連続切片SEM法により広がる植物オルガネラの世界

永田典子

日本女子大学理学部 〒112-8681 東京都文京区目白台2-8-1

要旨：連続切片SEM法（アレイトモグラフィ法）は、三次元再構築のための新しい手法であり、従来の連続切片TEM法に比べて以下の多くの利点がある。(1) 連続切片の回収が容易である。(2) 回収時の切片のロスやしわが少なく、観察時における切片の収縮や損傷も少ない。(3) 大きな基板が利用できるため、操作が楽なだけでなく、一度に大量の情報が得られる。(4) 観察倍率のレンジが広いので、切片の並び順などの全体像を把握しやすい。(5) 高解像度の広域画像取得が容易である。本稿では、植物オルガネラの解析例を示しつつ、連続切片SEM法と三次元再構築の手順を紹介する。また、SEM切片観察ならではの、特に注意すべき点についても解説する。

The world of plant organelles opened by serial section SEM

Noriko Nagata

Faculty of Science, Japan Women's Univ., Mejirodai 2-8-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8681 Japan

Author for correspondence: N. Nagata, n-nagata@fc.jwu.ac.jp

Summary: Serial section SEM (or array tomography) is a new technique for 3D reconstruction, and has many advantages over conventional serial section TEM. (1) It is easy to pick up serial sections. (2) There is little loss, wrinkling or damage of sections when picking up or observing. (3) Since a large glass plate is used, not only operation is easy, but also a large amount of information can be obtained. (4) The wide range of observation magnification makes it easy to grasp the whole image. (5) It is easy to acquire high-resolution wide-area images. In this paper, I introduce the procedure of serial section SEM and 3D reconstruction, showing an example of analysis of plant organelles. The following describes points that require special attention when observing SEM sections.

Key words: 3D reconstruction, array tomography, plant organelle, serial section SEM

はじめに

透過電子顕微鏡 (TEM) のもつ分解能は1Åとも言われ、分子・原子の世界を覗けるほどである。生物試料相手にその分解能を出すのはさすがに厳しいが、それでもナノメートル世界への扉を開いたTEM技術は、生物科学の発展に大いに寄与した。しかし近年、生物研究者の電子顕微鏡 (電顕) 離れが著しい。その理由の1つは、TEMの抱える技術的なハードルの高さではないだろうか。樹脂包埋からの超薄切片観察という最もオーソドックスなTEM技術であっても、その習得には時間を要し、卓越した技が必要であると言われる。しかも最近では、TEM画像であっても統計的な裏付けが求められ、二次元ではなく三次元解析が必要と言われ、量・質ともに要求が高くなっている。となれば、ますますTEMを敬遠したくなるのも無理はない。そのような中、走査電子顕微鏡 (SEM) が、TEMの難しさを解消する救世主として俄かに脚光を浴びている。本稿では、SEMを用いた切片観察法が、TEMよりもいかに簡便な技術であり、美しい三次元再構築像を得るのにどれほど威力を発揮するかについて解説する。

なぜSEMで切片が観察できるのか

SEMといえば表面観察のための顕微鏡である。そのSEMで、なぜ切片が観察でき、TEMのような画像を得ることができるのか、その原理は意外にも単純である。

TEMにしるSEMにしる、電子染色が施されて重金属が吸着した部分を、電子線は透過することができない。TEMでは、切片を透過した電子線が蛍光板 (検出器) と反応して白となり、電子線が透過しなかった部分が黒となって像を形作る (図1A)。これに対しSEMでは、透過せずに反射した電子線が検出器と反応して白となり、透過した電子線は検出器に向かわないのでその部分は黒となる。つまり、もしTEMとSEMで同じ切片を観察したならば、白黒がちょうど逆になった画像が得られることになる。図1BはSEM (HITACHI SU-8220) による超薄切片の観察像 (シリイヌズナ薬) であり、図1Cは図1Bをコンピュータ上で単に白黒反転した画像である。実際のところ、白黒反転してしまえば、SEM像はTEM像とほとんど見分けがつかないだろう。

なお、通常の表面観察用のSEMでは、試料表面を重金属で隙間なく覆ってから (金属コーティング)、電子線で金属表面を走査し、二次電子を検出することで像を得る。これに対し、SEMによる切片観察では反射電子を用いる。反射電子とは、文字通り試料にあてた電子線が反射してきたものであり、対象物深部の元素組成情報に敏感であると言われる。切片観察では電子染色による重金属の吸着差を検出することになるため、反射電子の利用が必須である。そのためSEMによる切片観察技術は、反射電子検出器の性能向上があつてこそ発展した。また、ひと昔前までの汎

用SEMはTEMに比べ著しく解像力が劣っていたものだが、電界放出形電子銃を用いたSEM (FE-SEM) の登場により、SEMでもより高倍率での観察が可能となった。以上のような技術革新や性能向上が相まって、今やSEMによる切片観察が可能となったわけである。

SEMの解像力はTEMに敵うのか

SEMの性能が向上したといっても、さすがにTEMのÅ世界は見ることはできない。ただ、樹脂包埋の超薄切片観察ならば、もともとTEMでもそこでも解像力が出ない。さらに、見る対象物がオルガネラ程度の大きいものであるならば、そもそもそこまでの解像力はいらない。そこで、同じ樹脂包埋サンプルから切り出した超薄切片 (80 nm厚) を、方やTEM (JEOL JEM-1400)、方やSEM (HITACHI SU-8220) で観察し、実際にどれほど解像力に差がつくのか比較してみた (図1D-G)。試料は緑のパブリカで、グラナ構造をもつ典型的な色素体 (葉緑体) を観察対象とした。なお、同じ色素体を探して撮影・比較したため、固定状態等の差はないものとみなした。結果的には、確かにTEM

の方が若干チラコイド膜の線がはっきりしており解像力は高いようであった (図1F)。しかし、SEMであっても膜の枚数も無理なく数えることができ (図1G)、筆者のようにオルガネラを観察対象とする者にとっては、SEMの解像力は十分過ぎるほどであった。

ところで、筆者が用いているのはFE-SEM (HITACHI SU-8220) であるが、汎用SEMではどこまで観察に耐えるのだろうか。図1H-Jは、シロイヌナズナ芽生えの子葉を、卓上型の簡易SEM (HITACHI TM3030) を用いて撮影した画像である。葉緑体のチラコイド膜の枚数が数えられるほどではないが、グラナが発達している様子などが明瞭に観察でき、光学顕微鏡よりはずっと細やかな像を得ることができた (図1J)。分解能でいうならば0.1 μm 程度は十分に出るので、観察対象がオルガネラの輪郭などの大きな物であるならば、汎用SEMで対応可能である。高価なFE-SEMの普及率は高くはないが、汎用SEMなら持っているという機関は多いだろう。その意味でも、TEMのかわりにSEMを使って、もっと気軽に切片観察にトライしてみてはいかがだろうか。

図1 TEM及びSEMによる超薄切片観察。(A) 切片のTEM観察とSEM観察の違いを表す概念図。

(B, C) シロイヌナズナ葉。(B) はSEM反射電子像、(C) は(B)の反転像。

(D-G) 緑パブリカの色素体。(D, F) はTEM像 (JEOL JEM-1400で撮影)、(E, G) はSEM像 (HITACHI SU-8220で撮影)。(F) は(D)の部分拡大、(G) は(E)の部分拡大。(D, F) と (E, G) は同じ包埋サンプルから切り出した同じ色素体の別切片画像である。

(H-J) シロイヌナズナ芽生えの子葉のSEM像 (HITACHI TM3030で撮影)。

Bars = 50 μm (B, C), 1 μm (D, E), 100 nm (F, G), 300 μm (H), 30 μm (I), 3 μm (J)。

連続切片SEM法がTEMに比べどれほど簡便か

SEMが特に注目を浴びているのは、連続断層像取得に威力を発揮するからである。例えば、SEM試料室内で樹脂包埋サンプルの表面をマイクロームで削りながら撮影する手法(SBF-SEM)や、収束イオンビーム(FIB)で包埋サンプルを切削しながら順に撮影していく手法(FIB-SEM)がある(Buchacker et al. 2019, Delgado et al. 2019, Goggin et al. 2020, 大井ら 2020)。本物の切片を作製しなくとも、断層面撮影により、連続切片を撮影したかのような効果が得られるのである。これらの手法では、切片作製をする必要がないのが魅力であるが、その一方でSEMにマイクロームやFIB装置を搭載しなくてはならず、装置導入へのハードルは高いといえる。これに対し、これから筆者が紹介する手法は、連続切片SEM法(serial section SEM; S³SEM)、もしくはアレイトモグラフィ法(array tomography)という名称で知られるものである(Micheva and Smith 2007, Horstmann et al. 2012, Reichelt et al. 2012, Koga et al. 2016)。これは、連続切片を作製しガラスなどの基板に載せた後に、SEM試料室で撮影する方法である。切片作製は手動で行う必要があるが、それでもTEM法に比べその操作の難易度は格段に低い。

連続切片SEM法では、TEM用の樹脂包埋サンプルを利用できる。筆者は、アルデヒド系の前固定液と四酸化オスミウムの後固定液というオーソドックスな二重固定を行い、スパー樹脂包埋したものを用いている。10年以上前のサンプルを掘り起こして使うこともあるが、何も問題はない。これを、ウルトラマイクロームとダイヤモンドナイフを用いて80 nm程度の厚みに薄切し(図2A)、円形のカバーガ

ラスに拾う(図2B)。TEMでは、切片作製よりも切片をグリッドに拾う操作が難しいと言われており、特に連続切片の場合は何枚ものグリッドにわたるため、切片ロスの可能性が高まる。また、TEM用グリッドに貼られた薄膜が脆弱であるために、切片回収時にしわや折れ曲がりなどの切片ダメージも受けやすく、観察時に薄膜の破れや切片の収縮なども起こりやすい。これに対し、この連続切片SEM法では、カバーガラスのような大きくて安定した基板に一度に連続切片を拾うことができるため、ロスやダメージのない美しい連続切片を簡便に取得できるのである。また、観察時に切片が損傷する心配も少なく、試料が長持ちする点も安心である。カバーガラスに拾ったSEM用切片には、ウラン・鉛の電子染色を施し(図2B)、さらに導電性を高めチャージアップを防ぐために、オスミウムコーター(メイワフォーシス Neoc-Pro)を用いてオスミウムを薄く蒸着する。その後、SEM試料台に導電性テープなどを用いてカバーガラスを固定する(図2C)。

SEM(HITACHI SU-8220)による観察では、まず低倍率(Low-Mag)撮影を行って全体を把握する(図2D)。ここで大切なのは、連続切片の並び順を確定する作業(番地付け)を行うことである(図2E)。「番地付け」では、1枚1枚の切片内構造(例えば細胞の輪郭など)が把握できる程度の倍率で全切片を漏れなく撮影し、各画像を比較しながら正確に並び順を調べていく必要がある。SEMはTEMに比べて、観察倍率のレンジが広く、切れ目のないズーミングが得意であるため、この作業が大変楽なのが有利な点である。その後、高倍率(High-Mag)撮影へと進む。

図2 SEM連続切片撮影の手順。
(A) ダイヤモンドナイフのポートに浮かぶ超薄切片(約80 nm厚)。
(B) 円形カバーガラスに拾った切片への電子染色(ウラン・鉛)。
(C) オスミウムコーティング後にSEM試料台に貼り付けられたカバーガラス。
(D) 低倍率(Low-Mag)撮影, 加速電圧1 kV, 作動距離8.0 mm, 倍率30倍。
(E) 低倍率(Low-Mag)撮影, 加速電圧2 kV, 作動距離2.1 mm, 倍率35倍。切片の順番を確認し「番地付け」を行う。
(F) 高倍率(High-Mag)撮影, 加速電圧2 kV, 作動距離2.0 mm, 倍率3,000倍。横15枚×縦11枚の計165枚の結合画像(シロイヌナズナ種子の胚の子葉)。1枚の切片の全領域の広域画像を取得した。
Bars = 1 mm (D, E), 100 μ m (F)。

SEMによる広域撮影のすすめ

連続切片撮影をはじめめる前に、どこかの切片を1枚でよいので、全領域を網羅した広域画像を取得しておくことを強くお勧めする。広域画像といっても、高倍率撮影でなくては意味がない。そこで、タイル状に何枚も画像を撮影し、のりしろ部分の画像を合わせていき、1枚の大きな結合画像を取得する(図2F)。筆者らは以前にTEMで広域画像を自動取得する手法を開発したことがあるが(Toyooka et al. 2014, 豊岡ら 2014)、筆者が使っているSEM(HITACHI SU-8220)には同様の機能を有するソフト(Multi Zigzag)をオプションでつけることができる。数百枚の画像ならば、半日ほどあれば全自動で撮影と結合を行ってくれる優れものである。

連続切片SEM法は、SBF-SEMやFIB-SEMと違い、何度でも同じ切片を観察に供せるのが最大の利点といえる。この利点を生かし、事前にじっくりと広域画像を見渡して、ここぞと思う観察場所を決めておくことよい。特に多細胞の植物試料の場合は、様々な組織・細胞が入り混じっていたり、固定剤の浸透に差があったりと均一ではないことが多いので、事前に場所を吟味しておくことがむしろ時間短縮となる。また、広域画像を取得しておくこと、色々と重宝することがある。三次元再構築をするのは手間暇がかかるため数をこなすことはできないが、二次元像であってもたくさんの数を眺めることができるならば、自ずと全体の形は見てくるものである。1枚の切片に含まれる情報は膨大であるため、もし画像から統計解析を行うならば広域画像はうってつけである(Toyooka et al. 2014, Kataoka et al. 2019)。

SEM切片観察において注意すべき点 ①電子の侵入深さと加速電圧

SEMで切片を観察するにあたり、TEMにはない幾つかの注意点がある。1つ目は、試料内への電子の侵入深さと加速電圧との関係についてである。入射電子の加速電圧の値を上げると、より深部の情報が得られることがわかっている。TEMの場合は、100 kV前後の加速電圧を用いるのが一般的であり、切片厚80 nm程度の切片ならば、電子線は当然のことながら容易に透過する。透過するからこそ結像できるのであって、TEMでは切片内情報が全て画像として表示されるという保証がある。しかしSEMの場合は、断面からの反射電子を使って結像するため、どの程度の深さ情報が得られているかが大きな問題となる。仮に、切片厚よりも浅い情報しか取得できないのであれば、連続切片からは切れ切れの構築像しか得られないことになる。そこで筆者はまず、どの加速電圧が適切であるかの検討を行った。

加速電圧の結果を示す前に、検出器についても言及しておきたい。筆者所属機関のSEM(HITACHI SU-8220)は複数の検出器を搭載しており、今回比較したのは半導体検出器(Upper検出器と表示されたもの)とYAG検出器である。検出器の説明は割愛するが、今回用いた半導体検出器は低い加速電圧での検出を得意とし、YAG検出器は高めの加速電圧を得意とするようである。両検出器を用いて、80 nm厚の同一切片の同一視野にて、様々な加速電圧で画像を撮影し比較を行った(図3A-K)。なお、試料内への電子の侵入深さを判定する目印として、グリッド線付きのカ

バーガラスを基板として使用した。つまり、切片の下にグリッド線が見えてくれば、80 nm厚の情報が得られていると判断できる。

半導体検出器の場合、加速電圧1 kVと2 kVを比較すると、1 kVではグリッド線の有無で地色に差がないのに対し(図3B)、2 kVではグリッド線の地色が透けて見えた(図3C)。すなわち、加速電圧1 kVでは80 nm厚全ての情報を得られないが、2 kVでは得られていると判断できる。4 kV以上ではむしろグリッド線が濃くなりすぎており(図3D-F)、電子の侵入深さが深すぎるようである。このことから筆者は、連続切片SEMを行う際には、80 nm厚で半導体検出器を用いて加速電圧2 kVというのを採用している。

YAG検出器の場合、加速電圧4 kV以上でないと結像できなかったが、結果としては4 kVならば観察対象(緑パブリカの色素体)の解像力も悪くなかった(図3G)。加速電圧4 kV同士で比べるならば、像質はYAG検出器のほうが半導体検出器よりも若干良いように思う。なお、切片を厚くして同様の解析を行ってみたところ、予想通りではあるが、厚い切片にはYAG検出器の方が適していた。例えば500 nm厚の場合、YAG検出器で加速電圧6 kVというのがお勧めである。

SEM切片観察において注意すべき点 ②ビームダメージ

TEMにはないSEM特有の操作として、金属コーティングがある。これは試料のチャージアップを防ぐために不可欠な操作であるが、高解像度で観察する以上、試料表面に余計なものは被せたくないものである。筆者は、コーティングの影響をなるべく少なくするためにオスミウムを薄く蒸着するようにしているが、念のため以下のように条件を変えて観察を行ってみた。すなわち、カバーガラスにオスミウムコーティングをしてから切片を載せたもの(図3L)と、カバーガラスに切片を載せてからオスミウムコーティングを行ったもの(図3M)とで比較した。両者は、同じ包埋サンプルから切り出した同じ色素体の別切片像であり、倍率35,000倍にて5分間の電子線照射後に視野を動かさずに倍率10,000倍にて撮影を行ったものである。結果としては、試料表面にオスミウムがあってもなくても、観察対象(緑パブリカの色素体)の画質には全く影響は感じられなかった。一方、試料の上にオスミウムコーティングをした場合には、ビームダメージを著しく軽減する効果があることがわかった。図3Lの矢頭はビームダメージを受けた領域を指しており、くっきりと跡が残っているが、図3Mでは全くダメージの跡はない。以上のように、ビームダメージ軽減という多大な恩恵があるため、是非ともオスミウムコーティングは切片の上にするをお勧めする。なお、オスミウムコーティングを全く行わなかったものは、チャージアップのために結像することさえできなかった。

三次元再構築の手順と具体例

連続切片の撮像が終了したら、次は三次元再構築である。得られた画像をどのように料理するかは研究目的に応じて異なると思うが、参考までに筆者の方法を以下に紹介する。まず、画像から目的の構造物を抽出しなくてはならないのだが、白黒の微妙な濃淡で描かれた電顕画像から機械に自動でそれを読み取らせるのは、なかなか難しい。そ

図3 SEM切片観察における諸条件の検討。
(A-F) 半導体検出器にて加速電圧を変えて撮影した画像。作動距離 1.9–2.1 mm, 倍率15,000倍。
(A)加速電圧 0.8 kV, (B)1.0 kV, (C)2.0 kV,
(D)4.0 kV, (E)6.0 kV, (F)7.0 kV。
(G-K) YAG 検出器にて加速電圧を変えて撮影した画像。作動距離 8.4–8.5 mm, 倍率15,000倍。
(G)加速電圧 4.0 kV, (H)6.0 kV, (I)7.0 kV,
(J)10.0 kV, (K)15.0 kV。矢印は、カバーガラス上のグリッド線の端を示している。(B)ではグリッド線の段差はわかるが地色は透けていない。画像は緑パブリカの色素体。
(L, M) オスミウムコーティングの条件を変えた試料の画像。加速電圧 2.0 kV, 作動距離 2.1 mm, 倍率10,000倍。半導体検出器にて観察。倍率35,000倍にて5分間の電子線照射後に倍率10,000倍に戻して撮影した。矢頭は、ビームダメージを受けた領域を指す。画像は緑パブリカの色素体。
(L) カバーガラスにオスミウムコーティングをしてから切片を載せたもの。
(M) カバーガラスに切片を載せてからオスミウムコーティングを行ったもの。
Bars = 1 μ m (L, M)。

図4 三次元再構築の手順。(A) Adobe Photoshop CS6を用いた作業画面。電顕画像上にレイヤーを重ねて、抽出したい構造をペンタブでなぞる(トレース)。(B-D) Image-Pro Premier 3D 64-bit-ver.9.3 (日本ローパー)を用いた作業画面。(B) アライメント。連続切片の前後を赤と緑にして、重ね合わせ図を見ながら手動で位置合わせ行う。(C) セグメンテーション。トレース像を抽出し認識させる。(D) 3D表示。

こで、筆者はトレース(目的物を手動でなぞる作業)を行うことにしている。用いるソフトはAdobe Photoshop CS6であり、電顕画像上にレイヤーを重ねて、抽出したい構造をペンタブでなぞる(図4A)。トレースの後にアライメント(連続画像の位置を合わせる作業)を行うが、アライメントはトレース前に行ってもよい。アライメントから3D表示まではImage-Pro Premier 3D 64-bit-ver.9.3(日本ローパー)を用いている。連続切片の前後を赤と緑にして、重

ね合わせ図を見ながら手動で位置合わせ行う(図4B)。アライメントは自動で行うこともできるが、結局は手動での修正が必要であった。次に、トレース像を使ってセグメンテーション(構造物を選択・抽出し認識させる作業)を行う(図4C)。すでにトレースが終わっているの、マジックワンドツールを用いることで、容易に目的物を認識させることができる。最後に、切片の厚み情報などを入力後、3D表示させれば完成である(図4D)。図5には、連続切片

SEM法による三次元再構築の具体例を示す。観察対象は赤パブリカの色素体である。詳細はここでは言及しないが、特徴的な構造物が色素体内にそれぞれ凝集して存在している様子などを明らかにすることができた。

図5 連続切片SEM法による色素体(赤パブリカ)の三次元再構築像。(A)連続切片画像(67枚)。(B)67枚目の色素体画像。(C)三次元再構築像。Bar = 2 μ m (B)

連続切片SEM法とFIB-SEMとの比較

先ほどFIB-SEMについて紹介したが、連続切片SEM法がFIB-SEMにどうしても敵わない点がある(大井ら 2020)。それはZ軸情報の精細さである。切片を手動で作製せねばならない連続切片SEM法では、切片の厚みはせいぜい

60 nmが限界である。これに対して、FIBの切削能力は非常に優れており、数 nm ピッチのZ軸分解能を有している。このため、小さなものを観察対象とする場合には、是非ともFIB-SEMを試したいところである。さらにFIB-SEMは、動かない断面を撮影するためにアライメントが容易であるという利点もある。また、削るところから機械まかせにできるため、より一層簡便な手法というのも嬉しい点であろう。

しかし、連続切片SEM法の方が優れている点も多い。最大の利点と思うのは、切片を何度でも観察できることである。基板に貼り付けていることから、TEMグリッドの薄膜のように経年劣化することも少なく、管理が良ければ一生モノであるかもしれない。また、FIBは切削に時間がかかり切削面積も限られるのに対し、連続切片SEM法では広い領域を対象とできるのが大きな利点である。大容量データ取得は最近の流行でもあり、器官を丸ごと観察するのも連続切片SEM法は向いている(Wacker et al. 2016)。さらに、連続切片SEM法では、TEM用包埋サンプルをそのまま使えるのが有り難い。FIB-SEMでは、後から電子染色を追加することができないため、事前に特別な固定・染色を施さなくてはならない。加えて、FIB-SEMは相当高価なSEMであるのに対し、連続切片SEM法ではマイクロームと通常のSEMがあれば実施可能であり、導入が容易なのも魅力の1つといえるだろう。

おわりに

本稿では、SEMを用いた切片観察法について、主に技術的な側面から解説した。筆者が研究対象としている色素体やミトコンドリアは大きさが数 μ m程度で、その形態解析には連続切片SEM法が実にぴったりであった。植物科学の世界でも、細胞内構造を三次元再構築することにより、これまで気がつかなかった様々なオルガネラ形態が明らかになりつつあり(Yamane et al. 2018)、まさにオルガネラ世界の新しい扉が開かれた思いがしている。光・電子相関顕微鏡と連続切片SEM法を組み合わせるなど、色々の応用例も報告されつつある(Burel et al. 2018, Booth et al. 2019)。この魅力的な連続切片SEM法の存在を多くの人に知ってもらい、電顕に携わる研究者が少しでも増えることを願っている。

謝辞

本稿は、坂野 愛 氏、八幡 英里香氏、村上 あまね 氏の卒業論文を元に執筆したものである。本研究を行うにあたり技術支援を頂いた、盛一 伸子 氏、小林 恵 氏、高木 智子 博士をはじめ、日本女子大学細胞生物学研究室及び電子顕微鏡施設の皆様に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- Booth, D. G., Beckett, A. J., Prior, I. A., and Meijer, D. (2019) SuperCLEM: an accessible correlative light and electron microscopy approach for investigation of neurons and glia in vitro. *Biol Open* 8: bio042085.
- Buchacker, T., Muhlfeld, C., Wrede, C., Wagner, W. L., Beare, R., McCormick, M., and Grothausmann, R. (2019) Assessment of the alveolar capillary network in the postnatal

- mouse lung in 3D using serial block-face scanning electron microscopy. *Front Physiol* 10: 1357.
- Burel, A., Lavault, M. T., Chevalier, C., Gnaegi, H., Prigent, S., Mucciolo, A., Dutertre, S., Humbel, B. M., Guillaudeux, T., and Kolotuev, I. (2018) A targeted 3D EM and correlative microscopy method using SEM array tomography. *Development* 145: dev160879.
- Delgado, T., Petralia, R. S., Freeman, D. W., Sedlacek, M., Wang, Y. X., Brenowitz, S. D., Sheu, S. H., Gu, J. W., Kapogiannis, D., Mattson, M. P., and Yao, P. J. (2019) Comparing 3D ultrastructure of presynaptic and postsynaptic mitochondria. *Biol Open* 8: bio044834.
- Goggin, P., Ho, E. M. L., Gnaegi, H., Searle, S., Oreffo, R. O. C., and Schneider, P. (2020) Development of protocols for the first serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) studies of bone tissue. *Bone* 131: 115107.
- Horstmann, H., Korber, C., Satzler, K., Aydin, D., and Kuner, T. (2012) Serial section scanning electron microscopy (SSEM) on silicon wafers for ultra-structural volume imaging of cells and tissues. *PLoS One* 7: e35172.
- Kataoka, M., Ishida, K., Ogasawara, K., Nozaki, T., Satoh, Y. I., Sata, T., Sato, Y., Hasegawa, H., and Nakajima, N. (2019) Serial section array scanning electron microscopy analysis of cells from lung autopsy specimens following fatal A/H1N1 2009 pandemic influenza virus infection. *J Virol* 93: e00644-19.
- Koga, D., Kusumi, S., and Ushiki, T. (2016) Three-dimensional shape of the Golgi apparatus in different cell types: serial section scanning electron microscopy of the osmium-impregnated Golgi apparatus. *Microscopy (Oxf)* 65: 145-157.
- Micheva, K. D., and Smith, S. J. (2007) Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* 55: 25-36.
- Reichelt, M., Joubert, L., Perrino, J., Koh, A. L., Phanwar, I., and Arvin, A. M. (2012) 3D reconstruction of VZV infected cell nuclei and PML nuclear cages by serial section array scanning electron microscopy and electron tomography. *PLoS Pathog* 8: e1002740.
- Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N., and Matsuoka, K. (2014) Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 55: 1544-1555.
- Wacker, I., Spomer, W., Hofmann, A., Thaler, M., Hillmer, S., Gengenbach, U., and Schroder, R. R. (2016) Hierarchical imaging: a new concept for targeted imaging of large volumes from cells to tissues. *BMC Cell Biol* 17: 38.
- Yamane, K., Oi, T., Enomoto, S., Nakao, T., Arai, S., Miyake, H., and Taniguchi, M. (2018) Three-dimensional ultrastructure of chloroplast pockets formed under salinity stress. *Plant Cell Environ* 41: 563-575.
- 大井崇生, 山根浩二, 谷口光隆 (2020) FIB-SEMを用いた三次元再構築法によるイネ葉肉細胞と葉緑体の形態解析. *Plant Morphol* 32: 19-25.
- 豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 永田典子 (2014) 高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用. *Plant Morphol* 26: 3-8.

Received: 10 January 2020 / Accepted: 7 March 2020