

STEM トモグラフィによる厚切り切片の観察

STEM-Tomography for Thick Biological Specimens

青山 一 弘

Kazuhiro Aoyama

日本エフイー・アイ(株)アプリケーションラボラトリー

要旨 STEMは生物試料の観察にはなじみの薄い結像法ではあるが、トモグラフィと組み合わせる場合には数々のメリットがあることが明らかになった。1) 試料の厚さに対して強い。STEMでは基本的に対物レンズの色収差の影響を受けないため、これに起因する像質の悪化がない。2) 傾斜時にも全視野にフォーカスが合う。試料を高傾斜した時、TEMでは試料のごく一部にしかフォーカスをあわせることができないが、STEMではフォーカスを変えながらスキャンすることにより像全体にわたりフォーカスをあわせることが可能である。3) 環状暗視野検出器により、高コントラストの暗視野像が得やすい。また、そのとき結像に使う電子の散乱角を自由に選択できる。4) コントラストがリニアである。STEMでは対物レンズの球面収差の影響も受けず、またデフォーカスする必要も無いため、これらに由来するアーティフィシャルなコントラストとは無縁である。

キーワード：STEM (走査透過型電子顕微鏡法)、電子線トモグラフィ、生物試料、厚切り切片

1. はじめに

透過型電子顕微鏡を用いた結像法には、生物分野で普通に使われているTEM法のほかにSTEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) 法というものがある。STEMは生物学者にとってはなじみの薄い結像法であるが、材料系、特に結晶材料の研究には広く用いられており、むしろ主流といえる結像法である。材料系で多用される理由は、HAADF (High-angle annular dark field) により回折コントラストの影響を軽減でき、元素組成に素直なコントラストの像が得られること、EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)、EELS (Electron Energy Loss Spectroscopy) など分析手法と組み合わせが容易であること、などである。しかし、上記のメリットは生物系の試料として一般的な樹脂包埋試料などを観察する場合には当てはまらない。そのため、今日までSTEMは生物分野ではほとんどの普及することはない、過去にわずかな数例の先駆的な研究があるのみであった¹⁻³⁾。一方で、ここ数年、電子線トモグラフィが一般化してきた。もちろん材料系の研究にはSTEMによる電子線トモグラフィも多く使われており、TEMトモグラフィとSTEMトモグラフィについての比較の議論も多くなされている⁴⁻⁶⁾。生物分野におけるSTEMトモグラフィも、いくつかの研究は既に始められており⁷⁻⁹⁾、トモグラフィと組み合わせるとき原理的にいくつかの大きなメリットがあることも明らかとなった¹⁰⁾。本稿では生物学で一般的な樹脂包埋試料へのSTEMトモグラフィの

応用について基礎的な解説を行う。観察用試料の作成法については、樹脂包埋のほかレプリカ法もあり、これについては本特集のほかの稿で述べられている。また、クライオ電子顕微鏡法への応用も期待される。

2. STEMとは

本誌は電子顕微鏡の専門誌であるので、本来は省略すべき内容かもしれないが、筆者が生物系の電子顕微鏡学者と話をするとき、STEMというものが生物学者にとっては本当に縁遠いものであるということを何度も痛感しているため、まず始めにSTEMについての簡単な解説を行う。

SEMを使用した経験のある方であれば理解は簡単であると思うが、STEMでは“小さく収束した電子線を試料上で走査すること”が結像の基本である(図1)。ここでSEMでは検出器を試料上部に置き、試料からの二次電子や反射電子を検出、その強度を電子線の走査にあわせて2次元にプロットすることにより画像化するが、STEMでは検出器を試料の下に置き、透過してきた電子を検出する。なお、当然のように現在では検出器からの強度データも電子線の走査位置の情報もデジタルデータであるので、画像はPC上で形成され、モニタに出力される。電子顕微鏡の鏡体内には像は結像されず、CCDのような2次元検出器を必要としない。また、このように走査を基本とする結像法は、試料に平行光を照射しレンズの作用により像を作るという通常のTEMとはまったく異なる結像法であり、結像には試料より下に位置するレンズ(結像レンズ)は必要ではない。とはいえ、装置として透過型電子顕微鏡を使うSTEMでは、対物レンズを含む結像系レンズも利用することができる。STEMの検出器は試料を透過もしくは、散乱した電子が集まる場所、つまり結像系レンズの

〒108-0075 東京都港区港南2-13-34
TEL: 03-3740-5392
E-mail: kazuhiro.aoyama@fei.com
2009年8月27日受付

後焦点面に置くが、検出器と試料の間にはレンズが複数あるため光学的な自由度がある(これについては後述する)。また、検出器の形は最近ではドーナツ型が主流であるが、これもその置き場所が後焦点面であることに深く関係している。

3. STEM トモグラフィ、利点は？

まず、原理的な考察から行うことにする。

トモグラフィと STEM の組み合わせを考えたとき、生物試料に対しても以下のような数々のメリットがあると考えられる。

- 1) 試料に厚さに対して強い。
- 2) 傾斜時にも全視野にフォーカスが合う。
- 3) HAADF を含む暗視野が使いやすいため、高コントラストが得やすい。
- 4) コントラストがリニアである。

1) STEM を使い慣れた材料系の分野では、厚い試料を観察する場合 STEM を用いれば TEM 像よりも鮮明な像が得られることは良く知られている。その理由は一言で言えば STEM はレンズによる結像ではないので、基本的に対物レンズの色収差の影響を受けないためである。

試料が厚くなるに従い、試料との相互作用により非弾性散乱を起こす電子の割合が増えてくる。非弾性散乱が確率的に起こるとすればごく当然の結果である。それにより試料を透過した後に入射電子よりエネルギーの減少した(波長が長くなった)電子が増えてくることになる。一方、電子レンズには色収差というものがあり、異なる波長(色)の光は一点に結像できず、像をボケさせる。これが通常の TEM 像が試料の厚さが増すにしたがってボケた像になる最大の原因である。エネルギーフィルタを用いれば TEM においても非弾性散乱をカットし厚い試料でもクリアな像を得ることができ

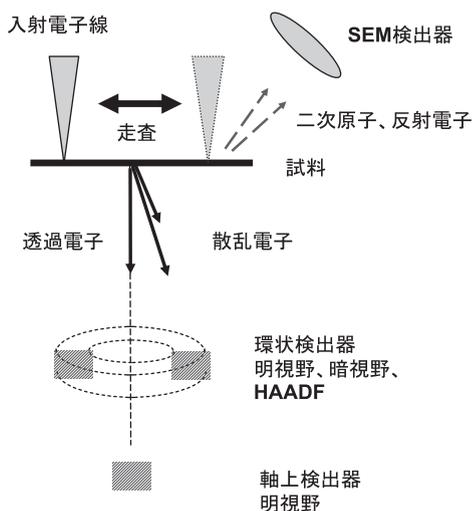


図1 STEM とは

- 平行ビームではなく収束した電子線を使用する。
- 収束した電子線を試料上で走査する。
- 検出器は後焦点面に置く。
- いろいろなタイプの検出器の使用が可能。

る。いわゆるゼロロス結像法と呼ばれているものであり、厚い試料に対して有効であると広く認識されている。しかし、試料がさらに厚さを増していくと非弾性散乱の割合はさらに増え、最終的にすべての電子が非弾性散乱することになり(図2)、ゼロロス像は取得することすら不可能となる。トモグラフィでは試料傾斜が必須であるので、試料の見掛けの厚さが2倍、3倍にもなることに注意しなければならない。STEM では非弾性散乱電子も捨てることなく結像に使うことができるので、ゼロロスピークが消失してしまうような厚さの試料も使うことができる。トモグラフィに厚い試料を用いることができるということは、当然のように、より多くの三次元情報を得ることができるということである。

2) トモグラフィでは高角度まで試料を傾斜し像を撮影する必要があるが、試料を高傾斜した時、TEM では試料のごく一部にしかフォーカスをあわせることができない。対物レンズのフォーカス面がひとつしかないためである(図3)。これに対し STEM では一枚の画像の中でもフォーカスを変えながらスキャンすることが可能であり、それによって高傾斜時であっても像全体にわたりフォーカスをあわせることができる。デジタル制御された電子顕微鏡では試料傾斜角度、倍率(つまり走査の範囲)、フォーカス値などを電子顕微鏡

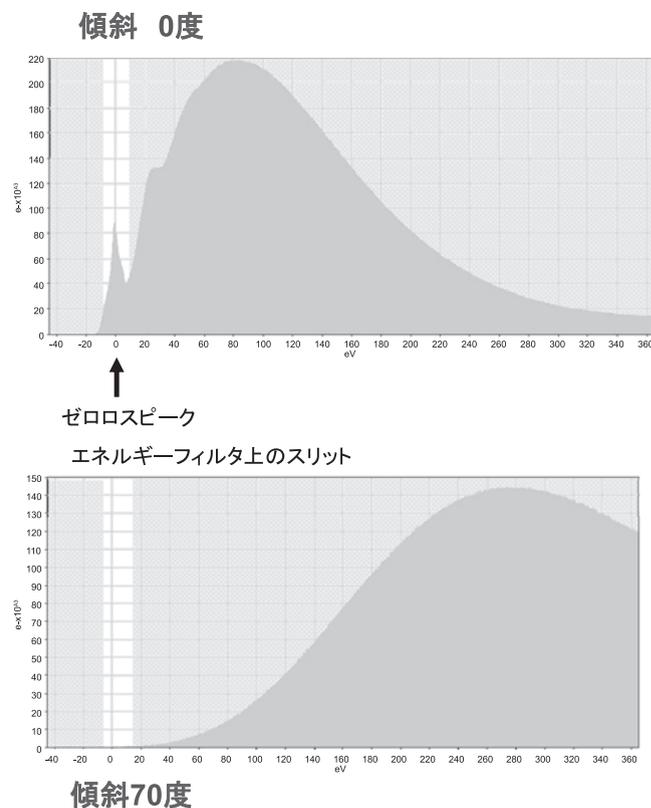


図2 厚切り切片よりの EELS

加速電圧 300 kV の電子顕微鏡で取得した厚さ約 1 μm の超厚切り切片よりの EELS の例。上図は試料傾斜ゼロ度。下図は同じ試料を 70 度傾斜したときの EELS。ゼロロスによる結像は一般的に厚い試料に有効とされるが、試料がここまで厚くなるとゼロロスピークが無くなってしまっているので使用できない。

のソフトウェアが把握しているので、トモグラフィデータ取得中、すべての画像において全視野で自動的にフォーカスをあわせることが可能である。FEI社ではこれをダイナミックフォーカスと呼称している。

3) 試料に入射した電子線は、試料により散乱されるもしくはそのまま透過することになる。散乱された電子を検出するのが暗視野、透過した電子を検出するのが明視野である。電子顕微鏡に限らず光学顕微鏡においても、一般に明視野より暗視野のほうが高いコントラストが得られることは経験のある方であればご存知であろう。これは明視野が単に試料を透過してきただけの光のバックグラウンドにのっているのと比較して、暗視野はシグナルのみを検出しているためであると理解できる。TEMの暗視野像が対物鏡により、ごく一部の散乱電子を取り込むのと比較して、STEMでは環状検出器を用いることにより全方位の散乱電子を取り込むことができるため、シグナルを無駄なく利用でき、また等方的な暗視野像を得ることができる。これが後焦点面に環状検出器を置く理由である。また、試料と検出器の間の光学的な位置関係に自由度があることは既に述べたが、この光学的な距離（カメラ長）を変更することにより、散乱角度の違う電子線を選択的に取り込めるというメリットが出てくる（図4）。カメラ長を短く設定すれば高角度に散乱された電子を選択的に検出し結像することができ、いわゆるHAADF（High Angle Annular Dark Field）像が得られる。散乱角度は試料の原子種によって決まるので、HAADF像は重原子のみがコントラストを持つ像である。重い原子核が大きく電子を散乱させるというのは直感的に理解しやすいと思う。反対に低角度の電子を集めれば軽元素によって散乱された電子による暗視野像になる。この稿では樹脂包埋染色試料について議論しているので、今見たいのは重原子によるコントラストであり、樹脂（軽原子）に散乱された電子はノイズでしかなく、カットすることにより高いS/N比の像を得ることができる。また、反対

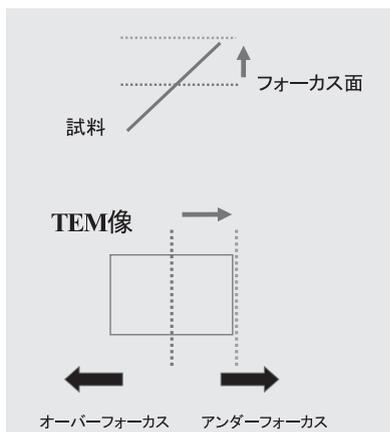


図3 ダイナミックフォーカス

TEMトモグラフィでは試料を高傾斜したときに像のごく一部にしかフォーカスをあわせられない。そのため、一枚の像の中で場所によりデフォーカス量が異なること、ある程度大きなデフォーカスの導入が必須なこと、などの問題がある。

にクライオなど無染色の試料を観察するときは低散乱角の電子を取り込めばよいことになる。以上のように試料により取り込み角を自由に選べることは大きなメリットである。しかし、試料が非常に厚い場合、電子は試料中で多重散乱を起すため以上のような効果は限定的になる。それをも含めて、試料にあわせた最適な取り込み角の選択が可能であり、また必要でもある。

なお、STEMで使用するのは散乱コントラストであり、干渉コントラストではないので、ここでの説明は簡単のために電子の波の性質は無視している。また、変更可能なのは試料と検出器の“光学的な”距離であり検出器の物理的な取り付け位置は固定されていることに注意が必要である。

4) STEMが電子レンズの色収差の影響を受けないため厚い試料を用いても像がボケにくいことは既に説明したが、同様に球面収差の影響も受けない。球面収差とは電子レンズの中心付近と周辺部分を通った電子が同じ点に収束できないという収差のことであり、TEMの分解能を制限する最大の要素であることは周知の通りである。この収差のためにTEM像は試料の形状（ポテンシャル）をそのまま現したものとはならない。支持膜上にのせた金コロイドを撮影したTEMと像とSTEM像を図5に示す。TEMでは黒いコロイドの周りに本来の試料の構造には無い白い縁取りが観察されるが、TEM像を見慣れた方にとっては特に違和感は無いらしい。STEMではそのようなアーティフィシャルな縁取りは現れない。実際の試料の形状と得られたTEM像との関係を空間周波数に対する像のコントラストで評価したものはCTF（Contrast Transfer Function）と呼ばれているが、撮影された

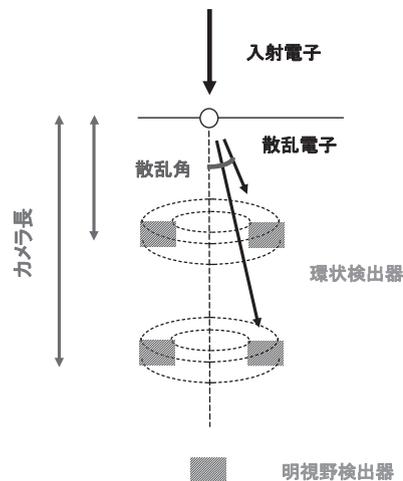


図4 入射電子の散乱とカメラ長

STEMでは円形検出器の使用できるので全方位の散乱電子を結像に使用できる（ADF: Annular Dark field）。また、検出器を置く位置によって得られる像を明視野、暗視野、HAADFと容易に切り替えられる。つまり、検出器を近くに置けば高角度に散乱した電子を、遠くに置けば低角度に散乱した電子を取り込むことができる。また回折図形をずらすなどして透過波を検出し明視野像も簡単に形成できる。透過型電子顕微鏡では、装置の中の検出器の物理的な位置は一定でもレンズを用いて光学的な位置は自由に変えることができる。

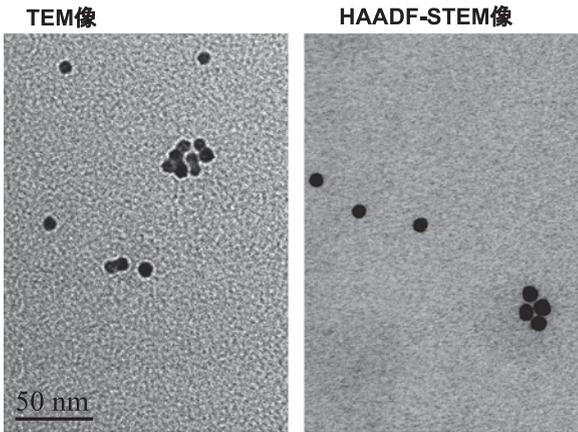


図5 TEM像とSTEM像の比較

カーボン支持膜上の10 nmの金コロイドを撮影した。比較しやすくするためHAADF-STEM像はコントラストを反転させてある。強調のためTEM像には約3 μm の非常に大きなデフォーカスを導入しているが、TEMトモグラフィには大きなデフォーカスの導入が必要である。

TEM像から本来の試料の正確な形状を求めようとするとき、CTFの補正は必須である。しかし、TEMトモグラフィでは傾斜像において、部分ごとにデフォーカスが異なるためこれは非常に複雑になる。一方STEMでは対物レンズの球面収差の影響も受けず、また2)で説明したようにデフォーカスの必要もなく、ダイナミックフォーカスが可能であるため、より正確で分解能の高い3次元解析が可能となる。これについての詳細は本特集の別稿で詳しく議論されている。

4. TEMトモグラフィとSTEMトモグラフィの比較

樹脂包埋された酵母細胞をテスト試料として厚切り切片を

作成し、TEMとSTEMの画像の比較を行った。図6では取得された連続傾斜像の0度、60度、73度の像を示している。試料の厚さは約1 μm であるが、73度傾斜時には見掛けの厚さは約3.2倍になる。この像を見れば、厚い試料を用いたときのSTEMトモグラフィの優位性は明確である。なお、TEM像はエネルギーフィルタを用い15 eV幅のスリットを入れたゼロロス像である。また、STEM像は暗視野なので、コントラストをあわせるために反転してある。0度のときからすでにTEM像は非常にボケているが、60度ではそれに加えて非常に少ない電子しか結像に使われていないためノイズの多い像になっている。73度になると結像に使える電子がほとんど無いが、これは3-1)で説明したとおりである。図7は図6の連続傾斜シリーズより再構築した3次元ポリリウムのレンダリング像である。基の傾斜像の像質がまったく違うので当然のように3次元再構築像も異なるが、連続傾斜像の像質は再構築自体の精度にも大きくかかわるため、その差はいつそう大きくなる傾向にある。なぜなら、ボケたり、S/Nが悪かったりする画像間では再構築のための位置アライメントが正確に取れないからである。

5. 超厚切り切片

試料の厚さに対して強いことがSTEMトモグラフィの特長のひとつであるが、それではどのくらいの厚さまでの解析が可能であるのか。解析事例を一つ示す。試料はマウス小脳のゴルジ染色標本であり生理学研究所の重本隆一教授にご提供いただいた。この試料は元々生理学研究所の超高压電子顕微鏡での観察用に作成されたものである¹¹⁾。図8に連続傾斜像の一部を示す。さすがに70度まで傾斜すると像はだいぶボケるが、加速電圧300 kVのSTEMで問題なく観察がで

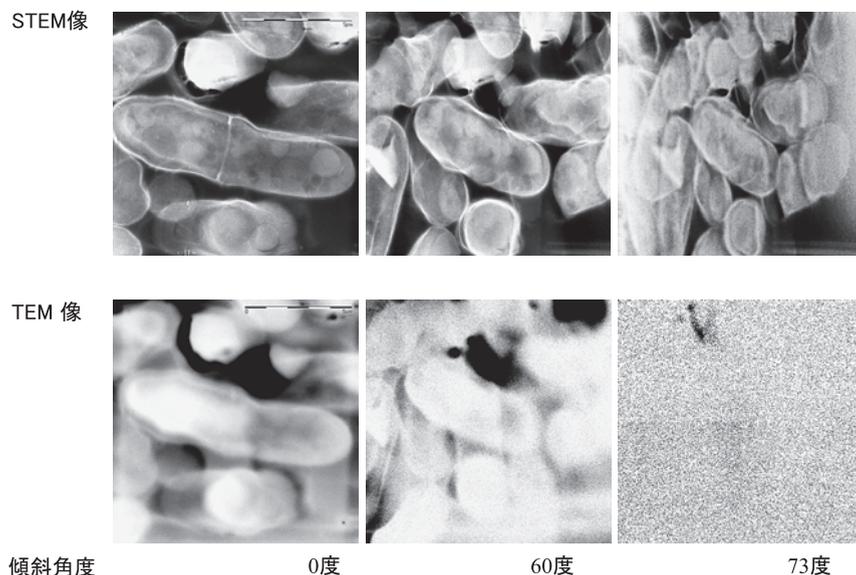
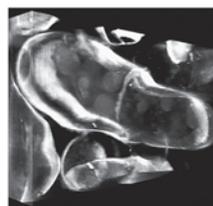
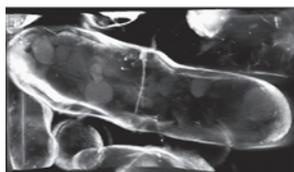


図6 厚切り切片の傾斜像

上段がSTEM像、下段がTEM像。0度のときからTEM像とSTEM像の差は大きいですが、角度が大きくなるとその差はますます大きくなる。73度になるとTEMではほとんど像にならなくなってしまふのは図2のようにゼロロスピークがなくなってしまうため。

STEM



TEM

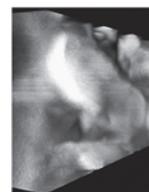
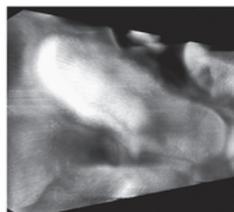
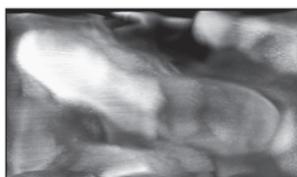


図7 TEM およびSTEM トモグラフィによる3次元再構築像の比較（ボリュームレンダリング像）
基となる傾斜像の像質が大きく異なるので当然再構築像の像質にも大きな差があるが、像質の悪さは再構築のときの画像のアーティファクトにも悪影響を及ぼすので再構築像での像質の差はいっそう大きなものとなる傾向がある。

きることが明らかとなった。3次元再構築の結果、この試料の厚さは一番厚い部分では $6\mu\text{m}$ 弱もあったので、70度では電子線は $15\mu\text{m}$ 以上も試料を透過していることになる。ここで像をよく見ると試料の上部では像はシャープなのと比較して切片の下部と思われる部分では像がボケているのがわかる。像がボケる原因は試料内部での電子線の拡散であるが、これがきちんと像に反映されているということである。この様子は当然のように3次元再構築したボリュームでも現れる。図9は再構築したボリュームの連続スライス像の一部であり、それぞれのスライスの間隔は約 $1\mu\text{m}$ である。最上部付近の再構築スライスはシャープな像であるが、深くなっていくにつれてだんだん不鮮明な像になっている。しかし、深さ $5\mu\text{m}$ 付近の像であっても試料の樹状突起の形状は明確に判別でき、充分使用に耐える像であることがわかる。

なおデータは -72 度から 75 度まで110枚の連続傾斜像を取得したが、ソフトウェアによる自動取得により、わずか40分程度で終了した。厚い切片を用いるということで必然的に撮影倍率が低くなり、位置やフォーカスに対する精度の要求が低いため、データ取得途中での試料位置補正やフォーカス補正も不要であり、データの取得自体はきわめて容易であった。

6. 試料の収縮について

STEM トモグラフィに限らず、通常のTEM観察においても事情はまったく同じであるが電子線の照射により樹脂は収縮する。樹脂包埋試料を観察した経験がある方であれば、電子線を照射していると樹脂が薄くなり、それによって顕微鏡像がクリアになっていくことは良くご存知だと思う。また、形状を考えても容易に想像がつくように試料面内にくらべて厚さ方向の縮み方はより大きい。この不均一さは、観察が2次元であれば、多少、小さく写ることさえ承知しておけば大きな問題ではないが、3次元構造を見るときには非常に深刻な問題となる。

STEM トモグラフィではTEM トモグラフィと比較して樹脂の縮み方が少ないことが明らかとなっている（本特集別稿参照）。しかし、STEMでも樹脂がまったく縮まないというわけには行かず、特に照射電流密度が大きくなる高倍率ではやはり大きな問題となる。そのためTEM トモグラフィでもSTEM トモグラフィでも、トモグラフィデータ取得前に十分な予備照射を行い、あらかじめ樹脂を収縮させてから連続傾斜像の取得を始めることになる。データ取得途中での樹脂の縮みは、後の3次元再構築をととても困難なものとしてしまうからである。予備照射を行っても樹脂の収縮は完全には止まらないが、収縮速度が非常に遅くなることがわかっている¹²⁾。

樹脂の収縮については他稿でも述べられているがここでも少しだけ触れる。樹脂の収縮が避けられないとしても、XY方向とZ方向のそれぞれの収縮率を把握しておけばある程度形を元に戻すことは可能である。筆者の以前の研究などからXY方向の収縮は10%弱であることがわかっている¹²⁾。円形の断面を持つ繊維毛を用いて収縮率の測定を行った。図10は樹脂包埋したマウス繊維毛のA:軸が切片に垂直なもの、B:軸が切片内にあるもの、の像である。樹脂はEPON812、切片の厚さは 250nm であった。Bについてトモグラフィを行い、その再構築ボリュームを軸に垂直にスライスにしたのが下段である。これは本来Aと同じ形状をしていたはずであるからXY方向と比べてZは半分程度になっている（2倍程度収縮する）ことが判る。

収縮に関しては、切片の裏表にカーボンを厚めに蒸着しサポートしてやると少なくなる傾向にある、暗い電子線で長い露光時間にすると減少するなどの対処法はあるが、樹脂包埋試料を用いる以上、残念ながら決定的な解決方法というのはいまだに見つかっていない。樹脂については、現状、通常のTEM観察に使うものを用いているが、今後、トモグラフィ用の樹脂の選択、場合によっては開発を検討して行く必要がある。

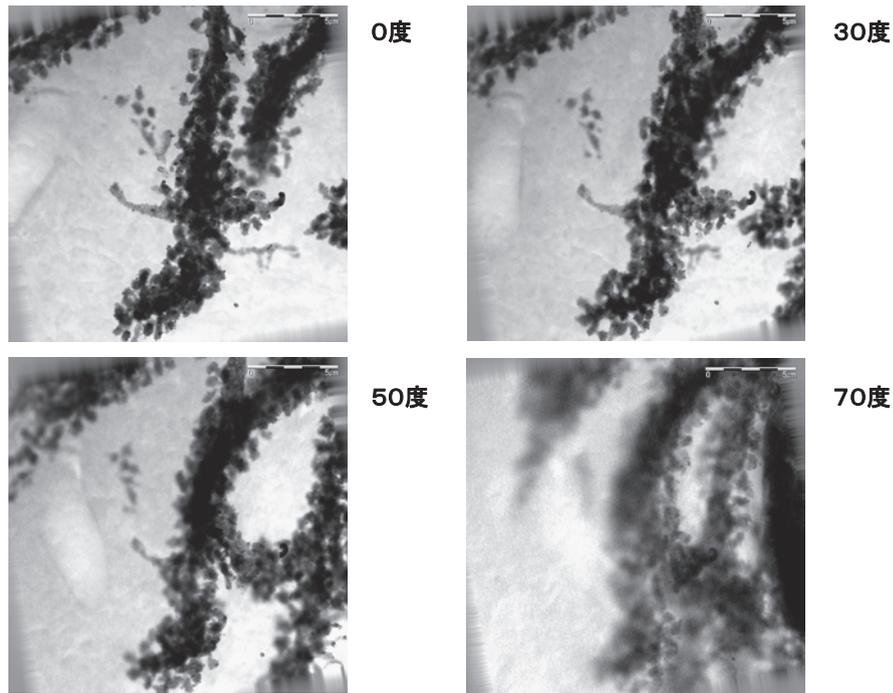


図8 厚さ約6ミクロンの切片のSTEMトモグラフィ（連続傾斜像）
 連続傾斜像シリーズの一部。試料はマウス小脳のゴルジ染色標本で写っているのはプルキンエ細胞の樹状突起。0度のときはもちろん70度まで傾斜しても像になっている。厚い試料をSTEMで観察したときの像のボケは試料中での電子の拡散に起因するが、それが像にきちんと反映されている。

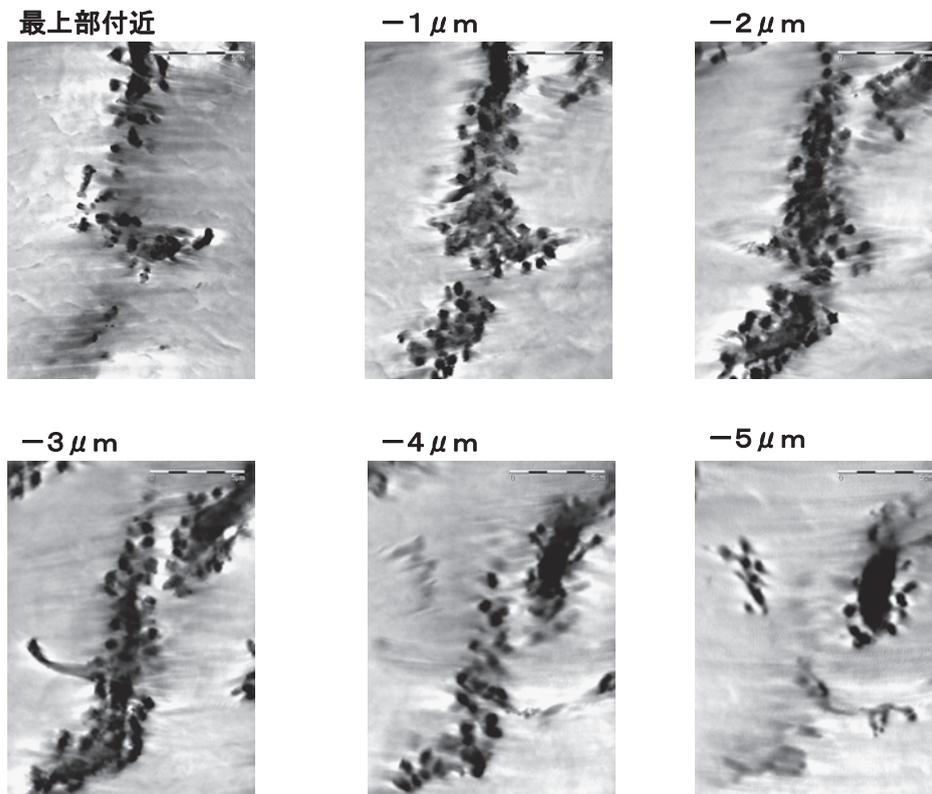


図9 厚さ約6ミクロンの切片のSTEMトモグラフィ（再構築ボリュームのXYスライス像）
 連続傾斜像より再構築したボリュームのXY平面のスライスを試料の最上部付近から深さ約5μmまで1μmステップで表示した。電子線の入射する試料上部付近では像はシャープであるが、深くなるに従いボケてくる。これは試料中の電子の拡散によるものである。

7. 試料作成と装置

本稿では重原子染色された樹脂包埋試料を用いている。最も一般的とも言える電子顕微鏡用の試料であるが、本研究のように通常では使わない厚さの切片を、トモグラフィ用に作成するとなるといくつか注意すべき点がある。まず染色剤の厚切り切片に対する浸透である。当然のように厚い切片を中心付近まで均一にきれいに染めることはそれほど簡単なことではない。染色時間を長くするなどの工夫は当然として、まだ決定的な解決策は見出されていないのが現状である。第2点として電子線照射による試料のチャージアップがある。特に高角度に傾斜したときにチャージアップにより試料が細かく振動してしまうことがある。これはSTEMトモグラフィに限ったことではないが、STEMではTEMと比べてどうしても画像の取り込み時間が長くなるのでチャージアップ対策はより重要である。対策としてはカーボンの蒸着が効果的である。もともと切片厚が非常に厚い試料を用いているわけであるし、STEMは試料厚に強いので、少々厚くカーボンを蒸着してもそれによる像質が悪化に関してはほとんど考慮する必要が無い。思い切って厚く蒸着してしまったほうがよい結果が得られる。

本稿で用いるデータはすべて300 kVの電界放射型電子銃を装備するTECNAI F30ST (FEI)で取得した。言うまでも無くSTEMで分解能を得ようとした場合には熱電子銃より電界放射型の電子銃のほうが格段に優れている。また使用した装置は300 kVの加速電圧を持つので試料の厚みに対して

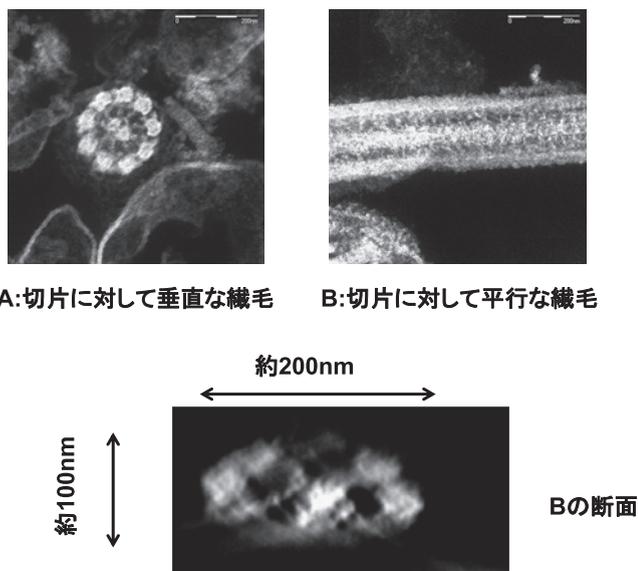


図10 樹脂包埋されたマウス繊毛

上段はそれぞれ切片に垂直、平行な繊毛。下段は平行な繊毛の3次元再構築ボリュームを軸に垂直に切った断面である。本来これは円形のはずであるから、試料が厚さ方向に約2倍収縮したことがわかる。

も強く、今回の実験には最適な装置であった。しかし、通常の熱電子銃の顕微鏡でもSTEMトモグラフィを行うこと可能であり、低倍での観察であればデータの質もほとんど変わらない。また加速電圧が低くても、それに合わせて試料厚を決めれば良いわけであるから、STEMトモグラフィに300 kVのFEGのような高価な装置が必須であるというわけではない。生物分野向けの120 kVや200 kVの既存の装置にSTEMが装備されているということは極めてまれであると思われるが、そのような装置でもSTEMトモグラフィを行うことは可能であり、同じ装置で行ったTEMトモグラフィよりも必ず良い結果が得られると期待できる。

8. おわりに

生物試料に対してもSTEMトモグラフィが有力な手法であることが明らかとなった。いままで、生物分野ではSTEM自体がなじみの薄い手法であったため、まだ広く普及するにいたっていないが、将来的には多くに研究者が用いる一般的な手法として広がっていくものと期待される。

謝 辞

酵母の試料作成は日本女子大学高木智子博士によるものである。また、繊毛の試料は浜松医大 瀬藤光利教授に、マウス小脳の試料は生理学研究所 重本隆一教授にご提供いただいたものであり、ここに感謝いたします。

文 献

- 1) Smith, D.J. and Cowley, J.M.: *Ultramicroscopy*, 1, 127–136 (1975)
- 2) Colliex, C., Mory, C., Olins, A.L., Olins, D.E. and Tence, M.: *J. Microsc.*, 153, 1–21 (1989)
- 3) Engel, A. and Colliex, C.: *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 403–411 (1993)
- 4) Midgley, P.A. and Weyland, M.: *Ultramicroscopy*, 96, 413–431 (2003)
- 5) Kübel, C., Voigt, A., Schoenmakers, R., Otten, M., Su, D., Lee, T.C., Carlsson, A. and Bradley, J.: *Microsc. Microanal.*, 11, 378–400 (2005)
- 6) Friedrich, H., McCartney, M.R. and Buseck, P.R.: *Ultramicroscopy*, 106, 18–27 (2005)
- 7) Porter, A.E., Gass, M., Muller, K., Skepper, J.N., Midgley, P.A. and Welland, M.: *Nature Nanotechnology*, 2(11), 713–717 (2007)
- 8) Porter, A.E., Muller, K., Skepper, J., Midgley, P. and Welland, M.: *Acta. Biomater.*, 2(4), 409–419 (2006)
- 9) Yakushevskaya, A.E., Lebbink, M.N., Geerts, W.J.C., Spek, L., van Donselaar, E.G., Jansen, K.A., Humbel, B.M., Post, J.A., Verkleij, A.J. and Koster, A.J.: *J. Structural biology*, 159, 381–391 (2007)
- 10) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, 109, 70–80 (2008)
- 11) 特集：超高压電子顕微鏡の医生物科学への応用 顕微鏡, Vol 43 No. 4
- 12) Aoyama, K., Matsumoto, R. and Komatsu, Y.: *J. Electron Microsc.*, 51, 257–263 (2002)