

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22611003

研究課題名（和文）X線顕微鏡によるヒルベルト微分像の観察と位相トモグラフィへの応用

研究課題名（英文）Observation of Hilbert differential image by x-ray microscope and its application to phase tomography

研究代表者

渡辺 紀生（WATANABE NORIO）

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：80241793

研究成果の概要（和文）：放射光施設 Photon Factory BL3C にゾーンプレート X線顕微鏡を構築し、5.4 keV で実験を行った。ゾーンプレート後焦点面にナイフエッジ走査フィルターを導入することによって、位相の定量的結像に成功した。ポリスチレン球を用いた位相トモグラフィ再構成では、標準偏差 5.4% で均質な再構成像を得ることが出来た。軟骨や植物の胞子がこの方法を用いてコントラスト良く 3次元観察可能であることを示せた。

研究成果の概要（英文）：An x-ray microscope with a zone plate was constructed using 5.4 keV x-rays from the synchrotron radiation source Photon Factory BL3C. A quantitative differential phase image was successfully obtained by introducing a scanning knife-edge filter at a back focal plane of an objective zone plate. In phase tomography, a reconstructed value of polystyrene beads was homogeneous in the standard deviation of 5.4%. Cartilage and spores of plants could be observed in 3 dimensions with good contrast.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2013年度			
2014年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：X線結像光学

科研費の分科・細目：医学物理学・放射線技術学

キーワード：X線、顕微鏡、位相計測、トモグラフィ

1. 研究開始当初の背景

X線は波長が短いので原理的に可視光と比較して高い分解能が期待でき、また可視光に対して不透明な試料でも観察できる。また、電子顕微鏡のような切片作成の処理が必要無いので、X線顕微鏡は光学顕微鏡と電子顕微鏡のギャップを埋めるものと期待されている。エネルギー数 keV の X線では空気に対する透過力が高く、試料回りの制約がほとんど無いという利点があるが、それだけ試料の

コントラストが付きにくいという欠点がある。この領域では、特に軽元素の位相変化が吸収に比べて数桁高い値を持つので、吸収コントラストで観察するよりも位相コントラストによる観察法が適している。そこで位相コントラスト観察法として、位相差顕微鏡、干渉顕微鏡、微分干渉顕微鏡などが開発されてきた。

位相差顕微法は、光学顕微鏡において Zernike によって提案された。この方法を同

じ原理でX線領域に応用したものがX線位相差顕微鏡である。位相差顕微鏡の欠点は、微細な位相変化に対する感度は高いが周辺にハローと呼ばれるアーティファクトが伴ったりすることから、位相の絶対測定には使えないということである。このため、試料を透過するX線の位相変化の絶対量が必要なトモグラフィーには原則的に使用することが出来ない。位相差像を投影像としてトモグラフィーの再構成計算はできるが、再構成像は試料のエッジ部分の強調された像となり試料本来のものからは異なったものになってしまう。

X線干渉顕微鏡を用いれば位相変化の絶対量の測定が可能であるが、それには非常に干渉性の良いX線源が必要となり、SPring-8のような第三世代放射光施設のX線アンジュレーターでなければ実験が不可能である。その他、ホログラフィーやコヒーレント散乱を用いた位相再構成法も開発されているが、同様に非常に空間コヒーレンスの高い光源を必要とする。位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡の場合にはそれほど光源の干渉性を必要としないので、Photon Factoryのような第二世代放射光光源の偏向電磁石光源でも実現可能である。このような比較的lowコヒーレンス光源でも位相の絶対量の測定が可能となれば、X線顕微鏡の生物・医学等への応用がより一層広がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ゾーンプレートX線顕微鏡を用いて3次元位相トモグラフィーを実現することにある。そのために、ゾーンプレート後焦点面に空間周波数フィルターを導入することによって、定量的な微分位相結像を実現する。

電子顕微鏡による位相結像の研究では、対物レンズ後焦点面に半平面型 π 位相板を置くヒルベルト微分法 (R. Danev et al., *J. Biol. Phys.*, 28, 627, 2002) やシュリーレンナイフエッジを置く微分位相結像法の報告がある。これらの方法は、比較的lowコヒーレンスな光源を用いたX線顕微鏡でも実現可能と考えられる。

これらの方法をX線顕微鏡に適用・最適化することによって微分位相像を得て、3次元位相再構成の可能な光学系の作成を目的とする。

3. 研究の方法

(1) X線顕微鏡光学系

放射光施設 Photon Factory の偏向電磁石光源 BL3C において、ゾーンプレートを結像素子として用いたX線顕微鏡を開発した。図1にその光学系を示す。2結晶分光器からの5.4 keV X線を試料に照射し、ゾーンプレ

トによってCCDカメラ (浜松ホトニクス C4742, CCD47-10, pixel size 13 μm) 上に結像した。ゾーンプレートは広い視野を確保するために主に直径 330 μm のゾーンプレート1を用いた。この場合、光学系の全長から倍率が48倍に制限されるため、分解できる線幅は0.3~0.4 μm であった。ゾーンプレート2を用いると倍率を207倍まで上げることが可能なため、図1に示すように0.1 μm 線幅まで分解結像できた。

(2) 空間周波数フィルター

平行照明系を用いると若干空間分解能が悪化するという欠点はあるが、試料のフーリエ変換パターンがゾーンプレートの後焦点面上にできるため、その振幅・位相に変調を加えることにより図2に示すように比較的容易に種々の位相コントラスト観察法を適用できるという利点がある。X線エネルギーは5.4 keVを用いており、X線が厚さ3 μm のアルミ箔を透過すると位相がちょうど $\pi/2$ 変化する。そこで、このアルミ箔にピンホールを図2(b)のように開けて試料からの直接光を通せばZernike型の位相差顕微鏡となる。また、図2(c)のように位相が π 変化する厚さ6 μm のアルミ箔のエッジを直接光の集光点に置くと、ヒルベルト微分干渉顕微鏡となる。さらに、図2(d)のようにX線を通さないエッジ (実験では直径250 μm のAuワイヤーを用いた) を集光点に置けば、シュリーレン像を得ることができる。

図2(a)~(d)にそれぞれの光学系で得られたマホガニーのX線像を示す。図2(a)の明視野像ではほとんどコントラストが付かないが、それ以外の方法では高いコントラ

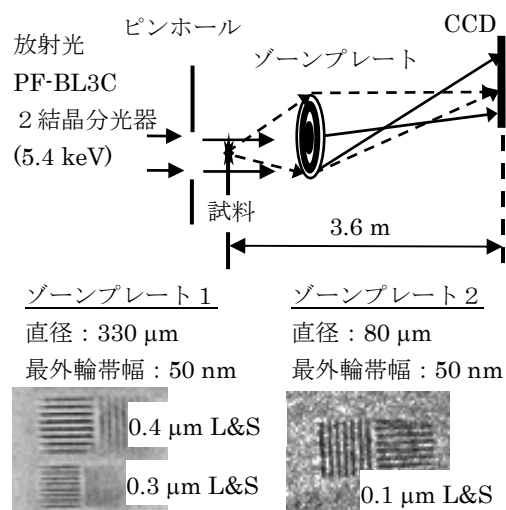


図1 X線顕微鏡光学系と用いたゾーンプレートの仕様、およびそれぞれのゾーンプレートによるテストパターンの像(5.4 keV)。

トで観察できている。微小な部分のコントラストでは図2 (b) の位相差法が優れているが、位相の定量性の面ではナイフエッジを用いた図2 (d) が優れている。

ナイフエッジを用いた位相再構成法では、ナイフエッジを互いに逆方向に露光中走査して得られた2枚の像から位相を再構成する方法が電子顕微鏡において開発されている (K. Nagayama, J. Phys. Soc. Jpn 73, 2725, 2004)。そこで、本研究ではこの方法をX線顕微鏡に適用することを行った。

(3) ナイフエッジ走査フィルターによる微分位相結像

図3 (a) にナイフエッジ走査フィルターを示す。実験では、直径 250 μm の Au ワイヤ

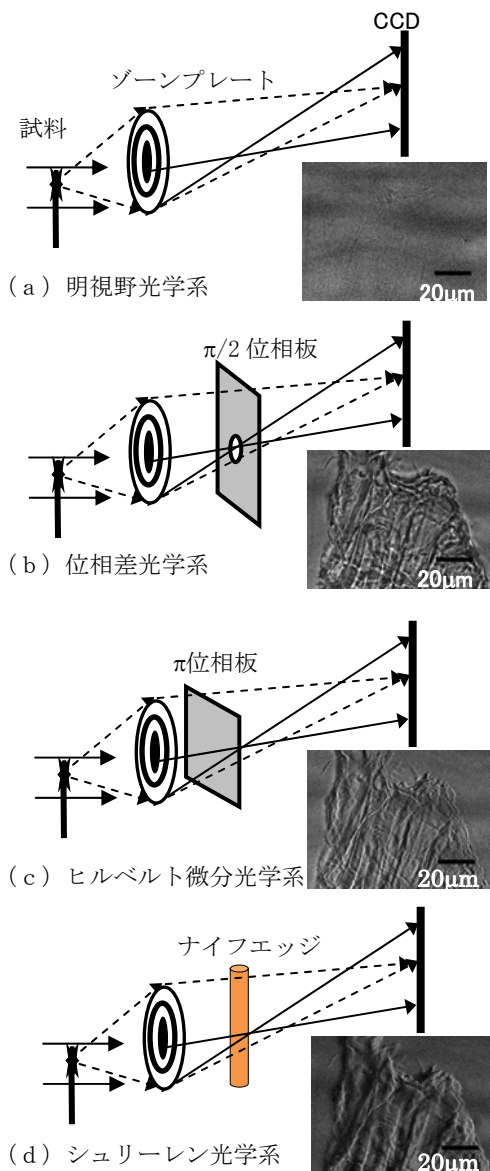


図2 X線顕微鏡による位相コントラスト結像法と、それぞれの光学系による木材 (マホガニー) のX線像 (5.4 keV)。

をエッジとして用いた。ゾーンプレートの後焦点面には試料のフーリエ変換パターンが出来るので、後焦点面での位置は試料の空間周波数に対応している。露光中にエッジを一定速度で $-S$ から S まで走査すると、時間平均した透過率は図3 (b) のように $-S$ から S まで直線的に変化する。ここで、原点は空間周波数0に対応したゾーンプレート後焦点を意味する。また、 S は試料の空間周波数で表したエッジの位置である。 $-S$ から S まで露光中に走査して得た像を I_+ 、それとは逆方向に S から $-S$ まで露光中に走査して得た像を I_- する。このとき、試料に含まれている空間周波数が $-S$ から S までに限定されていると仮定するならば、微分位相像は以下の式で計算できる (N. Watanabe, et al., to be published in Journal of Physics: Conference Series)。

$$d\phi(n) = 2\pi Sd \left(\frac{I_+(n) - I_-(n)}{I_+(n) + I_-(n)} \right)$$

ここで、 n はピクセルの位置であり、 d は試料のサンプリングピッチである。 d はゾーンプレート1を用いた場合 CCD のピクセルサイズ 13 μm を光学系の倍率 48 倍で割った 270 nm に対応している。走査範囲 S はサンプリングピッチ d に対応するナイキスト周波数程度 (この光学系では 30 μm に対応する) 広くとった方が理論上は忠実に位相再構成できるが、像のコントラストは走査範囲が狭い方が高い。図4に直径 25 μm のアルミワイヤを走査範囲を変えて撮像した結果を示す。走査範囲が狭い方が高いコントラストが得られていることがわかる。図4 (d) はそれぞれの微分位相像を微分方向に積分して位相に直し、直線的な位相勾配を補正して表示したアルミワイヤの位相プロファイルである。点線のプロファイルは Henke のテーブル (http://henke.lbl.gov/optical_constants)

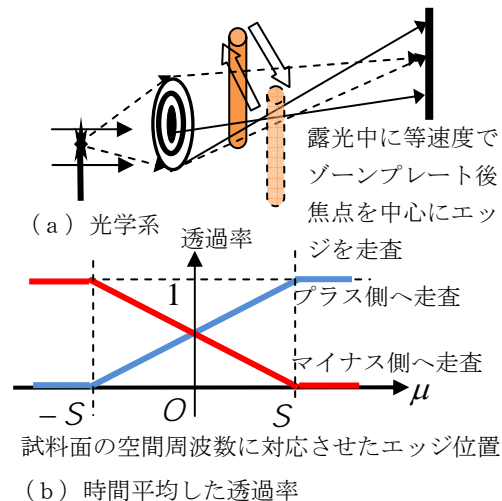


図3 エッジ走査フィルターによる微分位相像の記録方法

/)から計算した値であり、かなり近い値が再構成出来ていることがわかる。走査範囲が狭いと空間周波数の高い部分が忠実に再構成されなくなるため、若干再構成位相値が低下した。

この測定では、互いに逆方向の2回のエッジ走査間の位置ずれが $1 \mu\text{m}$ 以下でもかなり明瞭な位相勾配が発生した。エッジ位置精度の向上及び位相勾配の補正方法の課題は今後の課題である。

4. 研究成果

(1) 位相トモグラフィーの方法

位相トモグラフィーでは、位相勾配の問題を解消するために10投影ごとに試料を抜いたブランク画像を撮像し、それを基準として各投影像の微分位相像を計算した。試料を回転させながら360投影/360度または180投影/180度の微分位相像をエッジ走査フィルターを用いたX線顕微鏡により記録し、位相微分像からFBP法によって直接再構成を行った。

(2) ポリスチレン球による再構成像の評価

直径30 mmと10 mmのポリスチレン球をガラスキャピラリーに入れたものを試料として、位相再構成画像の評価を行った。エッジ走査幅は $\pm 10 \mu\text{m}$ とし、4 sの露光を2回行って微分投影像を得た。360投影/360度のデータから再構成した結果を図5に示す。図5(a)は3Dレンダリング像、図5(b)はその断面像である。図5(b)のポリスチレン球中央部分の再構成値は $\delta = 7.4 \times 10^{-6}$ となった。ここで、屈折率は $n = 1 - \delta + i\beta$ であり、 δ は屈折率実部の1からのずれを表す。この値をHenkeのテーブルから計算した値と比較す

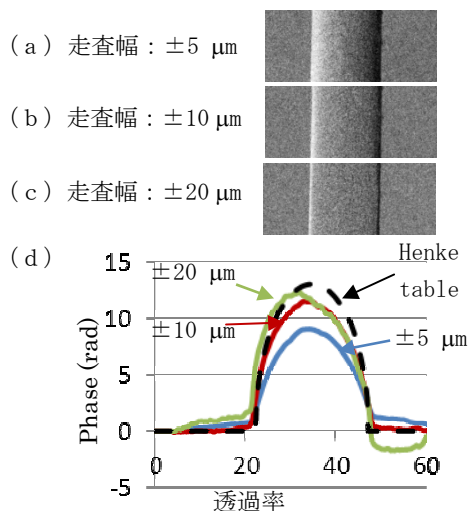


図4 アルミワイヤー (直径 $25 \mu\text{m}$) の走査幅 (a) $\pm 5 \mu\text{m}$ 、(b) $\pm 10 \mu\text{m}$ 、(c) $\pm 20 \mu\text{m}$ での微分位相像と (d) 再構成位相プロファイル。

ると、11%小さな値であった。エッジ走査範囲が狭いために若干小さな値になったことが考えられる。また、図5(b)の四角で囲った領域の再構成値の標準偏差は5.4%であり、均質な領域がかなり均質な値として再構成できていることが示された。

(3) 生物試料の観察例

エッジ走査フィルターを用いた位相トモグラフィーを生物試料に適用した例を図6に示す。図6(a)はt-BuOH凍結乾燥したニワトリ軟骨の断面位相像である。図6(b)は節足動物であるアルテミアの耐久卵の断面位相像である。また、図6(c)はフタホシコオロギの触角の位相再構成データの3Dレンダリング像である。いずれも試料の内部までコントラスト良く観察できていることがわかる。

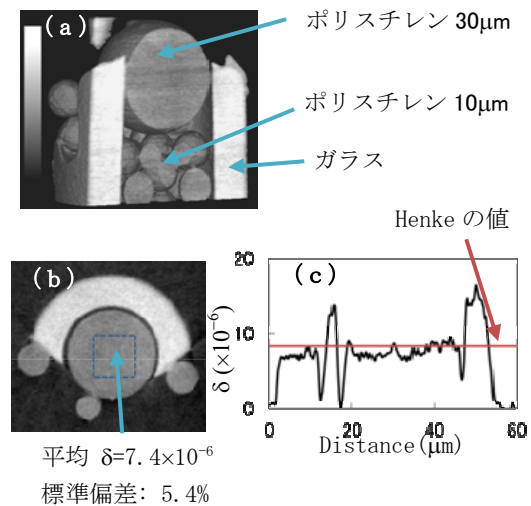


図5 ポリスチレン球の再構成像。(a) 3Dレンダリング像、(b) 断面像、及び(c) その白ラインにそった屈折率 δ のプロファイル。

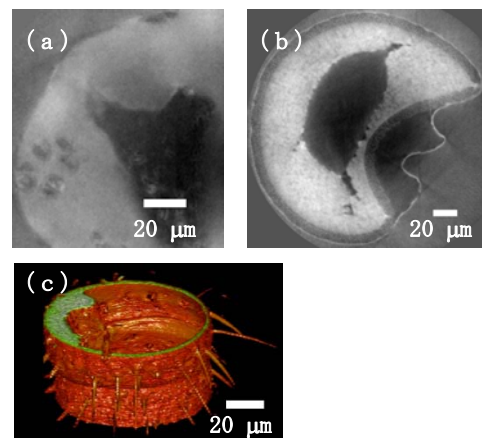


図6 生物試料の観察例 (a) ニワトリ軟骨の断層像、(b) アルテミア耐久卵の断層像、(c) コオロギ触角の3Dレンダリング像。

ここまでのデータはすべて図1に示したゾーンプレート1を用いたデータであった。図7にゾーンプレート2を用いて同様のエッジ走査フィルターを用いた微分位相結像による位相トモグラフィーを植物（ヒカゲノカズラ）の胞子に適用した例を示す。

ゾーンプレート2では、直径が1/4となるにともなって焦点距離も1/4となるため、フィルター走査範囲も同様に狭くする必要がありエッジ走査は±2 μmで微分位相像を取得した。図7(a)および(c)はその再構成断層像と3Dレンダリング像であり、図7(b)は比較のために撮影した位相差顕微鏡（図2(b)の光学系）でのトモグラフィー再構成結果である。位相差像からのトモグラフィー再構成では表面のエッジが強調されて内部が上手く再構成出来ないが、微分位相像からの再構成では内部まで良く再構成出来ていることがわかる。

このように、X線顕微鏡にエッジ走査フィルターを適用することによって定量的な微分位相像の結像が可能となり、位相トモグラフィーによる3次元位相再構成が可能となった。

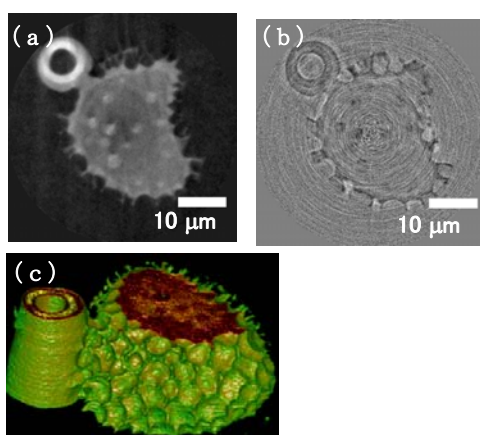


図7 ヒカゲノカズラ胞子に位相再構成像。
(a) および (c) はエッジ走査フィルター微分位相再構成による断層像および3Dレンダリング像。(b) は図2(b)に示した位相差光学系によるトモグラフィー再構成断層像。結像系にはゾーンプレート2を用いた。

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2件)

①N. Watanabe, J. Hashizume, M. Goto, M. Yamaguchi, T. Tsujimura, S. Aoki, Differential phase microscope and

micro-tomography with a Foucault knife-edge scanning filter, Photon Factory Activity Report 2011 #29, 査読無, 2012, B417.

<http://pfwww.kek.jp/pfacr/>

②N. Watanabe, T. Sasaya, Y. Imai, S. Iwata, K. Zama, and S. Aoki, Observation of Phase Objects by Using an X-ray Microscope with a Foucault Knife-Edge, AIP Conf. Proc., 査読有, 1365, 2011, pp.313-316.

〔学会発表〕(計13件)

①渡辺紀生, 橋爪惇起, 伍堂公浩, 山口真史, 青木貞雄, ゾーンプレートX線顕微鏡を用いた位相トモグラフィーの定量化、第60回応用物理学学会春季学術講演会、2013年3月28日 神奈川工科大学

②渡辺紀生, 橋爪惇起, 伍堂公浩, 山口真史, 青木貞雄, エッジ走査フィルターを用いたX線顕微鏡による位相CT、第26回日本放射光学会年会、2013年1月13日 名古屋大学

③渡辺紀生, 橋爪惇起, 伍堂公浩, 山口真史, 辻村貴幸, 青木貞雄, フーコーナイフエッジ走査フィルターを用いた位相結像の定量化、第73回応用物理学学会学術講演会、2012年9月12日、愛媛大学

④N. Watanabe, J. Hashizume, M. Goto, M. Yamaguchi, T. Tsujimura, S. Aoki, Differential phase microscope and micro-tomography with a Foucault knife-edge scanning filter, The 11th International Conference on X-ray Microscopy, August 5-10, 2012, Shanghai, China

⑤渡辺紀生, X線顕微鏡の現状と将来への展望、北海道大学・高エネルギー加速器研究機構連携シンポジウム、2012年3月29日、高エネルギー加速器研究機構

⑥渡辺紀生, 辻村貴幸, 橋爪惇起, 伍堂公浩, 山口真史, 青木貞雄, ゾーンプレートX線顕微鏡を用いた高分解能微分位相結像、第59回応用物理学関係連合講演会、2012年3月18日、早稲田大学

⑦渡辺紀生, 橋爪惇起, 辻村貴幸, 岩田俊治, 座間啓介, 青木貞雄, ゾーンプレートX線顕微鏡による位相トモグラフィー、第25回日本放射光学会年会、2012年1月7日、鳥栖市民文化会館

⑧渡辺紀生, 橋爪惇起, 辻村貴幸, 岩田俊治,

座間啓介, 青木貞雄、結像型 X 線位相コントラスト顕微鏡法、第 11 回 X 線結像光学シンポジウム、2011 年 11 月 5 日、東北大学

⑨橋爪惇起、辻村貴幸、渡辺紀生、細川好則、青木貞雄、マイクロ X 線 CT システムの開発と評価、第 11 回 X 線結像光学シンポジウム、2011 年 11 月 5 日、東北大学

⑩渡辺紀生、橋爪惇起、辻村貴幸、岩田俊治、座間啓介、青木貞雄、ゾーンプレート X 線顕微鏡による生物試料の位相コントラスト観察、第 72 回応用物理学会学術講演会、2011 年 8 月 30 日、山形大学

⑪渡辺紀生、岩田俊治、座間啓介、今井祐介、青木貞雄、ゾーンプレートを用いた硬 X 線顕微鏡によるヒルベルト微分像からの 3 次元再構成、第 24 回日本放射光学学会年会、2011 年 1 月 10 日、つくば国際会議場

⑫渡辺紀生、岩田俊治、座間啓介、今井祐介、青木貞雄、フォーナイフエッジを用いた X 線顕微鏡による位相物体の観察、第 71 回応用物理学会学術講演会、2010 年 9 月 15 日、長崎大学

⑬N. Watanabe, T. Sasaya, Y. Imai, S. Iwata, K. Zama, and S. Aoki, Observation of Phase Objects by Using an X-ray Microscope with a Foucault Knife-edge, The 10th international conference on x-ray microscopy, August 15-20, 2010, Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 紀生 (WATANABE NORIO)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：80241793