



Title	低温走査電顕における一新技法 : フリーズ・エッチング・SEM法
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 33, 45-52
Issue Date	1976-03-18
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17821
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p45-52.pdf



低温走査電子顕微鏡における一新技法 フリーズ・エッチング・SEM法*

根井外喜男・浅田 実

(低温科学研究所)

(昭和50年8月受理)

I. 緒 言

生物を対象として電子顕微鏡で観察するにあい、試料の乾燥は避けることのできない宿命であった。したがって脱水による試料の変形をいかにして防ぐかということが問題であったが、最近特にこの点が注目され、生物試料を生のまま、つまり含水状態で観察しようとする試みがしきりに行われるようになってきた¹⁾。

そのアプローチのしかたは、大きく二つに分けられる。一つは、本論文においても述べるところの凍結法であり、他は環境セル法²⁾である。後者は、試料をそのまま特殊な環境セル内に納め、大気圧あるいはそれに近い状態で観察しようとするものである。したがって他の方法に比較して理想に近いが、まだ問題点が多く残されている。

凍結法は、そのねらいや具体的な手順の違いから、さらにいくつかに分けられる。凍結乾燥法 Freeze-drying や凍結置換法 Freeze-substitution は、かなり古くからこの分野で利用されているが、結局は試料から脱水するものであり、乾燥の最終的な段階で、試料成分と結合している水と水まで除かれると、試料の変形は避けられないものと思われる。フリーズ・エッチング・レプリカ法は、凍結試料のレプリカを作るのであるから、乾燥の過程はなく試料の含水状態をそのまま表現するものであるということが出来る。しかし、これはレプリカをみることであって、試料そのものを観察するのではないので、たとえば試料中の化学的物質の検出などを行うことはできない。細胞構造の中、膜の剝離面がよく現われるなど、すぐれた面が多いので近時各方面で盛んに利用されるようになったが、像の解釈に難しい点もあるので、切片標本などとよく対比することが必要である。

一方、著者がかねて凍結試料の電子顕微鏡による直接観察を意図し、種々の技法の開発を試みてきた。そのひとつとして特殊噴霧銃による試料作製を行い、透過電顕による凍結細胞の直接観察に成功したが、電子線の透過性、試料の厚さ、細胞内微細構造のコントラストなど、種々の問題点があって、十分な成果をあげるまでに至らなかった³⁾。

これらの点に鑑み、透過電顕からさらに走査電顕の利用を考え、種々検討の結果、ようやく所期の目的を達することができるようになった⁴⁾。すなわち、走査電顕の試料室および予備

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1750号

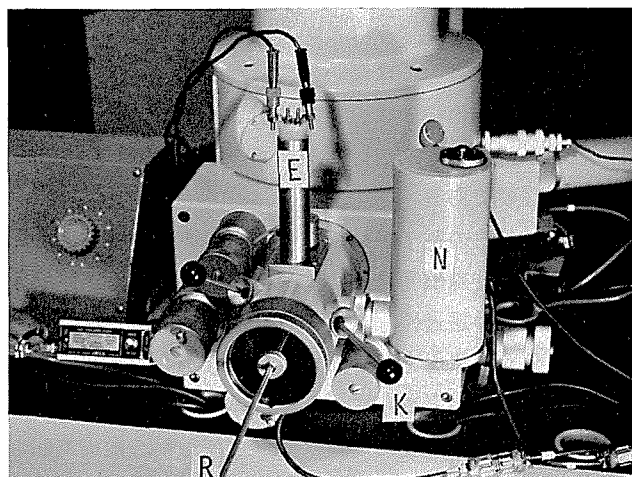
排気室に備えた試料冷却台を予め冷しておき、外で凍結した試料を持ち込んで、試料表面を観察するもの、あるいは凍結破断を行ってその破断面を観察するものである。この方法を用いて各種の試料を観察した結果、試料の性状によって観察の容易なものや難しいもののあることを知った。構造体が堅くてしかも比較的水分の少ないものでは、破断面そのままの観察で、かなりよく微細構造が現れているが、遊離細胞の水浮遊液のように、試料中の大部分が水から成るものでは、破断しただけでは、細胞の表面または内部の微細構造などの出にくいばあいが多い、この点が、透過電顕によるフリーズ・フラクチュア・レプリカ標本の観察とは異なるところで、走査電顕ではかなりの凹凸がないと、平面では二次電子による情報量が少ないので、微細構造はわかりにくい。そこで試料表面をエッチングすることによって、構造の細部をよく出すことをねらい、さらに、水は良導電体であるとはいえ、エッチングによって試料表面に乾燥層ができれば、チャージ・アップしやすくなるので、それを避けるために金による蒸着を行うことにした。この凍結試料への蒸着は、解像力を向上させる目的で、すでに Echlin らも使用している方法⁵⁾であるが、とくに立体構造の観察を強調するためにディープ・エッチングを行うときは、乾燥層が厚くなるのでいっそう蒸着が必要となる。

とにかく、このようにして、凍結試料を破断し、エッチングと蒸着を行うことによって、試料の微細構造がよく現われ、一方、チャージアップが押えられ分解能も向上した結果、各種の材料に容易に応用されるようになってきた⁶⁾。なお本装置全体を総称して Cryo-SEM と呼ぶ。

II. 材料と方法

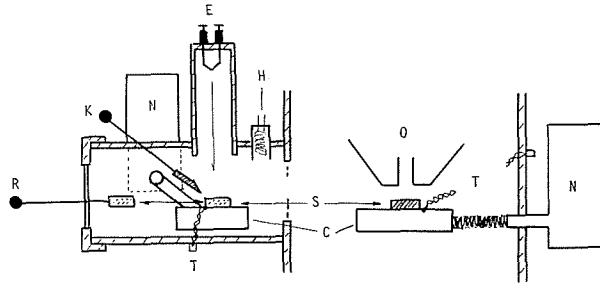
材料： 微生物細胞として酵母，動物性材料としてヒト赤血球，ネズミ腎，植物性材料として木材をとりあげた。

装置： 第1～2図に示すように、走査電顕本体の試料室と予備排気室に、それぞれ試料冷却台が設けられている外、予備排気室にはさらに破断のための冷却メスまたはピン、エッチング用のヒーター、蒸着用装置などが備えつけられている。



第1図 走査電子顕微鏡の凍結実験用付属装置の前面写真

試料台と試料のとり方：氷晶形成をさけるため、試料はできるだけ急速凍結を行う必要がある。特に熱伝導をよくするため、既製の試料台の外に特別に銅板（約 $10 \times 5 \times 0.3$ mm）を用い、表面に格子状の多数の傷をつけておき（破断の際に試料が銅板から剥げるのを防ぐ）、その上に液状試料を1滴（約0.01 ml）とる。場合によっては液滴の上にさらに小さな銅板をのせて薄層試料を作る（この



第2図 走査電子顕微鏡の凍結実験用付属装置の内部構造模式図

R, 試料移動棒; K, ナイフ; N, 液体窒素; E, 蒸着装置; H, ヒーター; T, 熱電対; S, 試料; C, 冷却台; O, 対物レンズ

いわゆるサンドウィッチ法については、文献⁷⁾に譲る。動物性や植物性組織は、これを1~2 mm角に細断し、別に作った銅板試料台の孔にさしこむ。

凍結： 以上のように準備した試料を、予め液体窒素で -150°C くらいに冷したフロン22の中に急速に投入する。試料は瞬間にして凍結するが、その凍結速度は0.1 mlの液滴でおよそ $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、0.003 mlのサンドウィッチ試料でおよそ $10^{50}\text{C}/\text{min}$ くらいである。組織については凍結速度を測ってないが、液滴の場合よりも遅いものと思われる。なお特別に、冷却速度を変える実験を行うばあいは、液体窒素に直接浸したり、あるいは液体窒素上の空気層で冷却したり、いろいろと凍らせ方を調節する。

破断・エッチング・蒸着： 走査電顕の本体試料室および予備排気室の冷却台は予め液体窒素で -150°C くらいまで冷却しておく。上記のようにして凍結した試料は、手早く予備排気室の冷却台に移す。この際、空気中の水蒸気が冷却した試料の表面に凝結するのを防ぐため、金属の覆いをかぶせ、予備排気室に運んで排気した後、これを外す。

試料は冷却台の上において冷却したまま、ナイフまたはピンを用いて、その一部を破断あるいは破碎する。サンドウィッチ法ならば、カバーの金属片を剥がす。これらの操作で新しい試料断面が現われるので、いったん顕微鏡本体の試料室に持ちこんで無蒸着のまま観察してもよいし、あるいはそのまま次の操作に移ってもよい。それには、試料冷却台から離して試料温度のやや上るのを待つ、あるいはエッチング用小ヒーターに近づけて氷の昇華を促進させる。やがて試料ホルダーに附着した霜が昇華するので、それをめやすとして経験的にエッチングの程度の見当をつける。温度の調節あるいは測定など、今後改善を必要とする点はまだ多く残されている。エッチングに引続いて金による蒸着を行う。この時、試料台を手動でいろいろの角度に動かし、なるべく薄くしかも一様に蒸着されるように心がける。

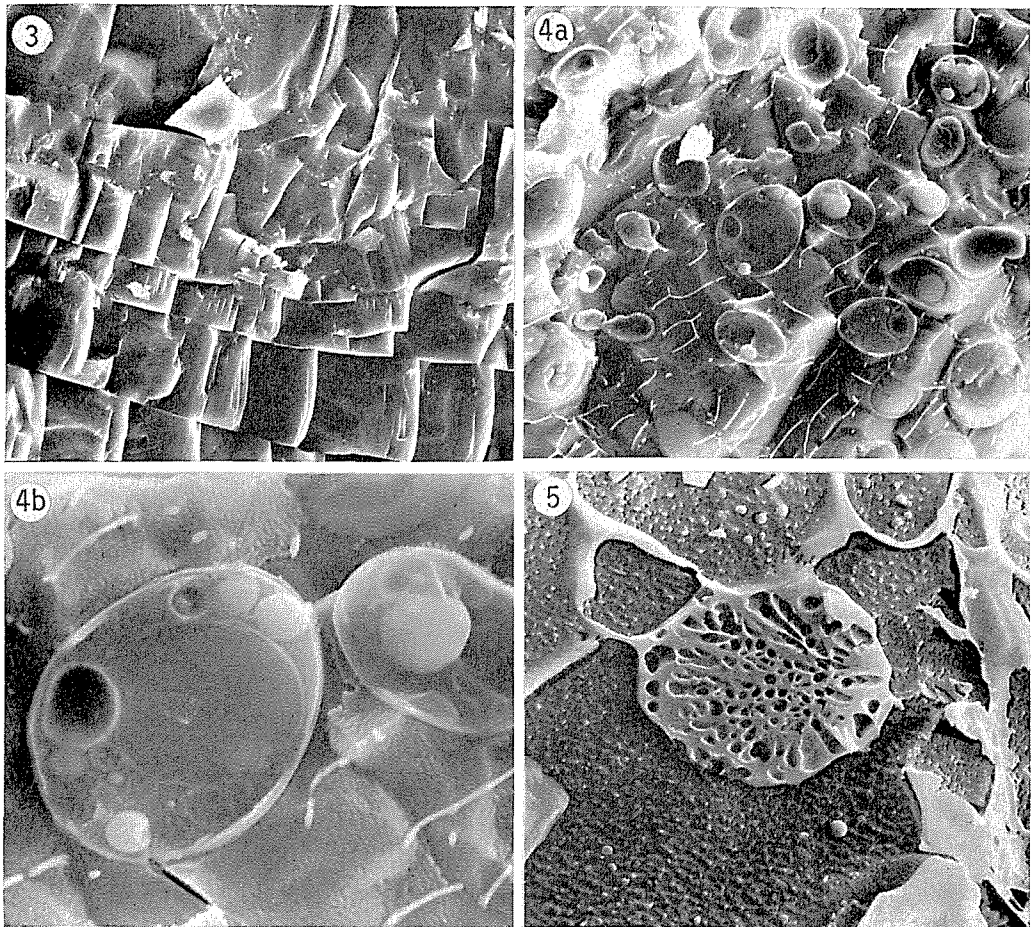
蒸着が終ったところで、本体試料室の冷却台に移し、凍結状態のまま観察を続けるのである。

III. 結 果

細胞浮遊液

1) 酵母：酵母細胞を蒸留水や食塩水に浮遊させたものは、凍結断面をそのまま見たのでは、氷晶の断面はよく観察されるが、その中に含まれる細胞の輪郭や内部微細構造はわかりにくい(第3図)。エッチングや蒸着をすると、細胞の内部や膜の剝離面の微細構造もよく現われてくる(第4図)。

2) 赤血球：ヒト赤血球の生理食塩水浮遊液を種々の冷却速度で凍結させ、細胞の凍結像を観察した。凍結の条件により細胞内氷晶のでき方、大きさなどの異なることがよくみとめられた(第5図)。



第3図 酵母の蒸留水浮遊液，凍結破断のみ 670×

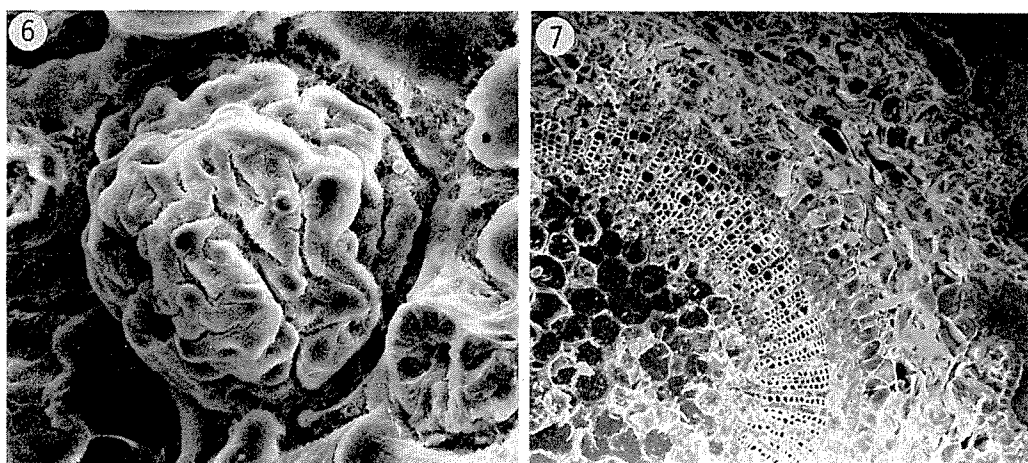
第4図 酵母の生理食塩水浮遊液，サンドウィッチ法，剝離後エッチング，金蒸着 a: 2,000×, b: 6,700×

第5図 ヒト赤血球の生理食塩水浮遊液，サンドウィッチ法，エッチング，蒸着，細胞内氷晶形成に注目 6,700×

組 織

1) 動物組織： ネズミ腎臓の組織片については、糸球体の立体像がよく観察された。本材料は特に徳永氏より分与をうけたもので、同氏の方法⁹⁾によって生体還流後グルタル固定の上 50% アルコールに置換されたものである (第 6 図)。

2) 植物組織： 従来、木材や豆などの堅い構造物は、通常のフリーズ・エッチング・レプリカ法では、ブリーチなどで容易に溶解せず、試料作製は困難であるとされていた。また木材では、その部位の違いにより、水分量その他組織の性状がかなり異なるため、試料断面の全体を同一視野内に含むように試料を作製するのは難しい。このような材料であっても Cryo-SEM によって容易に凍結破断面の観察が可能となった (第 7 図)。

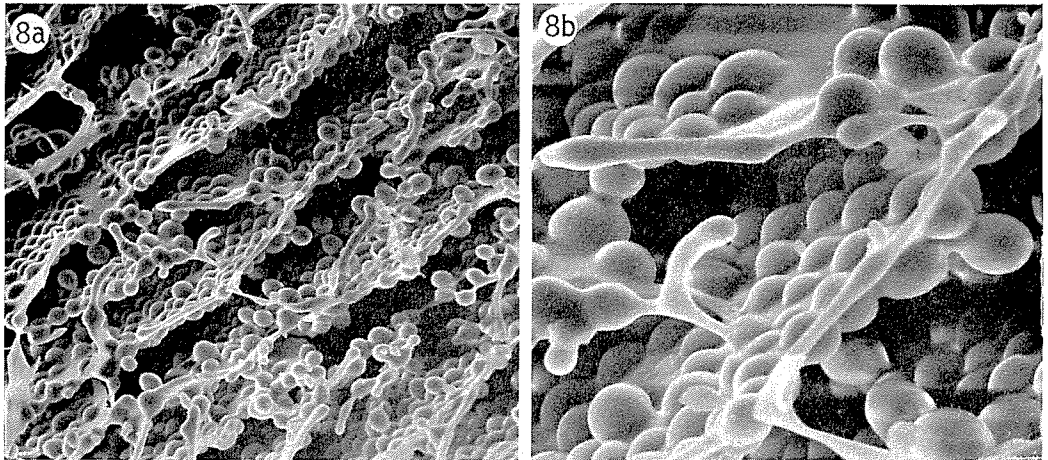


第 6 図 ネズミ腎糸球体，グルタル固定，50% アルコール置換，凍結破断，エッチング・蒸着 400×

第 7 図 ツツジ小枝横断面，凍結破断，エッチング，蒸着 130×

微生物の凍結乾燥過程

微生物は、株の保存、ワクチンの製造などの目的で凍結乾燥されることが多い。その凍結乾燥の機構は、種々の角度から検討されているが、形態学的な立場から、特に電子顕微鏡のレベルで細胞と媒液との相互関係を追及したもののはほとんどない。このような立体的構造の観察には、本法は極めて有利であり、エッチングの程度により種々の乾燥過程が観察されるわけである。第 8 図はその 1 例を示すもので、凍結条件による試料の凍結像の差異なども容易に知ることができる。図は、酵母細胞を 50% 血清に浮遊させ、緩慢凍結したもので、試料全体としては層状構造 (凍結像) を示し、個々の細胞は、それぞれさらに薄い膜 (乾燥血清) に包まれているように見える。

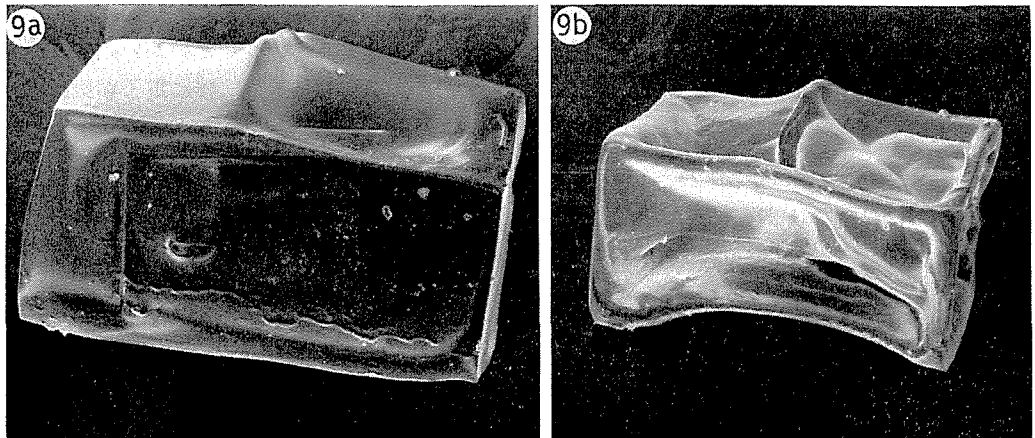


第8図 酵母の50%血清浮遊液の凍結乾燥過程

0.01 ml 液滴を約 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で凍結し、ディープ・エッチング・蒸着したもの、試料は全体として層状の凍結像を示す a: 670 \times , b: 2,000 \times

各種試料の凍結乾燥による収縮

緒言においても述べたように、凍結乾燥であっても、最終的には脱水による試料の収縮は免れないものと思われる。この点を確認するために、動物組織としてウサギの肝、腎、植物性組織としてダイコンとニンジン根の組織、それに構造をもたない試料として30%ゼラチン・ゲルを用い、それぞれほぼ1~2 mm角に切り出したものを試料台にのせ、冷却フロンで急速凍結した。まず対照として、この凍結状態のものを撮影しておく。次に予備排気室の冷却台にのせたまま、液体窒素の補給をとめると、 -120 乃至 -110°C の試料台は次第に温度が上昇し、3時間後には -60°C くらいに達するが、この頃にはほぼ乾燥を完了している。ここで金の蒸着を行った後もう一度撮影し、凍結時のものとの比較をした。その結果、動物性組織の



第9図 30%ゼラチン・ゲルの凍結乾燥による変化 34 \times

a: 凍結状態, 乾燥前, b: 凍結乾燥液, 収縮変形顕著

肝や腎ではほとんど収縮はみとめられなかったが、植物性組織のダイコンとニンジンでは、同じような構造を示すにかかわらず、ダイコンでは収縮はみとめられないのに、ニンジンで変形収縮が著しかった。また溶液のゼラチン・ゲルでも同様に変形が顕著であった(第9図)。なおこのばあいの乾燥は 10^{-5} Torrの真空中で行われ、試料は1~2 mm角のブロックであるから、 -90°C から -70°C くらいまでの温度上昇の過程で、30分乃至1時間以内で試料中の氷の昇華が完了するものと推定される。

IV. 考 察

既に述べたように、本法は新たに開発された新技法で、その応用範囲は今後急激に拡大されるものと思われる。本論文ではその一部を報告するにすぎない。

いまその特徴を列記すれば

1) 走査電頭を用いるのであるから、試料の形状や厚さの如何を問わないわけで、特に立体構造の観察には極めて好都合である。しかも本法によれば、試料本来の表面構造のみならず凍結破断による内部構造の観察も可能になるところに有利さがある。

2) 特に本法でとりあげたエッチングを行うことによる効果は、写真によってもわかるように、破断面の像をより鮮明にするものである。ただエッチングも凍結乾燥の一種であり、多少なりと試料よりの脱水が行われるのであるから、真の意味の含水試料の観察ということにならないかもしれない。しかし、最終過程が常温まで昇温されるような通常の凍結乾燥に比較すれば、エッチングは -90°C 付近で行われ、試料のごく表層部の氷だけが昇華するにすぎず、試料の大部分は再び -150°C まで冷却されその温度に維持されたまま観察されるのであるからエッチングされた部分であっても、その残水量はかなり多いものと思われる。したがって、通常の凍結乾燥法による試料に比較すれば、はるかに含水試料に近いものと考えられる。この点に関しては、また別の機会に論じたい。

さて、新技法の開発とはいっても、現時点では、操作ならびに装置のうえで、なお多くの不備な点を残している。

1) 凍結による試料中の氷晶形成を防御するためには、これまでにいろいろの方法が工夫されている。そのうち急速凍結法は本法でも当然用いられるが、凍害防止剤の添加には問題がある。フリーズ・エッチング・レプリカ法に比較して、本法ではより深いエッチングを行うのでグリセリンやDMSOが残留して微細構造を不鮮明にするという欠点をもたらす。グリセリンよりはDMSOのほうが幾分よいとされているが⁸⁾、これら添加剤については、今後さらに検討を重ねる必要がある。

2) 予備排気室の試料冷却台は、温度制御が完備していないので、さらに改良を加えねばならない。エッチングや蒸着を行うための条件にしても、同様で、装置の改善が望まれる。

本論文においては、主して凍結技法の技術的な面について述べた。したがって、各種試料の観察の結果についての考察は省略した。それぞれの試料に関しては、別途詳細な論文としてまとめる予定である。

今回 Cryo-SEM でとりあげたフリーズ・エッチング法は、エッチングまでの過程は、従来

の透過電顕用のフリーズ・エッチング・レプリカ法と同一であるが、それから後の過程が全く異なる。すなわち、レプリカ法では、破断面（あるいはエッチング面）のレプリカを作って、そのレプリカを透過電顕で観察するのに対し、本法では、エッチング後、導電性をよくするため金の蒸着をするだけで、あくまでも凍結試料そのものを直接走査電顕で観察するところに特色がある。このフリーズ・レプリカ法は通常フリーズ・エッチング法と呼ばれているが、本法のように Cryo-SEM によるフリーズ・エッチング法が新たに誕生した以上、両者の混同を避ける意味で、従来の方はフリーズ・エッチング・レプリカ法、またはフリーズ・レプリカ法、本法によるものは、フリーズ・エッチング SEM 法と命名して、はっきり区別することを提唱したい。

V. 要 約

Cryo-SEM 装置を用いて、新たにフリーズ・エッチング・蒸着を行う方法を考案したので、その方法の概略と応用の幾つかの例を報告した。

文 献

- 1) Nei, T. 1976 Review of the freezing techniques and their theories. *In Recent Progress in Electron Microscopy of Cells.* (E. Yamada *et al.* eds.) Igaku-Shoin, Tokyo. 213-243.
- 2) 深見 章・村上 悟 1974 水を含んだ試料の観察法とその応用. 電子顕微鏡, **9**, 4-19.
- 3) Nei, T. 1962 Electron microscopic study of microorganisms subjected to freezing and drying; Cinematographic observations of yeast and coli cells. *Exptl. Cell Res.*, **28**, 560-575.
- 4) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Nagasawa, Y. 1971 Direct observation of frozen specimens with a scanning electron microscope. *J. Electron Microscopy*, **20**, 202-203.
- 5) Echlin, P. and Moreton, R. B. 1973 The preparation, coating and examination of frozen biological materials in the SEM. *In Scanning Electron Microscopy/1973*, IIT Res. Inst., Chicago, 325-332.
- 6) Nei, T., Yotsumoto, H., Hasegawa, Y. and Hasegawa, M. 1974 Freeze-etching in scanning electron microscopy. *J. Electron Microscopy*. **23**, 137-138.
- 7) Nei, T. 1974 An attempt at cryocleavage in the freeze-etching technique. *J. Electron Microscopy*, **22**, 371-373.
- 8) 徳永純一・幡場良明・長谷川与一 1975 Cryo-SEM による二重凍結断面の観察. 細胞, **7**, 87-98.

Summary

As reported in previous papers, wet biological specimens such as cells and tissues had been observed in a frozen state without metal coating in the scanning electron microscope.

In order to gain higher resolution, we attempted in the present study to apply the freeze-etching technique to cryo-SEM and obtained satisfactory results. Yeast cells, human erythrocytes, plant and animal tissues were employed as experimental materials. Fine structures of fractured faces of frozen specimens were revealed more clearly with etching and metal coating.