

SPL-1

基調講演 1

11月11日（土）15：20～16：20

第1会場

先端イメージングにより脳の仕組みを明らかにする

岡部繁男
東京大学医

Understanding brain function by advanced imaging

S. Okabe

Grad School of Med. Univ. Tokyo

脳における情報処理は人の知性、意思決定、感情、社会生活などの基本となる。人の脳高次機能を支えるのは大脳皮質の神経回路だが、生まれた時には回路は未発達であり、生後早期に回路が複雑化し、様々な機能を獲得することになる。このような発達期に神経回路が形成されるメカニズムを知ること、またその神経回路が周囲の環境や感覚入力によってどのような影響を受けるのかを理解することは脳科学にとって最も大きな課題となっている。

神経回路は神経細胞同士がシナプスと呼ばれる非常に小さな構造を介して相互に接着することで形成される。神経回路の中で神経細胞から神経細胞へと興奮が伝搬することが情報処理の中心となる現象である。したがって回路の性質を知るには、つなぎ目であるシナプスの性質をまず知る必要がある。しかしシナプスの構造や性質を知るには、これまでの顕微鏡の技術では限界があった。光学顕微鏡を用いれば、生きた神経細胞におけるダイナミックなシナプスの変化を可視化できるが、ナノスケールの変化を捉えるには通常の光学顕微鏡では能力が足りない。また電子顕微鏡では材料を固定する必要があるため、発達過程でのシナプスの変化を追跡することができなくなる。光学顕微鏡の限界を超えるような技術を開発すること、また光学顕微鏡と電子顕微鏡の技術をうまく組み合わせることがシナプスの研究には必須となる。

顕微鏡技術は急速に進歩しており、超解像顕微鏡を用いてシナプスのナノスケールの構造を直接可視化し、その動態のデータを取得することも可能になりつつある。また光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関解析の手法を用いることで動的なシナプスの変化と電子顕微鏡による細胞内構造の可視化を組み合わせた実験も可能になった。更に二光子励起レーザー走査型顕微鏡が開発されて、動物を生かしたまま、脳内の神経回路の変化を可視化する実験も行われている。我々の研究室ではこのような先端的なイメージング技術を活用することで、生後発達過程でシナプスがどのように形成されるのか、また外部環境に応じてシナプスの出来方や回路の調節がどのように行われるのかについて研究を進めてきた。得られた結果は、生後の発達期には脳内でシナプスは速い速度で形成・消失を繰り返しており、一部のシナプスのみが安定化して長期間維持されることを示していた。またこのようなシナプスの動態は、脳疾患のモデルマウスでは障害を受けていた。これは正確なシナプス形成と不要なシナプスの除去が起こらないと、神経回路の機能自体が損なわれ、自閉スペクトラム症などの疾患の原因となりうることを示している。またこれらのシナプスイメージングの研究に必須となる、シナプスの超解像顕微鏡による解析やシナプス内部の分子の動きを直接可視化する技術の開発も推進し、新しい技術の有用性も示した。

先端的なイメージング技術の開発とその脳研究への応用により、脳神経回路のダイナミックな変化・環境への応答・疾患に関連した変化を直接的に捉える事が可能になりつつある。今後も顕微鏡技術が神経回路研究において必須の方法論として重要視され、様々な脳疾患の原因を理解するためにも活用されることを期待している。

参考文献

1. Okabe, S., et al. *Nature Neuroscience*, 2, 804-811, 1999.
2. Sugiyama, Y., et al. *Nature Methods* 2, 677-684, 2005.
3. Kawabata, I., et al. *Nature Communications* 3, 722, 2012. doi: 10.1038/ncomms1736.
4. Ito-Ishida, A., et al. *Neuron* 76, 549-564, 2012. doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.027.
5. Shin, E., et al. *Nature Communications* 4, 1440, 2013. doi: 10.1038/ncomms2443.

SPL-1

6. Isshiki, M., et al. *Nature Communications* 5, 4742, 2014. doi: 10.1038/ncomms5742
7. Chen S, et al. *Science*. 359:679-684, 2018. doi: 10.1126/science.aaq1144.
8. Higashi T, et al. *Cell Reports* 22(4):919-929, 2018. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.101
9. Kashiwagi, Y., et al. *Nature Communications* 10(1):1285, 2019. doi: 10.1038/s41467-019-09337-0.
10. Tamada K, et al. *Nature Communications* 12(1):4056, 2021. doi: 10.1038/s41467-021-24359-3.

SPL-2

基調講演 2

11月11日（土）16：30～17：30

第1会場

原子分解能電子顕微鏡法の新展開と材料科学への応用

幾原 雄一^{A,B,C}東大総合^A, JFCC^B, 東北大 AIMR^CDevelopment of Atomic Resolution Electron Microscopy
and Its application for Materials ScienceY. Ikuhara^{A,B,C}^AInst. Eng. Innovation, Univ. Tokyo, ^BJapan Fine Ceramics Center, ^CWPI-AIMR, Tohoku Univ.

収差補正を用いた走査透過電子顕微鏡法(STEM)の登場により、材料中の界面の原子構造、さらには単原子カラム一個一個について、その位置や元素の識別のみならず、局所的な組成や電子状態の解析までもが可能となっている。また、電子顕微鏡内での精密応力印可や電子ビームの制御により、材料の破壊・変形や拡散などの動的な現象を高分解能で直接観察することも可能になってきている。本講演では、種々のセラミック材料にこれら最新の観察手法を適用し、これより得られた材料設計指針や機能発現メカニズムの解明について紹介する。

セラミック材料は、酸素や窒素など軽元素から構成されており、軽元素の直接観察が必要であるが、従来の HAADF-STEM 法では軽元素の観察自体が困難であった。そこで、我々のグループは、低角に散乱された電子を取り込む環状明視野(ABF)-STEM 法を新たに開発し、材料中の軽元素の直接観察を可能とした。これより、エネルギー・環境材料として注目されているリチウムイオン電池材料中のリチウム原子や水素化合物の水素原子カラムの観察にも成功している。さらに、STEM 装置自体の高分解能化についても東大と日本電子で連携して開発し、2017年、STEMの空間分解能で40.5pmを達成した。この分解能は現時点においてもSTEMとしての世界最高記録を維持している。

材料への応用研究については、2005年、東京大学は我国で最初に収差補正器を既存のSTEM機に搭載し、種々の材料の界面・粒界や転位の構造解析に適用してきた。たとえば、セラミック材料に種々のドーパントを微量添加するとその機械的特性や電気的特性が大きく変化するが、その原因や特性変化のメカニズムの解明に適用した。すなわち、種々ドーパントを添加したセラミックス界面を対象とし、ドーパントの偏析サイトを特定するとともに、原子分解能EDSやEELSを併用して、偏析元素種の特定やその電子状態などを計測した。これらの一連の観察結果を、第一原理計算の結果と比較し、ドーパントのメカニズムなどを定量的に解明してきた。収差補正STEM法を駆使したさらなる例として、無機材料中の軽元素の原子位置の同定、転位芯・格子欠陥構造の解明、粒界三重点に形成される一次元規則結晶の発見など、これまでブラックボックスであった種々の材料現象の解明について取り組んできた。

一方、材料の信頼性、寿命特性などを定量的に把握するためには、材料の破壊や変形の素過程を本質的に理解する必要がある。そこで、(S)TEM内でのその場(*in-situ*)観察・評価技術が破壊および変形の素過程の観察に有用となる。我々は、TEM内にナノインデンテーションを組み込み、セラミックスの破壊・変形中の転位や微視亀裂の動的な観察を行い、転位運動の素過程、転位と粒界との相互作用、亀裂先端からの転位放出、粒界移動の素過程、双晶転位の運動など、これまで未解明であった素過程を次々と明らかにしてきた。最近では、電子ビームで誘起した粒界移動現象の原子レベルでの観察、MEMS技術を導入したTEMホルダーの開発と破壊・変形過程の原子レベル直接観察までもが可能になりつつある。本講演では、上述したような最先端の収差補正STEMや高分解能その場観察法が材料材料科学分野へ与えた役割とそのインパクトについても述べる。

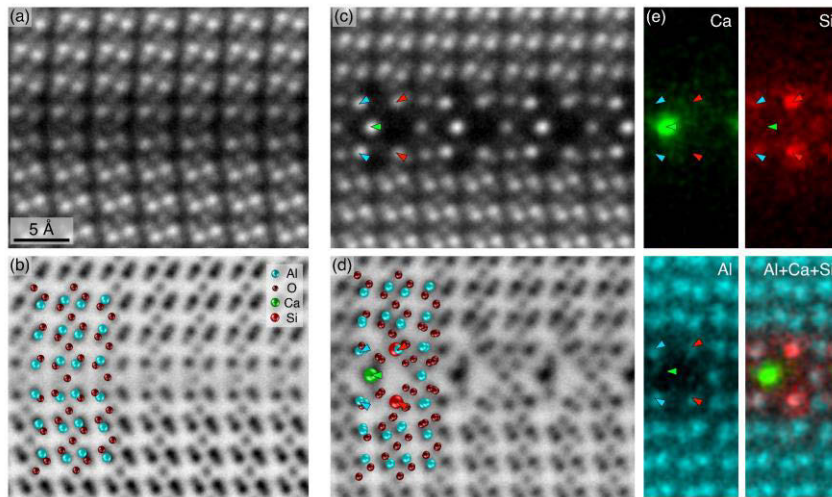


Fig. 1. Segregation Structures of Al_2O_3 $\Sigma 13$ GB (Grain Boundary); (a), (b) ADF and ABF STEM images of pristine $\Sigma 13$ GB; (c), (d) ADF and ABF STEM images of Ca/Si doped $\Sigma 13$ GB; (e) EDS mapping of Ca, Si, Al of the Ca/Si doped $\Sigma 13$ GB.

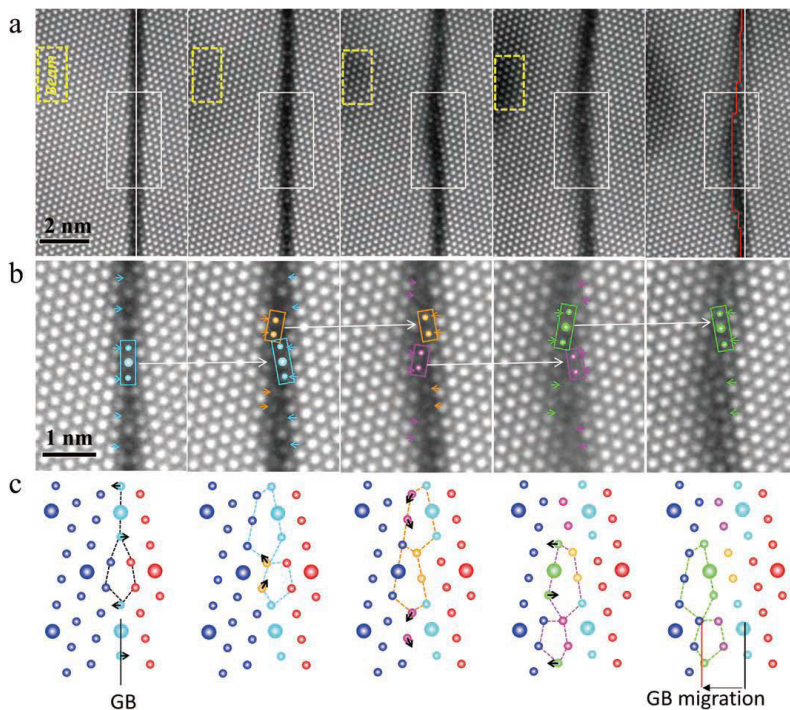


Fig.2. Atomic resolution dynamic observations of grain boundary migration in Al_2O_3 . (a) HAADF STEM images of GB migration induced by electron beam irradiation (yellow box area), (b) magnified HAADF STEM images, and (c) GB atomic structures predicted by first principles calculations.

- [1] T.Futazuka et.al., *Nature Communications*, 13(1), 5299, (2022)
- [2] J.K.Wei et.al., *Nature Communications*, 13(1), 1455, (2022)
- [3] J. K. Wei et al., *Nature Materials*, 20, 951-955(2021).
- [4] D. Yin et.al., *Nature Materials*, 18[1], 19-23 (2019).
- [5] S. Kobayashi et al., *Nature Communications*, 9, 2683 (2018).
- [6] S. Kondo et al., *Science Advances* 2 (11), e1501926 (2016).
- [7] C. Chen et al., *Nature Communications*, 6, 6327 (2015).
- [8] I. Sugiyama et al., *Nature Nanotechnology*, 8[4], 266-270(2013).
- [9] N. Shibata et.al., *Nature Physics*,8[8], 611-615(2012).
- [10] Z. Wang et.al., *Nature*,479[7373], 380-383(2011).
- [11] J. P. Buban et.al., *Science*, 311[5758], 212-215(2006).
- [12] Y. Ikuhara, *J. Electron Micros.*, Review paper, 60, S173 -S188 (2011).

S-1

材料・装置系セッション 物性科学を切り拓く最新顕微法 1

11月11日（土）10：00～11：50

第1会場

DPC STEM の結像理論と局所電磁場解析への応用

関 岳人^{A,B}, 幾原 雄一^{A,C}, 柴田 直哉^{A,C}^A東大工, ^BJST さきがけ, ^CJFCC

Imaging theory of DPC STEM and applications to local electromagnetic field analysis

T. Seki^{A,B}, Y. Ikuhara^{A,C} and N. Shibata^{A,C}^ASchool of Eng. Univ. of Tokyo, ^BJST PRESTO, ^CJFCC.

走査透過電子顕微鏡 (scanning transmission electron microscopy: STEM) は、細く絞った電子線を試料上で走査し、透過・散乱した電子を検出することで像を形成する。従来、環状型の検出器が広く用いられ、高角度に非弾性散乱した電子を検出する高角度散乱暗視野 (high-angle annular dark-field: HAADF) 法や、透過ディスクのうち外周部分の電子を検出する環状明視野 (annular bright field: ABF) 法が、原子位置を直接可視化できる手法として、広く普及している。近年、複数の検出面を有する分割型検出器や、回折パターンを2次元的に記録できるピクセル型検出器が STEM に用いられるようになり、大幅に結像の自由度が増大し、新規 STEM 法の開発が行われている。しかしながら、透過ディスクを用いた STEM の位相結像法はよく理解されていない状況にあった。我々のグループでは、結像理論の構築と材料解析への応用を両輪として進めることで、新規結像法開発を行ってきた。本講演では、局所電磁場を可視化することのできる微分位相コントラスト (differential phase contrast: DPC) 法の結像理論と材料解析応用を中心に議論し、付随して開発された低ドーズ STEM 法である最適明視野 (optimum bright field: OBF) 法についても紹介する。

DPC 法は STEM の一手法であり、電場や磁場による電子線の偏向を分割型検出器またはピクセル型検出器で計測し、試料内部の電磁場を高い分解能で可視化することができる (図 1) [1,2]。ナノメートルスケールの電子プローブを用いることで、半導体中の p-n 接合や強磁性体中の磁区、磁気スキルミオンの可視化がこれまで行われている。また、原子スケールのプローブを用いることで原子核と電子雲により生じる電場も可視化可能となっている。これらの電磁場イメージングを行うにあたっては DPC 像取得時に、1. デフォーカスや収差などによるコントラスト変化を正しく理解し、収差を十分に調整すること、2. 回折により生じる DPC コントラストを十分に抑制すること、が重要となるが、いずれもその方法が未確立であった。そこで我々のグループでは、DPC STEM の結像理論を構築することで収差の調整方法を確立するとともに、電子線の傾斜システムを用いた回折コントラスト抑制法を開発した。

DPC STEM は電子が試料を透過する際の位相変化を用いた結像手法であり、弱位相物体を仮定することで位相コントラスト伝達関数 (PCTF) を定義することができる。しかしながら、ヘテロ接合界面や多結晶試料では、透過関数の振幅 (吸収) によるコントラストも重要となる。そこで、弱吸収物体を仮定することで、振幅コントラスト伝達関数 (ACTF) を定義し、そのふるまいについて詳細に検討を行うと共に、マルチスライス像計算や実験と比較することで、振幅コントラストの定性的な理解を行った[3]。振幅コントラストは収差の存在しない条件では生じないこと、過焦点と不足焦点ではコントラストが反転することが明らかとなった。また、マルチスライス計算や実験による調査で、回折による透過波の減衰も吸収とみなすことで界面におけるコントラストを解釈できることが分かった。これらの結果から、多結晶試料において粒界におけるコントラストを最小化することで、収差の調整を行うことが可能となった。

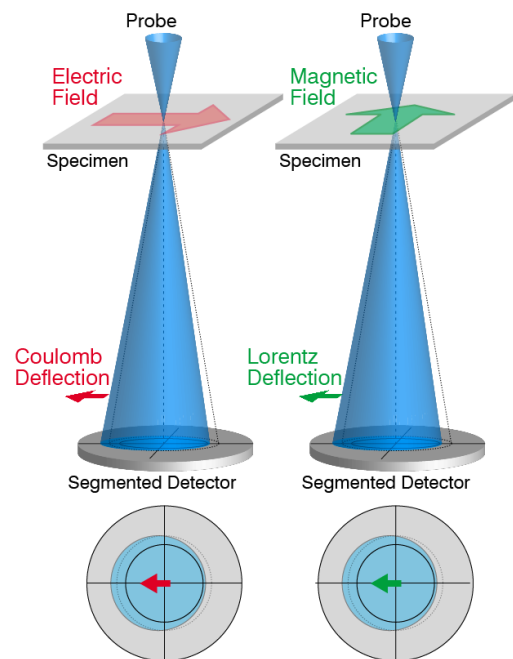


図 1. DPC STEM の模式図

S-1-1

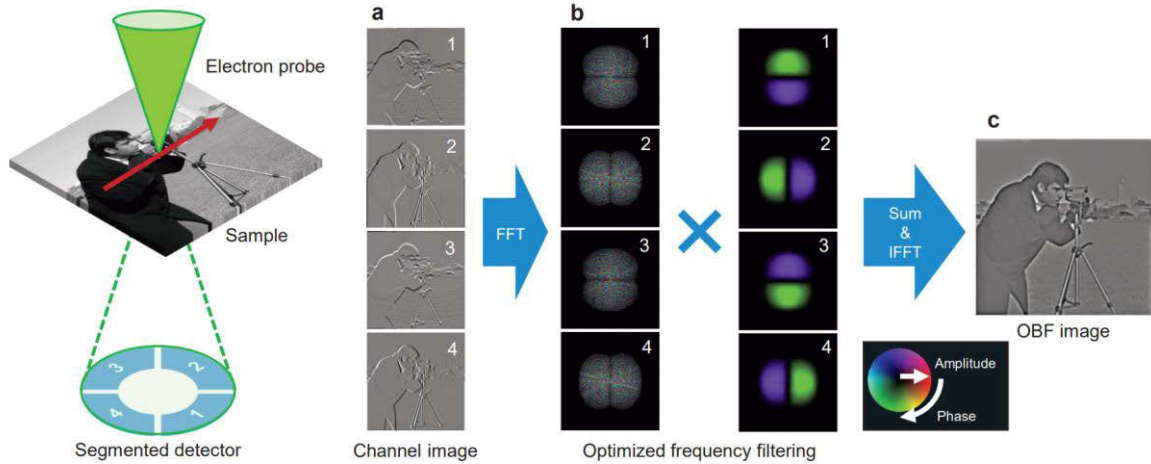


図1. OBF STEM の結像原理の模式図。(a) 分割型検出器の各チャンネルより STEM 像が同時取得され、(b) 各チャンネル像に対して周波数フィルタが施される。なお、各画像の周波数成分およびフィルタは複素数であるため、振幅と位相をカラーホイール表示にて示した。(c) 最終的に各チャンネル像を足し合わせ逆フーリエ変換を行うことで、OBF 像が得られる。(文献[11]より転載)

回折コントラストの抑制は、従来は試料の傾斜により強い回折を起こさない条件を探すことで行われてきた。しかしながら、さまざまな結晶方位をもつ多結晶試料や強い歪みのあるヘテロ接合界面近傍では、従来手法では回折コントラストを十分に抑制することは難しかった。我々は、試料と入射電子線の相対方位に対して回折による DPC 信号が非常に敏感で、電磁場による DPC 信号はほとんど変化しないことに着目し、さまざまな相対方位で DPC 信号を取得し平均化することで回折コントラストを抑制する手法を開発した。簡便には試料傾斜をわずかず傾斜させながら多数枚の DPC 像を取得し、実験後に平均像を得ることで回折コントラストを抑制できるが[4]、実験に長い時間がかかり、さらにその場で結果を確認することができないという問題がある。そこで、試料傾斜ではなく、入射電子線を傾斜するコイルを新たに開発し、スキャンと信号検出に同期しながら電子線を傾斜することで、その場で回折コントラストを低減する手法 (tilt-scan-averaged DPC: tDPC) を開発した[5,6]。tDPC 法により、多結晶試料中の磁区や半導体ヘテロ接合における二次元電子ガスの可視化に成功している[7,8]。

DPC STEM 法の研究が進展することで、STEM における位相イメージング一般の理解が深まり、新しい原子分解能 STEM 法の理論的開発が可能となった。STEM におけるノイズの理論的枠組を構築し[9]、STEM 位相イメージングの理論に組み合わせることで、弱位相物体近似において最も高い信号ノイズ比の像を生成する方法を理論的に導かれ、最適明視野 (optimum bright field: OBF) 法の開発に至った[10,11]。OBF 法では、分割検出器やピクセル型検出器で同時取得した多数枚の STEM 像をフーリエ変換し、最終的な信号ノイズ比が最大となるように最適化された重み付けフィルタを適用し、足し合わせた後に逆フーリエ変換することで像を生成する (図2)。本手法により、ABF 法よりもおよそ2桁高い感度で原子を結像することが可能となった。これにより、電子線照射で構造が損傷してしまいこれまで高分解能観察が困難であった材料の観察も可能になってきている。代表的な電子線敏感材料のゼオライトでは、局所領域でシリコンと酸素の全原子サイトの可視化が達成された[12]。

【参考文献】

- [1] N. Shibata *et al.*, *Acc. Chem. Res.* **50**, 1502–1512 (2017).
- [2] T. Seki, Y. Ikuhara, N. Shibata, *Microscopy* **70**, 148–160 (2021).
- [3] T. Seki *et al.*, *Ultramicroscopy* **240**, 113580 (2022).
- [4] Y. O. Murakami *et al.*, *Microscopy* **69**, 312–320 (2020).
- [5] Y. Kohno *et al.*, *Microscopy* **71**, 111–116 (2022).
- [6] S. Toyama *et al.*, *Ultramicroscopy* **238**, 113538 (2022).
- [7] Murakami *et al.*, submitted.
- [8] S. Toyama *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* **18**, 521–528 (2023).
- [9] T. Seki, Y. Ikuhara, N. Shibata, *Ultramicroscopy* **193**, 118–125 (2018).
- [10] K. Ooe, T. Seki, Y. Ikuhara, N. Shibata, *Ultramicroscopy* **220**, 113133 (2021).
- [11] 大江ら, *顕微鏡* **57**, 49–53 (2022).
- [12] K. Ooe *et al.*, *Sci Adv.* **9**, eadf6865 (2023).

高分解能無磁場電子顕微鏡の開発

河野 祐二^A, 柴田 直哉^B

日本電子(株)^A, 東京大学^B

Development of high-resolution magnetic field-free electron microscope

Y. Kohno^A and N. Shibata^B

^AJEOL Ltd., ^BThe University of Tokyo

電子顕微鏡の分解能や安定性は、対物レンズの性能によるところが大きい。例えば TEM 像観察の場合、対物レンズで試料の像を 100 倍程度拡大するので、後段レンズはすでに拡大された像を結像することになり、これらのレンズ系におけるノイズや収差の分解能や安定性への影響は小さく抑えられる。STEM の場合にも、倍率を縮小率と読み替えれば同じことがいえる。実際の顕微鏡において、対物レンズの倍率を大きくとり、その他のレンズ系からの収差やノイズの影響を小さくすることは、安定した高分解能観察を実現するうえで非常に重要となっている。また、対物レンズの倍率を大きくとるためには、焦点距離の短い、収束作用の強いレンズを試料の近傍に配置する必要があるが、このような配置では色収差係数が焦点距離と同程度の値になる。そのため短焦点レンズの使用により色収差の影響を低減することもできる。このように短焦点レンズを試料近傍への配置は、電子顕微鏡で高分解能観察をするうえで非常に有効な構成となっている。電子顕微鏡では回転対称性をもった磁場が電子線の収束作用を持ち、レンズの役割を果たす。一般的な高分解能電子顕微鏡の対物レンズでは、試料を 2~3T 程度の非常に強い回転対称磁場中に配置し、試料の前後の磁場を対物レンズとして利用する。このような構造をとることにより、短焦点のレンズを試料の近傍に配置し、高分解能観察を可能にしている。しかしながら、このような対物レンズで磁性材料の原子構造や磁場構造の観察を行うと、レンズ磁場による試料の歪・変形や磁気構造の変化、試料によるレンズ磁場の乱れで発生する収差等の問題があり、高分解能観察が困難であった。

この問題を解決するために、東京大学と日本電子のグループは、試料周辺を磁場フリーに保ちながら、原子分解能観察が可能な無磁場電子顕微鏡の開発を行った[1]。この開発では、試料周辺を磁場フリーに保ちながら焦点距離の短いレンズ、すなわち強磁場を試料近傍配置できる磁場フリー対物レンズを開発した。図 1 に磁場フリー対物レンズの概略図を示した。この対物レンズは 2 つの短焦点レンズから構成されており、試料面に対して対称に磁極とコイルを配置し、コイルの電流は反対称に励磁している。この構成によって上下のレンズの Z 方向磁場が打ち消しあい、もともとの回転対称性と合わせることで試料周辺の磁場を小さく抑えたまま、強磁場を試料の近傍に配置することが可能になった。実際に開発されたレンズでは、試料周辺の磁場を 0.3mT 以下に保ちながら、3mm 程度の焦点距離と色収差係数を実現することに成功している。一方で、このレンズは 18mm 程度の非常に大きな球面収差係数を持っており、対物レンズ単体では高分解能観察が難しい。そこで、高次収差の発生を抑えられるデルタコレクター[2]を照射系に組み込むことにより、STEM 像への幾何収差の影響を低減し、図 2 の Ge[112]の ADF STEM 像で示されているように 82pm の原子間隔を分解することも可能になった[3]。

当初、無磁場電子顕微鏡は STEM イメージングをターゲットとして開発されたが、それ以外観察・分析機能の実装に向けた開発も進められている。そのうちの一つとして TEM 観察がある。磁場フリー対物レンズが上下対称なことを考慮すれば、TEM 側に収差補正器を構成すれば高分解能 TEM 観察が可能になることは予想できる。実際に、結像系にデルタコレクターを搭載した光学系を開発し、図 3 に示したような収差が補正された状態の高分解能 TEM 像を取得することができるようになった。しかし、無磁場電子顕微鏡では、明・暗視野 TEM 像を取得する際に必要な対物絞りを、対物レンズの後方焦点面もしくはその近傍に配置することが困難であった。これは試料が配置される上下の対物レンズの磁極ギャップ間の磁場が非常に小さいため、ギャップ近傍に後方焦点面が形成されず、インギャップ型の対物絞りを使用できないことによる。そこで、新たに TEM 収差補正器と中間レンズの間にレンズを追加し、中間レンズ前方の固定された位置に回折面を形成する光学系を開発し、絞りを配置することによって明・暗視野像の観察を可能にした。図 4 に本光学系を使用して取得した STO[100]の小傾角粒界の転位列の明・暗視野像を示した。この光学系を使用すると回折面と絞りの位置を完全に一致させることができるので、視野の広い、明瞭な暗視野像

S-1-2

を取得することが可能になっている。

無磁場電子顕微鏡を用いた X 線分析システムにも進展があった。加速された電子線を試料に照射すると X 線だけでなく、反射電子や二次電子といった様々なエネルギーを持つ電子線が発生する。一般的な対物レンズでは、入射してくる電子線を収束させるために存在する試料周辺の磁場が、反射電子や二次電子を偏向し、これらの電子が X 線検出器に到達することを妨げている。この試料周辺磁場の遮蔽効果によって検出器を試料のごく近傍に配置することができ、高い感度の X 線分析が可能になっている。しかし、無磁場電子顕微鏡では試料周辺が磁場フリーに保たれており、反射電子を偏向させるほどの磁場は存在しない。そのため、通常の電子顕微鏡と同じように検出器を配置すると、非常に高いエネルギーを持った電子線が検出器に入射し、検出系を飽和させたり検出器にダメージを与えたりする。そのため、無磁場電子顕微鏡では X 線分析が困難であった。この問題に対応するため、我々は 200kV の電子線をカットすることのできる磁場型の反射電子フィルターを開発し、試料と検出器の間に構成した。フィルターの構成によって、立体角は 0.1~0.15sr 程度と制限されたが、エネルギー分解能や軽元素検出に関しては一般的なシステムと同等の X 線分析システムを構成でき、無磁場電子顕微鏡の STEM 観察と X 線分析を併用できるようになった。

本講演では、磁場フリー対物レンズの特徴と、無磁場電子顕微鏡の光学系の構成、TEM や X 線分析等の最近の結果、無磁場電子顕微鏡の今後について議論したい。

[1] N. Shibata, et al., *Nature Comm.* **10**, 2308 (2019)
[2] H. Sawada, et al., *J. Electron Microsc.* **58**, 341 (2009)
[3] Y. Kohno, et al., *顕微鏡* **57**, 131 (2022)

本研究は JST ERATO JPMJER2202 の支援を受けたものである。

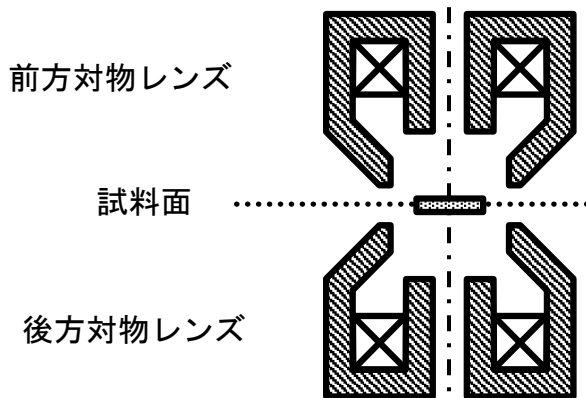


図 1 磁場フリー対物レンズの概略図

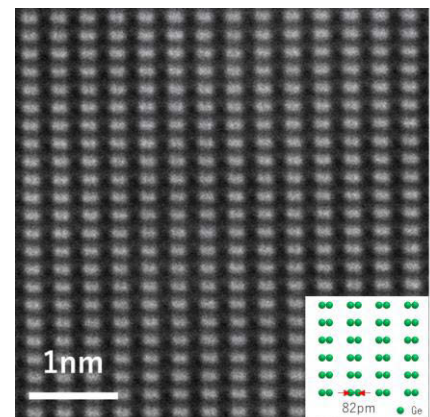


図 2 Ge [112] ADF STEM 像
5us/pixel, 50 枚積算

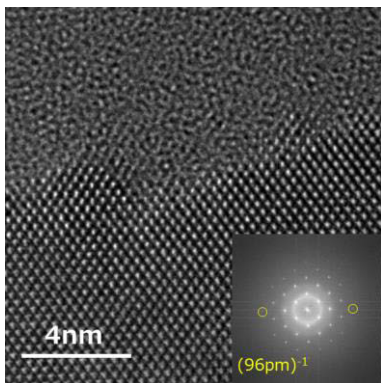


図 3 Si [110] 高分解能 TEM 像

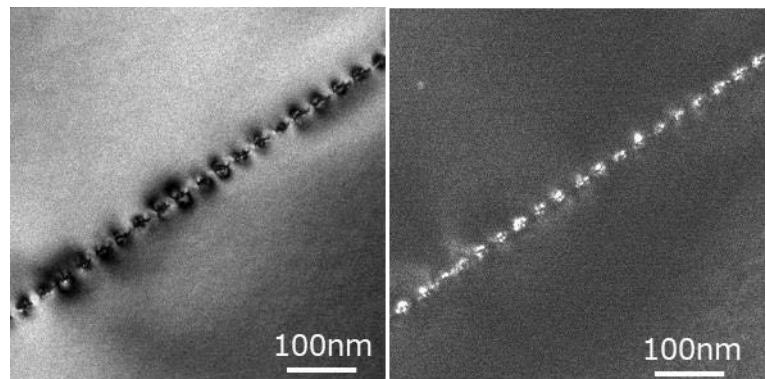


図 4 ST0 [100] の小傾角粒界の明・暗視野像

本試料は東京大学の近藤博士、関博士に提供いただいた。

その場電子顕微鏡観察による電池反応解析
 吉田 要^A, 佐々木 祐生^A, 桑原 彰秀^A, 幾原 雄一^{A,B}
 ファインセラミックスセンター^A, 東京大学^B

In situ Electron Microscopic Observations of Reactions in Batteries
 K. Yoshida^A, Y. Sasaki^A, A. Kuwabara^A and Y. Ikuhara^{A,B}
^AJapan Fine Ceramics Center, ^BSchool of Eng. Univ. Tokyo

-背景-

モバイル機器をはじめとして、様々な電子機器において高性能な充電電池（二次電池）は欠かせない存在となっている。特に軽量で高いエネルギー密度を有するリチウムイオン二次電池（LiB）の登場により、多くの機器が LiB に著しく依存した状況となっている。典型的な LiB の構造を Fig. 1 に模式的に示した。しかし一方で LiB の更なる高性能化は限界に近づいているといわれており、革新的な二次電池開発が現在強く求められている。特に急激な電気自動車への転換や不安定な再生エネルギーの貯蔵方法の確立といった背景から、高性能二次電池開発が急務であり、将来における持続可能な技術として研究の重要性がさらに高まっている。二次電池の用途は上記のようにモバイル用途から大容量の定置式に至ると多岐にわたるため、開発目標となる方向性も一つに定まったものではない。そのため開発が試みられている革新二次電池の方式も様々である。非常に大型になるレドックスフロー型の電池を除くと、二次電池の構造タイプとしては、電極材料での反応タイプと電解質内イオンの動きとで大まかに分類される。Fig. 2 には電極での反応タイプによる分類、Fig. 3 には電解液内イオンの動きによる分類をそれぞれ模式的に示した。

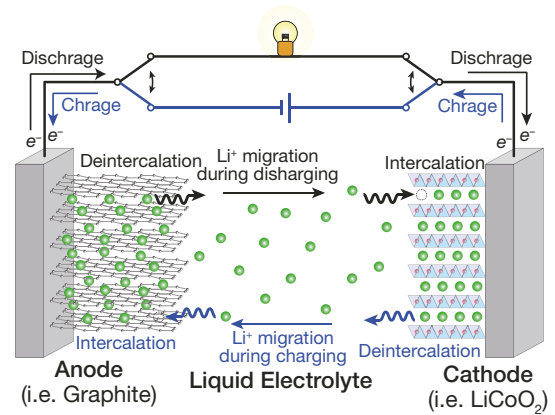


Fig 1. A structural model of typical LiB.

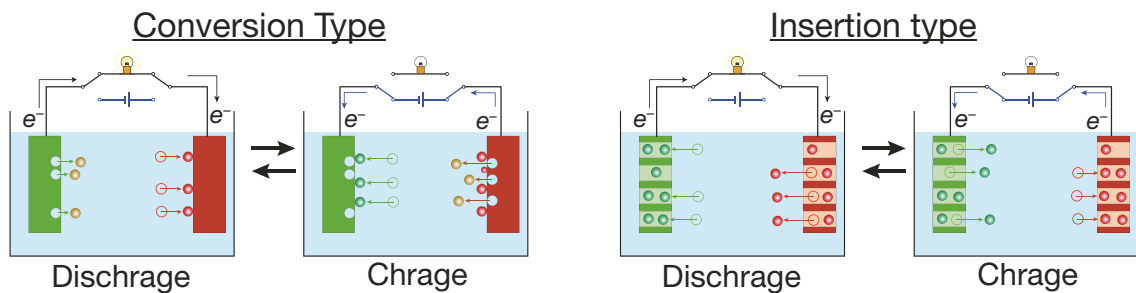


Fig. 2. Two classes of secondary batteries based on electrode reactions

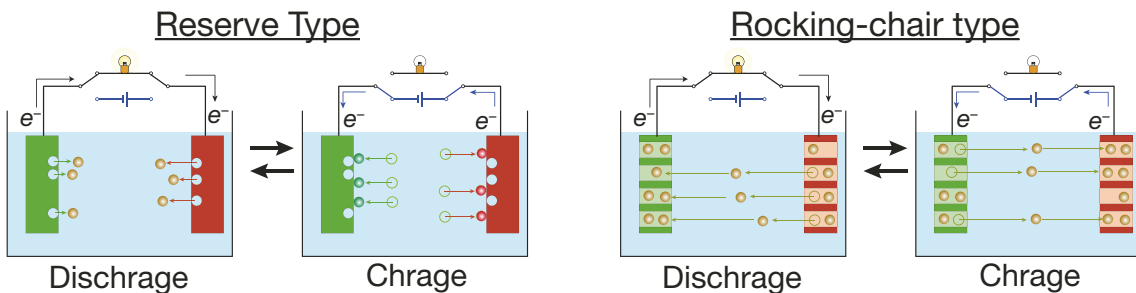


Fig. 3. Two classes of secondary batteries based on ionic flows in the electrolyte

上記2点の分類からみると LiB は脱挿入型かつロッキングチェア型にあたる。こうした構造を組み合わせることで革新型二次電池開発は進められているが、電池内での反応は多くの界面を含む

S-1-3

めそのメカニズムは複雑である。そうした背景において開発での様々な課題を解決するために反応過程をナノスケールで解析したいといった要望が高い。しかし一方で電子顕微鏡によるその場観察では必ずしも電池内反応をそのまま再現することはできないため、解析対象とする物理現象を絞ってモデル化する必要がある。本発表では電池開発のための電極反応その場観察事例として、脱挿入型反応である二硫化モリブデンへのリチウム挿入過程、コンバージョン型反応である亜鉛金属電析過程のそれぞれの結果を示して、目的に応じた手法選択について考察を行う。

-実験-

二硫化モリブデンのリチウム挿入過程その場観察には、NanoFactory 社製プローブホルダーと Thermo Fisher Scientific 社製 TITANE-TEM を組み合わせて観察を行った[1]。リチウム供給源となる電解質としてはリチウム金属表面の酸化リチウム層を用い、観察中に二硫化モリブデンとコンタクトプローブ間に電圧印加することでリチウム挿入反応を制御した。

各種水系電解質中における亜鉛電析過程その場観察には、透過型電子顕微鏡 (TEM) [2]および走査電子顕微鏡 (SEM) [3]の2手法において比較検討を行った。その場 TEM 観察には Thermo Fisher Scientific 社製 TITANE-TEM と Protochips 社製 Poseidon とを組み合わせた構成を用いた。また SEM 観察においては日本電子社製 ClairScope に電気化学制御システムを新規に構築することでその場観察を行った。

-結果-

二硫化モリブデンのリチウム挿入過程では、電解液中ではなく二硫化モリブデン薄膜端へ固体電界質をピンポイントでコンタクトさせる方式を採用したことにより、二硫化モリブデン面内へのリチウム挿入過程が明瞭に観察された。Fig. 4 にはリチウム挿入過程の動画から抽出した 80kV-TEM 像を示す。

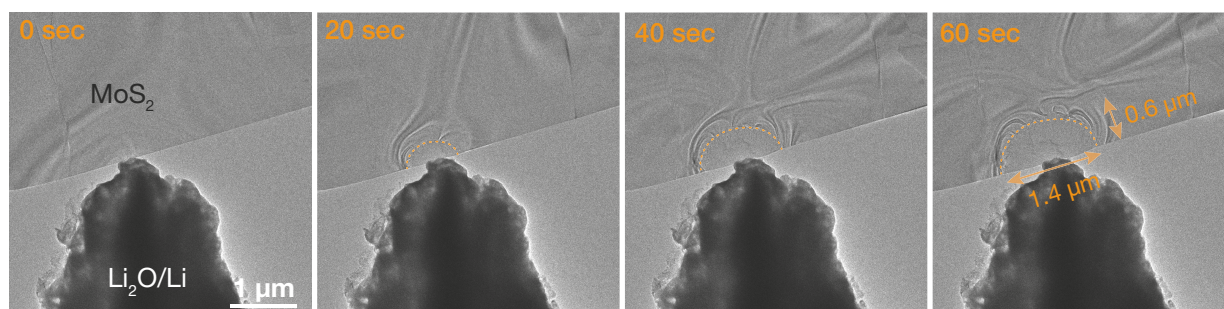


Fig. 3. Sequential TEM images for lithiation process of MoS₂

上記の実験では二硫化モリブデン薄膜の周辺は真空で保たれる構成となっているため高分解能観察や EELS 解析が可能となり、内部構造情報が必要とされる挿入反応過程の解析には非常に有効に機能することが確認された。

一方で亜鉛電析過程における解析においては、電析層形成時の形状 (外形) 変化が重要であるため、その点に着目して TEM 法と SEM 法との比較を行った。その結果、亜鉛電析形状の再現性についてその場液中 TEM 観察法での原理的課題が明らかとなり SEM 法による形状観察の有効性が確認された。電析過程などでは電解液中での 3 次元的なイオン拡散などが鍵となり、TEM 法での薄い液相厚みが反応再現性を阻害している可能性があり、その詳細については当日紹介する。

-参考文献-

1. K. Yoshida *et al.*, *Solid State Ionics* **357** (2020) 115488
2. Y. Sasaki *et al.*, *J. Power Sources* **481** (2021) 228831
3. K. Yoshida *et al.*, *Microscopy* **71** (2922) 311-314

-謝辞-

本研究の一部は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の助成事業 (JPNP16001:RISING2)および (JPNP21006: RISING3) のもとに行われました。

電子線をパルス化しない時間分解カソードルミネセンス計測
三宮工
東工大物質理工

Time-resolved cathodoluminescence measurement
without electron beam pulsing

T. Sannomiya

School of Mater. & Chem. Tech., Tokyo Tech.

近年、電子線を用いた光学計測は、光の回折限界を超えた光計測として、基礎及び応用の両分野において注目されている。特に走査透過電子顕微鏡 (STEM) を用いることで、電子顕微鏡の分解能である 1nm スケールでの光計測が可能となる。電子線による光計測には、1) 光励起による電子線のエネルギー損失を電子分光により計測する方法である電子エネルギー損失分光 (EELS) と、2) 電子線励起による発光であるカソードルミネセンス (CL) を計測する CL 法がある。EELS においては、励起のみが計測されるのに対し、CL では発光のみが計測される。本発表では、STEM-CL 法の手法および応用計測について発表する。CL は、電子の発見やブラウン管ディスプレイなど古くから知られている。計測としての CL 法においても、ワイドギャップ半導体の解析など計測にも用いられてきており、励起計測である EELS と比較して、偏光分解や発光の角度分解など光計測の手法がそのまま適用できる利点がある。

CL 信号は、コヒーレントな発光とインコヒーレントな発光に大きく分けられる。コヒーレントな発光は、電子の作る電磁場の光周波数成分を励起源とした光散乱であり、電子の作る励起電磁場と発光 (散乱) の電磁場の位相関係が保たれる。このようなコヒーレント CL では、発光強度は電磁場モードの作り出す電場の電子線平行成分に対応する。これを利用して、例えば、表面プラズモンやナノフォトニック構造の作りだす電磁場を電子線スケールで直接可視化することができる。

一方、緩和過程を伴い、励起と発光の位相関係が失われるような蛍光のような電子線励起発光は、インコヒーレント CL と呼ばれ、半導体中のキャリアやエキシトンの発光、あるいは結晶欠陥、錯体の発光などがある。このような発光においては、CL を用いることで、欠陥によるローカルな消光や、局所的な発光寿命計測などが可能となる。本発表では、CL 光子の時間相関を用いた発光寿命計測を紹介する。インコヒーレントな CL では、一つの電子から複数の光子が生成されることが多い。CL による放出光をビームスプリッタで分岐し、それぞれのパスにおいて単一光子検出器

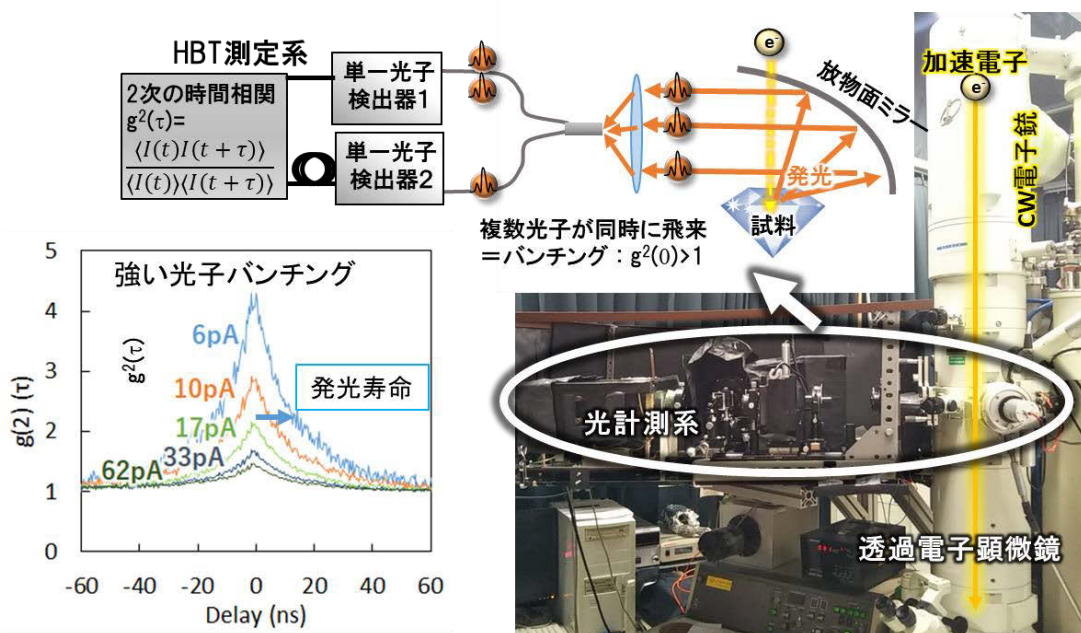


図1 走査透過電子顕微鏡カソードルミネセンス (STEM-CL) 装置に、Habury-Brown Twiss 計測系を導入した装置模式図。[2]

S-1-4

(SPCM) を用いて光子カウンティングし、時間相関器により強度の2次の自己相関 ($g^{(2)}$) を計測すると (図1)、遅延時間ゼロのときに強い相関が現れる (光子バンチング)。[1-3]この時間相関計測法は Hanbury-Brown Twiss (HBT) 法と呼ばれる。光子バンチングの時間減衰は発光源の寿命に対応するため、電子線の分解能で発光寿命計測が可能となる。この方法では、電子線を積極的にパルス化することなく、自然放出された電子一つ一つをパルスとして利用することで、時間分解計測が可能となっている。光子検出側だけのパッシブな計測により時間分解 CL が達成できるため、極めて簡便な方法である。本発表ではこの計測法そのものとともに、ナノダイヤモンド中の窒素—空孔中心の発光寿命変化[2]、ペロブスカイト発光材料の寿命計測などの応用例を紹介する。

また、HBT 法における時間相関の片側を、STEM の電子検出器に接続すると、透過した電子と CL 光子の相関を得ることができる。通常の STEM 電子検出器は、電子をシンチレータにより光に変換しているため、その光信号をそのまま SPCM に導入することで (図2)、透過電子—CL 光子の時間相関を得ることができる。[4] 前述の HBT 法では、1つの電子で2個以上の光子が放出される光子バンチングを必要とする一方、この電子—光子相関 CL 法では光子状態によらずパッシブな発光寿命計測が可能となる。またここでは、シンチレータの発光寿命とサンプルの発光寿命が、減衰曲線の遅延時間の正負側にそれぞれ独立に現れるのが特徴である。

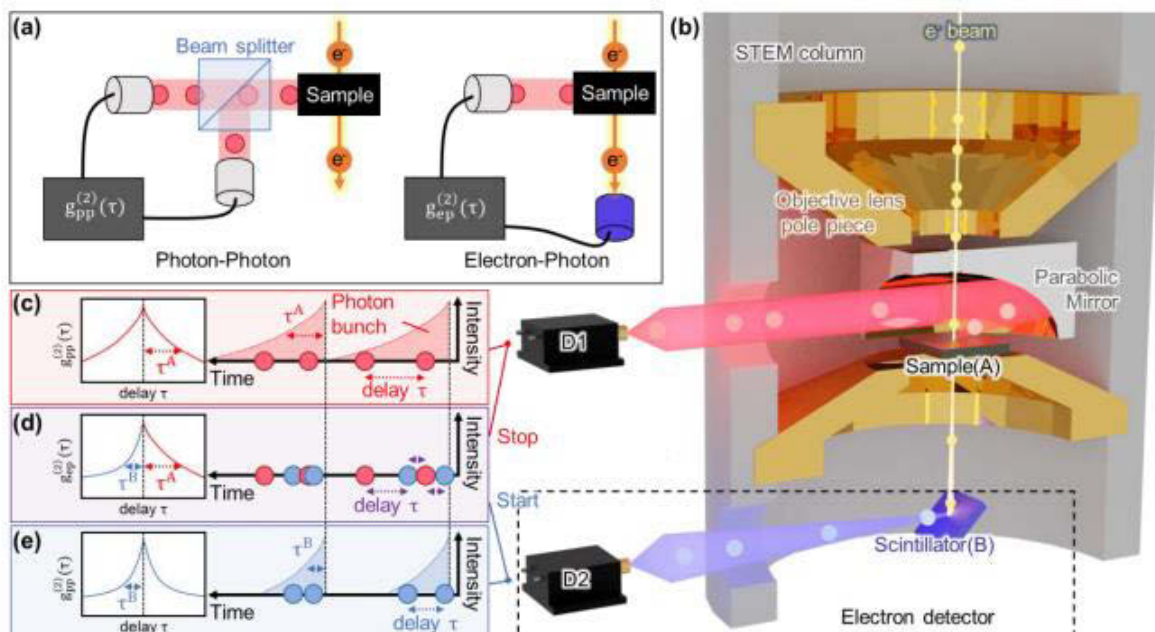


図2 電子—光子相関計測模式図。[4] (a) 光子—光子相関 (左) と、電子—光子相関 (右) の概念図。(b) 電子—光子相関装置模式図。(c-e) サンプルからの CL 自己相関、サンプルとシンチレータの相互相関 (電子—光子相関)、シンチレータからの CL 自己相関。

参考文献

[1] Photon Bunching in Cathodoluminescence, S. Meuret, L. H. G. Tizei, T. Cazimajou, R. Bourrellier, H. C. Chang, F. Treussart, M. Kociak, *Phys. Rev. Lett.* 114, 197401 (2015).
 [2] Purcell effect of nitrogen-vacancy centers in nanodiamond coupled to propagating and localized surface plasmons revealed by photon-correlation cathodoluminescence, S. Yanagimoto, N. Yamamoto, T. Sannomiya, K. Akiba, *Phys. Rev. B*, 103, 205418 (2021).
 [3] Superbunching in cathodoluminescence: A master equation approach, T. Yuge, N. Yamamoto, T. Sannomiya, K. Akiba, *Phys. Rev. B*, 107, 165303 (2023).
 [4] Time-correlated electron and photon counting microscopy, S. Yanagimoto, N. Yamamoto, T. Yuge, H. Saito, K. Akiba, T. Sannomiya, *Comm. Phys.* 6, 260 (2023).

S-2

分科会セッション：生体解析分科会
バイオ向けクライオ透過電子顕微鏡
の多様性の最前線 4

11月11日（土）10：00～11：50

第2会場

北大薬学部におけるクライオ電子顕微鏡施設の紹介

喜多 俊介^A, 前仲 勝実^A^A北大院薬^A

Introduction of Cryo-Electron Microscopy Facilities at Hokkaido University

S. Kita^A and K. Maenaka^A^AFaculty of Pharm. Sci., Hokkaido Univ.

北海道大学薬学部では2019年にクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を導入し、その後、クライオ集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (cryoFIB-SEM) やクライオ相関光電子顕微鏡 (cryoCLEM) などを継続して導入し、クライオ電子顕微鏡施設として環境を充実させてきた (図1)。時系列を追って記述すると、2019年度に Glacios (Thermo Fisher Scientific 社、cryo-EM、加速電圧 200 kV)、2020年度に Aquilos (Thermo Fisher Scientific 社、cryoFIB-SEM) と EM Cryo CLEM (Leica 社、cryoCLEM)、2021年度に Krios G4 (Thermo Fisher Scientific 社、cryo-EM、加速電圧 300 kV) を導入してきた。現在、共同研究をベースとして、Glacios と Krios を開放している。また、試料凍結機器として、Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific 社)、Leica EM GP2 (Leica 社) についても機器を開放しており、試料凍結から電子顕微鏡での観察やデータ収集まで、ユーザーのサポートを行っている。

研究内容は主にタンパク質の単粒子解析を行っており、特に新型コロナウイルスの spike タンパク質について構造解析を進めてきた。論文化されたものとして、SARS-CoV-2 オミクロン BA.2.75 や XBB.1 の spike タンパク質および spike-ACE2 複合体の構造解析が挙げられる (Cell Host Microbe., 2022) (Nat. Comm., 2023) (図2)。SARS-CoV-2 spike に結合する中和抗体や化合物との複合体構造も 20 種類程度解析し、順次論文発表およびその準備を進めている。この中では、広く変異ウイルスに効果を示す広域中和抗体について構造決定に成功し、論文発表を行った (mAbs, 2022) (Nat. Comm., 2023)。外部ユーザーの成果として、ペプチドホルモンであるガラニンとガラニン受容体 (GALR2)、Gq 蛋白質からなる三量体について、構造解析に成功している (PLoS Biol., 2022)。また、微小結晶を用いて構造解析を行う microED にも取り組んでおり、主に低分子化合物、中分子化合物の結晶を対象として構造解析を行ってきた (Angew. Chem., 2023) (ChemCatChem., 2021)。さらに最近では、ウイルスの電子線トモグラフィーや細胞試料の観察についても着手し、研究内容を in situ 構造生物学へと拡張しつつある。

本発表では、北大薬学部の機器、これまでの成果と現在取り組みつつある研究について、簡単に紹介したい。

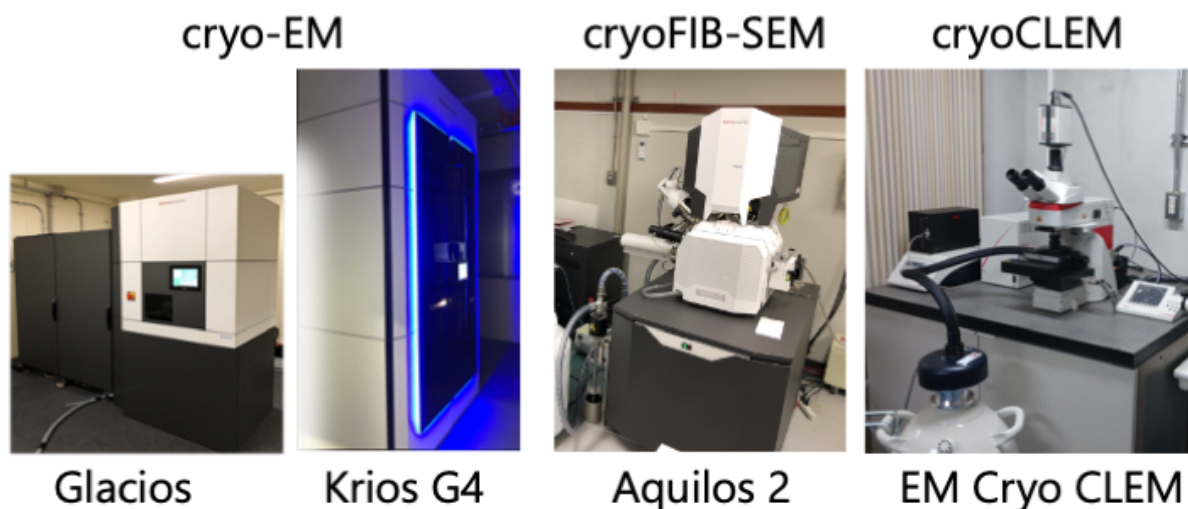
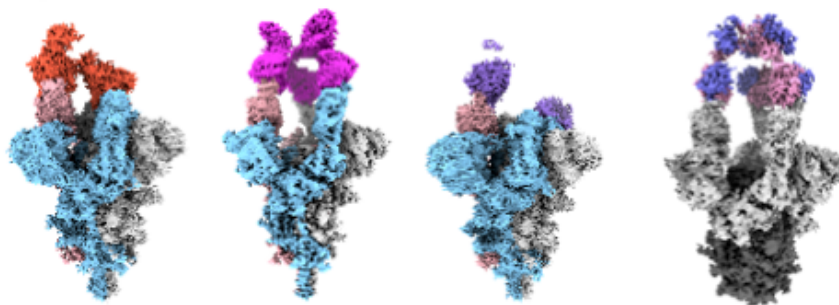


図1 北大薬学部の電子顕微鏡関連機器。

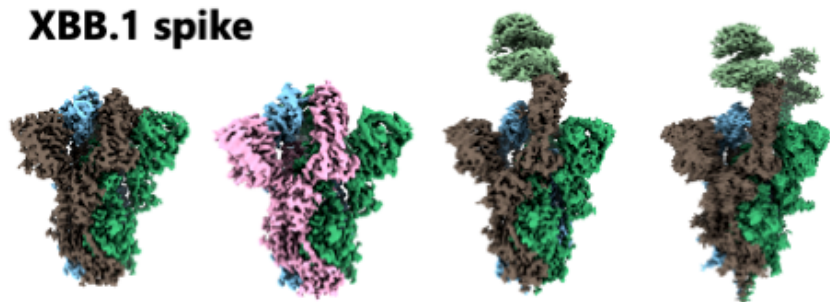
spike-中和抗体複合体



S-NIV10 Fab S-NIV11 Fab S-NIV13 Fab
Moriyama *et al*, *Nat Commun.*, (2023)

S-UT28K Fab
Ozawa *et al*, *mAbs* (2022).

XBB.1 spike



closed-1 closed-2 1 up-ACE2
T. Tamura, *et al*, *Nat Commun.*, (2023).

2 up-ACE2

図2 クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析例。

蛍光ビーズの“位置合わせ”による Cryo-CLEM 観察の精度と応用の可能性

中深迫 美穂^A, 五味渚 由貴^B, 高崎 寛子^C, 森本 雄祐^B,
加藤 貴之^C, 安永 卓生^B

九工大・情報工学府^A, 九工大・情報工学研究院^B, 阪大・蛋白研^C

Accuracy and application in cryo-CLEM observation by “alignment” using fluorescent beads

M. Nakafukasako^A, Y. Gomibuchi^B, H. Takazaki^C, Y. Morimoto^B,
T. Kato^C and T. Yasunaga^B

^AGrad. Sch. Comp. Sci. Syst. Eng., Kyutech., ^BDept. Phys. Info. Tech., Kyutech.,
^CIPR, Osaka Univ.

1. はじめに

近年、同一のサンプル・ターゲットに対して複数の観察手法を適用する相関顕微鏡法 (Correlation Microscopy) が注目を集めている。特に、蛍光顕微鏡法と電子顕微鏡法を組み合わせた光-電子相関顕微鏡法 (CLEM : Correlative Light and Electron Microscopy) は、タンパク質の局在観察やターゲットの探索効率の向上など多くの利点があることから、バイオ関連の研究に利用されている。

クライオサンプルで行う cryo-CLEM では、サンプルを凍結前もしくは後に蛍光顕微鏡で観察したのち、電子顕微鏡装置に移送、観察を行うのが一般的な流れである。ここで、それぞれの計測においてサンプルが同じ視野・位置であることを保証するために、視野の“位置合わせ”と呼ばれるプロセスを行う必要がある。本報告では、蛍光ビーズを用いた位置合わせ手法と、それによって得られた相関精度、この手法による応用の可能性を紹介する。

2. 蛍光ビーズを用いた位置合わせ手法

蛍光像と電子顕微鏡像など異なる顕微鏡視野で相関を取ることを“位置合わせ”という。位置合わせでは、蛍光顕微鏡座標系の座標群と電子顕微鏡座標系の座標群の対から最小二乗法を用いて変換行列を導出する。その変換行列により、蛍光顕微鏡座標系上の座標を電子顕微鏡座標系の座標として考えることができる。

ここでは、蛍光ビーズを用いた2段階の位置合わせを行う手法を提案する。蛍光ビーズとは、その名の通り蛍光を有しているビーズであり、x40程度の蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察可能である (図1)。ここでは、この蛍光ビーズを位置合わせの際のマーカーとして使用する。まず、1次相関では、グリッド全体の大まかな位置合わせを行う。このとき、低倍率でも観察可能な1 μm以上の大きさの蛍光ビーズを使用する。次に、2次相関では、ターゲットが存在するグリッド内のグリッド穴単位での位置合わせを行う。このとき、電子顕微鏡のデータ収集に利用されるSAモードの倍率で観察可能な500 nm以下の大きさの蛍光ビーズを使用する。

最終的に、2次相関にて行った位置合わせで導出された変換行列を用いて「同定した座標系」により蛍光顕微鏡座標から電子顕微鏡座標に変換し、推定されるターゲット位置を中心とした視野を撮影することで、確度良く狙ったターゲットを撮影することを可能とする。

S-2-2

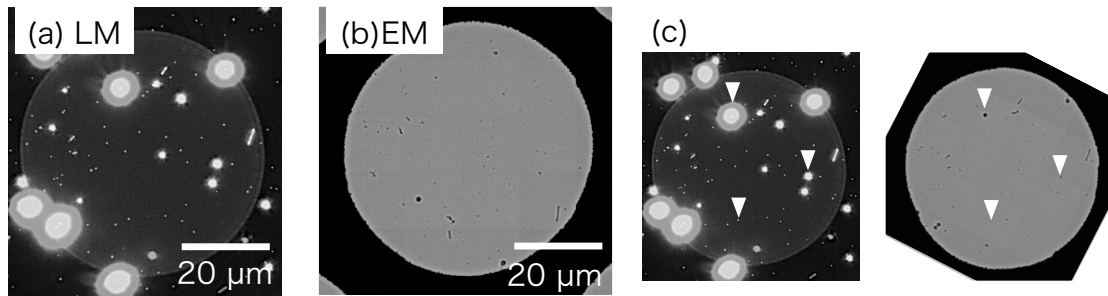


図 1. 蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡で観察した蛍光ビーズと、蛍光ビーズの相対位置を利用した位置合わせ. (a) x50 で撮影された蛍光像. 1.75 μm , 500 nm, 200 nm の蛍光ビーズを識別することができる. (b) x2,600 で撮影された透過型電子顕微鏡像. (a)と同様に, 3 種類の蛍光ビーズを識別することができる. (c) 蛍光ビーズの相対位置を利用した位置合わせ結果. 白三角はそれぞれ, 1.75 μm , 500 nm, 200 nm の蛍光ビーズを示している.

3. マーカー群およびターゲット位置と相関精度の関係性

蛍光ビーズを利用した位置合わせの際, 重要となるのは, 位置合わせにより同定した座標系の精度である. 今回の報告では, その精度をあげるための蛍光ビーズの選択方法について, マーカー群およびターゲットの特徴を次の4つの要素で表現した. ①マーカー個数: 変換行列の計算に使用するマーカーの個数, ②擬似的な短辺距離 (凸包/最遠点对距離): マーカー群の広さを擬似的に表現した指標, ③重心からの距離: マーカー群の重心とターゲットの距離, ④ターゲット位置: ターゲットがマーカー群の凸包内/凸包外のどちらにあるかについて着目し, それぞれの要素と相関精度の関係性を調査した. これらの結果から最も高い相関精度が期待できるマーカー群の選択方法を提案する.

4. おわりに

今回, 蛍光ビーズをマーカーとして使用した位置合わせにより得られる相関精度を調査した. 興味深かったのは, 乾燥サンプルとクライオサンプルで比較すると, クライオサンプルの方が高い相関精度となったことである. これは, クライオサンプルは凍結固定されており, サンプルトランスファー時, 電子線照射時におけるマーカーの位置変化が起こりづらいことが1つの理由であると考えられる. さらに, 蛍光ビーズは走査型電子顕微鏡法や位相差顕微鏡法など他の顕微鏡手法でも観察が可能であり, CLEM 以外の相関顕微鏡法への応用も期待できる.

自然科学研究機構における Cryo-FIB-SEM の活用事例

島田 雄斗^A, 陳 林^B, 村田 和義^{A, B}

自然科学研究機構 生命創成探究センター^A, 自然科学研究機構 生理学研究所^B

Application of Cryo-FIB-SEM at NINS

Y. Shimada^A, L. Chen^B, K. Murata^{A, B}

^A *Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences (NINS),*

^B *National Institute for Physiological Sciences, National Institutes of Natural Sciences (NINS)*

これまでの電子顕微鏡観察のための試料作製では、化学固定や脱水、樹脂包埋等により生物試料は物理的なダメージを受ける。試料の構造は変化し、本来の状態とは異なる構造を観察する恐れがある。しかし、試料を急速凍結させ、液体窒素冷却下で加工することで、より自然に近い生体構造を維持したまま高解像度で観察することが可能となる。Cryo-focused ion beam scanning electron microscope (Cryo-FIB-SEM) はそのための試料加工を行うことができる装置の一つである。

今回は、Cryo-FIB-SEM として Aquilos 2 (Thermo Fisher Scientific) (図 1) を用いて行った、①凍結超薄切片 (クライオラメラ) の作製 (図 2)、②蛍光顕微鏡ユニット (iFLM) を用いた光顕電顕相関観察 (CLEM)、③連続的にスライスした試料断面像の撮影 (Auto Slice & View) の 3 つの機能について我々の活用事例を紹介する。



図 1. Cryo-FIB-SEM (Aquilos 2)

① クライオラメラの作製

Cryo-FIB-SEM では、凍結させた試料を SEM で観察しながら集束イオンビーム (FIB) により加工する。まず、マイクログリッド上に載せた生物試料をできるだけ溶媒を除いて液体エタン中に浸漬することで急速に凍結させ、それを Cryo-FIB-SEM 内に液体窒素温度下で導入する。最初に、チャージアップを抑えるため試料を白金でコーティングし、その後、FIB を試料に照射することで試料を薄く加工し、クライオラメラを作製する (図 2)。その後、クライオ電子顕微鏡により、高分解能像またはトモグラフィーのための連続傾斜像を撮影する。このようにして、Cryo-FIB-SEM では、細胞などの生物試料の内部をより自然に近い状態を保ったまま立体再構築することを可能にする。図 3 にクライオラメラからクライオ電子顕微鏡により撮影したアメーバ細胞の内部の

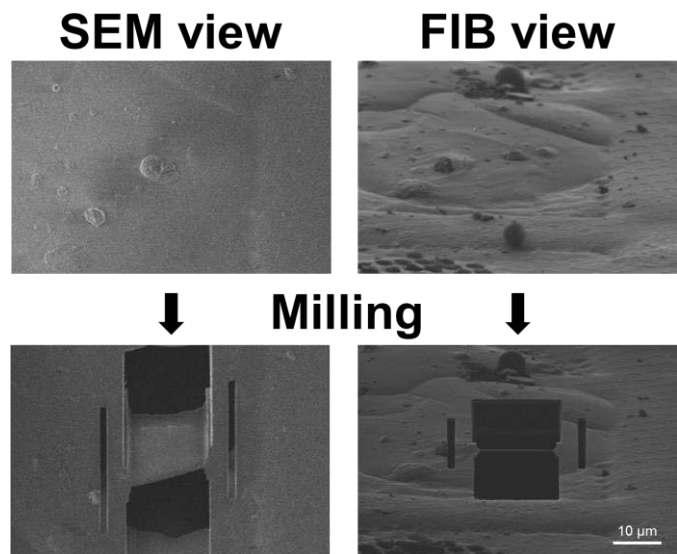


図 2. Cryo-FIB-SEM によるクライオラメラ作製の様子

S-2-3

像を示す。

② iFLM を用いた光顕電顕相関観察 (CLEM)

Aquios 2 では試料の加工を行う前に、同じチャンバー内に装備された専用の蛍光顕微鏡ユニット (iFLM) を用いて、凍結試料における目的箇所的位置や状態を確認することができる。予め標的となるタンパク質等を GFP などで蛍光ラベルしておき、凍結させた後 Aquios 2 のチャンバーにセットする。そして、その試料から iFLM による蛍光像を用いて試料の加工位置を決定し、クライオラメラを作製する。加工後、クライオラメラを再び iFLM により光顕電顕相関観察 (CLEM) することで、得られる構造と標的分子の局在を相関させることができる。

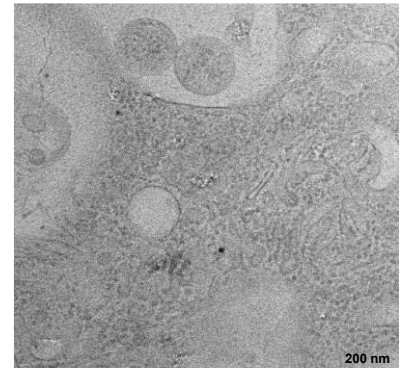


図 3. クライオラメラからクライオ電子顕微鏡により撮影したアメーバ細胞内部の像

③ Auto Slice & View

Aquios 2 では、高分解能構造観察のためのクライオラメラの作製に加えて、生物試料を FIB で連続的に切削してその断層を SEM 画像として記録することができる。これは凍結試料のみならず、樹脂に包埋した生物試料でも可能である。図 4 に Aquios 2 で撮影した酵母細胞の連続断面像の例を示す。その後、これらは 3 次元像として再構築することができる。凍結試料の連続断面観察では、試料によってはチャージアップが酷い場合があり、その改善が今後の課題である。

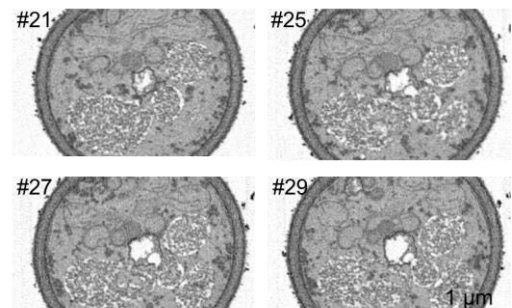


図 4. Aquios 2 により撮影した酵母細胞の連続断面像 (Fukuda et al., 2023, 改変)

以上、Cryo-FIB-SEM では、急速凍結固定した試料に対して、光顕電顕相関観察 (CLEM) により試料の位置や分布を確認し、その目的箇所においてクライオ電子顕微鏡観察を行うためのクライオラメラを作製することができる。また、凍結試料や樹脂包埋した試料を連続的にスライスし、その断層画像を得ることもできる。Cryo-FIB SEM は、生物等の水和した試料をより自然に近い状態の構造を維持したまま、三次元再構築できる点で、生命科学および創薬研究の分野において今後の応用が期待される。

Reference

Fukuda et al. *Molecular Cell*, 83: 2045-2058, 2023.

阪大生命機能研究科での *in situ* 構造解析への取り組み

- クライオ FIB-SEM からクライオ TEM へ

宮田知子^{A,B}, 木下実紀^{A,B}, 串間由江^{A,B}, 山内玲子^{A,B},
牧野文信^{A,B,C}, 難波啓一^{A,B},

大阪大学大学院生命機能研究科^A、大阪大学 日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所^B、
日本電子株式会社^C

Approach to *in situ* structural analysis at the Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University - From cryo-FIB-SEM to cryo-TEM

Tomoko Miyata^{A,B}, Miki Kinoshita^{A,B}, Yoshie Kushima^{A,B}, Reiko Yamauchi^{A,B},
Fumiaki Makino^{A,B,C}, and Keiichi Namba^{A,B}

^AGraduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, ^BJEOL YOKOGUSHI Research
Alliance Laboratories, Osaka University, ^CJEOL Ltd.

細胞内には単独のタンパク質では達成できない高度で制御された反応系が存在し、多くのタンパク質は生体内で種々の有機物や他のタンパク質と分子間相互作用を繰り返し、立体構造を変化させながらそれぞれの機能を発揮する。このようにタンパク質や核酸などの生体分子は生命活動の根幹を担っており、生体分子の立体構造情報は生命科学のみならず医療、創薬にとっても基盤的な情報をもたらす。これまでの構造生物の発展は X 線結晶構造学や NMR によって進んできたが、近年はクライオ電子顕微鏡が生体分子構造解析法の強力なツールとして加わり、その発展に大きく貢献している。

クライオ電子顕微鏡は生体分子を生理的環境に近い状態で凍結し、直接電子顕微鏡で観察する方法で、ごくわずかな水溶液試料から原子レベルの分解能の構造解析が可能である。10 年前の電子直接検出器の登場、非常によく制御された電子顕微鏡システムによる自動撮影法と画像解析方法の進化により非常に短時間で機能状態での生体分子の構造解析が可能となり、現在も進化を続けている手法である。¹⁾

大阪大学大学院生命機能研究科では現在 AMED BINDS の構造解析支援プログラムに参加し、日本電子のクライオ電子顕微 CRYO ARMTM 300 並びに CRYO ARMTM 300 II を用いた構造解析支援を進めている。主な支援は単離精製した生体試料を対象とした単粒子解析法、細胞や組織、微生物などを対象とするクライオトモグラフィー法、低分子や生体高分子の微結晶を対象とするマイクロ ED (Electron Diffraction) 法などである。

なかでもクライオトモグラフィー法では試料を連続的に傾斜させて撮影する傾斜像シリーズから立体構造を解析する手法であり、多数の同一試料の投影像を必要とする単粒子解析と異なり、一つの試料から立体構造を構築できる。また得られたトモグラムから特定分子の立体構造を数多く切り出し、平均化するサブトモグラム平均によって近原子分解能の構造解析も可能である。しかしながら電子の透過深度が限られているため観察対象となる細胞や組織の多くは電子線を透過できず、事前に試料を 100~300 nm 厚の切片に加工する必要がある。極低温収束イオンビーム (Cryo-FIB) スライス加工はガラス凍結された生物試料に収束したイオンビームを照射することで凍結細胞断面 (ラメラ) を調製するために開発された技術である。Cryo-FIB は収束イオンビームを凍結試料に照射することで試料を観察しつつ加工することができる²⁾。

我々は *in situ* 構造解析法の汎用化を進めるために日本電子製 Cryo-FIB-SEM (JIB-4700Fx) を導入し、ラメラ作成のためのワークフローの構築を進めている。作成したラメラはそのまま日本電子製 CRYO ARMTM 300 II に挿入可能で、このクライオ電子顕微鏡に導入された傾斜像シリーズを高速撮影するソフトウェア PACE-tomo³⁾ によって効率的なトモグラフィーデータの収集が可能である。これらの装置の実際の活用法を踏まえて生命機能研究科での *in situ* 構造解析の現状を報告する。

S-2-4

- 1) Namba, K. and Makino, F. Recent progress and future perspective of electron cryomicroscopy for structural life sciences. *Microsc.* 71(S1), i3-i14 (2022)
- 2) Li W, Lu J, Xiao K, Zhou M, Li Y, Zhang X, Li Z, Gu L, Xu X, Guo Q, Xu T, Ji W. Share Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. *Nat Methods.* 2023 20(2):268-275.(2023)
- 3) Eisenstein F, Yanagisawa H, Kashihara H, Kikkawa M, Tsukita S, Danev R Parallel cryo electron tomography on in situ lamellae. *Nat Methods.*20(1):131-138.(2023)

クライオ電子線トモグラフィーによる葉状仮足形成過程の観察

稲葉 弘哲
三重大医

Observation of lamellipodia formation process by cryo-electron tomography

H. Inaba
School of Med. Mie Univ.

葉状仮足は枝分かれしたアクチン線維に富む扁平なシート状の細胞突起であり、アメーバ運動・細胞移動において最も基本的な構造である。葉状仮足の形成は低分子量 G タンパク質 Rac1 が中心的な機能を担っており、その下流でアクチン線維の枝分かれ構造を形成する Arp2/3 複合体の働きによってアクチンのメッシュワークが形成される。このネットワークを構成する個々のアクチン線維の観察は、超解像の蛍光顕微鏡を使用しても困難であり、電子顕微鏡の解像度が必要となる。クライオ電子線トモグラフィーは、細胞内の微細構造を非破壊・無染色でコントラスト高く観察できる方法として近年注目を集めている。葉状仮足は非常に薄い構造であるため、収束イオンビームによる掘削の必要がなく、*in situ* クライオ電子線トモグラフィーの理想的な対象である。

一方、電子顕微鏡の制約として、試料を固定しなければならないため、時系列の変化を観察することができない。この問題を解決するため、我々は光遺伝学と急速凍結法を組み合わせ、擬似的な経時的試料を作製することを考えた。光遺伝学を利用することで、細胞内シグナル分子を青色光の照射によって特異的に活性化させ、反応の開始時間を正確に把握できる。

我々は COS-7 細胞に Rac1 の光遺伝学ツール mVenus-PA-Rac1 とアクチンマーカー Lifeact-mCherry を遺伝子導入し、laminin でコートした金グリッド上で培養した。青色のファイバー LED を浸漬凍結装置に組み込み、光照射開始から一定時間後に急速凍結した。この試料をクライオ蛍光顕微鏡で観察し、形成された葉状仮足を同定し、クライオ電子線トモグラフィーによる三次元解析を行なっている。

本発表ではこれまでに取得したデータを示すとともに、構造生物学を専門としない研究室のユーザーから見た課題点や将来展望について議論したい。

S-3

分科会セッション：液体材料の微細
構造研究部会
クライオ電子顕微鏡が拓く液体材料
の地平

11月11日（土）13：00～14：50

第1会場

液状材料や塗工プロセスの微細構造解析に対する クライオ電子顕微鏡法適用の試み

- 燃料電池開発への活用事例 -

高橋 真一^{A,C}, 伊藤 喜子^{B,C}, 西野 有里^C, 宮澤 淳夫^C
日本ゴア^A, ライカマイクロシステムズ^B, 兵庫県大理^C

Micro-structural Analysis of Liquid Materials and Coating Processes by Cryo-electron Microscopy

- Case Study on Fuel Cell Research -

S. Takahashi^{A,C}, Y. Ito^{B,C}, Y. Nishino^C and A. Miyazawa^C

^AW. L. Gore & Associates, ^BLeica Microsystems and ^CGrad. School of Sci. University of Hyogo

1. 液状材料の微細構造解析にクライオ電子顕微鏡法を適用する狙い

液状材料は物質の三相の一つとして、溶解・溶融体として存在したり、あるいは固体材料を液体に分散したりして、工業分野や生活の様々な場面において広く活用されている。工業分野に着目すると、顔料を溶媒に分散させた塗料、リチウムイオン電池・燃料電池の電極製造に用いる電極スラリー/インク、などが挙げられる。また身近な生活の中では、食品・化粧品分野においても液状材料が利用されている。これらの液状材料は、基材に塗布・乾燥して固体薄膜層を形成したり、様々な機能を持つ液体・流体として用いられ、温度による相変化現象を活用して用途に応じた形状を容易に形成できたりするものもある。

液状材料が持つ特徴である柔軟な形態や構造は、工業や生活の点から見て極めて有効な特性と言える。一方、工業的な視点から見ると、液状材料が持つこのような特徴は、固体材料と比較して内部構造の制御や解析が難しい、といった課題にもつながる。例えば走査電子顕微鏡や透過電子顕微鏡といった電子顕微鏡による観察手法は、固体材料の研究開発においては構造の可視化・解析に広く用いられる手法である。液状材料の分野においても、電子顕微鏡による観察手法は用いられてはいるものの、固体材料に比べると適用範囲は限られている。液状材料を電子顕微鏡の鏡筒内の真空中で保持することができないばかりか、液体材料は電子線照射ダメージを非常に受けやすいことが、液状材料が持つ本来の内部構造の観察を難しくしている。

このような技術的な課題に対して、試料を急速凍結して、凍結状態のままの試料を観察できるクライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) は、液状材料の観察・構造解析においても有効であると考えられる。液状材料が持つ本来の構造を可視化するためには、試料に応じた適切な凍結技法や観察手法の開発が重要になる。生物分野における cryo-EM による観察においては、試料中の水の晶質凍結に伴う構造変化 (構造アーティファクト) の影響を最小限に抑える技術 (非晶質凍結技法) が確立されている。生物試料は一般に 60~70%の水を含んでいるが、液体材料の溶媒は水溶液の場合もあるが、水と有機溶媒の混液や全く水を含まない有機溶媒の場合がある。試料の凍結条件、観察条件として、試料に水が含まれているのか (その場合どのくらいの割合で水が含まれているのか)、それとも全く水が含まれていないのかなど、試料の含水率が大きな分岐点となり、生物試料の観察で蓄積されてきたノウハウが、そのまま液状材料に適用できないことが多い。

2. 塗工プロセスの微細構造解析

汎用品、あるいは特殊用途向け製品を問わず、工業製品を製造する際に塗工プロセスが用いられることが多い。塗工プロセスは、原材料を物体の表面に塗布したり、薄膜/フィルムを形成したりする手法で、大きくは乾式法と湿式法の二種類に分けられる。乾式法は原材料を固体のまま物質に付着させるもので、例えば真空蒸着やスパッタリングといった手法が挙げられる。一方、湿式法は原材料を液体 (溶媒) に溶解したり、分散させて液状化したりした後、塗布、乾燥 (溶媒除去) する。湿式法は量産性が高い一方、乾燥 (溶媒除去) 工程の複雑さといった技術的な難しさも存在する。湿式塗工プロセスは、原材料の輸送、および成型の点で汎用性が高く、歴史的にも古くから用いられている。この汎用性の高さは、結果として感覚的・習慣的な手法の用い方につながることになる。しかしながら、今後の新しい、精密なモノづくりを考えると、湿式塗工プロセスにおいても原理原則に基づく構造設計や製造が求められる。

湿式塗工プロセスにおいて進行する微細構造の変化をとらえるためには、図1に示すような考え方で原理原則に基づき、構造の設計や解析することが求められる。このスキーム自体は固体材料の製造プロセスと同じ考え方で、計測、可視化、およびシミュレーションの側面から解析を進めることを想定している。

しかしながら、固体材料を用いた製造プロセスを対象とした研究開発と異なる点がある。液状材料を用いた湿式塗工プロセスの場合、液状材料の構造を可視化する手法が明確に存在していなかった。これに対して同じく液状の生体試料を扱う生物分野では、cryo-EMを用いた細胞の内部構造の可視化解析が行われ、タンパク質1分子レベルの構造解析ではノーベル賞の授賞対象となるなど、多くの分野で実績をあげている。この生物分野におけるcryo-EMの成果について、液体材料や塗工プロセスにおける構造の可視化・解析に適用できると考えている。

3. クライオ電子顕微鏡法による燃料電池電極製造プロセス解析

Cryo-EMを用いた液状材料や塗工プロセス分野への適用の一例として、本講演では、燃料電池電極製造プロセスにおける解析の試みを紹介する。脱炭素社会の実現に向けて、水素と空気（酸素）の電気化学反応により発電する燃料電池は、有力な方策の一つとして注目されている。この電気化学反応は、白金に代表される触媒粒子を含む触媒層において進行する。したがって触媒層の構造は、燃料電池の発電性能を決める上で重要な役割を果たす。触媒層の製造は、量産性の点から湿式塗工法を用いることが多い。湿式塗工工程において、最初に高分子電解質、白金触媒担持カーボン粒子を溶媒に分散させた触媒インクを作製する。その後、触媒インクを基材に塗布・乾燥させて触媒層を得る。したがって、必要な性能を発揮できる触媒層を得るためには、触媒インクの状態（内部構造）が重要な役割を果たす。しかし、触媒インクは固形分の濃度が高く、かつ黒色の白金担持カーボン粒子を含有するため、分光学的な構造分析が難しいという課題がある。

この課題に対して、我々はこれまで生物分野で広く用いられているcryo-EMを用い、触媒インクの構造可視化を試みてきた。本講演では、cryo-EMによる触媒インクの構造可視化について説明する。また、触媒インクのような固液分散系の内部構造解析において、cryo-EMが有するポテンシャルへの期待、ならびに解析上の課題についても議論する。

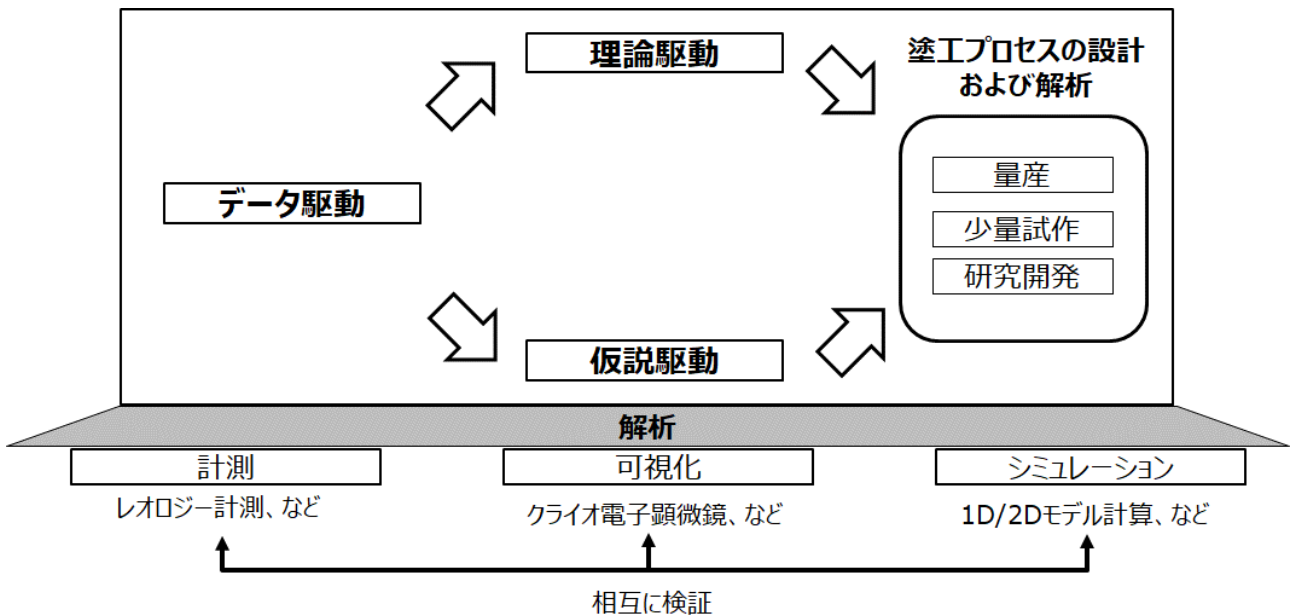


図1. 塗工プロセスの研究アプローチの一例

CMC 吸着挙動に対応した CNT 分散状態変化の Cryo-TEM 観察

菟田 悦之^A, 上山 真由^A, 森 隆之助^A, 祖父江 綾乃^B, 西川 明良^B, 大村 直人^A
神戸大院工^A, 第一工業製薬^B

Cryo-TEM observation of the dispersion state of CNT with CMC adsorption

Y. Komoda^A, M. Ueyama^A, R. Mori^A, A. Sofue^B, Y. Nishikawa^B and N. Ohmura^A

^ADept. Chem. Sci. & Eng. Kobe Univ., ^BDKS Co. Ltd.

【緒言】

高容量な二次電池開発において、負極材料を従来のカーボンブラックからシリコンへの置き換える取り組みが精力的に行われている。しかしながら、シリコンは充放電に伴う体積変化が著しく大きく、安定な導電性の確保が課題とされている。電極内の導電性を確保するための導電助剤としては、AB（アセチレンブラック）が用いられてきたが、その導電性はストラクチャと呼ばれる一次凝集構造に起因しており、活物質の体積変化に追従できないことが指摘されている。そこで、長距離の導電性に長けた CNT（カーボンナノチューブ）の使用が検討されているが、CNT が溶媒中で十分に分散されていなければ、期待通りの性能は得られないことになる。

一方で、CNT の分散状態を評価する手法が様々提案されているが、それらの手法から得られる結果の妥当性およびそれらの関係性に関する議論は不十分であった。本研究では、分散剤として CMC（カルボキシメチルセルロース）を用いて CNT の水分散液を調製し、CMC 濃度と CNT 分散性の関係を様々な手法により調査した。そして、CNT 分散液の Cryo-TEM 観察から、各手法によって得られた特性値と CNT 分散状態の関係を深めることを目的とした。

【実験】

0.1~2.0wt%の CMC 水溶液を調製し、ここに SWCNT（直径 2 nm，長さ 5 μm ）を 0.5wt%添加した。自公転型攪拌機を用いて 3 分間の予混合を行った後、超音波ホモジナイザーを用いて CNT の分散を行った、超音波は出力 30W，照射時間 2 時間とし、CNT スラリーを得た。このようにして得られた CNT スラリーを用いて、レオロジー測定、パルス NMR 測定を実施した。また、Cryo-TEM によるスラリー内部構造の直接観察を試みた。さらに、負極活物質を模した絶縁物質であるシリカ粒子（粒子径 20 μm ）とバインダー（SBR：スチレンブタジエンゴム）を CNT スラリーと混合後、塗布・乾燥を経てモデル電極を作製した。

【結果と考察】

図 1 に各 CNT スラリーの粘度測定結果を示す。これより、CMC 濃度 0.5wt%までは CMC を増やすほど粘度は低下したが、それ以上の CMC 濃度では逆に粘度は増加した。CMC は CNT に吸着して分散剤として機能することから、CMC 濃度 0.5wt%未満では CNT 表面に CMC が十分に吸着しておらず CMC を増やすほど分散が進んだと考えられる。逆に、CMC 濃度 0.5wt%を超えると余剰な CMC が CNT スラリーの粘度を増加させたと推定される。すなわち、CMC 濃度 0.5wt%で CNT 表面は飽和吸着に到達したと言える。また、CMC 濃度が十分に高くなっても CNT スラリーは著しいシアシニング性を示した。これから、例え CNT を十分に分散されたとしても、CNT 同士は完全に孤立せず、互いに機械的に絡まった状態にあることが示唆される。

次に、これらの CNT スラリーを用いてパルス NMR による緩和時間測定結果について述べる。パルス NMR では、試料に磁場を印加してプロトンを励起させ、磁場を取り去ったあとにプロトンが基底状態に戻る挙動を測定し、緩和速度の

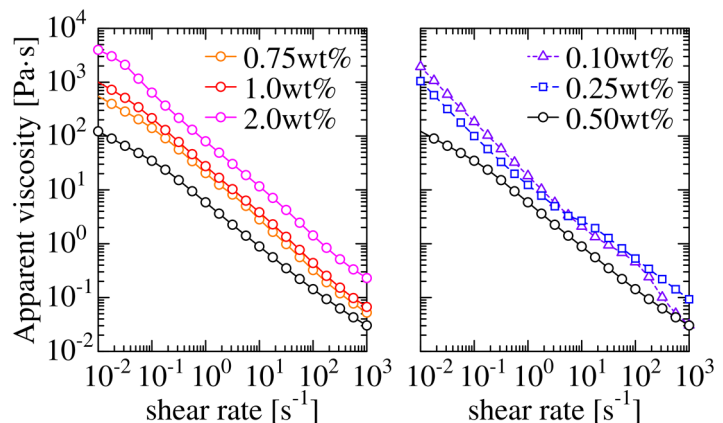


図 1 CNF スラリーの粘度に対する CMC 濃度の影響

S-3-2

逆数である緩和時間が得られる。一般に粒子分散液が測定試料である場合、分散媒と分散粒子の親和性が高くなると粒子表面の分散媒の運動性が抑制され、分散液の緩和時間は溶媒のそれより短くなる。図 2 には CNT スラリーの緩和時間と CMC 濃度の関係を示した。これより、CMC 濃度が増えるほど緩和時間は短くなり、0.5wt%以上ではほぼ一定になることがわかる。本検討で用いた水系 CNT スラリーでは、水分子のプロトン運動性変化が測定対象であり、CNT は疎水性が高いため CMC の水和水と CNT 間の親和性が評価される。すなわち、緩和時間は CMC 吸着量に応じて変化すると考えられ、CMC 濃度 0.5wt%以上で吸着飽和に到達したと解釈できる。この結果は、粘度測定結果から導きだされた結論と良好に一致していた。

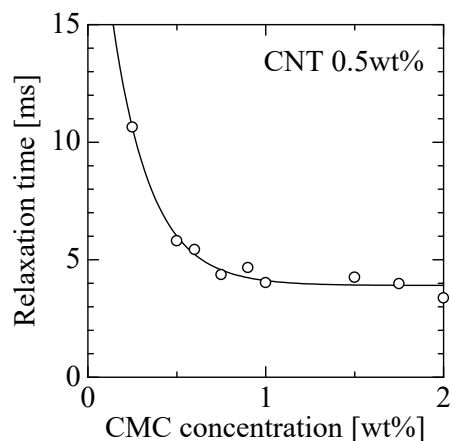


図 2 緩和時間と CMC 濃度の関係

そこで、Cryo-TEM により CNT スラリー内部の直接観察を試みた。図 3 に CMC 濃度が異なる CNT スラリーの Cryo-TEM 像を示す。CMC 濃度 0.1wt%では、明確な CNT のバンドル構造が残存していることがわかる。また、0.25wt%になると、バンドルの解砕はかなり進んでいるが、一方向に並んだ状態にあった。これに対して、0.5wt%以上になると解砕された CNT はランダムに配向し、重なり合うような状態にあることが観察された。すなわち、CMC が吸着飽和していなくても CNT のバンドル構造はおおよそ解砕されるが、自由に運動ができるほど十分な運動性は持っていないと推定される。以上のことから、CMC が表面に吸着することで CNT が自由に運動できるようになることが CMC の吸着飽和に対応することが判明した。

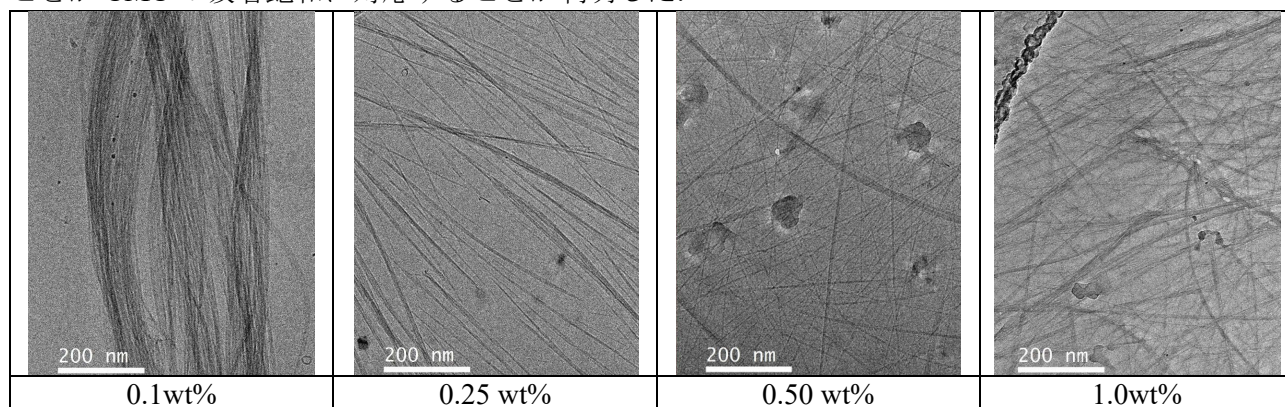


図 3 CMC 濃度が異なる CNT スラリーの Cryo-TEM 像

CNT を導電助剤として利用する場合、活物質粒子と混合して乾燥後の塗布膜に導電性が付与される必要がある。そこで、CMC 濃度の異なる CNT スラリーから形成される導電性の違いを評価するため、CNT スラリーをシリカ粒子および SBR バインダーと混合し、塗布乾燥を経てモデル電極を作製した。そして、交流インピーダンス法により、塗布膜の厚さ方向のコンダクタンス（抵抗の逆数）を測定し、その結果を図 4 にまとめた。この結果、CMC 濃度 0.25wt%の場合に比べて、0.5 および 1.0wt%の CMC を含む CNT スラリーから作製した電極はおおよそ 20 倍高い導電性を示した。これは、CMC が吸着飽和した CNT は飛躍的に運動性が向上しており、シリカ粒子の間隙部に一様に存在した状態を維持しながら乾燥は進行すると考えられる。すなわち、シリカ粒子間隙部には CNT が均一に濃縮され、結果的に互いに繋がりあった構造が高い導電性を発現したと考えた。一方、CMC 0.25wt%では CNT の運動性が低いために形成され導電パスが局在化し、膜全体としての導電性は低下したと考えられる。

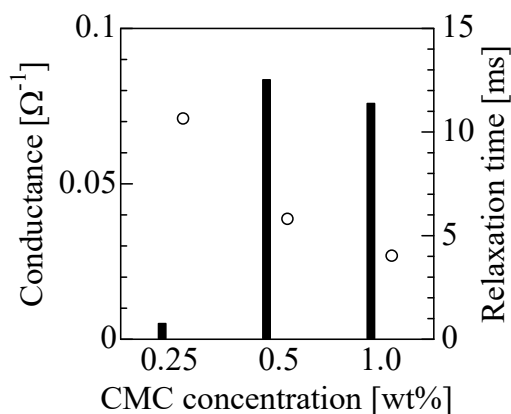


図 4 モデル負極の導電性と CMC 濃度

スラリー中 CMC 吸着 CNT ネットワーク構造のクライオ電子顕微鏡観察
○島貫 純一^A, 磯田 綾乃^A, 荒木 祥和^A, 菰田 悦之^B, 祖父江 綾乃^C, 西川 明良^C
日産アーク^A, 神戸大学^B, 第一工業製薬^C

Cryo-electron microscopy observation of CMC-absorbed CNT network structure in slurry

J. Shimanuki^A, A. Isoda^A, S. Araki^A, Y. Komoda^B, A. Sofue^C, and A. Nishikawa^C
^A*NISSAN ARC, LTD.*, ^B*Kobe University*, ^C*DKS Co. Ltd.*

クライオ電子顕微鏡 (Cryo-TEM, Cryo-SEM) 技術は、主に生物系で用いられ技術開発されてきたが、材料系試料の観察事例も増えてきている [1]。我々はこれまでに、燃料電池触媒層の原料となるインク中の Pt/C 凝集粒子の緩い凝集状態や、Pt/C 凝集粒子の微細構造を Cryo-SEM や Cryo-TEM を用いて観察してきた [2]。また、電極状態の燃料電池触媒層を薄片化し、アイオノマーを膨潤させ急速凍結し、Low Dose モードで観察することで電子線照射ダメージが入りやすいアイオノマーの分布状態を可視化することに成功している [3]。これらクライオ電子顕微鏡技術の材料系への適用は、「ものづくり」へのヒントを与え、産業界にも貢献できると考えている。

近年は、カーボンニュートラルやゼロエミッションなど、環境負荷低減のための材料開発が活発化しており、電池関連技術は特に注目されている。Li イオンバッテリー (LIB)、固体高分子形燃料電池 (PEFC) とともに、電極作製時には、コストや生産性の観点からウェットプロセスを用いた塗工技術が多く用いられている。これらのプロセスを最適化するためには、原材料であるインクやスラリーなどの液状物の微細構造と乾燥過程による分散性の変化を捉えることが重要になる。このことから、液状物の微細構造観察が可能なクライオ電子顕微鏡技術が強力なツールとなることが期待される。

LIB 電極の導電助剤として、カーボンナノチューブ (CNT) が注目されている。CNT は導電性・機械的強度・耐熱性などいずれも高く、電気を流すパスとして優秀な材料である。一方で、CNT はバンドルしやすく、凝集してしまうことから分散性が課題となる。これに対し、カルボキシメチルセルロース (CMC) を混合し、CNT へ吸着させることで、CNT の分散状態を制御する研究が行われており、CMC 吸着 CNT スラリーの粘度やパルス NMR で測定された緩和時間から CNT に対する CMC 吸着量の定量手法が提案されている [4]。しかしながら、スラリー中の CNT は間接的な手法から分散状態を推定することに留まっていた。これに対し、クライオ電子顕微鏡技術は液中の CNT の分散状態を直接可視化することが可能であり、新たな知見が得られる可能性が高い。

本発表では、CMC 吸着量を変化させた CNT スラリー試料について、分散状態を可視化するためのクライオ電子顕微鏡手法を検討した結果について報告する。CNT のバンドル状態やネットワーク構造などの全体的な傾向については、Cryo-SEM を用いて検討する。また、CNT ネットワーク構造のつながりや絡み具合を解析するための数値化については、Cryo-3D-STEM を用いた三次元構造体を構築し、画像解析により検討した結果を報告する予定である。

[1] S. Takahashi et al., *Chem. Electro. Chem.* **2**:1560-1567 (2015)

[2] J. Shimanuki et al., *Microscopy* **66**:1-5 (2017)

[3] J. Shimanuki et al., *Microscopy* **72**:60-63 (2023)

[4] 上山ら、第 63 回電池討論会 (福岡)、3D02 (2022)

「クライオ電子顕微鏡が拓く液体材料の地平」 クライオ FIB-SEM による液状試料の 3D 構造解析

宇部 卓司, 有田 竜馬
JFE テクノリサーチ株式会社

3D structural analysis of Liquid materials by Cryo-FIB-SEM -New horizons of liquid materials developed by the cryo-electron microscopy- Takuji UBE and Ryoma ARITA JFE Techno-Research corporation

ライフサイエンスにおける生体試料は、水並びに水溶液を主成分とするものであり、その中に分散したたんぱく質や脂質などの構造を保った状態で観察できるクライオ電子顕微鏡技術は、ライフサイエンスの研究を大きく進歩させ、試料作製装置を含むクライオ電子顕微鏡装置は近年広く普及することとなった。一方で、当研究会ではこれらライフサイエンスで培われたクライオ電子顕微鏡による観察技術をマテリアルサイエンスや産業界に広く応用展開していくことを目的としている。特にスラリーやエマルジョンといった液状試料の微細構造解析は塗工・成膜に代表される工業プロセスにおいて重要であり、乾燥前の溶液中の構造・形態を観察する観点から、当該技術は着目を集めている。本報告ではクライオ電子顕微鏡技術の中で、液状試料中の微視的な 3 次元(3D)構造を明らかにすることができるクライオ FIB-SEM による 3D 構造解析について、実用化に際した複数の課題とそれに対するアプローチ結果を報告する。

集束イオンビーム加工装置を備えた走査電子顕微鏡(FIB-SEM)を用いた 3D 構造解析は FIB による試料断面の切削と、切削断面を SEM で観察することを繰り返すシリアルセクションングと呼ばれる方法で実施する。これはクライオ TEM で一般的な 3D 観察法であるトモグラフィ法と比べ、空間分解能は劣るものの深さ方向を含めた観察領域を広く取ることができる特徴がある。しかしながら本手法を用いて液状試料のクライオ 3D 観察を行うためには下記をはじめ多数の障壁があることから、一般的な手法となっているとは言いがたい。

1. 液状試料の凍結が難しい

試料はクライオ TEM のサンプル(~200 nm)と比べて大幅に厚い 10 μ m 程度以上の厚さのバルクの状態で凍結させる必要があり、通常の浸漬凍結法では氷晶の成長を抑制することが困難である。また、浸漬凍結で用いられる液化エタンは有機溶媒として機能するため、油分の多い試料によっては適さない場合がある。

2. 凍結させた液状試料に対して保護膜を形成することができない

通常、FIB 加工の際は照射するイオンビームによる表面ダメージ、並びに切削断面におけるカーテニング現象を防止するために、Pt や C の前駆体ガスを試料表面に吹き付け、照射したイオンビームで還元して成膜する手法がとられている。しかしながら、クライオ条件の試料に上記ガスを吹き付けることは試料汚染の観点から不可能である。従って本研究では、クライオ機能を有した FIB-SEM 装置のサブチャンバーに取り付けた低エネルギーのスputtering 成膜装置を用いて間欠成膜した Pt 膜(80 nm 以上)

Pt 保護膜(40-80 nm)はすぐに流動して粒子状になり保護効果なし

表面凹凸に起因したカーテニング効果により観察が困難

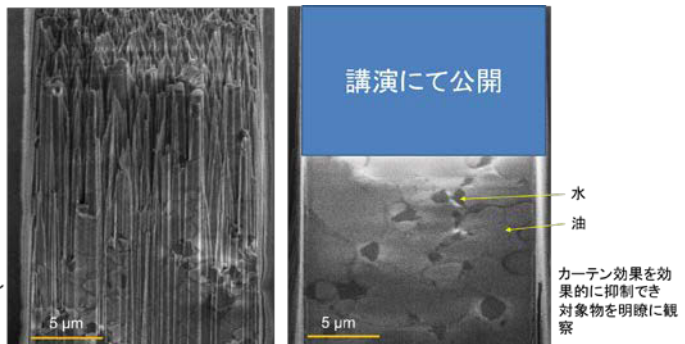


図1 保護膜形成条件の違いによるシリアルセクションング SEM 像の違い(W/O エマルジョン)

左:従来技術(スパッタリングによる Pt 成膜(80nm))

右:開発技術による保護膜

S-3-4

を保護膜として使用したが、測定の際に伴う試料表層の流動により消失して保護膜として機能しないことが示された(図1左)。

3. Z軸ドリフト補正機能が使用できない

FIBの加工(ビーム)位置は装置の電氣的・機械的安定性や試料のドリフトなどがあるため常に変動している(図2)ことから、シリアルセクションング1枚当たりのスライス厚さは一定にならず、最終的な3D構造に歪みを生じさせる。これを防止するために試料上に形成した特定形状のマーカを基準としてFIBのビーム位置を補正する機能が装置制御ソフトウェアには内蔵されている。しかし、長時間の測定に伴うビーム照射でも変形・消失しない強固なマーカを作製するために、一般的に重金属(Pt並びにW)膜を成膜してその上にマーカを切削加工する。上項2.とも関連するがクライオ条件では上記金属膜が形成できず、強固なマーカを形成することが出来ない。従って、事実上Z軸方向のドリフト補正機能を使用できないためZ軸分解能の大幅な低下と3D構造の歪みを補正することができない。

4. 像コントラストが得にくく、材料識別が難しい

クライオTEMでは位相板やデフォーカス等の手法によって水(氷)や炭化水素などの軽元素で構成された材料に対して明瞭な像コントラスト(位相コントラスト)を得ることができているが、FIB-SEMのシリアルセクションングにおいては一般的な二次電子像コントラストを利用する 경우가多く、この場合コントラストが不足し良好なセグメンテーション結果が得られない。

本報告では、上記2. 3.の課題に対して取り組み、改善を見ることができた結果と、4.に関しては観察を行うSEMの加速電圧を低加速電圧条件にすることで電子線侵入深さを抑制し、表面(断面)構造の明瞭化とインレンズ電子検出器の組み合わせによる軽元素のコントラスト増強法について報告する。

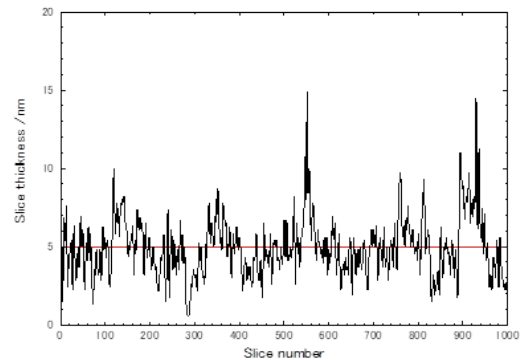


図2 スライスセクションング中の1スライス当たりのスライス厚さ計測結果

(赤線は設定値の5 nm)

Crossbeam 540(Zeiss)での計測結果

(常温・Si基板)

クライオ SEM を用いたエマルションの観察

西野 有里^A, 伊藤 喜子^{A,B}, 宮澤 淳夫^A
 兵庫県立大理^A, ライカマイクロシステムズ(株)^B

Observation of Emulsions by Cryo-SEM

Y. Nishino^A, Y. Ito^{A,B} and A. Miyazawa^A

^AGrad. Sch. of Sci., Univ. of Hyogo, ^BLeica Microsystems K.K.

エマルションの物性評価を行う上で、エマルション中の乳化粒子や含有固形成分の大きさや形状、分散状態を、高い分解能で可視化できることは非常に重要である。クライオ SEM は、試料中の水が非晶質氷となるように試料を凍結して、凍結状態を維持したまま SEM で観察する方法で、元来、含水生物試料を、化学固定や脱水による変形のない状態で観察するための手法として開発された。このクライオ SEM は、化学固定や脱水によるアーティファクトの影響が大きいエマルションを始めとしたソフトマテリアルに関しても、それらの本来の微細構造を観察できる非常に優れた解析手法となる。また、多くの有機溶媒、高分子ポリマー、油脂類などは、電子線照射によるダメージを受けやすく、微細構造の変形が容易に引き起こされる。電子線照射による試料ダメージは温度依存的事であることから、試料温度を下げるほどダメージを低減できる。この点からもクライオ SEM は、エマルションの微細構造を観察する上で、有用な手法と言える[1, 2]。

クライオ SEM でエマルションを観察するためには、試料凍結と断面作製という 2 つの試料調製ステップが必要となる。水を多く含む試料の場合、凍結時に氷晶が形成され、成長して大きくなる時に、水以外の成分が押し退けられて氷晶の縁に凝集したり、氷晶により押し潰されて変形したりすることにより、微細構造が破壊されてしまう。このため、試料に含まれている水を非晶質に凍結することが極めて重要となる。非晶質凍結法としては、210MPa の圧力をかけることによって氷晶形成を抑えながら凍結する高圧凍結法と、スラッシュ窒素（固体と液体が混在したシャーベット状の窒素）や液体エタンなどの冷媒中に、試料を急速に浸漬することによって凍結する浸漬凍結法がある。高圧凍結法は、現在、知られている非晶質凍結法の中で最も深い非晶質凍結深度が得られる方法で、含水生物試料をクライオ SEM で観察する場合に、一般的に用いられるようになった。

エマルションのように、水以外の液体成分を多く含む試料についても、高圧凍結法が有効であるか検証を行った。Oil in Water (O/W) エマルション、および Water in Oil (W/O) エマルションを高圧凍結または浸漬凍結して、クライオ SEM で観察し、それぞれ比較したものが図 1 である。O/W エマルションで油滴の直径が 1 μm 程度の場合、浸漬凍結法では氷晶の輪郭にそって油滴が並んでいる (図 1(a))。一方、高圧凍結法では油滴は分散していることが分かる (図 1(b))。油滴の直径が数 μm の場合、浸漬凍結法では氷晶の輪郭にそって油滴が角張って変形している (図 1(c))。高圧凍結法では油滴の断面はほぼ円形を保っている (図 1(d))。また、W/O エマルションの場合、浸漬凍結法では突起のある変形した水滴や、亀裂の入った水滴が多く見られた (図 1(e))。一方、高圧凍結法ではすべての水滴はほぼ円形で分散していた (図 1(f))。浸漬凍結法で観察された突起や亀裂の入

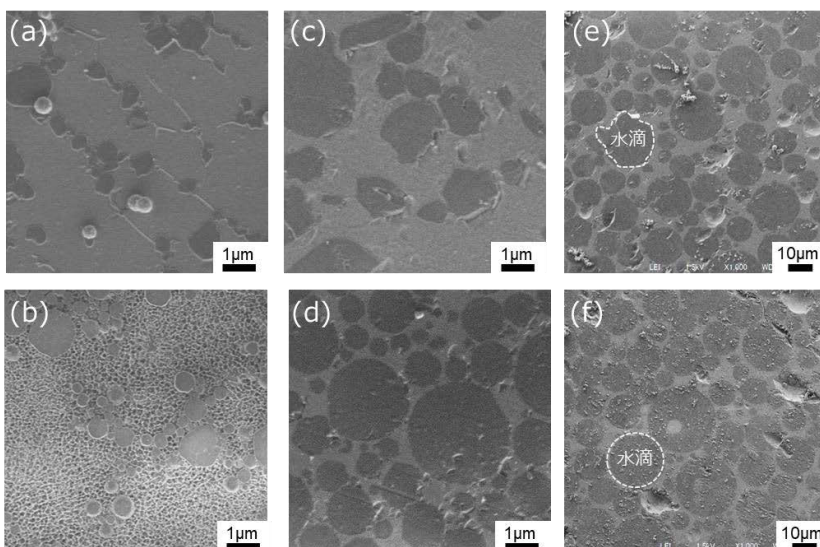


図 1. クライオ SEM でエマルション観察時の凍結法の比較

(a), (b) : 直径 1 μm 程度の油滴を含む O/W エマルション。(c), (d) : 直径数 μm の油滴を含む O/W エマルション。(e), (f) : W/O エマルション。(a), (c), (e) : スラッシュ窒素で浸漬凍結した試料。(b), (d), (f) : 高圧凍結した試料。それぞれ凍結切削法を用いて断面を作製して、クライオ SEM で二次電子像を取得した。

S-3-5

った水滴は、凍結試料の表面からの深度に比例して割合が増えたが、試料表面から 10 μ m 以内であっても、水滴に亀裂が見られた。こうした水滴の突起や亀裂は、水滴表面から水滴内部へ向かって氷晶が形成されるときに発生する膨張圧により、生じたと考えられる。これらの結果から、高压凍結法はエマルションの非晶質凍結にも有効であることが示された。

クライオ SEM で含水試料を観察するための断面作製法としては、凍結切断法が広く用いられている。凍結切断法は、凍結した試料に“なまくら”なナイフを当てることにより、試料中に含まれる互いに組成の異なる構造物の界面で割断されやすいことを利用した断面作製法である。エマルションの場合、油滴や水滴の表面で割断されれば、それらの分布や大きさ、表面の構造を調べることができる。凍結切断法は、比較的簡便で有用な断面作製法であるが、構造物の界面以外でもランダムに割断されてしまうため、観察像の解釈が困難となる場合もある。一方、クライオウルトラミクロトームを用いてダイヤモンドナイフで平坦な凍結切削面を作製すれば、平滑平面となった試料の断面像を観察することができる。図 2 は、高压凍結した O/W エマルション、および W/O エマルションを、凍結割断または凍結切削し、クライオ SEM で観察して比較したものである。O/W エマルションでは、凍結割断した場合には、油滴の表面で割断されることにより、油滴の分散状態を観察することができた (図 2(a))。また、凍結切削した場合でも、組成に由来した二次電子発生量の違いから、コントラスト差が生じ、油滴の分散状態を観察することができた (図 2(b))。W/O エマルションでは、凍結割断した場合、水滴表面で割断が起こらなかったため、水滴を同定することができなかった (図 2(c))。一方、凍結切削した場合には、組成に由来したコントラストから、水滴の分散状態を観察することができた (図 2(d))。クライオ SEM でエマルションを観察する場合、一般的な凍結切断法だけでなく、凍結切削法も非常に有用な断面作製法として検討する価値がある。

含水生物試料の解析を目的として開発されてきたクライオ SEM は、エマルションを始めとしたソフトマテリアルの微細構造観察においても、非常に有用な手法であることが実証されてきた。クライオ SEM で観察対象とされてきた主な液体成分 (溶媒成分) は水である。エマルションは、様々な油脂や溶媒から構成されており、それらの極低温 (液体窒素温度) 下での状態変化については、ほとんど知られていない。そのため、非晶質凍結法、断面作製および観察時の温度等については、試料ごとに丹念に検討する必要がある。また、電子線照射による試料ダメージは、温度上昇とリニアな関係ではなく、温度の少しの違いが顕著なダメージとして現れる場合もある。そのため、試料作製時ならびに試料観察時の温度条件だけでなく、観察対象の試料組成を把握し、それらに由来するわずかな二次電子や反射電子の発生量の違いを捉えられるよう電子線照射条件の検討が不可欠となる。さらに、クライオ SEM 観察時には、鏡筒内の真空度、試料のチャージアップを軽減する工夫、アンチコンタミネーターの状況など、装置の状態についての多角的な検討が求められる。

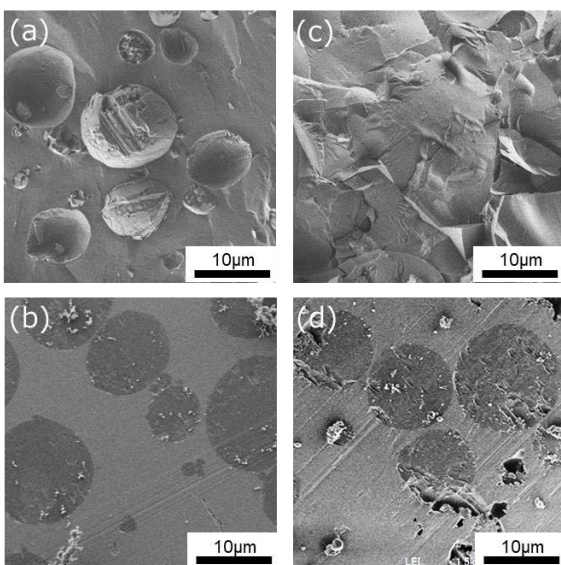


図 2. クライオ SEM でエマルション観察時の断面作製法の比較

(a), (b) : O/W エマルション。(c), (d) : W/O エマルション。O/W エマルション、W/O エマルションともに高压凍結した。(a), (c) : 凍結割断法による断面像。(b), (d) : 凍結切削法によりダイヤモンドナイフで切削した断面像。いずれも、クライオ SEM で、試料ステージ温度-150 $^{\circ}$ C、加速電圧 1.5kV で二次電子像を取得した。

- [1] Yuri Nishino et al., *Microscopy*, 71(1), 60-65 (2022).
- [2] Yoshiko Ito et al., *Microscopy*, 64(6), 459-463 (2015)

S-4

医学・生物系セッション 進化を続ける低真空 SEM の可能性

11月11日（土）13：00～14：50

第2会場

材料の改質加工用プラズマ技術による前処理方法の確立と 低真空 SEM での観察

池原 早苗^{1,3}, 若井 健¹, 緒方英之¹, 秋田 新介¹, 山口高志¹, 東 和彦¹,
大木翔太¹, 三川 信之¹, 馬場 恒明⁴, 秋元 義弘⁵, 内山 安男², 池原 讓^{1,2,3}
¹千葉大医, ²順天堂大医, ³産総研, ⁴DLC 研究所, ⁵杏林大医

Establishment of a pretreatment method for FFPE specimens on a glass slide for low-vacuum SEM observation— Using plasma technologies for material science.

S. Ikehara^{1,3}, K. Wakai¹, H. Ogata¹, S. Akita¹, T. Yamaguchi¹, K. Azuma¹,
S. Ohoki¹, N. Mitsukawa¹, K. Baba⁴, Y. Akimoto⁵, Y. Uchiyama², Y. Ikehara^{1,2,3}

¹Graduate School of Med. Chiba Univ., ²Juntendo Univ., ³National Inst. of Adv. Ind. Sci. and
Tech.(AIST), ⁴DLC Res. Inst. LLC., ⁵Kyorin Univ. School of Med.

I) 研究の概要

細胞膜は、電荷やイオンの移動を制限することでエネルギー順位を形成し、生体の基本ユニットである細胞の活動を維持・調節している。近年、低温・大気圧下で発生させたプラズマが、エネルギー順位への介入や調節で利用されるようになり、イオンやラジカルに対する組織や細胞の反応が明らかにされつつある。我々は、材料科学や半導体製造のプラズマ技術を利用した研究に取り組み、1) プラズマからの電荷供与により溶液中で分散したタンパク質が凝集することを発見し、2) 当該原理をとりいれたプラズマ止血デバイスの開発へと展開した^{1,2}。手術で止血に用いられる高周波や超音波凝固デバイスは、出血点周囲の間質に焼灼や挫滅を生じるが、プラズマ止血デバイスは、滲み出た血液や漿液を凝固物に変えて出血点を塞ぎ、止血操作による焼灼や挫滅を生じない^{2,3}。これらを踏まえて本シンポジウムでは、細胞膜の電荷の移動制限の解除、すなわち導電化にプラズマを用いた研究として実施した 3) 走査型電子顕微鏡(SEM)観察の標本処理への展開を紹介する^{4,7}。

II) はじめに：病理診断でおこなうこと

病理診断では、肉眼的に認識した臓器や組織の異常部位を採取し、顕微鏡で観察して、正常では見られない細胞の出現や組織構造の変化を判定する。通常は、ホルマリン固定・パラフィン包埋(FFPE)標本から、61x26mmのスライドガラス表面に収まる薄切標本作製と染色を行う。また、病理標本作成は保険診療において、透過型電子顕微鏡(TEM)での観察を想定した電子顕微鏡病理組織標本作製(1臓器につき2000点)とは区別して運用されている。腎組織や脂質蓄積症等を対象に行われる電顕標本の作製は、走査型電子顕微鏡(SEM)観察を行うためのスライドガラス標本の作製と処理を想定していないのである。

III) スライドガラス標本での観察の課題と可能性

病理診断に SEM 観察が取り入れられていない理由は、1) SEM ではリソソームや内分泌小胞での病的な蓄積を鑑別するのが困難であるだけでなく、2) TEM では取得できるオルガネラの形態学的特徴を取得できないためである。しかも 3) 抗体やレクチン染色、特殊染色も利用できず、FFPE 切片とスライドガラスが電荷やイオン移動を制限する材料であるために、入射電子と放出電子と放出電子電流のバランスが崩れて帯電しやすく解像度が上がらない。その点で反射電子信号を取得する低真空 SEM 観察は、低真空条件と反射電子散乱によって表面帯電が軽減されるので、この課題解決に有効である。これらの理解のもとに我々は、エネルギー分散型 X 線分析装置(EDS)Quantax75 を搭載した低真空 SEM(TM4000plus)と、四素子一体アニュラー型

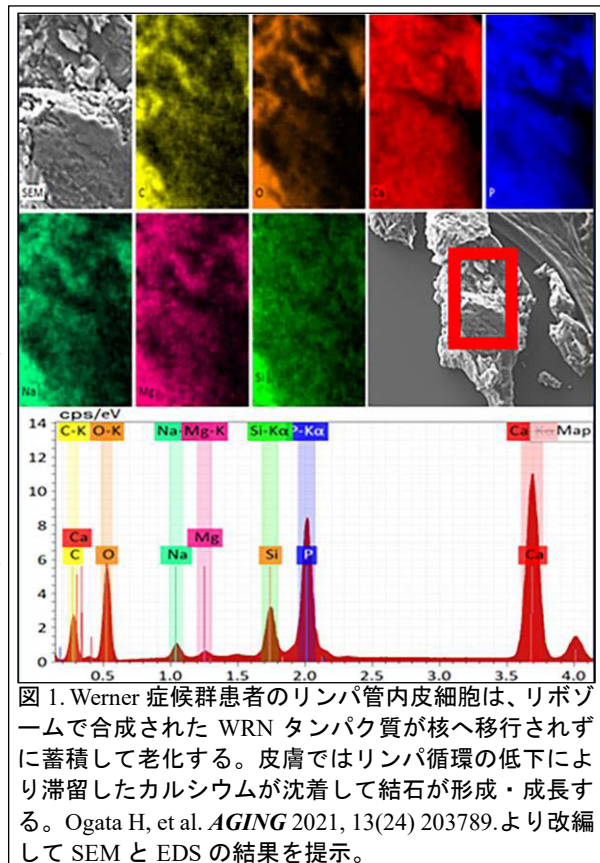


図1. Werner 症候群患者のリンパ管内皮細胞は、リボゾームで合成された WRN タンパク質が核へ移行されずに蓄積して老化する。皮膚ではリンパ循環の低下により滞留したカルシウムが沈着して結石が形成・成長する。Ogata H, et al. *AGING* 2021, 13(24) 203789.より改編して SEM と EDS の結果を提示。

EDS(Flat QUAD)を搭載した超高分解能電界放出型 SEM(Regulus 8220)を使用して、スライドガラス FFPE 標本の前処理に適したプラズマの発生と処理技術を開発する研究を開始した。

IV)低真空 SEM・プラズマカーボン処理

市販のプラズマ CVD 装置を使用した Os⁷⁶ 膜形成で、Werner 症候群患者の皮膚潰瘍に沈着した結晶を低真空 SEM で観察し、P と Ca を主成分としていたことが確認できた⁴ (図 1)。また、喘息モデルマウスの肺組織の SEM 観察で、気管支上皮における粘液小胞がグロコット染色により可視化でき、染色反応は、EDX で Ag⁴⁷ を粘液小胞に検出することによって確認できた⁵ (図 2)。しかしながら、FFPE 標本の前処理に用いた Os⁷⁶ 膜は、粘液小胞間の構造を被覆し、観察の妨げにもなっていた。そこで、高電圧・高パルスで発生させた炭素プラズマが、スライドガラス上の FFPE 切片と反応して導電性膜を形成する方法を考案し、病理解剖で採取された肺組織のスライドガラス標本を使用して、その原理実証と最適化を行った。確立した前処理は、SARS-CoV-2 感染の重症化により死亡した患者の肺組織でスパイクタンパク質に対する抗体染色を行ったのちに行い、FE-SEM で観察した。結果、肺血管壁中膜に出芽しているウイルス粒子の存在と広がりを可視化できた(図 3)⁷。観察表面にウイルスが出ていない場合についても、イオンミリングや Focal Ion Beam でのスパッタリングを行って面だし後に FE-SEM で観察して確認できたので、病理診断に必要な解析技術を確認できたと考えている。

V)まとめ

開発技術は、抗体反応や特殊染色の画像を SEM で取得して行う病理診断を実現した。炭素イオンとの反応で形成された炭素原子結合が、スライドガラス上の FFPE 切片における電荷の移動制限を解消したためにウイルスの可視化に必要な解像度を確保できたと考えている。これらより、スライドガラス標本で低真空 SEM を使用して行う病理診断の可能性も広がったと推察する。また、電子顕微鏡が半導体製造ラインで利用されている状況をふまえると我々の実現した技術は、電子顕微鏡観察を使用した病理診断とその自動化の扉を開くと期待している。

[引用文献]

1. Ikehara, S., et al. Plasma Blood Coagulation Without Involving the Activation of Platelets and Coagulation Factors. **Plasma Processes and Polymers** 12, 1348-1353 (2015).
2. Sakakita, H., Shimizu, T. & Ikehara, Y. Reviews of low-temperature atmospheric pressure plasma for studying hemostasis and international standardization. *Japanese Journal of Applied Physics* 60, 020502 (2021).
3. Shimizu, T. & Ikehara, Y. Benefits of applying low-temperature plasma treatment to wound care and hemostasis from the viewpoints of physics and pathology. **Journal of Physics D: Applied Physics** 50 (50), 503001 (2017).
4. Ogata, H., et al. Calcification in Werner syndrome associated with lymphatic vessels aging. **Aging** (Albany NY) 13, 25717-25728 (2021).
5. Wakai, K., et al. The new preparation method for paraffin-embedded samples applying scanning electron microscopy revealed characteristic features in asthma-induced mice. **Sci Rep** 12, 9046 (2022).
6. Okano, M., et al. Interleukin-33-activated neuropeptide CGRP-producing memory Th2 cells cooperate with somatosensory neurons to induce conjunctival itch. **Immunity** (2022).
7. Iwamura, C., et al. Elevated Myl9 reflects the Myl9-containing microthrombi in SARS-CoV-2-induced lung exudative vasculitis and predicts COVID-19 severity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 119, (2022).

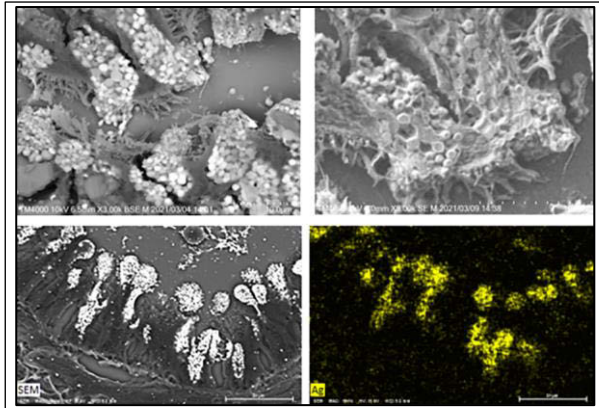


図 2. グロコット染色した標本の低真空 SEM・EDX での解析例。秋元 義弘, 池原 譲 論文図表を読む作法 第 3 章 細胞の形態や性質の解析 3. 走査電子顕微鏡。羊土社 2022 より提示。

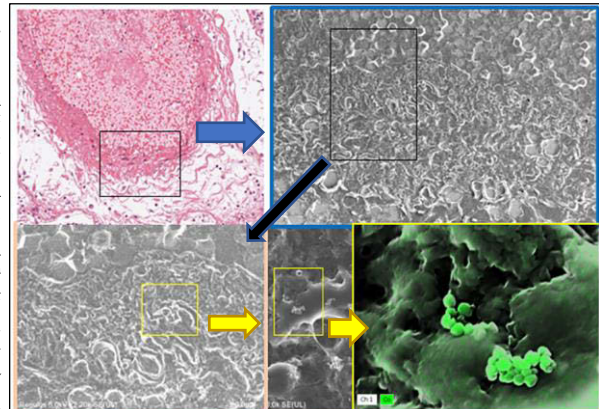


図 3. 肺動脈壁の観察例。SARS-Cov2 が HE 染色で認めた病変に存在することを抗体染色・SEM・EDX により確認。Iwamura C, et al. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2022 より改訂して提示。

S-4-2

卓上 LVSEM の FFPE 標本観察の試みと STEM ホルダーによる TEM 切片観察

高木 孝士
昭和大電顕室

Trial of FFPE samples on a tabletop LVSEM and observation of TEM sections using a STEM holder.

T Takaki

Center for Electron microscopy, Showa Univ.

透過電子顕微鏡(TEM)は細胞の微細構造物の形態観察に非常に重要で不可欠な装置であるが、高い導入・運用コストや厳しい設置条件、煩雑な操作方法などの欠点があり、自施設で TEM を維持運営することは限定的となりつつある。しかし腎疾患の病理診断では、未だに電子顕微鏡による形態観察の重要度が高い。また、本教室に来る海外からの留学生が電子顕微鏡技術を習得し国に帰っても、高価な透過電子顕微鏡がそもそも国や施設に無いという問題もあった。

この解消の為、近年、安価で簡易的な卓上型低真空走査電子顕微鏡(LVSEM)を用いて、病理学で使われる腎生検試料のホルマリン包埋パラフィン(FFPE)標本を用いた電子顕微鏡診断の可能性に関して検討をしている。しかし、透過電子と反射電子の性質の違い、装置の分解能の違いなど未だに課題が多いが、これに関して、我々が今まで試みてきたいくつかの成果を報告する。

また、上記の問題の解消の為、LVSEM の高感度検出器と Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) ホルダーを用いてヒト腎疾患症例の TEM 切片を STEM 観察することで分解能を上げ病理診断に適しているか検証している。IgA 腎症、膜性腎症、ループス腎炎など様々な腎症で検討を行い、従来の TEM 観察とほぼ同等の病理診断が可能であることを示してきた。この方法は従来と比較してはるかに安価で簡便に分解能の高い微細構造物の電子顕微鏡観察を可能とし、バクテリアのネガティブ染色による鞭毛観察も可能であった。しかし、腎臓病変の観察で重要なアミロイド線維のような nm レベルの構造を観察することは困難であり、今後の更なる装置性能の向上が望まれる。現在我々はさらに症例数を増やして病変の定量化を試みているため併せて報告をする。

卓上-低真空-SEMによる切片観察・三次元再構築の簡易化・効率化

大井 崇生
名古屋大農

Simplification and optimization of section observation and 3D reconstruction using tabletop-low vacuum-SEM

T. Oi
School of Agri. Nagoya Univ.

卓上SEMは、机や実験台の上に設置して使用する小型の走査型電子顕微鏡であり、大型の汎用SEMに比べて廉価で、一般的に初心者にも操作しやすい簡便な設計になっている。その中でも、低真空条件で作動するタイプは、水分を含んでいたり、導電性が低く帯電しやすかったりする生物系試料との相性に優れる。生鮮試料の外形の直接観察については他にも報告があるため、本講演では樹脂包埋試料を扱った観察の作業効率を高める比較的新しい取り組みについて数例を紹介したい。なお、報告内容は低真空SEMとしての性能に優れ、手軽に操作できる量産機 (TM4000 Plus II, Hitachi) を用いた演者の体験に基づいており、他の機種を用いた経験に欠けるため、卓上SEMについての見解としては不偏的ではない情報も含まれるかもしれない点をご容赦願いたい。

①卓上SEMによる切片-SEM法

透過型電子顕微鏡 (TEM) 用に固定・脱水・樹脂包埋された試料を、スライドガラスなどの基板に回収して平滑な切片の組成像をSEMで観察する切片-SEM法が近年普及してきている。電子線を透過させなければならないTEMでは超薄切片をメッシュや薄い支持膜上に載せる必要があったが、切片-SEM法では表面からの反射電子が適切に検出できれば試料は厚くても構わず、切片は基板上に貼り付けられるため破れにくい。この切片-SEM法は卓上SEMでも可能である。良質な像を得るコツは、可能な限りワーキング・ディスタンスを短く、検出器に近づけて試料台を設置することである。オルガネラ内部の微細構造観察には解像度が足りないが、細胞壁の厚みの測定などには十分である。演者らは、本手法を硬くて超薄切片の作製が困難であったイネ籾殻の硬壁繊維組織や肥厚したクチクラ層に覆われた表皮構造の観察に使い、TEMよりも楽に安定した定量比較を実現したり。

②卓上SEMによる連続切片-SEM法 (アレイトモグラフィ)

切片-SEM観察を連続した切片群に対して行えば、三次元再構築法に発展させることができる。樹脂包埋試料をマイクロトームで切削して得られる連続切片のリボンの回収は、直径3 mmの小さなグリッドで扱うTEM法よりも、より大きな基板で扱う切片-SEM法の方が操作が容易であり、かつ一度に回収できる切片枚数も多くなる。一般的なスライドガラスであれば1枚で100~300枚の切片を回収可能で、これだけの枚数を得られれば、比較的大きな細胞全体を三次元解析できる。そして、この連続切片-SEM法も卓上SEMで可能である²⁾。詳細は割愛するが、FIB-SEMやSBF-SEMのような大型特殊装置に頼らずに行えるため、経済的に導入しやすい3D解析法となり得る。また、卓上SEMの操作は容易であるため、学生たちが自分たち自身の手で撮影から3D解析までを一貫して行える点も教育現場としては魅力的である。

③TEM観察の事前確認としての卓上SEMの利用

TEMで観察を行う際に、準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色などを施して光学顕微鏡で事前に観察する場合も多いかと思われるが、卓上SEMはその作業も簡便化できる。マイクロトームで試料ブロックをトリミングして面出ししたらホルダーごと取り外し、観察したい断面を真上に向け卓上SEMで観察する。試料が切片でなくとも、平滑鏡面であればブロックのまま組成像を得ることができ、このブロックフェイス観察法はFIB-SEMやSBF-SEMなどによる撮像の基本原理でもある。

S-4-3

低真空SEMでは試料の導電性が低くてもチャージアップしにくいいため、ウランや鉛などの電子染色を行わずとも、固定剤として用いられる四酸化オスミウムによる効果だけでも組織や細胞の状態を大まかに把握できるため、面出し作業を効率的に進めることが可能となる。

なお、切片を載せた後のグリットの状態を丸ごと確認することも、卓上SEMでは容易に行える。演者が特に有用性を感じたのは、超高压電子顕微鏡による電子線トモグラフィーを行った際である。高性能なTEMほど広域観察に制約がかかり、切片や支持膜の状態の把握や観察対象の探し出しなどに時間を要する。また、無理に高倍率で縦横観察していくと試料や支持膜にダメージが加わることも多々ある。図1に示すように、事前に卓上SEMで試料グリットの全体像を撮影しておけば、切片の状態や位置がトモグラフィーに適するかを事前に判別でき、TEM観察の視野決めの際には見取り図にもなり、作業効率は各段に上がる。

④FIB-SEM試料の切削位置決めへの卓上SEMの利用

卓上SEMはFIB-SEMによる連続断面観察においても作業効率を高めてくれる。FIBは十nm単位での高精度の切削が可能で、作業時間や費用の面から削れる体積に制約がある。ブロックに包埋した組織のどこを切っても観察対象と遭遇できるような場合は問題ないが、対象が試料ブロック中に散在していたり、特定の箇所には、切削は宝探しの難しさに陥る。そこで試料ブロックをトリミングし、観察面以外にも平滑面を作出した段階で卓上SEMで状態を確認し、断面から組織の内部構造のパターンを推測する手がかりを掴んでおくことをお勧めしたい。図2は演者がイネ科植物の葉組織の表面に出現する毛状突起をFIB-SEMで観察するに際して卓上SEMで事前確認を行ったものである。平滑にした側面からは単子葉植物に特徴的な平行脈の維管束断面が観察され、葉脈に沿って分布する毛状突起の出現し得る領域を絞り込むことができる。さらにその領域内に見られる僅かな構造的特徴から観察位置を決めておける場合もある。FIB-SEM装置内でも同様に位置を予想できなくはないが、高真空観察となるため試料ブロックをしっかりとカーボンコートしておく必要があり、低真空条件の卓上SEMで事前に確認しておく方が構造を捉えやすい。卓上SEMの加速電圧を可能な限り高くし、ブロック表層の少し下層まで透けて見えるぐらいが丁度良い。追加の面出しが必要であると判断される場合に、試料の出し入れが容易に行えるのも利点となる。

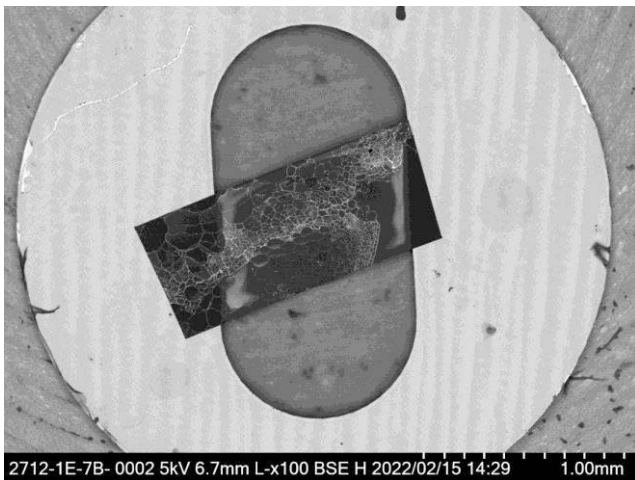


図1: 超高压電子顕微鏡トモグラフィー用試料の卓上SEMによる事前確認の様子。ホルムバル膜を貼った単孔グリットに厚切り切片が載っている。

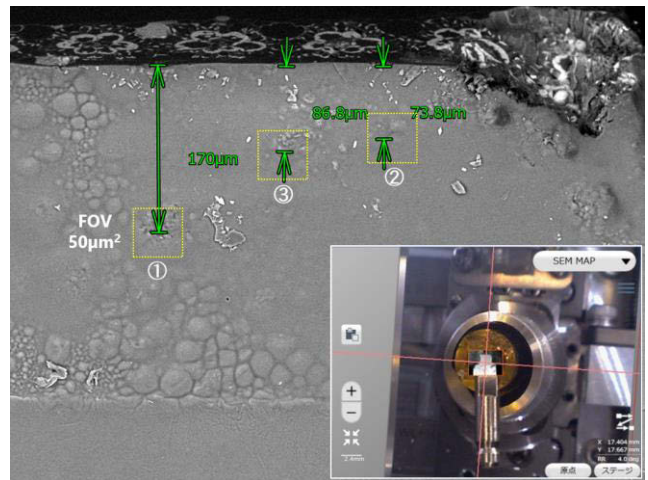


図2: FIB-SEM用試料の卓上SEMによる事前確認の様子。右下枠は光学カメラによるサポート画面からトリミングして重ね合わせた。

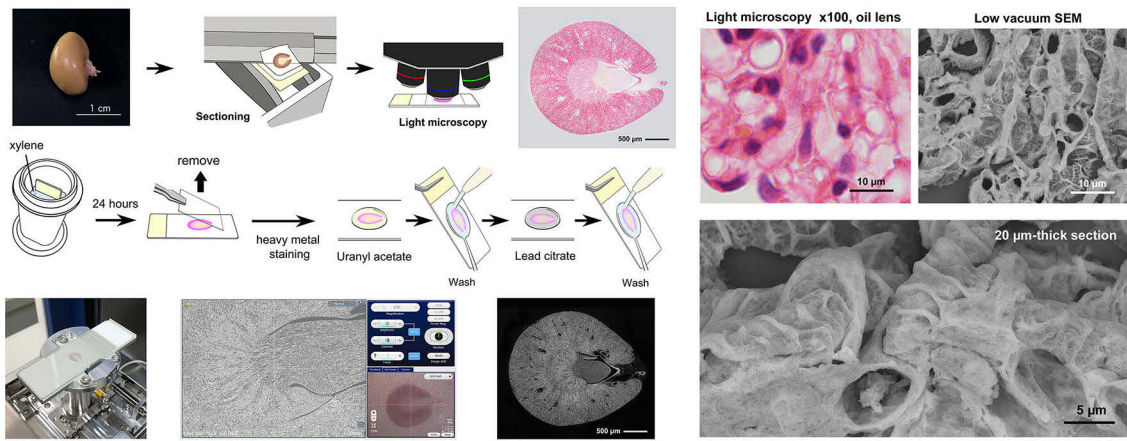
- 1). Sugiura K., Oi T., 他8名 (2022) Resistance factors of pecky rice incidence caused by the rice stink bugs (*Leptocoris chinensis*, *Nezara viridula*) in rice line CRR-99-95W. *Plant Production Science* 25: 172-182.
- 2). 前田芽依奈, 谷口光隆, 大井崇生 (2023) 異なる濃度の窒素施肥で育てたC₄雑穀シコクビエ葉身の光合成細胞の三次元形態解析. 日本作物学会第255回講演要旨集, pp114.

S-4-4

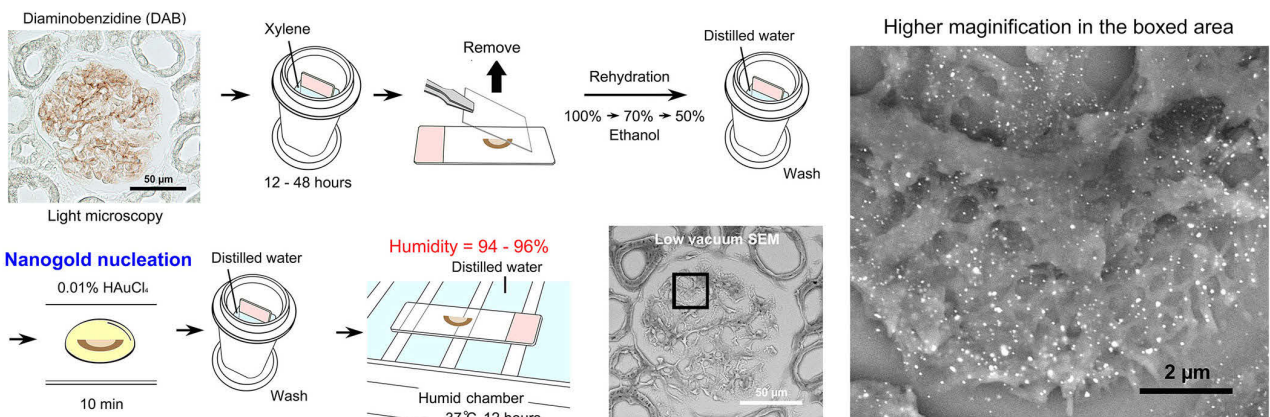
誰でも簡単、観える楽しさ ～卓上低真空走査電顕の魅力と威力～
 澤口 朗
 宮崎大・医・解剖

Attractive Desktop Low-vacuum SEM for Bio-medical Research A. Sawaguchi Dept. of Anat, Facul. of Med. Univ. of Miyazaki

生体の様々な器官は特有の生理機能を果たす細胞や結合組織が織りなす精緻な立体構造を有し、近年の目覚ましい再生臓器の開発研究においては立体構造の再現が喫緊の課題とされます。そこで、器官の構造を立体的に捉える新たな顕微技術として、当研究グループでは低真空走査電子顕微鏡を導入し、器官を構築する細胞や組織の微細形態を電子顕微鏡レベルで立体的に捉える新たな顕微技術として「厚切り切片観察法」を確立しました（参考文献 1）。低真空走査型電子顕微鏡は常法より低い真空度で稼働することから、光顕用のスライドガラスに載せた試料でも帯電することなく観察できます。また、通常の約 5 倍、20～30 ミクロンの厚さに「厚切り」したパラフィン切片の広範囲にわたるスクリーニングで狙いを定めた観察対象を、高精細かつ立体的なイメージで撮影できます。

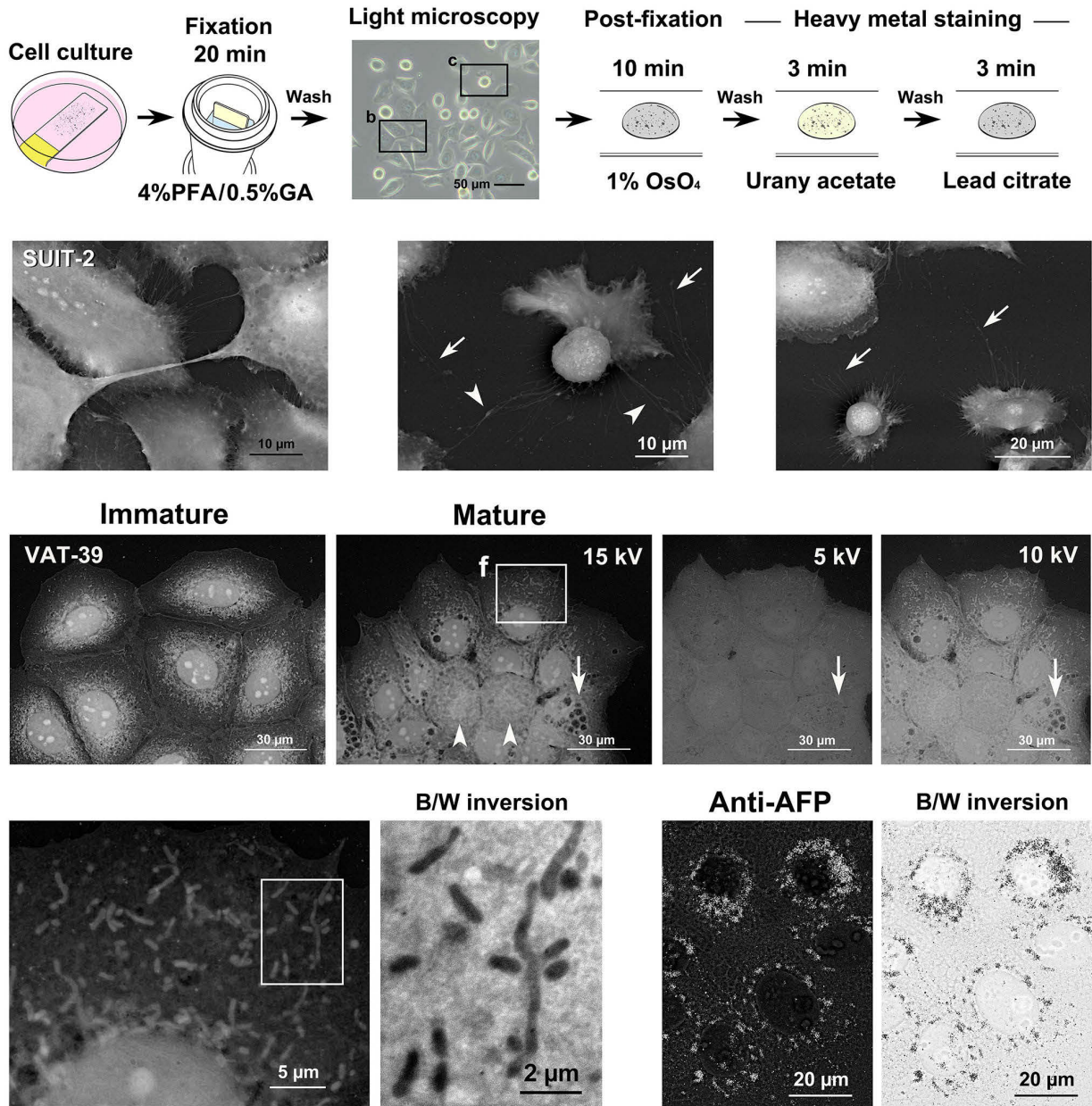


この特性を応用し、医学・生物学研究で標的とするタンパク質や遺伝子の発現部位を電子顕微鏡レベルで高精細に可視化する新たな手法を確立しました（参考文献 2）。従来の包埋後標識法では、標的に特異的な金粒子標識抗体を調製し、超薄切片の作製を経て、標識した抗体の反応処理を完了するまでに、長い時間と熟練の技を要しました。今回、新たに開発した方法は、光顕用切片に酵素抗体法で DAB 標識を施した後、0.01%塩化金酸水溶液で 10 分間処理することで DAB 標識部位に限局した金ナノ粒子が形成（平均粒子径=6 nm）され、続いて 37°C で 12 時間、高湿度に保つことで金ナノ粒子が成長（平均粒子径=47 nm）して可視化される画期的な標識法です。15 年前に DAB 標識された切片上で金ナノ粒子が形成・成長することも証明されており、保管庫にストックされた光顕標本を電顕レベルで再検証する応用に加え、CLEM 免疫電顕標識の実例もご紹介します。



S-4-4

直近の研究成果として、スライドガラス表面に接着性を有する細胞を培養し、培養された細胞の三次元微細形態を電子顕微鏡レベルで高精細に可視化する新たな手法をご紹介します。本研究では膵臓癌由来細胞株：SUIT-2 と VAT-39 を対象に観察を進め、細胞間接着や細胞分裂像、細胞表面の特異的な突起形成など、光学顕微鏡では捉えることができない微細な特徴が明らかとなりました。また、新たな金ナノ粒子標識法を応用することで、成熟 VAT-39 で産生される AFP が細胞内分泌顆粒に局在する明確な所見も得られました。これらの特徴は癌細胞の悪性度や転移性に関係することから、本法で獲得される微細形態所見が新たな治療戦略にも繋がるものと期待されます。



光学顕微鏡と電子顕微鏡の隔たりを埋める低真空走査電子顕微鏡の特性を活かした本法が医学・生物学研究に幅広く応用されることで、生体組織や細胞を構成する構造と機能の相関を解き明かす研究が加速・進展されるものと期待を寄せております。

参考文献：1. A. Sawaguchi et al., *Sci Rep* 8: 7479 (2018)
 参考文献：2. A. Sawaguchi et al., *Commun Biol* 4:710 (2021)

S-5

材料・装置系セッション 物性科学を切り拓く最新顕微法 2

11月12日（日）9：00～10：50

第1会場

FIB 装置を用いた TEM 試料作製および 3 次元再構成

加藤文晴, 吉田竜視

(一財) ファインセラミックスセンター ナノ構造研究所

TEM Specimen Preparation and 3D-Reconstruction using FIB System

T. Kato and R. Yoshida

Nanostructures Research Laboratory, Japan Fine Ceramics Center

集束イオンビーム(FIB)装置は、透過型電子顕微鏡(TEM)用の薄片試料作製⁽¹⁾装置として、材料の研究開発や産業分野で広く活用されている。FIB 加工の最大の問題は、加速電圧数 10 kV の Ga イオンビームを試料に照射することに伴う、FIB 加工面へのダメージ層の形成である。シリコンや酸化物材料の場合は、FIB ダメージにより非晶質化し、金属材料や化合物半導体材料では、転位ループ等の格子欠陥が導入されることが知られている。いずれの場合も、薄片試料表面に FIB ダメージ層が残っていると TEM 像の像質の低下を招く。また、イオンビームによるダメージ層の厚さは、その加速電圧に比例していることが知られている。そのため、FIB ダメージ層の除去方法としては、低加速電圧(数 kV~100 V) Ga イオンビーム、もしくは Ar イオンビームを薄片試料に照射することによりダメージ層厚さを低減させることができる。特に、非晶質相が形成される材料については、低加速電圧のイオンビーム照射は極めて効果的で、劇的に TEM 像の像質を改善させることができる。一方で、金属材料の場合は、低加速電圧のイオンビームを用いても薄片試料表面に転位ループが形成されることもあり、像質改善の報告例はそれほど多くはない。本報では、圧延処理を行った白金材料を対象として、イオンビームの加速電圧を低下させた場合の TEM 像の像質改善状況を調査した結果⁽²⁾を紹介する。

図 1(a)、(b)に加速電圧 40 kV の Ga イオンビームで薄片処理を行い、最終的に加速電圧 10 kV の Ga イオンビームで仕上げた白金の(220)回折条件で撮影した明視野像と暗視野像を示す。Ga イオンビームにより形成された多数の転位ループの影響により、圧延処理で白金粒子内部に導入された転位が不明瞭である。図 2(a)、(b)は加速電圧 40 kV の Ga イオンビームで薄片処理を行い、最終的に加速電圧 0.1 kV の Ar イオンビームで仕上げた白金試料の同条件で撮影した明視野像と暗視野像である。試料表面に形成された転位ループがより低減されており、白金粒子内部の転位が観察可能である。

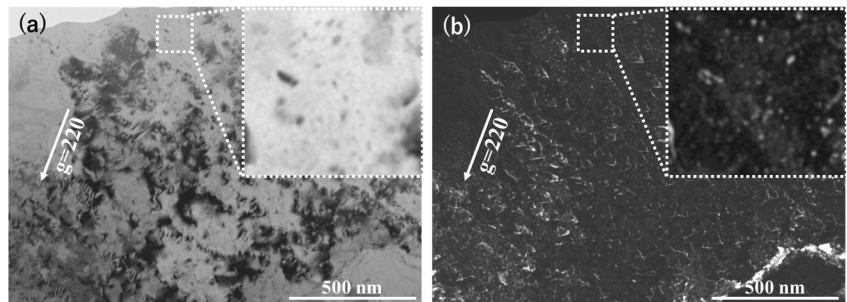


図 1 加速電圧 10 kV の Ga イオンビームで仕上げた白金試料。220 回折条件の(a)明視野像と(b)暗視野像。高密度に形成された転位ループの一部を拡大。

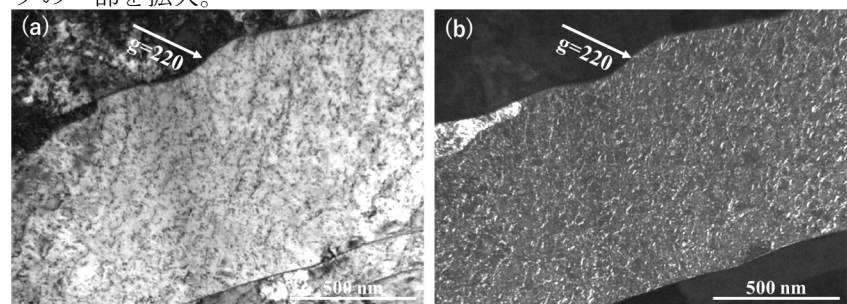


図 2 加速電圧 0.1 kV の Ar イオンビームで仕上げた白金試料。220 回折条件の(a)明視野像と(b)暗視野像。

2000 年代に入ると各 FIB メーカーから FIB カラムと走査型電子顕微鏡(SEM)カラムを 1 つの装置に搭載した FIB-SEM 複合機が市販されるようになる。複合機では、FIB 加工を実施した直後に、走査イオン顕微鏡(SIM)像とは別の方向から FIB 加工面の状態を SEM 像で確認することができる。特に、TEM 用観察試料仕上げの段階では、薄片試料の状態を確認できることから、従来型のシングルカラムの FIB 装置と比較して、TEM 用観察試料作製の成功率を格段に向上させることができる。

さらに、FIB-SEM 複合機では、FIB による連続断面加工（シリアルセクションング）と同時に加工面の SEM 像撮影を繰り返し、連続断面 SEM 像を用いた 3 次元再構成も実施することが可能である⁽³⁾。3 次元解析の例として BaHfO₃(BHO) ナノロッドが形成された EuBa₂Cu₃O_{7-y}(EuBCO) 酸化物高温超電導層^(4,5)の 3 次元再構成結果を紹介する。事前の TEM 観察から、EuBCO 層内部には異相として、CuO、Eu₂O₃ および BHO 粒子が分布し、マトリクスである *c* 軸配向 EuBCO 結晶の他に、結晶方位が異なる EuBCO 異方粒子が形成されていることが確認されている。

図 3 に EuBCO 層表面の SEM 像を示す。表面は凸凹している。このような EuBCO 超電導層の断面 SEM 観察例を図 4 に示す。CuO はマトリクスである EuBCO 結晶よりも暗いコントラストで、Eu₂O₃ もしくは BHO は明るいコントラストで現れる。EuBCO 異方粒子については、マトリクスである *c* 軸配向 EuBCO 粒子とのコントラスト差は生じ無いが、*c* 軸配向 EuBCO 粒子と比べ、表面が膨らんだ形状になる（凸形状）。また、白矢印で示すように EuBCO 異方粒子と *c* 軸配向 EuBCO 粒子の境界には隙間が形成されている。そのため、EuBCO 異方粒子は表面形状と、そのような隙間の有無から判断した。このような断面 SEM 像を用いて 3 次元再構成を行うには、各物質の領域分けを行う必要がある。コントラスト差が大きなもの、単純な画像処理で領域分けを行うことができるが、コントラスト差が小さい場合は、単純な処理では対応不能である。EuBCO 超電導層の場合、マトリクスの *c* 軸配向 EuBCO 結晶と EuBCO 異方粒子とのコントラスト差が無い

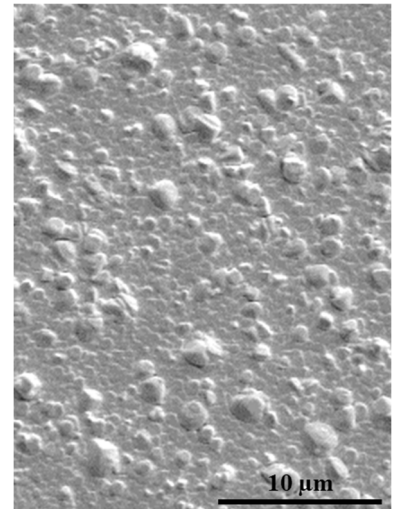


図 3 EuBCO 表面の SEM 像。

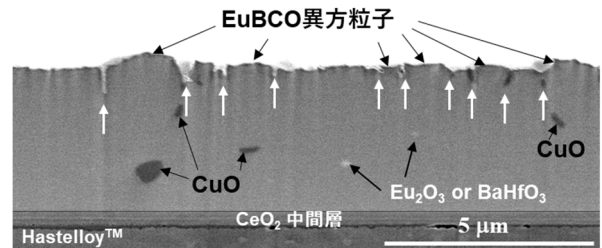
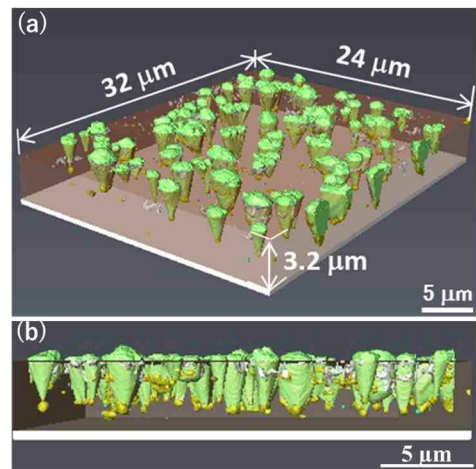


図 4 EuBCO 層の断面 SEM 像。



■: EuBCO 異方粒子, ■: CuO, ■: Eu₂O₃ もしくは BHO, ■: 隙間, ■: CeO₂

図 5(a) EuBCO 層の斜め方向、(b) 基板に対してほぼ平行方向からの 3 次元再構成結果。

差が無い

ため、これらの粒子、CuO 粒子、および Eu₂O₃ もしくは BHO 粒子の領域分けについては、結局、1,600 枚の全ての SEM 像を手作業で行った。そのため、連続断面 SEM 像撮影から 3 次元再構成まで莫大な時間を費やした。図 5 に、1,600 枚の SEM 像を用いて 3 次元再構成した EuBCO 超電導層の結果を示す。3 次元再構成領域は 32 μm × 24 μm × 3.5 μm である。図 5(a) は EuBCO 超電導層を斜め方向から、(b) は基板に対してほぼ平行方向から見た 3 次元再構成結果である。EuBCO 異方粒子は CuO 粒子を起点に形成され、超電導層の膜厚増加とともに粗大化している状態が確認できる。また、EuBCO 異方粒子は、中間層である CeO₂ 層から 0.5 μm 以上離れたところから形成されている。EuBCO 異方粒子はマトリクス *c* 軸配向 EuBCO 粒子と結晶方位が異なるため、超電導電流の抵抗となる。EuBCO 超電導層は膜厚増加とともに臨界電流が飽和する傾向^(4,5)があるが、EuBCO 異方粒子の粗大化は臨界電流飽和の 1 つの要因であるといえる。さらに、図 5 の 3 次元再構成結果から、体積 0.05 μm³ 以上の CuO 粒子が EuBCO 異方粒子の起点となることが判明した。

謝辞：本稿の成果の一部は、NEDO および経済産業省の委託により実施しました。白金試料は、田中貴金属工業(株)殿より提供頂きました。

【参考文献】

- (1) Kirk, E.C.G., Williams, D.A. and Ahmed, H., *Inst. Phys. Conf. Ser.*, **100**, 501-506 (1989).
- (2) 加藤丈晴、小形健二、着本享、まてりあ、**61**, No.12、887-897 (2022).
- (3) Holzer, L., Indutnyi, F., Gasser, P. H., Münch, B. and Wegmann, M., *J. Microsc.*, **216**, 84-95 (2004).
- (4) Ibi A, Yoshida T, Izumi T, Shiohara Y, Yokoe, D., Kato, T. and Hirayama, T., *Phys. Proc.*, **81**, 97-100 (2016).
- (5) Yokoe, D., Yoshida, R., Kato, T., Ibi, A. and Izumi, T., *Supercond. Sci. Technol.*, **33**, 024002 (2020).

ナノの世界の高速現象を捉えるパルス電子線イメージング

栗原 真人^{A, B}

名大 IMaSS^A, 名大工^B

Time-resolved electron imaging for capturing high-speed phenomena in nanomaterials

M. Kuwahara^{A, B}

^AIMaSS Nagoya Univ., ^BSchool of Eng. Nagoya Univ.

光電子放出を用いたパルス電子線発生は、プローブ電子線を活用する分析装置に高い時間分解能を付与することが可能である。特に透過電子顕微鏡 (TEM) は、高い空間分解能を有しつつ投影像および走査像の双方を取得できる強力な装置であり、プローブ電子線をパルス化することで高速に変化するナノ構造の可逆過程・非可逆過程の双方が計測可能となる。また、電子エネルギー損失分光 (Electron energy-loss spectroscopy: EELS) やカソードルミネッセンス、電子線ホログラフィーなど、TEM と組み合わせて活用される分析手法への応用も可能であり、より詳細なナノ材料の物性評価へと展開が期待される。

2000 年代後半にカルフォルニア工科大学の Zewail 教授のグループは、熱電子源と紫外パルスレーザーを組合せた光電子放出を電子源に利用することで Ultrafast TEM (UTEM) を実現し、可逆過程を数百フェムト秒時間分解能で観察することに成功した[1]。一方、名古屋大学グループでは、2010 年代前半より NEA (Negative Electron Affinity) 表面を形成した半導体 (NEA-PC) を光電子放出源に用いたレーザー駆動型パルス電子銃を開発し、TEM へ搭載し時間分解顕微計測を実現した[2]。これにより、時間分解能は電子線イメージング用カメラの露光時間を遥かに超えるピコ秒へと向上した。NEA-PC は、半導体清浄表面にアルカリ金属を蒸着することにより実現されるため超高真空を必須とするが、劣化後にアルカリ金属再蒸着を行うことで繰り返し使用できる。また、平面型光陰極電子源である NEA-PC は、高い光電変換効率 (量子効率)、狭いエネルギー幅、高いスピン偏極度、低エミッタンス性能や輝度の高さから、TEM のもつ分析性能の優位性を活用したピコ秒時間分解計測が可能となった[3-5]。しかし、当初開発した装置では 30 kV~50 kV の低い加速電圧での運用のため、これまで計測対象が限られてきた。このため、高い加速電圧で時間分解計測を可能にする 100kV 時間分解 TEM (TRTEM) を開発し、加速電圧 40kV~100kV でピコ秒パルス電子を用いた TEM 像、STEM 像、電子回折図形、電子エネルギー損失分光(EELS)の取得を実現した。高い加速電場および電圧により、試料透過能による制限の緩和、一般的な試料ホルダーの利用、空間電荷効果による電荷量制限の緩和が実現された。

TRTEM をもちいて金三角形ナノプレートに 780 nm の 150 fs パルスレーザーを照射することで光励起状態を生成し、その緩和過程をピコ秒時間分解 EELS 手法により測定を行った。この結果、各プラズモンピークに 7.8 ps と 100 ps 以上の時定数を確認した[5]。また、試料位置における電子線パルス幅は 8.5 ps であることを確認し、別途測定した PINEM 計測から推定されたパルス幅と良い一致を示すことがわかった。これにより、低エネルギーの EEL ピークの高速時間分解計測が可能であることが示された。

- 1 Lobastov, V A, Srinivasan R, and Zewail A H (2005) Four-dimensional ultrafast electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(20):7069-7073.
- 2 Kuwahara, M, Kusunoki S, Jin X G, Nakanishi T, Takeda Y, Saitoh K, Ujihara T, Asano H, and Tanaka N (2012) 30-kV spin-polarized transmission electron microscope with GaAs-GaAsP strained superlattice photocathode. *Applied Physics Letters*. **101**(3):033102-033102. [in English].
- 3 Kuwahara, M, Kusunoki S, Nambo Y, Saitoh K, Jin X G, Ujihara T, Asano H, Takeda Y, and Tanaka N (2014) Coherence of a spin-polarized electron beam emitted from a semiconductor photocathode in a transmission electron microscope. *Applied Physics Letters*. **105**(19):193101-193101. [in English].
- 4 Kuwahara, M, Yoshida Y, Nagata W, Nakakura K, Furui M, Ishida T, Saitoh K, Ujihara T, and Tanaka N (2021) Intensity Interference in a Coherent Spin-Polarized Electron Beam. *Phys Rev Lett*. **126**(12):125501.
- 5 Kuwahara, M, Mizuno L, Yokoi R, Morishita H, Ishida T, Saitoh K, Tanaka N, Kuwahara S, and Agemura T (2022) Transient electron energy-loss spectroscopy of optically stimulated gold nanoparticles using picosecond pulsed electron beam. *Applied Physics Letters*. **121**(14):143503.

電子線ホログラフィーで観る触媒の構造・状態

村上 恭和^{A,B}九州大学大学院工学研究院^A、九州大学超顕微解析研究センター^BStructure and Charging State of Catalyst Nanoparticles
Studied by Electron HolographyY. Murakami^{A,B}^A Department of Applied Physics and Quantum Engineering, Kyushu University^B The Ultramicroscopy Research Center, Kyushu University

電子線ホログラフィー(EH)は、波の性質を持つ電子の「振幅」と「位相」を再生するための代表的な技術であり、材料が示す電場や磁場を局所的に解析する手段として利用されている。EHの歴史を振り返ると、1980年代から2000年にかけては、日立基礎研のグループによるベクトルポテンシャルの存在実証や、超伝導体における磁束量子の実観察など、基礎物理に関わる重要問題に対して優れた研究成果が発信された。2000年以降、EHは材料工学や応用物理の分野にも広く展開され、これまでに半導体の $p-n$ 接合界面における電位やドーパント分布の解析、全固体型リチウムイオン電池の充放電過程の動的観察、磁石の性能を最大限に高めるための表面・界面の磁束密度計測など、それぞれの材料開発に関わる重要な成果が発表されてきた。

これに対して触媒研究を含む化学(無機化学)の分野は、EHにとっては比較的馴染みの薄い領域と思われる。例えば、 TiO_2 や MgO など酸化物の表面に金属ナノ粒子を載せた(担持した)触媒系は、環境浄化や有用物質(アンモニアやアルコールなど)の合成に欠かせない基軸的な材料である。その触媒活性は、酸化物と金属ナノ粒子の間で起こる電荷移動と、それに伴うナノ粒子の微弱な電気分極(帯電)の影響を受けることから、触媒材料の帯電状態の解析は、先端計測に携わる研究者・技術者にとって重要なテーマである。実際これまでに、放射光を用いた分光的手法(共鳴光電子分光法)により、酸化物に担持させた金属ナノ粒子の帯電量を高精度で決定した研究事例が注目を集めた。しかし、このような分光的手法は多数のナノ粒子に対する平均情報を得るもので、例えばナノ粒子の構造・形態・結晶性と帯電状態の関係を、粒子毎に明らかにすることは困難である。このような「ナノ粒子1個1個」に注目した解析は、透過電子顕微鏡を基盤とするEHが切り開くべき課題と言える。

一方、研究対象は微小な「ナノ粒子」であり、想定される帯電量は多くても電子数個分と予想される。つまり触媒材料が示す微弱な電気分極をEHで評価するためには、汎用的な実験に比べて位相計測精度を1桁高める程の技術強化が要求される。著者等は2016年~2021年に実施したJST-CREST課題(九大、日立、阪大の共同研究)において、EHの位相計測精度を高めるための要素技術開発を行った。これらの要素技術には、日立・高橋が主導した電子線ホログラムのデータ収集の自動化(大規模データを用いたデータ処理、情報抽出の強化)[1]、日立・市橋と九大・小山等が貢献した深層学習による電顕画像の識別技術(上記の自動データ収集と組み合わせた効率的なデータ収集、データ解析が可能)[2]、阪大・御堂等によるノイズ除去の統計数理的手法(ノイズと微弱信号の適切な分別手段)[3]など、重要かつ拡張性を備えた技術が含まれる。これらの要素技術と、最適化されたホログラフィー電子顕微鏡の活用により、上記のJST-CREST課題における当初目標であった $2\pi/400$ radを超える、 $2\pi/1000$ rad級の位相検出精度を達成することができた[4]。

上述したEHの要素技術開発を踏まえて、代表的な担持型触媒であるPt- TiO_2 (TiO_2 結晶の表面にPtナノ粒子を配置した試料)の解析を行った[4]。図1の上段は、観察を行ったPtナノ粒子の構造・形態を示す電子顕微鏡像である。いずれの画像もPtと TiO_2 の界面が入射電子と概ね平行となる構図、即ち TiO_2 結晶上のPtナノ粒子が真空領域に突き出した状態を観察したものである。中段は、これらの電子顕微鏡像のフーリエ変換パターンであり、Ptと TiO_2 の結晶方位関係や、Ptナノ粒子の結晶格子の歪具合の解析に利用した。下段はEHによって得た位相再生像を示す。なお本研究ではPtナノ粒子の帯電状態を評価するにあたり、ナノ粒子域内で観測される位相変化(ナノ粒子を透過した電子の位相変化)ではなく、敢えてナノ粒子の外側の位相、即ち真空領域における位相変化を解析した。真空領域における位相変化の様子は、色調の濃淡によって表現している：詳細は文献4を参照。Ptナノ粒子を透過した電子波は、ナノ粒子の電気分極に起因する位相変化に加えて、動力

S-5-3

学的回折効果による付加的な位相変化が重畳し、解析が複雑となる。これに対して真空領域では動力的回折効果の影響を無視でき、一見して間接的ではあるが、ナノ粒子の電気分極のみに由来した位相変化を解析できる。

本研究では図1上段に示すような電子顕微鏡観察を65個のPtナノ粒子に対して実施した。その結果、観察対象の92%に相当するナノ粒子は、(c)に示す通り、Ptのバルク材料と同じくFCC格子を示した。これに対して一部のPtナノ粒子では、図1上段の(a)や(b)の茶色い領域が示すように、理想的なFCCから大きく歪んだ結晶格子(FCCよりもHCPに近い結晶格子)が観察された。一方、図1下段に示す位相像の解析、より具体的には真空領域で観察された位相変化の大きさと符号(ナノ粒子に向かって位相変化量が増えるか減るか)の解析を行ったところ、表示した三つのナノ粒子はいずれも負に帯電していること、またその帯電量は素電荷(q_e)を基準として(a)の粒子では $-6 q_e$ 、(b)の粒子では $-3 q_e$ 、(c)の粒子では $-2 q_e$ と決定された。これらの観察は、Ptナノ粒子の帯電量が結晶格子の歪具合に影響を受けることを示唆している。この他にもPtナノ粒子とTiO₂の結晶方位関係、即ち両物質間の仕事関数の大小関係に関わる因子もPtナノ粒子の帯電状態の決定に関与していることをEHによって確認した。これらは、ナノ粒子1個1個の結晶性や歪具合を究明できる電子顕微鏡の構造解析機能と、高感度化されたEHの電場解析機能の複合的な利用によって獲得された成果である。

本研究は、九州大学の麻生准教授、北條准教授、永長教授、玉岡助教、湯蓋博士、中島博士、日立製作所の高橋博士、明石博士、市橋博士、谷垣博士、品田博士、大阪大学の御堂助教との共同研究としてJST-CREST(JPMLCR1664)の支援のもとで実施された。また一部の研究は科研費(21H04623)による支援のもとで実施された。

【参考文献】

- [1] Y. Takahashi, T. Akashi, A. Sato, T. Tanigaki, H. Shinada, Y. Murakami: *Microsc.* 69 (2020) 132.
- [2] F. Ichihashi, A. Koyama, T. Akashi, S. Miyauchi, K. Morooka, H. Hojo, H. Einaga, Y. Takahashi, T. Tanigaki, H. Shinada, Y. Murakami: *Appl. Phys. Lett.* 120 (2022) 064103.
- [3] Y. Midoh, K. Nakamae: *Microsc.* 69 (2020) 121.
- [4] R. Aso, H. Hojo, Y. Takahashi, T. Akashi, Y. Midoh, F. Ichihashi, H. Nakajima, T. Tamaoka, K. Yubuta, H. Nakanishi, H. Einaga, T. Tanigaki, H. Shinada, Y. Murakami: *Science* 378 (2022) 202.

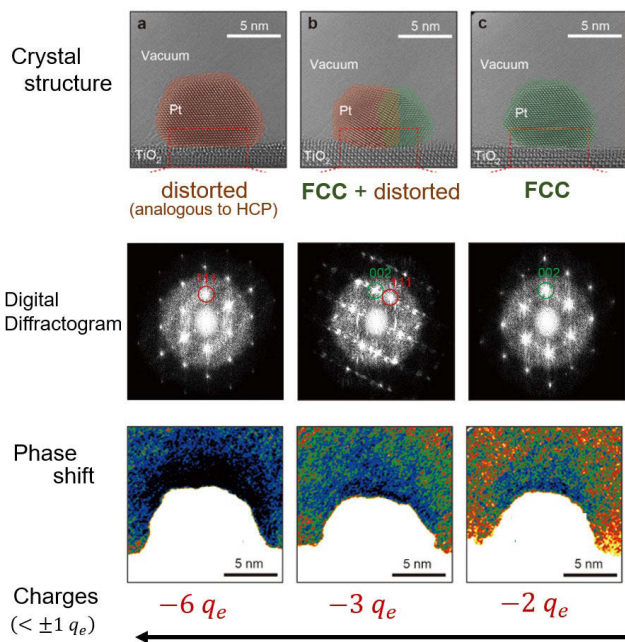


図1 Pt-TiO₂触媒の観察結果。

上段)Ptナノ粒子の形態を示す電子顕微鏡像。中段)Ptナノ粒子の結晶格子の歪具合の解析に利用したフーリエ変換図形。下段)電子線ホログラフィーで求めた位相像。Ptナノ粒子の外側(真空領域)の位相変化の様子を色調変化で表示。[4]

情報科学的画像解析と電子顕微鏡技術を融合した *in situ/operando* 計測

山本 和生^A, 野村 優貴^A, 佐々木 祐聖^A, 穴田 智史^A

^A一般財団法人ファインセラミックスセンター^A

In situ/Operando Electron Microscopy with Information Science

K. Yamamoto^A, Y. Nomura^A, Y. Sasaki^A, S. Anada^A

^AJapan Fine Ceramics Center

はじめに

我々のグループでは、これまで電圧印加中における全固体電池や半導体内部の電位分布、Li 分布などを、電子線ホログラフィーや S/TEM-EELS を用いて *in situ/operando* 計測を行ってきた[1-4]. 機能性材料やデバイスの高速な物理現象を計測するためには、高速かつ高感度な検出器が必要不可欠であるが、より極限的な *in situ/operando* 計測を行うためには、電子数が限られたノイズの多い画像や動画から、いかに真の情報を引き出すかが重要になってくる。我々は、スパースコーディングやテンソル分解法と呼ばれる情報科学的機械学習を用いて、ノイズの多い電子波干渉パターン（ホログラム）や 2 次元 Li 分布などの画像から、効果的に情報を引き出せることを示してきた。本講演では、上記の機械学習を用いて計測を行ってきた結果と今後の展開について報告する。

スパースコーディングと STEM-EELS を融合した Li 分布の高速 *operando* 計測

全固体電池は、高い安全性と高いエネルギー密度を両立できる次世代蓄電池の一つとして研究開発が進められている。全固体電池を実用化するためには、電池内部において Li イオンをスムーズかつ高速に移動させ、充電にかかる時間を短縮するとともに、放電における出力密度を高くする必要がある。それゆえ、電池動作中の Li イオンの動きをナノスケールで *operando* 観察することは、高性能な電池を開発する上で極めて重要となる。我々は STEM-EELS を用いて、薄膜型全固体 Li イオン電池の正極内部の Li 分布の変化を高速に観察することに成功したので紹介する[5].

図 1(a)に、本研究で用いた電池の模式図を示す。固体電解質として、Li イオン伝導体である $\text{Li}_{1+x+3z}\text{Al}_x(\text{Ti,Ge})_{2-x}\text{Si}_{3z}\text{P}_{3-z}\text{O}_{12}$ (LASGTP) の多結晶シートを用いた。正極材料は一般的な LiCoO_2 、負極材料はその場形成負極[6]と呼ばれる材料を用いた。図 1(b)は、 LiCoO_2 内部の Li 濃度分布（正確には、Li/Co 比分布）である。露光時間が 30 s 程度と短いため、ノイズが非常に多いことがわかる。この像から、MLLS(Multiple Linear Least Squares)フィッティングおよびスパースコーディング[7,8]を用いてノイズを除去し、さらにスパースコーディングによる超解像処理を行った結果を図 1(c)に示す。Li の分布が鮮明に観察できていることがわかる。充放電中にこのような Li 分布像を多数枚取得しているため、Li イオンがどのように脱離/挿入するかが動画として観察することができた。Li イオンは、充電中に、図の上方向（固体電解質がある方向）に移動するだけでなく、水平方向にも移動していることがわかった。機械学習の原理や Li 分布の動画は、講演で紹介する。

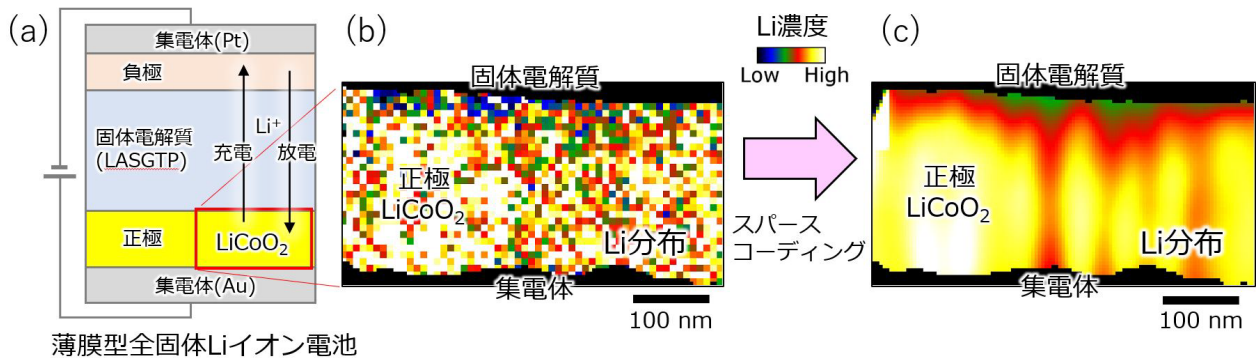


図1 薄膜型全固体 Li イオン電池の正極内部の Li 濃度分布

(a) 電池の模式図, (b) STEM-EELS による Li 濃度分布 (露光時間: 約 30 s), (c) MLLS フィッティングとスパースコーディングを用いてノイズを除去し、さらに、スパースコーディングによる超解像処理を行った後の Li 濃度分布。

テンソル分解法と電子線ホログラフィーを融合した有機 EL 内部の電位分布計測

有機 EL (Electro-Luminescence) は、有機半導体を用いた自発光素子であり、スマートフォンなどにも広く応用展開されてきた。それにともない、高性能な次世代有機デバイスの基礎研究も活発になっている。有機 EL は、多様な有機分子を用いることにより、任意の発光波長を実現できるが、各有機分子の間には、高いエネルギー障壁があり、キャリアの駆動力となる膜内部の電位分布は、無機半導体と比べて複雑である。そのため、半導体シミュレーターによるバンド計算も簡易的に行われてはいるが、実際の開発現場では、デバイスの機能特性を正確に反映できるまでには至っていない。最近、我々は電子線ホログラフィーを用いて、2層型有機 EL 内部の電位分布を直接的かつ定量的に観察することに成功した[9]。しかしながら、有機材料は、電子線照射によってダメージを受けやすく、低ドーズ観察が必須であることがわかってきた。そこで、今回、低ドーズで撮影したホログラムにテンソル分解法を適用し、高いドーズで撮影した電位分布と同等の電位分布が得られることを実証したので報告する[10]。

図 2(a)は、有機 EL (2層: Alq₃/α-NPD) 断面試料のホログラムである。露光時間は 0.5 s で撮影しているため、非常にノージーであることがわかる。水平方向の強度プロファイルを図 2(a')に示す。干渉縞に多くのノイズが重なっていることがわかる。この画像を 350 枚連続撮影し、テンソル分解法を用いてノイズを除去した結果を図 2(b), (b')に示す。テンソル分解法は、スパースコーディングで必要となる教師画像は不要であり、多くの画像群から、特徴量を抽出する画像処理である。処理の結果、画像の S/N 比が大幅に改善していることがわかる。各ホログラム (図 2(a), (b)) から、位相シフト法のアルゴリズムを用いて位相再生した結果を、それぞれ図 2(a''), (b'')に示す。ノイズを除去する前の図 2(a'')では、Alq₃ と α-NPD の層でさえ区別することは困難であるが、ノイズを除去した後の図 2(b'')では、2層の界面がはっきりと観察でき、また、各層の電位傾斜も計測することができた。この位相像は、露光時間 30 s で撮影したホログラムの位相像と同等の精度であった。つまり、テンソル分解法を用いれば、1/60 の低ドーズでもこれまでと同等の位相計測が可能であることを意味する。

講演では、スパースコーディングとテンソル分解法の原理や、その応用と今後の展開についても紹介する。

謝辞 本研究の電池に関する研究は、パナソニック株式会社と名古屋大学との共同研究として実施された。有機 EL に関する研究は、岩手大学との共同研究として実施されたものである。また、本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金 (JP17H02792, JP20H02627) の支援により行われた。本研究の遂行に対して貴重な助言を頂いたパナソニック株式会社 井垣恵美子氏、藤井幹也博士、名古屋大学 齋藤晃教授、岩手大学 吉本則之教授、一般財団法人ファイナセラミックスセンター 平山司博士に感謝いたします。

参考文献

参考文献

- [1] K. Yamamoto et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49** (2010) 4414-4417. [2] A. Shimoyamada et al., *Microscopy*, **64** (2015) 401-408. [3] S. Anada et al., *J. Appl. Phys.*, **122** (2017) 225702. [4] Y. Nomura et al., *Nano Lett.*, **18** (2018) 5892-5898. [5] Y. Nomura et al., *Nat. Commun.*, **11** (2020) 2824. [6] Y. Iriyama et al., *Electrochem. Commun.*, **8** (2006) 1287-1291. [7] 野村優貴ら, *顕微鏡*, **56** (3) (2021) 116-123. [8] S. Anada et al., *Microscopy*, <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfad037>. [9] Y. Sasaki et al., *Appl. Phys. Express*, **14** (2021) 075007. [10] Y. Sasaki et al., *Microscopy*, <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfad019>.

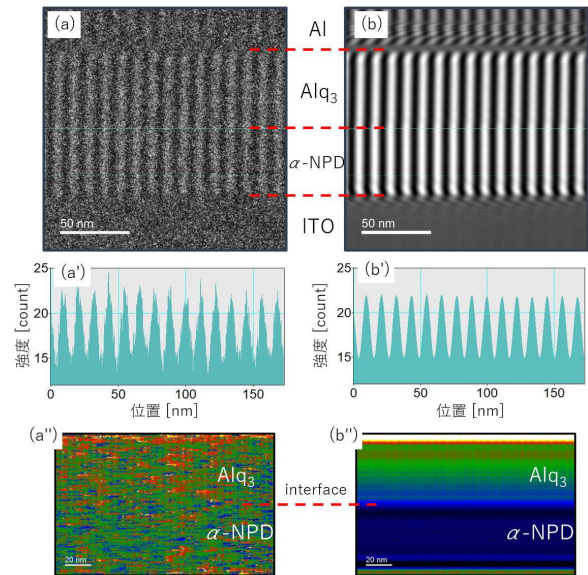


図 2 2層型有機 EL 内部の電位分布計測

(a) 露光時間 0.5 s で撮影したホログラム, (a') 水平方向の強度プロファイル, (a'') ホログラムから再生した位相像, (b) 露光時間 0.5 s で撮影した 350 枚のホログラムを用いてテンソル分解し、ノイズを除去した後のホログラム, (b') 水平方向の強度プロファイル, (b'') ノイズを除去したホログラムから再生した位相像。

S-6

医学・生物系セッション
マルチモーダルイメージングによる
生命科学研究の最前線

11月12日（日）9：00～10：50

第2会場

顕微科学から迫る細胞内分解最先端

和栗 聡
福島医大医

Cutting edge of intracellular degradation revealed by microscopy science

S. Waguri

Fukushima Med. Univ. School of Med.

自身のタンパク質を分解する現象はオートファジー（あるいは自食作用）とよばれ、ここ 10 年でその基本的なオルガネラレベルの形態変化、および駆動コアタンパク質である ATG (autophagy related) 遺伝子群の機能が分かってきた。しかし、今なお新たな発見や概念の提唱が続いているアクティブな分野である。本講演では、哺乳類細胞におけるオートファジー研究の最新成果について 3 つの話題を提供し、特に顕微鏡解析の応用ポイントとその具体的貢献内容について紹介する。

ミトコンドリアを選択的に分解するマイトファジーは、ミトコンドリア機能の維持に重要である。鉄欠乏により誘導されるマイトファジーでは、ミトコンドリアの一部をオートファジー隔離膜（以後隔離膜）がつかんで分離し分解するピースミールマイトファジーという様式がある (1)。しかし電顕レベルの証拠はなく、隔離膜の由来やその隔離過程の詳細は不明であった。培養細胞を鉄キレート剤であるデフェリプロンで処理すると、このタイプのマイトファジーが誘導されるが、その観察頻度は低い。そのため CLEM (correlative light-electron microscopy) により解析したところ、ミトコンドリアの一部が突出し、その部分に隔離膜が密着して存在していた。より広域を観察するために 3D-CLEM-FIB (Focused ion beam)-SEM を行ったところ、隔離膜の縁に小胞体のコンタクト部位が観察された。膜構造のコントラストを上げるためにアルデヒド-オスミウム混合固定液で固定し、電子線トモグラフィ法で解析したところ、隔離膜の縁と小胞体を繋ぐ細管および線状の構造が認められた。また、マイトファジー受容体の BNIP3/NIX の二重欠損細胞を観察したところ、ミトコンドリアへの接着性がない、あるいは弱い隔離膜が多数見られた。以上の結果は、このタイプのマイトファジーでは、小胞体-隔離膜コンタクト部位を介して脂質が隔離膜へ供給されること、および BNIP3/NIX がミトコンドリアに沿った隔離膜の伸張に必要であることを示唆する。

p62/SQSTM1（以後 p62）は、LC3 結合能、ユビキチン結合能、シグナル分子結合能などを有する多機能タンパク質であり、選択的オートファジー受容体としても知られている。演者らは最近、p62 がユビキチンと共に様々なストレスにより液-液相分離を起こして液滴を形成し、これが隔離膜形成および抗酸化ストレスシグナルのプラットフォームとして機能することを示した (2)。また、p62 液滴を精製してその成分を解析したところ、ヴォールト粒子という超分子複合体が含まれており、これが p62 の類似タンパク質である NBR1 を介して p62 液滴に集まり分解される。すなわち選択的オートファジーの基質であることを報告した (3)。さらに、ATG 上流因子である ULK1 キナーゼが p62 液滴に集まって p62 をリン酸化し、次いで KEAP1 を p62 液滴へ格納することで転写因子である NRF2 を活性化することを示した (4)。これら事実は、p62 液滴がオートファジーの基質分子やシグナル調節分子をリクルートすることで細胞の恒常性維持に働くことを示唆する。

リソソームが自身の膜陥入により周囲の細胞質を取り込み、分解する現象をマイクロオートファジーとよぶ。上記の隔離膜形成を伴うマクロオートファジーとは異なり、その分子機構や特異的基質は不明であった。一方、STING (Stimulator of Interferon genes) はウイルス感染などで細胞内に出現した DNA を認識し、I 型インターフェロン反応を起動する自然免疫制御分子である。STING は 4 回膜貫通タンパク質で通常は小胞体に局在する。細胞に STING アゴニストである DMXAA を投与すると、速やかにゴルジ体へ移動し、ここでシグナルを発する。その後の収束過程をエアリスキャン超解像顕微鏡で観察した結果、リサイクリングエンドソームを介して LAMP1 陽性リソソームへ直接取り込まれる現象を見出した。この時の様子（刺激後 3 時間）を CLEM で観察したところ、STING は約 100 nm 径の小胞に局在し、この小胞はクラスターを形成していた。また、LAMP1 陽性リソソーム内に別の膜に包まれた STING 小胞クラスターが存在していた。すなわち、マイクロオートファジーによって STING 小胞が取り込まれることが証明された。また、この現象には STING の K63 ユビキチン化、及び ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) タンパク質である TSG101 と VPS4 が必要であることが分かり、この分子の機能異常により STING 小胞がリソソ

S-6-1

ーム膜の外側に集積し、STING シグナルの活性化が維持された。以上より、マイクロオートファジーの基質としての STING、そしてその機構を担う ESCRT 分子群が同定された (5)。

- (1) Yamashita SI et al. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J Cell Biol* 215(5):649-665 (2016)
- (2) Kageyama S et al. p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response. *Nat Commun.* 12(1):16 (2021)
- (3) Ikeda R et al. Phosphorylation of phase-separated p62 bodies by ULK1 activates a redox-independent stress response. *EMBO J.* 42(14):e113349 (2023)
- (4) Kurusu R et al. Integrated proteomics identifies p62-dependent selective autophagy of the supramolecular vault complex. *Dev Cell.* 58(13):1189-1205 (2023)
- (5) Kuchitsu Y et al. STING signalling is terminated through ESCRT-dependent microautophagy of vesicles originating from recycling endosomes. *Nat Cell Biol.* 25(3):453-466 (2023)

脳脊髄液に接するニューロンの構造と回路網上野 将紀^A新潟大学脳研究所^A**Structures and circuitry of cerebrospinal-fluid contacting neurons**M. Ueno^A^A*Brain Res Inst, Niigata Univ.*

中枢神経系には、多様な種類のニューロンが存在し、各々が特異的な接続をもって神経回路網を形成し機能している。各ニューロン種が実際どのような様式をもってつながっているのか、接続の総体である「コネクトーム」を解明し、脳機能の仕組みを理解しようとする試みが世界的に進んでいる。私たちの研究室では、特定のニューロン種の標識、操作や顕微鏡による観察技術を駆使して、脳-脊髄間に内在する各ニューロン種の構造や接続の様式、機能を探る研究を進めている。本講演では、これらの手法を組み合わせ、最近新たに見出した神経回路の構造について紹介する。脳脊髄液接触ニューロン (Cerebrospinal fluid-contacting neurons ; CSF-cNs) は、脊髄の中心管に沿って存在し、樹状突起を脳脊髄液内に伸ばし接するユニークな神経細胞である。長らくその機能は不明であったが、ゼブラフィッシュやヤツメウナギを用いた最近の研究では、脳脊髄液の pH や構成成分を化学受容するとともに、脳脊髄液の流れや脊髄の動きを機械受容し、遊泳運動や姿勢を制御することが明らかになってきた。しかしわれわれ哺乳類において、CSF-cNs の持つ構造や機能は、ほとんど不明のままであった。私たちは近年、マウスの CSF-cNs を選択的に標識、操作する方法を見出し、この手法を用いることで、CSF-cNs の詳細な構造や接続様式、機能を明らかにしてきた。まず、マウスの脳室内へアデノ随伴ウイルス (AAV) を注入すると、CSF-cNs を特異的に標識できることを発見した。そこで、CSF-cNs を単一細胞レベルで蛍光標識し、脊髄を透明化してライトシートおよび共焦点顕微鏡を用いて 3 次元的に観察すると、軸索を腹側の白質へ伸ばした後、1800~5000 μm にも及ぶ距離を前方へと伸ばして再び中心管周囲へと戻り、別の CSF-cNs に接続する反回性の回路をつくっていることが明らかとなった。この CSF-cNs の構造を詳細に観察するため、CSF-cNs の細胞内小器官をペルオキシダーゼで特異的に標識して同定し、SBF-SEM により 3 次元的に電子顕微鏡観察を行った。その結果 CSF-cNs は、脳脊髄液に接する特徴的な突起構造や無髄線維で構成する軸索束、ロゼット様のシナプス構造、反回性のシナプス接続、を持つことがはじめて見出された。反回性の接続は、光遺伝学を用いた電気生理学的な解析でも確かめられた。また、CSF-cNs は特に、体幹の筋の運動に関わる複数の脊髄ニューロン種と GABA 作動性シナプスを介して接続していた。最後に CSF-cNs の活動を化学遺伝学的な手法で抑制すると、トレッドミルでの走行速度や歩調が減少し、歩行運動に異常が生じることを見出した。以上から、CSF-cNs は、中枢神経内において、脳脊髄液の情報を受け取り、運動を制御する脊髄回路へ出力する、新たなタイプの感覚ニューロンであることが示唆された。本研究では、特定のニューロン種の標識、操作、観察法を用いることで、運動や感覚機能をになう脊髄の新たな回路構造を明らかとした。この方法論や成果は、中枢神経系のもつ回路構造や動作原理のさらなる理解に貢献すると期待される。

In-resin CLEM によるオルガネライメージング

谷田 以誠
順天堂大院医

Organelle-imaging using in-resin CLEM

Isei Tanida

Juntendo Univ. Grad. School of Med.

要旨

超解像顕微鏡の分解能の向上とセミインレンズ型走査型顕微鏡による蛍光顕微鏡の視野に迫る広領域にわたる形態解析能の向上により、より広範囲で高い位置精度を持つ CLEM 技術開発が必要となっている。我々は生物材料の形態解析で汎用性が高く、且つ、形態保持性が高いエポキシ樹脂を用いて、同一の樹脂包埋超薄切片を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察することでより相関精度を高める手法（以後、In-resin CLEM）を開発・研究している。In-resin CLEM では同一超薄切片で観察するため、理論上は電子線と蛍光波長の差による違い以外は位置相関性が担保される。また蛍光シグナルの Z 軸分解能は超薄切片の厚み(50~100 nm)に依存するため、蛍光顕微鏡を用いた場合でも Z 軸分解能は最大で超薄切片の厚みに相当するのみであり、Z 軸分解能の向上が図られる。

しかしながら、多くの蛍光タンパク質・蛍光物質は電子顕微鏡観察用試料作成過程、特にオスミウム酸処理、で蛍光能を消失すること、また、生物試料に汎用されるエポキシ樹脂(Epon812 など) は自家蛍光を持つため、エポキシ樹脂を用いた In-resin CLEM のためには、これらの問題点を解決する必要があった。

そこで、オスミウム酸処理後も蛍光能を保持できる蛍光タンパク質のスクリーニングを行い、2つの緑色蛍光タンパク質および2つの赤色蛍光タンパク質を見出した。また、エポキシ樹脂の自家蛍光については、超薄切片で培養細胞を蛍光顕微鏡観察すると細胞が存在する領域は比較的自家蛍光が少なく、特に赤色～近赤外では観察が容易であることに気がついた。オルガネラ局在シグナルを持つ蛍光タンパク質を発現させた培養細胞を用いて、少なくとも小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、核などで In-resin CLEM が可能であった(図1)¹⁻²。

この蛍光タンパク質を用いた In-resin CLEM では、超薄切片による蛍光顕微鏡観察において、蛍光安定性が低く、蛍光強度も蛍光タンパク質に依存するため蛍光シグナルの高感度化がはかれないという点が問題であった。これらの問題を解決すべく、ビオチンリガーゼの一つ、miniTurbo を用いた近接依存性標識法を In-resin CLEM に適用した。miniTurbo は近接するタンパク質および自分自身をビオチン存在下で、約15分程度でビオチン修飾するタンパク質で、その修飾半径は約10nmである(図2)³。そのため、蛍光シグナルの分解能も比較的良いことが期待できる。ビオチン標識されたタンパク質は、蛍光標識されたストレプトアビジンで検出できる。この手法を用いることにより、蛍光強度、および、蛍光安定性が大幅に向上した。そこでミトコンドリア局在シグナルを持つ miniTurbo を培養細胞に発現させ、蛍光顕微鏡観察を行うと非常に分解能が高い蛍光画像が取得でき、電子顕微鏡による超

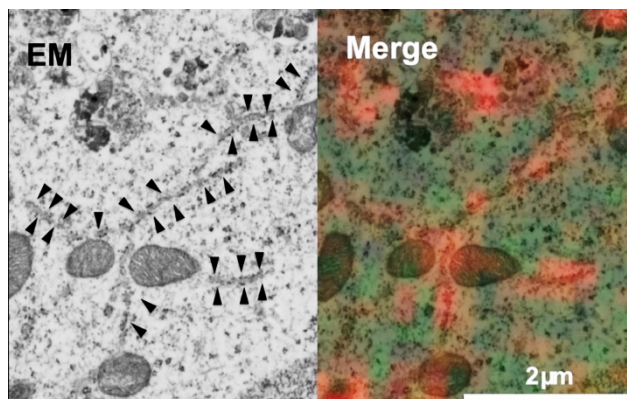


図1 赤色蛍光タンパク質を用いた小胞体の In-resin CLEM (文献2より改変)

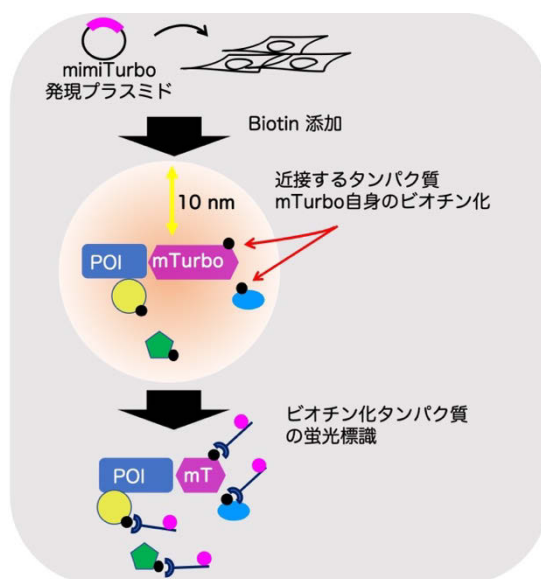


図2 miniTurbo を用いた近接依存性標識法

S-6-3

微形態観察も容易であった (図3)³。

上記の In-resin CLEM に用いた手法では、必ず分子生物学的手法をもちいてリコンビナントタンパク質を発現させる必要があった。また抗原抗体反応を In-resin CLEM に適用できれば、解析技術の普及・汎用性が大きく広がるはずである。一般的に、抗原抗体反応を用いて蛍光顕微鏡解析を行う場合には、パラホルムアルデヒド固定を行うが、パラホルムアルデヒドのみでは生体膜の超微形態保持性を担保できない。そ

のためにパラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒド混液を用いて固定を行うことが多い。しかしながら、多くの抗体においてグルタルアルデヒド処理は生物材料中の抗原性を大きく低下させる。そこで、グルタルアルデヒド存在下での固定条件、オスミウム酸処理およびエタノールによる脱水に耐性の蛍光色素スクリーニング、抗体のスクリーニングを行った。その結果、生体膜の超微形態を保持しながら、赤色の蛍光色素を用いた間接蛍光抗体法による染色ができる条件を見出した。これにより抗ミトコンドリア TOM20 抗体を用いたミトコンドリア、および、ゴルジ装置を染色する抗 GM130 抗体を用いたゴルジ体の In-resin CLEM を行った (図4)⁴。

この手法はアフィニティ標識法にも応用できるため、post Golgi を染色すると言われている小麦胚芽凝集素 (WGA: Wheat germ agglutinin) について、直径約 200nm 前後の WGA 陽性シグナルのなかには、Multi Vesicular Body-like エンドソーム様の構造体であることを明らかにし、同時に内在性物質を標的として 2 色の In-resin CLEM を行った。この Immuno In-resin CLEM は従来の徳安法などの免疫電子顕微鏡法に比べて、膜の形態保持性が優れており、多色化も可能である。

最後に、神経変性疾患様表現型を示す神経セロイドリポフスチン症マウスモデル脳を用いて、抗 Iba1 抗体や抗 GFAP 抗体などを用いた Immuno-in-resin CLEM によるミクログリア・アストロサイトの超微形態異常⁵ について発表し、これからの展望を議論する。

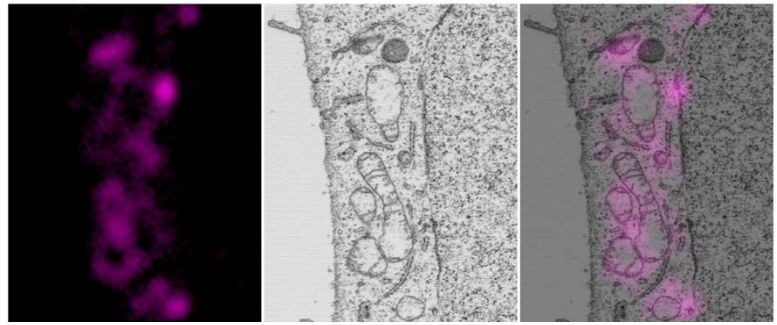


図3 ミトコンドリア局在 miniTurbo を用いた In-resin CLEM

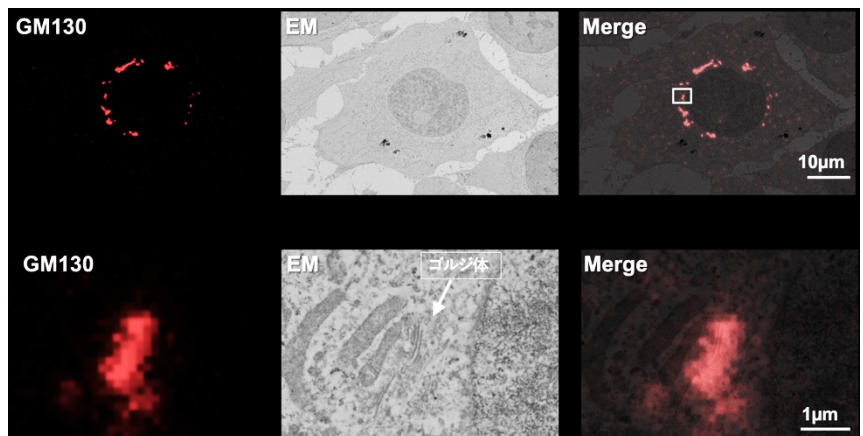


図4 抗 GM130 抗体を用いたゴルジ体の In-resin CLEM
(文献4より改変)

参考文献

1. Tanida *et al*, Two-color in-resin CLEM of Epon-embedded cells using osmium resistant green and red fluorescent proteins, *Scientific Reports*, 10 (2020) 21871.
2. Tanida *et al*, Osmium-Resistant Fluorescent Proteins and In-Resin Correlative Light-Electron Microscopy of Epon-Embedded Mammalian Cultured Cells. *Methods Mol Biol.* 2564(2023):287-297.
3. Sanada *et al*, In-resin CLEM of Epon-embedded cells using proximity labeling, *Scientific Reports*, 12 (2022) 11130.
4. Tanida *et al*, Application of immuno- and affinity labeling with fluorescent dyes to in-resin CLEM of Epon-embedded cells. *Heliyon*, 9(2023):e17394.
5. Mitsui *et al*, TUNEL-positive structures in activated microglia and SQSTM1/p62-positive structures in activated astrocytes in the neurodegenerative brain of a CLN10 mouse model, *Glia*, in press (2023) doi: 10.1002/glia.24449.

ポスター発表

討論

11月12日（日）11：00～12：00

ポスター会場

UV 硬化型インクにおけるワックス結晶成長のその場観察

宮内 真帆, 木内 宏佳, 成毛 章容
コニカミノルタ株式会社

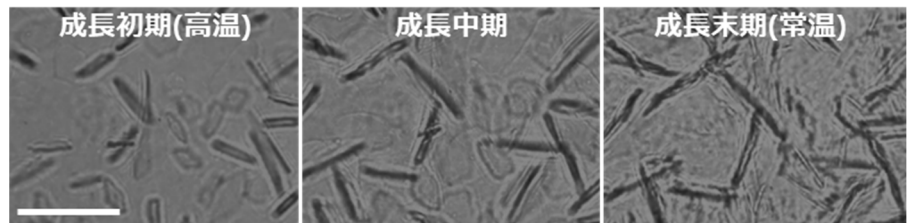
In-situ observation of nucleation and growth of Wax crystals in UV-curable ink

M. Miyauchi, H. Kiuchi, and A. Naruke
KONICA MINOLTA, INC.

UV 硬化型インクは UV 光（紫外線）の照射により、瞬時に硬化・定着するインクである。非浸透性の素材に着色でき、耐溶剤性・耐摩耗性が高いことから、大判の屋外・屋内ポスターやラベル、パッケージなどの印刷に多く用いられている。

オンデマンドを始めとする産業用途に求められる高解像度の画像をインクジェットで高速で印刷するには、インクがメディアに着弾した際に瞬時に増粘することが重要であり、インクにワックスを添加することで機能の付与が可能である。ワックスはインク中に相溶した状態から温度変化により板状結晶に成長し、カードハウスと呼ばれる構造を形成することで、インク全体を増粘させる役割をもつ。

本研究ではインク中におけるワックス結晶の成長を、光学顕微鏡を用いその場観察した。発表においては複数の材料に対して行った観察結果を示すと共に、インク粘度に対する結晶形態及びカードハウス構造の寄与について考察する。



UV 硬化型インク中ワックス結晶の光学顕微鏡像
(同一視野、スケールバー：50 μ m)

$\text{Li}_{1-x}\text{Na}_x\text{NbO}_3\text{:Pr}^{3+}$ の微細構造の TEM 観察
 高崎 光, 塚崎 裕文, 中島 宏, 森 茂生
 大阪公立大学

TEM observation of microstructures of $\text{Li}_{1-x}\text{Na}_x\text{NbO}_3\text{:Pr}^{3+}$
 H. Takasaki, H. Tsukasaki, H. Nakajima and S. Mori
 Osaka Metropolitan Univ.

$\text{Li}_{1-x}\text{Na}_x\text{NbO}_3\text{:Pr}^{3+}$ はマルチピエゾ物質の 1 つで、圧電性と応力発光を併せ持つ特徴がある。特に、応力発光については弾性変形による繰り返し発光を示すことから、多機能変換材料として注目されている[1]。最近、 $\text{LiNbO}_3\text{:Pr}^{3+}$ の Li イオンの一部を置換した $\text{Li}_{1-x}\text{Na}_x\text{NbO}_3\text{:Pr}^{3+}$ において、Na 置換量 (x) の増加に伴い逐次構造相転移を示し、 $x=0.89$ に存在する Na- $R3c$ 構造 (NaNbO₃ 型の菱面体構造) と $P2_1ma$ 構造 (NaNbO₃ 型の直方晶構造) との相境界においてマルチピエゾ特性の向上が見いだされた[2]。本研究では、マルチピエゾ特性に関わる微細構造について明らかにするために、 $x=0.89$ 試料の微細構造とその温度依存性について調べた。

固相反応法により作製した $\text{Li}_{1-x}\text{Na}_x\text{NbO}_3\text{:Pr}^{3+}$ ($x=0.89$) の高温 x 線回折実験の測定結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 から、200°C 付近、500°C 付近で構造の変化が見られた。そこで、 $x=0.89$ の微細構造変化を調べるため TEM 観察を行った。Fig. 2 に $x=0.89$ の室温における TEM 観察結果を示す。約 230 nm のバンド構造内に 10 nm ほどの縞状のコントラストを有するヘリングボーン型分域構造が観察された。フリーデル則の破れを用いた解析から、この分域構造は直方晶と単斜晶の 2 相モデルで特徴付けられることが分かった[3]。本発表では、TEM 内加熱その場観察、高温 x 線回折実験より、 $x=0.89$ 近傍の結晶構造及びドメイン構造について議論する。

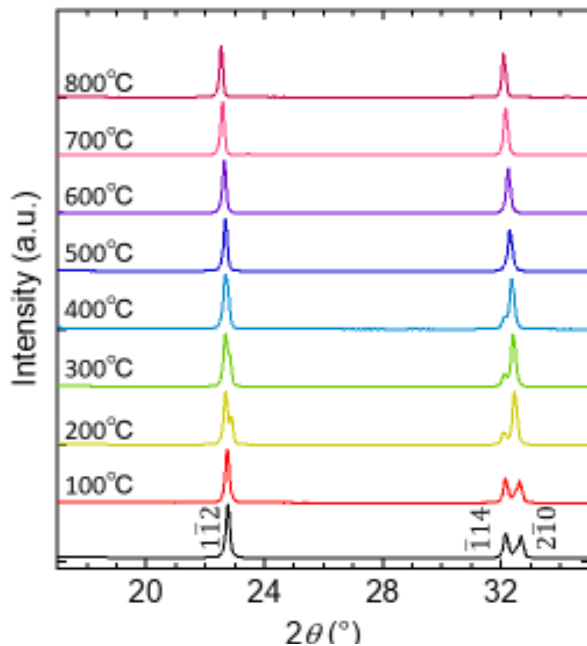


Fig. 1, $x=0.89$ 試料の粉末 x 線回折プロファイルの温度変化

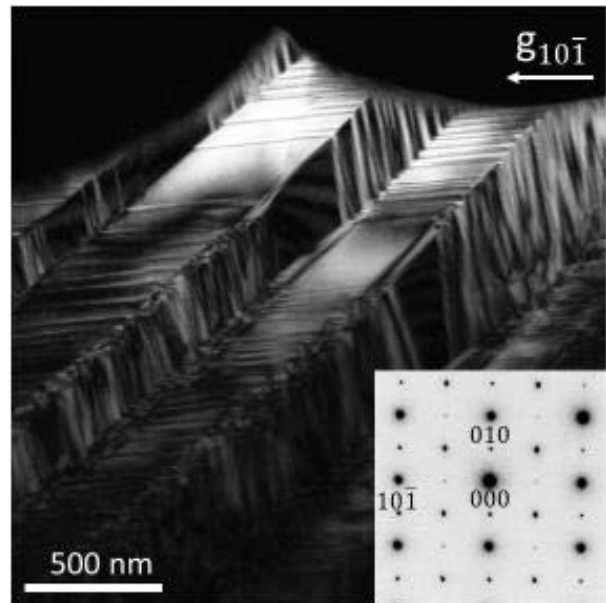


Fig. 2, $x=0.89$ 試料の室温での電子回折パターンと微細構造

参考文献

- [1] D. Tu, C. N. Xu, A. Yoshida, *et al*, *Adv. Mater.* Vol.29, Issue 22(2017), 1606914.
- [2] H.Hara, C.N. Xu, R. Wang, *et al*, *JCS-Japan*, Vol.128. No.8(2020), 518-522.
- [3] 高崎ら, 日本セラミックス協会第35回秋季シンポジウム講演概要集, 1PK07 (2022).

兵庫県立大学と兵庫県立工業技術センターにおける Network tele-microscopy

永瀬文嗣^A, 山口大智^A, 山本航^A, 山下満^B, 西竜治^C, 市川聡^D
兵庫県立大学^A, 兵庫県立工業技術センター^B, 福井工業大学^C, 大阪大学^D

Network tele-microscopy at University of Hyogo and Hyogo Prefecture Institute of Technology

T. Nagase^A, D. Yamaguchi^A, K. Yamamoto^A, M. Yamashita^B, R. Nishi^C and S. Ichikawa^D
^AUniv. hyogo, ^BHyogo Pref. Inst. of Technol., ^CFukui Univ. of Technol., ^DOsaka Univ.

Network tele-microscopy は、高額な設置費と維持管理費が必要となる先端電子顕微鏡を自らが保有することなく、オンライン会議ソフトやテレビ会議システムなどのオンライン接続技術を活用することによって、遠隔地でも先端電子顕微鏡の電子顕微鏡像をリアルタイムで観察することができる手法と考えることが出来る。

兵庫県は、北は日本海・南は瀬戸内海と2つの海に面し南北168.50 kmと南北に長い県域を有しており、近畿地方の府県で最大の面積を持つ。瀬戸内側は、阪神工業地帯や播磨臨海工業地帯といった日本有数の工業集積地を抱える一方で、但馬地域・丹波地域・淡路地域などのそれぞれ特徴のある地域を抱えている。兵庫県立大学および兵庫県立工業技術センターに設置された電子顕微鏡のNetwork tele-microscopy 観察が可能となれば、広い県域をカバーする電子顕微鏡利用環境の整備が可能となる。

本研究では、兵庫県立工業技術センター(神戸市)に設置された透過電子顕微鏡(JEOL JEM-2010)の電子顕微鏡画像を、兵庫県立大学・姫路工学キャンパス(姫路市)にてNetwork tele-microscopyにより遠隔観察した結果を報告する。兵庫県立工業技術センターと兵庫県立大学をつなぐNetwork tele-microscopyは、大阪大学超高压電子顕微鏡センターを中心に開発が進むCisco Webex meeting・Web会議システムを利用したNetwork tele-microscopy[1-3]をベースに構築した。図1に、兵庫県立工業技術センター側においてJEM-2010の電子顕微鏡像をWeb接続するための持ち運び可能なLaptop PCとその周辺接続装置の写真、図2に兵庫県立大学・姫路工学キャンパス側での遠隔観察の一例を示す。Network tele-microscopyにより、Pt/SiO_x試料における電子照射-電子励起誘起相転移現象の観察が可能であった。

REFERENCES

- [1] 永瀬文嗣, 西竜治, 市川聡, *材料*, 72, 226-227 (2023)., "Network tele-microscopyによる金属ガラスの微細組織観察", <https://doi.org/10.2472/jsms.72.226>
- [2] K. Sato, T. Nagase, T. Maruyama, S. Ichikawa, R. Nishi, *Reports of JFS meeting*, 181, 56 (2023)., "Ultra-High Voltage Electron Microscope - Network tele-microscopy observation on Spheroidal Graphite Cast Iron", https://doi.org/10.11279/jfeskouen.181_56
- [3] T. Nagase, S. Ichikawa, R. Nishi, *Reports of JFS meeting*, 181, 56 (2023)., "Network tele-microscopy observation on casting alloys using the ultra-high voltage electron microscope", https://doi.org/10.11279/jfeskouen.181_57



Figure 1 Outer appearance of the laptop PC and connection devices for Network tele-microscopy

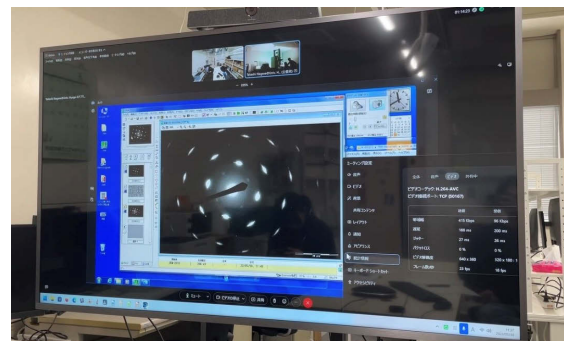


Figure 2 Typical example of remote observation at University of Hyogo, Himeji Campus.

透過菊池線回折法を用いた $\text{GdBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ 層の歪み解析

中村 泰輔, 横江 大作, 加藤 文晴

一般財団法人ファインセラミックスセンター ナノ構造研究所

Strain analysis of $\text{GdBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ layer by transmission Kikuchi diffraction

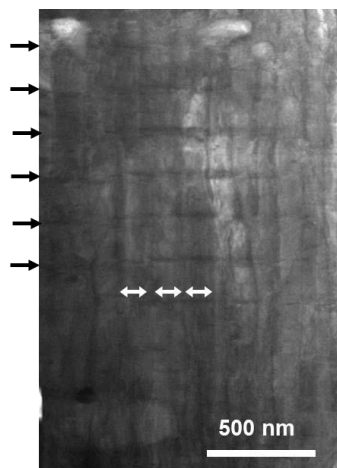
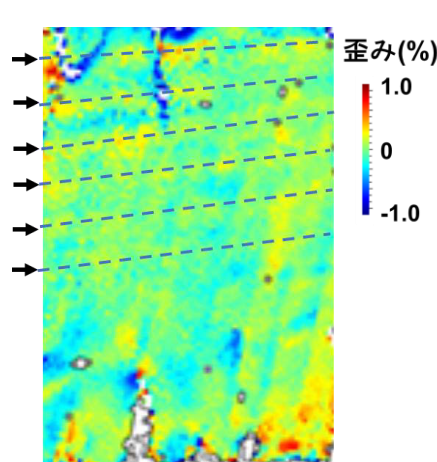
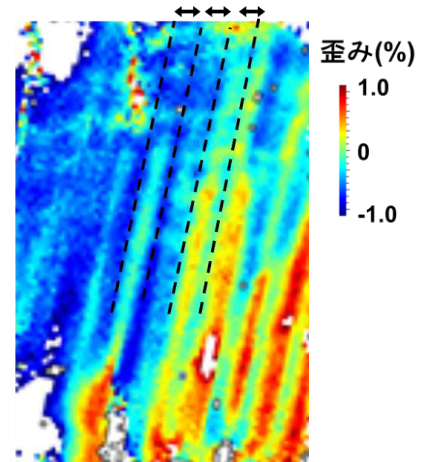
T. Nakamura, D. Yokoe and T. Kato

Nanostructures Research Laboratory, Japan Fine Ceramics Center.

透過菊池線回折法 (TKD 法) は SEM を用いて結晶方位等を評価する手法であるが、従来の反射 EBSD 法と異なり、試料を透過した電子線による菊池パターン (TKD パターン) を取得する手法である。また TKD 法は、薄膜試料を評価するためバルク試料を評価する通常の反射 EBSD 法と比べて試料内での電子線の広がりを抑えることができ、反射 EBSD 法より高い空間分解能で結晶方位解析ができる手法である。一方、菊池パターンの解析方法において、従来の反射 EBSD 法で用いられる Hough 変換に対し、相互相関関数を用いる Wilkinson 法[1]が開発されており、微小歪み解析に活用されている。本研究ではこれらの TKD 法と Wilkinson 法を組み合わせ[2]、酸化物高温超電導体の $\text{GdBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_y$ (GdBCO) 層の歪み解析を行い、TEM で観察される GdBCO 層中の格子欠陥との対応を評価した。

金属テープ基板上に成膜された GdBCO について FIB-SEM 複合装置(日立ハイテック製 NB5000)を用いて TEM 用薄膜試料を作製し、GATAN 製 PIPS II を用いて加速電圧 0.1 kV の Ar イオンビームで薄膜試料両面に形成された FIB ダメージ層を除去して測定用の試料を作製した。TSL 製 Digiview V 検出器を付設した日本電子製 JSM-7800F PRIME を用い、加速電圧 30 kV の電子線を照射して TKD パターンを取得した。取得した TKD パターンに対して Wilkinson 法による歪み解析を行った。

Fig.1 に GdBCO 層の TEM 像を示す。黒色の矢印で示す面欠陥と白色の矢印で示す双晶面が観察されており、EDS 分析からこの面欠陥は Gd-rich な面欠陥であることが確認できた。Fig.2 に Wilkinson 法による解析で得られた GdBCO 層の[001]方向に対応する歪みマップを示す。破線で示すように GdBCO 層の c 面に対して平行に、ほぼ等間隔の歪み領域が確認でき、Fig.1 の面欠陥の間隔と対応している。また、Fig. 3 に GdBCO 層の(110)面に対応する歪みマップを示す。周期的な歪み領域が確認でき、Fig.1 の双晶面の間隔と対応していることが分かった。

Fig. 1 GdBCO 層の TEM 像Fig. 2 GdBCO 層の[001]方向
に対応する歪みマップ
(赤：引張、青：圧縮)Fig. 2 GdBCO 層の(110)面
に対応する歪みマップ
(赤：引張、青：圧縮)

謝辞：本研究は、JST 未来社会創造事業 (JPMJMI17A2) による支援のもとで実施されました。

[1] A.J. Wilkinson et al., *Materials Science and Technology*, **22**, 1271-1278(2006)

[2] H. Yu et al., *Scripta Materialia*, **164**, 36-41 (2019)

収束電子回折法によるマルテンサイト変態の局所構造解析
 佐藤 誉頼^{A,B}、森川 大輔^B、木村 雄太^C、梅津 理恵^C、津田 健治^B
 東北大工^A、東北大多元研^B、東北大金研^C

Local Structure Analysis of Martensitic Transformation using Convergent-beam
 Electron Diffraction

T. Sato^{A,B}, D. Morikawa^B, Y. Kimura^C, R. Umetsu^C, K. Tsuda^B
^AGrad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ^BIMRAM, Tohoku Univ., ^CIMR, Tohoku Univ.

形状記憶合金材料等に用いられる Ti-Ni 系合金では、温度変化によりマルテンサイト変態を起こす。その際、マルテンサイト変態の前駆現象として局所的なナノドメインが発生することが知られているが [1-3]、このナノドメインはナノメートルスケールの複雑な空間分布を示し、その構造についてまだ不明な点が多く残されている。本研究では、マルテンサイト変態前後の局所構造変化を明らかにするため、Ti₅₀Ni₄₇Fe₃ 合金試料に収束電子回折 (Convergent-beam electron diffraction : CBED) 法 [4] を適用した。CBED 法では、ナノサイズに収束した電子プローブを試料に照射するため、試料のナノ局所領域を選択して電子回折図形が得られる利点がある。

CBED 実験には、エネルギーフィルター透過型電子顕微鏡 JEM-2010FEF を加速電圧 100kV で用いた。Ti₅₀Ni₄₇Fe₃ 合金試料に対して、Peltier 冷却低温試料ホルダーを用いて温度コントロールを行い、立方晶の B2 相 (空間群 $Pm\bar{3}m$) から三方晶の R 相 (空間群 $P\bar{3}$) へのマルテンサイト変態の前後の温度で CBED 図形を取得した。また比較のため多重散乱理論による CBED 図形のシミュレーション [5] を行った。

図 1 にシミュレーションによって得られた CBED 図形を示す。図 1 (a) は、マルテンサイト変態前の立方晶 B2 相、図 1 (b) は、前駆現象に対応する横波変位構造モデル [2]、図 1 (c) は、マルテンサイト変態後の三方晶 R 相の構造モデル [6] によるシミュレーションである。図 1 (b) および 1 (c) で矢印で示した超格子反射を見ると、図 1 (b) の横波変位モデルでは動力学的消滅による暗線が観察されるのに対して、図 1 (c) の R 相モデルではこの暗線が消失しており、横波変位構造モデルと R 相構造とが判別可能であることがわかる。前駆現象のナノドメインの空間分布など、より詳細な実験結果について当日述べる。

References:

- [1] Y. Murakami and D. Shindo, Materials Transactions, JIM 40, 1092 (1999).
- [2] D. Shindo, Y. Murakami, and T. Ohba, MRS Bulletin 27, 121 (2002).
- [3] Y. Kimura et al., Materials Transactions 64, 1591 (2023).
- [4] M. Tanaka and K. Tsuda, Microsc. 60, S245 (2011).
- [5] K. Tsuda and M. Tanaka, Acta Cryst. A 55, 939 (1999).
- [6] D. Schryvers and P. Potapov, Mater. Trans. 43, 774 (2002).

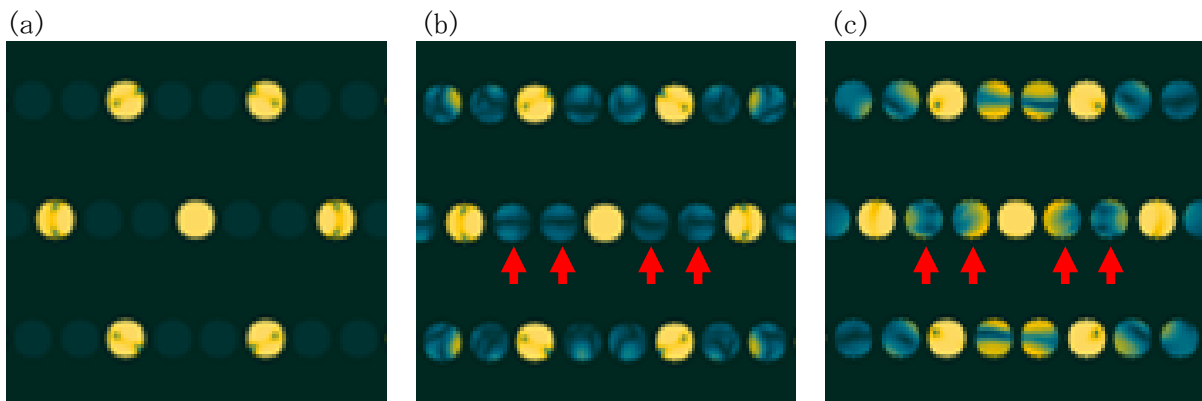


図 1 : Ti₅₀Ni₄₇Fe₃ の CBED 図形シミュレーション (a) B2 相 (b) 横波変位モデル (c) R 相

SrCrO_{3-δ} の電子線照射による酸素欠損の導入

小井沼 巖^A, 小林 俊介^A, 小菅 大輝^B, 山本 隆文^B, 桑原 彰秀^A
 ファインセラミックスセンター^A, 東京工業大学^B

Introduction of oxygen defects in SrCrO_{3-δ} by electron beam irradiation

G. Koinuma^A, S. Kobayashi^A, T. Kosuge^B, T. Yamamoto^B, A. Kuwabara^A

^AJapan Fine Ceramics Center, ^BTokyo Institute of Technology

結晶構造の基本フレームワークを維持したまま、構成イオンの交換・脱離反応や外部からのイオン挿入を行うトポケミカル反応は、固相焼結のような従来法では合成できない酸化状態や配位状態を有する結晶構造を探索することができる。Arévalo-López らは、準安定ペロブスカイト型酸化物 SrCrO₃ に対して、分解反応が起こりにくい温度領域で水素ガスまたは CaH₂ を還元剤としてトポケミカルに還元処理を行った[1]。この還元処理により SrCrO₃ を母構造とする酸素欠損型ペロブスカイト SrCrO_{3-δ} として、SrCrO_{2.8} (δ=0.2) および SrCrO_{2.75} (δ=0.25) の合成が報告されている。

一方、電子線照射は、ペロブスカイト酸化物へ酸素欠損を導入する手法として良く知られている。電子線の照射源として電子顕微鏡を利用すれば酸素欠損の導入と観察が同時に行えるため、酸化物への酸素欠損導入反応の観察に適した手法と言える。本研究では、SrCrO₃ に対して走査透過型電子顕微鏡 (STEM) 内で電子線照射を行い、試料内へ酸素欠損を導入すると共に観察を実施した。

高压法で作製した SrCrO₃ 粉末を乳鉢で粉碎後、カーボン支持膜付き Cu グリッドに分散したものを観察試料として電子線照射および原子構造観察を行った。観察には球面収差補正装置付き STEM (JEM-2100F) を、加速電圧 200kV で使用した。

Fig.1(a), (b)にそれぞれ SrCrO₃、SrCrO_{2.8} の結晶構造モデル、Fig.1(c), (d)にそれぞれ電子線照射前後の SrCrO₃ の環状暗視野 (STEM-ADF) 像を示す。電子線照射により SrCrO₃ の結晶構造が変化することを確認した。電子線照射後の Fig.1(d)を既報にて報告された SrCrO_{2.8} の [110] 入射のシミュレーション像と比較すると良い一致を示した。これらの結果から、電子線照射により SrCrO₃ へ酸素欠損が導入され、SrCrO_{2.8} へ結晶構造が変化したことが確認された。

SrCrO_{2.8} へさらに電子線照射を続けるとさらに結晶構造の変化を観察した。得られた STEM-ADF 像を、既報の SrCrO_{2.75} の結晶構造から作製したシミュレーション像と比較すると一致せず、未知の結晶構造に変化したと考えられた。

以上より、還元剤存在下での処理と同様に、電子線照射により準安定ペロブスカイト酸化物 SrCrO₃ の基本構造を維持したまま酸素欠損を導入できること、また SrCrO_{3-δ} が多様な酸素欠損配列を有することが示された。

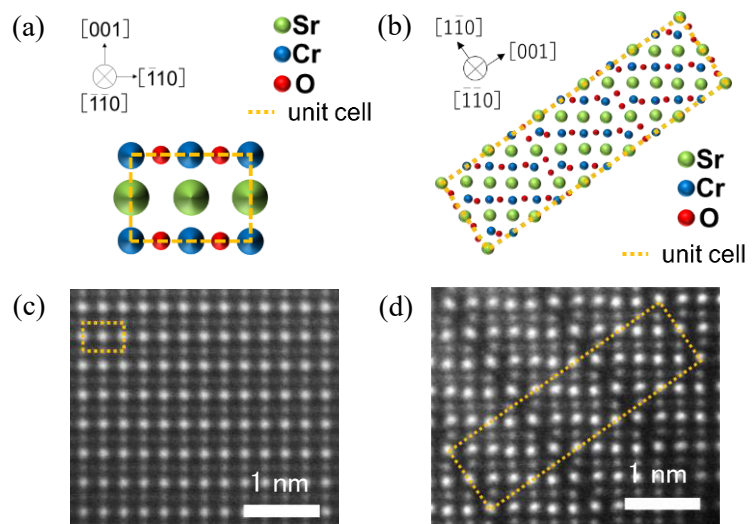


Fig. 1 (a) Model of SrCrO₃. (b) Model of SrCrO_{2.8}. (c) STEM-ADF image of SrCrO₃ before electron beam irradiation. (d) STEM-ADF image of SrCrO₃ after electron beam irradiation.

参考文献

[1] A. M. Arévalo-López et al., Angew. Chem. Int. Ed. 51, 10791-10794 (2012).

謝辞

本研究は JSPS 科研費 21K18196、22H04914 また一部の文部科学省データ創出・活用型マテリアル研究開発プロジェクト事業 JPMXP1122683430 の助成を受けて行われたものである。

電圧印加その場 DPC STEM による pn 接合内蔵電場応答の観察

小島 嘉文^A, 遠山 慧子^A, 関 岳人^{A,B}, 幾原 雄一^{A,C}, 柴田 直哉^{A,C}
 東京大工^A, JST さきがけ^B, ファインセラミックスセンターナノ構造研究所^C

Observation of built-in electric field in a p-n junction by *in situ* biasing DPC STEM

Y. Kojima^A, S. Toyama^A, T. Seki^{A,B}, Y. Ikuhara^{A,C}, and N. Shibata^{A,C}

^ASchool of Eng. Univ. of Tokyo, ^BJST PRESTO, ^CJapan Fine Ceramics Center

近年発展が著しい電子デバイスでは、外部電圧に応答した局所的な電場やキャリアの挙動の理解が、精密な特性制御において極めて重要である。つまり、デバイス中の局所電場を外部電圧印加下で直接解析する手法の確立が求められている。微分位相コントラスト (DPC) は、走査透過電子顕微鏡法 (STEM) の明視野領域に分割型検出器を配置することで、試料内の局所電場を高空間分解能で可視化・定量化できる手法である[1,2]。さらに近年、微小電気機械システム (MEMS) を用いた電圧印加その場 TEM 観察が発展している[3]。これらを組み合わせることで、試料内部電場の外部電圧応答を高分解能観察することが可能となり、電子デバイスの開発・理解のための強力な解析手法となることが期待される。本研究では MEMS を用いた電圧印加その場 DPC STEM による局所電場解析手法の開発を目的とする。半導体 pn 接合をモデル試料として、電圧印加可能な TEM 試料作製方法の最適化を行い、電圧印加その場 DPC 定量観察を行った。外部印加電圧に対する応答を解析し、シミュレーションとの比較を行った。

非対称なドーパント濃度を持つ GaAs 半導体 pn 接合 ($p: 10^{18} \text{ cm}^{-3} \text{ C}$, $n: 10^{19} \text{ cm}^{-3} \text{ Si}$) をモデル試料とした。集束イオンビーム装置 (Thermo Fisher Scientific 社製 Helios 5 UX) を用いて試料片を MEMS チップ上の電圧印加回路に固定し、厚さ 400 nm に薄片化した。16 分割検出器を備えた STEM (日本電子製 JEM-2100F) および外部電圧印加の可能な試料ホルダ (DENSsolutions 社製 Lightning DHB30) を用いて、外部電圧を変化させながら内蔵電場の DPC STEM 観察を行った (図 1)。この結果、順方向・逆方向バイアスの印加により平衡状態と異なる大きさの pn 接合内蔵電場ピークが観察された。また、ドーパント濃度の非対称性に起因する内蔵電場ピークの非対称性も捉えられた。さらにソフトウェア NEXT NANO++ [4]により本実験を再現したポアソンシミュレーションを行い、実験とシミュレーションの電場プロファイルと比較した。本手法及び結果の詳細については発表にて議論する。

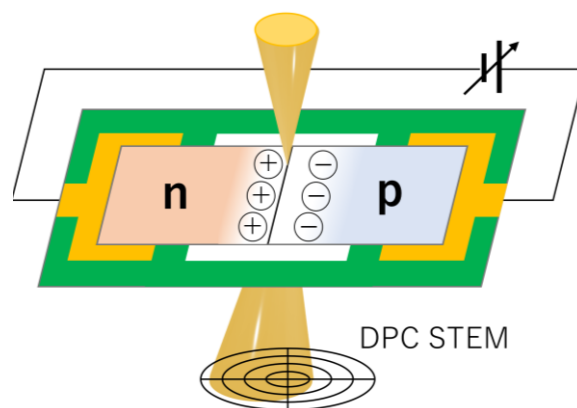


図 1 p-n 接合の電圧印加その場 DPC STEM 観察の概略図。

- [1] Shibata, N. et al., *Acc. Chem. Res.* 50 1502-1512 (2017).
 [2] Toyama, S. et al., *Nat. Nanotechnol.* 18 521-528 (2023).
 [3] Huang, Q. et al., *Nat. Commun.* 12 2095 (2021).
 [4] Birner, S. et al., *IEEE Trans. Electron Devices* 54 2137-2142 (2006).

(謝辞) 本研究に用いた試料は、古河電気工業株式会社 佐々木宏和博士にご提供いただきました。御礼申し上げます。

B₄C から超音波合成されたカーボンナノオニオンの電子顕微鏡分析ヨウ ロンウェン^A, 内田 正哉^B埼玉大^A, 埼玉大先端研^B**Electron Microscopy Observation of Sonication Synthesized Carbon Nano-Onions from B₄C**J. Yeh^A and M. Uchida^B^A *Grad. Sch. of Eng. Saitama Inst. of Technol.*, ^B *Adv. Sci. Res. Lab. Saitama Inst. of Technol.*

【背景と目的】 カーボンナノオニオン (CNOs) は、玉ねぎのような多層フラレン構造を持つ。高い電気伝導性、比表面積などの優れた特性をもち、バイオセンサーなどへの応用が期待されている。最近、種々の有機物から CNOs の合成が比較的容易にできることが分かってきた [1]。本研究では、超音波処理により、水中で無機炭化物 B₄C から CNOs の合成を行い、合成した試料を TEM、SEM-EDX および STEM-EELS で評価した。

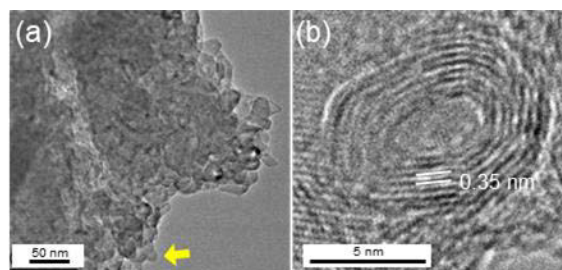


図 1 (a) 合成試料の TEM 像、(b) 拡大像

【結果】 図 1 (a)、1 (b) に TEM 像を示す。直径 20-30 nm、層間距離約 0.35 nm の CNOs が観察された。SEM-EDX による組成分析を行い、炭素以外に酸素も検出された。また、STEM-EELS マッピングによって、酸素が CNOs 表面に分布していることが観察された。当日は顕微ラマン分光と FTIR の結果も含めて報告する。STEM-EELS の測定は ARIM (東大) の支援を受けて実施された。

[1] Z. Yang et al., ACS Chem. Rev., **123**, 11047-11136 (2023)

収束電子回折法による pn 接合界面の微細構造解析
 齋藤 桃子^{A,B}, 森川 大輔^B, 佐々木 宏和^C, 津田 健治^B
 東北大工^A, 東北大多元研^B, 古河電工(株)^C

Structure analysis of pn junction using convergent-beam electron diffraction

M. Saito^{A,B}, D. Morikawa^B, H. Sasaki^C and K. Tsuda^B

^AGrad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ^BIMRAM, Tohoku Univ., ^CFurukawa Electric Co., Ltd.

われわれは収束電子回折(CBED)法を用いた局所領域の結晶構造および静電ポテンシャル分布解析手法の開発とその応用を行っている。特に界面における微細構造解析への応用を進めており、これまでに双晶界面[1]や強誘電体ドメイン壁[2]の結果を報告している。今回、産業応用上重要な pn 接合界面への応用を試みた。これまでに電子線ホログラフィー法[3]や DPC 法[4]による観察例がある、GaAs の pn 接合をテスト試料として用いた。

CBED 法では、各回折ディスクの強度分布を、多重散乱を考慮したシミュレーション強度と定量的に比較することで、原子位置や結晶構造因子を精密化でき、現在界面を含む超構造の解析を可能とすべく改良を進めている。今回、pn 接合によるポテンシャルジャンプを含んだ超構造を作成し、CBED 図形に現れる変化について調べた。図に GaAs[110]入射において、約 3 V のポテンシャルジャンプを仮定した場合のシミュレーション結果とその差分強度を示す。透過ディスクで大きな強度変化が見られており、これを用いて pn 接合を可視化したものが DPC 法による観察に対応する。一方、他の回折ディスクにおいても小さいながら強度変化が見られており、これを実験的に検出できれば、超構造の解析が実現できると期待される。実験においては、欠陥や歪みによると思われる強度変化が検出されており、ポテンシャルジャンプに加えて原子位置の変化や欠陥についての解析の可能性も挙げられる。当日は詳細について報告する。

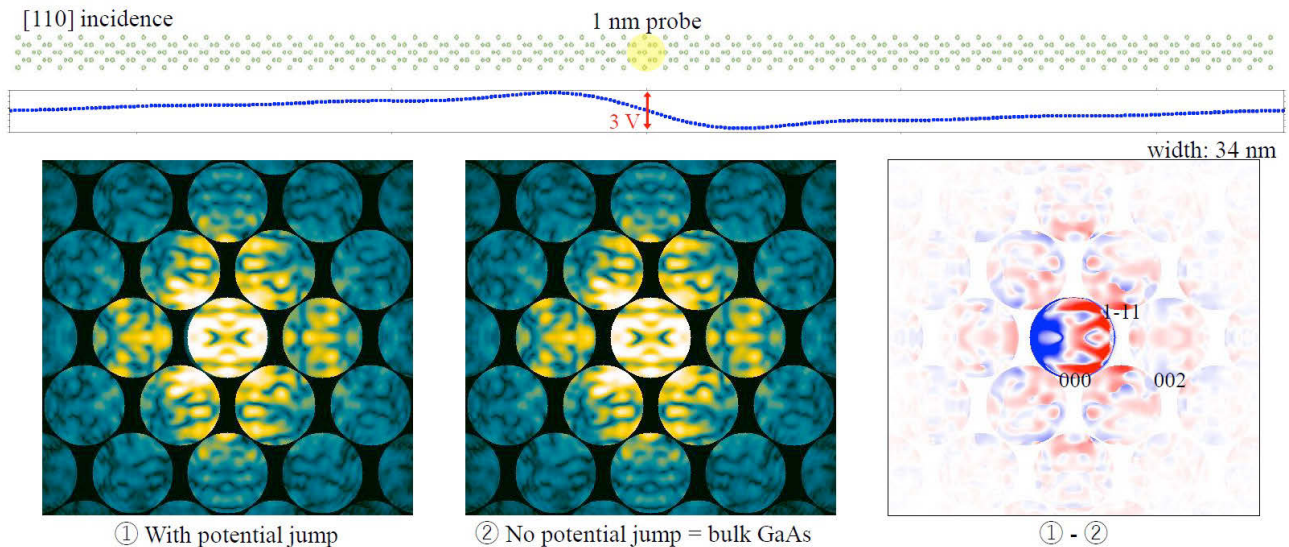


図. GaAs の pn 接合を模したポテンシャルジャンプの有無による収束電子回折(CBED)図形の強度変化のシミュレーション。透過ディスク内で最も大きな強度差が予想されるが、低次反射にも強度変化が現れている。

[1] D. Morikawa, K. Tsuda, Appl. Phys. Lett., 118, 092901 (2021).

[2] D. Morikawa, K. Tsuda, Jpn. J. Appl. Phys., 62, SM1003 (2023).

[3] H. Sasaki et al., Microscopy, 63, 235 (2014).

[4] N. Shibata et al., Sci. Rep., 5:10040 (2015).

有機溶媒分散試料のクライオ SEM 観察可否：溶媒物性からの検討岡田 賢^A

海洋研究開発機構

Which organic solvent is suitable for cryo-SEM? Study of solvent properties.Satoshi Okada^A*^AX-Star, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology*

クライオ走査電子顕微鏡（クライオ SEM）は、液中構造のスナップショットを擬三次元的に可視化する手法として、主に水中に分散した物質の分析に広く用いられてきた。分散媒として有機溶媒を用いても、試料を同様に凍結し溶媒を昇華することで表面構造が観察できる。水の低温物性は幅広く検討され知られているものの、有機溶媒の液体窒素温度付近での蒸気圧や密度などは一元的にまとまっていない。そのため、有機溶媒に分散した試料をサンプル調製しクライオ SEM 観察を行った際に生じるアーティファクト、最適な観察温度、昇華条件などのパラメータは、研究者独自のノウハウや感に頼っていた。本ポスターでは、研究室で汎用される有機溶媒を中心に、クライオ SEM への適用可否について、低温物性の観点から議論する。

アーティファクトのないクライオ SEM 観察には、有機溶媒が (1)アモルファス状に凍結可能で、(2) SEM チャンバー圧力以上の三重点圧力を持ち（液体を経ず昇華すること）、(3)常温液体の密度と固体密度の差が小さく、(4)昇華速度が水と同程度であること、の4点が必要である。文献調査等の結果、(1)メタノールを除く多くの溶媒で達成できる、(2)アルコール類を含む複数の溶媒では液相を経て蒸発する、(3)文献データに乏しく、独自の実験により決定した、(4)蒸気圧の温度依存性から推定できることが分かった。ポスターでは有機溶媒の固体密度測定の詳細を紹介する。また、高濃度分散系での沸点上昇や混合溶媒系での挙動については別途検討が必要である。

PZT/SRO/Pt 積層体断面の原子分解能 STEM 観察

橋本晋亮¹, 関岳人^{1,2}, 幾原雄一^{1,3}, 柴田直哉^{1,3}¹東京大学工学系研究科総合研究機構, ²JST さきがけ,³ファインセラミックセンター ナノ構造研究所

Atomic-resolution STEM Observation of PZT/SRO/Pt

Shinsuke Hashimoto¹, Takehito Seki^{1,2}, Yuichi Ikuhara^{1,3} and Naoya Shibata^{1,3}¹Inst. of Eng. Innovation, School of Eng., The Univ. of Tokyo,²JST PRESTO, ³Nanostructures Research Lab., JFCC

薄膜アクチュエータは、ハードディスクドライブの磁気ヘッド、インクジェットヘッド、オートフォーカス用液体レンズなどの製品に使用されている。汎用的な薄膜アクチュエータは、高い電気機械結合係数とキュリー温度を持つチタン酸ジルコン酸鉛(PZT)を厚さ数 μm の圧電膜とし、上下面にPtなどの電極層を接合させた構造を持つ。さらに、界面に金属酸化物のSrRuO₃(SRO)を挿入することで界面の剥離、欠陥生成、分極疲労などを抑制できることが知られており、バッファ層として広く用いられている。PZTとSROはいずれもペロブスカイト構造を有するが、格子ミスフィットが3%と大きいと、成膜に際して転位の導入などによる界面構造緩和が必要となる。一方、SROとPtは格子ミスフィットが0.3%の整合界面となっている。本研究では、薄膜アクチュエータのPZT/SRO/Pt積層体断面を原子分解能観察し、PZT/SRO界面のミスフィット緩和機構を調査した。今回用いた試料は、基板側からPt、SRO、PZTの順でスパッタ法により成膜されており、いずれの膜もc軸方向にエピタキシャル成長した単結晶となっている。

図1にSRO膜内部を[110]方向から観察したHAADF-STEM像を示す。SRO膜中内で観察された{111}双晶は、基板側のPt上面のステップ端部周辺から発生しPZTとの界面近傍で終端していた。このような双晶は複数の視野で観察され、そのほとんどが原子2層分の厚さとなっていた。一方、[100]方向の観察ではPZT/SRO界面近傍で刃状転位が観察された。転位はPZTとSROの格子ミスフィットを緩和するために導入されたと推察されるが、転位の頻度から計算される緩和効果はPZT/SRO界面のミスフィットの半分に相当する1.5%であることが分かった。残りの格子ミスフィットの緩和について、SRO{111}双晶に着目して解析を行った。{111}双晶は[11 $\bar{2}$]方向の原子変位により形成され、界面の面内方向成分は{110}面間隔の1/3倍の原子変位に相当する。原子2層分の双晶では面間隔の2/3倍に相当する。この原子変位によりPZT/SRO界面の格子ミスフィットが緩和されていると考えられる。双晶の頻度から格子ミスフィット緩和効果を求めると0.7%であり、刃状転位の緩和効果と合わせると2.2%となる。よってPZT/SRO界面の格子ミスフィットは主に刃状転位とSRO{111}双晶によって緩和されていると考えられる。詳細は発表で議論する。

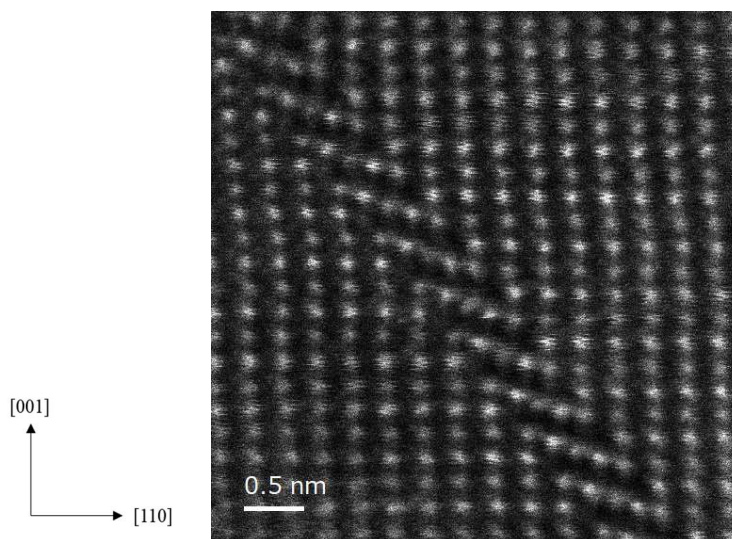


図1. SRO膜中のHAADF-STEM像, {111}双晶が存在する

水蒸気プロセスによりアルミニウム合金表面に生成した皮膜の結晶構造解析

周 焯翔, 瀧澤 正典, 茂手木 信, 芹澤 愛, 下条 雅幸
芝浦工業大学大学院

Crystal structure analysis of the film formed on a
Al-Mg-Si alloy by a steam process
W. ZHOU, M. Takizawa, M. Motegi, A. Serizawa, M. Shimojo
Shibaura Institute of Technnology,

1. 緒言

近年地球温暖化の進行が課題となり、脱炭素社会の実現が囑望されている。輸送機器に対し、軽量化が積極的に進められている。それを達成するために、自動車の軽量化の手段の1つとして使用される素材にアルミニウム合金がある。しかし、従来利用されている表面処理である陽極酸化処理や化成処理は、化学薬品を使用するため、環境負荷が大きい。そこで、水蒸気プロセスが注目されている。しかし、この処理によって生成する皮膜の微細構造は明らかになっていない。本研究では、この水蒸気プロセスを6000系アルミニウム合金に施し、作製した皮膜の断面を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、結晶構造を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 試料および水蒸気プロセス：

Al-Mg-Si 合金(A6061)試料と純水を圧力容器に入れ、温度 250°C で、処理時間 24h の加熱処理を行い、合金表面に皮膜を直接成長させた。

2.2 TEM 試料作製：

Ga イオンダメージを防ぐため、水蒸気プロセスを施した Al 合金試料に、厚さ 1 μm の炭素保護膜を作製した。その後、集束イオンビーム(FIB)を用いて厚さ 100 nm 以下にした断面 TEM 試料を作製した。

2.3 透過型電子顕微鏡観察：

高分解能 TEM 像の高速フーリエ変換(FFT)から、結晶構造を解析した。

3. 結果および考察

図 1 に 250°C-24h 生成した結晶層、緻密層と母材の TEM 像および FFT を示す。点線で囲った領域にフィルターをかけた像を(a)(c)(e)の右側に示している。250°C-24h の場合は、結晶層と緻密層どちらも、格子定数: $a=2.84 \text{ \AA}$, $b=4.39 \text{ \AA}$, $c=9.39 \text{ \AA}$ 、空間群 Pnma の AlO(OH) であることが明らかとなった¹⁾。また、母材の析出物は格子定数: $a=b=c=6.34 \text{ \AA}$ 、空間群: Fm $\bar{3}$ m の Mg₂Si 析出物であることが明らかとなった²⁾。

文献

1) <https://next-gen.materialsproject.org/materials/Mg-Si-1367> Mg₂Si

2) <https://next-gen.materialsproject.org/materials/Al-O-H-625152> AlO(OH)

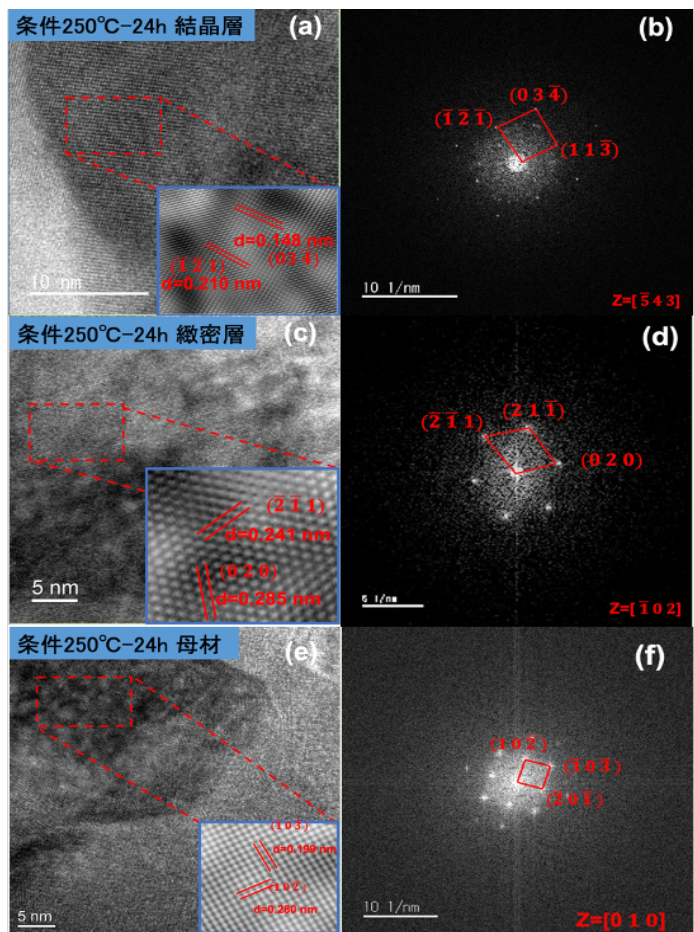


図 1 生成した皮膜の(a)(c)結晶層、緻密層と(e)母材の高分解能 TEM 像と(b)(d)(f)その FFT

Residual elastic strain analysis at the interface in ion irradiated 4H-SiC by various microscopic techniques

Subing Yang^{A, B}, Yuki Nakagawa^A and Tamaki Shibayama^A

^A*Faculty of Engineering, Hokkaido Univ.*, ^B*Present affiliation: School of Materials Science and Engineering, Jiangsu Univ.*

Silicon carbide (SiC) is a one of candidate materials for electronic and optical applications due to its excellent mechanical, optical and electronic properties, which has also been proposed as structure and cladding materials in nuclear or aerospace environment. However there are issues to apply SiC to harsh environments, especially for the irradiation-induced strain in SiC. An accurate non-destructive evaluation of the residual strain in SiC devices has become increasingly important, in particular with the development of the advanced micro/nano SiC-based devices. However, it is a significant challenge for common strain measurement techniques like X-ray diffraction (XRD) due to their spatial resolution limitation. In this study, selected-area ion irradiation was performed on n-type 4H-SiC (0001) single-crystal substrates at room temperature. Non-destructive residual elastic strain analysis were done by using a detailed normal strain distribution in the irradiated 4H-SiC was first provided using electron backscattering diffraction (EBSD) and confocal Raman microscopy (CRM). EBSD data at the interface were analyzed in detailed by Cross Court 3. Finally, an origin of residual elastic strain was evaluated by cross sectional TEM analysis.

In the case of 100 keV He⁺ ion irradiation, EBSD and CRM results showed good agreement. In addition to the strain introduced in the irradiated area, excessive strain also extended into the surrounding substrate owing to irradiation-induced swelling. Furthermore, a higher compressive strain is concentrated around the interface between the irradiated and unirradiated areas. An anisotropic strain distribution in the irradiated area is also detected using EBSD, which indicates a correlation of strain degree and crystallographic orientation.[1, 2] The distribution of irradiation-induced defects in the 4H-SiC was explored using various transmission TEM techniques. An anisotropy of defect distribution was found in the selected-area He⁺ ion irradiated 4H-SiC by C-TEM analysis. It was found that great compressive stress was introduced in the lateral direction in the selected-area He⁺ ion irradiated 4H-SiC due to the constraint against lateral expansion, and these compressive stresses were introduced at the beginning of ion irradiation. These findings provided a direct evidence that compressive stress was supposed to inhibit the interstitial type defect formation, enhancing the anisotropic defect distribution. [3] Effects of ion irradiation dose and ion species are also discussed.

[1] Subing Yang, Sakiko Tokunaga, Minako Kondo, Yuki Nakagawa, Tamaki Shibayama, *Applied Surface Science* 500 (2020) 144051.

[2] Subing Yang, Yuki Nakagawa, Minako Kondo, Tamaki Shibayama, *Acta Materialia* 211 (2021) 116845.

[3] Subing Yang, *Dissertation of Hokkaido Univ.*, Microscopic study of correlation between residual elastic strain and defects in He⁺ ion irradiated 4H-SiC, 2020

電子線照射によるナノデバイスへの局所溶着法の開発

○下田 周平^A, 女池 竜二^B, 迫田 将仁^C, 丹田 聡^C, 延兼 啓純^B
 北海道大学触媒科学研究所^A, 北海道大学理学研究院^B, 北海道大学工学研究院^C

Development of local welding method for nanodevices using electron beam irradiation

○S.Shimoda^A, T.Meike^B, M.Sakoda^C, S.Tanda^C, and H.Nobukane^B

^ALab. of Cat. Hokkaido Univ., ^BDept. of Phys. Hokkaido Univ.,

^CDept. of Appl. Hokkaido Univ.

近年ナノスケール単結晶の電子物性研究において、バルク（ミリメートルサイズ）単結晶では顕にならなかった新奇な量子現象が発見されている。超伝導や密度波、量子ホール効果などの量子力学的基底状態の理解、及び量子計算デバイスへの応用展開を実現させるためには、“ナノ試料による電子物性の解明”が必要不可欠である。

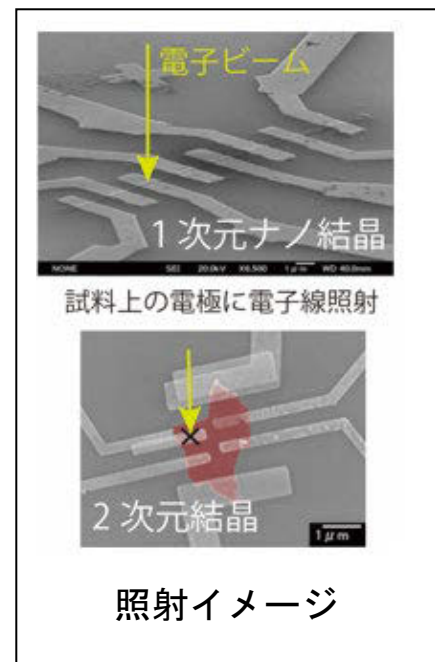
走査型電子顕微鏡（SEM）を用いた電子ビームリソグラフィ技術は、ナノスケール試料への電極作製を可能にする。しかし、試料と電極が接触しているように見えていても、実際は電氣的接触が不十分な場合が度々ある。この原因はリソグラフィの工程で使用する高分子レジスト膜が試料表面にわずかに残存していること、また酸化物試料ではそもそも伝導面が表面に無いことなどが挙げられる。これらの問題を解決するためにはナノ試料上に作製した電極に SEM 内にて局所的に電子線照射し、試料と電極を溶着することで良質な電氣的接触を実現する手法を開発する¹。

最初に試料台にファラデーカップを購入し、SEM チャンバー内への外部出力端子を取り付け、ピコアンメータにて照射電流値を計測する。加速電圧、及びスポットサイズによる照射電流値の依存性を調べ、電極溶着に最適な条件を探す。タングステンフィラメントを用いた SEM では照射電流値を 10^{-6} ~ 10^{-10} A で可変できる。

照射領域は点または面分析モードを使用することでナノメートル領域に的確に照射する。抵抗測定により照射試料の接触抵抗を調べる。ナノスケール低次元導体、酸化物超伝導体など様々な試料への適用を試み、その有効性を明らかにする。また低温における量子輸送測定を行う。

謝辞 本研究は文部科学省 先端研究基盤共用促進事業 令和4年度北大コアファシリティ事業 研究教育基盤強化プログラム R&T PJ 「SEM を用いた電子線照射によるナノデバイスへの局所溶着法の開発」(2022~2023 年度)の補助を受け実施した。

1) H. Nobukane et al., JJAP, 49 020209 (2010)



電子線ホログラフィーによる帯電した腎結石周辺の電場変動の時間分解評価

赤瀬 善太郎^{AB}, 真柄 英之^A, 佐藤 隆文^A, 岩崎 洋^B, 鳶田 恵子^B, 進藤 大輔^B,

W. Hipkaeo^C, P. Srison^C, W. Sirithanaphol^D, U. Rompsaithong^D, 近藤 尚武^C

東北大多元研^A, 理研 CEMS^B, Khon Kaen 大医^C, Khon Kaen 大 Srinagarind 病院^D

Time-resolved Evaluation of Electric Field Fluctuations around Charged Kidney Stone by Electron Holography

Z. Akase^{AB}, H. Magara^A, T. Sato^A, Y. Iwasaki^B, K. Shimada^B, D. Shindo^B, W. Hipkaeo^C, P. Srison^C, W. Sirithanaphol^D, U. Rompsaithong^D, H. Kondo^C

^AIMRAM, Tohoku Univ., ^BCEMS, RIKEN, ^CFaculty of Medicine, Khon Kaen Univ., ^DFaculty of Medicine, Srinagarind Hospital, Khon Kaen Univ.

強く帯電した試料から得られた電子線ホログラムを振幅再生すると、帯電した領域周辺で像強度が低下する。振幅像強度低下の原因は電場の時間変動によるホログラムの Visibility の低下によるものと考えられることから、振幅再生は電場変動の検出手段として有効と言えるが、これまで電場変動の時間スケールは明らかではなかった。そこで本研究では、露光時間が短いその場観察用の CMOS カメラ (OneViewIS カメラ、Gatan) を用いることで、TEM 観察中の帯電試料周囲の電場変動の時間スケールを調べた。帯電しやすい絶縁性試料として、腎結石を粉碎したものをを用いた。その場観察モード (4k x 4k ピクセル、25fps) でホログラムを約 6 秒間連続撮影したのち、フレームを複数枚ずつ積算処理することで有効露光時間を調整したホログラムのデータセットを作成し、各ホログラムから複素数像を得た。一連の複素数像を平均化したのちに振幅を抽出するとデータ取得時間全体 (約 6 秒間) の電場変動を反映した振幅像となる。それに対し、各複素数像から振幅を抽出したのちに平均化すると有効露光時間内の電場変動を反映した振幅像となる。有効露光時間を変えて比較した結果、腎結石試料の場合、電場変動の時間スケールは約 0.1 秒と見積もられた。本研究は JSPS 科研費 JP21H04608、コンケン大学卒業研究助成金 RP65-2-002、文部科学省先端研究基盤共用促進事業 (先端研究設備プラットフォームプログラム) JPMXS0450200723 の助成を受けた。

原子分解能磁場フリーSTEM を用いたケイ素鋼粒界の原子構造解析

新井 雅樹^A, 二塚 俊洋^A, 関 岳人^{A,B}, 森重 宣郷^C, 松原 稜^C,
幾原 雄一^{A,D}, 柴田 直哉^{A,D}

^A東大工, ^BJST さきがけ, ^C日本製鉄, ^DJFCC

Atomic structure analysis of grain boundaries in silicon steel by magnetic-field free STEM

M. Arai^A, T. Futazuka^A, T. Seki^{A,B}, N. Morishige^C, R. Matsubara^C,
Y. Ikuhara^{A,D} and N. Shibata^{A,D}

^ASchool of Eng., Univ of Tokyo, ^BJST PRESTO, ^CNippon Steel, ^DJFCC

ケイ素鋼は電磁鋼板としてモーターや変圧器の鉄心に用いられ、その軟磁性特性がエネルギー効率を大きく左右する。磁化方向を制御した電磁鋼板は方向性電磁鋼板と呼ばれ、高度な組織制御により圧延方向に磁化容易軸をもつ粗大結晶粒の集合組織を形成し、ヒステリシス損を抑制している。この結晶方位は Goss 方位と呼ばれ、連続圧延、連続焼鈍の後に行われる高温焼鈍での二次再結晶により、Goss 方位粒のみを異常粒成長させることが可能である。電子線後方散乱回折による異常粒成長の初期過程の解析では、 $\Sigma 9$ 粒界が他の粒界に比べて特異に移動しやすいことが観察されている [1]。しかしながら磁性材料の原子分解能観察はこれまで著しく困難であり、 $\Sigma 9$ 粒界の原子構造の直接観察は行われておらず、その特異性の起源は不明であった。近年、磁場フリー環境での原子分解能観察が可能な対物レンズが開発され [2]、それを利用した電磁鋼板の $\Sigma 9\{221\}$ 粒界原子構造の直接観察が行われた [3]。観察された粒界原子構造は従来の理論予測とは異っており、Simulated Annealing と呼ばれる理論計算手法を用いた粒界構造探索により、観察結果と整合し且つ従来の理論予測構造よりも安定な構造が発見された。新しく発見された安定原子構造は従来の理論研究では想定されない長周期構造もしくは非整合構造であるため、他の粒界性格においても長周期の安定構造が見逃されている可能性が考えられる。そこで本研究では、原子分解能磁場フリーSTEMによる原子構造直接観察と理論計算に基づき、様々な粒界性格におけるケイ素鋼粒界の安定原子構造探索を行った。

複数種類の対称傾角粒界を対象として実験と理論計算を実施した。Fe-3mass%Si の単結晶を準備し、方位を計測し切り出し後、水素 100%雰囲気における熱拡散接合により双結晶試料を作製した。機械研磨とイオン研磨により STEM 観察用薄膜試料を作製し、原子分解能磁場フリーSTEM (MARS) を用いて観察した。観察前に試料表面の酸化鉄をイオン研磨装置で除去した後、試料を大気非暴露条件で移送し、酸化膜による観察への影響を低減した。また、分子動力学計算に基づく Simulated Annealing 法を用いて安定粒界構造探索を行った。それぞれの粒界性格に対して様々な周期と粒界原子密度を仮定した。各条件に対して、粒界をランダムな原子配置とした 100 通りの構造を初期構造として 700 K から 0.001 K まで冷却し、粒界エネルギーを比較して最安定構造を探索した。

$\Sigma 5\{310\}$ 粒界の STEM 観察像は、従来の理論予測原子構造および Simulated Annealing 法による予測構造とよく一致した。一方 $\Sigma 3\{111\}$ では、回転軸方向の周期を 3 倍、粒界直上の原子密度を $2/3$ とした系から、従来の予測構造より粒界エネルギーの低い構造が発見された。また、STEM 観察においても従来の予測構造とは異なる原子構造が観察され、Simulated Annealing 法で予測された種々の準安定構造の一つに合致した。本結果は、bcc 構造のような単純構造の粒界において、長周期構造・非整合構造が普遍的に存在していることを強く示唆している。詳細はポスター発表で述べる。

[1] H. Homma & B. Hutchinson, Acta Materialia **51**, 3795 (2003).

[2] N. Shibata et al., Nat. Commun. **10**, 2308 (2019).

[3] T. Seki et al., submitted.

多様な液体材料観察を可能とするクライオ EM 試料作製法の検討と トモグラフィー解析

海原 大輔^A, 濱口 祐^A, 米倉 功治^{A,B}
東北大多元研^A, 理研 SPring-8^B

Cryo-EM observation of various liquid materials
D. Unabara^A, T. Hamaguchi^A and K. Yonekura^{A,B}
^AIMRAM, Tohoku Univ., ^BRIKEN SPring-8

クライオ電子顕微鏡法において、タンパク質等の生体分子試料の観察には水溶液を用いるのが一般的である。専用の試料急速凍結装置を使用して、試料支持膜の孔に薄い非晶質の氷を張ったグリッドを再現良く作製することができる。一方、生体分子以外の材料は非水溶性の試料も多く、その溶解には有機溶媒が多用されるが、有機溶媒試料の急速凍結、観察例は限定されている。有機溶媒試料の急速凍結法を確立することによって、従来観察困難であった樹脂、油脂、塗料・インク等、広範な液体材料のクライオ電子顕微鏡による構造観察が可能となり、材料研究の飛躍が期待される。本発表では、有機溶媒試料の急速凍結、およびクライオ電子顕微鏡観察を検討した結果を報告する。

試料として、有機溶媒（メタノール、エタノール、トルエン等）に金ナノ粒子が分散した溶液を用いた。グリッドは、修飾セルロース支持膜から成るレース状グリッド、または、カーボン支持膜上に規則的に多数の孔が空いたグリッド（Quantifoil 膜穴グリッド）を用いた。試料溶液の急速凍結は、自動浸漬凍結装置（EM GP2, Leica）を使用し、種々条件検討を行った。得られた凍結グリッドは、クライオ電子顕微鏡（CRYO ARM 300 II, JEOL）へ装填し、電子直接検出カメラ（K3, AMETEK Gatan）でサブフレーム撮影した傾斜像を記録するクライオ電子線トモグラフィー法により、有機溶媒凍結膜の形成とその状態について観察・評価を行った。

謝辞：本研究は、JSPS 科研費 23H05219 等の助成により行った。

Analysis of process-induced basal plane dislocations and stacking faults in 4H-SiC

T. Mori^A, T.Hiki^A and M. Yoshikawa^A

^A*ROHM Co., Ltd.*

In 4H-SiC, which is the mainstream in the field of power devices, BPD (basal plane dislocation) and SSF (Shockley stacking faults) generated in the epitaxial film are generally considered to be harmful, and their reduction is necessary. Research is underway. On the other hand, there are relatively few studies on process-induced BPD/SSF. In this study, we used TEM observation and gb contrast analysis to investigate the expansion mechanism of dislocation loops existing in locations where carrier loss actually occurs in 4H-SiC epitaxial films experimentally subjected to high-concentration implantation.

The shape of the process-induced dislocation loop extending from the implant region is significantly different from the conventional dislocation loop originating from the substrate-epi interface, and the loop is composed of two dislocation lines running in parallel, which are considered to be partial dislocations. In addition, the region between the two parallel dislocation lines was a 1SSF (single Shockley stacking fault).

This time, we will report on the results of our investigation while comparing the types and expansion patterns of process-induced BPD/SSF and conventional BPD/SSF.

大気非暴露システムおよび幅広い加工エネルギーに対応した 新規 BIB システムの開発

石丸 雅大^A, Alex Bright^A, Brandon Van Leer^A, Peter Priece^A, Ondrej Klvač^{A, B}
^AThermo Fisher Scientific, ^BBrno University of Technology

Development of new BIB systems with wide energy range and inert gas sample transfer capability

M. Ishimaru^A, Alex Bright^A, Brandon Van Leer^A, Peter Priece^A, Ondrej Klvač^{A, B}
^AThermo Fisher Scientific, ^BBrno University of Technology

より良い SEM 観察結果を得るためには、観察前の試料調製方法が重要である。SEM 観察試料調製方法としては機械研磨やセラミックスラリーを用いた伝統的な手法やイオンビームを用いた BIB (Broad Ion Beam) や FIB (Focused Ion Beam) といった手法が用いられてきた。近年盛んに行われている二次電池材料の SEM 観察では大気非暴露での加工観察が必要となるため、BIB や FIB が採用されることが殆どだが、加工時間や観察面へのダメージが問題となっていた。更に電池材料では場所による不均一な反応が起こるために、広い観察視野が求められる。また、生産性向上のためには統一されたシステムでのスムーズな試料搬送が求められていた。

これらの問題点に対して、我々は新しい BIB システムを開発した。最大加工電圧 16kV という高い加工電圧で試料作製時間の短縮を果たしつつ、0.1~2kV の加工電圧の際には異なる光学系システムを搭載することで、低ダメージ化との両立を可能にしている。また大気非暴露システム (IGST; Inert Gas Sample Transfer) に関しては、グローブボックスのパスボックスに収まり易い小型のサンプルカップセルや、グローブボックスに専用のポートを導入することで試料搬入作業の効率化を、BIB システムや FIB/SEM システムには自動で作動するポートを接続することでシームレスに加工や観察が行えるようになった (図 1)。また試料搬送時には、陽圧での移動も可能であることや、サンプルカップセル内部の圧力をモニタリングできることから大気非暴露状態の保持がより簡単になっている。

この BIB および IGST システムを用いて二次電池材料正極材 NMC を観察した結果を図 2 に示す。16kV の Ar イオンによる研磨とロックングによるカーテニング効果の抑制によって、500 μ m 以上に渡って平滑な断面観察試料が調製できていることがわかった。

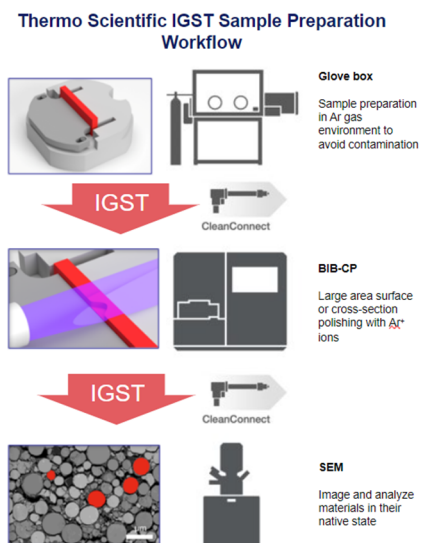


図 1. 大気非暴露システム (IGST) ワークフロー

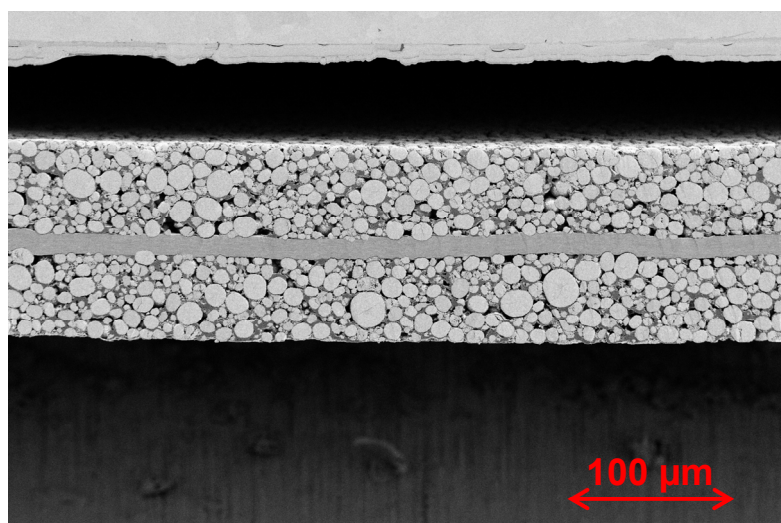


図 2. 新規 BIB システムで調整した NMC 正極材料の断面 SEM 観察結果

超高コントラスト STEM イメージング法を用いた クロシドライト石綿微細組織観察

三浦 颯人, 大西 市朗
日本電子株式会社

Observations of crocidolite asbestos nanostructure using ultra-high contrast STEM imaging technique

H. Miura and I. Ohnishi
JEOL Ltd.

クロシドライト石綿は、角閃石系石綿の一種であり、非常に微細な構造を持ち、高い吸引力を備えていることから、6種類の石綿の中でも人体への有害性が最も高いと考えられている。Ahn and Buseck (1991)は、高分解能透過電子顕微鏡(HRTEM)法を用いてクロシドライト石綿断面の観察を行い、クロシドライト石綿が多結晶の微繊維の集まりであり、微繊維内外に多くの積層不整や層状ケイ酸塩などが存在することを明らかにし、多結晶粒界や積層不整に沿って繊維が微細化する可能性を示唆した[1]。微細化のメカニズムを完全に理解するにはより詳細な観察が必要であるが、石綿中の積層不整や層状ケイ酸塩は、電子線に対して非常に敏感であり、詳細な構造解析には至っていない。

最近、最適明視野 STEM (OBF-STEM) 法が開発された[2]。OBF-STEM 法は従来の ABF-STEM 法よりも約2桁高い感度を持ち、低電子線照射条件下での観察も可能にしている。これにより、SN比が低く従来は困難だった条件下での高コントラスト試料観察が実現し、ゼオライトや有機金属錯体といった電子線に敏感な材料に対する原子分解能観察が可能になった。

本研究では、層状ケイ酸塩と欠陥の詳細な構造を理解し、アスベスト形成メカニズムに関する新たな知見を得るために、OBF-STEM 法を用いたクロシドライト石綿の微細組織観察を試みた。

[1] J.H. Ahn & P.R. Buseck (1991) *Am. Min.*, **76**, 1467-1478.

[2] Ooe et al. (2021) *Ultramicroscopy* **220**, 113133.

SEM、TEMによる豆乳クリームの微細構造観察

芦田 祐子^A, 柳澤 昌伸^A, 佐藤 亮太郎^A不二製油株式会社^A

Microstructural observation of soy milk cream by SEM and TEM

H. Ashida^A, M. Yanagisawa^A and R. Sato^A^AFuji Oil Co.,Ltd.

大豆は古事記にも記載があるとされ、古来より食され煮豆や豆腐、納豆、味噌や醤油に加工・活用されており、日本の食において欠かすことのできない食材のひとつである。弊社では特許技術であるUSS (Ultra Soy Separation)製法により、大豆から豆乳クリームと低脂肪豆乳を分離することに成功した。豆乳クリームは、従来の豆乳にはない深いコクを持つことが分かっている。このコクには、油脂が関与していると仮説を立て、その形態や存在状態を調べた。従来、豆乳は乾燥により表面に湯葉状の被膜を形成する為、低真空SEM法等では観察が困難であった。本検討では熱の影響を考慮し、低温でゲル化するSeaPrep®に包埋して前処理を行うことにより、豆乳クリームの油滴を明瞭に観察することができた。

比較として、原料の大豆種子中のOil Bodyや豆腐中の油滴の構造を観察する中で、油滴表面に構造の差がある可能性が示された。そこで、豆乳クリームについては更にフリーズ・フラクチャー法での観察も行い、油滴界面に多層ラメラ構造 (Fig.1) を確認することができた。

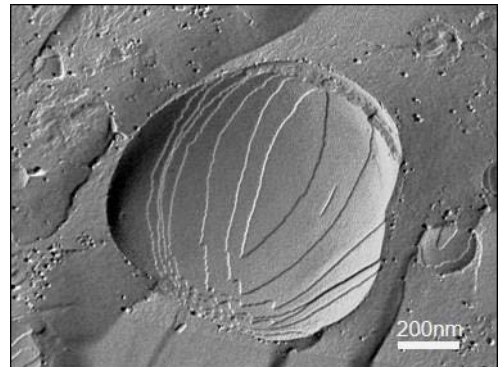


Figure.1 Soy milk cream observed by freeze-fracture method

神経活動観察のための小型蛍光顕微鏡法

浅井 裕貴^{A,B}, 林 芽衣^B, 鈴木 (大久保) 玲子^B, 金子 涼輔^C, 藤井 一希^B, 高雄 啓三^B,
八木 健^C, 岡部 繁男^A, 井ノ口 馨^B
東京大医^A, 富山大医^B, 阪大生命機能^C

The observation of neuronal activity with in vivo dual color microscopy

H. Asai^{A,B}, M. Hayashi^B, R. Okubo-Suzuki^B, R. Kaneko^C, K. Fujii^B, K. Takoa^B, T. Yagi^C, S.
Okabe^A, and K. Inokuchi^B

^A*School of Med. Univ. Tokyo*, ^B*School of Med. Toyama Univ.*, ^C*School of Front. Biosci. Osaka Univ.*

神経活動は脳機能の基盤となる現象であり、神経活動様式を理解することは脳機能の理解に重要である。神経活動の観察法としてカルシウムイメージングが近年広く用いられている。イメージングに用いる顕微鏡を小型化することで、マウスの行動制限を極力減らして神経活動の観察が可能になってきた。しかし、自由行動下のマウスから神経活動の観察と細胞種を同定するための観察を行うのは困難である。本研究では神経活動の観察と細胞種の同定を実現するために、2色の蛍光を観察できる小型顕微鏡法を確立する。この顕微鏡法で緑蛍光たんぱくにより神経活動を観察し、赤蛍光たんぱくで標識したクラスター型プロトカドヘリン β の特定のアイソフォームを発現した細胞の観察・同定を自由行動下のマウス海馬から行った。新規空間探索中の細胞ごとの神経活動を比較したところ、蛍光標識された細胞種と標識されていない細胞種間で有意な差は見られなかった。今後、安静時の神経活動の比較や細胞集団の活動特性の検証を行う。

Development of a method for large-scale imaging of axons and synapses using expansion microscopy

Yutaro Kashiwagi^A and Shigeo Okabe^A

^ASchool of Med. Univ. of Tokyo

The axon is a structure necessary for neurons to output information. Axons are hundreds of micrometers or more in length, whereas synapses are micron-scale structures. To understand brain function, it is necessary to reveal the neuronal connections between different brain regions in detail. Recent advances in tissue clearing methods have enabled light to penetrate deep into large tissues such as the brain. In addition, it is possible to observe even the deep parts of the brain using multiphoton excitation microscopy. However, the diffraction-limited resolution of optical microscopy makes it challenging to achieve both millimeter and micron-scale imaging, even with recent microscopy techniques.

Here, we utilized expansion microscopy to trace axons to their synaptic counterparts. Expansion microscopy is a modern histological technique that physically expands cells and tissues. If the specimen were to expand by a factor of 5, the optical resolution (X 200 nm, Y 500 nm) would be (X 40 nm, Y 100 nm). We first established a tracing technique of axons from pyramidal neurons in the cortex and hippocampus in the expanded specimens. To extend the range of axonal tracing, we then adapt the expansion microscopy to thicker specimens. Optimizing the experimental conditions made it possible to image synaptic structure at the nano-scale while tracing axons over a wide area in a 300- μm -thick tissue sample. Furthermore, the technique can be applied to uneven brain tissue, and we succeeded in visualizing axon-like structures running on the surface of the ventricles. These technologies are helpful for tracking axons and analyzing the structural and molecular characteristics of the synapses in brain tissue.

単粒子クライオ電顕法による V-ATPase 中間体構造のニューラルネットワーク評価

中西 温子^A, 岸川 淳一^B
横山 謙^C, 光岡 薫^A

Analysis using Neural Networks of V/A-ATPase Intermediate Structures by Single-Particle Cryo-Electron Microscopy

A. Nakanishi^A, J. Kishikawa^B, K. Yokoyama^C and K. Mitsuoka^A

^AResearch Center for Ultra-High Voltage EM, Osaka Univ., ^BStruct. Biol., Kyoto Inst. of Tech.,

^CDept. Mol. Biosciences, Kyoto Sangyo Univ.

単粒子クライオ電子顕微鏡（電顕）法を用いると、生体高分子の粒子画像を分類することで、同一溶液内にある複数の構造を決定することができ、それぞれの構造からヌクレオチドなどの結合状態と対応付けることができるので、機能と関係付けることができる。さらに、急速凍結を用いてクライオ電顕グリッドを作製しているため、ヌクレオチドを付加するなどの反応を開始してから時間を変化させることで、異なる中間体の構造決定も行うことができる。それらにより反応全体の構造変化の詳細を知ることができる可能性がある。そこで最近、我々は ATP のエネルギーを用いて水素イオンを輸送する膜タンパク質複合体である V/A-ATPase について、反応開始から 5 秒後と 30 秒後での複数の中間体構造などを決定することで、その反応開始時の構造変化を明らかにした¹⁾。

一方、最近深層学習などニューラルネットワークを利用した画像などの解析研究が進んでいる。そこで、ポスターでは上記の V/A-ATPase の中間体構造を明らかにした単粒子クライオ電顕画像を用いて、ニューラルネットワークを利用した cryoDRGN をその画像解析に応用したので、その結果について報告する。

1) Nakanishi et al. *J. Biol. Chem.* **299**, 102884 (2023)

**The morphological analysis of individual oligodendrocytes in aged mice
by serial block face-scanning electron microscopy.**

**S. Looprasertkul^A, R. Yamazaki^A, Y. Osanai^A, M. Yatabe^A, K. Tom^A,
K. Yagai^A, B. Battulga^A, N. Ohno^{A,B}**

^AGrad School of Med, Jichi Med Univ., ^BDiv of Ultrastructural Research, NIPS

Oligodendrocytes are myelin-forming cells in the central nervous system. They produce myelin to regulate nerve conduction and have a high metabolic demand to support their functions, including myelination and axonal support. Aging is associated with a functional decline of mitochondria, leading to energetic insufficiency, which may affect oligodendrocyte functions. However, the effect of aging on myelin formation and mitochondrial dynamics of individual oligodendrocytes is still elusive due to technical difficulties in analyzing their morphology and intracellular structures. To examine the morphology of individual oligodendrocytes in the corpus callosum of aged mice (18-month-old) and compare it to that of young mice (Tanaka et al. 2021), we performed analyses of three-dimensional (3D) ultrastructure using serial electron microscopic images from serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM). The mitochondria, nuclei, and myelinated axons were automatically segmented using UNI-EM, a software collection for CNN-based EM image analysis. Furthermore, we manually segmented the cell body and processes of each oligodendrocyte and proofread the inference images from UNI-EM. Thereafter, we combined the segmented 3D reconstructed individual oligodendrocytes. We found that the number of myelin sheaths formed near the oligodendrocyte cell bodies significantly decreased. In addition, there is a significant bias of individual oligodendrocytes to select axons with a discrete range of myelin sheath thickness but not the axonal diameter. These 3D reconstructions of oligodendrocytes demonstrate that the morphology of oligodendrocytes in aged mice is different from that in young mice. To determine the effect of aging on the intracellular organelles of individual oligodendrocytes, characterization of mitochondrial dynamics will be conducted in future research.

Investigation of Oligodendrocyte – Neuron interaction in the mouse cerebellum

**B. Battulga^A, Y. Osanai^A, R. Yamazaki^A, T. Kouki^A, M. Yatabe^A, S. Looprasertkul^A,
Y. Shinohara^A and N. Ohno^{A,B}**

^AGrad School of Med, Jichi Med Univ., ^BDiv of Ultrastructural Research, NIPS

Oligodendrocytes produce myelin sheaths to increase the conduction velocity of neuronal axons, and myelination by oligodendrocytes is essential for cognitive functions and motor functions. An oligodendrocyte myelinates multiple neuronal axons, and previous studies suggested that some of the oligodendrocytes preferentially myelinate a specific class of axons. However, it is technically difficult to investigate neuron class-specific myelination in conventional methods because it requires three-dimensional electron microscopic analysis or injection of multiple types of viral vectors. In this study, we developed a simple method for observing myelination toward a particular class of neuronal axons using an attenuated rabies virus vector and the tissue-clearing technique for immunohistochemical analyses. We visualized oligodendrocytes in the cerebellar white matter by the attenuated rabies virus injection, and Purkinje cell axons and the other types of axons were labeled by anti-calbindin and anti-neurofilament antibodies. Using the method, we found that approximately 50% and 90% of oligodendrocytes selectively myelinate axons derived from Purkinje cells in the cerebellar white of adult or neonatal mice, respectively. These results indicate that Purkinje cell axons are preferentially myelinated by oligodendrocytes, especially in the early developmental period, and this may be important for proper cerebellar function.

糖修飾 S199 β -アクチンの核内における局在

秋元義弘^A, 三浦ゆり^B, 宮東昭彦^A, Gerald W. Hart^C, 遠藤玉夫^B
杏林大医^A, 都健康長寿医療センター研^B, Comp Carbohydr Res Ctr, Univ. Georgia^C

Localization of *O*-GlcNAcylated S199 β -Actin in the Nucleus

Y. Akimoto^A Y. Miura^B, A. Kudo^A G.W. Hart^C, T. Endo^B
^AKyorin Univ. School Med., ^BTokyo Metropol. Inst. Gerontol., ^CUniv. Georgia

アクチンは細胞骨格成分としての機能がよく知られているのに加えて、近年、核内において転写などの調節に関与することが明らかになりつつある。核および細胞質タンパク質の多くは、アミノ酸のセリン、スレオニン残基に1個だけ *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が *O*-グリコシド結合する糖修飾 (*O*-GlcNAc 化) を受けている。アクチンのアミノ酸残基 Ser 52, 199, 323 はこの糖修飾を受けると共にリン酸化も受けることが質量分析から明らかにされている。このうち、Ser199 がリン酸化を受けるとアクチン線維の伸長が促進されることが報告されている。このことから、我々は Ser199 の糖修飾は核内におけるアクチン線維伸長の抑制に関わるのではないかという仮説を立てた。今回、糖修飾アクチンの核内における役割について調べる目的で、糖修飾(*O*-GlcNAc 化 Ser199) アクチン抗体と核内構造体に対するマーカータンパク質抗体を用いて、核内のどこに局在するかを免疫電顕にて検討した。その結果、ラット腎系球体の核において糖修飾アクチンが核スペckルに局在する serine and arginine rich splicing factor 2 (SRSF2) と共局在していることが明らかになった。さらに、糖修飾アクチン抗体を細胞内に導入したところ、核内にアクチン線維が形成された。以上のことから、糖修飾アクチンは、核内でアクチン線維形成を抑制し、核スペckルにおいて SRSF2 と相互作用して転写、RNA プロセッシングやタンパク質の翻訳などの機能を調節することが推測された。

C2C12 細胞の分化誘導におけるポリアミン関連物質の影響

山端 麻佑子, 西野 有里, 菓子野 康浩, 宮澤 淳夫
兵庫県立大学 大学院理学研究科

Polyamine Related Substances Promote the Differentiation of C2C12 Cells

M. Yamabata, Y. Nishino, Y. Kashino and A. Miyazawa
Graduate School of Sci. Univ. of Hyogo.

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は、筋分化過程の研究モデルとして広く使用されている。C2C12 細胞は、コンフルエントに達するまで増殖させた後、血清を枯渇させることで細胞同士が融合し、多核化した筋管細胞に分化する。しかし、サルコメアや自発収縮を伴った骨格筋細胞にまで分化する細胞は極めて少ない(図 1)。これまでに、マウス胚性幹細胞(ES 細胞)にポリアミンの一種であるスペルミンを一時的に添加することにより、骨格筋細胞に分化したことが報告されている[1]。ポリアミンはタンパク質の合成や遺伝子の発現、細胞増殖に関与することが示唆されている。また、スペルミンの分解に関わるスペルミンオキシダーゼは、筋芽細胞と筋管細胞で発現量が異なっており、過剰発現すると筋繊維が肥大することが報告されている[2]。しかし、ポリアミンの骨格筋細胞への分化誘導メカニズムについては明らかにされていない。また、ポリアミンには、プトレシン、スペルミジン、スペルミンの3つがあり、この並び順で細胞内においてオルニチンから合成されると共に、ポリアミン間での代謝も行われている。

そこで、本研究ではポリアミンやオルニチンを C2C12 細胞に添加することにより、骨格筋細胞への分化が促進されるのではないかと考え、C2C12 細胞の骨格筋分化におけるポリアミン類の効果を調べることにした。異なる濃度のポリアミン類を分化誘導過程の様々なタイミングで C2C12 細胞に添加し、光学顕微鏡を用いて細胞の形態を観察した。その結果、C2C12 細胞がコンフルエント時にオルニチンまたはプトレシンを加えることによって、太い筋管細胞が増加し、分化誘導開始から 26 日目にはサルコメアを伴う細胞が見られた(図 2)。本研究により、C2C12 細胞の骨格筋細胞への分化誘導が、ポリアミン類によって促進される可能性が示された。

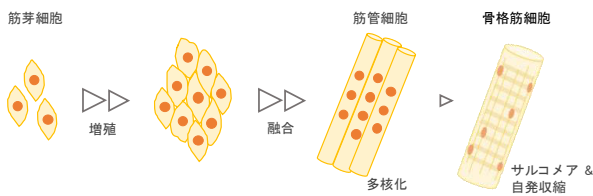


図 1 : C2C12 細胞の分化過程

C2C12 細胞を、ウシ胎児血清(FBS)を含む培地(DMEM)で増殖させ、コンフルエント時に低濃度のウマ血清(HS)を含む培地に交換することで、筋管細胞へと分化させることができる。

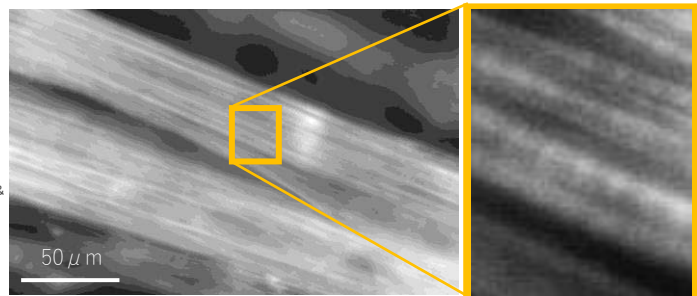


図 2 : C2C12 細胞から分化したサルコメアを伴う細胞の蛍光画像

プトレシンを添加し分化させた細胞の F-actin を Alexa Fluor488 結合 Phalloidin で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。細胞内でサルコメアの特徴である縞模様が観察された。

- [1] Toshiya Sasaki, Hideaki Matsuoka and Mikako Saito. (2008) "Generation of a multi-layer muscle fiber sheet from mouse ES cells by the spermine action at specific timing and concentration" *Differentiation* 76, 1023-1030
- [2] Manuela Cervelli, Alessia Leonetti, Guglielmo Duranti, Stefania Sabatini, Roberta Ceci and Paolo Mariottini. (2018) "Skeletal Muscle Pathophysiology: The Emerging Role of Spermine Oxidase and Spermidine" *medical sciences* 6(1),14

日本顕微鏡学会
第48回関東支部講演会
「進化する情報学 -顕微鏡研究の未来-」

11月12日（日）12：00～14：00

第1会場

Network Tele-Microscopy : 現状、課題、今後の可能性

樋田 一徳 ^{A, B}

川崎医科大解剖学 ^A, 大阪大超高压電顕センター^B

Network Tele-Microscopy: Current situation, challenges, future possibilities

K. Toida ^{A, B}

^A Kawasaki Medical School, ^B Research Center for Ultra-High Voltage Electron Microscopy

公益社団法人日本顕微鏡学会の新たな研究部会として『Network Tele-Microscopy 研究部会』の設立が 20 名の賛同者と共に申請され、その後理事会での承認を受け、2023 年度から正式に発足した。文末に列記する 20 名の共同申請者は研究部会幹事として部会の中心となり、今後の運営を担う。今般、同学会関東支部の招請を受け、『Network Tele-Microscopy 研究部会』の概要について講演の機会を得た。そこで研究部会設立の経緯と背景、「Network Tele-Microscopy」の現状、様々な課題、そして今後の可能性についての講演の概説を以下に紹介したい。

設立の経緯 :

大阪大学超高压電子顕微鏡センターは、共同利用施設として学内外・海外の研究者の利用を支援し共同研究を推進している。代表幹事・樋田も 2016 年度より客員教授として世界最高加速電圧 H-3000 を中心に利用している。その中で、2020 年からの COVID-19 感染拡大の影響で、いつ改善するともわからない状況で我々は逡巡し悶々としていた。しかし研究の中断は避けなければならない。外部からの利用で焦眉の課題となった問題は、「電子顕微鏡内に入れる観察試料は送付できるが観察者が赴けない」ということである。これは世界中のどの大学・研究機関でも同じ状況であった。

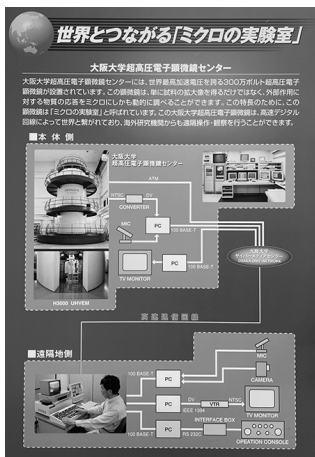
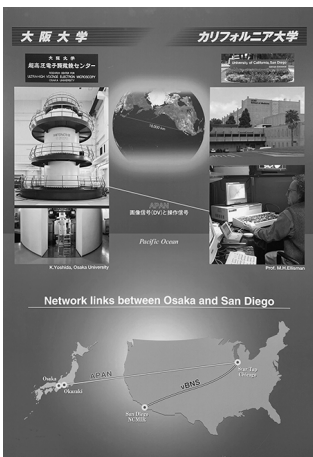
一方パンデミックの状況は、距離を隔てたコミュニケーションの必要性和重要性が人々の共有する課題となり、結果、インターネットを介したウェブ会議やウェブ講義が頻繁に行われるようになり、いわばネット・コミュニケーションは市民権を得た感がある。

このような状況下で、学会員はそれぞれ研究の継続と発展、特に遠隔地間での共同研究・共同利用の推進に思案を巡らし、独自の方法で課題を解決している情報が次第に共有されるようになり、それぞれの問題解決の現状と、さらなる課題、そしてこれを機に新たな可能性を共に考えて行こうという機運が生まれ、昨年の日本顕微鏡学会第 65 回シンポジウムにおいて「Network Tele-Microscopy」と題したセッションを組み、パンデミック化の顕微鏡遠隔利用の実際を紹介し、討論がなされた。それに関心を持たれた方々、そして研究部会幹事となる方々に筆者らが声をかけ、研究部会の設立に至った次第である。

背景と現状 :

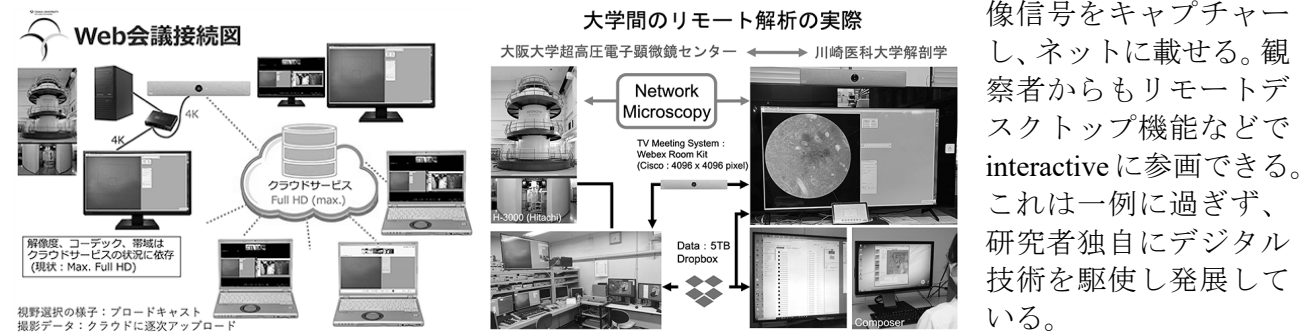
遠隔で電子顕微鏡を操作するという試みは決して新しいことではない。今から 25 年前、日米間で衛星通信を用いた遠隔操作による同時解析が行われたことがある。具体的には日本の阪大・生理研の超高压電顕をアメリカの UC San Diego の研究者が遠隔操作をして観察するというものである。

筆者もその現場に居合わせた経験があり「Telectron Microscopy」と称していただろうか。確かに電顕を操作し、撮影画像が転送され、遠隔地で撮影できたが、転送時間と時差は汎用性への発展に大きな課題として立ちはだかった。当時は画像をフィルムで撮影しており、デジタルカメラの解像度と感度も、また画像処理する PC の能力も、現在のものとは全く比較できないほど低かった。しかし、世界で唯一あるいは数台しかない高性能電子顕微鏡を、遠隔地や地方で共同利用できる将来の可能性に、心踊る高揚感を鮮明に覚えている。



今世紀に入り、PC、インターネット、スマートフォン、SNS、人工知能、デジタル静止画・動画解像度向上など、科学技術の進歩による社会コミュニケーションが急速に普及した。研究者あるいは企業によっては、個人・団体レベルで顕微鏡の遠隔操作、画像取得、処理、保守、修理などを遠隔で行うことができるようになってきている。それは研究のみならず、教育や医療の現場でも応用は目覚ましく迅速である。その中で起こったのが2019年末からのCOVID-19パンデミックである。

共同利用の妨げをいつまでも待っている訳も行かず、研究者は様々な工夫をしている。一例を挙げれば、筆者らがまず考えたのは既存の設備で行える簡便なウェブ会議ソフトによるPC画像共有である。これは大いに役立ったが本格的解析に難点があった。顕微鏡の解像度、試料移動の時間分解能に限度があり、これらを克服する必要がある、そして行き着いたのがTV会議システムを用いた高解像(4K)遠隔観察解析法である。(下図)これにより共同研究者は別の場所からもアクセス可能で、遠隔地間での複数の研究者による同時多元解析が可能となり、単に距離を克服するだけのものではなく、新たな価値が生まれ生産性向上に寄与した。さらに、この仕組みであれば、初心者も容易に参画できることも利点である。電子顕微鏡のみならずレーザー顕微鏡などの汎用機器の映像信号をキャプチャーし、ネットに載せる。観察者からもリモートデスクトップ機能などでinteractiveに参画できる。これは一例に過ぎず、研究者独自にデジタル技術を駆使し発展している。



様々な課題：

以上のような利用の現状について、本年6月の日本顕微鏡学会第69回学術講演会に先立ち同会場で研究部会の第1回研究会が開催され、そこで紹介・討論がなされた。同時に様々な課題が提起され、これらの課題を10項目に整理し、その後メール審議によって3つの重点課題として再分類し、その重点課題の中で優先順位をつけて、年に3~4回の開催を予定する今後の研究会において集中的に討論を行うこととなっている。(右図)

今後の可能性：

機器性能のみならず、様々な科学分野の革新とソフトウェア、人工知能などの発展が目覚ましく、汎用の新規システム開発など今後の可能性は計り知れない。一方、技術の暴走も危惧され、研究者・科学者として、利用倫理も考えてゆかねばならない。

重点課題	① 通信技術 (ハード・ソフト)：NTT・NHK・医療・開発メーカー	② 組織運用 (システム化)：省庁・自治体・医療	③ 将来展望 (課題・応用・検証)：教育・法令
課題10項目			
1) Networkを利用したMicroscopy：基礎・応用・理論・装置	○ (優先度1)	○ (優先度2)	
2) リモート操作(観察・撮影・解析・保守・修理)	○ (優先度1)	○ (優先度2)	
3) 遠隔地間利用の推進(共同研究・共同利用・データ共有・データ解析)	○ (優先度2)	○ (優先度1)	
4) データ通信技術	○ (優先度1)		
5) 情報セキュリティ			○
6) SNSを用いた応用		○ (優先度1)	○ (優先度2)
7) 倫理とコンプライアンス			○ (優先度1)
8) 人材育成と社会貢献：国際協力			○
9) ソフト・ハードの開発	○		
10) 映像フォーマット・コーデックの国際標準化	○		

この研究部会の研究会は学会事務局を介して全会員に周知され、より詳しい情報の希望者には、以下のメールアドレスに登録申し込みをいただければ、随時情報発信したい。なお、非会員で研究部会に関心のある方、研究会に参加希望の方は、以下の『Network Tele-Microscopy 研究部会』の20名の幹事を通じて、代表幹事に連絡いただきたい。より多くの関係各位の参加をお待ちしている。

幹事および事務局：

石丸雅大(日本FEI株式会社)、市川聡(大阪大学)、伊野家 浩司(アメティック株式会社)、大島義文(北陸先端科学技術大学)、奥西栄治(日本電子株式会社)、加藤優太(名古屋大学)、金子賢治(九州大学)、清蔭恵美(川崎医療福祉大学)、河野日出夫(高知工科大学)、柴山環樹(北海道大学)、陣内浩司(東北大学)、藺村貴弘(朝日大学)、竹田精治(大阪大学)、田中亨(カールツァイス株式会社)、谷口佳史(株式会社日立ハイテクノロジーズ)、樋田一徳(川崎医大：代表幹事)、永瀬丈嗣(兵庫県立大学) 西竜治(福井工業大学)、光岡薫(大阪大学)、山崎順(大阪大学)(以上幹事50音順・敬称略)、山西治代(川崎医大：事務局) 連絡先： toida@med.kawasaki-m.ac.jp

情報科学が拓く EELS 解析のフロンティア

溝口照康^A

東京大学・生産技術研究所^A

Frontier of EELS analysis unveiled by information science

T. Mizoguchi^A

^A*Institute of Industrial Science, The University of Tokyo*

シンクロトロン放射光施設などを用いて測定されるのが X 線吸収分光 (XAFS), 透過型電子顕微鏡を用いて測定されるのが電子エネルギー損失分光 (EELS) であり, 基本的に XAFS と EELS は等価な情報を与える. XAFS/EELS の立ち上がり (吸収端) から数十 eV 付近に現れる吸収端近傍微細構造 (XANES および ELNES) 領域と, それ以降に現れる広域吸収微細構造 (EXAFS および EXELFS) 領域に分けられ, それぞれの領域から別の種類の情報を得ることができる.

XAFS と EELS はそれぞれ異なる利点を有している. 極微量な元素からのスペクトル測定や, 短時間現象の計測には XAFS が有利である一方で, EELS の利点は空間分解能に尽きる. EELS は原子分解能でバルクのスペクトルを取得できる唯一無二の手法である.

近年では, それら分光計測実験をとりまく状況は大きく変化している. 電子顕微鏡の空間分解能の向上や, シンクロトロン放射光の感度の向上など, 装置的な発展により, 空間・時間分解計測が容易になり, 一度の実験で数千から数万本の実験スペクトルを得ることができる. そのような実験スペクトルをこれまで通り, 専門の研究者が一本一本, 理論計算や専門知識を用いて解析することは非常に困難である.

そのような中で, 材料科学の分野では新しい研究手法として情報科学が注目を集めている. 半導体やセラミックス, 電池, 触媒などのマテリアル研究に機械学習などの人工知能技術を組み合わせた「マテリアルズインフォマティクス」は近年盛んに行われている. その歴史は比較的早く, 2005 年に Krishna Rajan 博士の “Materials Informatics” という記事が Materials Today 誌に掲載され, 2006 年には米国材料学会の学会誌 MRS Bulletin に “Materials Informatics” の特集号が組まれている. その後, 2011 年にスタートした Materials Genome Initiative プロジェクトにより, 「マテリアルズインフォマティクス」が特に注目を集めた.

また, マテリアルズインフォマティクスの勃興と同時期の 2012 年に, トロント大学の Alex Krizhevsky 博士, Geoffrey Hinton 博士らにより Deep Learning が発表され, 人工知能技術も大きく進歩した. 2016 年には, Google 社が開発した人工知能 Alpha Go が碁の世界チャンピオンに勝利し, 人工知能技術が一般的に脚光を浴び, わずか 1 年後に Google 社は同 Alpha Go に圧勝する人工知能 Alpha Go Zero を発表している. また, 最近では人工知能の学習形態を人間が “学習” し, 悪手を指すことで人工知能を混乱させて人工知能を破る方法も紹介されている. 人工知能技術において世界をリードしてきた Google 社であるが, 最近では同技術を量子化学計算や, 機械学習ポテンシャル研究, さらにタンパク質の構造決定などに人工知能を活用し始めている.

そのような情報科学手法を活用する上でデータが本質的に重要になる. データに関する環境も急速に変化している. Materials Project や NOMAD のような web 経由で公開しているものもあれば, Scientific data や Data in Brief のように雑誌として公開しているものもある. 最近では完全結晶を対象とした材料データベースに加え, 二次元化合物や触媒に関する専門のデータベースなども存在している. また Materials Project では第一原理多重散乱法の FEFF9 コードで計算された ELNES/XANES スペクトルを 80 万個公開している. これらのデータベースは, 実験・計算を問わず (多くの場合無料で) 公開されている. いずれにせよデータの価値は近年急激に増しており, いかんにして意味のあるデータを, 利用できる形式で所有している (もしくはアクセスできる) か, そしてそのデータを活用するための技術を持っているかどうか, 今後の研究力や開発力に直結する時代が到来している.

以上のような状況の中, 筆者の研究グループは, それまではシミュレーションとナノ計測を用いた物質の原子・電子構造解析を行ってきたが, 2015 年ごろから機械学習を研究に取り入れ, 格子欠陥 (界面や表面) の解析 [1–8] やスペクトル解析 [9–16] に利用してきた.

本研究では, これまで EELS から取得することが困難と考えられてきた情報を「フロンティア」

としてとらえ、機械学習によりそれらフロンティアに関する情報を直接抽出した研究について紹介する。具体的には、以下の3つのトピックスについて紹介する予定である。

1. 分子量などの示量性物性の決定 [13]
2. 動径分布関数の決定 [10]
3. 価電子から伝導体を含む全電子構造の決定 [16]

謝辞

本発表で紹介する研究は、(当時)大学院生の Poyen Chen 氏, 高原泉氏, 清原慎 博士 (現・東北大学), 菊政翔氏, 助教の柴田基洋博士との共同研究である。また本研究では JST-CREST, 科研費のサポートを受けた。ここに謝意を表する。

参考文献

- [1] S. Kiyohara and T. Mizoguchi, *Effective Search for Stable Segregation Configurations at Grain Boundaries with Data-Mining Techniques*, *Physica B Condens Matter* **532**, 9 (2018).
- [2] S. Kiyohara and T. Mizoguchi, *Searching the Stable Segregation Configuration at the Grain Boundary by a Monte Carlo Tree Search*, *J Chem Phys* **148**, 241741 (2018).
- [3] H. Oda, S. Kiyohara, and T. Mizoguchi, *Machine Learning for Structure Determination and Investigating the Structure-Property Relationships of Interfaces*, *Journal of Physics: Materials* **2**, 034005 (2019).
- [4] R. Otani, S. Kiyohara, K. Shibata, and T. Mizoguchi, *Prediction of Interface and Vacancy Segregation Energies at Silver Interfaces without Determining Interface Structures*, *Applied Physics Express* **13**, 065504 (2020).
- [5] S. Kikuchi, H. Oda, S. Kiyohara, and T. Mizoguchi, *Bayesian Optimization for Efficient Determination of Metal Oxide Grain Boundary Structures*, *Physica B Condens Matter* **532**, 24 (2018).
- [6] H. Oda, S. Kiyohara, K. Tsuda, and T. Mizoguchi, *Transfer Learning to Accelerate Interface Structure Searches*, *J Physical Soc Japan* **86**, (2017).
- [7] S. Kiyohara, H. Oda, K. Tsuda, and T. Mizoguchi, *Acceleration of Stable Interface Structure Searching Using a Kriging Approach*, *Jpn J Appl Phys* **55**, (2016).
- [8] S. Kiyohara, H. Oda, T. Miyata, and T. Mizoguchi, *Prediction of Interface Structures and Energies via Virtual Screening*, *Sci Adv* **2**, e1600746 (2016).
- [9] T. Mizoguchi and S. Kiyohara, *Machine Learning Approaches for ELNES/XANES*, *Microscopy* **69**, 92 (2020).
- [10] S. Kiyohara and T. Mizoguchi, *Radial Distribution Function from X-Ray Absorption near Edge Structure with an Artificial Neural Network*, *J Physical Soc Japan* **89**, 103001 (2020).
- [11] S. Kiyohara, M. Tsubaki, and T. Mizoguchi, *Learning Excited States from Ground States by Using an Artificial Neural Network*, *NPJ Comput Mater* **6**, (2020).
- [12] S. Kiyohara, K. Kikumasa, K. Shibata, and T. Mizoguchi, *Automatic Determination of the Spectrum-Structure Relationship by Tree Structure-Based Unsupervised and Supervised Learning*, *Ultramicroscopy* **233**, (2022).
- [13] K. Kikumasa, S. Kiyohara, K. Shibata, and T. Mizoguchi, *Quantification of the Properties of Organic Molecules Using Core - Loss Spectra as Neural Network Descriptors*, *Advanced Intelligent Systems* **4**, 2100103 (2022).
- [14] S. Kiyohara, M. Tsubaki, K. Liao, and T. Mizoguchi, *Quantitative Estimation of Properties from Core-Loss Spectrum via Neural Network*, *Journal of Physics: Materials* **2**, 024003 (2019).
- [15] S. Kiyohara, T. Miyata, K. Tsuda, and T. Mizoguchi, *Data-Driven Approach for the Prediction and Interpretation of Core-Electron Loss Spectroscopy*, *Sci Rep* **8**, 13548 (2018).
- [16] P. Y. Chen, K. Shibata, K. Hagita, T. Miyata, and T. Mizoguchi, *Prediction of the Ground-State Electronic Structure from Core-Loss Spectra of Organic Molecules by Machine Learning*, *Journal of Physical Chemistry Letters* **14**, 4858 (2023).

半自動ガボールウェーブレット輪郭追跡法と AI への活用法

馬場 則男^A, 前田 元^A, 馬場 美鈴^A
 工学院大学 総合研究所^A

Semiautomatic contour tracking method using Gabor Wavelets and its utilization for AI

N. Baba^A, G. Maeda^A and M. Baba^A
^ARes. Inst. for Sci. Tech. Kogakuin Univ.

最近の深層学習技術は、U-Net などのニューラルネットワークを使って電子顕微鏡画像を効果的に分析し、セマンティックセグメンテーションや領域抽出を行えるようにしている。ただし、これらの手法に必要な多数のトレーニング画像を含むデータセットを構築するのは、対象にもよるが、一般に困難なことが多い。対象が複雑かつ多様な形態を持つ電子顕微鏡画像を考えたとき、高精度のセグメンテーション結果を保証するとは限らない。こうした観点から、我々は、そのようなデータセットの生成に役立つだけでなく、それらとは対照的でもある、インタラクティブなセグメンテーション方法を提案した。すなわち、対象の輪郭近傍または輪郭上を簡易な人為操作で指示するだけで輪郭全体を追跡する手法である^{1, 2)}。電子顕微鏡画像解析の多様で実際的なニーズを満たす可能性があると考えている。

本講演では、提案手法である、ガボールウェーブレット輪郭追跡法によるセグメンテーション法について主に説明し、上記 AI への活用法についても言及する。今世紀に入って電子線トモグラフィが盛んに応用されるに至った当初から、手描きによらない3次元セグメンテーション法が主要テーマの一つであった。また、古くから連続切片法やサンプルの多数の観察像に対するセグメンテーション法も望まれていた。多くの手法が提案されてきたが、比較的には、動的輪郭法 (active contour method) が良く知られるところであろう。ガボールウェーブレット(GW)の利用は初期から考えられたが、実用的に課題があり、ここで提案のインタラクティブな手法には発展せず、ガボールフィルタバンク (Gabor filter bank) 特徴量群を用いる別手法に発展したようである。我々は、その実用性の課題を解決し、GW(ガボールウェーブレット)をデジタル画像処理に都合の良い狭い範囲のカーネルに閉じ込めることに成功した (直流成分ゼロ型 GW)。しかも、GW の設定に必要なパラメータを最小限に削減し、1対2の矩形(カーネル)の辺サイズと周波数だけ (2つのパラメータ) とし、かつ、ユーザーはそれらのパラメータを知らずに済むようにした。(パラメータフリー) これにより、ユーザーは、画像を画面上で見ながら簡単な操作で輪郭を追跡できるようにした。我々が GW を用いる理由は、神経科学分野で認知されているように、視覚細胞受容野の形を良く記述しているのが GW であることから、この関数が画像の輪郭検出に極めて有用であろうと期待されたからである。図 1 は、GW のカーネルと輪郭との畳み込み積分(b)によってガボール特徴量マップ (GFM(Gabor feature map)) を生成し、その最大値位置から輪郭位置と接線方向を求め(a)、輪郭を追跡するアルゴリズムを示したものである。この説明では、ユーザーは、輪郭近傍に開始点(start point)を指定するのみであり、あとは自動で輪郭点が連続して求まる(c)。細胞膜のようなリッジライン、平均濃度の

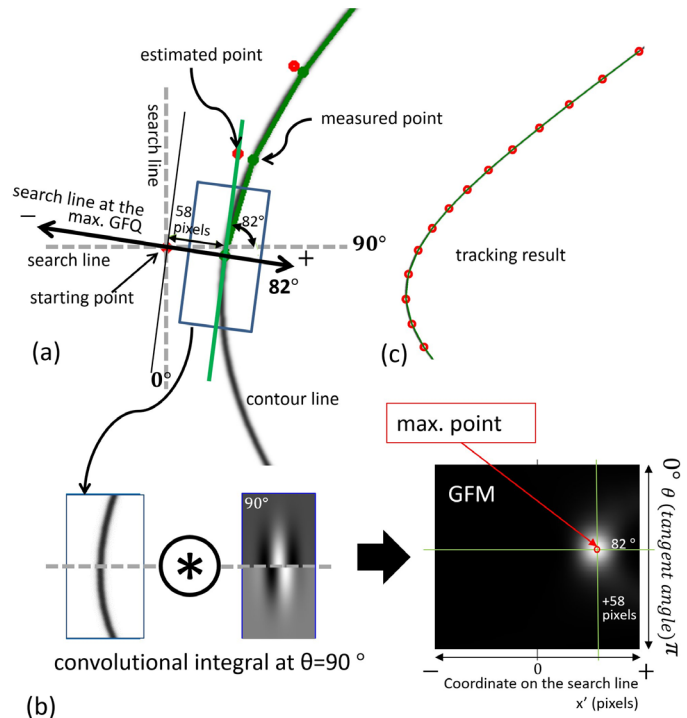


Fig.1 Flow of the normal automatic tracking algorithm after a point near the contour is specified.

この説明では、ユーザーは、輪郭近傍に開始点(start point)を指定するのみであり、あとは自動で輪郭点が連続して求まる(c)。細胞膜のようなリッジライン、平均濃度の

K-3

異なるステップエッジ、あるいはパターン境界の輪郭に対して機能する。実際の輪郭追跡においては、図2の実例のように、かなり接近した輪郭同士や曖昧な輪郭部分もある。このため、画面上でユーザーが行う操作に幾つかのモードを用意した。確実に追跡するために、短い線分（理屈上は3点の輪郭点指示）を輪郭上の開始位置に描くだけで自動追跡するモードも用意した。我々がこれまで試みた実際例及びシミュレーション結果からは、GW法は微妙なパターン境界線の境界線やS/Nの低い輪郭に対してもかなりの正確さでトレースする能力があることを確認している(図3)。ただし、実際のところ、こうした不鮮明な輪郭に対しては、本手法は開始位置に描く短線によっていわば誘導される形で滑らかに追跡する特徴があり、恣意性があることは事実である。それでもある誤差の範囲では有効に機能するし、この誘導の特徴が現実的な輪郭追跡に役立つことも事実である。例えば、不鮮明な輪郭が部分的にあると、自動追跡の途中で逸脱が起きたり、隣接する他を誤追跡することもある。こうした場合の人為的修正に利用している。

図3に、本手法の輪郭検出の高い能力を示すシミュレーション結果を示した。(a)の追跡結果はリッジラインの雑音像(b)に対して応用したものである。(b)は、明瞭な黒細線にS/N約0.8相当の雑音像を加えたもので、結果は正確に元の黒細線を追跡した。そのときのガボールウェーブレットの実数部を図に挿入した。(c、d)は、さらに本手法の強みであるパターン境界に適応した結果である。図では見難いが矢印でその境界を示したところを自動追跡した。(c)の上半分は境目の左右で僅かに異なるパターンをそのまま貼り合せ、下半分はさらに難しく、境目を中心に両パターンをある幅で重畳させた。それでもほぼ境目を追跡した。

本手法は生物系画像のみでなく、材料系の同様な研究テーマにおける電子顕微鏡像にも、また、SEM像や一般画像にも応用可能である。

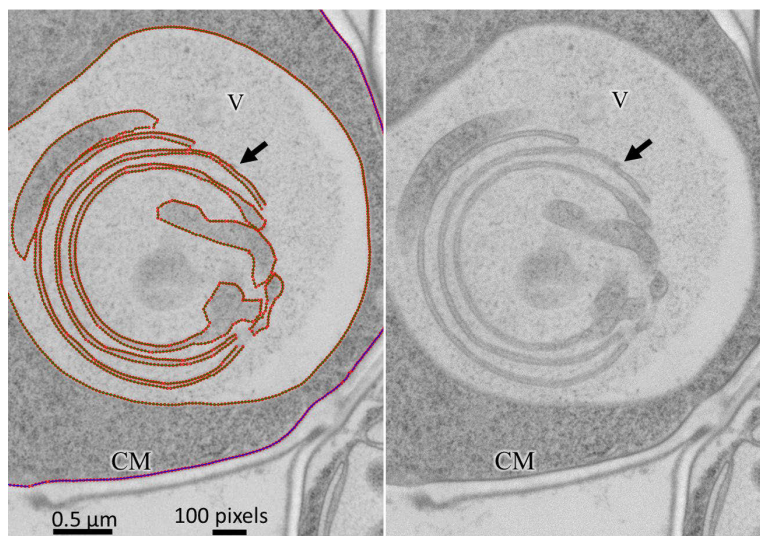


Fig.2 Application of the proposed method. Tracked lines shows a result of a complex vacuolar membrane morphology appeared in yeast cell (*Pichia pastoris*).

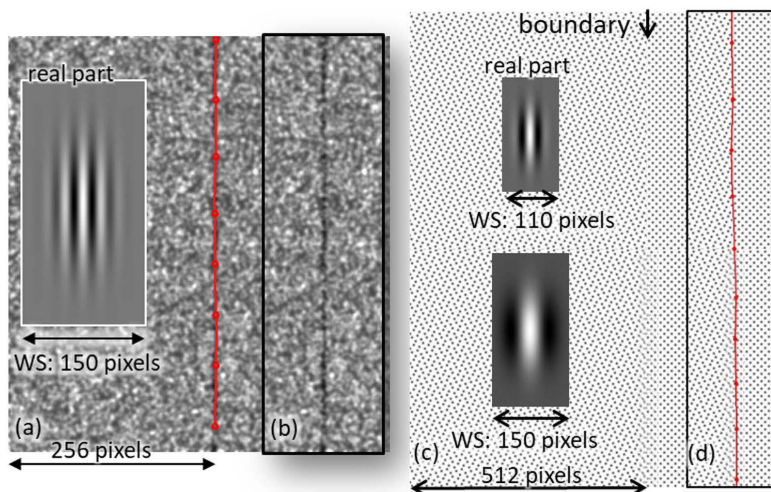


Fig.3 Simulation results of the proposed method. Tracked lines and dots (a & d) show the results. Details are explained in the text.

[1] G. Maeda et al., *Microscopy*, (2023), (doi.org/10.1093/jmicro/dfad018)

[2] 前田 元、他、*Bioimages*, Vol.31, pp.1-17, 2023

クライオ EM, ED 解析と AI 測定

米倉 功治

理研 放射光科学研究センター, 東北大学 多元研

Cryo-EM, ED analyses and AI data collection

K. Yonekura

RIKEN Spring-8 Center, IMRAM Tohoku Univ.

クライオ EM の単粒子解析は、分子量の比較的大きなタンパク質の構造解析法として大きく発展した。理想的な試料では、原子が分離して解像される分解能が達成されている。一方、氷中に分散した分子の電子顕微鏡像の処理は、分子量が小さくなるほど難しくなる。分子量数万未満のタンパク質や、有機化合物の構造解析には、試料の結晶化が必要である。ところが、結晶化は難しいことが多く、微小な結晶やごく薄い結晶しか得られないこともよく経験される。X 線に比べ電子線は試料と 4-5 桁も強く相互作用するため、X 線回折にはサイズが満たないこのような結晶や化合物の結晶微粉末から回折点が得られ、原子分解能で構造決定できることも多い。私たちは、この電子線三次元結晶構造解析 (3DED, マイクロ ED とも呼ばれる) と単粒子解析を用いて、より詳細な化学情報を引き出すことに興味を持っている。

X 線は原子核の周りの電子によって、電子線は、原子の周りのクーロンポテンシャルによって散乱される。電子線のこの特性を利用して、高分解能単粒子解析と 3DED による電荷の可視化と化学結合の測定について、最近、報告した (図 1, 2) [1, 2]。

より詳細な構造を解析するために、単粒子解析で要求される分子像の数は指数関数的に増加する。3DED においても、複数の結晶からの回折データの統合は解析精度の向上に有効である。そこで、データの自動測定が必要となるが、従来の画像処理の適用限界や機械的な精度の問題で、人間が関与しなければならない領域はまだ大きい。問題の解決のために、私たちは AI を利用して電子顕微鏡を制御するシステムを開発した [3]。現在、クライオ EM の画像と回折データの測定に非常に役立っている。

シンポジウムでは最近の解析例、AI によるクライオ EM 制御、X 線自由電子レーザー(XFEL)による結晶構造解析との比較 [2]、両線源の相補活用などについて紹介したい。

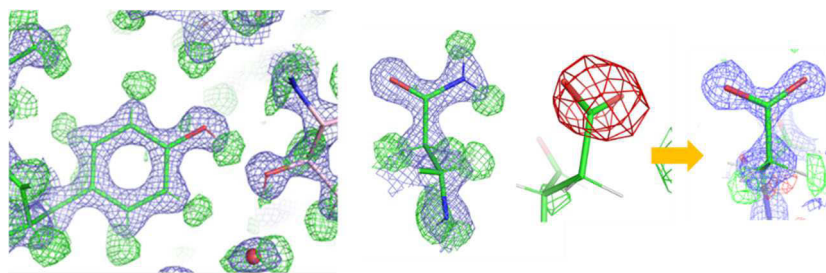


図 1. タンパク質中のアミノ酸の詳細構造。緑と赤の網目は実験データとモデルとの重み付け差フーリエマップで、それぞれ水素原子と負電荷に対応 [1]。

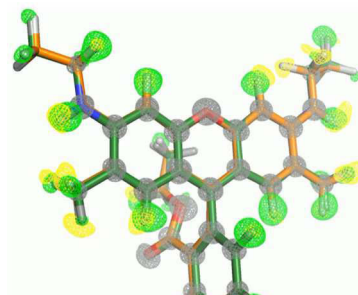


図 2. 蛍光分子ローダミン 6G の結晶構造の重ね合わせ。緑は XFEL、黄色は電子回折の測定データからそれぞれ得られた水素原子を表す。水素原子は、XFEL では結合相手の原子により近い位置に観察される。水素以外の原子位置 (灰色) はほぼ一致する [2]。

1. Mak-Yonekura, Kawakami et al., Measurement of charges and chemical bonding in a cryo-EM structure. *Commun. Chem.* (2023).
2. Takaba, Mak-Yonekura et al., Structural resolution of a small organic molecule by serial X-ray free-electron laser and electron crystallography. *Nat. Chem.* (2023).
3. Yonekura et al., Machine learning-based real-time object locator / evaluator for cryo-EM data collection. *Commun. Biol.* (2021).