

## STEM トモグラフィーにおける電子線損傷の定量

## Quantitative Determination of Beam Irradiation Damages to Biological Specimens Caused by STEM Tomography

平瀬 愛<sup>a, b, c</sup>, 宮澤 淳夫<sup>a, b, c</sup>

Ai Hirase and Atsuo Miyazawa

<sup>a</sup>独立行政法人理化学研究所放射光科学総合研究センター<sup>b</sup>兵庫県立大学大学院生命理学研究科<sup>c</sup>JST-CREST

**要旨** 生物試料の電子線トモグラフィーにおいて、走査透過型電子顕微鏡法 (STEM: Scanning Transmission Electron Microscopy) は、馴染みの薄いものであった。その理由の1つとして、STEMでは収束電子を用いるため、生物試料に利用する場合には電子線損傷が最も深刻な問題になると危惧されたからである。一方、STEMを電子線トモグラフィーに応用する (STEMトモグラフィー) ことで、超高圧電子顕微鏡法を用いることなく1 $\mu$ mという電子顕微鏡用試料としては非常に厚い試料の像取得が可能となり、試料の三次元構造を解明できるという利点がある。そこで、実際にSTEMトモグラフィー測定により生物試料が受ける電子線損傷を、撮影視野の中でミトコンドリアなどの分かりやすい形状のものの大きさを測定し、試料の収縮率として定量した。その結果、厚い試料を用いた場合にはSTEMトモグラフィーの方が、通常の透過型電子顕微鏡法 (TEM: Transmission Electron Microscopy) を用いた電子線トモグラフィーよりも、電子線損傷が少ない事がわかった。

キーワード: STEM, TEM, 電子線トモグラフィー, 電子線ダメージ, 樹脂包埋

## 1. はじめに

生物試料の観察に、走査透過型電子顕微鏡法 (STEM: Scanning Transmission Electron Microscopy) を用いる場合、一点に集中した電子線をあてて試料をスキャンするために、連続傾斜像を撮影する電子線トモグラフィーでは試料の電子線損傷がもっとも深刻な問題になると危惧されてきた。しかし、電子線が当たる時間は非常に短いので、逆にダメージが軽減されることも予測できる。また、透過型電子顕微鏡法 (TEM: Transmission Electron Microscopy) よりもSTEMの方が厚い試料の電子線トモグラフィーに有効であることが報告されており<sup>1,2)</sup>、STEMによる電子線トモグラフィー (STEMトモグラフィー) を行う事で、より多くの厚み方向の情報を含んだ立体構造を観察することができると考えられる。そこで、STEMトモグラフィーでの電子線が与える試料ダメージが、TEMによる電子線トモグラフィー (TEMトモグラフィー) のときよりも、実際に大きいのかを確認するために、TEMトモグラフィー、STEMトモグラフィー、それぞれによって生物試料が受ける照射ダメージを比較定量することを

試みた。電子顕微鏡観察のために一般的な方法で樹脂包埋された生物試料は電子線照射によって樹脂が収縮してしまう。この事は電子線トモグラフィーで三次元再構築を行う際に重大な問題となる。TEM, STEMそれぞれの手法により連続傾斜像を撮影し、三次元再構築した像を比べるのが直接の比較になるが、連続傾斜像を撮影する過程で徐々に収縮した連続傾斜像から再構築した像を比較する事は困難であった。そこで今回は、TEM, STEMそれぞれの連続傾斜像撮影を行う前と後に撮影した写真の収縮率を比較することで、試料が受ける照射ダメージを定量することにした。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料作製 (図1フローチャート参照)

定量実験にはHEK293細胞を用いた。培養3日目の細胞を回収し、遠心してペレット状にしたものを試料キャリアーに載せ、EM PACT 2 (Leica Microsystems) を用いて加圧凍結固定を行った。その後、2.5%オスミウム/アセトン中でAFS 2 (Leica Microsystems) を用いて凍結置換【-85°C (50 hr)  $\Rightarrow$  -85°C  $\rightarrow$  -20°C (13°C/hr)  $\Rightarrow$  -20°C (7 hr)  $\Rightarrow$  -20°C  $\rightarrow$  -4°C (5.3°C/hr)】を行った。凍結置換後アセトンで洗浄し、プロピレンオキシドに置換した後に、EPON812樹脂を1晩浸透させ、60°Cで24時間重合した樹脂ブロックをウルトラミクロトーム EM UC 6 (Leica Microsystems) を用いて1 $\mu$ m

<sup>1</sup> 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1  
TEL: 0791-58-1823; FAX: 0791-58-1826  
E-mail: atsuo@spring8.or.jp  
2009年8月31日受付

に切削した。プラスチック・カーボン膜を張ったグリッドに切片を回収し、切片をグリッド上で酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し、さらに上からカーボン蒸着を行った。

## 2.2 測定方法

連続傾斜像の撮影は TEM と STEM の自動トモグラフィーシステムを搭載した加速電圧 300 kV の TECNAI F30 (FEI Company) で行った。TEM トモグラフィーにはエネルギー幅 15 eV のエネルギーフィルター (GATAN) を使用し、ゼロロス像を取得した。STEM トモグラフィーは高角度散乱暗視野法 (HAADF-STEM) で行った。TEM トモグラフィーと STEM トモグラフィーを行った時の電子線による生物試料へのダメージを傾斜像取得前後での試料の収縮率を比較することで定量した。条件を一定にするために、イメージサイズ = 1024 × 1024, ピクセルサイズ = 2.6 nm, 一枚の像に照射される全電子線量 =  $3.5 \times 10^9$  electrons とした。傾斜角度は  $-65^\circ$  から  $+65^\circ$  までで、87 枚の傾斜像を取得した。表 1 に示したように、3 つの露光条件で傾斜シリーズの取得を行い、収縮率を比較した。露光条件 1 (1 イメージ当たり 3,500 electrons/pixel/sec で 1 秒) は TEM トモグラフィーで一般的に使われている条件であり、露光条件 3 (1 イメージ

当たり 233 electrons/pixel/sec で 15 秒) は STEM トモグラフィーで一般的に用いられる条件である。露光条件 2 の露光量 (233 electrons/pixel/sec) は TEM トモグラフィーを行うには非常に暗く、露光時間 15 秒もドリフトが起きてしまうなどの問題があるので、一般的ではないが、STEM トモグラフィーの露光条件を再現するために用いた。全傾斜像を取得するのに露光条件 1 では 20 分、露光条件 2 と 3 では 45 分かかった。連続傾斜像を撮り始める前に、電子線によるダメージがないように、なるべく素早く撮影した写真と取得し終わってから撮影した視野の中で、ミトコンドリアなどの分かりやすい形状のもの大きさを比較した。3 つの条件での測定はそれぞれ照射ダメージを受けていない別の領域で行った。

## 3. 結果・考察

### 3.1 厚い試料の電子線トモグラフィー

TEM では試料の厚さが増すと、像のボケの原因となる非弾性散乱した電子が増えてしまう。そこで、エネルギーフィルターで非弾性散乱した電子をカットすることにより、全体的には暗くなるが、比較的コントラストの高い像を得ることができる。しかし、図 2 に示したように、今回のような非常に厚い試料 (厚さ  $1 \mu\text{m}$ ) では、傾斜角度が  $0^\circ$  でもゼロロス像のピークは非常に小さく、大半の電子をカットしてしまう事になり、実際、わずか  $1 \sim 1.5\%$  の入射電子しか像形成に使う事ができなかった。つまり、像形成の主役である弾性散乱した電子が極端に少ないために、像形成のために照射しなければならない電子線量が増大することになり、その結果として電子線によるダメージが大きくなってしまおうと考えられる。また、このスペクトルから TEM ではほとんどが非弾性散乱電子であり、エネルギーフィルターを用いないと焦点の異なる像が重なるような事になり、最終的に像を劣化させてしまう事も分かる。一方、高角度散乱電子 (熱散漫散乱電子) を取得する STEM では、得られる像は原子番号の二乗でコントラストを与えるため、試料が厚くなることによる色収差の影響を受けないので、像形成に十分な電子を使う事ができる。

よって、通常の TEM トモグラフィーでの傾斜像の撮影時と比較して、STEM トモグラフィーでは少ない電子線量で高いコントラストの像が得られると考えられる。この性質は、

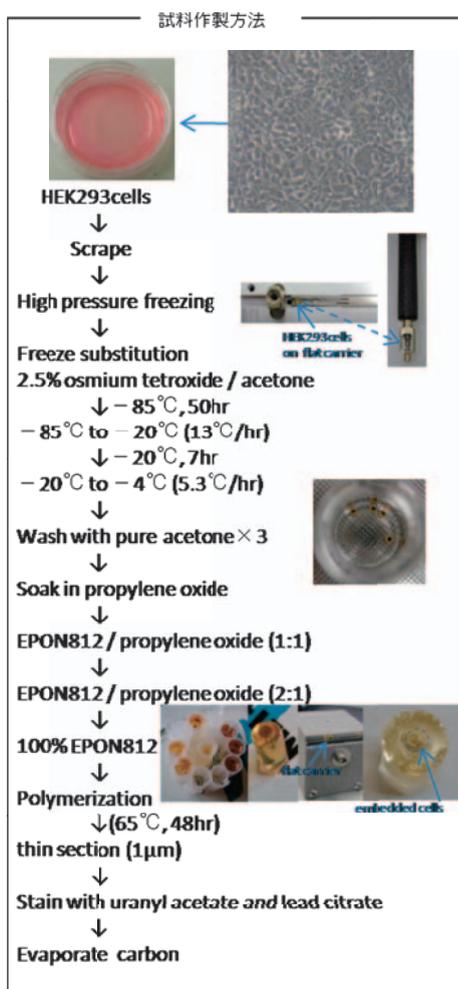


図 1 試料作製方法のフローチャート

表 1 3 つの露光条件での傾斜像取得前後での試料の収縮率

	A/B rate			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
露光条件 1 (TEM, 1 s)	0.913 (-8.7%)	0.920 (-8.0%)	0.920 (-8.0%)	0.921 (-7.9%)
露光条件 2 (TEM, 15 s)	0.940 (-6.0%)	0.947 (-5.3%)	0.935 (-6.5%)	
露光条件 3 (STEM, 15 s)	1.000 (0%)	0.993 (-0.7%)	0.994 (-0.6%)	0.991 (-0.9%)

特に試料の高傾斜時、試料の電子線通過距離が長くなった際（60度傾斜時に0度の2倍になる）の像撮影に、非常に有効である。なお、STEMトモグラフィーによる実際の三次元再構成像とそのコントラストについては、本特集の他稿で詳しく述べられているので、本稿では割愛させていただく。

### 3.2 トモグラフィー前後の収縮率

表1で示した結果のように、STEMトモグラフィーによる収縮率（0～0.7%）は、TEMトモグラフィー（5～9%）に比べて、明らかに少ない結果となった。露光条件1での試料の収縮率は、電子線照射による試料へのダメージを測定したLutherらの報告ともほぼ一致していた<sup>3)</sup>。STEMでは電子線がスキャンする一点に集中するが、その照射時間は非常に短い。断続的で短い照射によって、撮影視野全体に一定時間、電子線が照射されるTEMよりもダメージが軽減される可能性が考えられる。更に、STEMのプローブサイズは約0.6～1.0 nmで、ピクセルサイズよりも小さい事もダメージが軽減された要因であると考えられる。また、露光条件1と2の結果を比べるとTEMにおける電子線照射による試料の収縮は総電子線量を同じにした場合、強い露光で短時間照射する（3,500 electrons/pixel/secで1秒）よりも弱い露光で長時間照射した（233 electrons/pixel/secで15秒）方が軽減されていることが分かる。おそらく像取得時の温度が試料へのダメージに関与していると思われる。

### 3.3 電子線照射による樹脂収縮問題

電子線照射による試料の収縮でもうひとつ問題になるのが、厚み方向（Z軸）と表面方向（X軸、Y軸）で収縮率が異なる点である。厚み方向の収縮率の方が大きいために図4の左写真のように円形のはずの酵母の断面像が樹脂の圧縮に

よって、楕円形になってしまったという例がある<sup>1)</sup>。

この場合は、三次元再構成後のトモグラムでの楕円の形状から、約50%の収縮が起きていると考えられる。

試料の厚みは三次元再構成した結果を得て始めて計測できるので、連続傾斜像を撮影する前の厚さの実測値を得ることはできない。したがって、電子線トモグラフィー計測時の電子線照射による試料の厚さ方向の収縮について、電子線照射前後で比較することは不可能である。ただし、試料切片的の作製時における、ウルトラミクロームでの切削厚の設定値、また実際に切削された際の超薄切片的の干渉色から、電子顕微鏡観察前の切片的厚を推測することはできる。一般的に超薄切片的の作製では、ウルトラミクロームでの切削厚を80 nmに設定しており、切片的の干渉色もグレー（80 nm前後）を示す。この場合の切片的の三次元再構成後の厚さは50 nm程度となる場合が多い。本稿で用いた厚い切片的は、切削厚を1 μmに設定して作製した。この切片的の三次元再構成後に試料の厚さを計測したところ、約750 nmとなり、切削時に設定した切片的の厚さから約75%の収縮が起きたと思われる。前述の酵母のトモグラムから想定された収縮率（50%）と異なっているが、これは包埋に用いた樹脂の種類違いや、樹脂の硬化度や乾燥度の違い、また試料ごとのトモグラフィー計測時における電子線照射量の違い（撮影された像数の違い）などに依存して収縮率が変動したと考えられる。いずれにしても、電子線照射により試料の厚さ方向の収縮は発生する。

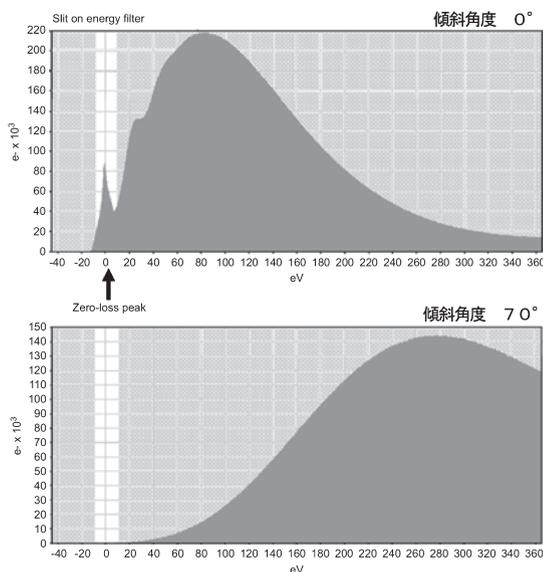


図2 厚み1 μmの生物試料切片的のEELS spectrum (GATAN imaging filter)。

上が傾斜角度0°、下が傾斜角度70°のときのスペクトラム。白いバーはゼロロススリットを示している。傾斜角度0°でのゼロロスのピークは非常に小さく、70°では完全でない。

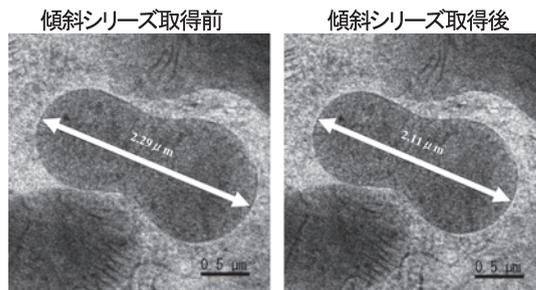


図3 露光条件1のときの傾斜像取得前（左）と後（右）の電子顕微鏡写真。傾斜像取得後のミトコンドリアは取得前に比べて小さくなっている。

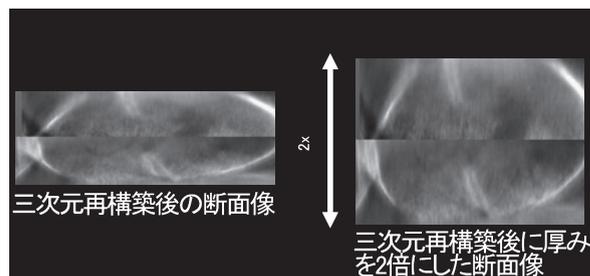


図4 三次元再構築した酵母菌切片的の断面像<sup>1)</sup>。

左：丸いはずの断面像が収縮のために楕円形になっている。右：三次元再構築後に像の厚みを2倍にすることで、断面像が本来の円形になったことから、おそらく厚み方向（Z軸）には50%程度の収縮が起きている。

傾斜像取得途中で試料が収縮してしまう事は三次元再構築を行う上で重要な問題になるので、実際に傾斜像を取得するときは、直径約30～40 μmの領域に600～1000 (electrons/nm<sup>2</sup>·sec)で5分間の予備照射を行っている。TEMでも電子線ダメージを試料の収縮率を測定した実験で、厚み方向の収縮の方が大きい事が報告されており<sup>2)</sup>、収縮の仕方も電子線を照射してから3分で大きく収縮することが分かっている。予備照射することで、傾斜像取得途中で厚みが変わってしまうのをある程度防ぐ事ができると考えられる。しかし、収縮の影響は試料が厚いほど大きく、電子線トモグラフィーにおいて正しい立体構造を観察する妨げになってしまうとも考えられる。

今後、収縮を回避するため試料作製段階での手法の検討・選択が、非常に重要になると考えられる。なぜなら、樹脂の重合が不完全であること事や、不均一になっている事も、試料の収縮の原因となりうるからである。樹脂の調整や重合後に、超薄切片を作製するときの実験室の湿度を60%以下にすること(40%以下が望ましいという人もいる)、樹脂重合に使用する容器は使う直前までオープンに入れておくこと、なども不完全重合を防ぐ手段である。また、吸湿性の高い樹脂にはビームカプセルよりもゼラチンカプセルの方がよいなど、容器の工夫も必要だと考えられる。さらに、切片を電子線染色する際に使用する水によっても樹脂が柔らかくなってしまふ可能性があるが、これについては、電子染色後に60°Cのオープンに一晚、入れておくことで回避できる。

### 3.4 包埋樹脂の選択

最近になり、通常の生物試料の電子顕微鏡観察には包埋剤としては、電子線への安定性があり、電子線によって昇華することが少ない事から、エポキシ系の樹脂が広く使用されるようになった。その中でもよく用いられている樹脂の一つであるEPON812も、配合を少し変えるだけでも樹脂の固さは違ってくる(図5)。また、EPON812よりも硬いエポキシ系樹脂であるEPON815や、電子線の透過性がよく、厚切り切片作製に最適であるとされているQetol651-ERL4206包埋法<sup>4)</sup>、電子線に強いとされているEPON-Araldid包埋法なども、検討の価値があると思われる(図6参照)。さらに、切削の仕方も切片の仕上がりに影響を与える。切削の速度が速すぎると厚みが不均一になったり、切削するときのナイフの圧力によって切片が圧縮されてしまうことが報告されており<sup>5)</sup>、それによって電子線による収縮の影響も大きくなってしまふと考えられる。通常のダイヤモンドナイフを用いて、エポキシ系の樹脂を切削した場合、切片は一般に切削方向に10～20%圧縮されてしまうので、ナイフの種類や角度など

EPON812樹脂の混合比と硬さの関係

	軟 ⇒ 硬		
	準超薄切片	超薄切片	超薄切片
EPON 812	39ml	39ml	39ml
DDSA	30ml	19ml	12ml
MNA	17.9ml	26.8ml	33ml
DMP-30	2ml	2ml	2ml

図5 EPON812樹脂の混合比と硬さの関係  
EPON812樹脂の硬化剤であるDDSAとMNAの混合比によって重合後の樹脂の固さを調節することができる。

厚切り切片のトモグラフィーの樹脂の候補と配合

Quetol 651 エポキシ樹脂(水溶性)	24ml	EPON 812	25ml	EPON 815	100 ml
NSA (DDSAより浸透性がよい)	64ml	Araldide M	15ml	MNA	75ml
ERL 4206	5.5ml	DDSA	55ml	DMP-30	1.5-2.5%
DMP-30	1.5-2.0ml	DBP	2-4ml		
電子透過性がよい、厚切り切片作製の 高加速度電圧観察用に開発された包埋法		DMP-30	1.5-3%	硬い試料の切削に向く 硬質エポキシ樹脂	
		粘性はあるが電子線に強く、 高分解能電顕像を得ようとする ときに適している。 切削面の表面が滑らかになる			

図6 厚切り切片トモグラフィーに用いる樹脂の候補と配合

も検討する必要がある。厚い試料の電子線トモグラフィーに有利であるSTEMトモグラフィーを行う上でも、このような様々な検討を行っていくことにより、生体内でのより正しい、より生きた状態に近い立体構造が観察に、使用できるようになると期待している。

### 謝 辞

加圧凍結・凍結置換法については、日本電子株式会社の会田嵯武朗様に、詳しくご指導をいただきました。切片の作製にあたっては、ライカマイクロシステムズ株式会社の伊藤喜子様に、丁寧なご指導をいただきました。ここに記して深謝の意を表します。また、特集号への執筆の機会を与えていただきました日本エフイー・アイ株式会社の青山一弘博士に、心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Aoyama, A. et al.: *Ultramicroscopy*, 109, 70-80 (2008)
- 2) Yakushevskaya, A.E. et al.: *J. Struct. Biol.*, 159, 381-391 (2007)
- 3) Luther, P. et al.: *Ultramicroscopy*, 24, 7-18 (1988)
- 4) Kushida, H. et al.: *J. Electron Microsc.*, 36, 133-135 (1987)
- 5) Studer, D. and Gnaegi, H.: *J. Microsc.*, 197, 94-100 (2000)