

走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた 生物試料の観察

自然研究講座 細胞分化研究室 出野 卓也

0. はじめに

このテキストでは、走査型電子顕微鏡の原理を簡単に説明した上で、生物試料の基本的な処理方法について解説する。操作電子顕微鏡の操作方法については、機種やメーカーによって異なる点があるため、実物(JXA-840A)を用いて説明するので、ここでは触れない。

1. JXA-840A の紹介

本学科学機器共同利用センターには、日本電子製電子プローブ・マイクロアナライザーJXA-840A(図1)が設置されている。

JXA-840A は、試料に照射した電子ビームにより発生した特性 X 線を測定し、試料表面の微小領域の元素分析(Electron Probe Micro Analyze : 以下 EPMA と略記 : 図2)を行なうための装置である。しかし、原型となった装置は走査型電子顕微鏡



図1 JXA-840A

(Scanning Electron Microscope : 以下 SEM と略記)なので、通常の二次電子像や反射電子像なども観察できる。JXA-840A は EPMA 用にタングステンフィラメントの電子銃を使用しているので、フィールドエミッション型の SEM に比べると高倍率での分解能は多少劣るが、それほど高倍率を必要としない生物試料の観察には十分な性能を持っている。

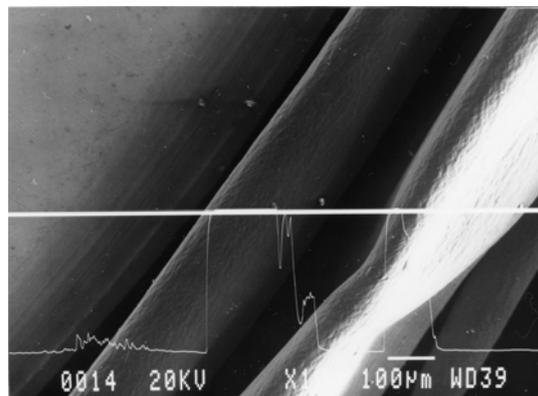
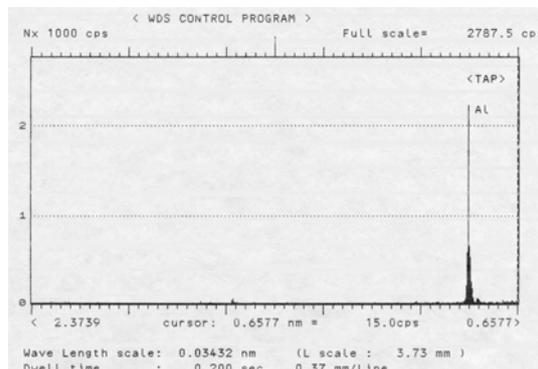


図2 アルミホイルの元素分析の例
上 : 点分析、下 : SEM 像と線分析

2. SEM 観察の原理

SEM は、一般的には、標本表面の微細構造を立体的に観察するための顕微鏡である。その拡大像形成の原理を理解することは、試料作製や、像解釈、トラブル対処の上で大変重要である。SEM 像が見える原理を簡単に説明すると、次のようになる。

高真空の試料室に置かれた試料に真上から電子レンズでできるだけ小さな点に収束した電子ビームを当てると、試料表面から二次電子や反射電子、オージェ電子、特性 X 線などが放出される。SEM では、この二次電子を捉えて像を作る。

電子ビームによって試料表面から叩き出される二次電子の量は、ビームの当たった表面の構成元素が重いほど多い。また、試料が同じ元素構成であれば、電子ビームの入射角度により二次電子量が変わり、入射角度が垂直に近いほど二次電子量が少なくなる。電子ビームが当たらない部分からは全く二次電子が放出されない。一方、尖った突出部分では二次電子が試料によって吸収されにくいので、二次電子量が多くなる(エッジ効果)。つまり、表面の凹凸に応じて二次電子の量に変化する。SEM では、この二次電子量の変化を利用して像をつくる。

電子ビームで試料表面をスキャンし、試料の斜め上方に設置された検出器で放出された二次電子を測定する。ビーム照射点の座標と二次電子量を、CRT 上の輝点の座標と明暗に変換する。すると、二次電子量が像のコントラストとしなり、ちょうど二次電子検出器から光を試料に照射し、電子銃の位置で見たような立体像が CRT 上に現れる。電子ビームのスキャン範囲を小さくす

れば、形成される像は拡大される。

3. SEM 試料の作製

i) SEM 試料に要求される性質

以上のような原理で像を形成させるため、観察する試料にはいくつかの要件が備わっていないといけない。

まず、第一に、高真空中に持ち込むため、完全に乾燥していて、ガスなどを放出しないことが要求される。もしガスなどが放出されると、電子ビームが散乱して像に影響が生じる。しかし、当然のことながら、生物材料は水を含んでいる。

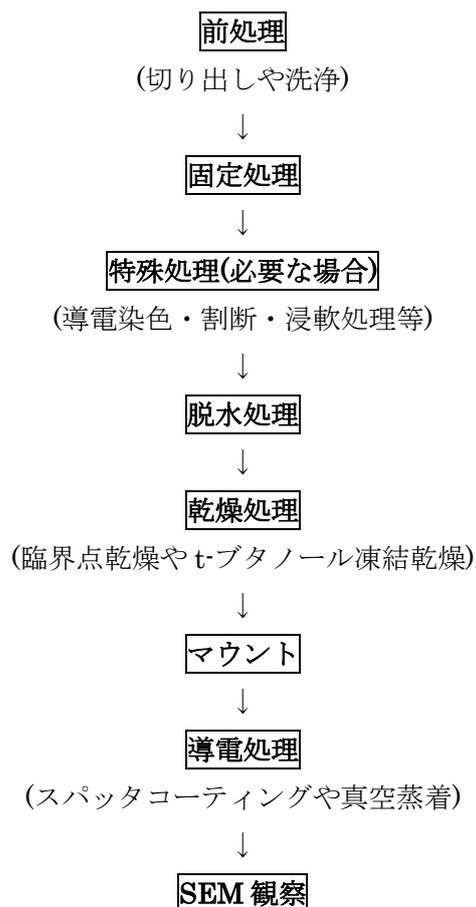
第二に、試料に導電性がなければならない。電子ビームの電子は、試料に到達後、アースへと逃がさなければならない。さもないと、試料に電子が蓄積し、それが放出されて、二次電子と一緒に検出器に捉えられる。CRT 上では異常に明るく光るようになる。ひどい場合はスミアを生じる。これは帯電(チャージアップ)と呼ばれ、像が乱れる大きな原因の一つである。試料そのものに導電性がなければ、何らかの方法で導電性を持たせなければならない。生物試料は、水を含んでいるときはある程度の導電性があるが、完全に脱水すると電気を通さない。

第三に、二次電子の発生効率が高いことが望ましい。この効率が低いと像のコントラストが低くなる。試料が重元素で構成されていれば十分な二次電子が得られるが、生物試料は通常、C や O、H、N などの軽元素でできているため、そのままでは十分な二次電子を得ることが困難である。

これらの条件を満たしていないと、満足

のいく SEM 観察ができないし、場合によっては真空度の低下などにより、SEM の装置を緊急停止させてしまうこともあり得る。

ii) 標本作製過程の流れ



前処理

a) 試料の切り出し

SEM ではある程度高倍率で観察することが多いので、試料を不必要に大きなまま処理することは無意味である。脱水・乾燥処理における変形を避け、オスミウム酸などの高価な試薬を節約する上でも、適当なサイズに切り出す方がよい。ただし、試料を取り扱う際にピンセットなどでつまむためのつかみしろを残した方がよい。

切り出しには、ハサミやメス、針などを必要に応じて用いる。また、刃物の他に、試料の保持に GG タイプの先端が細いピンセットを用意するとよい。2本のピンセットで試料を引き裂くこともできる。いずれにせよ、切ったり、引き裂いたり、挟んだりした部分とその周辺は、微細構造が破壊されていたり、変形していることが多いので、観察予定場所と切り出す場所に注意すること。また、どれほど鋭利な刃物で切り出しても、切り出し面は変形し破壊されている。断面を見る必要がある場合は、割断法を施した方がよい。

通常、切り出しはクリーニングの前に行なうことが多いが、必要に応じて、切り出し後や固定後に行なうこともある。

b) クリーニング

SEM は試料表面の微細構造を見ることが多いが、生物試料の表面はきれいであることは少ない。これらの汚染物は SEM 観察の障害になるので除去しなければならない。特に光学的に透明な粘液や体液などは顕微鏡観察のじゃまにならないが、SEM 観察では表面に金などを蒸着するため、“不透明な”障害物となる。

肉眼、あるいは双眼実体顕微鏡下で識別できる固形の汚染物は、GG タイプの先の細いピンセットや筆、柄付き針などを用いて、物理的に除去すればよい。また、多数の細かい固形汚染物や粘液・体液などは、試料に合わせて蒸留水や、リンゲル液、緩衝液などをピペットや洗瓶で水流にしてあて、洗い流す。生きたままの試料であれば、かなり強い水流でも破損することは少ない。しかし、固定後の硬化した試料はもろくな

るため、水流の強さに注意が必要である。また、タンパク質などを含む粘液や体液などは、固定前には液状であったものが、固定によって変性し、固体になる場合もあるので注意が必要である。

このような物理的手段で取り除くことの困難な汚染物や被覆物(生物の分泌物や細胞外マトリックスのようなもの)は、生化的・化学的手法で取り除くことになる。汚染物や被覆物の性質に合わせて酵素や酸・アルカリ等を用いて処理する。処理液の濃度や処理時間によっては、試料表面の微細構造にダメージを与える可能性が強いので十分注意する。物理的に除去した場合と比較する必要がある。

また、固定液や脱水液との化学反応によって新たに汚染物が生じる場合があり、クリーニング後も注意が必要である。

固定方法

a) 前固定

通常、グルタルアルデヒド単独、あるいはグルタルアルデヒドとホルムアルデヒドの混合液を用いることが多い。濃度は試料によって多少異なるが、グルタルアルデヒドなら 2~3%、混合液なら、グルタルアルデヒド 2~3%、ホルムアルデヒド 1.5~2%くらいが一般的である。例えば、Karnovsky の固定液は、2.5%グルタルアルデヒド、2.0%ホルムアルデヒド、0.1M カコジル酸緩衝液という組成で、これで 24 時間以上 48 時間以内の固定を行なう。

グルタルアルデヒドは電顕グレードの 25%のものを用いる。あまり古いものは使わない。筆者は TAAB 社の 25%水溶液を開封後、1 ヶ月以内に使用している。窒素封入

のアンブルのものは鮮度がよいが、1 回の使用量が少ない場合は不経済である。

ホルムアルデヒドは、ホルマリン(ホルムアルデヒド液)ではなく、粉末状のパラホルムアルデヒドを水に溶かして作製する。水にはそのまま溶けないので、湯煎等で加温し、1N の NaOH を 1 滴ずつ加えて沈殿が溶けるまで攪拌する。NaOH を入れすぎるとよくない。これも 2 週間程度で作り替える方がよい。これらを所定の濃度になるように適当な緩衝液で希釈して用いる。

b) 後固定

通常、オスミウム酸を用いて後固定を行なうことが多い。前固定終了後、適当な緩衝液で試料を洗い、緩衝液に 1%程度の濃度で溶かしたオスミウム酸で 1 時間から 1 時間半固定する。温度は 4℃がよく、冷蔵庫を用いる。オスミウム酸の蒸気は大変酸化力が強く、粘膜等に対して毒性が強いため、取り扱いにはできればドラフトを用い、固定に用いるサンプル瓶はパラフィルムなどで完全に密封すること。オスミウム酸廃液の処理にも注意が必要である。固定終了後、適当な緩衝液で十分に洗浄し、遊離オスミウム酸を完全に除去すること。

SEM 試料の場合、オスミウム酸による後固定を省くことができる。筆者の材料の場合、後固定を省いた場合を比較して、はっきりとわかるような違いは見られない。ただし、オスミウム酸で後固定すると導電染色にもなるので、チャージアップが予想される試料の場合はおこなった方がよい。

c) 緩衝液の選択

pH

固定液の pH は組織の pH に等しい方がよい。固定液によって組織の pH が変化すると、タンパク質の構造や性質が変化し、微細構造が変化したり、液性成分が不溶化して沈殿が生じ、それが微細構造上に付着したりする。ほとんどの動物組織では平均 pH は 7.4 なので、固定液の pH を pH7.2~7.4 の範囲に保つべきである。植物組織では多少酸性側(〜pH7.1)がよいとされている。従って、この範囲の緩衝液を用いて固定液を作製する必要がある。また、緩衝液のイオン成分も影響を及ぼすことがあるので、注意する必要がある。

浸透圧

生きている細胞の細胞膜は選択透過性を持った半透性膜なので、液性環境の浸透圧の影響を受ける。当然、固定液の浸透圧も試料に大きな影響を与える。固定液の浸透圧が高ければ試料は収縮するし、低ければ膨潤する。これを防ぐためには細胞質と等張であればよいわけだが、細胞質の浸透圧は不明なことが多いし、簡単に測定できない場合もある。そこで、とりあえず血液や体液、海水などの浸透圧で代用することが多い。もし微細構造に明らかな浸透圧の影響が見られるようなら、緩衝液の濃度を変えて固定液の浸透圧を調節する必要がある。

脱水・乾燥

a) 脱水処理

急速な脱水は試料のひずみを招くため、試料を直接高濃度の脱水液に入れることはない。通常、エチルアルコールシリーズで脱水を徐々に行なう。濃度は(30%)—50%—70%—90%—95%—99%の順で高めていく

が、濃度の精度はそれほど要求されない。むしろゴミなどの混入に注意すること。脱水時間は試料のサイズや組織の稠密度によって変わる。パラフィン切片標本を作るときに 99.5%以上のエタノールの水分を無水硫酸銅で取り除いたものを純アルコールとして用いるが、硫酸銅の結晶が析出する可能性もあるので SEM 標本作製では使用しない方がよい。99.7%以上の特級エチルアルコールを 99%兼 100%エタノールとして使用して脱水完了としても問題はない。

脱水にアセトン(シリーズ)を用いることもある。脱水力が強いために短時間で脱水ができるが、ひずみを生じる可能性が高くなるので十分注意して行なう必要がある。

b) 乾燥

貝殻や骨などの硬組織であれば、十分乾燥していればそのまま、仮に湿っていても、エチルアルコールなどで水分を除去し、自然乾燥させるだけで観察用の試料となる。甲虫類の乾燥標本なども同じである。残っている水分は、イオンスパッタリングの際に真空ポンプで引くことにより除去できる。

しかし、自然乾燥時の表面張力は大変大きく、軟組織の場合は微細構造が破壊される。ちょうどミイラか魚の干物のようになる。そのため、試料表面に表面張力をかけないで乾燥させる方法が開発されており、次に述べる臨界点乾燥法と t-ブタノール凍結乾燥法がその代表的手法である。

1. 臨界点乾燥法

SEM試料の乾燥に最もよく用いられているのが、CO₂を用いた臨界点乾燥法である。本学にはJCPD-5 という臨界点乾燥装



図3 臨界点乾燥装置 JCPD-5

置(図3)があり、脱水の済んだ試料を簡単に乾燥できる。細かい操作方法は説明書に書かれているので省く。

使用上の注意として、室温の高い夏期には、CO₂の断熱膨張を利用して、チャンバーの温度を十分(10℃以下)に下げた後、試料を入れ、CO₂を導入すること。また、室温の低い冬季には、あらかじめ室温を上げてボンベ内温度を上げた後に、試料を入れて乾燥すること。もちろん、チャンバーの温度が上がれば、断熱膨張で冷却する。いずれにせよ、可能な限り液体状のCO₂を導入することが絶対必要である。できればのぞき窓から見て泡程度しか気相が残らないようにした方がよい。

臨界点乾燥法では、通常、100%エタノールとCO₂の中間液として酢酸イソアミルを用いることが多い。酢酸イソアミルはエタノールより蒸発しにくく、試料が自然乾燥する危険が少ないし、特有のにおいがあるので、CO₂と十分置換したかどうか、鼻で確かめることができる。しかし、逆に蒸発しにくいために残りやすく、残存液で試料が濡れることもある。実際には、100%エタノールから直接CO₂に移しても問題はない

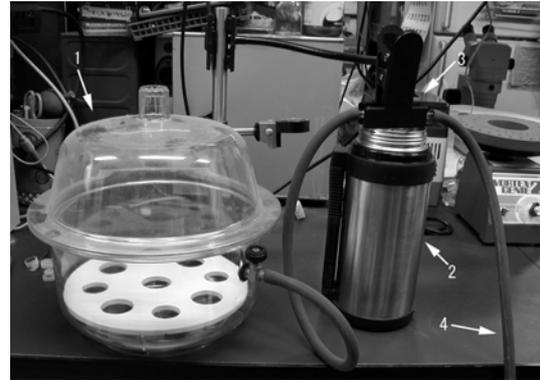


図4 t-ブチルアルコール凍結乾燥装置
1:真空デシケーター、2:液体窒素入りステンレス魔法瓶、3:トラップ、4:ロータリー真空ポンプへ

ようである。この場合、試料が自然乾燥しない程度に十分エタノールを除去し、手早く乾燥チャンバーに移して臨界点乾燥に移ることが重要である。

2. t-ブチルアルコール凍結乾燥法

t-ブチルアルコールは高い蒸気圧を持っており、凝固点は 25.5℃と高いので、通常の冷蔵庫で試料を凍結させることができる。また、凍結乾燥法の場合は、臨界点乾燥法のように数十気圧まで加圧する必要はなく、減圧で乾燥するために1気圧に耐える容器であれば、乾燥チャンバーとして利用できる。実際、プラスチック製の真空デシケーター(図4 矢印 1)で十分なため、真空ポンプの排気量が十分であれば、大量に試料を処理することが可能である。また、臨界点乾燥装置の乾燥チャンバーに入らないような大きな試料の観察も可能である。

脱水の済んだ試料を 100%エチルアルコールから t-ブチルアルコールに置換する。液は3回くらい交換して、完全に置換する。最終的な液量は、試料がかろうじて浸る程

度がよい。試料が飛散することを防ぐため、サンプル瓶の口をキムワイプ片で覆い、輪ゴムで止める。これを冷蔵庫、あるいは冷凍庫に入ると数分で白く凍結する。

これを真空デシケーターに移し、ロータリーポンプで排気を行なうと、凍結した t-ブチルアルコールは徐々に昇華する。室温が t-ブチルアルコールの凝固点より高い場合は、室温を十分下げるかサンプル瓶の下に十分冷却した金属ブロックをおくとよい。

t-ブチルアルコール用のトラップが付いた専用の装置も市販されているので、それを利用すると便利である。

試料台へのマウント

a) 試料台

JXA-840A では、通常、直径 12.5mm、厚み 10mm の真鍮製試料台を用いている。

b) 接着剤とテープ

試料を試料台に接着するには、一般的な教科書などには銀ペーストなどの導電性接着剤を用いるように書いてある。それ以外にも、カーボン両面テープや金属箔両面テープが市販されている。普通の両面テープを真空中へ持ち込むと、溶剤が揮発して収縮してひび割れが広がり、場合によっては表面に蒸着した金属膜が切れて導電性が失われる場合があるが、導電性の両面テープならその心配はない。なお、大きくて、底面が平らでない試料を保持するにはあまり向いていない。

また、木工用ボンドも便利な接着剤である。表面はかなり滑らかになるので、バックがきれいである。比較的大きくて不定型な試料も容易に接着できる。ただし、乾燥

に多少時間がかかるし、表面が先に乾いて膜を作り、内部が乾く前に真空中へ入れると、風船のように膨らんでしまうので注意が必要。爪楊枝や使用済みのプリペイドカードなどでできるだけ薄く広げるのがコツである。

c) 試料のマウント方法

比較的大きな試料の場合、観察に支障のない部分、例えば、試料の端とか裏側近くをピンセットで掴み、試料台上へ上記の接着剤やテープでしっかりと確実に貼り付ける。何かのショックで接着が外れたり、試料が動いたりすると、蒸着した金の膜が途切れて、試料がアースから浮いてしまい、チャージアップの原因となる。また、試料を真上から見てあまりオーバーハングが大きくて、イオンスパッタリングでも金などが回り込めないような状況なら、導電ペーストや導電両面テープを利用して、確実にアースへ落ちるように工夫すること。

小さな試料でオリエンテーションが問題にならない場合や、たくさんの試料があり、ランダムにマウントされても必要なオリエンテーションの試料を選べる場合は、試料台の上面に貼った導電両面テープの上に、乾燥させた試料の入った乾燥カゴかサンプル瓶を逆さまに載せ、試料台ごとテーブルに軽く叩きつけると試料がテープに貼り付く。試料が小さくて軽いため、この操作によって試料が破損することはほとんどない。なお、試料が多すぎる場合は、試料が重なり合い、導電処理後にアースから浮いた試料が生じることもあるので、試料台を横向きに数回机に打ち付けて、テープに貼り付いていない試料を落とす操作が必要である。

オリエンテーションを決めて小さな試料をマウントするには、ルーペあるいは双眼実体顕微鏡下での作業が必要になる。

導電処理

生物試料は生きているときはある程度電気を通すが、完全に乾燥すると電気を通さない。そのままではSEM観察試料として不适当である。通常、二つの方法で導電性を与えている。一つの方法は、試料表面に導電膜をコートする方法である。二次電子像の観察が目的であれば重金属の方が望ましく、通常は金や白金、白金パラジウム合金などの薄膜を被せる。そのために用いられているのが、イオンスパッタリング装置と真空蒸着装置である。もう一つの方法は、試料に重金属を染み込ませて導電性を持たせる方法で、導電染色と呼ばれている。

a) イオンスパッタリング

真空中で金属ターゲットに窒素やアルゴンなどのイオンをぶつけて金属原子塊を叩き出し、それを試料表面に付着させるイオンスパッタリングは最も一般的な導電方法で、操作も極めて容易である。

本学には JFC-1100E イオンスパッター(図5)があり、電流値と時間だけで膜厚を設定できる。詳しい使用方法は説明書を見てもらえばすぐに分かる。現在用意されているターゲットはAuだけだが、PtやPt・Pd合金、Au・Pd合金なども用いられる。Ptはコーティング粒子が細かいので、高倍率観察に適している。

原理からすれば、まんべんなくコーティングされるように思われがちだが、実際は金属ターゲットから影になった部分や、深



図5 イオンスパッタリング装置
JFC-1100E

い穴の奥などはコーティングが不十分になりやすい。生物試料の場合、結構このような構造をしていることが多いので、必要に応じて後述の導電染色と組み合わせる。

金属コーティングの膜厚は数~30nm程度とされており、膜厚が厚くなると、天ぷらの衣か樹氷のように、表面の微細な凹凸が隠れてしまう。また、膜厚が厚くなるほど金属の粒状構造が目立つようになるので、高倍率で観察する場合はチャージアップしない程度にできるだけ薄くする必要がある。しかし、生物試料は観察倍率が一般に低いので、チャージアップを避けるために厚塗りの方がベターな場合もある。

JFC-1100Eの場合、説明書にターゲットがAuで、イオン電流が10mAの場合のコーティング時間と膜厚のグラフが記載されており、イオン電流を10mAに保てば、膜厚はコーティング時間だけで調節できる。

b) 真空蒸着

イオンスパッタリングでは、EPMAに必要なカーボンのコーティングが困難である。

カーボンをコーティングするためには、真空蒸着を行なう必要がある。もちろん、

真空蒸着装置で Au などの金属もコーティングできるのだが、金属蒸発源から試料に向かって金属粒子が直線的に飛ぶため、影になる部分にはコーティングができない。そのため、ジンバル装置を用いて試料を3次元的に回転させてコーティングする。しかし、ジンバルを回しても均等に蒸着させるのは難しい。そのため、回り込みのよいカーボンを先にコーティングし、その上に二次電子放出量の多い金属を二重にコーティングすることが多く、皮膜の膜厚が厚くなりやすい。

4. 試料の特性に合わせた、標本作成上のチップス

これまでに筆者が SEM 標本を作成した際に用いた方法や気づいたことなどを、以下に簡単に述べる。

i)血球・大腸菌

カバーガラスを小さく切り、その上に血液や菌体の塊をなすりつける。かなり高密度なので、適当な緩衝液で希釈した方がよい場合もある。自然乾燥する前にカバーガラス片ごと固定液に投入し、脱水・乾燥したのち、試料台に両面テープで貼り付け、金属コーティングをして観察する。

ii)昆虫

表面の十分に硬い甲虫などの場合、十分乾燥した標本であれば、そのまま試料台に貼り付け、金属コーティングをして観察することが可能である。しかし、それ以外の昆虫だと外皮も柔らかいため、やはり固定・脱水・乾燥の手順を踏んだ方がよい。

iii)粉体

遊離細胞やプランクトンなど、実体顕微鏡の下でもオリエンテーションをしながら試料台にマウントするのが困難な試料の場合は、濾紙やメンブレンフィルターなどで試料懸濁液を濾過し、濾紙やフィルターごと固定・乾燥にかけてマウントする。

遠心で集める場合は、微細構造が壊れたり、変形しないように遠心力を調節する。

5. 標本観察上の注意点

i)加速電圧

通常、加速電圧を上げるほど高分解能が得られるが、生物試料の場合、電子ビームによるダメージが大きい。実際、観察中に突起物がゆがんでいくのがわかるほどである。またチャージアップしやすいので、もともと導電性のない生物試料にとっては不利である。さらに、電子ビームが試料内まで透過して、内部情報が表面上方に混入する、つまり半透明化した像になることもある。通常、5kV 程度の加速電圧を用いる。

ii)プローブ電流

観察用 CRT では、プローブ電流を減らすと像が暗くなり、ノイズが増えるために見にくくなるため、ある程度のプローブ電流を流す。しかし、写真撮影の時は解像度を上げるために、プローブ電流を絞る必要がある。これを忘れると、ヌメツとした写真に仕上がるので注意すること。

6. 写真撮影

i)インスタントフィルム

本学の JXA-840A には、インスタントフィルムにポラロイド #662 フィルム用のホルダーが用意されているが、通常は同じサイズで撮影条件が分かっているフジフトラマ FP100B を使用している。

ii)ブローニーフィルム

JXA-840A では 120 と 220 のブローニーフィルムが利用できる。6×7 サイズで撮影されるため、120 フィルムで 10 枚しか撮影できない。

iii)デジタルカメラの利用

特定微細構造の数を数える場合などのように、あまり解像度を必要としない場合は、観察用 CRT を直接デジタルカメラで撮影することも可能である。

観察用 CRT は残像性ブラウン管を用いているため、走査速度を TV か SR に設定し、デジタルカメラのストロボを off にして、できるだけ遅いシャッター速度で撮影すれば、ある程度の画像は記録できる。

また、本学の JXA-840A では、撮影用カメラユニットを取り外し、撮影用モニターをデジタル一眼レフカメラで撮影することが可能である。ただ、露出時間が 100 秒なので、タイムあるいはバルブのシャッター制御を持たない一般的なコンパクトデジタルカメラでは撮影できない。

iv)画像ファイリングシステム

最近の SEM ではコンピュータ制御が一般的となり、像観察も制御コンピュータの

モニター上で行う。当然、それらの画像はデジタルデータとして保存される。

また、本学の JXA-840A には付属していないが、JXA-840A に接続可能して、撮影用データを A/D 変換してパソコンに取り込む SemAfore という画像ファイリング装置も開発されている。

7. 参考文献

医学・生物学領域の走査電子顕微鏡技術

田中敬一編 講談社サイエンティフィック 1992

医学・生物学のための走査電子顕微鏡入門

M. A. Hayat 著 鈴木昭男・永谷隆訳 丸善 1979

図説 走査電子顕微鏡—生物試料作製法—

田中敬一・永谷隆編 朝倉書店 1980

タマムシの翅はなぜ玉虫色か 電子顕微鏡でのぞく身のまわりの世界

田中敬一 講談社ブルーバックス B1057 1995

走査電子顕微鏡の基礎と応用

日本電子顕微鏡学会関東支部編 共立出版 1983

Scanning Electron Microscopy of Embryos.

J. B. Morrill 著 Methods in Cell Biology, vol. 27, Echinoderm Gametes and Embryos. T. E. Schroeder 編集 Academic Press, Inc., 1986