



Dressing living organisms in a thin polymer membrane, the NanoSuit, for high-vacuum FE-SEM observation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-05-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 太田, 勲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2819

博士(医学) 太田 勲

論文題目

Dressing living organisms in a thin polymer membrane, the NanoSuit, for high-vacuum FE-SEM observation

(生きたままの生物を高真空電界放射型走査電子顕微鏡で観察可能にするための高分子薄膜”ナノスーツ”の装着)

論文の内容の要旨

[はじめに]

生物表面の微細構造の観察/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きた。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射型走査電子顕微鏡 (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、生物表面に様々な化学的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 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たりしてきたが、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る。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。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もつ粘性物質 (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世界で初めて成功し「ナノスーツ」と名付けた。さらに、ECS 成分を模倣した界面活性剤でナノスーツを形成させ、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、生きたままの生物表面は、従来の固定・乾燥・導電性物質蒸着処理によって SEM 観察されていた微細構造とは大きく異なることを明確にした。

[材料ならびに方法]

実験用生物: 実験動物には *Chironomus yoshimatsui* および *Talitrus saltator* を使用した。ナノスーツ処理による 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。ナノスーツ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、ナノスーツを形成させた。

従来法の SEM 試料作製法: 生物は 2% グルタ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。

[結果]

C. yoshimatsui 幼虫を Tween 20 によるナノスーツで被覆した後、FE-SEM 観察した。その幼虫は、ナノスーツ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、ナノスーツ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。次に、*T. saltator* をナノスーツ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、ナノスーツ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、ナノスーツ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、ナノスーツ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ナノスーツ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。

[考察]

今回の研究において、従来の固定試料とナノスーツ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、ナノスーツ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わかった。ナノスーツ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。ナノスーツの特性として、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らかとなり、ナノスーツが 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。今回は ECS を模倣した物質として Tween 20 を用いたが、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。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ナノスーツの開発を目指している。今後、ナノスーツの展開として、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が期待される。

[結論]

ナノスーツは、FE-SEM 内にて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った。本手法は、従来の SEM 試料作製よりも極短時間で処理でき、生物学、農学

や医学などの生命科学分野の研究のための有用な手段となりうる。