

BL20B2におけるX線位相差CTの現状報告

財団法人高輝度光科学研究センター
 利用研究促進部門 星野 真人、上杉 健太郎
 八木 直人

Abstract

X線位相イメージングは、X線と試料間において吸収コントラストによるイメージングでは試料中の僅かな密度差を認識できないような場合において、非常に高い感度でそれらを可視化できる測定手法である。位相情報を用いたX線位相差CTは、試料中の僅かな密度差に由来する構造を三次元で測定することが可能であり、主に軽元素で構成された軟組織構造を非破壊かつ高いコントラストで測定できるなど、バイオ・メディカルイメージングへの応用が可能である。BL20B2では、タルボ干渉計を用いたX線位相差CTが可能な光学系の整備を行ってきており、ラット脳全体の高感度三次元イメージングなど、ユーザーの持ち込み試料に対して、測定が行える環境が整っている。

1. はじめに

BL20B2は、SPring-8の中でも中尺の偏向電磁石ビームラインとして供用されており、特にX線イメージングビームラインとして、国内外問わず幅広いユーザーが実験を行っている^[1]。イメージングにおいて、その見やすさを決定するのは、測定対象である試料とその周辺部との間で、どの程度コントラストの差（構造の鮮明さ・見やすさ）が生じるかであり、一般的なX線イメージングの場合、試料との相互作用（吸収）により、そのコントラストは決定される。しかしながら、測定対象によっては、使用するX線に対して十分な吸収コントラストが得られない場合がある。これは、特に測定対象が炭素や水素などの、主に軽元素で構成された生体軟組織の場合顕著である。普段我々が目にするレントゲン写真では、骨のような比較的高い密度が高い組織の場合、吸収コントラストだけでも他の組織と分離して測定することができる。しかし、例えば脳の中において、白質と灰白質組織間を染色等することなく高いコントラストで観察しようと思うと、吸収コントラストだけでそれらを鮮明に可視化することは極めて困難である。もちろん波長の長いX線（透過力の低いX線）を用いれば、ある一部の組織に対しては実効的に吸収量が増え、その構造を観察できるだけのコントラストが得られるかもしれないが、その場合、試料は波長の長いX線でも透過できるような薄切片にする必要があり、バルク情報は得られないというジレン

マに陥る。そこで、このような軟組織であっても比較的大きな体積を持つ試料に対して、吸収コントラストに比べてはるかに高いコントラストで測定できる手法が、X線の位相情報を用いたイメージング技術である^[2]。

X線と試料との相互作用は、試料の複素屈折率 ($n = 1 - \delta + i\beta$) が大きく関係しており、吸収コントラストによるイメージングの場合、コントラスト生成には複素屈折率における虚部項である β が関与してくる。一方で、吸収を無視した位相イメージングの場合 ($\beta = 0$)、実部項である δ が画像コントラストに対して支配的となる。通常10 keV以上の高エネルギーX線の場合、軽元素に対しては、 δ は β に対して3桁程度大きな値を持つので、 δ を用いた位相イメージングは、 β による吸収イメージングに比べて、約1000倍高い感度で測定することが可能となる。

X線の位相情報を用いたイメージング技術としていくつか測定手法が提案されているが、その中でもとりわけ高い感度で測定できる手法が、X線干渉計を用いた位相イメージングである^[2]。BL20B2では、X線干渉計としてX線タルボ干渉計を導入したので、その整備状況と実際の試料の測定例について紹介する。

2. X線タルボ干渉計の概要

タルボ干渉計を用いたX線位相イメージングにつ

いては、文献 [3] ~ [5] に詳しく記載されているので、ここでは概要だけ述べる。タルボ干渉計は、透過型の回折格子を 2 枚用いるだけで実現することができる。試料によって僅かに屈折した X 線の角度広がりをもつ 2 枚の回折格子をアナライザーとして用いることで検出し、その角度広がりから試料による位相シフト量（微分位相）を求め画像化する。タルボ干渉計は、位相格子 (G1) と吸収格子 (G2) によって構成され、試料の直後に G1、検出器の直前に G2 が設置される [3]。タルボ干渉計の原理は、ある程度波面がそろった X 線が G1 を通過することにより、その通過直後では透過 X 線に強度変化は得られないが、ある距離を空間伝搬することで、回折効果により G1 と同じピッチを持った格子状強度分布（自己像）が形成される。試料を G1 の直前に置いた場合、この自己像は、試料によって歪められた波面の情報（試料によって屈折した X 線ビームの角度広がりの情報）を反映しているため、これを解析することにより、試料による位相シフト量を調べることができる。しかし、G1 の格子ピッチは、10 μm もしくはそれ以下であるのが一般的なもので、その格子構造を十分な空間分解能と広い視野で測定可能な検出器は存在しないのが現状である。そこで、自己像が生成される位置に G2 を設置することにより、同じ格子ピッチを持った強度パターン同士の重ね合わせにより、モアレ縞が形成される。このモアレ縞は自己の情報を反映し、その縞間隔は、調整次第で格子パターンに比べて十分大きなものにするのが可能なので、従来の X 線画像検出器を用いても十分測定することが可能である。フリンジスキャンと呼ばれる位相回復法を用いることで、モアレ縞から近似的に

位相シフト量（実際得られるのはその 1 次元微分位相）を見積もることができる。

3. タルボ干渉計を用いた X 線位相差 CT 光学系

BL20B2 における X 線位相差 CT では、ラットの脳のような数 10 mm 径の大きさの試料を測定することを想定しているため、断面積の大きな X 線ビームが得られる医学利用棟実験ハッチ（光源からの距離 ~ 200 m）において光学系の整備を行った。位相差 CT 光学系の概要を Fig.1 に示す。光学系上流部から試料、G1、G2、X 線画像検出器の順番で並んでいる。試料と検出器の間に 2 枚の回折格子が設置されている以外は、BL20B2 で実施されている X 線マイクロ CT の光学系と同等のセットアップである。X 線マイクロ CT の詳細については、ビームラインのホームページ [1] に記載されているので、ここでは割愛する。フリンジスキャンによって得られた試料の微分位相像を、1 次元積分することにより位相像を求める。フラットフィールド補正として、試料を除いた位相像（ダイレクト像）を同様の方法で作成し、試料の位相像からダイレクト像を減算した画像を投影像として CT 再構成を行う。試料の位相投影像は X 線パスに対する位相シフト量の積算で表わされるため、CT 再構成により単位ピクセルあたりの位相シフト量（試料とその周りの媒質との位相差）を見積もることができる [4]。位相シフト量と複素屈折率における δ は比例関係にあるため、再構成によって得られたピクセルあたりの位相シフト量から、屈折率差分布 ($\Delta\delta$) を計算することができる。

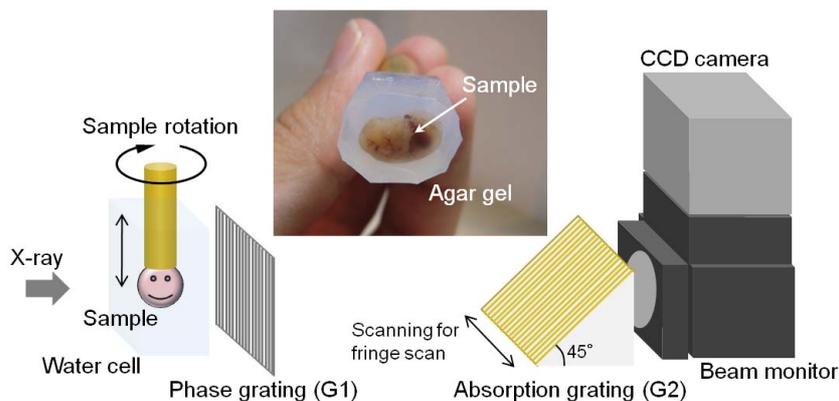


Fig.1 Illustration of X-ray grating interferometer. Inset: Photograph of sample embedded in agar block.

3-1 試料まわり

X線位相イメージングでは、試料を空气中に設置してしまうと、試料と空気の境界部分において、急激な位相変化（密度差）が生じてしまう。感度が高いX線干渉計では、急激な位相変化は、その境界部分で正しく位相情報を回復することを困難にする。そこで、空気に比べて密度が試料に近い溶液を満したセル中で測定を行うことで、試料とその周囲の溶媒との位相差を正しく検出することができる。また、試料を溶液中で測定することにより、乾燥による試料の変形を防ぐこともできる。生体組織の測定では、生理食塩水を用いている。試料セルの厚みは測定する試料の大きさに応じていくつか選択可能であるが、大抵の場合は厚さ25 mmのセルが使用される。試料については、ホルマリン固定されたものを標準的な試料と想定しており、ホルマリン固定された試料はそのままの状態、もしくは2%濃度のアガロースゲル（寒天）に包埋し試料ステージに取り付けられる。アガロースゲルに包埋した試料をFig.1中に示す。アガロースゲルに包埋することにより、試料の取り扱い（試料固定用ピンへの取り付けなど）が容易となり、ゲル自体がバッファーとなり不注意により試料自体を傷つけてしまう危険性も低減される。測定後にアガロースゲルを破ることにより、容易に試料を取り出すこともできる。これにより、位相差CTで測定した試料を研究室に持ち帰って、染色切片を作成し関心領域を顕微鏡観察することにより、位相差CTで測定したデータと比較することも可能である。

試料を溶液で満したセル中で回転させながら測定する都合上、試料は上から吊るすような形で取り付けられる。CT測定を行うための回転ステージと試料は、真鍮製のロッドを介して取り付けられており、試料交換はそのロッドごと交換する。

3-2 回折格子

G1およびG2（NTT-AT社製）は、それぞれ電子ビームリソグラフィ法によって製作されたものである。G1およびG2の外観をFig.2に示す。G1のパターン材質はタンタルであり、そのパターン厚は2.1 μm である。また、G2のパターン材質は金であり、そのパターン厚は16.6 μm である。格子ピッチはそれぞれ10 μm であり、格子の描画領域は25 mm \times 25 mmである。G1とG2間距離（分数タルボ距離 $L_T = pd^2/2\lambda$, $p=1,3,5,\dots$ ）は、格子ピッチ

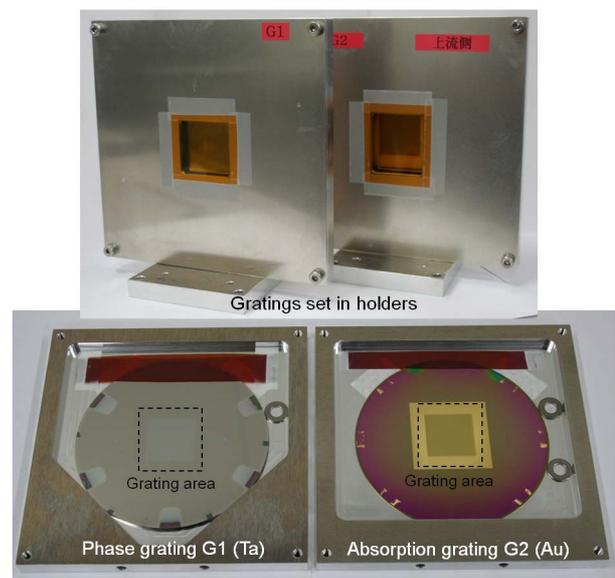


Fig.2 Photograph of phase grating (left) and absorption grating (right).

dとX線の波長 λ によって決定され、X線エネルギー25 keVの場合、1次 ($p=1$) の分数タルボ距離は1 mとなる。

G2は、パターン厚みが16.6 μm であるため、25 keVのX線の透過率は約26%である。G2は、X線ビームに対して格子部分が完全吸収体であることが高いVisibilityのモアレ縞を得る上で望ましい（このVisibilityは高いほどよいとされる）。しかし、実際はパターン加工技術の制約により、完全な吸収パターンを作成することは困難である。そこで、G2による実効的な吸収率を上げるために、X線の光軸に対して格子パターンを45度傾けて使用している（Fig.1参照）。これにより、実効的な透過率は約15%に減少し、モアレ縞のVisibilityも傾ける前に比べて実測値で約1.3倍に向上する。

原理で述べたように、試料によって屈折したX線の角度広がりから位相シフト量を求めているため、観測面を試料から遠ざけることによりX線の角度広がりも大きくなり、干渉計としての感度は向上すると思われる。理想的な条件では、上記の式でpの次数を3次、5次と増やしていくことにより、格子間距離は大きくなり、感度も向上する。しかし、一般的な放射光光源の場合、X線ビームは部分的にコヒーレントな光であり、ある有限の大きさを持った放射光光源によって決定される格子面上でのコヒーレントな領域もまた有限の大きさとなる。これにより分数タルボ距離の次数を大きくしていくと、それ

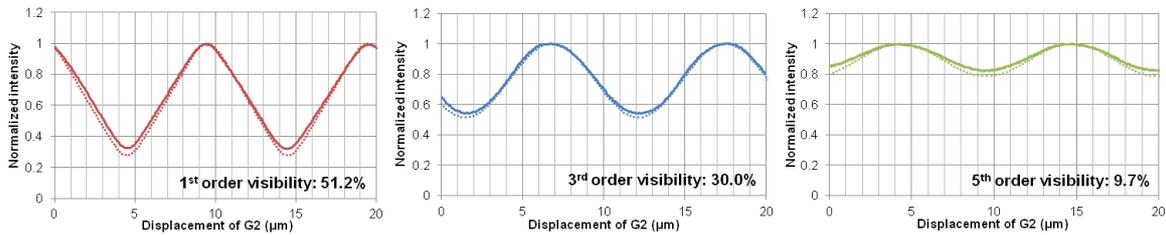


Fig.3 Visibility curves measured at 1st, 3rd, 5th fractional Talbot distance. Solid line: measured visibility, Broken line: calculated visibility.

だけ広いコヒーレントな領域が必要となり、高次になるほどモアレ縞のVisibilityは低下していく。Fig.3に、 $p=1, 3, 5$ 次におけるモアレ縞のVisibility曲線を示す。次数が大きくなるに従って、光源のコヒーレンスの影響により、モアレ縞のパターンは三角波形状から正弦波形状になり、Visibilityも低下していくことがわかる。また、これらのVisibility曲線は、理論計算（破線グラフ）とも良く一致する。一方で、試料から検出面までの距離が大きくなると、一般的にフレネル回折による試料エッジ部分のボケの影響により、空間分解能は低下する傾向にある。よって、格子間距離をむやみに大きくしてしまうと、Visibilityの低下や、空間分解能の低下を招き、測定光学系としての性能はむしろ低下してしまうため、高い空間分解能と高感度イメージングが両立できるような条件で測定を行う必要がある。これらを考慮し条件を変えて測定を行った結果、X線エネルギー 25 keVにおける測定では、3次の分数タルボ距離 ($p=3$, 格子間距離 3 μm) が妥当と判断し、この条件で測定が行えるようなセットアップになっている。

3-3 X線画像検出器

X線画像検出器は、X線ビームを可視光に変換するビームモニターと、その可視光像を検出するCCDカメラによって構成される。ビームモニター、CCDカメラ、可視光像をCCDカメラに結像するためのカメラレンズ系を適宜選択することにより、実効的なピクセルサイズや撮影視野をある程度調整することは可能である。現状では、ピクセルサイズ 10～25ミクロン程度で測定を行っている。X線画像検出器に関しては、基本的にX線マイクロCTと共通していることが多く、詳細については省略するが、CCDカメラの特性などはビームラインのホームページで確認することができる^[1]。

4. 生体軟組織のX線位相差CTによる測定例

BL20B2におけるX線位相差CTでは、これまでにラットやマウスなど実験動物の摘出組織（脳、脊髄、眼球、心臓など）やマウス胎児に対して、吸収コントラストに比べて試料中の僅かな密度差を三次元で鮮明に可視化できることを確かめている^[6]。位相差CTにより測定可能な試料の大きさは、原則的に回折格子の面積に依存しており、現状で幅 23 mm、高さ 17 mm 程度であるが、オフセットCTを用いることにより、最大幅 45 mm 程度の試料（高さは 17 mm）まで測定することが可能である。上記のピクセルサイズで測定を行った場合、測定時間は1サンプルあたり 3～4 時間程度で、空間分解能はピクセルサイズにも依存するが概算で 50 μm 程度である。X線位相差CTでは、軟組織で構成された試料に対してその僅かな密度差に由来する構造を解析するのに威力を発揮する。しかし、骨のような密度が高い部位が軟組織に付着しているような場合、骨と軟組織の境界部分で大きな位相差が生じてしまうため、X線干渉計による測定は非常に困難となる。よって、測定試料を準備する際は、その試料中で密度が極端に異なる部位が混在しないように注意する必要がある。このような高い感度での測定では、同様の理由で試料に小さな気泡が付着することにも注意が必要である。気泡は、試料をアガロースに包埋する際に付着しやすい。気泡の付着を防ぐために、包埋前に減圧装置を用いて脱気を行うことも一つの方法である。

X線位相差CTの測定例として、ラット脳（ホルマリン固定済み標本）の測定結果について紹介する。検出器の実効画素サイズは 11.7 μm 、検出器の視野は 23 mm (H) × 15 mm (V) で回折格子によって制約される視野よりも僅かに小さいが、成体ラットの脳全体（大脳+小脳）を一度に測定することは可能である。試料を 0.12 度ステップで 180 度回転させる



Fig.4 Coronal section of rat brain obtained from X-ray phase contrast tomography.

間に、1500枚の位相像を取得した。1枚の位相投影像を得るのに、G2を走査しながら5枚の画像を撮影しているため、実際の取得画像枚数は投影数×5となる。Fig.4に、ラット大脳の冠状断面を再構成した位相差CT像を示す。吸収CTでは可視化することができない海馬の構造など明瞭に測定できていることがわかる。再構成画像のバックラウンド値の揺らぎ (3σ , σ は標準偏差) から求めた密度分解能は 2.8 mg/cm^3 であり、非常に僅かな密度差まで画像化できることがわかる。位相差CTによって得られている脳構造の情報は、染色切片画像に匹敵するほどの情報が得られていることが確かめられている。位相差CTを用いることにより、染色切片を作成することなく、非破壊で有益な三次元情報が得られることから、病理の現場への応用が展開されている (脳サンプル：小野寺宏博士提供)。

5. まとめ

BL20B2では、タルボ干渉計を用いたX線位相差CTが行える光学系を導入し、ユーザー利用実験において供用が開始されている。本稿で紹介したようなラット脳をはじめ、様々な軟組織に対してその僅かな密度差を高いコントラストで測定できることを確かめている。また、位相差CTの再構成によって得られる屈折率差分布は、試料が軽元素で構成されている場合、試料の密度と近似的に比例関係にある。これにより、試料密度を定量することが可能となり、例えば眼球の位相差CTにおいて、水晶体断面におけるたんぱく濃度勾配を定量的に評価するような試みもなされている^[7]。単に、CT測定により試料の断面画像や三次元画像を取得するだけでなく、定量分析ツールとして利用されることも期待される。

謝辞

国立病院機構西多賀病院の小野寺宏博士には、生体軟組織の測定例で示したラット脳の試料を提供していただいた。東京大学大学院の百生敦准教授には、BL20B2におけるX線干渉計を用いた位相イメージングにおいて、光学系を設計する上での貴重なアドバイスをいただいた。

参考文献

- [1] SPring-8におけるX線マイクロイメージング & マイクロCTについては以下のURL参照：
<http://www-bl20.spring8.or.jp/>
- [2] A. Momose: Jpn. J. Appl. Phys. **44** (2005) 6355-6367.
- [3] A. Momose, S. Kawamoto, I. Koyama, Y. Hamaishi, K. Takai et al.: Jpn. J. Appl. Phys. **42** (2003) L866-L868.
- [4] A. Momose, W. Yashiro, Y. Takeda, Y. Suzuki and T. Hattori: Jpn. J. Appl. Phys. **45** (2006) 5254-5262.
- [5] T. Weitkamp, A. Diaz, C. David, F. Pfeiffer, M. Stampanoni et al.: Opt. Exp. **13** (2005) 6296-6304.
- [6] M. Hoshino, K. Uesugi and N. Yagi: Biol. Open (in press).
- [7] M. Hoshino, K. Uesugi, N. Yagi, S. Mohri, B. Pierscionek et al.: PLoS ONE **6** (9) (2011) e25140.

星野 真人 HOSHINO Masato

(財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : hoshino@spring8.or.jp

上杉 健太郎 UESUGI Kentaro

(財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : ueken@spring8.or.jp

八木 直人 YAGI Naoto

(財)高輝度光科学研究センター 利用研究促進部門
〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町光都1-1-1
TEL : 0791-58-0833
e-mail : yagi@spring8.or.jp