

走査型 X 線顕微鏡を用いた細胞イメージング
Cell Imaging Using Scanning X-ray Microscopy

松山智至¹, 志村まり², 藤井正輝¹, 脇岡敏之¹, 三村秀和¹, 佐野泰久¹,
矢橋牧名³, 西野吉則³, 玉作賢治³, 石川哲也³, 山内和人¹
S. Matsuyama¹, M. Shimura², M. Fujii¹, T. Wakioka¹, H. Mimura¹, Y. Sano¹, M. Yabashi³,
Y. Nishino³, K. Tamasaku³, T. Ishikawa³, K. Yamauchi¹
(¹大阪大学, ²国立国際医療センター, ³理化学研究所)
(¹Osaka Univ., ²IMCJ, ³RIKEN/SPring-8)
E-mail: matsuyama@prec.eng.osaka-u.ac.jp

X 線分析と X 線ナノビームを組み合わせた“ナノ X 線分析”は現在多くの放射光施設で活発に研究されており, すでにいくつかのビームラインではルーチン的な分析が行われている. 例えば, ナノ蛍光 X 線分析では, 試料走査によって試料内の元素マッピングを取得することが可能である. また, 良質で大きな結晶を作ることが難しいタンパク結晶に対しては微小領域であっても良質な部分のみにナノビームを照射し回折スポットを得ることが可能である.

X 線ナノビームを形成するためには X 線集光光学系が必要である. しかし, 可視光領域では簡単な光を集めるという行為は X 線領域 (特に硬 X 線領域) ではとても難しい. X 線領域での屈折率は極めて 1 に近く, 1 よりもわずかに小さい ($n=1.0-3.0 \times 10^{-5}$ Gold, @10keV). そのため, 単純なレンズやミラーでは X 線を集めることは難しい. 一般的に X 線を集光するためには回折現象を用いたフレネルゾーンプレートや全反射現象を利用した X 線ミラーが用いられている. とりわけ X 線ミラーは色収差がなく良集光効率であり, また, 比較的長い作動距離が可能であるという点からナノ X 線分析に適している. しかし, デメリットとしてミラーを作製する際に要求される形状精度が 1nm レベルと大変厳しく, 良質な集光ミラーを入手することは難しいのが現状である. (ただし, 最近では日本のベンチャー企業が X 線ナノ集光用の集光ミラーを商業ベースで作製している.)

大阪大学山内研究室では X 線ミラーの加工, 形状計測, 集光実験, 集光シミュレーションの研究を行い, 世界最高精度の X 線集光ミラーの開発を行ってきた. 得られた高精度 X 線集光ミラーを集光光学系として組込んだ走査型蛍光 X 線顕微鏡を開発し, これまで様々な試料の元素分布の可視化を行ってきた. 開発した X 線顕微鏡は高感度と高分解能を兼ね備えているため, 生物試料内の元素分布を観察するために最適である. 例えば, 抗がん剤耐性細胞の耐性メカニズム解明のために抗がん剤が細胞内にどのように分布しているのかを時系列的に調べたり, 骨髄細胞の分化の様子を元素分布という観点から調べるなど, 生物学的, 医学的に興味深い試料の観察を行ってきた. 現在, “より高い感度で”, “より高い分解能で”, 試料観察を行うために, “高密度な集光ビームを作るにはどうすればよいか?” と “10nm 以下の集光ビームを作るためにはどうすればよいか?” について検討を行っている.

高密度な集光ビームを作るためには幾何学的縮小倍率の大きな光学系を開発する必要がある. 縮小倍率の大きなミラーを設計するためには焦点距離を短くすればよい. しかし, 焦点距離の短い楕円ミラーを作ることは実は難しく, 世界中を見てもほとんど作製例はない. これは集光点に近いミラー領域の入射角が全反射の臨界角より大きくなってしまいうため単純な全反射ミラーでは作製することができないからである. これを解決するためには

多層膜コーティングが必要となってくる。

10nm 以下の集光ビームを作るためには開口数(NA)の大きな集光ミラーを作製すればよい。NA の大きな集光ミラーは焦点距離が短く、入射角が大きいという特徴がある。しかしどちらの条件をも満たすミラーというものは臨界角を超える入射角を持つミラー以外にありえず、結局、多層膜コーティングが必要という結論に達する。

ここで多層膜について簡単に説明したい。多層膜とは密度大の物質と密度小の物質が交互に積み重なった膜をいい、X 線は各界面で反射(全反射ではない)する。この場合、1 つの界面での反射は極めて効率が悪いが、数多くの界面で反射させ干渉させることで反射率を数 10%まで高めることが可能となる(ただし、色収差がある)。各界面からの反射光を干渉させるためにはブラッグ条件を満たすように多層膜の周期長を決定する必要がある。X 線ミラーは入射角分布を持つため多層膜の膜厚は分布を持たせるようにしなくてはならない点が難しい。

さらに、重要となる技術は、波面誤差計測技術と波面補正技術である。多層膜が必要なミラーは入射角が大きなミラーであると先ほど説明したが、入射角が大きくなればその分形状誤差が波面に与える影響は大きくなる。その結果、ミラー形状は 1nm 以下の精度で作製しなくてはならず、非常に困難であると考えている。さらに、多層膜の不具合で生じる波面の乱れは計測困難である。我々は、集光ミラーで X 線を集光した時に生じる集光ピークの乱れを精密に計測することで、それを用いて波面誤差を算出する手法を開発した。さらに、得られた波面誤差を補正するために形状可変ミラーを集光ミラーの前段に配置することを考えた。これによって、多層膜や基板形状の不具合によって波面が乱される場合でも、あえてその波面誤差をキャンセルするように形状可変ミラーを変形させ波面を歪ませることで、理想的な集光ピークが得られるようにすることが可能となる。このような補正技術は極限の精度で作製しなくてはならない大 NA を持つ多層膜集光ミラーのためには必要不可欠な技術であり、現在、その高精度化に向けた研究開発を行っている最中である。

本発表では、集光ミラーを搭載した走査型蛍光 X 線顕微鏡によって可視化された細胞内元素分布について報告し、さらに、10nm 以下の集光をめざす我々の最近の研究成果について報告する予定である。

References

1. X線ミラー作製に関する論文

H. Mimura et al., Efficient focusing of hard x rays to 25 nm by a total reflection mirror, *Applied Physics Letters* 90, 051903 (2007).

2. 細胞内元素分布に関する論文

S. Matsuyama et al., Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system, *X-ray Spectrometry* 38, 89 (2009).

3. 集光ピークから波面誤差を算出する手法に関する論文

H. Yumoto et al., At-wavelength figure metrology of hard x-ray focusing mirrors, *Review of Scientific Instruments* 77, 063712 (2006).

H. Mimura et al., Direct Determination of the Wave Field of an X-ray Nanobeam, *Physical Review A* 77, 015812 (2008).

4. 膜厚分布をコントロールして成膜する技術に関する論文

S. Handa et al., Highly accurate differential deposition for X-ray reflective optics, *Surface and Interface Analysis* 40, 1019 (2008).

5. 形状可変ミラーに関する論文

T. Kimura et al., Wavefront Control System for Phase Compensation in Hard X-ray Optics, *Jpn. J. Appl. Phys.* 48, 072503 (2009).