

第3節 電子顕微鏡

3.1 はじめに

顕微鏡の分解能は使用する光源の波長によって決まる。光学顕微鏡は自然光あるいはハロゲンランプなどを使用するので理論分解能は $0.2\mu\text{m}$ 程度、実用的な倍率は1,000倍程度である。これに比べて電子顕微鏡は光源として非常に波長の短い電子線を使用するので分解能は格段に向上し、必要によっては10数万倍までの観察をすることができる。しかし電子線は透過力が弱く電子線経路はすべて真空にしなければならないので試料も真空中でも変形せずかつ電子線が透過できるようにするための様々な試料作製法が考案されてきた。

電子顕微鏡は大きく分けて透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope 以下TEMと記載)と走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope 以下SEMと記載)に分けられる。試料作製法は共通するところもあるがいずれの場合も観察倍率が高いので人工産物ができると間違えた物を見たり解釈を誤る可能性があり、試料作製については細心の注意を要する

3.2. TEMの試料作製

生物試料の観察によく使用される試料作製法の中で代表的な超薄切片方とネガティブステイニング法について記す。

I 超薄切片法

生物試料観察の基本的な方法で試料を固定、脱水、樹脂包埋、超薄切、電子染色した後観察する方法である。ここでは代表的な樹脂であるエポキシ樹脂を用いた方法について記述する。

【安全上の注意】

使用する試薬には有毒な物が多く、発癌性の指摘されている物もあるので手袋を使用したりドラフトの中で作業を行う方がよい場合が多い。作業終了後の試薬、器具の廃棄にも注意が必要である。

A) 固定、脱水、包埋

【試薬】

2%グルタルアルデヒド溶液、1%オスミウム酸水溶液、生理食塩水、リン酸緩衝液、蒸留水エタノール(50, 60, 70, 80, 90, 99%水溶液)、無水エタノール(99.5%エタノールに無水硫酸銅またはモレキュラーシーブを投入してしばらく放置したもの)、プロピレンオキシド、エポキシ樹脂(ルベアック812:商品名、DDSA, MNA, DMP-30)(Eponが製造中止になったためEpok, Quetol, Luveakなどの国産品で代用する。)

【器具】

固定瓶数本(20 ml)、脱脂済安全カミソリ(片刃、両刃)、ピンセット、細切用コールドプレート(又は発泡スチロール容器に氷をいれビニールシートを置いたものたもの)、駒込ピペット数本、プラスチック手袋、マスク、実体顕微鏡、パラフィルム、スターラー、ディスポーザブルシリンジ(10ml, 1ml)、ディスポーザブルビーカー、ビームカプセルまたはゼラチンカプセル、恒温器(強制対流式で温度ムラのないもの)

【手順】

- 1) 試料が臓器などの場合は付着している脂肪や血液成分を生理食塩水で十分洗浄した後ろ紙で水分をふき取っておく。コールドプレート上で片刃カミソリを用いて5mm角程度に切る。試料の切断に際しては余分な力を掛けて試料を変形させたりしないように十分注意すること。
- 2) 試料にグルタルアルデヒド溶液を振りかけ、中央から半分に折った両刃カミソリを交差させるようにして1 mm角程度に細切する。
- 3) 試料を固定瓶に移し固定液を入れて冷蔵庫で2時間固定する。
- 4) 固定液を捨て緩衝液で洗浄する (20分ずつ, 4~5回)
- 5) オスミウム酸溶液を入れて同様に固定, 洗浄する。アルコール濃度を順次上げながら脱水する (各濃度 20分ごとに液を交換して3回, 無水エタノールのみ 30分3回) 。無水エタノールは乾燥し易いので試料の乾燥に注意すること。
- 6) アルコールをプロピレンオキシドに置換 30分3回
- 7) プロピレンオキシドと樹脂との置換
 まずルベアック 812, DDSA, MNA, DMP-30 の混合液を調整し, それとプロピレンオキシドを容積比 1:3, 3:1 の割合で混合したものを調整する。樹脂の割合の低いものから順に2時間浸透させその後樹脂混合液^{注1)}に入れ一晩放置する。
- 8) 新しく調整した樹脂混合液をビームカプセルに入れ, 浸透の終わった試料を注意深くこの中に移す。
- 9) 45°Cの恒温器に入れ, 30分~1時間後に試料がカプセルのそこに沈んでいることを確認, 1晩放置, 翌日温度を60°Cに上げ24時間重合させる (45°Cを省略して最初から60°Cで重合させることもできる) 。

注1) 樹脂の混合方法 Luft 法ではA液 (ルベアック 812・62ml+DDSA・100ml) とB液(ルベアック 812・100ml+MNA・89ml) を作製しその混合比で樹脂の硬さを変えるようになっており, A液の比率が高いほど堅い樹脂ができる。より簡単に目的の硬さの樹脂混合液を必要量調整するためには次の表を参考にすればよい。

A液, B液の混合比の各々の液量

A : B	Luveak 812	DDSA	MNA	DMP 30	全 量
5 : 5	1.5ml	1.0	0.8	0.05	3.35
4 : 6	1.9	1.0	1.2	0.06	4.16
3 : 7	2.6	1.0	1.8	0.08	5.48
2 : 8	4.1	1.0	3.1	0.12	8.32

例: 試料20個をA : B = 4 : 6の硬さで, 包埋する場合
 液量は $0.8 \times 20 = 16 \text{ ml}$ 必要 (ビームカプセル1個の液量は0.8 ml)
 表より各樹脂を5倍計量すればよい。

金芳堂刊 「現場で役立つ 電子顕微鏡試料作製法」 より

B) 薄切, 染色, 検鏡

【試薬】パラゴン染色液またはトルイジンブルー染色液, 4%酢酸ウラニル水溶液, 鉛染色液, 蒸留水

【器具】両刃カミソリ, 片刃カミソリまたはアートナイフ (商品名), スライドグラス, カバーグラス, ろ紙, シャーレ, グリッドスティック, ピンセット, トリミング台, ホットプレート, 染色バット, 粘着剤処理または支持膜を張ったグリッド, 実体顕微鏡, 光学顕微鏡, ガラスナイフ作製機, ウルトラマイクロトーム

【手順】

- 1) カプセルから重合の終わったブロックを取り出し, トリミング台にセットして実体顕微鏡下で作業を行う。両刃カミソリを用いて試料上面を水平に切削し, 試料を露出させる。樹脂の部分を少し残しながら周囲を台形状に整形する。
- 2) ブロックをウルトラマイクロトームに取り付けガラスナイフを用いて $0.5\sim 1\mu\text{m}$ の厚さの切片を作製する。切片をスライドグラスに回収しホットプレートで乾燥, 貼付する。
- 3) 切片にパラゴン染色液またはトルイジンブルー染色液を滴下し染色の周辺が乾燥するような状態になると水洗し余分な染色液を洗い流す。
- 4) 乾燥後光学顕微鏡で観察し必要部分が含まれていることとその位置を確認した後, ブロックをトリミング台に取り付け必要部分を残すようにしながら周囲を削り取って最終的に 0.5mm 角程度の台形にする。側面の最終仕上げは両刃カミソリで行う。
- 5) 再度ウルトラマイクロトームに取り付け超薄切片を作製する。切片はナイフに取り付けたポートに浮かんでくるのでこれをグリッドで上から押さえつけるようにして回収する。
- 6) グリッドスティックにグリッドを張り付け遮光した試験管に入れた酢酸ウラン染色液で 20 分間染色する。蒸留水を入れた試験管を 5 本並べ順次洗浄する。鉛染色液も同様の手順で 10 分間染色する。シャーレに敷いたろ紙上にグリッドを回収し検鏡する。

II ネガティブステイニング法

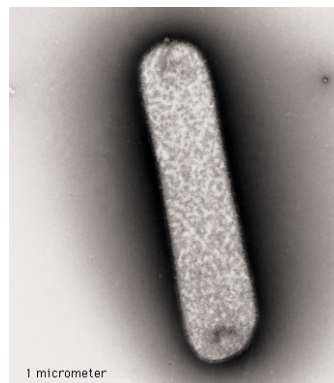
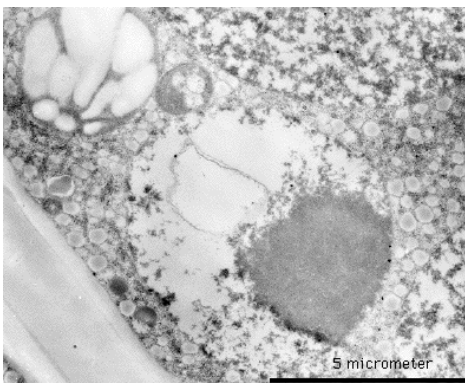
試料を染色するのではなく試料の周囲を重金属で染色することにより観察する方法で操作は簡単でありバクテリア, ウイルスなどの微生物や高分子, タンパク質会合体など応用範囲は広い。染色剤としては酢酸ウラニル, リンタングステン酸, モリブデン酸アンモニウムなどが使われる。

【試薬】1%リンタングステン酸溶液

【器具】支持膜を張りカーボン補強したグリッド, マイクロピペット, ろ紙, ピンセット

【手順】直前に親水化処理したグリッドをピンセットで取り, 試料を1滴膜面に載せ, 余分な液をろ紙で吸い取る。同じ面に染色液を1滴載せ余分な染色液をろ紙で吸い取る。自然乾燥して検鏡。

観察例



左: 超薄切片法

試料: 大豆, 二重固定
二重染色

右: ネガティブステイ
ニング法

試料: 古細菌, リンタン
グステン酸使用

3.3 SEM試料作製

真空中で試料に電子線が照射されると、試料の形状組成に応じて二次電子、反射電子 X 線などの様々な信号が放射される。このうちの二次電子を電気信号に変換して CRT 上で画像として観察できるようにしたのが SEM である。

TEM に比べて試料作製が簡単であり、低倍率から高倍率まで簡単に観察できること、得られる画像が立体的で分かりやすいこと、試料の大きさの制限が緩やかで数 cm の大きさの試料も観察できることなどが特徴であるが、表面しか観察できないというマイナス面もある。

試料作製で問題になることは試料に導電性が有るか無いかということで、導電性がない場合はチャージアップという現象を起こし満足な画像が得られないことが多い。試料に導電性を持たせる方法としてはカーボンや金属を表面にコーティングする、試料そのものに導電処理をするなどの方法があるが、イオンスパッターを用いて金、白金あるいはその合金をコーティングするのがもっとも一般的である。

I 乾燥・半乾燥試料

【試薬・器具】

接着剤、試料台、ピンセット、デシケーター、イオンスパッター

【手順】

少し水分を含むものはデシケーターで一晩乾燥した後試料台に木工用ボンドで接着し、ボンドが乾燥すればコーティングを施して観察すればよい。乾燥しているものはそのままでもよいが、念のためデシケーターで乾燥した方がよい。

II 動植物組織

動植物組織の試料作製法は TEM の試料作製法と共通する部分があり、TEM の固定・脱水・包埋の項 1~5 の手順はそのまま応用することができる。ただし、試料の大きさは $2\sim 3\times 2\sim 3\times 5\sim 6\text{mm}$ 程度の大きさとし、それに応じて固定時間も延長する (5~6 時間)。アルコール脱水の最終過程、無水アルコールの段階で凍結切断を行うと非常に平滑な観察面を得ることができる。

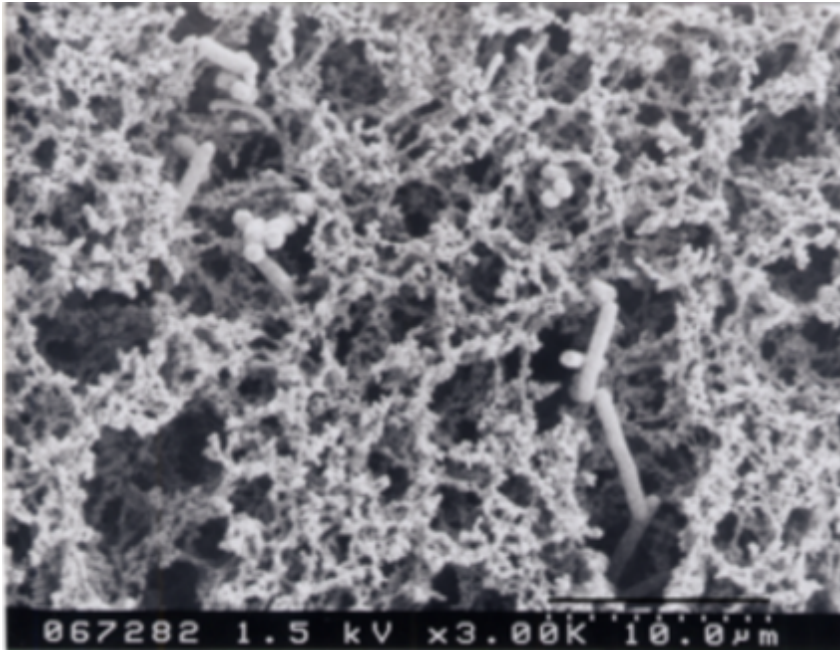
【試薬・器具】

TEM 試料作製の項参照、酢酸イソアミル、液体窒素、接着剤、イオンスパッター、臨界点乾燥器

【手順】

- 1) 細切、固定、脱水については TEM 試料作製手順 1)~5) 参照
- 2) ゼラチンカプセルの中に気泡の残らないようにエタノールを満たし試料を入れる。
- 3) 液体窒素で凍結し、鑿または片刃カミソリとかなづちか木槌を用いて割る。
- 4) エタノール中に戻して解凍した後酢酸イソアミルに置換。
- 5) 臨界点乾燥または t-ブタノール凍結乾燥を行う。
- 6) 木工用ボンド、シルバーペースト、カーボン両面テープなどで試料台に接着し、イオンスパッターによる導電処理を施して観察する。

観察例



市販ヨーグルト、
グルタルアルデヒド
単独固定、臨界点乾燥
後イオン Sputter で
Pt-Pd を 8nm コーティ
ング、加速電圧 1.5KV
で観察

3.4 これからの電子顕微鏡

I TEM

TEMの観察結果は写真として残されるのが通常であったが、平成20年現在市販されているTEMの中にはCCDカメラとコンピュータを標準装備している装置もあり、観察結果をデジタルデータとして保存できるようになった。これによって暗室での操作不要で多数のデータを処理することができるようになり、3Dトモグラフィーなど新しい手法も可能になってきた。しかし、現在の状況では画面の精細度においてフィルムと同等の情報量は難しいとされているが、操作の簡便性、暗室処理の必要がないことなどから今後徐々に導入される度合いが増えるものと考えられる。

また、装置の操作についてもコンピュータの導入により自動化される部分が増えてくると思われるが試料の作製法については電子線が透過することが絶対条件であるので従来の方法が基本となるものと考えられる。

II SEM

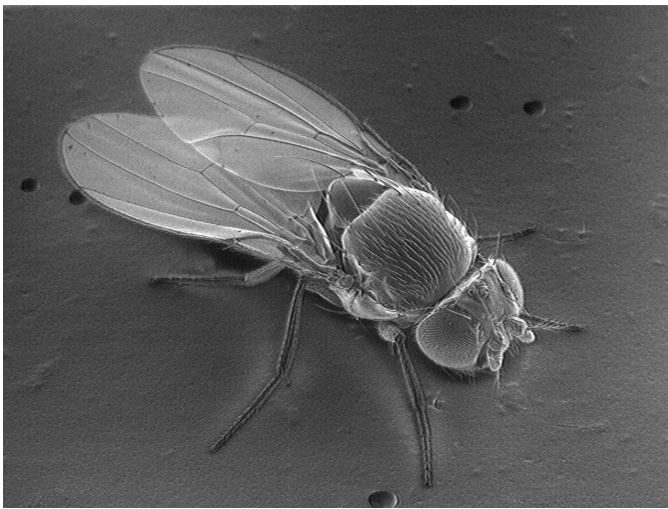
SEMは試料に電子線を照射して得られる二次電子、反射電子などの情報を電気信号に変換してCRT上に画像として表示するものである。もともと電気信号として画像を取り扱うものであるからデータのデジタル化も容易であり、コンピュータの高性能化もあって様々な画像処理やデータ蓄積とともにインターネットを介してのデータ通信や装置のコントロールも可能になってきている。また、装置本体も改良が進み、電界放射型電子銃を搭載した装置ではTEMに近い分解能での高倍率観察が可能となっており、試料最表面の情報を得るための極低加速電圧観察も行われるようになった。

Ⅲ 低真空SEM

無処理観察や含水試料の観察という点からは低真空SEMの使用が拡大しており、高性能化と同時に低価格で操作が簡便な汎用型の装置が開発され市販されるようになってきた。

低真空SEMは試料をまったく処理しないか、あるいは切断などの簡単な処理だけで観察できることが特徴であるが、低真空といえども試料を真空中において観察することによって変わりなく、乾燥による変形には十分注意する必要がある。乾燥による試料の変形を軽減し観察可能な時間を引き延ばすためには試料を低温に保持することのできる冷却ステージの使用なども有効な手段である。

堅いクチクラ層を有する昆虫の中には観察後も産卵するなど生殖行動を続けた例もあり、簡単に観察できることと光学顕微鏡と比較してはるかに高い倍率や深い焦点深度を有することから今後も低真空SEMの使用は増加するものと思われる。



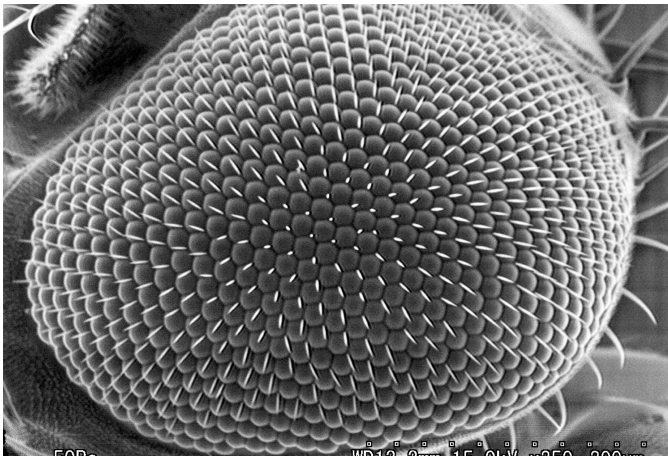
観察例

野生型ショウジョウバエの
全体像と複眼

エーテル麻酔後両面テープ上に
貼り付け

加速電圧；15KV

真空度：70Pa，50Pa
で撮影



【参考文献】

現場で役立つ 電子顕微鏡試料作製法 関西電子顕微鏡応用技術研究会編 金芳堂