

走査電子顕微鏡法(2)

木村 利 昭

(Toshiaki Kimura)

6. 試料作製法

電子顕微鏡が光学顕微鏡と最も異なる点は、鏡体内が真空に保たれていることで、試料は当然真空中に保持される。この点が試料作製の上で重要な留意点となる。さらに、試料は電子線に照射され、電子線のもっているエネルギーが熱に変換されると試料の温度が上昇する。観察試料は真空中で高温になっても変化しないように、作製されていなければならない。

電子顕微鏡研究者の間で言われていることに「生のイカを観たつもりが、スルメをみていた」とか、「イワシを観ようとしたら、黒焦げのメザシをみていた」という例えはこのような圧力と温度の制約からくる電子顕微鏡実験の障害であり、試料作製の困難性、障壁の高さを物語っている。

走査電子顕微鏡 (SEM)、透過電子顕微鏡 (TEM) を問わずこれまで開発されてきた試料作製法はこのような制約に見合うように検討された結果である。

最近は低真空 SEM が普及し、圧力の制約はかなり弱くなっているが、大気圧ではない。我々が観察する多くの場合は前述の2つの制約を受けることになる。

本稿では食品の試料作製に必要な処理法について、対象試料を① 乾燥試料、② 含水試料：乾燥してみる方法：凍結してみる方法：直接みる方法、に分けて紹介し、その注意点について述べる。

1) 乾燥試料をみる方法

乾燥試料の観察は SEM 観察の多くの方法の中で最も手間がかからない。試料に導電性があれば、試料台に載せるだけで観察が可能になる。

i) 載 台

この操作は含水試料の試料作製では乾燥後に行われ、専用試料台 (アルミ製が多い) に観察試料を載せ、接着することである。ここでの注意点は試料を試料台に単に付着するだけでなく、十分に接着することであ

る。

接着が悪いとアースされない状態になり、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。チャージアップは映像に異常なコントラストがでたり、走査線と平行に黒い線が描かれたり、実際とは異なる様々な像がでる。この現象は大きさの割りに表面積の大きな粉体、多孔質試料に発生しやすい。

これを解消するには試料と試料台を導電性のある物質で十分に接着する。接着剤には銀、カーボンなどの導電ペースト、両面テープおよび木工ボンドなどが用いられる。導電ペーストは SEM 用に専用品が販売されている。両面テープはカーボンを混合してあるもの、日常文房具として用いているものが利用できる。文房具の両面テープの場合には導電性がないので後述のコーティング操作を必要とする。木工ボンドにはシリカが含まれており導電性が得られる。

実際の操作を粉体試料を例に述べると、導電ペースト、あるいは木工ボンドを、試料台に均一に塗り、半乾きになるまで待つ。ウェットなところに試料を着けると導電ペーストの溶剤で試料が溶解したり、導電ペースト成分が毛管現象で試料内部を這い上がり、試料表面まで到達し、構造と見間違えることがある。また、接着剤を必要以上に塗布すると、溶剤が気化するまでに時間を要し、それが残存したまま観察すると、電子ビーム照射の加熱によって気化し、鏡体内の真空度を低下させることになる。真空度の低下は S/N (シグナル/ノイズ) 比を低下させ像質が悪化する。

粉体試料は綿棒の先に粉を少しつけ、綿棒をかるくたたくと粉がバラバラと落ちる。綿棒に大量の粉体をつけると、一度に沢山の粉が落ち、粉どうしが重なる。接着剤の上に少しづつ振り落とし、一層の粉が着いたところで止める。

試料と接着剤の接触の状態は図1に示すように、点接触よりは試料が少し埋没する程度がよい。それには

* 雪印乳業(株)技術研究所

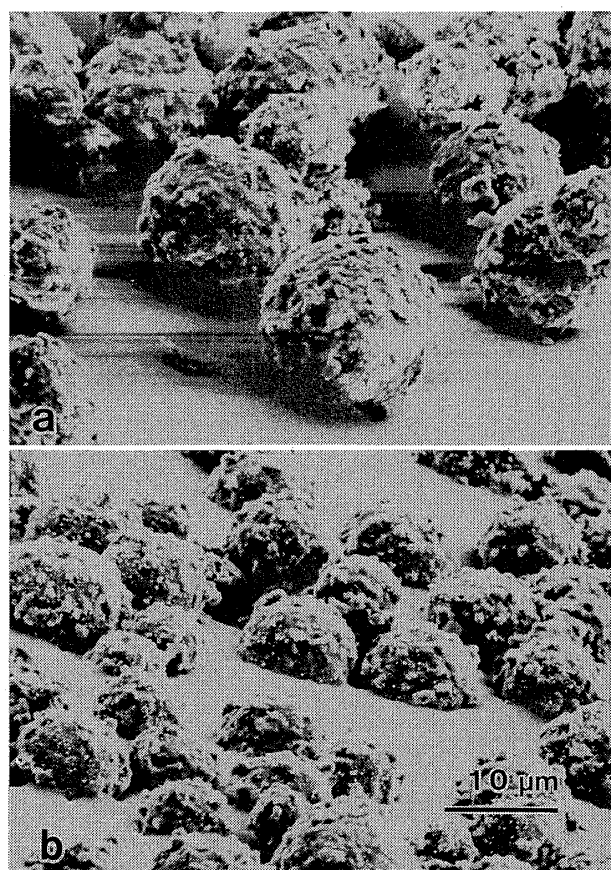


図1. 接着剤の有無による像質のちがい¹⁾

- a) トナー粉をアルミホイルに分散し金コーティング
b) 文房具用両面テープにトナー粉を分散し、数秒ヘアードライヤーで加熱

導電ペーストでは前述のように半乾き、両面テープではつぎのようにする。テープを試料台に固定後、ドライヤーで加熱し、テープが柔らかくなった時に試料を振り落とす。試料に耐熱性があれば、試料を着けた後に加熱してもよい¹⁾。

次に、試料を着けた後に、重なっている粉を落とすために、試料台を持ちその側面で実験台をかるくたたくようにし、接着の不十分な粉を落とす。試料が多層状に重なると、その上の層にある試料は、下の試料との接触が不充分になっており、そのような部位を観察してもチャージアップすることが多い。

立体の試料では図2のように、底面以外の側面にも導電ペーストを塗る。また、観察面の大きな試料もチャージアップしやすいので、図2bのように観察面に基盤の線を書くように、導電ペーストで適当に細分化し、表面の電位がすぐにアースされるようにして帯電を防止する²⁾。このような作業は裸眼では難しいので、実体顕微鏡下でおこなうとよい。

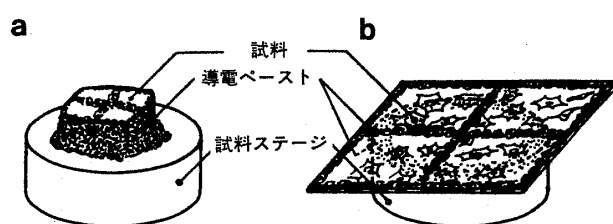


図2. 導電ペーストによる試料の接着²⁾

- a) 立体試料の側面への塗布
b) 大きい試料の導電ペーストによる細分化

ii) コーティング法

食品の場合には導電性がないのが一般的で、導電性を付与するために金属コーティングが必要になる。コーティングには真空蒸着法とスパッタリングを利用したコーティング(この方法を被着という呼び方もある)の2種がある。

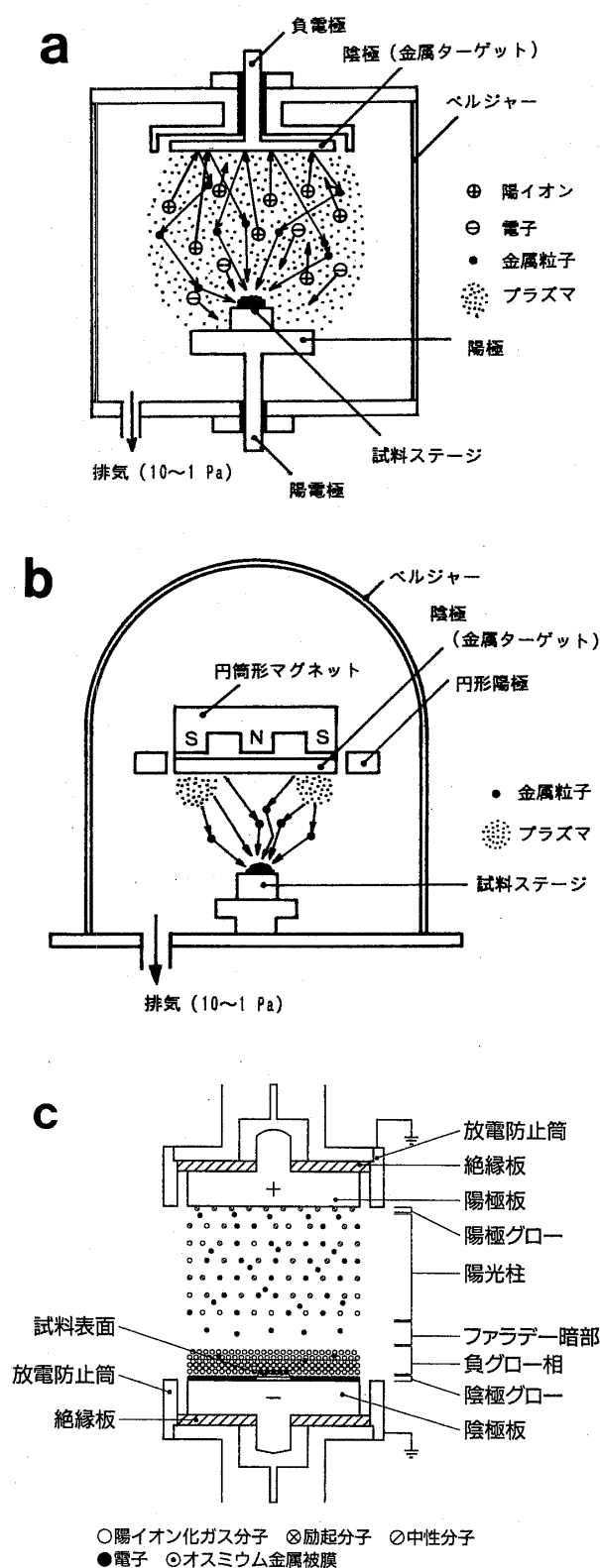
真空蒸着法はTEMのシャドウイング法、レプリカ法に用いられる方法と同一である。この方法は高真空中で行われるので、蒸着粒子に直進性がある。そのため、細かな凹凸や影に相当する部位への回り込みが少なくなり、SEMのコーティングには不向きである。最近ではスパッタコーティングをすることが多い。

スパッタコーティングはスパッタリングの原理*を応用し、飛散する微粒子を試料表面に均一にコーティングする方法である。この方法は低真空中で行われるので、スパッタされた金属粒子は残存気体分子に衝突して方向が変えられ、四方八方に飛び散りながら試料に付着する。そのため細部への回り込みがよく、ムラなくコーティングできる。

スパッタリングの方式にはグロー放電、マグネトロン電離方式(図3 a, b)などがありそれぞれ市販されている。グロー放電は10~1Paの真空中で電極間に1~1.5kV程度の電圧をかけると残留ガス分子が電離してグロー放電がおこる。陽イオンに電離したガス分子は陰極に引かれ衝突する。陰極にコーティング金属があると、その金属がスパッタされ真空中に飛び出し、試料表面に付着する。この粒子が堆積してコーティン

* スパッタリング(sputtering): 低圧気体中で金属を加熱またはイオン衝撃すると、そのイオンのもっているエネルギーで、対象となる金属原子が弾きとばされ、付近の物体表面に付着する現象。コーティングの他に試料表面の汚れをとるクリーニング、試料表面を削るイオンエッチングもこの原理による。イオンエッチングはイオンミリングとも呼ばれ、試料全体にイオンを照射するフラットミリング法と集束したイオンビームを特定の位置に照射する集束イオンビーム法(FIB: Focused Ion Beam)がある。

走査電子顕微鏡法(2)

図3. スパッタコーティング装置の原理図²⁾

- a) グロー放電によるスパッタコーティング装置
b) マグネトロン電離方式のスパッタコーティング装置
c) オスミウムプラズマコーティング装置

グ膜が形成される²⁾。

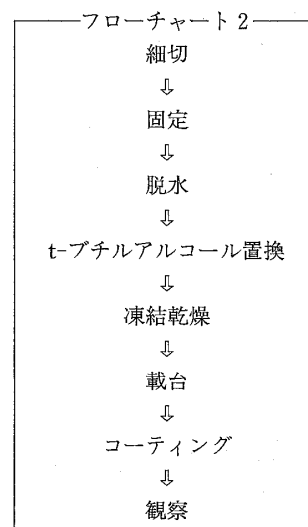
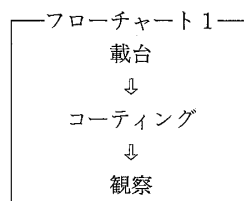
最近普及しているコーティング法にオスミウムプラズマコーティングがある。この方法はオスミウムガスをプラズマ状態にすると、試料のおかれた陰極近傍でオスミウムが非晶質の重合膜をつくることを利用している (図3 c)。この膜の特徴は、これまでのコーティング法による膜が粒子の集合体であるのに対し、この膜は重合体で粒子がない強靱な膜になる。このため、SEMのコーティング以外に、TEM用のレプリカ膜にも応用され、好成績をのこしている。

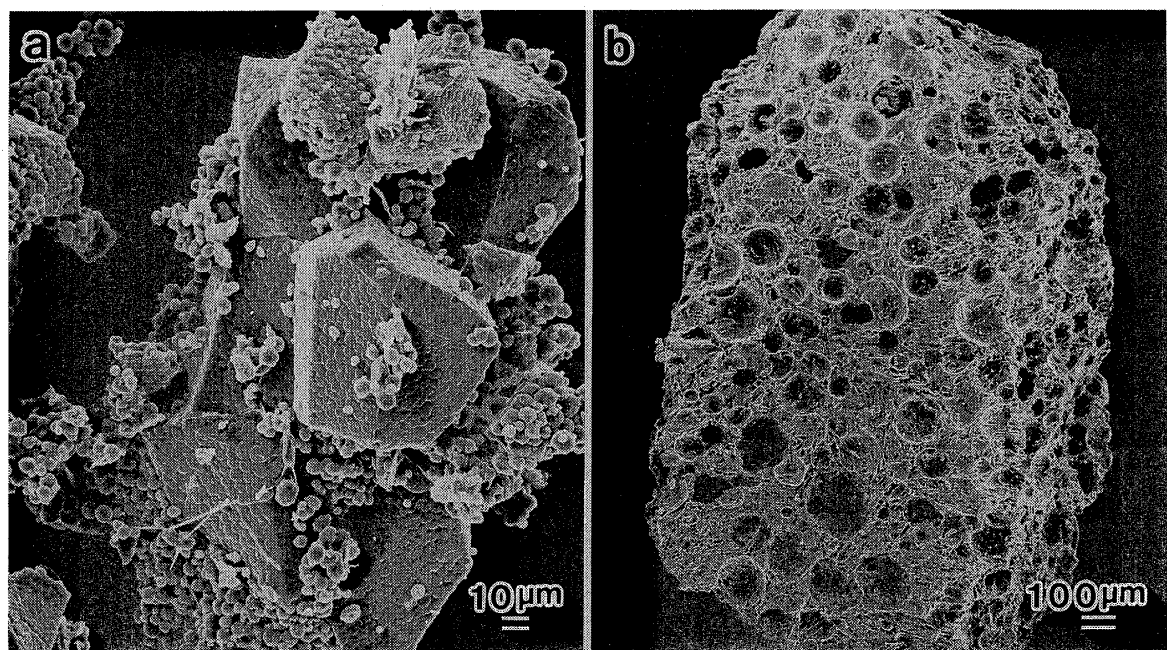
真空蒸着膜は金属蒸気の粒子からなるのに対し、スパッタリングでは原子がはじき出された粒子：クラスターアトムからなる膜で、粒状性が蒸着粒子より細かくコーティング膜としての性能は高い。

質のいいコーティングをするには金属粒子の粒状性と、必要にして最小限の膜厚が望まれる。粒状性とは蒸着膜を構成する金属粒子の大きさで、微細な粒子であることが第一である。粒状性のよい金属はカーボンで、以下タングステン、タンタル、白金、パラジウム、金の順²⁾である。金は試料に付着した直後、粒子が移動 (migration) し合一する。その結果、島状の大きな粒子となるので、高倍率観察には好ましくない。

コーティングの膜厚が過度になると、試料の細部を覆いかくすことになり、高分解能像を得ようとする時にはその妨げとなる。観察する倍率に合わせて膜厚を選択する。

倍率に応じた膜厚について小倉¹⁾は、人の目の分解能は0.2mmであるから、膜厚に倍率を乗じた値が0.2mm以下であれば、コーティングによる偽りの像を観察することはないとしている。すなわち、観察倍率1万倍の場合では、



図4. 乾燥試料の観察例³⁾

a) そば粉

b) 凍結乾燥したインスタントコーヒー

$$\text{膜厚}(x) \times 10,000 < 0.2 \text{ mm}$$

$$x < 0.00002 \text{ mm}$$

$$x < 20 \text{ nm}$$

となり、20nmが膜厚の目安となる。膜厚の調整は膜厚計でコーティング時に直接測定するか、電流ごとの時間と膜厚の校正曲線からコーティング時間を設定する。

ここでの注意点は操作中の試料温度の上昇である。油脂などの融点の低い試料では、十分な冷却あるいは照射時間を数回に分ける間欠的な処理をおこなう。

図4はフローチャート1に示した操作だけで観察したそば粉とインスタントコーヒーの凍結乾燥品である³⁾。両試料ともに試料台との接着に木工ボンドを使用している。コーティングはグロー放電のイオンスパッターによる白金処理である。

2) 含水試料を乾燥する方法

食品には多量の水を含む試料が多い。このような試料の構造を観察する本来の目的は、水を含んだ状態のままを視ることであるが、前述の制約条件から脱水・乾燥した試料を視ることが一般的である。操作手順にそって説明する。

i) 細切

SEM観察用の試料作製の注意点として、試料の大きさがある。これは後の固定、脱水操作の処理時間に影響する。

一般的な電子顕微鏡の試料作製法についての成書は、電子顕微鏡の歴史の違いから透過電子顕微鏡による研究手法が基本であったり、またSEMに特定した場合でも、病理組織などの生体試料の経験が大きくしめている。このような分野の試料作製条件を、食品の系にすぐに当てはめると、失敗をまねく恐れがある。最も違う点は試料の大きさである。読者が自分の試料をSEM観察しようとするとき、試料はどの程度の大きさをイメージするだろうか。食品の試料では3mm角でも5mm角でも自由に、制限なく大きな試料を採取できることが多い。このような大きさの試料で、先の成書の条件をそのまま導入すると時間が足りず、各処理が不十分になりかねない。

病理組織標本では、通常1mm角程度の大きさであり、TEMの超薄切片用の試料では、実体顕微鏡下で一边を300μm程度の大きさに細切することもある。この大きさで、固定時間は2時間である。固定の処理時間と浸透距離の関係は、試料の大きさが2倍になれば浸透時間は4倍となる「距離の自乗に反比例」の関係であろう。

ではどうするか。観察面積はより大きい方が研究には有利である。しかし、いつも数十時間の固定時間は大変である。そのためには観察対象となる面を先に露出させてから固定すればよい。

SEMの観察対象は表面である。試料本来の表面あ

走査電子顕微鏡法(2)

るいは、試料内部を露出させた表面である。試料本来の表面を観察する場合は、目的の部位を切断すればよいが、問題は試料の内部を観察するための切断である。単純にナイフで切断しても、自然な面は得られない。

ナイフで切ると圧縮による変形、ナイフマークという引っかき傷の入った不自然な面になることが多い。ナイフで切断する場合には、“押し切り”をしない、あるいはノコギリのように何回も引いたり押ししたりせずに、1回のストロークで引き切りする。丁度、刺身をおろす時の包丁の使い方と同じ要領である。この時、変化の激しい試料では、固定液を数滴落とした上から切り、新しい切断面がすぐに固定液にふれるようにする。

生物分野で一般的に行われている、より自然な断面を作る方法として凍結割断面法がある。これは試料を一度固定し、氷晶防止剤に浸漬後、液体窒素で凍結し切断する方法である。凍結割断面を作ってから、その面を再度固定するので、実際に観察する面を固定することになるので、浸透時間の心配はなくなる。具体的な操作方は後述する。

ii) 固定

固定操作の目的は、電子顕微鏡観察標本を作るまでの種々の処理の間、あるいは観察中に試料が変化しないように、試料本来の構造を「固定」することである。ゲルのような水を多く含む試料、流動状あるいは低融点物質からなるやわらかな試料では、脱水、乾燥の途中での収縮、膨潤などの変形、または観察中の発熱によるダメージを受ける。このような操作中での環境変化にも耐えられるような頑強な組織に変化させることが固定の目的である。

固定には化学的固定と物理的固定がある。化学的固定は文字通り化学反応による固定作用で、物理的固定は、化学変化を伴わない凍結などの物理的な方法である。物理的固定は凍結して観察する項で述べる。

化学的固定に通常使われている主な固定剤(表1)は、アルデヒド類とオスミウム、ルテニウムなどの重金属の化合物で、後者は導電染色の役割もはたす。アルデヒド類とオスミウムの固定剤を併用する場合を二重固定といい、まず初めにアルデヒドの固定を行うのでこれを前固定という。つぎを後固定という。

試料に固定液を接触させるには浸漬固定と、灌流固定の二種類がある。食品の場合はもっぱら前者の方である。ちなみに後者は、実験動物の組織を観察する際に行われる方法で、麻酔した標本の血管内に固定液を流し、自然の状態を維持して固定するものである。

a. アルデヒド系固定剤

アルデヒド系固定剤ではホルマリンが古くから使われている。ホルマリンはホルムアルデヒド(HCHO)を37~40%含む試薬であるが、他に蟻酸とメタノールも含まれるので、10%ホルマリンと4%ホルムアルデヒドは同一ではない⁴⁾。

ホルムアルデヒドは1個のアルデヒド基をもち、分子量30.03と低分子で、組織内部への浸透性はすぐれているが、反応性は弱く微細構造の固定はよくない。ホルムアルデヒドは固定後も酵素活性が保存されるので、免疫法と組織化学的方法を合わせた研究に適している。

アクロレン(CH_3CHCHO)も低分子(MW:56.02)で、組織への浸透性がよく、固定作用はホルムアルデヒドより優れている。

グルタルアルデヒド($\text{OHCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$)は、分子内に2個のアルデヒド基をもつので、タンパク質と結合し架橋構造をつくるので形態保持能が高い。これがSEM観察の固定に最も多く使われている理由であろう。しかし、組織内部への浸透性は、組織表面で架橋をつくることと、分子量が100.21と大きいことからあまりよくない。

以上のアルデヒド固定剤の特徴から、表面観察が主の場合にはグルタルアルデヒドを用い、組織を割断し、

表2. Karnovsky 固定液の作り方

8% パラホルムアルデヒド*	25ml
パラホルムアルデヒドの粉末に70°Cに加熱した蒸留水を加え、0.1 NのNaOHを3-4滴添加し、液が透明になるまで湯浴中で攪拌。	
50% グルタルアルデヒド	5ml
0.2M カコジル酸またはリン酸緩衝液(pH 7.4-7.6)	20ml

* 市販品もある。

**上記の他、1% パラホルムアルデヒド、3% グルタルアルデヒドの配合もある⁵⁾。

表1. 化学固定剤の種類

アルデヒド系固定剤; ホルムアルデヒド, アクロレイン グルタルアルデヒド
重金属化学物固定剤; 四酸化オスミウム, 過マンガン酸カリウム 四酸化ルテニウム

内部も観察する場合にはホルムアルデヒドと併用することが多い。その一例として、Karnovsky 固定液(表2)がある。この固定液は4% パラホルムアルデヒド、5% グルタルアルデヒドの混合液を原液とし、浸透圧は2010 mOsm で高い。これを通常2~4 倍に希釈して用いる。固定の初期にパラホルムアルデヒドが組織内部まで浸透し、さらにグルタルアルデヒドが表面構造を十分に固定すると考えられている。

各種の固定剤は“pure”あるいは“EM grad”品として濃度8~70% のアンプル入りで市販されている。これを緩衝液で3% 前後に使用の都度希釈して使用する。

グルタルアルデヒドは保存中に重合したり酸(アルデヒド酸)の不純物を生成する。純粋のグルタルアルデヒドは280 nm に最大吸収を示すが、不純物があると235 nm にも吸収が現れる。この時は活性炭による除去あるいは蒸留する。

アルデヒドの化学反応は蛋白質のリジン残基やアルギニン残基のε-アミノ基、N 末端のアミノ基あるいは、システイン残基のSH 基の活性水素と反応して分子に架橋結合を形成し分子構造を安定にする。各タンパク質、クロマチン、リボゾーム、可溶性タンパク質、細胞骨格もよく固定する。リン脂質(ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン)の一次アミンとも反応するので脂質膜の固定にも寄与していると考えられる。糖質、糖タンパク質との反応性は乏しい⁶⁾。

b. 四酸化オスミウム

四酸化オスミウム(OsO₄)は強い酸化剤で、エチレン二重結合と反応する。不飽和脂肪酸などの二重結合が近接しているとその間に架橋を形成し、よく固定するので脂質を含む食品では必須である。また、システイン、メチオニン、トリプトファンの各アミノ酸とも反応し、弱いながらも蛋白質を固定する。

四酸化オスミウムはアンプル入の結晶あるいは1~4% 水溶液が市販品されている。結晶を溶解する際の注意としてつぎの点がある。アンプルをきれいに洗浄し蒸留水で濃度4% に溶解し、保存液として冷暗所に密栓して貯蔵する。この時、アンプル表面に不純物が残らないように気をつける。アンプル、保存用の容器に汚れがあると、溶解した時点で黒化して使用できない。溶解には時間を要するので前日に準備し、使用の都度、所定濃度に緩衝液で希釈する。

固定液は独特の刺激臭があり有害である。溶解、固定作業は全てドラフト内で行う。手につくと皮膚が黒

化するので、ゴム手袋を着用する。

固定時間は2 時間以内が一般的である。2 時間固定の場合、2 時間で浸透する距離の80% が、はじめの1 時間で浸透する。その後の浸透はほとんど進まない⁶⁾。この時、温度の影響は少なく、20℃ と4℃ では大差ない。長時間の固定は細胞が破壊されたり、タンパク質に弱く結合している糖が脱水の過程で流れでる原因となる。この現象を利用して、浸軟法:マセレーションという、0.1% 四酸化オスミウムに長時間浸漬して、細胞内の膜構造だけを残す SEM 特有の操作がある。四酸化オスミウムの場合、上記の欠点を防ぐために単独で固定することは少なく、アルデヒド固定との二重固定が一般的である。

c. グルタルアルデヒド・四酸化オスミウム二重固定

グルタルアルデヒド・四酸化オスミウムに代表される二回の固定処理をすることを二重固定という。アルデヒド系固定液とオスミウム固定液を混合して使う例⁷⁾は少ない。

前固定、後固定の各固定液、操作は前述の固定操作

表3. 固定液、緩衝液、添加剤の浸透圧⁷⁾

0.5% 四酸化オスミウム	10	mOsm
1.0% 四酸化オスミウム	36	mOsm
2.0% 四酸化オスミウム	72	mOsm
1.0% グルタルアルデヒド	120	mOsm
2.0% グルタルアルデヒド	230	mOsm
4.0% グルタルアルデヒド	470	mOsm
0.05 M リン酸緩衝液	110~115	mOsm
0.10 M リン酸緩衝液	215	mOsm
0.20 M リン酸緩衝液	400~415	mOsm
0.05 M カコジル酸緩衝液	65	mOsm
0.10 M カコジル酸緩衝液	160	mOsm
0.20 M カコジル酸緩衝液	380	mOsm
0.05 M コリジン緩衝液	75	mOsm
0.10 M コリジン緩衝液	135	mOsm
0.20 M コリジン緩衝液	250	mOsm
0.0125 M ペロナール緩衝液	55	mOsm
0.025 M ペロナール緩衝液	115	mOsm
0.050 M ペロナール緩衝液	220	mOsm
0.10 M ショ糖	100	mOsm
0.15 M ショ糖	170	mOsm
0.20 M ショ糖	220	mOsm
0.10 M グルコース	100	mOsm
0.15 M グルコース	160	mOsm
0.20 M グルコース	200	mOsm
0.001 M CaCl ₂	1	mOsm
0.005 M CaCl ₂	12	mOsm
0.010 M CaCl ₂	26	mOsm

と同じである。注意点としては、前固定から後固定に移る間に前固定の成分を十分に洗浄することである。洗浄は緩衝液で行う。そのため、前固定と後固定に用いる緩衝液は共通でなければならない。洗浄に必要な時間は前固定の時間と同等と考えられている。前固定が2時間であれば洗浄も2時間行う。この間、数回洗浄液を取り替え、未反応の前固定液成分を除去する。

d. 糖質用固定剤

グルタルアルデヒド・四酸化オスミウム二重固定は動物、植物組織をよく固定するのが、多糖類を主成分とする組織の固定は不十分である。糖類の固定にはつぎのような方法がある。

① PATA (periodic acid-thiocarbohydrazide-Ag proteinate) 法⁹⁾: この方法は糖のアルコール残基を過沃素酸でアルデヒド基に変えて Schiff 試薬で検出する PAS 法をもとにしている。Schiff 試薬のかわりに TCH (thiocarbohydrazide) または TSC (tiosemicarbazide) とプロテイン銀 (Ag proteinate) を用いて多糖を固定する。透過電子顕微鏡の研究結果では植物細胞の細胞壁、デンプン粒のコントラストが顕著に高められ再現性もよい。

② グルタルアルデヒド・ルテニウムレッド混合固定液⁸⁾: この固定液はルテニウムレッドだけでは反応性が低く、四酸化オスミウムとの併用が必要になる。実際の操作は以下のとおり。

イ. 0.66 M カコジル酸緩衝液, 1.2% グルタルアルデヒド 100 ml に 5 mg のルテニウムレッドを溶解した液で 4°C または室温で 2~8 時間固定。

ロ. 0.15 M カコジル酸緩衝液で 3 回洗浄。

ハ. 100 ml の 0.66 M カコジル酸緩衝液に 5 mg のルテニウムレッドを含む 1.66% の四酸化オスミウム溶液で室温 3 時間固定。

ニ. 0.15 M カコジル酸緩衝液で 2 分洗浄。

e. 浸透圧

動物・植物の細胞から成る組織を固定する場合には浸透圧を考慮しなければならない。細胞を高張液に入れると収縮し、低張液では膨張する。この変化を防ぐには等張液の固定を用いる。しかし、実際に試料の浸透圧を正確に把握することは簡単ではなく、細胞の浸透圧は不明であることが多い。そこで経験的に血液、体液の値 (哺乳動物の血液: 300 mOsm) を参考にし、これらの値よりやや高い 300~400 mOsm の固定液が好結果が得られるようである。

表 3 に固定液、緩衝液の浸透圧⁷⁾を示した。所定の値に調整するには蔗糖などの添加剤を用いる。

f. 緩衝液

前記の浸透圧にまして試料と固定液の pH をそろえることは重要である。pH の調整には各種の緩衝液を用いる。

良く使われている緩衝液はカコジル酸緩衝液 (cacodylate buffer), リン酸緩衝液 (phosphate buffer), ペロナール酢酸緩衝液 (veronal acetate buffer), コリジン緩衝液 (collidine buffer) がある。それぞれ性質が違うので、試料の目的とする成分との相性を考えて選択する。固定液との相性ではグルタルアルデヒド、四酸化オスミウムの固定液にはカコジル酸緩衝液, リン酸緩衝液を用いることが多い。

カコジル酸緩衝液の調製条件を表 4 に示す。

表 4. カコジル酸緩衝液の作り方⁷⁾

保存 A: 0.2 M カコジル酸ナトリウム
($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) 42.8 g を
1000 ml の蒸留水に溶かす
保存 B: 0.2 N 塩酸

希望する緩衝液の pH に応じて A 液, B 液の量を表から選ぶ。					
pH	A 液 (ml)	B 液 (ml)	pH	A 液 (ml)	B 液 (ml)
5.0	50.0	47.0	6.4	50.0	18.3
5.2	50.0	45.0	6.6	50.0	13.3
5.4	50.0	43.0	6.8	50.0	9.3
5.6	50.0	39.2	7.0	50.0	6.3
5.8	50.0	34.8	7.2	50.0	4.2
6.0	50.0	29.6	7.4	50.0	2.7
6.2	50.0	23.8			

上記の割合で混合し、蒸留水を加えて 200 ml にすると、0.05 M の緩衝液が得られる。

食品の試料では軟らかく、保形性のない試料もある。例えば、図 5 はゲル化剤無添加のやわらかなヨーグルト³⁾である。この試料では一度に、観察する大きさに細切することはできなかった。固定前に細切すると、試料はくずれて原形をとどめなくなる。これを防止するために、スプーンですくい採った程度の大きさのまま固定液に入れ、そのまま 2, 3 日冷蔵庫内に静置し、試料が硬くなったのを確かめてから細切する。その後、新しい固定液でさらに固定し、フローチャート 2 の手順で観察した。

このような試料の固定期間は短くて 2, 3 日から長い場合は 10 日間に及ぶ試料もあり⁹⁾、十分に固定することが大事である。

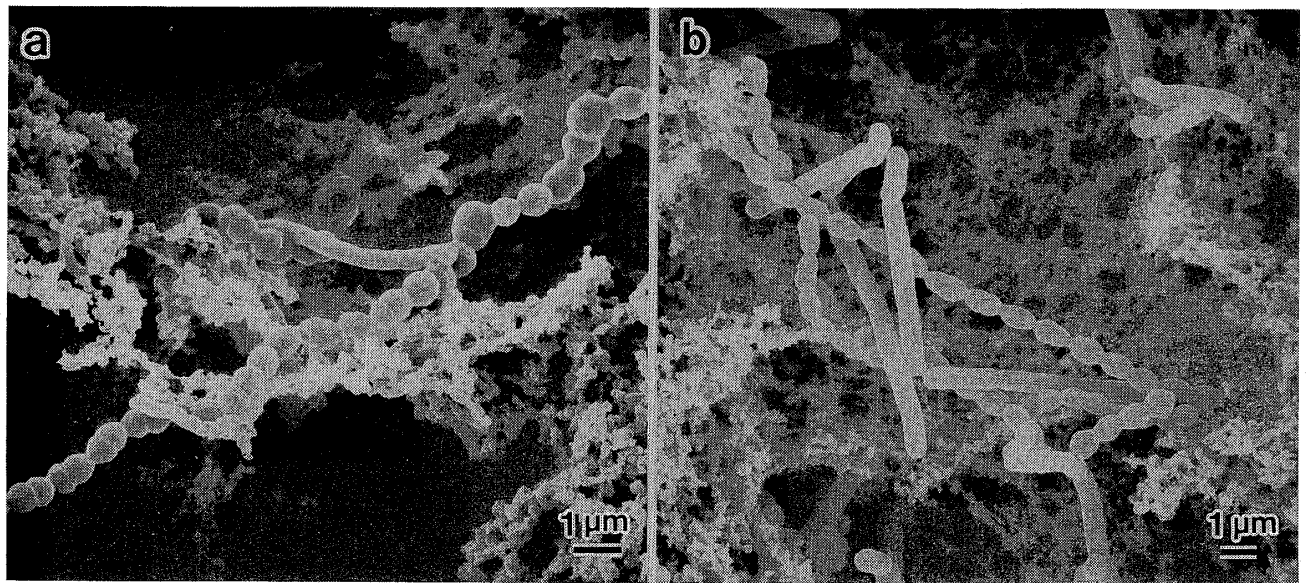


図 5. 含水試料の観察例³⁾

a) 市販プレーンヨーグルト。b) *St. thermophilus* (連鎖球菌) と *La. bulgaricus* (桿菌) の共生。菌体の周囲はカゼインミセルが凝固したゲル。

文 献

- 1) 小倉一道: J. Soc. Powder Technol., Japan, **35**, 455-460 (1998)
- 2) 安達公一, 村中祥悟: 医学・生物学の走査電子顕微鏡, 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編, pp 77-86, 医学出版センター (1992)
- 3) 種谷真一, 木村利昭, 相良康重: 食品・そのミクロの世界, pp 18, 19, 78-91, 147-149, 槇書店 (1991)
- 4) 星野忠彦: 調理科学, **22**, 183-189 (1989)
- 5) 金関 恵: 医学・生物学電子顕微鏡法, 日本電子顕微鏡学会関東支部編, pp 106-134, 丸善 (1982)
- 6) 村上 悟: 電子顕微鏡基礎技術と応用 1995, 第 6 回サマースクール実行委員会編, 学際企画 (1995)
- 7) 堀田康明: 医学・生物学の走査電子顕微鏡, 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会編, pp 62-77, 医学出版センター (1992)
- 8) Luft, J. H.: Anat. Res., **171**, 347 (1971)
- 9) McManus, W. R. McMahon, D. J. and Oberg, C. J.: Food Structure, **12**, 475-481 (1993)