

## 走査電子顕微鏡観察用の生物試料調製について

### 1. はじめに

細菌やかびなどの微生物、細胞、食品素材など水分を多く含む生物試料を走査電子顕微鏡で観察するためには、表面構造を保持するための処理が必要となります。また、より鮮明な像を得るためには試料調製方法の選択が非常に重要となります。そこで本稿では、走査電子顕微鏡観察の際に用いる生物試料の試料調製方法について紹介します。

### 2. 走査電子顕微鏡の概要と生物試料

走査電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope, SEM）は、真空中の鏡体で細く絞られた電子線を試料に照射し、試料と電子線の相互作用から得られる信号により試料表面の立体的な観察を行います。観察中の試料環境が高真空のため、水分を多く含む試料をそのまま観察すると水分の蒸発や収縮歪曲が起こり、表面構造が壊れてしまいます。

なお、真空圧数十から数百 Pa で観察が可能な低真空 SEM は水分の蒸発が少ないため、試料の状態や観察倍率によっては試料調製を省略、もしくは簡易化することができます。

### 3. 生物試料の化学固定処理について

生物試料の観察は、試料の性質や観察の目的に応じて①自然乾燥して観察、②化学固定により観察、③物理固定（凍結、クライオ法）により観察、④低真空条件で観察のいずれか、もしくは併用により行います。当センターでは主に化学固定法により生物試料を観察しています。その一般的な手順を図1に示します。

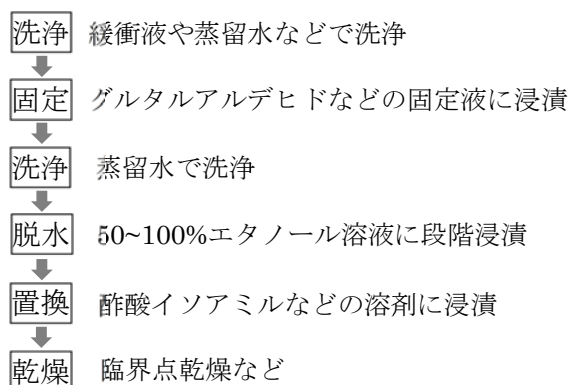


図1 化学固定法の手順

化学固定法は、薬品処理により試料中のタンパク質や脂質を生体時に近い状態で保持させる手法です。グルタルアルデヒドは主にタンパク質に作用し、四酸化オスミウムは主に脂質に作用します。また、四酸化オスミウムは帯電防止の目的でも使用されます。

試料の表面構造を維持して乾燥を行うには、試料を通過する空気と液体の界面による表面張力をできる限り小さくする必要があります。そのため、水よりも表面張力が小さいエタノールなどの有機溶剤により試料の水分を除去します。乾燥は、試料構造を変化させにくい臨界点乾燥法もしくは凍結乾燥法により行います。このため、脱水後にエタノールを乾燥操作に適した酢酸イソアミル（臨界点乾燥法）やt-ブチルアルコール（凍結乾燥法）などの溶剤に置換する必要があります。

より良い像を得るためには固定や脱水、乾燥などの処理操作だけでなく、試料の洗浄や作業中の塵埃の混入にも十分注意を払う必要があります。また、処理に使用する溶液の浸透圧や温度、pHなどが影響して試料の構造が変化することがあるため、観察に適した処理条件を考える必要があります。

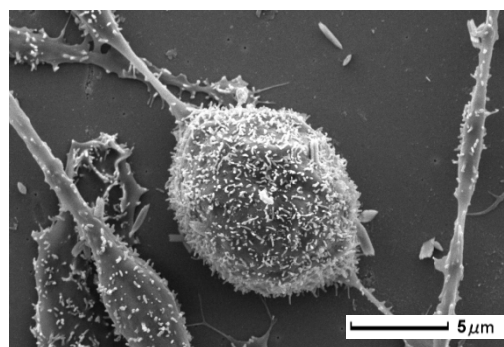


図2 化学固定した接着細胞のSEM画像

### 4. おわりに

走査電子顕微鏡による生物試料の観察では、装置の性質や観察の目的に適した処理条件の選択が非常に重要となります。当センターでは、走査電子顕微鏡を用いた生物試料の観察や試料調製に関する技術相談と依頼分析を行っております、お気軽にお問合せ下さい。



食品工業技術センター 保蔵包装技術室 近藤温子 (052-521-9316)

研究テーマ：剪定イチジク葉の有効活用に関する研究

担当分野：微生物利用、異物分析、食品包装