

リアルタイムで立体視観察が可能な 走査型電子顕微鏡の開発とその生物学応用

牛木 辰男
Ushiki Tatsuo

岩田 太
Iwata Futoshi

小竹 航
Kotake Wataru

伊東 祐博
Ito Sukehiro

走査型電子顕微鏡 (SEM) において、電子線を1ラインごとに左右に傾斜させることで2枚の視差画像を同時取得できるようにし、モニタ上でTVレートでの立体視ができる装置を開発した。また、電子線傾斜によって生じる軸外収差を低減可能な光学系を開発することにより、視差画像の分解能を向上させた。

このようなリアルタイムステレオSEMは、試料観察時に立体視ができることから、SEM内での試料のマニピュレーションなどに有用である。そこで、SEMの試料室に収納できる小型マニピュレータを試作し、これを搭載したリアルタイムステレオSEMにより生物試料の微小解剖を行い、その有用性を示した。

1. はじめに

走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) は、試料の三次元表面形状を観察することができることから、この特徴を生かして材料系のみならず、生物系においてもさまざまな応用がなされてきた。特に、医学生物学の分野では、透過型電子顕微鏡では解析が難しい、細胞や組織の立体微細構造の解析に利用され、その威力を発揮してきた¹⁾。

ところで、通常のSEMでは、観察時においても撮影時においても、カメラで写した1枚の写真のように単眼視の画像しか得ることができない。そこで、SEMが実用化された当初から、両眼視で観察を行う工夫として、同一視野で角度の異なる2枚の画像(視差画像)を取得し、平行視や交差視を行うことで立体視観察することが試みられてきている。しかし、これまでは、視差画像を得る手法の煩雑さや、ステレオ表示法の困難さにより、立体視観察の用途が限られていた。また一般のSEMではリアルタイムでの立体視観察をすることができない。一部でリアルタイムでの立体視を可能にするSEMが開発されてはいたが、解像度や操作性において実用的とは言えなかった。

ところが、最近のSEM技術の進歩とともに、コンピュータ技術や表示技術が進歩してきて、SEMの立体視観察にも新しい時代が訪れようとしている。そこで、われわれは、リアルタイムステレオSEMの本格実用化に向けた開発を

行うことを提案し、その開発を行うとともに、その一部の成果は製品化にまで導くことができた。ここでは、SEMにおける立体視の原理と、われわれが最近開発したリアルタイムステレオSEMの概要について述べ、さらに、そのSEMの特徴を生かしたSEM内マニピュレーションの試みを紹介する。

2. SEMによる立体視と視差画像取得法

すでに述べたようにSEMで立体視を行うためには、人の視差に応じた2枚の画像が必要となる。この2枚の視差画像を取得する方法はさまざまであるが、一般的には、(1) 試料を傾斜させて視差画像を得るステージ傾斜法、(2) 電子線を傾斜させその傾斜角に応じた視差画像を得る電子線傾斜法が用いられる²⁾。

2.1 ステージ傾斜法

試料台を傾斜させて、視差角に対応した角度の異なる2枚の画像を、1枚ずつ取得する手法である[図1(a)参照]。試料傾斜が可能なSEMであれば、どんな装置を用いても視差画像を得ることができることから、古くから用いられてきており、高分解能観察も可能である³⁾。しかし、試料の同一視野を傾斜させながら撮影するのはかなり煩雑で、また時間もかかり、当然のことながら、試料の形状をリアルタイムで立体視しながら観察することはできない。

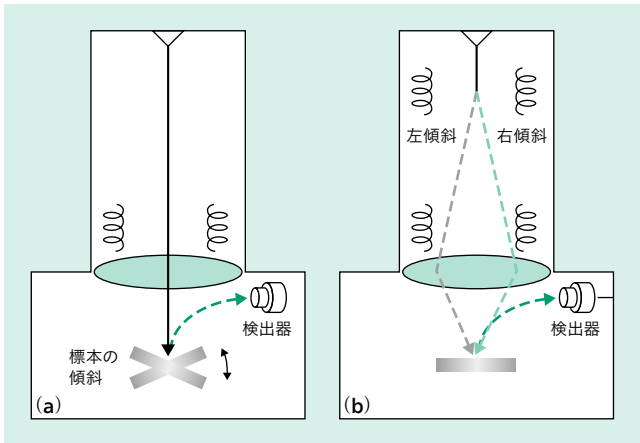


図1 SEMによる視差画像取得法

(a) にステージ傾斜法の模式図を、(b) に電子線傾斜法の模式図を示す。

2.2 電子線傾斜法

電子線傾斜を利用して視差画像を得る方法である [図1 (b) 参照]。この方法は、すでに1970年代に登場し、TVレートで立体視観察ができるSEMが紹介されている⁴⁾。しかし、実用化においては、電子線傾斜に伴って発生する収差(軸外収差)の問題から生じる解像度の低下や、リアルタイムでの表示法の問題を解決する必要がある。

3. リアルタイムステレオSEMへの挑戦

リアルタイムで立体視しながら観察する装置(いわゆるリアルタイムステレオSEM)の実用化を考えた場合、上述した電子線傾斜法を採用することになるが、その際に電子線傾斜に伴って発生する収差を低減した高解像度の視差画像を取得する工夫が必要である。またその得られた画像は、TVスキャンで観察可能であることが望ましい。また、立体視のための表示法の工夫も必要である。そこで、われわれは、まず電子線傾斜法を用いて高解像度の視差画像を高速取得する方法について検討した。

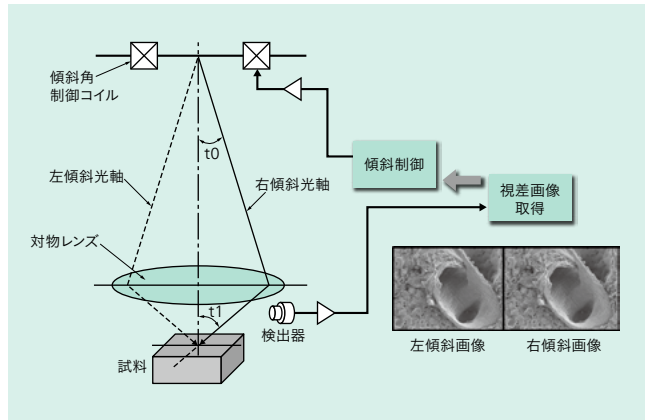


図2 電子線傾斜による視差画像取得法

走査のための偏向コイルとは別に傾斜角制御コイルを対物レンズの上部に配置する。これにより、電子線を1ラインごとに左右に傾斜することが可能になる。

3.1 レンズの集束作用を利用した電子線傾斜法の開発

視差画像の高速取得のためには1ライン単位または1フレーム単位の電子線傾斜により、角度の異なる2枚の視差画像をほぼ同時に取得することが望ましい。この場合、図2に示したように、傾斜角制御コイルにより、角度(t_0)で傾斜された電子線は、対物レンズで集束され、傾斜角(t_1)で試料上に照射される。この方法では走査速度に応じてそれぞれ視差画像を取得できることから、TVスキャンでも立体視観察が可能である。さらに、任意の方向や角度に電子線を傾斜することができるため、試料を機械的に回転させなくても、画像を回転させて自由に立体視観察を行うことができることになる。このような方式を搭載したSEMの実用化により、複雑な構造をした生体組織のリアルタイム立体視が可能となり、また1回の操作で、2枚の視差画像を同時に撮影できるようになった(図3参照)。

ところで、通常のSEM観察では、対物レンズの中心(軸上)に電子線を通過させるように制御している。しかし、電子線傾斜法で2枚の視差画像を取得する際にレンズの集

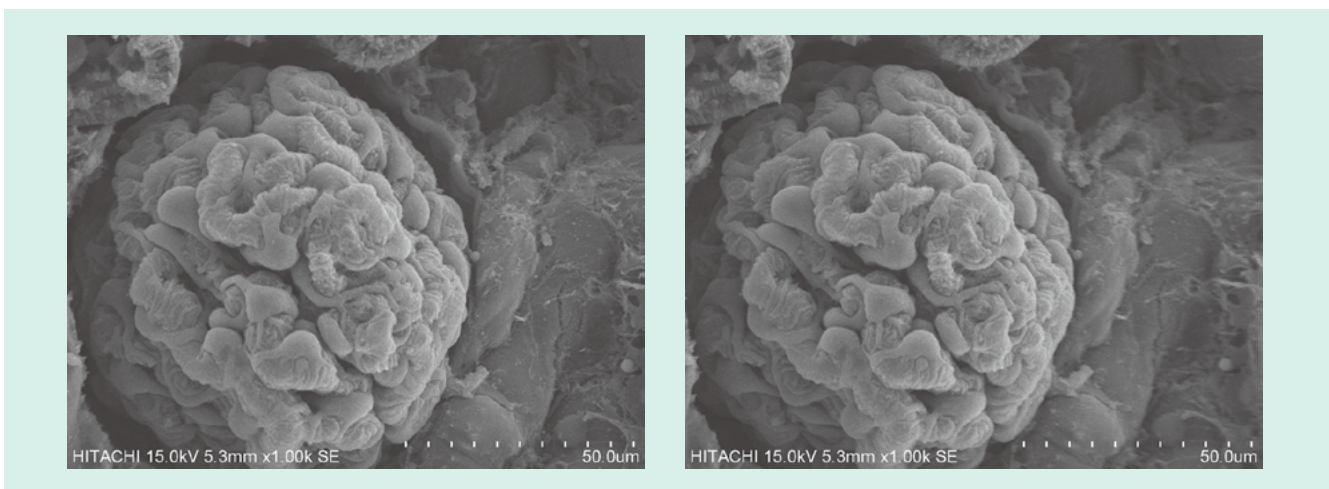


図3 電子線傾斜法で撮影した2枚の視差画像(ラット腎臓の糸球体)

この2枚の画像は交差法により立体視することができる。このような低倍率の観察では十分実用的である。

束作用を利用することになるため、対物レンズの中心から離れた場所（軸外）に電子線を通過させる必要が生じる。このとき、電子線傾斜に伴う収差が発生してしまい分解能の低下を招くことになる。

ここで、電子線傾斜時の分解能 (R_{cso}) は、以下の式（二乗平均法とした場合）によって求めることができる。

$$R_{\text{cso}} = \sqrt{\Delta W_{\text{S0}}^2 + \Delta W_{\text{RL}}^2 + \Delta W_{\text{C1}}^2 + \Delta W_{\text{C0}}^2 + r_d^2 + (r_{\text{SS}})^2} \quad (1)$$

球面収差： ΔW_{S0} 、コマ収差： ΔW_{RL} 、軸外色収差（倍率色収差と回転色収差の和）： ΔW_{C1} 、軸上色収差： ΔW_{C0} 、回折収差： r_d 、試料上光源径： r_{SS}

この式を用いて、熱電子銃型電子源とアウトレンズで構成される汎用型SEMに適用した場合の電子線傾斜角度と分解能の関係を解析すると、電子線傾斜時に分解能を低下させている原因が、軸外収差（コマ収差および軸外色収差）であることが分かる（図4参照）。なお、球面収差、軸上色収差、回折収差は、電子線傾斜角に依存せず、 $t1=0^\circ$ でも発生する収差で、電子線傾斜時の分解能低下に対する影響が小さいため、図には示していない。また、非点収差は、通常の汎用SEMに搭載されているスティグメータを利用することで低減が見込めるため、電子線傾斜での分解能の議論からは外して考えている。

以上から、例えば電子線傾斜角 3° の場合の分解能は約150 nmまで低下することが分かる。これは、観察倍率に換算すると約2,000倍程度に当たることから、この手法ではそれ以上の観察にはぼけが生じることが予測できる。しかし、通常のSEMにこの電子線傾斜法を搭載することで、低倍像はリアルタイムステレオ表示で立体視観察を行い、高倍像は通常のSEM観察法で観察することを可能にすれば、実用的な装置となることが期待される。こうした考えから開発されたのが日立SU3500である（図5参照）。

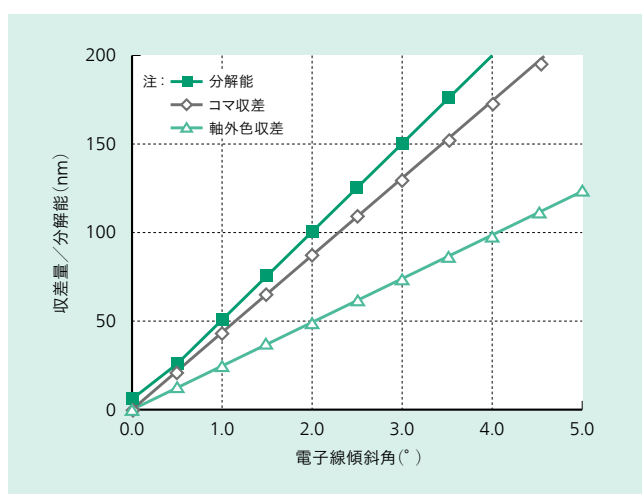


図4 | 電子線傾斜角と分解能の関係

電子線を傾斜させた場合、コマ収差と軸外色収差により分解能が低下する。



図5 | 日立走査電子顕微鏡SU3500の外観

電子線傾斜により、リアルタイムステレオ観察を可能にした走査電子顕微鏡である。

3.2 収差低減光学系の開発

とはいえ、リアルタイムステレオSEMの高分解能化は、装置の発展と実用性において、避けては通れない重要な問題である。そこで、より高倍率の立体観察に対応するため、電子線傾斜に伴う収差を低減する方法を検討してきている^{5), 6)}。具体的には、対物レンズから見て電子源側に電子線傾斜に伴う収差を低減するためのレンズ（収差低減レンズ）を追加し、対物レンズで発生する収差を低減しようとする試みである（図6参照）。

このように、リアルタイムステレオSEMに収差低減レンズを搭載した光学系とすることで、2枚の視差画像の分解能を格段に向上させることができることが分かっている。例えば、収差低減光学系においては、傾斜角 3° で分解能15 nm、観察倍率にして2万倍が可能となることが分かる。

4. 立体視のための観察方式の進展と工夫

リアルタイムステレオSEMで2枚の視差画像を同時に得られるようになると、観察時の画面上で簡単に立体視することができる手法の検討が必要になってくる。立体視の観察の方式にはいろいろな手法が知られているが、リアルタイムステレオSEMに有用で、しかも汎用性の高い方式として、次の二つが挙げられ、製品化されたリアルタイムステレオSEMにおいては、そのいずれかの方式で観察できるようになっている。

4.1 専用メガネを用いて観察する方式（メガネ方式）

最も手軽で汎用的な方式として、左右の視差画像を赤と青の光で重ね合わせて表示し、左右に赤と青のカラーフィルタ（セロファン紙）を貼ったメガネ（赤青メガネ）を用いて見る方法が知られている。これをアナグリフ（anaglyph）という。この方式はパソコンの画面上で簡単に合成できる

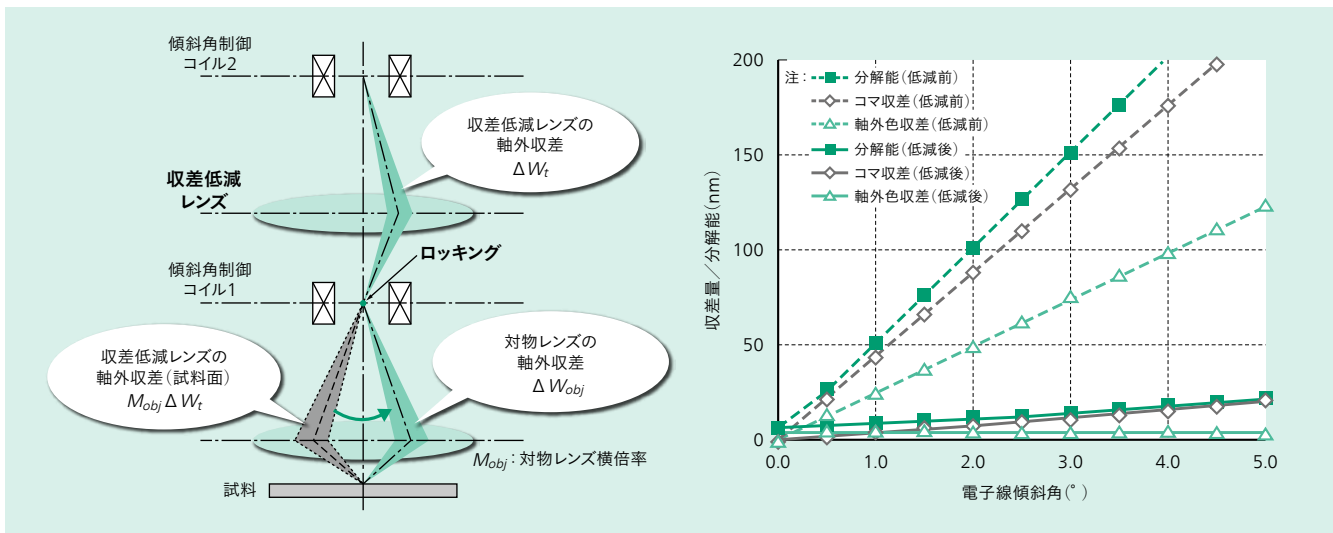


図6 収差低減光学系の概念

電子線傾斜時に、光軸に対して対称な収差を収差低減レンズで発生させることで、対物レンズの収差をキャンセルする。

ことから、リアルタイムステレオSEMの観察画面で視差画像をアナグリフ表示することで、TVレートでのリアルタイム立体視が可能となる。さらに2枚の視差画像をアナグリフ画像として保存すれば、通常のプロジェクタやモニターにおいても赤青メガネさえあれば表示が可能であるという利点を持っている。したがって、製品化されたリアルタイムステレオSEMでは、この機能が標準で搭載されている。

一方、左右の画像に異なる偏光をかけたものを重ねて投影し、これを偏光フィルタの付いたメガネで観察する方法も知られている。これには円偏光と直線偏光を用いるものがある。この場合、リアルタイムステレオSEMの観察時に2枚の視差画像の信号を専用モニターに映し出すことで、リアルタイムでの立体視が可能となる。

4.2 特殊な3D液晶モニターを用いて裸眼で観察する方式 (裸眼方式)

上述のようなメガネを用いなくて、裸眼で簡単に立体視ができる裸眼立体ディスプレイが、最近開発されるようになってきた。これには、縦縞ないし横縞のフィルタを重ねて左右の眼に見える像を分離する「視差バリア方式」や、小さなレンズを板状に並べて左右の像を分離する「レンチキュラ方式」などが採用されていることが多い。しかし、どちらの方法もフィルタを通して観察(表示)するために、モアレや輝度低下が発生するという問題が残されている。また左右の画像を分離して1つのモニターに表示するために、モニター本来の解像度が半減するという問題もある。

そこで、このリアルタイムステレオSEMの画像表示に適した高解像度の裸眼立体視モニターも開発されてきている。

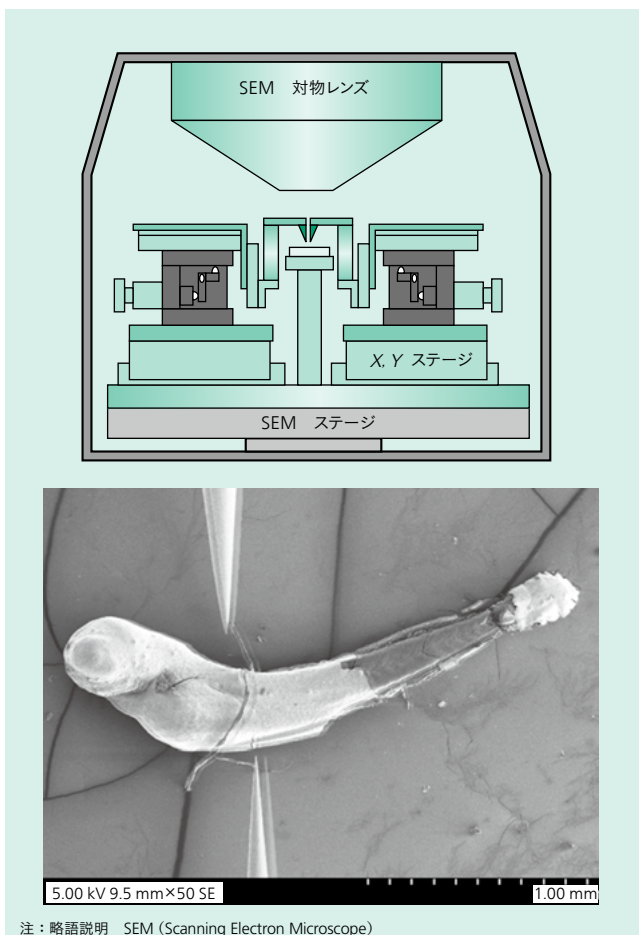
5. リアルタイムステレオSEMを用いたマニピュレーション

このようにSEMによるリアルタイムでの立体視観察が可能になることで、SEMの世界に大きな変化をもたらし始めているのではないかと思う。例えば、SEM内で試料のマニピュレーションを行うという試みはこれまでもあったが、従来のSEMでは単眼視での観察と操作しかできなかったため、画像の奥行きが分からず、精巧な作業ができないという壁があった。これは、片目で針の穴に糸を通そうとしているようなものと言えるであろう。しかし、リアルタイムステレオSEMを用いるならば、マニピュレーションにおいて、解剖針などの装具と試料との立体的な位置関係を正確に把握することができることになる。

そこで、われわれは、リアルタイムステレオSEMに搭載可能な小型のマニピュレータを開発し、それを生物試料のマニピュレーション(または顕微解剖)に用いることで、リアルタイムステレオSEMの有用性を確かめてきている^{7), 8)}。

そのために、SEMの試料室に収納可能かつ遠隔操作が可能な小型のマニピュレータを試作している。この小型マニピュレータを工夫することにより、リアルタイムでの立体視観察を行いながら、SEM内での試料のさまざまな操作や加工が可能である。また、SEMの試料室に複数台のマニピュレータを搭載することにより、両手で解剖針やはさみを操作するようなこともできるようになってきている(図7参照)。これにより、腎臓の糸球体を解剖針で試料内から取り出して任意の場所に移動したり、眼球内の水晶体の水晶体線維をほぐしたりするようなことが可能になっている。

また、ハプティックデバイスを用いた力覚提示システム



注：略語説明 SEM (Scanning Electron Microscope)

図7 SEMの試料室に搭載した小型マニピュレータの概念図(上)と、それを用いてゼブラフィッシュの胚子を微小解剖している画像(下)

下の画像は2枚の視差画像をアナグリフ方式で重ね合わせてある。

を組み合わせると、オペレータが試料表面の凹凸や針の押し込み荷重を体感しながらマニピュレーションを行うことができるようになってきている。今後さらに試料作製法の工夫を加えることにより、実体顕微鏡の下で解剖するような気分で、SEM内での操作ができるようになることが期待される。

6. おわりに

本稿では、立体構造観察に適したSEMの特徴をさらに生かすために開発したリアルタイムステレオSEMについて、その原理や基本構造を紹介し、生物分野への応用の一環としてのSEM内マニピュレーションについて述べた。

近年の技術の革新により、立体視技法は格段に進歩し、映画やテレビの世界など社会に普及し始めている。3D (Three-dimensional) デジタルカメラや3Dテレビ、3Dパソコン、3D携帯電話と、次々と3D家電が発売されるようになってきていることを思えば、リアルタイムステレオSEMは時代にマッチして出来上がったと言えなくもない。しかし、これによりSEMの世界がまた飛躍し、さまざまな分野で利用されるのであればすばらしいことである。こ

うした開発によって、透過型電子顕微鏡とは一味も二味も異なる、SEMならではの世界が切り開かれることを期待している。

謝辞

本研究の一部は、文部科学省委託事業「次世代の電子顕微鏡要素技術の開発」で採択された課題「力覚制御による体感型3Dナノ解剖バイオ顕微鏡の開発」(2006年度～2008年度)と、国立研究開発法人 科学技術振興機構・研究成果展開事業・先端計測分析技術・機器開発プログラムの開発課題「リアルタイムステレオSEMの開発」(2009年度～2011年度)による成果である。ここに謝意を表する。

参考文献

- 1) T. Fujita, et al.: Sem Atlas of Cells and Tissues, Igaku-shoin Medical Pub, Tokyo-New York (1981)
- 2) 伊東, 外: ステレオSEM法, (日本顕微鏡学会関東支部編) 新・走査電子顕微鏡, 116-120, 共立出版 (2011)
- 3) T. Ushiki: Actioforma stereo SEM atlas of mammalian cells and tissues 1, META Corporation Japan, Tokyo, ISBN978-4-904813-01-0 (2009)
- 4) J.B. Pawley: Design and performance of presently available tv-rate stereo SEM systems, Scanning Electron Microsc, 1978/I (SEM Inc., AFM O'Hare, IL 1978), p.157 (1978)
- 5) 牛木, 外: 力覚制御による体感型3Dナノ解剖バイオ顕微鏡の開発, 日本顕微鏡学会第65回学術講演会予稿集, p.96 (2009)
- 6) 伊東, 外: リアルタイムステレオSEMの実用化開発, 日本顕微鏡学会第66回学術講演会予稿集, p.179 (2010)
- 7) F. Iwata, et al.: Development of a nano manipulator based on an atomic force microscope coupled with a haptic device: a novel manipulation tool for scanning electron microscopy, Arch Histol Cytol, 72, 271-278 (2009)
- 8) 岩田, 外: 電子顕微鏡におけるAFMのマニピュレーター利用, O plus E, 34, 229~234 (2012)

執筆者紹介



牛木 辰男

新潟大学 教育研究院医歯学系 教授 顕微解剖学分野
現在, 細胞と組織の微細構造解析と顕微鏡の医学生物学応用に従事
医学博士
日本解剖学会会員, 日本顕微鏡学会会員



岩田 太

静岡大学 大学院総合科学技術研究科 教授 機械工学
現在, 主に走査型プローブ顕微鏡によるナノ計測・加工に従事
博士(工学)
応用物理学会会員, 精密工学会会員, 日本表面科学学会会員



小竹 航

株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学システム製品本部 電子顕微鏡第二設計部 所属
現在, 走査型電子顕微鏡の設計開発に従事



伊東 祐博

株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学システム製品本部 所属
現在, 走査型電子顕微鏡・透過型電子顕微鏡・集束イオンビーム加工装置の設計開発マネジメントに従事
日本顕微鏡学会会員