

イオン液体を用いた水生微生物の電子顕微鏡観察の方法

宮本 賢治*, 山下 泰史**

(キーワード: イオン液体, 走査型電子顕微鏡, 水生微生物)

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。一例として水生微生物 (プランクトン) に関して、赤潮発生の要因となるプランクトンの同定や渦鞭毛藻などの形態学的・分類学的研究のための微細構造の観察、さらに教育目的として生物の多様性を学習する教材としての実験・観察の授業等、SEM は多岐にわたって用いられている¹⁾⁻³⁾。

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、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。この凍結乾燥法とは、生体試料を凍結することで、真空中においても試料内部からの水分の蒸発を抑制する方法である。さらに蒸着装置を用いて試料表面に金属を蒸着することで、チャージアップを防ぐ。だが、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) ^{4), 5)}

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二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2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。

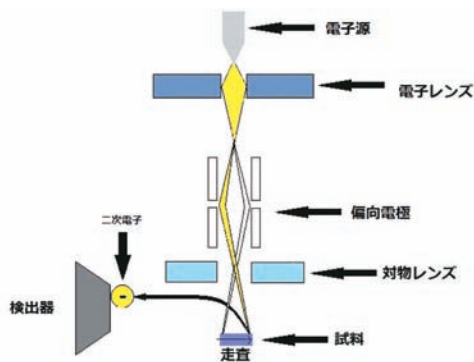


図1 SEMの原理図

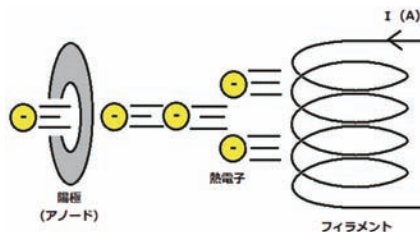


図2 電子銃

*鳴門教育大学生活・健康系コース (技術・工業・情報)

**鳴門教育大学院学校教育研究科生活健康系コース (技術・工業・情報)

図1に示すように、電子銃で作られた電子線束を、電子レンズ(集束レンズ・対物レンズ)を用いて集束する。その際に、電子レンズでは一般的に、コイル状に巻いた電線に電流を流すことで発生する磁界のレンズ作用が利用される。さらに走査コイルで2次元的に試料表面を走査し、検出器で試料面から発生する2次電子や反射電子を電気信号として検出する。検出された電気信号は液晶ディスプレイにより試料の微細な凹凸を反映した像が表示される。

3. 凍結乾燥法による試料の前処理

水生微生物をSEMで観察する際に以下のような問題が生じる。

- (1) 電子線の生成・照射や二次電子の検出の観点からSEM内は、高真空に保つ必要がある。しかし、水生微生物などの水分を含んでいる試料をSEM内に入れると真空劣化が生じ、SEMが破損するおそれがある。
- (2) 生物などは一般的に絶縁物(電気を通さない物質)なので、SEMで観察する際にチャージアップ(帯電)現象が起こる。
- (3) 真空中では水生微生物が収縮し形状が変化するので、正確な形態観察ができない。

これらの問題点を解決するために、従来は凍結乾燥法^{3),6),7)}による試料の前処理方法が用いられてきた。凍結乾燥法は試料内部の水分を冷却・凍結させた後に、真空排気させることで液体を経由しないで気化させる乾燥法である。凍結乾燥法の手順を図3に示す。

プランクトンを蒸留水で5回程度(各5-10分間)洗浄し、プランクトンを蒸留水に懸濁したままピペットで試料台に貼付した両面テープ上に1滴滴下する。ほとんどの生体試料は、水を含んでいる。これを電子顕微鏡で観察するためには乾燥させることが必要で、乾燥させても形状が変わらないようにするためには、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒド、四酸化オスミウムなどの固定材で形状を固定してから乾燥するという操作を行わなければならない。続いて、試料台ごと液体窒素中に浸し、凍結させる。凍結冷却時間は約10秒である。凍結試料を載せた試料台は直ちに試料ホルダーに取り付け、電子顕微鏡の試料室に入れ、低真空モード(約30Pa)で約1時間乾燥を行う。凍結乾燥の終了した試料に蒸着を行い、観察する。

この方法の長所として、試料の収縮が少ない、試料が物理的・化学的变化を受けにくいことが挙げられる。一方、手間と時間を要する上に、凍結時の水が組織を破断する可能性がある点が短所である。

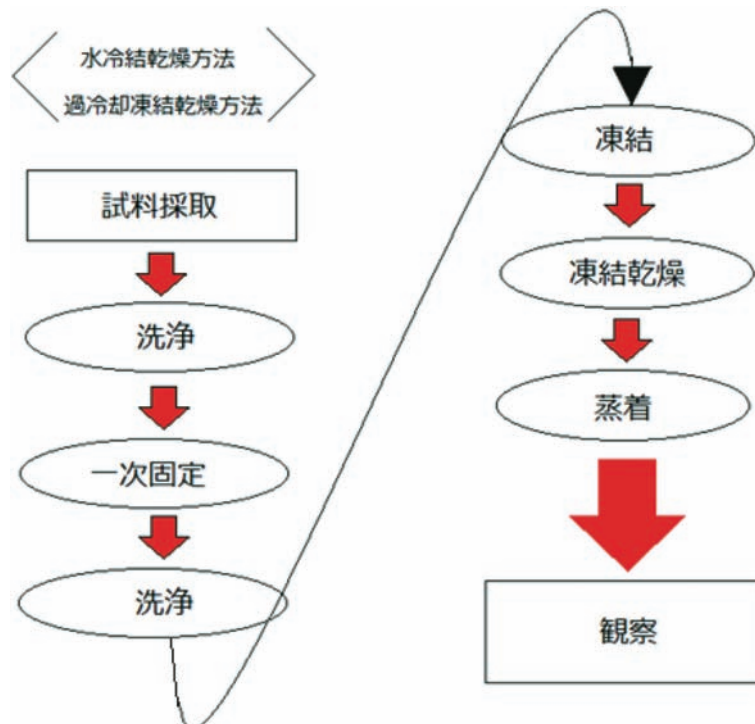


図3 凍結乾燥法による手順

4. イオン液体について⁸⁾⁻¹²⁾

代表的な塩である NaCl の融点は 801℃ であり、それ以上の温度で液状になる。それに対して、常温で液状の塩がイオン液体である。溶媒が存在せず、イオンだけで構成されている液体ということから、イオン液体と呼ばれている。そして、常温で液体のものとして、水、有機溶媒に続く「第3の液体」としての地位を得て、この十数年の間に数多くのイオン液体が合成され、数年前から国内外の試薬会社も競って販売し始めている。

1) 揮発性が極めて低いこと、2) 難燃性であること、3) イオン伝導性を有していること、がイオン液体の主な特徴としてあげられる。親水性のもの、水性のもの、さらには水にも有機溶媒にも混ざらないものも合成されている。イオン液体の一例として 1-メチル-3-メチルイミダゾリウム メチルホスホネート (EMI・BF₄) の外観と構造式を図4に示す。

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、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⁹⁾⁻¹¹⁾。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¹²⁾。

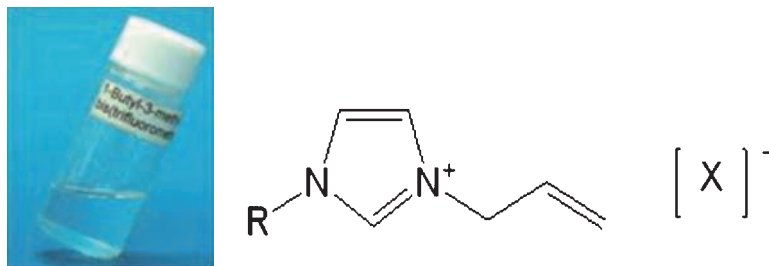


図4 イオン液体 (EMI・BF₄)¹³⁾

5. イオン液体を用いた前処理方法

水生微生物を SEM 観察するために、Tsuda らの方法¹²⁾を参照してイオン液体を用いた前処理方法を開発した。その手順を図5に示す。

今回の実験では、海産のプランクトンであるアルテミア・サリーナの観察を行った。海産のプランクトンであるため、表面に海水が付着している。この塩水は、真空中では塩の結晶となり SEM で観察の際に障害となる。そこで、プランクトンに付着している塩水を除去する必要がある。その方法としてコーヒーのフィルタにプランクトンの入っている塩水をスポイトによって流し込み、ろ過する。これは、塩の結晶よりプランクトンの方が大きいのでコーヒーのフィルタには、プランクトンだけが残る (図6)。さらに、そのコーヒーフィルタに真水を入れてプランクトンに付着している塩の結晶を取り除く。

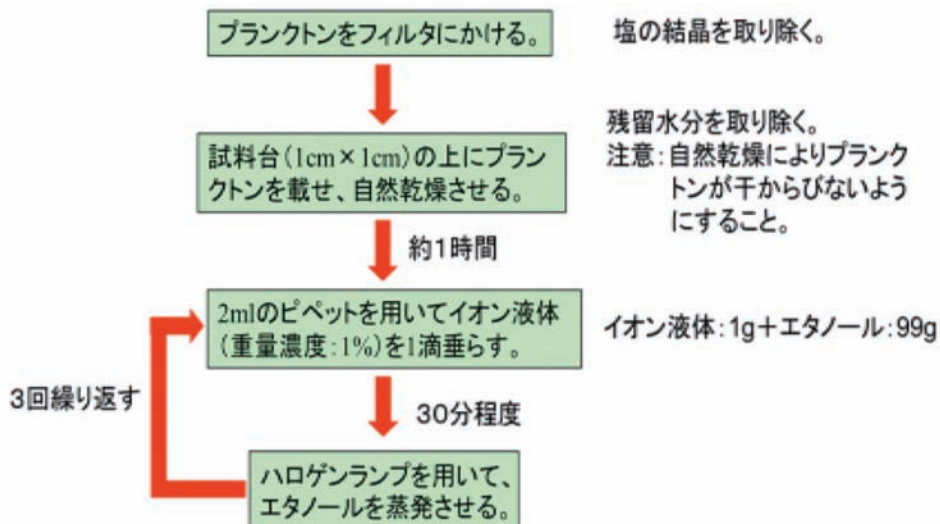


図5 前処理の手順

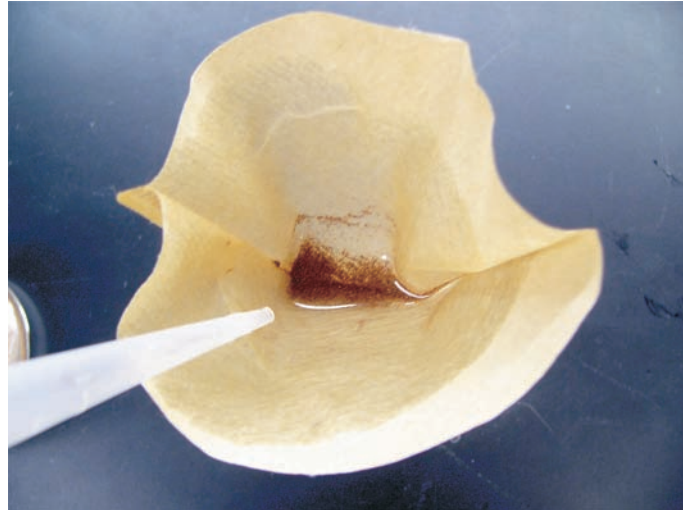


図6 ろ過方法

スポイトを用いて、このプランクトンを一辺が約1 cmの試料台の上に乗せる（図7）。一時間ほど自然乾燥して不要な水分を取り除いた後、イオン液体を塗布する（図8）。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。

イオン液体はエタノールを溶媒として、重量比で1%に希釈した。後述するようにイオン液体をプランクトンに希釈せずに塗布すると、プランクトンがイオン液体中に埋もれてしまい、SEM観察できなくなるからである。また注意点として、試料台の上に乗っているプランクトンが乾燥する前にイオン液体を塗布する。一度乾燥してしまうとプランクトンの形状が変形するからである。

イオン液体を塗布後さらに30分待ってからもう一度、イオン液体を塗布して置換を行う。1) 置換回数が少ないとプランクトンの体内へ十分にイオン液体が浸透しない、2) プランクトンの表面に十分な厚さのイオン液体の膜層が形成されないとチャージアップ（帯電）が生じる、という理由から、置換は少なくとも3回行う必要がある。この場合もプランクトンが乾燥する前にイオン液体を塗布する必要がある。イオン液体はエタノールで希釈しているため、真水と比べて気化しやすいので注意を要する。

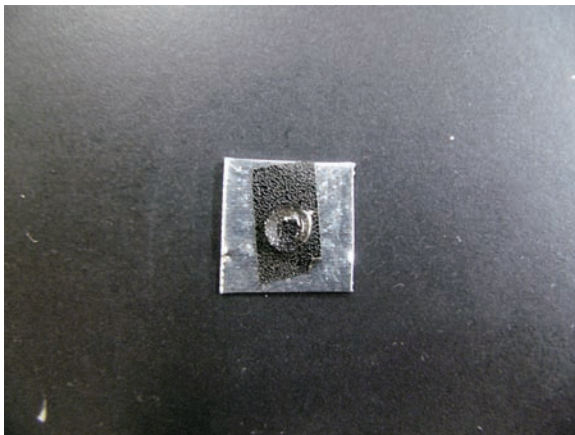


図7 試料台



図8 イオン液体塗布作業

6. 実験結果

6.1 イオン液体を用いたSEM観察

4章の図5に示した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9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10に示す。図10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。

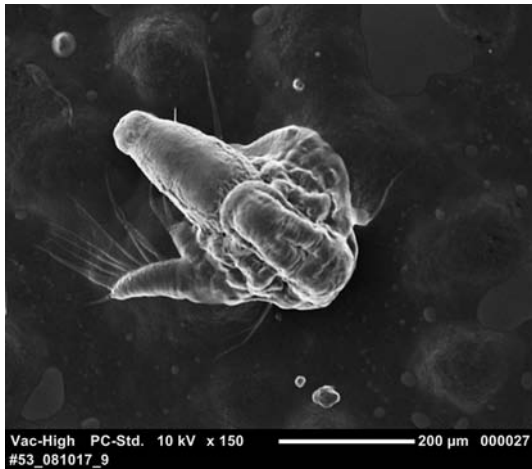


図9 アルテミア・サリーナのSEM画像

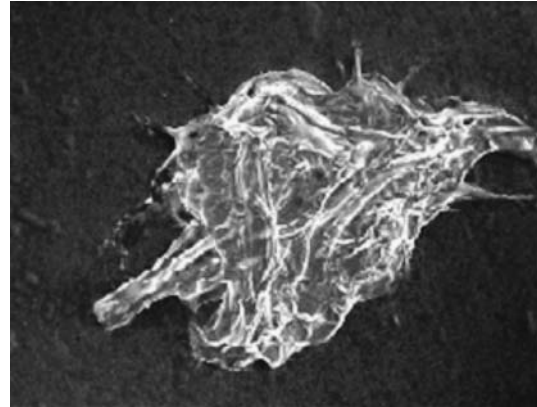
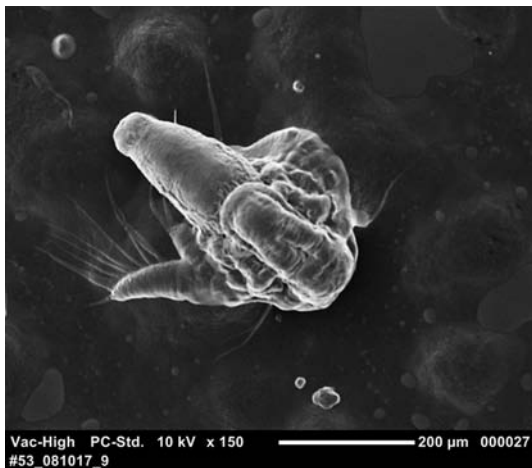


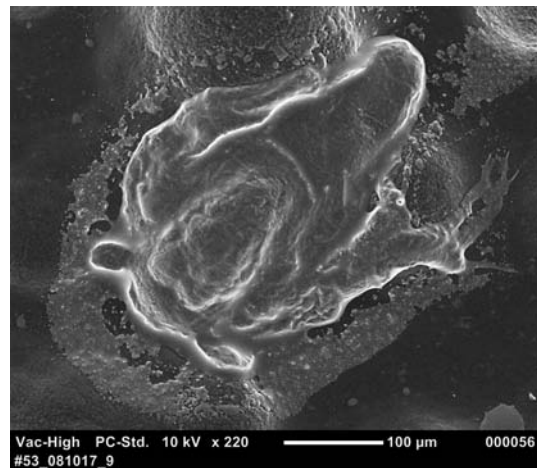
図10 イオン液体を塗布しない場合のSEM画像

6.2 イオン液体の濃度による違い

イオン液体の濃度が1%と2%の場合のSEM画像を図11に比較した。イオン液体濃度によりSEM画像に顕著な違いがみられることが分かる。イオン液体濃度2%の場合、イオン液体の濃度が少し高いためにアルテミア・サリーナの表面がイオン液体に埋もれており、イオン液体自身の液滴も見られる。すなわち、イオン液体濃度によっては表面の凹凸の部分が観察できないことがある。今回の実験から、アルテミア・サリーナのSEM観察に最適なイオン液体濃度が1%であることが分かった。



(a) イオン液体濃度1%



(b) イオン液体濃度2%

図11 アルテミア・サリーナのSEM画像のイオン液体の濃度による比較

イオン液体濃度がSEM画像に及ぼす影響を模式的に示したのが図12である。図12(a)に示すように、イオン液体濃度が最適な場合、電子銃から出た電子線（一次電子）をイオン液体で置換された試料表面に照射すると二次電子が生じて適切な試料表面のSEM画像が得られる。しかし、図12(b)に示すようにイオン液体濃度が低い場合、イオン液体に置換されていない絶縁体の試料表面に一次電子が照射されるのでチャージアップが生じてSEM観察が困難になる。また図12(c)に示すようにイオン液体濃度が濃い場合、試料がイオン液体に埋もれてしまい、一次電子は試料表面よりもむしろイオン液体を照射するので、イオン液体自身の液滴が観察されやすくなる。SEM観察においてイオン液体を用いて前処理を行う際、試料に適した最適なイオン液体濃度を確立することが肝要であることを明らかにした。

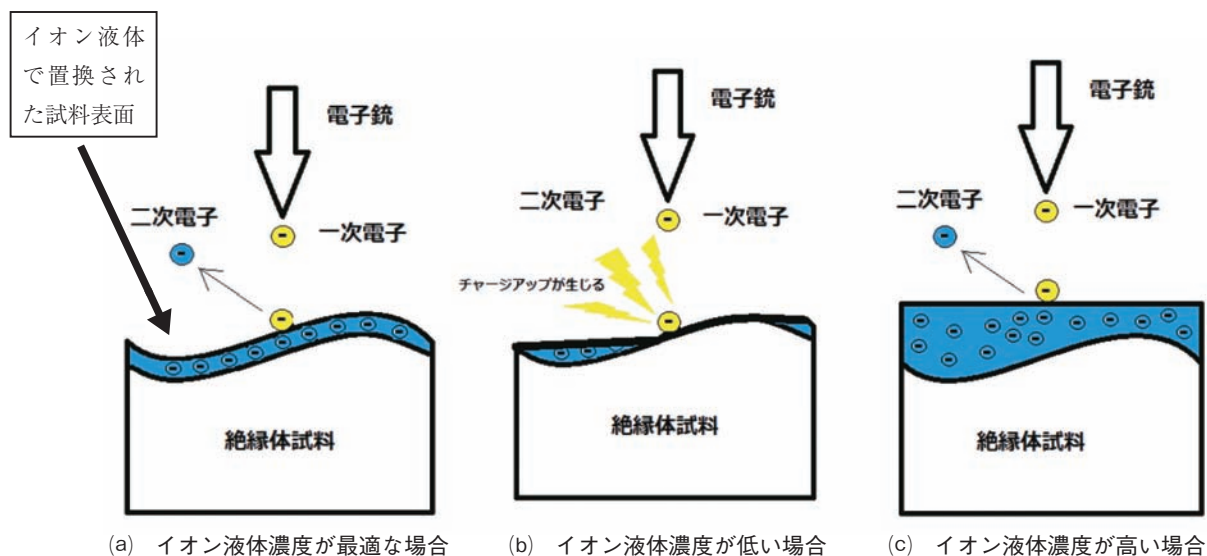


図12 イオン液体濃度による影響の模式図

6.3 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・サリーナの光学顕微鏡による画像とSEM画像を図13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。

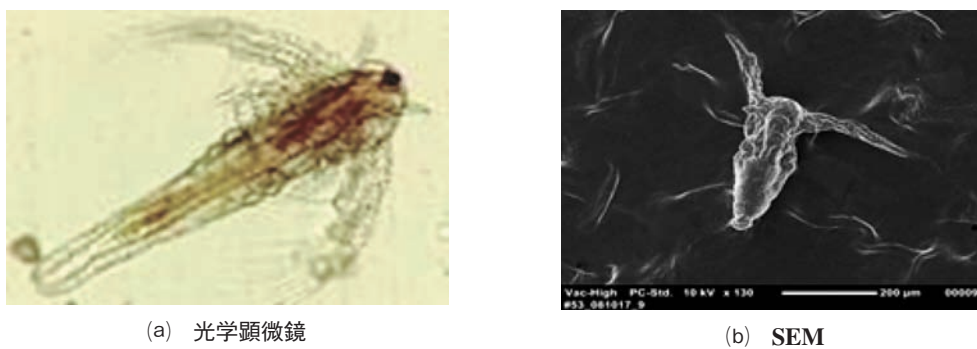


図13 アルテミア・サリーナの光学顕微鏡による画像とSEM画像の比較

おわりに

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。

参考文献

- 1) 鈴木武雄, 柴田昌輝, 田中和明, 土田恵子, 戸田龍樹: 日本プランクトン学会報, 第42巻, 第1号 (1995) pp. 53-62.
- 2) 高山晴義, 松岡数充, 福代康夫: 日本プランクトン学会報, 第45巻, 第1号 (1998) p. 9-19.
- 3) 小川 茂, 五百川裕, 大場孝信, 渡辺隆: 上越教育大学研究紀要, 第19巻, 第1号 (1999) p. 100-109.

- 4) 日本電子顕微鏡学会関東支部編, 走査電子顕微鏡の基礎と応用, 共立出版刊 (1983年)
- 5) 走査電子顕微鏡 基本用語集, 日本電子株式会 (<http://www.jeol.co.jp/words/semterms/>)
- 6) 井上貴央: 細胞, 第21巻, 第9号 (1989) p. 351-354.
- 7) T. Inoue and H. Osatake, Arch. Histol. Cytol., 51, (1988) p. 53-59.
- 8) 桑畑進: 生産と技術, 第63巻, 第4号 (2011) p. 63-65.
- 9) 桑畑進: 機能材料, 第27巻, 第10号 (2007) p. 6-12.
- 10) 桑畑進, 島本司: 表面技術, 第59巻, 第12号 (2008) p. 801-805.
- 11) S. Arimoto, M. Sugimura, H. Kageyama, T. Torimoto, S. Kuwabata, J. Electrochim. Acta, 53, (2008) p. 6228-6234.
- 12) T. Tsuda, N. Nemoto, K. Kawakami, E. Mochizuki, S. Kishida, T. Tajiri, T. Kushibiki, and S. Kuwabata, Chembiochem., 12, (2011) p. 2547-2550.
- 13) 関東化学株式会社 (http://www.kanto.co.jp/siyaku/ion.html#ank_4)

Pretreatment of plankton with room temperature ionic liquid for SEM Observation

MIYAMOTO Kenji* and YAMASHITA Taiji**

The scanning electron microscopy (SEM) has already been exploited in the medical and biological fields of research. Since SEM observation requires to place specimen in a vacuum chamber, it is impossible to observe the wet biological specimens like planktons as they are. Furthermore, it is required for the insulating specimens to be subjected to pretreatments such as coating of metal and carbon by vapor deposition or sputtering in order to prevent from charging the specimens. Thus, the pretreatment of the biological specimens is required for SEM observation. The conventional method generally consists of fixation, dehydration, freeze-drying, and Au sputtering. However, this method takes a lot of times and steps .

Recently it is reported that the SEM observation of biological specimens can be simple by the pretreatment with room temperature ionic liquid (RTIL). RTILs are liquid salts even at or below room temperature, and have several attractive features such as negligible vapor pressure and high ionic conductivity. The pretreatment with RTIL consists of immersing the specimens in the RTIL solution or spraying the RTIL solution onto the specimens, and subsequently blowing off the excess ionic liquids.

In the present study, the pretreatment with RTIL is applied to the SEM observation of planktons as a typical sample of the wet biological species, and the optimum protocol is investigated. Ionic liquid of 1-Ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate (EMI-BF₄: KantoChemical Co., Inc.) is used in the experiment. This ionic liquid is diluted by ethanol. The clear SEM image of *Artemia salina* as a plankton is successfully obtained by using the pretreatment with the ionic liquid. It is found that there is the optimum concentration of the ionic liquid [1% (w/w)] for the SEM observation of planktons.

*Naruto University of Education

**Graduate School of Education, Naruto University of Education