レーザー解説

レーザープラズマX線による生体の観察

篠原 邦夫*

(1992年10月20日 受理)

Biological Observation with Laser Plasma X-Rays

Kunio SHINOHARA*

(Received October 20, 1992)

Biological observation with soft X-ray microscopy using intense laser-produced plasma X-rays is reviewed. When laser is focused on a solid target at the intensity of 10^{12} – 10^{15} W/cm², plasmas are produced on the solid surface and emit intense soft X-rays. The X-rays are useful for soft X-ray microscopy which draws much attention recently. Soft X-ray microscopy is developed extensively using synchrotron radiation and applied to biological observation. However, for the observation of hydrated biological specimens, synchrotron radiation is not intense enough to circumvent image blurring caused by radiation damage and thermal diffusion. The single shot exposure of laser-produced plasma X-rays will have enough intensity for imaging hydrated biological specimens and will circumvent these problems. Images of hydrated human chromosome fibers obtained with soft X-ray contact microscopy using laser-produced plasma X-rays are shown at the resolution of ~ 10 nm as an example. The results indicate a big potential of laser-produced plasma X-rays for soft X-ray microscopy of hydrated biological specimens.

Key Words: Laser-produced plasma X-rays, X-ray microscopy, Hydrated biological specimen, Radiation damage.

1. はじめに

固体表面に 10^{12} – 10^{15} W/cm²の照射強度でパルスレーザーを集光照射すると、その固体に特有のプラズマ状態が形成される。このプラズマから放射されるX線をレーザープラズマX線と呼び、レーザーからX線への変換効率が極めて高い。高輝度のX線源としてX線リソグラフィ等種々の応用が考えられているが、特に生体観察には軟X線顕微鏡への応用が注目され

ている^{1,2)}。また、このプラズマをレーザー媒質とする軟X線レーザーも軟X線顕微鏡への応用が期待されている³⁾。

軟X線顕微鏡のX線源としては、高い強度が要求され、シンクロトロン放射光が利用されてきた。この軟X線顕微鏡開発の進歩は、急速で、ゾーンプレート光学系に用いた装置では、物理的分解能が50 nmに達するものが常時稼動するまでになっている⁴⁾。ところがこのシンクロトロン放射光を用いた軟X線顕微鏡で水溶液中

* 東京都臨床医学総合研究所放射線医学研究部門(〒113 東京都文京区本駒込3-18-22)

* Department of Radiation Research, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science (3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

の生物試料を観察する場合には重大な問題点があることが次第に明らかになってきた。放射線損傷と試料の熱拡散によるボケの問題がそれで、生体試料を観察するには避けて通れない問題である。そこで一つの解決法として、露光時間を短くし、避けることのできない放射線損傷も生じることは覚悟の上で、その損傷が構造変化となって現れる前にイメージングを終えてしまうという提案がある⁵⁾。このためのX線源としてはシンクロトロン放射光ではまだ強度不足で、より短時間のパルスで十分な光子数を供給するプラズマX線に期待が寄せられている。

本稿では、生体観察法としての軟X線顕微鏡について紹介し、さらにレーザープラズマX線およびX線レーザーを用いる利点とその現状等について論及したい。なお、プラズマX線としては、レーザープラズマによるX線と放電プラズマによるX線がある⁶⁾が、ここでは軟X線顕微鏡への利用の立場からこの両者を特に区別せず短パルス高輝度X線源としてのプラズマX線として扱いたい。

2. 軟X線顕微鏡と生体観察

波長1-10 nmのX線は、酸素・窒素・炭素等の生体構成成分によって吸収されやすいため、生体試料そのもののコントラストをうることができる。しかもFig. 1に示すように酸素のK吸収端(2.33 nm)より炭素のK吸収端(4.37 nm)までの間は、水の吸収に比べて蛋白質あるいは核酸の線吸収係数が格段に高く、water windowと呼ばれている。従ってこのwater windowのX線を観察に用いれば、水による吸収の影響を最小限にして生体試料のイメージングを行なうことが可能である。また、観察に用いるX線の波長が光学顕微鏡の場合よりも短いので、分解能の理論的限界は高い。すなわち軟X線顕微鏡は生きたままの自然な状態における生物試料を、光学顕微鏡の分解能を越えて観察できる新しい観察法として期待されている。

さらに、この波長域のX線は生物試料で吸収されるが、電子線に比べればはるかに透過性が

Fig. 1 Wavelength dependence of the linear absorption coefficients for protein, nucleic acid, and water (cited from Table I in reference 50). O, N, and C denote the wavelength of the absorption edge for each element.

高いので、生体の最小単位である細胞を生きている状態で丸ごと透視観察することも期待できる。すなわち生理機能と細胞内微細構造との関係を三次元的に理解するための新しい手段ともなり得よう。また、人体の元素組成を原子数の多い順に挙げるとTable Iのように、水素・酸素・炭素・窒素・カルシウム・リン・・・となる。すなわち生体構成元素はその大半が軟X線領域にKあるいはL吸収端を持っている。この性質を利用すれば、元素の生体内における分布を観察することも可能である。

以上のように、軟X線顕微鏡は、(1) 光学顕微鏡とは異なったコントラストで、(2) 光学顕微鏡よりも高い分解能で、しかも(3) 生体試料をそのままの状態で、観察できる新しい技術である。確かに分解能の点では電子顕微鏡に劣るが、一般的に生物試料を電子顕微鏡で観察するためには、試料を固定し、さらに電子線によるコントラストを得るための染色が必要である。軟X線顕微鏡は、この固定染色して観察した電子顕微鏡写真による知識が正しいものであったか否かがある範囲で検証する技術ともなり得るであろう。電子顕微鏡の場合のような複雑な試

Table I Main elements constituting human body and their absorption edges.

Elements	Symbol	Relative numbers ⁵¹⁾	Absorption edge (nm) ⁵²⁾	
			K	L 3
Hydrogen	H	9200		
Oxygen	O	3900	2.332	
Carbon	C	1620	4.368	
Nitrogen	N	370	3.099	
Calcium	Ca	34.4	0.30703	3.549
Phosphorus	P	20.3	0.5784	9.4
Sulfur	S	20	0.50185	7.51
Sodium	Na	11.3	1.1569	40.5
Potassium	K	5.6	0.34365	4.21
Chlorine	Cl	5	0.43971	6.14
Magnesium	Mg	1.65	0.95122	25.07
Silicon	Si	0.14	0.6738	12.3
Iron	Fe	0.09	0.17435	1.7525
Zinc	Zn	0.038	0.12834	1.2131
Copper	Cu	0.0063	0.13806	1.3288
Manganese	Mn	0.002	0.18964	1.94

料調製の必要がない点も電子顕微鏡と比較した場合の利点である。

細胞内は数nmから1 μ mの微小構造体に満ちあふれている。ひとたび軟X線顕微鏡が十分に開発されれば、必ず現状では知り得ない何等かの新しい知識を人類に提供するであろう。

3. 軟X線顕微鏡の種類

軟X線領域の光学素子の性能向上にともない軟X線顕微鏡の開発も急速に進展した^{4,7-9)}。軟X線顕微鏡としては、試料を透過したX線を検出する透過型X線顕微鏡の他に、X線を吸収した元素から二次的に放射される特性X線を検出する蛍光X線顕微鏡あるいは二次電子を検出する光電子顕微鏡等がある⁴⁾が、生物応用の検討が進んでいるのは透過型X線顕微鏡である。透過型X線顕微鏡については最近多くの解説が出て¹⁰⁻¹²⁾ので、ここでは簡単に紹介するにとどめたい。

透過型軟X線顕微鏡の種類としては、密着法・投影型・結像型・走査型・そしてホログラ

フィーの検討が進んでいる。

3.1 軟X線密着顕微法

検出器と試料とを密着させ、検出器に得られた像をなんらかの方法で拡大して観察する顕微法で、光学系は非常に簡単なものとなる。その分解能は、検出器で決まり、従来の銀塩フィルムにかわる高解像度のフィルムとして現在、半導体工業で開発されたX線レジスト(感光性高分子)がよく用いられている。また、最近になって、ヨウ化セシウムを光電変換面に用い、変換された電子を拡大して観察する二次元検出器(ズーミング管)の光電変換面に直接試料を密着させて観察する方法も報告された¹³⁾。分解能は、X線レジストとしてPMMA(ポリメチルメタクリレート)を用いた場合に、理論的限界が5nmといわれている¹⁴⁾が、実際に10nm前後の解像度の観察が報告されている^{15,16)}。また、ズーミング管を用いた密着顕微法では解像度が0.2-0.3nmと報告されている¹³⁾。

密着顕微法の長所は、光学系が単純で、操作

が容易にもかかわらず高分解能が得られる点にあり、短所としては、試料自身によるフレネル回折のために厚い試料では解像度が高くできない(厚さ1 μm の試料の場合に分解能が50 nm以下と推定¹⁷⁾されている)点にある。

3.2 投影型X線顕微鏡

X線顕微鏡としては最も歴史の古い技術の一つである。点線源、試料、検出器またはフィルムを光軸上にこの順で配置し、線源に近い位置に試料を置き、その投影像を観察する方法である。分解能は線源の大きさと線源と試料との距離によってきまる。走査型電子顕微鏡による微小点線源(10-50 nm)をX線源とし、0.08 μm の分解能が達成されている¹¹⁾。

長所として、実験室で自由に観察できることおよび焦点深度が深く、視野が広いことが挙げられるが、線源の強度が大きくできないことが最大の短所となっている。

3.3 結像型軟X線顕微鏡

半導体工業の進歩とともに、微細加工技術の進歩が著しく、非常に精度のよいフレネルゾーンプレートが作られるようになった。このゾーンプレートはX線の回折現象を利用した集光系で、光学顕微鏡の場合のレンズに相当する。現在結像型軟X線顕微鏡で最も分解能が高い装置は、このゾーンプレートを用いた装置で、ゲッチンゲン大学(ドイツ)のSchmahlらが50 nm以下の分解能で観察する装置を常時稼働させている¹⁸⁾。この装置にはシンクロトロン放射光を用いているが、プラズマX線を線源とし、ゾーンプレートを光学系とした顕微鏡の開発も目下進められている^{19,20)}。光学系に反射鏡を用いる場合には、X線の全反射角を利用する斜入射鏡と、各面一層での反射率は小さいが多層にすることによってその反射光の収率をよくする直入射方式の多層膜反射鏡が使われている。斜入射鏡を利用した軟X線顕微鏡²¹⁾の場合には入射X線に連続スペクトルのX線を用いても色収差がでないという利点があるが、分解能向上の

ためには鏡面の研磨に高い精度が要求される。他方多層膜反射鏡の場合には波長依存性があり、素材に用いる元素の吸収のために、目下water windowよりも長波長側(≥ 4.4 nm)でのみ実用的な反射率が得られている。この多層膜反射鏡を用いた軟X線顕微鏡にSchwarzschild型顕微鏡がある²²⁾。なお、ここに引用した反射鏡を光学系とする顕微鏡はいずれもプラズマX線を線源として試みられている例である。

3.4 走査型軟X線顕微鏡

電子線とは違って“走査”するのはビームではなく試料の方である。集光系を用いて絞った小さなビームスポット上を試料が移動し、試料を透過したX線の強度分布を比例計数管等で測定し、画像化して観察する。走査型軟X線顕微鏡として現在最も分解能の高い装置は、ゾーンプレートを集光系に使い、アンジュレータ放射光を光源としたニューヨーク州立大学ストーニーブルック校のKirzらの装置で、分解能50 nmの観察が常時行われるレベルに達している²³⁾。走査型軟X線顕微鏡の光源としてプラズマX線を利用する場合には、高繰返し線源を利用する必要があるだろう。

3.5 ホログラフィー

一回の露光で三次元構造の記録がとれる観察法として期待されている。目下ガボア(Gabor)型とフーリエ変換型が検討されている²⁴⁾。ホログラフィーには干渉性が高くしかも強度の高いX線が必須で、アンジュレータ放射光が使われている^{25,26)}が、X線レーザーによる試みも報告されている²⁷⁾。

4. 水溶液中の生体観察における問題点

—放射線損傷と熱拡散によるボケ

軟X線顕微鏡による生体試料の観察の場合には、観察に用いるX線による試料の放射線損傷を考慮する必要がある²⁸⁾。軟X線と物質との相互作用は、光電効果が主体となり、試料をX線で露光したとき、光子は相互作用をした元素

の軌道電子にその全エネルギーを渡す。軟X線領域ではこのエネルギーは元素のイオン化に十分な量であり、その元素を構成要素とする分子の損傷が生じる。すなわち、吸収のコントラストで観察する場合、観察している試料の構成元素によるX線の吸収でそのコントラストが生ずるわけで、必然的にその元素には放射線損傷を引き起こすようなエネルギー吸収があったことになる。この吸収エネルギーの大きさは、厚さ2-10 μm の試料を3 nmのX線で観察するとき、 10^4 Gy (分解能が100 nm) あるいは 10^7 Gy (分解能が10 nm) と推定された²⁹⁾。

吸収線量が 10^7 Gyという値は、遺伝物質であるDNAの二重鎖切断で考えてみると、放射線損傷が起こったのち、修復されることを考慮しても修復できないままの二重鎖切断が一個の細胞当たり 10^8 個以上も生ずると推定される²⁸⁾程大きな線量である。いいかえると、ヒトの細胞一個のDNA量は 6×10^9 塩基対であるがその60塩基対当たり一個のDNA鎖切断が生ずることに相当する。一方DNAは、ヒストンの8量体とともに染色体(太さ1 μm , 長さ5-10 μm)の構成単位であるヌクレオソームを形成するが、このヌクレオソーム一つには約150塩基対のDNAがある。また、ヌクレオソームは、直径11 nm 高さ5 nmの円板状をしている。従って、10 nmの分解能で観察しようとするとき、 10^7 Gyの吸収線量となり、直径11 nmのヌクレオソームに2個以上の修復できないDNA二重鎖切断が生ずることになる。

このように大きな放射線損傷が実際に生ずるか否かは確かな証拠がない。しかしながら、その可能性を考慮した上で、この放射線損傷の影響を回避して生体の真の構造を観察する方法を検討する必要があるだろう。まず第一に問題となるのは、時間経過の問題である。すなわち仮に分子にエネルギー吸収があったとして、それがX線顕微鏡で観察されるような(10 nm以上の大きさの)構造変化となるまでに要する時間が問題となる。水溶液中では、この分子の構造変化は主に分子の熱拡散によって決まる²⁸⁾。

Fig. 2 Relationship between exposure time and resolution in the case of "freely diffusable" molecules. Exposure time is obtained as the time taken for a globular molecule to diffuse the distance of its diameter. The resolution is equal to the diameter of the imaged molecule.

熱拡散による構造変化の問題は、放射線損傷によって生じた分子ばかりでなく、一般的に水溶液中で観察する場合に考慮しなくてはならない問題である³⁰⁾。Fig. 2 およびFig. 3は、水溶液中の微粒子を熱拡散によるボケの影響を考慮して観察するとき、その微粒子を識別できる分解能で観察するための露光時間を示している。Fig. 2は自由に拡散している微粒子を観察する場合で、Fig. 3はその微粒子がより大きな構造体に固定されている場合を想定して推定した関係を示している。なお、Fig. 2, Fig. 3において、分解能は、球形粒子の位置の移動がその直径に相当する距離以下であるときを意味する。

Fig. 2から解るように、水溶液中を自由に拡散している分子は、その位置の移動が非常に早い。例えば直径20 nmの球形分子の場合、その露光時間が0.02 μsec でないと20 nmの分解能で観察できないことをFig. 2は示している。

生体内では、その構造体の状況は様々であろう。自由に拡散できる分子もあれば、大きな構造体に固定されているものもある。あるいはその中間的な状態で、大きな構造体に接続されているが、それ自体もかなりの自由度で位置を移動できる場合もあるにちがいない。実際には自由に拡散できる場合がむしろまれで、中間的

Fig. 3 Relationship between exposure time and resolution in the case of "rigidly fixed" molecules. Exposure time was obtained as the time taken for a globular molecule to diffuse the distance of its diameter. The resolution is equal to the diameter of the imaged molecule. Each line is dependent on the size of the cellular structure on which the imaged molecule was rigidly fixed.

な状態、すなわちある大きさの構造体に接続され、その大きな構造体とともに移動するがそれ自身もある範囲の自由度で小さく位置を変えている場合が多いのではなかろうか。Fig. 3は大きな構造体に固定されている微粒子を識別する場合の露光時間について推定した結果である。例えば染色体(太さ $1 \mu\text{m}$)を構成するヌクレオソーム(直径 11 nm)を識別するには、露光時間を 0.4 msec 以下とすべきであることをFig. 3は示している。

この熱拡散の議論は、前記の放射線損傷によって生じた微粒子にもあてはまる。放射線損傷によって化学結合が切断され、その破片が微粒子として拡散する場合もあるだろう。このような微粒子は、Fig. 2の関係に従ってすみやかに移動することになる。すなわち露光時間が長くなると、その破片の分だけ失われた形の構造を観察することになるだろう。

以上のように、水溶液中の試料を高分解能で観察するためには、試料の熱拡散によるボケに注意が必要があると同時に、X線で観察する場合にはその放射線損傷の影響も考慮しなければならない。すなわち、Fig. 2, Fig. 3で示されたように、高い分解能で観察するためには、露光時間を十分に短くする必要がある。このためにはシンクロトロン放射光ではまだ強度不足

で、短時間パルスで高い強度のX線が得られるプラズマX線が注目されている⁵⁾。

なお、露光時間が極端に短くなると、試料に吸収されるエネルギーによる断熱膨脹の影響を考慮すべきであるという議論がLondonら³¹⁾によって提起され、この影響も回避して観察するには、数十psec以下が望ましいとされている。このLondonらの議論は、試料に吸収されたX線は瞬時にすべて熱エネルギーに変換されるとして推論されている。しかしながら、X線と物質との相互作用の第一段階は光電効果であり、X線のエネルギーは軌道電子の運動エネルギーに移される。このときX線のエネルギーの一部は電子によって別の場所に運ばれ、さらに相互作用をして、化学結合をきる。熱の発生はこのような反応の後でおこる。すなわち、X線の全エネルギーが熱に変換されるまでの時間が“瞬時”と言えるほど短いのか否かは検討の余地があるだろう。

5. プラズマX線による生体観察

X線顕微鏡の開発は、主にシンクロトロン放射光を用いて進められてきた。シンクロトロン放射光は、軟X線領域で連続スペクトルであり、任意の波長のX線を取り出すことができるので、生体観察の基礎データを得るには最も適し

た線源である。しかしながら、上記のように、水溶液中の生体試料を高分解能で観察するには、その露光時間を短くする必要がある。そのためにはシンクロトン放射光ではまだ強度不足で、プラズマX線と単色で強度の高い線源としてのX線レーザーに期待が寄せられている。

シンクロトン放射光を用いたX線顕微鏡による観察結果については、多くの結果が報告されているが、その代表的なものとして、文献4を参照していただきたい。今後も急速に観察結果が増大するだろう。ここでは、プラズマX線およびX線レーザーを用いた観察結果について紹介したい。

プラズマX線を水溶液中の生体試料の観察に用いた最初の例は、放電プラズマX線³²⁾を密着顕微法に応用したプロテオグリカン分子の観察例であろう³³⁾。その後、彼らはミオシン繊維の観察も報告している³⁴⁾。さらに放電プラズマX線による生体の最初の観察例は、Federらによる血球細胞の一つ血小板の密着顕微法による観察である³⁵⁾。なお、彼らは10 nmまで観察されていると主張しているが、具体的には明らかではない。

レーザープラズマX線も密着顕微法に利用され^{36,37)}生物観察が進められている。生体の観察例には、植物試料³⁸⁻⁴⁰⁾、ウニ精子⁴¹⁾等の例があるが、分解能は0.1 μm 程度にとどまっている。生体分子の観察には、ヒト染色体および染色体繊維を水溶液中で観察した我々の結果がある⁴²⁾。

Fig. 4はその染色体繊維の観察例を示している。Fig. 4aの矢印で示す部分をさらに拡大したのがFig. 4bである。我々はレジスト上のレリーフを透過型電子顕微鏡で観察するときにレプリカ法を用いているので、黒い部分がレプリカ膜の電子顕微鏡像であり、実際の像は、黒く縁どりされた中に白く抜けている部分となる¹⁶⁾。Fig. 4bには、球形の粒子が繊維状の分子の上につながっている形が観察される。この粒子状の像で小さい粒子像を選んで大きさを測定したところ $13.4 \pm 2.0 \text{ nm}$ ($n=10$)となっていた。こ

Fig. 4 X-ray image of a stretched portion of a hydrated human chromosome fiber. An enlargement of the area indicated by an arrow in (a) is presented in (b).

の大きさは、乾燥したヌクレオソームよりやや大きいとその大きさに相当しているといえよう。すなわち、この結果は、X線顕微鏡を用いれば水溶液中の生体分子を10 nmの分解能で観察できることを示している。

現在10 nmの分解能で観察できるX線顕微法は密着法だけであるが、3.1項に指摘したように密着法では厚い試料を高分解能で観察することは難しい。生体内における染色体繊維の高分解能観察には、X線顕微鏡装置の開発が必須である。なお密着顕微法にX線レーザーを用いた例としては、HeLa細胞を観察した例⁴³⁾があることを付記しておく。

X線顕微鏡装置にプラズマX線を利用した例も報告されている(文献4参照)。特にゲッチンゲン大学のSchamahlのグループは古くから実験室型の顕微鏡装置の開発に取組み⁴⁴⁾、放電プラズマX線を用いた透過型X線顕微鏡による生物試料の観察を試みている¹⁹⁾。まだ分解能はシンクロトン放射光を用いた装置におよばないが、今後の発展を期待したい。レーザープラズマX線を用いた実験室型X線顕微鏡製作も進行中である^{20,45)}。さらに、X線レーザーを線源とする結像型X線顕微鏡を組み立て、生物試料を観察した例がごく最近報告された⁴⁶⁾。

6. まとめ

レーザープラズマX線の利用を中心にX線顕微鏡による生体観察について紹介したが、シンクロトロン放射光によるX線顕微鏡にはまた別の利点がある。例えば、乾燥試料であれば、光学顕微鏡と同じように興味深い視野を求めて観察を続けることができる。あるいは、X線の波長を任意に変えることができるので、元素の吸収端を利用した元素の分析および分布を測定することもできる⁴⁷⁾。このようなシンクロトロン放射光の利点は、将来レーザープラズマX線あるいはX線レーザーでも可能となるかもしれないが、現状では両者が相補的と考えるほうが妥当と思われる。なお、シンクロトロン放射光を用いて、位相差顕微鏡⁴⁸⁾あるいはX線ミクロトモグラフィー⁴⁹⁾の検討もなされている。

水溶液中の試料の高分解能観察となれば、レーザープラズマX線あるいはX線レーザーに一日の長があるだろう。しかも、実験室型の顕微鏡となれば、シンクロトロン放射光には難しい点が多い。実験室型の顕微鏡として、乾燥試料を連続的に観察できる装置としては、分解能は劣るが投影型X線顕微鏡の利用価値も大きいだろう。生体観察の立場で考えると、実験室で常時利用可能な状態になっていることがその発展に大きく寄与する。種々の方式のX線顕微鏡が相補的に発展することが切に望まれる。

X線顕微鏡の特徴の一つとして、厚い試料の観察がある。水溶液中の試料の場合には、放射線損傷等の問題があり、単一短時間の露光で三次元的情報を記録する必要がある。そのためには、同時に二方向以上の線源から露光して観察するか、ホログラフィー観察を行うとよいだろう。二方向以上の線源を同時に発光させることは、レーザープラズマX線には難しくないだろう。また、ホログラフィーにはX線レーザーが最適であろう。

最後に、X線顕微鏡が期待通り開発されれば、生体観察に新しい手段を提供することになることは明らかである。すなわち、光学顕微鏡とは

異なったコントラスト機構で、光学顕微鏡よりも高い分解能で水溶液中の存在状態を観察できることになる。試料の調製も電子顕微鏡に比べてはるかに容易である。従来電子顕微鏡で行われていた観察のかんりの部分をX線顕微鏡で行えるのではなかろうか。あるいは、血液等を直接観察して医学診断にも利用できるかもしれない。今後の発展を期待したい。

参考文献

- 1) 望月孝晏：レーザー研究 **18** (1990) 856.
- 2) 田中和夫：オプトロニクス, **No. 10** (1988) 91.
- 3) 大道博行, 加藤義章：レーザー研究 **18** (1990) 861.
- 4) A. G. Michette, G. R. Morrison and C. J. Buckley (ed): *X-Ray Microscopy III* (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992).
- 5) K. Shinohara and A. Ito: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.397.
- 6) 岡田育夫他：レーザー研究 **18** (1990) 879.
- 7) G. Schmahl and D. Rudolph (ed): *X-Ray Microscopy* (Springer Series in Optical Sciences **43**, Springer-Verlag, Berlin, 1984).
- 8) D. Sayre et al (ed): *X-Ray Microscopy II* (Springer Series in Optical Sciences **56**, Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 9) K. Shinohara et al (ed): *X-Ray Microscopy in Biology and Medicine* (Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1990).
- 10) M. R. ハウエルズ, J. キルツ, D. セイヤー(青木貞雄訳)：日経サイエンス **21** (1991) No.4, 34.
- 11) 矢田慶治：電子顕微鏡 **26** (1991) 72.
- 12) 富江敏尚他：応用物理 **61** (1992) 682.
- 13) K. Kinoshita et al: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.335.
- 14) W. Gudat: in *Uses of Synchrotron Radiation in Biology* ed. H. B. Stuhmann (Academic Press, London, 1982) p.23.
- 15) R. Feder et al: Science **197** (1977) 259.
- 16) K. Shinohara et al: J. Microsc. **158** (1990) 335.
- 17) M. Howells et al: Phys. Today **38** (1985) No.8, 22.
- 18) G. Schmahl et al: Synchrotron Radiat. News **4**

- (1991) No.2, 10.
- 19) G. Schmahl et al: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.66.
- 20) H. Aritome et al: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al: (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.199.
- 21) S. Aoki and S. Sudo: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al: (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.114.
- 22) 田中和夫: パリティ, **5** No.5 (1990) 56.
- 23) J. Kirz: Synchrotron Radiat. News **4** (1991) No.2, 17.
- 24) M. R. Howells and C. J. Jacobsen: Synchrotron Radiat. News **3**, No.4 (1990) 23.
- 25) M. Howells et al: Science **238** (1987) 514.
- 26) I. McNulty et al: Science **256** (1992) 1009.
- 27) J. E. Trebes et al: Science **238** (1987) 517.
- 28) K. Shinohara and A. Ito: J. Microsc. **161** (1991) 463.
- 29) D. Sayre et al: Ultramicrosc. **2** (1977) 337.
- 30) A. Ito and K. Shinohara: Cell Structure and Function **17** (1992) 209.
- 31) R. A. London, M. D. Rosen, and J. E. Trebes: Appl. Opt. **28** (1989) 3397.
- 32) R. McCorkle et al: Science **205** (1979) 401.
- 33) B. J. Panessa et al: Ultramicrosc. **6** (1981) 139.
- 34) B. J. Panessa-Warren: in *X-Ray Microscopy* ed. G. Schmahl and D. Rudolph (Springer Series in Optical Sciences Vol. **43**, Springer-Verlag, Berlin, 1984) p.268.
- 35) R. Feder et al: Science **227** (1985) 63.
- 36) R. J. Rosser et al: J. Microsc. **138** (1985) 311.
- 37) R. J. Rosser et al: Appl. Opt. **26** (1987) 4313.
- 38) H.-g. Kim et al: Proc. SPIE **1140** (1989) 256.
- 39) P. C. Cheng, H.G. Kim and T.H. Lin: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al: (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.417.
- 40) T. W. Ford, A. D. Stead and A. M. Page: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al: (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.438.
- 41) T. Tomie et al: Science **252** (1991) 691.
- 42) K. Shinohara et al: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.347.
- 43) C. H. Skinner et al: J. Microsc. **159** (1990) 51.
- 44) D. Rudolph et al: in *X-Ray Microscopy II* ed. D. Sayre et al: (Springer Series in Optical Sciences Vol. **56**, Springer-Verlag, Berlin, 1988) p.216.
- 45) M. Richardson et al: Proc. SPIE **1741** (1992) in press.
- 46) L. B. Da Silva et al: Science **258** (1992) 269.
- 47) J. M. Kenney et al: J. Microsc. **138** (1985) 321.
- 48) G. Schmahl, D. Rudolph and P. Guttman: in *X-Ray Microscopy II* ed. D. Sayre et al: (Springer Series in Optical Sciences Vol. **56**, Springer-Verlag, Berlin, 1988) p.228.
- 49) U. Bonse et al: in *X-Ray Microscopy III* ed. A. Michette et al: (Springer Series in Optical Sciences **67**, Springer-Verlag, Berlin, 1992) p.167.
- 50) J. Kirz and D. Sayre: in *Synchrotron Radiation Research* ed. H. Winick and S. Doniach (Plenum Press, New York and London, 1980) p.277.
- 51) 日本生化学会編: 生化学データブック I (東京化学同人, 東京, 1979) p.1536.
- 52) B.L. Henke et al: Atomic Data and Nuclear Data Tables **27** (1982) 1.