

走査型電子顕微鏡の紹介と樹脂包埋切片観察について

¹三重大学医学部・医学系研究科電子顕微鏡室, ²三重大学工学部・工学研究科技術部

○小川 覚¹, 藤田 由紀子²

s-ogawa@doc.medic.mie-u.ac.jp

1. はじめに

今年度、電子顕微鏡施設の利用機器に走査型電子顕微鏡 (SEM) が加わった (図 1)。民間企業で使用されていたものを寄贈された装置である。SEM の基本的な像観察では二次電子像 (SEI) による観察があるが、そのほかに当施設に既存の SEM には機能として無かった反射電子像 (BSE) 観察、低真空モード観察が可能であり、またエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDS) 付属により元素分析も可能となる。そこで、透過型電顕用の樹脂包埋切片を用いた SEM 像観察および EDS 分析の試行と併せて装置の紹介を行う。

2. SEM の基本機能

2-1 SEM とは

光学顕微鏡にスライドガラス上の切片に光を透過して観察する生物顕微鏡と、物体の表面に光を当てて観察する実体顕微鏡があるように、電子顕微鏡にも透過型 (TEM) と走査型 (SEM) がある。

SEM は、電子を装置鏡筒内の真空中で集束させて電子をビーム状 (電子線) にし、その電子線を物体の表面をなぞるようにスキャン (走査) して、そこから発生した二次電子を検出器で検出し、その検出量を明るさに変換してモニターに表示して像が得られるため、走査型と呼ばれる。

2-2. 二次電子と反射電子

SEM 像の基本情報となる二次電子 (SE : Secondary Electron) は、電子が物体に入射したのち、その内部で衝突を繰り返すことでエネルギーを失うが、その過程で物体の構成原子の外殻電子が弾き飛ばされて、物体から放出された電子になる。得られた画像は、凹凸のある試料では明暗が付いて立体感のある表面像となるが、平面的な試料では明暗がはっきりしないため立体感のない像となる。

反射電子 (BSE : BackScattered Electron) は、入射した電子が物質内で散乱し、その一部が方向を変えて外に飛び出し反射電子となる。得られた画像は二次電子像とは異なり、平面であっても物体の構成元素 (組成) によって軽い元素より重い元素が密度差で明るく表示されるので、例えば混合物質などの分布状態を調べるのに有効である。

2-3. 寄贈 SEM (JSM-5600LV) の基本仕様

当機器の基本仕様としては下記のようにになっているが、特に倍率については実際にテスト観察を行ったところ、試料の材質にもよるが例として生物試料では通常観察で 1~2 万倍、試料を選び軸調整等の条件設定を厳密に行って 6~7 万倍が限度と思われるが、多くの観察ではこの範囲に納まる。(図 2)

高真空 (HV) モード

分解能 : 3nm

倍 率 : 18~300,000 倍

像の種類 : 二次電子像、反射電子像 (二次電子検出器による)

凹凸像、組成像、立体像 (反射電子検出器による)

低真空 (LV) モード

分解能 : 4.5nm

試料室内圧力 : 10~270Pa、1Pa 設定可能

像の種類 : 反射電子像 3 種類 (組成像、凹凸像、立体像)



図 1. SEM 外観

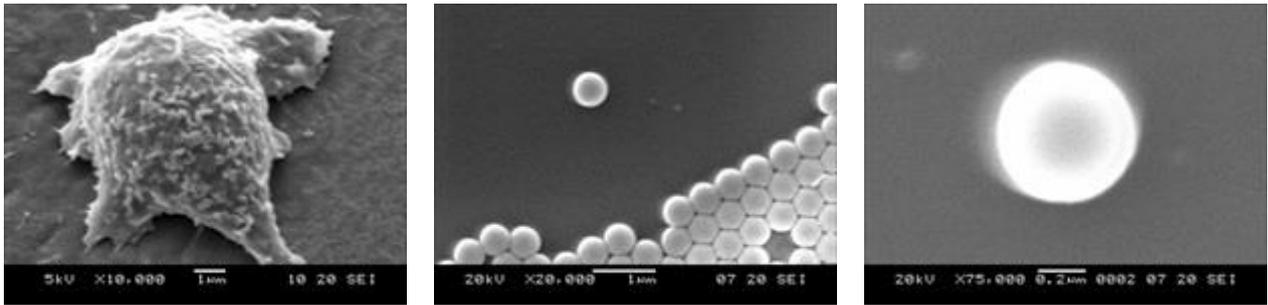


図2. 倍率の違いによる像質の比較 (スケール: 左、中央=1 μ m、右=0.2 μ m)

2-4. EDS 分析装置について

EDS 分析は、電子線を物質表面に照射して発生した特性 X 線を、検出器で捕えて積算カウントすることにより、スペクトルグラフに表示し物質の元素を同定する方法である。EDS で検出可能な元素は Na~U の各元素で、特徴として短時間 (数十秒) からでも試料に含有するすべての元素を同時に検出できることであり、比較的簡単に物質の同定が得られる。但し、厳密に試料の構成元素量を出すためには定量分析が必要だが、それには試料に含まれる元素個々の標準サンプルを準備して分析し比較対象とする必要がある。

また EDS 分析には点分析、線分析、面分析と、検出した各元素が観察表面のどこに含まれるかを表示するマッピングが可能である。

3. SEM 講習会の開催

このように多機能である SEM が当施設に加わったことで、研究に利用していただくため学内の利用者を対象に装置の紹介を兼ねた SEM 利用講習会を 10 月 22 日 (月) ~29 日 (月) にかけて開催した。初日は工学研究科の高橋教授より「SEM の ABC」と題して講義を行っていただき、その後 29 日 (月) までの 1 週間に渡り、実際に SEM を用いて機器の始動から微小構造観察方法、EDS 元素分析方法について、筆者 2 名による全 11 回の操作説明会を行った。参加者は学内各学部の研究者、大学院生、学部生など合わせて約 50 名となり、多くの方に参加いただいた。(図 3)



図 3. SEM 講習会の様子 (左=講義、中央、右=操作説明会)

4. TEM 用超薄切片を用いた SEM 観察について

前述の講習会 (操作説明会) において参加者より、TEM 観察用超薄切片の細胞組織に含まれる金属物質を SEM の EDS 分析で同定できないかとの相談を受けたことで、可能かどうかを検証するため試行を行ってみた。近年では超薄切片の SEM 反射電子像観察という方法で、細胞組織の連続切片法を用いた 3 次元再構築による形態研究も行なわれており、web 検索による情報も参考にした。

4-1. 観察方法

TEM 用に樹脂包埋した細胞組織の超薄切片を、約 10mm 四方の大きさに割ったスライドガラス片に水と一緒に載せた後、完全に乾くまでホットプレートで 20 分ほど乾燥した。その後、通常 TEM 切片に行う二重電子染色を行い、ガラス片ごと SEM 用試料台に貼りつけた後に導電コーティングを施して SEM 観察を行った。

4-2. 像観察結果

まず TEM 用切片の厚さは約 80nm で、ほぼ完全な平面であるため、一般的な SEM 像のような立体感はなく、二次電子像では薄く濃淡は付くものの、形態の確認は困難であった。

次に反射電子像で観察を試みた。予想では包埋樹脂だけの部分と細胞組織の部分での、いわゆる組成の違いが濃淡で現れると予測して観察したところ、TEM 観察の像質には到底及ばないが、二次電子像に比較してなんとか細胞組織がわかる程度の像を得ることができた。(図 4)

但しこの像を得るために、SEM の非点軸調整に加えて、明るさとコントラストを自動ではなく手動で微調整する必要があった。

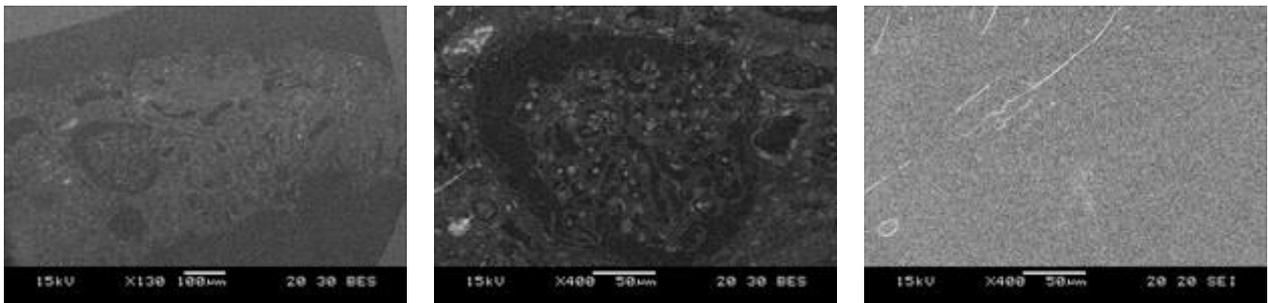


図 4. TEM 切片の検出電子の違いによる像質の比較 (左、中央=反射電子像、右=二次電子像)

4-3. EDS 分析結果

前述の切片を用いて、EDS による分析が可能か試みた。細胞組織内の特定箇所に含まれる物質が多く (明るく) 表示されることを期待していたが、結果は元素ピークは検出できるが、マッピングによる濃淡は見られず観察エリア前面がほぼ均等であった。(図 5) 原因としては、①切片の厚さが 80nm と超薄であるため物質の濃度比が反映され難いのでは、②切片を染色しているため染色剤の濃度に隠れてしまうのでは、③加速電圧 15kV が合っているか、などが考えられるが現時点で未検証である。

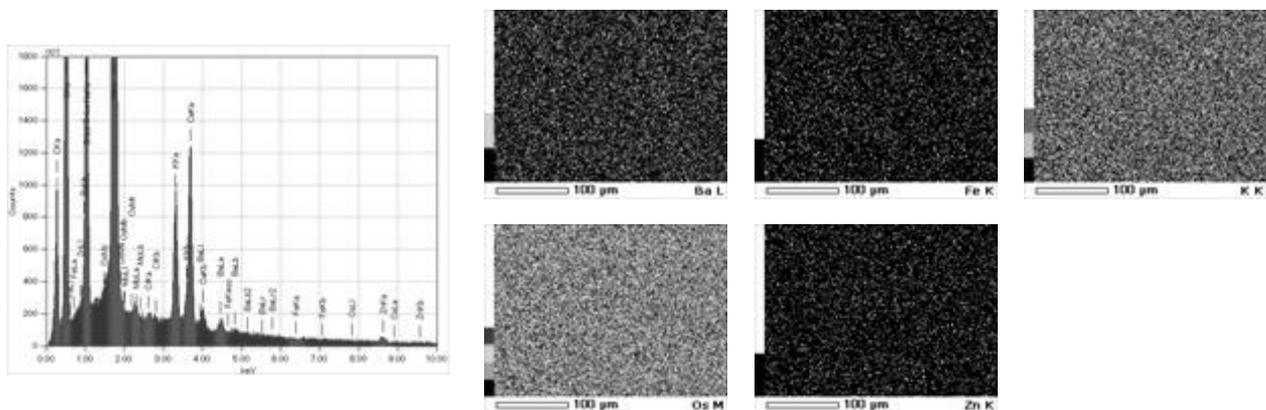


図 5. EDS 分析結果と各元素マッピング像

5. おわりに

当原稿を作成している時点では、TEM 切片を用いた SEM 観察と EDS 分析の結果はここまでになる。検証の途中であるので今後も引き続いて、切片の SEM 観察でどこまで TEM 像に迫れるか、また切片の EDS 分析の可能性の可否について検証する予定である。そして施設機器を管理する立場ではこの EDS 分析装置附属 SEM が設置されたことで、研究対象の幅が広がり利用者が増えることに期待しながら、技術支援を行っていききたい。