

界面を出す

ミ ク ロ ト ー ム 法

酒 井 俊 男

(株)明石製作所 〒113 東京都文京区本駒込 6-3-7

(1985年10月31日 受理)

Ultramicrotomy

Toshio SAKAI

Akashi Seisakusho, Ltd.

6-3-7, Henkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113

(Received October 31, 1985)

There are two methods for observations of boundary surface of metal, polymer, mineral, and biological tissues under Scanning Electron Microscope or Transmission Electron Microscope. One of them is to observe the block surface which is polished as cut with microtome. The other is to observe the complementary surfaces which are cut out of a block with ultramicrotome. The latter has the advantage of making it possible to observe sections which are cut in thicknesses not only 30-100 nm but also 0.5-1 μm . That is to say, some specimens can be studied by finding their right boundary surfaces under a light microscope; some under an electron microscope.

1. はじめに

界面をミクロトーム法を応用して電子顕微鏡で観察する場合、ミクロトームの用い方に2通りが考えられる。1つは、ミクロトームにより試料面を切削して、鏡面に仕上げるいわゆる“切削研磨”で界面を削り出す方法と、他の1つは、超ミクロトームで薄片を作りその試料の界面を、超薄切片として電子顕微鏡で直接観察する方法である。後者の場合、界面として2面が観察対象になり、1面は薄片であり、もう1面は切削面(ブロック側)である。この方法の利点は、観察表面を30 nm~100 nmまでの超薄切片が出来ると共に、1 μm 前後の厚い層も切り取る事が出来、試料によっては薄片を光学顕微鏡または電子顕微鏡下で確認しながら作業を進めて行ける事である。

ミクロトーム法(以後“切削法”とする)により界面を出す場合、切削時に生ずる試料変成(アーチファクト)を充分考慮する必要がある。それは切削時に切片側に入るコンプレッション、チャター、シワ及びメスマークなどで、同時に試料側には、ナイフの傷の痕跡と切削速度

の変化により生ずるチャターや、振動により試料面に凹凸が入ることが考えられるからである。ここで切削法と応用例について述べる。

2. 切 削

電子顕微鏡を用いて切片を観察する最初の試みは、1939年 Ardenne¹⁾ によりなされたがその理論を裏づけるための充分なミクロトーム、ナイフ及び包埋剤などがなかったため実証されなかった。今日の超薄切片技術の基礎を確立したのは、1948年 Peace と Baker²⁾ が光学顕微鏡用ミクロトーム、Spencer-820型ミクロトームを改良し、Collodion-Paraffingの2重包埋試料を用いて、0.3~0.5 μm の切片作製に成功した時に始まる。現在のように常時 300~600 Å の切片が安定して薄切できるようになったのは、1953年 Sjöstrand³⁾ が熱膨張送りのミクロトームを開発し、またこれと同年に Porter と Blum⁴⁾ が機械送りのミクロトームを報告した時から始まる。前者の熱膨張送りのミクロトームは、送り機構にヒーターを利用し、加熱で主軸を膨張させる方法によって、200 Å の切片がえられた。これに対し後者の機械送

Table 1

Specifications

Ultramicrotome	Feed System	Feed	Movement of specimen	Cutting Speed	Cryo-Attachment	Zoom Optical System
Huxley	Mechanical advance by Lead screw	5nm~150nm	** (D)	0.2~2mm/sec	X	—
LKB-4800	Thermal and manual (*)	5nm~100nm * 30nm~15 μ m	** (B)	1~50nm/sec	O	movable
LKB-8800	"	5nm~130nm * 30nm~50 μ m	"	0.1~20nm/sec	O	"
LKB-IV	"	0~200nm * 200~2.5 μ m	** (C)	0.1~70nm/sec	X	Semi Fixed
LKB-V	"	5~200nm * 100nm~50 μ m	** (B)	0.1~20nm/sec	O	Movable
LKB-New Nova (Nova)	"	10~200nm * 100nm~50 μ m	"	0.1~20nm/sec	O	Fixed
Leitz	Thermal	20~150nm	Rotation	3~50nm/sec	X	Semi Fixed
Hitachi MM-2	Electra mag	4~700nm	** (C)	0.08 10nm/sec	X	"
JEOL JUM-7	Thermal expansion	5nm~4 μ m	** (D)	*0.6~10nm/sec	X	"
Porter, MT-1	Mechanical advance by lead screw	25nm~2 μ m	** (A)	Hand cutting	X	"
Porter, MT-2	"	1nm~4 μ m	** (C)	*0.09~3.2mm/sec	O	"
SORVALL MT-6000 (MT-5000)	Microprocessor controlled Mechanical	5~995nm	** (D)	*0.1~39.9nm/sec	O	"
Reichert OMU ₂	Thermal	10~150nm	** (D)	*0.5~5nm/sec	X	Fixed
" OMU ₃	"	10~150nm 0.1~20 μ m	"	*0.5~10nm/sec	O	"
" Ultracut-E	Mechanical by Steppingmotor	1~99nm	** (C)	*0.1~90nm/sec	O	"

*manual mode speed variable by handwheel revolutions

** A. The specimen arm is deflected sideways so that the specimen block moves through a parallelogram-shaped path.

B. The specimen block moves through a D-shaped path, the downward cutting stroke forming the straight leg.

C. The specimen arms of the Porter-Blum II, LKB-IV and Reichert-E Ultramicrotome are moved backwards from the knife is retracted during the upward stroke until the specimen block has cleared the knife edge.

D. The specimen arms in the LKB-I, III, V, Nova Ultratomes are moved up and down along the same path, but the knife edge during the return stroke.

りのマイクロトームは、カンチレバーアームを主軸とし、この先に試料を取付け位置のずれたピボットで支持して主軸を上下運動させ、ラチェットによりリードスクリューを回し、アームを微動させて試料を送る機構で、送り量の最小は 250 Å であった。現在あるマイクロトームの送り量は Table 1 の如くである。表中 Cryo-アタッチメントとあるのは、近年生物試料の新鮮無固定試料及びゴムの様な弾力性に富む材料を、切削出来る硬さとなる迄冷却して切削する冷却装置である。詳細は別項で述べる。

試料を切削するためには、マイクロトームの精度だけでなく、試料とナイフとの関係にかなり左右されるものとする。現在では包埋剤の発達とナイフの進歩、その上超薄切片技術が進んだことも加わり、医学生物学の試料については、ほとんど問題なく切削出来るようになった。

超薄切片法を理論的に考える時、切削加工法が基礎となっており、超薄切片法と切削加工法の双方は目的が異なるが、切削機構は同じで非常に関係が深い。両者の目的は前者が削り屑(切片)で、後者が被削材(ブロック)

である。超薄切片切削は、切削時に出来る“屑”の面をいかに大きく、薄く、かつ歪のない物にするかにあり、そのための切削条件を研究し選定している。

切削性を理論的に見ると Fig. 1 のような要素が考えられ、それらの諸条件は①試料を何 nm に切削するか、②何度の刃角のナイフを用いるか: α 、③ニゲ角何度に取付けるか: β 、④ナイフポートに水をどの程度張るか: R、⑤切削速度: h、以上の相関関係が超薄切片作製の良否を左右する。実際には試料を容易に切削するためには、試料面を小さくし、 γ が小さくなるナイフを用いて、切削速度を 1~2 mm/sec にセットすれば、ほとんどの試料は切削される。これらの条件を別の言い方で説明すると、良い切削性は切削抵抗と切削時に生じる摩擦を小さくすることであり、切削抵抗は試料を小さくし、刃角の小さなナイフを使用すれば小さくなる。切削摩擦は試料の硬度及び、ナイフに水を用いると小さくなる。超薄切片作製に用いるポートの水は、切削された切片が刃面に付着するのを防ぎ、生物試料の場合その切片が水面上で伸展されると共に、メッシュに載物するための作業を容易にする働きを持っている。しかし水の量が少な

Table 2
Ultramicrotomy

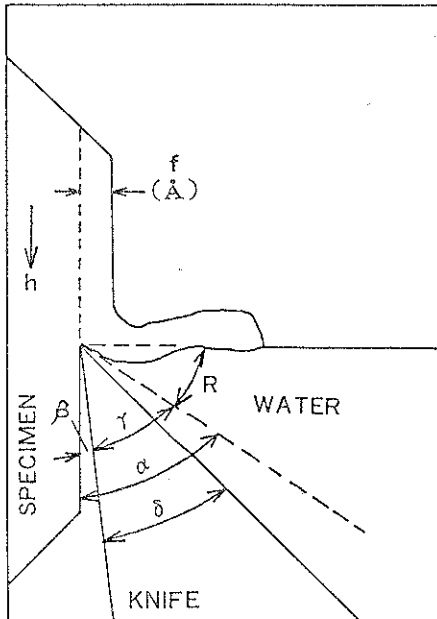
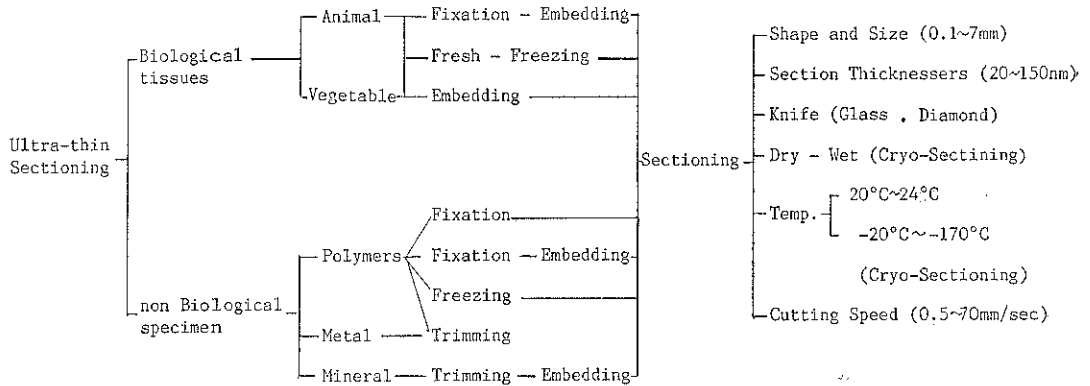


Fig. 1 Theoretical cutting form;

f : feed
 h : speed
 α : sectioning angle
 β : clearance angle
 γ : real angle of knife
 δ : knife angle
 R : rake angle

く刃先に水がのっていない場合、摩擦は大きくなり、水が水平より多い場合、抵抗は増し切削を困難にするので、量の調整は慎重にしなければならない。実際には試料と切削によって Table 2 に示す様な条件が考えられ、切削は多様である。切削性の良否は試料の硬度と大

きさ、使用するナイフと角度、および切削速度などの相関関係で決まる。

生物試料の切削は、室温を 20~24°C、湿度を 50% に整え、試料の大きさを 0.5 mm² 以下とし、切削性の良いダイヤモンドナイフを用い、切削速度を 1 mm/sec にして、厚さ 60~100 nm (銀-金色の干渉色)⁵⁾ の切片を得るのが理想条件である。なお切削速度は、試料により 20~50 mm/sec と早くしたり、0.2~0.5 mm/sec と遅くする場合もある。高分子材料のように弾力性に富んだ試料では、試料温度を -100~-170°C に冷却し、切削可能な硬度まで下げなければ切削できない場合がある。生物試料で温度を下げて切削する方法は、凍結超薄切片法と言い、目的により多く利用されている^{6,7)}。

3. 試料の形状と切削性

試料を切削する場合、その形状は、ナイフの性能の次に重要で、試料によっては Fig. 2 に示すように正方形又は矩形などにトリミング（整形）を行う必要がある。トリミングは切削する試料部分を切り出し、切片上に観察視野が入る事と、切りやすくすることが目的である。実際には、トリミングされた試料を見ると芸術品の様な形もあるが、中にはやっと切り出したと明示する形状もある。このトリミング作業は必要以上に丁寧にすることは、その出来、不出来は次の切削を左右するし、出来ない状態のまま切ると、刃先の損傷にもつながるので充分注意されたい。トリミングは糸ノコ、ヤスリ、カミソリ、小型グラインダーまたは、マイクローム等で行うがその作業は試料によって慎重にする必要がある。特に竹材、歯及び結晶化した試料等では組織が崩れやすいため、慎重に行わないと切削時にバラバラとなり、正常な切片及び鏡面を得る事は困難になる。

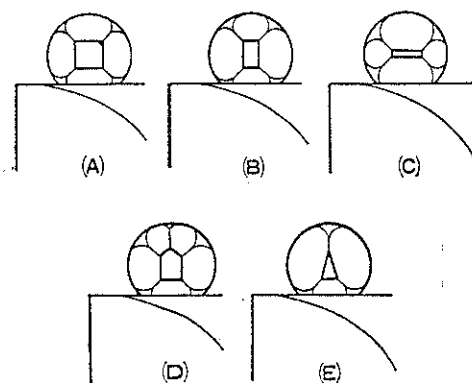


Fig. 2 Faces of trimmed specimen block.

3.1 切削面の形状と大きさ

(1) 試料面の大きさ 試料面の大きさは切削する試料、目的によって異なるが、普通生物試料では $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$ にして切削する。切削出来ない場合は徐々に小さくして行き、切削出来る大きさにトリミングする。時には大きい視野の切片が必要になり $1 \times 2 \text{ mm}$ に試料面を切り出す。また、金属材料では数ミクロン程度にすることがある。面の大きさは大きくなればなる程切りにくいが、逆に小さくなる程容易になる。

(2) 試料の形状 切削面の形状は切削の目的と容易さを考慮して形を造る。筆者は五つの形にトリミングを行っている (Fig. 2)。

a) 形状 (A) は正方形にトリミングを行い、すべての試料に応用できる一般的な形状で、サイズは $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$ である。

b) 形状 (B) は硬い試料を切る時に応用する形である。これは切削抵抗が小さく、刃先の損傷も少ない。面の長短の比は試料の硬さ、目的によって決定する。普通この形は硬組織、皮膚、動脈など切削面内に硬、軟組織が密着しているような試料に応用されている。サイズは生物試料の場合 $0.5 \times 1.0 \text{ mm}$ または $0.3 \times 0.5 \text{ mm}$ であるが、金属のような硬い試料では $0.1 \times 0.01 \sim 0.2 \times 0.5 \text{ mm}$ にする。

c) 形状 (C) は同じ試料を連続的に数多く切る時に適した形で、連続切片用のトリミングと言える。切削面の大きさは、1枚のメッシュに何枚の切片を載物するかによる。例えば $0.5 \times 2 \text{ mm}$ のスリットメッシュに100枚の切片を載物したい時は $0.8 \times 0.02 \text{ mm}$ 以下にトリミングすることになる。

d) 形状 (D), (E) は切削時、刃先から切片が離れにくい場合に応用する形で、普通の工業材料では切削性の悪い場合が多く利用度が高い。切り離れが悪いと言う

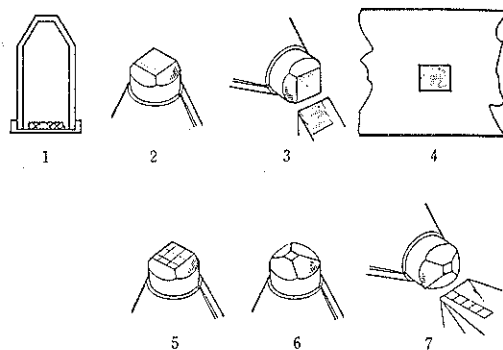


Fig. 3 Stages in the trimming of a large specimen block.

ことを説明すると、切り出された切片が刃先の水面上に浮き出した後、試料が完全に切れず、主軸の降下と共に切れた切片が試料の端に付着して、水面上から消えてしまうことがある。なおこの方法は生物試料にも応用できる。

以上の形は代表的なもので、実際には変形した形状になると思うが基本は変わらない。

3.2 大きい組織のトリミング法

大きい組織のまま固定、包埋し、光顕切片を作製後、光学顕微鏡下で目的の組織または細胞を確認したら、その部位を超薄切片の切削が容易になるように小さくトリミングして薄切する方法である。この利点は組織片が大きいので目的の組織または細胞を見出すことが容易な事である。欠点としては大きい組織を用いるために固定液および包埋剤の浸透が悪くなるので、操作には充分注意が必要になる。またもう一つの難点としては、光顕切片切削後トリミングするために一旦ブロックをマイクロームより取りはずさなくてはならず、トリミング後再びマイクロームに取付ける時は試料面とナイフの調整に充分注意しなくてはならない。

図解により詳しく説明すると (Fig. 3)。

(1) この方法は組織が大きいため包埋は図に示すように、ビームカプセルを逆にして使用するか平板包埋するのが一般的である。包埋には組織片がカプセルの底面に平に密着するように行う。

(2) 包埋した組織の大きさにより異なるが、組織の周りの樹脂を削り取る。

(3) トリミングした後マイクロームに取付け、光顕切片を切削する。切片の厚さは通常 $1 \mu\text{m}$ 程度であるが試料が 5 mm^2 以上になると、良い切片を切ることが困難な場合もあるので $1.5 \mu\text{m} \sim 2.5 \mu\text{m}$ とし、ナイフも 8 mm または 10 mm 幅のガラスナイフを使用する。

(4) 光顕切片はスライドガラス上に伸展、染色して

目的の組織または細胞の有無を光学顕微鏡下で確認しその位置を残して電顕用にトリミングする。しかしその組織や細胞の位置を確認したにもかかわらずブロック上の別の場所をトリミングすることもあるので、位置の確認は慎重に行う必要がある。筆者は貴重な試料の場合は、ポラロイドにてブロック面、光顕切片及び使用するメッシュ像を撮影しそれらを複合 (superimpose)⁸⁾ で視野の配置を充分検討してトリミングを行っている。

(5) トリミングの位置決めは、ブロック表面の組織が鮮明に見える場合は直接実体顕微鏡下でトリミングを行うが、不鮮明な場合はトリミングする場所を片刃のカミソリで井形に軽く傷を付けて囲み再度場所を確認した後行う。

(6) トリミングは片刃のカミソリを用いて手で行うか、ブロックをマイクロームに取り付け、ガラスナイフを 30° 斜めに固定しブロックの側面を削っていく方法もある。

(7) 超薄切片の切削に際しては先の直接法と同様、面合せの左右はもとより、試料の上下に対しても慎重にチェックする必要がある。このトリミング法では、ブロックを一旦マイクロームから取りはずしトリミングした後、再度取付けることになるので、この時 1 mm² の試

料ではブロック面の上下で 1 μ m 程傾き、時には 10 μ m も傾いた状態で取り付けられることがある。このため傾きを矯正せず面合せ後すぐに切削を行うと、試料が傾いた量だけ試料の上部または下部をバサリと切り落として貴重な試料をボツにしてしまうことがある。

3.3 ミクロームによるトリミング法

マイクロームによるトリミングは試料面をガラスまたはダイヤモンドナイフを用いて、1~5 μ m の厚さで切削しながら整形を行う方法である。この利点は試料の損傷が少ない事と、試料によっては切削した切片を光学顕微鏡を用いて、試料の有・無や良・否を確認しながら作業を進めて行くことが出来る。実際この作業を常時行なうと、マイクロームの機種によっては性能を悪くするものもあるが、LKB 社製のものは主軸の支えに板バネを使用しているので、その心配はない。Fig. 4 により方法を説明すると、①マイクロームのコントロールユニットの主軸の動きを手動にし、試料を上限 (UP) にする。オリエンテーションヘッドは Fig. 4-(1) のように左手に持ち、右手でマイクロ送りを 1~5 μ 回転しナイフを試料方向に前進させ、左手の試料を押し下げて切削する。試料が下限 (DUWN) になると、ナイフが自動的に 50 μ m 後退し、主軸の押えをゆるめると、試料が上限にもどると共に、ナイフも元にもどって次の切削が出来る。この作業のくり返しにより試料表面を出す。(2)表面が出たら、ナイフステージを Fig. 4-(3) の様に 30 度右に傾

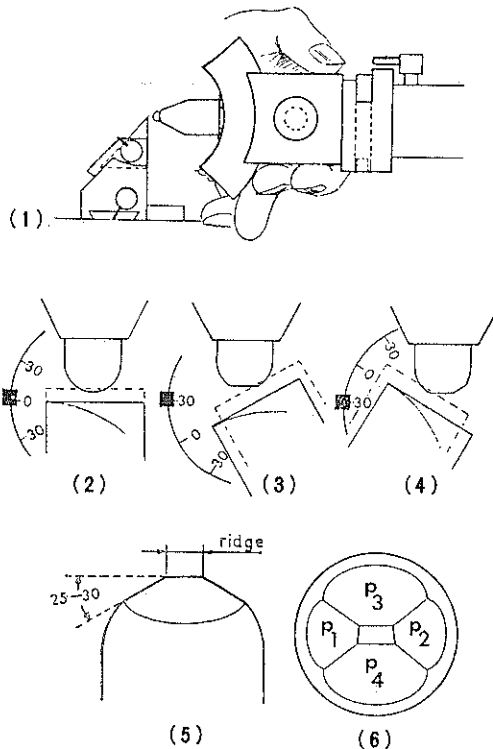


Fig. 4 Stages in the trimming of a specimen block on the ultra microtome.

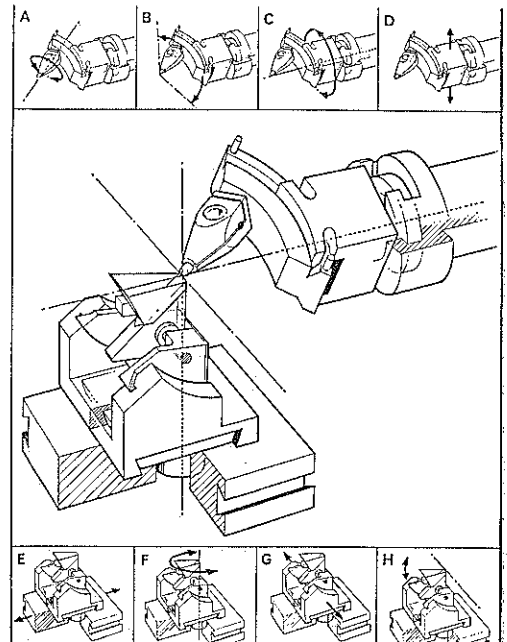


Fig. 5 Possible adjustments to the knife and the specimen block in the ultra microtome.

け、P₁面を削り、左に傾けP₂面を削る。次に試料を90度回転し、先の要領でP₃, P₄面を削り、Fig. 4-(6)の様に整形が仕上がる。

3.4 試料の方向づけ

試料をある角度で切削し、電子顕微鏡で観察する場合、切削試料の方向づけは重要な要素となる。角度を付けて切削するには、まず試料とナイフステージの両方がどのような角度まで動くかを調べてから試料をホルダーに取り付ける。Fig. 5にLKB社製マイクロトームの動きを示す。A: 試料ホルダーの回転, 360度。B: 試料ホルダーの傾斜。C: オリエンテーションヘッドの回転, 360度。D: 試料の上下位置調整。E: ナイフステージの前後。F: ナイフの回転, ± 30 度目盛付。G: ナイフの左右。H: ナイフの角度調整, 15~20度目盛付。以上の動きにより二方向からの試料切削も可能である。

4. ナイフ

ナイフはマイクロトームの性能と同じくらい、超薄切片切削の成果を左右する働きを持っている。現在使用されているナイフは、ガラスナイフ、ダイヤモンドナイフが主であるが、近年になってサファイヤナイフも市場に出始めている。ガラスナイフは、ナイフ作製機(ナイフメーカー)を使いFig. 6のように、刃角35~55度迄5種類の物が得られ、試料と切削の目的により使い分けている。ダイヤモンドナイフはFig. 7の様に、ホルダーが取付けられた刃角44~55度迄の製品が通常市販されているが、特別注文による刃角22.5度又は60度のナイフも入手できる。切削にあたり、ガラスナイフとダイヤモンドナイフのどちらを使用すべきかと言う質問を多くされるが、生物試料などで常法に従って固定・脱水・置換の後、混合比を8:2で樹胞包埋した材料ではガラスナイフでも十分切れる。また2mm²を越える試料の場合では、むしろガラスナイフの方が安全で且つチャターの入らない良い切片が得られる。

現在のガラスナイフは、1950年Latta, H. Hartmann J. P⁹⁾によって報告された方法が、基礎となり進歩したものである。それ以前は市販のカミソリ刃を再研磨して使っていたが、ガラスナイフが金属製ナイフに比べ、切削性も良く長寿命であることから、Hartmann型の利用が多くなり1957年に藤原、田路¹⁰⁾によって、ガラスの割り方が紹介された。1957年筆者は、ガラスを10cm²の正四角形に割り、それを四等分して5cm²の板を作り、刃先になる角を選び対角線に割って、刃角45度を有する直角三角形の理想的形状のナイフを作製する方法を考案した。この方法は1959年、高橋¹¹⁾により報告され、現在ではこの三角形のガラスナイフが主流となつて

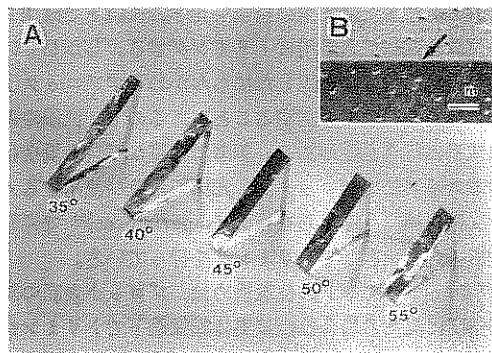


Fig. 6

- A Glass knives with various angle made by using LKB knifemaker
B Knife edge observed with the scanning electron microscope

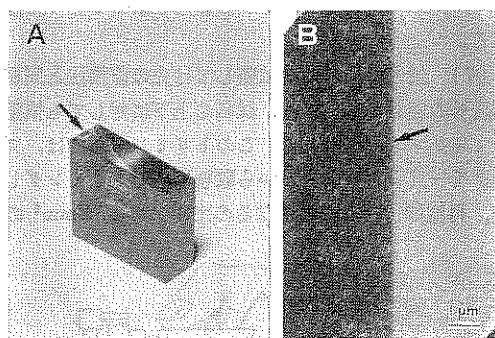


Fig. 7

- A Diamond knife made by JUMDI (by courtesy of SEMAL Co.)
B Knife edge observed with scanning electron microscope

いる。

ダイヤモンドナイフは、1953年 H. Fernandez Moran¹²⁾によって開発されたもので、当初は骨や金属試料の切削のために作り出され、我国では筆者が1957年に入手し紹介した¹³⁾。現在でもこのナイフは大変高価なものであるにも関わらず、多くの研究者によって使用されている。その理由の1つは、近年になって試料を作製する時に、樹脂の混合比をガラスナイフでは切削できない程度の硬度に重合させるため、ダイヤモンドナイフの必要性が高くなっているのである。確かにこのナイフで切削することにより時間が短縮できると共に、切片の像質は非常に良く、検鏡してから切り直しをする心配がない等、満足のいく成果が上がっている。しかしこのナイフには、長所、短所がハッキリとしており、刃先はガラスナイフに比べ非常に不安定で、良い刃先と悪い刃先がある。これは製作上の問題と合せ、材質、検査基準にも問

題があると考えられる。ダイヤモンドナイフの耐久性は3mm幅のナイフで、毎日十数点の生物試料を切削しても、2~3年は使用出来るし、使用者がベテランの場合は4~5年も使うことがある。しかし取扱いに慎重を欠くと、1日にして使用不可能となる性質を持ったナイフなので、十分注意を要する。なお詳しくは文献を参照されたい¹⁴⁾。

5. 超薄切片の載物

載物は、ナイフポートの水面に浮遊した超薄切片をシートメッシュに載せる作業である。これについては、切片がメッシュ上にシワなく載物出来れば良しとするところもあるが、試料や研究目的によっては特定な視野を確実に観察したい場合もあり、その様な時は慎重に行なわなければならない。載物方法については研究者により異なるが、以下に筆者が常用している方法を紹介する。(Fig. 8)

1) 押し付け法 Fig. 8の様に、グリッドをピンセットで持ち水面にある切片の真上より押し付けて載物する。このポイントは、押し付けた時にグリッドの中央部が切片に最初に触れるように、グリッドを図のように曲げて置くことである。失敗する多くの原因は押し付けの際、最初にピンセットまたはグリッドの端が水面に接し、切片が移動するためである。

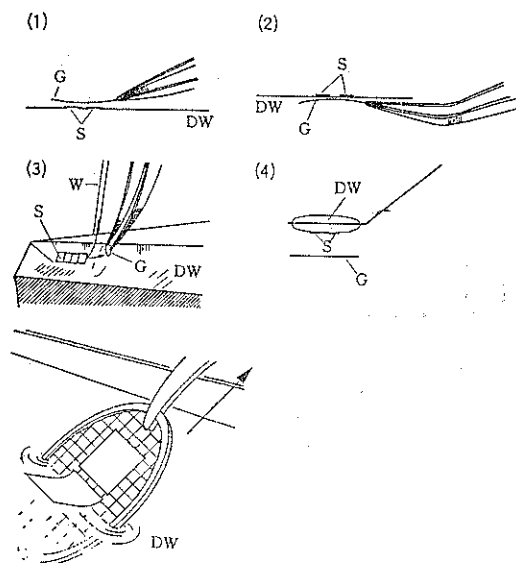


Fig. 8 Stages in the collection of the sections.

S: section

G: grid

DW: Distilled water

W: eyelash probe

2) 掬い取り法 Fig. 8(2)の様に、グリッドをピンセットで持ち、水面上の切片を金魚掬いの如く掬い上げ載物する。このポイントは掬い上げた切片がグリッド中央に止る様に押し付け法と同様グリッドを曲げておく事である。

3) 引き上げ法 Fig. 8(3)の様に、グリッドをピンセットで斜めに持ち、4/5程水中に入れて切片をマツ毛の先端でグリッドにたぐり寄せ、切片の端がグリッドに接した事を確認して引き上げると、切片は連続した状態で載物できる。

4) ループ法 Fig. 8(4)の様に、白金耳で切片をポート面より掬い上げグリッドやスライドガラス上に載物する。これは切片が1~2枚と少ない場合には良く、切削しながらも掬い取ることが出来る。白金耳は切片の大きさと掬う枚数により輪の大きさと使用線の太さを選択する。線の材質には銅、ステンレス、アルミなども使用できるが、これらの欠点は清掃が困難な事である。輪に切片の破片が付着した状態で載物を行うと、切片が輪に接着して失敗することがある。このため清掃が容易にできる白金線を使用することが望ましく、白金線の清掃は、アルコールランプで加熱する事でできる。

6. 凍結超薄切片法

凍結超薄切片法は、試料を -70°C ~ -150°C に冷却して、生物試料では新鮮な材料を、無固定無包埋で薄切し、高分子材料では、無処理で試料を薄切することを目的に利用する方法である。凍結超薄切片を作製するための装置として、クライオ・ウルトロームとクライオ・キット型の2種類があり^{15,16)}、現在は後者のクライオ・キット型が使われている。このクライオ・キット型は通常の超ミクロームに冷却槽を装着し、液体窒素で試料とナイフ及び槽内を冷却し、試料とナイフの温度はヒーターと温度センサーでコントロールしている。装置と冷却システムを Fig. 9 に示す。

応用例 1 粉体層の断面の観察 (Fig. 10)

粉体層を電子顕微鏡で観察するには、試料を樹脂で包埋しミクロームで切削する。包埋の際には、試料(磁気テープ、印刷インク)が包埋剤により変成する事もあるので、これを防ぐためには半重合した樹脂を用いるか、試料を防護処理(水溶性ノリ等)してから包埋する。

応用例 2 金属材料の切削 (Fig. 11)

金属材料のミクロームでの切削は、切片に歪が入るためあまり利用されていない。しかし前述したように、試料を短時間に数100Åに薄切出来、電子顕微鏡で観察出来る事は非常に魅力ある方法である。試料がプリント

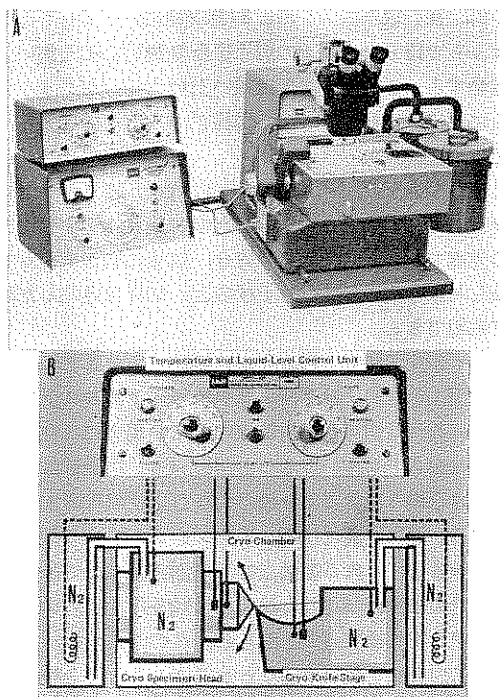


Fig. 9 Cryo ultratome.

- A LKB-8800 Ultratome equipped with cryo-kits
 B Schematic diagram of the temperature regulation system

基板用の銅板では、その大きさを 0.1mm 以下にして切削すると比較的容易に薄切できる。しかし半田に用いる鉛、錫の合金の場合は、切削時に切片にコンプレッション(歪)が入りやすく、時には試料がナイフに付着する事もあるので、この様な試料は小さくトリミングして切削すれば、試料が刃面に付いても損傷を少なくすることができる得策である。

応用写真は、A: プリント基板用銅の薄板と、B: 半田付用鉛錫の合金であるが両者共切削時の歪は少ないことが、像からも解る。鉛錫の合金など研磨により鏡面にすることは困難であるが、切削法では容易に鏡面が得られる。図中 C, D はアルミ材 (99.99%) の超薄切片作製時に生ずる試料表面の歪を、再包埋切削法により観察する。C: は 0.1 μ m の厚さで切削した時の試料表面(矢印)を示す。写真でも解るように試料の表面はスムーズである。D: は 0.5 μ m の厚さに切削した時の試料の表面状態を示すが、C: に比べると切削時に可成りの歪が入ることが、表面の凹凸(矢印)から解る。視野中に見える斜の線は二重露出で撮影した倍率測定用のグレーティング像。

応用例 3 二方向断面観察 (Fig. 13)

試料を二方向から観察するための切削は、Fig. 12 に

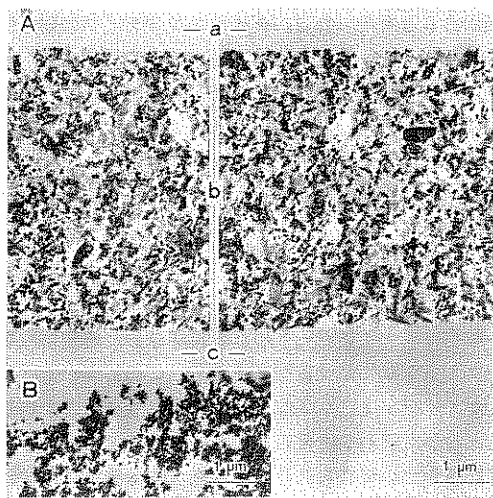


Fig. 10

- A Ultrathin sections of magnetic tape.
 a embedding material
 b oxide particle layer
 c basic layer
 B Deformed section when polymerized with embedding media

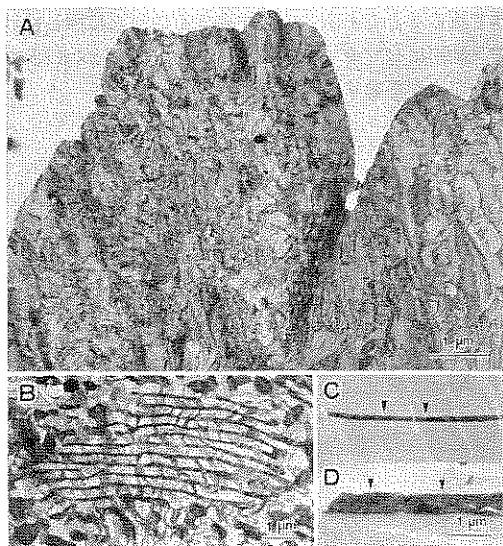


Fig. 11 Ultrathin sections of metals.

- A Copper plate for print circuit
 B An alloy (tin/lead) for solder
 C Sections resectioned perpendicular to an original aluminum section
 Judging from the resectioned sections,
 a surface of 1000 Å original section is smooth (arrow),
 b surface of 5000 Å original section is rough (arrow).

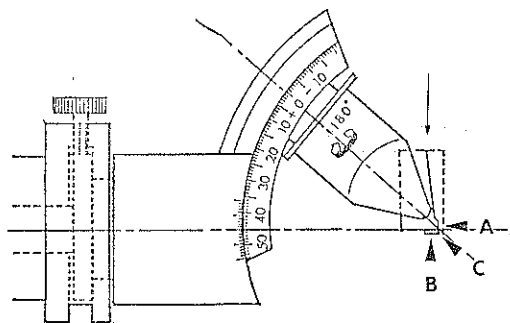


Fig. 12 Specimen with two faces in the goniometer-type holder.

Face A can be cut firstly, face B can be then cut by turning the specimen block holder at 180°

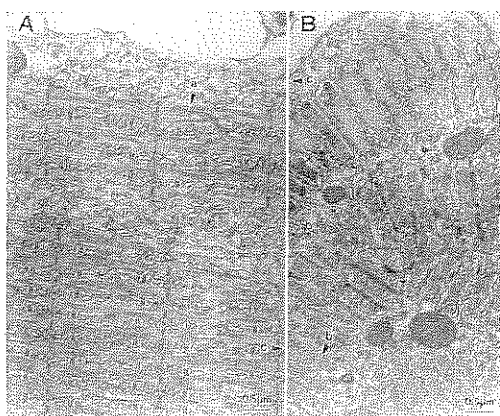


Fig. 13 Sonic muscle of the *Therapon Oxyrhynchus*.

- a longitudinal section
- b cross section
- c the ridge between two faces

示すオリエンテーションヘッドの動きを最大限利用して行う。また試料が45度以上傾けられるミクロトームであるならば可能な方法である。試料は平板包埋した物が良く、最初に観察したい視野が出る様に、バイズ型ホルダーに取り付ける。Fig. 12 A, B の様にトリミングした後、45度傾け固定する。切削は必ず矢印方向で行なうが、これを逆向で行なうと切削面にバイブレーションが入る。第1面(A)を切削後、試料ホルダーを180度回転すると第2面(B)が正面を向く。双方の角度で切削しA面、B面の交わる線上(C)が入るように撮影し二方向面の観察を行う。

応用例 4 高分子材料の凍結超薄切片による観察 (Fig. 14)

ゴム材料及び他の高分子材料の真の断面像を観察する

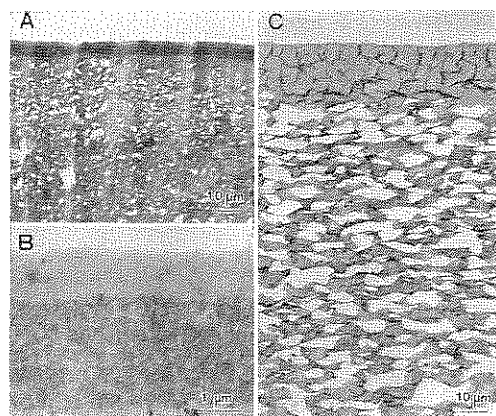


Fig. 14 Ultrathin sections of artificial leather.

A, B cryo-sections

C embedded with methylmethacrylate resin

場合は、凍結超薄切片法を用いなくてはならない。これらの試料は弾性に富み、このままの状態では切削は非常に困難である。場合により試料とアクリルを共重合させて切削を容易にする方法もあるが、Fig. 14 C に示すように可成り変成膨潤している。Fig. 14 A, B は凍結超薄切片像、試料の切削は、試料側を -140°C 、ナイフ側はアルコール溶液を使用するので -90°C にして、ダイヤモンドナイフで薄切した。なおこの種の試料は切削温度は -130°C が適当と思う。

文 献

- 1) M. Von Ardenne, and Z. Wissensch.: Mikroskope **56**, 8 (1939).
- 2) D.C. Pease and R.F. Baker: Proc. Exp. Biol. and Med. **67**, 470 (1948).
- 3) F.S. Sjöstrand: Experientia **9**, 114 (1953).
- 4) D.C. Porter and J. Blum: Anat. Rec. **117**, 685 (1953).
- 5) T. Sakai: J. Electron Microsc. **29**, 369 (1980).
- 6) 酒井俊男: 電子顕微鏡, **9**, 66 (1974).
- 7) 酒井俊男: 細胞, **9**, 21 (1977).
- 8) T. Sakai: "The Ultrastructure and Functioning of Insect Cell", ed. H. Akai et al (Soc. of Insect Cells Japan, 1980) p. 189.
- 9) H. Latta and J.F. Hartmann: Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., **74**, 436 (1950).
- 10) 藤原忠: 田路嘉秀: 電子顕微鏡, **6**, 70 (1957).
- 11) 高橋善策: 電子顕微鏡, **8**, 76 (1959).
- 12) H. Fernández-Morán: J. Biophys. Biochem. Cytol. **2**, No. 4 (1956).
- 13) 酒井俊男, 荒川清二: J. Electron microscopy **9**, 61 (1956).
- 14) 酒井俊男: 電子顕微鏡, **12**, 137 (1974).