

コヒーレント X線回折が拓く新境地

西野吉則

Exploring Frontier in Microscopy by Coherent X-Ray Diffraction

Yoshinori NISHINO

X-ray diffraction microscopy (XDM) is an X-ray imaging technique, which extends X-ray crystallography to allow imaging of non-crystalline samples. High image-contrast and high spatial-resolution can be achieved without suffering from limitations set by lenses. In XDM experiments, samples are illuminated by coherent X-rays, and far-field coherent diffraction patterns are recorded with fine angular resolution to satisfy the oversampling condition, a necessary condition for image reconstruction. Iterative phase retrieval algorithms are then used for image reconstruction. Although original XDM requires isolated micrometer-sized samples, ptychography, a scanning diffraction microscopy, is becoming popular for imaging extended objects. XDM using advance synchrotron radiation provides new opportunities for three-dimensional nanoimaging of objects too thick for electron microscopy, and has importance in imaging, *e.g.* biological cells and organelles. Emerging X-ray free-electron lasers further expand the capability of XDM, and will open up a frontier in microscopy, *e.g.* capturing molecular movie, bioimaging overcoming the radiation damage problem.

Key words: X-ray diffraction microscopy, coherent X-ray diffraction, iterative phase retrieval, ptychography, X-ray free-electron lasers

X線回折顕微法は、試料からのフラウンホーファー回折パターン（コヒーレント回折パターン）に反復的位相回復法を適用して試料像を再構成するX線イメージング手法である¹⁻⁵⁾。対物レンズなどの像形成のための光学素子を必要としないため、光学素子の性能に制限を受けない高い空間分解能が達成可能である。さらに、光学素子による像コントラスト低下のない理想的な位相コントラストイメージング法であり、無染色の細胞小器官など、X線に対して透明な試料に対しても高いコントラストでのイメージングができる。高い像コントラストの恩恵により、透過能の高い硬X線も使用可能となり、透過電子顕微鏡などでは困難であったマイクロメートル以上の厚みをもつ細胞などの試料に対しても、まるごと三次元イメージングが行える。

X線回折顕微法には、前方散乱配置⁴⁾と、単結晶試料に対する反射配置⁵⁾がある(図1)。前方散乱配置は、結晶以外の試料にも適用可能で、コヒーレントX線回折パターンからは電子密度分布が得られる。単結晶に対する反射配

置では、逆格子点近傍のコヒーレントX線回折パターンから結晶の歪み分布を得ることができる。

X線回折顕微法の基礎となるアイデアは50年以上も昔に提唱されたが³⁾、世界初の実験報告は1999年に行われた⁴⁾。実証までに長い年月を要したのは、コヒーレントX線の利用が、放射光の発展とともに、近年になりやっと可能となったためである。また近年、新世代のX線光源としてX線自由電子レーザーが登場し、X線回折顕微法の新たな可能性が広がった。

1. コヒーレント X線回折

コヒーレントX線回折では、レーザー光においては馴染み深い、スペックルとよばれる斑点模様が観測される。スペックルは、試料によって散乱されたX線の干渉によって起こるため、試料構造のわずかな違いがスペックルの顕著な違いを生む。X線回折顕微法は、回折パターンの試料構造に対するこの感性を利用している。フラウンホー

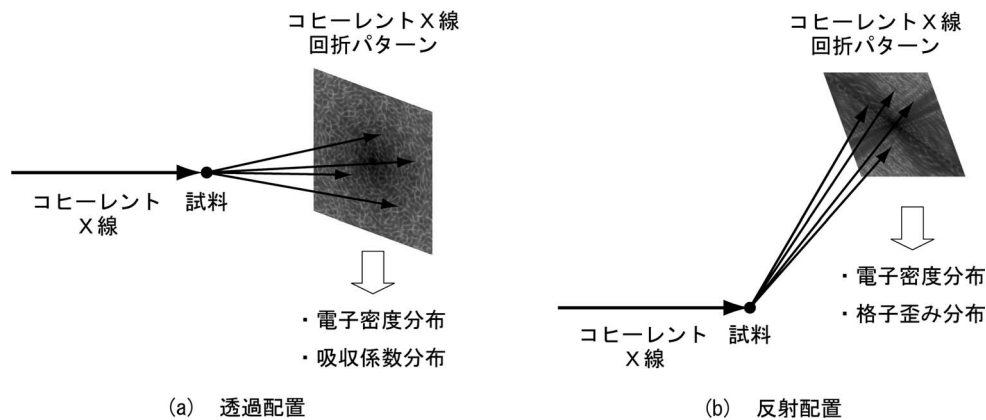


図1 コヒーレントX線回折の模式図. 微小な試料に、波面の揃ったコヒーレントX線を照射し、コヒーレントX線回折パターンを計測する. コヒーレントX線回折データからは、試料構造を三次元的に再構成できる. 測定配置には、(a)透過配置と(b)反射配置がある.

ファーン回折パターン中の一つ一つのスペックルの大きさは、試料（散乱領域）の大きさに反比例する。これは、小さなスリットを通った波が、スリットの開口幅に逆比例した角度広がりて伝搬することからも理解できる。量子力学的には、不確定性原理として知られている現象である。スペックルの大きさは、光の波長を λ 、試料の大きさを a 、試料と検出器の間の距離を D とすると、およそ $\lambda D/a$ で与えられる。

実験では、コヒーレント回折パターン中の一つ一つのスペックルを見分けることができるよう、細かい間隔で回折強度をサンプリング（計測）する。コヒーレント回折パターンのサンプリング間隔に対する要請はオーバーサンプリング条件とよばれ、二次元検出器のピクセル面積がスペックルの面積の半分以下であることが求められる⁶⁾。オーバーサンプリング条件は、測定した回折強度の情報量が、未知の試料構造の情報量を上回る条件を与える。このため、オーバーサンプリング条件は、回折パターンから試料構造を再構成する必要条件となる。

X線回折顕微法においては、元来、微小サイズの孤立した試料が必要とされてきた。これは、スペックルサイズが試料サイズに反比例するため、試料サイズが大きいとスペックル一つ一つを分解できなくなり、オーバーサンプリング条件を満たさなくなるためである。大きな試料に対して測定を行うには、後述のタイコグラフィーとよばれる走査型の回折顕微法が用いられる。

1つの入射角でのコヒーレントX線回折測定では、エバルト球上の回折強度が得られる。回折パターンの測定範囲が小さな立体角領域に限られ、エバルト球が平面とみなせる場合には、再構成像は試料の二次元投影とみなせる。また、さまざまな入射角で回折測定することにより、逆空間

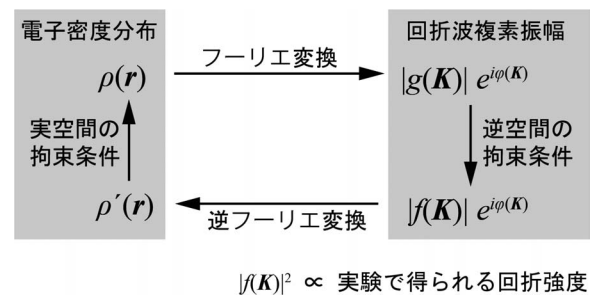


図2 反復的位相回復法の模式図. 実空間と逆空間（フーリエ空間）で既知の情報を与えながら、フーリエ変換と逆フーリエ変換を繰り返すことで、位相を回復する。

の三次元領域での回折強度分布データが取得でき、試料の三次元構造が得られる。

2. 反復的位相回復法

試料の電子密度分布（屈折率分布）とフラウンホーファー回折波の複素振幅とは、フーリエ変換の関係にある。X線回折波の複素振幅を計測することができれば、逆フーリエ変換によって電子密度分布を再構成できる。しかし、測定可能な物理量は光子数から得られる複素振幅の絶対値のみで、複素振幅の位相は直接的には測定できない。このため、電子密度分布を再構成するためには、何らかの方法で回折波の位相を回復する必要がある。これがよく知られたX線回折における位相問題である。

X線回折顕微法では、X線回折パターンからの位相回復にGerchbergとSaxtonに端を発する反復法を用いる⁷⁾。図2に反復的位相回復法の概念図を示す。反復法では、ランダムな電子密度分布（またはランダムな回折波の位相）から出発し、フーリエ変換と逆フーリエ変換を繰り返す。そして、各反復において、実空間および逆空間（フーリエ空

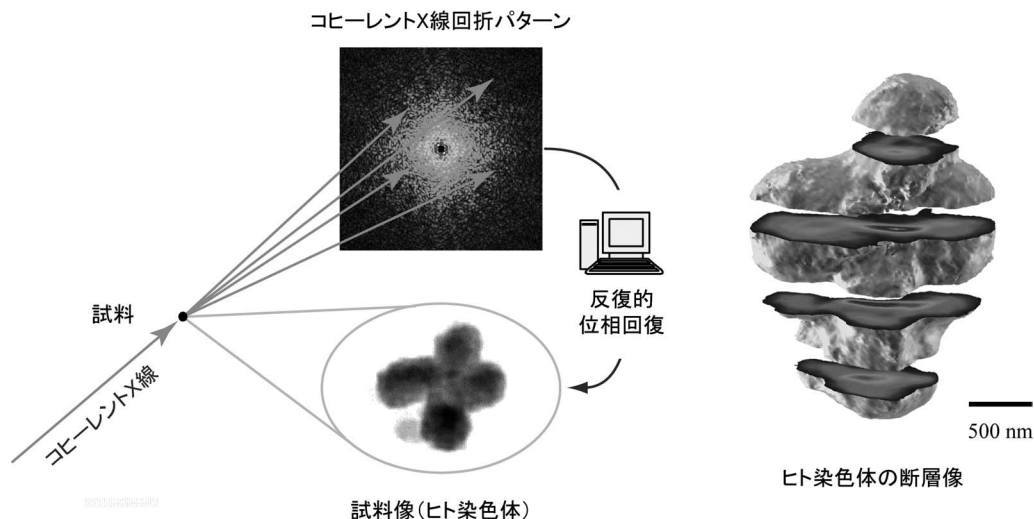


図3 ヒト染色体からのコヒーレント X 線回折パターンと反復的位相回復法により再構成された試料の二次元および三次元像。染色体の表面のみならず、内部構造も観察できる。

間)で既知の情報を補っていく。

まず、逆空間での既知情報として、回折強度の測定データを用いる。この際、位相は実験的に得られないため、各反復における計算値をそのまま採用する。実空間では、試料が存在するであろうと推定される領域(サポート)の外では電子密度がゼロであることや、物理的に電子密度が非負であることなどを拘束条件として課することができる。ここで、試料が存在するであろう領域は、スペックルのサイズが試料サイズに反比例するため、スペックルサイズから推定することができる。具体的な実空間拘束条件にはさまざまな流儀があるが、Fienupにより提案されたHIO(hybrid input-output)アルゴリズムが広く用いられている⁸⁾。

3. X線回折顕微法の測定例：バイオイメージング

X線の高い透過性は、試料が機能する自然な状態でのイメージングを可能とする重要な特徴である。この特徴を生かすことで、X線回折顕微法の応用が広がる。生物学への応用では、細胞や細胞小器官の、生きているに近い状態での観察が大きな目標に挙げられる。この分野ではクライオ電顕が現在最も有力な手法であるが、500 nmを超す厚い細胞小器官や細胞を丸ごとイメージングするには、透過能の優れたX線が有利である⁹⁾。

X線レンズを用いた通常の明視野の顕微鏡では、X線の高い透過性は諸刃の剣である。マイクロメートルサイズの無染色の生体試料は、X線をほぼ完全に透過してしまうため、吸収によるコントラストが得られず、内部構造を観察することは困難である。これに対しX線回折顕微法では、コヒーレントX線回折を利用することによって試料による

X線の波の位相シフトを高感度で検知することができ、無染色の生体試料のような透明な試料の内部構造も高いコントラストで観察することができる。

X線回折顕微法の世界初の生物学応用は、SPring-8のBL29XUでわれわれが行った大腸菌の二次元観察である¹⁰⁾。生物試料の三次元観察に関しても、SPring-8のBL29XUでわれわれが行った研究が世界初であり、無染色のヒト染色体の観察に成功した¹¹⁾。図3に、ヒト染色体からのコヒーレントX線回折パターンと、再構成された試料像を示す。われわれの研究により、コヒーレントX線を使った新しい顕微鏡で、イメージコントラストを人工的に高める染色や標識などの試料処理を必要とせず、細胞小器官の内部構造を高いイメージコントラストで観察できることが実証された。これにより、細胞内構造を観察する研究に新たな可能性を開いた。

4. タイコグラフィー

X線回折顕微法では従来、オーバーサンプリング条件を満たすために、微小サイズの孤立した試料が必要であった。試料サイズに対する制限をなくし、広がった試料にも適用できるタイコグラフィー(ptychography)とよばれる走査型の回折顕微法の研究が、近年盛んに行われている¹²⁻¹³⁾。タイコグラフィーでは、大きな試料の前にピンホールや集光光学系を置くなどして、照射領域をマイクロメートルサイズに制限する。試料を走査して重なり合いのある複数の試料領域からのコヒーレント回折データを計測することで、実験データの冗長性を高め、広がった試料の構造を再構成する。図4にタイコグラフィーアルゴリズムの模式図を示す。

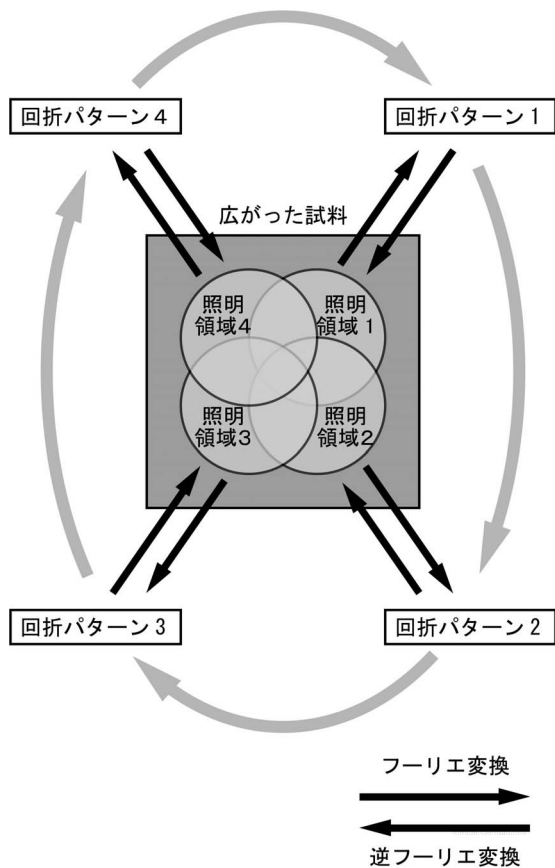


図4 タイコグラフィーの模式図. 試料を走査して重なり合いのある複数の試料領域からのコヒーレント回折データを計測することで、広がった試料の構造を再構成する。

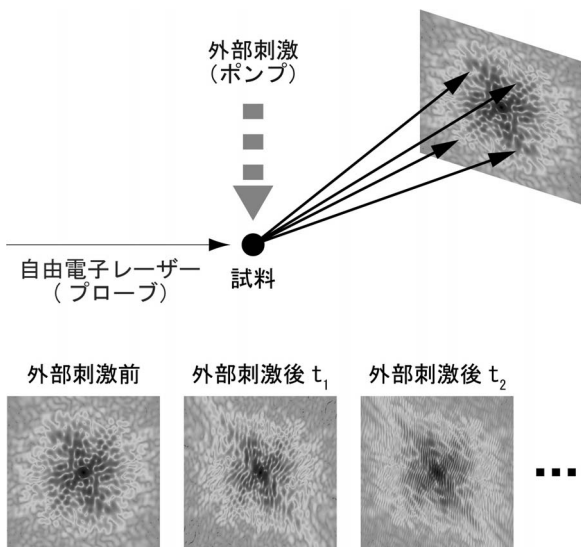


図5 X線自由電子レーザーを用いた超高速の構造ダイナミクス測定概念図. 究極的には、原子・分子の動画が得られる。

従来、タイコグラフィーでは三次元イメージングや散乱の弱い生体試料の観察は難しいとされてきたが、SLS (Swiss Light Source) においてこれらの困難を乗り越える

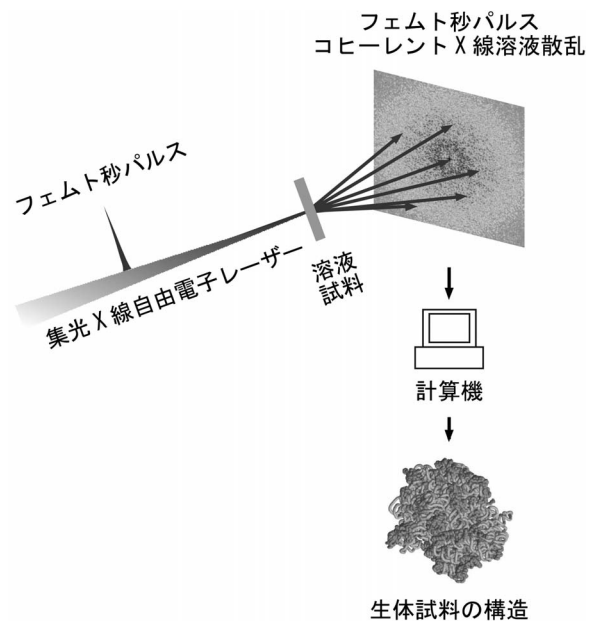


図6 X線自由電子レーザーを用いた放射線損傷の限界を超えたバイオイメージングの模式図. 溶液中で自然な状態にある生体試料もイメージングすることができる¹⁸⁾.

成果を近年挙げている。ただし、試料が厚い場合や、高分解能でのイメージングを行おうとすると、タイコグラフィーの基礎をなす投影近似が成り立たず、タイコグラフィーが適用できなくなるという限界も存在する。

5. X線自由電子レーザー

近年、新たなX線源としてX線自由電子レーザーが登場した。2013年現在、アメリカのLCLS (Linac Coherent Light Source)¹⁴⁾と日本のSACLA (SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser)¹⁵⁾が、X線自由電子レーザーの発生に成功している。X線自由電子レーザーは空間的にほぼ完全にコヒーレントな、大ピーク強度、超短パルスX線である。これを利用することにより、X線回折顕微鏡の新たな展開が期待される。

例えば、フェムト秒というきわめて短いX線自由電子レーザーのパルス幅を利用したコヒーレントX線回折実験を行うことにより、超高速ナノイメージングが実現する¹⁶⁾。図5には、超高速の測定法であるポンププローブ法とコヒーレントX線回折を組み合わせた実験が模式的に示されている。究極的には、原子・分子の世界の動画撮影が行えると期待している。

また、X線自由電子レーザーを用いることにより、これまでの分解能の限界を超えたバイオイメージングも行える。生体試料の高空間分解能での顕微鏡観察では、これまで、X線を用いた場合でも電子線を用いた場合でも、試料の放射線損傷が空間分解能を制限してきた。X線自由電子

レーザーは、フェムト秒というきわめて短いパルス幅をもつため、試料構造が破壊されるよりも前にX線と試料との相互作用が完了し、結晶以外の試料に対しても従来の限界を超えた高空間分解能が達成できる¹⁷⁾。これにより例えば、図6に示すように、溶液中で自然な状態にある生体試料もX線自由電子レーザーを用いてイメージングできる¹⁸⁾。X線自由電子レーザーの利用研究は始まったばかりであるが、これまで見ることでできなかった世界が開ける大きな可能性を秘めている。

本研究は文部科学省委託事業「X線自由電子レーザー重点戦略研究課題」、CREST、科学研究費の助成を受けたものである。

文 献

- 1) 西野吉則：“コヒーレントX線が明かす細胞の内部世界”，*パリティ*, **24** (2009) 14–20.
- 2) 西野吉則，石川哲也：“X線回折顕微法の原理”，*放射光*, **19** (2006) 3–14.
- 3) D. Sayre: “Some implications of a theorem due to Shannon,” *Acta Crystallogr.*, **5** (1952) 843.
- 4) J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz and D. Sayre: “Extending the methodology of X-ray crystallography to allow imaging of micrometre-sized non-crystalline specimens,” *Nature*, **400** (1999) 342–344.
- 5) I. K. Robinson, I. A. Vartanyants, G. J. Williams, M. A. Pfeifer and J. A. Pitney: “Reconstruction of the shapes of gold nanocrystals using coherent X-ray diffraction,” *Phys. Rev. Lett.*, **87** (2001) 195505.
- 6) J. Miao, D. Sayre and H. N. Chapman: “Phase retrieval from the magnitude of the Fourier transforms of nonperiodic objects,” *J. Opt. Soc. Am. A*, **15** (1998) 1662–1669.
- 7) R. W. Gerchberg and W. O. Saxton: “Phase determination for image and diffraction plane pictures in the electron microscope,” *Optik (Stuttgart)*, **34** (1971) 275–284.
- 8) J. R. Fienup: “Phase retrieval algorithms: A comparison,” *Appl. Opt.*, **21** (1982) 2758–2769.
- 9) R. Henderson: “The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules,” *Q. Rev. Biophys.*, **28** (1995) 171–193.
- 10) J. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros and Y. Nishino: “Imaging whole *Escherichia coli* bacteria by using single-particle x-ray diffraction,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (2003) 110–112.
- 11) Y. Nishino, Y. Takahashi, T. Ishikawa, N. Imamoto and K. Maeshima: “Three-dimensional visualization of a human chromosome using coherent X-ray diffraction,” *Phys. Rev. Lett.*, **102** (2009) 018101.
- 12) J. M. Rodenburg, A. C. Hurst, A. G. Cullis, B. R. Dobson, F. Pfeiffer, O. Bunk, C. David, K. Jefimovs and I. Johnson: “Hard-X-ray lensless imaging of extended objects,” *Phys. Rev. Lett.*, **98** (2007) 034801.
- 13) P. Thibault, M. Dierolf, A. Menzel, O. Bunk, C. David and F. Pfeiffer: “High-resolution scanning X-ray diffraction microscopy,” *Science*, **321** (2008) 379–382.
- 14) P. Emma, R. Akre, J. Arthur, R. Bionta, C. Bostedt, *et al.*: “First lasing and operation of an ångström-wavelength free-electron laser,” *Nat. Photonics*, **4** (2010) 641–647.
- 15) T. Ishikawa, H. Aoyagi, T. Asaka, Y. Asano, N. Azumi, *et al.*: “A compact X-ray free-electron laser emitting in the sub-ångström region,” *Nat. Photonics*, **6** (2012) 540–544.
- 16) Y. Nishino, Y. Tanaka, M. Okada, M. Okaya, Y. Uozaki, K. Nozaki, M. Yabashi, M. Nagasono, K. Tono, H. Kimura, H. Ohashi, S. Matsui, T. Ishikawa and E. Matsubara: “Femtosecond snapshot holography with extended reference using extreme ultraviolet free-electron laser,” *Appl. Phys. Express*, **3** (2010) 102701.
- 17) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: “Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses,” *Nature*, **406** (2000) 752–757.
- 18) J. Pérez and Y. Nishino: “Advances in X-ray scattering: From solution SAXS to achievements with coherent beams,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22** (2012) 670–678.

(2013年1月24日受理)