

イオンビームシリアルミリング法の 生物系試料への応用

Applications Using Ion-Beam Serial Milling and Reconstruction Technique in Life Science

完山 正林, 村田 薫, 鈴木 直久

Shoji Sadayama, Kaoru Murata and Naohisa Suzuki

日本エフイー・アイ株式会社 ナノポートジャパン

要旨 FIB/SEM 装置は、材料系分野で重要な装置として知られている。FIB/SEM 装置を使ったイオンビームによるシリアルミリング法は、スライス断面の作製/断面観察というサイクルを繰り返すことで得られる二次元の断面観察像群をコンピュータで三次元再構築させる手法である。シリアルセクションング法の1種として材料系試料で発展した手法であるが、近年生物系試料にも適用する事例が増えてきた。本稿では当手法の詳細について紹介する。

キーワード: 集束イオンビーム, SEM, シリアルセクションング, iSR, 生物系

1. はじめに

集束イオンビーム (FIB) 装置は、細く絞った Ga イオンビームをターゲット領域に照射することで数 nm ~ 数百 μm レベルの微細加工を可能にするツールである。この画期的な装置の原形は、1979年の Seliger らの発表^{1,2)} にさかのぼる。Seliger らの装置のビーム径は 100 nm、電流密度は 1 A/cm² 程度の性能であったが、当時としては画期的に高輝度なイオンビーム装置であったため様々な研究者たちの注目を集めた。そのアプリケーションも単なる微細加工にとどまらず、特定箇所の断面構造観察や透過電子顕微鏡 (TEM) 試料作製などにも及んだ^{3~5)}。

1990年代半ばになると生物系分野でも FIB 装置の活用事例報告が散見されるようになってきた。最初のアプリケーション例は歯など無機材料に近い試料の断面観察事例であった⁶⁾ が、2000年以降は樹脂包埋した生体試料を対象にした事例報告も増えてきた^{7~11)}。

このころから FIB 装置はさらに進化し、同一チャンパー内に FIB 装置と走査型電子顕微鏡 (SEM) を搭載した FIB/SEM (DualBeamTM, FEI) 装置が開発された。この装置は SEM 鏡筒と FIB 鏡筒それぞれのビームが、試料上の同一箇

所を異なる方向から照射されるよう設計されている。図1(a)に DB 装置で行う断面加工の模式図を示す。この装置の発明は、上記の従来型 FIB アプリケーションに加え新たな応用例ももたらした。その中の重要な1つに DB 装置を用いたイオンビームによるシリアルミリング三次元再構築法 (ion-beam Serial milling and Reconstruction; iSR) 法がある。iSR 法を紹介する前に、まず従来のシリアルセクションング法^{12~18,20)} について説明する。

2. 材料系分野におけるシリアルセクションング法とその歴史

シリアルセクションング法とは、試料の連続断面スライス作製とスライス毎の断面観察を交互に行うことで得られる多数の二次元連続画像を元にして試料の三次元像を再構築する手法である。シリアルセクションング法で使用される断面スライス方法は、FIB 以外の手法と FIB を使う手法が存在する。FIB 以外の手法としては、例えば Li らが機械式研磨機を用いてアルミニウム合金試料を断面スライス加工し、その加工面を光学顕微鏡観察するというプロセスを繰り返して三次元再構築する事例を報告している¹²⁾。

この断面スライス加工に FIB を用いる手法が発表されたのは 1990 年代に入ってからで、材料系分野が最初である。例えば Dunn らが、FIB 装置に四重極質量分析計 (Qmass) を装備し、断面スライス加工時に発生する二次電子および二次イオン情報を三次元構築する事例を報告している¹³⁾。この FIB に Qmass を取り付けたシリアルセクションング法は、

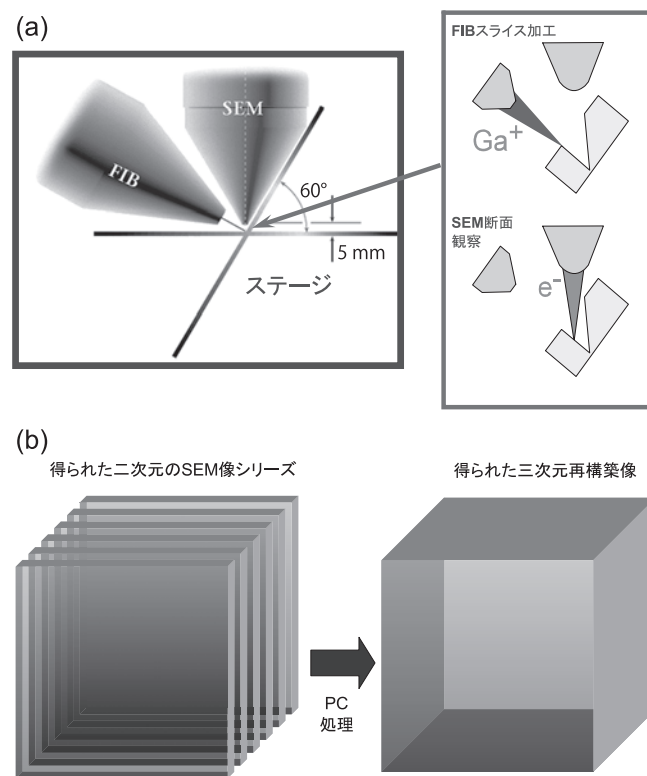


図1 FIB/SEM 装置と三次元構造解析手法の概略図

特に Image Depth Profiling 法と呼ばれ、二次イオン質量分析計 (Secondary Ion Mass Spectroscopy; SIMS) 法の 1 種として 1990 年代後半にいくつか報告例がある^{14,15)}。また Inkson らは SEM 鏡筒がついていない単体 FIB 装置を使って、スライス加工と断面観察像群を試料ステージ傾斜を繰り返すことで取得し三次元構築した事例を報告している¹⁶⁾。なお Inkson はこの手法を 3D FIB Tomography 法と呼んでいる。

一方生物系試料ではダイヤモンドナイフを使用する例がほとんどである。例えば White らは、線虫の 1 種である *Caenorhabditis elegans* をダイヤモンドナイフと TEM を用いて約 8000 枚もの画像をもとに、その全体像を再構築した事例について報告しており¹⁷⁾、Harris はラット海馬神経細胞樹状突起 (dendrite) の断面 TEM 像から 7 μm 長の三次元再構築像を作製して樹状突起棘 (dendritic spines) を見事に再現した事例を報告している¹⁸⁾。

近年のエレクトロニクスおよびパーソナルコンピュータ (PC) の発達で、装置データのデジタル化が進んだことや AMIRA™, AVIZO™ (<http://www.maxnt.co.jp/>) 等の市販の三次元再構築専用ソフトウェアも充実したこと、膨大な枚数を用いて三次元処理する必要のあるシリアルセクションング法も見直されてきた。近年の例では Denk らがマイクロトムの切り出しと SEM 観察のプロセスを繰り返してシナプスの三次元再構築を行った事例を報告している¹⁹⁾。なお Denk らはこの手法を Serial Block-Face Scanning Electron Microscope (SBFSEM) 法と呼んでいる。

3. iSR 法

iSR 法は、断面スライス加工に FIB を、スライス断面観察に SEM を用いる手法である。再構築手法は市販の三次元化ソフトウェアを用いて行うため、iSR 法と他手法で再構築時の違いはない。

前述した Image Depth Profiling 法は加工に FIB、観察に SIMS 像もしくは SEM による吸収電流像を使っているため、iSR 法の原型ともいえるものは 1990 年代には既に発表されていることになる。それが近年になって再度、同様の三次元再構築手法が注目を浴びているのには、PC の性能が大幅に向上した以外にも理由がある。それは従来の FIB を利用したシリアルセクションング方法と比較して、近年の FIB 鏡筒と SEM 鏡筒が急激に進歩したことである。つまり一定スライス幅の加工が高精度かつ正確に行われるようになったこと、1 スライスの加工が終わるごとに注目領域が常に画面中心となるように高分解能 SEM 観察および保存されること、またそれらのプロセスが全て自動的に行われるようになった等、ハード面の進歩が著しいことが挙げられる。

近年の PC の性能向上の恩恵で同様に注目されている他の三次元再構築法に、X 線トモグラフィ法²⁰⁾ や (S)TEM トモグラフィ法^{21,22)} がある。これらの手法には非破壊で試料の三次元構造が得られるという大きな利点があるが、基本的に試料の透過画像を元にして三次元再構築を行うため、再構築像

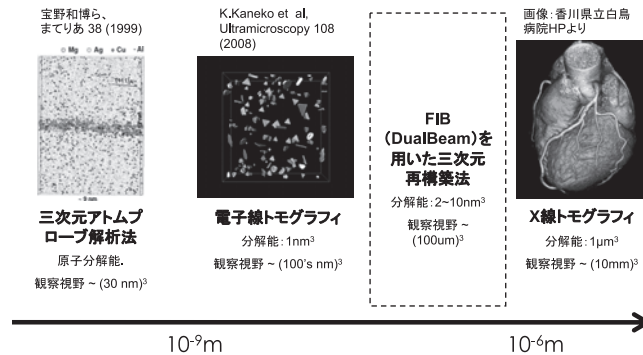


図2 様々な三次元構造解析手法とその位置づけ

の空間分解能は試料厚さに大きく依存する。

iSR 法は、原理的に観察像群の像質は何枚目であっても電子の試料への侵入深さ、加工スライスピッチでほぼ決まるため (後述)、三次元再構築像の空間分解能は理論的に試料厚を問わない。図 1 (b) および図 2 にこの手法の概略と他の三次元再構築手法との位置づけを示す。図 2 の横軸は空間分解能を表している。

市販の FIB/SEM 装置で iSR 法を適用した最初の事例報告は、2004 年に Holzer らから、チタン酸バリウム試料に適用した文献がある²³⁾。Holzer らはこの手法を FIB nano-tomography と呼んでいる。

一方生物系分野における iSR 法の適用事例は、Denk らの SBFSEM 法の報告以降になる。2006 年に Heymann らから酵母細胞やリンパ性腫瘍について iSR 法を適用した事例が報告されている²⁴⁾。その後、2008 年に Knott らが脳神経細胞の樹状突起について適用事例を報告している²⁵⁾。Knott らはこの手法を Serial Section Scanning Electron Microscope using FIB 法と呼んでいる。以降も、2009 年に Hekking らがアテローム性動脈硬化症の試料について適用した文献²⁶⁾ など、論文、学会での報告が続いている。

4. iSR 法の一般的な手順

iSR 法を適用する場合、試料には以下の前処理が必要となる。まず化学固定した試料を樹脂包埋し、ブロック染色することが必要である。この理由は、FIB によるスライス加工断面は非常に平滑で二次電子を用いた断面画像ではコントラストがつきづらく、反射電子を用いた原子番号コントラスト (Z コントラスト) 起因の断面画像を利用するためである。

次に樹脂包埋した試料をトリミング後、ダイヤモンドナイフを用いた加工で平滑断面を作製する。この時ターゲット箇所近傍が露出するまで加工することが望ましい。この理由は 2 つある。1 つは FIB 照射面付近に凹凸が存在すると、断面内にその形状を反映した加工跡、材料系分野で curtain と呼ばれるアーティファクト²⁷⁾ が入ってしまうためである。もう 1 つは FIB の焦点深度に起因する。FIB 加工深さが過剰に深いと FIB ビームのフォーカスぼけにより電流密度が低下してしまう。すると試料内に存在するエッチングレートが異な

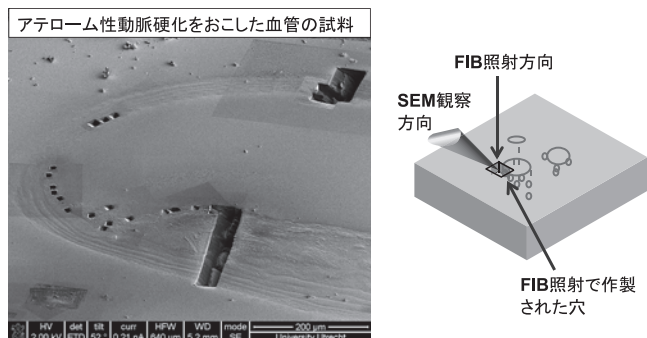


図3 iSR法に望ましい試料形状と模式図

る材質（生物系試料の場合、重金属と生体組織の結合の多少）に起因する curtain 現象により平滑な断面が作製できない。

ここまでの手順は TEM 試料作製時とほぼ同様になるが、iSR 法の場合、最後にスパッタ装置や蒸着装置等を用いて、作製した平滑断面上に導電性薄膜を成膜する必要がある。この理由は FIB および SEM が荷電粒子で電荷を帯びているためである。TEM の場合は試料が薄切されており、プローブに用いる電子は透過してしまうため像観察に際し影響を及ぼしにくい、一方 iSR 法の場合はブロック試料のため、加工・観察時に照射する荷電粒子の影響で試料がチャージアップを起こし、加工・観察の位置ズレなど悪影響を及ぼしやすい。そこでこの影響を極力排除する目的で、試料全体に導電膜を成膜する必要がある。iSR 法では FIB 加工した穴のいわば側面を SEM 観察するので原理上 FIB スライス加工面には導電膜はないが、加工面近傍に導電性膜が存在しかつ接地されているため、通常問題なくデータ取得が可能である。図3に上記手順で作製した試料とその模式図を示す。

5. iSR の生物系試料への応用事例

以下に iSR 法の応用事例を示す。

図4(a)はマウス小腸上皮組織の三次元再構築結果である。約 $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m} \times 8\ \mu\text{m}$ 厚のボリュームを $50\ \text{nm}$ のスライス幅でデータ取得を行っている。腸絨毛や細胞核等の組織内部構造が見事に再現されていることがわかる。図4(b)はマウス脳神経樹状突起の三次元再構築結果である。ミトコンドリア等の内部立体構造がきれいに再現されていることがわかる。

6. データ取得時の留意点

良好な再構築データを得るという観点から FIB によるスライス間隔はできるだけ細かくしたいところであるが、その際 SEM 観察に用いる加速電圧を考慮する必要がある²⁸⁾。すなわち電子線の interaction volume を考慮しないと、再構築結果に奥行き方向の情報が入ってしまう恐れがある²⁹⁾。例えば、試料をカーボン、電子線の入射角度を 38° (FEI 社製 FIB/SEM 装置の鏡筒配置)、加速電圧 $1\ \text{kV}$ と $10\ \text{kV}$ で電子線の侵入・脱出深さを計算させた結果を図5に示す。加速電圧 $1\ \text{kV}$ の反射電子の平均脱出深さは $3.04\ \text{nm}$ 、 $10\ \text{kV}$ のそ

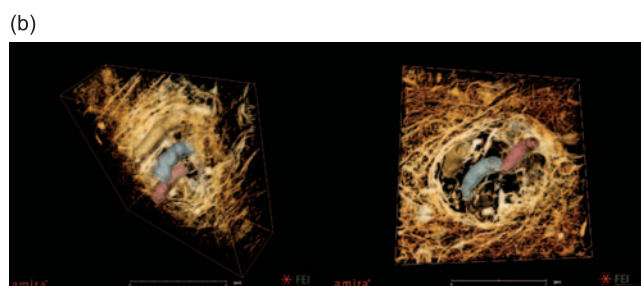
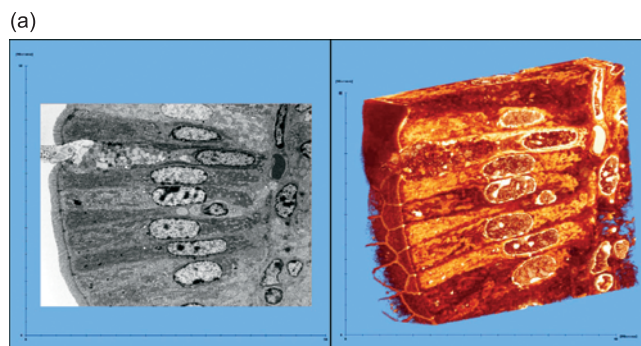


図4 iSAR法の応用例 (a) マウス小腸上皮組織の三次元再構築結果。Sample courtesy: Paul Matsudaira, NUS Singapore. (b) マウス脳神経細胞樹状突起の三次元再構築結果。Sample courtesy: FAIM, C Genoud, Friedrich Miescher Institute

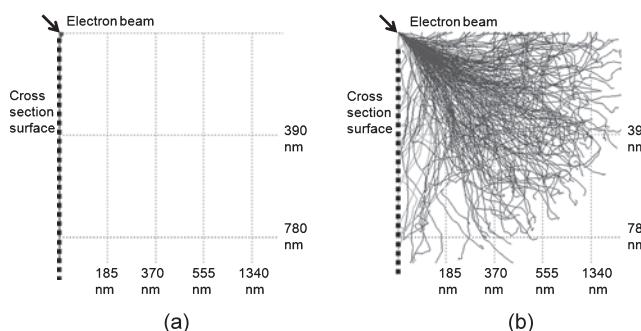


図5 モンテカルロシミュレーションによるカーボン試料に照射した入射電子の軌道計算結果。(a)加速電圧 $1\ \text{kV}$ の結果と(b)加速電圧 $10\ \text{kV}$ の結果。入射角 38° 、計算電子数 100000 個。

れは $146.2\ \text{nm}$ となった。これは加速電圧が $1\ \text{kV}$ の場合、少なくとも $3\ \text{nm}$ 程度もしくはそれ以上のスライス間隔を用いる必要があることを意味する。加速電圧 $10\ \text{kV}$ を用いる場合は $140\ \text{nm}$ 以上のスライス間隔を採用しないと奥行き方向の情報が断面像に入ってしまう、そのアーティファクトを完全に払しょくすることが難しくなる。

シミュレーションの結果から、iSR 法の空間分解能を議論する際、SEM 観察に用いるプローブのスポットサイズだけでなく interaction volume を考慮する必要があることがわかる。また SEM 平面分解能を上げる（プローブのスポットサイズを小さくする）ために加速電圧を上げて、interaction volume の広がりによって空間分解能は期待ほどには上がらないこともわかる。加えて FIB 照射による試料構成原子構造へのダメージ^{30,31)} を考慮すると、iSR 法で $10 \sim 20\ \text{nm}$ 以

下の空間分解能を議論するのは筆者としては疑問がある。それ以下の空間分解能で三次元構造の議論を行う必要がある場合は、電子線トモグラフィ法を利用の方が賢明であろう。

7. まとめ

以上生物系試料に関してのシリアルセクション法の歴史とiSR法について紹介してきた。本手法は、TEMで得られる二次元情報とはまた別の有効な知見が得られており、TEMトモグラフィとX線トモグラフィの守備範囲の隙間を埋める有効な手法の1つとして、現在さらなる注目を集めている。

生物系分野でのiSR法の更なる広がりを期待している。

文 献

- 1) Seliger, R.L., Ward, J.W., Wang, V. and Kubena, R.L.: *Appl. Phys. Lett.*, **34**, 310–312 (1979)
- 2) Seliger, R.L., Kubena, R.L., Onley, R.D., Ward, J.W. and Wang, V.: *J. Vac. Sci. Technol.*, **16**, 1610–1612 (1979)
- 3) Melngailis, J.: *J. Vac. Sci. Technol.*, **B5**, 469–495 (1987)
- 4) Kirk, E.C.G., Williams, D.A. and Ahmed, H.: *Inst. Phys. Conf. Ser.*, **100**, 501–506 (1989)
- 5) Tarutani, M., Takai, Y. and Shimizu, R.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **31**, L1305–L1308 (1992)
- 6) Giannuzzi, L.A., Prenitzer, B.I., Drown-MacDonald, J.L., Shofner, T.L., Brown, S.R., Irwin, R.B. and Stevie, F.A.: *J. Process Anal. Chem.*, **4**, 162–167 (1999)
- 7) 村中祥悟：医・生電顕技術会誌, **14**, 34–38 (1999)
- 8) Ballerini, M., Milani, M., Batani, M. and Squadrini, F.: Focused ion beam techniques for the analysis of biological samples: a revolution in ultramicroscopy?, *Proc. SPIE*, **4261**, 92–104 (2001)
- 9) Kamino, T., Yaguchi, T., Ohnishi, T., Ishitani, T. and Osumi, M.: *J. Electron Microsc.*, **53**, 563–566 (2004)
- 10) Milani, M., Ballerini, M., Batani, D., Squadrini, F., Cotelli, F., Donin, C.L.L., Poletti, G., Pozzi, A., Eidmann, K., Stead, A. and Lucchini, G.: *Eur. Phys. J-Appl. Phys.*, **26**, 123–131 (2004)
- 11) Drobne, D., Milani, M., Zrimec, A., Lešer, V. and Berden Zrimec, M.: *J. Microsc.*, **219**, 29–35 (2005)
- 12) Li, M., Ghosh, S., Rouns, T.N., Weiland, H., Richmond, O. and Hunt, W.: *Mater. Charact.*, **41**, 81–95 (1998)
- 13) Dunn, D.N. and Hull, R.: *Appl. Phys. Lett.*, **75**, 3414–3416 (1999)
- 14) Tomiyasu, B., Shibata, T., Owari, M. and Nihei, Y.: *Secondary Ion Mass Spectrometry SIMS X*, John Wiley & Sons, Chichester, 177–180 (1997)
- 15) Sakamoto, T., Cheng, Z., Takahashi, M., Owari, M. and Nihei, Y.: *Jpn. J. Appl. Phys.*, **37**, 2051–2056 (1998)
- 16) Inkson, B.J., Mulvihill, M. and Möbus, G.: *Scripta Mater.*, **45**, 753–758 (2001)
- 17) White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S.: *Philos. T. Roy. Soc. A*, **314**, 1–310 (1986)
- 18) Harris, K.M.: *Curr. Opin. Neurobiol.*, **9**, 343–348 (1999)
- 19) Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, **2**, 1900–1909 (2004)
- 20) Cormack, A.M.: *J. Appl. Phys.*, **34**, 2722 (1963)
- 21) De Rosier, D.J. and Klug, A.: *Nature*, **217**, 130–134 (1968)
- 22) Koster, A.J., Grimm, R., Typke, D., Hegerl, R., Stoschek, A., Walz, J. and Baumeister, W.: *J. Struct. Biol.*, **120**, 276–308 (1997)
- 23) Holzer, L., Indutnyi, F., Gasser, P.H., Münch, B. and Wegmann, M.: *J. Microsc.*, **216**, 84–95 (2004)
- 24) Heymann, J.A.W., Hayles, M., Gestmann, I., Giannuzzi, L.C., Lich, B. and Subramaniam, S.: *J. Struct. Biol.*, **155**, 63–73 (2006)
- 25) Knott, G., Marchman, H., Wall, D. and Lich, B.: *J. Neurosci.*, **28**, 2959–2964 (2008)
- 26) Hekking, L.H.P., Lebbink, M.N., Winter, D.A.M., Schneijdenberg, C.T.W.M., Brand, C.M., Humbel, B.M., Verkleij, A.J. and Post, J.A.: *J. Microsc.*, **235**, 336–347 (2009)
- 27) Giannuzzi, L.A. and Stevie, F.A.: *Micron*, **30**, 197–204 (1999)
- 28) Matthijs De Winter, D.A., Schneijdenberg, C.T.W.M., Lebbink, M.N., Lich, B., Verkleij, A.J., Drury, M.R. and Humbel, B.M.: *J. Microsc.*, **233**, 372–383 (2009)
- 29) 完山正林：日本顕微鏡学会第54回シンポジウム発表要旨集, 71–74 (2010)
- 30) Kato, N.I.: *J. Vac. Sci. Technol. A*, **17**, 1201 (1999)
- 31) 佐々木宏和, 加藤丈晴, 松田竹善, 平山 司：顕微鏡, **46**, 188–194 (2011)