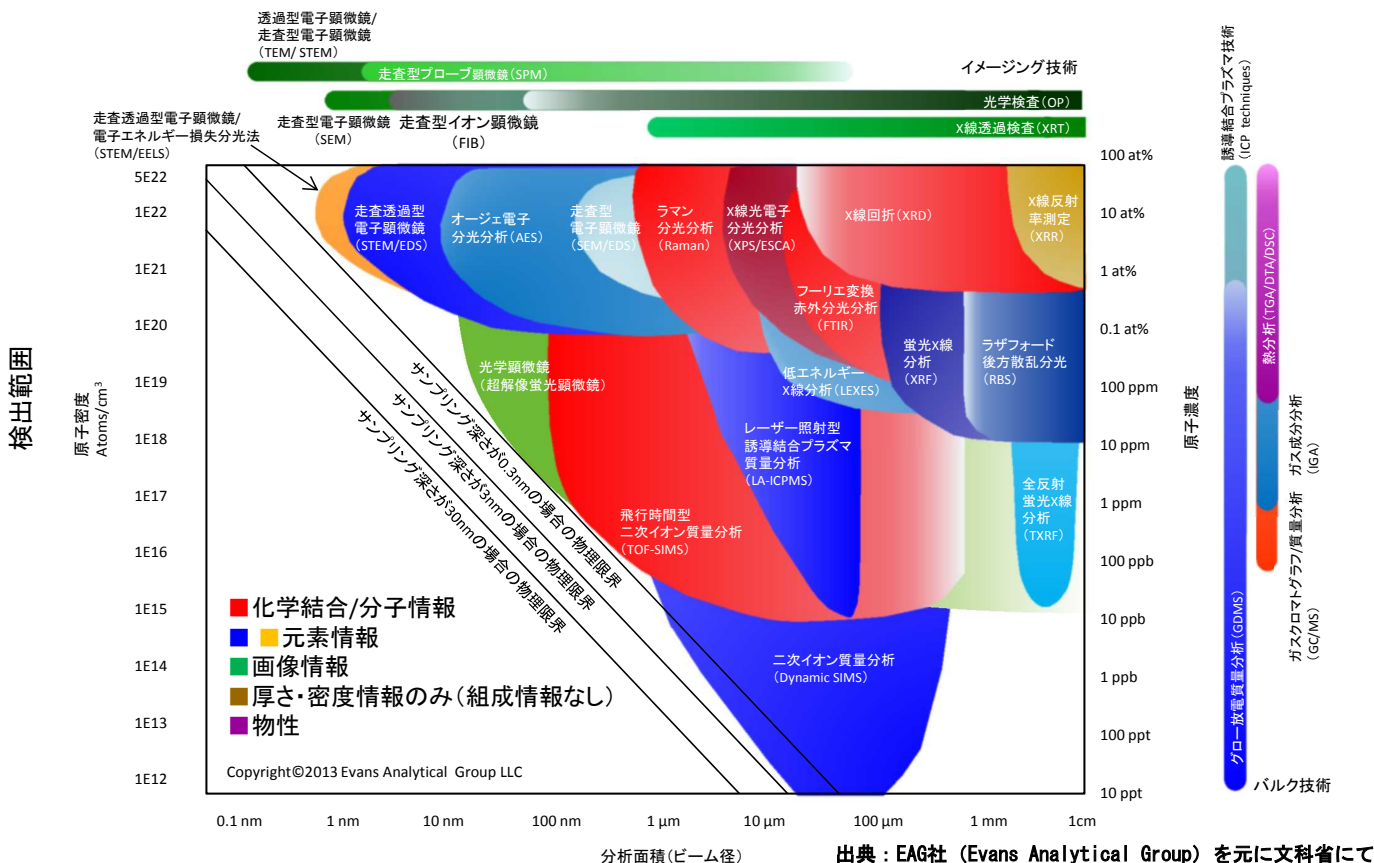
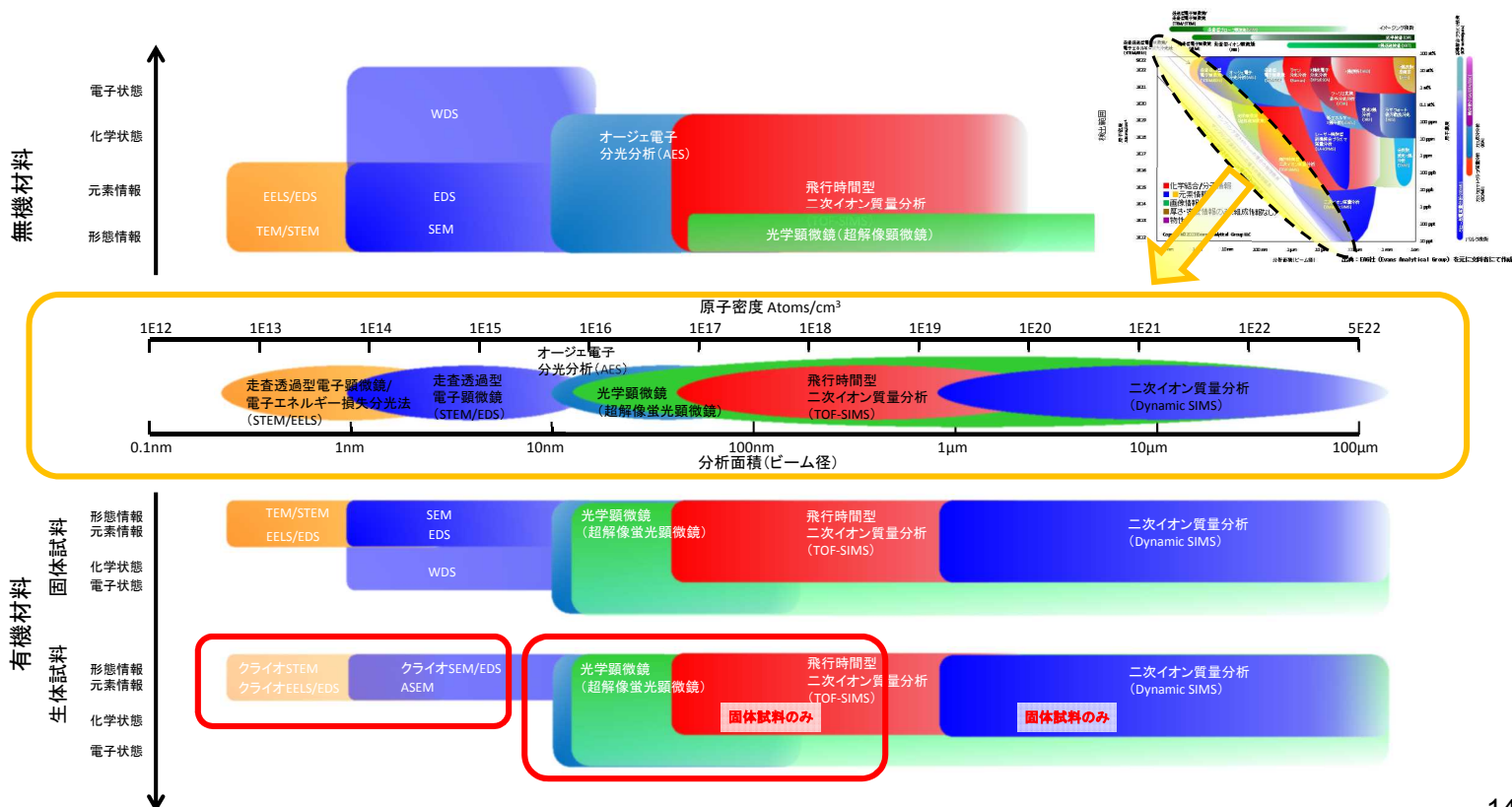


電子顕微鏡

表面・微小部分析手法の比較

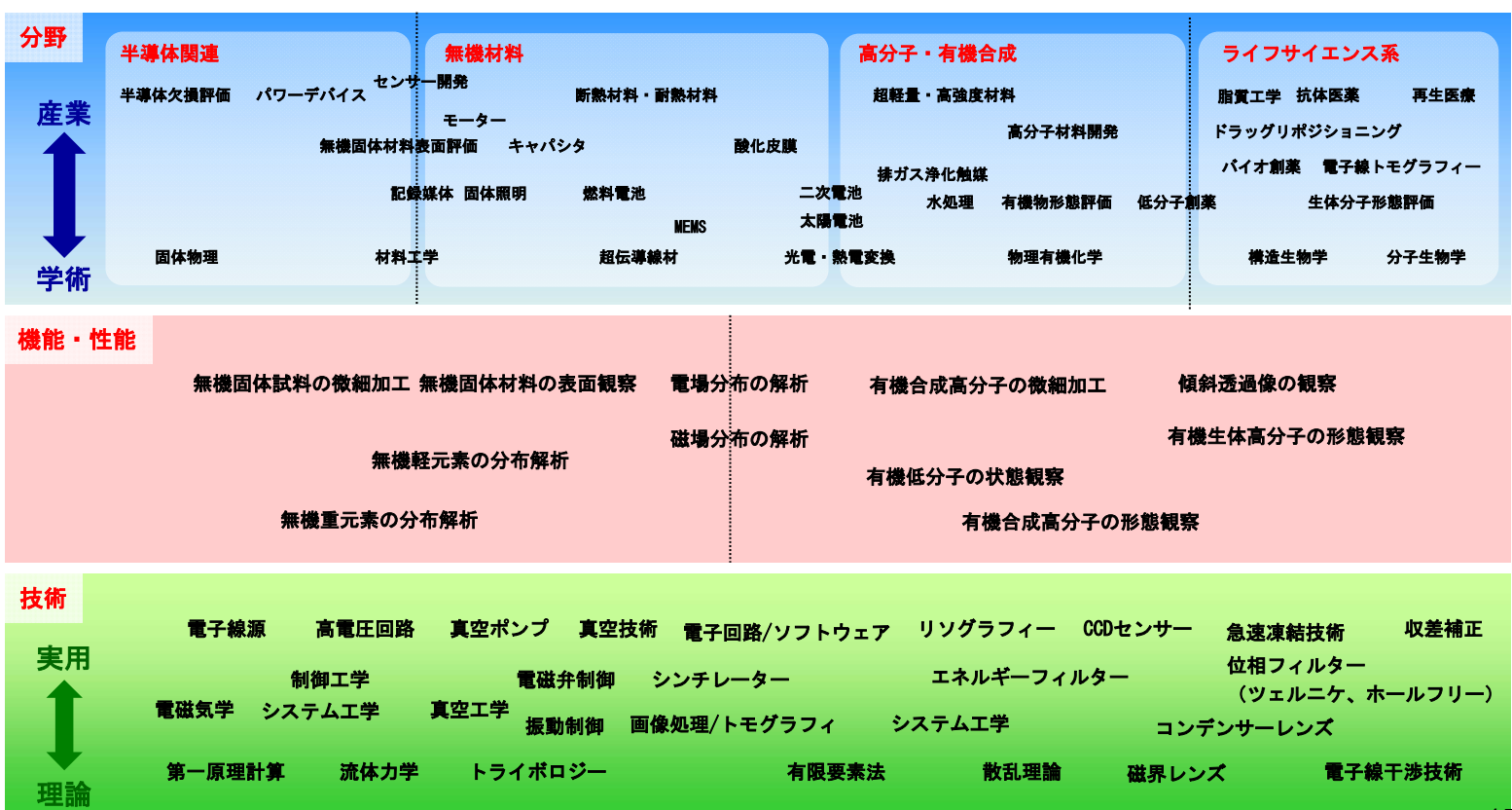


表面・微小部分分析手法の比較



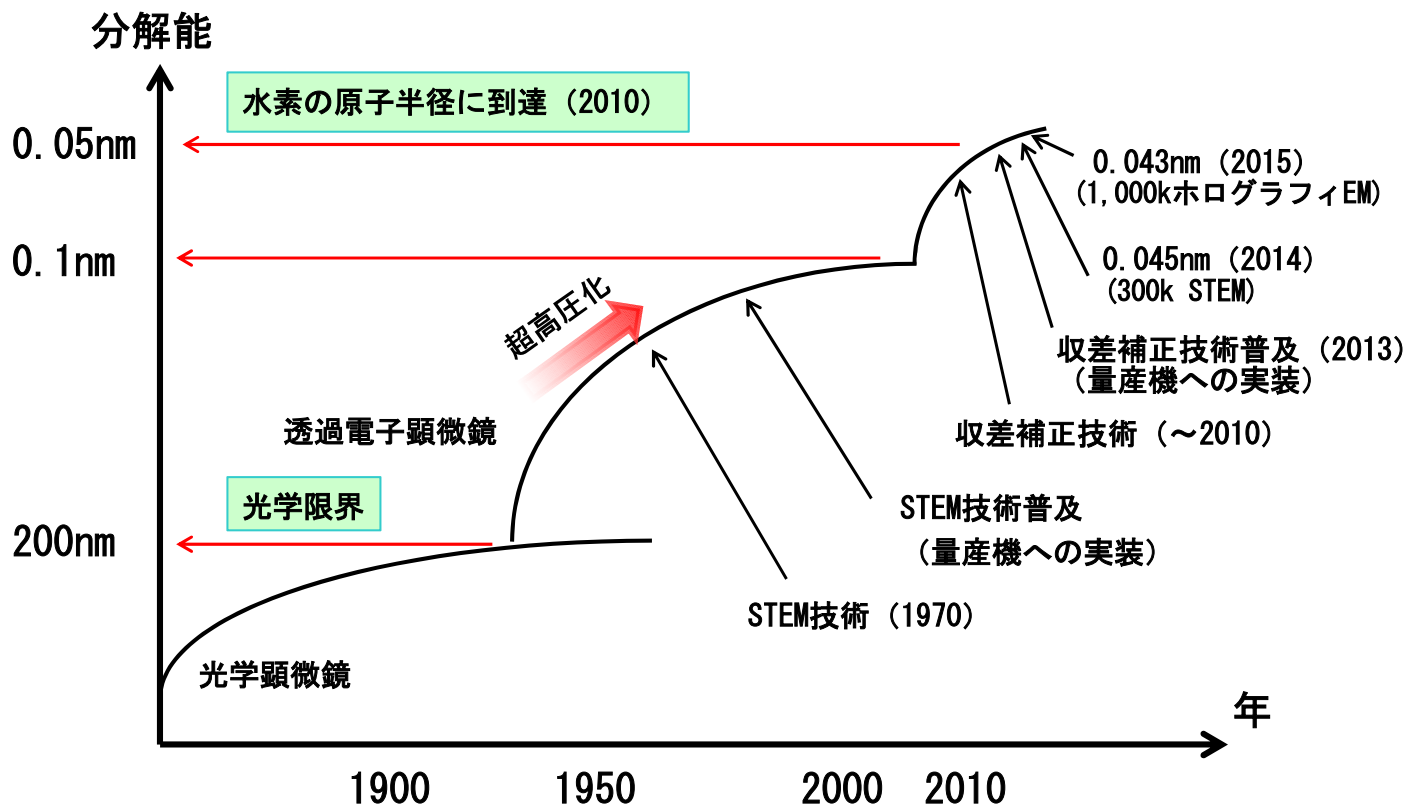
14

電子顕微鏡分野技術俯瞰図



15

電子顕微鏡分解能と技術変遷



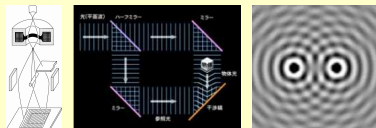
注目される技術

○重要な開発課題

・ホログラフィー



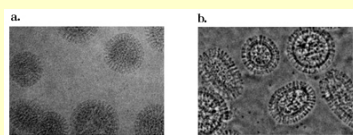
試料に透過させた電子波と、試料のないところを透過させた電子波を干渉させることにより生じたホログラムから、試料の電場が磁場、3次元像を解析することができる。



(資料提供: (株) 日立製作所、科学技術振興機構)

・位相板 (位相顕微鏡)

通常の明視野法では分解能を犠牲にしてデフォーカスしなければ有機試料のコントラストを高くすることができないが、位相板を使うことで分解能を損なわずにコントラストを高くすることができる。

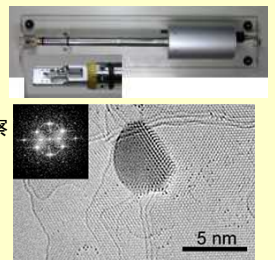


300kV分析型極低温電子顕微鏡 (FEG, He-ステージおよびエネルギーフィルター搭載) に薄膜位相板を挿入。(a)は通常2次元像、(b)はゼルニケ位相差2次元像 (どちらもインフルエンザウイルス (写真は2009年生理学研究所要覧より抜粋))

・環境TEM (ETEM)

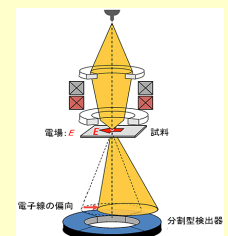
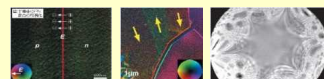
従来は電子顕微鏡で観察する際は試料を真空下におく必要があった。近年では窒化ケイ素などの隔壁で試料周辺部を挟み込み、試料周辺の差動排気をすることで触媒などが機能している状態での in situ 観察が可能になってきた。

光照射機能付き電子顕微鏡試料ホルダー (右上) とグラフェン上のPtナノ粒子の高温 (800°C) その場超高分解能TEM観察像 (右下)
資料提供: 物質・材料研究機構



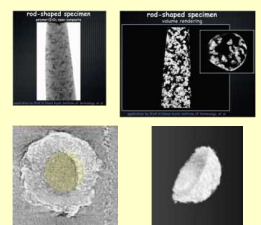
・分割型検出器 (8分割型)

8分割した検出器を利用し透過電子線の散乱角による違いを解析することで、電場や磁場の可視化を行うことができる。

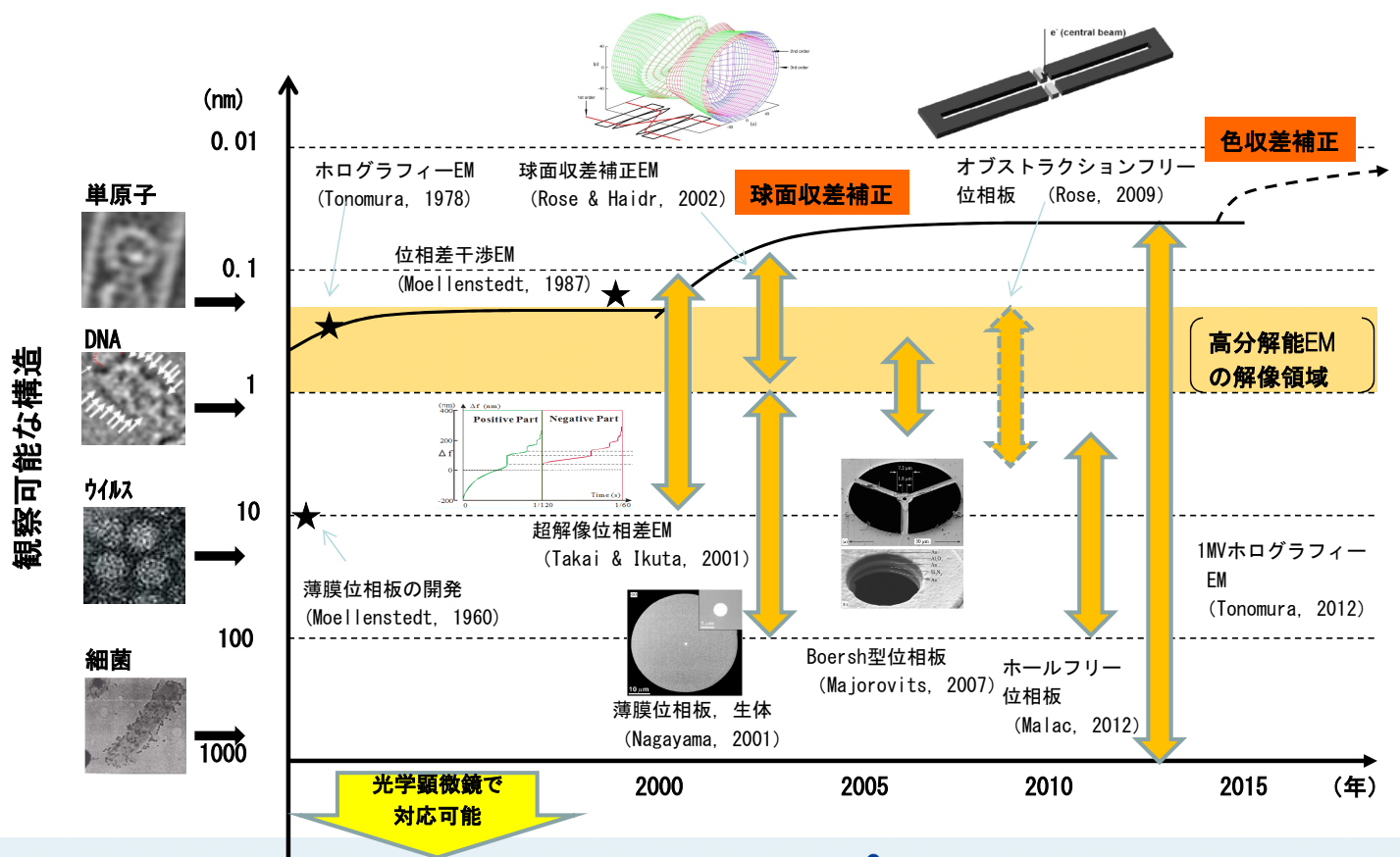


・トモグラフィー

電子線トモグラフィーは3次元再構築ルーチンの改良により複雑な構造の再構築も短時間で行うことが可能になった。また、近年では透過率の違いやEDSスペクトルによるマッピングも可能になってきている。

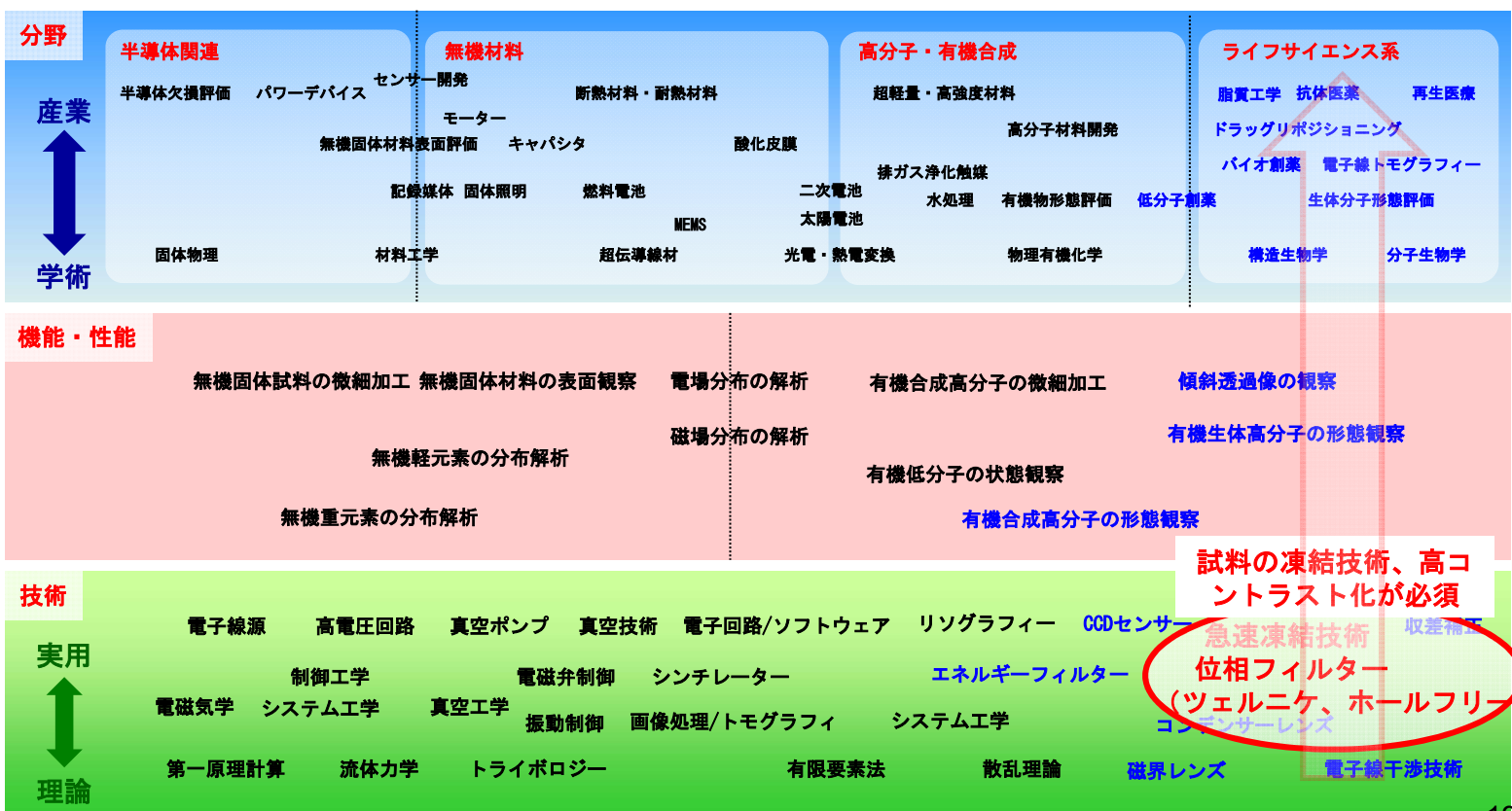


位相差電子顕微鏡ロードマップ



18

クライオTEM



19

クライオTEM

基本原理

- ・含水試料の瞬間凍結により、アモルファス水中で構造を保持した生体高分子試料の調製を行う。
- ・瞬間凍結した生体試料の透過電子顕微鏡により観察することで、生体高分子の構造の多角度からの透過像を取得する。
- ・取得した数千から数百万の透過像を投影角度ごとにクラスタリングし、バックプロジェクションにより3次元構造の再構成を行う。
- ・3次元構造再構成の反復により3次元構造の最適化を行う。

効果が期待できる研究分野

- ・生理活性タンパク質の構造解析（脂質膜中タンパク質、糖タンパク質、抗体等）
- ・生理活性物質と作用物質の複合体解析（イオンチャネル、分子チャネル、情報伝達などの機能解析）

産業応用が期待される分野

- ・バイオ医薬品開発
バイオ医薬品生理活性発現の機構解析、バイオ医薬品副作用の活性部位解析、バイオ医薬品の修飾部位検討（活性向上、副作用抑制）
- ・低分子医薬品開発
低分子医薬品薬理活性発現の機構解析

必要となる要素技術

- ・凍結試料作成技術（瞬間凍結、凍結試料切削）・凍結試料搬送技術（クライオトランスファー）、
- ・凍結試料撮像技術（クライオステージ）・除振技術・制振技術・電子線位相差技術・高感度検出技術（直接検出カメラ）・画像抽出技術、画像分類技術
- ・3次元像再構成技術・3次元像最適化技術

今後開発が期待される技術・システム

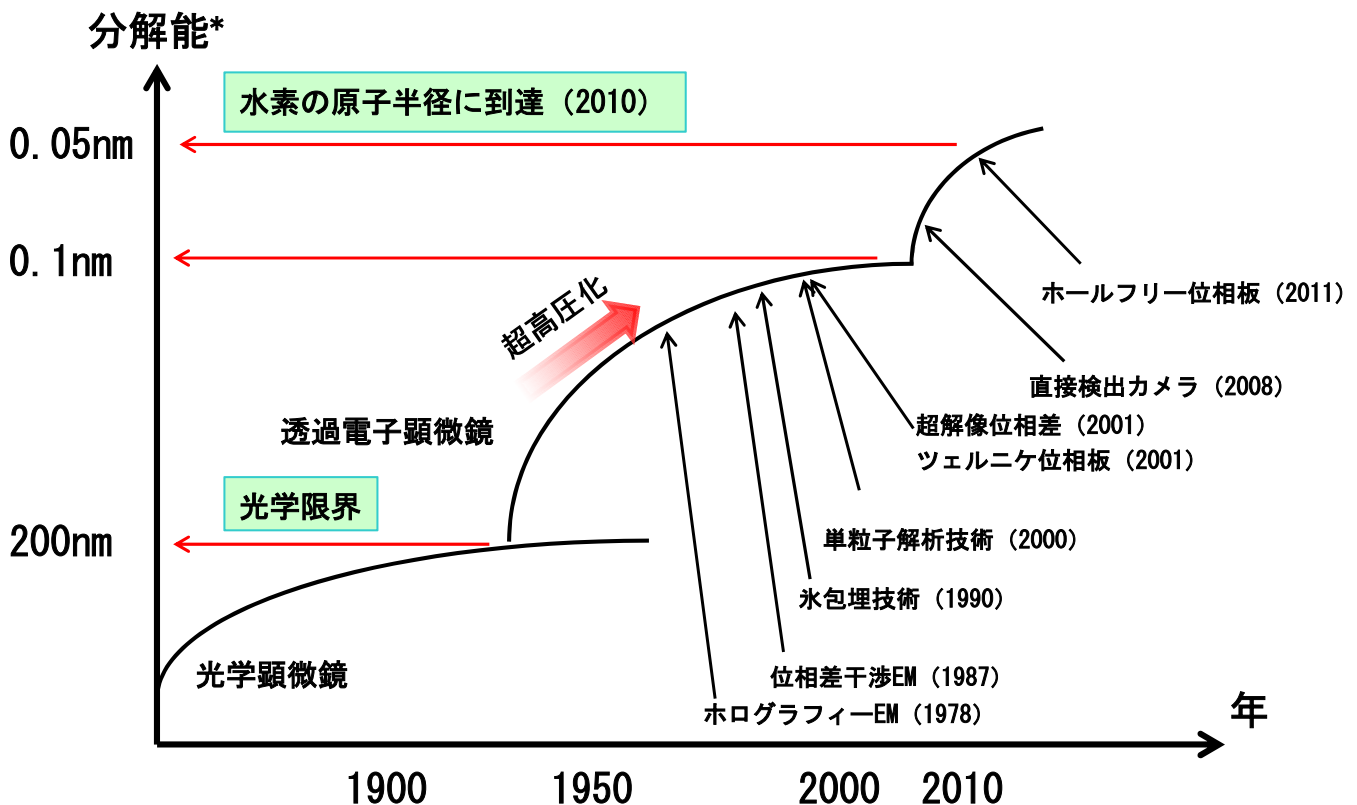
- ・生体試料の前処理から撮像までを簡便に行う。（システム化）
- ・撮像した大量画像の自動解析ソフトウェア

その他の波及効果

- ・再生組織等の3次元形態解析
- ・無機材料や高分子材料の撮像における試料ダメージの軽減

20

クライオTEM



* 電子顕微鏡像の分解能を示しており、単粒子解析などにより決定される構造の分解能とは異なる

21

クライオTEM

○重要な開発課題（クライオTEM）

・低温処理技術

（試料凍結・搬送、自動交換、クライオステージ）



Gatan社製品紹介より

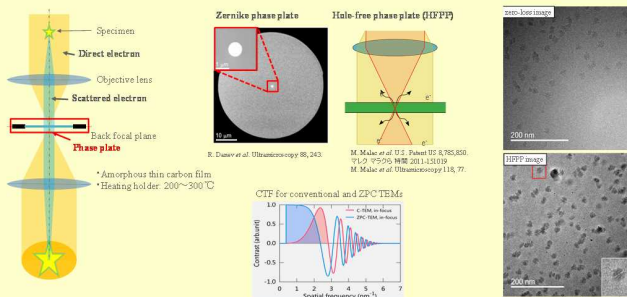
・高感度撮像技術（ダイレクトカメラ用センサー）



Direct Electron社、Gatan社製品紹介より

・位相板（有機試料高コントラスト化）

TEM with phase plate

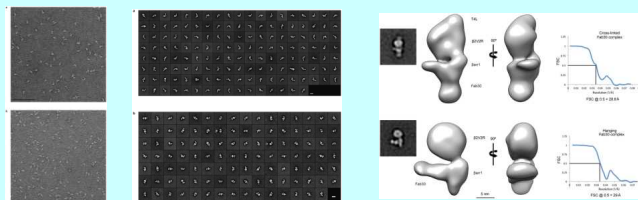


21

資料提供：日本電子株式会社

・画像解析技術

（粒子認識、統計、再構成・最適化計算、自動化）



Nature 512, 218–222(2014). doi:10.1038/nature13430 より抜粋

22



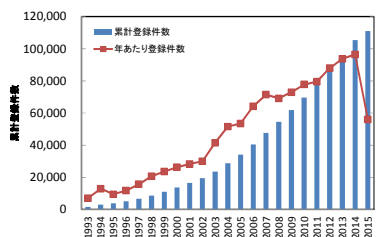
文部科学省

MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE, SPORTS,
SCIENCE AND TECHNOLOGY-JAPAN

クライオTEM

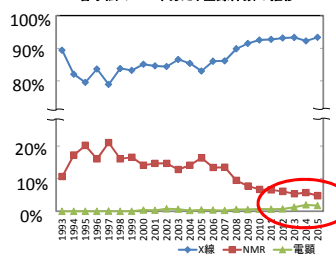
バイオ医薬品の研究が盛んになり、核酸やタンパク質の年あたりの登録件数は年々増加している。

PDB登録件数の推移

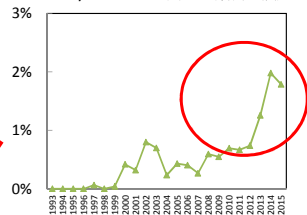


構造生物学分野の構造決定手法は、主にX線結晶構造解析であるが、近年では電子顕微鏡による単粒子解析法の成果によるPDB(Protein Data Bank)への登録が増加している。

各手法のPDB年あたり登録件数の推移



CryoTEMによるPDB年あたり登録件数の推移



この数年でクライオTEMによる成果の登録件数の伸びが大きくなっている

※ RCSB PDB 統計データ(<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/>)を元に文科省にて作成

○近年の登録件数の傾向について

2007年にIHRSR(Iterative Helical Real Space Reconstruction)が発表されるまでは、電子顕微鏡本体の性能が重要で電子顕微鏡による構造生物学は国産メーカーの電子顕微鏡を使った報告がほとんどだった。

しかし、IHRSR発表後の2013–2015では、単粒子解析の成果Top90のうち、日本の装置が使われたものは分解能が88位の1件のみ。

○クライオTEMの分野の例

(1) タンパクやDNA等の構造解析

・X線結晶構造解析やNMRだけではなく、クライオTEMでもタンパクやDNAの構造解析が可能に

（現在のクライオTEMで決定された構造の分解能の最高記録はFSC 2.2 Å）

・一週間程度で膨大な構造解析が可能になる可能性がある。

(2) クライオTEMの発表論文数とTEMメーカー

・FEI-クライオTEM 89件/90件 (2013.5~2015.5)

・日本電子-クライオTEM 1件/90件 (2013.5~2015.5)

☆研究開発現場に大きな感動を与える戦略

→創薬ユーザーに拡がりつつある。

→創薬開発の現場へ

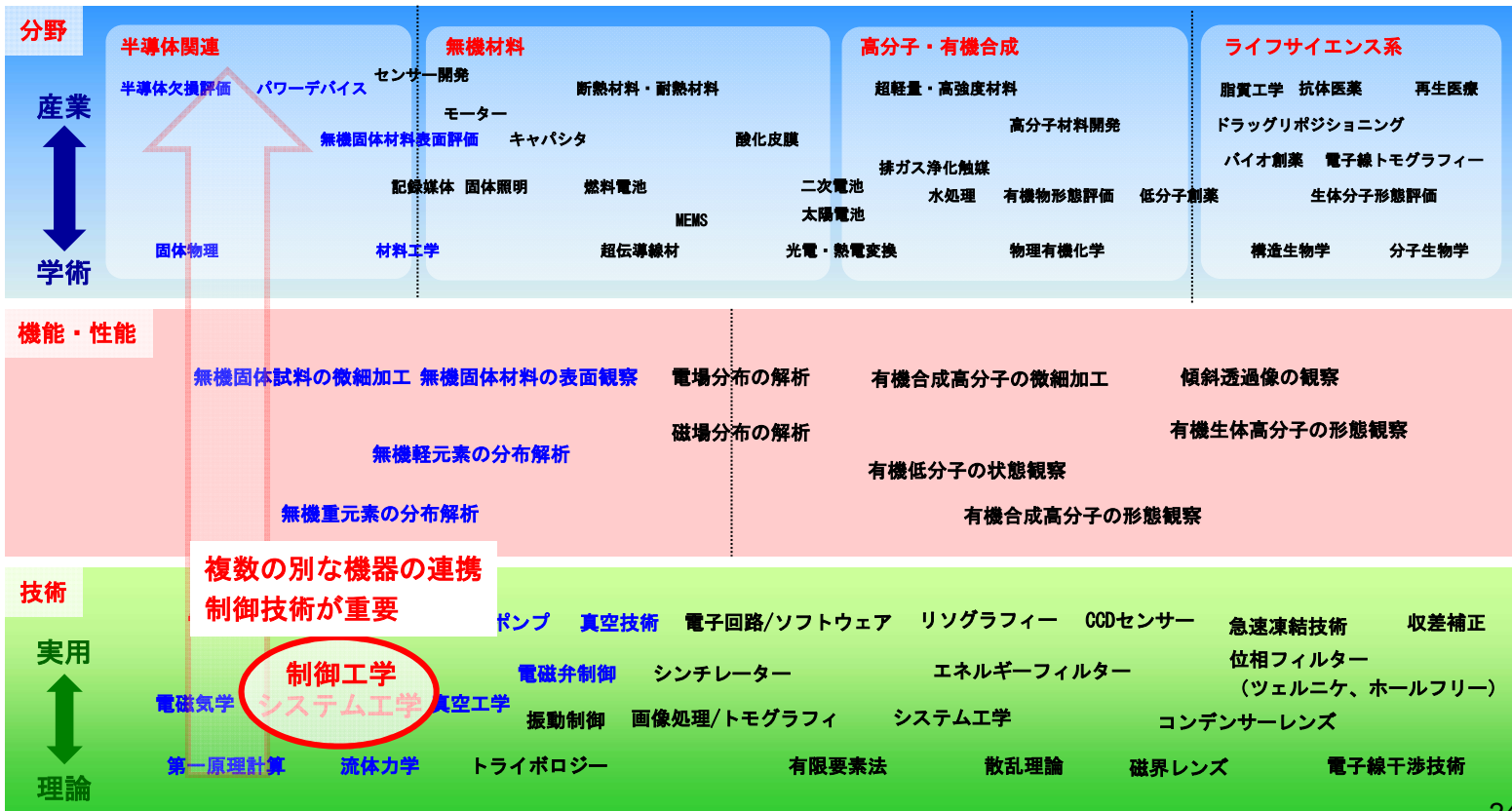
23



文部科学省

MINISTRY OF EDUCATION, CULTURE, SPORTS,
SCIENCE AND TECHNOLOGY-JAPAN

F I B - S E M / T E M



24

F I B - S E M / T E M

基本原理

- ・金属先端の液体金属（ガリウム等）に電界を印加することでイオンを引き出し、引き出したイオンを電圧により加速しビームとして放出する。
- ・放出されたイオンが対象試料の表面に衝突することで、表面の原子がはじきとばされるスパッタリング現象により試料を削る。
- ・放出するイオンビームはアパーチャーや集束レンズにより収束イオンビームとし、さらに偏光器により特定部位にイオンビームを収束させることができる。
- ・イオンビームが衝突した際には、二次電子も放出され、同時に二次電子像を得ることができる。
- ・イオンビーム照射部位近傍に吹き付けた化合物ガスが二次電子のエネルギーにより分解され、固体成分が試料表面に蒸着する。

効果が期待できる研究分野

- ・無機材料の超微細加工による界面構造解析
- ・無機材料の超微細加工による3次元構造解析
- ・有機材料の超微細加工による構造解析
- ・有機材料の超微細加工による3次元構造解析

産業応用が期待される分野

- ・半導体の欠陥検出
- ・固体材料の超微細加工
- ・固体材料の表面加工

必要となる要素技術

- ・イオン銃 ・磁界レンズ ・静電レンズ ・高電圧回路 ・微小機械制御技術 ・半導体検出器

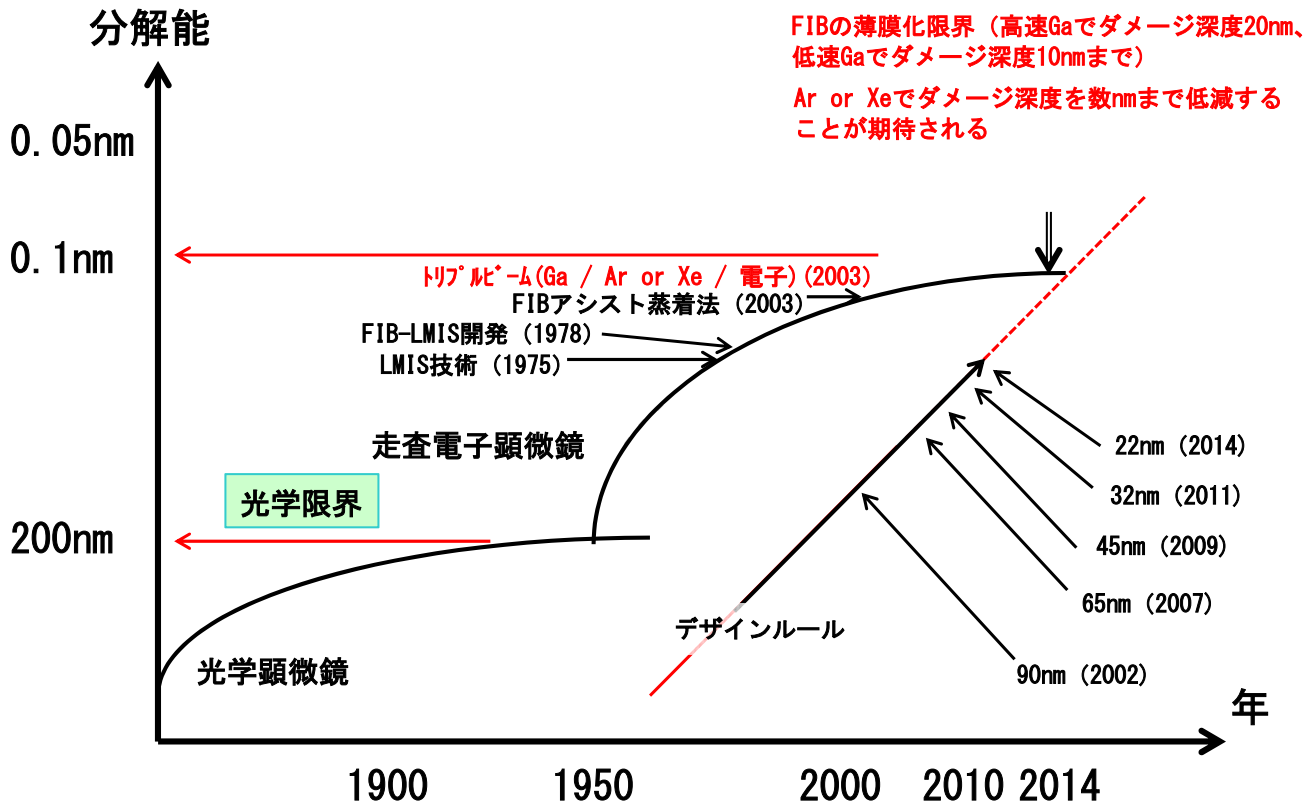
今後開発が期待される技術・システム

- ・マルチスケール観察（FIB-SEM分解能の観察とTEM分解能観察のシームレス化）
- ・試料前処理の自動化

その他の波及効果

25

FIB-SEM/TEM



26

光学顕微鏡

27