

平成 18 年度

兵庫医科大学

研究技術講習会

透過型電子顕微鏡入門

共同利用研究施設

微細形態分野

《目 次》

I. 透過型電子顕微鏡試料作製法

1. 超薄切片作製のための一般的方法

1. 1 試料採取	1
1. 2 固定	1
1. 3 脱水	2
1. 4 包埋	2

2. 試料採取・固定・脱水・包埋の実際

2. 1 試料採取および固定	3
A. 浸漬固定法	3
B. 灌流固定法	4
2. 2 脱水	5
2. 3 包埋	5

3. 超薄切片の作製

3. 1 メッシュの処理	7
3. 1. 1 メッシュ粘着処理	7
3. 1. 2 コロジオン支持膜の作製（湿式法）	7
3. 1. 3 フォルムバル支持膜の作製（溶液沈下法）	8
3. 2 ガラスナイフの作製	9
3. 2. 1 ガラスナイフ	9
3. 2. 2 ボート	10
3. 3 超ミクロトーム	11
3. 3. 1 薄切順序	11

4. 電子染色

4. 1 染色法	15
4. 2 染色の実際	15
4. 2. 1 酢酸ウラニル染色	15
4. 2. 2 鉛染色	16

5. カーボンの真空蒸着

6. 試薬の調整

6. 1 アルデヒド，オスミウムの二重固定	18
6. 2 四酸化オスミウム水溶液	18

6. 3	10%パラホルムアルデヒド	1 9
6. 4	0.2M 燐酸緩衝液 (pH 7.4)	1 9
6. 5	エポキシ樹脂混合液	2 0
6. 6	染色液の作り方	2 2

II. 透過型電子顕微鏡の構造

1.	鏡体	2 3
1. 1	電子銃	2 5
1. 2	コンデンサー・レンズ	2 6
1. 3	対物レンズ	2 7
1. 4	中間・投影レンズ	2 8
1. 5	収差	2 8
1. 6	観察記録	2 9
2.	真空排気系	2 9
2. 1	真空ポンプ	3 0
2. 1. 1	油回転ポンプ	3 0
2. 1. 2	油拡散ポンプ	3 0
2. 2	真空計	3 1
2. 2. 1	ピラニー計 (Pirani 計)	3 1
2. 2. 2	ペニング計 (Penning 計)	3 1
2. 2. 3	電離真空計	3 2

III. 写真処理

1.	フィルムの処理	3 3
2.	引伸しプリント処理	
2. 1	印画紙の種類	3 4
2. 2	印画紙の現像処理	3 4
2. 3	コンタクトプリント	3 5
2. 4	引伸しプリント	3 5
2. 5	ポジスライド	3 6

《参考図書》	3 7
--------	-----

I. 透過型電子顕微鏡試料作製法

1. 超薄切片作製法のための一般的方法

透過電子顕微鏡の試料作製過程は、固定、脱水、包埋、薄切の手順を経ていく。最終的に切片が電子顕微鏡という高真空状態の中で、電子線を通して観察されるので、このような苛酷な状態でも、形態や構造が生体にあった状態に近く保存されることが求められる。

1.1 試料採取

試料とする組織を機械的な歪みや破壊を起こさないように採取する。切り出した組織に血液や分泌物などが多量に付着している場合には、生理食塩水やリンゲル液または固定液中で素早くゆすいで取り除くようにする。採取の際にピンセットで挟んだり、ハサミを入れた部分は切り捨てる。

1.2 固 定

細胞の形態を出来るだけ生体に近い状態に保ったまま標本を作製する。

- 1) 死後変化を最少にするため、出来るだけ速やかに細胞内の酵素活性等の生活現象を止める。
- 2) 脱水・包埋の操作中に溶出・収縮変形の起こりにくい強固な状態に変化させる。

< 固定剤 >

固定剤としてホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウム、過マンガン酸カリウム等が用いられる。又、固定は一般的にpH7.2～7.4付近で行われた場合に組織の保存が良いので、上記の固定剤と共に次のような緩衝液が用いられる。

s-コリジン緩衝液， 磷酸緩衝液

カコジル酸緩衝液， 酢酸ペロナール緩衝液

緩衝液の種類により、細胞成分の溶出度が違い、異なった組織像を示す。

固定液には固定剤のほか、塩化カルシウム、ショ糖、沈降炭酸カルシウム等を入れ、組織を良く固定すると共に等張の役割を持たせることもある。

① ホルムアルデヒド：HCHO

四酸化オスミウム、グルタルアルデヒドより早く組織内へ浸透する。通常は純粋なホルマリンを得るためパラホルムアルデヒドの粉末を蒸留水に溶かして使用する。

尚、ホルムアルデヒドは単独ではほとんど使用されない。

② グルタルアルデヒド： $\text{CHO}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$

アルデヒド系固定液の中でグルタルアルデヒドが微細構造を最も良く保存し、酵素活性をあまり破壊しないといわれている。又、組織への浸透性は大きく、蛋白質は良く固定されるが、脂質は余り固定されない。前固定として用いるのが望ましく四酸化オスミウムとの二重固定が普通である。グルタルアルデヒドはアルデヒド単独、又はパラホルムアルデヒドとの混合液が良く用いられる。

③ 四酸化オスミウム： OsO_4

電子顕微鏡用の固定剤の中で四酸化オスミウムが最も広く用いられ、固定後の変化や人工像が非常に少ないとされている。

脂質、DNA 顆粒、膜構造蛋白質等を固定する。特に脂質は良く固定するが、蛋白質はあまり良く固定しない。

そこで逆に蛋白質を良く固定し、脂質の固定の良くないグルタルアルデヒドとの二重固定を行えば、四酸化オスミウム単独固定よりも効果的である。

四酸化オスミウムは有害なガス（有臭）が出るので取り扱いには注意する。使用済み固定液は貯留し流しに捨てないこと。

一般にはメルク社製の 0.5g、又は 1 g 入りの密封アンプルが良く用いられる。通常 2～4%水溶液として、褐色二重蓋の密栓出来る試薬瓶の中で冷蔵庫内に保存する。

1.3 脱 水

固定を終わった試料は、アルコールの上昇系列にて脱水する。通常は 50%→70%→80%→90%→95%→100%が標準的である。各々のアルコール中に入れておく時間は、試料の種類、大きさ、特に厚さによって変わるが、普通は厚さ 1 mm 以下の組織片で 5～10 分間、1～3 mm で 15～20 分間といわれる。

出来るだけ脱水の途中で中断しないのが望ましい。やむを得ぬ場合は 90%アルコールで中断する。脱水を充分に行うためには、試料を脱水剤中で振とうする。

1.4 包 埋

電子線の透過能は極めて小さいため観察する試料は $0.1\ \mu\text{m}$ 以下の厚さに薄切する必要がある。このような薄い切片を作るためには組織を硬い樹脂に包埋する事が必要となる。又、包埋剤を試料に良く浸透させるために、プロピレンオキサイドやn-ブチルグリシジルエーテルなどが置換剤として用いられる。プロピレンオキサイドは引火点が低く、爆発のおそれがあるため火気に近づけないこと。

2. 試料採取・固定・脱水・包埋の実際

2.1 試料採取および固定

A. 浸漬固定法

- ① マウスにネンブタール麻酔(ネブタール 0.05ml+ 生理食塩水=0.2ml)を行う。
- ② 開腹し脱血を行う。
※ 以後の操作は4℃で行う。
- ③ 目的の組織を切り出し、前固定液（6.1 ①参照）に入れる。次にあらかじめ冷やしておいたパラフィンプレート上に前固定液を滴下しておき、目的の組織を出来るだけ早く切り出しその中へ入れる。
- ④ 脱脂した2枚のカミソリ刃（両刃カミソリを半分にしたもの）を用いて図のように、まず短冊状に切り、さらに1mm角に細切する。
- ⑤ この1mm角の組織をサンプル瓶中の前固定液に入れ1～2時間固定する。
- ⑥ 前固定液を捨て、0.1M 燐酸緩衝液（6.4 参照）で10分間ずつ3回洗浄を行う。
- ⑦ 緩衝液を捨て、後固定液（6.1 ②参照）に入れて、1～2時間固定する。
- ⑧ 後固定液を捨て、0.1M 燐酸緩衝液で10分間ずつ3回洗浄を行う。

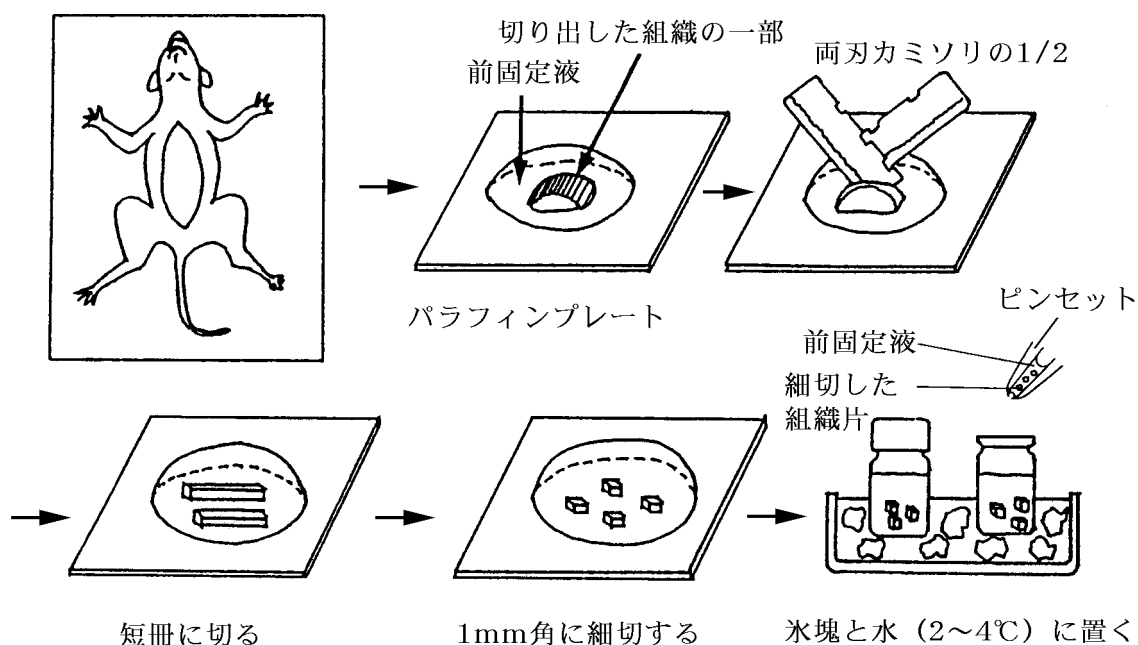


図 2-1 試料採取および固定の実際

B. 灌流固定法

- ① ラットをネンブタールで十分に深麻酔する。
- ② 適当な台にラットを固定する(麻酔が十分であれば硬く固定する必要はない)。
- ③ 固定液を準備、生理食塩水にヘパリン 500 IU を加える。固定液にグルタルアルデヒドを加える。
- ④ カニューレの中の空気を抜く。
- ⑤ ラットの胸部の皮膚をはぎ、第 5 肋間に鉗子を挿入して内胸動脈を結さず、ハサミで下より肋骨、胸骨を切って開胸。
- ⑥ 心膜を除いて心臓を遊離。心尖より向かって約 1 mm 右の所にハサミで割を入れて、左心室にカニューレを挿入、動脈クリップで固定。生理食塩水を注入。
- ⑦ 数秒後に右心房を切開。
- ⑧ 約 3～5 分 (又は 80～100 ml) 生理食塩水を流した後、三方コックの位置を変えて固定液を流す。(500～1000 ml)
- ⑨ 充分固定液が灌流していれば四肢の緊張が見られ、全身が硬直する。左心房や肺が膨れ、鼻、口から固定液が流れでてきた時は、右心室か左心房にカニューレが入っていると考えられるので入れ直す。
- ⑩ 灌流後は浸漬固定法の手順に従う。

☆準備するもの

1. 三方コック付イレガトール 2つ
2. 静脈カテーテル 6号
3. 手術用具 (ハサミ(大・小)、鉗子、動脈クリップ、ピンセット(鉤付が望ましい))
4. 生理食塩水
0.9 g NaCl
100 ml d.w. (又は 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4)
5. 固定液 500 ml
4% パラホルムアルデヒド
2.5% グルタルアルデヒド
(浸漬固定で使用したものと同一のもの)

2.2 脱 水

50%,70%,80%,90%,95% エチルアルコールを各 10 分間,100% を 10 分間ずつ 3 回脱水を行う。

(液の交換は上澄みを捨て(decantation)、90%までは4℃で行う)

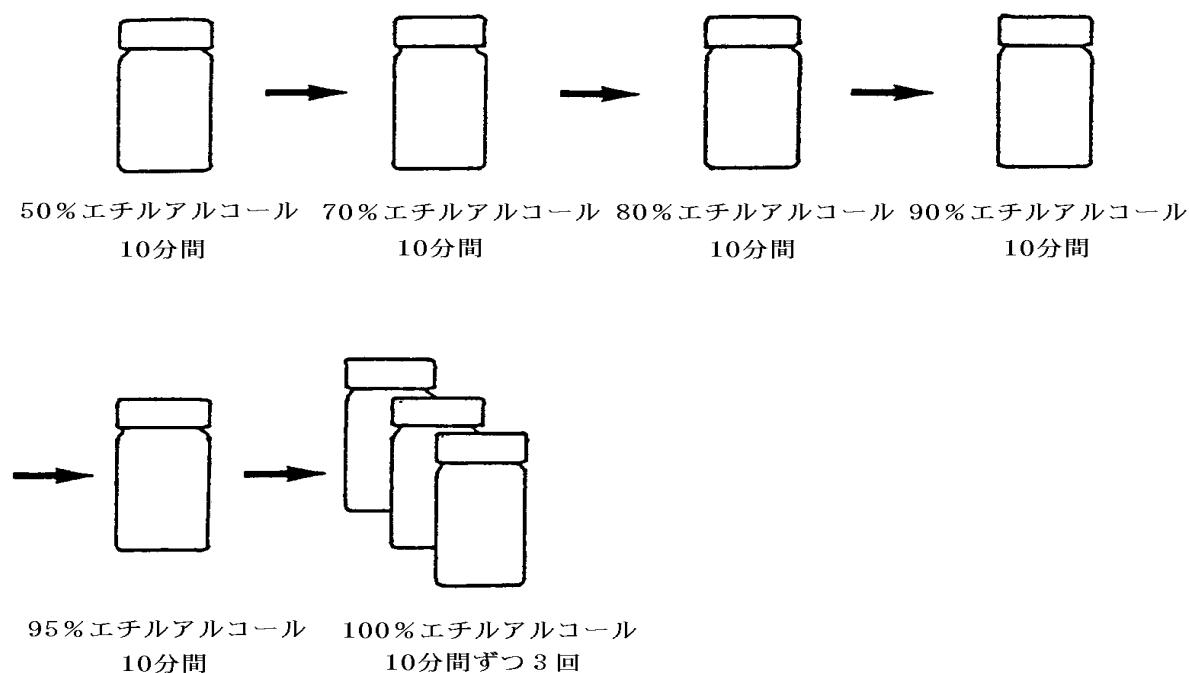


図 2-2 脱水の実際

2.3 包 埋

① 100%エチルアルコールを捨て、プロピレンオキサイドを入れる（10 分間）。

更にプロピレンオキサイドを入れ替える（10 分間）。

② プロピレンオキサイドと同量のエポキシ樹脂混合液（6.5 参照）を加え良く混ぜる（1 時間）。

③ プロピレンオキサイド+エポキシ樹脂混合液と同量のエポキシ樹脂混合液を加え、1：3 の割合としてよく混ぜる（1 時間）。

④ プロピレンオキサイド+エポキシ樹脂混合液を捨て試料をピンセットで口紙の上に取り出す、エポキシ樹脂混合液のみ入ったビンに入れる（1 時間）。

⑤ エポキシ樹脂混合液より試料を取り出し口紙の上へのせ、エポキシ樹脂混合液を入れたシリコンカプセルに移す。

⑥ シリコンカプセルを恒温槽に移し硬化させる。

※ 各処理中は振とう機などで振とうする。

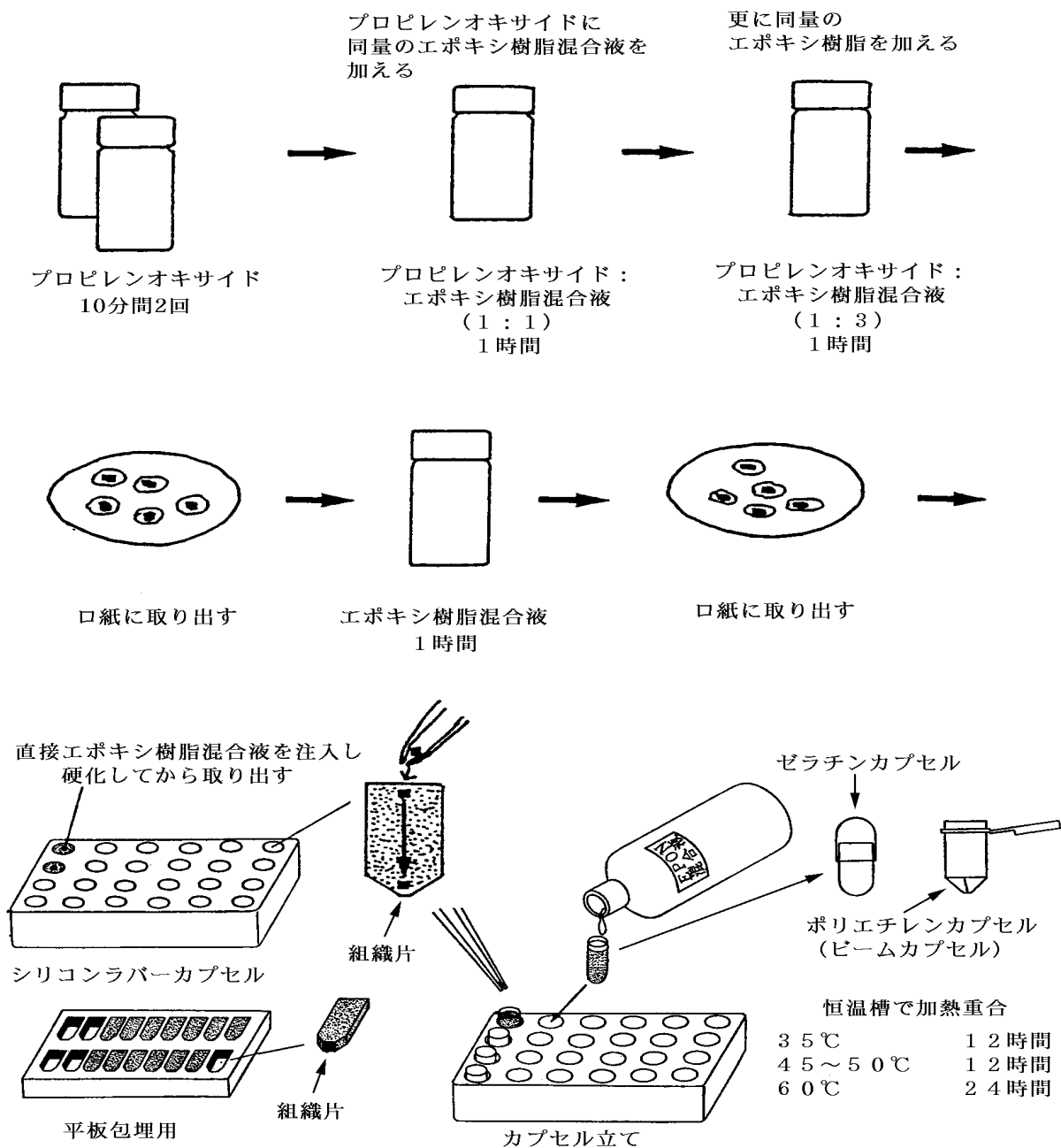


図 2-3 包埋の実際

3. 超薄切片の作製

3.1 メッシュの処理

電子線照射による試料の剥がれやドリフトを防ぐためにメッシュに以下の様な処理を行い、試料切片がメッシュに密着するようにする。

3.1.1 メッシュ粘着処理

- ① 市販のメッシュセメント (NeoprenW2%トルエン溶液) をトルエンで 0.3%に薄める。
- ② スライドガラスにメッシュを並べメッシュセメントを滴下する。余分な液はスライドガラスを少し傾け、口紙で吸い取る。
- ③ 粘着処理したメッシュはホコリがつかないようにスライドガラスごとシャーレに保存する。

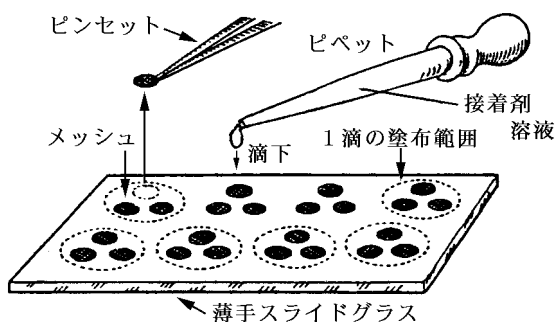


図 3-1 メッシュ接着処理⁶⁾

3.1.2 コロジオン支持膜の作製 (湿式法)

- ① 直径 16 cm のシャーレに水をあふれさせ、表面のゴミを流す。
- ② 2%コロジオン液を約 2 mm 径のピペットで一滴水面に滴下する。最初の膜はゴミを除去する意味で取り除き、再び膜を張る。

※液の濃度、量、水温等で膜の厚さは変化する。適当な厚さを得るように調整する。

又、湿度の高い部屋で行ったり、息をかけたりすると膜面に小孔が多数出来るので注意する。

- ③ 張れた膜面上にメッシュセメント処理したメッシュを静かに並べる。
- ④ パラフィルム (パラフィン紙と接していた面) を膜と少しずつ密着させる。

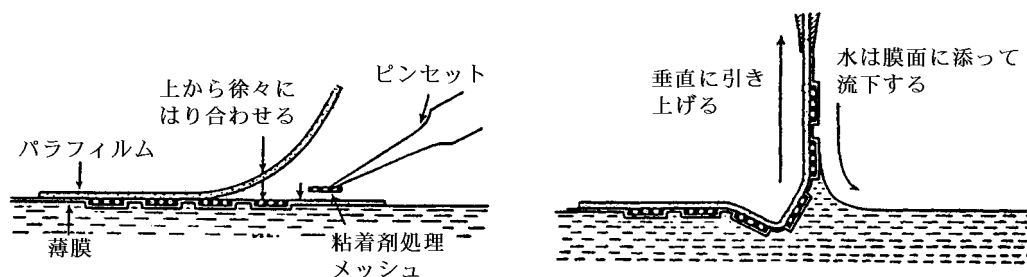


図 3-2 コロジオン支持膜の作製⁶⁾

⑤パラフィルムの回りの余分なコロジオン膜は取り除き、膜面に水が残らないようパラフィルムをゆっくり垂直に引き上げる。

⑥ シャーレの中に置き乾燥する。

3.1.3 フォルムパール®支持膜の作製（溶液沈下法）

①厚手スライドガラスを 1% アンモニア水に 10 分間浸けて、風乾する。

②表面処理したスライドガラスをフォルムパール膜張り装置（市販品）にセットする。

③膜張り装置の二連球側のコックを開いて空気を送り、空気圧でスライドガラスの 2/3 の高さくらいまで液面を上昇させて、コックを閉じる。

④リークコックを開いて、液面を下げる。

⑤図のように片刃カミソリでスライドガラスの縁沿いに、約 1mm 内側をカミソリで切り込みを入れる。

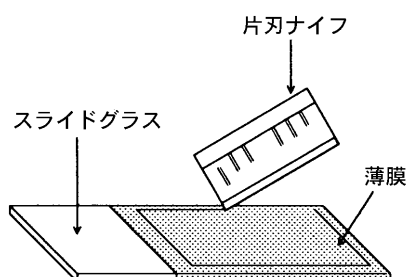


図 3-2a 薄膜剥離前の切り込み操作¹²⁾

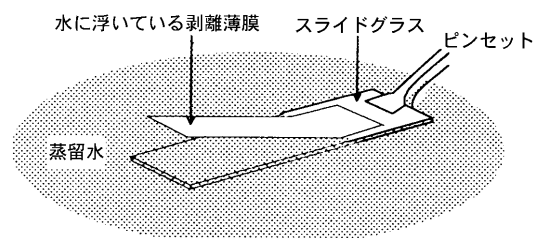


図 3-2b 水面上での薄膜の剥離操作¹²⁾

⑥スライドガラス用ピンセットでスライドガラスを水面に対して 10～20° に傾けて保持し（マニプレーターがあると操作し易い）、スライドガラスの先端を水面に接触させ、先端部の薄膜が剥がれ始めたらスライドガラスを静かに水中に少しずつ沈めて、膜を剥離する。

尚、剥離操作の直前に、スライドガラスの膜側に呼気をかけると膜の剥離がしやすい。

⑦水面に浮いた支持膜をコロジオン支持膜の場合と同様にメッシュ（単孔や孔径の大きな 100 メッシュ等）を静かに並べ、パラフィルムを密着させて引き上げる。

※市販の 0.5% フォルムパール（クロロホルム）溶液を支持膜作製に用いる。

3.2 ガラスナイフの作製

包埋した試料は超ミクロトームを使用して 60～100 nm の厚さに薄切されるが、その際使用されるナイフにはガラスナイフやダイヤモンドナイフがある。

3.2.1 ガラスナイフ

ガラスナイフはガラスナイフメーカーを使って作製する。使用するガラス板は洗剤で良く洗い、水ですすぎ乾燥しておく。

出来たナイフの良否は実体顕微鏡下で光を当ててノコギリ状の紋があるかどうかで判断する。刃と対となる割れ残りが 0.5mm 以内なら大体良いナイフとなる。

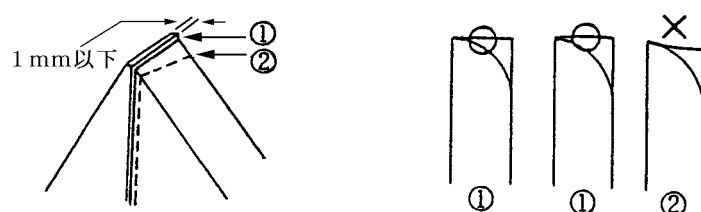


図 3-3 ガラスナイフの良否⁷⁾

刃先はほとんど直線であるものが良いが、多少片側が上がっていても直線部分が充分にあれば使用出来る。

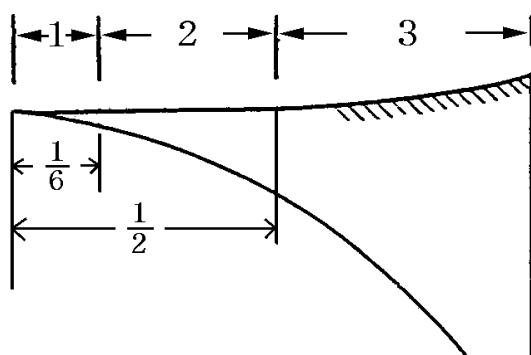


図 3-4 ガラスナイフの刃先¹⁾

- 1：ナイフマークは少ないが切れ味は良くない。
 - 2：ひずみもナイフマークも少なく刃として使用出来る。
 - 3：ひずみがひどく使用できない。
- ※ ガラスナイフは使用する時に作製するのが望ましい。

3.2.2 ポート

薄切された切片を取り扱い易くするために、ナイフにポート（液槽）を取り付ける。ポートには金属製のものやポート用ビニールテープなどが用いられる。

水漏れを防ぐためにガラスナイフとポートの接着部には主にマニキュアやパラフィンで縁どりして使用する。

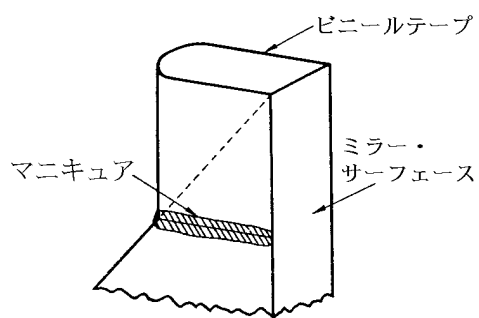


図 3-5 ガラスナイフポート¹⁾

※刃先やガラスナイフのミラー・サーフェースにマニキュアがつかないように注意する。

3.3 超マイクロトーム

超マイクロトームはその試料送り機構から機械送り方式と熱膨張送り方式に大別される。

① 機械送り方式：MT-7000(RMC),ウルトラカット UCT(ライカ)

ハンドルの回転によって機械的に試料ホルダーを前進させる方式。

② 熱膨張送り方式：LKB-NOVA(LKB)

試料ホルダーのアームに巻かれたヒーターを加熱してアームの熱膨張を利用した方式。

3.3.1 薄切順序

① トリミング（試料ブロックの整形）

脱脂したカミソリで試料の面出しを行い、回りのエポンだけの部分を削り取り、大体の形を整える。

② 荒削り

マイクロトームを用いて、切削面を平滑にしながら試料の面出しを行う。

1. 試料ブロックをマイクロトームの試料ホルダーに装着し、切削運動を与えながらナイフを前進させる。

2. 試料面が現れるまでは多少厚目に切り進み、現れたら送りを小さくして平坦な面をつくる。

③ ポート液面の調整

ポートに水、又は 10～20% アセトン水を入れる。

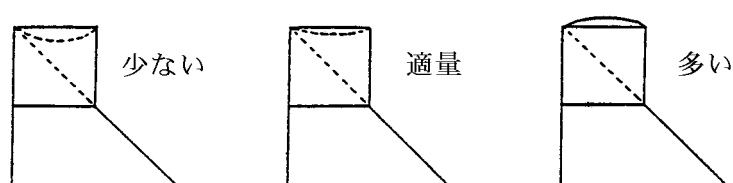


図 3-6 ポートに入れる水の量

※あまり多く入れすぎるとミラー・サーフェスや試料面一面に水が引き込まれる。

④ 光学顕微鏡用切片の作製

荒削り用のガラスナイフで1～2 μm の厚い切片を切り出す。ボートの水に浮かんだ切片をつまようじの先ですくい、スライドガラスの上に盛り上げた水滴に移す。50～60℃のホットプレートの上で乾燥する。トルイジンプールー染色液（6.6 参照）で加温染色し（数十秒間）、水洗乾燥後光顕観察し、その組織像から必要な部分を決める。

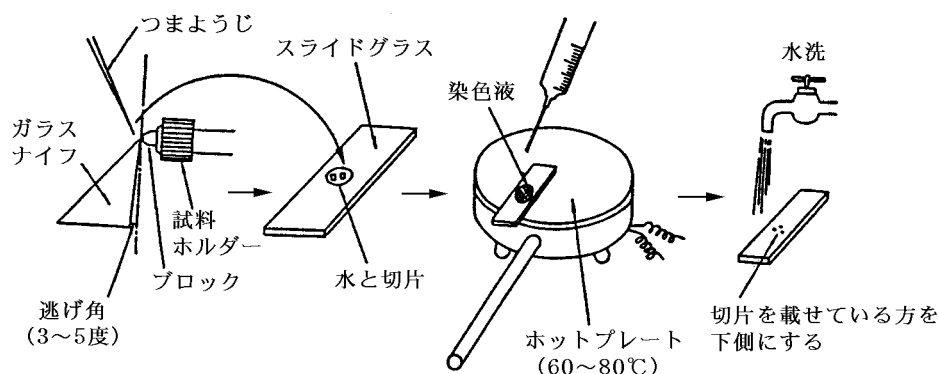


図 3-7 光顕用切片の作製³⁾

⑤ 再トリミング

目的の位置を中心に試料面を0.5～0.8mm角以下にした方が薄切は容易となる。四角形または台形にする。特にスロープはカミソリで一気に切り落とし、表面を滑らかにする。ザラザラしているとりボンになりにくくガラスナイフにも傷がつき、ナイフマークの原因となる。

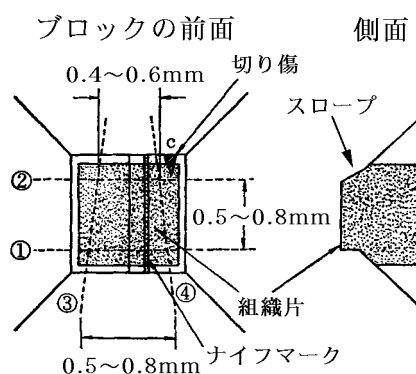


図 3-8 再トリミング³⁾

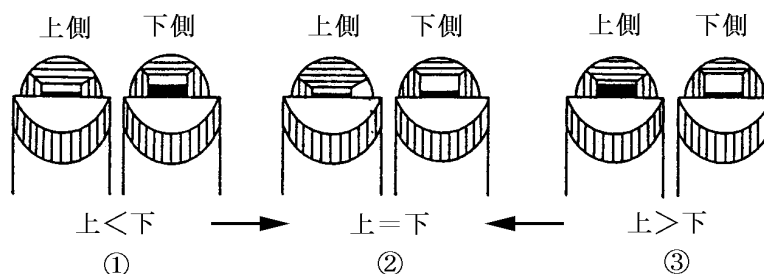
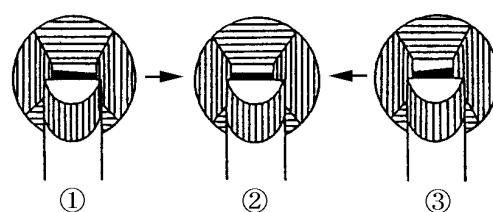
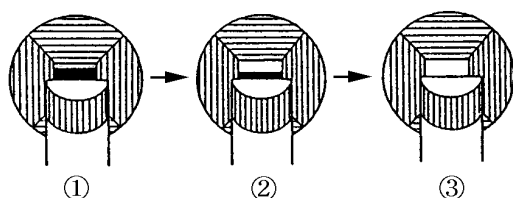
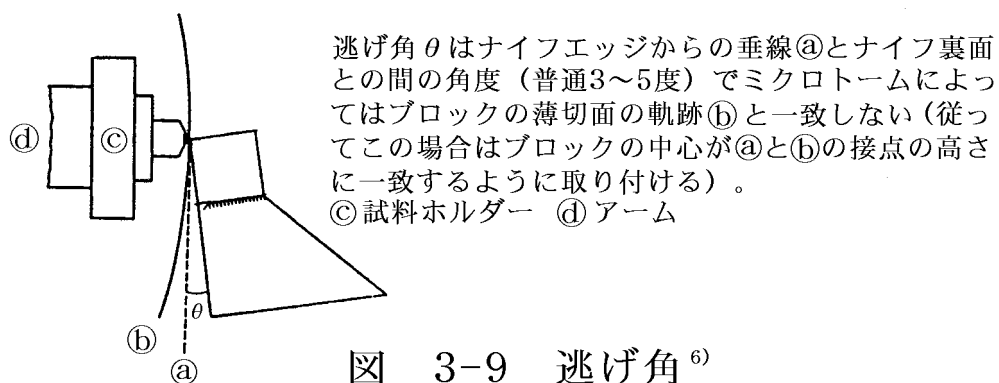
⑥ 薄切

試料ブロックおよびガラスナイフをマイクロトームのホルダーに取り付ける。

ナイフの刃先に試料面を近づけ切り始める。刃の位置を左右にずらす時は、ごくわずかなのであるが試料面と刃先との距離が変わる。

従って試料を少し後退させてから刃の位置をずらし、再び近づけて切り始める。

切片の厚さは干渉色によって判断する。普通は 60nm～100nm 位（灰色～銀色～金色）の切片をメッシュにとる。



⑦ 載物

切片をシートメッシュにすくい乾燥させる

切片のすくい方には次の2つの方法がある。

1. シートメッシュの支持膜の張ってある面を下にして、切片がシートメッシュの中央に来るように上から切片を押さえて載せる方法。

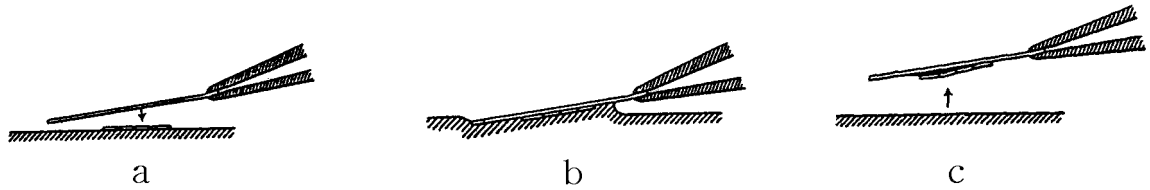


図 3-13 載物（押し付け法）⁶⁾

2. 切片から 2mm 位離れたところから垂直に 2/3 程度水中に入れる。切片の一端がメッシュに張り付いたらメッシュを垂直に引き上げる方法。

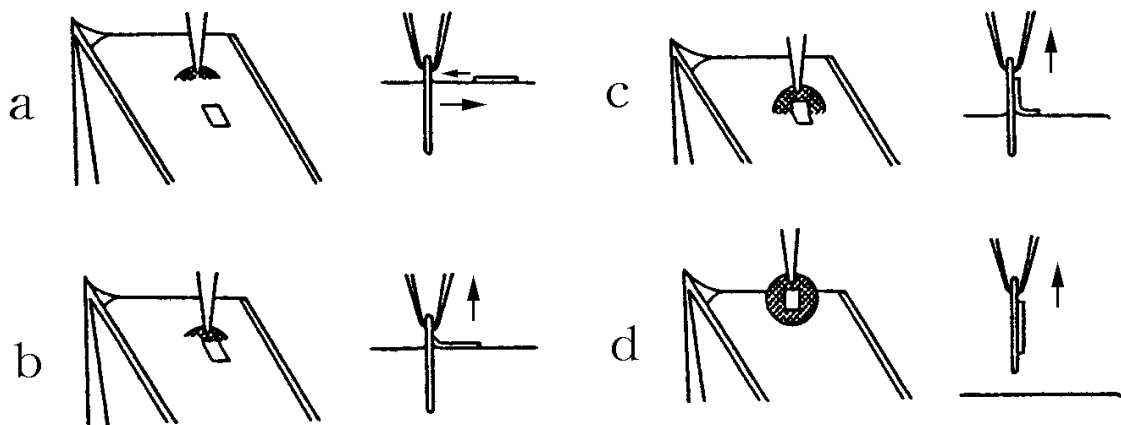


図 3-14 載物（すくい取り法）¹⁾

4. 電子染色

試料中の質量の大きい原子により電子線の散乱がおき電子線中に電子濃度差が生じ、それが拡大投影され像が作られる。生物試料のほとんどが水素、炭素、窒素、酸素などの軽い元素から構成されているので電子線の強い散乱は起きない。

そこで、蛋白質、核酸、脂質などに親和性の高い重金属を結合させ、電子線の散乱効果を大きくし、像のコントラストを上げてやれば観察が容易になる。染色に用いられる金属としては鉛、ウラニウム、タングステン、マンガン等がある。

4.1 染色法

電子染色には、薄切した切片を染める切片染色法（酢酸ウランと鉛塩の二重染色）が一般的であるが、固定と脱水の間の過程で試料をブロックの状態で処理するブロック染色との二通りがある。二重染色は単独で酢酸ウランや鉛塩を使用するよりも染色効果は強く相乗作用で全体のコントラストが高められる。

4.2 染色の実際

ウラン・鉛の二重染色を行う。

4.2.1 酢酸ウラニル染色（6.6 ②参照）

- ① シャーレの中にパラフィルムを敷き酢酸ウラニル染色液の小さな液滴をメッシュの数だけ（1回には5枚ぐらいが限度）作る。
- ② 液滴の中に切片を上にして沈めシャーレの蓋をする。10分間染色後水洗に移る。
- ③ 100%メチルアルコールを1分間ずつ3回洗浄する。
- ④ メッシュを挟んだピンセットに蒸留水をそわして流し、メッシュを洗う。水洗後余分な水を口紙の端で吸い取りシャーレに入れる。

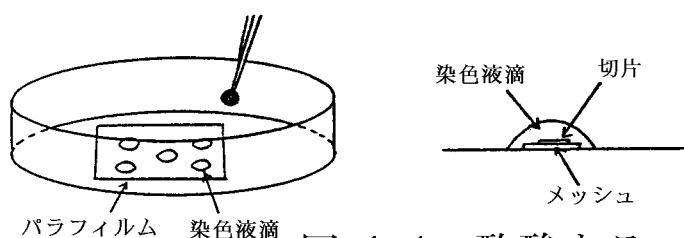


図 4-1a 酢酸ウラニル染色

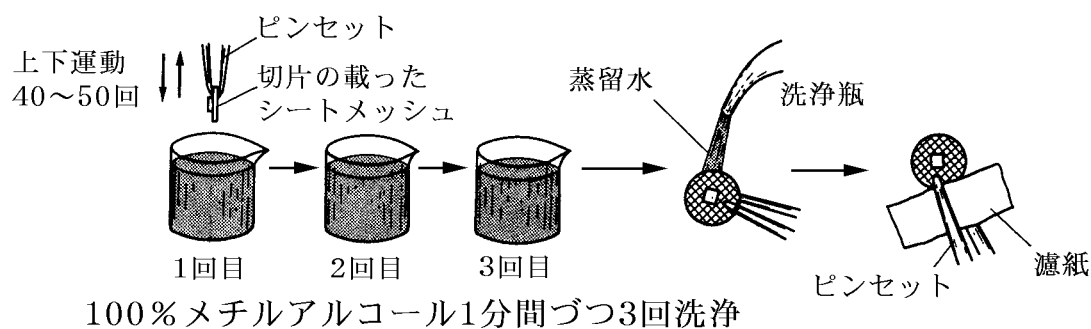


図 4-1b 酢酸ウラニル染色¹⁾

4.2.2 鉛染色

鉛染色液は、空気中の炭酸ガスと反応して水に難溶性の炭酸鉛を生じ、コンタミネーションの原因となる。それを防ぐためにシャーレの中に水酸化ナトリウムの粒を入れる。

- ① パラフィルムの上に液滴を 1 ～2 滴作りメッシュを入れ、10 分間染色する。（鉛染色

液は時間の経過に従い加染するので一度に何枚もしない。染色中はなるべく息をかけないようにする。）

- ② 蒸留水で 1 分間づつ 3 回洗浄し、最後に蒸留水で流し洗う。余分な水は口紙で吸い取り、シャーレの中に取り乾燥する。

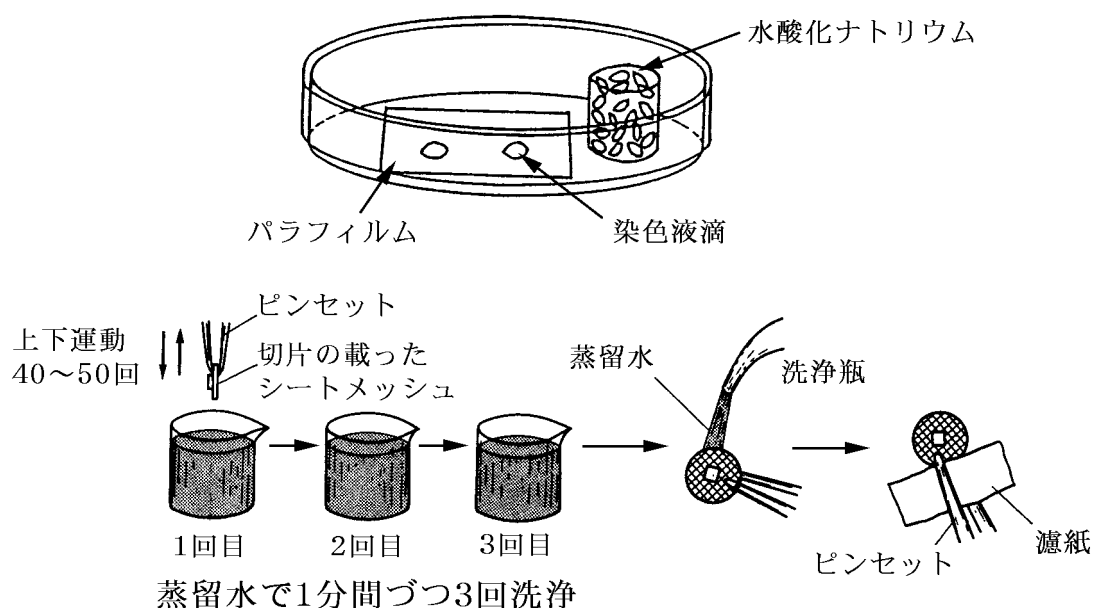


図 4-2 鉛染色¹⁾

5. カーボンの真空蒸着

電子線で切片が収縮したり破れるのを防ぐ意味からカーボン補強を行う。

支持膜と同じで切片は補強されるが、分解能、コントラストは落ちる。従ってカーボン蒸着を行うか行わないかは切片の厚さによる強弱、包埋剤の種類などにより判断する。

カーボン棒は直径 5mm の硬めのものを用い、一方は鉛筆削りで図のように尖らせ、他方はやすりで平らにみがく。

カーボンは図のように蒸着装置の支柱にとりつける。蒸着中にカーボンの接触点が離れないようにするため、弱いスプリングを用いて先端で押し合うようにする。真空排気して、 10^{-5} Torr に達したら、まず 10 V 位の電圧を加え、接触点が白熱状態になったら急速に電圧を加え、カーボン蒸着を行う。10 秒位で十分な厚さの蒸着膜が得られる。

最終的な電圧、電流値は、カーボンの削り具合によって変わるが、大体 20 V、30 A 程度である。

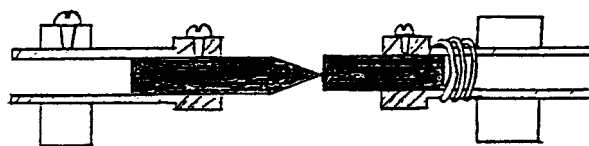


図 5 カーボンの真空蒸着

6. 試薬の調整

6.1 アルデヒド，オスミウムの二重固定

①前固定液

a. 4 %パラホルムアルデヒド，2.5%グルタルアルデヒド固定液

- | | | |
|--------|------------|--------|
| ・ 10 % | パラホルムアルデヒド | 8 ml |
| ・ 25 % | グルタルアルデヒド | 2 ml |
| ・ 0.2M | 燐酸緩衝液 | 1 0 ml |

※グルタルアルデヒドは重合化しやすく、組織の浸透性が悪くなるので、
アンプル入りのものを使い切るようにし、前固定液は要時調整する。

b. Karnovsky の固定液 (M.J.Karnovsky:J.Cell Biol.,27:137A,1965.)

- | | | |
|--------|------------|--------|
| ・ 8 % | パラホルムアルデヒド | 2 5 ml |
| ・ 50 % | グルタルアルデヒド | 5 ml |
| ・ 0.2M | 燐酸緩衝液 | 2 0 ml |

※この固定液は4 %パラホルムアルデヒドと5 %グルタルアルデヒドを含む固定液である。

※浸透圧は2010mOsm でかなり高張であるため、結果が良くない（例えば収縮する）場合には適当に（特にグルタルアルデヒド）濃度を低くする。

②後固定液 (下記を等量混ぜ合わせる。)

- | | | |
|--------|----------|------|
| ・ 2 % | 四酸化オスミウム | 2 ml |
| ・ 0.2M | 燐酸緩衝液 | 2 ml |

6.2 四酸化オスミウム水溶液

- ① アンプルはレットルをはがし、一晚洗剤の中にひたしておく。
- ② 充分流水で洗い、次に蒸留水でゆすぎ乾燥する（シャーレの中のきれいな口紙の上で）。以降、アンプルはじかに手で触れないこと。
- ③ 中心部にヤスリで傷をつけ、その部分を蒸留水で洗い乾燥する。
- ④ そのまま試薬ビンの中に入れ、ふって割る（又は、外で二つに割ってからアンプルごと入れてもよい）。
- ⑤ 再蒸留水を2～4 %になるように入れ、一晚放置して良く溶かす。

6.3 10%パラホルムアルデヒド

- ・ パラホルムアルデヒド粉末 2 g
- ・ 蒸留水 20 ml

蒸留水を60℃～70℃に加温してパラホルムアルデヒド粉末を加える。

この溶液に1N水酸化ナトリウム水溶液を数滴加えて溶解し、ろ過して放冷する。

6.4 0.2 M 燐酸緩衝液 (pH 7.4)

- ・ A 液 : 0.2 M 燐酸第1ナトリウム (NaH_2PO_4 ; M.W.=119.98) 水溶液

溶 液	1000ml	500ml	200ml	50ml
無水塩	24.0g	12.0g	4.8g	1.2g
1 水塩	27.6	13.8	5.52	1.38
2 水塩	31.2	15.6	6.24	1.56

- ・ B 液 : 0.2 M 燐酸第2ナトリウム (Na_2HPO_4 ; M.W.=141.96) 水溶液

溶 液	1000ml	500ml	200ml
無水塩	28.4g	14.2g	5.68g
12 水塩	71.6	35.8	14.3

※燐酸第2ナトリウム (Na_2HPO_4) の12水塩は不安定であるから使用しない方が
良い。

緩衝液 : A 液 (19 ml) + B 液 (81 ml)

pH の調整が必要な場合はA液 (酸性) かB液 (アルカリ性) を足して行う。

浸透圧調整剤等としてショ糖、塩化カルシウムなどを加えることもある。

※0.1M 燐酸緩衝液は0.2M 燐酸緩衝液に同量の蒸留水を加えて希釈する。

6.5 エポキシ樹脂混合液

材料は次の4種類から成る。

- ① 包埋剤：エポキシ樹脂 (EPON-812)
- ② 硬化剤：MNA(methyl nadic anhydride)
DDSA(dodecanyl succinic anhydride)
- ③ 加速剤：DMP-30 (2,4,6-tridimethyl aminomethylphenol)

混合の比率は Luft 法に従えば以下の通りである。

A液	EPON-812	62ml
	DDSA	100ml
B液	EPON-812	100ml
	MNA	89ml

A液、B液共作って良く混合し密栓して冷蔵庫の中に保存し、使用する時に混合する。

A液：B液の混合比を7：3（軟らかく重合）～3：7（硬く重合）にして硬さの調節をする。

A液、B液を作って冷蔵庫に保存して置いても粘度が高くなる。樹脂混合液の組織片への浸透を良くするためには粘度を出来るだけ低くすることが望ましい。それには使用する都度A：Bの比率より直接樹脂と硬化剤の量を硬さに合わせて計算する。

例えばA：B＝1：1で全量100ml 必要な場合は、

A液：EPON-812 $50 \times 0.383 = 19.15$, DDSA $50 \times 0.617 = 30.85$

B液：EPON-812 $50 \times 0.529 = 26.45$, MNA $50 \times 0.471 = 23.55$

EPON-812	45.5ml
DDSA	31ml
MNA	23.5ml
DMP-30	1.5ml

メスシリンダーに比重の大きい(MNA,EPON-812,DDSA) 順に入れて計量する。

ビーカに移し、最後に全量の1.5～2.0%に相当する量のDMP-30を加えマグネチックスターラーを用いて十分に混合する。混合が不十分だと硬化が不均一となり重合不全を生じる原因となる。混合が終れば真空ポンプで脱気を行う。

○包埋剤の EPON-812,DDSA,MNA,DMP-30 は全て吸湿性なのでデシケーターに入れ、冷暗所に保存する。

○DMP-30 は吸湿性のほか、酸化しやすい。新しい物は黄色か透明であるが、その色が茶褐色の色調を帯びてきたものは使用しない方がよい。

○樹脂の付いた実験器材はアルコールにつけブラッシングしエポキシ樹脂を除いてから洗剤槽に移す、余った樹脂は不用の容器にまとめ硬化してから捨てる。

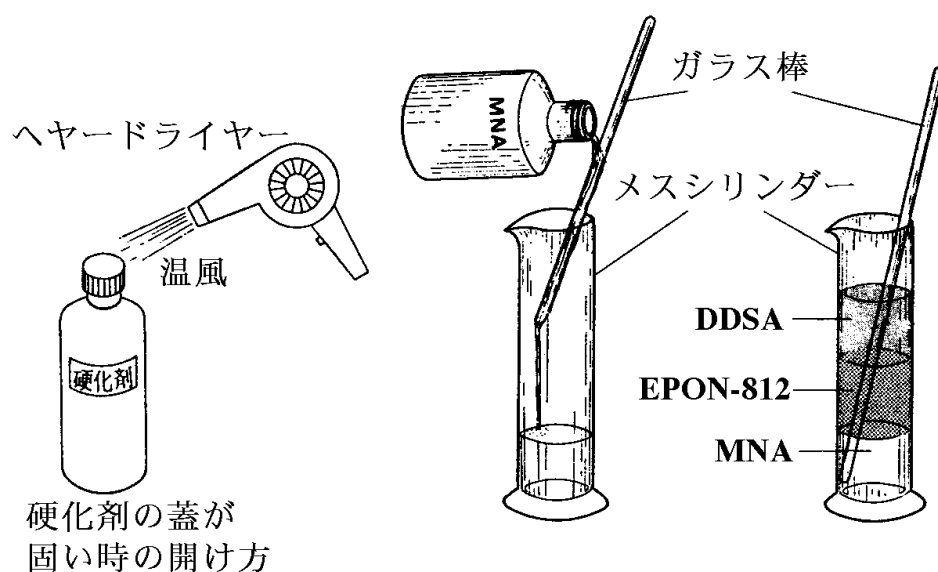


図 6 エポキシ樹脂混合液の作製¹⁾

* 実習では Taab 社が推奨している重量法による混合比率に従って作製します。

MNA	33g	66g	99g
EPON-812	48g	96g	144g
DDSA	19g	38g	57g
DMP-30	2g	4g	6g
合計	100g	200g	300g

6.6 染色液の作り方

<電顕用染色液>

① Reynold's 鉛染色液

A	: 硝酸鉛 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	1.33g
	クエン酸ナトリウム $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.76g
	蒸留水（蒸留水を沸騰後冷却）	30ml
B	: 1 N水酸化ナトリウム	8ml

50ml のメスフラスコにA液を入れ1 分間強く振とうする。30 分間時々混ぜ溶解後、B液を加え混合後さらに蒸留水を加えて全量を 50ml にする。

・ pH 12 染色時間約 10～20 分間 冷蔵庫保存 1 ヶ月

② 酢酸ウラニル染色液

メチルアルコールに 2%の酢酸ウラニルを溶かしたもの。

・ pH 3 染色時間約 10～20 分間 冷蔵庫保存 1 ヶ月

鉛、ウラン両染色液とも作った直後は切片を汚染するので1 日経ったものを使用する。
多量に作らずに 1 ヶ月間に使用する分だけ作るのが良い。密栓出来る瓶に保存する。

酢酸ウラニルは国際規制物質のため購入の際、科学技術庁の許可が必要で毎年残量を報告しなければならない。

<光顕用染色液>

◎トルイジンブルー染色液

トルイジンブルー 0.1 ～ 0.5 g を 0.1 M 燐酸緩衝液 (pH7.4) 100ml に溶解する。

Ⅱ．透過型電子顕微鏡の構造

電子顕微鏡は3つの主要部分、すなわち鏡体、真空排気系および電気系から構成されている。

鏡体は、光学顕微鏡と同様に、光源、コンデンサーレンズ、試料移動装置、対物レンズ、投影レンズより成っている。

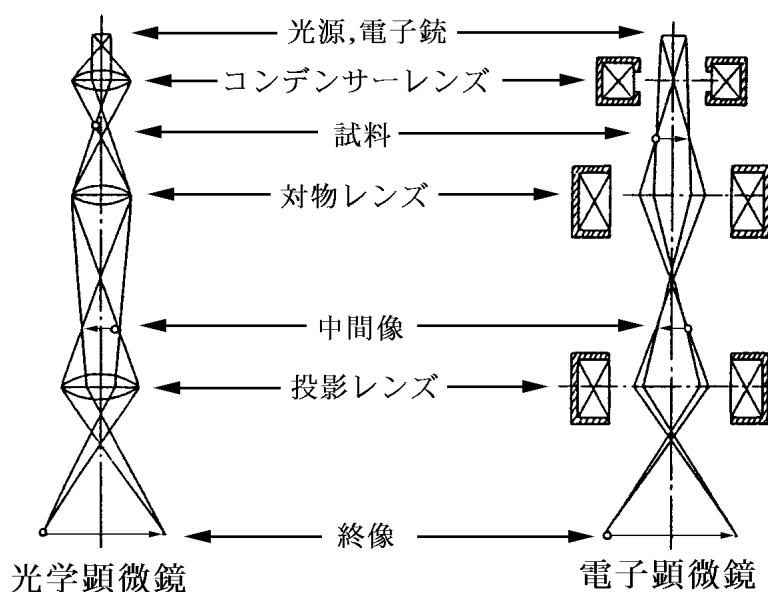


図 1 光学顕微鏡と電子顕微鏡の光学的な比較⁷⁾

1．鏡体

電子銃によって得られた電子線束は、コンデンサーレンズによって試料面に焦点を結ぶ。

試料は、電子線による照射と加熱に対して安定でなければならない。

光学顕微鏡の対物レンズと同様に、電子顕微鏡においても、対物レンズは光学系の最も決定的な要素である。それは、このレンズによって形成された像がさらに拡大されるためである。

光学顕微鏡の投影レンズ、又は接眼レンズに対応するものは、普通、中間レンズと投影レンズと称されるレンズの組み合わせである。三段階の結像が、固定された長さの鏡筒において幅広い倍率を得ることを可能にする。

光学顕微鏡の受容体は、普通、眼であり、また写真乾板である。電子顕微鏡においても、蛍光板上に形づくられた像を視覚的に観察するか、写真的に記録する。

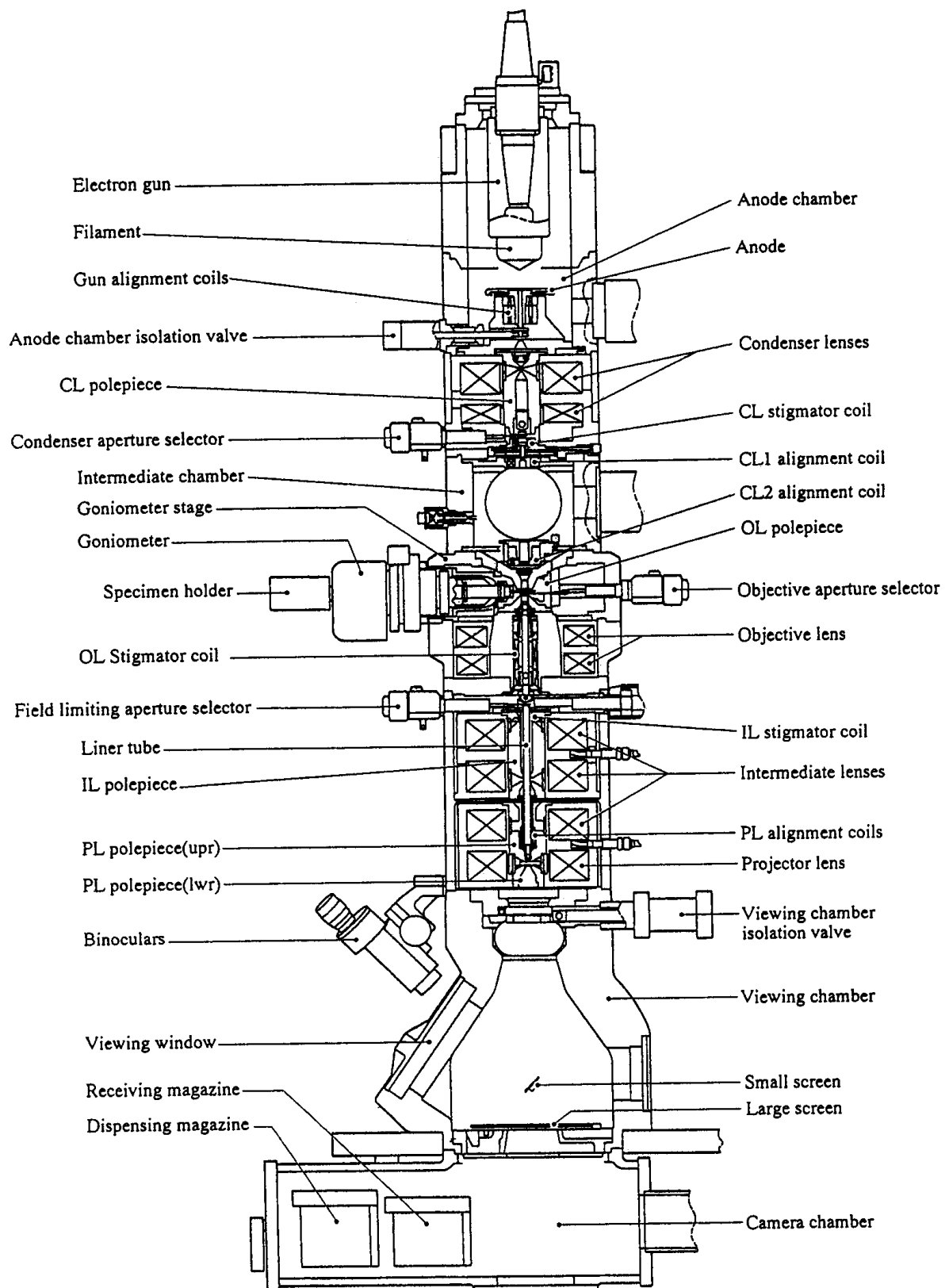


図 2 透過電子顕微鏡の断面図と各部の名称¹¹⁾

1.1 電子銃

熱電子放出が電子顕微鏡において使用される電子線の源である。

タングステンのフィラメントは、 2200°K より熱電子を放出し、さらに高温になるにつれ、熱電子放出も急速に増加する。また熔融温度 (3410°K) に近づくにつれて、フィラメントのタングステン原子の蒸発も増加する。それ故、適当な電子の流れが供給されるところに操作温度を設定してやらなければならない。

このレベル (約 2400°K) でもタングステン原子の蒸発は起こり、フィラメントの寿命を決定する。

一般的なフィラメントは、図3に示されているように、絶縁体の基盤の上に配置されたV型のタングステン線より成っている。

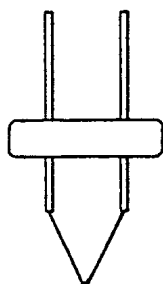


図3 フィラメントの形状³⁾

フィラメントから放出された電子の速度は遅いが、様々な速度で飛行し、電子銃において 100KV のオーダーの電位差によって加速される。加速電圧の選択は、試料の性質によって決定する。

図4に電子銃の基本的な図を示す。加熱されたフィラメントは、高い負の電位に維持されている。加速は、正の電位を電子の進行方向に与えることによってなされる。ウェーネルト(Wehnelt) は、バイアス抵抗によってフィラメントよりわずかに負の電位に維持されている。一方アノードは接地電位である。フィラメントからアノードに向かって加速された電子は、ウェーネルトの中心を通して集束する。

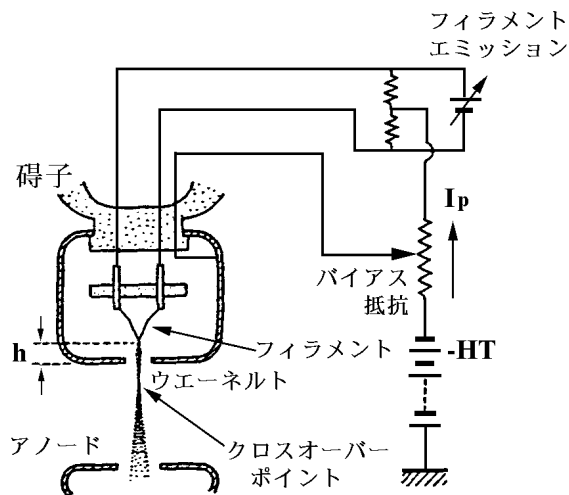


図 4 電子銃⁵⁾

図 5 において飽和点よりも上では、フィラメント電流の増加はフィラメントの過熱を引き起こすが、もはや熱電子の増加を生じない。

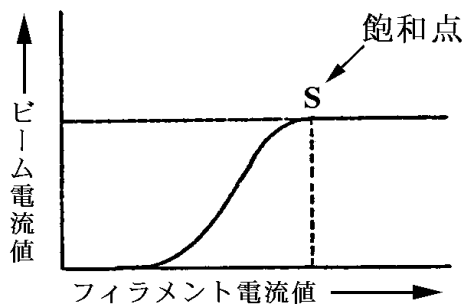


図 5 フィラメント電流とビーム電流³⁾

従って、フィラメント電流はこの飽和点よりやや高い位置に調節する。飽和点を著しく越えた電流を与えても、フィラメントの寿命を短くするだけである。

1.2 コンデンサーレンズ（集束レンズ）

コンデンサーレンズは、電子線を試料面、又はその近くに集束させ（焦点を結ばせ）像の強度（明るさ）を制御する。

コンデンサーの焦点の変化は、レンズの位置の変化によらず、レンズ電流の変化による。試料面上での照射の位置は、コンデンサーレンズの機械的な軸合わせと、レンズの近くにある偏向コイルによって決める。

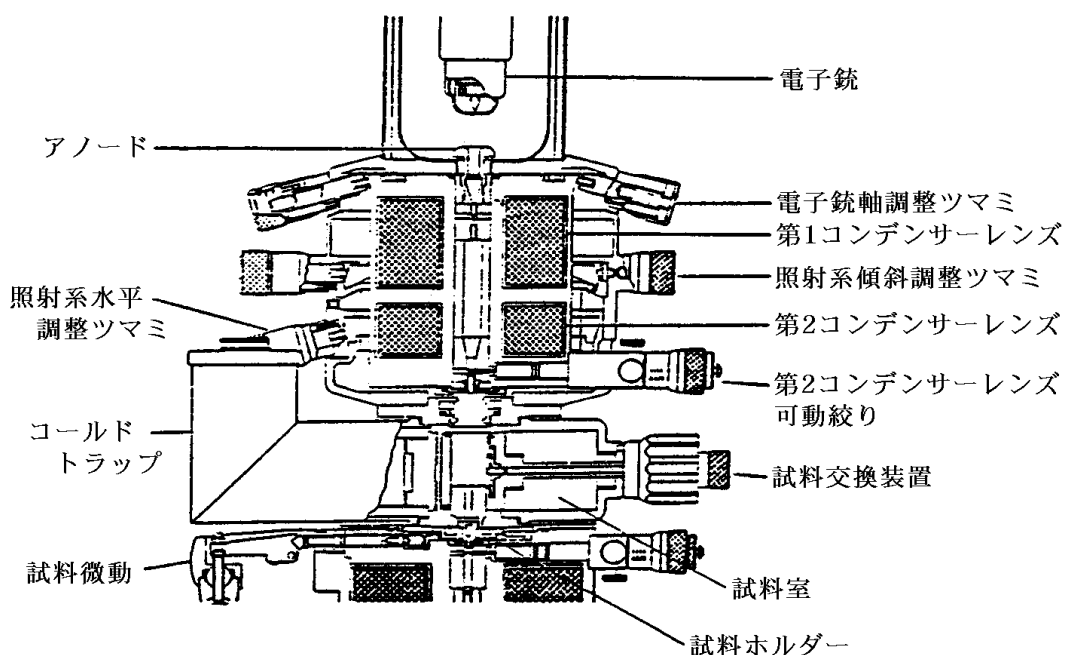


図 6 コンデンサーレンズ³⁾

1.3 対物レンズ

光学顕微鏡と同様、電子顕微鏡においても、対物レンズはもっとも決定的な光学的要素である。対物レンズが作る中間像に含まれる収差は、投影系によって拡大される。収差のうち、非点収差は対物レンズ系において補正されるようになっている。

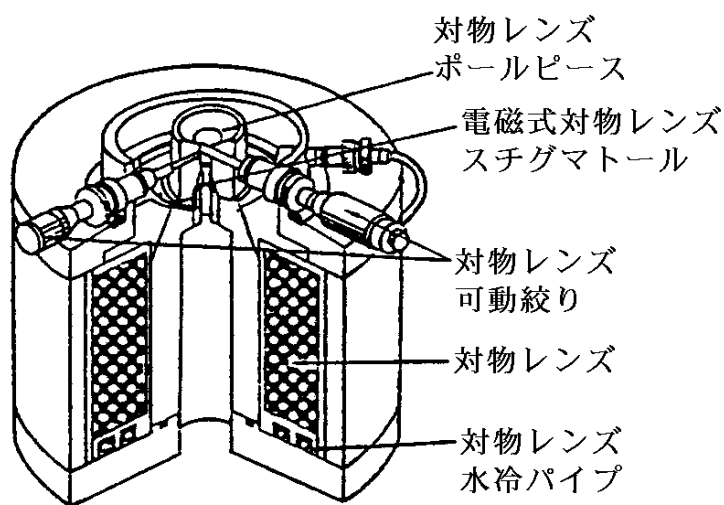


図 7 対物レンズ²⁾

1.4 中間・投影レンズ

光学顕微鏡の接眼鏡に対応するものが投影系であり、2つの要素より成っている。2つの要素はそれぞれ、中間レンズ、投影レンズと呼ばれる。

光学顕微鏡では、倍率の変換は接眼レンズと対物レンズの組み合わせによってなされる。電子顕微鏡では、投影系に与えるレンズ電流を変化させることによって、幅広く行われる。

1.5 収差

電子レンズには、大きく分けて以下の3つの収差がある。

(1) レンズ自身の収差

レンズ自身の収差は、さらに5種類に分けられる。①球面収差、②歪像収差、③非点収差、④湾曲収差、⑤コマ収差。

(2) 色収差

色収差は、電子放射の初速度の不均一や加速電圧あるいは励磁電圧が変動したり、試料透過の際、速度が変わったりすることによって生ずる波長の不均一に基づく収差である。

(3) 非対称収差

実際に作られる電子レンズは、完全な軸対称形になるとは限らず、電極、又は磁極の円孔が楕円になったり、各電極がくい違って傾斜をもったり、電荷がたまって非対称形になることが多い。非対称収差は、非対称なビームや、非対称な電磁場によって生ずる収差である。

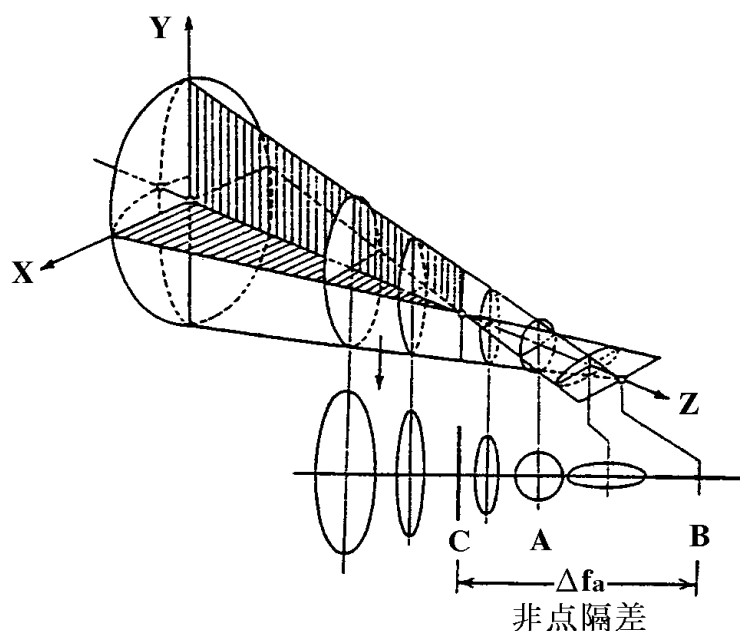
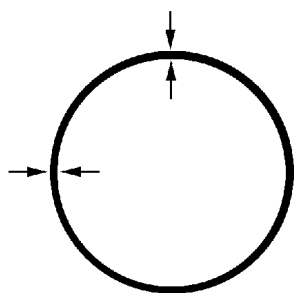
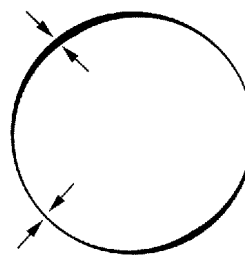


図 8 非点収差⁵⁾

マイクログリッドの膜穴の過焦点像（倍率5～10万倍）



フリンジの幅が一定
(a)非点収差が無い場合



フリンジの幅が異なる
(b)非点収差が有る場合

図 9 対物レンズの非点収差

1.6 観察記録

レンズ系を通ってきた電子線は、観察室内に置かれた蛍光板上に像を結ぶ。電子線像は蛍光体によって可視光に変換され、ガラス窓を通して観察される。また、写真フィルムを直接感光させて（電顕写真として）記録される。

カメラ室は、鏡体全体に空気を導入することなく、フィルム交換が可能となっている。

2. 真空排気系

電顕の鏡筒内は以下の理由により、高真空（ $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Torr）に保たれている。

① 電子の自由行程

電子銃により加速された電子の大気中での平均自由行程は数 cm しかない。

② 放電

ウェーネルトとアノード間に加速電圧を印加した場合、高真空でないと、放電を起こす。

③ 試料の変化

残留ガス中に有機ガスがあると、電子線の衝撃で分解され、炭素が試料上に沈着し、試料を変化させる。

④ 汚染

電子線通路が汚染されると、レンズに非点収差を起こさせたり、電子を不規則にふらつかせたりする。

電子銃内壁の汚染は微小放電を起こし、電子線を不安定にする。

2.1 真空ポンプ

高真空を保つために油回転ポンプ (Rotary pump) と油拡散ポンプ (Diffusion pump) の組み合わせにより、鏡体は排気されている。

2. 1. 1 油回転ポンプ

油回転ポンプは、油で満たされている (固定子中の) 回転子の回転により、気体の吸入と、排気を連続的に繰り返す。到達真空度は 10^{-3} Torr である。

2. 1. 2 油拡散ポンプ

油拡散ポンプは、底部に入っている油をヒーターで加熱し、その蒸気を圧力の低い広がった空間に、ノズルから超音速で噴出させる。この噴流により吸入した気体を圧縮し、排出口に運びだす。油の蒸気自身は、周囲を取り巻く冷却水により冷やされ、油として底部にもどる。排出口の圧力は、 10^{-1} Torr 程必要なため、油回転ポンプを接続する。到達真空度は 10^{-7} Torr である。

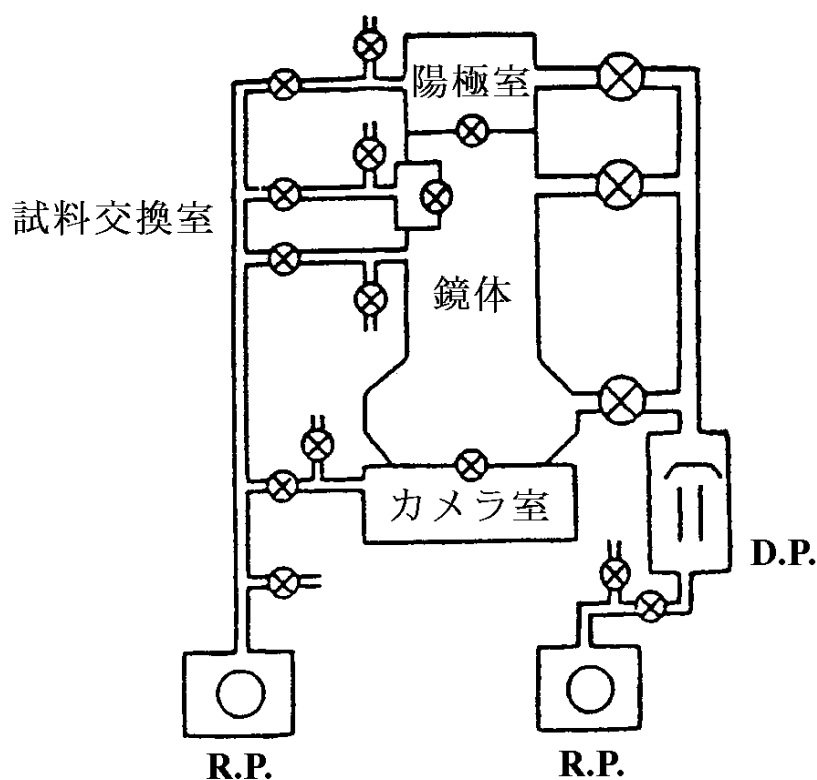


図 10 真空排気系⁵⁾

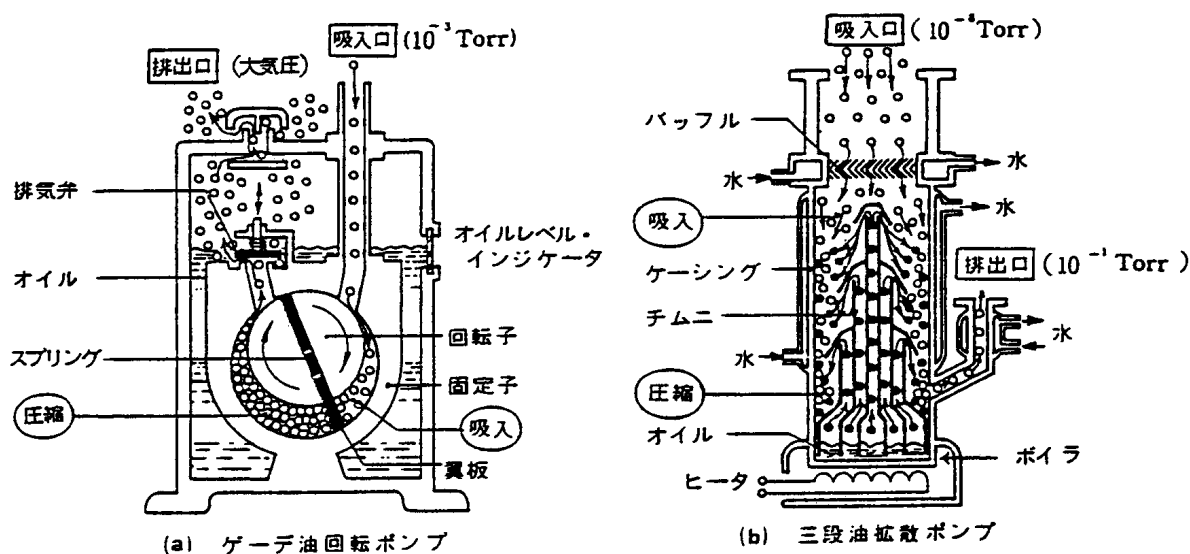


図 11 真空ポンプの構造¹⁰⁾

2.2 真空計

電子顕微鏡には真空排気系を制御するためや鏡体の真空度をモニターするために真空計が取り付けられる。

真空計には低真空用のピラニー計、高真空用のペニング計、電離真空計がある。

2.2.1 ピラニー計 (Pirani 計)

気体の圧力によってフィラメントに電流を流して加熱すると（管内の）気体の圧力によって熱伝導が変わり、フィラメントから逃げる熱量が変化する。高真空になると気体による熱伝導が小さくなるのでフィラメントの温度が高くなり、電気抵抗も高くなる。この電気抵抗の変化を読み、真空度を測定する。測定範囲は、 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ Torr である。

2.2.2 ペニング計 (Penning 計)

陰極からでた電子線は、電界と磁界によってラセン運動をしながら、ループ状の陽極の間を通過して、両端の陰極の間を何回も往復しながら気体分子を電離する。この放電電流を読み、測定する。測定範囲は、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ Torr である。

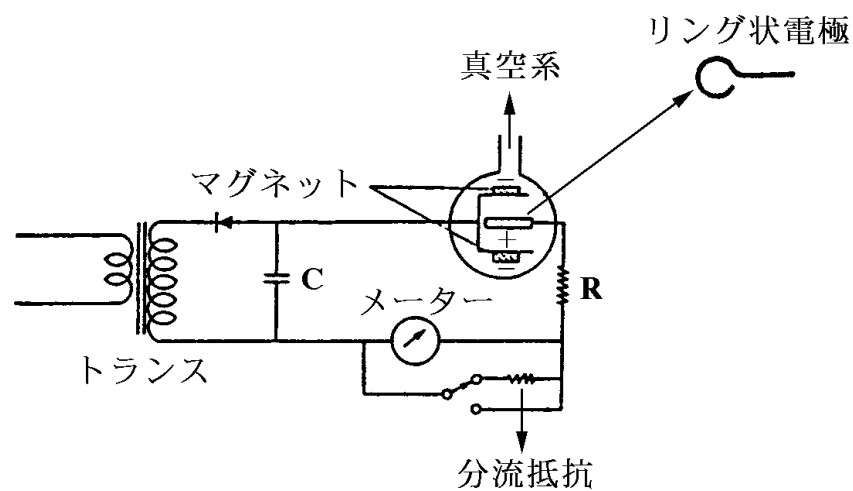


図 12 ペニング計³⁾

2. 2. 3 電離真空計

フィラメントを加熱して、熱電子を放出させる。電子がグリッドにつかまる間に、残留気体分子に衝突してイオン化する。このイオン電流から真空度を測定する。測定範囲は、 $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Torr である。

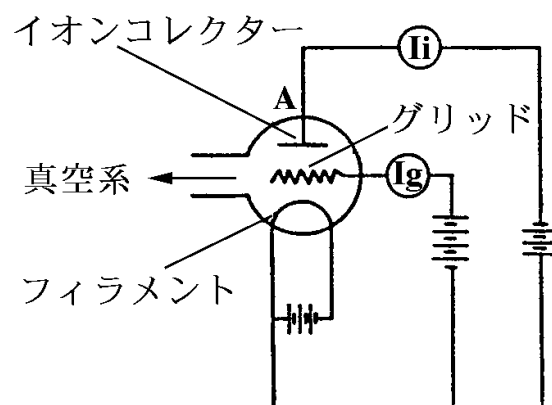


図 13 電離真空計³⁾

Ⅲ．写真処理

1．フィルムの処理

電顕用フィルム（コダック・エレクトロン・マイクロスコープ・フィルム 4489）

の現像方法に従って処理を行う。

現像から定着までの処理は安全灯下で行う。

① 現 像

現像液 D-19（コダック D-19 原液を水で 1 : 2 に希釈）を用いて液温 20℃で 4 分間現像する。

現像中は現像ムラを防ぐために一定の方法で液を攪拌するか、規則的にフィルムをゆり動かすことが大切である。これは停止、定着から水洗まですべての処理過程においてあてはまる。

＜注意＞ 電顕フィルム（フジ FG）は現像ムラを生じやすいので、入れた直後に 2～3 回上下に振り動かし、その後は静置する。

② 停 止

フィルムを定着液（酸性）に入れる前に、アルカリ性である現像液を洗い流し、定着液の寿命を長くすると共に定着ムラを防ぐために 18～21℃の流水でフィルムを 1 分 30 秒間すすぐ。

③ 定 着

未感光の乳剤（ハロゲン化銀）を除去するために液温 18～21℃の定着液（コダック F i x e r）で 8～10 分間定着する。定着が終わればフィルムを明るいところへ出しても差し支えない。

④ 水 洗

定着液や溶解した乳剤を除去する為に、流水で 20～30 分間水洗する。

⑤ 乾 燥

水洗後、乾燥中の水滴ムラ防止のためにフィルム用水切り液（ドライウエル）にフィルムを 30 秒間浸してから乾燥する（フィルム乾燥機を用いれば約 1 時間で乾燥できる）。

2. 引伸しプリント処理

2.1 印画紙の種類

① R Cタイプの印画紙

印画紙には昔から使われているバライタ印画紙と新しく普及してきたR Cタイプの印画紙がある。

R Cタイプの印画紙は印画紙の厚紙をポリエチレン樹脂でコーティングしてあり、その事により現像時間等の処理時間が短縮され、乾燥も自然乾燥で処理出来るという従来のバライタ印画紙にない利点を持った便利な印画紙である。

② 号数（軟調と硬調）

印画紙にはそれ自体のトーンが軟調のものから硬調のものまで何種類かあり、それは印画紙の号数で表示されている。

1号が最も軟調で2号、3号、4号と号数が大きくなるほど硬調になる。

従って、ネガの調子に合わせて軟調のネガには硬調の印画紙を、標準的な調子のネガには中間調の印画紙を、また硬調のネガには軟調の印画紙といった具合に組み合わせて用いる。

2.2 印画紙の現像処理

R Cタイプの印画紙であるフジブロWPペーパーの処理方法を示す。現像から定着までの処理は安全灯下で行う。

① 現 像

現像液コレクトール（コレクトール原液を水で1：1に希釈）を用いて液温20℃で90秒間現像する。

露光、液温が適正であれば現像を開始して20秒後位で画像があらわれ40秒後位で画像が安定してくる。この時間までは印画紙をピンセットでゆり動かしながら攪拌する。

② 停 止

液温15～25℃の停止液（1.5%酢酸水溶液）に印画紙を入れて5～15秒間攪拌する。

③ 定 着

液温15～25℃の定着液（フジフィックス）に印画紙を入れて約5分間攪拌する。

④ 水 洗

流水で印画紙を5～10分間水洗する。

⑤ 乾 燥

自然乾燥又は温風（60～70℃）で乾燥する。

2.3 コンタクトプリント

ネガの良否を見分けるために行うが、このプリントは撮影記録としてネガといっしょに保管しておけばネガ整理の際に便利である。

- ① 引伸し機を操作して、フィルムサイズよりやや大きめの照射面を作る。
- ② 照射面に印画紙を置き、その上にネガの膜面を下にして並べ、その上にガラス板を重ねる。
- ③ 引伸し機を点灯し適当な露光を与える。
- ④ 2.2 印画紙の現像処理の要領に従って現像を行う。

2.4 引伸しプリント

① 準備

- (1) 引伸すネガと引伸し機のネガキャリアをブロアーブラシ等で汚れを除く。
- (2) ネガをネガキャリアに装填する。
- (3) 引伸し機を操作してイーゼル上に撮影像を写し出し構図を決める。
- (4) 引伸しレンズの絞りを開放にして、フォーカスノブを操作し、フォーカスを合わせる。正確にフォーカスを合わせるには、フォーカスルーペを用いてネガ粒子を見ながら行う。
- (5) 引伸しレンズの絞りを開放から二段絞り込む。

② 試し焼き

本焼きに入る前に、適正な露出を与えるのに必要な露光時間を決める必要がある。その為に行うのが試し焼きである。

- (1) ネガの調子にあった印画紙をイーゼルにセットする。
- (2) 印画紙の上を厚紙でおおい順次ずらしながら露光を与える（段階露光）。

ずらす間隔は1～1.5cm 位が適当で、露光時間は引伸し倍率やネガの濃さによって異なるが、0.5～2秒の露光を与える。

- (3) 2.2 印画紙の現像処理の要領で現像を行い、露光時間を決める。

③ 本焼き

- (1) イーゼルの位置やフォーカスをもう一度確認する。
- (2) 印画紙をイーゼルにセットする。

- (3) 試し焼きで得られた露光時間を引伸しタイマーにセットする。
- (4) 露光ボタンを押し露光を行う。
- (5) 2.2 印画紙の現像処理の要領で現像を行う。

2.5 ポジスライド

印画紙の代わりに、電顕用フィルムを用いれば簡単にポジスライドを作製することが出来る。露光方法は2.3 コンタクトプリントの要領で行い、現像は1.フィルムの処理の要領で行う。

本文は下記の図書を参考にして作成致しました。

尚、図書右肩の番号は該当する番号の図書より引用しました。

《 参考図書 》

1) 電子顕微鏡の試料作成法

串田著

ニュー・サイエンス社

2) 電子顕微鏡学実習

東，遠山著

共立出版

3) 臨床検査講座 別巻 電子顕鏡法

宮本，平光著

医歯薬出版

4) 実験生物学講座（2） 光学・電子顕微鏡実験法

新津・平本編

丸善

5) 医学・生物学電子顕微鏡観察

日本電子顕微鏡学会関東支部編

丸善

6) 改訂2版 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

7) 病理技術マニュアル5 病理学領域における電顕応用

日本病理学会編

医歯薬出版

8) Optical Methods in Biology

ELIZABETH.M.SLAYTER

WILEY-INTER SCIENCE

9) 電子顕微鏡試料技術集

日本電子顕微鏡学会関東支部編

誠文堂・新光社

10) J E M-100 C X 取り扱い説明書

日本電子

11) J E M-1220 取り扱い説明書

日本電子

12) 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

朝倉書店

○電子顕微鏡診断学 ―基礎と実際―

日本医科大学WHO電顕診断学センター編

藤田企画出版

・分冊もあります。

○医学・生物学領域の電子顕微鏡操作マニュアル

水平敏知編著

講談社サイエンティフィク

○透過電子顕微鏡生物試料作製ハンドブック

永野俊雄監訳

丸善

○電子顕微鏡学事典

橋本初次郎・小川和朗編集

朝倉書店

○月刊 細胞

ニュー・サイエンス社