HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温顕微鏡の試作
Author(s)	根井, 外喜男; 岡田, 次郎
Citation	低温科學. 生物篇, 25, 149-153
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17730
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p149-153.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI and Jiro OKADA 1967 Designing of a New Cryomicroscope. *Low Temperature Science, Ser.* ***B, 25.*** (With English Summary p. 153)

低温顕微鏡の試作*

根井外喜男
(低温科学研究所　医学部門)
岡田次郎
(液酸化工機株式会社)
(昭和42年9月受理)

I. 緒　　言

通常の顕微鏡では，いろいろな生物試料の凍結状態をそのまま観察することはできない。特殊な冷却装置を用いて，凍結状態を維持する必要がある。

従って，これまでにも，多くの研究者によって，それぞれの目的に応じた独特の装置が工夫考案されている。

古くは Smith 等[1] の金属伝導によって試料部分を冷却する装置があるが，液体空気を用いても −100°C くらいしか下がらず，急速冷却はできない。

Rey[2] は，液体窒素で冷却した propane を循環させる試料室を用いた。−180°C まで冷却可能で，冷却速度，加温速度の調節も自在だという。

Rapatz 及び Luyet[3] のいわゆる AFBR 型低温顕微鏡は，横立顕微鏡にアルコール冷却槽をとりつけ，pneumoregulator で冷却用空気の制御を行なうものである。試料温度を正確に測定することができ，また急速凍結も可能である。

MacKenzie と Luyet[4] は，前記の顕微鏡に更に凍結乾燥過程観察用装置をとりつけた。

その外に，朝比奈の箱型電動装置付（遠隔操作可能）の低温顕微鏡もある。

吾々もまた，生物試料の凍結及び融解の過程更に凍結乾燥過程の観察をねらいとして，新しい様式の低温顕微鏡の考案試作を行なった。

特に低温顕微鏡製作上の問題点や留意点をあげると次の如くである。

1. 最大の問題点は，冷却部分に環境空気中の水蒸気が凝結するのを，如何にして防ぐかということである。特に試料面やレンズ面に凝結する場合には，顕微鏡観察の場合の光路を妨げるので，その防除の方策を講じなければならない。

2. 室温から −190°C 付近までのかなり幅広い温度範囲内で，冷却・加温の速度をできる限り自由に調節できることが望ましい。

3. 氷点に近い比較的高い温度，或は緩慢凍結の場合には，任意の温度で植氷し凍結を開

* 北海道大学低温科学研究所業績　第856号

始させることが必要である。

4. 同一装置内で，凍結過程から引続き凍結乾燥過程の観察に移れるように工夫した。特に乾燥過程での自由な温度調節に留意した。

5. 温度制御の自動化を図った。

II. 装置とその操作法

装　置

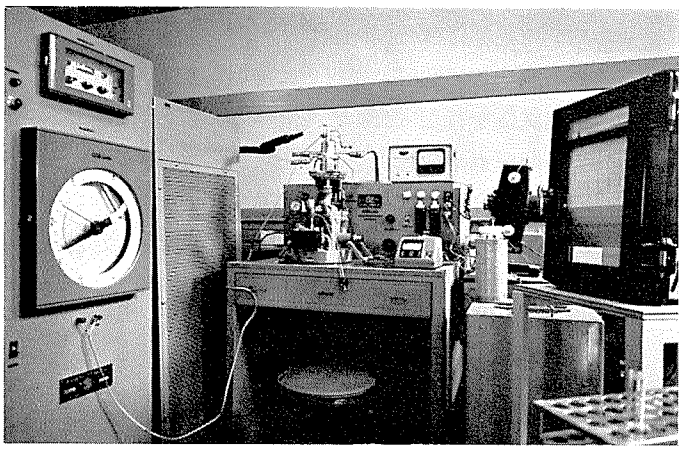
1. 顕 微 鏡

オリンパス光学の倒立型で，金属用と生物用とを組合せた特殊型を用いた。接眼レンズは7×，10×，20×，対物レンズは4×，10×，40×で，特に40×は作働距離 7.75 mm のものを使用した。本機には偏光及び位相差装置が付属している。また普通カメラ及びシネ・カメラも併用できる。光源は付属のタングステン・ランプを使用し，特に高倍率偏光の場合には別に xenon lamp を用いた。

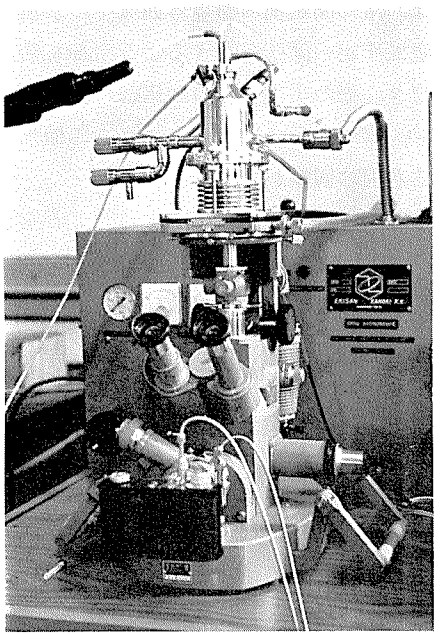
2. 試料冷却室

試料を載せてこれを冷却する内槽と，水蒸気の凝結を防ぐための外槽の2つから成る。そのうち試料を載せるのは鏡面であって，それは温度測定用の熱電対が固定されている。この槽の外側には加温用のヒーターが巻いてある。液体窒素自動補給器から送られる液体窒素は，適当に調節されながら，試料を載せた鏡面の裏側に吹きつけられ，試料を凍結させる。試料室は一方は換気装置に接続し，自動装置から送られる液体窒素が途中で気化して乾燥窒素ガスとなり，試料周囲の空気を置換して，水蒸気の凝結を防ぐ。試料室はまた他方真空装置に連なっており，凍結乾燥過程の観察ができるようになっている。

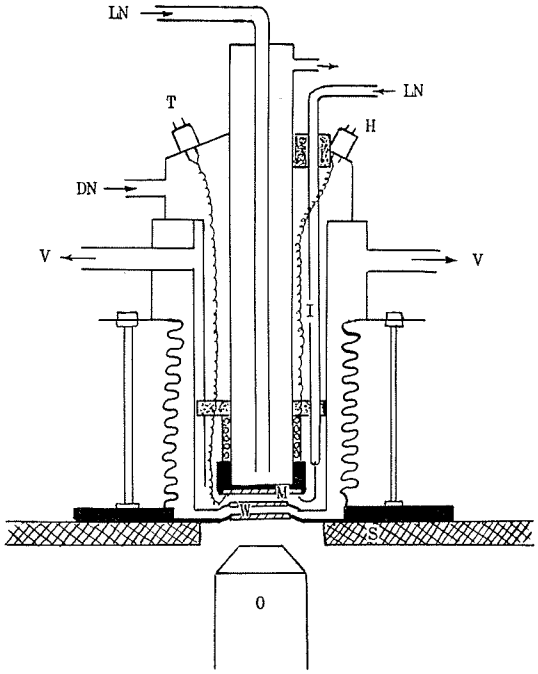
試料室をとり囲む外槽は二重層で，これを真空に保つことによって，冷却部分（試料室）を外界から遮断し，周囲の空気から水蒸気が凝結するのを防禦する。光路にあたる真空層の上下には，特殊ガラスで窓が作られている。



第1図　低温顕微鏡及び附属装置の全景



第2図
低温顕微鏡（倒立顕微鏡と試料冷却室）



第3図　試料冷却室の模式図
LN，液体窒素；DN，乾燥窒素ガス；I，植氷針；V，真空；T，熱電対；H，ヒーター；M，鏡；W，窓；S，ステージ；O，対物レンズ

試料槽には更に植氷針が備えられており，液体窒素によって冷却された針の先端を必要に応じて試料の一端に接触させ，氷を植付けることができる。植氷針は，植氷後できるだけ温度を下げることによって，コールド・トラップとして除湿にも役立つ。

3. 冷却装置

自動温度制御装置と連動で，液体窒素を噴射し，試料の冷却を行なうものである。この液体窒素噴射装置（自動補給装置）は，液酸化工機で開発されたもので，機械的ポンプによって液体窒素が送り出される。

4. 自動温度制御装置

千野製作所製電子管式調節温度計を使用した。本機は，予め設定したカムのプログラムにより，PID 調節計が適宜に制御動作を行なうものである。熱電対によって指示される試料温度は，液体窒素補給装置の連動によって，所要の条件に調節される。即ち，任意の冷却，加温の速度，任意の温度での保持が可能となるのである。

操 作 法

先ず鏡面に1滴試料をとり，直径 10 mm，厚さ 0.15 mm のカバー・グラスを載せる。試料の厚さを一定にするためには，厚さのわかっているアルミ箔の微細片にグリースをつけてのせておき，カバー・グラスをかぶせた後，よく押さえて厚さを均一にする。

この試料をつけた試料筒を冷却槽内におさめ，直ちに冷却装置を作動させる。最初，試料室中の空気を乾燥窒素ガスでなるべく置換する。これは，冷却開始前に環境雰囲気中の水蒸気をできるだけ追い出すためである。次いで所定の速度で所定の温度に達するよう冷却を始める。また必要に応じ，予め植氷針を液体窒素で冷しておき，その尖端を試料の辺縁に接触させて植氷を行なう。比較的高い温度での緩慢凍結の状況を観察するためには，このように植氷しなければ，通常はかなり低い温度まで過冷却して，凍結過程の観察ができない。

かくして，任意の冷却速度，任意の温度での凍結状態を観察することができる。これを普通カメラ又はシネ・カメラで撮影するのである。

更に試料室と真空装置との接続を行なうことによって，任意の温度での凍結乾燥過程の観察も可能となる。

以上のようにして凍結過程の観察が終った後は，今度はヒーターを入れ，温度を上げて融解過程の観察に移ることができる。

特に凍結と乾燥の全過程を同一装置内で一貫して観察できることに，本装置の利点があると思われる。

III. 考　　察

緒言に述べたように，従来多くの低温生物学者は，それぞれの実験目的に応じて，各自独特の低温顕微鏡を設計考案し使用してきた。従って，それらはいずれも特徴をもっており，利点もあれば欠点もあるという実状であった。

その意味に於て本機もまた同じような批判を免れないものと思う。今敢えてその長所と欠陥と思われるものをあげてみれば，次の通りであろう。

長　所

1) 低温室も低温箱も必要とせず，試料はすべて室温で取扱うことができる。従ってその操作が簡便容易である。

2) 環境空気中水蒸気の凝結防止法として，換気と真空の両法を併用した。

3) 室温から −180°C くらいまでの広い温度範囲に冷却できる。

4) 凍結に引続き乾燥過程の観察が可能である。

5) 自動制御装置を備えたので，任意の温度条件で操作できる。

欠　点

1) 顕微鏡は金属用反射型であるため，偏光や高倍率の場合には，光量が不足である。

2) 熱電対は試料付近の鏡面に接着されているので，必ずしも試料自身の温度を正確には指示しない。

3) 試料と対物レンズの間に真空層をおかねばならないので，対物レンズは作動距離の長いものを必要とする。

4) 100°C/min 以上の急速冷却はできない。

今後更に改良の手を加え，より理想的なものにしたいと思う。

IV. 摘　　要

液状試料の凍結融解及び凍結乾燥の全過程を観察できるような新しい型の低温顕微鏡を試作した。

本機は，倒立反射型顕微鏡，真空層で囲まれた試料室，自動制御液体窒素補給装置，及び真空装置等からできている。

−180°C くらいまで任意の速度で冷却でき，加温も自由である。また任意の温度での凍結乾燥も可能である。環境空気中水蒸気の凝結防止には換気と真空の両法が用いられた。

主 要 文 献

1) Smith, A. U., Polge, C. and Smiles, J. 1951 Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. *J. Roy. Microscop. Soc.*, ***71***, 186–195.

2) Rey, L. R. 1957 Dispositif pour l'examen microscopique aux basses températures. *Experimentia*, ***13***, 201–202.

3) Rapatz, G. and Luyet, B. 1957 Apparatus for cinematography during rapid freezing. *Biodynamica*, ***7***, 346–354.

4) MacKenzie, A. P. and Luyet, B. J. 1964 Apparatus for microscopic observations during freeze-drying (AFBR Freeze-Drying Microscope Model 2). *Biodynamica*, ***9***, 213–222.

Summary

A cryomicroscope for observation of the entire process of freeze-thawing or freeze-drying of liquid specimens was newly designed. The apparatus consists of the following four major parts: (1) an inverted reflecting type microscope, (2) a specimen chamber insulated with a vacuum space, (3) a liquid nitrogen supplier operated with an automatic regulator controlling the specimen temperature and (4) a vacuum pumping system.

The specimen can be frozen to any desired temperatures ranging from 0°C to approximately −180°C at various rates of cooling and thawed at various rates of warming. Freeze-drying can also be accomplished at any given temperatures.

Condensation of air moisture on the cooled specimen is prevented by preliminary cleaning with dry nitrogen gas and by insulation of the vacuum chamber.