

リアルタイム 3D 走査電子顕微鏡の 医学生物応用

Application of a Newly Developed Real-Time 3D Scanning Electron Microscope to the Biomedical Research

牛木 辰男^a, 伊東 祐博^b, 伊藤 広^c,
岩田 太^d, 甲賀 大輔^a

Tatsuo Ushiki, Sukehiro Ito, Hiroshi Ito, Futoshi Iwata
and Daisuke Koga

^a新潟大学大学院医歯学総合研究科顕微解剖学分野

^b(株)日立ハイテクノロジーズ先端解析システム第一設計部

^c(株)ナノオ映像商品開発部

^d静岡大学工学部機械工学科

要 旨 走査電子顕微鏡の通常の撮影法では単眼視の画像しか得られない。より立体的な画像を得るためには、試料台を傾斜させた 2 画像の立体視を行うが、この方法ではリアルタイムの観察ができない。そこで、われわれは、電子線傾斜方式と 3D 液晶モニターを用いて、リアルタイムで 3D 表示ができる顕微鏡を開発した。本稿では、その簡単な原理と、生物応用としての 3D イメージング、さらにマニピュレーションへの応用について紹介する。

キーワード：走査電子顕微鏡，立体視，3D 液晶モニター，生物試料，マニピュレーション

1. はじめに

走査電子顕微鏡 (SEM) は、電子線を試料表面に照射し走査することにより、観察物の表面形状を立体的に表示することができる魅力的な電子顕微鏡である。この特徴を生かして、材料系のみならず生物系においても、多様な応用が行われてきた。とくに、医学生物学の分野では、透過電子顕微鏡では知ることができない、細胞や組織の立体微細構造の解析に役立ってきた¹⁾。

ところで、得られた SEM 像は、そのままではカメラで写した写真のように単眼視の情報のため、SEM 本来の三次元画像が十分に生かされているとはいえない。そこで、SEM が実用化された当初から、両眼視観察を行うために、試料を機械的に傾斜して視差角のある 2 枚のステレオペア像を得る

ことが行われてきた。しかし、試料を傾斜させるこの手法は、傾斜後に同一部位を捜すのが煩雑であるだけでなく、2 枚の画像の撮影に時間差ができてしまうために、顕微鏡内でリアルタイムに観察できないことなど、実際の観察において避けられない問題点もあった。さらに、得られた写真の観察も、裸眼による平行視または交叉視が一般的なことから、必ずしもすべての人が同じように「見える」とは限らないというジレンマもあった。また、スクリーンへの投影においても、偏光板を付けた特殊な 2 台のプロジェクタと偏光メガネが必要で、こうした煩雑な状況が、SEM の 3D イメージングの普及を阻んできたのではないだろうか。

ところが、近年のさまざまな技術の進歩により、SEM のステレオ (3D) 観察にも新しい時代が訪れようとしている。ここでは、SEM の一般的な 3D 観察法と、私たちが最近開発したリアルタイム 3D-SEM について、生物応用例を中心に紹介する。

2. 試料傾斜法による一般的な 3D イメージング

すでに述べたように、SEM による 3D 画像の取得には、試料を機械的に傾斜してステレオペア像を撮影する手法が古くから行われている (図 1A)。この手法そのものには特に新しいところはないが、最近の試料ステージの進歩や液晶モニター技術やコンピュータ技術の発展から、このステレオペアの情報を、以前より簡単かつ能率良く撮影し有効に表示することが可能になっている。たとえば、撮影については、モーター駆動のユーセントリック試料ステージを用いることで、比較的能率の良い連続傾斜撮影が可能である。また、表示モニターについては、液晶モニター技術の発達により、従来の偏光メガネを用いて観察するタイプのモニター以外にも、メガネをいっさい用いることなく裸眼で立体映像を見ることができるよう裸眼 3D 液晶モニターも開発されてきており、これらのモニターを用

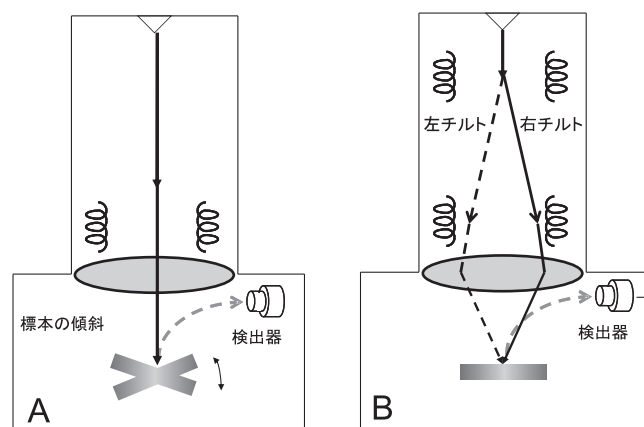


図 1 SEM の 3D イメージング法 (試料傾斜法 A と電子線傾斜法 B)

A. 試料傾斜法では、一度撮影した後、試料を 4~8° 傾けて、同一視野を再度撮影することによりステレオペア像を取得する。B. 電子線傾斜法では、電子線を光路上で傾斜 (チルト) させて、視差角のあるステレオペア像を取得する。

¹⁾ 〒 951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
TEL: 025-227-2058; FAX: 025-224-1767
E-mail: t-ushiki@med.niigata-u.ac.jp
2010 年 7 月 20 日受付

いと、誰でも簡単にステレオペアの立体視が可能である。また、コンピュータが一般化したことで、取得したステレオペア像をアナグリフ（赤青画像）表示などに簡単に变换できるようになり、赤青メガネを使って普通のモニターや印刷媒体でも自由にステレオ画像を楽しめるようになってきた（図2）。さらに、低倍率から高倍率まで段階的に3D像を撮影し、コンピュータ上のブラウザで自由に拡大や縮小を行うことや、数度単位で連続的に傾きを変えて撮影した複数の画像を用いて、標本を回転することも可能である。こうした、3Dコンテンツの集積により、従来の単眼視の観察では見落しがちな情報や錯覚に陥っていた情報を、正確に把握することが可能になってきている²⁾。

3. リアルタイム 3D-SEM による 3D イメージング

試料を機械的に傾斜して得られる2枚のステレオペア像は、試料傾斜さえできれば市販されているどの装置においても撮影が可能である。しかし、この方法では2枚の画像を別々に撮影しているため、SEMの試料室に置かれた標本をリアルタイムに3D観察することはできない。この問題を解決するためには、SEM観察時に電子線を傾斜させて、リアルタイムにステレオペア像を取得する方式（電子線傾斜方式、図1B）が便利である。実際に、視差角の調節や低真空観察にも応用できることから、これまでにもこの方式を用いたステレオSEMがいくつか考案されてきている³⁾。しかし、解像度や表示法の問題などから、実用的な装置がなかなか出てこなかった。

そこで、最近私たちはこの問題を克服したリアルタイム3D-SEMの開発を行ってきた（図3）^{4,5)}。電子線を傾斜させる方法はさまざまであるが、この装置ではレンズの偏向作用を利用して電子線を傾斜させている。電子線の傾斜は1ライン単位ごとに左右の傾斜を切替え、同一のラインを右傾斜視野、左傾斜視野と2回走査することで視差のある2枚（左右）の

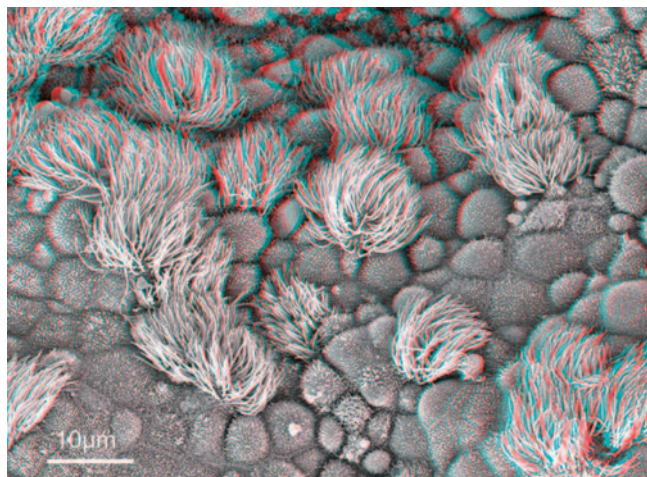


図2 試料傾斜法で撮影したラット気管の3D像（アナグリフ表示）
この標本では試料を4°傾けてステレオペア像を取得している。

ステレオペア像を同時に取得することができるようにしている。電子線の傾斜の切替は高速走査にも対応しており、その結果、TVスキャンでもフレームレートは半分になるが、3D像の観察が可能である。したがって、この装置に3Dモニターを搭載することで、観察者は、SEMの操作をしながらリアルタイムで3D画像を観察することが可能である。現状の3D-SEM観察においては±2～3°の視差角があれば、十分な立体感が得られることがわかってきている。また、この装置ではステレオペア像を一回のボタン操作で簡単に撮影することができるので、予め試料の凹凸情報をTVスキャンまたはスロースキャンモードで十分理解した上で、目的のステレオペア像を撮影することができる（図4）。

観察時の3Dモニターについては、多様な形式のものが現在市販されてきている。したがって、観察時にはステレオペア像をアナグリフ表示して赤青メガネで3D観察する方法や専用の偏光メガネを用いる3D液晶モニターが一般的である。

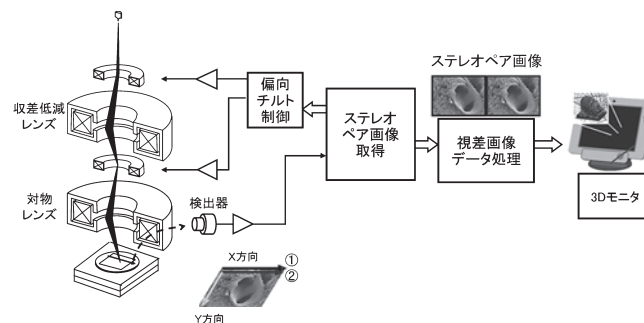


図3 リアルタイム 3D-SEM の基本構成

電子線を1ラインごとに傾斜させ、ステレオペア像を同時に取得し、3Dモニターにより直接3D表示ができるようになっている。また、電子光学系には、電子線傾斜時に発生する軸外収差を低減するため、収差低減レンズ、傾斜コイルを追加してある。

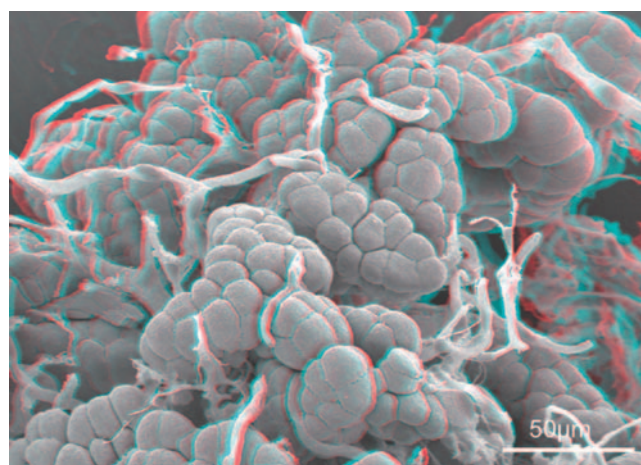


図4 リアルタイム 3D-SEM で撮影したラット膵臓の外分泌部（アナグリフ表示）
電子線傾斜法によりステレオペア像をリアルタイムで取得したもの。この標本は、KOH処理法でコラーゲン成分を取り除いてあるので、腺房がはっきり立体的に見えている。腺房間の細い紐状の構造は毛細血管である。

さらに最近では、特別なメガネを用いなくて、そのまま裸眼で3D観察が可能な3Dモニターが開発されている。この裸眼3Dモニターについては、リアルタイム3D-SEMに搭載することで、あたかも自分の眼で自然に標本を眺めるような気分で観察ができる点が魅力であるが、現在一般に市販されているものでは、モニターに対する視点位置によって右目像と左目像が入れ替わる「逆視」の現象が起こるなどの問題点もあり、今後のさらなる技術革新が期待される点である。

ところで、電子線傾斜方式では、電子線が対物レンズの軸外を通過するために、軸外収差が増大し、これに伴い、分解能が低下するなどの問題が起こる。その例として図5に熱電子型電子源とアウトレンズの構成における電子線傾斜角度と分解能の関係を示したが、電子線の傾斜角が3°の場合は、分解能は約150 nmまで低下することがわかる。これは、観察倍率10万倍で3 nmの分解能を持つ装置であれば、観察倍率と分解能の比より換算して、2000倍程度が実用の限界と算定できるので、軸外収差の低減を行わない場合は、数十倍から2000倍程度の観察にしか利用できないことになる。実際に最初に開発した試作1号機では、この程度の画像しか得られなかった。しかし試作2号機以降では、この軸外収差を低減するための工夫をしている。詳しい説明は紙面の都合から割愛するが、この軸外収差低減の原理をごく簡単に説明すると、対物レンズで生じる軸外収差とちょうど逆方向の軸外収差をわざと光学系に発生させ、これにより両者をキャンセルさせるというものである。実際には、図3のように、そのための偏向コイルと集束レンズ（収差低減レンズ）を対物レンズの直上に追加している。こうして、この収差低減レンズにおいて、対物レンズとは逆方向に電子線を傾斜させて軸外収差を発生させることで、対物レンズで生じる軸外収差を打ち消すことが可能となる。その結果、試料面での軸外収差は軽減され、分解能の低減を防ぐことができるので、汎用型SEMにおいても1万倍程度の3D観察が可能となってきた。

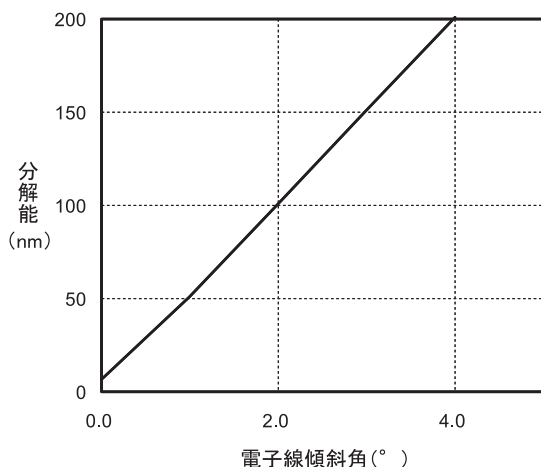


図5 電子線傾斜角と分解能の相関図

対物レンズの軸外を電子線が通過することにより生じる収差（軸外収差）のために、傾斜角が大きくなるほど、分解能が低下することがわかる。

いる。医学生物学分野における一般的な使用においては、十分な性能といえるだろう。

4. リアルタイム3D-SEMによるマニピュレーション

このようにSEMによるリアルタイムでの3Dメーキングが可能になると、SEMの生物応用の可能性がさらに広がるのではないと思う。たとえば、SEM内で試料のマニピュレーションを行う際には、リアルタイム3D-SEMが威力を発揮しそうである。それは、マニピュレーションにおいては、解剖針と試料との立体的な位置関係を正確に把握することが重要であるからである。その点で、単眼視のリアルタイム観察しかできない従来のSEMでは、観察している部位の奥行きが実感できないために、細かい操作はなかなか難しかった。その点でリアルタイム3D-SEMにおいては、マニピュレータの操作時においても、両眼視が可能である（図6）。

そこで、私たちは、この3D-SEMに搭載可能な小型のマニピュレータを開発してきている（図7）⁶⁾。この小型マニピュレータは、原子間力顕微鏡（AFM）の原理をベースにしているが、小型化が容易な自己検知型カンチレバーや、ひずみゲージを付けた解剖針を装着することで、試料の加工ができるようにしたものである。SEMの試料室に複数台のマニピュレータを搭載することが可能なので、試料の両側から、ナイフとフォークのように、カンチレバー（と解剖針）を試料に近づけて操作が可能である。したがって、1つのカンチレバー（解剖針）で試料を押さえ、もう1つのカンチレバー（解剖針）で試料を加工するなど複雑なマニピュレーションが可能になってきている。また、ハプティックデバイスを用いた力覚提示システムを組み合わせることにより、オペレータが試料表面の凹凸やカンチレバーの押し込み荷重を体感しながらマニピュレーションを行うことができるようになってきた（図8）。たとえば、試料側の1 μmの凹凸を受け手側で1 cmほどの凹凸の変化に増幅することが可能であるし、オ

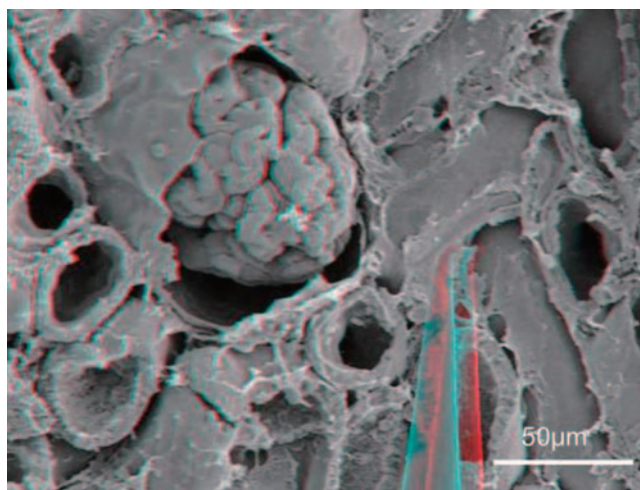


図6 ラット腎糸球体とその上の解剖針の3Dイメージング。腎糸球体とその上部に配置された解剖針の距離が、リアルタイム3D-SEMにより実感することができる。アナグリフ表示。

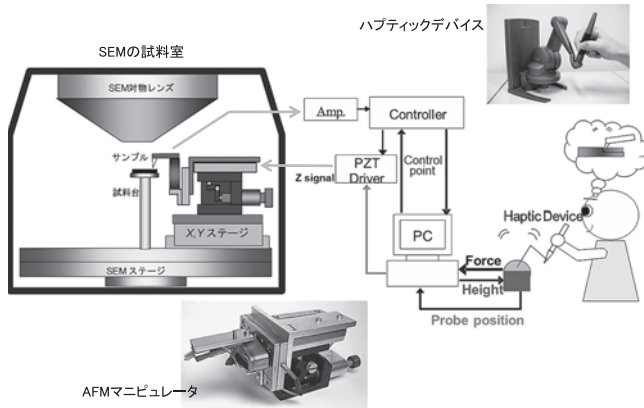


図7 リアルタイム 3D-SEM の中で利用するために開発したマニピュレーションシステム

マニピュレータは原子間力顕微鏡 (AFM) の原理を利用して作製し、ハプティックデバイスを用いた力覚提示システムを組み合わせることで、オペレータが試料表面の凹凸やカンチレバーの押し込み荷重を体感しながらマニピュレーションを行うことができるようなシステムを構築している。



図8 リアルタイム 3D-SEM にマニピュレータを装着し、実際に利用している様子

マニピュレータがカンチレバーを数 N で押し込むと試料に数十 nN の荷重を加えるように設定することができる。これにより、腎臓の糸球体を解剖針で試料内から取り出して任意の場所に移動したり、眼球内の水晶体の水晶体線維をほぐすようなことが可能になってきている。今後さらに試料作製法の工夫を加えることにより、実体顕微鏡の下で解剖するような気分で、SEM 内で試料の微小解剖が可能になるのではないかと期待している。

5. まとめ

本稿では、SEM の特徴を活かした 3D イメージングの現状と、私たちが最近開発したリアルタイム 3D-SEM について紹介し、今後の可能性の一つとして、この 3D-SEM のマニピュレーションへの応用と現状を述べた。現在、3D イメージング技術は、映画やテレビの世界で脚光を浴び、急速な進展を見せ始めている。3D デジタルカメラや 3D テレビ、3D パソコン、3D 携帯電話と、次々と 3D 家電が発売されるようになってきていることを思えば、SEM の世界においても、こうした 3D イメージングが標準となることはそんなに遠いことではなさそうである。

また、ここでは触れなかったが、SEM 像の解析においては、得られる画像からいかに定量的な情報を得ることができるかという点についても、忘れてはならない重要な課題である。この点では、SEM の反射電子像から得られる情報や、ステレオペア像から得られる情報から上手に三次元復構や計測を行う技法についても、さらに検討する必要があるだろう。こうした開発によって、透過電子顕微鏡とは一味も二味も異なる、SEM ならではの世界を切り開いていくことができれば、医学生物学分野に SEM がさらに貢献できるようになるのではないだろうか。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省委託事業「次世代の電子顕微鏡要素技術の開発」で採択された課題「力覚制御による体感型 3D ナノ解剖バイオ顕微鏡の開発」(2006～2008)と、文部科学省・先端計測分析技術・機器開発事業の開発課題「実用化に向けたリアルタイムステレオ SEM の開発」(2009～2011)による成果であり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Fujita, T., Tanaka, K. and Tokunaga, J.: SEM atlas of cells and tissues, Igaku-shoin, Tokyo-New York, (1981)
- 2) Ushiki, T.: Actioforma Stereo SEM atlas of mammalian cells and tissues 1, META Corporation Japan, Tokyo, (2009). (ISBN978-4-904813-01-0)
- 3) Pawley, J.B.: Scanning electron microscopy 1978/I, SEM Inc., AFM O'Hare, IL 1978, 157
- 4) 牛木辰男, 他: 力覚制御による体感型 3D ナノ解剖バイオ顕微鏡の開発, 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会予稿集, 96 (2009)
- 5) 伊東祐博, 他: リアルタイムステレオ SEM の実用化開発, 日本顕微鏡学会第 66 回学術講演会予稿集, 179 (2010)
- 6) Iwata, F., Ohara, K., Ishizu, Y., Sasaki, A., Aoyama, H. and Ushiki, T.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47**, 6181–6185 (2008)