

ナノスーツを用いた生物試料の電子顕微鏡観察

○六本木 美紀

宇都宮大学 工学部 技術部

1.はじめに

2024 年度に開催されたナノスーツ法を含む 4 手法の前処理による SEM 像の比較を行う研修会への参加をきっかけにナノスーツを用いた生物試料の観察に取り組んでいる。ある教員から業務依頼を受けた軟腐病菌のクリアな像取得を目的とし、試料台や加速度、菌体濃度など条件検討を行っており初段階での状況は 2025 年 3 月に開催された総合技術研究会(筑波大学)にて報告を行った。練習用として用いた酵母菌ではある程度の条件が確立でき、これをもとに軟腐病菌の観察へと転換した。さらに身近な生物試料に対してナノスーツが有効であるか検証をしている。今回は未だ途中段階ではあるが経過状況を発表したい。

2.ナノスーツの紹介

ナノスーツはその溶液を試料に塗布し電子線もしくはプラズマを照射することで試料表面にナノ薄膜を形成する。生物試料中の水分の蒸散を防止することができ、浜松医科大学のグループは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。生物試料を SEM 観察する場合、固定、脱水、乾燥、導電性付与のためのコーティングと、煩雑な作業を必要とするのが従来の方法であった。ナノスーツを用いた前処理は前者と比較して、作業がシンプルかつ短時間で効率よく観察に供することができる。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

(試料と前処理)

- ・細菌:観察の直前に培養液を 1.5mL マイクロチューブにとり遠心分離(3000~4000rpm、2~3 分)し純水で 2~3 回洗浄した。現段階では濁度の測定は行っておらず目視により濁りを認める程度の濃度とした。この懸濁液に適当な希釈倍率になるようにナノスーツ原液をマイクロピペットで加えミキサーもしくはマイクロピペットの吸出しにより混合した。
- ・蜘蛛の巣:カーボン両面テープを指先に貼り蜘蛛の巣の下からすくい上げて粘着させた。純水で 10 倍又は 100 倍に希釈したナノスーツ液をマイクロピペットで滴下し 10 倍希釈液は自然乾燥後に乾ききらない分をキムワイプで吸い取り、100倍希釈液は自然乾燥後に観察した。
- ・苔:先端をピンセットでつまみ、アルミテープ上に置き、細く切ったアルミテープで固定、純水で希釈したナノスーツ液をマイクロピペットで滴下し自然乾燥後に観察した。

(SEM本体)

低真空走査型電子顕微鏡、日本電子 JSM-5610LV を使用した。加速電圧:5~15kV

4.検討内容と結果

- ・細菌:サンプル固定材としてカーボンテープ、スライドガラス、アルミ試料台、アルミテープの中でアルミテープが操作性や画質の点で最も良好であった。今回は細胞の接着力にすぐれた MAS コートスライドガラス(松

浪硝子工業社製 MAS-01)を用いた。ナノスーツ溶液は 20 倍希釈となるように加えた。コート上で液滴となるため縫い針で均一にならし、自然乾燥ののち試料室に挿入した。

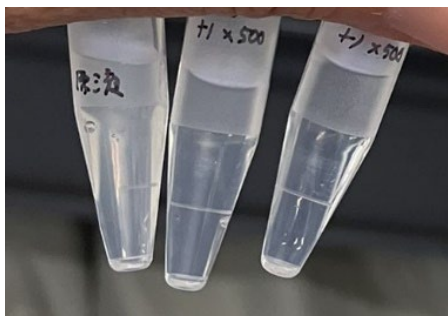


図1 観察に用いた軟腐病菌懸濁液

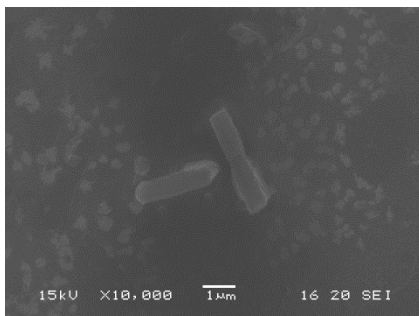


図2 観察像(10000倍)

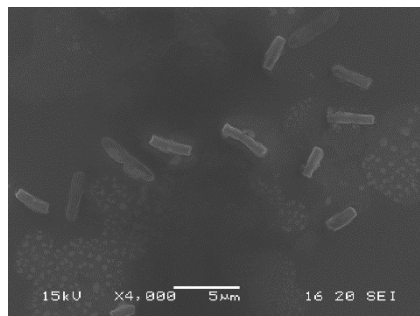


図3 観察像(4000倍)

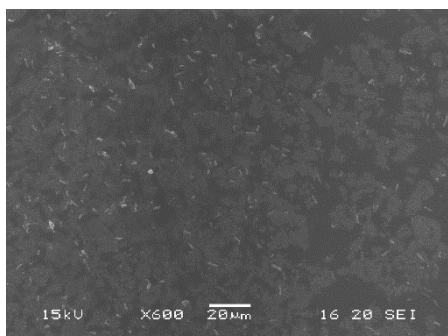


図4 観察像(600倍)

プレ実験で酵母菌を用いた場合加速電圧は 15kV が最もクリアであったためここでは 15kV での観察を行った。使用した懸濁液は図1左のものであり目に見えて多量の細菌を含み観察に充分量と予想した。しかし予想とは裏腹に像に映る菌体数は非常に少なく菌体の背面に多量の白い点が写っておりサンプル由来のものと考えている(図4)。観察倍率では10000倍が焦点の合う限度であった。表面はうすらばんやりし、しわや凸凹の情報は得ることができなかった。用いたスライドガラスも試料台として有効な材料の1つであると考えられた。

・蜘蛛の巣と苔

身近な生物試料では蜘蛛の巣と苔を観察した。蜘蛛の巣ではナノスーツの希釈倍率による像の鮮明さの違いはほとんどなく複雑に絡み合っている様子が観察できた。苔ではナノスーツ 10 倍希釈を使用した方が縦繊維中の縦模様まで観察でき高倍率で表面状態の差があった。

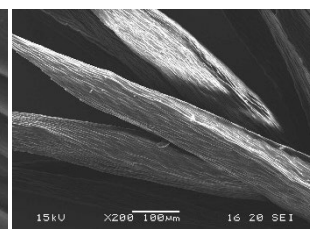
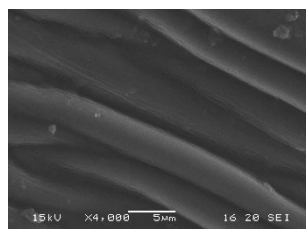
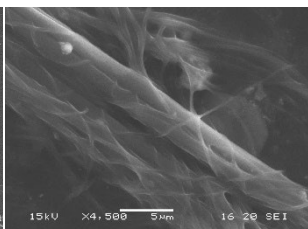
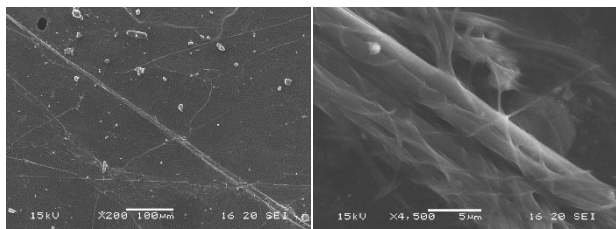


図5 ナノスーツ 100 倍希釈液を使用した観察像 左側(蜘蛛の巣) 右側(苔)

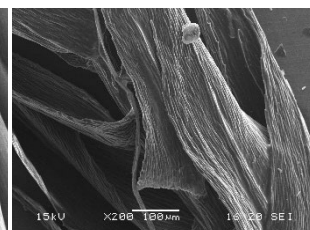
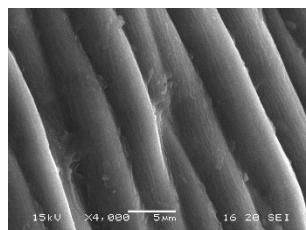
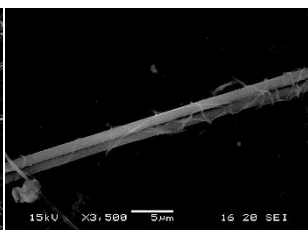
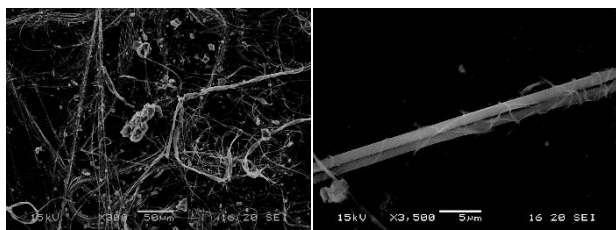


図6 ナノスーツ 10 倍希釈液を使用した観察像 左側(蜘蛛の巣) 右側(苔)

5.まとめ

主目的である細菌の観察では対象の菌種によって多少差があるものの菌体濃度やナノスーツの希釈倍率など前処理条件のおおよそのスタート条件(ナノスーツ 100 倍希釈、サンプル保持はアルミテープ又はコートスライドガラス、加速電圧 10~15kV)や本学での設備環境での観察の限度が確立されてきた。また細菌以外の生物に対してもナノスーツ溶液による前処理が有効であることが明確となった。