

## 新博士紹介

1. 氏名 星野真人(財団法人 高輝度光科学研究センター)
2. 論文提出大学 筑波大学
3. 学位種類 博士(工学)
4. 取得年月日 2008年3月25日
5. 題目 ウォルターミラーを用いた3次元イメージング X線顕微鏡の研究
6. 使用施設 KEK-PF BL3C2 (現 BL3C)
7. 要旨

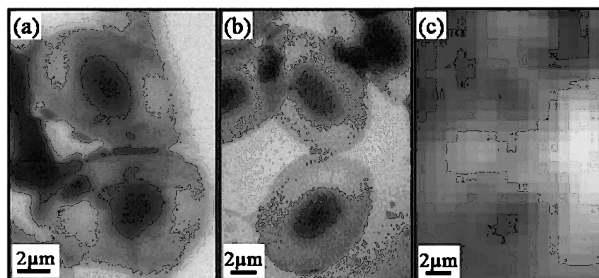
X線顕微鏡は、光学顕微鏡よりも高い空間分解能で試料の観察が可能であり、また電子顕微鏡のような染色・スライス等の加工が基本的には不要で、使用するX線エネルギーを選択すれば、細胞レベルの生体試料から産業用機器まで様々な試料の *in-situ* 高分解能測定が可能な顕微鏡として利用することができる。近年では、放射光に代表されるX線光源の進歩により、X線による干涉顕微鏡など様々な応用測定も始められてきており、その実用的利用が期待されている。本研究では、主に生体試料の測定を前提とした顕微鏡開発を行ったが、試料の大きさによりX線エネルギーを使い分け、細胞レベルの生体試料測定には、ウォーターウィンドウと呼ばれる波長域の軟X線(2.3 nm~4.4 nm)を用いた軟X線顕微鏡の開発を行い、またそれよりもマクロな試料に対しては、硬X線顕微鏡による測定を行った。また、通常の顕微鏡イメージングで得られる像は試料の2次元像であるが、X線を用いた測定で良く知られている Computed Tomography (CT) を結像光学系に導入することで、通常の投影型CTよりも高い空間分解能で試料の3次元イメージングが可能となる。このイメージングトモグラフィーを用いて、軟X線顕微鏡では大きさ10ミクロン以下の細胞試料に対してその3次元イメージングを行った。また、硬X線領域では、試料中に含まれるミネラル成分(鉄、亜鉛など)の3次元分布を測定できるような結像型蛍光X線顕微鏡による特定元素の3次元マッピング法の開発を行った。軟X線顕微鏡については、実験室規模の光源であるレーザープラズマ光源を用いた光学系の開発を行い、結像型蛍光X線顕微鏡については、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのBL3C2(現BL3C)で開発を行った。

本研究では、ウォルターミラーと呼ばれるX線の斜入射による全反射を利用した光学素子を用いた。ウォルターミラーは、比較的開口が大きく、高い反射率が得られるため、X線領域で使用されている他の結像素子に比べて効率がよく、フォトン数の少ない蛍光X線の結像などに適している。

まず、軟X線領域における顕微鏡光学系の開発では、生体試料の *in-situ* 測定が可能な光学系の開発と、対物ミラーとして用いたウォルターミラーの幾何学的に決まる低

倍率を克服するために、2つのウォルターミラーを用いたリレー光学系による高倍率系の開発を行った。*In-situ* 測定用の光学系では、コンデンサーミラーと対物ミラー間に大気層を生成することで、乾燥試料および溶液中の試料の測定が100 nm以下の空間分解能で可能となった。しかし、対物ミラーの幾何学的に決定されてしまう低倍率のために、ピクセルサイズの大きなCCDカメラでは十分な解像力は得られず、高分解能イメージングのためには高分解能検出器である写真乾板を用いなければならなかった。本研究の目的である3次元イメージングを行うために、CCDカメラによる高分解能像撮影が必要であったため、リレー光学系を用いた高倍率光学系の開発を行った。これにより、それまで対物ミラーのみで倍率32倍であったのが、倍率約1000倍でのイメージングが可能となった。**Fig. 1(a)**に、高倍率軟X線顕微鏡によって得られた鶏赤血球の軟X線像を示す。また、比較のために倍率32倍の光学系で、写真乾板およびCCDで撮影した鶏赤血球の軟X線像を、それぞれ**Fig. 1(b)**および**1(c)**に示す。光学系を高倍率にすることで、乾板でなくては撮影できなかった高分解能像が、CCDでも十分撮影できるようになった。この光学系では、リレーミラーの特殊な設置方法により、得られる像に歪みが生じたが、補正法も同時に開発することで対応した。

高倍率になった光学系を用いて、細胞試料のイメージングトモグラフィー光学系の開発と実際に生体試料の3次元イメージングを行った。コンデンサーミラーと対物ミラー間の僅かな大気層(1~2 mm程度)で試料を回転させるため、試料は先端を細く引き伸ばしたキャピラリーの先端に固定した。ウォルターミラーを用いた光学系では、色収差がないため、光学系のアライメントおよび試料の位置調整は可視光で可能である。よって、試料をX線に曝す時間を必要最小限に抑えることができる。**Fig. 2**に、開発した軟X線イメージングトモグラフィーによって得ら



**Fig. 1** (a) X-ray image of red blood cells of a chicken observed by a high-magnification soft x-ray microscope using relayed-tandem Wolter mirrors. (b) (c) X-ray images of red blood cells obtained with a photographic plate (nuclear emulsion plate, Fuji Photo Film) and a back-illuminated CCD camera (Hamamatsu photonics, 512×512 pixels, 24 μm/pixel), respectively.

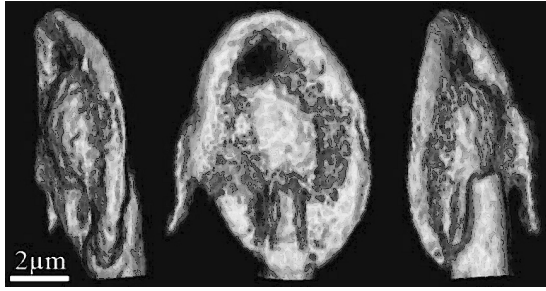


Fig. 2 Three-dimensional images of a red blood cell of a chicken obtained with the soft x-ray imaging tomography.

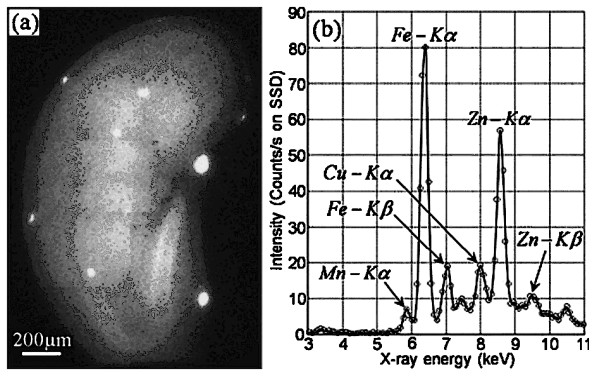


Fig. 3 (a) X-ray fluorescence image of an intact alfalfa seed. (b) X-ray fluorescence spectrum at the image plane measured by a solid state detector.

れた鶏赤血球の3次元像を示す。鶏赤血球には細胞核が存在するが、3次元イメージングによりその核の部分がまわりに比べて突出している様子などがわかる。

次に結像型蛍光X線顕微鏡による、特定金属元素の3次元イメージングについて述べる。ウォルターミラーを用いた結像型の蛍光X線顕微鏡では、弾性散乱によるバックグラウンドノイズを最小にするために、入射(励起)X線に対して結像系の光軸が直角になるように構築を行っている。今回、試料となる生体試料には、アルファルファと呼ばれる牧草の種子を用いた。Fig. 3(a)にアルファルファ種子の蛍光X線像を示す。検出器には、直接撮像型のCCDカメラを用いた。蛍光X線励起のための入射ビームには、偏向電磁石から得られる白色光を用いた。試料に照射する際は、スリットで $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 程度にビーム整形した。顕微鏡の有効視野に対して試料の方が大きかったため、試料を走査してサブ画像を撮影し、画像処理でつなぎ合わせた。また、試料の下半分に励起ビームを照射したときの、像面における蛍光X線スペクトルをFig. 3(b)に示す。ウォルターミラー内面には白金がコートしてあるので、約12 keVのX線まで結像することができる。スペクトルより、鉄および亜鉛が顕著に検出されていることがわかる。ウォルターミラーは、先にも述べたように反射型素子であるので基本的には色収差がなく、臨界エネルギー以下のX線であれば同じ光路長で像面に到達する。つまり、試料中に複数の元素が含まれていた場合、CCDによる通常

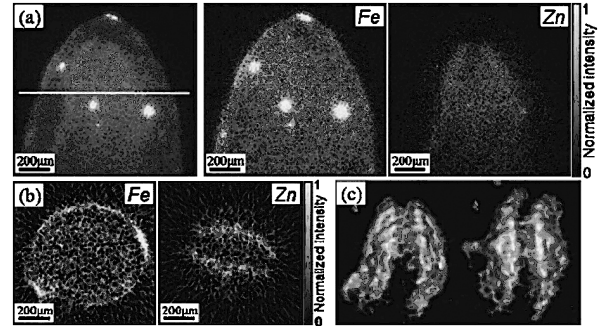


Fig. 4 (a) X-ray fluorescence image of an intact alfalfa seed (left) and its two-dimensional element mappings of iron (center) and zinc (right) obtained from a photon-counting calculation. (b) Sectional images of element distributions of iron and zinc. (c) Three-dimensional distribution of zinc. Side view (left) and top view (right).

の積算露光では各元素の位置情報を得ることはできない。

Fig. 3(a)に示した蛍光X線像も積算露光によるイメージングであり、スペクトルで検出されている各元素の位置情報は得られていない。

そこで、結像型蛍光X線顕微鏡で各元素のマッピングを得るために、CCDによるフォトンカウンティング法を用いた。X線フォトン1つが検出器に入射した場合、光電吸収によって生成させる電子の数は入射フォトンのエネルギーに依存するため、発生した電子数から蛍光X線発生元の元素を特定することができる。さらに、CCDの各ピクセルでこの操作を行うことで、ある特定元素の2次元マッピングを得ることができる。本研究では、このフォトンカウンティング法にイメージングトモグラフィーを組み合わせることで、特定元素の3次元元素マッピングを行った。

Fig. 4(a)に、フォトンカウンティングによって得られたアルファルファ種子に含まれる鉄および亜鉛の2次元マッピングを示す。また、図中に示したラインで再構成を行って得られた鉄および亜鉛のスライス像をFig. 4(b)に示す。再構成は、各投影角で各元素のマッピングを求めた後に行った。この結果より、亜鉛に関しては発芽後に子葉となる部分に多く分布していることがわかる。また、亜鉛の分布について3次元表示したものをFig. 4(c)に示す。亜鉛の分布を求めることで、それが分布している種子の胚の形状を3次元で測定することに成功した。

本研究では、ウォルターミラーを用いたX線顕微鏡にイメージングトモグラフィーを取り入れることで、軟X線では吸収による微小生体試料の高分解能3次元イメージング、硬X線では試料に含まれる特定金属元素の3次元イメージングを行い、それぞれの場合で非常に有益な成果を得ることができた。特に、軟X線によるイメージングトモグラフィーでは、コンパクト軟X線顕微鏡により細胞試料の3次元イメージングが可能になったことにより、今後の実用化などが期待される。