

# 投影X線顕微鏡によるウニの受精卵の内部構造の観察

矢田 慶治<sup>\*</sup>・篠原 邦夫<sup>\*\*\*</sup>・浜口 幸久<sup>\*\*\*\*</sup>

## 1. 緒 論

筆者らは、投影型X線顕微鏡による生物試料の観察の場合に、試料の種類に応じた最適波長のX線を用いるためにターゲット材料並びに加速電圧を選択すること、さらに、X線の波長が数Å以上の場合には真空カメラもしくはHeガスによる試料室内空気の置換が必要で、これらのことに留意することによってX線顕微鏡の利点を発揮できることを報告した<sup>1, 2, 3)</sup>。特にHeLa細胞について、分裂期の球状細胞の内部構造や、正常細胞のミトコンドリアの存在をX線吸収コントラストによって観察が可能であることを示すことができた<sup>3, 4)</sup>。ここではHeLa細胞（直径約10 μm）よりさらに大きなウニの卵（直径約80 μm）について、それが分裂期にある場合の内部構造の観察が可能であるかどうかを調べた。また先に報告したフレネル回折効果による像の劣化を改善する画像処理法がこのウニの卵の場合にも有効であるかどうかを検証することを試みた。

## 2. 実験方法及び観察試料

実験に使用した投影X線顕微鏡は、先にHeLa細胞の観察に用いたのと同じ走査電子顕微鏡（明石DS-130）にX線用真空カメラを取り付けたもので、その分解能は約0.1 μmである<sup>3, 4)</sup>。この装置にはLaB<sub>6</sub>陰極が使用され、加速電圧を10kVに選び、波長が各々1.05nmと0.58nmの特性X線を与えるGe膜（0.5 μm厚）とAu膜（0.2 μm厚）の2種類のターゲットを用いた。

観察に用いたウニの卵の試料は次のように準備された。受精して50-60分後の分裂期のメタフェーズ（中期）もしくはアナフェーズ（後期）にあるバフンウニ（*Hemi-centrocus pulcherrimus*）の卵を約1時間、表面活性剤 Nonidet P-40を含む Mes-glycerol（MEG）バッファー\*で処理をする。この処理によってウニの卵内の微小管は、固定無しで数時間にわたって安定になるので、生きている細胞の本来の微小管や処理後固定した微小管とを区別して、

1) K. Yada and S. Takahashi, J. Electron Microsc. 38 321 (1989)

2) K. Yada and S. Takahashi, X-Ray Microscopy in Biology and Medicine, Japan Scientific Society Press, Tokyo 193 (1990)

3) K. Yada and K. Shinohara, X-Ray Microscopy IV, Proc. XRM' 93 Chernogolovka, Russia 171 (1993)

4) 矢田 慶治・篠原 邦夫、青森公立大学紀要 1 2 (1996)

※青森公立大学 ※※東京大学・医学部・放射線研究施設 ※※※東京工業大学・生命理工学部

安定化微小管と呼ばれている。MEGバッファはグリセロールを含むので、卵内の繊維状構造や染色体などは変化せず、可溶性の蛋白質が細胞外に流出し、繊維が明瞭に見えるようになることが期待される。この後、0.1% のポリリジンで処理をしておいた窒化シリコン膜に卵を注ぎ、10分くらい静置して、卵が膜に張り付くのを待ってから  $-20^{\circ}\text{C}$  のメタノールを注ぎ固定をすると共にMEGバッファをメタノールで置き換える。この試料を乾燥させてX線顕微鏡観察の試料としたが、乾燥には、自然乾燥と臨界点乾燥の2種類を試みた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 乾燥法による違い

自然乾燥をしたウニの卵の像を図1に示す。(a) は光顕微鏡像、(b) はGeターゲット、10kVの条件でとったX線顕微鏡像である。自然乾燥をした場合、光顕微鏡像には僅かに内部構造がみられるが、X線像には殆ど内部構造が見られないことが判る。乾燥時に平坦に潰れてしまい、X線的にコントラストが付かなくなると考えられる。

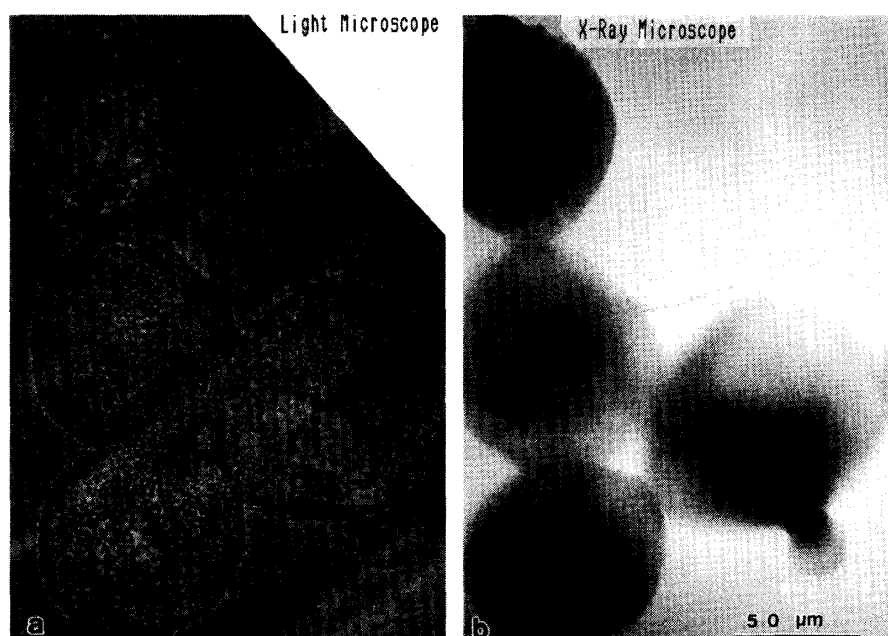


図1 自然乾燥によるウニの卵の光学顕微鏡像 (a) とX線顕微鏡像 (b) の比較 (a) では幾分の内部構造がみられるが (b) のX線像は全く無構造である

---

\*MEGバッファの組成は次の通りである。

- 0.55mM  $\text{MgCl}_2$
- 10mM glycoetherdiaminetetraacetic acid(EGTA)
- 2.5mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride(PMSF)
- 10mM MES-KOH pH6.8
- 25% glycerol
- 1% Nonidet P-40

図2は、生の試料のノマルスキー型微分干渉顕微鏡法による像 (a) 及び臨界点乾燥法による試料のX線像 (b) を示す。(a) では二つの紡錘体極の位置と中心の染色体が確認できるが内部構造はみられないのに対し、(b) のX線像では紡錘体極に星状体微小管がみられ、投影X線顕微鏡法の有効性が幾分示されている。図3は、X線顕微鏡像と走査電顕像とを同じ視野について比較したもので、(a) はAuターゲット、10kVで撮ったX線像、(b) は3kVで導伝膜のコートなしで得られた走査電顕像、(c) は倍率を高くした像である。これらの像を比較すると(c) からこの試料の表面がかなり荒い構造を持っていてそれがX線像にも出ていることが判る。

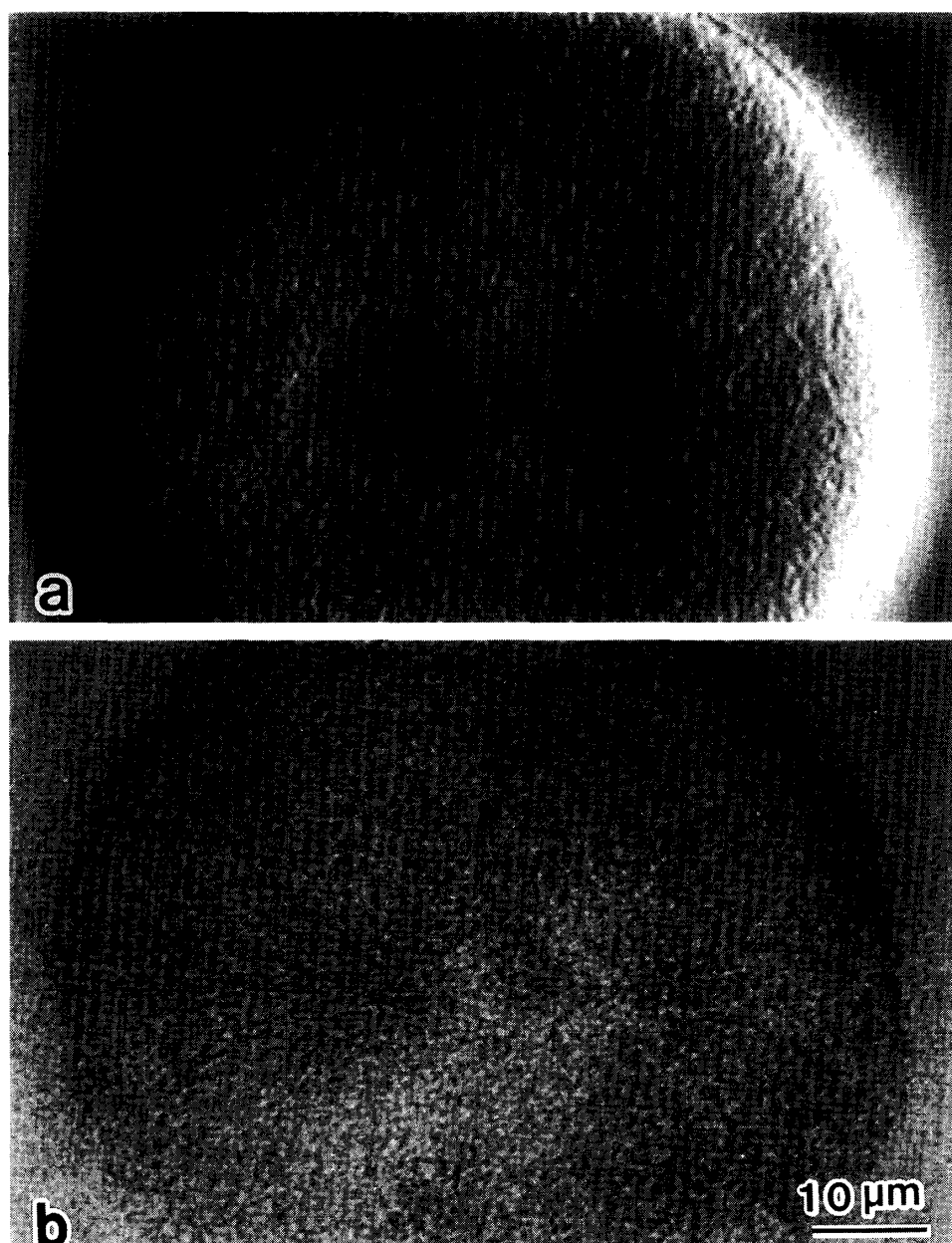


図2 ノマルスキー型微分干渉顕微鏡による生のウニの像 (a) と臨界点乾燥法による試料のX線像 (b) の比較

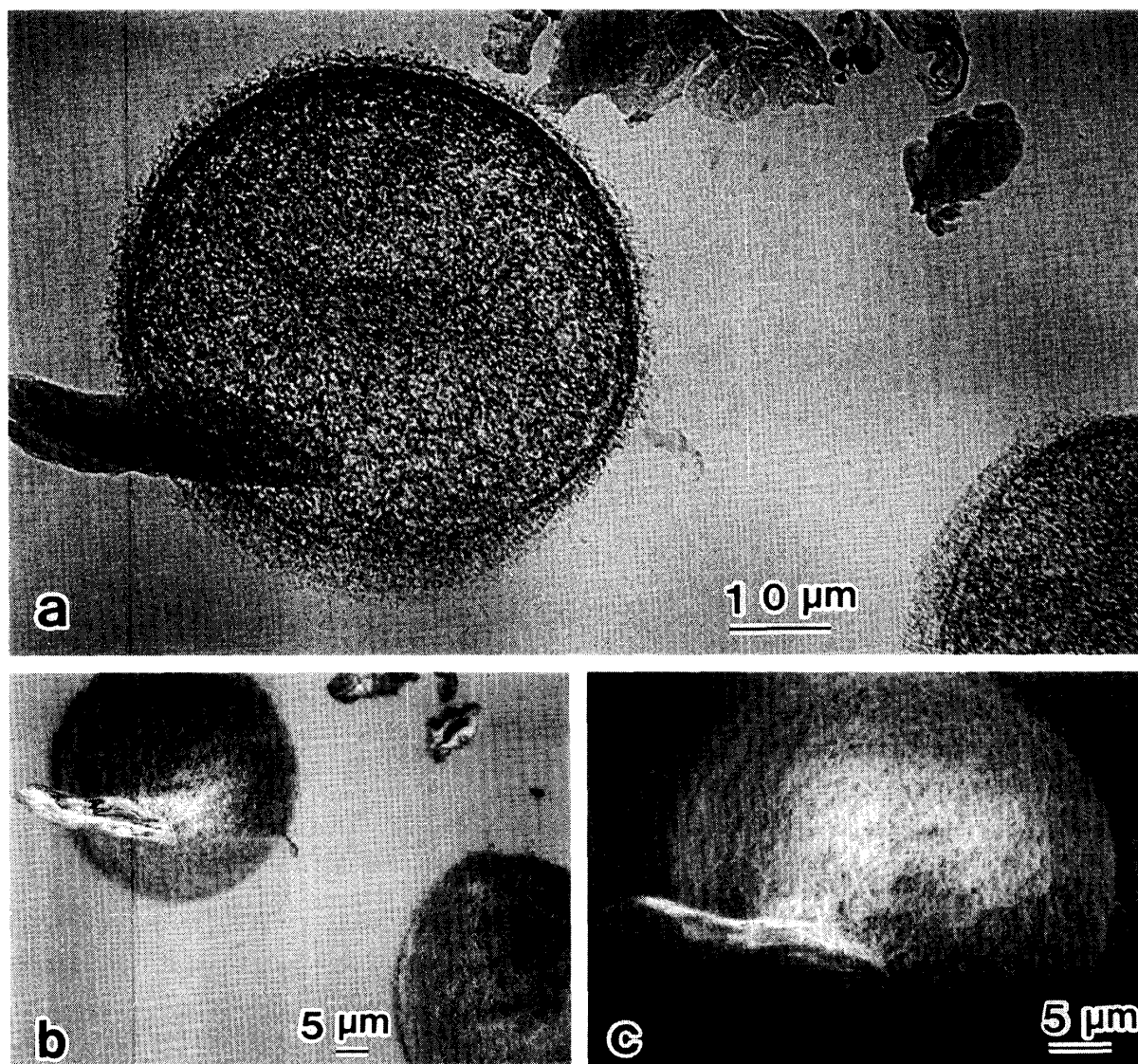


図3 Auターゲット、10kVで得られた臨界点乾燥によるウニの卵のX線像 (a) と無蒸着、3kVで得られた走査電顕像 (b、c) との比較 かなり粗い表面構造を持っていることが知られる

そのほかに (a) のX線像では分裂装置が現れている事が観察される。それをより明瞭にするために拡大したのが図4で、二つの紡錘体極 (mitotic pole)、中心付近に集まった染色体 (chromosome) が観られる。同一試料についてGeターゲットを用いて得られた像を比較した結果、Geターゲットの方が卵の周辺の細かい構造などのコントラストが優れているが、Auターゲットでは内部構造がよく透けて見え、しかもある程度コントラストがつき、像がより鮮明なのでほとんどの像はAuターゲットを用いて得られた。

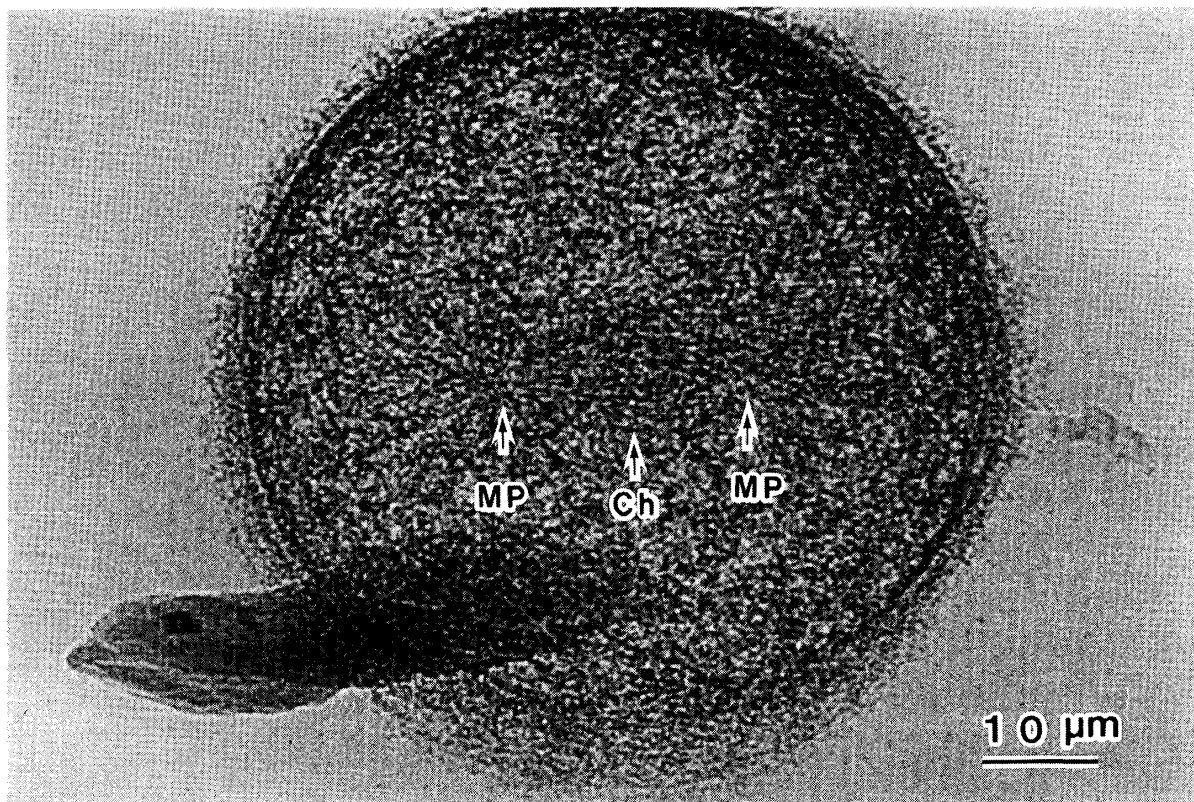


図4 Auターゲット、10kVで得られた臨界点乾燥によるウニの卵のX線像の拡大 紡錘体極 (MP)、染色体 (Ch) などの分裂装置がみられる

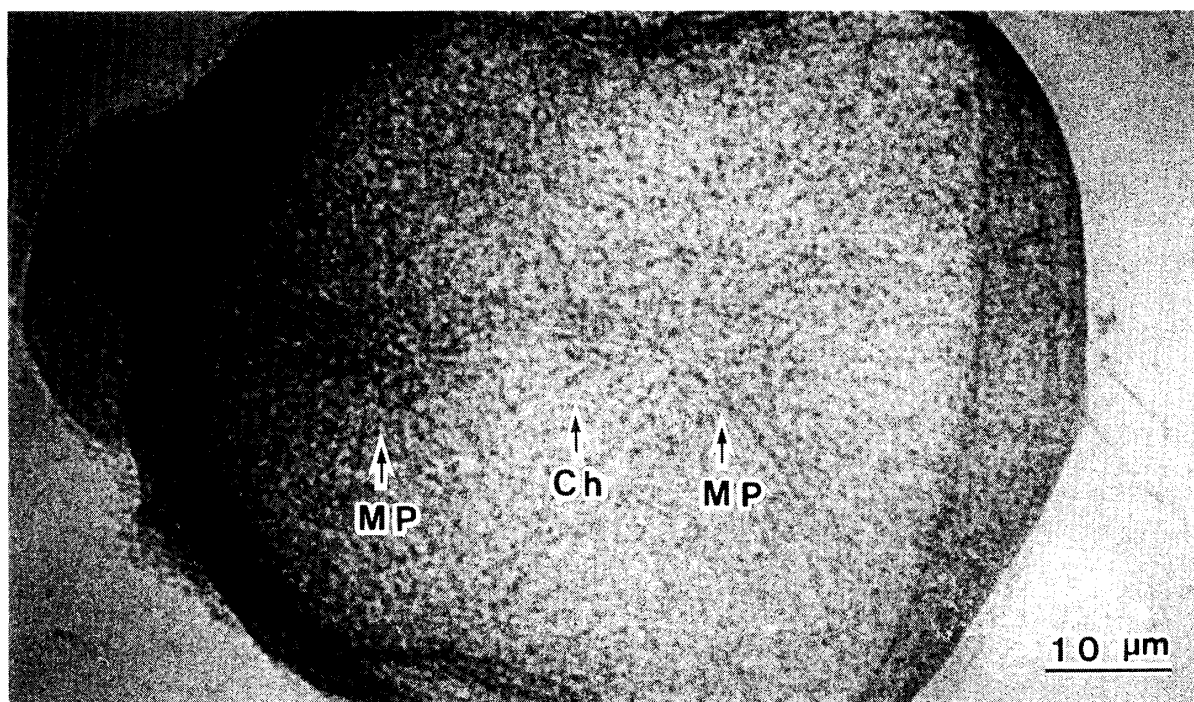


図5 表面構造が比較的滑らかな試料のX線像 内部構造が鮮明にみられる



図5は臨界点乾燥をしたウニの卵のX線像の他の例で、受精膜で一部覆われている。この例では、表面構造がそれほど粗くないので星状体微小管 (astral microtubule)、極微小管 (polar microtubule)、染色体 (chromosome) がその分だけかなり明瞭にみられ、個々の染色体が識別されているといって良いであろう。他方、個々の微小管は、直径が20-30nmといわれ、極めて細いので、X線顕微鏡の分解能以下で識別できないはずであるが、実際に星状体微小管と紡錘体が繊維状に観られる事は微小管が何本かの束状をなして配列している事を暗示している。また、内部の分裂装置を明瞭にみるには、この例のように表面構造に由来するむらが少ないことが望ましいが、受精膜の存在がどの様に関係しているかはまだ明確ではない。

### 3.2 立体観察

電子ビームをターゲット上で適当に位置を変えて何枚かの写真をとると、ステレオ観察をする事ができる。図6、図7は、その例を示すもので、紡錘体の構造が立体的にみられる。図6では、極めて薄いが大きくしわを持ちながら広がった受精膜に覆われている事が立体的にみられる。図7では中心部の紡錘体構造の他に、周辺に紐状構造がみられる。

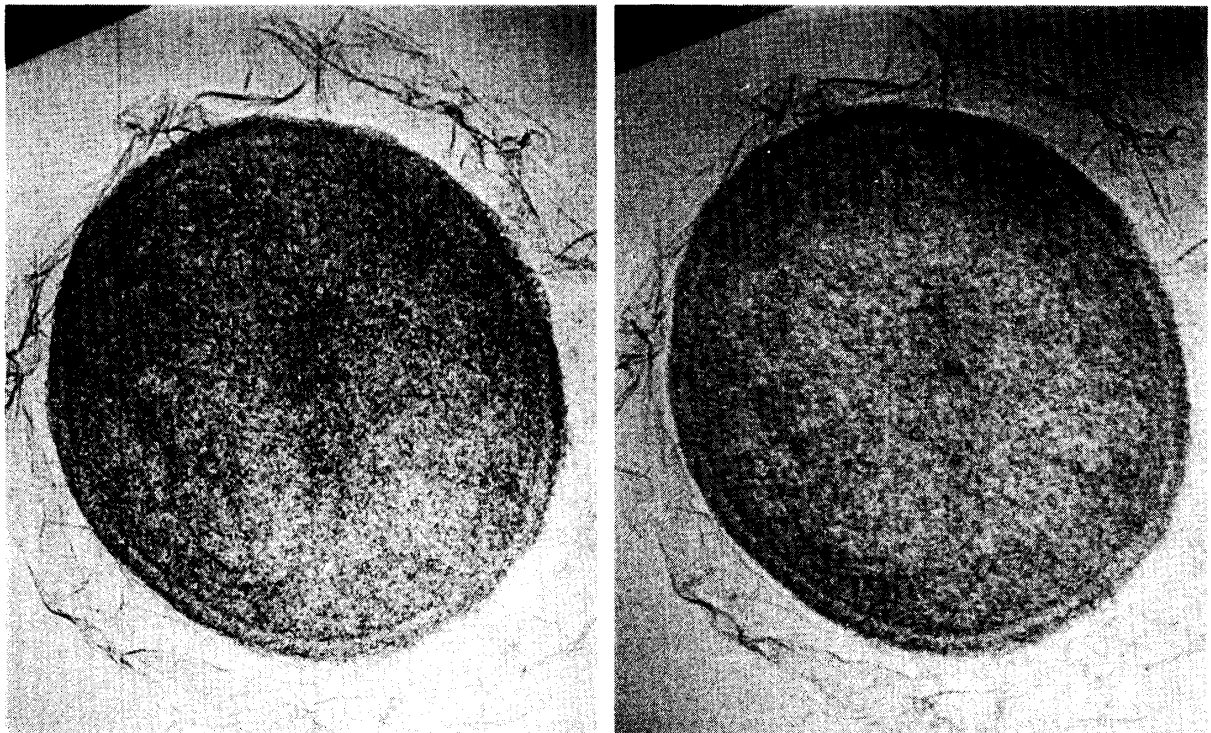


図6 薄い受精膜に覆われたウニの卵のステレオ写真

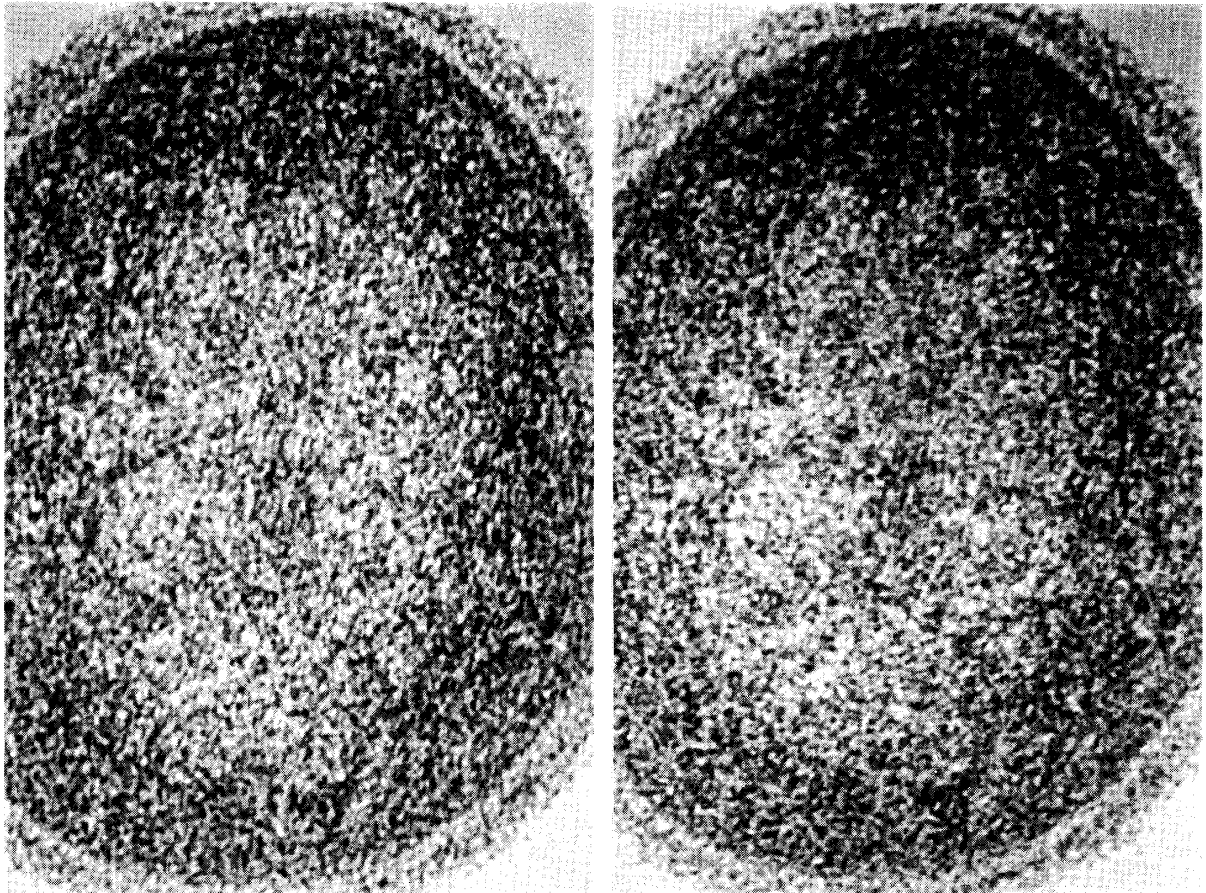


図7 中心部の紡錘体構造の他に周辺に紐状構造を持つウニの卵のステレオ写真

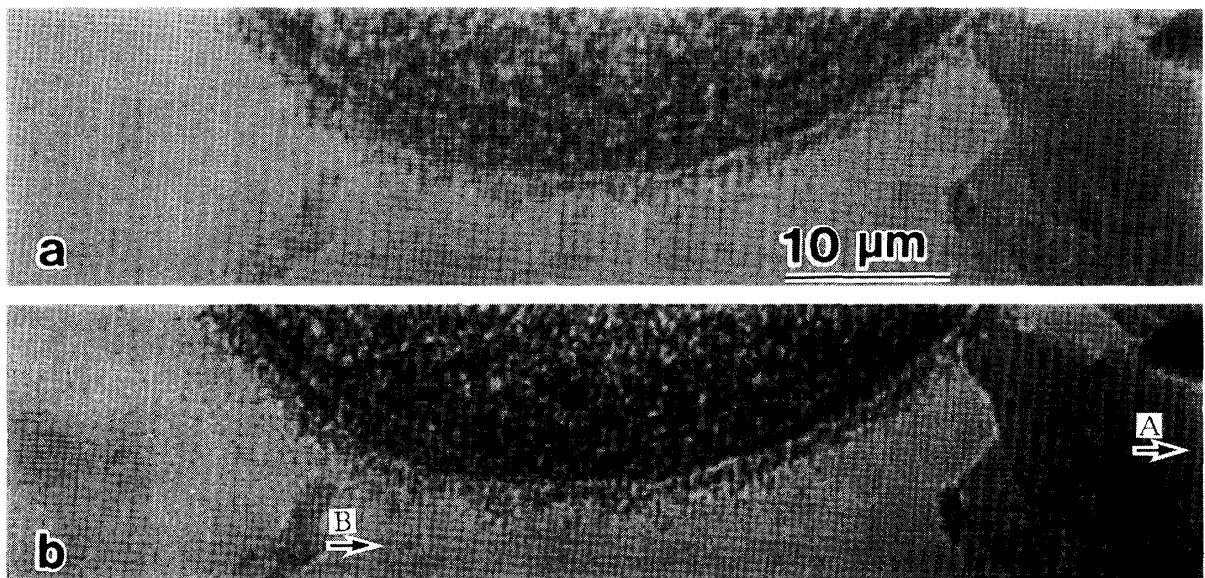


図8 画像処理によって像の鮮鋭度とコントラストが改善されたことを示す例 原画像 (a) にはなかったフレネル縞が処理像 (b) の枠(矢印A)やコントラストの強いごみ(矢印B)などに現れている

### 3.3 画像処理による投影X線像の改善

点源による投影像は本質的にデフォーカス像で、試料のエッジにはフレネル回折による縞が現われ、分解能がフレネル回折によって低下する。このフレネル回折効果を伴っている像を画像処理によってイン・フォーカスの像に復元できれば、分解能及びコントラストが改善されるであろう。我々は既にこの目的でWienerフィルターを用いるデコンボリューション法<sup>5)</sup>と弱振幅物体近似法<sup>3)</sup>を試み報告した。ここでは、後者の方法をウニの卵のX線像に適用した。図8で (a) はオリジナルの像を単にデジタイズしただけのもので、(b) はそれに適当なデフォーカス量を与えた場合の処理像である。画像の枠の横の縁に注目すると (a) ではエッジが鮮鋭であるが、(b) では矢印のようにデフォーカスによるフレネル縞が現れている事がみられる。この処理によって、細かい構造が鮮明になり、分解能がある程度改善され、コントラストも改善されている事がみられる。図9は画像処理をした像同士で立体観察をしたものである。

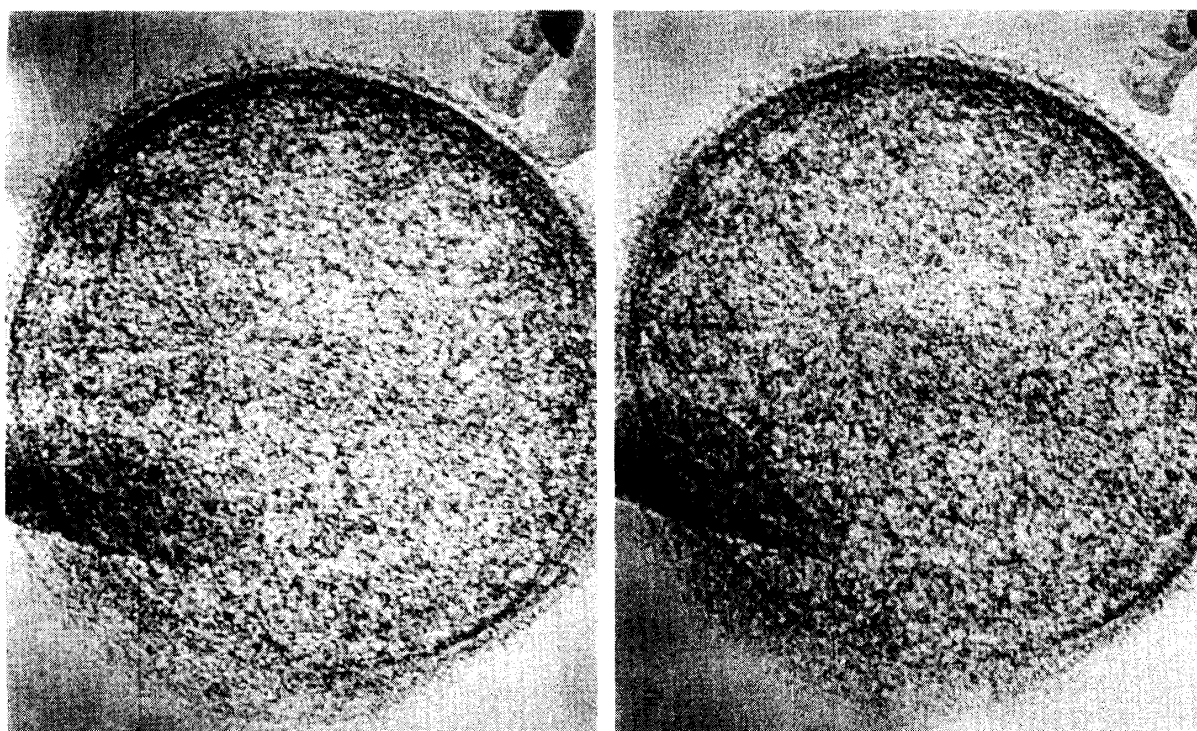


図9 画像処理をした像によるステレオ写真

5) K. Yada and S. Takahashi, Proc. 3rd Beijing Conf. and Exhib. Instrum. Analysis, Beijing, A7 (1989)



#### 4. 結 論

1. 分裂期のメタフェーズもしくはアナフェーズにあるウニの卵を臨界点乾燥法によって乾燥させ、投影X線顕微鏡で観察した結果、mitotic pole, astral microtubule, chromosome などの分裂装置を観察することができた。
2. ステレオ法によってこれらの分裂装置の配列を立体的に観察できた。
3. 得られたX線像に画像処理を行い、分解能とコントラストを改善する事ができた。

#### 謝 辞

X線像の画像処理については科学技術振興事業団・創造科学技術推進事業・高柳プロジェクトの茹慶新博士にお世話になった。この場を借りて謝意を表する。

(1997年12月1日受理)