

FIB による生体硬組織薄膜化と TEM 観察

九州大学大学院総合理工学研究院 波多 聡 池田 賢一 中島 英治
九州大学大学院総合理工学府 谷川 昌弘
大阪大学大学院工学研究科 石本 卓也 中野 貴由

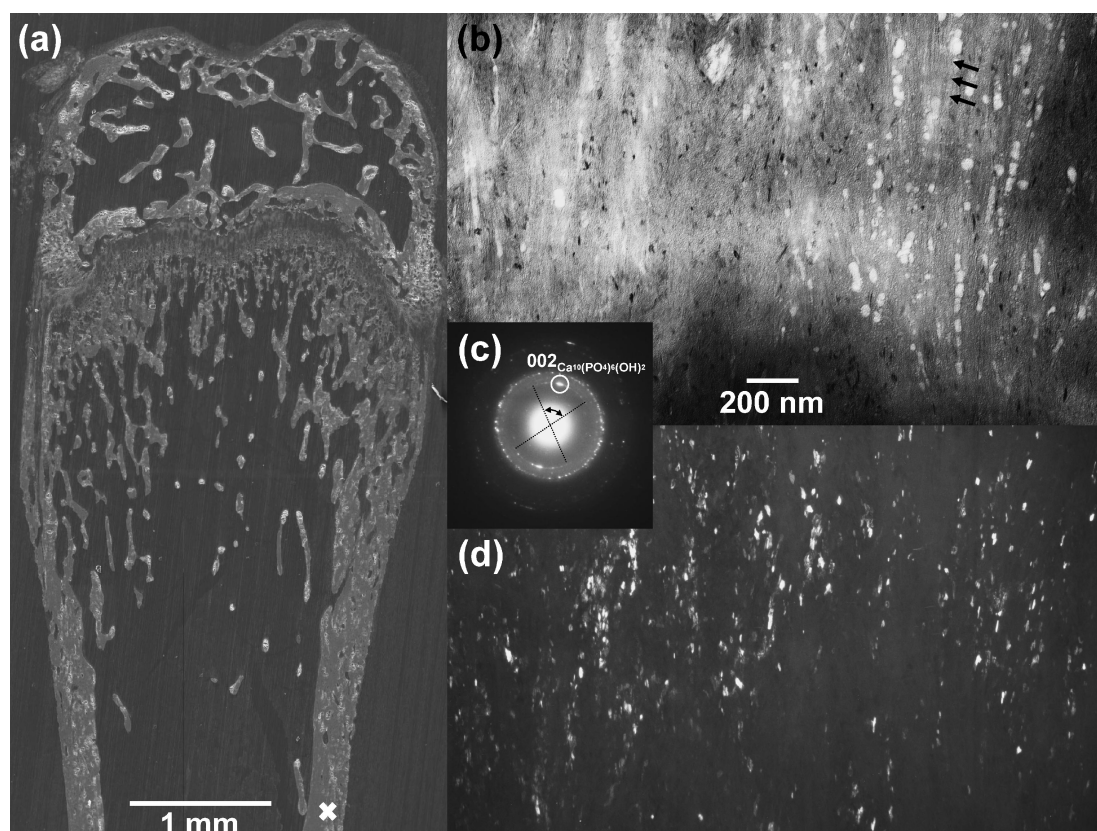


Fig. 1 (a) マウス大腿骨の SEM 二次電子像. (b) 骨幹部((a)の×印)の緻密骨の TEM 明視野像. (c) 電子回折図形. (d) BAp の TEM 暗視野像.

生体骨の透過電子顕微鏡(TEM)観察では、脱灰や重金属染色などの前処理を行い、硬組織である生体アパタイト(BAp)またはコラーゲン線維等の軟組織のいずれか一方を可視化する方法が知られている。一方、筆者らは集束イオンビーム(FIB)法を用いて、生体骨の任意の個所から薄膜試料を直接サンプリングし、骨の硬・軟複合組織をそのまま観察する簡便な生体硬組織評価法の確立に取り組んでいる。

典型的な観察例を以下に示す。B6C3Fe 系統マウス大腿骨の水分をアルコール置換した後、樹脂で再置換、硬化させて骨切片試料を得た。この切片試料に白金蒸着を施すと、Fig. 1(a)のように石灰化領域が強調された走査電子顕微鏡(SEM)像が得られ、観察領域の特定が容易となる。FIB マイクロサンプリング法⁽¹⁾により骨幹部(図中×印)から緻密骨を抽出し、更に FIB で 100 nm まで薄膜化した後の TEM 明視野像が Fig. 1(b)である。図の上下方向、すなわち、骨の成長方向に走向したコラーゲン線維が観察される。注意深く見ると、コラーゲンホールゾーン/オーバーラップゾーンの周期的繰返しによる幅約 70 nm の縞状

コントラストが現れている(図中矢印)。一方、BAp 結晶は 50 nm 以下の暗い微粒子状コントラストとして観察されている。これらの特徴は、ミクロトーム法を用いた従来の観察結果⁽²⁾と一致している。Fig. 1(c)の電子回折図形を見ると、六方晶系 BAp(ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ として指数づけ)からの $hkl=002$ 回折強度の分布が骨成長方向に偏っている。これは、BAp 結晶の c 軸の向きに配向性があること⁽³⁾を意味している。図中○で囲んだ $g(hkl)=002$ 回折波で結像した TEM 暗視野像が Fig. 1(d)である。BAp 結晶は c 軸方向に伸びた形態をとり、骨成長方向に互いに整列する傾向が認められる。このように、材料評価に用いてきた FIB や TEM の技術の応用は、生体硬組織評価法の進展のみに留まらず、新しい硬組織研究の方向性をも示しているといえる。

文 献

- (1) N. Kuwano, *et al.*: J. Electron Microscopy, **53**(2004), 541.
- (2) X. Su, *et al.*: Bone, **32**(2003), 150.
- (3) T. Nakano, *et al.*: Bone, **31**(2002), 479.

(2009年7月29日受理)

FIB Thinning and TEM Observation of Hard Tissue; Satoshi Hata*, Ken-ichi Ikeda*, Hideharu Nakashima*, Masahiro Tanigawa**, Takuya Ishimoto*** and Takayoshi Nakano*** (*Faculty of Engineering Sciences, Kyushu University, Kasuga. **Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University, Kasuga. ***Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita)

Keywords: biological apatite (BAp), hard tissue, focused ion beam (FIB)

SEM specimen preparation: fixation with ethanol and methacrylic resin and Pt coating SEM utilized: HITACHI S-3000H (25 kV)

TEM specimen preparation: FIB microsampling and thinning (HITACHI FB-2000 K, 30 kV) TEM utilized: FEI TECNAI-F20 (200 kV)

Observation conditions: SEM secondary electron imaging, TEM BF imaging, TEM DF imaging and TEM selected-area diffraction