

深層学習に用いるための細菌の走査電子顕微鏡による撮影方法の検討

長岡工業高等専門学校 非会員 ○齋藤那生
非会員 新部陽向, 土田勝範, 正会員 川上周司

1. 背景と目的

微生物の種の同定方法は、遺伝子操作を伴う技術や実験施設を要求し、専門的な知識や実験コスト、経験が求められる。これは微生物の形態学的特徴が乏しいことが原因で、見た目から種を同定することが難しいことに起因する。こうした中、抗体や aptamer といった微生物の細胞表層の分子を標的として任意の微生物を特異的に標識する技術が報告されている。これらの技術は株レベルで細菌の検出を区別したり、属レベルにまたがる系統学的に広いグループを検出するなど、任意のグループで検出できる可能性を示している。我々は、こうした抗体や aptamer が種を区別できるのは、同じ種の微生物でも細胞表面に微妙な違いがあると考えており、その違いを用いれば微生物を種で区別して同定できるのではないかと考えた。また、画像検出技術は Convolutional Neural Network (CNN) を始めたとした深層学習による技術の発展が著しく、環境工学の分野でも利用が広まっている。これらの技術は、人間の目視では区別のつかない違いも判別できる事例があり、その利用可能性が広がっている。我々の研究グループは、微生物の走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) 画像を深層学習で構築したモデルを使うことで、SEM 画像から微生物を区別できる可能性を示した。しかしながら SEM 画像の画質が低く、期待した成果が得られなかった。この問題を解決するための一つの方法として SEM 画像の画質を上げ、微生物の細胞表層をより詳しく捉える必要性を考えている。微生物の SEM 画像の取得方法については多くの知見があるが、操作が極めて煩雑であったり、特殊な脱水装置を要求するものが多い。本研究では、深層学習に用いるための大量の画像データを得ることを目的に、より簡易に安価な方法で、高画質な SEM 画像を取得するための検討を行った。

2. 実験方法

表 1 本研究における条件

本研究では、試料にトリブチルアルコール (TBA) を用いた凍結乾燥を施した。TBA は細胞内部の水分を置換し、細胞の

| | 凍結乾燥 | アルデヒド固定, 凍結乾燥の併用 |
|---------|------|------------------|
| スライドガラス | 条件A | 条件B |
| 銅板 | 条件C | 条件D |

構造を保持することが可能で、試料が乾燥した後も細胞の形状を維持しやすくなる。また、従来の手法ではスライドガラスを使用した SEM 撮影において、非導電性である生物試料にスパッタリングをし、導電性を与えることが一般的だが、本研究では銅板をスライドガラスの代用品とし、導電性を与えることでスパッタリングを施さず撮影する手法を試験した。さらに、TBA による凍結乾燥法とパラホルムアルデヒドによるアルデヒド固定を併用し、有効性の有無を試験した。本研究では、*Bacillus subtilis* NBRC3134 (NBRC:NITE Biological Resource Center) を LB 培地にて培養したものを使用して試料作成を行い、表 1 に示す 4 パターンにおける条件のもと、撮影方法の検討を行った。最初に、サンプルケースに前述の細菌試料を入れ、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えた後、遠心分離機によって PBS 洗浄を行った (20°C, 9000rpm, 5min)。その後上澄みを捨て、再度 PBS 洗浄を行う工程を 2 回繰り返し行った。次に条件 B、条件 D に使用するサンプルに 4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液を注入し、12 時間 (4°C) おいて固定し、PBS 洗浄を施した。その後、それぞれの細菌試料を条件 A・B の場合はスライドガラスに、条件 C・D の場合はスライドガラスの様に加工した銅板に薄く広げヒートブロックによって乾燥させた。試料が乾燥したことを確認した後、インキュベーターを 40°C に設定し、TBA に試料をのせたスライドガラス・銅板を 45 分間、TBA を入れ替えながら浸した (15 分間

×3回). その後, -10°Cに設定された冷凍庫に入れ, スライドガラス・銅板上の試料の凍結を確認し, 試料をのせたスライドガラス・銅板を真空デシケーターに並べ, 真空ポンプを用いて素早く排気し, 真空状態にした. 上記の各処理を組み合わせることで作成した試料を, JEOL JSM-IT500 走査電子顕微鏡で観察し, 比較検討を行った. なお, 全ての条件で加速電圧 15kV, 倍率 5000 倍で撮影を行った.

3. 結果および考察

以下に撮影した画像を示す (図 1, 図 2, 図 3). 条件 A・B に比べ条件 C・D の方が試料表面を明瞭に観察することができた. これは, 銅板の使用によって導電性が確保され, スパッタリングによる金属が付着していない試料を観察することができたからであると考えられる. しかし, 図 3, 図 4 から細菌試料の表面に結晶の様なものが観察された. 原因として細菌試料をサンプルケースからスライドガラス・銅板に移した際に PBS を含んだ上澄液の混入を最小限に抑えることができずに結晶化した結果, 表面の膜状のものを形成している可能性が高い. また, 今回の撮影で細菌試料が明瞭に観察できない背景として, 脱水の過程が TBA による脱水だけでは不十分であったことにより, 試料内部の水分が残留したことが原因として考えられる. 試料内部に水分が残留している場合, 真空環境で水分が蒸発し, 試料の損傷や形状変化を生じることがある. さらに, 試料の脱水時は TBA を液体の状態で使用するため, 凝固点が約 25.8°C の TBA を個体化させずに試料に十分に行き渡るように適切な温度管理を徹底する必要がある.

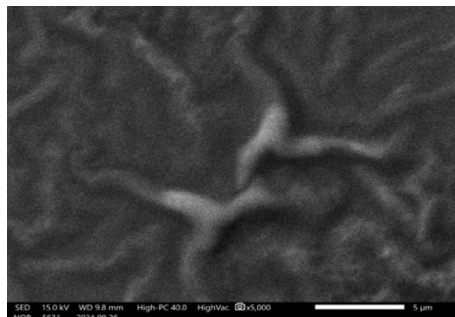


図 1 条件 A による画像

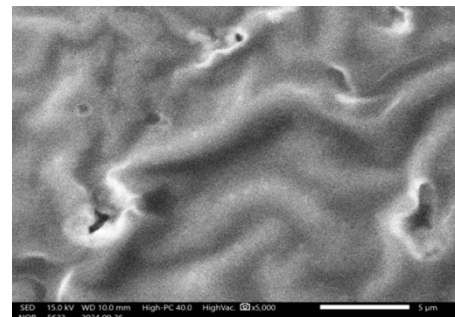


図 2 条件 B による画像

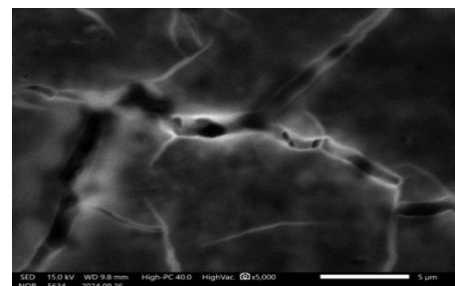


図 3 条件 C による画像

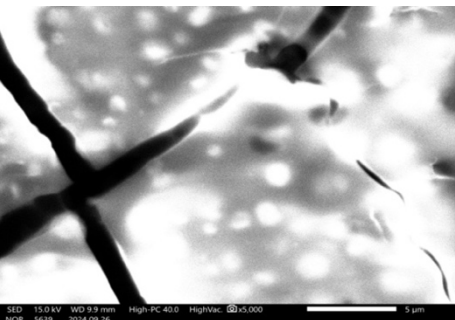


図 4 条件 D による画像

4. 今後の展望

今回の結果を踏まえ, 改善点として, サンプルケースから細菌試料を取り出す際に PBS 由来残留物が混入したことや TBA のみによる脱水では不十分であった可能性があることが挙げられる. 今後, PBS 由来残留物を最小限に抑える方法を検討する. また, 今回の脱水過程は簡易的に試料準備を進めるために TBA による脱水のみとしたが, このプロセスを変更し, 一般的な脱水法であるエタノールによる段階的な脱水を組み合わせ, その有効性を確認していきたい. これらの改善を行うことで, 安価な方法による高画質な SEM 画像の撮影が可能になると考える.

参考文献

- 1) 佐藤嘉彦, 田中利幸, 走査型電子顕微鏡用試料作成のための第三ブチルアルコール凍結乾燥法, 横浜国立大学理科教育実習施設研究報告, Vol.6, pp.1-9, 1990.
- 2) 新部陽向, 深層学習を用いた画像による微生物の判別システムの開発, 長岡工業高等専門学校卒業研究報告, 2024.