過冷却凍結乾燥法によるプランクトンの新しい電子顕微鏡試料作製手法の開発

○鈴木武雄[1]・戸田龍樹[2]・桑田正彦[2]・久世源太[2]
([1]㈱サン・テクノロジーズ、[2]創価大・工)

はじめに

プランクトンなどの水生生物の走査型電子顕微鏡試料の作製手順は、多くの作業ステップと時間を要するうえに、表面構造の柔らかい試料では変形が生じることが多かった。煩雑な手順にもかかわらず、必ずしも良い観察試料が得られるとは限らず、多くの試料の中から比較的状態の良い試料を探して観察せざるを得なかった。

発表者らのこれまでの研究では、表面構造を観察する際には多くの水生生物について、必ずしも二次固定を行う必要は無く、水による置換後、液体窒素で急速凍結し、低真空 SEM 試料室内で乾燥させることで試料を観察でき、作製手順の簡略化が可能であった（Suzuki et al. 1995）。

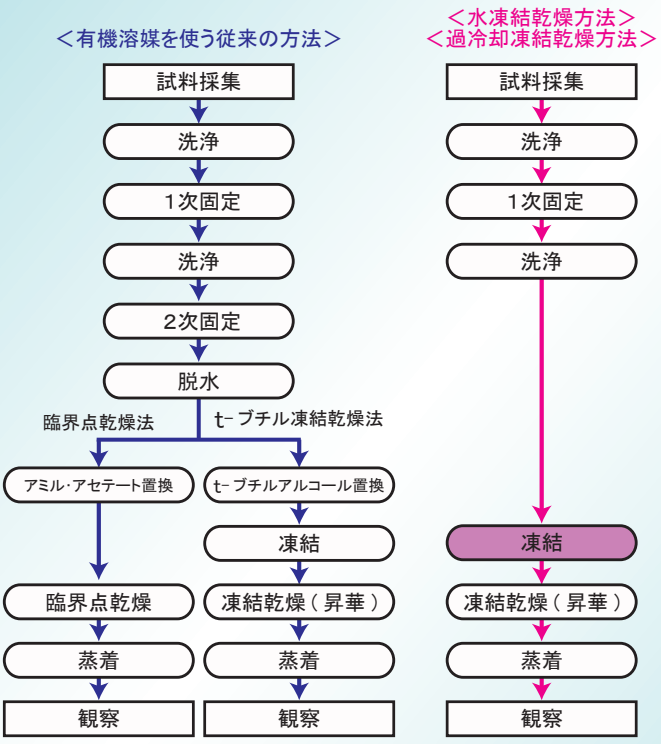
本研究ではさらなる各作業ステップの再検討を行い、これまでの試料作製方法を改良した。本法によって、これまで観察が困難とされていた各種の動物プランクトンの観察が可能となったので報告する。

材料と方法

相模湾真鶴港ならびにその沖合において採集されたプランクトン試料を、横浜国立大学の真鶴実習施設に持ち帰った。実習施設において、動物プランクトンを実体顕微鏡下で同定し、既報の一次固定液である、グルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒド、フォルマリンなどで直ちに固定し研究室に持ち帰って観察試料とした。

電子顕微鏡試料作製法における各作業ステップ直後の試料を顕微鏡下で観察し、変形の程度を確認しながら作業をすすめた。一次固定液の種類による若干の違いがあるものの、凍結ー乾燥の作業ステップにおいての試料変形が顕著であり、抜本的な手法の改良が必要と判断された。

そこで本研究では、過冷却を用いた凍結乾燥方法を電子顕微鏡試料の作製に応用し試料の観察を試みた。



結果と考慮

過冷却凍結乾燥方法によって作製された各種プランクトンの観察写真を右に示した。本法は、観察個体の全体像と微細構造の両方の観察において、極めて有効な手法であった。本法によって、ノープリウス幼生における不明瞭な分節構造や柔らかい様々な動物プランクトン微細構造が観察され、有効性が確かめられた。

本法は従来法で使用していた有機溶媒（例えば、アミル・アセテートやt-ブチルアルコール）、CO_2 高圧ボンベ、液体窒素などを使用しない簡便で環境にやさしい手法であり、今後の普及が期待される。

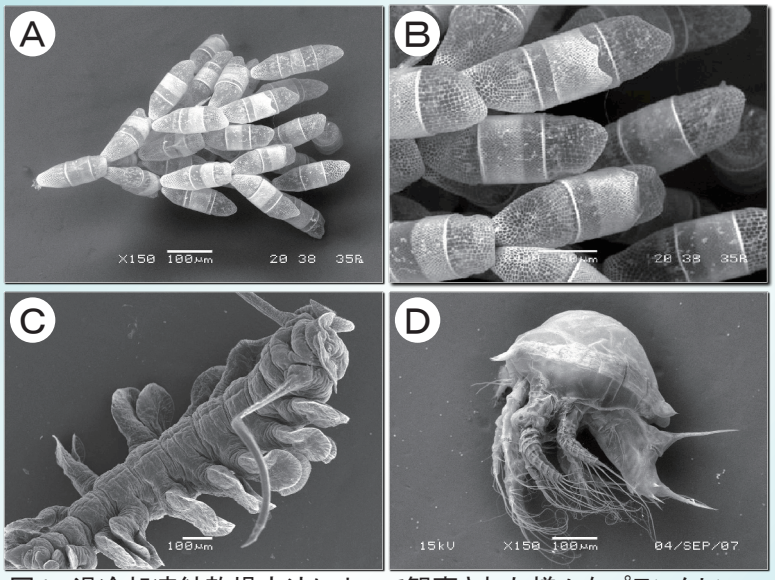


図1　過冷却凍結乾燥方法によって観察された様々なプランクトン
（A,B. 珪藻類 *Isthmia* sp.　C. ゴカイの幼生　D. フジツボ幼生）

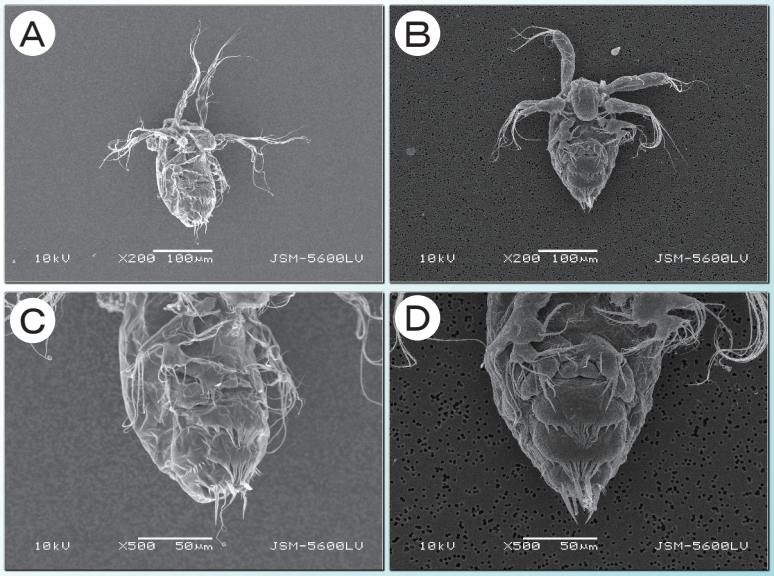


図2　従来の水凍結乾燥方法と過冷却凍結乾燥方法の比較
（A,C. 水凍結乾燥方法によるノープリウス幼生
B,D. 過冷却凍結乾燥方法によるノープリウス幼生）

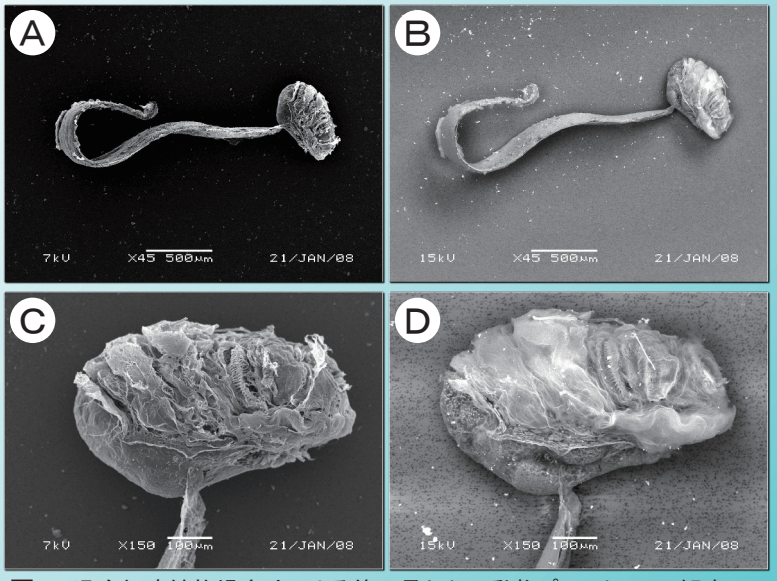


図3　過冷却凍結乾燥方法による体の柔らかい動物プランクトンの観察
―尾虫類を例として―（A,C. オタマボヤの蒸着試料の観察
B,D. オタマボヤの無蒸着試料の観察）