

## 高分解能三次元リアルタイム軟X線顕微鏡の開発

研究代表者

小椋 俊彦 独立行政法人産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門



### 1. 研究の背景と達成目標

大気圧下あるいは水溶液中の様々なサンプルを分子レベルの高分解能で3次元的に観察することは、生物学や物理学、材料科学やナノテクノロジー等の様々な科学・産業分野にとって基盤となる技術である。本提案では、電子線を走査させながら金属薄膜層に入射させ、そこから放射される軟X線を用いることで、大気圧下及び水溶液中の様々なサンプルを高分解能で、かつ3次元解析が可能な新規の軟X線顕微鏡を開発する。大気圧下または水溶液中の様々なサンプルを窒化シリコン膜の薄膜で挟みこみ、サンプルフォルダー内に密封した後に走査電子顕微鏡(SEM)にセットする。その後、この膜上部へ極めて細く絞った電子線を走査させながら照射する。窒化シリコン膜上部には、軟X線を放射する金属薄膜を薄くコートすることで、入射した電子により軟X線が様々な方向に放射される。放射されたX線は、サンプルを透過した後に、下側に設置されたX線検出器により検出される。ここで、X線検出器を様々な位置に多数設置することで、1回の走査でサンプルの3次元構造を解析することを可能とする。さらに、撮像時間を高速化することで、リアルタイムでの3次元観察を達成する。また、観察の分解能は、高解像度走査電顕を使用することで10nm以下とし、ウイルスやタンパク質複合体の非染色観察を可能とする。

### 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- 多素子X線検出システムによる3次元観察法の開発と非染色生物試料の解析  
従来の方法では、観察試料を回転・傾斜させながら数十枚の撮像が必要であったが、本方法により、一回の撮像で非染色生物試料の3次元観察が可能となった。これにより、観察時間の大幅な短縮とダメージの低減を可能とした。今後は、この方法を用いることで、様々な生物試料やナノ材料・有機材料の迅速な3次元構造解析に役立つものと考えられる。
- 高透過2次電子線観察方法の確立  
本研究を進める中で、極めて高い透過性を有する2次電子の存在が示唆された。これにより、細胞や細菌等々の非染色生物試料を、極めて高いコントラストでその内部構造を容易に観察することが可能となった。この方法は、生物学分野における汎用の観察技術として使用されるものと予想される。
- 観察方法の高分解能化と非染色ウイルス及びタンパク質複合体の観察  
試料支持膜の組成を改良することで、観察の分解能を飛躍的に向上させることが出来た。これにより、非染色のウイルスやタンパク質複合体の観察を可能とした。今後は、ウイルスやタンパク質の迅速な解析やナノ粒子の観察に使用されるものと考えられる。

### 3. 研究成果

軟X線による高速3次元解析方法の開発のため、多素子X線検出器を走査電顕内に設置し、一回の撮像による複数枚の傾斜画像データの取得を可能とした。さらに、Simulated Annealing(焼き鈍し)アルゴリズム

ムを応用した新たな3次元再構成アルゴリズムの開発を行い、傾斜画像データからの高精度な3次元構造解析を可能とした(図1)。従来の **Filtered Back projection** 法では、傾斜画像が数十枚以上必要とされていたが、本方法では再投射処理を必要としないため、10枚以下の画像データから高精度に3次元構造を求めることが可能となった。こうした成果は、国際学術誌に発表した。

エネルギー分光型検出素子であるシリコンドリフト検出器(SDD)を SEM 内部へと導入し、電子線の走査信号と同期して検出可能なシステムを構築した。これにより、X線のエネルギー量と透過2次電子の双方の検出を可能とした。実験の結果、2keV以上のX線による画像では、細胞のコントラストが極めて低く、観察が困難であることが判明した。一方、透過2次電子での観察では、細胞内の構造まで観察することが可能であった(図2)。従来、10eV程度のエネルギーの2次電子は、数nm程度しかサンプルを透過しないと思われていたが、今回の実験では、1 $\mu$ m程度の試料を透過していることが示唆された。これにより、簡便に生物試料の透過観察が可能となった。

X線及び透過2次電子線の分解能を向上させるため、サンプル支持膜の金属層の構成や種類の改良を進め、観察の分解能が10nm以下まで向上させることに成功した。これにより、非染色のウイルスやタンパク質複合体の簡便な観察が可能となった(図3)。こうした成果は、国際ジャーナルへと発表した。

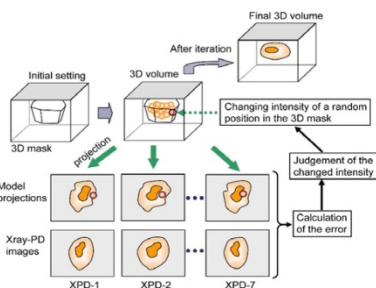


図1 新規3次元再構成アルゴリズム

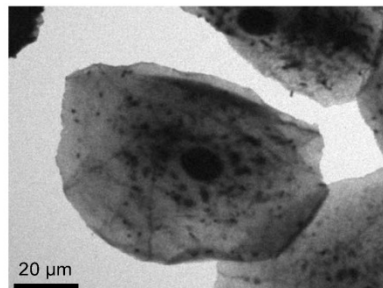


図2 透過2次電子による細胞観察

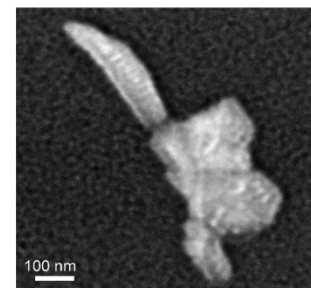


図3 ウィルスの高分解能観察

#### 4. 今後の展開

今回の研究では、3次元構造解析法及び透過2次電子による新たな観察方法の確立、さらには10nm以下の分解能を達成した。今後は、こうした撮像方法の高速化を進める予定である。リアルタイムでの3次元撮像には、検出信号のより高いSN比が必要とされる。これまでの開発により、検出器の高感度化を進めたが、3倍程度の向上に留まり、まだリアルタイムでの観察は困難な状況である。そのため、今後は、電子線の照射方法や信号の検出方法を改良することで10倍以上のSN比の向上を目指す。

本研究により開発した方法は、生物分野のみならず、有機材料や溶液中のナノ材料等の観察にも有効である。現在、医薬品メーカーやナノ材料メーカー、化学メーカー等からの試料観察の問い合わせがあり、順次対応を進めている。

#### 5. 発表実績

- (1) T. Ogura, "Three dimensional X-ray observation of atmospheric biological samples by linear-array scanning-electron generation X-ray microscope system", **PLoS One**, Vol. 6 (2011) e21516 (9 page).
- (2) T. Ogura, "Direct observation of the inner structure of unstained atmospheric cells by low-energy electrons", **Meas. Sci. & Technol.** (2012) 085402 (8 page).
- (3) T. Ogura, "High-contrast observation of unstained proteins and viruses by scanning electron microscopy", **PLoS One**, Vol. 7 (2012) e46904 (7 page).