

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600136

研究課題名(和文) 構造化照明法による軟X線顕微鏡の超解像化

研究課題名(英文) Super resolution of soft X-ray microscope by structured light

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 構造化照明による超解像を利用した結像光学実験を行うために、構造化照明を実現するための照明光学系の作製・評価と、試料を透過した光の位相情報を得るための5軸マニピュレータの作製を行った。軟X線領域の点光源を用いた軸対称の照明光学系を実現するために、反射多層膜を蒸着したトロイダル鏡の設計・製作を行い、波長4.5nm近傍で反射率が0.32となるトロイダル鏡を実現した。光の位相情報を得るために新たに5軸マニピュレータの設計・製作を行い、平均で25nm/pulseの移動量のマニピュレータを実現した。これらの装置を用いてマウスの肝臓細胞の撮影を行ったところ、60秒の露光でマウス肝臓の撮像に成功した。

研究成果の概要(英文)： For super resolution of microscope in soft X-ray region, it was developed that a grazing incidence condenser to illuminate a sample by a structured light and a 5 axes manipulator to obtain phase information of the light passed through a sample. The grazing incidence condenser is developed for structured illumination with the use of a point light source. The condenser is composed of toroidal mirrors and the mirror was fabricated and evaluated. A reflection multilayer was deposited on the mirror surface and measured reflectance of the mirror is higher than 0.32 at 4.5 nm wavelength. The 5 axes manipulator was designed and fabricated to obtain phase information of the light, and the average displacement evaluated in x/y/z directions was 25nm/pulse and 2x10

研究分野：軟X線光学

キーワード：軟X線顕微鏡 多層膜光学系

1. 研究開始当初の背景

軟X線は波長が可視光より1桁以上短いため、その波長の短さを利用する軟X線顕微鏡は高い空間分解能を持つ。このような軟X線顕微鏡は、Zone Plate (ZP) 光学系を対物レンズとした顕微鏡が現在のところ最も空間分解能が高く、広く使われている。ZP 光学系は回折格子を丸めた形状をしており、その空間分解能は最外輪帯幅に比例している。ZP 光学系は半導体技術を用いて作製されるが、現在の加工技術によると最外輪帯幅を狭くするのが難しく、これ以上の空間分解能の向上が望めない回折限界に達している。一方で、可視顕微鏡においてはこれまでに回折限界の顕微鏡が実現され、その回折限界を超えるための超解像技術が工夫されてきた。その中で試料を照らす照明光を構造化することによって試料の持つ空間周波数の高次成分のみを取り出す手法を、構造化照明法(SIM 法)と呼ぶ。顕微鏡では、試料からの0次光と±1次光の回折光が干渉して像を形成するため、対物レンズの開口角を超える高空間周波数の回折光は像を結ぶことができず、得られる空間分解能はレンズを通る最大空間周波数の逆数となる。SIM 法は、照明に構造を持たせることで、通常の撮像では対物レンズで集めることのできない高空間周波数成分を照明の回折効果によりレンズに取り込む。見たい物体の空間周波数 ν_1 と構造化照明の空間周波数 ν_2 とすると、最大空間周波数は差 $\nu_1 - \nu_2$ により与えられ、空間分解能が向上すると考えられる。

2. 研究の目的

軟X線領域で構造化照明法を実現し試料を通過した高空間周波数成分を取り込むために、軟X線光源に合わせた照明光学系を設計・製作し、その性能を評価する。各方位の高次成分を演算処理により合成し超解像化を実現するための、5軸マニピュレータの設計・製作・評価を行う。以上により、軟X線顕微鏡の超解像化を実現するための要素技術を開発し、その実現を試みる。

3. 研究の方法

軟X線領域において照明光学系を工夫して超解像化を行うためには、まず試料に照射する光を格子状にして向きを変える工夫と、得られた

高周波成分画像を処理して一枚の画像にする、という2つのプロセスを経る。照明光学系をを通して構造化された光は試料を通過して、試料と共に干渉像を形成する。研究室既存の密着型顕微鏡を用いて干渉像を観察するために、高いスループットを持つ照明光学系と短い干渉距離を経て干渉像を得るために精密5軸マニピュレータを開発する。開発した機器を用いて軟X線像を確認した後に、実際の高周波成分画像を取得し、画像処理により一枚の超解像画像にする。

本研究ではまず、照明光学系の開発とマニピュレータの開発を行い、その性能評価を行った。

4. 研究成果

4-1 照明光学系の設計・製作・評価

軸対称の光学系において、点光源から発生する光を最も効率よく集光する理想的な光学系は回転楕円面であるが回転楕円鏡は作製が困難なので、ここでは回転楕円鏡を4分割しトロイダル鏡で置き換えることで作製を容易にしようと考えた(図1)。

新たにトロイダル基板を設計・製作し、その基盤表面に、軟X線を効率的に反射するための反射多層膜を設計し鏡表面に蒸着した。設計した反射多層膜は、反射面で入射角が異なってもすべて同一の反射多層膜構造で対応でき、蒸着の容易性と要求される高い反射率を同時に満たす多層膜を設計した。作製したトロイダル基板に、Ion Beam スパッタ装置を用いて蒸着した。次にトロイダル面上に作製した多層膜の反射率を、KEK, Photon Factory BL11D の光学素子評価ビームラインを用いて測定した結果を図に示す。トロイダル面上の各点でs偏光反射率の値が0.32以上となる結果を得た(図2)。

以上の結果から、仮に白色光源からのEUV光以外の光をカットするフィルターを用いたとしても全体のスループットはおおよそ0.1~0.2となり、十分実用に耐える鏡が作製できた。

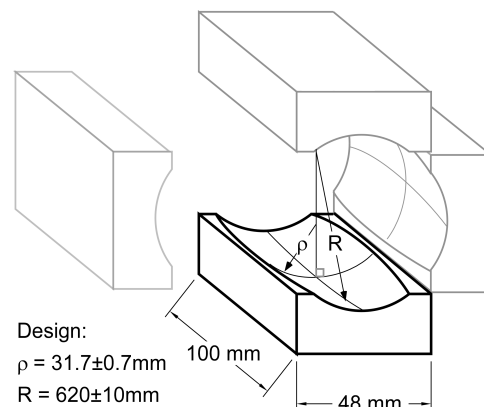


図1 照明光学系の外観図。素子を4分割し各々をトロイダル面で近似した。

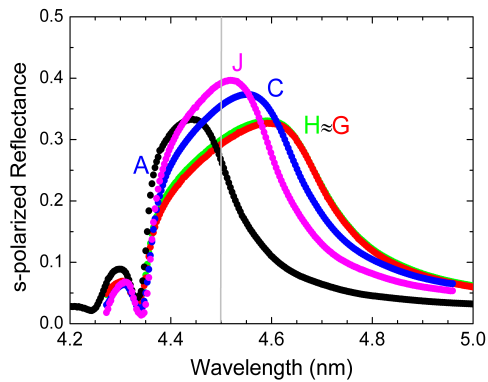


図2 トロイダル鏡の各点における反射率の測定結果。

4-2 照明光学系の設計・製作・評価

開発したマニピュレータは、試料取付部を梶の先端におき、梶の支点にフランジを置いて真空封止することで、真空中の動作を可能にした。試料の移動は、大気側の梶を精密マイクロメーターで押すことにより行い、支点と力点、支点と作用点の比がほぼ 1:1 となるように設計したことから、マイクロメーターで押した量がほぼ移動量になる。

図3に作製したマニピュレータの写真を示す。写真手前側に試料ホルダーがあり、真空フランジ手前に作用点を真空封止した銅製の丸板と筒が写っている。フランジ奥側に精密マイクロメーターが設置されている。精密マイクロメーターは精密ねじをパルス駆動で移動させるようになっており、平均の移動量はパルスあたりおおよそ 25nm である。

図3で示した Forward, Backward と示した矢印の方向に精密マイクロメーターの送り量と実際の移動量を観測した結果を図4示す。図中の白抜き丸が大気中で行った結果、中黒丸が試料部を真空中に引いて行った結果を示す。移動量は、大気中ではどちらも均等に移動し、その平均の移動量は大気中がおおよそ $24.3 \pm 2.8 \text{ nm/pulse}$ であった。真空中の場合は Forward 側に移動するときに移動量が小さくなり $16.6 \pm 1.7 \text{ nm/pulse}$ 、Backward 側への移動量は $22.0 \pm 1.8 \text{ nm/pulse}$ となった。同様に角度の変化量も測定した結果、真空中に引いた場合にやはり Forward 側と Backward 側で値のバラつきがあったものの平均で $2 \times 10^{-6} \text{ rad/pulse}$ の移動量が得られた。以上から、測定に必要な十分な精度が得られた。

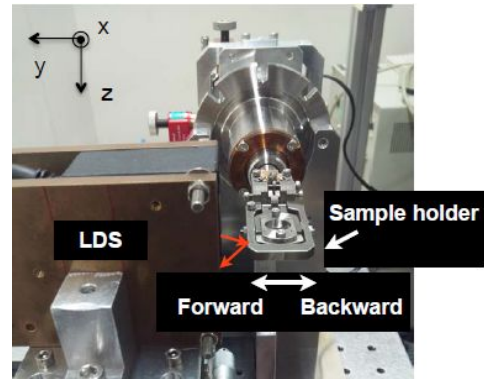


図3 開発した5軸マニピュレータの外観図。

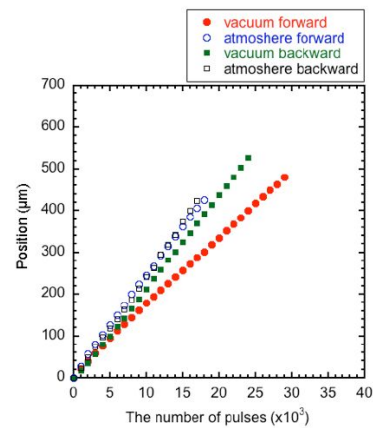


図4 図3に示した方向におけるマニピュレータの送り量と移動量の測定結果。白抜き丸が大気中、中黒丸が真空中での測定結果を表わす。

4-3 マウス肝細胞の軟線像

作製した照明光学系とマニピュレータの性能評価のため生物細胞試料の撮像を行った。用いた試料は、マウスの肝細胞を固定しヘマトキシリンで染色した後マイクロトームを用いて 200nm 厚の切片試料とした。撮像は、シンチレーターを撮像素子として軟線を可視光に変換し、可視光学系で像を読みだした。光源には、レーザー生成プラズマ光源を用いた。ターゲットとしてタンゲステンを用い、Pulse energy が 220 mJ、繰り返し周波数 10 Hz、露光時間は 60 s の条件で撮像を

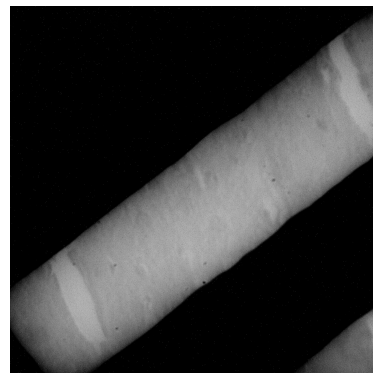


図5 マウス肝臓の軟線像。左右に毛細血管による大きな構造が見えるほか、細胞核などが見える。

行った。得られた結果を図5に示す。以上により、レーザー励起プラズマ光源を用いて軟線像が得られることが実証された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. **江島丈雄**、加道雅孝「『水の窓』波長域の軟線顕微鏡による生物細胞観測」O plus E 36(3), (2014) 296, 査読無.
2. K. Yoshida, **T. Ejima**, et al. "Efficient extreme ultraviolet emission from one-dimensional spherical plasmas produced by multiple lasers", 査読有, Appl. Phys. Exp. 7, 086202 (2014).
3. **T. Ejima**, et al., "Multilayer coated grazing incidence condenser for large numerical aperture objective at wavelength of 4.5 nm", 査読有, Appl. Optics, **53**, pp.6846-6852 (2014)
4. K. Fukui, **T. Ejima**, et al., "Design and performance of a new VIS-VUV photoluminescence beamline at UVSOR-III", 査読有, J. Synchrotron Rad., **21**, pp.452-455 (2014).
5. **T. Ejima**, et al., "Development of Soft X-ray Contact type Microscope and Application to Microspectroscopy in Water-window", 査読有, J. Phys.: Conf. Ser. **463**, 012055 (2013).
6. **T. Ejima**, et al., "Chemical Shift Images of Organelles in Leydig cells of Mice Testes", 査読有, J. Phys.: Conf. Ser. **463** 012047 (2013).
7. **T. Ejima**, et al., "Investigation of sample preparation methods for EUV imaging of fixed bio-cells", 査読有, J. Phys.: Conf. Series, **425**, 182007 (2013).
8. **T. Ejima**, et al., "Development of soft X-ray contact microscope for in-situ identification of organelles", 査読有, J. Phys.: Conf. Series, **425**, 182008 (2013).

[学会発表](計17件)

1. 羽多野忠, **江島丈雄** 他「炭素の窓用多層膜トロイダルミラーの反射率計測」第28回日本放射光学会年会、2015年1月11日(立命館大学草津キャンパス) 3A010
2. **江島丈雄**, 他「水の窓における生物細胞内構造のコントラスト」第28回日本放射光学会年会、2015年1月10日(立命館大学草津キャンパス) 2D004
3. 招待講演 **江島丈雄**「軟X線相関顕微法による生物細胞内の形態と化学組成」, 東北大学金属材料研究所共同利用ワークショップ「3GeV 中型高輝度放射光 (SLiF-J)の実現に向けて」2014年12月16日(東北大学金属材料研究所)
4. 招待講演 **江島丈雄**「軟X線相関顕微法とその生物観察応用」第4回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム (4th UU-BOS), 2014年12月11日(宇都宮大学)
5. **江島丈雄**, 他「培養液中のライディッヒ細胞の軟線吸収分光測定」UVSOR シンポジウム 2014 (分子科学研究所) 2014年11月14日 P034
6. **T. Ejima**, et al., "XAS Spectra of a Leydig Cell in Cultural Fluid to Evaluate Contrast of Organelles in Water Window", The 12th international conference on x-ray microscopy, Melbourne, Australia (Oct. 26-31, 2014), S2-P27.
7. **江島丈雄**, 他「N - K吸収端近傍における生物細胞内構造のコントラスト」第75回応用物理学会秋季学術講演会 2014年9月18日(北海道大学) 19p-A13-10
8. **江島丈雄**「アポトーシス細胞における赤外吸収スペクトル」, 「『軟X線による細胞内形態解析』研究会」, 2014年7月26日(宮城蔵王ロイヤルホテル)

9. **江島丈雄**「軟 線分光顕微像におけるオルガネラ判別への PCA 分析応用」第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 3 月 17-20 日 (青山学院大学相模原キャンパス) 18p-F1-2
10. 吉田健祐, **江島丈雄**, 他「球対称プラズマを用いた BEUV 光源データベースの構築」第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 2014 年 3 月 17-20 日 (青山学院大学相模原キャンパス), 18p-F1-12
11. 廣瀬僚一, **江島丈雄**, 他「マウス精巢ライディッヒ細胞の顕微分光測定」第 27 回日本放射光学会年会、2014 年 1 月 11-13 日 (広島国際会議場) 11P109
12. **T. Ejima**, et al., "Development of a grazing-incidence condenser for large NA objective", *The 12th Symposium on X-ray Imaging Optics, Osaka (Nov 18-20, 2013)*.
13. **江島丈雄**, 他「点光源軟 X 線顕微鏡の集光光学系の開発」レーザー学会第 450 回研究会「レーザー・ビーム・パルスパワー技術による Beyond EUV 光源」2013 年 10 月 22 日 (早稲田大学) 1.
14. **江島丈雄**, 他「波長 4.5nm 用軟 線顕微鏡の斜入射照明光学系の開発」第 74 回応用物理学会秋季学術講演会 2013 年 9 月 18 日 (同志社大学) 18p-A13-7
15. 鷓篋照之, **江島丈雄**, 他「球対称 BEUV 放射プラズマの電子密度計測」第 74 回応用物理学会秋季学術講演会 2013 年 9 月 18 日 (同志社大学) 18p-A13-12
16. 吉田健祐, **江島丈雄**, 他「球対称ガドリニウムプラズマからの B-EUV 放射特性とスペクトル特性」第 74 回応用物理学会秋季学術講演会 2013 年 9 月 18 日 (同志社大学) 18p-A13-13
17. **T. Ejima**, et al., "Development of a

grazing-incidence condenser for SX microscope", the 38th International conference on Vacuum Ultraviolet and X-ray Physics, Hefei, China (12-19 July, 2013), H8.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

柳原 美廣 (Yanagihara, Mihiro)
 東北大学・多元物質科学研究所・教授
 研究者番号：40174552