

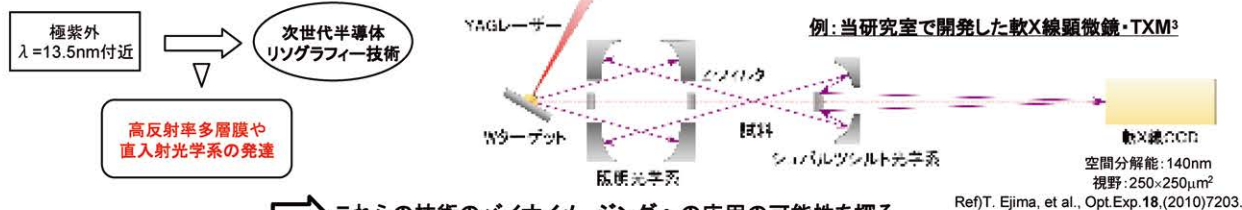
極紫外域での固定生物試料観察における染色法の比較

根市侑太郎, 江島丈雄, 石田史彦, 羽多野忠, 柳原美廣

東北大学 多元物質科学研究所

1. 背景

次世代半導体リソグラフィ技術への応用に向けた波長13.5nm付近の極紫外光の研究の過程で、この波長域において高反射率を誇る多層膜反射鏡やそれを用いた直入射光学系が発達してきた。一方で、バイオイミージングの分野の研究では主に水の窓と呼ばれる波長域を使っており、波長13.5nmはあまり用いられていない。



2. 実験

波長13.5nmの極紫外光での生物試料の観察例はあまり存在せず、最適な測定条件(試料包埋方法、染色法)が不明。

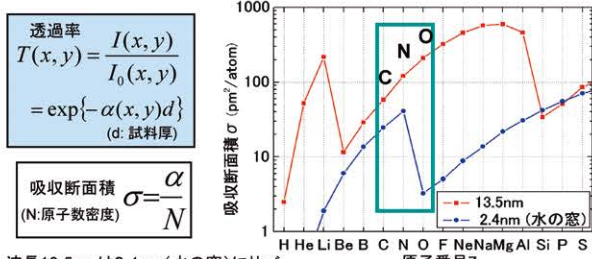


目的

同一の試料に異なる包埋法・染色法を施したものを撮像し、得られた像を比較して、波長13.5nm付近の極紫外光を用いた生物試料観察に最適な試料作製方法を探す。

2-1. 観察対象の検討

透過像：試料の吸収係数 α の差によって生じるコントラストを見ている。



波長13.5nmは2.4nm(水の窓)に比べH, C, N, Oの吸収が大きく同時に吸収断面積の差も大きい。

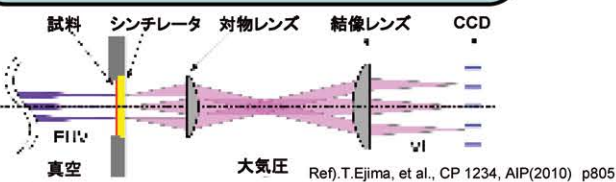
波長13.5nmの極紫外光は、脱水・薄切した非染色の生物試料の観察に適している。

2-2. 実験条件

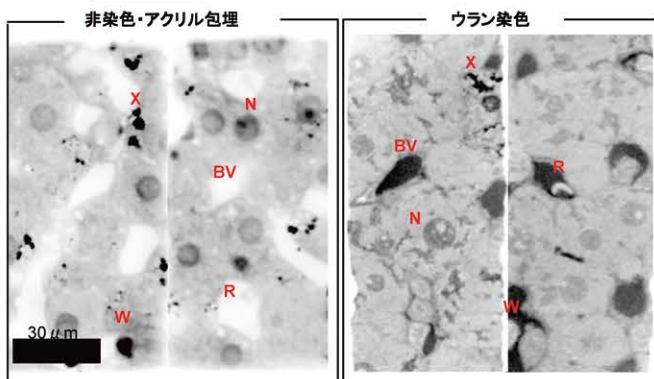
今回は2つの実験を行った。

- ①13.5nmによる染色/非染色の2つの試料の観察と細胞小器官ごとの比較
- ②13.5nmによる観察の優位性を確認するため、波長7~18nmの間で撮像

試料: ラット肝臓0.4μm厚(すべて一定)
非染色試料...アクリル包埋(試料A)、エポキシ包埋(B)
染色試料...ウラン染色(C)、クエン酸鉛染色(D)、ヘマトキシリン(アルミニウム)染色(E)
観察: ①: $\lambda = 13.5\text{nm}$, TXM³(1の図), Exp. Time=2.0sec
②: $\lambda = 7 \sim 18\text{nm}$, SCOM(下図), 光源...PF BL11D, NewSUBARU BL10



2-3. ①観察結果



N: 核 BV: 毛細血管 W: 管壁細胞 R: 赤血球 X: エラー?

3. 利得関数による評価

得られた像を評価するための関数を導入する。

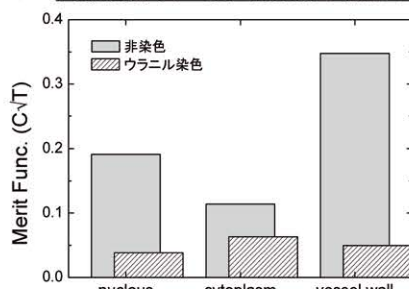
$\bar{N}$: 平均光子数

$$\frac{\text{Signal}}{\text{Noise}} = \frac{C\bar{N}}{\sqrt{\bar{N}}} = C\sqrt{\bar{N}}$$

光量一定とすると平均光子数は透過率に比例

$$C\sqrt{\bar{N}} \propto C\sqrt{T} \equiv \text{利得関数}$$

3-1. 実験①評価—染色/非染色 細胞小器官ごとの比較

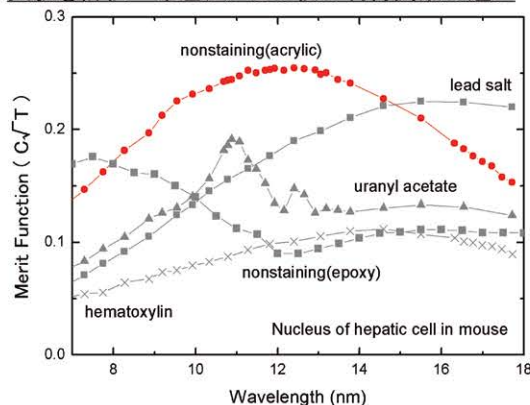


コントラスト:

$$C = \frac{T_a - T_b}{T_a + T_b}$$

各小器官においてウラン染色試料よりも非染色試料の方が高いSN比が得られた。

3-2. 実験②評価—染色法ごとの核の利得関数の違い



波長13.5nm付近では非染色アクリル包埋試料が最も高い利得を得る。

4. まとめ

- ・波長13.5nm付近で薄切した染色/非染色固定生物試料の撮像を行い、透過率、コントラストを求めた。
- ・指標として利得関数を導入し、得られた像について評価した。
- ・利得関数の比較から、極紫外域での観察には非染色アクリル包埋試料が最も適していることを示した。

波長13.5nm付近の極紫外光のバイオイミージングへの応用は十分に可能であると考えられる。

謝辞:

試料作製にあたり、東北大学医学系研究科病理PF、多元研技術室 犬戸理恵さん、東京大学総括プロジェクト機構 水谷治史先生にご協力頂きました。ここに記して感謝致します。