

Solutions for Innovation

CryoNote

Cryo の歴史

様々なクライオ技法

凍結手法

面だし法

エッチング【氷の昇華】

Cryo-TEM

凍結置換法

凍結切断レプリカ法

Cryo-SEM

低真空 SEM とペルチェ素子による冷却

Cryo-FIB

冷却 CP【Cryo-CP】

CryoNote

はじめに

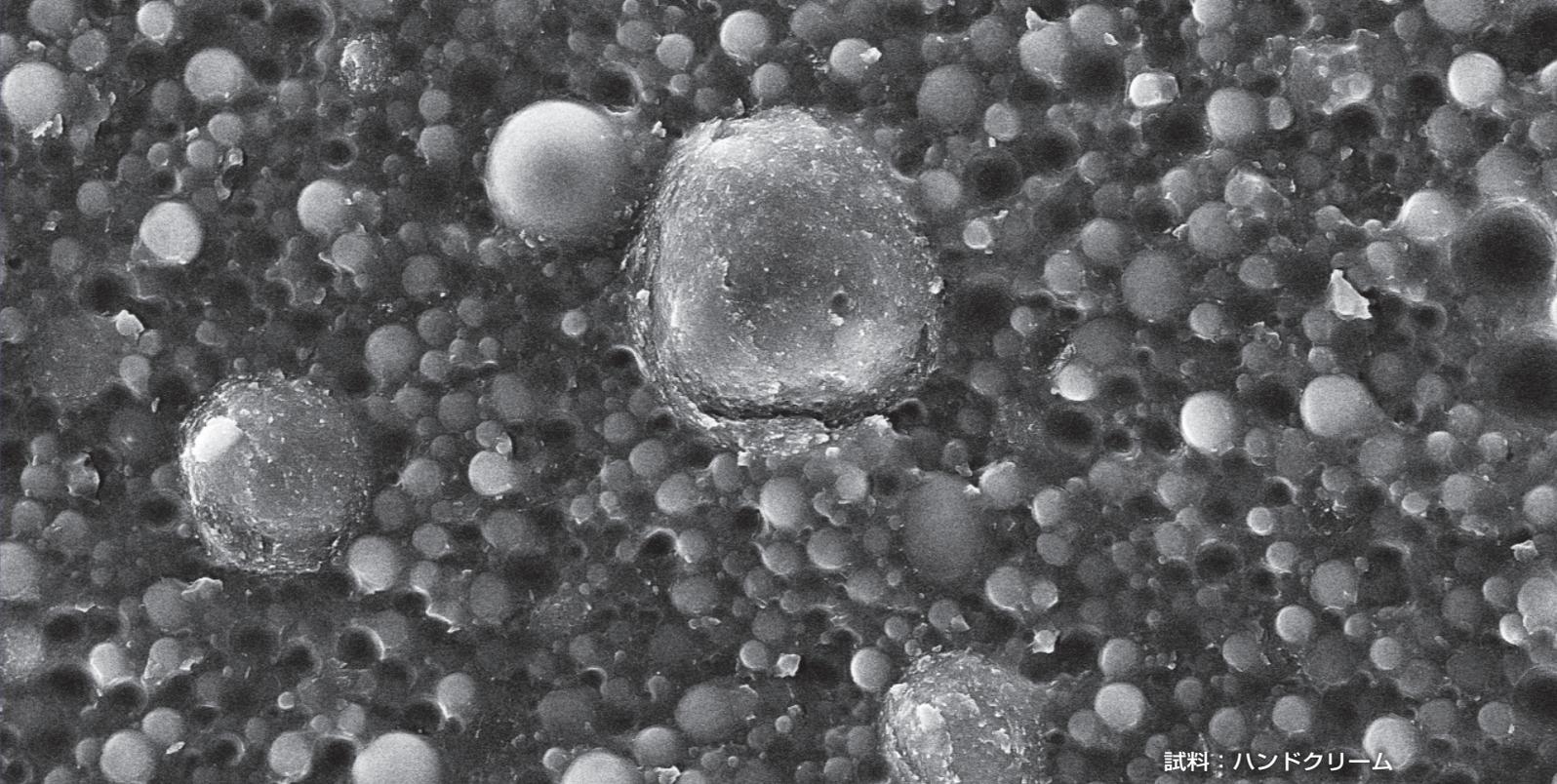
「リアルな姿を映し出したい」これはどの測定装置を用いる実験者も願っていることです。電子顕微鏡を使って観察する方々も例に漏れず、実際の姿を観察したいと切望しています。

しかしながら現実には、試料を観察可能な大きさに切り出す際の損傷に加え、標本のコントラストをあげるための染色で生じるアーティファクト、真空曝露に耐えられるように水を樹脂に置換することで生じる変形、試料への電子線照射によって生じる熱ダメージなど、リアルな姿からは掛け離れていくばかりです。

そのソリューションの一つが試料を冷却すること、「クライオ」の手法を導入することです。本書でご紹介する各手法は、「クライオ」の一部の例に過ぎません。皆様の問題が「クライオ」によって解決されることを願っております。

Cryo 年表

- 1939 Siemens 社より初の商用 TEM が発表
- 1949 日本電子光学研究所（後の日本電子）が商用 TEM、JEM-1 を発表
- 1952 Fernández-Moán が凍結置換法を開発
Glick と Malmstrom が急速凍結法（Plunge freezing）を開発
- 1957 Steere が凍結レプリカ法（Freeze-etching-replica）を開発
- 1963 Moor と Mühlethaler による凍結切断（Freeze etching）した酵母の観察
- 1964 van Harrevelt と Crowell が金属圧着法（metal contact）を開発
- 1965 Cambridge Instruments 社より初の商用 SEM、MK1 Stereoscan が発表
Bernhard が凍結超薄切片法を発表
- 1966 日本電子が商用 SEM、JSM-1 を発表
- 1968 Moor、Riehle らが加圧凍結（High pressure freezing）の試料作製装置を開発
- 1970 Echlin らが凍結した生物試料をクライオ SEM で観察
- 1973 徳安が Tokuyasu 法を開発
- 1974 根井らが Freeze fracture, deep etching 法を開発
- 1975 Henderson、Unwin らによるバクテリオロドプシンの構造解析
- 1982 Dubochet、Homo らによるスプレー凍結法（Spray freezing）の開発
- 1983 日本電子にてクライオ TEM の開発がスタート
- 1984 Adrian、Dubochet らが急速凍結法（Plunge freezing）を用いた無染色のウイルスの高分解能観察を報告
- 1986 Ernst Ruska 博士が電子顕微鏡の研究開発の業績でノーベル物理学賞を受賞
日本電子がクライオ TEM、JEM-4000SF を開発
Balzers 社より加圧凍結試料作製装置、HPM10 が発表
- 1998 Talmon らが急速凍結法に温度コントロールされた恒湿室を組み合わせた、controlled-environment vitrification system (CEVS) を開発
- 2004 Dubochet が非晶質凍結切片のクライオ電子顕微鏡での観察を CEMOVIS（Cryo-Electron Microscopy Vitreous Sections）と命名
Xuong らが透過電子顕微鏡用 direct electron detector を開発（JEM-1200 でカメラのテストが行われた）
- 2017 Jacques Dubochet 博士、Joachim Frank 博士、Richard Henderson 博士がクライオ電子顕微鏡法の開発の業績でノーベル化学賞を受賞
- 2020 Kuba らが Cryo-FIB-SEM を使い、急速凍結したクラミドモナスの連続断面観察を報告



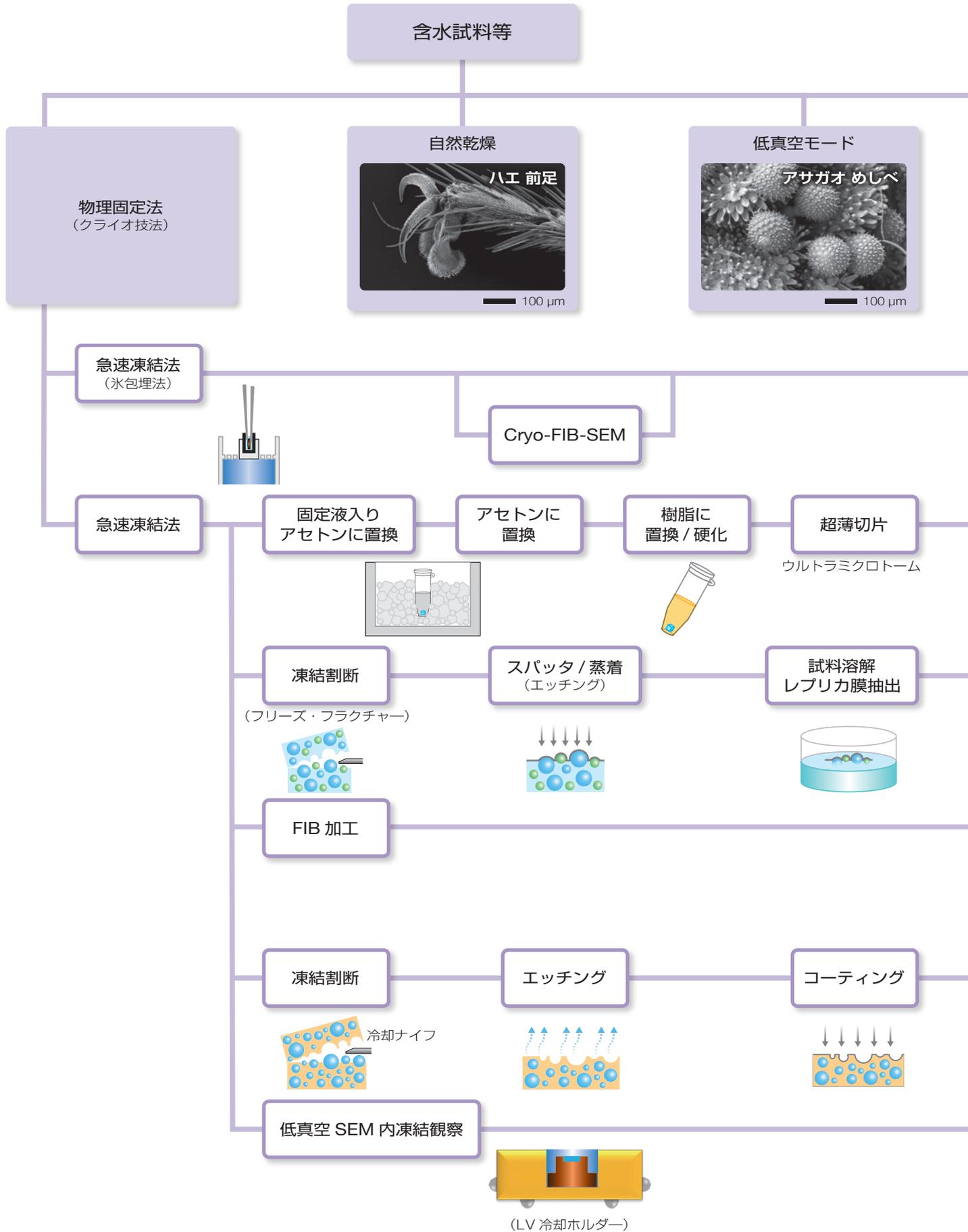
試料：ハンドクリーム

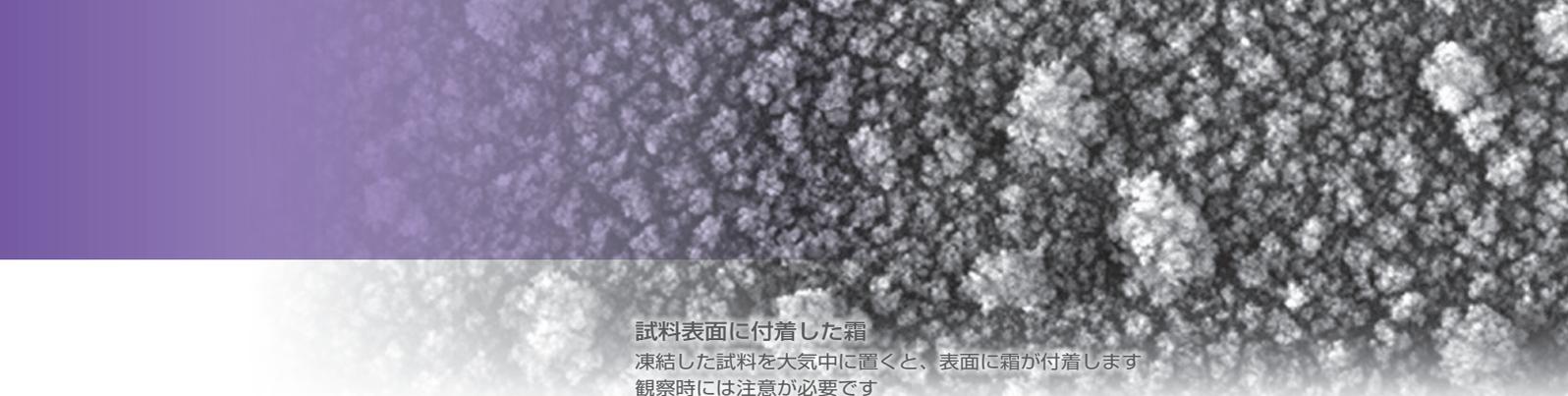
INDEX

はじめに		P1
Cryo 年表		P1
1 様々なクライオ技法		P3
2 凍結手法		P5
2-1 急速凍結法		P5
2-2 浸漬法		P5
2-3 金属圧着法 (メタルコンタクト)		P6
2-4 加圧凍結法		P6
3 面だし法		P7
3-1 凍結切片法 / クライオマイクロトーム法		P7
3-2 凍結切断法		P8
4 エッチング (氷の昇華)		P8
4-1 エッチング		P8
5 Cryo-TEM		P9
5-1 Cryo-TEM		P9
5-2 クライオトランスファーホルダーを用いた TEM の Applications		P10
5-3 自動試料搬送装置付 Cryo-TEM		P13
5-4 自動試料搬送装置付 Cryo-TEM Applications		P14
5-5 Cryo-FIB-SEM による試料作製		P15
6 凍結置換法		P17
6-1 凍結置換法		P17
7 凍結切断レプリカ法		P18
7-1 凍結切断レプリカ法	フリーズ・フラクチャー法	P18
	フリーズ・エッチング法 (ディープ・エッチング法)	P18
	クライオ抽出レプリカ法	P18
7-2 凍結切断レプリカ法 Applications		P19
8 Cryo-SEM		P21
8-1 Cryo-SEM		P21
8-2 Cryo-SEM Applications		P22
8-3 簡易クライオ法		P26
9 低真空 SEM とペルチェ素子による冷却		P27
9-1 低真空 SEM / ペルチェ冷却ステージ		P27
9-2 低真空 SEM / ペルチェ冷却ステージ / アクアカバー法 Application		P27
10 Cryo-FIB		P28
10-1 Cryo-FIB		P28
11 冷却 CP (Cryo-CP)		P29
11-1 冷却 CP (Cryo-CP) のしくみ		P29
11-2 冷却 CP (Cryo-CP) Applications		P29

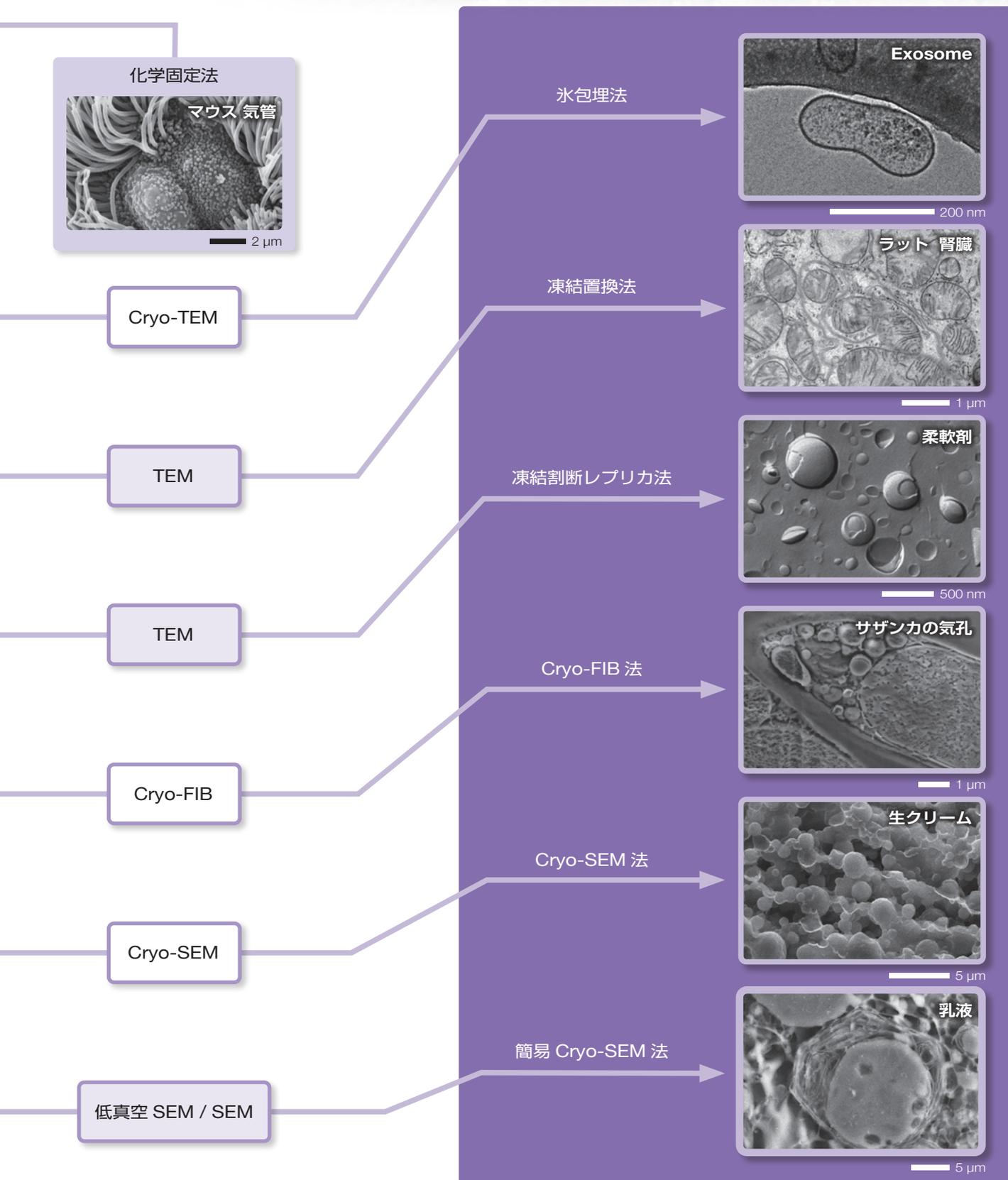
様々なクライオ技法

含水試料等を電子顕微鏡で観察する際は試料の特徴、観察目的に合わせて最適な試料作製法を選択する必要があります。Cryo note では、様々な物理固定法（クライオ技法）を紹介します。





試料表面に付着した霜
凍結した試料を大気中に置くと、表面に霜が付着します
観察時には注意が必要です



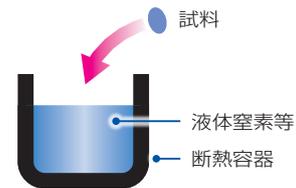
2

凍結手法

2-1 急速凍結法

生物、食品、塗料等の含水試料を観察するために、試料を急速に凍結して本来の状態に近い形態に保持する手法です。冷凍庫やドライアイスで緩慢に凍結させると水分の流動や体積膨張、氷晶形成により試料が変形する恐れがあります。水分を急速に凍結すると、それらを抑えることができ試料本来の微細形態が保持されます。凍結の速度は、大気圧下では 10^4 °C / sec 以上が必要であり、急速凍結には浸漬法や金属圧着法等が用いられています。

2-2 浸漬法

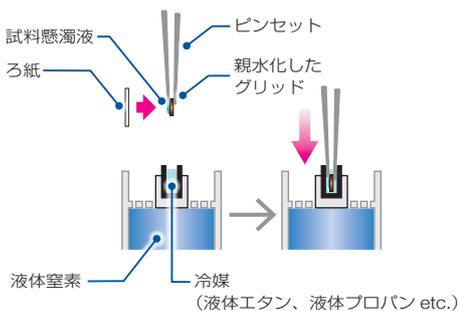


沸騰が起きにくい冷媒に試料を投入する方法で、冷媒としては融点と沸点の差が大きい液体エタンや液体プロパン、スラッシュ窒素が用いられます。この場合、電子顕微鏡観察が可能な微細形態を保っている凍結深度は表面から 5 ~ 10 μm 程度です。

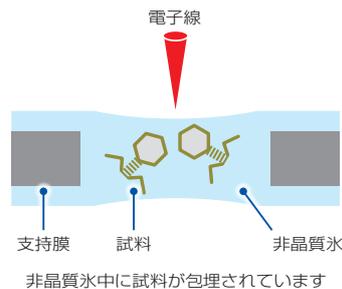
氷包埋法

浸漬法の一つであり、タンパク質やウイルス等の微粒子を TEM で観察するために用いられる急速凍結法の一つです。少量の試料懸濁液を親水化したマイクログリッドに滴下し、ろ紙で余剰の液を吸い取った後、冷媒に素早く浸漬し急速凍結します (図 a)。冷媒には、液体エタンや液体プロパン等が用いられます。精製したタンパク質やウイルスのような生体高分子懸濁試料を厚さ数十から百 nm の非晶質氷薄膜に包埋することで、溶液中の形態に近い状態の試料を観察することができます (図 c)。

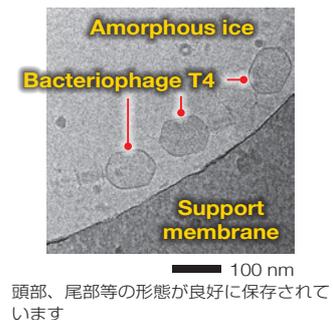
(a) 氷包埋法の概略図



(b) 氷包埋した試料の断面図



(c) 氷包埋した T4 ファージのクライオ TEM 像

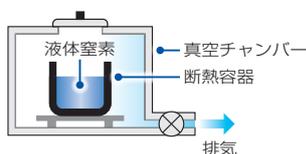


スラッシュ窒素とは

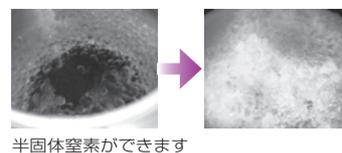
液体窒素に試料を投入すると、試料周囲に窒素ガス層が形成され、液体状態の窒素が試料に接触し難くなり、冷却効率が落ちます。この状態では試料が緩慢に凍結されます。それに対してスラッシュ窒素は融点付近の約 -210 °C が得られるため、試料浸漬時の窒素ガス層の形成がほとんど起きず、急速凍結が可能になります。

以下にスラッシュ窒素による急速凍結法を示します。液体窒素を断熱容器に入れ、真空チャンバーを減圧します (図 a)。気化熱が奪われることにより液体窒素中に固体窒素が分散した状態ができます (図 b)。小さく切り出した試料を投入し、凍結します (図 c)。

(a) 液体窒素を入れた真空チャンバーを減圧



(b) スラッシュ窒素の作製



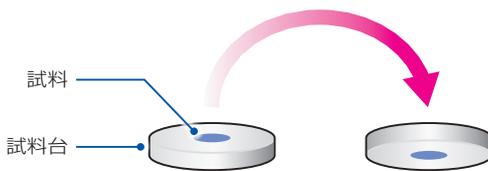
(c) 試料の凍結



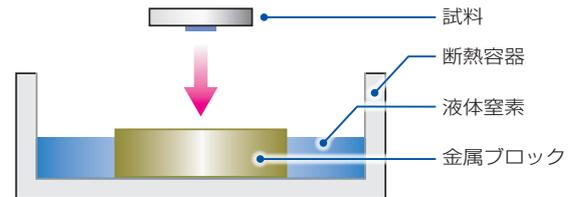
2-3 金属圧着法 (メタルコンタクト)

液体窒素や液体ヘリウムで冷却した金属ブロックに試料を圧着して急速凍結する方法です。金属ブロックの材料には、熱伝導率の良い高純度の銅に金メッキを施したものが多く用いられます。試料の温度降下効率を高めるために、金属ブロック表面は鏡面仕上げが施されています。この方法では、比較的安価な装置で凍結がおこなえますが、電子顕微鏡観察に適した凍結深度は表面から20 μm程度です。浸漬法や加圧凍結法と比較し、広い面の凍結をおこなうことができることが特徴です。凍結後、TEMの場合は、(1)そのまま凍結切片を作製する、(2)凍結置換法をおこなった後に試料を室温まで戻し、樹脂包埋後、超薄切片を作製する、(3)凍結切断法によりレプリカを作製する等の処理をおこないます。SEMの場合はそのままエッチングによる霜取りをして観察します。

(a) 試料台に試料をできるだけ薄く塗り、逆さに向ける



(b) 冷却しておいた金属ブロックに、試料を垂直に圧着する



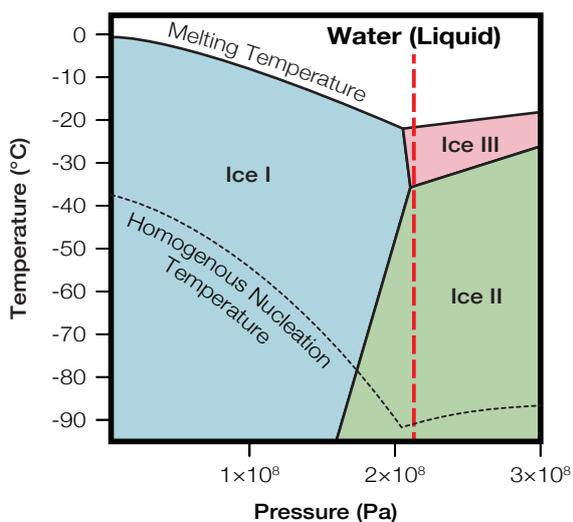
*専用装置を使用すると、容易に垂直に圧着することができます。

2-4 加圧凍結法

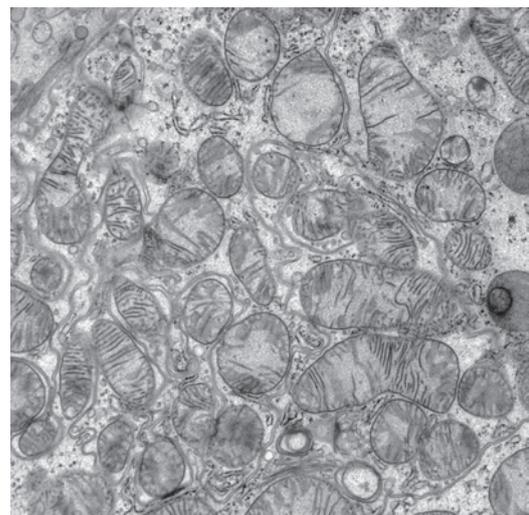
エアコンプレッサーにより約 2.1×10^8 Pa に加圧された液体窒素で試料を凍結する手法です。この圧力の近傍 (水の状態図の赤点線部分) では水の融点が下がり、粘性が上がるため、凍結に時間がかかっても組織の破壊の原因となる氷晶の形成が抑えられます。そのため、加圧凍結法では大気圧下での凍結と比較して数十倍の深度 (200 μm 程度) まで、凍結前の状態を保ったまま大きな試料の形態を観察することが可能です。

加圧凍結法をおこなう際は、専用の加圧凍結装置が必要です。

水の状態図



ラット腎臓



試料：ラット腎臓
加圧凍結 凍結置換法
酢酸ウラニル-クエン酸鉛染色
TEM 観察

3 面だし法

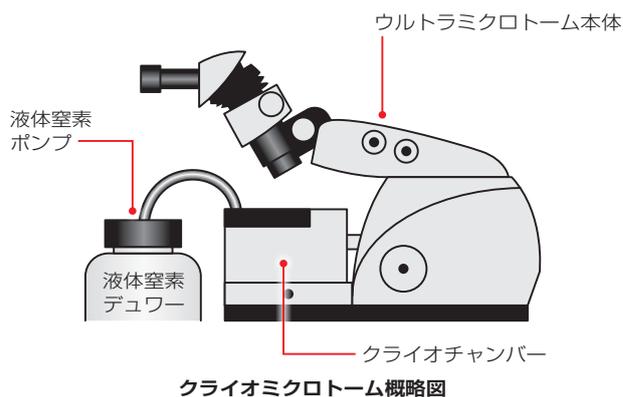
3-1 凍結切片法 / クライオマイクロトーム法

ウルトラマイクロトームは、あらかじめ設定した試料送り量（数 10 nm ～数 100 nm）で送り出されてくる試料がガラスナイフやダイヤモンドナイフに対して上から下に動くことにより TEM 用の超薄切片を作製する装置です。

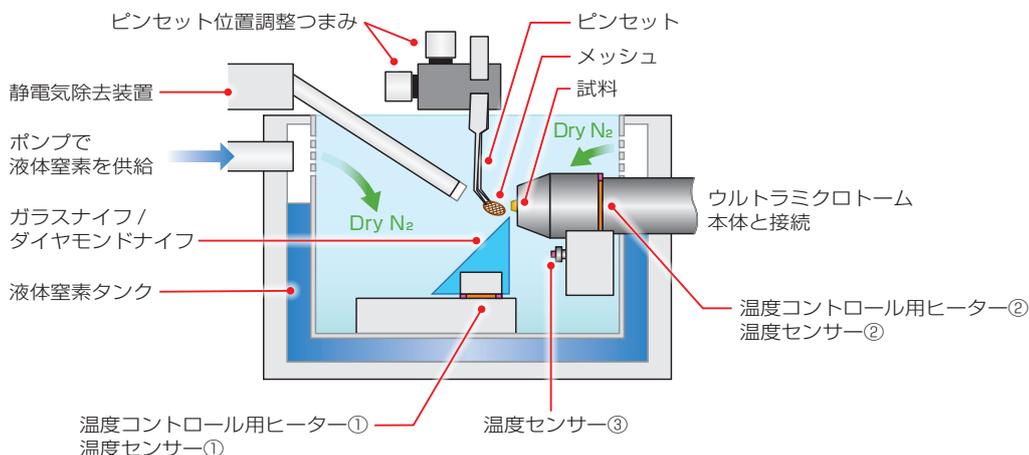
凍結切片法は、常温では軟らかく超薄切片作製が困難な試料（化学固定をしていない生体試料やゴムのような高分子材料）を液体窒素で冷却して硬化させることにより、切片を作製する方法です。クライオチャンバーと液体窒素デューワーを取り付けたウルトラマイクロトーム（クライオマイクロトーム）を使用して切片を作製します。

冷却されたガス雰囲気中で満たされたクライオチャンバーの中で超薄切片の作製および回収を行います。生体試料の場合、急速凍結法を用いて凍結させた試料から切片を作製するので、化学固定や脱水による試料の変形がなく、生きた状態に

近い組織を観察することができます。クライオトランスファーホルダーを使用すれば、超薄切片を凍結したまま TEM で観察することができます。



クライオチャンバー概略図



液体窒素タンク：ポンプから液体窒素が自動で供給されます

温度コントロール用ヒーター / 温度センサー①：ガラスナイフ / ダイヤモンドナイフの設定温度を保持します

温度コントロール用ヒーター / 温度センサー②：試料の設定温度を保持します

温度センサー③：チャンバー内の温度を検出します

試料：超薄切片にする試料です。あらかじめ設定した試料送り量（数 10 nm ～数 100 nm）で送り出されてくる試料が

ガラスナイフ / ダイヤモンドナイフに対して上から下に動くことにより薄く切り出されます

ガラスナイフ / ダイヤモンドナイフ：試料のトリミングおよび超薄切片を作製するためのナイフです

メッシュ：超薄切片を拾います

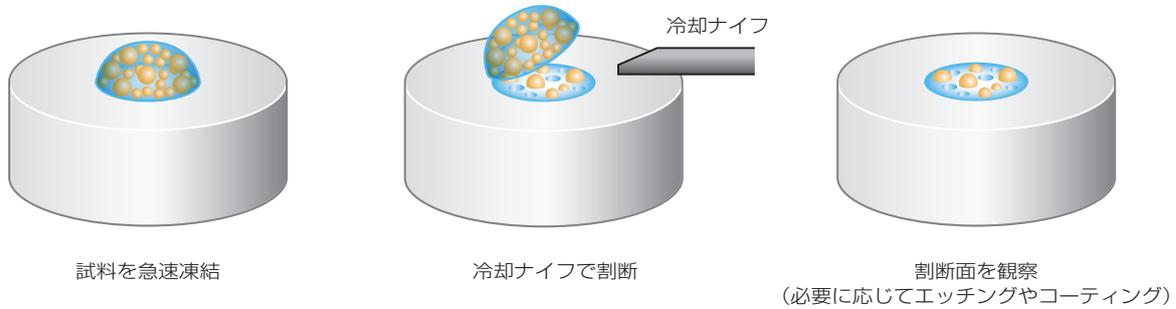
ピンセット：メッシュを保持します

ピンセット位置調整つまみ：メッシュがガラスナイフ / ダイヤモンドナイフ近傍になるようにピンセットの位置を調整します

静電気除去装置：静電気の蓄電機能と放電機能で切片の回収を補助します

3-2 凍結切断法

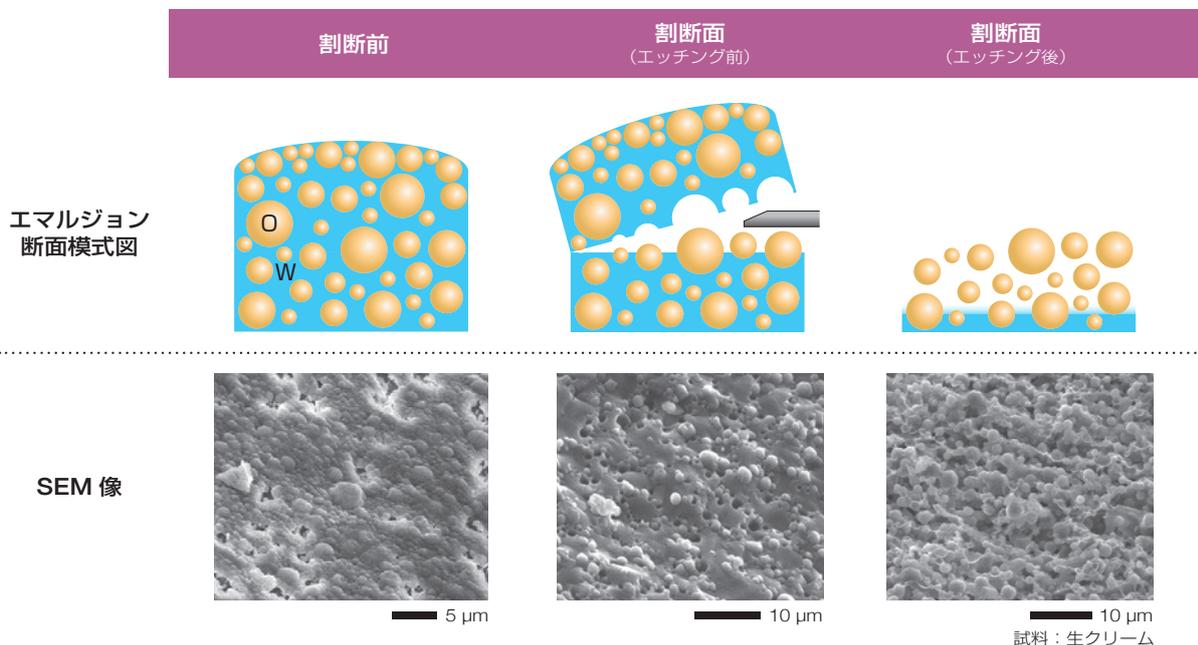
凍結した試料の切断面を観察するための手法です。切断は、試料と目的に応じ、冷却したナイフを用いて試料の盛り上がった部分や試料を詰めたパイプ等を割ることでおこないます。試料の内部構造や液中の物質の観察に有効です。



4 エッチング【氷の昇華】

4-1 エッチング

エッチングとは凍結試料表面の霜や内部の氷を昇華させることです。これにより氷に覆われていた試料内部の構造物を露出させ、形状を観察することができます。下の図は、O/W エマルジョン（水中油滴）の表面と切断面、切断面をエッチングして観察した例です。切断前の画像では表面に脂肪球が集まっている様子が、切断面（エッチング前）の画像で氷の中の脂肪球の様子が、切断面（エッチング後）の画像で水中での脂肪球の分布等が分かります。



5

Cryo-TEM

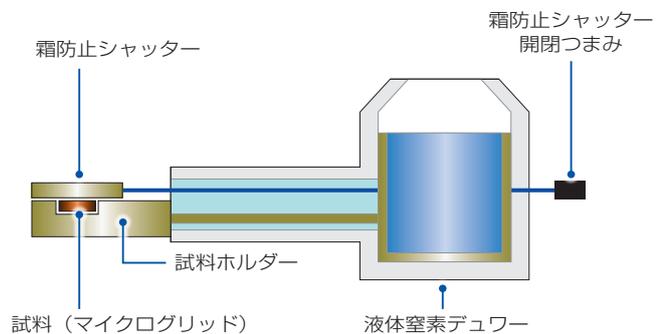
5-1 Cryo-TEM

氷包埋法や凍結切片法等の各種凍結技法により、染色等をおこなわずに作製した試料を、凍結状態のまま電子顕微鏡内に挿入して観察する手法です。観察は液体窒素温度、もしくは液体ヘリウム温度でおこないます。軽元素から構成される試料は散乱コントラストを生じにくいので、数 μm 程度デフォーカスすることで生じる位相コントラストにより観察をおこないます。また、オメガフィルター（P13参照）や位相板を組み合わせることによりコントラストがさらに改善されます。なお、クライオ電顕法を用いた三次元構造解析手法には、単粒子解析やトモグラフィー等があります。

クライオトランスファーホルダー

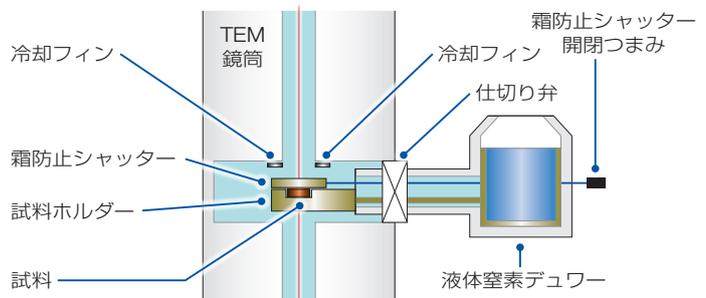
氷包埋法等により凍結した試料を、極低温で観察できるホルダーです。TEM、SEM、FIBに取り付けて使用できます。

液体窒素デュワーが備えられており、先端部は液体窒素温度に保たれます。ホルダーを電子顕微鏡に挿入する際に試料への霜の付着を防ぐため、先端部を外気と遮断するシャッターが装備されています。



装置への取付とアンチアイスコンタミ

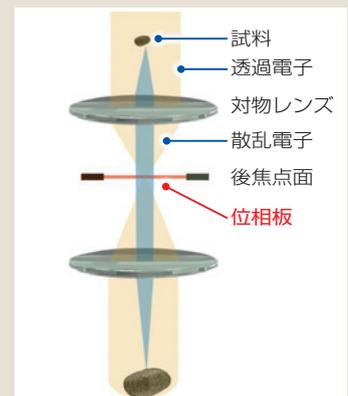
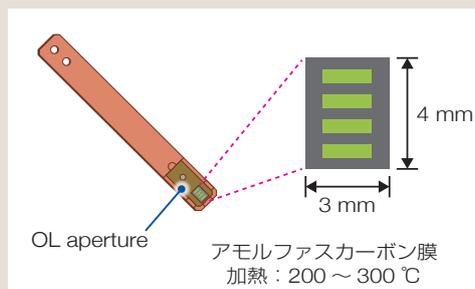
クライオトランスファーホルダーを取り付ける装置本体には、試料よりも温度の低い冷却フィン（アンチアイスコンタミデバイス）等を付ける必要があります。これにより観察中に試料表面に霜が付着することを防ぎます。



ホールフリー位相板

ホールフリー位相板は、コントラストの低い生体等試料に対して高いコントラストを与えるのに有効です。アモルファスカーボン膜により位相をずらすため、ジャストフォーカスでも高いコントラストをもった像が取得できます。

ホールフリー位相板



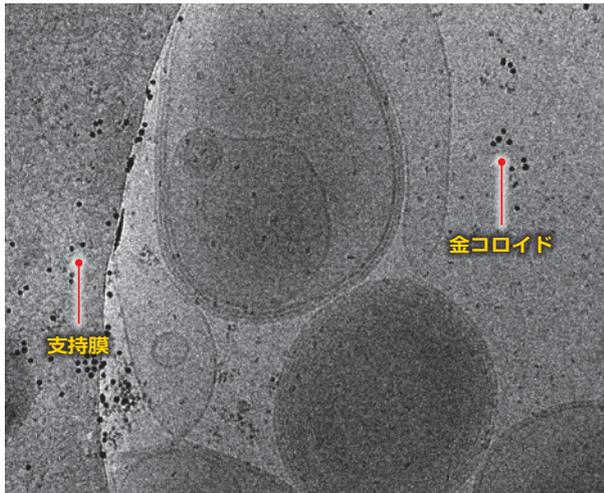
5-2

クライオトランスファーホルダーを用いた TEM の Applications

クライオトランスファーホルダーを、ホールフリー位相板やオメガフィルター付きの TEM に装着して観察すると、より高いコントラストで観察することができます。

Liposome

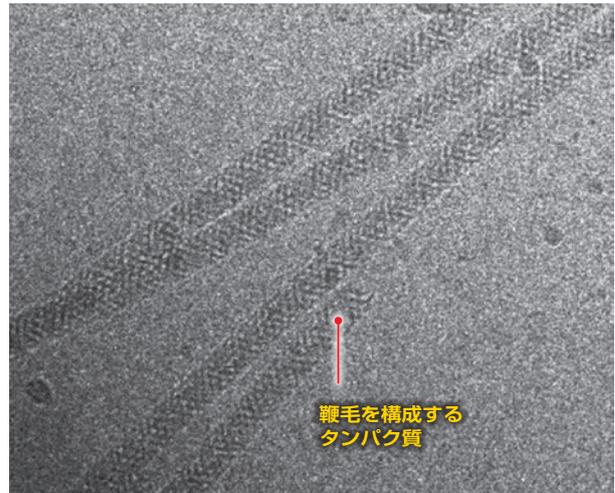
脂質二重膜から構成されるリポソーム粒子が高いコントラストで観察されました。



氷包埋 Omega filter slit In 200 nm

Flagellar poly-hook

長い繊維状の鞭毛およびそれを構成するタンパク質が高いコントラストで観察されました。

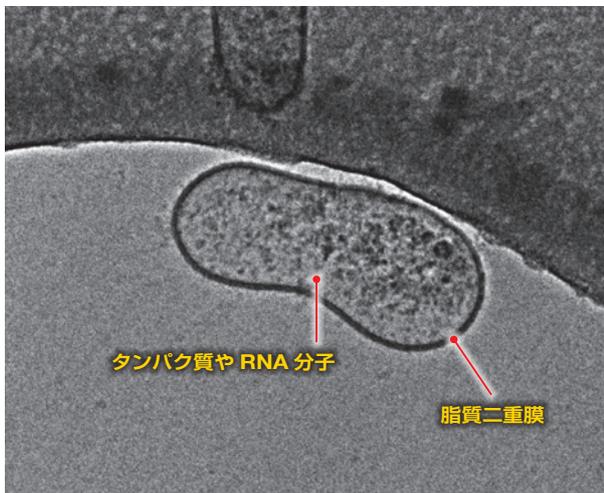


氷包埋 Omega filter slit In 100 nm

Fujii et al., Specific Arrangement of α -Helical Coiled Coils in the Core Domain of the Bacterial FlagellarHook for the Universal Joint Function. 2009 ,Structure.

Exosome

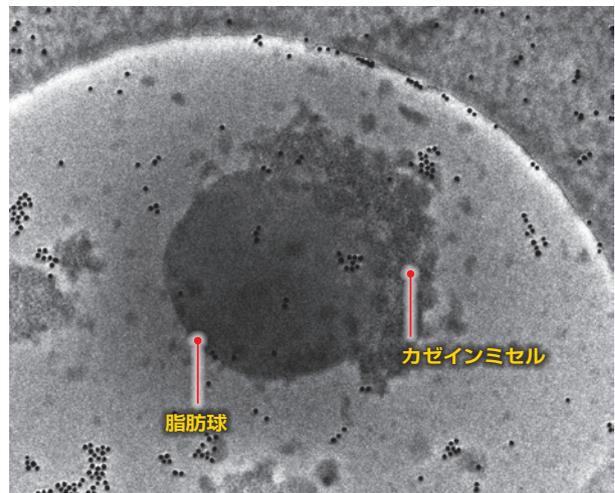
脂質二重膜から構成されるリポソーム様粒子内に内包されているタンパク質や RNA 分子が高いコントラストで観察されました。



氷包埋 Phase Plate In 200 nm

Casein micelle

球状の脂肪球周囲にカゼインミセルが存在していることが高いコントラストで観察されました。

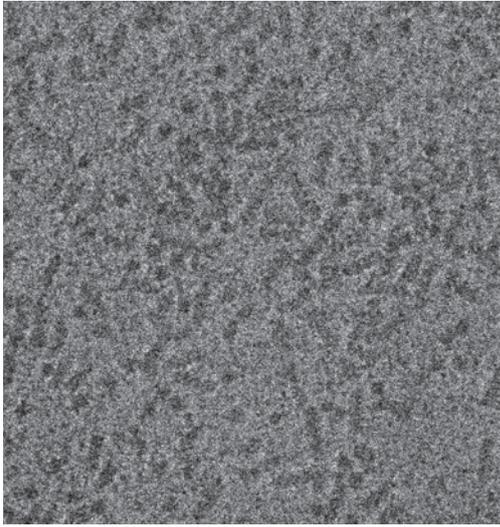


氷包埋 Omega filter slit In Phase Plate In 20 nm

Stathmine + Tubulins

Phase plate In

位相板を使用して観察し、スタスミンとチューブリンの複合体を観察しました。



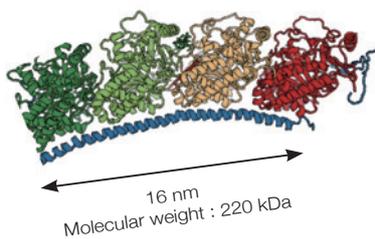
Detector : K2 Summit
Total dose : 30e⁻ / Å²

Phase plate Out

通常観察では、スタスミンとチューブリンの複合体は位相板を使用した時ほど明瞭には見えません。



位相板を使用して取得した画像から複合体粒子像を切り出し、外形や密度分布が同じものを集めてグループ分けします。その後、各グループの粒子像を加算平均して作成した代表的な二次元平均像（右三つの図）です。既知の構造（左図）に類似の構造が見取れます。



Representative 2D class average



試料ご提供：吉川雅英先生（東京大学）

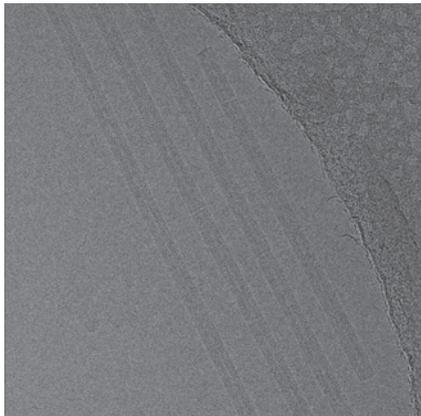
蛋白質やウイルスの三次元再構成

様々な方向から投影したタンパク質粒子像を外形や密度分布が同じものを集めてグループ分けします。その後、各グループの粒子像を加算平均して像のS/Nを向上させます。各グループの粒子像の投影方向の角度を推定し、その角度に沿って逆投影することによって、タンパク質の三次元構造を再構成します。

tobacco mosaic virus

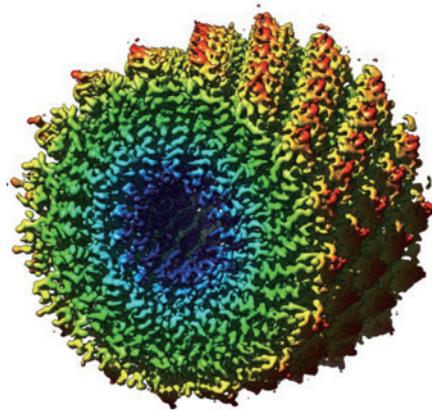
僅か 27 枚の電子顕微鏡写真で達成した、分解能 3.8 Å のタバコモザイクウイルスの構造解析結果です。左が電子顕微鏡写真、右が密度マップです。らせん状のウイルスの構造が確認できました。

電子顕微鏡写真



100 nm

密度マップ

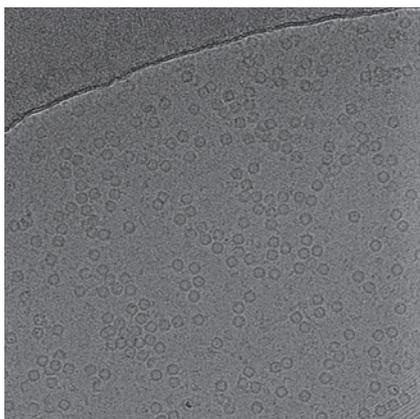


試料ご提供：吉川雅英先生（東京大学）

Apo ferritin

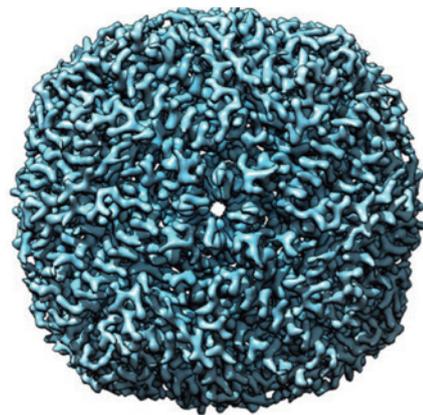
分解能 2.9 Å のアポフェリチンの単粒子解析結果です。

電子顕微鏡写真



50 nm

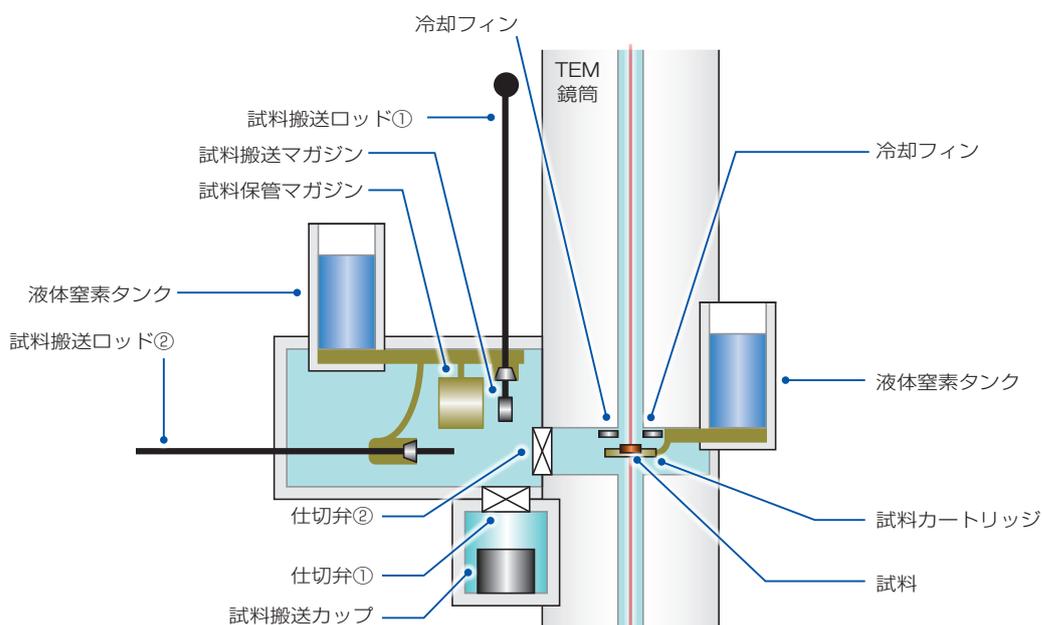
密度マップ



5-3 自動試料搬送装置付 Cryo-TEM

凍結した試料を載せた試料カートリッジを複数個、試料搬送マガジンに入れ、液体窒素を満した試料搬送カップに入れます。試料搬送カップを装置に設置し、チャンバーが気化した窒素で満たされたのち、液体窒素をカップから吸い出し、排気します。十分な真空度に達したら仕切弁①を開け、試料搬送ロッド①で試料搬送マガジンを取り出し、仕切弁①を閉じます。試料搬送ロッド②で、試料カートリッジを試料搬送マガジンから試料保管マガジンへ移送すると、1週間程度保管することができます。観察は、仕切弁②を開き、試料搬送ロッド②を用いて試料保管マガジンから取り出した試料カートリッジを TEM へ挿入しておこないます。

自動試料搬送装置付 Cryo-TEM 概略図

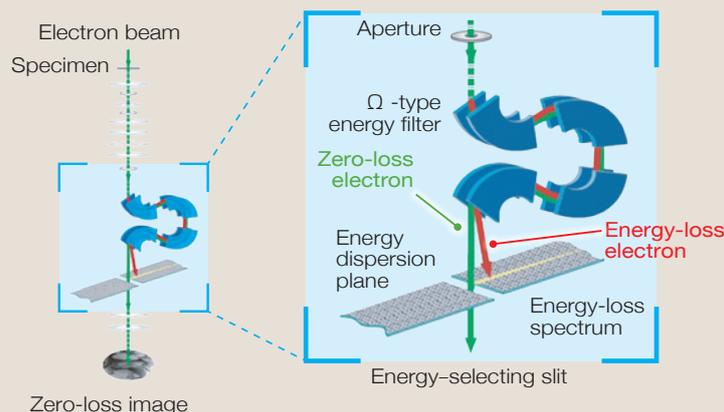


- ・ 試料カートリッジ 試料を載せるためのカートリッジです
- ・ 液体窒素タンク 試料搬送ロッド、試料保管マガジン、試料カートリッジ等を冷却する液体窒素が入っています
- ・ 試料搬送ロッド① 試料搬送カップから試料を取り出します
- ・ 試料搬送ロッド② 試料搬送マガジン、試料保管マガジン、試料室への試料カートリッジの出し入れをおこないます
- ・ 試料搬送カップ 凍結した試料を空気にさらさずに液体窒素内で搬送するためのカップです
- ・ 仕切弁① 装置外で凍結した試料を TEM へ挿入 / 取出する際の仕切弁です
- ・ 仕切弁② 試料カートリッジを試料室に脱着する際の仕切弁です
- ・ 試料搬送マガジン 大気中で凍結した試料を TEM 内に搬送するために、積み上げておくマガジンです
- ・ 試料保管マガジン 観察途中の試料を保管しておくためのマガジンです

オメガフィルター

オメガフィルターは、TEM の鏡筒に取り付けたインカム形エネルギーフィルターです。これによりエネルギーフィルター像やエネルギー損失スペクトル等を取得することができます。

また、オメガフィルターでエネルギーロス電子をカットし、ゼロロス電子だけを通すことで、色収差が低減されたコントラストの高いゼロロス像を観察できます。

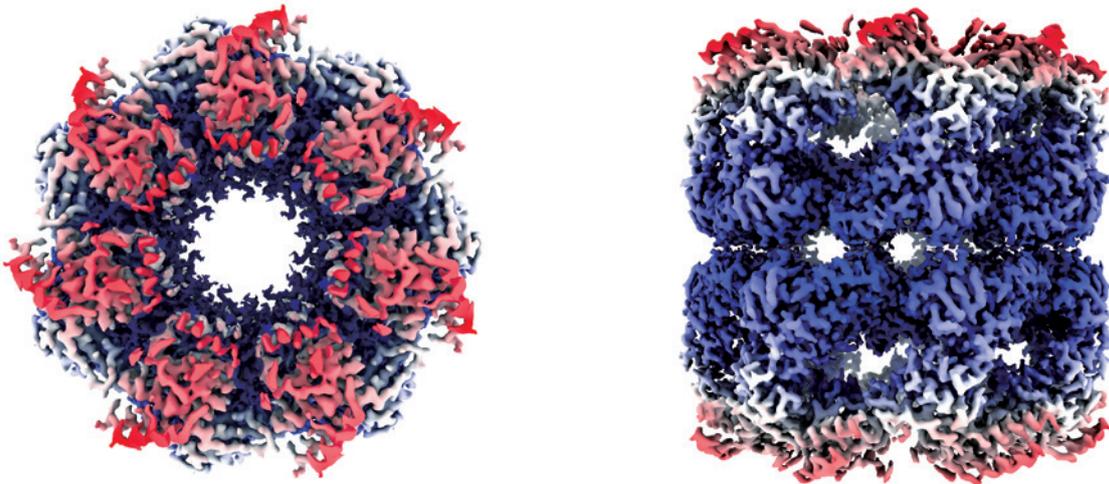


5-4 自動試料搬送装置付 Cryo-TEM Applications

GroEL

504 枚の電子顕微鏡写真で達成した、分解能 1.98 Å の GroEL の密度マップです。先行研究では、1,883 枚の電子顕微鏡写真から分解能 3.1 Å の密度マップが得られていました。(as of Oct. 26, 2020 at EMDB)

密度マップ

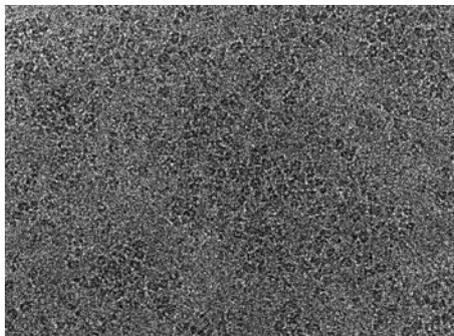


データご提供：藤田純三先生（大阪大学）

Hemoglobin

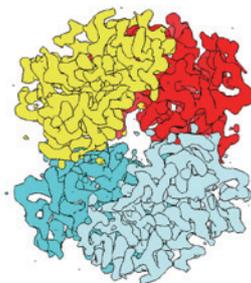
1 時間当たり 850 枚の画像を取得した、ヒトのヘモグロビン（64 kDa）の分解能 3.4 Å の構造解析結果です。

電子顕微鏡写真

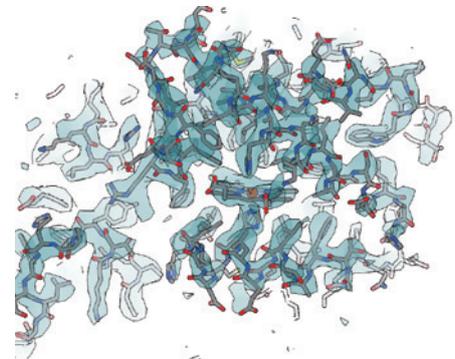


20 nm

密度マップ



密度マップへの原子モデルの
フィッティング

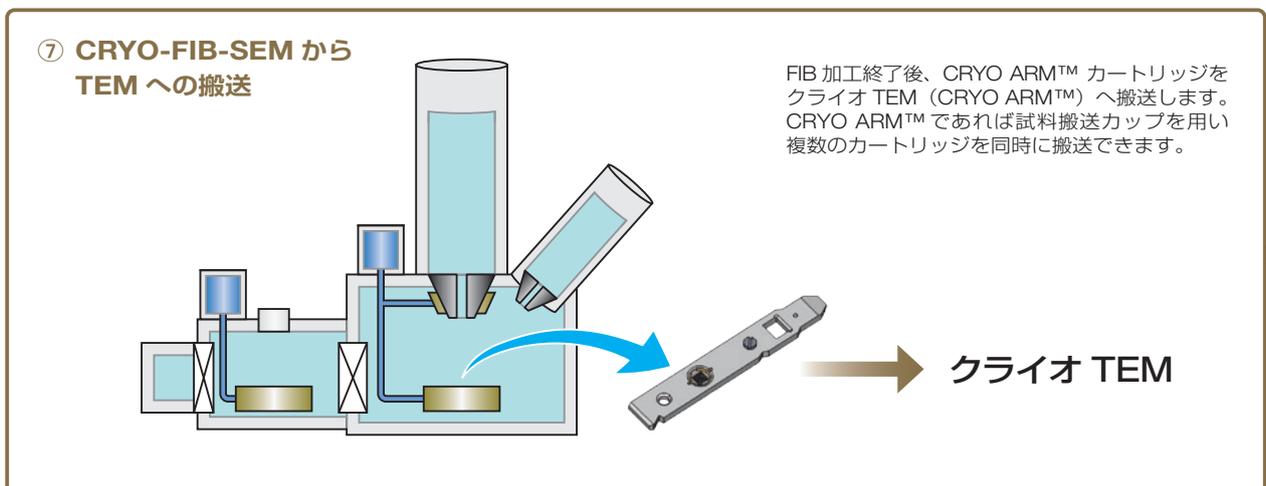
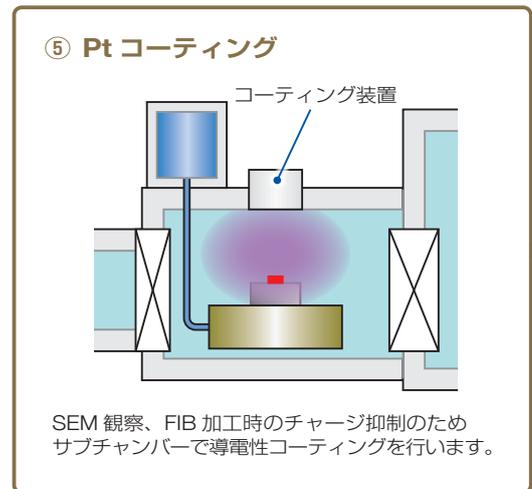
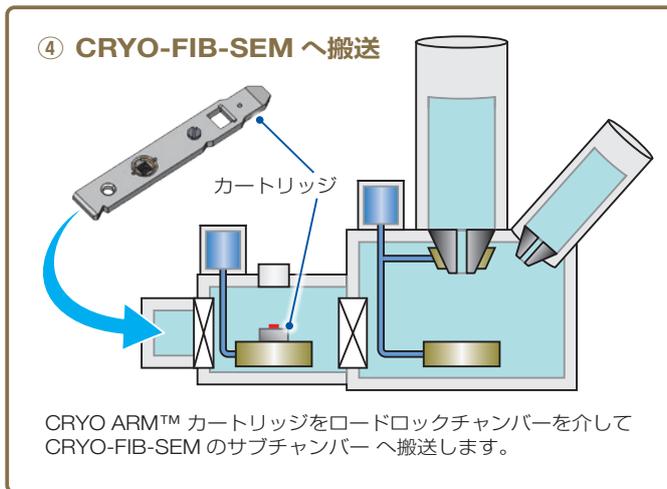
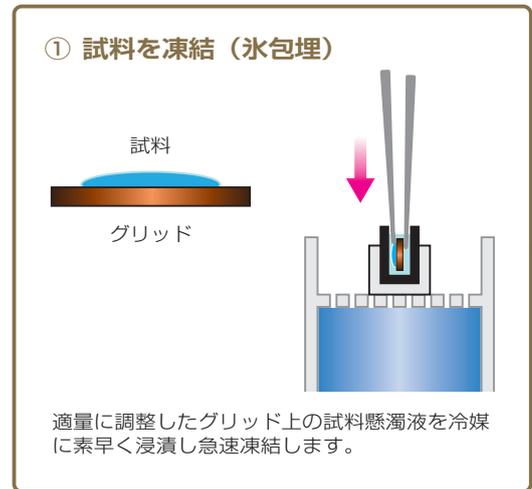
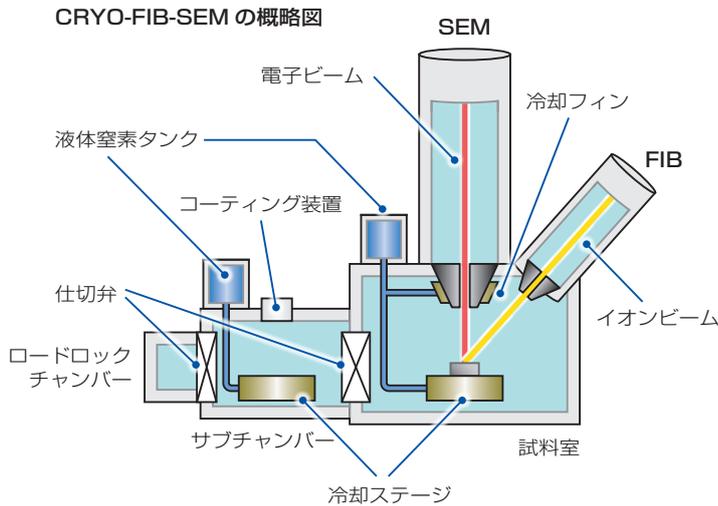


試料ご提供：木下実紀先生（大阪大学）

5-5 Cryo-FIB-SEM による試料作製

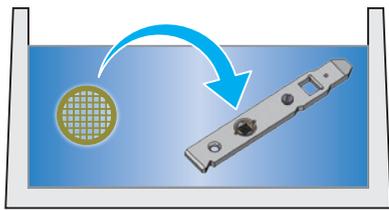
CRYO-FIB-SEM は、液体窒素冷却カートリッジを用いる CRYO-FIB-TEM 試料作製一連の処理が可能です。クライオ TEM (CRYO ARM™) へ

CRYO ARM™ カートリッジを使用した CRYO-FIB-SEM 薄片加工 ~ クライオ TEM 観察



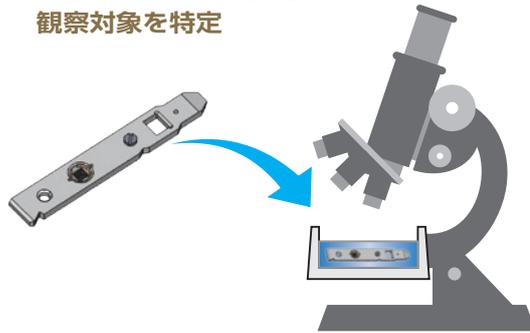
ステージと凍結試料の試料搬送機構（サブチャンバー）を FIB-SEM に搭載し、生物試料などの TEM 試料作製が可能です。特に CRYO ARM™ SEM はサブチャンバーにコーティング装置を内蔵しており、本システムのみで導電性コーティング、保護膜形成、FIB 加工という凍結試料の CRYO ARM™ カートリッジによる試料搬送方式は、液体窒素中でのグリッド操作を極力減らせるため、各装置間の移動や TEM 試料作製後の試料搬送をより容易に行えます。また、ステージの冷却方式はドリフトと振動が少ない熱伝導方式を採用し、確度の高い TEM 薄膜作製が可能です。

② グリッドを CRYO ARM™ カートリッジに取付け



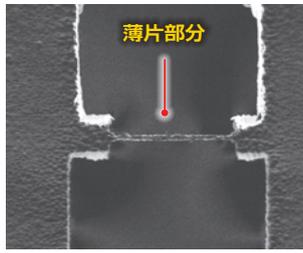
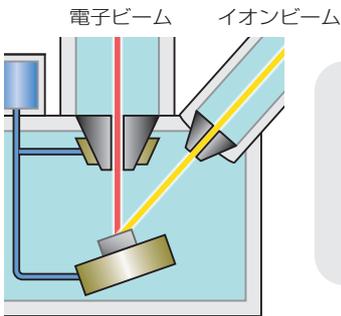
液体窒素中で行います。これ以降グリッドを直接扱う必要がないため、ハンドリングが容易です。

③ 冷却ステージ付き蛍光顕微鏡で観察対象を特定

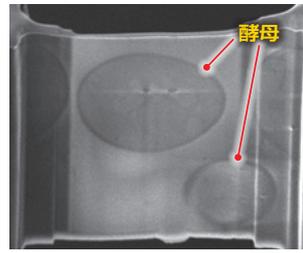


SEM や FIB では氷包埋された試料は観察できないため、事前に蛍光顕微鏡で試料の位置を特定しておきます。

⑥ FIB で薄片化加工



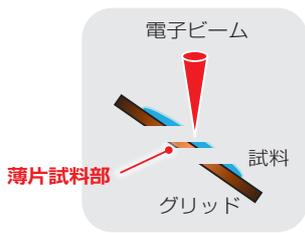
薄片部を残して FIB 加工した様子



薄片部の SEM 二次電子像 (試料: 酵母)

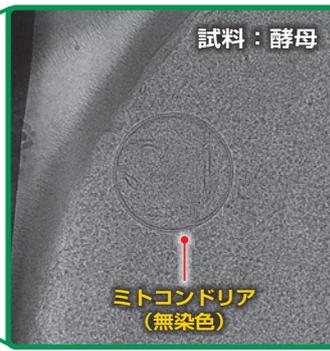
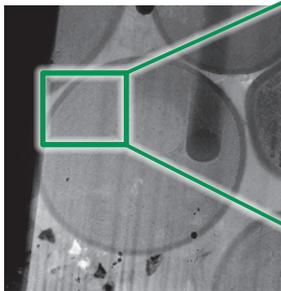
CRYO ARM™ カートリッジをサブチャンバーから FIB-SEM 内の冷却ステージに搬送します。試料を斜めにし FIB 加工を実施、薄片試料を作製します。

⑧ クライオ TEM 観察



薄片試料部を TEM 観察します。

無染色の生物試料をコントラスト良く観察できました



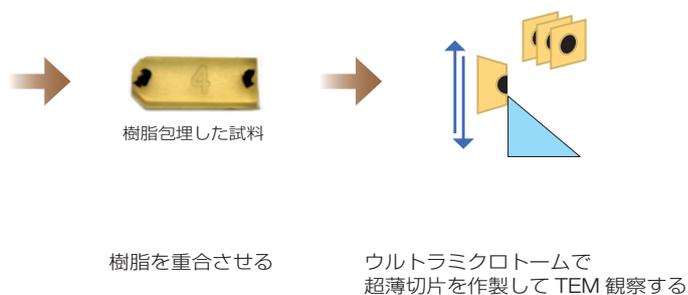
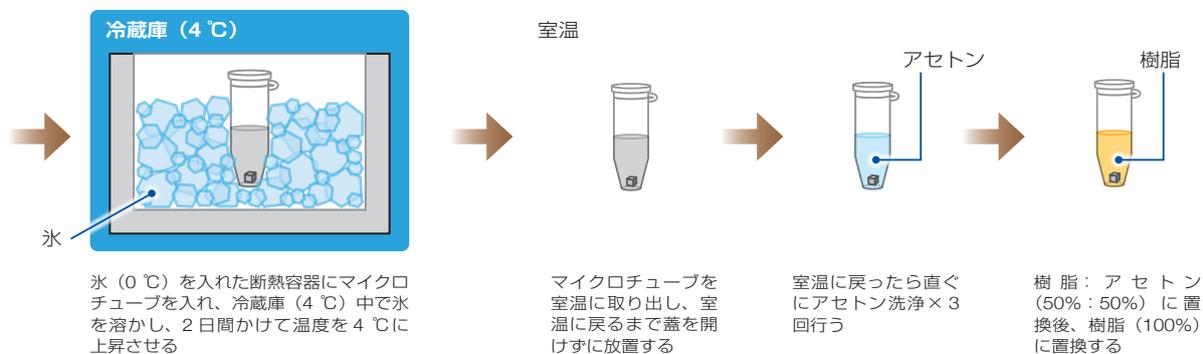
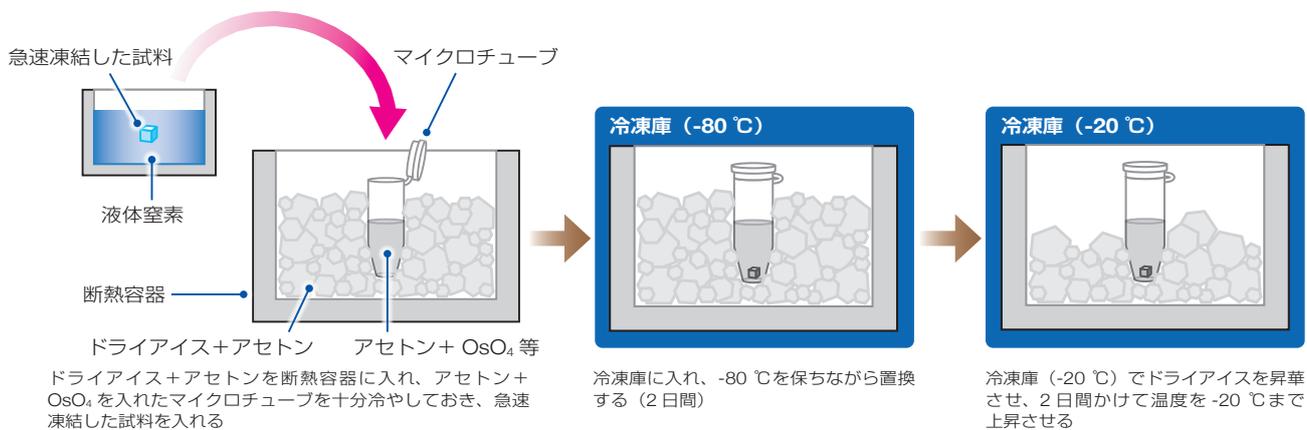
6

凍結置換法

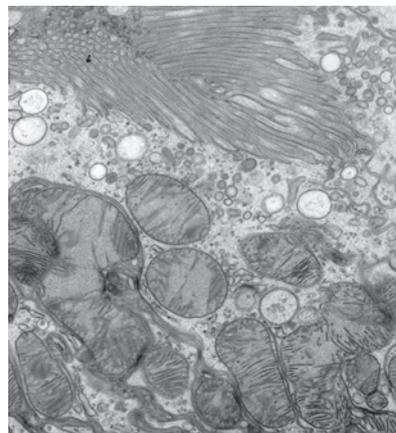
6-1

凍結置換法

急速凍結法（加圧凍結法、金属圧着凍結法等）により凍結固定した生物試料内の水分をアセトン等の有機溶媒に置換する方法です。その際、有機溶媒に四酸化オスミウムや酢酸ウラン等を加えることで、化学固定および電子染色を同時におこなうことができます。置換後は温度を徐々に室温まで戻します。その後は一般の化学固定法と同じように、樹脂包埋、超薄切片作製しTEM観察をおこないます。生きていたときに近い状態で急速凍結した生物試料の形態を保ちながら水分の置換をおこなうことができます。



ラット腎臓



加圧凍結 凍結置換法
酢酸ウラニル - クエン酸鉛染色
TEM 観察
1 μm

7

凍結割断レプリカ法

7-1

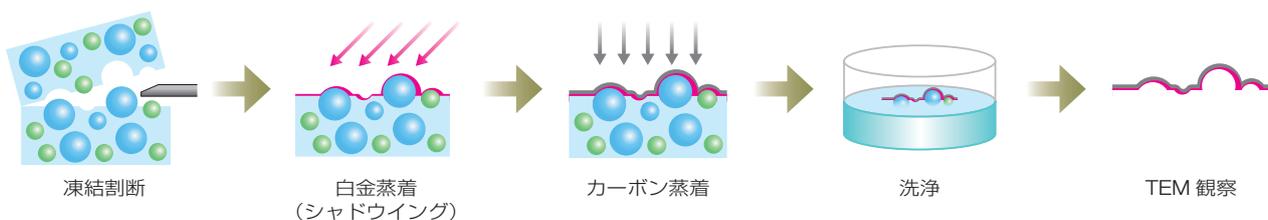
凍結割断レプリカ法

凍結（物理固定）した溶液や軟試料の凍結断面をレプリカ膜に転写して TEM 観察する方法です。フリーズ・フラクチャー法、フリーズ・エッチング法（ディープ・エッチング法）、クライオ抽出レプリカ法の三種類があります。

フリーズ・フラクチャー法、フリーズ・エッチング法では、試料に白金を蒸着することによるシャドウ効果により試料の凹凸構造に依存したコントラストを加え、立体的な TEM 像を観察することができます。クライオ抽出レプリカ法は、液中に分散する微粒子を直接レプリカ膜に抽出する方法であり、サンプルを直接観察するため EDS や EELS による元素分析も可能です。レプリカ膜の作製には凍結割断レプリカ作製装置が必要です。

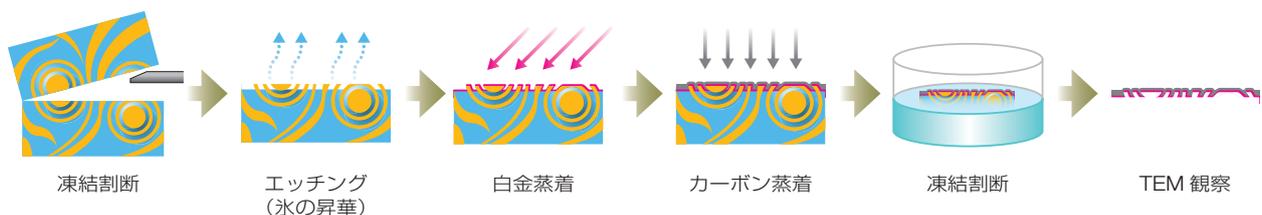
フリーズ・フラクチャー法

凍結試料を割断すると、抵抗の少ないところを通してミクロのレベルで微細に割れ進みます。実際には疎水面と親水面や物性が違う水と油の界面など、凍結下で物理的に弱い部分で割断が起きやすいため、水と油の界面や脂質二重膜の内部構造、ミセルや液晶などの構造を観察する際に用いられます。



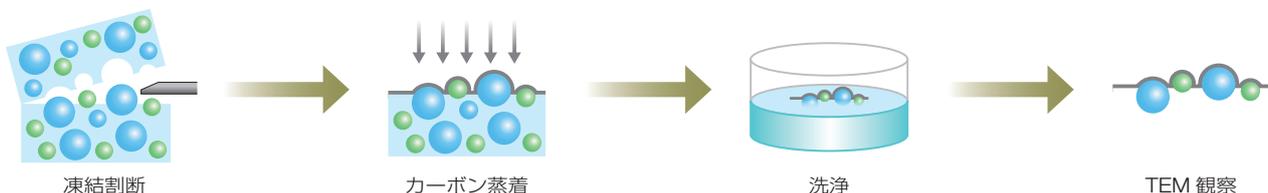
フリーズ・エッチング法（ディープ・エッチング法）

凍結試料の割断後、割断した表面の氷をエッチング（昇華）させて露出した内部構造を観察する方法で、水に覆われて観察できない内部の構造を露出したい場合に有効です。また、表面の氷が昇華して除かれるため、凹凸差によるコントラストが得られます。これを利用して O/W 構造、W/O 構造、Bicontinuous 構造の水部分の所在を可視化したい際に用いられます。



クライオ抽出レプリカ法

液中に分散する微粒子を直接レプリカ膜に抽出する方法です。サンプルを直接観察するため EDS や EELS による元素分析が可能です。また、白金蒸着を使用しないため、更に高倍率の観察も可能です。



7-2 凍結切断レプリカ法 Applications

コーヒーミルク

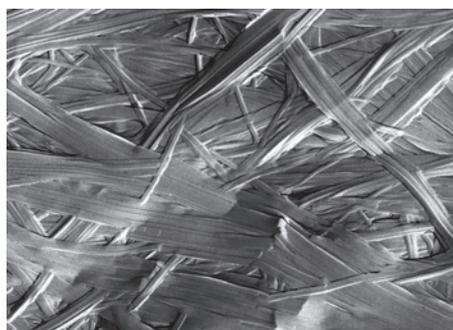
脂肪球やカゼインタンパクが観察されます。



フリーズ・フラクチャー法
TEM 観察 500 nm

石鹸

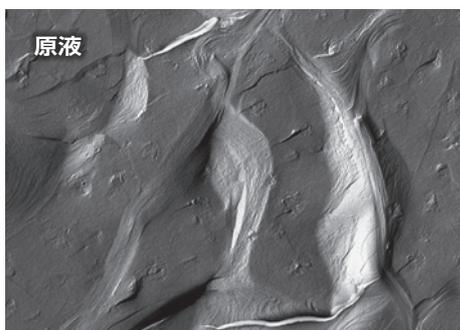
熱や電子線に弱い石鹸の形態が容易に観察できます。



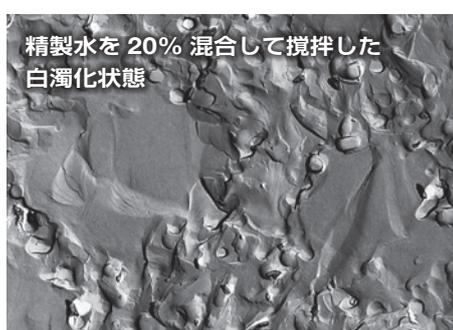
フリーズ・フラクチャー法
TEM 観察 1 μm

クレンジングオイル

透明なクレンジングオイルの原液に使用時と同じ 20% の水を混合し、白濁化した状態で観察すると、微細形態が均一な層状構造から約 500 nm の球状構造に変化したことがわかりました。



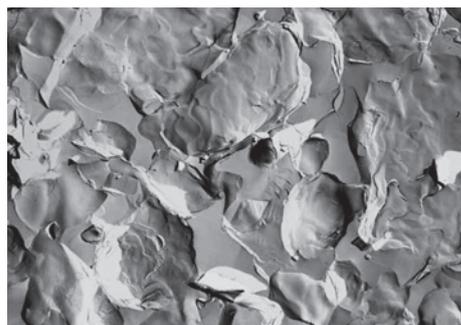
原液
フリーズ・フラクチャー法
TEM 観察 2 μm



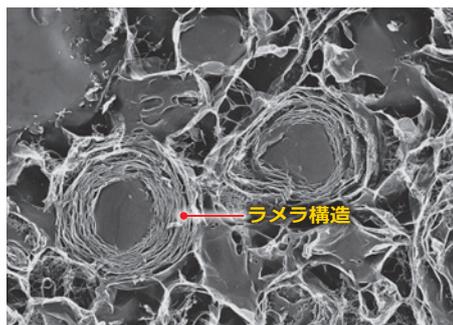
精製水を 20% 混合して攪拌した
白濁化状態
フリーズ・フラクチャー法
TEM 観察 2 μm

エマルジョン (クリーム)

フリーズ・フラクチャー法では含水試料の凍結切断によって得られた切断面を観察しているため、試料の脆性部分である油水界面に沿って切断された構造が観察されます。フリーズ・エッチング法では平滑な切削面を作製してエッチングを施すため、氷が昇華することによって得られた凹凸やエマルジョン粒子の内部構造を観察できます。



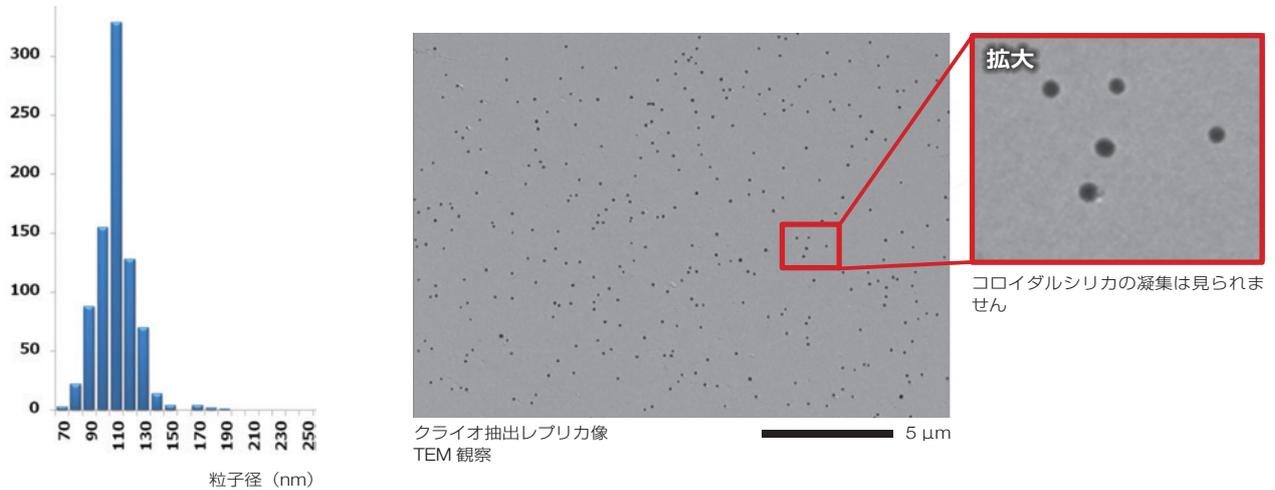
フリーズ・フラクチャー法
TEM 観察 500 nm



フリーズ・エッチング法
TEM 観察 500 nm

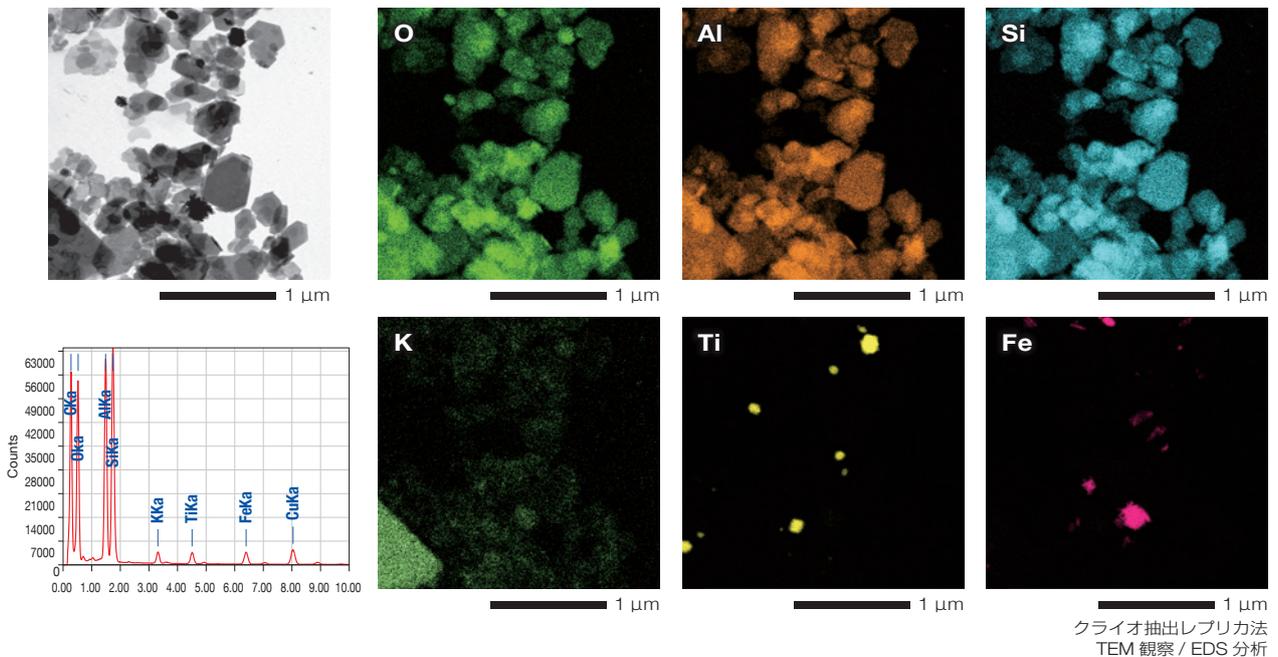
コロイダルシリカの粒度分布

クライオ抽出レプリカ法でコロイダルシリカの粒度分布解析をおこなった結果です。モンタージュ撮影で 30 μm \times 30 μm 四方の広範囲を撮影した像を用いて、画像の2値化（大津の2値化）により粒子を検出し円近似により粒径を算出しました。クライオ抽出レプリカ法では粒子の凝集が見られず、正確な粒子径の測定に有効であることが分かります。



乳化物中に分散する介在物の元素分析（液状ファンデーション）

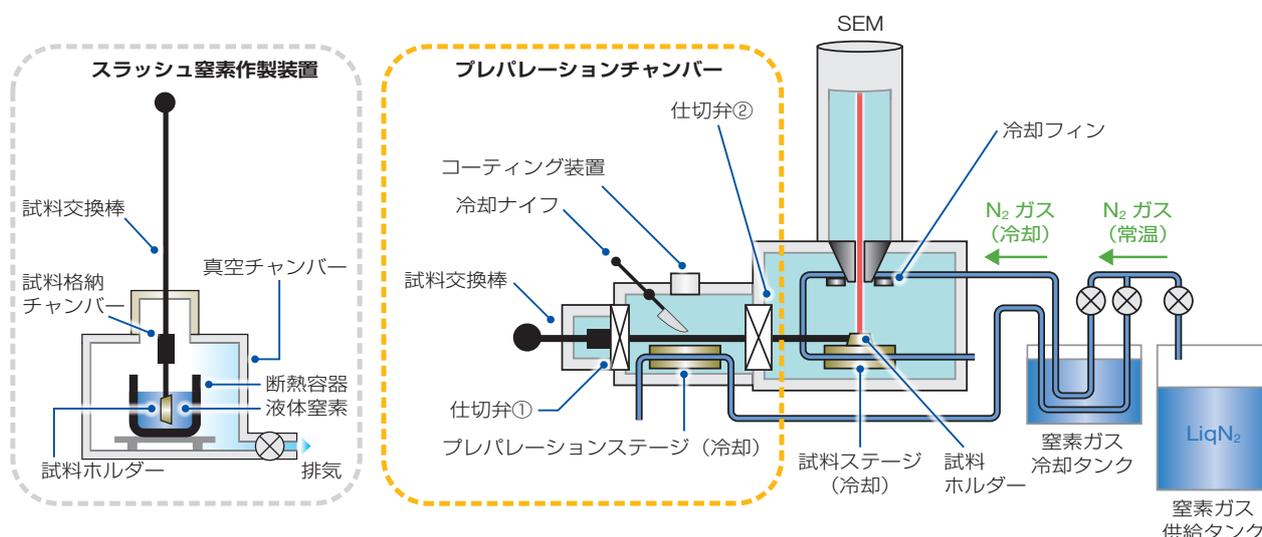
乳化物中に分散する無機添加物を EDS で元素マッピングしました。レプリカ膜は薄い高純度のカーボンでできているため、高分解能観察や分析に適しています。



8-1 Cryo-SEM

Cryo-SEMは、試料を凍結することで含水試料等の形態を保ったまま観察する手法です。また、ポリマーのような電子線照射による熱損傷を受けやすい試料の損傷を防ぐ目的にも使用されます。試料凍結後、必要に応じて切断やエッチング（氷の昇華）をおこない、目的の部位を露出させ、冷却ステージを使用して試料を凍結したまま観察します。

Cryo-SEM 概略図



【SEM】

試料ステージ（冷却）：試料を凍結したまま観察するために冷却されたステージです。

冷却フィン：冷却された試料のアイスコンタミネーション防止のため設置します。試料ステージより低い温度に設定します。

【プレパレーションチャンバー】

仕切弁①：装置外で凍結した試料を挿入 / 取出する際に使用します。

仕切弁②：プレパレーションチャンバーから SEM へ試料を挿入 / 取出する際に使用します。

冷却ナイフ：試料切断に使用します。

プレパレーションステージ：前処理中の試料温度を制御するための冷却ステージです。エッチングにも使用します。

コーティング装置：必要に応じて金、白金、カーボン等のコーティングをおこないます。

【付属設備】

窒素ガス供給タンク：試料ステージ、プレパレーションステージ、冷却フィンを冷却するための窒素ガスの供給源となるタンクです。
>99.999 vol%、H₂O フリーのドライ窒素ガスでも代用可能ですが、1 日で 7 m³ の容器を 1 本消費します。

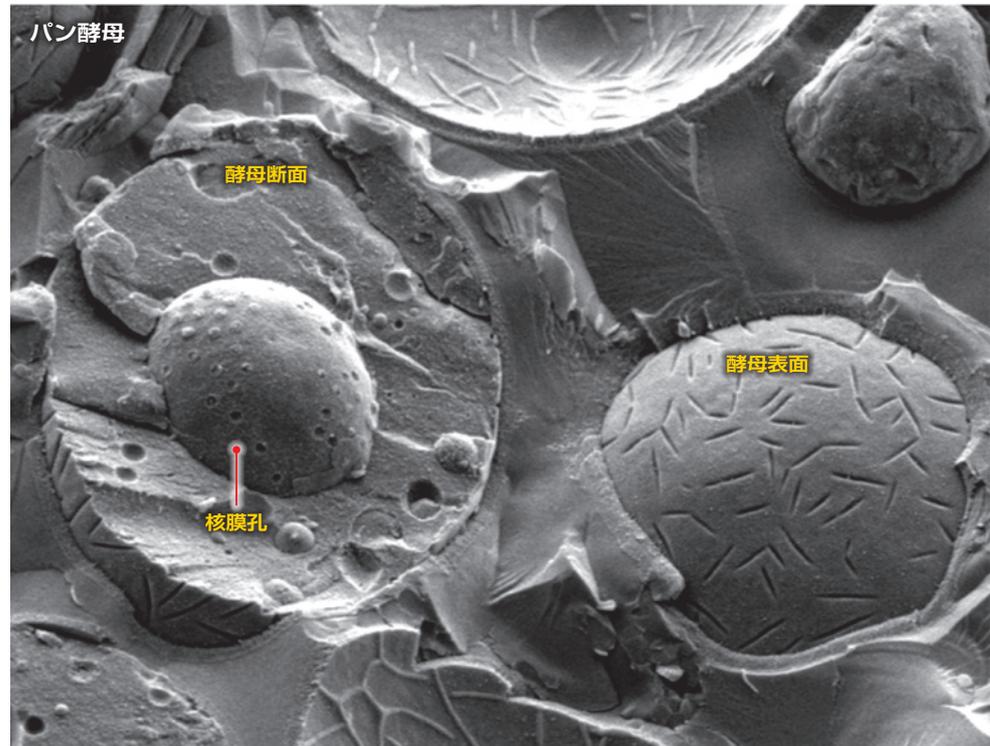
窒素ガス冷却タンク：窒素ガス供給タンクから供給された窒素ガスを液体窒素で冷却するためのタンクです。

スラッシュ窒素作製装置：スラッシュ窒素を作製する装置です。凍結後の試料を試料交換棒に搭載された試料格納チャンバーに格納し、大気に触れずにプレパレーションチャンバーへ搬送することができます。

8-2 Cryo-SEM Applications

微生物

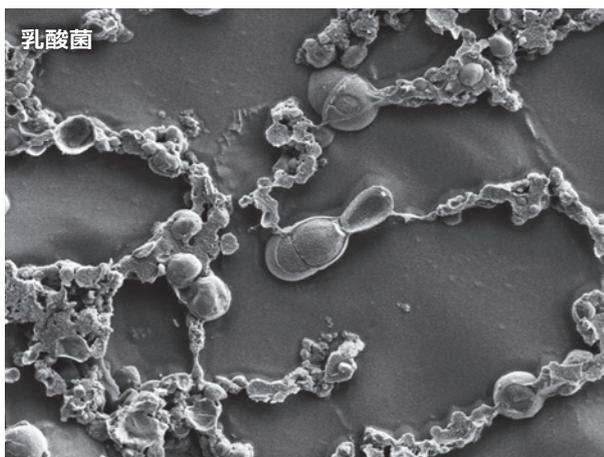
パン酵母を急速凍結し、真空中で切断し、クライオシステムを装着したFE-SEMで高分解能観察しました。酵母の表面構造や核膜孔が観察できました。



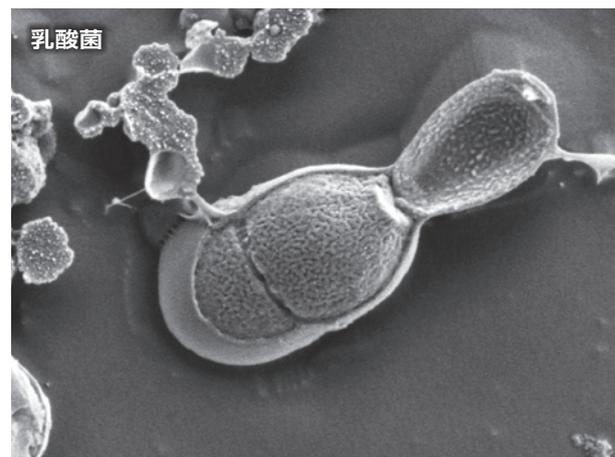
急速凍結（スラッシュ窒素） 凍結切断
Ptスパッタ Cryo-SEM 観察

1 μm

急速凍結したヨーグルトを切断、エッチングし、現れた乳酸菌を観察しました。



急速凍結（スラッシュ窒素） 凍結切断 エッチング
Ptスパッタ Cryo-SEM 観察

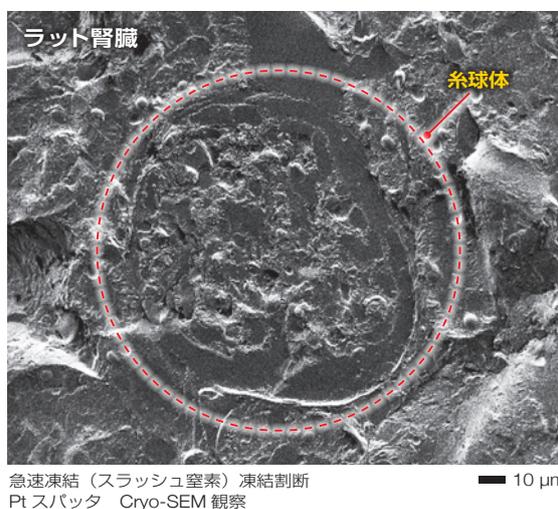
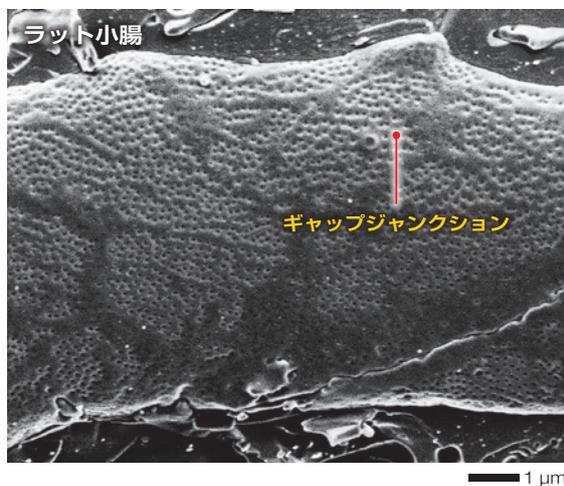
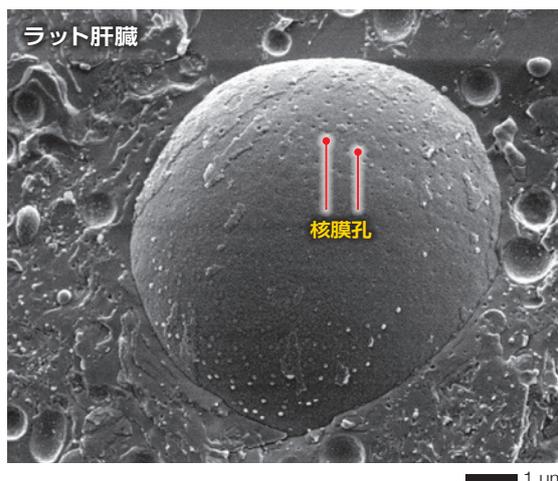


100 nm

動物組織

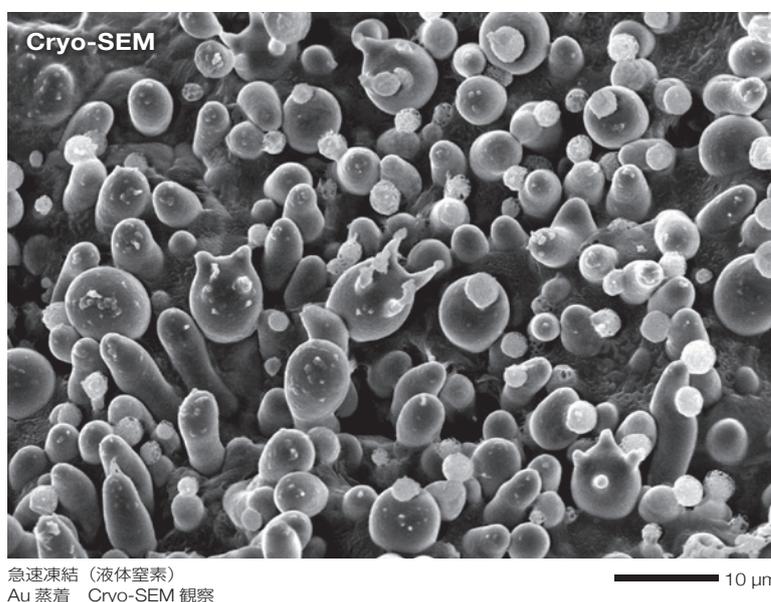
ラットの組織を Cryo-SEM で観察すると、核膜孔やギャップジャンクションが観察できました。試料を凍結して観察することは、常温観察のように試料を乾燥する必要がないため、乾燥時の収縮を回避して観察することができます。

1. 灌流固定後組織を摘出
2. 浸漬固定後、洗浄
3. 試料中の水分を 20% ショ糖溶液に置換
4. 急速凍結後、割断、観察



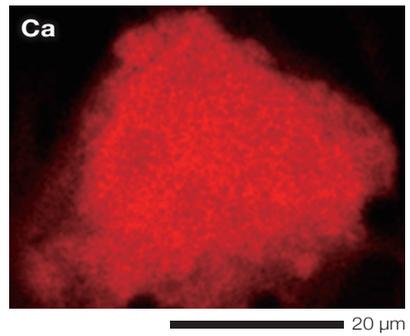
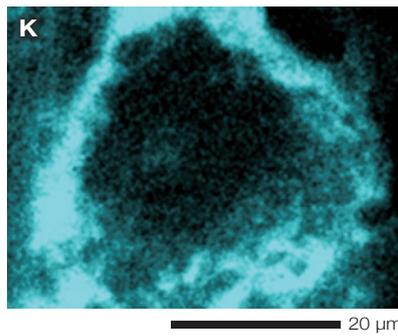
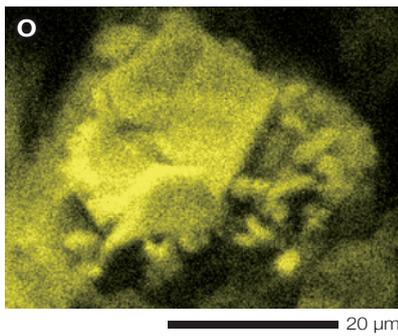
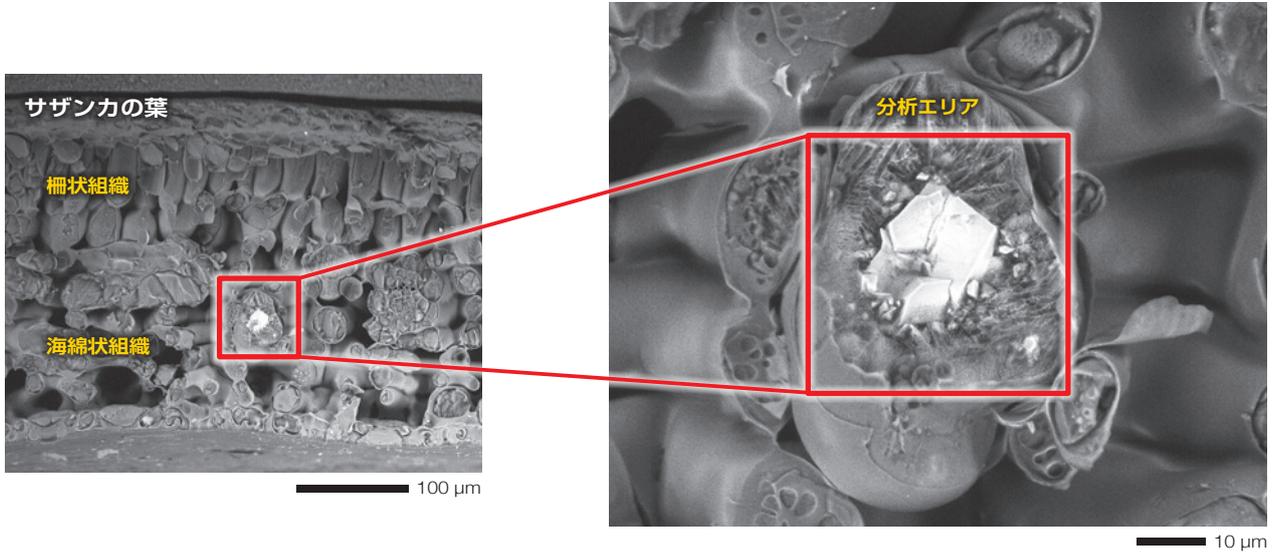
シイタケの担子

シイタケの担子（担子胞子）は低真空モード（常温）では真空中で変形しやすく、観察が困難ですが、凍結して Cryo-SEM で観察すると、形態を保って詳細に観察できました。



植物

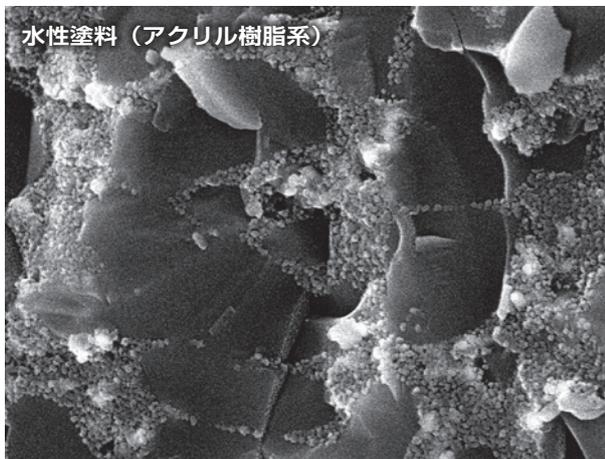
植物を凍結して Cryo-SEM で観察すると、ミネラル等の流出のない状態で断面観察することができます。これは、サザンカの葉の断面で、結晶が観察されました。EDS 元素マッピングにより、この結晶には Ca が、結晶の周囲には K が局在していることが分かりました。



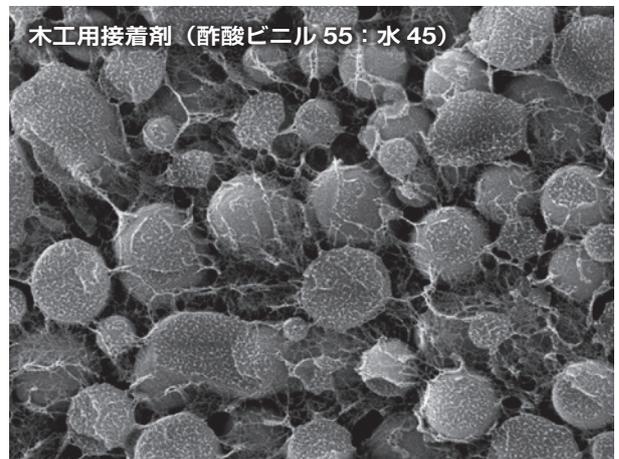
急速凍結 (スラッシュ窒素) 凍結切断
エッチング Pt スパッタ Cryo-SEM 観察 / EDS 分析

エマルジョン

エマルジョンを凍結後、エッチングして観察することで、粒径や分布等を確認できました。



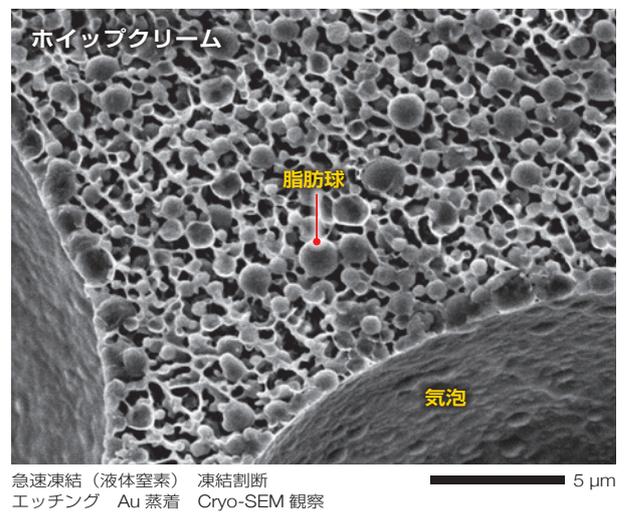
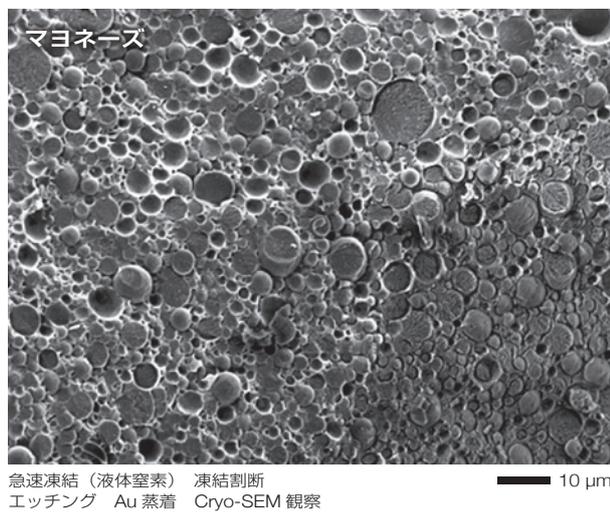
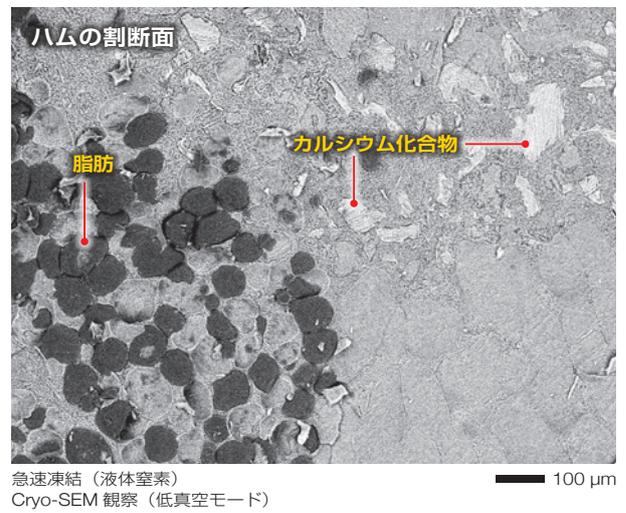
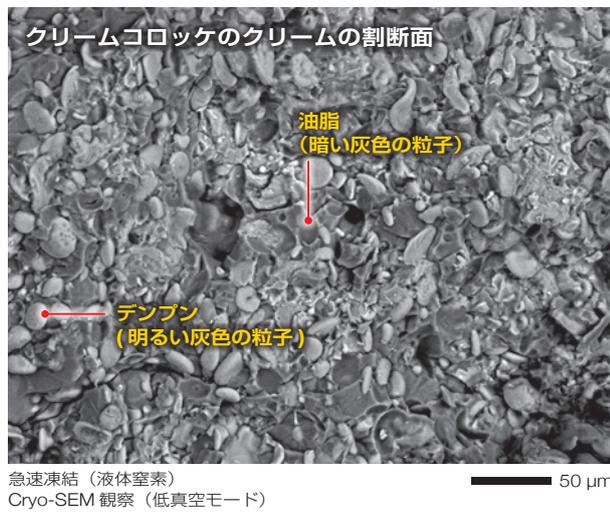
水性塗料 (アクリル樹脂系)
急速凍結 (液体窒素) 凍結切断
エッチング Au 蒸着 Cryo-SEM 観察



木工用接着剤 (酢酸ビニル 55 : 水 45)
急速凍結 (液体窒素) 凍結切断
エッチング Au 蒸着 Cryo-SEM 観察

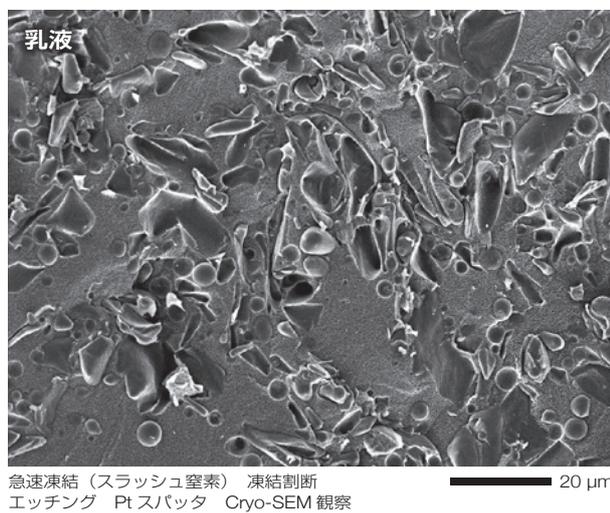
食品

水分が多く含まれる食品中の油脂やミネラル等の形状や分布を観察することができました。



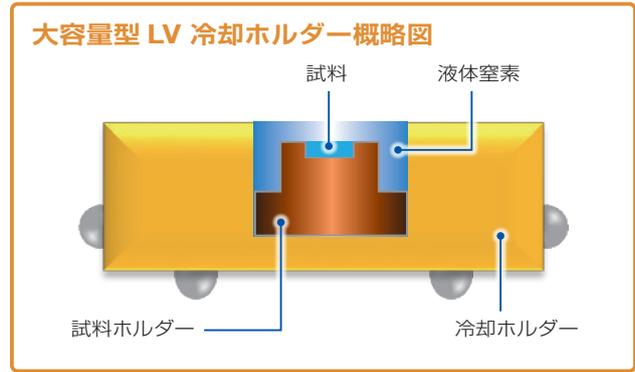
化粧品

凍結することでクリーム状の物質の構造を観察することができました。



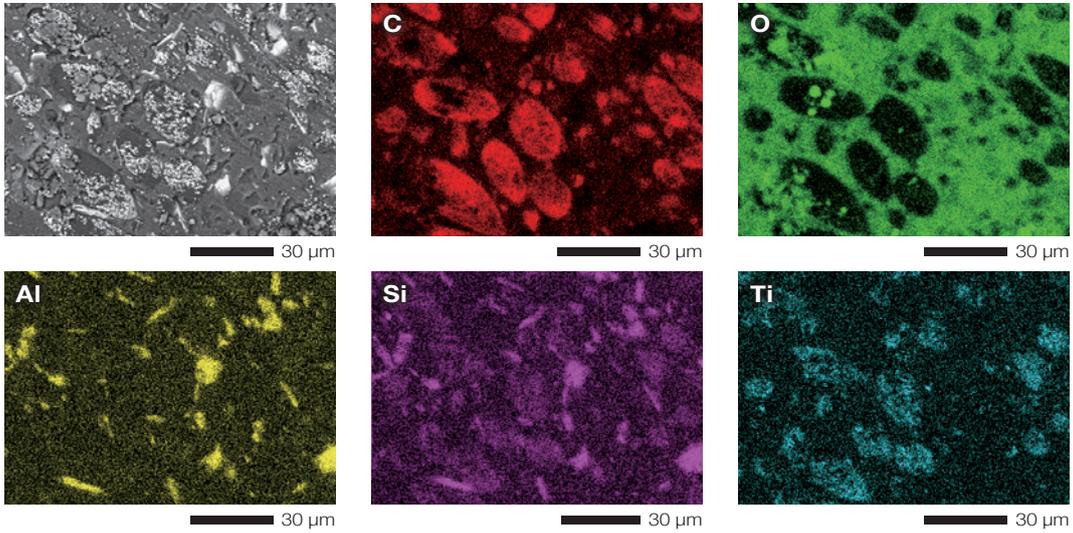
8-3 簡易クライオ法

簡易クライオ法は、LV 冷却ホルダーを用いて液体窒素温度に冷却した含水試料や軟試料を低真空 SEM 観察する方法です。低真空 SEM に搭載して、簡易的なクライオ SEM 観察や凍結乾燥をおこなうことができます。



液状ファンデーション

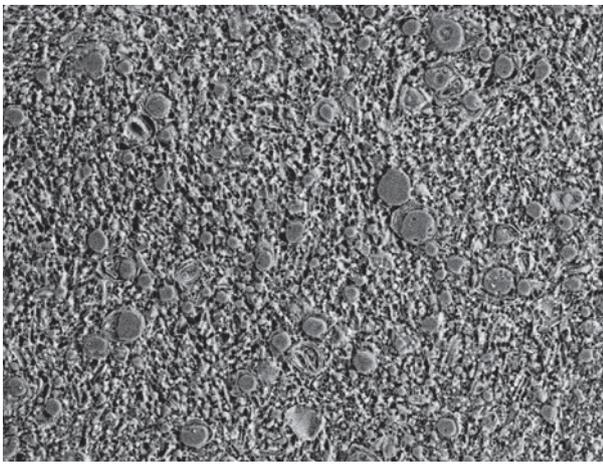
凍結したまま EDS 元素マッピングをおこなうことができます。無機材料だけでなく、液状の C や O の分布も安定した状態で確認できます。



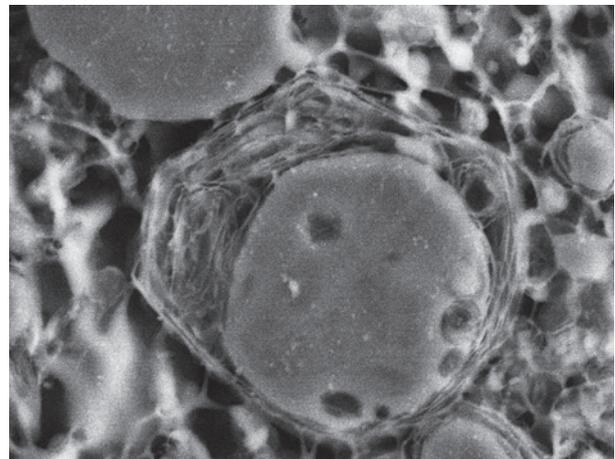
急速凍結（液体窒素） クライオマイクロームによる面出し エッチング LV 冷却ホルダー使用 SEM 観察 / EDS 分析（低真空モード）

乳液

クライオマイクロームで面出しした凍結断面をエッチングし、試料内部の氷を昇華することで、簡便にラメラ構造が観察できました。



急速凍結（液体窒素） クライオマイクロームによる面だし エッチング 冷却ホルダー使用 SEM 観察（低真空モード）



9

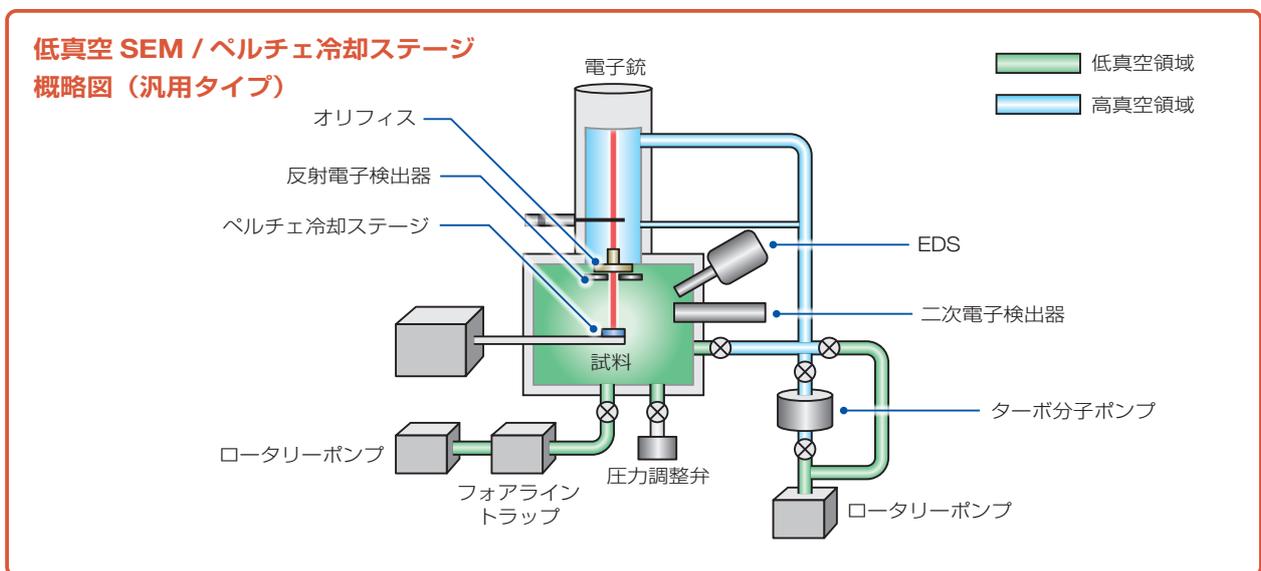
低真空 SEM とペルチェ素子による冷却

9-1

低真空 SEM / ペルチェ冷却ステージ

低真空 SEM は、空気、もしくは N_2 ガスを試料室に導入して試料室の圧力を数 Pa から数 100 Pa まで設定できる SEM です。試料室の残留ガス分子が、入射電子や試料から放出された電子と衝突することによって陽イオンになることを利用して、試料の帯電を中和します。適切な真空度に設定することで非導電性試料を導電物質のコーティングをせずに観察することができます。

ペルチェ冷却ステージは、ペルチェ素子により $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度まで冷却することができます。ペルチェ冷却ステージを低真空 SEM に装着すると、含水試料の水分の蒸発を抑えて観察することができます。さらに特殊なカバーを使用して、水蒸気分圧と試料温度を制御することで、液状の試料を SEM 観察すること（アクアカバー法）も可能です。



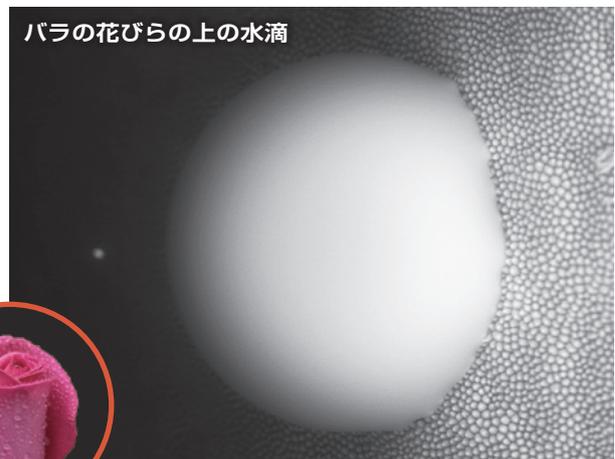
9-2

低真空 SEM / ペルチェ冷却ステージ / アクアカバー法 Application

水滴境界面の観察

アクアカバー法を使用して観察したバラの花びらの上の水滴です。大気圧下で花びらに付着していた水滴を、乾燥することなく SEM 観察することができます。境界面で、水が撥水している様子が観察できました。

バラの花びら上の水滴



無処理 低真空 SEM (低真空モード)
アクアカバー法 ペルチェ冷却: $0\text{ }^{\circ}\text{C}$

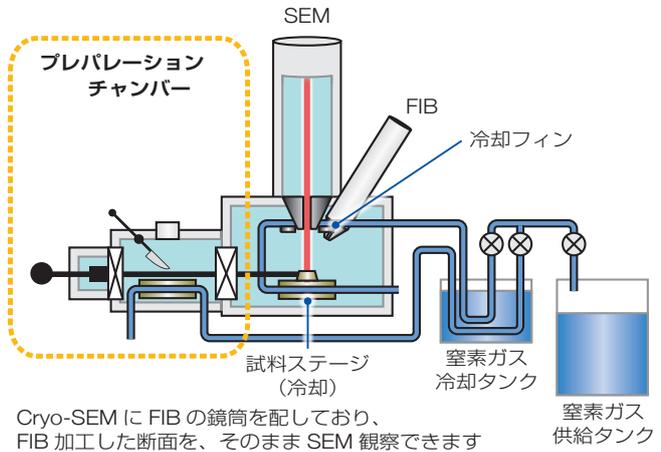
200 μm

10 Cryo-FIB

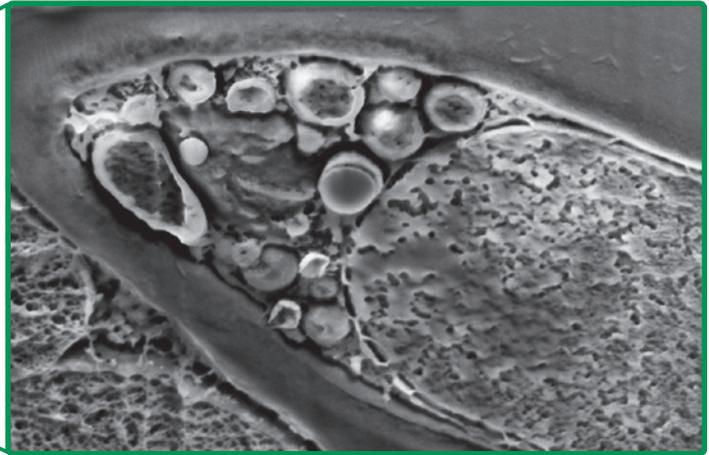
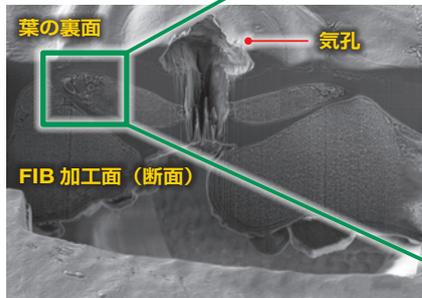
10-1 Cryo-FIB

FIBは、集束したイオンビーム（数 keV ~ 30 keV のエネルギーを持った細いガリウムイオンビーム）を試料に照射し、加工、観察する装置です。Cryo-FIB-SEM法は、SEMとFIBの鏡筒を一つの試料室に配し、さらにクライオシステムを搭載することで、凍結した含水試料等の形態を保ったままFIB加工し、そのままSEM観察できる手法です。試料を急速凍結し、細胞組織や食品、化粧品などの特定部位の断面加工による内部構造観察や分析をおこなうことができます。

Cryo-FIB-SEM 概略図

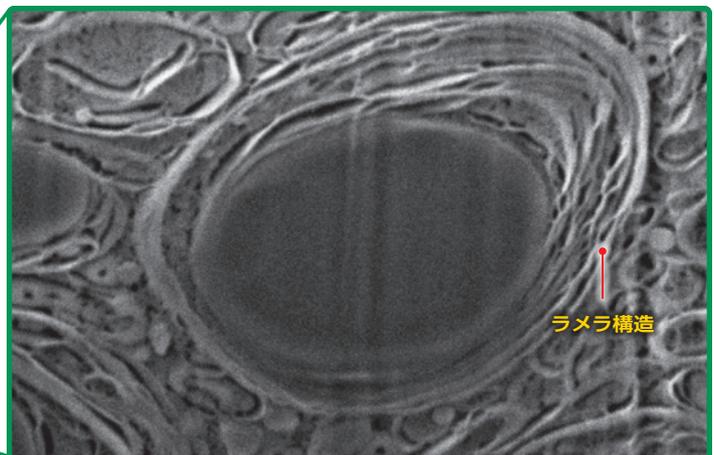
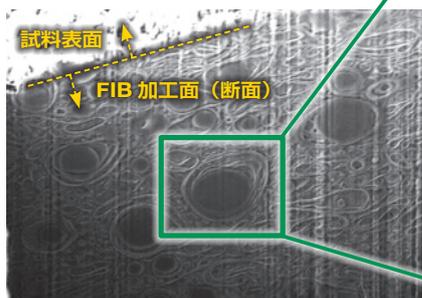


サザンカの気孔



急速凍結（液体窒素） Cryo-FIBによる断面だし Ptスパッタ Cryo-SEM観察

化粧品クリーム

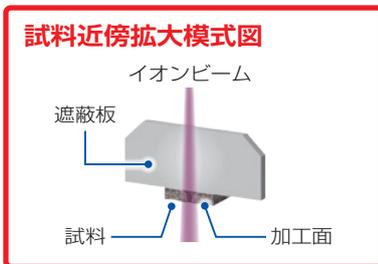


急速凍結（液体窒素） Cryo-FIBによる断面だし Ptスパッタ Cryo-SEM観察

11

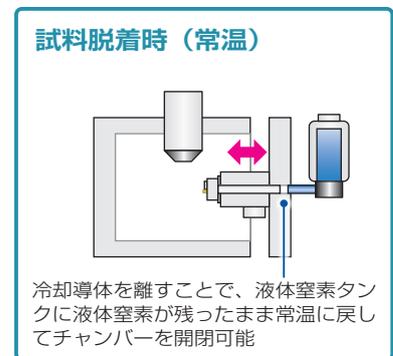
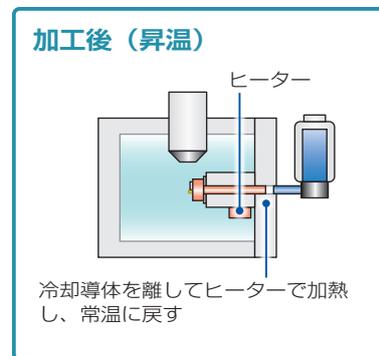
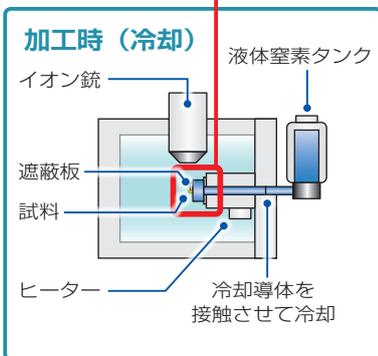
冷却 CP 【Cryo-CP】

11-1 冷却 CP (Cryo-CP) のしくみ



CP (クロスセクションポリッシャ™) は、アルゴンのブロードイオンビーム (BIB) を使った断面試料作製装置です。試料直上にスパッタリング速度の遅い遮蔽板を置き、その上からアルゴンの BIB を照射することで、遮蔽板の端面に沿った加工面を作ります。

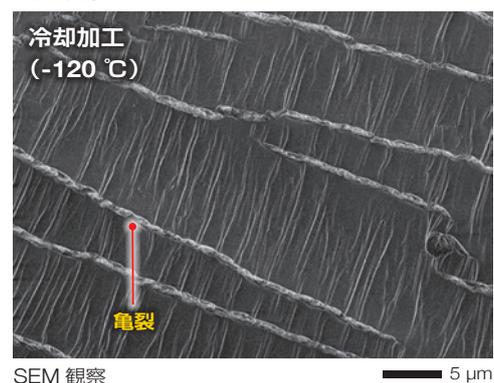
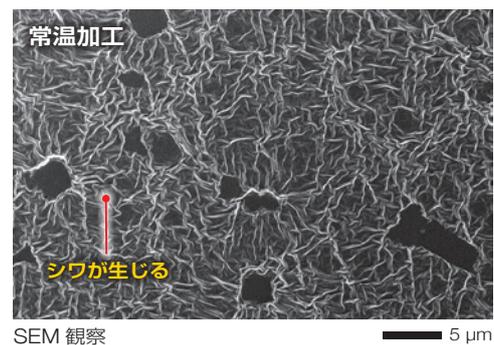
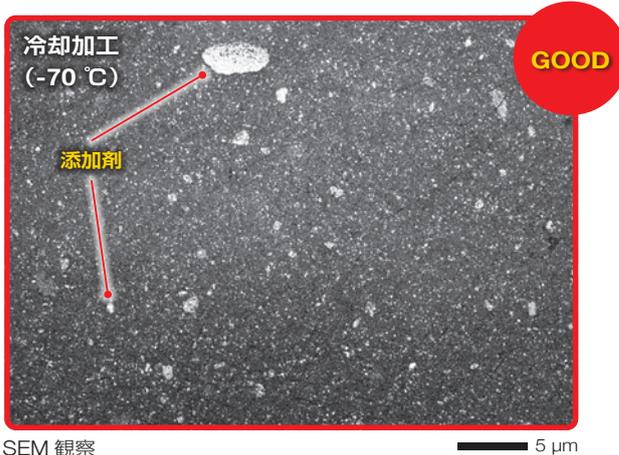
温度コントロールが可能な冷却機構を使って試料を適切な温度で冷却し、熱ダメージを軽減して試料加工をおこなえます。冷却機構は試料の冷却と冷却温度制御、ヒーターを用いた昇温(常温復帰)が自動でおこなえます。



11-2 冷却 CP (Cryo-CP) Applications

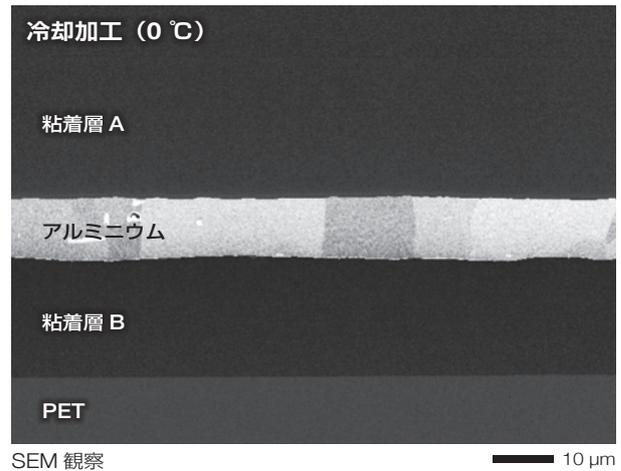
高分子材料 (輪ゴム)

ゴム等の材料は、熱に弱いだけでなく、過度な冷却によって変形するものがあります。輪ゴムの場合、常温で CP 加工すると加工熱によってシワが生じ、 $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ では過度な冷却により亀裂が生じました。冷却温度を $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ でコントロールしながら加工すると、熱と過度な冷却のダメージが低減された加工面が得られ、添加剤の分布が観察できました。



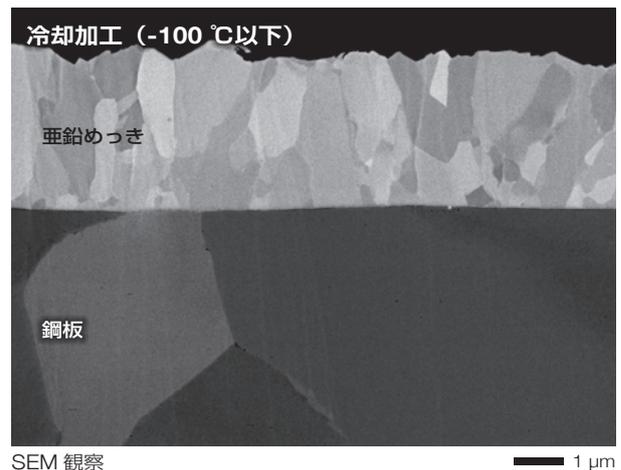
高分子材料（包装フィルム）

材質の異なる粘着層、アルミニウムおよびPETから構成された多層膜フィルムの加工例です。複合材料の場合、ミクロトーム加工では層が剥離することがありますが、冷却CP加工では剥離することなく、ダメージを低減した平滑な加工面が得られました。



低融点金属材料（亜鉛めっき鋼板）

低融点金属の冷却CP加工例です。融点の低い亜鉛めっき層の加工面が得られ、チャンネルリングコントラストが観察できました。



試料別索引

生物 (T4 フェージ) …………… P5	微生物 (酵母) …………… P16, 22	化粧品 (石鹸) …………… P19
生物 (リボソーム) …………… P10	微生物 (真菌・シイタケ) …………… P23	化粧品 (クレンジングオイル) …… P19
生物 (鞭毛) …………… P10		化粧品 (乳液/クリーム)
生物 (エクソソーム) …………… P10	植物 (サザンカの葉) …………… P24, 28	…………… P19, 25, 26, 28
生物 (スタスミン) …………… P11		化粧品 (ファンデーション) …… P20, 26
生物 (チューブリン) …………… P11	水滴 (バラの花びらの上の水滴) …… P27	
生物 (アポフェリチン) …………… P12		材料 (コロイダルシリカ) …………… P20
生物 (GroEL) …………… P14	食品 (生クリーム) …………… P8, 25	材料 (塗料) …………… P24
生物 (ヘモグロビン) …………… P14	食品 (コーヒーミルク/カゼインミセル)	材料 (接着剤) …………… P24
生物 (ラット肝臓/小腸/腎臓)	…………… P10, 19	材料 (輪ゴム) …………… P29
…………… P6, 17, 23	食品 (冷凍クリームコロッケ) …… P25	材料 (包装フィルム) …………… P30
	食品 (ハム) …………… P25	
微生物 (ウイルス) …………… P12	食品 (マヨネーズ) …………… P25	金属 (低融点金属) …………… P30
微生物 (乳酸菌) …………… P22		

▼ お問い合わせ



このカタログに掲載した商品は、外国為替及び外国貿易法の安全輸出管理の規制品に該当する場合がありますので、輸出するとき、または日本国外に持ち出すときは当社までお問い合わせください。



本社・昭島製作所

〒196-8558 東京都昭島市武蔵野3-1-2 TEL : (042) 543-1111(大代表) FAX : (042) 546-3353

www.jeol.co.jp ISO 9001・ISO 14001 認証取得

東京事務所 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル

業務統括センター TEL : 03-6262-3564 FAX : 03-6262-3589

デマンド推進本部 TEL : 03-6262-3560 FAX : 03-6262-3577

SI営業本部 SI販売室 TEL : 03-6262-3567 FAX : 03-6262-3577

ハイオ・セールスプロモーション TEL : 03-6262-3567 セミコンダクタ・ソリューションセールス部 TEL : 03-6262-3567

NMR・ソリューションセールス部 TEL : 03-6262-3575

SIグローバル本部 欧米部 TEL : 03-6262-3561 中国部 TEL : 03-6262-3562 AP部 TEL : 03-6262-3563

産業機器営業部 TEL : 03-6262-3570 MEソリューション販売室 TEL : 03-6262-3571

SE事業戦略本部 SE営業部 TEL : 042-542-2383 (本社・昭島製作所)

東京支店 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目1番1号 大手町野村ビル TEL : 03-6262-3580(代表) FAX : 03-6262-3588

東京 SI1グループ TEL : 03-6262-3581 東京 SI2グループ TEL : 03-6262-5586

ME営業グループ TEL : 03-6262-3583

東京第二事務所 〒190-0012 東京都立川市曙町2丁目8番3号 新鈴巻ビル

ソリューション推進室 TEL : 042-595-6886 FAX : 042-595-9227

ソリューションビジネス部 (保守更新) TEL : 042-526-5098 FAX : 042-526-5099

横浜事務所 〒222-0033 神奈川県横浜市港北区新横浜3丁目6番4号 新横浜千歳観光ビル6階

TEL : 045-474-2181 FAX : 045-474-2180

札幌支店 〒060-0809 北海道札幌市北区北9条西3丁目19番地 ノルテプラザ5階

TEL : 011-726-9680 FAX : 011-717-7305

仙台支店 〒980-0021 宮城県仙台市青葉区中央2丁目2番1号 仙台三菱ビル6階

TEL : 022-222-3324 FAX : 022-265-0202

筑波支店 〒305-0033 茨城県つくば市東新井18番1号

TEL : 029-856-3220 FAX : 029-856-1639

名古屋支店 〒450-0001 愛知県名古屋市中村区那古野1丁目47番1号 名古屋国際センタービル14階

TEL : 052-581-1406 FAX : 052-581-2887

大阪支店 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル11階

TEL : 06-6304-3941 FAX : 06-6304-7377

西日本ソリューションセンター

〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目14番5号 ニッセイ新大阪南口ビル1階

TEL : 06-6305-0121 FAX : 06-6305-0105

広島支店 〒730-0015 広島県広島市中区橋本町10番6号 広島NSビル5階

TEL : 082-221-2500 FAX : 082-221-3611

高松支店 〒760-0023 香川県高松市寿町1丁目1番12号 ハシフィックシティ高松5階

TEL : 087-821-0053 FAX : 087-822-0709

福岡支店 〒812-0011 福岡県福岡市博多区博多駅前2丁目1番1号 福岡朝日ビル5階

TEL : 092-411-2381 FAX : 092-473-1649