

最近の技術から

密着 X 線顕微鏡法による生物試料の観察

富江 敏尚・清水 秀明・眞島 利和・三浦 永祐・金山 敏彦・山田 雅弘

電子技術総合研究所 〒305 つくば市梅園 1-1-4

1. 生物試料の高分解能 X 線観察と フラッシュ露光

電子顕微鏡では、試料の固定、乾燥、薄片化が必要のため、生きた生物試料は観察できない。一方、『水の窓』領域の X 線 (波長 2.4~4.3 nm) を用いれば、酸素による吸収が炭素のその 1/10 と小さく、蛋白質や脂質などほとんどが炭素からなる生物試料が、多量の水 (酸素) を含んだ状態、つまり生きた状態で観察できる。

高分解能の像を得るためには、統計雑音を小さくするために多くの光子数 N が必要である。分解能 δ 、試料の吸収係数 α 、検出器効率 η_D のとき、 $N/\delta^2 \sim 16/(\alpha^2 \delta^4 \eta_D)$ である¹⁾。必要な光子密度が δ^{-4} で急激に増大する。50 nm の構造を波長 3 nm の X 線で観察する場合を考え、 $\eta_D=0.1$ と仮定すると、 $N/\delta^2 \sim 4 \times 10^{14}/\text{cm}^2$ である。エネルギー密度に換算すると 25 mJ/cm² になる。単位体積あたりでは数百 J/cm³ になり、試料の受ける放射線損傷は甚大である。

試料による X 線吸収は不均一であり、より多く吸収した部分の膨張により構造変形が生じる。本来の構造の観察には、変形前に露光を終了させる必要がある。数十 ps 程度との計算²⁾もあるが、もっと長くて良い可能性もある。しかし、数十 ns よりは長くないであろう。

2. レーザープラズマを用いた密着法

レーザープラズマの X 線源としての特性は文献³⁾を参照いただきたいが、ピーク輝度では SR 光より数桁も高く⁴⁾、フラッシュ露光に適している。それでも、高分解能観察に要求される X 線光子数を ns 程度で得るのは容易でなく、なるべく広い角度・スペクトル幅の X 線を損失なしで利用する必要がある。この目的には、記録材料に試料を密着させて影を等倍率投影する密着法が適している。

図 1 に密着法の実験配置図⁵⁾を示す。エネルギー数 J、パルス幅 ns 程度のレーザー光を真空中で固体標的に 100 μm 程度に集光しレーザープラズマを生成する。

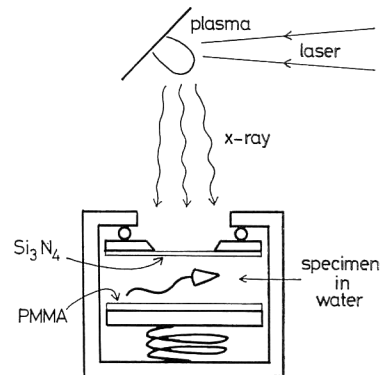


図 1 密着型 X 線顕微鏡法の実験配置図⁵⁾。

X 線窓 (0.1 μm 以下の膜厚の窒化シリコン薄膜) と記録材料 (X 線レジスト PMMA) で生物試料を含んだ溶液を挟み、パルス X 線を照射する。プラズマの距離を数 mm にすると、試料上で 100 mJ/cm² の X 線フラックスが得られる。

照射後、試料を洗い流してレジストを現像すると、溶解速度が照射 X 線量に依存するので、試料の透過率分布がレジスト上の凹凸パターンとなって現れる。

3. 原子間力顕微鏡による X 線像の 拡大読み出し

レジスト上に等倍率で記録された X 線像の拡大を電子顕微鏡で行う場合、電子ビームによるレジストの損傷などが深刻である。読み出された像の信頼性に対する疑いがつきまとっていたが、この問題は、原子間力顕微鏡 (AFM) の使用⁵⁾で解決できた。AFM で拡大読み出したウニの精子の X 線像⁵⁾を図 2 に示す。頭と、フラジェラと呼ばれる直径が 0.25 μm 程度の精子のシッポとが撮っている。頭部には、内部構造を反映する凹凸も見られる。

フラジェラ内部には 40 nm 径の微小管が 11 本あるが、バラバラになった微小管の X 線像も得られている¹⁾。レジストの同一箇所を何十回となく読み出しているが、読み出し像に変化はない。注意を払えば、原子間力顕微

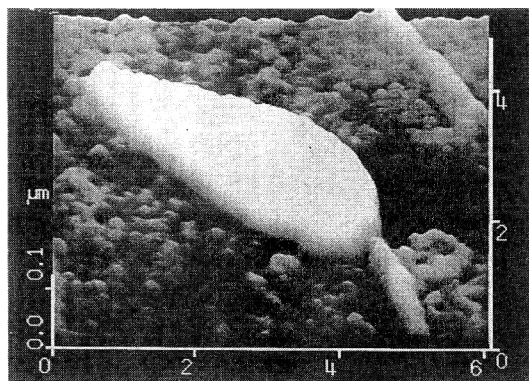


図2 ウニの精子のX線像⁵⁾

鏡読み出しによるレジスト損傷はほとんど問題にならない。

AFM利用のもう一つの重要な利点は、凹凸の高さが精度よく読み出せるので、光学顕微鏡や電子顕微鏡ではできない密度の定量的評価ができることである。現像深さから透過X線量が評価でき、試料の吸収率が求まる。この手法により、フラジェラ内部の蛋白等の密度が評価できている⁵⁾。

4. 結像法と密着法の比較

X線光学素子がないので面倒なフォーカス調整が不要である。回折ボケがあっても数十nmの分解能は可能である。露光領域が数百 μm と広いので、ある程度の試料密度があれば窓枠内に確実に試料のX線像が見出せる。実際にも、溶液の厚みの制御に若干の不確定要素があるが、かなりの歩留まりでX線像が得られている。

このように密着法に多くの利点があるが、光学素子を用いた結像法でフラッシュX線像が得られればという願いもある。しかし、それは極めて困難のようである。

数nm X線が数十nmに絞れるゾーンプレートが作られるようになっているが、焦点距離が波長に依存するため、十分な分解能を得るにはX線のスペクトル幅を0.2%程度に狭くしなければならない、回折効率はせいぜい10%程度と低い。大きな集光立体角のゾーンプレートを作製するのが容易ではない。それやこれやで、かなり理想的な場合でも、ゾーンプレートでは、密着法の場合の 10^{-4} 程度のX線しか利用できない。

反射光学系は広帯域、高反射率であり、原理的にはフラッシュ露光も期待できる。しかし現実には、斜入射光学系は収差が大きいため、高分解能が容易でなく、集光立体角も小さい。多層膜を施せば入射角度が大きくて

きるので収差がかなり低減されるが、短波長化が困難であり、スペクトル幅も数%に狭くなる。

分解能数十nmを求めると、結像法では生きた生物試料の観察は難しい。しかし、分解能を少し落とせば、必要な光子数は激減し許容露光時間も長くなり、フラッシュ撮影や、さらには、複数回のストロボ撮影も可能になる。分解能はそれほどでなくとも、X線の元素、状態選択性を活かせば多くの応用があるだろう。特に、有機物より遥かに放射線耐力が高い無機材料への応用が有望である。

5. 今後の課題

レジストの解像度、半影ボケ、ショットノイズ、回折ボケ、AFMのチップ先端形状などで制限されるが、密着法の分解能として数十nmが現在得られており、今後の技術の進歩で、10nm程度も夢ではなからう。

X線顕微鏡技術が本格的に進歩するには、多くの生物学研究者がX線顕微鏡法を採用することが必須である。彼等に魅力を知ってもらうために、X線顕微鏡法の有用性を幾つかデモンストレーションする必要がある。X線顕微鏡法で生きた状態が見えることの重要性に誰も異論はなからうが、まだ生物学的に重要な情報は報告されていない。われわれは、光学顕微鏡でも電子顕微鏡でも見られていない構造をX線像に見出しており、また、今までは計算しなかった部位の密度が実験的に評価できている。今後は、別の手法も駆使しながら、これらの生物学的意味を明らかにしていく予定である。また、誰でもが容易にアクセスできる装置の開発も必要である。

文 献

- 1) T. Tomie, *et al.*: "Flash contact X-ray microscopy of biological specimen in water," *Proc. SPIE*, **1741** (1992) 118-128.
- 2) R. A. London, M. A. Rosen and J. E. Trebes: "Wavelength choice for soft X-ray laser holography of biological samples," *Appl. Opt.*, **28** (1989) 3397-3404.
- 3) H. Kondo and T. Tomie: "Optimization of a laser-plasma X-ray source for contact X-ray microscopy," *J. Appl. Phys.*, **75** (1994) 3798.
- 4) 富江敏尚, ほか: "X線顕微鏡とその応用", *応用物理*, **61** (1992) 682-689.
- 5) T. Tomie, *et al.*: "Three-dimensional readout of flash X-ray images of living sperm in water by atomic-force microscopy," *Science*, **252** (1991) 691-693.

(1994年4月28日受理)