

走査型電子顕微鏡ホルダー「SETEM」の性能

池田 晃子^{A)}、牧 貴美香^{A)}、岡本 渉^{B)}、○伊藤 康友^{C)}

- A) 教育研究技術支援室 分析・物質技術系
B) 工学系技術支援室 装置開発技術系
C) 医学系技術支援室 生物生体技術系

概要

平成 22 年度名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース）において透過型電子顕微鏡（=Transmission Electron Microscope,TEM）の試料作成技術と TEM・走査型電子顕微鏡（=Scanning Electron Microscopy,SEM）の操作・観察技術を習得したのでここに報告する。また、特殊なホルダー（SETEM=Secondary Electron Transmission Electron Microscopy）を使用し、像を比較したので合わせて報告する。

1. TEM 試料作成技術

観察する試料（マウスの小腸と心筋）は事前に脱水・固定・樹脂包埋の処理済みのものを使用した。

1-1. ガラスナイフの作製方法

専用の厚手の板ガラスを正方形に切断後、再度半分に（直角二等辺三角形になる）切断して作成する。ガラスを切断したときにできる割れ口の片方を刃先として使用する。ガラスナイフ作製のナイフメーカーがいくつか発売されているが、どのナイフメーカーを使っても割れ方によって刃の良し悪しができるので、割れ口を見て判定する。ガラスナイフの作製手順は以下のとおりである。

- 1). ガラスの洗浄：ガラスの表面には汚れが付着している。切断する前に洗剤で洗い蒸留水で水洗した後、乾燥する。
- 2). 切断：ナイフメーカー（7800 型、LKB 社製）の使用方法に従って切断する。
- 3). ナイフの選別：割れ口の残り幅が狭く平行なものほど刃先は良い（図 1）。良い物から順に必要な個数だけ超薄切片用とし、残りを面出し用にする。
- 4). ポート作り：超薄切片用には水を張るためのポートが必要である。刃先とテープの上辺を正確に合わせ、ナイフの逃げ角が 4~5° のときに液面が水平になるよう、刃先まわりにテープを張り付ける（図 2A）。かみそりで刃先に触れないよう注意しながら余分なテープを切り落とす（図 2B）。水漏れ防止のためにテープの裾にマニキュアを塗る（図 2C）

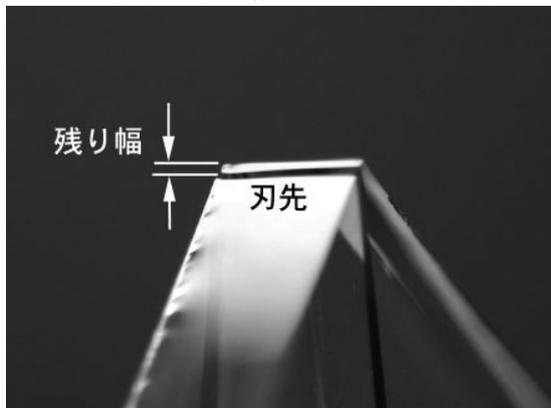


図 1. 刃先の判定

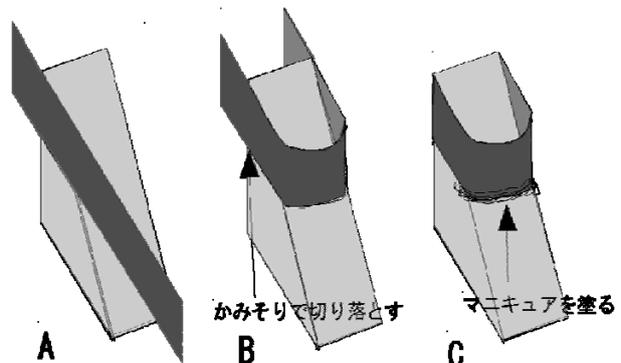


図 2. ポートの作り方

1-2. 超薄切片の作製方法

超薄切片作製装置は ULTRACUTS 型（REICHERT 社製）、ナイフはガラスナイフを使用した。観察用切片を銅グリッドに固定するまでに、トリミング→荒削り→再トリミング→超薄切→グリッドに吸着という手順で行う（図 4）。

1-2-1. トリミングの手順

- 1). トリミング：トリミング台に装着したブロック（図 3）を、アセトンで拭いたかみそりで切出し、試料表面を露出し整形する。
- 2). 厚切り：ガラスナイフを使い、厚さ 1 μm 程度の厚切り切片を作る。スライドガラス上の蒸留水滴へ移動した後、ホットプレートで十分に乾燥する。

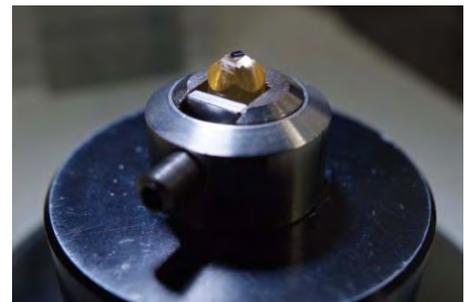


図 3. トリミングしたブロック

- 3). 光顕染色 : 切片上にトルイジンブルー染色液を滴下しホットプレートで 10 秒前後加熱した後、すぐに蒸留水で水洗・乾燥する。
- 4). 光顕観察 : 切片を顕微鏡で観察し、超薄切する部位を決める。
- 5). 再トリミング: 超薄切する部分を実体鏡で確認しながら、市販のかみそりで不要部分を切り落とし整える。

1-2-2. 超薄切

超薄切の操作は、基本的に厚切りと同じである。ただし、ブロックとナイフの接近には十分注意する。1 枚でも厚い切片を切ってしまったら、その刃先部分は使えないので、位置を変えて再度接近しなければならない。ナイフとブロック面の距離は、ブロック表面にできるナイフの影によって測るが、これは薄切時の重要な技術の一つであり、影の大きさと形から、おおよその距離や傾きがわかるようになるまで練習するのが望ましい。ガラスナイフに慣れた後、ダイヤモンドナイフを使用するのに必須の技術である。マイクロトームの操作方法は、機種によって異なるが操作の基本は同じである。要は自分が扱う機種の操作に慣れることである。以下にその手順を記す。

- 1) 超薄切用面出し: ウルトラマイクロトームにブロックとナイフを取り付け、位置合わせをする。切削面全面が出るまで薄切した後、切りくずをブローアで除く(図 4A)。
- 2) 位置調整: ナイフを超薄切する部位(一度もブロックの触れていない刃先の最良部分)まで横方向に移動する。再度ブロックとの位置合わせをして、最終的に $0.1\mu\text{m}$ 程度ずつ近づけながら切削操作を繰り返す。ブロック表面の一部が切れたら止め(図 4B)、切りくずをブローアで除く。
- 3) 水張り: ポートに蒸留水を盛り上げた後、水面が明るく反射し水平よりわずかに低くなるまで減らす。
- 4) 超薄切: 微動送りを 70nm 前後にし、 $1\sim 2\text{mm}/\text{sec}$ の切削速度にセットし自動で切削する(図 4C)。銀色または金色の切片が切れるように、送り量、切削速度を調節する。
- 5) 切片の回収: ポートに浮かんだ切片のうち必要な数枚を睫毛棒で中央に集める。切片の上からグリッドで押さえつけた後(図 4D)、引き上げると切片が付いてくるので、グリッドを裏返してろ紙に素早く付け、水滴を吸い取り乾燥する。

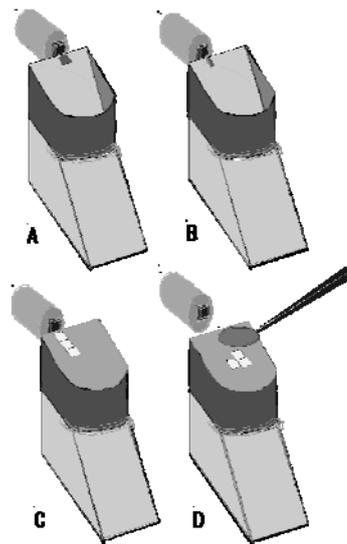


図 4. 超薄切の手順
A.面出し、B.位置調整、C.超薄切、D.回収

1-3. TEM 用試料グリッドの取り扱い

銅グリッドは直径 3mm 、厚さ $20\mu\text{m}$ (EM ファイングリッド F-300、日新 EM 社製) で、染色する前にグリッドはあらかじめ浸水処理 (PIB-10、エイコー社製) を行う。

1-4. 電子染色方法

染色とは、一般に一定の波長の光を反射することを言うが、電子顕微鏡(透過)では電子線を透過しないようにすることを示す。電子染色によって試料の構造を電子顕微鏡下でコントラストよく観察することが可能になる。超薄切片を載せたグリッドを電子染色液に浸し、余分な液を洗浄するだけであるが、この操作での試料汚染のトラブルは意外に多く、電子顕微鏡試料作りに慣れてからも悩まされることがある。通常の形態観察には、酢酸ウラン染色液と鉛染色液による二重染色が用いられることが多い。以下にその手順を記す(酢酸ウランと鉛の二重染色)。

- 1). 酢酸ウラン染色: パラフィルムの上に染色液の液滴を作り、切片の付いた面を下にしてグリッドを液滴に浮かべる。シャーレで覆って $7\sim 10$ 分間放置(染色)する(図 5A)。
- 2). 水洗: ピンセットでグリッドをつかみ蒸留水の入ったビーカーに入れて。グリッドと平行に上下に 10 秒ほど動かす(図 5B)。次にパラフィルム上に蒸留水の水滴を作り、グリッドを移して 1 分以上待つ。この水滴での水洗を 3 回繰り返す(図 5C)。
- 3). 鉛染色: 酢酸ウラン染色液と同じ要領で $2\sim 3$ 分間染色する。
- 4). 水洗: 2) の水洗に同じ。
- 5). 乾燥: グリッドの試料面(切片が載っている面)を上にしてろ紙に素早く移し、水分を吸い取らせ乾燥した後グリッドケースに保存する。

2. 電子顕微鏡の操作方法

電子顕微鏡は大きく分けて走査型と透過型の 2 種類がある。一般には透過型は、文字通り電子線が通過するか否かの像を観察するので薄い試料(厚さ、数

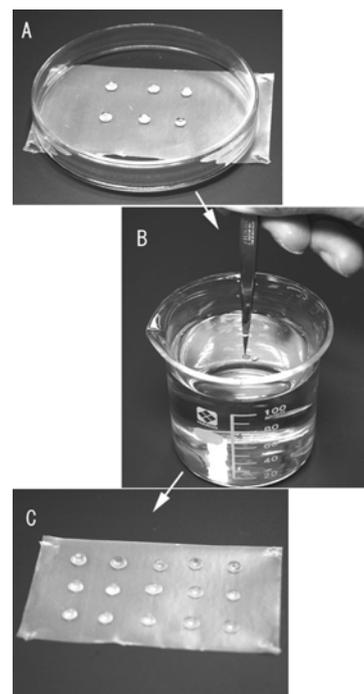


図 5. 電子染色の手順
A.酢酸ウラン染色、B.水洗、C.鉛染色

10nm 以下) を観察する。走査型は主に試料から放出される 2 次電子を検出するため試料表面の凹凸を像として観察する。今回使用する SETEM ホルダーは透過型電子顕微鏡用に作製された超薄切片試料を走査型電子顕微鏡で観察するものである。

2-1. 電子顕微鏡概要

2-1-1. SEM

本体：JSm6010（日本電子製）加速電圧：30kV、試料ホルダー-SETEM（日新 EM 社製）

2-1-2. TEM

本体：H-800 型（日立社製）、加速電圧：200kV、撮影装置：スロースキャンカメラ（2k×2k）

2-2. SEM と SETEM ホルダーのしくみの理解

走査型電子顕微鏡は電子線を絞り、走査して試料表面に照射し、放出された主に二次電子を検出することで観察する。光源として電子線を使用するため、装置内部は真空 (10^{-3} Pa 以下) に保たれている必要がある。古くから生物試料を電子顕微鏡で観察する場合、試料を薄く切り、その微細構造を知るために使用されてきた。TEM は SEM に比べて価格が高く、維持にもコストがかかる。よって、SEM で生物試料を観察できることは非常に有効である。通常、試料台上部に発生した二次電子を検出するが、SETEM ホルダー（材質はジュラルミンでミラー部分は金）を使用することによって上部への二次電子をできるだけ検出せず、試料を透過した二次電子を検出することができる。

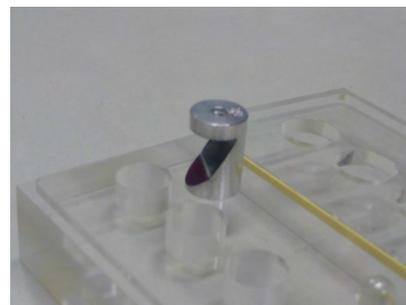


図 6. SETEM ホルダー

2-3. SEM の操作方法

前準備：あらかじめ、真空にしておく。

1. SETEM ホルダーに試料グリッドを乗せる。(図 6)
2. 試料室を大気圧に戻し、試料台を引き出す。(図 7)
3. ホルダーをセットして、試料台を納め、資料室を真空にする。
4. 電子銃の加速電圧を決め、照射する。
5. モニターの像を見ながら、試料をさがす。倍率を上げ、焦点を合わせる。
6. 電子線の非点収差を補正する。
7. 撮影。
8. データ保存。



図 7. SEM の試料室

2-4. TEM のしくみと現状の理解

TEM は通常上部に電子線があり、間に試料ホルダー、下部に電子線が衝突して発光する板（蛍光板）がある。稍体の電磁石が電子線を制御することによって、倍率を変更できる。

2-5. TEM の操作方法

前準備：あらかじめ真空にしておく。

1. 試料室を大気圧に戻し、試料台を引き出す。
2. 試料ホルダー（図 8）に試料グリッドを取り付ける。
3. 試料ホルダーを差し込み、電子銃に高電圧をかける。
4. 蛍光板にグリッドの像が現れたら、試料を探す。
倍率を上げ、焦点を合わせる。
5. 電子線の非点収差を補正する。
6. 撮影
7. データ保存。



図 8. TEM の試料ホルダー

3. 結果

試料は 2 種類あったが、心筋のまともな切片はできていなかった。小腸の切片の SETEM 像および TEM 像を図 9,10 に示す。ともに 10,000 倍で撮影したものである。SETEM 像は TEM 像に比べて全体的にコントラストが低い。この要因は加速電圧の差 (30 kV と 100 kV) によるものと考えられる。小腸の細胞に特徴的な微絨毛やミトコンドリア、小胞体等は確認できた。TEM 像は医学診断に多く利用されているが、診断に耐えられるかは改善が必要かもしれない。今回は試料作製の初心者者の技術的な問題も含まれていると考えられる。

参考文献

- ・「H-800 透過型電子顕微鏡の取扱説明書」百万ボルト電子顕微鏡研究室
平成 22 年度名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース）試料作製マニュアル 藤田芳和、水口幾久代 作

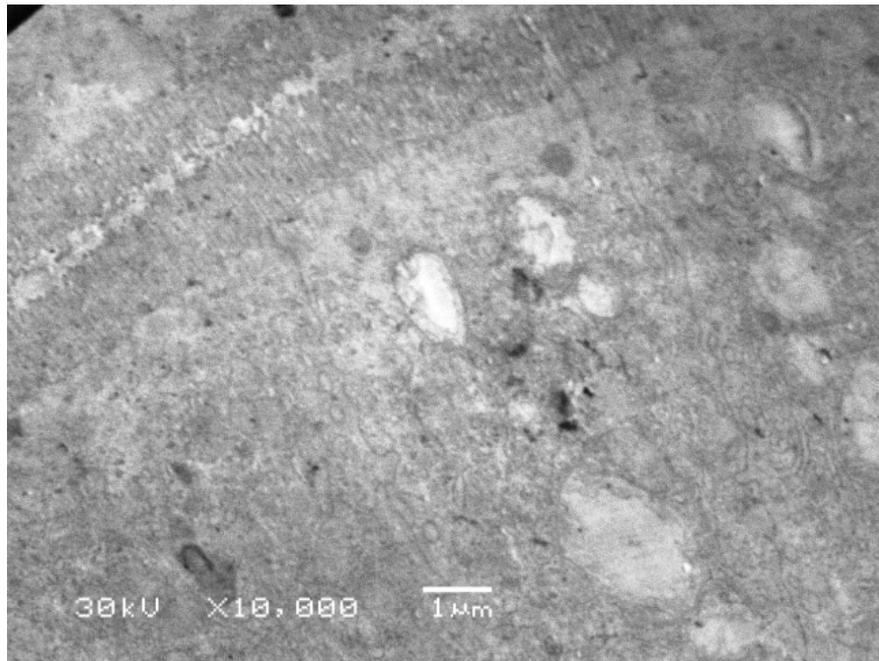


図 9 マウス小腸の SETEM 像

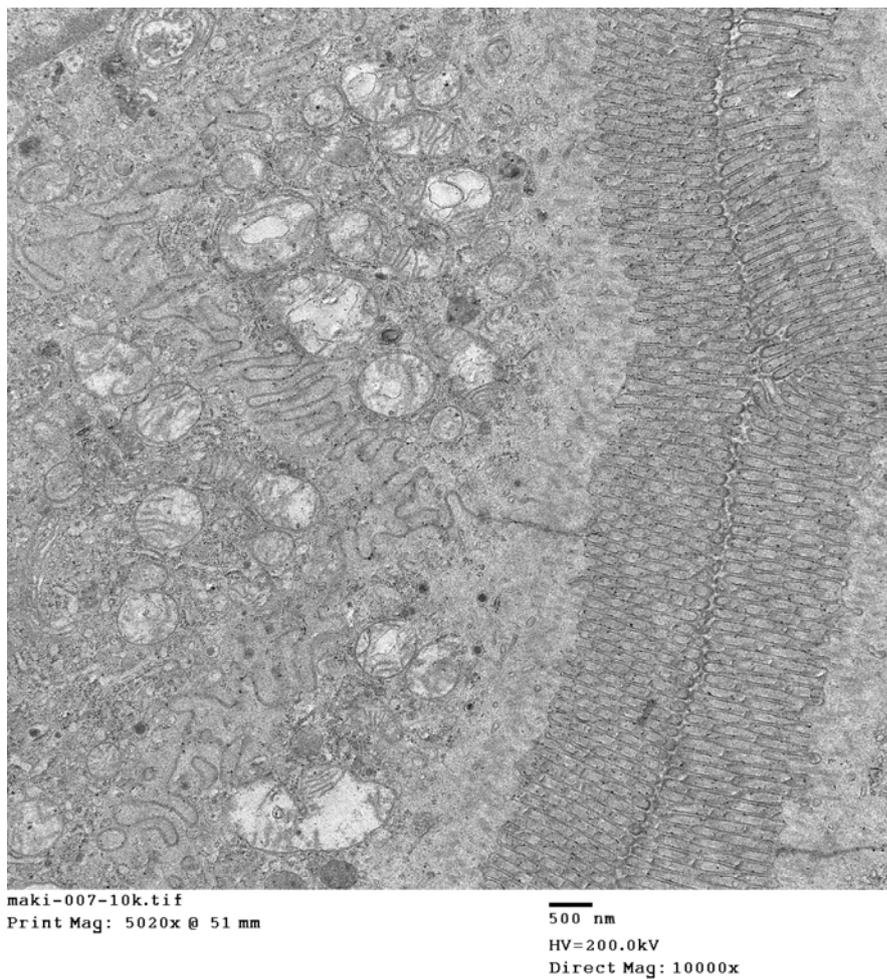


図 10 マウス小腸の TEM 像