

革新的前処理技術による生物試料の 迅速で高忠実なSEM観察

—日立電子顕微鏡用イオン液体HILEM「IL1000」—

Innovative and Fast Specimen Preparation Technique for Observation of Biological Specimens in their Natural State
- Hitachi's Exclusive IL1000 Ionic Liquid for Electron Microscopy Applications

二村 和孝

Nimura Kazutaka

河合 功治

Kawai Koji

中澤 英子

Nakazawa Eiko

富澤 淳一郎

Tomizawa Junichiro

小瀬 洋一

Ose Yoichi

水分を含んだ生物試料をSEM（走査電子顕微鏡）観察するには、固定、脱水、置換、乾燥といった、複雑で手間のかかる試料前処理が必要である。株式会社日立ハイテクノロジーズの電子顕微鏡用イオン液体「IL1000」は、蒸気圧がほとんどゼロで、高イオン導電性と高親水性を有するため、帯電付与剤として利用できる。その構造は、生体関連物質コリンを模倣しているため、安全性も高い。固定した生物試料をIL1000に浸漬し、余分なイオン液体の液滴を適宜除去するだけでSEM観察が可能である。またイオン液体で処理した試料は乾燥していないため柔軟である。これらの特性を生かして、従来の前処理法では形状保持が困難な甲殻類のSEM観察や、光学顕微鏡用試料を直接SEM観察する光—電子相関顕微鏡法へ適用した。

1. はじめに

SEM（Scanning Electron Microscope：走査電子顕微鏡）で絶縁試料を観察する際、帯電による像障害を防ぐために、真空蒸着装置やイオンスパッタ装置などで、Au（金）やPt（白金）などの金属を薄くコーティングして導電性を付与する必要がある。また、照射電子線の加速電圧を下げたり、試料室を低真空に保持するなど、観察条件の工夫も必要となる。さらに、水分を含んだ試料の場合は、固定、脱水、置換といった前処理を行ったうえで、試料形態を保持するための臨界点乾燥や凍結乾燥処理が必要で、複雑かつ手間のかかる作業を行わなければならない。

イオン液体は、常温で液体の塩であり、蒸気圧がほとんどゼロであるため、真空中でも蒸発しない。さらに不燃性や高イオン導電性を有するといった特質がある。この性質を利用して電子顕微鏡の試料前処理への適用が検討され、SEMでは、導電性付与剤として利用されている。イオン液体は、表面が入り組んだ凹凸の激しい試料でも全体に浸（し）み込み、真空状態での水分蒸発による試料形態の収

縮や変形を防ぐことが可能であるので、試料の形状を損なうことのない高忠実なSEM観察が可能である。生物試料では、脱水、置換、乾燥などの作業工程を省略することができるため、観察までの作業時間の短縮が期待できる。

ここでは、生物試料のSEM観察の前処理に日立電子顕微鏡用イオン液体「IL1000」を用いた、迅速でかつ高忠実なSEM像の観察手法について述べる。

2. 電子顕微鏡用イオン液体に求められる機能

イオン液体は、1992年にH.S.Wilkesらにより合成された常温で液体の塩で、構成成分のカチオン（+）とアニオン（-）の組み合わせによりさまざまな物性や機能をデザインできるユニークな物質であるため、材料科学や電気化学など多くの分野で注目されている。現在、200種類以上が市販されているが、腐食性を持つ有害なガスが発生するものや、毒劇法（毒物及び劇物取締法）、化管法（特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律）、化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）などの国内法令の規制対象物質となっているものもある。

日立ハイテクノロジーズは、イオン液体の特質を生かした電子顕微鏡用試料への適用研究を、2006年より大阪大学と共同で進めてきた。2013年には北海道大学、ミヨシ油脂株式会社の協力により、IL1000の販売を開始した。

IL1000は四級アンモニウムカチオン型界面活性剤と同様の有機塩であり、高親水性で、生体物質に対しての親和性が大きく、試料の形態維持特性にも優れた効果を発揮するなど、他のイオン液体にはない特長を有する。

IL1000は、エチル（2-ヒドロキシエチル）ジメチルアンモニウムメタンスルホナート（ $C_7H_{18}NO_4S$ ）90%と水（ H_2O ）10%から成る物質で、コリンに似た分子構造を持つ

ている。コリンは水溶性ビタミン様物質で、神経伝達物質などの栄養素でもあるので、これに似た構造であるIL1000は高い親水性を有するなど、バイオ材料に適していると言える。

塩は、カチオン(+)とアニオン(-)との強い相互作用により結晶を形成しているが、一般的に塩の低融点化(イオン液体化)は、そのカチオン(+)とアニオン(-)との相互作用(結晶性)を小さくすることで実現できる。

コリンは常温で固体だが、IL1000は、コリンのアニオン(-)を、電荷密度が小さいメチルスルホン酸(CH_3SO_3^-)とし、さらに、カチオン(+)のメチル基(CH_3)の一つをエチル基(C_2H_5)に変えて非対称な構造とすることで、カチオン(+)とアニオン(-)との間の相互作用を弱め、常温で液性を得ている(図1参照)。

ところで、一般にイオン液体はさまざまな特質を持っているが、粘性が高いため、導電性付与剤として、試料表面に薄く均一に塗布するのは難しい場合が多い。IL1000は、カチオンに親水性官能基の水酸基(OH)が存在し、メチル(CH_3 -)、エチル($-\text{C}_2\text{H}_5$)のように疎水性のアルキル鎖は短く、親水性が高い構造となっているので、水で希釈して使用できる。IL1000の水溶性は一般に親水性イオン液体として知られているBMImBF₄(1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムテトラフルオロボレート)と比較しても、非常に高い。また、生物組織などへの適用では浸透圧も考慮する必要があるが、IL1000の浸透圧はBMImBF₄より高く、イオン液体濃度と浸透圧の関係では、BMImBF₄が40 mmol/100 g-water付近で曲線を示すのに対し、IL1000は、直線性を呈し、高濃度下でも高い浸透圧を示す(図2参照)。40 mmol/100 g-water付近では約2 Osmol/kgであり、有機塩にもかかわらず、無機塩のNaClと同様、水中で完

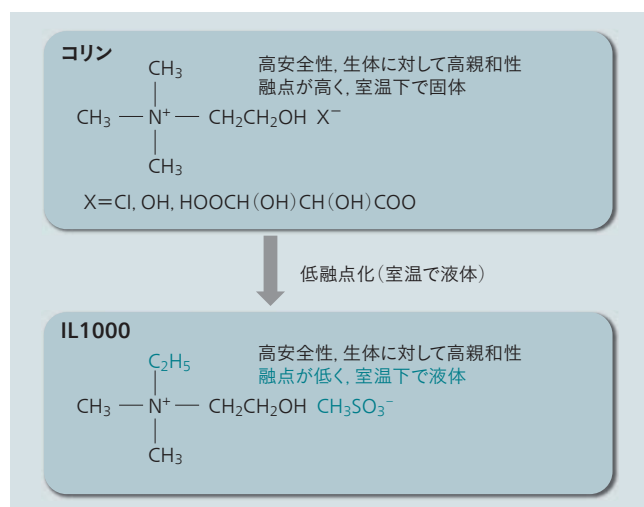


図1 | イオン液体IL1000は生体関連物質コリンの分子形状を模倣
IL1000のカチオン(+)は、コリンのメチル基(CH_3)をエチル基(C_2H_5)に置き換え、アニオン(-)をメチルスルホン酸(CH_3SO_3^-)とした。

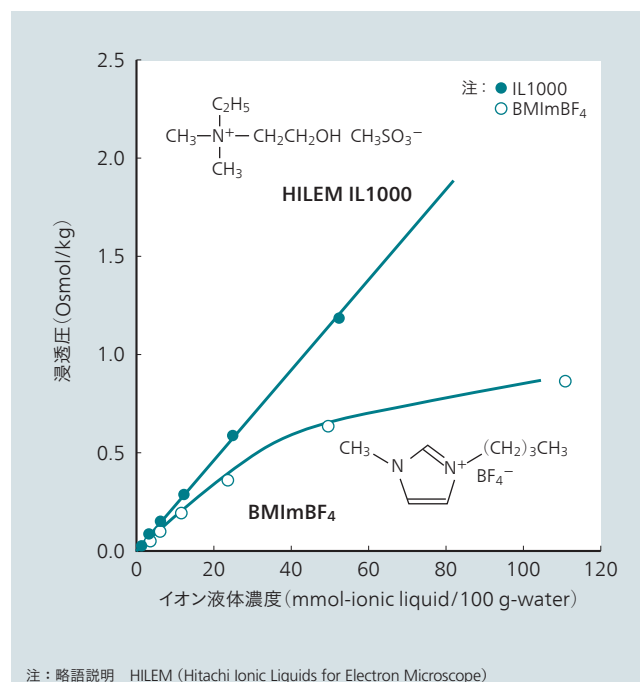


図2 | IL1000とBMImBF₄の浸透圧の比較

一般的な親水性イオン液体(BMImBF₄)と比較して、IL1000は水中でカチオン(+)とアニオン(-)が、ほぼ完全に電離し、より高い浸透圧を示している。

完全に電離するという物性を示す。IL1000の高電離性(高浸透圧)は、分子サイズが小さく、カチオン(+)とアニオン(-)の双方に水分子と水和する官能基を持つというIL1000の特異的な構造に起因すると考えられる。

IL1000はまた、生殖細胞変異原性試験(細菌を用いる復帰突然変異試験)において陰性で、ラットを用いた経口急性毒性試験では、LD50:>2,000 mg/kg、ウサギを用いた皮膚刺激性試験では刺激性は認められず、安全性が高い。

さらにIL1000の各種法令の該当状況(2013年5月時点)について、BMImBF₄と比較した。IL1000は、ユーザー

	IL1000	BMImBF ₄
	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \text{ CH}_3\text{SO}_3^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} / \text{H}_2\text{O}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{N}^+ - (\text{CH}_2)_3\text{CH}_3 \\ \\ \text{BF}_4^- \end{array}$
毒劇法	非該当	劇物
化管法	非該当	特定第一種指定化学物質 (政令405号 ほう素化合物)
消防法	測定されない。水分が蒸散したのちの引火点は210℃~250℃(セタ密閉式)で観察される。	危4-4-III 危険物 第四類 第四石油類 危険物等級III 引火点200℃以上250℃未満

注: 略語説明 毒劇法(毒物及び劇物取締法)、化管法(特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律)

図3 | IL1000とBMImBF₄の各種法令の該当状況

IL1000は、安全性試験及び毒劇法、化管法、消防法等の法令の該当状況から安全性が高いことが示されている。

に対して保管，作業管理上，より安心な環境を提供することができる（図3参照）。

3. IL1000を用いた生物試料の観察例

3.1 帯電防止剤としての適用

5 mm角に切ったろ紙を，直径15 mmのアルミニウム試料台にカーボン製の両面テープで貼り付け，IL1000の10 %水溶液を滴下する。10分ほど放置してSEM観察した（図4参照）。ろ紙のように，試料表面が入り組んだ凹凸の激しい絶縁物の試料でも，IL1000が全体に浸み込み，帯

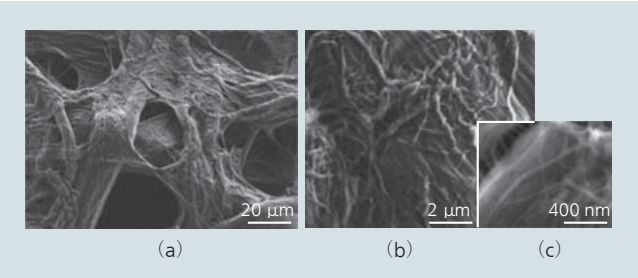


図4 | ろ紙 (IL1000処理) のSEM (走査電子顕微鏡) 像
イオン液体 (IL1000) 処理により，帯電を抑制し，ろ紙の繊維構造を観察できた。挿入にはセルロース繊維が確認できている。
[観察装置:SU8020, 加速電圧:1 kV, 観察倍率:1,000倍 (a), 10,000倍 (b), 25,000倍 (c), 信号: SE (Secondary Electron: 二次電子) (L)]



図5 | カマキリヨコエビの自然乾燥 (無処理) のSEM像
乾燥の影響で収縮や変形が起きている。
(観察装置: SU1510, 加速電圧: 1.5 kV, 観察倍率: 100倍, 信号: SE)

電することなく観察できている。

3.2 水分蒸発による形態の収縮や変形の防止

地球上で最もバイオマスの大きな動物の1つとして知られる海洋微小甲殻類の外骨格は脆 (ぜい) 弱で，例えばカマキリヨコエビの場合，自然乾燥では収縮や変形が起きる（図5参照）。当然，真空中では形態が保持できないが，固定液などの試薬も浸透しにくいいため，通常のSEM観察用の前処理でも収縮や変形をまぬがれない場合が多い（図6参照）。

甲殻類試料などの生物試料のSEM観察のための通常の前処理手順を示す（図7参照）。

(1) 固定

2% GA (Glutaraldehyde: グルタルアルデヒド) 0.1 M PBS (Phosphate Buffered Saline: リン酸緩衝生理食塩水) (pH7.2) で希釈した溶液により，4℃で，2時間前固定する。0.1 M PBSで4℃，3回洗浄後，蒸留水で希釈した2% O₅O₄ (四酸化オスミウム) を用い，4℃で，2時間後固定し，蒸留水で3回洗浄する。

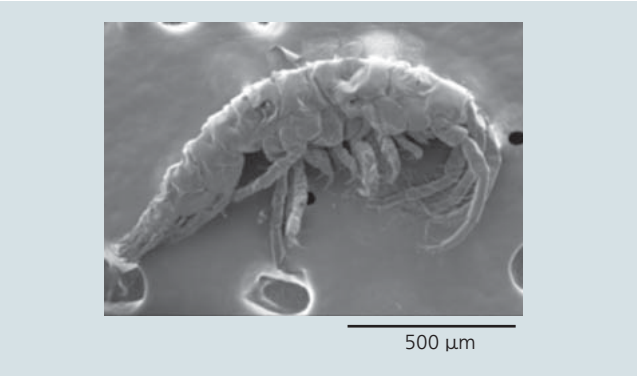


図6 | 通常のSEM観察用前処理をしたSEM像
通常のSEM観察用前処理でも一部収縮や変形が起きている。
(観察装置: S-3400N, 加速電圧: 1.0 kV, 観察倍率: 100倍, 信号: SE)

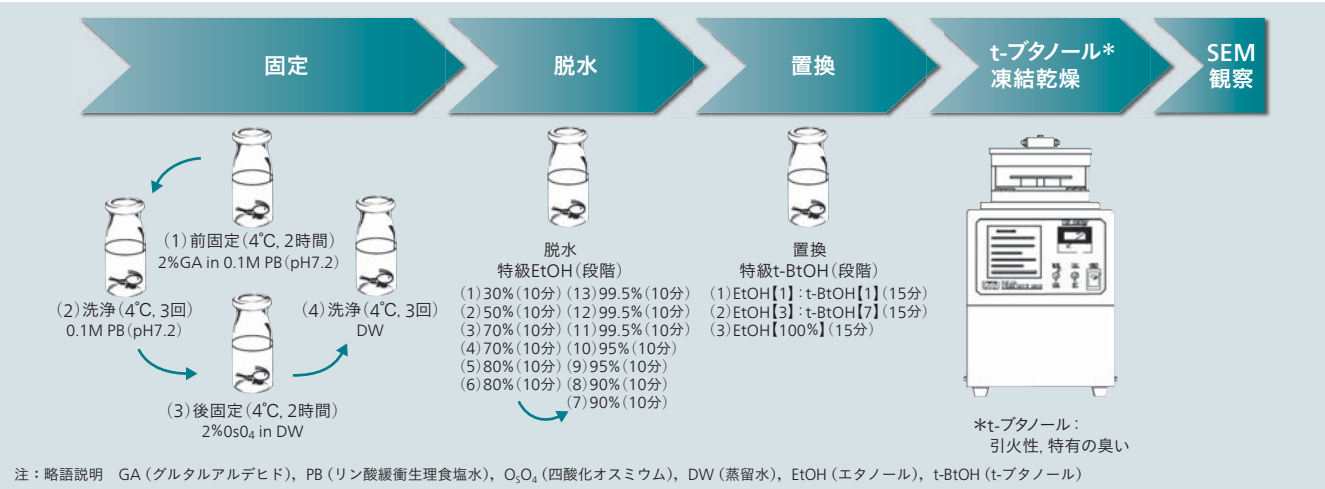


図7 | SEM観察での生物試料の通常の前処理手順

通常のSEM観察前処理手順は，固定，脱水，置換，t-ブタノール凍結乾燥という手順で行われる。

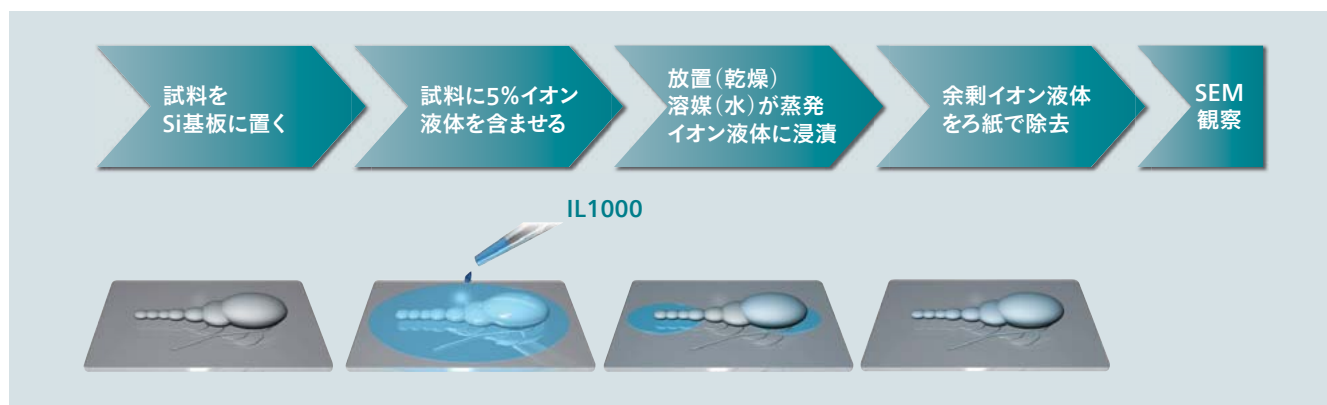


図8 | SEM観察での生物試料のイオン液体(IL1000)処理の手順

SEM観察でのイオン液体IL1000処理の手順は、試料をSi基板置き、手早く試料に5%希釈のIL1000を含ませ、4時間ほど放置すると、水が蒸発し、試料がIL1000に浸漬する。余剰イオン液体をろ紙などで除去し、SEM観察する。

(2) 脱水

特級EtOH (エタノール) を用いて、上昇系列、例えば30% (10分) → 50% (10分) → 70% (10分, 2回) → 80% (10分, 2回) → 90% (10分, 2回) → 95% (10分, 2回) → 99.5% (10分, 3回) で、振とう脱水する。

(3) 置換

室温で特級t-BtOH (t-ブタノール) : 特級EtOHを1 : 1で15分, 3 : 7で15分, t-BtOH100%で15分ほど浸漬置換する。

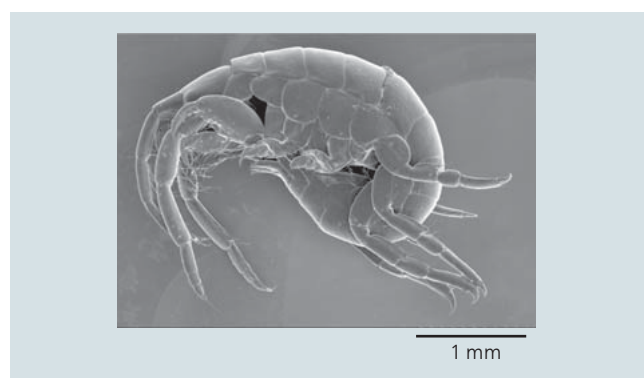


図9 | イオン液体処理したカマキリヨコエビのSEM像

イオン液体処理の場合、収縮や変形がなく甲や脚肢なども明瞭に観察できる。(観察装置 : S-3400N, 加速電圧 : 5 kV, 観察倍率 : 32倍, 信号 : SE)



図10 | カマキリヨコエビの生物顕微鏡(正立)像(暗視野照明)

ホールスライドガラス上で、水に浸漬させた状態で光学顕微鏡観察した。形状が保たれ、色の情報も捉えられる。

(4) 乾燥

t-ブタノール凍結乾燥装置付属の試料カップの中に試料がt-BtOHに隠れるように入れ、冷蔵庫で凍結する。凍結試料をt-ブタノール凍結乾燥装置に入れ、真空凍結乾燥する。

通常の試料前処理では以上のようなステップが必要となるが、今回はIL1000でカマキリヨコエビを処理した。

5%希釈IL1000をカマキリヨコエビに滴下し、4時間放置後に、余分な液滴をろ紙などで除去し、SEM観察した。各部の体節を覆う甲や脚肢なども明瞭に観察できる。このようにイオン液体を用いれば、乾燥処理を施さなくても、変形することなく短時間で観察することができる(図8, 図9参照)。乾燥しないで水に浸漬した状態で取得した光学顕微鏡像(図10参照)と比べてみてもその変形が少ない様子が示されている。

4. 培養細胞の光-電子相関顕微鏡観察への応用

蛍光顕微鏡で観察した試料の同じ部位を電子顕微鏡で観察し、両方の画像を相関するCLEM (Correlative Light and Electron Microscopy : 光-電子相関顕微鏡法) は、分子特異的な局在をナノレベルの高分解能で観察する方法として注目されている。IL1000を用いることで簡便なSEM観察が可能であるため、今回CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope : 共焦点レーザ顕微鏡) とSEMを組み合わせたCLEMの試料前処理にIL1000の適用を試みた。

4.1 位置合わせマーク付きディッシュの準備

CLSMとSEMで同一細胞を観察するにあたり、簡便に位置合わせを実施するため、英国Gilder Grids社のSEM Finder Grid (図11参照) をマスクとして用いた。直径35 mmのガラスベースディッシュ(AGCテクノグラス株式会社製「Cover Glass No.1S」)にSEM Finder Gridを置き、

日立イオンスパッタE-1045を用いて、膜厚約6 nmにAu（金）コーティングする（25℃、15 mA、36秒、試料高さ30 mm）。マスクにはアルファベットや数字がくり抜かれているので、ディッシュにはそれらがコーティングされ、位置合わせあるいは、試料探索用のマークとして活用できる（図12参照）。

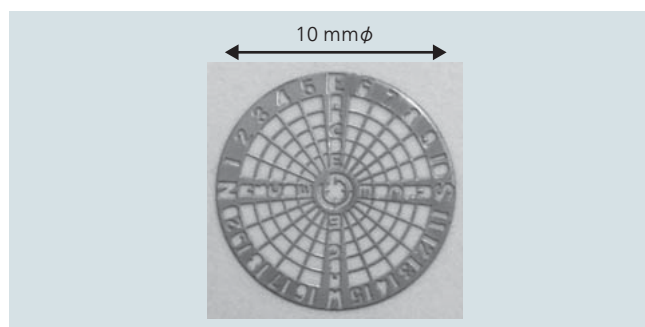


図11 | SEM Finder Grid, スタイルSEMF1
SEM Finder Grid, スタイルSEMF1をマスクとして用いた。

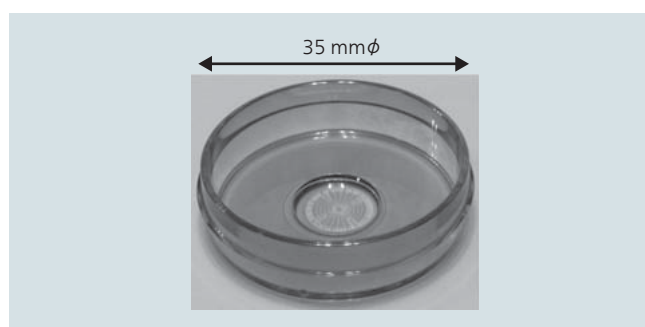


図12 | 位置合わせマーク付きガラスベースディッシュ
35mm径のガラスベースディッシュ（AGCテクノグラス株式会社製「Cover Glass No.15」）の底部中央にSEM Finder Gridを置き、6nm厚のAu（金）コーティングして作製した。Au（金）コーティングのために少しすりガラス状に黒っぽくなっている。

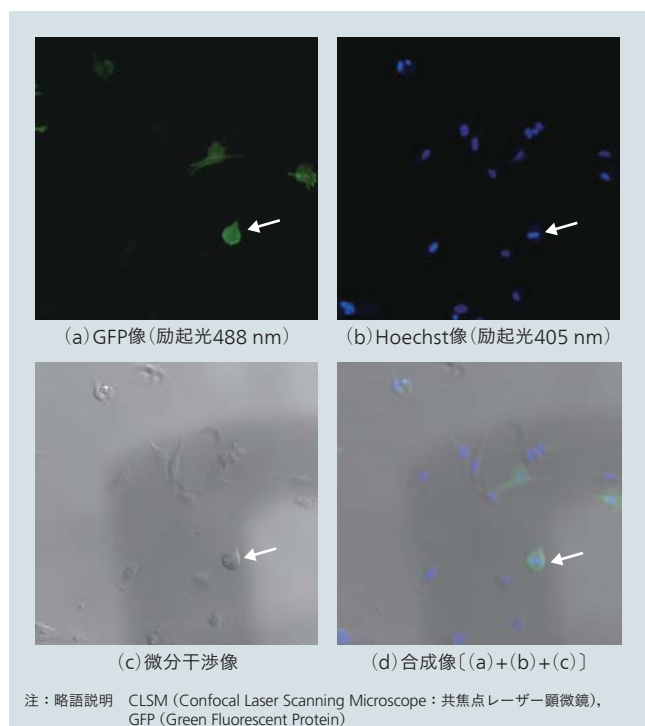


図13 | CLSM像
矢印が目的の相関させる細胞である。
[対物レンズ：×20, ドライ, 415×415 (μm)]

4.2 細胞培養～CLSM観察～目的細胞の決定

GFP (Green Fluorescent Protein) を発現させたヒト網膜色素上皮細胞を、準備した位置合わせマーク付きディッシュ上で培養し、蛍光妨害とならないように、通常よりも薄い0.1%のGAで固定した（室温、15分）。PBSで2回洗浄した後、核染色液（-Cellstain[※]）-Hoechst 33342 solution）入りPBSに浸した状態で、CLSM像を取得した（図13参照）。

SEM観察にあたり、CLSMで取得したGFP像[図13(a)参照]、Hoechst像[図13(b)参照]および微分干渉像[図13(c)参照]を、株式会社アストロンの画像重ね合わせソフトウェアAZblendを用いて合成し、相関させる細胞を決めた（図13矢印参照）。

4.3 イオン液体処理～SEM観察

ディッシュ上の核染色液入りPBSを除去し、蒸留水で3回洗浄した後、5%希釈IL1000をディッシュに滴下し、40分ほど放置した。その後、残った余分なIL1000をブロワで吹き飛ばし、念入りにろ紙ほどで除去し、そのまま

※) Cellstainは、株式会社同仁化学研究所の登録商標である。

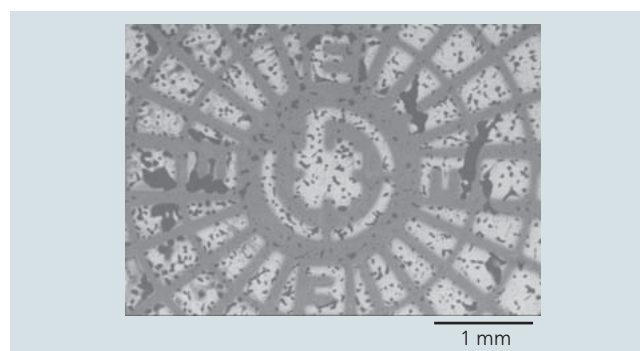


図14 | 場所特定のための低倍率反射電子像
Au（金）コーティングされた部分が明るく見え、IL1000が浸み込んだ細胞が暗く見えている。
[観察装置:S-3400N, 加速電圧5 kV, 観察倍率:30倍, 信号:BSE (反射電子)]

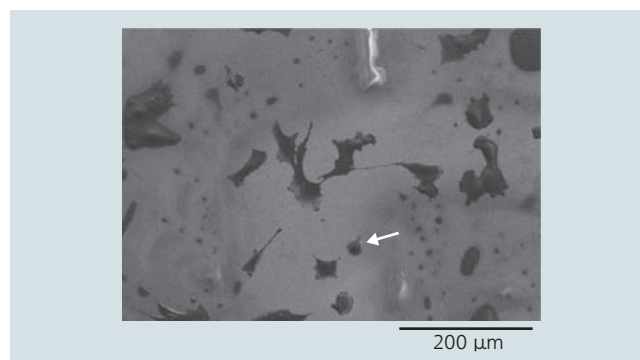


図15 | 図13のCLSM像と同様な視野のSEM像
矢印が目的の相関させる細胞である。

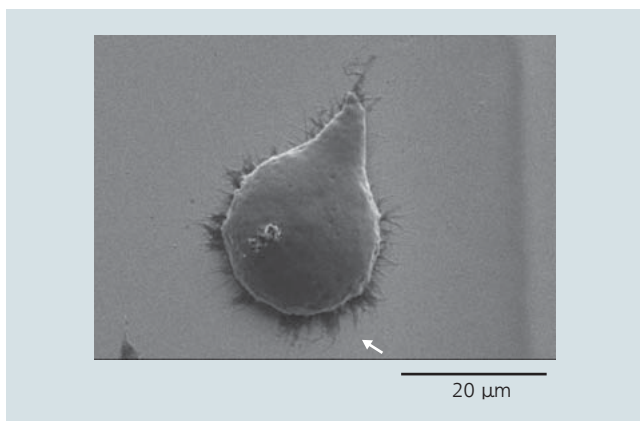


図16 | 細胞分裂中のヒト網膜色素上皮細胞のSEM像
細胞周辺の仮足（矢印）が収縮や剥離なく観察されている。
（観察装置：加速電圧5 kV，観察倍率：2,000倍，信号：SE）

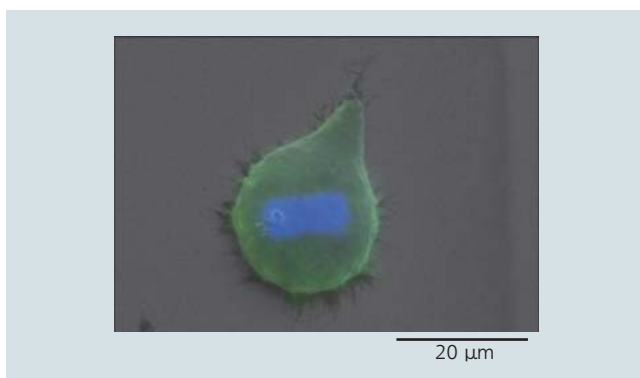


図17 | SEM像とCLSM像〔GFP（緑），Hoechst（青）〕の合成像
球形の細胞の中心に核が集まっている様子（青色）が観察されている。

ディッシュをSEM試料室内に入れて観察した。

まず，場所の特定のために，SEMで低倍率（×30）のBSE（Backscattered Electron：反射電子）像を取得し（**図14**参照），先ほどの合成像〔**図13**（d）参照〕と照らし合わせ，同様な視野サイズになるようにSEM像の倍率を決める（**図15**参照）。

目的の相関観察する細胞全体がちょうど視野に入るように倍率を調整し，SEM像を取得した（**図16**参照）。やや楕円の球形を呈したこの細胞は細胞分裂中と思われ，IL1000処理により，細胞周辺の仮足（矢印）も収縮や剥離なく観察できている。

AZblendを用い，二次電子像，GFP像，Hoechst像を重ね合わせた像（**図17**参照）を作成した。球形の細胞の中心にはHoechst染色された核が集まっている様子が観察される。このように，今まで，SEMの前処理に手間と時間がかかっていた培養細胞のCLEMが，1日のうちに可能となっている。

5. おわりに

ここでは，生物試料のSEM観察の前処理にIL1000を用い，迅速でかつ高忠実なSEM像の観察手法について述べた。

SEM観察における生物試料の前処理は，SEMが開発された1969年ごろから，さまざまな手法が試みられてきた。その目的は，いかに実際の試料形状を忠実に観察するかに重きが置かれてきたが，いかに簡単に素早く像を取得するかも重要なニーズとなってきている。

日立ハイテクノロジーズでは，今後もさまざまな顧客のニーズに応えられるように，電子顕微鏡装置本体だけでなく，試料前処理や観察技法などの工夫や改善も試み，最適なソリューションを提供していく考えである。

なお，本稿の執筆にあたり，ヒト網膜色素上皮細胞とそのCLSM像は，名古屋大学大学院医学系研究科附属医学教育研究支援センター分析機器部門より提供いただいた。関係各位に深く感謝の意を表する次第である。

参考文献

- 1) 桑畑，外：イオン液体の電子顕微鏡観察，表面科学，Vol.28，No.6（2007）
- 2) 桑畑，外：イオン液体の電子顕微鏡応用，顕微鏡，Vol. 44，No.1（2009）
- 3) 河合，外：コリンに似た分子構造を持つ高親水性イオン液体の特異物性とその電子顕微鏡用可視化剤への応用，表面，Vol.49，No.12，423～431（2011.12）
- 4) 塩野，外：イオン液体を用いた微小甲殻類のSEM観察，日本顕微鏡学会第68回学術講演会発表要旨集（2012.5）
- 5) 坂上，外：イオン液体を用いた柔組織のSEM観察，日本顕微鏡学会第69回学術講演会発表要旨集（2013.5）
- 6) Svitkina, et al. : Correlative Light and Electron Microscopy of the Cytoskeleton, Cell Biology, Four-Volume Set, Third Edition : A Laboratory Handbook, Volume 3, PartB, CHAPTER 28, 277-285, (2005.12)

執筆者紹介



二村 和孝

1985年日製産業株式会社入社，株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括部 事業戦略本部 科学システム事業戦略部 所属
現在，電子顕微鏡の中長期的な事業戦略および事業開発に従事
日本顕微鏡学会会員，医学生物学電子顕微鏡技術学会会員



河合 功治

1995年ミヨシ油脂株式会社入社，油化本部第二技術部 所属
現在，イオン液体，ナノ粒子などの新規機能性材料の研究開発に従事
博士（工学）



中澤 英子

1981年日立製作所入社，株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学・医用システム設計開発本部 アプリケーション開発部 所属
現在，電子顕微鏡のアプリケーション開発に従事
医学博士
日本顕微鏡学会会員，医学生物学電子顕微鏡技術学会会員



富澤 淳一郎

1983年日立那珂精工株式会社入社，株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部 科学・医用システム設計開発本部 先端解析システム設計部 所属
現在，電子顕微鏡の先端技術開発に従事



小瀬 洋一

1983年日立製作所入社，株式会社日立ハイテクノロジーズ 研究開発本部 所属
現在，電子顕微鏡の先端技術開発に従事
日本顕微鏡学会会員，電気学会会員