

小学生を対象とした電子顕微鏡観察イベントの実施

○正入木未来¹, 原口智宏¹

宮崎大学工学部教育研究支援技術センター¹

概要

宮崎大学では男女共同参画事業の一環として、教職員の子供（小学生）を対象とした「宮崎大学きつずサマースクール」を8月に実施している。工学部教育研究支援技術センターでは、電子顕微鏡および光学顕微鏡を使用した昆虫の観察教室を企画し、実施した。実施するにあたり、昆虫を電子顕微鏡で観察するための前処理（固定・脱水・乾燥）の最適条件の検証を行った。本報告では、その検証結果と電子顕微鏡観察教室の実施結果について報告する。

1. 企画準備

1-1. 目的

「宮崎大学きつずサマースクール」は学内の各部署の教職員が本学の特性を生かしたプログラムを提供し、参加者である子供たちの探求心・好奇心を引き出す機会を提供することを目的として開催されている。そこで工学部教育研究支援技術センターでは、産学・地域連携センター機器分析支援部門と連携し、「昆虫わくわく観察教室」を企画した。本企画では、走査型電子顕微鏡（SEM）や光学顕微鏡を用いた昆虫の観察、昆虫試料の前処理工程の一部（スパッタリング）を見学や体験することにより、子供たちが科学に対する興味を深める機会となることを目的とした。

1-2. 企画を実施する上での技術的課題とその対処

本企画を実施するにあたり最大の技術的課題となったのは、SEMで昆虫を観察するための試料の前処理方法、およびその条件の確立であった。なお、工学部教育研究支援技術センターでは生物試料のSEM試料加工を行った実績がないため、本学テニュアトラック推進機構研究員の助言や関連する文献を調査することから準備を始めた。

1-3. 前処理法の調査

文献等の調査を通じて、一般的な前処理工程（洗浄・固定化・脱水・乾燥・スパッタリング）を試すこととした^{1) 2)}。また、各工程について使用する薬品の濃度や浸漬時間を変動させ、最適条件を求めることとした。

1-4. 観察対象（昆虫）の選定

SEM観察の題材として、準備の容易さや観察に適した大きさであるかを考慮し、アリ、ダンゴムシ、バッタを選定した。また、光学顕微鏡の題材としてアリ、バッタ、スズメバチ、テントウムシ、カミキリムシ、チョウを選定した。従って、SEM観察対象として選出した3種類の昆虫について前処理条件を求めることとなった。

2. 前処理条件の検討および確立

2-1. 洗浄

洗浄は試料表面に付着している汚れや、昆虫が分泌している油分の除去を目的として行うものである。今回はシャーレに試料を入れ、エタノール水溶液で数回（3~5回程度）洗浄したのち、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で2回洗浄した。

2-2. 固定化

固定化は、グルタルアルデヒド（GA）とPBSの混合溶液を用い昆虫体内のタンパク質を固定化することにより、腐敗や乾燥後の形状変化を防止するための工程である。まず、3種の昆虫の中で最も小型で固定化が容易であると考えられたアリに対し、表1に示すような6つの条件で固定化を試みた。図1は浸漬時間1.5hのSEM像であり、図2は浸漬

時間2hのSEM像である。浸漬時間2h以降の試料でも図2と同様に試料の胸部や腹部に黒変等のダメージが観察されたため、今回は浸漬時間1.5hの条件にて固定化を行うこととした。しかし、他2種の昆虫はアリと比較して数十倍の体積であることやGAは浸透速度の遅い試薬であることを考慮し、固定液へ一晩浸漬させることとした。

表 1. アリの固定条件検討

No.	固定液への浸漬時間	試料の状態
1-1	1.5 h	○
1-2	2 h	△
1-3	3 h	△
1-4	4 h	×
1-5	5 h	×
1-6	24 h	×

○：良好 △：ダメージ有 ×：観察不適

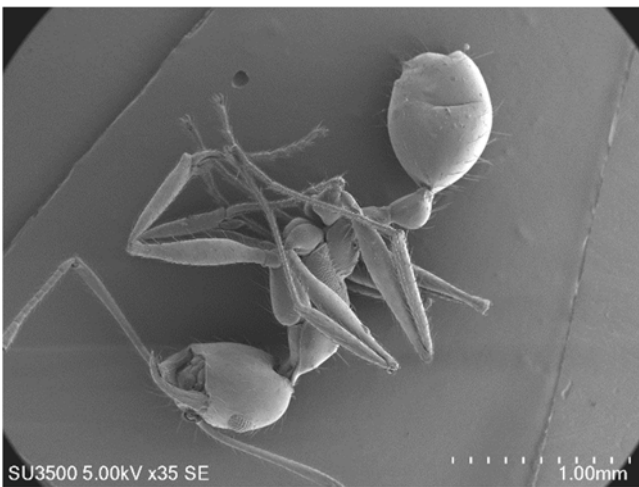


図 1. 固定液への浸漬時間 1.5h のアリ

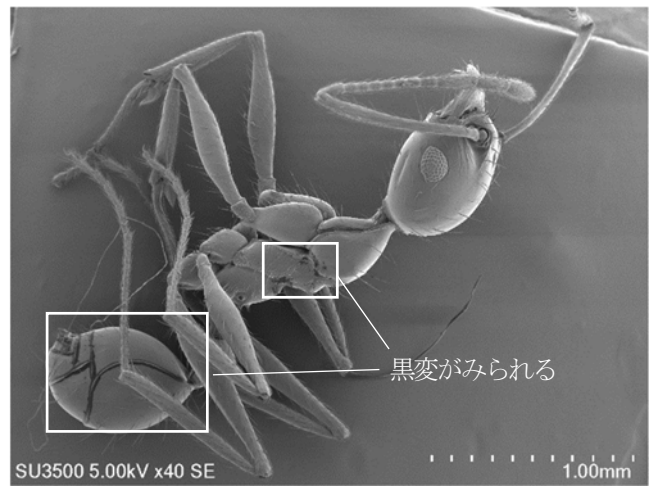


図 2. 固定液への浸漬時間 2h のアリ

2-3. 脱水・置換

電子顕微鏡にて観察を行う場合、最終的に試料内の水分を除去する必要がある。よって、固定化した試料は脱水・乾燥の工程を踏む必要がある。

脱水の工程では試料をエタノールに浸漬させることにより、昆虫体内の水分をエタノールに置換する。この際、固定後の試料をいきなり高濃度のエタノールに浸漬させると、急速な脱水が起こり試料にひずみが生じてしまう。そこで、濃度を徐々に上げたエタノール (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5%) に浸漬させ脱水を行った。浸漬時間は各濃度に対し30分とした。

エタノール置換後、さらに凝固点が25.66℃と高くエタノールよりも凍結乾燥に適しているt-ブチルアルコールに置換した。この際も、試料にひずみが生じるのを防ぐため、まずエタノール (99.5%):t-ブチルアルコール (99%)=1:1の溶液に30分浸漬させ、その後t-ブチルアルコール (99%) に60分間 (30分×2回) させることで置換した。

ダンゴムシ、バッタに対してもアリと同じ条件で脱水・置換を行った。

2-4. 乾燥および導電コーティング

t-ブチルアルコールに置換された試料を真空凍結乾燥装置 (日立 ES - 2030) にて乾燥させた。乾燥処理後、試料に導電性を持たせるため、Au スパッタ (10 nm) を施し、SEM 観察を行うための前処理工程が全て完了した。

3. 昆虫観察教室の実施内容および結果

3-1. 実施内容

参加者数、および実施プログラムを表2に示す。企画は、以下の①~④から成る構成で実施した。

表2. 昆虫観察教室実施プログラム

時刻	内容	
	前半グループ (女子 8 名)	
13:00	部門長の挨拶	
13:05	顕微鏡に関する説明	
	低学年 (5 名)	高学年 (3 名)
13:15	SEMによる観察	光学顕微鏡による観察
		昆虫のスパッタリングの見学
13:35	昆虫のスパッタリングの見学	SEMによる観察
	光学顕微鏡による観察	
	後半グループ (男子 10 名)	
14:00	部門長の挨拶	
14:05	顕微鏡に関する説明	
	低学年 (5 名)	高学年 (5 名)
14:15	SEMによる観察	光学顕微鏡による観察
		昆虫のスパッタリングの見学
14:35	昆虫のスパッタリングの見学	SEMによる観察
	光学顕微鏡による観察	

①顕微鏡に関する説明

顕微鏡による観察を開始する前に、電子顕微鏡と光学顕微鏡の相違点 (倍率、試料調製、観察像) について、資料を配布して説明した。また、電子顕微鏡で昆虫を観察するにはどのような前処理が必要となるのか、なぜ乾燥やスパッタリングを行わなければならないのかについても簡単に説明を行った。

②SEMによる昆虫や植物の観察

SEM 観察では 1-4 に記した 3 種類の昆虫に加え、綿毛や花、鳥の羽、クモの巣等の観察も行った。単純に試料の観察を行うのではなく、昆虫の一部を拡大した像を見せ、どの部位を拡大したものか当ててもらったり、植物に関しては実物を見せて拡大するとどのような構造になっているかを予想してもらってから観察を行う等、子供たちが飽きずに観察を楽しめるよう工夫した。また、希望者にはトラックボールの操作など簡単な SEM の操作を体験してもらった。当日観察した例を図 3, 4 に示す。

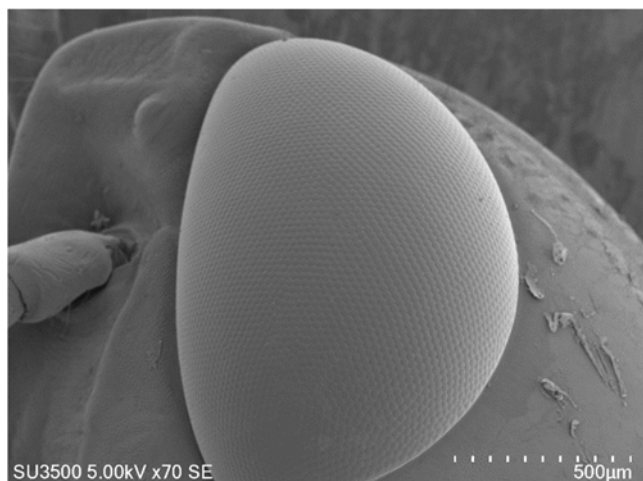


図3. バッタの複眼 (SEM 像)

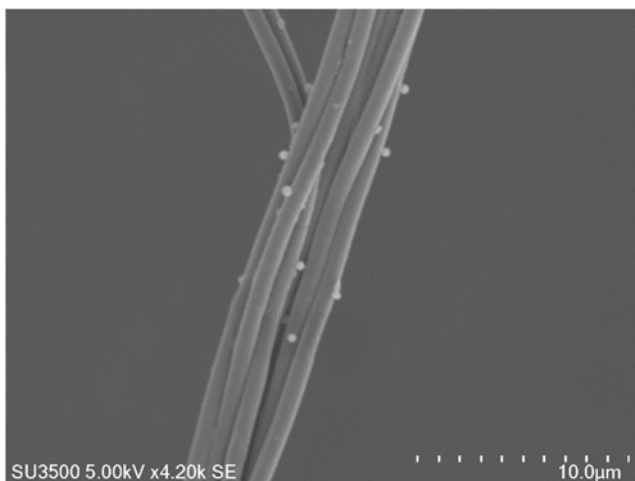


図4. クモの巣 (SEM 像)

③光学顕微鏡による昆虫の観察

光学顕微鏡では1-4に記した6種の昆虫の観察を実施した。まず、バッタの観察を行いSEMで得られる観察像との違いを比較した。その後、子供たちの希望する昆虫の観察を行い、テントウムシの斑点とカミキリムシの斑点は拡大した場合にどのような違いがあるのかなど、肉眼では確認できない相違点を探した。その際、顕微鏡のステージへの試料の上げ下げや、ピントの調整などの操作体験を行った。当日得られた観察像を図5,6に示す。



図5. バッタの複眼 (光学顕微鏡像)

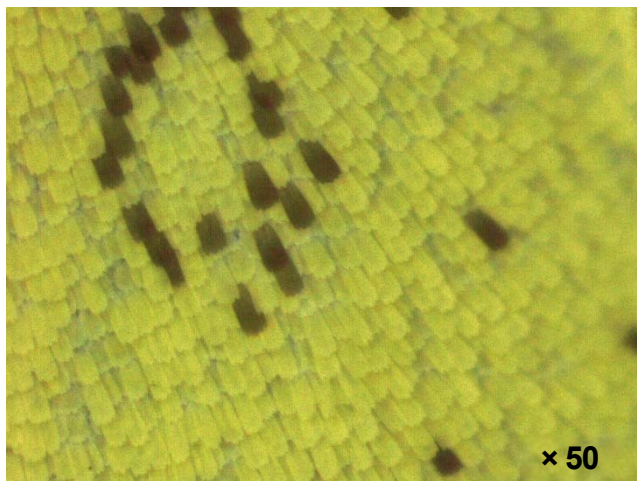


図6. チョウの鱗粉 (光学顕微鏡像)

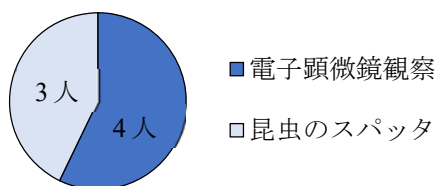
④昆虫のスパッタリングの様子の見学

あらかじめ前処理(洗浄・固定・脱水・乾燥)を施したアリを用意しておき、イオンスパッタ装置(日立 E-1030)を用いてAuスパッタを施す様子を見学を行った。

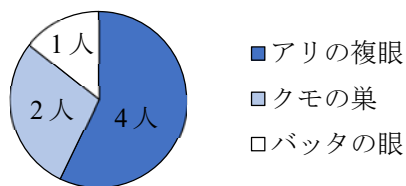
3-2. 実施結果

企画終了時に工学部教育研究支援技術センターが実施したアンケートの結果を以下に示す。尚、本アンケートは高学年の男女7名を対象としている。

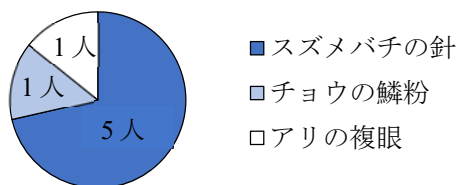
問1. 1番楽しかったものは何ですか



問2. 電子顕微鏡で観察したなかで面白かったものは何ですか



問3. 光学顕微鏡で観察したなかで面白かったものは何ですか



問4. 他に観察してみたいものがありますか

- ・ミジンコ
- ・熊の毛
- ・サメの歯
- ・シャーペンの芯
- ・クワガタ
- ・カブトムシ

きつずサマースクールの主催である清花アテナ男女共同参画推進室が実施したアンケートでは、楽しく勉強できたかという問に対し、アンケート回答者である17名全員が「とてもそう思う・少しそう思う」と回答している。また、またやってみたいかという問にも16名から「とてもそう思う・少しそう思う」という回答が得られており、子供たちに顕微鏡による昆虫や植物の観察を楽しんでもらえたことが分かる。その中でも、電子顕微鏡による観察が人気であったこと、昆虫の複眼の観察に興味を持つ子が多かったこともアンケート結果から分かっている。

4. まとめ

今回の小学生を対象とした電子顕微鏡観察イベントの準備を通して、生物試料をSEMで観察するための一般的な前処理法（洗浄・固定・脱水・乾燥・スパッタリング）や、固定化の最適条件を一定レベルまで確立、習得することができた。これらの技術習得により、今後学内での生物試料の観察依頼や、試料の加工相談等に対応することが可能となった。また、必要に応じて電子顕微鏡用試料加工の講習会を開催することも可能であり、学内での支援依頼に対して提供できるスキルが増え、より広い分野で対応できるようになった。

一方イベントの実施成果としては、アンケートで大多数から楽しかったという回答が得られていることや、子供たちが、複眼の観察など初めて見るもの・知ることに非常に興味を示していた様子から、本企画が子供たちの知的好奇心に訴えかけ、楽しみながら学習する機会となったと言える。すなわち「子供たちの探求心・好奇心を引き出す機会を提供する」という本企画の目的は達成できたのではないかと思う。

また、アンケート結果から電子顕微鏡による昆虫の観察が最も人気だったことも確認できている。これは、昆虫が誰でも目にしたことのある馴染み深い題材でありながら、顕微鏡を用いて観察してみると普段とは異なる姿に見えるという点が子供たちにとって興味深かったのではないかと考えられる。また、電子顕微鏡が日常生活のなかで目にする機会の少ない装置であり、その装置を見るだけでなく、簡単な操作体験をしてもらったことも要因の一つだと考えられる。これらより、参加者にとって馴染み深いものを観察対象として選出した方が、顕微鏡観察時に肉眼で観察した場合との違いを感じやすいこと、自分で装置に触れることができる体験型の学習にすることで子供たちがより好奇心を持つことが分かる。今後同様の企画を実施する際には、参加者にとって身近で興味を抱きやすいものを年齢や性別に応じて複数用意しておくことや、装置に触れる機会を増やすなど観察方法に工夫を凝らすことで、企画をより充実したものへと変化させていけるのではないかと思う。

今後の展望としては、海洋生物（カニ、貝類、ヒトデ等）など昆虫以外の生物試料を観察対象とした電子顕微鏡観察イベントの企画に取り組みたいと考える。それに伴い、今回の企画準備期間では実施できなかったアリ以外の試料の固定条件や脱水条件の詳細な検証を行い、試料の大きさによる前処理条件の変化についてデータを収集するなど、より観察に適した試料を作製できるよう習得した技術の向上を図りたい。

謝辞

本企画を実施するにあたり、多大なるご協力を賜った宮崎大学産学・地域連携センター機器分析支援部門長 境健太郎准教授、同センター連携研究設備ステーション技術補佐員 渡邊眞倫様、試料作製に関して助言をいただきましたテニユアトラック推進機構研究員 和田直久様、また、本イベントの主催である宮崎大学清花アテナ男女共同参画推進室に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 社団法人日本電子顕微鏡学会関東支部編. 電子顕微鏡生物試料作製法. 改訂2版. 丸善株式会社, 1986, p1-57.
- 2) 関西電子顕微鏡応用技術研究会編. 現場で役立つ電子顕微鏡試料作製法. 第1版. 株式会社金芳堂, 1999, p207-224