

ナノスーツ法による生きたままの生物の SEM 内生態観察

針山孝彦¹・高久康春¹・鈴木浩司¹・石井大佑²・下村政嗣³¹浜松医科大学 ☎ 431-3192 静岡県浜松市東区半田山 1 丁目 20-1²名古屋工業大学 ☎ 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町³千歳科学技術大学 ☎ 066-8655 北海道千歳市美々 758-65

(2014 年 12 月 18 日受付; 2015 年 3 月 2 日掲載決定)

A Thin Polymer Membrane, the NanoSuit[®], for the Observation of Living and Wet Organisms in High-Vacuum Scanning Electron MicroscopeTakahiko HARIYAMA¹, Yasuharu TAKAKU¹, Hiroshi SUZUKI¹, Daisuke ISHII² and Masatsugu SHIMOMURA³¹Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu, Shizuoka 431-3192²Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8555³Chitose Institute of Science and Technology, 758-65 Bibi, Chitose, Hokkaido 066-8655

(Received December 18, 2014; Accepted March 2, 2015)

Scanning electron microscopy (SEM) has become an essential tool for observing the biological materials, however, various complex procedures preclude observation of living organisms to date. Here we present a new method to observe living organisms by a SEM. We observed the active movements of animals *in vacuo* (10^{-5} – 10^{-7} Pa) by coating them with a thin polymer membrane, NanoSuit[®], made by polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate and found that the surface fine structure of the living organism is very different from that of traditionally fixed samples. After observation of the larvae of mosquitos, despite the high vacuum, we could rear them in normal culture conditions. We also found that the NanoSuit[®] and self-standing biocompatible films were able to produce by plasma polymerization from various monomer solutions. Our method will be useful for numerous applications, particularly in the electron microscopic observation of life sciences.

KEYWORDS : NanoSuit[®], plasma polymerization, biomimetic thin-film, animal behavior, living organism

1. は じ め に

17 世紀の初め, ヨーロッパ各地で光学顕微鏡が使用されるようになり, 生命科学の分野では, すべての生物は細胞から成っているという「細胞説」と呼ばれるパラダイムシフトを導いた。ただ, 光学顕微鏡は可視光を用いているために, 通常は 1 μm 程度までの観察にとどまる。この光学顕微鏡の分解能の限界を越えるために, 光の代わりに電子線を用いた電子顕微鏡の開発が 20 世紀の中頃に着手され, 多くの研究分野で使用されるようになった。生命科学の分野では細胞小器官やウイルスが発見され, 生命の理解を格段に広げるパラダイムシフトを

迎えることになった。

電子線が空気中を通過できないために, 高分解能な電子顕微鏡になればなるほど電子線が透過できる高真空環境状態が不可欠である。生物を高真空に曝すと, 体内のガスや液体が奪われ体積が収縮し, 体型だけでなく微細構造も大きく変形する。そのため, 可能な限り生きた状態に近い微細構造を維持しようと数々の手法が編み出されてきた。できるだけ生きている姿に近い, 死んだサンプルを観察する方法である。一方で, できるだけ生の試料を観察したいという欲求のもと, 走査型電子顕微鏡では, ガスや液体の離脱を押さえるために低真空下での電子顕微鏡観察装置 (低真空 SEM) や, 試料周辺だけの真空度を落とす電子顕微鏡観察装置 (環境 SEM) が開発されたが, 真空度の低下により微細構造の細部まで観

察することは難しい。生きたままの生物の微細構造を観察できたら、生命科学の研究に貢献できることは明らかだがそのハードルは高かった。

2. 生きたままの生物を高真空中に曝す

2.1 そのまま生物を電子顕微鏡で見たい

1960年代に、生きた昆虫(コクヌストモドキ)をそのまま観察したという報告¹⁾がある。当時の電子顕微鏡は、 10^{-2} Pa程度だったが、我々は真空度 $10^{-5}\sim 10^{-7}$ Paの電界放射型走査電子顕微鏡(FE-SEM)を用い高分解能の観察ができることを目指して、様々な生物を網羅的にFE-SEM下でそのまま観察した。当たり前のようにほとんどすべての生物は真空環境におかれると、脱気・脱水され押しつぶされたような姿になり生命は奪われた。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(ショウジョウバエをはじめとする双翅目昆虫の幼虫など)では、体積収縮のない微細構造表面を観察できるだけでなく、FE-SEMの中で活発に動いていることを発見した。

2.2 ショウジョウバエの幼虫とナノスーツ形成

ショウジョウバエの幼虫を電子顕微鏡内に直接入れて観察(Fig. 1 A)すると、0分後(Fig. 1 B)から1時間過ぎてもその形態は変化しないことを見つけた(Fig. 1 C)。一方で、Fig. 1 Eのように電子線による観察をすぐにはしない、つまり、Fig. 1 Aで生命維持されていた同じFE-SEMの中で、電子線照射をしないで高真空中にだけ曝すと、実体顕微鏡下で健常な幼虫(Fig. 1 F)が、1

時間後に電子線照射して観察すると、脱水されて平らに変形していた(Fig. 1 G)。この結果は、生物が電子線に暴露されることが高真空の環境下で生命維持するために必要であることを暗示したのである。

このウジの最外層を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察すると、電子線暴露していないものでは観察されない層(Fig. 1 H)が、電子線暴露したものでは新たに加わる(Fig. 1 D 三角矢頭の間)ことがわかった。丹念に観察すると、体中をすっぽりと覆っていた。つまり、ECSが、電子線重合によって極薄い薄膜の服素材となり全身を覆っていたのだ。そして、その観察した幼虫を電子顕微鏡から取りだして飼育を続けると外見的にはまったく正常な成虫になった。我々は、その極薄い薄膜で生命維持するものをナノスーツと名付けた。

ECSをもつ生物だけが生き残ることができたということは、粘液であるECSが個体内の脱気・脱水を防ぐはたらきがあるということなのだろうか。どのような粘性物質であっても、生物が内側にガスを抱える以上そのような機能をもつことは難しい。TEMでは固定・脱水・包埋という化学的处理を行う。それらの処理にもかかわらずFig. 1 Dのようにナノスーツが残り観察できるということは、粘液がしっかりと化学結合を形成しているということなのだろう。電子線重合という現象を思い出した。ECSが電子線による電子顕微鏡観察によって電子線重合を起こしているのではないか。電子顕微鏡が観察のために放った高エネルギーの電子線がECSの重合促進をし、それが生命維持している可能性が考えられた。そこで、電子線照射と同じように高分子重合を促進することが知られているプラズマを用いて生命維持をするか否かを検討した。FE-SEM観察前にショウジョウバエの幼虫にプラズマを照射して観察を行うと電子線照射の場合と同じようにFE-SEM内で動いている様子が観察され、またプラズマ照射した個体を電子線を用いた観察を行わず同じ高真空中下のFE-SEMの試料室内に30分ほど曝した後に観察すると形態が維持され生きていた。TEM観察したところ、プラズマ処理個体の表面にも薄膜が形成されていた。以上の結果から、幼虫の最外層にある粘性の高いECSに電子線またはプラズマ照射をすると、生物体内のガスや液体などの物質の放出を抑制できるナノサイズの薄膜が形成され、高真空中でのFE-SEM観察が実現できることが強く示唆された。

2.3 すべての昆虫を観察可能に一界面活性剤の利用

双翅目幼虫などを除いて、観察したほとんどの生物はSEM内では生命維持させることはできず、数分間以内に大きく変形してしまった。ショウジョウバエ幼虫のECSに変わる溶液を加えることで、ナノスーツ作製が

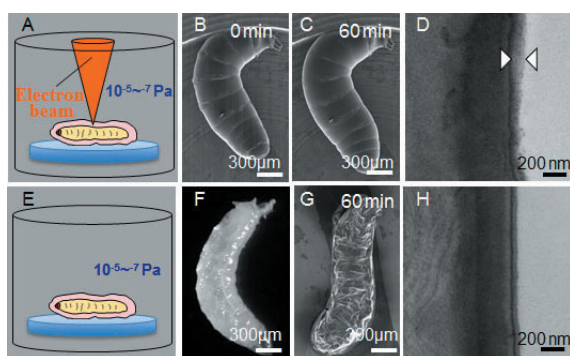


Fig. 1. (color online). (A-C) A living *Drosophila* larva was exposed in high vacuo for 60 min. (E-G) Before SEM observation, a different larva (light micrograph in F) was introduced into the observation chamber without electron-beam irradiation. It was collapsed thoroughly when observed by SEM subsequently (G). TEM images of vertical sections through the surface of each animal are shown in D and H. The layer between the arrowheads in D shows the newly formed outer membrane, not present in H.

できないだろうか。ECSを模倣した物質として電子線・プラズマ重合による成膜でき、かつ生体適合性物質として食品添加物にも指定されている Polysorbate 20 (Tween 20) を選択した。ボウフラを直接 FE-SEM 観察すると、体の収縮による変形が起こり数分の間に扁平になる (Fig. 2 A) が、1% Tween 20 水溶液をごく薄く塗布し濾紙などの上に置いて余分な溶液をできる限り除いた後、プラズマ処理をしてから FE-SEM 観察すると、高真空中でも体積収縮がなく (Fig. 2 B) 生きたまま微細構造を観察できる。また、ボウフラは微細構造観察時にも活発に活動しており (Fig. 2 C)、観察後に飼育水に戻すと、一週間ほどで蚊に成長した (Fig. 3)。ボウフラの断

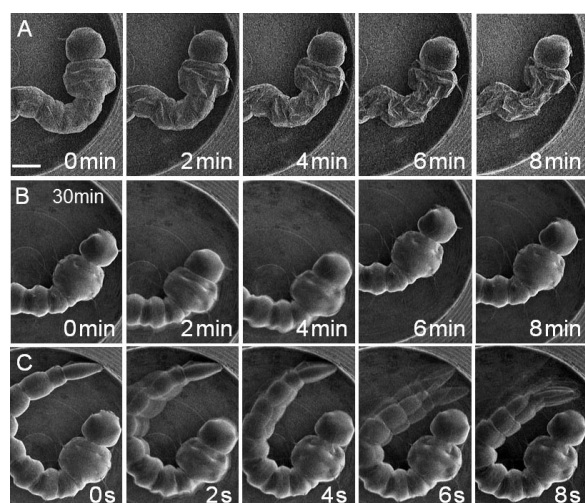


Fig. 2. A living larval mosquito *Aedes albopictus* was exposed in high *vacuo* and was collapsed completely within 8 min (A). Before SEM observation, a different larva was protected by plasma-irradiated Tween 20 (B) and introduced into the chamber. It moved in high *vacuo*. The blur around the tail showed a rapid movement (C).



Fig. 3. (color online). The adult mosquito which was observed in a FE-SEM when it was a larval stage.

面の TEM 観察を行うと、ナノスーツで被覆した試料からはショウジョウバエの幼虫の ECS の場合と同様に、最外層に 50~100 nm の薄膜が形成されていた。バイオミメティクス的発想による幼虫の ECS を規範とした Tween 20 でもナノスーツを形成させることができ、FE-SEM 観察により生きた状態の微細構造を観察できる。バイオミメティクス素材による生命維持に成功し、論文に纏めた^{2,3)}。

2.4 ナノスーツの電子線透過性

化学固定をして乾燥し金属蒸着をする従来法 (Fig. 4 A~C) とナノスーツ法 (Fig. 4 D~F) を SEM と TEM を用いて比較すると多くの違いがあることがわかる。従来法では、生物が死んでいる状態であるだけでなく形態が変化し (Fig. 4 A)、矢印で示した箇所を高倍で観察するとその従来法による微細構造 (Fig. 4 B) がナノスーツ法で観察した同様の箇所 (Fig. 4 E) に比べて乱れていることがわかる。TEM で観察すると、従来法では最

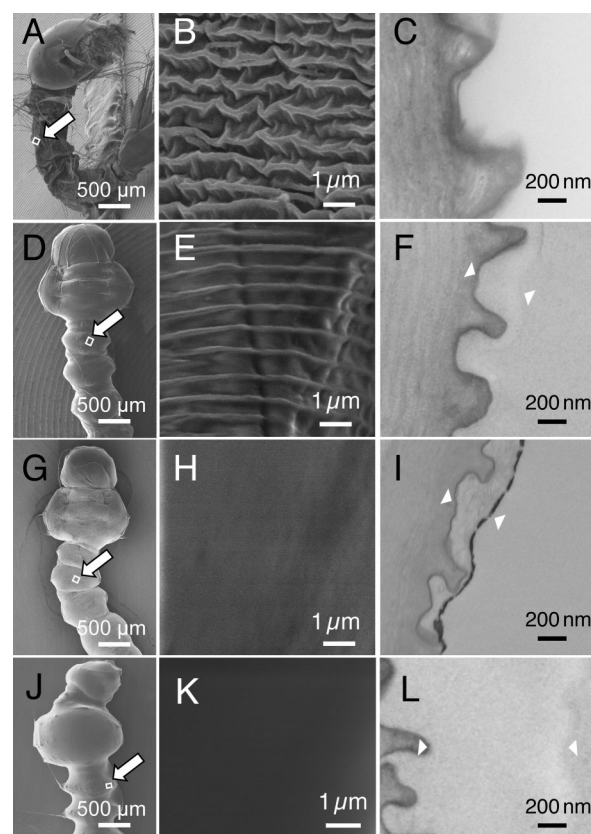


Fig. 4. Comparisons of electron micrographs of traditional treatment (A-C), based on treatments with 1% TW 20 solution (D-F), extra coating with gold (D-F) and 50% TW 20 solution (J-L). SEM images (A, B, D, E, G, H, J, K) and TEM images (C, F, I, L). White squares indicated by arrows in A, D, G, J are shown magnified in B, E, H, K. Layers between the arrowheads indicate the newly formed NanoSuit.

外層に新たな層は観察されない (Fig. 4 C) が、ナノスーツ法では、おそらく Tween 20 が重合したものであろう新たな層を観察することができる (Fig. 4 F)。

しかし、生物表面の外側にナノスーツが覆っている (Fig. 4 F) のに、なぜ生きている状態の超微細構造 (Fig. 4 E) が観察できるのだろうか。ましてや、ナノスーツ形成のとき Tween 20 を 1% 水溶液と薄く希釈したもので微細構造を覆ってナノスーツ形成されてしまう (Fig. 4 F 三角矢頭の間) こともあるのである。超微細構造を観察することができる SEM を扱う場合、覆った溶液が微細構造を反映している保障はない。1% Tween 20 水溶液をボウフラに浸してナノスーツ化させた後に金粒子を蒸着してボウフラ表面を観察すると微細構造は消失し、のっぺりとした面が観察された (Fig. 4 H)。この表面を TEM で観察するとナノスーツが微細構造を覆い、その表面上部に金属粒子が存在していることがわかった (Fig. 4 I, 右矢頭直下の黒い層)。また、Tween 20 の濃度を上げ 50% Tween 20 水溶液を塗布してナノスーツを形成させると Fig. 4 J のように低倍率での観察でものっぺりとした像になり、高倍率にすると微細構造はまったく観察不能になった (Fig. 4 K)。この表面を TEM で観察すると、1 μm ほどの膜が形成されていることがわかった (Fig. 4 L)。適度な厚さで生物表面に装着させたナノスーツは、生物体内のガスと液体成分の放出を防ぎ、かつ実効的に透明であるために超微細構造を観察することが可能である。

ショウジョウバエの幼虫が分泌する ECS や Tween 20 などの分子は軽元素なので密度が低く電子線が透過しやすい。そのことによって、電子顕微鏡内で透明な膜として機能するのだろう。いかに電子線を通しやすいものでも、さすがに粘性が高い 50% Tween 20 水溶液のようなものを塗布すると結果として厚く被ってしまうことになり、全体の姿を低倍で観察することはできても、微細構造は観察できなくなってしまう⁴⁾。

2.5 ナノスーツ開発に基づく自立薄膜作製

生命維持することができるナノスーツは、溶液を高真空に曝し電子線あるいはプラズマを照射することで形成する。この薄膜を独立して作り出すことができれば、多くの工学的応用に資することができる。たとえば、Tween 20 のように水溶液にしたものをガラス表面にスピンコートしプラズマ照射 (Fig. 5 A) する工程により Fig. 5 B のような薄膜を形成させることができる。これを Fig. 5 A 3) のように薄膜を上側にして水にガラス基盤ごとゆっくりと沈めると、Fig. 5 C のように自立膜を単離することができ、この膜を窓の空いたプラスチック基盤の上に掬いだして (Fig. 5 D)、自立薄膜の性質を調

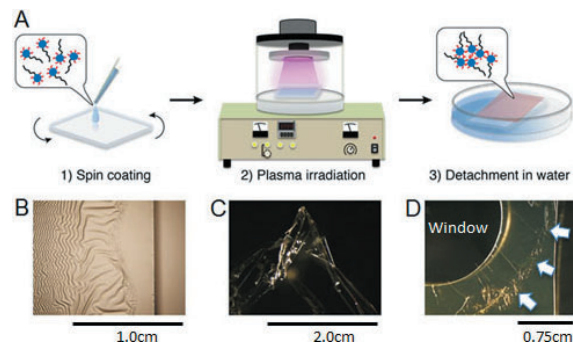


Fig. 5. (color online). Preparation of the free-standing biomimetic ECS film by plasma irradiation. Schematic illustration of the preparation method (A). A water-soluble layer onto a glass substrate becomes a water-insoluble film upon plasma irradiation. Digital photographs of the plasma-treated film (B), the free-standing film removed from glass substrate (C) and the self-standing film on a plastic window after natural drying (D). Arrows indicate the end of the self-standing film.

べることが可能である。

2.6 多様な物質で作製可能なナノスーツ

Tween 20 の希釈溶液でショウジョウバエ幼虫の ECS を模倣できるのではないかとこの研究を遂行したのは、研究仲間の化学的な知識を基盤とした生物を規範としてのづくりをするバイオミメティクスの発想であった。では、どのような物質がナノスーツを形成できるのだろうか。次に、多様な物質を素材に FE-SEM 内で生命維持の可能性と自立膜の作製を検討した。Table 1 に示すように、Tween 20 のようにポリエチレンオキシドに分類される物質群、多鎖多親水基型両親媒性化合物 (Multiple OH) に分類される物質群、一鎖一親水基型両親媒性化合物に分類される物質群 (Single OH)、二重結合をもつ両親媒性化合物に分類される物質群 (OH & double bond)、イミダゾール環構造をもつイオン液体 (double bond) のすべてにおいて 0.1% から 10% の濃度範囲の中で成膜することを確認し、これらの濃度範囲で作成したナノスーツによって生物を高真空環境下で保護することができることを明らかにした⁵⁾。しかし、先に述べたように、粘性の高い物質や、それ自身が反射電子や二次電子を強く出す物質では超微細構造の観察が場合によっては難しくなることもあるため、最適な物質を選択する必要がある。

また、これらの物質は、界面活性剤 (Table 1, 1~9)、糖類 (Table 1, 23, 24)、アミノ酸 (Table 1, 25~28, 32~34, 40, 41)、イオン液体 (Table 1, 42~46) に分類することもでき、これらの中から、生体適合性の高い物質を用いて、より効率的に実施する方法の検討を、今後も続け

Table 1. The summary of the free-standing films prepared from precursors with PEO chains (1-9); multiple hydrophilic groups (10-28); a single hydrophilic group (29-34); several double bonds (35-41); and an imidazolium ring typical of ionic liquids (42-46). All the free-standing films were insoluble in both water and ethanol. These results suggest that the radicals generated by the plasma promoted polymerization of both the common polymerizable functional groups, such as alkenes, and the hydrophilic groups, such as PEO chains, carboxyl, and hydroxyl groups, on the irradiated surface.

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	Tetraethoxysilane ^{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=C 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-Buthyl-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.

る所存である。

3. ま と め

ナノスーツに端を発した『生きたままの生物の FE-SEM 高分解能/高解像度観察』は、昆虫をはじめとした節足動物の動的観察を行う方法として確立した。まさに生体の超微細構造を電子顕微鏡内で“生態”観察することができるようになったといえる。

生物は、ホイットカーの五界説で代表されるように、原核生物（モネラ）界、原生生物界、植物界、菌界、動物界と分類されることがあるが、現在はこれらの生物のほぼすべてを、ナノスーツで生命維持することにより高真空電子顕微鏡内で観察可能になった（論文準備中）。

また、濡れたままの固定組織（病理）標本を用いた解析および診断、あるいは、これまで誰も知ることのなかった組織と細胞、細胞同士の超微細構造の連関も可視化できるようになり（論文準備中）、今後生物の本来の姿を追跡する次世代型解析法が開かれていくだろう。生きたままの生物の高倍・高解像度観察を実施することによって、新たなパラダイムシフトに貢献できることを目指している。

謝 辞

本研究は、本稿著者に加えて、太田勲、村中祥悟、河

崎秀陽、平川聡史、筒井孝朱、松本晴子各氏との異分野連携の結果達成できたものである。JST・CREST および新学術領域「生物多様性を規範とする革新的材料技術」の支援を受けている。また、本研究を絶え間なく励まし援助し続けてくださっている北大名誉教授の下澤楯夫先生に感謝する。

文 献

- 1) R.F. Pease, T.L. Hayes, A.S. Camp and N.M. Amer : Science **154**,1185 (1966).
- 2) Y. Takaku, H. Suzuki, I. Ohta, D. Ishii, Y. Muranaka, M. Shimomura and T. Hariyama : PNAS, **110**, 7631 (2013).
- 3) I. Ohta, Y. Takaku, H. Suzuki, D. Ishii, Y. Muranaka, M. Shimomura and T. Hariyama : Microscopy **63**, 295 (2014).
- 4) Y. Takaku, H. Suzuki, I. Ohta, T. Tsutsui, H. Matsumoto, M. Shimomura and T. Hariyama : Proc. R. Soc. B **282**, 20142857 (2015).
- 5) H. Suzuki, Y. Takaku, I. Ohta, D. Ishii, Y. Muranaka, M. Shimomura and T. Hariyama : PLoS One **8**, e78563 (2013).

動画などを見ることができるサイト

<http://www.pnas.org/content/110/19/7631>

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130416/>