極低温高分解能電子顕微鏡*

原田嘉晏**

High Resolution Cryo Electron Microscope / Yoshiyasu HARADA

Key words: cryo electron microscope, liquid helium stage, super-fluid helium, cryo-transfer mechanism, radiation damage, frozen hydrated specimens

1. はじめに

電子顕微鏡で試料を観察する場合、試料は室温状態にあることがほとんどである。しかし、材料の研究を行うには、その相転移温度の前後で、構造変化を観察したいという要求が多い。そのため、試料を高温下で観察したり、また、数十 K 以下の低温下で観察することができるように、高温用あるいは低温用の試料ステージ/ホルダが準備されている。高温観察時では、試料加熱時の熱ドリフトの影響で試料が動いてしまうが、テレビカメラを利用した動的観察法の助けにより、その影響を除けるので高分解能観察が可能である。しかしながら、低温観察時では、熱ドリフトの影響以外に、冷媒の沸騰による熱振動の影響で試料が振動するために、テレビカメラの助けだけでは高分解能観察はほとんど不可能であった。

このような状況下で、材料科学分野で試料環境が極低温で高分解能観察ができるように、また、電子線損傷を受けやすい試料、特に、有機材料、高分子材料、生体高分子の損傷を減らすために、試料冷却をして、高分解能観察ができるように、極低温高分解能電子顕微鏡の開発に着手した。幸いなことに、この極低温高分解能電子顕微鏡の開発は、1983 年度より文部省の民間等との共同研究制度で京都大

学とスタートすることができ、85 年度に完了することができた¹⁾。ここでは、この極低温高分解能電子顕微鏡の概要とその応用データの一部を紹介するが、その前に、比較のため、従来の極低温電子顕微鏡の要素技術である極低温試料冷却ステージの発展の歴史を振り返っておく。

2. 極低温試料冷却ステージの歴史

電子顕微鏡用の極低温試料冷却ステージは 1960 年代から実用化が始まった。その主要な極低温試料冷却ステージをまとめると、表 1 のようになる²⁾。この表は、試料交換機構と試料傾斜機構などの操作性、そして、液体ヘリウム消費量、試料冷却温度、分解能などの性能面に注目してまとめられた。また、冷却方式のうち、Vessel タイプは試料ステージ近傍に小さな液体ヘリウム槽を設け、その槽から熱伝導により試料ホルダを冷却する方式であり、Flow タイプは電子顕微鏡の近くに置かれた液体ヘリウム貯蔵タンクから試料ステージまで、液体ヘリウムを流しながら試料ホルダ

表 1 極低温試料冷却ステージの比較（発展の歴史）

	試料交換機構	試料傾斜角 (°)	冷却方式	液体ヘリウム消費量 (l/h)	冷却温度 (K)	分解能 (nm)
Boersch et al. (1966)		0	Vessel		4.2(2.5)	<5
Kitamura et al. (1966)		±12	Vessel		4.2	<3
Watanabe et al. (1967)	有	0	Flow		4.2	
Venables et al. (1968)	有	±8	Flow		8	<2.5
Valdre et al. (1970)	有	±7	Flow		10	
Yatsuhashi et al. (1971)	有	±10	Flow	5 (2)	12	<1.2
Kiritani et al. (1974)		±10	Vessel	0.6	10	
Etoh et al. (1974)	有	0	Vessel	0.2	4.2	
Naruse et al. (1975)	有	±10	Vessel	0.8	10	<0.8

* 原稿受付 平成 3 年 5 月 7 日

** 日本電子(株)電子光学機器技術本部 (昭島市武蔵野 3-1-2)

図1 超流動ヘリウムステージの断面図

を冷却する方式である。この時代の装置開発の主眼は、高分解能ではなく材料物性の研究にあったため、試料傾斜ができ、しかも、試料をいかに低温にできるかにあった。その結果、4.2 K まで冷却できるが、得られる格子分解能は高々数 nm であった。その後、1970 年代になって、高分解能化をめざして装置が開発されるようになり、Vessel タイプにおいて 1 nm 程度の格子分解能が実現できるようになった。しかしながら、試料冷却温度は、試料傾斜機構がある場合には、10 K 程度に制限されていた。これら一連の装置開発の結果からわかることは、試料冷却温度をできる限り下げ、試料傾斜機構をもたせた状態で、分解能をよくすることは非常に困難であることである。

3. 極低温高分解能電子顕微鏡の開発

3.1 開発目標

過去の極低温試料冷却ステージの開発を参考として、また、本共同開発の目的が生体高分子を電子線損傷の少ない状態で高分解能観察をすることを考慮して、次の開発目標を設定した²⁾。すなわち、

- (1) 分解能、試料冷却温度を最優先とし、試料ステージ、試料ホルダの構造を簡単にするため、試料傾斜機構を設けないこと。
- (2) 液体ヘリウム特有の超流動ヘリウムを利用し、試料ステージの温度を 2 K 以下にすること。
- (3) 1 日の操作時間を 10 時間と想定し、その間、2 回の冷媒補給ですむように、試料ステージの冷却能力を 5 時間以上とすること。
- (4) 生体高分子を固定するために急速凍結を行った試料を温度上昇なく試料ステージに移送できるクライオトランスファ機構（試料交換機構も含む）を備えること。
- (5) 生体高分子の構造解析に不可欠な 0.3 nm 以

下の点分解能を実現すること。

3.2 超流動ヘリウムステージ

超流動ヘリウム状態を実現する方法として、ヘリウム槽とポットをキャピラリーで接続して、ポット内の液体ヘリウムを真空排気することによって、液体ヘリウム温度を λ 点 ($T=2.17$ K, $P=0.049$ atm) 以下にする方法を採用した²⁾。

多くの基礎実験の結果を基に、400 kV 電子顕微鏡の試料室に組み込めるように開発した試料冷却ステージ（超流動ヘリウムステージ）の断面図を図 1 に示す³⁾。超流動ヘリウムステージは基本的に 4 つの部分、すなわち、液体窒素槽 (N)、液体ヘリウム槽 (H)、試料ステージ (SS)、ポット (P) から構成されている。液体窒素槽 (N) は 1.4 l の容積をもち、試料室の上部に置かれ、6 本の熱絶縁棒 (I-1) で対物レンズヨーク (L) に固定されている。熱シールド筒 (S-1) と試料ステージ (SS) はこの液体窒素槽 (N) からの熱伝導で冷却され、液体ヘリウム槽 (H) とポット (P) への熱輻射を小さくしている。1.2 l の容積をもつ液体ヘリウム槽 (H) は試料ステージ (SS) の直上に置かれ、3 本の熱絶縁棒で対物レンズヨーク (L) に固定されている。液体ヘリウム槽 (H) からポット (P) への液体ヘリウムの供給は、液体ヘリウム槽 (H) からの振動の影響を除くためにばね状に作られたキャピラリー (C) で行われる。試料ステージ (SS) は対物レンズヨーク (L) 上に置かれた熱絶縁板 (I-2) に固定されており、水平方向に任意に ± 1 mm 移動可能である。また、試料ステージ (SS) はフレキシブルな銅線 (F) で液体窒素槽 (N) に接続され、熱伝導により冷却されている。ポット (P) は 3 ml の容積をもち、試料ステージ (SS) の上に載っている熱絶縁体 (I-3) に固定されている。ポット内の圧力を真空排気で下げるために、

図2 超流動ヘリウムステージの温度特性

ポット (P) にはステンレススチール管とフレキシブルメタルベロー (B) から成る真空排気管 (E) が接続されている。試料ホルダ (SH) はこのポット (P) の上に熱接触よく載せられるようになっており、試料交換時にポット (P) の温度が早く平衡になるように、できる限り小さく作られている。また、この超流動ヘリウムステージは試料の熱ドリフトを最小にするために、光軸に対称に設計されている。

ポットの熱特性を調べるために、ゲルマニウム抵抗温度計とヒータがポットに組み込まれている。超流動ヘリウムステージの基本的な温度特性を図2に示す²⁾。この測定時には、液体窒素で冷却されたシールド部分の温度がクロメル-金 0.07% 鉄の熱電対で測定されたが、熱シールド筒 (S-1) と試料ステージ (SS) の温度はそれぞれ 84 K と 90 K であった。ポットの到達温度は 1.51 K であり、外部から熱負荷を少しずつ加えていくと、6.5 mW のところから急激に温

度が上昇することがわかる。基礎実験結果では、このポットが 4.2 K の理想的な環境に置かれた時に、臨界冷凍能力が 30 mW であったが、実際の試料ステージに組み込まれた場合には、周囲からの熱流入があり、これらの差 ($30 - 6.5 = 23.5$ mW) が実際の熱流入と考えられ、熱計算の結果とほぼ一致する。

3.3 クライオトランスファ機構

生体高分子などを大気中で急速凍結した試料を、大気中の水分などの汚れを付けずに、しかも、試料温度を約 100 K に保った状態で、電子顕微鏡内の試料室に組み込まれた超流動ヘリウムステージに移送でき、そして、電子顕微鏡による観察後に、その試料を大気中に取り出すことができる機構 (クライオトランスファ機構) を開発した²⁾。その断面図を図3に示す。

本機構は主に、第1予備室、第2予備室、試料室の3つの真空室から構成されており、各室には、急速凍結試料を温度上昇させることなく、試料ステージまで移送できるように工夫が施されている。第1予備室では、急速凍結した試料をセットした試料ホルダを 80 K 以下に冷却されたホルダマウントに載せた後に、ターボモレキュラポンプで高速排気される。真空が 10^{-3} Torr 程度になると、第1バルブを開けて、試料ホルダを第2予備室に挿入し、液体窒素で常時 100 K 以下に冷却されているホルダチャックにセットする。第1バルブを閉じた後、第2予備室の真空を油拡散ポンプにより $\sim 10^{-6}$ Torr まで排気後、第2バルブを開け試料室と真空中に接続する。試料ホルダはホルダチャックにセットされたまま試料交換棒によって、80 K に冷却されたガイド板で案内されながら、1.5 K に冷却されたポットにセットされる。

このクライオトランスファ機構は、急速凍結した試料の温度を 100 K 以上に上昇させることなく、電子

図3 クライオトランスファ機構の断面図

図4 JEM-4000 SFX 型極低温高分解能電子顕微鏡の外観写真

顕微鏡内の試料ステージまで移送でき、生体試料の高分解能観察には不可欠な装置である。

3.4 極低温高分解能電子顕微鏡

上述の超流動ヘリウムステージとクライオトランスファ機構を備えた加速電圧 400 kV の極低温高分解能電子顕微鏡 (JEM-4000 SFX 型) を開発した³⁾。その外観写真 (提供: 蛋白工学研究所・藤吉好則氏) を図 4 に示す。鏡筒の中心部左側にクライオトランスファ機構、右側には試料ステージに液体ヘリウムを供給するトランスファチューブが見られる。試料交換は約 5 分間で行うことができ、冷媒を扱うこと以外の操作性は通常の電子顕微鏡と大きな差はない。

4. 極低温高分解能電子顕微鏡の性能

この 400 kV 極低温高分解能電子顕微鏡の性能を表 2 に示す。参考のために、加速電圧をより一般的な

表 2 極低温高分解能電子顕微鏡の性能

	JEM-4000 SFX	JEM-2000 SFX
加速電圧	400 kV	200 kV
対物レンズ定数		
球面収差係数 C_s	1.9 mm	2.2 mm
色収差係数 C_c	2.2 mm	1.9 mm
分解能		
理論分解能	0.20 nm	0.28 nm
格子分解能	0.20 nm	0.34 nm
最高倍率	$\times 1\,000\,000$	$\times 500\,000$
試料温度	4.2 K	4.2 K
クライオスタットサイズ		
液体窒素用	1.4 l	1.4 l
液体ヘリウム用	1.2 l	1.2 l
液体ヘリウム消費量	0.16 l/h	0.16 l/h
最高保持時間	7 h	7 h
クライオトランスファ機能	組込み	組込み

図5 4.2 K で撮影されたゲルマニウム蒸着膜上の金コロイド粒子の結晶格子像

200 kV にしたときの性能も合わせて対比してある。試料冷却温度は 4.2 K 以下が達成されている。また、クライオスタットの容量を可能な限り大きくし、液体ヘリウムの消費量を 0.16 l/h とできる限り少なくした結果、一度、液体ヘリウムをタンクに一杯にしておくと、7 時間以上の動作が可能となり、煩わしい冷媒補給は 1 日 1 回ですむようになった。

そして、対物レンズの球面収差係数は 1.9 mm⁴⁾ であり、室温の電子顕微鏡と比べてもそれほど遜色のない値となるように、対物レンズの設計が行われている。その結果、分解能に関しては、理論 (点) 分解能は 0.20 nm となる。実際の装置でも、図 5 に示すように、4.2 K で撮影されたゲルマニウム蒸着薄膜上の金コロイド微結晶の (111) 面の 0.235 nm と (200) 面の 0.204 nm の結晶格子像が鮮明に観察されており⁴⁾、原子・分子レベルの高分解能が達成されている。このように当初の装置開発目標がほとんど達成できた大きな理由は、クライオスタットやステージの熱設計がいかに効率よくできたかによっている。

特に、分解能に関して、低温の電子顕微鏡と室温の電子顕微鏡の年代ごとの推移を比較すると⁴⁾、室温の電子顕微鏡では、1968 年には 0.1 nm の格子分解能がすでに得られており、その時の低温の電子顕微鏡では、格子分解能は 3 nm 程度であった。その後、低温では、1975 年に 1 nm を超える格子分解能が得られたが、その後、約 10 年間その進展は全く見られなかった。今回、開発された極低温高分解能電子顕微鏡では、0.20 nm の格子分解能が得られており、室温の電子顕微鏡との大きな分解能ギャップを一気に埋めることができた。このように、低温でも室温と同程度の高分解能が得られることは、材料科学や医学・生物学の分野で多くの応用がひらけることになる。

図6 非晶質の水の薄膜中に包埋されたインフルエンザウイルスの像

5. 極低温高分解能電子顕微鏡の応用

高分解能観察に適した試料作製法として、試料が自然に近い水和状態の原形を保つために、急速凍結法によって非晶質の水の薄膜の中に試料を埋め込む方法で作製された生体試料を、電子線損傷を減らすために極低温高分解能電子顕微鏡が応用され、いくつかの成果が得られているが⁵⁾、ここでは、一つの例を紹介する。図6は急速凍結法によって非晶質の水の薄膜中に包埋されたインフルエンザウイルスをクライオトランスファにより極低温高分解能電子顕微鏡の中に移送して撮影された像を示している³⁾。自然の水和状態のウイルスが非常に高いコントラストで観察されている。また、脂質二重膜やスパイクも明りょうに観察されている。特に、脂質二重膜のコントラストが高いのは、りん脂質中のりん原子によるものと思われる。このように急速凍結された非晶質の水の膜は均一にできており、電子線に対しほとんど透明である。この膜の中に

埋め込められた軽元素で構成されている無染色のたんぱく質が高いコントラストで観察できるのは、焦点をはずすことによって得られる位相コントラストのためである。

6. おわりに

以上、極低温高分解能電子顕微鏡、特に、超流動ヘリウムステージとクライオトランスファ機構を詳しく紹介し、その性能を裏付ける応用例を紹介した。本装置はクライオトランスファ機構を備えていることから生体高分子の分野に主に应用されており、生体高分子の構造解析の研究において、成果が得られつつある。しかしながら、これらの装置を材料科学の分野に効率よく応用していくためには、試料傾斜機構や温度を変化させる機構は不可欠である。高分解能を維持しながら、これらの機構や機能を付加していくことは、技術的にかなり困難ではあるが、今後、開発を進めていくことが必要であろう。また、開発された装置は加速電圧が400 kVであり、装置が大きく高価であるため、より一般的な加速電圧200 kVの普及型の装置（性能は表2を参照）の開発も不可欠である。

参考文献

- 1) 山岸秀夫, 原田嘉晏: 極低温高分解能電子顕微鏡の開発, 学術月報, **39** (1986) 177.
- 2) 極低温高分解能電子顕微鏡技術の誕生, 「生命科学の新しい展開を求めて」, 出版科学総合研究所, (1987) 48-98.
- 3) 山岸秀夫, 藤吉好則, 青木好則, 原田嘉晏: 極低温高分解能電子顕微鏡, 電子顕微鏡, **22** (1988) 153.
- 4) 原田嘉晏: 極低温高分解能電子顕微鏡とその応用, 金属, **59** (1989) 32.
- 5) 藤吉好則: 極低温高分解能 TEM による生体物質の直接観察, 日本の科学と技術, **28** (1987) 60.