

第 27 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：中村 桂一郎)

ハイブリッド SEM への挑戦

○金丸 孝昭 (九州大学病院 中央形態分析室)

ここ十数年来開発・研究を行ってきた、走査型電子顕微鏡 (SEM : Scanning electron microscope) のハイブリッド化に向けた私の挑戦を紹介する。

蛍光光学顕微鏡 (FOM:Fluorescence optical microscope) による観察法には、GFP (Green Fluorescent Protein) による蛍光標識方法や免疫組織化学的観察手法 (主に蛍光抗体法) などがあり、これらは組織や細胞、あるいは分子観察における一般的な可視化技法である。FOM 観察により同定される蛍光標識領域を電子顕微鏡にて高倍率で詳細に観察する場合、同一部位を特定するには困難を伴う。これらの問題を克服するために、光顕観察から電顕観察まで、標識位置を確認し即座に拡大観察し、形態的特徴から関心領域の同定が短時間で可能になる装置、つまり電子線と同じ光軸上に組み込まれた蛍光顕微鏡システムにより光が捕捉され、試料上の同一点を SEM によりズーム観察可能なハイブリッド型の顕微装置開発を目指し、SEM と FOM、2つの機能を融合させた多波長で同軸・同時観察を可能にした顕微装置の解が「FL-SEM」 (Fig.1) である。

最近、FIB-SEM や BFI-SEM など超微構造の 3D 立体構築手法が発展してきたが、試料作製法への更なる要望などが求められるようになってきた。そこで、「LANTome」 (Light Ablation Nano Tome) (Fig.2) と名付けた excimer laser ablation を用いた試料切削技術を開発した。SEM と組み合わせることで、電顕用樹脂包埋試料を連続切削し SEM 撮影を可能にした装置であり 3D 再構築を試行している。本法は、有機材料に限定しているが、A) 大面積・高速な切削が可能 B) 熱変性が少ない切削法 C) 帯電の中和が期待される。また、本法で用いた染色法が腎症の診断に十分な条件になるよう今後とも研究を継続中である。

これまで開発して来た「FL-SEM」や「LANTome」などのハイブリッド SEM 作製に挑戦した開発経緯を紹介し、今後の展望を述べたい。

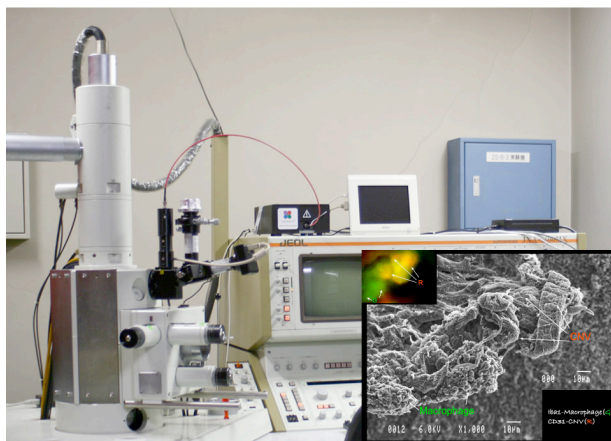


Fig.1 「FL-SEM」 外観と新生血管像

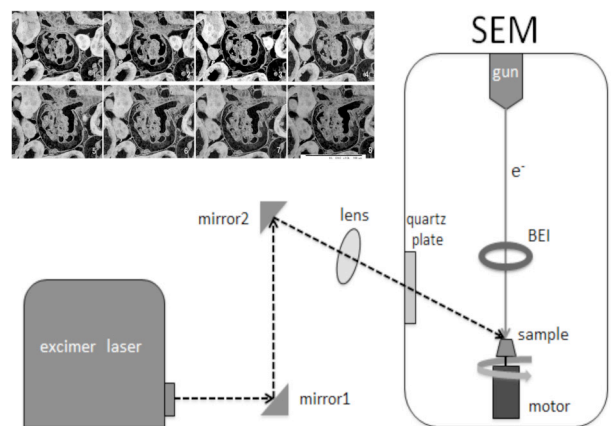


Fig.2 「LANTome」 イラストと連続切削画像

通電加熱アルマイト触媒担体の断面分析

○牧 禎¹、奥野 千央²、亀山 秀雄²

(1 東京農工大学学術研究支援総合センター、2 東京農工大学大学院工学研究院)

【背景】通電加熱アルマイト触媒は Ni, Al と微量の Pt (0.079%) 等を含み、アルミナ基板上で焼成された多孔質結晶材料である。温度 25°C から 1000°C の間で急速通電加熱と空気冷却を 5000 回以上繰り返しても皮膜が剥がれない強靱な特性を持ち、加えて熱伝導性や加工性にも優れており、環境改質システムの新材料として注目されている。東京農工大学化学システム工学科亀山秀雄研究室ではこれを燃料電池の水蒸気改質反応に応用し、都市ガスから速やかに水素を発生できるエネルギー触媒の開発を進めている。このメタン水蒸気改質反応をより効率的に設計するには触媒の内部構造を詳細に理解しておく必要がある。そこで触媒の気相表面付近（担体上部）とアルミナ基板界面付近（担体下部）の断面構造を観察・分析し、比較することで結晶成長過程について調べた。

【実験方法】触媒担体上部、下部をそれぞれエポキシ系樹脂（コニシ社クイック 5）に包埋し、樹脂が厚くかかっている場所を見つけて FIB (JIB-4500) で薄膜化した（約 $10 \times 10 \times 0.1 / \mu\text{m}$ ）。観察と分析には FE-TEM (JEM-2200FS) と EDS (JED-2300) を使用した。

【結論】担体厚さ $45 \mu\text{m}$ の上部と下部で基本構造は大きく異なっていた。担体下部では、アルミナ基板付近から Ni, Al からなる約 110 nm の幅のシリンダ型結晶が c 軸方向に規則的に成長しており、その結晶粒界では Al が、内部には Ni が多く存在していた。また、この結晶成長が途中で停止した箇所も複数あり、その元素組成比率は規則的な箇所よりも Ni が約 1.5 倍多く存在した。これに対し担体上部には空孔が多く、結晶が基板付近から上部まで到達できた箇所は殆どなかった。空孔内の表面付近は針状の多結晶が多く存在し、その形態は気相表面付近と同じであった。しかも Ni の元素組成比率は下部より約 10 倍も多く存在した。このことは触媒活性が c 軸方向で変化することを示唆しており、結晶成長過程や組成分布まで考慮した触媒合成が今後必要になると分かった。

光学バイオイメージングの最新技術

○及川 義朗 (株式会社ニコンインステック)

【背景】

観察部位を特異的に標識してその形態や動態を観察できる蛍光観察がバイオイメージングの中心的な手法となっている。このため装置としては空間分解能、時間分解能、感度向上のための技術開発を続けている。本講演ではそれらの成果として、高速の共焦点顕微鏡、超分解能の超解像顕微鏡、CMOS を採用したデジタルカメラ等の技術を紹介する。

【実験方法】

- i) 時間分解能の向上：高速の共振ガルバノミラーを採用した高速共焦点顕微鏡 A1R
- ii) 空間分解能の向上：構造化照明法により従来の約 2 倍の解像度を得られる超解像顕微鏡 N-SIM およびローカリゼーション法により従来の約 10 倍の解像度を得られる超解像顕微鏡 N-STORM
- iii) 受光感度の向上：共焦点顕微鏡および多光子励起顕微鏡における高感度 GaAsP 受光器 CMOS 素子により感度の向上した顕微鏡デジタルカメラ DS-Ri2/Qi2

【結論】

上記技術開発により、i) 時間分解能：共焦点顕微鏡で毎秒 30 枚以上、ii) 空間分解能：超解像顕微鏡で約 20nm、を実現した。iii) 二光子励起顕微鏡でマウスの脳の海馬の撮影に成功した。

生体への電気エネルギーの応用

○平川 一憲 (トキワサイエンス(株)、ネッパジーン(株))

約 35 年前に電気による細胞融合装置が発売されて以来、エレクトロポレーションで遺伝子導入法等へと応用が発展してきました。電気式細胞融合装置では、2 種類の細胞に AC パルス (交流波) を流すとパールチェーン (数珠つなぎ) が出来、直後に DC パルス (直流波) をかけると、細胞融合が行われ、その直後にまた AC パルスを流せば細胞膜修復の現象が起きます。当初、植物の 2 種以上の細胞を融合させることによる品種改良 (ポマト・ジャガトマ・メロチャ) が試みられました。同方法でミエローマ細胞と抗体産生細胞によるモノクローナル抗体産生細胞の作成が成されています。クローン羊のドリーが生まれた際には、核置換された乳腺細胞に DC パルスを流して活性化を促していました。この技術が不妊治療に応用されています。DC パルスを 4 ステップに分けて出力出来る装置 NEPA21 によって、InVivo、InVitro での遺伝子導入がより効率が上がって来ています。電気エネルギーを生体に適切な条件で流すことでの、様々なアプリケーションを紹介します。



トリミング装置 EM TRIM2 と高圧凍結装置 EM HPM100 のご紹介

○石原 あゆみ (ライカマイクロシステムズ(株) インダストリー事業部)

【要 旨】

生物試料の透過型電子顕微鏡用の前処理では、樹脂包埋法を用いた超薄切片法が従来から広く用いられてきました。超薄切片作製のポイントは、トリミングと切片回収ですが、習熟の必要な操作でありながら、全ての作業を実体顕微鏡下で行うため技術継承が難しく初心者にとってのハードルとなっています。そこで、再現性の高さと操作性の平易さで経験の少ないユーザーでも簡単に操作でき、且つ作業への安全性を兼ね備えた、トリミング装置 EM TRIM2 等の装置を紹介します。

次に、前述の樹脂包埋法では、とらえきれない、より生きた状態に近い構造の観察・解析には、化学固定法に変わって凍結固定法が、昨今、大いに普及し用いられています。電子顕微鏡レベルでの凍結固定法には大気圧下で試料を急速に冷却する急速凍結法と試料を高圧下で凍結する高圧凍結法があります。ここでは、最新の高圧凍結装置 EM HPM100 の紹介を行います。高圧凍結法では、2100 bar (210 MPa) の圧力下で急速に凍結することによって、微細構造破壊の原因となる結晶性氷の生成を抑え非晶質様に凍結ができます。大気圧下凍結では非晶質に凍結できる深さが約 5~20 μm であるのに対し、高圧凍結法では約 200 μm と言われています。さらに、EM HPM100 では、多彩な試料キャリアシステムがあり、大きいものでは内径が 5 mm あり、脳神経系の組織や植物等のやや大きめの細胞、さらに培養細胞における解析にも大いに役立つ装置となっています。また、光学顕微鏡と連携した CLEM 法にも対応しており、様々なニーズに柔軟に対応できるシステムになっています。

最新の SPM/AFM 応用事例のご紹介 ～高分解能測定、機械/電気特性から、化学結合情報へ～

○川口 哲成 (ブルカー・エイエクセス株式会社 ナノ表面計測事業部)

【背景】

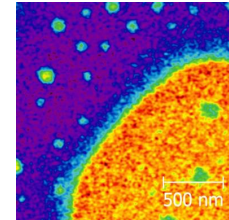
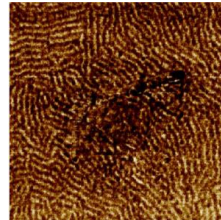
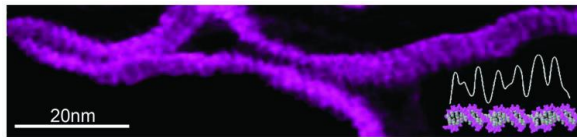
原子、分子スケールで物質表面の 3 次元の形状評価ができる走査型プローブ顕微鏡/原子間力顕微鏡 (SPM/AFM) が世に出て、25 年余り経った。SEM や TEM に比べてその歴史は浅いが、大気中のみならず溶液中等の環境制御雰囲気下での高分解能形状測定が可能であるとともに、ナノオーダーでの弾性率や吸着力といった機械特性、微小電流や表面電位といった電気特性が測定できるという他の顕微鏡には無い特徴がある。また、新たに Raman や IR といった光学技術と SPM/AFM を組み合わせることで化学結合情報の分析も可能になり、さらに多角的にサンプル表面の情報を得ることができるようになった。

これら走査型プローブ顕微鏡/原子間力顕微鏡 (SPM/AFM) の最新応用事例についてご紹介したい。

【実験方法】

ブルカー・ナノ社製走査型プローブ顕微鏡/原子間力顕微鏡 (SPM/AFM) での測定

【結論】



Correlative Microscopy をもっと身近に、もっと有効に

○葦原 雅道

(日本エフイー・アイ株式会社 営業部・アプリケーションスペシャリスト)

近年、電子顕微鏡と光学顕微鏡を相補的に用いる Correlative Microscopy (CLEM) の利用例が増加してきています。ナノメートルレベルの分解能で試料の超微細構造の観察や生体内分子の構造観察を行える電子顕微鏡の特長と、生体内での標識分子の局在性を詳細に確認できる光学顕微鏡の特長を併せ持つことが本イメージング手法の大きな利点です。

これまで様々な CLEM の手法が報告されてきました。しかし、従来の方法ではいくつかの問題点があります。第一に、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の位置合わせをマニュアルで行うため、観察位置を同定するのに時間がかかることです。第二に、蛍光像と電頭像では像の回転や向きを判断することが難しいことです。

そこで、FEI 社は世界に先駆けて 2 種類の CLEM ソリューションを提供します。蛍光顕微鏡と透過型電子顕微鏡を一体化させた顕微鏡である Tecnai with iCorr™ と CLEM 専用ワークステーション CorrSight です。Tecnai with iCorr™ では、試料ステージを 90° 垂直に回転することにより蛍光顕微鏡モードに切り替えます。あらかじめ蛍光染色を施した試料切片を直接電子顕微鏡内に搬送し、蛍光観察と電子顕微鏡観察を一台の顕微鏡で行います。一方、CorrSight を使用することにより、蛍光顕微鏡によるライブイメージングと SEM/DualBeam 観察とをシームレスに相関することができま

す。本講演では、従来の電子顕微鏡技術に光学顕微鏡の利点を付加する CLEM の 2 つの手法を、原理、試料調整方法、観察例を交えて報告します。

低真空モードを用いた含水試料観察への応用

○井上 雅行¹、高島 良子¹、川内 一晃¹、鈴木 俊明²
(¹日本電子株式会社 SM 事業ユニット SM アプリケーション部、
²日本電子株式会社 IB 事業ユニット)

【背景】走査電子顕微鏡（以後 SEM）の低真空モードは絶縁物を導電性コーティングすることなく観察や元素分析に威力を発揮することができる。また、近年では信号検出の技術の進歩と併せてより低い真空度での観察が可能となっており、「含水試料中の液体の水」の挙動を直接観ることが期待される。JSM-IT300 では真空度 650 Pa での低真空観察が可能である。本機能と冷却ステージを組み合わせることで含水試料中の「液体の水の直接観察」法を検討し有効な結果を得ることができたので報告する。

【実験方法】試料として含水させた吸水性ポリマーを用いた。一方、試料冷却にはペルチェタイプの冷却ステージを用いあらかじめ 0 °C 近辺まで試料を冷却した上で真空排気を行い、真空度 650 Pa で観察を行った。さらにステージ温度を下げその変化に注目をした。

【結論】実験結果を FIG.1-1、FIG.1-2 に示す。FIG.1-1 は 0 °C、650 Pa で観察した結果である。一方、FIG.1-2 は FIG.1-1 の観察条件よりさらに試料温度を-10 °C まで下げた結果である。FIG.1-2 の SEM 像中には多数の網目構造が見られる。これは 0 °C から-10 °C まで冷却する間に氷晶が形成されたと推測される。以上のことから左の SEM 像は吸水性ポリマー中に液体の水が存在した状態で観察されていることが考えられる。

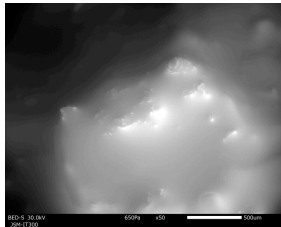


FIG.1-1 (650 Pa, 0 °C)

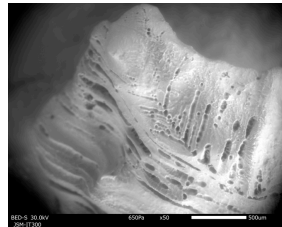


FIG.1-2 (650 Pa, -10 °C)

走査電子顕微鏡による生物分野へのアプローチ

- 1. 檀 紫 (株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学・医用システム設計開発本部 アプリケーション開発部)
○2. 大南 祐介 (株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学・医用システム設計開発本部 先端解析システム設計部)

1. 日立超高分解能 FE-SEM SU8200 による生物アプリケーションのご紹介

FE-SEM（電界放出形走査電子顕微鏡）SU8200 シリーズは、高輝度で安定した状態を長く維持できる新型電子銃を搭載しました。さらにセミインレンズによる超高分解能観察と、多種の信号検出系による二次電子/反射電子信号可変機能を用いることで、低加速電圧での観察と分析の両立を実現しました。また、試料に負電圧（減速電圧）を印可し、試料直前で入射電子線を減速させるリターディング法を用いることで、色収差を抑えた高分解能と最表面観察を行うことができます。今回は SU8200 の各種機能による生物アプリケーション例をご紹介します。

2. 大気圧走査電子顕微鏡による生物アプリケーションのご紹介

含水試料の観察のために、大気圧下で SEM 観察が可能な卓上型大気圧 SEM を開発しました。大気-真空間を分離する隔膜と観察試料とが非接触な状態にすることが可能のため、水分を含んだバルク試料を大気圧下で SEM 観察することができます。今回は、本装置の原理や特徴をご説明し、生物試料の観察例についてをご紹介します。

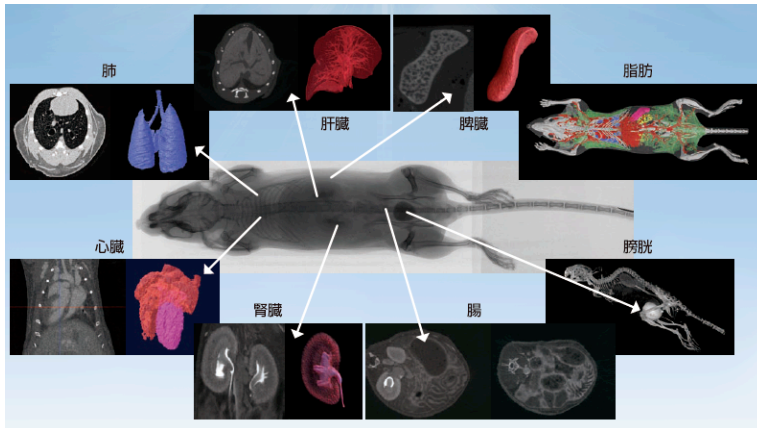
3次元内部構造観察装置とメディカル、ライフサイエンス分野への応用

○小森 研治 (株式会社東陽テクニカ 分析システム営業部)

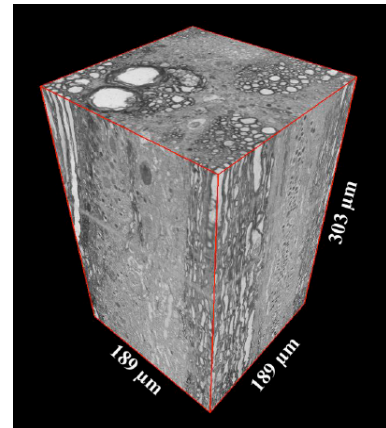
【内容】

内部構造を観察できる2つの技術・製品の紹介をいたします。3次元SEMはチャンバ内にマイクロトームやFIBを装着することで、イメージング&カッティング(スライシング)を全自動で行い、試料内部の3次元データを構築します。X線を使ったマイクロ/ナノスケールCTは非破壊で内部構造を観察できます。これらのメディカル/ライフサイエンス分野への応用例を紹介するとともに、特にCT技術に関しては、実験動物の経時観察ができるin-vivoマイクロCTの紹介も行います。

マウスの軟組織 (マイクロCT)



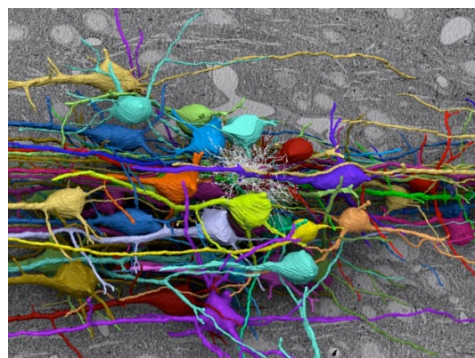
有髄神経細胞 (3D-SEM)



低加速SEM技術のイノベーションによる電顕3Dイメージングの高速化、大規模化の実現

○兼崎 琢磨 (カールツァイスマイクロスコピー株式会社)

ヒトを含む生物の内部立体構造の可視化とその機能解明は、ライフサイエンスにおける恒久の研究課題の一つである。多くの研究者は、過去数十年間、コンフォーカルレーザー स्क্যান顕微鏡を用いた光学セクションングにより、複雑な組織、細胞の三次元構造の全体像の可視化を行ってきた。対して電子顕微鏡分野においても、近年では集束イオンビームやin situ ウルトラマイクロトーム(通称3View)などの自動試料超薄切削法を応用した、SEMによるハイスループット三次元イメージングが適用されつつある。しかし、SEMを用いたシリアルセクション像取得の質的向上とスケールアップを実現するには、イメージングの低加速電圧化に代表される、顕微鏡本体に関わるいくつかの技術的課題を解決する必要がある。本発表では、電子顕微鏡の三次元イメージング技術における潜在的課題を説明したうえで、それらを克服するために弊社カールツァイスが開発してきたGEMINI技術、そしてライフサイエンスの未来のために実現した新技術について報告する。



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>

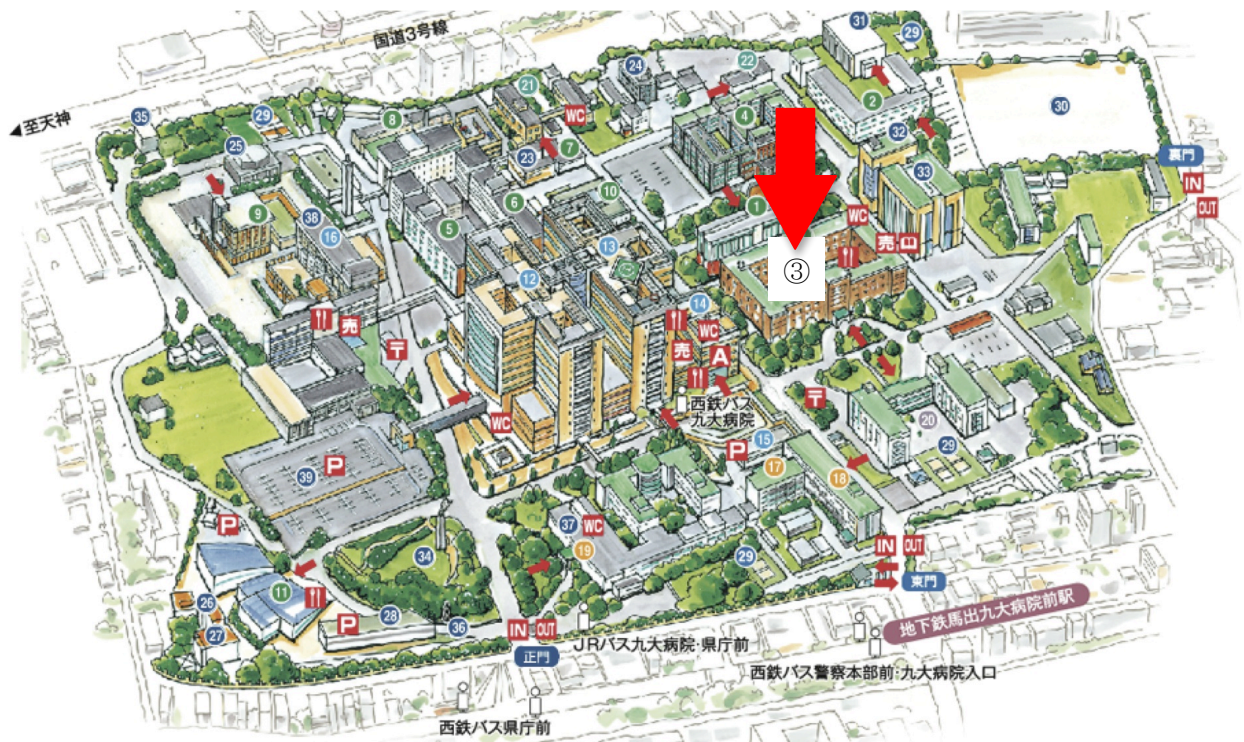
お車の場合

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1階 第1講義室 (下記地図の3番です)

<http://www.kyushu-u.ac.jp/access/map/hospital/hospital1.pdf>



【連絡先】

<平日> 事務局 電話: 092-642-5740

アドレス: kanemaru@mc core.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/>

電話: 092-651-1990

*研究会終了後、タクシー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!