特集

バイオイメージング特集Ⅲ：デジタル画像処理（ナノマシン集合体レベル）

電子線トモグラフィー

峰雪 芳宣¹、須田 甚将²、唐原 一郎²

¹広島大学大学院理学研究科生物科学専攻（〒739-8526 東広島市鏡山1-3-1）、

²富山大学理学部生物学科（〒930-8555 富山市五福3190）

Electron tomography

Yoshinobu Mineyuki¹, Jinsuke Suda², Ichiro Karahara²

¹Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima, 739-8526, Japan,

²Department of Biology, Faculty of Science, Toyama University, Toyama, 930-8555,
Japan

要旨：生命現象を実際に司っているナノマシンあるいはより高次な集合体で構成されるナノシステムが、いつ、どこで、どの様な挙動をしているか、直接見ることは生命現象の解析には必要不可欠である。これら、ナノレベルの観察には電子顕微鏡が必要であるが、最近まで、固定と画像処理技術の問題で解析に限界があった。最近になって、試料の凍結技法の進歩と電子線トモグラフィーによる3D解析法の開発により、従来よりも信頼のできるナノレベルでの細胞内構造の解析が可能になった。本稿では、ナノレベルでのバイオイメージング技術の例として、電子線トモグラフィー技術の歴史と方法について概説する。

Summary : To determine how, where and when nano-machines and/or nano-systems act within cells is necessary for understanding life phenomena. To analyze the cellular structure at nano level, electron microscope is necessary. However, until recently, the analysis of cellular structure by electron microscopy has been limited by both specimen preparation method and by image analysis problems. Both of these limitations can be overcome by combining cryofixation methods in conjunction with electron tomography. In this lecture, we will describe the history and the method of electron tomography.

Key words : electron tomography; high pressure freezing; cytoskeleton; onion; high voltage electron microscopy.

1. はじめに

生命現象の多くは、個々の生体分子の単独プレーではなく、何種類かの生体分子が集まった高分子集合体として一つのナノマシンを形成し機能することが多い。分子生物学的手法で、バイオナノマシンの個々の構成分子が次々と明らかになり、その分子構造はX線結晶解析等の構造生物学的手法で（Åレベル）、また、分子の細胞内での挙動は蛍光プローブと蛍光顕微鏡を使った生体内でのライブイメージングで（ μm レベル）解析できるようになって来ている。しかし、実際の生命現象は様々なナノマシンが集まった、より高次の集合体の場（ナノシステム）を形成して行われる。そのため、これらナノマシンがどのように相互作用して一つの生命現象を引き起こしているか、その現場の生の様子を見る必要がある。つまり、ナノレベルでのバイオイメージングが必要である。この目的に要求されるのは分解能1~10nmの世界である。このスケールで観察する装置は電子顕微鏡であるが、従来の電子顕微鏡法では、固定法と画像解析法に限界があり、真実に近い形でナノスケールでの3次元定量解析がなかなか進まなかった。最近になり、試料の凍結技法の進歩と、コンピューター技術の進歩で高容量の情報を高速で扱える様になり、凍結した試料を使った電子線トモグラフィーの技術が、新しい技術として注目を集めている。本稿では、コンピュータトモグラフィーの説明から始めて、現在のトモグラフィー技術の使われ方、電子顕微鏡での応用の仕方について説明し、最後に実際我々がやっている加圧凍結・2軸電子線トモグラフィー法の説明とそれで得られた結果について紹介する。

2. コンピュータトモグラフィー（CT）とは？

CT検査とか断層写真という言葉は、病院で良く聞く言葉である。このCTがコンピュータトモグラフィーのことで、外科的な手術をしなくても体の中の断面が見えるので、癌の早期発見などに役立っている技術である。CTとは、X線等を使って多方向から投影した画像を元に、コンピューターで数学的な処理をすることにより真の断面像を再生する技術である。この手法を電子顕微鏡に応用したのが電子線トモグラフィー（electron tomography）である。

3. CTの歴史

19世紀末のRentogenによるX線の発見以降、人類は体の中を透かしてみる技術を手に入れることになった。しかし、X線写真は3次元の立体構造を2次元に投影した像であり、奥行き情報が失われてしまう。それを補うための断層写真法が古くから工夫されてきたが、周りのぼけを取り除くのが難しく、コントラストが低下し満足のいく画像は得られなかった。1973年に英国のEMI社の技術者HounsfieldがX線CTを開発（Hounsfield 1973）し、従来のものとは比べ物にならないくらい良い画像が得られるようになり、この技術が特に医療分野で広がった。この方法と同じ様な原理は、それよりも前にCormack（1963）がガンマ線を使って発表していたため、1979年にHounsfieldとCormackの2人がCTの業績でノーベル医学・生理学賞を受賞した。

確かに実用性と一般へのインパクトの大きさから医療分野のCTが注目されて来たが、CTの数学的理論は1917年にRadonによって提唱されており（Radon 1917）、Hounsfield以前にも、電子顕微鏡、電波天文学、光学などの分野で研究されていた様である。ただ、コンピューター技術の進歩にうまく乗り、実用化にこぎ着けたHounsfieldのX線CTの発表が、デジタル画像処理が本格的に実用化されるきっかけとなったことは確かである。その後、コンピューターの処理能力とメモリー容量が飛躍的に発達することにより、より高速、高画質のデータが得られる様になって来た。植物科学分野で

も、電子線トモグラフィー以外に、X線CTによる器官の3次元観察 (Stuppy et al. 2003) やNMR顕微鏡による植物体内の水の移動の観察 (Köckenberger 2001) 等にもCTが使われている。

4. CTの原理

Radonの考えたCTの数学的原理を説明したのが図1A,Bである。図1A中央にある白黒の模様が見たい断面の真の姿だとする。これは2次元の様々な点の集まりと考えられる。ここでは x, y 座標上の個々の吸収係数を持った点の集まりとして、この点の吸収係数を $f(x, y)$ と表すことにする。この像に1方向から平行なビーム (例えばX線) を当てると、各点の吸収係数に従ってビームの強度が減少し、1次元の濃淡パターンの情報が検出できる。これを投影図と呼ぶ。投影図の個々の点 (投影データ) は、ビームが通過して来た直線上の吸収係数の値の総和に比例する。 (x, y) 座標系から角度 θ だけ回転させた座標系を (r, s) とすると、角度 θ の方向から投影したビームの投影データ (ここでは、 $p(r, \theta)$ と表す) は、像中、数式で $x \cos \theta + y \sin \theta = r$ と表現できる

直線上にある点の値の総和となる。つまり、 $p(r, \theta)$ はビームが通過した直線上の線積分を意味する。この変換は $f(x, y)$ に $p(r, \theta)$ を対応づける積分変換と考えられ、発見者にちなんで Radon変換と呼ばれている (Radon 1917)。数学的には、この投影データ $p(r, \theta)$ を $-\infty < r < +\infty, 0 \leq \theta < \pi$ において計算し逆変換すれば原画像の各点の $f(x, y)$ が得られるはずである。つまり、様々な角度から投影 (projection; 図1A) し、それを逆投影 (backprojection; 図1B) して重ね合わせることで、元の画像が再構成できるというのが、CTの基本原理である。

互いに180°異なる方向からの投影データ (図1Aの右側から横に進行したビームの投影データと左側から横方向に進行したビームでの投影データ) は全く同じ情報になるので片方だけで十分で、実際には360°すべての方向から撮る必要はなく、半分の180°の範囲の情報を得れば良い。ビームもX線である必要はなく、上記のRadon変換の条件を満たすものであれば良い。また、現実には、Radonの方法はあまり実用的でなく、再構成のプログラムはこの30年間にいろいろ開発され、幾つかのアルゴリズムが使用されている。代表的なアルゴリズムにFilter Back Projection法がある。この方法は以下の3つの手順 (数式処理) で行われる。数学的な詳細はKak and Slaney (1988)、馬場 (2004) の総説を参照されたい。

- (1) 投影データの1次元フーリエ変換
- (2) フィルターリング
- (3) 逆投影

図1. コンピュータトモグラフィー (CT) 法の原理 (逆投影法)。A: 2次元から1次元への投影。異なる角度からオブジェクトの1次元の投影図を得る。B: 1次元から2次元への逆投影。Aで得られた投影図を元に演算によって2次元の再構築を行う。C: 実際の画像再構築の流れ。

(2) のフィルタリングとは、(1) のフーリエ変換したものに、高域強調フィルター（空間周波数の絶対値に比例したフィルター関数）を掛け、その後に1次元フーリエ逆変換を行う操作である。(1)、(2) の操作の代わりに、畳み込み積分 (convolution integral) を行っても同様の効果がある。この方法をConvolution Back Projection法と呼ぶ。その他の再構成法としては、反復再構成法 (Iterative Reconstruction Technique)、SIRT (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique)、ILST (Iterative Least-Squares' Technique) 等の方法がある (馬場 2004)。

5. 電子線トモグラフィー法

電子顕微鏡でトモグラフィーを行うためには、Radon変換の条件を満たすこと、つまり“透過度の強度の減少が電子線の入射方向への投影試料密度に比例する”ことが前提条件になる。材料系の試料などでそのままではこれを満たさない場合は、別の工夫が必要である (田中 2004)。トモグラフィーでは、様々な角度から投影した画像を得る必要がある。電子顕微鏡の場合、試料ステージの構造等の問題から、試料の回転に限界がある。試料を支える金属部分があるため、電子線と平行になるまで試料を傾ける (試料を 90° 傾ける) と、メッシュの金属部分あるいは、それを支持する部分によって電子線が試料に届かなくなる。そこで、実際には $+60^\circ$ から -60° まで、 120° の範囲しかとれないことになる。試料の見たい場所が必ずしも回転軸上にあると

は限らないので、傾けて、同じ場所に焦点を合わせながら撮影して行くのは結構大変で、具体的な方法は図2に示している。残りの 60° は、情報欠落領域 (missing data-range) と呼ばれ、この領域が大きいほど像が悪くなる。最近では試料ステージを工夫して 80° まで傾けた例もある。

電子顕微鏡で実際に使える3次元の画像化は、英国MRC研究所のKlugのグループがネガティブ染色したT4ファージ鞭毛の螺旋構造を再構成したのが最初である (DeRosier and Klug 1968)。生体高分子のトモグラフィーはHoppeら (1974) が脂肪酸合成酵素の再構築に成功したのが最初である。その後、ウイルスや高分子複合体などの電子顕微鏡による立体構造の解析では、試料を含む水溶液をメッシュに載せ、そのまま極低温に冷やしたプロパンかエタンの溶液に浸漬して凍らせる氷包埋の技術と、極低温下で試料を直接観察できるクライオ電子顕微鏡 (cryo-electron microscopy) の発達とともに進歩して来た。電子線トモグラフィーでは、たくさんの画像をとらなければならないこと、観察できるだけの強さの電子線量を確保することという相反する条件がある。単離した生体高分子の場合、氷包埋した試料上には同じ分子がランダムな方向に配向しているため、一度にたくさんの方向を向いた画像を得られるので、この様々な方向を向いた画像を利用してトモグラムを作製する単粒子解析法 (single-particle analysis) という技術が使われている (van Heel et al. 2000, 佐藤ら 2002)。一方、クライオ電子顕微鏡を使ってトモグラフィーを作製するクライオ電子線トモグラフィー (cryo-electron tomography) の細胞への応用は、電子線を透すことの可能な扁

図2. 傾斜切片画像の取得方法の模式図。 $+60^\circ$ ~ -60° まで 1 または 1.5° 刻みで傾斜切片画像を取得する。A: tilt 0° におけるグリッドの状態。B: 傾斜に伴った傾斜軸と試料の移動。黒: tilt 0° における傾斜軸、灰: tilt -60° における傾斜軸。傾斜軸の移動に伴って焦点と画像の移動が行われる。

平な単細胞で成功している。Madeliaら（2002）は、粘菌の細胞をメッシュ上で培養し、そのまま凍結、クライオ電子線トモグラフィー法で立体再構成して細胞内構造を観察し、細胞内のアクチンネットワークや26Sプロテアソームを検出した。

6. 加圧凍結・2軸電子線トモグラフィー法

凍結電子線トモグラフィー法は、試料をそのまま凍結するため、生に近い状態で見える特徴がある。しかし、クライオ電子顕微鏡で観察している間の観察ビームによる損傷の問題から、観察時間に制限がある。また、試料の凍結できる厚さに限界がある。例えば筆者らの研究の目的の一つ"気孔分化過程での細胞分裂パターンの制御機構の解明"では、トモグラフィー法で観察したい場所はたくさんの細胞の並びの中の特定の細胞の、ある限られた部分（例えば、孔辺母細胞の分化のための不等分裂の分裂面予定位置など）になる。そうすると、電子顕微鏡下でその場所を探し当てるのに時間がかかり、観察前に電子線で試料が損傷してしまう恐れがある。また、急速凍結法ではうまく凍結できるのは表面の限られた領域であり、厚い試料には適応できない。そこで、これらの問題を解決して行われているのが、加圧（高压）凍結法で試料を凍結し、凍結置換後樹脂に包埋、切片にしてトモグラフィーを行う方法で、コロラド大学のグループが中心に開発してきた (<http://bio3d.colorado.edu/>)。コロラド大学のトモグラフィー法の全体的な内容はMcIntosh（2001）が述べているので、以下は我々がコロラド大学との共同研究で行っている植物材料における加圧凍結・2軸電子線トモグラフィー法について説明する。

図3. BAL-TEC HPM010を用いた加圧凍結の際の温度および圧力の時間変化。HPF開始後約10ミリ秒で試料表面は -50°C まで冷却される。約0.5秒間以上2.1kbar以上に圧力が保たれる。

凍結法 従来の急速凍結法では、せいぜい表面から数十 μm までしかうまく凍結できない。加圧凍結法は2.1kbar以上の圧力下では氷の状態が変化

図4. 加圧凍結法（HPF）と圧着法（Metal contact）によるタマネギ子葉表皮細胞の凍結状態の違い。A：加圧凍結法で凍結した細胞。Aの両脇のバーは細胞表面からの深さによる凍結状態を示し、黒は良い凍結状態の領域、白は氷晶形成により組織の破壊が起きている領域をさす。加圧凍結法では細胞1層の深さは十分保存されるが、圧着法では細胞の表層しか保存されない。bar=10 μm 。B：良く保存されたゴルジ体（加圧凍結法）。A中矢印の拡大図。bar=0.5 μm 。C：氷晶形成により破壊されたゴルジ体（圧着法）。

し、氷の結晶の成長が遅くなることを利用した凍結で、この方法だと数百 μm まで凍結可能とされている（村田ら 2000）。実際にBAL-TEC社の加圧凍結装置HPM010で加圧凍結した試料の凍結過程での温度と圧力の変化をモニターしたのが図3である。圧力の上昇と温度低下の微妙なバランスの上になりたっている装置で、約20ミリ秒以内に凍結できれば、だいたいの試料で200 μm の厚さまではうまく凍結できる（峰雪ら 1998図参照）。図4は我々の材料で、加圧凍結法と液体ヘリウム温度まで

図5. タマネギ表皮細胞における分裂準備帯の3次元構築過程。A～C:異なる傾斜角での傾斜切片画像。A, B, Cはそれぞれ順に傾斜角 $+60^\circ$, 0° , -60° での画像を示す。D:連続傾斜切片を元に演算によって得られた1軸トモグラム中のトモグラフィックスライス。E:Dを得た傾斜軸を 90° 回転した連続傾斜切片から得た1軸トモグラム中のトモグラフィックスライス。この場合、試料の傾斜軸が微小管の方向に対して垂直なため、微小管が鮮明に見えていない。F:D, Eのトモグラムを合同した2軸トモグラム中のトモグラフィックスライス。bar= $1\mu\text{m}$ 。G, H:1軸トモグラムと2軸トモグラムの解像力の差を示す図。GとHはそれぞれDとFの一部を拡大したもの。bar= 80nm 。I:2軸トモグラムの3次元モデルの2次元への投影図。bar= $1\mu\text{m}$ 。

冷却した金属に圧着して急速凍結した場合（圧着法）との比較をしたものであるが、加圧凍結だと表皮細胞全体がうまく凍結できているのに対し、この急速凍結法だと、表面から5 μ m程度までしかうまく凍結できない。

試料作製 うまく凍結できても、凍結置換、樹脂包埋の過程で構造が破壊されてはしようもない。そのため、凍結置換・樹脂包埋の方法が重要である。我々は試行錯誤の末、微小管だけでなくアクチン繊維も比較的安定に保存できる方法確立した（Murata et al. 2002）。その方法は以下の手順である。アセトンに溶かした2%OsO₄中で、 -80°C （2～3日） $\Rightarrow -20^{\circ}\text{C}$ （1日） $\Rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ （一晚） $\Rightarrow$ 室温（1時間） $\Rightarrow 40^{\circ}\text{C}$ （4時間） $\Rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ アセトン溶液で洗浄 $\Rightarrow 4^{\circ}\text{C}$ メタノールに溶かした5%酢酸ウラン（2時間） $\Rightarrow$ 徐々にspurr樹脂に置換。各処理の詳細は峰雪ら（2001）に示している。

トモグラム作製の前段階として、樹脂に包埋した試料から250nm厚の切片を作製し、フォルムバール膜を張ったスロットメッシュの中央に載せる。我々の試料では、すでに酢酸ウランでブロック染色しているので、染色なしでもある程度観察可能である。そこで、できた試料は電子顕微鏡で予備観察を行い、目的の場所を含む切片が載っているメッシュを選び、見たい場所を見つけ、その場所の低倍の画像を記録しておく。選んだメッシュを酢酸ウランと鉛で2重染色し、コントラストを高めた後、トモグラフィー用の位置合わせに使用する目的で、試料の載ったメッシュの両側に10nmあるいは15nmの金粒子をまぶせる。必要に応じて、あらかじめカーボンコートしてフォルムバール膜を補強する。

画像取得 試料作製後は、図1Cに示した手順に従って、（1）連続した画像の取得（図5A-C）、（2）各画像の粗な位置合わせ、（3）金粒子を使った精密な位置合わせ、（4）トモグラムの計算（図5D-F）、（5）でき上がったトモグラムのムービー表示、あるいは、トモグラムを元にモデルの作製（図5I）を行う。我々は2種類の電子顕微鏡を使っている。1台は、JEOLの超高压電子顕微鏡（電子山）で、もう一台はFEIのTecnai TF30である。前者は、加速電圧750kVで、後者は300kVで使用している。画像の取得は、前者は画素数が1k x 1kのCCDカメラを、後者は2k x 2kのCCDカメラを使用している。我々は微小管の端や小胞の形態の定量的解析を目標にしているため、目的の構造が区別できる分解能とともに、できるだけ多くの数を視野に入れる必要がある。そこで、1k x 1kのカメラの場合は、隣り合う4枚、あるいは6枚をとって重ね合わせた像を1枚の像として扱う様にしている。Tecnai TF30では、カメラ自体が2k x 2kなので、重ね合わせする必要がなく、しかもかなりの過程が自動化されており、ひとシリーズ1時間程度で撮影が終わる。以下、実際のプロセスをTecnai TF30の場合で説明する。

トモグラフィー用の画像取得のために、試料を $+60^{\circ}$ （図5A）から -60° （図5C）まで 1° あるいは 1.5° ステップで回転しながら連続画像を取得した後、試料を水平の位置（図5B）に戻し、水平方向に90度回転し、再度 $+60^{\circ}$ から -60° まで別の軸で回転して2組の連続画像を取得する。

トモグラム作製と解析ソフト 取得した画像データを別のコンピュータに転送し、まず、個々の連続画像から、各々1軸の3次元画像（トモグラム）を作製（図5D,E）、その後この二つのトモグラムを合わせることで最終的なトモグラム（図5F）を完成させる。2組のデータを結合させることで、情報欠落領域を減らし分解能を上げることができる（図GとHを比較）。この方法を2軸電子線トモグラフィー法という（Mastronarde 1997）。完成したトモグラムは、x-y平面に切断した画像（図5Fのような画像）がz軸方向に100枚以上重なった形で示し、これをトレースすることで、モデルを作製する（図5I）。トモグラム作製およびそれ以降のモデル作製には、The Boulder Laboratory for 3-D Electron Microscopy of Cellsで開発されたソフトIMOD（Kremer 1996,

Mastrorade 1997) を使用している。このプログラムは、画像取得の際に、試料の傾斜角や位置が少々ずれても、金粒子はメッシュの上面と下面に存在しているはずだから、その位置は、2つの平面に分布するはずであるという仮定の下に、金粒子で位置補正が可能である(図6)。また、コンピューターを選べば、大容量の画像を扱える特徴があり、Linux、MacOSX、Windowsなどで動作可能である。

7. タマネギ表皮での結果

実際に我々がタマネギ子葉表皮の分裂準備帯 (preprophase band) で作ったトモグラムでは、 $2,800 \times 2,800 \times 250 \text{ nm}$ の領域を 1.42 nm/pixel で立体再構成でき、1個のトモグラムの中に39個の微小管の端と124個の小胞を見つけることができた。この微小管端は、図7の様に、プロトフィラメントがシート状になって伸長していると思えるもの(図7A、先端が平らなもの(図7B)、プロトフィラメントが1本、1本ほどけて、コイル状に巻き、短縮していると思えるもの(図7C)、 γ チューブリンリング複合体でキャップされていると思われるもの(図7D)が見つかり、この方法で微小管のダイナミックスが推測できることが分かった。我々のトモグラムの写真は、峰雪ら(2001)、峰雪・唐原(2004)にも掲載している。

8. 今後の展開

従来の電子顕微鏡では難しかったナノレベルでの3D解析ができる電子線トモグラフィ法は、今後、バイオナノマシンやナノシステムの構造やダイナミックスの研究に重要な技術である。この技術は、加圧凍結法という、厚い組織でも凍結できる技術と結びつくことにより、より真実に近い形でのナノレベルでの立体構造解析が可能になり、

図6. 試料表面に付着させた金粒子を用いた位置合わせ。取得直後の傾斜切片画像は相対的な位置が合っていないため、試料両表面上(白:表側、灰:裏側)の金粒子を元に傾斜切片画像の位置合わせを行う。図は位置合わせ後の金粒子分布の正面図(A)、と側方図(B)。金粒子は2つの平面に分布しているので、側方図(B)では金粒子は2つの直線上に並ぶ。

図7. タマネギ子葉表皮のトモグラムから得た4個の特徴的な微小管端の像(上段)と、それに対応すると思われる微小管端モデル(下段)。下段矢印は微小管の伸長、短縮の方向を示している。A: Open sheet 型。伸長(重合)している時に見られると考えられている。B: Blunt end 型。C: Coiled end 型。脱重合時に見られると考えられている。D: Capped end 型。 γ チューブリン・リング複合体でキャップされたマイナス端の可能性が大きい。

今後の発展が期待できる。

謝辞

本総説の内容は、著者らがコロラド大学のAndrew L. Staehelin博士との共同研究で行った結果を元にしている。Staehelin博士とその研究室のメンバー、及びコロラド大学Laboratory of 3-D Electron Microscopy of Cellsのスタッフ諸氏に感謝いたします。本成果の一部は、科学研究費（平成15、16年度萌芽研究No. 15657017）で行ったものである。

文献

- 馬場則男 (2004) 電子線トモグラフィー再構成の原理. 顕微鏡 39: 4-10.
- Cormack, A. M. (1963). Representation of a function by its line integrals with some radiological applications. J. Appl. Phys. 34: 2722-2727.
- DeRosier, D. J. and Klug, A. (1968). Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. Nature 217: 130-134.
- Hoppe, W., Gassmann, J., Hunsmann, N., Schramm, H. J. and Sturm, M. (1974). Three-dimensional reconstruction of individual negatively stained yeast fatty-acid synthetase molecules from tilt series in the electron microscope. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355: 1483-1487.
- Hounsfield, G. N. (1973). Computerized transverse axial scanning (Tomography), Part I. description of system. British J. Radiology 46: 1016-1022.
- Kak, A.C. and Slaney, M. (1988). Principles of Computerized Tomographic Imaging. IEEE, Inc., New York, IEEE Press.
- Kockenberger, W. (2001). Functional imaging of plants by magnetic resonance experiments. Trends Plant Sci. 6: 286-292.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. and McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. J. Struct. Biol. 116: 71-76.
- Mastronarde, D. N. (1997). Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. J. Struct. Biol. 120: 343-352.
- McIntosh, J. R. (2001). Electron Microscopy of Cells: A New Beginning for a New Century. J. Cell Biol. 153: 25F-32F.
- Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G. and Baumeister, W. (2002). Macromolecular Architecture in Eukaryotic Cells Visualized by Cryoelectron Tomography. Science 298: 1209-1213.
- 峰雪芳宣、唐原一郎 (2004) 細胞・オルガネラレベルでの電子線トモグラフィー. 顕微鏡 39: 15-17.
- 峰雪芳宣、唐原一郎、村田隆、Otegui, M., Giddings, T.H.Jr., Staehelin, L.A. (2001) 植物組織の高圧（加圧）凍結. 電子顕微鏡 36: 105-107.
- 峰雪芳宣、村田隆、Giddings, T.H.Jr., Staehelin, L.A. (1998) 加圧凍結法による高等植物実生分裂組織細胞の観察. Plant Morphology 10:30-39.
- 村田長芳、菅沼龍夫、峰雪芳宣 (2000) 固定法3. 高圧凍結. 電子顕微鏡 35: 109-110.

- Murata, T., Karahara, I., Kozuka, T., Giddings, T. H., Staehelin, L. A. and Mineyuki, Y. (2002). Improved method for visualizing coated pits, microfilaments, and microtubules in cryofixed and freeze-substituted plant cells. *J. Electron Microsc.* 51: 133-136.
- Radon, J. (1917). Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Ber. Saechs. Gesells. Wiss, Math.-Phys. Klasse* 30: 262-277.
- 佐藤主税、上野豊、小椋俊彦、藤吉好則 (2002) 単粒子解析法による結晶を用いない蛋白質構造解析：電圧依存性Na⁺チャンネルの構造を例として. *電子顕微鏡* 37: 40-44.
- Stuppy, W. H., Maisano, J. A., Colbert, M. W., Rudall, P. J. and Rowe, T. B. (2003). Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography. *Trends Plant Sci.* 8: 2-6.
- 田中信夫 (2004) 材料・デバイス系試料の電子線トモグラフィー. *顕微鏡* 39: 26-30.
- van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E. V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M. and Patwardhan, A. (2000). Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quart. Rev. Biophys.* 33: 307-369.