

ナノスーツを用いた生きた生物試料の FE-SEM 観察

Observation of Living and Moving Organisms in a FE-SEM: A Successful Surface Shield “Nano-Suit” to Protect Animals in High Vacuum

高久 康春^{a, g}, 鈴木 浩司^b, 太田 勲^c,
石井 大佑^{d, e, g}, 村中 祥悟^c, 下村 政嗣^{e, f, g},
針山 孝彦^{a, g}

Yasuharu Takaku, Hiroshi Suzuki, Isao Ohta, Daisuke Ishii,
Yoshinori Muranaka, Masatsugu Shimomura
and Takahiko Hariyama

^a 浜松医科大学・生物学

^b 浜松医科大学・化学

^c 浜松医科大学・超微細形態共同利用機器室

^d 名古屋工業大学

^e World Premier International-Advanced Institute
for Materials Research

^f Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials,
東北大学

^g CREST, 独立行政法人 科学技術振興機構

要 旨 生物の微細構造の観察／解析には、走査型電子顕微鏡が有効な機器として用いられて来たが、生きたままの試料を高倍率・高分解能観察することは不可能と考えられていた。著者らは、生物が生来もつ粘性物質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の放出を抑制する効果を生みだし、FE-SEMへ適用できることを発見した。本稿では、当手法発見に至った経緯と現状について紹介する。

キーワード：ナノスーツ、電界放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM）、生きたままの電子顕微鏡観察

1. はじめに

生物表面の微細構造の観察／解析には、走査型電子顕微鏡が有効な機器として用いられて来た。しかし、高倍率・高分解能で表面微細構造を観察できる電界放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM）では、試料を高真空環境（ $10^{-5} \sim 10^{-7}$ Pa）に曝さなければならず、生物が含む水分やガスなどが奪われて

微細構造がたやすく変形してしまう。そのため、生物試料に様々な化学的前処理を施した後に予備乾燥したり、あるいは真空度を 10^{-2} Pa 程度に下げた低真空 SEM を用いるなどの機器側の開発が行われてきたが、前者は微細構造が崩れ、後者は解像度が下がってしまうなどの問題が生じた。このような背景から、生物という濡れた試料を高倍率・高分解能観察することは困難で、ましてや生きたままの生物の観察は不可能だと考えられてきた。著者らは、その固定概念を払拭し、生物がもつ真空耐性を増強する技術を検討した結果、虫（ショウジョウバエなど）の幼虫が体表にもつ粘性物質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の放出を抑制する表面保護効果を生み出すことを見だし、生きたままの FE-SEM 観察に適用することに成功した¹⁾。

2. ナノスーツの発見

著者らはまず、さまざまな生物を FE-SEM でそのまま観察した（SEM を壊してしまう恐れがあるので、十分な技術的管理が必要！）。その結果、ほとんどの生物は高真空環境に曝されることで死に至り、その表面構造は体積収縮により変形していた。しかし、粘性をもつ細胞外物質（ECS）を個体の最外層にもつ一部の生物（ショウジョウバエなどの幼虫）は、電子顕微鏡の中で1時間経っても活発に動き、体積収縮の無い極微細構造を観察することができた（図1）。さらに、観察を終えた生物を電子顕微鏡から取り出して飼育を続けると成虫になった。

ところが、同じ FE-SEM 内で、電子線照射なしで1時間放置した後に電子顕微鏡観察すると、ショウジョウバエの幼虫は体積収縮により変形し、取り出してみると死亡していた。

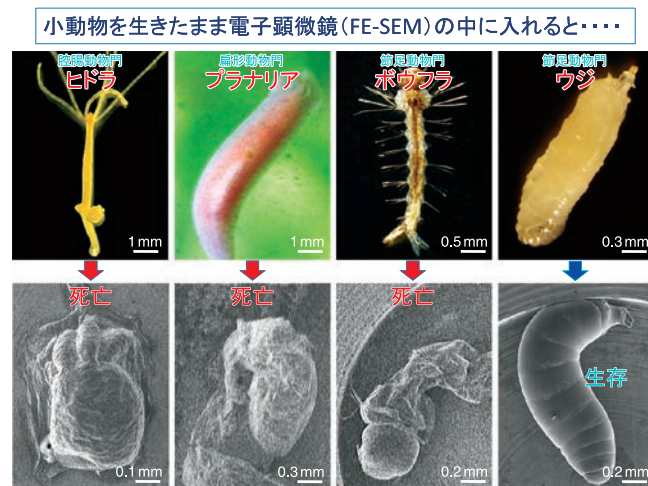


図1 従来の試料作製法を一切行わず、生きたまま（濡れたまま）電子顕微鏡に入れた生物の状態。現状、FE-SEMのチャンパーに入る試料の大きさには限界があるため、体の小さな生物を化学固定・脱水・乾燥作業などをせずに観察した。ショウジョウバエの幼虫など体表に粘性の高い液性物質を豊富に分泌している生物のみ生存可能であった。

〒431-3192 浜松市東区半田山1-20-1
TEL: 053-435-2351
2013年12月5日受付

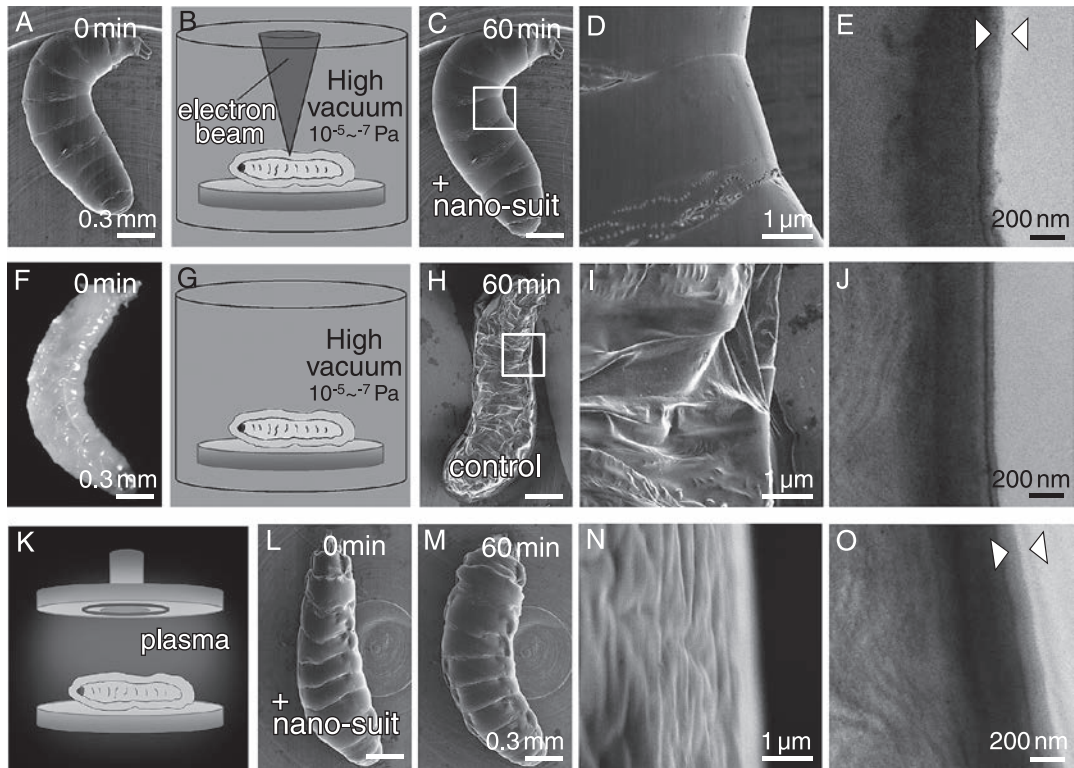


図2 従来の試料作成法を一切行わず、生きたまま電子顕微鏡に入れたショウジョウバエの幼虫。電子線を照射すると体表に薄膜(ナノスーツ)が形成され生存可能となるが(A-E)、照射をしないと死んでしまう(F-I)。このとき薄膜は見られない(J)。同様のナノ薄膜は、プラズマ照射によっても形成される(K-O)。

これらの結果から、ECSと電子線照射との相互作用に、高真空下で生命を維持する重要なポイントがあることが示唆された(図2A-D, F-I)。

生命維持されている幼虫表面の構造的な特徴を見つけるため、FE-SEM観察前後の体表最外層の超薄切断面を作製し透過型電子顕微鏡(TEM)で観察すると、電子線照射後の幼虫には50~100nmの薄膜が形成されていた(図2E)。しかし、電子線照射なしで1時間放置した個体の超薄切断面には、最外層の薄膜は観察されなかった(図2J)。この結果から、FE-SEM観察時の電子線照射により、幼虫の最外層にナノスケールの薄膜が形成され、それが高真空下での気体や液体の放出を抑制している可能性が強く示唆された。おそらくこの薄膜形成は、電子線のエネルギー照射による重合(電子線重合)からもたらされるものだろうと考え、電子線重合と同じような高エネルギー状態を作り出し物質の重合を行うことができるプラズマを、電子顕微鏡観察の前に照射して同様の実験操作を行った。その結果、電子線照射の場合と同じ効果が得られ、電子線重合でもプラズマ重合でも生命を維持薄膜の形成を行うことができることがわかった(図2K-O)。つまり、幼虫の最外層にあるECSに、電子線またはプラズマ照射するという簡便な操作で体内の物質の放出を抑制できるナノ薄膜を形成し、高真空下でのFE-SEM観察を実現できた。著者らは、全身を覆って生物を保護するこの革新的な薄膜構造を「ナノスーツ」と名付けた。

3. 電子顕微鏡観察のためのナノスーツ法の確立

次に、ECSをもたない生物に対して同等の機能の発現を試みた。例えばボウフラは、体表にECSが潤沢に分泌され

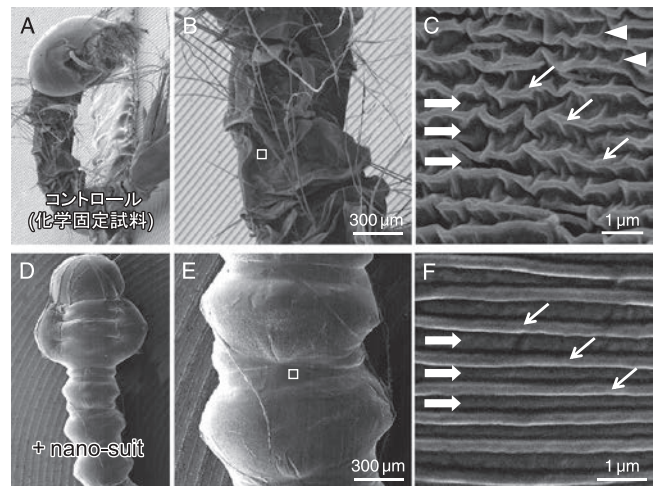


図3 従来の試料作製法とナノスーツ法による体表微細構造の比較。化学固定・乾燥処理等を加えた個体では微細構造が壊れている(A-C)。ナノスーツで保護されていた「生きた生物」の微細構造にはダメージが見られず、電子顕微鏡内の高真空環境下でも、生体本来の姿を高解像度/高分解能で維持できていることを表している(D-F)。

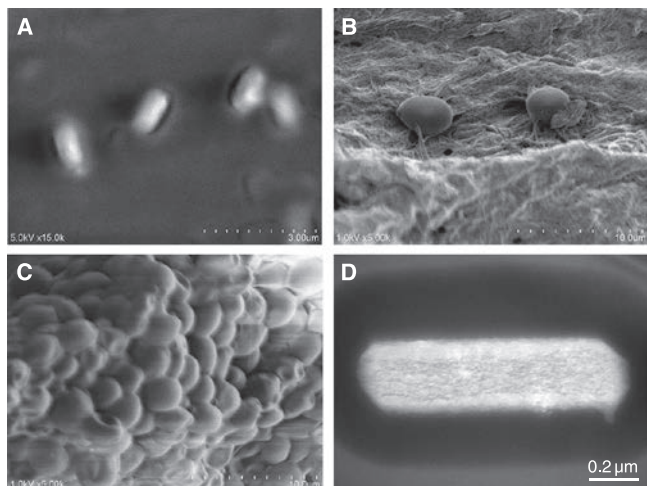


図4 ナノスーツで保護し、生きたまま観察した単一細胞の電子顕微鏡写真。納豆菌 (A)、ナタデココ菌 (B)、酵母 (C) の LiveSEM 像、および乳酸菌の LiveTEM 像 (D)。

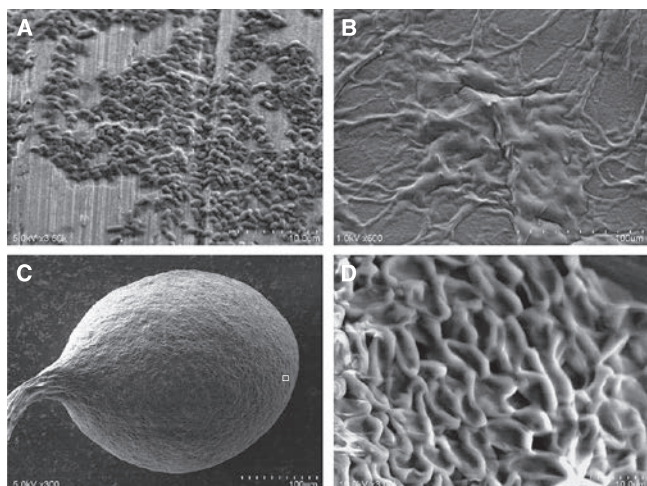


図5 ナノスーツで保護し、生きたまま観察したキイロタマホリカビ：ライフサイクル各ステージの LiveSEM 像。孢子とエサの大腸菌 (A)、アメーバ状に変化した細胞 (B)、アメーバが集合し形成された子実体 (C)、子実体内・孢子の強拡大像 (D)。

ていないため、直接 FE-SEM 観察すると収縮による変形が起こって死んでしまう。著者らは、ショウジョウバエ幼虫の ECS の成分分析を行い、類似した化学官能基をもつ溶剤の中から、生体適合性という観点から、食品添加物にも指定されている界面活性剤 (Tween20) を ECS 疑似物質として選択した。Tween20 が ECS の代替と成りうるのか？結果は、ボウフラ個体に Tween20 をごく薄く塗布し FE-SEM で観察すると、高真空下でも活動し、収縮がなく微細構造を観察できた。観察後、ボウフラ体表の TEM 観察を行うと、Tween20 で被覆した試料にはショウジョウバエの幼虫と同様に、最外層に 50 ~ 100 nm の薄膜が形成されていた。さらに強拡大により表面構造を調べると、微細構造は従来の化学固定法による像とは大きく異なっていた (図3)。このよう

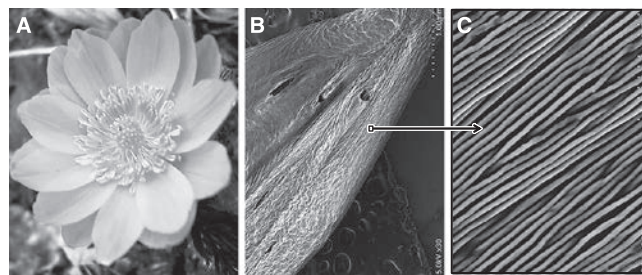


図6 ナノスーツで保護し生きたまま観察した福寿草の花弁 (LiveSEM 像)。

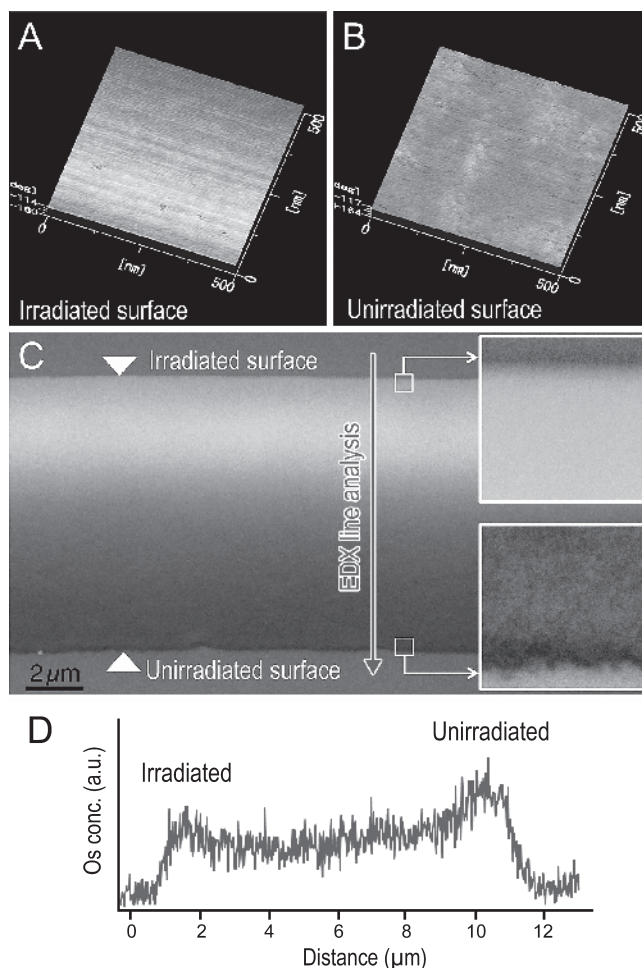


図7 プラズマ重合により形成された Tween20 ナノスーツの形態学的解析。プラズマ照射面 (A) と非照射面 (B) の原子間力顕微鏡像。断面の TEM 像 (C) と EDX 解析によるオスミウム濃度測定 (D)。オスミウムは重合度が低いドメインにより強く結合する特性がある。照射面から非照射面にかけての濃度勾配は、照射面側が重合度が高く非照射面にかけて低くなっていることを示す。

な結果から、Tween20 でも、ショウジョウバエの幼虫と同様に電子線またはプラズマ照射により、物質の放出を抑制できるナノスーツが形成され、FE-SEM 観察により生きた状態の微細構造を観察できることがわかった¹⁾。

表 1 様々なモノマーを構成コンポーネントとして利用したナノスーツ作製例. PEO 鎖をもつ前駆物質 (1–9), 多重親水基を持つもの (10–28), 単親水基 (29–34), 二重結合 (35–41), イオン液体 (42–46).

Sample	Monomer	Polymerization site	Solvent	State*
1	Tween 20** a)	PEO chain	Water	◎
2	Tween 40 a)	PEO chain	Water	◎
3	Tween 60 b)	PEO chain	Water	◎
4	Tween 80 a)	PEO chain	Water	◎
5	Brij 35** a)	PEO chain	Water	◎
6	Triton X-100** c)	PEO chain	Water	◎
7	Poly(ethylene oxide) c)	PEO chain	Water	◎
8	Pluronic F-127** c)	PEO chain	Water	◎
9	Pluronic F-68 c)	PEO chain	Water	◎
10	Lecithin (from soy bean) d)	Multiple OH	Ethanol	◎
11	Tannic acid c)	Multiple OH	Ethanol	◎
12	Tetrahydroxysilane b)	Multiple OH	Ethanol	◎
13	Span 20 b)	Multiple OH	Ethanol	◎
14	D-Maltose b)	Multiple OH	Water	◎
15	Trehalose C12 c)	Multiple OH	Water	◎
16	D-Glucose a)	Multiple OH	Water	◎
17	n-Dodecyl-β-D-maltoside ** c)	Multiple OH	Water	◎
18	MEGA-8** c)	Multiple OH	Water	○
19	CHAPS** c)	Multiple OH	Water	○
20	D-Trehalose b)	Multiple OH	Water	○
21	Sodium cholate** c)	Multiple OH	Water	○
22	n-Octyl-β-D-glucoside** c)	Multiple OH	Water	○
23	Inulin b)	Multiple OH	Water	△
24	Pullulan b)	Multiple OH	Water	△
25	D-Sorbitol b)	Multiple OH	Water	△
26	L-Tyrosine a)	Multiple OH	Water	△
27	L-Glutamic acid a)	Multiple OH	Water	△
28	L-Aspartic acid a)	Multiple OH	Water	△
29	Lauric acid b)	Single OH	Ethanol	○
30	Stearic acid n-dodecyl ester b)	Single OH	Ethanol	○
31	Docosanoic acid b)	Single OH	Ethanol	○
32	L-Proline a)	Single OH	Water	△
33	L- Lysine a)	Single OH	Water	△
34	L-Histidine a)	Single OH	Water	△
35	Linolenic acid b)	OH & C=C double bond	Ethanol	◎
36	Linoleic acid b)	OH & C=C double bond	Ethanol	◎
37	Oleic acid b)	OH & C=C double bond	Ethanol	◎
38	Erucic acid b)	OH & C=C double bond	Ethanol	◎
39	Methacrylcholine chloride b)	OH & C=C double bond	Ethanol	◎
40	L-Glutamine a)	OH & C=O double bond	Water	○
41	L-Arginine a)	OH & C=N double bond	Water	○
42	1,3-Diallylimidazolium bromide d)	C=C double bond	Ethanol	◎
43	1,3-Diallylimidazolium tetrafluoroborate d)	C=C double bond	Ethanol	◎
44	1,3-Diallylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide d)	C=C double bond	Ethanol	◎
45	1-Butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate d)	C=C double bond	Ethanol	○
46	1-Butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethanesulfonyl)imide b)	C=C double bond	Ethanol	○

* ◎: Large, thick, stable film ○: Small, thin, stable film, △: Unstable film ** SEM observation of living organisms

a) Wako Pure Chemical Co., b) Tokyo Kasei Kogyo Co., c) Sigma-Aldrich Japan Co., d) Kanto Chemical Co., e) Dojindo Co.

4. ナノスーツ法による様々な生物の観察

すでに我々は、五界説に属するいずれの生物もナノスーツ法で観察することに成功している。例外は、ナノ薄膜形成に至るまでの短時間の低真空状態に耐えられないものであるが、現在それらに対する有効な方法も検討中である。ここに、様々な単一細胞のLive走査型電子顕微鏡像を示す(図4A-C)。なお、同様の手法を用いることにより、一部の生物を生きた状態のまま透過型電子顕微鏡によって観察することにも成功している(図4D)。生きたまま観察したキイロタマホコリカビの各ステージ(図5)、植物のLiveSEM像(図6)を併せて紹介する。ナノスーツで保護していない細胞や組織は乾燥・変形により微細構造が壊れ、且つ電氣的なノイズ(チャージアップ)が生じてしまうため極短時間のうちに観察不能になる。また一部の植物は、従来法で試料作成を行うと脱水・乾燥過程において繊細な構造が容易に壊れてしまうため、これまでは電子顕微鏡観察自体、不可能とされていたが、ナノスーツ法で簡便に観察できるようになった。本技術はこのような課題を一気に克服する。

5. 万能ナノスーツ/コンポーネントの探索

プラズマ照射により生物体表に形成されるTween20-ナノ薄膜を詳細に解析すると、プラズマ照射面から非照射面にかけて構造の勾配が見られた(図7)。すなわち、照射面(表面側)はフラットで密、反対側は、凸凹で緩やかな構造を示していた。これは従来のプラズマ重合法のセオリーと合致しているものであるが、本ナノスーツ法においては、極めて有効に機能している可能性が高い。高真空に対し、個体を守る最外郭部位はタイトであり、体表側は優しくルーズに生物を包んでいることになる。FE-SEM観察時、激しく動く生物の様子を直視すると、ナノスーツの機能性を実感する。

また、本稿ではECSを模倣した物質としてTween20を報告したが、すでに多様な有機分子を用いてナノスーツが形成可能であることを確認している²⁾(表1)。これまでTween20などの界面活性剤は、細胞膜を可溶化するため生体に対して“毒”と考えられてきたが、本技術のように低濃度で処理しすぐに成膜化すれば、生体を保護するナノスーツとして機能する。また、SEM観察で用いる1kV~5kVの電子線はこのようなナノ薄膜を透過するので、ナノスーツ表面ではなく薄膜下に保護された微細構造を直接可視化できる。現在、これら多様な有機分子の単体、あるいは組合せ、または導電性物質などを付与することで、すべての生物の個体・器官・組織・細胞などを高真空環境下でさらに長時間保護/維持可能な「ナノスーツ」の開発を目指している。

6. まとめ

「ナノスーツ」を用いれば、これまでの「生きた状態に類似した死んだ生物の微細構造」ではなく、「生きた状態のままさまざまな生物試料の微細構造」を動的観察できるようになる。本手法を用いた多様な生物の生きた状態での微小領域での高分解能電子顕微鏡観察により、数多くの機能や微細構造を解明できれば、生物学、農学や医学などの生命科学分野での発展のみならず、近年世界的に注目されているバイオミメティクス(生物模倣技術)をはじめとする「ものづくり」の分野への著しい発展にも大きく貢献出来ると考えている。

文 献

- 1) Takaku, Y., Suzuki, H., Ohta, I., Ishii, D., Muranaka, Y., Shimomura, M. and Hariyama, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(19), 7631-7635 (2013)
- 2) Suzuki, H., Takaku, Y., Ohta, I., Ishii, D., Muranaka, Y., Shimomura, M. and Hariyama, T.: *PLOS ONE*, 8(11), e78563 (2013)