

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15012

研究課題名(和文) 大気環境・走査電子顕微鏡法による細胞と組織のライブイメージング

研究課題名(英文) Imaging of live cells and tissues by atmospheric scanning electron microscopy

研究代表者

牛木 辰男 (USHIKI, TATSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年開発された大気環境走査電子顕微鏡(大気環境SEM)法を用いて、大気圧環境で細胞や組織を生きた状態で観察する方法を検討し、その可能性を探った。その結果、植物の葉の表面のような組織では、きわめて良好な画像を取得することができたが、動物組織では、表面凹凸が複雑で、かつ表面に水滴が付着し、試料の真の形状の観察が難しかった。また動物組織においては信号量も少なくS/N比を高める必要があった。そのため、動物組織においては観察表面を平滑にし、しかも表面の水を除去した環境で観察できる方法を検討するとともに、イオン液体の利用の可能性を探った。これにより今後の可能性と問題点を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of observing live cells and tissues by atmospheric scanning electron microscopy (atmospheric SEM). Our study revealed that this technique is powerful for observing plant tissues including leaf surfaces, but has some difficulty for visualizing the surface of animal cells and tissues due to several reasons such as surface unevenness, low signal intensity and the presence of surface water. To improve the quality of cell observation by atmospheric SEM, preparation techniques including the ion liquid treatment were tested in this study.

研究分野：顕微解剖学

キーワード：走査電子顕微鏡 細胞と組織 ライブイメージング 大気圧

## 1. 研究開始当初の背景

走査電子顕微鏡 (SEM) は、観察対象物の立体表面形状を取得することができることから細胞や組織の3次元 (3D) 構造解析に威力を発揮してきた (図1)。申請者は、とくにこの顕微鏡を用いた立体組織学を専門とし、これまで様々な組織の微細構造機能解析にこの手法を利用してきた実績がある。

ところで、SEM で細胞や組織を観察する場合、SEM 内が真空であるために標本を乾燥させる必要があり、電子線を照射した際に帯電しないために導電染色や金属コーティングをする必要があった。そのため、こうした試料作製法が研究され、現在では、細胞小器官を始めとして様々な構造を SEM で解析できるようになっている。

しかし、こうした SEM 観察は、ウェットな試料の観察や生きた細胞や組織の観察ができない。この限界を克服するために、これまで「低真空 SEM」が開発され利用されてきた。通常の SEM では、鏡体内は高真空 (10<sup>-3</sup>Pa 以上) に保たれているが、低真空 SEM では試料室の真空を 1~280Pa 程度にすることで、ややウェットな試料を金属コーティングなしに観察することが可能となる。しかし、この環境は細胞や組織が生きる環境とはかけ離れており、細胞壁で囲まれた植物細胞は別として、動物細胞の観察は現実的ではなかった。

一方で、ごく最近、電子線を通す薄い隔膜を用いて液中の試料を観察する手法が開発されている。この方法では、隔膜に接した構造を SEM 観察できるが、SEM 本来の立体構造の観察には適さず、観察できるものも限られている。また、この技法は「大気圧 SEM」と呼称されているが、細胞が隔膜に接した部分の液中観察が可能ではあるが、大気圧での空気環境での観察はできない (Suga et al. 2011)。

これに対して、申請者が目指す「大気圧空気環境 SEM」は、単に水中の位置条件ではなく、生物が生きることができる自然な環境としての大気圧条件で、試料を観察できる手法を開発し、生物学、とくに組織学分野に応用しようとするもので、この点が斬新でチャレンジ性を秘めている。

## 2. 研究の目的

本研究は既成の装置に大気圧観察のユニットを図のように組み込んで使用するので、日立ハイテクノロジーズの設計担当者の協力が必要である。とくに、実験の遂行にあたり、生体試料の観察に適した形状にユニットを作り変えたり、検出器の配置等を変更することも考えられる。

また、大気圧・空気環境 SEM の画像の評価には、通常の標本作製法による高真空 SEM

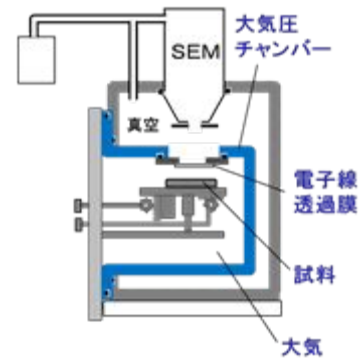


図 大気圧・空気環境 SEM の装置構成

像との比較がきわめて重要である。一方で、ウェットな試料でかつ明瞭な SEM 像を得るためには、試料に対する様々な工夫が必要である。以上の点を考慮して、以下の点を検討する。

1) 大気圧空気環境 SEM により、実際の生物試料の観察を行い、その可能性と問題点を抽出する。

2) 大気圧空気環境 SEM に適した試料作製法を開発する。

3) 生きた細胞や組織を大気圧空気環境 SEM で観察するために適した方法を開発し、それにより、生きた細胞や組織の動態観察にこの技法がどのように貢献できるかを明らかにする。

4) 上記の研究成果をもとに、生物観察により適した大気圧空気環境 SEM の改良・開発に貢献する。

## 3. 研究の方法

現在保有する大気圧・空気環境 SEM の実験機を用いて、以下の実験を行う。

1) 現有する大気圧・空気環境 SEM 試作機による生物観察とその評価

現有する試作機は簡易型 SEM (TM3000、日立) に大気圧観察ユニットを取り付けたもので、信号は隔膜を介して検出器で取得する。この形式で取得する場合、隔膜に試料を近接させる必要がある。予備実験では 1 気圧 (約 100kPa) の空気環境下では、試料と隔膜の距離は 10~50 μm まで近づく必要があることが分かっている。また、1 気圧より若干気圧が低い状態 (たとえば富士山の頂上の気圧程度) にすると画質が向上することもわかってきている。このように、若干の環境の違いでも、画質が大きく変化することがわかり始めているので、標準試料を用意して、生物試料に適した条件を抽出する。

次に、同じ条件でも試料によって信号発生量が異なることが考えられる。また、試料の表面に水滴が付着していると、その水滴が見えてしまうということが分かっている。こうした試料側の問題点を、多様な生物試料 (細菌、酵母、細胞、組織、小動物など) を用い

て解析する。

## 2) 装置の改善と試料作製法の検討

上記の結果から、測定条件と試料条件を整理し、以下の点を検討する。

生物試料に適した装置のマイナーチェンジ：本研究は装置開発が主ではないが、試料の形状に関連したチャンバーの改造や、出器の設置場所の変更など、装置のマイナーチェンジが生じると考えられる。これについては研究協力者の協力の下で行う

画像の評価：大気圧・空気環境 SEM で得られた生物試料の画像と、通常の試料作製法を行って高真空 SEM で得られた像とを比較し、像の評価を行う。

試料調整法の開発：この装置で観察する場合、上で述べたように試料を隔膜に近接させる必要がある。それが可能になる試料調整法を検討する。ここでは固定試料を用いるが、試料からの信号が少ないことが予想されるので、試料からの信号を高めるために金属染色する方法を検討する

## 3) 生きた生物試料の大気圧。空気環境 SEM 内での動的に観察法の検討

すべての生物試料で生きた状態での観察ができるとは思われないが、ライブイメージングを念頭に検討を行う。もっとも簡単と思われるものは、植物の気孔や酵母、昆虫の観察などであるが、それらの実験を通して、動物細胞または組織の生きたままの観察の可能性を探る。たとえば皮膚の表皮のように表面が水に覆われないような培養条件を検討し、一方でチャンバー内の湿度のコントロールを行うことで、ウェットで大気圧・空気環境 SEM に適した観察条件を検討する。

## 4. 研究成果

植物の葉の表面のような組織では、試料表面が平坦で、かつ水滴が付着しない状態に資料を調整することができることから、きわめて良好な画像を取得することが可能であったが、動物組織では、表面凹凸が複雑で、かつ表面に水滴が付着し、試料の真の形状の観察が難しかった。すなわち、大気圧 SEM で鮮明な画像を得るためには、隔膜（大気圧試料室に電子線を入射させるための窓に貼られた電子線透過膜）と試料表面との距離を、50  $\mu\text{m}$  程度に接近させる必要があるが、動物組織全体の凹凸はそれ以上のものが多く、またその凹部に水が付着してしまうことが多いため、目的の構造を画像にすることがきわめて難しかった。したがって、いかに観察表面を平滑にし、しかも表面の水を除去した環境を用意できるかが試料作製のポイントである。

大気圧 SEM 観察に不適切な表面の水分を排除するための方法の検討の一つとして、イオン液体を利用して見たが、試料表面を覆う点では水と変わりがなく、試料作製法については、さらに検討が必要である。

以上の結果をまとめると、大気圧 SEM は、気層に包まれた構造を大気圧下で観察し、その3次元構造を解析することには威力を発揮するが、一方で、水そのものが見えてしまうため、液中の構造を観察するに、解決すべき問題が多く残されているというのが現状である。」その点で、植物細胞や植物組織への利用や、従来の SEM では難しかった食品応用にはきわめて有用であるが、濡れた動物組織や液中の培養細胞の観察には問題が残されている。しかし病理組織の迅速診断など多様な活用の可能性もあることから、今後の研究の発展を期待したい。

### <引用文献>

Ominami Y, Kawanishi S, Ushiki T, Ito S: A novel approach to scanning electron microscopy at ambient atmospheric pressure. *Microscopy* (Oxf). 64(2):97-104 (2015), doi: 10.1093/jmicro/dfu107. Epub 2014 Dec 23.

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

牛木辰男：走査電子顕微鏡の生物応用とその現状。表面科学、36:189-194 (2015)

牛木辰男：電子顕微鏡。病理と臨床、33:1141-1147 (2015)

[学会発表](計 2件)

牛木辰男：走査電子顕微鏡のバイオ応用とその展望 応用物理学会 薄膜・表面物理分科会主催 第44回薄膜・表面物理セミナー、2016年7月29日、横浜

牛木辰男：顕微鏡と生物学 日本顕微鏡学会第60回記念シンポジウム(招待講演)、2017年12月1日、宮崎

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/an3/welcome.html>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

牛木辰男 (USHIKI, Tatsuo)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40184999

(2)研究分担者

中島 真人 (NAKAJIMA, Masato)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60588250

水谷 祐輔 (MIZUTANI, Yushuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40646238

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし