

# 研究終了報告書

## 「ビッグデータアプローチによる X 線レーザーイメージングの高度化」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 木村 隆志

### 1. 研究のねらい

本研究課題では、X 線自由電子レーザー(X-ray Free-Electron Laser: XFEL)によるフェムト秒のシングルパルス計測を、取得した大量データを高精度・高効率に解析可能とする情報処理技術と組み合わせることによって、液中における試料の特異構造を高空間分解能に観察可能な、新たな顕微イメージング技術の開発を目指した。

溶液中におけるナノ構造の様々な挙動を理解するには、溶媒中などの周囲環境を維持した自然な状態で構造を観察することが重要であるが、電子顕微鏡や X 線顕微鏡といった従来の高空間分解能の顕微イメージング技術では、化学固定や凍結処理などの試料の固定化が必須であり、また測定プローブによる構造損傷も大きな問題として存在していた。XFEL によるシングルパルス計測では、フェムト秒の超短パルスとオンゲストロームの波長という特性を活用することによって、液中の試料を固定化することなく自然な状態のまま観察することが可能であり、研究者はこれまで日本の XFEL 施設である SACLA(SPring-8 Angstrom Compact free-electron LAser)を利用しての液中試料イメージング手法の開発に取り組んできた。

本課題では XFEL による液中試料イメージング技術をさらに発展・深化させ、液中における反応現象を数 nm 程度の空間分解能での観察を可能にする、新たな X 線顕微イメージング技術の開発を目指した。一般的な構造解析手法では、多数存在する試料の平均的構造を求めるのに対し、XFEL シングルパルスによるイメージングでは個別粒子の特異構造を捉えることが可能になる。独自に開発する XFEL 計測用の溶液試料ホルダで取得される多数のコヒーレント回折パターンと、特徴量抽出・機械学習を利用した情報処理技術を融合させることによって、反応過程にある個別試料の特異構造を高精度・高効率に捉えることを目指す。液中でのナノ構造体の形成過程といった対象の計測をまず想定しており、将来的には生体試料のその場観察といった生物学的な応用にも取り組む計画である。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、XFEL での計測に利用する高集積度溶液試料ホルダと、コヒーレント回折パターンの高精度データ解析アルゴリズムの開発を行うとともに、SACLA での液中試料イメージングの実証実験に取り組んだ。半導体プロセス技術を活用した新たな溶液試料ホルダ構造を考案・作製するとともに、原子散乱モデルに基づいた X 線回折シミュレーションを用いた、コヒーレント回折パターンの識別・高精度化アルゴリズムを作成した。

新型コロナウイルス感染症の影響により、大学の実験施設の閉鎖や SACLA でのビームタイムが大幅に延期されるなど研究計画に深刻な影響が出たものの、2020 年 11 月に実施した

SACLA での実験では当初目的に合致する有望なデータを得られており、半年の研究実施期間延長中に迅速に成果をまとめる計画である。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、研究期間内に未実施であった生体試料に対する XFEL 顕微イメージングを試みた。これまでの実験結果を踏まえ、回折強度の弱い生体試料を計測するために、新たに SACLA の軟 X 線ビームラインである BL1 を利用した実験系を構築した。計測対象とした細胞株の温度感受性が想定以上に高く、生きた状態での観察には失敗したものの、液中細胞の観察にも成功し、今後新開発の分光素子と組み合わせたフェムト秒顕微分光イメージングの実現を目指していく計画である。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「XFEL 計測用高集積度溶液試料ホルダの開発」

溶液中の試料からのコヒーレント回折パターンを効率的に取得するために、高アスペクト比の異方性エッチングを利用した新型の溶液試料ホルダを開発した。溶液試料ホルダの作製は、東京大学浅野キャンパスの武田先端知クリーンルーム施設所有の半導体プロセス装置群を利用するとともに、溶液試料ホルダの高精度なアセンブリを可能にする組立装置を新たに作製した。図 1 に溶液試料ホルダの組立装置を示す。微小な X 線照射窓を正確に貼り合わせるために、光学顕微鏡と多数の自動ステージを組み合わせた機構となっている。図 2 は実際に作製した溶液試料ホルダの例である。面方位 110 の Si ウエハを利用することにより、X 線照射窓となる SiN 薄膜間の距離を狭めてチップ全体での集積度を高めるとともに、1 レーンのマイクロ流路内での時間分解能を向上させた。この他、従来の 4 倍程度の大面積チップを利用することによって、一枚のホルダ上に試料溶液の保持・導入機構を新たに集積することも試みた。作製した溶液試料ホルダは、後述する SACLA のイメージング装置内部でも  $10^{-3}$  Pa 程度の真空環境下で試料溶液を保持でき、内部試料からの回折パターンを計測可能なことを確認した。

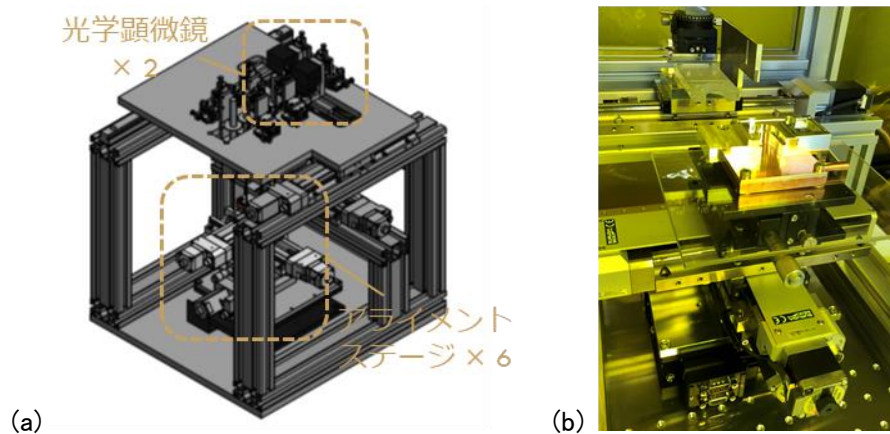


図 1 XFEL 計測用溶液試料ホルダ組立装置 (a) 装置の全体構成。

(b) 装置下部アライメントステージの拡大写真。

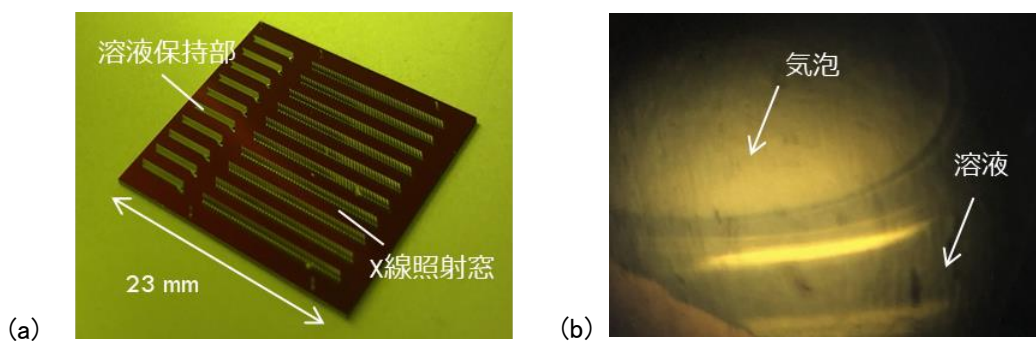


図 2 XFEL 計測用溶液試料ホルダ (a) 10 レーンの流路を集積した溶液試料ホルダ。  
(b)計測直前に真空チャンバー内で観察した、ホルダ上の溶液保持部の顕微鏡像。

### 研究テーマ B「コヒーレント回折パターンの高精度データ解析アルゴリズムの開発」

コヒーレント回折パターンの高精度データ解析アルゴリズムの開発では、原子散乱モデルに基づいたコヒーレント回折パターンシミュレータを利用した、データ識別・ノイズ除去アルゴリズムを作成した。X 線自由電子レーザーによるシングルショット計測では、試料構造に由来するコヒーレントな弾性散乱以外に、蛍光 X 線などの非弾性散乱、試料ホルダなどの光学系由来のノイズが発生し、これらが高分解能計測を行う際の大きな問題となっていた。原子モデルを利用したコヒーレント回折パターンシミュレーションでは、そのようなノイズの存在しない理想的なデータを得ることができるため、コヒーレント回折パターンの本来の特徴を辞書学習により抽出し、素性の異なる各ノイズの除去を試みた。図 3 にノイズ除去シミュレーションの結果を示す。分解能を左右する高角の低シグナル領域の構造がはっきりと明瞭になっており、画質評価指標でも PSNR: 179.5 SSIM:0.418 → PSNR:179.8 SSIM: 0.426 と改善が見られた。さらにそれぞれのコヒーレント回折パターン元に得られる試料像の分解能を比較した結果、ノイズ除去前後で再構成精度の向上が確認できた。

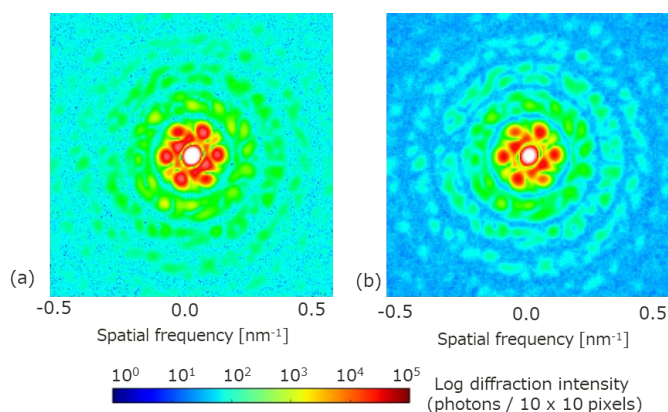


図 3 辞書学習を用いたコヒーレント回折パターンのノイズ除去シミュレーション。  
(a)ノイズ除去前 (b)ノイズ除去後

### 研究テーマ C「XFEL を利用した液中試料の計測と評価」

研究テーマ A および B で開発した溶液試料ホルダとコヒーレント回折パターン高精度化ア

ルゴリズムを使用し、SACLAでのXFELによる溶液中試料イメージングの実証実験に取り組んだ。実験はSACLAの硬X線ビームラインであるBL2において行い、理化学研究所や高輝度光科学研究センターと共同開発を行った高分解能コヒーレント回折イメージング装置MAXIC-S(図4)を利用した。MAXIC-Sでは大NAの多層膜集光ミラーを利用することで試料により強いX線を照射できるようになっており、従来と比較して微小なサイズの試料から、コヒーレント回折パターンをより高分解能領域まで検出することが可能になっている。多層膜の設計はX線エネルギー4.0 keVに合わせてあり、二次元検出器までの距離を0.32 mと近接させることによって、空間分解能として最高2 nmまで実現可能な光学系となっている。

図5にSACLAのフェムト秒シングルパルスにより計測した、ナノ粒子試料からのコヒーレント回折パターンを示す。球状とロッド状の二種類のナノ粒子を計測し、それぞれの粒子表面には、プラス・マイナスの電荷を持った有機分子を修飾し、液中で混合することによりナノ粒子構造体を形成するように調整した。こうしたナノ粒子構造体は、表面増強ラマン散乱やドラッグデリバリーシステムといった用途への応用が想定されており、液中での構造を観察することによって、より効率的な試料作製が可能になりうる。二種類のナノ粒子を混合し計測した試料からのコヒーレント回折パターンが図5(a)であり、辞書学習を利用したノイズ除去処理を施したものが図5(b)である。高角領域までのコヒーレント回折パターンの特徴を失わずにノイズ除去を行っており、更に(c)に示す再構成像では明らかに二種類のナノ粒子が結合した状態が観察できた。

新型コロナウイルス感染症の影響により延期され、2020年度後期に実施したSACLAのビームタイムでは更に有望な計測データを得られており、半年の研究実施期間の延長中に本成果をまとめ報告する計画である。

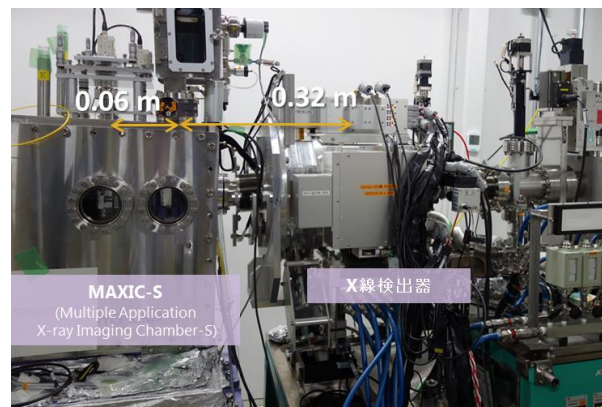


図4 高分解能コヒーレント回折イメージングシステム MAXIC-S。



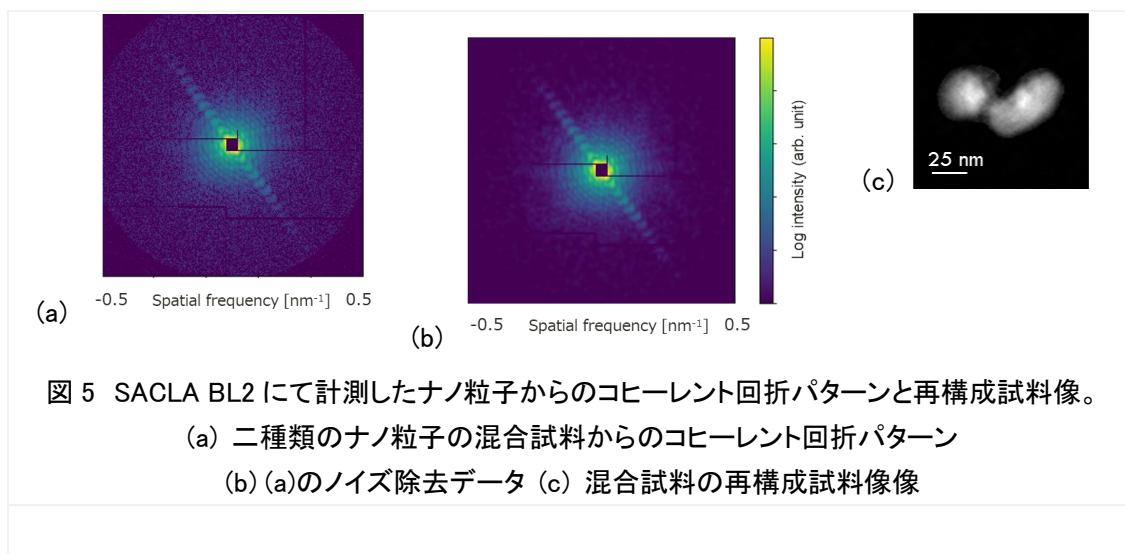


図 5 SACLA BL2 にて計測したナノ粒子からのコヒーレント回折パターンと再構成試料像。  
 (a) 二種類のナノ粒子の混合試料からのコヒーレント回折パターン  
 (b) (a)のノイズ除去データ (c) 混合試料の再構成試料像

### 3. 今後の展開

本研究課題では、XFEL によるシングルパルス計測と開発した溶液試料ホルダによる液中試料の高分解能イメージングを実証することに成功した。今後、XFEL 実験時に問題となった計測中のチャンバー内真空度悪化や溶液試料ホルダの作製精度などの技術的課題を克服し、液中試料の新たな顕微イメージング技術として本手法の確立を目指したい。またそれと並行して、生体試料や三液以上の混合を行うような、より複雑な溶液系の計測も実現できるよう、溶液試料ホルダの新たな構造も開発していきたい。

また本研究では主に硬X線を利用した実験を行ったが、将来的には軟X線領域での計測も検討している。軟X線は物質との相互作用が強く、試料の化学状態の解析などを行うのに適した性質を持っている。しかし逆に、一般的には物質に対する吸収率が高く、液中試料のその場観察には適していない。例外的に水の窓領域と言われる波長 2.2~4.4 nm 範囲では、水に対する吸収が弱く、水溶液の試料を観察することが可能であると言われている。今後、溶液試料ホルダの薄型化などの改良を行い、軟X線領域での液中試料イメージング実験を試みるとともに、吸収分光などの軟X線分析技術との組み合わせを試みていきたいと考えている。

### 4. 自己評価

本研究課題では、XFELによるシングルパルス計測により液中試料特異構造の高分解能イメージングを実証することに成功した。新型コロナウイルス感染症の影響で大きな遅れが生じたものの、新開発の溶液試料ホルダおよび機械学習を利用した高精度化アルゴリズムの実証に成功しており、当初目的を実現できたものと考えている。一方、可能性を検討した生体試料の計測に関しては、現状のシグナル強度ではそのまま計測するのが困難であることも発覚し、今後光子エネルギーや測定対象など、実験条件に関して再検討を行う必要がある。

しかし、従来観察困難な対象を高分解能イメージング可能にし、溶液環境と切り離せない化学反応、例えば新規ナノ粒子の合成手法の開発などへのインパクトは大きいものと考えている。今

後、X 線領域に限らず様々な分野の研究者と協力し、本研究で得られた成果を最大限に活用できるように努力していきたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. T. Kimura, A. Suzuki, Y. Yang, Y. Niida, A. Nishioka, M. Takei, J. Wei, H. Mitomo, Y. Matsuo, K. Niikura, K. Ijro, K. Tono, M. Yabashi, T. Ishikawa, T. Oshima, Y. Bessho, Y. Joti and Y. Nishino. Micro-liquid enclosure array and its semi-automated assembling system for x-ray free-electron laser diffractive imaging of samples in solution. Review of Scientific Instruments, 2020, 91, 083706.

XFEL での計測に対応した溶液試料ホルダの作製および、得られたコヒーレント回折パターンのデータ解析に関する論文である。構造や作製方法の他、性能評価を行うとともに、高集積化するため必要な自動アライメント装置に関しても述べている。SACLA で実際に計測した金ナノ粒子からの回折パターンに対するノイズ除去などのデータ処理についても述べている。

2. T. Koyama, H. Yumoto, T. Kimura, A Suzuki, T. Kameshima, Y. Joti, K. Tono, N. Tani, T. Tachibana, Y. Konishi, Y. Bessho, Y. Nishino, M. Yabashi, and H Ohashi, Development of Multilayer Focusing Mirror System for XFEL CDI Experiments of Biological Particles, Microscopy and Microanalysis, 2018, 24(1), 294

理化学研究所および高輝度光科学研究センターと共同で開発した、XFEL での高分解能イメージングを実現するための新たな多層膜ミラーの開発に関する論文である。100 nm 以下のサイズの試料から XFEL のシングルパルスでコヒーレント回折パターンを取得するためには、集光ミラーで X 線を非常に小さく絞り光子密度を大きくする必要がある。集光ミラー表面に多層膜を施すことにより大 NA を実現しており、数 nm 分解能での XFEL シングルパルスイメージングへの道を開いた。

3. A. Suzuki, T. Kimura, Y. Yang, Y. Niida, A. Nishioka, T. Tachibana, M. Takei, K. Tono, M. Yabashi, T. Ishikawa, T. Oshima, Y. Bessho, Y. Joti, Y. Nishino, Design of liquid cell toward three-dimensional imaging of unidirectionally-aligned particles in solution using X-ray free-electron lasers, Physical Chemistry Chemical Physics, 2019, 22(5), 2622.

XFEL での計測に利用可能な新たな溶液試料ホルダの作製及び評価に関して述べた論文である。現状のコヒーレント回折イメージングでは試料の二次元投影画像が得られるが、将来的な三次元イメージングを目指して、溶液中の試料に対して最大 70° の斜入射での照明を実現している。SiN 薄膜上に電子ビームリソグラフィで作製したテストサンプルの斜めからのイメージングに成功している。

### (2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・招待講演(著者、題名、学会名、場所、年月日)

1. T. Kimura, Radiation-Damage-Free Imaging of Solid Electrolytes for Lithium-Ion Batteries by Single-Shot Coherent Diffraction Imaging, International Conference on X-ray optics, detectors, sources, and their applications 2018, Pacifico Yokohama, Yokohama, 2018/04/26
2. 木村隆志、コヒーレント X 線光源を利用した新規イメージング技術の開発、LASOR セミナー(日本、千葉)、2019/9/30

・主要な学会発表(著者、題名、学会名、場所、年月日)

1. T. Kimura, New design of environmental cells for X-ray laser diffraction imaging of samples in mixed solution, X Ibero American Optics Meeting, XIII Latin American Meeting on Optics, Lasers and Applications, and Mexican Optics and Photonics Meeting, Cancun International Convention Center, Cancun, Mexico, 2019/09/26
2. 木村隆志、X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント回折イメージングの高度化、第 33 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(日本、愛知)、2020/1/11
3. 木村隆志、X 線自由電子レーザーを用いたコヒーレント回折イメージング用マイクロ流路型環境セルアレイの開発、2017 年度精密工学会春季大会、2018/3/17