

■Commentary

感染制御分野における走査型電子顕微鏡の活用事例

清水俊明^{1,2}、小林寛伊¹、吉田理香¹¹東京医療保健大学大学院 ²サクラ精機株式会社

Practical Use Example of the Scanning Electron Microscope in the Infection Control Field

Toshiaki Shimizu^{1,2}, Hiroyoshi Kobayashi MD PhD CICD¹, Rika Yoshida RN PhD CNIC¹¹ Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School² SAKURA SEIKI Co.,Ltd.

Key words : 感染制御、電子顕微鏡、infection control、sem、eds

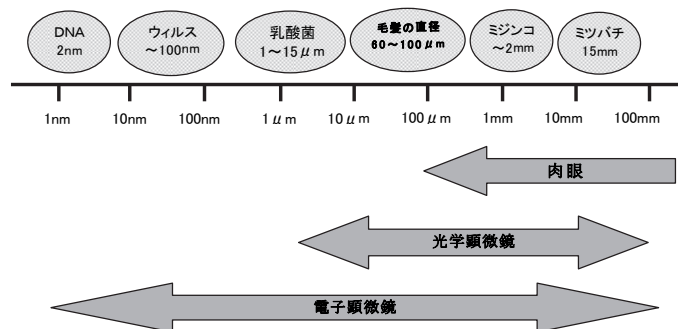
1. はじめに

最初の電子顕微鏡が1932年にドイツで開発¹⁾されて以来、様々なタイプの電子顕微鏡が開発されてきた。そのなかでも、走査型電子顕微鏡 Scanning Electron Microscope (SEM)は汎用性が高く医学・生物学の分野や、金属、半導体、セラミックスなど様々な分野で活用され、その用途を拡大している。現在では、小型で廉価な卓上SEMも普及しており、一層身近に使用できるようになった。また、SEMにエネルギー分散型X線分析装置 Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS)を装着して、試料の形状観察だけではなく、試料にどんな元素がどの程度含まれているかを調べる事も可能である。感染制御分野に於

いて、細菌の高倍率観察、滅菌後の材料表面の観察、銅製小物など金属の不純物観察や元素分析、など多岐に亘り使用された事例を紹介する。

2. SEMの概要

物質を観るための手段として、図1のごとく「肉眼」、「光学顕微鏡」、「電子顕微鏡」があるが、物質を観察できる最小の距離を示す分解能は、人の目ではおよそ0.1mm、それより小さい物の観察には光学顕微鏡や電子顕微鏡が使用される。光を利用した光学顕微鏡では光の波長よりも小さな物の表面観察はできないが、SEMは光よりも波長の短い電子線を用いるため、数十倍～数万倍以上の広い倍率で数nm程度の構造まで観察でき、また焦点深度が非常に深い立体的な形態観察が可能である。

図1 各観察手段の分解能¹⁾

3. SEM の原理・特徴と活用事例

3.1 原理と特徴

図2に示すように、まず真空中で細く絞った電子線を試料に照射し試料表面を走査すると、試料表面で反射して出てくる反射電子、原子内の電子が弾かれて飛び出てくる二次電子、電子が飛び出した後に出てくる特性X線などが信号として発生する。

それらの試料から出てくる信号を検出し、増幅・情報変換してモニター上に試料表面の拡大像を白黒で表示するというのが原理である。

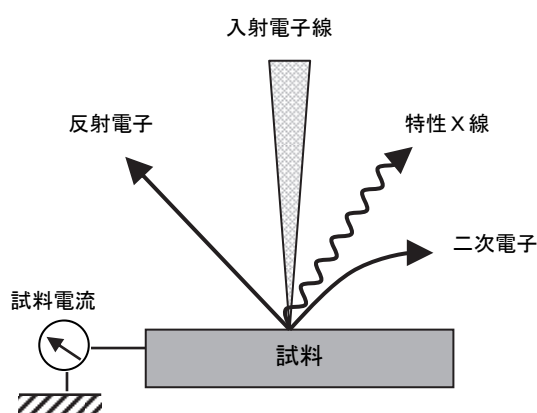


図2 試料から発生する信号²⁾

通常の SEM では、試料室の圧力を $10^{-3} \sim 10^{-4} \text{ Pa}$ にも及ぶ高真空中に保って二次電子を捕らえることにより、試料表面の浅い微細な凸凹構造を反映する二次電子像が得られる。または反射電子を捕らえることにより、試料表面の元素組成を反映してコントラストがつく反射電子像として試料表面を画像化することもできる。

ただし、SEM 観察は電子線を照射するため、金属などの導電性試料はそのまま観察できるもののプラスチックや生物試料など非導電性試料は表面に電子が溜まる「帯電」という現象がおり、白く歪んだ画像になってしまう正常な観察ができない。したがって、試料にあわせて試料表面の帯電を軽減する適切な前処理が必要となる。

例えば、イオンスパッタ装置を用いて金、白金、パラジウムなどの貴金属を試料表面にコーティングして導電性を持たせる方法が用いられている。

また、試料室の圧力を数十～数百 Pa 程の低真空中に保ち観察する方法がある³⁾。試料室内に残った空気などの残留ガスに電子線が衝突することによって、電離・イオン化されてプラスイオンが生成される。このプラスイオン

が、試料表面に溜まった電子を中和して除去することで非導電性試料を図3のように無コーティングで観察するという方法もある。

微生物の電子顕微鏡観察に於いても、生物試料は真空中で収縮し形状が変化する事、非導電性である事から前処理が必要になる。そこで、例えば、グルタールで前固定を行った後に、四酸化オスミウムで後固定し、更にエタノール系列で脱水・凍結乾燥し、オスミウムを蒸着して導電処理を行う方法⁴⁾や、グルタール固定した後、エタノール系列で脱水、プラチナチミジブルーで導電処理を行う方法⁵⁾などが行われている。

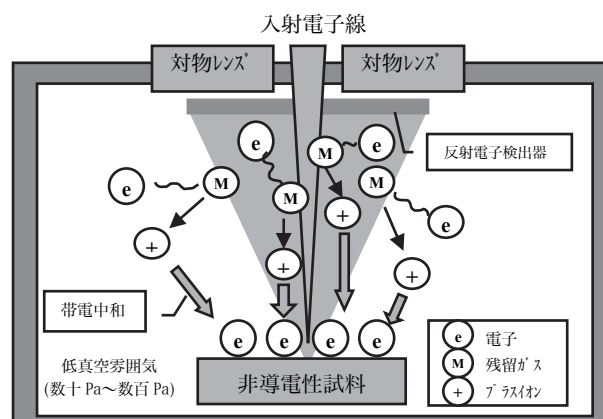


図3 低真空観察による帯電軽減効果³⁾

3.2 活用事例

①枯草菌の芽胞表面の観察像を図4に示す。

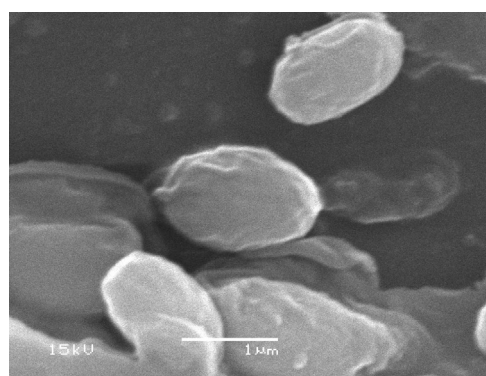


図4 枯草菌（芽胞）表面の電子顕微鏡像

<注記>

サンプル : *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953
前処理 : 金コーティング
観察倍率 : 25000 倍
加速電圧 : 15kV
真空モード : 高真空
信号 : 二次電子

<観察結果>

枯草菌の芽胞の表面構造を観察したところ、平滑ではなく不定形な凸凹構造である事が判った。

②過酸化水素滅菌後のプラスチックパネル（ポリアミド6：PA6）の表面観察像を図5に示す。

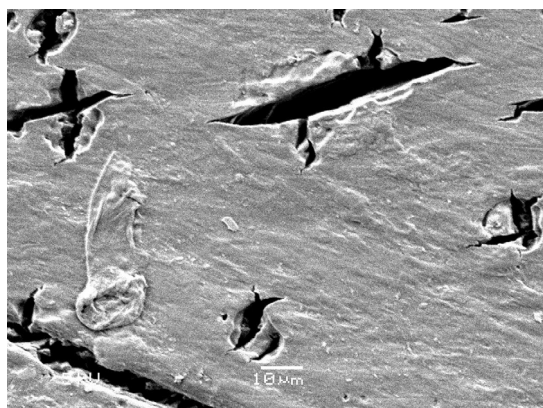


図5 過酸化水素滅菌後のプラスチックパネル（PA6）の電子顕微鏡像⁶⁾

<注記>

サンプル：プラスチックパネル（PA6）

サイズ：幅10mm×長さ10mm×厚さ6mm

滅菌条件：過酸化水素ガス滅菌装置(AMSCO® V-PRO® maX)にて1サイクル処理した。

前処理：金コーティング

観察倍率：1000倍

加速電圧：5kV

真空モード：高真空

信号：二次電子

<観察結果>

過酸化水素滅菌のプラスチック材料（PA6）表面への影響についての調査を目的とし、過酸化水素ガス滅菌装置にて1サイクル処理したプラスチックパネル（PA6）表面を電子顕微鏡にて観察したところ、顕著なクラックが多数確認された。よって、過酸化水素による化学的な影響が示唆された。

4. EDSの原理・特徴と活用事例

4.1 EDSの原理・特徴

EDSはSEMの附属装置としてSEMに装着され、試料に含まれる各元素を分析する装置である。その原理であるが、まず電子線が原子内の電子殻（電子軌道）に入射されると、電子殻内の電子が原子外に放出される。電子が放出されると、電子殻に電子の空きができ原子が不安定になるため、その空きに外側の電子殻から電子が埋まる。その時、図6のごとく、同時にX線の放出が起こる。そのX線は元素毎にエネルギーが異なり、元素固有のX線であることから「特性X線」と呼ばれ、その特性X線を測定することにより、試料表面に存在する元素を特定することが可能となる。

EDSは、導体検出器を用いて特性X線を検出し、図7のように横軸をX線のエネルギー、縦軸をX線の検出カ

ウント数としたスペクトルを得ると共に、原子番号5番のホウ素（B）～同92番のウラン（U）までの多元素を同時分析できるのが特徴である。定性された元素の種類とX線量からシミュレーション計算し、元素の半定量値（簡易定量値）を求めることも可能である。

また、観察視野の各元素の密度分布を可視化する元素マッピングという機能もある。

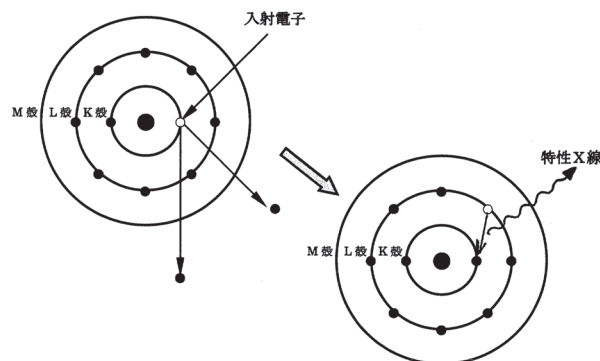


図6 特性X線の発生原理⁷⁾

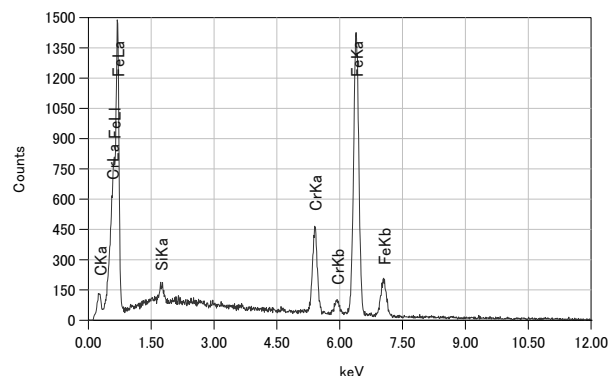
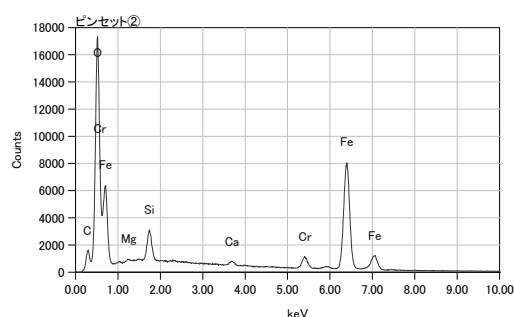
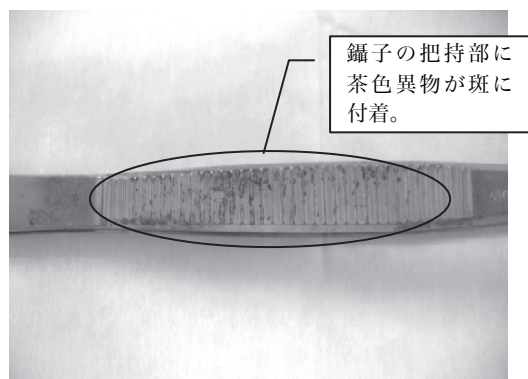


図7 EDS スペクトル例（ステンレス製鋼製小物）

4.2 EDS の活用事例

① 鑷子に付着の茶色異物の分析結果を図8に示す。



ZAF法[※]簡易定量分析

フィッティング係数 : 0.2713

元素	(keV)	質量%	誤差%	原子数%
C K	0.277	3.82	0.08	10.95
O K	0.525	18.26	0.09	39.24
Mg K*	1.253	0.23	0.16	0.32
Si K	1.739	2.19	0.14	2.68
Ca K*	3.690	0.63	0.22	0.54
Cr K*	5.411	4.02	0.41	2.65
Fe K	6.398	70.85	0.65	43.62
合計		100.00		100.00

※ ZAF法とは、EDSにより元素の簡易定量分析を行う際、各元素に於ける標準試料のX線強度に対する未知試料のX線強度の比(相対強度)の値に、原子番号補正(atomic number : Z)、吸収補正(absorption : A)、蛍光補正(fluorescence : F)を施して真の濃度を求める方法。

図8 鑷子に付着の茶色異物の分析結果

<注記>

サンプル：鑷子（マルテンサイト系ステンレス）

加速電圧：15kV

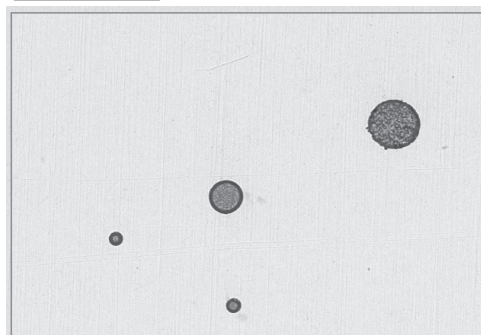
真空モード：高真空

<分析結果>

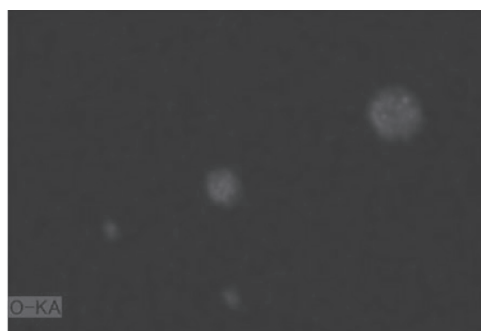
酸素（O）と鉄（Fe）の質量%が多いことから茶色異物は鉄錆である。

② 止血鉗子に含まれる非金属介在物の元素マッピングを図9に示す。

反射電子像



酸素（O）の元素マッピング像



ケイ素（Si）の元素マッピング像



脚注：元素マッピング像は、電子顕微鏡像を各元素の密度分布で表した画像に変える手法である。電子顕微鏡像内の化合物の特定と分布を知る手段として用いられる。

図9 止血鉗子に含まれる非金属介在物の元素マッピング

<注記>

サンプル：止血鉗子（マルテンサイト系ステンレス）

加工方法：止血鉗子を切断の後、断面を鏡面研磨。

観察倍率：1000倍

加速電圧：15kV

真空モード：低真空

<分析結果>

反射電子像の大小4ヶの黒く丸い部分は、酸素（O）とケイ素（Si）の密度が高い。この部分はシリケート（ケイ酸塩）からなる非金属介在物である。

5. おわりに

電子顕微鏡の原理・特徴と感染制御分野に於ける応用事例について概説した。感染制御に関する研究者にとって、高倍率観察や元素分析ができる電子顕微鏡は様々な研究で活用し得る事から、研究の深耕を視野に応用拡大を目指して頂きたいと考える。

■ 文 献

- 1) 内田稔. 「分析の原理」 05 電子顕微鏡の原理：
http://www.jaima.or.jp/jp/basic/pdf/basic_05.pdf. 2014年11月17日現在
- 2) 走査電子顕微鏡 (SEM) とは？：
https://members.hht-net.com/sinavi/Menu/Support/Sp/Sem/Pages/sem2_1.aspx. 2014年12月05日現在
- 3) 渡邊俊哉：走査電子顕微鏡の原理と応用（観察、分析）. *精密光学* 2011; 77: 1021-6.
- 4) 尾上孝利：口腔細菌の走査電子顕微鏡(SEM)観察—SEMで何が解るか？： *電子顕微鏡* 2003; 38: 138-141
- 5) 安川洋生, 今野法子. 卓上走査型電子顕微鏡を用いた身近な細菌の観察: *岩手大学教育学部附属教育実践総合センター研究紀要* 2014; 13: 53-8.
- 6) Yoshida R, Kobayashi H. Influence of Hydrogen Peroxide Sterilisation on Plastic Surface ; *J HAI* 2013; 6: 19-23.
- 7) SEM走査電子顕微鏡A～Z:
http://www.jeol.co.jp/words/semterms/sem-a_z.pdf#search=SEM%E8%B5%B0%E6%9F%BB%E9%9B%BB%E5%AD%90%E9%A1%95%E5%BE%AE%E9%8F%A1A%EF%BD%9EZ. 2014年11月21日現在