

3. 試料作製方法

3-1. 透過電子顕微鏡における動物細胞試料作製法の高分子ゲルへの応用

一般的な動物細胞の試料作製は、組織摘出後、前固定、洗浄、後固定、洗浄を経てから脱水行程に進むのであるが、今回用いる高分子ゲルの場合はエタノール中での機械的特性評価を行ったため、固定、洗浄の行程を省き脱水行程から始めることが可能である。また、高分子ゲル組織も動物細胞に比べダメージが少ないと考えられるため本来の過程を簡略化し試行を行った。図1に試料作製法のフローチャートを示す。

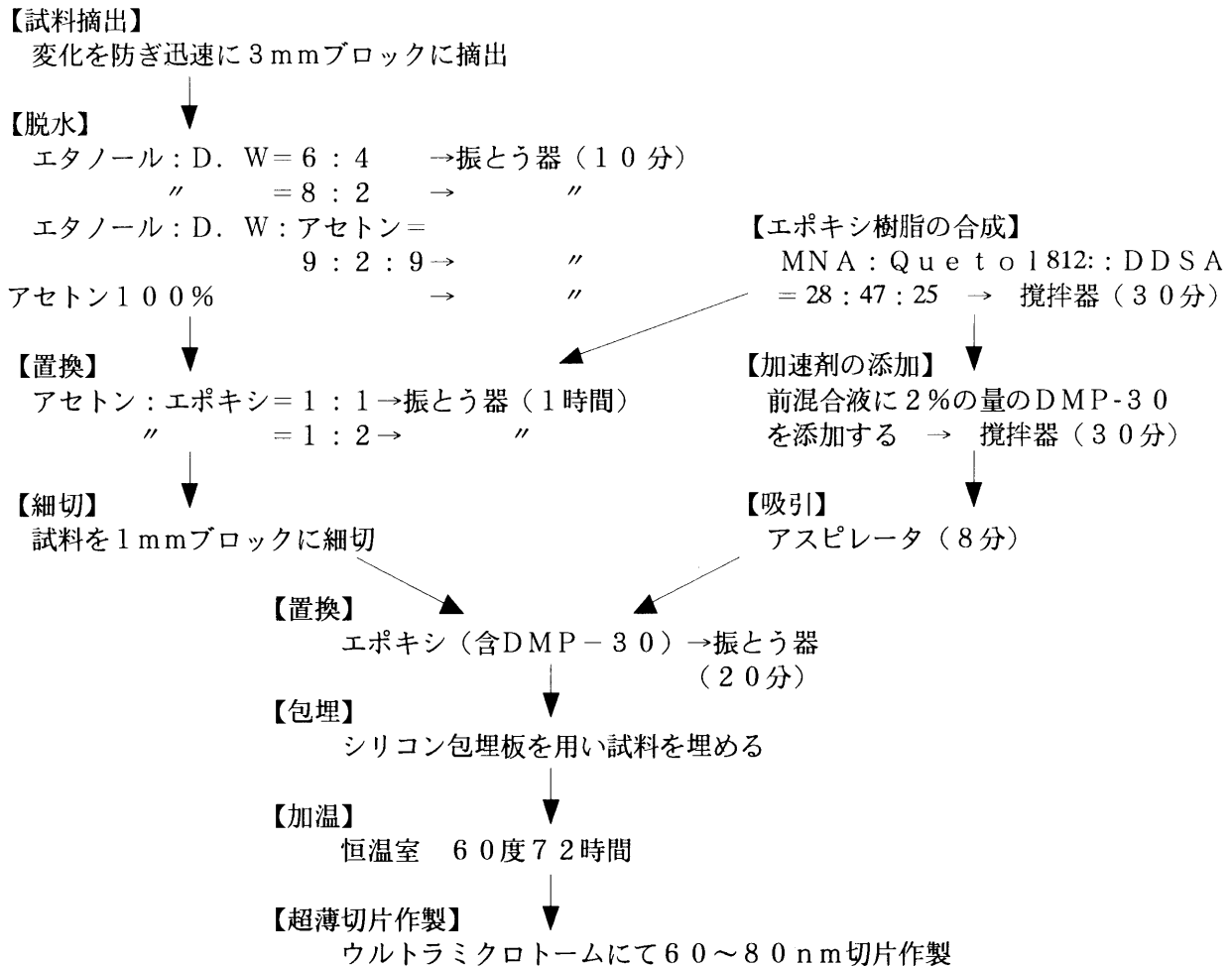


Fig.2 Application of creature cell method on TEM

3-2 走査電顕における臨界点乾燥法の高分子ゲルへの応用

走査電顕観察における試料作製で注意すべき点は、試料にダメージを与えず本来の構造のまま乾燥可能であるかということである。乾燥過程での組織のダメージは空気と液体の界面が試料中を通過するときが発生する表面張力により現れる。そこで、この表面張力を除去するため臨界点乾燥法を用いる。

臨界点乾燥とは、試料中の溶媒を液体二酸化炭素へ置換し、その後、圧力と熱の作用により液体二酸化炭素を液体もしくは気体でもない状態にし乾燥を行うものであり、試料に表面張力をかけずに乾燥可能である。図2に試料作製のフローチャートを示す。

【試料抽出】

5 mmブロックに試料を抽出

【脱水】

エタノール：D. W = 6 : 4 → 振とう器 (10分)

” = 7 : 3 → ”

” = 8 : 2 → ”

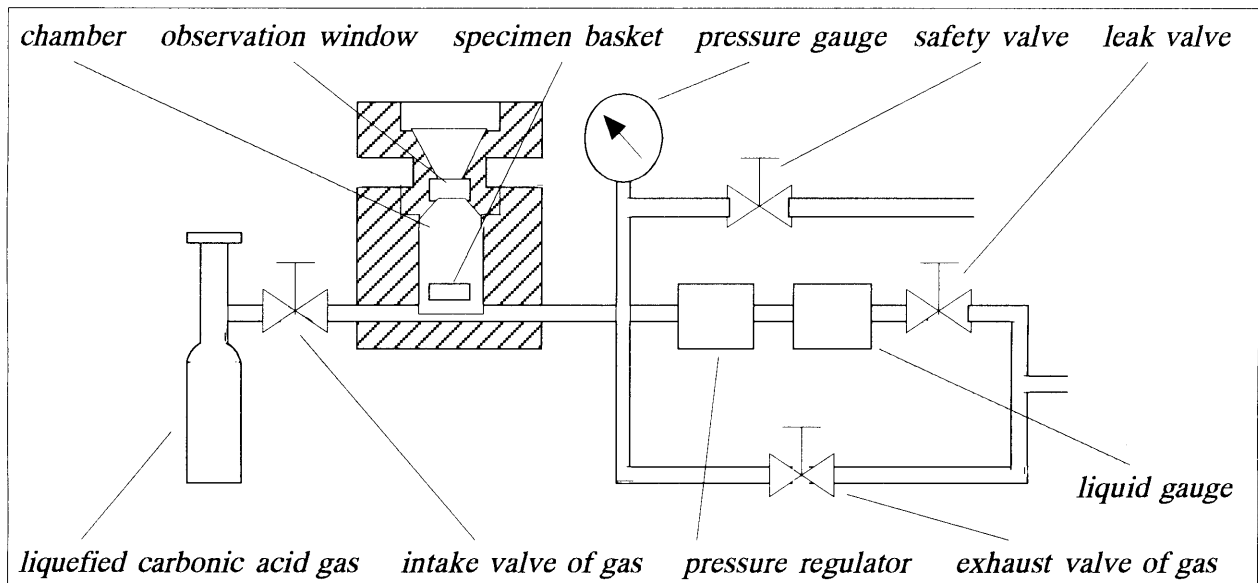
” = 9 : 1 → ”

” = 10 : 0 → ”

酢酸イソアミル 100%

(30分 x 2回)

【臨界点乾燥】



Schematic drawing of Critical dryer (Hitachi HCP-1)

【試料台への載物】

乾燥した試料をその方向性を考慮しながらSEM用アルミ試料台に載せる

【金属膜コーティング】

イオンスパッタリング装置を用い金コーティングを行う。

Fig.3 Flow chart of Critical dryer method on SEM

3-3 走査電顕における凍結乾燥法の応用

真空中の氷はその温度での水の蒸気圧より高真空度においては液体状態を経ずに直接気化を行う。再結晶化点以下の低温中でこれを行うことにより、試料は細胞構造損傷や、水溶性物質、イオンなどの流出やダメージを極力起こさずに乾燥でき、元の状態に近い電顕観察用

試料が作製できる。これを高分子ゲルへ応用した。図3に試料作製法のフローチャートを示す。

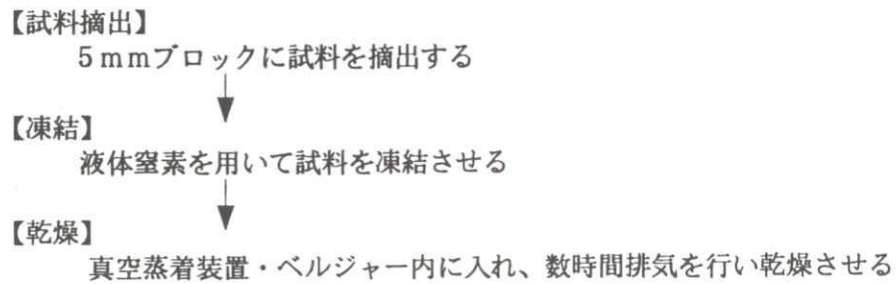


Fig.4 Flow chart of Freeze dry method on SEM

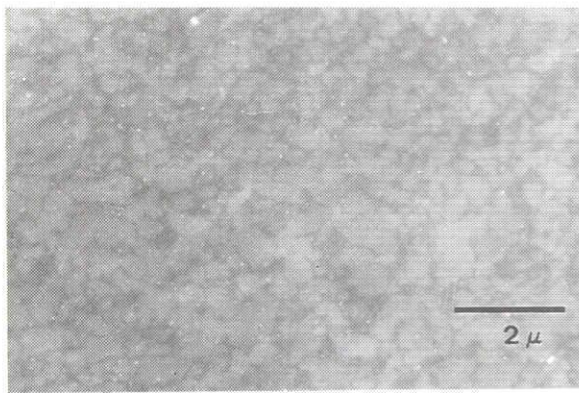


Photo. 1

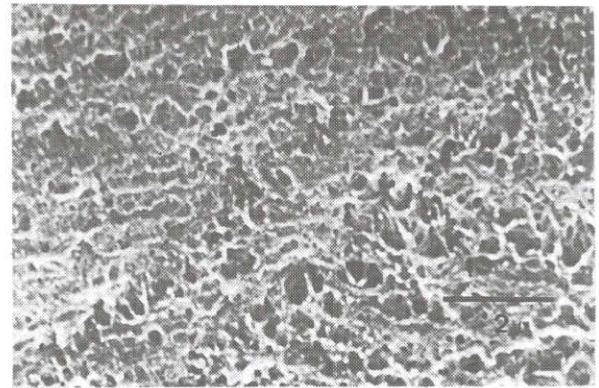


Photo. 2

4. まとめ

写真1に透過電顕における動物細胞試料作製法を用い撮影した電顕写真を示す。母材であるPVAと添加材であるPAAにより架橋された部分（黒）とエポキシ樹脂が入り込んでいる部分（白）とがコントラスト良く、また鮮明に編み目構造を形成しているのが良く解る。

写真2に走査電顕における臨界点乾燥法を用い撮影した電顕写真を示す。三次元的な表面状態は良く表しているが、これを画像処理に応用しようとするのが難しいように思われる。しかし、時間的にはかなり迅速に試料作製が可能であるため、表面観察に限っては支障は無いと考える。

3-3で行った走査電顕における凍結乾燥法を応用した試料作製は、蒸着装置内での真空乾燥中にかなりのダメージを受け観察不可能な状態になった。しかし、この原因と考えられるのは試料作成過程での脱水を行わなかったためと考えられる。

以上から、透過電顕での動物細胞試料作製法の応用が、今回の目的である画像処理等を行

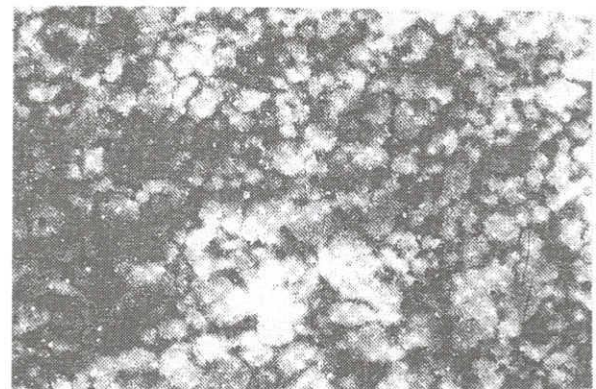


photo. 3

うには最も優れていた。写真3に写真1で撮影した画像をコンピュータにより加工した像を表す。また、エポキシ樹脂に包埋しウルトラミクロトームで薄片を切るため、この時、自由に角度を与えることが可能であるため任意の断面を得ることができる。今後、この作製法において迅速な試料作製を構築するために、脱水過程・置換行程での時間が短縮可能であることから、濃度、振とう時間を含めた可能性を検討する必要があると考える。

最後に、この作製法においての問題点は、高分子ゲルのエポキシ樹脂包埋後の各々の色が似かよっているため識別が困難である。そこで、何らかの方法を用い試料に染色等を施し、薄片作製のウルトラミクロトーム行程を容易にする必要があると考える。

5. 参考文献

- ・今井 貴寛 「高分子材料による人工筋の諸特性評価」(1993)
- ・L. E. NIELSEN 著、小野木 重治 訳 「高分子の力学的性質」 化学同人
- ・医学生物学電子顕微鏡技術研究会編集 「よくわかる電子顕微鏡技術」 朝倉書店