

正帯電金ナノ粒子標識法による鞭毛・線毛・細胞突起の 大気圧走査電子顕微鏡観察

Atmospheric Scanning Electron Microscope Observation of Cells Using a Charged Gold Labeling Technique

西山 英利^a, 寺本華奈江^b, 須賀 三雄^{a, b}, 佐藤 主税^c
Hidetoshi Nishiyama, Kanae Teramoto, Mitsuo Suga and Chikara Sato

^a 日本電子(株)SM事業ユニット

^b 日本電子(株)開発基盤技術センター

^c 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

要旨 細菌や培養細胞の光学顕微鏡観察には分解能の限界があり、ナノメートルオーダーの細菌の鞭毛・線毛や、真核生物細胞のフィロポディアの形状観察は容易ではない。このような繊細な構造を電子顕微鏡で観察するには、脱水や蒸着等の複雑な前処理が必要であり、これによって本来の形状が失われる場合もある。本研究では細胞表面が負帯電していることを利用して、正帯電金ナノ粒子を細胞に吸着させた後、金増感を行い水溶液中で大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) 観察を試みたところ、サルモネラ菌のらせん状の鞭毛、大腸菌の線毛、COS7 細胞のフィロポディアを明確に観察することができた。観察に必要な前処理は水溶液を入れ替えるだけの簡単な操作であり、1時間ほどで完了可能であった。本稿で紹介した技術は細胞本来の微細な形状を容易に観察することができるため、生物分野に広く応用が期待される。

キーワード：大気圧、走査電子顕微鏡、鞭毛、線毛、細胞

1. はじめに

電子顕微鏡は、光学顕微鏡では得られない高い空間分解能で試料を観察できる。しかし、電子線の散乱を防止するために、電子線の経路は試料室も含めて真空にする必要がある。そのため、水を含む生物試料を真空中に入れると、急激な水分の蒸発により試料の変形が起き易い。これを防止するためには、試料の脱水・乾燥あるいは脱水・包埋・薄切処理が必要になる。これらの作業は熟練と1日～数日の時間を必要とする¹⁾。また、脱水や乾燥工程は試料を変形させる可能性があり、特に細胞のフィロポディアや細菌の鞭毛・線毛のような繊細な構造の形状保存が難しい。

試料を液体の中で観察する技術の開発は電子顕微鏡が発明された直後から行われてきた。Abrams と McBain は、電子線は透過するが液体や気体は透過しない二枚のコロジオン膜の間に液体や気体の試料を入れる環境セル (Environmental Cell) を透過電子顕微鏡用に開発した²⁾。その後も環境セルの改良は続けられており^{3,4)}、近年では、走査型透過顕微鏡との組み合わせにより全細胞を観察できるようになった⁵⁾。また、走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM) においても、電子線透過膜一枚型の環境セルが開発されて⁶⁾、

固定された動物細胞や細菌の液中観察が行われてきた⁷⁾。環境セルの開発により、溶液中の生物試料を電子顕微鏡で観察できるようになったものの、環境セルは内部に入る液体が10 μl 程度であり、その中で培養できる細胞は限られていた。また、セルには外部からパイプなどを接続することはできたが、基本的には閉鎖系であったため、試料操作や試薬の添加には制限があった。これらの欠点を解消するために、筆者らは大気に開放された試料室を有する大気圧走査電子顕微鏡 (Atmospheric SEM: ASEM) を開発してきた⁸⁾。ASEM は倒立型SEMの上方に、窒化シリコン (SiN) 薄膜窓を備えた取り外し可能なプラスチック製の薄膜ディッシュを配置して、シールするものである。この薄膜ディッシュは3 ml の培養液を保持できるため、従来の環境セルよりもはるかに細胞培養が容易である。試料は薄膜ディッシュ中央の薄膜窓上に載せ、SEM 観察する^{9~13)}。この時、薄膜ディッシュ自体が隔壁となって下方のSEMは真空になるが、上方の試料室は大気に開放されているために、外部からの試料操作が容易である¹⁴⁾。

ASEM による液中観察では、薄膜越しに試料を観察するので、エネルギーの小さい二次電子は薄膜を通過せず真空側で検出できないため、エネルギーの大きい反射電子を真空側で検出して撮像する。そのため、コントラストは原理的に試料の原子番号や密度を反映したものになる。細菌や動物細胞などの生体試料の場合、生体を構成する物質は成分が異なって

^a 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2
2013年8月2日受付

いても、電子線の透過率や反射率に大きな違いがなく、そのままの状態でも十分なコントラストを得ることは容易ではない。そこで、十分なコントラストを得るために、重金属を用いた染色が広く行なわれている¹⁾。例えば、酢酸ウランと酢酸鉛を用いた染色、四酸化オスmiumによる二次固定をかねた染色、あるいは、リンタングステン酸による染色である。近年では、酢酸ウランの代替染色剤として、白金ブルー (TI-blue, 日新 EM) の利用も提案されている¹⁵⁾。しかしながら、これらの染色だけでは十分なコントラストが得られない場合もあった。そこで本研究では、ASEMでの利用を目的として、電子線の反射率が高い金粒子で標識して細菌や動物培養細胞の表面形態を明らかにする手法を開発した。

2. 実験

2.1 ASEMの原理

図1にASEMの構成を示す。SEMは倒立型で、底部に電子銃がある。上方の試料室との間は、試料を保持する薄膜ディッシュでシールされる(図1a, b)。この薄膜ディッシュは直径35 mmで、中心にSiN薄膜窓(100 nm厚)を持つ4 mm角のSiチップが埋め込んである(図1c)⁸⁾。このSiN薄膜は、電子線を透過するが1気圧の圧力差に耐える。SiN薄膜の下側は真空であり、下方から薄膜を通して溶液中の試料に電子線を照射する。試料からの反射電子は、再び薄膜を透過して真空側に設置した反射電子検出器で検出される(図1c)。そのため、従来の二次電子検出を用いたSEM像とは異なり、TEMに近い画像が得られる。また、薄膜ディッシュ

の上部には光学顕微鏡(蛍光顕微鏡)がSEMと同軸上に配置される。試料はx-yステージで移動できるため、試料の同じ部位を光顕とSEMで観察できる。このような光顕とSEMで同一視野を観察する相関顕微鏡法(Correlative Light Electron Microscopy: CLEM)は、マルチスケールの現象をとらえるための有力な手法であり、近年生物分野における強力な研究ツールとなっている^{16~18)}。このASEMとOMを組み合わせたシステムを、ClairScope™(JASM-6200, 日本電子)と呼んでいる。

薄膜ディッシュは取り外し可能で、3 mlの培養液を入れてCO₂インキュベーター内で細胞培養ができる。ASEM観察は溶液中で行うため、前処理は化学固定と染色だけである。従来必要であった熟練と時間を必要とする脱水・樹脂包埋・薄切などの過程が不要となる。このため、最短で10分程度の前処理で、SEM観察が可能となる⁸⁾。また、試料が常に水溶液中で保護されるため、抗原性を保つことが容易であり、免疫染色を実施しやすい。特に、蛍光体と金粒子の両方がついた2次抗体を用いることにより、同一試料におけるタンパク質の分布について、蛍光顕微鏡観察とSEMによる高分解能観察の両方が可能である¹⁰⁾。

2.2 細菌観察用の前処理

ここでは、モデル細菌として、大腸菌NBRC 3301とサルモネラ菌NBRC 13245^Tを用いた。これらの細菌を30°Cのルリアーベルターニューブロス培地の中で8時間培養した。その後、これらの細菌を遠沈管に入れて遠心分離(752g, 5分間)させ、上澄み液を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)

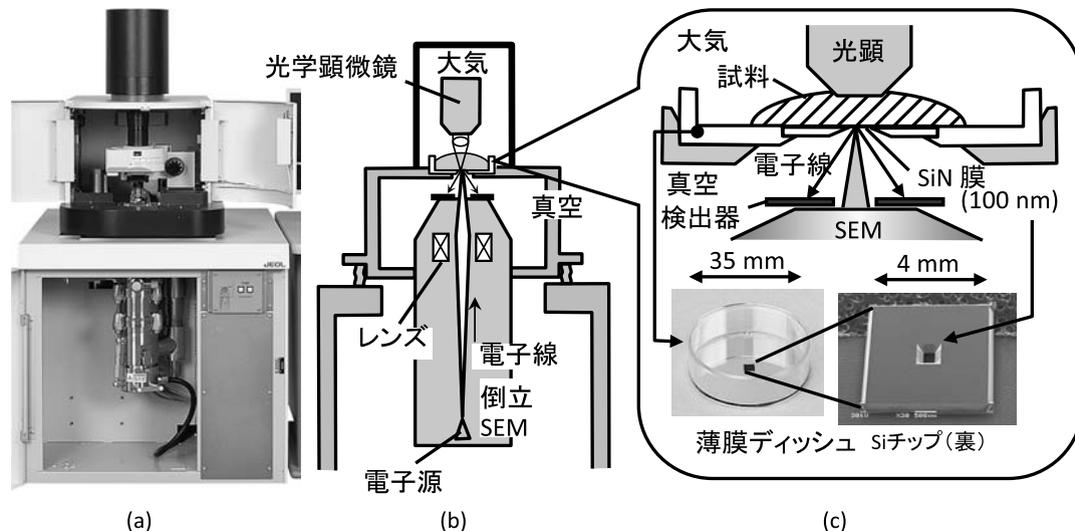


図1 (a) 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) の外観 (JASM-6200, 日本電子)。 (b) ASEM の概念図。倒立 SEM と光学顕微鏡から構成され、その間に試料ホルダーである薄膜ディッシュを設置する。 (c) 薄膜ディッシュ。取り外し可能で直径 35 mm、高さ 13 mm のポリスチレン製である。中心には、4 mm 角の Si チップを組み込んである。さらに Si チップの中心には、100 nm 厚の大気圧に耐える電子線透過 SiN 膜 (250 μm × 250 μm) の窓が加工してある。電子線は倒立 SEM の底部にある電子源から放出され、真空に保持されたディッシュの下方から SiN 薄膜を透過し、さらに大気圧下に保持された液中の試料を走査する。試料からの反射電子を真空側で検出することにより観察を行う。光学顕微鏡は薄膜ディッシュの上方に設置され、通常光または蛍光の像を取得する。光学顕微鏡と倒立 SEM の光軸は機械的に合わせてあり、上と下から同視野を観察する。視野移動は、試料ステージを x-y 平面上で動かすことにより行う。

を入れて攪拌する遠沈洗浄を2回繰り返した。次に、4%パラフォルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒドを含むPBS溶液で10分間固定し、DDW (Double Distilled Water) で2回遠沈洗浄した。ディッシュのSiN薄膜は、予め0.01%ポリ-L-リシン水溶液に15分間浸漬し、DDWで洗浄することで、ポリ-L-リシンコートしてある。このディッシュのSiN薄膜上に、DDWに浮遊させた細菌を滴下し、30-60分間静置して沈降させた。

細菌はC, H, N, O等原子番号の低い元素で構成されているので、反射電子を利用して撮像するASEMでは、像にコントラストが付きにくい。これを補うために、細菌表面が負帯電している性質を利用して正帯電したナノサイズの金粒子を吸着させ¹⁹⁾、さらに金増感により、コントラストを増加させた。細菌表面への金ナノ粒子の吸着は、3 μ Mの正帯電ナノ金粒子(#2022, Nanoprobes)水溶液に室温で20分間浸漬して行った。DDWで2回洗浄した後、10分間金増感(#2113, Nanoprobes)することにより、ASEMで十分観察可能なサイズ(数十nm)にまで金粒子を大きくした。なお、この金増感法では、マニュアルにあるsteps #3と#4の過程(残留したアルデヒド基を不活性にするために、50 mMグリシンを加える)は省略した。DDWで洗浄後、電子線ダメージ防止のために、ラジカルスカベンジャーであるデキストロース水溶液(10 mg/ml)に溶媒を入れ替えてASEM撮像した。

2.3 哺乳類培養細胞観察用の前処理

腎線維芽細胞(COS7: African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line)はディッシュのSiN薄膜上で直接培養した。SiN薄膜の表面は、ガラスポトムディッシュと同様の性質を持ち細胞培養が容易である。恐らく製造過程で酸化されてSiO_xとなっているからであろう。使用した培地は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)/10%ウシ胎児血清(FBS)/100 μ g/mlカナマイシンであり、37°CのCO₂培養器の中で一晩培養した。PBSで洗浄後、1%グルタルアルデヒドを含むPBSで室温30分間の固定を行った。固定後は、0.2%トリトンX-100水溶液中に10分間浸漬して膜透過処理を行った。その後は、細菌の場合と同様に、正帯電金ナノ粒子溶液に浸し、金増感した。ここでも増感時間は10分である。

3. 結果

3.1 細菌

従来のSEMでは試料を乾燥させて真空中で観察することが必要で、その影響で鞭毛が直線状になり易く、自然な形状を保つことが難しかった。その一例として、図2a, bでは、4%パラフォルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒドを含むPBS溶液で10分間固定を行い、DDW洗浄後に自然乾燥させて帯電防止のために白金コートをした後、通常のSEM(JSM-7001F, 日本電子)で観察した。鞭毛は直線状に変形している。

今回我々が開発した方法では、試料は前処理中・観察中を通して常に溶液中に保持される。サルモネラ菌の場合、鞭毛

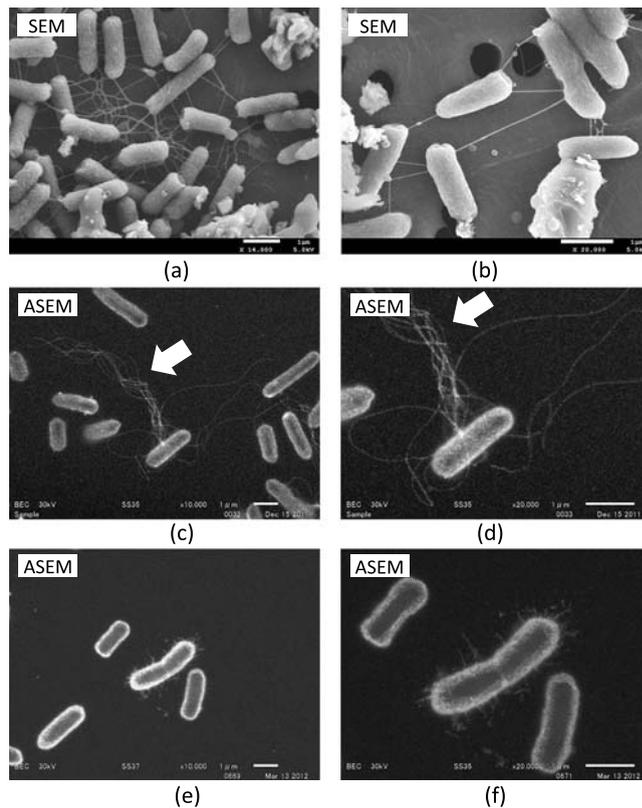


図2 従来型SEM像とASEM像の比較。(a, b)従来型SEM像。サルモネラ菌を4%パラフォルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒドで固定し、DDWで洗浄した。自然乾燥後に、真空の試料室で観察した。乾燥の影響で鞭毛が直線状に変形している。(c-f)ASEM像。(c, d)サルモネラ菌、(e, f)大腸菌を4%パラフォルムアルデヒド/1%グルタルアルデヒドで固定してから、金ナノ粒子で標識した後に金増感を行った。さらにDDWで洗浄した後に10 mg/mlのデキストロース水溶液に浸漬して観察した。鞭毛はらせん形状(矢印, c, d)を保っており、また線毛(e, f)も観察できた。スケールバー: 1 μ m。

は図2c, dの矢印に示すように自然ならせん形状を保つことができた。鞭毛が薄膜から離れた位置にある場合、像は電子線の液中での散乱によってぼやける。そのため鞭毛の形状がある程度立体的にも見える。また、大腸菌の一部には、図2e, fのように線毛²⁰⁾を確認することができた。これらの観察では、金粒子を細菌の表面に吸着させることでコントラストを高めている。そのため、観察に必要な電子線量を従来²¹⁾の半分以下に低減させ、試料への電子線ダメージも減らすことができた。本装置では、電子照射条件としてスポットサイズ20(約10 pA)程度、加速電圧30 kVで撮像している。

3.2 哺乳類培養細胞

COS7細胞をスポットサイズ20-25(10-20 pA)、加速電圧30 kVの電子線照射条件で撮像した(図3a-c)。金粒子は反射電子が十分多く、薄い細胞周辺部においても十分なコントラストが得られ、細胞の輪郭が明瞭に観察できた。比較のために、重金属染色した細胞⁸⁾を図3d, eに示す。ここでは、同様に固定・細胞膜透過処理をした細胞を、10%濃度の白金

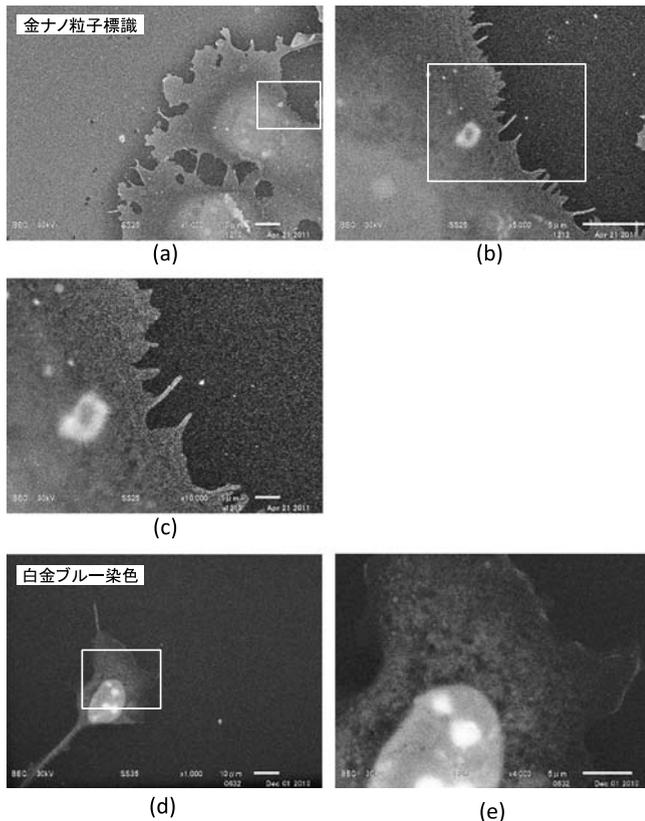


図3 正帯電金ナノ粒子標識と白金ブルーによる染色の比較。(a-c) 正帯電金ナノ粒子標識。COS7細胞を薄膜ディッシュ上で培養し、1%グルタルアルデヒドで固定、0.2%トリトンX-100処理した。金ナノ粒子で標識し、金増感後にDDWで洗浄を行い、10 mg/mlのデキストロース水溶液中でASEM観察した。(d, e) 白金ブルー染色。白金ブルー染色と比較して、金ナノ粒子標識法では細胞周囲の薄い部分でも高いコントラストが得られた。スケールバー：10 μm (a, d), 5 μm (b, e), 1 μm (c)。

ブルー水溶液で染色してある。スポットサイズは36と大きい電流値（金ナノ粒子の撮像条件の約2倍）であるが、細胞端の薄い部分では重金属の吸着量が少なくコントラストは小さい。一方、細胞組織が厚く、重金属の吸着が多い部分（この場合は核）では高コントラストである。

4. 考 察

正帯電金ナノ粒子による標識法を用いて、サルモネラ菌の鞭毛、大腸菌の線毛を液中で観察することができた。鞭毛は細菌が宿主の腸壁へ効率的にたどり着くために重要で、線毛は腸壁への付着に働き、感染効率を上げる。線毛と鞭毛は、細菌がバイオフィームを形成するときにも極めて重要な役割を果たす。細菌は、鞭毛や線毛を介して、体内に留置されたペースメーカーやカテーテルの表面に付着し、増殖しながら細胞外マトリックス（多糖類、タンパク質、DNA）を放出し、バイオフィームと呼ばれる凹凸のある複雑な3次元構造を形成する。バイオフィームは、外からの物質に対して高度な障壁のような働きを示すため、抗体や抗生物質が極めて働きに

くくなり、難治性感染症を惹起する。さらに、バイオフィームは、中耳炎・気管疾患・歯周炎などの慢性・難治性化に深く関連することが知られている^{22,23)}。一方、腸内で良い働きをすることで知られているビフィズス菌においても、線毛があれば長期間腸内でとどまることができるため、線毛の発達したビフィズス菌の選別により効果的な健康食品の開発に貢献できる²⁴⁾。また、鞭毛や線毛の有無は、細菌の種を判定し分類する指標の一つになる。ASEMを用いれば、多数の細菌試料の中から効率的に鞭毛や線毛の有無を見分けることができるかもしれない。

真核生物の培養細胞は、金ナノ粒子標識法によって、細胞端の形状が明確になった。この方法は、細胞膜の帯電状態を利用するので、原理的にはほぼすべての細胞に応用可能である。細胞の形態変化の観察は、様々な分野（生物の発生過程での器官形成、貪食作用時の遊走運動、ガンの発生等）において重要である。例えば、抗がん剤をがん細胞に添加し、細胞の変化を光顕観察することで抗がん剤の作用を予測しているが²⁵⁾、本方法を用いればさらに高分解能な観察ができるため、新たな知見が得られることが期待される。また、神経細胞は複雑に分岐する樹状突起と軸索をもち、シナプスを形成して興奮情報を伝達する。微小なネットワーク構造を末端まで追うことは神経細胞の情報処理メカニズムを解析するために本質的である。本方法を用いれば、細い突起も末端まで追跡することができるため、複雑なネットワークも明瞭に観察することが期待できる。

本稿で紹介した正帯電金ナノ粒子標識法は、細胞形状を明確にするものであるが、形状を決定づける細胞骨格（主にアクチンフィラメント、中間径フィラメント、微小管）の観察はできていない。一方、蛍光顕微鏡法では、特異的に細胞骨格に蛍光タンパク質を融合・発現させて生細胞観察ができています。これら二つの手法を組み合わせれば、細胞骨格タンパク質の細胞内分布と細胞形状の相関を明確にできると予想される。また、免疫電顕法を組み合わせることも可能である^{10~12)}。さらに、重金属染色による、染め分けを追加することで、特定の細胞構造を強調できる。例えば、酢酸ウランやリンタングステン酸は主に核酸・タンパク質を強調し、四酸化オスミウムは油滴や膜構造を強調する⁸⁾。このように、正帯電金ナノ粒子標識法、蛍光顕微鏡法、重金属による染め分け技術を組み合わせることによって、新たな知見が得られると期待される。

謝 辞

本観察で用いたサルモネラ菌は、名城大学農学部教授芳賀聖一先生にご提供していただきました。薄膜ディッシュの開発では山形県工業技術センターの渡部善幸博士、小林誠也博士、岩松新之輔氏、阿部泰博士、矢作徹氏、日本電子の小入羽祐治氏、ASEM開発では産業技術総合研究所の小椋俊彦博士、日本電子の露木誠氏、北村真一博士、日本電子テクニクスの小川康司氏、小泉充氏、SEMの撮像では高木孝士博士

に御協力していただきました。皆様方に感謝いたします。本研究は新学術領域「構造細胞生物学」・科研費・CREST（文科省）、産総研と日本電子によるマッチングファンドによる支援を受けました。

文 献

- 1) Deerinck, T.J., Martone, M. and Ellisman, M.H.: in Spector, D.L. and Goldman, R.D. (Eds.), *Preparative Methods for Transmission Electron Microscopy*, in *Basic Methods in Microscopy*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 307–342 (2006)
- 2) Abrams, I.M. and McBain, J.W.: *J. Appl. Phys.*, **15**, 607–609 (1944)
- 3) Fukami, A., Fukushima, K. and Kohyama, N.: in Bennett, R.H., Bryant, W.R., and Hulbert, M.H. (Eds.), *Observation Technique for Wet Clay Minerals Using Film-Sealed Environmental Cell Equipment Attached to High-Resolution Electron Microscope*, in *Microstructure of Fine-Grained Sediments: from Mud to Shale*, Springer, Heidelberg, 321–332 (1990)
- 4) Gai, P.L.: *Microsc. Microanal.*, **8**, 21–28 (2002)
- 5) de Jonge, N., Peckys, D.B., Kremers, G.J. and Piston, D.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2159–2164 (2009)
- 6) Thiberge, S., Zik, O. and Moses, E.: *Rev. Sci. Instrum.*, **75**, 2280–2289 (2004)
- 7) Thiberge, S., Nechushtan, A., Sprinzak, D., Gileadi, O., Behar, V., Zik, O., Chowers, Y., Michaeli, S., Schlessinger, J. and Moses, E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 3346–3351 (2004)
- 8) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **169**, 438–449 (2010)
- 9) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Senda, M., Numaga-Tomita, T., Senda, T., Suga, M. and Sato, C.: *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 10553–10567 (2012)
- 10) Maruyama, Y., Ebihara, T., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **180**, 259–270 (2012)
- 11) Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 1999–2007 (2010)
- 12) Sato, C., Manaka, S., Nakane, D., Nishiyama, H., Suga, M., Nishizaka, T., Miyata, M. and Maruyama, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 1213–1218 (2012)
- 13) Sato, S., Takaki, T., Nishiyama, H. and Omi, T.: *J. Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, **3**, 121–123 (2013)
- 14) Suga, M., Nishiyama, H., Konyuba, Y., Iwamatsu, S., Watanabe, Y., Yoshiura, C., Ueda, T. and Sato, C.: *Ultramicroscopy*, **111**, 1650–1658 (2011)
- 15) Inaga, S., Katsumoto, T., Tanaka, K., Kameie, T., Nakane, H. and Naguro, T.: *Arch. Histol. Cytol.*, **70**, 43–49 (2007)
- 16) Gaietta, G.M., Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Smith, W.B., Ngan, L., Llopis, J., Adams, S.R., Tsien, R.Y. and Ellisman, M.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 17777–17782 (2006)
- 17) Sartori, A., Gatz, R., Beck, F., Rigort, A., Baumeister, W. and Plitzko, J.M.: *J. Struct. Biol.*, **160**, 135–145 (2007)
- 18) Jahn, K.A., Barton, D.A., Kobayashi, K., Ratnac, K.R., Overall, R.L. and Braet, F.: *Micron*, **43**, 565–582 (2011)
- 19) Kaehr, B. and Brinker, C.J.: *Chem. Commun.*, **46**, 5268–5270 (2010)
- 20) Brinton, C.C., Jr., Gemski, P., Jr. and Carnahan, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **52**, 776–783 (1964)
- 21) Teramoto, K.: *JEOL News*, **45**, 38–41 (2010)
- 22) Harris, S.L., Elliott, D.A., Blake, M.C., Must, L.M., Messenger, M. and Orndorff, P.E.: *J. Bacteriol.*, **172**, 6411–6418 (1990)
- 23) 水之江義充：小児内科，**44**，1198–1202 (2012)
- 24) Turrone, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O’Connell Motherway, M., Taverniti, V., Mangifesta, M., Milani, C., Viappiani, A., Roversi, T., Sanchez, B., Santoni, A., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Delledonne, M., Margolles, A., Piazza, L., Palanza, P., Bolchi, A., Guglielmetti, S., van Sinderen, D. and Ventura, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110**, 11151–11156 (2013)
- 25) Futamura, Y., Kawatani, M., Kazami, S., Tanaka, K., Muroi, M., Shimizu, T., Tomita, K., Watanabe, N. and Osada, H.: *Chem. Biol.*, **19**, 1620–1630 (2012)