

TEM トモグラフィ

古河 弘光*

1. はじめに

今世紀の初頭くらいから透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy 以下 TEM) の技法の 1 つにトモグラフィ (tomography) が加わり、今日では電子線/EB トモグラフィ、電顕/EM トモグラフィ、TEM トモグラフィ等といった名称で広く知られるようになりました。本稿ではこの TEM によるトモグラフィ (以下 TEM トモグラフィ) について、実践的なノウハウを中心に解説いたします。

“電子線”あるいは“電顕”+“トモグラフィ”というキーワードであれば、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy 以下 SEM) で撮影した連続切片像から三次元を構築するアレイ (Array) ・トモグラフィや FIB-SEM トモグラフィと呼ばれる手法もありますが、“物体を透過した信号を計算することで内部構造の再構成を行う”という狭義のトモグラフィの概念から外れていることから対象外としました。

また、トモグラフィの基本理論や三次元データの可視化、特定の分野への TEM トモグラフィの応用に関しては、本特集でもそれらを専門とされている執筆陣が控えておられますのでここでは掘り下げません。

改めて述べるまでも無く、トモグラフィが最も応用されている事例は CT (Computerized Tomography) の略称で知られる X 線を用いたトモグラフィで、その強力な透過力を活かし、生体はもちろん美術品や大型の機械装置まであらゆる物体の内部構造を非破壊で観察することを可能としています。それに比べ電子線の透過力は遙かに弱く、また高真空中にある試料しか観察できないという制約はありますが、ナノメートルという微細スケールで三次元構造を直視できる手法として、生命科学、材料科学といった分野で活用されています。

2. TEM トモグラフィの手順とソフトウェア

TEM は文字通り試料を電子線で透かし観る装置で、電子線の波長が可視光より遙かに短いという特性から光学顕微鏡の数千倍という高い分解能での観察・撮影を可能としています。この TEM を使って試料を多方向から撮影し、撮影画像の三次元再構成及び、三次元構造の観察を計算機と専用ソフトウェアによって実行する、というのが TEM トモグラフィの手順となります。

前半の撮影プロセスは試料の同一視野の撮影を傾斜角度を変えながら繰り返すという単純なもので、TEM には視野の移動を伴わずに試料の傾斜角度を変えることができるユーゼントリックという機能を備えたゴニオメータ (試料の位置、角度を調整する機構) が標準で装備されていますので、TEM トモグラフィの導入に際しては装置自体の改造や付加装置の購入は不要です。

ただ、TEM で常用されている倍率となるとその視野は数 nm から数 μm というスケールですので、いくら高精度の機構であっても試料を傾斜すれば視野が移動することになります。また試料の見掛けの厚さが変わる事で焦点位置も外れてしまいます。これらの調整を試料の傾斜の度に手動で行い、撮影を繰り返す作業は結構な労力です。そこで、各部が電子制御となった新しい設計の TEM では連続傾斜像の撮影には専用のソフトウェアを使用することがほぼ常識となっています。

これに加えて、三次元再構成や三次元構造を観察・解析する各種ソフトウェアも TEM トモグラフィに特化した形で商品化・シェアウェア化され、TEM メーカーからもそれらを統合したソフトウェアパッケージが販売されていますので、装置に合わせたシステムを導入することが TEM トモグラフィ

* 株式会社システムインフロンティア 代表取締役 社長 (〒190-0012 東京都立川市曙町 2-8-3)
TEM Tomography; Hiromitsu Furukawa (President & CEO, SYSTEM IN FRONTIER INC., Tokyo)
Keywords: electron beam, tomography, transmission electron microscope, 3d-reconstruction
2021年8月19日受理 [doi:10.2320/materia.61.35]

の準備の第一歩となります。

3. TEM トモグラフィの実践にあたって

筆者は特定の分野の研究者ではなく、こうした TEM トモグラフィ用のアプリケーションソフトウェアの開発・販売を行っている会社の代表で、TEM トモグラフィの導入や応用に関するコンサルティングやサポートをさせて頂いています。20年程前に世界に先駆けて TEM トモグラフィ用の商用ソフトウェアを企画・開発して以来、世代や加速電圧の異なる装置で、生物・材料分野の多様な試料における三次元構造の観察を様々な国や地域のお客様と行ってきました。そうした経験を通して“TEM トモグラフィの撮影及び再構成において、その成否の80~90%はソフトウェアを起動する前に決まっている。”という持論に至りました。

ソフト屋の社長がこんなことを特筆大書すると失笑・苦笑されるのは当然と思われそうですが、つまりは、正確な三次元構造を観察するには試料の調整や装置の設定を TEM トモグラフィに適するように工夫する事が重要である、と考える次第です。

もちろん TEM トモグラフィは TEM の技法の一つですから、その試料の作成方法も装置の操作も培われてきた技術・知見の延長線上にあります。試料が厚くなること、試料を大きく傾斜すること、同一の視野に対して百回以上の撮影を行う、という三点において少々の配慮をして頂く必要があります。

4. 試料の傾斜とその調整

TEM トモグラフィの撮影は連続して試料の傾斜角度を変えながら撮影を行うだけと既に述べました。ここで、トモグラフィの原理を忠実に適用するのであれば、一つの傾斜軸に対してあらゆる角度からの透過像が必要とされますので、試料を+90°から-90°の範囲で傾斜して撮影することになります。

しかし、TEM トモグラフィでは、TEM のゴニオメータこそ垂直までの傾斜に対応しているものの、試料やその保持機構の物理的制約によって傾斜可能な角度範囲が制限されるという本質的な問題があります。

では実際、TEM トモグラフィにおいて必要十分な傾斜角度はどれくらいになるのでしょうか？ここでは、試料を柱状に加工することで傾斜角度の制約を取り払うという、東北大学の陣内教授らの研究⁽¹⁾の成果を参考にさせて頂きます。まず、図1の様に FIB を使ってジルコニア粒子を樹脂中に分散させた試料を柱状に加工してから、先端を切り落とした試料ホルダに接着することで、+90°から-90°における連続傾斜像の撮影を実現しています。

そうして得られた連続傾斜像の一部を使って再構成を行い、傾斜角度の制限が再構成結果にどう影響するかを示したのが図2です。

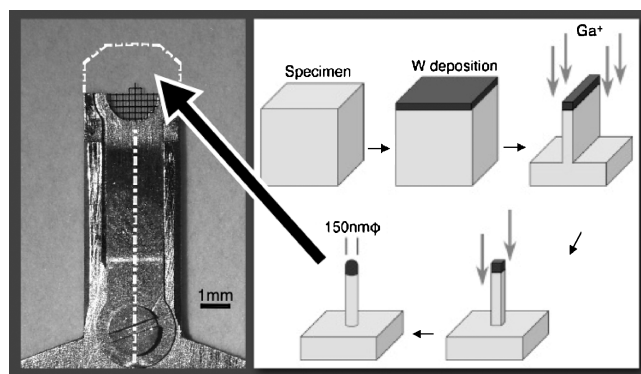


図1 試料の柱状加工⁽¹⁾。

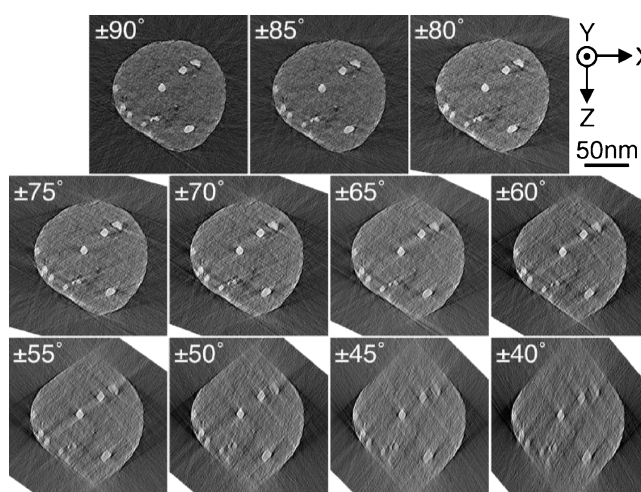


図2 傾斜角度の範囲と再構成結果⁽¹⁾。

この図において左上の画像は全周分の連続傾斜像を使った再構成結果で、傾斜軸が紙面に垂直となる断面を表示しています。再構成に使う連続傾斜像の範囲を±90°から±40°まで5°毎に減らしていくと樹脂中の粒子の断面形状、試料の外形共に、徐々に上下に引き延ばされその境界も曖昧になっていく様子が観察されます。どれくらいの傾斜範囲まで許容できるかという判断に明確な基準はありませんが、この試料の形状であれば大凡±65°くらいまでは傾斜させないと、正しい三次元構造が再現されていないと言えます。

それでは実際に、試料を最大±65°傾斜させた状態での撮影を行うために考慮すべき点について以下に説明します。

(1) 試料の調製①：ホルダ

既に述べた通り TEM のゴニオメータ自体は高傾斜が可能な構造になっているので、TEM メーカーの純正品やホルダメーカーのカタログを覗けば±60°~±80°の傾斜を可能とする試料ホルダを見つけることができると思います。

但し、TEM の電子レンズのタイプによって使用の可否があるので注意が必要です。図3は日本電子株式会社製の高傾斜用ホルダ先端部分のイラストです。右が超高分解能タイプのレンズ用で左が一般用です。超高分解能タイプの電子レン

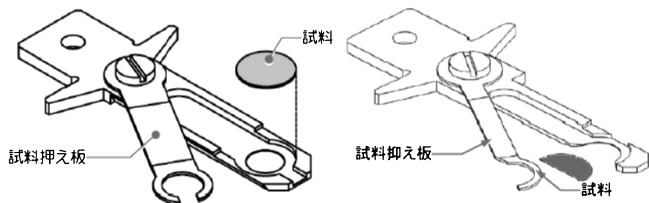


図3 高傾斜用ホルダの先端部(図版提供:日本電子株式会社).
(左:一般用 右:超高分解能用)

ズの場合, 対物レンズの磁片の隙間(polepiece gap)が試料グリッドの径である3mmよりずっと小さい為, ホルダの先端をいかに工夫しても傾斜させることは物理的に不可能になります. このため, 半裁したグリッドをホルダに載せることとなりますが, グリッドを巧い具合に切断するには慣れが必要ですし, なにより半分に切ってしまったグリッドではホルダ上で回転できませんので, 観察対象の形状に合わせて傾斜方向を最適化したいという場合の対応が出来なくなります.

(2) 試料の調製②: グリッド

ホルダに続きグリッドの選択にも配慮が必要です. 図4で示した様に, 試料の傾斜角度を大きくしていくと試料がグリッド自体の影に入り観察可能なエリアが狭くなっていく様子が分かります.

この影響を抑えるために, TEMトモグラフィには図5で紹介している様な開口面積の大きなグリッドの使用をお奨めしています.

ただ, そうした目の粗いグリッドや単孔のグリッドだと支持膜が破損し易かったり, 試料が不安定になりやすいので注意が必要です. また, スリット状のグリッドは, スリットの長手方向がホルダの中心線に直交するように配置することで高傾斜まで視野を確保できますが, グリッドを半裁した際と同様に傾斜方向の調整の自由度は失われます.

(3) 試料の調製③: 支持膜

グリッドの目より試料が小さい場合には支持膜が必要になりますが, 粉体や粉碎した試料の観察によく使われるマイクログリッドと呼ばれる網目状の支持膜はTEMトモグラフィとの相性は良いとは言えません. こうした支持膜を使う場合, 通常は網目の穴部分に突き出した試料を観察領域としますが, グリッドの選択の話と同じ様に傾斜していくと網目構造そのものが遮蔽物になってしまいます.

(4) 試料の調整④: 厚さ

試料がマイクローム切片の場合, 目的の構造が含まれるくらいの厚さで切り出すことが前提となりますが, その一方で電子線が透過できる厚さでなければなりません. 切片形状試料を傾斜すると, 電子線が通過するパス, 即ち見掛けの厚さ, は傾斜角のコサインの逆数となり, 切片の厚さに対して60°で2倍, 75°で約4倍と増加しますのでこの点を考慮して切片の厚さを調整する必要があります.

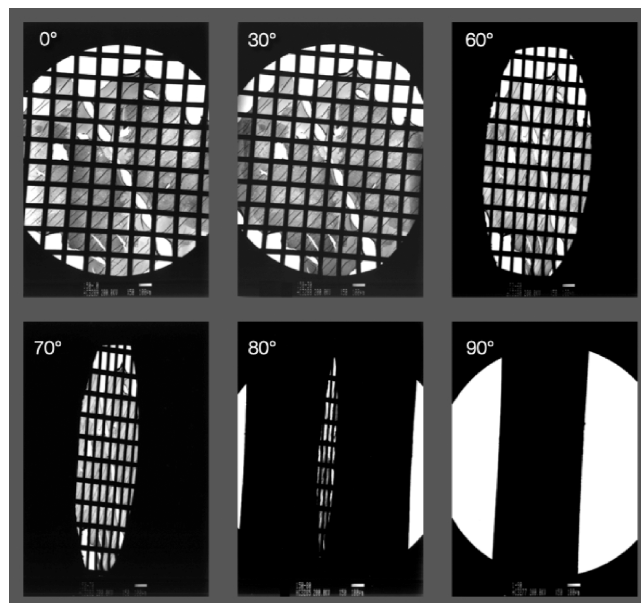


図4 試料の傾斜と観察可能エリアの変化.

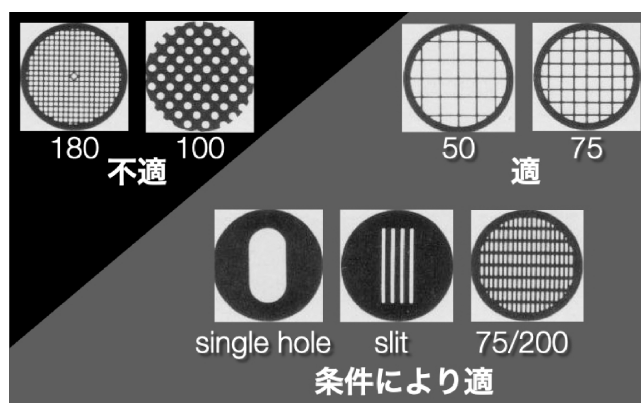


図5 グリッドの形状とTEMトモグラフィとの適性.

ちなみに筆者の経験では, 三次元再構成結果から計測される切片試料の厚さは製作者の意図と比べて30-50%くらい薄くなっていることがほとんどです. これは, 電子線よって切片が収縮することと, ミクロトームという装置の特性の両方に原因があると考えています. (電子線の照射による試料の厚さの変化に関しては, 久留米大学の太田教授らの論文⁽²⁾中にある写真が解りやすいと思います.)

電子線照射に伴う試料の変形は不可避ですが, 連続傾斜像の撮影を開始する前にビームシャワー等である程度試料の変形を落ち着かせることで安定した撮影が可能となります.

(5) 試料の調整⑤: 染色

通常, 生物組織や高分子等の試料は, そのままでは十分なコントラストが得られないので, 重金属を吸着させることで染色を行います. 特にTEMトモグラフィは内部構造の再構成が目的ですから, 切片の表面だけでなく内部まで十分に染色されている必要があります.

しかし試料内部の染色状態を把握するのは難しく、実際に染色が不十分だった為に三次元再構成が終わってみると表面だけで“餡子のない最中”の様な結果が得られた経験も少なくありません。反面、染まりすぎると電子線の透過が悪くなり高傾斜時の撮影が難しくなりますので、試料の材質、構造といった特性に合わせた塩梅を経験から得て頂く他はありません。

クライオ試料等で染色ができない場合は、画像処理に必要なコントラストが得られない事が多く、自動での撮影は難しくなります。しかし、比較的低い(ゴニオメータの機械的な再現性が期待できる程度)倍率であれば、各傾斜角度における視野及び焦点の移動量をあらかじめ計測しておき、撮影時にそれを参照することで自動撮影を行うといった機能を搭載したソフトウェアもあります。

また、金粒子等をマーカーとして試料に混載する方法も良く知られていますが、こうしたマーカーは再構成結果に悪影響を及ぼす可能性がありますので使用時には注意が必要です。

(6) 試料の調整⑥：導電コート

樹脂等、非導電体の切片試料の傾斜角度を大きくしていくと試料が周期的な動きを見せることがたまにあります。いわゆる電荷の蓄積によるドリフトなのですが、既に述べた様に試料を傾斜することで試料の見掛けの厚みが増して電荷が蓄積しやすくなるため発生していると考えられます。こうした場合は、カーボン等、導電性を高めるコーティングを施すことが一般的ですが、TEM トモグラフィの場合は、これを試料の両面に行うとより安定します。

(7) 試料の調整⑦：形状

いままで、主に切片やバルクの試料でTEM トモグラフィを行う際のポイントを説明させて頂きましたが、TEM トモグラフィに向いていると考えられる他の形態の例を紹介し

(a) レプリカ：傾けても厚さの変化が小さいので高傾斜が可能で、像のコントラストも高く、撮影も容易なことが多いです。更に再構成結果も立体的で見栄えがするので装置やソフトウェアのデモ等にもよく使われます。ただ、試料自体に内部構造が無いので物体内部を再構成できるというTEM トモグラフィの特徴は活かせません。

(b) パーティクル：材質にもよりますが、200 nm くらいまでの粒径のパーティクルやフラグメントは比較的疎な状態で支持膜上に分散できれば高傾斜可能で理想的な撮影が出来ます。

(c) ファイバー：パーティクル同様に分散の状況次第で高傾斜が可能です。複数のファイバーが絡まった状態を撮影する際は傾斜しても他の凝集体と重ならない視野を探します。ファイバー1本を高倍率で撮影する際は、グリッドを回転させてファイバーの方向を傾斜軸に近づけると良好な結果が得られます。

(8) 試料の調整⑧：金属材料

金属試料をTEM で観察する場合は、研磨やミリングといった方法で調整された極薄い部分を観察しますが、試料の傾斜後厚さや形状の変化が大きく、TEM トモグラフィとの相性は良くありません。

最近ではFIB で棒(針)状に加工した試料を、専用のグリッド(Omniprobe 社製等)を使って真空中に突き出させてトモグラフィを行う方法が主流になりつつあります。棒状の試料の長手方向と傾斜軸を合せれば、傾斜角度による試料の厚さの変化がありませんので高角度での撮影が可能となりますが、傾斜方向に垂直な画像情報が少ないためアライメントの精度が十分でないという欠点があります。

これを避けるために、棒状の試料を支持膜付きの通常メッシュの上に置いて撮影し、アライメントに支持膜のコントラストを利用することで理想的な再構成が可能となります。

5. TEM の設定

調整した試料ホルダをTEM にセットした後は、TEM トモグラフィに向けた装置設定を行っていきます。

(1) TEM の設定①：倍率

ここで適正な倍率について説明する前に、TEM トモグラフィが適用できる倍率の上限と下限について考察します。

まず上限ですが撮影された画像のスケール情報(nm/pix.)が各装置の仕様書に記載された点分解能(200 kV のLaB6 機で0.2 nm/pix.程度)と同じになる辺りと考えられます。これはカメラが蛍光板の下に設置されている構成で、150 k から200 k 倍程度となります。(一部機種を除く(株)日本電子製TEM の倍率表示において、顕微鏡メーカーによってこの倍率の表記がまちまちなので注意が必要。)

これ以上の倍率での撮影になると、撮影画像の解像度がTEM の光学分解能を上回ってしまい、撮影画像1 pix. に有意な情報が含まれない場合が生じることになります。そのため、ソフトウェアでの位置合わせや焦点調整の動作が不安定になります。仮に、手動での撮影を行ったとしても、上限倍率で撮影した画像をデジタル処理で引き伸ばした以上の画質は得られないことになります。

反対に倍率の下限ですがこれは試料の厚さで規定されると考えられます。即ち、試料の厚さが200 nm の時に画像のスケール情報が10 nm/pix. 程度の倍率で撮影したとすると、再構成される三次元像のZ方向のピクセル数は20 pix. となります。X-Y方向が1000 pix. ないし2000 pix. に対してZが20 pix. 程度という結果が三次元データとして有効なのか疑問になりますが、だいたいこの辺りが下限になると考えて良いと思います。これは、先ほどと同じくカメラが蛍光板の下に設置されている構成の場合で1500倍から2000倍に相当し、ほぼ通常観察モードの下限倍率とも一致するので特に配慮する必要はありませんが、カメラが蛍光板の上に設置され

ている場合は下限の倍率について意識する必要があります。

上記の範囲内で適当な倍率を選択しますが、目安は試料を傾斜しない状態で、撮影範囲の上下、左右をそれぞれ三等分したラインで構成される中央部のセクションと三次元観察したい関心領域がほぼ同じか、少し大きくなるくらいの倍率が基準となります。これは、傾斜に伴い予期しない構造が現れる可能性に備える目的の他、撮影後の連続傾斜像を処理する際の回転等の自由度を持たせる為でもあります。

(2) TEM の設定②：絞りと照射条件

TEM の操作に習熟した方であれば、像質の改善や試料保護の為に観察に適した絞りを選択されると思いますが、TEM トモグラフィで自動撮影を行う場合は多少像質が低下しても視野に余裕を持たせる事を優先して、大きめの絞りあるいは開放での撮影をお奨めしています。同様に、蛍光板上のビーム径も撮像素子に対して十分に大きめにしておくことが好ましいです。その理由は、自動撮影では結像位置や焦点の調整の為に偏向系のコイルや照射系・結像系のレンズを制御しますが、これらの条件が大きく変化した際にビームや絞りの端が撮影エリアに入り込んでしまうことを避けるためです。もちろん、ソフトウェアにはビームの中心を維持する仕組みや、絞りの影が検出されたら警告する機能が備わっていますが、安定した連続傾斜像の撮影を行うために TEM 側の設定でゆとりを設けておくことは極めて有効です。

“像質に妥協するのは TEM 屋の矜持に反する”という方もおられるとは思いますが、通常 TEM の撮影は一つの視野で最良な一枚を撮影できれば成功であるのに対して、TEM トモグラフィの撮影は±60°とか±70°といった範囲で均質な画像を撮影することが目的となります。傾斜していない時の画質だけ素晴らしくても高傾斜時に有意な撮影が出来なくては意味がありません。これは試料へのコーティングや支持膜の選択においても言えることです。画質が悪くなると敬遠されがちな厚めのコーティングや穴無しの支持膜も TEM トモグラフィにおいては、画質以上のメリットをもたらす場合があります。

(3) TEM の設定③：加速電圧

既に述べてきたように、TEM トモグラフィの撮影において透過力は重要なファクタです。したがって加速電圧は使用する TEM の最大電圧が基本となります。ただ、電子線損傷を受けやすい試料の場合は撮影が可能となる電圧まで下げざるを得ません。この場合でも、コーティング等の処理で試料の強度をコントロール出来るなら可能な限り高い加速電圧を選びたいところです。

撮影の際の露出も同様です。高傾斜時を想定すれば、なるべく明るい条件が望ましいのですが、ビーム径が小さくなり過ぎることや、撮影途中で試料が焼損してしまうことは避けなくてはなりません。

(4) TEM の設定④：撮像モード

TEM トモグラフィを TEM モードで行う方が良いか STEM モードで行う方が良いかという質問を受けることが多くあります。

STEM のメリットは一点に収束された電子線による強い透過力と暗視野像による回折コントラストの低減、それと引き換えのデメリットはコンタミネーションの付き易さです。本特集の後編で九州大学の波多教授が STEM トモグラフィについて専門的な記事を書かれていると思いますので、ここでは TEM/STEM の使い分けに対する私見だけ述べさせて頂く事とします。

試料がさほど厚くない場合、試料の特性がよく分からない場合はまず TEM モードで連続傾斜像の撮影を試みてください。試料を傾斜させると TEM モードでは観察できなくなるくらい試料が厚い際には STEM の明視野像に切り替えて撮影を、結晶性の試料で回折コントラストの影響が大きい場合には、STEM の暗視野像で撮影というのが私の選択基準です。

ちなみに、STEM モードの場合は再構成時に像を回転させる必要が無いので、先に説明した TEM モードでの倍率の基準より少し高めの倍率で撮影してかまいません。

6. 撮影ソフトウェアの設定

TEM の設定が終わったら、いよいよ自動撮影ソフトウェアを使用しての連続傾斜像撮影となります。もちろん、ソフトウェアによって異なりますが、ここで留意すべき点は撮影時の画素数と傾斜における角度の間隔程度です。

(1) 撮影ソフトウェアの設定①：撮影画素数

撮像素子の画素数は増える一方で、最近では 16 M pix. (4096 pix. × 4096 pix.) 相当が一般的になりました。もちろん、そのままの画素数でも撮影を行う事は可能ですが、再構成や可視化の処理を通常の PC で行う事を考えると現状では 4 M pix. (2048 pix. × 2048 pix.) 程度の画素数での撮影が画質と効率のバランスが良いと考えています。

16 M pix. の撮像素子で 4 M pix. の撮影を行う場合、撮像素子全面を使ってビニング (binning) 機能で画素を少なくする方法と、撮像素子の中心部のみをクロップして使う方法があります。撮像素子が CCD だった頃は感度を上げる目的で前者が主流でしたが、撮像素子が CMOS となった今日では、後者の方が TEM のイメージサークルを無駄に広げること無く高倍率の撮影ができるので有利です。

(2) 自動撮影ソフトウェアの設定②：傾斜角度の間隔

傾斜角度の間隔は 1° が基本です。ソフトウェア的には 1° 未満の設定も可能ですが、その場合、設定角度に対する機械的な応答性は TEM の機種や個体差に依存すると考えられます。

試料のダメージやコンタミネーションが心配される場合は、間隔を大きくして撮影枚数を減らしますが、それも 2° 程度までが目安です。それ以上の角度だと情報量が不足しますので再構成時に後述する代数的解法を選択する必要があります⁽³⁾。

生物分野からのニーズでサクストン・スキーム(saxton scheme)という角度設定があります。これは、傾斜角度に応じて角度の間隔を連続的に変化させる方式なのですが、前提としているモデルが二次元形状の射影なので、ごく薄い試料を低倍率で観察する場合以外の使用は適切ではありません。

7. 三次元再構成

撮影が終わったら、連続傾斜像のファイルを三次元再構成用のソフトウェアに読み込んで処理を進めていきます。

(1) 三次元再構成①：アライメント

三次元再構成は多数(~150枚程度)のTEM画像(二次元)を入力して立体構造(三次元)を計算するプロセスですが、実際は図6に図説するように、各TEM画像から傾斜軸に直交する同じ位置の直線成分(一次元)を取り出し、それらから一断面の再構成を実行、その処理を傾斜軸に沿って繰り返す行することで三次元を積み上げるとい手順になります。このため、各画像上における傾斜軸の位置を正確に知る必要があります。

X線CT装置では線源と検出器の軌道は装置側で固定されていますので傾斜軸の位置は既知情報となります。

一方、TEMの場合は、ゴニオメータの構造的にも、傾斜後に視野を調整するプロセスがあることから、傾斜軸の位置に関する情報は装置側では決められません。よって、連続傾斜像を解析することで傾斜軸の位置を求めなくてはなりません。こうした解析を行うことをTEMトモグラフィではアライメント(alignment)と呼んでいます。

実は、撮影後の処理においては、このアライメントが一番重要かつクリティカルです。その理由は、アライメントの結

果次第で再構成される断面形状が大きく変わってしまうにもかかわらず、アライメントの良否の評価が難しい点にあります。アライメントが再構成結果に及ぼす影響を図7に示しています。

アライメントの評価を容易にするため、試料にマーカを配置する方法もありますが、マーカ自体が測定中に移動したり、試料の収縮の影響を受ける事もありますので絶対的な指標とはなり得ません。なによりマーカ自体が再構成結果にノイズ(アーチファクト)を生じさせる原因となりますから、使用する場合には粒径や分散の具合に十分な注意が必要です。(一応、そうした影響を抑える機能を有するソフトウェアもありますが、試料レベルでの配慮ができればそれに越したことはありません。)

(2) 三次元再構成②：解析的解法による再構成

透過信号から断面が再構成される原理は1917年に数学者Johann Radonによって証明されたラドン-逆ラドン変換対で説明されます。TEMトモグラフィにおいては傾斜を伴う試料撮影がラドン変換に相当しますので、撮影した連続傾斜像に対して逆ラドン変換を行えば元の試料の構造が戻ることになります。

ここでは数式を使った解説はいたしません、逆ラドン変換で一断面を再構成するには、一次元のFFTを撮影枚数と同じ回数、二次元のIFFTを1回行うだけです。非常に高速に演算を実行することができます。

それぞれの変換の物理的作用からラドン変換をプロジェクション(投影)、逆ラドン変換をバックプロジェクション(逆投影)と表すことも多く、逆ラドン変換が積分式であることから、この再構成方法は解析的解法とも呼ばれています。

解析的とはいえ、実データを使って計算する場合には積分ではなく、撮影ステップ毎の離散的な処理になってしまいます。このためフーリエ空間で周波数の均衡が崩れてしまい、図8で示した様に高周波数成分を持ち上げるハイパスフィルタを使った補正が必要になります。

こうしたフィルタ処理が含まれる事から、トモグラフィで行われるバックプロジェクションは、フィルタードバック

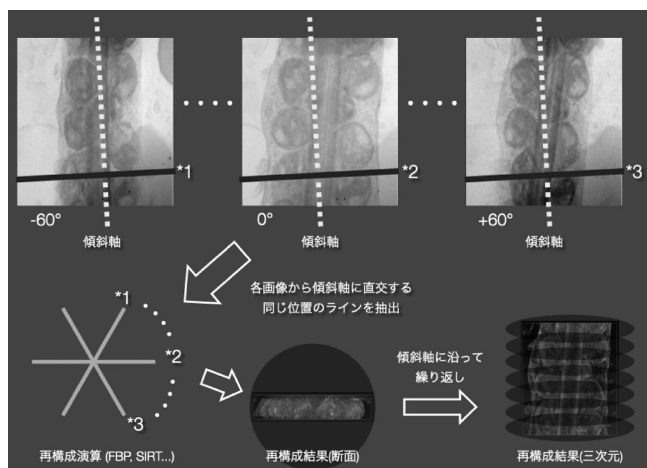


図6 再構成のプロセス。

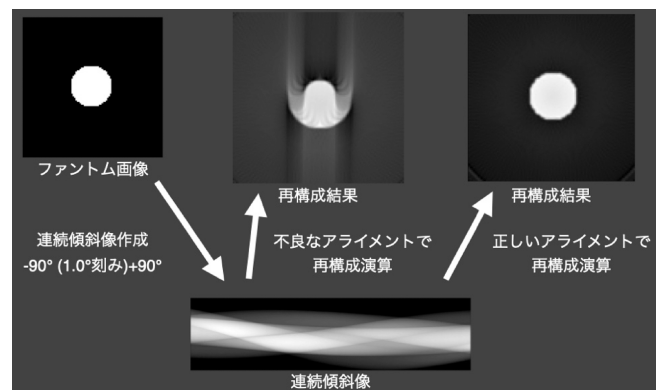


図7 アライメントの良・不良と再構成結果。

ロジェクション(Filtered Back Projection, 以降FBP)と呼ばれています。まれに filtered ではなく weighted と表現して WBP と呼ばれていることもあります。処理内容は同じです。逆ラドン変換を忠実に計算機用に最適化したとも言える処理で、高速演算が可能です。CTの商用機において半世紀以上もの間、主流の再構成方法とされています。

(3) 三次元再構成③：代数的解法による再構成

医療用のCT装置開発においては、低線量、高速スキャンといったニーズに対応すべく、S/N比の悪い信号や少ないプロジェクションでも高画質の再構成ができるよう、FBPに代わるアルゴリズムが研究されてきました。(本特集でも筑波大学の工藤教授が専門的な解説を書かれておられると思います。)

すでに非常に多くの解法が提唱されていますが、基本となる考え方は共通で、再構成したい断面を未知数の行列とし、この行列のプロジェクションと実際に撮影されたプロジェクションの比較を行い、その結果を未知数の行列に反映、再び、その行列のプロジェクションと実際に撮影されたプロジェクションを比較するという手順を繰り返し、両者の差が無くなれば、未知数の行列が解けた(=再構成ができた)とする方法で、逐次近似法とか反復法と呼ばれます。また、行列演算を使うことから先の解析的解法に対し、こちらを代数的解法と区別しています。

比較や反映方法の多様性から、多くの名称のアルゴリズムが存在し、いずれも原理的に演算時間がFBPの数千〜数千倍と非常にコストの高い演算となりますが、計算機の性能向上、特にGPUを使った並列演算技術の進歩でその欠点が解消されつつあります。

また、統計力学の手法や各種の先見情報を加味することでより性能を高めたとされるアルゴリズムが次々と発表されており、目的と手段がマッチすれば良い結果を期待できます。

対象物のあらゆる角度から数千回ものスキャンを行えるX線CTの場合、通常の条件であればFBPで十分な画質が得られますが、プロジェクション数がCTの1/10以下で、傾斜角の制限もあるTEMトモグラフィでは、FBPが適用出来るぎりぎりの条件であるとも言えます。従って、像質や撮影枚数が厳しい場合には、代数的解法を適用する必要があります。

ただ、いずれの代数的解法もアルゴリズムによってその指向とも云える特徴がありますので、データの特性に合わせて適切な解法を選択しなくてはなりません。以下、代表的な代数的解法による再構成の効果を紹介します。

(a) コントラストが低い試料

図9の試料は非晶質の水に包埋されたウイルスです。いわゆるクライオ試料で、試料保持部を液体窒素で冷却することで、凍った状態のままの試料を観察出来るホルダにセットしています。中央部の黒い小さなパーティクルは撮影の指標とするために配置したコロイド金です。アーチファクトの影響

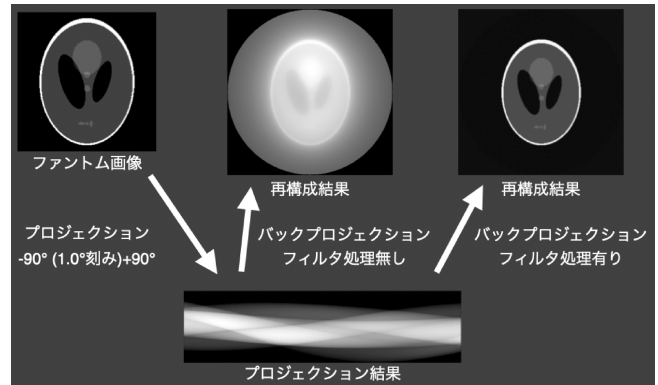


図8 ハイパスフィルタ処理の有・無と再構成結果。

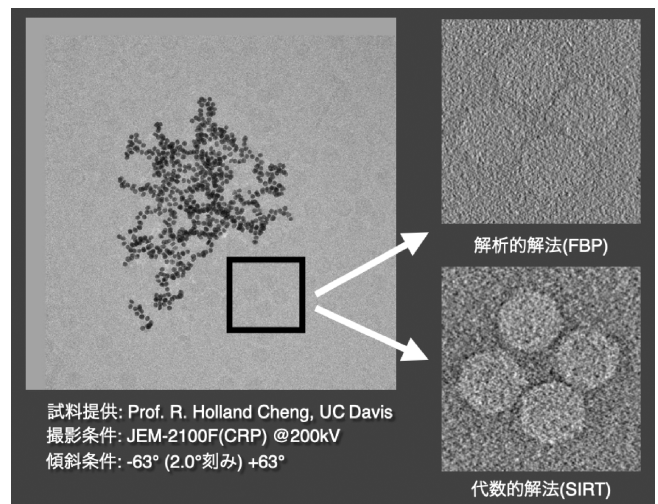


図9 クライオ撮影されたウイルス。

を避けるためにコロイド金がない右下の正方形部分を再構成エリアとしました。TEM写真を見て解る通り無染色の為、ウイルスのコントラストは非常に低くなっています。また、電子線による損傷を避けるために2°ステップでの撮影と言う条件も重なり、FBPでの再構成結果では目的のウイルスの形状はほとんど判別できません。

一方、代数的解法の一つであるSIRT(Simultaneous Reconstruction Technique)で再構成した結果ではウイルスの形状がはっきり再構成できています。

(b) ハイパスフィルタの影響が顕著な試料

図10の試料は神経細胞の一部でニューロンの周りにオリゴデンドロサイトが巻き付いてミエリン鞘を形成している様子を捉えています。TEM像では、バウムクーヘンの様な環状の層をなしているミエリン鞘がはっきり観察できますが、FBPで再構成を行うとミエリンの層が画面の水平と近くなる辺りの構造が消えて見えます。これは、FBPの計算過程で行われるフィルタ処理によって低周波成分の信号が弱まってしまった為に生じた結果です。代数的解法であればフィルタ処理は行われませんのでそういった影響は発生しません。

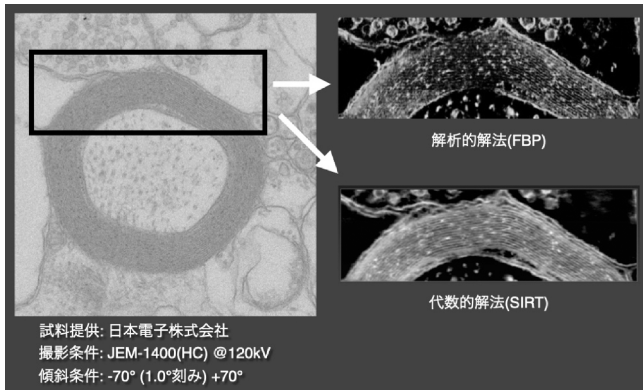


図10 ミエリン鞘の断面.

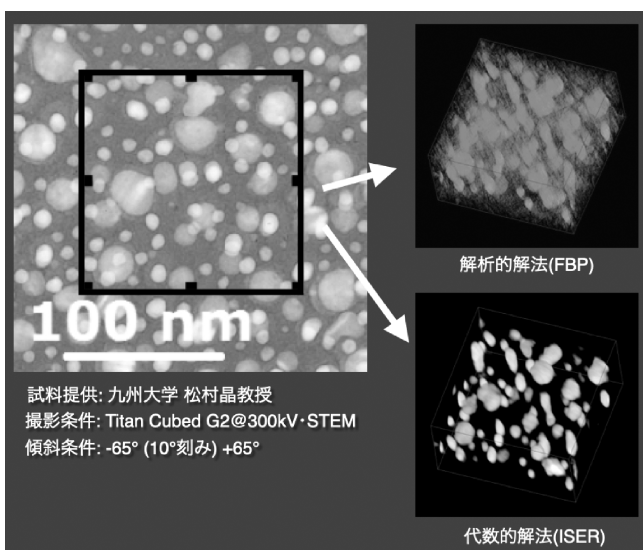


図11 Fe-Pt 粒子(撮影枚数14枚).

こうした方向に依存して再構成結果の一部のコントラストが消えてしまう原因が傾斜角度の制限による影響(ミッシングウェッジ問題)にあるとして、二軸トモグラフィの必要性のエビデンスとされることがありますがそれは間違いです。

(c) 撮影枚数が少ないケース

2013年から17年の4年間、九州大学、バージニア工科大学、大阪大学、筑波大学と弊社で、科学技術振興機構の先端機器開発プログラムの支援のもと、リアルタイム・トモグラフィ開発に取り組みました⁽⁴⁾。この時の課題の一つにトモグラフィの高速化に向けてどこまでプロジェクション枚数を減らすことができるか、というものがありました。この命題に対して筑波大学の工藤教授と共同で開発したアルゴリズムがISER (Iterative Series Reduction) です⁽⁵⁾。

圧縮センシング (Compressed Sensing) の原理を取り込み、少ない撮影枚数からの再構成を可能にしています。

図11では、 -65° から $+65^{\circ}$ まで 10° ステップで撮影した、わずか14枚の連続傾斜像から再構成を行った例を示しています。FBPによる結果ではノイズに埋もれてしまっている

Fe や Pt の粒子が ISER の結果では明確に再構成されていることが分かります。

8. TEM トモグラフィに有効な画像・信号

海外での事例ですが、弊社の製品 (TEMography™) を導入頂いた研究者が、反射電子像を使った TEM トモグラフィの結果を学会で発表していたことがありました。原理的には反射電子や二次電子の画像では TEM トモグラフィはできませんが、ソフトウェアの厄介なところは、入力する画像の物理的な意味にかかわらず、フォーマットさえ合っていれば処理ができてしまうところです。もちろん、そうして得られた結果は全くのデタラメであることは言うまでもありません。では、こういった画像が TEM トモグラフィに適用可能であるのか少し考察してみます。

トモグラフィとは X 線や電子線が物体を透過する間に減衰する量をいろいろな経路上で計測することで、入射した波の通りにくさのマップを作成する事と言い替えられます。ですから、TEM トモグラフィの再構成ソフトウェアに入力できるのは、“試料を透過した像であること”、“吸収・散乱の状態を反映した像であること”という二つが条件になります。

TEM 像でも通常の吸収・散乱コントラストは問題ありませんが、位相コントラストでは再構成ができません。

同様に位相板を使ったコントラスト増強は、散乱・吸収以外の条件が反映されているので再構成結果の物理的な意味が不明です。

結晶性の材料で生じる回折コントラストは、TEM トモグラフィにとってはノイズです。最近では、試料を傾斜させながら撮影した回折像から立体構造を決定するマイクロ ED が注目されていますが、当然、全く別の原理ですので TEM トモグラフィ用のソフトウェアは使えません。

STEM の場合、BF 像は TEM 像と同じ原理なので問題はありせんし、DF 像は散乱した電子線を画像化しているので、コントラストが逆転している事と、輝度と厚みの関係が BF 像と異なる点を再構成計算時に考慮すればトモグラフィは成立します。

EELS (Electron Energy-Loss Spectroscopy : 電子エネルギー損失分光法) は原理的には問題ありませんが傾斜角度が大きくなった時に有効な信号が得られるか否か、という別の問題が生じてきます。

(1) TEM トモグラフィと EDS

電子線によって励起された特性 X 線を解析することで元素組成を明らかにする EDS (Energy Dispersive x-ray Spectroscopy) は分析を目的とした TEM には欠かせない付属機器となっています。

従来の検出器と比較して高感度を実現した、SDD (Silicon Drift Detector) 登場がきっかけで各 TEM メーカーは EDS トモグラフィ (STEM-EDS で得られた元素マップ像から三次元の元素マップを再構成する手法) を新機能と謳っていま

すが、厳密には“透過信号ではない”という理由から TEM トモグラフィの適用は適切ではありません。

ただし、TEM に装着した EDS の場合は同視野の STEM 像が同時に撮影できますので、STEM 像が撮影できているなら電子線は透過できているだろう。故に入射した電子線が試料内部で特性 X 線に置き換わったと考えればトモグラフィも可能、という少々グレーな理屈の上に正当化されています。EDS トモグラフィを行う際は試料の厚さに注意して、必ず STEM 像の再構成結果と元素マップの再構成結果を見比べて結果の妥当性についての確認・検討が必要です。

(2) TEM トモグラフィと収差補正機

TEM の性能を飛躍的に向上させた立役者である球面収差補正機(Cs-corrector)ですが、これによって得られる像自体は TEM も STEM も当然ながら TEM トモグラフィの適用対象です。

しかし残念な事に自動撮影との相性は良いとは言えません。その理由は収差補正機が常に厳密な調整を必要とすることにあります。既に述べた様に TEM トモグラフィ(TEM/STEM 共に)では試料を傾斜させる毎に視野や焦点位置を再調整します。このため、最適に合わせたはずの収差補正機のセッティングがすぐにずれてしまい、収差補正の性能が 100%維持できません。

収差補正機の調整も自動化されてはいますが、試料傾斜の度にこれを行うというのも現実的ではありません。

9. おわりに

TEM トモグラフィに関する最初の論文は1968年に D. J. DE ROSIER と A. KLUG によって Nature 誌に発表されています⁶⁾。それから半世紀が経過し、制御や撮像がデジタル

化された TEM と専用のソフトウェアにより、TEM トモグラフィは誰もが試せる手法となりました。

今後も TEM のシステムや撮像素子、計算機の性能は更に向上するものと思われていますが、TEM トモグラフィの原理や物理は未来永劫に変わることはありません。本稿が TEM トモグラフィの活用を考えておられる方の一助となれば幸いです。

最後になりますが、本稿の執筆にあたり多くの御助言を頂いたバージニア工科大学の村山光宏教授に御礼を申し上げます。

文 献

- (1) N. Kawase, M. Kato, H. Nishioka and H. Jinnai: Ultramicroscopy, **107** (2007), 8–15.
- (2) K. Ohta, R. Higashi, A. Sawaguchi and K. Nakamura: Journal of Structural Biology, **177** (2012), 513–519.
- (3) Y. P. Yu, H. Furukawa, N. Holii and M. Murayama: Metallurgical and Materials Transactions A, **51** (2020), 20–27.
- (4) S. Hata, S. Miyazaki, T. Gondo, K. Kawamoto, N. Horii, K. Sato, H. Furukawa, H. Kudo, H. Miyazaki and M. Murayama: Microscopy, (2016), 1–11.
- (5) 工藤博幸, 董 建, 加茂勝己, 堀井則孝, 古河弘光, 波多聰, 村山光宏, 佐藤和久, 宮崎伸介: 顕微鏡, **51** (2016), 48–53.
- (6) D. J. DE ROSIER and A. KLUG: Nature, **217** (1968), 130–134.



古河弘光

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★
2010年7月 株式会社システムインフロンティアを
設立、取締役・副社長に就任
2019年2月 代表取締役・社長に就任
◎電子線トモグラフィ用ソフトウェアの他、透過型電
子顕微鏡・走査型電子顕微鏡向けの応用ソフトウエ
ア、画像解析ソフトウェアのコンサルティング、ユ
ーザーサポートといった活動を国内外で展開。
<https://www.sifi.co.jp/about/>
★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★