

赤潮プランクトンの走査電子顕微鏡試料作製法

誌名	広島県水産試験場研究報告
ISSN	03876039
著者名	高山,晴義
発行元	広島県水産試験場
巻/号	11号
掲載ページ	p. 101-112
発行年月	1981年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



赤潮プランクトンの走査電子 顕微鏡試料作製法

高山 晴義

Preparation of Red Tide Planktons for Scanning Electron Microscopy

Haruyoshi TAKAYAMA

Abstract

Methods of preparation of red tide planktons for scanning electron microscopy (SEM) was studied. Materials were fixed in osmic acid or glutaraldehyde, rinsed in filtered sea water and distilled water, dehydrated in a series of graded ethyl alcohol, exchanged for amil acetate, dried critical point drying method with CO₂ and coated with gold (showing fig. 1), and fairly good specimens were obtained. In the proccessing steps of preparation of red tide planktons for SEM, fixation is most important. Osmic acid was more suitable for the fixation of red tide planktons (especially anarmoured flagellates). The materials of red tide plankton are easily lost in the proccessing steps, because most of them are very small in the size. Filtering apparatus (showing fig. 3 and 4) was manufactured for trial to be solved this problem, and it seemed to be suitable for the preparation of small red tide planktons for SEM. On the other hand, adhering method onto poly-L-lysin coated coverglass was experimented with to prevent loss of materials (showing fig. 5). In the result, *Chattonella* sp. and some red tide planktons adhered onto poly-L-lysin coated coverglass but most of other red tide planktons were less satisfactory.

走査電子顕微鏡 (SEM) は、光学顕微鏡 (LM) に比べて分解能が優れているというほかに、焦点深度が深いなどの特長を有し、そのデータ写真は詳細で立体的である。細胞内部の微細構造を観察する手段としては透過型電子顕微鏡 (TEM) には及ばないが、全体像や微細な表面構造の観察に適しており、赤潮プランクトンの分類学的な混乱が論議されている折から、SEMは今後ますます有力な観察手段の1つになるものと思われる。一方、SEM観察のための赤潮プランクトンの試料作製法については必ずしも確立されたものではなく、それぞれの観察者が独自に工夫しながら処理しているのが現状である。今後さらにSEM装置自体の改良が進み、試料作製のための新しい技術の開発も行なわれるものと思われるが、これまで赤潮プランクトンのSEM試料作製法について2~3の検討を行なってきたので、それらをとりまとめてここ

に報告する。

なお、当場には日立製作所社製 S-430 型走査電子顕微鏡、日立精器社製 HCP-1型および HCP-2型臨界点乾燥装置、エイコーエンジニアリング社製 IB-3型および AX-10型イオンスパッタリング装置がそれぞれ設置されており、これらの機器を使用して試料作製および観察を実施した。

一般的な SEM 観察では、試料から発生する二次電子を検出して陰極管 (CRT) 上に表示する。また、試料は真空下におかれるので、SEM 観察試料はいくつかの条件を満たしていることが必要である。それら種々の条件のうち、試料が乾燥していること、導電性を有すること、の 2 点が最も重要であると考えら

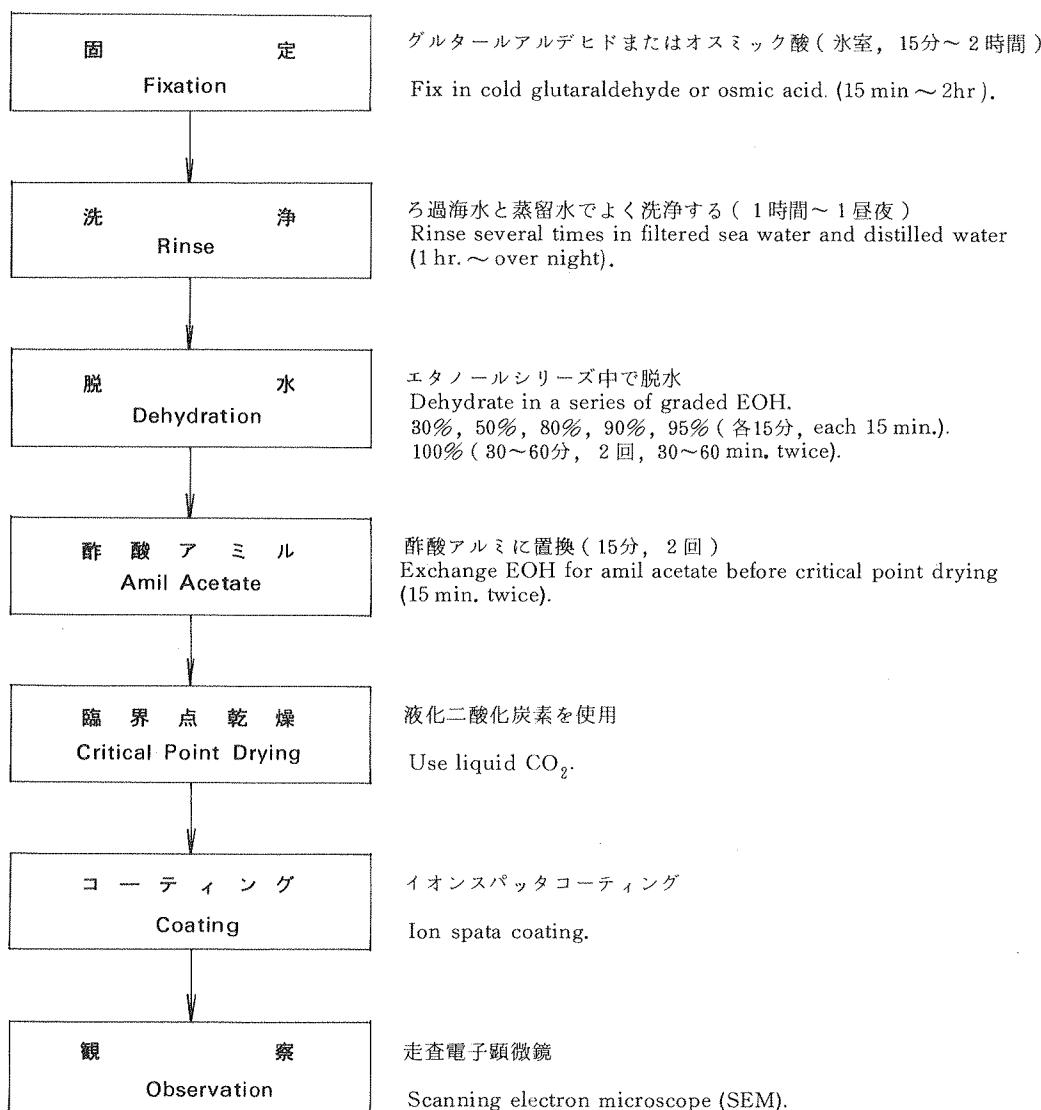


図 1 赤潮プランクトンの走査電子顕微鏡試料作製過程。

Fig. 1 Processing steps of preparation of red tide planktons for SEM.

れる。生物試料を観察する場合、いかにして生時の形態を損わないようにこれらの条件を満たす試料を作製するかが問題となる。赤潮プランクトンには珪藻や有殻鞭毛虫などのように体表構造が強固なものから、無殻の鞭毛虫のように非常に脆弱なものまであり、試料作製の難易度はそれぞれ異なる。しかし一般的には、赤潮プランクトンも他の生物柔組織試料に対して行なわれているように、固定→水洗→脱水→酢酸アミル置換→臨界点乾燥→コーティングの各過程を経て試料を作製するのが、現在のところ最も確実な方法であると思われる。

図1に現在著者が行なっている赤潮プランクトンの試料作製過程を示す。以下、順次各過程について説明する。

固定

外殻が非常に強固な一部の珪藻や *Distephanus* (Plate I, E) などの骨格を観察する際には不要の場合もあるが、細胞の変性や崩壊を防ぐために、一般的には固定が必要である。特に無殻の赤潮鞭毛虫については慎重に固定を行なう必要があり、固定の良否が観察結果に大きな影響を与えることが多い。

固定方法はTEM観察試料に準じて行なわれることが多く、固定剤としてはグルタールアルデヒドとオスミック酸が優れている。試料によってはホルマリンでも十分に固定できるものもあるが一般的ではない。最も簡単な固定法は、市販の良質の20~50%グルタールアルデヒドを2~4%の濃度になるように赤潮プランクトンを含む海水または培養液中に添加するだけでよい。この方法で *Skeletonema* などの珪藻(Plate I, A-D)や、*Prorocentrum*属(Plate I, F), *Peridinium*属などの有殻鞭毛虫のほか、*Gymnodinium*属(Plate II, B)の一部や *Noctiluca* (Plate II, A)の良好な固定が可能であった。

無殻の鞭毛虫はグルタールアルデヒドよりオスミック酸で固定する方が好結果が得られることが多い。小野(1979)¹⁾も *Chattonell* sp. (ホルネリア)の固定にオスミック酸が適していると述べている。著者(1980)²⁾はオスミック酸の1~2%ろ過海水溶液を固定液として使用しているが、固定液の調製法と固定方法はつぎのとおりである。

1) 固定液の調製

オスミック酸は孔径0.4 μmのメンブランフィルターでろ過した海水に溶かして、1~2%溶液とする。溶解方法は蒸留水に溶解する場合と同じである。オスミック酸をろ過海水溶液としたのは、海水にはそれ自体に緩衝能力があり、また赤潮プランクトンの細胞質とほぼ同程度の浸透圧を有すると考えられ、純水による溶解とするよりは好結果が得られるものと推定されたためである。このようにして調製されたオスミック酸のろ過海水溶液は、すり合せのよい共栓瓶に入れて冷蔵庫に保存すれば、少なくとも6か月間は黒化するなどの現象はみられず、変性することはない。

2) 固定法

赤潮プランクトンを培養液あるいは海水とともに、容量10ml程度のスピッツ管に入れて、しばらく静置するか軽く遠沈して器底に集め、ピペットで上澄み液を取り除く(図2)。この時、余分な上澄み液はできるだけ多く取り除いて、試料だけが器底に残るようにした方がよい。上澄み液を除去したら、す早く

上述のように調製した1～2%オスミック酸ろ過海水溶液を5～10mℓ加えて氷室で固定する。固定時間は厳密には検討していないが、15分～2時間で十分であると思われた。

Chattonella sp. (Plate II, E-F) や *Heterosigma inlan-dica* (Plate II, D) は非常に固定が難かしいとされている赤潮鞭毛虫であるが、以上の方法により比較的良好な固定試料を得ることができた。しかし、細胞膜の一部が破損したり鞭毛が不完全なことも多く、わずかな手順の違いで固定が不良になることが多い。赤潮プランクトンのSEM試料作製において、固定は最も重要な過程であるので、より確実な固定技術の確立をはかる必要がある。

水洗・脱水・酢酸アミル置換

臨界点乾燥の前処理として固定後の試料はろ過海水および蒸留水で水洗した後、エタノールシリーズ中で脱水し、酢酸アミル置換を行なう。各段階における大体の処理時間は図1に示した。ろ過海水による洗浄は固定剤が除去できるまで数回くり返す。ろ過海水で洗浄した後に蒸留水で水洗するが、これは塩分を除去するために行なう。塩分の除去が不十分であると脱水の際に白色の沈澱物を生じることがあるので、試料は十分に脱塩する必要がある。脱水をアセトンシリーズ中で行なうこともできるが、著者はエタノールで行なっている。脱水した試料は酢酸アミル中に移して臨界点乾燥に備える。

水洗→脱水→酢酸アミル置換の過程は試料が微細であるので、一般の生物体や組織などとは違った方法で行なわねばならない。著者はこの過程の処理に3つの方法を用いているのでつぎに述べる。

1) 沈澱法

この方法は赤潮プランクトンの処理に最も多く用いられているものと思われる。固定を行なう時(図2)のように、順次スピット管内で試料を器底に沈澱させて上澄み液を取り除いた後、各処理液を添加する。つまり沈澱→上澄み液の除去→次段階の処理液の添加、の操作をくり返しながら水洗→脱水→酢酸アミル置換を行なう。

ヤコウチュウなど比較的大形の赤潮プランクトンはしばらく静置すると容易に沈澱し、その様子が肉眼でも観察できるのでこの方法が適している。しかし、微細なプランクトンの場合にはかなり強く遠沈する必要がある。この時、細胞が破損したり、細胞が互いにくっつき合って塊状になることもあるので十分に気をつけなければならない。また、沈澱が不十分であると上澄み液とともに試料を捨て去ってしまうことになるので、微細なプランクトンを沈澱法で処理する場合には多量の試料が必要である。

2) ろ過法

ろ過装置を使用して水洗→脱水→酢酸アミル置換を行なう。著者は、臨界点乾燥用の試料カゴとしても

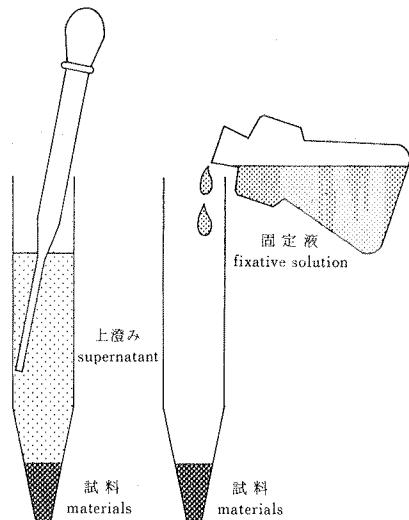


図2. 赤潮プランクトンの固定法.

Fig. 2 Fixative method of red tide planktons.

使用できる図3および図4に示したようなろ過装置を考案した。

このろ過装置は注射筒を応用した補助ろ斗(a), ナイロン製スクリューキャップ(b), ナイロン製ろ斗(c), テフロン製Oーリング(e), ステンレス製メッシュスクリーン(g), テフロン製ガスケット(h)およびステンレス製支持台(d)からなっている。これらろ過装置の構成部品は固定液, 脱水剤, 酢酸アミルなどの試葉によって変質しないものを厳選した。メッシュスクリーン(g)とOーリング(e)の間にメンブランフィルター(f)をはさんでろ過装置をセットする。メンブランフィルターは各々の処理液によって溶解されることなどがなく、孔径の種類が豊富なGE社製のヌークリボアフィルターが適当であると思われる。メンブランフィルターをセットした後、補助ろ斗(a)をとおしてろ斗(c)に固定試料を入れてろ過する。この際、試料の破損を避けるためには重力ろ過が好ましい。重力ろ過が困難な場合は吸引するが、あまり強い吸引は避けた方がよい。ろ過の終点はフィルター面に少し水分が残る程度にし、フィルター上の試料が乾燥しないようにする。終点に達したら補助ろ斗(a)にろ過海水を入れて、ろ斗(c)に滴下させながら水洗する。同様にして図1に示した順序にしたがって水洗→脱水→酢酸アミル処理を行なう。なお、これらの処理液はコンタミネーションを防ぐため、孔径が $0.4\sim1\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過して不純物を除いたものを使用する。

この方法は他の方法に比べて試料の損失が少ないので、試料が少量しか得られない場合に都合がよい。逆に、試料が多すぎると細胞が互いに重なりあうので、試料はフィルター上に均一に分布する程度にし、あまり多くない方がよい。

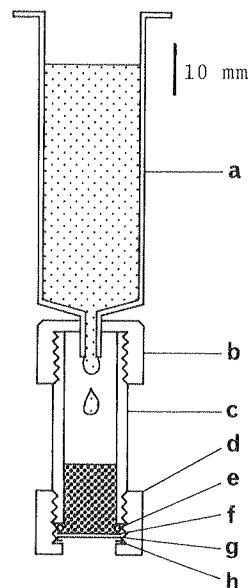


図3. 赤潮プランクトンのSEM試料作製のためのろ過器の模式図。

Fig. 3 Schematic diagram of filtering apparatus for preparation of red tide planktons for SEM.

- a: 補助ろ斗 sub-funnel
- b: スクリューキャップ screw cap
- c: ろ斗 funnel
- d: 支持台 support ring
- e: Oーリング O-ring
- f: メンブランフィルター membrane filter
- g: メッシュスクリーン mesh-screen
- h: ガスケット gasket

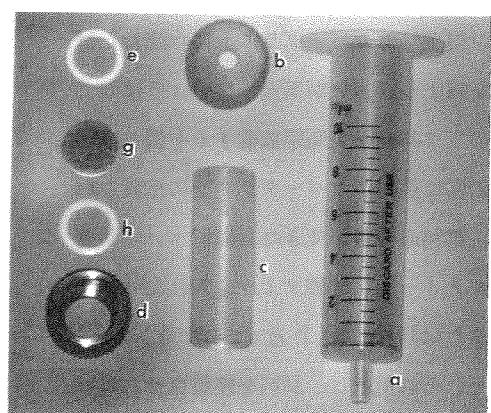


図4. SEM試料作製用のろ過器。

Fig. 4 Filtering apparatus for preparation of red tide planktons for SEM.

この方法は微細な赤潮プランクトンが少量しか得られない場合に適しているが、やや脱水処理が不十分になる傾向がみられるので、さらに工夫する必要があると考えている。

3) カバーグラスに試料を接着して行なう方法

ウィルスや血球などのSEM試料を作製する場合、各段階での試料の損失を防ぐため、ポリリジンなどのようなポリカチオン物質を被覆したカバーグラスに試料を接着して、固定→脱水→乾燥の処理をする方法が行なわれている。TSUTSUI *et al.*(1976)³⁾は、ポリカチオン被覆したカバーグラスに試料が接着するメカニズムをつきのように説明している。すなわち、ポリカチオンは表面に陽イオン結合手を残したままカバーグラス表面に強く吸着され、その陽イオンが試料表面の陰イオンと結合して試料を接着する。このようにしてカバーグラス上に接着された試料は、固定→脱水→臨界点乾燥の間に離れ落ちることはないといわれている。

赤潮プランクトンにもこのような方法が応用できれば試料作製が容易になると考えられたので検討した。

まず最初に、直径10～15mmの円形のカバーグラス（最初SEMプレートと称する円形のガラス板が市販されており、カバーグラスの代わりにこれを使用してもよい）上に0.1%ポリリジン水溶液を1～2滴滴下し、10～30分間放置してカバーグラス表面にポリリジンを吸着させる。つぎに、このカバーグラスをろ過海水で洗浄して、余分なポリリジンを洗い流す。血球などの場合はポリリジン被覆したカバーグラス上に試料を含んだ液を滴下すると、固定前の状態でも接着できるといわれている

(TSUTSUI *et al.*, 1976)³⁾。しかし、赤潮プランクトンが固定前にポリリジン被覆したカバーグラスに接着することは全くなかった。そこで、あらかじめ固定した後に沈澱法によってろ過海水で洗浄した試料を接着させることにした。すなわち、ポリカチオン処理したカバーグラス上に水洗した試料を滴下し、水分が蒸発しないようにしてそのまま30分～1時間放置する（図5）。この間に試料がカバーグラス上に接着される。試料の接着ができたら蒸留水、各濃度のエタノール、酢酸アミルを入れたペトリ皿または共栓ビン（秤量ビンが都合がよい）をそれぞれ用意し、試料を接着させたカバーグラスをピンセットで挟んで順次移行していく（図5）。

ポリリジン膜による接着効果は赤潮プラ

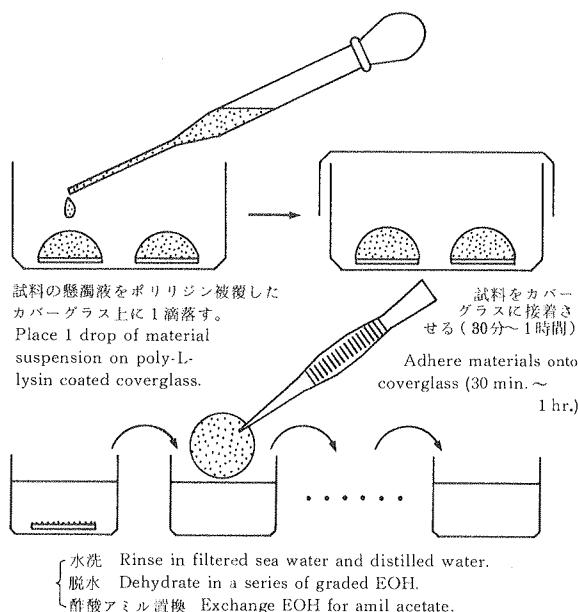


図5. ポリリジンを被覆したカバーグラスに赤潮プランクトンを接着して試料作製を行なう方法。

Fig. 5 Schematic diagram of preparation of red tide planktons adhered onto poly-L-lysine coated coverglass.

シクトンの種類によって異なり、*Chattonella* sp. は50~80%がカバーガラス上に接着された。しかし、*Gymnodinium* '65年型種や*Heterosigma inlandica* は水洗の過程で試料の90%以上が脱落した。しかし、水洗時に脱落しなかった細胞は、それ以後の過程ではほとんど脱落することはなかった。

組織培養した遊離細胞や細胞をホモジエナライズして得られたオルガネレなどは、ホルムバルムを被覆した試料合（試料スタブ）やカバーガラスにも接着するといわれる(KIRSCHNER, 1978)⁴⁾が、赤潮プランクトンがこれらに接着することはなかった。

臨界点乾燥

臨界点乾燥法は現在のところ乾燥時における変形が最も少ない乾燥と考えられ、多くの赤潮プランクトンの乾燥はこの方法による必要がある

あると考えられる。臨界点乾燥に用いるガス（移行液）としては、取り扱いが簡単で、しかも容易に入手できる液化二酸化炭素が適当であると思われる。

臨界点乾燥の際には試料を試料カゴに入れて行なうが、試料が粉失しないような工夫が必要である。

図3,4に示した沪過装置は補助ろ斗(a)を取りはずせば、そのまま臨界点乾燥装置の試料室に収容できるので、ろ過法によって酢酸アミルの段階まで処理した試料はろ過装置のまま臨界点乾燥を施せばよい。この場合、支持台(d)を少しゆるめておくと、ろ斗(c)内に液化二酸化炭素がすみやかに流入し、ガス注入時における試料の乾燥を少なくすることができる。

沈澱法によって処理された試料はメンブランフィルター、カバーガラスまたは金属板上に滴下し、図6,7に示した試料カゴに入れて臨界点乾燥を行なう。この操作は

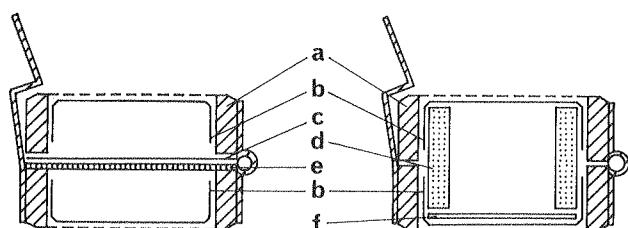


図6. 臨界点乾燥用の試料カゴ。

Fig. 6 Schematic diagram of baskets for critical point drying.

- a : ステンレス製試料カゴ stainless basket
- b : ろ紙 filtering paper
- c : メンブランフィルター membrane filter
- d : ガラス管 glass tube
- e : ステンレスメッシュスクリーン stainless mesh-screen
- f : カバーガラス coverglass



図7. 各種の臨界点乾燥用の試料カゴ。

Fig. 7 Some kinds of baskets for critical point drying.

酢酸アミルが蒸発しないうちにすみやかに行なわねばならない。また、試料カゴの上面と下面をろ紙で被つておくとガスを注入する際に生じる試料の粉失ある程度防ぐことができる。

ポリリジン被覆したカバーガラス上に接着したものは、カバーガラスをそのまま試料カゴに入れて臨界点乾燥を行なう。

試料台への試料の接着

臨界点乾燥を施した試料はメンブランフィルター、カバーガラス、金属板に載せたまま、接着剤を使用して試料台（試料スタブ）に貼付する。接着剤はAgペースト、木工用ボンドなどが使用されるが、画面テープが最も便利であった。

最近 SEM プレートと称する商品が市販されている（図8）。SEM プレート上に載せた試料は、コーティング後に専用のホルダーに装置して観察することができ、接着剤などで試料台に貼付する必要がない。

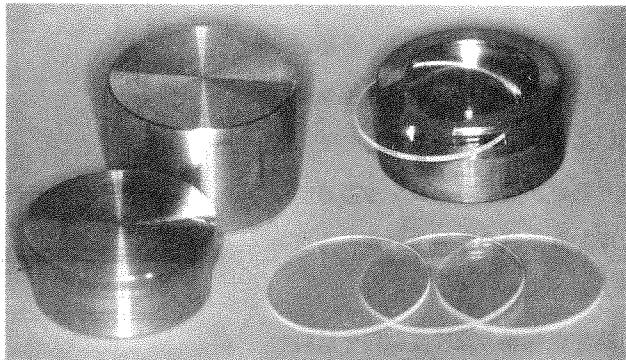


図8. 試料台と SEM プレートおよびそのホルダー。

Fig. 8 Support discs, SEM-plates and SEM-plate holder.

コーティング

最近、無蒸着観察法と呼ばれる方法が試みられている（渡辺ほか、1975）⁵⁾が、一般には臨界点乾燥した試料は導電性を付加するため、金、白金、パラジウムまたはそれらの合金をコーティングする必要がある。コーティングの方法には真空蒸着法とイオンスパッタコーティング法とがあるが、後者の方が金属のまわり込み効果が優れているうえ、コーティング膜の粒状が微細であるといわれている（永谷、1976）⁶⁾。取り扱い操作もイオンスパッタコーティング法の方が簡単であるので、赤潮プランクトン試料のコーティングもこの方法によればよいと思われる。

しかし、イオンスパッタコーティング法にも若干の問題が生じることもあり、試料によっては注意が必要である。つまり、試料によっては放電中に体表にシワを生じることがある。この障害はいわゆる熱ダメージと思われるが、今まで観察した試料の中では特にヤコウチュウにこの障害が強く現われた。このような試料の場合は、何かの方法で体表を補強するか、導電染色法によって導電性を付加するなど、何らかの工夫をする必要があると思われる。また、真空→リークの過程でも試料の変形を生じことがある。体内に液胞を多く含んでいるヤコウチュウなどは、臨界点乾燥すると薄い細胞膜の中はほとんど空気に置きかわる。このような試料の場合、イオンスパッタコーティング中は細胞内も真空状態になっているので、試料を取り出す時急激にリークすると、外部から圧力が加わり変形を生じる。丁度、紙風船をおしつぶし

たような状態になる。このような場合、装置に付属しているニードルバルブを利用して、1時間以上かけてゆっくりリークするようにすれば、このような障害を防ぐことができる。

問題点と今後の課題

著者は、赤潮プランクトンの中でも特に無殻の鞭毛虫を観察することが多いが、そのSEM試料作製にあたっては、固定に最も注意をはらっている。固定はSEM試料作製過程における最初の処理段階であるが、固定が不完全であると、その後の処理をいくら慎重に行なっても良好な観察試料を得ることができない。固定さえうまくできればその後の段階で生じる障害は工夫しだいで解決できる、ときえ感じている。オスミック酸はすぐれた固定剤であるが、必ずしも全ての試料に対応できるわけではないので、今後さらに完全な固定技術を確立していく必要があると考えている。

他の生物体や組織の場合に比べて、赤潮プランクトンのSEM試料作製が難しい原因の1つには、試料が一般に微細なことがあげられる。沈澱法、ろ過法と検討してきたが、試料をカバーガラスなどの固体に確実に接着することができれば、試料作製が数段容易になると考えられる。ポリリジン被覆したカバーガラスに試料を接着する方法も試みたが、まだ十分満足できる結果は得られていない。血球などの処理には、ポリカチオン膜のほかに蛋白膜を被覆したガラス板などに試料を接着することも行なわれており(永谷、1980)⁷⁾、今後検討してみる必要があると考えている。

最近、生物試料に導電性を付加するために、金属コーティングを施すかわりに導電染色法と呼ばれる処理が行なわれている(渡辺ほか、1975)⁵⁾。これは化学的な方法によって生物試料にオスミウムなどの重金属を反応させて、導電性を付加する方法である。赤潮プランクトンの中には、ヤコウチュウなどのようにイオナスパッタコーティング過程で障害を受けるものもあるので、このような試料の場合にはこの導電染色法を試みてみる必要があろう。

SEMは一般に試料の表面構造を観察するために使用されるが、医学の分野では凍結破断法、樹脂割断法、イオンエッティング法などの処理技術が開発され、細胞内構造をSEMで観察する試みが行なわれている(田中、1980)⁸⁾。SEMは分解能の点ではTEMに及ばないが、これらの方法によれば細胞内構造を立体的に観察することができるので、赤潮プランクトンにも応用すれば面白い観察結果が得られるものと考えられる。

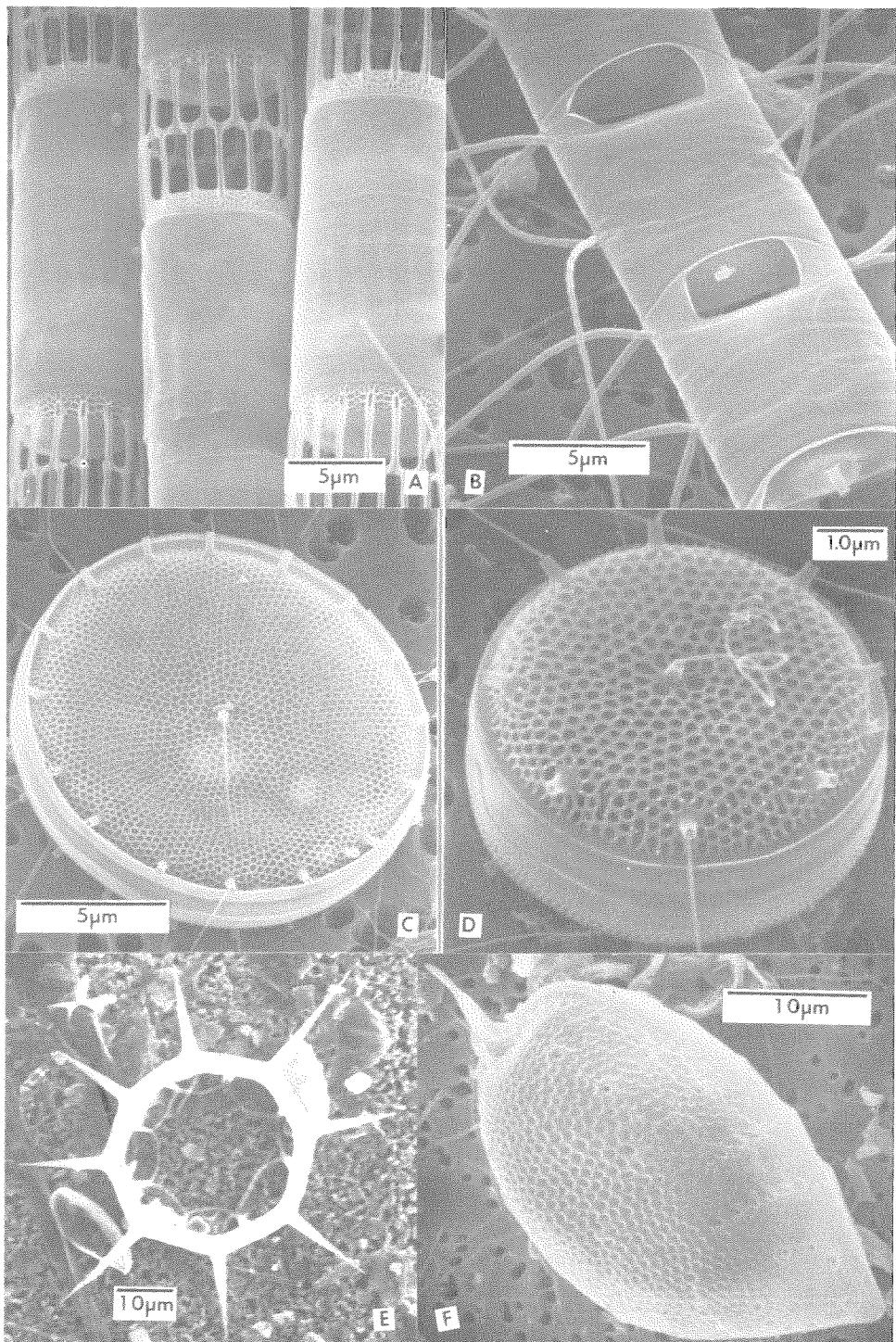
文 献

- 1) 小野知足(1979)：ホルネリアの固定と標本の作り方. 香川水試事報, 昭和52年度, pp. 68-71.
- 2) 高山晴義(1980)：走査電子顕微鏡による *Chattonella* sp. (*Hornellia* sp.) の観察. 日本プランクトン学会報, 27(1), pp. 37-40.
- 3) TSUTSUI K., H. KUMON, H. ICHIKAWA and J. TAWARA (1976) : Preparative Method for Suspended Biological Materials for SEM by Using Polycationic Substance Layer. *J. Electron*

Microsc., 25 (3), pp. 163-168.

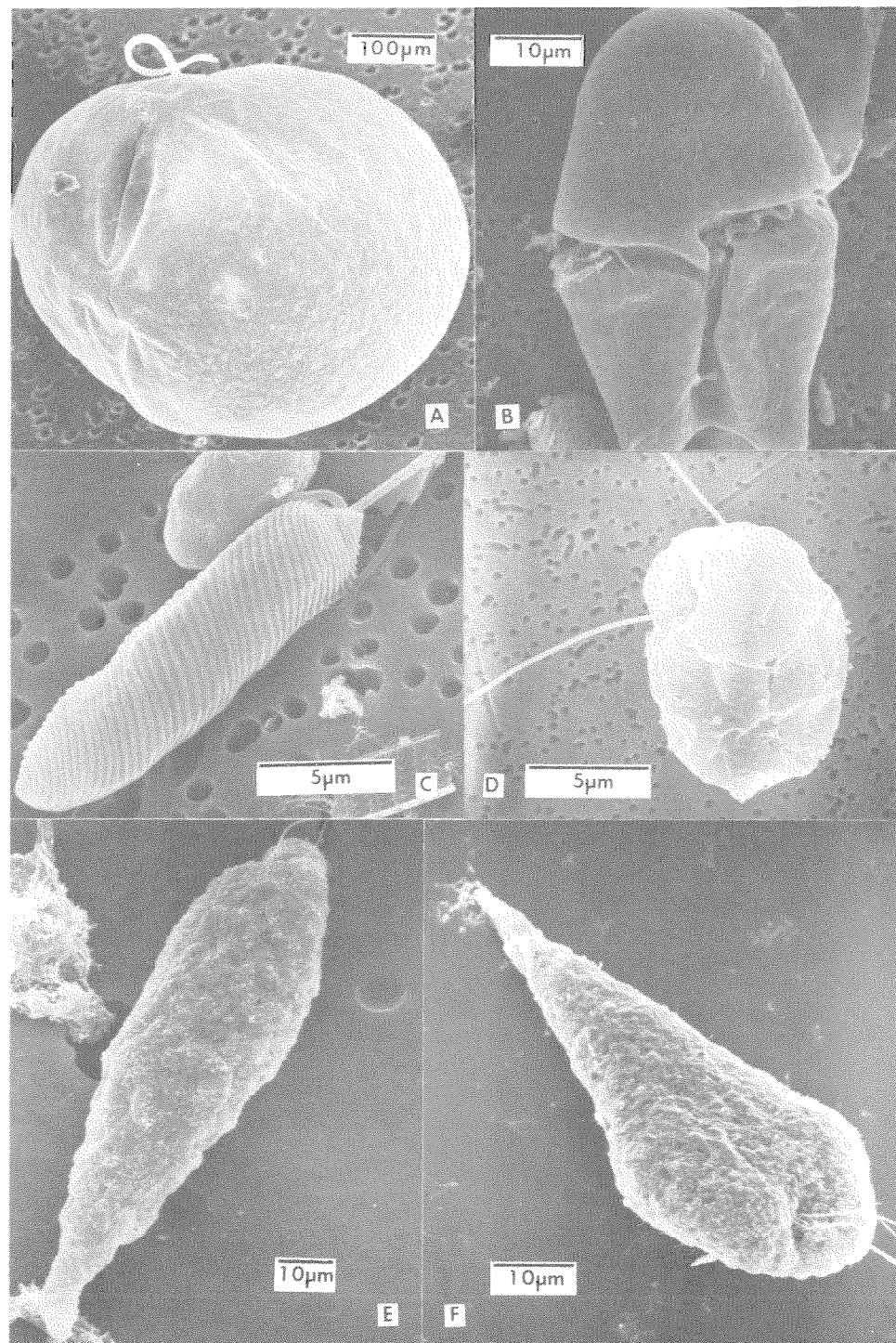
- 4) KIRSCHNER R. H. (1978) : in "Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy" (ed. by M. A. Hayat), vol. 6, Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 278-296.
- 5) 渡辺忠雄・永谷隆・村上宅郎 (1975) : SEMにおける新しい無蒸着観察技術. 細胞, 7(1), 118-125.
- 6) 永谷隆 (1976) : 走査電子顕微鏡 (日本電子顕微鏡学界関東支部編), 共立出版, 東京, pp. 83-91.
- 7) 永谷隆 (1980) : 図説走査電子顕微鏡 (田中敬一, 永谷隆編), 朝倉書店, 東京, pp. 119-129.
- 8) 田中敬一 (1980) : 図説走査電子顕微鏡 (田中敬一, 永谷隆編), 朝倉書店, 東京, pp. 60-83.

PLATE I



A : *Skeletonema costatum* B : *Chaetoceros* sp. C : *Thalassiosira* sp.
D : *Thalassiosira* sp. E : *Distephanus speculum* F : *Prorocentrum micans*

PLATE II



A: *Noctiluca scintillans*
D: *Heterosigma inlandica*

B: *Gymnodinium nelsoni*
E and F: *Chattonella* sp.

C: *Eutreptiella* sp.