

**エッジ強調型軟X線位相差顕微鏡**  
 -炭素K吸収端近傍の光学特性の活用-

(JST「さががけ」<sup>1</sup>、オリンパス<sup>2</sup>、ICU<sup>3</sup>、シカゴ大学<sup>4</sup>、ブタペスト経済工科大<sup>5</sup>、東工大<sup>6</sup>)

○池滝 慶記<sup>1,2</sup>、アンドリュー ドモンドン<sup>3,4</sup>、ナンドール ボコル<sup>5,6</sup>

【序】 生きた生物試料を高解像で観察できることは、生物顕微鏡に求められる不可欠な機能である。現在、様々な顕微鏡法が提案されているが、完全にこれを満たすものはない。例えば、電子顕微鏡は極めて高い空間分解能を提供するが、試料を凍結乾燥させる。また、光学顕微鏡は生きた生物試料を簡便に観察できるが、空間分解能やコントラストで十分でない。近年、空間解像度を向上させる試みも始まっているが、化学的染色を行うので、生命活動に影響を与える。以上の軟X線顕微鏡法の課題を解決するために、エッジ強調型軟X線位相差顕微鏡法を提案する。すなわち、本顕微鏡法は、wet な試料に光損傷を与えることなく、しかも高感度で生体分子の空間分布像を提供できる。本研究では、生体分子の炭素K吸収端近傍の光学特性を考察し、提案する顕微鏡法の画質に関して定量的に考察する。

【炭素K吸収端近傍の光学特性】 生体試料は有機分子から構成されるが、それら分子は特徴的な吸収スペクトルをもつ。炭素の1s電子が $\pi^*$ 軌道に共鳴遷移するので、極めて強いシャープな共鳴線が炭素K吸収端の長波長側に観測される。図1は、アミノ酸分子であるトリプトファン<sup>1</sup>の複素屈折率を示す。それによれば、1s電子のイオン化閾値よりも長波長側の4.35nmに極めて強い共鳴吸収線が存在する。この共鳴線に着目すると、極めて強い異常分散を誘導する。青い曲線は、クラマース-クロニッヒ変換法により求めた屈折の実部( $\delta$ )を示す[1]。図1によれば、 $\delta$ の振幅がマイナス側に最大に変化する波長、すなわち波長4.36nmでは、 $\beta$ がゼロとなり吸収が無い。

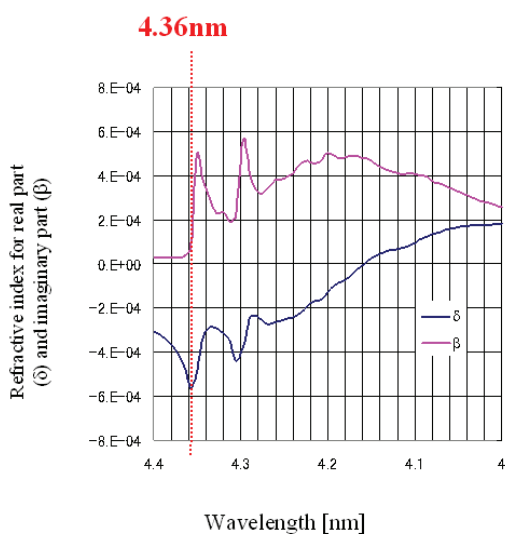


図1 炭素K吸収端近傍のトリプトワンの光学定数

すなわち、この波長では、殆どの炭素化合物に対して透明であり、試料は光損傷を受けることなく軟X線に大きな位相遅れを与える。従って、この波長で位相差顕微鏡法を適用すれば、高感度かつ高い分解能で位相差像が得られる。しかも、水に対しても透明なり、生きたwet な生体試料を観察できることを意味する。すなわち、顕微鏡法として理想的な性能を提供しうる。

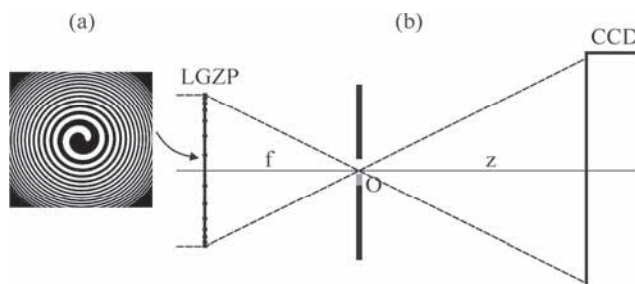


図2 エッジ強調型軟X線位相差顕微鏡法の原理

【位相差検出法】提案するエッジ強調型軟X線位相差顕微鏡法の原理を図2に示す[2]。図2によれば、単色の平面波の軟X線でラゲール・ガウシアンゾンプレート (LGZP) (a) を照明する。一方、LGZP を通過したゼロ次回折光は試料を照明する。1次の回折光をピンホール (b) を有する焦点面に集光することで、LG 螺旋波に変換する。その際、1次のドーナツビームに重ならない様に試料をピンホールの内部に置く。CCD は、物体から距離  $z$  だけ離れたところに置く。もし、Fraunhofer 回折の条件を満たすことができる様に物体から十分離れていれば、CCD のパターンは、物体のフーリエスペクトルと発散した LG 球面波の干渉波となる。従って、このパターンを逆フーリエ変換すると、エッジ強調された試料の位相差顕微鏡像が得られる。

【結果と考察】 図3に示すモデル位相物体に対して、提案する顕微鏡法による画質をシミュレーションした。表1に計算条件を示す。モデル位相物体は、入射光に対して  $2\pi/150$  だけ位相シフトした2領域をもつ (図3では異なる濃度レベルで表示した)。図4は物体のシミュレーションで得られた顕微鏡画像である。明らかな様に、提案する顕微鏡は、光路  $\lambda/150$  という極めて微小な位相ステップでも高いコントラスト画像を提供できることがわかる。さらにモデル位相物体のもつ精細で等方的なエッジ強調画像も再生できている。トリプトファンの屈折率を考慮すると、 $2\pi/150$  の位相差は 60nm のサイズの結晶に相当する。「水の窓」に属する波長を用いた従来の吸収法を用いた顕微鏡では、コントラストは 0.02 にも満たない。従って、提案方法の感度の高さが際立っている。本結果より、エッジ強調型軟X線位相差顕微鏡法が、他の生物光学顕微鏡では実現できないような分解能と感度を有していることが解る。

表1 計算条件

設計波長： $\lambda$	4.36nm
LGZP 径 (横方向)	0.14mm
LGZP 焦点距離： $f$	1mm (NA=0.07)
LGZP ゾーン数	600
ピンホール径	15 $\mu$ m
試料サイズ	7.5 $\mu$ m
物体- CCD 間の距離： $z$	6cm
CCD 画素サイズ	17 $\mu$ m
CCD 撮像面サイズ	8.4mm
CCD 有効画素数	512x512

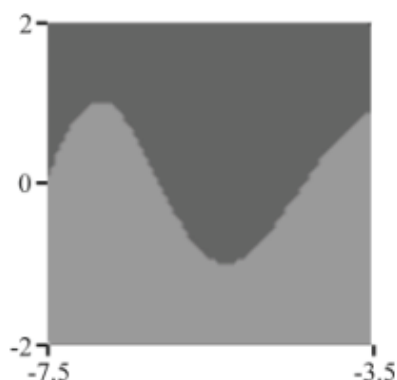


図3 テスト位相差パターン:位相差= $\pi/150$

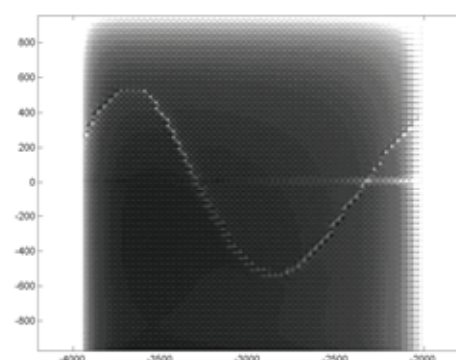


図4 エッジ検出像

- [1] A.Domondon , Y. Iketaki ,K. Nagai , Y. Sato and T. Watanabe, IEEJ Trans., **127** (2007) 1340  
 [2] N. Bokor, and Y. Iketaki, Opt. Exp., **17**(2009) 5533.