

技術報告

走査電子顕微鏡を用いた 水生微生物観察のための簡易試料前処理法

井上雅彦,^{1*} 菅波昌広²

¹ 摂南大学 理工学部 電気電子工学科, 〒572-8508 寝屋川市池田中町17-8

² 摂南大学 学習支援センター, 〒572-8508 寝屋川市池田中町17-8

*m-inoue@ele.setsunan.ac.jp

(2012年10月20日受理; 2012年11月27日掲載決定)

水生微生物を走査型電子顕微鏡で観察する際、真空中での体液の蒸発による細胞膜の変形と、電子線照射による帯電を避けるための工夫が必要である。本研究では、冷凍機や真空装置などの前処理用の装置を用いず、エタノール置換法とイオン液体塗布法を用いた簡単な前処理法について述べる。

A simple preparation method for observation of aquatic micro-organisms by scanning electron microscope

M. Inoue^{1*} and M. Suganami²

¹Department of Electrical & Electronic Engineering, Faculty of Science & Engineering,
Setsunan University, 17-8 Ikeda-nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

²Academic Support Center, Setsunan University, 17-8 Ikeda-nakamachi, Neyagawa,
Osaka 572-8508, Japan

*m-inoue@ele.setsunan.ac.jp

(Received : October 20, 2012; Accepted : November 27, 2012)

For observation of aquatic micro-organisms by a scanning electron microscope, sample pretreatments are necessary to avoid the deformation of cell membrane by evaporation of moisture from inside of the cell in vacuum and also the charging-up of sample under irradiation of electron beam. In the present paper, we report on a simple preparation method by ethanol dehydration and the ionic liquid coating method without using any apparatus for preparation such as a refrigerator, a vacuum equipment and etc.

1. はじめに

子供達に自然の神秘とそれを探るための計測技術の面白さを同時に体験してもらうことを目的として、簡単に持ち運びができ、電池駆動で野外でも使用可能な教育用モバイル走査型電子顕微鏡（モバイルSEM）を企業と共同開発している [1, 2]. 子供達が興味をもつ観察試料のひとつに水生微生物があるが、電子顕微鏡では真空中で観察するため、試料体内の

水分が急激に蒸発する際に試料が変形や破損などの大きなダメージを受ける。また、電子線照射による帯電や照射損傷などの問題がある。このため必ず試料の前処理が必要とされている。通常行われる方法は、以下のようなものである。

まずグルタルアルデヒドや4酸化オスミウムなどを使って細胞膜の固定を行った後、濃度の異なるエタノール水溶液のシリーズ（0～100%）によって

複数回にわけてゆっくりと脱水（エタノール置換）を行い、最後に試料内のエタノールを凝固点の高い第三ブチルアルコールに置換した後、凍結させ、真空中でゆっくり乾燥させる（フリーズドライ）。この後、耐電防止のため蒸着装置にて表面に金属薄膜をコーティングして前処理完了となる。

このような前処理のためには電子顕微鏡本体の他に凍結装置や真空装置、コーティング装置などが必要で、これらを野外に持ち出しての処理はまず不可能である。本研究ではモバイル SEM を使った屋外での観察を前提として、特別な装置を使わない試料前処理方法について検討することにした。

まず、水分の除去方法であるが、小中学校や高校での SEM 利用を考えると、なるべく特殊な薬品を使わない方がよい。そのため細胞膜の固定は省略し、エタノールシリーズによる脱水のみでどの程度の効果が得られるか調べることにした。また、帯電防止の導電膜のコーティングについては、桑畑らによって発明されたイオン液体を塗布する方法を利用することにした [3-5]。この方法では、エタノールで希釈したイオン液体を大気中で滴下するだけであり、特別な装置などは必要としない。ただ、表面の微細構造を埋めてしまうことがある [2, 6] ので塗布する際に工夫が必要である。10⁻² wt % 程度にエタノールで希釈したイオン液体を滴下することで、5000 倍での SEM 観察や EDX 分析が可能であることが河合らによって示されている [6]。

2. 実験

2.1 実験装置

実際に今回の実験に用いたのは日本電子製汎用走査型電子顕微鏡 JSM-6510LAS である。モバイル SEM は二次電子増倍管などの検出器を用いずに直接二次電子電流を計測する方式のため、十分な S/N 比で観察するためには、一次電子ビーム電流を 50~100 nA 程度と比較的大きくする必要があり、そのため試料に与えるダメージや帯電の影響がかなり大きい。今回は試料前処理の各段階での様子を観察し、確認するため、より少ない一次電子ビーム電流で観察可能な汎用 SEM を用いた。通常の二次電子増倍管による観測モードを用い、一次電子加速電圧はモバイル SEM と同じ 3kV とした。スポットサイズは SS50 で、一次電子ビーム電流は、この装置では直接測定はできないが、おおよそ 100 pA 程度である。前処理方法が確立すればもちろんモバイル SEM での観察も可能となると考えられる。

2.2 アルテミア・サリナ

観察試料として海水プランクトンのアルテミア・サリナ (*Artemia salina*) を用いた。アルテミアは米国ソルトレークに生息しているものが有名で、その乾燥卵はシーモンキーやブラインシュリンプの商品名で熱帯魚などの生き餌としてペットショップなどで販売されている。厳密には卵ではなく、休眠状態にある、発生途中の胚を乾燥させたもので休眠シストと呼ばれる。乾燥状態で何年も保存でき、必要な時に海水に浸せば 1~2 日でふ化する [7]。またゴミなどを含まない状態で大量に準備できるので、今回のような実験に適している。ただ、ふ化の際に残った硬い殻が水面に浮かんでアルテミア採取の邪魔となるので、事前に次亜塩素酸ナトリウムを含む家庭用漂白剤を水で 30~40% 程度に薄めたものにシストを 10 分ほど浸した。これによりシストの殻が溶けて無くなり（脱殻）、ふ化確率も大きくなる。脱殻後、よく水洗し、2% 前後の食塩水に浸すと 1~2 日でふ化した。ふ化直後のアルテミアの幼生（ノープリウス）のサイズは 0.3 mm 程度であった。脱皮を繰り返して成長して行くが、今回はふ化後 1 週間のものを使用した。

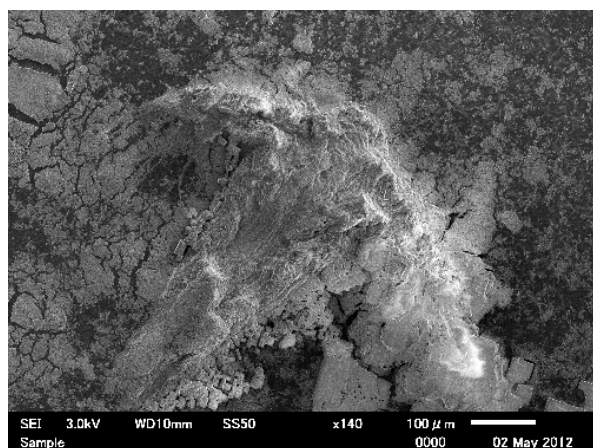
2.3 試料の支持

0.1mm 厚の真鍮板を 1cm×1cm 程度の大きさに切り取り、両面に SEM 観察に用いられるカーボン両面テープ（応研商事）を貼り付けた。正方形のひとつの角を軽く折り曲げ、ピンセットでつかみやすくした。表に試料をのせ、電子顕微鏡の試料ステージに取り付けた。

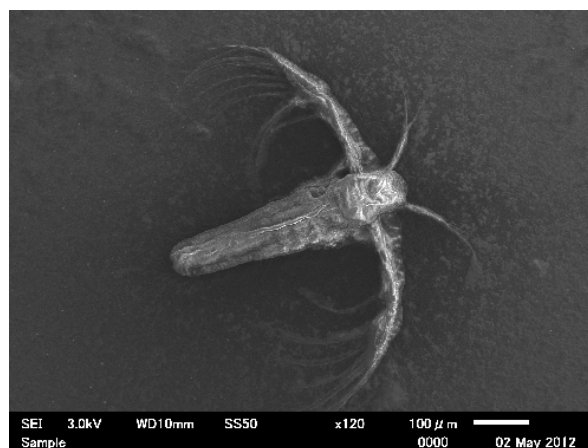
3. 実験結果

Fig.1(a)は食塩水中で泳いでいたアルテミアをスポイトで採取し、試料台にのせてそのまま乾燥させたものである。食塩が結晶化して付着し、アルテミアが全く観察できなかった。

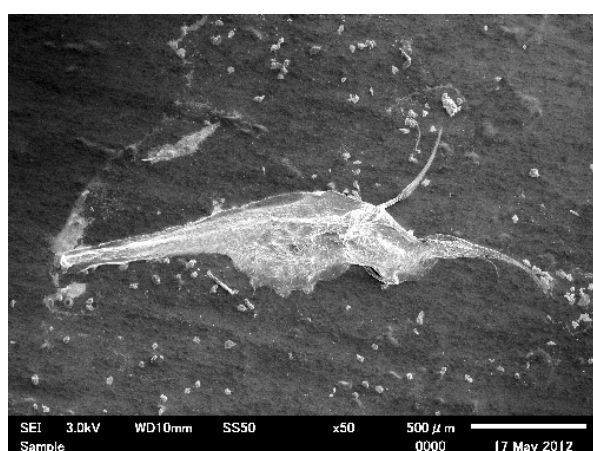
次にアルテミアを食塩水ごとコーヒーのペーパーフィルターに入れ、食塩水が流れ落ちた後に水道水を何度か注いで水洗した。アルテミアは水道水中でも 2~3 時間程度生存していた。これをスポイトを使って採取し、試料台にのせて乾燥させ観察した結果が Fig.1(b)である。食塩の結晶は無くなったが、体内の水分が蒸発するときに損傷を受け、干物のように平たくつぶれてしまっているのがわかる。



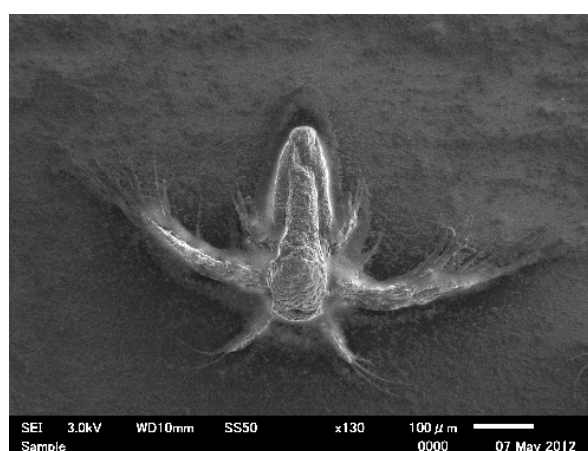
(a)



(c)



(b)



(d)

Fig.1 アルテミアのSEM像 (a) 食塩の結晶のついたアルテミア. 水洗前に観察. (b) 干物のようになったアルテミア. 水洗後に観察. 一次電子加速電圧 3kV. (c) エタノールシリーズにより体内の水分をエタノールに置換した後に観察. (d) イオン液体 (エタノールで 1 wt % に希釈したもの) を滴下後に観察.

濃度 20%, 40%, 60%, 80%, 100% のエタノール水溶液 (エタノールシリーズ) を用意し, 試料台にのせた水洗済みのアルテミアにスポイトを使って濃度の薄いものから濃いものへと順次滴下した. 各濃度において, 滴下後 10 分放置したあと, ティッシュペーパーでエタノール水溶液を吸い取り, 次の濃度のエタノール水溶液を滴下するという手順を踏んだ. 100% のエタノールで脱水後に自然乾燥させて観察した結果を Fig.1(c) に示す. 体の形が崩れておらず, エタノールで徐々に脱水した効果が現れている. ただし, 頭部など, 厚みのあるところでは帯電している部分があり, もしこの状態でモバイル SEM で観察すると, 試料全体が耐電してしまい, 正常な観察ができないことが予想される.

エタノール置換後のアルテミアにエタノールで 1wt % に希釈したイオン液体 EMI-Tf₂N (和光純薬

058-07603) を滴下し, 自然乾燥させて観察した結果を Fig.1(d) に示す. EMI-Tf₂N は毒性が無く, また粘性も比較的小さくて, 今回のような用途に向いていると考えられる. 頭部表面の構造がはっきりして耐電がかなり緩和された様子がわかる. この状態であればモバイル SEM でも正常観察可能であろうと予想される. ただし, アルテミアと下地のカーボンテープとの境目あたりにイオン液体がたまっており, 触角の先など細かい構造が埋められてしまっており, 余分なイオン液体を取り除く方法を考える必要がある.

今回, 河合らの条件 [6] に比べて高い濃度のイオン液体を用いたのは, 120~140 倍程度の低倍率の観察であるため, 高分解能よりも耐電防止の方を重視して, 厚いイオン液体被膜を作ることを意図したためであるが, 濃度の最適化も今後の課題としたい.

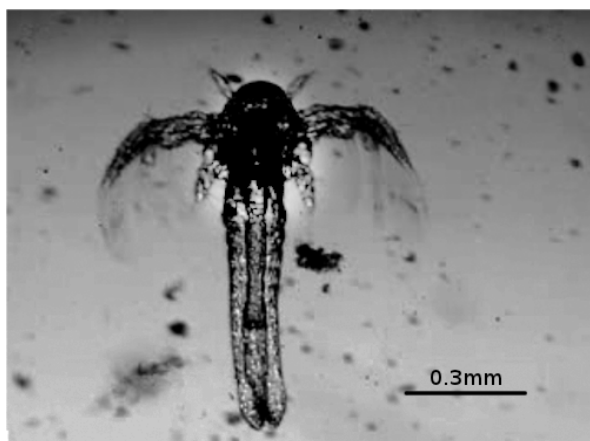


Fig. 2 透過照明を用いた光学顕微鏡によるアルテミアの観察

比較データとして、透過照明を用いた光学顕微鏡で撮影した像を Fig.2 に示す。電子顕微鏡像と比較すると、内部構造が透けて見える反面、表面の凹凸がわかりにくく、また内部構造と表面の凹凸の区別が付きにくい像となっていることがわかる。光学顕微鏡像と電子顕微鏡像を互いに参照すると微生物の構造が正しく把握でき、初等理科教育の現場での教育効果の向上が期待できる。

4. まとめ

教育用モバイル SEM を使った屋外での水生微生物の観察を前提として、冷凍機や真空装置などの装置を使用しない簡単な前処理法の可能性について検討した。

エタノールシリーズを用いた脱水では、脱水前の細胞膜の固定や脱水後の第三ブチルアルコールへの置換と凍結乾燥の手順を省略したが、少なくともアルテミアの観察においては試料の変形等は見られず、十分な効果が得られた。これはエタノールそのものにもわずかながら細胞膜固定の作用があり、またエタノールが真空中で蒸発する際に気化熱により温度が下がり、凍結して、結果的に凍結乾燥と同様の状態になっているのではないかと考えている。また今回はエタノールシリーズを 5 段階に分け、1 段階あたり 10 分としたため 1 時間近い時間を要したが、これはもっと短縮できる可能性がある。

希釈イオン液体の塗布による帯電防止効果は今回のケースでも認められた。ただ、微細な構造を埋めてしまう効果も確認された。これについては、イオン液体の希釈濃度と滴下料を最適化することで改善されるのではないかと考えている。

5. 参考文献

- [1] M. Inoue, Y. Hashimoto, T. Iyasu, K. Moriguchi, and T. Tanaka, *Proceedings of the 7th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices, ALC'09, Hawaii*, December 6-11, p.253 (2009).
- [2] M. Inoue, M. Suganami, Y. Hashimoto, T. Iyasu, H. Saito, K. Moriguchi, and T. Tanaka, *J. Surf. Anal.* **18**, 105 (2011).
- [3] S. Kuwabata, A. Kongkanand, D. Oyamatsu, and T. Torimoto, *Chem. Lett.* **35**, 600 (2006).
- [4] 桑畑 進, 島本 司, 表面科学 **28**, 322 (2007).
- [5] S. Arimoto, M. Sugimura, H. Kageyama, T. Torimoto, and S. Kuwabata, *Electrochimica Acta* **53**, 6228 (2008).
- [6] 澤 龍, 今宿 新, 一田昌宏, 河合 潤, 表面科学 **32**, 659 (2011).
- [7] 南部滋郎, 田中 晋, 南部文子, 産業医科大学雑誌 **22**, 383 (2000).