



## TEM像に迫る、リターディング法を用いた樹脂包埋生物標本のSEM反射電子観察とFIB/SEMトモグラフィーへの応用

### Improved Block Face Imaging and FIB/SEM Tomography from a Resin-Embedded Biological Specimen Using Back-Scattered Electrons with a Retarding Method

太田 啓介, 中村 桂一郎  
Keisuke Ohta and Kei-ichiro Nakamura

久留米大学解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

**要 旨** 重金属染色した樹脂包埋生物試料のブロック表面からのSEM反射電子組成像は超薄切片のTEM像と同等の構造情報を持つ。この組成像の像質は試料台とカラムの間に負電圧をかけるリターディング法により劇的に向上し、TEM像に迫る分解能が得られる。FIB/SEMトモグラフィー法に應用するとTEMを用いた電子線トモグラフィー法に準ずる分解能でより大きな構造を解析できる。これらの新しい生物組織観察法は、偶然得られる良い断面図に頼ることのない確実な構造観察を可能にする。

キーワード：減速法、FIB/SEMトモグラフィー、生物試料、組成像

#### 1. はじめに

医学・生物分野の主な観察対象は細胞や組織である。近年の蛍光顕微鏡や超解像技術の発展により、蛍光物質を用いて描出されるものの微細構造はかなり詳細に観察できるようになってきた。一方で、蛍光物質で標識されているものは組織が持つ構造のほんの一部に限られることに注意しなければならない。目標物とその周囲の構造を含めた組織の特徴を詳細に把握するには構造全体を漏らさず観察できる透過電子顕微鏡(TEM)との併用が重要になる。細胞や組織は電子顕微鏡観察レベルで結晶構造のような規則性を持たないことから、これらの特徴を正確に把握するためには数多くの試料を観察し、その全体像を類推していくことが必要である。しかし、光学顕微鏡とTEMの分解能の差は大きく、両者の像解釈にしばしば乖離をもたらすことがある。これに対する一つの取り組みとして、同一の試料を光学顕微鏡から電子顕微鏡へ連続的に観察するCorrelative Microscopeという手法が知

られており<sup>1)</sup>、近年はこれをシステム化した装置の開発が進んでいる<sup>2)</sup>。

ここで、走査型電子顕微鏡(SEM)は低倍から高倍までを連続的に観察できる光学顕微鏡とTEMの中間的な位置に存在する。医学・生物学分野でSEM観察と言えば、二次電子による凹凸像観察が一般的であった。しかし、近年の低加速電圧SEM観察の進歩により、Block Face Image(BFI)とよばれる二次元構造情報をもつ画像を得ることができるようになった<sup>3)</sup>。SEMを用いて平滑な試料表面を低加速電圧条件で観察して得られる反射電子像はTEM像と同様の画像コントラストを持つ。このBFIはTEMとSEMの両方の利点を併せ持ち、全体から詳細に至るまでを連続的に観察でき、また、後述する組織・細胞レベルの3次元再構築を可能にする基礎技術となる比較的新しい観察法である<sup>3,4)</sup>。

しかしながら、BFIはTEMに比べてコントラストノイズ比が小さく、汎用型(アウトレンズ型)SEMを用いて分解能の高いBFI像を得ることは容易ではなかった。我々は試料台とビームカラムの間に負電位を掛ける減速法(リターディング法)を用いることで従来の汎用型FE-SEMを用いてBFIの画像が劇的に改善されることを見いだした<sup>5,6)</sup>。減速法は低加速電圧観察技術の一つとして、主に材料分野で用いられてきた技術である<sup>7)</sup>。

本稿では医学生物学分野におけるBFI観察の利点を紹介した上で、減速法による画像改善、さらにFIB/SEMを用いた三次元再構築法への応用について我々の取り組みを紹介し、リターディング法を用いた低加速電圧・低電流観察による新しい生物組織観察法を解説する。

#### 2. Block Face Imageの利点

BFIは試料ブロックの表面像でありながら、あたかも超薄切片を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したものと同等のコントラストを持つのが特徴である。SEMのビーム照射に伴って得られる反射電子は試料自身の元素分布を反映した情報を含む。特に重金属で*en bloc*染色した樹脂包埋試料をウルトラミクロームなどで面出しし、その平滑な試料断面に電子線を照射した場合、得られる信号は細胞の膜構造やタンパク質複合体など重金属で染色され易い構造に一致して高いシグナルが得られる。走査型透過型電子顕微鏡(STEM)と比較するとその原理がわかりやすい(図1)。STEM像の場合、薄膜切片内部に存在する重金属に染色された構造に照射された電子が散乱されることによりコントラストを得る。この時、試料後方に散乱する電子は、照射される相手が切片でもブロックでも、およそ同じ現象が起き、反射電子の量は透過電子の量と負の相関をする。つまり、反射電子を信号として用いることで切片を作ることなくTEMやSTEMと同等の像を取得できるのである。これによって得られる利点は大きく3つある。

①薄切の必要が無い：BFIでは平滑な断面さえ作れば観察できるので、薄切が困難な試料を容易に観察できる。腱や昆虫のクチクラ層といった樹脂浸透の悪い組織でも、面を作

〒830-0011 福岡県久留米市旭町67  
E-mail: kohta@med.kurume-u.ac.jp  
2012年6月5日受付

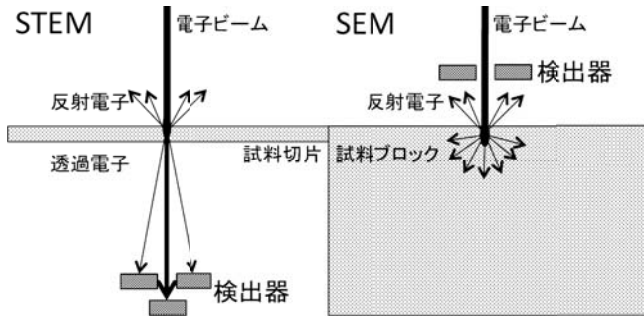


図1 STEM像とブロック表面からのSEM組成コントラスト像(BFI)の比較(文献6)

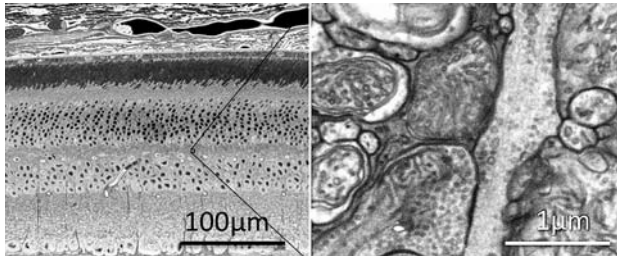


図2 BFI観察では臓器の全体から高拡大までを連続的に観察できる。標本はラット網膜(文献6)

る事はそれほど難しくはない。さらに未脱灰骨断面などの硬組織や、セラミックとの界面などはFIBを用いた試料面作製を行うことで、詳細に観察することが出来る。

②広範囲観察：生物組織観察では全体像の把握は重要である。臓器全体を俯瞰的に観察することで、人為的なセレクションエラーを起しにくくすることができる。BFIはSEMで取得するため原理的にはcmオーダーの標本をnmオーダーまで連続的に観察することが可能である。図2にラット網膜の全層をBFIで撮影したものを示す。このような範囲をTEMで観察する場合、単孔メッシュを使わない限りグリッドに視野を邪魔されることが多く、広範囲の観察は努力が必要であった。

③三次元再構築：SEM内にFIB<sup>4,5,8)</sup>や小型のマイクロトームを組み込むことで<sup>3)</sup>、試料を連続的に切削し、切削ごとにBFIを取得すると、TEMを用いた電子線トモグラフィー(TEMトモグラフィー)よりも大きな領域を3次元再構築することができる。前者はFIB/SEM TomographyもしくはISAR (Serial Ion Ablation and Reconstruction)<sup>6,9)</sup>などとよばれ、5 μm角~100 μm角の領域を完全に再構築して解析することができる。これは従来の連続超薄切片法と同様の結果をもたらすが、画像取得が自動化されるという点と、ブロックの表面観察であるため歪みがなく、得られたデータに定量性が有るという点で特徴がある。また切削幅を数nmに設定することで、高い空間分解能を得ることも可能となる。

このようにBFIは従来の観察法を補完する多くの利点もっているが、高分解能な像を取得するという点で未だ問題が残る。

### 3. BFIの像形成とリターディング法による像改善

高い分解能を持つBFI観察を行うためには低加速電圧・低プローブ電流という条件下の観察を行う必要がある。SEMでブロックの表面を走査する場合、入射ビームが試料と相互作用する領域を情報源サイズと呼び、これが分解能を規定する大きな要素となる。情報源サイズは入射電子の加速電圧に依存するため、加速電圧を下げることで分解能向上につながる。一方プローブ電流が大きくなればプローブサイズ・情報源サイズも大きくなり分解能向上は望めない。これらのことからBFIでは出来るだけ低加速電圧で、それに見合う低プローブ電流を用いることが重要となる。プースティングレンズ方式を用いた高分解能SEM<sup>10)</sup>を用いれば、極低加速電圧・低プローブ電流の観察条件において高分解能・高コントラストBFI像を得ることはできる。しかしながら汎用型SEMを用いてこのような条件下で高いコントラストを得ることは難しい。低加速電圧・低プローブ電流では情報源サイズは小さくなるが、コントラストノイズ比も急激に小さくなり画像を取得できないのである。従って、これらの条件がかみ合う部分が最適な動作条件となる。汎用型SEMでも、高い分解能を必要としない場合は大きなプローブ電流を用いることでコントラストノイズ比を得ることができる<sup>11)</sup>。我々が使用している汎用型FE-SEM (Quanta 3D FEG, FEI)の情報源サイズが最も小さくなる現実的な条件は加速電圧1.5 kV、プローブ電流10 pA程度であるが、通常この条件で十分なシグナルをもつBFI観察を行うことは難しい。

低電圧観察法の一つとして知られているリターディング法は試料とカラム間に負の電圧を掛けることで、一次電子を試料直前で減速させる方法である。このリターディング法は、電子の減速という効果以外に、カラムと試料の間にカソードレンズを形成し、これが球面収差と色収差を大きく軽減、像質の改善につながる事が知られている<sup>12)</sup>。我々は、このリターディングをBFIに応用し、その像質改善について検討した。

試料はラット肝臓をフェロシアン化カリ-四酸化オスミウム、酢酸ウラン、アスパラギン酸鉛で*en bloc*染色し、型どおりにEPON 812樹脂に包埋、マイクロトームにて面出しをしたものである<sup>5,13)</sup>。リターディングの有無を除いて各画像は同条件で取得し、同じ画像処理をしている。リターディング法を適応したものは、図3に示すように明らかにコントラストが上昇しており、分解能も向上がみられた。しかし、FIBで作為的に作製した試料面の凹凸(カーテニング)はリターディングにより過度に強調されており、この観察法では試料表面の平滑性が重要であることがわかる(図3c, f)。一方、加速電圧との関係を見ると、通常状態ではほとんどシグナルを検出できない低加速電圧条件(1.5 keV)であっても、リターディングにより明瞭に観察できることが判る(図4)。これは、リターディングにより反射電子が加速され、検出器の検出効率が高くなったこと、また、低角度散乱電子の軌道

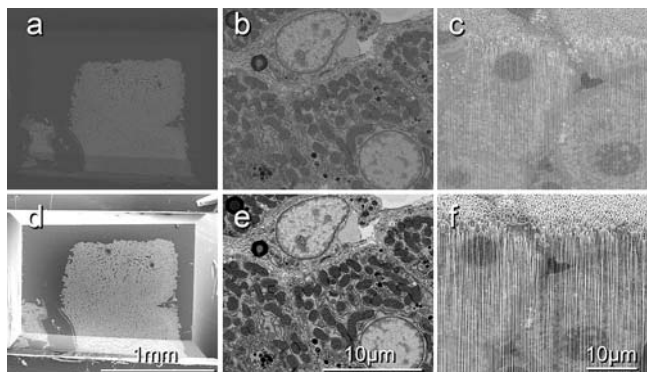


図3 ラット肝臓を包埋した樹脂ブロック表面をSEMにて観察（照射電子エネルギー5 keV）。上段は通常の反射電子像、下段はリターディング（2 kV）を掛けている。平滑面の低倍（a, d）像と拡大像（b, e）ではいずれも組成コントラストが高くなり、リターディングにより像質が改善している。一方、凹凸のある断面（c, e）ではリターディングにより、凹凸が強調されて内部構造が確認できない。（文献5、一部改変）

がカラム方向に曲げられることにより、より多くのシグナルを検出できたことがコントラストを増加させた要因と考えられる。これらの複合的な効果により汎用型FE-SEMでも分解能5～4 nmのBFI観察像を得ることができた。

とはいえ、SEMにより得られる像コントラストの成因、分解能の解釈はいまだ定まっていない。詳しくは成書を参照していただきたい<sup>14</sup>。この点は本学会においても「SEMの物理学」研究部会において活発な議論が行われている最中である<sup>15</sup>。

#### 4. リターディングとFIB/SEM トモグラフィー

FIB/SEMでの試料加工と観察は、試料面がFIB軸に直交した状態、すなわちSEM軸に対して傾斜した状態で行われる。一方、リターディング法は試料表面に強い電界、すなわ

ちカソードレンズを作る事で像質を改善するため、試料の大きな凹凸や傾斜が像に影響する。実際、樹脂包埋標本を試料台ごと傾斜させると、強い非点が生じて良好な像を得ることは出来なかった（図5a, b）。

我々はFIB/SEM トモグラフィーにリターディング法を応用するため、図5cに示す新しい試料台を開発した。試料台中央には直径2 mmの斜めのピットが作られている。試料台をSEMに対し水平に設置したときこのピットはFIB軸と同角度（38°）の傾斜を持つ。このピットにロッド状の試料を挿入すると、試料台の上面をSEMに対して水平に維持したまま、試料面のみ52°傾斜しFIB軸に直交した状態となる。この状態でFIBで切削した断面はSEM軸に対し38°傾斜する。この試料台を用いた場合リターディングモード下であっても傾斜したFIB切削面からのBFI像に強い非点は現れず、水平設置した時と同様、高い分解能で撮影することができた。この試料台上で試料は±0.8 mmの凹凸を持つためカソードレンズへの影響がゼロではない。しかし、その影響は、分解能に影響する他の様々なファクターよりも小さいところまでに押さえ込むことが出来ていると考えられ、リターディングモードでのFIB/SEM観察が可能であることが判る。

実際にラット肝臓の細胞質の一部分をリターディングモードを用いてFIB/SEMで観察し、3次元再構築したのが図6である。提示した例では照射電圧3 KeV 負電圧1.5 kV、プローブ電流10 pAの条件にて反射電子像を取得した（検出器：vCD, FEI）。FIBによる一回の切削厚は10 nmで、切削とBFI観察を650回繰り返して得られたデータである。およそ6 μm角の領域をボクセルサイズ6 nm×6 nm×10 nm、空間分解能20 nm程度で再構築している。核膜孔や様々なオルガネラの分布はもちろん、ミトコンドリアに注目するとそのクリステ構造を詳細に観察できる。

ミトコンドリアの膜は外膜と内膜の2枚からなり、クリステはこの内膜が内腔に棚状に突出した構造だと理解されてい

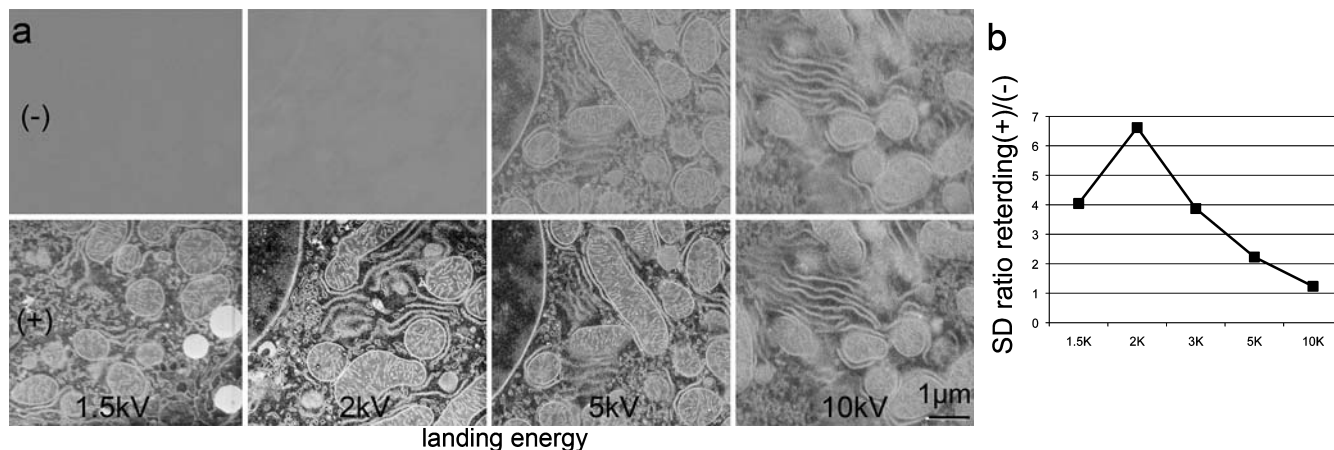


図4 樹脂包埋生物サンプルのSEM組成コントラスト像における照射電圧（Landing energy）とリターディング（2 kV）による像形成。（a）通常の観察では、2 keV以下の照射電圧では画像が得られなかったが、リターディングを行ったものでは1.5 keVで十分な像が得られる。一方、高い照射電圧ではいずれも像は得られるものの、鮮明さに欠ける。輝度分布を比較すると、この標本をこの倍率で観察したときには照射電圧2 keV、リターリング2 kVで最もコントラスト比の高い画像が得られている（b）。（文献5、一部改変）

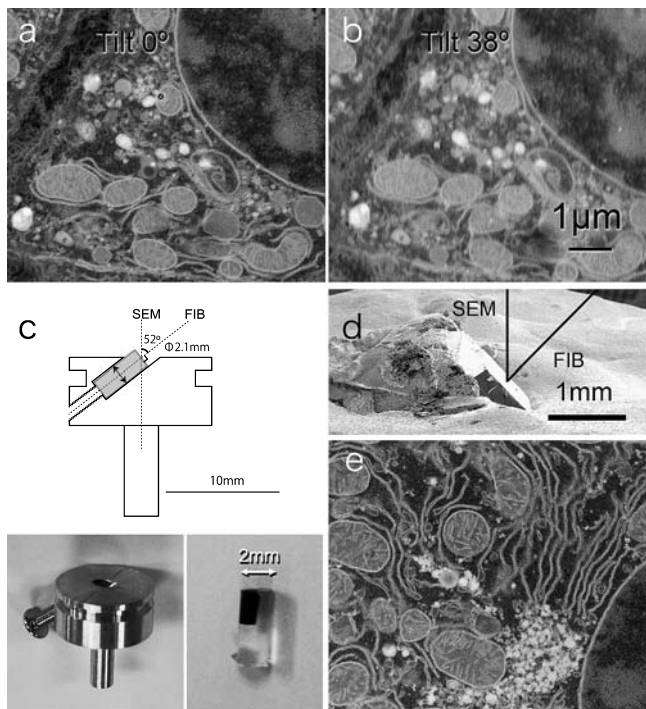


図5 リターディングが傾斜試料の画像に与える影響，傾斜することで傾斜軸に対し，修正困難な非点が生じる (a, b). 試料傾斜が必要な FIB/SEM に対応する新型試料台の構造とその写真 (c). 試料台を SEM に水平に設置すると，試料面のみ FIB 軸に直交する．試料の大きさを直径 2 mm にすることで，凹凸を極力少なくした．実際に (c) の試料台に試料を設置し (d)，組成像を取得，非点のない精細な画像が得られた (e)．(文献 5，一部改変)

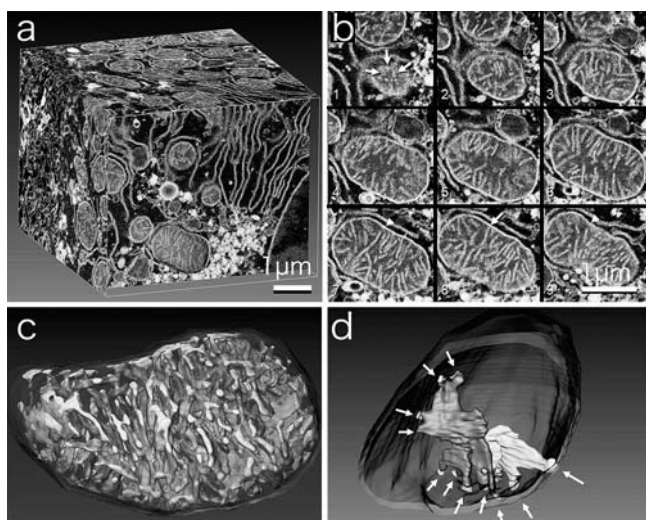


図6 図5の試料台を用いてえられた肝細胞の FIB/SEM トモグラフィー像．約  $6\mu\text{m}$  角の領域を再構築した (a)．一つのミトコンドリアに対して作製した連続スライス像 (b) では，ミトコンドリア外膜に接線方向に得られた断面ではクリステの断面がチューブ状を呈する．一方，垂直方向に得られた断面で見られるクリステが外側の膜と連結は，その前後の面で観察できず，この連結がチューブ状であることを示唆している．セグメンテーションを行ったミトコンドリア全体の膜構造 (c) とそこから抽出した 3 枚のミトコンドリア (d)．外側の膜との接点はいずれもチューブ状を呈する (矢印)．(文献 5，一部改変)

る．隣接するクリステ同士の距離は 30 nm 程度であり，これまでミトコンドリア全体のクリステ構造を把握することは困難な課題であった．TEM トモグラフィー法により，クリステが外側の境界膜と連結する部分に「クリステジャンクション」と呼ばれるチューブ状の構造を持つことが示唆されていたが<sup>16)</sup>，直径数ミクロンあるミトコンドリア全体の膜構造をこの方法で解析することは容易ではなかった．一方，今回の FIB/SEM トモグラフィー像の Z 分解能は，TEM 連続切片法に比べて 1 桁小さく，水平分解能もクリステ構造を観察するには十分であり，また TEM トモグラフィー法に比べて圧倒的に大きなボリュームを観察することが可能である．この観察により，クリステジャンクションがミトコンドリア全体に存在していることが明らかとなった．

このように新しい試料台を用いることで，リターディング条件下においても傾斜したサンプルから高解像度な BFI 像を取得することが可能であり，リターディング法を FIB/SEM トモグラフィーへ応用できることが実証された．

## 5. まとめ

今回紹介した低加速電圧下の BFI 観察や FIB/SEM トモグラフィー法は，“By chance”に依存しない確実性の高い顕微鏡観察法として生物分野において有効な手段となり得る．現在の医学生物学分野の研究における電子顕微鏡の位置づけは，様々な生化学的実験結果を形態学的側面から裏付けるツールとして用いられることが多い．つまり多くの場合，期待される事前情報がある．一方，通常 TEM を用いた研究では，多くの場合，試料全体のほんの一部しか観察することはできない．細胞や組織といった生物学標本の TEM 像は一つとして同じ構造が出現することのない極めて雑多なものであるにもかかわらず，このような状況で，都合のよい画像が見つかったら，どんなに批判的な目をもって観察していても時としてミスリードされた解釈が引き起こされやすい．従って，今後の電子顕微鏡観察にはこのようなヒューマンエラーによるリスクを極力低下させる，確実性の高い観察手法が求められる．前述の Correlative 顕微鏡はその一つの流れであると言える．それに加えて，注目する構造を広範囲に俯瞰的に観察すること，そして，注目領域については 3 次元的再構築を行い，像解釈の精度を高めることがより重要になると考えられる．低加速観察条件を用いた BFI そして FIB/SEM トモグラフィーはこれらを実現する十分なポテンシャルを持っているといえる．特に後者はこれまでの手法に比べて高い定量性を持っており，生物分野の形態観察に統計解析の手法を導入して比較検討できる点で画期的な手法である．

今回我々が用いたリターディング法は，その機構が単純であり，また汎用型 SEM に導入してその効果が得られる点で，導入の垣根が比較的低い手法である．一方，BFI 観察は研究者にとっても超薄切片作製という技能を必要としない点，また広範囲を簡単に観察できる点で，大きなメリットがある．

電子顕微鏡観察法は，現在も日進月歩で新しい手法の開発

がすすめられている。近い将来、生物観察においても、さらに確実性の高い観察法が登場する可能性もある。今後これらの観察法がより一般的に生物組織観察に用いられるようになることで、形態学的側面から生命現象をより正確に理解することにつながると確信している。

#### 文 献

- 1) Razi, M. and Tooze, S.A.: *Autophagy in Mammalian Systems, Part B. Academic Press*, 452, 261–275 (2009)
- 2) Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S., Isobe, S., Mizuki, K., Mataka, S. and Nakamura, K.: *Ultramicroscopy*, 109, 344–349 (2009)
- 3) Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, 2, e329 (2004)
- 4) Knott, G., Marchman, H., Wall, D. and Lich, B.: *J. Neurosci.*, 28, 2959–2964 (2008)
- 5) Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R. and Nakamura, K.: *Micron*, 43, 612–620 (2012)
- 6) 太田啓介, 都合亜記暢, 東 龍平, 中村桂一郎: 久留米医学雑誌, 75, 1–10 (2012)
- 7) Frosien, J., Plies, E. and Anger, K.: *J. Vac. Sci. Technol. B, Micro-electron Nanometer Struct.*, 7, 1874–1877 (1989)
- 8) Ohno, N., Kidd G.J., Mahad, D., Kiryu-Seo, S., Avishai, A., Komuro, H. and Trapp, B.D.: *J. Neurosci.*, 31, 7249–7258 (2011)
- 9) 完山正林, 村田 薫, 鈴木直久: 顕微鏡, 46, 273–276 (2011)
- 10) Frosien, J., Lanio, S. and Feuerbaum, H.P.: *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 363, 25–30 (1995)
- 11) Bushby, A.J., P'ng, K.M.Y., Young, R.D., Pinali, C., Knupp, C. and Quantock, A.J.: *Nat. Protocols*, 6, 845–858 (2011)
- 12) Phifer, D., Tuma, L., Vystavel, T., Wandrol, P. and Young, R.J.: *Micros. Today*, 17, 40 (2009)
- 13) West, J.B., Fu, Z., Deerinck, T.J., Mackey, M.R., Obayashi, J.T. and Ellisman, M.H.: *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 170, 202–209 (2010)
- 14) 電子顕微鏡学会関東支部編日本: 新・走査電子顕微鏡 (2011)
- 15) 板倉 賢, 桑野範之, 佐藤 馨, 立花繁明, 安田雅昭: 顕微鏡, 47 suppl, 76 (2012)
- 16) Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. and Frey, T.: *J. Struct. Biol.*, 119, 260–272 (1997)