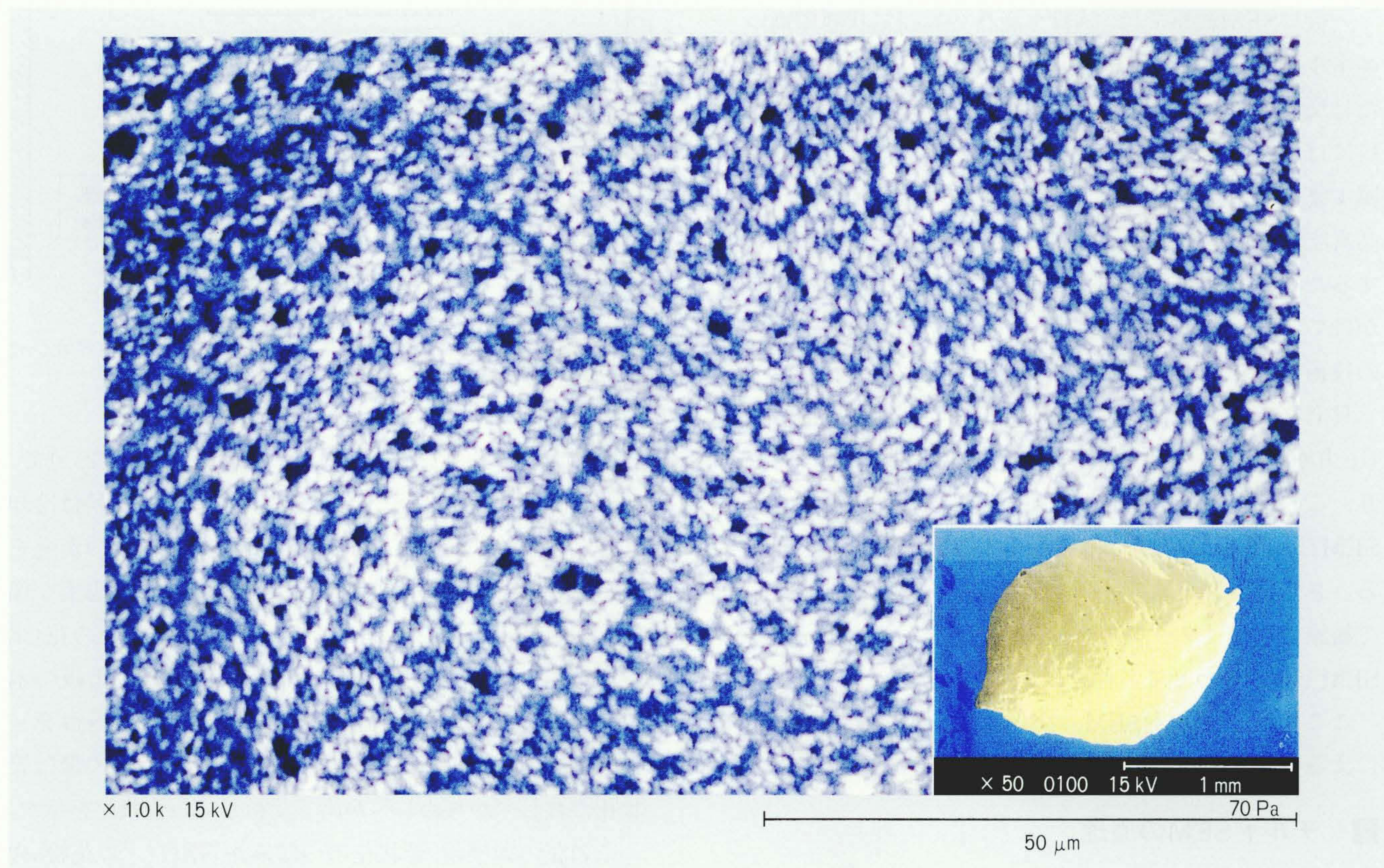


走査電子顕微鏡による食品などの直接観察

Scanning Electron Microscopy of Foodstuffs Using a Variable-Pressure SEM

久保木健三* *Kenzo Kuboki*

和田正夫** *Masao Wada*



寒天培地上の細菌(試料提供：筑波大学社会医学系 小池先生)

寒天培地上で生息するBacillus cereus食中毒原因細菌のコロニー(右下)，およびコロニー中で生息している細菌の状態の直接観察を示す。

物質の表面微細構造を観察する方法としては、大別して光学顕微鏡とSEM(走査電子顕微鏡)がある。

SEMでは電子を光源とするため、観察時、試料は常に高真空の雰囲気に入れられ、像形成の信号源となる高いエネルギーの電子ビーム照射を受けている。そのため、そのまま観察すると、非導電性試料は帯電現象による像障害が、熱に弱い試料は電子ビーム照射による熱での試料損傷がそれぞれ起こる。さらに、食品、生物などの含水試料は、水分の蒸発によって表面形態が変化し、忠実な観察が難しくなる。

そこで、このような現象を避けるため、あらかじめ

め試料に適した前処理を行い、試料表面に忠実な観察を心がけるのが一般的である。

一方、近年、試料の置かれている雰囲気低真空にすると、試料前処理を省略して観察できるため、この簡単な手法が注目され認められてきた。さらに、含水試料は冷却して飽和蒸気圧を低くすると急激な水分蒸発の抑制効果があるため、チルド帯温度に維持して観察することによって変形のない長時間観察が可能となり、幅広い試料に効果があることが確認できた。

* 株式会社日立サイエンスシステムズ ** 日立計測エンジニアリング株式会社

1 はじめに

SEMは、表面微細構造観察装置として、生物分野から材料分野まで、あらゆる産業分野でその有用性が認められ、活用されている。

一般にSEM観察では、試料を高真空雰囲気状態で高いエネルギーの電子ビームを照射し、発生した二次電子または反射電子を検出して像観察を行うため、非導電性試料には、帯電などを防止するために観察前処理として金属皮膜を蒸着する。また、食品、生物などの含水試料は、高真空雰囲気での水分蒸発による表面形態の変化を防止するための前処理を行い、表面形態に忠実な像観察を心がけている。この試料前処理工程はSEMには必要不可欠の技術であり、今後も進歩していくものと思われる。

日立グループは、試料の置かれている雰囲気を高真空(圧力が低い)から低真空(圧力が高い)とすることにより、この前処理を省いて光学顕微鏡と同様に観察できるSEM(以下、「ナチュラルSEM」と言う。)を製品化している。さらに、含水試料をチルド帯温度まで簡単に冷却して観察できる「クールステージ」を開発し、ナチュラルSEMと組み合わせて名称を「チルドSEM」とした。

ここでは、「チルドSEM」の原理、および対象試料観察による効果などの応用例について述べる。

2 チルドSEMの原理

2.1 ナチュラルSEMの原理¹⁾

SEMの試料室内の圧力を高く(低真空)すると、残留ガス分子によって入射電子の平均自由行程が短くなり、入射電子の一部が残留ガス分子と衝突してガス分子をイオン化する確率が大となる(図1参照)。このとき生成された正イオンが、試料表面の負の帯電電荷と再結合することによって中和され、帯電現象が軽減される。ナチュラルSEMでは、実用圧力として1 Paから最大270 Paの範囲で試料の種類に適した圧力にプリセットできる機能や、自動圧力制御機能などのくふうを取り入れている。また、試料室圧力を高くすることにより、試料に含まれる水分、油分などの飽和蒸気圧に近づくために急激な蒸発を抑制する効果がある。したがって、短時間の観察では、蒸発による試料の収縮・変形が軽減された、生に近い状態の観察が可能となる。

2.2 クールステージの効果²⁾

クールステージは、観察試料を大気中で簡単に冷却できる機能を持っている。冷却手段は、電子冷却法を採用

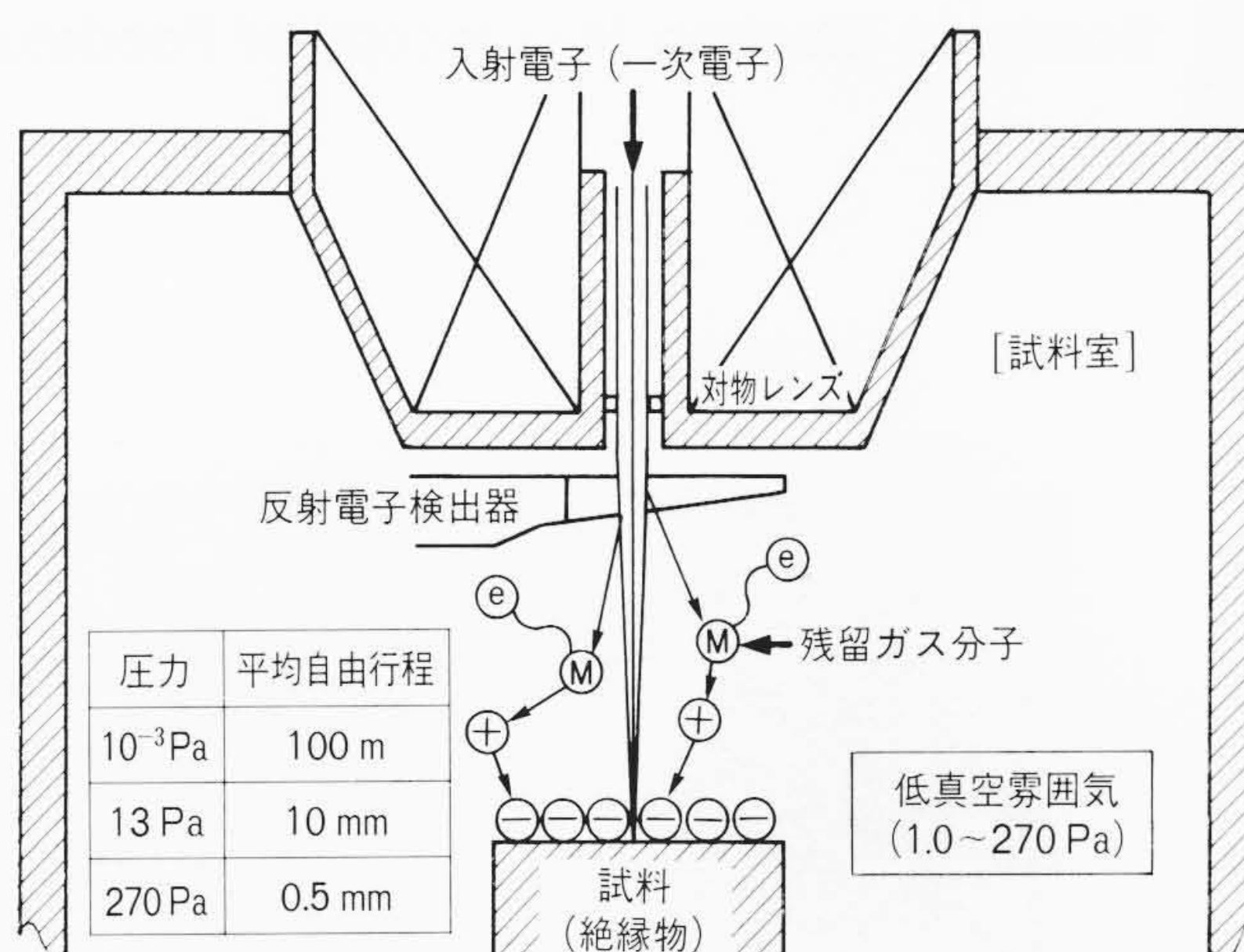


図1 低真空状態における帯電現象の軽減

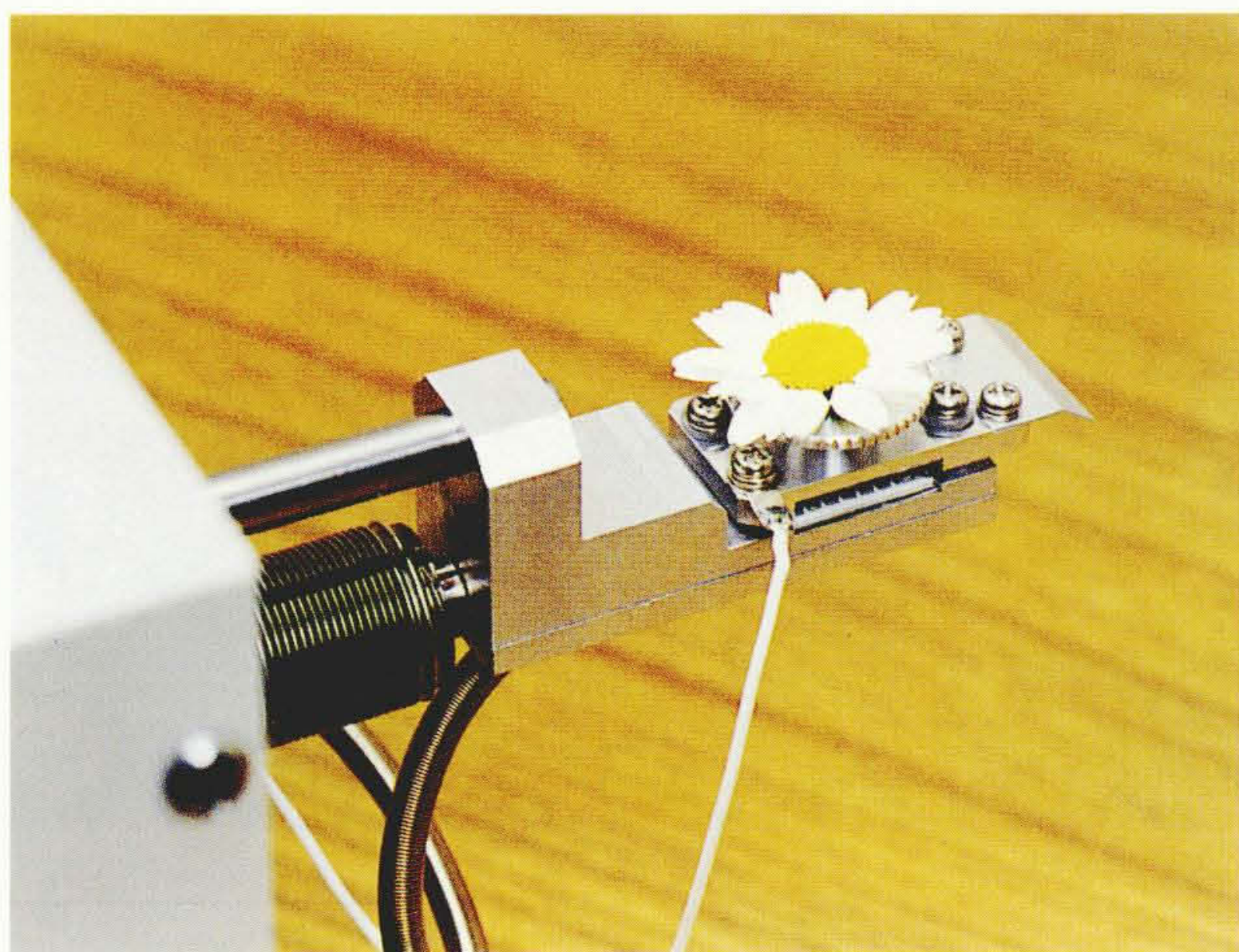
入射電子の一部が残留ガス分子と衝突してガス分子をイオン化し、正イオンが帯電電荷と再結合して中和される。

し、設定温度範囲はチルド帯温度(冷えても凍らない)で、 $10 \sim -10^{\circ}\text{C}$ 間を 1°C 単位で設定できる。含水試料は冷却すると水の飽和蒸気圧が低くなるため、観察中の蒸発を抑えて、長時間にわたり収縮・変形の少ない、忠実な像観察が可能となる。クールステージ試料台に菊の花(試料)をセットした状態を図2(a)に示す。試料は市販の木工用接着剤で試料台に固定した。大気中で試料台を -10°C に予冷して観察した像を同図(b)に示す。この像は管状花のおしべからめしべが出て受粉している状態を示す。

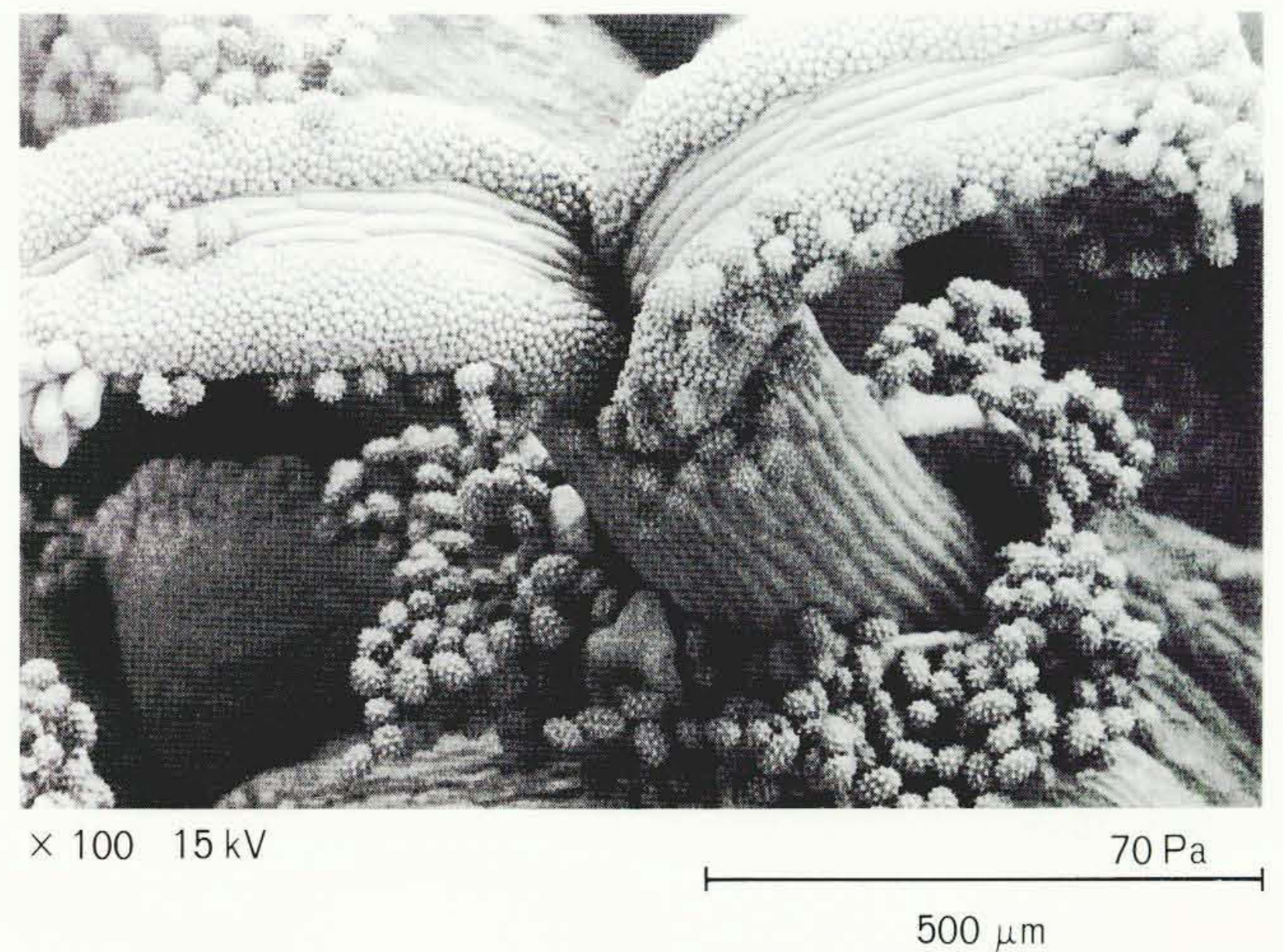
この花の観察は、管状花のつぼみから、おしべ、花粉、めしべの順で受粉に至るまでの生長過程を、同一試料で約10日間、長期間観察に成功した例である。観察方法は、観察時だけ試料を試料台に固定し、観察終了後は試料台から外して水分を与え、生長させて次の日の観察に備えた。

さらに、電子ビームの照射熱によって組織が破壊される試料でも、冷却することによって熱ダメージを軽減する効果があることを確認した。生まれたばかりの繊細なアスパラガス細胞の成長点観察の例を図3に示す。試料温度を常温としてナチュラルSEMで観察した例を同図(a)に、クールステージの試料台の温度を -10°C として観察した例を同図(b)に示す。同図から明らかなように、従来はこのような試料の観察はきわめて難しいとされてきたが、試料を冷却して観察することで熱ダメージが軽減され、試料に忠実な観察が可能であることが確認できた。

以上のような観察結果から、チルドSEMが含水試料の直接観察に効果があることがわかった。



(a)



(b)

図2 クールステージへの試料(菊の花)のセット状態(a)と菊の花(管状花)の受粉状態(b)

観察時だけ試料台に木工用接着剤で固定し、開花までの生長過程を日数単位で長期間観察した(a)。管状花(黄色い部分)のつぼみから受粉状態までを約10日間、同一試料での連続的観察に初めて成功した(b)。

3 チルドSEMによる食品の観察例

チルドSEMで観察することにより、従来のSEMでは観察が難しいとされてきた試料でも、生の状態を容易に観察することが可能となってきた。

現在までの、チルドSEMによる食品の直接観察例について以下に述べる。

3.1 寒天培地上の細菌の観察³⁾

寒天培地上で生息する *Bacillus cereus* 食中毒原因細菌の観察に成功した(75ページの図参照)。培養条件は、「普

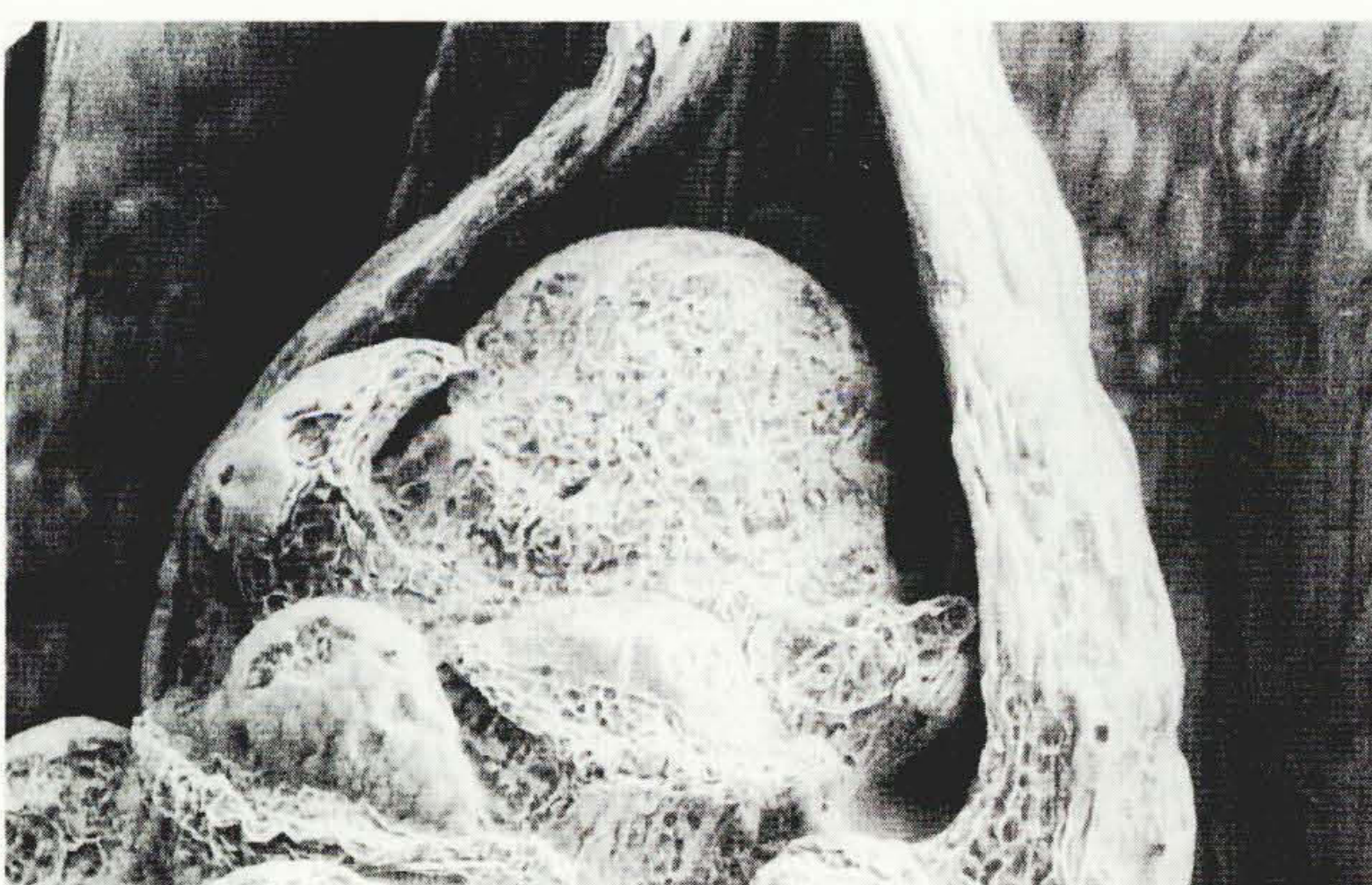
通寒天培地」(37℃)で一晩培養した状態をそのまま観察したもので、コロニー(同図右下)およびコロニーの中で渦を巻きながら生息している細菌の状態が明瞭(りょう)に観察できる。

3.2 こんにゃく芋の割断面観察

こんにゃく芋の割断面観察を図4に示す。こんにゃく芋では、「あくのもと」である針状の結晶が長時間にわたって変形せずに安定した状態で観察できる。

3.3 生米と飯米の観察⁴⁾

わが国の食生活では、飯米の食味への関心が非常に高

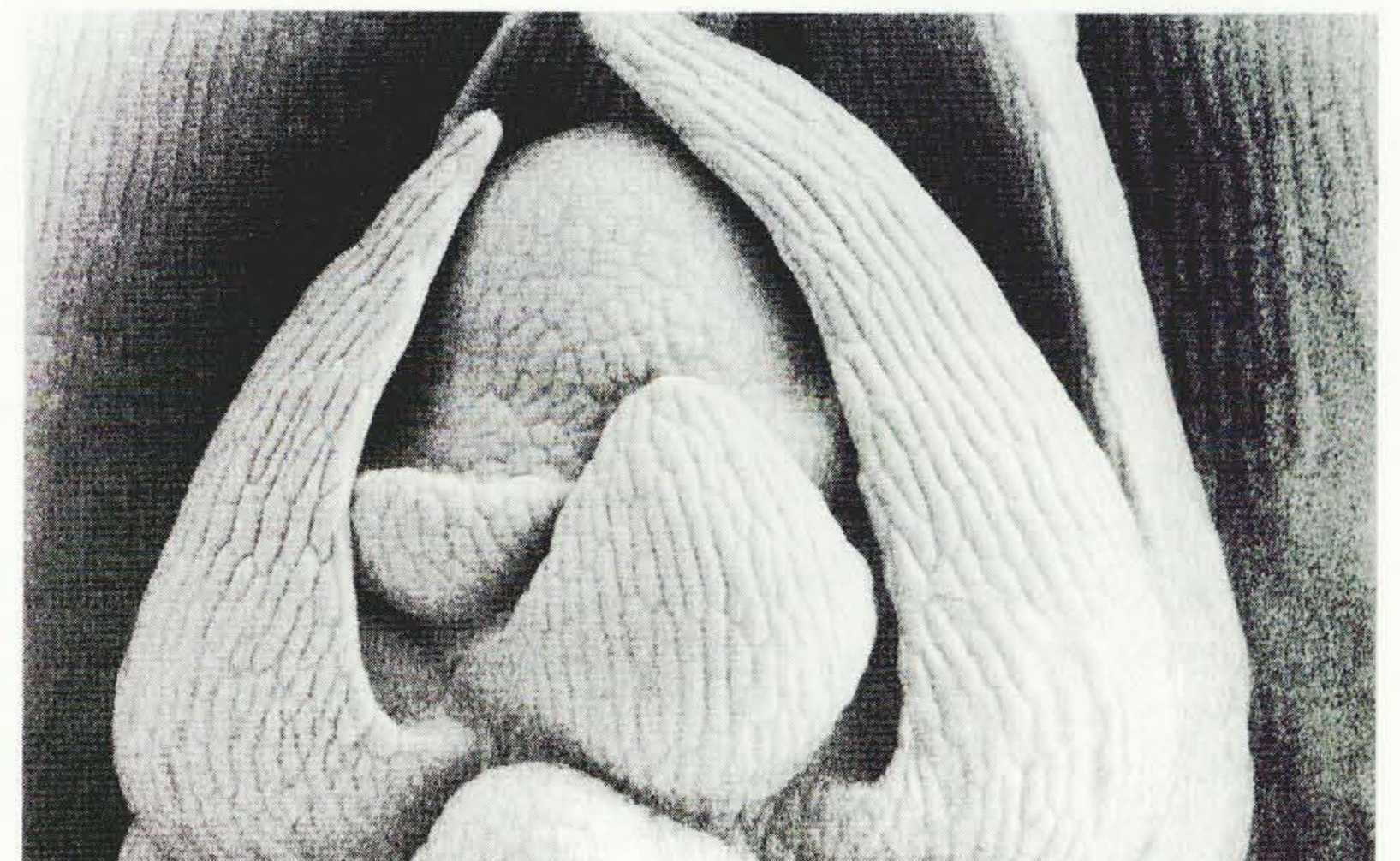


× 200 15 kV

100 Pa
200 μm

(試料提供：埼玉大学理学部 松島先生)

(a)



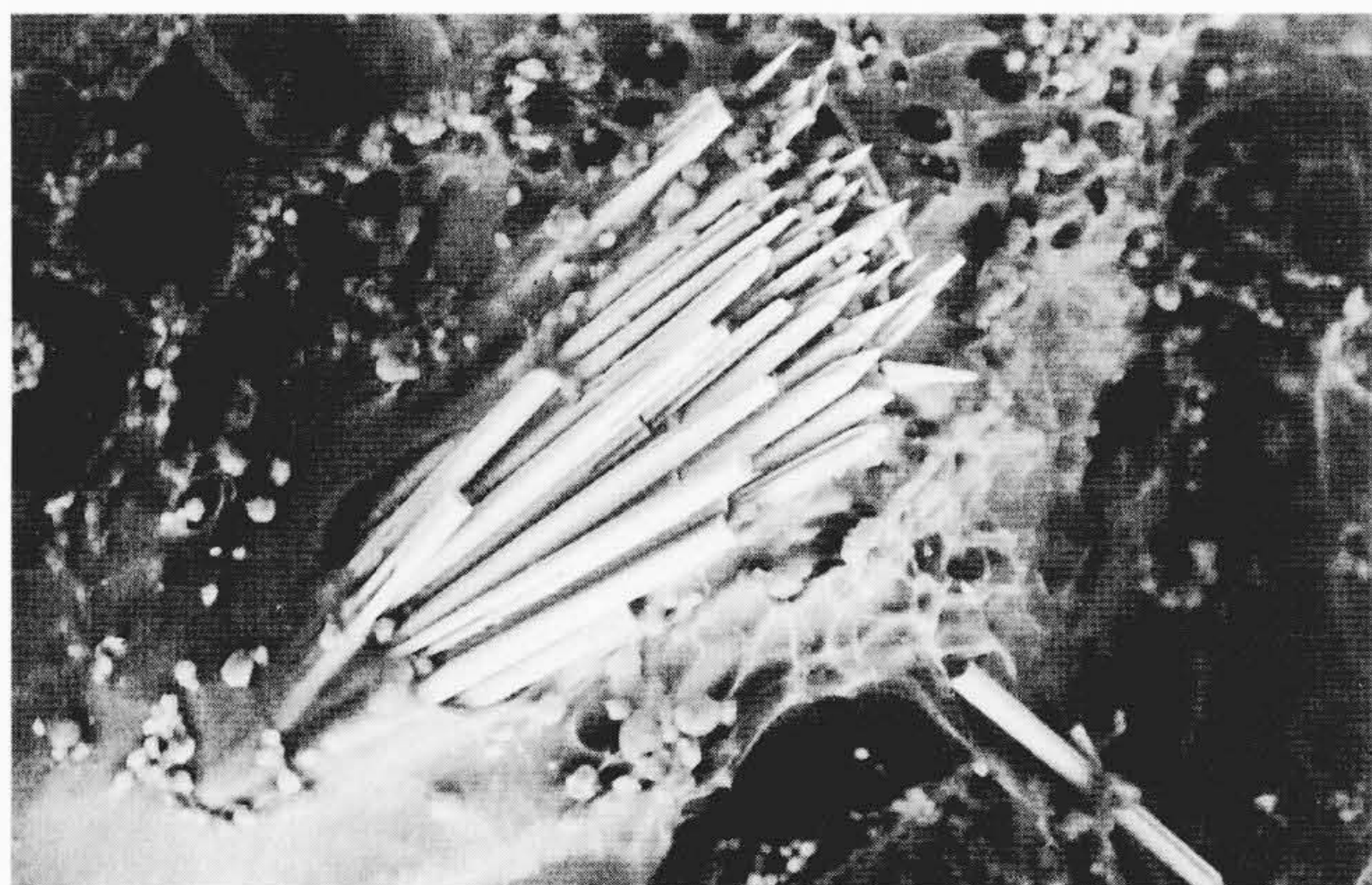
× 200 15 kV

50 Pa
200 μm

(b)

図3 アスパラガスの成長点のナチュラルSEMによる観察例(a)とチルドSEMによる観察例(b)

繊細な細胞などは、電子ビーム照射による熱ダメージで変形が起こり、忠実な観察が難しい(a)。一方、試料を冷却すると熱ダメージが軽減され、生に近い忠実な観察が可能となった(b)。



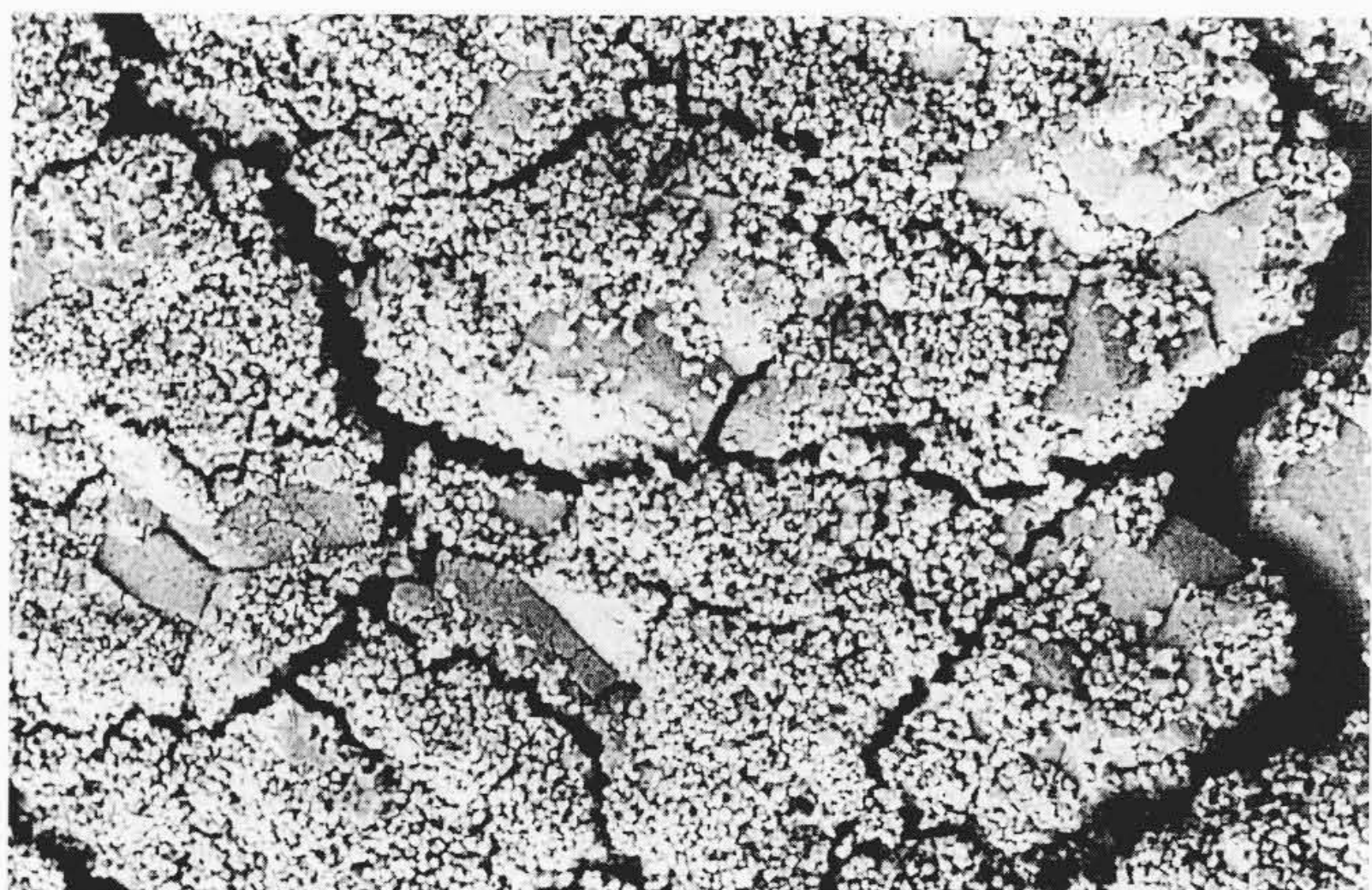
× 600 15 kV
50 Pa
50 μm

図4 こんにゃく芋の観察例(試料提供：群馬大学工学部 瀧上先生)

「あくのもと」の針状結晶が安定した状態で観察できる。

い。ここでは、おいしい米と言われているコシヒカリを観察した。生米を90分浸水した浸水米(図5参照)、および飯米(図6参照)のおのおのの試料を切断し観察した。

米の主成分はデンプンであるが、このデンプンに水と熱を加えると吸水によって浸水米ではアミロプラスト包



× 200 15 kV
30 Pa
200 μm

図5 浸水米の観察例

90分浸水米ではアミロプラスト包膜が破れ、デンプン粒の露出が観察できる。



× 200 15 kV
30 Pa
200 μm

図6 飯米の観察例

飯米になると膨潤糊(こ)化し、胚(はい)乳細胞やアミロプラストが消失した状態になる。

膜が破れ、デンプン粒の露出が顕著になる。飯米になると膨潤糊化し、生米で見られる結晶状の胚乳細胞やデンプン粒を包むアミロプラスト包膜が消失した状態になる。胚乳細胞の境界やデンプン粒がcaろうじて観察できるものの、アミロプラスト包膜の存在はほとんど確認できない。

4 おわりに

含水物を試料前処理工程を省略し、生の状態で直接観察することは長年の夢であったが、「チルドSEM」で観察することによってよい結果が得られた。つまり、水分を多く含んだ飯米の内部構造を長時間安定して観察する手法として簡便であり、しかも氷晶に起因するアーティファクトの生成が少なく好適であることがわかり、新たな知見が得られつつある。しかし、低真空状態では、入射電子や反射電子の散乱による像の分解能やS/Nの低下が免れないため、実用観察倍率は一万倍前後が限度である。

今回は含水試料の直接観察の第一歩と考え、今後は高分解能観察を可能とした「チルドSEM」の性能向上に努め、新たな知見に貢献していく考えである。

参考文献

- 1) 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会：走査型電子顕微鏡の上手な使い方(低真空型), 電子顕微鏡と周辺機器, 医学出版センター, 68~73(1994)
- 2) 久保木, 外: The Variable Pressure SEM with the Cooling Stage, Hitachi Instrument News, 27th Edition, 20~25(1995)
- 3) 西村, 外: 食中毒菌について, 日本電子顕微鏡学会, 第51回学術講演会予稿集, 239(1995)
- 4) 和田, 外: 飯米について, 日本電子顕微鏡学会, 第51回学術講演会予稿集, 184(1995)