水生微生物の電子顕微鏡観察のためのイオン液体を用いた前処理方法

教科・領域教育専攻
生活・健康系コース（技術・工業・情報）
山下　泰史　　指導教員　宮本賢治

1．はじめに

今日，走査型電子顕微鏡(SEM)は，医学・生物学分野の研究において欠くことのできない機器として広く普及している[1]。しかし，水生微生物のような表面構造が柔らかく水分を含んでいる試料をSEMで観察する際チャージアップや変形が生じることが多いという問題がある。

その解決方法として，従来では，凍結乾燥法と呼ばれる試料の前処理法が採られてきたが，この方法を用いると多くの作業ステップと時間を要する上に，蒸着装置や液体窒素などの様々な器具や薬品が必要になる。

本研究では，従来の凍結乾燥法に比べて簡単に行える前処理法としてイオン液体を用いた方法に着目し，その方法が水生微生物のSEM観察に適用可能な条件について検討した。

2．走査型電子顕微鏡（SEM）

SEMは，電子線を試料に照射する際に試料表面から放出される2次電子や反射電子を検出することで，試料表面を観察する顕微鏡である。図1にSEMの原理図を示した。図1に示すように，SEMは電子銃，電子レンズ（集束レンズ，対物レンズ），走査コイル，検出器から構成される。

電子銃によって電子線が生成される。電子銃の模式図を図1に示す。細い（0.1mm程度）タングステン線のフィラメント（陰極）に電流を流すことで，2800K程度の高温に加熱して熱電子を放出させる。対向して置いた金属板（陽極）に数10kVの正の高電圧を印加することで熱電子を静電加速し，電子線を生成する。電子線は陽極中央の孔を通過して引き出される。

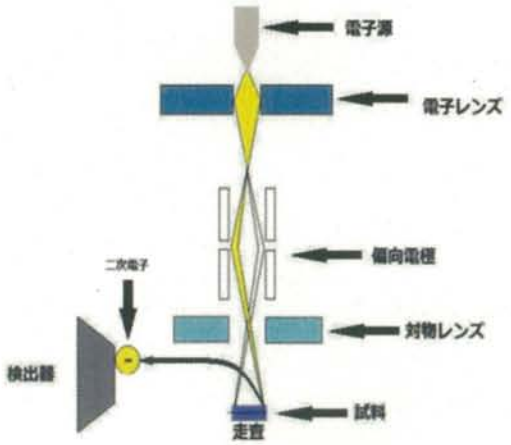


図1　SEMの原理図

3．イオン液体について

イオン液体（図2）は，常温で液体状態の塩である。蒸気圧が限りなく0に近く、熱しても、真空下でも蒸発することが無い。そのゆえ，発揮しない溶媒ならびに電解液として有機合成や電気化学反応のための溶媒としての研究が盛んに行われている。

当研究グループは，種々の電気化学反応にイオン液体を利用する研究を行ってきた。その研究を推進する中で，イオン液体を電子顕微鏡で直接的に観察できることを発見した。この現象を利用するとイオン液体中での電気化学反応をin situで電子顕微鏡観察することが可能となる。

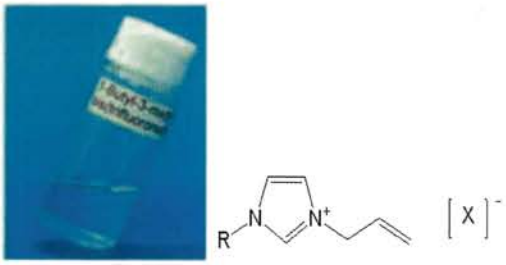


図2　イオン液体　（EMI・BF4）

イオン液体を用いた生体試料の観察例としてワカメが報告されており（図3），乾燥状態と濡れた状態で明らかに形状が異なることが示されている。また，昆虫や花粉，ネズミの繊維芽細胞の観察例も報告されている。



図3　イオン液体を用いたワカメのSEM画像

4．イオン液体を用いた前処理方法

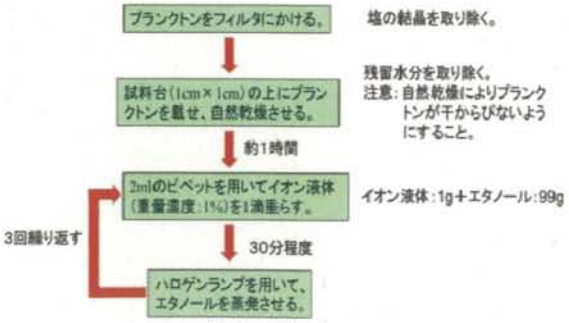


図4　前処理方法

水生微生物をSEM観察するためにイオン液体（EMI・BF4）を用いた前処理方法を開発した。その手順を図４に示す。

まずプランクトンに付着している塩の結晶を取り除くために,フィルタにプランクトンを載せてスポイトを用いて真水を掛ける。

次にイオン液体をエタノールで溶媒として，重量比で1%に希釈した溶液を試料に塗布する。この作業によってプランクトン体内の水分をイオン液体に置換し,SEM装置内でのプランクトンの収縮による形状変化やチャージアップを抑制するという理由から,置換は、３回行う必要がある。

５．実験結果

図４の作業手順で前処理したアルテミア・サリーナのSEM画像を図５に示す。アルテミア・サリーナは，チャージアップすることなく，凹凸のある表面の構造まで観察することができた。一方，イオン液体を塗布しない場合のアルテミア・サリーナのSEM画像を図６に示す。図６に示すように真空中で変形が生じて，元の形状とは大きく異なることがわかる。また，チャージアップの生じた個所は白い線状として現れている。以上から，イオン液体を用いて適切な回数の置換を行うことで，水生微生物が真空内でも乾燥せず導電性を保つことができたことが実験によって明らかになった。



図５　アルテミア・サリーナのSEM画像

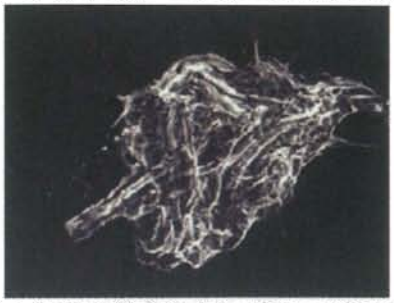


図６イオン液体を塗布しない場合のSEM画像

６．光学顕微鏡とSEMの比較

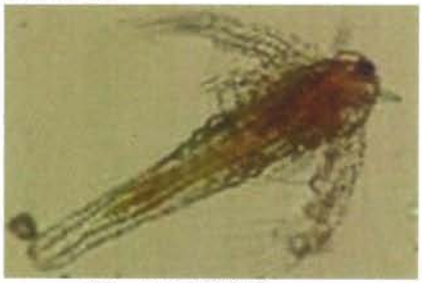
一般的にSEMを用いた観察と光学顕微鏡を用いた観察には以下の違いがある。

（1）光学顕微鏡よりSEMの方が解像度が高いため生物の細かい部分の観察が行える。

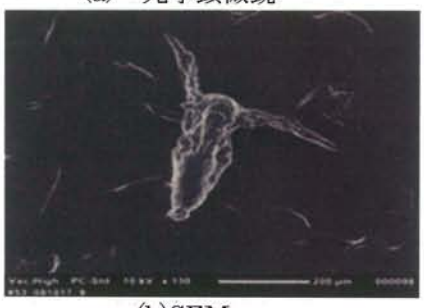
（2）光学顕微鏡では，二次元的にしか像を捉えることができない。

（3）SEMでは，三次元的な像が得ることができるので表面の凹凸部分の観察も行える。

アルテミア・サリーナ，ミジンコ，ミカヅキの光学顕微鏡による画像とSEM画像を図７に比較した。上記の（2），（3）の違いが明白に現れていることが分かる。



(a)　光学顕微鏡



(b)SEM

図７　アルテミア・サリーナの光学顕微鏡による画像とSEM画像の比較

同様にイオン液体濃度1%で水生微生物であるミジンコの観察を行った。図８に示す。

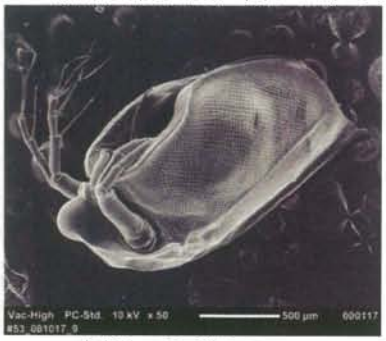


図８　ミジンコ

イオン液体濃度１％で同様にミジンコの観察鵜を行ったところ三次元的な像が得ることができた。また光学顕微鏡では可視化することが出来なかった表面の凹凸部分の観察も行えた。(図８）に示す。

４．まとめ

水生生物の一種であるアルテミア・サリーナのSEM観察に対して，イオン液体を用いた前処理法の適用を試みた結果，エタノールとの置換回数やイオン液体濃度の最適化条件を明らかにした。この最適化条件の下，簡易にかつ再現性よくSEM観察できることを実験的に確認した。