

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-55175

(P2005-55175A)

(43) 公開日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 1/28	GO 1 N 1/28	G
GO 1 N 1/06	GO 1 N 1/06	C
GO 1 N 1/36	GO 1 N 1/28	R
	GO 1 N 1/28	K

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平11-253592	(71) 出願人	501203344 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構 茨城県つくば市観音台3-1-1
(22) 出願日	平成11年9月7日(1999.9.7)	(71) 出願人	502283800 有限会社つくば食料科学研究所 茨城県牛久市上柏田1丁目33-23
		(74) 代理人	100067839 弁理士 柳原 成
		(72) 発明者	堀金 彰 茨城県つくば市松代5丁目16番地520 棟201号

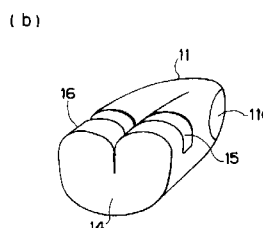
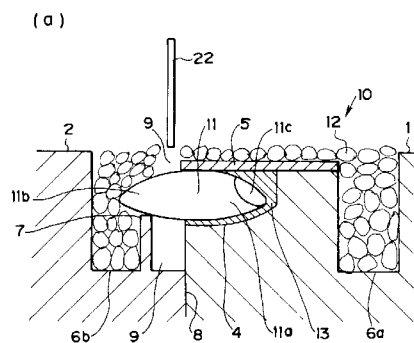
(54) 【発明の名称】 試料調製方法および装置

(57) 【要約】

【課題】簡単な構成と操作により、試料の変形、破壊、変質等を防止して切断面および/または切込を形成し、高精度の分析、観察、記録等を可能にする試料調製装置および方法を提案する。

【解決手段】試料ホルダ1の試料保持部4に試料11の一部を充填材13で包埋して、固定部材5で固定し、試料11の突出部11bを受台2の突出部受部7で保持し、ドライアイス収容部6a, 6bにドライアイスを収容して試料11を瞬時に凍結すると同時に気相置換した状態でカッタ22により試料11を切り、切断面14および/または切込15を形成する。

【選択図】 図3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料ホルダに試料を保持し、ドライアイスで試料を凍結するとともに気相置換した状態で、カッタで試料を切って試料調製することを特徴とする試料調製方法。

**【請求項 2】**

試料ホルダに充填した充填材に試料を包埋した状態で、ドライアイスで凍結して充填剤を固化させ、カッタで試料を切るようにした請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

試料調製は試料の切断面および/または切目形成を含む請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

試料保持部を有する試料ホルダと、  
試料保持部に保持された試料を固定する固定部材と、  
試料ホルダに保持された試料を凍結および気相置換するように設けられたドライアイス収容部と、  
ドライアイスで凍結および気相置換された状態で試料を切るカッティング空間と  
を備えている試料調製装置。

10

**【請求項 5】**

試料保持部が複数個一列に設けられた請求項 4 記載の装置。

**【請求項 6】**

試料ホルダから突出する試料の突出部を保持する突出部受部を有し、試料ホルダに着脱可能に取付けられる受台  
をさらに備えている請求項 4 または 5 記載の装置。

20

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は分析、観察、記録等（以下、分析等という場合がある。）に供する試料の調製方法および装置、特に生物、有機物、化学物質等の変形、破壊または変質しやすい試料に適した試料調製方法および装置に関するものである。

**【0002】****【従来の技術】**

種子等の生物体を分光分析する場合、生物体を切断して鏡面仕上げすることが要求される。また試料をレーザビームで打ち抜いて質量分析する場合は、特定の厚さの試料片とすることが要求される。このような試料を鏡面仕上げする装置としては、刃物をスライド式および回転式で用いるものがある。

30

このうちスライド式のものは鋭利な刃をスライドさせるもので、肝細胞等の動物組織などを柔らかいパラフィンなどに包埋して切断するのに適している。しかし刃物の圧力により組織が変形あるいは破壊されやすく、また植物の茎、葉のようにプラントオパールなどのケイ酸成分を含む組織を切る場合、スチールナイフはケイ酸で傷付き、ナイフマークなどの引っかき傷が試料に生じやすい。

**【0003】**

回転式のものダイヤモンドソーのような回転式カッタを用いるものであるが、上記と同様の刃物の圧力による変形や破壊のほか、摩擦熱で試料が変質しやすい。これを防止するために切削油などを用いて冷却と酸化防止を計っているが、生物試料の場合は切削油を吸収しやすく、分光分析を行うと異物として検出されてしまい、測定精度が悪くなる。このほか両方式とも試料を切るときに試料が動かないようにするために、パラフィン、樹脂等で包埋して切ることが行われているが、切断に際して包埋剤が試料中に混入し、測定精度が悪くなるなどの問題点がある。

40

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、簡単な構成と操作により、試料の変形、破壊、変質等を防止して切断面

50

および/または切込を形成し、一定の位置および角度に測定面を形成して、高精度の分析、観察、記録等を可能にする試料調製装置および方法を提案することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

(1) 試料ホルダに試料を保持し、ドライアイスで試料を凍結するとともに気相置換した状態で、カッタで試料を切って試料調製することを特徴とする試料調製方法。

(2) 試料ホルダに充填した充填材に試料を包埋した状態で、ドライアイスで凍結して充填剤を固化させ、カッタで試料を切るようにした上記(1)記載の方法。

(3) 試料調製は試料の切断面および/または切目形成を含む上記(1)または(2)記載の方法。

10

(4) 試料保持部を有する試料ホルダと、  
試料保持部に保持された試料を固定する固定部材と、  
試料ホルダに保持された試料を凍結および気相置換するように設けられたドライアイス収容部と、  
ドライアイスで凍結および気相置換された状態で試料を切るカッティング空間と  
を備えている試料調製装置。

(5) 試料保持部が複数個一列に設けられた上記(4)記載の装置。

(6) 試料ホルダから突出する試料の突出部を保持する突出部受部を有し、試料ホルダに着脱可能に取付けられる受台  
をさらに備えている上記(4)または(5)記載の装置。

20

【0006】

本発明において試料調製の対象となる試料は分析、観察等に供する試料であって、変形、破壊または変質しやすい試料である。このような試料としては生物、有機物、化学物質などがあげられる。具体的には植物の種子、茎、葉、根、動植物(ヒトを含む)の組織などがあげられる。

【0007】

このような試料を用いる分析、観察等としては、試料の切断面または切込を利用して分析、観察、記録等を行うすべての方法に適用できる。例えば分光分析(IR、ラマン、蛍光X線、色彩色差計を含む)、質量分析など計数的に分析するもののほか、顕微鏡(電子顕微鏡等を含む)、テレビジョン、画像解析装置、写真、肉眼等により画像として観察、測定、記録するものなどを含む。

30

【0008】

本発明では、このような変形、破壊または変質しやすい試料を試料ホルダで保持し、ドライアイスで試料を冷却して実質的に瞬時に凍結させるとともに、気相を炭酸ガスに置換して固定した状態でカッタで切って切断面および/または切込を形成することにより試料を調製する。ドライアイスは炭酸ガスを冷却して固化したものであり、粒径0.1~5mm、好ましくは0.1~2mmのものを使用することができる。このドライアイスは試料を冷却、凍結、気相置換できる位置に存在させればよいが、試料を覆うように、試料の周囲および上部に置くのが好ましい。

【0009】

試料を切る段階で試料は試料ホルダに固定されている必要があるが、この固定は試料ホルダに設けた固定部材により固定してもよく、また充填材を試料ホルダに充填し、充填剤自身の固着力により、またはドライアイスで冷却して固化させることにより固定することができる。充填剤としてはパテのような低温で固化する可塑性物質が作業性が良いため好ましいが、樹脂のように重合または縮合性のものを用いてもよい。

40

【0010】

試料ホルダは試料を一部が突出するように部分的に保持し、固定部材で固定できるように構成することができる。試料ホルダに形成される試料保持部は試料を保持できる構造となっていればよいが、試料を収容できるように試料の外形に対応した形状を有するのが好ましい。この試料保持部は完全に試料の外形に一致する必要はなく、ほぼ対応した形状の大

50

きめの収容部とし、この収容部にパテのような充填剤を収容して試料を包埋できるようにするのが好ましい。この試料保持部は複数個を形成するのが好ましく、この場合カッタにより同一平面上で一度に切ることができるように複数個を一行に並べて形成するのが好ましい。

【0011】

固定部材は試料保持部に保持された試料を固定する部材であり、試料保持部に保持された形状に応じて試料を傷つけない限度で弾性体により押しつけて固定するのが好ましい。試料ホルダが試料保持部を複数個有する場合は固定部材もこれに対応して固定できる構造とし、例えば試料保持部が一行に配置される場合にはこれに対応した長板状またはくし歯状の固定部材を用いることができる。

10

【0012】

試料保持部の構造によっては充填材を固定部材として利用することもできる。例えば試料保持部が穴状に形成されている場合には、穴状部に試料を挿入した状態で周囲にパテのような充填材を充填して試料を包埋し、充填材を固化させれば充填材で試料を固定することができる。充填材としては両面粘着テープのようなシート状のものであってもよい。

【0013】

試料ホルダに保持された試料を凍結し、気相置換するように設けられるドライアイス収容部は、試料ホルダに一体的に形成してもよく、また試料ホルダを取付ける取付台に形成してもよく、また試料ホルダと取付台の中間部に形成してもよい。ドライアイス収容部は試料保持部を取り囲むように溝状に設けるのが望ましいが、単に試料保持部の周辺上部にドライアイス載せるだけでもよい。

20

【0014】

カッティング空間は試料ホルダに保持された試料をカッタで切って切断面および/または切込を形成するように設けられる。このカッタは試料ホルダと一体化し、または独立して設けられるもので、一般には半導体ウエハ用の高精度スライサ等のカッティング装置のカッタをそのまま利用できるが、簡易切断の場合には試料ホルダの一端部に支点を有するレバー式のカッタなども使用できる。この場合試料ホルダをカッティング装置に装着して位置決めし、試料保持部から突出する試料を切るように構成される。複数の試料保持部に複数の試料が保持される場合にはすべての試料を同一平面で切るように配置される。例えば複数の試料保持部が一行に配置される場合には、その列方向にカッタまたは試料ホルダを移動させて、複数の試料を切るように構成される。カッタはスライド式、回転式など任意のものが使用できるが、ダイヤモンドソーのような刃部にダイヤモンド等の超硬材を有する回転式のカッタが好ましい。

30

【0015】

試料ホルダから突出する試料をカッタで切る場合、突出部を保持するための突出部受部を設けるのが好ましい。この突出部受部は試料ホルダに直接または取付台等を介して着脱自在に取付けられる受台に設けられるのが好ましい。

【0016】

上記のような装置により分析等の試料を調製するためには、まず試料ホルダの試料保持部に試料を保持し、好ましくは試料保持部に充填材を充填して試料を包埋した状態で試料を保持し、固定部材がある場合は固定部材で試料を固定する。また受台がある場合は受台を試料ホルダに取付けて突出部受部で試料の突出部を保持する。この状態でドライアイス収容部にドライアイス粉末を収容し、試料の周囲および上部をドライアイス粉末で覆う。

40

【0017】

ドライアイスは昇華温度が大気圧下では $-78.5$ であるため、試料は実質的に瞬時に凍結されて周囲の気相が不活性な炭酸ガスに置換される。試料は瞬時に凍結するため、組織内部の氷の結晶は成長せず、また酸素が追出されるため、氷、酸素および熱による変質はなくなる。また低温のため充填材は固化して試料は固定される。

【0018】

この状態でカッタをスライドまたは回転させてカッティング空間において試料を切ると、

50

摩擦熱はドライアイスに吸収されるため、試料は実質的に - 78 . 5 の不活性雰囲気  
に保たれた状態で切断面または切込が形成される。試料および充填材とも固化する  
ため、根のような軟質組織も切れ、切屑は飛散し、試料面に付着しない。切断面を  
カッタの刃で薄く再研磨することにより、鏡面仕上げにすることができる。

#### 【0019】

上記により調製された試料は試料ホルダごと受台から取外して分析装置に装着して  
分析、観察、記録等の操作を行う。これらの操作は試料を凍結させた状態で行って  
もよく、また常温に戻した状態で行ってもよい。切断面を形成した場合は切断面  
にビームを照射して分光分析等の分析を行ったり、顕微鏡または写真等による観  
察、画像解析装置等による形状の記録、測定などを行う。切断面と平行に切込を  
形成した場合は、形成された片にレーザー照射して成分を蒸発させることによ  
り質量分析を正確に行うことができる。上記の試料は分析面を光軸に対して直角  
にできるため、従来法では光散乱で測定できなかった微量成分の分析が可能に  
なる。また切断面は試料ホルダの基部から一定の距離に形成できるため、多数  
の試料を同条件で分析でき分析精度が高くなる。

10

#### 【0020】

上記により調製された試料はドライアイスで凍結した状態で切っているため、  
変形、破壊、変質が生じない。このため、試料の内部状態を正確に分析、観察等  
を行い、分析等の精度を高くすることができる。またドライアイスにより生成す  
る炭酸ガスは容易に除去できるため、分析精度への影響を少なくすることができ  
る。

#### 【0021】

切断された試料または突出部は瞬間的に凍結が起こるため変質はなく、解凍後  
は元の状態に復帰する。このため種子を試料とした場合、胚部は発芽機能を維  
持するから、育種することが可能になる。従って試料分析により優れた種子を  
選別し、選別された種子の胚部を利用して育種することにより、目的とする種  
子を増すことができる。この場合胚部を試料保持部側に位置させることによ  
り、分析による影響を受けることなく、種子の選別が可能になる。

20

#### 【0022】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、ドライアイスで凍結および気相置換した状態で試料を切るよ  
うにしたので、簡単な構成と操作により、試料の変形、破壊、変質等を防止し  
て切断面および/または切込を形成し、高精度の分析等を行うことができる。

30

試料保持部に充填材を充填し試料を包埋してドライアイスにより充填材を固  
化させると、試料の固定が容易であり、種子のように機械的な固定が困難な試  
料についても容易に固定することができる。

試料ホルダから突出する突出部を保持する突出部受部を設けることにより、  
カッタにより切るときの振動等による試料の移動を防止し、試料を正確に切  
ることができる。

#### 【0023】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態を図面により説明する。

図1は実施形態の試料調製装置の斜視図、図2はカッタで切る状態を示す斜  
視図、図3(a)は切る状態の断面図、(b)は切った状態の試料の斜視図、  
図4は切った状態の試料の斜視図、図5(a)、(b)、(c)は異なる状態の試料  
ホルダの一部の拡大斜視図である。

40

#### 【0024】

図1ないし5において、試料調製装置10は試料ホルダ1と受台2が結合部材3  
aにより着脱可能に取り付けられている。試料ホルダ1は上辺のエッジに沿  
って試料11(本実施形態では小麦種子)の半分の形状に対応した凹部からなる  
複数の試料保持部4が一行に形成されている。この試料保持部4に保持され  
た試料11の保持部11aを上から押えて固定するようにくし歯状の固定部材  
5が結合部材3bによって取り付けられている。試料保持部4には充填材13  
を充填する充填空間4aを形成するのが好ましい。試料ホルダ1に

50

は試料保持部 4 を取り囲むようにドライアイス 1 2 を收容するためのドライアイス收容部 6 a が溝状に形成されている。

【0025】

受台 2 は試料ホルダ 1 に着脱自在に取り付けられており、試料 1 1 の突出部 1 1 b を保持する突出部受部 7 が試料保持部 4 に対向して一列に設けられている。突出部受部 7 の周囲にはドライアイス收容部 6 b が設けられ、ドライアイス收容部 6 a に連なっている。

試料ホルダ 1 と受台 2 の合せ面 8 の上部にはカッティング空間 9 が形成されている。

【0026】

図 2 において、20 はカッティング装置、21 は試料ステージ、22 は回転式のダイヤモンドソーからなるカッタ、23 は試料押え治具、24 は保持板である。

10

【0027】

上記の装置による試料調製方法は以下のように行われる。まず図 5 ( a ) の状態から図 5 ( b ) に示すように、試料ホルダ 1 の試料保持部 4 に試料 1 1 の胚部 1 1 c 側を保持部 1 1 a として收容した状態でシリコンパテ等の充填材 1 3 を充填して試料 1 1 を包埋し、固定部材 5 で固定する。そして図 3 ( a ) に示すように受台 2 を結合部材 3 a で結合し、突出部 1 1 b を突出部受部 7 で保持する。この状態で図 2 に示すように試料調製装置 10 をカッティング装置 20 の試料ステージ 21 に載せ試料押え治具 23 で位置決めする。そしてドライアイス收容部 6 a、6 b および試料 1 1 の上にドライアイス 1 2 を收容して試料 1 1 を凍結させ、気相置換するとともに充填材 1 3 を固化させて試料 1 1 を固定する。

【0028】

20

この状態でカッタ 22 をカッティング空間 9 に降下させ、カッタ 22 または試料ステージ 21 を移動させて試料を切り、切断面 1 4 および切込 1 5 を形成する。このときカッタ 22 による摩擦熱はドライアイスにより吸収される。試料 1 1 は凍結により脆化しているのでカッタ 22 による切取部分は粉末化して飛散し、試料 1 1 の外層部等が内層部の切断面に付着せず、変形、破壊、変質等のない観察面としての切断面 1 4 および切込 1 5 が得られる。カッタ 22 を再度降下させて切断面を薄く研磨することにより鏡面仕上げも可能である。

【0029】

こうして調製した試料 1 1 は試料ホルダ 1 ごと取り出して受台 2 から分離すると、図 4 および図 5 ( c ) に示すように、試料 1 1 の切断面 1 4 が露出した状態になる。試料 1 1 の形状は図 3 ( b ) に示す通りである。この試料ホルダ 1 を試料が凍結状態のまま、または常温に戻して分析装置等に装着して分析等を行う。例えば分光分析の場合、試料 1 1 の切断面 1 4 に照射光を照射するように試料ホルダ 1 を装着して分光分析を行う。この場合切断面 1 4 は試料ホルダ 1 の基部から一定距離、一定角度 ( 直角 ) となっているので、多数の試料について同一条件で分析を行うことができ、分析精度は高い。質量分析を行う場合は切断面 1 4 と切込 1 5 間の試料片 1 6 にレーザ光を照射して蒸発させ、質量分析を行う。他の分析、観察、記録、測定等も上記と同様にして行うことができる。

30

【0030】

実施形態のように小麦の種子を試料とする場合には、上記の分析により種子の選別を行い、これを育種して増やすことができる。この場合胚部 1 1 c は発芽機能を維持したまま残留するので、その中から選別した種子の胚部をとり出して育種することができる。

40

【0031】

【実施例】

次に本発明の実施例について説明する。

【0032】

実施例 1

図 1 の試料調製装置を用い、試料として小麦品種 ( 農林 6 1 号、関東 1 1 9 号、Halberd、Eradu ) の種子を各 5 粒ずつ ( 合計 20 粒 ) 分光分析に供し白度を調べた。試料調製装置は、アクリル樹脂を切削加工して作成した。試料ホルダと受台を結合ネジで結合し、試料調製装置を組み立てた。小麦種子をシリコン系のパテを薄く塗布した試料保

50

持部に並べ、ワイヤカット放電加工機で作成したステンレス製の板バネ ( $t = 1 \text{ mm}$ ) からなる固定部材をネジ止めして種子の下部をパテの中に包埋した。

【0033】

小麦は、可食部である胚乳部を突出部として、以下の通り高精度スライサー (USM 150A、東芝機械) で切断した。20個の試料を保持した試料ホルダをスライサーの電磁チャック式ステージに固定用治具で固定し、切断位置の照準を合わせた後、試料調製装置のドライアイス収容部および試料上部を直径約1mmに粉碎したドライアイスで埋め、ドライアイスで全体を  $-78.5$  に冷却して試料およびパテを固化させて切断時の変形および発熱を防ぐと共に、昇華した炭酸ガスで酸素を置換して酸化を防止した。切断は、ダイヤモンドソー ( $\phi = 100 \text{ mm}$ 、 $t = 200 \mu\text{m}$ 、ダイヤモンド粒度500メッシュ、旭ダイヤモンド社) を用い、ドライアイス粉末の中に包埋された試料を  $6,000 \text{ rpm}$  の回転速度で切断した。次いで、表面を  $5 \sim 10 \mu\text{m}$  削り、鏡面仕上げの切断面として試料測定部を調製した。試料の厚さの均一性が要求される場合には、切断面より1mm後方に切込を入れ、試料片の厚さを一定にした。

10

【0034】

白度の測定は、切断した種子が並んでいる試料調製装置の結合ネジを外して受台を離し、試料の鏡面状の切断面が上面になるように試料ステージに設置し、微小面 ( $300 \mu\text{m}$ ) の顕微測色を試みた。測色データはコンピュータに記録し、色彩解析ソフトを用いて、カラー画像化して解析した。その測定結果を表1に示す。

20

【0035】

【表1】

表1

	農林61号	関東119号	Halberd	Eradu
測定値	96.02	93.07	67.24	86.39
	71.45	84.71	83.68	96.08
	80.39	87.3	78.01	85.96
	72.87	98.85	76.28	93.6
	81.68	82.54	60.45	97.82
平均値	80.48	89.29	73.13	91.97
標準誤差	9.78	6.64	9.23	5.50

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1】実施形態の試料調製装置の斜視図である。

【図2】カッタで切る状態を示す斜視図である。

【図3】(a)はカッタで切る状態の断面図、(b)は切った状態の試料の斜視図である。

【図4】カッタで試料を切った状態の試料ホルダの斜視図である。

【図5】(a)、(b)、(c)は異なる状態の試料ホルダの一部の拡大斜視図である。

50

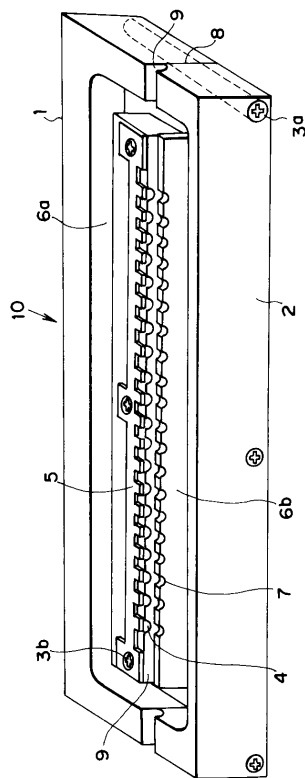
## 【符号の説明】

- 1 試料ホルダ
- 2 受台
- 3 a、3 b 結合部材
- 4 試料保持部
- 5 固定部材
- 6 a、6 b ドライアイス収容部
- 7 突出部受部
- 8 合せ面
- 9 カutting空間
- 10 試料調製装置
- 11 試料
- 12 ドライアイス
- 13 充填材
- 14 切断面
- 15 切込
- 16 試料片
- 20 カutting装置
- 21 試料ステージ
- 22 カッタ
- 23 試料押え治具
- 24 保持板

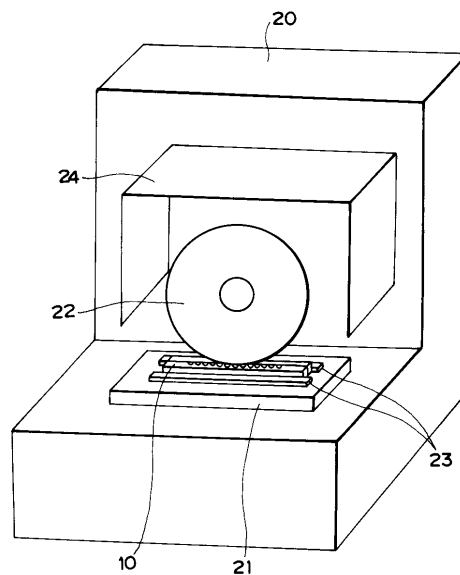
10

20

【図1】



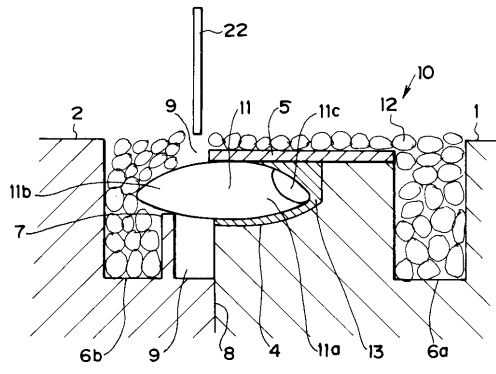
【図2】



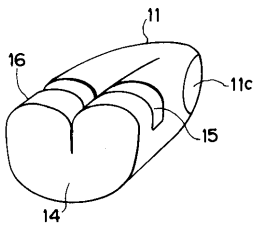


【 図 3 】

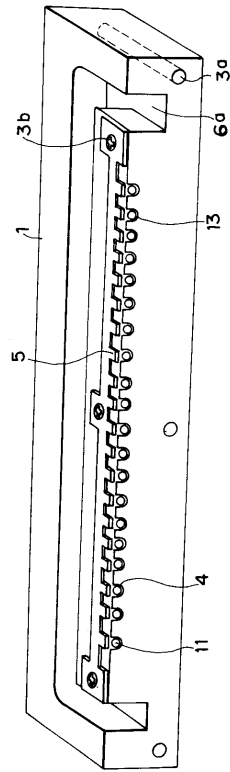
(a)



(b)

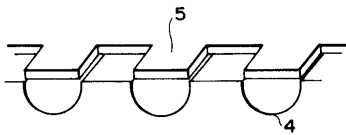


【 図 4 】

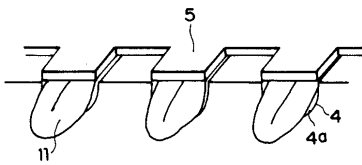


【 図 5 】

(a)



(b)



(c)

