

***“Taking electron microscope images of biological objects in their natural state.”***

**“NanoSuit”**

NanoSuit株式会社

# NanoSuit<sup>®</sup> とは

- ◆ 細胞や微生物などの試料を“生きている状態のまま”走査型電子顕微鏡（SEM）で観察できるようにする新しい技術です。
- ◆ “NanoSuit” は試料の表面にごく薄い被膜を形成し電子顕微鏡観察における真空条件下においても試料に含まれる水分を保持して試料の形状を維持します。また被膜は電気伝導性を有します。
- ◆ 使い方は簡単です。“NanoSuit溶液”を試料に1滴加えるだけですぐに電子顕微鏡観察に供することができます。（従来のような煩雑な化学固定を要しません）

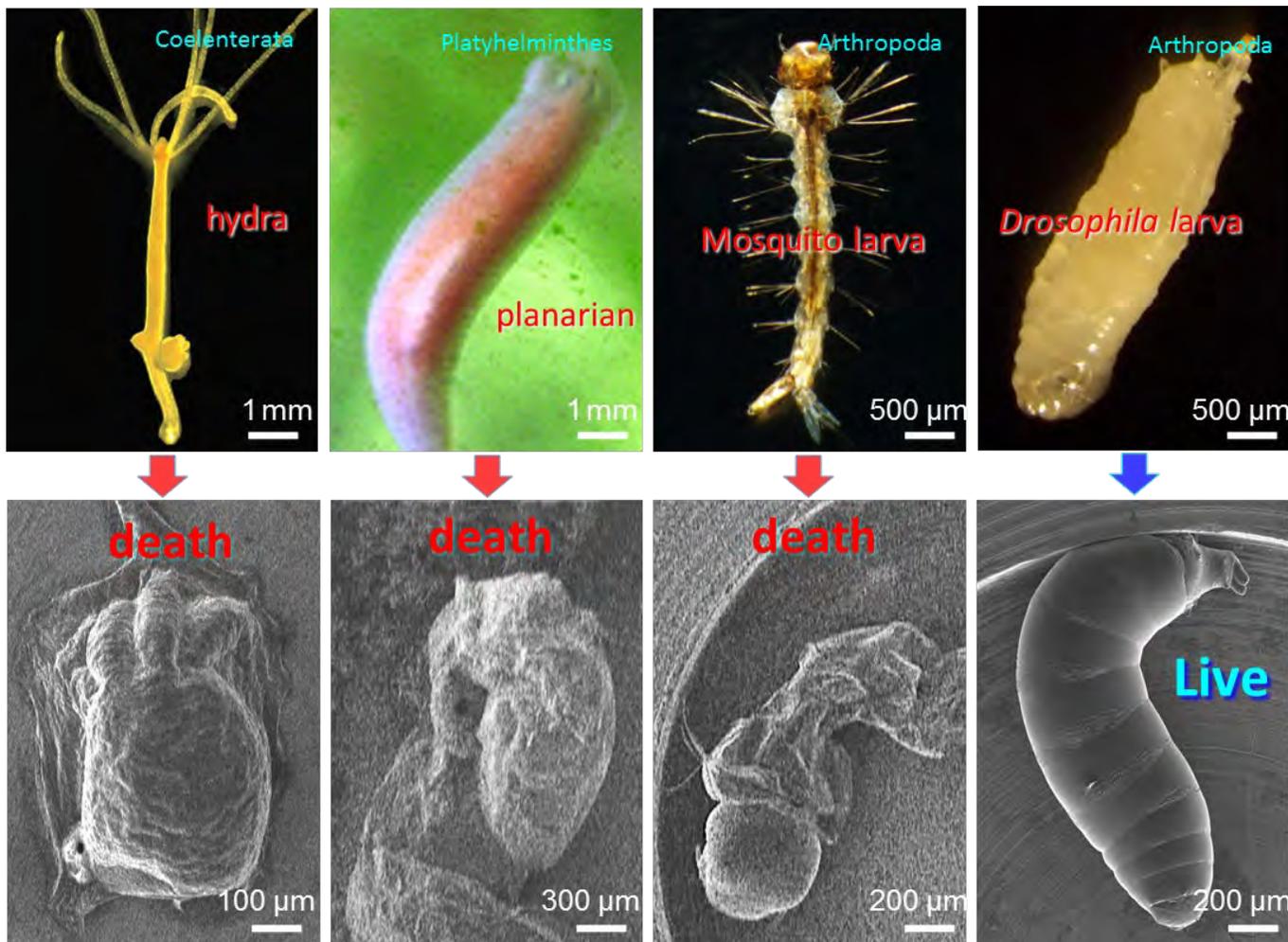


“生きている状態”  
“ありのままの形態”  
をSEM観察できます

金属蒸着が不要です

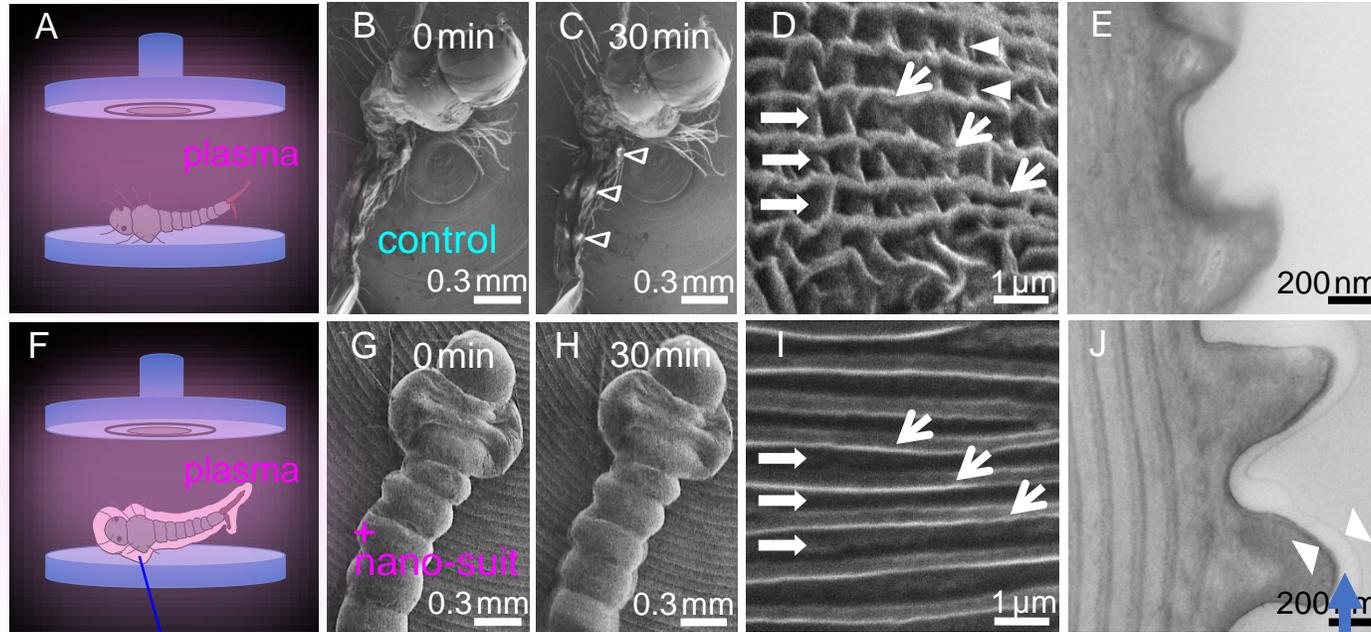
1滴かけるだけで  
SEM観察できます  
(複雑な化学固定は不要)

# 開発の経緯



- バイオミメティクスの研究者でもある発明者の針山（浜松医科大）らは、様々な微小な生物を走査型電子顕微鏡で観察しようとしてきました。できる限り生の状態に近い形態観察をするために電顕に生物そのまま入れると、高真空条件により乾燥し死んでしまいました。
- しかし、ある種のハエの幼虫は真空条件下でも形態を保ち生きたまま観察できました。
- 研究グループがこの現象を調べ、ハエの幼虫の表面に分泌された成分が電子顕微鏡の電子線によって重合して被膜を形成し、それが体内の水分を維持していたことがわかりました。
- 研究グループはこの現象をヒントに、NanoSuit技術を開発しました。

# 技術内容



ECS mimetic substance

NanoSuit

## “NanoSuit®”

- 生体適合性高分子の水溶液試料に1滴加えるだけです。
- 電子顕微鏡での電子線照射または事前のプラズマ照射（大気圧プラズマ）で重合して試料表面に被膜を形成します。
- 被膜は電気伝導性を有するので試料表面の電顕観察を阻害せず、試料内部の水分の蒸散を抑えて自然な形状の観察を可能にします。

実際の走査型電子顕微鏡観察に際しては、事前にプラズマ処理する必要はありません。電顕観察時の電子線によってNanoSuit膜が形成されます。

# 観察事例（パンジーの花弁表面）

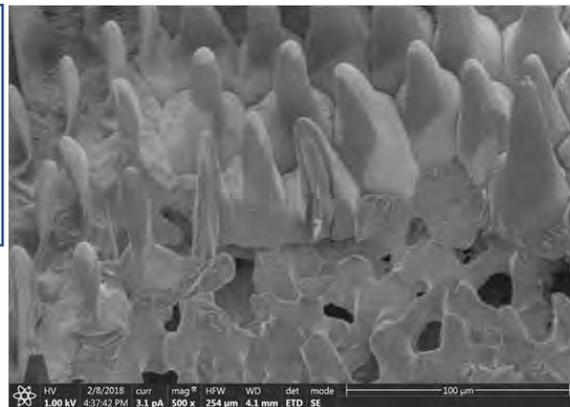
## Control



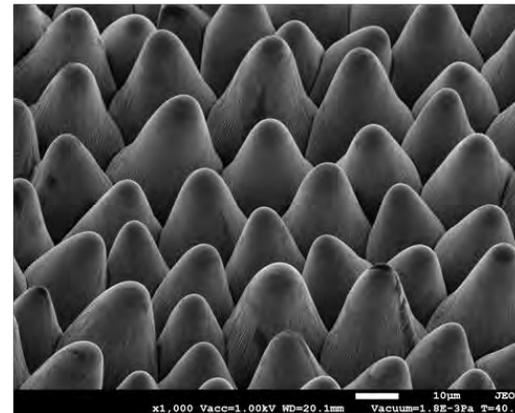
何も処理しないと、真空下で乾燥してしまう

## Cryo-SEM

クライオ電顕では凍結による形状変化が避けられない



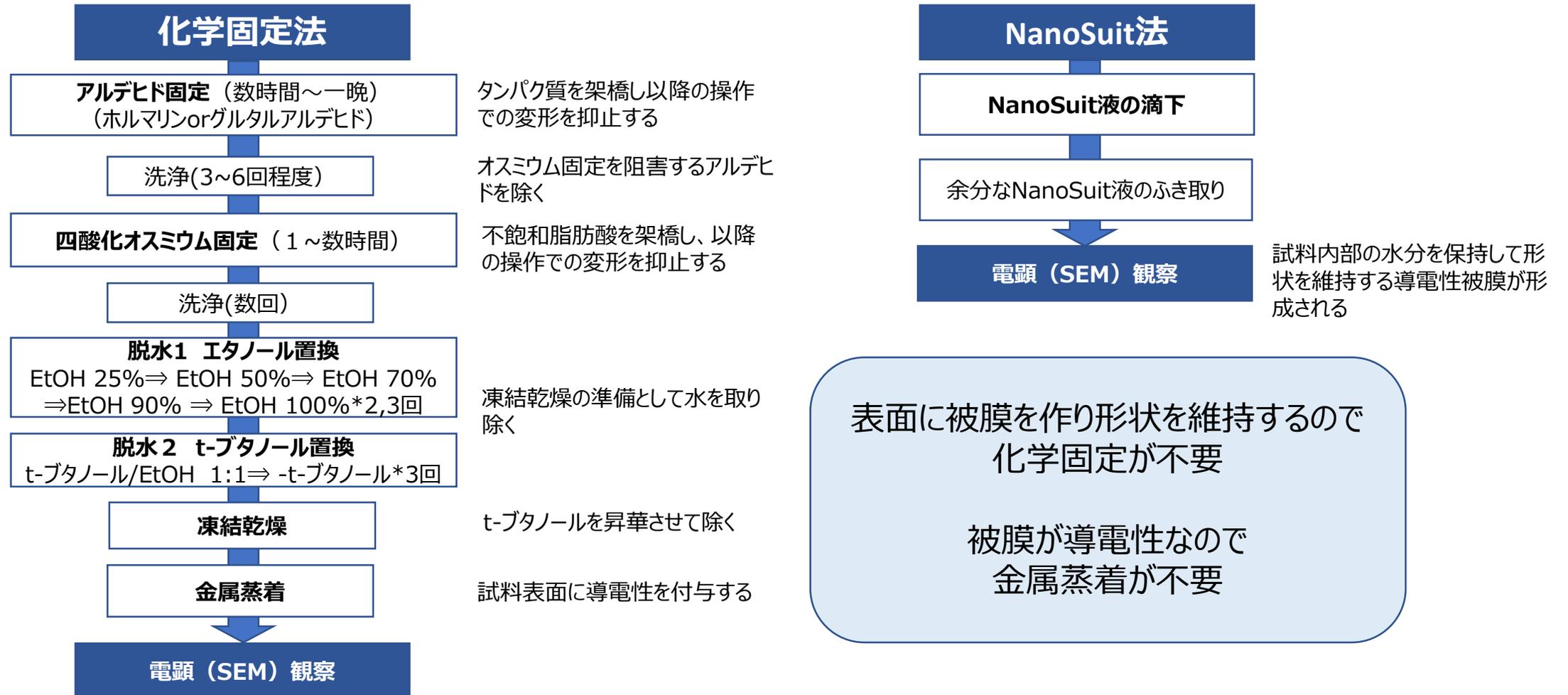
## NanoSuit



“NanoSuit”が花弁に含まれる水分を保持し形状を維持するので自然な微細凹凸構造を観察することができる

# NanoSuitによる電子顕微鏡試料調製—化学固定 vs NanoSuit法

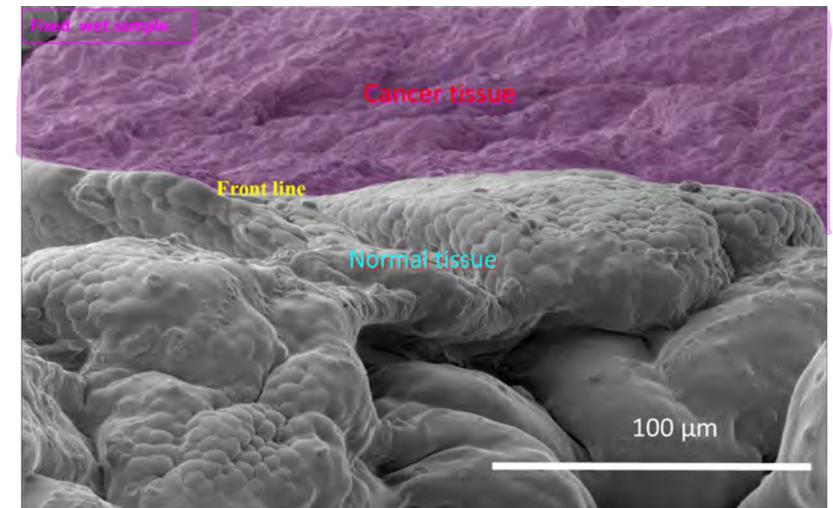
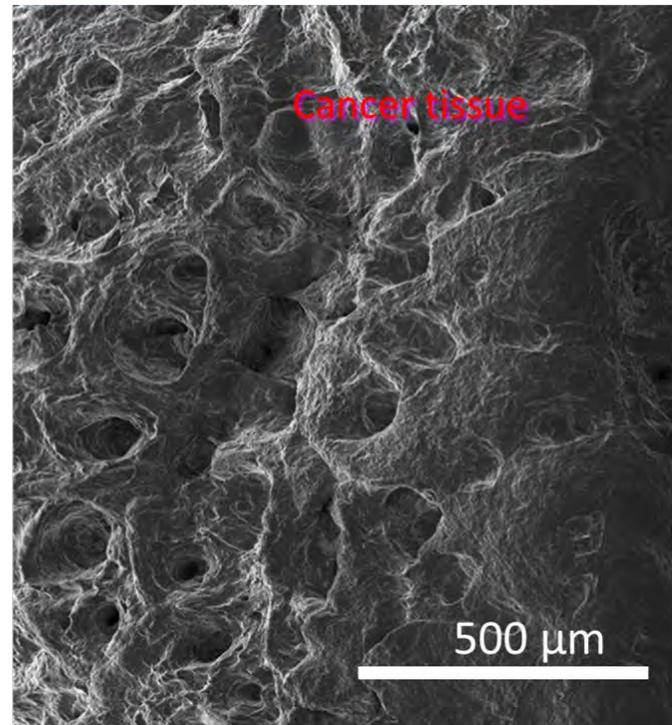
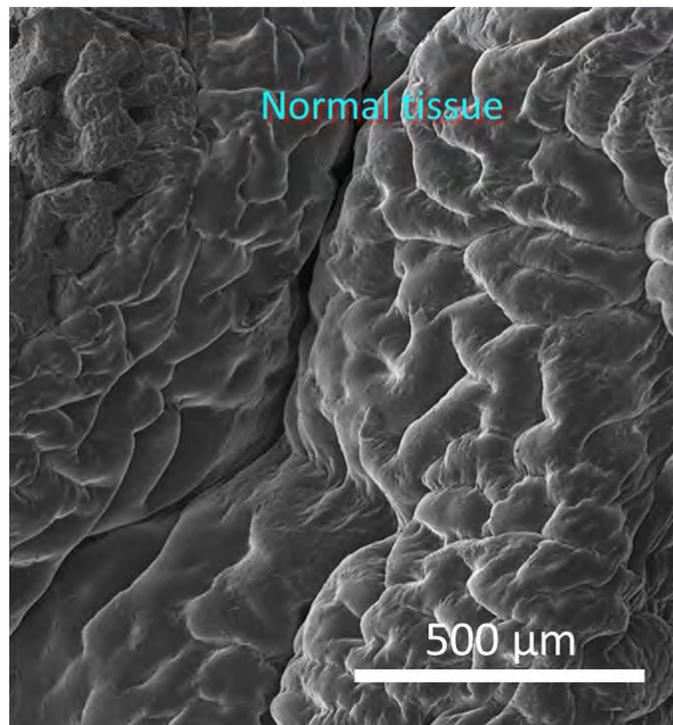
- ◆ 化学固定法は煩雑な操作を要し時間がかかる。繰り返される溶液置換や凍結・乾燥により、どうしても形状が変化してしまう。きれいな観察像は得られても、真実を観察している保証はない。
- ◆ NanoSuitは表面に塗布するだけで簡単。試料内部の水分を維持して“ありのまま”の観察像を与える。



# 観察事例（生体組織；胃の正常部／胃がん）

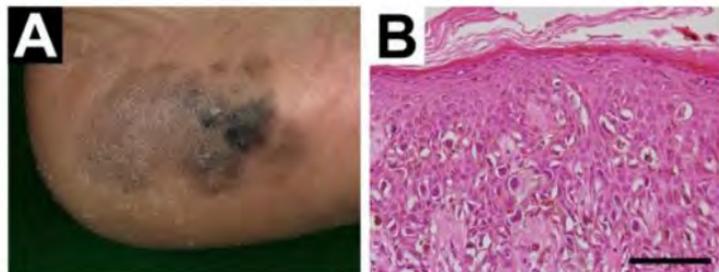
Human Stomach Cancer (normal and cancer tissue)

SSE / nanosuit method



“NanoSuit®” が生体組織のありのままの形状を維持するので、正常組織と胃がん部位の表面構造の違いを明瞭に識別することができる

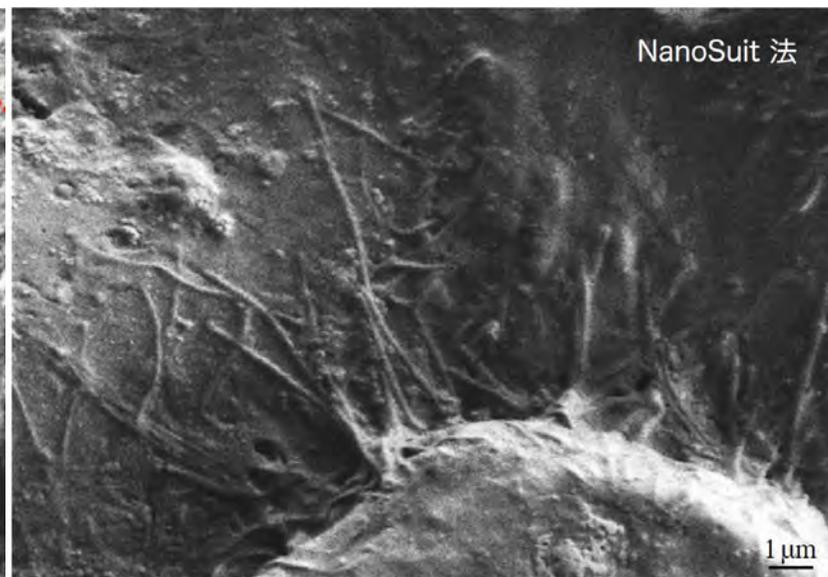
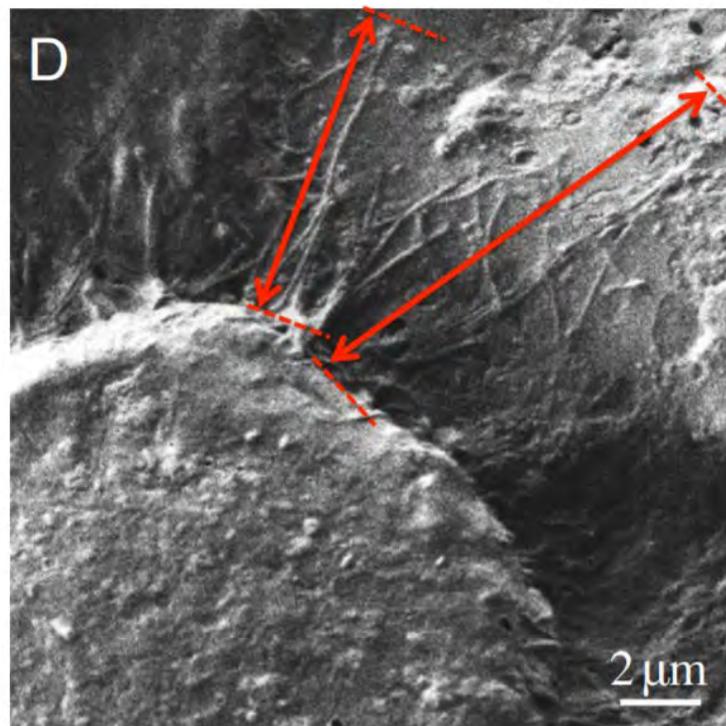
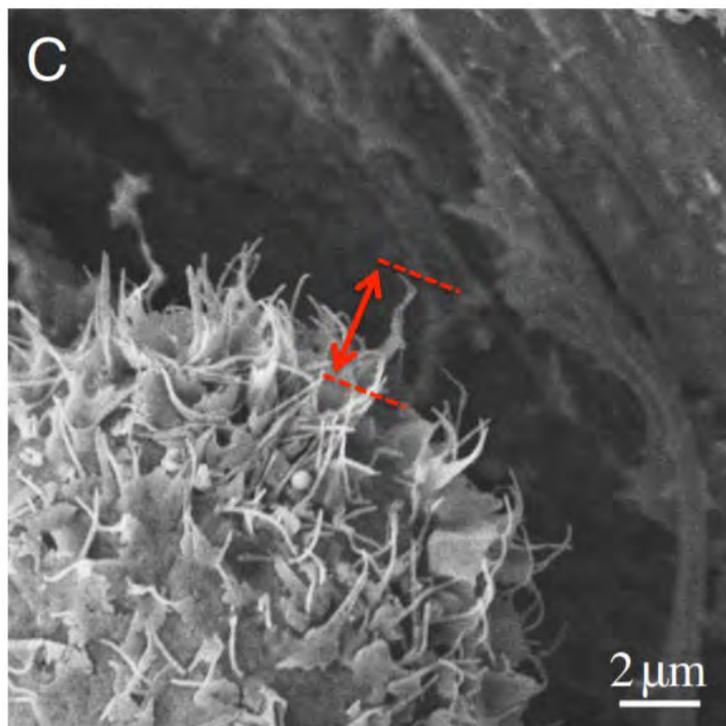
# 観察事例（がん細胞のフィラメント;メラノーマ細胞）



“NanoSuit®” を用いた観察では、がん細胞から伸びるフィラメントが長く伸びている様子が観察できる。がん細胞をはじめ多様な細胞種の表面の微細構造の維持と観察に有効と考えられる。

Conventional method

NanoSuit method



## 観察事例（線維芽細胞）

マウス繊維芽細胞のNanoSuit法／従来化学固定法の比較

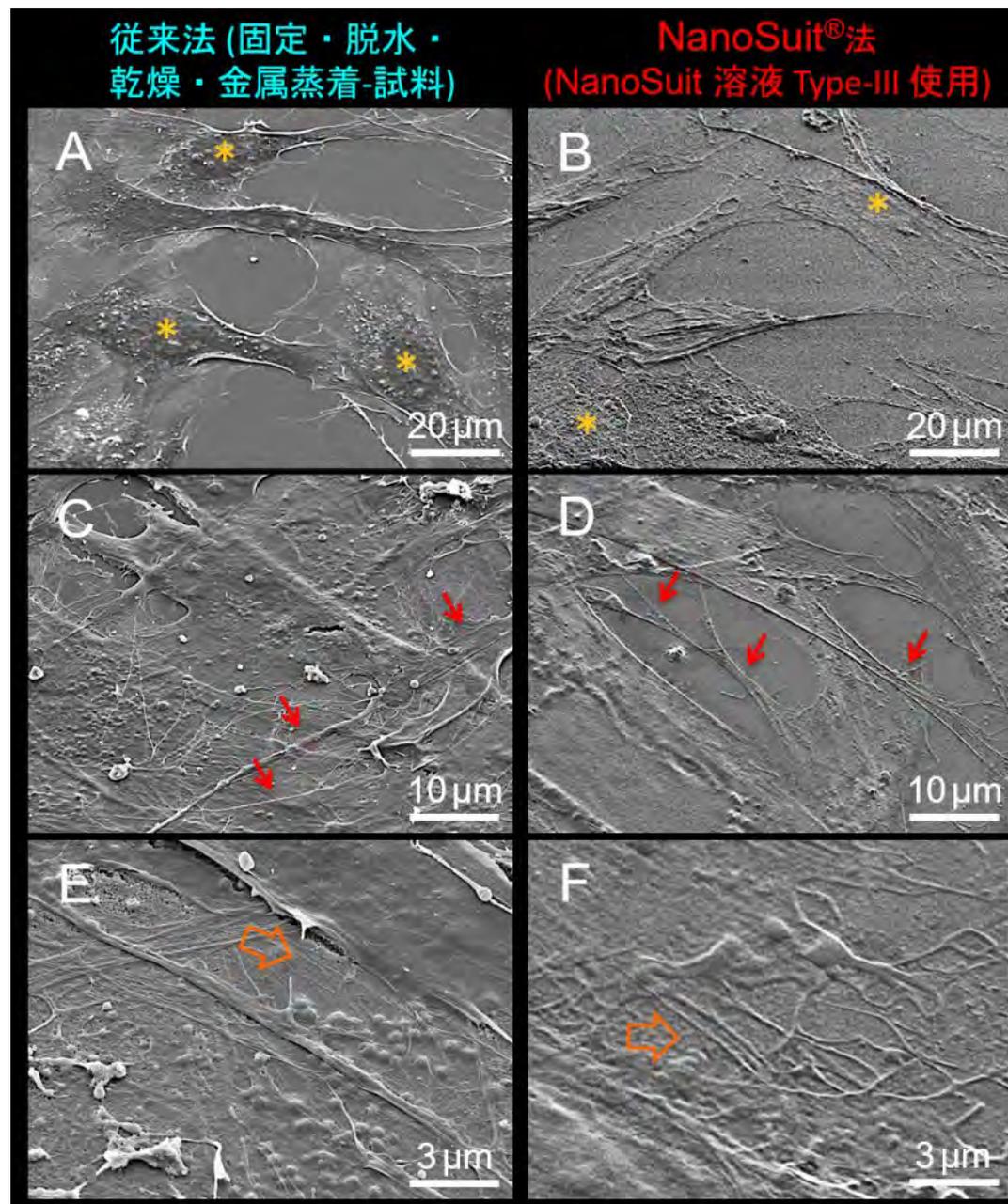
従来法：化学固定/脱水/乾燥/金属蒸着) (A, C, E)

NanoSuit法 (NanoSuit溶液Type-III) (B, D, F)

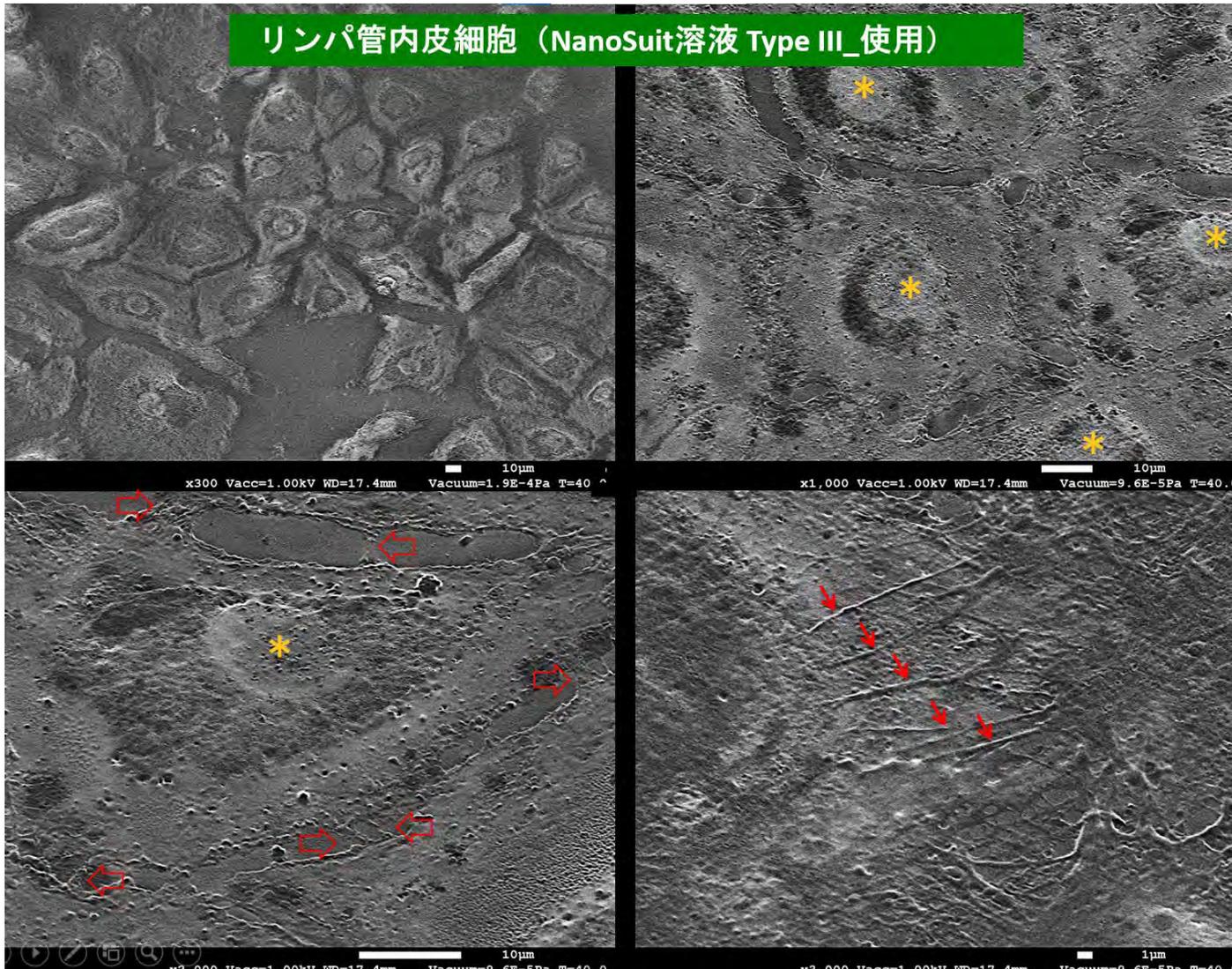
核 (\*)が確認される (A, B)。

加えて強拡大すると細胞間にフィラメント状の微細構造が観察される (赤矢印) (C, D)。

これらのフィラメントは従来法では乾燥によりダメージを受けているがNanoSuit法では維持されており互いに結合していることが分かる (E, F) (オレンジ矢印)。



# 観察事例（リンパ管内皮細胞）

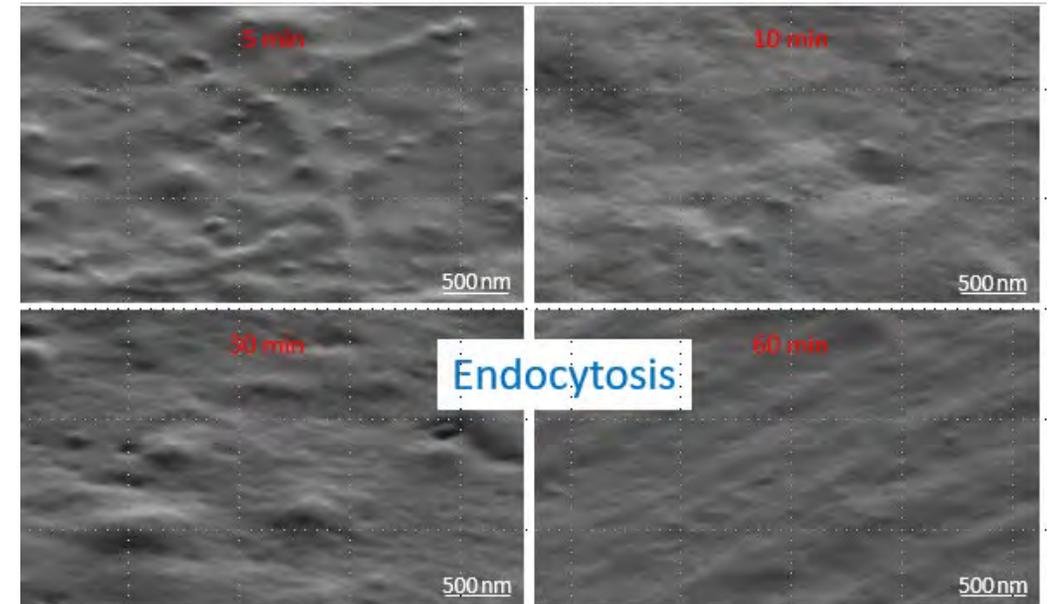
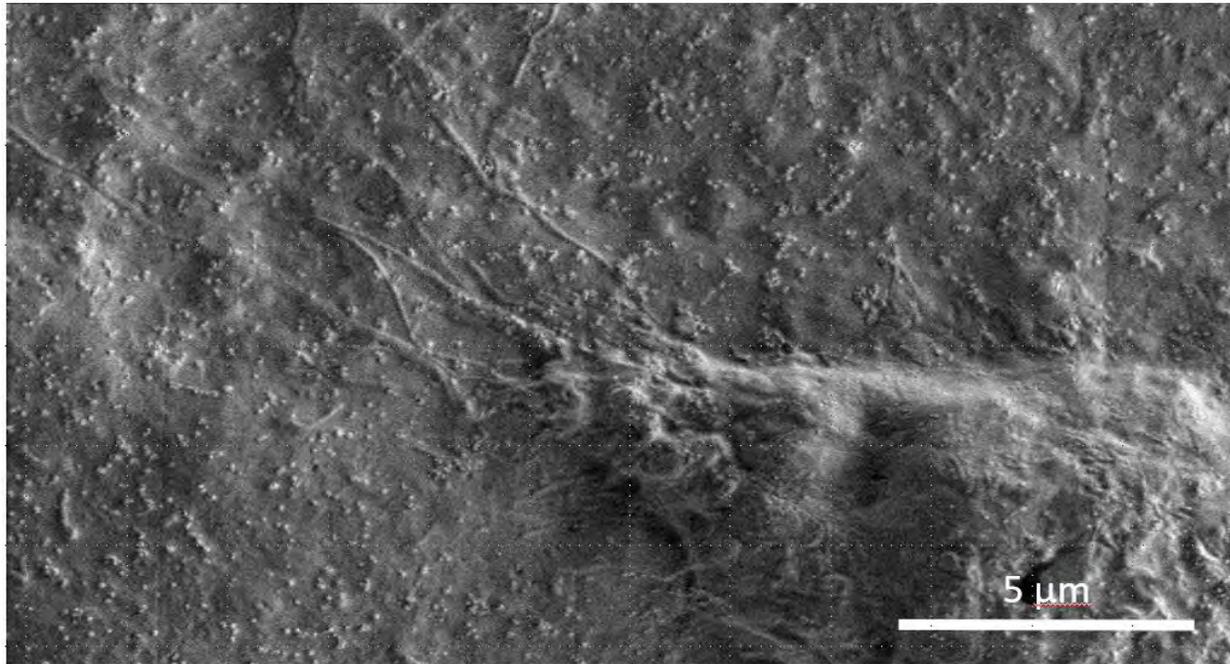


ヒトのリンパ管内皮細胞の観察画像

核(\*)が確認できる。

強拡大すると細胞間のフィラメント状の微細構造が観察できる（赤矢印）。

## 観察事例（細胞へのウイルスの侵入（マウス繊維芽細胞））



NanoSuitを用いてマウス繊維芽細胞へのウイルス侵入を観察した。（左写真の小さい粒がウイルス）  
右写真；ウイルス播種後5分では細胞表面にウイルスが存在し凹凸がある状態が観察できるが、10分、30分、60分と経過するとウイルスは細胞内に取り込まれ細胞表面が平滑になっていく様子が観察された。

# 観察事例 (ヒト精子)

浜松医科大学 宗修平先生

「NanoSuit 法を用いた FE-SEM による精子超微形態の特徴づけ」

日本アンドロロジー学会・学会賞を受賞

宗先生らは、NanoSuit を利用してヒトの精子を短時間処理でダメージを与えずに高分解能で観察し、表面構造の顕著な違いを発見することに成功されました。

同定された精子の超微細構造と受精能との相関が示唆され、この技術によって不妊治療に光明を与える可能性が学会で高く評価されました。

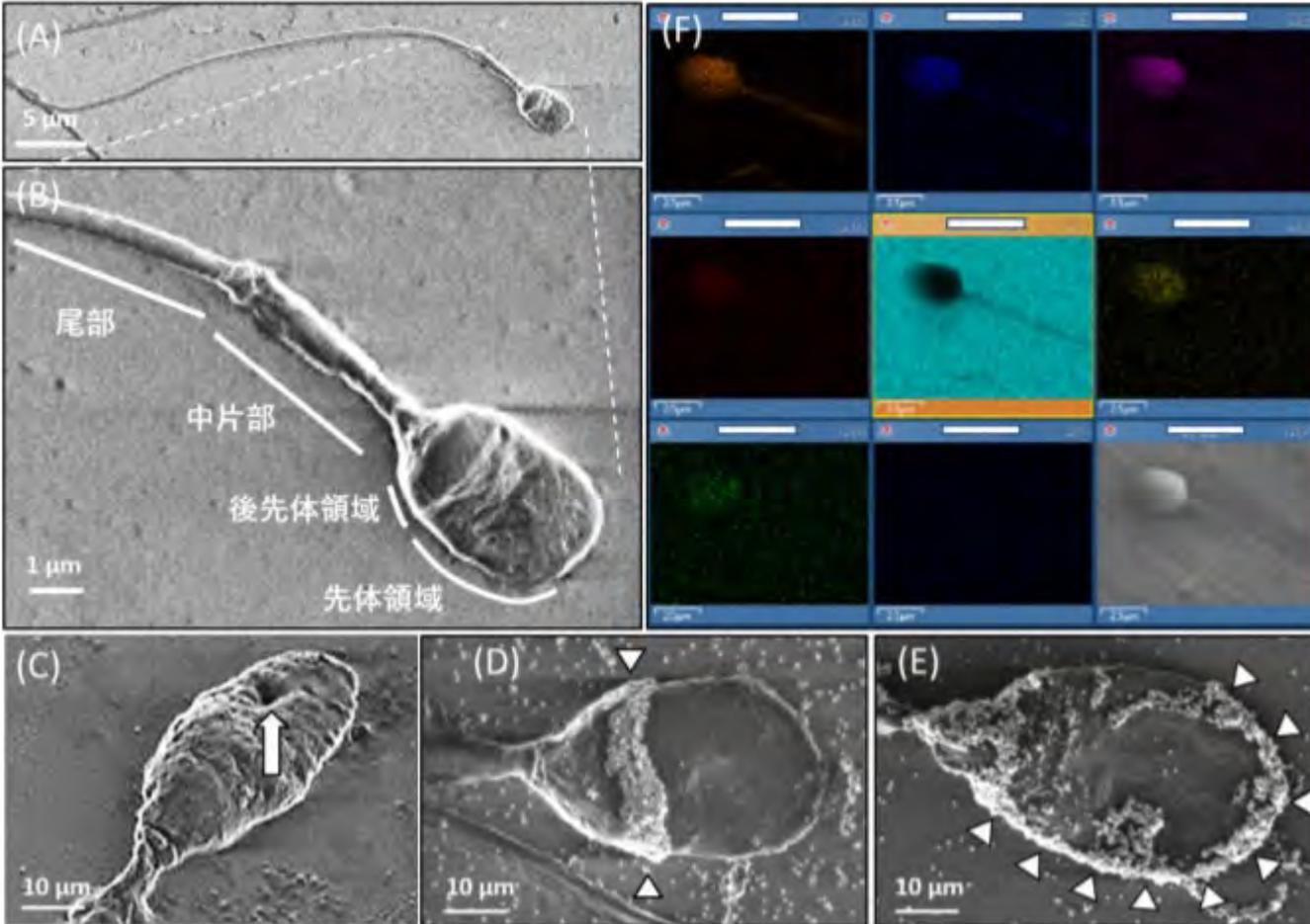
(A) NanoSuit 法で観察した精子

(B) (A) 頭部の強拡大

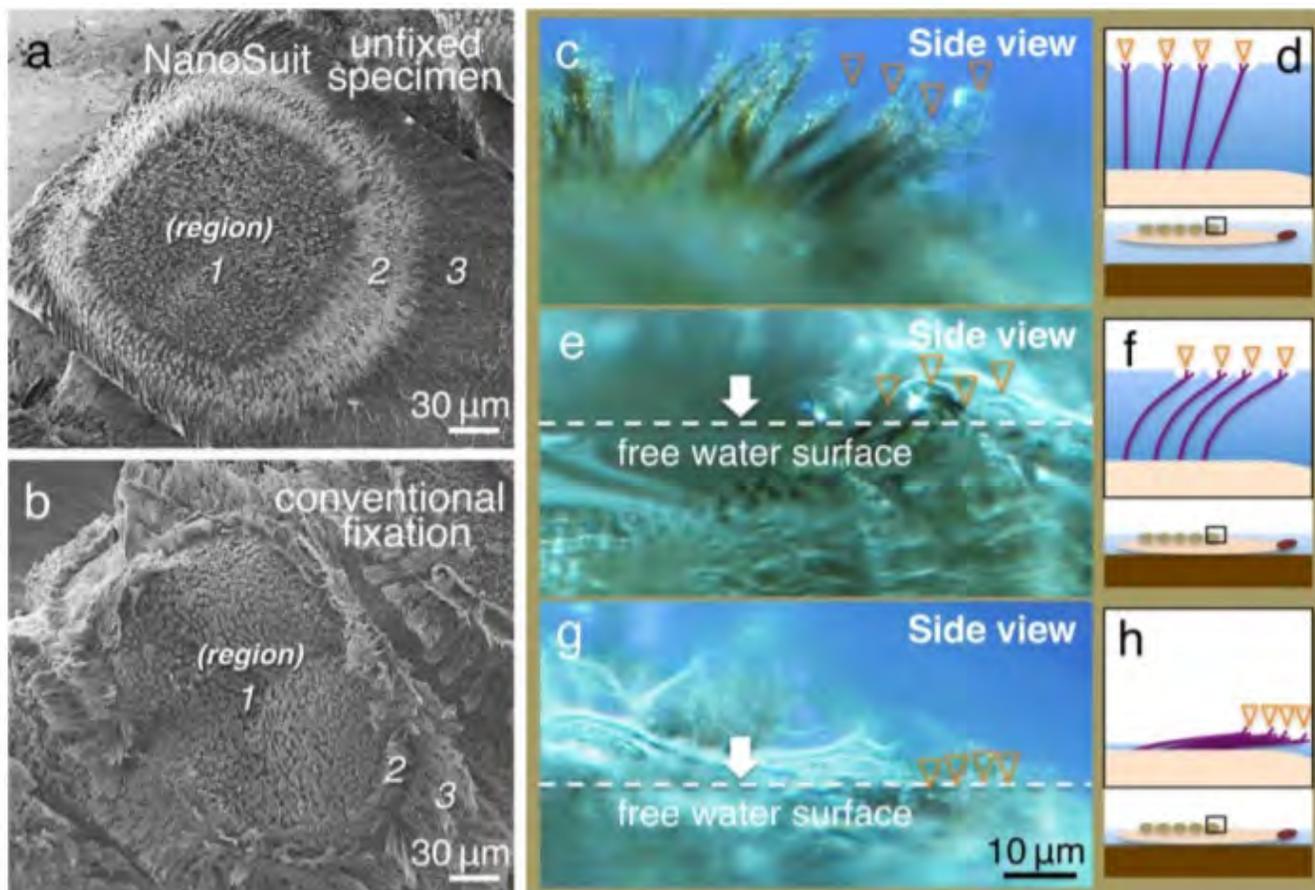
NanoSuit 法による観察精子で可能な解析①：形態異常精子の評価(C, 矢印は精子頭部空砲)

NanoSuit 法による観察精子で可能な解析②：免疫 SEM (図はレクチンタンパク質の結合パターンの評価, D and E, △はレクチン結合部位)

NanoSuit 法による観察精子で可能な解析③：元素分析(F)



# 観察事例 (ホソカ) 針山・高久他



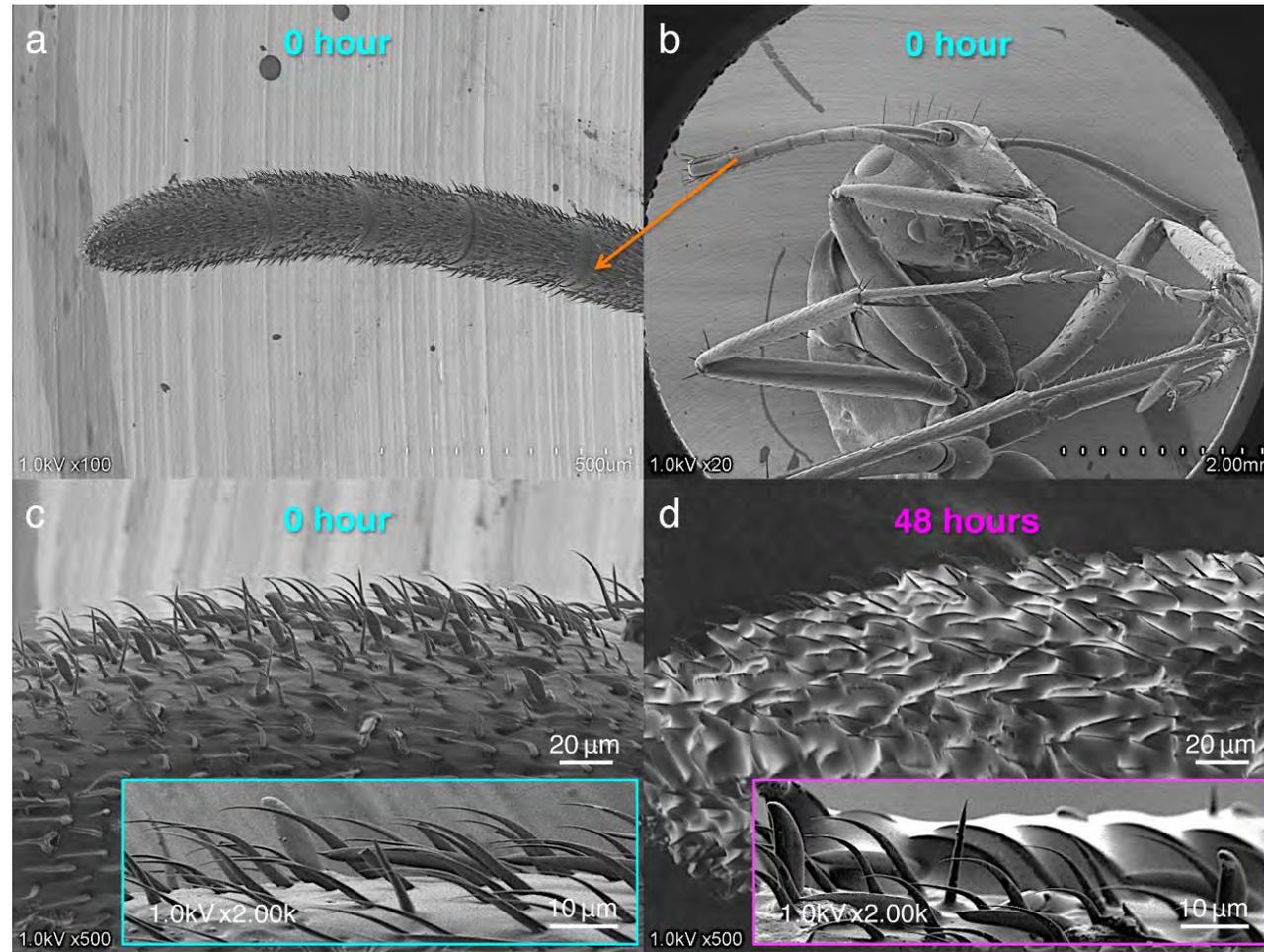
Nature (Communications Biology) に掲載されました。

ホソカ (*Dixa longistyla*) の幼虫は水面の水中側に留まることができ、これには体表にあるクラウン構造が寄与していることは知られていましたが、そのメカニズムは解明されていませんでした。

この度、クラウン構造を NanoSuit 法で観察することで従来の化学固定法では得られなかった真の構造を観察することができ水面に留まる現象のメカニズムが解明されました。

# 観察事例（クロオオアリ）

理研 尾崎まみこ先生



## “Insects”に掲載されました

クロオオアリは、体臭の素になる数種類の炭化水素の違い（割合）を識別して同じ巣の仲間か、別の巣の個体かを認識します（Ozaki et al, 2005）。この炭化水素を受容する場所は、触角（antenna）にある感覚毛ですが（図a-c）、常に掃除をしていないとWaxが付着し過ぎて感覚受容が出来なくなります（図d）。このような触角表面の変化は従来のSEM観察法では化学固定プロセスでの有機溶媒による処理中にWaxがすべて流れてしまって観察不能でしたが、NanoSuit法ではじめて観察が可能になりました（Mizutani et al, 2021）。』

# 観察事例（食品；魚の筋組織—冷凍の影響）

アマゴ (*Oncorhynchus masou ishikawae*)

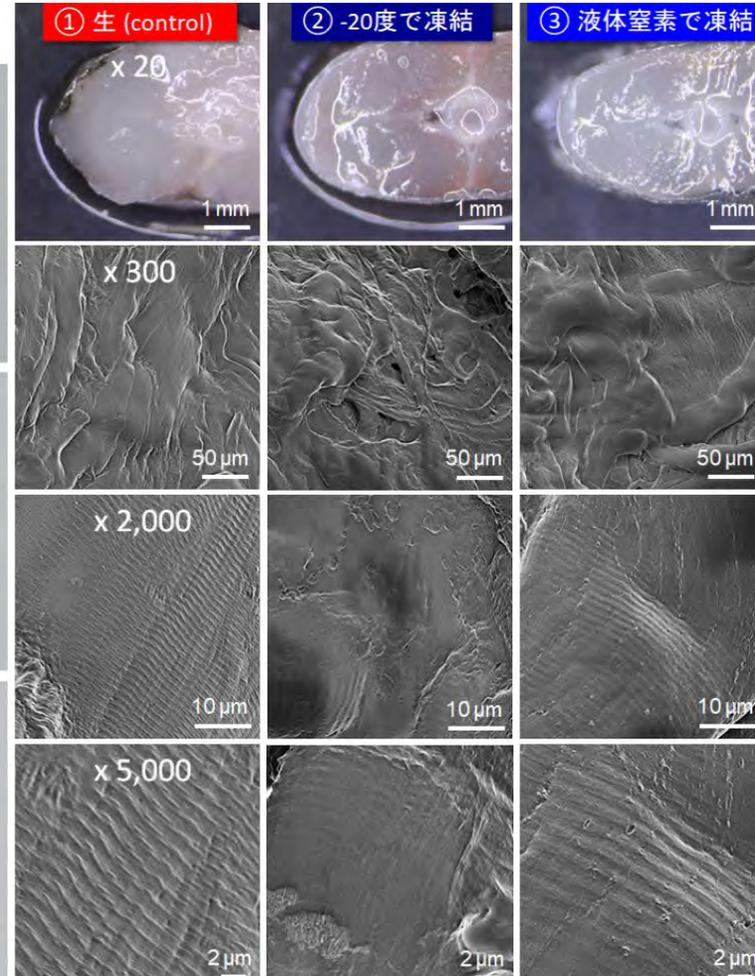
① 生 (control)



② 家庭用フリーザー(-20度)で凍結



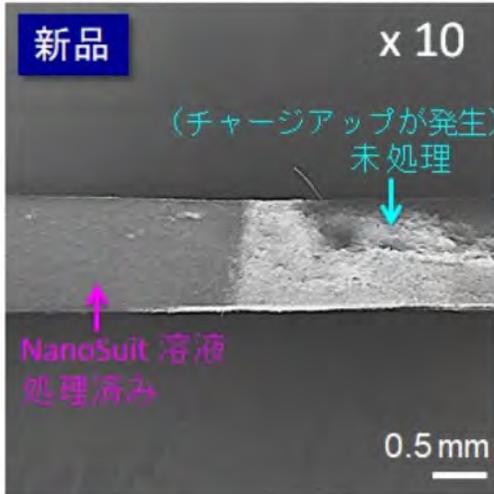
③ 液体窒素で急速凍結



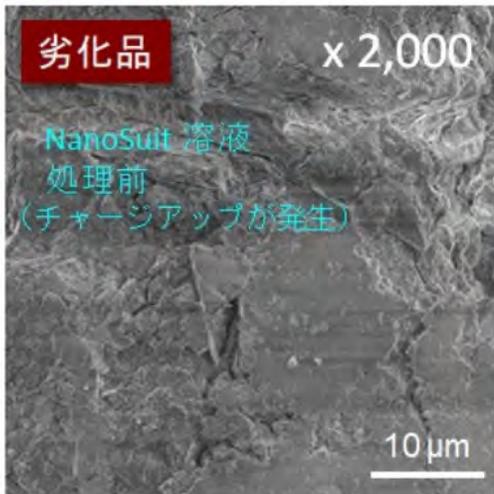
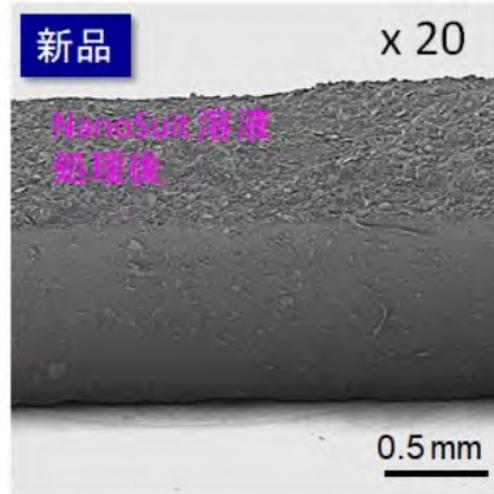
生／通常冷凍—解凍／急速冷凍—解凍、の比較観察

通常冷凍では魚の筋組織構造が失われているが、急速冷凍したものは筋組織構造が維持されていることが分かる。

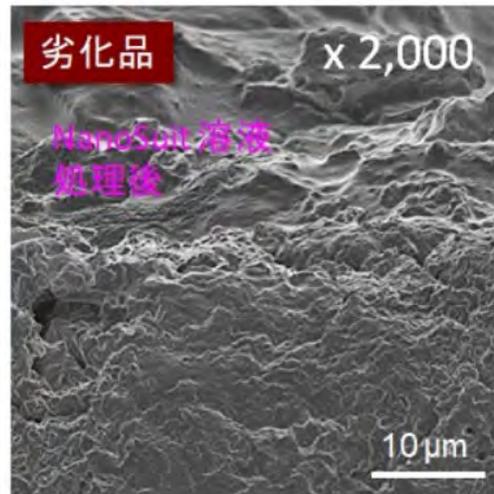
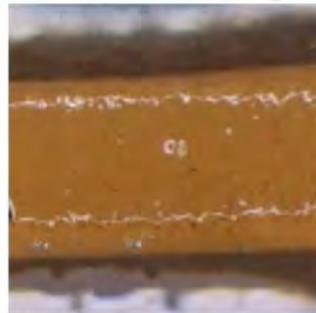
# 観察事例（材料；輪ゴム）



NanoSuit 溶液で処理



NanoSuit 溶液で処理



絶縁性材料を電子顕微鏡観察するとチャージアップが生じ画像にノイズが乗ってしまう。

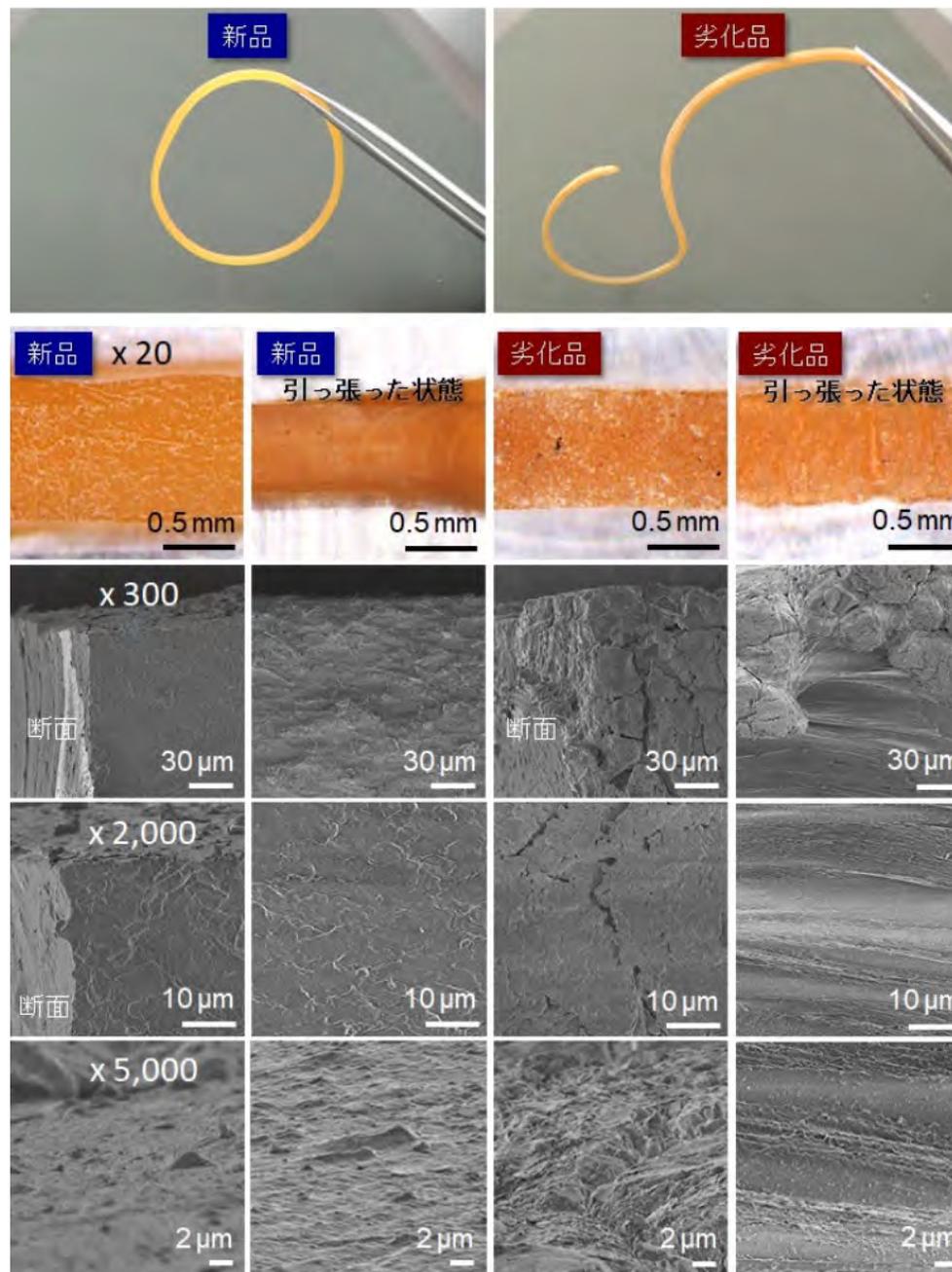
NanoSuit被膜は導電性を有するためチャージアップが低減された観察像を得ることができる。

# 観察事例（材料；輪ゴム）

NanoSuitによりチャージアップが低減されるため輪ゴムのような絶縁性材料についても簡易な操作\*でSEM観察が可能。

\* 従来法の金属蒸着に比べ簡易。

但しNanoSuitによって得られる導電性は金属蒸着には及ばないため観察試料および観察条件によって選択してください。



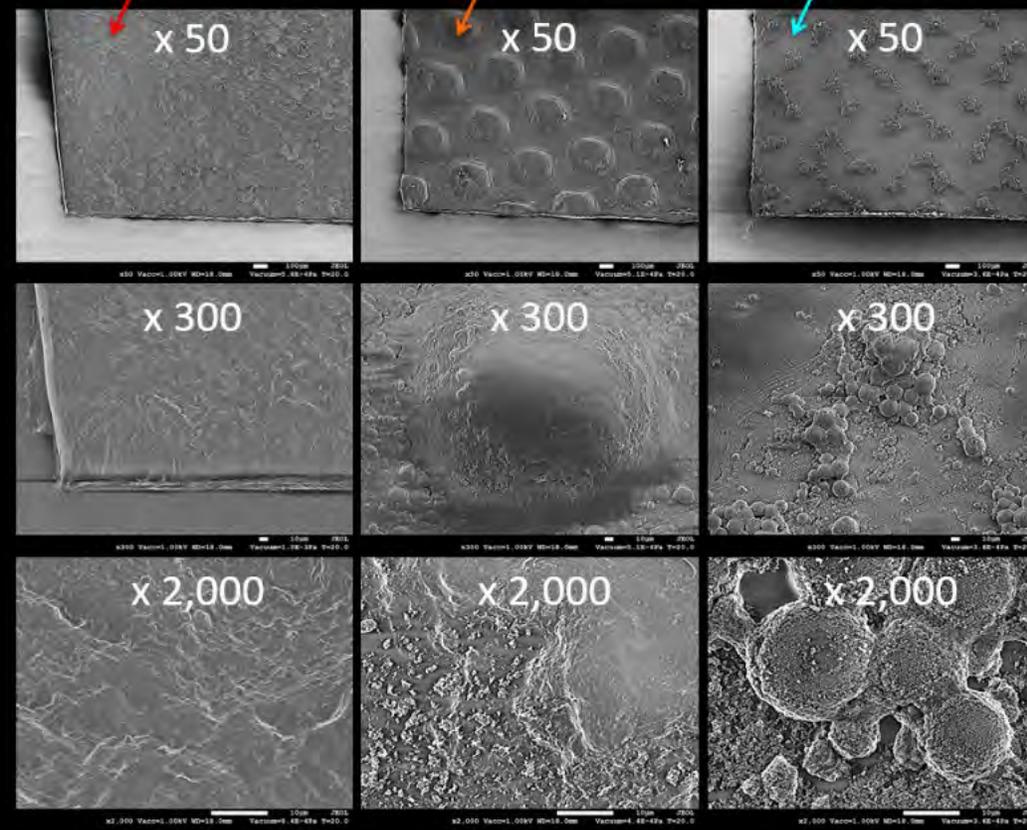
## 観察事例（材料；表面構造）

NanoSuit溶液 Type Iは表面張力を下げた設計がなされているため多様な素材に塗布しての使用が可能。

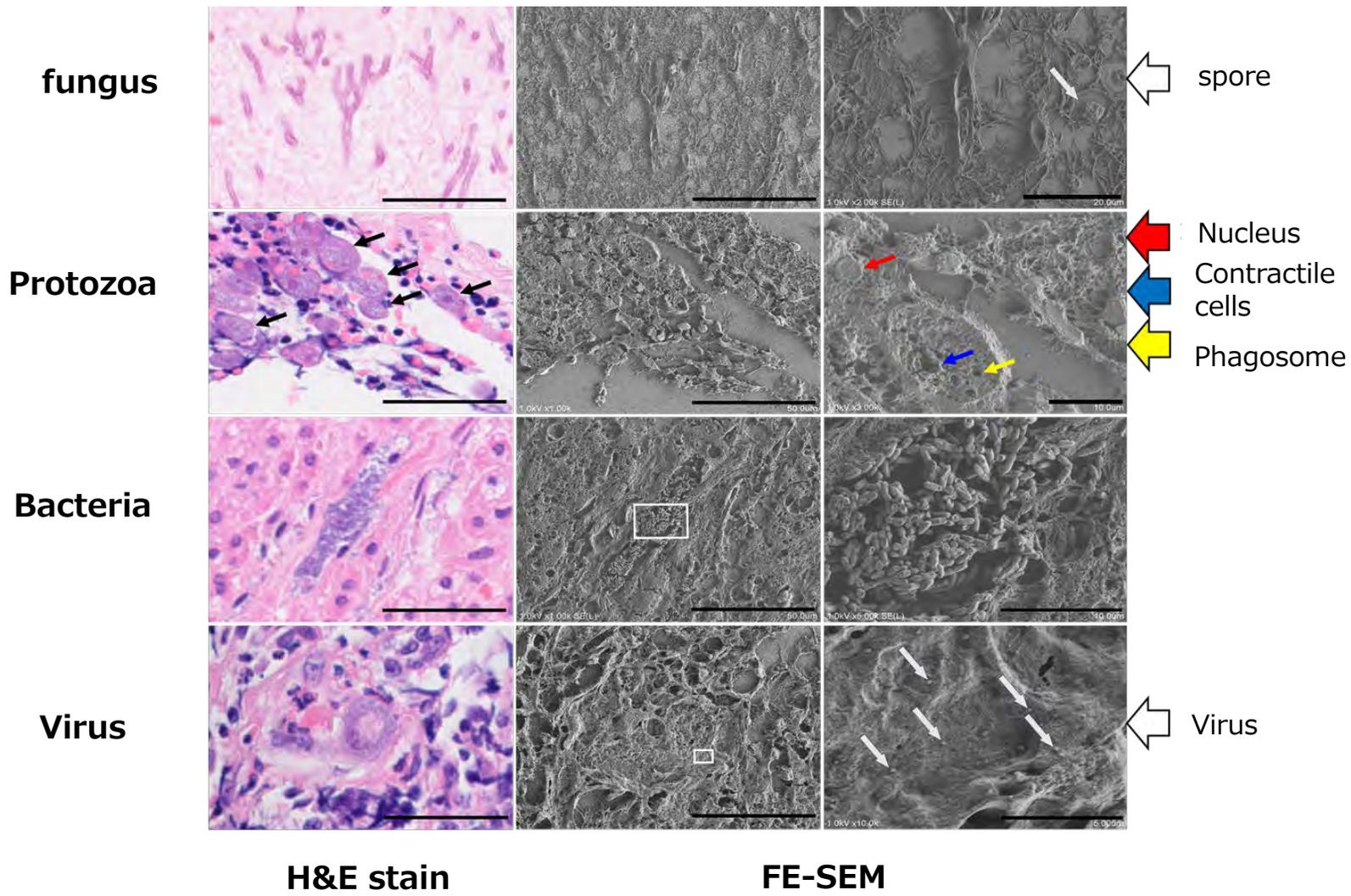
右の写真は微細な表面凹凸により内容物（ヨーグルト）の付着をおさえたフタ紙の裏面のSEM像。

それぞれ異なる微細構造であることがわかる。

ヨーグルトが付着しない蓋\_3種 (NanoSuit溶液 Type I\_使用)



# 観察事例 (CLEM; 光-電子相関顕微鏡法)



NanoSuitを用いると光-電子相関顕微鏡法 (CLEM)による観察も容易に行うことができる。

HE染色や免疫染色されたプレパラート標本にNanoSuit溶液を滴下するだけで走査型電子顕微鏡観察に供することができ、光学顕微鏡で得た情報に加えて電子顕微鏡で高倍率で観察した情報を得ることができる。

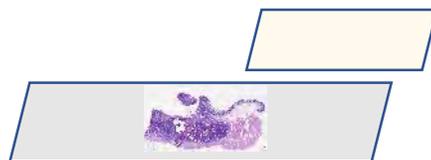
金属蒸着を必要としないので、大切なプレパラート標本を損なわずに電顕観察することができる。

# “NanoSuit-CLEM”の観察手順

光学顕微鏡観察



HE染色標本、免疫染色標本 etc.



キシレンなどの適切な溶媒で封入剤を溶かし  
カバーガラスをはずす。  
そののち親水化処理を行う。



NanoSuit溶液Type IIを試料に加える

スピナー等を用いて、NanoSuit溶液をひろげる



走査型電子顕微鏡観察



再染色可能  
再び封入して試料の保管が可能

大切な標本の  
再保管が可能

金属蒸着が不要

# NanoSuit®溶液type II 塗布前の病理組織検体の準備

**疎水性**の封入剤  
 例えば、HE染色などのプレパラートの場合  
 キシレンなどに漬けて、カバーガラスを外します。

**パラフィン**包埋切片の場合

## 脱パラフィン処理\*

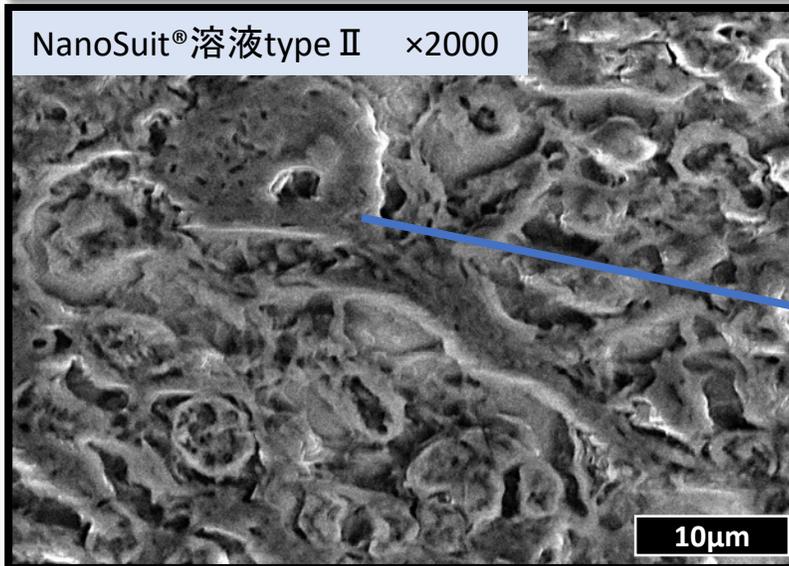
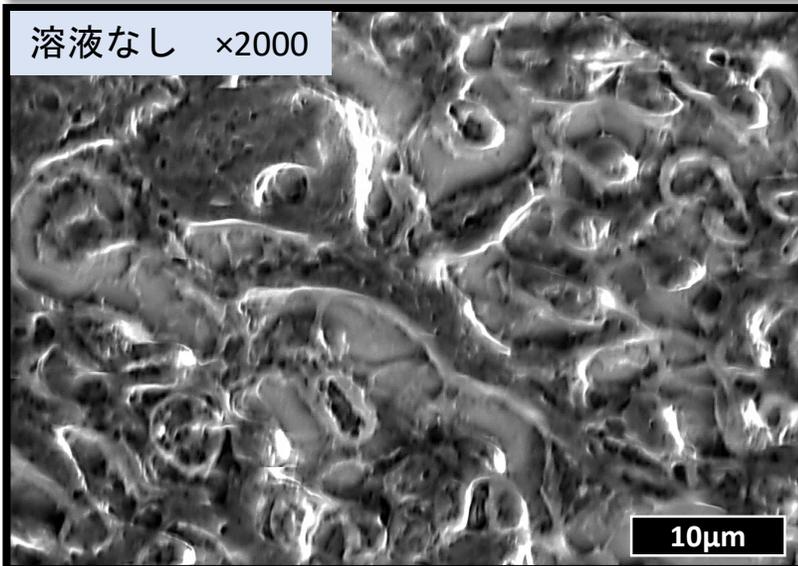
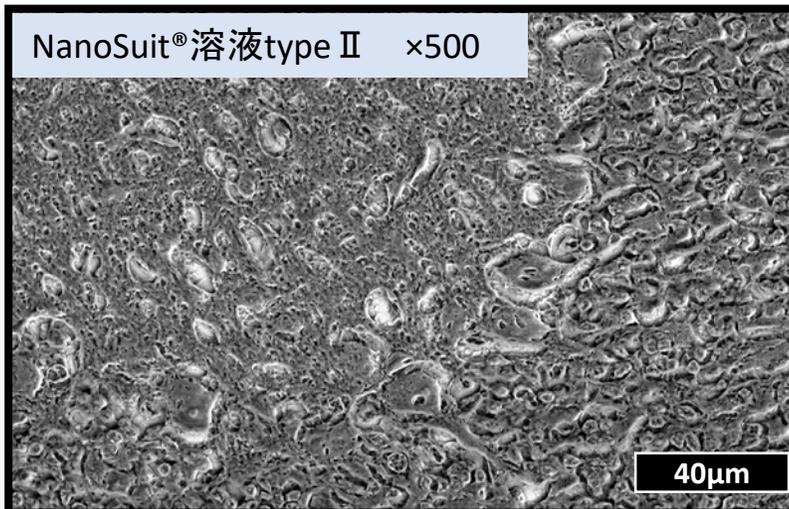
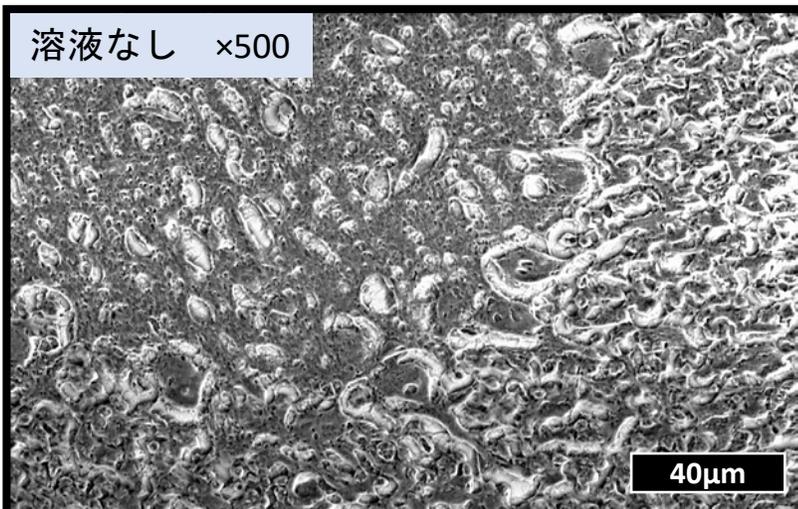
工程	試薬	時間
1	キシレン1	5分
2	キシレン2	5分
3	キシレン3	5分
4	キシレン4	5分
5	100%(無水)エタノール1	5分
6	100%(無水)エタノール2	3分
7	100%(無水)エタノール3	1分
8	100%(無水)エタノール4	1分
9	95%エタノール	1分
10	80%エタノール	1分
11	70%エタノール	1分
12	蒸留水1	5分
13	蒸留水2	5分

左の表は脱パラフィン処理\*の一例です。  
 皆様の研究室で培われた脱パラフィンの工程で  
 進めてください。

**親水性**の封入剤  
 例えば、蛍光免疫染色などのプレパラートの場合  
 カバーガラスを外し、PBS バッファ  
 などで洗浄します。

NanoSuit®溶液 type II をスピコートします。

# NanoSuitのチャージアップ軽減効果（パラフィン固定標本）



試料：マウス 小脳  
撮影条件：加速電圧10kV, 反射電子モード

左の溶液なしの像では、帯電現象（チャージアップ）が発生し、異常なコントラストによる像のギラつきや像の歪みが観察されます。また、この現象は観察倍率を上げると、より顕著に現れます。

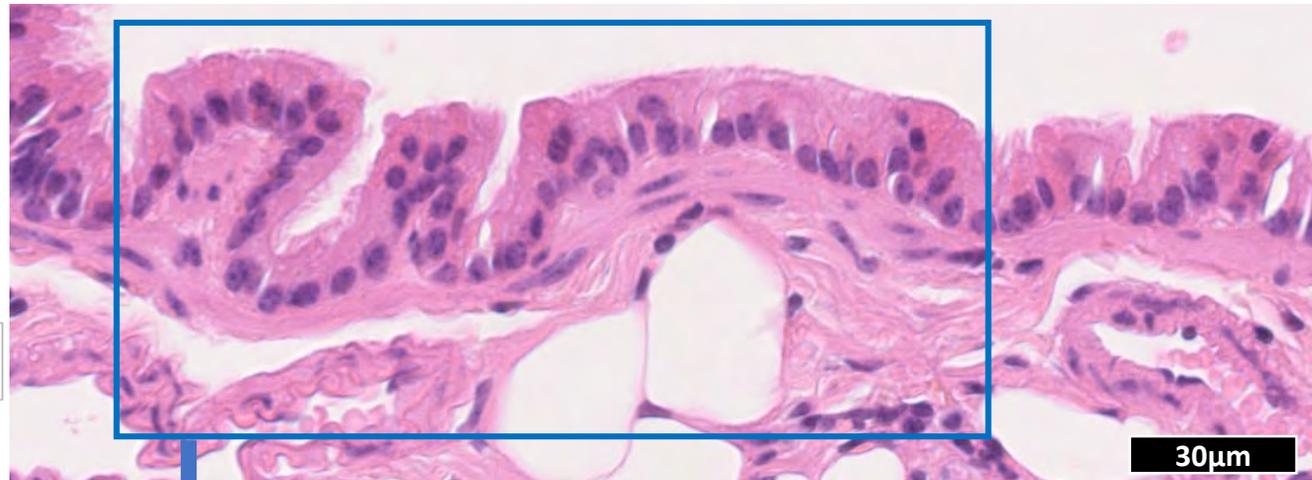
右のNanoSuit®溶液type II コートをした像では、チャージアップは軽減され、微細な構造の観察ができます。

→ 小脳プルキンエ細胞

# 観察事例（組織標本）

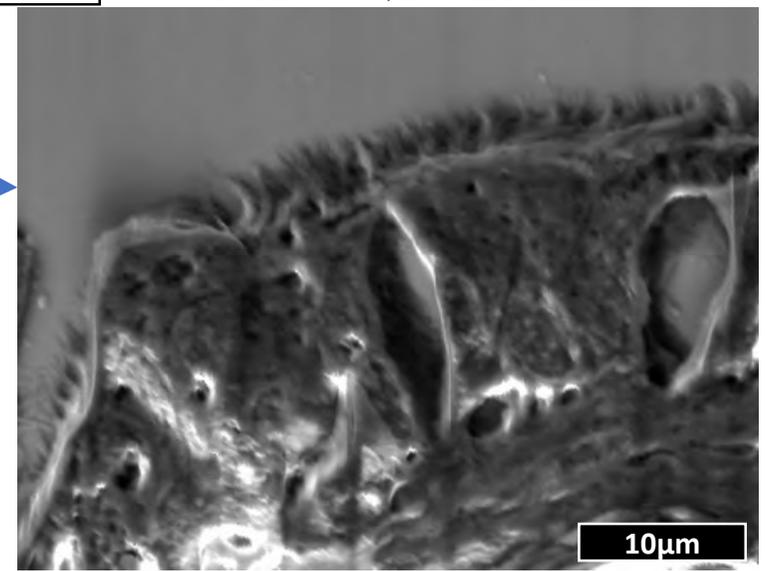
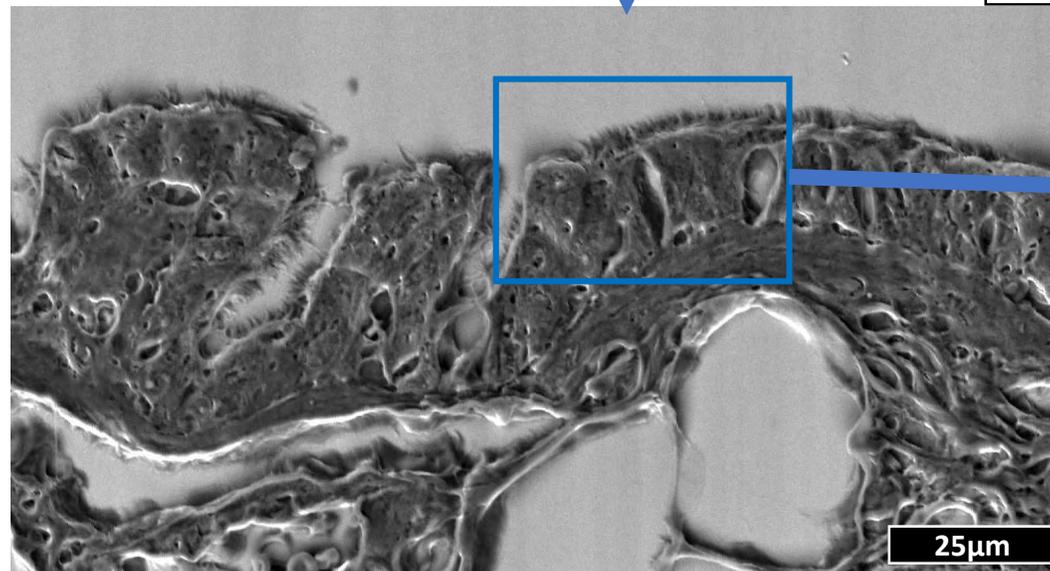
## マウスの肺の細気管支支の線毛

HE染色（光学顕微鏡観察）



SEM観察

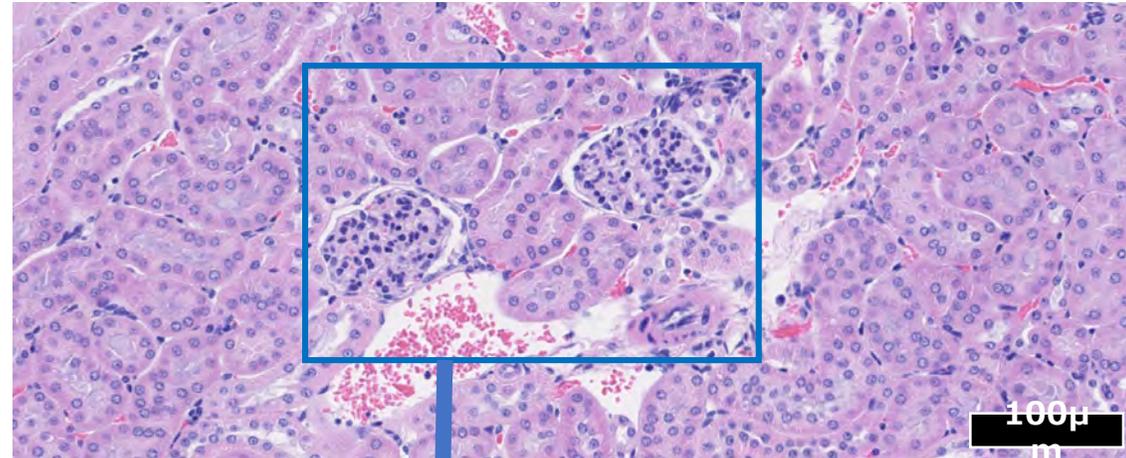
加速電圧10kV, 反射電子モードにて撮影



# 観察事例（組織標本）

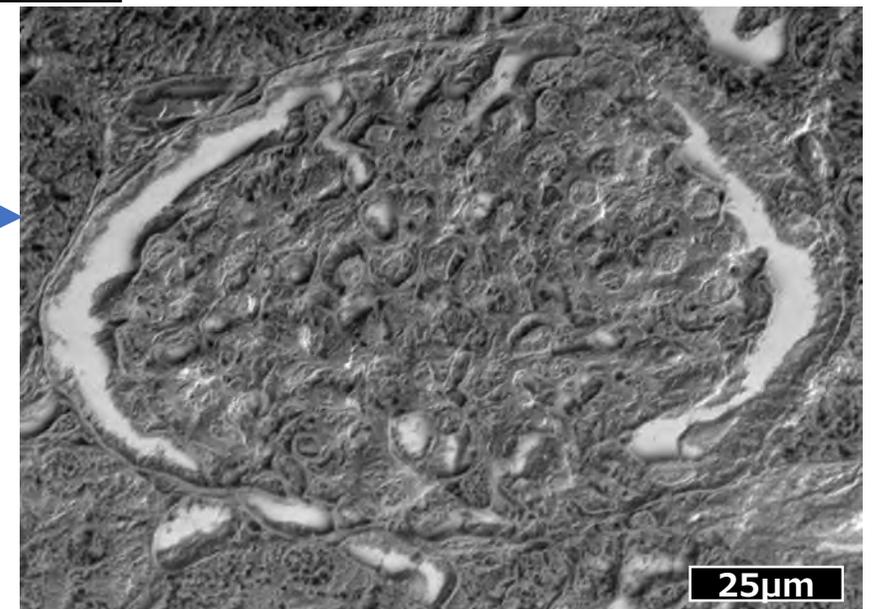
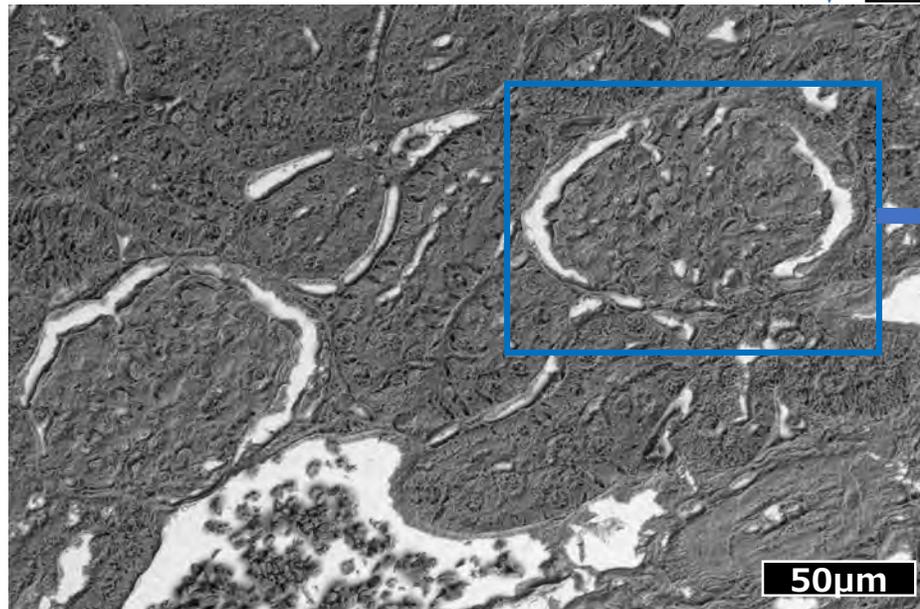
## マウスの腎臓糸球体

HE染色（光学顕微鏡観察）



SEM観察

加速電圧5kV, 反射電子モードにて撮影

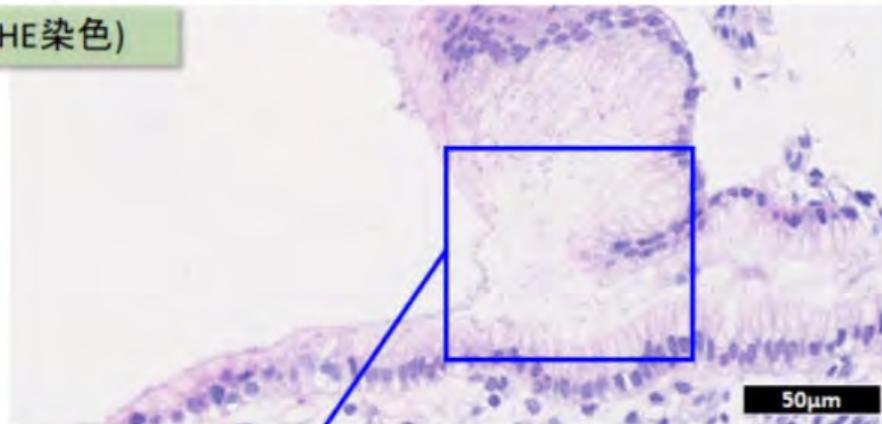


# 観察事例（組織標本）

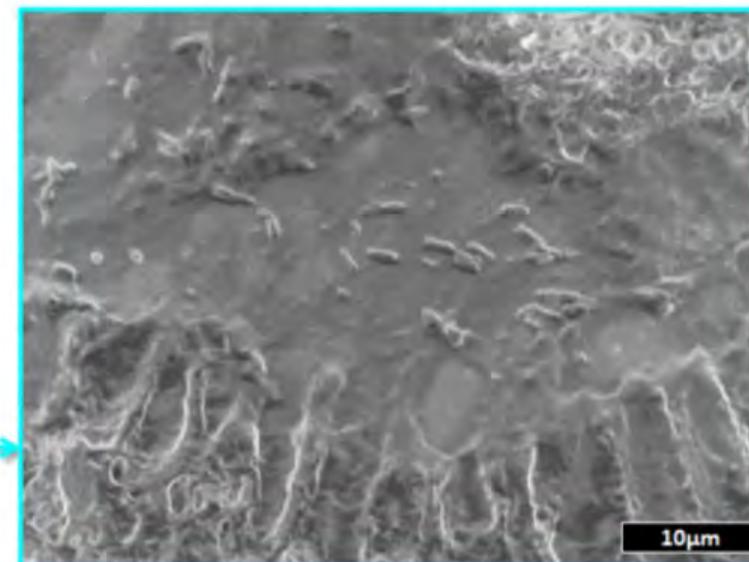
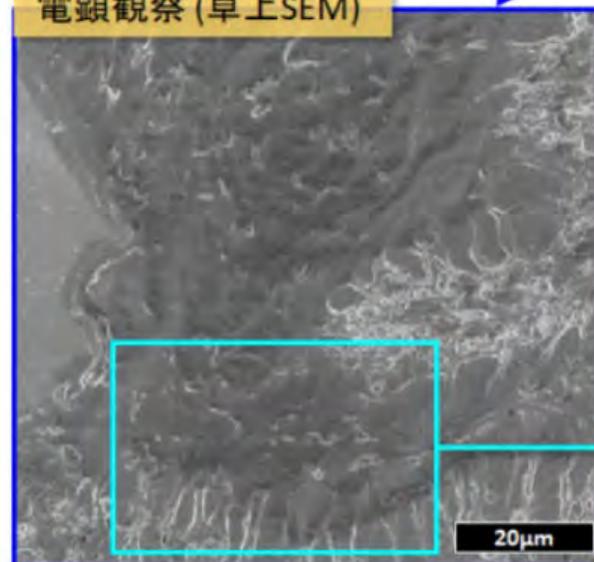
## 胃内壁のピロリ菌

ヒト 胃の粘膜のピロリ菌（NanoSuit溶液 Type-II 使用）

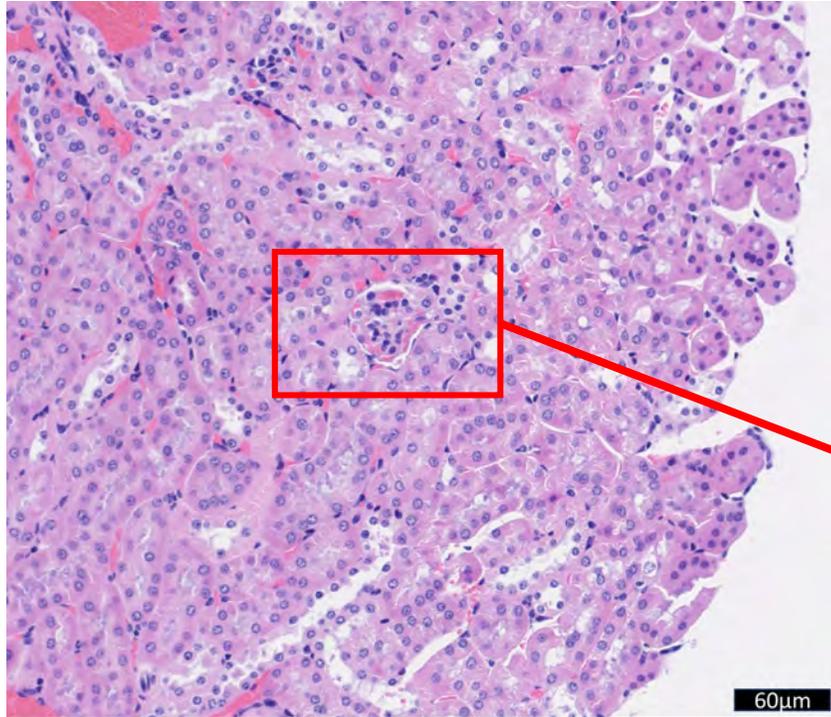
光顕観察 (HE染色)



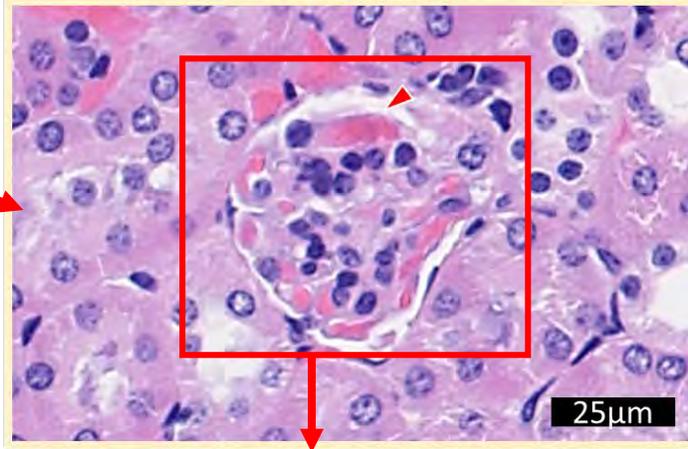
電顕観察 (卓上SEM)



# 観察事例（マウス腎臓 糸球体）

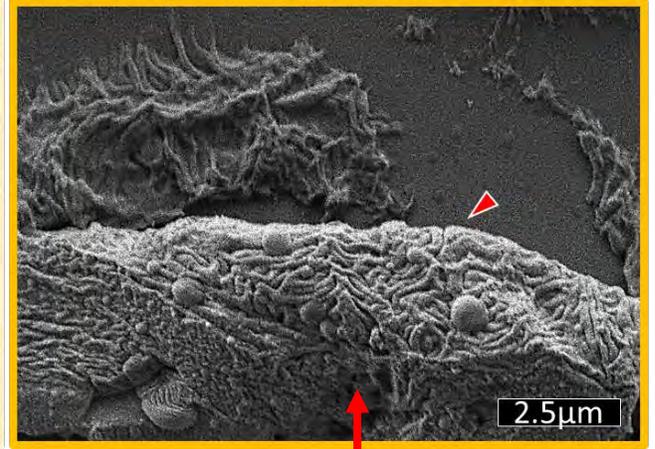


HE染色、光学顕微鏡

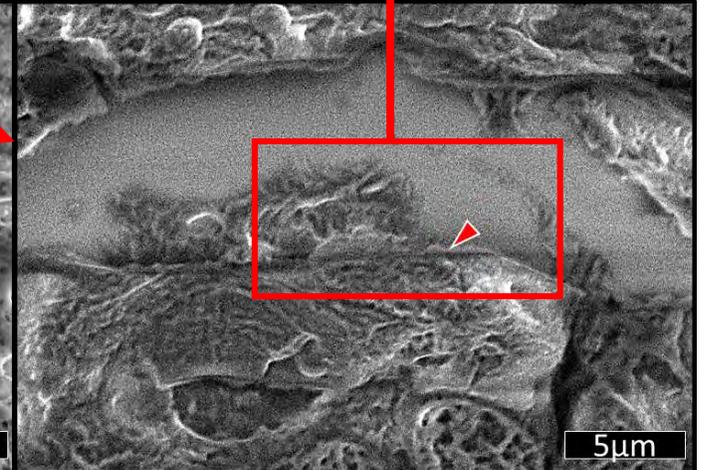


FE-SEMでの観察例  
タコ足細胞が明瞭に観察できた

NanoSuit®溶液 type II 使用、FE-SEM 撮影時の倍率x10000



NanoSuit®溶液 type II 使用、卓上SEM 撮影時の倍率 左：x1500, 右 x5000



卓上SEMでの観察例

# 観察事例 (SEM-EDS 解析) 浜松医科大学 新村先生

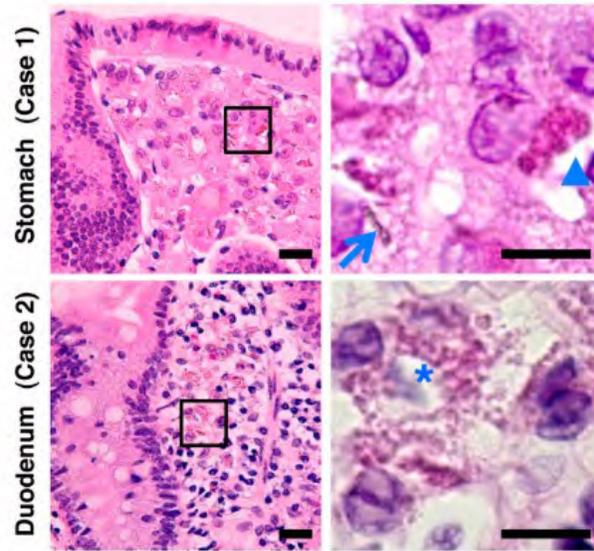


Diagnosticsに掲載されました

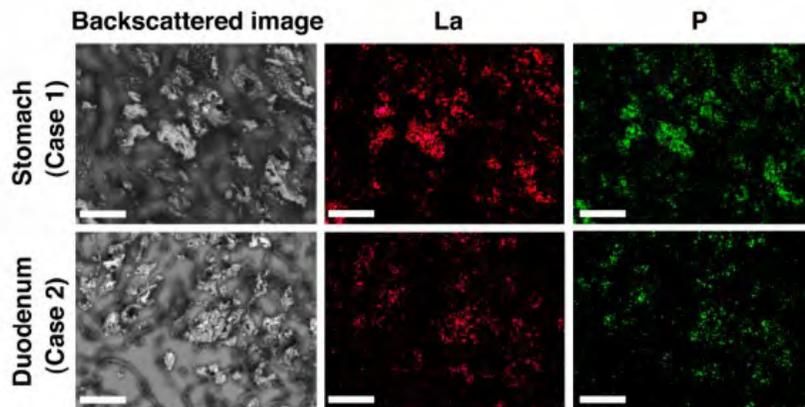
Article

## Utility of Scanning Electron Microscopy Elemental Analysis Using the 'NanoSuit' Correlative Light and Electron Microscopy Method in the Diagnosis of Lanthanum Phosphate Deposition in the Esophagogastroduodenal Mucosa

Kazuya Shinmura<sup>1,\*†</sup>, Hideya Kawasaki<sup>2,\*†</sup>, Satoshi Baba<sup>3</sup>, Isao Ohta<sup>4</sup>, Hisami Kato<sup>1</sup>, Hideo Yasuda<sup>5</sup>, Satoshi Yamada<sup>6</sup>, Kiyoshi Misawa<sup>6</sup>, Ken Sugimoto<sup>5</sup>, Satoshi Osawa<sup>7</sup>, Masanori Sato<sup>8</sup>, Takahiko Hariyama<sup>2</sup> and Haruhiko Sugimura<sup>1</sup>



(a)



(b)

**Figure 2.** Lanthanum phosphate deposition in the stomach and duodenum. (a) Images by light microscopy of H&E-stained gastric and duodenal mucosa containing brown pigment deposition, which was suspected as lanthanum phosphate deposition. Images in the right column are a higher magnification of the boxed areas in the images in the left column. Depositions showing granular, needle-shaped, or amorphous structures are marked with an asterisk, arrow, or arrowhead, respectively. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  (left); 10  $\mu\text{m}$  (right). (b) Lanthanum phosphate deposition in the gastric and duodenal mucosa shown by SEM-EDS analysis using the NanoSuit-CLEM method. Images in the left column are backscattered SEM images showing a bright area in the mucosa. The middle- and right-column images are elemental mapping images using SEM-EDS analysis showing deposition of lanthanum (La) and phosphorus (P), respectively. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ .

# 観察事例 (病理標本)

浜松医科大学 河崎秀陽先生

## Diagnosis of Ion-Exchange Resin Depositions in Paraffin Sections Using Corrective Light and Electron Microscopy-NanoSuit Method

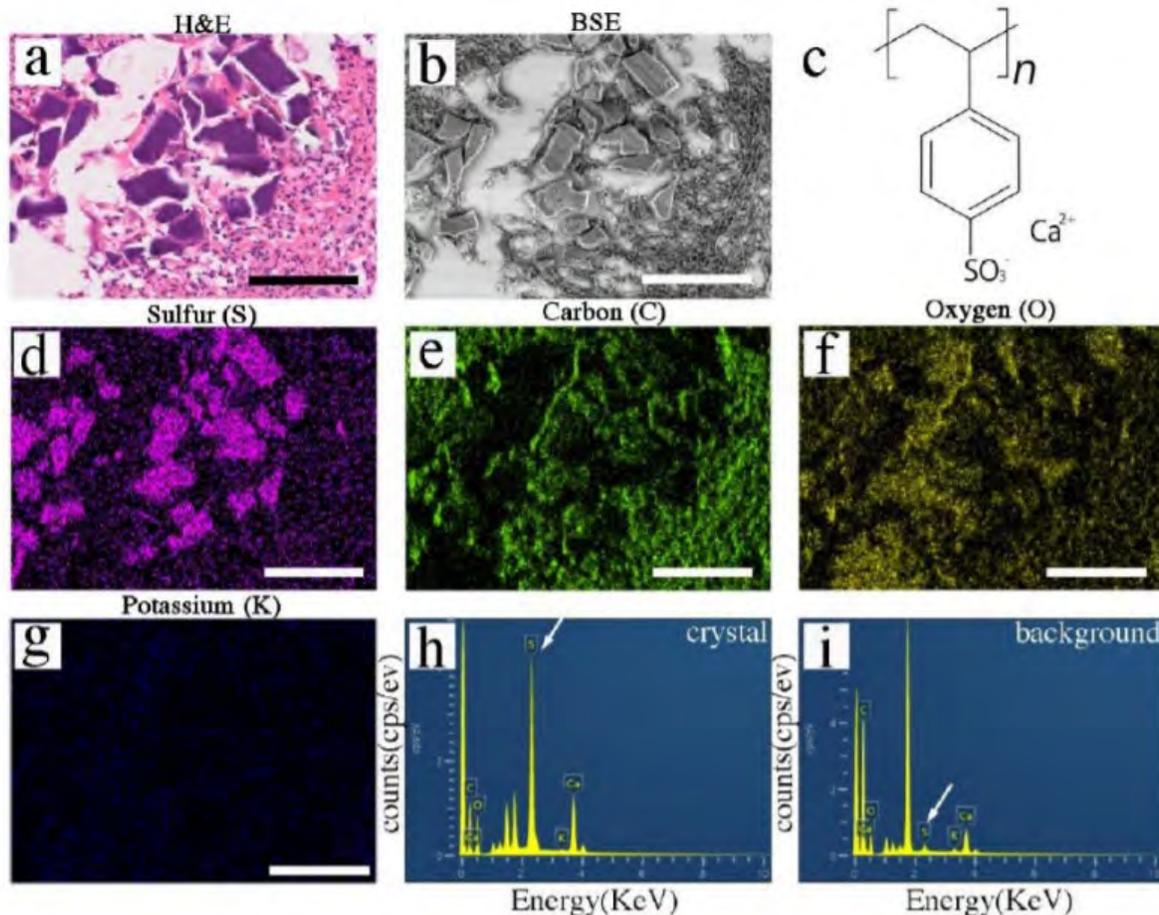
## Diagnosicsに掲載されました

高カリウム血症、高リン酸血症、高コレステロール血症などの治療に、ポリスチレンスルホン酸カルシウムなどイオン交換樹脂が使われます。しかし胃腸炎を誘発するなどの副作用も起きうるため病理組織診断にてイオン交換樹脂の残存やその状態を解析し、治療の継続や中断を判断する場面があります。

従来の H&E 染色による組織観察では病理医がイオン交換樹脂の種類や状態を識別できる割合は 76%程度とされていました。

これに対して、NanoSuit 法を用いた SEM-EDS 観察によりイオン交換樹脂中の硫黄、リン、カリウム等を検出し識別精度を高めることができました。

NanoSuit (TypeII) を用いると簡易な操作で病理標本表面に導電性を付与することができるので、このような解析が可能になります。



# 観察事例 (病理標本)

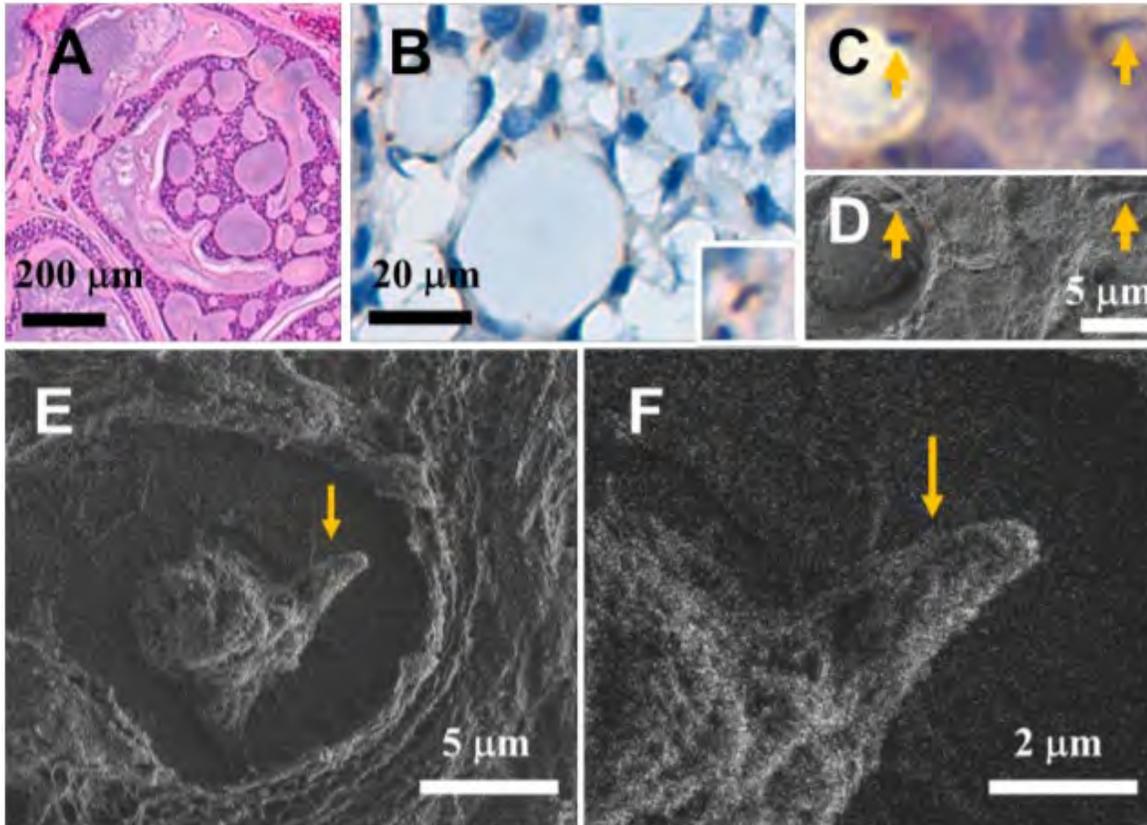
浜松医科大学 新村和也先生

THE JOURNAL OF  
**Pathology**

A Journal of  
The Pathological Society  
Understanding Disease

Original Paper

Identification and characterization of primary cilia-positive salivary gland tumours exhibiting basaloid/myoepithelial differentiation



## Journal of Pathologyに掲載されました

新村先生らは唾液腺腫瘍の様々な病理型組織のサンプル 100 例について、一次繊毛 (Primary cilia) の発現に着目して免疫組織学的解析方法と NanoSuit を用いた走査型電子顕微鏡観察を組み合わせ解析されました。

その過程で NanoSuit・correlative light electron microscopy (NanoSuit-CLEM)法にて、免疫染色標本上の一次繊毛と同一部位に立体的な一次繊毛像を得ることに成功されました。

新村先生らはこの研究で、多形腺腫、基底細胞腺腫、腺様嚢胞癌、基底細胞腺癌では、解析した全ての症例で一次繊毛を有していること、またワルチン腫瘍、唾液腺導管癌、粘表皮癌、腺房細胞癌では全ての症例で一次繊毛を有していないことを世界で初めて確認し、この一次繊毛有無の病理組織型区分は、筋上皮・基底細胞への分化成分を含むか否かに対応することを見出しました。さらに一次繊毛の発現に関わるシグナル伝達に関わるいくつかの遺伝子発現との関係も解明されました。

# NanoSuit®溶液 使い方



1

実態顕微鏡、ピペット、吸水紙（ろ紙など）、NanoSuit溶液、観察試料を用意



2

試料を試料台に置く



3

ピペットを用いてNanoSuit溶液を試料に滴下



4

余分なNanoSuit溶液を吸水紙で吸い取る（良い観察像を得るために必須）



5

必要に応じ試料を導電性テープで固定



6

試料台を電子顕微鏡の試料室に入れて真空引き開始



7

真空引きが終わったらすぐに観察開始  
（観察を開始して電子線が照射されたときにNanoSuit膜が形成されます）

## Tips

- クリアな画像を得るために試料には最小限のNanoSuit液が残るように余分なNanoSuit液はふき取ってください。
- 真空引きが終わったら速やかに電子線照射して観察を開始してください。

# NanoSuit®溶液 TypeII (病理標本用) 使い方



1 親水化処理したプレパラート標本にNanoSuit TypeIIを適量滴下する



2 スピンコーターにセットする

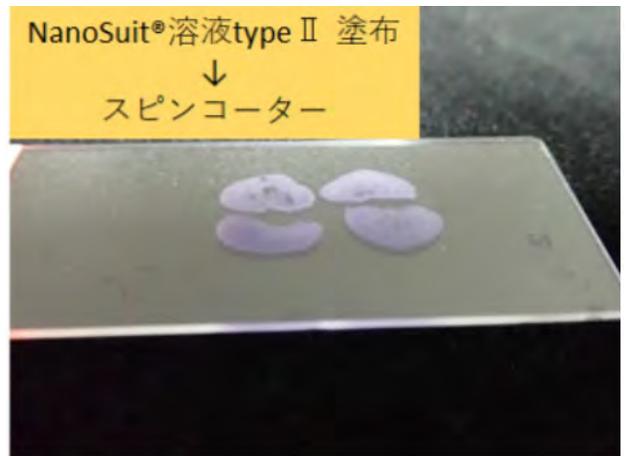
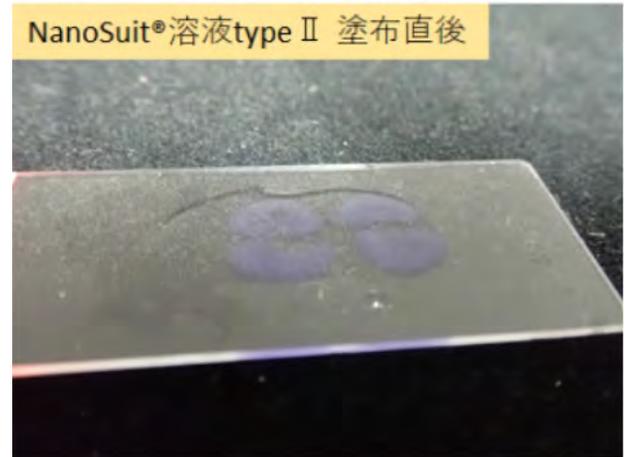


3 スピンコーターを回転させて液をひろげる



→ プレパラートを取り出してそのままSEM観察へ

(参考)  
NanoSuit液滴下後とスピコート後





**NanoSuit® 溶液 Type I**  
(微小生物/個体/生体組織用)



**NanoSuit® 溶液 Type II**  
(病理標本・CLEM用)



**NanoSuit® 溶液 Type III**  
(細胞用)

**NanoSuit溶液(5ml入り)**  
お取引先の試薬販売代理店様から購入いただけます  
(販売元：日新EM株式会社)

<http://nisshin-em.co.jp/nanosuit/index.html>

**NanoSuit株式会社にて**  
受託解析もお引き受けします  
Contact: [info@nanosuit.jp](mailto:info@nanosuit.jp)

# NanoSuit 溶液

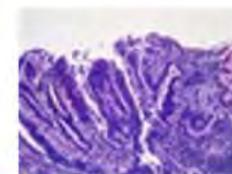
## - 溶液タイプ選択のガイド -



微生物  
植物  
食品  
化学材料 etc.

**NanoSuit 溶液 I**  
(微小生物・個体・生体組織用)

(水で希釈すると良い結果が得られる場合があります)



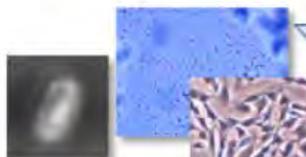
**NanoSuit 溶液 II**  
(病理検体・CLEM用)

パラフィン固定された病理検体標本専用です。

スフェロイド  
オルガノイド



細胞  
バクテリア



**NanoSuit Solution III**  
(細胞用)

エクソソーム  
ウイルス



## 「良くあるご質問」「こんなときは」

### 生物試料の観察にはNanoSuit液が必須なのですか？

- 一概には言えませんが、生物試料のなかには元々重合可能な特性をもつ粘性物質（細胞外分泌物質やワックス等）が表面を覆っている場合があります。そのような試料ではNanoSuit 溶液を使用しなくても表面の粘性物質が重合して被膜形成される場合があります。しかし粘性物質の量や特性は試料ごとに異なっています。
- そこで、あらかじめ NanoSuit 溶液で処理することにより、試料表面の状態が一定に保たれ安定した電子顕微鏡観察が可能になります。また NanoSuit 溶液は、導電性を併せ持つ生体適合性の素材を用いているので、生物試料に優しく「生きた状態のまま」チャージアップすることなく観察することが出来ます。

### NanoSuit液を使っても乾燥してしまいました。

- NanoSuit 薄膜が高真空状態で機密性の高いバリアとして機能し試料の含水状態を維持するためには、試料表面との相互作用がとても重要です。例えば生物試料では、上皮組織や細胞表面の特性を利用することによって高い保護能力を生み出します。工学素材の場合も、その表面の微細構造や素材特性を生かした状態で相補的なバリア能が発揮されます。
- そのため、元々バリア能の低い生物試料の場合、NanoSuit 溶液を用いても十分な効果が得られないことがあります。同様に対象試料が単なる溶液の場合（例；水滴）や、溶液が素材に含有されただけの状態（例；吸水した繊維）では、NanoSuit 溶液を用いても試料中の水分を保つことはできません。
- NanoSuitは試料の真空引きが終わって電子顕微鏡観察が始まり電子線が照射されたときに重合して被膜形成します。そうした使用法でうまく行かない場合でも、NanoSuit液を塗布後に低真空あるいは大気圧のプラズマ照射装置を使用して、しっかりとしたNanoSuit膜を形成させてから電子顕微鏡観察をおこなうと、改善がみられる場合があります。

### **ボヤツとして鮮明な画像が得られないのですが、どうしたらよいですか？**

- 余分なNanoSuit溶液の拭き取りが不十分なため、残留NanoSuit溶液が試料表面を厚く覆ってしまっていることが原因かもしれません。NanoSuit溶液が多く残っていると、電子線による分子重合が生じる際に厚い被膜が形成され、微細構造の観察が難しくなる場合があります。試料をNanoSuit溶液で処理した後、電子顕微鏡の試料室に入れる前に濾紙等で十分に拭き取ってみてください。
- またNanoSuit溶液Type IIIをお使いの場合は、試料に適した溶媒で数倍～10倍程度に希釈して用いると改善される場合があります。

### **試料表面が脂っぽくて細胞や組織構造が観察できないのですが？**

- 試料から分泌される大量の脂や粘液が試料表面を覆っている場合は、NanoSuit溶液を用いても微細構造が観察できないことがあります。
- そのような試料の場合、NanoSuit溶液Type I（界面活性剤を含みます）により前処理をおこなうことで、脂や粘液が除かれ観察像が改善される場合があります。

### **TypeIIで病理切片を観察しましたが、鮮明な画像が得られない、またはチャージアップをして観察できないのですが、どうしたらよいですか？**

- 蛍光免疫染色後のプレパレートの場合、カバーガラスを外した後、親水性封入剤が組織上に残っている場合にそのような現象が起こることがあります。
- NanoSuit処理の前にPBSなどでの洗浄作業をお勧めいたします。また通常の病理標本と同じく、検体スライドを乾燥しないよう十分にお気を付けください。