

## FIB/SEM トモグラフィー法による三次元再構築の特徴

## Advantages of FIB/SEM Tomography in SEM-Based Three-Dimensional Reconstruction

太田 啓介, 金澤知之進, 中村桂一郎

Keisuke Ohta, Tomonoshin Kanazawa and Kei-ichiro Nakamura

久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

**要旨** FIB/SEM トモグラフィー法は SEM 連続スライス観察による生体組織の三次元再構築法の一つであり、その特徴は試料切削に収束イオンビーム (FIB) を用いる点にある。FIB で切削した試料表面は比較的帯電し難く、導電性の低い様々な生体組織観察に応用可能である。また、本手法は FIB という歴史のある微細加工技術を用いることで、電子線トモグラフィー法に準ずる高い分解能の三次元構造解析や、骨などの硬組織の観察を可能とする。三次元再構築できる領域は最大約 100  $\mu\text{m}$  角の領域に限られるものの、FIB/SEM では観察できる試料サイズに特別な制限がないため、肉眼レベルの臓器を SEM で俯瞰して観察しつつ、注目領域のみを詳細に立体再構築することができる。この特徴は、臓器や病変の構造を解析する医学領域の課題において特に有用である。また FIB/SEM トモグラフィー法は、CLEM 観察 (光学顕微鏡で観察した同じ場所を電子顕微鏡で観察する相関観察法) と相性が良く、汎用性の高い三次元観察手法である。

キーワード: FIB/SEM トモグラフィー, 医学生物学応用, ミトコンドリア, ブロックフェイス像

## 1. はじめに

FIB/SEM (focused ion beam scanning electron microscopy) トモグラフィー法は、電子顕微鏡レベルの分解能を持つ細胞・組織の三次元再構築手法であり、試料切削と撮影を繰り返すことで再構築を行う連続スライス SEM 法の一つである。しかし、試料切削に収束イオンビーム (FIB) を用いることにより、他の手法では難しい特徴的な解析が可能となる。その一つが、電子線トモグラフィー法に準ずる高分解能観察である。我々はこの手法を用いて、ミトコンドリアのクリステ構造の解析結果を報告している<sup>1)</sup>。ミトコンドリアのクリステ構造は、細胞種や細胞の生理状態によって大きく変化することが知られているものの、その制御機構だけでなく、正確な三次元的構造すら不明な点が多かった。これらの構造を正確に理解するためには、電子顕微鏡レベルの三次元再構築の導入が大いに期待された。従来、この解析には電子線トモグラフィー法による微細三次元解析が用いられてきた。しかし、その方法には厚さ方向に制限があり、超高压電子顕微鏡を用いてもミトコンドリアの一部分を可視化するにとどまった<sup>2)</sup>。我々は、これに FIB/SEM トモグラフィー法を用いることで、厚さ方向の制限を無くし、細胞内におけるミトコンドリアの分布、他のオルガネラとの関係性、またクリステを含めた全膜構造を詳細に解析することができた。

一方、本手法を用いてさまざまな試料を観察してみると、高分解能観察以外にも FIB を用いることで初めて可能になる手法がいくつもあることがわかり、現在はそれぞれの特徴を生かした複数の課題について解析を進めている。

本稿では、まず FIB/SEM トモグラフィー法の特徴と実際の試料作製・観察法を解説する。これに続いて第 4 章では、FIB/SEM の特徴を生かした三次元解析の例として、①高分解能観察、②硬組織観察、③大規模構造の観察の 3 点に注目し、我々がこれまでに行った実例を紹介する。最後に本法における将来展望を述べる。

## 2. FIB/SEM トモグラフィー法の特徴

FIB/SEM トモグラフィー法では、その名の通り FIB を搭載した走査型電子顕微鏡 (SEM) 装置を用いて試料切削と画像取得を繰り返し、試料の連続断面像を得る (図 1)。画像自体は、本特集に登場する様々な連続スライス SEM 法と同じで、平滑に切削されたブロック表面に低加速電圧の電子線を照射し、そこから得られる反射電子や二次電子の組成コントラストを画像情報として記録する (ブロックフェイスイメージ; BFI)<sup>3)</sup>。よって本手法と、他の連続スライス SEM 法との大きな違いは、試料切削に FIB を用いるところにあると言える。

FIB は微細加工装置としての長い歴史があり、主に材料系での試料加工に用いられてきた。加速され直径数 nm に収束されたガリウムイオンビームは樹脂のような柔らかい素材から未脱灰骨のような硬い組織に至るまで、nm オーダーで任意の形状に切削・加工することが出来る。FIB/SEM トモ

〒 831-0011 福岡県久留米市旭町 67  
TEL: 0942-31-7541; FAX: 0942-31-7555  
2014 年 9 月 5 日受付

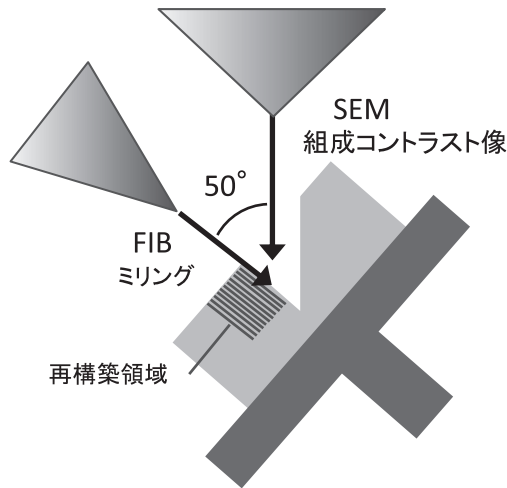


図1 一般的なFIB/SEM装置を用いたFIB/SEMトモグラフィ法における試料とデバイスの配置

ラフィー法ではこの特徴を生かし、試料表面をnm単位で剥ぎ取るように切削し、極めて平滑な試料断面を連続して作製し、これを記録する。本手法の特徴としてナイフのような機械的接触による切削手法では困難な微量切削を実現することで、数nmの深さ分解能を持つ高分解能三次元再構築を可能にし、さらに未脱灰骨やインプラント-組織の界面など、硬組織の再構築も行う事ができる。

本手法は試料を一度セットしてしまえば、全自動で連続断面像が得られるという利点はあるものの、一度に再構築できる範囲はFIBの特性から数 $\mu\text{m}$ 角~100 $\mu\text{m}$ 角の領域と限られており、さらに破壊的な解析であるため観察部位の試料は観察と同時に消失してしまうため、観察対象に因っては注意が必要である。その一方で、SEM内に装填する試料自身のサイズには大きな制約が無いため、FIB/SEMの再構築では、一般的に数mm角の試料を俯瞰し、その中の任意の領域を再構築することができる。場合によっては細胞培養した35mmディッシュをそのまま観察することも可能である。つまり、もう一つの特徴として、試料全体の俯瞰的观察と注目する局所的な部位の詳細解析との相関観察を行うことが容易であるということが挙げられる。SEMは透過電子顕微鏡(TEM)に比べて俯瞰的な観察が容易であり、半導体分野では、広大な構造から局所を解析する手法として有効に使われている。生物組織を観察する上で、顕微鏡レベルの微細構造と肉眼レベルでの大規模な構造との関係性にはしばしば理解の相違があり、そのギャップを埋めることは困難な場合がある。これらの構造的ギャップを埋めるためには、生物分野でも、SEMによる俯瞰的观察とFIB/SEMを用いた局所解析の技術の組み合わせによる構造解析が強力なメリットになると考えられる。

### 3. 試料調製・観察時の特徴

SEMによるブロック表面観察では、試料の原子組成が像

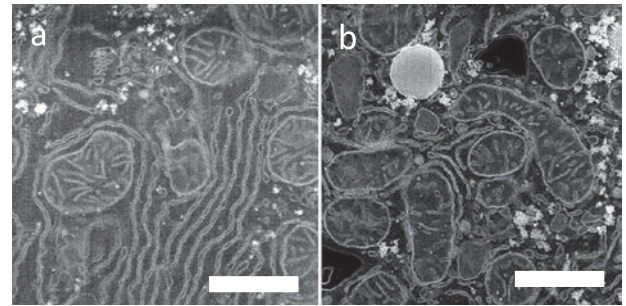


図2 FIB切削標本表面の組成観察像。a)通常TEM用標本と、b) rOTO法で*en bloc*染色した標本(加速電圧1.5kV、二次電子像、MI4000L装置にて撮影) スケールバー1 $\mu\text{m}$

コントラストとして画像化される。軽元素で構成される生物組織の場合、無染色では良いコントラストは得られないので、あらかじめ重金属などで*en bloc*染色を施した後に樹脂包埋した試料を用いる。SEMの検出器が高性能になって来たため、通常のTEM観察用の標本であっても、四酸化オスミウムで固定されてさえいれば、このオスミウムによりある程度のコントラストを得ることができる(図2a)。しかし、還元オスミウム-チオカルボヒドРАЗИド-オスミウムによる強力な*en bloc*染色(rOTO法)を施した試料であれば、より強い膜コントラストが得られる<sup>1)</sup>(図2b)。観察に供する試料ブロックは、TEM用の試料調製と同様にマイクロームを用いて面出しを行った後に、SEMの試料台に載せられ、カーボンなどを蒸着してから観察される。BFIは組成像であるので一般的に観察には反射電子が用いられるが、平滑な試料表面へ照射された電子線からの信号は、凹凸コントラストをほとんど含まないため、反射電子によって励起される二次電子も用いることが可能である。実際の観察は、前述の様に試料表面全体をSEMで観察することで再構築を行う領域を決定し、その後、この部分をFIB/SEM装置を用いて連続的な切削と断面像の取得を行う。

FIB装置の性質として、ガリウムイオンビーム入射角度は試料に対して直角であることが望ましい。そのためFIB/SEMトモグラフィ法で再構築を行う場合、一般的には試料表面(ビーム入射面)をFIBの軸に対して直角に配置する。このため、FIBとSEMが傾斜配置される一般的なFIB/SEM装置では、図1に示すように試料はSEM本体の水平面(SEM軸に直交する面)に対し50°ほど傾斜して配置される。その結果、FIBによって作られた切削面は、SEMに対し40°ほど傾いた斜面となる。そのため画像を解析する場合には、XY比の補正が必要となる。一方、直交型FIB/SEM装置を用いた場合は、試料の真横に配置されたFIBから試料隅の上面を切削する方法をとるので、SEM光軸と切削面は直交しており、画像の補正は不要となる。

試料調製におけるもう一つの特徴として、FIBによる切削表面はSEM観察時の帯電についてあまり気をつかわなくても良いという点にある。SEM観察時に試料が帯電すると像

の歪みやコントラストの異常が生じ、観察は困難になる。ミクロトームなどを用いた連続スライス SEM 法では、切削表面は未コーティングであり、包埋樹脂自体も導電性が無いいため、帯電が起りやすく、これを防ぐために試料調製や観察条件に気をつけなければならない。これに対し、FIB によって得られた切削面は、このような帯電について、ほとんど気にすることなく観察することが可能である。これは、観察する切削面積が比較的小さいことに加えて、切削時にガリウムイオンが試料表面に残存することから、若干の導電性が確保されているためであると考えられている。このことから、FIB/SEM トモグラフィー法では、結合組織や骨組織など、試料自身が導電染色されず帯電を起こしやすい試料についても、これを特に気にすることなくベストな条件で観察することが可能である。

#### 4. FIB の特徴を生かした三次元再構築の実例

##### 4.1 高分解能三次元再構築

連続スライス SEM 法における深さ方向の分解能は、観察に用いる SEM のビーム条件と FIB による切削ピッチ (厚) により決まる。一般に、SEM の加速電圧を下げると電子線の透過能が下がるため、シグナル・ノイズ比が十分であれば分解能は上がる。しかし、加速電圧を下げれば水平分解能が低下するので、低ければ良いという訳ではない。切削ピッチ 10 nm 程度であれば加速電圧 1.5 kv 程度が適当な値となる。FIB による切削では、材料系試料で 2 ~ 3 nm ピッチのスライスが可能とされている。生物試料においては我々の経験上、樹脂包埋試料を 5 nm ピッチで切削して立体再構築が可能であることを確かめている。図 3b は 5 nm ピッチで切削した標本の XZ 平面の積層仮想断面であるが、電子線トモグラフィー法の Missing Wedge によって引き起こされるような上下方向のボケが無く、Z 方向においても丸い小胞は丸く描出され (図 3b 矢印)、図 3a に示した XY 平面像と遜色のない再構築が可能であることがわかる。連続超薄切片として取得可能な技術的限界が厚さ 30 nm 程度と考えると、FIB/SEM における深さ方向の分解能は、連続切片法に比べおよそ 1 桁高いことがわかる。これは、オルガネラレベルでの膜構造の解析にも有効であり、500 nm 以上の厚さのある試料における電子線トモグラフィー法の分解能に匹敵する。

図 3c-e は、6  $\mu\text{m}$  角のラット肝細胞をボクセルサイズ 6 nm  $\times$  6 nm  $\times$  10 nm で再構築した例である。詳細については 2012 年の本誌にも掲載したが<sup>3)</sup>、この方法によって、ミトコンドリアのクリステ構造を従来の方法に比べて広範囲に、かつ正確に解析することができた。得られた三次元再構築像から膜分画を抽出 (セグメンテーション) したところ、ミトコンドリアクリステが内膜から立ち上がる部分は、「クリステジャンクション」と呼ばれるチューブ状の構造であることが示された (図 3e 矢印)。この構造自体は、オスミウム軟浸法標本の高分解能 SEM 観察や電子線トモグラフィー法で部分的に予想されていた構造であるが<sup>2)</sup>、FIB/SEM を用

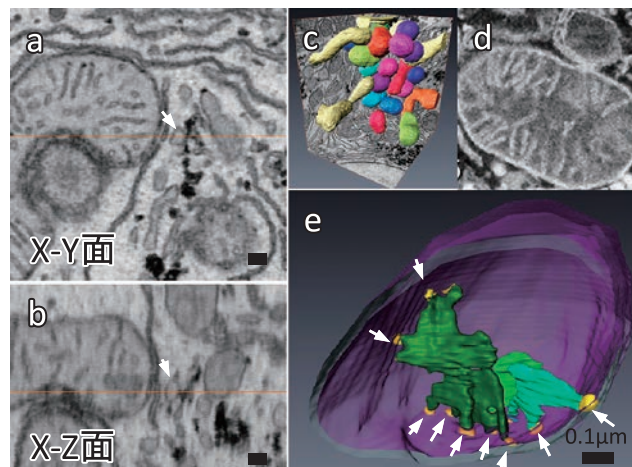


図 3 a, b) FIB にて 5 nm ピッチで切削した肝細胞再構築像 (加速電圧 1.5 kV). a) オリジナルのブロック表面像と b) 積層断面像. 積層断面像でも小胞は丸い形として捉えることができる (矢印). c) 肝細胞 6  $\mu\text{m}$  角の領域を三次元再構築し、セグメンテーションにより抽出したミトコンドリア分画. d) 三次元再構築に用いたミトコンドリア一つの断面と、e) 三次元再構築後のレンダリング像. 3つのクリステのみを抽出した. クリステと内膜の間は全てチューブ状のジャンクション (矢印) で内膜につながっている (文献 1) より改変).

いた三次元解析によって、肝細胞のミトコンドリアのクリステのほとんどはクリステジャンクションによって内膜と連結していることが示された<sup>1)</sup>。

##### 4.2 硬組織観察

硬組織の観察には比較的早い時期から FIB が用いられてきた<sup>4,5)</sup>。未脱灰状態の骨や歯科用インプラントと骨組織との接合面、いわゆるオステオインテグレーションの観察などに有効である。FIB はイオンビームのスパッタリング効果で試料を切削するため、ビーム条件を整えることで、金属やアパタイト結晶の様な堅い素材でも、また両者が混ざった試料であっても、比較的平滑な観察面を作製することができる。これにより、均一な硬組織と軟部組織の界面、インプラント体表面の観察などが可能となる。図 4 は、その一例としてインプラント体がオステオインテグレーションする界面を、FIB で切削し観察した像である。骨組織とインプラント体との界面が損傷されることなく鮮明に観察できていることがわかる。

##### 4.3 試料の自由度を利用した大規模構造の観察

FIB/SEM を用いることで得られるもう一つの特徴は、試料形状の自由度である。前述のように、三次元再構築できる範囲は試料の一部であるが、装置内に装填可能な試料サイズには原則制限がない。そのため、平滑な観察面さえ作製することができれば、肉眼レベルで構造を確認できる大きな標本をそのまま SEM 観察することができる。例えば、創傷治療過程や癌など臓器レベルの対象を、電子顕微鏡レベルで調べるためには、数ミリメートル、場合によってはセンチメートルレベルの組織を俯瞰的に観察し、周辺の組織との関係性を把

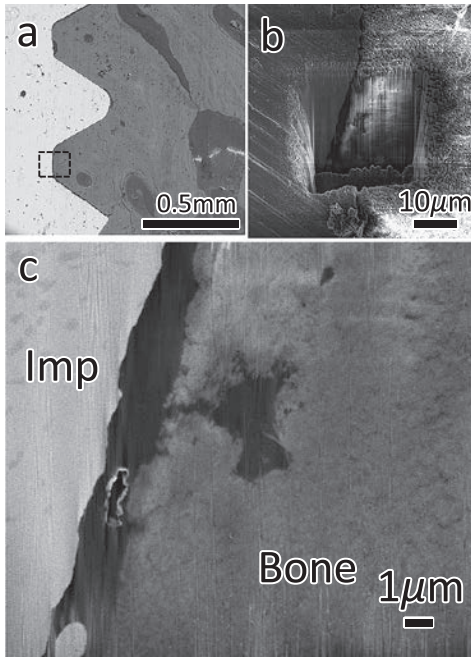


図4 骨 (Bone) とインプラント体 (Imp) との接合面. a) 研磨標本の低倍 SEM ブロック表面観察像. b) FIB による切削像. c) FIB 切削面のブロック表面観察像.

握しながら、目的の場所を詳細に検討することが必要になる。SEM によるブロックフェイス観察はこのような用途に於いて非常に有効な手段である。我々は、この特徴を用いることで腱骨付着部の三次元的構造解析を行い、肩関節腱板の付着様式が従来の理解とは異なっていることを明らかにした<sup>6)</sup>。

肩関節における腱板断裂の外科的な治療は整形外科領域において重要な課題であり、臨床的な最終目標は正常な付着部の再生にある。しかし、現在の外科治療では腱と骨は接着し安定するものの、決して正常な構造を再生することはなく、その強度も正常には及ばないことが知られている<sup>6)</sup>。両者の違いがどのように生じるのかを調べるため、FIB/SEM トモグラフィ法を用いた三次元構造解析を行った。ここでは紙面の関係上、正常部のみについて紹介する。正常な肩腱板付着部は、これまで光学顕微鏡的観察から骨層・石灰化軟骨層・非石灰化軟骨層・腱の4層構造からなり、これらが腱を骨に強力に連結する構造を作っているとされてきた。特に腱と軟骨の移行部は、両者がくさび形にかみ合った構造をとり、力学的強度を維持していると考えられてきた。我々はこの構造を再評価するため、ラット腱板付着部全体が入った5mm角の試料を作製し、軟骨-腱移行部に注目してFIB/SEMを用いて観察を行った。

二次元的な観察では従来の説を支持するように、腱から続く線維性成分が柱状の軟骨の間に挟まれた構造が観察された。そこで、同じ標本で軟骨側から腱に向かって数カ所を三次元再構築し、連続性のある移行部全体の細胞構築として解析した(図5)。一つ一つの三次元再構築の大きさは細胞が数個から数十個程度入る60µm角の領域である。各エリアにおける細胞形態をセグメンテーションにより抽出したところ、軟骨側では突起のない卵円形の細胞集塊が観察され、典型的な軟骨細胞の特徴を示していた(図5右下)。一方、腱側では長い細胞突起を広げた典型的な腱細胞(線維芽細胞)が観察された(図5右上)。ところが、両者の移行部領域で

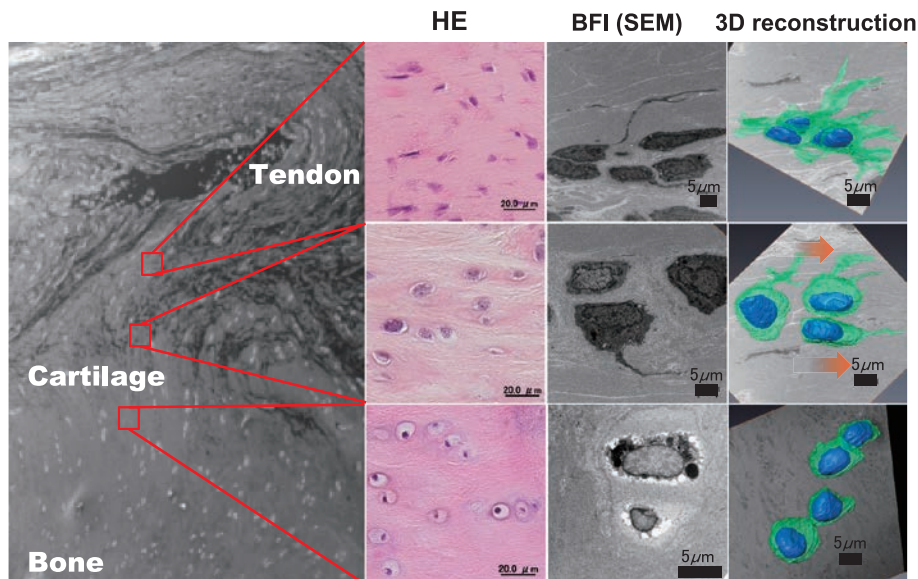


図5 腱骨付着部の三次元解析例。骨-腱板付着部全体が入る組織のうち、非石灰化軟骨層から腱に至る領域を連続的にFIB/SEM トモグラフィ法で解析した。相当する領域のヘマトキシリンエオジン染色像(HE)およびBFI像、連続BFI像による三次元再構築像を示す。軟骨部では突起を持たない卵円形の典型的な軟骨細胞が観察され、腱領域では紡錘形の細胞体に長い突起を持つ腱細胞様の細胞が観察された。しかし、両者の移行部では軟骨細胞と腱細胞の両方の特徴を持つ細胞が観察された。すなわち、細胞体は軟骨細胞様の卵円形の形態を持つものの、腱細胞のような線維の走行(矢印)に沿った細胞性突起を伸ばしており、軟骨-腱間は2種類の細胞が混在するのではなく細胞形態が徐々に変化している事が明らかとなった(文献6)より一部改変)。

は軟骨細胞と腱細胞が独立して存在するのではなく、両方の特徴を備えた中間的な細胞が多数存在することが確認された(図5右中)。この細胞は軟骨細胞様の特徴を持つ卵円形の細胞体から数本の細胞突起を膠原線維束に向かって伸ばしており、腱細胞とも軟骨細胞とも分類できないものであった。このような中間的な細胞の存在は、本解析で初めて明らかになったものである。これらの結果は軟骨-腱移行部が、軟骨と腱という別々の組織が癒合して形成されたという従来の考え方とは異なり、細胞レベルで中間的な構造を介して徐々に変化していくものであることを示唆するものであった<sup>6)</sup>。このような形態が生じた背景として予想されることは、腱骨付着部が発達段階で、同根の細胞・組織がそれぞれ置かれた状況に依存して変化し形成される、というものである。これらの結果は、腱骨付着部再生という究極の目標に対し、その考え方を根本的に変更するきっかけを作るものであり、現在、腱骨付着部の発生過程や再建後の腱の状態について様々な角度から再検証を行っている最中である。

## 5. 将来展望とまとめ

装置としてのFIB/SEMは、ここで議論する様な生体組織の三次元観察が行われるよりも以前から存在し、安定した技術として発達してきたが、ブロック表面から直接TEM様の組織像が撮れるようになったことをきっかけに、医学生物学への応用が急速に開けた。これまで観察の難しかった数十 $\mu\text{m}$ 角の領域の微細な三次元構造を、半自動でデータ取得できるようになったこと自体大きな進歩であり、本稿では本手法について生物試料の形態観察に特化して紹介した。この手法の価値は、さらに組織化学的手法と組み合わせることによって飛躍的に高まるのが容易に想像できる。近年は光学顕微鏡で観察した構造を電子顕微鏡レベルで観察する相関観察技術(correlative light electron microscopy; CLEM)が注目され、生体組織レベルで観察される現象を極微の構造に帰結することで、説得力のあるデータを出すことができるように

なった<sup>7)</sup>。FIB/SEMは、培養ディッシュ全体から特定の細胞を探し出すといった、広い領域から目的の構造をピンポイントで拾い出すことにすぐれており、この点でCLEM観察とも非常に相性の良い技術である。このような点で、FIB/SEMトモグラフィ法は、医学生物分野に於いて汎用性の高い三次元再構築技術であると言える。組織化学的手法との組み合わせは、現在、その技術の確立を目指して研究が進められているところであるが、その手法は、今まで観察が難しかったメゾスケールの特定構造におけるタンパク質の局在、ひいては細胞内でのタンパク質の空間的マッピングへとつなげることを可能とするものであり、今後さらに多くの生物学的な課題に応用されていくと期待される。

## 謝 辞

本研究で紹介したMI4000L(日立ハイテクサイエンス)での試料撮影像は、名古屋大学超高压電子顕微鏡施設荒井雄勇准教授の協力のもと行った。また、インプラント体-顎骨標本は、久留米大学歯科口腔医療センター楠川仁吾教授・田上隆一郎助教よりご提供いただいた。

## 文 献

- 1) Ohta, K., Sadayama, S., Togo, A., Higashi, R., Tanoue, R. and Nakamura, K.: *Micron*, **43**, 612-620 (2012)
- 2) Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M. and Frey, T.: *J. Struct. Biol.*, **119**, 260-272 (1997)
- 3) 太田啓介, 中村桂一郎: 顕微鏡, **47**, 176-180 (2012)
- 4) Giannuzzi, L.A., Phifer, D., Giannuzzi, N.J. and Capuano, M.J.: *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **65**, 737-747 (2007)
- 5) Schneider, P., Meier, M., Wepf, R. and Müller, R.: *Bone*, **49**, 304-311 (2011)
- 6) Kanazawa, T., Gotoh, M., Ohta, K. and Nakamura, K.: *Muscles Ligaments Tendons J*, **4**, 182-187 (2014)
- 7) Kopek, B.G., Shtengel, G., Xu, C.S., Clayton, D.A. and Hess, H.F.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 6136-6141 (2012)