

走査電子誘電率顕微鏡

1 はじめに

水溶液中の生物試料や有機材料、ナノ粒子を直接観察し分析することは、生物機能の解明や新たな高機能材料の開発に結び付く。一般的な光学顕微鏡では、溶液中の試料を観察可能であるが、その空間分解能は光の回折限界により約 200 nm に制限される。一方、電子顕微鏡の空間分解能は数 nm 以下と極めて高く、ナノレベルの微細構造も観察可能である。しかし、プローブとして電子線を使用するため、^{きょうたい}筐体内部を真空にする必要があり、溶液中の試料をそのまま導入し観察することは困難である。そのため、溶液試料を大気圧状態で封入し観察する液体観察用の試料ホルダが開発されてきた^{1)~3)}。一般的に金属粒子等の観察では、試料に直接電子線を照射し高いコントラストで観察することが可能である。しかし、有機材料や生物試料では水と比重が近く、高いコントラストでの観察は困難である。さらに、電子線が直接照射されるため電子線ダメージも大きな問題となる。こうした問題を克服するため、著者らの研究グループでは、電子線の照射に伴う電位変化を検出し観察する走査電子誘電率顕微鏡 (SE-ADM) の開発を進めている⁴⁾⁵⁾。本稿では、この装置の概要について解説する。

2 走査電子誘電率顕微鏡の概要

従来の透過電子や反射電子による観察方法では、試料に電子線を直接照射することが必要となり、電子線ダメージや低コントラストの問題が生じる。これまで著者らは、低加速の電子線を観察窓の薄膜に照射・吸収させて、この電位変化を検出することで、水溶液中の試料の誘電率の違いを観察する新たな観察技術の開発を行ってきた (図 1)⁴⁾⁵⁾。本装置では、電子線を試料ホルダ上部の窒化シリコン (SiN) 薄膜のタングステン層に照射し、薄膜内に局所的な電位変化を生じさせる。この電位変化は、水溶液中の試料を透過し、下側の測定端子により検出される。こうした電位変化の透過状況は、物質の比誘電率により異なる。水は比誘電率が 80 と高いため電位変化を良く透過する。一方、生物試料や有機材料は、2 ~ 3 と低く透過が阻害される⁴⁾⁵⁾。こうした比誘電率に起因する電位変化の透過の違いを検出することで、極めて高いコントラストで水溶液中の試料の直接観察が可能となる (図 1)。また、入射電子は、ほぼすべてタングステン層と SiN 薄膜で散乱・吸収されるため、試料への電子線ダメージも極めて少ない⁴⁾⁵⁾。著者らのグルー

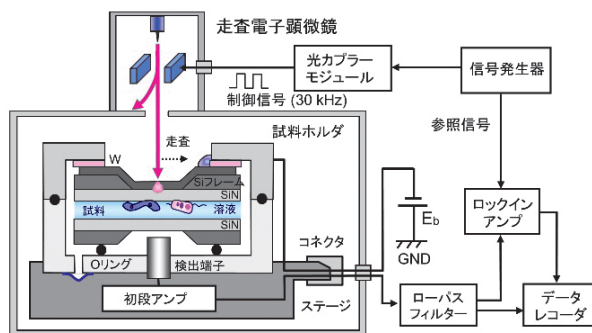


図 1 SE-ADM の概要
(文献 5 より一部改変して転載)

プでは、SE-ADM を用いて、溶液中の生物試料やナノ粒子等を直接観察し、その構造や分散状態の解析を進めて来た。以下に本方法による観察結果を紹介する。

3 溶液中のナノ粒子の直接観察

著者らはこれまで、SE-ADM を用いて水溶液中のナノ粒子の直接観察を行ってきた。例えば、大気中の汚染物質である PM2.5 は、カーボンや金属酸化物、有機物が凝集した粒子である。こうした PM2.5 を溶液中で直接観察したところ、100 nm 程の小さな粒子が葡萄の房状に凝集していることが確認された (図 2a, b)⁶⁾。PM2.5 は炭素や酸化金属等の比較的軽い元素が主成分のため、従来方法では水溶液中で直接観察することは困難であった。これ以外にも直径が数 μm で厚さが数 nm と極めて薄い粘土粒子を水溶液中で直接観察することにも成功している⁷⁾。この観察では粘土粒子のシート状の構造

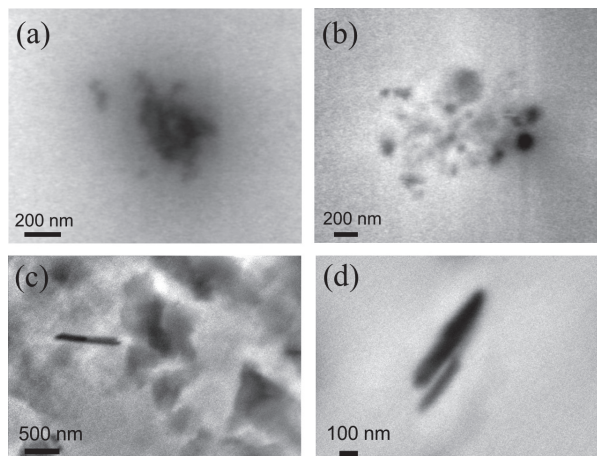


図 2 SE-ADM による溶液中の PM2.5 と粘土粒子の直接観察
(a), (b) 溶液中の PM2.5 の観察画像, (c), (d) 溶液中の粘土粒子の画像 (文献 6, 7 より一部改変して転載)。

だけでなく、巻物状に巻き込まれて円筒形をした粘土粒子も観察された (図 2c, d)⁷⁾。

4 生物試料の液中観察

生物試料を電子顕微鏡で観察するためには、試料の固定化と脱水処理、さらには重金属による染色等の様々な処理が必要となる。一方、SE-ADM を用いることでこうした処理を行う必要が無く、直接溶液の状態を観察することが可能となる。細胞機能を解析するためには、培養液中の生きた細胞を直接観察することが望ましい。著者らはこれまで培養細胞を SE-ADM により観察するための独自の培養ディッシュを開発し、生きた細胞を直接高分解能で観察することに成功した⁸⁾⁹⁾。市販の培養ディッシュ下部の中央部を四角く切り抜き、ここに SiN 薄膜をはめ込む形で付着させ細胞を培養する⁸⁾。これにより、SiN 薄膜上に細胞が培養され、ほぼ一層の細胞シート状に増殖する。培養細胞を観察するには、ディッシュ下部の SiN 薄膜をアルミホルダごと取り外し、上下反転させた後に培養液を含む形で下部の SiN 薄膜の間に挟み込む。この状態で密閉し、電顕内部に設置し SE-ADM による観察を行った⁸⁾⁹⁾。図 3 は、上皮細胞を SiN 膜上に培養し、後から PM2.5 を添加した時の細胞の状態を観察した結果である⁶⁾。細胞核は、直径が 10 μm 程の楕円形をしており、その周辺に複雑な細胞内部の微細構造が観察された (図 3a, b)⁶⁾。細胞核の周辺には、通常の細胞では見られない黒い粒子の凝集体が多数観察される。こうした箇所を一万倍の高倍率で観察すると PM2.5 の黒い粒子が細胞内の膜構造により包み込まれていることが確認された (図 3c, d)⁶⁾。これ以外にも骨を形成する骨芽細胞やメラニン色素を生成する細胞の直接観察を行い細胞機能の解析を進めている¹⁰⁾¹¹⁾。

さらに著者らは、細胞生物由来試料として牛乳の直接

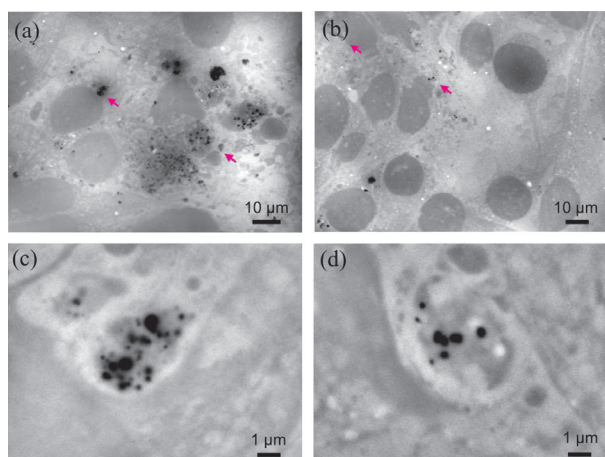


図 3 SE-ADM による培養細胞の直接観察

(a), (b) 培養細胞に PM2.5 を添加した観察結果, (c), (d) 細胞内の PM2.5 粒子の画像 (文献 6 より一部改変して転載)。

観察を行った。通常の牛乳は、牛乳脂肪とタンパク質を多く含むカゼインミセルが水溶液に懸濁した状態となっている¹²⁾¹³⁾。SE-ADM を用いることで、こうした脂質やタンパク質の粒子が懸濁されたエマルジョン試料を直接観察することが可能となる¹⁴⁾。

5 おわりに

本稿では、溶液中の様々な試料を解析するための新たな観察方法として、SE-ADM の概要とその観察結果を報告した。本システムでは、溶液中の非染色・非固定の培養細胞やバクテリア、エマルジョン等をナノレベルの高分解能で直接観察することが可能である。SE-ADM では、電子線を試料に直接照射しないため、電子線ダメージを低く抑えることができる。さらに溶液中の生物試料を極めて高いコントラストで観察が可能である。空間分解能も 4.5 nm まで向上しており、液中試料を高分解能で観察することができる。最近では、SE-ADM をベースに交流のインピーダンス成分を計測可能な走査電子インピーダンス顕微鏡の開発も並行して進めている¹⁵⁾¹⁶⁾。この方法では、入力信号の周波数を変化させることで、インピーダンスの周波数スペクトル成分を解析でき、組成分析への応用が期待される。本方法を用いることで溶液中の有機材料やナノ粒子、油液中改質剤等の観察や分析への活用が期待される。

文 献

- 1) F. Nagata, I. Ishikawa : *Jpn. J. Appl. Phys.*, **11**, 1239 (1972).
- 2) D.F. Parsons : *Science*, **186**, 407 (1974).
- 3) S. Thiberge, A. Nechushtan, D. Sprinzak, O. Gileadi, V. Behar, O. Zik, Y. Chowers, S. Michaeli, J. Schlessinger, W. Moses : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3346 (2004).
- 4) T. Ogura : *PLOS ONE*, **9**, e92780 (2014).
- 5) T. Ogura : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **459**, 521 (2015).
- 6) T. Okada, T. Iwayama, S. Murakami, M. Torimura, T. Ogura : *Sci. Rep.*, **11**, 228 (2021).
- 7) T. Ogura, T. Okada, M. Hatano, M. Nakamura, T. Agemura : *Microscopy & Microanalysis*, **29**, 1037 (2023).
- 8) T. Okada, T. Ogura : *Sci. Rep.*, **6**, 29169 (2016).
- 9) T. Okada, T. Ogura : *Sci. Rep.*, **7**, 43025 (2017).
- 10) T. Iwayama, T. Okada, T. Ueda, K. Tomita, S. Matsumoto, M. Takedachi, S. Wakisaka, T. Noda, T. Ogura, T. Okano, P. Fratzl, T. Ogura, S. Murakami : *Science Advances*, **5**, eaax0672 (2019).
- 11) T. Okada, T. Iwayama, T. Ogura, S. Murakami, T. Ogura : *Comp. Struct. Biotech. J.*, **21**, 506 (2023).
- 12) S. Gallier, D. Gragson, R. Jimenez-Flores, D. Everett : *J. Dairy Sci.*, **58**, 4350 (2010).
- 13) D. J. McMahon, B. S. Oommen : *J. Agric. Food Chem.*, **91**, 1709 (2008).
- 14) T. Ogura, T. Okada : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**, 1021 (2017).
- 15) T. Ogura : *PLOS ONE*, **14**, e0221296 (2019).
- 16) T. Ogura : *PLOS ONE*, **17**, e0263098 (2021).

[国立研究開発法人産業技術総合研究所 小椋 俊彦]