X線顕微鏡による生物試料の観察

渡辺 紀生*, 木原 裕**

* 名古屋大学理学部物理教室, 名古屋市千種区不老町 (〒464)

** 自治医大看護短大, 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-159 (〒329-04)

(1991 年 3 月 1 日受理)

Observation of Biological Specimen with X-ray Microscopy

Norio WATANABE*, Hiroshi KIHARA**

* Department of Physics, Faculty of Science, Nagoya University, Furo, Chikusa-ku, Nagoya 464

** Jichi Medical School, School of Nursing, Minamikawachi, Tochigi 329-04

(Received March, 1, 1991)

Several methods in the development of X-ray microscopy were tested, including the imaging method with zone plates and grazing-incidence mirrors. With zone plates, spatial resolution of $0.5\ \mu\text{m}$ was attained. With grazing incidence mirrors, the spatial resolution of $0.2\ \mu\text{m}$ was achieved. With both methods, zone plates, diatoms, muscle, collagen and other biological specimen were observed.

As a compact X-ray source, AURORA seems to be promising. We have tested contact X-ray microscopy of HeLa cell and chromosomes. With 10 s exposure (ring current $\sim 2\ \text{mA}$), good contrast image was taken.

Spatial resolution was about several tens nm. Points to be improved were discussed for each method.

1. はじめに

X線顕微鏡は、「(i) 光学顕微鏡に比べて波長が短いので、より高い空間分解能が期待できる。(ii) 電子顕微鏡に比べて水中で見えること、染色の必要がないこと、より厚い(～数 μm) 試料の測定ができること、の特徴があるため、生きた細胞をそのまま観察することができる点で優れている。(iii) 重原子などによるラベルをすることにより、特定物質のミクロ分布を観察することができる。」などの特徴がある。

筆者らは7, 8年前よりX線顕微鏡を開発し、生きた細胞、超分子構造と機能などを観察したいと様々な試みを行ってきた。この報文では、最初に簡単に一般的なX

線顕微鏡の解説を行い、続いて筆者らのX線顕微鏡についての最近の成果をサマリーしてみたい。なおX線顕微鏡についての、より一般的な解説については、文献1, 2, 15を参照されたい。なおX線顕微鏡の国際会議が3年に一度開催され、それらの報告集が単行本として出版されており³⁻⁵⁾、またその間に開かれた国際会議の報告も別に出版されているので^{6,7)}、それぞれの方法について詳しく知りたい方はこちらを参照されたい。

2. X線顕微鏡の方法

X線顕微鏡とはX線を用いて微小なものを見る方法の総称で、光学顕微鏡と同様に種々の方法がある。それらはそれぞれ特徴があり、単純な優劣はつけがたい。表1

表 1 種々の X 線顕微法の比較

方法	分解能 (nm)	波長 分解能	集光効率	実時間測定	立体	光源	国内研究者
結像型					可能		
ゾーンプレート法	40	あり	<12%	可能		SR	有留, 籠島, 木原
Wolter 型斜入射鏡	300	なし	100%	可能		SR	青木, 木原
Kirkpatrick-Baetz 型斜・射鏡	1500	なし	100%	可能		SR	鈴木 ¹⁷⁾
Schwarzschild 型鏡	500	なし	~1%	可能		LASER	田中
走査型					可能		
ゾーンプレート型 (1枚)	40	あり	100%	不向き		SR	
Wolter 型斜入射鏡	300	なし	100%	不向き		LASER	早川 ¹⁵⁾
Schwarzschild 型鏡		あり	100%	不向き		LASER	
投影法	200	なし	100%	不向き	可能	点光源	矢田
光電変換型	200	なし	~10%	可能		SR	木原
密着法	20	なし		不可能	可能	SR	篠原
				フラッシュ法		フラッシュ X 線	篠原
ホログラフィー	100	なし		不向き	最適	SR	
マイクロ CT	2000	なし		不向き	最適	SR	鈴木 ¹⁸⁾

国内研究者の発表については、特に記したものの以外は、文献 5 を参照されたい。

にそれぞれの特徴を要約して示す。国内でも X 線顕微鏡を開発しようという試みが、いくつかのグループによってなされてきている。それらについてもあわせて表 1 にまとめておいた。

3. 我々の試みてきた方法

我々は 7, 8 年前からいくつかの方法により, X 線顕

微鏡の開発を試みてきた。表 2 にそれらの方法と場所とをまとめて示す。以下、それらの試みについて順に述べよう。なおここで述べている研究の一部については、既に別の場所に報告してあるので詳しくはそちらを参照していただきたい⁸⁻¹³⁾。

4. ゾーンプレート法

ゾーンプレートを用いた結像の試みは、1987 年より分子科学研究所の UVSOR 研究施設を利用して行ってきた。用いたゾーンプレートの特性を表 3 に示す。表の中で HZP1 は波長 1.76 nm で位相ゾーンプレートになる。ゾーンプレートの空間分解能をレーリーに従って $1.22 * dr_n$ で定義すると、表 3 のそれぞれのゾーンプレートの理論的空間分解能は計算できるわけである。現在

表 2 今までに行った X 線顕微鏡の測定法と線源

結像法	線源
ゾーンプレート法	UVSOR 6A1, 8A
斜入射鏡法	UVSOR 8A
コンタクト法	AURORA
X 線ブーミング管	PF 11A

表 3 ゾーンプレート特性表

	r_1 (μm)	D (μm)	n	dr_n (μm)	焦点距離 ($\lambda=4.5\text{nm}$)	マスク ($\mu\text{m}\phi$)	コメント	材質	厚さ (μm)	製造者
CZP1	34.6	1220	312	0.98	266.7	200	Free-standing	Au	2	CANON
CZP2	34.6	1220	312	0.98	266.7	No	Free-standing	Au	2	CANON
CZP3	15.82	500	250	0.50	55.6	100	0.3 μ polyimide	Au	0.3	CANON
MZP1	27.3	1492	746	0.50	166.0	No	1.5 μ SiC	W/Ti	0.5	三菱電機
MZP2	9.4	117.4	89	0.50	19.7	No	1.5 μ SiC	W/Ti	0.5	三菱電機
HZP1	9.38	212	128	0.40	19.6	No	Free-standing	Au	0.5	Heidenhein
HZP2	9.38	212	128	0.40	19.6	No	Free-standing	Ni	0.43	Heidenhein
HZP3	32.7	2400	1350	0.44	23.8	Yes	Free-standing	Au	9.5	Heidenhein

r_1 : 最内輪帯半径, D : ゾーンプレート直径, n : ゾーン本数, dr_n : 最外輪帯幅

図1 ゾーンプレートを用いた結像法のシステム図。

表4 ゾーンプレート法によるX線顕微鏡システム特性表

No.	集光/分光	結像	波長 (nm)	倍率	分解能 (μm)	備考(試料)
1	分光器	CZP1	10.5	10	数	#1000 メッシュ
2		CZP2	6.0	13.4	数	ゾーンプレートの熱損傷
3		CZP3	4.74	43.7	1.5	メッシュ, ゾーンプレート
4		MZP2	1.7	50	1.0	ゾーンプレート, 珪藻土
5		(HZP1, HZP2)	1.76	47	1.2	位相ゾーンプレートのテスト
6		HZP1	1.76	70	0.55	珪藻, コラーゲンなど

使用しうるゾーンプレートの中で最も空間分解能が高いのは HZP1 と HZP2 でそれぞれ $0.5\mu\text{m}$ である。

表4に今までに行ってきた実験を要約して示す。光源としては分子科学研究所の UVSOR を用いた。おもに用いたビームライン 8A1 は光学系のない白色光ラインである。No. 1 の場合を除いていずれの場合も図1に示すように2枚のゾーンプレートをそれぞれ集光用、結像用に用いた。集光用のゾーンプレート (CZP) には入射する0次光をカットするために中心にマスクをつけた。入射X線は光源を小さくするためにピンホール (PH1) を通し、フィルターでカットしたのち、集光用ゾーンプレート (CZP) で集光させる。集光点にピンホール (PH2) をおいて分光し、試料を照射する。結像用ゾーンプレート (MZP) を通ったのち、結像面におかれたマルチチャンネルプレート (MCP) で線を受け、蛍光スクリーンに写った像を SIT カメラで、(浜松ホトニクス) モニターし、データ処理装置 (ARGUS100, 浜松ホトニクス) を経てモニター TV 上で観察した。光軸調整、測定はほとんど実時間または1秒程度の積算で行った。

4.1. 位相ゾーンプレートのテスト¹⁰⁾

計算によれば、今回の実験で MZP として用いた位相ゾーンプレート (HZP1) の透過率の計算値は、16.4% で、同じサイズで位相型になっていない振幅型のゾーンプレートである HZP2 に比べて強度比が2.6倍になる筈であった。実際の我々の測定では透過率が8%, 1.6倍であった¹⁰⁾。それぞれの値が理論予測値には及んでい

ないが、主な原因はこの時の波長分解能 ($\lambda/\Delta\lambda$) が7.4と不十分であった事によると思われる。理論計算の時には、単色光 (波長分解能は無限大) を仮定しており、その点を考慮すれば位相型のゾーンプレートはほぼ設計通りに働いたといえよう。

4.2. 結像法による像観察

我々はこの数年間に、表4に示すように種々のゾーンプレートを用いて結像テストを行った。現在の所、MZP1-HZP1 系で観察した $0.55\mu\text{m}$ の分解能が最も優れた結果を示している¹⁴⁾。図2にこの組合せで得た結果の中から、ゾーンプレート自身を試料として観察した例を示す。ゾーンプレート法は世界的には最も分解能が高く、Schmahl (Gottingen 大学) らによって古くから開

図2 ゾーンプレート法で撮影したゾーンプレート。

発されてきた方法である¹⁹⁾。表1にも示したように現在40 nmの分解能でウェットな染色体の像が撮影されている²⁰⁾。我々の場合、用いているゾーンプレートから予測される分解能は最外ゾーン幅が $0.41\ \mu\text{m}$ を用いて、 $1.22 \times 0.41\ \mu\text{m} = 0.5\ \mu\text{m}$ で、いま得られた分解能はほぼ理論値と同じになっている。No. 6以外の実験の場合に、理論的に予測される分解能までに至らなかったのはゾーンプレートそのものが理想的な状態でなかったか、分光が充分でなかったことによると思われる。

4.3. 今後の課題

1) 水中での測定 我々が今回測定したのは真空中においたドライな試料だけであるが、X線顕微鏡の最も重要な特徴の一つは水の中でも（生きた状態で測定するためには必須の条件であるが）測定できることであるので、なるべく早期に水中の試料を入れられる試料槽を開発したい。世界的にはすでに水中の試料の測定例は報告されており^{20,21)}、国内でもコンタクト法については、篠原²²⁾、富江²³⁾らが既に水中での測定の結果を報告している。

2) 空間分解能の改善 もっと空間分解能の高いX線顕微鏡を開発するためには、さらに分解能の高いゾーンプレートの製作が望まれる。世界的には Lawrence Berkeley の Attwood らが、最外輪帯幅 (dr_m) が 30 nm のゾーンプレートをつくることに成功したと報告している²⁴⁾。

5. 斜入射鏡法

5.1. 現在のシステム

1985 年以来、我々は浜松ホトニクス研究部と協力して Wolter I 型の斜入射鏡を用いたX線顕微鏡システムを開発してきた¹¹⁾。図3に系の概念図を示す。鏡は、斜入射角 $26.2\ \text{mrad}$ のものを用い、倍率 20 倍に設定した。この倍率はそんなに高いものではないが、後述するX線ズーム管と併用することにより、10 nm の分解能までは使用しうる（X線ズーム管の検出面での分解能は $0.2\ \mu$ である）。光源には UVSOR のビームラ

図3 斜入射鏡を用いたX線顕微鏡のシステム図。

イン 8A1（白色光ライン）を用いた。今回の実験では波長についてはフィルターでカットするだけで比較的にブロードな光を用いている。入射光は1枚目の斜入射鏡で集光され、発散角を大きくする。集光された点に試料をおき、2枚目の斜入射鏡で結像させる。系の空間分解能は斜入射鏡の表面粗さと形状精度によって決められる。一般に短波長側では表面粗さが、長波長側では形状精度がより大きい影響を及ぼす。設計値からは 10 nm 近辺で 50 nm の分解能が得られるはずである。

この方式の特徴は (i) 全反射を利用しているため、光学系に波長依存性がなく、種々の波長での測定が可能で

図4 斜入射法で撮影したゾーンプレート。

図5 斜入射法で撮影した珪藻土。

図 6 斜入射法で撮影した筋肉。

ある。特に軟X線領域と可視光とで生体試料の同じ場所を観察することができれば、大変興味深い。(ii) 検出器としてズーム管を用いることにより、ズーム、時間分解測定などが可能となる。

5.2. 測定結果

1989年から90年にかけて、我々は分子研の UVSOR で様々なテストをおこなった。図4にゾーンプレートを試料として観察した場合の撮影例を示す。これらの像から予測される空間分解能は $0.2 \sim 0.3 \mu$ 位であろうと思われる。図5、図6に、この方式で得られた珪藻土、筋肉の撮像例を示す。その他今までにコラーゲン繊維、染色体などの撮影を行った。

5.3. 今後の課題

斜入射鏡を用いたX線顕微鏡の場合もゾーンプレートの場合と同様に、今後の課題としては (i) 観察面全体にアーティファクトのないきれいな画像を得ること、(ii) 分解能を更にあげること (iii) ウェットな試料が観察するための試料槽をつくること、が上げられる。

斜入射鏡法はゾーンプレート法に比べて、システムに波長依存性がないこと、より少ない光量で結像させることができることという特徴がある。特に後者の特徴を生かすと、SR光ではない実験室レベルの線源と結合して、テーブルトップ型のX線顕微鏡をつくることが可能になる。我々は浜松ホトニクスとの共同研究により、ガスバフ線源を用いた実験室用X線顕微鏡の開発にも取り組んでおり、現在メッシュのイメージングに成功した段階である。

図 7 AURORA を用いて撮影した Hela 細胞。

図 8 AURORA を用いて撮影した染色体²⁹⁾。

6. コンタクト法

住友重機が開発した AURORA は、コンパクトな SR 光としてX線顕微鏡の光源としても期待されている。我々はこれを用いて、コンタクト型のX線顕微鏡を試みた¹⁹⁾。リング電流が数 mA であったが、20 秒の露光で充分感度を示すレジスト像を得ることができた。試料として Hela 細胞と染色体のイメージを撮影することに成功した。分光しない SR 光をそのまま用いたが、分解能は数十 nm は保証されているように思われる¹⁹⁾。図7、8にそれぞれの撮影例を示す。

7. 直入射反射鏡法

AURORA はその後入射用マイクロトロン改良を重ね、現在 300 mA の電流が蓄積可能になった。我々はこのようなコンパクト SR 線源に向けたシステムとして Schwarzschild 型の直入射反射鏡を用いる方式を考え、系を設計した。図9にそのシステム概念図を示す。波長は 13.5 nm で設計値によると分解能は $0.1 \mu\text{m}$ より良

図9 Schwarzschild 型反射鏡を用いたX線顕微鏡システム原理図。

い。

8. X線ズーム管¹⁸⁾

X線ズーム管は、CsI, Auなどを塗布した面にX線が当たったとき放出される2次電子を電磁レンズで拡大してその後マルチチャンネルプレート(MCP)で検出するX線顕微鏡の検出器の1種である。ズーム管は次に上げるいくつかの特徴を有するために、特に注目を集めている検出器である。

- i) 実時間測定が可能である。
- ii) 検出面の空間分解能が高い。
- iii) 観察中に倍率や視野を変えて測定することができる。

我々はいままでこのズーム管について、より定量的に、研究するために次のような実験を行った。

(イ) 量子効率と検出効率のテスト

既に Henke²⁰⁾や三国氏ら²⁰⁾の先駆的研究により、CsIなどの物質では量子効率(=検出電子数/入射X線光子

図10 AuとCsIを用いた光電面の量子効率の波長依存性

(a) 43 Å

(b) 45 Å

図11 ズーム管で撮影した珪藻土。

(a) 53 倍

(b) 200 倍

(c) 600 倍

図 12 ズーミング管で撮影したコラーゲン繊維. 同一場所を拡大倍率を変えて測定したもの波長 10 nm.

数) が 1 を越す場合もあり, きわめて有望な方法であることが報告されていた. 我々は高エネルギー放射光研究施設のビームライン 11A を使って Au を薄く塗布した上に CsI を重ねて塗り, 1.5 nm から 15 nm の範囲で量子効率を測定した. その結果は図 10 に示すように波長によっては 1 を越すことが分かった. 検出効率 (= 検出に捉えられた X 線光子数 / 入射 X 線光子数) は初步的な測定結果ではあるが, 10~20% ぐらいと推測される結果を得た. これは予想を上回り, きわめて有望な数値であると思われる.

(ロ) 空間分解能のテスト

X 線ズーム管の最も優れた特徴の一つはその検出面上での空間分解能の高さである. 我々はこれをより実

践的に測定するために, 生物試料を光電面に密着させておき, その像を撮影した. 試料としては珪藻土, コラーゲン, 神経細胞, ナマコの骨片など様々なものを用いたが, 特に珪藻土の試料を用いたとき, 空間分解能 0.2μ で像を観察することに成功した. 図 11 に撮影例を示す. 試料を載せたまま, 波長の掃引を行ったところ, 炭素の吸収端の前後で著しい像のコントラストの差異が生じることを見いだした. コントラストは炭素の吸収端より長い側でより強くなっており, 波長掃引が新しい情報を引き出す好例かと思われる.

(ハ) ズーム機能のテスト

ズーム機能を持つことは, X 線ズーム管の最大の特徴の一つである. その観察例を図 12 に示す.

9. 総合的考察

本論文では私がこの数年の間に多くの共同研究者と共に試みてきた X 線顕微鏡開発の試みについてそれぞれの方法を比較しながら, 簡単にまとめて報告した. 10 nm の分解能で生物の運動しているところを観察しようという本来のゴールからいうとまだ距離はあるが, 1 年の単位で考えると毎年着実に進んでいる.

現在までに試みてきた方法のどれが優れているかを議論するのはなかなか難しい問題である. 光学素子の作製の難易度などさまざまな因子を考慮すると, ズーンプレート法は最も分解能の高い (少なくとも現在の世界的レ

ベルでは) 方法であり, 斜入射鏡法はテーブルトップ型の X 線顕微鏡に向いた方法であろう。Schwarzschild 法は波長を固定して, 通常の光学顕微鏡のようにルーチンで使用する X 線顕微鏡として最も向いていると思われる。今の段階ではそれぞれの方法がそれぞれの特徴を生かしながら開発されるのが望ましいと思われる。

生物試料の測定は既にかなり行われつつある。生物学的に重要な発見が X 線顕微鏡によってなされるのもそう遠くない時期にくるのではないかと。

謝 辞

本研究は, 多くの方々との協力で行われているものであり, ここに謝意を表する次第である。文献の項に上げた方々および分子科学研究所 UVSOR, 高エネルギー物理研究所放射光研究施設, 住友重機械工業株式会社の AURORA を使用させていただいた事にかんじ, 特に感謝したい。

参考文献

- 1) 木原 裕: 限界を越える顕微鏡 (宝谷紘一, 木下一彦編) (学会出版センター), 印刷中
- 2) J. Kirz, D. Sayer, G. Schmahl, and M. Howells (永井喜則, 木原 裕訳): パリティ, 1, 4 (1986).
- 3) X-Ray Microscopy: ed. G. Schmahl and D. Rudolph, (Springer-Verlag, 1984).
- 4) X-ray Microscopy II: ed. D. Sayre, M. Howells, J. Kirz and H. Rarback (Springer-Verlag, 1988).
- 5) X-ray Microscopy III: ed. A.G. Michette, P.J. Duke and R.E. Burge (Springer-Verlag, in press).
- 6) X-ray Microscopy, Instrumentation and Biological Application: ed. P.C. Cheng and G.J. Jan (Springer-Verlag, 1987).
- 7) X-ray Microscopy in Biology and Medicine: ed. K. Shinohara, K. Yada, T. Saito and H. Kihara, (Japan Sci. Press, 1990).
- 8) 木原 裕: 文部省科学研究費総合研 A (究矢田慶治代表) 報告書 p. 92 (1990).
- 9) N. Watanabe, M. Taniguchi, Y. Shimanuki, K. Kawasaki, Y. Watanabe, Y. Nagai, and H. Kihara: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin) in press.
- 10) H. Fujisaki, N. Nakagiri, H. Kihara, N. Watanabe, Y. Shimanuki, and Y. Nagai: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin) in press.
- 11) S. Ohsuka, A. Ohba, M. Sugiyama, T. Hayakawa, T. Matsumura, K. Kinoshita, N. Watanabe, Y. Shimanuki, Y. Sano, and H. Kihara: *X-ray Microscopy III* Springer-Verlag, Berlin) in press.
- 12) H. Yamada, H. Nakabushi, Y. Kinjo, K. Shinohara, N. Watanabe, and H. Kihara: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin) in press.
- 13) K. Kinoshita, T. Matsumura, Y. Inagaki, N. Hirai, M. Sugiyama, H. Kihara, N. Watanabe, Y. Shimanuki, and A. Yagishita: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin) in press.
- 14) 渡辺紀生ら: 未発表
- 15) M. Howells, J. Kirz, and D. Sayre: *Sci. Amer.*, Feb. 42 (1991).
- 16) S. Hayakawa, A. Iida, S. Aoki, and Y. Gohshi: *Rev. Sci. Instr.*, 60, 2452 (1989).
- 17) 鈴木芳生: 私信.
- 18) Y. Suzuki, T. Hirano, and K. Usami: *X-Ray Microscopy in Biology and Medicine*, ed. K. Shinohara et al. (Japan Sci. Soc. Press, Tokyo) p. 179.
- 19) D. Rudolph and G. Schmahl: *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 342, 94.
- 20) P. Guttmann, G. Schneider, M. Robert-Nicoud, B. Niemann, D. Rudolph, J. Thieme, T. Jovin, and G. Schmahl: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin), in press.
- 21) S. Williams, C. Jacobsen, J. Kirz, S. Lamm, and J. Van't Hof: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin), in press.
- 22) K. Shinohara, A. Ito, Y. Kinjo, M. Watanabe, Y. Kikuchi, and K. A. Tanaka: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin), in press.
- 23) T. Tomie, H. Shimizu, T. Majima, M. Yamada, T. Kanayama, H. Kondo, M. Yano, and M. Ono: *Science*, 252, 691 (1991).
- 24) E.H. Anderson, and K. Kern: *X-ray Microscopy III* (Springer-Verlag, Berlin), in press.
- 25) B.L. Henke, J.P. Knauer, and K. Premaratne: *J. Appl. Phys.*, 52, 1509 (1981).
- 26) 三国 晃ら: 私信.