

Cryo-FIB-SEMによる生物試料の測定手法 ～断面観察から三次元観察、TEM試料作製まで～

日本電子株式会社

EP事業ユニット EPアプリケーション部 山田 晶子

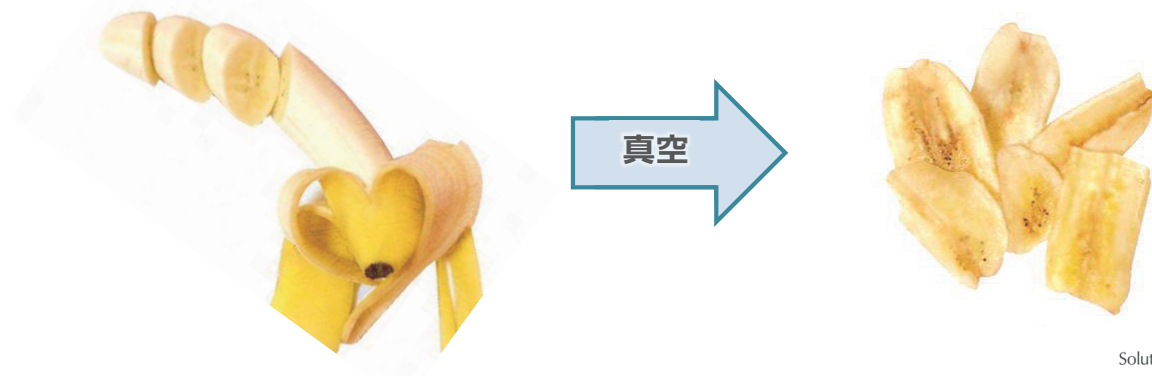
内容

1. 生物試料の観察方法
2. FIB-SEMの概要
3. クライオFIBによる応用例の紹介
 - ① 酵母菌のクライオ断面観察
 - ② 酵母菌のクライオ三次元観察
 - ③ 酵母菌のクライオTEM試料作製
4. まとめ

生物試料の観察方法

生物試料をSEMやTEMで観察するためには、一般的に「固定」を行う

- 生物試料は水分を含んでいるため、電子顕微鏡の真空環境下では蒸発し変形する
- 生物試料を観察するためには、前処理によって試料組織を固定し、水分を除去する必要がある



3

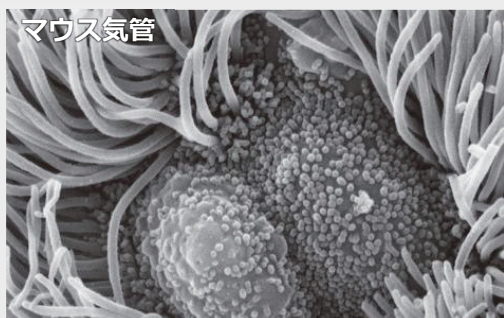
Solutions for Innovation JEOL

生物試料の観察方法

生物試料をSEMやTEMで観察するためには、一般的に「固定」を行う

化学固定法

- 方法
- ホルムアルデヒド等の固定液によって試料組織を保持する
- 特徴
- 染色によってコントラストが明瞭になるが、染色、脱水の際に試料の変形が起きやすい



凍結固定法

- 方法
- 液体窒素等によって試料を凍結し、水分も含めた構造を保持する
- 特徴
- 染色や脱水を行わないため、より生きた状態に近い組織を観察できる



凍結固定法によって試料の観察を行う

4

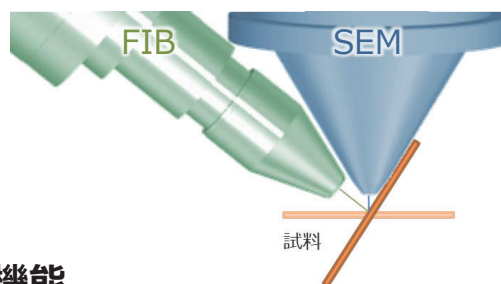
Solutions for Innovation JEOL

FIB-SEM

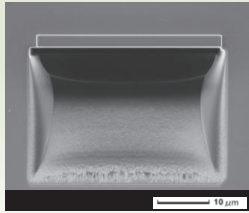
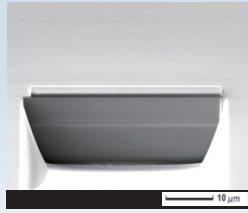
□ 装置外観



□ 構造



□ 基本機能

FIBの機能	SEMの機能
 - ミリング - デポジション - 観察	 - 観察 - 分析(EDS/EBSD) - デポジション

5

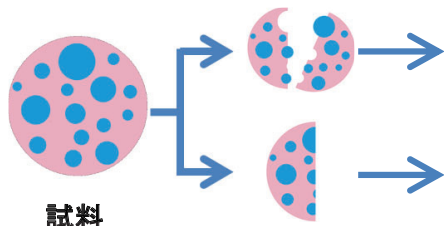
JEOL

FIB試料作製

FIB加工の特徴

- 異種材料でも加工可能
- 平滑な断面を作製できる
- 狙った部位で加工できる

断面試料作製手法の分類

	金属	セラミックス	半導体	樹脂	生物
					
・ 切断		○		○	
・ ミクロトーム				○	○
・ 機械研磨		○	○		
・ 化学研磨	○		○		
・ CP / FIB	○	○	○	○	△

(※化学固定試料)

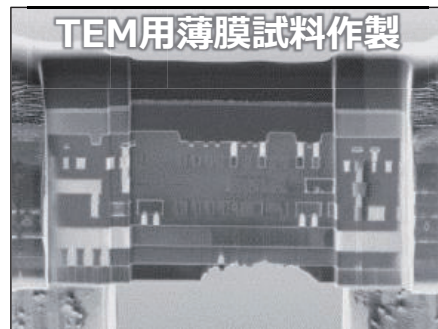
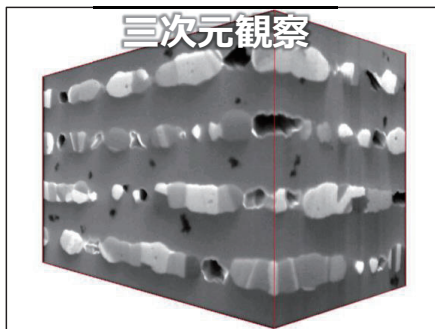
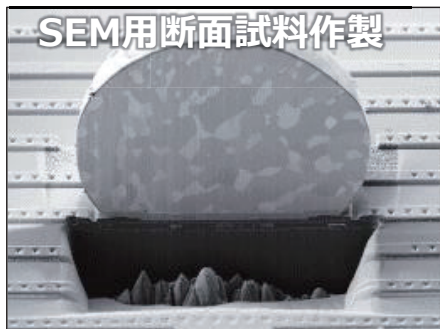
6

Solutions for Innovation JEOL

主なアプリケーション

FIB加工の特徴

- 異種材料でも加工可能
- 平滑な断面を作製できる
- 狙った部位で加工できる



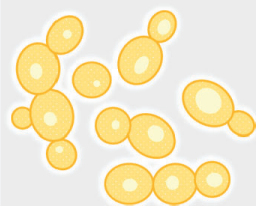
クライオシステムを装着することで生物試料の測定も可能！

7

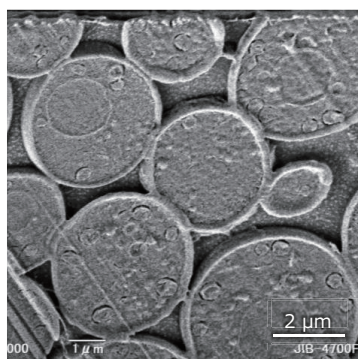
Solutions for Innovation JEOL

クライオFIBによる応用例の紹介

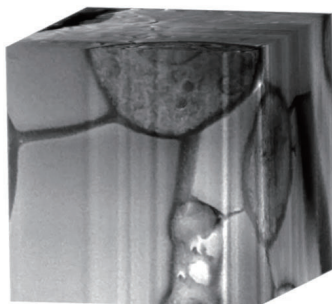
試料: 酵母
食品等に利用される
単細胞性の微生物



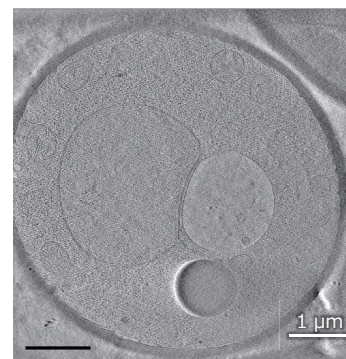
① クライオ断面観察



② クライオ三次元観察



③ クライオTEM試料作製



→ クライオFIBを用いた3つの測定手法について紹介する

8

Solutions for Innovation JEOL

① クライオ断面観察

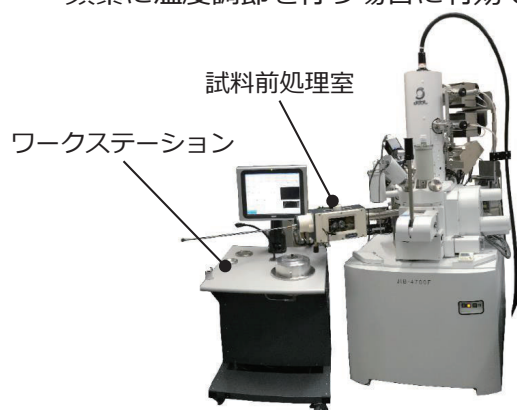
冷却ガス循環式Cryo-FIB

機構：

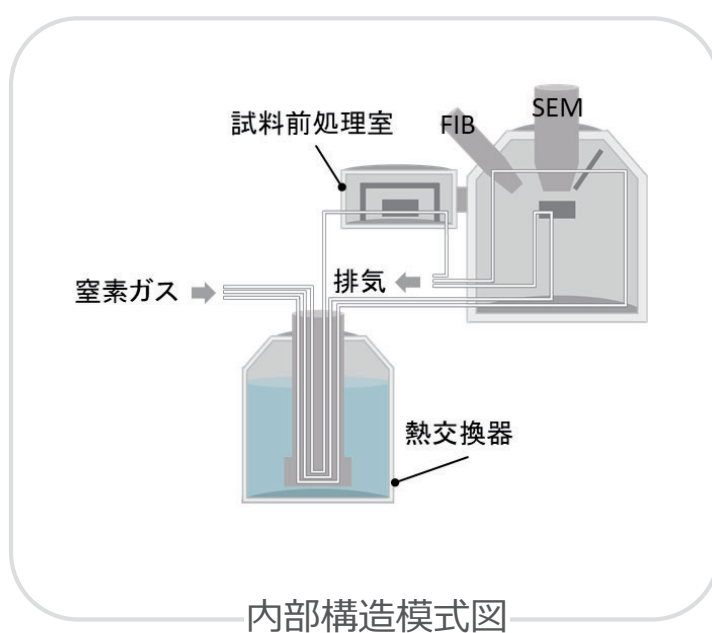
冷却された窒素ガスの流量を制御することで
試料室内のステージを一定温度に冷却する

特徴：

冷却速度が速く温度調節が容易なため、
頻繁に温度調節を行う場合に有効である。



Quorum社製 クライオシステム



冷却ガス循環式Cryo-FIB

試料前処理室



冷却ガス循環式Cryo-FIBでは、
試料前処理室にて以下の前処理を行う

□ 割断

試料前処理室内に備え付け
られたナイフで試料を割断
する



□ エッチング

ステージ温度を上昇させる
ことで、凍結試料の氷部分
のみを昇華する



□ コーティング

試料前処理室内に備え付け
られたスパッタコーターに
よりPtをコーティングする

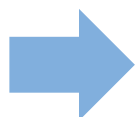
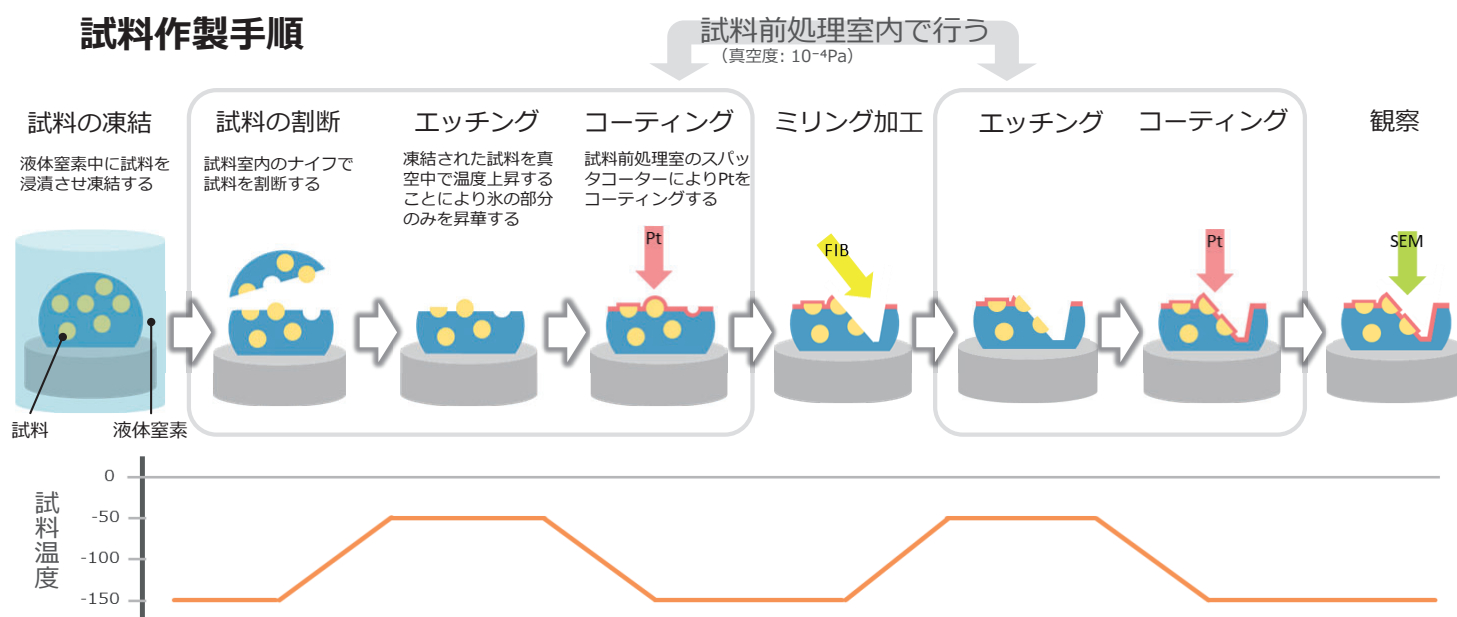


Solutions for Innovation JEOL

11

断面観察の概要

試料作製手順



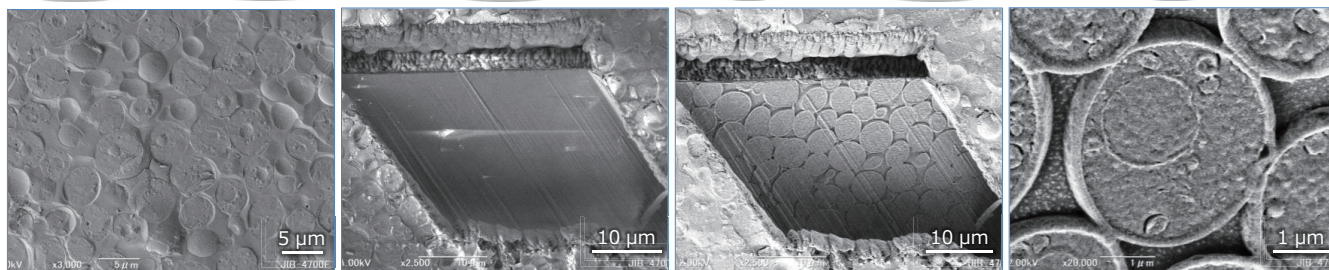
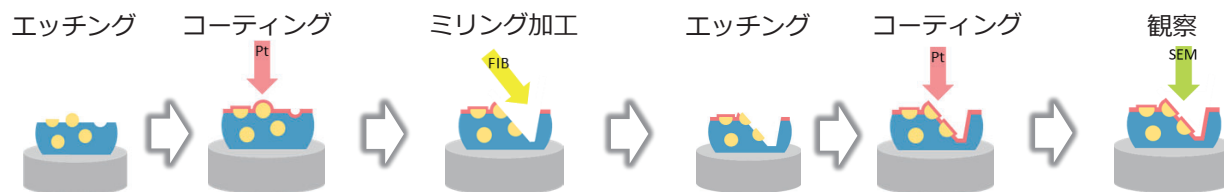
頻繁な温度調節が重要

12

Solutions for Innovation JEOL

加工中の様子

試料: 酵母

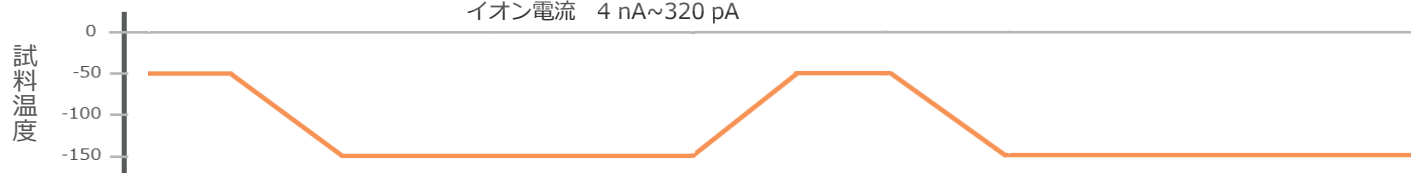


加工条件：
スパッタ(Pt) 1 mA, 60 s

加工条件：
加速電圧 30 kV
イオン電流 4 nA~320 pA

加工条件：
スパッタ(Pt) 10 mA, 60 s

観察条件：
加速電圧 2.0 kV

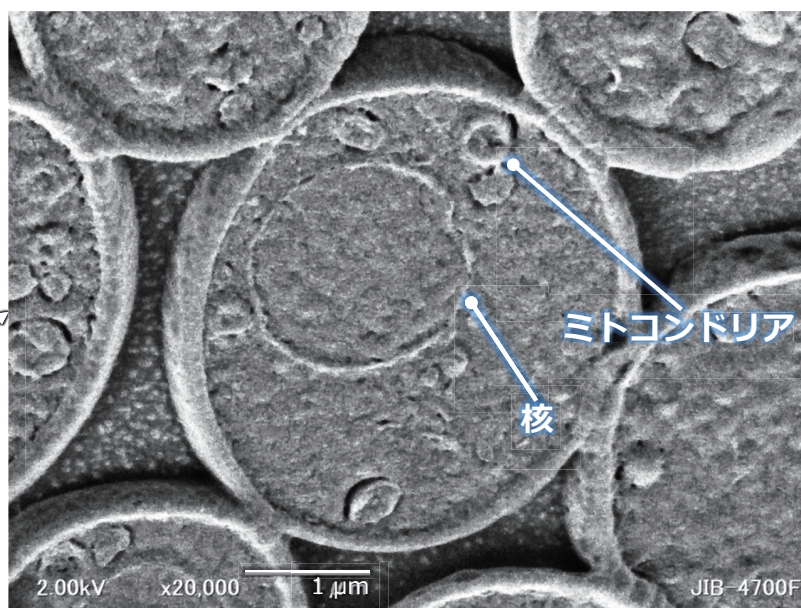
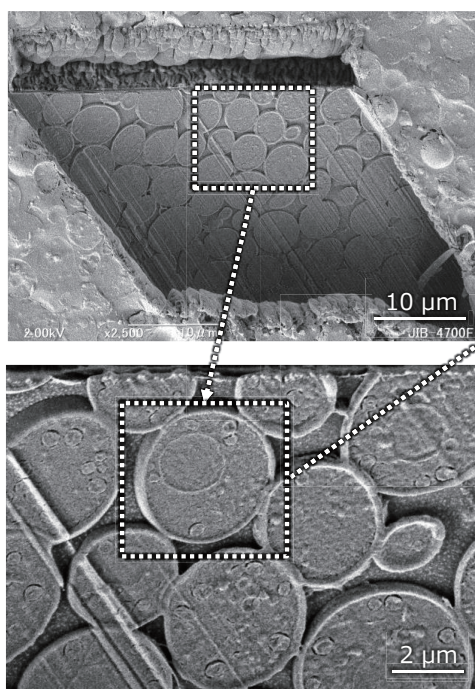


13

Solutions for Innovation JEOL

FIB断面観察

試料: 酵母



加工条件： エッチング -50℃, 5 min / スパッタ(Pt) 10 mA, 60 s
観察条件： 加速電圧 2.0 kV / ステージ温度 -150℃

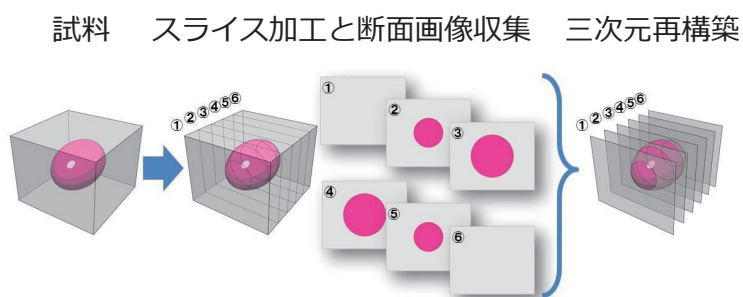
14

Solutions for Innovation JEOL

② クライオ三元観察

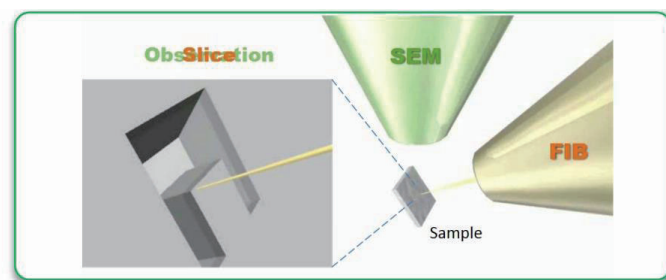
三次元観察の概要

測定原理



- ・ FIBにより等間隔にスライス加工を実施しながら、それぞれのスライス断面画像を収集する
- ・ 取得した連続スライス断面観察像を順番に積み重ねることにより、三次元画像へ再構築を行う

測定手順



スライス断面観察像 (SEM像)

- ・ FIBによるスライス加工とSEMによる断面観察を測定領域にわたり自動で繰り返す



長時間安定したステージが重要

熱伝導冷却方式Cryo-FIB

機構：

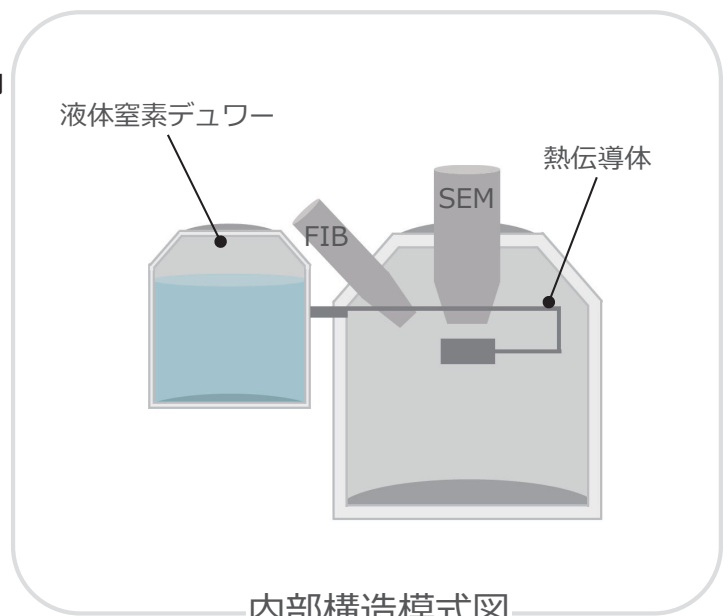
冷却されたブレードの熱伝導によって試料室内のステージを一定温度に冷却する

特徴：

ステージ温度が安定するため、長時間測定を行う場合に有効である

適したアプリケーション

- ・ 三次元観察測定（長時間安定）
- ・ TEM試料作製（ステージドリフトが少ない）



三次元観察

試料: 酵母

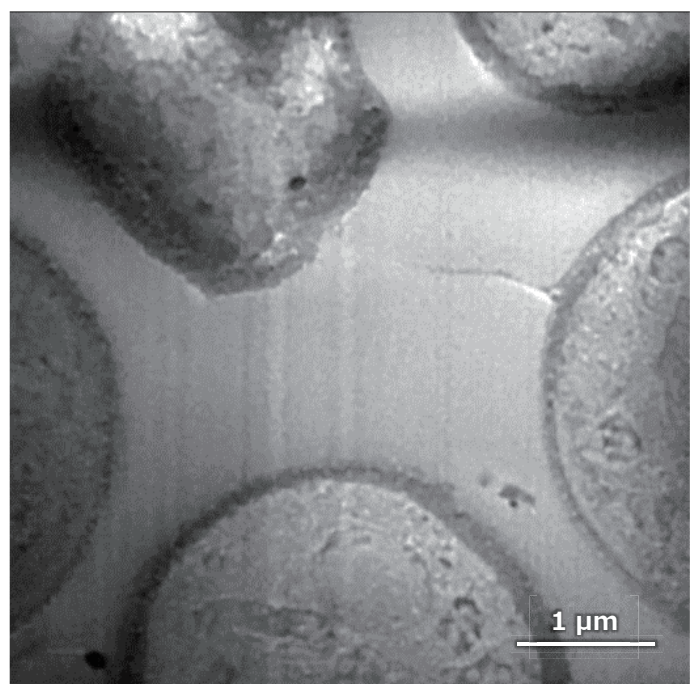
連続断面観察像(LED)

加工条件

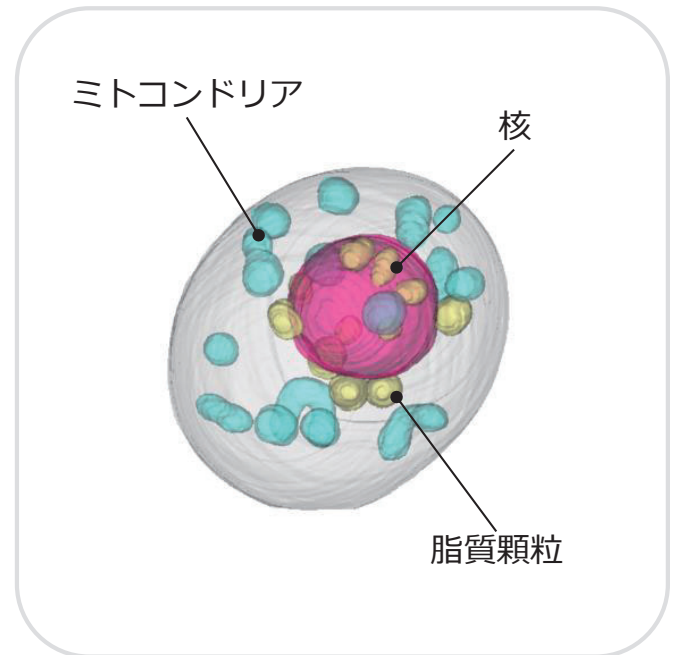
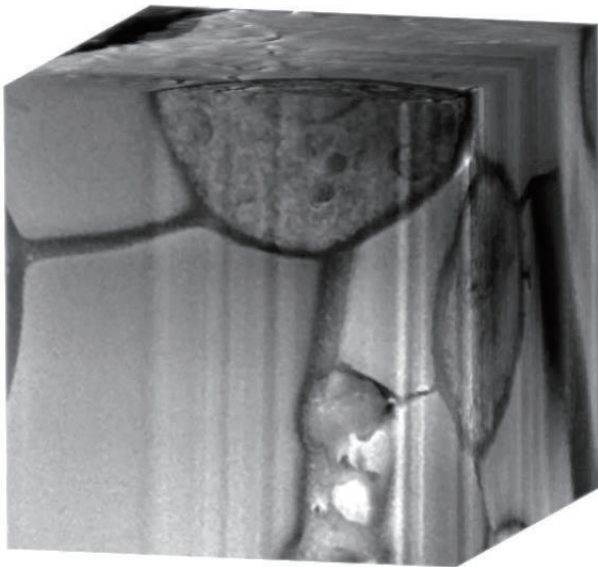
- 加速電圧 30 kV
- イオン電流 100 pA
- スライス間隔 30 nm
- スライス枚数 460枚

観察条件

- 加速電圧 3 kV
- 測定時間(合計) 7時間30分



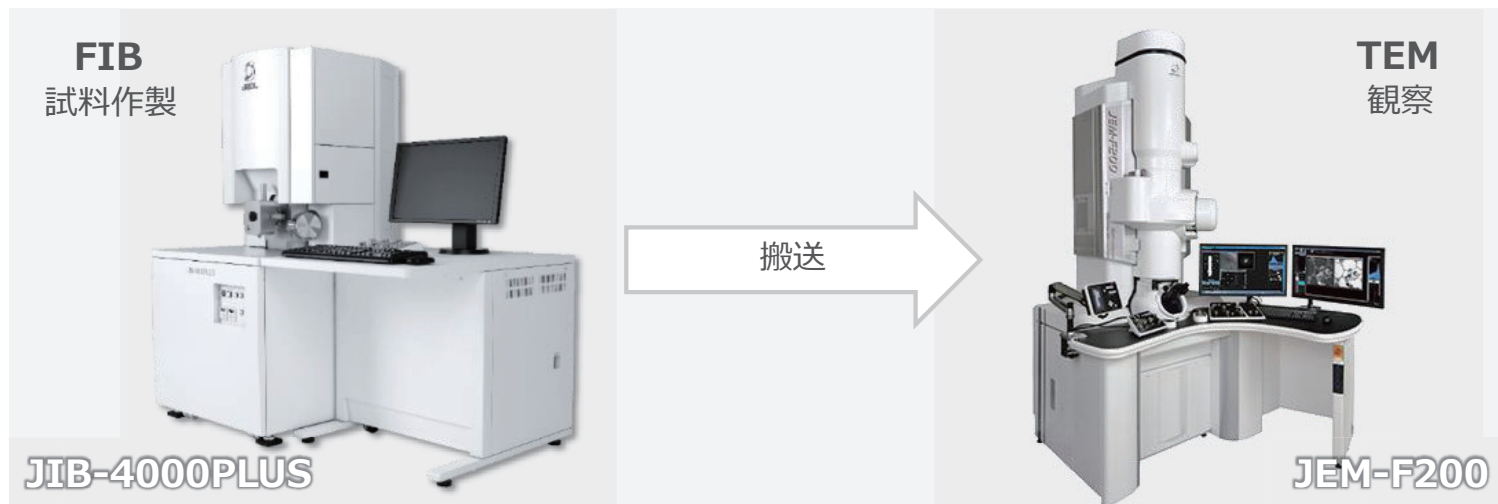
三次元再構築像



③ クライオTEM試料作製

TEM試料作製の概要

FIBからTEMへ試料搬送中も凍結状態を保つ必要がある



➡ TEMと共通のトランスファーシステムが必要

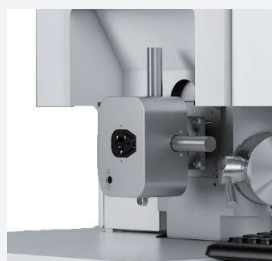
TEM試料作製の概要

共通試料ホルダー

JIB-4000PLUSでは、サイドエントリーゴニオメーターステージの装着によってTEMと共通の試料ホルダーを使用できる



共通試料ホルダー



サイドエントリー
ゴニオメーターステージ



JIB-4000PLUS

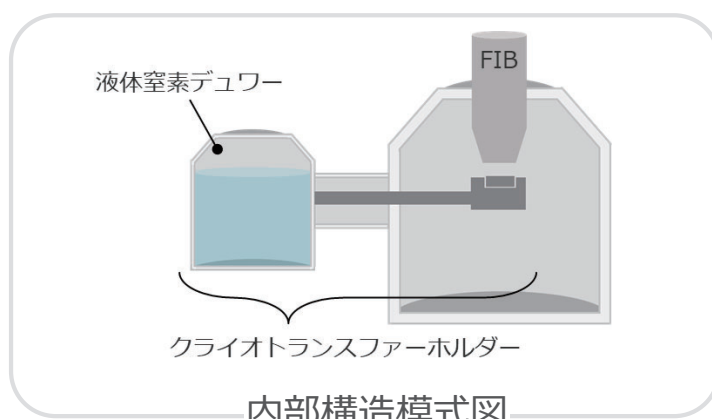
クライオトランスファー

機構：

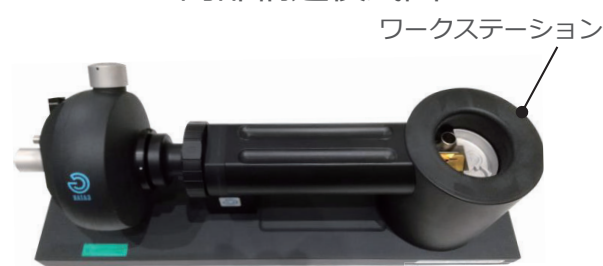
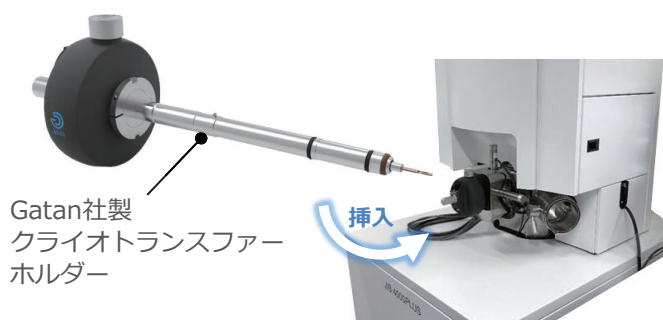
TEMと共通のクライオトランスファーホルダーを用いることで、冷却しながらFIBで加工した試料をTEM観察することができる

特徴：

ホルダーから試料を外す必要がないため、FIB加工とTEM観察を繰り返すことも可能である



内部構造模式図



Solutions for Innovation JEOL

23

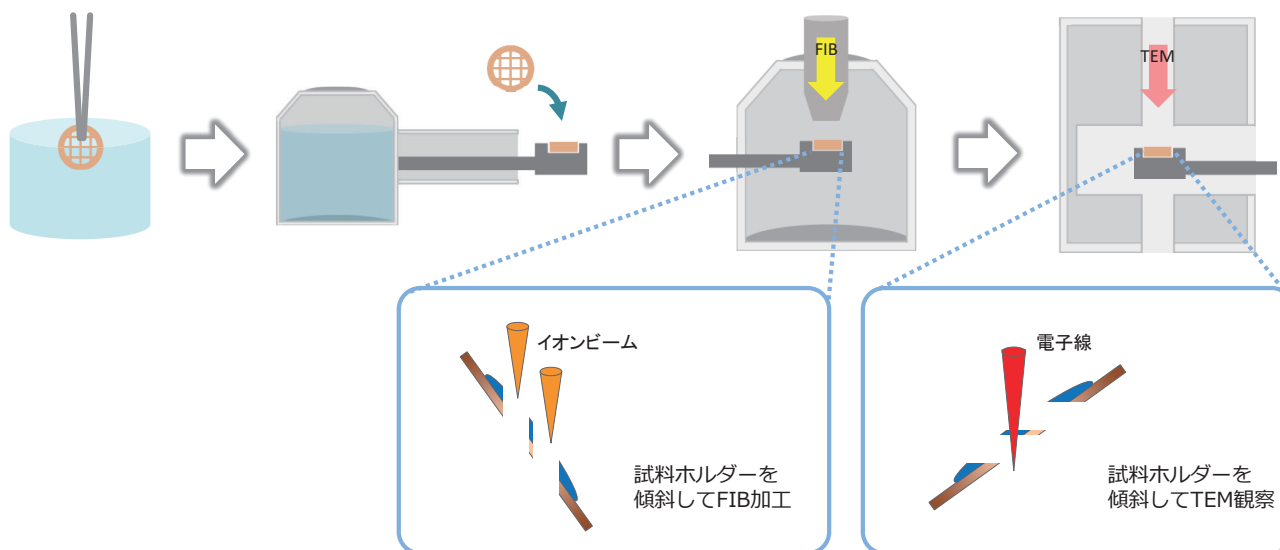
試料作製手順

試料の凍結

グリッドをホルダーに固定

FIBミリング加工

TEM観察



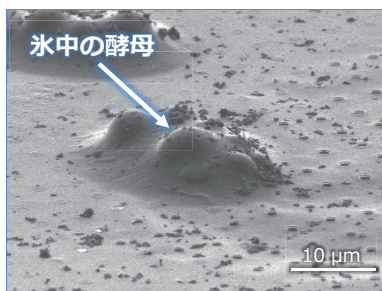
24

Solutions for Innovation JEOL

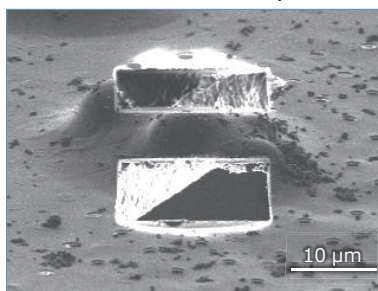
加工中の様子

試料: 酵母

1. 加工前

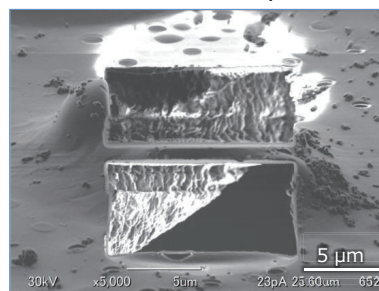


2. 薄膜化 ~3 μm



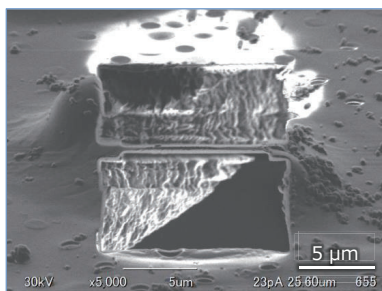
加工条件: 30kV, 700pA

3. 薄膜化 ~2 μm



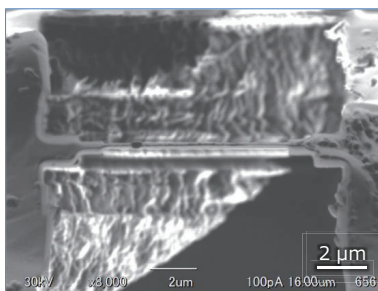
加工条件: 30kV, 320pA

4. 薄膜化 ~500 nm



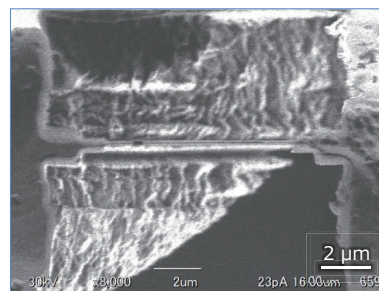
加工条件: 30kV, 100pA

5. 薄膜化 ~250 nm



加工条件: 30kV, 23pA

6. 薄膜化 ~150 nm



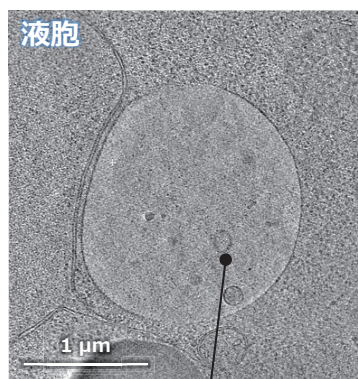
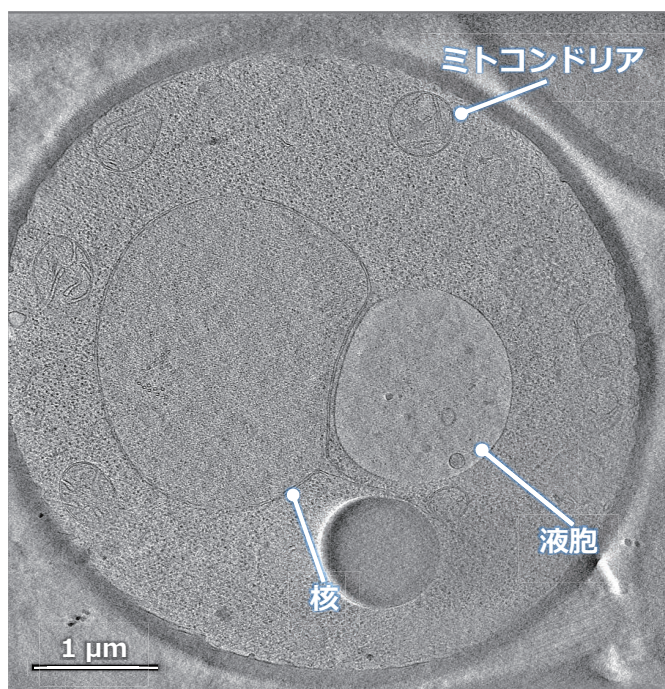
加工条件: 30kV, 23pA

ovation JEOL

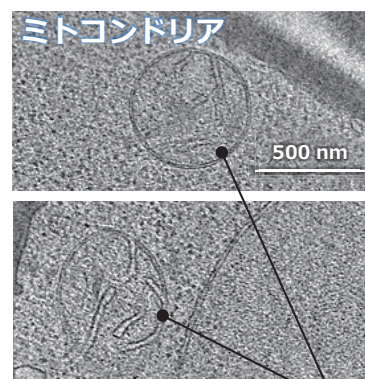
25

TEM観察

試料: 酵母



オートファジックボディ



クリステ

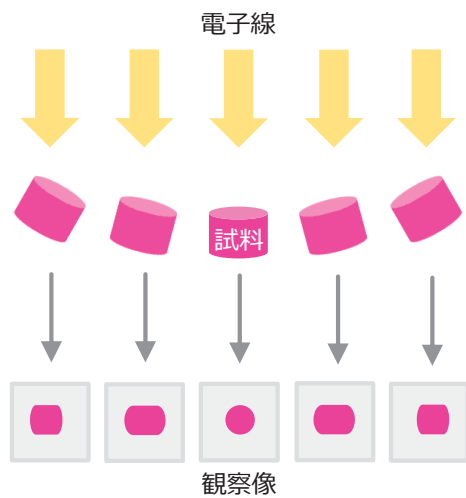
細胞内の微小構造を観察する場合はTEMを用いる

26

Solutions for Innovation JEOL

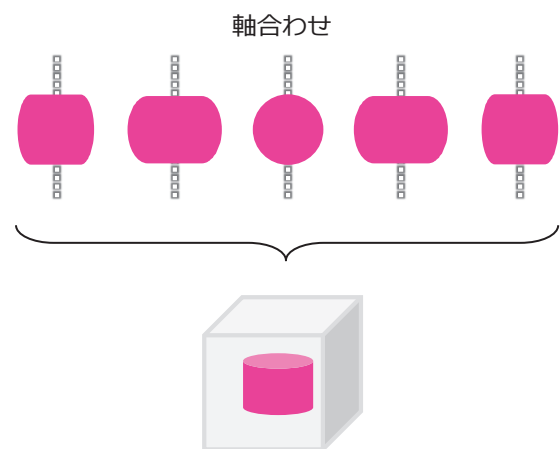
TEMトモグラフィ観察の原理

傾斜観察と画像収集



±70°に傾斜し、TEMまたはSTEMの連続傾斜観察像を収集する

三次元再構築



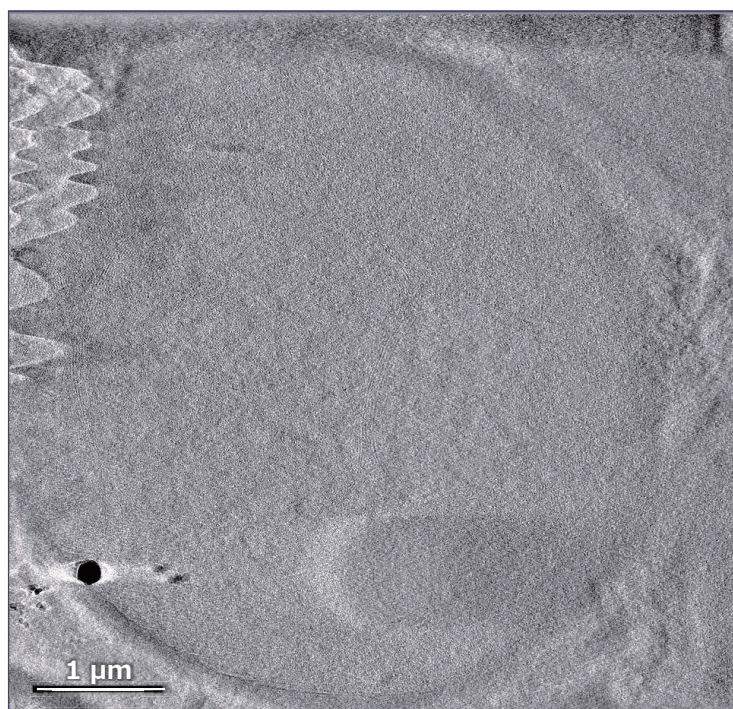
軸を合わせ再構築することで、試料内部を三次元的に観察する

Solutions for Innovation JEOL

27

トモグラフィ観察

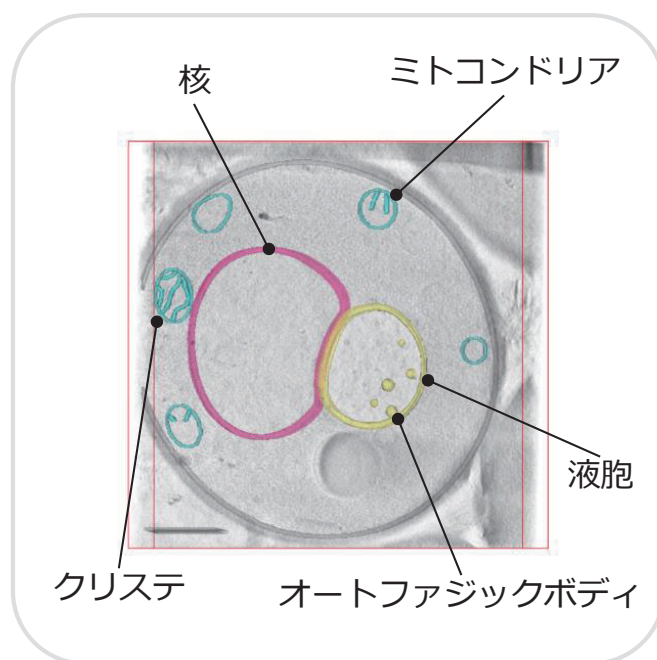
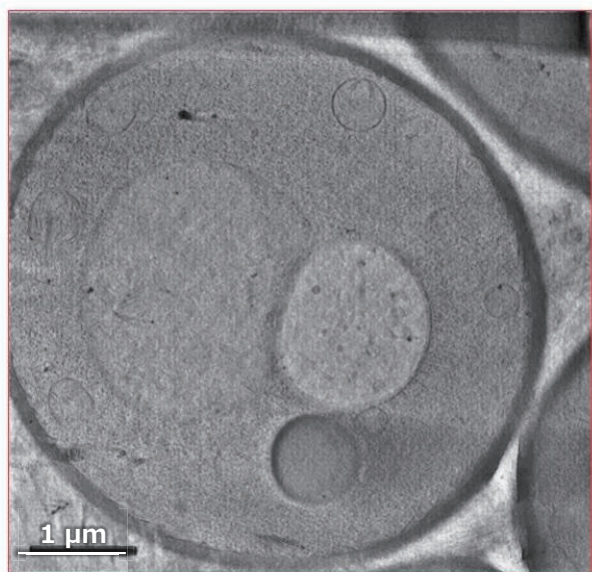
試料: 酵母



28

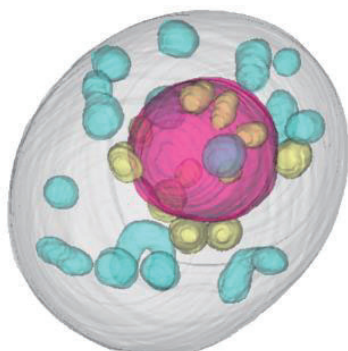
Solutions for Innovation JEOL

三次元再構築像



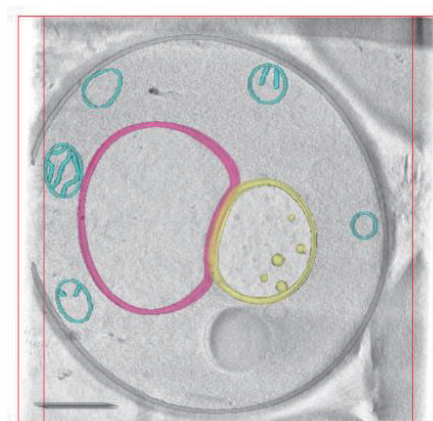
三次元観察の比較

FIB-SEM三次元再構築像



奥行方向に広く観察するため、細胞中の小器官の分布が確認できる。

TEM三次元再構築像



観察範囲は限られるが、ミトコンドリア内のクリステなど、より詳細な構造を確認することができる。

まとめ

- FIB-SEMにクライオシステムを取り付けることによって、凍結試料の様々な測定が可能になる。
 - クライオ断面観察
 - クライオ三次元観察
 - クライオTEM試料作製

- クライオシステムには複数手法があり、測定により手法を選択する。