

新 制
理
406

京大附図

原子の直接結像による分子構造の研究

藤吉好則

HORIZON  
A4-S



( )

# 原子の直接結像による分子構造の研究

結晶化学

藤吉好則

## 目 次

序論	1
I 高分解能電子顕微鏡像を得るために	6
I-1 電子線の波長および対物レンズの収差	6
I-2 伝達関数の減衰	11
I-2-1 照射角の測定	15
I-2-2 エネルギー分布の測定	20
I-3 焦点条件	24
I-4 像の流れ	27
I-5 光軸合せ、非点収差補正	27
I-6 試料の厚さ	32
I-7 試料コントラストと支持膜	35
a 非晶質膜	37
b 結晶性支持膜	40
c マイクログリッド	42
I-8 コンタミネーション	43
I-9 電子線損傷	43
a MDSの原理	45
b MDSの操作	52
c MDSによる、と得られる結果	61
I-10 画像記録装置	66
図表	67
II 高分解能電顕法による、と得られた結果	85
II-1 塩化フタロシアニン銅結晶の原子レベル	

の像	86
II-1-1 塩化フタロニズニ銅結晶のC軸 投影	87
II-1-2 高分解能像の撮影	89
II-2 電子線損傷を受け易い試料の高分解能像	96
II-2-1 亜鉛フタロニズニの高分解能像 (100kV電顕 + MDS)	97
II-2-2 TCNQと金属の複合体 (200kV電顕 + MDS)	101
図表	105
III 核酸の直接観察	113
III-1 DNAのコントラストと試料支持技術	114
III-2 DNAの電子線損傷	117
III-3 DNAの二重らせん構造の直接観察	118
図表	123
IV 結論	126
文献	131
謝辞	134



## 序 論

原子は近代科学の根底にありながら、目にはみえないものとされてきた。原子を直接観察するための光源として、電子線が着目され、電子顕微鏡（以下電子顕と略）が創られた。電子線の波長は100kVの加速電圧で、 $0.037 \text{ \AA}$ であり、極めて短く、Abbeの理論からすれば、原子を充分に分解し得るものと期待される。しかし、電子線による照射損傷のために、原子像の撮影は不可能と考えられた。

電子顕は像として直接構造をとらえられる可能性があること、原理的には結晶を必要としないということから、構造研究の手段として捨てがたい魅力があ

る。1928年にRuska等が電顕作成に着手して50余年の間に電顕は理論的にも装置の性能においても飛躍的に前進してきた。Scherzer<sup>1)</sup>は弱位相物体とみなせるほど充分薄い試料において、到達可能な分解能と、そのための最適な焦点条件 (Scherzer focus) についての理論を作った。

1970年 Uyeda<sup>2)</sup>らによって行なわれた塩化フタロシアニン銅の分子像撮影以来、多くの研究者が高分解能像を得ようとしてきたし、これにこたえるように装置の分解能は向上してきた。Scherzerの理論に基づいて Kobayashi<sup>3)</sup>らは高分解能をめざした500kVの電顕 (HAREMと略) を1974年京都大学化学研究所に



設置した。<sup>4)</sup> Ishizuka と Uyeda は、分解能や焦点条件  
試料の厚さの像に与える効果についてシュミレーション  
による検討を行ない、HAREM により原子の像が得  
られると予言した。装置の性能からも、理論的検討  
からも、原子レベルの分解能の像が得られると期待  
された。しかし、理論と実際の間には大きな開きが  
あり、多くの解決すべき問題のために原子像観察は  
成功しなかった。

本研究の目的は、電顕を用いて直接原子レベルの  
像を得る方法を確立し、とくに電子線による損傷を  
受け易く、低コントラストの有機生体物質の分子構  
造をも直接決定する方法を確立することにある。

分解能を制限する因子を実験的に充分検討し、これらを解決するための実験的方法を開発することによって、塩化フタロシアニン銅結晶の像をはじめとして、有機結晶の原子レベルの像を得た。さらに、特別な試料支持技術(アルミナスーパーマイクログラフィット)を開発し、電子線損傷を受け易い試料の高分解能像を撮影できる装置(Minimum Dose System)を開発することによって、DNAの二重らせん構造(Watson-Crickモデル)の直接観察に成功した。

第一章において、今回開発した高分解能電顕像を得るための手法について述べ

第二章において、原子像観察の結果について述べ



第三章において、核酸の直接観察について述べる。

第四章において、結論を述べる。

## I 高分解能電顕像を得るために

電顕の実際的な分解能を知らなくては、期待できる結果を予測することができず、研究計画を立てられない。それゆえ、電顕の分解能を測定する方法を検討し、用いる電顕の分解能を決定した。<sup>5)</sup>

現在、技術的に到達し得る最高の分解能を得るために、分解能を制限するすべての因子を検討し、これを解決するための手法を研究した。<sup>5)6)</sup>

### I-1 電子線の波長および対物レンズの収差

Scherzer<sup>1)</sup>によれば、分解能 $\delta$ は、

$$\delta = C_1 \lambda \alpha_{\max}^{-1} = C_2 \lambda^{3/4} C_s^{1/4} \quad \dots (1)$$

で与えられる。なお、 $C_1$ 、 $C_2$ は比例定数で、ここを



は  $C_1 = 0.84$ ,  $C_2 = 0.60$  の値を用いる。  $\lambda$  は電子線の波長、  $\alpha_{max}$  ; 伝達関数の位相が乱されない最大の散乱角、  $C_s$  ; 対物レンズの球面収差係数。 この式から明らかかなように、高分解能の電顕は加速電圧を高くし (波長を短くし)、なおかつ対物レンズの球面収差係数を小さくする必要がある。(HAREM は、この事を念頭において作られた。) 電顕の分解能を求めするには、電子線の波長と、球面収差係数を測定しなければならない。像を正しく解釈する上からも、正確な波長と球面収差係数測定が必要となる。

波長は *Kikuchi* 線とこれに対応する回折点とのすれから精度良く求める方法が知られている。<sup>(7)8)</sup>

Phumphrey<sup>8)</sup>の方法で HAREM の波長測定を行なった結果、 $\lambda = (1.42 \pm 0.01) \overset{\times 10^{-2}}{\text{Å}}$  (498.8 kV) が得られた。これは非常に精度の高い測定方法である。

球面収差係数は Budinger と Glaeser<sup>9)</sup> および Krivanek<sup>10)</sup>の方法が知られているが、加速電圧が高く、高分解能電顕の球面収差係数を精度良く求める方法を開発した。<sup>5)11)</sup> 適当な結晶の一次と二次の回折波、例えば金の (111) と (222) の回折波の逆格子ベクトルの大きさをそれぞれ、 $g_1$ 、 $g_2$  とする。これらの回折波の像と、明視野像とのおれの量を  $t_1$ 、 $t_2$  とすると、

$g_2 = 2g_1$  であるから、

$$t_1 = C_s (\lambda g_1)^3 - \Delta z (\lambda g_1) \quad \dots (2)$$



$$\begin{aligned}
 t_2 &= C_s (\lambda f_2)^3 - \Delta Z (\lambda f_2) \\
 &= 8 C_s (\lambda f_1)^3 - 2 \Delta Z (\lambda f_1) \quad \dots\dots (3)
 \end{aligned}$$

となる。等間隔の焦点変化量  $\Delta Z$  で、*under focus* から *over focus* にわたって図 1 a のような像を撮影する。これは、図 1 a の 14 に示す回折図形からわかるように、金の (111) と (222) だけが強い回折点を与える好都合な結晶で、多重露光を行なわないう得られた像である。(2) 一般には、制限視野絞りをを用いて、透過波と回折波による像の多重露光をやる。こうして得た像から、 $t_1$ ,  $t_2$  を測定し、横軸を焦点変化  $\Delta Z$ 、縦軸をおれの量  $t$  として、図 1 b のようなグラフを描く。その交点は (2), (3) 式から、

$$t_0 = -b C_s (\lambda g)^3$$

となる。図 1 b の交点  $t_0 = -36.0 \text{ \AA}$  が得られ, Phumphy

の方法で求めた  $\lambda = (3.75 \pm 0.01) \times 10^{-2} \text{ \AA}$  を用いると、

$C_s = (1.48 \pm 0.03) \text{ mm}$  と求められる (JEM 100 C の場合)。

HAREM については  $C_s = (1.06 \pm 0.09) \text{ mm}$  と求められた。

この方法は、各測定点の直線性によつて、測定結果の良し悪しかわかると同時に、(2)、(3)式より明らかかなように、 $t_2$  があの直線の傾きの 2 倍でなければならぬことから、実験結果を検査することができ、焦点変化量は、等間隔でありさえすれば良く、絶対値は、不要で、逆に  $C_s$  決定後に (2) 式から求めることができる。

対物レンズの収差には、球面収差と同様に重要な色収差もあるが、それは次の項でエネルギー分布として△の中に含んで扱う。

## I-2 伝達関数の減衰

図2bに示す伝達係数 $B_c$ は、上記の方法で求めた波長と球面収差係数の関数であり、シェルツァーフォーカスにおいても、高角側が振動していることがわかる。つまり、分解能を制限するシェルツァーリミットが得られる。しかし、この他にも分解能を制限する因子がある。すなわち、図2bの伝達関数を減衰させる因子が存在することが知られている。それは、二つに大別できる。その第一は、試料を照射する電子線の開

き角である。第二は、均一でない波長による効果として表現できる現象で、加速電圧の不安定性、フラメントを成る熱電子のエネルギー分布、対物レンズの不安定性などに起因する。

Frank<sup>(13)</sup> として Hammen と Trepte<sup>(14)</sup> によれば、照射の開き角  $\beta_c$  と、エネルギー分布  $\Delta$  (熱電子のエネルギー分布の他、加速電圧の不安定性、対物レンズの不安定性もこの中に含む) による透過関数の減衰は、それぞれ、

$$S(k) = \exp - [(\pi\beta_c \cdot \lambda^{-1}) \cdot (C_s \lambda^3 k^3 - z \lambda k)]^2 \quad \dots (4)$$

$$E(k) = \exp - \left[ \frac{1}{2} \cdot \pi \cdot \lambda \cdot k^2 \cdot C_c \cdot \delta E \cdot (2\sqrt{\epsilon n_2} \cdot E)^{-1} \right]^2$$

$$= \exp - \left( \frac{1}{2} \pi \cdot \Delta \cdot \lambda \cdot k^2 \right)^2 \quad \dots (5)$$

で与えられる。なお  $k$  ; 空間周波数、 $C_c$  ; 色収差係数  
 $\delta E/E$  ; 加速電圧の不安定性、 $z$  ; 焦点はおれ量で  
 ある。

実例として、HAREMの場合の伝達関数の減衰の様  
 子を図2bに示す。 $S$  は(4)式で示されている照射の  
 開き角による減衰関数、 $E$  は(5)式で示されるエネ  
 ルギー分布による減衰関数、 $T$  は減衰も考慮した伝  
 達関数。 $I$  は伝達関数と構造因子の積の2乗である  
 が、これらの関数の計算には、 $\lambda = 1.42 \times 10^{-2} \text{ \AA}$ 、 $C_s =$   
 $1.06 \text{ mm}$ 、 $z = 2860 \text{ \AA}$ 、 $\beta_c = 2 \times 10^{-4} \text{ rad}$ 、 $\Delta = 74 \text{ \AA}$  という実  
 測値を用いた。

充分薄い(弱位相物体として扱える)非晶質膜の

電顕像を光変換すると、その強度  $I(k)$  は、

$$I(k) = E^2(k) \cdot S^2(k) \cdot H^2(k) \cdot B_c^2(k) \cdot F^2(k) \quad \dots (6)$$

で表される。<sup>15)</sup> ここで  $B_c(k)$  は、coherent な伝達関数  $F(k)$ ；構造因子、 $H(k)$ ；film の modulation transfer function (MTF) である。

直接倍率40万倍でHAREMにより撮られた30 Åの膜厚のカーボン膜を上記の条件で撮影し、これを光変換すると図2aのようになる。(6)式のIが図2bに示されているが、これと光変換像図2aとは良い一致を示していることがわかる。このことは、電顕の性能の多くを薄い非晶質膜像の光変換から知ることができるところを示唆している。



Frank<sup>16)</sup> や Trojan<sup>17)</sup> は  $\beta_c$  と  $\Delta$  を非晶質像の光変換から求める方法を報告している。

### I-2-1 照射角の測定

エネルギー分布の最良の値は電顕によつて決まっていますが、開き角は撮影時の条件で任意に変化させることができ、最適条件を設定できるので、開き角を簡単に測定できる方法が必要である。開き角  $\beta_c$  を実測するために光変換を利用する方法と、輝度不変の法則に基づく方法とを比較検討した<sup>5)</sup>。

#### a. 光変換を利用する方法<sup>17)</sup>

(4)式において、 $|Z| \gg C_s \lambda^2 k^2$  のとき

$$S(\beta_c) \approx \exp - [(\pi \beta_c \lambda^{-1}) \cdot Z \theta]^2 \quad \dots (7)$$

となる。ここで  $\theta = \lambda k$ 。図3のように、大きい焦点はずれ量で撮影したカーボン薄膜像の光変換像からその強度が検出できる最大の空間周波数  $k_m$  を求める。同時に、強度ゼロの光変換リングの直径  $d$  を測定して、

$$z = 4\pi \lambda^2 L^2 (\lambda M^2 d^2)^{-1} + C_s \lambda^3 M^2 d^2 (8 \lambda^2 L^2)^{-1} \quad \text{--- (8)}$$

から *defocus* 量を出す。なお、 $n$ ) 低角側からかぞえた強度ゼロのリングの次数、 $\lambda$ ) レーザー光の波長、 $L$ ) 光変換のカメラ長、 $M$ ) 像の倍率である。そして炭素原子の原子散乱振幅から、 $F(\theta) = F(k_m) / F(0)$  を求める。(6)式において、 $E^2(k)M^2(k) \approx 1$  とみなせる。低角側では、 $B_c \approx 1$  のとき、 $I \approx S^2(k)F^2(k)$  となる。

(17)

検出可能な伝達関数の強度を5%としたとき、

$$S^2(k_m) \cdot F^2(\theta) \approx 0.05 \quad (9)$$

となる。  $k_m$  を図3から測定して式(7)(8)(9)を用いて

表1が得られる。すなわち、  $\beta_c = \sqrt{\ln S^{-1}(\beta_c) (\pi Z k_m)^{-1}} = 1.7 \times 10^{-4} \text{ rad}$  となる。

b. 輝度不変の法則による方法<sup>18)</sup>

軸上輝度  $B$  は照射角によらず一定であり、

$$B = I / \pi \beta_c^2 \cdot \pi \rho^2 = J / \pi \beta_c^2 \quad \dots (10)$$

$\rho$ : 電子線束の半径、 $J$ : 軸上の電流密度、 $I = \pi \rho^2 J$  で

ある。前もって軸上輝度を測定しておけば、 $J$  を測

定することにより(10)式を変形した

$$\beta_c = \sqrt{J / \pi B} \quad (11)$$

から照射角  $\beta_c$  を求めることができる。しかし通常測定できる輝度は、

$$\bar{B} = I_p / \pi \beta_c^2 \cdot \pi \rho^2 \quad (12)$$

$I_p$  はアノード電流で  $\rho$  と  $\beta_c$  を無限に小さくした場合が軸上輝度である。それゆえ、まづ軸上輝度を求めなければならぬ。電圧の倍率を適当に変化させて、Faraday cage に入る電子線源の割合を変化させてビーム電流を測定する。なお、HAREM において測定を行なった投射レンズ、Faraday cage、蛍光板、EM Film 等の配置を図4に示す。その結果を表2に示す。図5には、それぞれに対応して、Faraday cage に入るビームソースの部分を示す。実測の結果ビームソース

は、

$$G(r) = (2\pi\sigma^2)^{-1} \exp - [r^2 / (2\sigma^2)] \quad (13)$$

の  $\sigma = 0.37$  のガウス分布をしていることがわかった。その形を図5に示している。表2から明らかによえに、実験の精度範囲内で、 $p_x/p_0 = 0.14$  以下なら、軸上の電流密度とすることができると。よって HAREM に7アピンフラメントをつけた時の軸上輝度は(10)式から、 $B_{ax} = 3.4 \times 10^5 \text{ Amp/cm}^2 \text{ str}$  と算出できる。

光変換を用いた時とほぼ同一の照射条件で軸上の電流密度を測定すると、 $2.9 \times 10^3 \text{ Amp/cm}^2$  となる。

(11)式から  $\beta_L = 1.6 \times 10^{-4} \text{ rad}$  と求められる。この結果を表3に示す。

表1と表3は、同一照射角を二つの方法で測定した結果で、測定結果は良い一致を示している。両方とも精度は良くないが、実際上は容易に照射角を知る事が重要であり、精度の高さはそれほど必要としないので、これらの方法は有効である。特に輝度不変の法則によれば、軸上の電流密度を測定して(4)式からすばやく照射角を求めることができるので好都合である。後で述べるように、電顕像撮影条件の設定には、この方法が力を発揮する。

### I-2-2 エネルギー分布の測定

均一でない波長によって伝達関数は、(5)式に示されるエネルギー分布  $\Delta = (C_c / 2\sqrt{\ln 2}) (\delta E / E)$  によって



減衰される。この式では、加速電圧の不安定性  
 $(\delta E/E)$ だけに $\Delta$ が依存するように書いたが、他に  
 もフラメントを出す熱電子のエネルギー分布による  
 ものと、レンズの不安定性によるものがあるが、(5)  
 式の $\Delta$ をこれらすべてを含むものと考えよ。それゆ  
 え、今後、エネルギーの分布 $\Delta$ という時は、このよ  
 うに波長の分布に帰することのできるすべての因子  
 を含ませているものとする。

エネルギー分布を測定する方法も Frank<sup>(16)</sup>と Trayon<sup>(15)</sup>  
 が示している。図6aに HAREMで撮影した厚さ約30  
 Åのカーボン膜と金の(200)の格子像を示す。こ  
 れを光変換するとbのようになる。ただし、空間周

波数限界を見やすくするために *Young's fringe* で示してある。この光変換像から、空間周波数限界  $k_m = 0.63 \text{ \AA}^{-1}$  と求められ、Trayon の方法に従<sup>15)</sup>て表4のようにエネルギー分布  $\Delta = 74 \text{ \AA}$  と算出された。

加速電圧やレンズの不安定性によって、エネルギー分布  $\Delta$  は大きくなり、高分解能の情報が見失われるので、これらの安定性は極めて重要である。それゆえ、高分解能像を撮影する場合には、加速電圧と対物レンズの安定性を常に測定する。また、加速電圧やレンズが安定のときには、電子がフラメントを出る時に有するエネルギー分布によって、 $\Delta$  の値が左右される。このエネルギー分布は、フラメントのタイプ

によって表5のような値となる。また、この表には  
試料照射の開き角 $\beta$ と関係深い輝度とフィラメントの寿命  
についても示しておく。この表で、エネルギー分布  
の小さいフィラメントを用いるのが高分解能の研究に  
適しているのであるが、フィラメントの寿命と値段も  
無視できない要素であるので、現在までのところ、  
我々は、アロータイプとポイントフィラメントを主に用  
いている。

なお、*field emission gun* は、エネルギー分布が  
1桁低いといわれており、輝度も高いので高分解能  
電顕に適している。それゆえ、安定な *field emission*  
*gun* が開発されることが望まれる。

## I-3 焦点条件

高分解能の像になればなるほど、正確に焦点合せをしなければならぬ。図26にも示されている塩化フタロシアニン銅に関して、スルーフォーカスの像を図7に示す。分子構造と正しく対応しているのは450 Å アンダーフォーカスの像だけである。450 Å アンダーフォーカスは、シエルツァーフォーカスと呼ばれ、この電顕(HAREM)における最適の焦点条件である。この他の焦点条件では、構造と直観的に対応がつかぬ像を得ることができない。シエルツァーフォーカス  $Z_0$  は

$$Z_0 = 1.19 (C_s \lambda)^{1/2} \quad (14)$$

から計算できる。<sup>19)</sup>しかし、いかにしてこの最適焦点条件の像を撮影するかが問題となる。有機試料の場合には、薄い電子線照射量で焦点合せを行なう必要があり、特別な熟練を必要とする。ただ、この焦点合せの精度と試料の照射損傷の受け易さを考慮して、適当な範囲の *through focus* の像を撮影する。これらの像の中から最適焦点の像を選び出すことができる。<sup>6)</sup>たとえば、図7のIの1,2,3,4のオリジナルフィルムを、He-Neレーザ光を用いて光変換すると、それぞれ、Dの1,2,3,4のようになる。この試料は、塩化フタロシアン銅の薄い結晶を約20Åのカーボン膜で“裏打ち”しているので、結晶の回折点と重

量して、カーボン膜の光変換のリングパターンがみられる。このリングのゼロコントラストの半径 $r$ を測定して式(8)から像のデフォーカス量 $Z$ を求める。この $Z$ と(17)式を算出した $Z_0$ とが等しくなるような像が最適条件の像である。ただ $D$ の $l$ を見てわかるように、最適焦点条件の付近では、光変換のゼロコントラストのリングの半径が測定し難いので、スルーフォーカス $Z$ 、いくらかデフォーカスした像のデフォーカス量から逆算して最適焦点条件を選び出す場合もある。

モデル構造を仮定して、撮影条件を用いて計算機によるシミュレーション、たとえば図7の $D$ の $l$ 、 $Z$ 、



3.4 と実際に撮られた像である I の 1. 2. 3. 4 とをそれぞれ比較検討すれば、仮定した構造と焦点条件の正(いか)否(か)を確認することが出来る。なお Ishijuka と Ugeda<sup>29)</sup> は電頭像から Z を決定し無収差像を得る方法を理論的に示している。

#### I - 4 像の流れ

像の流れの原因を明らかにし、それらを定量的に検査する方法を開発した<sup>5)</sup>。これから、目的の分解能が得られるように像の流れの問題を解決した。

#### I - 5 光軸合せ, 非点収差補正<sup>5) 11)</sup>

高分解能像を得ようとする時には、電頭の光軸を正確に合せなければならぬ。像質に直接影響を与

える非点収差は、特に正確に補正しなくてはならない。高分解能のための電顕の調整の状態を調べる方法と基準を明らかにし、その条件を拘束ことを確認して、試料の撮影を行った。ここでは非点収差補正について述べる。

高分解能になると非点補正が特に重要になることは図29の塩化フッロシアン銅の *through focus* 像からも明らかである。例えば図29の  $550 \text{ \AA}$  *under focus* の像では、塩化フッロシアン銅の銅の位置が黒くみえるが、 $600 \text{ \AA}$  *under focus* の像では、反転して白いコントラストになる。つまり、おおよそ  $50 \text{ \AA}$  の焦点変化によって、像が変化するわけだ。

非点が50 Å以上ある場合には、構造と直接対応する像を得ることができなくなることを示唆している。

非点収差補正は、普通膜穴を用いてアンダーフォーカスやオーバーフォーカスのフリンジを一樣にするようにしてなされているが、より高分解能の場合には非晶質膜の粒状性をみて補正する方法がとられている。しかし、この方法で熟練したオペレーターが非点補正を行なっても、完全に補正を行なうのは困難であり、定量性がないので、どこまで非点補正ができたか知ることができない。例えば、図8のaは非晶質像の粒状性から非点収差補正を行な、た結果であり、bと比較してそれほど非点収差がある像と

は観えらるが、後述の光変換の方法によれば、 $a$  は  $800 \text{ \AA}$  の非点収差量がある場合で、 $b$  は  $50 \text{ \AA}$  以下に非点収差補正をしたものである。図 8  $a, b$  を光変換すると、それぞれ  $a', b'$  となる。非点収差補正工されると、 $b'$  のように同心円のパターンが得られるが、非点収差があつて、全方向ともアニターフォーカスかオーバーフォーカスにある場合には、 $a'$  のように楕円のパターンを与える。(アニターフォーカスとオーバーフォーカスの両フォーカス条件が同一視野にある場合には、より複雑なパターンを与える)。

非点量  $\delta z$  は図 8  $a'$  の点おとび  $l$  を測定して、

$$\delta z = 4\pi n^2 L^2 (\lambda M^2)^{-1} (S^2 - l^2) \quad (15)$$

ただし、 $n$ ；低角側からかぞえた強度  $0$  のリングの  
 次数、 $\lambda$ ；レーザー光の波長（He-Neレーザーで  
 $= 6328 \text{ \AA}$ ）、 $L$ ；光変換のカメラ長、 $M$ ；像の倍率、  
 を用いて算出できる。

非晶質の像を電顕で撮影して、現像、定着、水洗  
 エタノールをかけた写真用スポンジで水分をふきと  
 り、ドライヤーで乾燥後、光変換装置にセットし、  
 ホラロイドフィルムで光変換パターンを撮影する。

(15) 式の非点量の計算に必要な  $\Delta$ 、 $\delta$  および、フ  
 ィルムの一定方向に対する角度  $\theta$  を測定する。ステ  
 ィゲメーターの  $x$  と  $y$  軸が  $\pi/4$  の角度をなしている  
 場合には、CHAREM, JEM100C, 200CX

$$\delta I_x = C \cdot \delta Z \cdot \sin(|\theta - \alpha| - 0.25\pi)$$

$$\delta I_y = C \cdot \delta Z \cdot \sin(|\theta - \alpha + 0.25\pi| - 0.25\pi) \quad (16)$$

から補正すべきステイゲメータの電流量が計算される。あらかじめ、補正する非点収差量とステイゲメータの電流値との関係によって決まる定数Cを求め、倍率に依存する角度 $\alpha$ を決めておく。この方法によって、図11のaのように非点収差のある状態からbのように1回で正確に補正することができ、この方法で非点収差補正をするのに要する時間は、およそ10分である。

### I-6 試料の厚さ

試料の厚い場合には、ある原子で散乱された波が

また別の原子で散乱されるような現象(多重散乱)が起きるため、像の解釈が複雑になる。この様な場合の像解釈のために、動力学的理論が発表されて<sup>21)</sup>いる。しかし、試料が厚くなるとFrennel回折によるボケの効果等により、分解能が悪くなることが知られており、<sup>22)</sup>高分解能像を撮る時には、試料を十分薄くしなければならぬ。それゆえ、試料の厚さを正確に測定する方法が必要となる。真空蒸着法で試料を作成する場合は、マイクログラフがある程度膜厚測定のみ安くなるが、正確に膜厚を知るには、試料の不連続性を考慮に入れなければならない。最も簡単にしかも、ある程度精度良く試料の膜厚を知るには、シヤ



ドゥイングによる方法がある。しかし、この方法の場合、シャドウイングの角度を正確に知らなければならぬ。膜が曲っていることにより、シャドウイングの角度が場所により変化する。この問題を解決するために、ホリスチレンボールを用いることにより、シャドウイングの角度を正確に知る方法を開発した。例として、酸化バナジウム *Bilty sol*<sup>23)</sup> の繊維状結晶の厚さ測定を図9に示す。ステレンボールは球であるので、影の長さ $L$ と高さ $H$ との比を知ることができ、これから結晶の厚さ $t$ は30Åと測定される。シャドウイングに用いる金属とその蒸着方法により、極めて薄い試料の厚さを正確に知ることに

ができる。加熱蒸着法で白金をシャドウイングに用いる場合でも高真空の条件で、二段スリットを通してシャドウすれば数 $10\text{\AA}$ の厚さを測定できる。

### I-7 試料コントラストと支持膜<sup>6)</sup>

単一の原子を直接観察しようとする場合には、電顕の分解能が重要であることは当然であるが、試料を支持する技術が重要な問題となる。単一の原子の場合には、原子番号80番の水銀原子をHAREMで撮影する場合のコントラストはおよそ25%で、ヨウ素原子で19%、炭素原子では5%である。このようにコントラストが低いために、支持膜にノイズがある場合には、求めるシグナルを取り出すことができる。

なくなってしまう。それゆえ、試料支持技術の問題は、特別に重要であり、原子像を直接観察する方法を確立するためには避けることができない研究課題である。

これまでに発表されている主な支持膜について、その特徴を表6に示す。これは、ノイズの低さ、観察可能領域の広さ、(電子線に対する)安定性、微小試料の支持、作成の容易さの各項目についての良否を検討したものである。この表により、目的に応じて適当な支持膜を選択することができる。それらの作成法については、代表的文献を示しておく。<sup>24-30)</sup>

支持膜は大別して、非晶質膜、結晶性膜、マイク

ロケリッドの三種類がある。

### a. 非晶質膜

カーボン膜は、容易に作成できるわりに長所が多くて、最も一般に使用されているようである。しかし、普通は膜厚が厚くて、ノイズが多いため、高分解能用支持膜としては適さない。高分解能用非晶質膜として、アルミナ膜や、木ウソ膜が発表されているが、我々が検討したかぎりでは、それほどすぐれているとは思われない。非晶質膜の中で最もすぐれているのは、<sup>31)</sup> 間接蒸着法 (Rubenの方法) によるカーボン膜であることが明らかとなった。我々が用いている数  $10 \text{ \AA}$  の間接蒸着カーボン膜の作成法<sup>6)</sup> は、次

のようである。

図10のように、Cからカーボンを加熱蒸発させて、Tの板で、直接Mのマイカ上へ蒸着されるカーボンをとらえる。横からまわりこんだり、Sのスライドガラスで反射したカーボンがマイカ上へ蒸着される。この方法によれば、大きいカーボン粒子はマイカ上へ到達できないので、非常にスムーズなカーボン膜ができる。さらに、Tには白いタイル（半分は真空用グリースをぬっておく）を置き、黒化度とマイカ上のカーボンの膜厚とをあらかじめ対応づけておけば30Å程度の極めて薄い膜も任意に作成できる。

図10のTのタイルの濃さとマイカ上のカーボンの

厚さとを対応づけるには、極めて薄い膜の厚さを測定する方法が必要である。それには、安達等<sup>32)</sup>による「折曲げ法」が有力である。図11aのように測定する膜の上に白金を真空蒸着する。ついで、“裏打ち”の膜としてカーボンを測定したい膜のおよそ2倍程度真空蒸着する。これを図11cのように、2枚の剃刀の刃で押え、ピンセットでゆっくり折り曲げる。この時、膜が破れないように十分注意する。これを電顕に入れて、図11bのように観察する。この場合コンタミネーションのない状態で撮影しなければならない。I-9で述べるMDSを用いるとコンタミネーションを避けることができるので、薄い膜でも

精度良く膜厚測定ができる。この方法でカーボン膜の厚さを測定した例を図12に示す。この膜は30Åの厚さであるが、これより薄い膜になると、マイカせ上のらカーボン膜を水面剥離することが困難になる。30Åより薄い膜はNaCl(またはKCl)の単結晶<sup>へき</sup>上面にカーボンを蒸着し、水面上で、その結晶をゆっく<sup>り</sup>溶解して作製する。ただし、電子線に対する安定性が悪くなるので、30Åの膜厚のカーボン膜が最も実用的である。

### b. 結晶性支持膜

結晶性支持膜は、その周期性のために、支持膜からの主な情報が対物レンズの後方焦点面ではシャ-

な回折点に集まる。この回折点をさへざると、支持膜からの情報の大部分はなくなり、このため原理的には支持膜によるノイズは著しく少なくなるはすである。しかし、十分薄くて、観察可能領域の広い結晶性支持膜を作成するのは極めて困難である。さらに、結晶のステップの問題や表面の構造と内部の構造のズレの問題等、理想的な結晶性支持膜から期待されるほど良い支持膜を作成するのは困難であることが明らかになった。シエルトアーフオーカス付近の像の問題にするか否りにおいては、原子を直接観察する支持膜としては、 $\alpha$ で述べた間接蒸着によるカーボン膜がすぐれている。



## C. マイクログリッド

支持膜によるノイズに対しては、試料を空中に静止するのが理想的である。これを実現するには、孔に試料を“架橋”するのが良い。それを実現したのがマイクログリッドである。しかし、機械的強度の弱い、生体高分子、例えば核酸を架橋して観察するには、数 $100\text{\AA}$ 程度の孔径で、とる限り開孔面積比の良いグリッドが望まれる。この目的で開発されたアルミニウムスーパーマイクログリッド(ASMと略)である。<sup>29)</sup> 代表的なASMを図13に示す。またより高倍率の像を図14に示す。

ASMはアルミニウム箔を陽極酸化して得られる

多孔性酸化膜のバリア層を化学的にエッチングして、薄膜化することによって作製される。ASMの作製法のフローチャートは図15に示してある。

ASMは図16に示すように電解液と酸化電圧を適当に選択することによって、 $200 \text{ \AA} \sim 1000 \text{ \AA}$ の任意の孔径のスーパーマイクログリッドが得られる。

### I-8 コンタミネーション

コンタミネーションを防ぐ方法を検討するとともに、次に述べる *Minimum Dose System*<sup>33)</sup> の開発によって、この問題は解決された。

### I-9 電子線損傷

有機、生体試料を電顕で観察しようとする場合には

最も重大な障害となるのが、電子線による試料損傷である。試料の電子線損傷については多くの研究がなされているが、そのメカニズムは複雑で、不明な点も多い。損傷のメカニズムを正面から研究し、それを明らかにして、損傷を解決するという正攻法の進み方もあるが、現在実現可能な方法で、損傷をできるだけ限り少なくして、高分解能像を撮影する事を追求するのは、重要なことであろう。

まず、当然考えられることは、“無駄な”電子線を試料に照射しないことである。すなわち、像を記録する時に限り、撮影する試料部分に電子線を当てる方法である。この考えに基づいて、電子線損傷を

受けやすい試料の高分解能像を撮影するための装置を、日本電子の協力を<sup>33)</sup>作成した。これは *Minimum Dose System (M.D.S.)* と呼ばれ、市販されるようになった。また、これを装備した新しい電顕も市販されるに至った。この M.D.S. の開発によって、初めて一般の有機・生体高分子の高分解能像が撮影できるようになった。ここで、その方法、原理と使用者について述べる。

#### a. M.D.S. の原理

Williams<sup>34)</sup> は、蛍光板の一部に電子線を集束し、そこで焦点合わせを行ない、投射レンズを移動させることにより、像を  $2\mu\text{m}$  程度移動して、集束レン

度を強化させて、ビームを広げることによってフィルムに露光する方法 (Minimal Beam Exposure) を用いてタバコモザイクウイルスの像を撮り、良い結果を得ている。この“横で焦点を合わせる”考えに基づいて、高分解能像を撮影するために必要なすべての条件を満たし、操作性の良い装置としたのがMDSである。

MDSは図17に示すように、基本的には“視野探し”“焦点合わせ”“写真撮影”の各モードから成り立っている。タイマーをあらかじめ設定しておくと、それに従って集束レンズ、偏向コイル、投射レンズ中に設置されたシャッター、蛍光板および、カメラ駆動部が目的にたじた動きを自動的に行なう。

集束レンズと偏向コイルは3つのモードに適するよう  
にあらかじめ設定しておく。投射レンズ中のシヤ  
ッターは振動源にならず、素早く動くようにしてあ  
る。

視野探しのモードにおいては、電子線の中心が補  
助蛍光板の方へ移動して、電子線束の端が蛍光  
板の中心近くへくるように集束レンズを調節してお  
く。図17bに電子線の強さ(明るさ)を示す。この  
“山”の“裾野”の極めて電子線の強度の弱い部分  
で視野選択を行なう。視野選択が終わったら、スイッ  
チを切り替えると、焦点合わせモードにあることか  
らえる。

焦点合わせモードは、偏向コイルにより、ビーム中心が試料のBに移動し、集束レンズ電流を変えて、補助蛍光板上にビームを集束できる。この状態では、写真撮影される試料部分Aには全く電子線が照射されておらず、ビームはBに集束されているため、焦点合わせ用蛍光板上は極めて明るく、正確に焦点合わせを行なうことができる。焦点合わせ後、写真撮影用ボタンを押すと、シャッターが閉じて、蛍光板があがり、偏向コイルによってあらかじめ設定されている位置まで電子線が曲げられる。この状態を“ビームブランキング”と呼ぶ。ブランキングでは、すなわち電子線照射されている試料の方向に、すなわ

ちBより外側へ電子線を振り曲げる。そして集束レンズが、写真撮影の条件に設定される。このビームブランキングの機能は高分解能電顕像撮影には必須である。なぜなら、焦点合わせモードで撮影する試料部分の近傍を局所的に強い電子線照射で加熱したことにより生じた熱的ひずみの緩和と、集束レンズのヒステリシスの影響を避けることが必要だからである。あらかじめ設定された時間(普通10秒)だけブランキングされる。それが終了すると、偏向コイルで自動的にビームがAの位置へ振り戻されて、写真撮影のモードになる。

写真撮影のモードでは、電子線が写真撮影される。



Aの部分を照射すると、少しの遅延時間(通常0.1  
μs)の後、シャッターが開き、フィルムに露光し、  
あらかじめ設定された露光時間後、シャッターが閉  
じる。同時に焦点合わせモードにもどる。この焦点  
合わせモードではAの部分は電子線照射されない。

MDSの一連の動作の関係をわかり易くするため  
に、図18にタイミングチャートを示す。それぞれの  
実線の高さは、このシステムにおける電流の変化を  
定性的に示したものである。蛍光板、シャッター、  
偏向コイルおよび集束レンズは、互いにタイミング  
チャートで示すような関係で動作する。 $t_1, t_2, t_3$ は  
それぞれ、ブランキング時間、遅延時間、露光時間

である。これらはタイマ一回路で調節が可能で、通常  $t_1 = 10$  秒、 $t_2 = 0.1$  秒としている。

試料の目的とする視野に照射される全電子線量  $E_x$  ( $C/cm^2$ ) は

$$E_x = J_s \cdot (t_2 + t_3) \quad (17)$$

ここで  $J_s$  ( $Amp/cm^2$ ) は、写真撮影モードで設定された試料上の電流密度である。撮影倍率を  $M$  とすると電顕に組み込んだ露出計により、 $J_s / M^2$  を測定し、およその  $E_x$  を知ることもできる。この決定については、MDS の操作のところで述べる。

MDS は現在すでに市販されている電顕に、大きな変更を加えないで設置できることを念頭において

設計されたため図17のように補助蛍光板が必要であるが、対物レンズの下に安定な偏向コイルを加えれば、試料部分においてのみ、ビームを移動させることができ、焦点合わせモードにおいても、蛍光板の中心Aで焦点合わせを行なうことができる。このシステムの方が、任意の距離と方向で焦点合わせを行なうことができるので、理想的なMDSは、このような構成を考えている。これは、HAREMとJEM-1200EX (MDS標準装備の電顕) において実現された。

#### b. MDSの操作

MDSは通常の高分解能電顕像を撮影する場合と

基本的には同一の操作で使用することができるが、あらかじめ設定するものがあるのと、普通の方法と考え方を異にする部分があるので、MDSを用いて高分解能像を撮影するために必要な操作を記述する。

各試料における電子線損傷の受け易さに従い、撮影条件を決定する。撮影条件の決定方法を図21の銀TCNQ結晶の場合を具体例として示す。

用いる電顕の分解能をI-1, I-2で述べた様に決定する。簡単には(1)式を用いて計算する。JE M-200 CXの場合、 $\lambda = 0.025 \text{ \AA}$ ,  $C_s = 1.2 \text{ mm}$ であるので、 $\delta = 2.2 \text{ \AA}$ と求められる。200 CXにポイントフィラメントを使用した場合に(5)式の $\Delta =$

150 Å となる。この時の減衰関数  $E$  は、図 19 の様  
なり、2.2 Å の分解能を与え情報を伝達する。こ  
のようにして、ポイントフィラメントを用いた時の  
200 cX の分解能は、2.2 Å であることがわかる。  
フィルムの modulation transfer function (MTF) が  
2.2 Å の分解能を保證するような直接倍率を選ぶ必  
要がある。つまり、フィルムの粒状性によって分解  
能が劣化しない充分な倍率が必要である。Fuji F. G.  
フィルムを用いた場合に 2.2 Å を保障する最低の倍  
率はおおよそ 10 万倍である。フィルムの MTF の影響  
を受けないようにするには 10 万倍より高い直接倍率  
にする必要がある。銀 TCNQ の場合は総合的に考

えて、19万倍の直接倍率に設定した。

MDSを用いない普通の方法で損傷を受け易い試料を撮影するには、焦点合わせやフィルム送りなどの時間に照射される電子線を減らすために、ビームを広げて(暗くして)長時間露光で撮影しなければならないが、露光時間の長いと、電顕の不安定性による像質の劣化が生じ易くなる。その意味で露光時間はできる限り短い方が良い。MDSを用いた時は充分短い露光時間で撮影ができる。ただし、そのために電子線を集束するので、試料照射の用き角による伝達角数の減衰が問題となる。

(4)式から明らかのように、用き角 $\beta$ による減衰関

数  $S(\text{Å})$  は焦点条件に依存しているので、200 CX の  
 場合の各焦点条件において許される。(分解能を劣  
 化しない) 最大の用き角を求めるグラフは図20のよ  
 うになる。ここでは  $C_s = 1.2 \text{ mm}$ ,  $\lambda = 0.025 \text{ Å}$ ,  $S$   
 $= 2.2 \text{ Å}$  より最大の空間周波数  $k_m = 0.45 \text{ Å}^{-1}$ ,  $S(\text{Å})$   
 $= 0.9$  の条件のグラフである。横軸は、焦点はずれ  
 量  $\Delta$ , たて軸は試料照射の用き角  $\beta_i$  である。このグ  
 ラフから Scherzer focus の条件で、分解能を劣化しな  
 い最大の用き角はおおよそ  $2.5 \times 10^{-4} \text{ rad}$  である。Scherzer  
 focus付近において、像質を劣化させないように、妥  
 合性をみる。  $\beta_i = 1 \times 10^{-4} \text{ rad}$  と設定した。以上のよう  
 な条件における伝達関数  $T$  は図19のようになる。

これには  $\Delta$  による減衰係数  $E$ 、および  $\beta_i$  による減衰係数  $S$  も示してある。このような図から  $2A$  の分解能が得られる条件とあることが確認される。

以上のように鏡体の条件が決まると、フィルムに露光される単位時間当たりの電子線量が決まる。一方、フィルムの黒化度 (O.D) を 0.5 程度にするのに必要な電子線量から、露光時間  $t_3 = 0.7$  秒が決定される。そのようにタイマーをセットする。

一方、試料に照射される電流密度  $J_s = 0.23 \text{ Amp/cm}^2$ 、露光時間  $t_3 = 0.7$  秒から試料に照射される電子線量 (total dose) は、(19) 式から

$$E_x = J (t_2 + t_3) = 0.18 \text{ C/cm}^2 \text{ と なる}$$



銀TCNQの結晶が損傷を受けて、回折点がすべて消えてしまう電子線量 (total end point dose) は  $0.3 \text{ } \mu\text{m}^2$  であるので、上の条件で、銀TCNQの結晶が破壊されず以前に像を撮影できる。以上述べた銀TCNQを撮影する条件を表7に示す。また、この条件で撮影した銀TCNQ結晶の像を図2/aに示す。bは計算機によるシミュレーションである。図2から、銀原子柱を完全に分離して撮影できていることがわかるし、さらに、TCNQのキノリン部分がやや濃いコントラストで観られ、シスノ基も観察できていることがわかる。

この  $0.18 \text{ } \mu\text{m}^2$  の電子線照射の条件では、図2/aの

Bで示す部分(結晶の端)はすでに損傷を受けていることがわかる。しかし、別の言い方をすれば、total end point doseの半分以上の電子線照射によっても、結晶の一部(中心部分)は、それほど損傷を受けないというと考えられる。つまり、電子線による結晶の損傷は、一様に起こるのではなく、局所的に異なっており、起こる。

以上のような撮影条件決定後、写真撮影モードで軸合わせや、非点補正等を行なう。ビームの中心が図17のAにきて、開き角 $\beta$ が適当になっていることを確認する。焦点合わせモードで、ビームの中心がBにきて、補助蛍光板にビームが集束されているこ

とを確認する。視野探しモードにして、ビームの端がA付近にくるように設定する。

視野探しモードで、試料をAからBの方向に移動して、視野を選択する。この時、ビームの極めて暗い部分を用いる。倍率を下げて視野探しもできるが、倍率を変化させると、中間レンズにおいて使用するレンズ条件が変化するので、像の流れ等像質劣化の原因となる。高解能の場合には、このようなことが問題になるので、でき得る限り、倍率を変化させないで視野探しをすることが望ましい。視野探しモードはこのために設けられている。

視野選択後ただちに、焦点合わせモードに切り替

える。補助蛍光板は集束されたビームで、充分明るいので、正確に焦点合わせを行なう。焦点合わせが終われば、写真撮影用ボタンを押す。図18のフローチャートに示してあるように、 $t_1$ の間ビームブランキングして、 $t_2$ の遅延時間の後、 $t_3$ の間フィルムに露光する。その後ただちに、焦点合わせモードにもどるので、試料にはフィルムに露光される時間 $t_3$ とほぼ同じ $t_2 + t_3$  ( $t_2 \ll t_3$ ) だけ照射されるだけである。フローチャートから明らかのように、MDSを用いれば、最少の電子線照射で、スルーフォーカスの連続写真撮影も可能である。

C. MDS による、2得られる結果

まず、MDSを用いて像を撮影した時、電顕の有する性能が充分発揮されるか否かが問題となる。これをテストするには、I-2およびI-3で述べた様に薄い非晶質膜の像を撮影し、これを光変換する方法が良い。図22はそのテストの結果を示す。aおよびcは、それぞれMDSを用いて、および用いないでJEM100Cで撮影したカーボン膜の像である。また、bとdはそれぞれaとcを光変換した結果である。この両者を比較して、MDSを用いても電顕そのものの像質を劣化させないことがわかる。この光変換から、これらの像は $3\text{\AA}$ 程度までの情報を伝達していることがわかる。

MDS を用いることにより、これまで撮影できなかった有機結晶の高分解能像が得られるようになった。その結果については、2章で述べる。

MDS を用いて明らかになった注目すべき他の結果は、生体試料において、通常行なわれている染色の問題についてである。

図23のaは2%のリニタンゲステン酸 (PTA) によって染色したウィールスをMDSを用いて撮影した像である。これには、格子像が観られる。つまり、左下に示す電子線回折図形からも明らかたように、PTAが結晶化していることを示している。ところが通常の方法で撮影すると、PTAの結晶は、

損傷を受け、もはや格子像がみえなくなってしまう<sup>33)</sup>  
う(図23b)。

これは、PTAが染色材として用いられた時、結晶化する事は知られていない。PTAが染色に用いられた時、それが結晶化する事によつて、試料本来の形を歪曲させる事によつて、リーティファクトが入るおそれがある。PTAの結晶は条件によつて異なるが、数100Å程度の大きさになるため、PTAの染色によつて、この程度より細かい構造を議論するのは危険であると思われる。

また、例えば酢酸ウランによる染色の場合でも、MDSを用いた場合と用いない場合では、その像が

変化することが、光変換等を用いて明らかとなった。  
図24はT4ファージを2%の酢酸ウランで染色して、  
MDSで撮影したものであるが、T4ファージの頭殻  
部にDNAが規則正しい“同軸性糸巻き”構造を  
していることが明らかとなった。<sup>35)</sup> この頭殻部のDNA  
をMDSを用いずに撮影するのは容易ではない。  
最少の電子線照射によって高分解能像を撮影するM  
DSの開発によって、電子線損傷を受け易い試料の  
高分解能像が得られるようになった。ただこの方法  
は、試料自身の損傷を本質的に軽減するものではな  
いので、試料の電子線損傷を軽減する方法、例えば  
試料冷却等の研究が極めて重要である。



## I-10 画像記録装置

画像記録装置として、解像力、感度等を総合的に検討すると、現在までのところ、フィルムが最も良い。電顕フィルムの感度および modulation transfer function (MTF) の測定を行ない、最適な撮影条件を決定するパラメータを求めた。<sup>6)</sup>

以上のように電顕の分解能とそれを制限する因子を調べ、これらを解決する方法を研究、開発した。これによって、これまでには原子レベルの像が得られなかったが、ここで述べた手法によって現実には、原子レベルの分解能の像が得られるようになった。次の章ではこれらの結果について述べる。

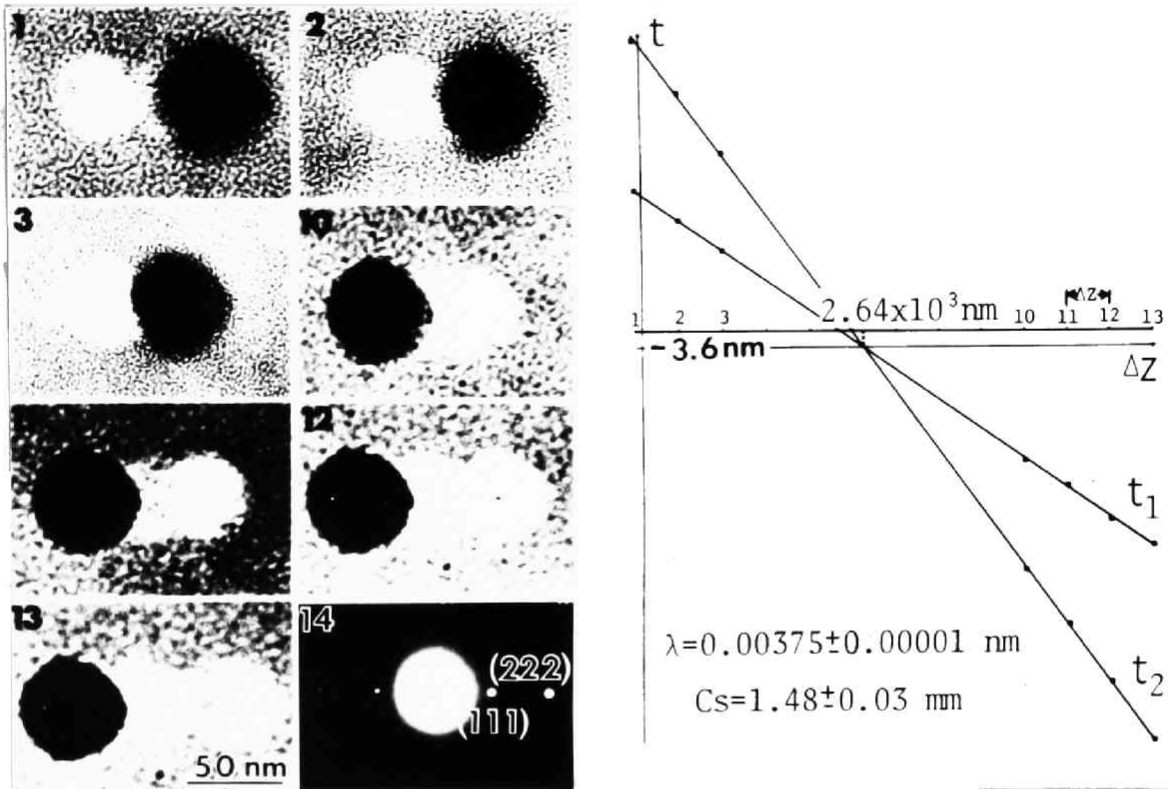


図1 球面収差係数測定法

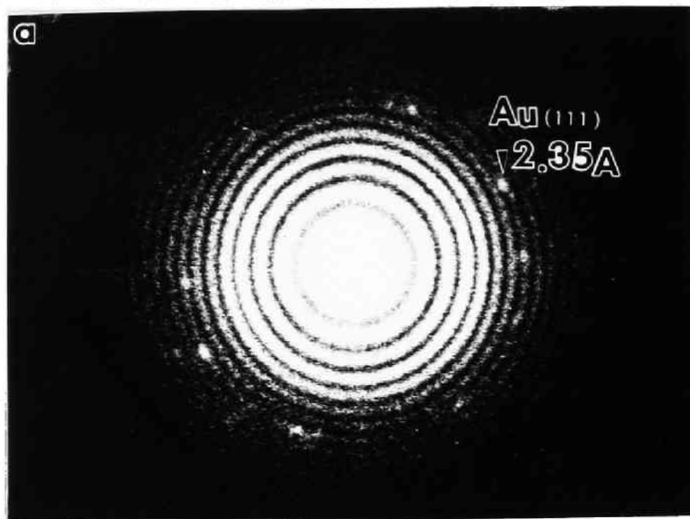
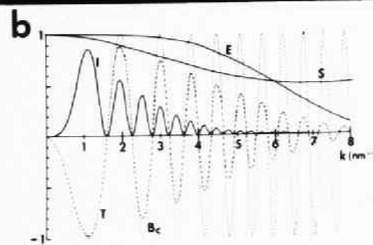


図2 HAREMによ  
って撮られた非晶質  
薄膜像の光変換像



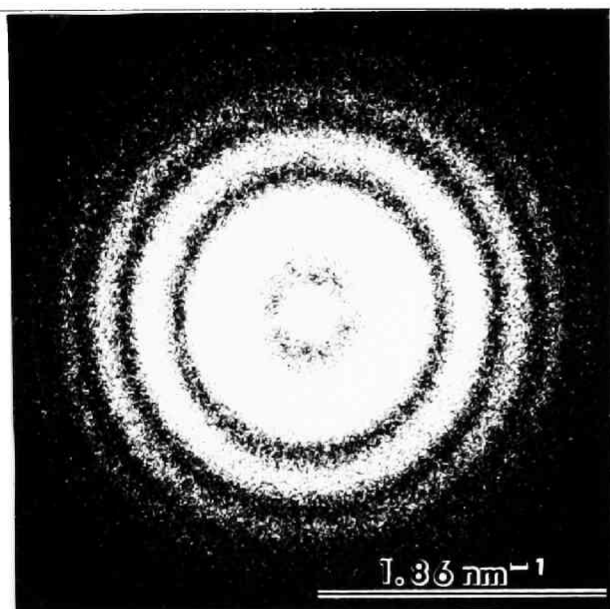


図3 Z=1.170nm で撮られた carbon 膜の光変換

$k_m$	1.86 nm <sup>-1</sup>
z	1170 nm
$F(\theta)=F(k_m)/F(0)$	0.876
$S(\beta_i)=\sqrt{0.05}/F(\theta)$	0.255
$\beta_i=\sqrt{2nS^{-1}}/\pi z k_m$	1.7x10 <sup>-4</sup> rad

表1 図3から  $k_m$  を測定して照射角を求めた例

B	3.4x10 <sup>5</sup> Amp/cm <sup>2</sup> str
J	2.9x10 <sup>-2</sup> Amp/cm <sup>2</sup>
$\beta_i=\sqrt{J/\pi B}$	1.6x10 <sup>-4</sup> rad

表3 表1と同一条件の照射角を輝度不変の法則から求めた例

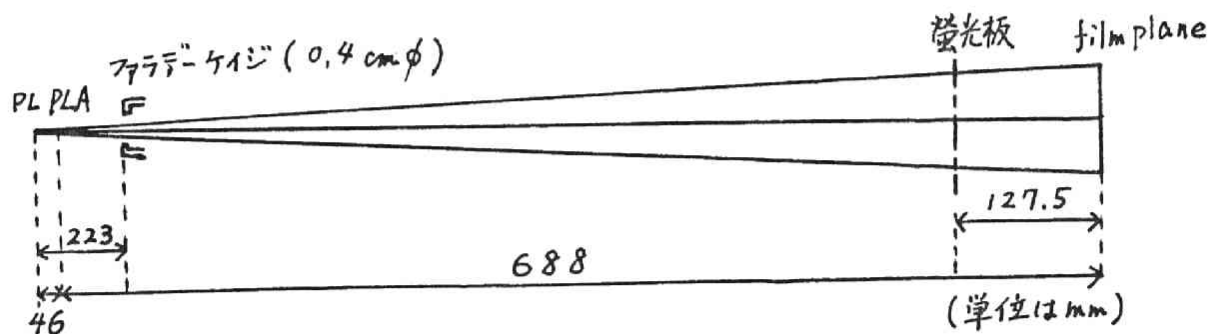


図4 Faraday cage等の配置

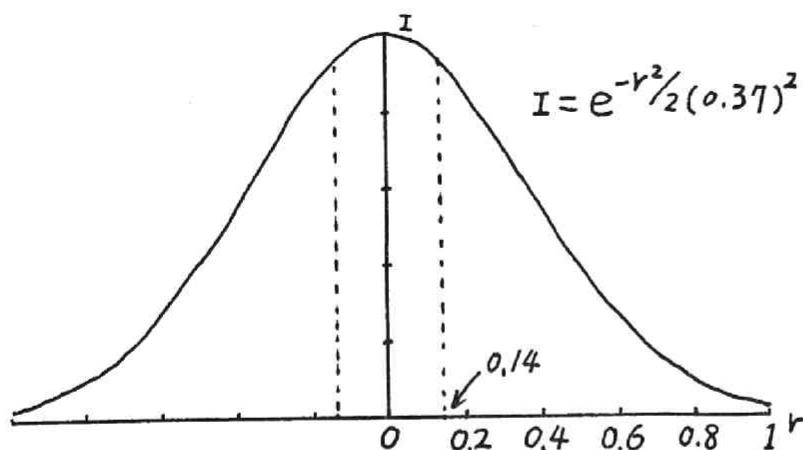


図5 電子線源の形  
 $\sigma = 0.37$  のガウス分布

Faraday cage に入 るビーム半径( $P_x$ )	$P_x/P_0 = \gamma$	測定電流 ( $I_x$ Amp)	$I_x/r^2$
$9.5 \times 10^{-5} = P_0$	1.0	$3.0 \times 10^{-9}$	$3.0 \times 10^{-9}$
$6.6 \times 10^{-5}$	0.69	$2.5 \times 10^{-9}$	$5.2 \times 10^{-9}$
$3.3 \times 10^{-5}$	0.35	$1.1 \times 10^{-9}$	$9.0 \times 10^{-9}$
$2.2 \times 10^{-5}$	0.23	$5.4 \times 10^{-10}$	$1.0 \times 10^{-8}$
$1.3 \times 10^{-5}$	0.14	$2.1 \times 10^{-10}$	$1.1 \times 10^{-8}$
$8.8 \times 10^{-6}$	0.093	$9.8 \times 10^{-11}$	$1.1 \times 10^{-8}$
$6.6 \times 10^{-6}$	0.069	$5.5 \times 10^{-11}$	$1.1 \times 10^{-8}$
$3.3 \times 10^{-6}$	0.035	$1.3 \times 10^{-11}$	$1.1 \times 10^{-8}$

表2 Faraday Cage に入  
るビーム半径と測定電流

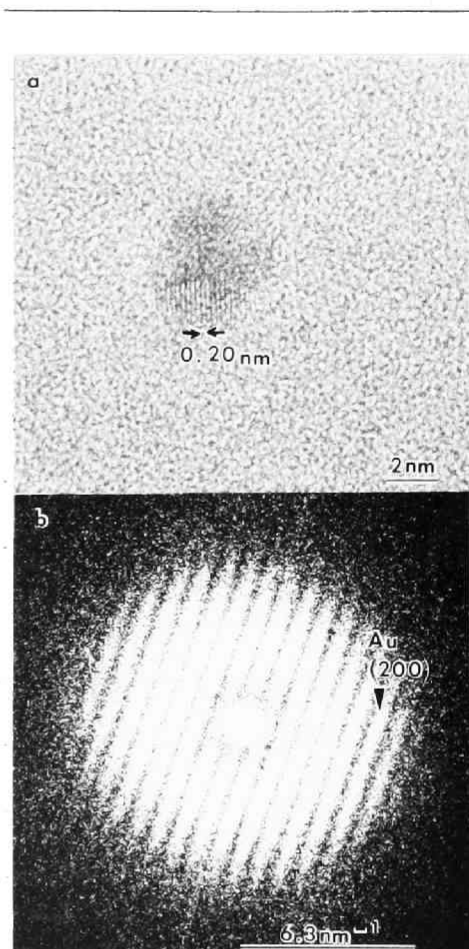


図6 a. Scherzer focus  
 で撮られた  $t = 30 \text{ \AA}$  の  
 Carbon 膜の像と  
 金粒子の格子像  
 b. young's fringe で  
 示した光変換像  
 c. 伝達関数

	ヘアピン フィラメント	アロータイプ フィラメント	ポイント フィラメント	ランタン ヘキサボライ ド
エネルギー分布 (eV)	~4	~3	~3	~2
輝度 (Amp/cm <sup>2</sup> str)	$5 \times 10^5$	$\sim 1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$5 \times 10^6$
寿命 (h)	100	30	8	?

表5 フィラメントの種類による、エネルギー分布、輝度、寿命

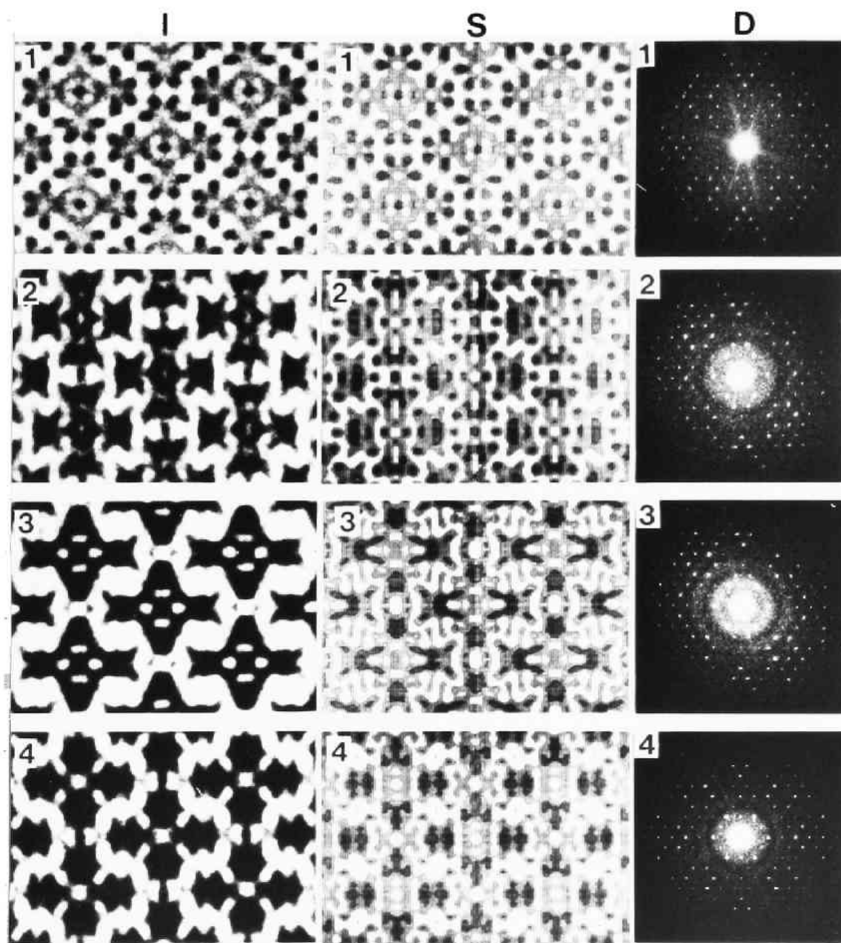


図7 増倍タングステン銅の電顕像(I)と、計算機によるシミュレーション像(S)およびIの光変換図形(D).  
1は最適焦点条件, 450 Å アンダーフォーカス 2, 3, 4 はそれぞれ 1000 Å, 1600 Å, 2000 Å アンダーフォーカス

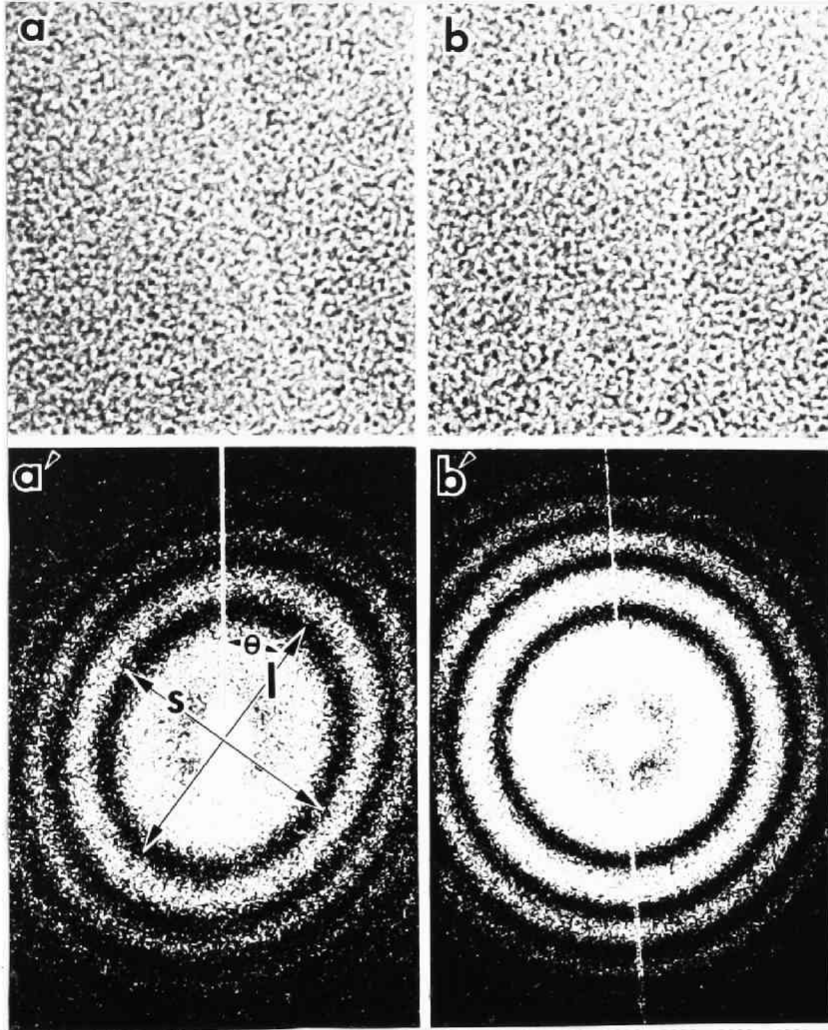


図8 非点収差補正の方法。

a, b; カーボン膜の電顕像。これらを光変換すると、それぞれ a', b' となる。a, a' は  $800 \text{ \AA}$  の非点収差がある場合、b, b' は光変換による非点補正された結果

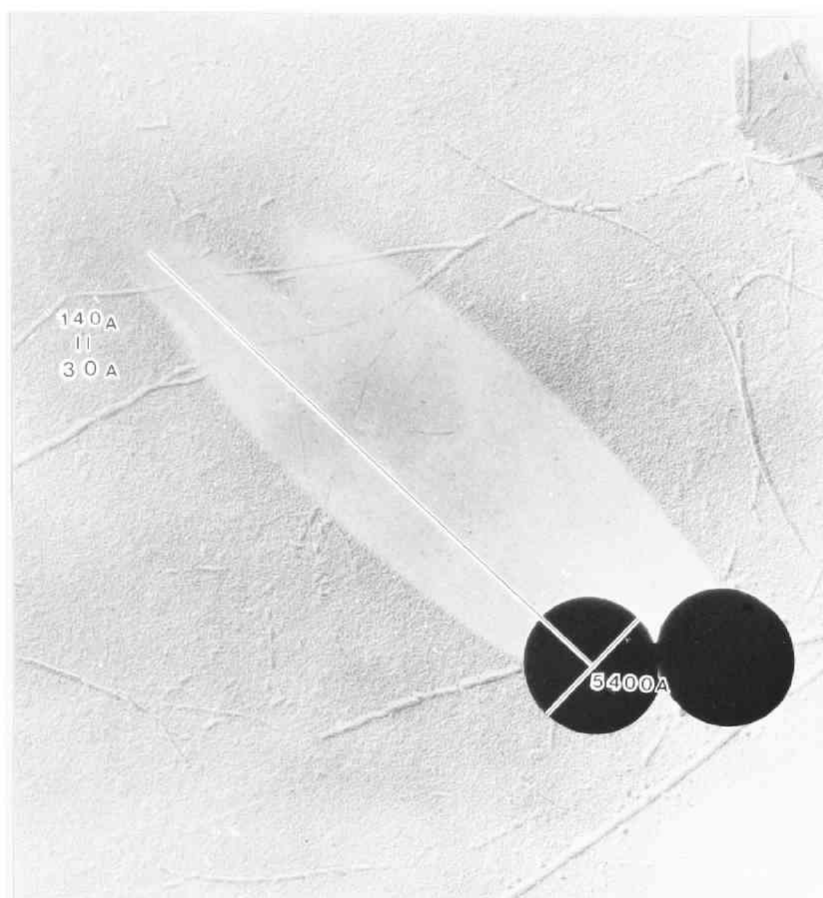


図 9 酸化バナジウム Bilty sol の繊維状結晶の厚さ測定



図10 間接蒸着の仕方。Cからカーボンを加熱蒸発させ、Tを直接マイカMに蒸着されるカーボンをさける。Sはスライドガラス



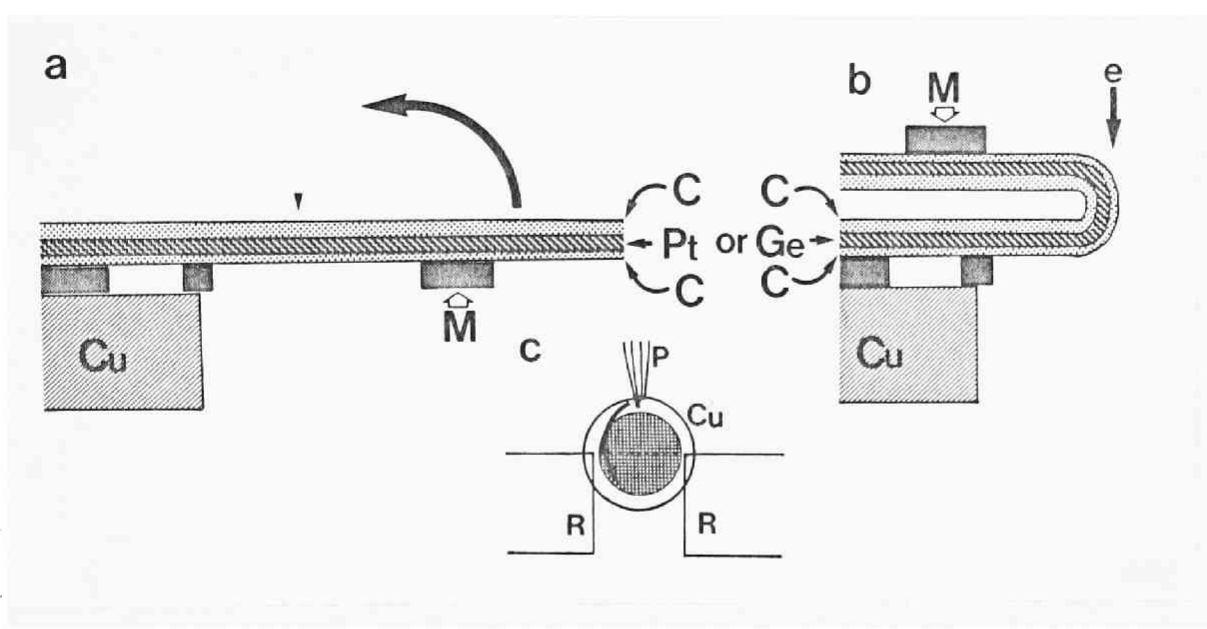


図11 「折曲げ法」の説明

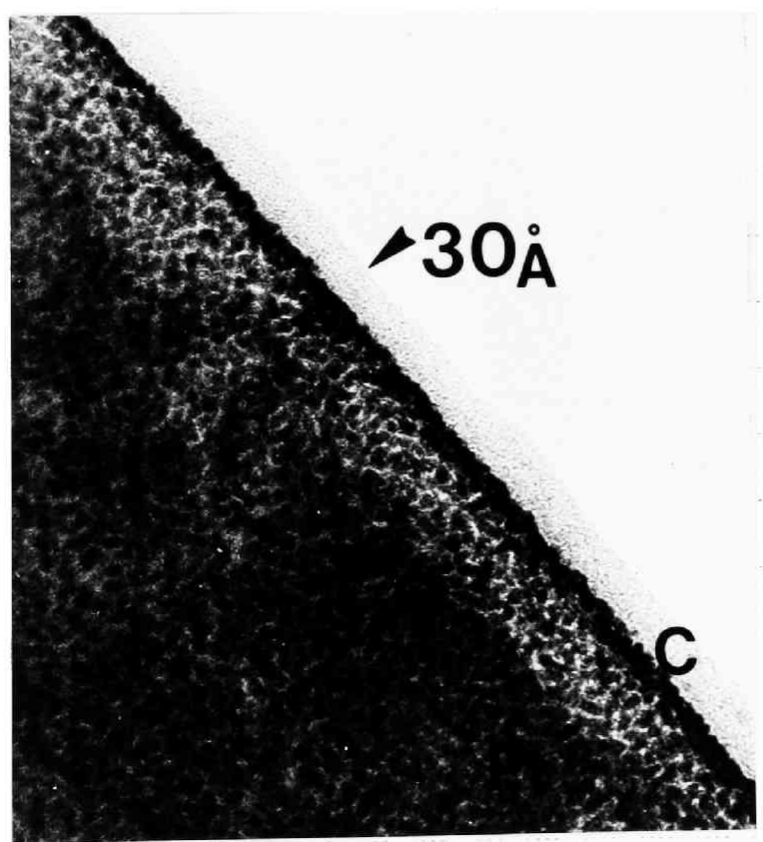


図12 「折曲げ法」によるカーボンの膜厚測定

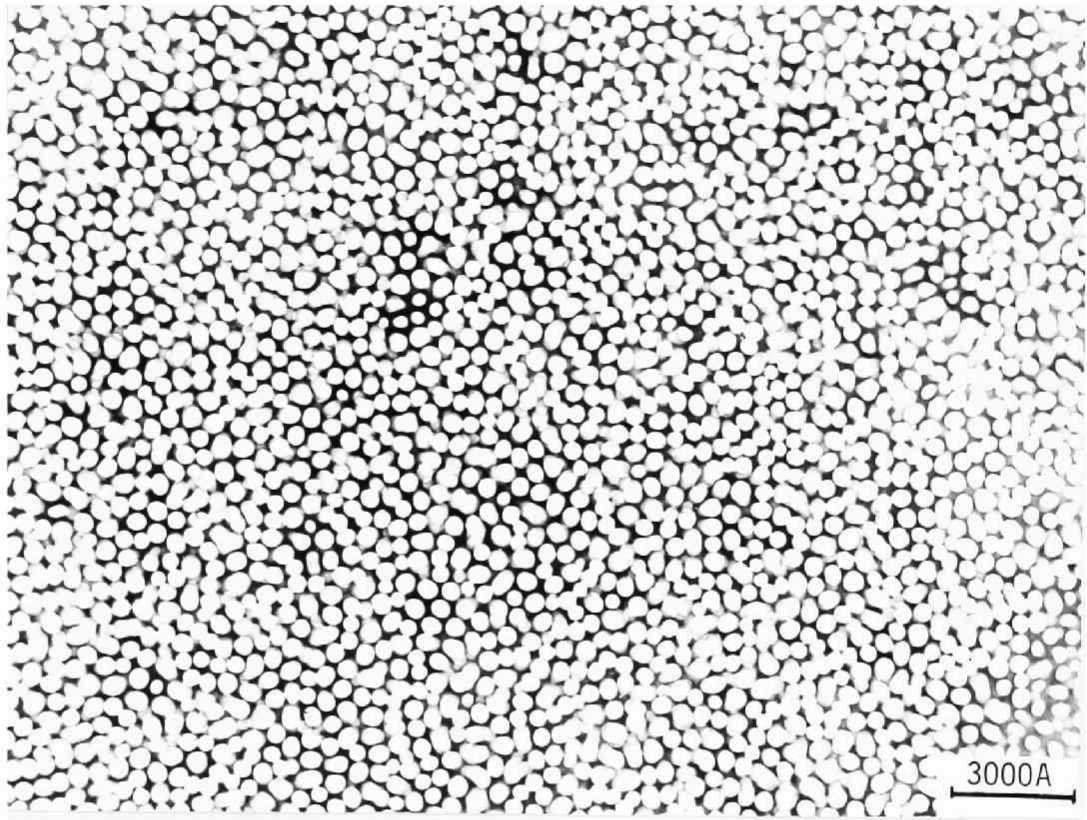


図13 アルミナスーパーマイクログリッド

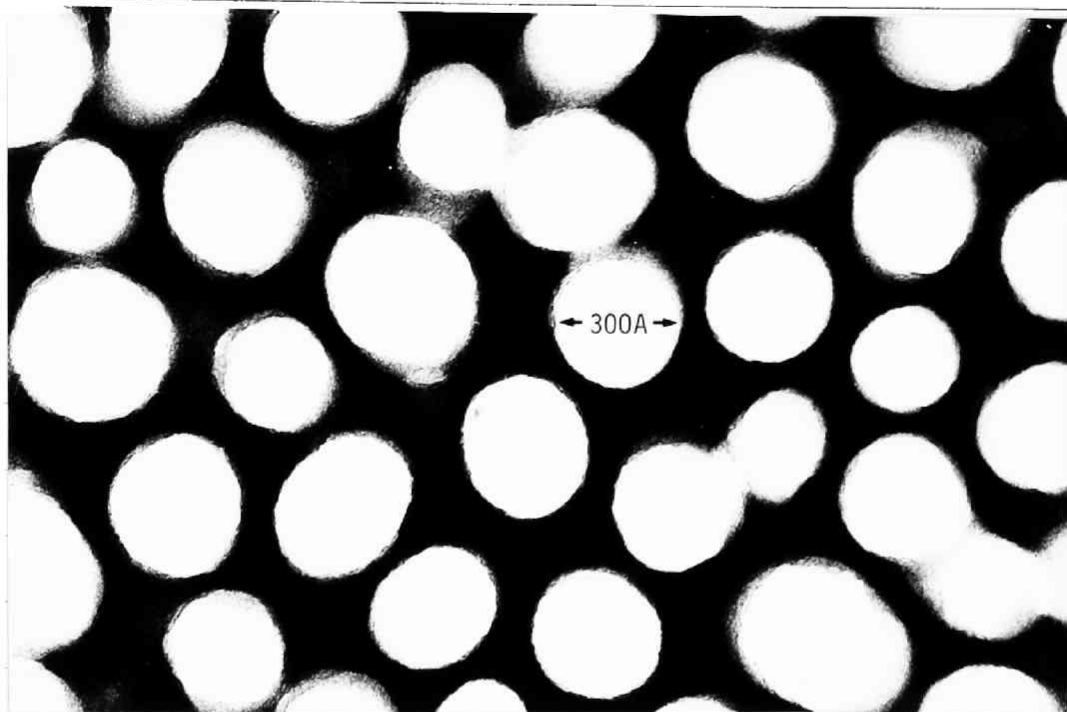


図14 300 Å の孔径のアルミナスーパーマイクロ  
グリッド

純粋なアルミナ箔  
(2cm×1cm×30μm)  
↓  
表面酸化膜除去  
[1% NaOH・80℃]  
↓  
1% HNO<sub>3</sub>  
↓  
蒸溜水  
↓  
陽極酸化  
(15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30秒)  
↓  
中和  
(1% NH<sub>3</sub>・OH)  
↓  
水洗  
↓  
表面を切る  
(2mm×2mmの格子状)  
↓  
剝離  
[HgCl<sub>2</sub> 1分]  
↓  
蒸溜水  
↓  
1% HCl  
↓  
蒸溜水  
↓  
Moメッシュへ接着  
(ネオアレンW)  
↓  
エッチング  
[3NHCl 15分]  
↓  
蒸溜水  
↓  
中和  
↓  
水洗  
↓  
カーボン(金)蒸着  
(伝導性を増す)

図15 ASMの  
作製法を示す  
フローチャート

試料	非晶質膜				結晶性水酸化			マイクロドリッド			
	ホルムアルデヒド	カーボン膜	間接蒸着カーボン膜	アルミナ膜	ホウ酸	グラファイト	アイソシアナリド	ペリウラムオキサイド	マイクロドリッド	アルミナマイクロドリッド	ホーロンフィルム
ノイズの低減	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
超音波洗浄の向き	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
電子管に対する安定性	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
微小試片の支持	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
自吸の向き	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表6 試料支持膜の比較

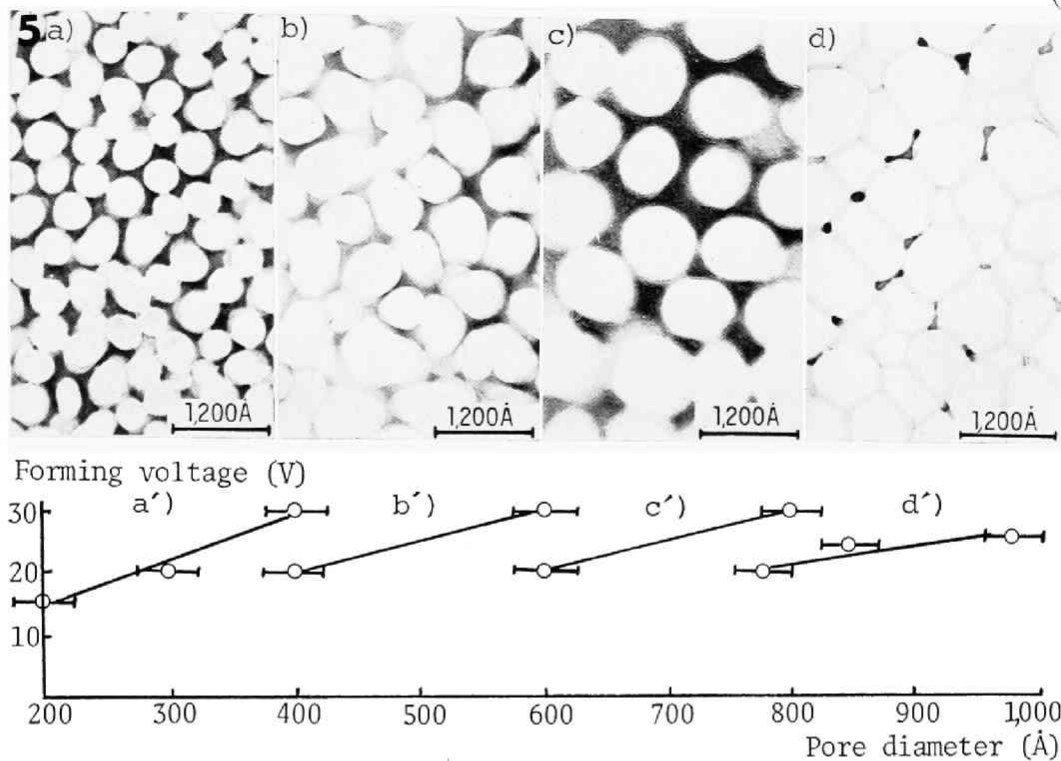


Fig. 16. Control of hole size.

a), a') 15% sulfuric acid, 20°C, 20 V; b), b') 8% oxalic acid, 20°C, 20V; c), c') 10% chromic acid, 40°C, 30V; d), d') 12% phosphoric acid, 20°C, 20 V.

図16 200 Å ~ 1000 Å の任意の孔径の A S M を作製するための電解液と酸化電圧の条件

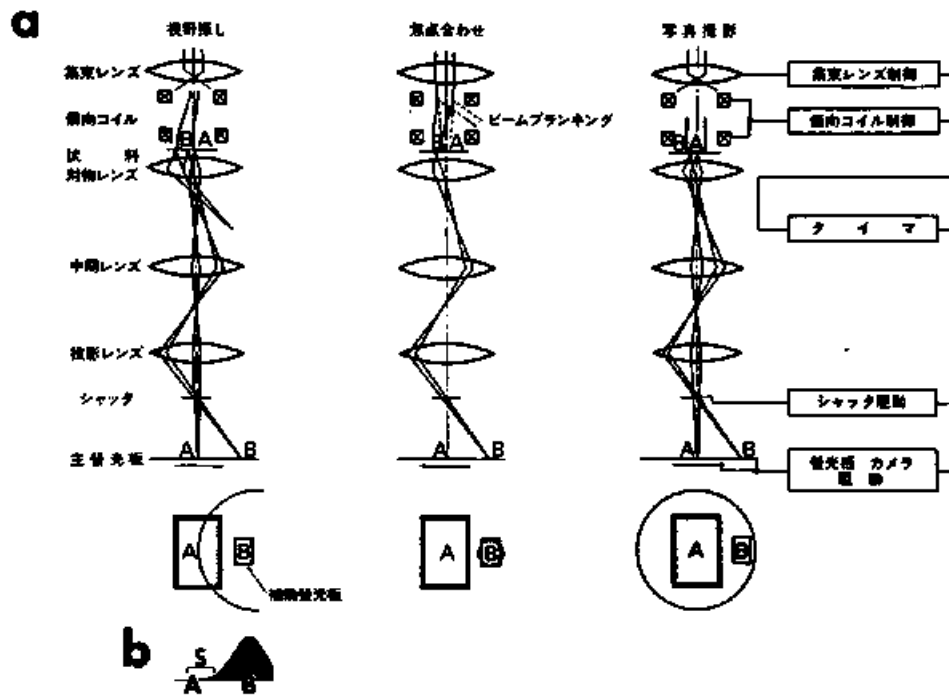


図17 Minimum Dose System の原理図

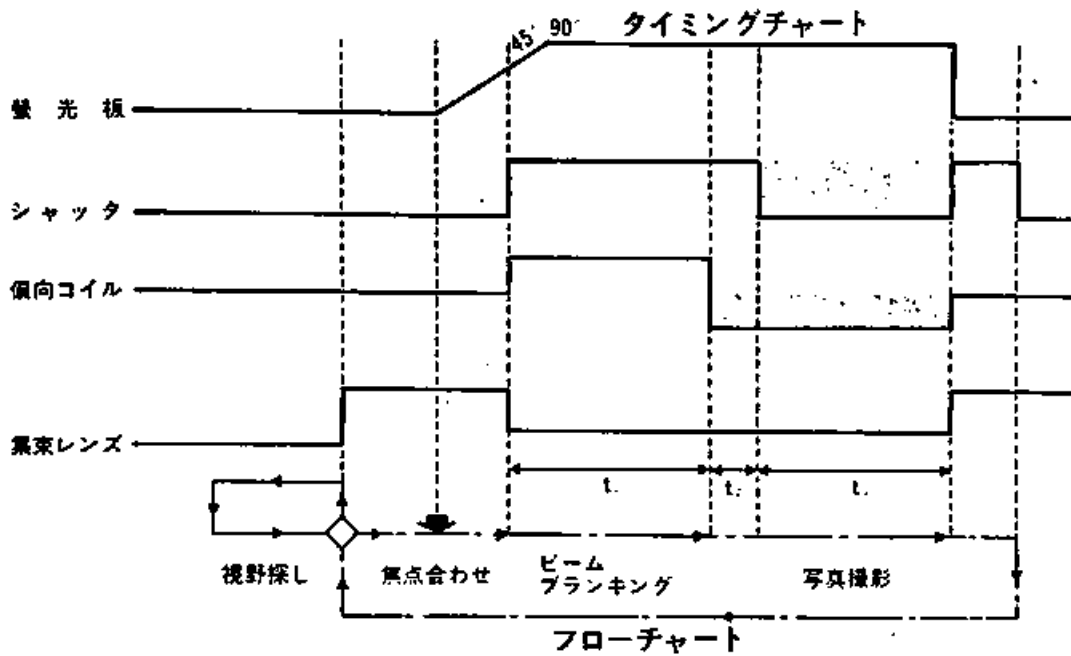


図18 MDSの各部分の動きに関するタイミングチャート、およびフローチャート。↓は、写真撮影用ボタンを押す

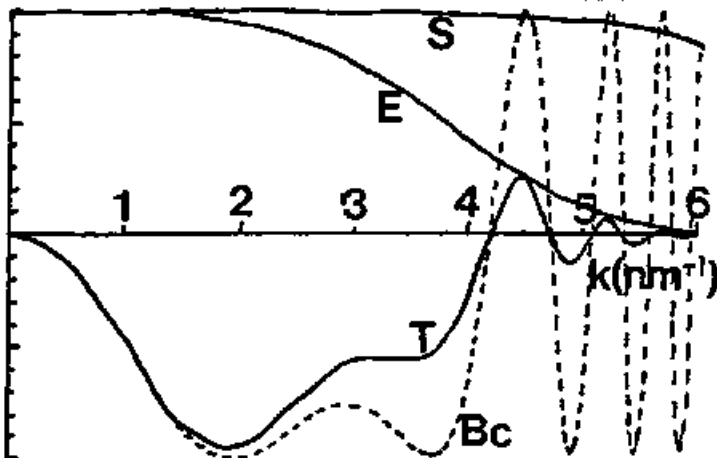


図19 JEM200CXの最適焦点条件における伝達関数と減衰関数。

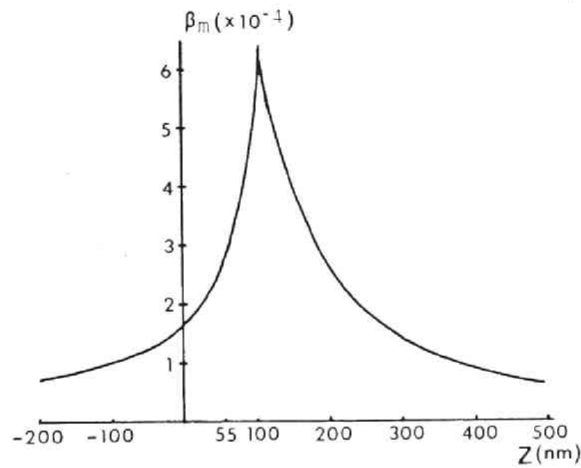


図20 JEM-200 CXの各焦点条件において許される最大の崩き角を求めるグラフ

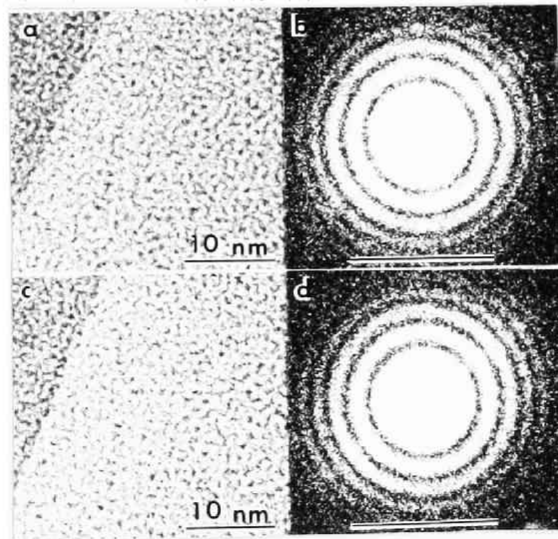


図22 MDSを用いた場合(a, b)と用いない場合の分解能テスト



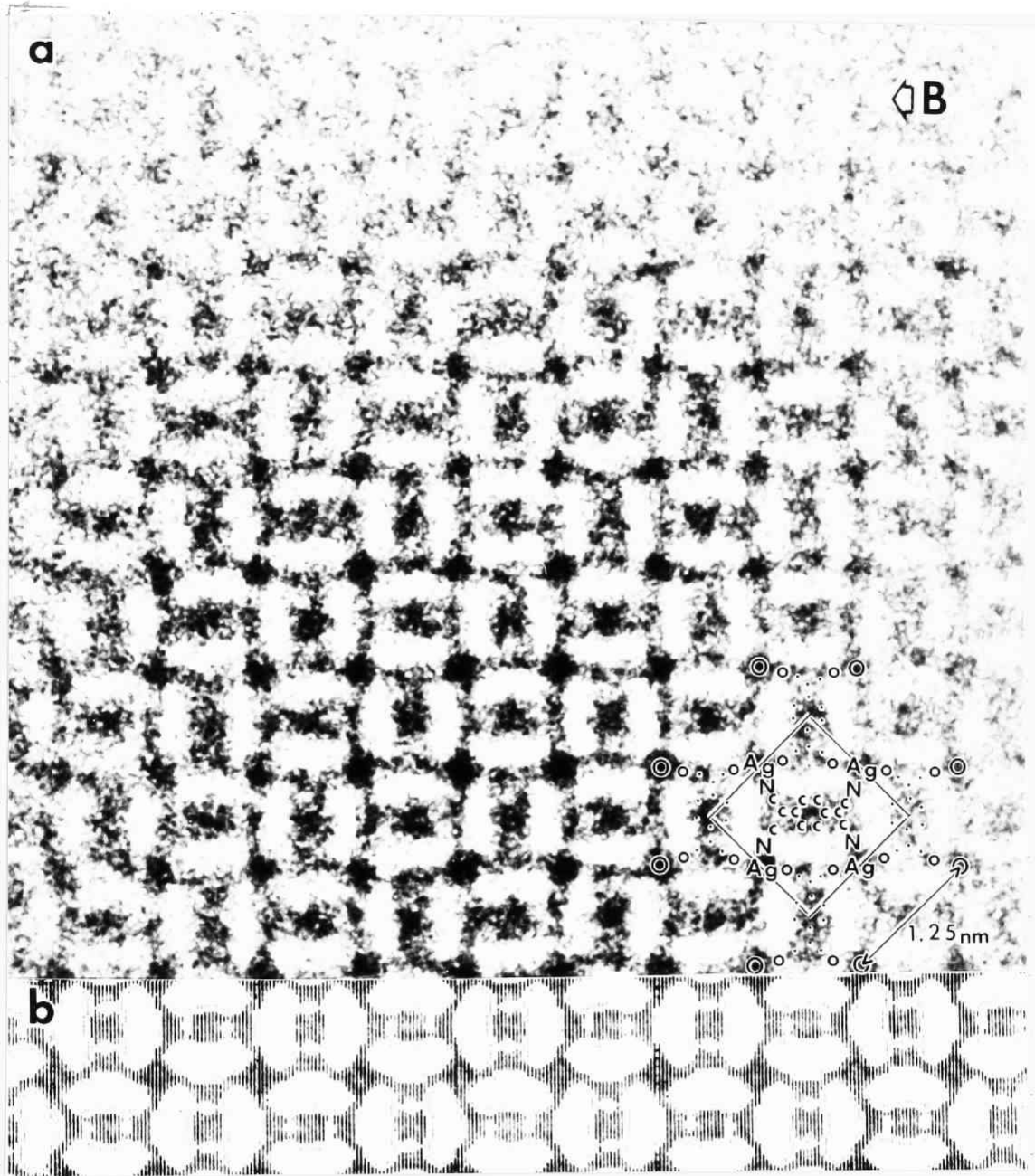


図21 Ag-TCNQ結晶の高分解能像と計算機によるシミュレーション

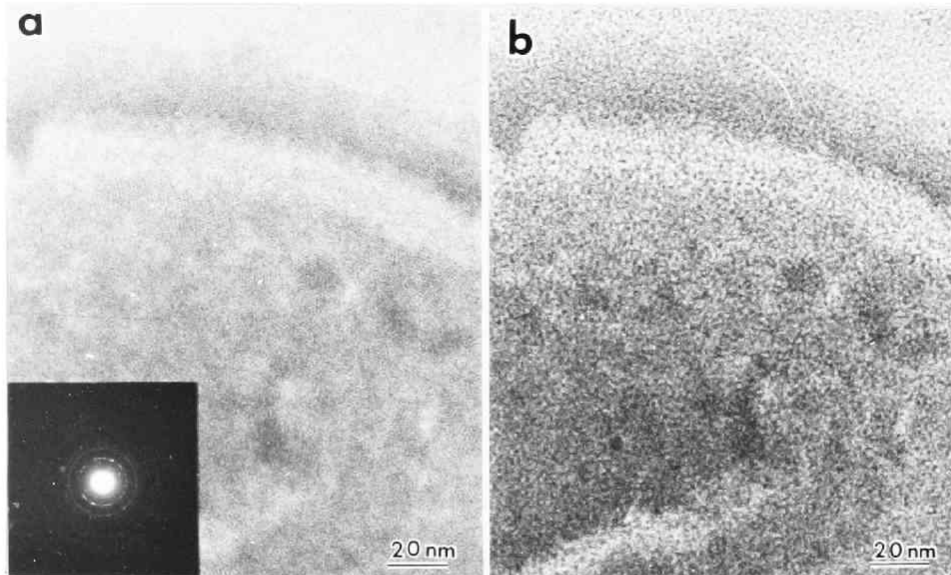


図23 a. リンタンゲステン酸で染色したウィールスをMDSを用いて撮影した像, および電子線回折図形。 b. MDSを用いずに撮影した像

---

Imaging condition of Ag-TNCQ

---

JEM-200CX + MDS	
Acc. Volt.	200 kV ( $\lambda = 2.5 \times 10^{-3}$ nm)
Spherical aberration coefficient $C_s$	1.2 mm
Filament	Pointed filament
Energy spread $\Delta$	15 nm
Illuminating angle $\beta_i$	$1 \times 10^{-4}$ rad
Magnification $M$	190,000
Current density $J_s$	0.23 A/cm <sup>2</sup>
Exposure time $t_3$	0.7 s
Total end-point dose	0.3 C/cm <sup>2</sup>
(Total dose $J_s \cdot t_3$ )	0.16 C/cm <sup>2</sup> )
Defocus condition $\Delta z$	55 nm
EM film	Fuji F.G.
Developer	Kodak D-19

---

表7 Ag-TNCQ を撮影する条件

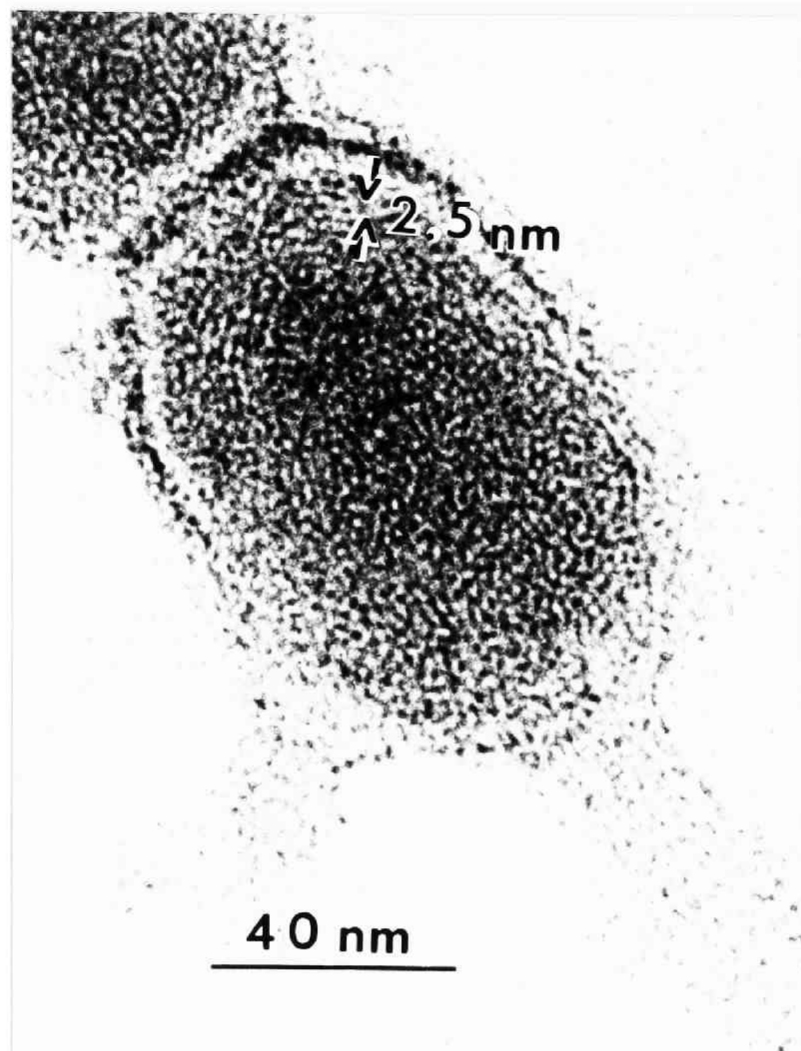


図24 T<sub>4</sub>ファージ頭部を酢酸ウランで染色し、MDS  
を用いて撮影した像

## II 高分解能電顕法によつて得られた結果

I章において述べられた、高分解能電顕法により、原子像の直接観察が可能となった。ここでは有機、生体試料の結果について述べるが、無機結晶、例えば、酸化バナジウム結晶においても、図25に示すように、酸素原子の位置を直接観察することによつて、結晶構造が明らかにされた。<sup>36)</sup> 図25aには電顕像を明らかにされた構造も示す。bにはこの構造を仮定して計算したシミュレーション像を示す。この結晶は、Bilz sol中の繊維状の形態をしており、高分解能電顕法以外に、構造解析が不可能なものであった。

## II-1 塩化フタロニズニ銅結晶の原子レベル の像<sup>37)</sup>

塩化フタロニズニ銅は、塩素化されていながらフタロニズニより30倍程度も電子線に対して安定であり、total end point dose は約30 C/cm<sup>2</sup>であることが知られており<sup>38)</sup> Uyeda 等<sup>2)</sup>によつて、1970年にこの分子像が撮影されていゝる。またHAKEMの性能を最高に發揮した時、この塩化フタロニズニ銅がどのように観えよかの予測をIshizukaとUyeda<sup>4)</sup>は行なつていゝる。その結果中心の銅と16個の塩素が分離して観察できるといふことが期待された。しかし、HAKEMを用いたもこの結晶の原子レベルの分解能の

像は得られなかった。<sup>39)</sup> I章で述べた高分解能像撮影のすべての条件を満すことにより、はじめに図26に示すような、原子レベルの像が得られるわけである。

### II-1-1 塩化チタロシズニ銅結晶のC軸投影

塩化チタロシズニ銅の結晶は、塩化ナトリウムや塩化カリウムの劈開面にエピタキシャル成長させたものである。<sup>40)</sup> その厚さはI-6で述べたシャドウイング法で測定して、約30 Åと求められた。格子定数は  $a = 19.62$ ,  $b = 26.08$ ,  $c = 3.76$  Å,  $\beta = 116.5^\circ$  で、空間群は  $C2/c$  と決定されている。この結晶の分子の配列は図27に示すように、分子像を観察するために

はC軸に平行に電子線が入射されるように、正確に結晶を傾斜させる必要がある。このため、 $26.5^\circ$ 傾斜した試料ホルダーを製作し、その傾斜軸が正確に結晶のb軸に合うように方向を決めて試料を置くなければならない。電子線回折で結晶の傾きを検査しつつ、試行錯誤により、試料セットを行なった。試料が傾斜しているのを、最も良い好物レンズの球面収差係数と色収差係数になる試料位置に、焦点の合う好物レンズの電流値を前もって知り、その高さの位置にある試料だけを撮影する。傾斜の軸と試料微動の軸を合わせなおいて、試料の高さが変化しない方向に試料微動ができるようにしておく。制

限視野回折法を用いて、正確にC軸投影になる結晶の視野選択を行なう。

## II-1-2 高分解能像の撮影

撮影しようとする結晶に電子線が照射されなくなるように、しかも試料の高さが変化しない方向に試料を移動し、良い傾きの結晶の近傍において、光軸合せや非点収差補正を行なう。このためにはI-5で述べた非点補正法を用いる。非点量が $50\text{\AA}$ 以下まで補正できたことを確認する。この時、光変換のペターンからI-2で述べたように空間周波数限界を測定して、電顕の調子を検査しておく。充分電流密度を減らして、目的の試料部分を蛍光板の中心へ移



動する。像を撮影する条件において、エミッションを切り、電圧を安定化させる。加速電圧と、対物レンズの安定性を調べておき、同時に完全に部屋を暗くして、目を暗さに馴れさせる。その後、充分暗い条件で焦点を合わせ、through focusの像を撮影する。26.5°の傾きがあるので、直接倍率20万倍で、59×82 mmのフィルムでは約1400Åの焦点範囲が一枚のフィルムに撮られる計算になるが、結晶が平らでなく、曲がっているため、フィルムの全範囲でC軸投影の結晶の像は得られない。このため、200 Å間隔のthrough focus seriesを撮影する。Kodak SO-163をD-19で現像した時のフィルムのMTFから、H

A R E M の分解能  $1.4 \text{ \AA}$  を保証する倍率は 15 万倍以上であると計算される。安全性をみて直接倍率は 20 万倍とした。電流密度  $J = 4.4 \times 10^{-3} \text{ Amp/cm}^2$  とし、フィルムの濃度  $OD = 0.4$  とするには 7 秒の露光時間を必要とする。この条件で、20 枚の *through focus series* を撮影するには、フィルム送り等の時間を考慮して、約  $17 \text{ C/cm}^2$  の電子線を試料に照射することになる。塩化 77 ロニウム銅の *total end point dose* はおよそ  $30 \text{ C/cm}^2$  であるので、半分程度の総照射量で像を撮影できる。*through focus series* の枚数を多くしてやる理由は、少ない電流密度（暗い状態）で焦点合せを行なうため、正確な焦点合せが不

可能だからである。(この時、MDSは存在しなかった) 試料照射角 $\beta_i = 6.3 \times 10^{-5} \text{ rad}$ で充分平行な電子線であるので、減衰関数 $S(\beta_i)$ によつて情報を失うことはない。以上の像撮影条件を表8に示す。

このようにして撮影した像は図28aに示すように低コントラストで、ノイズの多い( $S/N$ の低い)像である。しかし、結晶の周期性に従つて、図28aのCu1(銅原子)をCu2に、Cl1(塩素原子)をCl2に平行移動によつて重ね焼きの像処理を行なうと図28bのような $S/N$ の改良された像が得られる。原子が観察されている像であるため、正確な重ね焼きが可能である。

最適焦点条件の像を図26aに示す。bには計算機

によるシュミレーション像を示す。図26aの右下には塩化フタロシアニン銅分子の構造を重ねて示してある。図26から、中心の銅原子と16個の塩素原子の“柱”を完全に分離して観ることができ、ホルファイリン環も観察される。図29には、代表的な焦点条件における像と、それと対応するシュミレーションを示す。I-3において議論したが、わずかな焦点変化量で像が変化することから、逆にこれらの像は高角側の情報が結像に用いられている。すなわち、これらの像は高分解能であることを示している。図7に示した、through focusのそれぞれの像の光変換像を観ると、塩化フタロシアニン銅結晶の“裏打ち”

をしたカーボン膜の光変換像と、結晶の回折点を重ねてみられる。I-Zにおいて述べたように非晶質の光変換は、(6)式で示すように、伝達関数と密接に関係している。図7の結晶からの回折強度は、カーボンの光変換パターン強度の変化と対応して変化している。例えば、図7の1の *Scherzer's focus* において、低角側の回折点の強度は弱くなっているし、他の焦点条件における黒いリングの所でも回折点の強度は弱くなっている。このことから、高分解能像を撮影した結晶は弱位相物体近似が成り立つほど十分に薄いということを示している。それゆえ、図26のような、分子構造をそのまま可視化した像が

得られたのである。図29において、撮影された像と、シミュレーション像とがかなり良く一致しており、用いたパラメータの値を支持しているように思われる。ただし焦点はすれの像において、一致しない部分も存在するが、これは、パラメータの精度の問題と同時に、さらに多くのパラメータをシミュレーションの時考慮に入れる必要があることを示唆している。

増化フクロシニアニ銅の像<sup>37)</sup>はI章で検討した、分解能を制限するすべての因子を克服してはじめて得られるもので、この像はこれまで得られた電顕像の中で最も分解能の高いものである。この像撮影の

意義は、原子柱を完全に分離して観察できたということに加えて、高分解能電顕法の確立という点で重要である。

II-2 電子線損傷を受け易い試料の高分解能像<sup>33)</sup>  
 前に述べた塩化フタロンニッケル銅の像は塩化フタロンニッケル銅結晶が有機物の中で電子線に対して最も安定であるという事実上支えられて、得られたものである。電子線に対して最も安定なこの結晶を以て、電子線損傷の高分解能像の撮影を防ぐため、熟練と、多くの努力なしでは、図26のような像を得ることはできなかった。まして、他の一般の有機結晶の高分解能像撮影は、不可能であった。実際に、

これまで、塩化フタロニズニ銅以外の有機物の高分解能像は得られていなかった。しかし、I-9で述べたMDSの開発により、芳香族有機結晶の高分解能像が得られたので、その結果を簡単に述べることにする。

### II-2-1 塩化フタロニズニの高分解能像<sup>33)</sup> (電顕+MDS)

I-7で述べた、 $30 \text{ \AA}$ の膜厚の间接蒸着カーボン膜に、塩化フタロニズニを真空蒸着することにより試料作製を行なう。I-9のMDS法の新で述べたように、撮影条件を決定する。すなわち、 $0.7 \text{ mm}$ の球面収差係数のホールコーズを備えた $100 \text{ kV}$ の電



顕の分解能は $2.6 \text{ \AA}$ であり、この分解能を保證する倍率は、フィルム $M$ の $M T F$ を考慮して、 $15$ 倍となる。また、この分解能の情報を劣化させない試料照射角は $\beta_0 = 2 \times 10^{-4} \text{ rad}$ である。この時の試料上における電流密度は $J = 0.5 \text{ Amp/cm}^2$ で、Fuji F. G. フィルムを $D-19$ で現像して、フィルムの濃度 $D = 0.5$ 程度にするための露光時間は $1$ 秒である。表9に示すように、あらかじめ条件を設定して、 $M D S$ を用いて、撮影した像は、図30に示すようなものである。 $M D S$ を用いると正確に焦点合せを行なうことのできるのを、一視野につき一枚の写真を撮影する条件を考慮して、表9は計算された。 $M D S$ を用いれば、

多くの高分解能像が比較的容易に得られる。重鉛フタロンアミン結晶の代表的な例を図30aのAおよびCに示す。Bはこれまで知られていない結晶で、bに拡大像を示す。用で示したフタロンアミンの分子の形を観察される列と、分子の形を直感的に認識される列が交互にみられる。この結晶構造は、分子の配列構造を仮定して、計算機によるシミュレーションを行ない、電顕像と比較するという方法で、明らか<sup>41)</sup>にされた。またCに拡大像を示すように、結晶の中心部分は分子の形が明確に認識できるが、結晶の周辺部分は、分子の形が不明になる。このような像が多く観察される。この微結晶は、周辺部分にお

いて分子の重なりが赤れているため、このように観察されるのであろう。図式的にその構造を図30Cに示してある。

図30AのAの部分には、フタロニアニン分子の形が孤立して観察される。これは単一の分子から予想されるコントラストより高いコントラストであるので、一枚のフタロニアニン分子ではなく、分子が積み重なった"分子柱"の像であらうと思われる。

ここに紹介した結晶は、電子線回折も含めて他の研究手段では、解析できないほど小さい結晶である。

MDSを用いた高分解能像によって、はじめて、その存在と構造が明らかになったものである。

## II-2-2 TCNQと金属の複合体<sup>33)42)</sup> (200KV電顕+MDS)

TCNQは多くの金属と複合体(Complex)をつくることについてはすでに Uyeda<sup>43)</sup>らによつて研究されたといえるが、これまでには、この試料が電子線損傷を受け易いことから、高分解能像を得ることができなかった。しかし、MDSを用いることによつて、I-9-bで銀とTCNQとの複合体結晶について述べたように、銀原子柱が直接観察できるようになった。撮影条件についても具体的にI-9-bにおいて述べた。銀との複合体以外にも、Al, Tl, Li等と、TCNQとの複合体の高分解能像が撮影された。図31に、銀とTCNQおよび、アルミとTCNQの複合体の高分解能

像を示す。aが銀と、bがアルミとの複合体であるが、いずれも、金属原子柱を分解して観察できている。TCNQのキノン環を同一濃度とした時、銀とアルミの濃度を比較すると、銀の濃度が高いことが明らかである。これは、電子線に関する原子散乱因子のちがいによるもので、“重原子”である銀の方が、アルミより高いコントラストで見られるわけである。

2.2 Åの分解能を仮定して、計算機によるシミュレーションを行なった結果と電顕像が、良一致を示すことから、これらの像は2.2 Åの分解能を有していることが理解される。この結晶の total end

point dose が  $0.3 \text{ C/cm}^2$  であるにもかかわらず、JEM 200 CX の電顕自身の分解能によつて、この像の分解能が制限されている事實は重要である。すなわち、より高分解能の電顕を用いれば、さらに高分解能の像が得られる可能性があるということである。ただ、高分解能になればなるほど、損傷の影響は大きくなる。この他に T<sub>4</sub> phase をはじめとした染色による生物試料の観察も行なつて<sup>35)</sup>いるが、I-9 で述べたように、染色した試料であつても、電子線損傷を受けるので、比較的高い分解能の議論をする場合には、電子線による損傷の問題に充分注意しなければならぬことが明らかになった。このことは、これまで

染色法で撮られた像からの結果について、再検討を要することを示唆している。

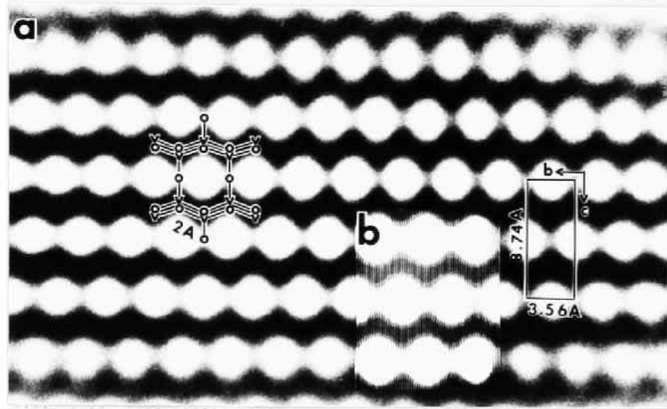


図25 a. 酸化ベンゼン結晶の高分解能像  
b. 計算機によるシミュレーション

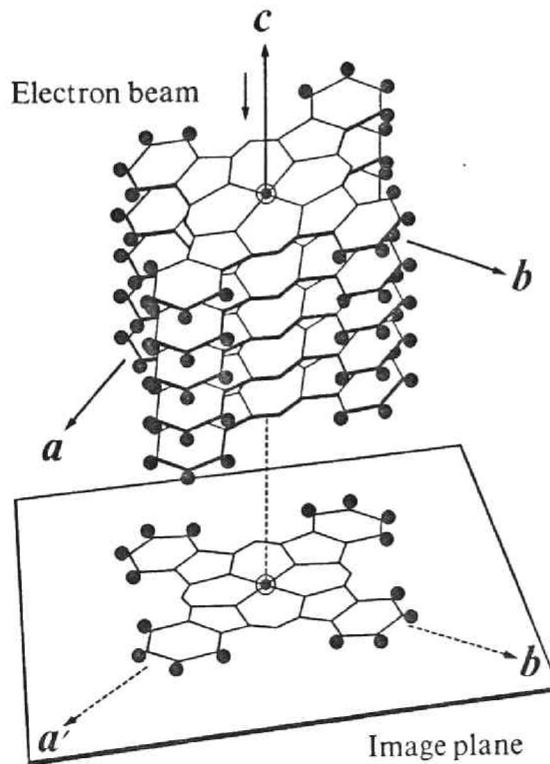


図27 塩化フタロシアニン銅の結晶構造における分子の配列と結晶軸の関係



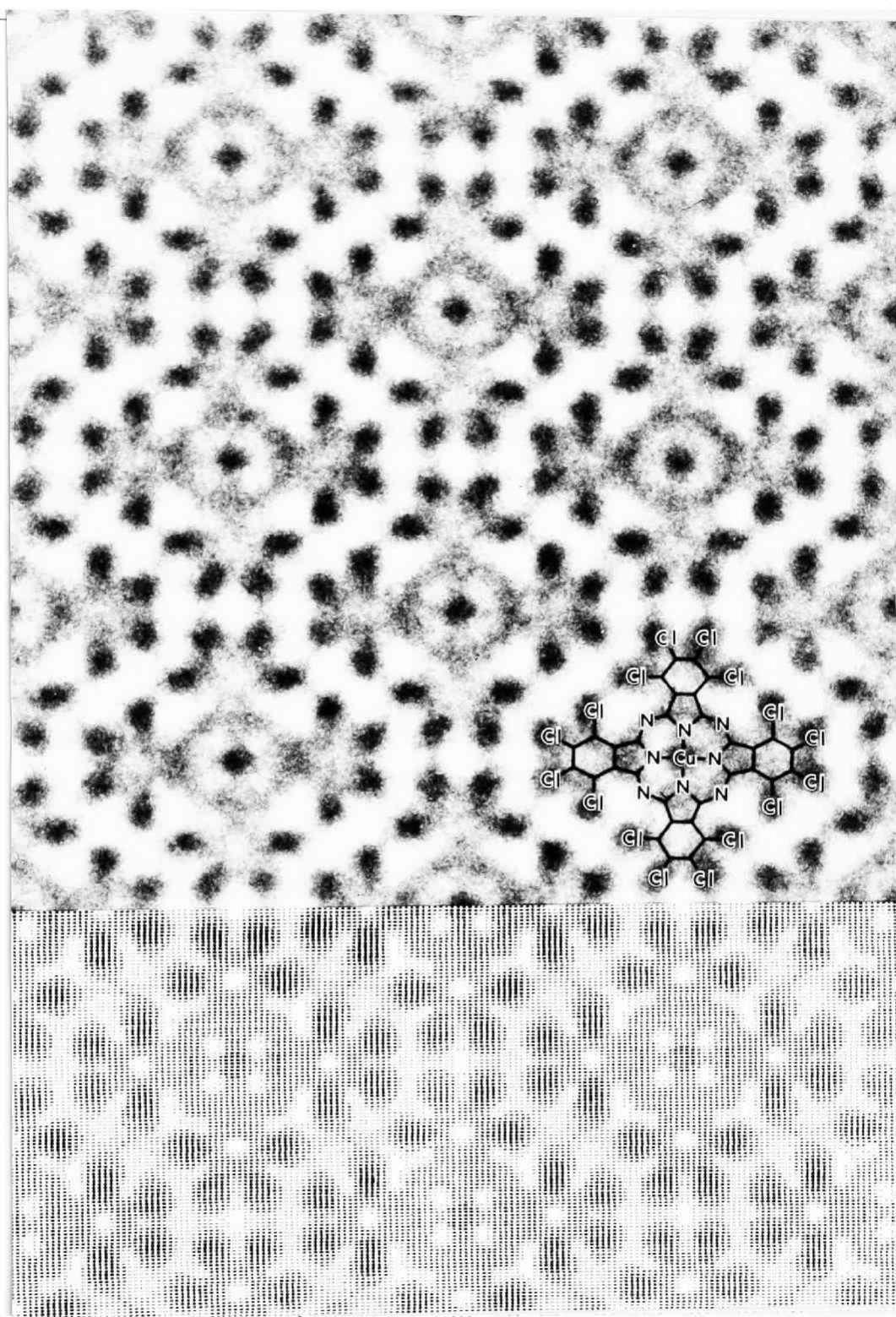


図26 塩化テトラロシミン銅の原子レベルの像

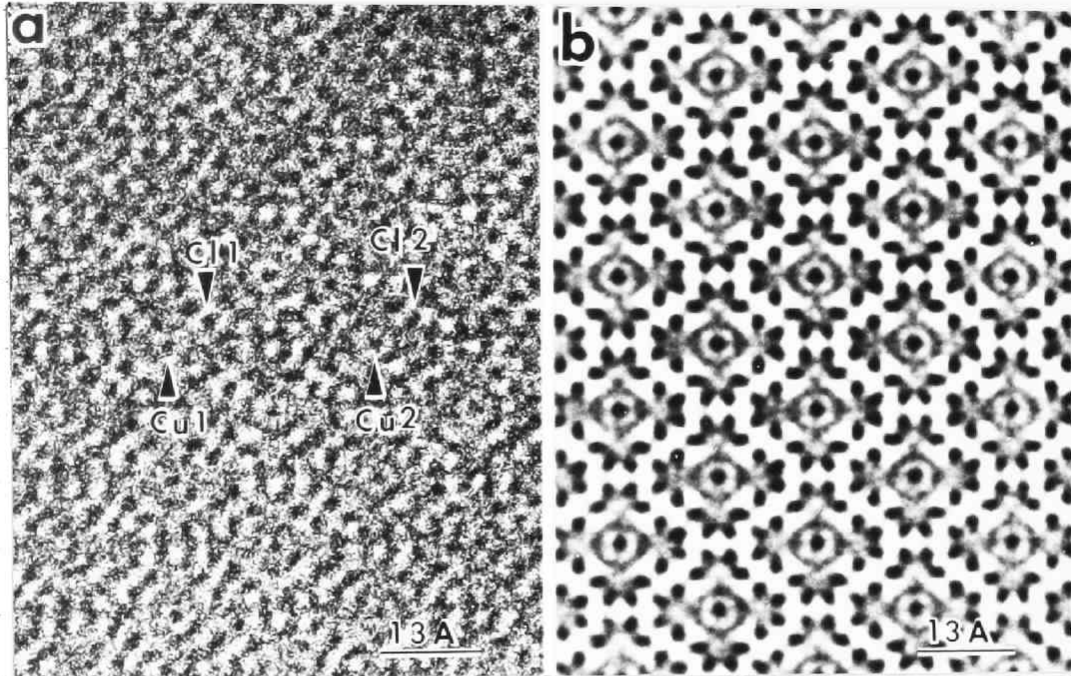


図28 塩化フタロシアニン銅の電顕像。

a. オリジナル, Cu(1)とCu(2), Cl(1)とCl(2)が重なるように平行移動して数10回重ね焼き処理を行なうとbの像が得られる。

Imaging condition of chlorinated Cu-phthalocyanine

HAREM	
Acc. Volt.	500kV ( $\lambda = 1.42 \times 10^{-3}$ nm)
Spherical aberration coefficient $C_s$	1.06mm
Filament	Arrow-type filament
Energy spread $\Delta$	7.4nm
Illuminating angle $\beta_i$	$6.3 \times 10^{-5}$ rad.
Magnification $M$	200,000 $\times$
Current density $J_s$	$4.4 \times 10^{-3}$ Amp./cm $^2$
Exposure time	7 s
Total end-point dose (Total dose)	30 C/cm $^2$
Defocus condition $\Delta z$	17 C/cm $^2$
EM film	45nm
Developer	Kodak SO-163
	Kodak D-19

表8 塩化フタロシアニン銅の撮影条件

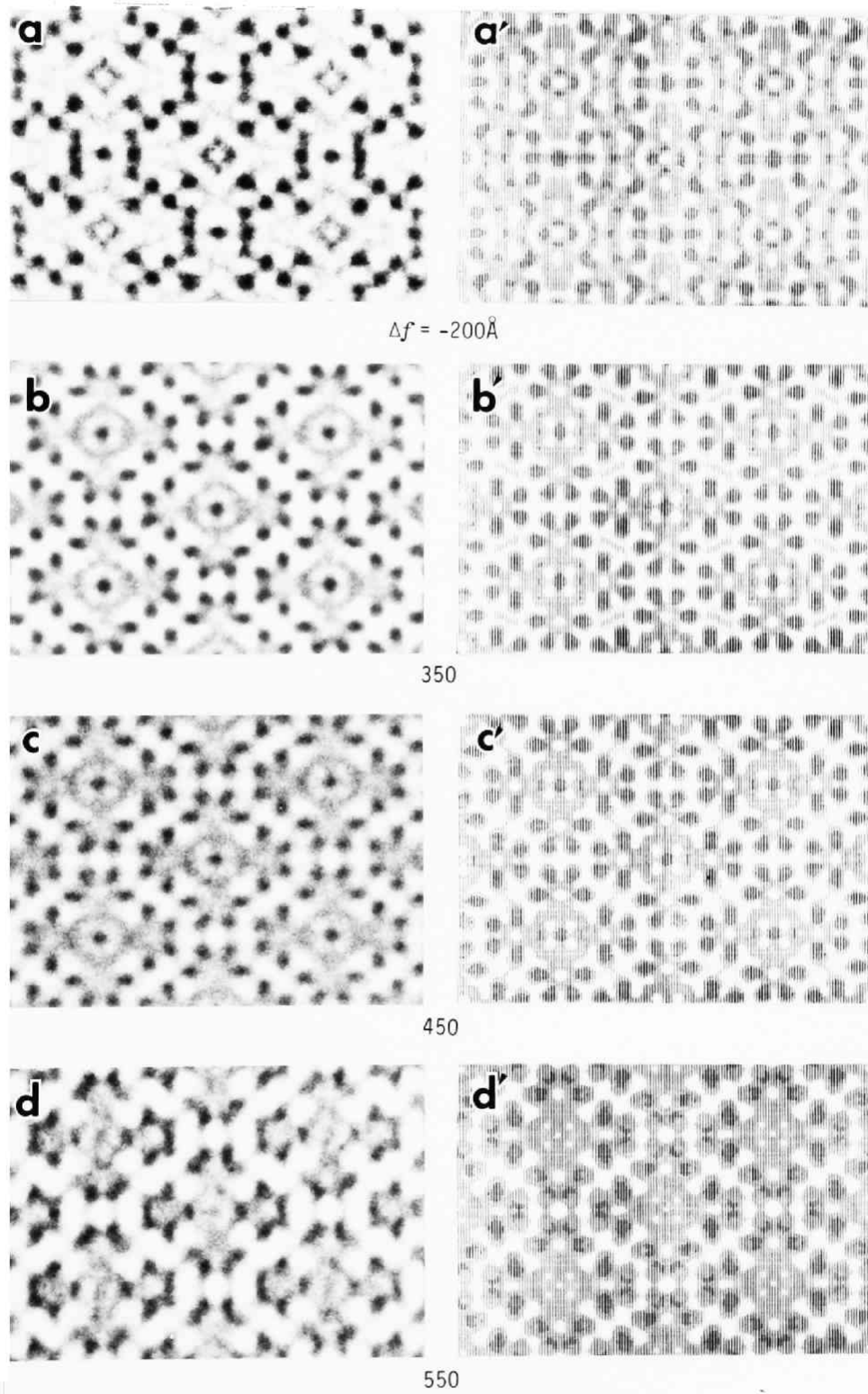


図29 塩化フタロシズニ銅の through focus 像

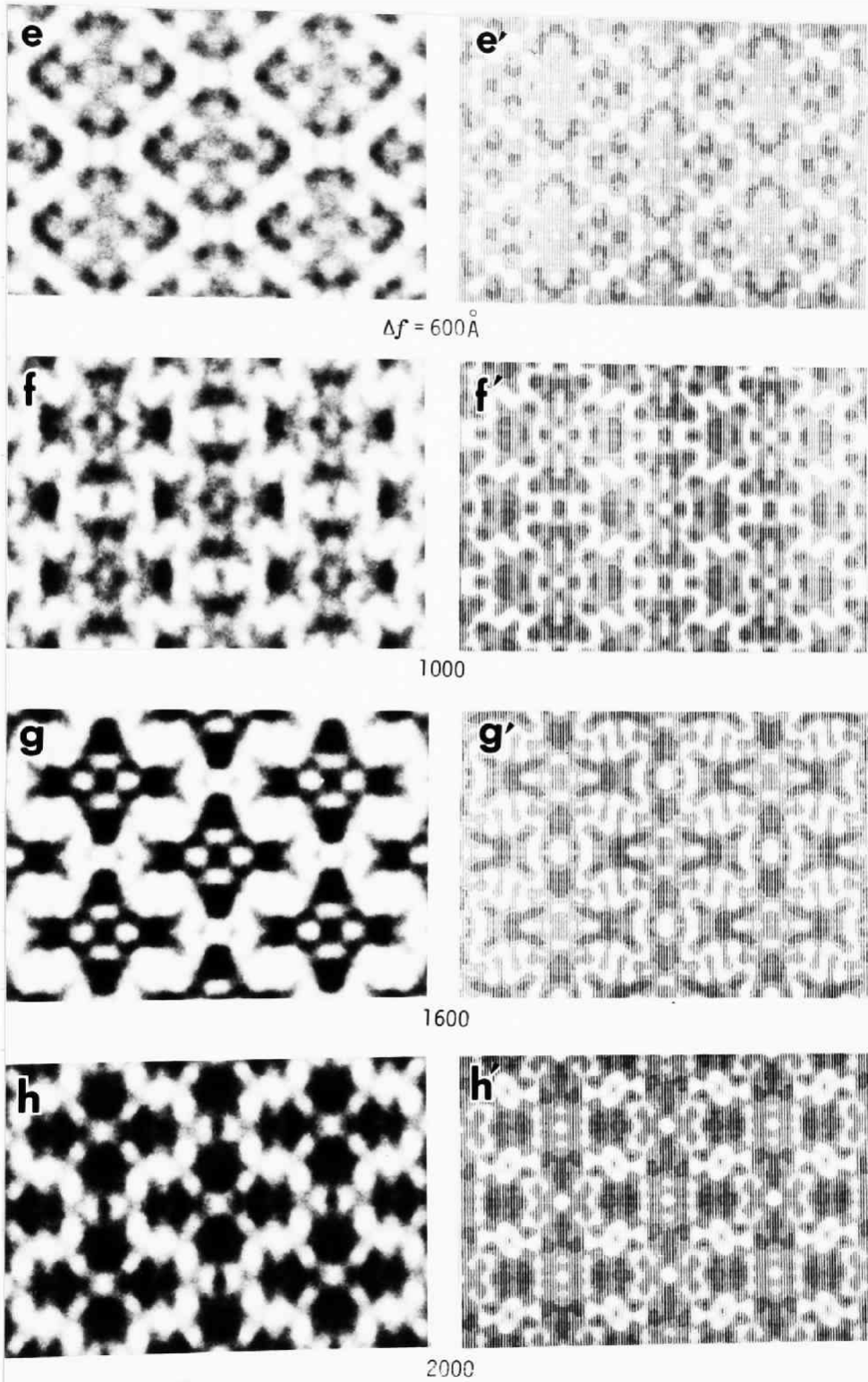


図 29 塩化フタロシアニン銅の through focus 像

Imaging condition of Zn-phthalocyanine	
JEM-100C + MDS	
Acc. Volt.	100 kV ( $\lambda = 3.7 \times 10^{-9}$ nm)
Spherical aberration coefficient $C_s$	0.7 mm
Filament	Arrow-type filament
Energy spread $\Delta$	15 nm
Illuminating angle $\beta_1$	$2 \times 10^{-4}$ rad
Magnification $M$	150,000
Current density $J_s$	0.5 A/cm <sup>2</sup>
Exposure time $t_3$	1.0 s
Total end-point dose	1 C/cm <sup>2</sup>
(Total dose $J_s \cdot t_3$ )	0.5 C/cm <sup>2</sup> )
Defocus condition $\Delta z$	60 nm
EM film	Fuji F.G.
Developer	Kodak D-19

表9. 亜鉛フタロシスニンの撮影条件

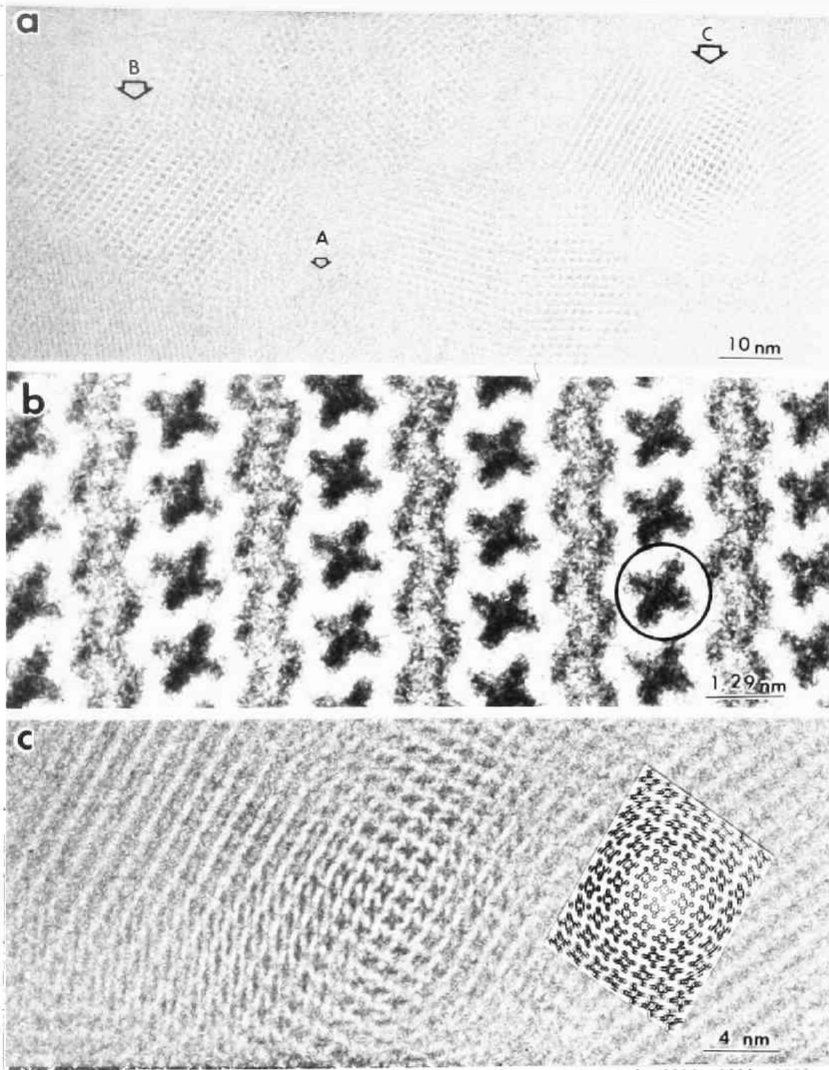


図30 重鉛フタロシレンの分子像



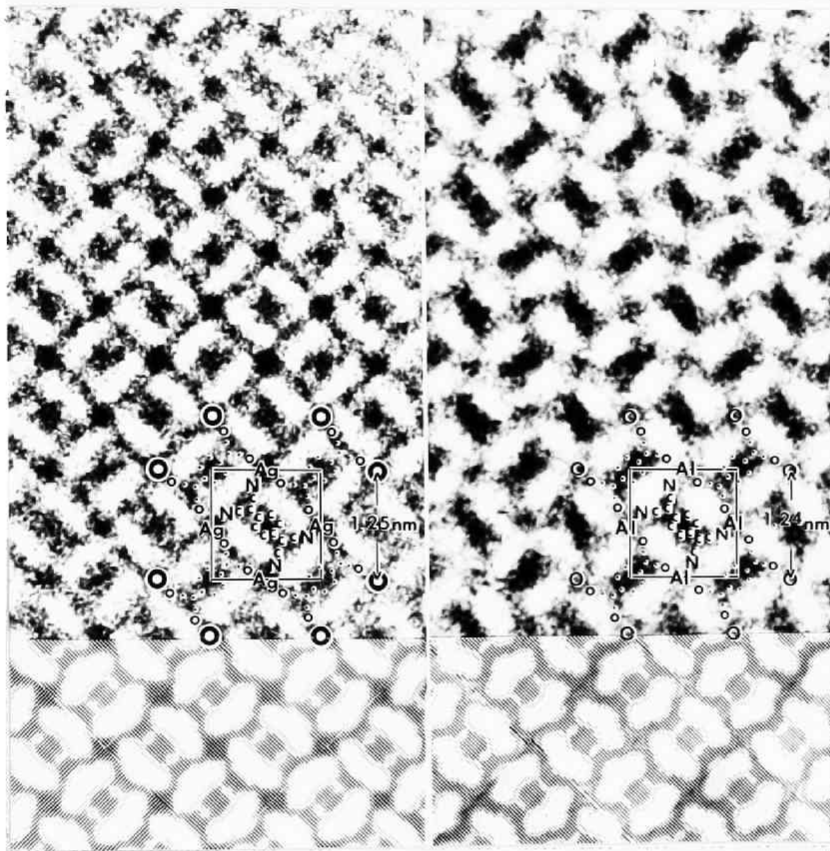


図31 a  $Ag \cdot TCNQ$  結晶の高分解能像  
b  $Al \cdot TCNQ$  結晶の高分解能像

### III 核酸の直接観察<sup>44)</sup>

I, II章で述べた高分解能電顕法を生体試料にまで拡張して、電子線損傷を受け易い核酸を高分解能電顕で観察できれば、現在でも議論が行われていた核酸(DNA)の構造を直接可視化することができるといえる。

電顕はX線と異なり、原理的には結晶を必要としないという決定的な利点がある。しかし、解決が不可能であると思われていた困難も存在する。まず第一に、I-9で述べた電子線による試料損傷の問題である。また同時に、電顕の試料は真空中に入れな



けなければならないので、水が存在する時の構造と乾燥時の構造の変化が問題となる。第二は、核酸が比較的原子番号の小さい“軽原子”から成り立っているため、コントラストが低いことである。以上二つの大きな困難を克服する方法を開発しないかぎり、核酸の直接観察は不可能と言わなければならない。有機結晶の高分解能像を撮影する方法の確立に基づいて、上に述べた二つの困難を克服する方法を開発することによって、DNAの二重らせん構造を直接観察することができた。<sup>44)</sup>

### III-1 DNAのコントラストと試料支持技術

DNAは主として、水素、炭素、窒素、酸素、リン

の各原子から成り立っている。かりに高分解能電顕  
H A R E M (分解能が高い方が位相コントラストは  
高くなる)においても、炭素、チツ素、酸素で5%  
程度、リン原子でも9%程度のコントラストになる。  
特別薄いカーボン膜を作成したとしても、支持膜の  
ノイズのために、一本のDNAの像をとらえること  
は不可能である。もしDNAを直接観察しようとし  
たならば、空中にDNAを静止する以外にないこと  
になる。これを実現するには、DNAの機械的強度  
で耐ええ得るほど、充分小さい孔が密に分布した支  
持膜を作成し、それにDNAを架橋することが考え  
られる。その目的を達成したのが、エークにおいて

述べたASMである。<sup>29)</sup>ASMは孔径が均一で、孔が密にあいており、開孔面積比が良く、目的のためには良い支持膜である。DNAをASMに架橋しようとした時、図32の矢印を示したようにDNAはASMのフレームに付着してしまう。なお、このDNAは酢酸ウランで染色してある。多くの試みを行なった結果DNAを架橋させるには、凍結乾燥を行なうとよいことが明らかになった。パラフィルム上に、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のfd phageのDNA (RF)を $4 \mu\text{l}$ の溶液を4℃で冷却して銅板上で凍結する。同時にASMも冷却しておいて、パラフィルムごと凍結したDNAとASMが接するように、グリッド上に置く

2. 真空乾燥する。この方法によ、ASMにDNAを架橋できるようになった。なお、試料作成直後に電顕観察を行なう。

### III-2 DNAの電子線損傷

ASMに架橋されたDNAが、損傷を受けて切れるcriticalな電子線照射量を決定しなければならない。このために、酢酸ウランで染色したDNAをASMに架橋し、様々な電子線照射量を撮影した。

$0.0015 \text{ C/cm}^2$ 以上の電子線照射量はDNAは観察されないが、これ以下の電子線量は図33のように架橋されたDNAが観察される。これは直接倍率3万倍で得られた染色DNAの像である。

### Ⅲ-3 DNAの二重らせん構造の直接観察

Kodak SO-163 を最大スピードで現像した時のフィルムの黒化度  $OD = 0.4$  程度となる条件で、 $7 \times 10^4$   $\mu\text{cm}^2$  の電子線照射量 (Critical dose の半分) で、像を撮影できる最大の倍率を Kodak の Data Release<sup>45)</sup> から計算すると、5万倍であると求められる。MDS の撮影モードにおける電流密度を  $7 \times 10^4 \text{ A}/\mu\text{cm}^2$  とする (試料照射角  $\beta_0 = 5 \times 10^{-5} \text{ rad}$  以下と充分平行な条件となる)。この時の露光時間は1秒とする。このような条件で、視野探しは行なわず、“盲撮り”をやる。現像液 D-19 で最大スピードの条件で現像して、架橋した DNA が撮影されたらどうか、注意深く探す。

図34aは、このようにして撮られたDNAを示す。A, Bには図34bに模式的に示すように、ASMに架橋されたDNAが観られる。これはきわめてコントラストの低いものであるが、しかし、注意深く観察すれば、DNAを確認することができる。この像からも、支持膜がある場合は、それがどれほどノイズの少ないものであるとしても、DNAを観察できなくさせるであらうことが理解される。図34aのAのDNAを拡大して、観察される周期に合わせて平行移動による重ね焼きの像処理を行なうと、図35aのような像が得られる。

図35bには、Watson & Crick モデル<sup>46)</sup> (B-form)

を示す。Cは像撮影の条件と、Wingら<sup>47)</sup>による合成DNA (dodecamer) のX線結晶構造解析<sup>48)</sup>による構造を仮定して、計算機によるシミュレーションを行なった結果である。図35aに矢印で示したように、“小さい溝”(minor groove)と“大きい溝”(major groove)の特徴を観察せられ、DNAのB-formとよく一致を示す。図35cに示すとAの分解能を仮定して計算したシミュレーション像と、電顕像との比較から、図35aの像の分解能は5Å程度であると結論せられる。極めて少ない電子線に結像せられていることによる量子ノイズと、倍率が低くて、教しい現象条件であることによる、フィルムの粒状性のため、像質が悪い

くなっている。明らかに、DNAの像の分解能は電子顕微鏡そのものの分解能によらずではなく、DNAの電子線損傷の受け易さによらず制限されている。

Arnett<sup>48)</sup>による総説にもみられるように、Watson-Crickモデルに対する疑問も存在する現状で、このB-formの像が得られたことは意味がある。真空中に入れたDNAが水の存在下で安定なB-formをとっているということは興味深い。なお、この事実ほどはVollenweider<sup>49)</sup>によらずシヤドウィング法を用いてDNAの長さを測定するという方法で示されている。今回の結果はこれを直接観察によらず実証したことになる。



DNAの直接観察法によつて、DNAの他の  
Conformation すなわち、A, C, Z-form等の局所的構  
造を研究できる可能性が生じた。特に現在DNAの  
Z-formが自然界に存在するののかという問題や、局  
所的にConformationが変化してゐるのではないのかと  
いう仮説もあり、直接観察が可能になることは重要  
である。また、DNAと“Activator”や“Repressor”  
との結合様式の研究等も、今回開発した方法の延長  
上にあると期待される。

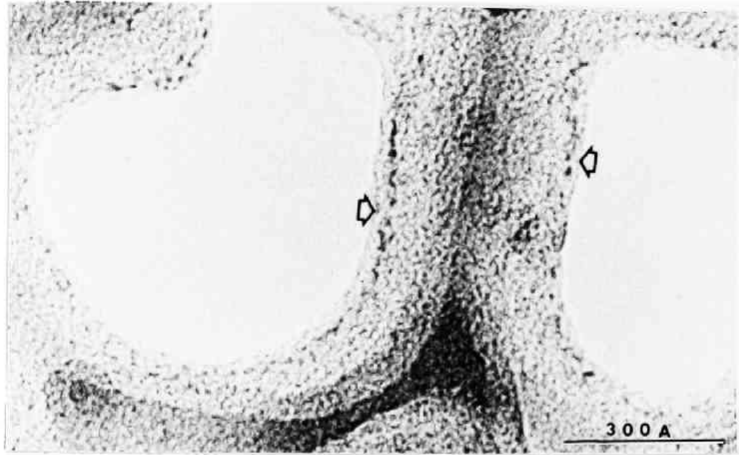


図32 ASMのフレームに付着したDNA

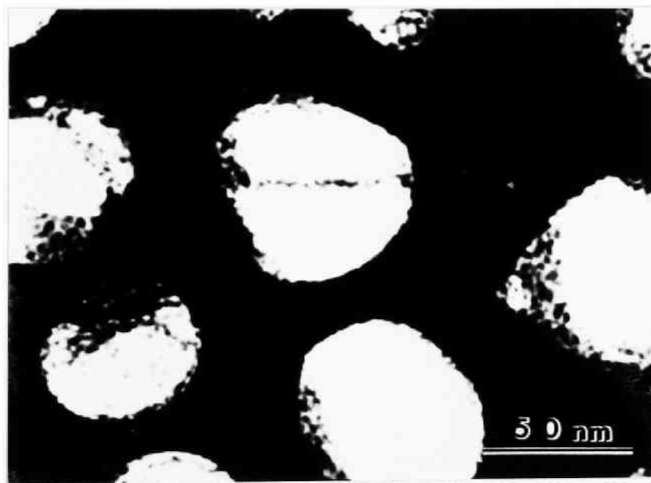


図33 ASMに架橋されたDNA (酢酸ウランで染色)

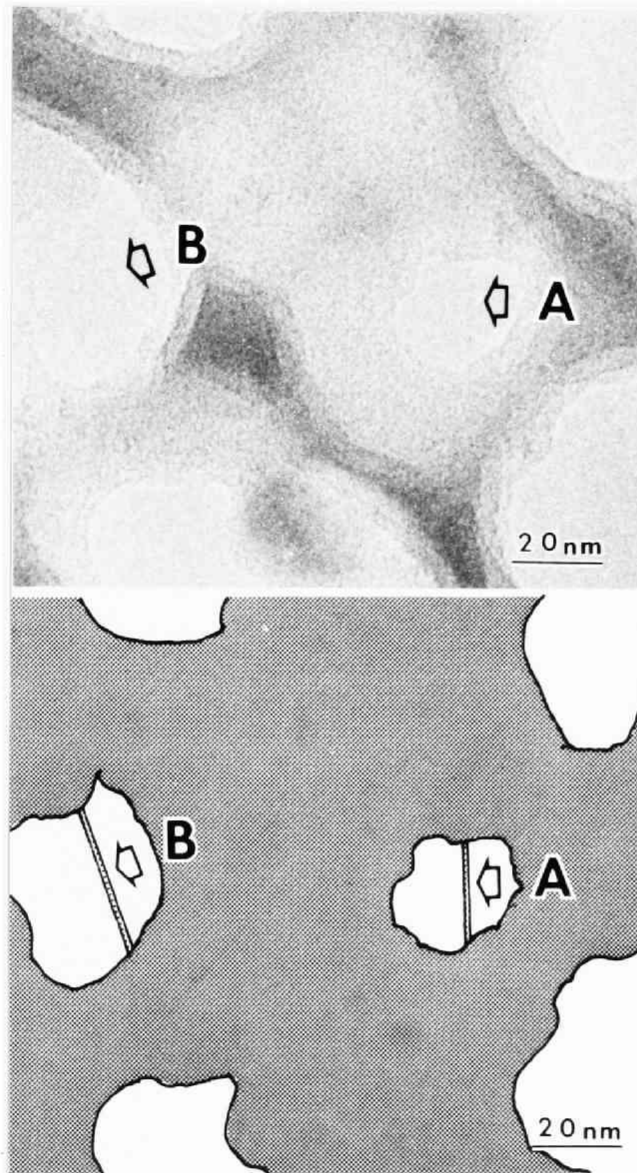


図34 無染色のDNAが、ASMに架橋された状態を觀察される。bには図式的に示す。

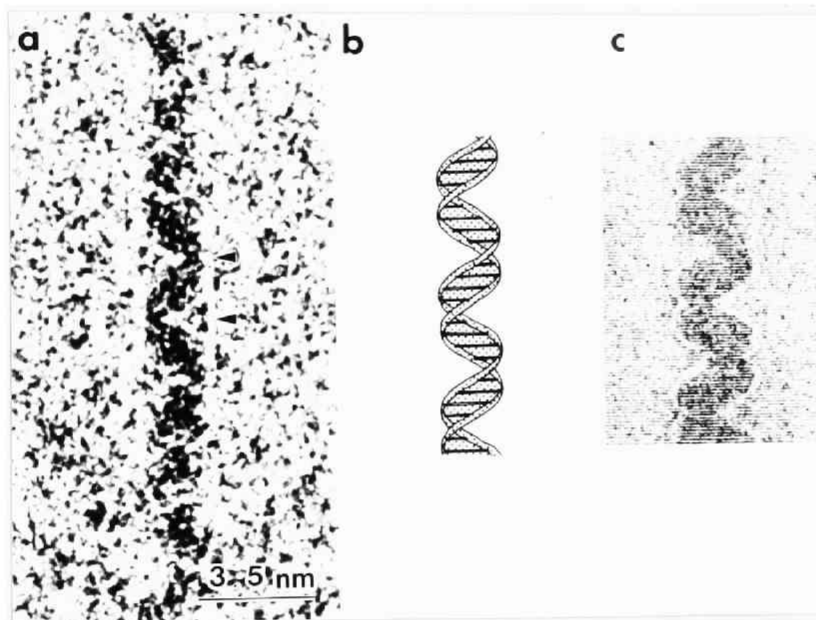


図35 a. 電顕で直接観察されたDNA  
b. Watson Crick モデル  
c. 計算機によるシミュレーション

## IV 結論

充分短い波長の光源を用いる電顕は、原子を直接観察する手段として期待されたが、一方では電子線による損傷のために、原子像観察は不可能とされた。理論的な電顕の分解能や、像解釈についての研究が進み、同時に電顕の装置としての性能も著しく向上した。しかし、現実には真の原子レベルの分解能の像の撮影は行なわれなかった。I章に述べたように分解能を制限するすべての因子を明らかにし、これを解決する手法を研究開発することによって、II章で述べた塩化フタロシアン銅において完全に原子(柱)を分離した分子像を撮影することに成功した。<sup>37)</sup>

このことにより、原子像観察という電顕の発明以来の夢が実現し、電顕によって原子が観察できることが実証された。また、同時に、高分解能像を撮影する方法が確立された。

より電子線損傷を受け易い普通の有機結晶においても、MDSの開発によって、原子レベルの分解能の像が撮影できることが示された。<sup>33)</sup> このことから、他に研究手段の無い極微少結晶の構造を高分解能電顕法で解析し得るようになった。亜鉛フタロシアニン<sup>42)</sup>においても、TCNQと金属との複合体においても、得られた像の分解能限界と一致しており、MDSを用いて、電顕の分解能を劣化させることなく、最高

の分解能で、損傷を受け易い試料の像を撮影できることが示された。

試料の電子線損傷の受け易さの程度から、可能な最高の分解能を計算し、それを保証するMDSの条件を設定することにより、像を撮影する方法が開発された。<sup>33)</sup> この方法によつて、電顕像撮影が従来の単に経験にたよる非科学的なものから、科学的方法に高められることとなった。

さらに、電子線損傷を受け易い生体試料であるDNAの直接観察まで、高分解能電顕法を拡張した。DNAは極めて電子線照射損傷を受け易いこと、および、軽原子から成り立っており、しかも結晶ではな

いことから、電顕像において低いコントラストしか  
与えないという二つの大きな困難が存在する。

特別な試料支持膜、ASM(アルミエスパーマイ  
クログリッド)<sup>29)</sup>を開発し、DNAをこれに架橋する  
ことにより、コントラストの問題を解決した。MDS  
(Minimum Dose System)<sup>33)</sup>を開発し、像を撮影する科  
学的方法の確立によって、損傷の問題を解決した。  
高分解能電顕法の基礎の上に、主に以上二点にあけ  
る前進によって、無染色のDNAを直接観察すること  
に成功した。<sup>44)</sup>

DNAのB-formが可視化されることによつて、  
DNAの他のconformationの研究や、DNAと蛋白質



との結合構造の研究、DNAの塩基配列の研究への可能性が生じてきた。得られたDNAの像は電子線損傷による制限のために、像質の点で不十分なものである。しかし、この像は通常(常温)の電顕で可能な最良の像であり、もしこれ以上の結果を得ようとするなら、液体トリウム温度か、それ以下に試料を冷却して、しかも高分解能像が撮影できる新しい電顕を作製する必要がある。

## 文献

- 1) O. Scherzer; J. Appl. Phys., 20, 20 (1949)
- 2) N. Uyeda, T. Kobayashi, E. Suito, Y. Harada and M. Watanabe; J. Appl. Phys., 43, 5181 (1971)
- 3) K. Kobayashi, E. Suito, N. Uyeda, M. Watanabe, T. Yanaka, T. Etoh, H. Watanabe and M. Moriguchi; in Electron Microscopy Canberra Vol. I, p. 30 (1974)
- 4) K. Ishizuka and N. Uyeda; Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., 55, 260 (1977)
- 5) 藤吉好則 電子顕微鏡15巻, 72 (1980)
- 6) 藤吉好則 「遺伝子観察への旅」 東大出版会P21 (1981)
- 7) R. Uyeda, M. Nonoyama and K. Kogiso; J. Electron Microscopy, 14, 296 (1965)
- 8) P. H. Phumpherly; Proc. Fifth European Congress on Electron Microscopy, 466 (1972)
- 9) T. E. Budinger and R. M. Glaeser; Proc. Fifth European Congress on Electron Microscopy, 634 (1972)
- 10) O. L. Krivanek; Optik, 45, 97 (1976)
- 11) 藤吉好則, 植田夏, 磯田正二, A. Bouret  
日本電子顕微鏡学会第34回講演予稿集, 216 (1978)
- 12) 矢田慶治: 私信
- 13) J. Frank; Optik, 38, 519 (1973)
- 14) K. J. Hanszen and L. Trepte; Optik, 32, 519 (1971)
- 15) M. Troyon; Optik, 52, 402 (1979)
- 16) J. Frank; Optik, 44, 379 (1976)
- 17) M. Troyon; Optik, 49, 247 (1977)
- 18) P. B. Hirsch, R. B. Howie, D. W. Pashley and M. J. Whelan; Electron Microscopy of Thin Crystals, 15 (1965)
- 19) B. M. Siegel; Appl. Phys. Letters, 8, 258 (1966)

- 20) K.Ishizuka and N.Uyeda; *J.Electron Microscopy*,24,65(1975)
- 21) J.M.Cowley and A.F.Moodie; *Acta Cryst.*,10,609(1957)
- 22) J.M.Cowley and S.Iijima; *Z.Naturforsch.*,27a,445(1972)
- 23) W.Biltz; *Berichte*,37,1095(1904)
- 24) H.Formanek,M.Mueller,M.H.Hahn and T.Koller; *Naturwissenschaften*,58,339(1971)
- 25) D.Dorignac,M.E.C.Maclachan and B.Jouffrey; *Ultramicroscopy*,4,85(1979)
- 26) W.H.Dobelle and M.Beer; *J.Cell Biol.*,19,733(1967)
- 27) K.Mihama and N.Tanaka; *J.Electron Microscopy*,25,65(1976)
- 28) A.Fukami and K.Adachi; *J.Electron Microscopy*,14,112(1965)
- 29) Y.Fujiyoshi and N.Uyeda; *J.Electron Microscopy*,27,75(1978)
- 30) A.Koreeda; *J.Electron Microscopy*,29,61(1980)
- 31) G.Ruben; 私信;
- 32) K.Adachi,M.Adachi,M.Kotoh and A.Fukami; *J.Electron Microscopy*,17,280(1968)
- 33) Y.Fujiyoshi,T.Kobayashi,K.Ishizuka,N.Uyeda,Y.Ishida and Y.Harada;  
*Ultramicroscopy*,5,459(1980)
- 34) R.C.Williams and H.W.Fisher; *J.Mol.Biol.*,52,121(1970)
- 35) Y.Fujiyoshi,H.Yamagishi,T.Kunisada,H.Sugisaki,T.Kobayashi and N.Uyeda;  
*J.Ultrastructure Research*, (1982) in press
- 36) Y.Fujiyoshi,K.Ishizuka and N.Uyeda; *J.Electron Microscopy*,26,47(1977)
- 37) N.Uyeda,T.Kobayashi,K.Ishizuka and Y.Fujiyoshi; *Chemica Scripta*,14,47(1979)
- 38) Y.Harada,T.Taoka,M.Watanabe,M.Ohara,T.Kobayashi and N.Uyeda; *Proc.30th Ann. Meeting,EMSA*,686(1972)
- 39) N.Uyeda,K.Ishizuka,Y.Saito,Y.Murata,K.Kobayashi and M.Ohara; in *Electron Microscopy Canberra Vol.I*,p.266(1974)
- 40) E.Suito,N.Uyeda and M.Ashida; *Nature*,194,273(1962)

- 41) T.Kobayashi, Y.Fujiyoshi, F.Iwatsu and N.Uyeda; Acta. Cryst., A37, 692 (1981)
- 42) N.Uyeda, T.Kobayashi, K.Ishizuka and Y.Fujiyoshi; Nature, 285, 95 (1980)
- 43) N.Uyeda, T.Kobayashi and E.Suito; E.Microscopie Electronique, 1, 443 (1970)
- 44) Y.Fujiyoshi and N.Uyeda; Ultramicroscopy, 7, (1982) in press
- 45) Kodak Pamphlet No.XP-252JP (1975)
- 46) J.D.Watson and F.H.C.Crick; Nature, 171, 737 (1953)
- 47) R.Wing, H.Drew, T.Takano, C.Broka, S.Tanaka, K.Itakura and R.E.Dickerson; Nature, 287, 755 (1980)
- 48) S.Arnott; Nature, 278, 780 (1979)
- 49) H.J.Vollenweider, A.James and W.Szybalski; Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 710 (1978)

## 謝辞

本研究において、御指導いただいた植田夏教授に、貴重な助言をいただいた小林隆史、石塚和夫博士に感謝の意を表す。また核酸の試料をいただいた梶崎弘幸博士と、助言をいただいた山岸秀夫博士に感謝の意を表す。また、本研究に協力いただいた日本電子の江藤輝一、原田嘉晏、石田征久の各氏に感謝す。また有意義な討論と、HAKEMの性能維持に協力いただいた磯田正二氏に感謝す。そして本研究遂行において、理解と励しを与えて下さった荒川正文、西野操両博士をはじめ、植田研究室の皆様にも感謝す。最後に本論文の清書をお願いした、

田明子さんに感謝の意を表す。