



| | |
|------------------|---|
| Title | Dow latex 粒子による電子顕微鏡の倍率測定 |
| Author(s) | 四方, 英四郎; 高橋, 昭一郎 |
| Citation | 北海道大學農學部邦文紀要, 3(1), 162-170 |
| Issue Date | 1958-03-14 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/11659 |
| Type | bulletin (article) |
| File Information | 3(1)_p162-170.pdf |



[Instructions for use](#)

Dow latex 粒子による電子顕微鏡の倍率測定

四 方 英 四 郎*

高 橋 昭 一 郎**

Determination of magnification of an electron microscope by Dow latex particles

By

Eishiro SHIKATA

Botanical Institute, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University

Shoichiro TAKAHASHI

Research Institute for Tuberculosis, Hokkaido University

緒 言

電子顕微鏡の倍率測定は極めて重要な問題であり現在まで種々の方法が報告されたが、未だ充分満足すべきものがない。電子顕微鏡の倍率測定には一定の加速電圧の下で投影レンズ電流或は中間レンズ電流の変化に対する倍率の変化をグラフに作つて用いる方法が広く使用されているが、此の倍率グラフが各1枚1枚の写真に対してどの程度の信頼性があるかということに就いてはあまり注意が払われず無頓着に用いられていることが多い。此の様な場合 10~15% 位の誤差はさげられないものと云われているが、此のグラフの作製及撮影された写真によほどの注意を払わないと全く無意味な測定となりかねない。此の倍率グラフは時々較正する必要があることは従来も指摘されて来たが⁽¹⁾、渡辺等⁽¹¹⁾によると毎日の較正でもなお約 10% の誤差を生ずると云う。倍率グラフは光学用回析格子のレプリカ (grating replica) を用いて作るのが普通である。光学用回析格子は現在最も信頼出来る電子顕微鏡の倍率測定スケールとされているが、そのレプリカに関してはなお検討を要することが多い様である^(1,7,9)。

BUCKUS & WILLIAMS⁽⁹⁾ は Dow latex 580 G lot no. 3584 に就いて報告したが、その後多くの研究者

に用いられ、特にウイルス粒子の大きさの決定に大きな役割を果たした。しかし latex 粒子そのものの大きさ、特に電子顕微鏡中で電子照射を受けた時の latex 粒子の大きさに就いては多くの問題が含まれて居り^(6,7,8) 不注意な使用は大きな誤差のもととなる。

近年電子顕微鏡の著しい発達に伴い分解能が向上し直接高倍率による観察が可能となり、益々倍率の正確な測定の必要に迫られると共に高倍率観察の際の強い電子照射による影響も等閑視出来なくなつた。

筆者等は主として latex 粒子による倍率の決定について二三の実験を行つたので茲に報告する次第である。

尚本実験に使用せる電子顕微鏡は日立製作所製 HU-7 型及日本電子光学研究所製 JEM-4B 型である。

この研究に当り Dow latex 粒子の入手に関して滯米中特に御尽力を賜つた農学部田川隆教授に対し厚く御礼申し上げる。更に研究中御協力を得た金属研究所電子顕微鏡室の佐藤義一及富田吾郎の両氏に謝意を表す。又本稿の校閲を賜つた農学部富士貞吉教授に深く感謝する次第である。

* 北海道大学農学部植物学教室

** 北海道大学結核研究所

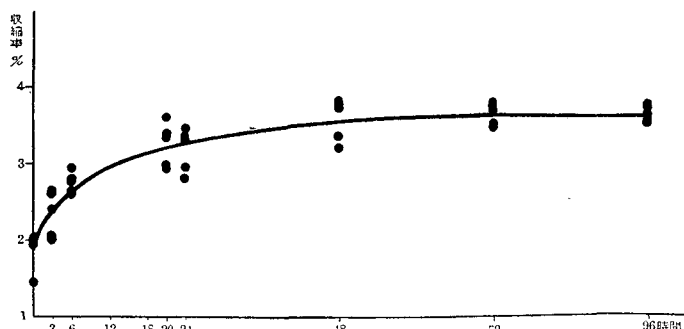
実験 I

Grating replica による倍率測定

1. Grating replica 膜の収縮

Grating は科研製の 1 mm 間隔に 960 本の格子が縦横互に直角に刻んであるものを用いた。replica 膜は深見⁽⁵⁾の filmy replica 法を用い、応研商事製の Bioden-1 (acetylcellulose 膜) を用いて第 1 段 replica を作り、これに carbon shadow を行い、更に Cr-shadow を行つて第 2 段 replica 膜として mesh にすくい取つた。

森戸等⁽⁶⁾及明石等⁽⁴⁾によると methylmethacrylate の転写膜は 1~2% 或は ±1% の収縮をするそうであるが、筆者等は acetylcellulose 膜の収縮について実験を行つた。その方法は光学顕微鏡の接眼マイクロメーターの 1 目盛を正確に測定しておき、次に vernier calliper の或る目盛の位置 (例えば 15~15.5 cm の間) の線間隔を夫々光学顕微鏡で測定しておく。同じ場所の第 1 段の replica を作り、その線間隔を光学顕微鏡で測定して膜の収縮量を計算した。第 1 図は 5 枚



第 1 図 Acetyl cellulose replica 膜の収縮

の replica 膜に就いて剥離直後から 4 日目まで測定した結果であるが、3 日目まで平均 3.628%、4 日目まで 3.612% の収縮率であつた。剥離直後大凡 2% 収縮しているがその後 2 日間に次第に収縮し 3 日後は余り縮まない。他に行つた同様な実験でも 3 日後から 15 日目まで殆ど変化は無かつた。この実験から grating replica の収縮を 3.6% とし倍率計算をした。

2. Grating replica 膜の変形と撮影上の注意

次に latex 粒子を grating replica 膜にのせて撮影を行つたが、その際次の如き場合が観察された。

a) 電子顕微鏡の同じ条件のもとで同一 mesh から異つた 6 視野を出来る丈け早く撮影した場合、光

学顕微鏡で測定した latex 粒子の大きさは 6 視野とも殆ど変化が無いのに grating の格子間隔にかなり変化が現われることがある。

b) grating replica の格子は正しく直交しているが縦横の格子間隔に大きな差がある。

c) grating replica の格子が直交していないものがある。但し latex 粒子は中央部では正球形を示している。

d) grating replica の格子が縦横の一方のみ明瞭で他方が殆ど測定出来ないものがある。

以上の問題は全て replica 膜作製上の問題である。

又 b) の場合は mesh にすくい上げる前の収縮であるか電子線による収縮が明らかではないが、この様な写真から倍率の測定は不可能である。c) の場合 latex 粒子が入っていないとレンズの収差か grating の変形か判断出来ない場合があり grating replica に latex 粒子をのせることはいずれの場合にも必要なことである。d) の場合については shadow の方向が悪い場合も考えられるから格子の方向に対して 45° の角度に shadow する様にした。一般に carbon replica 膜は

電子照射に対して強いと云われているが Cr-shadow した replica 膜では shadowing の方向に収縮しているものも多く、直交せる格子の間隔が一致しないものが案外多かつた。これは電子線による収縮であるか或は mesh にすくい上げるとき既に一方向だけ縮んでいたのか明らかではない。科研製の grating は格子の堀りが浅い為か或は acetylcellulose film をただ grating に張りつけて replica を作る為か shadowing を

行わずに 8000~10000 倍の直接倍率で観察すると極めてコントラストが悪く撮影及計測が困難である。この際特に注意を要することは電子顕微鏡で観察して grating の一方の格子のみ特にコントラストの良い場所は一方向に収縮している場合が多いから撮影の場合は grating の直交する 2 本の格子が同じ位のコントラストに見え、直交して且つピンと張つている視野を選ぶ必要がある。carbon replica 膜は蒸着の際の真空度、carbon の質が適当でないとなかなか大きい膜が得難く、mesh にすくい取るまでに小さい膜片にち切れ易いものである。我々の実験中にもこの点で理想的な膜がいつも得られたとは云えず、前述の如き replica

膜の収縮、ゆがみなどを起したものが多く様に思われた。この様な点から先づ正確な grating replica 膜を作る必要があると考え BRADFORD 等⁽⁶⁾の指摘している様に carbon 膜を更にシリカで補強して好結果を得た。シリカ補強した carbon 膜は第1に相当大きな膜を作ることが容易であり grating replica 膜を mesh 全体に張りつけて支持膜として使用することが出来るのでこの膜に試料をのせて1枚1枚の写真的倍率を計算出来る。第2に膜自体の機械的強度が強くと mesh にすくい取るときに収縮したりゆがんだりすることが殆ど無くなつた。従つて電子顕微鏡所見では正しい直交した格子を示した。第3に電子照射による収縮が殆ど起きない様である。

e) 實際上完全に非点収差の無い写真がいつも撮影出来るとは云えない状態であつたので僅か underfocus にして撮影したことが多い。非点収差のはつきり現われた写真や overfocus のものは計測出来ない。8000~10000 倍では僅かな underfocus の為の倍率計算に対する著しい相違、或いは latex 粒子の大きさの著しい変化は無い様である。

f) latex 粒子が視野の中心で楕円形となつているもの、或いは視野の一端の latex 粒子が正球形で他端では楕円形をなすものがある。この場合の grating replica は決して正しい格子間隔を示さない。始めは latex が古い為この様な変形したものが入るのかと考えたが grating replica と比較してこの場合は明らかに電子顕微鏡の軸調整の不正によるものであつて撮影直前必ず軸調整について細心の注意を払つてこの様な問題の無い様にした。

3. Grating replica を用いて測定した場合の電子顕微鏡の倍率の変動に就いて

上述の点に注意して grating replica を用い、電子顕微鏡の倍率測定を数ヶ月に亘つて続けた。この際試料支持台は毎回異つたものを用い、電子顕微鏡の電流及高圧のスイッチを入れてから数分後に撮影を開始した。得た写真のうち縦横の格子が直交し、その4本の間隔の測定が互に一致したものから倍率の計算を行つた。格子間隔の測定には vernier calliper を用いた。その結果は第4図 A に示された如く対物レンズ電流値の変化に従つて 6940 倍から 8180 倍の間で変動し約 7500 倍の倍率が多く現われた。

実験 II

Latex 粒子による倍率測定

1. 数年間保存した Dow latex 580 G 粒子の均一性に就いて

実験に用いた latex 粒子は昭和 28 年夏京都大学東昇教授から分譲していただいた Dow latex 580 G と云われるものであるが、その後蒸溜水に分散させて冷室 (3~5°C) に貯蔵しておいたので長期間の保存後もなお均一な大きさを持つているか否かを確かめるため、3 台の電子顕微鏡を用いて撮影し各 1 枚 1 枚の乾板に

第 1 表 latex 580 G の均一性

| 使用した電顕 | 乾板番号 | 中間レンズ電流 mA | 投影レンズ電流 mA | latex 測定粒子数 | latex* の直径 | 標準偏差 |
|--------|--------|------------|------------|-------------|------------------|------|
| HU-7 | 2726-A | | 50.0 | 20 | 44.73 | 0.34 |
| | 2726-B | | // | 8 | 46.06 | 0.32 |
| | 2727 | | // | 8 | 50.13 | 0.35 |
| | 2806 | | // | 20 | 45.25 | 0.64 |
| | 2819 | | // | 7 | 46.07 | 0.34 |
| | 2820 | | // | 6 | 45.0 | 0 |
| | 2821 | | // | 9 | 45.89 | 0.38 |
| | 2850 | | // | 17 | 46.65 | 0.61 |
| JEM-4 | S-752 | 14.0 | ⑤** | 7 | 30.0 | 0.38 |
| | S-763 | // | // | 10 | 32.65 | 0.48 |
| | S-774 | // | // | 7 | 34.21 | 0.27 |
| | S-775 | // | // | 11 | 33.81 | 0.25 |
| | S-778 | // | // | 12 | 29.67 | 0.83 |
| | S-781 | // | // | 10 | 32.75 | 0.35 |
| | S-787 | // | // | 14 | 37.68 | 0.37 |
| | S-788 | // | // | 17 | 37.76 | 0.43 |
| T-1 | 1 | | | 5 | 22.5 ×22.5 | |
| | 2 | | | 2 | 22.0 ×22.0 | |
| | 3 | | | 3 | 80.0*** ×80.0 | |
| | 4 | | | 2 | 22.0 ×22.0 | |
| | 5 | | | 4 | 23.75 ×23.63 | |
| | 6 | | | 2 | 23.0 ×23.0 | |

* latex 粒子の大きさは Leitz の光学顕微鏡の接眼マイクロメーターの目盛数 (1 目盛 1/15 mm)。

** 投影レンズ電流は ①-⑤ までの切換スイッチである。

*** Leitz (6×3) 1 目盛 0.15/8 mm

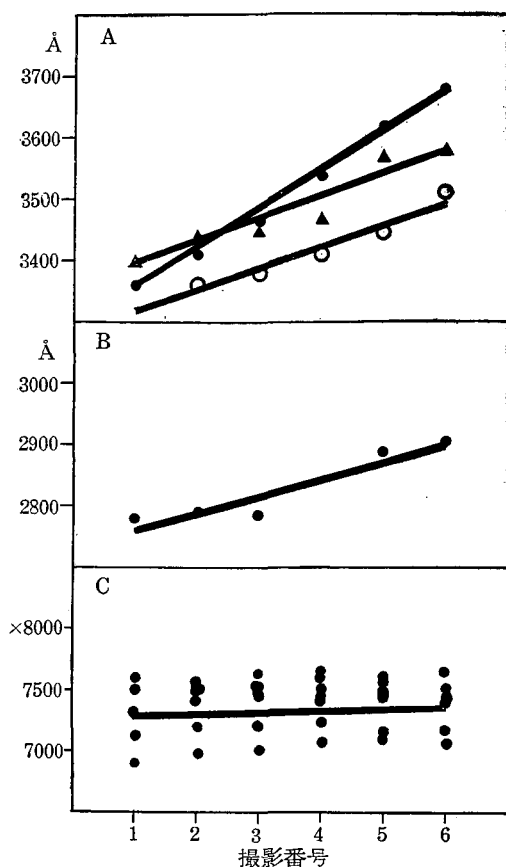
ついて粒子の径を測定した。日本電子光学研究所製の T-1 型電子顕微鏡の最高倍率で grating replica 膜の上に latex 粒子をのせて撮影した (grating replica はレンズの歪像収差を調べるためである) とところ何れも正球形を示し、又他の電子顕微鏡でも特に調整に注意した場合の乾板の中心部では殆ど正球形の粒子のみであつた。

latex 粒子は shadow しない粒子の 2, 3 方向の直径を測定した。直接倍率約 8000~10000 倍にて撮影し乾板の中心部 (約 35 mm 平方) のみを使用した。大きさの測定には光学顕微鏡の低倍率 (Leitz 6×1) のものを用い対物レンズのマイクロメーターの 1 目盛は 1/15 mm である。第 1 表はその結果を示したものであるが、ここに示した偏差が latex 粒子自体の大きさの違いによるものか、電子顕微鏡のレンズの収差によるものか明らかではない。又この表から、1 視野中では極めて均一な大きさをもつ latex 粒子が各視野毎にかなり大きさが違っていることは注目すべきことである。即ち乾板毎の倍率がこれだけ変動していることが分る。

2. Latex 粒子の鏡体内変化

BRADFORD 等⁽²⁾によると latex 粒子は支持膜を張つた mesh の種類によつて電子照射の際膨大することがある。我々の実験結果からも真鍮 mesh を用いた場合第 2 図 A, B の如く粒子径が次第に大きくなつた。即ち grating replica 膜上に latex をのせて同一視野を 3 分間最高の明るさ (我々の使用した電子顕微鏡の beam 電流は 10 μ A である) に照射して 6 枚の写真撮影したものから latex 粒子の直径を計算したものである。その結果 latex 15 N-7 では約 5.3~9.5%, latex 580 G では約 5.7% 直径が膨大するのを認めた。grating の格子間隔は 6 視野共変化が少く倍率変化は極めて少い (第 2 図 C)。即ち replica 膜自体の変化は極めて少いと考えられる。これに対して latex 粒子は照射時間の経過と共に直径が大きくなつた。

FISCHER⁽⁴⁾は Dow latex は強い電子線照射によつて破壊され径が小さくなる事を報告しているが、我々の実験では出来るだけ少い電子照射量をもつて撮影する機会が多いので、むしろ粒子の破壊よりは Bradford 等⁽²⁾のいう如く径の大きくなる事が問題である。この現象は contamination と考えられているが、小さい粒子の大きさを測定する際には充分注意を要する問題である。latex 粒子による倍率測定或いは大きさの



第 2 図 latex 粒子及 grating replica 膜の電子照射による変化

- A latex 15 N-7
- B " 580 G
- C grating replica (carbon 膜, シリカ補強)

測定のとときは出来るだけ少い電子流密度です早く撮影し同じ mesh から多くも 3 視野以上の写真をとらないこと、及 1 視野撮影毎に必ず他の遠く離れた場所を観察、撮影するなどして電子線の影響、contamination 等を少なくする様に注意して実験を行つた。

3. Dow latex 580 G の大きさ

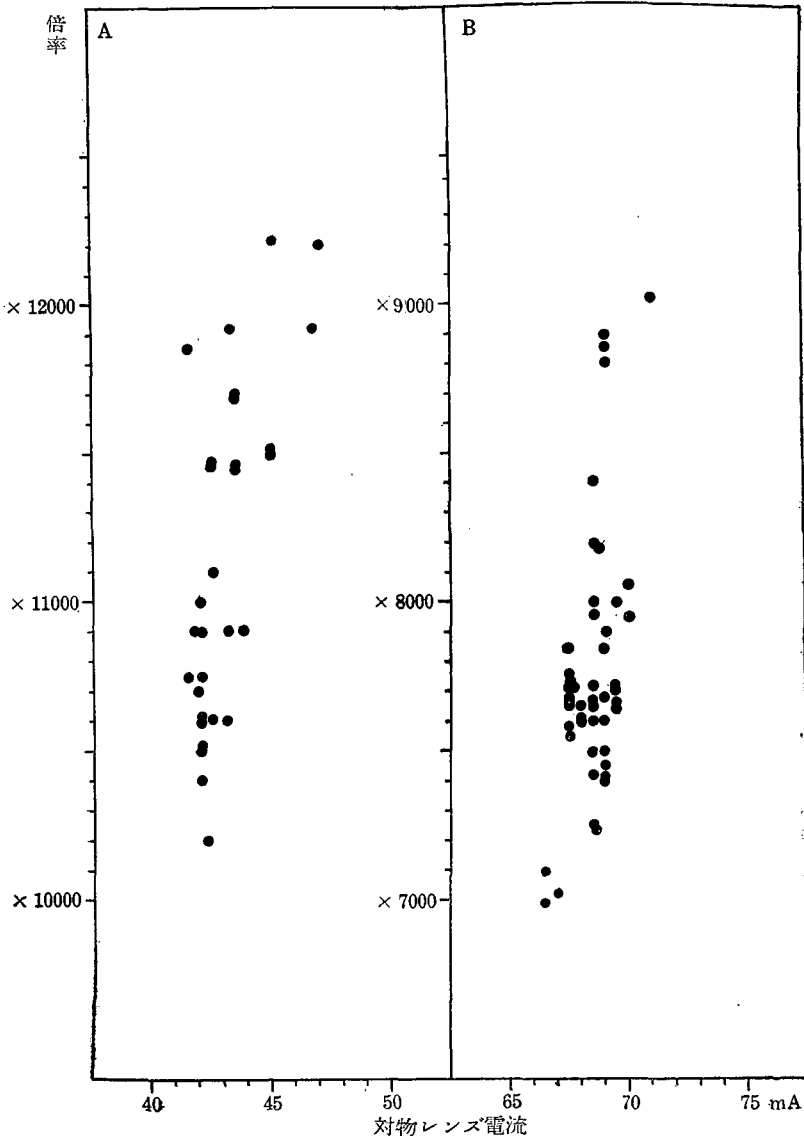
grating replica 膜の上に latex 580 G をのせ、前述の如き点に注意して撮影し replica film の収縮を 3.6% として、277 ケの粒子の直径を計算したところ $2819 \pm 57 \text{ \AA}$ であつた。Dow latex 580 G は直径 $2590 \pm 25 \text{ \AA}$ と報告されたが⁽⁴⁾ 蒸留水に分散させて 3~5°C の冷室に約 3 ケ年間保存したものは明らかに膨潤しているが粒子の均一性は失われなかつた。

4. Latex 粒子を用いて測定した場合の電子顕微鏡の倍率の変動に就いて

その後 Dow chemical Co. の好意により最近作られた latex 粒子が入手出来たので, latex 15 N-7 ($3400 \pm 52 \text{ \AA}$) 及 15 N-8 ($5110 \pm 74 \text{ \AA}$) の 2 種と Dow latex 580 G (2820 \AA としして計算した) との 3 種を用いて約 6~7 ケ月に亘つて毎日数枚の latex 粒

子の写真を撮影し, 各乾板の latex 粒子の直径から倍率を計算し第 3 図及第 4 図 B の如き結果を得た。撮影に際しては 1 視野撮影毎に金網の目を移し, 真鍮線から離れた目の中心部を撮影し, 1 枚の mesh から連続 3 視野以上撮影をしない様にした。

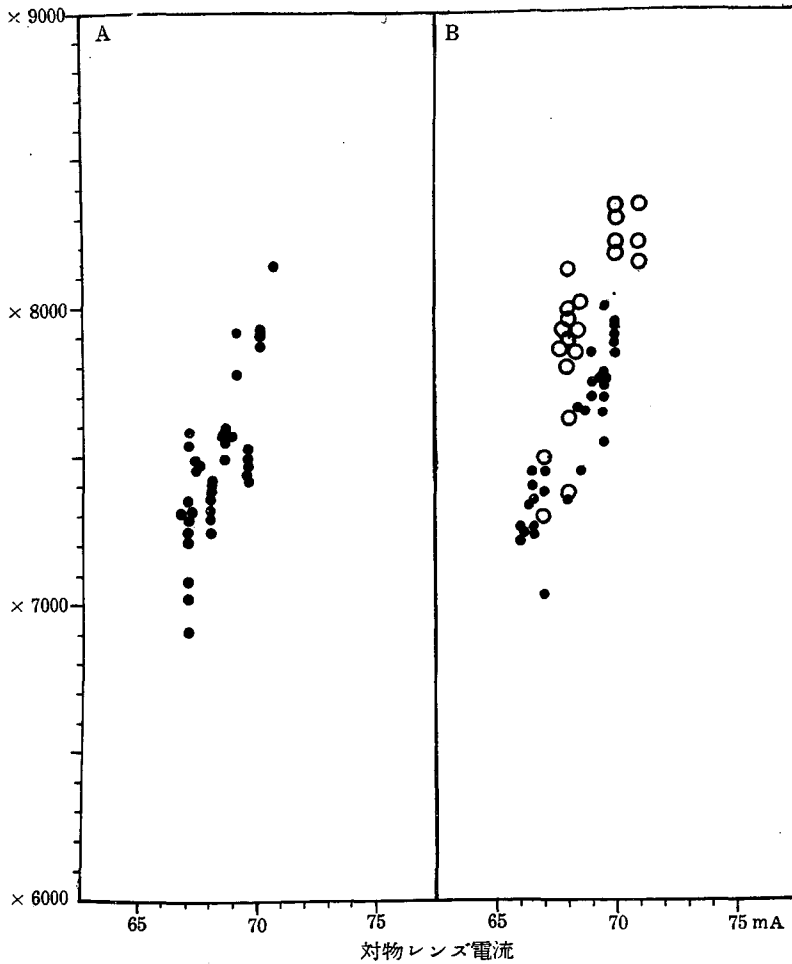
この結果から電子顕微鏡の倍率変動はかなり大きく, 例えば JEM-4 型では中間レンズ電流 14 mA,



第 3 図 latex 580 G にて測定した場合の倍率変動

A HU-7 型電子顕微鏡 (投影レンズ電流, 50 mA)

B JEM-4 型電子顕微鏡 (中間レンズ電流 14 mA, 投影レンズ電流 ⑤)



第 4 図 電子顕微鏡の倍率変動

- A JEM-4 型電子顕微鏡 (中間レンズ電流 14 mA 投影レンズ電流 ⑤)
grating replica, (カーボン膜, シリカ補強)
- B 同上 • latex 15 N-7 ◦ latex 15 N-8

投影レンズのスイッチを ⑤ としたとき約 7700 倍が最も多く現われる倍率とすれば高い方に 19.5%, 低い方に 9.2% の変動を生じた。19.5% の変動とは 280 μ m の長さの煙草モザイク病ウイルスが 225.4 μ m 或は 334.6 μ m として測定される場合があり得ることを示すものである。HU-7 型は実験例が少いので確かな事は云えないが、やはり相当の変動を示した。但し JEM-4 型は beam 電流 10 μ A であるが HU-7 型では 100 μ A で而も視野が暗い為正確な焦点の写真を得るには殆ど最高の明るさにしなければならなかつたからこの場合の倍率変動は当然 latex 粒子の conta-

mination による膨大が前者より遙かに多いと考えられる。

更に第 3, 4 図に示された様に対物レンズ電流即ち試料位置の変化一試料支持台の長さも倍率の変動に対して無関係でないことも注意しなければならぬ。JEM-4 型の場合試料支持台を mesh の入れかえ毎に変えると対物レンズ電流値は 66 mA から 71 mA の間で変動し、HU-7 型では 41~47 mA の間であつた。この値の変化は加速電圧も関係するからこの実験のみから断定出来ないが試料支持台の長さが夫々極めて異つてゐることは注意を要する。

5. Shadowed 及 unshadowed latex 粒子の大きさ

KERN and KERN⁽⁸⁾ は shadow した latex 粒子と shadow しない粒子では前者の方が確実に大きいことを報告した。Dow latex 580 G で測定した結果では shadow しない標本では $2650 \pm 50 \text{ \AA}$, shadow したものは $2840 \pm 50 \text{ \AA}$ になると云う。この点に関して我々は次の如き実験を行った。即ちコロジウム膜上にのせた latex 粒子をパラジウム或はクロームで shadow した後、その上に再び latex 粒子をのせて検鏡した。shadow された latex 粒子と shadow されないものと一緒に写し込んでその大きさを比較した。パラジウム shadow は我々が普通ウイルス試料の際に行っている様に shadow 角度を浅くし (約 1:10), クロームの場合はその角度を深くし (約 1:1) で行った。前者の場合の蒸着膜は出来るだけ薄くしたので蒸着金属の厚さによる latex 粒子の直径の伸びは殆ど無視して良い位であつたが後者では少し厚く shadow したため明らかに shadow 方向の伸びが認められ、直径の測定は shadow 方向に対して直角の方向を測つた。

その結果 shadow しない粒子の大きさが $5110 \text{ \AA} \pm 74 \text{ \AA}$ (Dow latex 15 N-8) とするとパラジウム shadow したものは $5214 \text{ \AA} \pm 67 \text{ \AA}$ となり僅か 2.03% の増加に過ぎなかつた。クロームを shadow したものは unshadowed 粒子が $3400 \text{ \AA} \pm 52 \text{ \AA}$ (Dow latex 15 N-7) とすると shadow したものは $3491 \text{ \AA} \pm 44 \text{ \AA}$ であつて 2.68% の増加である。即ち KERN & KERN⁽⁸⁾ の結果は約 7% の増加を示したが、我々の実験結果は僅かに 2~2.7% の増加でしなかつた。

論議及結論

今回我々の行つた実験に於ては電子顕微鏡自体の性質から極めて当然の結果が得られたに過ぎないと云えるが、従来報告されたものの多くは電子顕微鏡の倍率測定そのことに対する検討であつて、その様にして得られた倍率グラフが応用研究者の試料撮影から得た乾板の 1 視野と如何なる関係にあるか具体的に検討していない。実際には 1 人の技術者が電子顕微鏡を調整しておき、応用研究者の依頼した試料をその技術者が撮影する場合が多いと思われる。その為応用研究者が、与えられた乾板から計測を行う場合、写真のみから倍率の変動や軸調整の良否を見出すことが困難であるか

ら極めて誤差の多い実験を繰り返していることに気がつかないで過し勝ちである。我々の今回の実験は主としてこの様な点についての検討を目的としたものであつた。

第 3, 4 図に示された様に電子顕微鏡の倍率は倍率グラフを用いる場合約 20% の誤差を含むものと考えて良いと思う。それ故同じ日に如何に多くの優れた写真を得、測定数を充分多く取つたとしてもそれはあまり意味がなく、むしろ毎日何枚かづつ長期に亘つて撮影した乾板から得た粒子を測つたものでないと倍率グラフの倍率はあまり信用出来ない。又ある 1 日だけ特に電子顕微鏡の調整を入念に行い、充分注意して grating replica を撮影し、その結果 1 本の倍率グラフを画いても、それは決して翌日の倍率の標準とはなり得ない。更に多く指摘された如く時々補正を行つて正しい倍率グラフを画いても実際の試料の測定の方もかなり長期の撮影となるか或は相当大きな誤差を含むものと考えて実験を行うべきであるから甚だ能率の悪い仕事となる。

以上の点から電子顕微鏡の倍率は各々 1 枚 1 枚の乾板に就いて測定し得ることが最も理想的であり且つ必要なことである。

その方法として第 1 に試料を 2 枚同時に鏡体内に入れる事が出来る電子顕微鏡では一方に grating replica を入れ他方に試料を入れて 1 枚の乾板に二重写しをする方法がある。我々はそのような電子顕微鏡については実験を行つて居ないので批判することができない。第 2 は grating replica 膜を支持膜としてその上に試料をのせる方法であり、最も正確な倍率測定をなし得ると思われるが、現今の如く直接 10000 倍以上の倍率で観察するのが普通になると 1 mm 間隔に 960 本の格子数では使用に耐えず結局 replica 膜上の特定の小物質或はコラーゲン繊維との併用⁽⁹⁾を考えねばならない。しかし試料 1 視野毎の倍率測定には不便であり且つ replica 膜面の凹凸の為に shadowing が旨くゆかないことが多い。第 3 の方法は latex 粒子の使用である。特に種々の直径の latex 粒子を使用すればかなり広範囲に利用出来る⁽⁹⁾。latex 粒子は試料中に混ざるか、試料と二重に散布して視野の 1 枚 1 枚について倍率を決定出来る外に数枚の latex 粒子を写し込めば軸調整についても凡そ知ることが出来るから後になつてその時の電子顕微鏡の電流中心のズレを検討することが可能となる。又 shadow の影の長さから試料の高さを求めることも出来る。しかし latex 粒子自体の電子

顕微鏡による大きさの測定に関しては多くの問題が含まれている^(2,6,9)。第1は latex 粒子の保存中の変化である。特に粒子の均一性と大きさについて使用前必ず測定をくり返す必要がある。我々が約3ヶ年蒸留水に分散させて冷室中に保存した Dow latex 580 G は約 8.84% 膨潤していた。しかし粒子の均一性は失われなかつた。第2に実験 II. 2. に示した如く電子照射の際に contamination を生ずることである。この為出来る限り少い電子流密度に於ける迅速な撮影技術が必要とする。同じ mesh からなるべく少い枚数の撮影に止め、特に長時間観察した視野の撮影は避けるべきである。latex 粒子を使用する倍率の測定に於て contamination が最も誤差を生ずる原因となり易いが、現在これを防ぐ有効な方法は無い様である。BRADFORD 等は stainless steel の mesh を用いることによつて replica 膜の収縮と latex 粒子の contamination を小さくすることが出来ることを報告した。我々は可能な限り少い電子流密度をもつて撮影したが真鍮 mesh を用いた場合約 20 分後(6 視野3 分間隔の撮影) 最大約 9.5% の直径の膨大するのを認めた。特に高倍率観察の場合の強電子流密度に対する latex 粒子の変化に対しては尚検討を要すると考えられるので今後実験を行う予定である。この様なことから latex 粒子を使用する場合、少い電子照射によつて最高の肉眼的明るさが得られ、試料の震動や beam の動きなどで撮影に手間取ることのない様な電子顕微鏡が要求される。第3は shadowed 及 unshadowed latex 粒子の大きさの相異である。Kern 等の実験結果は約 7% の相異を示したが我々の実験では僅か 2~2.7% であつた。この相異がどの様な理由によるものか明らかにし得なかつたが、Kern 等の用いた電子顕微鏡は非バイアス型の電子銃で beam 電流 300 μ A であり、我々の用いたものはバイアス型電子銃で beam 電流 10 μ A のものである。この問題についての決定的な解決は未だ報告されていないが、KERN 等は latex 粒子と支持膜との間の荷電の問題として考えられることを示した。今回の結果からこの問題は shadow 金属の種類、厚さ、試料面に於ける電子流密度、mesh 金属の種類等によつて変化があると考えられるので latex 粒子の使用に際して充分注意を要する。常に unshadowed latex 粒子を用いるか shadowed latex の径を grating で測定し、同じ条件で shadow した試料中の latex 粒子を用いた方が良い。

latex 粒子による倍率の決定は上述の如くなお未解決の問題が多くこれを使用する場合撮影技術上種々の制限を受ける。しかしこれらの点について充分な考慮を払つて用いるならば、少くとも現在の倍率グラフとは比較にならない優れた結果を期待出来るであろう。即ち各視野毎の倍率を知ることが出来ること、第2に局部的な位置の shadow 角度を正確に求め得ること。第3にいろいろの大きさの latex 粒子を用いて今後直接 grating では計測し得ない高倍率観察の場合の倍率測定に利用出来ること、第4に数ヶの latex を適当に撮しておくこと各乾板の撮影当時の軸調整についても後から大凡検討出来、歪曲収差の計算も出来る。第5に非点収差、像の動き、焦点の良否等が容易に検討し得る等である。

以上の外に倍率誤差を大きくするものとしてレンズ電流の磁気ヒステリシスの問題がある。既に多くの研究者によつて報告されているので今更繰り返す必要が無いが、観察中倍率を変えることが多いとこの点に関する注意を忘れ勝ちである。後になつて視野毎の倍率を計算すると1枚だけかなりひどく違つた倍率のものが混つていたりする。この様なものは勿論除いているが latex 粒子を用いない試料のみの写真からはこの事を知ることはむづかしい。同様に調整不十分な電子顕微鏡、特に電流中心のズレている場合の倍率測定は無意味に近いものがあるが単にウイルスやバクテリア等の試料のみのときは写真を見た丈ではこの点に気が付かないで過し勝ちである。我々は平常調整が充分出来ている電子顕微鏡であつても毎回撮影直前の軸調整の点検を怠つてはならないと考えている。latex 粒子による計測に頼つていと必要とする視野の中に latex 粒子が存在しないことが屢々生ずる。この場合はその前後の写真から倍率を求める様になるが、その為にも写真撮影の場合1 視野毎に電圧及各レンズ電流値を出来るだけ正確に記録して置くことにした。

又試料中に latex 粒子を混入或は後から spray 出来ない時始め grating replica 或は latex 粒子を数枚撮影し、次に同じ試料支持台に試料の mesh を入れかえて検鏡する必要がある。この場合いつも同じ試料位置を保持出来るとは云えないから夫々の電流値、特に対物レンズ電流値に注意、記録しておく方が良いと思う。

摘 要

(1) 倍率グラフを作つて電子顕微鏡の倍率を決定

する方法は、grating replica 或は Dow latex 粒子を用いて計測した結果約 20% の誤差を生ずることが分つた。

(2) grating replica は filmy replica 法を用いて作つたが、第1段 replica の acetylcellulose 膜は約 3.6% 収縮した。第2段 replica の carbon 膜は変形及収縮を起し易いがシリカ蒸着による補強を行つて好結果を得た。

(3) Dow latex 580 G を蒸溜水に分散させて永く冷室に保存したものは、粒子の均一性に変化はなかつたが直径が 8.84% 膨潤していた。使用の際は grating replica で直径の計測を必ず行う必要がある。

(4) latex 粒子を用いた場合に倍率誤差を生ずる最も大きな原因となるのは contamination である。我々は少い電子流密度で迅速な撮影を行い、1枚の mesh から3視野以上の撮影をしない様にし、各視野共なるべく離れた場所を選び、contamination の影響を少なくする方法を用いた。

(5) shadow した latex 粒子は shadow しないものより約 2~2.7% 直径が大きかつた。

(6) 上述の点に充分考慮を払つて使用すれば、Dow latex 粒子を試料中に混ぜてコロジウム膜にのせるか、或は支持膜に試料をのせた後に spray して各撮影視野毎の倍率を測定する方法は、倍率グラフを用いるよりは有効な方法である。

引用文献

- 1) 明石和彦, 益田達之助, 小川重弘: 電子顕微鏡 5: 79-82, 1956
- 2) BRADFORD, E.B. & J.W. VANDERHOFF: Jour. appl. Phys. 26: 864-871, 1955
- 3) BUCKUS, R.C. & R.C. WILLIAMS: Jour. appl. Phys. 19: 1186, 1948; ibid. 20: 224-225, 1949
- 4) FISCHER, R.B.: Applied electron microscopy 1954
- 5) 深見 章: 電子顕微鏡 4: 274-278, 1955
- 6) GEROULD, C.H.: Jour. appl. Phys. 21: 183-184, 1950
- 7) 伊藤一夫, 四本晴夫: 電子顕微鏡 5: 72-73, 1956
- 8) KERN, S.F. & R.A. KERN: Jour. appl. Phys. 21: 705-707, 1950
- 9) 森戸 望, 菟田 孜: 電子顕微鏡 5: 76-79, 1956
- 10) 笹川久吾: 電子顕微鏡 1951
- 11) 渡辺 顕, 串田 弘, 高橋 茂, 岩田 博: 電子顕微鏡 5: 73-76, 1956

Summary

It has been found that the possible error in measurement of magnification of the electron microscope was about 20%, as a result of measurements by grating replica, or by particles of Dow latex 580-G, 15 N-7 and 15 N-8. Therefore it is desirable to measure the magnification of electron micrographs separately.

"The filmy replica technique" was employed to make the grating replica. About 3.6% shrinkage of acetylcellulose films of the first step replica was shown 3 days after removing from a glass grating. Silica gel was used for shadow casting on carbon replica films, the second step replica, and found to be effective to prevent the shrinkage and distortion of films due to electron bombardment.

To determine the magnification of the electron microscope by means of latex particles, it is necessary to consider some of the factors which may cause errors in calculation of magnification. The average particle diameter of Dow latex 580-G spheres increased by 8.84% when dispersed in dist. water and preserved at 3°-5°C. for 3 years, but there was nearly no change in the standard deviations of measurements. The diameters of Dow latex particles of 15 N-7 and 580-G on the collodion films supported by brass grid increased by about 5.3-9.5% and 5.7% respectively after about 20 minutes when six successive photographic exposures of the same area were made under conditons of continuous irradiation by the intense electron beam. In order to reduce the influence of contamination, observation of specimens should be made as rapidly as possible and photographing less than three areas in different grid openings of the same specimen mesh should be made to minimize the bombardment by electron beams. Diameters of palladium and chromium shadowed latex particles were found to be larger than unshadowed ones by about 2-2.7 per cent. It is desirable to employ the unshadowed latex particles for electron microscope calibration.

It is concluded that the fluctuation in magnification of the electron micrographs for separate specimens can be minimized by using Dow latex particles if adequate attention was paid for the possible cause of errors in measurements.