

## 医学・生物学用超高压電子顕微鏡

## High Voltage Electron Microscopy in Biology

村田 和 義, 重 本 隆 一

Kazuyoshi Murata and Ryuichi Shigemoto

自然科学研究機構生理学研究所

**要 旨** 医学・生物学における電子顕微鏡観察では、1) 厚みのある試料に対する高い透過能、2) 高い分解能、3) 低い試料ダメージの三つの条件が求められる。これら条件の多くは超高压電子顕微鏡を使うことにより達成される。本項では、まず医学生物学分野における超高压電子顕微鏡に必要とされる性能を解説する。そしてこれを使った観察例を紹介する。さらに最近の電顕技術の革新を踏まえて、医学生物学用超高压電子顕微鏡の将来像を展望する。

**キーワード**：超高压電子顕微鏡、試料の厚さ、電子線透過能、分解能、照射損傷

## 1. はじめに

超高压電子顕微鏡は、主として材料科学の分野において広く利用されてきた。特にその高加速電子による高い試料透過能を生かして、塊としての材料の観察や、環境制御試料室を導入した材料の物理化学変化の解析が行われている。一方、医学生物学分野においても厚い試料を観察したいという要求は、電子顕微鏡が開発された当初から強い。超高压電子顕微鏡は、ナノからミクロンのオーダーで複雑に重なり合った細胞内構造などの形態解析において、光学顕微鏡と超薄電子顕微鏡観察との間を埋めるものとして期待されている。しかし利用できる施設が少ないため、研究内容が限られている。

著者らが所属する生理学研究所では、こうした要請のもとに1982年に最高電圧1250 kVの超高压電子顕微鏡を導入し、以来、国内唯一の医学生物学専用超高压電子顕微鏡として国内外にわたる共同利用実験を広く公募し、これまでに延べ450件あまりを受け入れ、延べ191報の論文を発表している。

本項では、まず医学生物学用超高压電子顕微鏡とは何かということを理解して頂くために、その要求される性能について解説する。次に、これまでに生理学研究所において本装置を使って得られた観察例を紹介する。そして最後に医学生物学用超高压電子顕微鏡の今後の展開について述べる。

## 2. 医学生物学用超高压電子顕微鏡の必要条件

医学生物学用超高压電子顕微鏡では、数ミクロンまでの奥行きに複雑に重なり合った生体構造物を、光学顕微鏡よりも高い分解能で三次元構造解析することが求められる。そのためには、超高压電子顕微鏡の高い試料透過能、高い分解能、

低い試料ダメージという性質が利用される。以下、それぞれについて解説し、その他生物試料観察用として必要と思われる条件についても述べる。

## 2.1. 高い試料透過能

電子顕微鏡で観察できる試料の厚さは、試料で散乱し対物鏡を通り抜けた電子の量と、その弾性散乱電子の割合に依存する。これらは結像面で像コントラストを与えるが、試料と衝突してエネルギーを失った非弾性散乱電子は、色収差として像のボケおよびバックグラウンドノイズとなる。たとえば、厚い試料に対して照射電子線を多くし、大きな対物鏡を用いれば、単純に試料を透過する電子の量を増やすことができる。しかし非弾性散乱電子の増加で像コントラストが低くなるので、実際に観察できる試料の厚さは、おのずと電子顕微鏡の加速電圧により決まってくる。加速電圧を上げると、試料における散乱断面積が小さくなり、これにより電子の多重散乱や非弾性散乱によるエネルギー損失が少なくなる。そして重要なことは、これに伴って電子の透過能を表す平均自由行程( $\Lambda$ )が長くなる。図1には水と炭素試料における弾性散乱電子の平均自由行程と加速電圧の関係を示した。このように $\Lambda$ は試料の材質によって大きく異なるが、生物試料における電子の透過能を議論する場合には、非常におおざっぱに加速電圧100 kVでは100 nm、200 kVでは200 nm、1000 kVでは1  $\mu$ mと見積もることができる。ただし、 $\Lambda$ は電子の速度の二乗に比例する値であり、電子が光速に近づくにつれてその効果も頭打ちになってくる。図2では、加速電圧200 kVと1000 kVで観察した厚さ約1  $\mu$ mの氷包埋したシアノバクテリアの像を示す。200 kVではバクテリア部分が黒くなってしまい、内部を観察することが出来ないが、1000 kVでは内部を透して観察することができる。

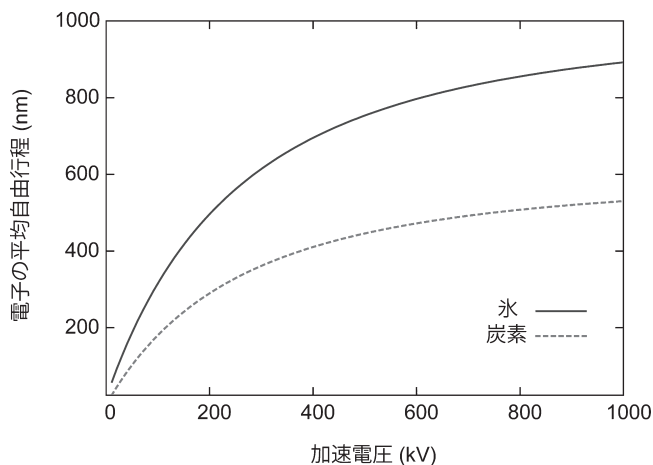


図1 氷と炭素の試料における加速電圧と電子の平均自由行程の関係

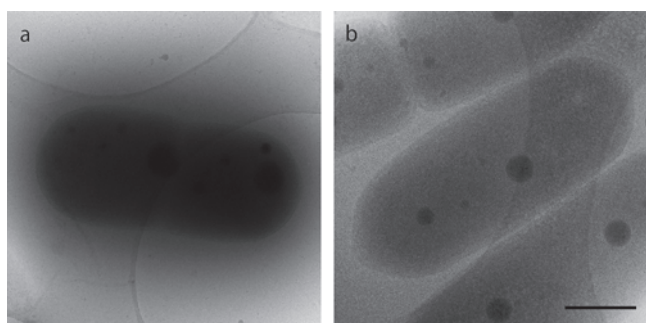


図2 加速電圧 200 kV (a) と 1000 kV (b) で撮影したシアノバクテリアの氷包埋試料の像。スケールは 1 μm。

## 2.2. 高い分解能

電子顕微鏡の分解能を議論するとき、加速電子の波長スケールを理解しておくことは最低限必要なことである。電子の波長と加速電圧の関係は、ド・ブロイの物質波の式から計算される。ただし電子の速度は光の速度を超えられないという制約があるために、次式の第三項に示したように相対論的な補正が必要となる (式 1)。

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{\sqrt{2m_0eE\left(1 + \frac{eE}{2m_0c^2}\right)}} \quad [\text{m}] \quad (1)$$

ここで  $\lambda$  は電子線の波長、 $h$  はプランク定数、 $m$  は電子の相対質量、 $v$  は電子の速度、 $m_0$  は電子の静止質量、 $e$  は電気素量、 $E$  は加速電圧、 $c$  は光速である。通常、これを簡便にした次の式で代用することができる。

$$\lambda = \frac{12.26}{\sqrt{E(1 + 0.9788 \times 10^{-6} E)}} \quad [\text{\AA}] \quad (2)$$

主な電子顕微鏡の電子の波長を計算した値を表 1 に示す。

100 kV の電子の波長は約 0.04 Å で、このクラスの電子顕微鏡で保証されている点分解能の値 (数 Å) からすると二桁近く短い。電子顕微鏡では、電子レンズ (ポールピース) が

表 1 電子顕微鏡の加速電圧と電子の波長

電子顕微鏡の加速電圧 (kV)	電子の波長 (Å)
100	0.037
200	0.025
500	0.014
1000	0.0087

大きな球面収差係数  $C_s$  を持っているため、これが主に分解能を決定するからである。コントラストが反転せずに実像として直接得られる最高分解能  $d$  は、波長の三乗に球面収差を乗じた次の式で計算される。これは提案者の名前を取ってシェルツァー分解能とも呼ばれる<sup>1)</sup>。

$$d = 0.65\sqrt{C_s\lambda^3} \quad (3)$$

分解能を決める要因は後述するものも含めて数多くあるが、これがまず電子顕微鏡の性能の目安となる。たとえば、ポールピースの  $C_s$  が 5 mm の 100 kV 電子顕微鏡では、点分解能が 4.88 Å と計算される。これが 200 kV の電子顕微鏡では 3.88 Å となり、1000 kV では 1.55 Å となる。

実際の生物試料の観察では、この球面収差による像のボケ量は、電子線の散乱角  $\alpha$  に対して次式で与えられる。 $\delta_s$  は像面における最小錯乱円の直径を表す<sup>2)</sup>。

$$\delta_s = \frac{1}{2}C_s\alpha^3 \quad (4)$$

$\alpha$  は、空間周波数 ( $1/d$ ) に波長をかけたもの (式 (5)) なので、加速電圧が高ければ (電子の波長が短ければ) 分解能はその三乗に比例して向上する。

$$\alpha = \frac{\lambda}{d} \quad (5)$$

例えば、加速電圧を 100 kV から 1000 kV にする (電子の波長を 4 分の 1 にする) と、散乱角も 4 分の 1 になるので (式 (4))、ボケ量をその三乗の 64 分の 1 にすることができる。

次に生物試料のような比較的厚い試料の観察において、主に分解能を制限する要因となるのは色収差による像ボケである。このボケ量 (最小錯乱円の直径) は散乱角  $\alpha$  に対して次式で表される<sup>2)</sup>。

$$\delta_c = C_c\left(\frac{\Delta E}{E}\right)\alpha \quad (6)$$

ここで  $C_c$  は色収差係数、 $\Delta E$  は非弾性散乱によるエネルギー損失、 $E$  は加速電圧を示す。 $\Delta E$  はエネルギーフィルターにより測定することができる。入射電子線の  $\Delta E$  は ~ 3 eV であるが、これが 50–100 nm の厚さの試料を通過すると 15–25 eV 程度に広がる。これはゼロロススペクトルの半値幅の広がりとして観察される。さらに厚い試料の場合には、ゼロロススペクトルが低エネルギー損失 (プラズモンロス) スペクトルに移行し、これは試料の厚さが増すに連れて 250 eV あたりまで広がる。加速電圧 1000 kV の電子顕微鏡では、100 kV のものに比べて、 $\Delta E$  を一定とすると  $\Delta E/E$  が 10 分の 1 になる上に、(5) 式で示したように散乱角  $\alpha$  が約 4 分の 1 になるの

で、これらを考慮するだけでも理論的には $\delta_c$ を40分の1にすることができる。さらに、高加速電子では前述したように非弾性散乱電子の割合が少なくなることから低加速電子に比べて $\Delta E$ が小さくなり、 $\delta_c$ は40分の1よりも小さい値となる。

このように超高圧電子顕微鏡は、高い加速電圧を使用することによって、球面収差と色収差を小さくし分解能を向上させることができる。

### 2.3. 低い試料ダメージ

電子顕微鏡の試料ダメージでは、主に2種類を考慮することができる。一つは試料のイオン化による化学結合の切断である。これには非弾性散乱電子が関わっており、加速電圧を上げることによって小さくすることができる。もう一つはノックオンダメージである。これは、照射電子の試料への移行エネルギーによって試料中の原子、特に軽原子が蹴り出されてしまう現象で、加速電圧の増加とともに増加する(図3)。重原子で染色した試料ではそれほど問題にならないが、生(なま)の試料を凍らせて直接観察するような氷包埋試料の場合には、高い加速電圧は逆に深刻なノックオンダメージを引き起こすことになるので注意が必要である。

### 2.4. その他、3次元構造解析のための必要条件

その他、医学生物学用超高圧電子顕微鏡を使った試料の三次元構造解析に必要な条件としては、2軸傾斜ホルダーや高精度の試料傾斜装置が挙げられる。投影像からの三次元再構成に必要な画像数は、以下の式から計算される。これはCrowtherの公式として知られる<sup>3)</sup>。

$$N = \frac{\pi D}{d} \quad (7)$$

$N$ は画像枚数、 $D$ は試料の直径、 $d$ は分解能である。ここで傾斜角度ステップを $\Delta\theta$ とすると、

$$N = \frac{\pi}{\Delta\theta} \quad (8)$$

で与えられるので、逆に必要な傾斜角ステップは式(7, 8)から、

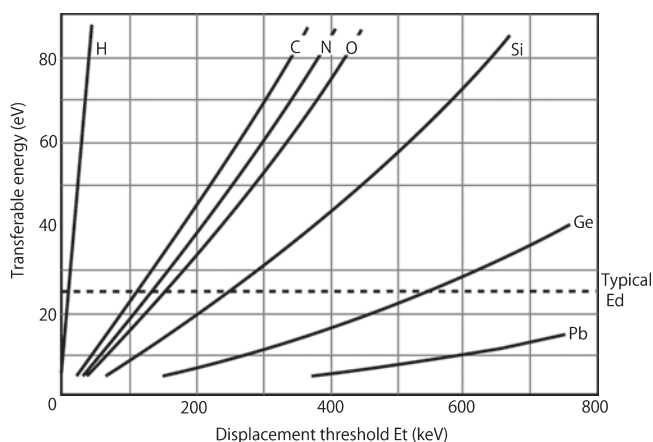


図3 電子顕微鏡の加速電圧(横軸)と各原子に移行可能なエネルギー(縦軸)の関係。一般的な例として移行エネルギーが25 eV (Typical Ed)を越えるとノックオンダメージが始まる<sup>7)</sup>。

$$\Delta\theta = \frac{d}{D} \quad (9)$$

と求められる。例えば、試料の直径10 nmに対してその1/10の1 nmの分解能が必要な場合は、 $\Delta\theta = 0.1$ (ラジアン)、つまり最低でも5.72°の傾斜角ステップで像を収集する必要がある。

しかし、実際に電顕試料のように2次元的に広がったものでは、傾斜角度 $\theta$ の増加に応じて( $\cos\theta$ に逆比例して)試料の厚み( $L$ )が増していく(図4)。よってこれを考慮した傾斜角ステップで変化させて行くのが過不足のない最適な測定である<sup>4)</sup>。つまり、

$$D = \frac{L}{\cos\theta} \quad (10)$$

となるので、傾斜角ステップは、式(10)を式(9)に代入して、

$$\Delta\theta = \frac{d}{L} \cos\theta \quad (11)$$

で計算される。無染色の氷包埋試料などでは、 $\cos\theta$ に比例した傾斜角ステップを取ることによって、撮影画像枚数を減らし、試料ダメージを抑えることができる。図4に $d/L$ (試料の厚さと分解能の比)を目安とした傾斜角度の例を示す。ただし、これを実際に行うためには、自動化された精度の高い試料傾斜装置が必要となる。

次に、電顕トモグラフィーにおける制限された傾斜角度(通常 $\pm 60^\circ \sim \pm 70^\circ$ )による情報欠損(ミッシングウエッジ)を減らすためには、2軸傾斜ホルダーが有効である。 $\pm 60^\circ$ の1軸傾斜の場合には、全情報空間の33%が欠損するが、2軸傾斜によるデータ収集を行うことによって、これを16%にまで減らすことができる。ただし、試料ダメージが深刻な無染色氷包埋試料の場合には、与えるダメージを考慮して倍率、照射量、撮影枚数を事前に見積もっておく必要がある。

### 3. 医学・生物学における超高圧電子顕微鏡の応用

医学生物学用超高圧電子顕微鏡が応用されている分野の一つに神経科学研究がある。神経細胞は非常に細かく枝分かれた突起をもつ細胞であり、この突起間の結合によって複雑な神経シグナル伝達回路を形成している。神経細胞の全体像を把握し、その細胞間の接続構造を調べるためには、超高圧電子顕微鏡による厚切り切片の観察が有効である。図5に神経細胞の樹状突起とその表面にあるスパインと呼ばれる小突起の構造を示す。試料の厚さは $5 \mu\text{m}$ であり、三次元再構成像(図5b)は、 $\pm 60^\circ$ を $2^\circ$ 間隔で傾斜させた加速電圧1000 kVの超高圧電子顕微鏡像シリーズから作成された。この試料にはゴルジ染色法と呼ばれる硝酸銀染色が使われており、このように重原子で対象物だけを染色した場合には、試料傾斜 $60^\circ$ で相対厚さが $10 \mu\text{m}$ に達するようなものでも、フォーカスのボケを最小にして、その投影像を記録することができる。これをトモグラフィーにより三次元再構成することによって、スパインの数とその分布を調べることができる。さらに、特定の神経細胞だけを免疫抗体法によって可視化し、これを超高圧電子顕微鏡で観察することもできる。図5c,

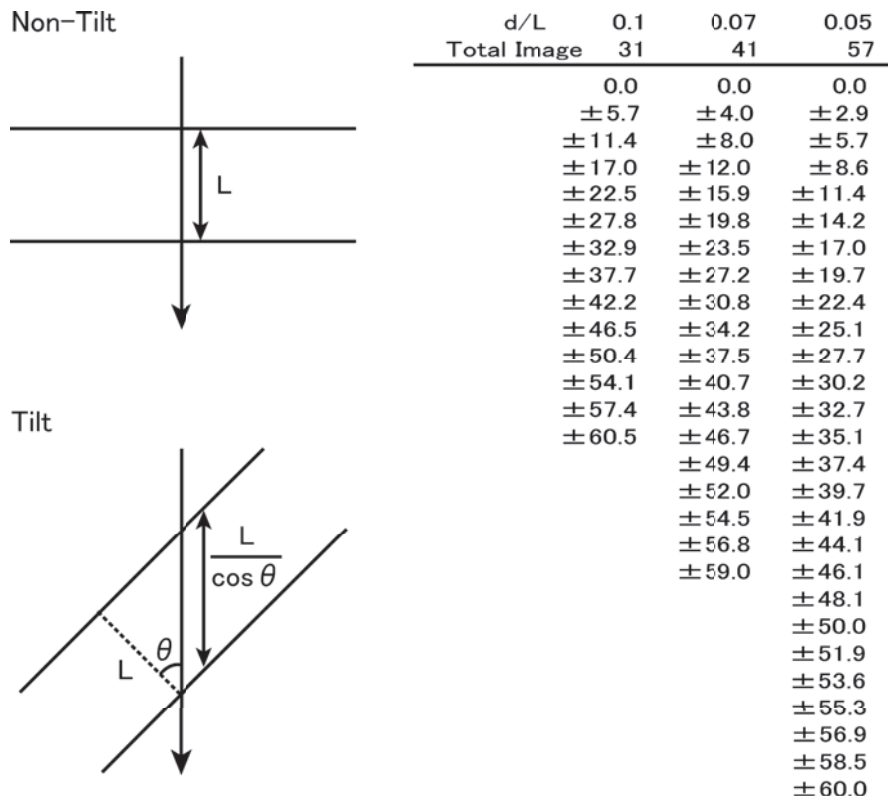


図4 電顕試料における傾斜角ステップの設定. 2次元に広がる電顕試料では, 試料を傾斜するにつれて試料の厚さが増すため, これに合わせて傾斜角ステップを小さく取る必要がある. 左表は試料の厚さと分解能の比 ( $d/L$ ) を設定した場合に必要な傾斜角度シリーズの例を示す.

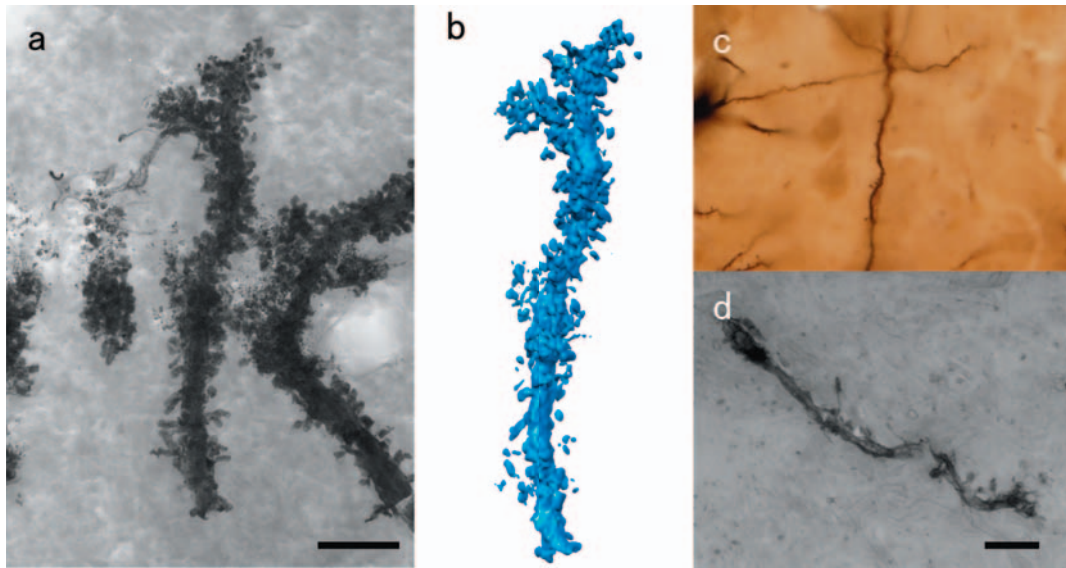


図5 (a) マウス小脳プルキンエ細胞樹状突起の超高圧電子顕微鏡像. 加速電圧 1000 kV で撮影. スケールは  $3\ \mu\text{m}$ . (b)  $\pm 60^\circ$  の傾斜シリーズから計算した樹状突起の三次元再構成像. (c) マウス脳海馬神経細胞の DAB- プラチナ塩による免疫抗体染色の光学顕微鏡像. (d) (c) の超高圧電子顕微鏡像. 加速電圧 1000 kV で撮影. スケールは  $3\ \mu\text{m}$ .

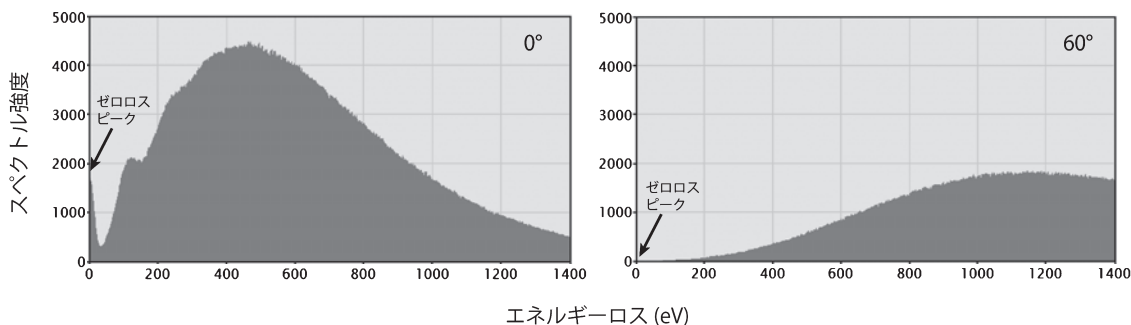


図6 エポキシ樹脂切片 (1  $\mu\text{m}$ ) を  $0^\circ$  と  $60^\circ$  に傾斜した試料からの EEL スペクトル.  $60^\circ$  傾斜 (相対厚み 2  $\mu\text{m}$ ) では、ゼロロスピークがほとんど消失してしまう. データは 200 kV の電子顕微鏡を使って撮影.

5d は、特定の神経細胞に発現している緑色蛍光タンパク質 (GFP) に抗体を反応させ、プラチナ塩存在下で DAB 染色を行った切片像を示す. この方法により選択的に特定の神経細胞の構造だけを解析することが可能となる.

#### 4. 医学生物学用超高压電子顕微鏡の新たな展開

##### 4.1. エネルギーフィルターの応用

比較的厚い生物試料の観察では、エネルギーフィルターによる非弾性散乱電子の除去 (ゼロロスイメージング) が有効である. ただ、エネルギーフィルターのついた超高压電子顕微鏡は限られているので、まだその知見は多くない. そこで、ここでは加速電圧 200 kV の例を紹介する. 図 6 は、1  $\mu\text{m}$  の厚さのエポキシ樹脂切片を 200 kV の電子顕微鏡で照射した EEL スペクトルである. これにはゼロロスピークに加えて多くのプラズモンロスピークが観察される. そして試料を  $60^\circ$  傾斜させて (試料厚さが約 2 倍の 2  $\mu\text{m}$  になる) 同様に EEL スペクトルを観察すると、ゼロロスピークがほとんど観察されなくなる. つまり、200 kV の加速電圧では、2  $\mu\text{m}$  の樹脂試料を透過する散乱電子のほとんどが非弾性散乱電子となることを意味する. この状態では当然ながらゼロロス像は観測できない. しかし重原子で染色した樹脂切片のような試料の場合、像コントラストは、エネルギーをロスした範囲を適切に選択することで、不要なボケを取り除いて、よりシャープな像を得ることが出来る<sup>5)</sup>. これは MPL (Most Probable Loss) イメージングと呼ばれ、重原子染色した厚い樹脂切片の観察に用いられている. エネルギーフィルターの着いた超高压電子顕微鏡がもっと普及すれば、厚い生物試料の超高压電子顕微鏡観察でもさらにコントラストの高い高分解能の像が得られると期待される.

##### 4.2. 環境制御セルの可能性

環境制御セルは材料科学の分野では活発に行われている. 試料に物理的な力をかけたり、ガスを導入したり、レーザーで照射したりしながら、リアルタイムで試料変化のその場観察が行われている. 生物試料においても環境制御セルの開発が行われている<sup>6)</sup> が、試料を狭いセル中に固定しないといけない困難さと、化学変化を追跡するための適当なラベル剤が

必要なことから、まだ常用電顕を使った予備的な研究に限られている. しかし、今後これら試験的に行われている生物用環境制御セルを超高压電子顕微鏡に導入することによって、ダメージの少ない条件でさらに広範な生命現象のその場観察が行われるようになると期待される.

#### 5. おわりに

超高压電子顕微鏡は、厚い試料の高分解能観察のために欠かすことのできない装置である. ところが高額で広い設置場所が必要なことから、一般には利用できる機会が限られていた. 今後、中低圧の電子顕微鏡で行われている最近の技術革新をどんどん超高压電子顕微鏡にも応用し、さらに研究者が利用しやすいような環境を整備することによって、新しくユニークな成果がまだまだ出てくると期待される. 現在施設を管理する我々としては、今後とも新しい技術を積極的に取り入れ、またその応用例を紹介しながら、施設のより自由な利用環境を整備して、超高压電子顕微鏡を使った医学生物学研究的の更なる成果の発掘をめざしていきたいと考えている.

#### 謝 辞

本稿で紹介した超高压電子顕微鏡の結果は、自然科学研究機構生理学研究所に設置された H-1250M をもとに書かれました. 本施設を世界に先駆けて立ち上げ、そしてこれまでその性能を維持して来られた濱清先生、有井達夫先生にこの場を借りて感謝の意を表します.

#### 文 献

- 1) Scherzer, O.: *J. Appl. Physics*, 20, 20–29 (1949)
- 2) Agar, A.W.: *Principles and Practice of Electron Microscope Operation*. Elsevier, New York (1974)
- 3) Crowther, R.A. *et al.*: *Proc. R. Soc. Lond. A.*, 317, 319–340 (1970)
- 4) Saxton, W.O. *et al.*: *Ultramicroscopy*, 13, 57–70 (1984)
- 5) Bouwer, J.C. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, 148, 297–306 (2004)
- 6) Minoda, H. *et al.*: *Biochem Biophys Res Commun*, 405, 651–656 (2011)
- 7) Williams, D.B. and Carter, C.B.: *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science* 2nd ed., Springer, New York (2010)