

走査型電子顕微鏡のための試料作製法

志茂聡

健康科学大学 健康科学部 リハビリテーション学科

A specimen preparation method for scanning electron microscopy

SHIMO Satoshi

要旨

走査型電子顕微鏡は数十倍から数万倍の拡大が可能であり、組成と表面地形を非常に詳細な三次元的な画像として形成することができる。これらの画像は、真空下で走査した電子ビームが試料に当たって放出される二次電子、反射電子、特性X線、オージェ電子、蛍光線などを用いて取得することができる。しかし、真空下で高分解能、焦点深度の深い像の観察を行うためには、放射物によって試料の見え方が異なるため、一定の前処理が必要となる。さらに、生物試料の状態によっては試料作製法を改変したり、特別な前処理をしなければならぬため、観察の目的に応じた試料作製技術を選択することが必要となる。本稿では、標準的な生物試料作製法の固定・脱水・試料乾燥法・導電法について概説する。

キーワード：走査型電子顕微鏡, 生物試料, 試料作製法

I. はじめに

電子顕微鏡は透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy, 以下TEM) と走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy, 以下SEM) の二種類に大きく分類され、それぞれ試料作製法や特徴が異なる¹⁾。SEMは、光学顕微鏡では観察不可能な微小な表面構造を鮮明に観察することができ、焦点深度が深い像が得られることから、凹凸の激しい試料表面の構造を三次元的な画像として観察することができる (Fig 1.)。しかし、SEMでは作製した試料を試料室内の真空中に入れるため、60～80%以上の水分を含有している

生物試料は、一定の前処理を行い水分を取り除く必要がある。また、試料の状態によっては試料作製法を改変したり、特別な前処理をしなければならぬため、観察の目的に応じた試料作製技術を選択することが必要となる^{2), 3)}。走査型電子顕微鏡観察のための試料作製法は、多様な方法が確立されているが、本稿では、標準的な生物試料作製法の固定・脱水・試料乾燥法・導電法について説明する。

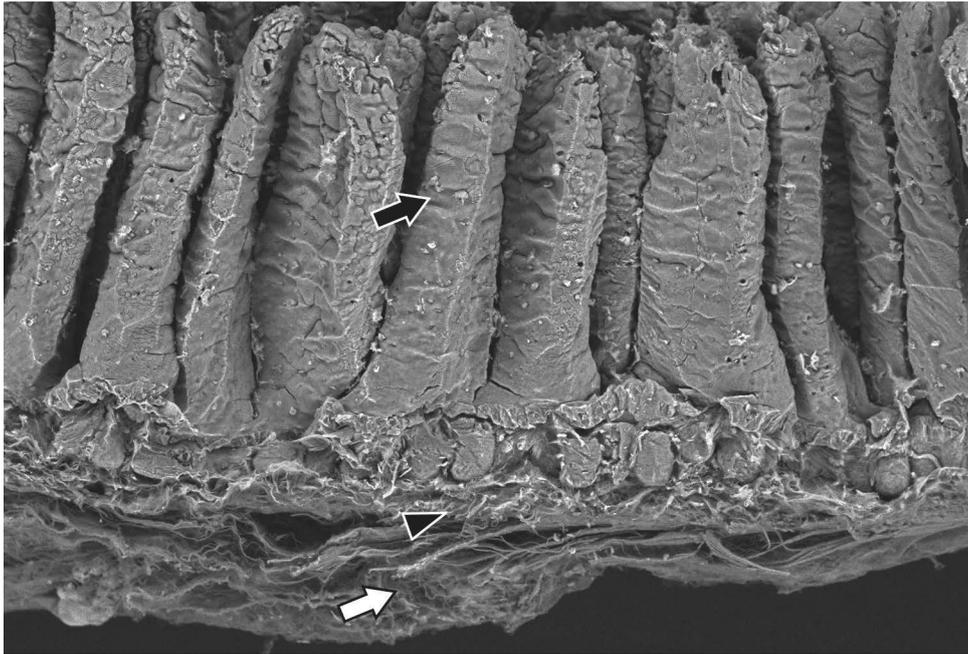


Fig 1. Scanning Electron Microscopic (SEM) Image of the Horizontal Section of the Small Intestine. The image displays the villous surface of the small intestine at the top, as indicated by the black arrow. Conversely, at the serosal side at the bottom, the external longitudinal muscle (white arrow) and the internal circular muscle (black arrowhead) are observed to be composed of fibers running in different directions.

II. 走査型顕微鏡とは

SEMは、高真空内で走査した電子ビームが試料に当たって放出される二次電子 (Secondary electron, 以下SE), 反射電子 (Backscattered electrons, 以下BSE), エネルギー分散型X線 (Energy dispersive X-ray spectroscopy, 以下

EDX, EDS), オージェ電子, 蛍光線などを用いて試料を画像化解析する^{5), 6)}。このように, 通常の走査型電子顕微鏡は電子線が試料を照射して跳ね返ってきた電子を検出して画像を得ることから, 熟練した技術のいる超薄切片を作製する必要はなく, 観察する試料作製は比較的容易である (Fig 2)。

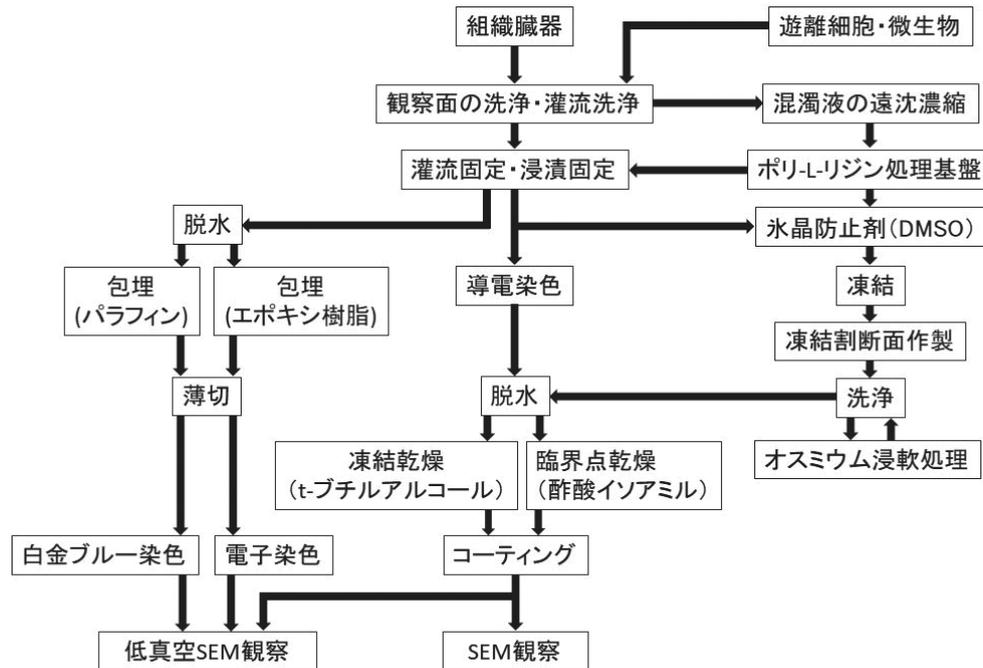


Fig 2. Preparation Procedure of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy (SEM) Observation. Biological specimens require specific preprocessing steps to remove moisture content. Depending on the condition of the sample, it may be necessary to modify the preparation method or apply special preprocessing techniques. Therefore, it is essential to select a sample preparation technique that aligns with the objectives of the observation. Various methods have been established for the preparation of specimens for SEM observation.

Ⅲ. SEM観察のための生物試料作製法（二次電子(SE)での観察）

一般的に生物試料の細胞組織は、主にタンパク質や脂質、糖質などから成り、多量の水分を含んでいる。この様な生物試料を高真空タイプのSEMに直接持ち込むと、細胞組織は熱ダメージによる変性や破壊を生じてしまう。したがって、水分を多く含む生物試料をSEM（高真空SEM）で観察するためには、試料の固定、脱水、乾燥、

金属コーティングなどの処理をおこない、細胞組織微細構造の安定化と電子照射による十分な試料情報が得られるような処理が必要となる⁷⁾。さらに、細胞組織の表面観察なのか、細胞内微細構造の観察なのか、“何をみるのか”を明確にすることで、固定法と試料作製法が決まる。その上で、下記の項目に注意してアーチファクト（人工産物）の少ない試料作製を心がける必要がある。良いSEM像を得るためには、以下のような試料を準備する必要がある（Table 1.）。

Table1.SEM像を得るための試料準備のポイント

1. 観察面が十分に露出した試料。
2. 観察対象の微細構造が良好に保存された試料。
3. 細胞・組織の収縮や破壊、汚染などアーチファクトのない試料。
4. 帯電を生じない試料。
5. 十分な微細構造の情報が得られる試料。
6. その他、接着剤やコーティング金属の選択、撮影条件などにも注意する。

1. 組織切り出し・洗浄

観察対象以外の表面に付着した生体内代謝産物（組織液、粘液、血液など）が残存して、目的物が観察できない場合は、固定前に物理的な方法（緩衝液などによる洗い流し）を用いてこれらの物質を除去する。もしくは、観察対象構造物以外の部位を酵素や酸、アルカリなどで融解処理して除去する。また、TEMでは組織内への固定液浸透速度を考慮して試料サイズを小さくする（2mm角）が、SEMは試料表面の観察のためこの制限がない。しかし、脱水、乾燥の事を考えると $5 \times 5 \times 2$ mm以下が望ましい⁸⁾。組織の切り出しの際は、2枚の両刃カミソリで挟むように左右に引いて細切すると良い。押さえるように力を加えて切り出すと、組織が圧迫されて挫滅を生ずるため注意が必要である。粘液や組織残渣物が付着している場合は、固定後の除去では困難となるためピンセットや緩衝液の吹き付け、軽い攪拌などで除去するとその後の固定が良好となる。

2. 固定（導電染色）

2.5%グルタルアルデヒド（以下GA）で試料を固定（4℃、2時間以上）する。現在ではGA単独ではなくパラホルムアルデヒド（以下PFA）との混合液を使用することが多い。観察対象物によって浸漬固定、還流固定、滴下固定、注入固定などの固定方法を選択する。0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4, on ice, 10分×3回）にて洗浄後、固定液内に導電染色剤としてタンニン酸を加えるか、後固定として2%四酸化オスミウム（導電染色を兼ねる。on ice, 2時間以内）を使用する。この他に、2%四酸化オスミウムとタンニン酸溶液浸漬を数回繰り返して導電性を高める導電染色法がある⁹⁾。

タンニン酸溶液を作製する際の注意点として、固定液にタンニン酸を加える際は10mlの2.5%GA、4%PFAなどに0.03～0.2gのタンニン酸を混和する。単体で使う際は10mlの0.1Mリン酸緩衝液に0.1～0.2gのタンニン酸を混和させる。どちらの溶液も必要時に作製し0.22 μ mのミリポアフィルターでろ過をする。2%四酸化オ

スミウム溶液（以下OsO₄）は、市販の2%OsO₄水溶液を使用するか、50mlの0.1Mリン酸緩衝液に1gの2%OsO₄結晶を溶かし、作製する。

固定液の注意点として、GAはタンパク質を良く固定するが脂質は固定しないため、組織への浸透性は悪い。一方、PFAは、タンパク質の固定は弱い浸透性は良く抗原性を保持することから免疫電顕法で使用されている。OsO₄は、脂質を良く固定するが、タンパク質はほとんど固定せず使用状況によっては破壊するため注意が必要である（オスミウム-DMSO-オスミウム法）。また、水分の少ない実質性組織ほど長時間の浸漬が必要になるが、タンニン酸を使用することで、オスミウムの付着が増加し、帯電防止効果と二次電子発生増加につながる反面、過度の処理は試料の表面形状やサイズにアーチファクトを生ずるため注意が必要である。

3. 脱水・置換

固定後の試料をアルコール上昇系列（エタノール）で脱水する（50%・60%・70%はon iceで10分、80%・90%は室温で10分、100%は室温で10分×3回）。置換剤にはt-ブチルアルコール（30℃、24時間以上）や酢酸イソアミル（室温、90分）を使用する。脱水時のポイントとして、組織が大きい場合は50～90%エタノールの脱水時間を各20～30分、100%エタノールは途中で新しい溶液に交換しながら、12～24時間浸漬させると良い。一方、脱水過程での組織の収縮は避けられないため、構造物のサイズなどを論じる際は、注意を要する。

細胞組織の内部構造を観察する場合には、液体窒素中で凍結切断して観察するが、切断時に試料を封入する溶媒によって、DMSO凍結切断法（Fig 2.右列）とエタノール凍結切断法（脱水最終段階の100%エタノールで凍結切断）がある。エタノール凍結切断法では、100%のエタノールまで浸漬した試料を液体窒素中の金属片で急速に凍結させ、カミソリ刃などを使って衝撃を与えて切断する。切断した試料は、速やかに100%エタノールに再度浸漬する。

酢酸イソアミルを用いる臨界点乾燥法では組織中の水分量が試料作製の良否にかかわるため厳密な脱水操作が必要である。酢酸イソアミルは100%エタノールとの等量混合液を室温で30分浸漬後に酢酸イソアミルに30分浸漬を2回行うと良い。t-ブチルアルコールでは100%エタノールとの等量混合液に30℃で30分間浸漬後、t-ブチルアルコールに30℃で30分を2回行う。その後、30℃で1晩浸漬。翌日に専用容器に組織が完全に浸漬する最低量のt-ブチルアルコールを入れて冷蔵庫で完全に凍結させる。

4. 乾燥・載台

脱水した試料や未処理の試料を、そのまま自然乾燥すると試料形態は著しく変形し、アーチファクトを生ずる。そのような、アーチファクトを防止するため2種類の乾燥法が確立されている。試料をt-ブチルアルコールで置換後は真空内での昇華を利用した凍結乾燥 (**Fig 3.**) と酢酸イソアミルで置換後に炭酸ガスを使った臨界点乾燥法である^{10), 11)}。乾燥した試料は金属製の試料台にカー

ボン両面テープや導電ペーストなどを用いて固定する。

凍結乾燥では、乾燥時に試料を入れるカップは、試料ステージに載る大きさであれば良い (アルミ製又は銅製が望ましい)。一方、ガラスのカップは熱伝導性が悪く、試料の内部まで十分に凍結されないことがあるので、使用は避けた方が良い。臨界点乾燥法では、使用にあたり高压製造許可申請や液体炭酸ガスポンベの購入などが必要となるので注意する。

載台時には、試料を実体顕微鏡下で確認しながら作業を行うが、ピンセットで試料をはさむ際には、観察したい場所をつぶしてしまわないように注意する。また、乾燥した試料はペーストを吸い上げやすいため必要以上の導電ペーストの使用は避ける。さらに、試料とカーボン両面テープの接着が悪いと入射電子が試料内部に溜まって異常に電位が高くなり、チャージアップ (異常帯電) 現象の原因となる。



Fig 3. Freeze Vacuum Dryer (Hitachi ES-2030). The water contained in the hydrated sample for SEM would be dehydrated with ethyl alcohol, and substituted with t-butyl alcohol, and frozen in a freezer of -20°C and then dried with sublimation at about 13.3 Pa in the evacuator of reduced pressure.

5. 金属コーティング蒸着

脱水乾燥した生物試料には、導電性がほとんどなく、SEM観察時にチャージアップ（異常帯電）し、二次電子像に著しい像障害が生じるため、SEM観察前に導電処理が必要となる¹²⁾。載台に使用したペーストや試料に残っている有機ガスを完全に乾燥・放出させた後、非導電物質である試料の帯電防止および2次電子の放出効率を増加させるため、観察対象物によって選択した金属でイオンスパッタリングして試料表面に10～20nm

の厚さのコーティングをする（Fig 4.）。

導電コーティングに使用する装置は、観察倍率やサンプルの構造によって使い分ける必要がある。観察倍率が数百倍～数千倍程度であれば金、1万倍～3万倍程度であれば白金、それ以上の倍率もしくはサンプル構造が複雑な構造をもっているのならば、オスmiumコーターを利用する。必要以上の金属コーティングは、微細構造の埋没を生じるため注意する必要がある（Fig 5.）。



Fig 4. Ion Sputter Coater Hitachi E-1030. It is utilized in the preparation of non-conductive specimens for electron microscopy by applying a thin conductive coating on their surfaces. This process enhances the electrical conductivity of the specimens, preventing charging artifacts during microscopic observations and ensuring the acquisition of high-quality images and data.



Fig 5. Changes in the Specimen Before (Left) and After (Right) Coating in the Ion Sputter Coater. Comparing before and after the coating process, it is observed that not only the surface of the specimen but also the stage has turned grey after coating, indicating that the entire specimen, along with its stage, has been uniformly coated.

IV. 低真空SEM観察のための生物試料作製（パラフィン切片スライド標本のBSEでの観察）

近年、操作が簡便で高性能の卓上型の低真空走査型顕微鏡（低真空SEM）が開発され、煩雑な前処理や金属コーティングをせずに数十倍から数万倍など任意の倍率で迅速に観察することが可能となり、様々な分野で幅広く活用されるようになった。低真空SEMでは、油や水を含む試料や非導電性試料とともにパラフィン切片スライド標本のSEM観察が可能であり、迅速で簡便に組織内部の微細構造を解析することができる。一般的な低真空SEM観察には、残留ガス分子による散乱の影響を受けにくい反射電子（Backscattered electron: BSE）シグナルが用いられる。そこで、高感度の反射電子シグナル増強法（重金属による白金ブルー染色法）によって解像度の良い三次元画像を観察する方法が工夫されてきた¹³⁾。今回は、低真空SEM観察のためのパラフィン切片に対する白金ブルー染色を用いた手技（Fig 2.左列）について説明する。

1. 組織切り出し・固定

光顕（パラフィン包埋）の試料作製方法に準じる。

2. 脱水・置換・包埋

パラフィン包埋試料は定法の試料作製法で行う。

3. 薄切

マイクロームで薄切（2～5 μm）し、切片をスライドガラスやシリコンに載せる。

4. 脱パラフィン

パラフィン試料は、脱パラ（キシレン、室温で一晩浸漬）、浸水（100%・90%・80%・70%・60%・50%エタノールを室温で各10分）を行う。脱パラフィンが不十分だと表面のパラフィンが見えてしまうため丁寧に行う。

5. 白金ブルー（TIブルー）染色

Milli-Q水で洗浄後（室温、5分×3回）、TI-ブルー染色（室温、10～20分）を行う。以前は、白金ブルーそのものを使用者自身で作製しなければならない上、合成反応に約一週間かかるのが難点であったが、現在は商品化されており、簡便に作業できるようになっている。TI-ブルー染色液の取り扱いには、添付の説明書（TI-Blue small Kit : No.335-2 日新EM株式会社）を参照する。TI-ブルー染色液は、重金属廃液（一般無機廃液）となるため、使用後の廃液処理に注意する（Fig 6）。



Fig 6. Platinum Blue (TI-Blue) Staining Kit. Previously, a significant drawback was that users had to personally prepare the platinum blue, and the synthesis reaction took about one week to complete. However, since its commercialization in 2008 by Nissin EM Co., Ltd. (as TI Blue), it has become readily available, allowing for easy use by anyone in the present day.

6. 金属コーティング蒸着・SEM観察

基本的には不要だが帯電防止、BSEの発生効率の増加、切片の破れ防止のために薄くコーティングする事もある。必要があれば同一サンプルの光顕像と蛍光像とも対比して観察することができる (Fig 7.)。

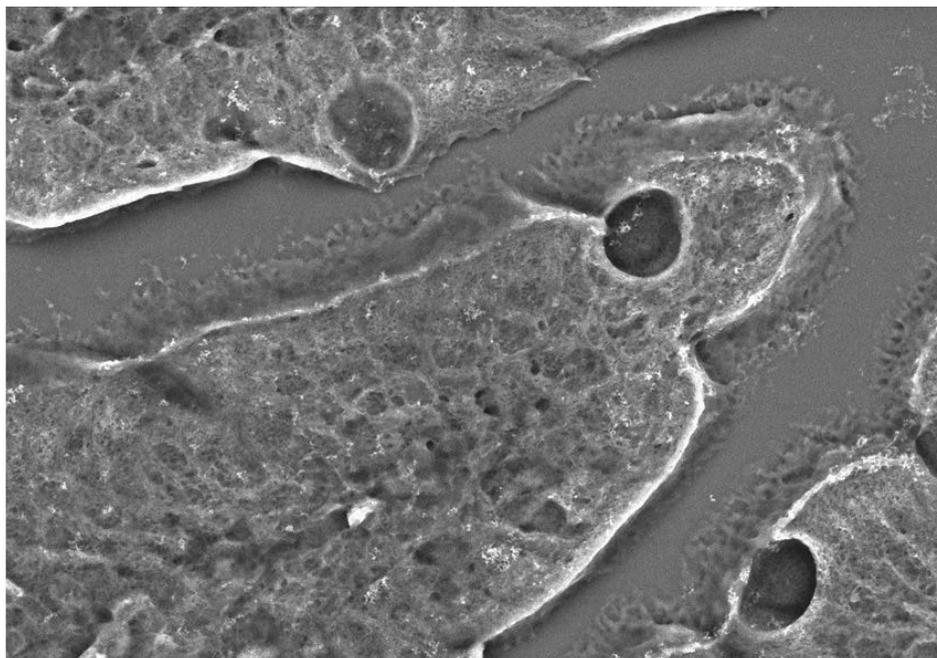


Fig 7. Observation of Small Intestinal Villi in Paraffin Sections Using TI Blue Staining. If necessary, observations can be contrasted and compared between the same sample's optical microscopy images and fluorescence microscopy images, allowing for a multifaceted examination and analysis.

V. 低真空SEM観察のための生物試料作製 (エポキシ切片のBSEの観察)

1. 組織切り出し・固定

TEM (エポキシ樹脂包埋) の試料作製方法に準じる。

2. 脱水・置換・樹脂重合

エポキシ樹脂包埋試料は、TEM試料作製の定法かオスミウム-チオカルボヒドラジド-オスミウム (OTO) 染色法を用いる。

3. 薄切・表面平滑化

エポキシ樹脂包埋試料は、切片観察を行う場合は超薄切片 (60 ~ 90nm) をグリッドメッシュにひろうか、50 ~ 300nmの切片をスライドグラ

スやシリコンに載せる。エポキシ樹脂包埋試料は包埋前に金属によるブロック染色が施されている場合、薄切しなくとも平滑化された表面を観察することで画像が得られる。この場合、ウルトラミクロトームや研磨機を使って試料表面を鏡面仕上げにする。

4. 電子染色 (ウラン鉛染色)

TEM試料作製の定法に従って作製された試料では、Milli-Q水で洗浄後 (室温, 5分×3回), 電子染色 (酢酸ウラン染色: 室温10分, クエン酸鉛染色: 室温2分), Milli-Q水での洗浄 (室温, 5回以上) を行う。2%酢酸ウラン染色液の作製は、Milli-Q水10mlに酢酸ウラン0.2gを溶かし作製後1晩静置した上澄み液を使用する。使用時には

0.22 μm のミリポアフィルターでろ過をして使用する。クエン酸鉛染色液の作製は、硝酸鉛1.33gとクエン酸ナトリウム1.76gをMilli-Q水30mlに加えて溶解させる（白濁）。これに1 N NaOH溶液を8ml加えてよく混和する（無色透明）。全量が50mlになるようにMilli-Q水を加える。使用時には0.22 μm のミリポアフィルターでろ過をして使用する。

5. 金属コーティング蒸着・SEM観察

基本的には不要だが帯電防止，BSEの発生効率の増加，切片の破れ防止のために薄くコーティングする事もある。低真空SEMによるエポン包埋試料の観察では，エポン包埋された小腸試料表面からSEMで反射電子を検出することによって，試料表面近傍の情報を反映したTEM観察による超薄切片像に類似した画像を取得できる^{14), 15)} (Fig 8.)。

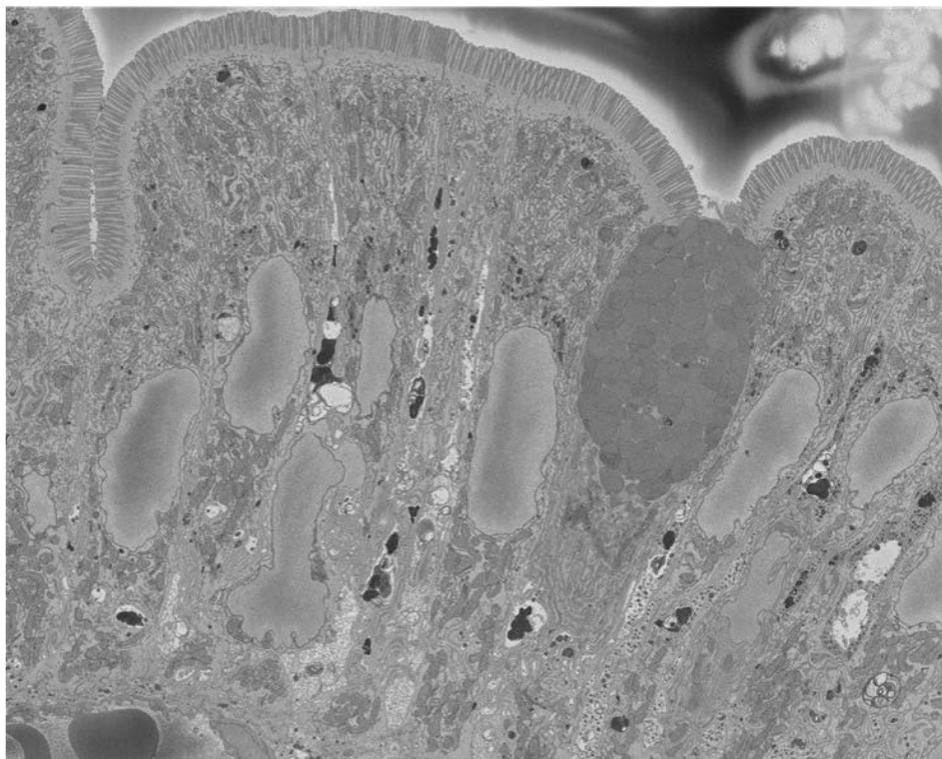


Fig 8. Observation of Epon-Embedded Specimens using Low-Vacuum SEM. By detecting backscattered electrons (BSE) from the surface of Epon-embedded small intestine specimens using SEM under low vacuum conditions, it is possible to acquire images that reflect information from the near surface of the specimens. These images are analogous to those obtained from ultra-thin sections observed with TEM.

VI. おわりに

本稿では、標準的な生物試料作製法の固定・脱水・試料乾燥法・導電法について説明した。各処理過程とともに、各ポイントに記載したアーチファクトの要因等を十分考慮して、作業を進めていくことが重要となる¹⁶⁾。さらに、本稿で紹介したパラフィンおよびエポキシ切片との組み合わせにより、同一箇所を光顕と電顕で得られた像を重ね合わせることで、今まで得られなかった新しい知見を得ることが期待できる^{17), 18)}。一方、本稿で説明したSEMの試料作製法は、すべての試料に当てはまるものではない。目的に合った試料作製法を選択して、研究に最適化することが肝要である。本稿が研究者の方々のSEM試料作製法の理解と、その効果的な利用の一助となれば幸いである。

VII. 謝辞

本稿で紹介した研究に対して、これまでの研究費の助成を賜りました健康科学大学学内研究助成、JSPS科学研究費基盤研究C (22K11815)、生理学研究所計画共同研究 (23NIPS206) の関係者の皆様へ深く感謝申し上げます。

VIII. 文献

- 1) 日本顕微鏡学会: 電顕入門ガイドブック改訂版. 電子顕微鏡技術認定委員会編. 2013.
- 2) 水口國雄編集: 染色法のすべて. 医歯薬出版, 272-277. 2021.
- 3) 四本晴夫: 走査型電子顕微鏡への入門. 色材 45, 35-43. 1972.
- 4) 岩野恵美, 磯貝彰: 変わる電子顕微鏡技術. 生物と科学 vol38, No4, 250-253. 2000.
- 5) 近藤俊三: 走査電顕試料作製におけるトラブルシューティング. 顕微鏡 vol.42, No1, 19-22. 2007.
- 6) 二重作豊, 安達公一, 朝倉健太郎編集: 電子顕微鏡チャートマニュアル, II -D, II -F 医学出版センター. ISBN4-900575-06-02. 1993.
- 7) 平野寛, 宮沢七郎 監修: よくわかる電子顕微鏡技術. 朝倉書店, 99-119. ISBN4-254-30044-1. 1992.
- 8) 太田啓介: 電子顕微鏡 試料作成の基礎, 観察法から最新応用まで: 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学 2023, 131-144. 2020.
- 9) Nguyen JNT, Harbison AM.: Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging. Methods Mol Biol. 1606:71-84. 2017.
- 10) Inoué T, Osatake H.: A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze-drying method. Arch Histol Cytol. 51(1):53-9. 1988.
- 11) Kang KY, Hwang KR, Park JY, Lee JP, Kim JS, Lee JS.: Critical Point Drying: An Effective Drying Method for Direct Measurement of the Surface Area of a Pretreated Cellulosic Biomass. Polymers (Basel). 10(6):676. 2018.
- 12) Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW.: Scanning electron microscopy. Curr Protoc Microbiol. Chapter 2:Unit 2B.2.. 2012.
- 13) 稲賀すみれ他: 低真空SEMを用いた腎生検パラフィン切片の迅速三次元解析法. 顕微鏡 vol.43, No3, 147-151. 2008.
- 14) 大野伸彦, 志茂聡, 齊藤百合花: 電子顕微鏡ボリュームイメージング法, 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学 2020, 159-170. 2020.
- 15) 宮木充史, 立花繁明, 許斐麻美: 顕微鏡 55 巻 1 号, 3-6. 2020.
- 16) 太田啓介: サブオルガネラレベルの構造と機能をつなぐ光電子相関顕微鏡法のワークフロー. 顕微鏡 55 巻 2 号, 83-89. 2020.
- 17) 早津学, 奥山健太郎, 信藤知子, 岡野栄之, 芝田晋介: マルチビームSEMとCLEMによる広範囲試料の構造解析への応用. 顕微鏡 56 巻 3 号, 124-130. 2021.
- 18) Oorschot V, Lindsey BW, Kaslin J, Ramm G.: TEM, SEM, and STEM-based immuno-CLEM workflows offer complementary advantages. Sci Rep. 11(1):899. 2021.