HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	電子顕微鏡と試料作製法の概要
Author(s)	伊藤, 利章
Description	技術部職員研修の研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告, 2, 16-24
Issue Date	1995-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35288
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_p16-24.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

電子顕微鏡と試料作製法の概要

農学部共同利用電子顕微鏡センター　伊藤　利章（作物・分析系　共同利用班）

1、はじめに

電子顕微鏡は６０年ほど前にドイツの科学者ルスカによって発明され、その後めざましい発展を遂げた。それは、光学顕微鏡をはるかに越えた分解能（解像度）で、原子までもが観察可能となった。その電子顕微鏡の概要を簡単に紹介する。

また、観察試料は、真空中に曝され、電子線が常に衝突する。したがって、一般的に試料は「乾燥していること、電子線によるダメージをうけないこと、電子線が透過すること（透過型電子顕微鏡で観察する場合）」などの制約を受ける。生物の組織・細胞は水分を多量に含んでいるのでそのままの状態で観察することはとうてい不可能である。したがって、その条件を充たすため処理する行程が試料作製法であり、形態を自然のままの状態で保存することが不可欠である。現在では組織形態構造を観察するだけでなく、細胞内に分布する物質を特異的に可視化し、その局在性を解明しようとする組織化学的手法も導入されている。ここでは形態構造を観察する上で最も基礎的な超薄切片法を中心に、その概要を紹介する。

2、電子顕微鏡の構造

１）電子が物質にぶつかると？

最初に電子が物質に衝突したときにどんな情報が得られるかというと図１の通りである。これらの情報が元になり電顕像が形成される。電顕像とは一般的に弾性散乱電子、非弾性散乱電子及び透過電子から形成される明視野像（透過型電顕の場合）、二次電子から形成される二次電子像（走査型電顕の場合）である。

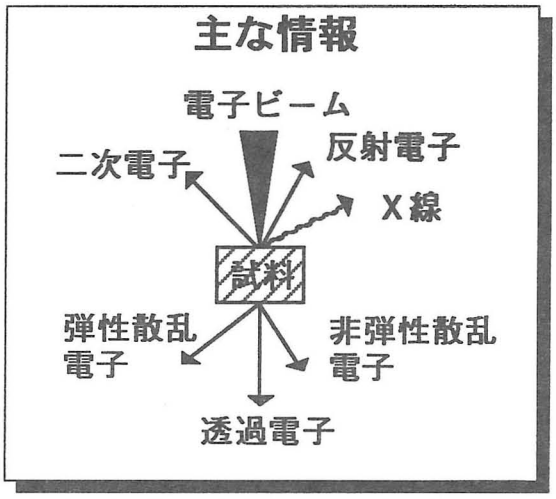


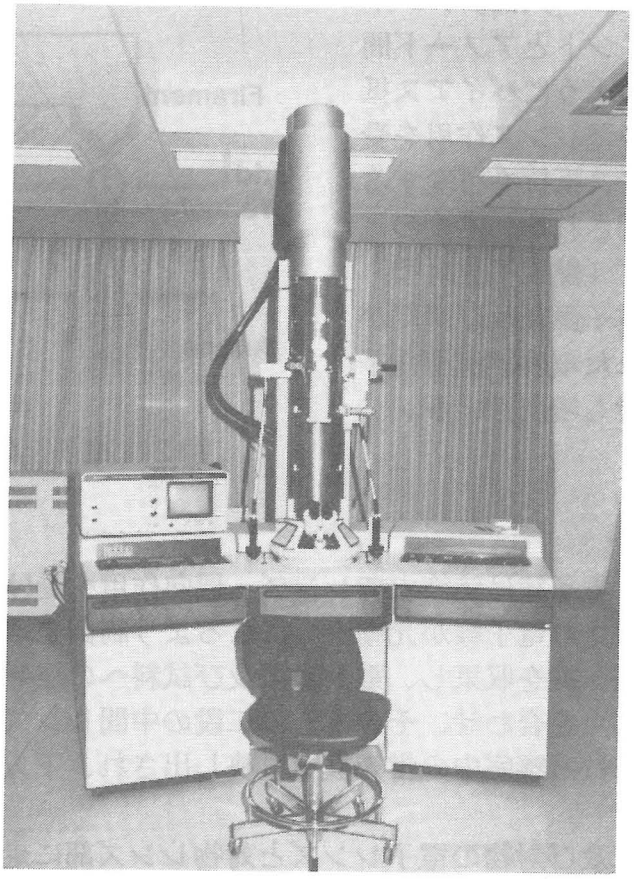
図１

２）外観

電子顕微鏡には透過型（ＴＥＭ）と走査型（ＳＥＭ）のタイプがある（写真１）。特徴をまとめると以下の通りである。

透過型　鏡筒が長く操作卓と一体である。
主に明視野像を表示する。
電子線が透過できるぐらい試料を薄くする必要がある。

走査型　鏡筒が短く操作卓と分かれていることが多い。
主に二次電子像を表示する。
試料の表面構造を立体的に観察できる。



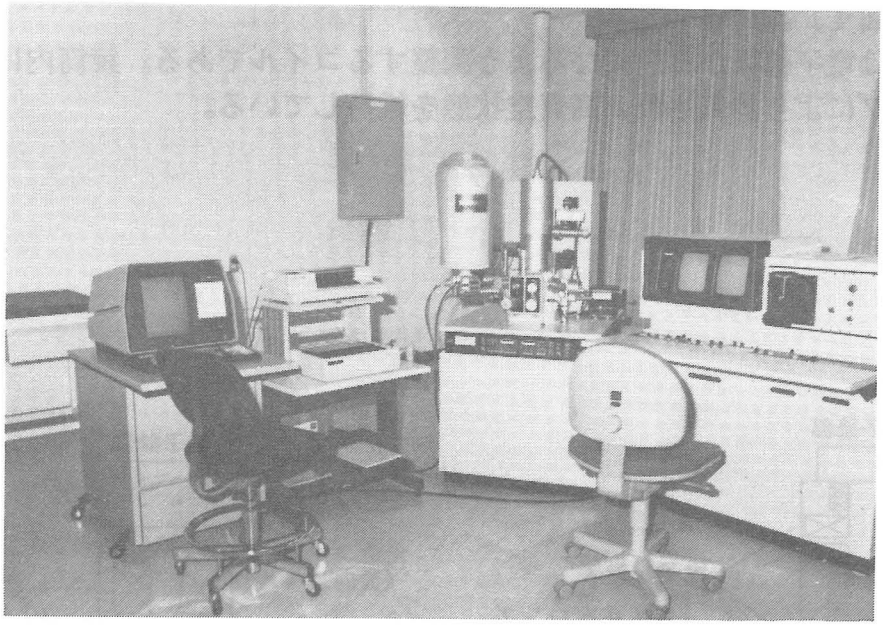


写真１　上：透過型(TEM)　下：走査型(SEM)

３）電子銃の構造

電子銃とは、電子線の発生源となるところで鏡筒の先端部に位置し、構造は図２の通りである。電子線発生のメカニズムは、真空中でフィラメントに電流を流すとそこから熱電子が放出される。フィラメントとアノード間に高電圧（加速電圧）を印加す

ると熱電子が加速され、一気にアノードを通過するがフィラメントとアノード間にグリッドを設け図のようにバイアス抵抗をおくと電子線は静電レンズ作用を受け収束される。バイアス抵抗を可変することで電子線量は制御される。多くの電子顕微鏡はこのタイプ（熱電子放射型）であるが、最近では電子源径及び輝度が従来のタイプより優れた電解放射型電子銃を備えた電子顕微鏡も増えている。

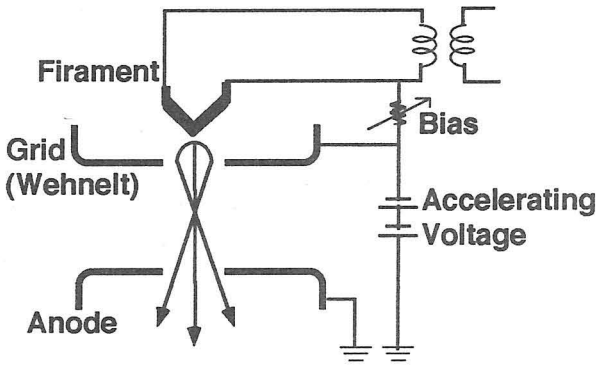


図２　電子銃の構造

４）鏡筒の構造

電子銃から発生した電子線は鏡筒内でレンズ・偏向作用を受ける。透過型電顕では、偏向コイルは二組配置され電子線が光軸中心になるよう制御する。電子レンズは、第一、二集束レンズで電子線を収束し、電子線径及び試料への照射電流を可変する。そして、対物レンズで焦点を合わせ、その下方の二段の中間レンズと投影レンズによって像拡大する。最終像は観察室中の蛍光板上に映し出され、下方のカメラ室で撮影される（図３）。

走査型電顕は、収束及び対物の電子レンズと対物レンズ部に走査コイルが配置されている。走査コイルによって電子線は、試料表面上をテレビのラスタのように走査制御している（図４）。

非点補正子は電子線径が真円になるよう調整するコイルである。鏡筒内は両タイプとも真空ポンプにより排気され、高真空状態を維持している。

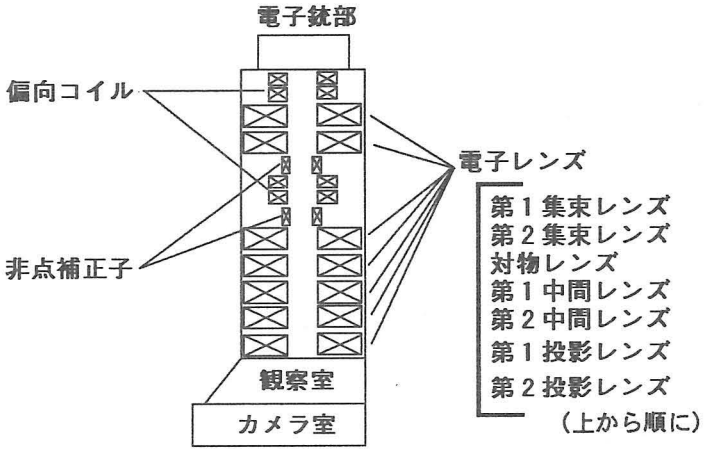


図３　透過型電顕鏡筒断面図

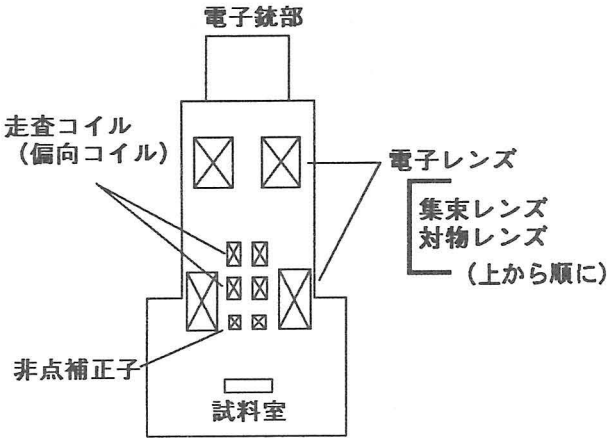


図４　走査型電顕鏡筒断面図

5）電子顕微鏡の像形成の原理

透過電顕の像形成は、試料を透過する電子（透過電子、弾性散乱電子及び非弾性散乱電子）の相互作用による。したがって、試料に対して電子線の透過する割合がが高ければ明るく、逆に散乱する割合が高ければ暗く蛍光板上に映る。

走査電顕の場合は、最初に走査電源から信号を受け取った走査コイルは、試料表面上に電子線を走査させ、同期信号によって観察用CRTも走査される。このとき、試料表面上から発生する二次電子は、二次電子検出器によって検出され電気信号に変換される。そして、増幅器を通り映像信号となって観察用CRTに映し出される（図５）。

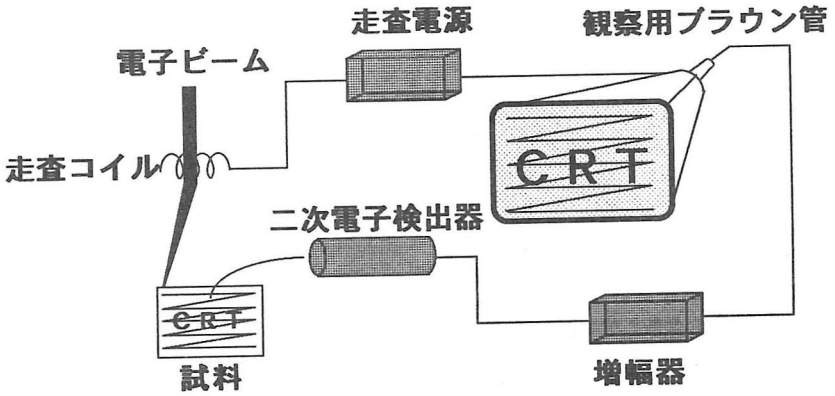


図５　走査像ができるまで

3、試料作製法の概要

1）超薄切片法（固定から染色まで）

これは、光顕のパラフィン切片法と同様に固定、脱水、包埋した試料をミクロトームで薄切し、その切片を観察する。内部構造を二次元的に観察することができる。

A、試料作製

試料を作製するために最初に行うことは固定である。固定とは、組織・細胞の形態をなるべく生きていた時の状態に保つことであるが、そのひとつに化学的に固定する方法がある。用いる固定液にはそれぞれ特徴があり、目的によって選択しなければならない。常用されるのは、グルタルアルデヒド、オスミウム酸である。また、パラホルムアルデヒドもよく利用され、免疫組織化学を行う場合は常用される。グルタルアルデヒドはアルデヒド基を二つ持ち、これがタンパク質分子間を架橋し固定する。オスミウム酸は脂質をよく固定し、電子密度が高く像のコントラストを増強させる。一般的にグルタルアルデヒドで前固定後オスミウム酸で後固定を行う。

固定された組織は脱水液（エタノールまたはアセトン）の濃度を徐々に上げ完全に脱水する。脱水した組織は樹脂に包埋するが、包埋剤に充分つけ組織の隅々まで浸透させる。用いる樹脂はエポキシ系、アクリル系等いろいろあるがエポキシ系樹脂が組織の保存と薄切時の切れ味の良さからも優れている。包埋後ゼラチンカプセル等の鋳型に入れ、熱重合させる。

出来上がった重合ブロックはウルトラミクロトームで薄切する。ガラス又はダイヤモンドナイフを用い、厚さ６０～１００㎚で薄切する（図６）。

薄切した切片はグリッドへ載せる。グリッドとは、電顕観察するための銅製の載せ台で、直径３㎜の薄い円盤の中が格子状になり孔が空いている。（図７）。

最後に電子染色を施す。電子染色とは電子密度の高い重金属を組織・細胞に結合させることで、酢酸ウラン及びクエン酸鉛が普通用いられる。前者は主に核酸、リン脂質、植物細胞壁等を良く染める。後者は多くの細胞内成分を染める。また、酢酸ウラン染色の強調としての作用もある。染色法の実際は図８の通りで小滴の染色液にグリッドを浮かせ一定時間放置し、水洗後乾燥させる。通常は酢酸ウラン染色後にクエン酸鉛を染色する。

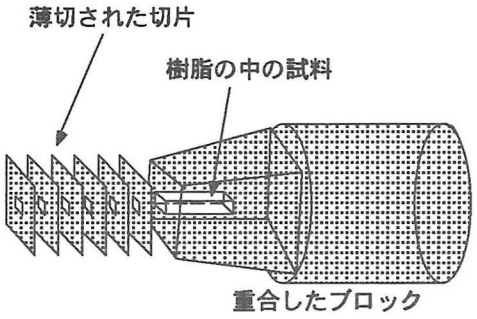


図６

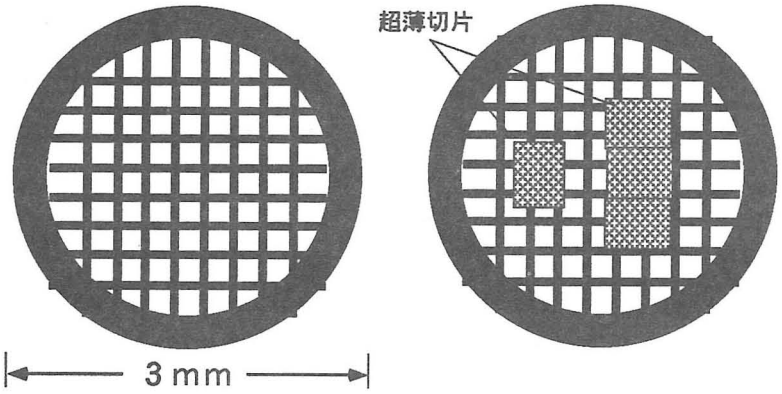


図７　グリッドへの載物

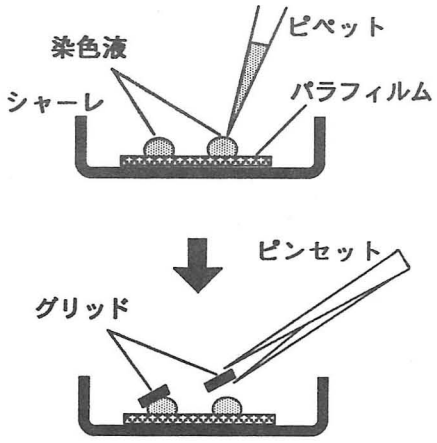


図８　電子染色法

B、観察例

写真２は、ナシ茎頂部を観察した。Ａは茎頂部の中央縦断面の光顕写真で、中心付近が頂端分裂組織部で細胞分裂が活発に行われている。その左右からは葉原基を構成する細胞が重なり合って縦に延びている。Ｂは頂端分裂組織部を電顕で観察した。これだけ拡大すると細胞ひとつひとつがはっきり区別できる。Ｃはその中のひとつを拡大したものである。細胞内には、核及び細胞質が存在し、細胞質内には細胞内小器官がところ狭しと観察される。Ｄ、Ｅ、Ｆは細胞内小器官の拡大で順にミトコンドリア、ゴルジ体、色素体である。ミトコンドリアは二重膜に囲まれ内部にクリステと呼ばれる膜構造をもつ。ゴルジ体は多くの小胞がまとまり組合わさったものである。写真では扁平な小胞がたくさん重なり合っているように見える。この色素体は二重膜に囲まれた内部に円盤状の小胞がたくさん重なり合っていることから葉緑体である。

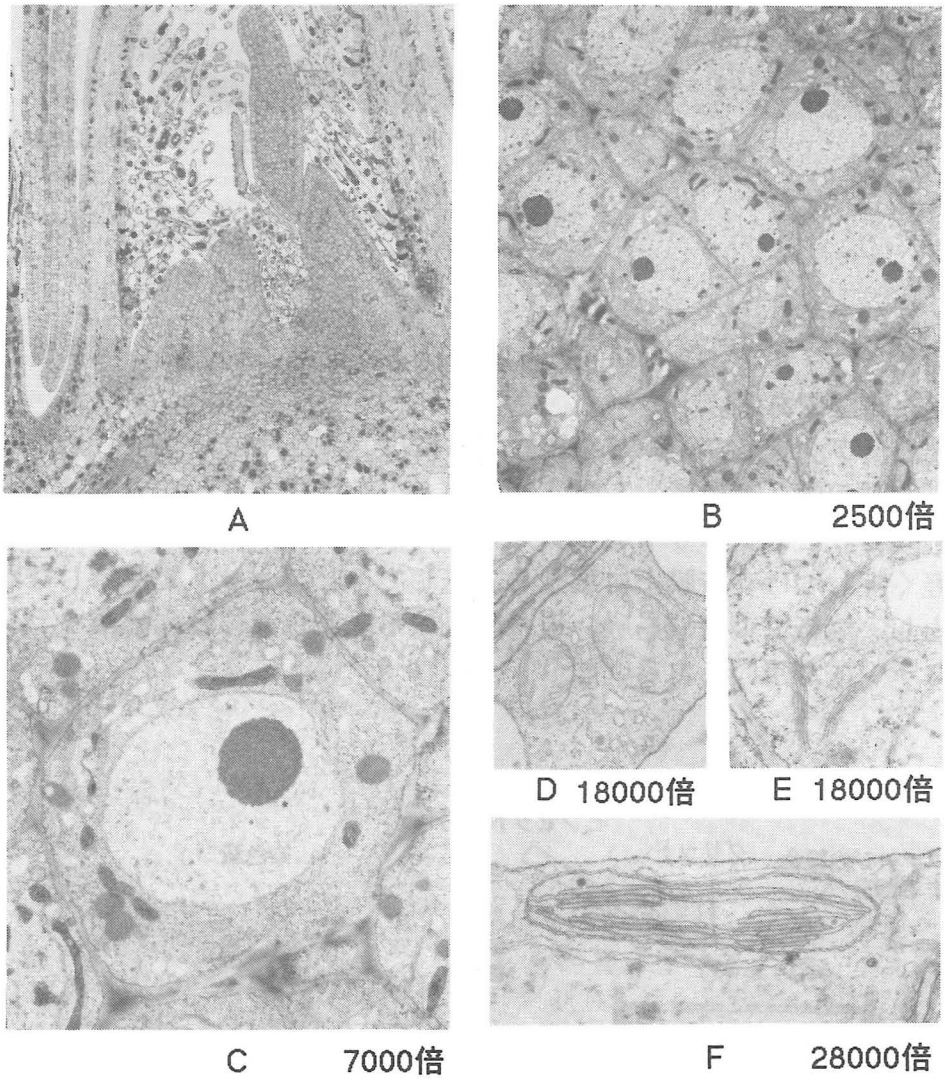


写真２

写真３はバレイショのやくを観察した。Ａは横断面の光顕写真で、蝶々が羽を開いたような形をしており、中央部に維管束が存在し、周辺にはＵ字型の空間が二組対称に配置している。その部分を拡大したのがＢである。その空間には、花粉母細胞から形成された花粉が存在し、その内部には核及び細胞内小器官が観察される。

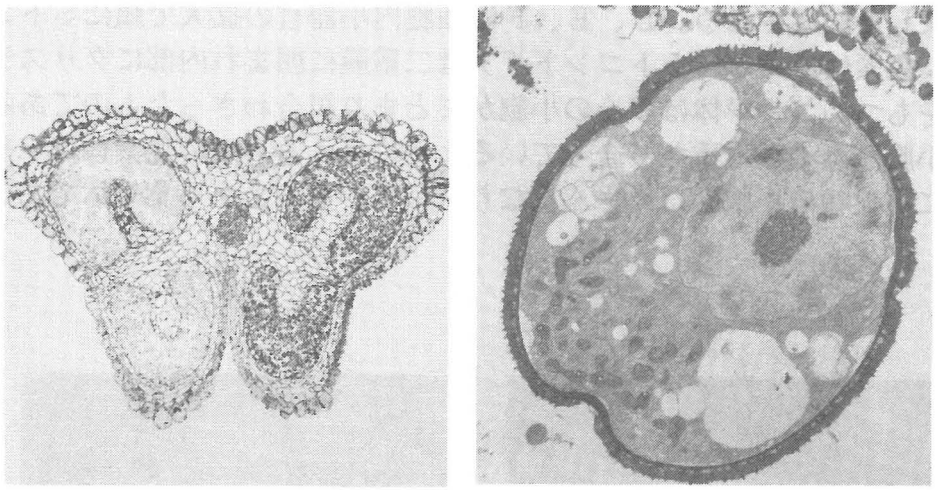


写真３

２）ネガティブステイン法

これは、細菌、ウィルス、ファージ、生体高分子浮遊液、構造タンパク質等を観察するのに適した方法である。

Ａ、試料作製法（アクチノファージを観察するには）

プラスチック製の膜（支持膜）を張ったグリッドを用意する。この膜は非常に薄く電子線を透過する。このグリッドをピンセットでつまみ寒天培養したファージの集合する部分に軽く押しつけ支持膜上に載せる。そして、ピンセットで保持しながら染色液を一滴落とし、濾紙で染色液を吸い取り乾燥する。染色液には、酢酸ウランまたはリンタングステン酸が用いられる（図９）。

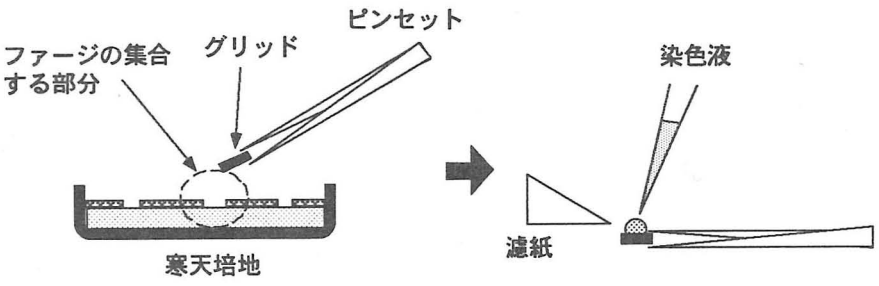


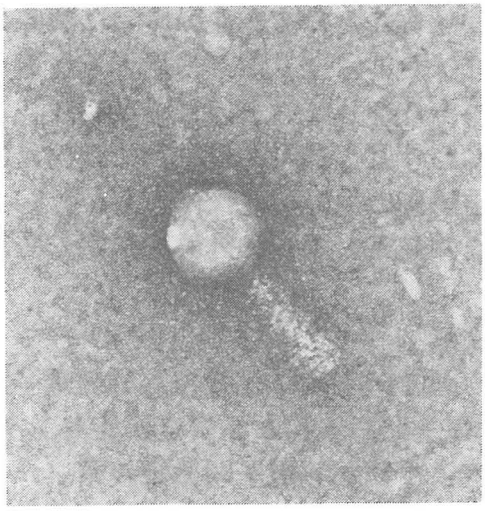
図９　ネガティブステイン法

染色の原理は、濾紙で素早く染色液を吸い取り乾燥させると、構造物（試料）の隙間と周辺部だけに染色液が残され、その部分が試料よりも電子密度が高くなる。した

がって、蛍光板上では試料の部分は明るく、染色液の残った部分は暗く映る。

B、観察例

写真４はアクティノファージである。バクテリオファージと構造は似ている。頭部（円形の部分）にはＤＮＡが存在すると思われる。アクティノファージのなかにはそうか病菌（放線菌の一種）を分解するものがある。



130000倍

写真４

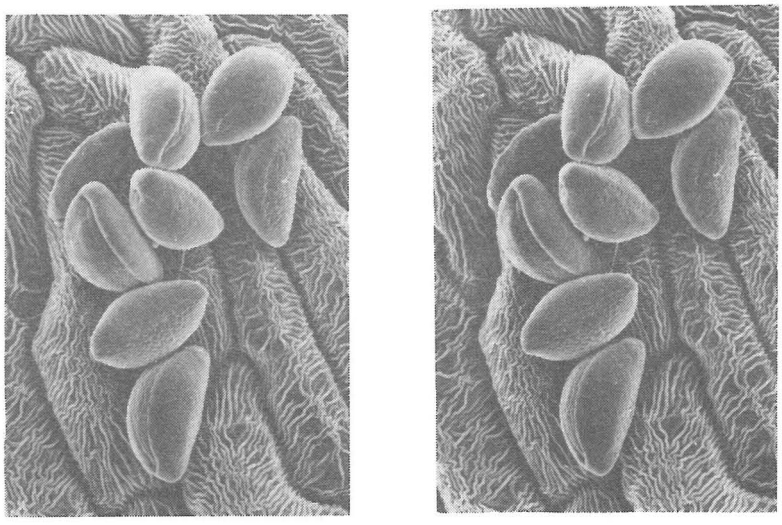
３）走査電顕による観察法

A、試料作製法

化学固定後、脱水し置換する。置換液には、その後臨界点乾燥する場合は酢酸イソアミル溶液に、ｔ－ブタノール凍結乾燥する場合はｔ－ブタノール溶液に充分つける。そして、臨界点乾燥またはｔ－ブタノール凍結乾燥を行い、専用の試料台に載せる。試料台は直径１５㎜高さ５㎜程度の円柱状のアルミニウムまたは真鍮製である。試料に導電性がなければ観察できないので真空蒸着装置またはイオンスパッタコーティング装置等を使用して試料表面に金属の薄膜を蒸着する。また、この薄膜により二次電子の発生効率の向上と電子線によるダメージの軽減も期待できる。使用する金属は金、白金、金/パラジウム合金、白金/パラジウム合金、カーボン等がある。

B、観察例（ステレオ観察法）

写真５はギョウジャニンニクのやくの上の花粉である。二枚の写真は同じところを撮影したものであるがわずかに傾斜角度が違う。これを右目は右写真を、左目は左写真を見ると二枚の写真の間に立体的な奥行きのある像が現れる。これにはある程度訓練を必要とするが、ステレオスコープで眺めると簡単に立体視することができる。



500倍

写真５　ステレオペア写真

4、おわりに

以上、簡単に電子顕微鏡と試料作製法の概要を述べたが電子顕微鏡で見る世界は肉眼では見ることのできない非常に興味の湧く世界である。しかし、間違った試料づくりをすればそこは全く偽りの世界となる。それを認識し、真の世界が見られるよう適切な試料づくりをしなければならない。

おわりに、試料を提供して頂いた附属農場の中嶋博氏、園芸学講座の鈴木卓氏、寄生病学講座の秋野聖之氏に感謝いたします。また、光顕写真を撮影して頂いた園芸学講座の笠井登氏、電顕の外観を撮影して頂いた坪野保雄氏にお礼申し上げます。

参考文献

1）医学・生物学研究のための電子顕微鏡学Ⅰ（基礎編）
WHO電子顕微鏡診断学研究研修センター編　藤田企画出版（1987）
2）よくわかる電子顕微鏡技術
医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編集　朝倉書店（1992）
3）電子顕微鏡生物試料作製法
日本電子顕微鏡学会関東支部編　丸善（1986）
4）医学・生物学電子顕微鏡観察法
日本電子顕微鏡学会関東支部編　丸善（1982）