

投影型 X 線顕微鏡とその昆虫学、組織学等への応用

三井利夫*, 吉村英恭**

665-0875 宝塚市 中筋山手 3-6-24*, 明大 理工 物理**

Projection X-ray Microscopy and Its Application to Entomology and Histology

T. Mitsui* and H. Yoshimura**

Nakasuji-yamate 3-6-24, Takarazuka, 665-0875, Japan*

and Department of Physics, Meiji

University, Higashimita, Tama-ku, Kawasaki, 214-8571, Japan**

A projection X-ray microscope has been constructed by modifying a scanning electron microscope. The resolution of the microscope is about 0.1 μm , a little higher than that of an optical microscope. Focal length is very large and stereo-pair photographs can be easily obtained. Computed tomography (CT) has been developed to get detailed three-dimensional structures of small specimens.

Micrographs of various biological samples are presented in order to demonstrate that the X-ray microscope is a very useful tool for the non-destructive studies of internal structures of small insects and histological studies of thick preparations. In the micrographs, very thin whiskers or hairs of insects are visible, which suggests that a phase-contrast effect is present in imaging. This effect is studied by changing distances between the X-ray source and specimen. Observed results are in agreement with the conclusion of theoretical consideration.

目次

1. まえおき
2. 投影型 X 線顕微鏡の構造と性能
 - 2.1 構造
 - 2.2 倍率と分解能
 - 2.3 ターゲット中の X 線の発生領域
 - 2.4 薄いターゲットの耐性
 - 2.5 試料室内の気体、硬 X 線と軟 X 線
 - 2.6 コンピューター断層写真法 (CT)
3. 観察結果
 - 3.1 昆虫学への応用

- 3.2 組織学等への応用
- 4. 位相コントラスト
 - 4.1 理論的考察
 - 4.2 X線源と試料との距離
 - 4.3 軟X線と硬X線
- 5. まとめ
- 参考文献

1. まえおき

投影型X線顕微鏡についての仕事の紹介をするようにとのことで、書かせていただく。主な目的は、写真の実例を多く挙げてX線顕微鏡には広い応用の可能性があることを知っていただくことにある。また位相コントラストという概念には判り難いところがあり理解に混乱があるようなので、少し丁寧にその議論をする。

X線顕微鏡とは、X線を試料に照射し、その拡大像を得るイメージングシステムの総称である。可視光とは異なりX線に対する物質の屈折率は極めて1に近く（1よりわずかに小さい）、レンズ系をつくるのは困難である。よって全反射利用の凹面鏡やフレネル帯で光学系をつくる方法があるが、原理的に一番簡単なのは、球面波的に広がるX線を用いて影絵写真をつくる投影型顕微鏡等である。最初のX線顕微鏡の提案は1936年で、SievertがX線を遮蔽板にあけた小さい孔を通すことで球面波的なX線を得て投影型顕微鏡を作っている[S1]。1939年にはvon Ardenneが電子レンズで電子線を集束して点状のX線源を作っている[V1]。この方法で1951年からCosslettとNixonによって分解能のかなり良い写真が得られるようになった[C1~C4]。その後走査型電子顕微鏡が発明され、電子線を非常に小さい領域に集中する技術が生まれた。YadaとTakahashiは走査型電顕を改造してX線顕微鏡をつくり、分解能の良い写真を撮った[Y1, Y2]。我々の研究はそれに続くものである[M1, H1, Y3~Y5]。なお、ここで紹介するX線顕微鏡は放射光を使わず、実験室のX線源を使用したものであるが、最近雑誌Synchrotron Radiation Newsが放射光を使ういろいろな型のX線顕微鏡紹介の特集[S2]を出しており、またShinohara等の解説[S3, Y6]もある。それに見られるように、世界各地でいろいろの技術的な開発が進んでいる。

投影型X線顕微鏡の特性を要約すると次のようになる。

- (1) 光学顕微鏡よりは分解能が良い（0.1 μm に近い）。
- (2) 光学的に不透明な試料の内部構造を非破壊的に観測できる。
- (3) 電子顕微鏡と違い、試料を空気中もしくはヘリウムガス中に置いて観測できるので、水分の多い試料も調べられる。
- (4) 焦点深度が大きい（理論的には無限大）ので、厚い試料の内部構造を一度に観測できる。このことは特にコンピューター断層写真（CT）に有利である。
- (5) X線源を移動させること、或いは試料を傾けることで、ステレオペア写真が容易に撮れる。

- (6) ターゲット物質と加速電圧、或いは試料室の気体を選び、X線の平均波長を0.1~1 nm くらいの範囲で変えることができ、構造をコントラストを変えて観測できる。
- (7) 重原子修飾のできる組織は明瞭に観測できる。
- (8) 位相コントラストにより微細な構造の観測が可能である。

2節では我々の投影型X線顕微鏡の構造と性能について述べる。3節ではX線顕微鏡が多細胞生物の非破壊的構造研究に有用なことの具体例を多く示す。4節では位相コントラストについて考察する。5節では全体をまとめる。

2. 投影型X線顕微鏡の構造と性能

2.1 構造

明大のX線顕微鏡は走査型電子顕微鏡（日立製S-2500CX）の試料室部分を改造して製作した。図1にその構造を示す。(a)は顕微鏡全体である。(b)はX線源となる金属薄膜を中央に保持する台である。(c)は試料の支持台で、中央部に試料を置く。(a)に示すように、電子ビームを集束させる装置としては走査電顕の本体をそのまま用いる。ただ、ビームは走査電顕での試料の代わりに(b)の中央部の金属薄膜（厚さ0.1~1 μm程度のAuやAlの膜）の上に集束させる。電子ビームは走査せず膜上の一点に静止させ、点状のX線源をつくる。図(a)に示すように、ターゲット薄膜の下が生物試料と写真フィルムを入れる試料室となっており、X線は金属薄膜を通過し

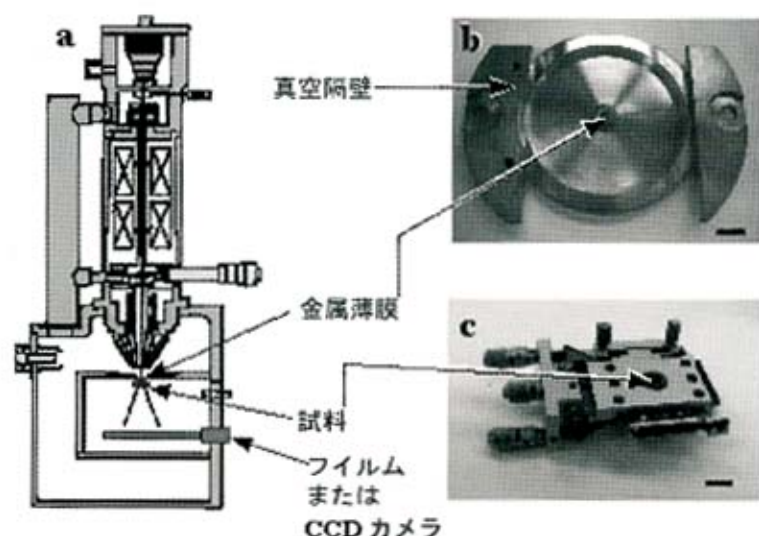


図1 投影型X線顕微鏡の構造 (a) 顕微鏡全体の概念図。(b) X線源。スケール：10 mm。中心部がAuやAl等の薄膜で、その上面に集束させた電子線を照射し、下方にX線が放出される。(c) 試料支持台。スケール：10 mm。小さい試料は電子顕微鏡用のグリッドにカーボン支持膜を張ったものを載せ、試料台中央部に固定する。昆虫などの大きな試料は薄い粘着テープに着け、試料台中央部に置く。試料は3次的に移動させ得る。

て試料室内を球面波状に拡がる。試料室は真空にもできるが、水分の多い生物試料を扱う場合等、空気または1気圧のヘリウムで満たす(Heを用いる効果については2.5節参照)。この場合ターゲット薄膜は電顕の高真空部分と大気圧部分の境となるが、膜部分(直径200 μm 程度)は小さいので、これで充分真空を保つことができる。

2.2 倍率と分解能

影絵写真ということから、投影型X線顕微鏡の直接倍率 M は、X線源と試料との距離を D_s (s:specimen)、試料とフィルムの距離を D_i (i:image)として、

$$M = (D_s + D_i)/D_s \quad (2-1)$$

となる。例えば $D_s = 50 \mu\text{m}$, $D_s + D_i = 50 \text{mm}$ とすれば、 M は1,000となる。露出時間は倍率が大きくなるにつれ長くなる。通常フィルムを使用する場合は5分から20分、CCDカメラの場合は3分以下である。

グレーティングの写真で調べた結果では分解能は0.1 μm よりも良くなりうる[Y2]。分解能を決める諸因子については[M1]の3.3節を参照していただくとして、分解能を決めるのは主にX線源の大きさで、それを決める重要な因子としては電子散乱がある。次節でこれについて最近調べた結果を紹介する。

2.3 ターゲット中のX線の発生領域

X線源が大きいと像に半影ができ分解能がわるくなる。X線源の大きさは電子線が金属薄膜上に集束する領域の大きさに加えて、電子線の金属中の散乱によるX線発生領域の広がりである。図2はこの散乱の効果を示す。金表面の赤い線で示した点に、(a)では10 keV, (b)では20 keVのエネルギーを持った電子が100個当たった場合の、モンテカルロシミュレーションの結果である。計算法は[K1]によった。原子との衝突で電子がエネルギーを失いながら拡散する様子を色で示してある。赤、黄、緑、青、黒の線はそれぞれ、衝突でエネルギーが入射エネルギーの100-80、80-60、60-40、40-20、20-0%

となった電子の軌跡を示す。(b)の加速電圧が20 kVの場合に、特性X線 $\text{AuL}\alpha_1$ (9.71 keV, 0.128 nm)を出せるのは赤と黄の領域で直径は300 nm程度である。そのうち赤の領域からは特に強くX線が出るであろうが、その直径は50 nm以下である。(a)の10 kV

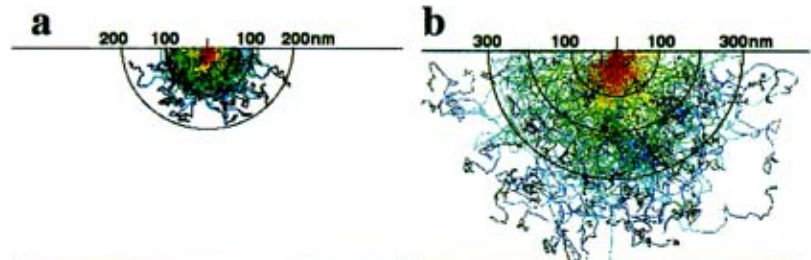


図2 電子の散乱によるX線の発生領域の広がり

(a) 電子の入射エネルギーが10 keVの場合、(b) 20 keVの場合。金表面の赤い線で示した点に100個の電子が入射したときに、原子との衝突で電子がエネルギーを失いながら拡散する様子を示す。赤、黄、緑、青、黒の線はそれぞれ衝突の結果、エネルギーが入射エネルギーの100-80、80-60、60-40、40-20、20-0%となった電子の軌跡を示す。

の場合はそれよりも小さい。電子ビームの集束直径はそれよりも小さくでき、実効的な X 線源の大きさが 50 nm 程度もしくはそれ以下に到達することは可能と思われる。なお、膜を薄くすると、特性 X 線 $Au\alpha_1$ を発生できない低エネルギーの電子が突き抜けるようになり、余分の熱発生が少なくなる。突き抜けた電子は試料室が空気やヘリウムで満たされていれば、吸収されてそれ程多くはフィルムに到達しない。フィルムを 2 枚重ねて置き、1 枚で電子線を吸収させ、2 枚目を像記録に用いることで、突き抜けた電子線の影響を大体除くことができる。

2.4 薄いターゲットの耐性

電子線のターゲットすなわち X 線源となる金属としてどのようなものがよいかは、Yada と Takahashi[Y1]が検討している。我々は多くの場合に金を用いた。通常の X 線発生装置で、過大な電流を流すと電子線の当たったターゲット部分が損傷する。加速電圧を V 、電流を I とし、電子をターゲット上の半径 r の円内に集束するとしよう。この際ターゲットに損傷を与えない程度に適当に大きい単位面積当たりのエネルギー入力を w とする。例えば $V = 50$ kV, $\pi r^2 = 1\text{mm}^2$ の場合、ターゲットに損傷が起きないように、 $I = 150$ mA とした値が選ばれるが、この際 $w = 50 \times 10^3 \times 150 \times 10^{-3} / 10^{-6} \text{ W/m}^2 = 7.5 \times 10^9 \text{ W/m}^2$ である。我々の実験例で、ターゲットは Au 薄膜で、 $V = 16$ kV, $\pi r^2 = 1\mu\text{m}^2$, $I = 30 \mu\text{A}$ といった場合、 $w = 16 \times 10^3 \times 30 \times 10^{-6} / 10^{-12} \text{ W/m}^2 = 0.48 \times 10^{12} \text{ W/m}^2$ となる。これと上の w との比は $0.48 \times 10^{12} / 7.5 \times 10^9 = 64$ 倍となる。[C4]の p. 618 にはこういった比が 680 倍になる例が見られる。つまりターゲットが薄い場合、単位面積当たりのエネルギー入力 w を大きくでき、電子線を小さい面積に集束してもターゲットの損傷は少ない。このことは投影型 X 線顕微鏡を可能にしている一つの要因である。もっとも実際はターゲット膜にはときどき孔があく。

通常の水冷式対陰極で広い面積に電子線が当たると熱の流れが一方向き（1 次元）になるが、薄膜の場合、膜の厚さが熱発生領域の大きさに近付くと、熱の流れが円筒対称的（2 次元）となり、また 2.3 節で述べたように、遅くなって X 線を発生させる能力がなくなった電子が膜から飛び出すことになれば無用の熱発生がなくなる。こういったことが有利に働いているようである。このことの理論的考察は [C4, C5]とその引用文献に見られる。

2.5 試料室内の気体、硬 X 線と軟 X 線

ターゲットの金属と加速電圧を変えると X 線の波長分布が変わるが、試料室を空気で満たすか He ガスで満たすかでも、フィルムに到達する X 線の波長分布は大きく変わる。その様子は文献[Y4]の Fig. 3 に示されている。これによると、同じ Au ターゲット、同じ加速電圧 20 kV で、X 線源から 100 mm 離れたところで、空気の場合軟 X 線が吸収されて硬 X 線が主成分となり、He ガスでは軟 X 線が主成分になる。これにより、空気と He を交換することで、比較的簡単に硬 X 線主体の写真と軟 X 線主体の写真を撮ることができる。事例は後程図 17 に示す。

2.6 コンピューター断層写真法 (CT)

昆虫等の3次元構造を詳しく調べるためコンピューター断層写真法(CT: computer tomography)を導入した。試料の回転には図1(c)に示した試料支持台の代わりに新たに開発した試料回転用の装置を付けた。回転装置はパルスモーターで0.018度のステップで、X線の光軸に垂直に回転する。試料は回転軸にゲル状の瞬間接着剤で固定した。撮影にはCCDカメラを用い、3次元構造再構成は円錐状に広がるビームに対するフィルター補正逆投影法[F1]によった。これによりデータはX線吸光度の3次元分布として再構成され、多数のピクセルの立体的配列で吸光度分布を表現する。これにより、試料の外表面の立体可視化とか断面の構造を見ることなどができる。実例は後程図8に示す。

3. 観測結果

3.1 昆虫学への応用

アブラムシコマユバチはミカンクロアブラムシに卵を生み付け、卵はアブラムシ体内で孵化し、成虫になることが知られている。図3はこのことをX線顕微鏡で直接観測したものである。図(a)は光学顕微鏡写真である。ハチに寄生された太って丸いアブラムシが写っている。(b)は同じ個体のX線顕微鏡写真である。寄生蜂は幼虫か蛹のように見える。(c)は異なる個体であるが、寄生蜂は成虫になっているように見える。(d)は背中に孔のあいたアブラムシの死骸で、寄生蜂の抜けた後と思われる。

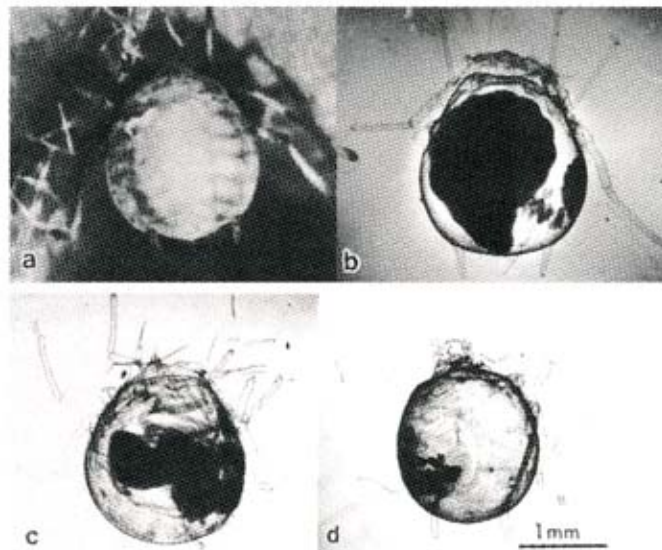


図3 アブラムシ中の寄生蜂 [Y3]

アブラムシ(*Toxoptera contricidus*)中の寄生蜂(*Lysiphlebus japonicus* Ashmead)。(a)光学顕微鏡写真。(b)、(c)、(d) X線顕微鏡写真。Auターゲット(厚さ1 μ m), 20 kV, Heガス、露出7分。(b)は(a)と同じ個体。寄生蜂の幼虫或いは蛹が見える。(c)寄生蜂が成虫になったらしい状態。(d)寄生蜂がアブラムシの背中に孔をあけて抜け出した後と思われる。

図4はワラジムシのX線顕微鏡写真である。臨界点乾燥した試料なので、鮮明な写真になっている。中央部の縦に黒い棒状の太い器官は消化器官で昆虫の消化器官が簡単な構造であることを示す。生きたワラジムシを使うと、食物が消化器官を通してゆく過程をみることもできる。

図5(a)は甲虫の光学顕微鏡写真で、(b)はX線顕微鏡写真である。(c)は腹部の拡大X線顕微鏡写真である。(c)に矢印で示した白い紐状のものは呼吸器官である。専門家の話では、昆虫の呼吸気管はこのように単純なので、モスラのような巨大化は考え難いとのことである。



図4 フラジムシとその消化器官 [S4]
 フラジムシ(*Porcellio scaber* Lateille)の X 線顕微鏡写真。臨界点乾燥。Au ターゲット (厚さ 0.3 μm), 20 kV, 空気、露出 15 分。体の軸に平行な太い棒状のものが消化器官。

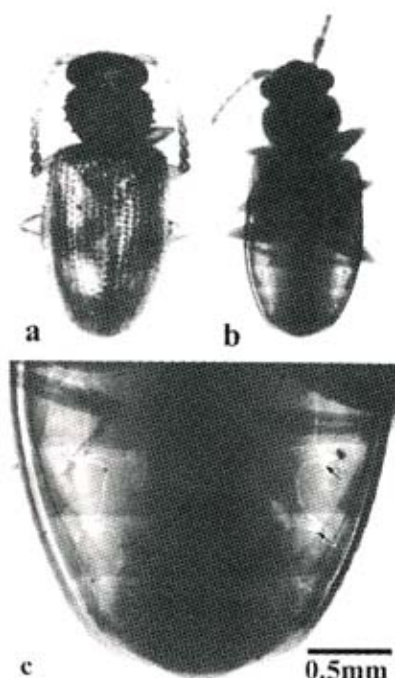


図5 昆虫の呼吸器官 [Y3]。
 (a) 光学顕微鏡像。(b) X線顕微鏡写真。Au ターゲット (厚さ 0.3 μm), 10 kV, He ガス、露出 5 分。(c) 腹部の拡大。矢印で示したのは気管 (呼吸器官) で、白く紐状に見える。

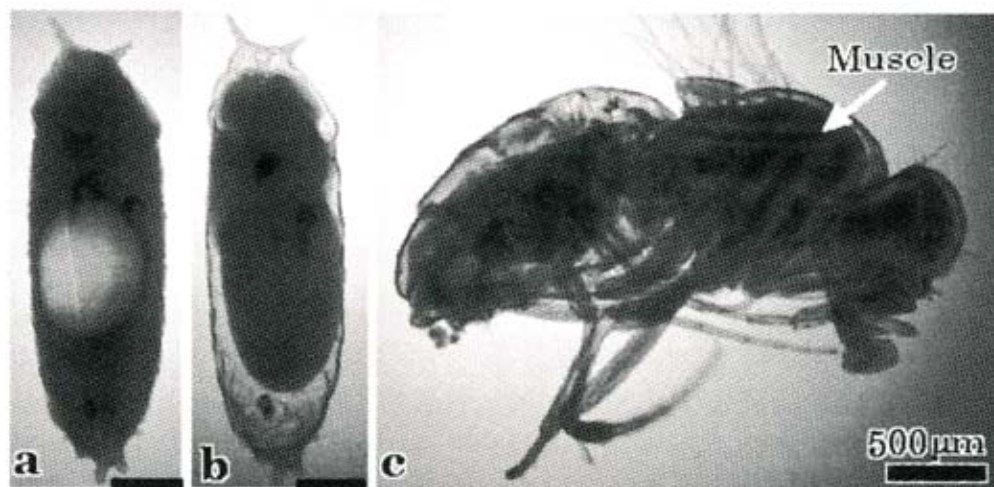


図6 ショウジョウバエの変態と筋肉 [Y3]
 ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の X 線顕微鏡写真。Au ターゲット (厚さ 1 μm), 20 kV, 空気。(a) 蛹となって 2 時間後。成虫に変態中。中央部の白い楕円状の部分は体の融けたところ。(b) 蛹となつてから 39 時間経つたところ。融けたところがなくなり、成虫の体に近くなつている。(c) 臨界点乾燥した成虫を横から撮つた写真。翅を動かす筋肉 (矢印) がよく発達している。ショウジョウバエは東大物理の堀田凱樹教授からいただいた。

図6はショウジョウバエのX線顕微鏡写真である。昆虫の変態では、蛹の体のかなりの部分が溶けて、成虫の体を作られることが知られている。図(a)は蛹の体内構造を示す写真で、体の中央部の丸く白い部分が溶けている部分に当る。(b)では殆ど成虫になっている。(c)は臨界点乾燥で処理したショウジョウバエの成虫で、矢印で示した翅を動かす筋肉が良く発達している。

図7には体長0.5mm程度のクマムシを臨界点乾燥したもの、X線顕微鏡写真を示す。写真に見られるように、クマムシは8本の肢を持つ。各肢の軸方向に黒く見えるのが筋肉である。通常の動物の筋肉は伸筋と屈筋のように、力学的に対抗する働きをする拮抗筋の対になっているが、クマムシの筋組織はそのようにはなっておらず、主に体液の膨圧で肢を伸ばし、筋肉で肢を縮める。始めて肢を持った動物という説もある。クマムシは緩歩動物門に属し、光学顕微鏡で見ると、緩やかに可愛げに動く。コンピューター断層写真法(CT: computer tomography)については2.6節で述べた。図8はワラジムシについての結果を示す。撮

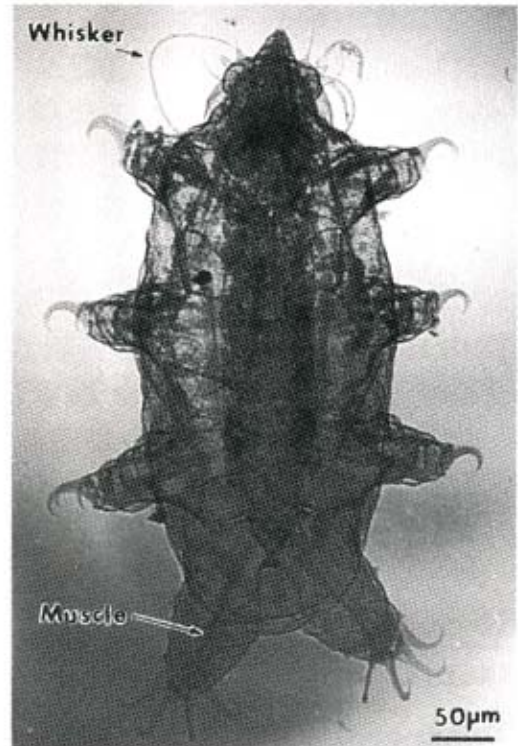


図7 クマムシの肢と筋肉 [Y3]

クマムシ(*Echiniscus japonicus*)のX線顕微鏡写真。Auターゲット(厚さ0.3µm)、10kV、Heガス、露出7分。8本の突起は肢。各肢の軸に黒く見えるのが筋肉。クマムシは東京女子医科大学の宇津木和夫教授からいただいた。

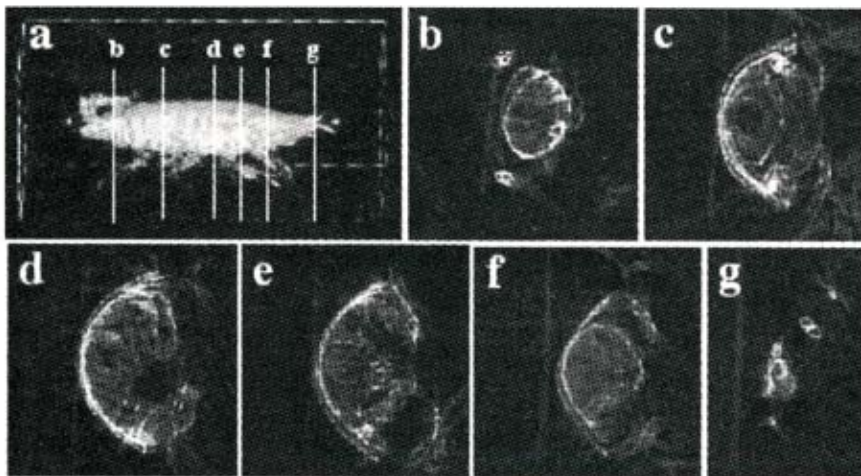


図8 ワラジムシのCT写真 [Y4]

ワラジムシのX線顕微鏡CT写真。Auターゲット(厚さ1.2µm)、15kV、露出2分。CCDで撮影。(a)ワラジムシの体表面を立体可視化したもの。縦に引いた線b~gは断面構造を求めた切り口を示す。(b~g)断面の構造。

影には CCD カメラを用い、被写体を回転し、1 度毎に撮影して 1 回転 360 組の投影像のデータを得た。1 度毎の露光時間は 1 枚当たり 2 分である（現在は 20 秒程度で済む）。立体像の再構成には円錐状に広がるビームに対するフィルター補正逆投影法 [F1] を用いた。これによりデータは X 線吸光度の 3 次元分布として再構成され、256 × 256 × 512 ピクセルの立体的配列で表現された。図 a はワラジムシの外表面を立体可視化した結果で、立体表示支援ソフトウェア (AVS: Advanced Visual System) を用いた。図 a に示した b~g の位置に於ける回転軸に垂直な断面の構造を図 b~g に示す。図 c と d に見られる大きい円形の黒い部分は消化器官である。細い繊維状の組織の多くは筋肉と思われる。

3.2 組織学等への応用

低倍率の X 線顕微鏡は医学におけるレントゲン写真類似の使い方ができる。図 9 には生後 1 日のラット幼児後肢の X 線顕微鏡写真を示す。肢の骨が形成される際は、まず軟骨が出来上がり、ついでこれがなくなり、その後で改めて骨芽細胞によって骨が作られることが知られている。図 9 にはその中間段階が見られる。

図 10 にはヒトの骨の研磨標本の X 線顕微鏡写真を示す。中央左寄りの白い大きい丸は血管である。その周りに楕円を描くように配列している小さい白い点状の構造体は骨細胞のあった骨小腔を示す。骨が活着している器官であることを実感させる写真である。

X 線は金、銀、オスミウム、バリウム、ウラニウム等の重原子によってよく吸収される。従って、生体組織の特定部分をこれらの原子によって修飾できれば、その部分を際立たせて観測できる。投影型 X 線顕微鏡は焦点深度が大きくかつステレオ写真が容易に撮れるので [M1]、厚い試料の立体構造が直接に観測できる。普通の透過電顕で生物試料を観察する場合、試料の厚さは 1 μm くらいが限度であり、超高压電顕でも 5 μm 程度である。従って 100 μm

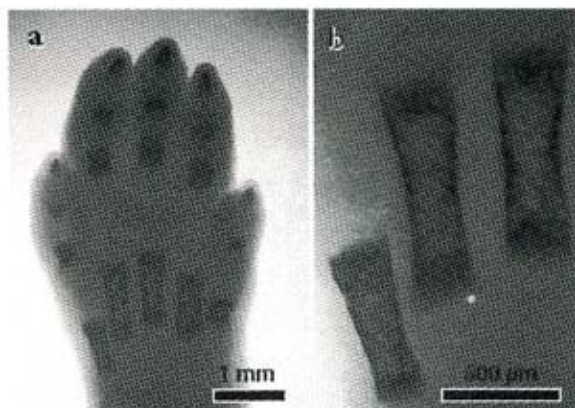


図 9 マウスの後肢の X 線顕微鏡写真 [H1]

生後 1 日目のマウス後肢の拡大レントゲン写真。Au ターゲット (厚さ 1 μm)、加速電圧: 17 kV、空気、露出 10 分。(a) 全体像。(b) 一部の拡大像。軟骨から硬骨への骨化の過程を示す。硬骨内部の空洞は骨髓腔。



図 10 ヒトの骨の X 線顕微鏡写真 [H1]

厚さ 50 μm の研磨標本。Au ターゲット (厚さ 1 μm) 17 kV、空気、露出 7 分。中央から左よりの白い楕円は血管。その周りに楕円上に配列している小さい白い点状のものは骨細胞のあった骨小腔。標本は東京医科大学の和気健二郎教授からいただいた。

くらいまでの立体構造が良い分解能で把握できることは組織学的研究のうえでは有意義なことと思われる。ここではステレオペア X 線顕微鏡写真の 2 例を示す。慣れた人ならこれから試料の立体構造を見ることができよう。

図 11 はゴルジ（銀）染色したラットの大脳皮質の切片の写真で、切片の厚さは 80 μm くらいである。神経繊維の立体的網目構造を厚さ 80 μm の全体にわたって見ることができる。

和気らはブタの肝臓切片をゴルジ染色し、光学顕微鏡と電子顕微鏡で星細胞の構造と機能を詳しく調べた [W1]。図 12 にはその切片の X 線顕微鏡写真を示す。試料の厚さは 50 μm 程度である。上半分では毛細胆管の網目構造が、下半分では類洞（毛細血管）に巻き付いた星細胞の立体構造が楕円状に見える。

4. 位相コントラスト

X 線写真には、ショウジョウバエの頭の毛（図 6c）、クマムシのひげ（図 7）などがはっきり写っている。これらの場合 1 mm 以上の厚さの体内構造がコントラストよく見えるように露出時間を調節してあるので、毛や

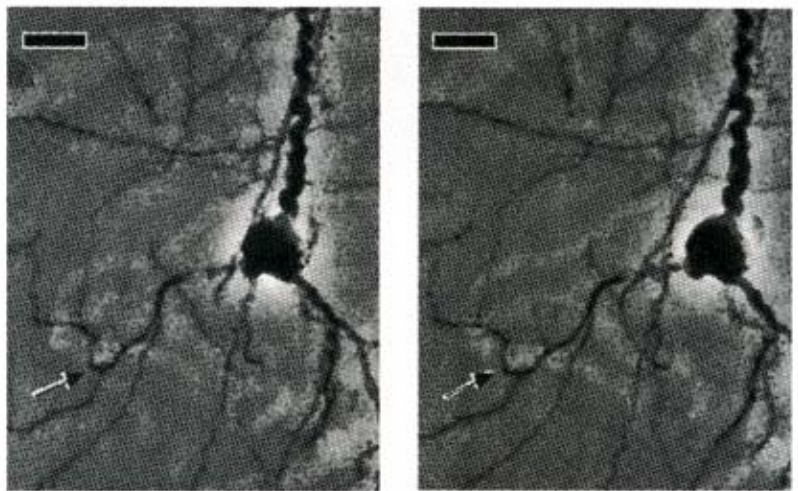


図 11 ラットの大脳皮質の X 線顕微鏡写真 [Y4]

ゴルジ（銀）染色した切片（厚さ約 80 μm ）のステレオペア X 線顕微鏡写真。スケール：10 μm 。Au ターゲット（厚さ 0.2 μm ），10 kV，He ガス、露出 30 分。中央右寄りに神経細胞があり、その周りの軸索の空間配列が見える。彎曲したやや白い管状のものは毛細血管と思われ、矢印のところで軸索が血管を巡って曲がっている。切片は生理研の浜清教授からいただいた。

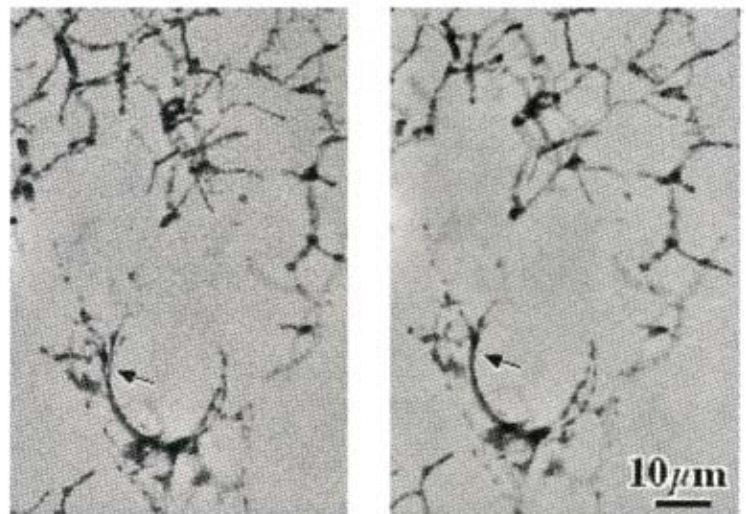


図 12 ブタの肝臓組織の X 線顕微鏡写真 [H2]

ゴルジ（銀）染色したブタの肝臓切片：厚さ 50 μm のステレオペア X 線顕微鏡写真。Au ターゲット（厚さ 0.18 μm ），15 kV，空気、露出 20 分。上半分は毛細胆管の立体的網目構造、下半分には星細胞のリング状の立体構造が見られる。切片は東京医科歯科学大学の和気健二郎教授からいただいた。

ひげが X 線吸収の結果見えるようになったとは考え難い。図 13 にはもう一つの例として、左側にシダの空の胞子胞、右側に 2 つの胞子を示す。胞子上の微細な毛がはっきり見える。この場合も胞子の質量は毛よりはるかに大きいから、こういった結果は位相コントラストによるものと思われ、我々の X 線顕微鏡には位相差顕微鏡としての一面もあることを示す。この節ではこのことについて考察する。

4.1 理論的考察

X 線顕微鏡のターゲットの各原子からの X 線波は相互に関連なく発生し、よって位相に相関がなく、それぞれ独立にフィルム上に像をつくる。観測される像はそういった像の強度分布を足し合わせたものとなる。しかし X 線源は広がりを持つので、それぞれの像は互いに少しずれて重なることとなり、合成された像は点光源による像とは違うものとなる。この違いについて考える。簡単な問題であるが、経験上話が混乱することが多いので、基本的なことから整理させていただく。

各原子からの X 線波は有限の長さの波連 (wave train) として表象できる。これら波連の位相に相関が無ければ、これらが重なっても重ならなくても、統計平均としては同じ像が得られる。しかしそれはそれとして、我々の行っている X 線実験で波連がどのように飛んでくるかについて考察したところ、少し思いがけない描像となったのでご参考までにまずそれについて述べる。対陰極の 1 個の Cu 原子に電子が衝突し、特性 X 線 $\text{CuK}\alpha_1$ が放出されたとする。この X 線を近似的に Δt の間継続する正弦波の波連で表す。波連の周波数スペクトルは波連の Δt にわたるフーリエ積分で与えられ、スペクトルの実効的な幅 $\Delta\nu$ は Δt と

$$\Delta\nu = 1/\Delta t \quad (1)$$

なる関係にある (例えば[B1]参照)。よって波連の長さ l (可干渉距離) は、 c を光速度として、

$$l = c\Delta t = c/\Delta\nu \quad (2)$$

となる。波長を λ とすると $\nu = c/\lambda$ なので、 $\Delta\nu = c\Delta\lambda/\lambda^2$ となり、

$$l = \lambda^2/\Delta\lambda \quad (3)$$

を得る。文献[R1]によると、 $\text{CuK}\alpha_1$ 線の場合、 $\lambda = 0.154 \text{ nm}$ 、自然幅は $\Delta\lambda = 4.59 \times 10^{-5} \text{ nm}$ である。よって波連の長さは $l = \lambda^2/\Delta\lambda = 5.2 \times 10^2 \text{ nm} = 0.52 \text{ }\mu\text{m}$ となる。つまり、X 線源からは長さ $0.5 \text{ }\mu\text{m}$ くらいの X 線の波が次々と飛び出すことになる。

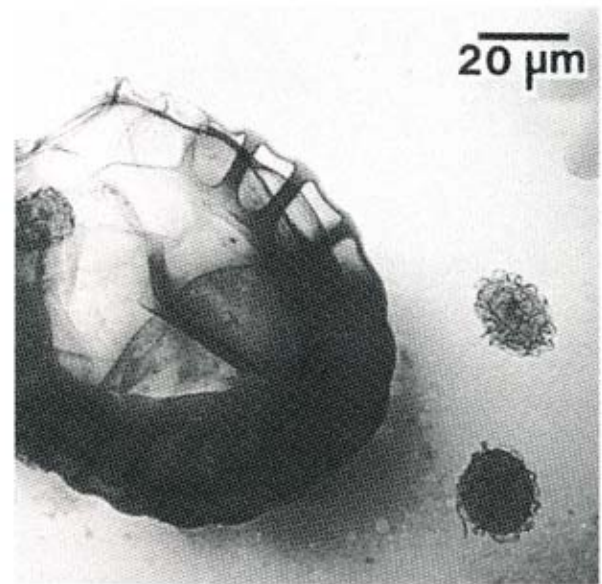


図 13 シダ胞子の X 線顕微鏡写真 [Y3]
Au ターゲット (厚さ $1 \text{ }\mu\text{m}$)、 20 kV 、He ガス、露出 2 分。左に大きいシダの空になった胞子胞、右に小さい 2 つの胞子を示す。胞子表面の細かい毛がよく見える。

文献[Y7]の図4.15によると、X線量子発生効率はステラジアンあたり $10^{-4} \sim 10^{-3}$ である。対陰極にあたる電子電流を 150 mA として、1秒に当る電子数は、 $150 \times 10^{-3} / 1.6 \times 10^{-19} = 9.4 \times 10^{17}$ となる。試料の広がりをも $(0.1 \text{ mm})^2$ 、X線源と試料との距離を 5 mm とすると、使うX線の広がり立体角で $(0.1)^2 / 5^2 = 4 \times 10^{-4}$ ステラジアンとなり、スリットでX線をこの程度に絞ったとすると、試料に当るX線量子は、発生効率の上限 10^{-3} を用いて、多くて $9.4 \times 10^{17} \times 10^{-3} \times 4 \times 10^{-4} = 3.8 \times 10^{11}$ cps となる。X線波連間の平均距離を L とすると、 L は光速 $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ をX線量子数で割って得られる。すなわち $L = 3 \times 10^8 / 3.8 \times 10^{11} = 8 \times 10^{-4} \text{ m} = 800 \mu\text{m}$ となる。上の結果と合わせると、平均 800 μm おきに 0.5 μm の長さのX線波がポツンポツンと試料に当ることとなる。我々のX線顕微鏡ではターゲットはAu薄膜からのL線を使っている。[R1]によると $\text{AuL}\alpha_1$ の場合、 $\lambda = 0.128 \text{ nm}$ 、 $\Delta\lambda = 1.03 \times 10^{-4} \text{ nm}$ で、 $l = \lambda^2 / \Delta\lambda = 1.6 \times 10^2 \text{ nm} = 0.16 \mu\text{m}$ となる。X線量子の発生効率は $\text{AuK}\alpha_1$ より小さいが、上限はおおまかに言って 10^{-3} 程度である[Y7]。ターゲットにあたる電流は加速電圧 16 kV の場合 30 μA 程度で、上の $\text{CuK}\alpha_1$ 線の例と同様の計算をすれば、4 m おきに 0.16 μm の長さのX線波がポツンポツンと試料に当ることとなる。X線顕微鏡で使用するX線は基本的にはこのようなものである。

図14に示すように、点線で示した光軸に垂直な光源面、試料面、像面からなる光学系を考える。光源面と試料の間隔を D_s (s: source)、試料面と像面の間隔を D_i (i: image) と記す。光源面と光軸との交点を 0 とし、0 を原点として面上に x 軸をとり、1つの点光源が x 軸上 x なる位置にある場合を考える。試料面には遮光板を置き、光軸との交点から x 軸に平行に $\pm (a/2)$ の位置にある孔 P_1 と P_2 以外にはX線を通さないとし、 P_1 と P_2 の透過率は同じとする。 x と P_1 と P_2 との距離は r_1 と r_2 と記す。像面の光軸との交点を 0_i で表し、 0_i を原点にして x 軸に平行に ξ 軸をとる。 ξ 軸上 ξ での電場は x にも依存するので $E(\xi: x)$ と記す。上述のように、X線波はポツンポツンと入射する。1秒間に x から n 個のX線波が放出されるとし、1つのX線波連が像面に当たっている時間を Δt とし、 Δt 秒の間に積分したX線の強度を $I(\xi: x)$ とする。 $E(\xi: x)$ は P_1 を通ってきたX線の振幅 E_1 と P_2 を通ってきた電場 E_2 の和になる。 P_1 と P_2 の中間でのX線の振幅を E_0 とし、 ε を誘電率、 A を定数とすると、 $I(\xi: x)$ は次のように書ける。積分は 0 から Δt までである。

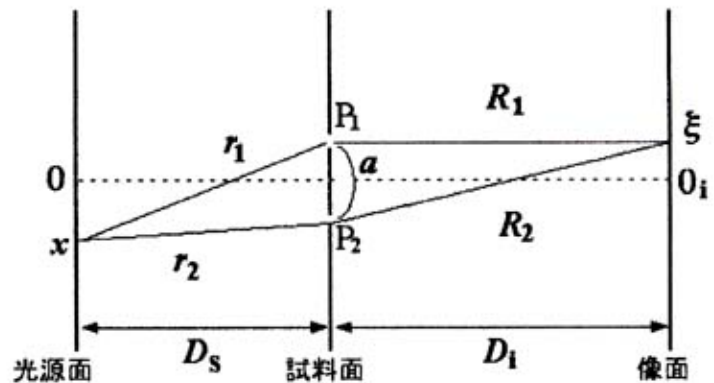


図14 点状のX線光源が x にあるとして、像面上 ξ でのX線強度、 $I(\xi: x)$ を求める。

$$\begin{aligned}
 I(\xi: x) &= n\varepsilon \int [AE_0 \cos(2\pi r_1/\lambda + 2\pi R_1/\lambda - \omega t) + AE_0 \cos(2\pi r_2/\lambda + 2\pi R_2/\lambda - \omega t)]^2 dt \\
 &= n\varepsilon A^2 E_0^2 \int [\cos^2(2\pi r_1/\lambda + 2\pi R_1/\lambda - \omega t) + \cos^2(2\pi r_2/\lambda + 2\pi R_2/\lambda - \omega t) \\
 &\quad + 2\cos(2\pi r_1/\lambda + 2\pi R_1/\lambda - \omega t)\cos(2\pi r_2/\lambda + 2\pi R_2/\lambda - \omega t)] dt
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= n\epsilon A^2 E_0^2 [\Delta t + \int \cos(2\pi(r_1 + r_2 + R_1 + R_2)/\lambda - 2\omega t) dt \\
 &\quad + \int \cos(2\pi(r_1 - r_2 + R_1 - R_2)/\lambda) dt] \\
 &= n\epsilon A^2 E_0^2 \Delta t [1 + \cos 2\pi(r_1 - r_2 + R_1 - R_2)/\lambda] \quad (4)
 \end{aligned}$$

$r_1 = \{D_s^2 + (a/2 - x)^2\}^{1/2}$ 、 $r_2 = \{D_s^2 + (a/2 + x)^2\}^{1/2}$ で D_s が a や x よりはるかに大きいとすると、良い近似で

$$r_1 = D_s + (1/2)(a/2 - x)^2/D_s \quad (5a)$$

$$r_2 = D_s + (1/2)(a/2 + x)^2/D_s \quad (5b)$$

となり、その差は

$$r_1 - r_2 = -ax/D_s \quad (6)$$

となる。同様にして D_i が a や ξ よりはるかに大きいとすると、

$$R_1 - R_2 = a\xi/D_i \quad (7)$$

となり、光源が1つの原子の場合、(4) は次のようになる。

$$I(\xi: x) = \epsilon A^2 E_0^2 \Delta t [1 + \cos 2\pi(-ax/(D_s\lambda) + a\xi/(D_i\lambda))] \quad (8)$$

もし光源の原子が0にあれば、 $x=0$ とおいて、

$$I(\xi: 0) = n\epsilon A^2 E_0^2 \Delta t [1 + \cos 2\pi a\xi/(D_i\lambda)] \quad (9)$$

となり、回折縞の強度は $\xi=0$ で最大になる。

次にX線源として2つの原子があり、1つの原子が0点に、もう1つが x にある場合を考え、 ξ 軸上の強度分布を $I(\xi: 0, x)$ で表す。これは $I(\xi: 0)$ と $I(\xi: x)$ の和なので、(8) と (9) から

$$\begin{aligned}
 I(\xi: 0, x) &= n\epsilon A^2 E_0^2 \Delta t [2 + \cos 2\pi a\xi/(D_i\lambda) \\
 &\quad + \cos 2\pi(-ax/(D_s\lambda) + (a\xi/(D_i\lambda))] \quad (10)
 \end{aligned}$$

となる。もし $x=0$ つまり2つの原子が共に0にあれば、

$$I(\xi: 0, 0) = 2n\epsilon A^2 E_0^2 \Delta t [1 + \cos 2\pi a\xi/(D_i\lambda)] \quad (11)$$

となり、干渉縞は(9)の2倍の強さになる。もし(10)で $2\pi ax/(D_s\lambda) = \pi$ すなわち

$$x = D_s\lambda/(2a) \quad (12)$$

ならば、2つの \cos 項は逆符号になり、

$$I(\xi: 0, D_s\lambda/a) = 2n\epsilon A^2 E_0^2 \Delta t \quad (13)$$

となる。すなわち回折縞は消えて一定の強度分布になる。 x が0から(12)に近付くにつれ干渉縞は鮮明でなくなる。このように、0と x から発するX線は振幅の重なりがないという意味で非干渉であるが、強度分布のずれが観測される図形を変えろという意味で相関がある。

次にX線源が多数の原子からなり広がりを持つ場合を考える。上の議論から点光源の場合に比べて回折図形がぼけることが期待される。このぼけ方を問題にする。実際のX線源では発光する原子は図2に示したように立体的に分布しているが、簡単のため、光源面上0を中心直径 d_s の円板の中に光源が均等に分布しているとする。試料面上には図14のようなスリットがあるとする。光源の広がりがあまり大きくなければ像面 0_i に最大値 I_{\max} 、それから少し離れて最小値 I_{\min} を持つ回折縞が観測される。縞の鮮明度(visibility) V は

$$V = (I_{\max} - I_{\min})/(I_{\max} + I_{\min}) \quad (14)$$

で与えられる。詳しくは光学の教科書[K2, K3]を参照にさせていただくこととして、

この V は

$$V = 2 |J_1(\pi z)| / (\pi z) \quad (15a)$$

$$z = ad_x / (\lambda D_s) \quad (15b)$$

で与えられる。ここで a と D_s は図 14 に示した長さで、 J_1 は 1 次のベッセル関数である。図 15 に V を D_s の関数としての示す。実線と点線はそれぞれ次の数値を入れての計算である。(このような数値を用いた理由は 4.2 節で述べる。)

$$a = 3 \mu\text{m}, \quad d_x = 43 \text{ nm}, \quad \lambda = 0.128 \text{ nm} \quad (\text{硬 X 線}), \quad \text{実線} \quad (16)$$

$$a = 3 \mu\text{m}, \quad d_x = 43 \text{ nm}, \quad \lambda = 0.77 \text{ nm} \quad (\text{軟 X 線}), \quad \text{点線} \quad (17)$$

(15a) の V の一番小さいゼロ点 z_1 は

$$z_1 = 1.22 \quad (18)$$

である。(15b) により、このゼロ点を与える物理条件は

$$ad_x / (\lambda D_s) = 1.22 \quad (19)$$

となる。先に簡単な系で求めた (12) を書き変えると

$$ax / (\lambda D_s) = 0.5 \quad (20)$$

となる。回折縞が現れる大体の境界を与える条件としては (19) と (20) は似た関係である。なお、反位相を与える位置という意味で (20) の x は $d_x/2$ に相当する。

図 15 には硬 X 線 ($\lambda = 0.128 \text{ nm}$) の場合を実線で、軟 X 線 ($\lambda = 0.77 \text{ nm}$) の場合を点線で示したが、計算は共に、 $a = 3 \mu\text{m}$, $d_x = 43 \text{ nm}$ とおいて行った。(19) のゼロ点に対応する D_s は実線の場合 0.85 mm 、点線の場合 0.14 mm となっている。図にも見られるように、 D_s がこういった値の 3 倍程度、つまり実線では 2.6 mm 程度、点線では 0.42 mm 程度を越して増大すると回折縞は鮮明になる。つまり軟 X 線の方が試料を X 線源に近く置いて、拡大率を大きくしても、位相差の効果が観測しやすいこととなる。

(15) によると、干渉縞の鮮明度 V は a 、 d_x 、 λ 、 D_s の 4 つの変数をまとめて $ax / (\lambda D_s)$ の関数となっている。

図 15 の曲線で、 a 、 d_x 、 λ を固定して D_s を変え、 D_s が大きくなると V が 1 に近づくことを示したが、 d_x 、 λ 、 D_s を固定して、 $1/a$ を変えても図 15 のような曲線が得られる。つまり a が小さくなり、 $ad_x / (\lambda D_s)$ が (19) の値を越して小さくなると干渉縞の鮮明度 V は 1 に近付き、 a が大きくなると 0 に近づく。これは X 線の干渉の効果が試料面における観測対象が小さいときは観測され易いが、大きくなるとかえって観測され難いことを意味する。よって試料面に小さい試料がありその屈折率が

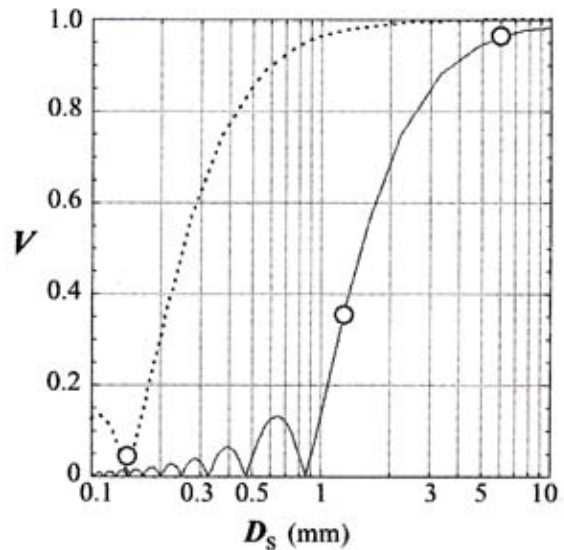


図 15 D_s の関数としての V [Y3]

D_s : X 線源と試料との距離。 V : 回折像の鮮明度。(15) と (16) による計算。丸印については 4.2 節参照。

周辺とは違う場合、位相差による回折図形が観測されることが期待される。これが吸収では見えない筈の細いものが観測された原因と思われる。

原子の出す各 X 線波連の試料面での空間的コヒーレンスの度合いは 1 と思ってもよいであろうが、 a の関数としての V は、光源の広がりの結果としてこのコヒーレンスが壊され、試料面でどの程度生き残るかを示しているかのように見ることがもできる。よって V は空間的コヒーレンスとも呼ばれる。もっともこの述語は各原子による電磁波の振幅に重なり合いがあるような誤解を与えて、議論に混乱を招くこともあるようである。

4.2 X 線源と試料との距離

図 15 に示したように、位相コントラストの鮮明度は X 線源と試料との距離 D_s によって変わる。この効果を実験的に調べるため、太さ $3 \mu\text{m}$ くらいのアリの体毛を、X 線源と試料の距離 D_s を変えて写真を撮った。試料は空気中にあり、加速電圧は 20 kV であったから、2.5 節で述べたことから X 線の主成分は硬 X 線である。図 16 の左側は印画紙に焼き付けた結果である。 D_s は (a) 0.14 mm 、(b) 1.3 mm 、(c) 6.2 mm である。各写真の中央部にある縦に長い線が体毛で、(a)、(b)、(c) の順にはっきり見えている。図 (a) の白い水平の線に沿ってフィルムの黒化度 ODF を計ったところ、図の右側のグラフに示すような結果を得た。フィルムの黒化度なので、X 線のあまり当たらないところつまり ODF の小さいところは印画紙上では黒くなる。つまり体毛が黒く見えるのは、体毛をフィルム上に投影した所には X 線があまり入射しないことを意味する。体毛を屈折率 n の円柱のように考えると、物質の X 線に対する屈折率 n は 1 より小さいので、体毛は可視光における凹レンズのようになり、X 線を外側に屈折させた結果と思われる。

この観測では図 14 のようなスリットはないが、この干渉図形の鮮明度は (14) 式と図 16 右の ODF のデータから計算することができる。得られた値を図 15 に丸印で示す。実際には丸の分布に合うように (16) 式のパラメータを決めている。具体的

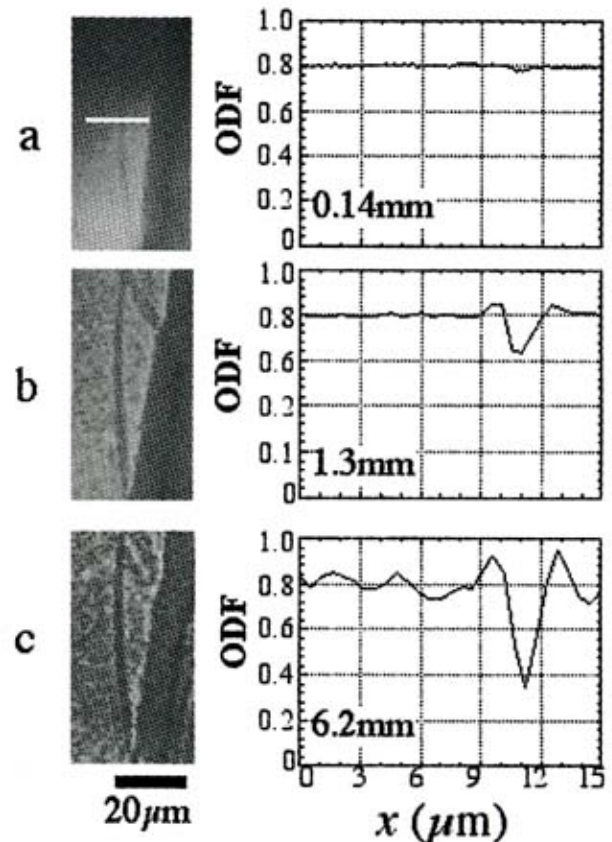


図 16 X 線源と試料との距離 D_s を変えることの効果 [Y3]

左側はアリの体毛による X 線回折像。Au ターゲット (厚さ $0.3 \mu\text{m}$)、 20 kV 、空気、露出 10 分。(a) $D_s = 0.14 \text{ mm}$ 。(b) $D_s = 1.3 \text{ mm}$ 。(c) $D_s = 6.2 \text{ mm}$ 。右側は写真 (a) 中の白線に沿って計ったフィルムの黒化度 (ODF) を示す。横軸は白線上の距離である。

には、(16)の λ としては特性 X 線 $\text{AuL}\alpha_1$ の値を用いた。また 4.1 節の最後で論じたように、(15)の V を X 線源から出る各波連の空間コヒーレンスが試料面で a だけ離れた 2 点でどれだけ生き残っているかを示すパラメータとも見ることができる。体毛の太さは約 $3 \mu\text{m}$ なので、この程度の範囲では空間コヒーレンスが生き残っているとして a を $= 3 \mu\text{m}$ と置いた。 d_x は実線が丸の分布と一致するように選び、 43 nm としたところ、図 15 のようにデータの分布をよく説明できた。この一致自体過大な評価はできないが、一応 d_x の値もかなり妥当であるし、とにかく D_s が変わると位相コントラストがどう変わるかについて理論的予想との傾向の一致が見られる。試料面で空間的コヒーレンスが $3 \mu\text{m}$ 程度の範囲では生き残っていると思ってもよさそうである。なお(17)の λ は(16)の λ の6倍とした。

4.3 軟 X 線と硬 X 線

先に 2.5 節で、試料室内の気体が空気の場合硬 X 線成分が多くなり、He ガスの場合は軟 X 線成分が多くなることを論じた。図 17 はこれがどのように X 線像に影響するかを示す。(a) は試料室を空気で満たした場合のアリの肢の一部の写真である。(b) は He ガスの場合を示す。10 本くらいの体毛が写っており、フレネル回折によるエッジ強調が現れている。矢印で示したところには細い毛がある。これは位相コントラストで見えるようになったと思われる。(c) は (a) と (b) の 2 つの場合にこの細い毛をそれに垂直な線に沿って計ったフィルムの黒化度 (ΔODF : ODF のバックグラウンドを引いたもの) を示す。実線が (b) の He ガスの場合、点線は (a) の空気の場合に当る。実線すなわち軟 X 線の方が点線よりもはっきりした山と谷を与える、図 15 によると、同じ D_s で比べると、位相コントラストによる鮮明度 V は軟 X 線では (点線) は硬 X 線 (実線) より大きくなる。図 17 の結果は予想通りとなっている。

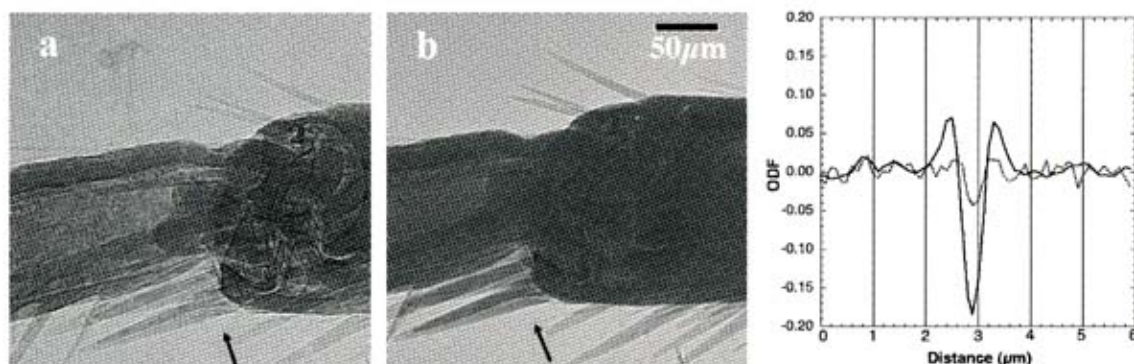


図 17 軟 X 線成分の多い場合と硬 X 線の多い場合の比較

アリの肢の一部と体毛の X 線顕微鏡写真[Y4]。試料室を空気で満たしたときと He ガス (1 気圧) で満たしたときの比較。スケール: $50 \mu\text{m}$ 。Au ターゲット (厚さ 0.3 mm)、 20 kV 。(a) 空気 (硬 X 線が多い)。(b) He ガス (軟 X 線が多い)。(c) 写真で矢印で示した毛に垂直な線に沿って計ったフィルムの黒化度。実線は He ガスの場合。点線は空気の場合。

5. まとめ

投影型 X 線顕微鏡は拡大影絵写真を撮るという原理的には簡単な顕微鏡であるが、

分解能は光学顕微鏡に優り、不透明物体の非破壊的観測に有用である。しかしその活用には生物学、組織学等の専門家との良い関係が必須である。その誘い水となることを希望して、多くの投影型 X 線顕微鏡写真を紹介した。

投影型 X 線顕微鏡の特性は 1 節に要約した如くである。

X 線源を小さくすることで、半影によるぼけを小さくして分解能を良く出来、また X 線の干渉性がよくなるので位相コントラストで細かいものの存在が見えるようになる。一方で、X 線源を小さくするとナイフエッジ回折に見られるようなフレネル回折像によるぼけも生じる。投影型 X 線顕微鏡の像形成の原理は簡単なので、半影やフレネル回折像によるぼけはかなりの程度計算機処理により補正が可能であろう。

謝辞

この研究は最初矢田慶治東北大名誉教授の御指導と平岡和佳子博士の協力で始まった。明大の学生諸君等と生物の不思議さに触れ、楽しみながら多くの写真を撮った。東大の堀田凱樹教授、東京女子医科大学の宇津木和夫教授、生理研の浜清教授、東京医科歯科学大学の和気健二郎教授、には貴重な資料を提供頂いた。執筆にあたって、矢田慶治教授、篠原邦夫東大名譽教授には文献について御教示をいただいた。皆様に御礼申し上げます。

引用文献

- B1. Born, M. and Wolf, E. *Principle of Optics*. II. Pergamon Press (1970): 草川徹、横田英嗣訳、光学の原理 II. 東海大学出版部、1975. p.502.
- C1. Cosslett, V. E. and Nixon, W. C. X-ray shadow microscope. *Nature* **168** (1951) 24-25.
- C2. Cosslett, V. E. and Nixon, W. C. X-ray shadow microscopy. *Nature* **170** (1952) 436-438.
- C3. Cosslett V. E. and Nixon, W. C. An experimental X-ray shadow microscope. *Proc. Roy. Soc.* **B140** (1952) 422-431.
- C4. Cosslett, V. E. and Nixon, W. C. The X-ray shadow microscope. *J. Appl. Phys.* **24** (1953) 616-623.
- C5. Cosslett, V. E. Intensity limitations in a point source of X-rays. *Proc. Phys. Soc. (London)* **B65** (1952) 782-785.
- F1. Feldkamp, L. A., Davis, L. C. and Kress, J. W. Practical cone-beam algorithm. *J. Opt. Soc. Am.* **1** (1984) 612-619. (1984).
- H1. 掘越俊彦、千葉久博、三井利夫. X 線顕微鏡で見た生物の世界. 遺伝 **50** (1996) 76-82.
- H2. 掘越俊彦. 明大修士論文 (1994).
- K1. 神田公生 (著作権者). 日立計測器サービス (株) ホームページ <http://www.hisco.co.jp/ei/software/mc.html>
- K2. 菊田惺志. X 線回折・散乱技術 上 東京大学出版会 (1996) p.52.

- K3. Klein, M. V. and Furtak, T. E. Optics. John Wiley & Sons (1986) p.545.
- M1. 三井利夫、平岡和佳子、掘越俊彦、千葉久博、矢田慶治. 投影型 X 線顕微鏡の製作と生物研究への応用. 明治大学科学技術研究所紀要 33 (1994) 47-60.
- R1. Robert, D. and Sulkanen, M. AXAF Project Science: Width for characteristic X-ray lines. <http://wwwastro.msfc.nasa.gov/xray/xraycal/linewidths.html>.
- S1. Sievert R. M. Two methods of Roentgen microphotography. *Acta Radiol.* 17 (1936) 299-309.
- S2. Schmahl, G. "Introduction to the special issue on X-ray microscopy" にはじまる 14 編の論説. *Synchrotron Radiation News* Vol. 16, Nos.3 and 4 (2003).
- S3. 篠原邦夫, 伊藤敦. 2.2 章 軟 X 線顕微鏡で細胞の分子構築を見る, pp. 25-35. In: 日本分光学会測定法シリーズ 40 極限状態を見る放射光アナリシス、尾嶋正治編 (2002) 学会出版センター.
- S4. 正津大介. 修士論文 (明治大学 理工学部 物理学系) 1997.
- V1. von Ardenne, M. Zur Leistungsfähigkeit des Elektronen-Schattenmikroskopes und ueber ein Roentgenstrahlen-Schattenmikroskope. *Naturwiss.* 28 (1939) 485-486.
- W1. Wake, K. and Sato, T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res.* 273 (1993) 227-237.
- Y1. Yada, K. and Takahashi, S. Target materials suitable for projection X-ray microscope observation of biological samples. *J. Electron Microsc.* 38 (1989) 321-331.
- Y2. Yada, K. and Takahashi, S. The recent development of projection X-ray microscopy for biological applications. In: *X-ray Microscopy III*, Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 pp.195-198. Springer (1992).
- Y3. Yoshimura, H., Shoutsu, D., Horikoshi, T., Chiba, H., Kumagai, S., Takahashi, K. and Mitsui, T. Application of SEM-modified X-ray microscope to entomology and histology, and effects of X-ray coherence in imaging. *J. Electron Microscopy* 49 (2000) 621-628.
- Y4. Yoshimura, H. Application of the projection X-ray microscopy to biological specimens. *Proc. Arthropod. Embryol. Soc. Jpn* 38 (2003) 1-8.
- Y5. Yoshimura, H. Maeda, H., Hori, A., Horikoshi, T., Takada, H. and Igarashi, K. Three-dimensional visualization in projection X-ray microscopy of biological specimens. *J. Phys. IV France* 104 (2003) 355-358.
- Y6. Yamamoto, Y. and Shinohara, K. Application of X-ray microscopy in analysis of living hydrated cells. *The Anatomical Record (New Anat.)* 269 (2002) 217-223.
- Y7. 吉松満、菊田惺志. 1-4 章 X 線源、 p. 58. In: 物理実験学講座 20「X 線回折」、高良和武編集 (1988) 共立出版.