

平成 22 年度 名古屋大学技術職員研修（分析・物質コース）の受講

報告 —SEM 用特殊試料ホルダーを用いた観察—

○西村真弓、日影達夫

工学系技術支援室 分析・物質技術系

概要

本研修は技術職員として専門技術を学び資質の向上を図るとともに他の支援室の技術職員との技術交流に寄与するためにも毎年開催されているものである。分析・物質コースの技術的目的は二つあり、一つは透過型電子顕微鏡(TEM)観察用の薄膜試料作製（生物試料）の技術を習得すること、もう一つは特殊試料ホルダーを用いて走査型電子顕微鏡(SEM)で TEM 像相当の試料観察像を得ることである。

まず薄膜試料作製法として超薄切片法を学び、ガラスナイフの作製から樹脂包埋試料のトリミングおよびウルトラミクロトーム ULTRACUTS の操作方法を習得した。次に今回作製した薄膜試料を SEM (JSM-6060) に特殊試料ホルダーを使用して観察した試料像と TEM (H-800) で観察した試料像を比較し、検証を行った。これらの内容について報告する。

1 超薄切片法の習得

SEM 用特殊試料ホルダーを使って TEM 像相当の像を観察するため、試料は TEM で観察可能な厚さ 100 nm 以下の超薄切片である必要がある。そこで医学系技術支援室の水口幾久代氏と三澤申明氏のご指導のもと、超薄切片法の作製技術を学んだ。

1.1 ガラスナイフの作製

ウルトラミクロトーム ULTRACUTS は試料を超薄切片とする装置である。これに取り付けて試料を削るガラスナイフを以下の手順で作製した。

- ①ナイフメーカーを使って、洗浄したガラスを三角形に割断する（図 1）
- ②割れ口が滑らかで刃先の良いものを選別する（図 2）
- ③超薄切片用には水を張るためのボート（水張り用部位）が必要となるため、刃先まわりにテープを張り付けさらに水漏れ防止用のマニキュアを裾部分に塗る（図 3）



図 1. ナイフメーカー

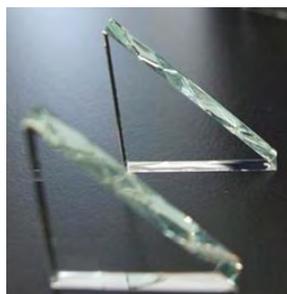


図 2. ガラスナイフ



図 3. ボート付ガラスナイフ

1.2 トリミングと顕微鏡観察

試料の目的とする部位を超薄切するため、以下の手順で確認しつつ試料の整形を行った。

- ①樹脂包埋試料をカミソリで切出し、試料表面を露出し整形する（トリミング約 0.5mm 角、図 4-a, b）
- ②1.1 で作製したガラスナイフをウルトラマイクロトームに取り付け厚さ 1 μm の厚切り切片をつくる（図 5）
- ③厚切り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 秒前後の加熱後水洗し乾燥する
- ④染色した切片を光学顕微鏡で観察し、超薄切する部位を決める
- ⑤超薄切する部位を実体顕微鏡で観察しながらカミソリで不要部分を切り落とし、再度トリミングする

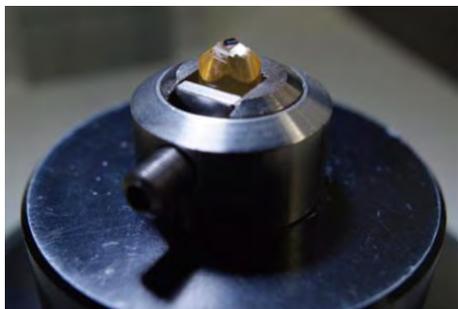


図 4-(a). 試料ブロック



図 4-(b). 試料表面



図 5. ウルトラマイクロトームの
試料部周辺

1.3 超薄切方法

ウルトラマイクロトームの操作は基本的に厚切りと同じであるが、試料ブロックとナイフの接近には十分注意が必要でありかなりの熟練を要する操作であった。

- ①ボート付ガラスナイフを取り付け、切削面全体が出るまで薄切りを続け超薄切用面出しをする
- ②刃先の最良部分を超薄切する部位に合わせて 100nm 送りで切削操作を繰り返し面の一部が切れたら止める
- ③切削した切片が浮かぶようにボート部分に蒸留水を入れる
- ④70 nm 前後の自動送り切削を設定し、切片が銀色または金色に見えるように調節する
- ⑤ボートに浮かんだ切片の上から、あらかじめイオン蒸着させたグリッドで押さえつけ回収し、濾紙で水滴を吸い取り乾燥する

1.4 電子染色

試料構造を電子顕微鏡下でコントラスト良く観察するための操作で、今回は以下の二重染色を用いた。

- ①酢酸ウラン染色：パラフィルム上に酢酸ウラン液の液滴を作り、切片の付いた面を下にしてグリッドを液滴に浮かべ、シャーレで覆って 7~10 分間染色をする（図 6）
- ②蒸留水の入ったビーカーにグリッドを入れて水洗し、さらにパラフィルム上に作った水滴にグリッドを移して 1 分待ち、この水洗を 3 回繰り返す（図 7）
- ③鉛染色：酢酸ウラン染色と同じ要領で、2~3 分間染色を行う
- ④上記水洗を繰り返す
- ⑤グリッドの試料面を上にして濾紙に移し、水分を吸い取り乾燥させグリッドケースに保存する

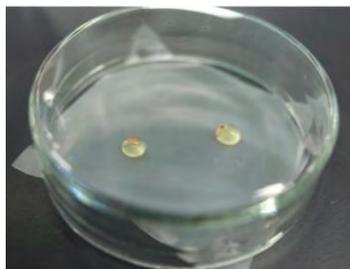


図 6. 酢酸ウラン染色



図 7. 水洗

2 SEM 用特殊試料ホルダーの取扱操作および観察像の取得

特殊試料ホルダーへの試料セット方法や SEM 装置の操作方法を学び、1 で作製した薄膜試料を観察した。

2.1 SEM 用特殊試料ホルダー

浜松医科大学の技術職員である村中祥悟氏らの開発により市販化まで至った試料ホルダー (図 8) であり、薄膜試料を透過した電子が二次電子発生面で二次電子に変換され検出器によって言わば走査透過二次電子像として像を得ることを可能とする構造を有しているため、SEM で TEM 像相当の像が観察できるようになっている。

2.2 使用した SEM 装置

日本電子 6060 型を使用した (図 9)。

2.3 観察条件

加速電圧 30 kV、作動距離 5 mm、電子プローブ径 50 にて 50~20000 倍の観察を行った。

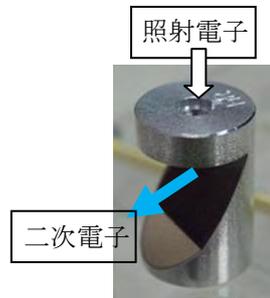


図 8. 特殊試料ホルダー

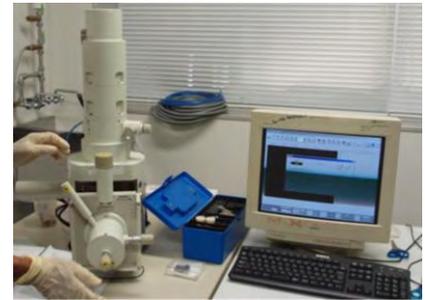


図 9. JSM-6060 型

2.4 観察された試料像

1 で作製した薄膜試料から得られた試料像を図 10~13 に示す。

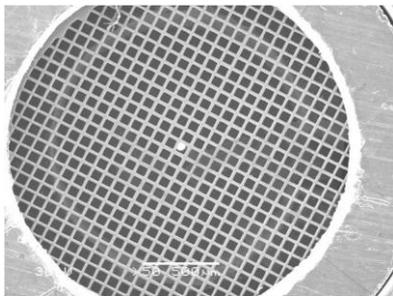


図 10. グリッドと観察視野 (50 倍)

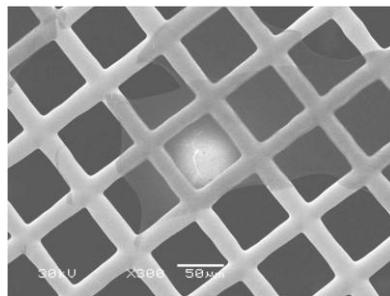


図 11. グリッド線と試料薄片 (300 倍)

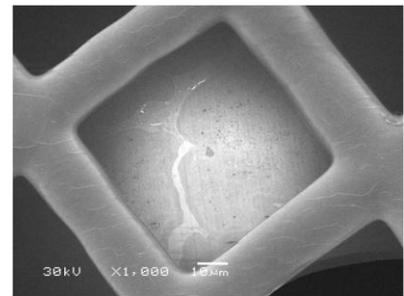


図 12. 試料部拡大図 (1000 倍)

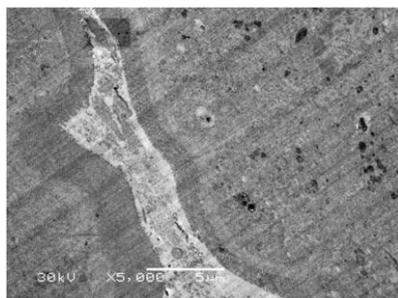


図 13-(a). 5000 倍

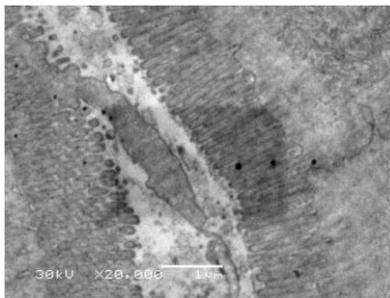


図 13-(b). 20000 倍

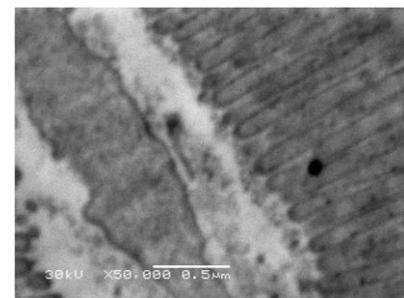


図 13-(c). 50000 倍

図 13. 試料像

図 11, 12 で観察視野の中に試料切片があることが確認できる。図 13 では小腸特有の絨毛および微絨毛が比較的感度良く観察された。本研修の試料としてマウスの小腸と肝臓の二種類が用意されており、この試料はマウスの小腸であることが確認できた。

3 TEM 像との比較

2 で観察したのと同じ試料を TEM でも観察し、2 で得られた試料像と比較を行った。

3.1 使用した TEM 装置

エコトピア科学研究所所有の日立 H-800 型を使用した (図 14)。

3.2 観察条件

加速電圧 200 kV にて荒井専門職員の操作のもと 300~50000 倍の観察を行った。

3.3 観察された試料像

得られた試料像を図 15(a)~(c) に示す。

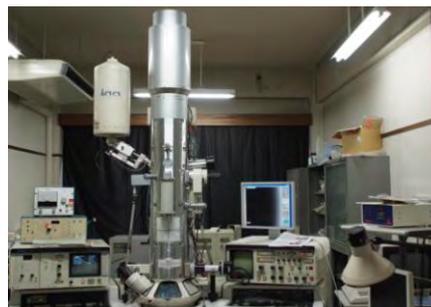
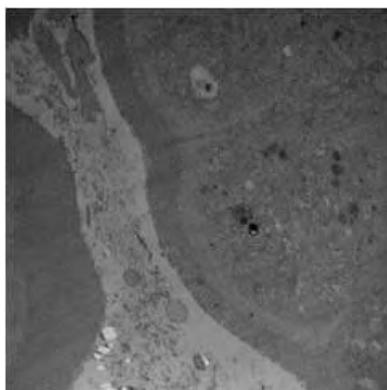
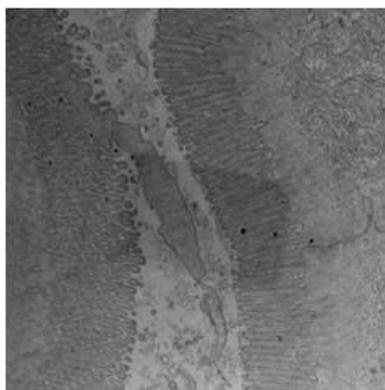


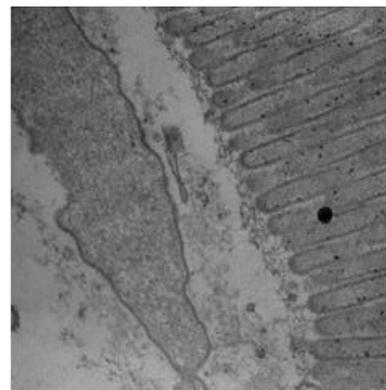
図 14. 日立 H-800 型



(a). 6000 倍



(b). 15000 倍



(c). 50000 倍

図 15. TEM 像

SEM で得られた試料像 (図 13) は TEM 像の解像度に劣るものの実用性では十分な結果を示すことができた。

4 終わりに

業務で使用しない生物試料を扱い、SEM・TEM をはじめそれに関連する装置・機器などの普段体験できない貴重な実習を行うことができた。実習指導者から、TEM 観察用薄膜試料作成の技術およびきれいな TEM 像を観察する技術を学べたが、この技術を自分のものにするには日々行わなければいけない事を実感した。約 2 日間の実習を通して、SEM・TEM を使用しての試料観察への第一歩となったと思う。また、各装置に習熟した実習指導者や、他の支援室の技術職員との交流も有意義であり、研修の目的を十分に達成したと思う。

最後に、本研修で講義及び実習を担当して頂いた講師の方々、並びに企画・運営にご尽力された研修スタッフの皆様に厚くお礼申し上げます。