

生物組織切片の広域モンタージュ技法

..高精度ステージとオート機能充実による高精細 SEM 画像の巨大つなぎ写真作成..

小倉 一道、山田 貢、平原 修、箕田 政顕 日本電子(株) SM 事業ユニット/SA・SM 設計室

ウルトラマイクロトームで切り出した 1 枚の生物切片に対して、高倍率での情報すなわち細胞内の微細形態情報を保ったまま全領域を画像化することは容易ではありません。例えばメッシュに載せた切片の TEM 観察ではメッシュ部分の情報が欠落してしまいます。それを解決する一つの可能性は、平坦な基板の上に切片を載せて FE-SEM を使って切片の全領域のつなぎ写真を作成することです。試料が四酸化オスmium (OsO₄) などの重金属で十分に染まっていれば FE-SEM の反射電子像で組織の微細形態は十分に観察することが可能です。また、切片の表面側からの観察により切片の全面が欠落なく観察できます。本アプリケーションノートではこの FE-SEM 反射電子像を使ったマウス脳組織切片の広域視野のつなぎ写真作成の事例を紹介しします。

一般につなぎ写真を作成する場合、実際の SEM の操作としてはノリシロ部を考慮して隣接する複数の視野の写真撮影していきませんが、いざ写真をつなぎ合わせようとするときに位置ずれが大きくなり、最終的にはどこかで無理が出てくるのが実態です。これはステージ移動量が一定でないことや、一枚ずつの画像に歪みがあることが原因です。したがって、人が手動で行うことのできるつなぎ写真の数は縦横 5 視野ずつの計 25 枚~数十枚程度です。しかし、1 枚の切片に対して細胞内の微細形態が観察できる 20000~30000 倍の倍率で全領域のつなぎ写真を作成するためには数千枚という写真の取得が必要となります。また視野ごとの位置決めや焦点合わせなど膨大な時間がかかります。とても人が手動でできる作業ではありません。それではなぜマウス脳組織切片の広域視野のつなぎ写真が成功したのか、以下に試料、手法、およびつなぎ写真の結果とその評価を紹介しましょう。なお、ここで紹介する内容は、「脳組織の連続切片 1 枚ずつのつなぎ写真を作成し、更に三次元再構築して脳組織の任意の部位で脳神経組織のネットワーク (ニューロンネットワーク) を可視化する」という Harvard 大学 J. Lichtman 教授のプロジェクトにおける共同作業結果の一部です。

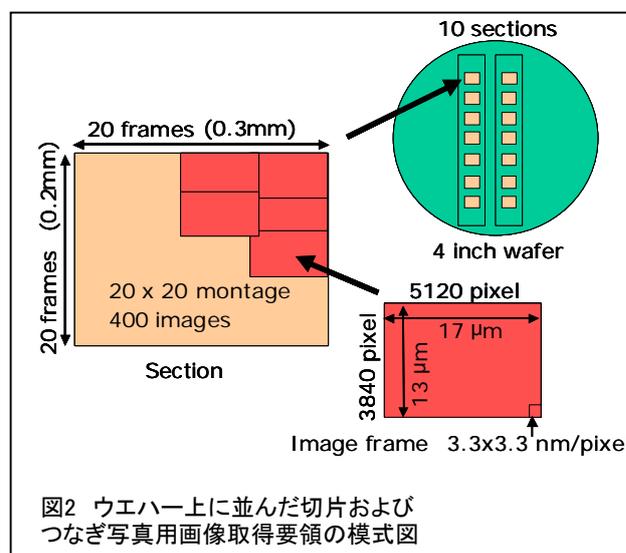
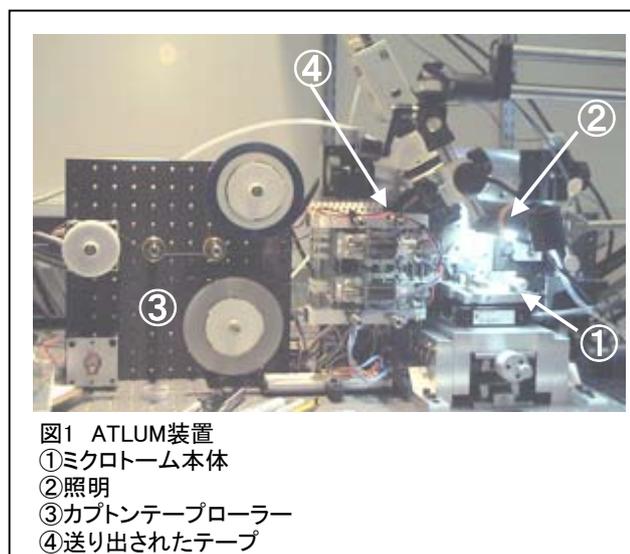
ここで紹介するつなぎ写真に用いた試料は、Harvard 大学 J. Lichtman 教授から提供されたマウス脳組織の約 50 nm の厚切り連続切片です。マウス脳組織は通常の TEM 試料作製手法に則り、グルタルアルデヒドと四酸化オスmiumによる二重固定後エポキシ樹脂包埋後、Harvard 大学が開発した ATLUM (Automatic Tape Collecting Laithe Ultramicrotome) 装置¹⁾ で切り出され、自動的に Capton と呼ばれる導電性テープに一定間隔で貼り付けられたものです。^(注1) ATLUM 装置の外観を図 1 に示します。連続切片の載ったテープは適当な長さに切られて 4 インチウエハー表面に貼り付けられ、SEM 観察 (反射電子像) に当たりウエハー表面にカーボン蒸着を施しました。

(注 1) : Harvard 大学のプロジェクトならびに ATLUM 装置に関しては以下の URL を参考にしてください。

http://www.mcb.harvard.edu/lichtman/ATLUM/ATLUM_web.htm

また、Harvard 大学は最終目的が三次元構築にあるため連続切片を作成していますが、1 枚の切片の広域視野つなぎ写真を作成するのであれば、市販のウルトラマイクロトームで切り出した切片をシリコンなどの平滑な基板上に掬い取ればそのまま観察用の試料が出来上がります。

ウエハー上に載せられた切片と、1枚の切片で縦横20枚ずつ計400枚のつなぎ写真作成の模式図を図2に示します。



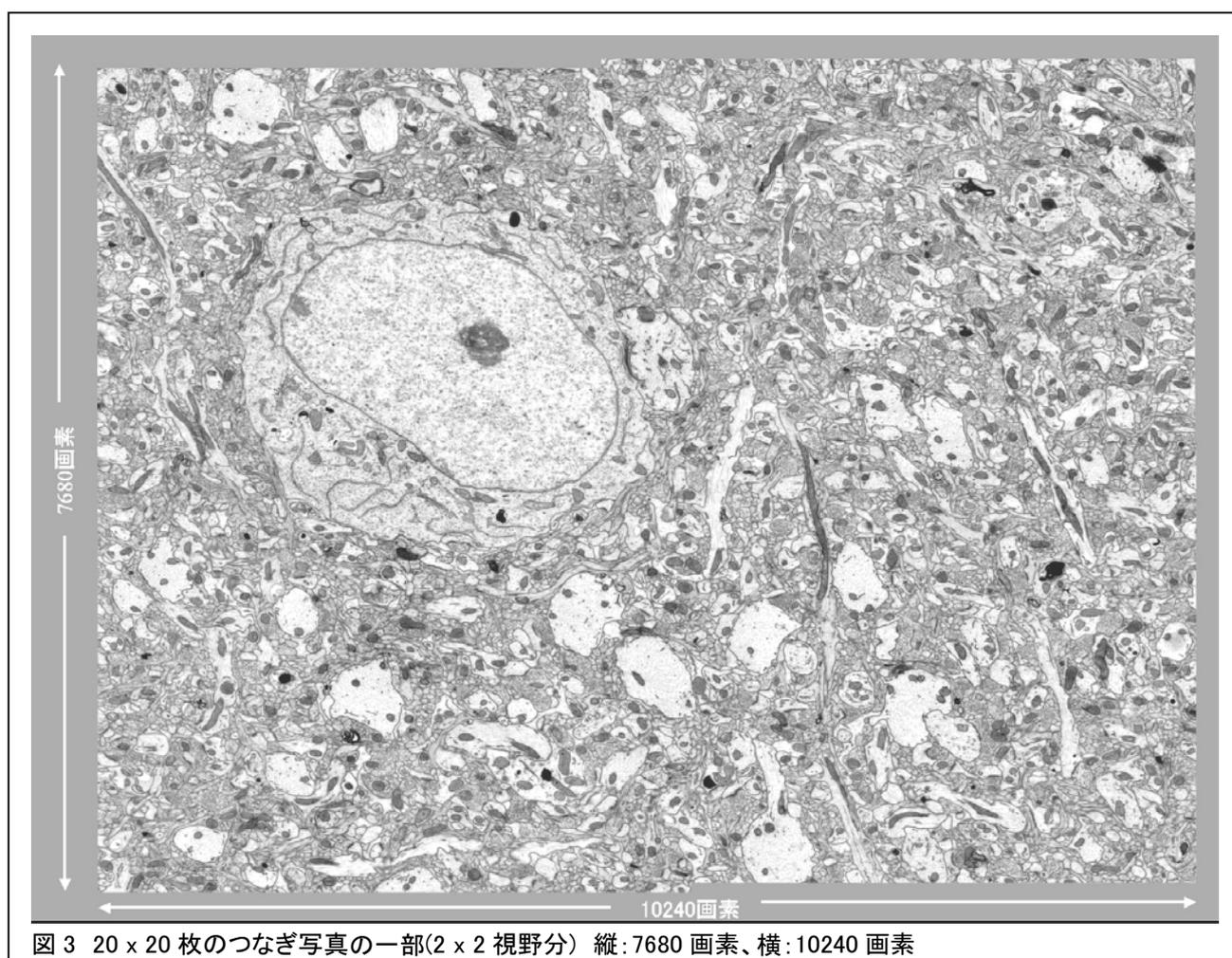
使用したFE-SEMは、高精度ステージを搭載したJSM-7001Fです。取得画像は、切片を染めている四酸化オスミウムのコントラストを観察するためYAG検出器による反射電子像です。^(注2) 写真の画素数は5120×3840画素で、撮影倍率は7000倍としました。これは、7000倍の高精細画像を取得すればデジタルズームによって細胞内微細構造を鮮明に観るために必要な20000～30000倍が容易に得られることと、写真の総取得枚数を減らすことが目的です。また隣接する視野とのノリシロ（オーバーラップ）は視野の13%としました。観察条件は50 nmの厚みの切片に対して最もコントラストがよく、かつ切片の厚み分の情報（切片の表層のみではない）を持った10 kVを選択しました。プローブ電流は反射電子像の解像度とS/Nを検討し、およそ2 nAとしました。以上の条件で1枚の写真の取得時間は60 sとしました。

(注2)：反射電子検出器はYAG検出器を使用しましたが、半導体検出器でも問題ありません。

1切片で400枚の写真撮影をするためには約7時間が必要であり、それを10切片で行うと70時間近い時間が必要です。これを人が手動で行うことは不可能であり、完全自動化が求められます。このため、自動焦点合わせ（オートフォーカス）、自動非点補正（オートスティグマコレクション）、自動画像調整（オートコントラストブライツネス）、自動画像取得および転送（オートイメージアキュイジション）、自動ステージ駆動（オートステージコントロール）の組み合わせを最適化しました。ただし、連続切片で同じ視野のつなぎ写真を作成するため、各切片でのスタート視野の位置決め（ステージ位置の入力）のみは事前に手動で行わなければなりません。また、何らかの理由でオートフォーカスが効かない状況が発生したときの対応として、フォーカスエラーに対する自己判断機能を持たせ、万一エラーが発生したときには自動的に1視野前のフォーカス条件で再撮影が実行されるようにしました。^(注3) 取得した写真は後述する相互相関演算によって自動的に位置合わせを行い、400枚のつなぎ合わせを行いました。

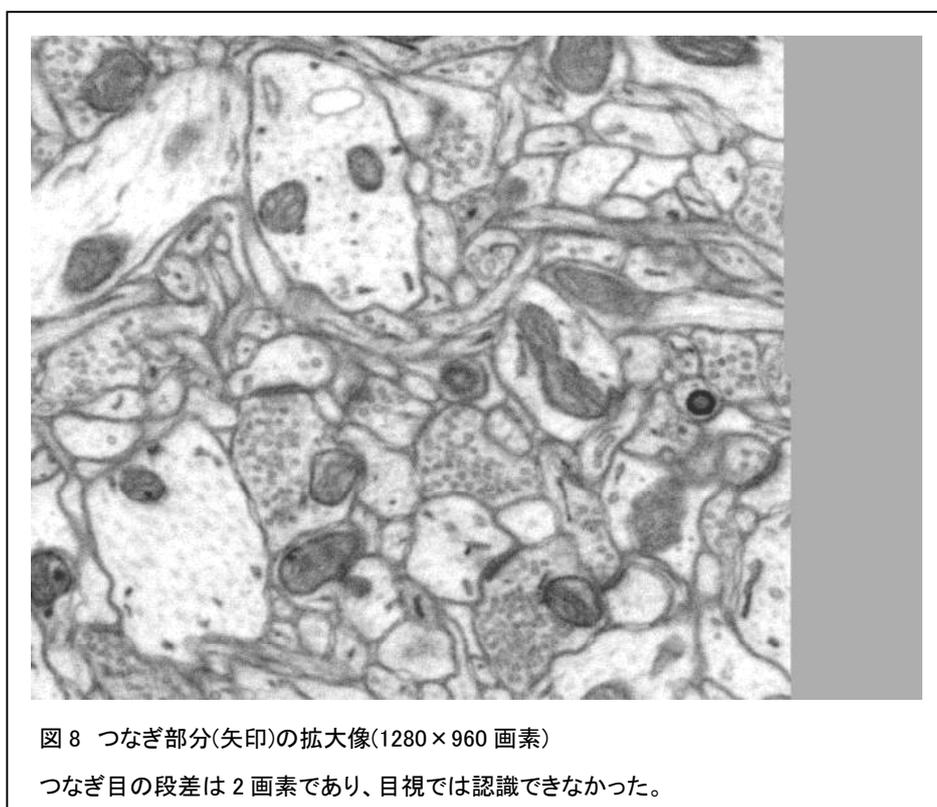
(注3)：視野がたまたま血管などの無構造な場所に来てしまうと、オートフォーカスが効かずにエラーとなります。このような場合は1視野前のフォーカス値で再撮影を行います。切片はほぼ平滑ですので1視野前のフォーカス値でも問題ありません。

さて 10 枚の切片に対して総枚数 4000 枚 (400 枚/切片) の画像の自動取得および自動つなぎ合わせを実行したわけですが、4000 枚の画像取得に要した時間は約 72 h でした。4000 枚の自動画像取得におけるオートフォーカスのエラー発生率は 0.5% で、これは切片上の染色時の残渣と見られる異物の異常コントラストと切片内の無構造領域 (細胞内の大きな空包) が存在したことが主原因と考えられます。勿論エラーが発生した場合には、前述したように 1 視野前のフォーカス値で画像の再取得が行われました。図 3 は 400 枚のつなぎ写真の一部 (縦横 2 枚ずつの 4 視野分) です。



つなぎ写真の結果としては、図 3 に示したように 400 枚のつなぎ写真上の任意の視野でどこがつなぎ目が判断できないレベルでつなぎ写真が出来上がりました。そこで 400 枚/切片で 10 組のつなぎ写真 (計 4000 枚) に対して定量的につなぎ精度を評価しました。まずは隣接し合う画像が確実にノリシロ領域に入っているのかどうかを調べました。評価手法の詳細は省きますが、結果として各切片 400 枚全ての画像において隣接し合う画像の最大ズレ量は、X、Y 軸両方向に対して ± 400 nm でした。7000 倍の画像は $17.1 \times 12.9 \mu\text{m}$ でノリシロ 13% は $1.7 \mu\text{m}$ ですので、 ± 400 nm の画像のズレはノリシロ内に十分に収まっていることが判明しました。

次に、取得した 4000 枚の画像に対して隣接する画像同士の画像歪量を評価しました。一般的に SEM 画像は周辺部すなわちつなぎ写真を作る際のノリシロ部で歪を持っています。これは電子プローブの偏向系の収差によるもので、特に低倍率でこの現象は顕著になります。つなぎ写真を作成するときにこの画像の歪が大きいと、隣接する画像とのつなぎにずれが生じてしまいます。画像歪の評価手法の詳細は省きますが、結果的には歪量は 5120×3840 画像フレームの画素中で 0 画素から 11 画素で、この量は 3840 画素に対して最大 0.3 % に相当します。この歪量は今回のつなぎ写真を作成する上では全く問題になりませんでした。図 8 は、図 3 のつなぎ部分（写真右端の上下のつなぎ目部分）のデジタルズーム画像 (1280×960 画素) です。矢印は上下 2 枚の画像のつなぎ目ですが、この部分での段差はわずか 2 画素であり、デジタルズーム画像においても目視では認識できませんでした。ただし、画像歪は視野ごとに一定ではありませんでした。このことは（画像歪はつなぎ写真を作る上で問題にはならなかったとはいえ）歪みの要因はビーム偏向系の収差ではなく、視野内での像ドリフトによる歪曲が支配的であると判断できます。このドリフトの要因としては、ステージの粘りや室温の変化が考えられます。



以上に、マウス脳組織の連続切片での巨大なつなぎ写真の自動作成を紹介しました。今回のチャレンジに当たって、つなぎ写真のためのステージコントロール、無人での画像取得のためのオート機能の確立、またつなぎ写真の結果評価法などさまざまな新技術が確立されました。

参考文献

- 1) K.J. Hayworth, N. Kasthuri, R. Schalek and J.W. Lichtman, Microscopy and Microanalysis (2006), 12: 86-87