

水中のサンプルを多色観察できる走査電子顕微鏡システムの開発

研究代表者

佐藤 主税 産業技術総合研究所 研究グループ長



1. 研究の背景と達成目標

我々は、走査電子顕微鏡を倒立させ電顕カラムの走査ビーム出口の上に電子線透過薄膜 dish を配置することで、薄膜越しに反射電子を測定する 8nm 分解能の大気圧電子顕微鏡(ASEM)を開発した。直接水中を観察できるためサンプルに前処理が必要なく、観察が迅速である。そのため、ガンの術中迅速診断や感染症の高分解能診断に貢献することが期待される。本プロジェクトでは ASEM による迅速診断法を開発するために、蛍光も含めたラベリング法の開発と装置開発も含めた観察システムの研究を行う。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

・細胞を蛍光物質でラベルし、電子線走査して放出される電子線励起蛍光(Cathodeluminescence: CL)を高感度で検出するために、冷却 GaAs-PMT 検出器を光ファイバーで対物レンズと接続する光学ユニットを造り込んだ。さらに、電子ビームを自在にコントロールできる外部制御装置を組み合わせ、調整により検出の最適化を進めた。

・様々な種類の蛍光物質のスクリーニングを行った。GaAs-PMT による高感度検出システムで数 micro meter サイズの ZnO の CL が明解に観察できた。しかし、GFP・EGFP・mCherry 等の蛍光タンパク質、Alexa では検出されなかった。半導体蛍光物質 Qdot は凝集し易く難しかった。Fluorescent nanodiamond、Nano Phosphor での弱いシグナルで研究を進めている。また、術中診断のマーカーの一つであるガンの巨大な核を、6 分以内に染色して ASEM で観察する方法開発に成功した。新たに、2nm 分解能の HIM を用いて、CL を観察し国際誌に出版した。Qdot 525・655 でも観察できた。以上の結果は、抗体ラベルへの応用、さらには、生物・医学・農学のみならず物性や半導体などへの幅広い応用が期待される。

3. 研究成果

①細胞を蛍光物質でラベルし、電子線走査により放出される CL を高感度で撮影できる光学系を構築するために、GaAs-PMT 検出器とその冷却装置を構築し、サンプルホルダー上部の対物レンズと接続するために光ファイバーなどの光学ユニットを造り込んだ。さらに、電子ビームをコントロールできる外部制御装置を構築した。

②ガンのマーカーである核を6分以内に染色してASEMで観察する方法開発に成功した。また、バイオフィームは肺炎や歯周病・リュウマチ等の様々な慢性の感染症疾患の原因で抗体や抗生物質に耐性である。それは、抗体を捕まえるタンパク質などが存在するからで、抗体によるバイオフィーム内部の研究は難しかった。結合タンパク質を遺伝的に除くことで、抗体によるラベル法を新たに開発した。バイオフィーム内には、抗体ラベルにより2本鎖DNA鎖の存在が観察され、骨格構造としての役割が示唆される。また、バイオフィーム内のMRSA細胞間には、微小胞・細胞間チューブ構造が観察された。これら結果の一部は、Scientific report誌とFrontier in microbiology誌で報告した。さらに、フランスのグループと共同でこれまで観察が難しかった線毛の観察に成功し、抗生物質耐性の拡散メカニズムに関する考察をFrontier

in microbiology誌で報告した。様々な種類の蛍光物質のスクリーニングを行い、GaAs-PMT高感度検出システムにより数micro meterサイズのZnOの放出するCLが明解に観察できた。しかし、GFP・EGFP・mCherry等の蛍光タンパク質、Alexaでは検出されなかった。半導体蛍光物質Qdotでは、蛍光は弱い。Fluorescent nanodiamond、Nano Phosphorでの弱いシグナルで研究を進めている。新たに、2nm分解能のHIMを用いて、電子ビーム励起蛍光を観察しIJMM誌に出版した。本法ではQdot 525と655でもCLが観察でき、抗体ラベルへの応用が期待される。以上の結果は、今後癌の術中診断・バイオフィルムによる慢性的な感染症の克復、医学・農学さらには物性・半導体研究などに貢献すると思われる。

4. 今後の展開

今回の観察は、バイオ分野のみならず親水環境で物性研究にも影響を与える。さらに、本研究は半導体製造工程における薄膜製造技術応用を促進するため、日本の半導体製造技術のさらなる開発の促進が期待される。

5. 発表実績

1. C.Sato, M.Sato, S.Ogawa. Imaging of immunogold labeling in cells and tissues by helium ion microscopy. *Int J Mol Med* 42, 309-321, 2018
2. K.Okuda, R.Nagahori, S.Yamada, S.Sugimoto, C.Sato, M.Sato, T.Iwase, K.Hashimoto, Y.Mizunoe. The Composition and Structure of Biofilms Developed by *Propionibacterium acnes* Isolated from Cardiac Pacemaker Devices. *Front Microbiol*, 9, 182, p. 1-12 (2018)
3. M.Poidevin, M.Sato, I.Altinoglu, M.Delaplace, C.Sato, Y.Yamaichi. "Mutation in ESBL Plasmid from *Escherichia coli* O104:H4 Leads Autoagglutination and Enhanced Plasmid Dissemination. *Front Microbiol*. 9, 130, 1-11, 2018
4. C.Sato, T.Kinoshita, N.Memtily, M.Sato, S.Nishihara, T.Yamazawa, S.Sugimoto. Correlative lightelectron microscopy in liquid using an inverted SEM (ASEM). Chapter 10 in "Correlative Light and Electron Microscopy III", edited by Thomas Muller-Reichert, Paul Verkade, Elsevier, pp187-213, 2017
5. T.Kinoshita, C.Sato, T.J.Fuwa, S.Nishihara. Short stop mediates axonal compartmentalization of mucin-type core 1 glycans. *Scientific Reports*, 7,41455, 1-14,2017
6. T.Kinoshita, C.Sato, S.Nishihara. The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) observes the axonal compartmentalization and microtubule formation in neurons. *Microsc. Microanal.* 23 (Suppl 1), 1298-1299, 2017
7. T.Yamazawa, N.Nakamura, M.Sato, C.Sato. Secretory glands and microvascular systems imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). *Microsc Res Tech*, 79(12), 1179-1187, 2016
8. C.Sato, M.Suga. Observations in Liquids using an Inverted SEM. Chapter 5 in "Liquid Cell Electron Microscopy", edited by Frances Ross, Cambridge University Press, pp106-126
9. S.Sugimoto, K.Okuda, R.Miyakawa, M.Sato, K.Arita-Morioka, A.Chiba, K.Yamanaka, T.Ogura, Y.Mizunoe, C.Sato. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Scientific Reports*, 6:25889, 1-13, 2016