

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



11 Veröffentlichungsnummer: **0 475 098 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **91113635.6**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **G21K 7/00**

22 Anmeldetag: **14.08.91**

30 Priorität: **29.08.90 DE 4027285**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**18.03.92 Patentblatt 92/12**

84 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT CH DE FR GB LI NL SE**

71 Anmelder: **Firma Carl Zeiss**

**W-7920 Heidenheim (Brenz)(DE)**  
84 **CH DE FR LI NL SE AT**

71 Anmelder: **CARL-ZEISS-STIFTUNG,  
HANDELND ALS CARL ZEISS**

**W-7920 Heidenheim an der Brenz(DE)**  
84 **GB**

72 Erfinder: **Thieme, Jürgen, Dr.**  
**Im Winkel 4**  
**W-3407 Diemarden(DE)**  
Erfinder: **Schmahl, Günter, Prof. Dr.**  
**Sertürnerstrasse 14**  
**W-3400 Göttingen(DE)**  
Erfinder: **Nieman, Bastian, Dr.**  
**Elly Heuss-Knapp Strasse 9**  
**W-3400 Göttingen(DE)**  
Erfinder: **Rudolph, Dietbert, Dr.**  
**Bronstein 10**  
**W-3410 Nordheim(DE)**

54 **Röntgenmikroskop.**

57 Das Röntgenmikroskop besitzt eine gepulste Röntgenstrahlquelle, die eine intensive Linienstrahlung liefert, wie z.B. eine Plasmafokusquelle, einen Spiegelkondensator der die Strahlung der Röntgenquelle auf das zu untersuchende Objekt fokussiert, und eine als Zonenplatte ausgebildete Röntgenoptik, mit der das Objekt unter hoher Auflösung auf einen Röntgendetektor abgebildet wird.

Durch diese Kombination ist es möglich, bei bildfehlerfreier hoher Auflösung auf der Abbildungsseite gleichzeitig noch eine ausreichend hohe Röntgenenergie am Probenort freizusetzen, so daß sich für die Untersuchung lebender Zellen erforderliche kurze Belichtungszeiten ergeben.

**EP 0 475 098 A2**

Es sind verschiedenartige Röntgenmikroskope bekannt, die sich in ihrem optischen Aufbau hinsichtlich der benutzten Strahlquelle, der Optik zur Fokussierung des Röntgenstrahls auf das zu untersuchende Objekt und die zur Abbildung des Objekts auf den verwendeten bildgebenden Röntgendetektor mehr oder weniger stark unterscheiden.

So sind beispielsweise Röntgenmikroskope beschrieben worden, in denen Spiegeloptik für die Abbildung des Objekts auf den Detektor benutzt wird zum Beispiel eine Wolter-Optik, die das Objekt unter streifendem Einfall der Röntgenstrahlung abbildet. Die Qualität des mit solchen Mikroskopen erzeugten mikroskopischen Bildes ist jedoch nicht sonderlich gut, da die Spiegeloptiken zum Teil mit erheblichen Bildfehlern behaftet sind. Diese Bildfehler - bei Spiegeloptiken, die unter streifendem Einfall arbeiten, ist das beispielsweise der sogenannte Winkeltangentenfehler - begrenzen die von der Apertur der Optik vorgegebene, prinzipiell mögliche Auflösung, die sich mit dem Mikroskop erzielen läßt.

Es sind auch Röntgenmikroskope beschrieben, in denen sowohl zur Fokussierung der Röntgenstrahlung auf das Objekt als auch zur Abbildung des Objekts auf den Detektor sogenannte Zonenplatten Verwendung finden. Diese Zonenplatten ermöglichen ähnlich sehr dünnen Linsen eine weitgehend bildfehlerfreie und damit hochaufgelöste Abbildung des Objekts. Sie haben jedoch einen bedeutend schlechteren Wirkungsgrad als Spiegeloptiken. Er liegt in der Praxis zwischen 5% und 15%, d.h. es werden nur maximal 15% der auf die Zonenplatte auftreffenden Röntgenstrahlung für die Abbildung benutzt.

Eine Übersicht über die verschiedenen Röntgenmikroskope gibt das Buch mit dem Titel "X-ray microscopy", Herausgeber G. Schmahl und D. Rudolph, Springer Series in Optical Science, Band 43, 1984.

In diesem Buch ist auf Seite 192 ff ein Röntgenmikroskop beschrieben, bei dem sowohl der Kondensator als auch das Objektiv als Zonenplatte ausgebildet ist. Die als Kondensator verwendete Zonenplatte dient dabei nicht nur zur Fokussierung der Röntgenstrahlung auf das Objekt, sondern wirkt außerdem als Monochromator und sondert die für eine hochauflösende Abbildung erforderliche monochromatische Strahlung aus den von der Röntgenquelle abgegebenen mehr oder weniger ausgedehnten Wellenlängenbereich aus. Dies geschieht einfach durch eine geeignete Lochblende auf der optischen Achse, die bewirkt, daß nur eines der infolge der Wellenlängenabhängigkeit der Brennweite der Zonenplatte auf der optischen Achse entstehenden monochromatischen Bilder durch die Blende hindurchtritt.

Das beschriebene Röntgenmikroskop ist we-

gen der Verwendung von Zonenplatten mit dem genannten niedrigen Wirkungsgrad relativ lichtschwach, so daß sich lange Belichtungszeiten ergeben, was z.B. bei der Aufnahme von lebenden Zellen zu Bewegungsunschärfe während der Belichtung führen kann. Man ist deshalb auf möglichst intensive Röntgenstrahlquellen angewiesen.

Für die Röntgenmikroskopie wird deshalb fast ausschließlich Synchrotronstrahlung von Elektronenspeicherringen verwendet. Dies hat jedoch den Nachteil, daß das Röntgenmikroskop nicht autark ist, d.h. der Benutzer ist räumlich und hinsichtlich der ihm zur Verfügung stehenden Meßzeit an einen der wenigen Elektronenspeicherringe gebunden.

Als Röntgenstrahlquelle ist weiterhin die sogenannte Plasmafokusquelle bekannt. Solche beispielsweise in der DE-OS 33 32 711 beschriebenen Röntgenquellen geben jedoch Röntgenstrahlung nicht kontinuierlich ab, sondern liefern einzelne kurze Röntgenpulse, denen sich eine relativ lange Totzeit anschließt, während der die Kondensatoren der Röntgenstrahlquelle wieder aufgeladen werden müssen. Die in einem Puls enthaltene Röntgenenergie ist in vielen Fällen nicht ausreichend,

Aus dem Vorgesagten ergibt sich, daß ein autarkes, gleichzeitig hochauflösendes und lichtstarkes Röntgenmikroskop bisher nicht existiert. Für biologische Anwendungen wird aber gerade dies u.a. wegen der dabei geforderten kurzen Belichtungszeiten für die Untersuchung von lebenden Zellen gefordert.

Gemäß der Erfindung wird nun diese Aufgabe durch die Kombination von den im Anspruch 1 angegebenen Maßnahmen, d.h. durch ein Röntgenmikroskop mit folgendem Aufbau gelöst: Es besitzt

- eine gepulste Röntgenquelle, die eine intensive Linienstrahlung liefert,
- einen Spiegelkondensator, der die Strahlung der Röntgenquelle auf das zu untersuchende Objekt fokussiert,
- eine als Zonenplatte ausgebildete Röntgenoptik, die das Objekt mit hoher Auflösung auf einen Röntgendetektor abbildet.

Durch die Kombination der gepulsten Röntgenquelle, die intensive Linienstrahlung liefert, mit einem Spiegelkondensator wird die zur Verfügung stehende Röntgenenergie optimal genutzt. Hierbei wirkt sich die Verwendung von Spiegeloptik auf der Beleuchtungsseite nicht nachteilig aus, da einmal die Bildfehler des Spiegelkondensators bei der Beleuchtung bedeutend weniger kritisch als auf der Abbildungsseite des Mikroskops sind. Hingegen wird im Vergleich zu einer Zonenplatte auf der Beleuchtungsseite ein 20 bis 30facher Lichtgewinn erzielt.

Zwar kann der Spiegelkondensator nicht als Monochromator verwendet werden, dies ist jedoch auch nicht erforderlich, da Röntgenquellen wie z.B.

der Plasmafokus bereits eine ausreichend intensive monochromatische Linienstrahlung liefern.

Aufgrund des genannten beleuchtungsseitig erzielten Lichtgewinns kann auf der Abbildungsseite die Zonenplatte mit ihren ausgezeichneten Abbildungseigenschaften beibehalten werden.

Mit der beschriebenen Kombination hat man erstmals genügend Röntgenenergie zur Verfügung, um biologische Objekte sozusagen "mit einem Schuß" abzubilden, d.h. die in einem Röntgenpuls enthaltene Röntgenenergie wird optimal genutzt und reicht zur Aufnahme eines Röntgenbildes von biologischen Objekten aus.

Beispielsweise kann der Spiegelkondensator ein Segment eines Ellipsoids sein, das die Röntgenstrahlung unter streifendem Einfall auf das Objekt fokussiert. Es ist zweckmäßig, wenn der Spiegelkondensator zur Erhöhung des Reflektionsvermögens mit einer Vielschicht belegt ist. Hierdurch läßt sich der Wirkungsgrad des Mikroskops nochmals verbessern.

Die für die Abbildung des Objektes auf den Detektor benutzte Zonenplatte ist zweckmäßig eine Phasenzonenplatte, die einen höheren Wirkungsgrad als eine Amplitudenzonenplatte hat.

Es ist weiterhin zweckmäßig, wenn der Kondensator die Röntgenstrahlquelle direkt auf das Objekt abbildet nach Art der sogenannten "kritischen Beleuchtung". Im Gegensatz zu der sonst üblicherweise in der Mikroskopie verwendeten sogenannten "Köhlerschen Beleuchtung" hat das den Vorteil, daß man mit einer einzigen Kondensatoroptik auskommt, d.h. der Wirkungsgrad auf der Beleuchtungsseite optimiert ist.

Es ist vorteilhaft, wenn der Spiegelkondensator durch eine oder mehrere Folien geschützt ist, durch die der Röntgenstrahl hindurchtritt. Mit diesen Folien lassen sich die empfindlichen Spiegelflächen abschirmen gegen Staub und Schmutz aus der Umgebung, eventuell auch gegen Dämpfe aus der Plasmafokusquelle, die sich andernfalls auf den optischen Flächen des Kondensators niederschlagen und seinen Wirkungsgrad verschlechtern.

Als Detektor kann entweder eine Fotoplatte oder eine röntgenempfindliche CCD-Kamera verwendet werden. Der Kamera wird zweckmäßig ein Bildspeicher nachgeschaltet, in den dann die jeweils mit einem Röntgenpuls erzeugten Bilder der zu untersuchenden Objekte eingelesen und beispielsweise mit den bekannten Methoden der Bildverarbeitung weiter verarbeitet werden.

Weitere Vorteile der Erfindung werden anhand des nachstehend in der einzigen Figur dargestellten Ausführungsbeispiels der Erfindung beschrieben.

In der Figur ist das neue Röntgenmikroskop in einer stark vereinfachten, zum Teil perspektivischen Prinzipskizze dargestellt.

In dem Mikroskop ist mit (1) die Röntgenquelle bezeichnet. Bei dieser Röntgenquelle handelt es sich um eine Plasmafokusquelle des Typs wie sie in der DE-OS 33 32 711 beschrieben ist. Diese Plasmafokusquelle liefert kurzzeitig ein punktförmiges Plasma, das Röntgenstrahlung mit einer dominanten Emissionswellenlänge auf der Lyman- $\alpha$ -Linie des sechsfach ionisierten Stickstoffs emittiert. Betrieben wird die Plasmafokusquelle (1) mit einer Kondensatorbank (2), die in der Zeit zwischen den Entladungen elektrisch aufgeladen wird.

Die von dem Plasmafokus (1a) ausgehende Röntgenstrahlung wird mit Hilfe eines Spiegelkondensators (3) auf das auf einen Objektträger (4) aufgelegte Objekt fokussiert. Der Spiegelkondensator (3) hat die Form eines Rotationsellipsoides und reflektiert die auf seine Spiegelflächen auffallende Röntgenstrahlung unter streifendem Einfall. An beiden Enden ist der Spiegelkondensator (3) durch je eine Folie (15) und (16) abgeschlossen, die die empfindlichen Spiegeloberflächen gegen Verschmutzung schützt. Die Folien sind aus einem im Spektralbereich der Röntgenstrahlung möglichst schwach absorbierenden Material wie z.B. Polyimid hergestellt.

Über der Objektebene ist eine sogenannte Mikrozonenplatte (5) angeordnet. Diese Mikrozonenplatte stellt die eigentliche Abbildungsoptik des Röntgenmikroskops dar. Ihr Abstand von der Objektebene ist in der Darstellung stark übertrieben. Tatsächlich besitzt die Mikrozonenplatte etwa einen Durchmesser von 20 - 50  $\mu\text{m}$  und befindet sich nur wenige zehntel mm über dem zu untersuchenden Objekt.

Die Mikrozonenplatte (5) bildet das Objekt stark vergrößert auf einen Detektor (6) ab. Der Detektor (6) ist eine Festkörperkamera wie sie beispielsweise unter der Bezeichnung NXA 1011 von der Firma Valvo bezogen werden kann, und die für Röntgenstrahlen sensibilisiert ist, indem das Deckglas entfernt und die photoempfindliche Fläche mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z.B.  $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Tb}$  belegt wurde.

Die CCD-Kamera (6) ist an einem Träger (7) befestigt, der wie durch den Pfeil angedeutet entlang der optischen Achse mit Hilfe einer Einstellvorrichtung (8) zum Zwecke der Fokussierung verschoben werden kann.

Die vorstehend beschriebenen Bauteile des Röntgenmikroskops befinden sich in einer auf die Kondensatorbank (2) aufgebauten zylindrischen Säule (9), die unter Vakuum steht oder mit einem im Bereich der verwendeten Röntgenstrahlung nur schwach absorbierenden Gas wie z.B. Helium oder Wasserstoff gefüllt ist.

Die Signalleitungen der CCD-Kamera (6) sind durch die Einstellvorrichtung (8) hindurchgeführt und an eine Elektronikeinheit (10) angeschlossen,

die das Auslesen des Bildes aus der CCD-Kamera (6) besorgt. Diese Kameraelektronik (10) ist über eine Steuereinheit (11) mit der nicht näher dargestellten Elektronik für den Betrieb der Plasmafokusquelle synchronisiert derart, daß nach jedem von der Plasmafokusquelle (1) abgegebenen Röntgenpuls jeweils ein Bild eingezogen und in einem Bildspeicher (13) abgelegt wird. Die dort abgespeicherten Bilder können dann mittels eines ebenfalls an die Elektronikeinheit (10) angeschlossenen Monitors (12) betrachtet werden.

Es ist klar, daß im Rahmen der Erfindung Abwandlungen von dem hier im Detail beschriebenen Aufbau möglich sind. So kann anstelle der CCD-Kamera (7) auch eine Röntgenfilmkassette verwendet sein. Weiterhin ist es möglich, anstelle des unter streifendem Einfall arbeitenden Spiegelkondensors in Form eines Rotationsellipsoides andere Spiegeloptiken, beispielsweise eine Spiegelanordnung vom sogenannten Schwarzschildtyp zu verwenden.

#### Patentansprüche

1. Röntgenmikroskop mit folgendem Aufbau:
  - einer gepulsten Röntgenquelle, die eine intensive Linienstrahlung liefert,
  - einem Spiegelkondensator, der die Strahlung der Röntgenquelle auf das zu untersuchende Objekt fokussiert,
  - einer als Zonenplatte ausgebildeten Röntgenoptik, die das Objekt mit hoher Auflösung auf einen Röntgendetektor abbildet.
2. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei die Spiegelfläche des Kondensators (3) mit einer Vielfachschicht zur Erhöhung des Reflexionsvermögens belegt ist.
3. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei der Spiegelkondensator die Röntgenstrahlung unter streifendem Einfall fokussiert.
4. Röntgenmikroskop nach Anspruch 3 wobei der Spiegelkondensator ein Segment eines Ellipsoids ist.
5. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei die Röntgenquelle eine Plasmafokusquelle ist.
6. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei die Zonenplatte eine Phasenzonenplatte ist.
7. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei der Spiegelkondensator durch eine Folie geschützt ist, durch die der Röntgenstrahl hindurchtritt.
8. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei der Spiegelkondensator die Röntgenquelle (1a) direkt auf bzw. in das Objekt (4) abbildet.
9. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei der Detektor (6) eine Halbleiterkamera ist.
10. Röntgenmikroskop nach Anspruch 1 wobei eine Elektronik (11) vorgesehen ist, über die der Detektor (6) und die gepulste Röntgenquelle (1) synchronisiert sind, derart daß jeweils nach einem Röntgenpuls ein Bild aus dem Röntgendetektor (6) ausgelesen wird.
11. Verfahren zur Erzeugung von hochaufgelösten mikroskopischen Bildern im Lichte von Röntgenstrahlung wobei
  - die Strahlung einer gepulsten Röntgenstrahlquelle mittels eines Spiegelkondensators auf das Objekt fokussiert wird,
  - jeweils ein Bild des Objekts mit einem ausgelösten Röntgenpuls erzeugt wird,
  - die Kamera, auf die das mikroskopische Objekt von einer Zonenplatte abgebildet wird, synchron mit der gepulsten Röntgenstrahlquelle jeweils nach einem erzeugten Röntgenpuls ausgelesen wird.

