

最近の研究から

位相差 X 線マイクロ CT と蛍光 X 線マイクロ CT による低コントラスト生体微細構造の可視化と 3 次元元素マッピングの試み

星野真人, 渡辺紀生, 青木貞雄
筑波大学大学院数理物質科学研究科

Visualization and Three Dimensional Element Mapping of Low Contrast Biological Micro Tissues Using Phase Contrast X-ray Micro CT and X-ray Fluorescence Micro CT

Masato HOSHINO, Norio WATANABE and Sadao AOKI
Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

1. はじめに

X線をを用いた顕微的手法は、高輝度放射光源の出現や微細加工技術の進歩に伴い急速な発展を遂げており、現在までに軟X線領域における結像型顕微鏡で約15 nmの空間分解能が得られている [1]。X線は電子線に比べてはるかに透過力が大きいため、電子顕微鏡観察における試料作製のような何段階にも及ぶ試料加工が不要であり、試料を自然のままの状態を観察するという、いわゆる非破壊観察が可能である。また光学顕微鏡における観察方法、例えば位相差法や微分干渉法などの手法を応用することが可能であり、X線の蛍光作用を利用した微小領域の元素特定およびそのマッピングも大きな利点の1つである。さらに、Hounsfieldによって実用化されたX線CT (Computed Tomography) 技術は、医学の分野でこそ汎用的手法になっているが、X線顕微鏡においてもその技術は適用可能であり、マイクロCTさらにはナノCTとして非破壊で試料の3次元構造を知ることができる。本稿ではまず、BL-3C2にて開発を行ったX線位相差顕微鏡 [2,3] とCTを組み合わせ、低コントラスト試料のマイクロCTについて解説を行い、実際に得られた3次元像を示す。また、同じBL-3C2で開発した蛍光X線顕微鏡 [4-7] とCTを組み合わせ、生体試料の3次元元素マッピングについても解説を行い、その測定結果を示す。

2. X線用光学素子

X線領域では、可視光領域で用いられているような単体の屈折型レンズでは、集光・結像を行うことはできない。その代わりに、X線の回折を用いた素子や反射型の素子が提案された。回折型の代表的な素子として、本研究で位相差顕微鏡の対物素子としても用いたFresnel Zone Plateがある。Zone Plateは、透明・不透明の同心円の輪帯を交互に並べたもので、円形の透過型回折格子である。Zone Plateの理論分解能は $1.22dr_n$ として与えられ、ゾーンの最外輪帯幅 dr_n に依存する。放射光施設におけるX線顕微鏡の多くが、Zone Plateを集光・対物素子として用いている。Zone Plateは、ホログラフィー法や電子ビームリソグラフ

イー法によって製作される。

また、反射型の光学素子としては、Kirkpatrick-Baez mirrorやWolter mirrorなどがある。本研究で蛍光X線顕微鏡の結像素子として用いたWolter mirrorは、非点収差やコマ収差の影響が少なく数nmの理論分解能が得られるということで、古くからその有用性が示されてきた。提案当時の加工技術では作製が不可能であったWolter mirrorであるが、近年の微細加工技術の進歩により、X線領域で使用できるものが作製されるようになってきた。顕微鏡用のWolter mirror (Type 1)は、金型の母材を超精密加工し、その形状をパイレックスガラスに転写させるレプリカ法によって製作した [8]。

3. 位相差X線マイクロCT

位相差顕微鏡法は、光学顕微鏡においてZernikeによって提案された。この方法を同じ原理でX線領域に応用したものがX線位相差顕微鏡である。試料を透過したX線は、そのまま直進する直接光と回折光に分かれる。その後、直接光はZone Plateの後焦点面に集光され、その集光点に位相板と呼ばれる位相変調物体を設置することによって、直接光のみの位相を変調し、像面で強度差として検出する。位相変化は複素屈折率 $n=1-\delta-i\beta$ の位相項 δ と試料の厚みに依存する。Fig. 1にたんぱく質($C_{94}H_{139}N_{24}O_{31}S$, $\rho=1.35\text{g/cm}^3$ [9])の δ および吸収項 β を示す [10]。生体試料を主に構成する軽元素の δ は、5 keV以上の硬X線領域では β に比べて数桁高い値を持つので、吸収コントラストで観察するよりも δ を利用した位相コントラストによる観察法が適しているといえる。試料による吸収が少ないということは、試料に与える放射線ダメージが少ないということと等価であるので、生体細胞などの繊細な試料の観察には、非常に理にかなった観察法だといえる。

X線位相差顕微鏡の光学系概略図をFig. 2に示す。光学素子には、最外輪帯幅50 nmのFresnel Zone Plateを用いた。よって光学系の理論分解能は約60 nmとなる。Zone Plateで集光・結像を行うためには、Zone数と同程度の単色性が光源に要求される。そこで2結晶分光器によって

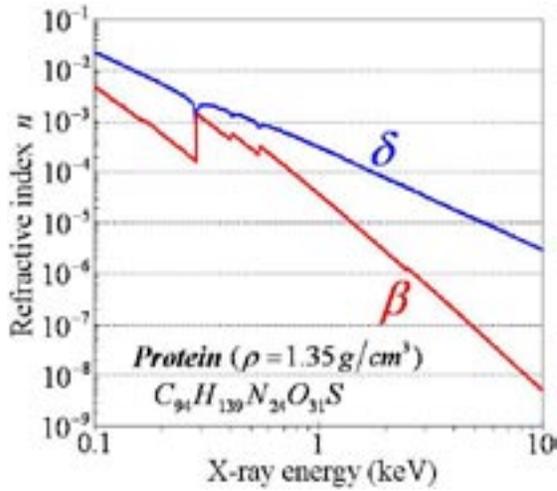


Figure 1 Refractive index of a protein.

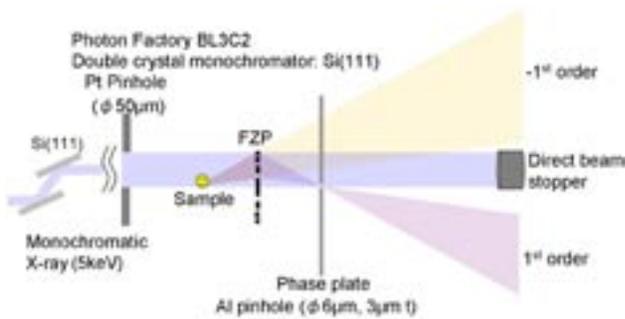


Figure 2 Schematic diagram of phase contrast X-ray microscope with Zone plate.

単色化された 5 keV の X 線を用いた。使用した Zone Plate の 5 keV の X 線エネルギーにおける回折効率率は約 4% である。試料手前の直径 50 μm プラチナ製ピンホールによって、2 結晶分光器からの単色 X 線を整形し試料に照射した。Fig. 2 のように Zone Plate の半分のみを照明することにより、Zone Plate による +1 次の回折光と -1 次の回折光を分離して観察することができる。試料は、Zone Plate の前焦点に設置し、後焦点には位相板を設置した。先の記述で、位相板によって直接光の位相を変調させるとしたが、実際に光学系で使用したものは、直接光の位相は変化させず試料からの回折光の位相を変調させる、ピンホール型の位相板を使用した。アルミニウムピンホール型位相板の直径は 6 μm で厚さが 3 μm であるので、5 keV の X 線が位相板を通過したときの位相変化は約 $\lambda/4$ である。検出器には、直接撮像型の CCD カメラ (TC-215, 浜松ホトニクス社製, 1000(H) \times 1018(V) pixels, 12 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) を用いた。

位相差顕微鏡の試料として珪藻 (*Cymbella*), およびハルジオン (*Erigeron philadelphicus*) の花粉を用いた。珪藻の位相差像および比較のための吸収像を Fig. 3 に示す。珪藻は単細胞藻類で、主にケイ素からなる硬い殻に覆われている。その殻には回折格子状の条線と呼ばれる微細な模様があり、古くから顕微鏡の分解能評価などに用いられてきた。位相差像では、その条線まで観察できているのに対して、位相板を抜いた状態で撮影した吸収像では、ほとん

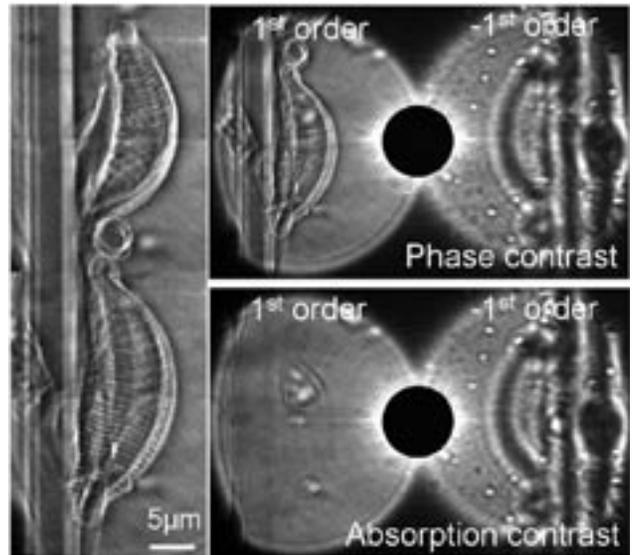


Figure 3 Phase contrast X-ray image of diatom. Exposure: 1 min \times 60 integration (Left). Phase contrast mode (Upper right). Absorption contrast mode (Lower right).

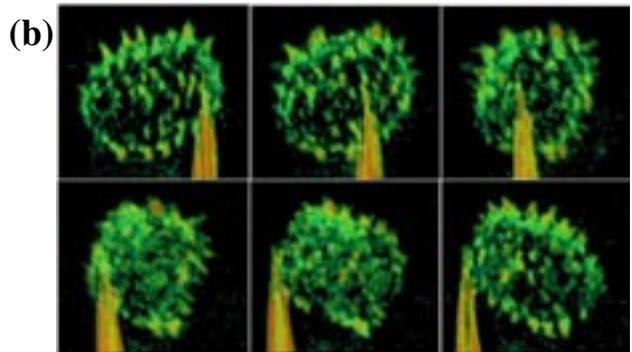
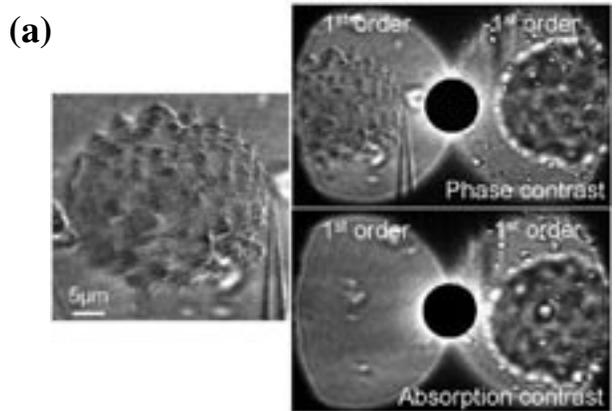


Figure 4 (a) Phase contrast X-ray image of pollen (*Erigeron philadelphicus*). Exposure: 1 min \times 30 integration (Left). Phase contrast mode (Upper right). Absorption contrast mode (Lower right). (b) Three-dimensional volume rendering images. Voxel size: 162 nm \times 162 nm \times 162 nm.

ど像コントラストが得られていない。位相差顕微鏡の利点が最大限に活かされている事が分かる。次に、花粉の位相差像およびその吸収像を Fig. 4(a) に示す。珪藻同様、位相差像にすることで初めてその形を捕らえることができる。また、花粉では位相差マイクロ CT を行った。撮影条件は

3.6° ステップで 100 投影である。再構成は、Shepp-Logan フィルターを用いたパラレルビームにおける畳積積分法 (Convolution Back Projection) を適用した。3次元再構成像を Fig. 4(b) に示す。再構成像中の円錐状の物体は、花粉を固定したキャピラリーチューブの先端である。花粉表面に無数の棘を見て取ることができる。

4. 蛍光X線マイクロCT

前章までは Zone Plate を対物素子に用いた位相差顕微鏡を紹介した。この章では試料から発せられる蛍光X線を結像するような結像型の蛍光X線顕微鏡について述べる。

各元素には吸収端と呼ばれる固有のエネルギーが存在し、一般的にその吸収端よりも高いエネルギーのX線を照射すると、蛍光X線と呼ばれる元素に固有なエネルギーのX線が放射される。この蛍光X線のエネルギーを半導体検出器等で調べることで試料の元素マッピングを行うことが可能である。この蛍光X線を用いた元素マッピングは、試料を走査させながら全体像を得る走査型蛍光X線顕微鏡が一般的なスタイルである。走査型蛍光X線顕微鏡では、Zone Plate 等の集光素子を用いてマイクロビームを生成し、試料の微小領域に照射してそこから発せられる蛍光X線を SDD (Silicon Drift Detector) 等で検出する。我々のグループでは、走査型顕微鏡に併行して、一度の露光で試料全体の蛍光X線像を得ることができる結像型の蛍光X線顕微鏡を開発している。

結像型蛍光X線顕微鏡の概略図を Fig. 5 に示す。弾性散乱の影響を極力抑えるために、結像光学系は励起X線に対して直角を成す方向に構築した。蛍光X線を励起するための照明光には、発生する蛍光X線の積分強度を大きくし露光時間を短縮する目的で、偏向電磁石からの白色X線を、特に分光することなくそのまま用いた。試料に照射する際には、ハッチ直前のスリットで 1 mm² に整形した。試料から発せられた蛍光X線を結像するために斜入射光学素子である Wolter type-1 mirror (×10, 斜入射角 7 mrad) を用いた。ミラー内面にはプラチナがコートしてあるの

で、約 12 keV のエネルギーのX線まで反射することができる。Wolter mirror は Zone Plate とは異なり色収差がないので、同一光学系で複数のエネルギーのX線を結像することが可能である。検出器には先程紹介した CCD のほかに、8 keV 付近で検出感度が 1 桁ほど高い Deep-depletion タイプの CCD カメラ (LCX-1300, Roper Scientific, 1340(H) × 1300(V) pixels, 20 μm/pixel) を用いた。また、像面での蛍光X線エネルギーを測定するために SSD (Solid State Detector, Canberra, GUL0055P) も併せて用いた。

蛍光X線顕微鏡の試料には、アルファルファと呼ばれる多年生植物の種子を用いた。アルファルファは、その構成元素が人体のそれに比べて類似しているということから、栄養食品としても注目されている植物である。まず、アルファルファ種子を前章で示した Zone Plate 位相差光学系で撮影したものを Fig. 6(a) に示す。ここでは最外輪帯幅 100 nm の Zone Plate を用いた。所々にX線が強く吸収されている箇所が存在していることがわかる。次に種子の蛍光X線像を Fig. 6(b) に示す。所々に非常に強い発光箇所を見て取ることができる。透過像における強い吸収体に相当する部分ではないかと思われる。特に種子のくぼみ部分に比較的大きな発光点があるのが特徴的である。このアルファルファ種子は水を与えてから 24 時間以内に発芽するという特徴をもっているため、種子の経時変化の観察を試みた。残念ながら、白色光を用いたことによる放射線損傷により、同一の種子による経時観察は不可能であった。しかし、種子間に大きな違いはないものとして、複数の種子を同時に成長させて、ある経過時間における種子を取り出し観察することにより、仮想的な経時変化観察を行った。水を与えてから 0, 1, 2, 4, 8, 15, 30 時間後の種子の蛍光X線像を Fig. 7 に示す。それぞれの蛍光X線像の左下に示した数字が経過時間である。15 時間を経過すると、根が分離してくる様子を見て取ることができる。また半分以上の種子で、種子のくぼみ部分に強い発光点が存在していることがわかる。次に、アルファルファ種子の蛍光X線 3次元分布を Fig. 8 に示す。これは、蛍光X線で CT を行って再構成した結果

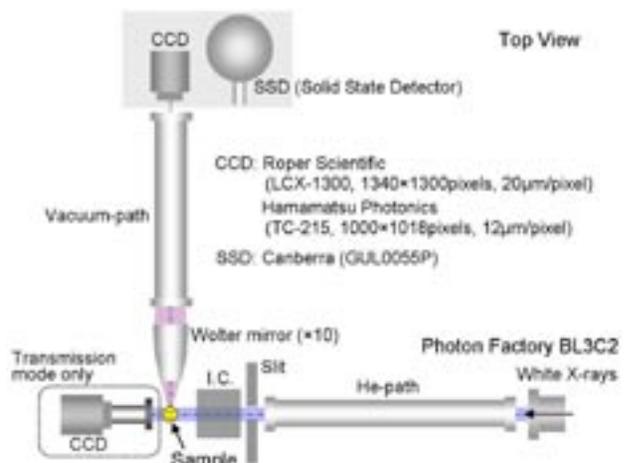


Figure 5
Schematic diagram of full-field X-ray fluorescence imaging microscope with a Wolter mirror.

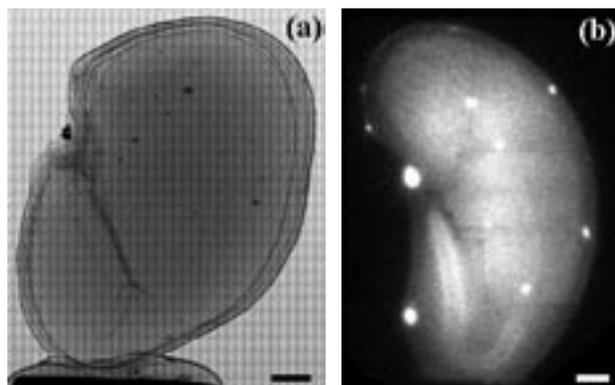


Figure 6
(a) X-ray image of Alfalfa seed taken with phase contrast X-ray microscope. X-ray energy: 7 keV. Exposure: 6 sec/image. Bar: 0.2 mm.
(b) X-ray fluorescence image of Alfalfa seed. Exposure: 30 sec×10 integration. Bar: 0.2 mm.

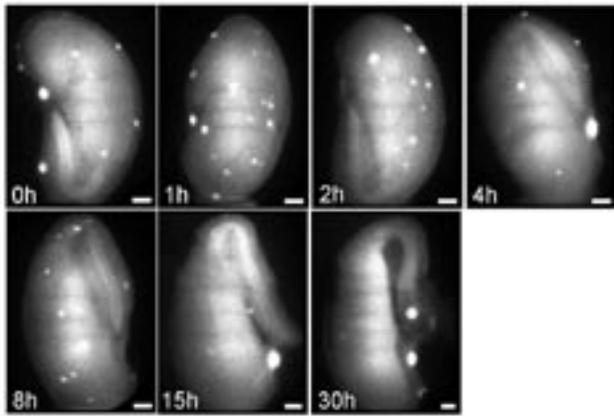


Figure 7
Time-lapse observation of Alfalfa seeds. Exposure: 30 sec × 10 integration. Bar: 0.2 mm.

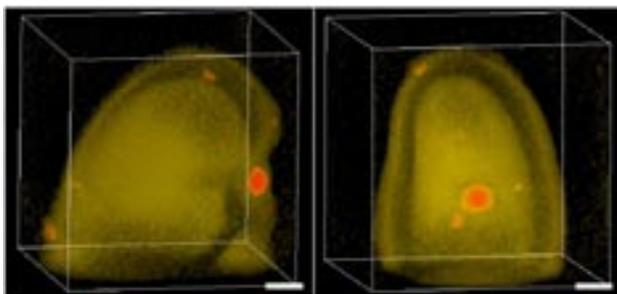


Figure 8
Three-dimensional X-ray fluorescence images of Alfalfa seed. Exposure: 1 min/projection. Bar: 0.2 mm. Voxel size: 8 μm × 8 μm × 8 μm.

である。撮影条件は、1.8°ステップで200投影である。また再構成法は位相差顕微鏡CTと同様に、Shepp-Loganフィルターを用いた畳込積分法で行った。このとき、励起光および蛍光X線の吸収補正は特に行っていない。種子の表面部分および種子内部の胚珠部分に蛍光X線分布を見ることができる。

上で述べた蛍光X線像およびその再構成像は、積算露光およびそのデータを元にした再構成像であるので、種子に含まれている元素の情報は得られていない。SSDを用いれば何の元素が含まれているか知ることはできるが、それがどこに分布しているのかは、Wolter mirror 顕微鏡による積算露光像からでは読み取ることはできない。そこで、主に天文学で用いられる手法であるが、CCDをフォトンカウンティング条件下で用いることにより、位置情報とともにエネルギー情報も得ることができる方法を用いた。このフォトンカウンティング条件では、1つのX線光子がCCD 1ピクセルに入射したときに、光電吸収によって発生する電子数は $N=E(eV)/3.65$ で与えられ、これは各エネルギーに固有である。よって、発生した電子数を調べることで、入射した蛍光X線エネルギー、つまり元素の種類を特定することが可能である。この処理を画像全体もしくは特定領域の全ピクセルに対して行い、さらに統計的ノイズを低減させるために多数の画像からエネルギー情報を得ることにより、結果として像面における蛍光X線エネルギースペク

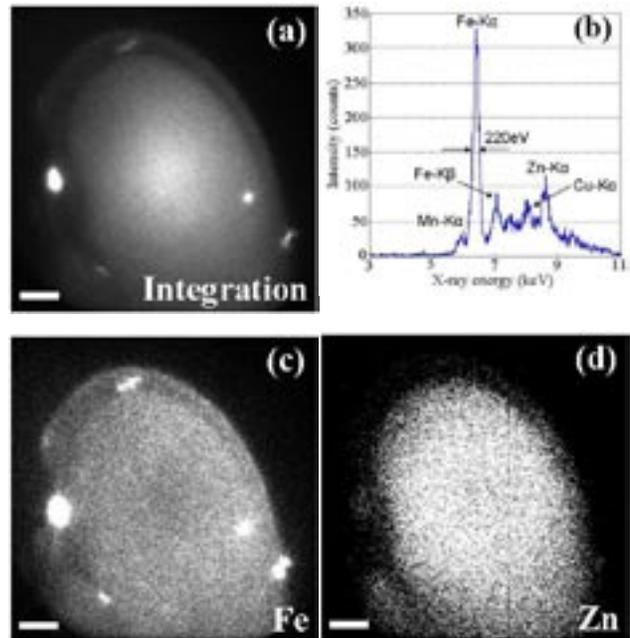


Figure 9
(a) Integration image of 1000 photon counting dataset. Exposure: 1 sec/image. Bar: 0.2 mm. (b) X-ray fluorescence energy spectrum obtained from photon counting calculation. (c) Iron image. Bar: 0.2 mm. (d) Zinc image. Bar: 0.2 mm.

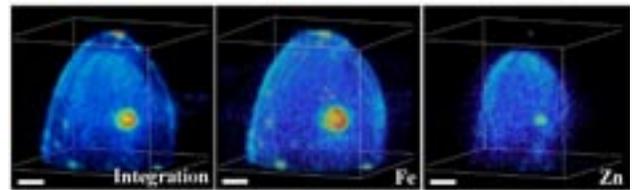


Figure 10
Three-dimensional element mappings. Integration image (Left). Iron image (Center). Zinc image (Right). Exposure: 1 sec/image, 500 photon counting images/projection. Bar: 0.2 mm. Voxel size: 4.8 μm × 4.8 μm × 4.8 μm.

トルを得ることができる。さらに、ある特定のエネルギーを検出したピクセルの位置情報を積算することにより、その蛍光X線エネルギーのマッピング、つまり元素マッピングを得ることができる [6]。この元素マッピングと、CTの技術を合わせることで、3次元元素マッピングを行うことが可能になる。

ではまず、フォトンカウンティングによって得られた像面での蛍光X線エネルギースペクトルについて示す。Fig. 9(a)に1000枚のフォトンカウンティング積算像、Fig. 9(b)にフォトンカウンティング計算によって得られたエネルギースペクトルを示す。主に鉄と亜鉛が多く検出されており、鉄のKα線ではエネルギー分解能220 eVを得ることができた。続いて2次元の元素マッピングの結果について示す。鉄と亜鉛のマッピング結果をそれぞれFig. 9(c)と9(d)に示す。この結果より、強い発光点には鉄が豊富に含まれているということがわかる。また、亜鉛は主に胚珠部分に分布していることが見て取れる。続いて、このフォトンカウンティングによる2次元元素マッピングとCT再構成法を

組み合わせて3次元の元素マッピングを行った。撮影条件は、7.2°ステップで50投影、そして1投影500枚のフォトンカウンティング像を撮影した。Fig. 10に500枚の積算、鉄および亜鉛の3次元再構成像を示す。鉄と亜鉛の再構成像に関しては、2次元の元素マッピングを求めてからCT再構成を行った。光源のエネルギースキャンや試料の走査を行わずに3次元の元素マッピングが得られるということは、非常に画期的な方法であるといえる。

おわりに

本稿では、位相差顕微鏡による低コントラスト生体試料の3次元像および、蛍光X線顕微鏡によるアルファ種子の3次元元素マッピングについて紹介した。位相差CTは、試料への放射線ダメージを最小限に抑え、かつ試料の3次元形状を得ることができるということから生物学や医学の分野への応用が期待できる。また蛍光X線による元素マッピングは、生体試料のみならず半導体等の産業用素子や様々な材料成分の分析への応用が可能であり、測定時間や空間分解能の向上により非常にすぐれた分析ツールになりうる可能性を持っている。現状では2つの光学系を別々に構築しているが、将来的には2つの顕微鏡モードで同時に試料を測定することができるようなシステムの構築を目指している。

引用文献

- [1] W. Chao, B. D. Harteneck, J. A. Liddle, E. H. Anderson and D. T. Attwood, *Nature* **435**, 1210 (2005).
- [2] H. Yokosuka, N. Watanabe, T. Ohigashi, Y. Yoshida, S. Maeda, S. Aoki, Y. Suzuki, A. Takeuchi and H. Takano, *J. Synchrotron Rad.*, **9**, 179 (2002).
- [3] H. Yokosuka, N. Watanabe, T. Ohigashi, S. Aoki and M. Ando, *J. Phys. IV France*, **104**, 591 (2003).
- [4] A. Takeuchi, S. Aoki, K. Yamamoto, H. Takano, N. Watanabe and M. Ando, *Rev. Sci. Instrum.*, **71**, 1279 (2000).
- [5] N. Watanabe, K. Yamamoto, H. Takano, T. Ohigashi, H. Yokosuka, T. Aota and S. Aoki, *Nucl. Instrum. & Methods A*, **467-468**, 837 (2001).
- [6] T. Ohigashi, N. Watanabe, H. Yokosuka, T. Aota, H. Takano, A. Takeuchi and S. Aoki, *J. Synchrotron Rad.*, **9**, 128 (2002).
- [7] T. Ohigashi, M. Hoshino, Y. Takeda, N. Yamada, T. Namiki, T. Ishino, N. Watanabe and S. Aoki, *Proc. 8th Int. Conf. X-ray Microscopy*, eds. S. Aoki, Y. Kagoshima and Y. Suzuki (IPAP Conf. Series **7**, 2006) p.154.
- [8] Y. Sakayanagi and S. Aoki, *Appl. Opt.* **17**, 601 (1978).
- [9] D. Weiß, G. Schneider, B. Niemann, p. Guttman, D. Rudolph and G. Schmahl, *Proc. 6th Int. Conf. X-ray Microscopy*, 1999, ed. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, New York, 2000) p.123.

[10] Calculated using following database. http://www-cxro.lbl.gov/optical_constants/

(原稿受付：2006年9月8日)

著者紹介

星野真人 Masato HOSHINO



筑波大学大学院数理工学系研究科 一貫制博士課程4年次
〒305-8573
茨城県つくば市天王台 1-1-1
TEL: 029-853-5044
FAX: 029-853-5205
e-mail: hoshino@aokilab.bk.tsukuba.ac.jp

略歴：2005年筑波大学大学院数理工学系研究科 修士課程修了。

最近の研究：硬X線および軟X線顕微鏡による生体試料の3次元イメージング。

趣味：ドライブ

渡辺紀生 Norio WATANABE



筑波大学大学院数理工学系研究科講師
〒305-8573
茨城県つくば市天王台 1-1-1
TEL: 029-853-5318
FAX: 029-853-5205
e-mail: watanabe@bk.tsukuba.ac.jp

略歴：1991年名古屋大学大学院理学研究科修了。1992年筑波大学物理工学系助手。1994年博士(理学)(名古屋大学)。1999年筑波大学物理工学系講師。最近の研究：ゾーンプレートを用いたコモンパス干渉顕微鏡の開発。

趣味：登山、ピアノ

青木貞雄 Sadao AOKI



筑波大学大学院数理工学系研究科教授
〒305-8573
茨城県つくば市天王台 1-1-1
TEL: 029-853-5299
FAX: 029-853-5205
e-mail: aoki@bk.tsukuba.ac.jp

略歴：1974年東京大学大学院理学系研究科博士課程修了。1978年～現在、筑波大学物理工学系。

最近の研究：X線顕微鏡による3次元計測法の研究。

趣味：知らない町をブラブラ歩くこと。