

個別研修「電子顕微鏡技術の修得」中間報告

三重大学工学部工学研究科技術部

○藤田 由紀子

fujita@chem.mie-u.ac.jp

1. はじめに

工学研究科 技術部では、現在就いている又は将来就くことが予想される職に必要な知識、技術などを習得させ、業務遂行に必要な能力、資質等を向上させることを目的として、個別研修を申請することができる。そこで、多くの研究室が利用する電子顕微鏡の専門知識と技術修得を目指して、電子顕微鏡施設にご協力いただき 2015 年 11 月から継続している、表題の研修について報告する。

2. 電子顕微鏡

光を利用する光学顕微鏡では可視光線（おおよそ 400～700nm）の波長より小さい構造の観察は難しいが、電子顕微鏡はそれよりも短い波長の電子線（100kV：0.0037nm）を利用するため、数 nm 程度の対象を観察することができる。

電子顕微鏡は大別すると、透過電子顕微鏡（TEM）と走査電子顕微鏡（SEM）があり、TEM では試料を透過した電子線を目で感知できるよう、蛍光スクリーンで可視像に変換し、SEM では試料に電子線を照射すると発生する信号を検出器に集めてモニターに表示して観察する。

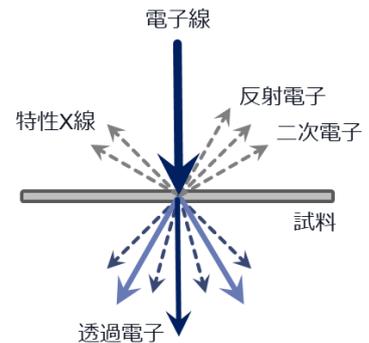


図 1. 電子線と試料の相互作用

3. 研修内容

3. 1 TEMの非点補正

観察に際して、焦点を合わせるだけではなく、電子線がレンズの光軸を通るよう調整する操作。頻繁に行う必要はないが、加速電圧の変更もしくはフィラメント交換後には必ず行う。

非点があると、本来は粒子状構造のものが楕円状あるいは線状の構造に、また焦点が合っている箇所と、そうでない箇所が同時に観察されるなど、正しい情報が得られない。

非点補正用マイクログリッドを使うと分かりやすいが、支持膜などの非晶質薄膜にみられる粒状構造の方向性で確認することもでき、図 2 は、左から不足焦点、過焦点、正焦点だが、非点ありでは流れがあるように見える。

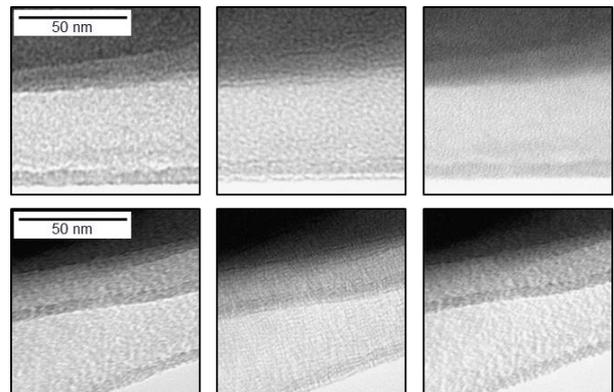


図 2. 支持膜における非点補正 上: なし下: あり

3. 2 電子染色

通常の染色（ポジティブ染色）は、電子線が透過しにくい重元素を特定の構造に反応させることによって、ほぼ無色透明の軽元素（C, N, O, H など）で構成された試料にコントラストを与える操作である。

ネガティブ染色では、試料の周辺を染色剤が覆い、試料そのものは電子密度が低く電子線が透過しやすいため、影として見える。観察しているものは、試料と染色剤が接触している表面であり、試料の内部構造を反映したものではない。

図 3. a は、既に樹脂ブロックに包埋された生物試料の超薄切片に、酢酸ウラン（角質、リボソームなどを染色）とクエン酸鉛（グリコーゲン、細胞膜などのコントラストを高める）で二重染色したポジティブ染色。図 3. b は、フォルムバル支持膜載せたポリスチレンラテックス粒子の、リンタングステン酸によるネガティブ染色。支持膜貼付グリッドは、よく磨いたスライドガラスを溶液に浸漬し、取り出して溶媒を飛ばした後に水面に剥離して作製している。

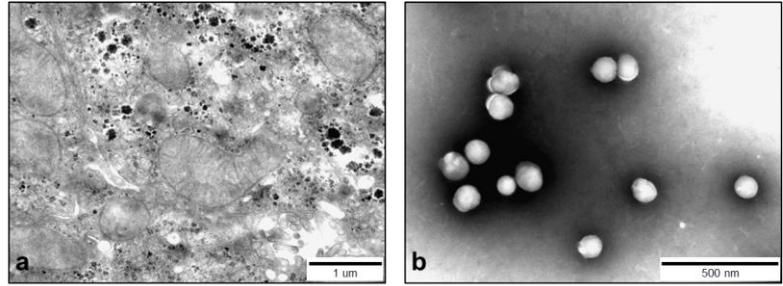


図 3. 電子染色 a: 超薄切片 b: ポリスチレンラテックス粒子

3. 3 超薄切片作製

TEM で細胞の構造を観察するためには電子線を透過させるほど試料を薄くする必要があり、超薄切片作製は試料を固定、脱水、樹脂包埋した後、ウルトラミクロトームで 100 nm 以下の切片を作製し、電子染色後に観察する、よく用いられている方法である。

本研修では、学内で簡単に入手できるためサクラ、アジサイ、イチヨウの葉を使った。植物組織は細胞間隙に空気を含むのでグルタルアルデヒド固定液の浸透し難いため、簡単な減圧浸透処理を施し、固定液に沈まなかった組織は取り除いた。それ以降の過程は動物組織と同じ処理（四酸化オスミウムで固定、エタノール及びアセトンで脱水、樹脂に埋め込み固めて、80~90 nm の切片作製、染色）を行った。

サクラ、アジサイについては、葉緑体、液胞などおおよその植物細胞の構造を確認することができたが、イチヨウでは、回収できたどの切片でもほとんど構造がわからなかった（図 4）。今回は試料の固定～超薄切片作製までの一通りの操作を行うことを目的としており、最適条件で調製したものではないが、技量によるところも大きいと思う。

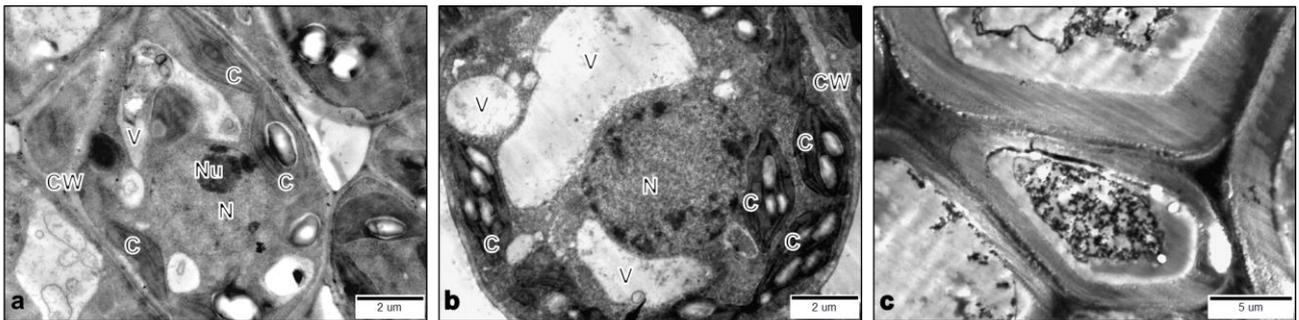


図 4. 葉組織の超薄切片 a: サクラ, b: アジサイ, c: イチヨウ (C: 葉緑体, CW: 細胞壁, N: 核, Nu: 核小体, V: 液胞)

3. 4 外部研修

日本顕微鏡学会 第 27 回電顕サマースクール 2016

平成 28 年度東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修（生物・生命コース）

日本電子(株) SEM 観察のための生物試料前処理作製セミナー、電子顕微鏡試料作製セミナー・マイクロトームワークショップ

3. 5 発表

総合技術研究会 2017 東京大学 ポスター発表参加;

個別研修「電子顕微鏡技術の修得」報告

3. 6 その他

日本顕微鏡学会主催 電子顕微鏡技術認定試験 2級技士 (図 5)
学内共用 SEM 及び EPMA のごく基本的な操作の習得

4. おわりに

試料作製、観察だけでなく、写真に対する解釈、装置のメンテナンス、問題発生時の対応など、研究活動の一助となることができるよう、本研修を継続していきたいと思う。

5. 謝辞

電子顕微鏡施設 小川覚様をはじめ、ご理解・ご協力賜っている先生方と工学研究科 技術部の皆さまに感謝申し上げます。今後ともご指導ご鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。



図 5. 認定試験合格証

参考文献

- 1) (社) 日本顕微鏡学会 電子顕微鏡技術認定委員会編 電顕入門ガイドブック 改訂版 国際文献印刷社
- 2) 第 27 回電顕サマースクール 2016 配布テキスト
- 3) 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 朝倉書店
- 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