

生体試料観察のための投影型軟X線顕微鏡の開発

伊藤 敦¹、本田捷夫²、吉村英恭³、遠藤久満⁴、金城康人⁵、矢田慶治⁶、小林克己⁷、篠原邦夫⁸

¹ 東海大学工学部応用理学科、² 千葉大学工学部情報画像工学科、³ 明治大学理工学部物理学科、
⁴ 京都工芸繊維大学工芸学部電子情報工学科、⁵ 都立産業技術研究所放射線利用施設、⁶ 東北大学、
⁷ 物質構造科学研究所、⁸ 高輝度光科学研究センター

Development of Soft X-ray Projection Microscope for the Observation of Biological Specimens

Atsushi ITO¹, Toshio HONDA², Hideyuki YOSHIMURA³, Hisamitsu ENDOH⁴, Yasuhito KINJO⁵, Keiji YADA⁶,
Katsumi KOBAYASHI⁷, Kunio SHINOHARA⁸

¹School of Engineering, Tokai University, ²Faculty of Engineering, Chiba University,

³School of Science and Technology, Meiji University, ⁴Faculty of Engineering and Design, Kyoto Institute of Technology,

⁵Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, ⁶Tohoku University, ⁷Institute of Materials Structure Science, ⁸JASRI

1. はじめに

われわれは生物試料の高分解能観察に適した観察法として軟X線顕微鏡の開発を進めてきた。その主な理由として、1) 生体を構成する主要軽元素であるC, N, OなどのK吸収端が存在するため、細胞あるいは細胞内構造など薄い試料においてコントラスト高く観察できる、2) Ca, S, Pなどの微量ではあるが生体にとって重要な軽元素のL吸収端もこの波長領域に存在する、3) water window とよばれるOとCのK吸収端に挟まれた領域では、細胞成分と水との吸収係数の差が大きいことを利用して水溶液中の試料が観察できる、4) ゾーンプレートなどの光学素子の進歩により分解能が20 nm程度にまで達していること、これによって細胞内の微細構造の観察が可能となること、などがあげられる。近年硬X線を利用する顕微鏡の急激な進歩によって、生体組織など厚い試料の生理状態での観察が可能となってきたが、細胞あるいは細胞を構成する分子複合体の高分解能観察、元素マッピングなどにはまだ軟X線の利点があるように思われる。本稿では、BL-12A, 11A, 2Cにて行ってきた生物試料観察を目的とした投影型軟X線顕微鏡開発について、各ビームラインの比較も含めてまとめた。

2. 投影型X線顕微鏡の特徴とこれまでの研究

投影型X線顕微鏡は点光源から拡散するX線の光路に試料を設置することにより、試料の拡大投影像を得る手法である。焦点深度が深いこと、視野が広いこと、容易にズームアップ可能なこと、ステレオ、CTなどの3次元観察がやりやすいことなど、他のタイプのX線顕微鏡にない特徴を持っている。これらの特徴は生物試料観察において特に有効である。すなわち、広い視野から特定の構造をズームアップによってとらえ、それらの3次元構造を観察することが期待される。

これまで実用化された投影型X線顕微鏡は、走査型電子顕微鏡を用いて集光した電子ビームを金属ターゲットに照射し、そこから発生する特性X線を点光源として試料透過光を拡大投影する方式をとっているが [1, 2]、この方式に

おける問題点は、利用可能波長が限られていること、X線強度に限界のあること、があげられる。しかしながら、点光源と試料とを近づけることによってフレネル回折によるボケを抑え、約0.1 μmの高分解能が達成されている [3]。

一方、渡辺らは投影型インラインホログラフィーの観点から、フレネル回折を伴う像からの再生をPhoton Factory旧BL-11Aで試み、赤血球を試料として約1.4 μmの分解能を得ている [4]。

本研究では、放射光を利用した高分解能投影型顕微鏡の試作を行い、細胞および染色体観察を試みた。目標は以下の通りである。

- 1) ゾーンプレートにより単色放射光を集光し、これまでの走査型電子顕微鏡を用いたタイプより強度の高い点光源を利用可能とすること。
- 2) 放射光の特徴を生かして可変波長に対応できること。これによって元素や分子の分布画像を求めること。
- 3) フレネル回折像からのより精度の高い像再生法を開発すること。

装置の設計と生物試料観察の予備的結果は文献 [5] に報告済みである。

3. 投影型顕微鏡の装置レイアウトと性能評価

3-1. 装置レイアウト

投影型の光学系を Fig. 1 に示す。渡辺らと同様、入射光をゾーンプレートにより集光し点光源をつくる。理想的には、ゾーンプレートがコヒーレント照明されれば最大限の集光性能を発揮させることが可能である。放射光は完全コヒーレント光源ではないため、ゾーンプレートの上流に入射光の空間コヒーレンスを上げるための前置ピンホールを挿入可能とした。また、集光点にピンホール（以後後置ピンホールと呼ぶ）を設置することにより、ゾーンプレートからの不要な次数の回折光を除いた。集光サイズが後置ピンホールサイズより大きい場合には、集光サイズを規定する役割ももつ。後置ピンホールからの発散光は試料を透過後、背面照射型 CCD により検出された。後置ピンホール

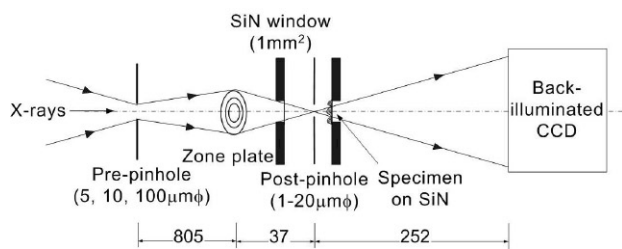


Figure 1 Optical layout of soft X-ray projection microscope. Sizes are typical values in the BL-11A beamline with 1.5 nm soft X-rays.

Table 1 Experiments at PF soft X-ray beamlines for projection microscopy.

Beamline	Wavelength (nm)	Slit width (μm) (Entrance-Exit)	Pre-pinhole ($\mu\text{m}\phi$)	Post-pinhole ($\mu\text{m}\phi$)
BL-12A	1.5, 2.4, 3.5, 4.5	100-100	-	1, 5, 10, 20
BL-11A	1.5, 2.4, 3.5	200-200	10, 20, 100	1, 5, 10, 20
BL-2C	3.1	100-250	5 ^{*)} , 100	1, 5, 10, 20

^{*)} 5 $\mu\text{m}\phi$ pre-pinhole was available only for post-pinholes with the diameter larger than 5 μm .

は4連のピンホールホルダーに1, 5, 10, 20 $\mu\text{m}\phi$ が装着され、真空を破らずに大きい方から選択することによって、集光位置へ微小後置ピンホールをアラインメントするときの能率を上げた。また2連の前置ピンホールホルダーには2種類のサイズを装着し、空間コヒーレンスの影響を調べた。

後置ピンホールと試料はそれより上流のゾンプレートが設置されるチェンバーとSiN膜により真真空的に仕切られている。現在は低真空の雰囲気乾燥試料の露光を行っているが、将来的には試料を湿潤状態に保つよう改善したい。

画像の波長依存性を測定するために、ゾンプレートの光軸方向の移動によって1.5 nmから5 nm付近までの波長走査が可能である。なお、用いたゾンプレートのスペックは最外殻ゾーン幅が80 nmであり、従って分解能は最高約0.1 μm となる。

Table 1に各ビームラインで行った実験条件を使用可能であった前後ピンホールサイズとともにまとめた。これらのサイズ制限は主に軟X線用背面照射型CCDで検出できる光強度に依存している。後述するようにいずれのピンホールも小さいほど分解能の向上が期待できる。BL-12Aは最も光強度が低いビームラインであるが、最小後置ピンホール1 $\mu\text{m}\phi$ を挿入することができた。これによって分解能は約0.5 μm が達成され、はじめて細胞試料のイメージングを行った。さらにゾンプレートの集光サイズなどの光学特性を評価することができた。12Aのもう一つの利点としては、フローに装置を直接設置することができるため、振動対策のしやすさ、装置設置の自由度が高い点があげられる。BL-11Aでは前置ピンホールの集光サイズ、分解能への影響の検討を行った。分解能は約0.2 μm まで改善され、細胞や染色体の微細構造の観察を行うことができた。高輝度ラインのBL-2Cでは、前置ピンホールが最小

5 $\mu\text{m}\phi$ まで利用可能となったが、CCDの検出感度から後置ピンホールサイズは5 $\mu\text{m}\phi$ が限界であった。

なお、本装置ではゾンプレートの集光点に最小1 $\mu\text{m}\phi$ のピンホールをアラインメントする必要があるが、ビーム変動、装置全体の振動、ピンホールの微動装置の不安定性、によって視野が失われてしまう。とくにビームの変動に関して、数回の経験から通常の2.5 GeV運転より3 GeV運転モードの時の方が安定している印象をもった。変動といっても1-2 μm 程度のピンホールの微動でもとに戻すことができるようなミクロンオーダーのずれではあるが、このような顕微鏡の場合には深刻な問題となる。

3-2. 分解能

投影型顕微鏡の分解能(δ)は、光源サイズ(δ_s)、光源と試料間の距離に依存したフレネル回折によるボケ(δ_f)によって決まる[6]。すなわち、光源の直径を d_s 、波長を λ 、光源と試料間の距離を d とすると、 $\delta = \sqrt{\delta_s^2 + \delta_f^2} \approx \sqrt{d_s^2 + \lambda d}$ で表される。ただし、フレネル回折によるボケは回折縞の第一極大の半値幅 $\sqrt{\lambda d}$ をとった。ゾンプレートの集光点と試料間の距離はマイクロメーターにより規定できる。一方、ピンホール面における集光サイズは、ナイフエッジの上下、左右方向の走査、1 $\mu\text{m}\phi$ ピンホールの2次元走査、の2つの方法により求めた。ナイフエッジの走査による方法では1 μm ピッチにて測定を行い、前置ピンホールのない状態では半値幅が約15 μm 、前置ピンホール100 $\mu\text{m}\phi$ で約3 μm 、10 $\mu\text{m}\phi$ にて約1 μm となり、前置ピンホールの径が小さくなるにつれ集光サイズが小さくなること示された。同様の結果は1 $\mu\text{m}\phi$ ピンホールの2次元走査によっても確認され、数 μm^2 全面の0.5 μm ピッチでの走査により0.5 μm 程度の集光サイズが得られた。

これらの集光サイズが実際の分解能に与える影響については、一定の幅のline and spaceをもつテストパターンの画像から判断した。Fig. 2に後置ピンホール1 $\mu\text{m}\phi$ の場合、前置ピンホールなし、100 $\mu\text{m}\phi$ 、10 $\mu\text{m}\phi$ としたときの画像を示す。波長は1.5 nm、後置ピンホールと試料間距離は1 mmである。前置ピンホール100 $\mu\text{m}\phi$ の挿入により、ピンホールなしより0.5 μm のline and spaceのコントラスト

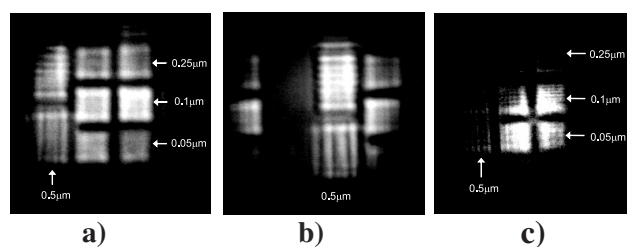


Figure 2 Effect of pre-pinhole on the spatial resolution. (a) no pre-pinhole; (b) 100 $\mu\text{m}\phi$ pre-pinhole; (c) 10 $\mu\text{m}\phi$ pre-pinhole. Test patterns with defined width of line and space were imaged with 1.5 nm soft X-rays. Post-pinhole: 1 $\mu\text{m}\phi$; Magnification: about 252 under 1mm distance between post-pinhole and the specimen.

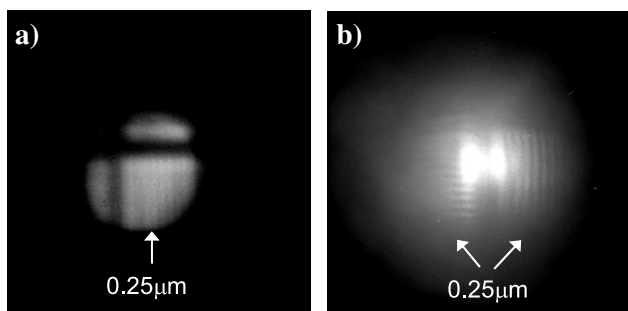


Figure 3 Observation of 0.25 μm pattern under 0.2 mm distance between post-pinhole and specimen. (a) no pre-pinhole; (b) 100 μmφ pre-pinhole.

が向上しているように見える。さらに、前置ピンホールを 10 μmφ とすると、ピンホールなし及び 100 μmφ では分解されなかった 0.25 μm の line and space が識別できた。このように前置ピンホール挿入によりゾーンプレートへの入射光の空間コヒーレンスが向上し、その結果、集光サイズが小さくなり、それに伴う分解能の向上が示された。

ついで、分解能を規定するもう一つの因子である光源(後置ピンホール面)と試料間の距離を縮めることによって分解能の向上を試みた。Fig. 3 に距離を 0.2 mm とした場合のテストパターン画像を示した。後置ピンホールは 1 μmφ を用いた。前置ピンホールなしでも 0.25 μm の線幅が何とか識別できる。さらに 100 μmφ の前置ピンホールを入れると縦パターン(右)と横パターン(左)ともにはっきりと分解できた。これらの結果より、光源と試料間距離を縮めることによってフレネル回折ボケを抑え、分解能を向上できることが確認された。なお、0.1 μm の線幅はこの条件でも分解できなかったことから、本装置の分解能は 0.25 μm と 0.1 μm の間にあることになる。

3-3. フレネル回折縞によるボケからの像再生

光源と試料間の距離が増大するとフレネル回折により画像がボケる。フレネル回折の影響を避ける方法の一つは、フレネル回折によってボケた検出面での画像からフレネル逆変換によって試料直後の像(波面)を再生することである。このために、コンピュータを用いた計算により、少しずつ再生像に近づける繰り返し法を用いた。再生の精度を上げるために試料面に形、大きさが既知の開口を設け、

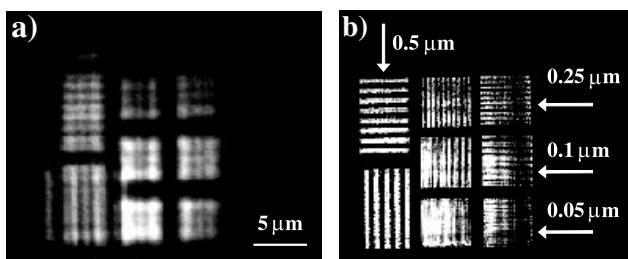


Figure 4 Reconstruction of image blurred by Fourier diffraction. (a) Raw image; (b) Reconstructed image. Wavelength: 1.5 nm; Pre-pinhole: 10 μmφ; Post-pinhole: 1 μmφ; Magnification: about 168

その情報を用いた [7]。Fig. 4(a) は光源と試料間の距離が 1.5 mm で撮影したテストパターン画像である。0.25 μm の line and space はフレネル回折によって検出できていないが、繰り返し法を用いた像再生によって再生像(b)のように分解することが可能となった。こうした像再生の方法によって、光源-試料間距離を近づけられない場合でも高分解能を達成する可能性が示された。

4. 生物試料観察例

動物培養細胞の乾燥試料の観察を行った。Fig. 5 にヒト子宮がん由来 HeLa 細胞の軟 X 線画像を光学顕微鏡画像(位相差)と比較した。位相差画像に比べて細胞内の密度の変化がよりコントラスト高く観察されるように見える。たとえば核内の核小体と思われる数個の不定形の構造、核と細胞質の境界部分などである。Fig. 5(c) の拡大像では、核内および細胞質での密度変化の微細構造が見られるが、その同定はこれからの課題である。なお、前置ピンホールなしと 100 μmφ では、前置ピンホールがある方がややコントラストがよいように感じられたが、テストパターンでの差ほどの違いは観察されなかった。

染色体の高分解能観察も現在試みている。波長 1.5 nm にて光源-試料間距離を 0.5 mm まで近づけた高拡大像が得られているが、試料が薄いためコントラストが低く、さらに長波長での観察を計画している。

5. 今後の課題

以下の課題が今後の検討項目である。

- 1) 試料の視野制限のための開口をなくした像再生法の開発: 微小な開口内に試料を準備する制限がなくなることにより試料作製の自由度が高められる。
- 2) CT による 3 次元観察: X 線顕微鏡の特徴である厚い試料の観察をより有効なものにするために CT への拡張は重要である。投影型における焦点深度が深いという特徴は画像再生に有利である。CT を行う場合、試料を回転させるため光源と試料間距離がある程度必要であるが、3-3 項で述べた距離があっても分解能が得られる像再生法が有効となる。
- 3) 画像の波長依存性をとることによる元素分布マッピング: 現在の光学システムでは 1.5-5 nm 程度の範囲で

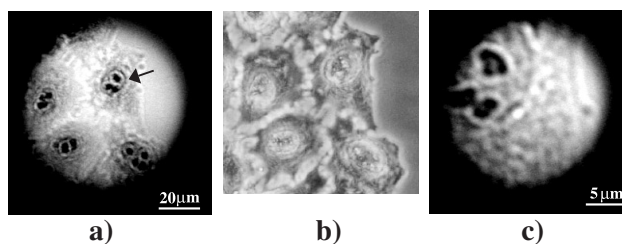


Figure 5 X-ray images of human HeLa cells. (a) X-ray image at the wavelength of 1.5 nm; (b) Phase contrast image with optical microscope; (c) Magnified image of intracellular part indicated by the arrow in panel (a). Pre-pinhole: none; Post-pinhole: 1 μmφ

の波長走査が可能である。この範囲で C, O, N, Ca の分布画像の取得を行いたい。

- 4) ウェット試料用の試料槽の設置：現在の試料用低真空槽内にさらに水を含んだ試料を保持できる小チェンバーを設置し、生理的な状態での観察を目指す。

引用文献

- [1] K. Yada and S. Takahashi, J. Electron Microsc. (Tokyo) **38**, 321 (1989).
 [2] H. Yoshimura et al., J. Electron Microsc. (Tokyo) **49**, 621 (2000).
 [3] K. Yada and S. Takahashi, In "X-Ray Microscopy in Biology and Medicine" (eds. K. Shinohara et al.), Japan Sci. Soc. Press/Springer Verlag, Tokyo/Berlin, 193 (1990).
 [4] N. Watanabe et al., Appl. Opt. **36**, 7433 (1997).
 [5] K. Shinohara et al., In "X-Ray Microscopy" (eds. W. Meyer-Ilse et al.), American Institute of Physics, New York, 346 (2000).
 [6] 矢田慶治, 電子顕微鏡 **26**, 72 (1991).
 [7] 児玉巖他, 光学 **24**, 226 (1995).

(2004年1月19日原稿受付)

著者紹介

伊藤 敦 Atsushi ITO

東海大学工学部 教授

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 1117

TEL: 0463-58-1211 ext. 4148 FAX: 0463-50-2017

e-mail: aeito@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

略歴：1983年東京大学大学院理学系研究科物理学博士課程修了、1987年東京都臨床医学総合研究所研究員、1994年東海大学工学部助教授、2001年同教授。理学博士。

最近の研究：X線顕微鏡による元素・分子分析、重イオン線によるフリーラジカルの生物作用、光による遺伝子制御法の開発。

本田捷夫 Toshio HONDA

千葉大学工学部 教授

〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

TEL: 043-290-3469 FAX: 043-290-3490

e-mail: toshio.honda@faculty.chiba-u.jp

略歴：1968年東京工業大学理工学研究科修士課程修了、同年東京工業大学工学部助手、1981年東京工業大学工学部助教授、1993年千葉大学工学部教授。工学博士。

最近の研究：立体テレビ方式の開発、レーザー干渉法によるレンズ等の光学部品の高精度性能計測および機械部品の高精度形状計測、画像を使った人の顔の3次元形状計測とその利用、軟X線顕微鏡システムの開発。

吉村英恭 Hideyuki YOSHIMURA

明治大学理工学部 教授

〒214-8571 川崎市多摩区東三田 1-1-1

TEL: 044-934-7439 FAX: 044-900-0421

e-mail: hyoshi@isc.meiji.ac.jp

略歴：1982年名古屋大学理学研究科博士課程修了、1984年日本電子(株)研究員、1990年新技術事業団永山たん白集積プロジェクト(出向)、1995年明治大学理工学部助教授、2000年同教授。理学博士。

最近の研究：走査電顕を改造した投影型X線顕微鏡の開発、タンパク質を使ったナノ粒子の生成、バクテリアべん毛モーターの構造研究、深海生物の細胞骨格。

遠藤久満 Hisamitsu ENDOH

京都工芸繊維大学工学部 教授

〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

TEL: 075-724-7441 FAX: 075-724-7400

e-mail: endoh@dj.kit.ac.jp

略歴：1970年京都工芸繊維大学工学研究科修士課程中退、同年同大学工学部助手、1975年大阪大学工学部助手、1989年京都工芸繊維大学工学部助教授、1999年同教授。工学博士。

最近の研究：高分解能電子顕微鏡像コントラスト解析法の研究、電子線ホログラフィーの結像に関する研究。

金城康人 Yasuhito KINJO

都立産業技術研究所 研究員

〒158-0081 東京都世田谷区深沢 2-11-1

TEL: 03-3702-3126 FAX: 03-3703-9768

e-mail: yasuhito_kinjou@member.metro.tokyo.jp

略歴：1974年千葉大学理学部生物学科卒業、同年都立アイソトープ総合研究所研究員、1997年都立産業技術研究所研究員。理学博士。

最近の研究：軟X線顕微鏡および原子間力顕微鏡を用いた染色体微細構造解析。

趣味：テニス、料理。

矢田慶治 Keiji YADA

(株)東研 技術顧問。東北大学名誉教授

〒182-0025 東京都調布市多摩川 2-27-7

TEL: 0424-84-6155 FAX: 0424-89-9241

e-mail: kyada@tohken.co.jp

略歴：1950年東北大学工学部卒業、1990年東北大学科学計測研究所教授退官、東京都臨床医学総合研究所非常勤研究員、青森公立大学教授を経て(株)東研技術顧問。工学博士。

小林克己 Katsumi KOBAYASHI

物質構造科学研究所 助教授

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

TEL: 029-864-5655 FAX: 029-864-2801

e-mail: katsumi.kobayashi@kek.jp

略歴：1976年東京大学理学系研究科物理学専門課程博士課程修了、日本学術振興会奨励研究員の後、1978年より、筑波大学生物科学系講師、1986年高エネルギー物理学研究所助教授。1997年機構改革により物質構造科学研究所助教授。理学博士。

最近の研究：低線量放射線の生物効果、特にマイクロビームを用いて、照射された細胞とされていない細胞を区別して、それぞれに誘発される生物作用を研究している。

篠原邦夫 Kunio SHINOHARA

高輝度光科学研究センター 特別研究員

〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都 1丁目 1-1

TEL: 0791-58-0802 ext. 6123

e-mail: kshino-ky@umin.ac.jp

略歴：1972年東京大学医学系研究科修了、同年放射線医学総合研究所研究員、1977年神戸大学医学部助教授、1983年東京都臨床医学総合研究所室長、1996年東京大学医学部教授、2003年高輝度光科学研究センター特別研究員、姫路工業大学客員教授。医学博士。