

# X 光相對比高速高解析度顯微術的原理及應用

## The Principles and Applications of High Speed High Resolution Phase Contrast Radiology Based on Synchrotron X-Rays

胡宇光、楊宗燁、王長海、施元丁、諸丁鎬、Giorgio Margaritondo

Yeu-Kuang Hwu, Tsung-Yeh Yang, Chang-Hai Wang, Yuan-Ting Shih, Jung Ho Je, Giorgio Margaritondo

X 光成像術是 X 光最古老且在應用上是最廣的領域。近年來，由於同步輻射光源的優異性能，造成了此技術在解析度及影像對比品質方面有了突破性的進展。當同步輻射光源的高空間同調性被應用在新穎的超高解析度 X 光顯微術時，其結果特別地引人注目。利用小劑量 X 射線輻射即可獲得高品質的 X 光顯微影像和動態影片。這些技術在材料科學、生物學和醫學研究方面上已經產生了重要的應用。

Radiology is the oldest and by far the largest field of application of X-rays. In recent years, this domain has been literally revolutionized by the exploitation of the unique characteristics of synchrotron sources. The results are particularly spectacular when the high spatial coherence of the radiation is used for novel and powerful approaches to radiology. The results are very high quality microradiology and microtomography images and movies-taken with a limited X-ray dose-that find a variety of applications in materials science, biology and medical research.

### 一、前言

自從倫琴 (Rontgen) 發現 X 光以來<sup>(1)</sup>，X 光成像術 (radiology) 顯然是使用 X 光最多樣且應用最廣泛的領域。其中診斷用 X 光顯微術就是促成醫學進步的一個重要里程碑。它改變了傳統的診斷模式，使醫生能對許多症狀從單純猜測演進到利用此

可靠的資訊建立完整的分析，幫助病理的診斷。

相對於大多數常用的光源而言，因 X 光的波長極短，一直有科學家不斷地嘗試提高 X 光成像的解析度，希望進一步利用它來進行顯微術獲得有用的資訊。隨著科技的進展，但受限於 X 光光源品質，就大程度上來說，到目前為止利用 X 光顯微術的成效仍然相當不足<sup>(2-15)</sup>。近年來情況已大幅

地改觀，主要是基於同步輻射光源的發展，使得 X 光的光源物理性質可有相當大的進展。譬如說 X 光的空間同調性已得到初步實現<sup>(2,5)</sup>，也使得在 X 光顯微術中同調性的影響變得極為重要。

建立在同步加速器基礎上的 X 光顯微術的確是一迅速發展、快速成長的領域，其所造成的影響從初步小規模的研究，到現在已經在不同的領域裡有了重要的研究結果<sup>(2-15)</sup>。這樣的發展對材料科學和生物學來說有其特別的重要性 (例如，對材料動態的非破壞性檢測分析及單一細胞的 X 光影像等)<sup>(16)</sup>，另外在醫學上的應用，其遠景也相當令人拭目以待<sup>(2,3)</sup>。

本文將對於這個領域的發展和近年來的成果進行回顧。首先將討論同步輻射 X 光顯微術有別於一般 X 光顯微術的概念及理論背景<sup>(3)</sup>。並討論這個領域發展的一些實際技術，同時介紹在材料科學和生物學中已獲得的一些成果。

## 二、原理及技術背景

### 1. X 光顯微成像原理

各種類型的 X 光顯微術都是基於光子與凝聚態物質 (軟的或硬的) 之間相互作用。為了簡化處理，我們考慮沿著 Y 軸線性偏振的單色平面電磁波沿著 X 軸傳播的特殊情形。在真空中上述電磁波的電場可以被表達為：

$$E_y(x,t) = E_0 \exp[i(kx - \omega t)] \quad (1)$$

這些符號代表它們的一般物理意義；即  $E_0$  是與強度的均方根值成比例， $k$  是波數 (等於  $2\pi/\lambda$ ， $\lambda$  是波長，對應與三維空間中的波向量)， $\omega$  是角頻率。當上述電磁波在物質中而非在真空中傳播時，波函數可寫成：

$$E_y(x,t) = E_0 \exp[i(nkx - \omega t)] \quad (2)$$

其中  $n$  是與頻率相關 (可寫為  $n(\omega)$ ) 的材料複數折射係數。 $n(\omega)$  的虛數部描述了吸收的衰減，而其實數部則決定波的相位，也就是對應於可見光光學

中所描述的現象，像折射、干涉和繞射等現象的 (實) 折射係數。對於絕大部分材料而言，在適合於 X 光顯微術的光譜範圍內，其對 X 光的吸收量是很有限的。此外，因為折射很小，折射係數的實數部很接近在真空中的數值 ( $= 1$ )。因此，複數的折射係數通常可被展開而表達成下面的形式：

$$n(\omega) = 1 - \delta(\omega) + i\beta(\omega) \quad (3)$$

在這裡  $\delta$  和  $\beta$  兩者是很小的正數，值得注意的是方程式 (3) 中因為 X 光的折射性質 ( $n < 1$ ) 所以  $\delta$  是正值，也就是說其對折射率的貢獻為負。這是不同於一般的可見光，其折射率通常大於 1<sup>(2)</sup>。

所有的 X 光成像術都基於相同的原理：光子束進入目標物體，然後由二維探測儀器來接收穿過樣品後的 X 光分布。因為樣品內部的各部分對 X 光光子之作用不同 (受到其複數折射係數的影響)，造成穿過樣品後 X 光在垂直光進行方向平面的分布有所變化，分析這些變化可了解樣品各部複數折射係數的分布，進而了解物體內部的細微結構。從理論上來說，複折射係數的實部和虛部在這一機制中都有作用<sup>(4)</sup>。然而在實際情形中，除非 X 光束具備高同調性，否則折射係數的實數部 ( $1 - \delta(\omega)$ ) 的影響並不明顯<sup>(2,4)</sup>。例如標準醫用 X 射線儀的光源多藉由高壓電子束轟擊金屬陽極板而產生，因其波長範圍寬、光源尺寸大、光束發散，因而都不具備同調特質。因此在標準的 X 光成像技術中，通常省略掉折射係數實數部 ( $1 - \delta(\omega)$ ) 的效應。事實上迄今為止，所有的醫用 X 射線診斷儀都是根據樣品不同部位間對 X 射線吸收 (折射係數的虛數部) 的差異來進行成像的。

### 2. 同步輻射 X 光的同調性

同調性一般是指當一個輻射源的波長 (光子能量) 被限制在一個極小的範圍內，並且光源的尺寸和角發散性足夠小<sup>(2,4)</sup>，此時干涉現象是可被觀察到的一個特性指標。同調性是與波的現象 (諸如干涉與繞射) 密切相關的一種特性。簡單地說，同調性是一種可使波產生可偵測的干涉和繞射現象的特性。

根據此一概念導引，我們可以區分兩種不同的同調性，縱向 (longitudinal，或稱為時間，temporal) 同調性及橫向 (lateral，或空間，spatial) 同調性。這些概念可以藉由分析小孔繞射現象來理解。由點光源所放射出的單色波，經由小孔而被偵測，會產生圓形的繞射圖形。對於具有有限波段的非單色波，因每個波長擁有各自大小不同的繞射圖樣，以致於如果波段很寬，這些單獨的圖樣疊加後將會互相抵銷，所產生的圖樣將無法區別任何繞射圖形。因此，此光源即不具有同調性，或更嚴格的來說，是不具有時間同調性。而對於中等寬度的波段，其波長足夠小，因而可產生最終的繞射圖樣。雖然這些圖樣有點模糊不清，但仍可以觀察得到，所以此種光源擁有一定程度的時間同調性。

為了瞭解空間同調性，考慮具有較大放射範圍的單色光源而不是點光源。光源中的每個點都可以產生一個繞射圖樣，但圖樣的重疊可能使最終的繞射圖樣消失。假設光源的面積足夠小，最終的繞射圖樣仍然可見，因此這光源擁有一定程度的空間同調性。如果假設光源輻射的發散角是有限的，光源某些部分的發射光子可能無法到達小孔，而導致形成繞射圖樣的寬化。所以要定義空間同調性，必須同時考慮光源尺寸和發散角。空間同調性會隨光源尺寸或隨發散角度的減少而增加。

從定量的觀點切入，時間同調和空間同調的程度可用同調長度 (coherence length) 和同調效能 (coherence power) 兩個參數來描述。時間同調性對應於同調長度  $L_c$ 。同調長度可以粗略地定義為，由波長寬度引起的位相變化從零增加到  $2\pi$  所對應的光程長度。由方程式 (1)，波的相  $\psi$  等於  $kx = 2\pi x/\lambda$ ，再經由微分而得  $\delta\psi = 2\pi x \delta\lambda/\lambda^2$ 。因此，在光程長度上  $\delta\psi$  由 0 增加到  $2\pi$ ：

$$L_c = \lambda \left( \frac{\lambda}{\delta\lambda} \right) \quad (4)$$

其中  $\delta\lambda$  為絕對波長帶寬， $\delta\lambda/\lambda$  為相對帶寬。要達成時間同調，需有大的同調長度。以小孔繞射為例，如果  $L_c > \lambda$  此輻射光源即擁有足夠的時間同調，因此

$$\delta\lambda < \lambda \quad (5)$$

為描述空間同調，選擇同調效能為參數，定義如下：

$$P_c = \frac{\lambda^2}{\epsilon_y \theta_y \epsilon_z \theta_z} \quad (6)$$

其中  $\epsilon_y$  和  $\epsilon_z$  為  $y$  和  $z$  橫截面方向的光源尺寸， $\theta_y$  和  $\theta_z$  為相應的輻射發散角。高空間同調即高同調效能，其要求光源尺寸和發散角要小。

以小孔繞射為例，同調效能的意義並不難理解。如果我們選取  $y$  軸尺寸為  $\epsilon_y$  的光源，每一個點光源可假設對應一個繞射圖樣。所有圖樣到中心點的最大角距離為  $\epsilon_y/L$ ，其中  $L$  為光源到小孔的距離。粗略來說，觀察到最終繞射圖樣的條件是，角距離必須小於中心圖樣和第一個最小圖樣的角度， $\lambda/d$ ，其中  $d$  為小孔的厚度。

因此，空間同調的條件為  $\epsilon_y/L < \lambda/d$  或  $d/L < \lambda/\epsilon_y$ 。 $d/L$  對應於小孔的照射角：如果發散角在  $y$  方向為  $\theta_y$ ，只有  $(d/L)/\theta_y$  部分可以照射到小孔。最大的可以照到小孔並符合空間同調的部分為  $\lambda/(\epsilon_y \theta_y)$ 。同樣的結論也適用於  $z$  軸方向。因此可以照到小孔並符合空間同調的部分為  $\lambda^2/(\epsilon_y \theta_y \epsilon_z \theta_z)$ ，這與方程式 (6) 是一致的。在繞射極限時， $\epsilon_y \theta_y$  和  $\epsilon_z \theta_z$  擁有最小值並約為  $\lambda$ 。因此根據方程式 (6)，如果  $P_c = 1$ ，此光源將具有全橫向 (空間) 同調。

從方程式 (4) 和 (6) 可以理解為何 X 光比可見光或紅外光更難達到同調的特性。事實上，高時間同調和高空間同調約定於波長大小，因而當  $\lambda$  變小時其更難達到高時間同調和高空間同調。

如上文提及的，傳統的 X 光源很難實現同調性。這是因為它們的光源尺寸，發散角和頻寬都非常大，不符合方程式 (4) 和方程式 (6) 所規定的條件。值得注意的是，非同調的光源可以轉換為同調性的。寬頻光源可以藉由單光器過濾的方法來減小頻寬。如果只想達成空間同調，可使用帶有小孔的不透光遮蔽物，將其置於遠離發散的傳統光源處，這樣小孔變為具有空間同調的二次光源。由於這些

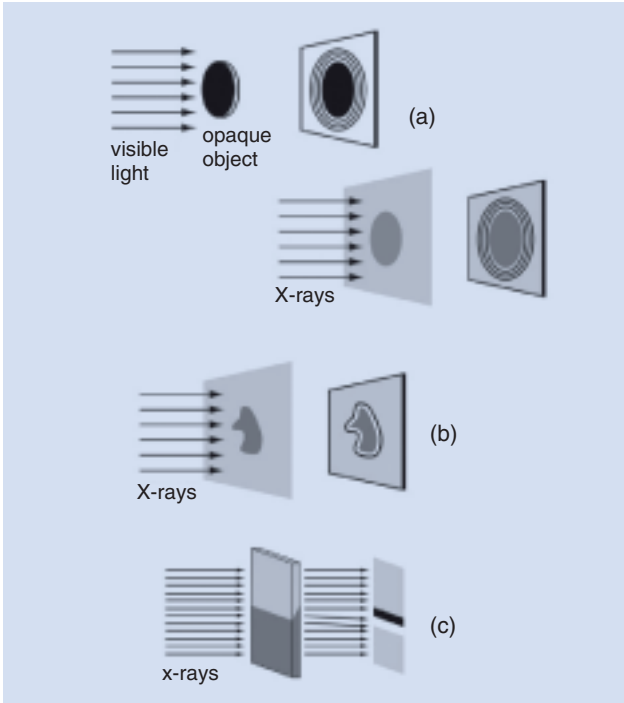


圖 1. 利用折射係數差異來加強邊緣對比度的同步輻射 X 光顯微照片：(a) 類似於可見光在不透明物體邊緣所產生的菲涅爾繞射的繞射條紋；(b) 由折射對比機制而產生的明暗相間的特徵條紋；(c) 折射對比機制在傾斜的邊緣所產生的邊緣增強效果。

方法只利用小部分的光子強度，雖然可以提高同調性，但是會造成光源強度太弱，以致在實際上卻很難有實際的用途。

另一方面，同步輻射光源因其高準直、低度發散的光源特性，其自然的輻射（偏轉 (bending) 磁鐵在水平面偏轉接近光速的電子束所發出扇形的同步輻射光光束）已具備了相當高的空間同調性。此外使用所謂的插件元件，同步輻射光源通過聚頻或增頻 (wiggler or undulator) 磁鐵的控制從一個小點發出一道準確的平行光束，可以更大幅度提高空間同調性。至於時間同調性，通過聚頻 (undulator) 磁鐵同步輻射可以提供一道相當窄頻寬的光束，因此產生了時間同調性。另外也可以用單光鏡過濾掉發散輻射來增加時間同調性。偏轉 (bending) 和增頻 (wiggler) 磁鐵能使光子在水平面發出相對頻寬為 1 的輻射。其對應的同調程度已足夠滿足大部分的應

用，若有需要則可以進一步用單光器來增加時間同調性。

### 3. 同調性 X 光成像的機制

折射係數的虛數部與實數部影響了光波的振幅和相位，這些效應決定了偵測器所偵測到的波場及其強度。基於高同調性的 X 光顯微影像大致上和全像 (holography) 照相術在某些方面相當接近<sup>(5)</sup>。由於探測到的圖像包含了相位與強度的訊息，因此至少從理論上來說，經過適當的重組處理，應該可以還原物體的三維構造。這方法雖然可行但卻因重建需要更高的同調性而較不實際。在大部分的情況下，同調光所得影像並不常用全像術來重建三維構造。因為這方法相當的複雜且耗費時間，比較好的方式是減少得到的訊息量並專注在相關的特性上以加快處理速度。

為瞭解這個方法，我們採用非常簡單的成像機制的圖片加以說明。如圖 1(a) 所示，我們可以發現物體的邊緣因為不同的折射係數而產生明顯的一系列繞射條紋。這些條紋讓人聯想起由菲涅爾繞射 (Fresnel diffraction) 在不透明物體邊緣所產生的繞射條紋。這兩個現象的確很相似<sup>(14)</sup>，唯一的區別只是在於：對 X 光而言，沒有所謂的不透明物體，只是不同區域有不同的折射係數而已。但整體而言，其結果就如圖 1(a) 中的菲涅爾繞射條紋一樣<sup>(14)</sup>。

圖 1(b) 的結果和圖 1(a) 既相似又有不同。我們仍可看到邊緣加強效應。然而，一系列繞射條紋被較寬明暗相間的條紋所取代。其實造成這現象的原因可以用個比較簡單與折射現象類比的方式來解釋。圖 1(c) 表示了傾斜的邊緣所產生的折射可以造成明暗相間的條紋。其他形狀的邊緣也可以產生類似現象。

圖 2 以兩張 X 光影像來比較：一個只有呈現吸收對比，另一個則有同調性所產生的邊緣加強效應<sup>(14)</sup>。第二張圖可見到的小細節令人驚訝，在沒有複雜的影像重建處理之下，其結果比傳統 X 光顯微影像好得多。

圖 3 是以一根光纖當作樣品所取得的影像，顯示出了繞射與折射成像的轉變過程<sup>(15)</sup>，兩者主要的差異在於物體和偵測器的距離，只要改變這項參數

就可以選擇加強繞射或折射機制。這是一個很重要的特點，因為繞射包含較多的訊息(類似全像術)，而折射現象的觀察則較為簡單且容易瞭解<sup>(15)</sup>。在同調 X 光顯微影像的實際應用上，折射機制較佳，而且只要調整物體與偵測器就可以實現。

圖 3 所顯示的折射與繞射之間的交互作用可以與產生側向及縱向的同調性的條件一併探討和解釋。此方法的細節在參考文獻 14 與 15 有詳細的討論。觀察邊緣所產生的繞射條紋的條件為：

$$\frac{\delta\lambda}{\lambda} \ll 2 \quad (7)$$

$$\varepsilon_y \ll \rho_0 \sqrt{\frac{\lambda}{r_0}} \quad (8)$$

$$\Delta y < 0.5 \times \sqrt{r_0 \lambda} \quad (9)$$

$\rho_0$  為光源和物體的距離， $r_0$  為物體和偵測器的距離， $\Delta y$  則是垂直於加強邊緣且在偵測器的  $y$  方向上的側向解析度。方程式 (7) 顯示縱向同調性的條件非常容易滿足，幾乎所有的同步輻射光源即使不加單光器也能符合所需條件<sup>(5)</sup>。方程式 (8) 所要求的側向同調性也是相當微弱的條件，在合理的參數值之內，光源必須小於 0.1–0.2 mm，顯然大部分的同步輻射光源皆符合此要求<sup>(4,5)</sup>。方程式 (9) 給出



圖 2. 不同成像機制形成的含差草 X 光顯微照片的比較：吸收對比(上)和伴有由同調性所產生的邊緣加強效應(下)。

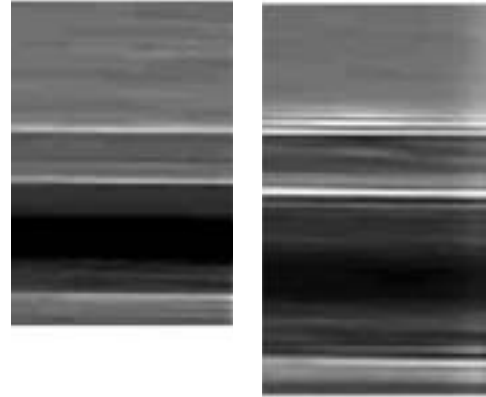


圖 3. 光纖成像機制由折射主導到繞射主導的轉變。

了很有趣的限制條件：物體與偵測器之間的距離必須大到足夠讓偵測器的側向解析度偵測到繞射條紋。換句話說，如果偵測器和物體的距離太短，就無法觀測到條紋。

橫向同調性的條件不能用一般的方程式來表示，因為這要依邊緣的特殊形狀而定。然而，簡單的分析<sup>(15)</sup> 即可證明絕大部分的同步輻射光源都可以滿足這些條件。最後，物體和偵測器的距離必須足夠讓偵測器的解析度能夠分辨兩種明暗條紋<sup>(15)</sup>，但是如果距離太大，則折射所產生的明暗條紋又會重疊在一起以至於模糊看不見。也就是說，折射機制只在某一段有限的物體－偵測器距離內才有效。

我們現在可以總結折射與繞射的交互作用如下：如果物體和偵測器之間的距離很短，則不會有邊緣加強效應，影像對比完全取決於吸收對比。隨著物體－偵測器距離的增加，折射條紋開始出現。當隨著物體－偵測器距離的進一步增加，繞射條紋開始出現而折射條紋則逐漸淡出。

從這個角度來說，同步輻射光源的出現正從三方面深深地影響著 X 光顯微術的發展<sup>(2,3,5)</sup>。首先，即使我們忽略由非 X 光吸收機制所引起的效應，同步輻射光源的高強度和準直性對於提高標準的 X 光顯微術已經多有裨益<sup>(5)</sup>。其次，利用 X 光吸收與頻率或能量相關性，同步輻射光源提供的單色 X 光束可以提高 X 光顯微術的效能<sup>(3,5)</sup>。一般的 X 光源強度都很弱，從中獲取的單色光會更弱，從而無法用於 X 光顯微術。而同步輻射 X 光不僅單色性

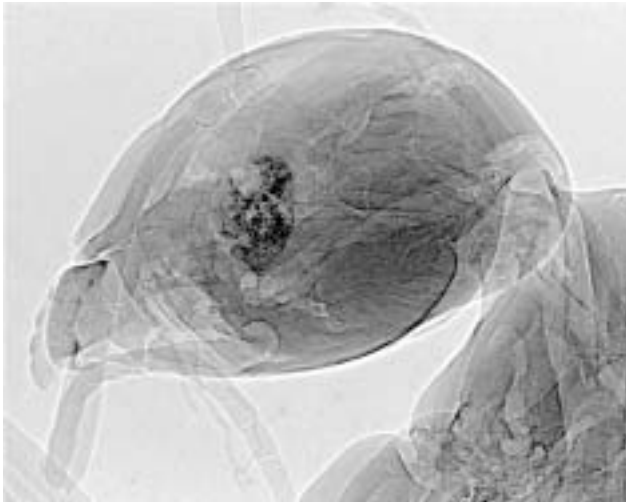


圖 4. 螞蟻頭部的 X 光顯微照片。所示影像是由三  
張  $600 \times 400$  平方  $\mu\text{m}$  的小圖像累加形成的，  
每一張小圖像的曝光時間位元小於 2 微秒。

好而且光強度更高。第三，由於同步輻射 X 光具有高同調性的特點，這使得我們可以同時利用複折射係數的實數部和虛數部所造成的效應來進行 X 光顯微術。

圖 4 為以同步輻射 X 光獲得的螞蟻頭部的 X 光顯微照片。圖中顯示了極佳的空間解析度，證明了可利用此技術來實現高解析的夢想。由於採用這種方法可以對微觀的物體進行臨場 (real-time) X 光顯微術和斷層掃描成像術，而且所有的影像能夠在快於一毫秒和小的 X 光劑量輻射下來獲得，因而是具有革命性的技術變革。目前 X 光顯微術的空間解析度已經小於  $1 \mu\text{m}$ ，而時間解析度也短於 1 毫秒。

### 三、同調性 X 光成像實驗設施

圖 5 顯示的是位於韓國浦項光源的 X 光顯微鏡光束線 (7B2) 略圖。這一條光束線也是 ICPCIR (International Consortium of Phase Contrast Imaging and Radiology)<sup>(17)</sup> 數條光束線中的一條。7B2 的光源來自於偏轉磁鐵組 (bending magnet)，儲存環中的電子束大小在垂直與水平方線分別為  $45 \mu\text{m}$  及  $120 \mu\text{m}$ 。7B2 光束線的全長為 34.8 公尺，已是浦項光源室內空間所能允許的最大長度。

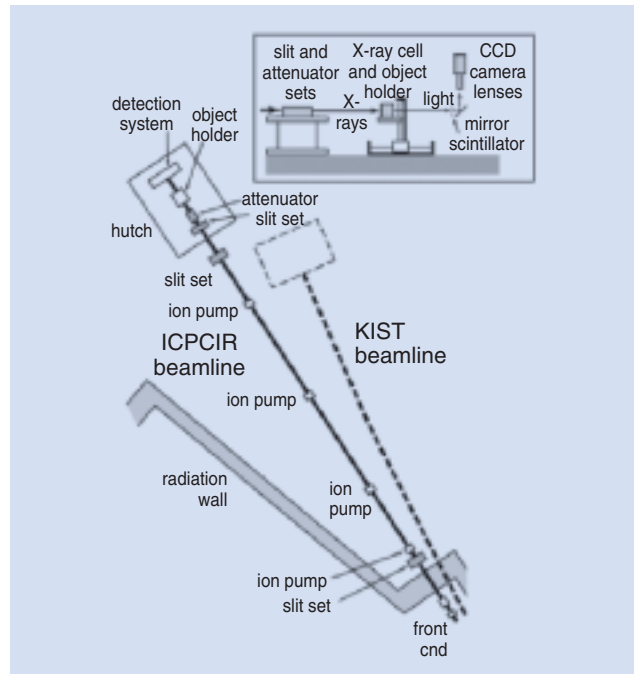


圖 5. 韓國浦項光源的同調性 X 光顯微光束線佈線圖。

ICPCIR 光束線中的另一條位於新竹同步輻射研究中心的 X 光顯微鏡光束線 (BL01A)。BL01A 的光源來自於一個超導移頻磁鐵 (super-conducting wavelength shifter, SWLS)，為三個實驗站中的一條，可有效地將光子能量提高至較高能區域，主要的光子能量起始於  $4 \text{ keV}$ ，向上延伸至約  $40 \text{ keV}$ 。儲存環中的電子束大小在垂直與水平方線分別為  $12 \mu\text{m}$  及  $120 \mu\text{m}$ 。已如前述，在成像技術中，光源—物體以及物體—偵測器之間距離的比例非常重要。因此長度越長的光束線，先天上在影像品質方面就佔了優勢。BL01A 光束線的全長為 18.6 公尺，受限於與其他相鄰實驗站的空間分配。光子的通量為  $1 \times 10^{12} \text{ photons/s}$ 。實驗站中的樣品台具有六軸的自由度 (精確度為  $0.1 \mu\text{m}$ )，外加旋轉及傾斜功能以配合諸如 X 光斷層掃描成像術或是其他需求。樣品離偵測器的距離可由滑軌來控制，可調範圍為 0.5 毫米至 1.5 公尺之遠。X 光穿過物體之後，它的強度變化是由閃爍計數晶片 (scintillator) 轉換成可見光，再經 CCD 相機加以紀錄的。閃爍計數晶片的材質為  $250 \mu\text{m}$  厚的  $\text{CdWO}_4$  單晶晶片，尺寸有  $10 \times 10$  及  $30 \times 30$  毫米見方兩種，視需

要而更換。 $\text{CdWO}_4$  的優點是具有較高的光轉換效率以及適當的解析度，而且非常能抵抗輻射損傷，適合長時間使用。在閃爍計數晶片上形成的影像，先經過光學顯微鏡頭放大之後，再由 CCD 相機加以擷取。光學顯微鏡頭是可拆換的，倍率介於 1 至 50 倍之間，視實驗需求而更換適當的鏡頭。CCD 相機部分亦有數種可供選擇，可供高速連續攝影(曝光時間短於 0.1 毫秒)或是長時間曝光使用。相機的畫素及灰階最大可至 2000 畫素  $\times$  2000 畫素及 16 位元灰階。

目前本設施的整體性能，如小於  $1 \mu\text{m}$  的空間解析度、小於 1 毫秒的時間解析度，已使它成為相當具競爭力的顯微工具。而 X 光獨特的穿透力，使我們得以觀察高於解析度  $10^4$  倍的厚樣品(例如以  $1 \mu\text{m}$  的解析度來觀察細胞，在厚達 0.5 公分的組織切片中仍可利用電腦斷層掃描方式重組出細胞結構)。其在影像上的卓越區分性及靈敏度 ( $> 10^{12}$  in volume) 正可以補足其他電子顯微鏡或是光學顯微技術的缺點，尤其當研究三維的微觀組織時，高解析度相對比顯微術將是最佳選擇。

## 四、應用

### 1. 材料科學

目前同調 X 光顯微技術在材料科學領域所解決的問題，最重要的一項就是解釋在工業上廣泛應用的電鍍金屬膜過程中，氣泡所扮演的角色。同調光 X 光顯微技術的關鍵在於可以微觀尺度和毫秒級時間解析度臨場獲得即時影像。這項技術使我們可以進一步瞭解電鍍過程的動態機制，也證實了一些從所未見的特徵<sup>(18,19)</sup>。

實驗主要研究的是在銅電極板上電鍍鋅的過程。該實驗是在一個 X 光顯微術實驗站所特別設計的微型電鍍槽中進行的。雖然 X 光的高穿透力使我們可以對電鍍的過程直接在溶液中觀察，但為了減少電解液對 X 光的吸收，在 Kapton 膜之間溶液層的厚度被縮短為小於 5 mm。陽極與陰極分別為鋅棒與銅棒。兩個電極相距約 8 mm，其間距可以藉由旋進或旋出電極來調整。為了控制電流密度，以一個  $0.5 \times 1.8 \text{ mm}^2$  開口的防蝕環氧樹脂包

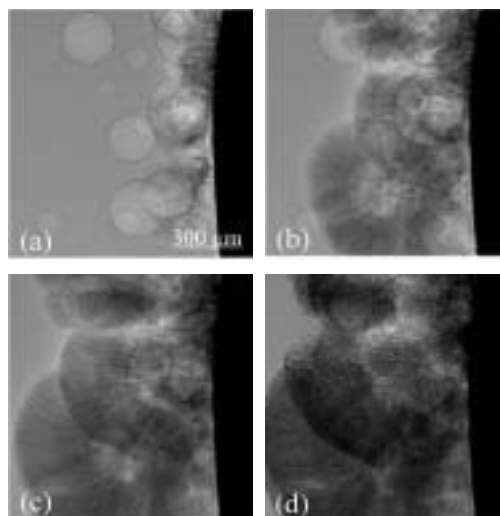


圖 6. 在銅電極上的電鍍鋅層的 X 光顯微照片，圖中顯示鋅的樹枝狀結構成長在氣泡上。上述影像的擷取時間間距為 6 秒。

覆銅棒來消除其導電性，利用直流電源供應器提供恆定的電流或偏壓來探討電流密度或電場對電鍍層的影響。

本實驗最引人注意的結果是直接觀察到氣泡對鍍覆層成長過程的顯著影響。雖然先前已經有理論研究預測過，但由於很難直接觀察到鍍覆層而無法令人信服。因為氣泡體積很小，且存在的時間十分短暫，所以使得直接觀察其中的微觀機制變得非常困難。我們所發展的同調性輻射顯微術克服了上述的這些障礙，並且直接顯示了如圖 6 中所見的奇特現象。最引人注意的是，我們可以看到金屬直接成長在氣泡上。依照實驗的條件不同，在氣泡上形成的鋅可以是樹枝狀、層狀或其他形狀。金屬在氣泡上成長解釋了在電鍍過程中常見的特殊鍍層缺陷：金屬原子包覆在氣泡表面上，接著氣泡消失而留下了永久的圓形孔洞，造成了鍍層的缺陷。

利用改變電流、偏壓及電解液濃度，我們可以得到不同的鍍覆層結構，例如圖 7 所示的柱狀或樹枝狀等鍍覆層型態。另一個重要的研究成果是利用輻射顯微術觀察到了電解液中離子濃度的變動。圖 8 為在不同電流密度 ( $5.5 - 88 \text{ mA/mm}^2$ ) 之下，在電鍍過程開始後 0.5 秒所拍攝到的影像，相機的快門速度為 100 ms。在電流產生後，由於鋅的濃度耗

盡，在電極前形成一個「白區」。由於鋅是電解液中最強的 X 光吸收物，因此輻射顯像的對比變化可以反映出鋅的濃度分布。

## 2. 生命科學

能將顯像技術推進至細胞的層級對於 X 光顯微成像術能否在生命科學方面有效應用是一個關鍵性挑戰。因為 X 光能量範圍在 284–543 eV 區間內，含碳區域與水的相對比可以達到最大值<sup>(20,21)</sup>，所以選擇此能量區間的 X 光顯微術，已可以在含水的狀態下觀察次細胞的結構<sup>(22-24)</sup>。然而，這個能量的 X 光光子並不能穿透厚度超過幾  $\mu\text{m}$  (大約是一個單一細胞厚度)，因此在某方面來說限制了該項技術的應用潛力。

同調 X 光顯微術由於利用折射率不同而造成的邊緣加強效應，細胞影像可以藉由硬 X 光而非軟 X 光取得。利用此方式，可以在更真實的環境下來研究厚樣品內微結構的三度空間分析。我們成功地採用此方法<sup>(16)</sup>，不需要藉由任何染色或是增強對比的樣品製備程序，而直接觀察到細胞和次細胞等級的細微結構。例如我們發現對於 5 mm 厚的樣

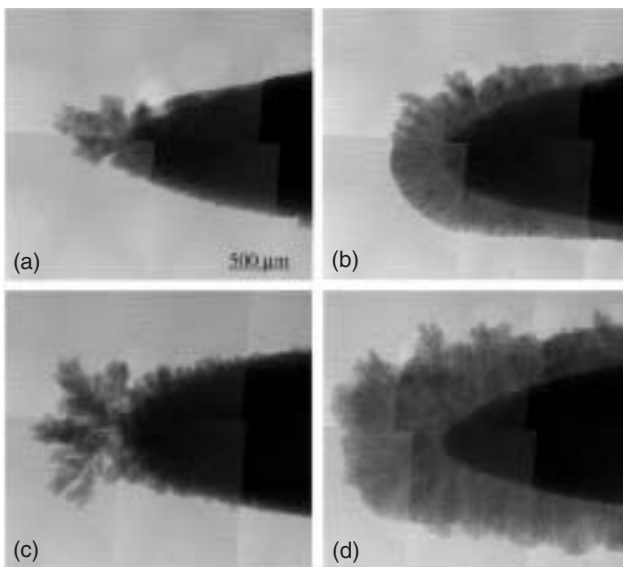


圖 7. 在銅電極上電鍍鋅層的微形貌變化，依照電流函數與所施加的電壓分別為：(a) 20 mA-0.4 V；(b) 25 mA-0.5 V；(c) 40 mA-0.6 V 和 (d) 60 mA-0.9 V。

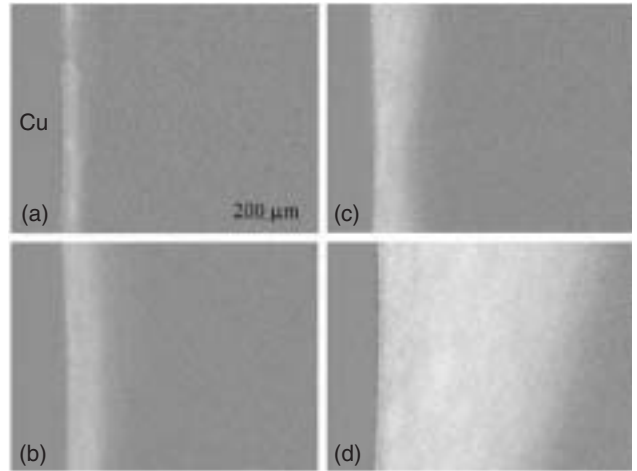


圖 8. 在銅電極上鋅沉澱物的電解液密度變動的情形，對於不同的電流密度值來說，從 (a) 到 (d) 分別是 5.5、16.5、55 和 88  $\text{mA}/\text{mm}^2$ 。

品，從試片表面到指定深度的細胞結構，在不需要犧牲空間解析度的情況下，仍然可以被清楚地被識別。最近我們後續的實驗更證明短波長的硬 X 光能用於獲得 25–60 nm 解析度的影像重建，這已大大超出基於繞射成像的光學顯微鏡的解析度<sup>(25)</sup>。

我們眾多結果中比較令人滿意的一個示於圖 9。圖中所顯示的是蟾蜍卵母細胞的影像<sup>(16)</sup>。從圖中可以清楚的辨識出動物極 (灰階的左半球體)、植物極 (粒狀的右半球體) 和具有動物極的核 (如放大的插圖所示)。邊緣增強效應使得卵細胞的外圍邊界更加地清楚，並且更可以觀察到核和周圍區域的邊界。

藉由我們的方法可以相當簡單地獲得植物細胞的影像。圖 10 顯示的是在寬頻白光條件下孤挺花葉子的 X 光顯微影像的例子<sup>(16)</sup>。本圖的水平視野 (field of view, FOV) 約為 1.5 毫米。要製備可以觀察的動物細胞也並不困難<sup>(3)</sup>，圖 11 所示為人工培養且被固定住的老鼠腦部的神經元細胞。不僅神經元軀體可以輕易的被觀察到，互相連結的神經細胞軸突也可以被觀察到。

我們的結果顯示，利用同調 X 光顯微成像技術，可以在無染色的情形下，獲得清晰的細胞和次細胞等級影像。從獨特性、適用性與未來改進潛力方面考量，我們的方法和其他的技術相較都較為優

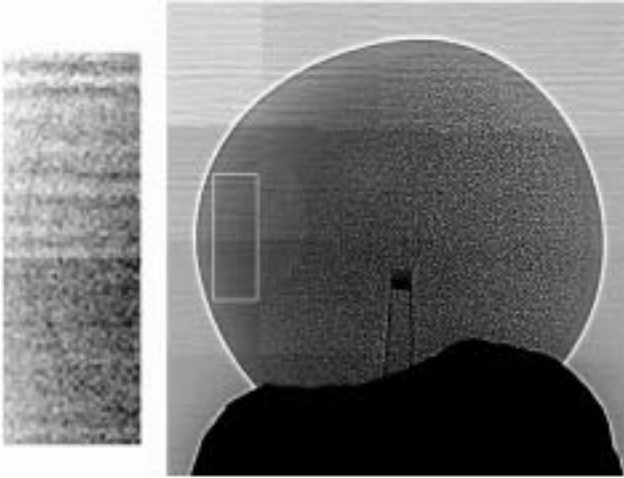


圖 9. 細胞層級上的同調 X 光顯微術：顯示蟾蜍卵母細胞內部結構的影像。一支尖頭的玻璃毛細管 (在影像中央可見) 被用來將試樣固定在支架上面 (底部暗處)。試片直徑為 1.5 毫米。左邊插圖為經過處理的右邊影像有標記部分的放大圖，用以強調細胞核的邊界的可見性。

異。目前獲得的解析度大致和光學顯微技術相同，並且還可以有很大的改進空間。軟 X 光顯微成像技術雖然擁有略佳的解析度，但卻沒有辦法觀察厚度大於單層細胞厚度的樣品。透射和掃描式電子顯微鏡需要特定的樣品準備程序，並且樣品的厚度同樣不能太厚。而我們方法的優異處在於，利用硬 X 光的高穿透力從而比較容易地在保持樣品的自然狀態下觀察動物的整體內部結構及狀態。事實上，目前尚沒有一種顯微技術可以像同調 X 光顯微術技術一樣，可以觀察不透明的厚試片並可以獲得類似的高解析度<sup>(16)</sup>。

### 3. 醫學影像技術

X 光顯微術開始發展的一個重要目的即是偵測活體生物體內部的微小結構 (如小血管)。傳統 X 光顯微術因完全依賴吸收對比，如果想要對體內之 X 光吸收對比較少的軟組織成像，為了要提高對比度則必須使用對 X 光具有高吸收性造影劑之染劑來成像。這無疑地大幅限制了血管造影技術 (研究循環系統的診斷和生物醫學 X 光成像術的分枝) 的進一步發展。

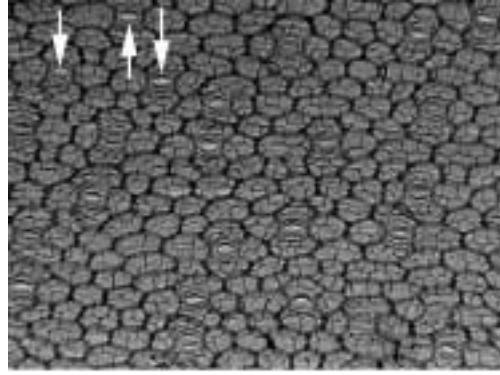


圖 10. 另一個在細胞層級上的同步 X 光顯微影像的例子：寬頻 X 光 (白光) 孤挺花葉子表皮膜細胞影像。影像大小是  $1.5 \times 1 \text{ mm}^2$ 。箭頭所指為 3 個氣孔細胞。就我們所知，這是第一個不需要染色而達成的細胞 X 光顯微影像。

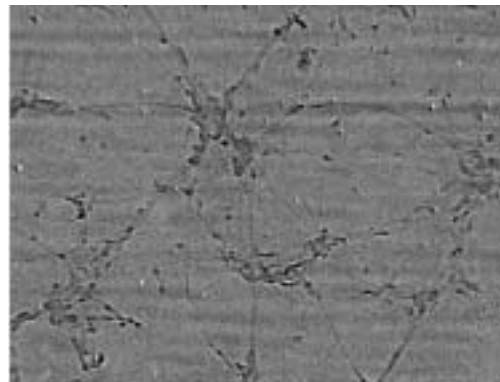


圖 11. 人工培養且被固定住的老鼠腦部的神經元細胞 X 光顯微影像。水平方向的視野為  $500 \mu\text{m}$ 。

使用額外的相對比，可使同調 X 光顯微術對軟物質的成像能力有更大的改進。我們的實驗結果證明同步輻射所產生的 X 光非常適合做相對比成像，因而可獲得高品質的血管影像<sup>(27)</sup>。由於不需要使用單色光，因此訊號強度極高，可獲得時間解析度小於 1 毫秒的即時影像。目前我們所發展的同調 X 光顯微術已達到可以無需使用碘或其他的造影劑即可即時觀察到活體中最小可觀察到的微血管的地步。在不同活體動物樣品我們均可觀察到小於  $10 \mu\text{m}$  尺寸的影像。上述結果如果使用目前醫學用血管造影技術是絕無可能達成的。雖然斷層掃描術與

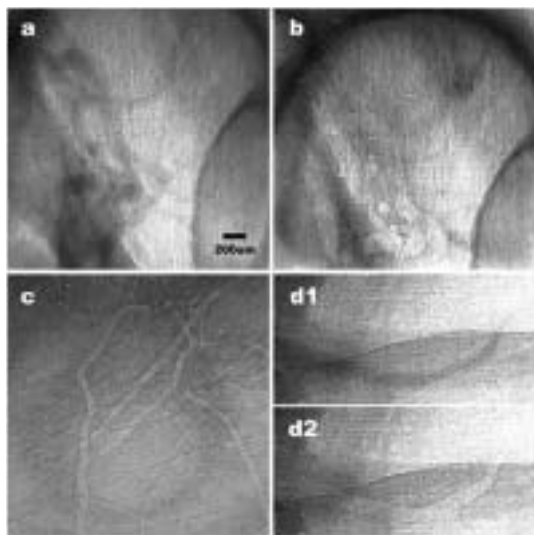


圖 12. 應用同步輻射 X 光得到的活鼠眼睛和耳朵的顯微影像。一種可增強對比的染色劑(碘，商品名：Imagopaque，密度：300 mg/mL) 通過脖子前方最接近的頸動脈被注射到活鼠體內。在注射之前，取 0.3 毫升染色劑，用 1.0 毫升注射針中的生理食鹽水稀釋一倍。外徑為 0.8 毫米的微細的聚乙烯管在向頸動脈分岔部位前的頭部位置被插入 5 mm，將染色劑注入活鼠體內。(a) 和 (b) 是染色劑注入過程中和幾分鐘後眼睛的血管顯影。(d1) 是染色劑注入過程中耳朵的血管顯影，而 (c) 和 (d2) 是染色劑注入幾分鐘後的耳朵的血管顯影。每張影像的曝光時間是 15 毫秒。

核磁共振影像有時可以達到比傳統 X 光顯微術更好的影像對比，但是這些方法不能觀測到  $\mu\text{m}$  級的細微結構。而對這一尺度細微結構的觀察又是對血管疾病、腫瘤醫學的早期診斷及其發展的研究是非常重要的。

圖 12 與圖 13 是我們所完成的許多微血管造影影像中比較典型的例子。圖 12(a) 與 (b) 中顯示出一隻老鼠眼球內的彎曲放血血管，從微弱可見的混雜血管中可見脈絡膜血管叢。值得注意的是在圖 12(a) 中，少量的並已稀釋一倍的碘對比染色劑在取得影像之前已從預先插入的聚乙烯管內注入頸動脈，因此以這個影像作為參照，我們確定無顯影劑時所成像的微觀特徵是真正來自於運動中的血管。

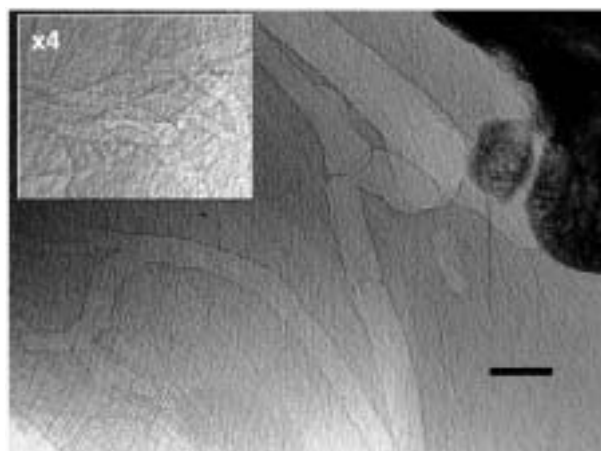


圖 13. 無對比染色劑的 X 光顯微照片：在一隻小鼠的腳踝附近部，不使用任何對比染色劑，影像的取得時間是 30 毫秒。插圖是表示同一隻老鼠的腿部不同部位放大影像，刻度是  $100 \mu\text{m}$ 。

圖 12(b) 是在注入對比染色劑之前所獲得的影像。這些小血管的血管壁在折射對比的增強效應強化下已經清晰可見。事實上我們可以由這個對比判斷出，這些小血管管壁的影響在沒有對比染色劑流過時反而更加清晰，這是血管內強 X 光吸收與折射增強效應共同影響的結果。以圖 12(a) 而言，在注入對比染色劑後，因對 X 光大量的吸收減弱了邊緣增強效應，使得邊緣增強效應產生的折射邊緣幾乎不可見。圖 12(c) 與 (d) 則顯示出寬度約為  $8-100 \mu\text{m}$  的樹枝狀外耳血管。外耳血管的這種樹枝狀特徵在此之前從未在活體動物影像中取得。圖 12(c) 是在對比染色劑流過後之影像。而圖 12(d1) 和 (d2) 則比較了同樣的血管在對比染色劑流過期間與流過後的影像。圖 13 是在沒有注射任何對比染色劑而進行微血管造影一個很好的例子。這個影像清楚的顯示出接近老鼠足踝部位的血管形態。

將我們的方法與其他的顯微技術比較即可清楚的看到 X 光顯微術優異的特性。採用斷層掃描與核磁共振對腦部骨頭與胸部組織進行體外研究，所得到之細節的尺寸不會小於數百  $\mu\text{m}$ <sup>(28)</sup>。而以單色同步輻射 X 光源與碘染色劑在活體動物中的血管造影影像，則可觀察到大小接近  $20 \mu\text{m}$  的微血管血管<sup>(29-32)</sup>。使用現有的技術，我們可以看到物體更精

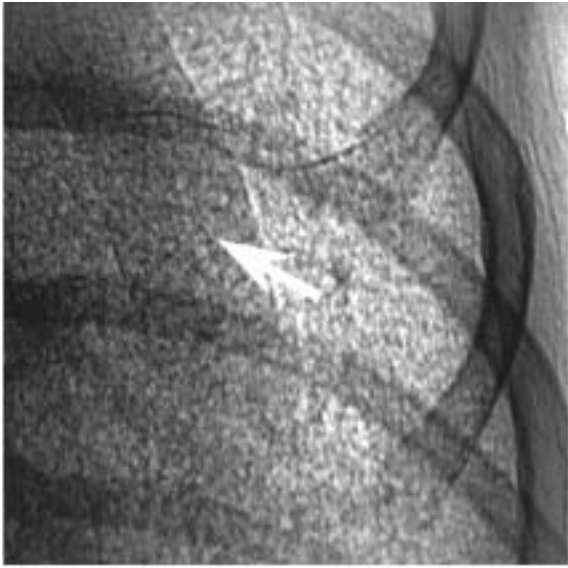


圖 14. 從小鼠心臟動脈運動的影片中擷取的顯微影像。影像曝光時間是 1 毫秒，並且沒有使用對比劑。

細的微結構。需要特別指出的是，此結果是在一個快速動態的情形下所得到的影像。圖 14 顯示一隻小鼠心臟附近器官組織結構。圖 14 的影像是取自一連續影片中，曝光時間 1 毫秒且沒有使用任何的對比染色劑。這個例子顯示要在一個快速運動的系統 (以顯微術觀察之極小尺度而言，幾乎所有的活體運動皆相當快速) 中，要得到清晰的影像，快速的成像速度的確是必要的，因此同步輻射白光的使用對於獲得這類動態影像來說是不可或缺的。

搭配斷層掃描重建對即時 X 光顯微術來講是另一個重要的發展，將會大大地改善外觀型態分析的能力。然而，因為所有重建的演算過程都是著眼於吸收對比，微斷層照相術並不是一個簡單的方法。雖然如此，我們初步的實驗結果也得到了令人興奮的結果。舉例來說，圖 15 為利用斷層掃描成像術重建果蠅腦部，由 1000 張不同角度拍攝的影像得出的結果。其中值得注意的是清晰的眼部結構、眼睛附近的細毛，以及腦部內部扁長的結構特徵亦清晰可見、如圖 15(a)–(c) 所示。目前斷層掃描成像術相關的技術仍處在初期發展階段，且有許多問題如減少輻射損傷以維持試片穩定等方面有待解決，但該技術已經使我們獲得許多有用的成果。

## 五、結論

本文描述了有關即時同步輻射 X 光顯微成像研究的技術及其在材料科學、生命科學與醫學應用研究的一些實驗結果。這些結果清楚的顯示基於折射率對比成像原理的同步輻射 X 光顯微術已經快速的發展成一個成熟的技術，而這樣一個具有次毫秒時間及奈米級空間解析度的技術也可以廣泛的使用於許多不同的研究系統，特別是進行活體生物即時影像觀察或是厚樣品內奈米結構的三度空間成像。本項技術發展尚未達到極限，因此其最終極的潛力仍不易預測，也顯示出在未來在技術發展及應用仍有十分有趣的挑戰。

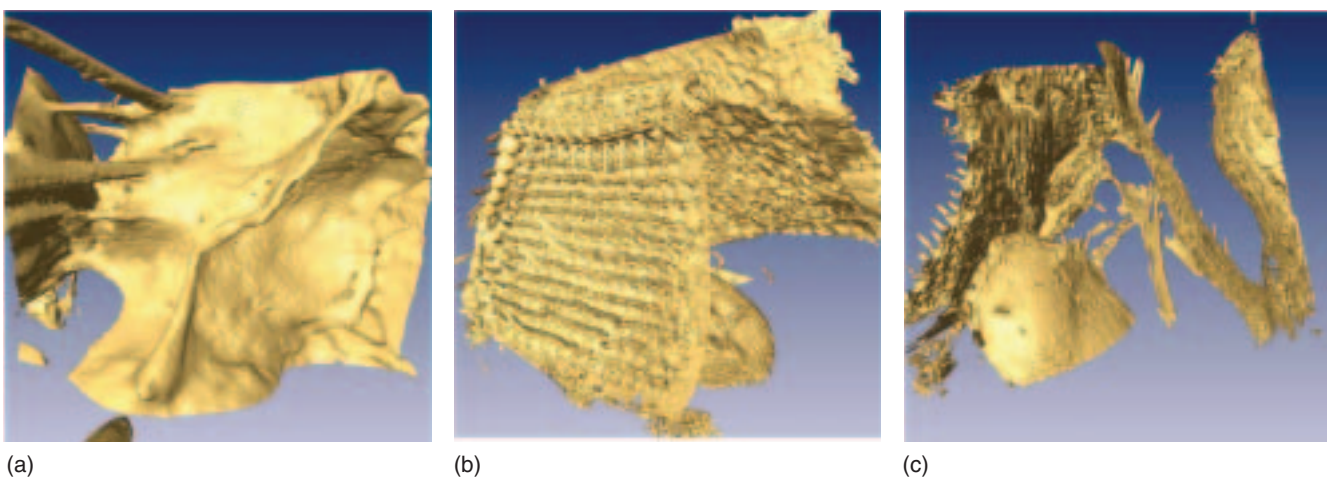


圖 15. 利用斷層掃描照相術重建的果蠅腦部圖像，由 1000 張在不同角度拍攝的影像而得到。

## 參考文獻

1. W. C. Rontgen, *Nature*, **53**, 274 (1896).
2. G. Margaritondo and R. Meuli, *European Radiology*, **13**, 2633 (2004).
3. R. Meuli, Y. Hwu, J. H. He, and G. Margaritondo, *European Radiology*, **14**, 1550 (2004).
4. G. Margaritondo, *Introduction to Synchrotron Radiation*, New York: Oxford (1988).
5. G. Margaritondo, *Elements of Synchrotron Radiation for Chemistry, Biology and Medical Research*, New York: Oxford (2003).
6. F. Arfelli, M. Assante, V. Bonvicini, A. Bravin, G. Cantatore, E. Castelli, L. Dalla Palma, M. Di Michiel, R. Longo, A. Olivo, S. Pani, D. Pontani, P. Poropat, P. Prest, A. Rashevsky, G. Tromba, A. Vacchi, E. Vallazza, and F. Zanconati, *Physics Medicine and Biology*, **43**, 2845 (1998).
7. F. Arfelli, V. Bonvicini, A. Bravin, G. Cantatore, E. Castelli, L. Dalla Palma, M. Di Michiel, M. Fabriziooli, R. Longo, R. H. Menk, A. Olivo, S. Pani, D. Pontani, P. Poropat, P. Prest, A. Rashevsky, M. Ratti, L. Rigon, G. Tromba, A. Vacchi, E. Vallazza, and F. Zanconati, *Radiology*, **215**, 286 (2000).
8. A. Snigirev, I. Snigireva, V. Kohn, S. Kuznetsov, and I. Schelokov, *Rev. Sci. Instrum.*, **66**, 5486 (1995).
9. D. Chapman, W. Thomlinson, R. E. Johnston, D. Washburn, E. Pisano, N. Gmur, Z. Zhong, R. Menk, F. Arfelli, and D. Dayers, *Phys. Med. Biol.*, **42**, 2015 (1997).
10. A. Pogany, D. Gao, and S. W. Wilkins, *Rev. Sci. Instrum.*, **68**, 2774 (1997).
11. S. W. Kilkins, T. E. Gureyev, D. Gao, A. Pogany, and A. W. Stevenson, *Nature*, **384**, 335 (1996).
12. K. A. Nugent, T. E. Gureyev, D. F. Cookson, D. Paganin, and Z. Barnea, *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 2961 (1996).
13. P. Cloetens, M. Pateyron-Salomé, Y. Buffiere, G. Peix, J. Baruchel, F. Peyrin, and M. Schlenker, *J. Appl. Phys.*, **81**, 5878 (1997).
14. G. Margaritondo and G. Tromba, *J. Appl. Phys.*, **85**, 3406 (1999).
15. Y. Hwu, H. H. Hsieh, M. J. Lu, W. L. Tsai, H. M. Lin, W. C. Goh, B. Lai, J. H. Je, C. K. Kim, D. Y. Noh, H. S. Youn, G. Tromba, and G. Margaritondo, *J. Appl. Phys.*, **86**, 4613 (1999).
16. Y. Hwu, W. L. Tsai, H. M. Chang, H. I. Yeh, P. C. Hsu, Y. Cu. Yang, Y. T. Su, H. L. Tsai, G. M. Chow, P. C. Ho, S. C. Li, H. O. Moser, P. Yang, S. K. Seol, C. C. Kim, J. H. Je, E. Stefanekova, A. Groso, and G. Margaritondo, *Biophysics J.*, **87**, 4180 (2004).
17. S. Baik, H. S. Kim, M. H. Jeong, C. S. Lee, J. H. Je, Y. Hwu, and G. Margaritondo, *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, 4355 (2004).
18. W. L. Tsai, P. C. Hsu, Y. Hwu, C. H. Chen, L. W. Chang, J. H. Je, H. M. Lin, A. Groso, and G. Margaritondo, *Nature*, **417**, 139 (2002).
19. W. L. Tsai, P. C. Hsu, Y. Hwu, C. H. Chen, L. W. Chang, J. H. Je, and G. Margaritondo, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **199**, 451 (2003).
20. J. Kirz, H. Ade, E. Anderson, C. Buckley, H. Chapman, M. Howells, C. Jacobsen, C. H. Ko, S. Lindaas, D. Sayre, S. Williams, S. Wirick, and X. Zhang, *Nucl. Instrum. Meth. B*, **87**, 92 (1994).
21. C. Jacobsen, T. Beetz, M. Feser, A. Osanna, A. Stein, and S. Wirick, *Surf. Rev. Lett.*, **9**, 185 (2002).
22. C. A. Larabell, D. Yager, and W. Meyer-Ilse, Proc. of the 6th X-Ray Microscopy Conference, ed. W. Meyer-Ilse, T. Warwick, and D. Attwood, *Am. Inst. of Physics CP*, **507**, 107 (2000).
23. T. Ford, W. Meyer-Ilse, and A. D. Stead, *ibid.*, 119.
24. D. Weiss, G. Schneider, B. Niemann, P. Guttmann, D. Rudolph, and G. Schmahl, *ibid.*, 123.
25. J. W. Miao, T. Ishikawa, B. Johnson, E. H. Anderson, B. Lai and K. O. Hodgson, *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 088303 (2002).
26. W. Yun, B. Lai, A. Krasnoperova, E. Di Fabrizio, Z. Cai, F. Cerrina, Z. Chen, M. Gentili, and E. Gluskin, *Rev. Sci. Instrum.*, **70**, 3537 (1999).
27. Y. Hwu, W. L. Tsai, J. H. Je, S. K. Seol, B. Kim, A. Groso, G. Margaritondo, K.-H. Lee, and J.-K. Seong, *Phys. Med. Biol.*, **49**, 501 (2004).
28. R. Fitzgerald, *Physics Today*, **53**, 4355 (2004).
29. W. R. Dix, K. Engelke, W. Graeff, C. Hamm, J. Heuer, B. Kaempfer, W. Kupper, M. Lohmann, B. Reime, and R. Reumann, *Nucl. Instrum. Meth.*, **A 314**, 307 (1992).
30. S. Takeshita, T. Isshiki, H. Mori, E. Tanaka, K. Eto, Y. Miyazawa, A. Tanaka, Y. Shinozaki, K. Hyodo, M. Ando, M. Kubota, K. Tanioka, K. Umetani, M. Ochiai, T. Sato, and H. Miyashita, *Circulation*, **95**, 805 (1997).
31. Y. Tanaka, H. Mori, E. Tanaka, S. Abe, H. Makuuchi, H. Nakazawa, S. Handa, K. Tanioka, M. Kubota, S. Jumaoka, T. Hyodo, and M. Ando, *Medical Applications of Synchrotron Radiation*, M. Ando and C. Uyama eds., Tokyo: Springer-Verlag (1998).
32. H. Mori, E. Tanaka, K. Hyodo, M. M. Uddin, T. Sekka, K. Ito, Y. Shinozaki, A. Tanaka, A. H. Nakazawa, S. Abe, S. Handa, M. Kubota, K. Tanioka, K. Umetani, and M. Ando, *Am. J. Lphysiol.*, **276**, H429 (1999).

- 
- 胡宇光先生為美國威斯康辛大學麥迪遜校區物理博士，現任中央研究院物理研究所研究員。
  - 楊宗燁先生為大同大學材料工程學博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 王長海先生為新加坡國立大學材料科學碩士，現任中央研究院物理研究所研究助理。
  - 施元丁先生為國立中央大學光電碩士，現任中央研究

院物理研究所研究助理。

- 諸丁鎬先生現任韓國浦項科技大學材料科學系教授。
- Giorgio Margaritondo 教授現任瑞士聯邦工學院 (洛桑) 學務副校長。
- Yeu-Kuang Hwu received his Ph.D. in physics from the University of Wisconsin-Madison, USA. He is currently a research fellow in the Institute of Physics, Academia Sinica.
- Tsung-Yeh Yang received his Ph.D. in materials engineering from Tatung University. He is currently a post-doc researcher at the Institute of Physics, Academia Sinica.
- Chang-Hai Wang received his M.S. in materials science from National University of Singapore. He is currently a research assistant at the Institute of Physics, Academia Sinica.
- Yuan-Ting Shih received his M.S. in optical sciences from National Central University. He is currently a research assistant at the Institute of Physics, Academia Sinica.
- Jung Ho Je is currently a professor in the Department of Materials Science and Engineering at Pohang University of Science and Technology, South Korea.
- Giorgio Margaritondo is currently the vice president of Academic Affairs at Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Switzerland.