



電子直接検出カメラ (direct electron detector) の TEM への応用

Application of Direct Electron Detector for TEM

宮崎 直幸, 村田 和義*

Naoyuki Miyazaki and Kazuyoshi Murata

自然科学研究機構生理学研究所

要旨 CMOS イメージセンサーを用いた電子直接検出カメラ (Direct electron detector: DED) が開発され, 次世代の透過電子顕微鏡用撮像媒体として注目されている. DED はその構造原理から CCD に比べて高い解像度と感度を持つことから, クライオ電子顕微鏡などの低照射観察への応用が期待される. また連続高速撮影が可能のため, 試料経時観察やドリフト補正などにも利用される. 本稿ではその DED の仕組みと性能, そしてこれを利用した最近の応用研究を紹介する.

キーワード: CMOS イメージセンサー, クライオ電顕, 高速撮影, CCD, 試料ドリフト補正

1. はじめに

透過電子顕微鏡 (TEM) の画像記録媒体として, 以前は電子線フィルムが用いられていたが, 効率的にデータが収集できるデジタル媒体の CCD (Charge-coupled device) カメラが現在広く普及してきている. しかし CCD カメラは照射ダメージを受けやすくまた信号が飽和しやすいため, カメラに直接電子線を当てることができない¹⁾. そのため電子は CCD カメラの手前に置かれたシンチレーターで光子に変換され, 光ファイバーやミラーを使って CCD 画素上に転送される. その結果, 電子-光子変換過程において, 光子の点広がりによる解像度の低下が CCD カメラ上で発生する. また, データの読み出しを画素間の転送によって行うため, データを読み出している間はカメラを使うことができず, 高速連続撮影には向かないという欠点もあった.

近年, 半導体技術の進歩によって CMOS (相補性金属酸化膜半導体: Complementary metal oxide semiconductor) を用いた固体撮像素子が利用できるようになってきた. CMOS イメージセンサーは, 検出器 (CMOS) と増幅器 (APS: Active pixel sensor) がオンチップ上で構成された撮像素子で,

構造的にスマイヤやブルーミングが起らず, 数百 MHz での高速読み出しが可能である. しかも安価に大量生産でき, CCD と比較して消費電力が少ないため, CCD に変わる撮像素子としてデジタルカメラや携帯電話カメラにおいて近年爆発的な普及を見せている. 電子顕微鏡の分野では, この CMOS イメージセンサーをもとにして電子を直接検出するカメラ (Direct electron detector: DED) の開発が 2000 年代になって進められ, 昨今各機器メーカーから販売されるようになった. この DED は電子-光子の変換がなく電子を直接検出するため, 点広がりによるボケがおこらない. そして, 各ピクセルに付随した APS が直接信号を読み出すので, 高い解像度とシグナルノイズ比 (S/N 比) が実現できるのに加えて, 読み出し速度も早くなるので連続高速画像記録が可能である. これらの特性を利用して, 低照射量で高いコントラストが必要となるクライオ電顕や, 経時観察が必要な場合観察および反応科学電顕への応用が始まっている. そして最近では 30 μm 程度まで DED を薄く加工できるようになったため, 背面反射 (back scattering) の影響が少なくなり, 超高圧電顕など高加速電子の検出にも利用できるようになってきた. 本稿では, この DED の仕組みと性能, そして応用例について紹介する.

2. DED の仕組みと特徴

DED の特徴である高い感度と解像度の秘密はその構造にみることができる. 従来の電顕用 CCD カメラと DED との構造比較を図 1 に示す. CCD カメラを使った撮影では, 検出器に入ってくる電子を撮像素子の前面にあるシンチレーターで光に変換し, それを光ファイバーによってセンサーまで伝達させた後, 光電変換により電荷として蓄えてイメージを記録する (図 1a). この方法だと, 電子がシンチレーターで光に変換される場所で信号が広がってボケが生じるうえ, 光子が光ファイバーで伝えられるときにロスやノイズをとまらう. その結果, 高解像度に行くほど画像に含まれる情報量の減衰が大きく (MTF: Modulation transfer function が悪く) なる. これは同じシンチレーター方式を採用している一部の CMOS カメラでも同様である. それ故に CCD カメラを用いた場合は, 一般にフィルムで撮影する時よりも高い倍率で撮影しなければならなかった²⁾. 一方, DED はシンチレーターを使用せずに CMOS イメージセンサーで直接電子を検出するため, シンチレーター方式においてみられたようなボケが抑えられ, 解像度の高い (MTF の良い) 像が得られるのが特徴である (図 1b)^{3~5)}.

その上 CCD と DED では信号読み出し方式の違いにより, その読み出し速度が全く異なる. 電顕用のフルフレームトランスファ型 CCD カメラでは, 画像情報はまず垂直転送用 CCD に電荷として蓄えられる. そしてデータを読み出す時は, 各画素に蓄えられた電荷を順次隣の CCD 画素に受け渡していき, 最後に増幅して出力している (図 2a). このフレームトランスファー機構は電荷のパケツリレーに例えられ,

* 〒 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38
TEL: 0564-55-7872
E-mail: kazum@nips.ac.jp
2012 年 12 月 14 日受付

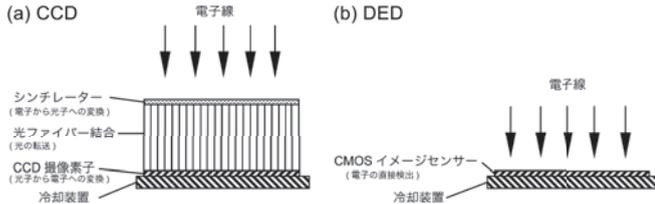


図1 CCDとDEDの検出原理。(a) CCDでは電子はCCD素子の手前に置かれたシンチレーターで光子に変換され、光子は光ファイバーを使ってCCD上に導かれて検出される。(b) DEDでは電子は直接CMOSイメージセンサーによって検出される。

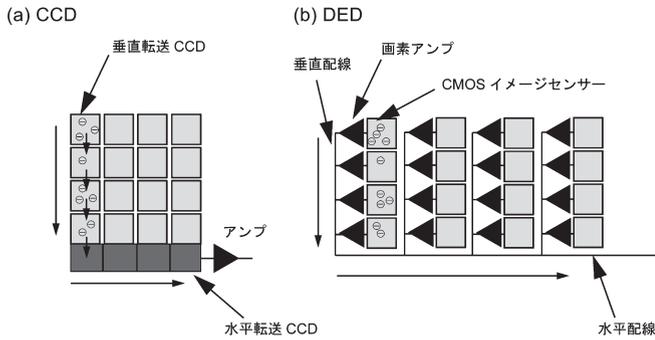


図2 CCDとDEDのシグナル読み出し機構。(a) CCDでは光によって生じた電荷シグナルを順次隣の画素に転送し、最後に出力回路で増幅して利用する。(b) DEDでは各画素に増幅器(APS: Active pixel sensor)が組み込まれており、電荷シグナルをその場で増幅して直接読み出す。CCDの様に電荷を隣の画素に受け渡すことをしないので、圧倒的に読み出しが速い。

SlowScanCCDと呼ばれるようにデータ転送に非常に時間がかかってしまう。さらに各画素で電荷が飽和してしまった場合に、ブルーミングを起す原因にもなる。一方、CMOSをもとに開発されたDEDではCMOSイメージセンサー1個につきアンプ1個が対をなす構造となっており、各画素における電荷はその場で増幅され直接出力される。そのため電気ノイズが乗りにくい上に読み出しが早い(図2b)。さらにその仕組みから特定の画素を指示して必要な領域のデータを読

み出す事もできる(X-Yアドレッシング機能)。

3. DEDの性能

次に、DEDのすぐれた性能を紹介する。図3aはビームストップャーによるナイフエッジ像をDEDとCCDで比較したものである。一般に使用されている300kV電顕用CCDカメラでは加速された個々の電子がCCD上で30 μm 程度にまで広がって検出されると言われている。従って画素サイズが15 μm のCCDカメラでナイフエッジ像を撮影すると、エッジが数画素に広がってしまう。これに対して電子をそのまま検出できるDEDでは、電子-光子変換に伴う点広がりがないので、シャープなナイフエッジ像が得られる。これは空間解像度の減衰が少ないことを示しており、電子線フィルムに近い優れたMTF特性を持っていることがわかる(図3b)。また、DEDでは各画素で信号が増幅されてから読み出されるので電気ノイズに強く高いS/N比が得られる。このことによってCCDに比べ高周波成分の量子検出効率(Detective quantum efficiency: DQE)が顕著に改善する(図3c)^{3,6)}。実際、クライオ電顕の単粒子解析において、Nyquist frequency(サンプリング出来るもっとも高い周波数)に対する到達分解能の値を比べると、CCDでは $\sim 2/3$ (0.66) Nyquist^{7,8)}であるのに対して、DEDでは $\sim 3/4$ (0.75) Nyquistであった²⁾。この結果はDEDの方が実際に高周波成分の減衰が少ないということを表している。

DEDのもう一つの優れた性能としては、前項で述べたように信号読み出し速度が非常に早いことである。その性能はメーカーによって40~400フレーム/秒と様々である。DEDの撮影ではこの高速読み出し機能を使って、一枚の写真を短い時間にフレーム分割して取得することができる。その機能の応用としては、短時間で進行する現象の経時観察や試料ドリフトの補正がある。試料ドリフトの補正では、試料の動きをフレーム毎に補正して足し合わせることで、像質を改善することができる(詳細は次項で述べる)。さらにこの機能を応用すれば、カメラの画素サイズよりも小さい(サブ

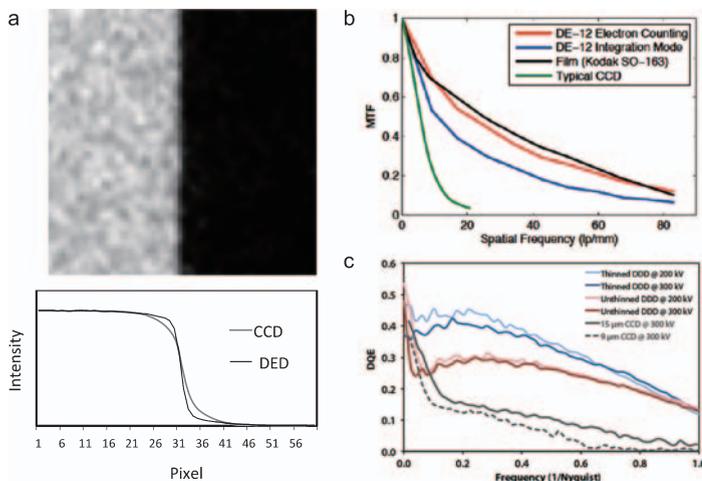


図3 CCDとDEDの性能比較。(a) ナイフエッジ像とその1次元プロファイル。CCDではエッジがなだらかな(ボケている)のに対し、DEDではよりシャープになることがわかる。(b) MTF特性曲線。ナイフエッジ像をフーリエ変換することで、空間解像度の減衰量を見積もることができる。DED(DE-12)のMTFはCCDのものよりも遙かに良く、フィルム(SO-163)のそれに近いことがわかる。(c) CCDとDEDの量子検出効率(DQE)の比較。DED(DDD)はCCDと比較して非常に高いDQE値をもつ。基板部を薄く削ったThinned DDDでは、低い空間周波数においてさらに高い値を示す。(b)と(c)のデータはDirect Electron LP社の好意による。

ピクセル) 情報を取り出すことも可能である (超解像撮影). この超解像技術は入射する電子一つ一つを検出できる程度の高速フレームレートにおいて, 電子が各画素のどの四隅に入射したかを検出するというものである. Gatan 社製の DED の K2 Summit では, このシングル電子カウンティングモードによる超解像撮影がすでに導入されている. この手法は, 光学顕微鏡の分野で用いられている PALM (Photoactivated localization microscopy) や STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy) と呼ばれる超解像技術で採用されているものと原理的に同じである.

DED の欠点としては, センサー自体が直接高エネルギーの電子線に曝されるため, センサーが劣化し感度が次第に低下していくということがある. しかし改良が進みセンサーの寿命も延びてきており, その問題も克服されつつある. 通常の研究室の使用で1年かそれ以上継続して使用することが充分可能になってきている.

4. DED の応用例

本節では DED の優れた性能を利用した実際の応用例を紹介する. まず DED の高速読み出し機能を利用した研究を紹介する. 高速読み出し機能を利用する利点は, 前項で述べたように露光時間中に生じた試料ドリフトを補正できることにある. フィルムや CCD を用いたこれまでの撮影法では, 露光時間中に試料が動いてしまうと, それはそのまま像のボケに繋がっていた. 一方 DED ではそれを多数のフレームに分割して撮影できるので, その動きを補正できる. この試料ドリフトには, 大きく分けて試料ステージの不安定性に起因するもの (stage drift) と電子線照射に誘起されたもの (beam induced movement) がある. 特にクライオ電顕では, 以前から電子線照射によって氷包埋された試料が動くことが示唆されていた⁹⁾. そしてこの電子線照射に誘起された試料の動きが最近 DED を使用して詳しく調べられた¹⁰⁾. Brilot らは Direct Electron 社製の DED : DE-12 (4k × 3k 画素) を用いて, 氷包埋したロタウイルス粒子が露光中にどのように動いているかを $20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2 \cdot \text{s}$ の電子線量で 0.25 秒ごとに記録した. その結果, ウイルス粒子を包埋した氷の膜が電子線照射に誘起されて, カーボン支持膜の穴の中で太鼓の膜が振動するよ

うに動くことが分かった (図 4a-e). そして, この試料ドリフトによって 1.5 秒露光の間にウイルス粒子が最大 70 \AA 動いていた. さらに, 彼らはこのウイルス粒子の移動をフレームごとに補正することによって, ウイルス粒子の微細な構造情報を回復することに成功している (図 4f-g).

我々の研究グループでは, DED と薄膜位相差クライオ電顕¹¹⁾ とを組み合わせて使用することにより以下のような良い結果を得ている. 通常クライオ電顕を使用して単粒子構造解析用のイメージを撮影する場合, $20 \text{ e}^-/\text{\AA}^2 \cdot \text{s}$ 以下の電子線量で 1 秒間程度露光する. 例えば, DED を使って $10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2 \cdot \text{s}$ の電子線量で 10 フレームに分割して 1 秒間撮影したとすると, 1 フレームあたりの電子線量はわずか $1 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ になってしまふ (図 5). この場合 DED の感度がいくら良くても非常にコントラストの低いイメージになってしまい, フレーム間でアライメントを行う際に精度が上がらず, ドリフト補正が上手く働かない. これに対して, 薄膜位相差電顕は低照射像においても高いコントラストを示すため, 分割され照射量が 10 分の 1 となった個々のフレームにおいても十分なコントラストが得られ, フレーム間での試料ドリフトを精度良く補正することができる. このことはクライオ電子線トモグラフィーにも応用できる. クライオ電子線トモグラフィーでは, 一つの視野を $\pm 60 \sim 70^\circ$ の範囲で傾斜させながらイメージを取得しなければならないので, 一枚あたりの電子線量は $1 \sim 2 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ 程度になってしまい, 図 5a に示した単粒子構造解析のフレーム分割像のようにコントラストの低い像になる. そこで通常は金コロイドなどの位置マーカー (fiducial marker) を試料に混入させなければならない. ところが DED と薄膜位相差電顕を組み合わせて用いることで, 位置マーカーを混入できないような試料においてもトモグラフィーのための傾斜画像の正確なアライメントが可能となる (データ省略).

最後に DED の超高压電子顕微鏡への応用について紹介する. DED のもう一つの利点として, 一台で幅広い加速電子の検出に使えることが挙げられる. メーカーの性能表では $60 \text{ keV} \sim 1.25 \text{ MeV}$ となっており, これは CCD では不可能な特筆すべき性能である. CCD ではシンチレーターによって電子を光子に変換するが, シンチレーターの変換効率には電子のエネルギーによって大きく異なるため, 同一のシンチ

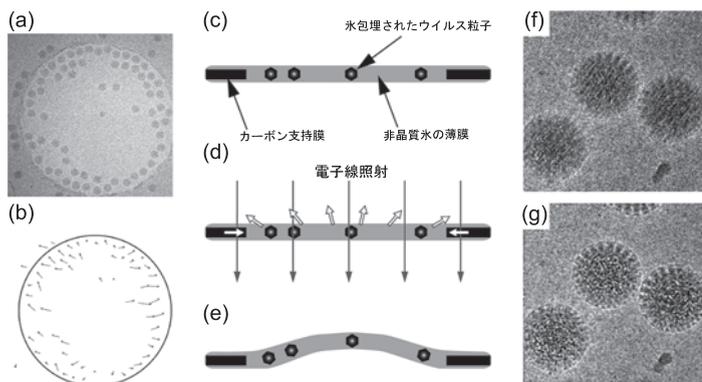


図 4 DED のフレーム分割撮影による試料ドリフトの観察. 試料として膜穴グリッドに氷包埋したウイルス粒子が用いられた. (a) 電子線照射によるウイルス粒子の移動の軌跡 (b) 軌跡は 1.5 秒露光を 6 フレームに分割して記録された. 電子の照射前 (c), 照射中 (d), 照射後 (e) の氷とウイルス粒子の様子. 電子照射によりカーボン支持膜の穴が収縮し, 太鼓の皮が振動する様に氷の膜が動いて変形すると考えられた. そしてこれをフレーム間で補正して積算することにより像質の改善がみられた. (f) 補正なし. (g) 補正あり. 以上 Brilot et al., 2012¹⁰⁾ より改変して転載.

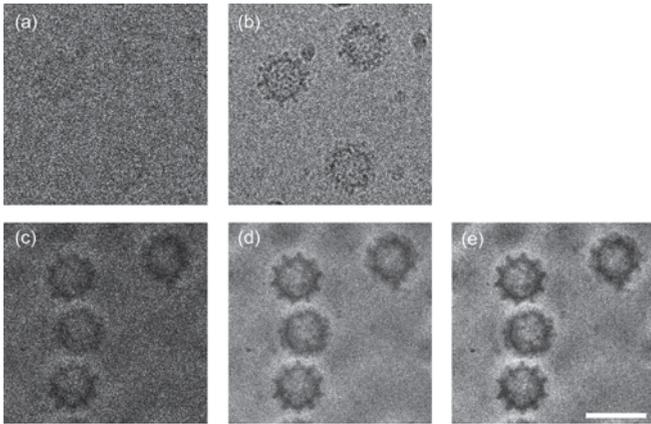


図5 DEDの薄膜位相差クライオ電顕への応用. 氷包埋ウイルス粒子(サボウイルス)像を照射量 $10 \text{ e}^-/\text{\AA}^2 \cdot \text{s}$ でクライオ電顕の通常法と薄膜位相差法で観察した. ウイルス粒子はDEDで1秒の露光時間を10フレームに分割して記録された. 通常法による1フレーム像(a)と10フレームの積算像(b). 薄膜位相差法による1フレーム像(c)と10フレームの積算像(d), さらにドリフト補正を行った積算像(e). この実験では, 通常法は各フレームのコントラストが低く, ドリフト補正が上手く働かなかったが, 薄膜位相差法では同じ条件で高いコントラストが得られるため, ドリフト補正が可能であった. スケール 100 nm.

レーターで効率よく検出できる電子線の範囲は非常に狭い. さらに制動X線によるノイズの影響が顕著であるため, 高い加速電圧の電顕ではCCDカメラを光軸上に置くことができない. よって, 超高圧電顕用のCCDカメラでは, ミラーなどを使って光に変換した画像を光軸外に結像する必要があり, 非常に高価な装置になる. これに対してDEDでは, 素子が薄いためX線によるノイズの影響が少ない. さらに最近ではBackthinnedと呼ばれる素子の基板部をさらに薄く削った製品が開発されており, 後方の基板からくる背面反射も少なく抑えられ, DQEも顕著に向上している(図3c). 図6にDEDを使って記録した加速電圧1MVのカーボングラファイトの像を示す. DEDは光軸上に置かれているのにもかかわらず, このようにバックグラウンドノイズの少ないシャープな像が得られている. 1 MeVのような高加速電子では散乱断面積が小さくなるためどうしても量子検出効率(DQE)は下がってしまうが, それでも200 keV (1/2 Nyquistで30%)の電子に比べても3割程度(1/2 Nyquistで20%)の減衰に留まっている(データ省略). これらのことからDEDは超高圧電顕においても安価でしかも有効な撮像媒体であるといえる.

5. おわりに

DEDは実用化されてまだ数年しか経っていないが, 既に従来のCCDに比べ様々な点で優れていることが本稿で紹介したように示されてきている. 今後さらに改良が進み, その優位性は確たるものとなるであろう. そしてこれまで捉えられなかったような物理現象, 化学反応, そして生命現象が, その優れた描画力により可視化され, 解明されていくものと期待される.

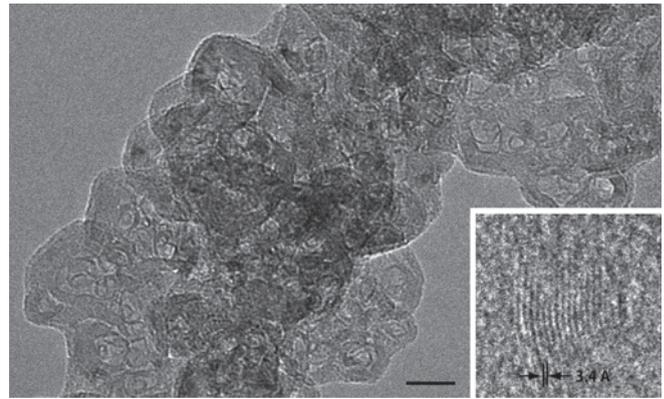


図6 DEDの超高圧電顕への応用. 1 MeVの加速電子によるカーボングラファイト像をDEDで記録した. 光軸上に置かれたDEDによる直接撮像にもかかわらず制動X線によるノイズの影響のほとんどないシャープな像が得られた.

謝 辞

本稿を執筆するにあたって, Direct Electron, LPのLiang Jin博士, Dong-Hua Chen博士, ならびにテガサイエンス(株)の近藤信也氏には, DE-12カメラのデモならびに技術支援を頂きました. 薄膜位相差電子顕微鏡JEM-2200FSの使用は生理学研究所の永山國昭教授のご厚意に依ります. 超高圧電子顕微鏡は, 生理学研究所のH-1250Mを使用させて頂きました. ウイルス粒子の試料は国立感染症研究所の片山和彦博士にご提供頂きました. ここに感謝の意を表します.

文 献

- 1) Roberts, P., Chapman, J. and MacLeod, A.: *Ultramicroscopy*, **8**, 385–396 (1982)
- 2) Bammes, B.E., Rochat, R.H., Jakana, J., Chen, D.-H. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **177**, 589–601 (2012)
- 3) Jin, L., Milazzo, A.-C., Kleinfelder, S., Li, S., Leblanc, P., Duttweiler, F., Bouwer, J.C., Peltier, S.T., Ellisman, M.H. and Xuong, N.-H.: *J. Struct. Biol.*, **161**, 352–358 (2008)
- 4) Milazzo, A.-C., Moldovan, G., Lanman, J., Jin, L., Bouwer, J.C., Kleinfelder, S., Peltier, S.T., Ellisman, M.H., Kirkland, A.I. and Xuong, N.-H.: *Ultramicroscopy*, **110**, 741–744 (2010)
- 5) Milazzo, A.-C., Cheng, A., Moeller, A., Lyumkis, D., Jacovetty, E., Polukas, J., Ellisman, M.H., Xuong, N.-H., Carragher, B. and Potter C.S.: *J. Struct. Biol.*, **176**, 404–408 (2011)
- 6) Bammes, B.E., Rochat, R.H., Jakana, J. and Chiu, W.: *J. Struct. Biol.*, **175**, 384–393 (2011)
- 7) Chen, J.Z., Sachse, C., Xu, C., Mielke, T., Spahn, C.M.T. and Grigorieff, N.: *J. Struct. Biol.*, **161**, 92–100 (2008)
- 8) Zhang, J., Baker, M.L., Schröder, G.F., Douglas, N.R., Reissmann, S., Jakana, J., Dougherty, M., Fu, C.J., Levitt, M., Ludtke, S.J., Frydman, J. and Chiu, W.: *Nature*, **463**, 379–383 (2010)
- 9) Wright, E.R., Iancu, C.V., Tivol, W.F. and Jensen, G.J.: *J. Struct. Biol.*, **153**, 241–252 (2006)
- 10) Brilot, A.F., Chen, J.Z., Chen, A., Pan, J., Harrison, S.C., Potter, C.S., Carragher, B., Henderson, R. and Grigorieff, N.: *J. Struct. Biol.*, **177**, 630–637 (2012)
- 11) Nagayama, K.: *Eur. Biophys. J.*, **37**, 345–358 (2008)