

# 走査型電子顕微鏡装置を用いた観察における試料前処理方法の検討

鳥居実恵、永田陽子、日影達夫、山本悠太、林育生、  
樋口公孝、神野貴昭、都築賢太郎、伊藤広樹、高田昇治

工学系技術支援室 分析・物質技術系

## はじめに

H26年度の系研修において、汎用型 SEM で利用できる SiN 膜を用いた試料カプセルの作成を行った。これにより、液中の金コロイド粒子の観察など一定の成果を得る事ができた。しかし課題もあり SiN 膜は高価であり扱いにも習熟を要する。また植物切片試料などは SiN 膜を通して直接電子線が照射されるため試料へのダメージも少なくなかった。そこで、今年度は更に簡便な方法として近年注目を集めているイオン液体を用いた前処理方法及び界面活性剤を塗布し重合膜を作成する方法で SEM 観察における前処理方法の技術研鑽として研修を行ったので報告する。

## 1. 研修の概要

これまで、我々工学系の分析・物質技術系技術職員は SEM 観察における生物・生体試料をほとんど取り扱ったことがない為、各々調査する事から始めた。イオン液体を用いる方法については導電性を持つ為、希釈溶液に試料を浸漬するだけでチャージアップせずに観察できるという簡便さが特徴となっている<sup>[1]-[12]</sup>。一方界面活性剤を塗布し重合膜を形成する方法については、希釈した界面活性剤を塗布し、電子線照射あるいはプラズマ照射することで重合薄膜を形成し水分保持ができるため生物試料を生きたままの状態での観察が可能と報告されている<sup>[13]-[18]</sup>。プラズマ照射装置に関しては文献<sup>[9]</sup>を参考に大気圧プラズマ照射装置を作製し照射を試みる事とした。

## 2. 実験の概要

### 1) 試料の調製

観察試料としてショウジョウバエの成虫及び幼虫などを選定した。イオン液体は親水性である 1-butyl-3-methylimidazolium chloride (BMI<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>) を用いた。界面活性剤としては Tween20 を用いた。BMI<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>と Tween20 は、水およびエタノールを用いて異なる濃度に希釈調製した。また、比較として一部の試料については t-BuOH 凍結乾燥を行ったものを用いた。

### 2) プラズマ照射装置の作製

大気圧プラズマ照射装置の外観図を図 1 に示した。この装置作製に際して、装置開発技術系の方々にご協力をいただいた。小さな穴を開けたパストツールピペット内にステンレスワイヤーを接続したステンレスパイプを入れ、ワイヤーはピペットの穴から出し、ピペットの穴の隙間をトルシール(真空用接着剤)で塞いだ。更にステンレス配管とピペットを接続した。ピペットの先端部分に銅板を巻き付け、ワイヤーと銅板に電圧をかけ、チューブから He ガスを流すことでプラズマが発生することを確認した。(図 2)

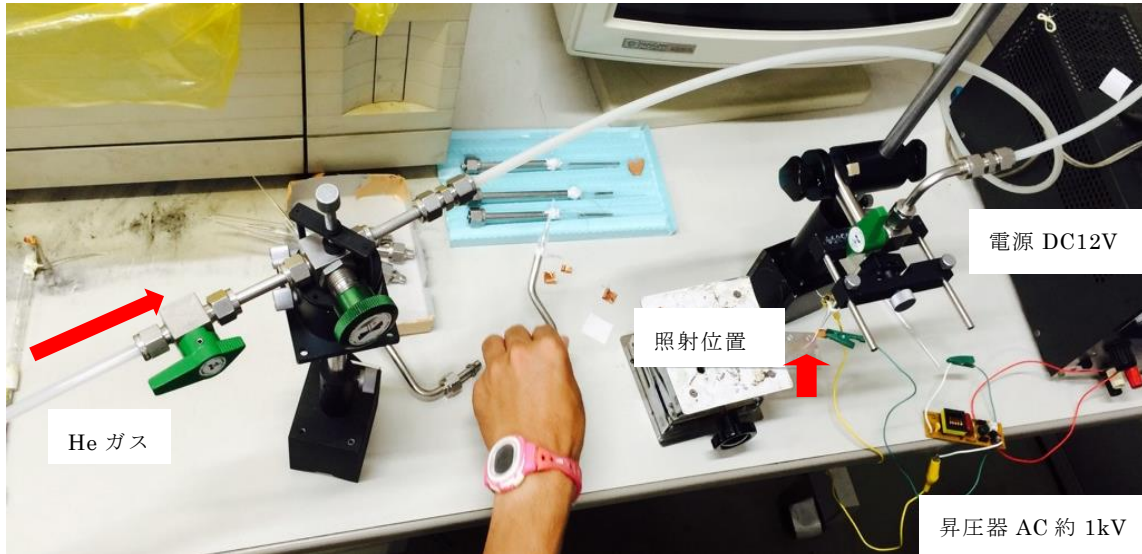


図 1 大気圧プラズマ発生装置外観

### 3) 重合膜の IR 測定

プラズマ照射によって重合膜の生成を確認する為、オゾン処理を行った Si 基板の上に Tween20 水溶液を滴下し、スピンドーターで回転させ溶液を均一に塗布した。塗布した基板は真空引きによる乾燥を行い、プラズマ照射装置でプラズマ照射を行い、照射前のサンプルと照射後のサンプルを IR 測定し比較を行った。



図 2 プラズマ照射の様子

## 3. 結果

まずショウジョウバエの幼虫に  $\text{OsO}_4$  をコーティングしたもの、 $\text{BMI}^+\text{-Cl}^-$  及び Tween20 の希釈溶液に浸漬したものを比較・観察した。更にはプラズマ照射し観察を試みた。ショウジョウバエの幼虫は細胞外物質を有する為、SEM 装置のような高真空環境下においても長時間生きながらえる事ができる。その為、今回の観察においても前処理を施したものと未処理のものとの比較において有意な差は見られなかった。

そこで次に成虫についても検討を行った。その結果の一例を図 3 に示す。成虫は動きが早くカーボンテープの粘着力では固定するのが困難であった。そのため図 3(a)ではハエを試料台に載せる際に圧着した事もあり観察時には収縮変形していた。図 3(b)は従来より行われている  $t\text{-BuOH}$  凍結乾燥法であり、変形及び収縮などは見られていない。一方、図 3(c)のようにイオン液体に浸漬して観察したものは膨潤が見られた。時間の都合上短時間のみの浸漬だったのが原因ではないかと考えられる。図 3(d)についてもプラズマ照射中あるいは SEM 内に導入した段階で死亡したためか観察中生体の動きは見られなかった。

そこで、プラズマ照射の有無による違いを確かめるべく Tween20 水溶液を塗布した Si 基板にプラズマ照射を行い IR 測定し構造に変化があるか確認した。照射前と照射後ではわずかではあるが水酸基由来のピークに変化が見られた為、重合はできていると推察した。

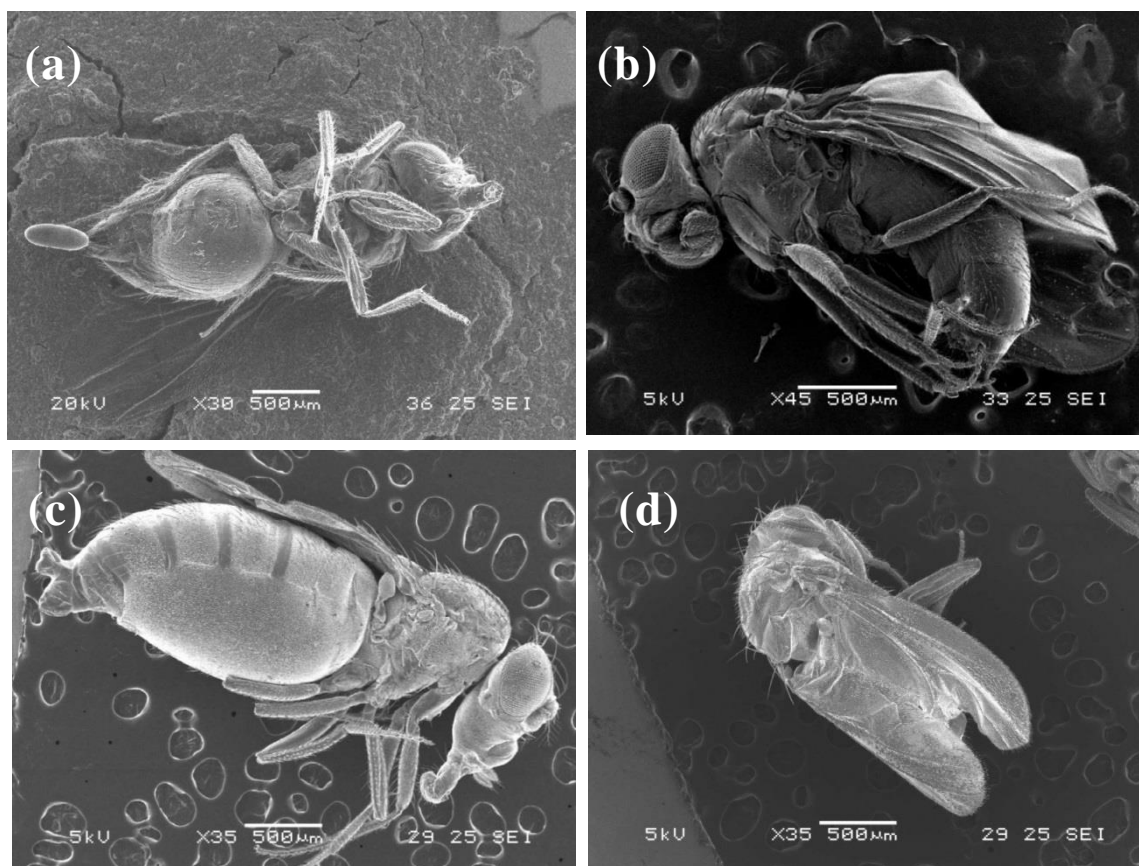


図3 ショウジョウバエ成虫のSEM観察

(a) 未処理 (b) t-BuOH凍結乾燥後 OsO<sub>4</sub> コーティング (c) 1%イオン液体 EtOH 溶液浸漬  
 (d) 1%Tween20 水溶液塗布後プラズマ照射処理

#### 4. まとめ

プラズマ照射装置については照射距離約 5 mm, AC1 kV の電圧, ステンレスワイヤーは径が細かいものを使用すると良好なプラズマが得られた。ただしプラズマ源については He ガスではなく空気にするなど検討の余地がある。界面活性剤を塗布する方法については、幼虫は粘膜で覆われていて有意差がみられなかった。更に成虫は氷麻痺を行って仮死状態でしか観察できなかったことからサンプルの選定が必要な手法だと感じた。イオン液体を用いた方法については濃度検討を精査に行えば最も簡便な方法であることが分かった。総じて生体試料の観察の難しさを痛感したが今回の研修を通して SEM 観察用として試料の前処理方法の検討を行い、各々の観察技術の向上につながったと思われる。

#### 5. 謝辞

今回の研修においてイオン液体を供与いただきました工学研究科後藤元信研究室、ショウジョウバエの幼虫・成虫をご提供くださいました理学研究科上河内教授に深く感謝いたします。また、重合膜作成に関するご指南・ご助言をいただきました工学研究科関研究室の原助教に厚く御礼申し上げます。最後に大気圧プラズマ照射装置の作成にご協力いただきました装置開発技術系の白木様、中西様、ガラス工作室の森木様、川崎様、そして研修の実施にご協力いただきました分析・物質技術系の皆様に感謝の意を表明いたします。

## 6. 参考文献

- [1] Kuwabata S. et al. (2006) *Chemistry Letters* Vol.35, No.6, 600-601
- [2] 桑畑 進, 鳥本 司(2008) *表面技術* Vol.59, No.12,801-805
- [3] 桑畑 進 (2011) *生産と技術* 第 63 卷, 第 4 号,63-65
- [4] 澤 龍 他 (2011) *表面科学* Vol.32, No.10, 659-663
- [5] 澤 龍 他 (2012) *分析化学* Vol.61, No.11, 947-951
- [6] ISHIGAKI Y. et al. (2011) *Microsc. Res Tech.* Vol.74, Issue5, 415-420
- [7] 二村 和孝 他 (2013) *日立評論* Vol.95, No.9
- [8] 二村 和孝 他 (2014) *日立技術解説* Vol.57, No.2
- [9] 宮本 賢治, 山下 泰史 (2014) *鳴門教育大学研究紀要* 第 29 卷 332-339
- [10] Komai F. et al. (2014) *J. Japan.Soc.Hort.Sci.* Vol.83, Issue4, 317-321
- [11] Hyono A. et al. (2014) *Surf. Interface Anal.* Vol46, 425-428
- [12] Kawai K. et al. (2011) *Langmuir* Vol.27, 7353-7356
- [13] 科学技術振興機構(JST)プレス発表 (2013) <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130416/>
- [14] Takaku Y. et al. (2013) *PNAS* Vol.110, No.19, 7631-7635
- [15] Suzuki H. et al. (2013) *PLOS ONE* Vol.8, Issue11, e78563
- [16] Ohta I. et al. (2014) *Microscopy* Vol.63, No.4, 295-300
- [17] 高久 康春 他 (2014) *顕微鏡* Vol.49, No.1, 68-72
- [18] 下村 政嗣、針山 孝彦 (2015) *応用物理* 第 84 卷, 第 4 号, 334-337
- [19] 赤松 浩、金田 智大、市川 和典 (2012) *神戸高専研究紀要* 第 50 号, 87-92