SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

生物を生きたまま電子顕微鏡観察できる「NanoSuit®法」

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-03-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 勲, 高久, 康春, 鈴木, 浩司, 石井, 大祐, 村中, 祥悟, 下村, 政嗣, 針山, 孝彦 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00027086

生物を生きたまま電子顕微鏡観察できる「NanoSuit®法」

太田　勲[1)]、高久康春[2)]、鈴木浩司[3)]、石井大祐[4)]、
村中祥悟[5)]、下村政嗣[6)]、針山孝彦[2)]
（浜松医科大学[1)]技術部、[2)]ナノスーツ開発研究部、[3)]化学、
[4)]名古屋工業大学大学院、[5)]大阪大学、[6)]千歳科学技術大学）

1.はじめに

生物表面の微細構造観察/解析には、走査電子顕微鏡（SEM）が有効な機器として用いられている。70～80％の水で構成する生物試料を高真空環境（10^{-5}～10^{-7}Pa）の SEM で観察するためには、前処理として化学固定・脱水・乾燥が不可欠と考えられてきた。しかしこれらの従来法では、試料変形などアーティファクトを生じさせるため、生体本来の構造を完全に捉えることは困難であり、ましてや生きたままの生物試料観察は不可能だと考えられてきた。我々は、その固定観念を払拭し、生物がもつ真空耐性を増強する技術を検討した結果、ショウジョウバエなどの幼虫が体表に持つ粘性物質（Extracellular substances; ECS）に電子線またはプラズマ照射することで得られるナノ薄膜が、超高真空下でも体内の水分やガスを抑制する表面保護効果を生み出すことを見いだし、生きたままの FE-SEM 観察に適用することに世界で初めて成功して「NanoSuit®」と名付けた[1)]（図 1）。さらに、ECS 成分を模倣した界面活性剤で NanoSuit®を形成させ、多様な生物を生きたまま電子顕微鏡観察することに成功した[2-3)]（図 2）。生きたままの生物表面は、従来の固定･乾燥･導電処理によって得られた SEM 試料の微細構造とは大きく異なることを明確にした。

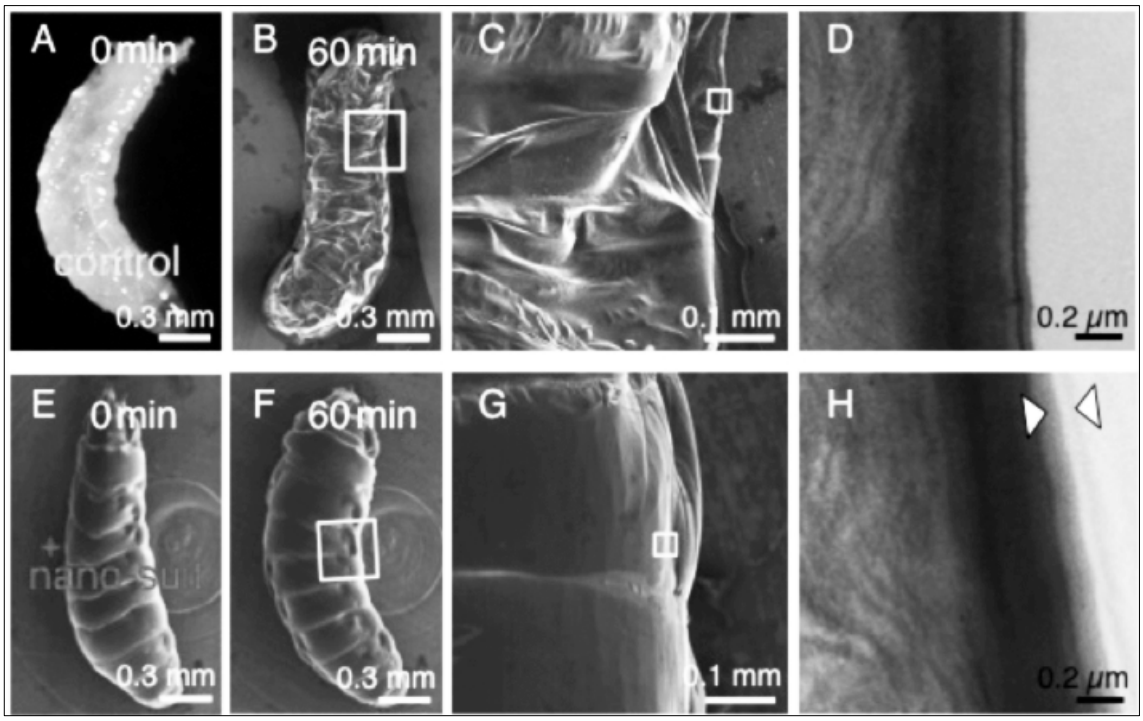

図 1.ショウジョウバエ幼虫（A）を高真空に暴露する（B-D）と個体は脱気・脱水されて死滅するが、真空暴露直後に電子線照射すると生存し（E-G）、固体表面に NanoSuit®が形成される（H）。

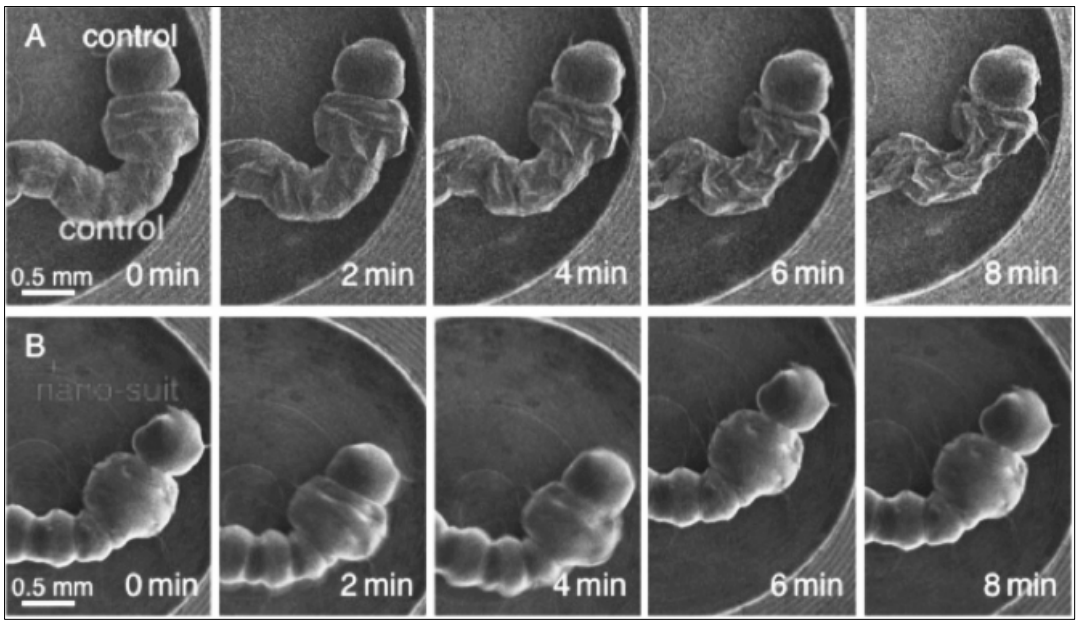

図 2.シマダラカやチカイエカのボウフラを飼育水から取り出し、そのまま SEM 中に入れると脱気・脱水され死んでしまう（A)。Tween20 （Polysorbate 20）塗布後、自己組織化したこの物質に対し、電子線またはプラズマ照射すると、30 分以上 SEM 中で運動観察が可能となる（B)。

2.材料ならびに方法

実験用生物:今回、実験動物には *Chironomus yoshimatsui* および *Talitrus saltator* を使用した。NanoSuit®処理による FE-SEM 観察用試料作製法：両親媒性の界面活性物質の化合物 polyoxyethylene（20）sorbitan monolaurate（Tween 20）を疑似 ECS として用いた。NanoSuit®を形成させるために、生きたままの生物を 1%Tween 20 に浸漬し余分な溶液は乾燥濾紙にて除去し試料台に乗せた。この個体をプラズマ照射、または FE-SEM の試料室に直接挿入し電子線照射によって、NanoSuit®を形成させた。

従来法の SEM 試料作製法：生物は 2%グルタールアルデヒドおよび 1%四酸化オスミウムにて固定、エタノール脱水、凍結乾燥、オスミウムプラズマ蒸着を施した。

電子顕微鏡観察：これらの試料を、FE-SEM（S-4800;Hitachi）にて、加速電圧 5 kV で観察した。

3.結果

C. yoshimatsui 幼虫を Tween 20 による NanoSuit®で被覆した後、FE-SEM 観察した。その幼虫は、NanoSuit®の保護効果により帯電無く活発な動作が観察され、少なくとも約一時間帯電は認められなかった。FE-SEM 観察後、NanoSuit®処理した幼虫を大気圧下の泥水に戻したときは、すべての幼虫の生存を確認でき、その後、約 70%蛹化、成虫まで生育した。対照群として蒸留水のみで洗浄処理した幼虫を FE-SEM で観察するとその表面構造は乾燥・変形により微細構造が壊れ、帯電が生じるため極短時間のうちに観察不能になった（図 3)。次に、*T. saltator* を NanoSuit®処理した個体と化学固定による従来法で処理した対照群とを FE-SEM で比較観察した。*T. saltator* 側面を低倍率観察したときの背甲外郭は、対照群ではより明瞭に見られたが、NanoSuit®処理した個体は極めて平滑だった。頭部と前側部位では対照群には収縮を示す凹みの存在を認められたが、NanoSuit®処理した個体では収縮は認められなかった。*T. saltator* の触角部位には、三本の小感覚体を構成する長い突起が存在し、対照群では分散しているように見えるが、NanoSuit®処理した個体では端然と直線的であった。同様に触角先端を拡大すると対照群では斜め外側に広がって束

ねられた構造がNanoSuit®処理した個体では一列に整然と観察され、明瞭な形態学的相違が認められた（図4）。

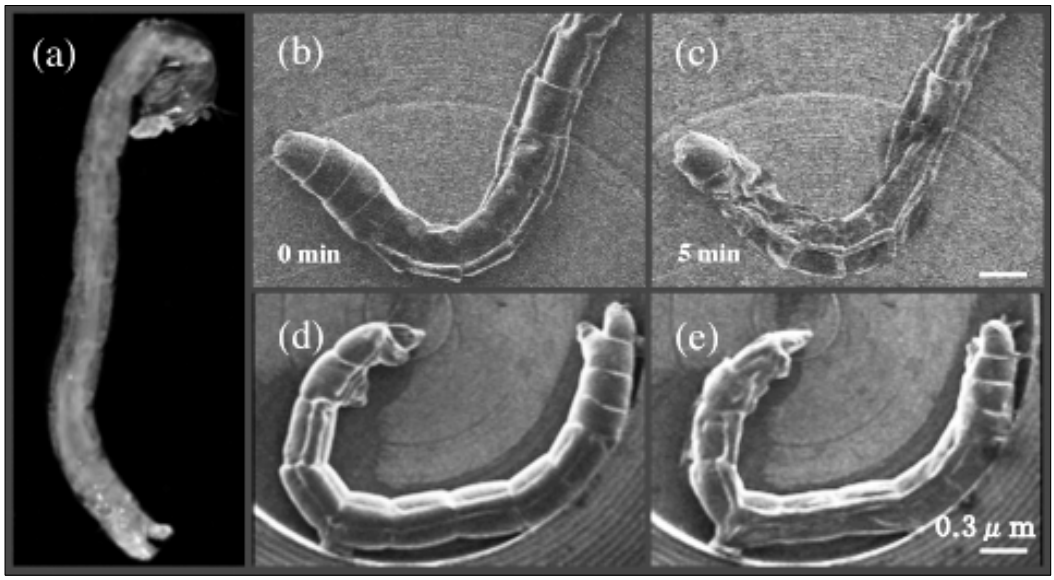

図3.ネムリユスリカ(*C. yoshimatui*)の幼虫(a)をそのままSEM中に入れるとすぐに脱気・脱水され死滅してしまう(b, c)。Tween20塗布後、電子線またはプラズマ照射処理した個体は、高真空中でもしばらく生存可能で（d, e)、微細構造を維持したまま電子顕微鏡で高解像度観察できる。

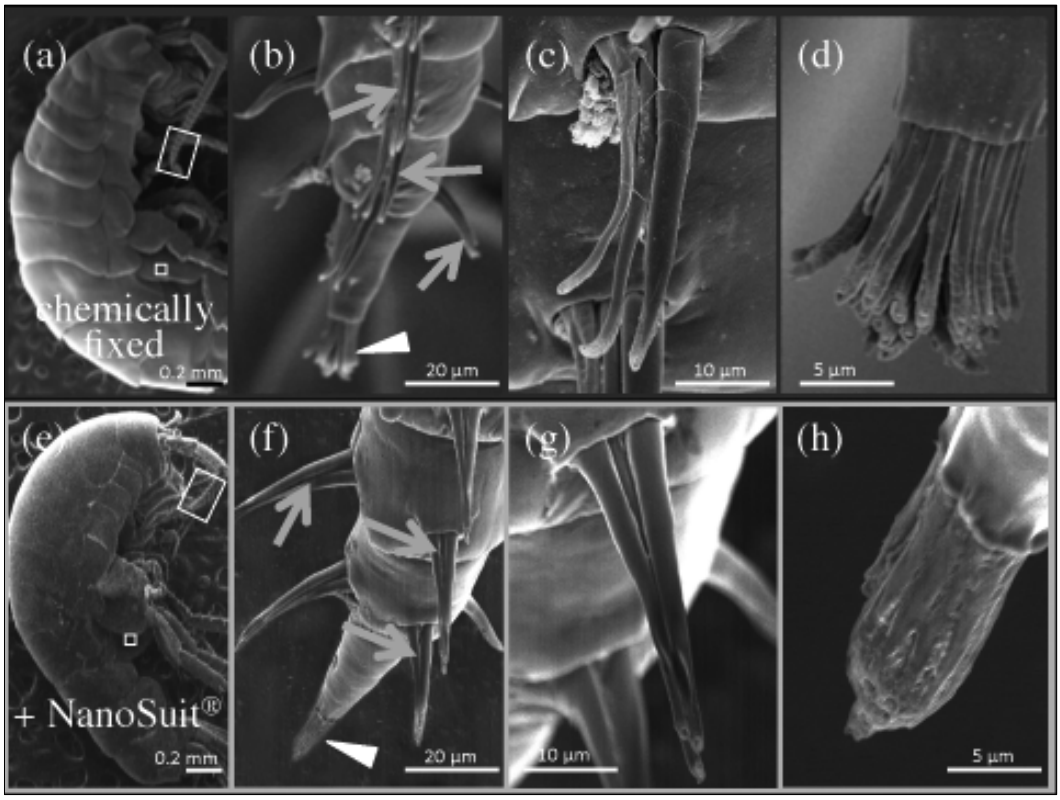

図4.ハマトビムシ（*Talitrus saltator*）を化学固定による従来法で処理した対照群（a-d）とNanoSuit®処理したSEM像（e-h)。触角先端を拡大するとそれぞれの部分には長い突起を有した三本の小感覚体を構成する長い突起が存在し、対照群では分散して観察される（b-c）が、NanoSuit®処理では端然と直線的である（f-g)。さらにその先端部位を拡大すると対照群では斜め外側に広がって束ねられた構造（d）が、NanoSuit®処理した個体では一列に整然と観察される（h)。

4.考察

NanoSuit®を用いた生物試料 SEM 観察法において、従来の固定試料と NanoSuit®処理による生きたままの試料の間には多くの異なった構造が見られた。生物表面に疑似 ECS を塗布し、NanoSuit®を形成させることで、生きたままの生物の自然な表面構造が保持されており、従来法では特に微細構造の変形が生じていることが明らかとなった。NanoSuit®処理による生きたままの試料では帯電無く良好な分解能で観察された。それは帯電を抑制している表面において確かな特性を保有しているためか、あるいは生きている生物自身が導電性をもつことを示唆している。NanoSuit®の特性として、超高真空下でも生物内のガスや液体の放出を抑制する働きをしていると考えられ、しかも帯電を大幅に軽減し、整然とした表面構造を巧妙に維持できることが明確となり、NanoSuit®が FE-SEM 内における生命維持に重要な役割を担っていることが示された。また、ECS を模倣した物質として Tween 20 以外にもすでに多様な有機分子を用いて NanoSuit®が形成可能であることを確認している[4-6]。多様な有機分子の単体、あるいは組み合わせ、または、導電性物質などを付与することで、すべての細胞の個体・器官・組織・細胞など高真空環境下でさらに長時間保護や維持可能な NanoSuit®の開発を目指している。今後、NanoSuit®の展開として、含水状態の細胞や組織等の高真空環境下での FE-SEM 観察により、医療および生命科学研究における応用や汎用的利用、材料系においてはナノテクノロジーと生物学の異分野連携による生物模倣(バイオミメティクス)技術への応用が期待される。

5.参考文献

[1] Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T, A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum, PNAS 110 (19), 7631-7635, 2013.

[2] Suzuki H, Takaku Y, Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T: In Situ Preparation of Biomimetic Thin Films and Their Surface-Shielding Effect for Organisms in High Vacuum, PLOS ONE, 8(11), e78563, 2013.

[3] Ohta I, Takaku, Suzuki H, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T: Dressing living organisms in a thin polymer membrane, NanoSuit, for high vacuum FE-SEM observation, Microscopy, 63(4), 295-300, 2014.

[4] Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Tsutsui T, Matsumoto H, Shimomura M, Hariyama T: A 'NanoSuit' surface shield successfully protects organisms in high vacuum: observations on living organisms in an FE-SEM.,Proc. Biol. Sci., 282(1802), pii: 20142857, 2015.

[5] Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, Ohta I, Ishii D, Hirakawa S, Tsutsui T, Matsumoto H, Takehara S, Nakane C, Sakaida K, Suzuki C, Muranaka Y, Kikuchi H, Konno H, Shimomura M, Hariyama T: A modified 'NanoSuit®' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in FE-SEM. Royal Society Open Science, DOI: 10.1098/rsos.160887, 2017.

[6] Takehara S, Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Shimomura M, Hariyama T: A 'NanoSuit' successfully protects petals of cherry blossoms in high vacuum: examination of living plants in an FE-SEM, Sci Rep, 8(1), 1685, 2018.