

# ゼルニケ型硬X線位相差顕微鏡による透明試料の観察

籠島 靖 ( 姫路工業大学大学院理学研究科 )

## 1. はじめに

軟X線領域でのゼルニケ型位相差顕微鏡は Schmahl らによって実現されているが[1]、よりエネルギーの高い硬X線を用いた場合、その高い透過力から軟X線では不可能な厚い試料の観察が可能となる。また、軟X線では吸収像でも十分高いコントラストが得られるので、位相差像は吸収像に対する付加的な情報を与えるに過ぎないが(波長によっては被爆線量をかなり低減できるという利点はある)硬X線ではそもそも吸収コントラストが限りなくゼロに近いので、吸収像では見えない透明なものを可視化するという、本来の意味での位相差顕微鏡になる。さらに、吸収がほとんど無いことは被爆線量が小さいことを意味しているので、軟X線に比べて低い線量での観察が期待できる。

このような観点から、我々は生体試料のその場観察を目指して SPring-8 の兵庫県ビームライン (BL24XU) において、硬X線ゼルニケ型位相差顕微鏡の開発を進めてきた。これまでに空間分解能約 500 nm の顕微鏡を開発し[2]、生体試料について正負の両コントラストによる位相差像を取得している[3]。さらなる高空間分解能化にも取り組み、100 nm の Line & Space の解像[4]とこの空間分解能での位相差法による透明試料の観察にも成功している[5]。本講演では、硬X線位相差顕微鏡で期待される像のコントラスト、開発した位相差顕微鏡の光学系、性能評価及び実際の試料を観察した例について報告する。

## 2. ゼルニケ型位相差顕微鏡で期待される像のコントラスト

ゼルニケの位相差法の原理は、物体によって生じた位相差を強度差に変換し、透明な物体でも位相差さえ存在すれば可視化することができることである。対物レンズの後側焦平面上には、物体のフーリエスペクトルが現れるが、そこに位相板を置くことにより 0 次のスペクトルのみ位相差を与える。この位相板により 0 次光に与えられる位相差(光路差)は通常  $\pi/2$  ( $\lambda/4$ ) または  $3\pi/2$  ( $3\lambda/4$ ) であり、前者の場合をポジティブコントラスト、後者をネガティブコントラストと呼ぶ。ポジティブコントラストの場合、位相差が大きいほど像が明るく(強度が高く)なり、ネガティブコントラストの場合には逆の関係になる。軟X線領域におけるゼルニケ型位相差顕微鏡に関しては、Rudolph らにより詳しく述べられており[6]、実際に彼らにより初めて軟X線領域での位相差顕微鏡が実現された[1]。我々も独自に硬X線領域において期待される像のコントラストの検討を試みた。詳しい解説は他の文献を参照していただくとして[7]、ここでは理想的な場合、すなわち 0 次光のみに位相差が与えられると仮定した場合の像のコントラスト  $C_p$  を与える式を(1)に示す。

$$C_p = \frac{|I' - I_b'|}{I' + I_b'} = \frac{\left| e^{-\mu t} \left[ 2\{1 - \cos(\phi - \phi_b)\} + e^{\frac{m\beta_p \pi}{\delta_p}} \pm 2\sin(\phi - \phi_b) \cdot e^{\frac{m\beta_p \pi}{2\delta_p}} \right] - e^{-\mu_b t} \cdot e^{\frac{m\beta_p \pi}{\delta_p}} \right|}{e^{-\mu t} \left[ 2\{1 - \cos(\phi - \phi_b)\} + e^{\frac{m\beta_p \pi}{\delta_p}} \pm 2\sin(\phi - \phi_b) \cdot e^{\frac{m\beta_p \pi}{2\delta_p}} \right] + e^{-\mu_b t} \cdot e^{\frac{m\beta_p \pi}{\delta_p}}} \quad (1),$$

ここで、複素屈折率を  $n = 1 - \delta - i\beta$  とし、 $\mu$  は線吸収係数、 $\phi - \phi_b = \frac{2\pi}{\lambda}(\delta - \delta_b)t$  はバックグラウンドを基準とした試料による位相差、 $t$  は試料の厚さである。添え字“b”と“p”はそれぞれ対応する変数がバックグラウンド及び位相板に対応することを示している。また添え字の無い変数は、試料についてのものである。 $m = 1$  で符号が“+”の場合がポジティブコントラスト、 $m = 3$  で“-”の場合がネガティブコントラストである。

図 1 に(1)式を用いて計算した、厚さ 1  $\mu\text{m}$  のタンパク質と厚さ 7  $\mu\text{m}$  のポリスチレン膜が空

気中及び水中に存在する場合の像のコントラストを示す。ここでは、位相板の厚さは全てのエネルギーにおいて $\pi/2$  ( $\lambda/4$ ) または  $3\pi/2$  ( $3\lambda/4$ ) の位相差 (光路差) を与えるものと仮定して計算する。吸収コントラストでは限りなくゼロに近いコントラストしか得られないのに対し、位相コントラストでは十分大きなコントラストが期待できることがわかる。11.9 keV、13.7 keV、14.4 keVにある不連続構造は位相板である金のL吸収端である。金の $L_3$ 吸収端 (11.9 keV) 直上の 12 keV にエネルギーを合わせることで、最も高いコントラストが得られるので、使用エネルギーを 12 keV に選定した。

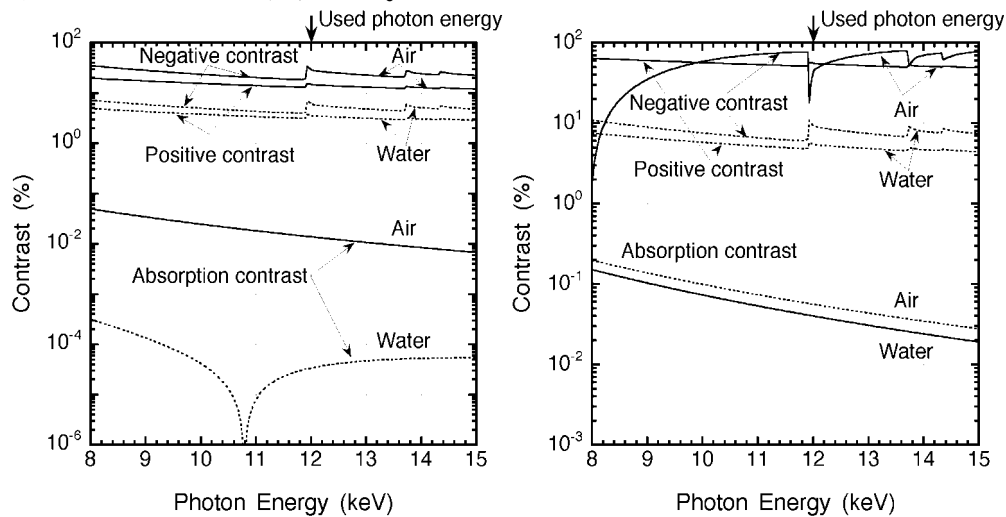


図1 . 厚さ 1  $\mu\text{m}$  のタンパク質と厚さ 7  $\mu\text{m}$  のポリスチレン膜が空气中及び水中に存在する場合の像のコントラスト。

### 3 . ゼルニケ型位相差顕微鏡の光学系

開発当初は、光学顕微鏡に倣って集光レンズを用いた臨界照明系による位相差顕微鏡を構築したが [ 2,3 ]、高空間分解能化と広視野化を狙った光学系では平行光照明系を用いている [ 4,5 ]、いずれの場合も対物レンズには NTT アドバンステクノロジー社製のタンタル製位相ゾーンプレートを用いている [8]。図 2 に平行光照明系の光学系を示す。この場合、対物レンズの後側焦平面内の 0 次回折光 (ダイレクト光) の形状はほぼ光源の縮小像となるので、放射光の光源の形状を反映して横長の楕円となる。しかしながら、光学系の軸対称性を保証するために位相板の形状は円形とすべきであり、実際に円形の位相板を採用している。0 次光の大きさは、光線追跡で事前に見積った値と、実際にナイフエッジスキャン法で測定した値がほぼ一致している。図には示していないが、アンジュレータ光の高いコヒーレンシーは、結像顕微鏡では像の擾乱を引き起こし像質を低下させてしまうので、照明系の前にダイヤモンドペースト製の拡散板を挿入可能にしている [5]。

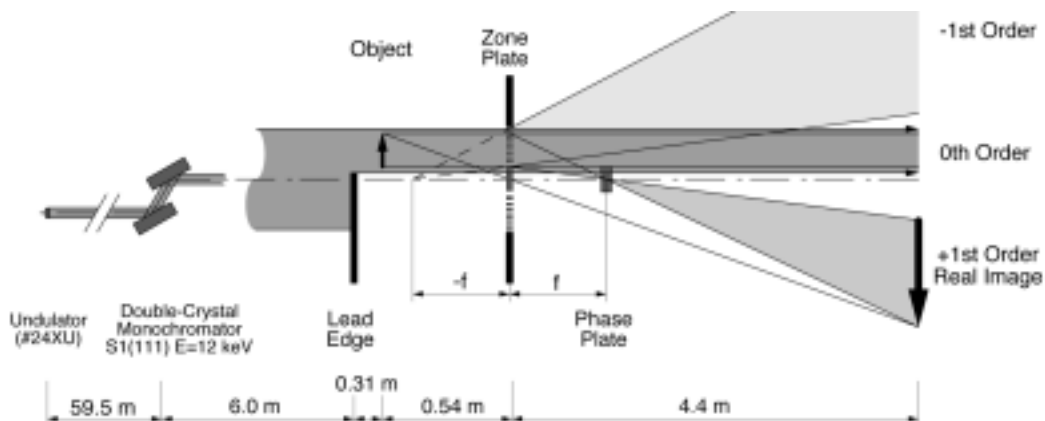


図2 . BL24XU におけるゼルニケ型位相差 X 線顕微鏡の光学系 (E=12 keV)

#### 4. 性能評価

空間分解能は、エッジ構造の拡大像の強度分布をエラー関数にフィッティングする方法で評価している。図2の光学系では、10 keVにて220 nmという値を得ている[5]。我々の経験では、この方法で定義した空間分解能の約半分弱の Line & Space パターンまで解像できることがわかっており、実際100 nmの Line & Space まで解像できている[4,5]。図3にその結果を示す。12 keVの場合

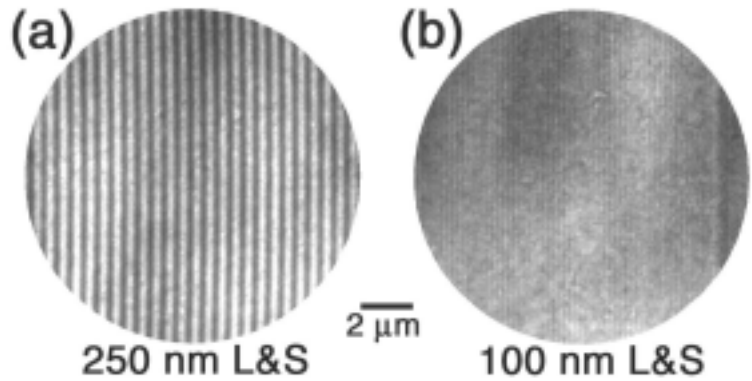


図3 . L&S パターンの拡大像 (E=10 keV)

には、倍率の関係で120 nmの Line & Space までの解像に留まっている[9]。尚、最近新たに導入した最外幅50 nmのゾーンプレートを用いて60 nmの Line & Space まで解像することに成功した。これは10 keV以上のX線では世界最高の空間分解能である[10]。

#### 5. 位相コントラスト X 線顕微鏡像の例

二種類の位相板(位相差が $\pi/2$ と $3\pi/2$ )を作り、ポジティブコントラスト(PC)像とネガティブコントラスト(NC)像の取得を試みた。 $\pi/2$ 位相板がPC像を $3\pi/2$ 位相板がNC像を与える。X線のエネルギーは、より高いコントラストを得るために、金(位相板)の $L_3$ 吸収端直上の12 keVに合わせた。ゼルニケ法の本質は透明な物体を可視化することである。図4は直径7  $\mu\text{m}$ のポリスチレン微粒子のX線顕微鏡像である。計算上の吸収コントラストの値は12 keVで0.04%である。粒子構造が(b)のPC像と(c)のNC像では明瞭に観察できるのに対し、(a)の吸収像ではほとんど構造が認められない。さらに、PC像とNC像ではコントラストが反転していることがわかる。すなわち、バックグラウンドに対してPC像では粒子が明るく(強度が高く)NC像では粒子が暗く(強度が低く)現れている。また、NC像では粒子の中心部分が明るくなっているのがわかる。

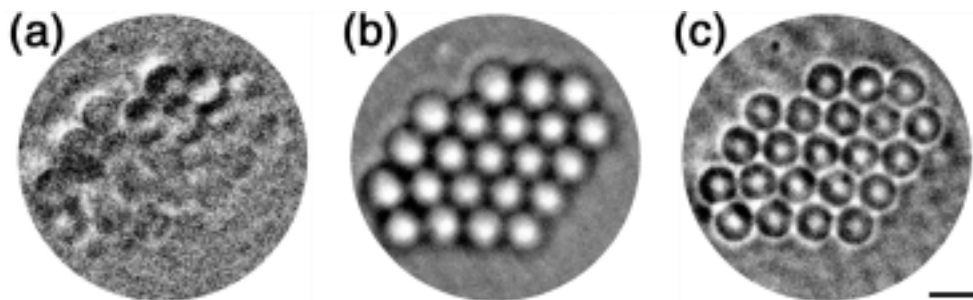


図4 .ポリスチレン微粒子のX線顕微鏡像(@E=12 keV).スケールバーは10  $\mu\text{m}$ .  
(a)吸収コントラスト像、(b) Positive Contrast 像、(c) Negative Contrast 像

#### 6. まとめ

ゼルニケ型のX線位相差顕微鏡を実現し、透明な微小試料の可視化に成功した。10 keVのX線の場合空間分解能は約200 nmであり、100 nmの Line & Space まで解像可能である。12 keVにおいて位相板を選択することにより、正負の両コントラストを得ることに成功した。

ゼルニケ法の欠点は、試料によって生ずる位相差を定量的に評価することが困難なことである。この問題を解決するために、干渉計やトモグラフィーの概念を導入した、新しいX線顕微鏡を考案する必要がある。

## 謝辞

ここで述べた研究は、姫路工業大学大学院理学研究科物質科学専攻 X 線光学講座が中心になって行ったものである。本大学院修了生である伊吹高志君、横山佳行君、在校生の新美敏弘君、小山貴久君、和田いづみさん、講座スタッフの津坂佳幸助手、松井純爾教授に感謝します。また、共同研究者であり本大学院 OB でもある財団法人高輝度光科学研究センターの高井健吾氏に感謝します。

## 参考文献

- [1] G. Schmahl, D. Rudolph, P. Guttman, G. Schneider, J. Thieme and B. Niemann: *Rev. Sci. Instrum.* **66** (1995) 1282.
- [2] Y. Kagoshima, T. Ibuki, K. Takai, Y. Yokoyama, N. Miyamoto, Y. Tsusaka and J. Matsui: *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** (2000) L433.
- [3] Y. Kagoshima, T. Ibuki, Y. Yokoyama, Y. Tsusaka, J. Matsui, K. Takai and M. Aino: *Jpn. J. Appl. Phys.* **40** (2001) L1190.
- [4] Y. Kagoshima, T. Ibuki, Y. Yokoyama, K. Takai, Y. Tsusaka and J. Matsui.: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) 412.
- [5] Y. Kagoshima, Y. Yokoyama, T. Ibuki, T. Niimi, Y. Tsusaka, K. Takai and J. Matsui: *J. Synchrotron Rad.* **9** (2002) 132.
- [6] D. Rudolph, G. Schmahl, B. Niemann, in *Modern Microscopies, Techniques & Applications*, edited by A. Michette & P. Duke, (London, Plenum Press, 1990), p. 59.
- [7] 籠島 靖、横山佳行、新美敏弘、伊吹高志、津坂佳幸、松井純爾、高井健吾、相野公孝、*放射光* 第 15 巻 (2002) 146.
- [8] A. Ozawa, T. Tamamura, T. Ishii, H. Yoshihara, Y. Kagoshima, *Microelectron. Eng.* **35** (1997) 525.
- [9] 横山佳行、姫路工業大学大学院理学研究科 平成 13 年度修士論文 .
- [10] Y. Kagoshima, Y. Yokoyama, T. Niimi, T. Koyama, Y. Tsusaka, J. Matsui, K. Takai, submitted to the Proceedings of International conference on X-Ray Microscopy 2002.