

SEM 観察における試料前処理方法の検討

○鳥居 実恵、高田 昇治、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
名古屋大学 全学技術センター 工学系技術支援室 分析・物質技術系
torii@apchem.nagoya-u.ac.jp

1. 目的

ここ数年、本系では SEM・TEM を中心とした電子顕微鏡観察・測定技術について研修を行っている。その中でも生体・生物試料の電子顕微鏡観察は工学分野においてもバイオミメティクスといった技術への応用が期待される。今年度は SEM 観察における生体試料の前処理方法について広く学習し実施する事で技術の研鑽を目的とした。生体試料を SEM で観察する為には通常何工程もの手順を経て前処理を行うが、近年、イオン液体を浸漬しチャージアップを起こさず観察できる手法が確立されている^{1),2)}。また、界面活性剤 Tween20 を塗布しプラズマ照射する事でナノスーツと呼ばれる重合膜を形成し生体試料を生きた状態で観察できることも報告されている^{3),4)}。今回、実習として文献⁵⁾を参考に大気圧プラズマ発生装置を製作し、上記前処理方法を行い観察の検討を行ったので報告する。

2. 大気圧プラズマ発生装置の製作

生体試料の SEM 観察において困難を伴う理由として、真空条件下で観察する為、酸欠状態や、水分の保持ができずに乾燥してしまう事があげられる。また、電子ビームを照射することで熱的・電氣的な要因で変性・変形する事もある。試料に対してできるだけマイルドな条件でプラズマ照射すればダメージが少ないのではないかと考え大気圧プラズマ発生装置を作成し、前処理を行う事にした。小さな穴を開けたパスツールピペット内にステンレスワイヤーを溶接され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て、ピペットの穴の隙間をトルシールで塞いだ。更にステンレスチューブとピペットを接続しトルシールで固定した。ピペットの先に銅板を巻き付け、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 1)。



図 1 大気圧プラズマ発生装置

一般的に、減圧環境下でのプラズマと比較して大気圧プラズマは電子温度が低いと推測される。故に、プラズマ照射によってどの程度の重合膜が形成されるかは現段階での課題であり、今後検証する必要がある。

3. 試料前処理の検討

試料の前処理方法として以下の方法を試みた。

- [1] t-BuOH に置換して凍結乾燥する方法
- [2] イオン液体のエタノール溶液に浸漬する方法
- [3] Tween20 希釈溶液に浸漬した後プラズマ照射する方法

イオン液体は親水性である 1-butyl-3-methylimidazolium chloride を用いた。今回用いた生体試料はモデル生物として研究分野でよく利用されているショウジョウバエの成虫及び幼虫を当学の理学研究科より供与いただいた。SEM 装置は汎用型である JEOL JSM-5600 を用いて行った。

4. 観察結果と考察

まずショウジョウバエの幼虫であるウジ虫を各前処理方法で行った後、未処理のものと比較した。しかしながらウジ虫は粘性の物質で体表面が覆われており⁶⁾、我々の予想に反して、未処理のものと同処理を行ったものとの有意な差が見られなかった。

そこで、成虫に対しても同様に前処理方法を行い観察した。未処理のものは明らかに収縮・変形が起こっていた。イオン液体に浸漬したハエは t-BuOH 置換法と比較しても変形などは少なかったが、目の部分は凹みが見られた。Tween20 希釈溶液を塗布し、更にプラズマ照射を行ったハエについては、観察中全く動かず照射状況下あるいは SEM 内の観察条件下 (10^{-4} Pa 程度) で死亡したとみられた。それでも目の部分などの凹みは見られず、収縮・変形もそれほどないように見えた。今回の研修で我々は初めて動く状態の生物を観察対象にしたため、ハエをカーボンテープに固定するのもも苦慮し、氷麻痺で仮死状態にしてテープに固定し動いている状態とは異なる条件下での観察となってしまった。総じて生体試料の観察はやはり難しく検討すべき事項も多々あり、それぞれの技術の蓄積が必要だと感じた。

5. 参考文献

- 1) Kuwabata S, Kongkanand A, Oyamatsu D, Torimoto T 「Chemistry Letters」 Vol. 35, No. 6, (2006)
- 2) 宮本賢治、山下泰史 「鳴門教育大学研究紀要」 第 29 巻(2014)
- 3) Takaku Y et. al 「PNAS」 Vol. 110, No. 19 (2013)
- 4) Suzuki H et al. 「PLOS ONE」 Vol. 8, Issue11, (2013)
- 5) 赤松浩、金田知大、市川和典 「神戸高専研究紀要」 第 50 号(2012)
- 6) 科学技術振興機構(JST)プレス発表 <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130416/> (2013)