

投影型軟 X 線顕微鏡による生体試料観察

伊 藤 敦

Observation of Biological Specimens with Soft X-Ray Projection Microscopy

Atsushi ITO

Soft X-ray microscopy has advantages over other microscopies in 1) observation of thick specimen under hydrated environment, 2) higher resolution than optical microscope, and 3) element and chemical bond mapping using absorption edges of elements and chemical bond specific absorption peaks in XANES (X-ray absorption near edge structure). Among several types of the microscopes, projection microscopy has unique features for the observation of biological specimens, including easy extension to 3D observation such as stereo imaging and CT and zooming up against objects to be observed. In the present minireview, after brief summary of soft X-ray microscopy, I surveyed the historical view of the projection microscopy, summarized the typical images of biological specimens, and presented a new approach using synchrotron radiation as an X-ray source.

Key words: soft X-ray microscopy, projection microscopy, biological specimen, stereo imaging, synchrotron radiation

1. X 線顕微鏡の特徴

光学顕微鏡は細胞において、核、ミトコンドリア、リソソームなどのオルガネラによって構成される細胞内微細構造を明らかにした。これらはマイクロメートル前後のサイズをもつ。それでは、その内部構造を知るにはどの程度の分解能が必要であろうか。染色体の構造を例にとると、染色分体の太さは約 $0.7 \mu\text{m}$ 、それらにはループ状にのびた構造 (約 $0.3 \mu\text{m}$) がパックされている。ループを作る構造体は、 30 nm 径のクロマチンファイバーとよばれる。クロマチンファイバーはヒストンコアに DNA が巻き付いた 11 nm 径のヌクレオソーム (beads-on-a-string 構造とよばれる) がパックされて構成される。このように染色体には各段階での特徴的な構造が存在し、それが一定の様式で折り畳まれてより高次の構造を形作る。ここで示された $0.7 \mu\text{m}$, $0.3 \mu\text{m}$, 30 nm , 11 nm のように、いわゆる超分子

構造は 10 nm からサブミクロンにわたり、この領域を形態ごと、できれば細胞内に存在する状態で観察することが、構造と機能を理解するうえで重要である。

光学顕微鏡の最大分解能は、 $0.3\sim 0.4 \mu\text{m}$ とされる。蛍光顕微鏡技術の発展により、これ以下の分解能で対象の存在部位を検出することは可能となったが、その形態を明らかにすることは、より波長の短い X 線顕微鏡に期待される。したがって、X 線顕微鏡観察の第 1 の特徴は、光学顕微鏡が対象とするような比較的厚い試料の高分解能観察にあるといえる。

X 線顕微鏡の第 2 の特徴として、試料の X 線吸収スペクトルにおいて観察される元素の吸収端を利用して、元素分布を画像化できること、さらには元素吸収端近傍に観察される X 線吸収端微細構造 (X-ray absorption near edge structure: XANES) における共鳴ピークが化学結合特異的 (したがって分子特異的) であることを用いて分子分布

の画像化が可能であること、があげられる。このように X 線領域における試料の吸収特性を利用した高分解能の元素および分子分布観察は、スペクトロマイクروسコピーとよばれ、X 線顕微鏡独自のものである。

X 線の長波長領域の軟 X 線 (約 0.1 nm から 10 nm) は、細胞のような、生体組織に比べれば比較的“薄い”試料に適した透過度をもつこと、X 線光学素子の開発が波長の短い硬 X 線に比べて先行していること、生体試料において大部分を占める軽元素の吸収端が存在する、などの点で、生物試料観察のための X 線顕微鏡としての開発も進んでいる。本稿では、生物観察に利用されている軟 X 線顕微鏡の光学系および観察例を概観した後、筆者らが試みている投影型顕微鏡について解説する。

2. 軟 X 線顕微鏡のタイプと特徴

2.1 光学系

表 1 に、生物試料観察に主に用いられる軟 X 線顕微鏡の形式をまとめた¹⁻¹⁴⁾。

現在欧米で最もよく用いられているのは、軟 X 線領域の

集光素子であるゾーンプレートを利用した結像型顕微鏡¹⁵⁾、およびゾーンプレートによって作られたマイクロビームを用いて、試料上を走査することにより画像を再構成する走査型¹⁶⁾である。いずれも分解能はゾーンプレートの性能に依存し、現在、約 20 nm の分解能をもつゾーンプレートが用いられている。結像型は光学顕微鏡と同様の光学系を採用していることから、位相差顕微鏡の試みもある。顕微鏡としてのシステムもこの 2 方式は最も整備が進んでいる。すなわち、水を含む試料のための試料室、光学顕微鏡を組み込むことによる観察部位の位置決めシステム、観察に伴う放射線損傷を最小限にするための急速凍結装置、などである。

これらに対し、密着型、投影型は、現状で分解能は及ばないが (密着型の一部を除く)、独自の特徴をもっている。密着型は性能が検出器に大きく依存する。検出器として PMMA などフォトレジストを用いると約 10 nm の軟 X 線顕微鏡として最高分解能が発揮される^{1,2)}。また、電子ズーム管など、ズーム可能かつ広い波長域に感度を有する検出器を用いれば、視野の選択が容易となり、さら

表 1 軟 X 線顕微鏡のタイプと特徴。

種類	光学系 (原理)	特徴	分解能	観察例
密着型	試料の透過強度を試料に密着させた検出器により検出する	○光学素子が不要 ○分解能、適用波長領域、定量性は検出器に依存 ×厚い試料では分解能が上がらない	・約 10 nm (フォトレジスト PMMA 使用時、高分解能だが定量性に難点) ・約 0.2 μm (電子ズーム管使用時、定量的かつ広い波長範囲で利用可能)	・染色体繊維およびヌクレオソーム構造の高分解能観察 ^{1,2)} ・精子の水溶液中での観察 ³⁾ ・細胞内の元素分布解析 ⁴⁾
投影型	点光源より発散するビーム内に試料を設置し、その投影拡大像を検出する	○ズーム可能 ○視野が広い ○焦点深度が深い ×X 線源の強度不足 (現状の SEM を利用した場合) ×フレネル回折によるぼけ	≤0.1 μm	表 2 参照
結像型	集光用ゾーンプレートにより試料を照明し、結像ゾーンプレートにより拡大像を検出器面に結像する	○分解能が高い ○位相差観察への拡張 ×視野が狭い	20~50 nm	・各細胞周期における細胞内微細構造 (間期での核膜、ミトコンドリア、分裂期での微小管、動原体など) ⁵⁾ および急速凍結観察 ⁶⁾ ・無固定、無染色のヒト精子の水溶液中での観察 ⁷⁾ ・肝クッパー細胞の水溶液中 ⁸⁾ および急速凍結観察 ⁹⁾ ・金コロイド抗体を用いた細胞内微小管、核膜複合タンパク質、splicing factor の分布 ¹⁰⁾
走査型	ゾーンプレートにより作られた微小スポットで試料上を走査する	○分解能が高い ○蛍光 X 線など微小領域の情報を取得可能 ×観察時間がかかる ×コヒーレント線源が必要	20~50 nm	・金コロイド染色による細胞内微小管ネットワーク ¹¹⁾ ・染色体中の DNA 分布 ¹²⁾ ・頭蓋骨での Ca 分布 ¹³⁾ ・精子における DNA とタンパク質分布 ¹⁴⁾

に生体を構成する種々の元素の吸収端を利用できるので、生体元素分布マッピングが可能となる^{4,17)}。投影型は、視野が広く、ズームアップが可能であること、焦点深度が深いことを利用してステレオ観察など三次元観察への拡張が容易であること、などの利点があげられる。

2.2 細胞内微細構造観察

50 nm あるいはそれ以下の高分解能で細胞試料が結像型、走査型顕微鏡を用いて観察されている。一例として図1に、結像型による Tasmanian rat kangaroo 由来 PtK2 細胞の分裂期の画像を示す⁹⁾。固定されてはいるが水溶液中で観察された。(a) は分裂中期に metaphase plate (動原体が一平面内に並ぶ) を上から見たところで、染色分体が見られる。ミトコンドリアもはっきり識別できる。(b) は紡錘体を横から見たところである。中心小体に向かって、動原体から微小管が並んでいることがわかる (矢印)。(c) は中期の終わりから後期初めである。動原体の密な構造と動原体に微小管が結合している様子がはっきりと見える。

2.3 元素および分子分布解析

スペクトロマイクロコピーを行うための基礎となる吸収スペクトルの例を図2に示す。これは、仔ウシ胸腺 DNA の軟 X 線領域 200~800 eV (1.5~6.2 nm) における吸収スペクトルである。C, N, O の K 吸収端が明瞭で、その吸収端近傍に微細構造が観察される。N-K 吸収端の部分拡大したものが右上の図である。比較のためにタンパク質ヒストンのスペクトルを示した。N 原子の $1s \rightarrow \pi^*$ 軌道への励起に相当する共鳴ピークが DNA では矢印のように 2 つに

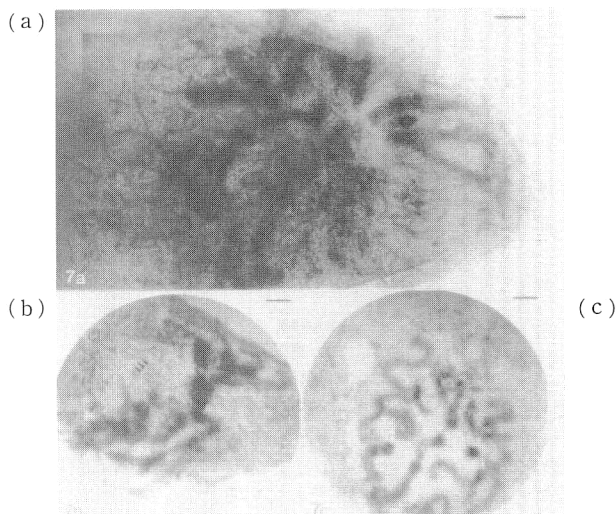


図1 結像型 X 線顕微鏡による PtK2 細胞の分裂中期像⁹⁾。Tasmanian rat kangaroo 由来 PtK2 細胞をグルタルアルデヒドで固定後バッファー中に保持して観察。スケールバー：(a) 2.2 μm , (b) 2.1 μm , (c) 1.9 μm 。

分離しているのに対し、ヒストンでは単一ピークである。このピーク位置のエネルギーの違いを利用して、DNA をヒストンから分離して画像化することが可能である。C-K 吸収端の XANES を利用してウシ精子中のタンパク質と DNA 分布¹⁴⁾、ソラマメ染色体中の DNA 分布¹²⁾ が報告されている。

その他の代表的な観察例については表1を参照されたい。

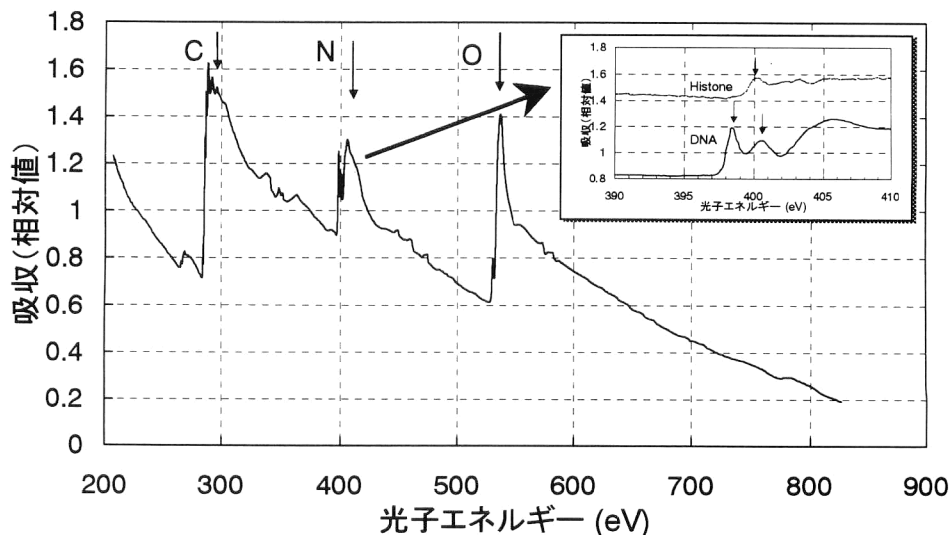


図2 仔ウシ胸腺 DNA の軟 X 線領域の吸収スペクトル。水溶液 DNA をコロジオン膜上に滴下し風乾後、透過率を測定した。矢印により C, N, O の吸収端を示す。右上の挿入図は、N の K 吸収端近傍における XANES スペクトル。DNA と比較のため、ヒストンタンパク質のスペクトルをあげた。

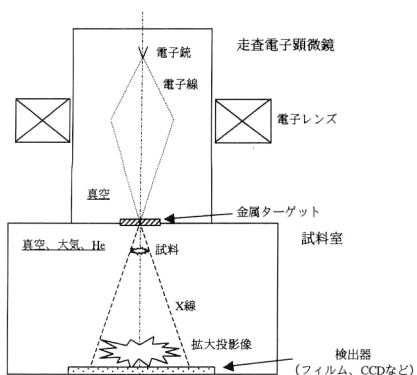


図3 走査型電子顕微鏡 (SEM) を利用した投影型 X 線顕微鏡. 電子線は金属薄膜ターゲットに集束される. ターゲットより発散する X 線ビームの途中に試料を設置し, その拡大投影像をフィルム, CCD など検出する. 金属薄膜は真空と試料室を仕切る役目も果たしている.

3. 投影型軟 X 線顕微鏡

投影型顕微鏡の特徴をまとめると, 広い視野から観察対象部位を探し, その部位をズームアップできること, フォーカスフリーの光学系のため, ズームアップのどの段階でも焦点が合っていること, これを利用してステレオ観察など三次元観察が容易であること, となる. これらの特徴は, 生物試料観察において特に重要な観点であることがわかる. すなわち, 独特の複雑な構造を有する生体において, 広い視野から対象部位を探すことは常套の手順である. また, 前述の染色体などパックされた構造の内部観察においては, 立体構造を画像化する手段が求められる. 本解説の後半では, 投影型軟 X 線顕微鏡のこれまでの成果とこれからの新しい試みについて述べることにする.

3.1 光学系

投影型に用いられる微小 X 線源として, 1936 年, Sievert はピンホールによる方法を, 次いで Ardenne は電子線の陽極へのフォーカスによる方法を提案した. Nixon らが電子線に対する薄い透過型ターゲットを用いたことから, 光学顕微鏡を超える分解能による観察が可能となった¹⁸⁾. 雄ウシ精子の尾の太さから, 生体試料ですでに $0.3 \mu\text{m}$ もの分解能を報告している¹⁹⁾. 透過型ターゲットでは試料を近接して設置することが可能なため, 試料への X 線強度を増大させ, さらにターゲット単位面積当たりの電子線の負荷 (kW/mm^2) を上げることができるといった利点があった. 1980 年代になって矢田らは金属ターゲットに照射する微小電子線源として走査型電子顕微鏡 (SEM) の集束電子線を用い, さらにターゲットの材質, 厚さを検討し, 生物試料の微細構造観察に適した高分解能投影型 X 線顕微鏡を開発した²⁰⁾. 図3に光学系を示す. ターゲットの選択により, 0.1 nm から 1.1 nm の波長領域をカバーした^{20,21)}. この方式の特徴は, ターゲットの材質を選択するこ

とにより, ある程度の波長選択性が得られること, 実験室に設置可能な顕微鏡装置として利用できる点にある. 生体試料を対象とする場合, この点は非常に重要である.

3.2 分解能

投影型の分解能は X 線源の大きさ (d_x) と試料で起こるフレネル回折によるぼけ (d_f) で規定される. 分解能 (d) は次式で表される²²⁾.

$$d = \sqrt{d_x^2 + d_f^2} \quad (1)$$

d_f としてフレネル回折縞の第 1 極大の半値幅を用いると, $d_f \approx \sqrt{\lambda b}$ (λ : 波長, b : X 線源から試料までの距離) となる.

X 線源の大きさに関して, 矢田らによると SEM からの 10 kV 電子ビームを用いた場合, ターゲット中の X 線源の大きさはモンテカルロ計算により, たとえば Ge と Ag について, それぞれ 100 nm , 50 nm 程度であった²¹⁾. 一方, フレネル回折によるぼけについては, 波長 1 nm とすると, $b = 10 \mu\text{m}$ まで近づければ 100 nm となり, X 線源の大きさと同程度となる.

これまでに得られている最高分解能は, $2000 \text{ lines}/\text{mm}$ の回折格子を用いて $0.1 \mu\text{m}$ 以下であることが確認されている²³⁾.

3.2.1 フレネル回折によるぼけの修正

コンピューターを用いた画像処理により, フレネル回折ぼけを修正する試みがある. 矢田らは, Wiener filter を用いてコントラスト, 解像度の向上を示した²³⁾. 本田らは, インラインホログラムからの像再生において, 少しずつ再生像に近づけていく繰り返し法 (イタレーション法) を用いた²⁴⁾. その際, 試料に完全不透明な視野制限枠を設けることによって, 検出面で失われた位相情報の回復の精度とイタレーションの時間を改善できることを示唆した.

ここで, フレネル回折縞が試料の輪郭のコントラストをむしろ増大させる場合があることをつけ加えておく. 線源-試料間距離 b が大きくなると空間コヒーレンスは増大する. その結果, 干渉縞が明らかとなり, ある距離 b では試料の輪郭のコントラストが向上することが認められている²⁵⁾.

3.3 観察例

これまでに焦点深度が深いという投影型の特徴を生かした, 厚い試料の観察, さらにそれらの三次元観察が試みられている. 主な観察例を表2にまとめた¹⁹⁻³²⁾. 図4に, 矢田らによる神経細胞ネットワークのステレオ観察像²²⁾を示した. 図5には, 昆虫のような厚い試料の高分解能像を示した²⁵⁾. 細かい筋繊維が分解されていることが見てと

表2 投影型軟 X 線顕微鏡による生体試料の観察例。

試料	処理方法	厚さ	観察の特徴	文献
雄ウシ精子	固定後金染色	—	・尾 (太さ $0.3 \mu\text{m}$) が識別	19)
前立腺	凍結乾燥	5 mm	・カルシウム化した部分の観察 ・ $5 \mu\text{m}$ 以下の分解能	26)
珪藻土	そのまま	—	・内部構造が確認できる	20)
成犬の横舌筋繊維中隔部	固定切片の無染色および銀染色	$20 \mu\text{m}$	・繊維の微細構造 ・無染色でも十分のコントラスト ・ステレオ観察	23)
ラット海馬	固定切片の銀およびゴルジ染色	$200 \mu\text{m}$	・ステレオ観察によるニューロンの立体構造 ・高分解能樹状突起の観察	20), 22), 27)
ヒト HeLa 細胞	固定後風乾および臨界点乾燥	数 μm	・核および核小体の構造 ・分裂期細胞におけるひも状および子午線状構造 ・分裂期細胞のステレオ観察	20), 21), 23)
ウニ受精卵	界面活性剤処理後固定 風乾および臨界点乾燥	約 $80 \mu\text{m}$	・臨界点試料において内部構造の観察 ・紡錘体極 ・星状体微小管 ・染色体 ・ステレオ観察	28), 29)
アリ	臨界点乾燥	数 mm	・脚の筋繊維 ・触覚	25)
ショウジョウバエ	臨界点乾燥	数 mm	・筋繊維 ・変態中の内部構造	25)
アブラムシ	生体	—	・寄生虫の存在	25)
クマムシ	臨界点乾燥	—	・筋繊維の束 ・微細なひげ	25)
ブタ肝臓の胆汁細管	ゴルジ染色	$50 \mu\text{m}$	・ネットワークの立体構造のステレオ観察	25)
シダの孢子および孢子嚢	—	$10 \sim 100 \mu\text{m}$	・孢子嚢の内部構造 ・孢子内部のひも状構造	25)
ヒト内耳	エポキシ包埋	—	・micro-CT ・分解能は低い (歯科用 X 線を利用)	30)
ワラジムシ	臨界点乾燥	—	・micro-CT	31)
珪藻土	—	—	・holography and CT ・分解能約 $1.5 \mu\text{m}$, CT の深さ方向の分解能は約 $10 \mu\text{m}$	32)

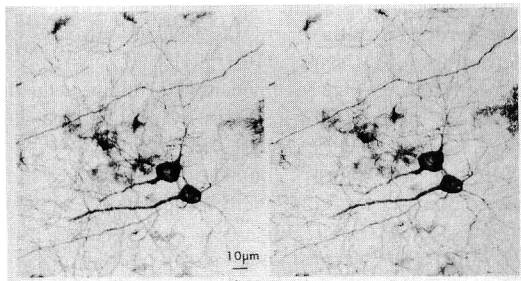


図4 銀染色したラット海馬の切片のステレオ画像²²⁾。SEM を利用した投影型顕微鏡による。加速電圧: 10 kV , ターゲット: Au, 検出器: 真空カメラ。

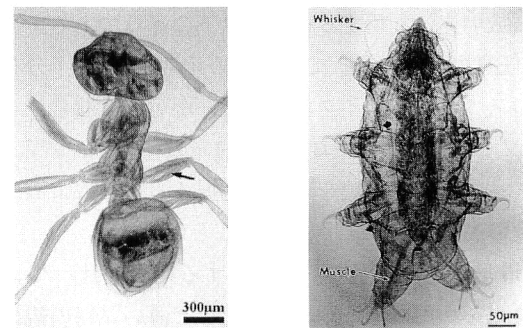


図5 SEM を利用した投影型顕微鏡による昆虫の筋繊維微細構造²⁵⁾。(a) 臨界点乾燥したアリ。矢印は足の筋繊維を示す。加速電圧: 10 kV , ターゲット: $0.2 \mu\text{m}$ 厚 Au, He ガス中。(b) 臨界点乾燥したクマムシ。筋繊維の束 (太矢印), $0.3 \mu\text{m}$ 幅のひげが観察される。加速電圧: 10 kV , ターゲット: $0.3 \mu\text{m}$ 厚 Au, He ガス中。

れる。

3.4 新しい展開

従来の投影型軟 X 線顕微鏡の観察のほとんどすべてが SEM を電子源に用いた装置による。そこでは、厚い試料に

対して、 $0.1 \mu\text{m}$ を下回る分解能をもつ三次元ステレオ観察

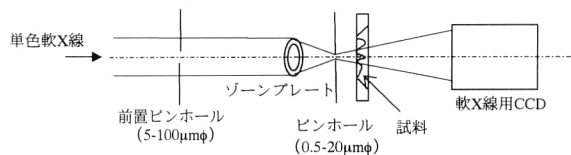


図6 放射光を利用した投影型 X 線顕微鏡のレイアウト。左方より入射した単色軟 X 線はゾーンプレートにより集光される。前置ピンホールは空間コヒーレンスを向上させるために、集光点の後置ピンホールは、不要な回折光を除去するために設置する。発散する X 線は試料を透過後背面照射タイプの CCD により検出される。物質構造科学研究所放射光研究施設における単色軟 X 線を利用した。

が達成されている。投影型の今後の展開において主要な問題は、1) 微小 X 線源の強度の不足、2) 任意の波長が選択できない、3) フレネル回折によるぼけ、にまとめられる。X 線源の強度に関しては、大強度の電子を得るための陰極の改良、開発が求められる。2) については、シンクロトロン放射（放射光）を分光する方式が考えられる。また、放射光の採用は強度の問題も解決できる可能性がある。3) のフレネル回折によるぼけの修正法については、前述の本田らの方法が有望ではあるが、さらにリアルタイムに修正が行えるシステムが理想的である。

以下に、筆者らが試みている放射光を利用した投影型を紹介したい。

3.4.1 放射光を用いた投影型軟 X 線顕微鏡

図6に光学系を示す³³⁾。分光された軟 X 線（波長 1.5~5 nm）はゾーンプレートにより集光される。ゾーンプレートの光源側上流の前置ピンホールにより空間コヒーレンスを向上させる。ゾーンプレート焦点面にはピンホールを設置し不要な回折光を除去する。焦点から発散する X 線は試料を透過後、背面照射タイプの CCD カメラにより画像化される。放射光を利用する利点は以下の通りである。

- 1) 任意の波長を選択できるため元素分布、分子分布などのスペクトロマイクروسコピーが可能となる
- 2) ゾーンプレート、および放射光の種類（アンジュレータ放射光など）を適切に選択することによって、強度の高い微小 X 線源を作ることができる
- 3) 電子線をターゲットに照射する場合に比べて、長波長光を利用できるため、細胞など薄い試料の観察も可能となる
- 4) 波長分解能を上げることによる時間コヒーレンスの向上、ピンホールの設置による空間コヒーレンスの向上が可能である。これはフレネル回折ぼけの画像修正法をより容易にする

現在、分解能は約 0.3 μm であるが、ゾーンプレートに対するコヒーレント照明の改善を行いさらに高分解能化を図

っている。将来は、50 nm 程度のフォーカスサイズをもつゾーンプレートを利用することにより、現状の投影型の分解能を大きく向上させたい。

3.4.2 その他の試み

三次元観察としてステレオ観察以外に CT が行われた^{30,31,34)}。また、投影型ホログラフィーの試みも、前述の本田らのほかに行われている³⁵⁾。ホログラフィーは基本的には三次元観察を目指すものであるが、X 線では波長が短いため深さ方向の分解能が不足し、現状では二次元像の再生にとどまっている。CT と組み合わせたホログラフィックトモグラフィーの可能性も試みられている³²⁾。

X 線顕微鏡の生体試料観察に関して、有用なレビューとして Kirz らによるもの³⁶⁾ および Jacobsen によるもの³⁷⁾ があげられる。また、X 線顕微鏡光学も含めた最新の進歩は、モノグラフ³⁸⁾ (X 線顕微鏡国際会議の抄録集でもある) を参照されたい。

放射光を利用した投影型 X 線顕微鏡の開発グループにおいてリーダーシップをとられ、常に貴重な助言をいただいた篠原邦夫東京大学医学系研究科教授に感謝いたします。また、SEM を用いた投影型顕微鏡での分解能についてお教えいただいた吉村英恭明治大学工学部教授に感謝いたします。

文 献

- 1) K. Shinohara, *et al.*: "Fine structure of unstained human chromosome fibres dried with no fixative as observed by X-ray contact microscopy," *J. Microsc.*, **158** (1990) 335-342.
- 2) Y. Kinjo, *et al.*: "Direct imaging in a water layer of human chromosome fibres composed of nucleosomes and their higher-order structures by laser-plasma X-ray contact microscopy," *J. Microsc.*, **176** (1994) 63-74.
- 3) 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.
- 4) A. Ito, *et al.*: "X-ray contact microscopy system for spectromicroscopy of biological specimens," *J. Synchrotron Radiat.*, **5** (1998) 1099-1101.
- 5) O. Methe, *et al.*: "Transmission X-ray microscopy of intact hydrated PtK2 cells during the cell cycle," *J. Microsc.*, **188** (1997) 125-135.
- 6) G. Schneider: "Cryo X-ray microscopy with high spatial resolution in amplitude and phase contrast," *Ultramicroscopy*, **75** (1998) 85-104.
- 7) J. V. Abraham-Peskir, *et al.*: "Morphological studies of human sperm using the Aarhus X-ray microscope," *X-ray Microscopy*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, Melville, New York, 2000) pp. 113-118.
- 8) J. -G. Scharf and G. Schneider: "Ultrastructural characterization of isolated rat Kupffer cells by transmission X-ray

- microscopy," *J. Microsc.*, **193** (1999) 250-256.
- 9) G. Schneider, *et al.*: "Visualization of 30 nm structures in frozen-hydrated biological samples by cryo transmission X-ray microscopy," *X-ray Microscopy*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, Melville, New York, 2000) pp. 3-11.
 - 10) W. Meyer-Ilse, *et al.*: "High resolution protein localization using soft X-ray microscopy," *J. Microsc.*, **201** (2001) 395-403.
 - 11) H. N. Chapman, *et al.*: "A characterization of dark-field imaging of colloidal gold labels in a scanning transmission X-ray microscope," *Ultramicroscopy*, **62** (1996) 191-213.
 - 12) H. Ade, *et al.*: "Chemical contrast in x-ray microscopy and spatially resolved XANES spectroscopy of organic specimens," *Science*, **258** (1992) 972-975.
 - 13) J. M. Kenny, *et al.*: "Absorption microanalysis with a scanning soft X-ray microscope: Mapping the distribution of calcium in bone," *J. Microsc.*, **138** (1985) 321-328.
 - 14) X. Zhang, *et al.*: "Mapping and measuring DNA to protein ratios in mammalian sperm head by XANES imaging," *J. Struct. Biol.*, **116** (1996) 335-344.
 - 15) G. Schmahl, *et al.*: "Phase contrast studies of biological specimens with the x-ray microscope at BESSY," *Rev. Sci. Instrum.*, **66** (1995) 1282-1286.
 - 16) S. Williams, *et al.*: "Instrumentation developments in scanning soft x-ray microscopy at the NSLS," *Rev. Sci. Instrum.*, **66** (1995) 1271-1275.
 - 17) A. Ito, *et al.*: "Measurement of soft X-ray absorption spectra and elemental analysis in local regions of mammalian cells using an electronic zooming tube," *J. Microsc.*, **181** (1996) 54-60.
 - 18) V. E. Cosslett and W. C. Nixon: "X-ray shadow microscope," *Nature*, **168** (1951) 24-25.
 - 19) W. C. Nixon: "High-resolution X-ray projection microscopy," *Proc. R. Soc. Lond.*, **A232** (1955) 475-485.
 - 20) K. Yada and S. Takahashi: "Target materials suitable for projection X-ray microscope observation of biological samples," *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **38** (1989) 321-331.
 - 21) 矢田慶治, 篠原邦夫: "投影 X 線顕微鏡の開発と生物学への応用", *青森公立大学紀要*, **1** (1996) 2-13.
 - 22) 矢田慶治: "X 線顕微鏡について", *電子顕微鏡*, **26** (1991) 72-81.
 - 23) K. Yada and S. Takahashi: "Projection X-ray microscope observation of biological samples," *X-Ray Microscopy in Biology and Medicine*, eds. K. Shinohara, K. Yada, H. Kihara and T. Saito (Japan Sci. Soc. Press/Springer-Verlag, Tokyo/Berlin, 1990) pp. 193-202.
 - 24) 児玉 巖ほか: "物体の領域制限効果を用いたインライン X 線ホログラムからの像再生", *光学*, **24** (1995) 226-232.
 - 25) H. Yoshimura, *et al.*: "Application of SEM-modified X-ray microscope to entomology and histology, and effects of X-ray coherence imaging," *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **49** (2000) 621-628.
 - 26) R. L. Davies, *et al.*: "X-ray microscopy of the prostate gland," *Br. J. Urol.*, **61** (1988) 230-233.
 - 27) K. Yada and S. Takahashi: "The recent development of projection x-ray microscopy for biological applications," *X-Ray Microscopy III (Springer Series in Optical Sciences, Vol. 67)*, eds. A. G. Michette, G. R. Morrison and C. J. Buckley (Springer, Berlin, 1992) pp. 195-198.
 - 28) K. Yada, *et al.*: "Observation of the inner structures of sea-urchin eggs by projection X-ray microscopy," *X-Ray Microscopy and Spectromicroscopy*, eds. J. Thieme, G. Schmahl, E. Umbach and D. Rudolph (Springer-Verlag, Berlin, 1998) pp. II255-II259.
 - 29) 矢田慶治ほか: "投影 X 線顕微鏡によるウニの受精卵の内部構造の観察", *青森公立大学紀要*, **3** (1998) 2-10.
 - 30) S. J. P. A. Shih, *et al.*: "Cone-beam X-ray microtomography of human inner ear," *Cell Vision*, **4** (1997) 216-217.
 - 31) H. Yoshimura, *et al.*: "Contrast enhancement and three-dimensional computed tomography in projection X-ray microscopy," *X-ray Microscopy*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, Melville, New York, 2000) pp. 525-528.
 - 32) N. Watanabe and S. Aoki: "Three-dimensional tomography using a soft X-ray holographic microscope and CCD camera," *J. Synchrotron Radiat.*, **5** (1998) 1088-1089.
 - 33) K. Shinohara, *et al.*: "Development of an X-ray projection microscope using synchrotron radiation," *X-RAY MICROSCOPY*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, Melville, New York, 2000) pp. 346-349.
 - 34) S. Pan, *et al.*: "Experimental system for X-ray cone-beam microtomography," *Microsc. Microanal.*, **4** (1998) 56-62.
 - 35) N. Watanabe, *et al.*: "Soft-x-ray Gabor holography by use of backilluminated CCD camera," *Appl. Opt.*, **36** (1997) 7433-7436.
 - 36) J. Kirz, *et al.*: "Soft X-ray microscopes and their biological applications," *Q. Rev. Biophys.*, **28** (1995) 33-130.
 - 37) C. Jacobsen: "Soft x-ray microscopy," *Trends Cell Biol.*, **9** (1999) 44-47.
 - 38) W. Meyer-Ilse, *et al.* *X-RAY MICROSCOPY*, eds. W. Meyer-Ilse, T. Warwick and D. Attwood (American Institute of Physics, Melville, New York, 2000).

(2002年2月6日受理)