

# 投影X線顕微鏡の開発と生物学への応用

矢田 慶治<sup>\*</sup>／篠原 邦夫<sup>\*\*</sup>

## 1. 緒論

電子はX線より2年遅れて発見されたが、電子レンズという極めて好都合なデバイスの考案によって電子顕微鏡が急速な発展をとげるとともに、集束電子線によって強度の強い微小X線源が得られるようになって、投影型X線顕微鏡の考えが1930年代に提案された。1950年頃には光顕微鏡より幾分分解能の良いものが造られ、工学、医学・生物学の分野でかなりの成果が得られた。しかし、この方式は強度が一般に不足で、像の直接観察が難しいのと、露出に数分以上かかるため、光学顕微鏡の分解能を越える比較的安価な唯一のものであったにも拘らず、それほど大きな発展がみられないままに過ぎた。最近になって、筆者たちは走査型電子顕微鏡を転用して高分解能投影X線顕微鏡に改造することに成功し、同時に、生物試料に適したターゲット材料の研究を行った。筆者らのこれらの研究によって進展がみられ、生物学への新たな応用も可能になってきつつある。

ターゲット材料の系統的な研究によって、植物細胞、小昆虫、骨や歯の切片などの多くの生物試料の観察には0.3nm程度の特性X線を与えるTiとScのターゲットが適しているが、より小さい、あるいは無染色の生物試料にはより長い波長のX線が必要であり、0.6-1nmの特性X線を与えるAu,Ta,Geを、10kV程度の加速電圧で真空中もしくはHeガス中で使用するのが適当であることが判った。より長波長のwater window領域での可能性についてもここで触れる。

## 2. X線顕微鏡の開発

### 1) ターゲットによるX線像のコントラストとX線強度

ターゲット材料として、Nixon<sup>1)</sup>は0.1  $\mu\text{m}$ の厚さのAu箔を7kVの加速電圧で用い、Hallたち<sup>2)</sup>はAu,Cu,Alを10-20kVの加速電圧で用いるのがよく、特にCuがよいことを述べている。我々は、約0.3 nmの特性X線を与えるTiとScのK-線が多くの生物試料に良好なコントラストを与えることを報告した<sup>3)</sup>。その後、無染色の生物試料により適したターゲット材料の研究を続け<sup>4)</sup>、表1に示すような種々の試料に対して十分なコントラストを与えるターゲット材料、加速電圧の最適の関係を見いだした。波長1nm程度あるいはそれより幾分長いX線はHeLa細胞のような無染色の生物試料に十分なコントラストを与えることを、後で示すように、Al,Ge,Auのターゲットで得られた同じ視野の像との比較から明らかにすることができた。

1) W. C. Nixon, Proc. Roy. Soc. London **A232** 475 (1955)

2) T. A. Hall et al, *X-Ray Microscopy in Clinical and Experimental Medicine*. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois (1972) P.27

3) S. Takahashi et al, Bull. Res. Inst. Sci. Meas. Tohoku Univ. **29** 13 (1980)

4) K. Yada and S. Takahashi, J. Electron Microsc. **38** 321 (1989)

表1 生物試料に適したターゲットと電圧

試料	波長 (nm)	ターゲット	電圧 (kV)	雰囲気
硬組織 骨、歯、 昆虫など	0.1~0.3	W, Au, Ti	30~20	Air
中間組織 植物細胞、神経 (染色) など	0.3~0.7	Ti, Sc, Ta, Si	20~10	He, Vacuum
軟組織 培養細胞、 筋肉など	0.7~1.1	Au, Al, Ta, Ge	10~8	He, Vacuum

これらのターゲットの最適の厚さを推定するためには、ターゲット内でのX線の吸収とX線の発生領域の広がり の推定を必要とする。ターゲットの厚さに対する吸収特性については、よく知られた式  $I=I_0 \exp(-(\mu/\rho)\rho t)$  で計算できる。

X線の発生領域の推定には、モンテ・カルロ法による計算と実験的な方法とが利用できる。X線発生領域は加速電圧を下げると急速に減少する。これは像の分解能をあげる上で好都合なことであるが、同時にX線強度も減少することを覚悟しなければならない。図1は、GeとAgに対する10kVの場合のモンテ・カルロ法による結果である。GeとAgについての電子線の阻止領域は、深さx幅が各々400nm x 300nm、250 x 150nmであるが、強度の極めて強い中心核の大きさは各々、100nm x 50nm、50nm x 25nm程度で有効なX線源のサイズはかなり小さく、特に、軸方向の大きさが、400-500nm厚のGeターゲットで10kVの場合、50nmと小さいことが注目される。

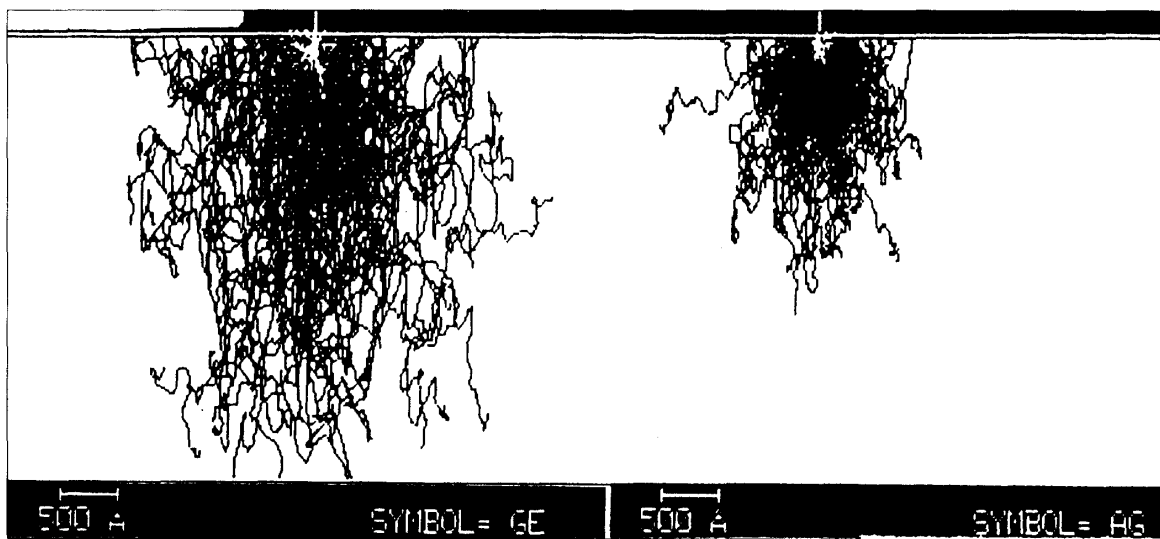


図1 GeとAgについてのモンテカルロ法による進入深さ (10kV)

ターゲット内のX線の吸収と電子線の広がりからの二つの要因から、各ターゲットについてその最適の厚さを決めることができる。特に、真空カメラを使用する場合大事なのは、入射電子のほとんどを阻止できるようターゲットが厚くなければならないことである。さもなければ、ターゲットから逃げて出た電子が検出器に達してX線像を悪化させるであろう。

ターゲットを変えた場合、結像に与る特性X線の相対強度を、全X線強度を表す式 $P = kZJV^2$ が特性X線にも当てはまると仮定することによって推定することができる。ここで、 $k$ は比例定数で $1.3 \times 10^{-9} V^{-1}$ 、 $Z$ は原子番号、 $J$ は電子電流、 $V$ は加速電圧である。つまり、 $ZV^2$ を結像に与るX線のfigure of meritとみなすことができる。 $V$ の値としては、ある与えられたターゲットについてそのL線もしくはM線を利用する場合、そのターゲットのK線もしくはL線が結像に与らないようにするために、K線もしくはL線のエネルギーに相当する電圧を用いる。図2は、このようにして得た結像に与る特性X線のfigure of merit  $ZV^2$ を示す。これから、X線強度が波長の増加とともに著しく減少することが知られる。また、TiのM線(2.74nm)のように、長波長のwater window領域の特性X線を利用する可能性があることが判る。その強度は、GeのL線(1.05nm)の約7分の1程度の弱いものになるであろうが、将来、電子線の強度が飛躍的に増加し、高感度の検出器が開発されれば実用になるであろう。SiやAlのようにK線を利用する場合には加速電圧を高くできるので強いX線強度が期待できる。この図では30kVを使った場合をプロットしてある。

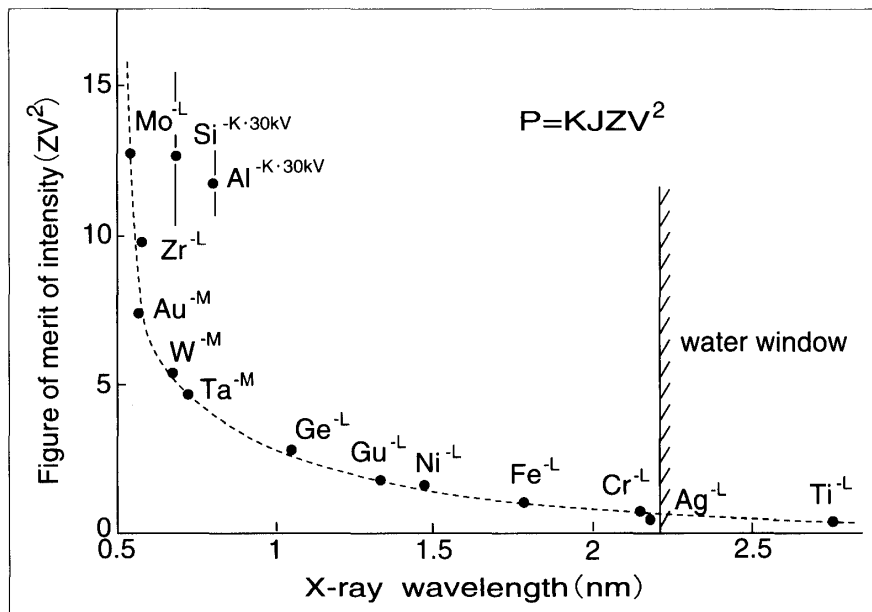


図2 結像に与る特性X線の波長と強度のfigure of merit

## 2) 分解能

投影X線顕微鏡法は、試料をX線の点光源の近くに置いて、透過X線の拡大像を得る原理的に簡単な方法である。1939年にArdenneとMartonが独立に電子光学的に電子線を絞ってターゲットに当てれば、 $1 \mu m$ 以下の強いX線源が得られることを提案し、さらに、Cosslettは薄い透過型のターゲット方式が優れていることを提案して実際的な装置を開発した。1955年には、Nixon<sup>1)</sup>がターゲットが真空窓をかね

るタイプのもので直接倍率100-500、分解能100-200nmを得た。図3は、筆者が使用した投影X線顕微鏡で、走査電子顕微鏡にターゲット、試料、真空カメラを取り付けたものである。

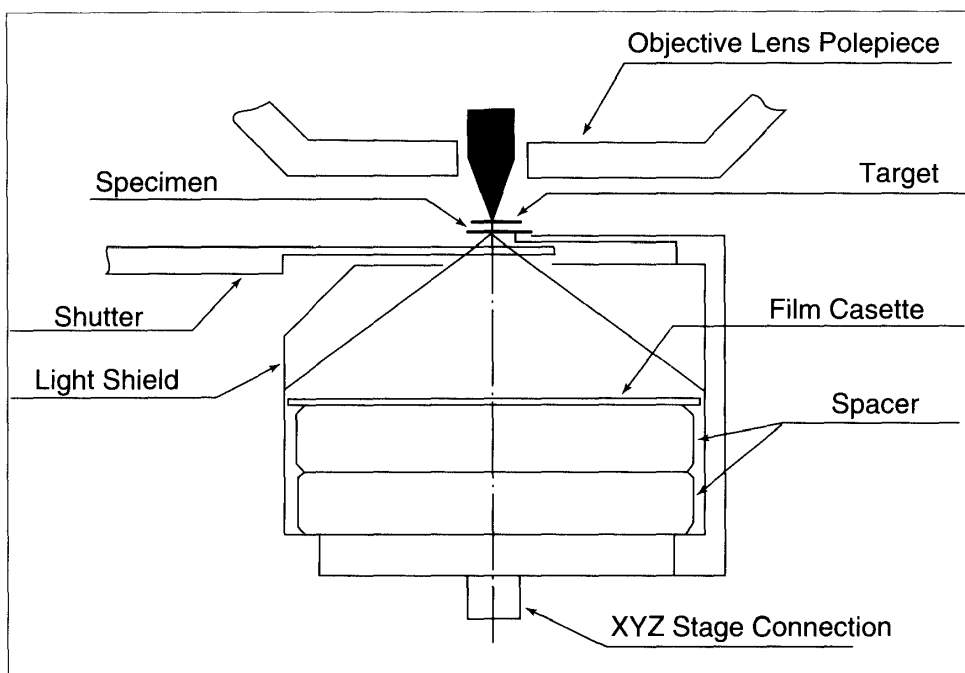
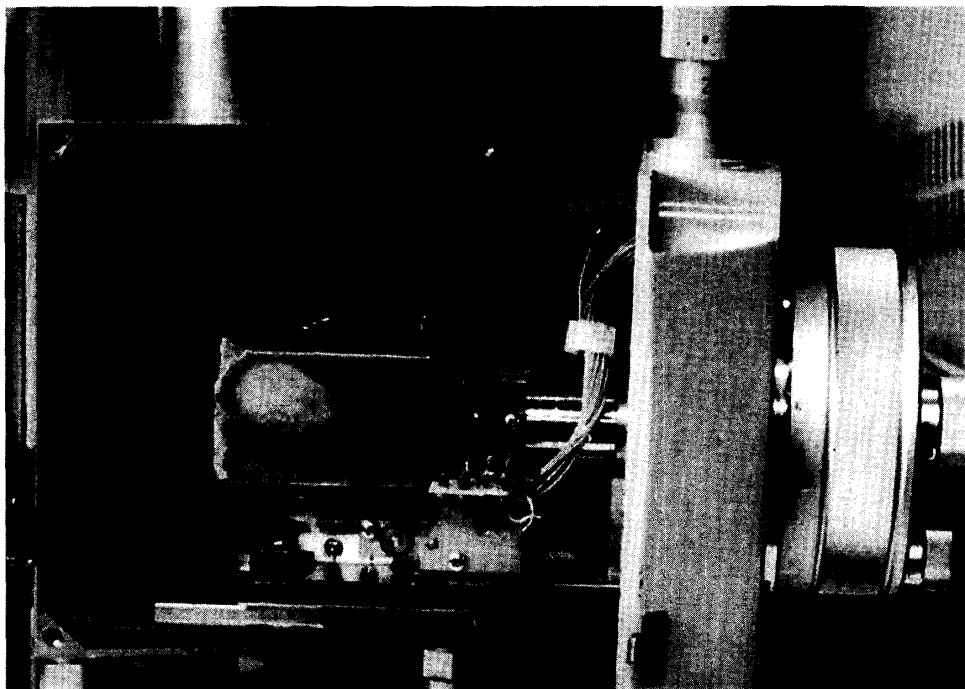


図3 真空カメラをつけた投影型X線顕微鏡

この方式による分解能は、X線源の大きさのほかに、試料のエッジで起こるフレネル回折が関係し、次のように表せる。

$$d = (d_x^2 + d_F^2)^{1/2} = (d_e^2 + d_s^2 + d_F^2)^{1/2}$$

ここで、 $d_x$ はX線源の大きさで、集束電子ビームの大きさ $d_e$ とターゲット内での広がり $d_s$ に分けて表せる。 $d_F$ はフレネル回折によるボケで、フレネル縞の第1ピークの半値幅を用いて、

$d_F = (b\lambda)^{1/2}$  と表せる。 $b$ はターゲットと試料までの距離、 $\lambda$ は波長である。生物試料には

波長1nm程度以上の軟X線が必要とされるので、100nmより良い分解能を1nmのX線で得ようとする、試料をターゲットに10 $\mu$ m程度あるいはそれ以下に近づけなければならない。強度の問題を別にすれば、電子線を10nm以下に絞ることは比較的容易なので、フレネル回折の方がむしろ厳しい制限である。図4は、2000本/mm、0.2mm厚の金の透過回折格子をテスト試料としてGeターゲット、10kVで得た像とその中心部の濃度曲線を示すもので、ターゲットと試料の間隔は50 $\mu$ mで直接倍率は750倍である。分解能として、濃度曲線の肩の立ち上がり幅の75%をとれば、75nmの分解能が得られていることが判る。

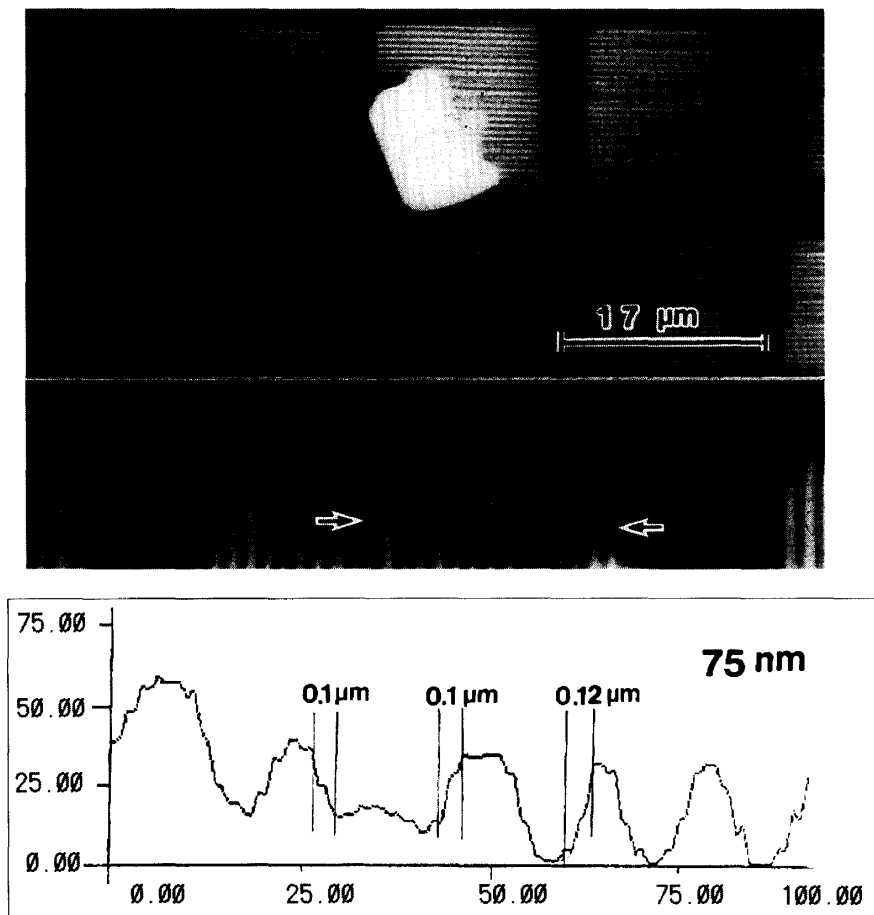


図4 2000本/mmの透過型格子を用いた分解能テスト (Geターゲット、10kV、直接倍率750)

他方、電子レンズで絞った場合、変換されるX線源の強度は、レンズの球面収差係数を $C_s$ とすると、 $P = k(Z)d_x^{11/3}C_s^{-2/3}V$ で表される。X線源の大きさ $d_x$ は望む分解能近くまでしか大きくできないから、 $C_s$ を極力小さくすることが必要で、この $-2/3$ 乗に比例する関係は、 $C_s$ の減少によって比較的有効にX線強度が増加することを示している。今後 $C_s$ の極めて小さいレンズを使用すべきことが示唆される。

投影X線顕微鏡の分解能をさらに改善する可能性としてフレネル回折の効果をウイナー・フィルターを用いる画像処理によって補正することがすでに筆者の一人によって試みられ、ある程度の効果を示し

た<sup>5,6)</sup>。ここでは、別の方法で行った画像処理の結果について述べる。

試料として弱位相物体を仮定するとその透過関数は、 $|\phi(x,y)| \ll 1$  で、試料下面での波動関数は

$$\psi(x,y) = 1 - \phi(x,y) \quad (1),$$

と表せる。いま、系の透過関数を $P(u,v)$ とすると、試料から $d_f$ だけ離れた像面で次の関係が成り立つ。

$$\psi'(x,y) = \psi(x,y) * FT[P(u,v)] \quad (2)$$

$$P(u,v) = \exp\{2\pi i \lambda d_f (u^2 + v^2)\} \quad (3)$$

ここで、\*はコンボリューション積分を、FTはフーリエ変換を表す。像の強度は、

$$I(x,y) = 1 - 2\phi(x,y) * FT[P_r(u,v)] \quad (4)$$

$$P_r(u,v) = \cos\{2\pi i \lambda d_f (u^2 + v^2)\} \quad (5),$$

ここで、 $P_r$ は $P$ の実部を表す。従って、像の強度のフーリエ変換は、

$$\begin{aligned} i(u,v) &= FT[I(x,y)] \\ &= \delta(u,v) - 2\phi(u,v)P_r(u,v) \end{aligned} \quad (6)$$

となり、これにフィルタリングを施して、

$$i'(u,v) = i(u,v) \frac{P_r(u,v)}{|P_r(u,v)|^2 + C} \quad (7)$$

これの逆フーリエ変換によって、焦点外れを補正した像が次のように得られる。

$$\begin{aligned} I'(x,y) &= FT^{-1}[i'(u,v)] \\ &= 1 - 2\phi(x,y) \end{aligned} \quad (8)$$

図5は、補正処理の1例を示すもので、(a)は自然乾燥をしたHeLa細胞のもとの像、(b)は画像処理を施したものである。試料の厚い部分の縁には明るくフレネル縞が残っているが、薄い部分では細かい構造がより鮮明になっていることが判る。

### 3. 細胞分裂各期におけるHeLa細胞の観察

#### 1) 自然乾燥による正常細胞

HeLa細胞の核の内部構造をそのまま光顕微鏡もしくは電子顕微鏡で観察することは困難である。その特徴を知るため、図6に、HeLa細胞の同じ視野について光顕微鏡(a)、X線顕微鏡(b)、電子顕微鏡(c)による比較を示す。核の内部構造がX線像で最も良くみられることが判る。図7は、細胞の別の例で、核の内部に紐状の構造がみられる。

5) K. Yada and S. Takahashi, Proc. 12th Int. Cong. X-ray Optics and Microanalysis, Krakow, Poland Vol. 1 181 (1989)

6) K. Yada and S. Takahashi, Proc. 3rd Beijing Conf. and Exhibition on Instrum. Analysis, Beijing, A7 (1989)

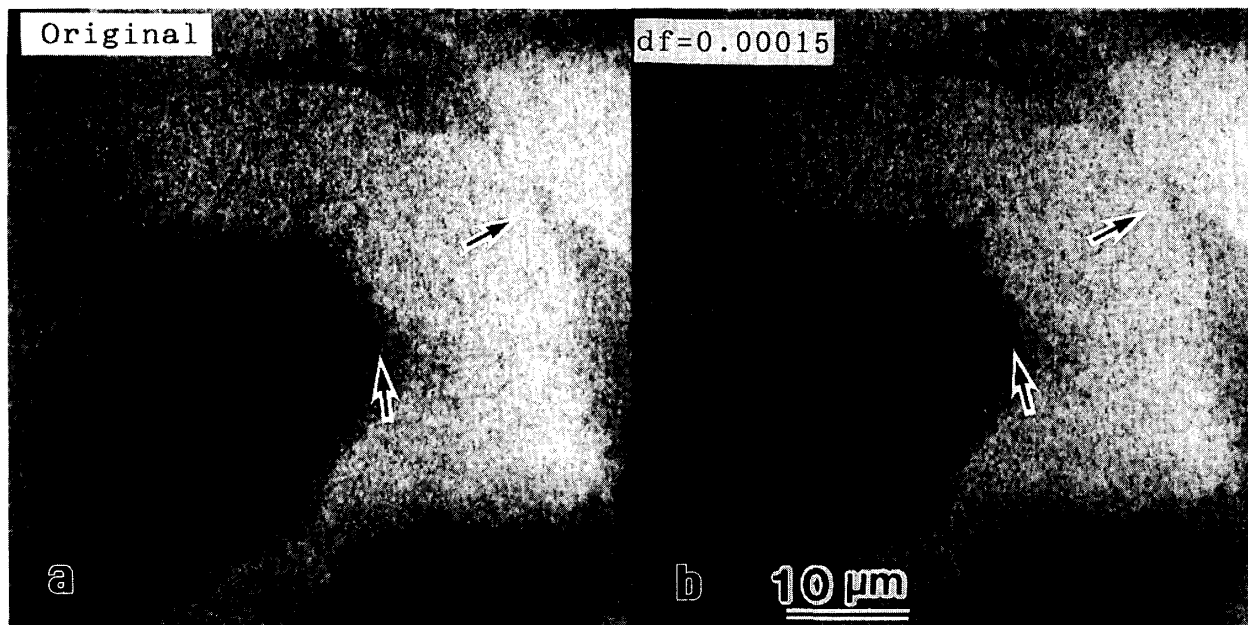


図5 HeLa細胞のX線像の画像処理 もとの像(a)、処理像(b)

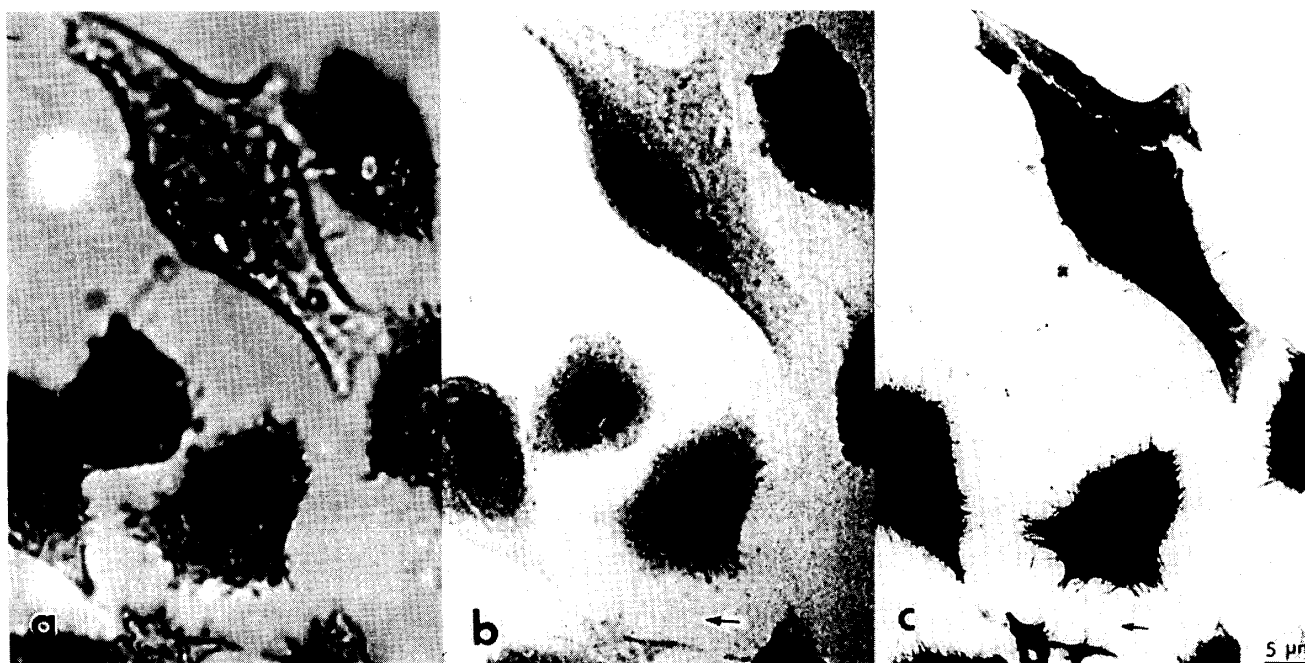


図6 HeLa細胞の光顕微鏡(a)、X線顕微鏡(b)、電子顕微鏡(c)による比較

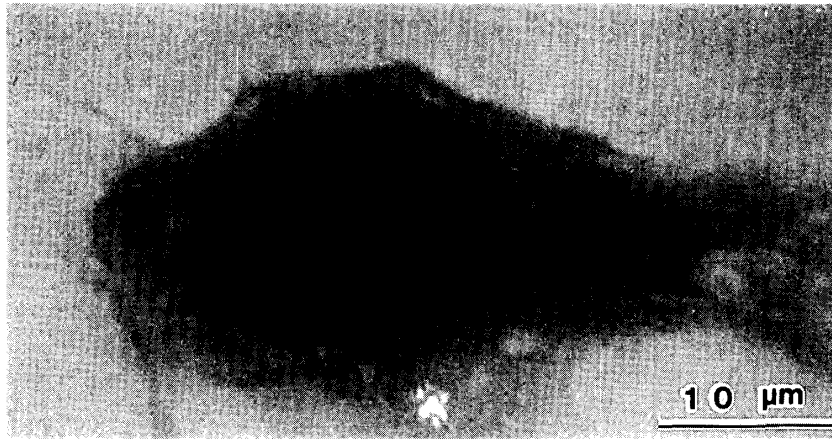


図7 自然乾燥をしたHeLa細胞の核の内部構造

## 2) 臨界点乾燥法によるHeLa細胞

図8は、臨界点乾燥によるHeLa細胞をターゲット及び電圧を変えて観察したもので、

- (a) : Geターゲット 0.5 $\mu$ m厚、 8kV、 10分露出
  - (b) : Alターゲット 4 $\mu$ m厚、 10kV、 5分露出
  - (c) : Alターゲット 4 $\mu$ m厚、 15kV、 3分露出
  - (d) : Auターゲット 0.2 $\mu$ m厚、 9kV、 6分露出
- の条件で撮られた。平坦な細胞体にはGeが最も良いコントラストを与え、Auは分裂期の丸い細胞の内部構造を見るのに適している。Alはその中間のコントラストを与えるが、必要なターゲットの厚さが4 $\mu$ mと厚く、X線の発生領域が広くなり、X線源が大きいため、分解能は劣ることが判る。

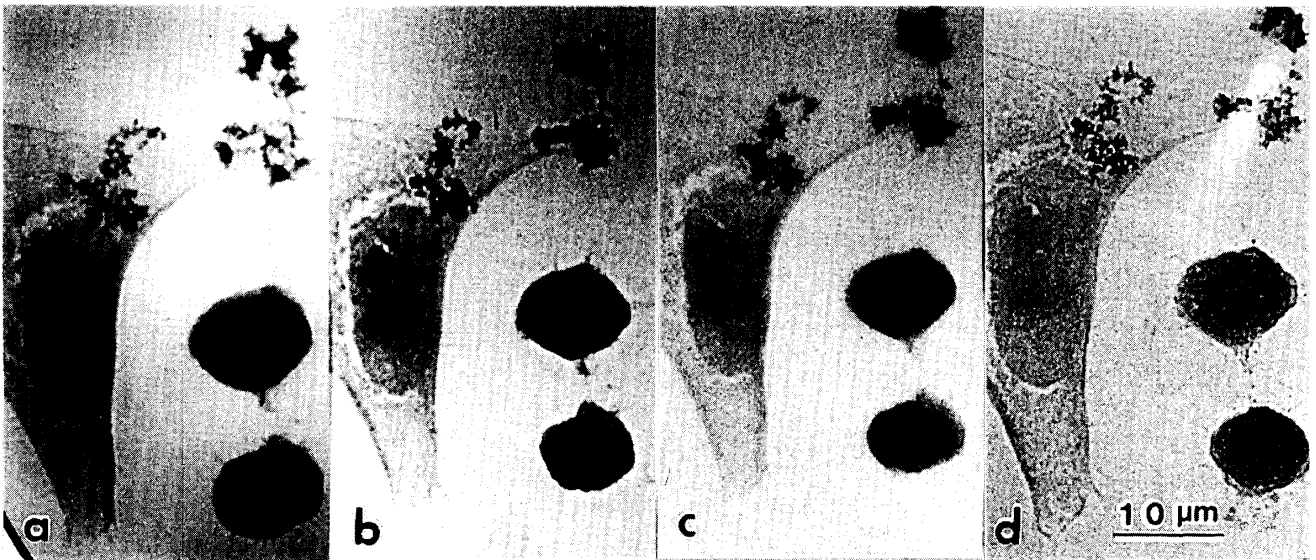


図8 ターゲットと電圧によるHeLa細胞のコントラストと解像度の比較



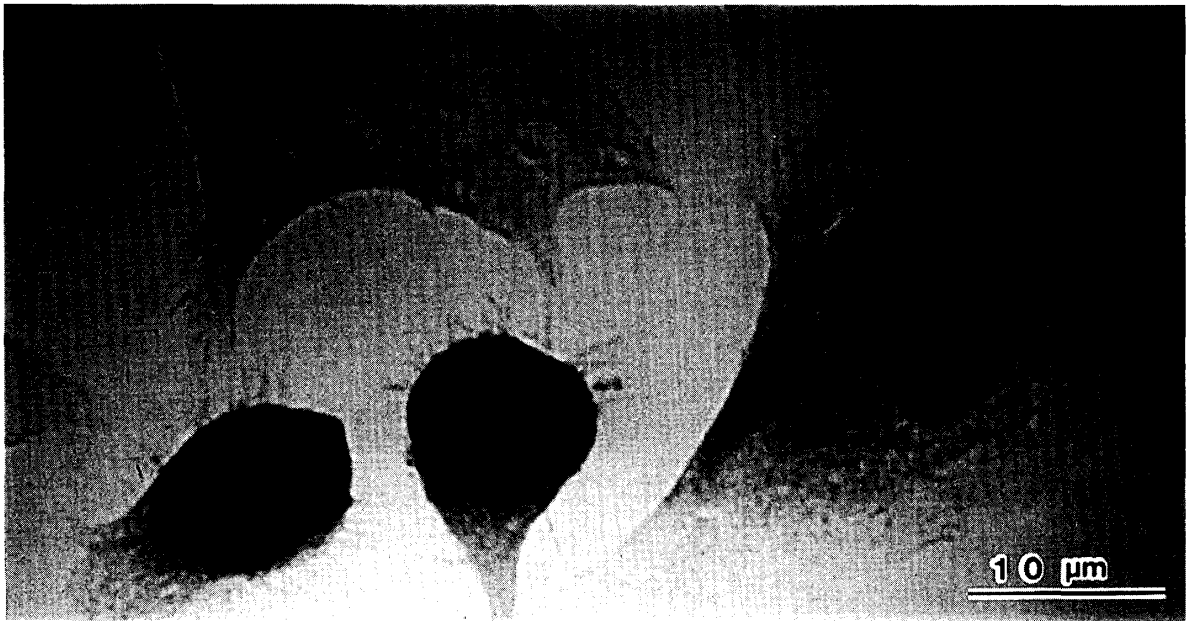


図9 Geターゲット、8kVで撮られたHeLa細胞

図9は、8kVの加速電圧でGeターゲットで得られたHeLa細胞の他の例である。平坦な細胞の核の構造や、分裂期の丸みをもつ細胞の内部構が見られる。

図10は、分裂期の球状のHeLa細胞の像である。内部構造の比較的ないもの、紐状の構造を示すもの、

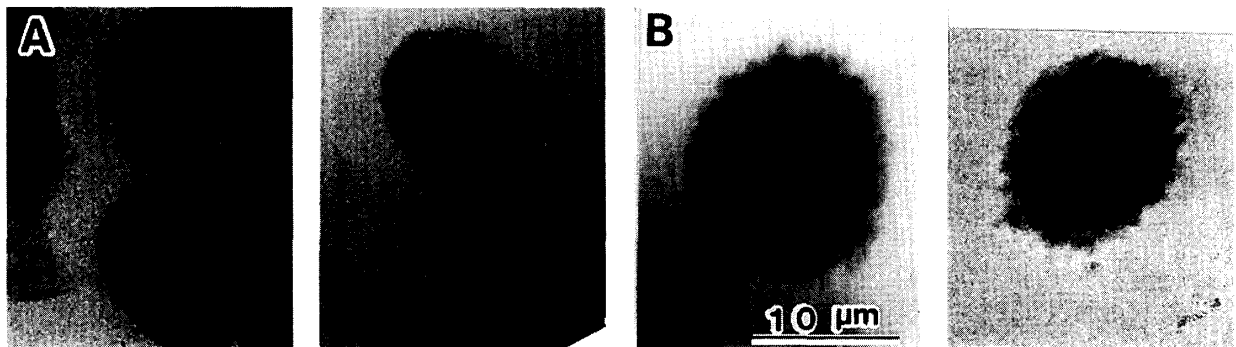


図10 分裂期にあるHeLa細胞の内部構造

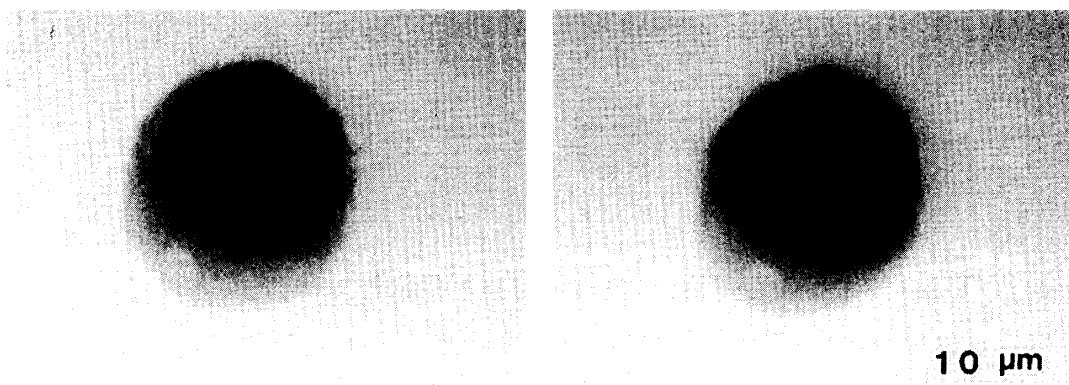


図11 分裂期にあるHeLa細胞のステレオ像

子午線状の構造を示すものなどが観察された。図11は、子午線状構造と白い斑点を示すもののステレオ像である。ステレオ観察から、白いところはくぼみであることが判る。線状構造は分裂期に現われるコントラクトイル・リングと思われる。

### 3) 共焦点顕微鏡とX線顕微鏡との比較

図12は、ノコダゾール(0.25g/ml)を用いた同調培養により分裂期の細胞を増加させた後、臨界点乾燥したHeLa細胞をコンフォカル・レーザー顕微鏡とX線顕微鏡で観察したものである。(a)はX線による

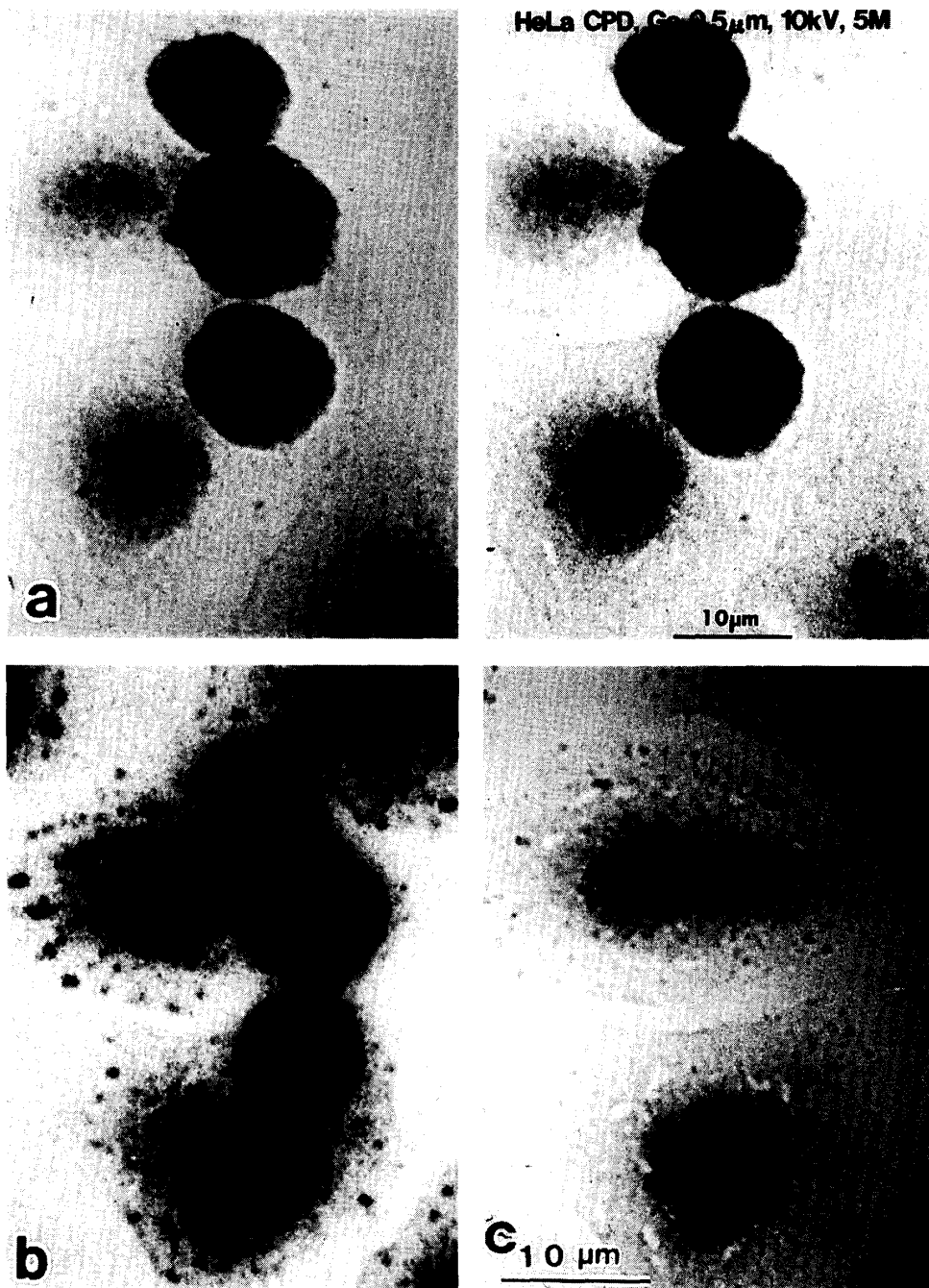


図12 共焦点顕微鏡像とX線像との比較 (a):X線ステレオ像、(b):共焦点顕微鏡像(再構成反転像)、(c):X線像(ここでは、球形の細胞3個が失われている)

ステレオ像で、平坦な細胞の核の立体感がよくでている。(b)はauto-fluorescenceによって輝いてみえる同じ場所のコンフォカル・レーザー顕微鏡による像の反転像、(c)は同じ場所のX線像である。(b)で黒く見える蛍光を出している部分は、ミトコンドリア内のニコチンアミド・アデニン・デニユクレオタイド(NADH)、リボフラビン、フラビン・コエンザイムによることが知られているので<sup>7)</sup>、細胞内のミトコンドリアがX線の吸収コントラストで識別されたことになる。

#### 4) ジンク・フォルマリン固定の効果

HeLa細胞の微細構造のコントラストを増加させることを狙って、グルタル・アルデヒドの代わりにジンク・フォルマリンによる固定を試みた。図13は、ジンク・フォルマリンで固定し、臨界点乾燥をしたHeLa細胞の典型的な例を示すもので細胞体と核のコントラストが改善されている。ただし、細胞体には小さい点状構造が散在しているように見える。この形態的な差異については今後更に調べることが必要である。

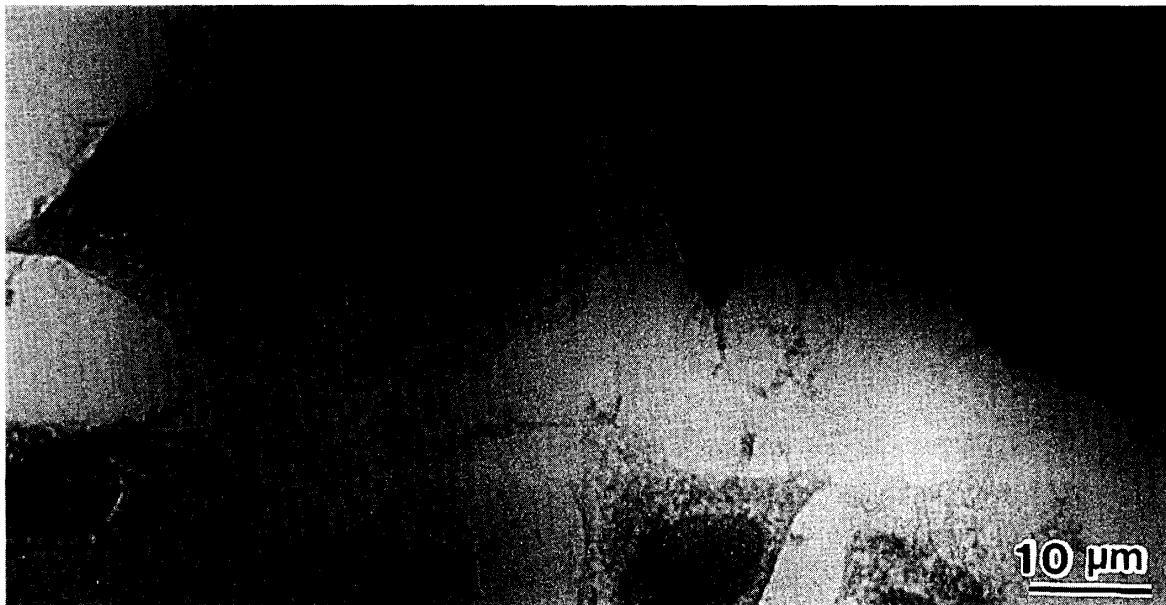


図13 ジンク・フォルマリン固定と臨界点乾燥をしたHeLa細胞のX線像

#### 4. まとめ

投影X線顕微鏡法は、ターゲット及び加速電圧を適切に選ぶことによって、光学顕微鏡よりかなり良い分解能(80nm)で無染色の生物試料の観察が可能で、ここではHeLa細胞について幾つかの新しい知見が得られた。しかし、現状では、X線強度が十分大きくとれないため長時間の露出を必要とするという欠点がある。将来、電子源、電子レンズ、検出器などが改善されれば、焦点深度が深く、立体観察ができる、視野が広いという利点を生かした実験室的装置として大きな役割を果たすことができるであろう。

7) J. E. Aubin, J. Histochem. Cytochem. 27 36 (1979)

う。画像処理によってフレネル回折の影響を軽減できれば、更に分解能を50nm程度まで向上することができるであろう。

## 謝辞

HeLa細胞の培養を長期間にわたって献身的に行ってくださった東京都臨床研放射線研究部門の中野久子氏に深く感謝します。

(1995年7月3日受理)