

博士論文

小型X線源とウォルターI型鏡を用いた  
実験室規模の軟X線3D顕微鏡の開発と  
その事業化に関する研究

2015年8月

光産業創成大学院大学  
光産業創成研究科

大須賀 慎二



# 要旨

## 小型X線源とウォルター I 型鏡を用いた実験室規模の 軟X線 3 D 顕微鏡の開発とその事業化に関する研究

本博士論文では、軽元素試料の高分解能三次元構造観察を可能とする、軟X線 3 D 顕微鏡の開発と事業化に関する研究について論じた。X線は可視光と比べて波長が短く、X線をプローブとしたX線顕微鏡は、既に数 10 nm 程度の分解能を達成している。また、X線は物質を透過し易いので、CT 技術を高分解能X線顕微鏡と組み合わせれば、数 10 nm スケールでの三次元構造観察が可能となる。更に、光学顕微鏡や電子顕微鏡では得られない元素間の自然な吸収コントラストが得られる。特に、水の窓域 (284 – 534 eV) のX線は、生物試料を構成する水とタンパク質とのコントラストが得易く、生物試料の観察には好適である。しかし、現在のところ、X線顕微鏡のほとんどが放射光施設に設置されているため、その利用機会を得られる研究者は限られている。そこで本研究では、X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術を、生命科学分野や材料科学分野に普及させることを目的とした。この目的達成のため、一般的な実験室に設置可能な実験室規模の大きさで、研究者自身が操作可能な使い勝手の良い装置の開発と評価、および、事業化への取り組みとして、事業コンセプトの明確化、事業評価、および事業化に向けたシナリオの作成を行った。

軟X線 3 D 顕微鏡の開発については、電子衝撃型X線源とウォルター I 型鏡を用いたX線集光・結像光学系とを組み合わせた独自の構成と、X線撮像素子として裏面照射型 CCD を用いることで、実験室規模の概念実証用の実験装置を構築することに成功した。電子衝撃型X線源は、コンパクトな構造で取り扱いが容易であり、陽極ターゲット物質として酸化クロムを用いると、水の窓域の酸素  $K\alpha$  X線 (525 eV) を発生させることができる。ウォルター I 型鏡は、X線の利用効率が高くX線源に単色性を要求しないことから、電子衝撃型X線源との組み合わせに適している。集光用と結像用のウォルター I 型鏡の設計パラメータは、X線の集光効率や拡大率、作製可能なウォルター I 型鏡の内径等を考慮して決定し、実験装置の光学系の全長として実験室規模の 3.4 m を実現した。ウォルター I 型鏡の作製には、金型の形状をガラス面へ転写するガラスレプリカ法を採用し、形状誤差： $\pm 0.1 \mu\text{m}$  以下、表面粗さ： $2 \text{ nm (rms)}$  の鏡面精度を達成した。

構築した実験装置の性能については、解像度チャートを試料とした二次元イメージング特性の評価から、500 nm ライン&スペースのパターンが確実に解像でき、1.0 ラインペア/ $\mu\text{m}$  の空間周波数において 5% – 10% の画像コントラストを期待できることを確認した。また、マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーの三次元画像再構成の結果から、1  $\mu\text{m}$  スケールの三次元構造を解像可能であることを明らかにした。更に、マウス腎臓の乾燥切片を試料と

して糸球体の三次元構造を画像化することにも成功し、軟X線3D顕微鏡の生命科学分野へ適用可能性を実証した。

軟X線3D顕微鏡の事業化に向けた検討としては、先ず、事業コンセプトの明確化を行った。具体的には、顧客として生命科学分野の研究者を想定し、そのニーズに基づいて軟X線3D顕微鏡の仕様を設定した。そして、詳細な文献調査に研究者との面談を援用して、仕様の各項目の顧客にとっての位置付けを分析した。その中で、分解能の仕様と価格が顧客に受け容れられるには、軟X線3D顕微鏡により得られる画像の価値を顧客に納得させることが重要であると、明確に認識した。

次いで、事業評価をBMO法と呼ばれる、候補事業が魅力的で自社に適しているかを数値化して評価する手法を用いて行った。そして、軟X線3D顕微鏡は、事業に魅力はあるものの、事業の成功確率の評価からは、「条件付の参入」に該当するという結果を得た。前述の仕様についての分析から、参入条件は、生命科学分野向けの仕様を満たすプロトタイプ開発の成功と、軟X線3D顕微鏡の価値が生命科学分野の研究者に受け容れられることと結論づけた。

最後に、事業化に向けた次の3ステップからなるシナリオを作成した。①生きたままに近い状態での観察を可能とする生命科学分野向けのプロトタイプを開発する。②生命科学分野の研究者との共同研究により軟X線3D顕微鏡の価値を示す観察事例を探索・蓄積する。共同研究先の持つネットワークに含まれる生命科学分野の先駆的研究者へのプロモーションを行い、潜在ユーザーを掘り起こす。③社内に向けたプロモーションも合わせて実施し、経営層や関連部署から事業化のための支援を取り付ける。

以上、本研究では、X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術を、生命科学分野や材料科学分野に普及させるために、一般的な実験室に設置可能な実験室規模の大きさで使い勝手の良い軟X線3D顕微鏡の開発と評価、事業化への取り組みを行った。科学技術の発展におけるナノテクノロジーの重要性については言をまたず、軟X線3D顕微鏡は、光学顕微鏡や電子顕微鏡と共にナノテクノロジーの一翼を担い得ると期待される。本研究に基づいて軟X線3D顕微鏡の事業化を実現し、学術分野だけでなく産業や医療の発展に資する、光産業の新たな分野の創成に貢献したいと考える。

# Abstract

## Development and business feasibility study of 3D soft x-ray microscope with a small x-ray source and Wolter type I mirrors

This doctoral thesis describes the development and business feasibility study of the three-dimensional (3D) soft x-ray microscope, which enables observation of 3D structures of light element samples with high spatial resolution. Since the wavelength of the x-ray is shorter than that of visible light, x-ray microscopes have achieved a spatial resolution of several tens of nm. The high resolution x-ray microscopy can be extended to perform high resolution 3D observation when combined with tomographic reconstruction techniques because x-ray can penetrate a thick sample. Moreover, x-ray microscopes provide element-specific absorption contrasts which are not available with optical microscopes or electron microscopes. Especially, x-rays in the water-window region (284 – 534 eV) are suitable for observation of organic biological samples such as proteins in aqueous solution because the x-rays provide high contrast images of carbon-containing substances in water. Despite of these capabilities, at present almost all x-ray microscope are located at synchrotron facilities where access is limited. Therefore, in this research, in order to expand the use of the x-ray microscope for high-resolution observation of 3D structures in life and materials sciences, I developed and evaluated a laboratory-size 3D soft x-ray microscope that researchers can easily access and operate by themselves. I also performed a business feasibility study of the 3D soft x-ray microscope in which I defined the business concept, evaluated the potential of the business, and created a scenario toward its commercialization.

Concerning the development of a laboratory-size 3D soft x-ray microscope, I successfully constructed a proof-of-concept apparatus with members of my group. The apparatus consisted of an unique combination of an electron-impact x-ray source and collecting and imaging optics with Wolter type I mirrors, and a back-illuminated CCD used as an imaging device. The electron-impact x-ray source, which is compact and easy to use, can generate oxygen  $K\alpha$  x-rays (525 eV) in the water-window region with a chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) target. The Wolter type I mirror is suitable for combination with an electron-impact x-ray source since it can utilize x-rays with high efficiency and does not require monochromatic x-rays. I designed the condenser and the objective mirrors by carefully considering such parameters as the collection solid angle, the magnification factor, and the inner diameters

of the mirrors. Then, we fabricated designed mirrors by a glass replication method and realized the laboratory-size apparatus with an optical system 3.4 m in total length. The shape of the mirrors was replicated to the inner surface of the glass tube from an accurately figured mandrel. The figure error and the surface roughness of the mirrors were less than  $\pm 0.1 \mu\text{m}$  and 2 nm (rms), respectively.

I evaluated two-dimensional imaging performance of the constructed apparatus using an x-ray resolution chart, confirming that the apparatus clearly resolved the 500-nm line-and-space pattern and that image contrast of 5% – 10% was expected at the spatial frequency of 1.0 line-pair per  $\mu\text{m}$ . I also evaluated its 3D tomographic imaging performance using a glass capillary for micro injection, confirming that the apparatus imaged the 3D structure with 1- $\mu\text{m}$  scale resolution. Then, we demonstrated the applicability of the 3D soft x-ray microscope to life sciences by successful observation of 3D structures of the glomerulus in a dehydrated mouse kidney slice.

As for the business feasibility study of the 3D soft x-ray microscope, firstly, I defined the business concept. Specifically, I determined specifications of the microscope based on the needs of researchers in life sciences who I expected to be customers. Then, I evaluated the attributes of specifications by examining articles about x-ray microscopy and interviewing an actual researcher. The evaluation made me acutely aware that it is important to convince customers of the value of obtained images for persuading them to accept such specifications as the resolution and price.

Secondly, I evaluated the potential of the business using the BMO method that scores its attractiveness and its suitability to the company where the business is developed. The total score indicated that the 3D soft x-ray microscope could conditionally enter the market. The two determined conditions that should be satisfied to enter the market were that development of a prototype for life sciences is completed and that customers place a high value on the microscope.

Thirdly, I created the following three-step scenario toward commercialization of the microscope: (1) Completion of development of the prototype for observation of biological samples in their near-native states. (2) Searching and collecting its application examples that increase the value of the microscope by collaboration with a life science researcher and unearthing potential customers by promoting the microscope to innovative researchers in life sciences who are colleagues of the collaborator in the scientific community. (3) Winning support of the management and relevant departments for commercialization by intra-company promotion of the microscope.

In conclusion, in order to expand the use of the x-ray microscope for high-resolution

observation of 3D structures in life and materials sciences, I developed and evaluated a laboratory-size easy-to-use 3D soft x-ray microscope with members in my group and made a business feasibility study. Nanotechnology is obviously important for the progress of science and technology, therefore, the laboratory-size 3D soft x-ray microscope must play a significant role in the progress along with optical and electron microscopes. Commercialization of the 3D soft x-ray microscope based on this study will create new photonics industries, which impact not only on academia but also on industry and medicine.



# 目次

第 1 章	緒言	1
1.1	本研究の背景	1
1.2	本研究の目的	3
1.3	本論文の構成	4
	参考文献	6
第 2 章	高分解能三次元構造観察技術の動向	7
2.1	はじめに	7
2.2	光学顕微鏡	9
2.3	電子顕微鏡	11
2.4	X線顕微鏡	13
2.5	まとめ	22
	参考文献	22
第 3 章	軟X線3D顕微鏡の開発	27
3.1	はじめに	27
3.2	開発に至る経緯	27
3.3	斜入射X線反射鏡（回転楕円鏡・ウォルターI型鏡）	30
3.4	軟X線3D顕微鏡の構成	37
3.5	結果と考察	41
3.6	課題と展望	53
3.7	まとめ	56
	参考文献	57
第 4 章	生命科学分野に向けた軟X線3D顕微鏡の事業化検討	61
4.1	はじめに	61
4.2	事業コンセプト	62
4.3	事業評価	75

4.4	事業化に向けたシナリオ . . . . .	85
4.5	他分野への展開 . . . . .	87
4.6	まとめ . . . . .	88
	参考文献 . . . . .	89
第 5 章	結言	97
	謝辞	101
	業績目録	103

# 目次

1.1	本研究の目的 . . . . .	5
2.1	レーザー顕微鏡の原理説明図 . . . . .	10
2.2	生物学用レーザー顕微鏡の国内市場規模 . . . . .	11
2.3	透過型電子顕微鏡の国内市場規模 . . . . .	13
2.4	ゾンプレートの説明図 . . . . .	15
2.5	軟X線の水の窓 . . . . .	17
3.1	新規観察技術の開発における試料提供者との協働のモデル . . . . .	30
3.2	2媒質の界面における光線の屈折 . . . . .	32
3.3	斜入射X線の反射率 . . . . .	34
3.4	回転楕円鏡による集光 . . . . .	35
3.5	ウォルターI型鏡による結像のしくみ . . . . .	36
3.6	ウォルターI型鏡設計のためのパラメータ . . . . .	37
3.7	軟X線3D顕微鏡の構成概念図 . . . . .	38
3.8	集光・結像光学系の反射率 . . . . .	41
3.9	解像度チャートの透過X線画像 . . . . .	43
3.10	輪帯開口と軟X線3D顕微鏡の変調度伝達関数 . . . . .	46
3.11	鏡面の凹凸に起因する光路差 . . . . .	47
3.12	結像用ウォルターI型鏡のラインスプレッド関数 . . . . .	48
3.13	三次元再構成の手順 . . . . .	49
3.14	点像分布関数のデコンボリューション . . . . .	50
3.15	ガラスキャピラリーの三次元再構成 . . . . .	52
3.16	マウス腎臓の乾燥切片の三次元再構成 . . . . .	54
4.1	X線顕微法とクライオX線顕微法に関する論文数の推移 . . . . .	68
4.2	クライオX線顕微鏡の設置場所 . . . . .	69
4.3	消費チェーン . . . . .	73

4.4	軟X線3D顕微鏡に基づく事業の事業度 . . . . .	84
4.5	軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたシナリオ . . . . .	85
4.6	軟X線3D顕微鏡の他分野（材料科学分野）への事業展開 . . . . .	88

# 表目次

2.1	生物試料の高分解能三次元構造観察に用いられる技術の比較 . . . . .	8
2.2	実験室規模のX線顕微鏡の比較 . . . . .	21
3.1	軟X線3D顕微鏡の仕様 . . . . .	39
3.2	集光用および結像用ウォルターI型鏡の諸元 . . . . .	40
4.1	事業化の検討に用いる分析・評価手法 . . . . .	62
4.2	5W1H法による軟X線3D顕微鏡の顧客層の描像 . . . . .	64
4.3	生命科学分野研究者向けの軟X線3D顕微鏡の仕様 . . . . .	65
4.4	X線顕微鏡開発における「分解能」の位置付けの変遷 . . . . .	66
4.5	アトリビュート・マトリックス . . . . .	70
4.6	軟X線3D顕微鏡のアトリビュート・マトリックス . . . . .	71
4.7	軟X線3D顕微鏡のアトリビュート・マトリックス（改訂後） . . . . .	72
4.8	軟X線3D顕微鏡の消費チェーンにおける差別化の方法 . . . . .	74
4.9	BMO法における12の評価指標 . . . . .	76
4.10	軟X線3D顕微鏡に基づく事業の魅力度 . . . . .	81
4.11	軟X線3D顕微鏡に基づく事業の適社度 . . . . .	83



# 第1章

## 緒言

### 1.1 本研究の背景

平成26年6月24日に、第2次安倍政権が閣議決定した「科学技術イノベーション総合戦略2014～未来創造に向けたイノベーションの懸け橋～」[1]は、科学技術イノベーションで拓く日本の未来、2030年に我が国が目指すべき経済社会の姿として、次の三つの経済社会像を設定している。(1)世界トップクラスの経済力を維持し持続的発展が可能となる経済、(2)国民が豊かさと安全・安心を実感できる社会、(3)世界と共生し人類の進歩に貢献する経済社会。そして、科学技術イノベーション政策が当面特に取り組むべき課題として、以下の5つの政策課題を設定している。

- I. クリーンで経済的なエネルギーシステムの実現
- II. 国際社会の先駆けとなる健康長寿社会の実現
- III. 世界に先駆け次世代インフラの構築
- IV. 地域資源を活用した新産業の育成
- V. 東日本大震災からの早期の復興再生

更に、これらの政策課題の解決に向けて共通基盤的に適用され、将来の産業競争力の源泉となる分野横断技術として、情報セキュリティ・ビッグデータ解析・ロボット・制御システム技術等のICT (Information and Communication Technolog: 情報通信技術)、デバイス・センサや新たな機能を有する先進材料を開発するためのナノテクノロジー、地球観測技術や資源循環等のための環境対策技術、の3技術分野を挙げている。そのうちのナノテクノロジーについての記述を見ると、エネルギーの効率的な利用のため、ナノテクノロジーはこれまでも様々な技術で期待に答えてきたとして、ハイブリッド自動車用の高エネルギー密度のバッテリー材料、レアメタルを大幅に削減した触媒、情報機器のパネルに利用される有機EL材料やタッチパネルに利用される透明導電体等を実例として挙げている。そして、「これらの材料やデバイスは、ナノレベルでの現象・構造・組成の可視化・理解のための計測・分析や、機能を実現す

るためのナノレベルの材料設計、及びそれらをデバイスやシステムに作り込む加工技術等がなければ実現していない。」と、ナノテクノロジーの基盤的技術としての重要性に言及している。

前掲の参考文献 [1] からの引用では、材料分野との関連において、ナノテクノロジーの重要性が指摘されていたが、ナノテクノロジーは分野横断的な基盤的技術であり、ナノテクノロジーの重要性は、材料分野においてのみにとどまらない。独立行政法人科学技術振興機構研究開発戦略センターによる「研究開発の俯瞰報告書 ナノテクノロジー・材料分野 (2013 年) 第 2 版」 [2] は、ナノテクノロジーの応用分野を、「グリーンナノテクノロジー」、「バイオナノテクノロジー」、「ナノエレクトロニクス」の 3 分野に区分している。

ここで、改めてナノテクノロジーの定義として、参考文献 [2] による定義を引用しておく。

### ナノテクノロジー

1 ナノメートルから 100 ナノメートルの領域において物質を成長させ、加工し、そしてそのサイズのバルク・表面・界面の構造や、そこで生ずる諸物性現象を原子・分子レベルで観測し、理解し、制御し、それら諸要素を組み合わせることで、あるいは他の知識・技術と組み合わせることにより、新しい知と機能を創出しようとする学術的・技術的領域。

そして、参考文献 [2] は、ナノテクノロジーの要素概念として、①ナノ形成・加工、②ナノ構造、③ナノ界面・表面、④ナノ物性、⑤ナノ計測、⑥構造設計・機能設計、を挙げている。その中の⑤ナノ計測の概念には、原子分解能、三次元描画、単分子・孤立細胞計測等が含まれ、材料分野に適用されれば、ナノレベルでの現象・構造・組成の可視化・理解のための計測・分析技術として新規材料の開発を下支えし得る。また、バイオ（生命科学）分野においては、病気の発生メカニズムを細胞レベルで解明しようとする細胞病理学へ、病理組織を数 100 nm 以下の高分解能により三次元構造観察する手段を提供する、あるいは、特定タンパク質の細胞内、細胞間の分布を可視化することで創薬支援へ適用されることが期待される。

以上で見たように、基盤技術としてのナノテクノロジーに対する期待は大きく、今後の科学技術の発展においてナノテクノロジーが果たす役割の重要性は、増加する一方であると考えられる。多岐にわたるナノテクノロジーの中で、数 nm から数 100 nm の三次元構造を可視化する高分解能三次元構造観察技術に着目すると、現在のところは、光学顕微鏡技術と電子顕微鏡技術が二つの主要な柱となっている。そして、X線をプローブとする X 線顕微鏡技術が新たに加わろうとしている。

X線は、可視光と比べて電磁波としての波長が短く、X線をプローブとした X 線顕微鏡は、原理的には、10 nm 以下の分解能の実現が期待できる。また、X線は物質を透過し易く、CT（コンピュータ断層撮像）技術を高分解能 X 線顕微鏡と組み合わせることにより、三次元構造観察が可能となる。X線の物質との相互作用は、可視光や電子線の物質との相互作用と異なり、X線顕微鏡からは、光学顕微鏡や電子顕微鏡とは相補的な情報が得られる。100 eV~2 keV のエネルギー範囲の軟 X 線は、炭素や酸素等の軽元素から構成される試料に用いた場合に

元素間の自然な吸収コントラストが得られることから、組織切片のような生物試料や炭素繊維強化樹脂に代表される炭素系材料等の軽元素試料の高分解能三次元構造観察に好適である。特に、水の中のタンパク質や脂質等の炭素を含む物質のコントラストを得やすい水の窓と呼ばれるエネルギー範囲（284 – 534 eV）のX線を用いたX線顕微鏡では、細胞や組織切片のような生物試料を、生きたままに近い含水凍結状態で観察でき、非染色で細胞や細胞小器官の分布を三次元的に画像化することが可能である。この特徴を活かすことで、細胞中の特定分子の分布を細胞の三次元構造を背景として可視化することができる。また、細胞小器官の形態的解析から幹細胞の分化状況を評価できる可能性もあり、基礎生物学や、抗体創薬、あるいは再生医療分野に、X線顕微鏡を適用する試みが広まりつつある。ただし、現在のところ、X線顕微鏡のほとんどがSPring-8（日本）やBESSY II（ドイツ）等の放射光施設に設置されているため、その利用機会を得られる研究者は限られている。そのため、X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術を、光学顕微鏡と電子顕微鏡と同じように生命科学分野や材料科学分野に普及させるためには、一般的な実験室に設置可能な実験室規模の大きさと、研究者自身が操作できる使い勝手の良さを併せ持つX線顕微鏡の開発が不可欠である。

## 1.2 本研究の目的

企業の中央研究所に所属する本論文の筆者のグループは、斜入射X線反射鏡の一つであるウォルターI型鏡とそれを結像用光学素子として用いたX線顕微鏡の開発に、1980年代後半から現在に至るまで継続して取り組んでいる\*。斜入射X線反射鏡はX線の利用効率が高く、また、X線源に単色性を要求しない。ウォルターI型鏡のX線利用効率の高さに着目すると、コンパクトな構造で取り扱いが容易でありながら、X線強度が不足しているとされ、これまで軟X線顕微鏡用のX線源の主流になれなかった電子衝撃型の軟X線源の利用も、現実的な選択肢となり得る。電子衝撃型軟X線源、ウォルターI型鏡を用いた光学系、およびCT技術を組み合わせることにより、一般的な実験室に収まる大きさで取扱いが容易な軟X線3D顕微鏡を開発し実用化することができれば、軽元素試料の高分解能三次元構造観察が放射光施設に依らずとも可能となる。研究者の利便性を向上させることにより、実験室規模の軟X線3D顕微鏡は、生命科学分野や材料科学分野の研究の促進に貢献できると考える。

本研究の目的は、以下の2点に要約される。

### 1. 軟X線3D顕微鏡の開発

筆者のグループにおけるX線関連研究のコア技術である斜入射X線反射鏡と、電子衝撃型軟X線源およびCT技術を組み合わせ、軽元素試料の高分解能三次元構造観察を可能

---

\*筆者は、X線顕微鏡開発の立ち上げ段階から開発に携わり、その後、一旦は開発から離れたものの、2008年に開発に復帰し、2010年からは開発を統括する立場に就いている。

とする実験室規模の軟X線3D顕微鏡を開発する。軟X線3D顕微鏡を実際の研究・開発の現場に適用させるには、それぞれの分野に固有の要求に対応する必要がある。有望な市場として期待できる生命科学分野においては、生物試料を含水凍結状態に置いて生きたままに近い状態で観察する技術への要求があるので、真空中で試料の含水凍結状態を保持するための冷却試料ステージ等の試料周辺技術についても開発する。

## 2. 軟X線3D顕微鏡の事業化の検討

軟X線3D顕微鏡を生命科学分野や材料科学分野に広く普及させるためには、軟X線3D顕微鏡を事業化する必要がある。研究の現場に普及することで生命科学分野や材料科学分野の研究者の利便性が向上し、結果として研究の促進に貢献できる。そして、軟X線3D顕微鏡の事業化は、ナノテクノロジーの一翼を担い科学技術の発展に資する、光産業の新たな分野を創成する第一歩である。本論文では、軟X線3D顕微鏡の事業化の検討として、事業コンセプトを明確にして事業の評価を行い、それらの検討の結果に基づいて事業化に向けたシナリオを作成する。

前述した本研究の背景と上記の研究目的との関連を図1.1に示す。筆者のグループおよび所属企業の保有技術であるX線光学技術、軟X線源技術と、新規開発を要する試料周辺技術等を統合して、実験室規模の軟X線3D顕微鏡を開発する（第1の目的）。そして、軟X線3D顕微鏡がもたらす軽元素試料の高分解能三次元構造観察技術を生命科学分野と材料科学分野に普及させるために、軟X線3D顕微鏡の事業化の検討を行う（第2の目的）。本研究に基づいて軟X線3D顕微鏡の事業化を実現することができれば、わが国の科学技術イノベーションに資する、光産業の新たな分野の創成に繋がると考える。

## 1.3 本論文の構成

本論文の構成を以下に示す。

第1章においては、本研究の背景として、科学技術の発展におけるナノテクノロジーの重要性を、我が国の科学技術イノベーション政策を引き合いに出して確認した。そして、本論文で論じる軟X線3D顕微鏡がもたらす、高分解能三次元構造観察技術の意義について説明した。また本研究の目的である軟X線3D顕微鏡の技術開発とその事業化検討について、上記の本研究の背景との関連において説明した。

第2章では、生命科学分野や材料科学分野の研究を下支えする、高分解能三次元構造観察技術の動向を取り上げる。まず、既に基盤的な技術として普及している光学顕微鏡、および電子顕微鏡による三次元構造観察技術について概観する。次いで、X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術の開発動向について、本研究の先行研究としての位置付けにおいて、X線顕微

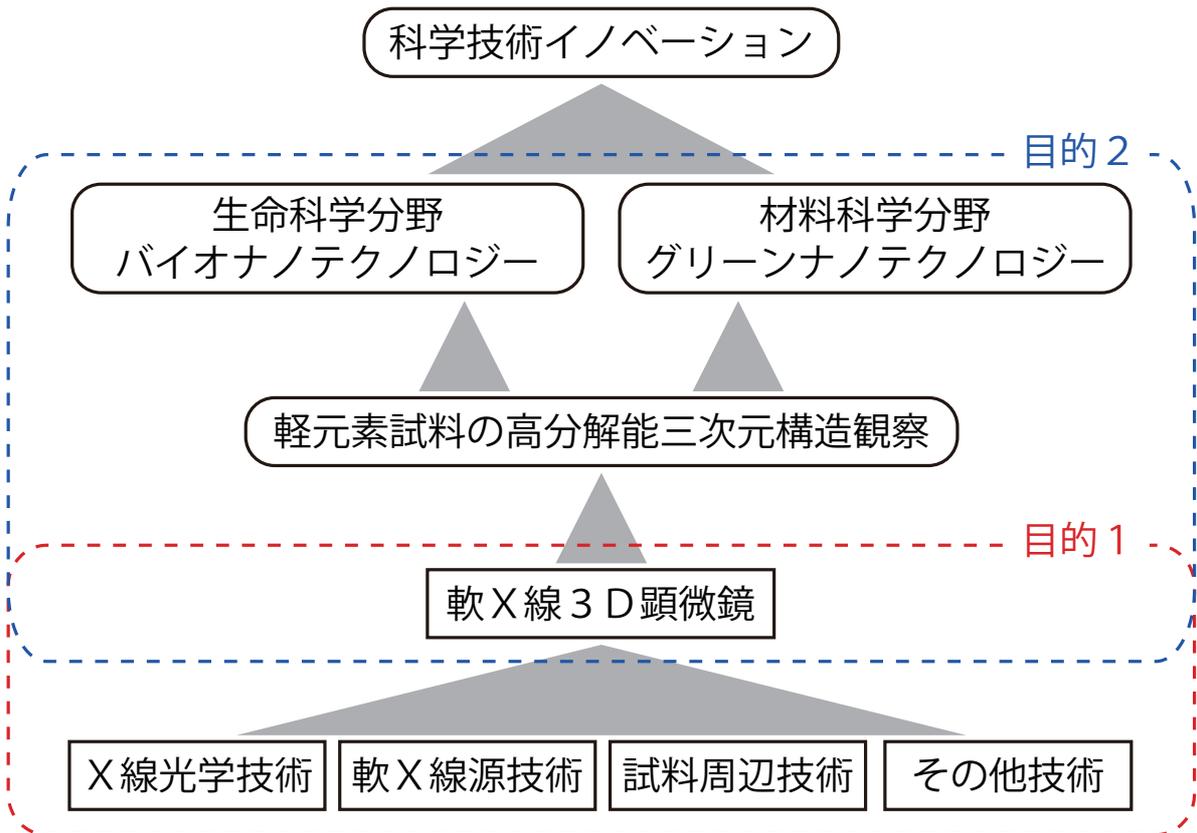


図 1.1 本研究の目的

鏡開発の歴史をも包含して詳述する。

第3章では、本研究の第1の目的である軟X線3D顕微鏡の開発成果について開発の経緯を含めて詳述する。筆者の所属部署では、1980年代後半に軟X線顕微鏡の開発におけるコア技術としてウォルターI型鏡の開発に着手し、現在もその高精度化に取り組んでいる。第3章では、ウォルターI型鏡を含む斜入射X線反射鏡についても論述を加える。

第4章においては、本研究の第2の目的である軟X線3D顕微鏡の事業化検討を行う。先ず、事業コンセプトを明確にするため、軟X線3D顕微鏡の顧客と仕様、及び差別化の方針について検討する。次に、事業としてどの程度の魅力があるのか、また、筆者の所属企業に適した事業であるのか、の二つの観点から事業評価を行う。そして、最後に軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたシナリオを作成する。

第5章では、本論文の結言として、本研究の背景と目的、および、高分解能三次元構造観察技術の動向を振り返り、軟X線3D顕微鏡の開発と事業化検討で得られた成果をまとめる。

## 参考文献

- [1] 内閣府 総合科学技術・イノベーション会議. 科学技術イノベーション総合戦略 2014 ～未来創造に向けたイノベーションの懸け橋～, 2014. <http://www8.cao.go.jp/cstp/sogosenryaku/>.
- [2] 独立行政法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター. 研究開発の俯瞰報告書 ナノテクノロジー・材料分野 (2013 年) 第 2 版, 2013. <http://www.jst.go.jp/crds/pdf/2013/FR/CRDS-FY2013-FR-05.pdf>.

## 第 2 章

# 高分解能三次元構造観察技術の動向

### 2.1 はじめに

本章においては、先ず、生命科学分野や材料科学分野において、既に標準的な研究ツールとして普及している光学顕微鏡と電子顕微鏡による三次元構造観察について概観する。光学顕微鏡による三次元構造観察技術としては、共焦点レーザー顕微鏡と多光子励起顕微鏡（以下、レーザー顕微鏡と総称する）を取り上げ、電子顕微鏡による三次元構造観察技術としては、透過型電子顕微鏡とトモグラフィーの手法を組み合わせた電子線トモグラフィー法を取り上げる。また、技術面の動向に加えて市場動向についても言及する。なお、ここで取り上げる市場規模のデータは、第 4 章において軟 X 線 3 D 顕微鏡の市場規模を推定する際に援用する。次に、本研究の先行研究のレビューとして、X 線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術の開発動向について、X 線顕微鏡開発の歴史を辿り、また、第 12 回 X 線顕微鏡国際会議（The 12th International Conference on X-ray Microscopy, XRM2014）で見られた最新の動向を詳述する。生物試料の高分解能三次元構造観察における X 線顕微鏡の特徴を、他の技術（レーザー顕微鏡、電子線トモグラフィー）と比較して表 2.1 に示す。

表 2.1 生物試料の高分解能三次元構造観察に用いられる技術の比較

顕微鏡	コントラストの起源	三次元再構成の方法	分解能	試料厚さ	主な観察対象	特徴
レーザー顕微鏡	試料中の蛍光標識された分子からの蛍光	共焦点光学系、多光子励起	焦点面内： 200 nm 程度 厚さ方向： 試料の厚さにより 500 nm から数 $\mu\text{m}$	多光子励起顕微鏡の場合 は 数 100 $\mu\text{m}$	細胞・生体組織中の 蛍光標識分子の分布・動態	染色を要するが 高コントラスト
透過型電子顕微鏡	試料中の電子による入射電子線の散乱	トモグラフィ	5 - 10 nm 試料の厚さ、取得する 透過像の枚数、傾斜角 の範囲に依存	100 - 300 nm	細胞内の高分子の 構造・結合状態	高分解能である が試料の薄切片 化が必要
水の窓 X 線 <sup>a</sup> 顕微鏡	試料中の原子による入射 X 線の吸収。	トモグラフィ	50 - 100 nm	10 $\mu\text{m}$ 程度 <sup>b</sup>	細胞・組織切片の 三次元構造	非染色で試料を 構成する分子の 同定が可能

<sup>a</sup>284 - 534 eV の範囲の X 線。炭素原子と酸素原子の吸収コントラストが得やすく、生物試料の観察に好適に用いられる。

<sup>b</sup>水が 8  $\mu\text{m}$ 、タンパク質が 2  $\mu\text{m}$  の厚さを持つ試料の場合、透過した酸素 K $\alpha$  X 線の強度は 3% に減衰する。

## 2.2 光学顕微鏡

光学顕微鏡は、生物学においては標準的な研究ツールである。その歴史は、古く 17 世紀にまで遡ることができ、17 世紀後半にはオランダのアントニ・ファン・レーウェンフック (Antonie van Leeuwenhoek) が光学顕微鏡を用いて微生物の観察を行っている [1]。それ以降、光学技術の進展による顕微鏡光学系の改良、位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡等の新しい顕微観察手法の発明、あるいはレーザーや高感度光検出器等の新技术との結合により、現在では、生命科学分野だけでなく材料科学分野や様々な分野において欠かすことのできないツールとなっている。特にレーザー技術との結合は、共焦点レーザー顕微鏡や多光子励起顕微鏡として三次元構造の再構成を可能とし、また、STED (stimulated emission depletion) 顕微鏡として光学顕微鏡の解像度限界を打破する超解像の実現等、光学顕微鏡に飛躍的な進歩をもたらしている。2014 年のノーベル化学賞が、超解像蛍光顕微法 (super-resolved fluorescence microscopy) の開発を理由として、STED と単一分子顕微法 (single-molecule microscopy) を開発した研究者たちに贈られたことは記憶に新しいところである。

一般的な光学顕微鏡において、2 つの点光源を識別できる最小の距離  $d$  で与えられる分解能は、レイリーの基準 (Rayleigh criterion) によれば、

$$d = \frac{0.61\lambda}{\text{NA}} \quad (2.1)$$

となる [2]。ここで、 $\lambda$  は観察に用いる波長であり、NA は対物レンズの開口数である。なお開口数 (numerical aperture) とは、対物レンズがどれだけ多くの光を取り入れられるかを示す指標であり、試料と対物レンズの間の媒質の屈折率を  $n$ 、光軸上の 1 点から出て対物レンズに入る光のうち一番外側になる角度を  $\theta$  とすると、 $\text{NA} = n \sin \theta$  で与えられる。青色 ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) の光を使って、高開口数 ( $\text{NA} = 1.4$ ) の対物レンズで観察すれば、 $d = 196 \text{ nm}$  となり、光学顕微鏡の分解能の限界は 200 nm 程度にあることになる。

共焦点レーザー顕微鏡は、その名が示す通り、従来の光学顕微鏡とは異なり、共焦点光学系を採用している。共焦点光学系では、図 2.1(a) に示すように、対物レンズの焦点位置と共役な位置 (像位置) に円形の開口をもつピンホールを配置することで、焦点のあった位置のみの光を検出することが可能となる [3]。生物学用途としては、主に蛍光像の観察となるが、その場合は、励起レーザー光が集光・照射された焦点からの蛍光のみが検出され、焦点の上下の領域からの蛍光はピンホールによって除かれる。そのため、コントラストに優れ、高い解像度の蛍光画像が取得できる。また、試料の異なる深さに焦点を合わせて取得した画像を積み重ねることにより、三次元の蛍光画像を構築することも可能である [4]。共焦点レーザー顕微鏡により得られる画像には、理論上は通常の広視野顕微鏡よりも 2 倍程度高い空間周波数までの情報 (超解像成分) が含まれているが、この超解像成分はコントラストが低く観察は困難であった。

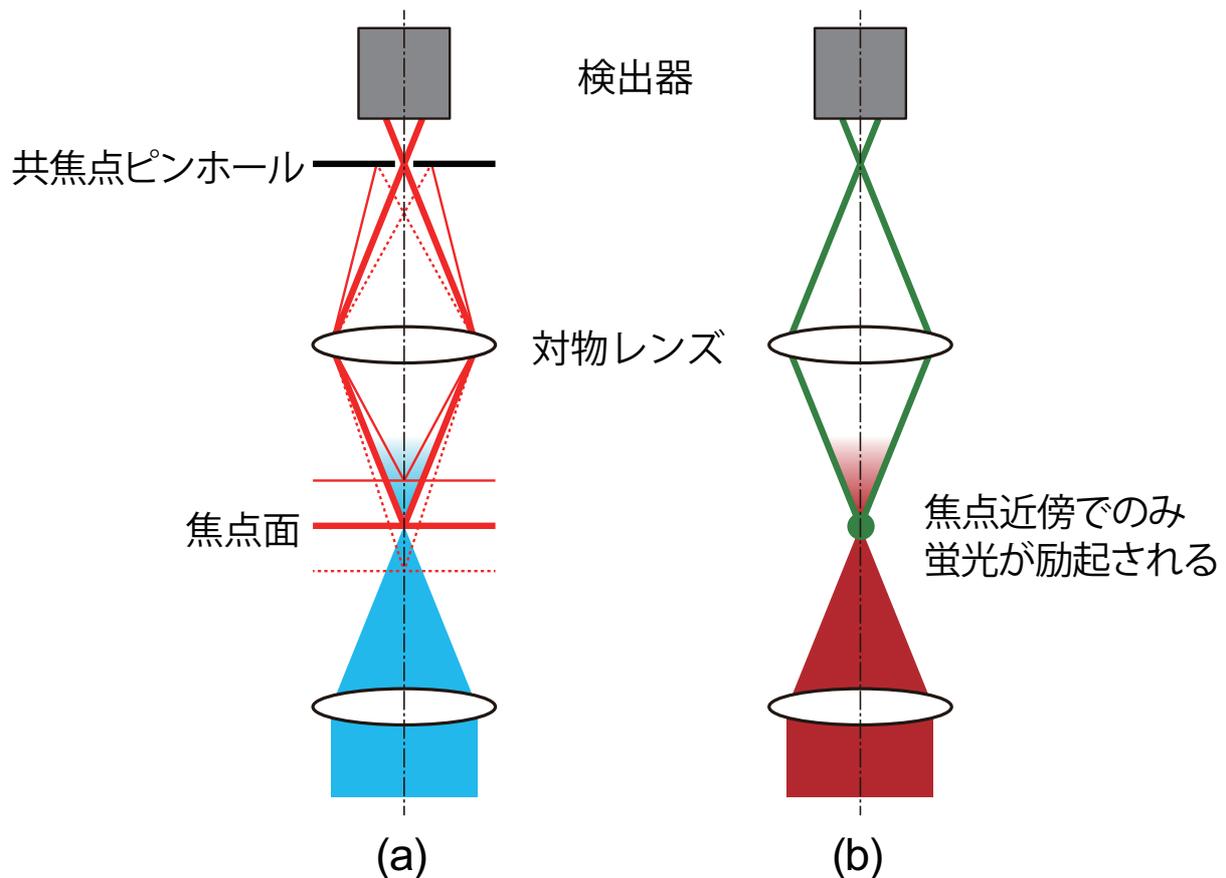


図 2.1 (a) 共焦点レーザー顕微鏡、および、(b) 多光子励起顕微鏡の原理説明図

最近になって、超解像成分のコントラストを向上させて強調処理する「超解像技術」が開発され、上述の光学顕微鏡の限界を超える 120 nm の分解能が実現されている [5]。

多光子励起顕微鏡では、蛍光分子の吸収波長の整数倍の波長を持つフェムト秒レーザーを試料に集光照射し、2 個以上の励起光光子を蛍光分子が同時に吸収して蛍光を発する現象（多光子励起）が利用されている [6]。多光子励起が生起される確率は、励起光光子の時間的・空間的密度を高めることにより、非線形的に急激に増大する。従って、多光子励起顕微鏡では、励起光の焦点でのみ蛍光分子が励起されて蛍光を発する。そのため、ピンホールを使用することなく、共焦点レーザー顕微鏡と同じように高コントラストな三次元蛍光画像を取得することが可能である（図 2.1(b) 参照）。また、励起レーザーには、紫外から可視域にある蛍光分子の吸収波長の 2 倍以上の波長となる近赤外光のレーザーが使用される。この近赤外域の光は生体組織を透過し易く生体組織へのダメージが小さいため、多光子励起顕微鏡によれば、生きた状態の試料の数 100  $\mu\text{m}$  におよぶ深部観察も可能であり [7]、その場合でも深さ方向の分解能は数  $\mu\text{m}$  が得られる [8]。

生物学用の共焦点レーザー顕微鏡・多光子励起顕微鏡の 2013 年度の国内市場規模は、「科

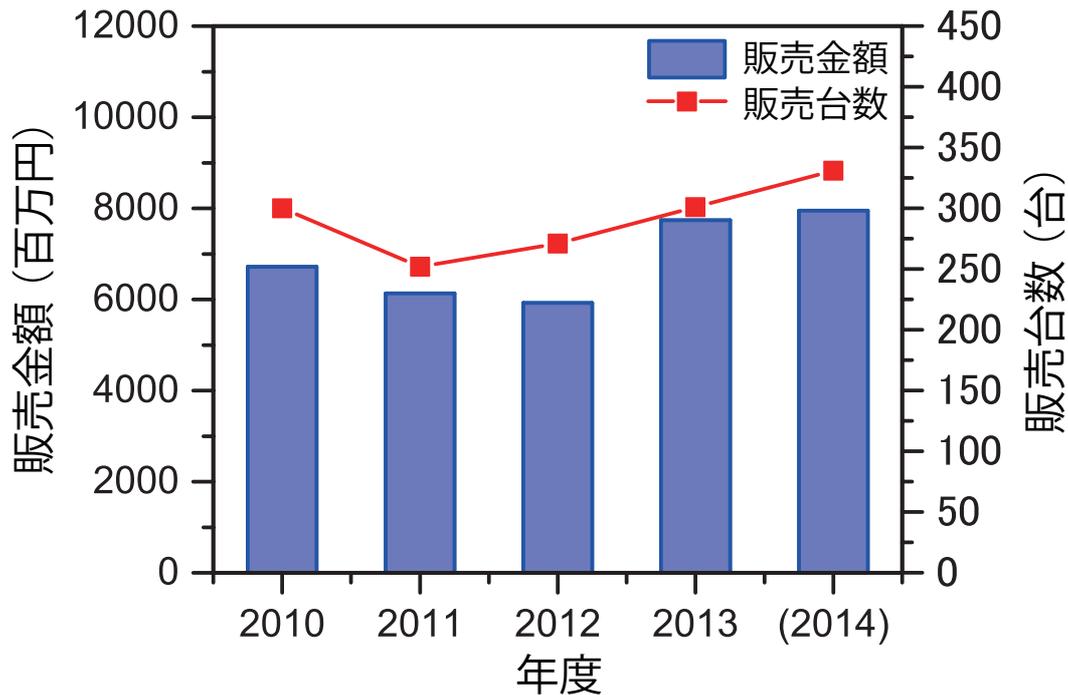


図 2.2 生物学用の共焦点レーザー顕微鏡・多光子励起顕微鏡の国内市場規模。2014 年度の数值は予測値である。「科学機器年鑑 2014 年版」[9] に基づき筆者がグラフ化した

学機器年鑑 2014 年版」[9] によれば、参入メーカーの国内向け販売実績の金額として 7,739 百万円、台数は 301 台と推定されている。2010 年度を起点とすると、2013 年度までの金額ベースの年平均成長率は +4.8% の伸びを示すが、台数では +0.1% と横這いであり（図 2.2 参照）、レーザー顕微鏡の市場については、成長段階の成熟期に入ったと見ることができる。なお、2014 年度については、7,951 百万円、331 台と予測されている。

## 2.3 電子顕微鏡

電子顕微鏡は、光学顕微鏡が試料に可視光を照射するのと同じように、試料に電子を照射して観察を行う。電子顕微鏡には、試料に電子線を当て、試料を透過した電子像を拡大して観察する透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope, TEM）と、試料に電子線をあてる位置を二次元的に走査しながら、試料から跳ね返った、あるいは試料に当たった電子に弾き飛ばされた電子（二次電子）を計測する走査型電子顕微鏡の 2 種類がある。本節では、生物試料の高分解能三次元観察にも用いられている透過型電子顕微鏡について概観する。

光学顕微鏡の分解能の限界は、前節で示したように 200 nm 程度である。これよりも微細な構造を観察するためには、光学顕微鏡で用いられる紫外・可視光よりも波長の短いプローブを観察に用いる必要がある。電子顕微鏡は、加速された電子を観察のプローブとして用いてい

る。量子力学的には、電子は粒子性と波動性を併せ持ち、エネルギー  $E$  の電子を波としてみたときの波長（ド・ブロイ波長）は以下の式で与えられる。

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0E \left(1 + \frac{E}{2m_0c^2}\right)}} \quad (2.2)$$

ここで、 $\lambda$  は電子のド・ブロイ波長、 $h$  はプランク定数、 $m_0$  は電子の静止質量、 $c$  は光速である。この式によれば、100 kV の電位差で加速された電子のド・ブロイ波長は 0.0037 nm となり、電子線をプローブとして用いることで、光学顕微鏡よりも桁違いに高い分解能が得られることがわかる。実際の透過型電子顕微鏡では、電子レンズの球面収差により分解能が制限され、加速電圧 100 kV の場合で、分解能は 0.5 nm 程度である [10]。

透過型電子顕微鏡により試料の高分解能三次元構造観察を行う手法は、電子線トモグラフィ（Electron Tomography）法と呼ばれる。工業用の X 線 CT と同じように電子線トモグラフィ法においても、試料を傾斜させて多数の連続的な傾斜角での電子線透過像を取得し、これらの透過像から数学的に試料の三次元構造を再構成する。生物試料の観察では、電子線によって試料が損傷を受けることから、試料に照射できる電子線の量に制約がある。このことは、傾斜角を変えて取得する電子線透過像の枚数を多くできない、あるいは透過像の信号対雑音比が低いことにより、三次元構造観察の高分解能化を困難にしていた。しかし、近年になって細胞内でのタンパク質の同定を可能とする数 nm 程度の分解能が達成されている。電子線トモグラフィ法では、透過型電子顕微鏡としては比較的厚い試料が観察され、分解能は試料の厚さにも依存する。更には、取得する透過像の枚数、および傾斜角の範囲にも依存し、 $\pm 60^\circ$  もしくは  $\pm 70^\circ$  の傾斜角の範囲を  $1^\circ$  間隔で透過像を取得する場合には、5 – 10 nm の分解能を得られる試料厚さは、100 – 300 nm が上限となる [11]。

含水状態の組織切片や細胞等の生物試料を、液体窒素で冷却された極低温の冷媒に漬けて急速凍結すると、試料の構造を凍結前の生きたままに近い状態で固定することができる。この含水凍結状態の試料を、液体窒素で冷却した試料ステージに搭載して透過型電子顕微鏡により観察するクライオ電子顕微法と、上述の電子線トモグラフィ法とを組み合わせることで、生物試料を生きたままに近い状態に保持して分子レベルの高分解三次元構造観察を行うことも可能になっている。

透過型電子顕微鏡の 2013 年度の国内市場規模は、「科学機器年鑑 2014 年版」[9] によれば、参入メーカーの国内向け販売実績として、金額では 13,822 百万円、台数では 98 台と推定されている。2014 年度の市場規模は、7,137 百万円、66 台と予測され、金額、台数共に 2013 年度の実績から大きく減少している。これは、2013 年度の実績には補正予算の影響が含まれているためであり、2014 年度の市場については 2011 年度、2012 年度の水準に戻る、と見ることが出来る（図 2.3 参照）。なお、「科学機器年鑑 2014 年版」における透過型電子顕微鏡の国

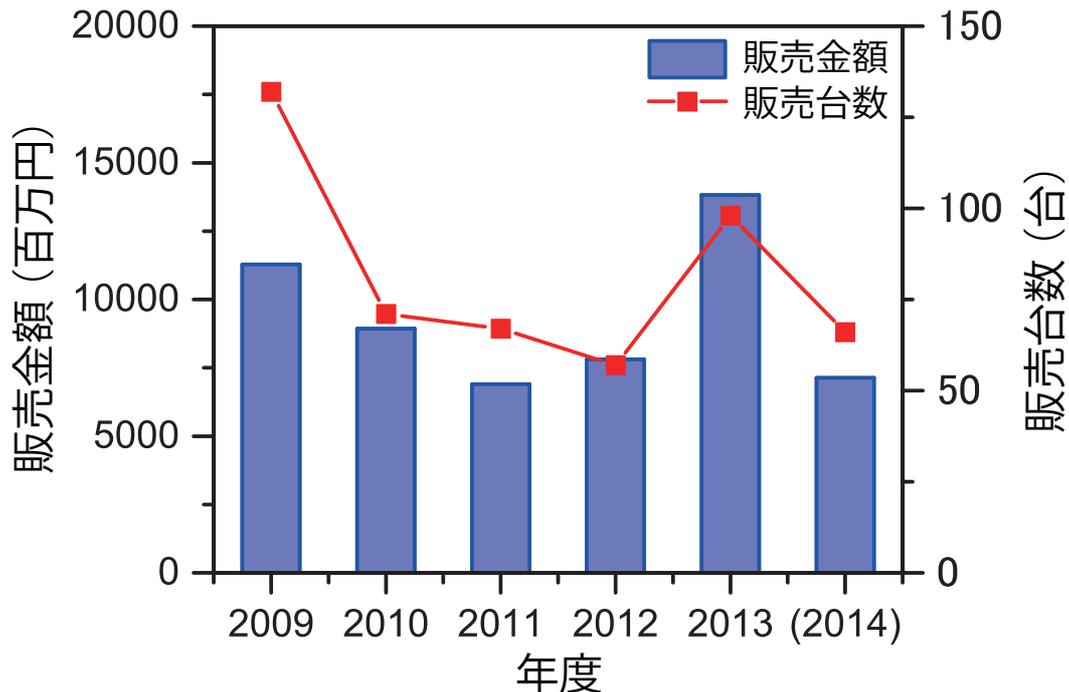


図 2.3 透過型電子顕微鏡の国内市場規模。2014 年度の数值は予測値である。「科学機器年鑑 2014 年版」[9] に基づき筆者がグラフ化した

内市場規模の推定では、用途別には推定されていないが、電界放出 (Field Emission, FE) 電子銃を採用した FE タイプと、それ以外の汎用タイプとに分類して推定が行われている。FE タイプは、高価ではあるが高分解能が得られる。汎用タイプについては、「医療分野やバイオ系が需要先の一つとなっているが、前処理の煩雑さ、TEM 操作の難しさなどあって、レーザー系および光学系の顕微鏡からシェアを奪うことができない状況が続いている」とコメントされている。汎用型の 2013 年度の販売実績は 51 台と推定され、2014 年度については 33 台と予測されている。

## 2.4 X線顕微鏡

### 2.4.1 X線顕微鏡開発の歴史

顕微観察のプロブとして、数 keV から数 100 eV のエネルギーの軟 X 線を用いることについては、いくつかの利点が挙げられる。まず、このエネルギー域の X 線の波長は、1 nm 以下から数 nm であり可視光の波長よりも短いため、原理的には、光学顕微鏡よりも微細な構造の観察が可能となる。次に、軟 X 線と物質との相互作用は、軟 X 線のエネルギーと物質を構成する元素の原子番号に強く依存し、そのため、X 線のエネルギーを選べば特定の元素を際

立たせた観察も可能である。また、電子顕微鏡での観察に適さない厚い試料も観察できることも、軟X線をプローブとする観察の特徴の一つである。これらの特徴は1950年代までには広く認識され、密着顕微法 (micro radiography もしくは contact microscopy) や投影顕微法 (projection microscopy) が開発されたが、軟X線の利点が十分に活用されるためには、高性能な軟X線源や軟X線光学素子の登場を待たねばならなかった [12] [13]。

1970年代に軟X線域の放射光が新しいX線源として認知されると、軟X線用の光源としての放射光の利用が、高エネルギー物理学実験用の電子シンクロトロンを使って始まった。なお放射光とは、円形加速器の中で電子の軌道が曲げられる時に、軌道の接線方向に指向性を持って発生する電磁波である。当初は高エネルギー物理学実験用の電子加速器において電子のエネルギーを奪う厄介者であったが、1970年代には、放射光発生を目的に設計された加速器 (電子蓄積リング) を有する放射光施設が建設されるようになった。放射光施設では、従来の紫外光源や電子衝撃型X線源と比べて桁違いに強力な極端紫外光～硬X線が利用でき、また近年の大型放射光施設では、アンジュレータと呼ばれる強力な磁場の周期構造が組み込まれ、高輝度かつコヒーレント (可干渉) なX線も利用可能である。1980年代に入ると電子蓄積リングを備えた放射光施設において、軟X線用の光学素子としてゾーンプレート (zone plate、Fresnel zone plate とも) を用いたX線顕微鏡が建設されるようになった。

ゾーンプレートは、X線に対して透明・不透明の輪帯を交互に繰り返す構造をした円形の透過型回折格子である。各輪帯の半径と幅は、不透明な輪帯を挟んで隣り合う透明な輪帯から回折されたX線の光路差が、X線の波長と等しくなるように設計されていて、その結果全ての透明輪帯からの回折X線が干渉効果で光軸上の一点で強め合い焦点を形成し、屈折レンズと同じ働きをする (図2.4参照)。原理的には、最も外側の輪帯の幅と同程度の分解能が得られる。Niemannら [14] は、1976年に、独国 (当時は西独) の加速器施設 DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) にある電子シンクロトロンを放射光源とし使い、ゾーンプレートを結像用光学素子とした結像型X線顕微鏡により、波長4.6 nmにおいて0.5  $\mu\text{m}$  の分解能を報告している。また、1980年代前半に米国の放射光施設 NSLS (National Synchrotron Light Source) において開発された走査型X線顕微鏡では、3.6 nm 近辺の波長の放射光をゾーンプレートで0.2 – 0.4  $\mu\text{m}$  程度に集光してカルシウムの元素マッピングを行い、0.3  $\mu\text{m}$  の分解能を達成している [15]。そして1980年代以降は、放射光施設におけるゾーンプレートを用いた結像型・走査型X線顕微鏡がX線顕微鏡開発の主流となり、近年には10 nmに迫る分解能も達成され [16]、また、トモグラフィーの手法と組み合わせた三次元構造観察では50 nmの分解能も確認されている [17]。

軟X線用の光学素子としては、回折を利用したゾーンプレートの他にも、全反射臨界角以下の極めて浅い角度で平滑な面に入射したX線が全反射される斜入射鏡や、原子層レベルで膜厚が制御された多層膜が直入射に近いX線を反射する多層膜鏡が開発されてきた [18]。斜入射鏡には、2枚の楕円面鏡を組み合わせたKB (Kirkpatrick-Baez) 鏡や、回転楕円鏡、ウォルター

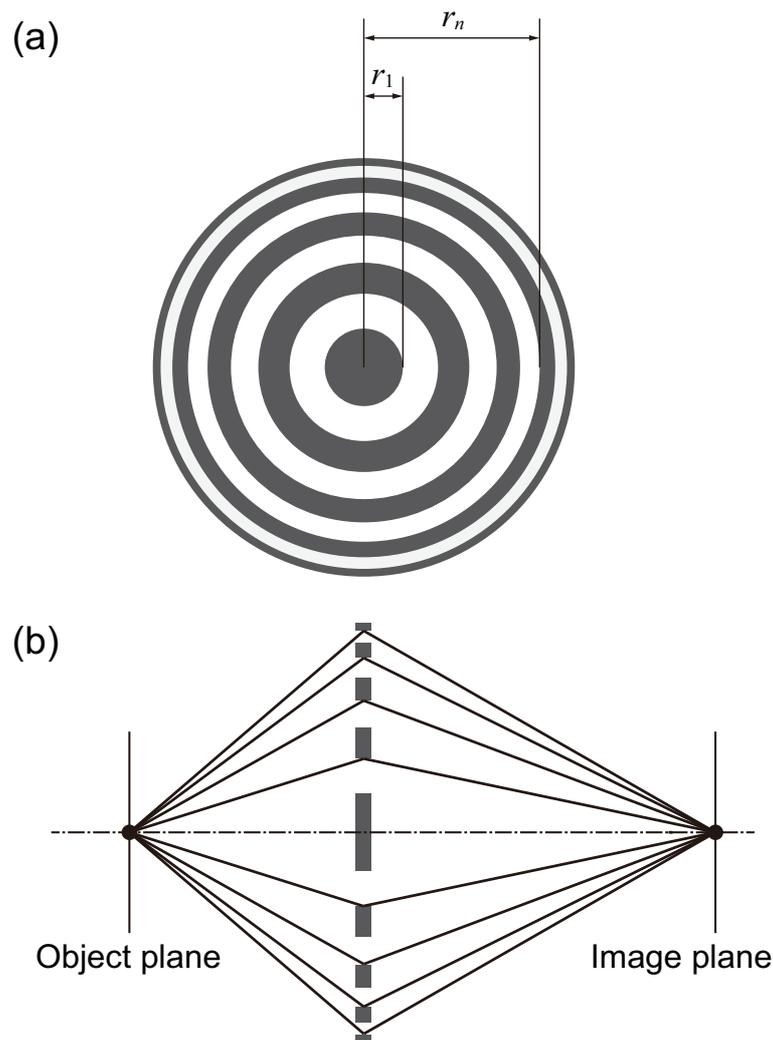


図 2.4 ゾーンプレートの説明図。(a) 正面図。内側から  $n$  番目の境界の半径  $r_n$  は、 $r_n^2 = nf\lambda + (n\lambda)^2/4$  により与えられる。ここで、 $f$  はゾーンプレートの焦点距離、 $\lambda$  はX線の波長である。(b) ゾーンプレートによる結像。試料を透過してゾーンプレートに入射したX線は、X線に対して透明な輪帯と不透明な輪帯の境界で回折され、全ての透明輪帯からの回折X線が、干渉効果で結像面上で強め合い像を形成する。

(Wolter) 鏡等がある。その中でも、円筒内面に形成された回転楕円面と回転双曲面を組み合わせたウォルター I 型 (Wolter type I) 鏡は、コマ収差を小さくできることから視野を比較的大きくとることができ、X線顕微鏡の黎明期からX線顕微鏡用光学素子として開発されてきた [19] [20]。円筒内面に二乗平均平方根 (root mean square, rms) で評価した表面粗さにして数 nm の高精度鏡面を作製することが難しく、初期のウォルター I 型鏡の分解能は  $1 \mu\text{m}$  前後であったが [21] [22]、加工技術の向上に伴い、300 nm の分解能も報告されるに至ってい

る [23]。多層膜鏡を使ったシュヴァルツシルト (Schwarzschild) 光学系\*も、X線顕微鏡の結像光学系として開発され、 $0.5 \mu\text{m}$  以下の分解能と直入射時の反射率として 3.5% 程度 (シュヴァルツシルト光学系としては 0.1% 程度) が報告されている [24]。多層膜鏡を波長が数 nm のX線用として実用化するには、多層膜の各層の厚さの制御に光学系全面で原子層レベルの精度を要する困難さがある。凹球面の多層膜鏡は1枚でもX線の集光用として機能し、また、多層膜鏡はその波長選択性により分光器としても機能するため、多層膜凹面球面鏡を高強度のX線源の集光光学系として利用したX線顕微鏡も開発されている [25]。

先に述べたように軟X線顕微鏡の特徴として、X線のエネルギーを選ぶことにより、特定の元素についてコントラストを強調した画像を得られることがある。特に、図 2.5 に示す「水の窓 (water window)」と呼ばれるエネルギー領域は、X線顕微鏡の生物試料観察への適用において注目されてきた。炭素の K 吸収端 (284 eV) と酸素の K 吸収端 (534 eV) の間のエネルギー領域では、タンパク質のX線に対する線減衰係数 (Linear attenuation coefficient, LAC) が水の LAC よりも 1 桁程度大きい。そのため、このエネルギー領域のX線を用いると、水の中にあるタンパク質 (例えば、生きた含水状態の細胞中のタンパク質) を水の存在に妨げられることなく観察できる。このエネルギー領域が「水の窓」と呼ばれる所以である。前述したように、1970 年代後半から 1980 年代前半に初期の放射光施設でゾーンプレートを使って実現されたX線顕微鏡も、この水の窓域のX線を使用している。なお、含水状態の試料を凍結することで、画像取得中の試料の動きを止めることができ、またX線による試料の損傷も抑えられることから、近年の水の窓X線顕微鏡の多くは、含水凍結状態の試料を真空中で極低温に保持可能なクライオステージを装備している。

X線顕微鏡開発は、現在までのところは、大規模放射光施設における開発が主流であり続けているが、通常の実験室に設置可能な実験室規模のX線顕微鏡の開発も、並行して取り組まれてきた。X線光学素子の中でいち早く  $100 \text{ nm}$  以下の分解能を達成したゾーンプレートは、X線の利用効率 (幾何効率  $\times$  回折効率) が  $10^{-6}$  程度と小さい [27] ことから、実験室規模のX線顕微鏡を実現するためには、実験室規模の高強度のX線源が必要と考えられてきた。そして、1988 年には、ガス放電により生成されたプラズマをX線源とする実験室規模X線源の開発の報告があり [28]、また、このガス放電プラズマX線源とゾーンプレートを用いた集光・結像光学系とを組み合わせた実験室規模のX線顕微鏡については、1992 年に報告されている [29]。近年では、真空中に噴出させた液体窒素のジェットに高強度のレーザー光を集光照射し、生起したプラズマからの水の窓域のX線を使用し、含水凍結状態にある生物試料の  $100 \text{ nm}$  スケールの三次元構造の観察を可能とする実験室規模のX線顕微鏡も開発されている [30]。ただし、真空中に液体窒素を噴出させる機構やプラズマの生成に必要な高強度レーザー装置は、実験室

\*シュヴァルツシルト光学系は、凸面球面鏡と凹面球面鏡を同軸に組み合わせた光学系である。この光学系では、二つの鏡面の半径を適切に設計することにより、三次の球面収差、コマ収差、非点収差を取り除くことができる。入射角は、直入射に近い角度になる。

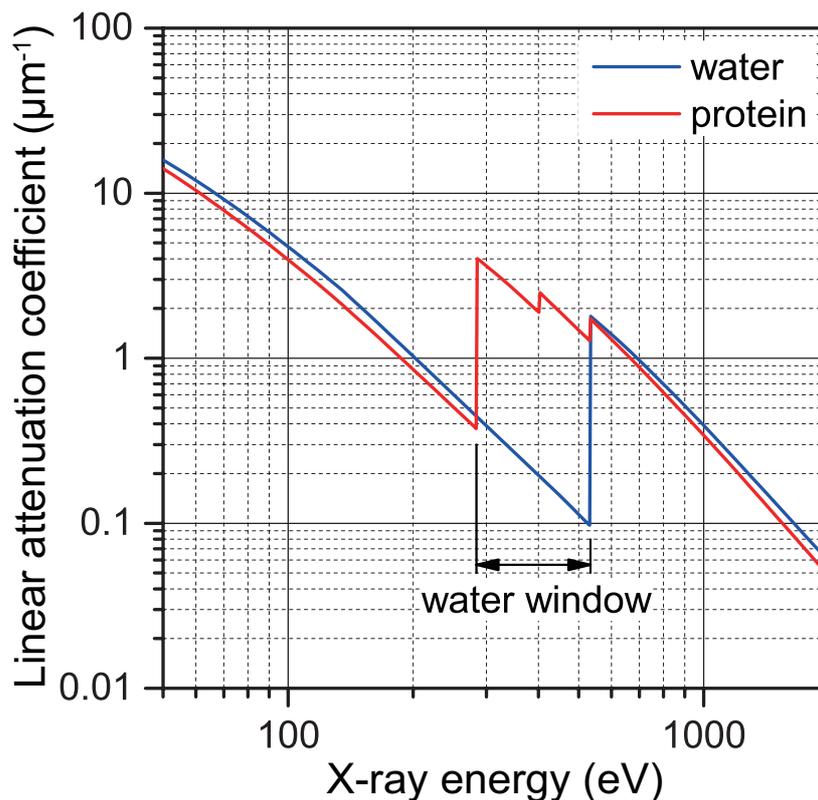


図 2.5 軟X線の水の窓。水（青実線）とタンパク質（赤実線）のX線に対する線減衰係数（Linear attenuation coefficient, LAC）を示す。water window と示されたエネルギー領域（水の窓）では、タンパク質の LAC は水の LAC よりも 1 桁程度大きい。なお、LAC の計算 [26] に際して、タンパク質については、元素組成（原子 %）として、H : 50%、C : 34%、N : 8%、O : 8% [27]、密度として  $1.35 \text{ g/cm}^3$  [12] を仮定した

規模ではあっても操作・保守が容易とは言い難い。

## 2.4.2 現在の開発動向

ここでは、X線顕微鏡の 2014 年現在の開発動向について、2014 年 10 月 26 日から 31 日にかけてメルボルン（オーストラリア）において開催された、第 12 回 X線顕微鏡国際会議（The 12th International Conference on X-ray Microscopy, XRM2014 [31]）に筆者が参加して行った動向調査に基づいて概観する。なお、XRM2014 の会議録は、*AIP Conference Proceedings* として 2015 年 12 月にオンライン公開される予定である。

XRM2014 への参加者は、事前登録者リストの集計からは、20 以上の国・地域から 300 人以上が参加したことになり、国別の内訳は以下の通りである。

オーストラリア	74 人	スウェーデン	13 人
ドイツ	56	スイス	11
日本	34	カナダ	10
米国	30	台湾	8
フランス	20	ベルギー	6
中国	14	デンマーク	5
英国	14	その他	19

開催国であるオーストラリアを除いた上位 3 カ国には、X線顕微鏡関連研究に伝統のあるドイツ、米国に加えて日本も入っていて、日本国内におけるX線顕微鏡開発のアクティビティの高さが窺われる。上記の国名を挙げた国・地域からベルギーを除いた 12 の国・地域は、全て、放射光施設を保有している。このことから、現在のX線顕微鏡開発においても、放射光施設の利用が主流であると見ることができる。

次に、72 件の口頭発表件は、以下のように 15 のセッションに分類されていた。

Introduction	2 件	High Brilliance	2 件
New Facilities	3	Bio/Imaging	13
Optics	7	Ordered Materials	4
Tomography	8	Phase	4
Application	3	Ptychography	5
Elemental Contrast	8	Novel Approaches	4
Energy / Material	4	Future Perspectives	1
Magnetic	4		

ここで注目すべき点は、応用範囲が多様化していることである。X線顕微鏡は生物試料のイメージングを大きなターゲットとしてきたため、Bio/Imaging のセッションの発表が多いのは当然としても、リチウムイオン電池材料 (Energy / Material) や磁性体 (Magnetic) 等の材料関係の発表も 1 割以上を占めている。材料科学分野も X線顕微鏡の市場として有望であるが、材料科学分野の試料は、生物試料よりも厚くなると考えられ、数 keV 以上のエネルギーの X線を利用することになるため、X線光学素子への要求は生物試料をイメージングする場合よりも厳しくなる。また、口頭発表 72 件の大多数が、放射光施設を利用し、あるいは放射光施設や X線自由電子レーザー (XFEL) の利用を前提とした内容であったことも、注目すべきであり、この点も、現在の X線顕微鏡関連研究の主流が、前述したように、大規模施設を用いて最先端 (極限) を追求する研究になっていることを裏付けている。

この X線顕微鏡関連研究のトレンドを象徴的に示す事実が、Ptychography (タイコグラフィ) と呼ばれる、コヒーレントな X線源の利用を前提とする新規のイメージング手法に一

つのセッションが設けられていたことである。X線タイコグラフィーは、X線回折を利用した位相コントラストイメージングの一手法である。光学系を使ったイメージングとは異なり、回折パターンに位相回復計算を実行して試料像を再構成するレンズレスイメージング技術になる [32]。従来のX線回折が、コヒーレントではないX線 (disordered beam) を使って結晶化した試料 (ordered sample) の構造を明らかにしてきたのとは対照的に、コヒーレントなX線 (ordered coherent beam) により生物組織や細胞等の秩序的ではない試料 (disordered sample) の三次元イメージングが可能となる [33]。光学系の性能によって制限されてきたX線顕微鏡の空間分解能を飛躍的に向上させ、原理的にはX線の波長程度が可能であり、現状でも 10 nm 台の空間分解能が達成されている [34]。XRM2014 のタイコグラフィーのセッションでは、タイコグラフィーと蛍光X線イメージングを同時に行った発表があり、タイコグラフィーによる高空間分解能 (20 nm) イメージに蛍光X線による 80 nm 分解能での元素マッピングを重ねて示し、タイコグラフィーと他の計測手法とを組み合わせることで、両者の「いいとこ取り (the best of the both world)」が可能であることが示されていた。

このようなトレンドの中であって、実験室規模のX線顕微鏡に関する発表は、件数こそ少なかったが、一定の存在感は保っていた。XRM2014 の主要スポンサー (2 社) である ZEISS と BRUKER からは実験室規模の装置に関する発表と展示があった。ZEISS の装置は、電子衝撃型X線源から 5.4 keV もしくは 8.0 keV の軟X線を発生させ、X線集光用キャピラリーと結像用ゾンプレートを用いて位相コントラストによるイメージングとトモグラフィーを行う。比較的高エネルギーの軟X線を用いることで数 10  $\mu\text{m}$  程度の厚みを持った試料の観察を可能とし、位相コントラストイメージングにより軽元素試料に対しても高いコントラストと 50 nm の分解能を達成していることが特徴である [35]。ただし、水の窓域のX線ではないため、生物試料の生きたままに近い状態での観察には不適である。ZEISS に買収される前に Xradia 社が開発した同等品の日本国内での販売価格は、2010 年時点で 1 億 8000 万円円~3 億円であった [36]。BRUKER の装置は、スタンドアロンX線顕微鏡として、ガス放電X線源 (水の窓域を含む) と集光用回転放物面鏡、結像用ゾンプレート、CCD 検出器から構成される装置であり、10  $\mu\text{m}$  までの厚さの試料に対して 50 nm 以下の分解能を謳っている [37]。レーザープラズマX線源と集光用多層膜凹面鏡の組み合わせを選択することも可能である。他にも、スウェーデン王立工科大学 (KTH) のグループからは、前述した液体窒素ジェットにレーザーを照射して生成したプラズマからの水の窓X線を用いたX線顕微鏡 [30] や熔融金属ジェットに電子線照射して発生する硬X線を用いた計測等、実験室規模のX線源に関する複数の発表が行われた。レーザープラズマX線源を用いたX線顕微鏡 [30] では、100 nm スケールの三次元構造観察が可能となっているが、真空中に噴出した液体窒素のジェットにハイパワーなレーザーを集光するため、安定してプラズマを生成することに難しさがある。これらのX線顕微鏡は、第3章で詳述する筆者のグループが開発している軟X線3D顕微鏡とは装置構成や技術的特徴は異なるものの、軟X線3D顕微鏡を事業化する際には競合相手になると予想される。表 2.2

に、筆者のグループが開発している軟X線3D顕微鏡と合わせて、各実験室規模のX線顕微鏡の特徴を比較して示す。筆者のグループが開発している軟X線3D顕微鏡は、水の窓域のX線を発生する電子衝撃型X線源と、X線の集光・結像用としてウォルターI型鏡を使用していることが特徴である。電子衝撃型X線源は、いわゆるX線管と動作原理はまったく同じであり、取り扱いが容易である。また、ウォルターI型鏡は、ゾーンプレートに比べてX線の利用効率が高く、また一つの光学系で広範囲のエネルギーのX線を集光・結像できるため、マルチ・エネルギー化への発展の可能性を持っている。筆者のグループは、この組み合わせにより、実験室規模で使い勝手の良い装置の実現を目指している。

XRM2014 最終日の最後の講演、C. Jacobsen (Advanced Photon Source, USA) による“Future challenges in x-ray microscopy”と題した講演の中で、“Will large-scale x-ray sources go the way of dinosaurs?”として、大規模施設と実験室規模の装置の、それぞれの位置付けについて、問題提起がなされた。そして、大規模施設はX線顕微鏡の最先端を切り開き、実験室規模の装置は、自前の実験室で大量の試料を観察する手段を研究者に提供し、それぞれの役割は補完的なものである、との結論が示された。

XRM2014へ参加してのX線顕微鏡開発の動向調査からは、以下の結論が得られた。すなわち、X線顕微鏡開発、あるいは、X線顕微鏡を使った研究の主流は、最先端を切り拓く研究が遂行される放射光施設やXFEL施設に今後も有り続ける。しかしその一方で、実験室規模のX線顕微鏡も、ユーザー（研究者）のニーズに適い、ユーザーの利便性向上に役立つ装置を提供することができれば、大規模施設の補完的な位置付けとして受け容れられる余地は十分にあると考えられる。

表 2.2 実験室規模のX線顕微鏡の比較

企業・大学	X線源	水の窓	使い勝手	光学系 <sup>a</sup>	分解能 (nm)	多波長対応	特徴
ZEISS <sup>b</sup> (Xradia)	電子衝撃型 5.4 keV, 8.0 keV	×	○	集光: CP 結像: ZP	< 50	×	位相コントラスト 最大試料サイズ: $\phi 100 \mu\text{m}$ 本体寸法 (W×D×H): 2.0 m × 1.3 m × 1.9 m 価格: 1.8 億円 - 3 億円
BRUKER	ガス放電、または レーザープラズマ	○	×	集光: EM MLM 結像: ZP	< 50	×	吸収・位相コントラスト 試料厚さ: 最大 10 $\mu\text{m}$ KTH と協力関係あり
スウェーデン王立 工科大学 (KTH)	レーザープラズマ (N Ly $\alpha$ 500 eV)	○	×	集光: MLM 結像: ZP	~ 100	×	吸収コントラスト クライオX線顕微鏡
筆者の グループ	電子衝撃型 (O K $\alpha$ 525 eV)	○	○	集光: W-I 結像: W-I	現状: < 500 目標: < 200	○	吸収コントラスト 本体寸法 (W×D×H): 4 m × 1 m × 1.5 m 程度 価格: 5 千万円 - 1 億円

<sup>a</sup>CP: キャピラリー、ZP: ズーンプレート、EM: 回転円筒、MLM: 多層膜鏡、W-I: ウォルター-I 型鏡

<sup>b</sup>現在の ZEISS の製品ラインアップにある機種についての情報が少ないため、ZEISS に買収される前に Xradia 社が開発した同等機種についての情報を示す [38] [36]

## 2.5 まとめ

レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡、そしてX線顕微鏡のそれぞれについて、生物試料の高分解能三次元構造観察における特徴を比較した表 2.1 から見てとれるように、X線顕微鏡を用いた観察からは、レーザー顕微鏡や透過型電子顕微鏡による観察とは相補的な情報が得られるものと期待される。透過型電子顕微鏡による電子線トモグラフィーでは、分子レベルの三次元構造の観察が可能であり、タンパク質分子の結合状態の解明に用いられるが、観察可能な試料の厚さは数 100 nm 以下であり薄切片化が必須である。レーザー顕微鏡による観察には、蛍光色素による試料の染色が必要となるが、細胞だけでなく生体組織中の特定の分子（タンパク質や DNA 等）の分布を数 100 nm 分解能で可視化することが可能である。X線顕微鏡、特に水の窓域のX線を用いたX線顕微鏡による観察では、レーザー顕微鏡とは異なり、試料を染色することなく細胞や組織切片の自然に近い状態の 100 nm スケールの三次元構造を画像化することができる。また、X線の物質透過性により、10  $\mu\text{m}$  程度と、透過型電子線顕微鏡よりも厚い試料の観察が可能である。このように、透過型電子顕微鏡、レーザー顕微鏡、X線顕微鏡は、生物試料の高分解能三次元観察において相互に異なる特徴を有しているため、どれか一つにより全ての情報が得られるわけではなく、互いに補完しあう役割を担うことになる。実際、最近になって、これらの観察手法を組み合わせる一つの試料を観察する *correlative microscopy* に関する論文が散見されるようになった [39] [40]。

生物学用のレーザー顕微鏡の 2013 年度の国内市場規模は、販売実績の金額として 7,739 百万円、台数は 301 台と推定され、2014 年度については、それぞれ、7,951 百万円と 331 台と予測されている。また、医療分野やバイオ系が需要先の一つと見られる汎用型透過型電子顕微鏡の 2013 年度の販売実績は 51 台と推定され、2014 年度については 33 台と予測されている。

X線顕微鏡は開発当初から大規模な放射光施設での開発が主流であり、そのトレンドは現在も変わりなく、放射光施設や XFEL 施設において X 線顕微法の最先端が切り開かれている。しかし、X線顕微鏡のコミュニティでは、実験室規模の装置と大規模施設は相互に補完的であると認識され、実際に、水の窓X線を用いた生物学用を含む実験室規模のX線顕微鏡も開発されている。したがって、ユーザー（研究者）のニーズに適い、ユーザーの利便性向上に役立つ実験室規模の装置を提供することができれば、大規模施設の利用機会の限られたユーザーに大きな利便性の価値をもたらすことができると考える。

## 参考文献

- [1] 国立天文台編, 理科年表 平成 9 年 机上版 (丸善, 1996), p. 1023.
- [2] W. J. Smith, "Image formation: Geometrical and physical optics," in "Handbook of

- Optics,” , W. G. Driscoll, ed. (McGraw-Hill, New York, 1978).
- [3] オリンパス株式会社, “技術情報: レーザー顕微鏡の基本原理,” [http://www.olympus-ims.com/ja/knowledge/metrology/lex\\_t\\_principles/](http://www.olympus-ims.com/ja/knowledge/metrology/lex_t_principles/).
- [4] オリンパス株式会社, “カタログ: 共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV10i,” (2014). <http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/product/fv10i/>.
- [5] オリンパス株式会社, “カタログ: 生物用共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1200,” (2014). <http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/product/fv1200/>.
- [6] オリンパス株式会社, “カタログ: 多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FV1200MPE,” (2014). <http://www.olympus.co.jp/jp/lisg/bio-micro/product/fv1200mpe/>.
- [7] 長野主税 (著) 日本顕微鏡工業会, “光学を中心とした顕微鏡の基礎,” <http://www.microscope.jp/knowledge/index.html>.
- [8] 寺川進, “多光子励起顕微鏡の基礎と最近の動向,” 光学 **44**, 11–17 (2015).
- [9] 科学機器年鑑 2014 年版 市場分析編 (株式会社アール アンド ディ, 2014).
- [10] 村田和義, 重本隆一, “医学・生物学用超高压電子顕微鏡,” 顕微鏡 **46**, 170–174 (2011).
- [11] 太田啓介, 東龍平, 中村桂一郎, “STEM を用いた厚切り生体組織の電子線トモグラフィー観察による空間分解能の向上,” 顕微鏡 **44**, 252–256 (2009).
- [12] J. Kirz and H. Rarback, “Soft x-ray microscopes,” *Review of Scientific Instruments* **56**, 1–13 (1985).
- [13] M. Howells, J. Kirz, D. Sayer, and G. Schmahl, “Soft x-ray microscopes,” *Physics Today* **38**, 22–32 (1985).
- [14] B. Niemann, D. Rudolph, and G. Schmahl, “X-ray microscopy with synchrotron radiation,” *Appl. Opt.* **15**, 1883–1884 (1976).
- [15] J. M. Kennedy, C. Jacobsen, J. Kirz, H. Rarback, F. Cinotti, W. Thomlinson, R. Rosser, and G. Schidlovsky, “Absorption microanalysis with a scanning soft x-ray microscope: mapping the distribution of calcium in bone,” *Journal of Microscopy* **138**, 321–328 (1985).
- [16] 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. Express* **17**, 17669–17677 (2009).
- [17] J. L. Carrascosa, F. J. Chichon, E. Pereiro, M. J. Rodriguez, J. J. Fernandez, M. Esteban, S. Heim, P. Guttmann, and G. Schneider, “Cryo-x-ray tomography of vaccinia virus membranes and inner compartments,” *Journal of Structural Biology* **168**, 234 – 239 (2009).
- [18] 青木貞雄, “軟 X 線光学素子,” 光学 **13**, 18–24 (1984).
- [19] A. Franks and B. Gale, “Grazing incidence optics for x-ray microscopy,” in “X-

- Ray Microscopy,” , vol. 43 of *Springer Series in Optical Sciences*, G. Schmahl and D. Rudolph, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1984), pp. 129–138.
- [20] S. Aoki, M. Shiozawa, K. Kamigaki, H. Hashimoto, M. Kokaji, Y. Setsuhara, H. Azechi, M. Yamanaka, T. Yamanaka, Y. Izawa, and C. Yamanaka, “Imaging characteristics of a replicated Wolter type. I. X-ray mirror designed for laser plasma diagnostics,” *Japanese Journal of Applied Physics* **26**, 952–954 (1987).
- [21] S. Ohsuka, A. Ohba, M. Sugiyama, T. Hayakawa, T. Matsumura, K. Kinoshita, N. Watanabe, Y. Shimanuki, Y. Sano, and H. Kihara, “X-ray microscope with grazing incidence mirrors and a high resolution x-ray imaging apparatus,” in “X-Ray Microscopy III,” , vol. 67 of *Springer Series in Optical Sciences*, A. G. Michette, G. R. Morrison, and C. J. Buckley, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1992), pp. 164–166.
- [22] M. Hasegawa, H. Taira, T. Harada, S. Aoki, and K. Ninomiya, “Fabrication of Wolter-type x-ray focusing mirror using epoxy resin,” *Review of Scientific Instruments* **65**, 2568–2573 (1994).
- [23] A. Ohba, T. Nakano, S. Onoda, and M. Sugiyama, “X-ray microscope with a gas-puff plasma x-ray source and grazing incidence mirrors,” in “Proceedings of the 8th International Conference on X-ray Microscopy,” (Institute of Pure and Applied Physics, 2006), pp. 50–52.
- [24] K. Murakami, T. Oshino, H. Nakamura, M. Ohtani, and H. Nagata, “Schwarzschild microscope for carbon  $K\alpha$  radiation,” *Applied Optics* **32**, 7057–7061 (1993).
- [25] M. Bertilson, O. von Hofsten, U. Vogt, A. Holmberg, A. E. Christakou, and H. M. Hertz, “Laboratory soft-x-ray microscope for cryotomography of biological specimens,” *Opt. Lett.* **36**, 2728–2730 (2011).
- [26] 線減衰係数の計算には、NIST X-Ray Form Factor, Attenuation and Scattering tables (<http://www.nist.gov/pml/data/ffast/index.cfm>) を利用した。
- [27] J.-F. Adam, J.-P. Moy, and J. Susini, “Table-top water window transmission x-ray microscopy: Review of the key issues, and conceptual design of an instrument for biology,” *Review of Scientific Instruments* **76**, 091301 (2005).
- [28] W. Neff, J. Eberle, R. Holz, F. Richter, and R. Lebert, “A plasma focus as radiation source for a laboratory x-ray microscope,” in “X-Ray Microscopy II,” , vol. 56 of *Springer Series in Optical Sciences*, D. Sayre, J. Kirz, M. Howells, and H. Rarback, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1988), pp. 22–29.
- [29] G. Schmahl, B. Niemann, D. Rudolph, M. Diehl, J. Thieme, W. Neff, R. Holz, R. Lebert, F. Richter, and G. Herziger, “A laboratory x-ray microscope with a plasma

- x-ray source,” in “X-Ray Microscopy III,” , vol. 67 of *Springer Series in Optical Sciences*, A. G. Michette, G. R. Morrison, and C. J. Buckley, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1992), pp. 66–69.
- [30] H. Hertz, O. von Hofsten, M. Bertilson, U. Vogt, A. Holmberg, J. Reinspach, D. Martz, M. Selin, A. Christakou, J. Jerlstrom-Hultqvist, and S. Svard, “Laboratory cryo soft x-ray microscopy,” *Journal of Structural Biology* **177**, 267 – 272 (2012).
- [31] XRM2014 conference web site (<http://xrm2014.synchrotron.org.au/>).
- [32] 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**, 034801 (2007).
- [33] M. Dierolf, A. Menzel, P. Thibault, P. Schneider, C. M. Kewish, R. Wepf, O. Bunk, and F. Pfeiffer, “Ptychographic X-ray computed tomography at the nanoscale,” *Nature* **467**, 436–439 (2010).
- [34] Y. Takahashi, A. Suzuki, S. Furutaku, K. Yamauchi, Y. Kohmura, and T. Ishikawa, “High-resolution and high-sensitivity phase-contrast imaging by focused hard x-ray ptychography with a spatial filter,” *Applied Physics Letters* **102**, 094102 (2013).
- [35] Carl Zeiss Microscopy GmbH, “Product Info: ZEISS Xradia 810 Ultra,” (2014). [http://www.zeiss.com/microscopy/en\\_de/products/x-ray-microscopy/xradia-810-ultra.html](http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/x-ray-microscopy/xradia-810-ultra.html).
- [36] キヤノンマーケティングジャパン株式会社, “ニュースリリース:産業用 X 線 CT の国内独占販売権を取得,” <http://cweb.canon.jp/newsrelease/2010-09/pr-xct200.html>.
- [37] Bruker Advanced Supercon GmbH, “Product Sheet: LTXM Stand-alone X-ray Microscope,” <http://www.bruker-est.com/ltxm.html>.
- [38] “キャノン MJ、米社製の産業用 X 線 CT “MicroXCT/UltraXRM シリーズ” を販売開始,” 日経速報ニュースアーカイブ, 2010 年 9 月 14 日付.
- [39] C. Hagen, P. Guttman, B. Klupp, S. Werner, S. Rehbein, T. C. Mettenleiter, G. Schneider, and K. Grunewald, “Correlative vis-fluorescence and soft x-ray cryo-microscopy/tomography of adherent cells,” *Journal of Structural Biology* **177**, 193 – 201 (2012).
- [40] E. Duke, K. Dent, M. Razi, and L. M. Collinson, “Biological applications of cryo-soft x-ray tomography,” *Journal of Microscopy* **255**, 65–70 (2014).



## 第 3 章

# 軟 X 線 3 D 顕微鏡の開発

### 3.1 はじめに

本研究の第 1 の目的は、軽元素試料の高分解能三次元構造観察を可能とする実験室規模の軟 X 線 3 D 顕微鏡を開発することであり、本章において、筆者のグループが現在開発している軟 X 線 3 D 顕微鏡とその利用に関して、技術的側面から論述する。先ず、第 3.2 節において、筆者のグループにおける X 線顕微鏡開発と軟 X 線 3 D 顕微鏡開発に至るまでの経緯を概説し、合わせて新規観察技術の開発に関する教訓的な知見についても言及する。次いで第 3.3 節において、筆者のグループのコア・コンピタンスである X 線光学と斜入射 X 線反射鏡（回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡）について説明を加える。そして、これらを背景として第 3.4 節以降において、軟 X 線 3 D 顕微鏡の構成、現在までの開発成果とそれらについての考察、および、今後の展望について論述する。

### 3.2 開発に至る経緯

筆者が所属する部署（およびその前身となる部署）においては、1980 年代半ばに、X 線顕微鏡の開発が着手された。その背景には、当時、電子管製品を製造・開発する事業部において、光電面から放出された電子の軌道を、電場と磁場によって制御して高倍率の拡大像を得る電子ズーム管が開発されたことがあった。この技術を X 線のイメージングに利用し、更に、X 線の利用効率の高い斜入射 X 線反射鏡の一つであるウォルター I 型鏡を用いた光学系を筆者の所属部署で開発して組み合わせることにより、実験室規模の X 線顕微鏡が構築できる、との目論見であった。ウォルター I 型鏡の作製方法としては後述するガラスレプリカ法を採用し、光学系の倍率については、X 線用の電子ズーム管の分解能が  $1 \mu\text{m}$  以下であること [1] を期待して、比較的低倍率の 20 倍で設計をした。国内における X 線顕微鏡研究の草分け的な研究者の一人の協力を得て、X 線顕微鏡としての実験には放射光施設（現在の大学共同利用機関

法人 自然科学研究機構 分子科学研究所 極端紫外光研究施設) を利用した。波長 1.3 nm (エネルギーとしては 950 eV) 近辺の X 線に対して 0.5  $\mu\text{m}$  程度の分解能が得られたことから、1990 年に開催された第 3 回 X 線顕微鏡国際会議において発表を行った [2]。

1990 年代には、実験室規模の軟 X 線源として、ガス放電型のプラズマ X 線源の開発にも着手した。数 100 eV の軟 X 線に対しても高い検出効率を有する裏面照射型の CCD 素子と、拡大率 300 倍のウォルター I 型鏡を組み合わせることで、実験室規模の軟 X 線顕微鏡を構築した。光学系の分解能としては、Ar プラズマからの 2.7–5.7 nm の波長範囲の X 線により、300 nm ライン&スペース (L&S) のパターンを解像できる分解能を達成している [3]。ただし、この分解能では光学顕微鏡の分解能と同程度であることから、生物学分野への応用を図るには、光学顕微鏡ではなく分解能 300 nm L&S の X 線顕微鏡で試料を観察することの意義・メリットを実際の生物学的試料で示す必要があった。近隣の大学の研究者からの試料提供はあったが、結局、生物学分野への応用展開は実現できず、X 線顕微鏡の開発は材料分野への応用を指向した蛍光 X 線による顕微観察技術の開発へと軸足を移していった。

拡大率 300 倍のウォルター I 型鏡を用いた光学系を、一般的な実験室に収まる数 m の大きさに設計すると、必然的に内径は数 mm 程度になってしまう。このような小口径のウォルター I 型鏡を作製するノウハウを獲得したことにより、10 keV 程度までの比較的高エネルギーな X 線用のウォルター I 型鏡の作製も可能となった。これにより、筆者のグループにおけるウォルター I 型鏡の応用範囲は、蛍光 X 線分析にまで広がった。試料に励起 X 線を照射し、試料中のニッケルや銅、鉛、金等の金属元素が発する蛍光 X 線をウォルター I 型鏡により CCD 素子上に結像させる。CCD 素子をフォトンカウンティングモードで動作させてエネルギー分解計測を行い、元素に固有の蛍光 X 線のエネルギーに基づいた元素分布の画像化が可能となる。元素分布画像の空間分解能としては、数  $\mu\text{m}$  程度が得られている [4]。

2011 年に筆者は、現在共同研究を行っている研究者との知遇を得て、当時の X 線顕微鏡関連研究のトレンドについて認識を新たにする機会を得た。第 2 章でも言及したが、近年の X 線顕微鏡開発の主流は放射光施設にあり、そこでは、水の窓 X 線を使った含水凍結試料の三次元構造観察が、100 nm 以下の分解能で可能となっていた [5]。また、放射光施設以外でも、水の窓 X 線による高分解能トモグラフィーを可能とする実験室規模の軟 X 線顕微鏡の開発が、レーザー誘起プラズマを水の窓 X 線源として進められていた [6]。ウォルター I 型鏡は X 線の利用効率が高く、また、X 線源に単色性を要求しない。ウォルター I 型鏡の X 線利用効率の高さに着目すると、コンパクトな構造で取り扱いが容易でありながら、X 線強度が不足しているとされて、これまで軟 X 線顕微鏡用の X 線源の主流になれなかった電子衝撃型の軟 X 線源の利用も、現実的な選択肢となり得る。特に、金属酸化物をターゲット物質に用いることで発生できる酸素  $K\alpha$  X 線は、水の窓 X 線のエネルギー範囲の上限に位置し、含水試料を透過し易いため、生物試料の観察には好適である。この認識を筆者と前述の研究者とが共通して持つに至り、水の窓 X 線 3 D 顕微鏡の開発を目指す共同研究を 2012 年 4 月より開始して現在も継続し

ている。そして、2014 年末時点において、水の窓域の酸素  $K\alpha$  X線に対する光学系の分解能が 1.0 ラインペア (lp) / $\mu\text{m}$  以上であること、また、三次元再構成により 1  $\mu\text{m}$  スケールの三次元構造を識別できることを確認し、更に、乾燥状態ではあるが生物試料の三次元構造観察への適用までを達成している [7] [8]。

以上の経緯を振り返る中で得られた教訓的な知見として、新規観察技術の開発（筆者にとっては X線顕微鏡・軟 X線 3 D 顕微鏡の開発）における試料提供者との協働の重要性が挙げられる。筆者のグループが開発している軟 X線 3 D 顕微鏡の開発コンセプトは、X線顕微鏡としての性能リストの先頭に来る分解能については、放射光施設の装置に劣るものの、光学顕微鏡と同等以上の分解能を達成した上で、実験室規模の使い勝手の良い装置として生命科学分野や材料科学分野の研究者に役立つ装置を提供することにある。解像度チャートにより優劣を容易に示すことができる分解能とは異なり、研究者にとって軟 X線 3 D 顕微鏡が有用なツールであることを訴えるには、研究者が実際に研究に用いる様々な試料を観察した画像を提示する必要がある。幸いなことに筆者のグループは生物医学分野においてアクティビティの高い研究グループとの共同研究を行い、研究者が X線顕微鏡で見てみたいと思う組織切片や培養細胞の試料提供を受けている。また、X線の特性を活かすための試料調整（コントラスト増強）法についても知見の提供が得られつつある。現在取り組んでいる水の窓 X線 3 D 顕微鏡の開発と並行して、生物医学分野への有用性をアピールする観察事例を蓄積していく計画である。1990 年代に筆者の所属部署で開発した X線顕微鏡は、分解能については、軟 X線 3 D 顕微鏡と比べても遜色ない。しかし、X線で観察する意義を実試料をもって示すことができず、生物学分野への応用展開が図れなかった。この教訓は、次のように新規観察技術の開発についてモデル化できる（図 3.1 参照）。すなわち、新規の観察技術を開発するに当たっては、その技術が適用される研究分野（想定される市場）の研究者が扱う実際の試料を観察することで、ユーザーである研究者にとってその観察技術が有用であることを示し、また、装置の開発・改良に有用な知見を得ることが必要である。そのためには、ユーザーの少なくとも一人（図 3.1 中の研究者 A）と協力関係を構築し、試料提供を介した協働を行うことが重要である。まず、研究者 A が関心を持つ試料の提供を受ける（①）。そして、開発グループは提供された試料の観察を行い、結果を研究者 A に戻す（②）。研究者 A は、観察結果の評価を開発グループに伝え（③）、開発グループでは評価結果に基づいて観察技術の開発・改良を進め、また、試料観察に関する知見を獲得する。①・②・③の過程を繰り返すことで、開発グループは新規観察技術の完成度を高めるとともに観察事例の蓄積を行い、市場である研究分野に新規計測技術の価値を発信することができる。更に、このような協働は、開発グループにとって有益であるだけでなく、試料提供者である研究者 A にとっても有益であり、他の研究者に先駆けて新規観察技術を活用した研究成果を発信できる。

本節の最後に、筆者のグループにおける軟 X線 3 D 顕微鏡の開発体制についても言及しておく。筆者の他に 4 人の研究者が軟 X線 3 D 顕微鏡の開発の携わり、それぞれ、斜入射 X線反

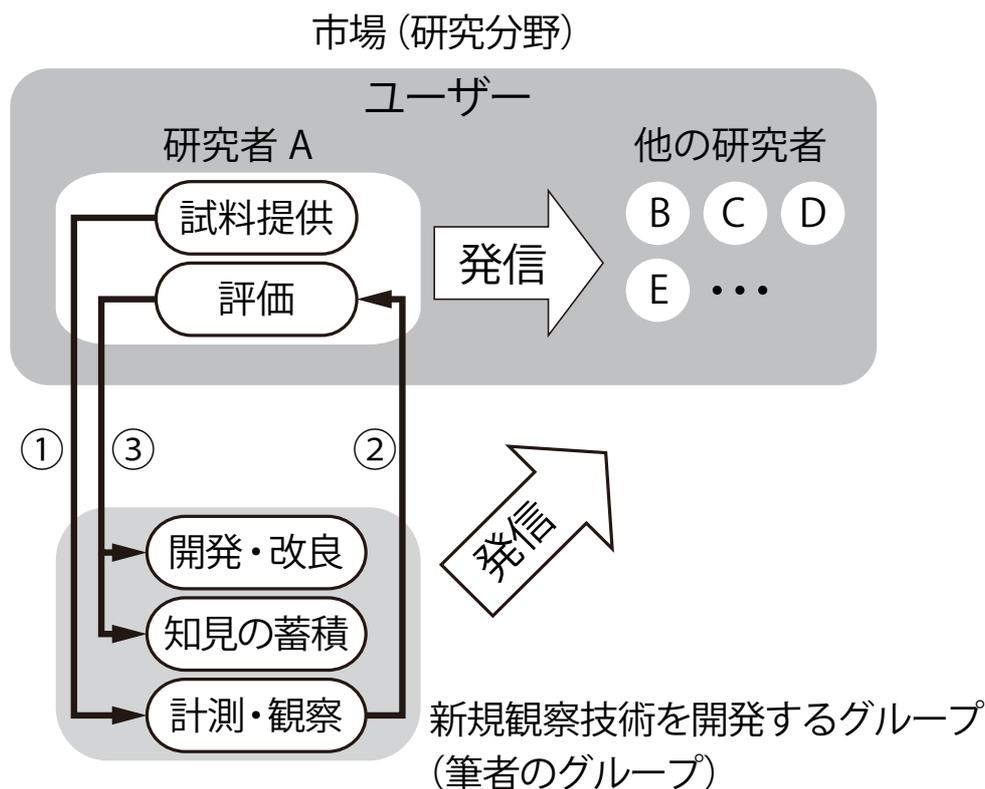


図 3.1 新規観察技術の開発における試料提供者との協働のモデル

射鏡（回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡）の開発、軟 X 線 3 D 顕微鏡の構築・評価、三次元再構成に必要なアルゴリズムの開発、および、軟 X 線源の評価に取り組んでいる。筆者の役割は、研究・開発全体の統括であり、軟 X 線 3 D 顕微鏡の基本概念の提示と開発目標の設定により研究・開発を立ち上げた。また、各研究者への助言者として開発を推進し、社内外への情報発信の調整、更には共同研究先との折衝担当でもある。隔週のグループミーティングや担当者間の随時の対話によって、各開発項目について得られた知見や明らかとなった課題、そして課題を解決するためのアイデア等の開発に関する各種情報はグループ内で共有されている。従って、次節以降で説明すウォルター I 型鏡とそれを用いた軟 X 線 3 D 顕微鏡は、グループ全体の開発成果である。

### 3.3 斜入射 X 線反射鏡（回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡）

#### 3.3.1 X 線の反射

X 線領域における物質の屈折率  $n$  は、1 よりもわずかに小さく次式で与えられる。

$$n = 1 - \frac{N_A r_e}{2\pi} \lambda^2 \sum_j \frac{\rho_j}{A_j} f_j \quad (3.1)$$

ここで、 $N_A$  はアボガドロ数、 $r_e$  は電子の古典半径： $2.818 \times 10^{-13}$  cm、 $\lambda$  はX線の波長 (cm) であり、 $\rho_j$ 、 $A$ 、 $f_j$  はそれぞれ、物質を構成する  $j$  番目の元素の密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )、質量数、および原子散乱因子である。原子散乱因子が複素数であることから、屈折率も複素数となり、次式のように表わされる。

$$n = 1 - \delta - i\beta \quad (3.2)$$

ここで、

$$\delta = \frac{N_A r_e}{2\pi} \lambda^2 \sum_j \frac{\rho_j}{A_j} (Z_j + f'_j) \quad (3.3)$$

$$\beta = \frac{\mu \lambda}{4\pi} \quad (3.4)$$

である。なお  $Z_j$  は物質を構成する  $j$  番目の元素の原子番号であり、 $Z_j + f'_j$  は原子散乱因子の実部である。また、 $\mu$  は物質のX線に対する線吸収係数である。物質の屈折率が1よりも小さいと言うことは、水中から水面（水・空気界面）に向かって発した光線と同じように、真空中から物質に入射するX線も入射角がある角度以上になると全反射を起こす。スネルの法則によれば、屈折率  $n_1$  の媒質1から屈折率  $n_2$  の媒質2に光線が入射する場合に、入射角  $\varphi_1$  と屈折角  $\varphi_2$  の関係は次式で与えられる（図3.2参照）。

$$n_1 \sin \varphi_1 = n_2 \sin \varphi_2 \quad (3.5)$$

媒質1を真空 ( $n_1 = 1$ ) とし、 $\varphi_1$  が全反射臨界角  $\varphi_c$  に等しい場合には  $\varphi_2 = \pi/2$  となるので、 $n_2$  と全反射臨界角との関係は、

$$n_2 = \sin \varphi_c = \sin \left( \frac{\pi}{2} - \theta_c \right) = \cos \theta_c = \sqrt{1 - \sin^2 \theta_c} \simeq 1 - \frac{1}{2} \theta_c^2 \quad (3.6)$$

となる。なお、 $\theta_c$  は界面から測った全反射臨界角であり、 $\theta_c \ll 1$  である。X線の吸収が無視できる ( $\beta_2 = 0$ ) とすれば、 $n_2 = 1 - \delta_2$  であるから  $\theta_c^2 = 2\delta_2$  となる。また、物質によるX線の吸収スペクトルに見られる吸収端から離れた高エネルギー側では原子散乱因子の実部は原子番号  $Z_i$  に等しいと置くことができるため、 $\theta_c$  は次式のように反射面を構成する物質の密度  $\rho$  とX線の波長  $\lambda$  の関数として与えられる。ただし、簡単のために  $Z_j/A_j = 0.5$  とし、また、 $\lambda$  の単位は cm である。

$$\theta_c = 1.643 \times 10^5 \lambda \sqrt{\rho} \quad (3.7)$$

一例として、シリコン ( $\rho = 2.34 \text{ g}/\text{cm}^3$ ) について計算すると、エネルギー 4000 eV のX線 ( $\lambda = 0.31 \times 10^{-7} \text{ cm}$ ) に対しては、 $\theta_c = 7.8 \text{ mrad}$  となる。

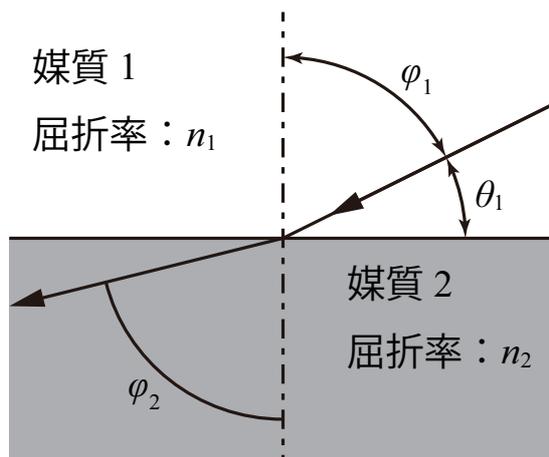


図 3.2 2 媒質の界面における光線の屈折 ( $n_1 > n_2$  の場合)。  $\varphi = \pi/2$  となる入射角以上で全反射が起こる

実際の X 線の反射については、物質表面での X 線の吸収も考慮する必要があり、斜入射角が小さい条件 ( $\sin \theta \approx \theta$ ) 下では、X 線の反射率は次式で表わされる [9]。

$$R = \frac{(\theta_1 - p_2)^2 + q_2^2}{(\theta_1 + p_2)^2 + q_2^2} \quad (3.8)$$

ここで、

$$2p_2^2 = [(\theta_1^2 - 2\delta_2)^2 + 4\beta_2^2]^{1/2} + (\theta_1^2 - 2\delta_2) \quad (3.9)$$

$$2q_2^2 = [(\theta_1^2 - 2\delta_2)^2 + 4\beta_2^2]^{1/2} - (\theta_1^2 - 2\delta_2) \quad (3.10)$$

である。式 (3.8) からは完全に平滑な鏡面の反射率が得られるが、現実の鏡面の反射率を計算するには、表面粗さを考慮した補正が必要となる。表面粗さ (rms) が  $\sigma$  である鏡面の反射率は、式 (3.8) により与えられる平滑な鏡面の反射率を  $R_0$  として、

$$R = R_0 \exp \left\{ -4 \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^2 \theta_1 p_2 \sigma^2 \right\} \quad (3.11)$$

と表わされ [10]、現実の鏡面の反射率は、表面粗さの 2 乗の増大に伴って指数関数的に平滑鏡面の反射率から減少する。従って、X 線反射光学素子の作製には、光学素子としての曲面を高精度に形成する技術に加えて、超平滑な面を形成する技術も必須である。

式 (3.8) と式 (3.11) の計算に必要な原子散乱因子や線吸収係数は、Henke ら [11] によって原子番号が 1 (水素) から 92 (ウラン) までのほぼ全ての元素について 50 - 30000 eV の範囲で纏められているが、Lawrence Berkeley National Laboratory の Center for X-Ray Optics の web サイト [12] を使うと、各種の物質表面での X 線反射率を、表面粗さも考慮して求めることができる。図 3.3(a) は、平滑なシリコン鏡面の 2000 eV、4000 eV、および 8000

eV のX線に対する反射率を、斜入射角（入射角の余角、鏡面から測った角度）の関数としてプロットしたグラフである。シリコン鏡面の表面粗さは 0 nm (rms) とした。4000 eV のX線に対する反射率は 7.8 mrad において 50% となっていて、式 (3.7) による全反射臨界角の計算結果と一致している。図 3.3(b) と (c) は、石英ガラス ( $\text{SiO}_2$ ) と金の表面のX線反射率を、異なる斜入射角についてX線エネルギーの関数としてプロットしたグラフである。どちらも表面粗さは 2 nm (rms) とした。X線のエネルギー（波長）と斜入射角に依存してX線反射率は大きく変化するため、回転楕円鏡やウォルター I 型鏡のような斜入射X線反射鏡を設計するに当たっては、使用するX線のエネルギーと鏡面を形成する物質を考慮して適切な斜入射角を設定する必要がある。具体例を挙げると、水の窓域 (284 - 534 eV) 用の光学系であれば、図 3.3(b) から見てとれるように、斜入射角を 40 mrad 以下で設計することで、2 nm (rms) の表面粗さに研磨したガラス面をそのまま鏡面として使用しても、1 回反射で 70% 以上、2 回反射でも 50% 以上の反射率が得られることになる。また、水の窓域よりも高エネルギーの 1.5 - 2 keV の範囲のX線に対しては、例えば、ガラス鏡面に金を蒸着することにより反射面として金を使用することで、20 mrad の斜入射角で光学系を設計しても 1 回反射で 70% 前後の反射率が得られる（図 3.3(c) 参照）。

### 3.3.2 回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡の光学

回転楕円鏡は、楕円を長軸の周りに回転させることで形成される回転楕円面を鏡面とする斜入射X線反射鏡である（図 3.4 参照）。焦点の一つ  $F_1$  から発したX線は、回転楕円面で反射してもう一つの焦点  $F_2$  に収束する。従って、 $F_1$  にX線源を置いて  $F_2$  に試料を置けば、X線源から発したX線を試料上に集光・照射することができ、光学顕微鏡におけるコンデンサーレンズの役割を持たせることができる。ただし、回転楕円鏡では 1 回の反射となるために収差を除くことが困難であり、結像用途には適さない。図 3.4 の写真の回転楕円鏡は、筆者のグループが 1 - 2 keV 程度のX線の集光用に設計・作製したものである。次節で説明するガラスレプリカ法によりガラス円筒の内面に回転楕円面を形成し、1 - 2 keV 程度のX線に対しても高い反射率が得られるように反射面に金を蒸着してある。

ウォルター鏡は、元々はX線望遠鏡の光学系として Wolter によって発明された。回転放物面もしくは回転楕円面と回転双曲面とを組み合わせた斜入射反射光学系であり [13]、構成の違いにより I 型から III 型までがある。望遠鏡用のウォルター I 型鏡は一つの焦点と回転軸を共通とする回転放物面と回転双曲面の組み合わせとなる。回転放物面と回転双曲面で各 1 回反射させることで、コマ収差を取り除くことができ、大きな視野が得られる。望遠鏡は、無限遠方からのX線を集光するため回転放物面と回転双曲面の組み合わせになるが、顕微鏡用としては、試料から有限遠距離に結像させるため、回転楕円面と回転双曲面との組み合わせとなる（図 3.5 参照）。回転双曲面の焦点  $F_2$  から発したX線は回転双曲面で反射し、あたかも、回転

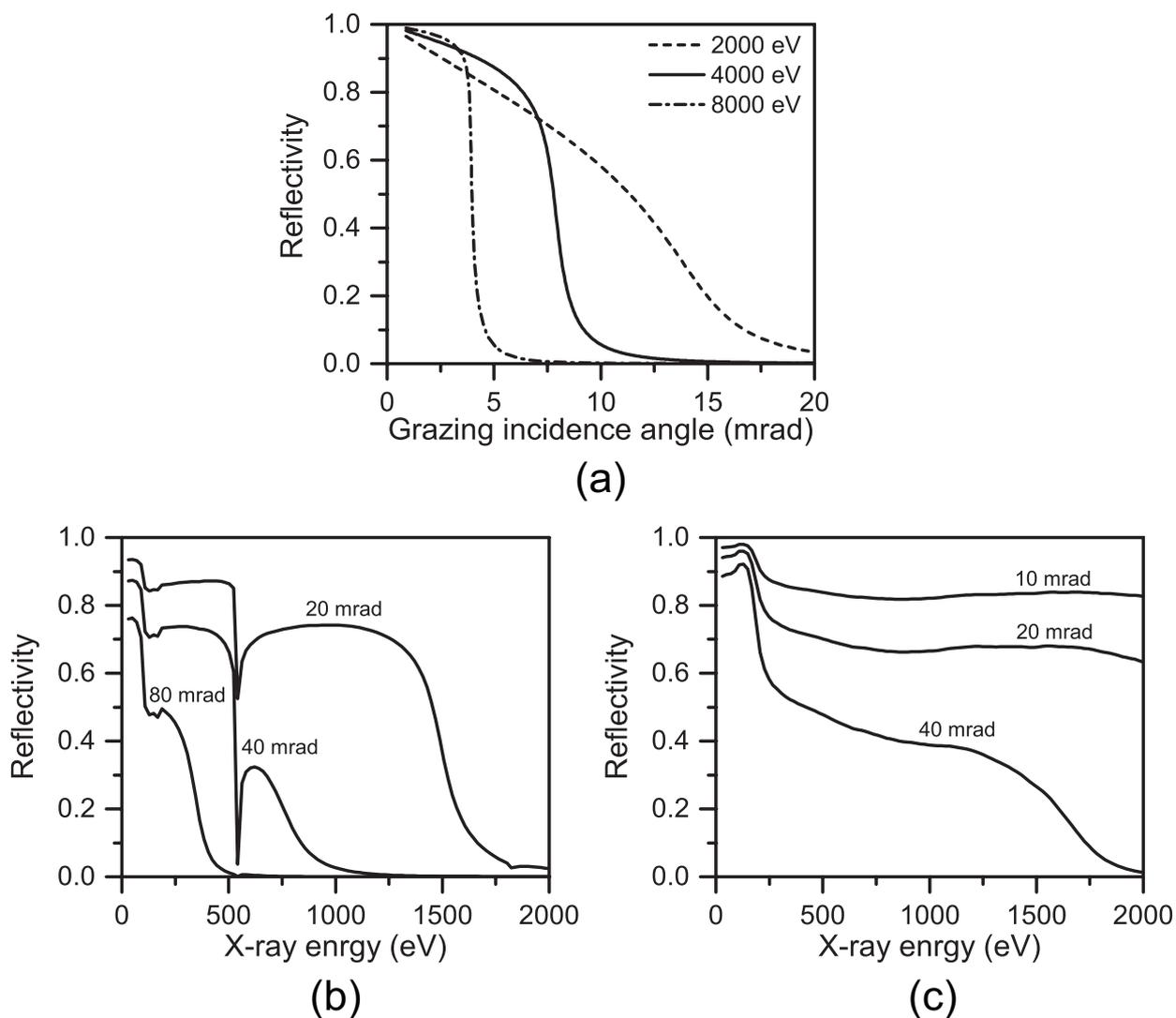


図 3.3 斜入射 X 線の反射率 [12]。(a) 平滑なシリコン鏡面（表面粗さ：0 nm (rms)）の 2000 eV、4000 eV、および 8000 eV の X 線に対する反射率を、斜入射角の関数としてプロットした。(b) 表面粗さが 2 nm (rms) である石英ガラス表面の X 線反射率、および (c) 表面粗さが 2 nm (rms) である金表面の X 線反射率を、幾つかの斜入射角について X 線エネルギーの関数として示した

双曲面と回転楕円面に共通の焦点  $F_1$  から発したかのように回転楕円面に向かう。そのため、回転楕円面で反射した X 線は回転楕円面のもう一つの焦点  $F_3$  に収束する。 $F_2$  を含み光軸に垂直な面（試料面）内の光軸から離れた点から発した X 線についても、収差を受けることなく、 $F_3$  を含んで光軸に垂直な結像面上の対応点に収束する。焦点  $F_2$  に試料を置いて X 線をウォルター I 型鏡に向かって透過させれば、焦点  $F_3$  に試料の透過 X 線像が拡大・結像される。反対に焦点  $F_3$  に X 線源を置いた場合は、X 線源の縮小された像が焦点  $F_2$  に置いた試料上に形成され、X 線源からの X 線により試料を照射することができる。従って、ウォルター I 型鏡

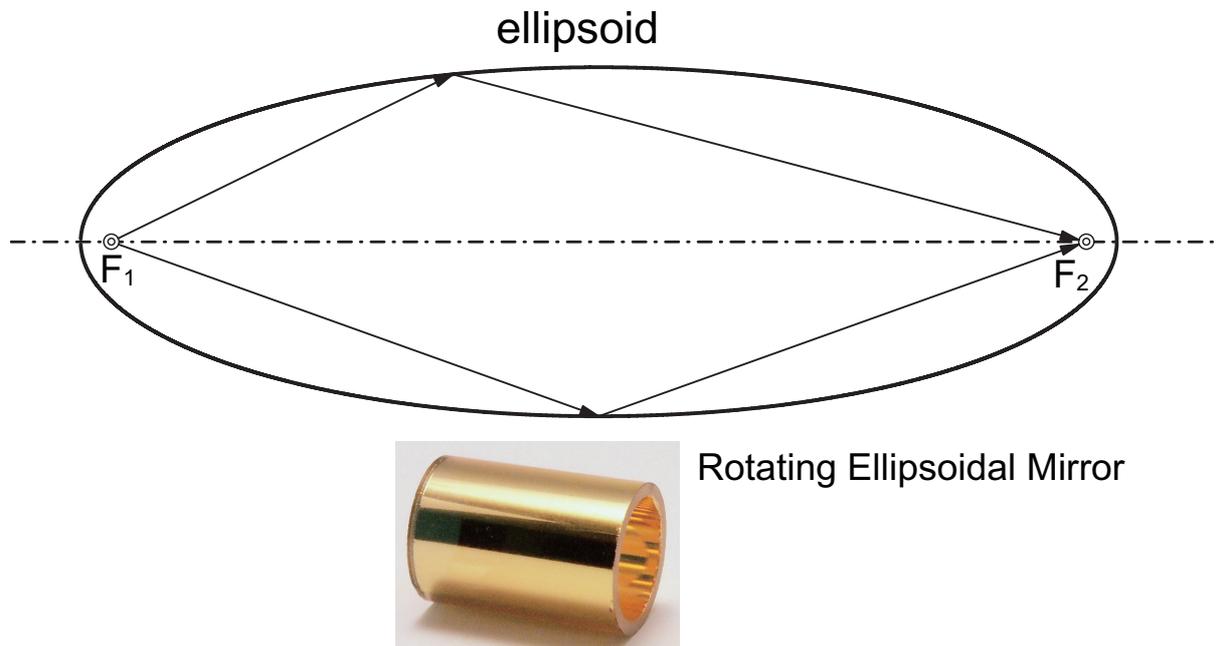


図 3.4 回転楕円鏡による集光。焦点  $F_1$  から発したX線は、回転楕円面で反射して焦点  $F_2$  に収束する。写真の回転楕円鏡は、1 – 2 keV 程度のX線に対しても使用可能なように反射面に金を蒸着してある

は、X線顕微鏡の光学系において、集光・結像のどちらにも使用可能である。図 3.5 の写真のウォルター I 型鏡は、10 keV 以下のエネルギーの蛍光X線のイメージング用に筆者のグループが設計・作製したものである。数 keV のX線に対しても高い反射率が得られるように反射面には金を蒸着し、斜入射角は 10 keV のX線に対する金の全反射臨界角である 8 mrad 以下で設計されている。

ウォルター I 型鏡の設計においては、図 3.6 に示す斜入射角  $\theta$ 、拡大率  $M$ 、焦点  $F_2$  から回転双曲面と回転楕円面の接続位置までの光軸上の距離  $d$ 、および回転双曲面の長さ  $L_H$  を入力パラメータとして与えて、回転双曲面と回転楕円面の形状を決定するそれぞれの長半径 ( $A_H$ 、 $A_E$ ) と離心率 ( $\epsilon_H$ 、 $\epsilon_E$ ) を求める。回転双曲面と回転楕円面の接続位置から焦点  $F_3$  までの光軸上の距離  $D$  は  $D = Md$  となるため、 $d$  を固定して拡大率を大きくすると光学系の全長も大きくなる。また、斜入射角を一定として  $d$  を小さくすると、ウォルター I 型鏡の内径も小さくなるため、高精度な鏡面の作製が難しくなる。このように各入力パラメータは相互に、また鏡面作製の難易度とも関連するため、ウォルター I 型鏡の設計に際しては、光学系の全体的な性能を勘案して各入力パラメータを決定する必要がある。

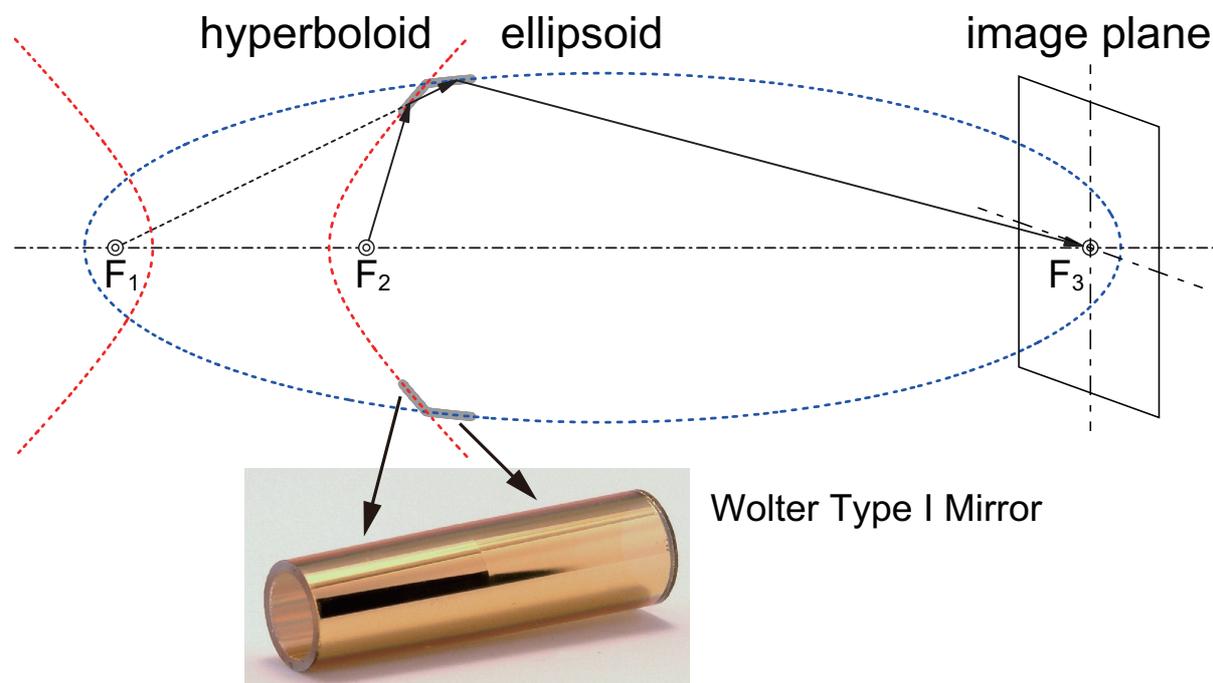


図 3.5 ウォルター I 型鏡による結像のしくみ。焦点  $F_2$  から発した X 線は回転双曲面で反射する。反射 X 線の進行方向を逆向きに延長すると回転双曲面と回転楕円面に共通の焦点  $F_1$  がある。回転楕円面で 2 回目の反射をした X 線は、回転楕円面のもう 1 つの焦点  $F_3$  に収束する。写真のウォルター I 型鏡は、10 keV 以下のエネルギーの蛍光 X 線のイメージング用であり、数 keV の X 線に対しても高い反射率が得られるように反射面には金を蒸着してある

### 3.3.3 回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡の作製

筆者のグループでは、回転楕円鏡やウォルター I 型鏡の作製にはガラスレプリカ法を用いている。ガラスレプリカ法は、鏡面形状が形成された金属母材からガラス面に鏡面形状を転写して鏡面を作製するため、ガラス材料やガラス加工に関する知識や経験が必要となる。筆者の所属企業には電子管製品の開発・製造を通してガラス加工に関するノウハウが蓄積されていることから、筆者の所属部署において X 線顕微鏡開発に着手した際にガラスレプリカ法を回転楕円鏡とウォルター I 型鏡の作製方法として選択した。回転楕円鏡・ウォルター I 型鏡の作製工程は、概略以下のような流れとなる。

1. 光学系の仕様（X 線エネルギー、鏡面材質、斜入射角、拡大率、作動距離等）を考慮して、鏡面形状の設計を行う。
2. 円筒状金型母材に高精度な切削加工を施して、鏡面（回転楕円面・回転双曲面）の形

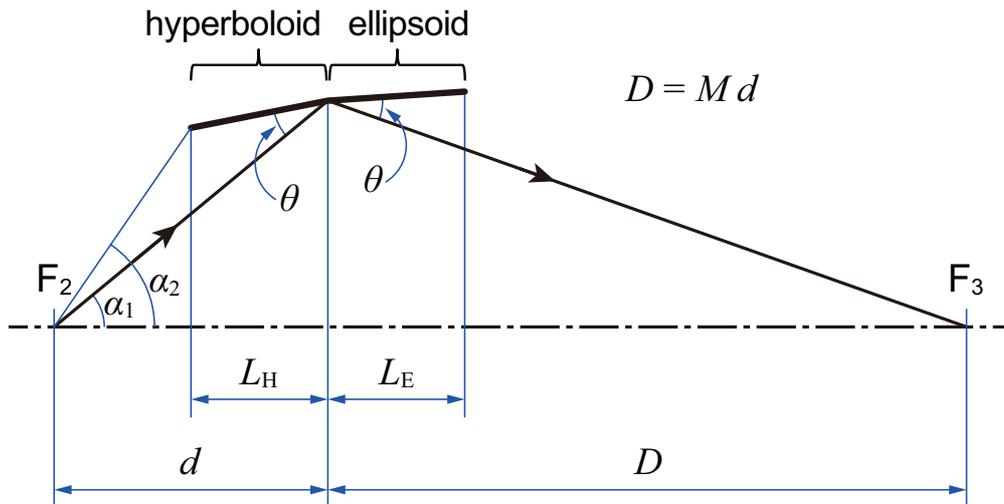


図 3.6 ウォルター I 型鏡設計のためのパラメータ。 $\theta$  : 斜入射角、 $M$  : 拡大率、 $d$  : 焦点  $F_2$  から回転双曲面と回転楕円面の接続位置までの光軸上の距離、 $D$  : 回転双曲面と回転楕円面の接続位置から焦点  $F_3$  までの光軸上の距離、 $L_H$  : 回転双曲面の長さ、 $L_E$  : 回転楕円面の長さ、 $\alpha_1$  : 焦点  $F_2$  が回転双曲面を見込む最小の角度、 $\alpha_2$  : 焦点  $F_2$  が回転双曲面を見込む最大の角度

状を形成する。

3. 金型の形状と表面粗さを、触針式の表面形状・表面粗さ測定器により評価する。
4. ガラス円筒中に金型を入れ、電気炉により加熱しながらガラス円筒を真空に排気する。軟化したガラスが大気圧により金型に押し付けられ、金型の形状がガラス円筒内面に転写されてレプリカとなる。
5. 冷却後、所定の長さにレプリカを切断し金型を取り出す。レプリカ内面を、コンピュータ制御された研磨機により、形状を崩すことなく鏡面に研磨する。
6. レプリカ鏡面の形状と表面粗さを触針式の表面形状・表面粗さ測定器により評価する。
7. 使用するX線のエネルギーによっては、レプリカ鏡面に金を蒸着する。
8. 光軸調整用のステージへ取り付けするためのホルダーにレプリカを固定する。

軟X線3D顕微鏡用に作製したウォルター I 型鏡の加工精度は、鏡面形状の設計形状からのずれである形状誤差として  $\pm 0.1 \mu\text{m}$  以下が得られている。また、表面粗さは  $2 \text{ nm (rms)}$  に達しているが、光学系の結像性能はウォルター I 型鏡の鏡面精度に大きく依存するため、継続的に製作工程の見直しと加工精度の向上に取り組んでいる。

### 3.4 軟X線3D顕微鏡の構成

結像型のX線顕微鏡の構成は、基本的には通常の光学顕微鏡と同じであり、光源（X線源）、集光・結像用の光学系、および、撮像デバイスから構成される。また、トモグラフィックな三

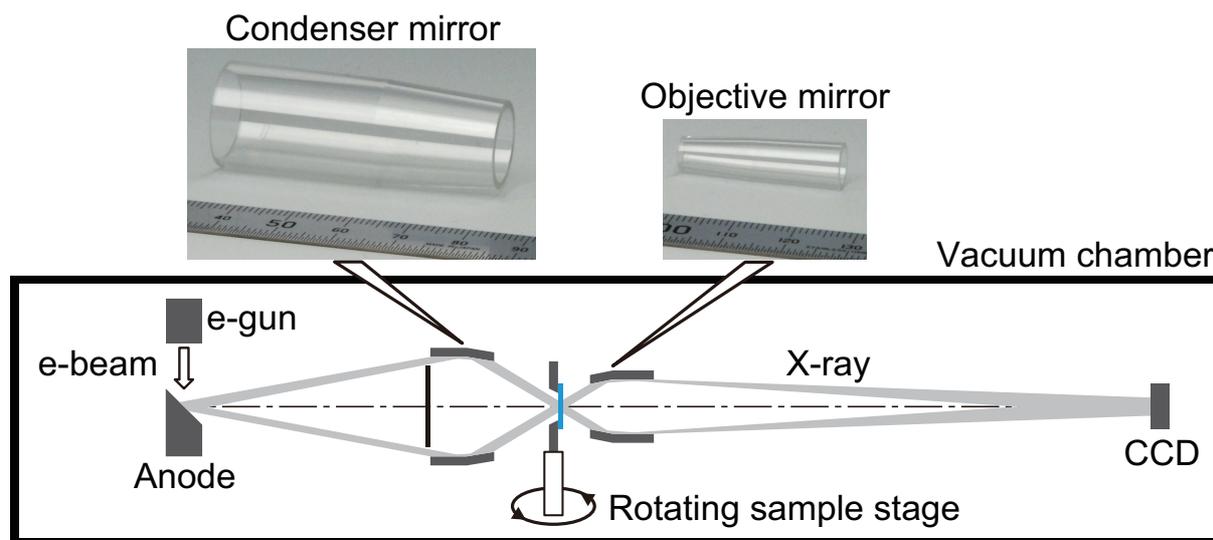


図 3.7 軟X線3D顕微鏡の構成概念図。電子衝撃型X線源、斜入射X線反射光学系、回転試料ステージ、および裏面照射型 CCD 素子から構成され、これらの構成要素は真空チャンバー中に配置される

次元再構成を行う場合には、試料を微小角度のステップで回転させる回転ステージが必要となる。筆者のグループが開発した実験室規模の軟X線3D顕微鏡の構成概念図と仕様を図3.7および表3.1に示す。

X線源は電子衝撃型X線源であり、アノード上に酸化クロム ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) のターゲットが形成されている。電子銃からの電子ビームは、15 kV の高電圧で加速されてターゲットに衝突し、水の窓域の酸素  $\text{K}\alpha$  X線 (525 eV) が放出される。ターゲットからのX線は、集光用のウォルター I 型鏡 (condenser mirror) により回転ステージに搭載された試料上に集光・照射される。試料を透過したX線は、結像用のウォルター I 型鏡 (objective mirror) に入射し、試料の透過X線像が100倍に拡大されてX線検出用の裏面照射型 CCD 素子上に拡大・結像される。CCD の画素サイズは  $13\ \mu\text{m}$ 、画素数は  $1024 \times 1024$  であり、試料面上の画素サイズは  $0.13\ \mu\text{m}$ 、視野の大きさは  $133\ \mu\text{m}$  である。標本化定理によれば、試料面上における画素ピッチの逆数の  $1/2$  で与えられるナイキスト (Nyquist) 周波数までは試料の構造に忠実に画像化される。結像用ウォルター I 型鏡の拡大率が100、CCD の画素ピッチが  $13\ \mu\text{m}$  であることから、試料面上のナイキスト周波数は  $3.85\ \text{lp}/\mu\text{m}$  となる。

空気による酸素  $\text{K}\alpha$  X線の減衰を避けるため、各構成要素は真空チャンバー中に配置されている。X線源の焦点から CCD 素子までの距離は  $3.4\ \text{m}$  に設計されていて、装置全長も  $4\ \text{m}$  程度であることから、一般的な実験室への設置が可能である。

表 3.2 に、軟X線3D顕微鏡の集光用ウォルター I 型鏡と結像用ウォルター I 型鏡の諸元を示す。これらのウォルター I 型鏡の設計に当たっては、X線の利用効率を可能な限り大きくす

表 3.1 軟X線3D顕微鏡の仕様

X線源	
ターゲット	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
加速電圧	15 kV
X線エネルギー	525 eV (酸素 K $\alpha$ )
光学系	
集光用素子	ウォルター I 型鏡
結像用素子	ウォルター I 型鏡
拡大率	100
全長 <sup>a</sup>	3.4 m
撮像デバイス	
タイプ	裏面照射型 CCD
画素サイズ	13 $\mu\text{m}$ $\times$ 13 $\mu\text{m}$
画素数	1024 $\times$ 1024
ナイキスト周波数 (試料面上)	3.85 lp/ $\mu\text{m}$

<sup>a</sup>X線源のターゲットから CCD 入射面までの距離。

ることに主眼を置いた。集光用ウォルター I 型鏡がX線源からのX線を取り込む立体角、すなわち、図 3.5 において焦点 F<sub>3</sub> が回転楕円面を見込む立体角は  $5.4 \times 10^{-4}$  (sr) である。また、集光用ウォルター I 型鏡の回転双曲面から出射して試料を透過した全てのX線が結像用ウォルター I 型鏡の回転双曲面に入射するためには、集光用ウォルター I 型鏡の図 3.6 における  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  の間の角度範囲が結像用ウォルター I 型鏡の  $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  の間の角度範囲に全て含まれている必要がある。表 3.2 によれば、前者の角度範囲は 94 – 105 mrad であり後者の角度範囲の 93 – 105 mrad にほぼ全範囲が含まれていて、集光用ウォルター I 型鏡から結像用ウォルター I 型鏡への高効率なX線の伝送が期待できる。実際に光線追跡シミュレーションの結果として、X線源の直径 300  $\mu\text{m}$  の範囲から放出されたX線に対して 92% の効率が確認されている。

ガラスレプリカ法により作製された集光用および結像用ウォルター I 型鏡の鏡面の形状誤差と表面粗さは、触針式の表面形状・表面粗さ測定機 (Form Talysurf Super S5K, Taylor Hobson Ltd., UK) を使って鏡面を計測し、形状誤差については、測定された鏡面形状と設計形状とを比較して評価した。集光用および結像用ウォルター I 型鏡のどちらについても、回転双曲面、回転楕円面共に形状誤差は  $\pm 0.1 \mu\text{m}$  以下、表面粗さは 2 nm (rms) であった。この表面粗さの実測値を用いて集光用および結像用ウォルター I 型鏡のX線反射率 (2 回反射) を

表 3.2 集光用および結像用ウォルター I 型鏡の諸元。 $\theta$  : 斜入射角、 $M$  : 拡大率、 $d$  : 焦点  $F_2$  から回転双曲面と回転楕円面の接続位置までの光軸上の距離、 $D$  : 回転双曲面と回転楕円面の接続位置から焦点  $F_3$  までの光軸上の距離、 $Q_E$  : 焦点  $F_3$  が回転楕円面を見込む立体角、 $\alpha_1$  : 焦点  $F_2$  が回転双曲面を見込む最小の角度、 $\alpha_2$  : 焦点  $F_2$  が回転双曲面を見込む最大の角度 (図 3.5 参照)

諸元	集光用ウォルター I 型鏡	結像用ウォルター I 型鏡
$\theta$ (mrad)	30	24
$M$	3.5	100
$d$ (mm)	82	30
$D$ (mm)	287	3000
$Q_E$ (sr)	$5.4 \times 10^{-4}$	—
$\alpha_1$ (mrad)	94	93
$\alpha_2$ (mrad)	105	105

計算し、図 3.8 に 2000 eV まで X 線エネルギーの関数として示す。酸素  $K\alpha$  X 線 (525 eV) に対する反射率は、斜入射角 30 mrad の集光用ウォルター I 型鏡では 41%、斜入射角 24 mrad の結像用ウォルター I 型鏡では 53% と計算され、集光・結像光学系としては 22% の反射率 (4 回反射) となる。また、集光用ウォルター I 型鏡の 1000 eV における反射率は 14% であるが、1500 eV では 0.034 % まで急激に低下している。そのため、電子衝撃型 X 線源からの高エネルギーの制動放射 X 線やクロムの特性 X 線 ( $K\alpha_1$  : 5.415 keV、 $K\alpha_2$  : 5.405 keV) は集光用ウォルター I 型鏡での反射で減衰され、試料にはほとんど照射されない。

酸素  $K\alpha$  X 線を発生させるためのターゲット物質としては、酸化クロム ( $Cr_2O_3$ ) が用いられている。酸化クロムは熱安定性に優れ、また、電気伝導性であることから、実験室規模の水の窓 X 線顕微鏡に関するレビュー論文 [14] の中でも電子衝撃型 X 線源のターゲット物質の候補として言及されている。実際に、酸化クロムターゲットの表面とアノードの金属部との間の抵抗値は数 100  $\Omega$  から数  $k\Omega$  の範囲にあり、X 線源を 10 時間以上連続動作させても、その間にアノードのチャージアップに起因する X 線強度の低下は認められなかった。

集光用および結像用ウォルター I 型鏡は、真空中での光軸調整を可能とするため、2 軸傾斜制御付のモーター駆動 XYZ ステージに搭載されている。試料ステージは、モーター駆動の XYZ ステージ上にモーター駆動回転ステージを載せ、更にもその上に搭載された手動の XY ステージに試料ホルダーを固定する構成となっている。X 線による観察のために真空チャンバーを排気する前に、X 線光学系に隣接して置かれた光学顕微鏡を用いて試料を観察し、試料中の関心領域が回転ステージの回転軸上に位置するように、試料ホルダーの位置調整が行われる。その後、XYZ ステージを駆動して試料の関心領域を結像用ウォルター I 型鏡の焦点位置に移

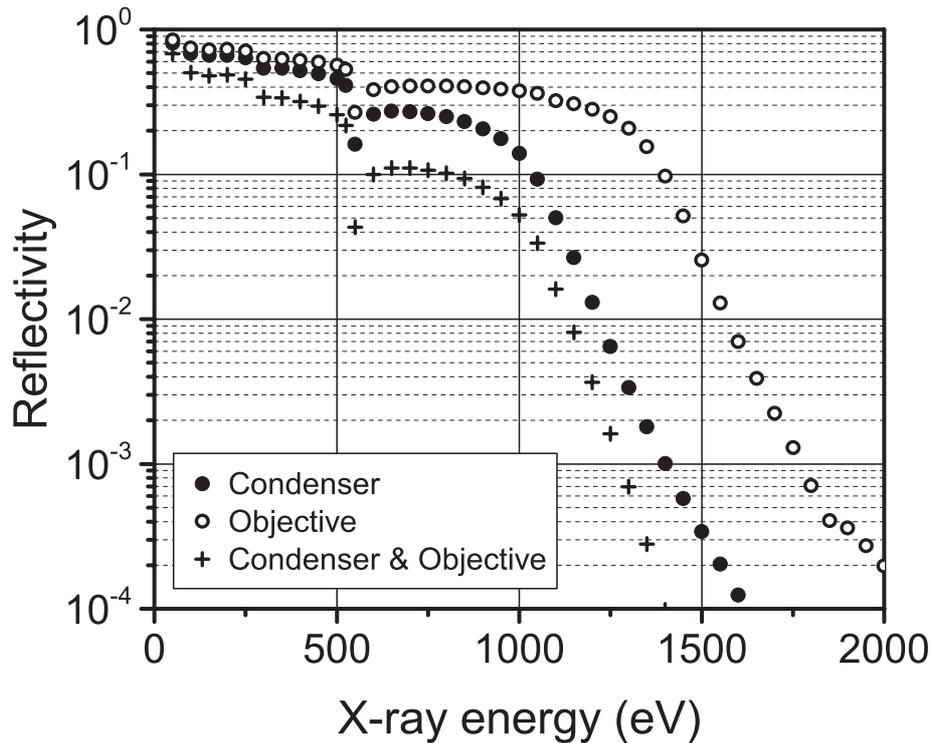


図 3.8 集光用ウォルター I 型鏡 (2 回反射)、結像用ウォルター I 型鏡 (2 回反射)、および、集光・結像光学系 (4 回反射) としての反射率

動かせる。集光用および結像用ウォルター I 型鏡の光軸調整、および試料ステージの位置調整は真空チャンバーの外部から遠隔制御される。

## 3.5 結果と考察

### 3.5.1 X線スペクトル・強度

X線源の酸化クロムターゲットからのX線スペクトルの中で、試料観察に寄与しているX線が主に酸素  $K\alpha$  X線であることを確認するため、 $0.1 \mu\text{m}$  厚の窒化シリコン ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) 膜を試料位置に置いて、X線の透過率を測定した。 $525 \text{ eV}$  のX線エネルギーにおける  $\text{Si}_3\text{N}_4$  の減衰長 (線減衰係数の逆数) は  $0.238 \mu\text{m}$  である [12]。従って、 $0.1 \mu\text{m}$  厚の  $\text{Si}_3\text{N}_4$  膜の酸素  $K\alpha$  X線に対する透過率は、 $\exp(-0.1/0.238) = 0.66$  と計算される。実際に計測された透過率は  $0.65$  であり、この結果は、酸化クロムターゲットから放出されて CCD に到達するX線が主に酸素  $K\alpha$  X線であることを裏付けている。

X線源の強度、すなわち、試料が置かれていない場合に集光用および結像用ウォルター I 型鏡を経て CCD の入射面上に毎秒 1 画素当たり に到達するX線光子の個数は、フォトンカウンティングモードで動作する CCD [15] を用いて評価することができる。CCD のフォトンカ

ウンティングモードでは、1枚の画像を取得する間に CCD の一つの画素には最大でも1個の X線光子しか入射しないような X線強度の下で CCD を動作させる。X線光子が CCD の空乏層中で吸収されると、X線光子のエネルギーに比例した個数の—Si 中では、3.6 eV あたり1対の—電子正孔対が生成される。生成された電荷の広がり方が CCD の画素サイズよりも小さければ、X線光子のエネルギーに比例した電荷が一つの画素のポテンシャルウェル（電位の井戸）に集められる。従って CCD の画素値のヒストグラムから、X線光子1個に相当する画素値を求めることができる。この評価法により CCD 入射面上の酸素  $K\alpha$  X線の強度を見積もると、X線源の加速電圧と電流がそれぞれ 15 kV、400  $\mu\text{A}$  である場合に、0.1 photons/s/pixel であった。

### 3.5.2 二次元イメージング特性

軟X線3D顕微鏡光学系の二次元イメージング特性については、厚さ 500 nm のタンタル製の解像度チャート (XRESO-50HC, NTT Advanced Technology Corp., Japan, [http://www.ntt-at.com/product/x-ray\\_chart/](http://www.ntt-at.com/product/x-ray_chart/)) を用いて評価を行った。解像度チャート中の放射状パターンを中心部分の透過X線画像を図 3.9(a) に示す。X線源の加速電圧と電流は、15 kV、400  $\mu\text{A}$  であり、75 分の撮像時間で得られた画像である。放射状パターンの寸法は、図 3.9(b) の一点鎖線の位置で 2  $\mu\text{m}$  ライン&スペース (L&S)、実線の位置で 1  $\mu\text{m}$  L&S、破線の位置で 0.5  $\mu\text{m}$  L&S である。従って、解像度チャートの X線透過画像からは、軟X線3D顕微鏡光学系により 0.5  $\mu\text{m}$  L&S のパターンが解像可能であることが確認できた。図 3.9(c) は、図 3.9(a) 中の白色の実線に沿った画素値のプロットである。プロットの中央部のパターン寸法は 0.75  $\mu\text{m}$  L&S であり、空間周波数に換算すれば 0.67 lp/ $\mu\text{m}$  である。放射状パターンのような明暗の（白黒の）パターンに対する画像コントラスト  $C$  は、画素値のプロットのピークの値  $I_{\text{peak}}$  と谷の値  $I_{\text{valley}}$  を使って

$$C = \frac{I_{\text{peak}} - I_{\text{valley}}}{I_{\text{peak}} + I_{\text{valley}}} \quad (3.12)$$

と表わされる。図 3.9(a) の白色実線の位置を  $90^\circ$  として同一パターン寸法の  $0^\circ$ 、 $180^\circ$ 、および  $270^\circ$  においても画像コントラストを求めた結果、空間周波数 0.67 lp/ $\mu\text{m}$  に対する画像コントラストは  $18.2\% \pm 3.0\%$  であった。同様にして他の空間周波数についても画像コントラスト求め、空間周波数の関数としてプロットした結果を図 3.9(d) に示す。プロットの傾向を高空間周波数側に向かって外挿すると、空間周波数 1.0 lp/ $\mu\text{m}$  における画像コントラストとして 5% から 10% の間の値が期待される。空間分解能（限界解像度）の一つの目安として、画像コントラストが 5% に低下する空間周波数を採用することができる。図 3.9 に示された結果より、軟X線3D顕微鏡光学系は、酸素  $K\alpha$  X線に対して少なくとも 1.0 lp/ $\mu\text{m}$  の空間分解能を有していることが確認できた。

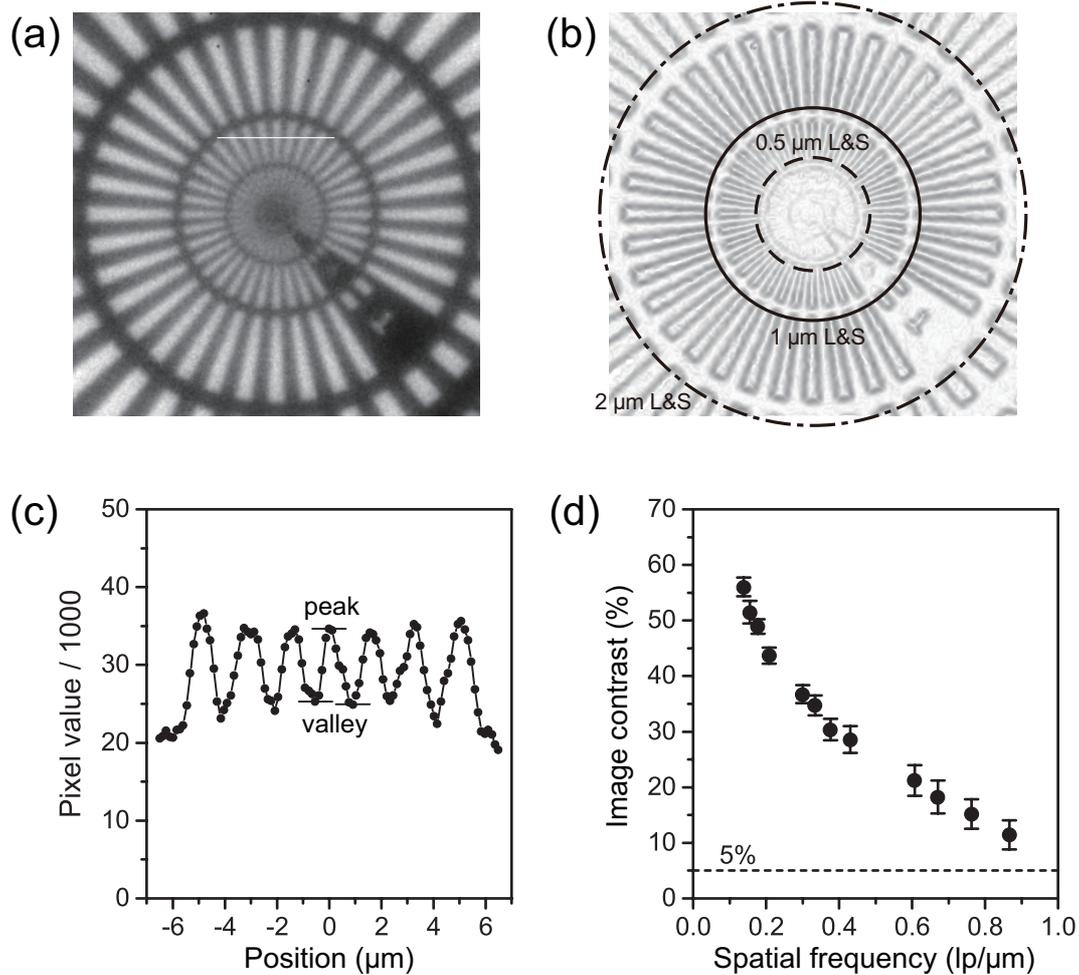


図 3.9 (a) 解像度チャートの放射状パターン中心部の透過X線画像。(b) 放射状パターン上の3箇所における寸法(ライン・アンド・スペース)。(c) 画像(a)中の白色の実線に沿った画素値のプロット。(d) 画像(a)から求めた空間周波数の関数としての画像コントラスト

軟X線3D顕微鏡によりどこまで正確に試料の構造を画像化できるかは、空間周波数  $f$  の正弦波状パターンに対する変調度伝達関数(modulation transfer function, MTF)を用いて理論的に見積もることができる。軟X線3D顕微鏡のMTFは、結像用ウォルターI型鏡のMTFにCCDによるサンプリングを考慮に入れて次式で与えられる。

$$MTF_{\text{total}}(f) = MTF_{\text{Wolter}}(f) \times MTF_{\text{CCD}}(f) \quad (3.13)$$

ここで、 $MTF_{\text{total}}(f)$  は CCD 素子を含めた軟X線3D顕微鏡の変調度伝達関数、 $MTF_{\text{Wolter}}(f)$  は結像用ウォルターI型鏡の変調度伝達関数である。また、 $MTF_{\text{CCD}}(f)$  は

CCDの画素によるサンプリング効果の変調度伝達関数であり、

$$\text{MTF}_{\text{CCD}}(f) = \text{sinc}\left(\frac{\pi f}{2f_N}\right) = \frac{\sin\left(\frac{\pi f}{2f_N}\right)}{\frac{\pi f}{2f_N}} \quad (3.14)$$

である [16]。なお、 $f_N$  は CCD によるサンプリングの試料面上でのナイキスト周波数であり、CCD の画素ピッチを  $p$ 、結像用ウォルター I 型鏡の拡大率を  $M$  とすれば、

$$f_N = \frac{1}{2} \frac{1}{p/M} \quad (3.15)$$

である。

結像用ウォルター I 型鏡の変調度伝達関数は、鏡面が理想鏡面であれば、同じ大きさの輪帯開口の変調度伝達関数で置き換えることが可能である。図 3.10(a) に示す外側半径： $w_0$ 、内側半径： $\eta w_0$  ( $0 < \eta < 1$ ) の輪帯開口が試料面から距離  $d$  の位置にある場合に、波長  $\lambda$  の X 線に対する変調度伝達関数  $\text{MTF}_{\text{annular}}(f)$  は、

$$\omega_0 = \frac{2\pi}{\lambda d} w_0 \quad (3.16)$$

として次の一連の式によって与えられる [17] [18]。

$$\text{MTF}_{\text{annular}}(f) = (1 - \eta^2)^{-1} [A + B + C] \quad (3.17)$$

ここで、

$$A = \begin{cases} \frac{2}{\pi} \left\{ \cos^{-1} \frac{\Omega}{2} - \frac{\Omega}{2} \left[ 1 - \left( \frac{\Omega}{2} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\} & 0 \leq \frac{\Omega}{2} \leq 1 \\ 0 & \frac{\Omega}{2} > 1 \end{cases} \quad (3.18)$$

$$B = \begin{cases} \frac{2\eta^2}{\pi} \left\{ \cos^{-1} \frac{\Omega}{2\eta} - \frac{\Omega}{2\eta} \left[ 1 - \left( \frac{\Omega}{2\eta} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \right\} & 0 \leq \frac{\Omega}{2\eta} \leq 1 \\ 0 & \frac{\Omega}{2\eta} > 1 \end{cases} \quad (3.19)$$

$$C = \begin{cases} -2\eta^2 & 0 \leq \frac{\Omega}{2} \leq \frac{1-\eta}{2} \\ -2\eta^2 + \frac{2\eta}{\pi} \sin \phi + \frac{1+\eta^2}{\pi} \phi & \\ -\frac{2(1-\eta^2)}{\pi} \tan^{-1} \left[ \frac{1+\eta}{1-\eta} \tan \frac{\phi}{2} \right] & \frac{1-\eta}{2} \leq \frac{\Omega}{2} \leq \frac{1+\eta}{2} \\ 0 & \frac{\Omega}{2} \geq \frac{1+\eta}{2} \end{cases} \quad (3.20)$$

であり、また、

$$\phi = \cos^{-1} \frac{1+\eta^2 - \Omega^2}{2\eta}; \quad \Omega = \frac{2\pi f}{\omega_0}$$

である。

結像用ウォルター I 型鏡を輪帯開口で置き換えるには、図 3.6 のパラメータを用いて、

$$w_0 = d \tan \alpha_2 \quad (3.21)$$

$$\eta = \frac{\tan \alpha_1}{\tan \alpha_2} \quad (3.22)$$

とする。図 3.10(b) には、式 (3.13) において  $\text{MTF}_{\text{Wolter}}(f)$  を  $\text{MTF}_{\text{annular}}(f)$  で置き換えて計算した軟 X 線 3 D 顕微鏡の変調度伝達関数を示す。なお、X 線の波長は酸素  $K\alpha$  X 線の 2.36 nm としてある。このグラフからは、光学系が理想的である場合に空間周波数 0.87 lp/ $\mu\text{m}$  の正弦波状のパターンに対する変調度伝達関数として、およそ 87% が期待できることになる。実際には、同じ空間周波数の矩形波状パターンに対する画像コントラストとしては 11% が得られている (図 3.9 参照)。変調度伝達関数が正弦波状パターンを対象として画像コントラストが矩形波状パターンを対象としている違いはあるにしても、光学系が理想的な場合に期待されるイメージング性能からの実際の光学系で得られる性能の乖離はかなり大きなものである。このイメージング性能の劣化は、結像用ウォルター I 型鏡の鏡面の表面粗さと形状誤差に起因すると考えられる。

鏡面性状 (形状誤差・表面粗さ) がウォルター I 型鏡の結像性能に及ぼす影響は、平滑な面についてのレーリーの基準 (Rayleigh roughness criterion) を用いて、定性的ではあるが、X 線の波長と斜入射角に関連付けて論じることができる [19]。レーリーの基準によれば、反射面の凹凸によって生じる光路差が波長の 4 分の 1 以下であれば反射面は smooth であり、逆に光路差が波長の 4 分の 1 よりも大きければ反射面は rough であると見なされる。図 3.11 に示すように鏡面の凹凸の大きさを  $h$ 、斜入射角を  $\theta$  とすると、鏡面での反射で生じる光路差は  $2h \sin \theta$  となる。ウォルター鏡では X 線は 2 回の反射を経るため、ウォルター鏡の鏡面が平滑であると見なされるには 1 回の反射で生じる光路差は波長の 8 分の 1 以下である必要があり、

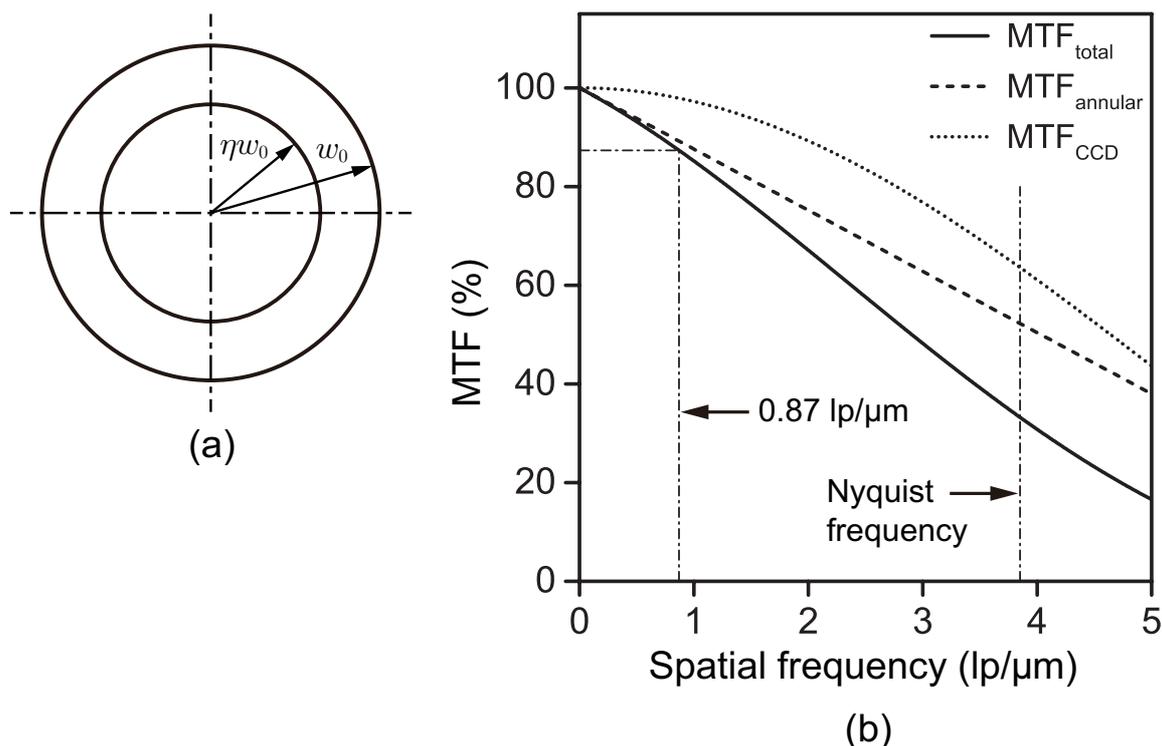


図 3.10 (a) 外側半径  $w_0$ 、内側半径  $\eta w_0$  ( $0 < \eta < 1$ ) の輪帯開口。(b) 光学系が理想的な場合の軟X線3D顕微鏡の変調伝達関数。結像用ウォルターI型鏡を輪帯開口で置き換えて計算している

レーリーの基準は以下のように表される。

$$2h \sin \theta < \frac{1}{2} \frac{\lambda}{4} \quad (3.23)$$

$$h < \frac{\lambda}{16 \sin \theta} \quad (3.24)$$

式 (3.24) から、斜入射角を小さくして右辺の分母を小さくする、あるいはX線の波長を長く (エネルギーを小さく) して分子を大きくすることで、レーリーの基準により平滑面と見なされる凹凸の程度が大きくなる。そして、同じ鏡面性状 (形状誤差・表面粗さ) であれば、斜入射角を小さくする、あるいはX線の波長を長くすることでより良い結像性能を得られることが期待できる。実際に、酸素  $K\alpha$  X線 (波長: 2.36 nm) よりも長波長である炭素  $K\alpha$  X線 (波長: 4.48 nm) を使用することで、画像のコントラストが改善できることが確認できている。図 3.12 は、ナイフエッジ法を使って得られた酸素  $K\alpha$  X線と炭素  $K\alpha$  X線に対するラインスプレッド関数 (LSF) を比較して示している。直径  $50 \mu\text{m}$  の白金線を試料位置に置いて白金線の縁を横切る位置での強度プロファイルを測定し、強度プロファイルの隣接画素間の差分に、中心を共有する2個のガウス関数の和をフィッティングしてLSFとした。酸素  $K\alpha$  X線の LSF (細い実線) が  $\pm 4 \mu\text{m}$  程度まで裾を引いているのに対して、炭素  $K\alpha$  X線の LSF (太

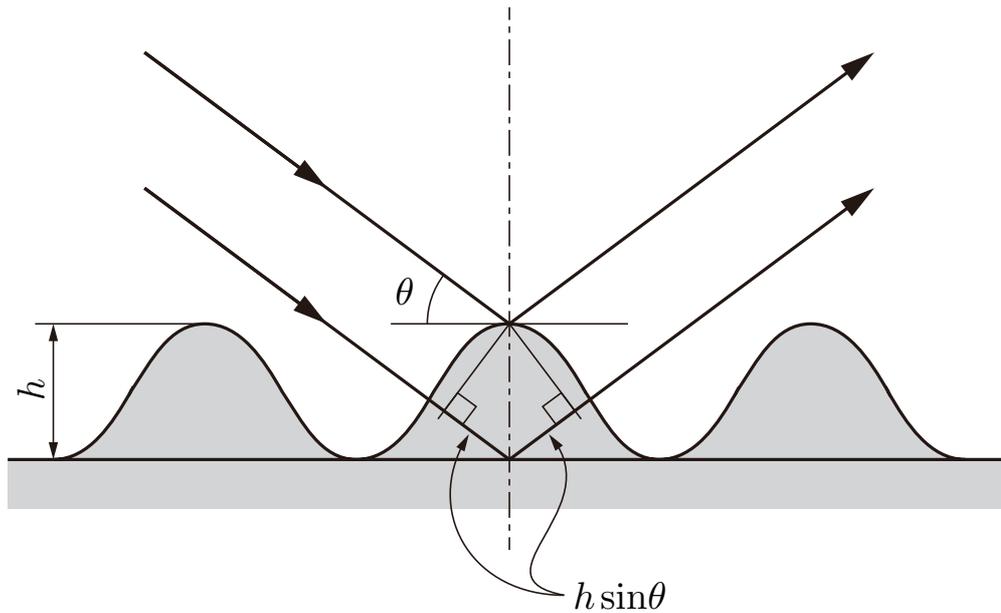


図 3.11 鏡面の凹凸に起因する光路差。図中、 $h$  は鏡面の凹凸の大きさ、 $\theta$  は斜入射角である

い実線) では裾引きの程度が抑えられていることが見て取れる。従って、ウォルター I 型鏡の設計を見直して斜入射角を小さくすることによっても、画像コントラストが向上し、より微細な構造の識別が可能になることが期待できる。

### 3.5.3 三次元イメージング特性

軟 X 線 3 D 顕微鏡による三次元構造の再構成は、図 3.13 に示す手順で行われる。まず、 $1.5^\circ$  程度のステップで試料を回転させて各回転角における透過 X 線画像を取得する (A)。次に、透過 X 線画像から光学系の点像分布関数 (PSF) をデコンボリューションした画像から X 線透過率の対数のマイナスを計算する前処理を加える (B)。そして、前処理の済んだ画像から最尤推定期待値最大化 (MLEM: maximum likelihood - expectation maximization) 法により三次元再構成を行う (C)。

前処理に用いる PSF は、ナイフエッジ法により得られた LSF に基づいて計算される。視野内の水平方向と垂直方向とで計測した LSF にほとんど差がないため、軟 X 線顕微鏡の光学系は光軸に対して回転対象であると見なして [7]、LSF を原点の周りに回転することで PSF が求められる。透過 X 線画像から PSF をデコンボリューションすることで、画像のボケを取り除いて劣化したコントラストを回復させることができる。図 3.14 の (a) は解像度チャートの透過 X 線画像であり、(c) は (a) 中の白線に沿った X 線強度プロファイルである (いずれも図 3.9 からの再掲)。また、(b) は (a) から PSF をデコンボリューションした画像であり、(d) は (b) 中の白線に沿った X 線強度プロファイルである。(a) と (b) を比べれば、デコンボリューション

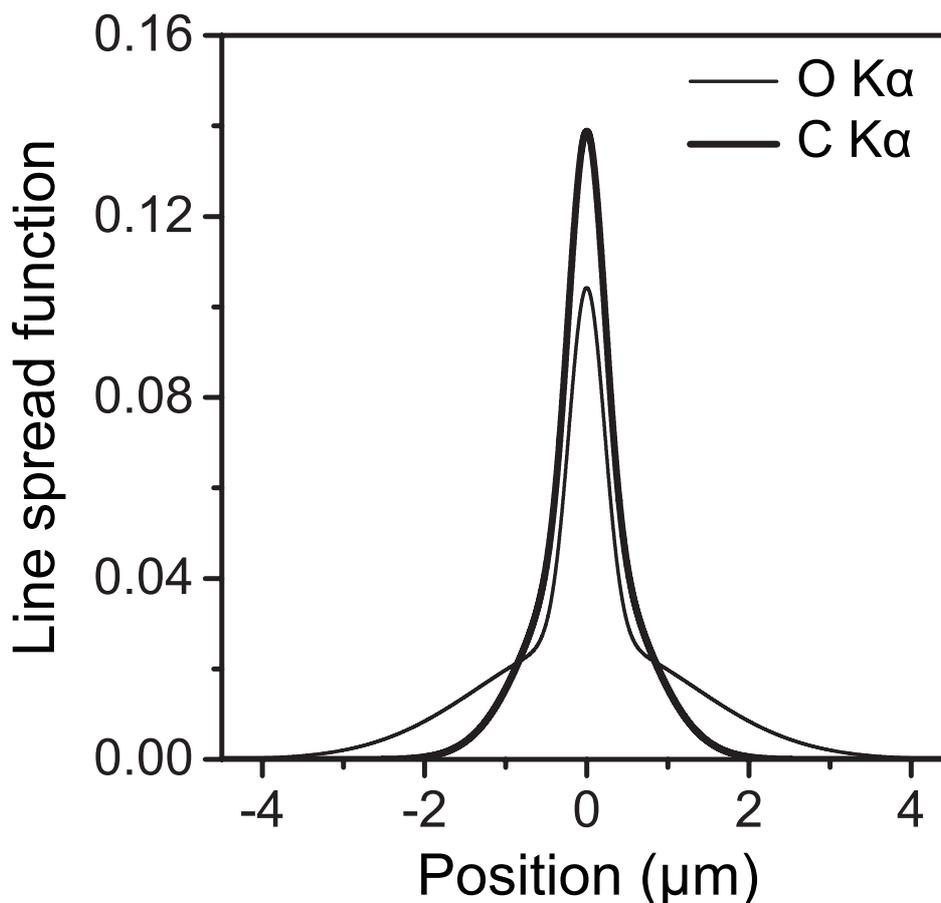
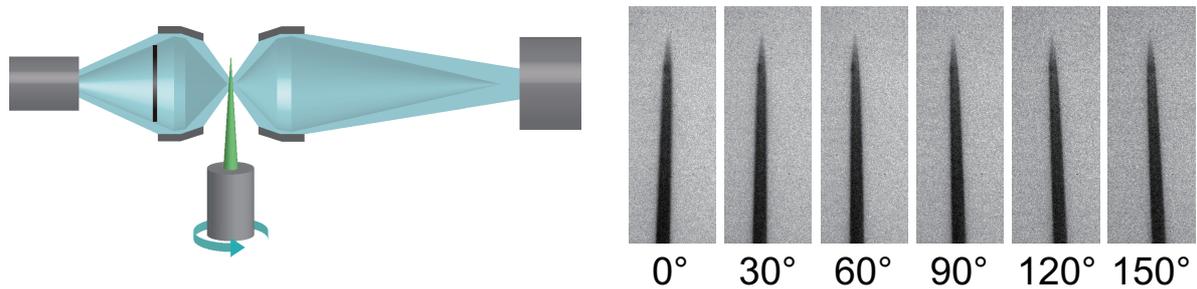


図 3.12 ナイフエッジ法によって求められた酸素  $K\alpha$  X線と炭素  $K\alpha$  X線に対する結像用ウォルター I 型鏡のラインスプレッド関数

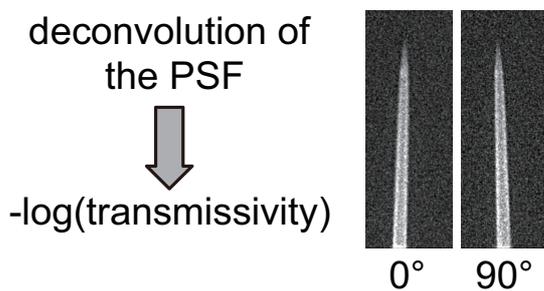
ションにより画像コントラストが改善されていることが見て取れる。また、(c)、(d) に示された X線強度プロファイルの中央部分の空間周波数は  $0.67 \text{ lp}/\mu\text{m}$  であり、この位置におけるコントラストを計算するとデコンボリューションの前後で、 $18.2\% \pm 3.0\%$  から  $28.0\% \pm 3.7\%$  まで大きくなっていて、デコンボリューションの効果が定量的にも確認できる。なお、PSF をデコンボリューションするアルゴリズムとしては、Richardson と Lucy によるベイズ定理に依拠した反復的計算手法 [20] [21] を用いた。

三次元構造観察の性能評価用試料としマイクロインジェクション用のガラスキャピラリー (Femtotips, Eppendorf AG, Germany, <http://www.eppendorf.com/int/>) を採用し、軟 X線 3D 顕微鏡による撮像と三次元再構成を行った。ガラスキャピラリーは自立可能であるため  $180^\circ$  の角度範囲 (半回転)、必要であれば  $360^\circ$  の角度範囲 (1 回転) で透過 X線画像の取得が可能である。三次元再構成結果に悪影響を与える角度欠損が生じないため、基本的な性能評価用の試料として好適である。図 3.15 の (a) は回転角  $0^\circ$  における透過 X線画像であり、(b) は (a) から PSF をデコンボリューションした後に X線透過率の対数のマイナスを計算した画

## (A) Imaging with sample rotation



## (B) Preprocessing



## (C) Tomographic reconstruction

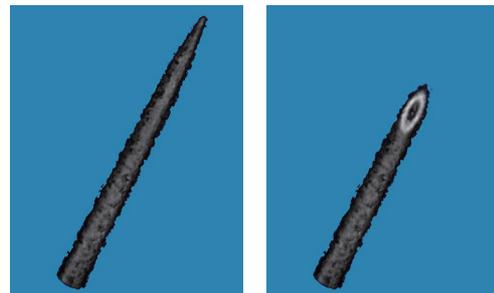


図 3.13 三次元再構成の手順。(A) 撮像：試料を回転させて各回転角における透過X線画像を取得する。(B) 前処理：透過X線画像から光学系の点像分布関数をデコンボリューションし、X線透過率の対数のマイナスを計算する。(C) 再構成：前処理された画像から最尤推定期待値最大化 (MLEM: maximum likelihood - expectation maximization) 法により三次元再構成を行う

像である。X線源は 15 kV、280 – 290  $\mu\text{A}$  の条件で動作させ、 $1.5^\circ$  ステップで 121 枚の画像を取得した。1 画像当たりの撮像時間は 20 分である。121 枚の画像から三次元再構成を行った結果を図 3.15(c)、(d) に示す。(c) はキャピラリーの軸に平行なスライス画像であり、中空構造が先端近くまで解像されていることが見て取れる。また、(d) は (c) 中の A – C の位置におけるキャピラリーの軸に垂直なスライス画像を、図中の破線に沿った線減衰係数 (linear attenuation coefficient, LAC) のプロファイルと共に示している。B、C におけるスライス画像と LAC プロファイルから中空構造が明瞭に識別できるだけでなく、A におけるスライス画像からも中空構造が確認でき、また、LAC プロファイルでは  $1.17 \mu\text{m}$  間隔のピークとしてガラス壁が識別できている。これより、水の窓X線 3 D顕微鏡は、 $1 \mu\text{m}$  スケールの三次元構造を観察できる能力を有していることが確認できた。

透過X線画像からの三次元再構成では、各ボクセル (voxel、体積要素) における LAC が計算される。図 3.15(d) の位置 C における LAC プロファイルのピーク値は  $0.4 \mu\text{m}^{-1}$  である。ガラスキャピラリーに用いられているガラス材の組成は明らかにされていないため実際の

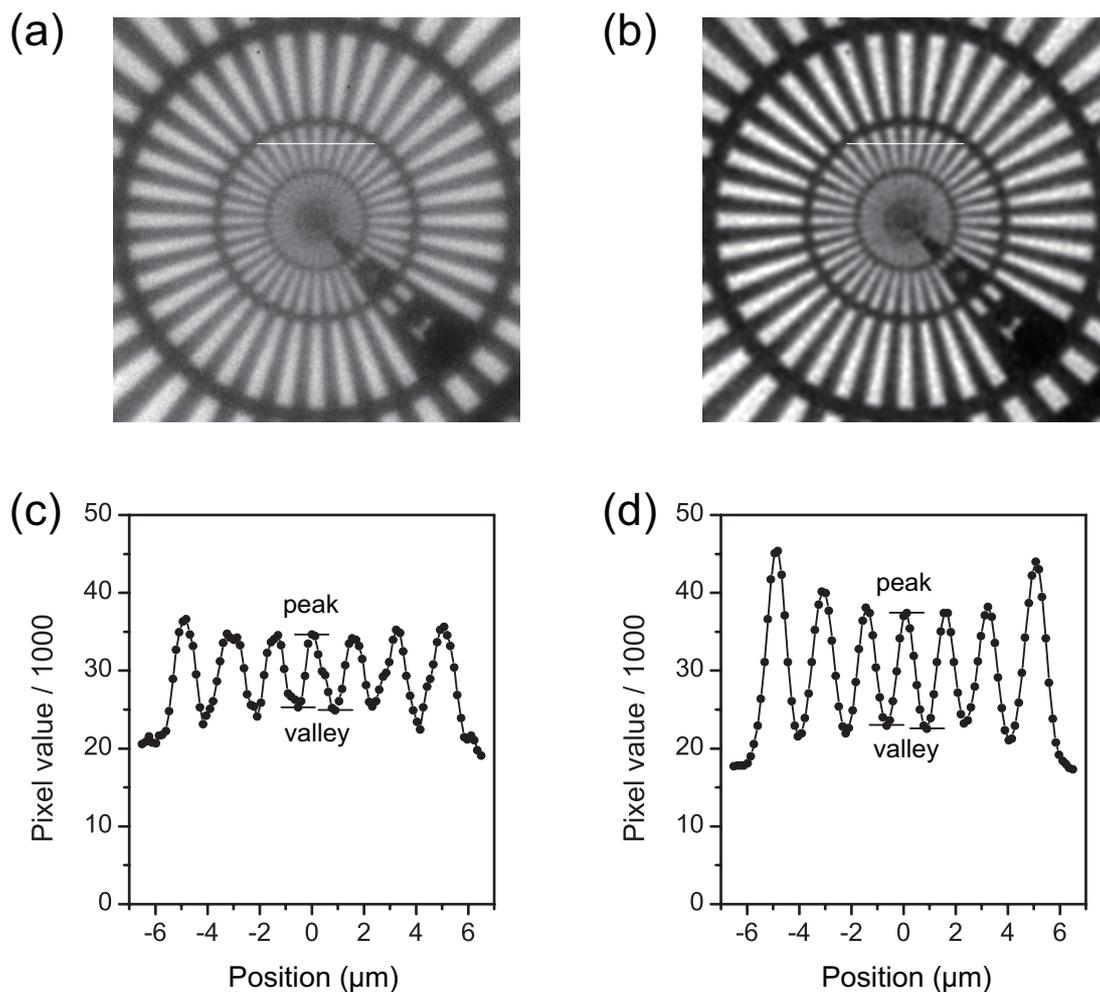


図 3.14 点像分布関数のデコンボリューションによる画像コントラストの回復。(a) 解像度チャートの透過X線画像（原画像）。(b) デコンボリューション結果。(c) 原画像 (a) 中の白線に沿った強度プロファイル。(d) デコンボリューション後の画像 (c) 中の白線に沿った強度プロファイル

LAC の値は不明であるが、密度  $2.2 \text{ g/cm}^3$  の  $\text{SiO}_2$  の  $525 \text{ eV}$  における LAC が  $1.05 \mu\text{m}^{-1}$  と計算される [12] ことを考慮すれば、三次元再構成により得られた LAC は、実際の値よりもかなり小さいと推測される。この差異の原因としては、軟X線3D顕微鏡の分解能がガラスキャピラリーの構造のスケールと同程度であるため、ガラス壁の厚さがぼかされてしまったことが挙げられる。ガラス壁によるX線の吸収はガラス壁の厚さとガラス材のLACの積の関数であり、X線の吸収は透過X線画像から所与である。そのため、ガラス壁の厚さが実際よりも大きく再構成され、逆にLACは小さく画像化されたと考えられる。

LAC は、物質の化学組成に依存して物質毎に異なる。従って、LAC に対する定量性が十分に高ければ、LAC の値に基づいて試料の構成要素を同定し、各構成要素の三次元的な分布をマップ化することも可能である。LAC に基づく画像が得られることは、軟X線3D顕微鏡の

有する大きな特徴であり、光学顕微鏡や電子顕微鏡に対する優位点となる。この優位性を活用するには、まず、LACの定量性を高める必要があり、そのためには、光学系の分解能の向上と、X線源の強度増強によるX線透過画像の信号対雑音比の改善が有効である。また、三次元再構成された画像を、ボクセル毎のLAC値に基づいて、似通ったLAC値の領域に分割する領域分割(segmentation)アルゴリズムの実装も必要である。

### 3.5.4 生物試料の三次元構造観察

生命科学分野への軟X線3D顕微鏡の適用可能性を示すため、生物・医学的な試料の観察を行った。図3.16は、マウスの腎臓切片の観察例である。試料ホルダーの厚さ $0.1\ \mu\text{m}$ の窒化シリコン膜上に置かれた乾燥切片(厚さ $5\ \mu\text{m}$ )の糸球体部分を観察している。糸球体は血液をろ過して尿を作る器官であり、毛細血管が糸玉状に集まった構造をしている。糸球体の周りをボウマン嚢という袋が取り巻き、ろ過された尿を受け止めている[22]。図3.16の(a)は光学顕微鏡による画像であり、(b)は回転角 $0^\circ$ における透過X線画像である。試料ホルダーの枠部分が厚みを持ち、試料が枠部分の陰に入って観察できない回転角があるため、透過X線画像は、 $0^\circ - 63^\circ$ と $118.5^\circ - 180^\circ$ の範囲内の $1.5^\circ$ ステップで85枚を取得した。X線源は $15\ \text{kV}$ 、 $250 - 270\ \mu\text{A}$ の条件で動作させ、1画像当たりの撮像時間は15分である。図3.16(c) - (g)は、再構成された光軸に垂直なスライス画像であり、スライス間隔は $1\ \mu\text{m}$ になっている。透過画像からは識別できない、糸球体網目構造の厚さ方向の変化が観察できる。画像の大きさは全て $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ である。

図3.16の(a)と(b)を見比べると、X線の透過画像は、光学顕微鏡の画像とは明らかに異なるコントラストを示している。マウスの腎臓切片の他にも、生物試料として培養細胞の観察も行っているが、観察結果を試料提供者である研究者に見せると、光学顕微鏡による可視画像とは見え方、コントラストの表れ方、が異なることに「おやっ」と思い関心を示す。X線の透過画像のコントラストは、X線が試料を透過することに伴う減衰に起因し、X線の減衰量は、X線の経路に沿った線減衰係数(LAC)の積分値に依存する。そのため、トモグラフィーの手法により三次元再構成を行えば、ボクセル毎のLAC値の三次元分布画像が得られる。このことが、まさに軟X線3D顕微鏡による観察の特徴であり、光学顕微鏡や電子顕微鏡による観察と異なる点である。LACは物質の元素組成に依存するためタンパク質や脂質、あるいは核酸等の分子は異なったLACの値を持つ。そして、それらの分子で構成される細胞核や核小体、小胞、ミトコンドリア等の細胞小器官も、例えば、小胞が水と脂質で構成されミトコンドリアはタンパク質濃度の高いマトリックスを内部に持っているように、それぞれ化学的な組成が異なるためにLAC値もまた異なる。従って、LACを指標として領域分割アルゴリズムを適用すれば、細胞小器官の三次元的な分布を識別することが可能となる。特に、水の窓域のX線を使って含水凍結状態の試料を観察すれば、生きたままに近い水を含んだ(hydrated)状態の、

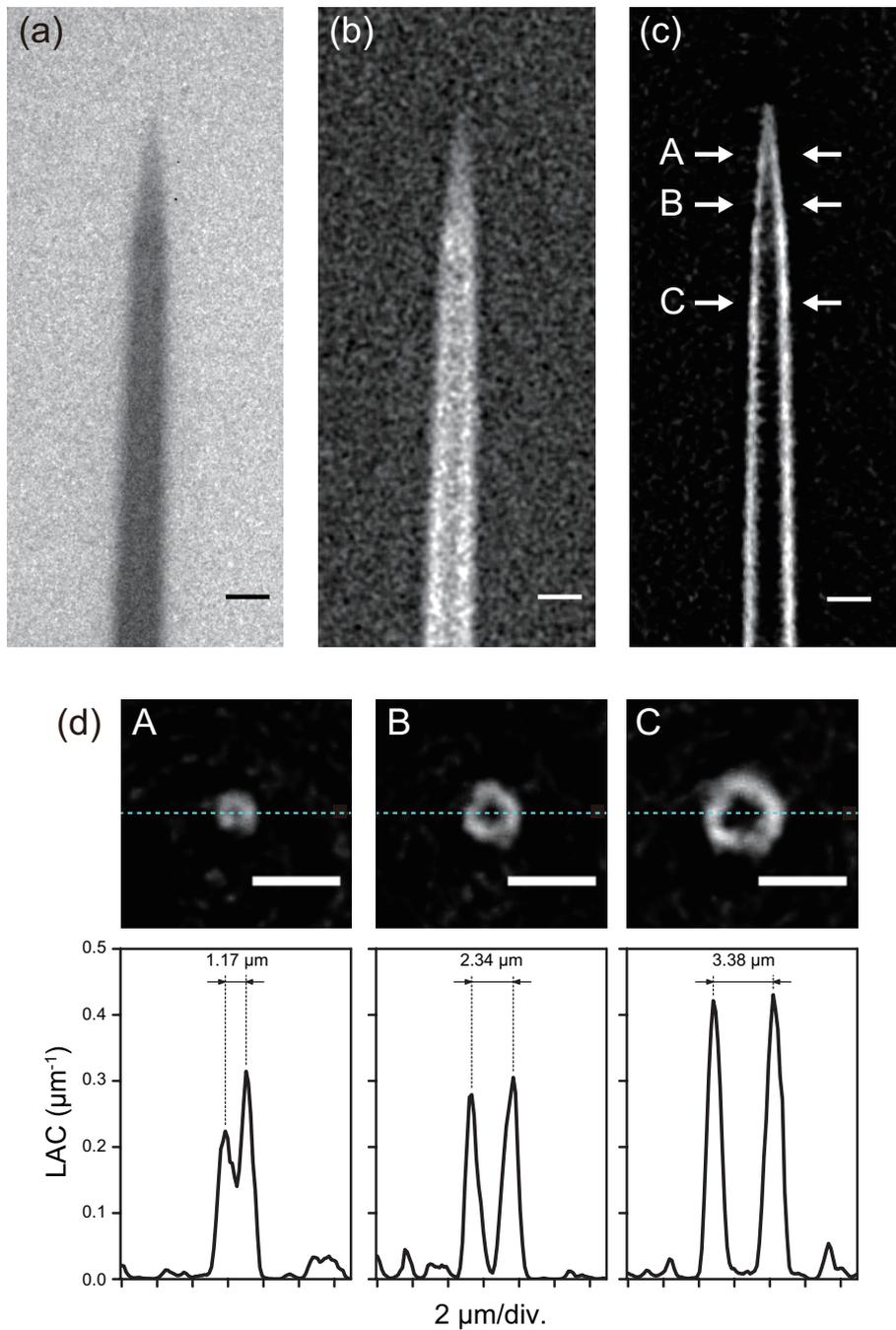


図 3.15 ガラスキャピラリーの三次元再構成。回転角  $0^\circ$  における (a) 透過X線画像と (b) 前処理 (PSF のデコンボリューションと対数のマイナスの計算) 後の画像。(c) キャピラリーの軸に平行なスライス画像。(d) 画像 (c) 中の矢印で示された A - C の位置におけるキャピラリー軸に垂直なスライス画像と破線に沿った線減衰係数 (LAC) のプロファイル。スケールバーは全て  $5 \mu\text{m}$  である

細胞や細胞小器官の三次元的なマップを取得することができる [23] [24]。

### 3.6 課題と展望

水の窓域のX線は、炭素を含むタンパク質等の物質と水との間で良好な吸収コントラストが得られ、生きたままに近い状態で生物・医学的試料を観察できることが特徴である。軟X線3D顕微鏡が、生命科学分野の研究において真に有効であることを示すには、乾燥切片ではなく、含水状態、もしくは含水凍結状態の試料の観察を行う必要がある。ウォルターI型鏡を集光・結像光学系に用いる利点として、試料周辺に十分な空間が確保できることがある。現在、生物・医学的試料の生きたままに近い状態での観察を可能とするため、試料の含水凍結状態を保持できる冷却試料ステージを軟X線3D顕微鏡に搭載する準備を行っている。

現状の軟X線3D顕微鏡の分解能は、二次元構造に対して、 $1.0 \text{ lp}/\mu\text{m}$  (500 nm L&S)を上回っていることが確認できているだけであり、 $1 \mu\text{m}$ スケールの三次元構造を識別できると合わせても、光学顕微鏡の分解能の200 nmと比べて見劣りがする。レーリーの基準に基づけば、斜入射角を小さくすることで鏡面の加工精度が現状のままであっても、X線の波長を酸素  $K\alpha$  X線の2.36 nmから炭素  $K\alpha$  X線の4.48 nmへ長波長化してみた場合と同じように、画像コントラストの向上が期待できる。ウォルターI型鏡の作製の各工程の高度化による鏡面精度の改善と合わせて、斜入射角や拡大率等の光学系設計の見直しを行い、光学顕微鏡並みの分解能である200 nm L&Sを達成する必要がある。

図3.16の三次元再構成を行うための透過X線画像の取得には、撮像時間だけでも20時間以上を要している。2-3時間程度の実用的な(ユーザーが受け入れ可能な)時間内に測定を終えるためには、X線強度を現状よりも少なくとも一桁増強する必要がある。そのためには、X線源の改良が不可欠である。現状のX線源の設計は集光・結像用ウォルターI型鏡の設計に適合しているわけではない。X線源のX線発生領域の大きさは、結像用ウォルターI型鏡による縮小を経ても結像用ウォルターI型鏡の視野よりも直径にして2-3倍程度大きく、結像に寄与しないX線の割合が大きくなっている。X線源の電子軌道設計を見直すことで、X線発生領域の大きさを集光用ウォルターI型鏡による縮小率と結像用ウォルターI型鏡の視野に適合する0.6-0.7 mm程度にするとともに、電子銃周辺を高真空に維持して1 mA程度の電流を取り出せる真空系の見直しを行い、X線強度の一桁以上の増強を図る。

これらの改良を着実に加えていくことで、筆者のグループの軟X線3D顕微鏡は、一般的な実験室に設置可能な大きさであることに加えて生命科学分野の研究者にも取り扱いが容易であり、含水凍結状態の試料の生きたままに近い状態での高分解能三次元構造観察を可能とする、研究者にとって真に有用な研究のツールになり得ると考える。生命科学分野において想定される軟X線3D顕微鏡の応用領域としては、抗体創薬が挙げられる。抗体創薬の研究においては、標的となる抗原(例えばがん細胞や細胞内の特定部位)に選択的に正しく抗体を結合させ

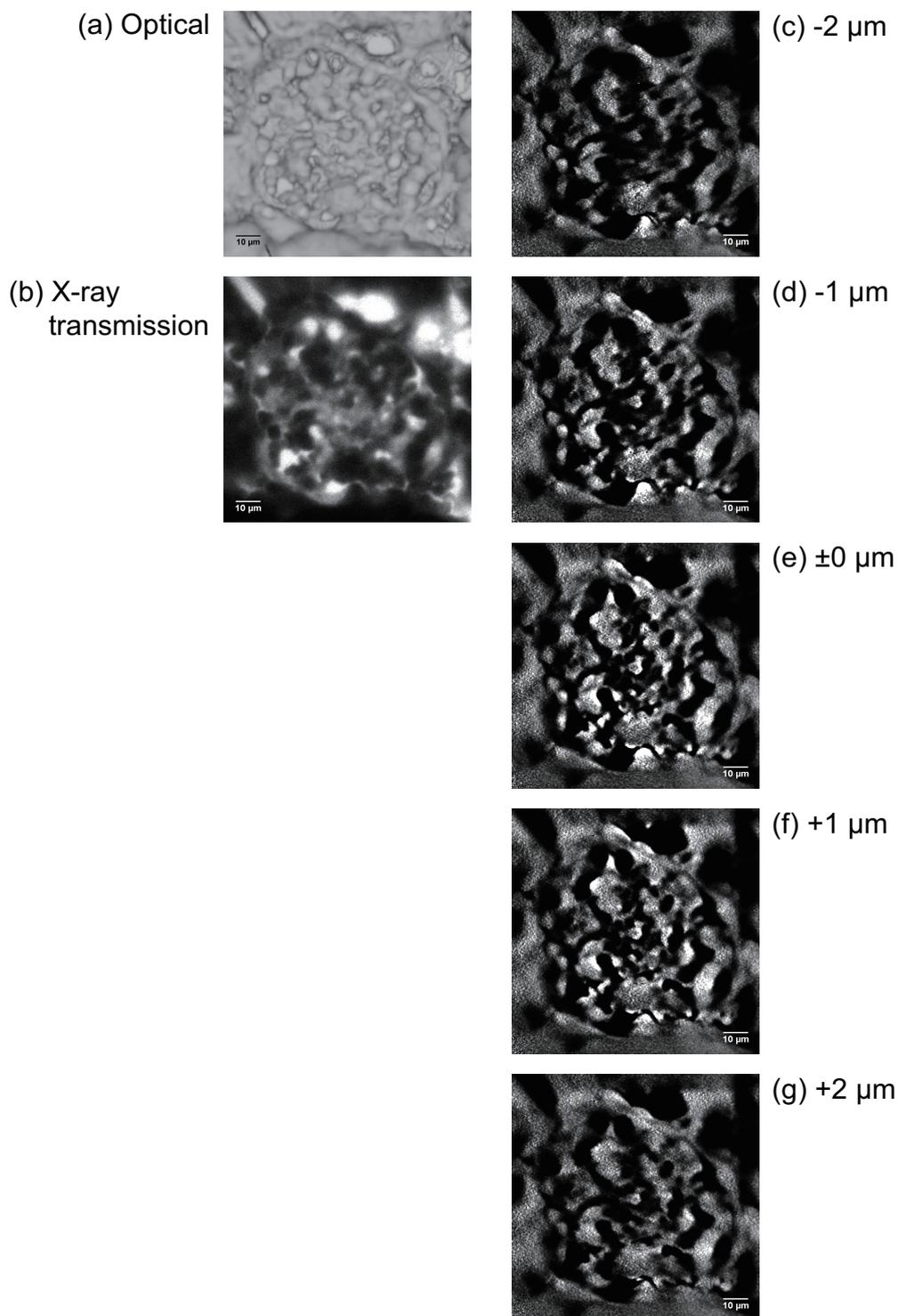


図 3.16 マウス腎臓の乾燥切片の三次元再構成。(a) 光学顕微鏡による画像。(b) 透過X線画像。(c) - (g) 三次元再構成された光軸に垂直なスライス画像。スライス間隔は  $1 \mu\text{m}$ 。糸球体の複雑な三次元構造が観察できる。画像の大きさは全て  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$  である

ることが必要である。そのためには、細部内や組織切片中の抗体分子の分布を、細胞や細胞小器官の三次元的な構造を背景として可視化する技術が必要となる。前節で述べたように、水の窓域のX線顕微鏡により含水凍結状態の試料を観察し、トモグラフィックな手法で三次元再構成行くと、線減衰係数 (LAC) の値に基づいて識別される細胞小器官の三次元構造のマップを取得することができる。近年になって放射光施設の BESSY II (独) や Diamond Light Source (英) においては、レーザー顕微鏡とX線顕微鏡により同じ含水凍結試料の同じ部位を観察する *correlative microscopy* の手法が開発され、水を含んだ生きたままに近い状態の試料の三次元構造を背景として、蛍光標識された特定の分子の分布を可視化して重ね合わせて示すことが可能となっている [25] [26]。また、X線顕微鏡だけでも、注目する分子を金微粒子で標識することにより、細胞小器官の構造を背景に標識された分子の分布を可視化することが可能である [24]。筆者のグループの軟X線3D顕微鏡の分解能が光学顕微鏡並みの 200 nm L&S になれば、比較的大きな細胞小器官の幾つかについては、細胞内や組織切片中の分布を可視化することができるので、*correlative microscopy* を研究者の実験室に持ち込むことが可能になり、研究の効率アップに貢献できる。抗体創薬の他にも、細胞小器官の体積やLACの情報を、幹細胞の分化状態の解析に適用しようとする研究も行われている [24]。

本節の最後に、軟X線3D顕微鏡の材料科学分野への適用を考えた場合の課題について検討したい。本章においては、生命科学分野を応用分野として想定した軟X線3D顕微鏡の開発について論じたが、第2章で説明したX線顕微鏡の開発動向に見られるように、X線顕微鏡は材料科学分野にも応用されている。筆者のグループの軟X線3D顕微鏡も、図3.15に示したように、微小な非生物試料の観察が可能であるが、本格的に材料科学分野、特に軽元素材料の観察へ適用するためには、幾つかの課題が挙げられる。まず、軽元素材料の観察に適したX線を発生する電子衝撃型X線源が必要となる。水の窓X線3D顕微鏡に利用している酸素  $K\alpha$  X線 (525 eV) は、炭素による吸収が大きいため、炭素繊維強化樹脂のような炭素系材料の観察には適していない。むしろ、より低エネルギーの炭素  $K\alpha$  X線 (277 eV)、あるいは、より高エネルギーの1 – 数 keV のX線を試料の材質・大きさに合わせて選択することで、良好な吸収コントラストが得られると考えられる。どちらのX線についても、電子衝撃型X線源の陽極を適切に設計することで発生が可能である。

次に、選択したX線のエネルギーや必要とされる仕様 (倍率、光学系の長さ等) に合わせて、集光・結像用の斜入射X線反射鏡を設計する必要がある。1000 – 2000 eV のエネルギー範囲にあるX線、例えばアルミニウム  $K\alpha$  X線 (1487 eV)、を使用するには、図3.3より斜入射角は 10 mrad 以下にすることが望ましい。その場合、作製可能なウォルター I 型鏡の内径の制約と光学系の長さを実験室規模に抑える制約とから、結像倍率は 50 倍程度が限界となる。実際に、筆者のグループは、水の窓X線3D顕微鏡の実証実験系の構築に着手する前に、1800 eV 程度のエネルギーのX線を使ったX線顕微鏡の実験を行った。その時の光学系の倍率は 40 倍であり、炭素繊維強化樹脂中の直径数マイクロメートルの炭素繊維を識別できている [27]。

生命科学分野の試料については、生きたままに近い状態での観察を可能にするため、真空中で試料を含水凍結状態に保つ技術が必要であるように、軟X線3D顕微鏡を材料科学分野に適用するに際しても、材料科学分野固有の試料周辺技術が必要になると考えられる。一例として、試料の中の関心領域を機械的な加工やレーザー・アブレーション、或いは集束イオンビーム (FIB, Focused Ion Beam) を用いて切り出す微細加工技術 [28] が挙げられる。軟X線3D顕微鏡を材料科学分野へ適用するためには、これらの技術を自前のものとして取り込む必要があり、材料科学分野の研究者との協働が有効である。

### 3.7 まとめ

本章では、まず、筆者のグループにおけるX線顕微鏡開発と軟X線3D顕微鏡開発に至るまでの経緯を概観した。そして、四半世紀以上におよぶ研究開発の歴史を振り返る中で、新規観察技術の開発に関する次のような教訓的な知見が得られた。「新規の観察技術を開発するに当たっては、ユーザーにとってその観察技術が有用であることを示すことが必要であり、そのためには、ユーザーが実際に観察したいと思う試料の提供を受けることができる研究者との協働が欠かせない。」

次いで、筆者のグループのコア・コンピタンスであるX線光学と斜入射X線反射鏡（回転楕円鏡・ウォルターI型鏡）について説明を加えた。なお、回転楕円鏡やウォルターI型鏡は、ガラスレプリカ法を用いて作製し、加工精度は、形状誤差として $\pm 0.1 \mu\text{m}$ 以下が得られている。また、表面粗さは2 nm (rms) に達しているが、光学系の結像性能はウォルターI型鏡の鏡面精度に大きく依存するため、継続的に製作工程の見直しと加工精度の向上に取り組んでいる。

軟X線3D顕微鏡の開発については、電子衝撃型X線源とウォルターI型鏡を用いたX線集光・結像光学系、およびX線撮像素子として裏面照射型CCDを組み合わせることで、実験室規模の実験装置を構築することに成功した。電子衝撃型X線源は、コンパクトな構造で取り扱いが容易であり、陽極ターゲット物質として酸化クロムを用いると、水の窓域の酸素 $K\alpha$ X線(525 eV)を発生させることができる。ウォルターI型鏡は、X線の利用効率が高くX線源に単色性を要求しないことから、電子衝撃型X線源との組み合わせに適している。集光用と結像用のウォルターI型鏡の設計パラメータは、X線の集光効率や拡大率、作製可能なウォルターI型鏡の内径等を考慮して決定し、実験装置の光学系の全長として実験室規模の3.4 mを実現した。

構築した実験装置の性能については、解像度チャートを試料とした二次元イメージング特性の評価から、500 nm L&Sのパターンが確実に解像でき、 $1.0 \text{ lp}/\mu\text{m}$ の空間周波数において5% - 10%の画像コントラストが得られることを確認した。また、マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーの三次元画像再構成の結果から、 $1 \mu\text{m}$ スケールの三次元構造を解像可能であることを明らかにした。更に、マウス腎臓の乾燥切片を試料として糸球体の三次元

構造を画像化することにも成功し、軟X線3D顕微鏡の生命科学分野への適用可能性を実証した。

現状の軟X線顕微鏡の実験装置には、幾つかの改良が必要がある。第1に、生きたままに近い状態での培養細胞や組織切片の観察を可能とするため、試料の含水凍結状態を保持できる冷却試料ステージを搭載する。第2に、結像用ウォルターI型鏡の斜入射角や拡大率等の光学系設計の見直しを行い、光学顕微鏡並みの分解能である200 nm L&Sを達成する。そして、第3の改良点は、X線源の強度の一桁以上の増強であり、これにより撮像時間の短縮を図る。これらの改良を加えることにより、軟X線3D顕微鏡は生命科学分野の研究者にとっての有用なツールとなる。

## 参考文献

- [1] K. Kinoshita, T. Matsumura, Y. Inagaki, N. Hirai, M. Sugiyama, H. Kihara, N. Watanabe, Y. Shimanuki, and A. Yagashita, “The electronic zooming tv read-out system for an x-ray microscope,” in “X-Ray Microscopy III,” , vol. 67 of *Springer Series in Optical Sciences*, A. G. Michette, G. R. Morrison, and C. J. Buckley, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1992), pp. 335–337.
- [2] S. Ohsuka, A. Ohba, M. Sugiyama, T. Hayakawa, T. Matsumura, K. Kinoshita, N. Watanabe, Y. Shimanuki, Y. Sano, and H. Kihara, “X-ray microscope with grazing incidence mirrors and a high resolution x-ray imaging apparatus,” in “X-Ray Microscopy III,” , vol. 67 of *Springer Series in Optical Sciences*, A. G. Michette, G. R. Morrison, and C. J. Buckley, eds. (Springer Berlin Heidelberg, 1992), pp. 164–166.
- [3] A. Ohba, T. Nakano, S. Onoda, and M. Sugiyama, “X-ray microscope with a gas-puff plasma x-ray source and grazing incidence mirrors,” in “Proceedings of the 8th International Conference on X-ray Microscopy,” (Institute of Pure and Applied Physics, 2006), pp. 50–52.
- [4] 大庭昌, 中野知康, 小野田忍, 大須賀慎二, “実験室規模の結像型蛍光X線分析顕微鏡,” 第72回応用物理学関係連合後援会, 2012年3月.
- [5] J. L. Carrascosa, F. J. Chichon, E. Pereiro, M. J. Rodriguez, J. J. Fernandez, M. Esteban, S. Heim, P. Guttman, and G. Schneider, “Cryo-x-ray tomography of vaccinia virus membranes and inner compartments,” *Journal of Structural Biology* **168**, 234–239 (2009).
- [6] H. Hertz, O. von Hofsten, M. Bertilson, U. Vogt, A. Holmberg, J. Reinspach, D. Martz, M. Selin, A. Christakou, J. Jerlstrom-Hultqvist, and S. Svard, “Labo-

- ratory cryo soft x-ray microscopy,” *Journal of Structural Biology* **177**, 267 – 272 (2012).
- [7] S. Ohsuka, A. Ohba, S. Onoda, K. Nakamoto, T. Nakano, M. Miyoshi, K. Soda, and T. Hamakubo, “Laboratory-size three-dimensional x-ray microscope with Wolter type I mirror optics and an electron-impact water window x-ray source,” *Review of Scientific Instruments* **85**, 093701 (2014).
- [8] S. Ohsuka, A. Ohba, S. Onoda, K. Nakamoto, T. Nakano, M. Miyoshi, K. Soda, and T. Hamakubo, “Laboratory-size three-dimensional water-window x-ray microscope with Wolter type I mirror optics,” in *AIP Conference Proceedings* (accepted).
- [9] F. Stanglmeier, B. Lengeler, W. Weber, H. Göbel, and M. Schuster, “Determination of the dispersive correction  $f'(E)$  to the atomic form factor from x-ray reflection,” *Acta Crystallographica Section A* **48**, 626–639 (1992).
- [10] M. Hüppauff and B. Lengeler, “Surface analysis of floatglass by means of x-ray absorption, reflection, and fluorescence analysis,” *Journal of Applied Physics* **75**, 785–791 (1994).
- [11] B. Henke, E. Gullikson, and J. Davis, “X-ray interactions: Photoabsorption, scattering, transmission, and reflection at  $e = 50\text{--}30,000$  eV,  $z = 1\text{--}92$ ,” *Atomic Data and Nuclear Data Tables* **54**, 181 – 342 (1993).
- [12] X-ray database at Center for X-Ray Optics, Lawrence Berkeley National Laboratory ([http://henke.lbl.gov/optical\\_constants/mirror2.html](http://henke.lbl.gov/optical_constants/mirror2.html)).
- [13] H. Wolter, “Spiegelsysteme streifenden Einfalls als abbildende Optiken für Röntgenstrahlen,” *Annalen der Physik* **10**, 94–114 (1952).
- [14] J.-F. Adam, J.-P. Moy, and J. Susini, “Table-top water window transmission x-ray microscopy: Review of the key issues, and conceptual design of an instrument for biology,” *Review of Scientific Instruments* **76**, 091301 (2005).
- [15] A. Owens, T. Mineo, K. J. McCarthy, and A. Wells, “Event recognition in x-ray CCDs,” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **346**, 353 – 365 (1994).
- [16] 浜松ホトニクス「光半導体素子ハンドブック」制作委員会編, 光半導体素子ハンドブック (浜松ホトニクス株式会社固体事業部, 2013), p. 116.
- [17] E. L. O’Neill, “Transfer function for an annular aperture,” *J. Opt. Soc. Am.* **46**, 285–288 (1956).
- [18] “Errata,” *J. Opt. Soc. Am.* **46**, 1096–1096 (1956).
- [19] J. A. Desanto and G. S. Brown, “Analytical techniques for multiple scattering from rough surfaces,” in “*Progress in Optics*,” , vol. 23, E. Wolf, ed. (Elsevier, 1986), pp.

- 1 – 62.
- [20] W. H. Richardson, “Bayesian-based iterative method of image restoration,” *J. Opt. Soc. Am.* **62**, 55–59 (1972).
- [21] L. B. Lucy, “An iterative technique for the rectification of observed distributions,” *Astron. J.* **79**, 745 (1974).
- [22] 坂井建雄, “Primers of nephrology-1 : 初心者のための腎臓の構造,” *The Japanese journal of nephrology* **43**, 572–579 (2001).
- [23] G. McDermott, M. A. L. Gros, C. G. Knoechel, M. Uchida, and C. A. Larabell, “Soft x-ray tomography and cryogenic light microscopy: the cool combination in cellular imaging,” *Trends in Cell Biology* **19**, 587 – 595 (2009).
- [24] J. C. Niclis, S. V. Murphy, D. Y. Parkinson, A. Zedan, A. H. Sathananthan, D. S. Cram, and P. Heraud, “Three-dimensional imaging of human stem cells using soft x-ray tomography,” *Journal of The Royal Society Interface* **12** (2015).
- [25] C. Hagen, P. Guttmann, B. Klupp, S. Werner, S. Rehbein, T. C. Mettenleiter, G. Schneider, and K. Grunewald, “Correlative vis-fluorescence and soft x-ray cryo-microscopy/tomography of adherent cells,” *Journal of Structural Biology* **177**, 193 – 201 (2012).
- [26] E. Duke, K. Dent, M. Razi, and L. M. Collinson, “Biological applications of cryo-soft x-ray tomography,” *Journal of Microscopy* **255**, 65–70 (2014).
- [27] 浜松ホトニクス株式会社 web サイト :  
<http://www.hamamatsu.com/jp/ja/technology/lifephotonics/environment/NonDestructiveInspection/index.html>.
- [28] P. Bleuet, G. Audoit, J.-P. Barnes, J. Bertheau, Y. Dabin, H. Dansas, J.-M. Fabbri, B. Florin, P. Gergaud, A. Grenier, G. Haberfehlner, E. Lay, J. Laurencin, R. Serra, and J. Villanova, “Specifications for hard condensed matter specimens for three-dimensional high-resolution tomographies,” *Microscopy and Microanalysis* **19**, 726–739 (2013).



## 第4章

# 生命科学分野に向けた軟X線3D顕微鏡の事業化検討

### 4.1 はじめに

筆者のグループは、第3章で述べたように、軟X線3D顕微鏡の概念実証用の実験装置を構築し、その生命科学分野への適用可能性を示してきた。そして、現在は、生命科学分野の研究者が研究に役立つ実用的なデータを取得できるレベルの完成度に装置を仕上げるべく、装置の改良を行っている。また、構築した実験装置を使って、共同研究を行っている生命科学分野の研究者から提供される生物試料の観察を行い、試料の保持方法や試料調整法等の試料周辺技術の開発にも着手している。このような状況にある筆者のグループの軟X線3D顕微鏡を、生命科学分野や材料科学分野の研究現場に有用なツールとして普及させるためには、軟X線3D顕微鏡を事業化する必要がある。そこで本章においては、軟X線3D顕微鏡の事業化検討として、事業コンセプトを明確にして事業評価を行い、更に事業化に向けたシナリオを作成する。事業コンセプトの明確化と事業評価に用いた分析・評価手法を表4.1に示す。

先ず、事業コンセプトを明確にするため、5W1H法、アトリビュート・マトリックス、および、消費チェーンを用いた分析を行う[1, 第4章]。5W1H法では、事業化をしようとしている製品に関して、「誰が(WHO)」「何を(WHAT)」「いつ(WHEN)」「どこで(WHERE)」「なぜ(WHY)」「どのように(HOW)」使うのかという質問に答えることで明確となる顧客の姿を通して、顧客のニーズを探りあてることができる。アトリビュート・マトリックスは、製品の仕様を製品に対して肯定的立場・否定的立場・中立的立場にとっての基本的特性・優勢的・決定的特性に分類する。肯定的立場にとっての基本的特性は絶対なだけでなく、決定的特性は購入の決定につながる仕様である。アトリビュート・マトリックスからは、企業がその製品に対してどのように行動すべきかが示唆される[2]。消費チェーンとは、顧客が「買いたい」と思ったときから「捨てる」ときまでの、顧客と製品の関わりであり、顧客の消費行動

表 4.1 事業化の検討に用いる分析・評価手法

検討項目		手法
事業コンセプトの 明確化	顧客ニーズの明確化	5W1H 法
	顧客にとっての仕様の位置付け	アトリビュート・マトリックス
	差別化の方針	消費チェーン
事業評価		BMO 法

の一連のステップ（ニーズの顕在化、選択、購入、支払、利用、…、廃棄）を含んでいる。そして、事業化を成功させるには消費チェーンのどこかで差別化をする必要がある。

次に、軟X線3D顕微鏡の事業化の可能性について、BMO法（提唱者である Bruce Merrifield & Ohe の頭文字から命名）[1, 第5章]を用いた評価を行う。BMO法は、候補事業の魅力がどの程度であり、その事業が自社の事業として適しているのかを数値化して評価する。評価に際しては、事業化5年後の軟X線3D顕微鏡の市場規模や5年間の平均市場成長率、事業化した場合の5年間の平均ROI (Return on Investment) 等の、幾つかの仮説を立てることになる。

最後に、事業コンセプトの明確化と事業評価の結果を踏まえて、軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたシナリオを作成する。

## 4.2 事業コンセプト

事業コンセプトとは、その事業がどのような顧客をターゲットとして、そのニーズやウォンツを満たす製品、サービスをどう提供していこうとしているのかを、整理して表したものである [3, p.23]。また、大江 [1] は、事業コンセプトを明確にする三要素として、①顧客、②提供する製品・サービスの仕様、③製品・サービスを提供する方法の差別化、を挙げている。

### 4.2.1 5W1H法による顧客ニーズの分析

軟X線3D顕微鏡に基づく事業が想定する顧客は、軽元素試料の三次元構造を高分解能で観察したい、生命科学分野の細胞や生物組織を扱う研究者、もしくは、材料科学分野の研究者である。ただし、第2章においてX線顕微鏡開発の歴史や現在の開発動向に見たように、X線顕微鏡の応用分野の主流が生命科学分野であり、また、第3章で述べたとおり、軟X線3D顕微鏡の開発が細胞や組織切片等の生物試料を当面のターゲットとしてきたことから、以下では、生命科学分野の研究者を、軟X線3D顕微鏡にとって最初に想定すべき顧客として位置付ける。なお、軟X線3D顕微鏡の材料科学分野への事業展開については、本章第4.5節において言及する。

生命科学分野の研究者の、軽元素試料の高分解能三次元構造観察技術についてのニーズを明確にする手法として、ここでは、前述の 5W1H 法を用いる。生命科学分野の研究者を軟 X 線 3 D 顕微鏡の顧客に想定すると（表 4.2 参照）、何を（WHAT）観察するのは、細胞や組織切片の三次元構造を観察する、となる。器官や個体（昆虫等）のマクロな試料の三次元構造の観察であれば投影型のマイクロ CT 装置を使うであろうし、細胞や組織切片の二次元構造であれば、光学顕微鏡を使って観察可能である。

次に、いつ（WHEN）細胞や組織切片の三次元構造観察をするのかについて考える。研究者の利便性に配慮すれば、研究の過程で必要な場合はいつでも観察できるのが望ましいが、共同利用の施設や装置を利用する場合には、予めマシンタイム（利用時間）を確保する必要があり、その時間に合わせて試料を用意して観察を行うことになる。従って、いつ（WHEN）観察するのは、どこで（WHERE）観察するのかと密接に関連し、研究者が必要な場合にいつでも観察できるようになるには、研究者が自分の実験室に軟 X 線 3 D 顕微鏡を置くことができれば良く、そうとなれば、研究者は自分の実験室で観察をすることになる。

細胞や組織切片をどのように（HOW）観察するののかについては、試料を乾燥して、試料中の特定のタンパク質を金の微粒子で染色して、あるいは、含水状態の試料をそのまま凍結して観察する等、いくつかの観察方法を取り得る。第 3 章で説明したように、軟 X 線 3 D 顕微鏡による観察、特に水の窓域（284 – 534 eV）の X 線を用いた観察の特徴は、染色をしなくても水と炭素を含むタンパク質等の物質とのコントラストが得やすいことにあり、観察方法（HOW）については、含水状態の試料をそのまま凍結して、となる。試料を凍結する理由（WHY）は、試料を凍結することで、細胞や組織の生きている状態（構造）を保持したままで固定することができ、試料を生きたままに近い状態で観察することが可能になるからである。

以上の 5W1H 法による軟 X 線 3 D 顕微鏡を使用する生命科学分野の研究者の描像から、生命科学分野研究者向けの軟 X 線 3 D 顕微鏡の仕様を導くことができる。試料の三次元構造を観察するためには、試料を回転させる回転ステージと各回転角において得られた画像から三次元再構成（トモグラフィ）を行うソフトウェアを搭載している必要がある。また、細胞や組織切片の構造を観察することが使用目的であるからには、分解能としては少なくとも光学顕微鏡を上回る、200 nm 程度以下が必要であろう。

必要な場合にはいつでも軟 X 線 3 D 顕微鏡で観察がしたい、というニーズに対しては、先ず、専門のオペレータが不要で研究者自ら操作できる、取扱いの容易さが必要である。また、午前中に試料の準備ができた場合には、その日の夕方に結果が得られる、すなわち、2 – 3 時間程度でデータ取得と三次元再構成までが終了すれば都合が良く、更に、午後に複数の試料の用意ができた場合に、一晩かけて、試料交換を含めた自動計測が可能で、翌朝には結果が出そろうていれば、なお好都合である。

共同利用の装置としてではなく、研究者が必要とする場合にはいつでも使える自前の装置として軟 X 線 3 D 顕微鏡を自分の実験室に設置できるためには、設置面積が普通の実験室に収ま

表 4.2 5W1H 法による軟X線3D顕微鏡の顧客層の描像（生命科学分野の研究者が使用する場合）

5W1H		選択肢	選択
WHO	誰が軟X線3D顕微鏡を使うのか	生命科学分野の研究者、材料科学分野の研究者、受託分析会社	生命科学分野の研究者
WHAT	生命科学分野の研究者は軟X線3D顕微鏡で何を観察するのか	細胞や組織切片の二次元構造、三次元構造	細胞や組織切片の三次元構造
WHEN	軟X線3D顕微鏡で試料の三次元構造をいつ観察するのか	装置の使用を予約して、必要な場合はいつでも	必要な場合はいつでも
WHERE	どこで軟X線3D顕微鏡を使って試料の三次元構造を観察するのか	SPring-8等の放射光施設、大学内の共同利用施設、自分の実験室	自分の実験室
HOW	どのように試料を観察するのか	試料を乾燥して、染色して、そのまま含水状態で凍結して	そのまま含水状態で凍結して
WHY	なぜ試料をそのまま凍結して観察するのか	試料を生きたままに近い状態で観察したいから	試料を生きたままに近い状態で観察したいから

る大きさ（4 m × 1 m 程度）であることが必要であり、また、購入に要する費用は、研究者の属する研究室、若しくは、学科・研究科といった小さな組織単位で賄えることが望ましい。

細胞や組織切片を、染色することなく、そのままの状態を観察するためには、水の窓域の軟X線源が搭載されている必要がある。また、試料の凍結状態を維持するための凍結試料ステージが搭載されている必要もある。

以上をまとめると、生命科学分野研究者向けの軟X線3D顕微鏡の仕様は、表 4.3 に示すようになる。

#### 4.2.2 アトリビュート・マトリックスに基づく仕様の分析

前小節において 5W1H 法を用いて生命科学分野研究者向けの軟X線3D顕微鏡の仕様を導き出した。以下では、これらの仕様について、あって当たり前で絶対になければならない「基本的特性」であるのか、あったほうが良い「優勢的特性」であるのか、あるいは、購入の決定につながる「決定的特性」であるのか、詳細な文献調査に基づいた位置付けを行う。

*Journal of Microscopy* (Impact Factor: 2.15, [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2818](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2818)) は、顕微鏡の諸形態、空間分解分光、組成マッピング

表 4.3 生命科学分野研究者向けの軟X線3D顕微鏡の仕様

ニーズ	必要な仕様
三次元構造を観察する	回転試料ステージ、および三次元再構成（トモグラフィ）ソフトウェアを搭載
細胞や組織切片を観察する	200 nm 以下の分解能（少なくとも光学顕微鏡の分解能を上回る）
必要な場合はいつでも観察したい	研究者自身が操作できる取扱いの容易さ
	2 - 3 時間でデータ取得と三次元再構成が完了する
	自動計測（試料交換を含む）が可能である
自分の実験室で使用する	普通の実験室に収まる設置面積
	小さな組織単位（研究室、若しくは学科・研究科）で購入可能な価格
そのまま凍結した試料を観察する	水の窓域（284 - 534 eV）のX線源を搭載
	試料を -50°C 程度以下に冷却可能な試料ステージを搭載

グ、画像解析を用いる科学者・技術者のための国際的な学術論文誌であり（“The *Journal of Microscopy* is for scientists and technologists that use any form of microscopy, spatially resolved spectroscopy, compositional mapping and image analysis.” 上記ウェブサイトより）、X線顕微鏡開発の動向を調べるには好適と考えられる。この *Journal of Microscopy* に掲載された論文に対して、論文のキーワードに“x-ray microscopy”または“x-ray tomography”を含むことを条件とした検索を行い、更に、アブストラクトの内容から判断してX線顕微鏡技術に関連する論文を選び出したところ、1995年 - 1999年の間に7件 [4-10]、2000年 - 2004年の間に14件 [11-24]、また、2005年 - 2009年と2010年 - 2014年の間にそれぞれ、10件 [25-34]、12件 [35-46] の論文が掲載されていた。5年毎の論文数に2000年以降は大きな差異は認められないことから、この間のX線顕微鏡開発のアクティビティに変化は無かったと考えられる。

その一方で、論文のタイトルとアブストラクトへの“resol”を含む単語の出現頻度を調べると、2000年 - 2004年の間に平均して1論文に対して1.64個の“resol”を含む単語が出現しているが、この期間をピークとして以降は減少傾向を示し、2010年 - 2014年の間では1論文当たり0.83にほぼ半減している（表4.4）。“resol”を含む単語とは、resolution、resolving、あるいはresolvedであり、いずれも分解能に関係する。論文のタイトルやアブストラクトは、その論文の主題が凝縮される場であり、そこへのこれらの単語の出現頻度が減少していることは、2010年以降、分解能の向上がX線顕微鏡開発における第1の課題ではなくなってきた

表 4.4 X線顕微鏡開発における「分解能」の位置付けの変遷 (*Journal of Microscopy* 掲載論文の傾向より)

期間	X線顕微鏡関連論文数	論文タイトルおよびアブストラクト中への“resol”の出現頻度(平均)
1995年～1999年	7	1.29
2000年～2004年	14	1.64
2005年～2009年	10	1.50
2010年～2014年	12	0.83

ると解釈することができる。既に、2004年には米国の放射光施設において、60 nm 分解能でイースト菌の三次元構造観察を行った報告 [47] があり、もはや、放射光施設のX線顕微鏡としては、100 nm 程度の分解能はあって当たり前の基本的特性になっている。

それでは、X線顕微鏡開発の焦点はどこへ移ったのだろうか。*Journal of Structural Biology* (<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-structural-biology/>) は、構造生物学に関する国際的な学術論文誌 (Impact Factor: 3.369) である。光学顕微鏡や電子顕微鏡、あるいはX線顕微鏡等あらゆる手段を用いた生体試料の構造解析を通して、生命機能の理解に迫ろうとする論文が掲載されている (上記ウェブサイトより) ため、X線顕微鏡が生命科学分野の研究現場においてどのように使われているかの動向は、*Journal of Structural Biology* 掲載のX線顕微鏡関連論文の動向から知ることができる。

*Journal of Structural Biology* 掲載論文から、X線を用いた二次元もしくは三次元構造の観察に関する論文を抽出するため、以下の検索式を適用し、検索結果の出版年毎の論文件数の推移を図 4.1 に白抜き黒四角のプロットで示した。

Search (1) tak("x-ray microscop?") OR tak("x-ray tomogra\*") OR tak("nanotomogra\*") OR tak("micro-tomogra\*") OR tak("x-ray imag\*")

なお、tak( ) は、括弧内の語句が論文のタイトル、アブストラクト、キーワードの何れかに現れることを意味する。図 4.1 の Search (1) の結果のプロットからは、X線顕微鏡による二次元もしくは三次元の構造観察に関する論文が、2006年頃からはほぼ毎年、掲載されるようになった、つまり、この頃からX線顕微鏡が構造生物学の研究現場で使われだしたことが見て取れる。2012年の論文数は突出しているが、これは、2012年2月発行の177巻第2号に「生物試料のX線顕微法」についての特集 (Focus Issue: X-ray microscopy of Biological Materials) が組まれたためであり、X線顕微法への注目が高まったと見ることができる。この特集に掲載された論文10件のタイトルを見て気付くことは、10件の内の半数の5件のタイトルに“cryo”と

いう語が現れていることである。クライオ (cryo) とは、生物試料のような水を含んだ試料をそのまま凍結することにより、生きたままに近い状態で観察を可能にする手法のことである。

X線顕微法と含水凍結状態での試料観察 (クライオX線顕微法) に関する論文が、いつから *Journal of Structural Biology* に現れるようになったのかを確認するため、前記の Search (1) の結果を “cryo” をキーワードとして絞り込む以下の検索を行い、クライオX線顕微法に関する論文件数の推移を図 4.1 に赤四角のプロットで示した。

Search (2) (tak(“x-ray microscop?”) OR tak(“x-ray tomogra\*”) OR tak(“nano-tomogra\*”) OR tak(“micro-tomogra\*”) OR tak(“x-ray imag\*”)) AND abs(cryo)

ここで、abs( ) は、括弧内の語句が論文のアブストラクト中に現れることを意味する。図 4.1 より、クライオX線顕微法は、2009年頃から構造生物学の研究現場で使われ始めたと考えられる。従って、クライオX線顕微法は、X線顕微鏡開発の焦点、今まさに利用が広がりつつある “旬な” 手法であり、試料の含水凍結状態を保持できる試料ステージを搭載することは、軟X線3D顕微鏡の仕様として優勢的特性であると位置付けることができる。

実験室規模のサイズであることの位置付けを考える材料として、前記の検索式 Search (2) により抽出された 12 件の論文 [48–59] の研究が、どのような施設において実施されたのかを調べた。その結果、11 件の論文は放射光施設 (BESSY II\* (独) 7 件、ALS<sup>†</sup> (米) 3 件、ESRF<sup>‡</sup> (仏) 1 件) において実施された研究に関する内容であり、実験室規模のクライオX線顕微鏡に関する論文は僅か 1 件 [51] のみであった。このことは、生命科学の研究者にとってのクライオX線顕微鏡へのアクセシビリティ (利用可能性) が極めて限定的であることを示していると考えられる。現状では、研究者がクライオX線顕微鏡を利用して自身の研究に必要な試料観察をしたい場合には、先ずマシンタイムを確保し、それに合わせて試料を用意して放射光施設へ運んで実験を行う。得られた結果に基づき新たな実験を計画しても、次のマシンタイムを確保できるまで待たなければならない。これに対して、実験室規模のクライオX線顕微鏡を生命科学分野の研究者自身の実験室に置くことができれば、研究の一連のプロセス (実験 → 結果の解析 → 次の実験の計画と準備 → 実験) を効率的に遂行することが可能となる。研究の効率的遂行がもたらす価値は大きく、装置サイズが実験室規模であり研究者自身の実験室に設置可能であることは、軟X線3D顕微鏡の仕様として決定的特性に位置付けられる。そもそも、装置サイズが実験室規模になってはじめて、一般の (放射光施設に籍を持たない) 研究者が軟X線3D顕微鏡の購入を考えることができるようになる。なお、実験室規模のクライオX線顕微鏡に関する 1 件は、スウェーデン王立工科大学 (KTH) のグループが開発しているレーザーブ

\*Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung II

<sup>†</sup>Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory

<sup>‡</sup>European Synchrotron Radiation Facility

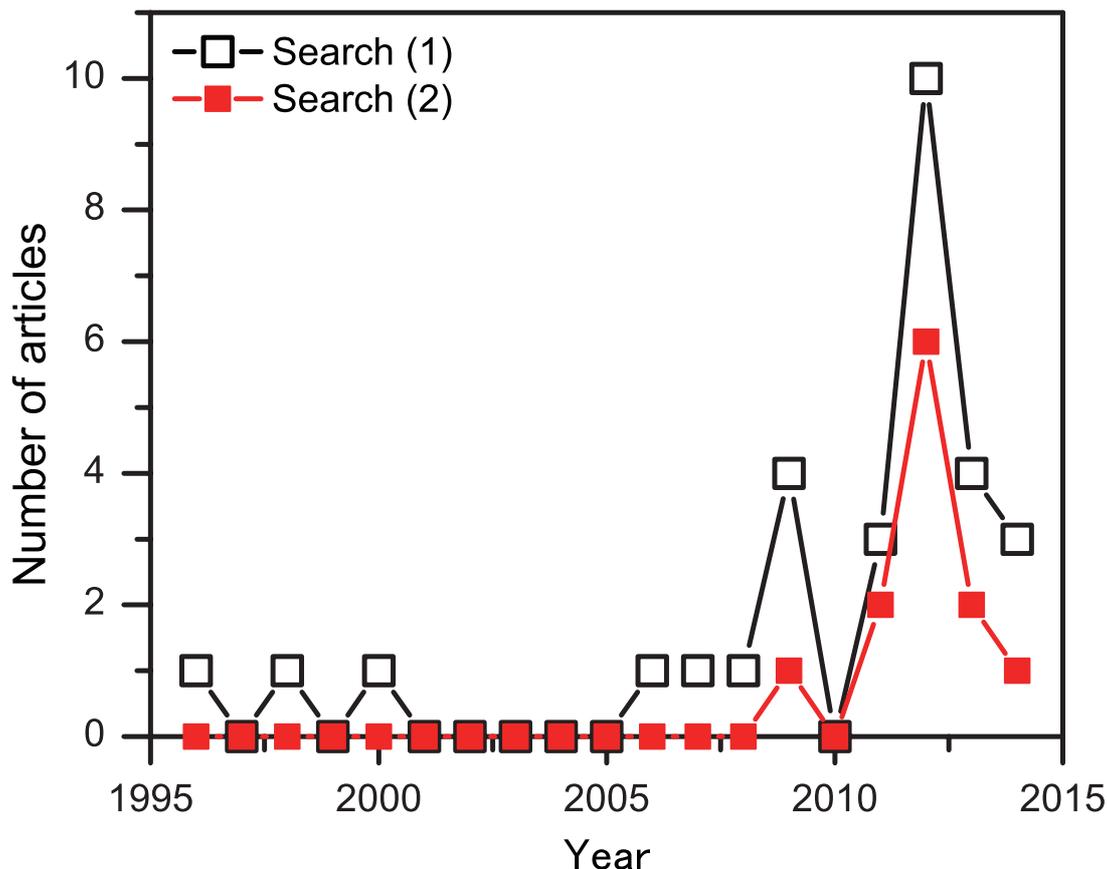


図 4.1 *Journal of Structural Biology* へ掲載されたX線顕微法 (Search (1) 白抜き黒四角)、および、クライオX線顕微法 (Search (2) 赤四角) に関する論文数の推移

ラズマX線源を用いたクライオX線顕微鏡に関する論文である。詳細は、第2章第2.4.2節と表2.2に記述してある。

ここまでの文献調査による軟X線3D顕微鏡の仕様の特性についての検討結果に基づき、ここからは、軟X線3D顕微鏡のアトリビュート・マトリックスを作成する。アトリビュート・マトリックス [1, 第4章] とは、表4.5に示すように、製品・サービスの仕様を顧客の立場（肯定的立場・否定的立場・中立的立場）と前述の仕様の特性（基本的特性・優勢的特性・決定的特性）によって分類した表である。製品・サービスの購入に肯定的な立場にとって、基本的特性は「あって当たり前」、優勢的特性は「ちょっと違う」と感じ、決定的特性に「興奮する」ことになる。それに対して、否定的な立場に立つと、基本的特性は「我慢できる」が、優勢的特性には「文句を言いたい」となり、決定的特性で「何だこれは」となる。中立的な立場については、基本的特性は「だから何なの」、優勢的特性でも「おまけなら欲しい」程度の反応と考えられる。

軟X線3D顕微鏡の仕様については、第3章第3.6節で説明した今後の開発目標の達成を前

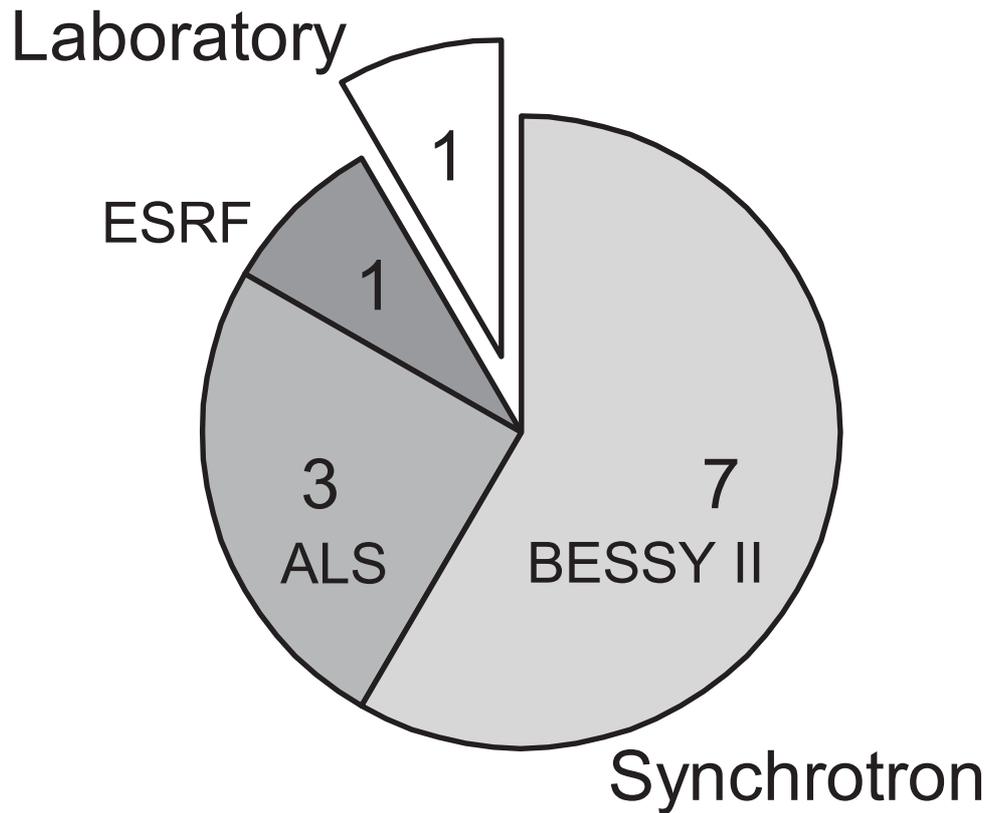


図 4.2 *Journal of Structural Biology* に掲載されたクライオX線顕微鏡 [48–59] の設置場所

BESSY II: Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung II

ALS: Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory

ESRF: European Synchrotron Radiation Facility

提として、アトリビュート・マトリックスによる分析を行う。なお、軟X線3D顕微鏡の市場は中立的立場を含める必要があるほど成熟してはいないため、以下の分析では中立的立場についての考察は省略する。

想定する軟X線3D顕微鏡の性能・仕様は、以下の通りである。

- ・ 200 nm L&S (ライン&スペース) の構造を解像できる分解能で、10  $\mu\text{m}$  程度の厚さの試料の三次元構造観察が可能。
- ・ 水の窓域 (284 – 534 eV) の酸素  $K\alpha$  X線源を搭載する。
- ・ 真空中で試料の含水凍結状態を保持する冷却試料ステージを搭載する。
- ・ 普通の実験室に設置可能な 4 m  $\times$  1 m  $\times$  1.5 m (W  $\times$  D  $\times$  H) 程度の大きさである。
- ・ 価格は 5000 万円から 1 億円。

前述した文献調査の結果から明らかになったように、分解能については、軟X線3D顕微鏡に肯定的な立場にとっても基本的特性であり、「200 nm L&S の構造を解像できる分解能で、10

表 4.5 アトリビュート・マトリックス [1, 第4章]

	基本的特性	優勢的特性	決定的特性
肯定的立場	あって当たり前	ちょっと違う	興奮する
否定的立場	我慢できる	文句を言いたい	何だこれは
中立的立場	だから何なの	おまけなら欲しい	

μm 程度の厚さの試料の三次元構造観察が可能」であることは、もはや当たり前の仕様である(表 4.6)。その一方で、分子レベルの分解能を手にした電子顕微鏡ユーザーや、従来の光学顕微鏡分解能の限界を打破する超解像顕微法のユーザーにとっては、これ以下の分解能では、否定的立場を決定づける特性になりかねない。また、水の窓域の酸素 K $\alpha$  X線源を搭載し、真空中で試料の含水凍結状態を保持する冷却試料ステージを搭載していることは、軟X線3D顕微鏡に肯定的な立場にとっての優勢的特性に該当し、普通の実験室に設置可能な大きさであることは、同立場にとっての決定的特性に該当する。

軟X線3D顕微鏡と同じ高分解能三次元構造観察のための装置である透過型電子顕微鏡やレーザー顕微鏡の価格がおよそ3000万円から1億円の範囲にある[60]ことから、軟X線3D顕微鏡の価格として5000万円から1億円を想定していることについては、「我慢できる」範囲にあると考えられる。

文献調査に基づいて作成した表 4.6 のアトリビュート・マトリックスが、実際の顧客にとっての特性と合致しているかを確認するため、共同研究を行っている生命科学分野の研究者との面談を2015年5月に行った。面談で得られたコメントの概略は以下の通りである。

① 水の窓域のX線源と冷却試料ステージの搭載について

水が存在する状態は重要であり、クライオ電子顕微法により分子の結合状態が観察できるように、クライオX線顕微法も細胞集合の観察に有効だろう。

② 200 nm L&S の分解能について

より高分解能を期待するが、200 nm L&S の分解能で何が見えるかが重要である。

表 4.6 軟X線3D顕微鏡のアトリビュート・マトリックス

	基本的特性	優勢的特性	決定的特性
肯定的立場	200 nm L&S の構造を解像できる分解能で、10 $\mu\text{m}$ 程度の厚さの試料の三次元構造観察が可能である。	水の窓域 (284 – 534 eV) の酸素 $\text{K}\alpha$ X線源を搭載する。 真空中で試料の含水凍結状態を保持する冷却試料ステージを搭載する。	普通の実験室に設置可能な 4 m $\times$ 1 m $\times$ 1.5 m 程度の大きさである。
否定的立場	価格が 5000 万円から 1 億円もする。	使い勝手が今一つ良くない。	分解能に満足できない。

## ③ 5000 万円から 1 億円の価格について

何が見えるか次第である。価格だけでなく、ランニングコスト（消耗品、オペレーター人件費等）も考慮される。

## ④ その他

使い勝手が良くないことは、否定的立場にとっては決定的特性であろう。研究者自身で容易に操作できる必要がある。

コメント①は、水の窓域のX線源と冷却試料ステージが搭載されていることを肯定的立場の優勢的特性に位置付けたことの裏付けとなる。また、コメント②の前半から、200 nm L&S の分解能を肯定的立場にとっての基本特性に位置付けたことは妥当であったと言える。コメント②の後半、およびコメント③からは、200 nm L&S の分解能であっても、軟X線3D顕微鏡でなければ見るのできない画像、5000 万円から 1 億円の装置価格に見合った価値ある情報が得られるのであれば、分解能が期待通りではなく価格が高いことも我慢が出来る（否定的立場にとっての基本的特性）と考えられる。否定的立場にとっての決定的特性は、コメント④に基づいて、分解能から使い勝手に置き換えた。表 4.7 に研究者との面談後に改訂したアトリビュート・マトリックスを示す。

以上のアトリビュート・マトリックスによる分析に基づき、今後の軟X線3D顕微鏡の開発方針は、以下のように定められる。

1. ウォルター I 型鏡の高精度化と光学系設計の見直しにより、200 nm L&S を解像する分解能を達成する。
2. 真空中で試料の含水凍結状態を保持できる冷却試料ステージ、および凍結試料の取り扱いに関する試料周辺技術を開発する。

表 4.7 軟X線3D顕微鏡のアトリビュート・マトリックス（生命科学分野の研究者との面談の後に改訂）

	基本的特性	優勢的特性	決定的特性
肯定的立場	200 nm L&S の構造を解像できる分解能で、10 $\mu\text{m}$ 程度の厚さの試料の三次元構造観察が可能である。	水の窓域 (284 – 534 eV) の酸素 $\text{K}\alpha$ X線源を搭載する。 真空中で試料の含水凍結状態を保持する冷却試料ステージを搭載する。	普通の実験室に設置可能な 4 m $\times$ 1 m $\times$ 1.5 m 程度の大きさである。
否定的立場	価格が 5000 万円から 1 億円もする。 分解能が物足りない。	—	使い勝手に満足できない。

3. ハードウェアとソフトウェアの両面から、使い勝手を向上させる。

4. 軟X線3D顕微鏡を特徴づける、他の高分解能三次元構造観察技術では得られない観察事例を、探索して蓄積する。

500 nm L&S を確実に分解できる程度の現状の分解能では、肯定的立場の基本的特性に達していない。まずは、ウォルター I 型鏡の作製技術を向上させ鏡面の高精度化を図るとともに光学系設計の見直しにより、光学顕微鏡の分解能限界である 200 nm L&S を達成し、更にはそれを凌駕する必要がある。

水の窓域にある酸素  $\text{K}\alpha$  X線を発生する電子衝撃型X線源の原理実証は既に済んでいて、現在はX線強度の増強を進めている段階である。水の窓X線は、含水状態の試料の観察において、その真価を発揮する。従って、今後は、真空中で試料の含水凍結状態を保持する冷却試料ステージと凍結試料の取り扱いに関する試料周辺技術を、早急に自前の技術として確立することを目指す。これにより、今まさに広がりつつあるクライオX線顕微法のトレンドに乗ることが可能となる。

軟X線3D顕微鏡が普通の実験室に設置できるサイズであることは、既に実現できている。普通の実験室に設置することができれば、研究者自らが、軟X線3D顕微鏡を操作することも可能となる。そうなった場合に、軟X線3D顕微鏡の操作性（使い勝手）が、研究者がストレス無く使えるレベルに達していなければ、普通の実験室に設置できるサイズであることの価値が大きく損なわれてしまうだけでなく、否定的立場を決定的にしてしまう。従って、装置の起動から、試料のセット、データ収集を経て、最終的な三次元再構成像の出力に至るまでの装置全体の使い勝手を、ハードウェアとソフトウェアの両面から向上させることが必要となる。

光学顕微鏡でも電子顕微鏡でもなく、軟X線3D顕微鏡を研究者に選んでもらうためには、

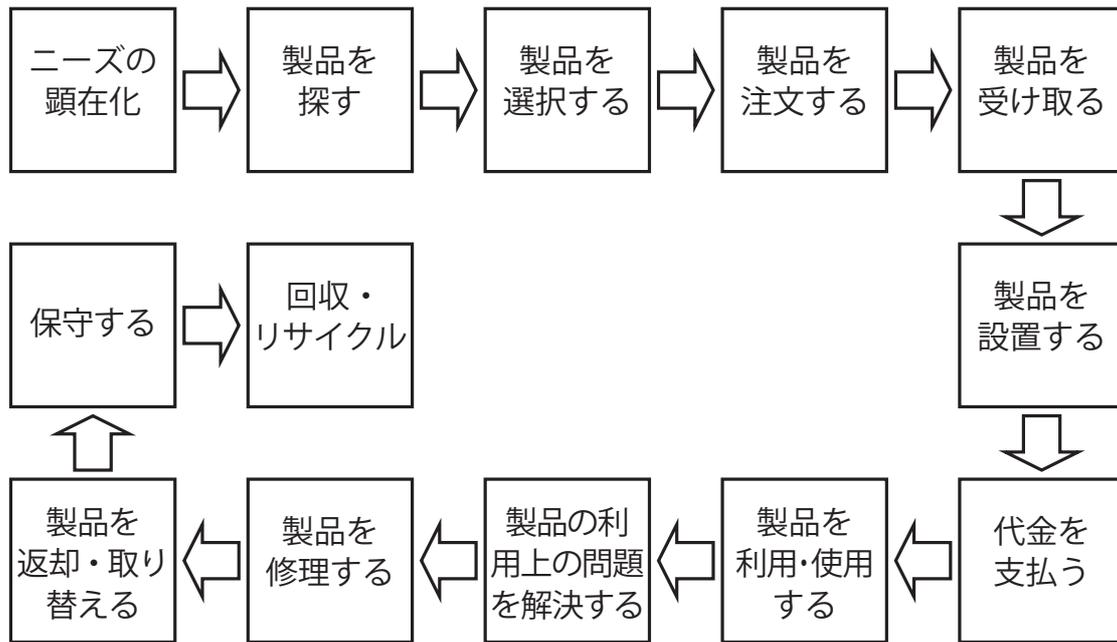


図 4.3 消費チェーン（大江による図 [1, 図表 4-11] を筆者が一部改変して作成）

軟X線3D顕微鏡の価値を研究者に納得してもらう必要がある。軟X線3D顕微鏡の特徴を活かした、他の高分解能三次元構造観察技術では得られない観察事例を探索・蓄積して、新規ユーザー獲得のためのプロモーションに役立てる。

### 4.2.3 消費チェーンにおける差別化の検討

消費チェーンとは、顧客が「買いたい」と思ったときから「捨てる」ときまでの、顧客と製品の関わりであり、顧客の消費行動の一連のステップ（ニーズの顕在化、選択、購入、支払、利用、…、廃棄）を含んでいる。そして、大江 [1] によれば、「どんな事業でも、この消費チェーンのすべての段階で差別化をする必要も意味もないし、実際にそれは不可能である。反面、最低一つのステップさえも差別化できなければ、新規事業を始める資格もないし、恐らく成功もしないだろう。」とある。

本章の冒頭で述べたように、筆者のグループでは現在、構築済みの軟X線3D顕微鏡の実験装置に改良を加え、前節で検討した生命科学分野向けの仕様を前提としたプロトタイプの開発に取り組んでいる。また、生命科学分野の研究者との間の協力関係を活用し、実際の生物試料を用いて試料周辺技術の開発にも着手している。このような筆者のグループの軟X線3D顕微鏡の開発状況は、国内においては他に先行していると言える。そして、この状況を活用することで、消費チェーンの「ニーズの顕在化」「製品を探す」「製品を選択する」「製品の利用上の問題を解決する」の4つのステップにおいて、差別化を図ることが可能であると考えられる。

表 4.8 軟X線3D顕微鏡の消費チェーンにおける差別化の方法

ステップ	差別化の方法
潜在ニーズの顕在化	軟X線3D顕微鏡が普通の実験室に設置可能であることと、その使い勝手の良さをアピールする ⇒ 「これならば自分でも使えるかも」と研究者に思わせて潜在ニーズを掘り起こす
製品を探す	共同研究先の大学の研究者に、主要な学会や学術論文誌で、軟X線3D顕微鏡による観察結果を公表してもらう ⇒ その分野のコミュニティ内での軟X線3D顕微鏡の認知度をアップさせる
製品を選択する	共同研究先の大学の研究者に、主要な学会や学術論文誌で、実際に研究に用いる試料（培養細胞や組織切片）の軟X線3D顕微鏡による観察結果を公表してもらう ⇒ 「この試料がこのように観察できるのなら…」との発想から軟X線3D顕微鏡が選択される
製品の利用上の問題を解決する	様々な種類の試料についての観察の記録を観察事例集として蓄積する ⇒ 客先での試料観察で発生した問題に対して、観察事例集を活用して適切な対応を提案することが可能となる

表 4.8 に、上記の 4 ステップのそれぞれにおいて差別化を図るための方法を示した。まず、軟X線3D顕微鏡が普通の実験室に設置可能であることと、その使い勝手の良さをアピールすることにより、放射光施設へのアクセスの無い研究者に「これならば自分でも使えるかも」と思わせ、クライオX線顕微法に対する潜在的なニーズを顕在化させることができる。次に、共同研究を行っている大学の研究者に、実際に研究に用いる試料（培養細胞や組織切片）の軟X線3D顕微鏡による観察結果を、主要な学会や学術論文誌に発表してもらうことで、その分野のコミュニティ内で軟X線3D顕微鏡が認知されるようになる。その結果として、自らの研究に適用できる高分解能三次元構造観察の手法を求めている研究者の目にとまり、「この試料がこのように観察できるのなら…」との発想から、軟X線3D顕微鏡が選択されることが期待できる。また、プロトタイプ開発の段階から、共同研究先の大学の研究者や、そこから紹介された研究者に軟X線3D顕微鏡を試用してもらい、様々な種類の試料についての観察の記録を観察事例集として蓄積する。この観察事例集には、実際に試料を観察する際に生じた問題やその解決法が含まれることになるので、客先における実試料の観察の際に問題が生じた場合に、観察事例集を活用して適切な対応を提案することが可能となる。

## 4.3 事業評価

### 4.3.1 BMO 法

ここでは、軟X線3D顕微鏡の事業化の可能性について、BMO法に基づいて評価を行う。BMO法では、まず、夢の新規事業を考える。夢の新規事業とは、市場規模は非常に大きく、成長性も高く、競争相手は存在せず、資金に百億円が必要でも全額を自社で用意でき、現有の販売網、製造設備、技術力が利用できる、等々の理想的な状況に置かれた新規事業である。そして、この夢の新規事業から、候補事業—本論文では軟X線3D顕微鏡に基づく事業—がどのくらい隔たった位置にあるのかを、明確にする評価手法である。具体的には、候補事業がどの程度の魅力のある事業であるかを示す魅力度と、その事業が自社の事業として適しているのかを示す適社度を、表4.9に示す12指標に基づいて数値化して評価する。提唱者によれば、魅力度と適社度の評価点を合計した事業度（＝魅力度＋適社度）と事業の成功率との間には、経験的な相関関係が得られているため、事業度に基づいて事業が成功する可能性を判断することができる。また、BMO法を複数の企業の開発プロジェクトに適用した報告[61]においても、魅力度が高くかつ適社度の高いプロジェクトは総じて事業化に成功し、両者とも低いプロジェクトは撤退や中止になっていることが確認されている。

BMO法による事業評価の特徴は、新規事業の魅力度・適社度といった抽象的な概念を、具体的に把握できる指標に基づいて定量化できることにある。数値化することで新規事業の抱える矛盾点や弱点、事業化する場合の課題を明確にできる。このような利点がある一方で、「魅力度」「適社度」を評価する12指標に過不足は無いのか、各指標の評価における重みは同等なのか、といった点をBMO法の問題点とする指摘もある[62]。また、ベンチャー企業による新規事業の事業性評価には、BMO法的な考え方は適していない、との指摘もある[63]。しかし、BMO法は元々、比較的規模の大きな企業が社内で新規事業を起こす場合に適用されることを想定した手法である。筆者の所属する企業の規模を考えれば、軟X線3D顕微鏡の事業化は、まさにBMO法が想定するケースである。従って、本論文では、数値化によるわかり易さの利点を探り、BMO法に基づいて軟X線3D顕微鏡の事業評価を行う。

### 4.3.2 魅力度

事業の魅力度は、①市場規模・利益の可能性、②市場の成長性、③競争力（競合状況）、④リスクの分散、⑤業界の再構築、⑥特別な社会的状況、の6つの指標に基づいて評価される。この中で、市場規模は5年後に事業が立ち上がるとして、その時点での市場規模を想定して評価する。総じて、魅力度は、未来における市場の評価となる。軟X線3D顕微鏡に基づく事業の魅力度を評価した結果を、表4.10に示す。また、以下では、各指標での評価点の基となる仮

表 4.9 BMO 法における 12 の評価指標 [1, p.161]

魅力度	適社度
市場規模	資金力
成長性	マーケティング力
競争力	製造力
リスク分散	技術力
業界の再構築	原材料の入手力
社会的優位性	事業推進力

説とその根拠について説明を加える。

#### 市場規模・利益の可能性

■5年後の市場規模 生命科学分野向けの実験室規模のX線顕微鏡は、少なくとも国内では未だ事業として立ち上がっていないため、市場規模に関するデータは入手困難である。そこで、X線顕微鏡と同じく、高分解能三次元構造観察を可能とするレーザー顕微鏡（共焦点レーザー顕微鏡、および多光子励起顕微鏡）と透過型電子顕微鏡の国内市場規模 [60] を援用する。第2章で見たように、生物学用のレーザー顕微鏡の2013年度実績の国内市場規模は、7,739百万円と推定されている。2010年を起点とする台数ベースの年平均成長率は+0.1%であることから、生物学用のレーザー顕微鏡の国内市場は成熟期にあると見ることができる。従って、X線顕微鏡の市場が立ち上がって5年後の市場規模が、成熟期の半分程度と仮定すれば、生物学用のレーザー顕微鏡の国内市場規模の半分として、およそ40億円と推定できる。また、透過型電子顕微鏡の国内市場も、ここ数年の動きから補正予算の影響を除けば、成熟期にあると見ることができ、医療分野やバイオ系が需要先の一つとなっている汎用型の透過型電子顕微鏡の2012年度、2013年度の販売実績は、それぞれ、29台、51台と推定され、2014年度については33台と予測されている。これらの数字から、軟X線3D顕微鏡の市場が成熟期における市場規模を30~40台、立ち上がり後5年時点の市場規模を20台と仮定し、軟X線3D顕微鏡の販売価格を7,000万円とすれば、市場規模は14億円と推定される。（評価：2点）

評価基準	1000億円以上	5点
	500億円以上、1000億円未満	4点
	100億円以上、500億円未満	3点
	10億円以上、100億円未満	2点
	10億円未満	1点

■平均 ROI 利益の可能性については、投資効率 ROI (Return on Investment) に基づいて評価する。5年間の平均 ROI を計算するため、以下に示す投資と利益の大雑把な計画を作成した。

(百万円)	1年	2年	3年	4年	5年
売上	0	70	70	140	140
製造原価	0	30	30	60	60
固定費（人件費他）	20	20	20	20	20
減価償却費	40	29	20	15	12
営業利益	-60	-9	0	45	48
累計営業利益	-60	-69	-69	-24	24
設備投資	140	0	0	0	0

ここで、軟X線3D顕微鏡の売上に関しては、販売価格を70百万円、製造原価を30百万円と仮定した。また、人件費の固定分等の固定費を20百万円/年とした。初年度の期首に140百万円の設備投資を行い、耐用年数7年（電気機械器具製造業用設備）の定率法（償却率：0.5）により減価償却費を計算した。5年間の累計営業利益は24百万円であり、5年間の投資総額は設備投資の140百万円に1年目と2年目の営業赤字の補填を加えて209百万円となる。従って、5年間の平均 ROI は、累計営業利益を投資総額で除した11.5%となる。（評価：3点）

評価基準	20% 以上	5 点
	15%～19%	4 点
	10%～14%	3 点
	5%～9%	2 点
	1%～4%	1 点
	1% 未満	0 点

### 市場成長率

市場成長率については、最近になって急速に市場が立ち上がりつつある、超解像顕微鏡の国内市場の成長率を援用する。超解像顕微鏡は、技術的な説明は省くが、通常の光学顕微鏡よりも高い数10 nmの分解能が得られ、電子顕微鏡では困難な生きた細胞の観察、ライブセルイメージングを可能にする顕微鏡である [64]。2014年のノーベル化学賞は、超解像蛍光顕微鏡の開発に贈られている。超解像顕微鏡の国内市場規模は、2011年度実績で690百万円、2014年度予測として1,215百万円と推定されている [60]。3年間の年平均成長率は+20.8%となるので、これを5年間に引き伸ばして、X線顕微鏡市場の成長率（5年平均）を+12.0%と仮定

する。(評価：6点)

評価基準	年20%程度	10点
	年14%程度	7点
	年10%程度	5点
	年6%程度	3点

### 競合状況

競合状況については、先発企業の対応力、商品寿命、および特許等の強さを評価する。

■先発企業の対応力 実験室規模のX線顕微鏡としては、第2章においてX線顕微鏡の現在の開発動向について概観した中でも触れたが、ZEISSとBRUKERが先発している。国内の生命科学分野向けのX線顕微鏡については、市場としてはまだ立ち上がっていない状況であるが、ZEISSは生物用光学顕微鏡の業界においては主要な企業であり、その対応力には警戒を要する。また、BRUKERについても、X線顕微鏡は未だ日本国内に入ってきてはいないものの、産業用のマイクロCT市場へは参入済みであり、また、分析機器メーカーとしても名が通っていることから、その動向にも注意を払う必要がある。従って、評価点は1点とする。

■商品寿命 X線顕微鏡と同じ高分解能三次元構造観察のための装置であるレーザー顕微鏡と透過型電子顕微鏡について、「科学機器年鑑2014年版」に収録されている機種別の販売実績表には、5年間にわたって販売台数が記載されていることから、X線顕微鏡の商品寿命についても5年間はあるものと仮定する。実際、ZEISSに買収される以前にXradia社が開発したX線顕微鏡(UltraXRM-L200)の日本国内独占販売権をキャノンマーケティングジャパン株式会社が取得したとの発表が、2010年9月14日付であり[65]、UltraXRM-L200とほぼ同じ機種[66]が現在のZEISSの製品ラインアップに含まれていることから、X線顕微鏡の商品寿命を5年とする仮定は裏付けられる。(評価：3点)

評価基準	5年程度	3点
	3年程度	2点
	3年未満	1点

■特許等の強さ 軟X線3D顕微鏡のコア技術であるウォルターI型鏡の作製は、ノウハウ・経験等の暗黙知に支えられているために、短期間での模倣は困難である。また、プロトタイプの開発を通して、熟知している光学系周辺、あるいは自社技術であるX線源周辺における技術的工夫から、有効な特許の取得も期待できる。ただし、筆者のグループが採用しているガラスレプリカ法とは異なる技術により、ウォルターI型鏡が作製されるようになる可能性も十分に

ある。その可能性が現実のものとなれば、ガラスレプリカ法に関するノウハウの価値が損なわれるため、評価点は1点とする。

評価基準	排他的な強い特許群がある	3点
	クロスライセンスができる程度	2点または1点
	特許・ノウハウ・知的財産権等が存在しない	0点

#### リスクの分散

この指標は、市場を細分化することでリスクが分散できるかを評価する。事業化する技術が複数の分野へ応用が可能であれば、ある分野で競合が現れて利益が圧迫されても、別の分野へ参入することができる。軟X線3D顕微鏡は、先ずは生命科学分野向けに事業化を図るが、材料科学分野も有力な応用分野である。また、科学分野によるセグメンテーションとは別の視点から、分析業務を専門的に請け負う受託分析業界も応用先の1つと考えられる。(評価：6点)

評価基準	5種類以上	10点
	4種類の場合	8点
	3種類の場合	6点
	2種類の場合	4点
	1種類しかない場合	2点

#### 業界の再構築

本来は、革新的技術やノウハウにより業界の再構築を導き出す可能性や既存の市場構造を打破する可能性を評価する指標であるが、ここでは、業界を研究分野と読み替えて、軟X線3D顕微鏡が適用される研究分野の研究スタイルへ及ぼす影響の大きさを評価することにする。実験室規模の軟X線3D顕微鏡を提供することで、X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察を、生命科学分野や材料科学分野の研究者自身の実験室で可能とすることができる。従来は、大規模放射光施設にアクセス可能な研究者に限られていたツールを誰もが使えるようになることから、その影響は革新的である。(評価：7点)

評価基準	商品（サービス）、販売形態のどちらかが革新的である	最大10点
	革新的とはいわなくてもこの業界では初めて	7点
	商品の改良版などや安価版は点が低い	3点

### 特別な社会的状況

この指標は、政治的問題、公正取引上の問題、社会環境上の問題が、この事業にどのような影響を与えるかを評価する。第1章において本研究の背景として、政府の「科学技術イノベーション総合戦略2014」の中で、ナノテクノロジーが基盤的な分野横断技術として取り上げられていることを指摘した。また、健やかな高齢化社会、あるいは省エネルギー化社会を志向する機運から、バイオナノテクノロジーやグリーンナノテクノロジーへの期待も高い。X線顕微鏡は、軽元素試料の観察に好適であり、バイオナノテクノロジー、グリーンナノテクノロジーを下支えすることが可能な技術である。以上から、社会環境的状況についてはプラス評価をする。(評価：6点)

評価基準	好影響も悪影響もない	5点
	悪影響の1つ毎に	1点ずつ下げる
	好影響の1つ毎に	1点ずつ上げる

### 4.3.3 適社度

事業の適社度は、①資金力、②マーケティング力、③製造力・オペレーション力、④技術力、⑤原材料入手力、⑥事業推進力、の6指標についての現時点での評価により与えられる。軟X線3D顕微鏡に基づく事業の筆者の所属企業への適社度を評価した結果を、表4.11に示す。また、以下では、各指標での評価点の基となる仮説とその根拠について説明を加える。

#### 資金力

限られた企業しか出せないほどの多額の資金が必要であっても、自社が対応可能な場合の資金力は10点と評価される。逆に、必要資金が少額でどの企業でも賄える場合は5点とする。

軟X線3D顕微鏡の事業化に必要な投資額を209百万円とした。筆者の所属する企業の2014年9月期の連結売上高は112,100百万円、開発費は対売上高9.8%の約11,000百万円であるので、投資額209百万円は、経営層の承認が得られれば十分に賄える。ただし、他の企業でも賄える額であるため、資金力については5点と評価する。

#### 現有マーケティング力

既存の生命科学分野向けの販売チャネルを利用できる可能性がある。また、共同研究先の研究者が持つ学術的なネットワークを介しての、口コミによる評判の拡散も期待できるので、現有マーケティング力の評価は7点とする。

表 4.10 軟X線3D顕微鏡に基づく事業の魅力度

評価指標	最大 評点	評価 点	評価点の基となる仮説
市場規模と利益	10	<b>5</b>	
5年後の市場規模	5	2	生物学用のレーザー顕微鏡、および汎用透過型電子顕微鏡の市場規模を援用して、14～40億円と仮定した
平均ROI	5	3	5年間の投資総額209百万円に対して累計営業利益を24百万円と見込んで、平均ROIを11.5%と仮定した
市場成長率	10	<b>6</b>	超解像顕微鏡の市場成長率を援用して、+12.0%と仮定した
競合状況	10	<b>5</b>	
先発企業の対応力	4	1	ZEISSの生命科学分野への対応力には警戒を要する。BRUKERの動向にも注意を払う必要あり
商品寿命	3	3	レーザー顕微鏡と透過型電子顕微鏡の製品寿命を参考に、5年間と仮定
特許等の強さ	3	1	ウォルターI型鏡の作製は、ノウハウ・経験等に支えられている。プロトタイプの開発を通して、自社技術の周辺で有効な特許取得も期待できる。ただし、ガラスレプリカ法とは異なる技術でウォルターI型鏡が作製される可能性もある
リスクの分散	10	<b>6</b>	生命科学分野、材料科学分野、受託分析業界
業界の再構築	10	<b>7</b>	実験室規模の軟X線3D顕微鏡は、X線による高分解能三次元構造観察技術の利用機会の拡大、という点において革新的である
特別な社会的状況	10	<b>6</b>	「科学技術イノベーション総合戦略2014」の中にナノテクノロジーについて言及されていることからプラス評価
魅力度（5年後時点）	60	<b>35</b>	魅力のある事業である

### 現有製造力

ウォルター鏡等の製造に関しては、現有の設備・開発人材を転用することが可能であり、また設計変更にも対応できる。ただし、プロトタイプ開発の態勢から製品版の製造態勢へ、態勢を転換する過程が現時点では不透明であるので、評価としては5点とする。

### 現有技術力

ガラスレプリカ法によるウォルターI型鏡の作製については、ノウハウと経験の蓄積に裏付けされた優位性がある。また、X線光学系の構築に関する経験も豊富であり、顧客要求に合わせた設計変更にも対応可能である。更に、軟X線源とX線検出器の開発に事業部の協力が期待できる。ただし、ガラスレプリカ法とは異なる技術でウォルターI型鏡が作製されるようになる可能性も十分にあり、その点をマイナス評価して7点とする。

### 原材料入手力

既存の購買ルートを通して、ほとんどの部品・材料を入手可能である。ただし、主要構成要素の1つである試料冷却ステージについては、プロトタイプ開発の中で機能を検証するまでは設計・購入先が確定しないため、その点をマイナス評価して7点とする。

### 事業推進力

■強力な事業推進者 筆者は、光産業創成大学院大学において、新事業開発について3年間学んできたので、技術開発に専念してきた研究者よりは、事業開発についての知識を持っている。客観的な評価は難しいものの、この指標については3点と評価する。

■強力な社内支援 筆者の所属する企業は、浜松市内にある3大学（静岡大学、浜松医科大学、および、光産業創成大学院大学）と連名して、「浜松光宣言2013」を発表している[67]。その中では、浜松を、「世界に役立つ新しい光科学、新しい光産業を創造する『光の尖端都市（preminent city）HAMAMATSU』にしたいと謳っていて、そのための活動方針の中には、ベンチャー企業等の迅速な動きに対応する支援を行うことも挙げられている。軟X線3D顕微鏡の開発と事業化は、科学技術の発展に資する光産業の新たな分野の創成の第一歩であり、「浜松光宣言2013」の趣旨に適っていると考えられるので、強力な社内支援を期待して4点の評価とする。

#### 4.3.4 事業度

軟X線3D顕微鏡に基づく事業についての事業度は、魅力度の35点と適社度の38点を加えて73点となる。大江によると[1, p.170]、「事業度80点以上の事業は成功する可能性が大きい

表 4.11 軟X線3D顕微鏡に基づく事業の適社度

評価指標	最大 評点	評価 点	評価点の基となる仮説	
資金力	10	5	初期投資額 209 百万円は、所属企業でも経営層の承認が得られれば賄える額であるが、他の企業でも賄える	
現有マーケティング力	10	7	既存の生命科学分野向けの販売チャネルを利用できる可能性がある。共同研究先の持つ学術的なネットワークにも期待	
現有製造力	10	5	プロトタイプ開発の態勢から製品版の製造態勢へ転換する過程が、現時点では不透明である	
現有技術力	10	7	X線光学系の構築とウォルターI型鏡作製については、ノウハウと経験の蓄積に裏付けされた優位性を有している。軟X線源とX線検出器も自社技術である。ただし、ガラスレプリカ法とは異なる技術でウォルターI型鏡が作製される可能性もある	
原材料入手力	10	7	購買ルートを通して、ほとんどの部品・材料を入手可能であるが、試料冷却ステージについては未確定	
事業推進力	10	7		
	強力な事業推進者	5	3	筆者は光産業創成大学院大学で3年間新規事業開発について学んできた
	強力な社内支援	5	4	軟X線3D顕微鏡の事業化は、科学技術の発展に資する光産業の新たな分野の創成の第一歩であり、「浜松光宣言 2013」の趣旨に適っている
適社度（現時点での）	60	38	適社度は高い	
事業度（＝魅力度＋適社度）	120	73		

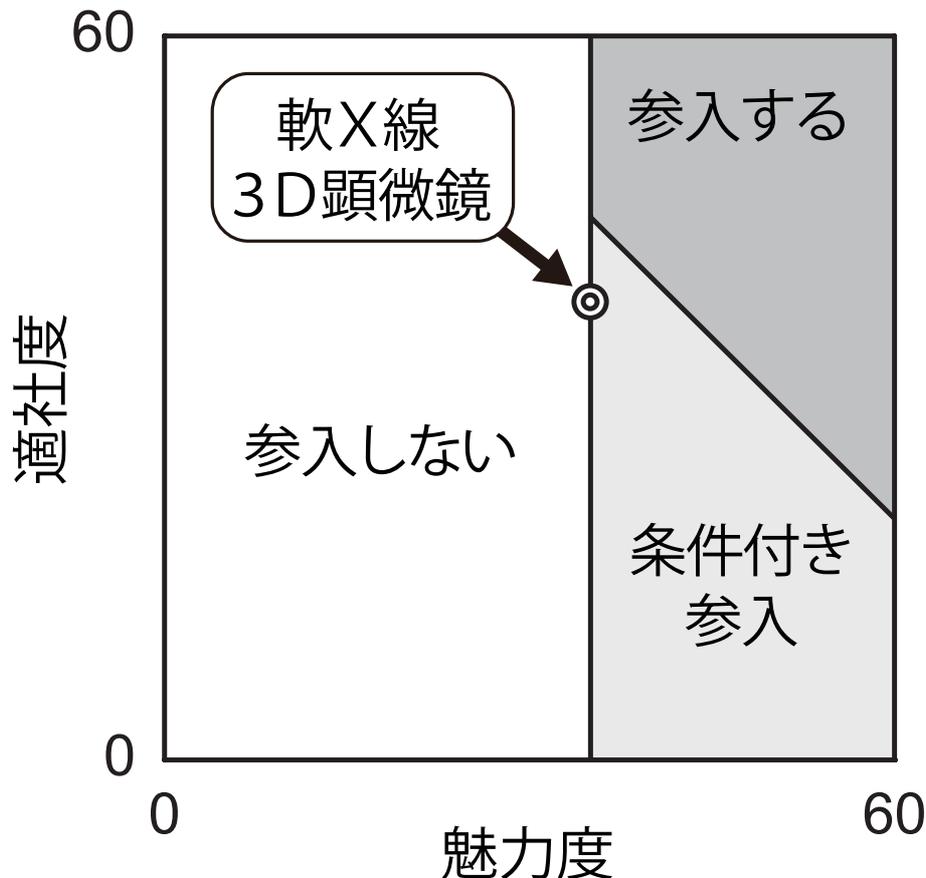


図 4.4 軟X線3D顕微鏡に基づく事業の事業度

く、70点未満の事業は成功する可能性が低い」ということである。この基準に照らすと、事業度73点の軟X線3D顕微鏡に基づく事業の評価は、成功する可能性は五分五分、といったところである。また別の基準として、魅力度が35点以上であれば条件付きで参入する、という考え方もあり（図4.4参照）、軟X線3D顕微鏡は、この「条件付き参入」に該当する。軟X線3D顕微鏡を事業化するには、前節のアトリビュート・マトリックスによる分析から、生命科学分野向けの仕様を満たすプロトタイプ開発の成功と、軟X線3D顕微鏡の価値が生命科学分野の研究者に受け容れられること、の2点が先ずクリアすべき事業化の条件となる。次節では、軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたシナリオとして、プロトタイプ開発とプロモーション期における取り組みについて考察する。

なお、以上の事業度の評価は、現時点での適社度の評価であり、また、5年後を想定した魅力度の評価である。評価指標の中には、未確定な点や不透明な点を含めての評価となっている指標もあるが、プロトタイプの開発やプロモーションを通して、未確定、不透明な点を解消することで、事業の成功率を高めることができると考える。

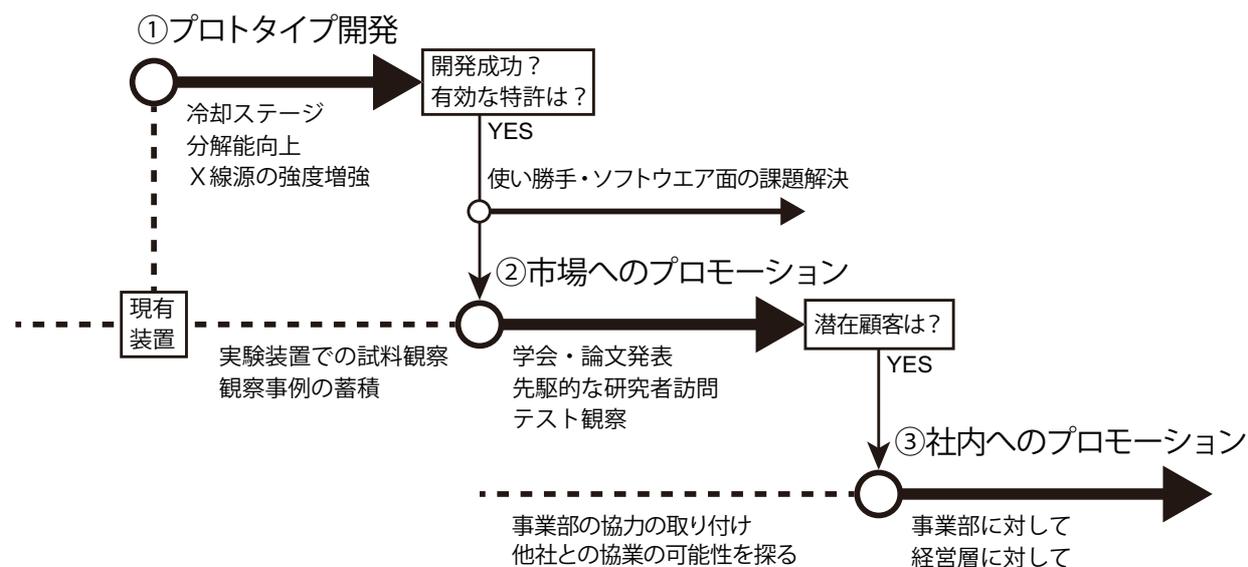


図 4.5 軟X線 3 D 顕微鏡の事業化に向けたシナリオ

## 4.4 事業化に向けたシナリオ

本節では、筆者のグループで開発している軟X線 3 D 顕微鏡の事業化に向けたシナリオとして、事業化に至るまでのプロトタイプの開発とプロモーション期における取り組みについて段階を追って考察する。図 4.5 に事業化に向けたシナリオを示す。

### 4.4.1 プロトタイプ開発

第 3 章第 3.6 節において、技術的観点から次の 3 点が、生命科学分野向けの軟X線 3 D 顕微鏡の今後の課題として挙げられた。

- I. 生物・医学的試料の生きたままに近い状態での観察を可能とするため、試料の含水凍結状態を保持できる冷却試料ステージを軟X線 3 D 顕微鏡に搭載する。
- II. 斜入射角や拡大率等の光学系設計の見直しを行い、光学顕微鏡並みの分解能である 200 nm L&S を達成する。
- III. X線源の強度を一桁以上増強し、撮像時間を短縮する。

また、本章第 4.2 節でのアトリビュート・マトリックスによる分析からは、今後の軟X線 3 D 顕微鏡の開発方針として以下の 4 点に取り組むことが定められた。

1. ウォルター I 型鏡の高精度化と光学系設計の見直しにより、200 nm L&S を解像する分解能を達成する。

2. 真空中で試料の含水凍結状態を保持できる冷却試料ステージ、および凍結試料の取り扱いに関する試料周辺技術を開発する。
3. ハードウェアとソフトウェアの両面から、使い勝手を向上させる
4. 軟X線3D顕微鏡を特徴づける、他の高分解能三次元構造観察技術では得られない観察事例を、探索して蓄積する。

技術的観点からの検討はハードウェア面の課題に限定されているが、マーケティングの観点から定められた開発方針は、ハードウェア面の課題解決に加えて、装置の使い勝手まで含めた広義のソフトウェア面の課題解決と応用面での用途開拓とを含んでいる。従って、先ずは今後1年以内の完了を目途として、上記のハードウェア面の課題を解決した軟X線3D顕微鏡のプロトタイプ開発に取り組む。この際、冷却試料ステージ周辺の技術開発の成否にプロトタイプ開発全体の成否の判断も影響を受ける。真空中での試料の冷却は筆者のグループには経験のない技術であり、試料を介してユーザーが装置に最初に触れる部分でもある。共同研究先の研究者と連携して、試料調整の手順と擦り合せながら、冷却試料ステージ周辺技術の開発を行う。プロトタイプ開発という具体的な作業に入ることにより、例えば、X線源と集光光学系との組み合わせに関わる部分、あるいは、試料ステージ周辺部分での工夫について特許化を進めることができると考えている。これにより、筆者のグループの強み（コア・コンピタンス）を、これまでの「斜入射X線反射鏡（回転楕円鏡・ウォルターI型鏡）の作製とその使い方に関する知見と経験」から、「軟X線による生物試料の高分解能三次元構造観察技術全般に関する知見と経験」へと拡張させる。

プロトタイプ開発と並行して、事業化に向けた次のステップであるプロモーションのための用意を進める。光学顕微鏡でも電子顕微鏡でもなく、軟X線3D顕微鏡を選んでもらうためには、生命科学分野の研究者に軟X線3D顕微鏡の価値を納得してもらう必要がある。共同研究先から、あるいは共同研究先のネットワークを経て提供される試料を観察することで、軟X線3D顕微鏡の特徴を活かした、他の高分解能三次元構造観察技術では得られない観察事例を、探索・蓄積して、新規ユーザー獲得のためのプロモーションに役立てる。また、実際に試料を観察する際に生じる問題やその解決法も蓄積でき、プロモーション段階での潜在ユーザーからの依頼による試験的な観察に際しての有用な知見となる。

事業化に向けたステップをプロトタイプ開発から次の段階へと進ませるかどうかについては、上記の技術的開発課題の解決が達成され、また、複数の有効な特許出願が完了されていることを条件として判断される。特に光学顕微鏡並みの200 nm L&Sの分解能の達成は、アトリビュート・マトリックス分析からは、軟X線3D顕微鏡に肯定的な立場にとっては基本的な特性であるため、プロトタイプ開発から次の段階へ進めるかの判断においても、結論を左右する決定的な特性となる。

ハードウェア面の課題がプロトタイプの開発により解決された後に、プロモーションと並行して、装置の使い勝手を含めたソフトウェア面の課題解決に取り組む。アトリビュート・マトリックス分析からは、装置の使い勝手が悪ければ、軟X線3D顕微鏡に否定的な立場を決定的にしてしまうからである。ただし、ソフトウェア面での課題解決には、筆者のグループには無い技術や知識、経験が必要となり、社内の事業部の協力を取り付ける、あるいは社外の他社との協業の可能性を探ることになる。そのためにも、プロモーションの成果が重要となる。

#### 4.4.2 プロモーション

プロトタイプが成功裏に開発されると、次の段階として、プロトタイプを活用した軟X線3D顕微鏡のプロモーションを行う。ハードウェアについては、筆者のグループからX線顕微鏡関連の学会や学術論文誌への発表を行う。並行して共同研究先の研究者から、生物学、あるいは医学的に興味のある細胞や組織切片等の軟X線3D顕微鏡を使った観察について、生命科学分野の学会や学術論文誌へ発表を行ってもらおう。これにより、新しい観察手法に関心のある先駆的な研究者（ユーザー）、あるいは研究者コミュニティ内のオピニオンリーダー的な研究者の目に留まることを期待する。更に、共同研究先の研究者の学界内のネットワークを活用し、先駆的な研究者に試験的な観察による評価の機会を提供し、研究者コミュニティ内の口コミにより軟X線3D顕微鏡の評判を広める。

以上のプロモーションの成果として、5件程度の複数の有望な潜在顧客を掘り起こすことができたかが、事業化に向けたステップを更に進めるか判断する材料となる [68, chap.9]。ここで、潜在顧客とは、試験的な観察による評価を行って軟X線3D顕微鏡の価値を認め、事業化後の購入を期待できる研究者である。

そして、潜在顧客の存在と研究者コミュニティにおける軟X線3D顕微鏡に対する評価を材料として、社内に向けたプロモーションを行う。すなわち、経営層に対して事業化に向けたステップを進める許可を願い、また、関連する事業部や社内各部署に対しては事業化に向けた支援を要請する。プロトタイプからの製品化を始めとしてサポート体制の構築等、軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたステップを進めるためには、社内の各部署の支援・協力が不可欠である。

### 4.5 他分野への展開

前節では、軟X線3D顕微鏡を生命科学分野において事業化するシナリオについて検討したが、本節では、生命科学分野とは異なる他分野への事業展開について考えたい。図4.6に、軟X線3D顕微鏡を材料科学分野へ事業展開する、追加のシナリオについて示した。

材料科学分野においては、既に高分解能な産業用CTであるマイクロCTが研究のツールとして用いられている [69] [70] ため、軟X線3D顕微鏡は後発となり参入に対する障壁は高いと

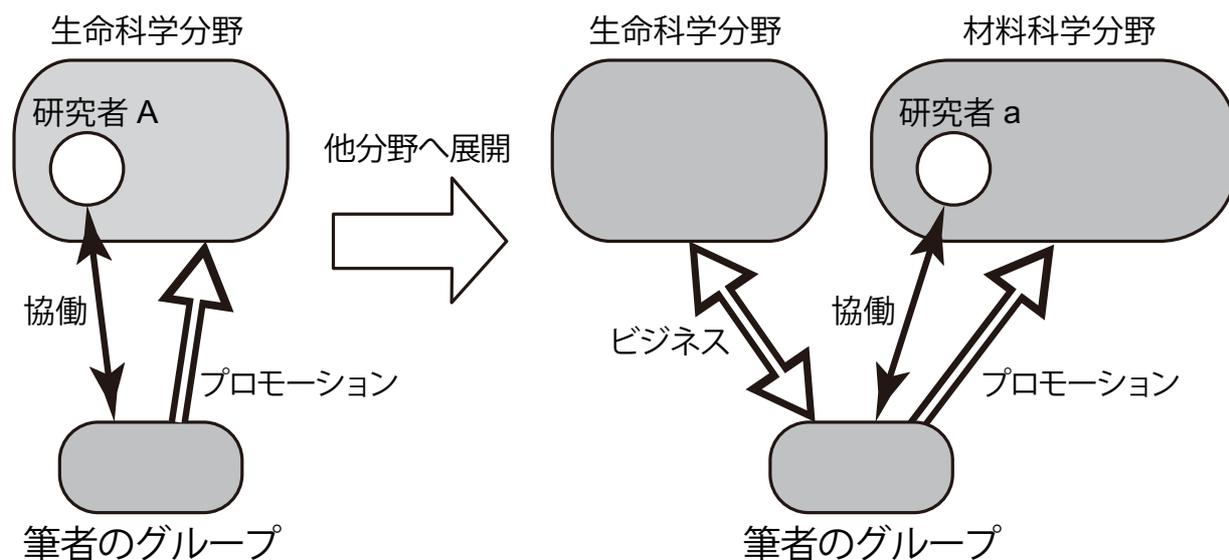


図 4.6 軟X線3D顕微鏡の他分野（材料科学分野）への事業展開

考えられる。また、第3章第3.6節で検討したように、生命科学分野向けの軟X線3D顕微鏡は、そのままでは材料科学分野へ適用することはできない。従って、まずはニッチな市場であり、先行優位も期待できる生命科学分野において地歩を築くことが得策であると考え。そして、生命科学分野での事業化を図る間に蓄積した知見・ノウハウ・技術を活用して、材料科学分野向けの軟X線3D顕微鏡に必要となる技術の開発を進める。また、生命科学分野向けの軟X線顕微鏡で実現した実験室規模と使い勝手の良さをアピールすることで、軟X線3D顕微鏡でのテスト観察に興味を持つ先駆的な材料科学分野の研究者と、社内、社外を問わず、協力関係を構築し、試料周りの技術と材料科学分野における軟X線3D顕微鏡の価値を示す観察事例を蓄積する。そのうえで、材料科学分野への参入を果たす。これが、生命科学分野における事業化の成功を前提として、軟X線3D顕微鏡を材料科学分野へ事業展開するシナリオである。

## 4.6 まとめ

本章では、生命科学分野に向けた軟X線3D顕微鏡の事業化検討として、まず、事業コンセプトを明確にする検討を行った。軟X線3D顕微鏡の事業コンセプトが想定する顧客は、生命科学分野の研究者である。このニッチな市場におけるニーズから導出した軟X線3D顕微鏡の仕様は、少なくとも光学顕微鏡並みの分解能で試料の三次元構造観察が可能であり、含水凍結状態の試料を観察するため水の窓域の軟X線源と冷却試料ステージを搭載し、設置面積は実験室に収まる4m×1m程度、価格は5000万円から1億円、となった。これらの仕様が顧客に受け容れられるためには、顧客にとって価値ある画像・情報が得られること、あるいは、得られるかもしれないと思わせることが重要である。筆者のグループは生命科学分野の研究者と

共同研究を行っているため、実際に研究者が扱う培養細胞や組織切片を軟X線3D顕微鏡の実験装置で観察することが可能である。従って、他に先行して生命科学分野の研究者の興味・関心を喚起する観察事例を集めることができ、またその過程において、実際に試料を観察する際に生じた問題やその解決法も蓄積される。この優位性を活用することで、顧客の製品との関わりにおける「ニースの顕在化」「製品を探す」「製品を選択する」「製品の利用上の問題を解決する」の4つのステップで、差別化を図ることが可能である。

次いで、BMO法を用いた事業評価では、軟X線3D顕微鏡の5年後の市場の魅力度と筆者の所属企業の事業としての適社度を数値化して評価した。その結果は、魅力のある市場であり適社度も高いものの、魅力度と適社度を合わせた事業度の評価としては、条件付の参入、となった。クリアすべき参入条件は、生命科学分野向けの仕様を満たすプロトタイプ開発の成功と、軟X線3D顕微鏡の価値が生命科学分野の研究者に受け容れられること、の2点である。

最後に軟X線3D顕微鏡の事業化に向けたシナリオを作成して、生命科学分野向けのプロトタイプ開発と社内外へのプロモーションの過程で取り組むべき事柄について考察した。プロトタイプ開発では、光学顕微鏡並みの分解能の達成と含水凍結試料の観察を可能とすることは不可欠である。また、プロトタイプ開発の過程の中から、複数の有効な特許出願がなされることも参入条件の一つである。プロトタイプの開発が成功すると、軟X線3D顕微鏡の特徴を活かした、他の高分解能三次元構造観察技術では得られない観察事例を探索・蓄積して、生命科学分野へのプロモーションを行う。軟X線3D顕微鏡の価値を研究者に示すことで、潜在ユーザーの掘り起こしを図る。また、社内に向けたプロモーションも合わせて実施し、経営層や関連部署から事業化のための支援を取り付ける。軟X線3D顕微鏡の事業化に向けて、以上のシナリオを現実のものとするのが今後の課題である。そして、生命科学分野において軟X線3D顕微鏡の事業化がかなえば、そこを足掛かりとして新たな市場である材料科学分野への参入も可能性を持ってくる。

## 参考文献

- [1] 大江建, なぜ新規事業は成功しないのか: 「仮説のマネジメント」の理論と実践 (日本経済新聞出版社, 2008).
- [2] I. C. MacMillan and R. G. McGrath, "Discover your products' hidden potential," *Harvard Business Review* **74**, 58 – 73 (1996).
- [3] 伊藤良二, 成功するビジネスプラン, 日経文庫 (日本経済新聞社, 2005).
- [4] J. M. Rajyaguru, M. Kado, D. Torres, M. Richardson, and M. J. Muszynski, "X-ray microscopy and imaging of Escherichia coli, LPS and DNA," *Journal of Microscopy* **188**, 96–105 (1997).
- [5] J. Cazaux, "A physical approach to the radiation damage mechanisms induced by

- x-rays in x-ray microscopy and related techniques,” *Journal of Microscopy* **188**, 106–124 (1997).
- [6] O. Methe, H. Spring, P. Guttman, G. Schneider, D. Rudolph, M. F. Trendelenburg, and G. Schmahl, “Transmission x-ray microscopy of intact hydrated PtK2 cells during the cell cycle,” *Journal of Microscopy* **188**, 125–135 (1997).
- [7] A. Sasov and D. Van Dyck, “Desktop x-ray microscopy and microtomography,” *Journal of Microscopy* **191**, 151–158 (1998).
- [8] Y. Wang and C. Jacobsen, “A numerical study of resolution and contrast in soft x-ray contact microscopy,” *Journal of Microscopy* **191**, 159–169 (1998).
- [9] J.-G. Scharf and G. Schneider, “Ultrastructural characterization of isolated rat kupffer cells by transmission x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **193**, 250–256 (1999).
- [10] K. E. Kurtis, P. J. M. Monteiro, J. T. Brown, and W. Meyer-Ilse, “High resolution transmission soft x-ray microscopy of deterioration products developed in large concrete dams,” *Journal of Microscopy* **196**, 288–298 (1999).
- [11] J. Maser, A. Osanna, Y. Wang, C. Jacobsen, J. Kirz, S. Spector, B. Winn, and D. Tennant, “Soft x-ray microscopy with a cryo scanning transmission x-ray microscope: I. Instrumentation, imaging and spectroscopy,” *Journal of Microscopy* **197**, 68–79 (2000).
- [12] Y. Wang, C. Jacobsen, J. Maser, and A. Osanna, “Soft x-ray microscopy with a cryo scanning transmission x-ray microscope: II. Tomography,” *Journal of Microscopy* **197**, 80–93 (2000).
- [13] C. Jacobsen, S. Wirick, G. Flynn, and C. Zimba, “Soft x-ray spectroscopy from image sequences with sub-100 nm spatial resolution,” *Journal of Microscopy* **197**, 173–184 (2000).
- [14] B. W. L. Jr, W. Meyer-Ilse, and S. S. Rothman, “Automatic image acquisition, calibration and montage assembly for biological x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **197**, 185–201 (2000).
- [15] M. Berglund, L. Rymell, M. Peuker, T. Wilhein, and H. M. Hertz, “Compact water-window transmission x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **197**, 268–273 (2000).
- [16] W. Meyer-Ilse, D. Hamamoto, A. Nair, S. A. Lelievre, G. Denbeaux, L. Johnson, A. L. Pearson, D. Yager, M. A. Legros, and C. A. Larabell, “High resolution protein localization using soft x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **201**, 395–403 (2001).
- [17] B. W. Loo Jr, I. M. Sauerwald, A. P. Hitchcock, and S. S. Rothman, “A new sample preparation method for biological soft x-ray microscopy: nitrogen-based contrast and

- radiation tolerance properties of glycol methacrylate-embedded and sectioned tissue,” *Journal of Microscopy* **204**, 69–86 (2001).
- [18] A. Postnov, N. De clerck, A. Sasov, and D. Van dyck, “3D in-vivo x-ray microtomography of living snails,” *Journal of Microscopy* **205**, 201–204 (2002).
- [19] D. Paganin, S. C. Mayo, T. E. Gureyev, P. R. Miller, and S. W. Wilkins, “Simultaneous phase and amplitude extraction from a single defocused image of a homogeneous object,” *Journal of Microscopy* **206**, 33–40 (2002).
- [20] S. C. Mayo, P. R. Miller, S. W. Wilkins, T. J. Davis, D. Gao, T. E. Gureyev, D. Paganin, D. J. Parry, A. Pogany, and A. W. Stevenson, “Quantitative x-ray projection microscopy: phase-contrast and multi-spectral imaging,” *Journal of Microscopy* **207**, 79–96 (2002).
- [21] H. Stollberg, J. Boutet De Monvel, A. Holmberg, and H. M. Hertz, “Wavelet-based image restoration for compact x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **211**, 154–160 (2003).
- [22] T. Limongi, L. Palladino, G. Tomassetti, L. Reale, P. Cesare, F. Flora, P. Aimola, and A. M. Ragnelli, “Comparative analysis of isolated cellular organelles by means of soft x-ray contact microscopy with laser-plasma source and transmission electron microscopy,” *Journal of Microscopy* **214**, 43–50 (2004).
- [23] D. Paganin, T. E. Gureyev, S. C. Mayo, A. W. Stevenson, Y. I. Nesterets, and S. W. Wilkins, “X-ray omni microscopy,” *Journal of Microscopy* **214**, 315–327 (2004).
- [24] G. A. Johansson, S. M. Khanna, A. nair, P. Mannstrom, G. Denbeaux, and M. Ulfendahl, “Exploring the use of soft x-ray microscopy for imaging subcellular structures of the inner ear1,” *Journal of Microscopy* **215**, 203–212 (2004).
- [25] S. Jearanaikoon and J. V. Abraham-Peskir, “An x-ray microscopy perspective on the effect of glutaraldehyde fixation on cells,” *Journal of Microscopy* **218**, 185–192 (2005).
- [26] L. Fan, D. Paterson, I. McNulty, M. M. J. Treacy, and J. M. Gibson, “Fluctuation x-ray microscopy: a novel approach for the structural study of disordered materials,” *Journal of Microscopy* **225**, 41–48 (2007).
- [27] H. Stollberg, P. Guttmann, P. A. C. Takman, and H. M. Hertz, “Size-selective colloidal-gold localization in transmission x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **225**, 80–87 (2007).
- [28] H. Stollberg, M. Pokorny, and H. M. Hertz, “A vacuum-compatible wet-specimen chamber for compact x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **226**, 71–73 (2007).
- [29] P. A. C. Takman, H. Stollberg, G. A. Johansson, A. Holmberg, M. Lindblom, and

- H. M. Hertz, “High-resolution compact x-ray microscopy,” *Journal of Microscopy* **226**, 175–181 (2007).
- [30] O. Betz, U. Wegst, D. Weide, M. Heethoff, L. Helfen, W.-K. Lee, and P. Cloetens, “Imaging applications of synchrotron x-ray phase-contrast microtomography in biological morphology and biomaterials science. i. General aspects of the technique and its advantages in the analysis of millimetre-sized arthropod structure,” *Journal of Microscopy* **227**, 51–71 (2007).
- [31] S. Mayo, P. Miller, D. gao, and J. Sheffield-Parker, “Software image alignment for x-ray microtomography with submicrometre resolution using a SEM-based x-ray microscope,” *Journal of Microscopy* **228**, 257–263 (2007).
- [32] M. Engelhardt, C. Kottler, O. Bunk, C. David, C. Schroer, J. Baumann, M. Schuster, and F. Pfeiffer, “The fractional talbot effect in differential x-ray phase-contrast imaging for extended and polychromatic x-ray sources,” *Journal of Microscopy* **232**, 145–157 (2008).
- [33] A. Lareida, F. Beckmann, A. Schrott-Fischer, R. Glueckert, W. Freysinger, and B. Muller, “High-resolution x-ray tomography of the human inner ear: synchrotron radiation-based study of nerve fibre bundles, membranes and ganglion cells,” *Journal of Microscopy* **234**, 95–102 (2009).
- [34] S.-C. Gleber, J. Thieme, W. Chao, and P. Fischer, “Stereo soft x-ray microscopy and elemental mapping of haematite and clay suspensions,” *Journal of Microscopy* **235**, 199–208 (2009).
- [35] J. Dinley, L. Hawkins, G. Paterson, A. Ball, I. Sinclair, P. Sinnott-Jones, and S. Lanham, “Micro-computed x-ray tomography: a new non-destructive method of assessing sectional, fly-through and 3d imaging of a soft-bodied marine worm,” *Journal of Microscopy* **238**, 123–133 (2010).
- [36] Y. Yang, W. Li, G. Liu, X. Zhang, J. Chen, W. Wu, Y. Guan, Y. Xiong, Y. Tian, and Z. Wu, “3D visualization of subcellular structures of *schizosaccharomyces pombe* by hard x-ray tomography,” *Journal of Microscopy* **240**, 14–20 (2010).
- [37] A. Schropp, P. Boye, A. Goldschmidt, S. Hönig, R. Hoppe, J. Patommel, C. Rakete, D. Samberg, S. Stephan, S. Schöder, M. Burghammer, and C. Schroer, “Non-destructive and quantitative imaging of a nano-structured microchip by ptychographic hard x-ray scanning microscopy,” *Journal of Microscopy* **241**, 9–12 (2011).
- [38] A. Kyrieleis, V. Titarenko, M. Ibrison, T. Connolley, and P. Withers, “Region-of-interest tomography using filtered backprojection: assessing the practical limits,” *Journal of Microscopy* **241**, 69–82 (2011).

- [39] G. van Dalen, P. Nootenboom, and P. C. M. Heussen, “Correlative microscopy of detergent granules,” *Journal of Microscopy* **241**, 273–281 (2011).
- [40] Y. Davit, G. Iltis, G. Debenest, S. Veran-Tissoires, D. Wildenschild, M. Gerino, and M. Quintard, “Imaging biofilm in porous media using x-ray computed microtomography,” *Journal of Microscopy* **242**, 15–25 (2011).
- [41] A. Pakzad, N. Parikh, P. Heiden, and R. Yassar, “Revealing the 3D internal structure of natural polymer microcomposites using x-ray ultra microtomography,” *Journal of Microscopy* **243**, 77–85 (2011).
- [42] A. Chawanji, A. Baldwin, G. Brisson, and E. Webster, “Use of x-ray micro tomography to study the microstructure of loose-packed and compacted milk powders,” *Journal of Microscopy* **248**, 49–57 (2012).
- [43] E. Lima, A. Diaz, M. Guizar-Sicairos, S. Gorelick, P. Pernot, T. Schleier, and A. Menzel, “Cryo-scanning x-ray diffraction microscopy of frozen-hydrated yeast,” *Journal of Microscopy* **249**, 1–7 (2013).
- [44] A. Tapfer, M. Bech, I. Zanette, P. Symvoulidis, S. Stangl, G. Multhoff, M. Molls, V. Ntziachristos, and F. Pfeiffer, “Three-dimensional imaging of whole mouse models: comparing nondestructive x-ray phase-contrast micro-CT with cryotome-based planar epi-illumination imaging,” *Journal of Microscopy* **253**, 24–30 (2014).
- [45] E. Duke, K. Dent, M. Razi, and L. M. Collinson, “Biological applications of cryo-soft x-ray tomography,” *Journal of Microscopy* **255**, 65–70 (2014).
- [46] D. Laloum, T. Printemps, D. Sanchez, F. Lorut, G. Audoit, and P. Bleuet, “Reduction of the scanning time by total variation minimization reconstruction for x-ray tomography in a SEM,” *Journal of Microscopy* **256**, 90–99 (2014).
- [47] C. A. Larabell and M. A. Le Gros, “X-ray tomography generates 3-D reconstructions of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, at 60-nm resolution,” *Molecular Biology of the Cell* **15**, 957–962 (2004).
- [48] J. L. Carrascosa, F. J. Chichon, E. Pereiro, M. J. Rodriguez, J. J. Fernandez, M. Esteban, S. Heim, P. Guttman, and G. Schneider, “Cryo-x-ray tomography of vaccinia virus membranes and inner compartments,” *Journal of Structural Biology* **168**, 234 – 239 (2009).
- [49] E. Hanssen, C. Knoechel, N. Klonis, N. Abu-Bakar, S. Deed, M. LeGros, C. Larabell, and L. Tilley, “Cryo transmission x-ray imaging of the malaria parasite, *p. falciparum*,” *Journal of Structural Biology* **173**, 161 – 168 (2011).
- [50] T. Dučić, S. Quintes, K.-A. Nave, J. Susini, M. Rak, R. Tucoulou, M. Alevra, P. Guttman, and T. Salditt, “Structure and composition of myelinated axons: A

- multimodal synchrotron spectro-microscopy study,” *Journal of Structural Biology* **173**, 202 – 212 (2011).
- [51] H. Hertz, O. von Hofsten, M. Bertilson, U. Vogt, A. Holmberg, J. Reinspach, D. Martz, M. Selin, A. Christakou, J. Jerlstrom-Hultqvist, and S. Svard, “Laboratory cryo soft x-ray microscopy,” *Journal of Structural Biology* **177**, 267 – 272 (2012).
- [52] E. Hanssen, C. Knoechel, M. Dearnley, M. W. Dixon, M. L. Gros, C. Larabell, and L. Tilley, “Soft x-ray microscopy analysis of cell volume and hemoglobin content in erythrocytes infected with asexual and sexual stages of plasmodium falciparum,” *Journal of Structural Biology* **177**, 224 – 232 (2012).
- [53] G. Schneider, P. Guttman, S. Rehbein, S. Werner, and R. Follath, “Cryo x-ray microscope with flat sample geometry for correlative fluorescence and nanoscale tomographic imaging,” *Journal of Structural Biology* **177**, 212 – 223 (2012).
- [54] F. J. Chichon, M. J. Rodriguez, E. Pereiro, M. Chiappi, B. Perdiguero, P. Guttman, S. Werner, S. Rehbein, G. Schneider, M. Esteban, and J. L. Carrascosa, “Cryo x-ray nano-tomography of vaccinia virus infected cells,” *Journal of Structural Biology* **177**, 202 – 211 (2012).
- [55] C. Hagen, P. Guttman, B. Klupp, S. Werner, S. Rehbein, T. C. Mettenleiter, G. Schneider, and K. Grunewald, “Correlative vis-fluorescence and soft x-ray cryo-microscopy/tomography of adherent cells,” *Journal of Structural Biology* **177**, 193 – 201 (2012).
- [56] W. G. Muller, J. B. Heymann, K. Nagashima, P. Guttman, S. Werner, S. Rehbein, G. Schneider, and J. G. McNally, “Towards an atlas of mammalian cell ultrastructure by cryo soft x-ray tomography,” *Journal of Structural Biology* **177**, 179 – 192 (2012).
- [57] A. Weiner, S. Kapishnikov, E. Shimoni, S. Cordes, P. Guttman, G. Schneider, and M. Elbaum, “Vitrification of thick samples for soft x-ray cryo-tomography by high pressure freezing,” *Journal of Structural Biology* **181**, 77 – 81 (2013).
- [58] E. A. Smith, B. P. Cinquin, G. McDermott, M. A. L. Gros, D. Y. Parkinson, H. T. Kim, and C. A. Larabell, “Correlative microscopy methods that maximize specimen fidelity and data completeness, and improve molecular localization capabilities,” *Journal of Structural Biology* **184**, 12 – 20 (2013).
- [59] A. Leforestier, P. Levitz, T. Preat, P. Guttman, L. J. Michot, and P. Tchenio, “Imaging drosophila brain by combining cryo-soft x-ray microscopy of thick vitreous sections and cryo-electron microscopy of ultrathin vitreous sections,” *Journal of Structural Biology* **188**, 177 – 182 (2014).

- [60] 科学機器年鑑 2014 年版 市場分析編 (株式会社アール アンド ディ, 2014).
- [61] 高橋富男, 原健次, 新商品開発マネジメント (日科技連出版社, 1997).
- [62] 土居弘元, “価値焦点思考による新規事業への参入検討について,” 三田商学研究 **37**, 73–82 (1994).
- [63] 松井憲一, 技術系ベンチャーのイノベーション評価法: 成功する事業を目利きする (ダイヤモンド社, 2005).
- [64] 藤田克昌, “超解像顕微鏡の進展,” 生物物理 **50**, 174–179 (2010).
- [65] キヤノンマーケティングジャパン株式会社, “ニュースリリース: 産業用 X 線 CT の国内独占販売権を取得,” <http://cweb.canon.jp/newsrelease/2010-09/pr-xct200.html>.
- [66] Carl Zeiss Microscopy GmbH, “Product Info: ZEISS Xradia 800 Ultra,” (2014). [http://www.zeiss.com/microscopy/en\\_de/products/x-ray-microscopy/xradia-800-ultra.html](http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/x-ray-microscopy/xradia-800-ultra.html).
- [67] 浜松ホトニクス株式会社, “プレスリリース: 浜松を光の先端都市に ～浜松光宣言 2013 地元 3 大学と調印,” <http://www.hamamatsu.com/jp/ja/news/news/20130611000000.html>.
- [68] R. McGrath and I. MacMillan, *The Entrepreneurial Mindset: Strategies for Continuously Creating Opportunity in an Age of Uncertainty*, Working paper series (Snider Entrepreneurial Center) (Harvard Business School Press, 2000).
- [69] P. R. Shearing, N. P. Brandon, J. Gelb, R. Bradley, P. J. Withers, A. J. Marquis, S. Cooper, and S. J. Harris, “Multi length scale microstructural investigations of a commercially available Li-ion battery electrode,” J. Electrochem. Soc. **159**, A1023 – A1027 (2012).
- [70] B. Patterson, K. Henderson, P. Gibbs, S. Imhoff, and A. Clarke, “Laboratory micro- and nanoscale x-ray tomographic investigation of Al-7 at.%Cu solidification structures,” Materials Characterization **95**, 18 – 26 (2014).



## 第5章

# 結言

近年の我国の科学技術イノベーション政策においては、いわゆるナノテクノロジーが共通基盤的な分野横断技術として注目されている。ナノテクノロジーの概念要素の一つにナノ計測があり、ナノ計測を構成する具体的技術の一つに数ナノメートルから数 100 ナノメートルスケールの対象を観察する高分解能三次元構造観察技術が位置付けられる。生命科学分野においては、細胞の内部構造や組織の細胞レベルの構造の観察や、特定タンパク質の細胞内、細胞間の分布を可視化する高分解能三次元構造観察技術への大きなニーズがある。また、材料科学分野においても、グリーンイノベーションに期待される炭素繊維等の高機能材料の開発に、高分解能三次元構造観察技術が役立てられている。現在、生命科学分野に普及している高分解能三次元構造観察技術としては、レーザー顕微鏡と透過型電子顕微鏡が挙げられるが、X線をプローブとした観察手法も次に述べるように、前二者と相補的な情報を提供できるものと期待される。

X線は、可視光と比べて電磁波としての波長が短く、X線をプローブとしたX線顕微鏡は、原理的には、10 nm以下の分解能の実現が可能である。また、X線は物質を透過し易く、CT（コンピュータ断層撮像）技術を高分解能X線顕微鏡と組み合わせることにより、ナノメートルスケールでの三次元構造観察が可能となる。特に、100 eV~2 keVのエネルギー範囲の軟X線は、炭素や酸素等の軽元素から構成される試料に用いた場合に、元素間の自然な吸収コントラストが得られる。このことから、組織切片のような生物試料や炭素繊維強化樹脂に代表される炭素系材料等の軽元素試料の高分解能三次元構造観察に好適である。ただし、X線顕微鏡は、これまでは主に放射光施設において開発・構築され、限られた利用機会を獲得できた研究者によって利用されている。X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術が、レーザー顕微鏡や透過型電子顕微鏡と同じように生命科学分野や材料科学分野に普及するためには、一般的な実験室に設置可能な大きさであり、かつ、研究者自身による操作が可能な使い勝手の良いX線顕微鏡の実現が不可欠である。

筆者のグループは、電子衝撃型軟X線源、ウォルターI型鏡、及びCT技術を組み合わせる

ことにより、一般的な実験室に収まる大きさ、いわゆる実験室規模の装置であり、かつ、高分解能三次元構造観察を可能とする軟X線3D顕微鏡を開発した。ウォルターI型鏡はX線の利用効率が高く、また、X線源に単色性を要求しない。ウォルターI型鏡のX線利用効率の高さに着目すると、コンパクトな構造で取り扱いが容易でありながら、X線強度が不足しているとされ、これまで軟X線顕微鏡用のX線源の主流になれなかった電子衝撃型の軟X線源の利用も、現実的な選択肢となり得る。特に、金属酸化物をターゲット物質に用いることで発生できる酸素 $K\alpha$ X線は、水の窓X線のエネルギー範囲の上限に位置し、含水試料を透過し易いため、生物試料の観察には好適である。解像度チャート、及びマイクロインジェクション用のガラスキャピラリーを試料として用いた評価の結果として、500 nm L&Sのパターンが確実に解像でき、1  $\mu\text{m}$  スケールの三次元構造を識別可能である。また、マウス腎臓の乾燥切片を試料として糸球体の三次元構造を画像化し、軟X線3D顕微鏡を生命科学分野へ適用する可能性を示した。

実験室規模の軟X線3D顕微鏡が、生命科学分野において有用な研究ツールとなるためには、幾つかの改良を加える必要がある。まず、試料の生きたままに近い状態での観察を可能とするため、真空中で試料を含水凍結時状態に保持するための冷却試料ステージの搭載が必要である。次に、細胞レベルの三次元構造が観察できるようにするため、少なくとも光学顕微鏡並みの分解能として、200 nm L&Sの分解能を実現する必要がある。更に、X線強度の増強により三次元再構成のためのデータ取得に要する時間の短縮を図り、研究のツールとしての使い勝手を向上させることも重要である。これらの改良の結果として、生きたままに近い状態での細胞や組織切片の細胞小器官レベルでの三次元構造の可視化が可能となり、生命科学の多くの領域、例えば、抗体創薬や幹細胞の研究において、軟X線3D顕微鏡が活用されることが期待できる。

X線顕微鏡による高分解能三次元構造観察技術を、生命科学分野や材料科学分野に普及させるためには、軟X線3D顕微鏡を事業化することが必要である。事業化検討としては、まず、事業コンセプトを明確にするため、顧客として生命科学分野の研究者を想定し、そのニーズに基づいて軟X線3D顕微鏡の仕様を設定した。そして、詳細な文献調査に研究者との面談を援用して、仕様の各項目の顧客にとっての位置付けを分析した。その中で、分解能の仕様と価格が、軟X線顕微鏡により得られる画像の価値に見合ったものであると顧客に納得させることが重要であると、明確に認識した。次いで、事業評価をBMO法と呼ばれる、候補事業が魅力的で自社に適しているかを数値化して評価する手法を用いて行った。そして、軟X線3D顕微鏡は、事業に魅力はあるものの、事業の成功確率の評価からは、「条件付の参入」に該当するという結果を得た。前述の仕様についての分析から、参入条件は、生命科学分野向けの仕様を満たすプロトタイプ開発の成功と、軟X線3D顕微鏡の価値が生命科学分野の研究者に受け容れられることと結論づけた。最後に、事業化に向けた次の3ステップからなるシナリオを作成した。①生命科学分野向けのプロトタイプを開発する。②軟X線3D顕微鏡の価値を示す観察事

例を探索・蓄積して、生命科学分野へのプロモーションを行って潜在ユーザーを掘り起こす。③社内に向けたプロモーションも合わせて実施し、経営層や関連部署から事業化のための支援を取り付ける。このシナリオを現実のものとするのが今後の課題であり、生命科学分野において軟X線3D顕微鏡の事業化がかなえば、そこを足掛かりとして新たな市場である材料科学分野への参入も可能性を持ってくる。

最後に、軟X線3D顕微鏡を事業化することの光産業創成にとっての意義について考えてみたい。紫外～可視～近赤外の領域においては、光を発生し、操作し、そして測る多様な技術が、現在では利用可能である。そして、これらの技術の様々な組み合わせの中から多くの新しい光産業分野が生まれ、今日では、日本国内の光産業の生産額が8兆5000億円を超えるに至っている（光産業技術振興協会調査の2014年見込み）。本論文で先行技術として取り上げた光学顕微鏡は、まさに、光を発生し、操作し、測る技術の高度な組み合わせであり、学術を始め、産業・医療等の様々な分野の発展に貢献して光産業の一翼を担っている。翻ってX線領域では、X線を発生し測る技術については、1895年のX線の発見以来、長足の進歩を遂げているが、X線を操るX線光学技術とその利用については、未だ発展途上にあると言える。筆者のグループが開発し、事業化を目指している軟X線3D顕微鏡は、X線を発生し、操作し、測る技術の組み合わせである。軟X線3D顕微鏡を事業化することができれば、光学顕微鏡と同じように科学技術イノベーションを通して社会の様々な領域の発展に資する、光産業の新たな分野の創成に貢献できるものと考えられる。



# 謝辞

本研究は、筆者が光産業創成大学院大学に在学した期間に取り組んだものです。3年間に亘り研究の御指導を頂いた高橋宏誠先生（元教授）、論文をまとめるにあたり御指導を賜りました増田靖教授、横田浩章准教授に衷心より御礼申し上げます。また、論文審査の労をお執りくださいました坪井昭彦教授、森芳孝准教授に厚く感謝致します。そして、在学中の御指導と御厚誼に対して、加藤義章学長をはじめとする教員・事務局の皆様と、共に学んだ8期生諸氏に感謝致します。

筆者が光産業創成大学院大学に入学したのは、浜松ホトニクス株式会社に入社してから30年経った4月でした。本研究に取り組む機会を与えてくださった晝馬明代表取締役社長、原勉常務取締役中央研究所長に深甚なる感謝を申し上げます。

生命科学分野向けの軟X線3D顕微鏡の開発は、東京大学先端科学技術研究センターと浜松ホトニクス株式会社との共同研究として実施しています。先端科学技術研究センターにおいて、共同研究の窓口として生物医学分野と工学分野の懸け橋となって頂いた三好元介博士（元特任教授）に心からの御礼を申し上げます。また、先端科学技術研究センターの中野義昭教授、浜窪隆雄教授、早田敬太博士（特任研究員）に深く感謝致します。

最後に、浜松ホトニクス株式会社中央研究所において、筆者と共に軟X線3D顕微鏡の開発に取り組む第1研究室の大庭昌専任部員、小野田忍専任部員、中本勝大室員、望月崇宏室員とレイフォーカス株式会社の中野知康社長のご尽力に、厚く御礼を申し上げます。また、開発にご協力を頂いた社内の皆様に感謝致します。



# 業績目録

対象期間：2012年4月～2015年7月

## 学術論文、学会発表等

### 査読付き論文

- Shinji Ohsuka, Akira Ohba, Shinobu Onoda, Katsuhiro Nakamoto, Tomoyasu Nakano, Motosuke Miyoshi, Keita Soda, and Takao Hamakubo, “Laboratory-size three-dimensional x-ray microscope with Wolter type I mirror optics and an electron-impact water window x-ray source,” *Review of Scientific Instruments*, Vol.85, No.9, 093701 (2014).

### 査読付きプロシーディングス（受理済み）

- Shinji Ohsuka, Akira Ohba, Shinobu Onoda, Katsuhiro Nakamoto, Tomoyasu Nakano, Motosuke Miyoshi, Keita Soda, and Takao Hamakubo, “Laboratory-size three-dimensional water window x-ray microscope with Wolter type I mirror optics,” *AIP Conference Proceedings* としてオンライン出版される予定の *Proceedings of the 12th International Conference on X-ray Microscopy* に受理されている。

### 国際会議発表

- Shinji Ohsuka, Akira Ohba, Shinobu Onoda, Katsuhiro Nakamoto, Tomoyasu Nakano, Motosuke Miyoshi, Keita Soda, and Takao Hamakubo, “Laboratory-size three-dimensional water window x-ray microscope with Wolter type I mirror optics,” *In the 12th International Conference on X-ray Microscopy (XRM2014)*, October 2014.

## 国内学会発表

- 大須賀慎二, 大庭昌, 小野田忍, 中本勝大, 中野知康, 三好元介, 早田敬太, 浜窪隆雄, “ウォルター鏡を使ったラボサイズの水の窓X線3D顕微鏡,” 第34回ナノテストインゴシンポジウム, pp.25-28, 2014年11月.

## 特許出願

- 大庭昌, 大須賀慎二, “X線計測装置,” 特開 2015-090311.