

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03902

研究課題名(和文) 高輝度フラッシュ光源による「水の窓」波長域軟X線顕微鏡の高空間分解能化

研究課題名(英文) Development of soft X-ray microscope in Water window wavelength region using Flash LPP light source

研究代表者

江島 丈雄 (Ejima, Takeo)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：80261478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：「水の窓」波長域(2.3～4.4nm)は波長の短さとこの波長域に存在する軽元素の吸収端から、この波長域の光を用いて生物細胞を撮像すると無染色で高い空間分解能を持つ像が得られる。この波長域の実験室光源による溶液中の有機物試料の高空間分解能撮像を可能とするために、(1)レーザー生成プラズマ光源の高効率化・高輝度化、(2)軟X線結像光学系を用いた実験室型軟X線顕微鏡の高度化、(3)(1)(2)に基づく「炭素の窓」「水の窓」波長域における生物細胞の軟X線像の実証を行った他、予想外の成果として水の窓波長域のレーザープラズマ発光強度が、窒素ガス雰囲気中でガス圧に応じて増大することを新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基礎医学・臨床応用、薬学、基礎生物学、農学などの生物を対象とする学問はすべて、生物を構成する細胞内の構造を知るために高い空間分解能を持つ顕微鏡を必要としている。本研究はその要求に応えるための一つの方法として「水の窓」波長域(=2.3～4.4 nm)を利用した軟X線顕微鏡のための光源、光学系などの要素技術開発を行い、それらを組み合わせて顕微鏡として完成させた。その他、要素技術開発の途中で新たな高輝度光源の動作原理となる可能性のあるプラズマ発光強度のガス圧依存性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Since the shortness of the wavelength and existence of some absorption edges of light elements in "Water window" wavelength region (2.3 - 4.4 nm), a high spatial resolution image will be obtained with high contrast when an unstained organic material is imaged using this wavelength region. In order to enable high spatial resolution imaging of organic materials using a laboratory light source in this wavelength region, we made following studies: (1) Improvement of efficiency and brightness of laser-produced plasma light source, (2) Development of laboratory type soft x-ray microscope with soft x-ray imaging optics, and (3) Demonstration of soft X-ray images of biological cells in the "carbon window" and "water window" wavelength region. Furthermore, we found newly as an unexpected result that the emission intensity of the soft X-ray in "Water window" wavelength region from the laser produced plasma under N₂ atmosphere increases as the increase of the N₂ gas pressure.

研究分野：軟X線光学

キーワード：水の窓 UTA放射 反射多層膜 軟X線顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟線顕微鏡は、これまでに撮像が難しかった軽元素物質の微細構造が可視顕微鏡を超える高い空間分解能で撮像できるため、自由電子レーザーなどの大型施設を用いてその研究・開発が行われてきた。その一方で、溶液中の有機材料、生物細胞などの撮像は、ブラウン運動による限界を超えて 1 ms 以下の短時間で撮像する必要があるため、いまだ実現していない (A. Ito & K. Shinohara, *Cell Struct. Function* **17** (1992), 209)。

代表者の江島と分担者の東口は、これまでにレーザー励起プラズマ軟線光源を用いた実験室型の軟線顕微鏡を開発し、励起レーザーのパルス幅 150 ps の 1 パルスで Cu 製格子の撮像に成功した (図 1) (T. Ejima 他, *J. Phys.: Conf. Ser.* **463**, 012055 (2013))。また、代表者の江島と分担者の加道は、蛍光染色したマウス精巣ライディッヒ細胞の蛍光像と軟線像 (空間分解能 90 nm) を連続撮影し、得られた蛍光像と軟線像を画像解析した結果、細胞中のオルガネラの微細構造の分布を高い空間分解能で正確に抜き出すことに世界で初めて成功した。さらに分担者の刀祢は、細胞核のみでアポトーシス過程を示すように調製した HeLa S3 核を DAPI 染色し、光顕を用いて観察した結果、アポトーシス中の DNA の凝縮が 3 つの段階に分けられることを示した (S. Tone *et al.*, *Exp Cell Res.* **313**, (2007) 3635.)。

2. 研究の目的

「水の窓」波長域 (2.3 ~ 4.4 nm) で動作する軟 X 線顕微鏡は、特異な吸収端構造とその短波長性から、原理的に無染色で可視顕微鏡以上の空間分解能が得られる。この波長域を用いて、実験室光源による溶液中の有機物試料の高空間分解能撮像を可能とするために、以下の研究目標を設定した。

- A) 短パルス中赤外レーザーの高強度化とレーザー生成プラズマ光源の高効率化・高輝度化
- B) 実験室型軟線顕微鏡の高度化とその性能評価
- C) 「水の窓」波長域における溶液中の生物細胞の 1 パルス撮影による B の実証

3. 研究の方法

(1) レーザー生成プラズマ方式軟線光源の高輝度化

LPP 光源の高輝度化を行うには、a. UTA 放射の利用、b. UTA 放射を実現するための電子温度 T_e の高温化、c. 発生した軟線のプラズマによる再吸収を妨ぐためのプラズマ臨界密度 n_c の低密度化、の 3 つ要素があり、これを実現するために、ターゲットを重金属化することで a, b が、また励起レーザーを長波長化・短パルス化することによりプラズマの臨界密度 n_c が低下し c が達成できると考えた。従ってプラズマターゲットに Au, Pb, Bi などの重い金属を用い、励起レーザーに波長 $\lambda_L = 10.6 \mu\text{m}$ 、パルス幅 2 nsec、レーザー強度 $I_L > 10^{13} \text{ W/cm}^2$ のレーザーを開発することで、電子温度 $T_e > 500 \text{ eV}$ のプラズマ生成を目指し、軟線光源の高輝度化を達成できると考えられる。

(2) 実験室型軟線顕微鏡の高度化とその性能評価

軟 X 線顕微鏡は、全体を倒立型に配置し試料の観察が容易な配置にする。光源からの軟線を照明光学系により試料上に集光し、試料を透過した軟線を結像光学系により CCD 面上に拡大・結像する。照明光学系は、これまでの Au 膜の反射面は水の窓領域での反射率が 0.01 程度と低いので、反射多層膜鏡に変える。波長 4 nm で反射率が最大となるように設計を行ったところ、Au 膜での値の約 36 倍となる 0.36 の値を得た。

4. 研究成果

研究は 2 の研究目的に沿って進められた結果、ほぼ順調に研究結果が得られた。その一方で、

今回新たに、窒素ガス雰囲気中のプラズマで水の窓波長域の発光強度が導入したガス圧に応じて増大する現象を発見した。この発見は研究途中で得られた予想外の結果であるため、今後さらに研究を進める必要がある。得られた結果については目的の順に従って結果を記す。

(1) 窒素ガス雰囲気下のレーザー生成プラズマからのプラズマ発光強度の増大

窒素ガス雰囲気中の Au, Al ターゲットにレーザー光を照射して得られるプラズマからの波長 3 ~ 6 nm の軟 X 線発光強度が波長に依らず、窒素ガス圧力に比例して増大することを見出した。導入した窒素ガスの圧力を 3 Torr まで変えた Au プラズマからの発光スペクトルを図 1 に示す。スペクトル強度は窒素ガスの透過率により補正を行った。得られた発光強度のガス圧力依存性は、波長ごとに異なる。ターゲットを Au から Al に変えて同様の測定を行っても、同様の結果が得られた。窒素ガスの透過率で補正した結果を図 2 に示す。Au の場合とは異なりスペクトル形状は無ガス時とガス導入時でほぼ同じ形状を示した。またスペクトル強度はほぼ一様に約一桁増加した。今回の新たに発見した結果から、いくつかの仮定が必要ではあるが、市販の 2.0J/pulse の Nd:YAG レーザーを使ってプラズマを励起すると 1 パルスでの撮像が可能になると考えられる。

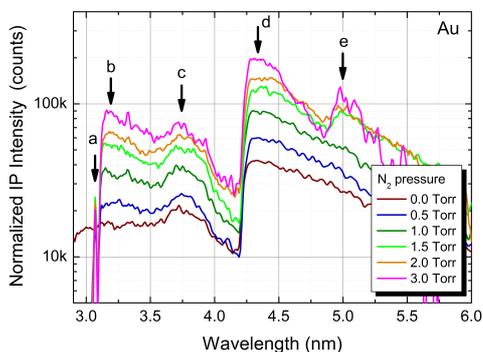


図 1: Au プラズマ発光スペクトルの N₂ ガス圧依存性。

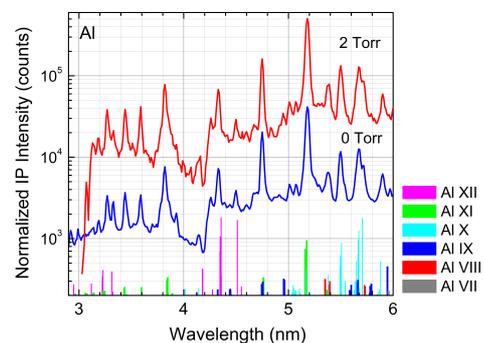


図 2: Al プラズマ発光スペクトルの N₂ ガス圧依存性。

(2) UTA 窒素ガス雰囲気下のレーザー生成プラズマからのプラズマ発光強度の増大

プラズマにおける準 Moseley の法則に基づく、高原子番号元素をターゲットに用いたときの軟 X 線強度は大きく水の窓波長域では Bi が高い変換効率を持つと予想されている。通常、プラズマ発光点位置は軟 X 線光学系の焦点位置と一致させるが、Bi の融点 (271) が他の元素と比較して低くターゲットが変形しプラズマ発光点の変動するため、軟 X 線強度の変動となって観測される。本研究では、Bi の他いくつかの元素をターゲットとして用いたレーザー生成プラズマから放出される水の窓波長域の光子数の変化を測定し、ターゲット寿命の特定を行った。

図 3 に得られた発光スペクトルを示す。最大光子数の 70% の光子数を照射限界と定義し、各ターゲットでその値に達するショット数を求めると、Pb, Bi は 4、Au は 10、Zr、Nb、Mo の場合、それぞれ

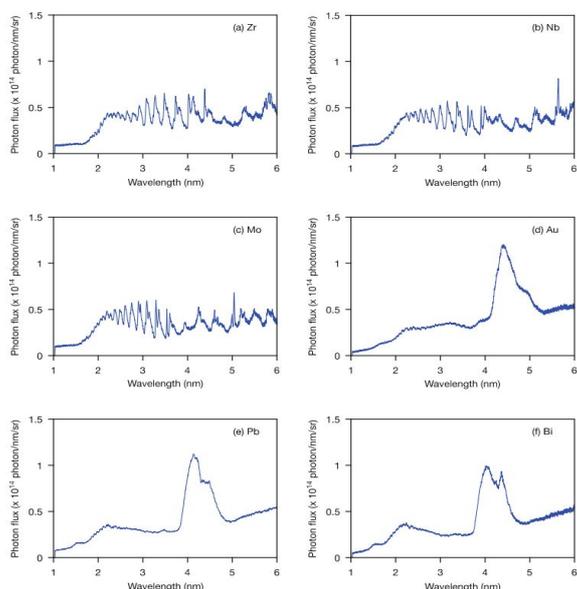


図 3: 各プラズマ発光スペクトルの比較

15、25、40 であった。得られた結果から、Mo がマルチショットに対して最も安定である。

(3) 軟 X 線反射多層膜を用いた照明光学系の開発

Au、Pb、Bi などの高 Z 元素をターゲットに用いたレーザー生成プラズマは、図 3 に示したように広い波長領域で発光する。特に Bi プラズマにより水の窓波長域に含まれる波長 4nm (光エネルギー 310eV) 付近で UTA 発光による強いピークが観測される (図 3(f))。一般に軟 X 線を利用するための光学素子は反射光学系によって実現され、その反射膜に反射多層膜を利用することによって高い反射率や回折効率を実現している。Bi ターゲットからの UTA 発光による波長 4nm 近傍の光を利用するために、新たに UTA 発光による広い波長領域と高い反射率を同時に満たす斜入射反射多層膜の開発を行った。

新たな設計では従来の設計手法とは異なり、構成物質が Cr、Sc、Mo の 3 種類からなる。単純に積層数を減らすと反射率が減少するため、Mo を加えた。Mo の屈折率が Cr と Sc の間の値を取ることで、また格子定数が Cr と Sc の間の値を取ることで、少ない積層数でも高い反射率が期待できるためである。作製した多層膜の反射率測定を PF BL-11D で行った結果を図 4 に示す。ピーク反射率は 27.4% であった。反射帯域幅 (角度許容度) は 1.5° であった。スペクトル帯域幅も同様に測定したところ、その値は 3.5 eV であり、Bi プラズマの UTA 放射幅と一致した。

(4) 密着型軟 X 線顕微鏡による撮像実験結果

「水の窓」波長域 (2.3 nm ~ 4.5 nm) の軟 X 線は酸素の吸収が少なく炭素や窒素により吸収されるので、この波長域で生物細胞を観察すると細胞を構成する炭素や窒素によりコントラストがつく。本研究では high-Z 元素を用いた LPP 光源を用いて「水の窓」波長域で動作する密着型軟 X 線顕微鏡の開発を行った。

作製した軟 X 線顕微鏡の外観を図 5 に示す。ターゲット金属を変えることにより、軟 X 線発光波長を変えることができる。照明光学系は で作製した。試料は 5mm 角の Ce:LSO (Oxide Co., Japan) 板の上に密着されており、試料を透過した軟 X 線

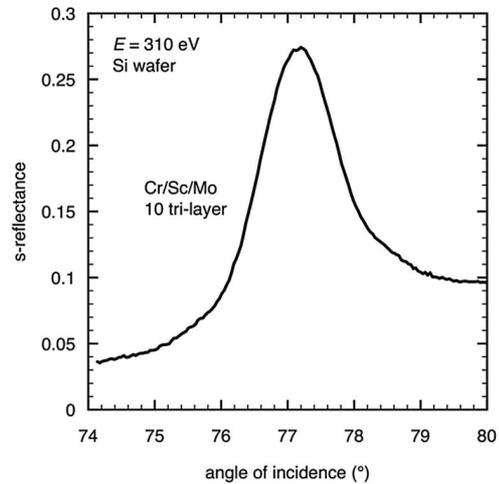


図 4 : 作製した Cr/Sc/Mo 多層膜の反射率測定結果。ピーク反射率は 27.4%。

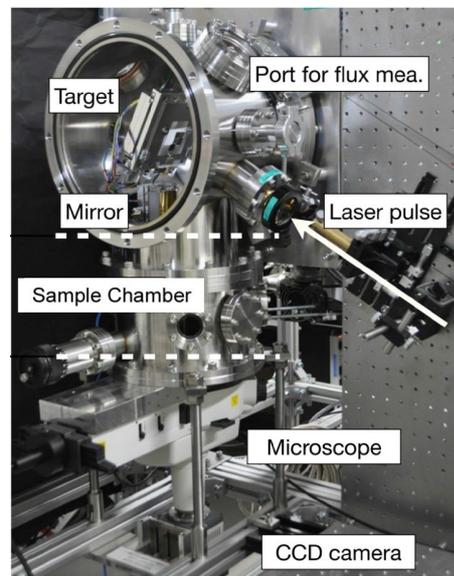


図 5 : 作製した密着型軟 X 線顕微鏡

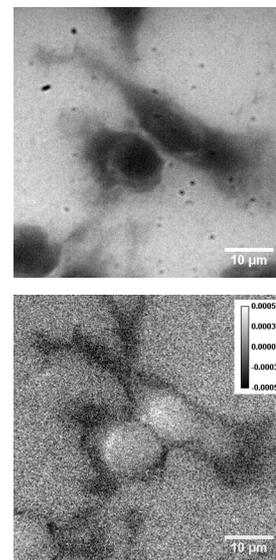


図 6 : (上)Pt と Bi プラズマによる平均像。(下) Pt と Bi ターゲットの発光波長の違いによる偏差像。

はシンチレーターにより可視光に変換され、その像を光学顕微鏡により読み出す。空間分解能は0.8 μ mであった。ターゲットにPtとBiを用いて、HeLa S3細胞の軟X線撮像を行った。得られた軟X線像からPCA解析により平均像と偏差像を求めた結果を図6に示す。平均像は、炭素と窒素による吸収の強さを表し、偏差像はグレースケールで表した。画像中、白が炭素原子が多く、黒が炭素原子が少なく窒素原子が多いことを表している。灰色は両者の信号がほぼ等しい所で、細胞の外側はバックグラウンド、内側は炭素と窒素が等しい所を表している。得られた結果から細胞核に炭素原子が多く分布することが分かる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計37件)

1. T. Ejima, Y. Ono, K. Ito, H. Kawasaki, T. Higashiguchi, S. Tone, and T. Hatano, "Development of Laboratory-type Soft X-ray Microscope, CXRM, in Water-Window using LPP Light Source", *Microscopy and Microanalysis*, **24**(S2) (2018), 214-215, doi:10.1017/S1431927618013417, (査読有).
 2. T. Hatano, T. Ejima, T. Tsuru, "Cr/Sc/Mo multilayer for condenser optics in water window microscopes", *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **220**, 14-16 (2017).
 3. M. Kado, M. Kishimoto, K. Shinohara, and T. Ejima, "Increase of the emission of laser-produced plasmas under N₂ gas atmosphere in the 2.9-6 nm region", *Appl. Phys. Lett.* **111**, 054102 (2017), DOI: 10.1063/1.4996890, (査読有)
 4. T. Ejima, Y. Kondo, Y. Ono, T.-H. Dinh, T. Higashiguchi, and T. Hatano, "Development of Soft X-Ray Microscope in Water Window Using Laser-Produced Plasma Light Source", *X-Ray Lasers 2016, Springer Proceedings in Physics* **202**, Chap. 59, (査読有).
 5. H. Hara, G. Arai, Y. Kondo, T. Dinh, P. Dunne, G. O'Sullivan, T. Ejima, T. Hatano, W. Jiang, M. Nishikino, A. Sasaki, A. Sunahara, T. Higashiguchi, "Characteristics of the soft X-ray emission from laser-produced highly charged platinum plasmas", *Appl. Phys. Express*, **9**, 066201-1-066201-4 (2016) DOI:10.7567/APEX.9.066201, (査読有).
- 他 32 件

[学会発表](計57件)

1. N. Ito, S. Tone, and M. Tanaka, "C-terminal 15kDa fragment from β -actin causes apoptotic cell death", Annual Meeting 2017 of American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB2017). (2017), McCormick Place Convention Center, Chicago, U. S. A.
 2. T. Higashiguchi, "Efficient EUV and soft x-ray sources with unresolved transition array from highly charged ions in high-Z plasmas", 23rd International Conference on Spectral Line Shapes, Tu.O.1.I1 [invited], Culture and Congress Centre Jordanki, Toru, Poland (2016).
 3. T. Ejima, M. Kado, M. Aoyama, K. Yasuda, S. Tamotsu, "Organelle Distribution in a Hydrated Bio-cell by Correlation between Soft X-ray and Fluorescence Images", 13th International Conference on X-ray Microscopy, Oxford, UK, (2016), S2-P6-05.
 4. T. Ejima, Y. Kondo, Y. Ono, T. -H. Dinh, T. Higashiguchi, T. Hatano, "Development of soft X-ray microscope in Water Window using laser produced plasma light source", The 15th International Conference on X-Ray Lasers, Nara, Japan, (2016), p-11.
 5. T. Hatano, T. Ejima, "Three element multilayer reflector for condenser optic in water window soft X-ray microscope", The 39th International conference on Vacuum Ultraviolet and X-ray Physics, Switzerland, Zurich, (2016)
- 他 52 件

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：軟X線光源、露光装置および顕微鏡
発明者：江島丈雄、加道雅孝、篠原邦夫、岸本牧
権利者：国立大学法人東北大学
種類：特許、PCT/JP2017/12554
出願年：2017年
国内外の別：外国

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：加道 雅孝

ローマ字氏名：Kado, Masataka

所属研究機関名：国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構

部局名：量子ビーム科学研究部門

職名：室長代理

研究者番号(8桁)：30360431

研究分担者氏名：刀禰 重信

ローマ字氏名：Tone, Shigenobu

所属研究機関名：東京電機大学

部局名：理工学研究科

職名：特別専任教授

研究者番号(8桁)：70211399

研究分担者氏名：東口 武史

ローマ字氏名：Higashiguchi, Takeshi

所属研究機関名：宇都宮大学

部局名：工学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80336289