

# 同步輻射 X 光的生醫顯微影像應用

## The Applications of Biomedical Imaging with Synchrotron X-Rays

胡宇光、王錚亮、劉啟人、許倍誠、陳琮瑜、羅宗男、華子恩

Yeu-Kuang Hwu, Cheng-Liang Wang, Chi-Jen Liu, Pei-Cheng Hsu, Tsung -Yu Cheng, Tsung-Nan Lo, Tzu-En Hua

近年來由於同步輻射光源所產生 X 光的優異性能，X 光顯微成像在解析度、影像對比與品質方面有突破性的進展，X 光成像術是 X 光應用最廣的領域。因此同步光源的高空間同調性應用在創新的超高解析度 X 光顯微術時，其結果特別地引人注目。利用小劑量的 X 射線輻射即可獲得高品質的 X 光顯微影像和動態影片。這些技術除了在傳統的材料科學的研究分析外，已經在生物學和醫學研究方面上產生重要的應用，本文將詳細探討全影像式的兩種 X 光顯微技術，並以數個生醫樣品的成像為例，說明 X 光成像的發展與展望。

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 (Röntgen) 一百多年前發現 X 光以來<sup>(1)</sup>，X 光成像術 (radiology) 即是這種神奇的電磁輻射線最廣泛的應用之一，其中診斷用的 X 光顯微術更是醫學發展的一個里程碑。X 光最重要的也是最吸引人的特性就是與其他之前所知道的電磁波相比起來極高的穿透性能，使人類第一次能夠在不破壞、不侵入的狀況下看到人體內部許多重要的器官與結構。也因此它改變了傳統醫學的診斷模式，使醫生能對許多症狀判斷不再侷限於單純外表病徵觀

察來推測病情，而是演進到利用可靠的影像資訊來建立更完整的分析。這對醫學的貢獻可說是革命性的，而且一直延續一百年到現在，X 光仍是醫院中最重要的診斷工具。

除了 X 光的高穿透能力外，相對於大多數常用的光源來說，其波長極短，理論上其影像解析度應不會受可見光的「繞射極限 (diffraction limit)」的影響，因此一直不斷的有科學家嘗試提高 X 光成像的解析度，進一步希望使用它來進行顯微術。以生物醫學而言，所有的研究都希望能對活生物體進行觀察，對研究對象不加以破壞的需求也因此比

其他的科學研究高得多。此外，我們希望不但能觀察器官，更能進一步觀察更小的組織、細胞、胞器、甚至 DNA 與蛋白質。利用 X 光進行高解析度顯微術，有可能看到物體內部比光學顯微鏡可看到的還要細微的結構，這將是生物醫學上非常有用的工具。

可惜幾十年來，影像科技雖有極大的進展，但是受到 X 光光源品質的限制，到目前為止，傳統醫用 X 光成像技術的效能，和一百年前倫琴發現 X 光時所進行的 X 光成像，在解析度上可說是並無太大差異。近年來主要是基於同步輻射光源的發展，X 光的光源性質已有相當的進展，在研究領域中 X 光顯微術的性能已大幅改觀<sup>(2-15)</sup>。譬如說因為 X 光的空間同調性 (spatial coherence) 已得到初步實現<sup>(2,5)</sup>，也使得 X 光顯微術中同調性的影響變得極為重要。這些 X 光顯微術目前雖然大部分建立在同步輻射光源的優異性能，但是並不影響其快速成長，並迅速擴展到不同領域的應用。所造成的影響也從初步小規模的技術研究，發展到現在已經開始在不同領域裡產生重要的研究結果<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 (例如對材料動態的高解析度、非破壞性分析及單一細胞的 X 光影像等)<sup>(16)</sup>，而在醫學上的應用遠景更是令人鼓舞<sup>(2,3)</sup>。

我們將會討論 X 光顯微成像技術這個領域發展的兩種對生醫研究特別有潛力的成像方式，並且介紹我們已獲得的結果。本文將藉由回顧該領域的發展和近年來的研究成果，配合同步輻射 X 光顯微術的概念及其理論背景的討論<sup>(3)</sup>，使讀者能夠瞭解該技術未來應用的無限潛力。

## 二、原理及技術背景

### 1. X 光顯微成像原理

各種類型的 X 光顯微術都基於光子與凝聚態物質 (軟的或硬的) 之間相互作用的不同作為其成像的機制。本文所要介紹的兩種全景穿透式 X 光顯微術其取像方式都基於相同的原理：讓 X 光子束進入並穿透目標物體後，然後由兩維探測儀器來接收穿過樣品後的 X 光。兩種顯微技術唯一的差

異在於其對穿透物體後 (在轉換成可見光影像前) 是否對 X 光影像進一步放大。如欲取得高於光學顯微技術的解析度，必須使用適當的 X 光光學元件對 X 光影像精確地放大。

因為樣品的內部各部分對 X 光光子之作用不同 (受到其複數折射係數的控制)，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。從理論上說，複數折射係數的實數部 (也就是相位) 和虛數部 (吸收) 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影響並不明顯<sup>(2,4)</sup>。例如標準醫用 X 射線儀的光源多半來自典型使用高壓電子束轟擊金屬陽極板所產生，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，通常無法利用相位成像的效應。事實上迄今為止，所有醫用 X 射線診斷儀都是根據樣品不同部位間對 X 射線吸收的差異造成影像對比來進行成像的。

### 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>，干涉和繞射現象可被觀察到時的一個特性指標。根據此一概念導引，可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。

高時間同調和高空間同調性都與波長有決定性之關聯，當波長變小時較難達到高時間同調和高空間同調。也因此可以理解為何 X 光比可見光或紅外光更難達到同調的特性。傳統 X 光源同調性極差的另一個原因是，因為它們的光源尺寸、發散角和頻寬都非常大。值得注意的是，非同調的光源是可以提高同調性的。例如寬頻光源可藉由單光器過濾的方法來減小頻寬。另外，縮小光源的大小，例如使用帶有針孔的遮蔽物，將其置於遠離發散的傳統光源處，這樣小孔就變為具有空間同調的二次光源。但是由於這些方法只利用到小部分的光子強度，雖然可提高同調性，但是會造成光源強度太

弱，以致很難有實際用途。

同步輻射光源因其高準直、低度發散的光源特性，其自然的輻射已具備相當高的空間同調性。此外，使用所謂插件元件 (insertion device)，同步輻射光源通過增頻 (wiggler) 或聚頻 (undulator) 磁鐵的控制，從一個小點發出一道準確的平行光束，可大幅提高空間同調性。至於時間同調性，通過聚頻磁鐵同步輻射可以提供一道相當窄頻寬的光束，因此產生時間同調性。另外，也可用單光鏡過濾掉發散輻射來增加時間同調性。由偏轉 (bending) 和增頻磁鐵發出的 X 光其同調程度已足夠滿足大部分應用。若有需要則可進一步利用單光器來增加時間同調性。

為瞭解利用相位差異成像的方法，我們採用非常簡單成像機制的圖片加以說明。如圖 1(a) 所示，可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。這兩種現象的確很相似<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。其實造成該現象的原因可以用一個比較簡單與折射現象類比的方式來解釋。圖 1(c) 表示傾斜的邊緣所產生的折射可造成明暗相間的條紋，其他形狀的邊緣也可產生類似現象。

圖 2 是以一根光纖當作樣品所取得的影像，顯示繞射與折射成像的轉變過程<sup>(15)</sup>，兩者主要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。雖然含有繞射信號的成像包含較多的訊息 (類似全像術)，但折射現象的觀察則較為簡單且易於瞭解<sup>(15)</sup>。而且在同調 X 光顯微影像的實際應用上，利用邊緣折射成像的機制較容易達成，只要調整物體與偵測器就可以實現。

圖 2 顯示的折射與繞射之間的交互出現可與產生側向與縱向同調性的條件一併探討，此方法的細節在參考文獻之 14 與 15 有詳細討論。從這些討論中可以發現顯示時間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>。空間同調性也是相當微弱的條件，大部分同步輻射光源皆符合此要求<sup>(4,5)</sup>。此外，另一個限制條件就是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。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，以至於模糊不清，意即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

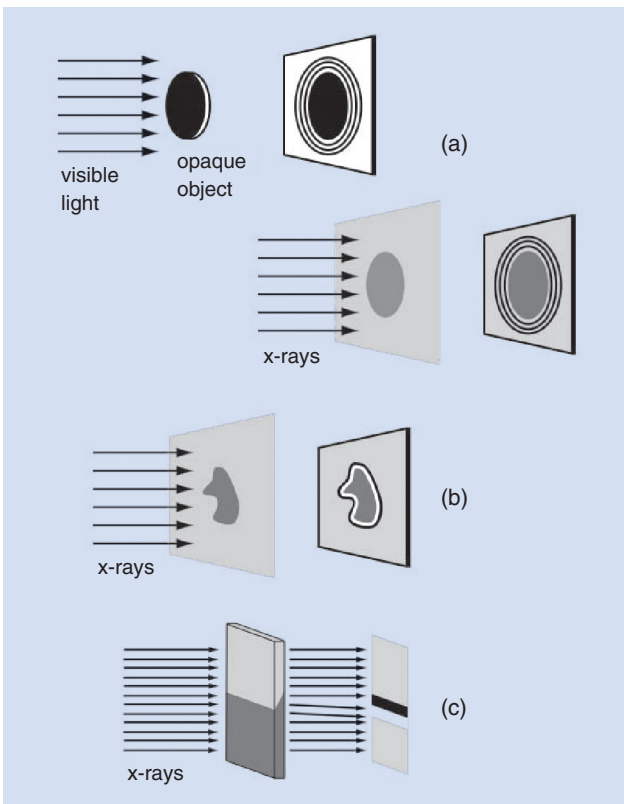


圖 1. X 光成像在物體影像邊緣形成不同效應的示意圖。

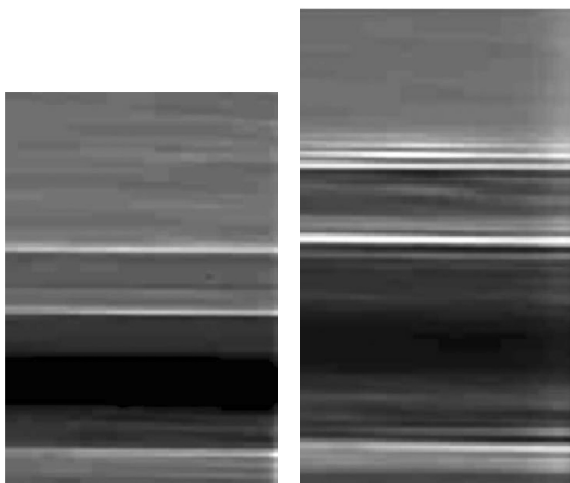


圖 2. X 光成像在物體 (樣品為一塑膠線) 實際影像在不同成像距離, 所得到折射 (左圖) 與繞射 (右圖) 的邊緣效應。

方面深刻地影響著 X 光顯微術技術的發展<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 光顯微術已多有裨益<sup>(5)</sup>。其次, 利用 X 光吸收與入射 X 光能量的相關性, 同步輻射光源提供的單色 X 光束可以提高 X 光顯微術技術的效能<sup>(3, 5)</sup>。一般的 X 光源強度都很弱, 從中獲取的單色光強度, 更無法有效用於 X 光顯微術。同步輻射 X 光不僅單色性好, 而且光強度比傳統光源高數千倍。第三, 由於同步輻射 X 光具有高同調性的特點, 這使我們可以同時利用複數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。

### 3. 利用波帶片成像的超高解析度全景 X 光顯微術

在目前生物及生物醫學領域中, 發展超過光學顯微解析度的新式顯微術是一個極為重要的方向, 而能夠偵測到個別細胞甚至其細胞內的結構無疑是最重要的目標。X 光雖然在最近一世紀的生物醫學研究中扮演基礎且重要的角色, 但目前為止在這個方向並無可觀之貢獻。在我們不斷的努力研究下, 利用同步輻射的全景 X 光顯微鏡觀察組織檢體, 已經可觀察到組織內細胞的內部結構。

我們的策略是希望能夠同時改進影像空間解析

度與其影像對比。為了達到此目標, 高亮度的同步輻射光源是無可取代的。由於同步輻射光源具有高同調性, 利用此特殊的性質將能夠使影像解析度大幅提升<sup>(17-20)</sup>, 同時亦將能改進所獲得的影像對比, 此乃主要基於折射係數實數部的貢獻 (決定波的相位)<sup>(17, 18)</sup> 而非虛數部的貢獻 (吸收的衰減), 利用此機制, 預期可大幅增強軟組織與生物試片間之對比。

我們的實驗主要是利用短波長 ( $\sim 1 \text{ \AA}$ ) 之 X 光 (硬 X 光) 的特性來穿透較厚的生物檢體。相對地, 過去的 X 光顯微術乃利用長波長之軟 X 光 (23–45  $\text{\AA}$ ) 當作光源, 在此長波長之 X 光能量範圍內稱為水窗波段 (water window), 若在含有碳與水的試片中, 利用軟 X 光觀察試片將可獲得最強之對比<sup>(21, 22)</sup>, 因此若搭配使用先進之軟 X 光光學元件, 次細胞結構可在含有水氣之環境中觀察到<sup>(23-25)</sup>。然而軟 X 光並無法穿透較厚之生物檢體, 最多只能穿透數層細胞而已, 因此無法觀察到相對較厚的組織內部細胞結構, 也喪失了使用 X 光最原始的目的。

若利用硬 X 光光源來觀察未經染色處理之組織內部細胞 (組織厚度為數個微米), 如果使用毫米解析度的 X 光顯微技術<sup>(16)</sup>, 的確無法達到次細胞解析度。但經由不斷的創新及改進, 目前本實驗室所獲得的影像解析度已能達到預期之目標, 即可觀察到組織內部細胞。最主的原因是因為我們使用本實驗室製作之菲涅爾波帶片來放大 X 光影像<sup>(26-28)</sup>。菲涅爾波帶片之製作乃基於本實驗室領先於世界之奈米製程技術<sup>(29)</sup>, 使用此波帶片, X 光影像可達到小於 30 奈米<sup>(30)</sup> 之空間 (Rayleigh) 解析度, 同時影像擷取時間亦可小於 50 ms。

我們亦利用染色方式標定與偵測細胞內部特定的蛋白質, 若能了解細胞內部的特徵, 便能對次細胞結構 (胞器) 有更深入的了解。相對於其他顯微技術, 如可見光、共軛焦螢光顯微鏡及穿透式電子顯微鏡等, 硬 X 光顯微術中, 對於細胞或胞器之染色, 目前尚在摸索階段。目前只能使用基於傳統免疫染色的染色標定方式來增強目標物對 X 光吸收之對比, 尚無法充分利用相對比。即便如此, 使用此技術已能更進一步探討具奈米解析度的特定蛋白質在二維甚至是三維中的空間分布。

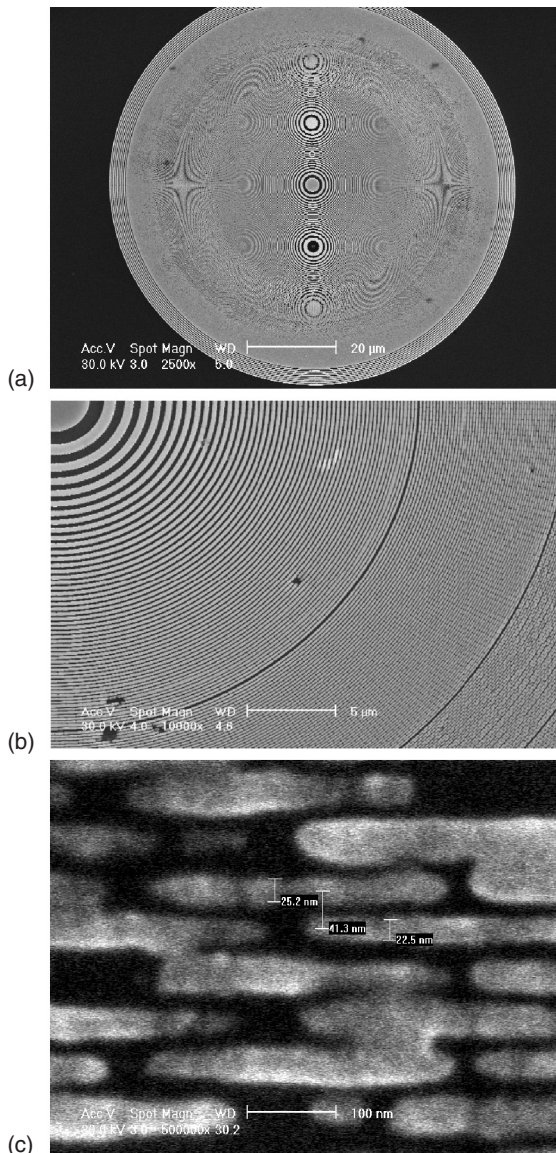
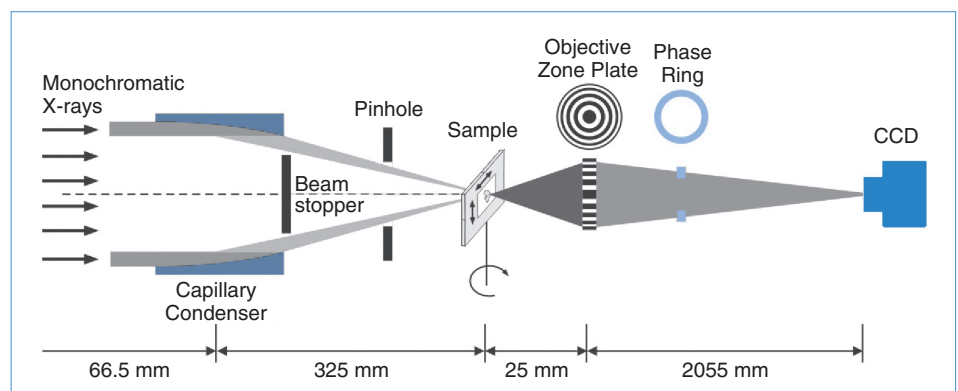


圖 3. 本實驗室製備之最外圈線寬小於 25 nm 的波帶片，由掃描電鏡在不同放大倍率所取得的影像，顯示出 25 nm 的最小線寬。

相對於軟 X 光顯微術，使用硬 X 光顯微術具有一些顯著的優勢。其中一項為具有較深的試片穿透深度。當試片厚度大於 5 mm 時，仍然可以清楚地觀察到細胞內的資訊，且其影像空間解析度亦不會隨著試片厚度的增加而有明顯的損失。在先前的影像測試中<sup>(31-33)</sup>，對 X 光繞射影像使用相位補償可達到奈米等級的解析度，相對的，在我們的影像測試中，實驗結果顯示不需使用任何影像處理就能夠達到次細胞等級的解析度。此外，也曾利用相位補償方式對未經染色之細胞作影像測試，經由相位補償影像處理（基於波傳遞演算法<sup>(34, 35)</sup>）能夠在次細胞等級中產生相位分離 (separate phase) 與幅度圖像 (amplitude images)。

我們目前正致力於研發奈米尺度中更具功能性的標定方式，以及更具功能性的聚焦元件、影像擷取及影像處理等。目前使用 X 光聚焦元件之波帶片可獲得小於 30 nm 空間解析度，然而此影像解析度仍然遠低於經由繞射極限所計算出的解析度極限，以及從使用之儀器設備所推估之解析度極限。使用奈米製程製作出的高性能波帶片，由於其具有較小之最外圈線寬，因此可得到較佳之側向解析度，目前本實驗室已製備出最外圈線寬小於 25 nm 的波帶片 (如圖 3)。圖 4 為此 X 光顯微鏡的光學組成示意圖。新一代同步輻射光源由於 X 光亮度 (brightness) 可明顯提升，因此曝光時間將可大幅縮減，進而減低活體試片在曝光時之瞬間移動而產生不必要的干擾。更進一步，若能使用高階繞射模型<sup>(36, 37)</sup>，雖然此模型所產生之訊號強度相對較弱，而造成影像擷取所需時間勢必增加，然而影像側向解析度可大幅提升。

圖 4. 穿透式波帶片取景式 X 光顯微鏡的光學組成的示意圖。



### 三、X 光成像實驗設施

圖 5 是位於新竹同步輻射研究中心光源的 X 光顯微鏡光束線 (BL01A) 的略圖。這一條光束線的光源來自於一個超導移頻磁鐵 (superconducting 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 keV，向上延伸至約 40 keV。波帶片全景 X 光顯微鏡使用此三條光束線的另外一條。儲存環中的電子束大小在垂直與水平方向分別為 12 微米及 120 微米。BL01A 光束線的全長為 18.6 公尺，光子的通量為  $1 \times 10^{12}$  photons/s。

實驗站中的樣品台具有六軸的自由度 (精確度為 0.1 微米)，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，由閃爍計數晶片 (scintillator) 轉換成可見光，再經 CCD 相機加以紀錄。閃爍計數晶片的材質為 250 微米厚的  $\text{CdWO}_4$  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  $\times$  2000 畫素及 16 位元灰階。

目前本設施的整體性能，如小於 1 微米的空間解析度、小於 1 毫秒的時間解析度，以及波帶片 X 光顯微鏡的 30 奈米解析度，已使它成為相當具競

爭力的顯微技術。而 X 光獨特的穿透力使我們得以觀察高於解析度  $10^4$  次方倍的厚樣品 (例如以 1 微米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 X 光顯微術將是最佳選擇。

### 四、生物學及醫學應用

#### 1. 生物學

將顯像技術推進至細胞的層級是 X 光顯微成像術能否在生命科學方面有效應用的一個關鍵性挑戰。因為 X 光能量在 284–543 eV 區間的能量範圍內，含碳區域與水的相對比可以達到最大值<sup>(22, 23)</sup>，所以選擇這個能量區間 X 光顯微術已可在含水的狀態下觀察次細胞的結構<sup>(23-25)</sup>。然而這個能量的 X 光光子最多只能穿透厚度超過幾  $\mu\text{m}$  (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，細胞影像可藉由硬 X 光而非軟 X 光取得。利用此方式可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>，不需藉由任何染色或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。例如發現對於 5 mm 厚的樣品，從試片表面到指定深度的細胞結構，在不需犧牲空間解析度的情況下，仍然可以被清楚地識別。我們最近的後續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之光學顯微鏡的解析度<sup>(31)</sup>。

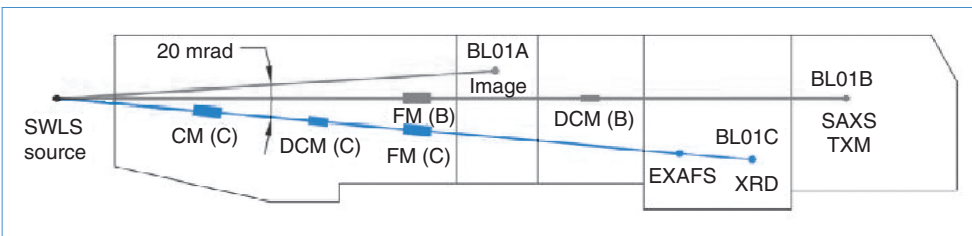


圖 5. 位於新竹同步輻射研究中心光源的 X 光顯微鏡光束線 (BL01A 超導移頻磁鐵光束線) 的略圖。

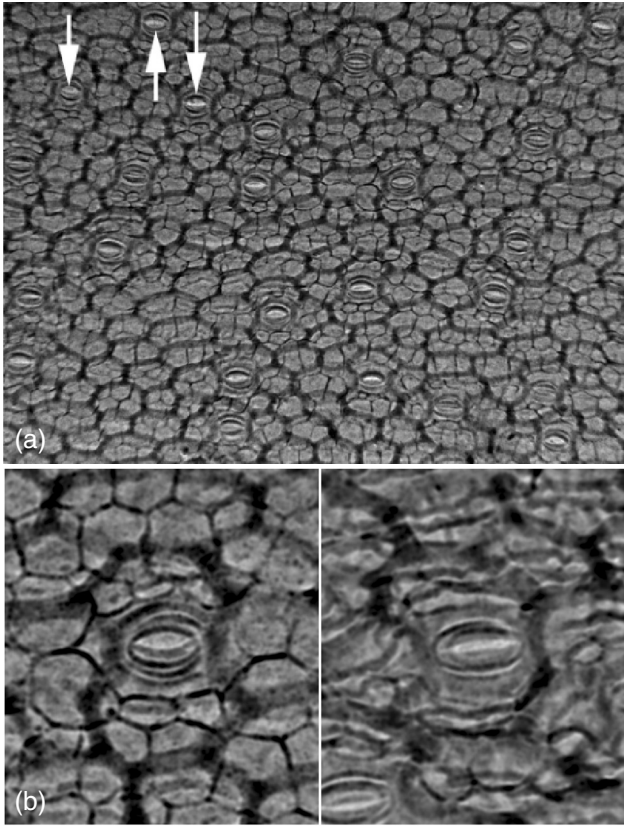


圖 6. 寬頻白光條件下利用相對比 X 光成像技術所取得的孤挺花葉子的 X 光顯微影像。

藉由我們的方法可以相當簡單地獲得植物細胞的影像，圖 6 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。要製備可觀察的動物細胞也並不困難<sup>(3)</sup>，圖 7 所示為人工培養且被固定住的老鼠腦部的神經元細胞。不僅神經元軀體可輕易地被觀察到，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 光顯微成像技術雖擁有略佳的解析度，但卻無法觀察到大於單層細胞厚度的樣品。穿透式和掃描式電子顯微鏡需要特定的樣品準備程式，並且樣品的厚度同樣不能太

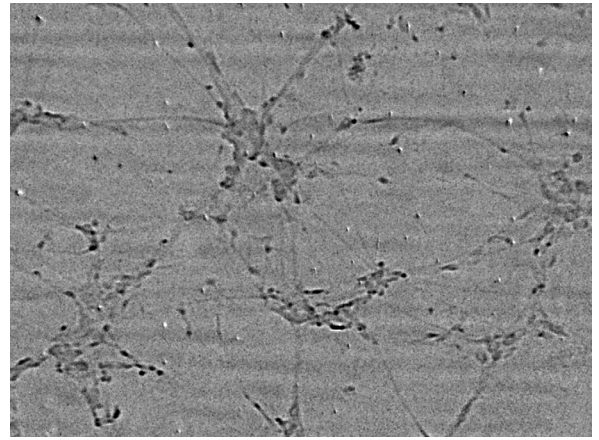


圖 7. 人工培養且被固定住的老鼠腦部神經元細胞的 X 光顯微影像。不僅神經元軀體可以輕易的被觀察到，互相連結的神經細胞軸突也可以被觀察到。

厚。而我們方法的優異處在於利用硬 X 光的高穿透力，因此能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，目前尚無一種顯微技術可以像同調 X 光顯微術技術一樣，以類似的高解析度觀察厚試片<sup>(16)</sup>。

### (1) 次細胞解析度實驗

圖 8 與圖 9 為使用硬 X 光波帶片穿透式全景顯微鏡所獲得的測試結果，透過上述的雷利準則 (Rayleigh-criterion) 計算其空間解析度優於 30 nm。圖 8 為西門子公司所生產的標準氮化矽薄膜上製作的金星狀圖案測試片，最小線寬為 30 nm，而不同線寬的間距為 60 nm。圖 9 是本實驗室製作的測試圖案，最小線寬為 20 nm，可以發現小於 20 nm 的特徵也清晰可見。透過詳細分析 (相似於參考文獻 18) 可知道 Rayleigh 解析度為 29 nm。

圖 10 為使用單光 X 光高解析度，硬 X 光顯微鏡影像測試的進展。在圖 10 中利用單光 X 光顯微術，藉由使用鎳增強效果的 DAB 染色，可以清楚地觀察到 HeLa 細胞內網狀分布的相對比影像，其一微米的空間解析度近似於一般光學顯微鏡。我們可以清楚地看到在細胞中染色後的細胞骨架 (vimentin) 和細胞核 (FOV = 240  $\mu\text{m}$ )。細胞核不會被染色過程所影響，並且有較弱的吸收對比。相較

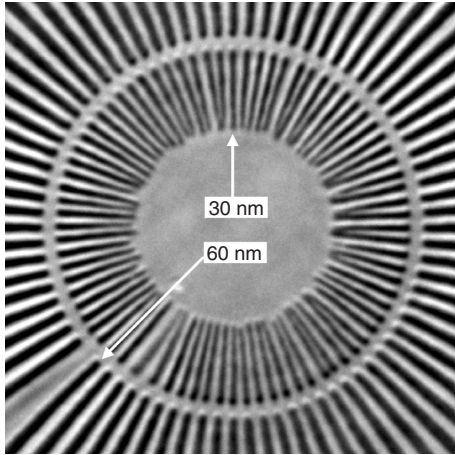


圖 8. 使用硬 X 光波帶片穿透式全景顯微鏡測試西門子公司所設計、Xradia 公司所生產的標準氮化矽薄膜上製作的金星狀圖案測試片，所取得的 X 光顯微影像顯示出此測試圖樣最小線寬為 30 nm，而不同線寬的間距為 60 nm。透過上述的 Rayleigh-criterion 計算其空間解析度優於 30 nm。

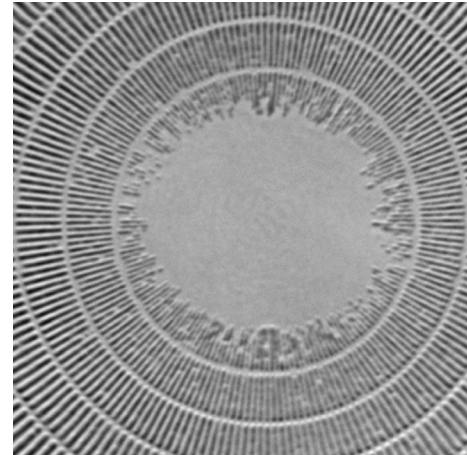


圖 9. 本實驗室製作的奈米測試圖案，最小線寬為 20 nm。

於細胞核，細胞質有較深的對比，因為它具有較緻密的細胞骨架染色，透過光學顯微鏡佐證可以發現，尤其是位於細胞質周圍的區域會有明顯的 X 光吸收。

在圖 10 中明白指出結合波帶片之硬 X 光顯微鏡，其放大倍率可以超越光學顯微鏡的限制。圖 10 中可清楚地看到靠近細胞核成束的細胞骨架結構。細胞骨架也在靠近細胞質周圍呈現類似網狀物的結構，細胞邊界可以藉此完整顯現出清晰的輪廓，除了成束的細胞骨架外，也可以看到單一的細絲 (filaments)。

## (2) X 光斷層掃描影像顯微術

對於數千張影像資訊的 X 光影像重建，快速的影像擷取是相當重要。同樣的，空間和時間解析度的妥協也要考慮。對那些培養細胞的檢體，平坦在培養皿表面的結構，也會干擾到 360 度旋轉的影像擷取範圍，部分角度受限於局部斷層掃描，使得影像資訊損失。圖 11 是 EMT-6 免疫染色的測試結果，很清楚地可以看到這個方法可以重現細胞骨架的三維立體結構，圖 11(b) 是圖 11(a) 的 X 光斷層

掃描重建的影像。圖 12 是同樣檢體的有限角度之影像重組，與奈米金粒子一起培養的 EMT-6 細胞。如圖 12(a) 和 (b) 所示，細胞核附近叢集的金粒子可被個別的解析出來，因此即使是有限角度的局部影像重組，也不會造成空間解析度的惡化。

偵測奈米粒子的能力對於組織層的影像尤其重要，金奈米粒子可清楚地再器官的組織層被偵測到，像是肝、腎和脾的靜脈末梢，圖 13 是放置在

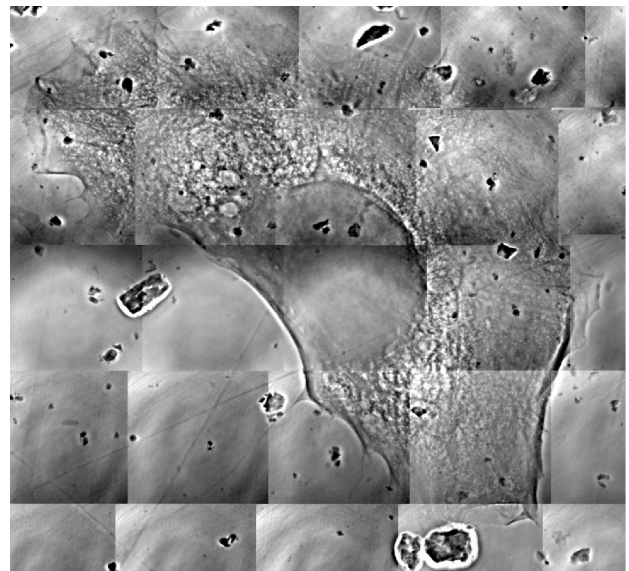
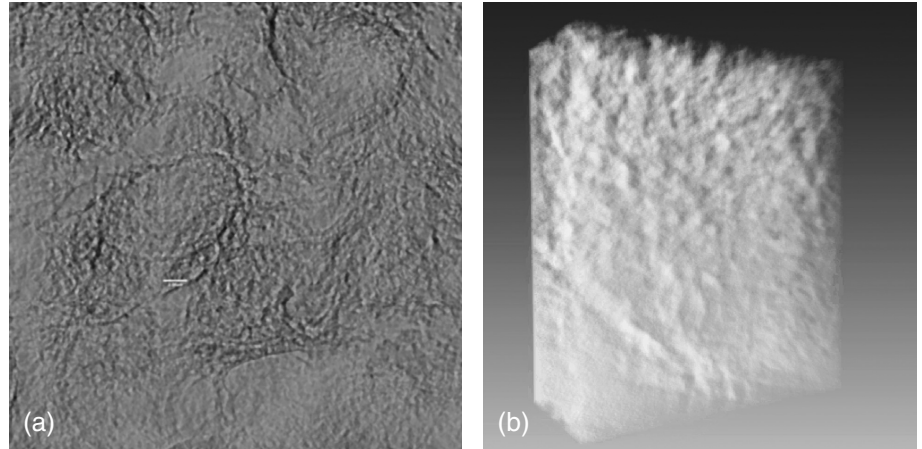


圖 10. 利用非單光 X 光顯微術，藉由使用鎳增強效果的 DAB 染色，可以清楚地觀察到 HeLa 細胞內網狀分布的相對比影像。

圖 11.

使用硬 X 光波帶片穿透式全景顯微鏡測試 EMT-6 細胞經過免疫染色的測試結果，很清楚可以看到這個方法可以重現細胞骨架的三維立體結構，(b) 是圖 (a) 的 X 光斷層掃描重建的影像。



細胞膜上的 200  $\mu\text{m}$  厚的含有奈米金的腫瘤組織。這些重建後的影像顯示出 EPR 效應 (enhanced permeation and retention)，即是奈米金 (橘色部分) 優先聚集在腫瘤上。

目前在進行奈米解析度的 X 光斷層影像術的重要限制因素是，當執行次細胞成像等級的超高解析度影像重組時，旋轉時樣品位置的精確度會受到機械精密度及再現性的嚴重影響。但是在進行微米等級的空間解析度之斷層成像與重建時樣品位置精確度就相對不成問題。對於使用非單光的 X 光和沒有波帶片取像影像重組也是相對簡單的，因為數千張影像可在幾秒鐘內就擷取到。

圖 14 是利用標準背投影濾波方法所拍的小鼠肝臟 X 光影像重建 3D 影像，360 張用於 3D 重建的 X 光影像擷取都在 10 ms 達成。影像重組顯然並不會影響到解析度。

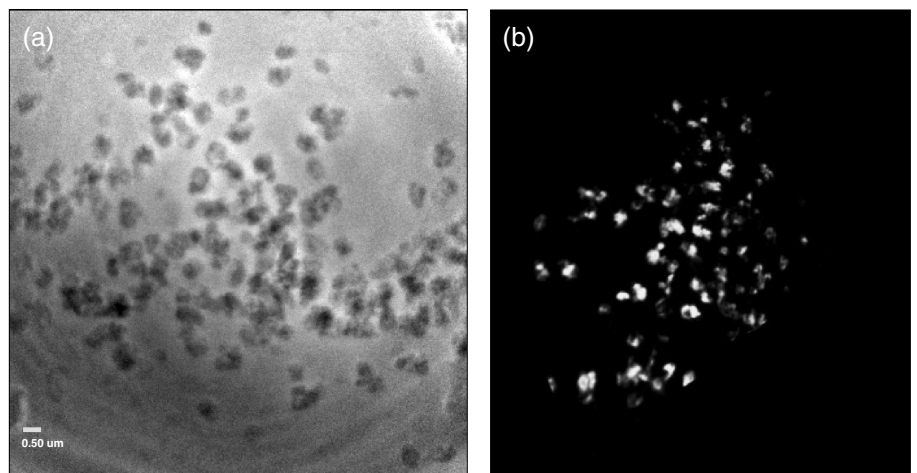
### (3) 輻射破壞

高速影像擷取可讓檢體在被輻射嚴重破壞之前得到結果，這一點已在在先前工作<sup>(22)</sup> 測試過，我們在潮濕狀態下從老鼠大腦和動物細胞中培養且固定的神經元細胞，證實目前的實驗結果。基本上，尚未在目前實驗的影像擷取發現到偵測得到的輻射破壞。

這項結果並不令人驚訝，因為相位對比的加強效應，相同品質與效果的影像可使用較低的輻射劑量取得，因此可有效降低曝光和輻射效應。然而輻射破壞的風險始終存在而且不會自動消失。該潛在危機對於要處理大量投影影像數據的斷層掃描過程尤其明顯，為了使用波帶片放大達到更高的空間影像解析度，而使用較長的曝光時間，可能引起可偵測到的輻射破壞。幸運地，仍然有進步的空間，像是使用較好的偵測器<sup>(39)</sup> 可以讓目前每個影像的曝

圖 12.

同樣檢體的有限角度的影像重組，與奈米金粒子一起培養的 EMT-6 細胞。如 (a) 和 (b) 所示，細胞核附近叢集的金粒子可以被個別的解析出來。



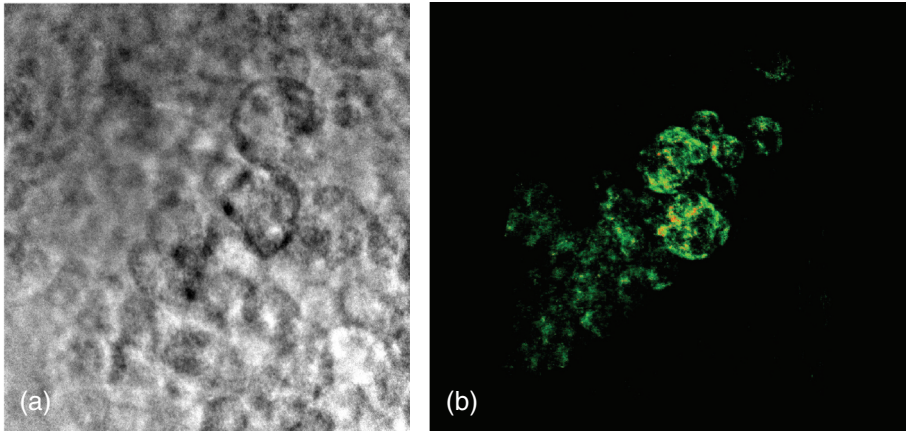


圖 13.  
200  $\mu\text{m}$  厚、含有奈米金的腫瘤組織的 X 光影像。這些重建後的影像顯示出 EPR 效應，即是奈米金 (橘色部分) 優先聚集在腫瘤上。

光時間 (50 ms) 和相對劑量可以減少到一至兩個數量級大小，使用冷凍保存<sup>(40)</sup> 也可以達到相似的效果。

#### (4) 厚樣品

硬 X 射線顯微鏡具有非破壞性的獨特優勢，對於厚樣品不需複雜的準備程序即可觀察，我們經過一系列的實際測試結果，證實樣品厚度對於空間解析的影響主要是由 X 散射造成，衰退極為有限也可相當準確的評估。在不超過釐米厚度的生物樣品空間解析度仍足以解析厚組織的細胞位置。以昆



圖 14. 利用標準背投影濾波方法所拍的小鼠肝臟 X 光影像重建 3D 影像，360 張用於 3D 重建的 X 光影像擷取都在 10 ms 達成。影像重組顯然並不會影響到解析度。

蟲之 X 光成像而言，可觀察到約 400  $\mu\text{m}$  蚊子腹部數微米的細血管。擁有低於 1  $\mu\text{m}$  的高解析度及可穿透大於 1 mm 的穿透深度，而體積敏感度可高於  $1/10^9$ 。

這種具有選擇性的功能大大的降低樣品準備的困難性，且容易尋找特定區域作研究。另外，試片可保持在較自然的環境。相反的，一般顯微鏡技術只能透過薄切技術去解析三維的結構，因而此方法容易遺失一些重要訊息，因此 X 光顯微術不僅可解析細胞輪廓，更可詳細解析次細胞的結構。如同樣品厚度對於白光 X 光顯微術解析度所造成的影響有限，我們發現使用波帶片，只要樣品厚度小於 200  $\mu\text{m}$ ，空間解析仍可達到最佳 30 nm 的程度。如前所示高解析 X 光照片已清楚地顯示經合適減薄及染色的次細胞解析度的三維影像，其解析度經斷層掃描後並沒有被減損。因此經由這些例子的解釋，顯示出 X 光顯微術觀察厚樣品的優點，可以定位出腫瘤的位置，且利用金顆粒的分布作定量分析。

大厚度的試片確實會降低解析度，就經驗而言，以偵測次細胞為例，樣品厚度可達數毫米都能維持的良好解析度。過大的樣品由於 X 光散射造成影像模糊，因此會使局部斷層掃描發生重組困難的問題<sup>(31,32)</sup>。

#### (5) 其他方法的比較與結論

由實驗證明高穿透性的硬 X 光不但可用來探討動物組織的單一細胞，且可觀察到次細胞結構。

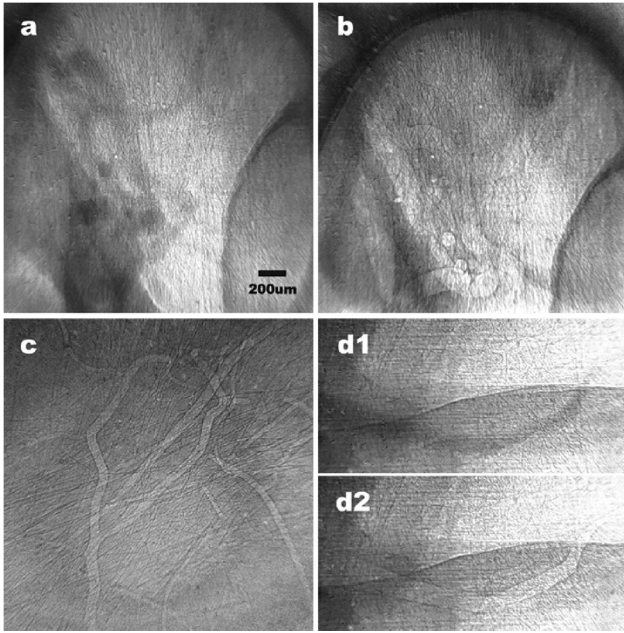


圖 15. (a) 與 (b) 中顯示出一隻老鼠眼球內的彎曲放血血管，從微弱可見的混雜的血管中可見脈絡膜血管叢。(b) 是在注入對比染色劑之前所獲得的影像。這些小血管的血管壁因折射對比的增強效應強化下已經清晰可見。以 (a) 而言，在注入對比染色劑後對 X 光的大量吸收減弱了邊緣增強效應，使得邊緣增強效應產生的折射邊緣幾乎不可見。圖 (c) 與 (d) 則顯示出寬度約為 8 到 100 微米的樹枝狀外耳血管。外耳血管的這種樹枝狀特徵在此之前從未在活體動物影像中取得。(c) 是在對比染劑流過後之影像。而 (d1) 和 (d2) 則比較了同樣的血管在對比染劑流過期間與流過後的影像。

以空間解析為首要目地，影像可達 30 nm 的解析程度。對於不同的研究，利用控制不同參數可在時間解析和空間解析之間取得平衡點。使用白光及未經波帶片放大的顯微術可即時觀察活體樣品，其空間解析佳，且空間解析度可低於 1  $\mu\text{m}$ 。由結果顯示 X 光顯微術可擴展至生物及生物醫學的研究。為了強調這項重點，我們將和其他顯微術作比較，雖然硬 X 光顯微術確實擁有獨特的益處，但最好的策略還是要和其他技術搭配。

與一般光學顯微鏡比較，我們的實驗可達較好的解析度 (< 30 nm)，而且樣品製備簡單，更重要的是，硬 X 光可以探測厚的樣品。雖然穿透式電子顯微鏡提供較好的解析度，但其也需較複雜的樣品準備步驟，樣品必須乾燥、經包埋後，利用超薄切割成薄片，這樣的步驟不但複雜且耗時。另外，穿透式電子顯微鏡只能觀察小於 1  $\mu\text{m}$  厚度的薄樣品，且其對比受到限制。一般而言，樣品可以大角度的旋轉有助於擷取影像作斷層掃描重組，但薄樣品卻無法達成此目標。穿透式電子顯微鏡也可利用連續切片及演算重組而獲得厚樣品的三維影像，但 Z 軸解析度卻受到約束。我們的硬 X 射線顯微鏡比軟 X 光顯微鏡 (< 10  $\mu\text{m}$ ) 或穿透式電子顯微鏡可偵測較厚的樣品 (300  $\mu\text{m}$  – 10 mm)。但不需經過連續切片便可以偵察整個細胞、多細胞結構 (multicellular structures) 或動物組織，並減少訊息的遺失或扭曲。

硬 X 光在生物及生物醫學研究的重要性非常明顯。我們不但討論不同顯微術的利弊，並且在某些方面可以取代它們，譬如穿透式電子顯微鏡在動物組織的研究。硬 X 光顯微鏡的角色將進一步擴展，目前的儀器並未達到理論的極限值，此技術有很大的進展空間，因此目前也正在發展更先進的系統。

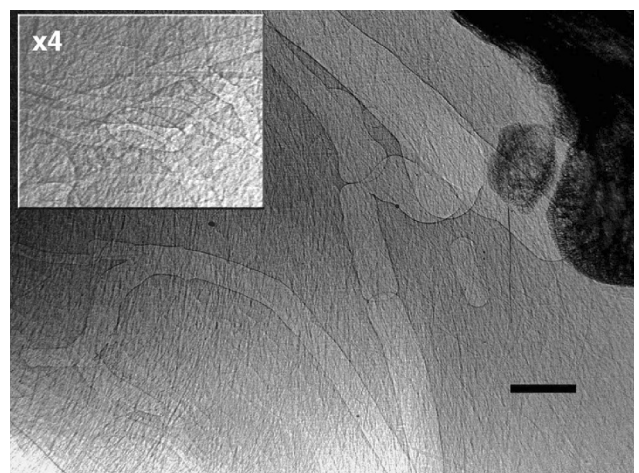


圖 16. 沒有注射任何對比染色劑而進行微血管造影很好的一個例子。這個影像清楚的顯示出接近老鼠足踝部位的血管的形態。

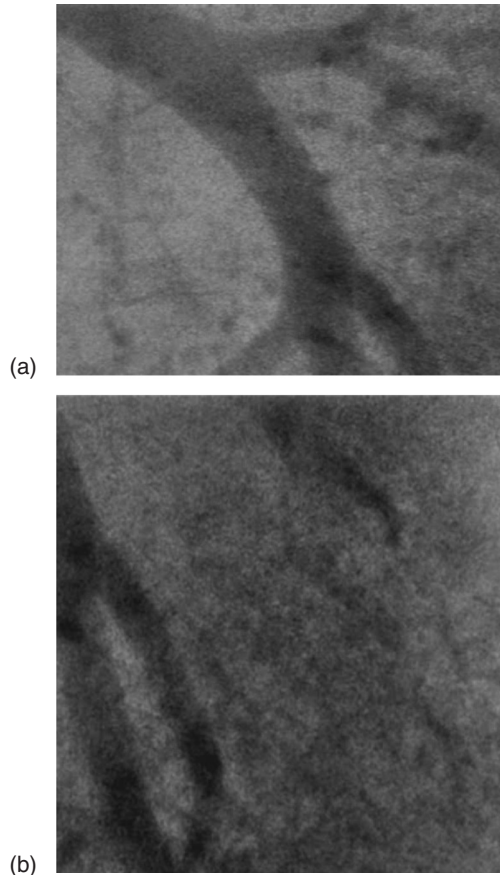


圖 17. 顯示一隻小鼠心肺器官附近組織結構。(a) 的影像是取自一連續影片中，在注射顯影劑後所取的血管成像，曝光時間 1 毫秒。(b) 曝光時間也是 1 毫秒，小鼠肺臟內之血管結構清晰可見。

## 2. 醫學應用

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 光成像因完全依賴吸收對比，如果想要對於體內對 X 光吸收極少的軟組織成像，則為了提高對比度必須使用對 X 光具有高吸收性的造影劑，這無疑地大幅限制了血管造影技術的進一步發展。

使用額外的相對比，X 光顯微術在對軟物質的成像能力方面有很大的改進。實驗結果證明同步輻射所產生 X 光非常適合做相對比成像，並可獲得高品質的血管影像<sup>(40)</sup>。由於不需使用單色光，因此訊號強度極高，從而可獲得時間解析度小於 1 毫秒的即時影像。目前所發展的同調 X 光顯微術已

達到無需使用造影劑便可即時觀察到活體中最小的微血管。在不同活體動物樣品中我們均可觀察到小於 10 微米尺寸的影像。雖然醫用核磁共振影像有時可達到比傳統 X 光成像更好的影像對比，但是這些方法不能觀測到微米級的細微結構。而這一尺度細微結構的觀察對血管疾病、腫瘤醫學的早期診斷是非常重要的。

圖 15 與圖 16 是我們所完成許多微血管造影影像中比較典型的例子。圖 15(a) 與 (b) 中顯示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 15(a) 中少量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，在確定無顯影劑時所成像的微觀特徵是真正來自運動中的血管。圖 15(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因折射對比的增強效應強化已經清晰可見。事實上我們可由這個對比判斷出，這些小血管管壁的影像在沒有對比染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 15(a) 而言，在注入對比染色劑後對 X 光大量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 15(c) 與 (d) 則顯示寬度約為 8 至 100 微米的樹枝狀外耳血管。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 15(c) 是在對比染劑流過後之影像。而圖 15(d1) 和 (d2) 則比較同樣的血管在對比染劑流過期間與流過後的影像。圖 16 是在沒有注射任何對比染劑而進行微血管造影很好的例子，該影像清楚的顯示出接近老鼠足踝部位的血管形態。

圖 17 顯示小鼠心肺器官附近的組織結構。圖 17(a) 的影像是取自一連續影片中，在注射顯影劑後所取得的血管成像，曝光時間 1 毫秒。圖 17(b) 曝光時間也是 1 毫秒，小鼠肺臟內之血管結構清晰可見。這個例子顯示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。

## 五、結論

本文描述有關即時同步輻射 X 光顯微成像研究的技術及其在生命科學與醫學應用的實驗結果。該結果清楚地顯示使用同步輻射 X 光光源的顯微技術已經快速的發展成熟，而該具有次毫秒時間及奈米級空間解析度的技術也可廣泛使用於許多不同研究系統，特別是活體生物進行即時影像觀察或是厚樣品內奈米結構的三度空間成像。實驗結果也顯示利用全景 X 光顯微鏡可對組織之細胞內部結構作深入之觀察及探討，研究核心乃基於三項主要因素：同調（同步輻射）X 光的使用、應用複數折射係數的實數部所貢獻之相對比機制，以及使用具放大效果之菲涅爾波帶片。利用菲涅爾波帶片的 X 光成像技術可獲得高品質的人類及小鼠細胞之顯微 X 光影像，Rayleigh 空間解析度可達到 29 奈米，利用影像重組技術也可繼續應用於觀察次細胞特徵的三維空間結構，在生物醫學應用上與其他生物影像設備相比較，全景 X 光顯微術在細胞與次細胞結構觀察上將更具發展潛力。目前 X 光顯微技術發展尚未達到極限，也顯示未來在技術發展與應用上仍有相當的挑戰。

## 參考文獻

1. W. C. Röntgen, *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, *et al.*, *Physics Medicine and Biology* **43**, 2845 (1998).
7. F. Arfelli, *et al.*, *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. Buffière, G. Peix, J. Baruchel, F. Peyrin F, 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, *et al.*, *Biophysics. J.*, **87**, 4180 (2004).
17. C. K. Gary, H. Park, L. W. Lombardo, M. A. Piestrup, J. T. Cremer, R. H. Pantell, and Y. I. Dudchik, *Appl. Phys. Lett.*, **90**, 181111 (2007).
18. C. G. Schroer, J. Meyer, M. Kuhlmann, B. Benner, T. F. G&uuml;nzler, B. Lengeler, C. Rau, T. Weitkamp, A. Snigirev, and I. Snigireva, *Appl. Phys. Lett.*, **81**, 1527 (2002).
19. T. Wilhein, B. Kaulich, E. Di Fabrizio, F. Romanato, S. Cabrini, and J. Susini, *Appl. Phys. Lett.*, **78**, 2082 (2001).
20. B. Kaulich, S. Oestreich, M. Salome, R. Barrett, J. Susini, T. Wilhein, E. Di Fabrizio, M. Gentili, and P. Charalambous, *Appl. Phys. Lett.*, **75**, 4061 (1999).
21. J. Kirz, H. Ade, E. Anderson, C. Buckley, H. Chapman, M. Howells, C. Jacobsen, C. H. Ko, S. Lindaas, and D. Sayre, *et al.*, *Nucl. Instrum. Methods.*, **87**, 92 (1994).
22. C. Jacobsen, T. Beetz, M. Feser, A. Osanna, A. Stein, and S. Wirick, *Surf. Rev. Lett.*, **9**, 185 (2002).
23. C.-A. Larabell, D. Yager, and W. Meyer-Ilse, *Proc. of the 6th X-Ray Microscopy Conference, American Institute of Physics, College Park, MD.*, **507**, 107 (2000).
24. T. Ford, W. Meyer-Ilse, and A. D. Stead, *Proc. of the 6th X-Ray Microscopy Conference, American Institute of Physics, College Park, MD.*, **507**, 119 (2000).
25. D. Weiß, G. Schneider, B. Niemann, P. Guttman, D. Rudolph, and G. Schmahl, *Proc. of the 6th X-Ray Microscopy Conference, American Institute of Physics, College Park, MD.*, **507**, 123 (2000).
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. D. Attwood, *Soft X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications*, Cambridge: Cambridge University Press, 337 (1999).
28. W. Chao, B. D. Harteneck, J. A. Liddle, E. H. Anderson, and D. T. Attwood, *Nature*, **435**, 1210 (2005).
29. T. N. Lo, Y. T. Chen, C. W. Chiu, C. J. Liu, S. R. Wu, I. K. Lin, C. I. Su, W. D. Chang, Y. Hwu, B. Y. Shew, C. C. Chiang, J. H. Je, and G. Margaritondo, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **40**, 3172 (2007).

30. Y. S. Chu, *et al.*, *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 103119 (2008).
31. J.-W. Miao, B. T. Ishikawa, E. H. Johnson, Lai, B. Anderson, and K. O. Hodgson, *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 088303 (2002).
32. J. Miao, K. O. Hodgson, T. Ishikawa, C. A. Larabell, M. A. LeGros, and Y. Nishino, *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 110 (2003).
33. J. W. Miao and T. K. Lee's work
34. W. K. Hsieh, F. R. Chen, J. J. Kai, and A. I. Kirkland, *Ultramicroscopy*, **98**, 99 (2004).
35. G. C. Yin, F. R. Chen, Y. Hwu, H. P. D. Shieh, and K. S. Liang, *Appl. Phys. Lett.*, **90**, 181118 (2007).
36. G. C. Yin, Y. F. Song, M. T. Tang, F. R. Chen, K. S. Liang, F. W. Duewer, M. Feser, W. B. Yun, and H. P. D. Shieh, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 221122 (2006).
37. M. Young, *J. Opt. Soc. Am.*, **62**, 972 (1972).
38. A. Faridani, D. Finch, E. L. Ritman, and K. T. Smith, *SIAM J. Appl. Math.*, **57**, 1095 (1997).
39. 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, *J. Microsc.*, **201**, 395 (2001).
40. 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).
41. R. Fitzgerald, *Physics Today*, **53**, 4355 (2004).
42. W. R. Dix, K. Engelke, W. Graeff, C. Hamm, J. Heuer, B. Kaempf, W. Kupper, M. Lohmann, B. Reime, and R. Reumann, *Nucl. Instrum. Meth.*, **A 314**, 307 (1992).
43. S. Takeshita, *et al.*, *Circulation*, **95**, 805 (1997).
44. 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).
45. H. Mori, *et al.*, *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暨國立清華大學系統與工程科學系與國立海洋大學光電科學研究所合聘教授，同時為國家同步輻射研究中心兼任研究員。
  - 王錚亮先生為逢甲大學材料科學與工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 劉啟人先生為國立成功大學材料科學及工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 許倍誠先生為國立台灣大學材料科學與工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 陳琮瑜先生為國立清華大學動力機械工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 羅宗男先生為國立成功大學材料科學及工程博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 華子恩先生為國立清華大學生命科學博士，現任中央研究院物理研究所博士後研究員。
  - 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 at Academia Sinica, and also an adjunct professor in the Department of Engineering and System Science at National Tsing Hua University, in the Institute of Optoelectronic Sciences at National Taiwan Ocean University, an adjunct scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
  - Cheng-Liang Wang received his Ph.D. in materials science and engineering from Feng Chia University. He is a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
  - Chi-Jen Liu received his Ph.D. in materials science and engineering from National Cheng Kung University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
  - Pei-Cheng Hsu received his Ph.D. in materials science and engineering from National Taiwan University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
  - Tsung-Yu Cheng received his Ph.D. in power mechanics engineering from National Tsing Hua University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
  - Tsung-Nan Lo received his Ph.D. in materials science and engineering from National Cheng Kung University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.
  - Tzu-En Hua received his Ph.D. in life science from National Tsing Hua University. He is currently a postdoctoral fellow in the Institute of Physics at Academia Sinica.