

トピックス

硬 X 線位相差顕微鏡による植物生体試料の観察

籠島 靖¹, 横山佳行¹, 新美敏弘¹, 伊吹高志¹,
津坂佳幸¹, 松井純爾¹, 高井健吾², 相野公孝³

¹姫路工業大学大学院理学研究科*, ²高輝度光科学研究センター, ³兵庫県立中央農業技術センター

Hard X-ray Phase-Contrast Microscopy for Observing Biological Specimens

Yasushi KAGOSHIMA¹, Yoshiyuki YOKOYAMA¹, Toshihiro NIIMI¹, Takashi IBUKI¹,
Yoshiyuki TSUSAKA¹, Junji MATSUI¹, Kengo TAKAI² and Masataka AINO³

¹Graduate School of Science, Himeji Institute of Technology, ²Japan Synchrotron Radiation Research Institute,
³Hyogo Prefectural Agricultural Institute

Abstract

Phase-contrast hard X-ray microscopy of Zernike's method for observing transparent biological specimens is described in both terms of theory and experiments. According to theoretical calculation, an image contrast as high as 1% may be expected even for a very thin protein structure of a 100 nm thickness in a water background at such high photon energy as 10 keV, although the absorption contrast is almost zero. Further, the phase-contrast hard X-ray microscopy requires smaller dosage necessary to image the protein structure in the water background than the dosage required by the absorption-contrast soft X-ray microscopy when the water background thickness becomes thicker than approximately 14 μm . We have constructed a phase-contrast microscope using Fresnel zone plates as X-ray lenses at BL24XU of SPring-8 and succeeded in imaging transparent biological specimens with a spatial resolution of approximately 500 nm. We have also succeeded in obtaining positive- and negative-contrast images in the reverse contrast with phase plates to shift the phase by one-quarter and three-quarters of a period. These results demonstrate that the phase-contrast hard X-ray microscopy may open a way to observe fine structures of thick biological specimens in their natural living state.

1. はじめに

硬 X 線顕微鏡は、空間分解能では電子顕微鏡はもちろんのこと軟 X 線顕微鏡にも現状ではとても敵わないが、比較的厚い試料を非破壊で観察できる、試料の前処理が簡便である、試料環境の選択の自由度が高いなど、幾つかの優れた特徴を持っている。しかしながら、生体試料の微細構造観察に用いることを考えた場合、生体試料はほとんど軽元素で構成されるために、従来の吸収コントラストでの観察は事実上不可能である。一方、Zernike (ゼルニケ) によって発明された位相差顕微鏡¹⁾ (ゼルニケ型位相差顕微鏡) は、可視光領域で透明な試料を観察するために用いられており、これを硬 X 線に適用すれば生体試料の微細構造の観察が可能となるかもしれない²⁾。特に、硬 X 線領域では δ が β より 2 ないし 3 桁大きいので、期待される像のコントラストを検討してみる価値が十分にある。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³⁾、軟 X 線では吸収像でも十分な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 (波長によってはコントラストの向上と吸収線量の低減が図れるという利点はある)。また、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吸収線量が小さいことを意味しているので、軟 X 線に比べて低い吸収線量での観

察が期待できる。

以上のような観点から、我々は硬 X 線位相差顕微鏡で期待される像のコントラストの理論的検討を行い、併せて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)⁴⁾ において、そ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⁵⁾、生体試料の正負のコントラストによる位相差像の取得に成功している⁶⁾。本稿では、硬 X 線位相差顕微鏡の原理、期待される像のコントラストと吸収線量、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述べる。

2. 硬 X 線領域の位相差顕微鏡

2.1 ゼルニケの位相差法の原理

入射光の位相は変えるが、振幅は変えない物体を位相物体 (phase object) という。検出器は強度しか検出できないので、入射光の振幅変化すなわち吸収は判別できても、位相変化に関する情報は得ることができない。位相変化に関する情報を得るためには、特殊な工夫を凝らした観察方法を用いて位相変化を強度変化に変換しなければならず、その一つにゼルニケの位相差法がある。ここでは、ゼルニケの位相差法の原理について簡単に説明する。以下の議論においては、ゾーンプレートをレンズとする結像系は無収差光学系であり、ゾーンプレートの回折効率や画像検出器の検出効率は全て 100% であることを前提とする。Figure

* 姫路工業大学大学院理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1
TEL: 0791-58-0230 FAX: 0791-58-0236 E-mail: kagosima@sci.himeji-tech.ac.jp

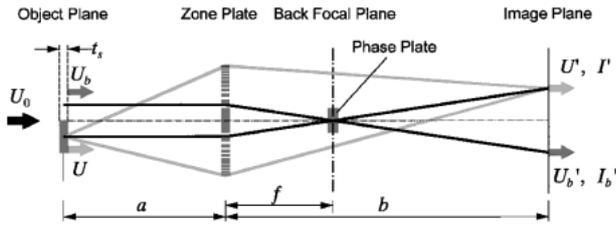


Figure 1. Principles of Zernike's phase contrast method.

1にコヒーレント照明におけるゼルニケの位相差法の光学系を示す。Figure 1に示すように、入射光、試料の無い部分（バックグラウンド）の試料面透過後、試料透過後、結像面におけるバックグラウンド像と試料像の複素振幅をそれぞれ U_0, U_b, U, U_b', U' とする。試料の複素屈折率を $n_s (= 1 - \delta_s - i\beta_s)$ 、厚さを t_s とし、入射光の波長を λ とすれば、

$$\begin{aligned} U_b &= U_0 \cdot e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}t_s} \\ U &= U_0 \cdot e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}(1-\delta_s-i\beta_s)t_s} \\ &= U_b \cdot e^{-\frac{\mu_s}{2}t_s} \cdot e^{i\phi_s} \end{aligned} \quad (1)$$

となる。ただし、 $\mu_s (= 4\pi\beta_s/\lambda)$ は試料の線吸収係数、 $\phi_s (= 2\pi\delta_s t_s/\lambda)$ は試料によって生ずる入射光のバックグラウンドに対する位相変化である。添字 b はバックグラウンドを意味している。光学の原理としてよく知られているように、結像レンズの後側焦平面（Back focal plane）には、物体のフーリエスペクトルが生ずる。ゼルニケの位相差法の原理は、後側焦平面に位相板を置き、0次のスペクトル（0次光）にのみ位相変調を与えることにより、像面でのコントラストを向上させることである。(1)式を次の(2)式のように変形すると、括弧内第一項の“1”が0次光を、第二項と第三項の“ $e^{i\phi_s} - 1$ ”が回折光を表していることになる。

$$U = U_b \cdot e^{-\frac{\mu_s}{2}t_s} \cdot (1 + e^{i\phi_s} - 1) \quad (2)$$

結像面での複素振幅は、全スペクトルすなわち0次光と回折光の複素振幅の和であるから、位相板の振幅透過関数を $A = ae^{i\alpha}$ (a と α は実数) とし、位相板を0次光のみに作用させた時の結像面での複素振幅 U_b', U' は、

$$\begin{aligned} U_b' &= U_b \cdot ae^{i\alpha} \\ U' &= U_b \cdot e^{-\frac{\mu_s}{2}t_s} \cdot (\alpha e^{i\alpha} + e^{i\phi_s} - 1) \end{aligned} \quad (3)$$

となる。強度は複素振幅の絶対値の二乗であるから、観測される像の強度は次式となる。

$$\begin{aligned} I_b' &= |U_b'|^2 = |U_0|^2 a^2 \\ I' &= |U'|^2 = |U_0|^2 \cdot e^{-\mu_s t_s} \cdot [a^2 + 2\{1 - a \cos \alpha - \cos \phi_s \\ &\quad + a \cos (\alpha - \phi_s)\}] \end{aligned} \quad (4)$$

$\phi_s \ll 1$ の時は、(4)式は近似的に

$$I' = |U_0|^2 \cdot e^{-\mu_s t_s} \cdot [a^2 + 2a\phi_s \cdot \sin \alpha] \quad (5)$$

となり、位相差法によって観測すると、物体による位相変化が強度変化に変換され、像面の任意の点における強度は（付加的な定数を除き）物体の対応する位置の位相変化 ϕ_s に比例することになる。特に、最大のコントラストを与える $\alpha = (\pi/2), (3\pi/2)$ の時は、それぞれポジティブコントラスト（Positive contrast）、ネガティブコントラスト（Negative contrast）と呼ばれ(5)式の括弧内は $a^2 \pm 2a\phi_s$ となる。ポジティブコントラストでは符号が“+”であり、物体の存在する部分がバックグラウンドに対して明るくなり、ネガティブコントラストでは逆の関係になる。位相板の吸収により、入射光が $a^2 (a \leq 1)$ になるので0次光の強度が弱まり像自体は暗くなるが、(5)式の括弧内第二項の第一項に対する比は $\pm \phi_s/a$ なので、感度が $1/a$ に向上し像のコントラストは増大する。

高い位相検出能力を持つ位相差法にも幾つかの欠点がある。その一つは、像の強度分布が物体の位相分布に比例するのは、位相差が小さい場合限られることである。実際硬X線領域でも、試料によっては必ずしもこの条件が満足されないことがあるので、得られた像の解釈には十分注意を払う必要がある。また、位相差が $\pi/2$ ならばコントラストは生じず、 $\pi/2$ より大きければ明暗が反転する。もう一つの欠点は、非常に粗い構造（低周期構造）の位相物体では、 ± 1 次回折光が0次光のすぐ近くで生ずるために ± 1 次回折光を0次光に対して空間的に分離するのが難しいことである。3つ目に、位相物体の縁の部分にハローと呼ばれる光の滲みが生ずるために、境界近傍の微細な構造が良く見えないという性質がある。

2.2 像のコントラスト

実際にX線で位相差顕微鏡を構成した場合、どれくらいのコントラストが期待できるのかを見積もっておく必要がある。位相板の複素屈折率を $n_p (= 1 - \delta_p - i\beta_p)$ 、厚さを t_p とすれば、位相板の振幅透過関数 A は、

$$\alpha = \phi_p = \frac{2\pi\delta_p}{\lambda} t_p = \frac{m\pi}{2} \quad (m=1, 3), \quad a = e^{-\frac{\mu_p}{2}t_p}$$

から

$$\begin{aligned} A &= ae^{i\alpha} \\ &= \pm ie^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \end{aligned} \quad (6)$$

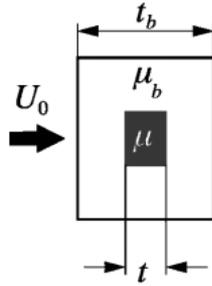


Figure 2. Case when a sample with the thickness of t and the linear absorption coefficient of μ exists in a uniform background with the thickness of t_b and the linear absorption coefficient of μ_b .

となる。ここで、 $m+1$ で符号が“+”の時はポジティブコントラスト、 $m=3$ で符号が“-”の時はネガティブコ

ントラストに対応する。添字 p は位相板を意味している。**Figure 2**に示すように、試料が均質なバックグラウンド中に存在する場合、(4)式の像の強度は次式に示すようになり一般的な式に書き換えられる。

$$I'_b = e^{-\mu_b(t_b-t) - \mu t} \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi}$$

$$I' = e^{-\mu_b(t_b-t) - \mu t} \cdot \left[2\{1 - \cos(\phi - \phi_b)\} + e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi} \pm 2 \sin(\phi - \phi_b) \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \right] \quad (7)$$

(7)式から、均質なバックグラウンド中に試料が存在する場合の像のコントラストを与える式は、次式となる。

$$C_p = \frac{|I' - I'_b|}{I' + I'_b} = \frac{\left| e^{-\mu t} \left[2\{1 - \cos(\phi - \phi_b)\} + e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi} \pm 2 \sin(\phi - \phi_b) \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \right] - e^{-\mu t} \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi} \right|}{e^{-\mu t} \left[2\{1 - \cos(\phi - \phi_b)\} + e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi} \pm 2 \sin(\phi - \phi_b) \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \right] + e^{-\mu t} \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{\delta_p}\pi}} \quad (8)$$

さらに、

$$\phi - \phi_b = \frac{2\pi}{\lambda} (\delta - \delta_b)t \ll 1, \mu t \ll 1$$

と仮定すれば(8)式は近似的に

$$C_p = \frac{\left| (\mu_b t - \mu t) \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \pm 2(\phi - \phi_b)(1 - \mu t) \right|}{(2 - \mu_b t - \mu t) \cdot e^{-\frac{m\beta_p}{2\delta_p}\pi} \pm 2(\phi - \phi_b)(1 - \mu t)} \quad (9)$$

となる。硬X線で水溶液中の薄い軽元素試料を観察する時、この仮定は多くの場合成り立つが、比較的厚い試料などこの仮定が成り立たない場合は(8)式をそのまま使えばよい。(8)、(9)式からわかるように、均質なバックグラウンド中に試料が存在する場合の像のコントラストはバックグラウンドの厚さ t_b によらない。従って、例えば水中の生体試料の場合は水の厚さはコントラストに関係しないことになり、このことが硬X線を用いる大きなメリットとなる。

次に、生体試料の観察を前提として、どれくらいのコントラストが得られるか計算した例を示す。**Figure 3**は水中に100 nm厚のタンパク質が存在するときに期待される

像のコントラストを計算した結果である。位相差像のコントラスト(ポジティブコントラストとネガティブコントラスト)を左縦軸に、吸収コントラストを右縦軸に示した。位相板の材質はタンタルとし、全エネルギー範囲で位相板の厚さが位相差 $\pi/2$ (ポジティブコントラストの場合)または $3\pi/2$ (ネガティブコントラストの場合)を与える厚さとなるように計算している。5~15 keVのエネルギー範囲にわたって、1%前後のコントラストが期待できることがわかる。ポジティブコントラストよりネガティブコントラストの方が高いのは、位相板の吸収が後者の方が大きいからである。10~11 keVに見られる不連続構造は位相板であるタンタルのL吸収端である。我々は、100 μm 厚の水の透過率が5%以下という基準で、入射X線のエネルギーを10 keVに設定したが、タンタルの L_3 吸収端が9.9 keVなので、この入射X線ではタンタルが最も高いコントラストを与える位相板の材料である。

2.3 吸収線量

X線顕微鏡を用いて生体試料を観察する場合、像のコントラストだけではなく試料の吸収線量についても検討しておく必要がある。吸収線量は、物体の像の観察に必要なSN比によって決めることができ、軟X線顕微鏡の場合について、Rudolphらによって詳しく検討されている⁸⁾。彼らによれば、厚さ t 、断面積 S 、線吸収係数 μ 、密度 ρ の物体が、同じ厚さで線吸収係数 μ_b の均質な物質(バック

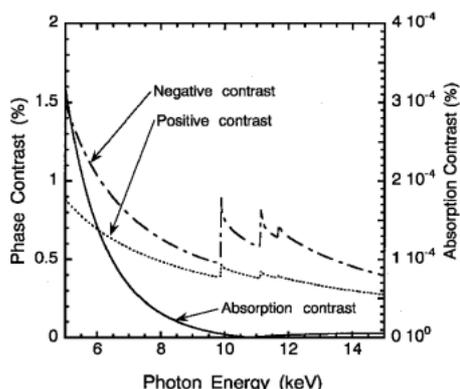


Figure 3. Expected image contrast of phase-contrast microscopy for a specimen of a 100-nm-thick protein feature in a water background. The elemental composition and the density of the protein are assumed to be $C_{94}H_{139}N_{24}O_{31}S$ and 1.35 g/cm^3 . The optical constants from Henke *et al.*⁷⁾ are used in the calculation. For comparison, the absorption contrast is also shown. Image contrast of about 1% can be expected by tuning the photon energy to the L_3 absorption edge of tantalum (9.9 keV) even though the absorption contrast is almost zero.

グランド) 中に存在するとき、与えられた SN 比で物体の像を観察するのに必要な吸収線量 $D(\text{Gy})$ は、次式となる。

$$D = \left(\frac{S}{N}\right)^2 \frac{hc}{\lambda \rho S t} e^{\mu t} e^{\mu_p t} (1 - e^{-\mu t}) \frac{I'_b (I' + I'_b)}{(I' - I'_b)^2} \quad (10)$$

ここで、 μ_p と t_p は位相板の線吸収係数と厚さ、 I' と I'_b は物体とバックグラウンドの像の強度であり、 h はプランク定数、 c は光速である。検出器やゾーンプレートの効率は 100%，すなわち装置系での損失は無いものと仮定している。(10)式は、物体とバックグラウンドの厚さが同じ場合の吸収線量を与えるものであるが、彼らの理論を Fig. 2 に示すようなより一般的な場合、すなわちバックグラウンドの厚さが物体の厚さと異なる場合に適用すると、吸収線量 D は(10)式より $e^{\frac{\mu_p}{2}(t_p - t)}$ 倍だけ大きくなる。ここで t_p はバックグラウンドの厚さであり、物体はバックグラウンドの厚さ方向の中央にあると仮定している。従って、バックグラウンドが厚くなれば、与えられた SN 比で物体の像を観察するのに必要な吸収線量も増大することになる。Figure 4 は、水中に 100 nm 厚のタンパク質が存在する時に、SN 比を 3 で観察する場合に必要な吸収線量を水の厚さの関数として、軟 X 線 (SX) と硬 X 線 (HX) について示したものである。軟 X 線では吸収コントラストで、硬 X 線ではネガティブコントラストで観察する場合についての値である。X 線のエネルギーとしては、軟 X 線と硬 X 線についてそれぞれ代表的な 3 種類のエネルギーを選んだ。軟 X 線では水の厚さが増すにつれて吸収線量が急激に増大するのに対して、硬 X 線では水の厚さに関わらず吸収線量はほぼ一定であることがわかる。また、水の厚さが約 $14 \mu\text{m}$ 以上になると、吸収線量の大小関係が軟 X 線と硬

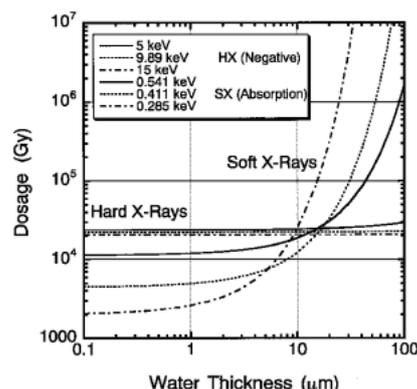


Figure 4. Dosage necessary to image a 100-nm-thick protein feature in a water background as a function of the water background thickness both for soft x-rays and hard x-rays.

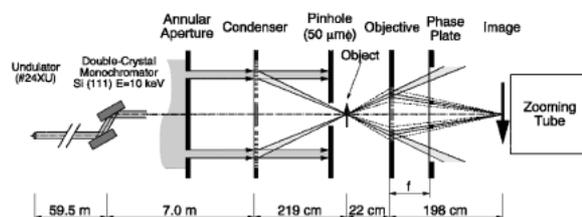


Figure 5. Optical system of the hard X-ray phase-contrast microscope developed in the beamline BL24XU of the SPring-8. Synchrotron radiation from the undulator is monochromatized by a silicon double crystal monochromator. The photon energy is tuned to 10 keV so that the expected image contrast can be enhanced as shown in Fig. 3. The absorption-contrast image can also be taken by removing the phase plate.

X 線とで逆転する。このように、吸収線量を抑えるという観点では、水の厚さが厚い場合に硬 X 線を用いた方が有利となる。

3. SPring-8 の BL24XU における X 線位相顕微鏡

3.1 光学系

X 線位相顕微鏡の開発は、SPring-8 の兵庫県ビームライン (BL24XU)⁴⁾ の実験ハッチ C において進めている。Figure 5 にその光学系を示す。図には示していないが、光源から 30 m の位置に開口 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ のフロントエンドスリットがある。アンジュレータ光は、シリコン二結晶分光器 (111 反射、水平偏向) によって 10 keV に単色化され、実験ハッチ C に導かれる。フロントエンドスリットの開口と分光結晶によって決まる分光光のエネルギー分解能 $\Delta E/E$ は約 2.1×10^{-4} である。顕微鏡の主要部は、輪帯状絞り (Annular Aperture)、集光ゾーンプレート (CZP)、ピンホール、対物ゾーンプレート (OZP) 及び位相板 (Phase Plate) からなっている。これは、ゲッティング大学のグループが開発した軟 X 線位相顕微鏡³⁾ と本質的には同等のものである。唯一の違いは、軟 X 線顕微鏡では CZP とピンホールからなる照明系が線形分光器 (linear

Table 1. Parameters of CZP and OZP. The zone plate material is tantalum. Since the optimized tantalum thickness is $2.4 \mu\text{m}$ at 10 keV⁵⁾, the thickness of the CZP is not thick enough at present*1

	CZP	OZP
Radius of innermost zone; r_1 (μm)	15.8	5.0
Number of zones; N	1000	100
Outer diameter; D (μm)	1000	100
Outermost zone width; δr_N (nm)	250	250
Focal length @10 keV (mm)	2013	202
Thickness of zones (μm)	0.6*1	2.4
Calculated diffraction efficiency @10 keV (%)	4.5	20.8

monochromator) の役割を果たしている⁹⁾のに対し、我々の顕微鏡では結晶分光器によって入射光が予め分光されていることである。線形分光器ではエネルギー分解能を上げるにはピンホールの開口を小さくする必要があるので⁹⁾, 結果としてピンホールと試料間のワーキングディスタンスが制限されてしまう。一方、入射光が単色光なら比較的大きな開口のピンホールが利用できるため、ワーキングディスタンスを大きく取ることができる。CZP と OZP の変数を **Table 1** に示す。ゾーンプレートの材質はタンタルである。ゾーンプレートの加工に関しては、参考文献を参照されたい¹⁰⁾。

ゾーンプレートの光学特性については、本学会誌に詳細に解説してあるので¹¹⁾, ここでは顕微鏡で最も重要な性能である空間分解能についてのみ触れることにする。ゾーンプレートをレンズとする顕微鏡の空間分解能 Δ は次式で与えられる。

$$\Delta = 1.22\delta r_N \quad (11)$$

ここで、 δr_N はゾーンプレートの最外輪帯幅である。空間分解能は入射光の波長によらずゾーンプレートの最外輪帯幅 δr_N のみで決まるので、ゾーンプレートをより微細に加工すれば、より高い空間分解能が得られることになる。現状は、加工上の限界で制限されている。例えば、10 keV の X 線で最も高い回折効率が得られるタンタルの厚さは $2.4 \mu\text{m}$ であるが⁵⁾, アスペクト比(ゾーンの厚さと幅の比)の限界が10程度のため、最外輪帯幅は250 nm 程度が限界となる。ただし、回折効率を犠牲にすれば、最外輪帯幅が50 nm のゾーンプレートを製作することはできる¹⁰⁾。**Table 1** に示したように、OZP の最外輪帯幅は250 nm なので、理想的な空間分解能として約300 nm が期待できる。光学系の倍率は、実験ハッチの大きさで制限され、9倍である。画像検出器には浜松ホトニクス社製のズーム管を用いている。ズーム管の空間分解能は500 nm より高いので¹²⁾, 9倍という低倍率でも十分空間分解能を評価することができる。

2.1では、位相差法を実現するためにゾーンプレートの

後側焦平面に位相板を置くことを説明した。**Figure 1** は平行ビームによるコヒーレント照明という最もシンプルなケースで、この場合0次光にのみ位相変化を与える位相板の形状は円形である。一方、**Fig. 5** に示すような臨界照明系では、集光レンズの前に輪帯状絞りを置き、それと相似形の位相板を対物レンズの後側焦平面上に置くことにより0次光のみに位相変化を与える光学系が用いられる。用いた輪帯状絞りと位相板の外径と内径はそれぞれ $800 \mu\text{m}$, $600 \mu\text{m}$ 及び $77.7 \mu\text{m}$, $58.3 \mu\text{m}$ である。輪帯状絞りに厚さ $100 \mu\text{m}$ のタングステン板をレーザ加工したものを用いた。位相板はタンタル製で、その厚さは10 keVでの位相シフトがポジティブコントラストでは $\pi/2$, ネガティブコントラストでは $3\pi/2$ になるように、それぞれ $1.33 \mu\text{m}$ と $3.97 \mu\text{m}$ とした。10 keV の X 線に対する透過率は、それぞれ59.2%, 20.8%である。位相板を光軸から外せば吸収コントラスト像を取得できるので、吸収コントラスト像と位相コントラスト像の比較は容易にできる。

3.2 吸収コントラストによる標準試料の観察

顕微鏡の性能を見積もるために、位相板を用いない条件すなわち吸収コントラストモードで標準的な試料の観察を行った。**Figure 6** に銅の#2000メッシュの顕微鏡像を示す。メッシュ線幅は約 $5 \mu\text{m}$ なので、空間分解能はサブミクロンに達していることがわかる。また、メッシュ線の縁の微細な凹凸構造も観察できており、高空間分解能が達成されている。CZP は試料位置に光源の縮小像を形成し、臨界照明系ではこの光源の縮小像が試料の照明領域となる。幾何光学的に決まる光源の縮小像の大きさ、すなわち照明領域の大きさは、光源の大きさに光源と CZP 間及び CZP と試料間の距離の比(縮小率)を掛けたものとなる。第三世代放射光源では、光源サイズが極めて小さく、また光源から実験装置までの距離が大きいため必然的に縮小率が大きくなってしまふ。結果として、試料の照明領域が必要以上に狭くなってしまふという問題が起こる。この問題を解決するために、米国 Lawrence Berkeley National Laboratory (LBNL) の Center for X-Ray Optics (CXRO) の X 線顕微鏡グループが考案した、露光中に CZP を 2 次

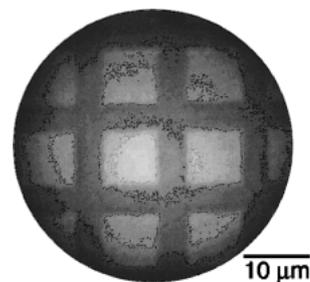


Figure 6. Magnified image of copper #2000 mesh. The exposure time was 10 min. The photon energy was 10 keV. The total magnification of the microscope system was $\times 450$ (optical system $\times 9$, image detector $\times 50$).

元的に走査する方法¹³⁾を採用した。走査の振幅は垂直・水平両方向ともピンホールサイズ ($50\ \mu\text{m}$) より大きくなるように $\pm 30\ \mu\text{m}$ とし, CZP を載せたパルスステージを露光中2次元的に周期的に連続走査した。その結果, **Fig. 6** に示すように直径約 $40\ \mu\text{m}$ の均一な照明が達成できた。

次に, どれくらいの微細構造まで解像可能かを調べた。我々は, OZP は自身の最外輪帯幅程度の Line & Space まで解像できることを経験的に学んでいるので, この経験に従えば $250\ \text{nm}$ の Line & Space まで解像できることが期待される。そこで, OZP と同じ仕様のゾーンプレートを試料として観察した。**Figure 7** にその結果を示す。**Figure 7** はゾーンプレートの最外周付近の拡大像であり, $250\ \text{nm}$ の Line & Space まで解像可能であることが確認できた。従って, 極めておおまかには約 $500\ \text{nm}$ の空間分解能を達成できたことになる。視野約 $40\ \mu\text{m}$, 空間分解能約 $500\ \text{nm}$ という性能のもと, 金属微粒子を観察した結果を **Fig. 8** に示す。試料は蛍光粉末 (成分, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Tb}$,

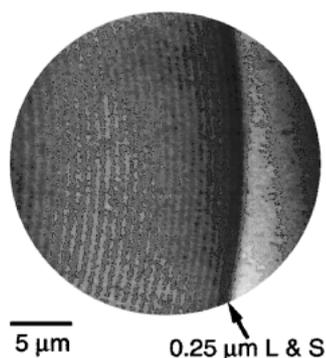


Figure 7. Magnified image of the outermost region of a sample zone plate having the same specification of the OZP. A $250\ \text{nm}$ line-and-space pattern was well resolved. The exposure time was $10\ \text{min}$. The photon energy was $10\ \text{keV}$. The total magnification of the microscope system was $\times 1080$ (optical system $\times 9$, image detector $\times 120$).

日亜化学工業 Type NP-3010) で, 視野を変えて2画像を示した。**Figure 6~8** に示した顕微鏡像より, 開発したX線顕微鏡は極めて良好な性能を達成していることがわかる。

3.3 位相差コントラストによる軽元素試料の観察

ここまで示した顕微鏡像は吸収コントラストで観察したものであるが, 吸収コントラストでは観察できない透明な試料を観察できることが位相差顕微鏡の最大の特長である。ここでは, 軽元素で構成されている生体試料への応用として, 植物病原菌の観察を行った例を示す。観察した試料は *Curvularia* の分生子である。**Figure 9** にそのX線顕微鏡像を示す。(a)の吸収コントラスト像では分生子の存在が辛うじて確認できる程度であるが, その内部構造は不明瞭である。一方, (b)のポジティブコントラスト像及び(c)のネガティブコントラスト像では, 分生子の外形が明瞭に認識でき, 内部構造も見て取れる。特にネガティブコントラスト像ではより高いコントラストが得られており, 分生子が隔壁によって仕切られた4つの細胞からできていることが判別できる。また, ポジティブコントラスト像では分生子の構造体部分が明るく(強度が強く)なり, ネガティブコントラスト像では構造部分が暗く(強度が弱く)になっている。ネガティブコントラスト像の方がコントラ

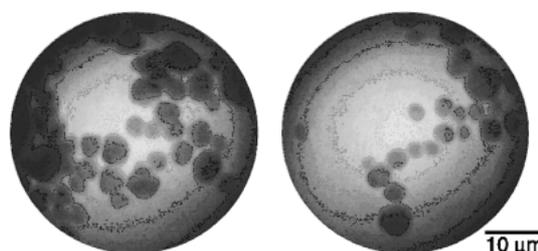


Figure 8. Magnified image of phosphor powder (composition, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Tb}$, NICHIA Chemical Industries, Ltd., Type NP-3010). The exposure time was $5\ \text{min}$. The photon energy was $10\ \text{keV}$. The total magnification of the microscope system was $\times 450$ (optical system $\times 9$, image detector $\times 50$).

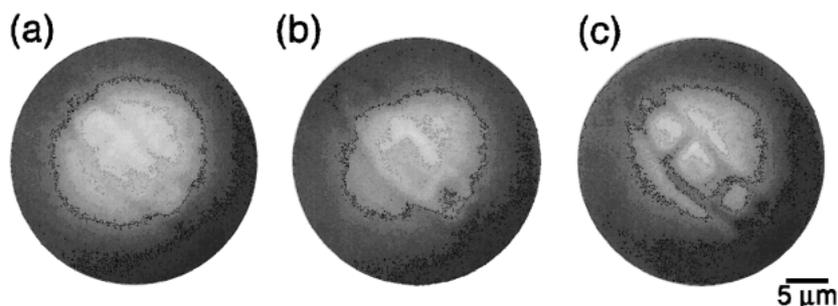


Figure 9. X-ray micrographs of the conidium of *Curvularia* species: (a) absorption contrast image, (b) positive contrast image and (c) negative contrast image. The structure of the specimen are well observed in (b) and (c), while the structure can be seen with little contrast in (a). Further, the image contrast is reversed between (b) and (c) as expected in eq. (7). The exposure time was $3\ \text{min}$. The photon energy was $10\ \text{keV}$. The total magnification of the microscope system was $\times 450$ (optical system $\times 9$, image detector $\times 50$).



Figure 10. A montage X-ray micrograph of the same specimen in Fig. 9. It was produced by increasing the magnification of the image detector, taking images separately, and then combining them using graphic software. The intensity changes caused by the optical thickness variation in the specimen can be recognized. The exposure time was 5 min for each separated image. The photon energy was 10 keV. The total magnification of the microscope system was $\times 1800$ (optical system $\times 9$, image detector $\times 200$).

トが高いことは、**Fig. 3** で示した結果と一致しており、またポジティブコントラスト像とネガティブコントラスト像ではコントラストが反転することは、(7)式から予測される通りの結果となっている。これらの結果から、開発した X 線位相差顕微鏡においては、位相差コントラストの生成メカニズムは理論から予測される結果とよく整合していることが確認できた。

Figure 7 で示したように吸収コントラスト像で 250 nm の Line & Space まで解像できていることを考えると、**Fig. 9** の像質はやや低いように感じられる。実際、**Fig. 9** では検出器の倍率が解像度を制限しており、検出器の倍率を上げると像質が向上し、より精度の高い拡大像が得られる。ただし、検出器の倍率を上げると視野が狭くなり試料全体を観察できなくなる。そこで、試料の位置を変えながら数枚露光し、それらをモンタージュ写真のように結合させて試料全体の拡大像を得る方法を採用した。**Figure 10** は、そのようにして得られた *Curvularia* のネガティブコントラストの顕微鏡像である。光学的厚さ (δt) の変化に起因する強度変化が明瞭に観察できており、細胞壁部については 40% 前後という極めて高いコントラストが得られた。**Figure 10** は本手法が生体試料の微細構造の観察に有効であることを示していると言えよう。

4. まとめ

空間分解能において、光学顕微鏡に匹敵する硬 X 線顕微鏡を開発した。生きた生体試料の観察を可能にするためにゼルニケの位相差法を導入し、植物病原菌について正負

の両コントラストで位相差コントラスト像を取得することに成功した。空間分解能は必ずしも十分ではないが、硬 X 線領域においても位相差顕微鏡により生体試料の観察が可能であることを示した。より微細な構造をもつ試料に適用するために空間分解能の向上に取り組んでおり、現在 100 nm の Line & Space まで解像可能な光学系の開発に成功している¹⁴⁾。今後は、水溶液中の試料の観察を可能にする試料セルの開発や、得られた像を定量的に解釈する方法の研究に取り組んでいく予定である。

参考文献

- 1) M. Born and E. Wolf: *Principles of Optics* (Pergamon Press, Oxford, 1986) 6th ed.
- 2) 硬 X 線の位相差法の軽元素試料への適用は、Watanabe らによって、はじめてなされた。N. Watanabe, S. Aoki, H. Takano, K. Yamamoto, A. Takeuchi, H. Tsubaki and T. Aota: in *X-Ray Microscopy*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (AIP Conf. Proc., New York, 2000) Vol. **507**, p. 84.
- 3) G. Schmahl, D. Rudolph, P. Guttman, G. Schnieder J. Thieme and B. Niemann: *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 1282 (1995).
- 4) Y. Tsusaka, K. Yokoyama, S. Takeda, K. Takai, Y. Kagoshima and J. Matsui: *Nucl. Instrum. Methods A* **467-468**, 670 (2001).
- 5) Y. Kagoshima, T. Ibuki, K. Takai, Y. Yokoyama, N. Miyamoto, Y. Tsusaka and J. Matsui: *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, L433 (2000).
- 6) Y. Kagoshima, T. Ibuki, Y. Yokoyama, Y. Tsusaka, J. Matsui, K. Takai and M. Aino: *Jpn. J. Appl. Phys.* **40**, L1190 (2001).
- 7) B. L. Henke, E. M. Gullikson and J. C. Davis: *At. Data & Nucl. Data Tables* **54**, 181 (1993).
- 8) D. Rudolph, G. Schmahl and B. Niemann: in *Modern Microscopies, Techniques & Applications*, eds. A. Michette and P. Duke (Plenum Press, London, 1990) p. 59.
- 9) B. Niemann, D. Rudolph and G. Schmahl: *Nucl. Instrum. Methods* **208**, 367 (1983).
- 10) A. Ozawa, T. Tamamura, T. Ishii, H. Yoshihara and Y. Kagoshima: *Microelectron. Eng.* **35**, 525 (1997).
- 11) 籠島 靖, 青木貞雄: *放射光* 第3巻, 301 (1990).
- 12) K. Kinoshita, T. Matsumura, Y. Inagaki, N. Hirai, M. Sugiyama, H. Kihara, N. Watanabe and Y. Shimanuki: *Proc. SPIE* **1741**, 287 (1992).
- 13) G. Denbeaux, L. Johnson and W. Meyer-Ilse: in *X-Ray Microscopy*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (AIP Conf. Proc., New York, 2000) Vol. **507**, p. 478.
- 14) Y. Kagoshima, T. Ibuki, Y. Yokoyama, K. Takai, Y. Tsusaka and J. Matsui: *Jpn. J. Appl. Phys.* **41**, 412 (2002).