

第1章

§ 1. はじめに

顕微法においては、観察の目的に最も適した手法を用いることが重要である。現在手にすることができる顕微法によって、生物試料がその機能に必要な構造や分子組成を保っているそのままの状態を、分子レベルの高空間分解能で実時間観察することは非常に難しい。電子顕微鏡は、空間分解能がオングストロームオーダーに達しており、試料の超ミクロな観察に適しているが、試料の固定、超薄切片、重原子修飾などの過程を経なければならないので、厳密には「生きたまま」の観察とはいえない。光学顕微鏡の場合は、生きている生物試料をそのまま観察でき、取扱が容易であるという利点はあるが、空間分解能は可視光の波長によって制限されるので、分子レベルの空間分解能を得ることは不可能である。X線回折法は、原子またはそれに近い空間分解能で、良質の3次元像を得ることができるが、試料がかなり大きな結晶や配向繊維のような非生物学的な形態でなければならないという欠点があり、実時間観察することも難しい。最近実用化された走査型トンネル顕微鏡は、空間分解能が非常に高く原子レベルの観察に大変優れているが、生物試料の分子レベルあるいは巨視的な観察には不向きである。

波長が10~100Åの軟X線を顕微鏡の光源として用いれば、これらの制約を避けることができる。まず、波長が分子の大きさと同程度なので原理的に分子レベルの空間分解能が得られる。吸収の断面積の大きさが、透過法を用いて厚さが数μm程度の細胞をそのまま観察するのに適した大きさである。また、吸収端を利用した差分法を用いれば無染色で特定の原子の空間分布をコントラスト良く検出できる。さらに、波長を23~44Åに限れば、水溶液中の試料の観察が可能である。このように、軟X線顕微鏡は生きた生物試料を高空間分解能で観察できる顕微鏡としてその実用化が待たれている。

顕微鏡像を実時間観察するには、光学素子を使って試料を直接拡大、結像することが最も有効である。軟X線領域で現在用いることができる結像素子には、ゾンプレート、斜入射鏡、多層膜反射鏡などがある。これらの素子の開発は、超LSIという産業界の要求によって進んできた。ゾンプレートの分解能の向上は、電子ビームリソグラフィにおけるマスクパターンの微細加工技術の進歩に

よってなされてきた。マスクパターンの転写には現在紫外線による縮小投影法が使用されているが、回折効果によってパターンの線幅が限界に達しつつあり、近い将来はX線リソグラフィーの導入が必要であると考えられている。多層膜反射鏡は、転写の際のX線縮小露光光学系に有効な結像素子であり、超精密加工技術と薄膜製作技術の進歩によってその実用が可能となりつつある。

軟X線用の結像素子では、ゾンプレートが現在最も高い空間分解能を得ているが、回折を利用した光学素子であるので、効率が低いことや照明光には単色性が必要であるなどの短所も持っている。シンクロトロン放射光は、その高輝度性、波長選択性、パルス特性、光源位置と強度の安定性など従来のX線源にない優れた特長を持っており、X線源としての地位は揺るぎないものとなっている。さらに、より高輝度の挿入型光源の開発が相次ぎ、X線光源の主流になりつつある。特に、アンジュレータ光の高輝度、準単色性、波長可変性などの特長は、ゾンプレートの短所を十分に補うことができると考えられる。さらに、ゾンプレートもアンジュレータ光も軸対称性を持っているので、両者間の整合性が良いという利点もある。

本研究では、アンジュレータ光を光源に用いゾンプレートを結像素子に用いた軟X線顕微鏡の開発を進めてきた。本論文は、五つの章から構成される。第1章では、軟X線顕微鏡の研究の歴史と現在の研究状況をレビューする。第2章では、軟X線の性質とゾンプレート及びアンジュレータ光の諸性質を公式を用いて要約する。第3章は、アンジュレータ光の高次光とゾンプレートの正負の回折次数が織りなす複雑な像形成を幾何光学と波動光学の双方を使って解析した結果と、それを実証する実験について述べる。本研究の主役である軟X線顕微鏡の開発については第4章で詳しく述べる。アンジュレータ光とゾンプレートを結像型顕微鏡に応用した世界で初めての試みである。

§ 2. 軟X線顕微鏡の歴史と現状¹⁾

X線は、1895年にレントゲン(W. Roentgen)によって発見された。X線の高い物質透過能は、それまで不可能だった不透明物質の内部構造の観察を可能にしたため、その応用は医学を中心に急速に広まった。

最も古く、また最も簡単なX線顕微法は、顕微照射法(microradiography)で

ある。これは、現在の密着顕微法 (contact microscopy) の原型である。X線感光体を試料の後方に接近させて置き、それにX線を照射し現像したものを光学顕微鏡で観察する方法である。この方法の空間分解能は、写真乾板と光学顕微鏡の分解能で制限されていた。エングストローム (A. Engström) らは、いくつかの波長で照射するという定量的な方法を開発し、試料の質量と基本構成物質の分布を測定した²⁾。X線レジスト (X線感受性高分子) の開発は電子顕微鏡による観察と相まって高分解能を実現し、現在は密着顕微法と呼ばれ最も高分解能のX線顕微鏡像を得ている。

投影拡大法 (projection microscopy) は、X線像を拡大する最初の方法である。これは、微小点光源から発散するX線を幾何学的に拡大するもので、試料はX線源の直後に置きその透過像を写真乾板に投影する。分解能は、X線源の大きさと回折の効果によって決まる。1950年代には、この方法は広く用いられ、コスレット (V. E. Cosslett) らは投影拡大法を発展させ実用化した³⁾。

X線顕微鏡の発展を妨げていた一つの要因は、強度の高い線源がなかったことである。しかし、1960年代に入ってから電子シンクロトロン放射光科学が発展し、顕微鏡の光源としても利用されはじめた。シンクロトロン放射光を用いた最初の顕微鏡は、ホロヴィツ (P. Horowitz) とハウエル (J. A. Howell) が建設した走査型顕微鏡である。分解能はコリメータに用いた直径1~2 μ mのピンホールによって決まり、試料の前方に斜入射集光器を置いてフラックスを上げる工夫もした⁴⁾。

斜入射鏡を結像素子として利用する研究も行なわれていた。カークパトリック (P. Kirkpatrick) とバエズ (A. Baez) は円筒鏡または凹面鏡を組み合わせた斜入射顕微鏡を提案している⁵⁾。実際の応用には期待した結果が得られなかったが、その概念はX線のビームラインや天体望遠鏡の設計に現在も活かされている。ウォルター (H. Wolter) は、1つの焦点を共有する回転双曲面と回転楕円面からなる全反射X線顕微鏡を提案したが⁶⁾、非球面の研磨技術がなく実現には至らなかった。また、バエズはゾンプレートを用いて軟X線を結像させる研究に着手し、金を吸収体に用いたゾンプレートを製作して紫外線を結像させた⁷⁾。しかし、分解能は20 μ mと非常に低いものであった。

以上のように、X線顕微鏡の試みは1940年代後半から1960年代前半にかけて精力的に行なわれてきたが、技術的な限界により光学顕微鏡の分解能を越えること

ができなかった。しかしながら、80年代に入ってから超精密、超微細加工技術の著しい進歩と、大型放射光源の建設により、高空間分解能のX線顕微鏡の開発が可能になった。

現在軟X線顕微鏡に実際に応用されている光学素子には、斜入射鏡とゾンプレートがある⁸⁾。これらの素子を結像素子に用いるのが結像型、集像素子に用いるのが走査型顕微鏡である。結像型顕微鏡は、直接に拡大像が得られることや実時間観察が可能などの長所を持っており、走査型顕微鏡には、デジタル像なので定量評価が容易であることや試料の放射線損傷を最小にできるなどの長所がある。

斜入射鏡を用いた軟X線顕微鏡では、鏡面の形状精度と表面粗さの問題で、分解能は炭素K α 線(44Å)を用いたとき約0.5 μ mである⁹⁾。波長が短くなると表面粗さの影響が大きくなり、分解能は悪くなってしまう。斜入射鏡は集光効率が比較的高く、入射X線を必ずしも単色化する必要がないので実験室規模の光源との組合せに適している。

ゾンプレートの製法には、紫外線レーザーを用いたホログラフィー法と電子ビーム描画法がある。現在は電子ビーム描画法が主流である。Göttingenのグループはホログラフィー法によるゾンプレートの開発を20年ほど前からはじめ¹⁰⁾、シンクロトロン放射光を光源に用いた500Åの分解能を持つ結像型軟X線顕微鏡をBESSYに開発した¹¹⁾。彼らは金と銀の2種類の位相板を用いた位相差顕微鏡も開発した¹²⁾。さらに、走査型顕微鏡の開発もほぼ並行して進めており、分解能は0.1 μ mに達している¹³⁾。われわれのグループは、PFのアンジュレータ光を光源としNTTの開発したゾンプレートを結像素子に用いた軟X線顕微鏡の開発を進めており、乾燥状態の試料の拡大像を約3000Åの分解能で得ている¹⁴⁾。SUNYのグループは、IBMで開発されたゾンプレートをを用いて、750Åの分解能を持つ走査型軟X線顕微鏡を開発した¹⁵⁾。また、King's Collegeのグループは、コンタミネーション法で作ったゾンプレートをを用いて800Åの分解能を持つ走査型軟X線顕微鏡をSRFに開発した¹⁶⁾。このように、ゾンプレートをを用いた軟X線顕微鏡の分解能は、現在1000Å以下に達し、生物学的に興味のある知見が得られるであろうと言われている100Åの分解能に近づくつつある。

References

1) X線顕微法のレビューとして、次の文献を挙げる。

J. Kirz and H. Rarback: *Rev. Sci. Instrum.* 56(1985)1.

M. Howells, J. Kirz, D. Sayre and G. Schmahl: *Physics Today* 38(1985)22. (邦訳 永井喜則、木原裕: *パリティ* vol. 1, No. 4(1986)4.

S. P. Newberry: in X-Ray Microscopy-Instrumentation and Biological Applications, ed. by P. C. Chen and G. J. Jan (Springer, Berlin 1987) p. 346.

2) A. Engström: *Acta Radiol. Suppl.* 63(1946)1.

3) V. E. Cosslett and W. C. Nixon: *Nature* 168(1951)24.

4) P. Horowitz and J. A. Howell: *Science* 178(1972)608. ; P. Horowitz: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 306(1978)203.

5) P. Kirkpatrick and A. V. Baez: *J. Opt. Soc. Am.* 38(1948)766

6) H. Wolter: *Ann. Phys.* 10(1952)94.

7) A. V. Baez: *J. Opt. Soc. Am.* 51(1961)405.

8) 最近のX線顕微法に関する研究は、国際会議「X-Ray Microscopy」のプロシーディングスとして出版されている。X-Ray Microscopy, ed. by G. Schmahl and D. Rudolph (Springer, Berlin 1984); X-Ray Microscopy-Instrumentation and Biological Applications, ed. by P. C. Chen and G. J. Jan (Springer, Berlin 1987); X-Ray Microscopy II, ed. by D. Sayre, M. Howells, J. Kirz and H. Rarback (Springer, Berlin 1988)

9) S. Aoki: in X-Ray Microscopy II, ed. by D. Sayre, M. Howells, J. Kirz and H. Rarback (Springer, Berlin 1988) p. 102.

10) G. Schmahl and D. Rudolph: *Optik* 29(1969)577.

11) B. Niemann, D. Rudolph and G. Schmahl: *Nucl. Instr. Meth.* 208(1983)367.

12) G. Schmahl, D. Rudolph and P. Guttman: in X-Ray Microscopy II, ed. by D. Sayre, M. Howells, J. Kirz and H. Rarback (Springer, Berlin 1988) p. 228.

13) B. Niemann, P. Guttman, R. Hilkenbach, J. Thieme and W. Meyer-Ilse: in X-Ray Microscopy II, ed. by D. Sayre, M. Howells, J. Kirz and H. Rarback (Springer, Berlin 1988) p. 209.

14) Y. Kagoshima, S. Aoki, M. Kakuchi, M. Sekimoto, H. Maezawa, K. Hyodo and M. Ando:
Rev. Sci. Instrum. 60(1989)2448.

15) H. Rarback, D. Shu, S. C. Feng, H. Ade, J. Kirz, I. McNulty, D. P. Kern, T. H. P. Chang,
Y. Vladimirovsky, N. Iskander, D. Attwood, K. McQuaid and S. Rothman: Rev. Sci.
Instrum. 59(1988)52.

16) G. R. Morrison, S. Bridgwater, M. T. Browne, R. E. Burge, R. C. Cave, P. S.
Charalambous, G. F. Foster, A. R. Hare, A. G. Michette, D. Morris, T. Taguchi and
P. J. Duke: Rev. Sci. Instrum. 60(1989)2464.