

平成 25 年度東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修（生物・生命コ ース）を受講して

○高間瑠佳^{A)}、林育生^{B)}

A) 教育・研究技術支援室 分析・物質技術系

B) 工学系技術支援室 分析・物質技術系

概要

2013 年 7 月 3 日から 5 日にかけて、東海・北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修（生物・生命コース）が自然科学研究機構基礎生物学研究所・生理学研究所で開催された。この中で、「走査型電子顕微鏡を用いた試料観察法の体験」のコースを受講したのでその内容を報告する。

1 研修の概要

- 期間 2013 年 7 月 3 日～5 日の 3 日間
- 会場 自然科学研究機構 基礎生物学研究所・生理学研究所
- 参加人数 21 名

2 日程

- (1 日目) 講義 1 「古典園芸植物・アサガオの分子生物学」
講義 2 「脳機能解析に有用な新しい遺伝子導入技術の開発」
講義 3 「共同利用分析機器の管理と技術サポート」
「研究室における実験植物の維持管理と技術支援」
講義 4 「生理学研究所の情報ネットワーク」
「生理学研究所の広報活動と技術支援」
受講生自己紹介プレゼンテーション
- (2 日目) 実習
8 コースが実施され、各コース 1～4 名毎に分かれた。受講した G コース「走査型電子顕微鏡を用いた試料観察法の体験」には 3 名が参加した。電子顕微鏡での観察・撮影は一人ずつ行うため、順次 3 日目の発表の原稿を作成した。
- (3 日目) 午前： 実習報告のプレゼンテーション
午後： 基礎生物学研究所「大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBPP) センター」の見学
地元企業（岡崎 3 機関と共同開発）「東海光学」の見学

3 講義

「古典園芸植物・アサガオの分子生物学」では、アサガオが日本で古くは薬草として輸入され、その後園芸品として偶発的品種改良を経て親しまれてきた歴史から入り、西暦 1900 年前後から人工的品種改良が行わ

れてきたが、この品種の多様化について遺伝子解析を行ったという講義であった。「脳機能解析に有用な新しい遺伝子導入技術の開発」は、脳機能の研究についてのこれまでの手法（トランスジェニック・ノックアウト法など）の紹介やそれぞれの難点について学び、またウイルスを使った新しい遺伝子導入方法についての説明があった。

講義 1・2 は研究所の教員による講演だったが、講義 3・4 は研究所の技術職員による講演だった。「生理学研究所の広報活動と技術支援」では、研究所が一般市民に対して行う出前講義や広報誌の発行によって、より研究所に親しみを持ってもらい、また健康情報を最新研究成果とともに役立ててもらおうことを実践している話であった。

講義は全て PowerPoint を用いて進められたが、印刷資料は配布されなかったため、自分の日常業務とは異なる分野の話を瞬時に理解するのは難しかった。

4 自己紹介プレゼンテーション

受講者の自己紹介プレゼンテーションは、PowerPoint を用いた 5 分間の口頭発表形式で行われた。業務内容の紹介から学歴・趣味などの自己紹介まで多岐にわたるプレゼンテーションであった。自分の業務分野とは異なる生物技術系の方がほとんどだったので、興味深かった。

5 実習「走査型電子顕微鏡を用いた試料観察法の体験」

5.1 目的

本来電子顕微鏡用の試料作成は、高真空下でも変形しないように試料を加工するために、固定（組織が変形しないための化学処理）、脱水・乾燥・電子染色または金属コーティングを行い数日間の作成時間を要する。しかしこの実習では 1 日間で講義・試料作成・撮影を一通り行うため、試料作製には時間をかけることができず、実習難易度としては「体験」レベルであるということだった。

短時間で走査型電子顕微鏡用試料を作成するために、研究所敷地内で採取された園芸用の花が数種類用意された。これらから花粉を採取し、イオンコーターで導電染色（金属コーティング）を行って顕微鏡に導入し観察と撮影を行った。花粉が試料として用いられた理由は、水分の含有率が低く非常に安定的な化学物質スプロポレニンとセルロースが主成分の外壁があるため、通常の乾燥した状態では変形せず固定・脱水・乾燥の処理が必要ないためである。

5.2 講義

午前中に電子顕微鏡の原理と試料の作成方法について講義を受けた。電子顕微鏡には大きく分けて透過型（TEM）と走査型（SEM）の 2 種類がある。固定・脱水・乾燥した試料を薄い（80~100nm）切片にしてから電子染色（ウランや鉛など電子が透過しにくいものを定着させて、像の陰影を強調させる）し、電子線をあてて透過した電子の像を撮影するものが透過型である。これに対し、固定・脱水・乾燥した試料を切片にせず丸ごと導電染色（帯電しないように金属をコーティングする）して表面に電子線を当て、反射した電子もしくは二次発生した電子を検出器で拾い集め並び直して像にするのが走査型である。

実習では行われなかった標本の「固定」について、被検動物に深麻酔をかけてから腹部を切開し、血管に固定薬液を注入して、目的の組織内の血液を固定薬液に置換する「灌流固定」もビデオで視聴した。

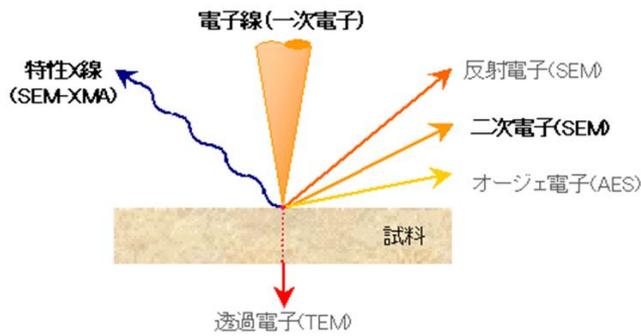


図1 電子顕微鏡で使用する透過電子・二次電子・反射電子

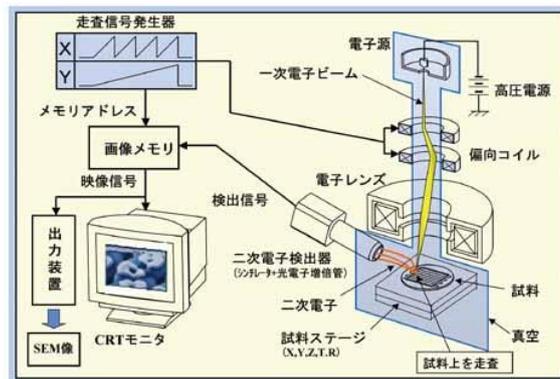


図2 走査型電子顕微鏡の原理

今回実習では、カールツァイス社製走査型電子顕微鏡「SIGMA」という SEM を使用した。この機種の特徴として、通常 SEM についている二次電子検出器 (図3の「SE2 検出器」) の他に、「インレンズ SE 検出器」がレンズ機構内部に備わっている。前者は二次電子と一部の反射電子を検出し、後者は二次電子のみを検出する。二次電子は表面からごく浅い範囲から発生するものであるのに対し、反射電子は二次電子よりも深部から発生するという特徴があるためであるため、それぞれで観察できる像には違いがあるという説明を受けた。反射電子も二次電子も電子であることには変わりはないので、1 枚の像にしたものから区別することはできず同時に 2 種類の観察像を得て比較することが大事であるということだった。

実習では、同じ試料・同じ位置・同じ倍率で 2 つの検出器を切り替えて観察し、像の違いを検証した。

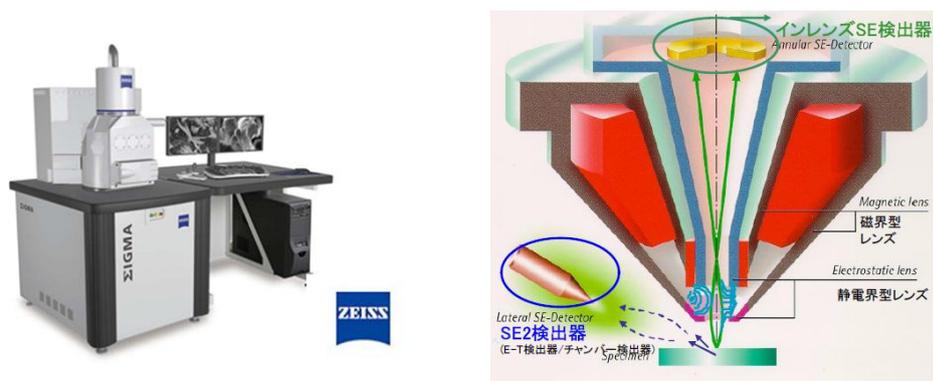


図3 カールツァイス社製走査型電子顕微鏡「SIGMA」(左)と2種類の検出器(右)

5.3 試料作製

直径 15mm、高さ 10mm 程度の SEM 試料台に直径 10mm 程度のカーボンテープを貼り付け、その上に予め用意された花を付着させて花粉を採取した。これを数種類の花で行って、何種類の花粉を見つけられるかを比較する。

次にイオンコーターで金のコーティングを行った。これはロータリーポンプで 20Pa まで気圧を下げた状態で 6~8mA の電流を流し 2 分ほどかけて 100~150Å の厚さに金をコーティングする。20Pa 程度の低真空にすることで、コーティング粒子が残留ガス分子に衝突して付着方向を変えるため、試料は上面だけでなく立体的にコーティングされる。



図 4 試料の花（左）と花粉採取（右）



図 5 EIKO 製イオンコーター（左）とコーティング（放電）中の状態（右）

5.4 観察・撮影

コーティングの終わった試料台を SEM 内部にセットし、指導担当者と一対一で操作方法を学習しながら観察、撮影を行った。

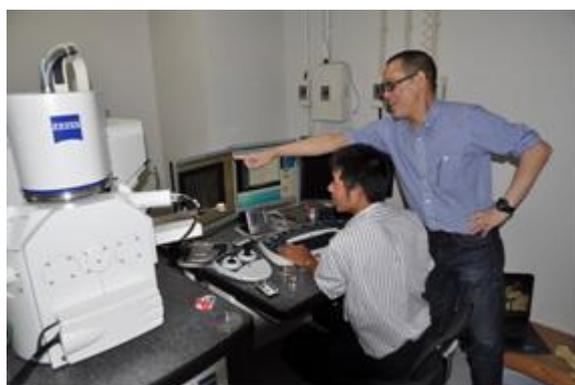


図 6 観察・撮影風景

花粉は5種類ほどあることが観察できた。一部を図7・8に挙げる。

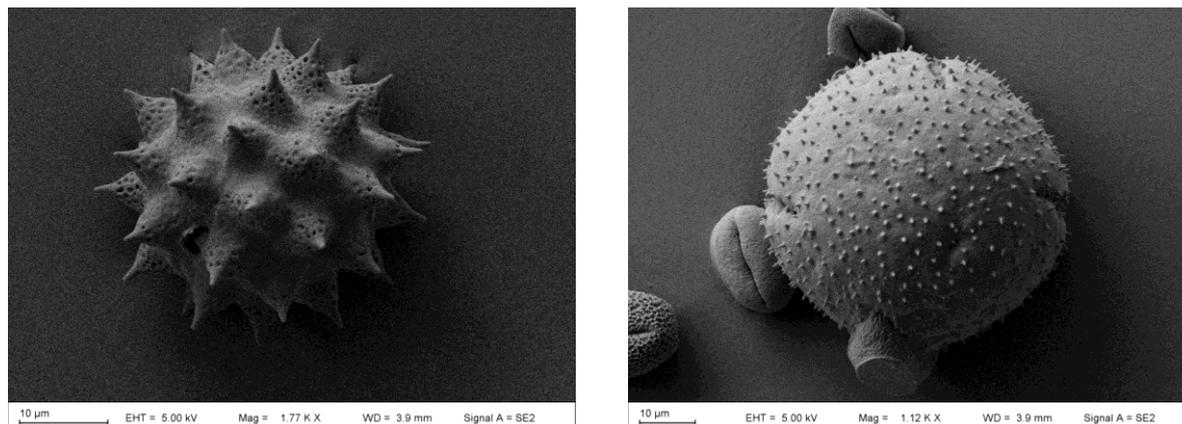


図7 花粉の二次電子像 (SE2 検出器による、スケールはそれぞれ 10µm)

次に SE2 検出器とインレンズ検出器で撮影した像を比較した。SE2 検出器では、検出器が試料に対し斜め上に設置されているため陰影ができ、花粉全体を立体的に見ることができている。これに対してインレンズ SE 検出器では検出器が試料の真上にあるため、真上から見た二次元映像である。また、ごく表面から発生する二次電子で像を作ることで輪郭が際立って見えるため、表面の微細な構造を観察できることが分かった。

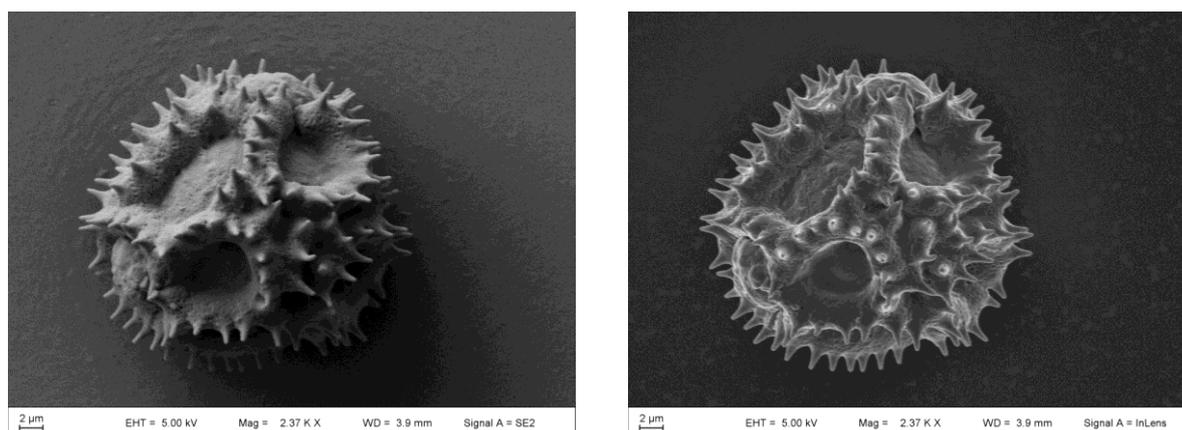


図8 SE2 検出器 (左) とインレンズ SE 検出器 (右) の二次電子像 (スケールは 2µm)

今回花粉を採取した際に花に紛れ込んでいた小さい蜘蛛も一緒に金属コーティングをかけた。金属コーティングの際まで蜘蛛は生きていたが、真空状態にさらされたため、内部組織がつぶれて形が平たく変形していると推測できた。軟組織を標本化するにはやはり固定等前処理工程が必要であることが分かった。

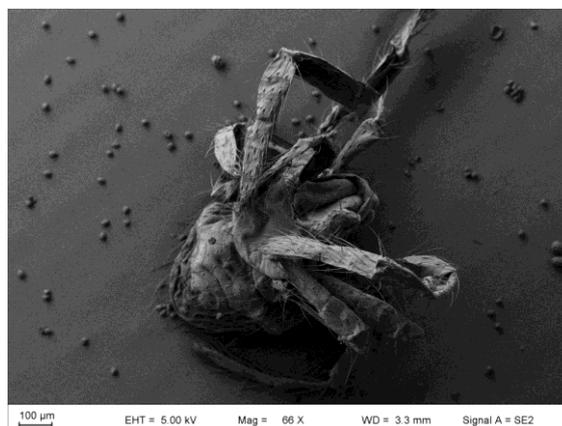


図9 花に紛れ込んでいた蜘蛛の二次電子 (SE2 検出器) 像 (スケールは 100µm)

6 基礎生物学研究所 IBBP センター見学

午後から基礎生物学研究所内にある「大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP) センター」の見学が行われた。大型の液体窒素保存容器があり、自然災害等の緊急時でも標本を失わないように冷凍保存を継続するための設備である。通常の 1.5 倍の強度を持つ耐震性建築で、非常用電源が二段階で整備され、ガスの供給が切れても 24 時間は自家発電ができるようになっている。使用料は無料ということであった。



図 10 IBBP センターの液体窒素凍結保存システム

7 研修を終えて

今回同じコースを受講した 3 名は全員電子顕微鏡の使用経験があり、今回の実習で新たな技術を習得するというまでには至らなかったが、2 種類の検出器で同じ試料を観察することで、改めて反射電子・二次電子の特徴を学ぶことができた。花粉は化石になりやすく、古い時代の植生を推定することもできると講義も、実習の試料作製時に変形しないことから、より納得することができた。

時間があれば、より高倍率での微細構造の観察や、水分を少し含ませると花粉が発芽するそうなので、そういう観察も実施出来たら良かったと思う。

最後に、本稿をまとめるにあたり、写真を提供いただきました基礎生物学研究所技術課小林(梶浦) 弘子様、ご指導いただいた生理学研究所技術課山田元様、ほか合同研修でお世話になりました基礎生物学研究所・生理学研究所の担当の皆様にご心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 宮澤七郎,中村澄夫, 医学生物学電子顕微鏡技術学会“花粉の世界をのぞいてみたら”, p49,p87-88