

超大立体角EDSを用いた生物組織の 高速三次元元素マッピング

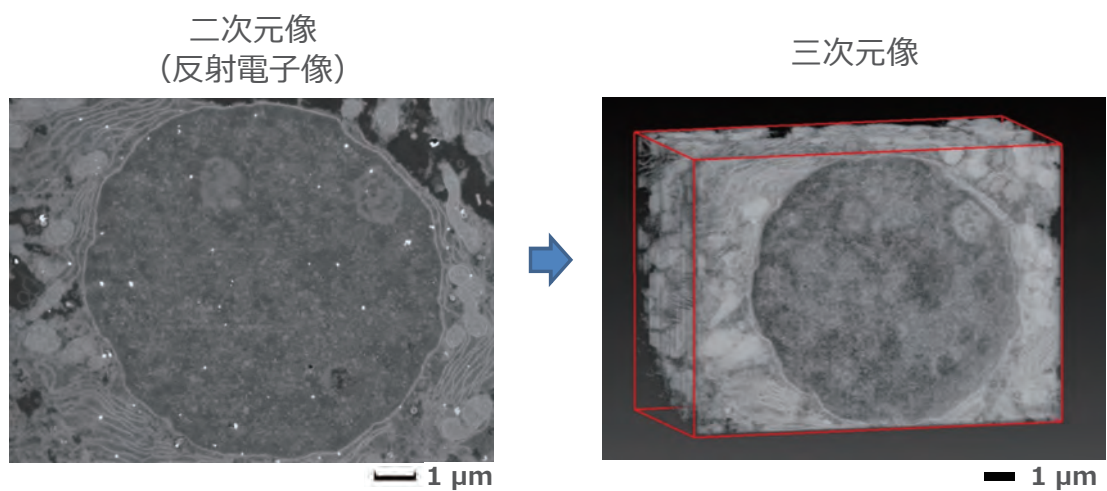
2021 SEMユーザーズミーティング

日本電子株式会社
山口 祐樹

目次

1. 三次元観察および三次元元素マッピングとは？
2. アレイトモグラフィー(AT)法について
3. ゾウリムシを用いた三次元観察および三次元元素マッピングの応用例

三次元観察とは？



試料の内部にある構造を三次元的に明らかにする観察

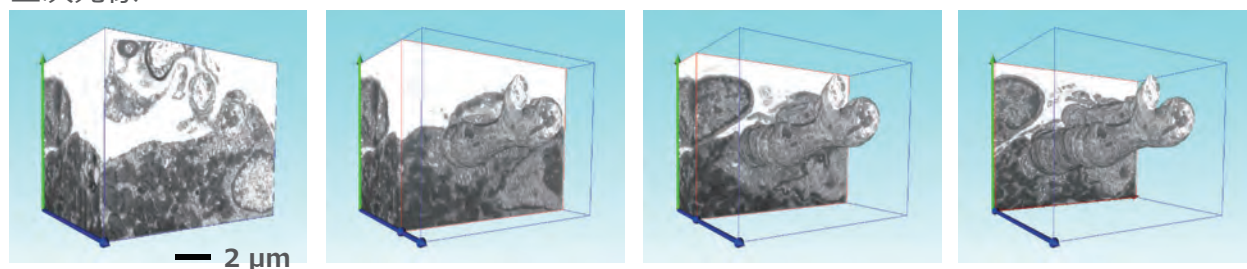
試料：マウス肝臓

3/32

Solutions for Innovation JEOL

生物組織の三次元観察例～マウス肋間筋神経近接部～

三次元像



神経終末 三次元像



ミトコンドリア 三次元像

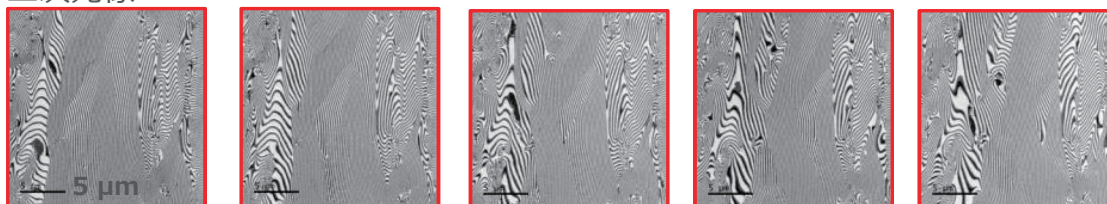


体積

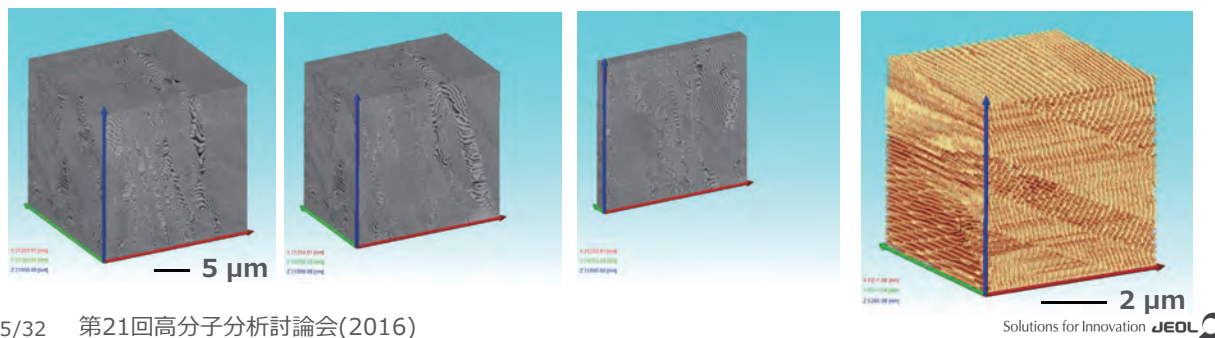
神経終末	66 μm^3
ミトコンドリア	15 μm^3
神経終末に占める ミトコンドリアの割合は22 %	

ポリマーの三次元観察例～ジブロックコポリマー～

二次元像



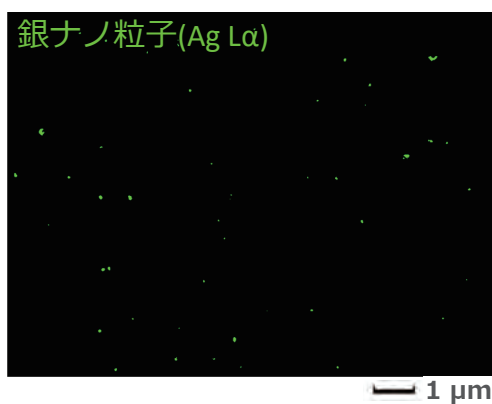
三次元像



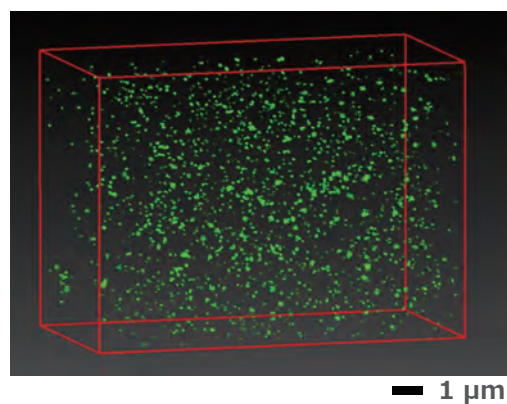
5/32 第21回高分子分析討論会(2016)

三次元元素マッピングとは？

二次元元素マップ



三次元元素マップ

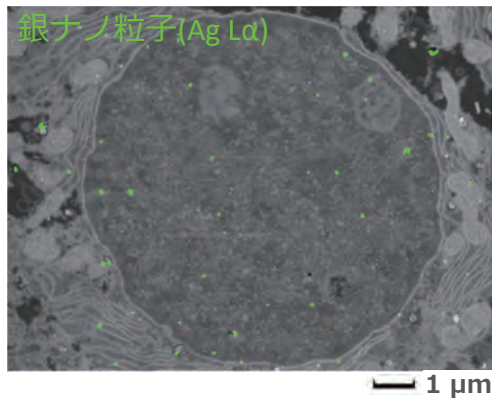


試料の内部にある元素分布を三次元的に明らかにする分析

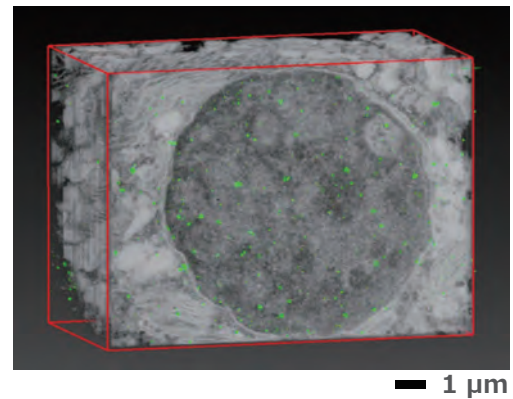
試料：銀ナノ粒子を取り込ませたマウス肝臓

三次元元素マッピングとは？

二次元元素マップ



三次元元素マップ



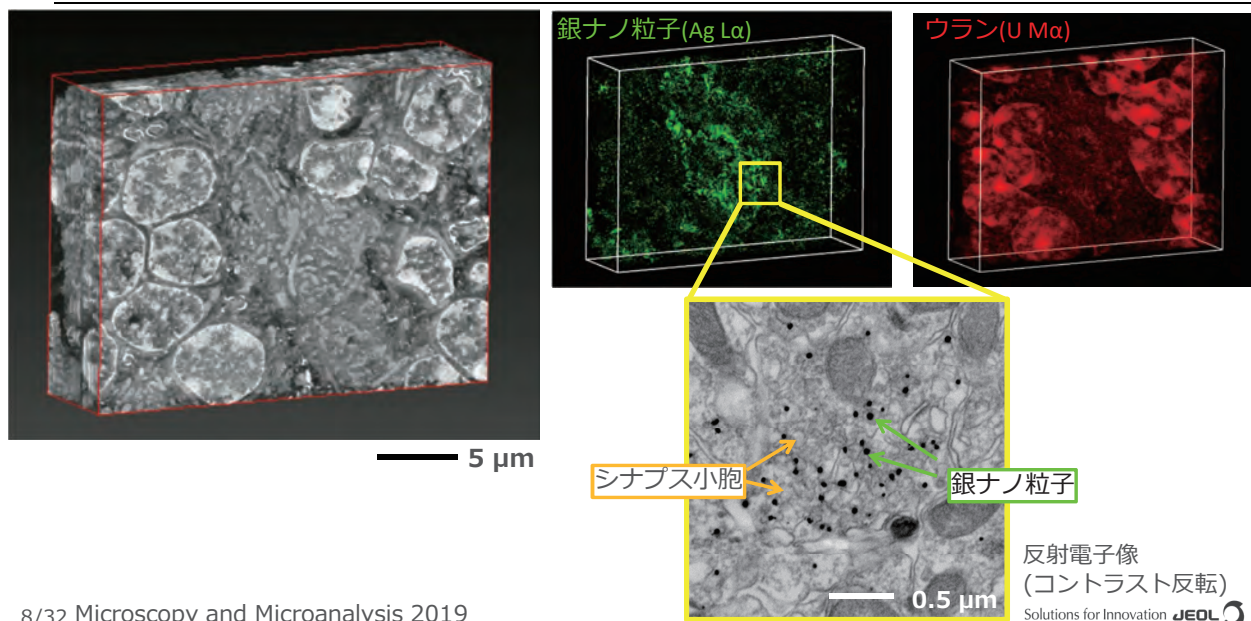
試料の内部にある元素分布を三次元的に明らかにする分析

試料：銀ナノ粒子を取り込ませたマウス肝臓

7/32

Solutions for Innovation JEOL

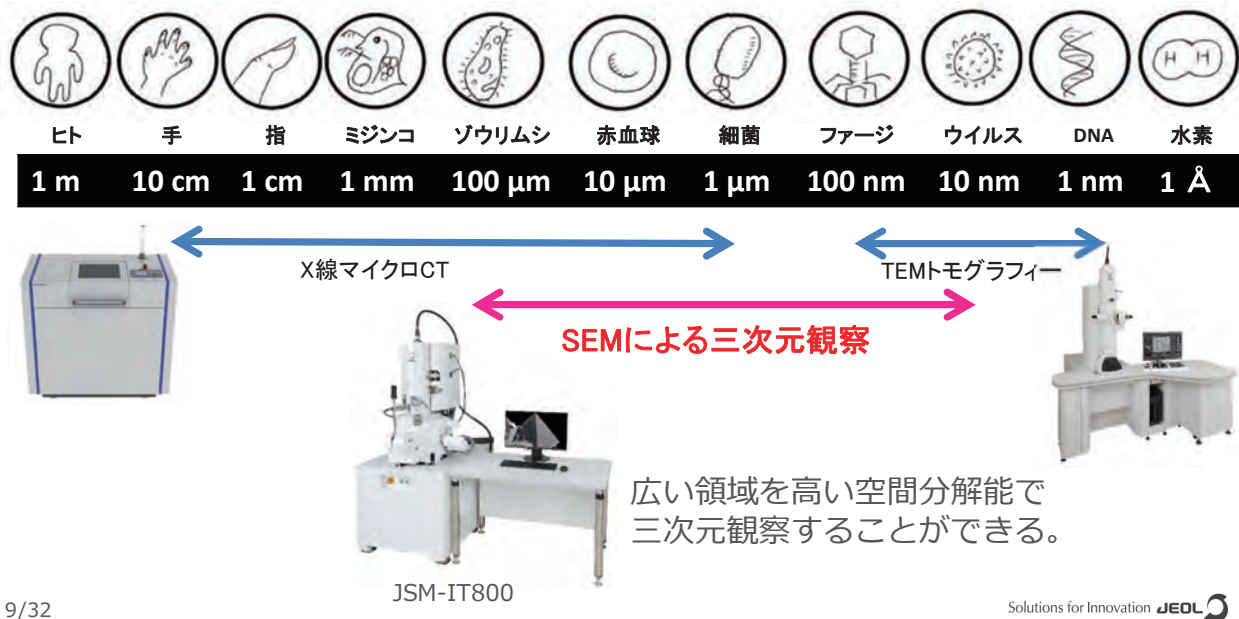
三次元元素マップ例～銀ナノ粒子で免疫染色したマウス小脳～



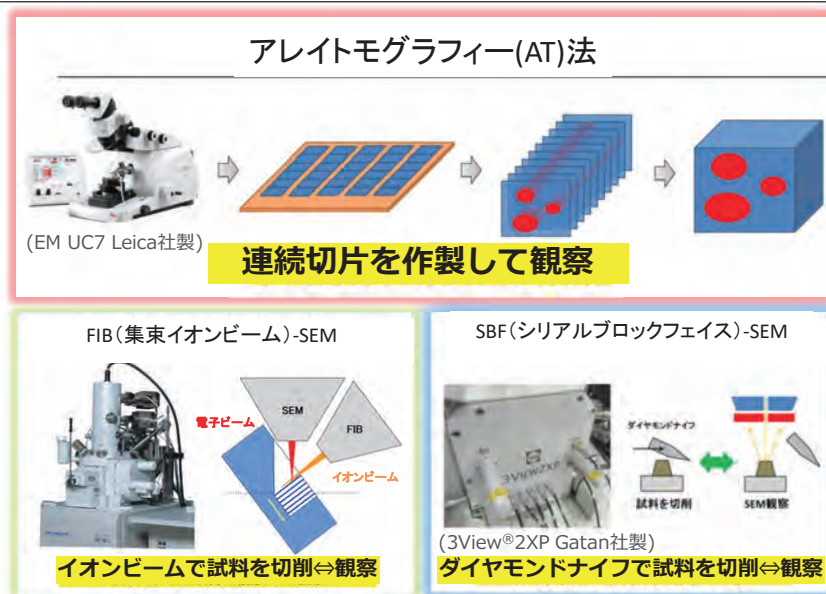
8/32 Microscopy and Microanalysis 2019

Solutions for Innovation JEOL

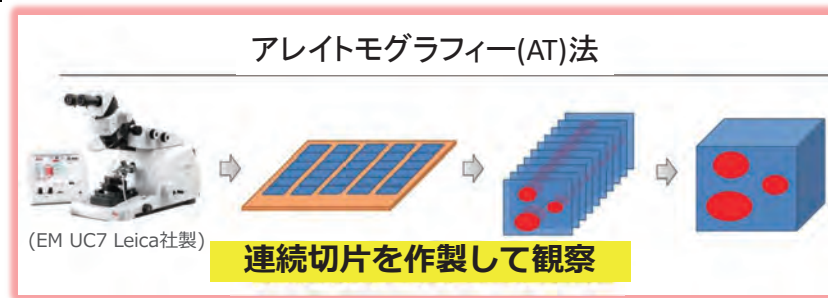
三次元観察法



SEMによる三次元観察法



SEMによる三次元観察法



メリット

- 切片が基板上に保存されるため再観察が可能
- 基板上の切片は帯電やダメージを受けにくいいためEDS分析が可能

11/32

Solutions for Innovation JEOL

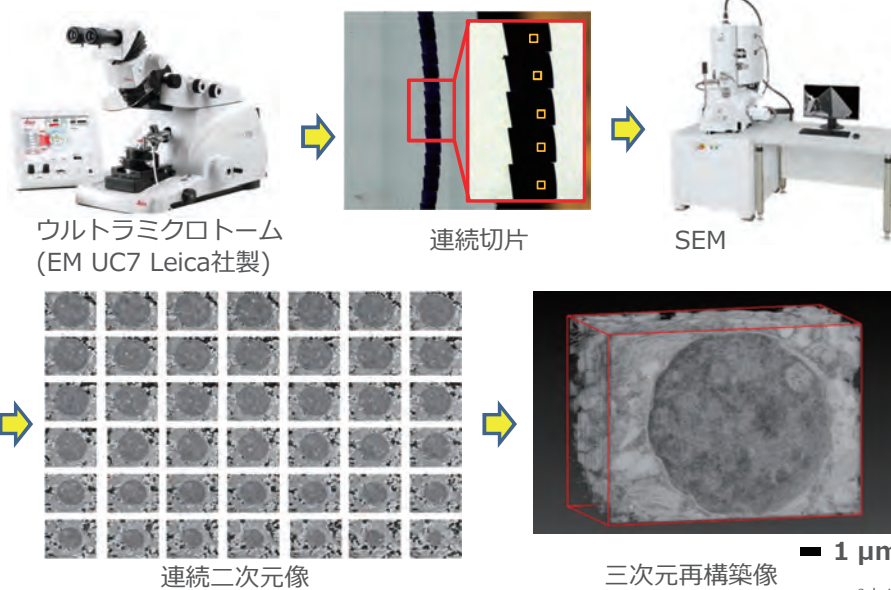
目次

1. 三次元観察および三次元元素マッピングとは？
2. アレイトモグラフィー(AT)法について
3. ゾウリムシを用いた三次元観察および三次元元素マッピングの応用例

12/32

Solutions for Innovation JEOL

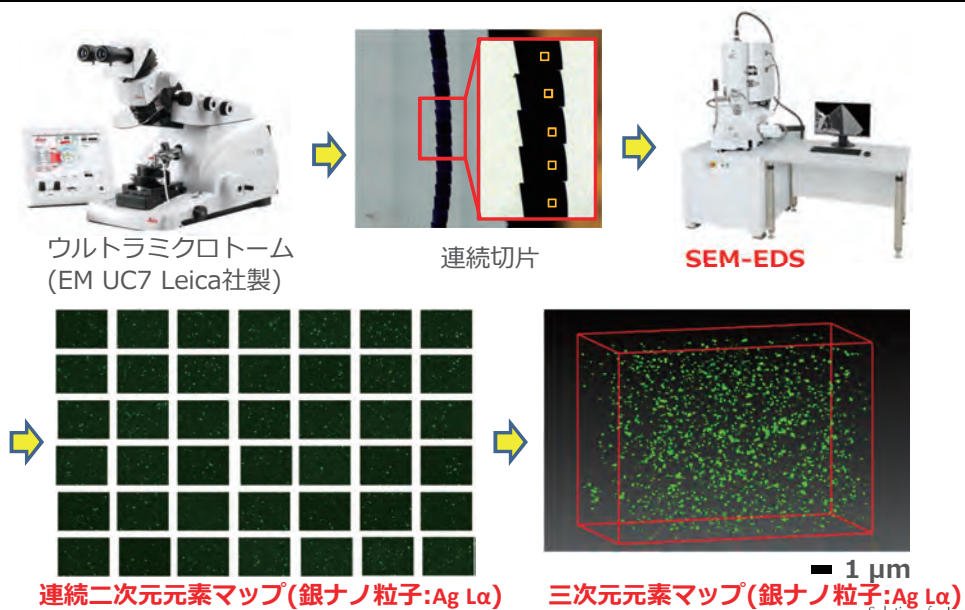
アレイトモグラフィー(AT)法による三次元観察



13/32

Solutions for Innovation JEOL

アレイトモグラフィー(AT)法による三次元元素マッピング

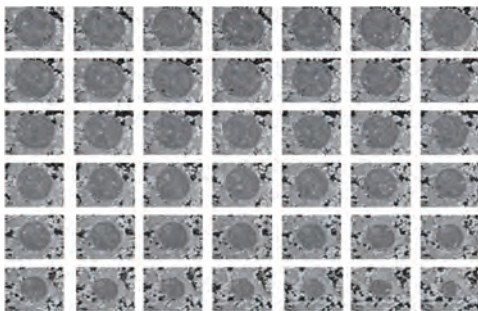


14/32

Solutions for Innovation JEOL

データ取得の高速化

連続二次元像

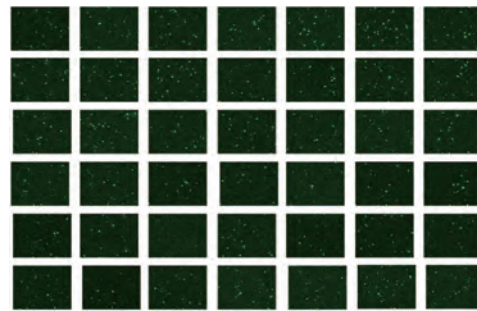


切片を1枚1枚観察するのは
手間と時間がかかる。



**自動観察ソフトウェアと
新型反射電子検出器による高速観察**

連続二次元元素マップ(銀ナノ粒子:AgLα)



切片からのX線信号は乏しく
測定には時間がかかる。

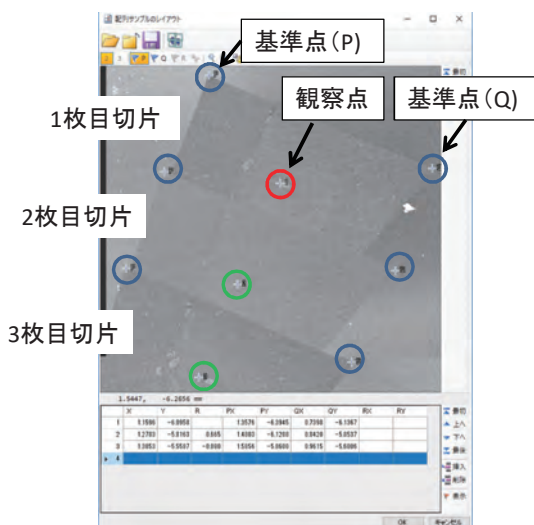


**超大立体角EDSを用いた
高速元素マッピング**

15/32

Solutions for Innovation JEOL

自動観察ソフトウェア～Array Tomography Supporter～



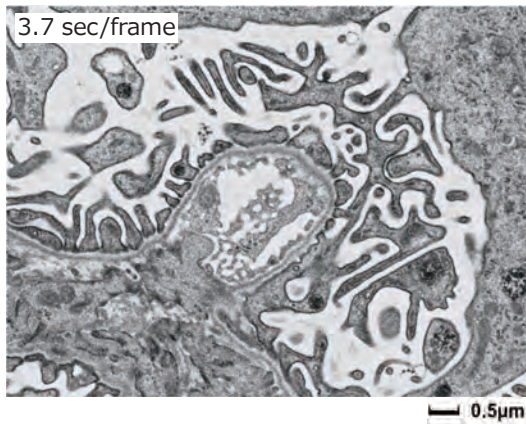
- 自動で観察位置を登録することができる。
- 自動で観察を行うことができる。

16/32

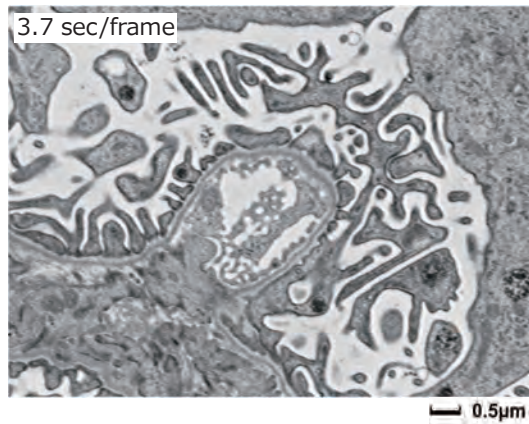
Solutions for Innovation JEOL

新型反射電子検出器

シンチレーター反射電子検出器 (SBED)



従来型反射電子検出器 (BED)



高速スキャンで観察することが可能。
(5120 x 3840 画素で取得, スキャン速度 3.7 秒/枚)

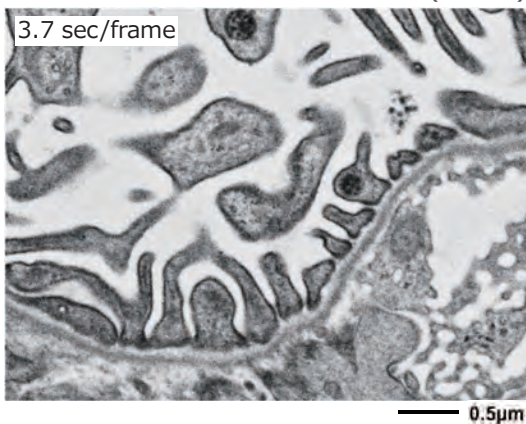
試料：マウス腎臓の超薄切片, 反射電子像（コントラスト反転）, 加速電圧 5.0 kV

17/32

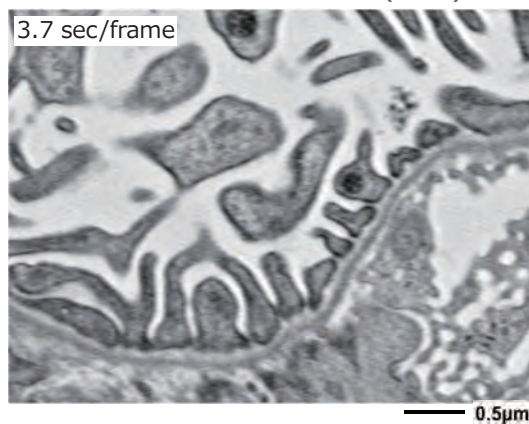
Solutions for Innovation JEOL

新型反射電子検出器

シンチレーター反射電子検出器 (SBED)



従来型反射電子検出器 (BED)



SBEDでは応答性が高いため、像の滲みが無い。

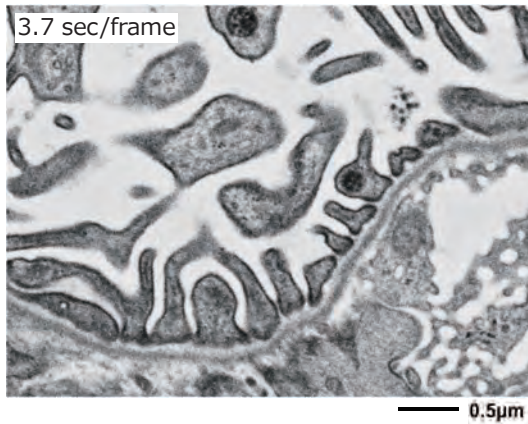
試料：マウス腎臓の超薄切片, 反射電子像（コントラスト反転）, 加速電圧 5.0 kV

18/32

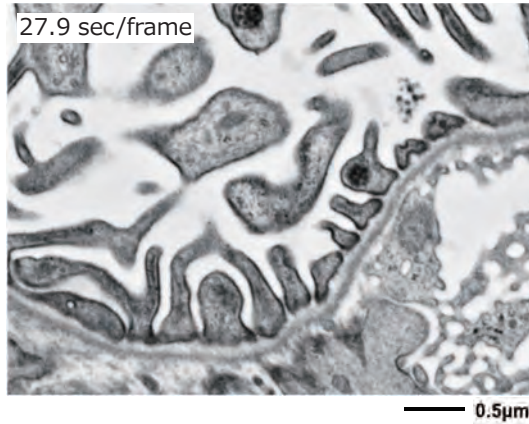
Solutions for Innovation JEOL

新型反射電子検出器

シンチレーター反射電子検出器 (SBED)



従来型反射電子検出器 (BED)



スキャン速度を遅くすることでBEDでも像の滲みが無くなるが、SBEDはその約8倍のスキャン速度で観察が可能である。

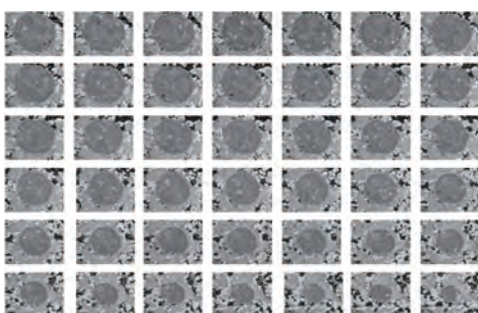
試料：マウス腎臓の超薄切片, 反射電子像（コントラスト反転）, 加速電圧 5.0 kV

19/32

Solutions for Innovation JEOL

データ取得の高速化

連続二次元像

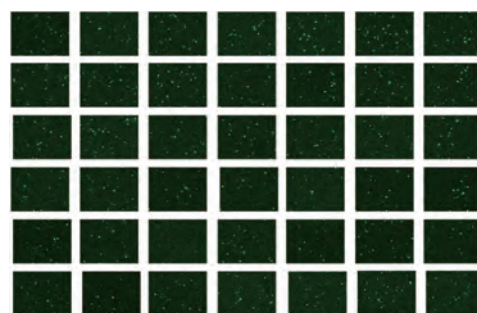


切片を1枚1枚観察するのは
手間と時間がかかる。



自動観察ソフトウェアと
新型反射電子検出器による高速観察

連続二次元元素マップ(銀ナノ粒子:AgLα)



切片からのX線信号は乏しく
測定には時間がかかる。



超大立体角EDSを用いた
高速元素マッピング

20/32

Solutions for Innovation JEOL

超大立体角EDS



XFlash®5060FlatQUAD (Bruker社製)

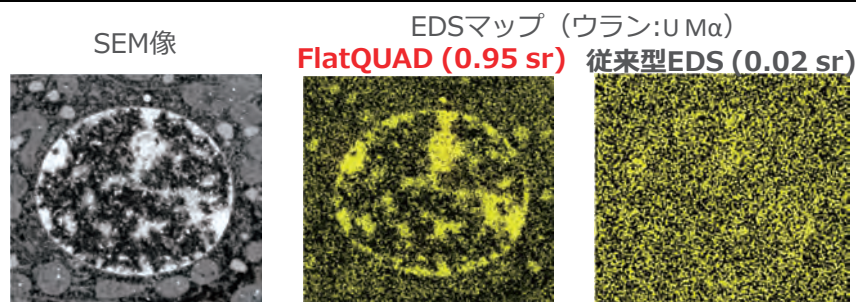


EDS検出器	検出素子	挿入位置	立体角
FlatQUAD	60 mm ²	試料直上	0.95 sr
従来型	60 mm ²	試料斜め上	0.02 sr

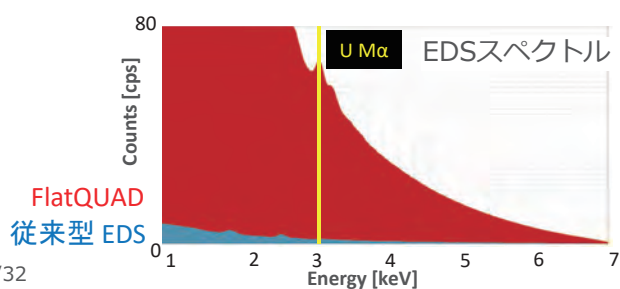
21/32

Solutions for Innovation JEOL

超大立体角EDSを用いた超薄切片の元素マッピング



※試料：マウス腎臓の超薄切片, 加速電圧 7kV, 照射電流 8 nA, 測定時間 5 分



FlatQUADは立体角が従来型EDSの約50倍なので、ウランのマッピングが明瞭に示された。

22/32

Solutions for Innovation JEOL

目次

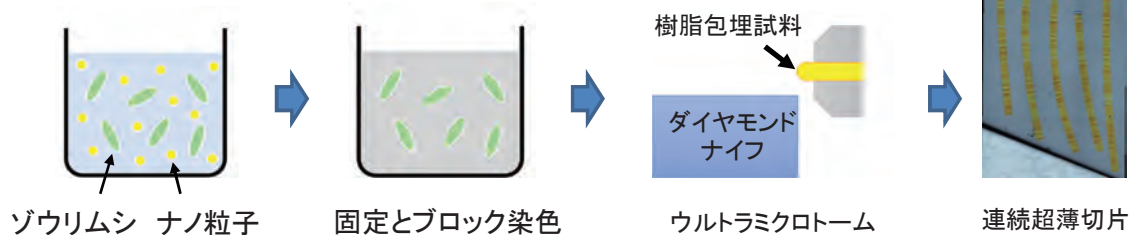
1. 三次元観察および三次元元素マッピングとは？
2. アレイトモグラフィー(AT)法について
3. ゾウリムシを用いた三次元観察および三次元元素マッピングの応用例

背景と目的

- ゾウリムシは細胞口からエサを取り込み、食胞に溜め込んだ後、体から排出する。
- 金ナノ粒子、銀ナノ粒子、シリカナノ粒子を含む溶液で培養したゾウリムシの食胞に保存された元素を明らかにしようと試みた。

試料作製

- ① ゾウリムシを金ナノ粒子（40nmφ）を含む溶液、銀ナノ粒子（40nmφ）を含む溶液、シリカナノ粒子（50nmφ）を含む溶液で順番に1時間ずつ培養した。
- ② グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで固定を行い、酢酸ウランでブロック染色を行った。
- ③ 樹脂に包埋し、200nmの厚さで連続切片を作製した。
- ④ 283枚の連続超薄切片を超平滑なカーボン板（日本電子製ウルトラフラットカーボン）に載せた。
- ⑤ 酢酸ウランとクエン酸鉛で超薄切片を染色した。



25/32

Solutions for Innovation JEOL

ゾウリムシの連続二次元像（反射電子像）

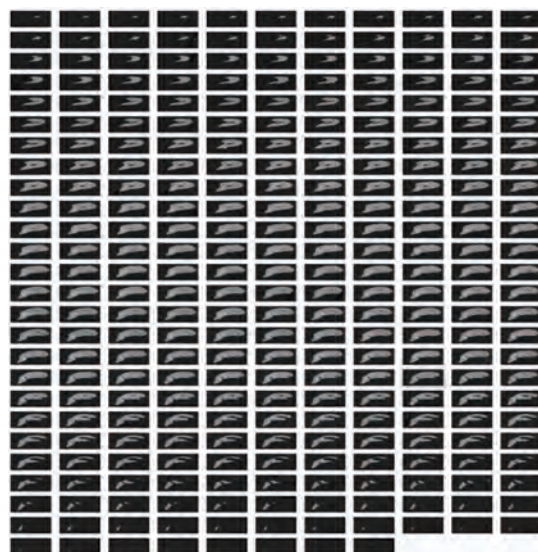


Array Tomography Supporter を使用

加速電圧： 7 kV
 倍率： x1,000
 画素数： 9710 x 3856 画素
検出器： SBED
撮像時間： 7 秒/枚
 取得時間： 67 秒/枚
 5時間17分/283枚

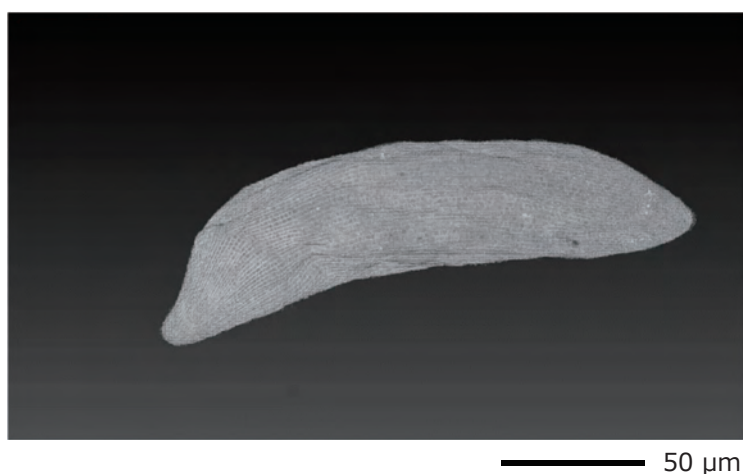
試料：ゾウリムシ

26/32



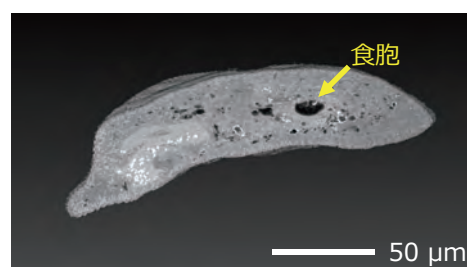
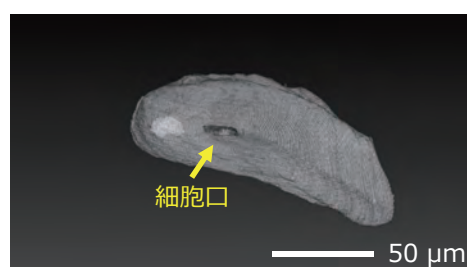
Solutions for Innovation JEOL

ゾウリムシの三次元再構築像



ナノ粒子は細胞口から取り込まれ、
食胞に保存される。

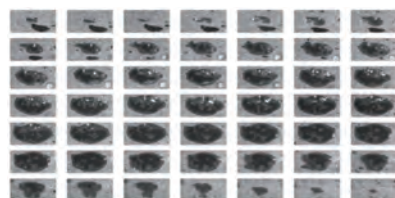
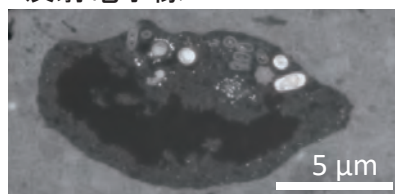
27/32



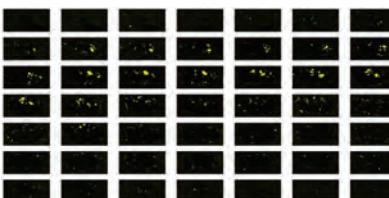
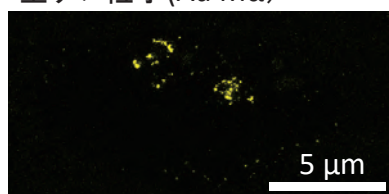
Solutions for Innovation JEOL

食胞の連続二次元元素マップ

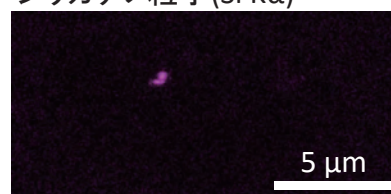
反射電子像



金ナノ粒子(Au Mα)



シリカナノ粒子(Si Kα)



加速電圧： 7 kV
倍率： x7,500
画素数： 512 x 384 画素

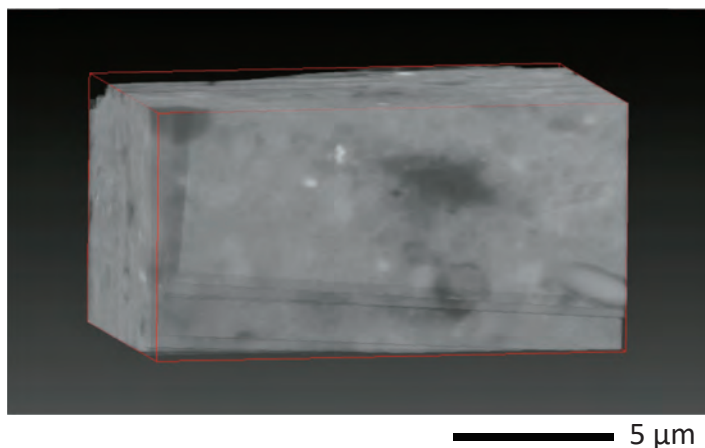
EDS検出器: FlatQUAD
撮像時間: 1 分/枚
取得時間: 2分33秒/枚
2時間8分/50枚

28/32

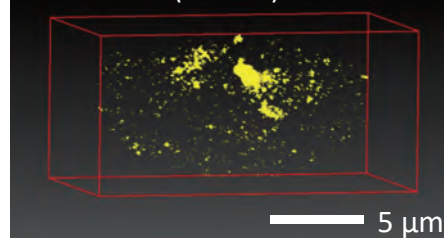
Solutions for Innovation JEOL

食胞の三次元元素マップ

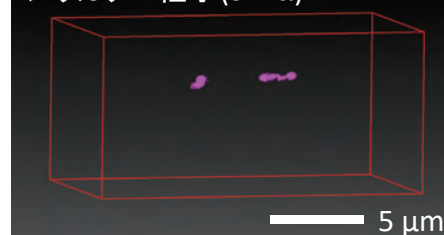
反射電子像



金ナノ粒子(Au Mα)



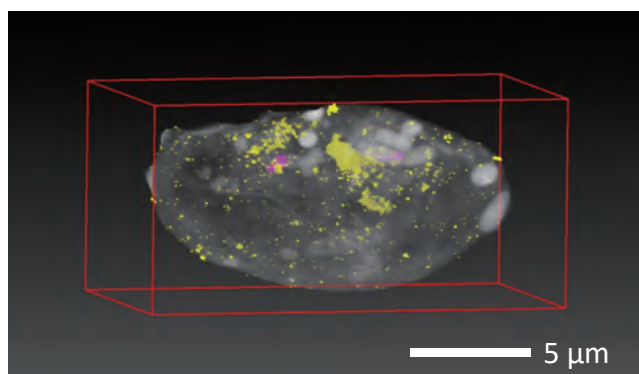
シリカナノ粒子(Si Kα)



29/32

Solutions for Innovation JEOL

食胞の三次元元素マップ



	ボクセル数	食胞全体に対する 体積分率 (%)	粒子 個数
食胞全体	2208147	—	
金粒子	6524	0.30	5656
シリカ粒子	1242	0.06	689
銀粒子	0	0	0

※三次元解析には
Colorist, Visualizer-evo(SIF社製)を使用。

- 三次元像で観察されたひとつの食胞に着目し三次元元素マッピングを行った。
- 食胞内の各粒子の偏析量は金ナノ粒子>シリカナノ粒子>銀ナノ粒子（偏析なし）となっていた。

30/32

Solutions for Innovation JEOL

超大立体角EDSを用いた生物組織の高速三次元元素マッピング

- ◆ 本システムによりデータ取得の高速化が可能である。
(自動観察ソフトウェア、新型反射電子検出器、超大立体角EDS)
- ◆ 試料内部の構造および元素分布を三次元的に明らかにできた。
- ◆ ゾウリムシの食胞内では、各粒子の偏析量が異なった。

ご清聴ありがとうございました。