

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18360044

研究課題名（和文） ゾーンプレートを用いた硬 X 線干渉顕微鏡の開発とその応用

研究課題名（英文） Development and its application of the hard-X-ray interference microscope with zone plates

研究代表者

渡辺 紀生 (WATANABE Norio)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号 80241793

研究成果の概要：

ゾーンプレートを2枚用いて同軸で干渉させる新しいタイプの X 線干渉顕微鏡の開発を放射光施設 SPring-8 BL20XU にてエネルギー8～10 keV の X 線を用いて行った。分解能評価では、0.2 μm 線幅まで分解させることができた。また、位相検出感度は $\lambda/62$ と見積もられた。フリンジスキャンを用いた位相トモグラフィシステムを構築し、ドライ及び凍結生物試料の3次元位相再構成に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：X 線結像光学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 ・ 応用光学・量子光工学

キーワード：X 線、顕微鏡、干渉計、位相計測

1. 研究開始当初の背景

X 線による観察では、厚みのある試料の内部構造を観察することが可能である。しかし、吸収が少ないことは逆にコントラストが付きにくいことを意味する。このような場合、試料の吸収の違いを観察するよりも試料の屈折率の実部を透過 X 線の位相変化として観察する方がはるかにコントラスト良く観察することが可能である。このため、X 線領域の顕微鏡開発では、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡、干渉顕微鏡といった様々な位相コントラスト結像法が開発されてきた。この中で、干渉顕微鏡は試料による位相変化を正確に

測定するには最も適したものである。

X 線干渉計としては以前より結晶を用いた Bonse-Hart 型干渉計が知られていた。しかしこの場合、結晶反射の角度許容幅が小さく試料で回折された X 線は干渉計に取り込めないため、顕微鏡として用いることは出来ない。このため、それまで開発されてきた X 線干渉顕微鏡はすべて拡大結像系の横からコヒーレントな参照光を像面に対して照射してその干渉縞を測定する方法であった。この方法の欠点としては、(1) X 線領域ではこのような off-axis での干渉は干渉縞の間隔が数ミクロン程度となるため、高分解能な検出器が必要

となること、(2) 像はフリンジスキャンによって位相を計算するまで良くわからないこと、が挙げられる。このような欠点は参照光を同軸で干渉させれば克服できる。我々は、ゾーンプレートを2枚用いた干渉顕微鏡を開発し、干渉顕微鏡によるフリンジレスイメージングに世界で初めて成功した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が最近結像に成功した硬 X 線干渉顕微鏡を発展させ、原理実験のレベルから実用的な顕微鏡へと発展させることにある。具体的には、

- (1) 分解能の向上: エネルギー8~10 keV の X 線を用いて 100 nm を切る分解能を目指す。
- (2) 位相計測: フリンジスキャンおよび単一画像からの位相計測
- (3) 位相トモグラフィーによる 3 次元位相計測
- (4) クライオ CT システムの開発
- (5) 生物試料等への応用
- (6) 反射試料の位相計測

となる。

3. 研究の方法

(1) X 線干渉顕微鏡光学系の開発

ゾーンプレートは同心円状の回折格子であり、平行光を入射すると焦点距離 f に集光する 1 次光の他に $-f$ の位置から広がってくるように発散する -1 次光、及び回折されずに直進する 0 次光に分かれる。同じ仕様の 2 枚のゾーンプレートを光軸上に $2f$ の距離を置いて設置し、試料側のゾーンプレートの 1 次光で試料の像を結像し、下流側のゾーンプレートの -1 次光で参照光を形成するというのが、本研究で開発した干渉顕微鏡である。図 1 にその光学系を、また表 1 に使用したゾーンプレートを示す。

実験は大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL20XU に光学系を設置して行った。このビームラインはアンジュレーター光源が実験ハッチの上流 240 m と遠い位置にあるため、干渉性の良い X 線を利用することができる。この光学系では用いるゾーンプレートの直径だけの空間コヒーレンスが必要となる。そのため、ZP2 を使用する場合には分光器直後に 50 μm ピンホールを挿入して実験を行った。X 線のエネルギーは 8 keV または 10 keV を使用した。

照明光と参照光は、おおよそゾーンプレートの 1/3 の間隔をあけてワイヤーまたはダブルピンホールで分離した。位相シフターには厚さ約 70 μm の石英板を使用し、回転させることによって参照光の位相を変化させた。X 線光学系の倍率は 20~60 倍で、蛍光板にて可視光に変換して CCD カメラで像を記録し

た。

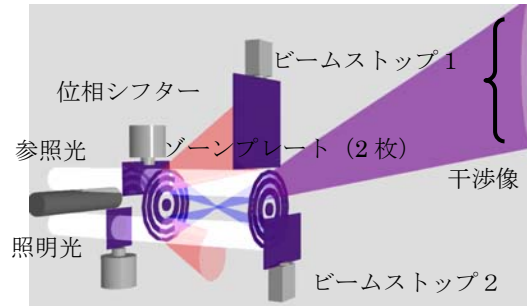


図1 X線干渉顕微鏡光学系

表1 ゾーンプレートの仕様

ゾーンプレート	ZP1	ZP2
直径	155 μm	330 μm
最外輪帯幅	100 nm	50 nm
厚さ (Ta)	1.0 μm	0.4 μm
製作	NTT AT	NTT AT

(2) 位相トモグラフィー

トモグラフィーでは光学系の長時間の安定性が必要となる。そのため、2枚のゾーンプレート間の距離を固定して安定性を高めた。この光学系では視野の一様性を保つには 0.1 μm 程度の安定性が必要とされるが、その結果数 10 分間程度の安定性を確保することができた。

位相計測は、参照光の位相を $\pi/2$ ずつ変化させて4枚の画像を記録する4ステップフリンジスキャンによって行った。10 投影ごとに試料を抜いたブランク像の位相を測定し、その値を基準に試料の位相像を計算した。得られる位相は $(-\pi, \pi]$ の範囲に限られるのでそれを超える場合にはアンラップする必要がある。アンラップでは、隣り合うピクセルの位相ギャップが π を超える場合には 2π を加えるか引いて位相ギャップを π 未満にする。単純な一方向のスキャンでうまくいかない場合には、Goldstein の Branch Cut アルゴリズムを用いて位相アンラップを行った。トモグラフィーではこのような投影像を 180 度にわたって 90 または 180 投影記録し、重畳積分法によって逆投影することにより再構成像を求めた。1枚の露光時間は 5 s から 20 s で、1つのトモグラフィー像を得るのに約 2 時間を要した。

(3) 凍結試料観察

生物試料を生きている状態に近い水分を含んでいる状態で観察したいという要望に対して、試料を凍結させて観察することは試料のスタビリティの向上及び放射線損傷の低減の意味からも非常に有効である。本研

究では、クライオジェット（オックスフォード）を用いて冷却窒素ガスによる凍結試料の位相トモグラフィーを行った。その結果、図2に示すように試料の真上に近い角度から窒素ガスを吹き付ければ、現在の分解能において試料のドリフトを検出することなく投影像を記録することができた。

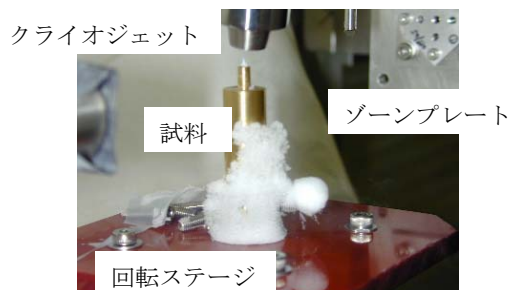


図2 凍結試料ホルダー

4. 研究成果

(1) 空間分解能評価

タンタル製、厚さ $0.5 \mu\text{m}$ のテストパターンを用いて空間分解能を X 線エネルギー 8 keV で評価した。その結果、図3に示すように ZP2 を用いた光学系で $0.2 \mu\text{m}$ 線幅まで分解結像することが出来た。ZP2 の最外輪帯幅 50 nm から計算されるゴンプレート自体の理論分解能は 60 nm であり、試料面に換算した検出器ピクセルサイズが 48 nm であったので、そこから期待される分解能 80 nm と比較すると悪い結果となった。原因は良くわかっていないが、蛍光板を含めた検出器の分解能や振動の影響、ゴンプレート自体の精度などの影響が考えられる。

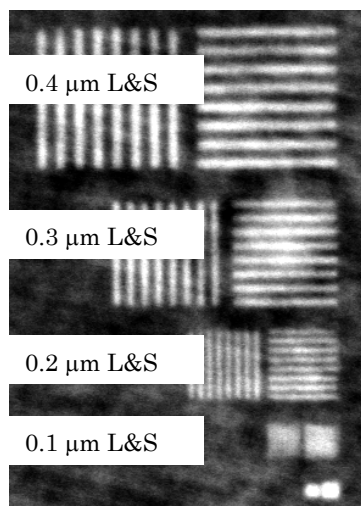


図3 分解能テストパターンの位相像

(2) 位相計測

10 keV の X 線における厚さ $5 \mu\text{m}$, $12.5 \mu\text{m}$,

$18 \mu\text{m}$ のアルミ箔の位相像からの位相計測結果を図4に示す。厚さ $18 \mu\text{m}$ のアルミ箔では、Henke table から計算した値とかなり良く一致した。全体として計算値よりも大きい理由としては、X 線が垂直に入射していなかった可能性が考えられる。アルミ箔像のバックグラウンドにおける位相値の標準偏差は 0.034 rad であった。この3倍から検出感度を計算すると $\lambda/62$ となり、同軸干渉での高い検出感度が示された。

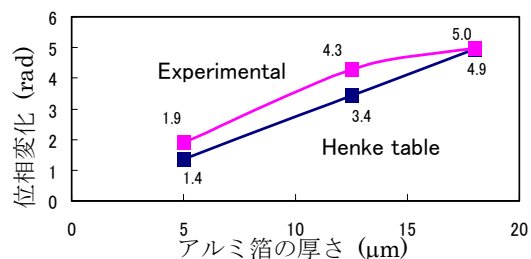


図4 アルミ箔の厚みに対する位相像の位相計測値。下のラインは Henke table (http://henke.lbl.gov/optical_constants/) からの計算値

図5は厚さ $4 \mu\text{m}$ の銅箔の位相変化を銅の吸収端付近で位相像から求めたもので、上側の点線は Henke table から計算して求めたものである。計算値と比較してかなり複雑な構造があることがわかる。物理的な意味づけは出来ていないが、マイクロな領域でのこのよう

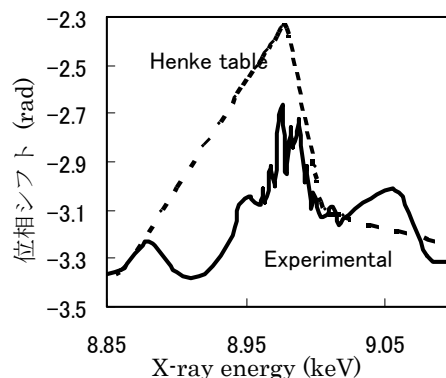


図5 銅箔($4 \mu\text{m}$)の吸収端付近の位相変化な位相変化を観察することが可能となった。

(3) 位相トモグラフィー

図6に、ガラスキャピラリに詰めた直径 $2.8 \mu\text{m}$ のポリスチレンラテックス球のエネルギー 10 keV における位相再構成像を示す。再構成は2度おきにフリンジスキャンによって求めた 90 枚の位相像から計算した。エネルギー 10 keV の X 線に対してほとんど透

明なポリスチレン球がコントラスト良く再構成出来ている。ポリスチレンのような軽元素試料もこのようにコントラスト良く3次元再構成できることから、この手法が生物試料等の低コントラスト試料の高分解能3次元観察に有用であることが示された。

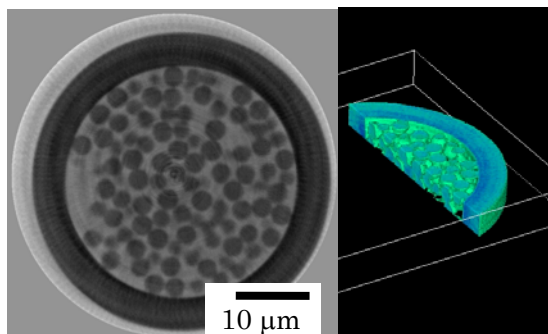


図6 ガラスキャピラリー (外径: 41 μm) 中のポリスチレンビーズ(2.8 μm)の位相トモグラフィー再構成像。X線: 10 keV。

(4) 生物試料観察

ヒカゲノカズラ孢子 (石松子) の観察例を図7に示す。この試料の直径は約30 μm であり、ピペットプレーにて先端部直径38 μm に引き伸ばしたガラスキャピラリーの先端部に挿入して回転ステージに取り付けた。この位相像を図7(a)に示す。このような投影像を2度間隔で90投影記録し、再構成計算を行った。その縦横の再構成断面像を図7(b)に示す。孢子表面の凹凸や内部構造を良く再構成することが出来た。

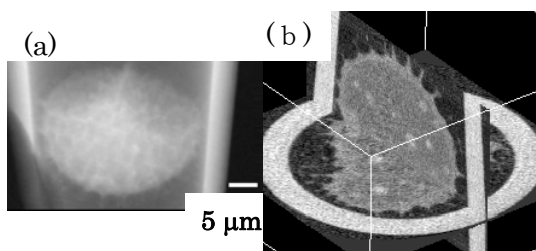


図7 ガラスキャピラリー (外径: 38 μm) 中のヒカゲノカズラ孢子 (石松子)。(a)位相投影像、(b) 3次元位相 CT再構成像、X線: 8 keV。

図8にウシのヒザ軟骨のクライオ位相トモグラフィー再構成断面を示す。試料はリン酸緩衝液中で針状に切り出して試料ホルダーにセットし、冷却窒素ガスで150 Kまで冷却して観察した。現時点では凍結の際の試料の構造変化等の問題もあるが、凍結後は2時間以上安定して観察でき、微細な構造も再構成出来るようになった。

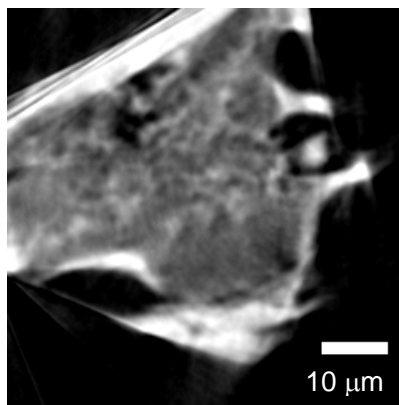


図8 ウシのヒザ軟骨のクライオ位相CT再構成断面像。X線: 8 keV。

以上より、本研究で開発したX線干渉顕微鏡はほぼ実用段階にあり、生物試料への応用を目指した3次元位相トモグラフィー顕微鏡の開発という面では目的を達成することができた。しかし、反射像の位相計測では試料エッジからの散乱などのためうまく測定することが出来なかった。また、分解能では目標とした100 nmに到達することが出来なかった。しかしながら、本研究では100~200 μm 程度の視野を確保するために比較的直径の大きなゾーンプレートを使用したが、視野を犠牲にして小さくて焦点距離の短いゾーンプレートを使用すれば、より高倍率な光学系が可能となり分解能100 nmも十分可能であると思われる。

現在、このようなサブミクロン領域の位相トモグラフィーが可能な干渉顕微鏡は世界的にも非常にユニークな存在であり、本研究の成果により今後細胞集合体の構造解析などの分野で威力を発揮するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① N. Watanabe, M. Hoshino, K. Yamamoto, S. Aoki, A. Takeuchi and Y. Suzuki, X-ray phase micro-tomography using an interference microscope with zone plates, *Journal of Physics: Conference Series* 186, 012021, (2009), 査読有。

② 渡辺紀生、ゾーンプレート硬X線干渉顕微鏡による3次元位相トモグラフィー、*KEK Proceedings 2007-18*, (2008), pp.64-66, 査読無し。

③ Norio Watanabe, Masato Hoshino, Mariko Sato, Yoshihiko Takeda, Takashi

Namiki, Sadao Aoki, Akihisa Takeuchi and Yoshio Suzuki, Hard X-ray Interference Microscope with Two Zone Plates, IPAP Conference Series 7 (The Institute of Pure and Applied Physics, Tokyo, 2006), pp372-374、査読無し。

〔学会発表〕(計 11 件)

① 渡辺紀生、笹谷智隆、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による凍結試料の位相トモグラフィ、第 23 回日本放射光学会年会、イーグレ姫路、2010 年 1 月 9 日。

② 渡辺紀生、笹谷智隆、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による生物試料の位相マイクロトモグラフィ、第 10 回 X 線結像光学シンポジウム、つくば国際会議場、2009 年 11 月 6 日。

③ 渡辺紀生、鬼木崇、笹谷智隆、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による軟骨細胞の位相マイクロトモグラフィ、第 56 回応用物理学関係連合講演会、筑波大学、2009 年 3 月 30 日。

④ 渡辺紀生、鬼木崇、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による生物試料の位相マイクロ CT、第 22 回日本放射光学会年会、東京大学、2009 年 1 月 12 日。

⑤ Norio Watanabe, Masato Hoshino, Kazuyuki Yamamoto, Sadao Aoki, Akihisa Takeuchi, Yoshio Suzuki, X-ray phase micro-tomography using an interference microscope with zone plates, 9th International Conference on X-Ray Microscopy, Zurich, Switzerland, July 23, 2008.

⑥ 渡辺紀生、星野真人、山本一行、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による 3 次元位相トモグラフィ、第 55 回応用物理学関係連合講演会、日本大学理工学部、2008 年 3 月 29 日。

⑦ 渡辺紀生、ゾーンプレート硬 X 線干渉顕微鏡による 3 次元位相トモグラフィ、PF 研究会 X 線位相利用計測の将来展望、高エネルギー加速器研究機構、2008 年 1 月 18 日。

⑧ 渡辺紀生、星野真人、山本一行、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、硬 X 線干渉顕微鏡による生物試料の位相 CT、第 21 回日本放射光学会年会、立命館大学、2008 年 1 月 14 日。

⑨ 渡辺紀生、星野真人、新井健太郎、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、X 線干渉顕微鏡による位相マイクロトモグラフィ、第 9 回 X 線結像光学シンポジウム、中部大学名古屋キャンパス、2007 年 11 月 3 日。

⑩ 渡辺紀生、星野真人、新井健太郎、青木貞雄、竹内晃久、鈴木芳生、コモンパス硬 X 線干渉顕微鏡による 3 次元位相 CT、第 20 回日本放射光学会年会、広島国際会議場、2007 年 1 月 14 日。

⑪ Norio Watanabe, Masato Hoshino, Sadao Aoki, Akihisa Takeuchi, Yoshio Suzuki, Hard X-ray Common-Path Interference Microscope with Two Zone Plates, The 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation, Daegu, Korea, May 29, 2006.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 紀生 (WATANABE Norio)
筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師
研究者番号：80241793

(2) 研究分担者

青木 貞雄 (AOKI Sadao)
筑波大学・大学院数理物質科学研究科・教授
研究者番号：50016804