

ナノスーツを用いた含水試料の電子顕微鏡観察

○六本木 美紀、中澤 育子

宇都宮大学工学部技術部

1. はじめに

サメ肌の形状を水着や航空機に応用した例のように生物表面の観察が寄与するところは大きい。生物観察では前処理が不可欠であり筆者は過去に臨界点乾燥法を用いた下水活性汚泥の観察業務に携わっていた。本年度ナノスーツ法を含む4手法の前処理による像の比較を行う研修会に参加する機会を得ることができた。同時期に細菌のSEM観察の業務依頼を受け8年のブランク期間を経て再びSEMに関わることとなった。従来使用してきた日立ハイテク社製 S-4500 型に代わり本学機器分析センターに新たに導入された同社 SU8600 型（超高分解能電界放出型）および旧機種である日本電子社製 JSM-5610LV 型（低真空型）はいずれも操作に慣れておらず、はたまた EDS 分析についてはほぼ未経験でありこれらの使用法の習得も現在の研鑽の一つである。本発表ではナノスーツ法を用いた微生物試料観察の手始めの現状について報告する。

2. ナノスーツとは

ナノスーツはその溶液を試料に塗布し余分な液分をワイプで除去したのち電子線もしくはプラズマを照射することで重合が起き試料表面にナノ薄膜を形成する。そのため含水試料中の水分の蒸散を防止することができ、特に生物を扱う研究者の“可能な限り本来の姿を捉えたい”という願望を満たしてくれる画期的な材料である。浜松医科大学の開発グループにより命名され、本法を用いてショウジョウバエのウジに処理を施したところ1時間後のSEM観察後にも死滅することがなかったという報告がなされている^[1]。この前処理の特徴は、生物試料の固定、脱水、乾燥、導電性付与のためのコーティングという煩雑で長時間を要す臨界点乾燥法と比較して、作業がシンプルかつ短時間で観察に供することができるという点である。加えて導電性を併せ持つことも大きな利点である。

3. 実験方法

試料はアルミ試料台に貼ったカーボンテープ上に培養した菌体、ナノスーツ溶液(タイプⅢ)の順にマイクロピペッターでそれぞれ10 μ Lとり混合してキムワイプで余剰の液滴を吸い取り観察に供した。菌体は実験日に準備できたものを都度用いた。使用したSEMは日本電子社製JSM-5610LVを主とし、確認用として金属コーティングを施した試料を日立ハイテク社製SU8600型で観察した。

行った実験内容を以下に記す。

- ・(実験1) ナノスーツ溶液を異なるマウント材に原液で塗布(マウント材:カーボンテープ、カバーガラス、アルミ試料台)
- ・(実験2) ナノスーツ溶液濃度による比較(希釈倍率:2.4.10倍希釈)
- ・(実験3) ナノスーツ溶液滴下混合直後にPtPdコーティングを施す 15mA 60秒
- ・SEM観察条件
加速電圧:15kV 信号:二次電子
真空:高真空モード スポットサイズ:20
WD:20mm 対物レンズ絞り:30 μ m
- ・使用菌株
Stenotrophomonas maltophilia
Escherichia coli、軟腐病菌
ドライイースト 共立食品株式会社

4. 結果

(実験1) 3種のマウント材カーボンテープ、カバーガラス、アルミ試料台のうちカーボンテープとアルミ試料台はチャージアップなく像を得ることができたがカバーガラス上では液滴の無い部分が生じ均一な塗布ができずチャージアップが起これり観察が困難であった。画像の菌体は全体がもやもやして透明性があり輪郭も不明瞭であった。これらを金属コーティングしFE-SEM観察したところ菌体間に

ナノスーツ溶液が糊状に入り込んでおりあたかも雷おこしのようであった(図1)。塗布にはある程度の希釈が必要であると判断した。

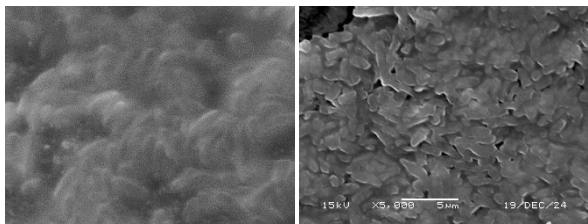


図1.カーボンテープ上、ナノスーツ溶液塗布試料(写真左)、ナノスーツ溶液塗布観察後 PtPd コーティングした試料(写真右)

(実験2)

研修時の濃度を参考にナノスーツ溶液を2倍、4倍、10倍希釈しカーボンテープ上で酵母菌へ塗布し観察を行った。試料室挿入直後は像にざらつきが生じピント合わせが困難であった(図2.写真A 上半分はスロースキャン中)。液滴は各所に膨らみが生じており(図2.写真B)、観察倍率を上げると3000倍あたりから菌体間にある膜が膨らんだり萎んだりを繰り返す現象が生じた(図2.写真C)。観察を続けているうちに約2時間後にピントを合わせるのが容易となった。この段階で液滴のふくらみ部分にはひび割れが生じていた(図2.写真C)。試料室挿入後の膜形成の経時変化を確認する必要があると思われる。約2時間経過後希釈倍率別の試料をそれぞれ5000倍で観察した場合2倍希釈のナノスーツ溶液を用いた試料が最も鮮明であった(図3)。

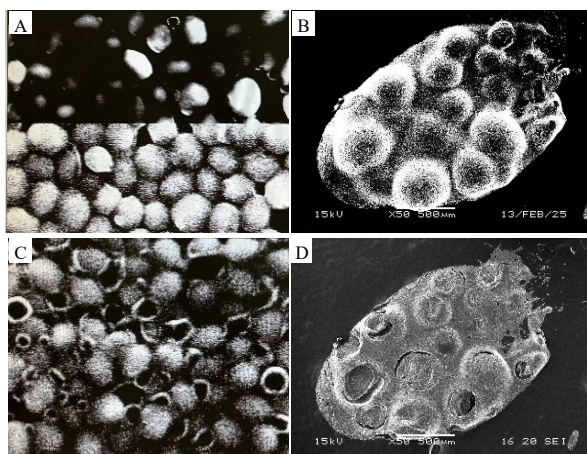


図2.観察中の膜の状態と時間変化の様子

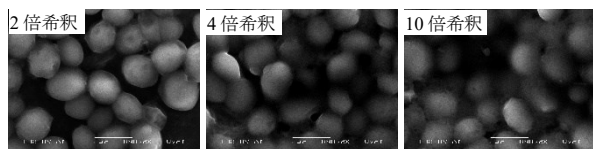


図3.ナノスーツ溶液の希釈倍率による像の違い 5000倍

(実験3)

実験2の結果を踏まえ、試料室へ濡れた状態の試料台を挿入する前に PtPd コートを施し先に膜形成を終了させた後に観察することを試みた。

マウント材としてアルミテープを用い、菌体濃度もこれまでより少なく採取した。ただし OD₆₆₀ のような濁度を求めたわけではなく適当量である。しかしここでも菌体全体をナノスーツ膜でくまなく覆うことができていたが観察中に膜の膨らみが生じ撮影に支障があった。

5. 装置の操作習得と管理

現在、旧型の低真空 SEM についてフィラメント交換及びウェネルトの焼き付きのクリーンアップの作業を現管理者に習い引継ぎをしているところである。新規導入された SU8600 型については停電時対応や基本の装置条件での観察を行い EDS 分析を習得している。使い慣れた機種を処分したため2台の装置に慣れたいと考えている。

6. まとめと今後の課題

ナノスーツⅢを用いて細菌の観察に着手した。臨界点乾燥法で得られていた1~3万倍の鮮明な像が生存時の真の姿を表現しているかは不明だが少なくとも菌体表面の細胞外物質や微細構造は観察できていた。対してナノスーツ前処理法ではその簡便さゆえにスムーズに理想像が得られるのではと期待していたが最適条件が未だ確定できていない。前処理の条件は対象となる生物表面との相性もあるであろうし、装置側の加速電圧や真空モードの条件変更によりさらに鮮明な像が得られる可能性があるかと予想している。観察において発生した事象によってその原因に対して適切なアプローチができるよう、装置の仕様や特性を把握することが今後の課題である。

参考文献

- [1] <https://www.jeol.co.jp/solutions/applications/details/1098.html>

謝辞

本研鑽において宇都宮大学工学部、荷方稔之氏、機器分析センター、長谷川和壽氏にご助言をいただいた。書面をもって感謝の意を表します。