



軟X線顕微鏡の生物応用

篠原 邦夫

東京都臨床医学総合研究所
放射線医学研究部門

Soft X-Ray Microscopy in Biology

Kunio SHINOHARA

Department of Radiation Research, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Present status of the biological application of X-ray microscopy is reviewed in view of the expected potential of it. The characteristics of X-ray microscopy in the observation of biological specimens are: (1) applicable to the observation of hydrated specimens in a physiological condition at higher resolution than optical microscopy; (2) three dimensional observation of thick specimens; (3) different images from optical microscopy due to the different contrast mechanism; and (4) mapping and analysis of elements in specimens. Examples of X-ray images showing these characteristics are presented: (1) An X-ray image of hydrated biological specimen at the resolution of 10 nm is shown by contact microscopy; (2) three dimensional observation of a 200 μm thick dried and stained biological specimen at the resolution higher than 0.08 μm by projection microscopy; and (3) element mapping by scanning microscopy. However, much more data are required to establish the characteristic advantages of X-ray microscopy in biology. For this purpose it is essential to have an X-ray microscope system working anytime.

1. はじめに

生命は非常に高度な組織構築とその調節によって維持されている。例えば、生命の基本単位である細胞には、細胞核、ミトコンドリア、ゴルジ装

置、粗面小胞体、リソソーム等々といった細胞内小器官が整然と秩序正しく配置され、そのそれぞれが協調的に機能することによって細胞としての機能を維持している。細胞内小器官はそれぞれさ

らに微細構造をもつ。すなわち細胞内では10-100nmといった光学顕微鏡では直接観察できない構造が細胞の機能に大きく関与している。

光学顕微鏡で明らかにできない構造の観察には、電子顕微鏡が利用され、生物学に多大な貢献をしてきた。すなわち、構造を明らかにすることが細胞の機能ひいては生命の機構の理解に大きく寄与していることは明らかである。しかしながら、電子顕微鏡は水溶液中の生理的な条件下にある細胞の観察には適していない。従って、生物試料をそのままの状態でも光学顕微鏡より高い分解能で観察することができたら、今までにない新しい知見を得ることができるに違いない。確かに電子顕微鏡は細胞内微細構造を高分解能で画像化できる。しかし、生理的な状態での構造と固定・染色した後の構造とでは何かが違うだろう。しかも、電子顕微鏡では厚い試料の観察が難しい。例えば丸ごとの細胞の三次元的な構造を光学顕微鏡よりも詳しく観察する方法は今のところない。

波長1-10nmの軟X線は、生体を構成する元素との相互作用が適度に大きく、なおかつ、それぞれの元素に応じてその相互作用の大きさが有意に異なる。また、この相互作用の大きさはX線の波長によっても異なる。この特性を積極的に利用する観察法として軟X線顕微鏡が期待されている。軟X線顕微鏡は、分解能の点では電子顕微鏡よりも劣るが光学顕微鏡よりも高くできる。また軟X線の生体試料中の透過率は電子線に比べてはるかに高いので、1-10 μ mといった厚い試料の観察が可能である。すなわち軟X線顕微鏡は、電子顕微鏡の場合よりも厚い生物試料を光学顕微鏡よりも高い分解能で観察できる新しい観察法として期待され、実証されつつある。

本稿では、まず始めに生物応用の際に期待される軟X線顕微鏡の特徴について整理し、次にその特徴に沿って現在のX線顕微鏡開発の現状を紹介し、最後にその将来性について論及したい。

2. 生物応用に期待される軟X線顕微鏡の特徴

生物応用に期待される新しい顕微鏡とは、現行の方法では観察できないかあるいは観察が非常に難しい問題を解決する顕微鏡を意味する。すなわち、光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡では観察が難しい生物試料を観察できるようにすることが期待される。

よく知られているように生体は主に水素、酸素、炭素、窒素等の軽元素を構成元素としており、その大半が波長1-10nmの軟X線領域にK殻あるいはL殻吸収端を持っている¹⁾。また、水は水素と酸素のみで構成されているのに対し蛋白質や核酸といった生体構成分子は炭素を主要な構成元素としているため、酸素のK殻吸収端(2.33nm)より長波長側炭素のK殻吸収端(4.37nm)までの波長域は、水による吸収が低いにもかかわらず生体分子による吸収が大きい領域である。従って、この領域(water windowと呼ばれている)のX線を利用すれば、水による吸収の影響を最小限にして生物試料の観察を行なうことができる。しかも、この波長域のX線は、電子線よりもはるかに透過性が高い。

以上のように、軟X線顕微鏡は、光学顕微鏡とは異なったコントラストで、(使用する光源の波長が短いので)光学顕微鏡よりも高い分解能で、しかも生物試料をそのままの状態でも観察できる新しい観察法である。この特徴を生物試料観察の観点でまとめてみると

- (1) 水溶液中にある生理的な状態の生物試料を光学顕微鏡よりも高分解能で観察できる。
- (2) 厚い試料(乾燥試料を含む)の三次元観察が可能である。
- (3) 光学顕微鏡の範囲の分解能であってもコントラスト生成機構の違いにより観察結果が光学顕微鏡とは異なる。
- (4) 元素分布の観察と解析ができる。

と整理することができよう。確かに分解能の点で

は電子顕微鏡に劣るが、一般的に生体試料を電子顕微鏡で観察するためには、試料を固定し、さらに電子線によるコントラストを得るための染色が必要である。軟X線顕微鏡は、この固定染色して観察した電子顕微鏡写真による知識が正しいものか否かある範囲で検証する観察法ともなりうるであろう。また、電子顕微鏡による観察の場合のような複雑な試料調製の必要がない点も電子顕微鏡と比較した場合の利点である。

3. 水溶液中の生物試料観察における問題点

上記のように、X線顕微鏡の大きな特徴の一つとして水溶液中の生物試料の観察があるが、水溶液中の試料の場合には、その観察に特有の問題、すなわち、観察に用いるX線による試料の放射線損傷と熱拡散によるボケの問題がある。

波長の短い電磁波(軟X線-硬X線)の場合には、物質との相互作用によって、化学結合を切断するのに十分なエネルギーの授受がある。この現象はX線顕微鏡の場合でも例外ではなく、いわゆる試料の放射線損傷を誘起する。X線顕微鏡の場合には、観察に用いるX線による試料の吸収エネルギーは電子顕微鏡の場合よりもはるかに小さく、約1/1000と推定されている²⁾が、無視できるほど小さくはない。また、この放射線損傷が試料の構造変化を誘起するという可能性については実証されたわけではないが、その可能性を否定することはできないので、十分に念頭においた上で水溶液中の生物試料のX線顕微鏡観察を行なうべきであろう。

軟X線と物質との相互作用は、光電効果が主体である。すなわち、光子は元素の軌道電子にすべてのエネルギーを渡す。その結果その元素はイオン化し、分子に傷害が生ずる。現在開発が進んでいるX線顕微鏡は吸収のコントラストを利用して観察する方式が主体であるが、この場合のX線顕微鏡による観察は、必然的に観察点にその化学結合を切断するのに十分すぎるほどのエネルギー吸

収があることを意味する。いいかえると、X線顕微鏡はその観察の端から放射線損傷を引き起こしている可能性が高い。また、この吸収エネルギーの大きさの計算による推定値は、厚さが2-10 μ mの試料をwater windowのX線(3nm)で観察すると10⁴Gy(分解能が100nm)あるいは10⁷Gy(分解能10nm)程度となることがいくつかのグループによって示された³⁾。この線量は、生物には放射線損傷の修復機構があるという事実を考慮しても非常に大きな値で、生き残る細胞は零に等しく、また10⁴Gyの吸収エネルギーでも、修復できないDNAの二重鎖切断が細胞当たり10⁵個も生ずると推定された³⁾。このDNA損傷の量は200-300個のヌクレオソームに一個の損傷に相当する。さらに分解能10nmで観察する場合にはその吸収エネルギーの推定値は10⁷Gyとなり、修復できないDNA損傷はすべてのヌクレオソームに一個以上生じてしまうと推定された³⁾。ヌクレオソームの大きさは、直径11nmで厚さ5nmの円板状であるから、分解能10nmで観察する場合の傷害の大きさを推測して欲しい。

このように大きな放射線損傷も、乾燥試料であればX線顕微鏡で観察できるほどの大きな構造変形につながることはないであろう。しかし、水溶液中にある場合にはその熱拡散の影響により、大きな構造変化となりうる。この構造変化が生ずる時間は主に損傷分子の熱拡散による移動の時間と考えられるが、高い分解能で生物試料を観察する場合には、放射線損傷のあるなしに関わらず試料の水溶液中での熱拡散によるボケが問題となる。ちなみに10nmの粒子が熱拡散によって10nm移動する時間は10 μ sec以下と推定された⁴⁾。従って、水溶液中の生物試料を高分解能で観察するには、短時間露光による観察等の工夫が必要となるだろう。

一方露光時間が水の中での熱拡散に要する時間より短い場合には、試料に吸収されるエネルギーによる断熱膨脹の影響を考慮すべきでその影響も

回避するには数十 psec 以下の露光が望ましい、という議論が London ら⁵⁾ により提起されているが、試料に吸収された全エネルギーが熱に変換されるまでに要する時間については検討の余地がある。

4. 軟 X 線顕微鏡の種類と生物応用

軟 X 線源の開発とその光学素子の性能向上に伴い、軟 X 線顕微鏡の開発も急速に進展している⁶⁻⁹⁾。軟 X 線顕微鏡としては、試料を透過した X 線を検出する透過型 X 線顕微鏡のほかに、X 線を吸収した元素から二次的に放射される特性 X 線を検出する蛍光 X 線顕微鏡等種々の方法が検討されているが、ここでは生物観察への応用の進んでいる透過型 X 線顕微鏡に限って話を進めていきたい。なお、軟 X 線顕微鏡装置については、最近多くの解説がでている¹⁰⁻¹²⁾ ので、ここでは生物応用を中心に紹介したい。

透過型軟 X 線顕微鏡は、さらに結像に用いる光学素子の違いや観察のための検出方式の違いなどによって、Table 1 のように分類できる。分解能は現在達成されているレベルを Table 1 に記したが、目下急速に進歩しており、将来はいずれも 10nm 以下を達成できると予測されている¹³⁾。また、X

線源としては成果が報告されているものをあげた。将来はいずれの線源も利用可能となるだろう。

4.1 軟 X 線源

軟 X 線源としては、シンクロトロン放射光、プラズマ X 線、レーザーで誘起された X 線レーザー等の線源が一般的である。いずれも大型の装置が利用されているが、実験室型の観察装置には、プラズマ X 線源の利用もある。また、投影法には走査型電子顕微鏡が利用されている。

前項に記したように、水溶液中の生物試料の観察の場合は、熱拡散によるボケの影響を考慮すべきで、高い分解能で観察する場合には一般的には露光時間を短くするべきであろう。この点は観察対象の試料の状態にもより、試料が固定されていればその必要がない。現在ミリ秒以下の露光で観察するには、シンクロトロン放射光では強度不足で、プラズマ X 線源が利用されている。

一方軟 X 線の波長を自由に選択して観察するには、シンクロトロン放射光に一日の長がある。すなわち、生物試料における元素の分布の観察解析には、乾燥試料になるかも知れないがシンクロト

Table 1 Soft X-ray microscopes

Type	Optics or Detectors	Resolution (nm)	Source*
Contact	Resist	10	SR, PX, XL
	Zooming tube	200	SR
Projection		80	SEM-X
Imaging	Zoneplate	50	SR, PX, XL
	Grazing incidence (Wolter)	100	SR, PX
	Multilayer (Schwarzschild)	500	PX
Scanning	Zoneplate	50	SR
	Grazing incidence (Wolter)	300	SR
Holography	Resist	<100	SR, XL
	CCD	100	SR

*SR, Synchrotron radiation; PX, Plasma X-rays; XL, X-ray laser; SEM-X, Point source produced with scanning electron microscope.

ロン放射光が便利であろう。なお、要求する分解能によっては水溶液中の試料も可能であろう。

4.2 X線密着顕微法

検出器と試料を密着させ、検出器に得られた像をなんらかの方法で拡大して観察する方法で、光学系は非常に簡単なものとなる。拡大観察の方法としては、ノマルスキー型の微分干渉顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察が一般的であるが、現在はレジストを直接¹⁴⁾あるいはレプリカ法¹⁵⁾によって透過型電子顕微鏡で観察する方法が開発されている。また、原子間力顕微鏡 (AFM) による観察も最近報告された¹⁶⁾が、利用価値の高い方法として期待したい。分解能は検出器で決まり、従来の銀塩フィルムの場合には1 μm 程度が限界であったが、半導体工業の進歩で高解像度のX線レジスト (感光性高分子) が開発され、飛躍的に向上した。このX線レジストを用いる密着法は、1976年にIBMのFederらによって始めて報告された¹⁷⁾。X線レジストとしてはPMMA (polymethylmethacrylate) がよく使われる。その分解能の理論的境界は5nmといわれており¹⁸⁾、現実には10nm前の解像度での観察が報告されている^{19, 20)}。また、最近になって、ヨウ化セシウムを光電変換面に用い、変換された電子を拡大して観察する二次元的検出器 (ズームング管) の光電変換面に直接試料を密着させて観察する方法も報告された²¹⁾。

密着顕微鏡の長所は、光学系が単純で、操作が容易にもかかわらず高分解能が得られる点にあるが、一方、同一試料を何回も観察して (波長依存性のような) 比較をするには適していない。また露光後の処理が複雑な点も問題である。この2点を補う方法として期待できるのがズームング管の利用²¹⁾であるが、まだ分解能 (0.2-0.3 μm と報告されている) の点ではレジストよりかなり落ちる。なお本質的な短所としては、試料自身によるフレネル回折のボケの影響がある [厚さ1 μm の

試料の場合に分解能は50nm以下と推定されている¹³⁾。] このため、厚い試料の観察には向かない。軟X線の生物観察への応用は、この密着顕微鏡によるものが古く、最近になって以下に紹介する光学系を用いる顕微鏡による観察が多くなってきたが、現在でも達成分解能は密着法が最も高い。

本法を用いた軟X線顕微鏡による生物観察例は、まず、固定した乾燥試料ではあるが、細胞を切片にせず、染色もしないで観察できることが示された。その代表的な例は、ニワトリ胚の心臓の細胞で、核、核小体、微小管等が明瞭に写し出されている²²⁾。この結果は、生体構成成分によるコントラストが高い分解能で得られることを示している。なお、炭素のK- α 線を用いて25時間を要した露光時間は、シンクロトロン放射光の利用によって大幅に短縮された²²⁾。その後シンクロトロン放射光による密着顕微法を用いて種々の細胞試料が観察された²³⁾。水溶液中の細胞試料の観察も短時間パルスのプラズマX線源を用いて試みられ、前述のFederらが1985年に発表した生きた血小板の観察²⁴⁾、ウニ精子の観察¹⁶⁾などの例がある。いずれも水溶液中の生理的な条件下における観察が可能であることを明らかにした結果であるが、分解能は余り高くない。

X線顕微鏡のもう一つの特徴に、元素の分布の観察と解析がある。Fig.1は、ズームング管を利用した密着顕微法によって炭素のK殻吸収端前後の波長のX線による観察を行い、その両画像の差分をとったものである。乾燥したHeLa細胞の炭素による画像がFig.1cに示されている。まだ分解能が高くないので、期待されるほどのデータとはなっていないが、この方法を発展させることによって炭素以外の成分元素の分布の画像も得ることができよう²⁵⁾。なお、X線顕微鏡をこの目的で利用する場合には、密着顕微法よりも結像型あるいは走査型の顕微鏡の方が有利である。

前述のフレネル回折によるボケの影響を考慮す

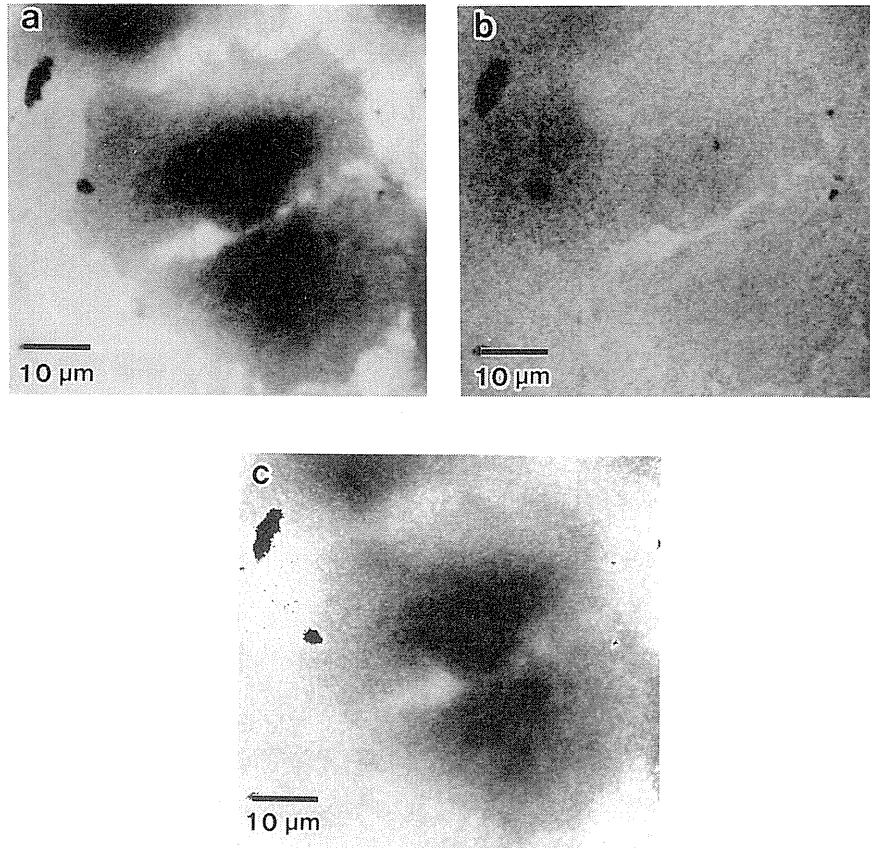


Fig.1 X-ray Images of dried HeLa cells at the wavelengths of below (4.0 nm) and above (4.5 nm) carbon K absorption edge: (a) at 4.0 nm, (b) at 4.5 nm, and (c) subtracted carbon image.

ると、密着顕微法はむしろ生体分子のような厚さの薄い試料の観察に適しているだろう。Federらは1977年に、カエルの網膜色素上皮の切片のメラニン色素顆粒を10nm以上の分解能で観察した結果を報告¹⁹⁾した。我々も、無固定無染色の乾燥ヒト染色体をX線密着顕微法によって10nmレベルの解像度で観察したので、ここに紹介したい。

分裂期のヒトリンパ球を表面を清浄にした蒸留水面上におくと、細胞は浸透圧の差と界面張力によってこわれ、染色体を含む成分分子が水面上に広がる。このとき、一部の染色体は界面張力によって伸ばされ、ほどけた状態になる。これをPMMA (X線レジスト) 上に移しとって乾燥し、X線露光を行う²⁶⁾。露光には、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設のアンジュレータ光 (2.98nm) を用いた。Fig. 2, Fig. 3はレプリカ法

を用いて電子顕微鏡で観察した像である。Fig. 2は一組の染色体、Fig. 3は部分的に引き伸ばされてほどけた染色体繊維の像である。Fig. 3aの矢印の部分拡大した像がFig. 3bに示されている。この観察では、電子顕微鏡観察にレプリカ法を用いているので、Fig. 3bでは黒い影に囲まれた白い部分を測定し、 $12.2 \pm 2.1\text{nm}$ および $31.4 \pm 13.2\text{nm}$ の値を得た²⁰⁾。この大きさは、染色体の単位構造であるヌクレオソーム (nucleosome) とスーパービーズ (superbeads) に相当している。以上の結果は、X線顕微鏡が生物試料の構成元素そのものによるコントラストを比較的高い分解能 (10nm) で観察像とすることができることを明らかにしたものである。

この染色体繊維の構造は、試料を乾燥させず、

トの特性X線を微小点線源として観察を行ない、 $0.08\ \mu\text{m}$ の分解能が達成されている¹¹⁾。観察視野が大きい利点があり、また焦点深度が深いので、三次元観察に適している。Fig. 5は、 $200\ \mu\text{m}$ の厚さのラット海馬（銀染色したもの）を $0.08\ \mu\text{m}$ 以下の分解能で立体観察した例である¹¹⁾。このとき使用したターゲットはAuであった。ターゲットに利用する元素を選ぶことによって観察試料に適した波長のX線を選択することができる。例えば、乾燥したHeLa細胞の観察にはターゲットとしてGeが使われた²⁸⁾。本装置の特徴は、視野の広さと焦点深度の深さにあるだろう。また実験室で観察できる実験室型の顕微鏡であることも長所といえる。なお、線源の強度が低いのが難点である。

4.4 結像型X線顕微鏡

半導体工業の進歩とともに、微細加工技術の進歩が著しく、非常に精度の良いフレネルゾーンプレートが作られるようになった。このゾーンプレートはX線の回折を利用した集光系で、光学顕微鏡の場合のレンズの働きをする。現在結像型X線顕微鏡で最も分解能が高いのは、このゾーンプレートを用いたタイプで、ドイツのSchmahl（ゲッチンゲン大学）のグループは、 40nm の分解能のゾーンプレートを用いて約 50nm の分解能での観察に成功している²⁹⁾。

反射鏡としては、X線の全反射角を利用する斜入射鏡と各面一層での反射率は小さいが、多層にすることによってその反射光の収率をよくする直入射方式の多層膜反射鏡がある。全反射鏡は波長依存性がない長所をもつが、分解能の向上のためには鏡面の研磨の精度が要求される。また多層膜反射鏡の場合には波長依存性があり、目下water windowよりも長波長側（ $\geq 4.4\text{nm}$ ）でのみ実用的な反射率が得られている。

生物観察としては、シンクロトロン放射光を用いたSchmahlらの結像型顕微鏡がBESSYで常時稼働状態にあり、目下、水溶液中の固定した培養

細胞の観察例³⁰⁾等を蓄積中である。Fig. 6はその一例で、ユスリカの唾腺染色体をグルタルアルデヒドで固定した試料を水溶液中で観察したものである³¹⁾。細い繊維は $60\text{--}120\text{nm}$ となっており、光学顕微鏡では識別できない構造を観察している。

以上のように結像型のX線顕微鏡装置はほぼ実用段階に入ったといえる。しかしながら、水溶液中の試料の観察にはシンクロトロン放射光では強度不足で、露光時間が十分には短くできないだろう。水溶液中の試料の観察にシンクロトロン放射光による顕微鏡装置を用いた場合の条件（試料の状態、要求する分解能および露光時間で左右される。）については今後の課題といえる。

なお、ごく最近X線レーザー（ 4.48nm ）を光源とし、多層膜反射鏡をコンデンサーレンズ、ゾーンプレートを対物レンズとした結像型顕微鏡で乾燥したラットの精子を観察した例が報告された³²⁾。このX線レーザーを用いた顕微鏡は、 200psec 以下の単一露光で観察をしており、今後水溶液中の無固定の試料の観察への応用が興味深い。

4.5 走査型X線顕微鏡

電子顕微鏡の場合とは異なり、“走査する”の

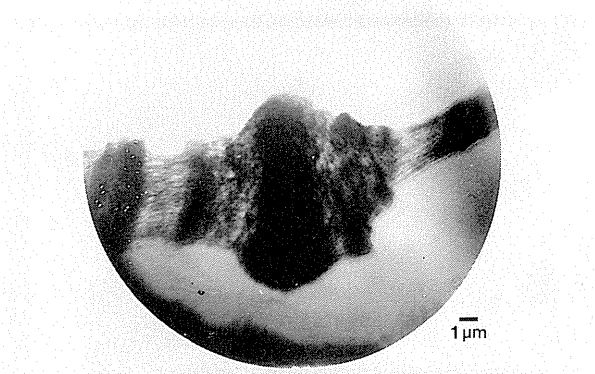


Fig.6 Part of a condensed isolated polytene chromosome of 'Chironomus thummi' as observed with imaging microscope at the wavelength of $2.4\ \text{nm}$. The exposure time was $10\ \text{sec}$ ³¹⁾.

は線源ではなく試料の方である。各種の集光系を用いて絞った小さなビームスポット上を試料が移動し、試料を透過したX線の強度分布を比例計数管等で測定し、結果を画像化して観察する。走査型X線顕微鏡として最も分解能が高い装置もゾーンプレートを集光系に用いている。ブルックヘブン国立研究所のNSLS (National Synchrotron Light Source) に設置した走査型X線顕微鏡³³⁾は、分解能50nmの観察が常時行われるレベルの装置として確立している。

この装置は生物観察も盛んであるが、その代表的なものとして、カルシウムのL殻吸収端附近にある共鳴吸収ピーク波長のX線を利用したヒト頭蓋組織中カルシウムの分布の観察³⁴⁾や水溶液中にあるグルタルアルデヒド固定したソラマメの根の先端の細胞の染色体の観察³⁵⁾ (Fig. 7) 等がある。本装置でも無固定の水溶液中の繊維芽細胞の観察³⁶⁾等、目下種々の生物試料の観察が試みられている。なかでもX線吸収の波長依存性を利用した元素の分布の観察は、X線顕微鏡の特徴を示すものとして興味深い。その観察例として、ヒト関節の軟骨組織切片中にあるカルシウム微結晶の高分解能観察³⁷⁾がある。また、化学結合の違いによるX線吸収スペクトルの微妙な差を利用した観

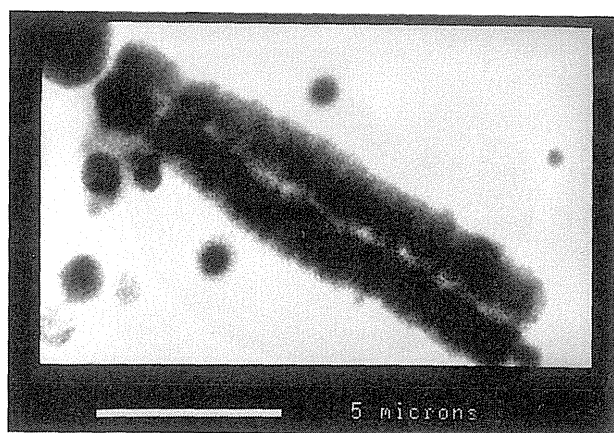


Fig.7 X-ray micrograph of a chromosome of the bean *V. faba* taken with the scanning transmission microscope at the wavelength of 3.41 nm³³⁾.

察³⁸⁾も、その利用次第では非常に興味深い観察法となることだろう。

4.6 ホログラフィー

厚い試料の三次元観察法として開発が期待されている方法にホログラフィーとトモグラフィーがある。観察に複数回の露光を必要とするマイクロトモグラフィー³⁹⁻⁴¹⁾に対し、X線ホログラフィーは一回の露光で三次元構造を記録する観察手段として期待されている。X線ホログラフィーによる最も高分解能の観察例は、干渉性の高いアンジュレータ放射光を用いて行われた。X線レジスト上に40nmの分解能で臍臓のチモーゲン顆粒のホログラムを記録し⁴²⁾、電子顕微鏡で読出したのち、計算機によって100nm以下の分解能で再生した例がそれである⁴³⁾。生物観察例ではないが、X線レーザーによるホログラフィーも(まだ分解能は低い)報告されている⁴⁴⁾。いずれもGabor型であるが、フーリエ変換型ホログラフィーの議論もでてきている^{45, 46)}ので、その成果に期待したい。

乾燥試料の三次元観察であれば、試料を回転して多方面から観察し、再構成するマイクロトモグラフィーは将来分解能も向上し、有効な観察手段となることであろう。しかしながら、前述のように水溶液中の生物試料の場合には、放射線損傷の影響も考慮すべきで、短時間パルスによる1回の露光で観察することが望ましい。この場合の三次元観察法としては、ホログラフィーの方が優れている。今後の発展に期待したい。

5. まとめ

軟X線顕微鏡は、生物試料そのもののコントラストを利用し(少なくとも分子レベルでは)10nmの分解能で観察可能とする技術であることが明らかにされた。すなわち、軟X線顕微鏡は、従来の方法とは異なったコントラストによる新しい観察法であることがほぼ実証されたといつてよい

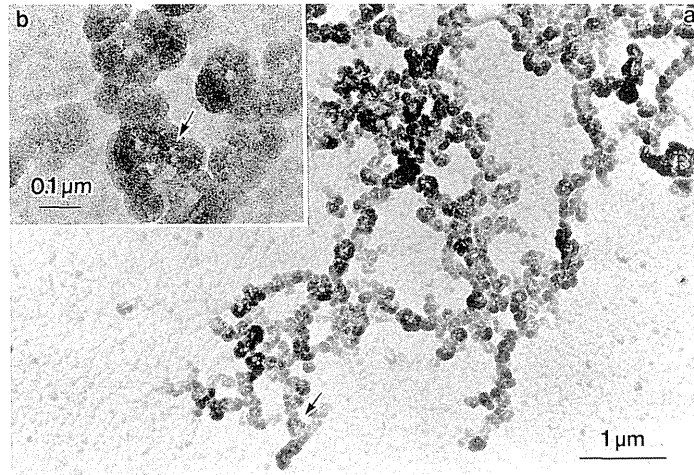


Fig.4 X-ray image of a stretched portion of a hydrated human chromosome as observed by contact microscopy. An enlargement of the area indicated by an arrow in (a) is presented in (b). The image is similar to that for dried chromosome (Fig.3).

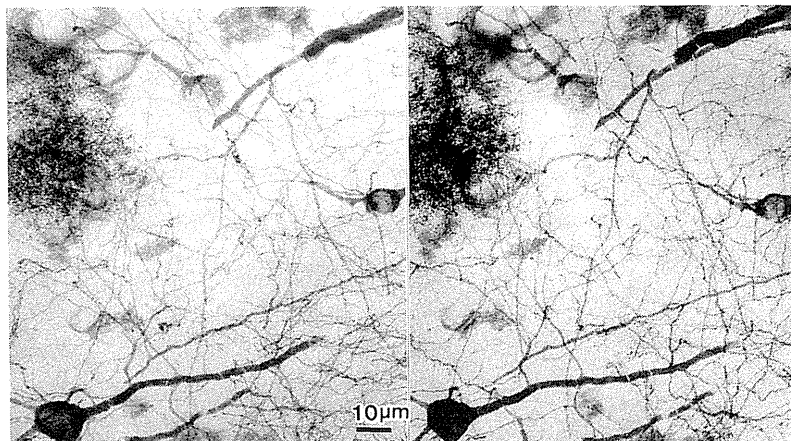


Fig.5 Stereo-image of a 200 μm thick section of rat hippocampus stained with silver as observed with a projection microscope¹¹⁾.

の大きさに相当し、観察しているものがヌクレオソームであるといえる。この結果は、X線顕微鏡を用いれば水溶液中の生物試料を10nmの分解能で観察できることを示している。

以上のように、X線顕微鏡は、水の中にある生体分子を、生体分子の構成元素によるコントラストで、10nmという高分解能で観察できる観察法であることがX線密着顕微法を用いて明らかとなった。現在分解能10nmで観察できるX線顕微法は密着法だけであるが、前述のように密着法では

厚い試料を高分解能で観察することは難しい。生体内における染色体繊維の高分解能観察には、X線顕微鏡装置の開発が必須であろう。

4.3 投影型X線顕微鏡

点線源からの光軸上に試料をおき、その投影像を観察する方法である。分解能は線源の大きさと線源と試料との距離によってきまる。走査型電子顕微鏡を利用して金属薄膜のターゲット上の一点に電子線を集める。収束点で変換されるターゲッ

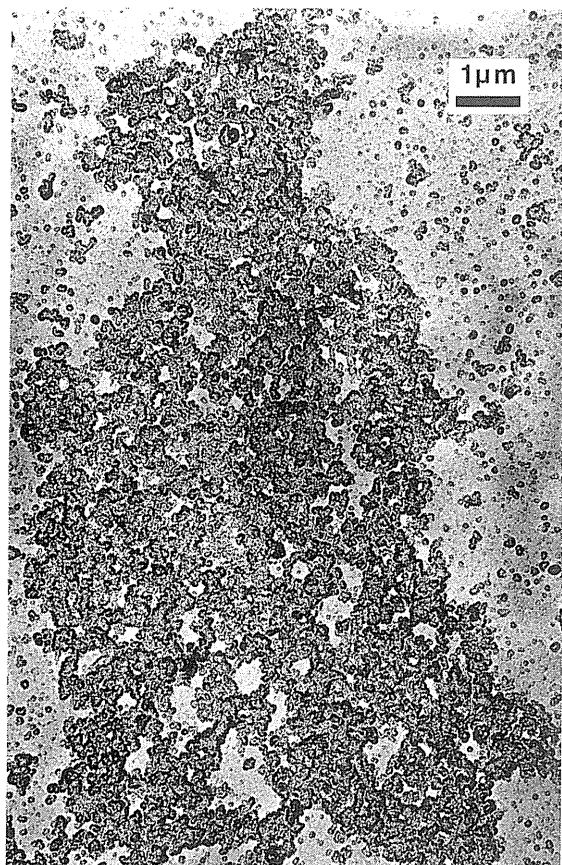


Fig.2 X-ray image of human chromosome as observed by contact microscopy and seen in a transmission electron microscope.

水の中にある状態でも観察することができた (Fig. 4)²⁷⁾。ヒト染色体試料を乾燥試料の場合と同様にして PMMA 上に調製し, 乾燥する前に SiN の薄膜 (厚さ $0.4 \mu\text{m}$) を窓材とする試料槽に封入する。なお, 水の層の厚さは $1-5 \mu\text{m}$ であった。この試料槽をターゲット (Au) から 2cm の距離におき, レーザープラズマ X 線 (スポット径 $100 \mu\text{m}$) の露光を行った。レーザー波長は 527nm , レーザーエネルギーは 26J , パルス巾は 300psec であった。Fig. 4 はその染色体繊維の観察例を示している。Fig. 4a の矢印の部分をもさらに拡大したのが Fig. 4b である。レジスト上のレリーフの透過型電子顕微鏡による観察にはレプリカ法を用いているので, 黒い部分がレプリカ膜の電子顕微鏡像であり, 試料の像は黒く縁どりされた中に白く抜けている部分となる²⁰⁾。Fig. 4b には, 球形の粒子が繊維状の分子の上につながっている形が観察される。この粒子状の像の中で小さい粒子像を選んで大きさを Fig. 4a の広い視野にわたって測定したところ $13.4 \pm 2.0\text{nm}$ ($n = 10$) となっていた。この大きさは, 乾燥したヌクレオソームよりやや大きい

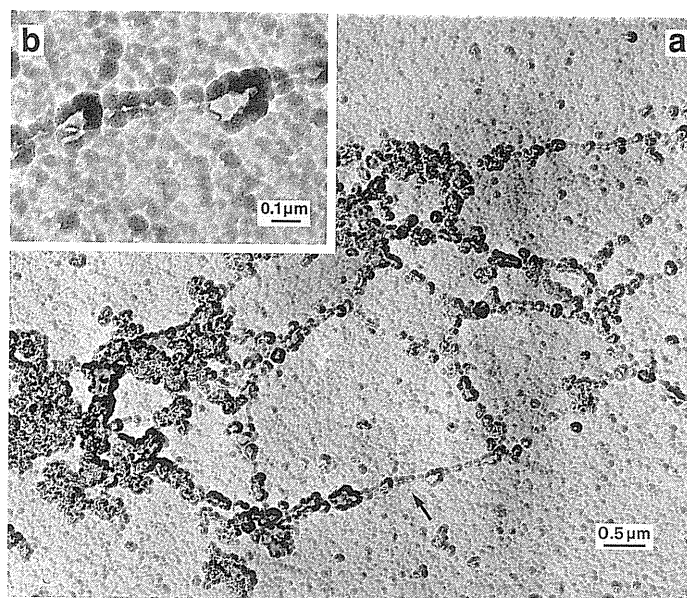


Fig.3 X-ray image of a stretched portion of a dried human chromosome as observed by contact microscopy. An enlargement of the area indicated by an arrow in (a) is presented in (b). A "beads-on-a-string" structure is clearly observable.

だろう。また、目下開発中の種々の観察法は、それぞれ相補的である。現在は、密着顕微鏡が最も分解能の高い観察法であるが、この方法は将来他の顕微鏡装置の性能が向上するに伴い、その存在価値が失われるであろう。水溶液中の試料の観察には、短時間パルスのX線源を利用した観察法がよいだろう。元素の分布等の観察には、任意の波長の選択が容易なシンクロトロン放射光の利用が有利である。生物側の立場からすれば、その技術を生かすための“実用的”な装置の開発が望まれる。実験室型のX線顕微鏡装置の開発^{47, 48)}や光学顕微鏡と組み合わせたX線顕微鏡の考え方は、生物・医学関係者に歓迎されるだろう。また、軟X線顕微鏡が生物学・医学に寄与するには、多くの観察経験を積む必要があるだろう。そのためには、常時利用可能な装置は最低限必要な条件となる。早くそのような装置が実現するよう希望したい。

文献

- 1) 篠原邦夫：レーザー研究, **20**, 880 (1992).
- 2) D. Sayre et al.: Ultramicrosc., **2**, 337 (1977).
- 3) K. Shinohara and A. Ito: J. Microsc., **161**, 463(1991).
- 4) A. Ito and K. Shinohara: Cell Struct. Funct., **17**, 209 (1992).
- 5) R. A. London et al.: Appl. Opt., **28**, 3397 (1989).
- 6) G. Schmahl and D. Rudolph (ed.): "X-Ray Microscopy", Springer Series in Optical Sciences Vol. 43 (Springer-Verlag, Berlin, 1984).
- 7) D. Sayre et al. (ed.): "X-Ray Microscopy II", Springer Series in Optical Sciences Vol. 56 (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 8) K. Shinohara et al. (ed.): "X-Ray Microscopy in Biology and Medicine" (Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1990).
- 9) A. Michette et al. (ed.): "X-Ray Microscopy III", Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992).
- 10) M. R. ハウエルズ, J. キルツ, D. セイヤー (青木貞雄 訳): 日経サイエンス, **21**(4), 34 (1991).
- 11) 矢田慶治: 電子顕微鏡, **26**, 72 (1991).
- 12) 富江敏尚他: 応用物理, **61**, 682 (1992).
- 13) M. Howells et al.: Phys. Today, **38**(8), 22 (1985).
- 14) R. Feder et al.: Science, **212**, 1398 (1981).
- 15) K. Shinohara et al.: Photochem. Photobiol., **44**, 401 (1986).
- 16) T. Tomie et al.: Science, **252**, 691 (1991).
- 17) R. Feder et al.: J. Appl. Phys., **47**, 1192 (1976).
- 18) W. Gudat: in "Uses of Synchrotron Radiation in Biology", ed. by H. B. Stuhmann (Academic Press, London, 1982), 23.
- 19) R. Feder et al.: Science, **197**, 259 (1977).
- 20) K. Shinohara et al.: J. Microsc., **158**, 335 (1990).
- 21) K. Kinoshita et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 335.
- 22) J. Wm. McGowan et al.: J. Cell Biol., **80**, 732 (1979).
- 23) K. Shinohara: in "X-Ray Microscopy in Biology and Medicine", ed. by K. Shinohara et al. (Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1990) 203.
- 24) R. Feder et al.: Science, **227**, 63 (1985).
- 25) K. Shinohara et al.: PF Activity Report 1992 (National Laboratory for High Energy Physics, in press).
- 26) K. Shinohara et al.: in "X-Ray Microscopy II", ed. by D. Sayre et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 56 (Springer-Verlag, Berlin, 1988) 429.
- 27) K. Shinohara et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 347.
- 28) K. Yada and S. Takahashi: in "X-Ray Microscopy in Biology and Medicine", ed. by K. Shinohara et al. (Japan Scientific Societies Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1990) 193.
- 29) G. Schmahl et al.: Synchrotron Radiat. News **4**(2), 10 (1991).
- 30) Rudolph et al.: in "X-Ray Microscopy III.", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 392.
- 31) P. Guttmann et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol.

- 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 404.
- 32) L. B. Da Silva et al.: *Science*, **258**, 269 (1992).
- 33) J. Kirz: *Synchrotron Radiat. News*, **4**(2), 17 (1991).
- 34) J. M. Kenny et al.: *J. Microsc.*, **138**, 321 (1985).
- 35) S. Williams et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 408.
- 36) J. R. Gilbert et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 388.
- 37) C. J. Buckley et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 423.
- 38) H. Ade et al.: *Science*, **258**, 972 (1992).
- 39) 宇佐美勝久, 平野辰巳: *レーザー研究*, **18**, 951 (1990).
- 40) U. Bonse et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 167.
- 41) J. C. Elliott et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 461.
- 42) M. Howells et al.: *Science*, **238**, 514 (1987).
- 43) C. Jacobsen et al.: in "X-Ray Microscopy II", ed. by D. Sayre et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 56 (Springer-Verlag, Berlin, 1988) 253.
- 44) J. E. Trebes et al.: *Science*, **238**, 517 (1987).
- 45) M. R. Howells and C. J. Jacobsen: *Synchrotron Radiat. News*, **3**(4), 23 (1990).
- 46) I. McNulty et al.: *Science*, **256**, 1009 (1992).
- 47) D. Rudolph et al.: "X-Ray Microscopy II", ed. by D. Sayre et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 56 (Springer-Verlag, Berlin, 1988) 216.
- 48) G. Schmahl et al.: in "X-Ray Microscopy III", ed. by A. Michette et al., Springer Series in Optical Sciences Vol. 67 (Springer-Verlag, Berlin, 1992) 66.

キーワード

ゾーンプレート (zoneplate)

軟X線結像用光学素子の一種で、光学顕微鏡の場合のレンズの役割をする。現在最も解像度を高くできる光学素子である。X線に対して透明不透明の同心円状の帯を繰返した板で、 n 番目の境界の半径 r_n が、

$$r_n = (nf\lambda)^{1/2}, n=1,2,3,\dots$$

の条件を満たすとき、この板は凸レンズの作用をする。ここで f は焦点距離、 λ はX線の波長である。このアイデアは、光の回折や干渉性の実例を示すために100年以上も前に提案されていたが、近年軟X線顕微鏡用レンズとして活発に開発が進められている。分解能は、最外殻の最小線幅で決まる。

レーザープラズマX線源 (laser-produced plasma X-rays)

固体表面に $10^{12}-10^{15} \text{ W/cm}^2$ の照射強度でパルスレーザーを集光照射すると、その固体に特有のプラズマ状態が形成される。このプラズマから放射されるX線をレーザープラズマX線と呼び、レーザーからX線への変換効率が極めて高い。放射されるX線のスペクトルは、レーザーを集光照射するときに選択した固体によって自由に変えることができる。また、このプラズマをレーザー媒質とするX線レーザーの開発研究が進められている。なおプラズマの生成に放電を用いる放電プラズマX線もある。