

放射光マイクロCT・ナノCTによる生物試料解析入門

Introduction to synchrotron radiation microtomography (micro-CT) and nanotomography (nano-CT) of biological samples

水谷 隆太¹, 雑賀 里乃¹, 星野 真人², 上梶 真之², 竹内 晃久², 寺田 靖子²,
上杉 健太郎², 鈴木 芳生^{3,4}, Vincent De Andrade⁵, Francesco De Carlo⁵

¹東海大工・生化, ²高輝度光科学研究センター/SPRING-8,

³東大・院新領域, ⁴高エネルギー加速器研究機構・Photon Factory,

⁵米アルゴンヌ国立研究所・Advanced Photon Source

Ryuta Mizutani¹, Rino Saiga¹, Masato Hoshino², Masayuki Uesugi², Akihisa Takeuchi², Yasuko Terada²,
Kentaro Uesugi², Yoshio Suzuki^{3,4}, Vincent De Andrade⁵, and Francesco De Carlo⁵

¹Sch. of Engineering, Tokai Univ.; ²JASRI/SPRING-8.; ³Grad. Sch. of Frontier Sci., Univ. Tokyo; ⁴Photon Factory, KEK;

⁵Advanced Photon Source, Argonne National Lab.

本研究の実施につき、関係各位に深く謝意を表する。

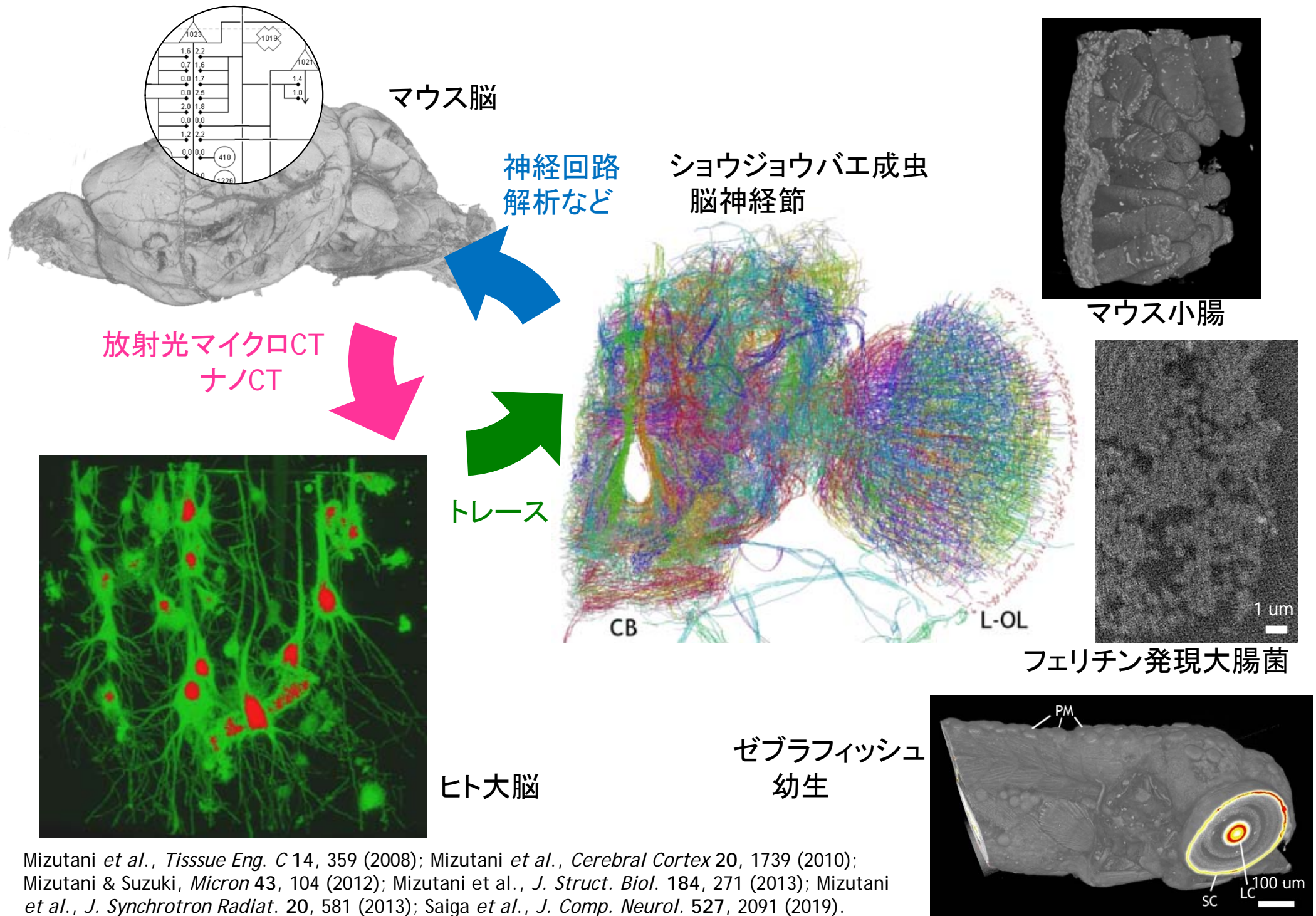
ヒト組織を用いた研究に関しては、東海大学「人を対象とする研究」に関する倫理委員会、医学部臨床研究審査委員会を含め、関連各機関における倫理委員会等、ならびに、米国アルゴンヌ国立研究所Institutional Biosafety Committeeの審査を経て、認められた条件に従って実施している。

本研究は、文部科学省科学研究費基盤研究B(25282250)、挑戦的萌芽研究(25610126)、基盤研究C(21611009)を含め、各種助成に基づいて実施している。

大型放射光施設SPRING-8における実験は、以下の課題により実施している: 課題番号2006B1014, 2006B1716, 2007A1844, 2007A2072, 2007B1102, 2007B1894, 2008A1190, 2008B1261, 2009A1113, 2009B1191, 2011A0034, 2011B0041, 2013A1384, 2013A1865, 2013B1889, 2014A1057, 2014B1096, 2014B1083, 2015A1160, 2015B1101, 2016B1041, 2017A1143, 2017B1120, 2018A1164, 2018B1187, 2019A1207他。

Synchrotron radiation experiments at the Advanced Photon Source were performed under GUP-45781 and GUP-59766. This research used resources of the Advanced Photon Source, a U.S. Department of Energy (DOE) Office of Science User Facility operated for the DOE Office of Science by Argonne National Laboratory under Contract No. DE-AC02-06CH11357.

放射光による脳組織などなどの三次元構造解析



放射光施設あれこれ



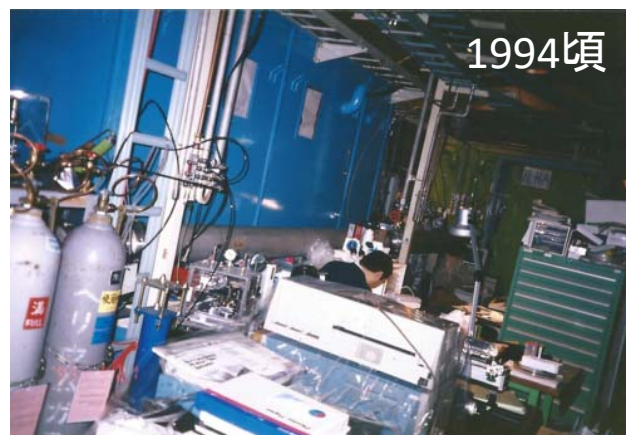
2019.5

SPring-8(兵庫県)「世界最高性能の放射光」施設



2019.6

Advanced Photon Source (APS), アルゴンヌ国立研究所(米イリノイ州)

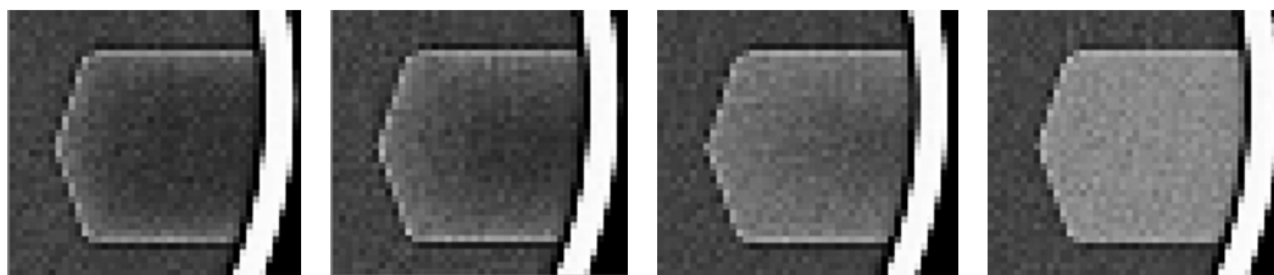


1994頃

「西半球で最高輝度のX線」施設

Photon Factory (PF)
高エネルギー加速器研究機構(つくば市)

放射光(≒ケタ違いに強いX線)を使ってできること



135 s

280 s

1090 s

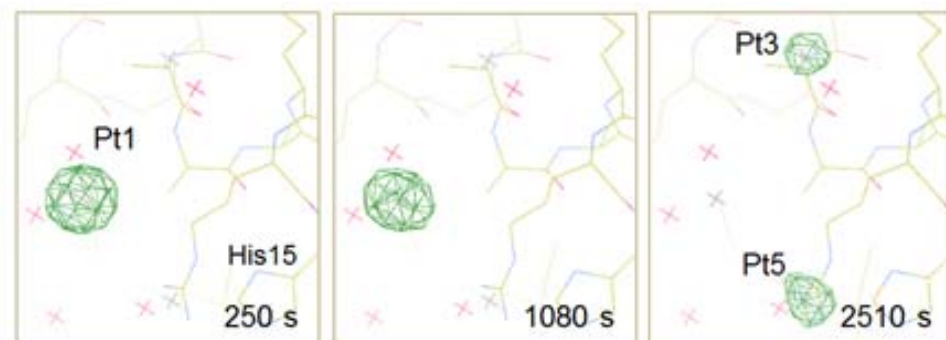
2490 s

顕微法(イメージング)

二次元像やCTスキャン

Lysozyme crystal, Pt soaking, BL20XU

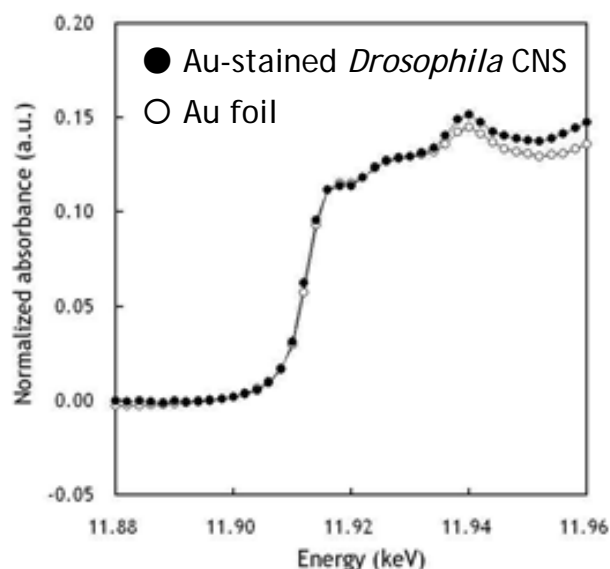
Mizutani *et al.*, *Scientific Reports* 4, 5731 (2014).



回折法・散乱法

タンパク質の結晶構造解析など

Lysozyme crystal, BL26B2, *ibid.*



分光法

金属原子まわりの配位など

Drosophila larvae CNS, Bodian staining, BL20XU

Mizutani *et al.*, *J. Synchrotron Radiat.* 14, 282 (2007).

放射光を使うと...

利点: うまい! (質の良いデータが得られる)

安い! (自前の装置がなくてもOK)

速い! (短時間で測定できる)

欠点: みんなが使う＝実験時期が限られる

初めての時に、ちょっとこわい気がする

X線エネルギー(波長)を 自由に変えるのもアリ

キロショウジョウバエ

緑: Pt

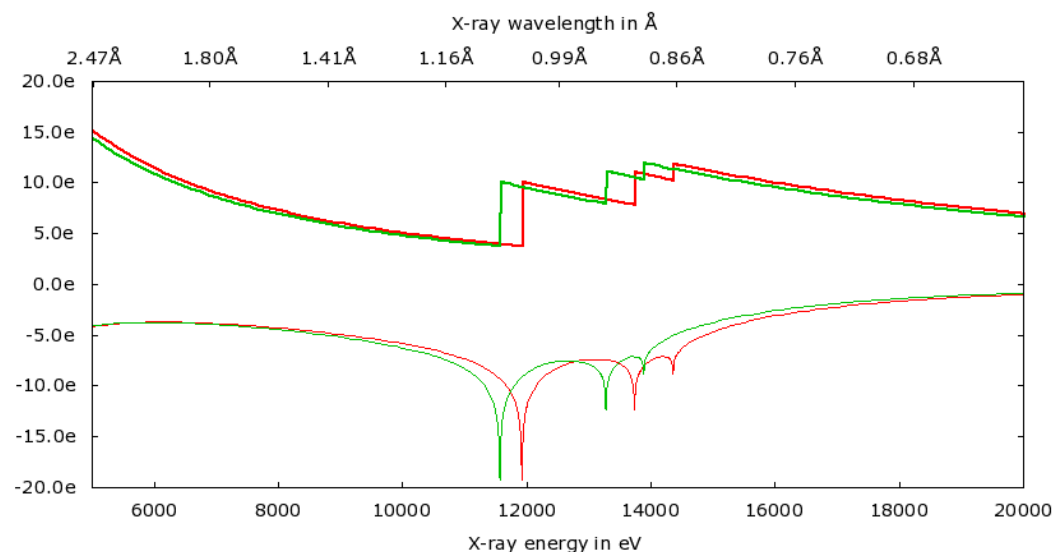
11.570 keV - 11.550 keV

培地(飼料)に添加

赤: Au

11.930 keV - 11.910 keV

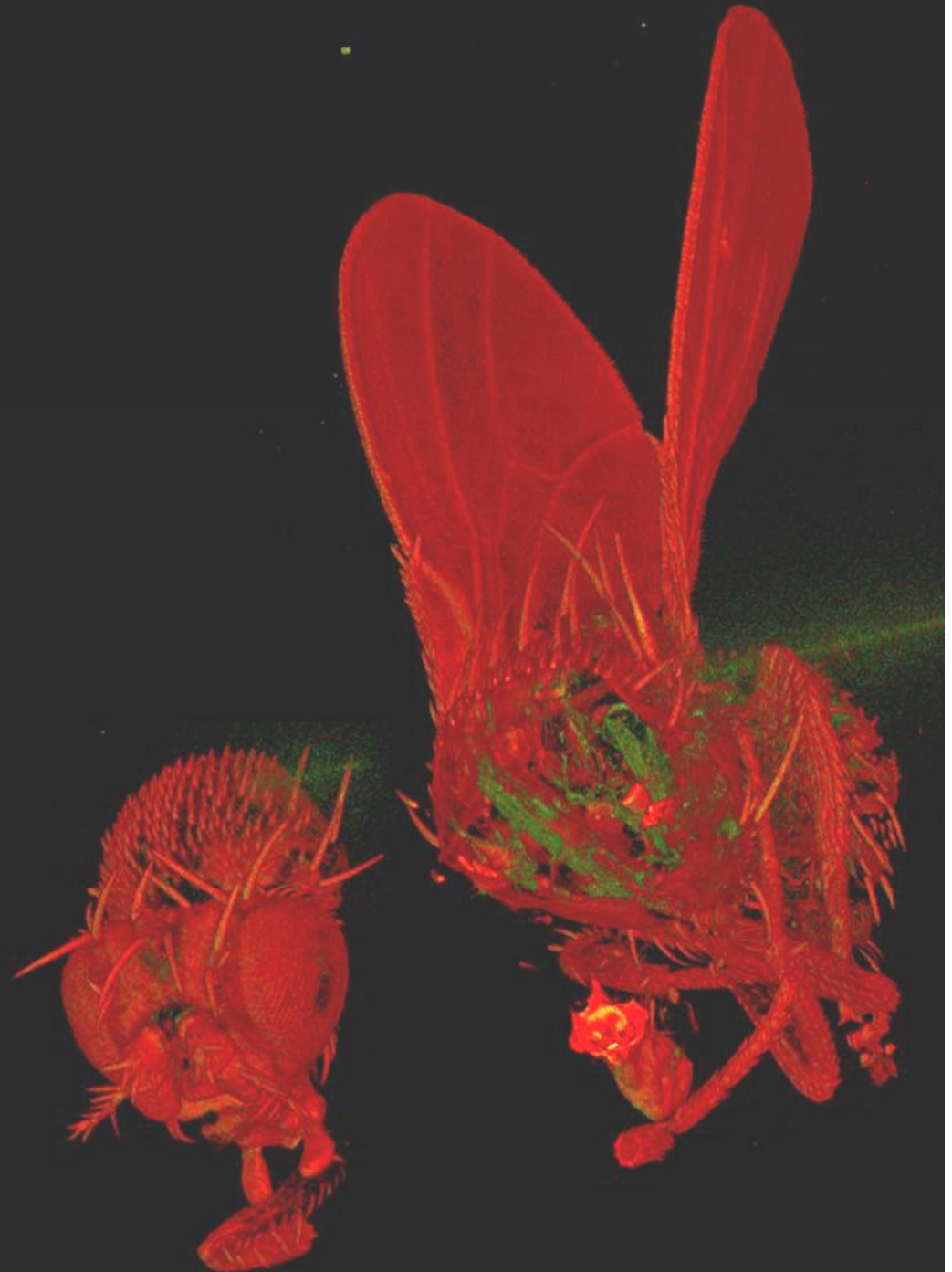
染色



BL20B2

Mizutani *et al.*, *J. Synchrotron Radiat.* 15, 374 (2008).

Mizutani *et al.*, *Tissue Eng. Part C* 15, 359 (2008).

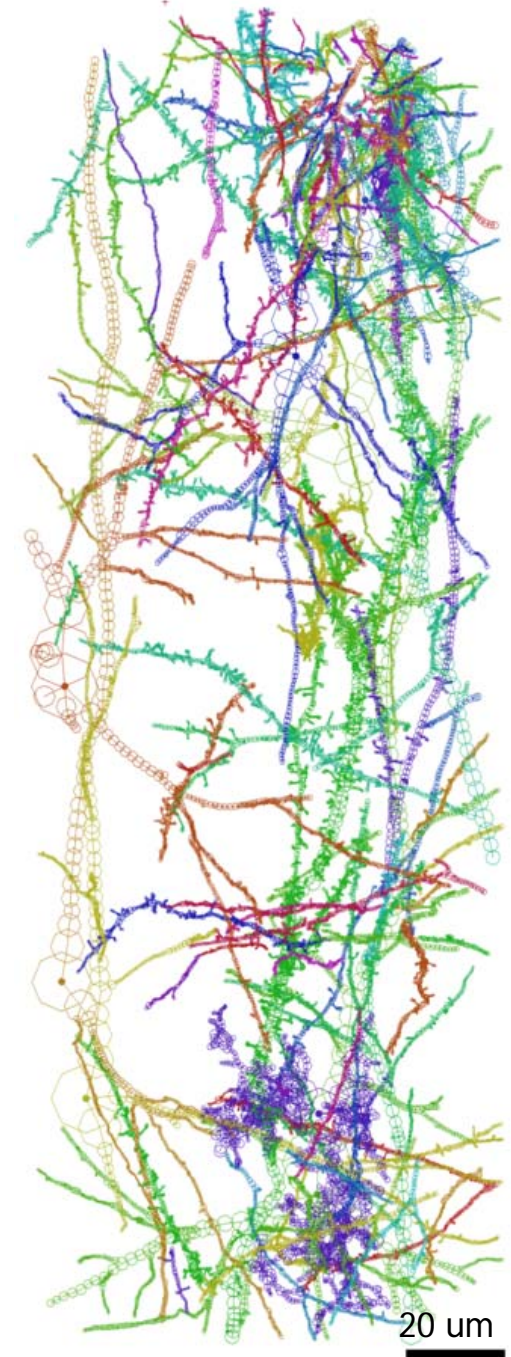
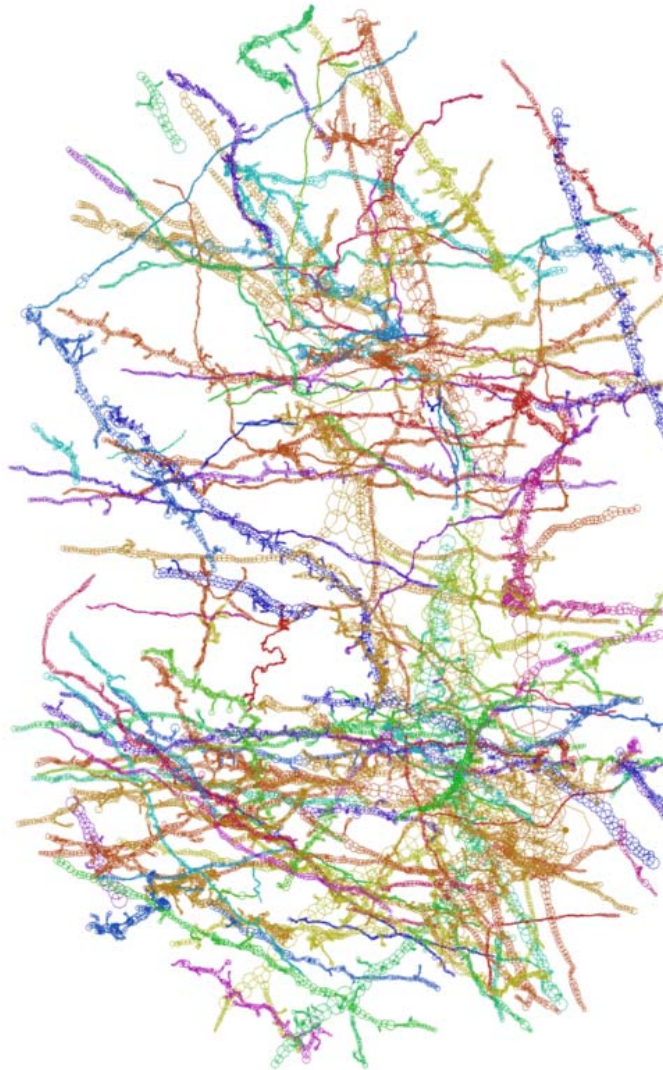


高輝度＝小さい所に多数の光子→ピクセル小→高分解能



統合失調症例 大脳前頭葉皮質
三次元像で100-300 nm 分解能

Human cerebral cortex
Spring-8 BL37XU, BL47XU; Advanced Photon Source 32-ID-C
Mizutani *et al.* *Translational Psychiatry* 9, 85 (2019).



対照例

サンプルについて：生物試料はX線コントラストが弱いです。
X線では生物試料＝軽元素は見えにくいので、対策が必要です。

方法1. そのままで見えるときもあります。おすすめはしません。

方法2. 重元素で染色 (Mizutani & Suzuki, 2012)

主に第5～第6周期元素 Au, Ag, Pt, Os, W, **I** など
選択的に染色するのがポイントです(光顕と同様)。

方法3. 乾燥して水(軟組織の7割)を除く。

電子顕微鏡用のブタノール凍結乾燥など

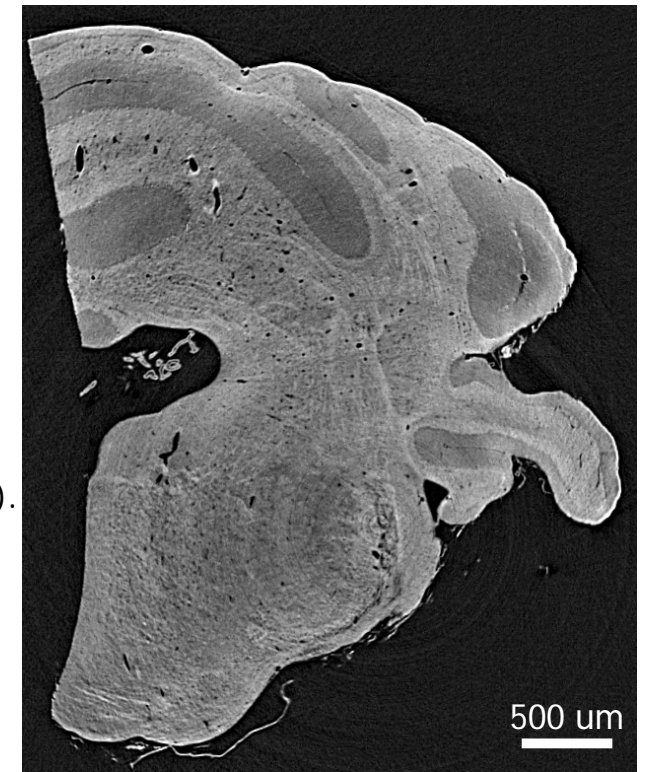


残り3割(タンパク質・脂質)が見えてきます。

多発性硬化症モデルマウス脳

EAE-mouse brain, BL20B2,
Saiga *et al.* *J. Comp. Neurol.* 527, 2091 (2019).

他にもいろんな方法があります。

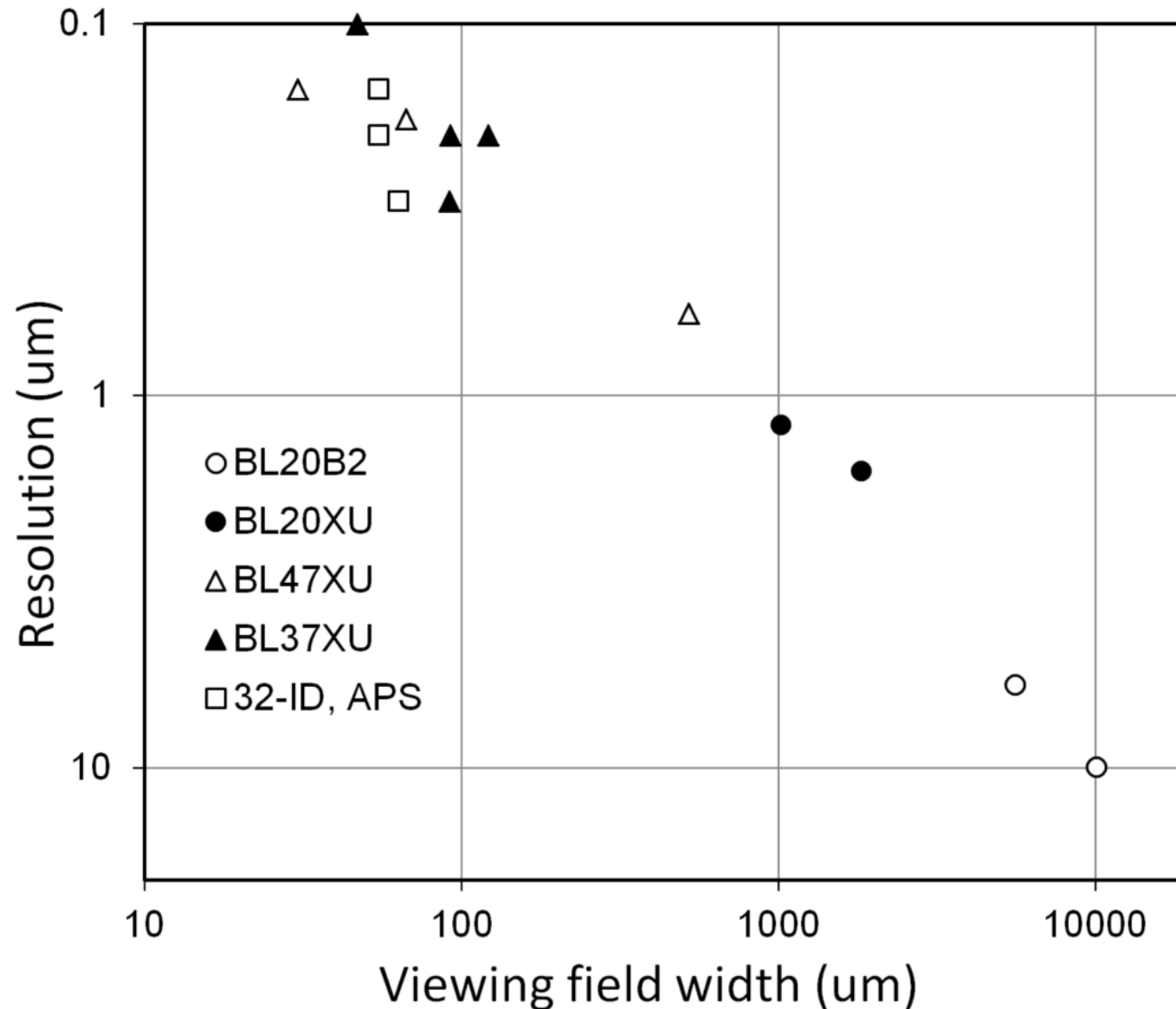


分解能と視野はトレードオフの関係にあります(光顕と同じ)

視野幅＝画素数タテヨコ各2000 ×ピクセル幅(≦分解能÷2)

例) 1 μm 分解能÷2 × 2000ピクセル＝ 視野最大1 mm

100 nm分解能→視野最大100 μm



求める分解能で測定サンプルの準備方法が変わります。

原則は、サンプル変形<分解能、です。

分解能10 μm (BL20B2など): ナマでも何でも測定可能

緩衝液中でもOK。ヨウ素染色が使えます。

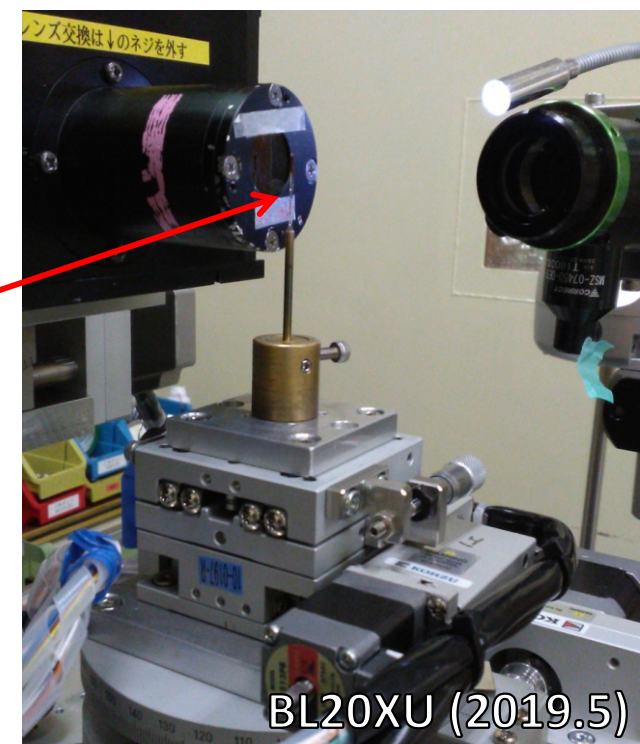
分解能1 μm (BL20XUなど): 樹脂包埋か凍結乾燥

オススメ樹脂 Petropoxy 154 (濁った樹脂等はNG)

樹脂包埋の場合は染色が必要。

分解能100 nm (BL47XUなど): 樹脂包埋が必須。試料温度も影響

100 nm変形しただけで画像がぶれます。いろいろ注意点あり。



放射光施設やビームライン(測定場所)の選び方 イメージング実験では...

高分解能(100~300 nm)で三次元で測りたい→高輝度+FZP光学系

SPring-8, Advanced Photon Source, ESRFの挿入光源ビームライン
厚みのあるもの(数cm以上)を測りたい→高エネルギー

SPring-8などの偏向電磁石BLか、様々な施設の挿入光源BL
波長を変えて測りたい→

その波長(エネルギー)がでるビームライン
その他条件:二次元像か、CTか、時分割が必要か、などなど...



BL20B2: 8 μm 分解能～

BL20XU: 1.2 μm ～



BL47XU: 100 nm～

放射光施設で実験するには

1. 利用課題を申請します。

予算申請のような感じです。施設によってシステムが違います。

SPring-8: 年2期 Advanced Photon Source: 3 runs/yearなど

2. 実施が認められたら

日本の施設では、放射線被曝管理されていることが必須です。

所属機関でRI講習と健康診断(血算と問診)

生物試料では別途手続きが必要な場合があります。

生きているもの、ヒト検体、海外産土壌由来のもの、など

3. 放射光施設に行って実験します。

昼夜敢行で何日も実験するには、最小2チームいります。

SPring-8では2人以上で実験を行います。→2チーム×2人×旅費
利用料: SPring-8約3万円~/1日、Advanced Photon Sourceは無料

といっても初めてで、ちょっと試したいだけなんですけど...

それなら、この手順をパスする裏技？があります。

方法1. SPring-8 UI →利用課題実験報告書検索→詳細検索

方法2. 放射光施設の各種講習会

おもしろい結果がでたんですけど...

是非、ご専門分野の著名誌でご発表ください。

今なら何やっても新しいです。好意的でないrefereeは多いですが。実際どう書いたらいいか、わからない→どう書いても大丈夫です。

SCIENTIFIC REPORTS

どんな分野の論文でも載ります。IF = 4.5です(2018)。

チャージが20万円弱かかります(2019現在)。

Handleご要望の際は、submission前にご連絡ください。



掲載分野にmicrotomographyを標榜する、ほとんど唯一の学術誌。

IF~2のElsevier査読誌で、チャージはありません(2017時点)。

MICROSCOPY & MICROANALYSIS

米国顕微鏡学会で発表すると、*Microscopy & Microanalysis*に載ります。IF~3の査読誌。参加費480 USD(2019現在) + 旅費

この資料→「動物学会 水谷 資料」で検索