解像イメージングが可能となる。

想定される用途

- 細胞、オルガネラ内の高分子、薬剤分子の分布などを複数色で可視化する超解像イメージング。
- 厚みを持った器官の内部構造を可視化。

実用化に向けた課題

- 顕微鏡の高解像度化のためX線構造光の微細構造化、試料中に導入するシンチレーター粒子の微小化、発光効率の向上。
- シンチレーター粒子の生体器官への特異標識。
- **実用化に向けて**、三次元の解像度50→20nmの達成を目指した条件出し。

企業への期待

- 微細化されたX線構造光と、実験室レベルでの実験を想定したビジネス展開。
- シンチレーター粒子の化学組成、構造の最適化による、微小化、発光効率の向上。
- 生体器官への特異標識の技術開発。
- 生命科学・医学薬学分野における本技術を用いた単分子イメージング。

以上における**共同研究**をご検討頂けると有難いです。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：X線照明顕微鏡および発光物質像の撮影方法
- 出願番号：特願2023-035109
- 出願人：理化学研究所
- 発明者：香村芳樹、高野秀和、横田秀夫

お問い合わせ先



株式会社理研鼎業 (りけんていぎょう)

新技術説明会事務局

Email: senryaku@innovation-riken.jp

終わり