

大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) による溶液中での細胞観察

Atmospheric Scanning Electron Microscope Observes Cells in Solution

西山 英利^a, 須賀 三雄^a, 小椋 俊彦^b, 丸山 雄介^b, 小泉 充^a,
三尾 和弘^b, 北村 真一^a, 佐藤 主税^b

Hidetoshi Nishiyama, Mitsuo Suga, Toshihiko Ogura, Yuusuke Maruyama, Mitsuru Koizumi,
Kazuhiro Mio, Shinichi Kitamura and Chikara Sato

^a 日本電子(株)開発本部, ^b 産業技術総合研究所脳神経研究部門

要 旨 光学そして電子顕微鏡は、細胞の生理活動の鍵となる巨大分子複合体を観察する重要なツールである。しかし、光学顕微鏡は分解能が 200 nm 程度と低く、電子顕微鏡は試料を真空中に置く必要がある。薄膜で真空から隔離できる環境セルが開発されたが、容量はわずかに数十 μl 程度の閉鎖系である。そこで、我々は液中での観察を開鎖系で行う為に、鏡筒先端を薄膜でシールして大気と真空を隔離した倒立型の大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を開発した。試料は薄膜上に置かれ、上部に光学顕微鏡も搭載しており、両顕微鏡での同視野観察が可能である。電子線は薄膜を透過して試料に照射され、反射電子を検出して像を得る。薄膜上の細胞は、外部操作可能で、固定・染色後に ASEM で観察できる。組織ブロックも薄切せずに表面を観察できる。この顕微鏡は、10 から 200 nm のメゾスコピックサイズの構造観察や、がん診断、そして高分子化学にも適用できる。

キーワード：ASEM, 大気圧, 走査電子顕微鏡, 環境セル, 薄膜

1. はじめに

様々なマイクロイメージング技術は科学の全領域を進展させた。特に、光学顕微鏡 (光顕) は細胞内小器官や比較的大きい分子複合体の観察を可能にした。光顕用には多くの染色剤 (例えばヘマトキシリン・エオジン, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)) やラベル体が開発され、生物学、医学そして薬理学¹⁾ で利用されている。特に蛍光顕微鏡は、蛍光ラベルによって蛋白の局在を決定することができる。しかし、光の波長などの要因により、光顕の分解能は約 200 nm が限界である。この値は、細胞微細構造や病原菌の観察には明らかに不十分である。近年、この限界をある程度超える超分解能光顕が登場し、主に高精度での位置特定が可能になっている。だが、量産は容易ではなく、試料の蛍光ラベルが必須である。より高分解能・高スループットの観察法開発が、薬のスクリーニングへの応用の鍵となっている。

電子顕微鏡 (EM: Electron Microscope) はサブナノメートルの分解能を持ち、細胞小器官観察に幅広く利用されている。しかし、試料は真空中に耐えるように前処理する必要がある。重金属によるコーティング法では、内部構造の直接観察は不可能となる。また透過電子顕微鏡 (TEM: Transmission EM) 用のエボン超薄切片法では、試料は固定、脱水、包埋、薄切、

染色される。脱水や包埋は細胞内のデリケートな親水構造に対して本質的なダメージを与えるおそれがある。EM 用の染色液には、酢酸ウラン塩、クエン酸鉛、リンタンングステン酸、白金ブルー²⁾ などがある。しかし染色剤の種類は、光顕用と比較して少ない。

TEM クライオトモグラフィは、500 nm より薄い細胞の 3D 構造を 4-5 nm 分解能で観察する^{3,4)}。しかしながら、動物細胞は 500 nm よりも厚く、電子線を透過させるために細胞の凍結薄切が必要となる。これは難しい作業であり、薬のスクリーニングのような大量検体には基本的に向かない。

X 線や電子線結晶解析は蛋白や複合体を 3 Å 以上の高分解能で決定することができる⁵⁻⁸⁾。TEM を用いた単粒子解析は in-silico 結晶化であり、分解能は結晶解析法には及ばないが、結晶化を必要としない選択肢である^{5,9)}。しかしながら、これらの方法は全て蛋白精製が必要なため、解析可能な蛋白質は限られ、スループットも低減する。さらに、基本的に、20 nm 以上の分子複合体に適さない。これと光顕の 200 nm の分解能を考え合わせると、メゾスコピックサイズと呼ばれる 20 から 200 nm の間のサイズの粒子の多くは観察困難である。

これらを克服するため、Abrams らによって初めて環境セルが開発された。この TEM 用環境セルは準閉鎖系であり、コロジオン¹⁰⁾ やカーボン^{11,12)} の電子線透過フィルム二枚の間に湿潤状態で試料を保持し、高分解能観察を可能にする¹³⁻¹⁷⁾。細胞の薄い端では、固定後に小胞を金コロイドラベルして、走査型透過電子顕微鏡 (STEM: Scanning TEM) により透過観察に成功している¹⁸⁾。

一方、走査電子顕微鏡 (SEM: Scanning EM) は、試料表

^a 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2
TEL: 042-542-2764; FAX: 042-542-1924
E-mail: hinishiy@jeol.co.jp
2009 年 10 月 1 日受付

面スキャンによる反射電子や二次電子を検出しており、試料の厚みに関わらず表面近傍が観察できる^{19~21)}。このユニークな特性は、SEMを二つの方向、環境SEM^{22~24)}と環境セル^{25,26)}へと発展させた。環境SEMは差動排気システムとGSED (gaseous electron detector) 技術の組み合わせによって1000 Pa (1/100気圧)程度の真空度で湿潤試料の撮像を可能にしている。しかし、撮像は水分が完全に蒸発する前、かつ試料表面に極薄の水膜存在下で行わなければならない。そのため、撮像のタイミングを見極めることは容易ではない。一方、ポリイミド膜を用いた環境セルがThibergeらによって開発され、完全な湿潤試料(細胞や組織)の観察に成功している^{25,26)}。しかし、容積わずか15 µlの閉鎖系で、外部からの細胞操作や試薬投与は困難である。さらに、このフィルムは典型的には145 nmと厚く、電子線を散乱し分解能を低下させる。

近年、電子線透過度が高い窒化シリコン(SiN)フィルムが、半導体製造プロセスによって生産されている^{27,28)}。我々は、プロセス最適化により、僅か30 nm厚の非常に薄く平坦なSiNフィルムの製造に成功した。高分解能を可能にし、かつ一気圧の圧力耐性を持つこのフィルムを用い、我々は開放試料室を持つ大気圧走査電子顕微鏡(ASEM: Atmospheric SEM)を開発した。この装置では、光頭と倒立型SEMとをサンプルを挟んで同軸上に配置することで、同視野観察を実現している。

2. システムの概説

2.1 電子線透過膜の作製方法

薄膜を作製するために、SiNをChemical Vapor Deposition (CVD)²⁹⁾法を用いて10, 30, 100, 150 nmの膜厚でSi基板に積層する。Si基板を部分的にウェットエッチングで溶かし^{30~32)}SiN薄膜窓を作製した(図1左下※)。薄膜窓は標準的な直径35 mmプラスチックペトリディッシュの底面

に組み込んだ。ASEMディッシュは、約10 ml容量で(図1左)、本体から取り外し可能であるため、CO₂培養器で細胞を培養できる。

2.2 ASEMの設計

ASEMディッシュホルダーの下部に、倒立型SEMを新設計した。電子線は薄膜を透過した後、試料を照射する(図1中)。反射される電子はSiN薄膜を通過してディスク型BEI (Backscattered Electron Imaging) 検出器で検出されASEM像を得る。また、薄膜ディッシュ上方には、光頭(BXFM, オリンパス社製)を備え、ASEMとの交互観察を可能にしている。両装置の光軸は一致した状態で固定され、視野は試料ステージを水平方向に動かすことにより移動する。なお、本装置、及び薄膜ディッシュ(SiN 100 nm)は商品機ClairScope™ (JASM-6200, 日本電子(株))、及びその消耗品として発売されている(図1右)。

2.3 細胞培養、金ラベリング、固定及び染色

SiN薄膜は一般に細胞培養に適している。37°Cの5% CO₂培養機内で、COS7 (African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line)等の接着の良い細胞はASEMディッシュのSiN薄膜上に直接培養(培養液: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml kanamycin)される。細胞によっては、膜にコーティングを要する。ASEM観察には、①細胞を1%グルタルアルデヒド、リン酸バッファ(PBS)液で室温、10分間固定、②Triton-X 100で処理した後、③白金ブルー(0.6% Pt₄(NH₃)₈(C₆H₁₃O₅)₄溶液、原液の10%濃度、日新EM)で10分間染色した。

Wheat Germ Agglutinin (WGA)-goldラベルでは、①処理後、固定細胞をブロッキング液(2% Bovine Serum Albumin (BSA)を含むPBS溶液)に30分間浸し、細胞表面のグリカンを濃度0.8 A⁵²⁰の15 nm金コロイド(EY laboratories)標識WGAで30分間ラベルした。

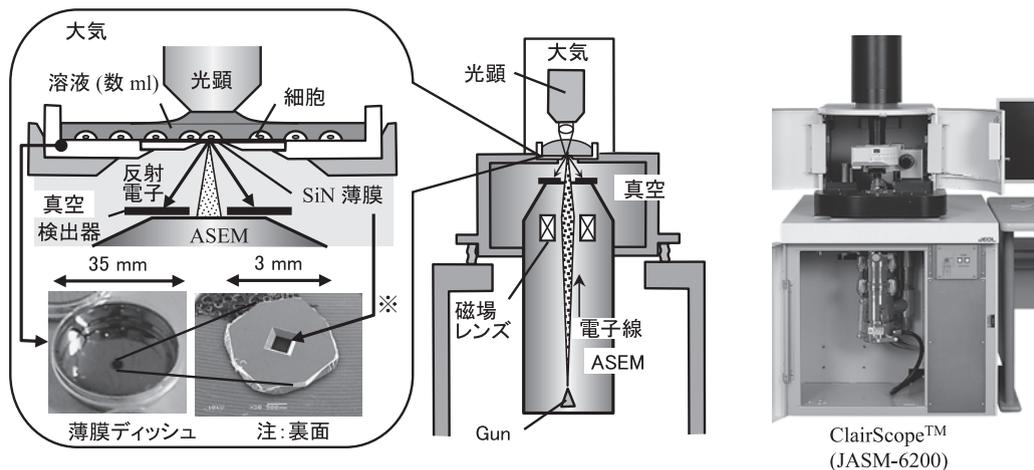


図1 ASEMの構造図。倒立型SEM(大気圧走査電子顕微鏡, ASEM)に対向して光学顕微鏡(光頭)を配置し、間にASEMディッシュを備える。ASEMディッシュは取り外して細胞の培養が可能で、SiN薄膜窓を底面に持つ。この薄膜は、電子線を透過するほど薄いが大気圧を保持できる。薄膜を介して液中の細胞に電子線を照射し、細胞からの反射電子を検出することにより高分解能で像を取得できる。また、光頭を用いた蛍光ラベリングにより発現部位を特定できる。薄膜窓を※で示した。

2.4 細胞や組織の核特異的な染色

ASEM ディッシュ上で培養した COS7 細胞を固定のみ 1% パラホルムアルデヒド溶液で行った。組織観察では、金魚の脳をおおよそ半分に切断し、細胞の場合と同様の処理を行った。

2.5 ASEM と光顕による同視野観察

細胞を培養した ASEM ディッシュを試料ステージ上に Oリングで固定し、倒立 SEM 鏡筒内部を一分程度かけて真空排気する。ディッシュに下から電子ビームを照射し、反射電子は、SiN 薄膜の直下にある BEI 検出器で検出する(図 1 中)。ディッシュ上部から光顕で細胞器や構造を確認し、ASEM で高分解能撮像することができる。

3. ASEM の分解能検証

3.1 薄膜厚および加速電圧との関係

SiN 薄膜、ポリイミド膜とも電子線に全透性ではないため、膜厚が分解能に影響する。この関係を、SiN 薄膜上に載せた金コロイド(直径 15 nm)の視直径を求めて解析した。初めに、150 nm 厚の SiN 膜を用いた結果では(図 2 (a, b)), 倍

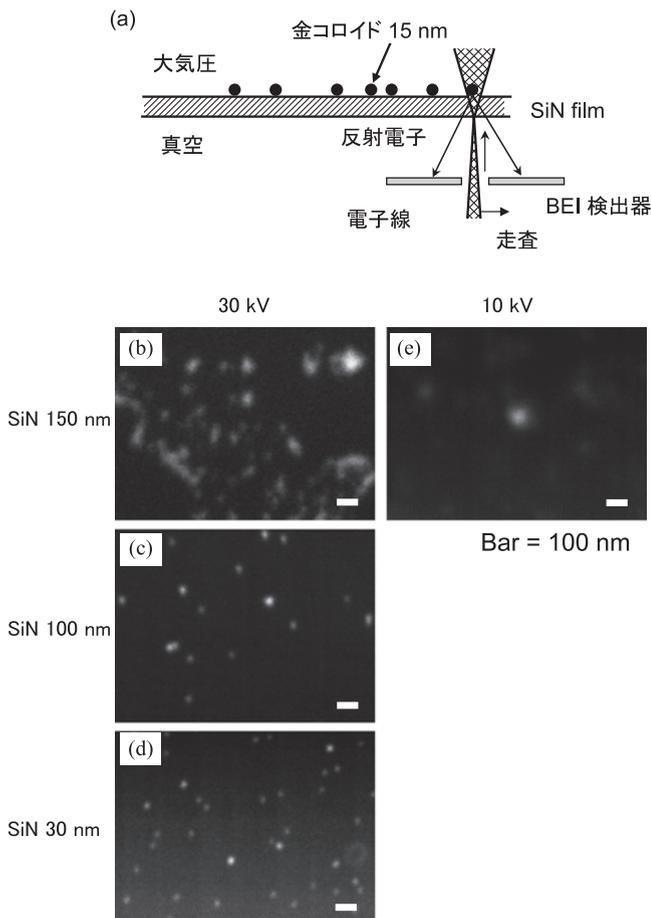


図 2 ASEM による様々な SiN 膜を通しての金コロイド観察。(a) ASEM の原理図。(b) (c) (d) 倍率 100,000 倍, 加速電圧 30 kV, ビーム電流 40 pA で, SiN 膜厚 (b) 150 nm, (c) 100 nm, (d) 30 nm での金コロイドの像。膜厚が減ると, 金粒子の形状が徐々に明確になる。低加速 10 kV (e) では, 金粒子はよりぼやける。これは電子線の散乱がより大きくなるためである。

率 100,000 倍(加速電圧 30 kV, 電流 40 pA)で, 近接している金粒子は分離できず, その輪郭も明確ではなかった。厚さを 150 nm から 30 nm に徐々に薄くすると(図 2 (b-d)), 個々の金粒子はより明確になる。最終的に粒子径は 30% 減り, S/N 比は徐々に向上する。逆に低加速 10 kV (膜厚 150 nm, 図 2 (e)) では, 金粒子はぼやける。低加速では SiN 薄膜中での電子線の広がりが大きいためである。以上の結果から, 薄膜厚 100 nm 以下, 加速電圧 30 kV を使用する。

3.2 細胞表面糖鎖の金ラベルによる ASEM の分解能測定

ASEM ディッシュ上の COS7 細胞を 1% グルタルアルデヒドで固定し, 細胞表面の糖鎖を WGA-金コロイド(直径 15 nm)で特異的にラベルした。液中の細胞を ASEM で倍率 40,000 で観察したところ(図 3 (a, b)), 金粒子は細胞表面の至る所で輝度の高い白い粒子として見られる。粒子は細胞の周囲を密に形どり, 特にフィロポディア, ラメリポディアを含む仮足に集中している。これら結果は, 糖鎖の予想分布と一致する。

高倍率 100,000 倍(加速 30 kV, ビーム電流 40 pA)では, 各々の金粒子の判別は容易である(図 3 (c))。しかし下方の細胞の縁から中心に向かって金粒子は徐々にぼやけ, 細胞の中心付近では消えてしまう。これは, 細胞の高い所(細胞質が厚い所)に吸着した金粒子は薄膜から離れ, 電子ビームが届かないためと思われる。なお, 分解能を判別可能な金粒子間隔

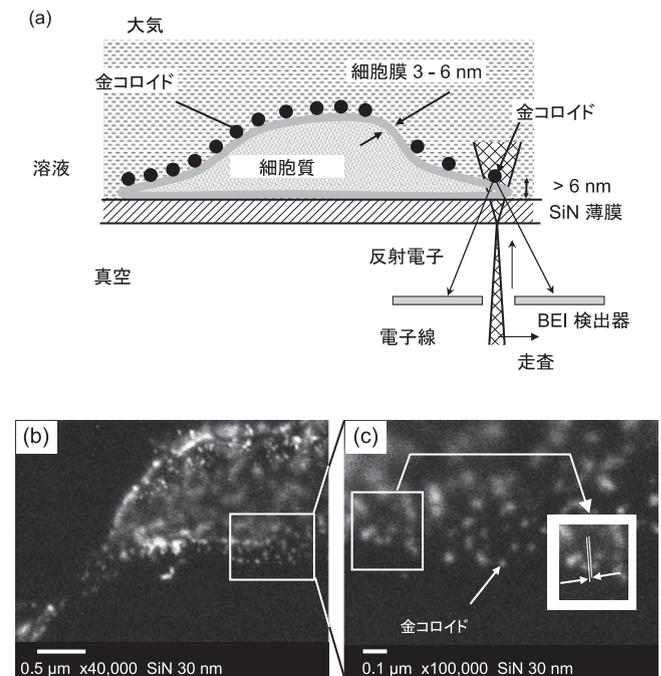


図 3 金コロイドで表面の糖鎖をラベルした COS7 細胞。(a) 電子線の経路。金コロイドに到達する前に, 電子線は SiN 膜, 細胞膜, そして細胞質により散乱される。散乱された電子線は最後は金により反射され, 再び SiN 薄膜を通り, BEI 検出器に到達する。細胞をグルタルアルデヒドで固定後, その表面糖鎖を WGA-gold (15 nm) によりラベルした。(b) ASEM は, 倍率 40,000 で SiN 100 nm 膜を越しに金粒子を観察。(c) 倍率 100,000 倍で, 分解能は 8 nm。

と定義すると、30 nm SiN 薄膜では、8 nm であった (図 3 (c)).

3.3 ASEM の分解能の理論的限界

歴史的には、ASEM (反射電子像) の分解能は、Kanaya-Okayama³³⁾ 理論から、試料内部での電子線の広がりによって決定されると考えられていた。この広がりには加速電圧と試料 (薄膜も含む) の原子番号 Z に依存する。無染色生物試料の Z は小さい。電子線は μm オーダー (加速電圧 30 kV) に広がり、反射電子効率は 5% 程度³⁴⁾ となる。しかし、ここでの金粒子での分解能はこの値よりも二桁良い (図 3 (c)). 薄膜に近く電子線の広がりが小さい場所で、 Z の大きな金粒子 ($Z=79$) が電子線を強く散乱しているためである。重金属で染色された像も、これと似ている。現に Merli らは、高 Z の層を含む半導体積層膜を用いて、分解能は高 Z 原子の位置と S/N 比で決定されることを示した³⁵⁾。

4. 様々な細胞の ASEM 観察

4.1 ニューロンの結合

ニューロンは一般的に培養条件、特に培養基質に敏感であり、シナプスの形成には数日間の CO_2 培養器での培養が必要である。脱着可能な ASEM 薄膜ディッシュは環境セルと異なり、数 ml の培地を保持でき、安定な長期培養が可能である。

コラーゲンコートした 100 nm SiN 膜上で PC12 細胞 (rat adrenal pheochromocytoma) を四日間培養し、固定後、Triton X 処理、白金ブルー染色を行った^{2,36)}。ASEM の高分解能により、これまで顕微鏡では難しかったニューロン間の微細な結合を多数観察できた (図 4)。初代培養のシナプスも同様に ASEM で観察された。

4.2 食細胞作用

全ての細胞、とりわけ免疫細胞にとっては、細胞外物質や病原菌を破壊・分解することは必須である。それらの初期段階である食細胞作用を COS7 細胞を用いて観察した。直径 10–20 nm の Q dot[®] 粒子を細胞周囲に散布した。ASEM ディッシュは開放構造なので、試薬の投与は容易である (図 5 (a))。

まず蛍光顕微鏡で生きたままの細胞の挙動を観察する。細胞が粒子を取り込んだ瞬間、グルタルアルデヒドで固定し、BSA でブロッキング、そして Qdot[®] WGA conjugate と、さらに 1% のリタングステン酸 (ASEM 用) で染色した。蛍光

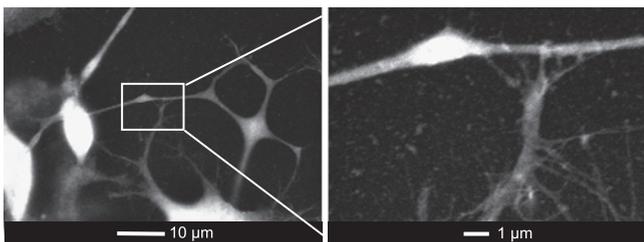


図 4 PC12 神経細胞間のシナプス結合。細胞をコラーゲンコートした SiN 薄膜の上で NGF 添加培地中、四日間 CO_2 培養器で培養した。神経細胞間で多数のシナプスが形成され、固定・Triton-X 穿孔・白金ブルー染色した。

像では、細胞内に取り込まれた粒子 (矢印、図 5 (b)) が確認できる。ここで一つに見えていた楕円の粒子は、高分解能な ASEM では、二点 (図 5 (c) 中で太い矢印) である。リタングステン酸は核 (特に核酸) も高コントラストに染色する。

4.3 小胞体

細胞内で Ca イオンを溜める小胞体は、ニューロン間の情報伝達や胚形成など重要な生理的役割を担う。しかし、その構造は顕微鏡で観察するには小さすぎる。小胞を観察するために、COS7 細胞を同様に固定・穿孔した。顕微鏡用には、Alexa Fluor で特異ラベル、電顕用には白金ブルーで染色した。顕微鏡では小胞の大きな構造のみ見えるが (図 6 (a)), ASEM では、太いチューブから蜘蛛の巣状に広がった構造を倍率 20,000 倍で観察できた (図 6 (b, c))。白金ブルー染色では、細胞の核、特に染色質が強く染色される。それは、前述のリタングステン酸などによる染色よりも遥かに明るい。

4.4 組織の表面観察

SEM では電子線で試料表面のみを走査する。そのため、環境セルを用いて心臓組織の表面が、薄切無しに酢酸ウラン染色によって観察された²⁵⁾。しかし、そこでは癌の診断で重要な細胞核が明確ではなかった。白金ブルーは染色質を強く染色する傾向があるため、培養細胞を用いて、核が強調できる固定・染色条件を ASEM で調べた。その結果、パラフォルムアルデヒド 1% による固定と白金ブルー染色の組み合わせが最良であった。他の組み合わせと比較して、はるかに高コントラストである (図 7 (a))。この核特異的な条件で、半分に切断した金魚脳組織を固定・染色した。黒い背景の中で切断面にある核が白く際立って見え、細胞の突起も弱く判別できた (図 7 (b))。

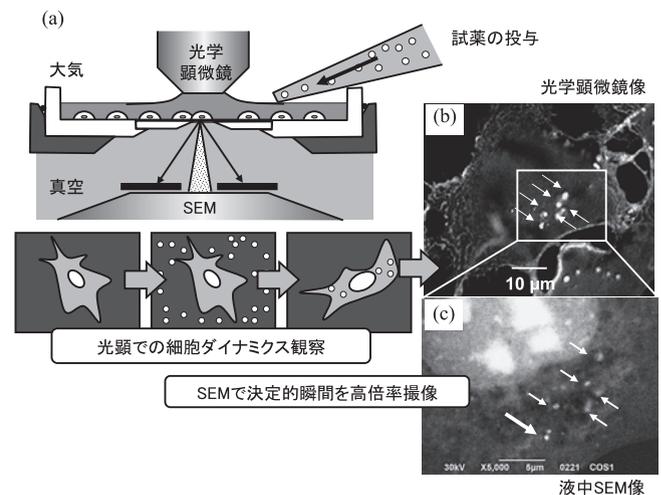


図 5 顕微鏡と ASEM による食細胞作用の同視野観察。COS7 細胞の周囲に直径 10–20 nm の Qdot 粒子を蒔いた。顕微鏡で観察することで、細胞が粒子を内部に取り込んだ瞬間を捉え、固定・リタングステン酸染色を行った。顕微鏡像では一つに見えていた粒子は、ASEM 高分解能撮影では二つに分別 (太い矢印) できる。

5. 考察

5.1 ASEM と環境セル

TEM用の環境セルは、カーボンかコロジオンの二枚の薄膜間に湿潤試料を保持する。これらの薄膜は真空との圧力差によって真空側（外側）に膨らみ、薄膜間の電子線経路が増大し易い。電子線散乱は増え、像はぼける。ASEMにおいても、大気圧はSiN薄膜を真空側に押し曲げるが、フォーカスを調整するだけで容易に補正できる。さらに、二枚の薄膜窓からなるTEM用環境セルのリークチェックは容易ではない。しかし、ASEMディッシュは、下側に真空ボトルを装着し真空度をモニターすることで、簡単にチェックできる。このような方法を用いて、我々は1000枚以上のディッシュをトラブル無しに使用している。

環境セルは一般に容量が非常に小さい。SEM用も僅か15 μ lの閉鎖系で、外部からの試料操作が困難である。これに対して、ASEMディッシュは容量が10 mlで、環境セルのような数 μ lの難しい液滴操作が不要である。そして、本ディッシュの開放構造は、ステージ上でのマイクロインジェクションや電気生理をも可能にし、薬やウイルスの滴下も容易である。すなわち、ステージ上で生きた細胞を操作しながら、その変化を上部から光顕で観察して、最適なタイミングで固定する。そしてASEMでnmレベルの高分解能で観察する。またASEMで得られた構造が未知の場合は、構成候補タンパク質を蛍光ラベルし、光顕像とのパターンマッチにより解析できる可能性がある。その際、共焦点顕微鏡、二光子励起顕微鏡、そして最近の蛍光顕微鏡（特にSTORMやPALM³⁷⁾は、分子の位置や種類により高精度で特定できる。

5.2 様々な細胞種への適用

ASEMディッシュは、SiN薄膜をコラーゲンやフィブロネクチン等でコーティングすることで、神経細胞、上皮細胞、免疫細胞など比較的培養が困難な細胞を培養できる。特に、

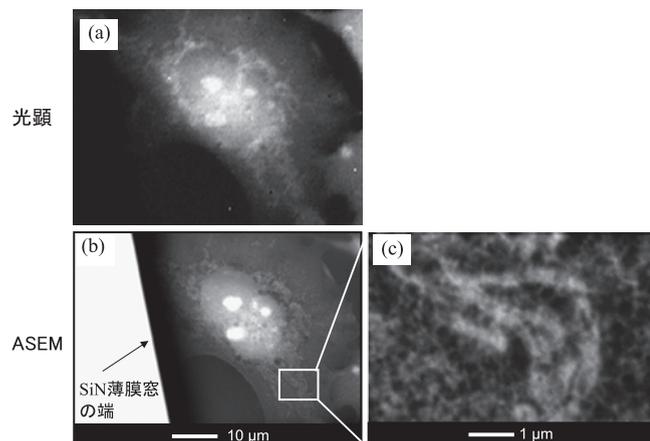


図6 COS7細胞内小胞。細胞を固定、穿孔し、光顕用にAlexa Fluor 488でラベルし、さらにASEM用に白金ブルー染色した。(a)光顕と(b,c)ASEMでの同視野観察。光顕では観察困難な小胞の微細構造が、ASEMでは観察された。

ニューロン間での微細なシナプス形成への応用が注目される。脳の神経ネットワーク形成は、発生における様々な刺激に影響を受け、本能と記憶を含む高次元の精神的活動を司る。これらシナプス形成の基本制御機構の研究には、*in vivo*系はあまりにも複雑なため、培養系が広く用いられてきた。一般的にシナプス・スパインのサイズは、50-500 nmと微細であり、光顕よりも電顕が観察に適する。しかしTEMでシナプスを観察するためには培養面と水平なエポキシ薄切という実際には困難な作業が必要のため、これまで光顕が用いられてきた。

5.3 組織観察と迅速癌診断

細胞のASEM観察には、白金ブルー、酢酸ウラン、リンタンゲステン酸、四酸化オスミウムなど様々な染色剤が有効であった。中でも白金ブルーは、RNAやDNAなど核酸に結合しやすく、核の染色質、染色体を強く染める。本特徴は、白金ブルーの前駆体シスプラチンがガンの化学療法薬であり、DNAに結合し細胞分裂を阻害する性質に由来すると思われる。

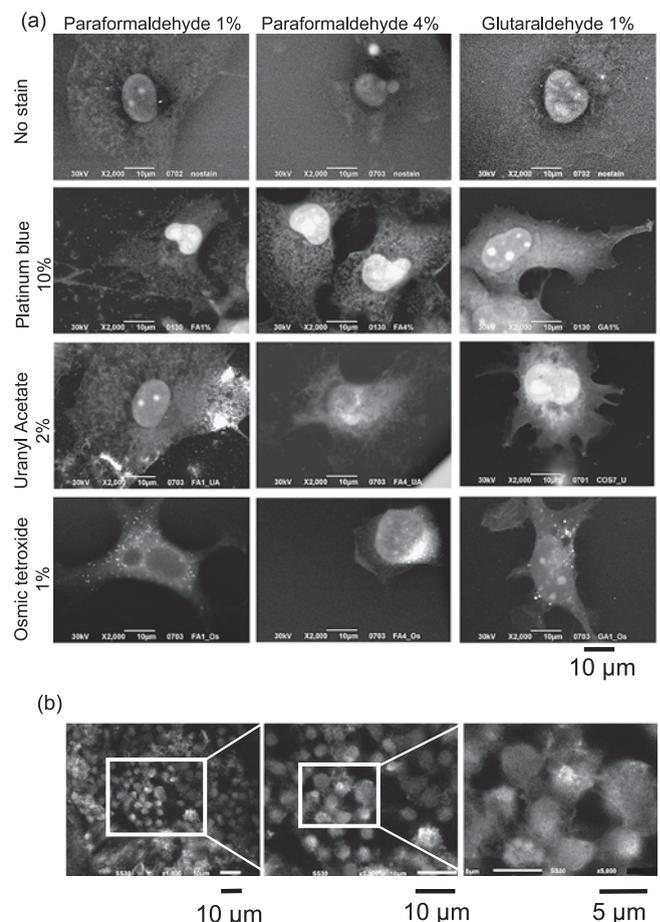


図7 組織ブロックの細胞核。(a) COS7細胞を用いて染色条件の最適化を行った。様々なアルデヒド液で固定後、染色。パラフォルムアルデヒド固定・白金ブルー染色により、他の条件よりも特異的に核を染色した。比較のための四酸化オスミウムOsO₄では、細胞質の脂質が特に染色されている。(b)組織の観察。金魚の脳を半分切断し、上記の核染色処理を行った。切断断面をASEMで観察すると、表面近傍の核が特に明るく観察できた。核の形状は明瞭であり、細胞突起様繊維も弱く染色された。

核のサイズは手術中の迅速癌診断における最も重要な指標である。これまで組織をクライオ薄切し、ヘマトキシリン・エオジンで染色して顕微鏡で決定していた。しかし、クライオ薄切は、難しく、全過程に15-30分必要で、その間手術は中断していた。また、その困難さから通常、診断は術後にパラフィン薄切や、時には抗体を用いて確認される。ASEMは組織の薄切を必要としないため、術中診断を早める可能性がある。ここで電子のシミュレーション結果によれば、ASEMは表面のみならず数 μm の深さまでを見ていると推測される。

免疫EMで標準的な脱水過程は、時に繊細なエピソードを保持するには乱暴である。脱水せずに水溶性樹脂に直接包埋することも可能だが、一般に水溶性樹脂の薄切は容易ではない。薄切作業が要らないASEMは、必要な前処理が固定・標識のわずか10分程度であるため、免疫EMのスループットを向上させられると思われる。薄膜ディッシュの多孔化によりさらなる高効率化が期待され、試薬のスクリーニングのようなステップにも応用可能と思われる。

5.4 SiN 薄膜

電子線は、照射時と検出時とで薄膜を2回通る。そのため、ASEMの分解能決定要素の一つとして、電子線透過膜の品質、特に厚さと平坦さが挙げられる。SiN薄膜の製作精度を上げるためここではCVDプロセス²⁹⁾とウェットエッチングを用いている。膜を薄くすると、電子線散乱から理論的に予想されるように、分解能は徐々に向上する。特に電子線の浸透力が弱い低加速電圧においてこの傾向は顕著である。我々は僅か10nmの厚み(SiもしくはN原子おおよそ100個分)しかないSiN薄膜の製造に成功し、二気圧の圧力差に耐性があることを確認した。しかし、商業機では膜破壊の可能性を極力低減するために、100nm厚を採用している。

本論文では、開放型試料室をもつ全く新しい走査電子顕微鏡ASEMを解説した。自由度の高い試料操作が可能で、高分解能(8nm, SiN 30nm使用)で高スループットが特徴である。電子線照射ダメージが想定されるので、観察前に試料固定が必要になる。基礎生物学のみならず、創薬、病原菌診断、食物科学、化粧品、ポリマー分野でのメゾスコピックスケール観察に広く利用できる。特に電子線耐性のある金属、セメント、そしてナノマテリアルでは、ASEMは、固定無しで動的観察ができる。

謝 辞

ASEMシステムの製作では、日本電子テクニクス(株)の露木誠氏、佐藤猛氏、石森能夫氏、薄膜の製作では、山形県工業技術センターの渡部善幸博士の御協力に感謝いたします。本研究は、産業技術総合研究所とJEOLとのマッチングファンドの支援を受けている。

文 献

1) Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Rattmeyer, L.S. and Wilson, W.D.: *Biochemistry*, 31, 3103-3112 (1992)

2) Inaga, S., Katsumoto, T., Tanaka, K., Kameie, T., Nakane, H. and Naguro, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, 70, 43-49 (2007)

3) Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W.: *Science*, 298, 1209-1213 (2002)

4) Leis, A., Rockel, B., Andrees, L. and Baumeister, W.: *Trends Biochem. Sci.*, 34, 60-70 (2009)

5) Frank, J.: *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*, Oxford University Press, New York (2006)

6) Fujiyoshi, Y.: *Advan. Biophys.*, 35, 25-80 (1998)

7) Henderson, R.: *Q. Rev. Biophys.*, 37, 3-13 (2004)

8) McPherson, A.: *Preparation and Analysis of Protein Crystals*, Krieger Publishing (1989)

9) Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A. and Fujiyoshi, Y.: *Nature*, 409, 1047-1051 (2001)

10) Abrams, L.M. and McBrain, J.W.: *J. Appl. Phys.*, 15, 607-609 (1944)

11) Fukami, A., Fukushima, K. and Kohyama, N.: *Microstructure of Fine-Grained Sediments: from Mud to Shale*, Springer, Heidelberg (1990)

12) Fukushima, K., Ishikawa, A. and Fukami, A.: *J. Electron. Microsc.*, 34, 47-51 (1985)

13) Butler, E.P. and Hale, K.F.: *Dynamic Experiments in the Electron Microscope*, Vol. 9, North-Holland, New York (1981)

14) Daulton, T.L., Little, B.J., Lowe, K. and Jones-Meehan, J.: *Microsc. Microanal.*, 7, 470-485 (2001)

15) Fullam, E.F.: *Rev. Sci. Instrum.*, 43, 245-247 (1972)

16) Parsons, D.F.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 483, 157-160 (1986)

17) Swift, J.A. and Brown, A.C.: *J. Phys. E*, 3, 924-926 (1970)

18) Jonge, N.D., Peckys, D.B., Kremers, G.J. and Piston, D.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 2159-2164 (2009)

19) McMullan, D.: *Proc. Inst. Electr. Engrs*, 100 (1953)

20) Reimer, L.: *Scanning Electron Microscopy*, Springer-Verlag (1998)

21) Zworykin, V.A., Hillier, J. and Snyder, R.L.: *ASTM Bull.*, 117, 15-23 (1942)

22) Danilatos, G.D.: *J. Microsc.*, 121, 235-238 (1981)

23) Danilatos, G.D.: *J. Microsc.*, 162, 391-402 (1991)

24) Robinson, V.N.E.: *J. Microsc.*, 103, 71-77 (1975)

25) Thiberge, S., Nechushtan, A., Sprinzak, D., Gileadi, O., Behar, V., Zik, O., Chowars, Y., Michaeli, S., Schlessinger, J. and Moses, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3346-3351 (2004)

26) Thiberge, S., Zik, O. and Moses, E.: *Rev. Sci. Instrum.*, 75, 2280-2289 (2004)

27) Green, E.D. and Kino, G.S.: *J. Vac. Sci. Technol. B*, 9, 1557-1558 (1991)

28) SPI.

29) Hwang, H.L., Hwe, C.C., Liue, J.C. and Lin, H.H.: *Appl. Phys. Lett.*, 41, 844-846 (1982)

30) Hsu, T.R.: *MEMS & Microsystems: Design, Manufacture, and Nanoscale Engineering*, John Wiley & Sons (2008)

31) Sze, S.M.: *VLSI technology*, McGraw-Hill (1998)

32) Sze, S.M.: *Semiconductor Devices: Physics and Technology*, John Eiley & Sons (2001)

33) Goldstein, J.I., Newbury, D.E., Echlin, P., Joy, D.C., Romig, A.D., Lyman, C.E., Fiori, C. and Lifshin, E.: *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Vol. 2nd Ed., Plenum, New York (1992)

34) Joy, D. and Joy, C.S.: *J. Microsc.*, 221, 84-88 (2006)

35) Merli, P.G., Migliori, A., Nacucchi, M., Govoni, D. and Mattei, G.: *Ultramicroscopy*, 60, 229-239 (1995)

36) Nisshin-EM.

37) Hell, S.W.: *Science*, 316, 1153-1158 (2007)