

超高精細バイオイメージング用波面補正軟X線多層膜ミラーの開発

津留 俊英*・羽多野 忠*・原田 哲男**・豊田 光紀*
江島 丈雄*・柳原 美廣*・山本 正樹*

Development of Wavefront Error Corrected Soft X-Ray Multilayer Mirrors for Ultra-High Definition Bio-Imaging

Toshihide TSURU*, Tadashi HATANO*, Tetsuo HARADA**, Mitsunori TOYODA*, Takeo EJIMA*,
Mihiro YANAGIHARA* and Masaki YAMAMOTO*

Soft X-ray multilayer mirror microscope with a laboratory light source could realize wide field of view and ultra-high definition bio-imaging. Nm-period multilayer mirror fabrication and the reflection wavefront error correction method by milling of multilayer surface based on a physical optics principle are described for the diffraction limited imaging. At-wavelength wavefront measurement of milled soft X-ray multilayer is also reported.

Key words: soft X-ray, multilayer mirror, microscope, wavefront error correction

光学顕微鏡の空間分解能は、開口数と使用波長で決まる回折限界で制限される。したがって、可視光より波長が短い光を用いれば原理的に高い空間分解能が実現できることから、波長をX線域まで一気に短波長化したX線顕微鏡は高解像度化が期待できる。特に、波長数 nm から数十 nm の軟X線波長域には生体を構成する軽元素の吸収端があることから、生体試料を染色することなく元素で“色付いた”顕微像を撮像できる。また、酸素の吸収端と炭素の吸収端の間の波長 2.3 nm から 4.4 nm の領域は、生体中のタンパク質や核酸などの主要構成元素である炭素と水分子を構成する酸素の吸収の差が大きくとれるので、数 μm 厚の生体を生きたままの状態を観察できる「水の窓」(water window)として着目されている¹⁾。近年は、炭素の吸収端 4.4 nm の長波長側を「炭素の窓」(carbon window)と呼び、生体の炭素吸収コントラスト像の取得を目的とした軟X線顕微鏡開発も進んでいる²⁾。

軟X線顕微鏡観察は生体観察に適した計測法であるが、

軟X線は空気に吸収されるため、光学系はすべて真空中で取り扱わなければならない、物質の屈折率が1に近く可視光のような屈折型のレンズが使えない、など制約も大きい。現在は、大別すると、斜入射の全反射を利用したウォルター型結像系^{3,4)}、回折を利用したゾーンプレート系^{5,6)}、多層膜ミラーを用いた直入射光学系の開発が行われている^{7,8)}。これらの最近の進捗については、2008年に開催された第9回X線顕微鏡国際会議の会議録⁹⁾をご参照いただきたい。

生体は、小器官・細胞・組織など、それぞれを構成するスケールと機能に基づく階層構造を有し、これらの個々の機能理解とともに、それぞれを関連付けて機能を明らかにすることが必要である。多層膜ミラーによる直入射型の光学系には、高精度な多層膜ミラーに加え、ミラーに1 nmを切る波面精度と高精度なアライメントが要求されるなど解決すべき課題はあるものの、数100 μm の広い視野を数十 nmの高い空間分解能で観察することが期待される。ま

*東北大学多元物質科学研究所 (〒980-8577 仙台市青葉区片平2-1-1) E-mail: tsuru@tagen.tohoku.ac.jp

**兵庫県立大学高度産業科学技術研究所 (〒678-1205 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-1-2)

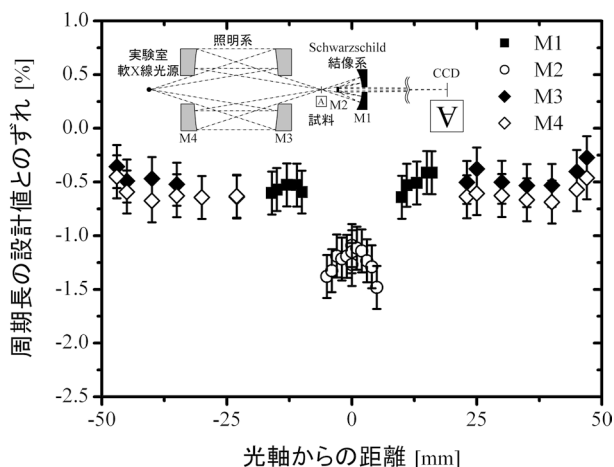


図1 作製した軟X線顕微鏡用シュバルツシルト対物ミラー光学系 M1, M2 と照明用ミラー M3, M4 の周期長分布実測値。

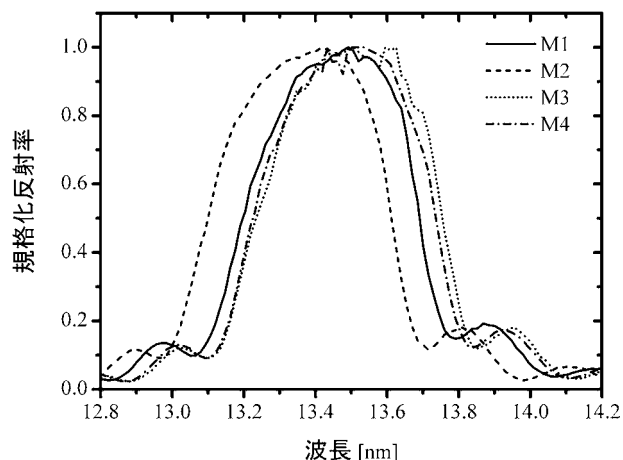


図2 作製した軟X線顕微鏡用シュバルツシルト対物ミラー光学系 M1, M2 と照明用ミラー M3, M4 の入射角 5° における軟X線反射スペクトル。

た、点光源であるレーザー生成プラズマ (LPP) 光源¹⁰⁾ との組み合わせで光学系を構成しやすく、実験室規模の顕微鏡が実現できる。われわれはこれまでに、ナノメートル周期膜厚の多層膜を精密に制御する技術と、基板面内で周期膜厚分布を制御する技術を開発し、これを曲面ミラーへと展開し精密結像ミラー作製技術を確立した。製作した多層膜対物ミラーを組み込んだ軟X線多層膜ミラー顕微鏡1号機では、波長 13.4 nm で LPP 光源の1ショット撮像に成功した。現状では、結像ミラー用の超研磨基板の形状加工の限界精度 1 nm が結像性能を決定している。回折限界結像の実現には、多層膜を曲面基板上に精密に作製する技術に加えて、反射波面を実使用波長で計測し反射波面誤差を補正する技術が要求され、これらの開発を並行して進めている。本稿では、これまでに開発した軟X線精密多層膜ミラー作製技術について述べた後、製作したミラーを実装した軟X線顕微鏡による撮像例を示す。また、今後の回折限界結像を目指してわれわれが提案する物理光学的な手法による 0.1 nm 精度波面補正原理¹¹⁾ について述べるとともに、これを実現するためのイオンミリング波面補正装置と、軟X線実使用波長による波面補正の原理検証実験について紹介する。

1. 軟X線精密多層膜ミラー作製技術

軟X線多層膜ミラーは、2種類の物質をそれぞれ波長の4分の1程度の厚さで数十から数百層積層した反射増加膜であり、数十%の高い反射率が得られる。多層膜は強め合いの干渉効果によるもので、可視光に用いる誘電体多層膜ミラーと同様であるが、使用する波長が1桁から2桁短いために、要求される作製精度も2桁程度高精度化しなけれ

ばならない。また、直入射光学系を多層膜ミラーで構成しスループットを確保するためには、① 曲面内で入射角依存性を補償した膜厚分布でナノメートル周期膜厚の多層膜を形成すること、② 複数枚の多層膜ミラーの反射ピーク波長を厳密に一致させることが要求される。したがって、周期膜厚がナノメートルの軟X線ミラーは膜厚とその分布をピコメートルオーダーで精密に制御しなければならず、これらは自己組織化や成型技術では実現し得ない。

この要求に応えるため、多層膜ミラーの作製には、2機の電子サイクロトロン共鳴イオンガンに備えたイオンビームスパッタリング装置を開発した。装置は、三角柱状のターゲットホルダーを回転制御し成膜物質を切り替え、自転させた基板の前面に設置したマスクを移動制御し、膜厚の面内分布制御を行う¹²⁾。この方法で、大小さまざまな直径と曲率の基板上に、回転対称性を持つ任意の膜厚分布を精密に形成することができる。

軟X線多層膜ミラー顕微鏡は、シュバルツシルト結像用ミラー⁸⁾ (凹面 M1: 直径 34 mm, 曲率半径 50 mm, 凸面 M2: 直径 12 mm, 曲率半径 22.4 mm) と照明用穴あき凹面ミラー 2 枚 (M3, M4: 直径 100 mm, 曲率半径 400 mm) の合計 4 枚の球面鏡を用いる構成で、使用波長の初期設計値を 13.5 nm, 多層膜の材料を 40 周期の Mo/Si とした。基板に対する軟X線の入射角に合わせて多層膜の周期長を変える必要があり、M1 ミラーの外周部で 0.5%, M2 ミラーのそれでは 3% 厚い周期長が必要であった。高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー (PF) BL-12A で計測した軟X線反射スペクトルから決定した周期長分布を図1に示す。初めに作製した M1 ミラーで -0.5% の誤差が発生したため、残りの 3 つのミラーは 0.5% 短い設計値

で成膜した。図から、ミラー全面の周期長誤差を目標値±1%を上回る±0.6%以内に制御できたことがわかる。図2には入射角5°における軟X線反射スペクトルを示す。得られた反射率は約60%と顕微鏡应用到に十分な値であった。直径が小さく曲率が急なM2ミラーは、他の3つのミラーと比べてマッチング精度が悪いものの、4枚の反射スペクトルが精密に合致した場合の積分反射率を100%とすると、作製した4枚のミラーのスループットは86%を実現しており、十分実用的な値を達成した。

2. 透過型軟X線多層膜ミラー顕微鏡 TXM³

作製した4枚の精密多層膜ミラーを搭載した透過型軟X線多層膜ミラー顕微鏡 TXM³ (transmission X-ray multilayer mirror microscope) を開発した。詳細は別稿に譲る¹³⁾として、現状を簡単に述べる。TXM³は、波長1.06 μmのパルスNd:YAGレーザーを用いたLPP光源の光を、2枚の凹面ミラーで試料に照明し、50倍のシュバルツシルト光学系で試料を拡大・結像する。4枚の多層膜ミラーとZrフィルターにより波長13.4 nmに分光される。TXM³を用いた生体試料観察例として、ブロック染色した500 nm厚のマウスの大脳皮質を露光時間200 nsで撮影した結果を図3に示す。像は、現在のところ装置の制限により試料の傾きが調整できないため、視野全面で焦点を合わせることができず、ブロックごとに分けて撮影を行った。撮影した複数枚の像の輝度を調整した後、部分像から全体像を再構成した。エッジレスポンスの半値全幅から推定した撮像時の空間分解能は、おおよそ140 nmであった。得られた図3の上部がマウス脳の表面側、下部が内側にあたる。図は、深部側から伸びた太く白く写っている軸索が丸い細胞体に達し、さらにその細胞体から複数の樹状突起が枝分かれし、互いに絡まりあって細い搔き傷のような様子を示している。絡まりあった樹状突起は神経回路網を形成しているといわれる。250×250 μm²という広い視野で、かつ、電子顕微鏡では観察の難しい500 nmの厚さで撮像できた。この結果は、開発したTXM³がこれまでの可視顕微鏡と同等の視野を持ちつつ高い空間分解能で撮影でき、また、生きたままの生体を観察するために必要な短時間露光撮影が可能であることを示している。広い視野を高分解能撮影できる点は、細胞や組織など大小さまざまな構造を持つ生体試料観察に特に有用で、生体試料中の複数のイベントを一括撮像し、撮影後に任意の場所の高精細画像を拡大処理することができる。また、ナノ秒の短時間露光は生体試料中のイベントを静止した状態で観察できるだけでなく、軟X線による放射線損傷の問題も克服できることを示

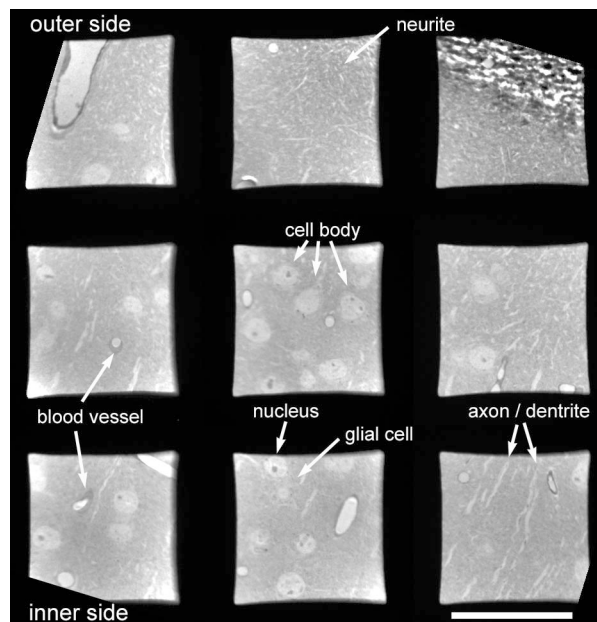


図3 軟X線顕微鏡によるマウスの大脳皮質の撮像例。スケールバーは50 μm。

すとともに、励起YAGレーザーの繰り返し周波数に同期させた動画撮像も期待できる。現状では軟X線CCDのピクセルサイズ13 μmが分解能を制限しており、数μmサイズの軟X線CCDの開発が望まれる。基板の形状誤差に起因する波面誤差は次章に述べるミリング波面補正法で、ピクセルサイズによる制限は高倍率化¹⁴⁾でそれぞれ解決を目指しており、現状の100 nm分解能を1桁向上させた分解能が期待できる。また、TXM³で採用したシュバルツシルト対物ミラーはアライメント誤差に敏感で実用面で課題があるが、解析的な設計手法で得た偏心とチルト外乱にきわめて強い対物ミラー¹⁵⁾の使用によって、より実用的な顕微鏡を構成できる。

3. 軟X線多層膜ミラーの0.1 nm精度波面補正技術

3.1 ミリング波面補正原理

軟X線多層膜ミラー顕微鏡で広い視野を回折限界の分解能で一括結像するという期待に応えるためには、波面位相を精密に制御し、光学系の収差を抑えることが不可欠となる。反射光学系の形状精度はMarechal条件から $\lambda/28$ が要求されたため、少なくとも2枚の反射ミラーから成る軟X線顕微鏡の対物ミラーでは、1枚の多層膜ミラーに1 nmを切る形状精度が必要となる。われわれは確実にこの波面精度を得るために、「多層膜ミラーの表面多層膜を周期ごとにミリング除去して0.1 nm精度で波面補正できる物理光学的補正法」¹¹⁾を考案し、イオンミリング波面補正装置を開発した¹⁶⁾。補正原理に従うと、多層膜最表面1周期7 nm

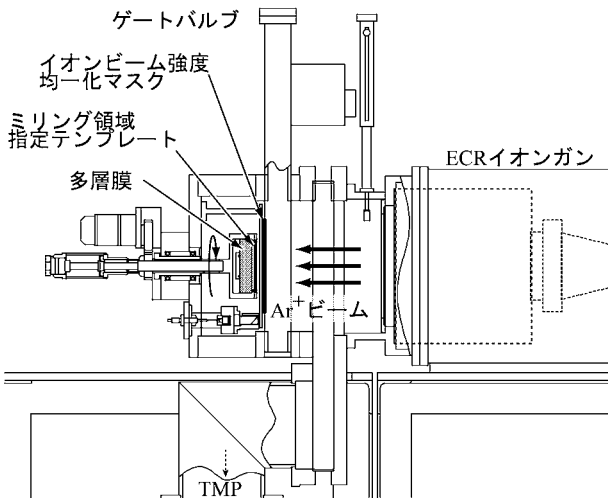


図4 大口径イオンビームによる多層膜ミラーの全面一括波面補正を実現するイオンミリング波面補正装置模式図。

のミリングで基板の形状を 0.1 nm 凹にしたことに相当する効果が得られる。近年、東北大学多元物質科学研究所附属光器械工場の協力を得て、 1 nm 程度の形状精度の球面基板を研磨する技術を開発した。軟X線多層膜ミラーで満たすべき形状誤差 0.1 nm の実現には1周期単位でミリングすればよく、最大でも10周期で所望の波面精度が実現できる。

軟X線波長域では光の吸収が避けられないため、反射率はある周期数で飽和し、その後は反射位相のみ変化する。反射位相の基準を最上層表面にとると、多層膜ミリングによる位相変化は、物質と真空の屈折率差 $(1-n)$ と除去膜厚 d の乗算で与えられる。軟X線領域の物質の屈折率 n は1に近く、 $(1-n)$ は 10^{-2} から 10^{-4} 程度であるから、位相差 $4\pi d(1-n)/\lambda$ は微量となり、基板ミリングによる位相差 $4\pi d/\lambda$ と比べて、多層膜ミリングでは $(1-n)$ の分だけ除去膜厚による位相の制御精度を向上させることができる。Mo/Si多層膜ミラーのミリングによる位相変化を詳細にみると、Siの屈折率はMoと比べても1にきわめて近いことから、反射位相変化はMo層除去で生じていて、Si層除去では反射位相も反射率も変わらない¹¹⁾。すなわち、除去量を 0.1 nm の精度で制御することなくSi層が最表面となる条件を検知し、厚さ 4 nm のSi層中でミリングを終了すればよい。

3.2 イオンミリング波面補正技術

図4に示すイオンミリング波面補正装置は、ECR型イオン源で生成した直径 150 mm の低加速 Ar イオンビームを直径 100 mm の多層膜に照射し、全面一括ミリング補正する¹⁶⁾。 200 rpm で自転する多層膜ミラーの全面で所定のイオンビーム強度分布を得るために、イオンビーム強度均

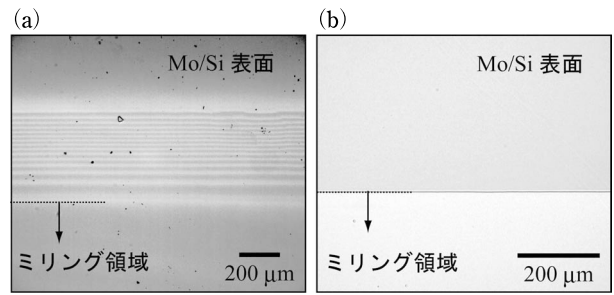


図5 Mo製領域指定テンプレート (a) とフォトリソト密着マスク (b) を用いてミリングした Mo/Si 多層膜ミラーの光学顕微鏡写真。

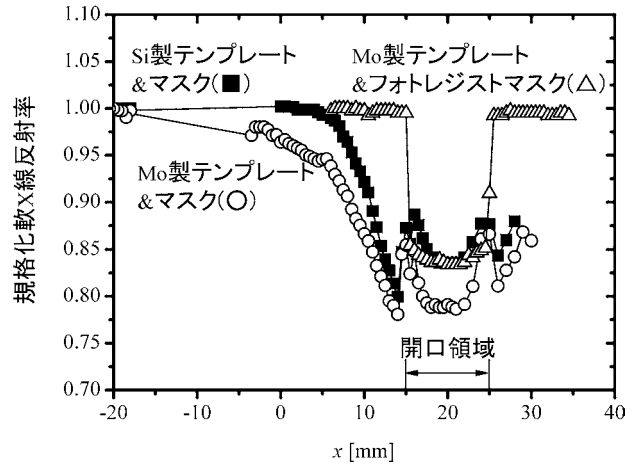


図6 10 mm 角の開口を持つ Si 製、Mo 製領域指定テンプレートとフォトリソト密着マスクを用いて10周期ミリング除去した40周期 Mo/Si 多層膜ミラーの軟X線ピーク反射率の場所依存性。

一化マスクを用いる構成とした。イオンガンの各種動作パラメーターを最適化し、最大ミリング加工時間2時間で 0.07% の安定化を図った。このとき、Mo および Si のミリング速度は 3.9 nm/min 、 5.1 nm/min である。

波面誤差領域のミリングには、軟X線実波長計測¹⁷⁾した波面誤差マップに従ってミリング領域指定テンプレートを作製し、テンプレートの開口部を通過したイオンビームでミリング加工を行う。領域指定テンプレートとして、ミラー前面 3 mm の位置に設置した Si あるいは Mo 製テンプレート、または、多層膜表面に塗布したフォトリソトを用いる。Si または Mo 製テンプレートを用いた多層膜ミリングでは、図5 (a) に示すようにミリング境界付近に Mo と Si の可視分光反射率の違いによって縞模様が観察される。ミリング境界はぼけるが、縞本数を数えれば容易にミリング除去層数を知ることができる。一方、フォトリソトによる領域指定ミリングは、図5 (b) に示すように加工領域の指定精度が良いミリングが可能である。この結果は、図6に示す軟X線反射率の計測結果にも表れている。

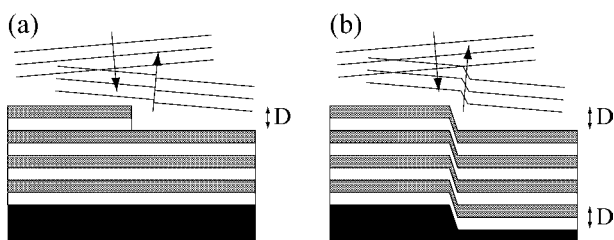


図7 (a) 表面1周期をミリングした多層膜と、(b) 基板を1周期分の厚さミリングした多層膜の反射波面の模式図。

平面 Mo/Si 多層膜ミラー前面に 10 mm 角の開口を持つ Si および Mo 製テンプレートを設置したミリングでは、ミリング領域外にコンタミネーションによる反射率低下がみられるが、フォトレジストをマスクとしたミリングでは急峻なミリングエッジが得られた。両者ともミリング領域内に化合物層形成が原因と思われる反射率低下が生じたが、軟 X 線領域の物質の屈折率には大きな差はなく、ミリングによる光路長変化は小さいことから、結像特性に与える影響も小さいと考えられる。

3.3 軟 X 線反射型ヤング干渉計によるミリング波面補正原理の検証

表面 1 周期をミリングした多層膜の反射位相を考えると、基板を同じ厚さだけミリングした場合と比べると、しばしば混乱することがある。図 7 (a), (b) はそれぞれ多層膜の表面および基板を 1 周期分除去した様子を模式的に示す。図 7 (b) の場合は、基板除去していない部分と比べて反射位相が約 360° 遅れることは自明である。図 7 (a) と (b) では多層膜下地の基板部分が異なるだけであるから、反射位相は同じであるとの見方もあり得る。よって、図 7 (a) の場合にも、表面除去していない部分と比べた反射位相差も約 360° ではないかとの考えが生じる。見落としてならないのは、2つのモデルで左右の多層膜構造のつながりが 1 周期ずれているということである。このことにより、図 7 (a) では先に述べた通り $(1-n)$ の因子が掛かった位相変化しか起こらない。この考えを実証するため、ヤングの干渉計を応用した軟 X 線干渉計測を行った。2つのスリットを通る光路に相対的に位相のずれが生じると、干渉縞が横ずれを起こす。ダブルスリットと多層膜ミラーを近接させて配置した反射型ダブルスリットを用い、ミラーの反射位相の変化を干渉縞の変位として観測できる構成である。図 8 (a) に反射型ヤング干渉計の概念図を示す。光をダブルスリットに右から入射させ、多層膜ミラーの反射位相差を反映した回折光を出射させる。1つの Mo/Si 多層膜平面ミラー上にミリング領域と非ミリング領域を作製し、両者を含むようにダブルスリットを設けて試

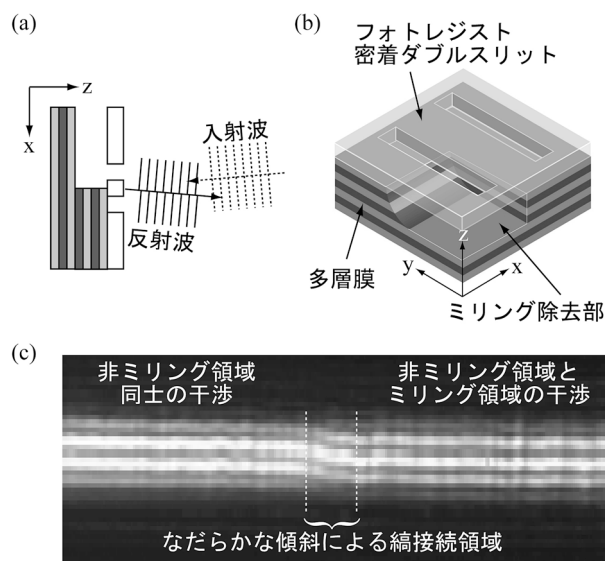


図8 (a) 反射型ダブルスリットを用いたヤングの干渉計の概念図、(b) ミリング領域となだらかなミリング傾斜領域をもつ多層膜ミラー表面にフォトレジスト密着ダブルスリットをパターンニングした計測試料の模式図、(c) 波長 14.15 nm の軟 X 線によるヤング干渉縞 (縦サイズを 2 倍に拡大)。

料とする。位相変化は、非ミリング領域同士の干渉縞を参照しながら、ミリング領域-非ミリング領域の干渉縞のずれ量で計測できる。また、縞の飛びを防ぐため、ミリング深さがなだらかに変化する領域を設けた (図 8 (b))。ダブルスリットは、フォトレジストの軟 X 線反射率が十分に低いことを利用し、部分ミリングした多層膜にフォトレジストを塗布しスリットパターンを露光・現像処理して作製した。形状は、幅 $30 \mu\text{m}$ で間隔 $80 \mu\text{m}$ とした。

干渉縞計測は、PF BL-12A で行った。用いた多層膜は周期長 7.40 nm 、周期数 40 の Mo/Si 多層膜で、入射角 5° における反射ピーク波長は 14.15 nm である。部分ミリング量は 10 周期 74 nm で、膜厚変化量のみを考えると干渉縞 10 本分のずれ量に相当するが、波面補正原理にしたがうと、縞 1 本にも満たない計算となる。波長 14.15 nm で計測した干渉縞を図 8 (c) に示す。左側が非ミリング領域同士の干渉縞で、右半分がミリング領域-非ミリング領域の干渉縞である。境界部分で両者の縞は接続されており、縞のずれは 1 本分もないことが明らかである。反射ピーク波長の前後で波長を変えたときの振る舞いも、多層膜ミリング波面補正原理からの予想と一致した。したがって、多層膜の表面 1 周期ごとのミリングでサブナノメートルのデジタル波面補正が軟 X 線実波長で可能であることが示された。

高いスループットを実現した軟 X 線多層膜ミラー顕微鏡用の精密対物ミラー作製技術、これを搭載した顕微鏡 TXM³ と生体試料の撮像例、また超高精細イメージングを

達成するためのミリング波面補正技術について紹介した。光学設計、光学素子作製、波面計測、補正技術、アライメント調整を高度化することによって、軟X線多層膜ミラー顕微鏡が本来兼ね備える広い視野と高い分解能が両立できる。軟X線顕微鏡が、生体試料のみならずソフトマテリアルや材料開発などさまざまな分野で活用されることを期待したい。また、顕微鏡開発に要求される高い精度の各種作製・評価技術は軟X線に限定せず適用できることから、広範囲な波長領域で応用・発展することを望む。

本研究は文部科学省科学研究費補助金特別推進研究および科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発事業の助成を受けて実施した。軟X線顕微鏡観察用試料は東京大学総括プロジェクト機構水谷治央博士よりご提供いただいた。

文 献

- 1) 波岡 武, 山下広順 (共編) : X線結像光学 (培風館, 1999).
- 2) I. A. Artyukov, A. V. Vinogradov, Yu. S. Kas'yanov and S. V. Savel'ev: "X-ray microscopy in the carbon window region," *Quantum Electronics* **34** (2004) 691-692.
- 3) Y. Sakayanagi and S. Aoki: "Soft X-ray imaging with troidal mirrors," *Appl. Opt.*, **17** (1978) 601-603.
- 4) M. Hoshino and S. Aoki: "Laser plasma soft X-ray microscope with Wolter mirrors for observation of biological specimens in air," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45** (2006) 989-994.
- 5) B. Niemann, D. Rudolph and G. Schmahl: "X-ray microscopy with synchrotron radiation," *Appl. Opt.*, **15** (1976) 1883-1884.
- 6) W. Chao, J. Kim, S. Rekawa, P. Fischer and E. H. Anderson: "Demonstration of 12 nm resolution Fresnel zone plate lens based soft X-ray microscopy," *Opt. Exp.*, **17** (2009) 17699-17677.
- 7) Y. Horikawa, K. Nagai, S. Mochimaru and Y. Iketaki: "A compact Schwarzschild soft X-ray microscope with a laser-produced plasma source," *J. Microsc.*, **172** (1993) 189-194.
- 8) M. Toyoda, Y. Shintani, M. Yanagihara, T. Ejima, M. Yamamoto and M. Watanabe: "A soft X-ray imaging microscope with a multilayer-coated Schwarzschild objective: Imaging tests," *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39** (2000) 1926-1929.
- 9) C. Quitmann, C. David, F. Nolting, F. Pfeiffer and M. Stampanoni: "9th International Conference on X-Ray Microscopy," *J. Phys.: Conf. Ser.*, **186** (2009) 011001.
- 10) 豊田浩一, 岡崎信次 (監修) : EUV光源の開発と応用 (シーエムシー出版, 2007).
- 11) M. Yamamoto: "Sub-nm figure error correction of an extreme ultraviolet multilayer mirror by its surface milling," *Nucl. Instrum. Methods A*, **467-468** (2001) 1282-1285.
- 12) T. Hatano, H. Umetsu and M. Yamamoto: "Deposition shutter control for figured multilayer fabrication," *Precision Science and Technology for Perfect Surfaces*, JSPE Publication Series, No. 3 (The Japan Society for Precision Engineering, Tokyo, 1999) pp. 292-297.
- 13) T. Ejima, F. Ishida, H. Murata, M. Toyoda, T. Harada, T. Tsuru, T. Hatano, M. Yanagihara, M. Yamamoto and H. Mizutani: "High throughput and wide field of view EUV microscope for blur-free one-shot imaging of living organisms," *Opt. Express*, **18** (2010) 7203-7209.
- 14) 豊田光紀, 神野貴義, 原田哲男, 羽多野忠, 柳原美広: "軟X線用超高倍率顕微対物鏡の開発", 第34回光学シンポジウム, **11** (2009) pp. 31-32.
- 15) M. Toyoda and M. Yamamoto: "Analytical designing of two-aspherical-mirror anastigmats permitting practical misalignments in a soft-X-ray optics," *Opt. Rev.*, **13** (2006) 149-157.
- 16) T. Tsuru, A. Tosaka, Y. Sakai and M. Yamamoto: "Development of a period-by-period EUV multilayer milling system for the final nm figure error correction by 0.1 nm per period," *J. Phys. Conf. Ser.*, **186** (2009) 012077-3.
- 17) M. Yamamoto, T. Hatano and M. Furudate: "Present status of EUV interferometer development at the research center for soft X-ray microscopy," *Opt. Precis. Eng.*, **9** (2001) 405-410.

(2010年1月18日受理)