

# 電子顕微鏡に於けるシャドウイング法

土 倉 秀 次\*

## Shadow Casting on Electron Microscopy

By Hidetsugu Tsuchikura

Central Laboratory, Hitachi, Ltd.

### Abstract

The technique which has come to be known as "Shadow Casting" was first described by H. O. Müller in 1942 though R. C. Williams and R. W. G. Wyckoff (1944) have been responsible for its reintroduction and more extended development.

Müller, in his original work, employed certain angle of incidence so that the height of a particle could be measured directly from the length of the shadow. But his efforts not only introduce the solid beauty of picture, but also increase contrast and bring out definition of fine details by shadowing metal.

Writer has experimented on this method and applied it to typical specimens.

This paper gives an introduction of "Shadow Casting".

### [ I ] 緒 言

電子顕微鏡に依る形態的研究が平面的な其から立體的な形態研究に發展しようとする試みは、電子顕微鏡初期の頃から立體寫眞の撮影と解析への努力が拂われて來たが、Müller<sup>(1)</sup>は試料に對して或る規定の角度から、真空蒸發法に依つて金屬蒸氣を吹付け、其から生ずる被檢體の影の長さから粒子の高さを間接に測定しようとする着想を提唱し、その後 Williams, Wyckoff<sup>(2)(3)</sup>等は之に示唆を受けて今日のシャドウイング法を確立、方法並びにその應用について一連の研究<sup>(4)(5)</sup>が進められ、應用研究分野に少なからぬ貢獻を爲しつゝ發展した。

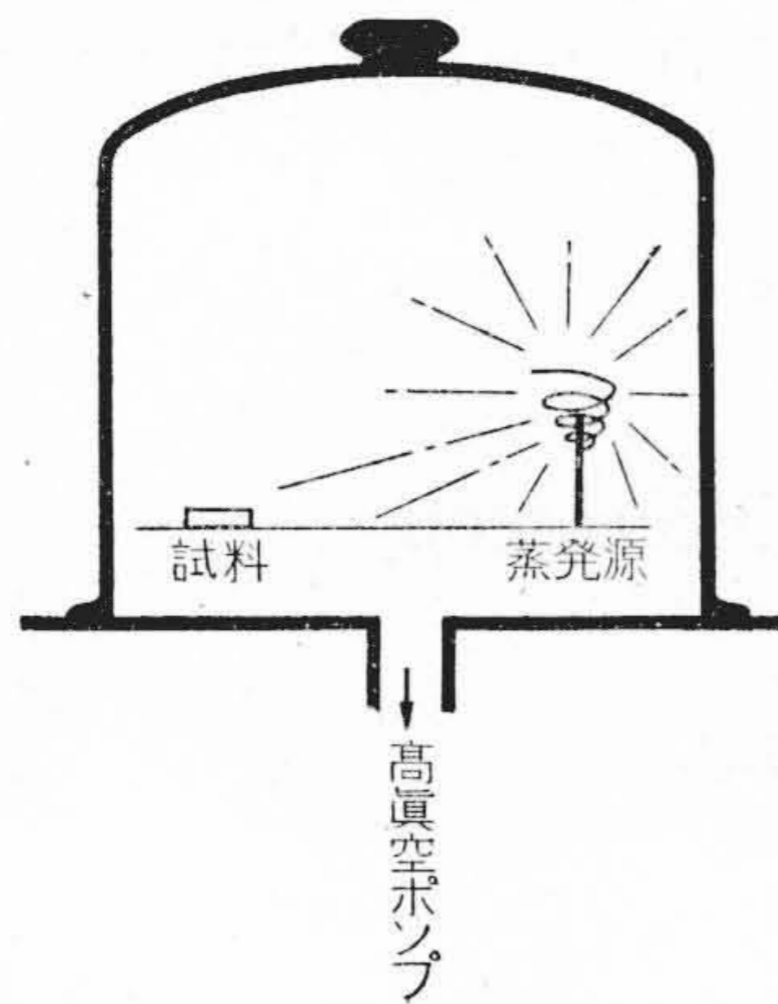
ウィールスのような電子顕微鏡的にも微小でしかも密度の低い被檢體の撮影は極めて困難であるが、本法を應用すると著しくコントラストを増して微細部分を鮮明に描出した立體的な擴大像が得られ、その効果は極めて顯著である。現在各國に普及して盛んに利用されて居る現狀であるが、本邦でもこれに關する二三の研究<sup>(6)(7)(8)</sup>がある。

### [ II ] 實 験 の 方 法

真空鐘は硝子製若しくは金屬製のものでもよいが高真

空を得られるものでなければならない。大いさは内徑 15~30cm、高さ 20cm 位のものが適當である。油廻轉ポンプに適當な高真空ポンプ（油擴散ポンプ等）を併用して内部氣壓  $10^{-4}$  mmHg 以下に排氣する。蒸發源<sup>(9)</sup>はバスケット型のタングステンコイル（0.5 mm  $\phi$  前後のもの）が簡單で、この中に金屬の小粒を置いて真空中で加熱する。この際金屬を豫め真空中で熔融してタングステンに融着せしめ、吸着ガスを除くことが望ましく、直接に蒸着を行うとタングステンと金屬が熔融の際反應して飛散金屬を生じ標本中に斑點を生ずることがある。これを防ぐためには試料とフィラメントの間に開閉出来るシャッターを置いてよい。蒸發金屬には色々な金屬が用いられるが、クロームが無難で、取扱に注意すれば金がよいコントラストを與える。 $10^{-4}$  mmHg に於ける Cr 及び Au の沸騰溫度<sup>(10)</sup>は夫々 1320°K 及び 1500°K であるが、0.5 mm  $\phi$  のタングステンコイルであれば、約 18 Amp の電流で（約 2600°K）<sup>(11)</sup> 良好な蒸發が行われる。標本は通常電子顕微鏡標本に用いられるコロヂウム支持膜上に檢體を載せ乾燥固定してから標本臺ごと鐘内に置いてシャドウイングに供する。シャドウイング用支持膜としてコロヂウム及びフォルムバルは大差なく、何れも表面に 50~100 Å 位の微細凹凸を持ち比較的その構造を現わさないと云われている<sup>(12)</sup>。

\* 日立製作所中央研究所



第1圖 眞 空 蒸 發 装 置

Fig. 1 Apparatus for Shadow-Casting.

フィラメントと試料との距離はフィラメントの輻射熱を考慮して 5 cm 以上は離れた方がよい。眞空度  $10^{-4}$  mmHg, 投射角度  $\tan^{-1} 1/5$ , 距離 10 cm でクローム 10~18 mg, 金 8~12 mg の蒸發量が適當である。この場合、蒸着被膜の平均厚さは Strong の式<sup>(13)</sup> から近似的に求められるが、よいコントラストが得られるのはクロームで 20~40 Å, 金ならば 8 Å 前後である<sup>(6)</sup>。被検體の形を忠實に表現するために、蒸着被膜は出来るだけ薄くて良いコントラストが得られるものが望ましいことは云うまでもない。原子量が大きく、蒸發が簡單で、而も粒狀化の傾向の少ない蒸發金屬が理想的である。Shadowing agent としては他にウラニウム、パラジウム<sup>(14)</sup>、或は合金として金マンガン、金パラジウム<sup>(15)</sup>、白金パラジウム<sup>(14)</sup>等を用いた研究がある。

シャドウイングを行つた標本は次で電子顯微鏡中で鏡檢に供せられる。この際あまり密度の高い電子線をあてると、蒸着金屬が粒狀化する<sup>(16)(17)</sup>。従つて鏡檢中及び撮影にあつては成可く低倍率にし、しかもコンデンサーレンズの勵磁電流を焦點合わせが可能な程度に於て最小限になすことが望ましい、撮影された原板は反轉現象若くは現象後プロセスフィルムに反轉焼付を行い、次で Negative Print を作るとシャドウ部分が黒く現われる。

### 〔Ⅲ〕 應用並びに應用例

殆んど凡ゆる分野の試料に應用される。一般の微粒體以外にも、レプリカ、マイクローム切片に併用すると立體觀を増し、微細部をよく表現してコントラストを附加する。試料の蒸發源に對する、投射角度は大きな粒子の場合にこれをあまり淺くすると不自然になる。ウィールスのような小さい試料には淺く (1/10~1/5)、比較的大きくて高さを持つた試料には深く (1/5~2) とつた方がよい。又角度をあまり淺くすると支持膜の構造が強調さ

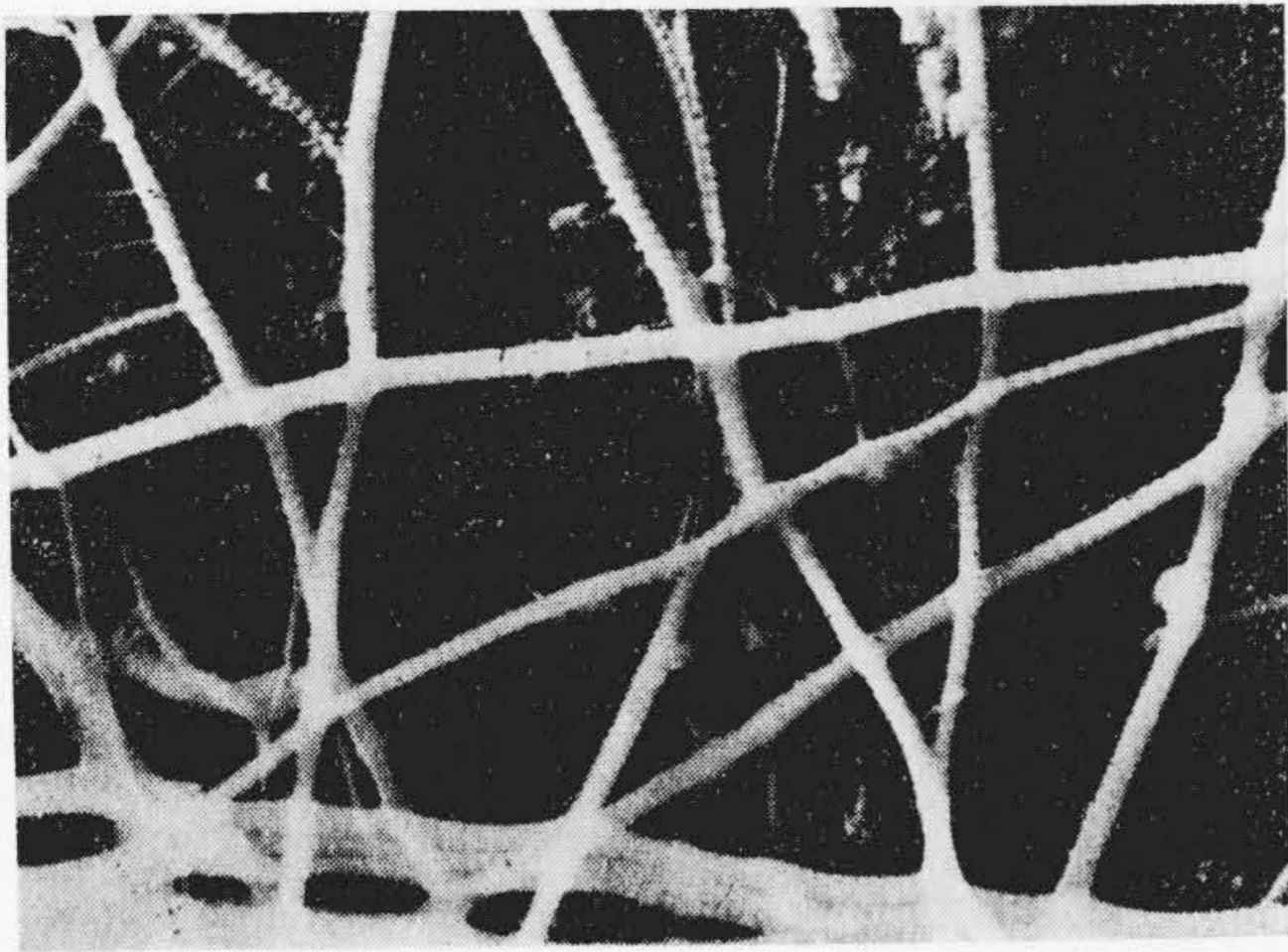
れる嫌いがある。又蒸着膜を厚くつけると試料の内部構造を陰蔽することがあり、蒸發金屬が電子線照射を受けた際、その粒狀化に伴つて試料の弱い部分 (例えば細菌の鞭毛) を切斷することがある。これを防ぐにはシャドウイングを行つた後安定な物質 (例えば Be) を薄く垂直に蒸發して被覆するとよいとも云われて居る。その他蒸發金屬分子線の熱エネルギーの試料に及ぼす影響も考慮されるべきであらう。

第2圖は超過心分離を行つて精製したタバコ、モザイクウィールス<sup>(17)</sup>に金をシャドウイングしたものである。

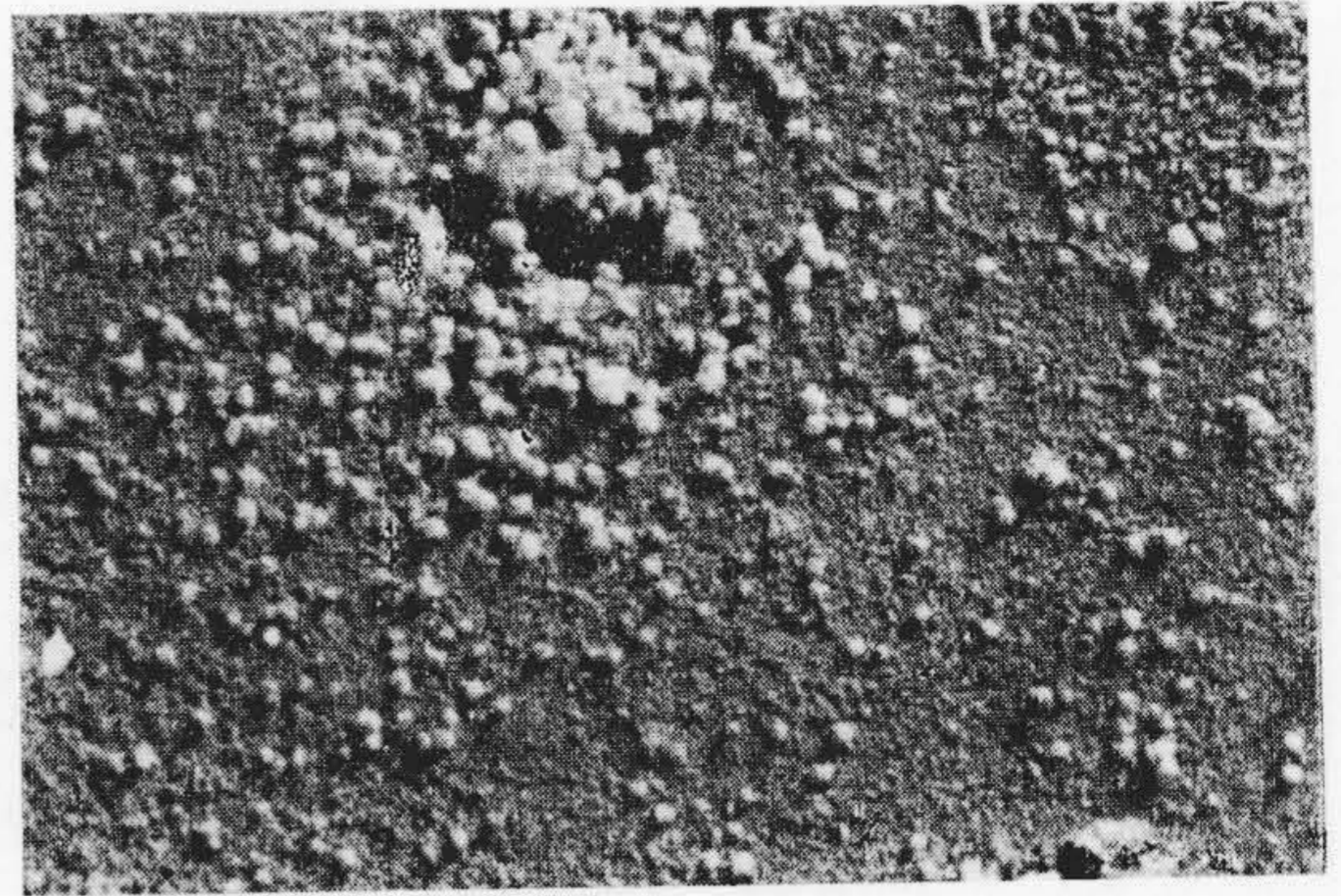
第2圖 タバコモザイクウィールス Au Shadow  $\times 20,000$   
Fig. 2 Tobacco Mosaic Virus.

精製法は先ず罹病葉を凍結し、肉挽で磨碎融解せしめ、このパルプを壓縮して汁液をとり、これを低速遠心で大きな不純物を振り落とすと濃茶褐色の透明な液が得られる。これを所謂分割遠心 (differential centrifugation—30,000 r. p. m. & 10,000 r. p. m. を繰返す) を行つるとウィールスは殆んど無色透明のゲル状 Pellet として沈澱管の下部につく。これを pH 7.0, 0.01 M の燐酸鹽緩衝液溶媒中に溶かし 0°C に保存、鏡檢に際して Ca 0.01mg/cc 程度の蒸溜水懸汚液となし、コロジウム支持膜上に置いて乾燥固定、シャドウイングを行つた。Stanley 等の云う如く 280 m $\mu$   $\times$  15 m $\mu$  のものが最も多く存在するが、會合して之より長くなつたものもあり、また之より短い粒子も多い。

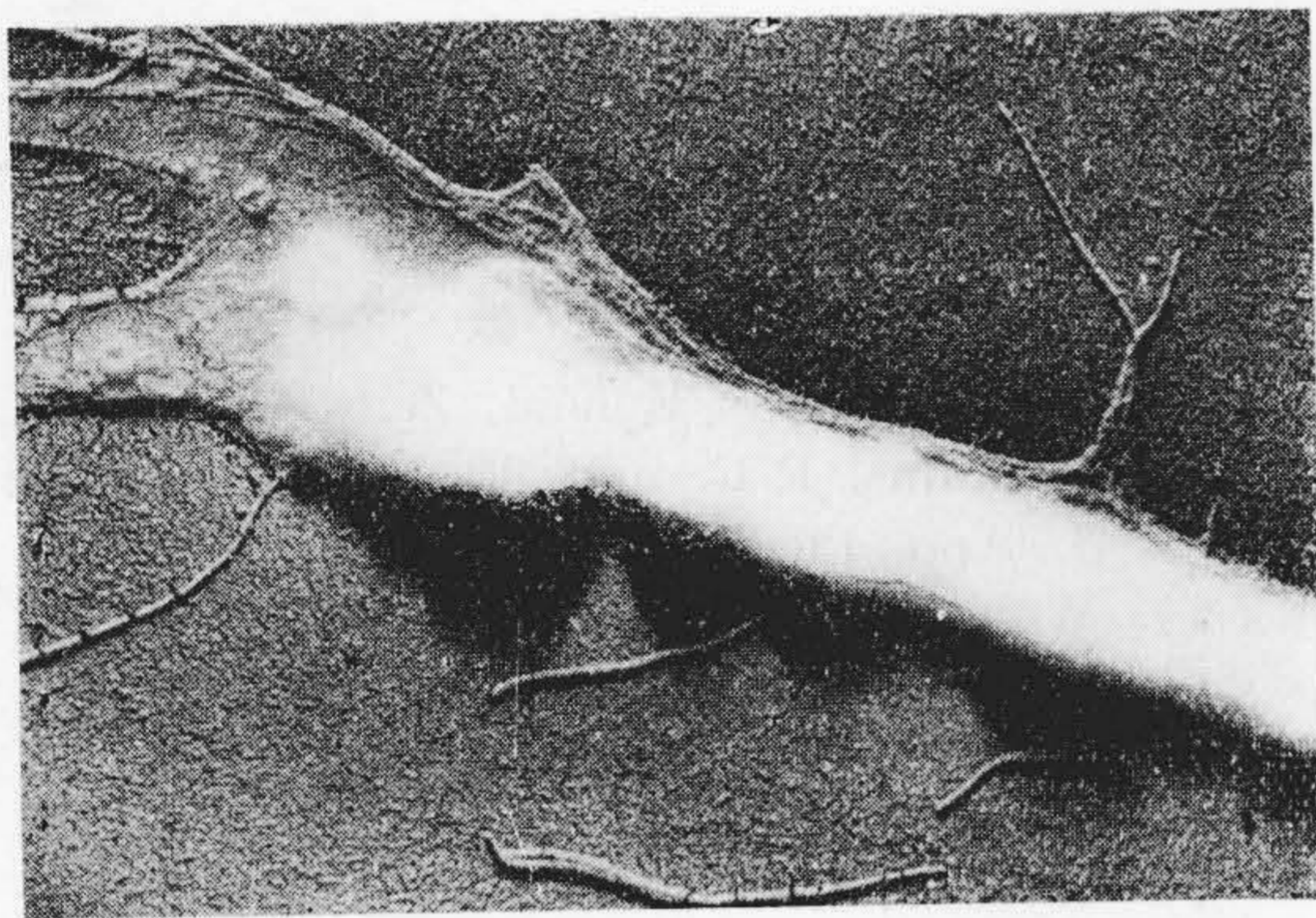
第3圖は家兎アヒレス腱<sup>(18)</sup>、原纖維 (Proto-fibril) の超微細構造で、試料はフォルマリン固定を行つたものを二時間水洗、解剖針で單離、更に乳鉢で一時間ゆるやかに磨潰した。X線廻折像の研究から種々の纖維蛋白が從來知られて居たものよりも遙かに小さい纖維周期を有することが見出されて居り、例えばコラーゲンでは約 640 Å の纖維周期を示すが、これ等の幾何學的圖形 (Meridian spacing) は電子顯微鏡寫眞に依つて直接確かめられた。



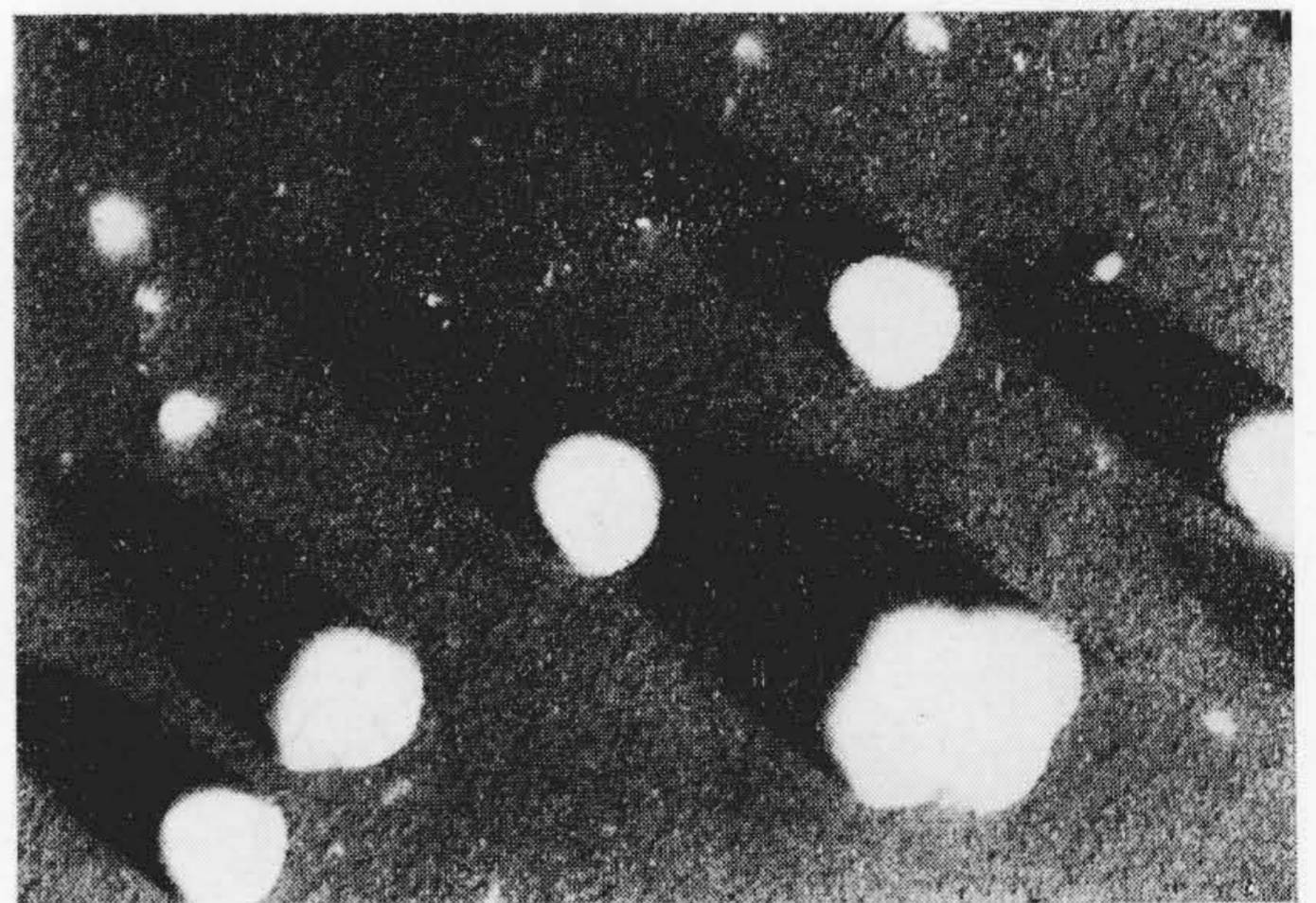
第3圖 家兎アヒレス腱 Au Shadow ×16,000  
Fig. 3 Rabbits Tendon Fibrils.



第5圖 膿病ウィールス Au Shadow ×50,000  
Fig. 5 The Grasserie Virus of The Silk Worm.



第4圖 プロテウス菌 Au Shadow ×10,000  
Fig. 4 *Bacillus Proteus, Vulgaris*.



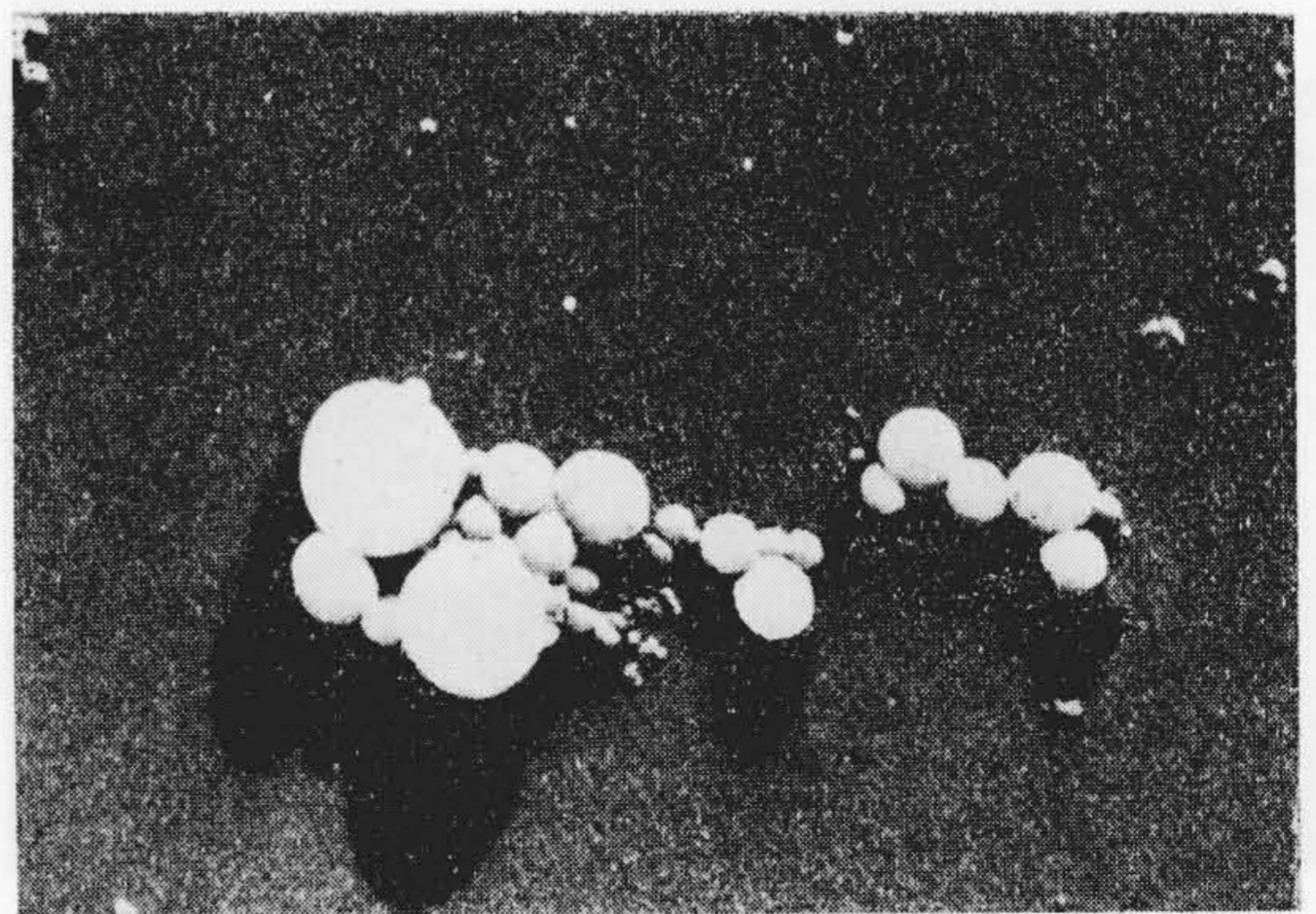
第6圖 ポリ醋酸ヴィニール Au Shadow ×10,000  
Fig. 6 Poly-Vinyl-Acetate.

第4圖はプロテウス菌のシャドウイング像で菌體顆粒が著しく隆起し、Endoplasma が峰状を爲して連なる様が観察される。

一般に新鮮培養菌は電子光學的に（シャドウイングを行わざる場合）屢々均一無構造である。その原因の一つは若い菌は電子線を透過させないため密度・厚みの差を見出すことが出来ない。換言すれば菌の密度・厚みの最小部分に於て電子線の透過力の限界に到達して居るためであろう。本例は菌體の立體形狀をよく強調した一例であるが、蒸着被膜が粒狀化して鞭毛が切斷されて居るのが認められる。

第5圖は家蠶膿病の病源體ウィールスで<sup>(19)</sup>罹病蠶病血をタバコモザイクウィールスと同様超遠心機で精製したものである。寫真中 10~20 m $\mu$  前後の大いさのものがウィールスと云われ、不同のものについてはなお検討の餘地あるものとされて居る。

第6圖はポリ醋酸ヴィニール、第7圖はポリ鹽化ヴィ



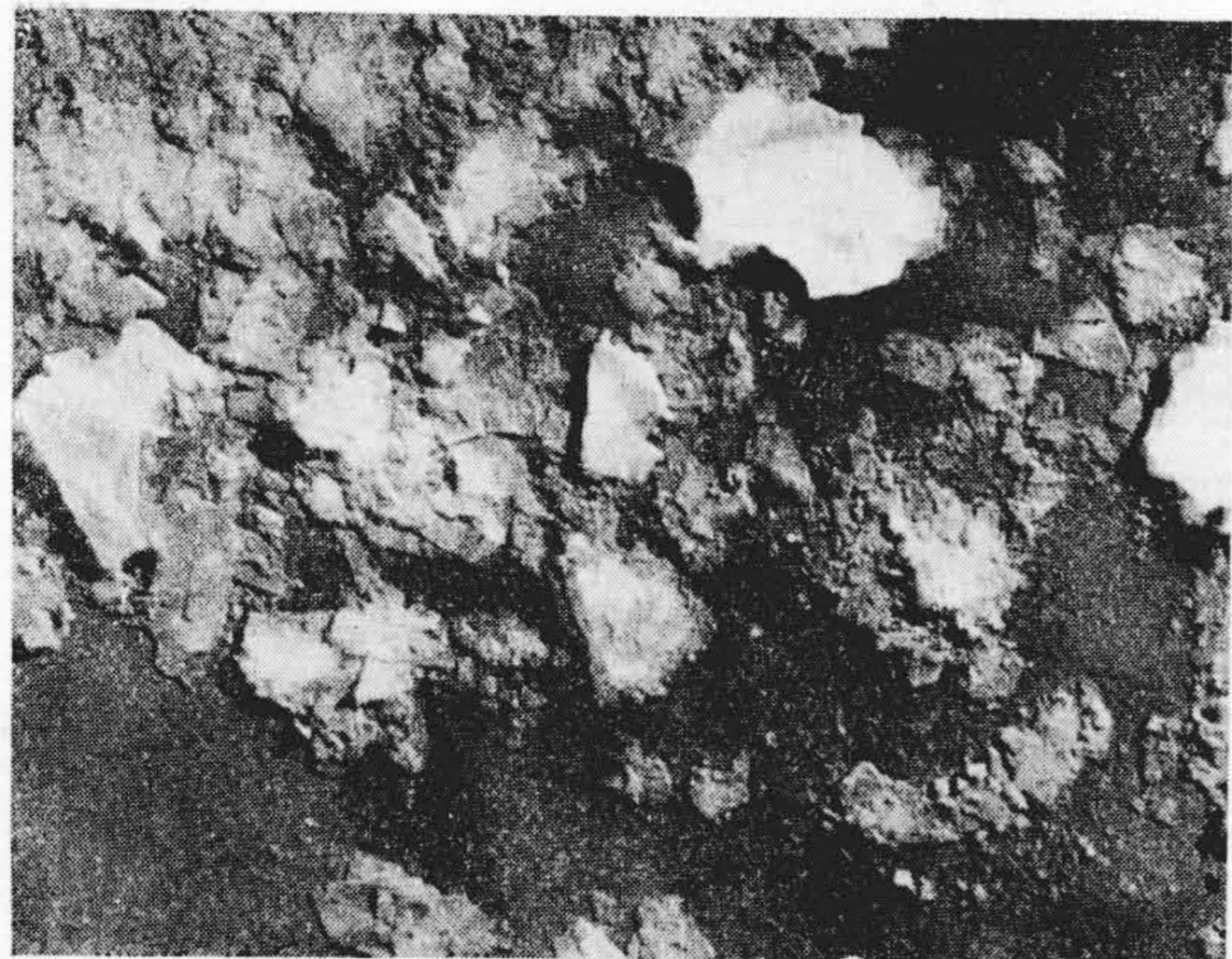
第7圖 ポリ鹽化ヴィニール Cr Shadow ×10,000  
Fig. 7 Poly-Vinyl-Chloride.

ニールの乳化重合粒子のシャドウイング像である。

乳化重合の過程は、重合は始め重合粒子が、保護膠質のミセル中に出来、それが、外部水相（エマルジョン）からモノマーを吸収して、吸収されたモノマーは、その場所で重合し、重合粒子は生長すると説明される<sup>(20)</sup>。

ヴェニール粒子は明らかに略球形をなして生成し、その形態に関する知見は、他の理化學的諸現象と相俟まつて、漸次その様相を明らかにして行くであろう。

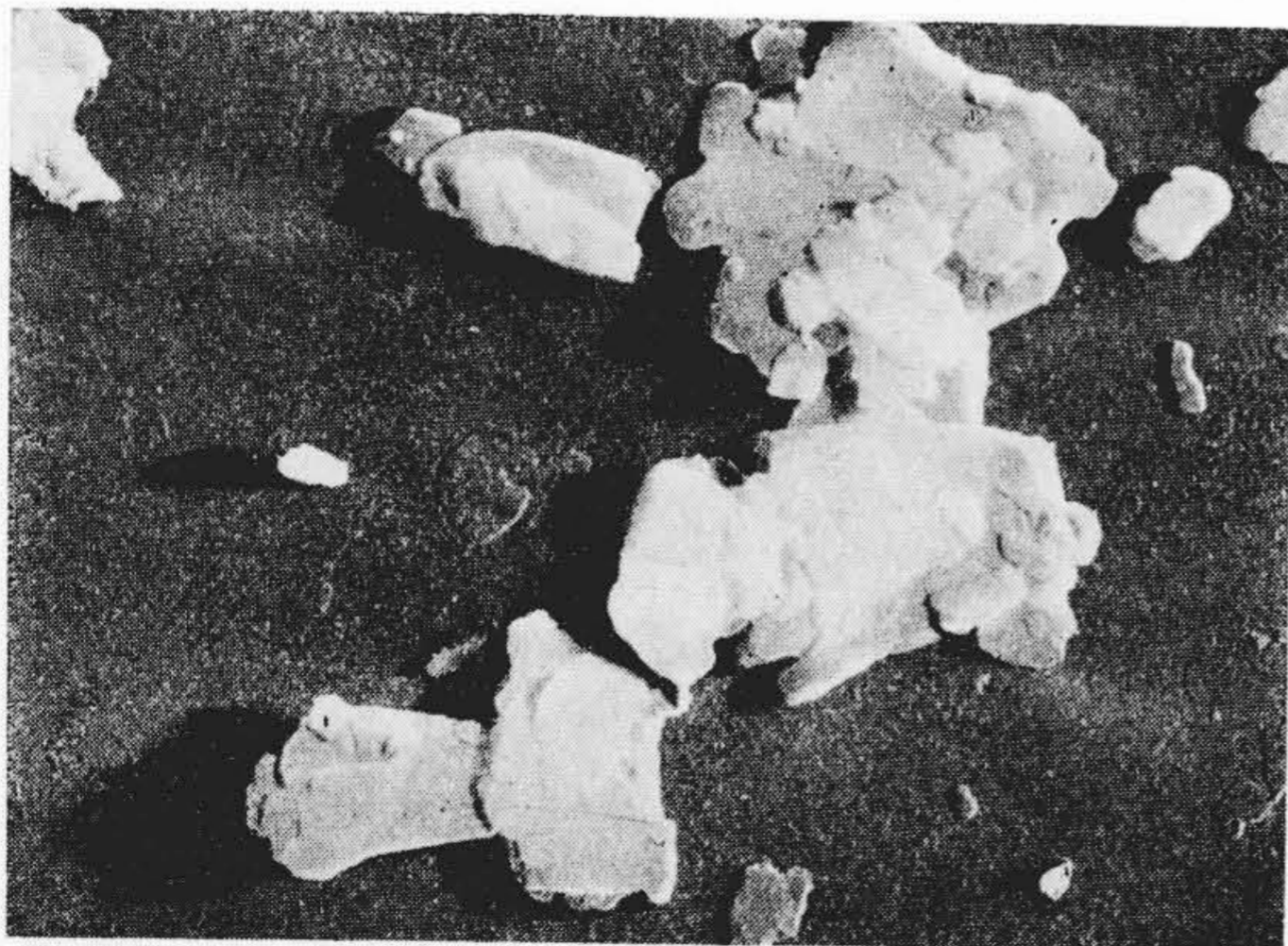
第8圖は膠質黒鉛粒子で、これは微粉黒鉛を水に懸濁させた所謂膠質黒鉛水液で、真空管材料、通信機材料、



第8圖 膠質黒鉛 Cr Shadow ×10,000  
Fig. 8 Colloidal Graphite.

その他線引用潤滑材等に賞用されて居る。薄い板狀結晶が重なり合つて居り、この粒子の大きさ、厚みが膠質黒鉛の性能を支配するものゝようで小さくて薄いもの程良質の黒鉛とされて居る。

第9圖はラウリン酸 ( $C_{12}H_{24}O_2$ ) の亜鉛鹽で化粧品材料に賞用されて居る。ラウリン酸は樟點實油、月桂樹實



第9圖 ラウリン酸亜鉛 Cr Shadow ×10,000  
Fig. 9 Zinc Laurate.

油椰子油、棕櫚核油、鯨蠟等に存在する天然脂肪酸の一種で、白色針狀結晶としてアルコールから結晶精製され

るが亜鉛鹽の電子顯微鏡像は比較的不規則な板狀結晶として觀察された。

これ等板狀微細結晶粒に於ても、シャドウイングに依つて、結晶の重なり方、或は鏡檢時、被檢體の占める立體的な構成が瞭然として甚だ興味深い。

その卓效は今日、凡そ電子顯微鏡の應用分野に関する限り、缺くべからざる手段としての利用度を占めるに至つた。

#### [IV] 結 言

シャドウイングの概要と二三の應用例について略述した。詳細に涉つては引用文獻について参照されたい。その少からぬ貢獻については筆を盡すまでもないが、内包する未解決の諸問題も又少くない。差當り高原子量金屬の蒸發と、粒狀化の克服は當面の課題であろう。

擱筆に際し、平素御指導、御鞭撻を賜る鳥山、濱田、只野の三博士、御協力を寄せられた長崎博男氏等に謝意を表す。

#### 参 考 文 獻

- (1) Müller, H. O. : Kolloid, Zeits 99 6 (1942)
- (2) Williams, R. C. and Wyckoff, R. W. G. : J. App. Phys. 15 712 (1944)
- (3) Williams, R. C. and Wyckoff, R. W. G. : J. App. Phys. 17 23 (1946)
- (4) Williams, R. C. and Backus, R. C. : J. App. Phys. 19 98 (1949)
- (5) Wyckoff, R. W. G. : Electron Microscopy ; New York 1949.
- (6) 土倉秀次、電子顯微鏡學會誌 1 50 (1950)
- (7) 土倉秀次、岡田重文、電子顯微鏡學會誌 2(1951)
- (8) 日比忠俊、電子顯微鏡學會講演要旨、於東京 (1950)
- (9) Strong, J. : Procedure in Experimental Physics, New York
- (10) 田中、物理實驗學、三卷 437 頁  
Landolt-Bernstein : Physikalische, chemische Tabellen III. C
- (11) Espe, Knoll 共著、船曳譯、真空管材料學、370 頁
- (12) 文獻 (4), (13), 文獻 (9), (14) 文獻 (5)
- (15) Drummond, D. G. et. al. J. Royal. Microscop. Soc. 70 101 (1950)
- (16) Mandle, R. J. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 64, 362 (1947)
- (17) 試料、渡邊格氏 (理工研) より分與
- (18) 試料、細見泰三氏 (京大生理) より分與
- (19) 試料、渡邊靜夫氏 (東農工大) より分與
- (20) Harkins, W. D. : J. A. C. S. 69, 1428 (1947)