

様式1)

国立国際医療センター倫理審査申請書

平成18年 4月3日
(平成19年12月21日変更)

国立国際医療センター総長 殿

申請者 所属 病院 血液内科
職名 5階北病棟医長
氏名 萩原将太郎 印

1. 審査対象 研究計画 出版公表原稿 報告書
(迅速審査に相当する場合には、その理由)
研究計画の軽微な変更 主たる研究機関で承認済みの共同研究
その他 ()

2. 課題名 走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞に
おける細胞内元素変動解析

3. 当センターの研究代表者
所属、職名、氏名 病院 血液内科 5階北病棟医長 萩原将太郎

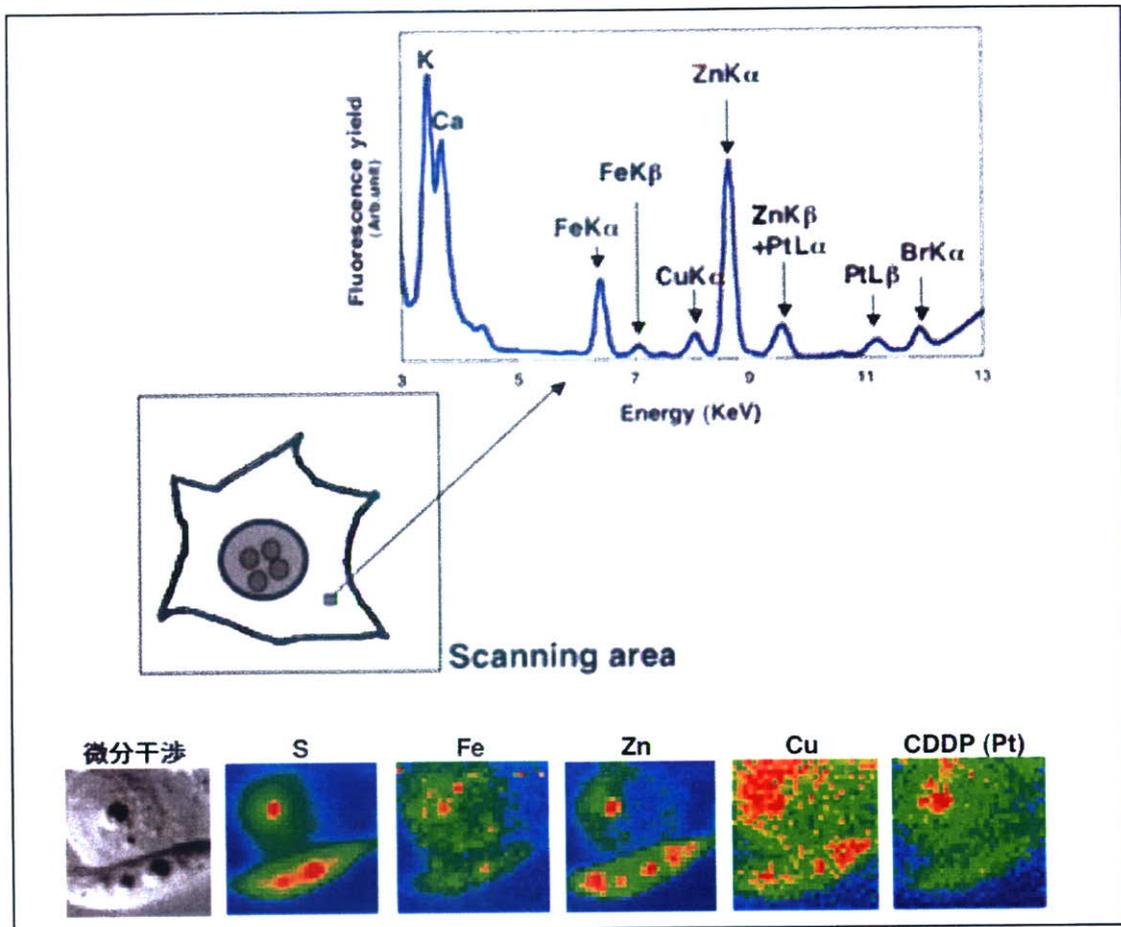
4. 当センターの研究協力者
所属、職名、氏名 研究所 難治性疾患研究部長 石坂幸人
難治性疾患研究室長 志村まり
病院 第1内科(血液内科)医長 三輪哲義
共同研究施設
所属、職名、氏名 理化学研究所播磨研究所(SPring-8)
X線干渉光学研究室 主任研究員 石川哲也
大阪大学大学院工学研究科
精密科学専攻教授 山内和人

5. 研究の概要

急性白血病、骨髄異形成症候群や再生不良性貧血など難治性血液疾患は、確実な治療法の研究が日々行われ、生存率が徐々に向上しているものの、依然、完治は困難であり、また発症のメカニズムも十分に解明されていない。さらなる有効な治療法の確立と、癌化機序の解明が待たれている。

これらの病態解明の糸口を得るため、造血器腫瘍の一部に対して DNA マイクロアレイ等の解析が行われている〔文献1〕。本研究ではこれまでにないユニークな方法として、走査型蛍光 X 線顕微鏡〔SXFPM; 文献2〕を用いた細胞内の元素分析(エレメントアレイ解析; 図参照)を行う。元素は、細胞内酵素、転写活性および膜チャネル機

構など細胞代謝に必須な物質である。本研究では正常骨髄・末梢血液細胞と血液疾患患者骨髄・末梢血液細胞の比較においてに特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明やあらたな診断および治療法の端緒を探索する。



参照図 1 走査型蛍光 X 線顕微鏡 (SXFM) を用いた細胞内の元素分析
細胞内の 1 区画当たりの元素分析スペクトルを示す。細胞全領域のスキューニングにより、下段写真のように、細胞内元素マッピングが可能となる。写真は Pt 製剤であるシスプラシンを細胞投与後 4 8 時間後の各元素の細胞内分布を示す (文献 2 より引用)。

6. 研究の対象等

研究の対象

文書で同意を得た血液疾患 (急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、真性多血症、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、発作性夜間血色素尿症) 患者の末梢血および骨髄細胞 (末梢血液あるいは骨髄細胞の片方の提供の可とする)

*末梢血は約 10ml、骨髄細胞は初診診断あるいは治療上必要な場合に施行される骨髄穿刺検査の余剰骨髄液約 0.5- 1 ml

実施場所

患者検体の収集：国立国際医療センター病院

解析準備のための細胞処理：国立国際医療センター研究所

元素分析（エレメントアレイ解析）：理化学研究所播磨研究所 SPring-8

元素結合蛋白質の解析：大阪大学工学部および国立国際医療センター研究所

実施（予定）期間 承認後 ～ 平成 22 年 3 月

7. 研究における倫理的配慮

全ての研究の段階で最大限の倫理的配慮を行っている。

①研究の対象とする個人の人権の擁護

研究への協力はあくまで自由意志で有ることを前提にしており、患者は試料採取を拒否した場合でも、何ら臨床上の不利益を受けない。採取されたサンプルはすべて当センターの研究責任者（研究代表者）により連結可能匿名化を行い、解析を担当する研究者にそのサンプルが誰の物であるかがわからない方式をとる。

②被験者に理解を求め同意を得る方法

主治医から患者に対して、説明文書（別添）および同意書（別添）を用いて、分かり易い言葉で適切かつ十分な説明を行う。同意への能力を欠く者または有効なインフォームドコンセントを与えることが出来ないと客観的に判断された場合あるいは未成年（20歳未満）の場合には保護者などの代諾者の同意を得るものとする。

③研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測

研究に用いるサンプルは初診時あるいは病状評価際など診療に必要な検査として施行する採血の際に追加採取される末梢血液約 10 ml および骨髄穿刺の際の骨髄液余剰分であり特に患者に不利益を与えない。研究成果とその臨床応用には一定の時間が必要であり、試料提供者に直ちに有益な情報をもたらされる可能性は高くはないが、将来的には多発性骨髄腫における癌化の病態解明、新たな治療法の開発に貢献すると予想される。

④その他

疾患名、年齢、性別以外の個人情報は一切秘匿とし、論文発表などにおいても公開しない。

研究計画書

1. 研究課題

走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における細胞内元素変動解析

2. 研究組織

研究代表者

病院 血液内科 5 階北病棟医長 萩原将太郎

研究協力者

研究所 難治性疾患研究部長 石坂幸人

難治性疾患研究室長 志村まり

病院 第 1 内科（血液内科）医長 三輪哲義

共同研究施設

所属、職名、氏名 理化学研究所播磨研究所 (SPring-8)

X 線干渉光学研究室 主任研究員 石川哲也

大阪大学大学院工学研究科

精密科学専攻教授 山内和人

3. 研究目的

難治性血液疾患患者の末梢血液あるいは骨髄細胞について走査型蛍光 X 線顕微鏡 (SXFM ; 文献 2) を用いて、細胞内微細構造における元素分析 (エレメントアレイ解析) を行い、難治性の血液疾患患者末梢血液・骨髄細胞に特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する。

4. 研究方法

①研究対象

当センターに外来通院中あるいは入院中の血液疾患患者 (急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、真性多血症、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、発作性夜間血色素尿症) を対象とする。

②研究期間 承認後 ～ 平成 22 年 3 月

③検体の解析方法

患者末梢血と骨髄液を採取 (どちらか一方でも可)。

蛍光 X 線専用基板に細胞を接着後固定する。

試料は理化学研究所播磨研究所 SPring-8 に搬送。

細胞の形態学的分類を施行した後走査型蛍光 X 線顕微鏡による元素分析を行う。

さらに、変動している特異元素に結合している蛋白質の解析を行うために、High performance liquid chromatograph (HPLC)-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) の連続測定による解析を行う。必要であれば、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) - Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法) (MAIDI-TOFMS) での蛋白質同定を行い、難治性の血液疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する

④目標症例数

各疾患最低 3 例、目標総数 50 例とする。

5. 患者への説明と同意

対象者には、血液疾患末梢血・骨髄細胞の特性に関する研究目的のためにサンプルを採取することを説明する。その際に、説明文書（別紙）を対象者に渡すと共にその内容を担当医が説明する。具体的には研究協力の任意性と撤回の自由、研究計画、研究目的、試料提供者にもたらされる利益および不利益、個人情報保護、研究成果の公表、得られた医学情報の権利、費用負担に関する事項について説明する。患者（あるいは代諾者）の同意が得られた場合は同意書（別紙）に署名してもらい保存する。患者が研究目的の採取を拒否した場合はサンプルの採取は行わない。

6. 個人情報の保護

当センター病院の患者検体や診療情報は、解析する前に試料の整理簿から、住所、氏名、生年月日などを削り、代わりに新しく符号をつけ、分析を行う研究者にも、患者の個人情報が漏れないようにする。解析後のサンプルは適切に処理される。

7. 解析結果の開示

本研究は、血液疾患患者の協力を得て、難治性血液疾患の末梢血液細胞および骨髄細胞における疾患特有な元素変動を調べるものである。この結果、患者個人の病気の治療などに有益な結果が出る可能性は低いため原則として解析結果を本人に開示することはしない。しかし解析の結果、診療上重要な情報が見つかった場合には、診療を担当する医師から患者あるいは家族へ結果の説明を行うことがある。

研究の進み具合やその成果、学術的な意義については、定期的に、また、患者の求めに応じ、分かりやすい形で、公表あるいは説明を行う。

8. 研究成果の公表

研究の成果を学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公表する際には、患者の個人名を匿名とし、その他のプライバシーに関することも、すべて配慮する。

9. 知的財産権の扱い

患者から提供された末梢血液あるいは骨髄細胞を用いた研究によって新たな血液疾患の診断あるいは治療に役立つような情報が発見されることも考えられる。この場合、知的財産権は研究施設に帰属し、検体を提供した患者には帰属しないことを患者に説明し了解を得た後、同意書を得る。

10. 解析研究終了後の試料等の取扱の方針

解析終了後のサンプルはすべて廃棄する。

参考文献

文献 1 Fabris S, et al. Characterization of oncogene dysregulation in multiple myeloma by combined FISH and DNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;42(2):117-127.

文献 2 Shimura M, et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum treatment. *Cancer Research* 2005;65(12):4998-5002.

説明文書

研究課題名

走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における細胞内元素変動解析

1. はじめに（本研究の意義及び目的）

血液疾患の多くは、その発症メカニズムが十分に解明されておらず、有用な診断法、また有効な治療法についての研究開発が必要です。本研究は、走査型蛍光 X 線顕微鏡^(注)という新しい技術を用いて、血液細胞や骨髄細胞のミネラル（元素）変動を調べるものです。ミネラル（元素）は、細胞代謝に必須であり、バランスを損なうと体調に変化が出ることも知られています。最近、このミネラルが、腫瘍細胞などの特徴と密接に関連していることが徐々にわかってきました。この研究により、今までわからなかった血液疾患の血液細胞や骨髄細胞のミネラル変動を詳しく調べることができます。この研究により新しい診断法や治療法の開発の助けになる可能性があります。

これからご説明することをご理解いただいた上で、この新しい技術を用いた研究のために、検査の際に末梢血液および骨髄液（どちらか一方でも結構です）を提供して頂きたい御協力をお願い致します。

（注）走査型蛍光 X 線顕微鏡とは？

生体内では、適切な量の鉄、銅、カルシウム、マグネシウム、カリウム等ミネラル（元素）は代謝に必須な成分であることが知られています。この顕微鏡では、被写体（細胞）の生体内の大体全てミネラル（元素）を観ることができます。また、生体内では様々な細胞が存在し、それぞれ役割分担があります。近年、細胞は外界の刺激に対して、細胞のミネラル（元素）に変動を起こすことを、この顕微鏡を用いて世界で初めて観ることができるようになりました。現在、日本はこの分野において世界最高水準にあります。

2. 研究協力は任意であり、撤回も自由であること

この研究への協力への同意はあなたの自由意志で決めて下さい。また同意しなくてもそのことによって治療上何ら不利益を受けません。一旦同意した場合でも、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は採取した試料（末梢血液や骨髄液）や調べた結果などは廃棄され、診療記録などもそれ以降は研究目的に用いられることはありません。

3. 研究のあらまし

研究名：走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における元素分析
研究の目的：血液疾患患者の末梢血液および骨髄細胞について走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いて、細胞内の様々な元素分析を行い、血液疾患患者血液・骨髄細胞に特徴的な元素の変動を調べます。

研究機関名及び研究者・研究責任者氏名：

研究責任者	所属機関	職名	氏名
研究協力者	国立国際医療センター病院	血液内科 5階北病棟医長	萩原将太郎
	国立国際医療センター病院	血液内科 第1内科医長	三輪哲義
	国立国際医療センター研究所	難治性疾患研究部部长	石坂幸人
		難治性疾患研究部難治性疾患研究室	志村まり

研究の方法：

血液検査の際に末梢血液約10mlおよび骨髄穿刺の検査を受ける際に余った骨髄液を約0.5-1.0ml程度いただきます。末梢血液か骨髄液のどちらか一方のご提供でも結構です。また、この研究のために新たに骨髄採取を行うものではありません。提供して頂いた末梢血液あるいは骨髄液中の血液細胞を分離し、走査型蛍光X線顕微鏡という特殊な装置をもちいて、細胞の中に含まれる元素を測定します。また特定の元素に変動がある場合には、血液細胞・血清や骨髄液に含まれる元素に結びついている蛋白質を解析します。

本研究の研究期間は、現在から平成22年3月までです。

御希望があれば、この研究の計画のさらに細かい内容（研究計画書）をお渡しします。

4. 予測される結果、研究協力者にもたらされる利益および不利益について

この研究は、血液疾患の患者さんの協力を得て、血液疾患の血液および骨髄における元素を調べるものです。研究の結果から、将来の血液疾患の患者さんにとって役に立つ情報が得られる可能性があります。しかし、あなたにとって直ちに役に立つような結果は出ないかもしれません。ただし、解析の結果、特に診療上重要と思われると判断される情報が得られることがあるかも知れません。この場合には、研究代表者より担当医師へ連絡し、担当医よりご本人へ御説明いたします。

研究から得られた解析結果につきましては、特に何かお知りになられたいことがございましたら、担当の医師を通じて研究責任者に御連絡いただければ御返事いたします。

5. 個人情報第三者から保護され、匿名化され、研究成果が公表されること

個人名につきましては当センターの個人識別情報管理者が番号で置き換えてわからないようにしてから、年齢、性別、検査所見などに関係するデータのみを添付して研究に使わせていただきます。研究の結果は、学会や学術雑誌等に発表しますが、その場合もプライバシーは保護されます。

あなたの協力によって得られた研究の成果を学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公表する際にはあなたの個人名を匿名とし、あなたが特定されるような状況はないように配慮されます。

本研究では、あなたの末梢血液あるいは骨髄液に含まれる元素や元素似結びついている蛋白を調べますが、遺伝情報についての解析は行いません。測定後の検体（末梢血液および骨髄液）は適切な方法（オートクレーブ＝高熱処理）により廃棄されます。

あなたの検体（末梢血液および骨髄液）は、研究に用いられる前に氏名や診療番号などの個人情報が取り除かれ、本研究の研究代表者によって新たに番号が付されます。これを

試料の匿名化といいます。本研究ではこのように匿名化された試料を用いることで、あなたのプライバシーが保護された状態で解析を行います。また本研究計画の結果を論文として公表する際にも個人の特定化が可能になるようにはいたしません。

6. 研究から生じるかもしれない知的財産権は研究協力者（あなた）には属さないこと

解析研究の結果として特許権などが生じる場合でも、残念ながら、試料を提供して下さった方のものにはなりません。あなたから提供していただいた試料を用いた研究によって、疾患の診断や治療に役立つような情報が発見され特許権などが生じることも考えられます。この様な知的所有権は研究者又は研究者の所属する施設に帰属し、試料を提供して下さったあなたには帰属しないことになります。何卒ご了解下さい。

7. 研究協力は無償で行われ、研究協力者に費用の負担はないこと

検体の提供は無償でお願いいたします。もちろん研究協力者の方に費用の御負担はありません。

平成 年 月 日

お問い合わせ先

国立国際医療センター血液内科 5階北病棟医長
萩原将太郎

国立国際医療センター血液内科 第1内科医長
三輪哲義

〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

TEL 03-3202-7181 (代表)

FAX 03-3207-1038 (代表)

研究協力についての同意書

申請番号 ()

国立国際医療センター総長殿

私は、走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞における元素分析について、下記説明者より説明文書を用いて以下の項目の説明を受けました。

- ・研究協力は任意であり、撤回も自由であること
- ・研究の意義、目的と方法
- ・研究から生じるかもしれない知的財産権は研究協力者に属さないこと
- ・研究終了後の試料等の取り扱い方法
- ・研究は無償に行われ、研究協力者に費用の負担はないこと

特に、以下の項目に関しては了解したことを□にチェックし、確認いたします。

- 血液検査および骨髄穿刺検査の際に末梢血液および骨髄液を提供していただくこと
(末梢血液あるいは骨髄液のどちらか一方でも可)
- 研究協力者にもたらされる利益および不利益について
- 個人情報第三者に漏れることなく、匿名化された上で研究成果が公表されること
- 末梢血液および骨髄細胞の解析が終了した後は直ちに試料は廃棄されること

以上より、私は上記の研究に協力することに（下記を○で囲んで下さい）

同意します

同意しません

平成 年 月 日

研究協力者氏名（署名または記名、捺印）

説明者の職名、氏名（署名または記名、捺印）

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K. and Nagamatsu, S.	Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis.	Journal of Cell Biology	177	695-705	2007
Matsuyama S., Mimura H., Shimura M., Yamauchi K, et al., Trace element	Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system,	Surf. Interface Anal.	Accepted		2008

Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system

S. Matsuyama,^{a*} H. Mimura,^a K. Katagishi,^a H. Yumoto,^a S. Handa,^a M. Fujii,^a Y. Sano,^a M. Shimura,^b M. Yabashi,^c Y. Nishino,^d K. Tamasaku,^d T. Ishikawa^d and K. Yamauchi^{a,e}

We have developed a scanning X-ray fluorescence microscope (SXFM) using Kirkpatrick-Baez mirror optics, which enables achromatic and highly efficient focusing, at BL29XUL of SPring-8. The SXFM enables observations of multielement distributions inside a sample with high resolution and high sensitivity. Previously, we have reported the high spatial resolution of a newly developed SXFM. In the present paper, we focus on the high sensitivity of the SXFM. By observations of fine test patterns using the X-ray beam probe having a size of $100 \times 100 \text{ nm}^2$ and an energy of 15 keV, the lower detection limit for the visualization of elemental distributions was investigated. As a result, the lower detection limits were found to be 0.009 fg (gallium) and 0.012 fg (tungsten). Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: scanning X-ray fluorescence microscope; X-ray microscopy; Kirkpatrick-Baez mirror system; trace element mapping; hard X-ray; focusing

Introduction

The measurement of elemental distributions has been widely applied to impurity analysis inside semiconductors and metals in materials science. Recently, the importance of such a measurement technique has begun to be recognized in various fields, such as biology, medical science, and archaeology, and several interesting studies using new methods to measure elemental distributions have been reported.^[1–4] However, few observational techniques have high resolution, high sensitivity, and simultaneous multielement detection capabilities that can be used under atmospheric conditions.

A scanning X-ray fluorescence microscope (SXFM) is a spectromicroscope that allows quantitative elemental maps to be acquired using X-ray fluorescence analysis, a focused hard X-ray beam, and raster scanning of a specimen. Since the excitation beam consists of hard X-rays, an SXFM enables us to observe samples without causing destruction and under atmospheric conditions. From the viewpoint of spatial resolution, SXFMs are more promising than visible light microscopes owing to the short wavelengths. Compared to other microscopes, SXFMs allow for easy acquisition of images of multielement distributions at a sub-100-nm spatial resolution without complex sample preparation under atmospheric conditions.

We have developed a high-sensitivity, high-resolution SXFM using the powerful combination of a synchrotron radiation source, which can generate the brightest X-rays, and a Kirkpatrick-Baez (K-B) mirror system,^[5–7] which enables achromatic and highly efficient focusing. Previously, we reported the high spatial resolution of the SXFM.^[8] In the present paper, the high sensitivity

of the SXFM is considered. In order to investigate lower detection limits for the purpose of visualizing elemental distributions, fine test patterns were observed. Moreover, the data of X-ray fluorescence obtained by the SXFM were quantified using standard specimens, the elemental contents of which were determined by Rutherford backscattering spectrometry (RBS). As a result, the detection limits were found to be 0.009 fg (gallium) and 0.012 fg (tungsten). In this experiment, the hard X-ray probe had a size of $100 \times 100 \text{ nm}^2$ and an energy of 15 keV.

* Correspondence to: S. Matsuyama, Department of Precision Science and Technology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.
E-mail: matsuyama@prec.eng.osaka-u.ac.jp

^a Department of Precision Science and Technology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Intractable Diseases, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan

^c Spring-8/Synchrotron Radiation Research Institute (JASRI), 1-1-1 Kouto, Sayocho, Sayogun, Hyogo 679-5148, Japan

^d Spring-8/RIKEN, 1-1-1 Kouto, Sayocho, Sayogun, Hyogo 679-5148, Japan

^e Research Center for Ultra-Precision Science and Technology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Experimental

Scanning X-ray fluorescence microscope

Figure 1 shows the optical focusing system employed in the proposed X-ray microscope. X-rays generated by an undulator are monochromatized to approximately 0.014% (at 15 keV) by a double-crystal monochromator (DCM)^[9] and then focused by a pair of elliptical mirrors aligned at a right angle to each other for vertical and horizontal focusing, called a Kirkpatrick-Baez (K-B) mirror system,^[8] and placed approximately 100 m downstream of the undulator. The working distance is designed to be 100 mm considering the practical use of the X-ray microscope. One major feature of the focusing system is that the beam size is controllable within a wide range from $29 \times 48 \text{ nm}^2$ (theoretical diffraction limit) to $\sim 2000 \times \sim 2000 \text{ nm}^2$ (at 15 keV) by adjusting a slit installed just downstream of the DCM.^[8]

Figure 2 shows a schematic diagram of the SXFM system. A mirror manipulator,^[10] developed especially for high-accuracy positioning of K-B mirrors, allows for the rapid alignment of two mirrors with an accuracy required for diffraction-limited focusing. A μ PIN photodiode is placed downstream of the sample stage to count transmission X-rays. An ion chamber is placed just upstream of the mirror manipulator to normalize output data having intensity fluctuations. An energy dispersive detector (silicon drift detector, SDD, Röntec Co., Ltd.) is employed to detect X-ray fluorescence with high sensitivity and high-energy resolution. A sample and a linear-encoder-based feedback X-Y stage with a

positioning resolution of 1 nm (SIGMA TECH. Co., Ltd.) are inclined at 60° to the incident X-ray beam to set up the SDD near the sample. The entire sample scanning system can be hermetically enclosed using an acrylic box and filled with helium gas.

X-ray fluorescence data detected by the SDD are analyzed by a multichannel analyzer (MCA, MCA8000A, AMPTEK Inc.) for pulse height analysis and are then downloaded to a personal computer. X-ray fluorescence spectrum data recorded for every pixel are processed using newly developed software, which integrates the counts of each region of interest (ROI) selected by the user in advance and visualizes elemental distributions according to the ROIs.

Quantitative analysis

To quantitatively analyze the measured data, thin membranes coated with platinum and nickel, the thickness and density of which were determined in advance by RBS, were measured under the same geometric conditions and the same beam condition as one of sample observations. In the RBS system, ion species are helium nuclei at an energy of 2.34 MeV and a beam size of $1 \times 1 \text{ mm}^2$. On the basis of on these results, a linear calibration curve of normalized X-ray fluorescence intensity as a function of the weight (fg) of platinum and nickel, having thicknesses of approximately 1 and 2 nm, was obtained (Fig. 3). In this case, the size of the focused beam and the exposure time were $100 \times 100 \text{ nm}^2$ and 1 s, respectively, and the number of measurements is 100. When

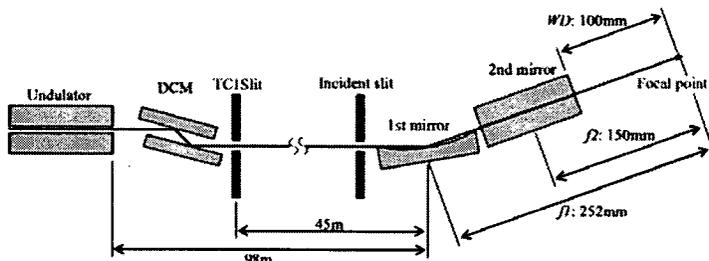


Figure 1. Optical focusing system.

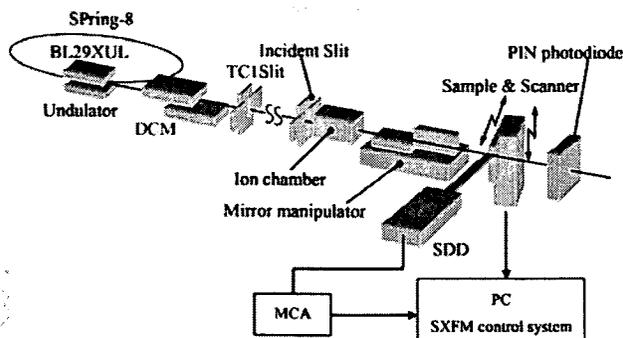


Figure 2. Scanning X-ray fluorescence microscope system.

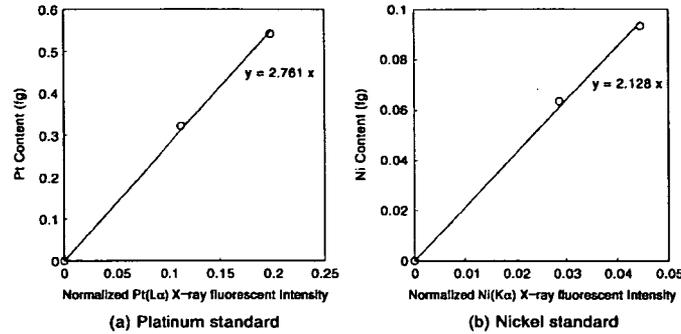


Figure 3. Linear calibration curves of normalized X-ray fluorescence intensity as a function of weight (fg). The weight on the vertical axis is decided by Rutherford backscattering spectrometry. Thick standard: $9.57 \pm 0.37 \times 10^{15}$ (atoms/cm²: Ni), $1.67 \pm 0.05 \times 10^{16}$ (atoms/cm²: Pt). Thin standard: $6.50 \pm 0.28 \times 10^{15}$ (atoms/cm²: Ni), $9.92 \pm 0.28 \times 10^{15}$ (atoms/cm²: Pt).

self-absorption effects and matrix effects are negligibly small because of a thin and/or sparse specimen and the incident X-ray is monochromatic, the contents of other elements were semi-quantitatively determined using the achieved calibration curve and the simple equations¹¹ below:

$$I(ip) = I_0 \cdot (\mu_i \cdot W_i \cdot \omega_i \cdot K_i \cdot R_i^p) \cdot T(ip) \cdot \epsilon(ip) \cdot G \quad (1)$$

$$\beta_i = (\mu_i \cdot \omega_i \cdot K_i \cdot R_i^p) \cdot T(ip) \cdot \epsilon(ip) \quad (2)$$

$$1/\alpha_i = \beta_i \cdot G = 1/\alpha_{Pt} \cdot \beta_i/\beta_{Pt} = 1/\alpha_{Ni} \cdot \beta_i/\beta_{Ni} \quad (3)$$

$$W_i = \alpha_i \cdot (I(ip)/I_0) \quad (4)$$

where α_i and β_i are coefficients depending on individual elements of i . Specifically, α_i denotes the slope of the linear calibration curve. In addition, $I(ip)$ and I_0 are the X-ray fluorescence intensities of the p -line in the element i , corresponding to counts accumulated into the ROI and the incident X-ray intensity given by the ion chamber, respectively, and W_i is the weight of element i in the irradiated area. The parameters μ_i and ω_i represent the photoelectric mass absorption and fluorescence yield, respectively, of element i . Parameters K_i and R_i^p are, respectively, the absorption jump ratio of the corresponding atomic shell in element i and the intensity fraction of the p -line to the entire emission series to which the p -line belongs in the element i . The parameters G , $T(ip)$, and $\epsilon(ip)$, which correct the efficiency of X-ray fluorescence emission, indicate a geometrical factor, the transmission through the atmosphere between the sample and the SDD, and the detector efficiency of the SDD, respectively. The $\epsilon(ip)$ corresponds to the value measured by the manufacturer. The other parameters except ϵ in these equations were obtained through the X-ray data booklet.¹²

Results and Discussion

To investigate the lower detection limit of the SXFM, observations of the test patterns were performed at the second experimental hutch (EH2) of BL29XUL of SPring-8 at an X-ray energy of 15 keV. The patterns used in the present study were microfabricated on a thin SiN membrane (NTT Advanced Technology Corporation Co., Ltd.) using a focused ion beam system (Hitachi, Co., Ltd., FB-2100). Figure 4(a) shows the fabricated pattern, in which the white

area represents a tungsten deposition. Elemental distribution maps visualized by the SXFM are shown in Figs 4(b) and (c). The color bars shown in Fig. 4 indicate the content (fg) of the element existing in the irradiation area ($100 \times 100 \text{ nm}^2$). The two maximum and minimum values represent values quantified using the two standard specimens of nickel (upper) and platinum (lower), respectively. In the case of Fig. 4, data mismatching falls within 20%. This result suggests that the proposed quantitative analysis is properly processed.

We estimated the detection limits for visualizing elemental distributions in the case of Fig. 4 using the following equation:

$$MDL = 3\sqrt{B}/I_0 \cdot \alpha \quad (5)$$

where MDL denotes the method detection limit (fg), I_0 is the incident X-ray intensity (count), \sqrt{B} , in which B is the background level (count) in each raw X-ray fluorescence intensity map before quantitative analysis, denotes the standard deviation of shot noise (count), and the parameter α is the slope of the linear calibration curve mentioned in Eqn (4). As a result of the calculation, MDL s to visualize elemental distributions were found to be 8.8×10^{-3} (fg, gallium) and 12×10^{-3} (fg, tungsten) under the condition of a dwell time of 1 s and a beam size of $100 \times 100 \text{ nm}^2$ (Table 1). In the analysis, the background level is estimated to be 3 (tungsten) ~6 (gallium, silicon) cps per channel of the SDD using the histogram of the elemental maps. However, the value actually includes not only background noise but also signals, considering X-ray fluorescence spectra recorded for each pixel. Therefore, the real background levels of these are thought to be approximately 1 cps per channel. Real MDL s appear to be smaller than the values calculated above.

Table 1. Estimated lower detection limits			
	B (count)	α/I_0 (fg/count)	MDL (fg)
Si	230	24.5×10^{-3}	1.11
Ga	220	0.197×10^{-3}	8.76×10^{-3}
W	119	0.361×10^{-3}	11.8×10^{-3}

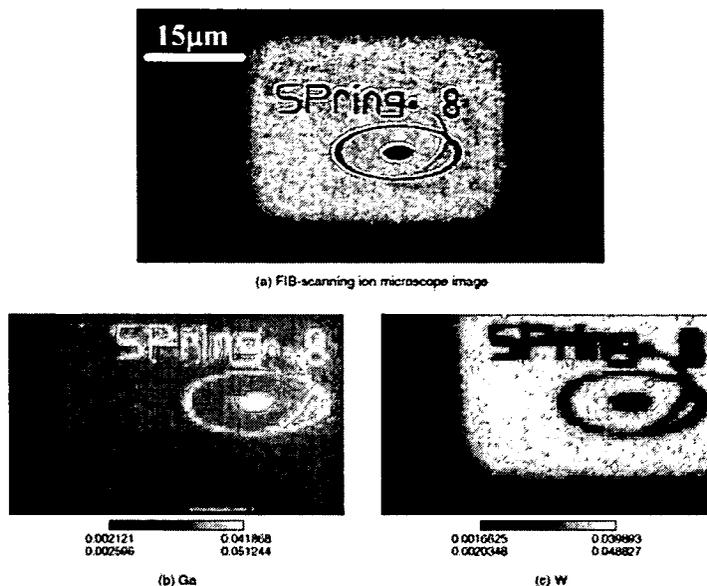


Figure 4. Elemental distributions quantified with the standard specimens. The two maximum and minimum values represent values quantified using the standard specimens of nickel (upper) and platinum (lower), respectively. (X-ray energy: 15 keV, Beam size: 100 nm \times 100 nm, Scanning pitch: 100 nm/pixel, dwell time: 1 s/pixel).

Conclusions

These experiments and analyses show that the developed SXFM can visualize elemental distributions in which the contents of gallium and tungsten are on the order of 0.01 fg using a nanobeam having a size of 100 \times 100 nm². This high sensitivity enables us to investigate samples of minute size and samples that contain trace elements, such as cells and tissues. To improve the sensitivity of the proposed SXFM, the development of long focusing mirrors and an X-ray detector having a large active area is necessary, and the former improvement is currently being investigated by our group. In the near future, using the SXFM, we hope to obtain new insights into various scientific fields based on element distributions.

Acknowledgements

This research was supported by a Grant-in-Aid for Specially Promoted Research 18002009, 2006 and 21st Century COE Research, Center for Atomistic Fabrication Technology, 2006, from the Ministry of Education, Sports, Culture, Science and Technology, Japan, and a Research on Advanced Medical Technology 2006-11-29, 2006, from Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

- [1] Kemner KM, Kelly SD, Lai B, Maser J, O'Loughlin EJ, Sholto-Douglas D, Cai Z, Schneegurt MA, Kulpa CF Jr, Nealson KH. *Science*. 2004; **22**: 686.

- [2] Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaku K, Nishio K, Nishino Y, Endo K, Hatake K, Mori Y, Ishizaka Y, Ishikawa T. *Cancer Res*. 2005; **65**: 4998.
- [3] Strick R, Strissel PL, Gavrilov K, Levi-Setti R. *J. Cell Biol*. 2001; **155**: 899.
- [4] Zorly MV, Dehnhardt M, Reifenberger G, Zilles K, Becker JS. *Int. J. Mass spectrom*. 2006; **257**: 27.
- [5] Kirkpatrick P, Baez AV. *J. Opt. Soc. Am*. 1948; **38**: 766.
- [6] Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Saito A, Endo K, Souvorov A, Yabashi M, Tamasaku K, Ishikawa T, Mori Y. *Jpn. J. Appl. Phys*. 2003; **42**: 7129.
- [7] Mimura H, Matsuyama S, Yumoto H, Hara H, Yamamura K, Sano Y, Shibahara M, Endo K, Mori Y, Nishino Y, Tamasaku K, Yabashi M, Ishikawa T, Yamauchi K. *Jpn. J. Appl. Phys*. 2005; **44**: 539.
- [8] Matsuyama S, Mimura H, Yumoto H, Sano Y, Yamamura K, Yabashi M, Nishino Y, Tamasaku K, Ishikawa T, Yamauchi K. *Rev. Sci. Instrum*. 2006; **77**: 103102.
- [9] Mochizuki T, Kohmura Y, Awaji A, Suzuki Y, Baron A, Tamasaku K, Yabashi M, Yamazaki H, Ishikawa T. *Nucl. Instrum. Methods* 2001; **A467/A68**: 647.
- [10] Matsuyama S, Mimura H, Yumoto H, Hara H, Yamamura K, Sano Y, Endo K, Mori Y, Yabashi M, Nishino Y, Tamasaku K, Ishikawa T, Yamauchi K. *Rev. Sci. Instrum*. 2006; **77**: 093107.
- [11] Shiraiwa T, Fujino N. *Jpn. J. Appl. Phys*. 1966; **5**: 886.
- [12] Thompson AC, Attwood DT, Gullikson EM, Howells MR, Kortright JB, Robinson AL, Underwood JH, Kim K, Kirz J, Lindau I, Pianetta P, Winick H, Williams GP, Scofield JH. In *X-Ray Data Booklet*, Thompson AC, Vaughan D (eds). Lawrence Berkeley National Laboratory: California, 2001.

AQ3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

4