

地学試料の電子顕微鏡的観察

その3. SEM観察のための化石脱灰の新手法

大久保 雅 弘

島根大学理学部地質学教室

(1978・9・6 受理)

Electron Microscopy of the Geologic Materials

Part 3. New Method of Decalcification of the Fossil Shells for SEM Observation

Masahiro OKUBO

まえがき

化石中に残存する有機質膜（コンキオリン）の電顕的観察については、試料を脱灰したのち分散・剝離させたものを透過型電顕（EM）により観察する手法が常用されてきた。有機質膜自体の微細構造をみるためにはその手法でも目的を達しうるが、膜全体の形、あるいは有機質膜と硬組織を構成する鉱物との構成関係を知るためには、別の手法が必要である。すなわち、膜をできるだけ破損させずに残して、それを走査顕微鏡（SEM）下で観察できればよいのであるが、化石を脱灰して有機質膜を原形どおりに残すことは至難の技である。脱灰中、ごく僅かの震動のために、有機質残渣が一挙に飛散してしまうことは誰しも経験するところである。

しかし、SEMの使用が一般化してきた今日、試料作製技術に一工夫こらせば、化石有機質膜の巨視的構造が部分的にせよみられるはずである。筆者はこれまでの失敗例を反省して、次の諸点に留意すれば、化石中の有機質膜をSEM下において観察しうると考えた。

(1) 液浸中の試料に与える震動を可能な限り少なくするために、脱灰開始から脱水完了まで、試料を固定した状態におくこと。

(2) 有機質膜の破損をできるだけ少なくするために、試料の脱灰は深部まで完全に行なわずに浅くとどめておくこと。

(3) 脱水等の液交換はなるべくおだやかに行なうこと。

(4) 脱灰試料の乾燥は臨界点乾燥法を用いること。

その結果、ここにのべるような手法が、化石有機質膜の巨視的ないし立体的構造をSEMで観察するためには、かなり効果的であることがわかった。

本論に入るに先立ち、臨界点乾燥装置の設計および製作にあたり、岡山大学温泉研究所の野一色泰晴・伊藤英司の両博士から全面的なご教示とご援助を頂いたことを感謝する。また、

鳥取大学医学部の井上貴央氏には、実験過程でご協力をいただいたことを感謝する。

手 法

1. 前処理

1a) 試料の切り出しにさいしては、あとでのべる金網籠の大きさ、および使用する SEM の載物台の面積を考慮しなくてはならない。普通は、面積 5mm 角程度、厚さ 2mm ぐらいの試料で充分であろう。

試料表面（観察面）は、研磨面でも破断面でもよいが、一般的には前者の方が好結果をえられそうである。

所定の試料を約 5mm 角のスライドガラス片に、エポキシ接着剤により固着させる。これは、脱灰試料の浮上による変形および散逸を少なくするためである。

1b) ガラス片上に接着した試料を納める小さな籠を金網で作製する。その大きさは、ガラス片 4 個分の試料を一回の処理量とすれば、一辺が 10~15mm、深さ 3~4mm ぐらいが適当であろう。金網の網目は、およそ 200 メッシュほどのものがよい。同時に、軽く蓋をす程度の覆いも同じ材料で作製する。

この金網籠の目的は、脱水・置換後の最終段階において、臨界点乾燥用容器に試料を移すときに、試料と蓋との僅かな間隙にたまる液の表面張力を利用することによって、液が急激に逸流することを防止する点にある。従って、金網の目が粗らすぎたり、あるいは金網籠が深すぎると、この目的から外れることになる。

1c) 次に上記の籠よりも少し大き目の金網籠をさらに一つ作る。網目はもっと粗らいものでよい。これの目的は、試料を納めた籠を移動させるさいの把手の役目にすぎない。



第1図 試料のセット法。a: 試料, b: 接着剤, c: スライドガラス片, p: 粗らい金網, q: 細かい金網籠

以上のべたところを模式的に図示すると第1図のようになる。このようにセットした試料を、適当なガラス容器内に置いて脱灰を開始することになる。筆者は容器として容量約 50cc の秤量びんを用い、上記の籠の下方を約 5mm あけて実験を行なっている。

2. 脱灰・脱水および置換

2a) 脱灰には EDTA-4N の 0.5 モル液を使用した。試料の大きさや目的に応じて、脱灰液をさらに希釈したり、脱灰時間を調節すればよい。ほぼ完全に脱灰させるためには一晩放置すればよく、また、表層部分の脱灰にとどめたいときには 20~60 分程度でよいであろう。

2b) 脱水は常法どおりのエタノール系列で行なうが、試料を動かさずに、液交換により

濃度をあげる。従って数%きざみで濃度があがるが、最終的には理想的な無水アルコールの状態にはなりにくい。脱水液の交換は、注射筒を用いて注意深く行なうことが大切である。

2c) 次段の乾燥に移る前に、脱水後さらに酢酸アミルに置換する。この場合にも試料を動かさないのであるから、アルコールからの置換には、数回の酢酸アミルの注入および置換が必要である。

3. 乾燥

3a) 筆者が常用している臨界点乾燥 (CPD) 装置は手製のものであって、本体の容器は内容積約 100cc である。液体炭酸注入の代わりにドライアイスを用いているが、経験的には、この方が試料破損が軽くなるように思われる。

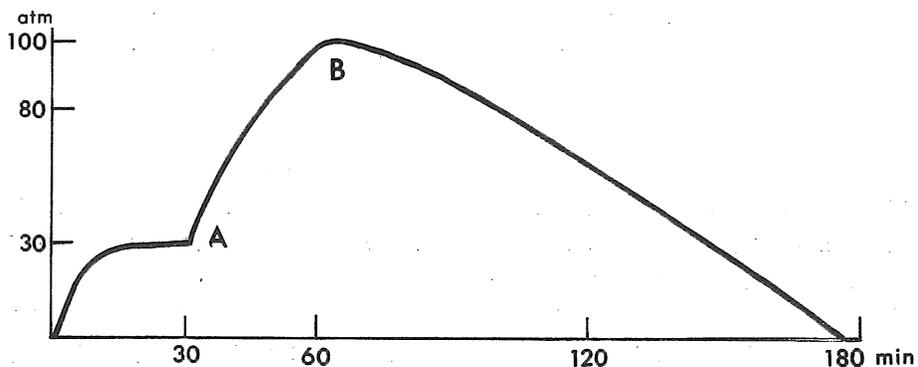
操作は、まず最初に、酢酸アミルに置換された試料を手ぎわよく CPD 容器に移す。試料を直接動かすのはこのとき一回だけであるから、第 1 図に示した籠ごと全体を、慎重かつすばやく容器内に置く。

3b) 次に、あらかじめ適当な大きさに砕いておいたドライアイスを、容器いっぱい詰めておく。このさい、試料破損を少しでも防ぐ意味で、金網籠 (第 1 図) 全体を覆うもの (いわば防石ネットの役目をするもの) を用意しておいた方がよい。

3c) ドライアイスを詰めたのち、容器を密閉してしばらく放置する。室温とドライアイスの量によって変わるが、容器内は数分後に約 30 気圧となり、容器外面には霜が付着する。手製の装置であるので、容器内の温度は不明である。筆者は容器外面の霜が室温でとれるまで放置しているが、この段階で、試料の酢酸アミルと液体炭酸との交換が行なわれる。

3d) 容器密閉後約 30 分ののち、55°C ぐらいの温浴槽に容器をうつして、100 気圧程度まで昇圧させる。温浴槽の温度とドライアイスの量で変わるが、この間 30 分ぐらいである。その後は、温浴槽の温度を 40°C 以上に保ちながら、平均 1.7l/m の割合で CO₂ ガスをぬく。

以上の経過をグラフで示すと第 2 図のとおりである。



第 2 図 臨界点乾燥装置の操作データ。A: 室温放置状態から温浴槽内へ移動, B: CO₂ ガスの流出開始

4. 真空蒸着

乾燥した試料を容器からとり出し、ガラス片のまま SEM 用載物台に接着する。従って、試料とガラス片の大きさを必要最小限のものにしておけば、載物台上に 2~3 個の試料を並べることができるので、鏡下で比較観察するのに便利である。

真空蒸着法については、従来はジンベル機構を具へた装置内で、金・炭素の二重蒸着を行なうのが常道であった。しかし最近ではイオン・スパッタリング法が多用されつつある。この方が簡便であるだけでなく、粒状性においても優れているといわれる。筆者は日本電子 K.K. 製 FC-1100 型を使い、金蒸着を行なった。

実験結果の考察

走査顕微鏡は日本電子 K.K. 製 JSM-15 型を使用した。

(1) 腕足類 *Terebratalia coreanica* (ADVMS et REEVE) の現生種および化石種について、同一手法で試料を作製して比較した (図版. 1~3 図)。本種は管状構造が顕著な種類であるが、現生種の場合には細管を包む有機質膜と、貝殻の内層中の有機質膜とが連結して立体構造を保っていることが明瞭である。現生種においては、脱灰の程度が深くても浅くても、このような好結果がえられる。

これに反して化石種では、細管周囲の膜はかなり完全な形で残っているのに対して、内層中の有機質膜は大部分が飛散してしまったことがわかる。これは、光学顕微鏡下の薄片脱灰においても同様の結果となる点であって、化石の場合には有機質膜が一般には非常にもろいことを物語っている。第 3 図において、未脱灰の内層方解石上に散在している白色線維状物質は、内層の膜が破損した一部ではないかと思われる。

(2) 二枚貝 *Patinopecten* sp. の交叉板構造中の有機質膜はかなり飛散してしまったが、第 4 図表面の切れぎれの膜状物質は、大部分が有機質膜と思われる。また第 5 図の線維状物質は、ほぼ原形に近い位置に残っているものと思われる。

(3) 二枚貝 *Inoceramus* の稜柱層は、化石採集のさいに誰しも気づくほど顕著である。この標本には、貝殻が茶褐色を呈するものと、黒色に近いものとの 2 種類がみられたが、脱灰結果からみると前者の方が好結果をえられた。この場合にも有機質膜が破損しがちな中であって、第 6 図のように単一稜柱の外観を呈する構造が残っていた。

(4) 以上のべたように、化石種の場合には脱灰が進行するにつれて、有機質膜の破損が増大する傾向がある。これは支持物としての構成鉱物が失われるためであろう。従って完全に脱灰したときには、有機質膜の大部分が飛散してしまい、わずかに接着剤付近においてのみ、多少とも立体構造がみられる程度となる。

(5) 微細構造についていえば、有機質膜にみられる細孔の形質が焦点であるが、ここに図示したものがそのまま化石有機質膜の本来の構造であるとはいえない。有機質膜とみなされる部分にも、なおかつ未脱灰の微小部分が付着している可能性が強いし、また、実験過程で加えられる種々の人為的産物をも考慮しなくてはならないからである。

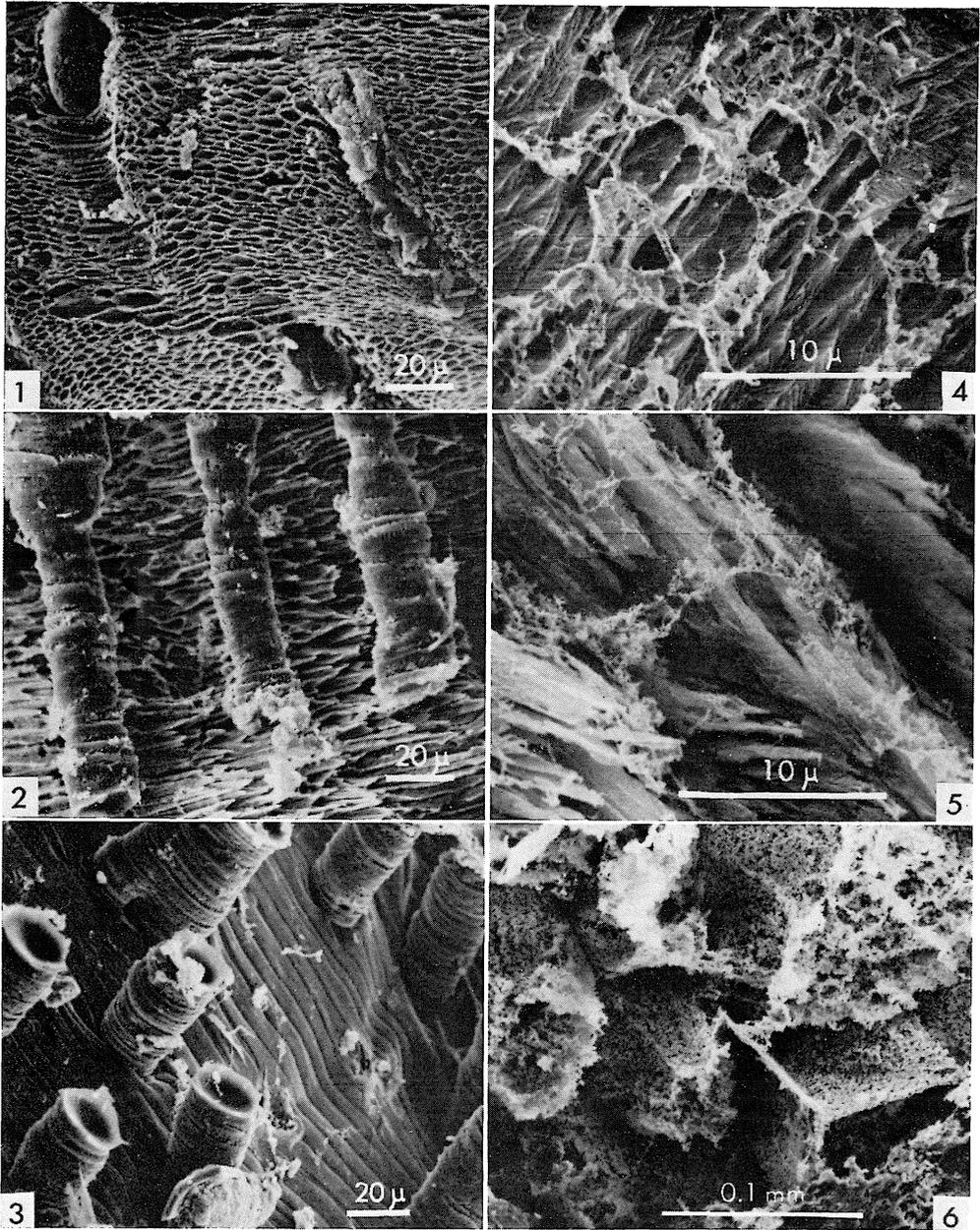
要点と問題点

(1) 化石中の有機質膜は破損しやすく観察が困難なもの、という先入感があったが、ここでのべた手法で脱灰すれば、ある程度 SEM 観察にたえうる試料をつくることができるだろう。

(2) 微細構造を論ずる上での問題点として、筆者は次の2点が今後の課題であると考えられる。1つは化石有機質膜の巨視的形態を明らかにする上で、同一対象について光学顕微鏡像と比較することである。他の1つは、微細構造を明らかにするためには、透過型電顕像との比較が不可欠である。

参 考 文 献

- 化石研究会編：化石の研究法。共立出版。1971
日本電子顕微鏡学会関東支部編：電子顕微鏡試料技術集。誠文堂新光社。1970



1. *Terebratalia coreanica* (ADAMS et REEVE), 現生種・青森湾産
- 2・3. 同上, 化石種・第四系成田層産
- 4・5. *Patinopecten* sp., 化石種・隠岐島釜谷の上部中新統産
6. *Inoceramus uwajimense* YEHARA, 化石種・宇和島の上部白亜系産