

細胞・組織を美しくイメージングするためのナノ薄膜ラッピング

岡村 陽介

顕微鏡イメージング技術は、近年急速な進化を遂げており、生命現象の全容をリアルタイムで取得できる、まさに「百聞は一見に如かず」を実現する技術である。超解像度顕微鏡を例にあげるように、顕微鏡本体や観察精度（ハード面）の開発は目を見張るものがある。しかし、イメージング時のソフト面「観察試料の作成法」は未だ研究者のノウハウに頼っている。たとえば、血球を代表とする浮遊細胞をイメージングする場合、カバーガラス上に滴下して観察するのが常套手段であるが、ブラウン運動して焦点が定まらないほか、液性刺激因子を滴下した瞬間に拡散してしまう。また、生体組織も同様にカバーガラスに乗せて観察するが、組織の乾燥・変形・ぶれが常に課題となる。本稿では、浮遊細胞や組織をイメージングする従来技術を紹介するとともに、美しい画像を取得するための新しい手法「ナノ薄膜ラッピング」を紹介する。

細胞は生命体を司る最小単位の構造体であり、タンパク質や核酸などのバイオ分子のアクセシに必要不可欠な生体材料である。接着細胞とは違い、浮遊細胞はその名の通り浮遊状態で存在する。フローサイトメーターは、細胞の膜タンパク質を蛍光標識抗体でラベルして発現応答を追跡できる手法であるが、界面との接着反応に関する情報は得られない。これを得るには浮遊細胞を基板に固定してイメージングすることが必須であるが、細胞外マトリックスなどを基板に固相化すると、細胞は接着するものの瞬時に活性化し、細胞の状態が変化してしまうため、未活性状態からの接着反応に関する欲しい情報が得られない。Katoらは、アシル鎖を片末端に導入したポリエチレングリコール誘導体 (biocompatible anchor for cell membrane, BAM)¹⁾ を提案している。BAMを基板に固相化し、アシル鎖を細胞膜に貫通させてアンカ

リングする画期的な手法である。血清非存在下で効果的に機能し、浮遊細胞固定化技術として市販されている。また、Tokuyamaらは、細胞が通過しない溝やフィルターをマイクロ流体デバイス内に配置して浮遊細胞を捕捉しイメージングする技術を提案している²⁾。しかし、流路内の圧力変化で細胞が破裂するなど、詳細な実験条件設定が必須となる。

Okamuraらは、厚みを100 nm以下に制御した生体適合性高分子からなるナノ薄膜を開発してきた³⁾。得られるナノ薄膜は、ナノメートルの厚さに由来する柔軟性と高い接着性を発現し、反応性官能基や接着剤を使用せず物理吸着のみで種々の界面に貼付できるユニークな性質を示す。最近、Zhangらは、どこにでも貼れるナノ薄膜を用いて浮遊細胞や生体組織を保定し、美しい画像を取得するための「ナノ薄膜ラッピング」技術を提案している(図1)。浮遊細胞用ツールとして、液性刺激が透過できるような貫通孔を有するナノ薄膜を調製した⁴⁾。ナノ薄膜でラッピングした血小板(浮遊細胞の一例)は、液性刺激因子を滴下しても拡散せずに1視野に留まり、未活性状態から活性化、細胞間相互作用(凝集)する動的な刺激反応をライブで追跡できることを報告している。また、乾燥・変形・ぶれを防ぐ生体組織用ツールとして、フッ素系高分子からなる撥水性ナノ薄膜を調製した⁵⁾。ナノ薄膜の撥水性を保水能に転換する発想である。実際、カバーガラス上のマウス脳切片を撥水性ナノ薄膜でラッピングし、黄色蛍光タンパク質(eYFP)を発現させた神経細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて広範囲(タイリングモード)に深部イメージングした。ラッピングしないと脳切片の乾燥に伴い画像は劣化するが、ナノ薄膜ラッピングにより深部まで鮮明な画像を取得できた。誌面の関係上、ナノ薄膜の調製法や物性は割愛するが、詳細は文献^{4,5)}を参照されたい。

ナノ薄膜の厚みは、最薄カバーガラスの1/1000に相当する。屈折率もナノ薄膜の素材で設計できる。カバーガラスを介してモノを見ることは常識であるが、ナノ薄膜を介してモノを見るカバーガラスフリーイメージングが確立できれば、生体組織などの深部イメージング技術は飛躍的に向上すると期待される。

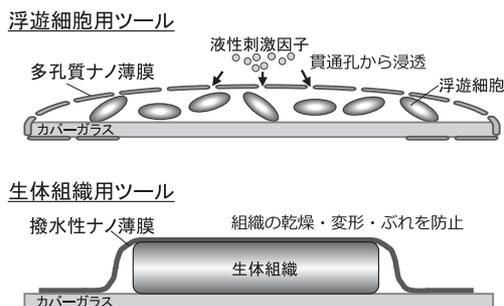


図1. 細胞・組織を美しくイメージングするための「ナノ薄膜ラッピング」

- 1) Kato, K. *et al.*: *Biotechniques*, **35**, 1014 (2003).
- 2) Tokuyama, T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **77**, 3309 (2005).
- 3) Okamura, Y. *et al.*: *Adv. Mater.*, **21**, 4388 (2009).
- 4) Zhang, H. *et al.*: *Adv. Mater.*, **29**, 1703139 (2017).
- 5) Zhang, H. *et al.*: *J. Mater. Chem. B.*, **6**, 6622 (2018).