

SEM/EDX の生物試料への応用

—細胞に処置した微量金属イオンの存在確認—

杉山 博則

金沢大学 理工研究域

1. 概要

EDX による元素分析は、簡易な手法として用いられている。この方法の生物試料への応用として今回、金属イオンを処置した生物細胞内から金属イオンの有無を検出できるか否かを検討した。培養細胞に金属イオン溶液を所定の濃度で2日間処置した。処置後、細胞を十分に洗浄し、脱水及び凍結乾燥を行った。その後 SEM で表面観察、EDX で元素分析を行った。その結果、金属イオンを処置した細胞から金属イオンの存在を確認することができた。

2. 緒言

現在、当技術室では、金沢大学自然システム学類物質循環工学コース及びバイオ工学コース(旧工学部物質化学工学科化学工学コース)で保有する電界放出形走査電子顕微鏡(日立 S-4500) (Fig.1)の管理等を任されている。日立 S-4500 は、冷陰極電子銃が搭載されており、電界放出現象を利用することで電子線を発生させている。そのため、一般の電子顕微鏡(タングステンフィラメント電子銃搭載型の電子顕微鏡、熱電子放出による電子線発生)に比べ高倍率・高分解能な画像を習得できる性能を有している。また、鏡体には二次電子検出器以外にもエネルギー分散型 X 線分析装置(EDS)が備わっており、多目的な分析に対応可能な装置構成となっている。EDS では、電子線が照射された試料表面から放出される蛍光 X 線を検出することができ、試料の元素分析を簡易に行うことができる。

当技術室で管理する装置の対象物は主に金属や高分子等の無機・有機材料が主流であったが近年、バイオ工学コース等生物試料を扱うコースからの依頼が増加しており、走査電子顕微鏡や EDS 用いた生体試料の観察・分析手法の検討や技術研鑽が必要になっている。

今回、細胞に対して毒性等を示す金属イオンの生理的作用の機序が細胞表面への付着によるものか、細胞内に取り込まれたためなのかの確認を行いたいという依頼があり、SEM/EDX を用いて簡易に確認できる方法を検討した。本実験では細胞に処置した微量金属イオンの存在確認をエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて行ったので報告する。

3. 実験方法

3-1 試料作製

本実験では、H4 II EC3 ラット肝癌由来細胞を用いた。培地として、10% Fetal bovine serum、100 U/mL penicillin、0.1 mg/mL Streptomycin を含む Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)を用いた。37°C 飽湿、5%CO₂-incubator 内で細胞を培養した。約 90%~100%の培養密度となるまで培養を行い、細胞を 24 時間飢餓状態においてから実験を行った。細胞に金属イオンを 100μM の濃度で溶解させた DMEM 溶液を加え、48 時間処置を行った。金属イオン溶液を処置した後、細胞を PBS で十分に洗浄した。その後、細胞を 50%、80%、100%濃度のエタノールに 10 分間浸漬し、エタノール置換を行った。エタノール置換後、t-ブチルアルコールに浸漬し、冷凍庫に試料を導入し凍結させた。凍結した細胞を真空装置内に導入し、真空排気を行い凍結乾燥させた。得られ



図 1.電界放出形走査電子顕微鏡(日立 S-4500)

た試料にカーボン蒸着処理を行い電子顕微鏡内へ導入した。

3-2 試料の観察及び元素分析

作製した試料を日立 S-4500 にて表面観察を行い、HORIBA 社製エネルギー分散形 X 線分析装置 (EMAX-5770W) を用いて、試料の元素分析を行った。その際、加速電圧を 15kV、ワーキングディスタンスを 15mm、コンデンサーレンズを 8 とした。また、チップノイズにより試料観察が困難になる際には、適宜フラッシングを行った。

4. 実験結果及び考察

4-1 試料の観察

図 2 および図 3 に金属イオン溶液を処置していない細胞と金属イオンを処置した細胞の SEM 画像 (撮影倍率 3000 倍) を示した。細胞の大きさは 10 μ m 程度であった。また、細胞の形状は、金属イオンを処置したものと処置していないものとは大きな差はなかった。このことから、今回観察した細胞は、金属イオンを処置したことで細胞死が引き起こされていない細胞の一群であることが考えられる。

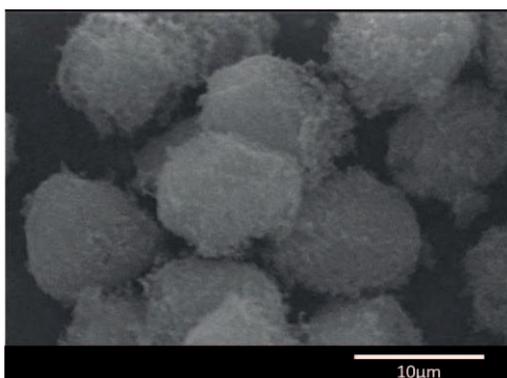


図 2 金属イオンを処置していない細胞の SEM 像

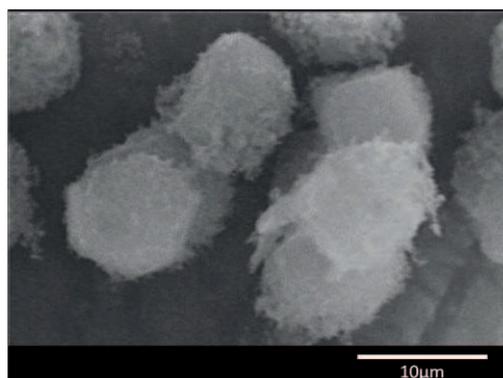


図 3 金属イオンを処置した細胞の SEM 像

4-2 試料の元素分析

図 4 および図 5 に金属イオンを処置していない細胞(図 2)と処置した細胞(図 3)の EDS スペクトルを示した。また、目的の金属のピーク位置を赤線でスペクトル図内に示した。低エネルギー側は、目的金属の L 線であり、高エネルギー側は K 線である。また、L 線は酸素のピークとほぼ重なっている。金属イオンを処置した細胞の EDS スペクトルは、バックグラウンドが金属イオンを処置していない細胞のスペクトルより小さくなる傾向が認められた。このスペクトルを付属ソフトによる定量分析を行った結果を表 1 および表 2 に示した。金属イオンを処置した細胞からは、目的金属の存在を示す数値結果が得られた。しかし、目的金属の正確な定量を行うことはできなかった。

細胞の観察結果および元素分析結果から、細胞が生きている時に目的の金属を内部に取り込んだものと考えられる。本実験で EDS による元素分析により、その取り込まれた金属イオンの存在を細胞内に確認することができた。

また、金属イオンを処置した細胞の EDS スペクトルは、処置していない細胞のスペクトルと比較し、バックグラウンドのレベルが低下している傾向が認められた。



図 4 金属イオンを処置していない細胞の X 線スペクトル

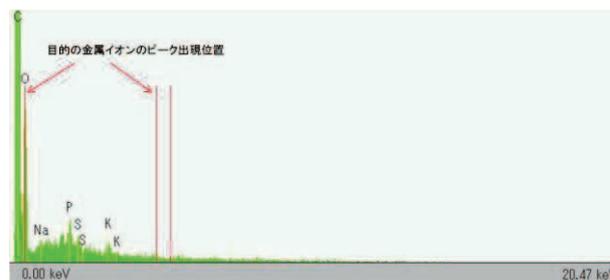


図 5 金属イオンを処置した細胞の X 線スペクトル

表 1 金属を処置していない細胞の定量分析結果

元素	ライン	重量濃度(%)	原子数濃度(%)
P	K 線	46.72	47.59
S	K 線	53.28	52.41
目的金属	K 線	0	0

表 2 金属を処置した細胞の定量分析結果

元素	ライン	重量濃度(%)	原子数濃度(%)
P	K 線	39.38	42.75
S	K 線	30.79	32.29
K	K 線	26.44	22.74
目的金属	K 線	3.38	2.23

5. まとめ

EDS を用いて細胞に処置した金属イオンの存在を検出できるか検討した。その結果、目的の金属イオンの X 線を細胞内から検出することができ、細胞に処置を行った金属イオンの存在について EDS を用いて確認することができた。しかしながら、本実験では単純な存在の有無のみであり、詳細な濃度等を検討するためにはさらなる工夫が必要であることが分かった。

6. 参考文献

- [1] 株式会社 日立ハイテクノロジーズ中部支店 半導体製造装置部編：SEM セミナー2009 予稿集 (2009)
- [2] 株式会社 日立ハイテクノロジーズ先端製品営業本部 営業技術部：SEM と友だちになろう！ (2008)
- [3] 奥 健夫：これならわかる電子顕微鏡 - マテリアルサイエンスへの応用 - ,(株)化学同人(2004)
- [4] 日本電子株式会社：SEM を使うための基礎知識(2007)
- [5] 山田 昭雄、嶋田 裕、鮎川 武二：ライフサイエンス 電子顕微鏡入門 朝倉書店(1992)