

## 第 25 回 九州電子顕微鏡技術研究会 抄録

10:02-11:00 特別講演 (座長：金丸 孝昭)

### SEM で TEM 像？ 樹脂包埋生物標本の SEM 組成観察による 2D・3D 構造解析

○太田 啓介 (久留米大学医学部解剖学講座)

我々は SEM で TEM と同様の 2 次元構造情報を取得する Block Face Image (BFI) とよばれる観察法に取り組んでいる。この方法は超薄切片を作ることなく組織像を得られるだけでなく、FIB と組み合わせることでトモグラフィーのような 3 次元解析へも応用できる有効性の高い観察法である。

医学・生物学分野で SEM 観察と言えば、二次電子による凹凸像観察が一般的であるが、近年の低加速電圧 SEM 観察技術の進歩により、このような新しい観察が可能になった。この BFI は平滑な試料断面から得られる SEM の反射電子組成コントラスト像である。重金属で en bloc 染色した樹脂包埋生物試料の表面に電子線を照射すると、細胞の膜やタンパク質複合体などの構造に一致して高いシグナルが得られる。分解能の高い BFI を汎用 SEM で取得することは従来難しかったが、我々は「減速法」を用いることで、汎用 FE-SEM で 5nm 程度の分解能を持つ BFI が得られることを示してきた (加速電圧：<2kv, プローブ電流:10pA)。このような BFI 観察は SEM と TEM の利点を兼ね備えており、従来よりも確実性の高い組織観察を可能にすると考えている。

例えば、SEM の特徴を持つ BFI 観察は容易に且つ極めて広範囲な領域を詳細に観察することができる。組織構造を俯瞰的に観察することでその特徴を大局的につかみ、且つ、統計的に解析することも可能になる。TEM の局所観察では、像解釈の確実性を高めることが重要であるが、そのためには、多数の断面観察、また Correlative Microscope のような光学顕微鏡から電子顕微鏡への連続観察が必要であった。BFI による広範囲観察はこのような問題に対して有効な手段となり得る。

さらに FIB/SEM トモグラフィーへの応用により得られる組織の大規模な 3D 構造は、TEM の一断面からだけでは予想しにくい組織内部の構造を正確に理解することを可能にし、従来の観察で予想されてきた組織構造の真偽を高い確度で検証することができる。

このような BFI を用いた 2D, 3D の解析の実例を紹介し、その原理と現状について解説する。

### 走査型電子顕微鏡による樹脂包埋試料平面観察のための新たな染色の試み

○都合 亜記暢<sup>1</sup>, 東 龍平<sup>1</sup>, 太田 啓介<sup>2</sup>, 中村 桂一郎<sup>2</sup>,  
(<sup>1</sup>久留米大学医学部電子顕微鏡室, <sup>2</sup>久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門)

【背景・目的】 *en bloc* 染色を行った平滑な生物試料表面を走査電子顕微鏡 (SEM) の反射電子 (後方散乱電子) モードで観察すると、透過電子顕微鏡 (TEM) に類似した構造情報を得ることができる。この観察方法 (Block Face Imaging: BFI) はブロックの表面を直接観察するため、超薄切片の作製が必要なく、グリッドの影を気にせず広範な組織構築を解析することが可能な観察法である。この観察法において現在、おもに生体膜の観察に最適化した染色法は開発されているものの、タンパク複合体など膜以外の構造物に適した染色法は確立していない。そこで、様々な *en bloc* 染色法を組み合わせることで試料を染色し BFI により細胞の内部構造がどのように観察できるのかを比較・検討することを目的とした。

【材料・方法】 試料にはラット肝臓を用い、half *Karnovsky* 液にて経心臓灌流固定、フェロシアン化カリ添加オスミウム酸後固定をした。1%または4%の酢酸ウラン浸漬による *en bloc* 染色を行った。速やかな脱水後、さらに、後染色としてリンタングステン酸または過マンガン酸カリウムによる *en bloc* 染色を施し、EPON812 樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームにより面出しした試料は、カーボン蒸着の後、SEM (Quanta3DFEG, FEI 社; 加速電圧 3~7 kV, BD 500V, 反射電子モード) にて観察した。

【結果】 全体的な S/N 比は酢酸ウランを比較した場合 4%において良好な結果が得られた。後染色においては、リンタングステン酸処理をしたものでは膜コントラストは高いものの核内構造の染色性は減弱した。過マンガン酸カリ染色標本では、試料が割れやすく、標本の平滑性を得ることが困難であったため、良好な像を得ることはできなかった。脱水後の後染色によって BFI 像のコントラストに影響があることが判った。

### 細孔内表面有機修飾メソポーラスシリカの TEM-EDS 分析

○牧 禎<sup>1</sup>, 富永 洋一<sup>2</sup> (<sup>1</sup>日本電子株式会社, <sup>2</sup>東京農工大学大学院工学研究院)

#### 【背景】

メソポーラスシリカは二酸化ケイ素からなる均一な細孔を持った多孔質物質である。細孔内部にバルク環境と異なる広大な表面積を有し、かつ安全・安価なため、新機能性材料への応用研究が盛んに行われている。例えば、細孔内表面にスルホ基含有高分子をカップリングさせたスルホ基修飾メソポーラスシリカ (SMPSi) を利用した電解質膜は高いプロトン伝導度を示し、燃料電池の基材として期待されている。しかしこの電解質膜は、合成方法を変えるとプロトン伝導値に違いが見られ、その原因がはっきりしていない。そこでスルホ基含有高分子の分布を調べることでプロトン伝導度の違いの原因を調べる必要性が出てきた。

#### 【実験方法】

合成方法の異なる二種類の SMPSi を使って比較した。SMPSi をエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームで均一な厚さ 70 nm にスライスした。観察は電界放出型 TEM (JEM-2200FS, JEM-2800) を使用した。EDS 分析 (JED-2300, DrySD100GV) では高分子鎖末端に含まれる硫黄元素 (S) に注目した。

#### 【結論】

TEM 観察により、SMPSi の各細孔径・細孔間隔を決定した。EDS 分析により、細孔側壁周辺に S が多く存在していることを確認した。また測定した二種類の SMPSi で S の量に違いが見られた。この量比と IEC (Ion-Exchange Capacity) で決定したイオン交換容量との間に相関関係が認められたので、スルホ基の量がプロトン伝導度に影響することが示唆された。

### 卓上顕微鏡 Miniscope<sup>®</sup>TM3000 の生物試料観察へ応用

○上村健 (株式会社日立ハイテクノロジーズ)

絶縁物試料や含水試料を、試料前処理を簡略化して迅速な観察が可能な低真空 SEM は、多くの分野で活用されています。

今般、日立ハイテクノロジーズの卓上顕微鏡、Miniscope<sup>®</sup>TM3000 の低真空機能を生物試料の観察において最大限に活用できるよう、オプションのクールステージを発売いたしました。

今回はこのクールステージを中心として、3次元画像表示機能(3D-VIEW)、エネルギー分散型 X線分析装置 (EDX)、光学顕微鏡用組織切片の観察等、Miniscope<sup>®</sup> TM3000 を用いた最新アプリケーションをご紹介します。

### SEM/FIB 複合装置のソフトマテリアルへの応用

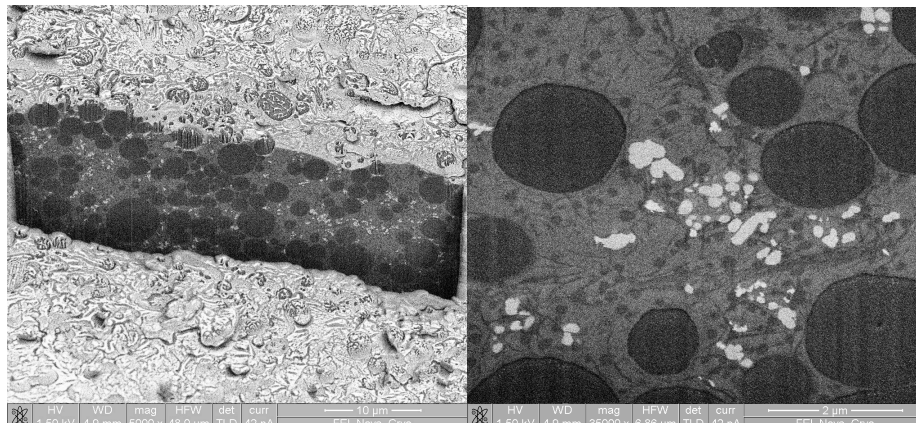
○村田 薫 (日本エフイー・アイ株式会社マテリアルサイエンスビジネスユニット)

#### 【要旨】

FIB はナノメートルオーダーでイオンビームのスキャン位置を制御できることから、TEM や SEM の観察用の試料作製ツールとして電子顕微鏡ユーザに広く使用されている。特にピンポイントの TEM や SEM の観察が求められる解析には手軽に試料準備ができることから用いられることが多い。しかしながらソフトマテリアルの分野では Ga 照射による試料の熱ダメージが起り、試料の本質を観察できないケースもでてくる。これは TEM に限らずに極低加速電圧の観察を可能とする最近の高分解能 SEM においても、ダメージによりその性能を發揮できないでいる。そこで我々は、試料加工時の熱ダメージを減らすために、液体窒素冷却によるステージを FIB に取り付けその効果を調べている。

FIB は1つの加工断面を作製するだけでなく、連続スライスさせることで SEM を搭載させた FIB では三次元観察も行うことができる。この観察手法では等間隔の厚みに切削することが重要であるが、ソフトマテリアルでは、加工面の熱影響により材料そのものがシュリンクし等間隔の加工が不可能になる。こういった場合にも冷却ステージにより試料を凍結させて加工することでシュリンクを回避できる。

発表では、このような事例やこれまで我々が取り組んできたソフトマテリアルを中心に冷却ステージを利用した FIB 加工の事例を方法の説明を交えて紹介したい。



観察事例：乳液の Cryo 断面 SEM 観察

### 原子間力顕微鏡(AFM)による生体材料の3次元構造と物性の同時観察

○川口 哲成 (ブルカー・エイエックスエス株式会社 ナノ事業部)

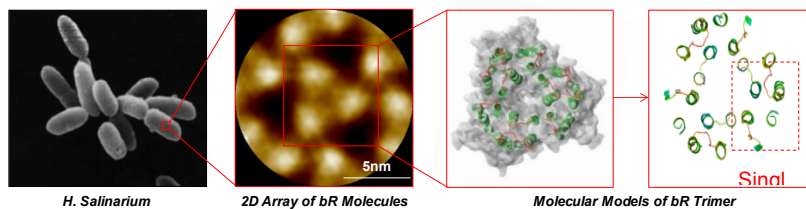
#### 【背景】

原子、分子スケールで物質表面の3次元の形状評価ができる走査型プローブ顕微鏡が世に出て、25年余り経った。SEMやTEMに比べてその歴史は浅いが、培養液中で生細胞が観察できる、形状測定とともに生体材料の弾性率や吸着といった機械特性が観察できるという、他の顕微鏡には無い特徴がある。また、これまでのAFMと比較して、ブルカー社が2010年に世界初リリースした新しいAFMの測定モードであるピークフォーススタッピングが、生体材料のアプリケーションに非常によく適応するようになった。この2つにより、生体材料の研究ツールとしてAFMの使用が拡がり始めた。細胞レベルから分子レベルまで、原子間力顕微鏡(AFM)を使ってどのようなことができるかをご紹介します。

#### 【実験方法】

ブルカー社のMutiMode8システム、及びCatalystシステムによる溶液中のAFM観察

#### 【結論】



### 演題(最新のエネルギー分散型X線分析装置の特長とアプリケーション)

宮坂真太郎 (株式会社堀場製作所)

#### 【要旨】

近年、エネルギー分散型X線分析装置の検出器として、シリコンドリフト検出器(SDD)が製品化され、広く使用されるようになってきた。SDDは、従来のSi(Li)検出器に比べ、エネルギー分解能が高く、高計数率のX線取込みが可能である。また、ペルチェ素子による冷却(-数十度)で動作し、液体窒素による冷却が不要であるという特長をもつ。また最近では、大型のSDD検出素子が製品化され、従来では分析が困難であった、X線発生量の少ない条件(低加速電圧、高倍率)においても短時間で測定ができるようになってきている。測定用のソフトウェアの発達もめざましく、測定中にスペクトルのバックグラウンドやピーク分離の処理を行ったマッピング像を取得できるようになっている。講演では、大型のSDD検出器や新型ソフトウェアの特長と、その特長を生かしたアプリケーションを紹介する。

### 電子顕微鏡用カメラのご紹介

○原 和弘 (所属 浜松ホトニクス株式会社)

#### 【背景】

現在、透過型電子顕微鏡 (TEM) における撮像装置として、CCD センサを用いたカメラが広く用いられている。しかし、近年では半導体プロセス品質や技術の向上により、これまでの CMOS センサの常識を覆す低ノイズ、高画質な CMOS センサを使用したカメラが開発されており、明視野から微弱な蛍光までの幅広い光領域でのイメージングや計測に対応するようになってきている。浜松ホトニクス (株) では、光計測用の各種 CCD カメラと、最新の半導体プロセスを使用した CMOS カメラ、ORCA-Flash2.8 と ORCA-Flash4.0 を販売しており、これらのカメラの特長と TEM への撮像装置としての可能性を説明する。

#### 【結論】

高速、高感度、高解像度、低ノイズ特性を併せ持つ CMOS カメラは、TEM の撮像装置としては最適と考えられる。今後は、これまで培ってきた真空技術、シンチレータ作製技術、カメラ開発技術を融合し、ファイバーカップリング型のボトムマウント CMOS カメラの開発に注力する。



### 新カメラシステムを搭載した透過電子顕微鏡の機能

○濱元 千絵子 (日本電子株式会社 EM 事業ユニット)

我々は、生物分野からポリマー、ナノテクノロジー、最先端材料まで幅広い分野で活用できるように加速電圧 120 kV の透過電子顕微鏡 (TEM) *JEM-1400Plus* を新たに開発した。この TEM は新しいカメラシステムを搭載しており、以下の特長を持っている。

- ① 視野探し用にカメラを繁雑に切り替えることなく、 $\times 10$  から  $\times 1.2M$  までの倍率を 1 台のカメラで観察可能
- ② さまざまなオート機能 (オートフォーカス、オート露光、オートモニタージュなど)、撮影した画像のサムネイル表示、測長ツールといった本体制御とカメラが連携して動作する統合化された操作環境を実現
- ③ TEM の操作に最適化したシンプルな操作パネルを新たに開発
- ④ 撮影した画像をオフラインで閲覧・編集する為の、Viewer ソフト「JEOL SightX」が標準搭載

また、新規に開発された本体及びカメラシステムの他に以下の特長を併せ持っている。

- ① STEM 機能が搭載可能
- ② TEM に最適設計されたエネルギー分散形 X 線分析装置 (EDS) が搭載可能

以上のように *JEM-1400Plus* では、新たに開発された機能と分析機能を駆使し、高コントラスト TEM/STEM 観察や高分子複合材料の STEM 観察や分析に威力を発揮することが期待される。

## 光学顕微鏡の限界を超えた超解像顕微鏡の技術

○及川 義朗 (所属：株式会社ニコン ハイサイエンス営業本部 アプリケーション技術部)

### 【要 旨】

光学顕微鏡の解像力の限界は光の回折により約 200nm であった。以前よりこの理論上の解像力限界を打ち破るべくさまざまな手法が考案されてきた。近年そのうちのいくつかの技術は実際に顕微鏡メーカーが製品として開発および市場に販売を開始して、それらは「超解像顕微鏡」という新しい製品分野として認識されつつある。超解像顕微鏡に使われている基本原理はいくつかあるが、(株)ニコンは、それらのうち「構造化照明顕微鏡法」を用いて製品名「N-SIM」を、および、「ローカライゼーション顕微鏡法」を用いて製品名「N-STORM」を発表した。

本講演では、超解像顕微鏡のためのいくつかのアプローチを紹介した上で、特に構造化照明法とローカライゼーション法についてその詳細を紹介し、それらを元に開発された「N-SIM および N-STORM」の製品の詳細について紹介する。

### 【結 論】

超解像顕微鏡は、従来の光学顕微鏡の 200nm という解像限界を超えて 100nm 以下の解像度をもつ顕微鏡である。ニコンは N-SIM、N-STORM という 2 種類の超解像顕微鏡を発表した。N-SIM は XY 方向約 100nm、Z 方向約 300nm と、従来の 2 倍の解像度を、N-STORM は XY 方向 20nm、Z 方向約 50nm と、従来の約 10 倍の解像度を実現した。

## その他のご案内

【会場までの道順】\*なるべく公共機関をご利用下さい。

公共機関利用の場合

<http://www.hosp.kyushu-u.ac.jp/access/index.html>

お車の場合

正門から入構します。駐車場は有料です。「研究会参加のため」ということで東門からも入れますが、この場合、守衛所で所属や用務を記入する必要があります。駐車料金は正門から入る場合と同じだと思います。半日駐車すると 2000 円ほどになります。

### 【地図】

馬出(病院)キャンパス 基礎A棟 1F 第1講義室 (下記地図の3番です)

<http://www.kyushu-u.ac.jp/access/map/hospital/hospital.html>

### 【連絡先】

<平日> 事務局 電話： 092-642-5740

アドレス： [kanemaru@mccore.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:kanemaru@mccore.med.kyushu-u.ac.jp)

<当日> 事務局・金丸(携帯：080-5252-6649)

### 【懇親会】

<懇親会会費> 5,000 円

<懇親会会場> 「石蔵酒造博多百年蔵」

URL： <http://www.ishikura-shuzou.co.jp/enkai.shtml>

電話： 092-651-1986

\*研究会終了後、送迎バスにて懇親会会場へ向かいます。

研究会会場では、携帯電話の電源は OFF またはマナーモードに！