

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506008

研究課題名(和文) 高真空下における生物試料の生命維持機能の解明と宇宙環境への応用

研究課題名(英文) The elucidation of the life support mechanism under high vacuum condition: the application to space environment

研究代表者

太田 勲(OHTA, ISAO)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門員

研究者番号：20464133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たな宇宙実験材料として、重合薄膜『NanoSuit』によって保護された生物試料を用い、極限環境における生命維持メカニズムの解明を目的とした。宇宙ステーション軌道に相当する、電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)内の高真空環境(10<sup>-3</sup>-10<sup>-7</sup>Pa)を利用し、生命を保護するための新技術の開発を行った。その結果NanoSuitの新素材として、糖類とグリセリンを配合した新規合成溶液surface shield enhancer(SSE)の開発に成功し、含水状態のまま高解像度でFE-SEM観察が可能となった。また、多細胞生物に限らず幾種かの単細胞生物を高真空下で生命維持することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, with the aim of elucidating the life support mechanism in space, we have examined various living biological specimens protected with a polymerized thin film "NanoSuit". We used the high vacuum conditions (10<sup>-3</sup>-10<sup>-7</sup> Pa) in the observation chamber of a field-emission scanning electron microscopy (FE-SEM) as the experimental space, and revealed that a simple surface modification by electron beams can equip some multicellular organisms with a strong tolerance against the high vacuum. Furthermore, to protect living single cells, we have developed a new solution "Surface Shield Enhancer (SSE)" that consists of glycerin and electrolytes as a component for NanoSuit. The SSE based NanoSuit affords a much stronger barrier to gas and/or liquid loss than the previous NanoSuit did and, since it allows more detailed images, it could significantly help to elucidate the 'real' organization of cells and their functions under the space environment.

研究分野：微細構造、顕微鏡技術、細胞微細形態学

キーワード：走査電子顕微鏡 NanoSuit 高真空 生命維持 バリアー機能

### 1. 研究開始当初の背景

Arrhenius (1903) により「地球上の最初の生命は宇宙からやってきた」という『パンスペルミア仮説』が提唱された。この説は、原始大気は酸化的なものであり、グリシンなどのアミノ酸が合成されるのは難しいという物理化学的背景や、地球誕生からわずか数億年の38億年前の地層から生命体としての真性細菌様の化石が発見された進化的背景と整合性を持ち、「生命は地球上で無機物から生まれた」という従来の考えを否定する革新的なものであった。しかし、現存する生命体は、構成成分の70~80%が水であるため、宇宙空間の高真空環境に耐え得るとは考えにくく、生命の起源を考える上で大きな障壁となっている。

### 2. 研究の目的

電子線を用いる高分解能電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) は、宇宙ステーション軌道付近と同程度の高真空 ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$ Pa) 条件を必要とする。そのため、構成成分の80%ほどが水である生物を観察するためには、事前の化学固定や脱水・乾燥作業が不可欠とされ、生きた超微細構造の観察は不可能であった。これに対し申請者らは、昆虫の体表面物質を生物試料の保護溶液とし、電子線およびプラズマ照射をエネルギー場として利用した『生物試料をナノ薄膜バリアーで覆う方法 (NanoSuit®法)』より、これまでに誰も成し得なかった生きた生物の運動/変化を FE-SEM によりリアルタイム・高解像度で追跡することを可能にした (Takaku et al. 2013, 特願2012-197927 等) (図1、2)。本研究では、新たな宇宙実験の方法として NanoSuit®をさらに改良・発展させ、NanoSuit®によって保護された生物個体・細胞等を用い、宇宙ステーションレベルでの高真空環境の暴露実験を試みることにより、生命維持メカニズムの解明を目的とする。

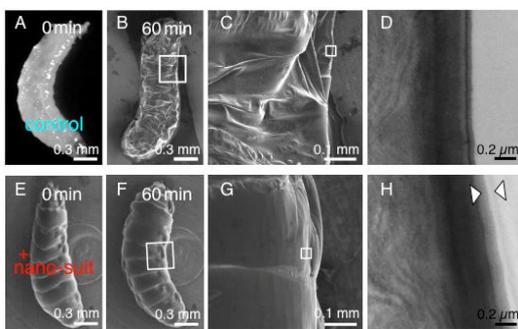


図1. ショウジョウバエ幼虫 (A) を高真空に暴露する (B-D) と個体は脱気・脱水されて死滅するが、真空暴露直後に電子線照射すると生存し (E-G)、固体表面に NanoSuit® が形成される。

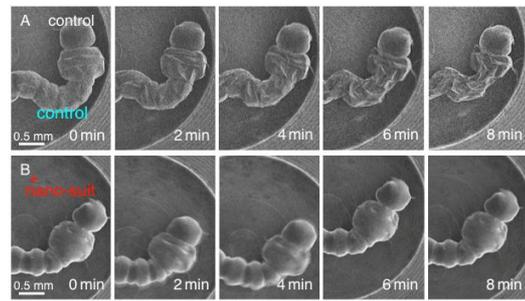


図2. シマダラカヤチカイエカのポウフラを飼育水から取り出し、そのまま SEM 中に入れると脱気・脱水され死んでしまう (A)、Tween20 (Polysorbate 20) 塗布後、自己組織化したこの物質に対し、電子線またはプラズマ照射すると、30分以上 SEM 中で運動を観察できた (B)。

### 3. 研究の方法

電子顕微鏡の鏡体内は宇宙環境に近い高真空状態に保たれており、地上において様々な生物を生きたまま電子顕微鏡内で実験・解析する新技術の完成は、宇宙ステーションでの船内及び船外暴露実験に直接応用できる。初年度は電子顕微鏡内における実験を中心に、生命の保護液として利用出来る成分を特定する。次年度以降は、これらの結果を統合的に活用し、細胞や組織レベルにおける詳細な生命応答へと解析範囲を広げて行く。さらに、地上と宇宙空間における NanoSuit®保護生物の実験をタイアップさせながら研究を展開し、独創的アストロバイオロジーとして生命の起源を探る。

### 4. 研究成果

(1) これまで宇宙生命科学分野では、宇宙ステーションを利用した様々な船内及び船外実験が行われてきた。各種生物の真空耐性も調べられ、例えば、乾燥状態にあるネムリユスリカの幼虫は、2年半の長期に渡って船外に放置しても蘇生可能であることが明らかになった。しかしこれは、外環境の湿度がゆっくりと下がっていく場合に、体内にトレハロースが大量に蓄積される「クリプトビオシス」がもたらす乾燥耐性を示したもので、実際、生きたまま高真空環境に曝された幼虫はたちまち脱気・脱水され死んでしまう (図3B, C)。これに対し、NanoSuit®で保護された個体は高い真空耐性を示す (図3D, E)。さらに、SEM 観察後に大気中へ戻し3-4日飼育水で約7割の幼虫は生存を続け、成虫脱皮し蚊となり飛翔した。申請者らの研究により、この特性は多細胞生物に限らず、幾種かの単細胞生物においても確認できた (高久, 2014 他) (Ohta et al., 2014) (Takaku et al., 2015)。



図3.ネムリユスリカの幼虫(A)をそのまま SEM 中に入れるとすぐに脱気・脱水され死んでしまうが(B, C)、Tween20 塗布後、電子線またはプラズマ照射処理した個体は、高真空中でもしばらく生存可能で(D, E)、微細構造を維持したまま電子顕微鏡で高解像度観察できる。

(2) 切除したばかりの哺乳類の組織・単離した真核細胞や培養細胞などは、Tween20 を主体とした初期の NanoSuit<sup>®</sup>ではクチクラや細胞壁や夾膜などに覆われていないために高真空環境下での保護が困難であった。そこで申請者は、バイオメテイクスの観点から生体適合性を考慮し、糖類とグリセリンを配合して新規合成溶液 surface shield enhancer (SSE) の開発に成功した(国際出願番号 PCT/JP2015/052404)。SSE 溶液によって保護された個体は高い真空耐性を示し、この特性は多細胞生物に限らず、幾種かの単細胞生物においても確認され、含水状態のままチャージによる障害もなく良好な分解能で FE-SEM 観察が可能となり、従来法で得られる SEM 像とは全く異なる画像を得ることに成功した(図4)(Takaku et al, R Soc Open Sci, 2017)。

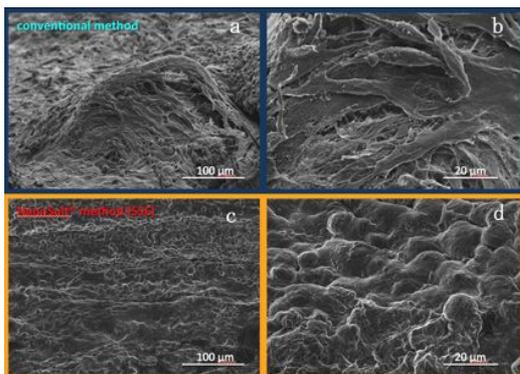


図4.従来法(a, b)とSSE 溶液による NanoSuit<sup>®</sup>法(c, d)のウサギ腹膜剥離部位病理標本の比較。従来法は細胞の剥離や隆起した構造である。NanoSuit<sup>®</sup>法で処理された細胞は整然と配列し、含水状態で観察できる。

(3) 高真空下における水の保持メカニズムを組織レベルで解析するために、SSE 溶液によって NanoSuit<sup>®</sup>処理した病理組織を FE-SEM により観察した。その結果、従来法では鑑別困難なヒト胃癌境界部の正常組織と癌組織の瑞々しい SEM 像が得られた。また、NanoSuit<sup>®</sup>処理した組織は含水状態のまま

あるため戻し包埋が可能になり、SEM 像と同一部位の断面切片が得られた。HE(ヘマトキシリン・エオジン)染色後、顕微鏡と SEM 像を組み合わせることにより正常細胞と癌細胞の鑑別が容易になった(図5)(Takaku et al, R Soc Open Sci, 2017)。

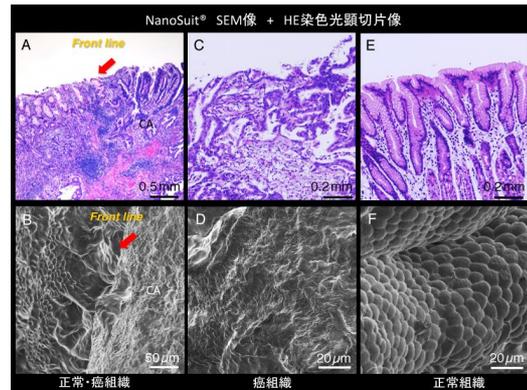


図5:胃癌境界部の判別。HE 染色光顕像(A,C,E)と NanoSuit<sup>®</sup>処理した SEM 像(B,D,F)を組み合わせることにより、より詳細な癌細胞と正常細胞の判別が容易になる。

(4) 高真空環境における、細胞レベルの生命維持メカニズムを解明した。SSE 溶液によって保護された線維芽細胞は、FE-SEM 観察後、大気圧中に戻しても培養液中で増殖することを確認した(論文作成中)。

(5) 宇宙環境への応用において、SSE 溶液を用いた NanoSuit<sup>®</sup>によって保護された生物固体・組織、細胞の生存実験を国際宇宙ステーション内外で行う目的のため、国際宇宙ステーション「きぼう」利用ファジビリティスタディ(FS)実験テーマ「生命科学分野」を応募申請したが、残念ながら不採択となり、宇宙実験は実現できなかった。

## 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12件)

Ohta I, Takaku Y(共筆頭著者), Suzuki H, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T: Dressing living organisms in a thin polymer membrane, the NanoSuit, for high-vacuum FE-SEM observation. Microscopy 63, 295-300(2014). 査読有

高久 康春, 鈴木 浩司, 太田 勲, 石井 大祐, 村中 祥悟, 下村 政嗣, 針山 孝彦「ナノスーツを用いた生きた生物試料の FE-SEM 観察」和文誌「顕微鏡」49(1), 68-72(2014). 査読有

針山 孝彦「ナノスーツ」高分子, 63, 634-635(2014). 査読有

針山 孝彦「生きたまま電子顕微鏡で観る「ナノスーツ」」化学工学,78(6),370-373(2014).査読有

Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Tsutsui T, Matsumoto H, Shimomura M, Hariyama T: A “NanoSuit” surface shield successfully protects organisms in high vacuum. Proc Biol Sci, 282 (1802),(2015).査読有

Kasuya A, Ohta I, Tokura Y: Structural and immunological effects of skin cryoablation in a mouse model. PLOS ONE, 10(3):e0123906,(2015).査読有

針山 孝彦、高久 康春、鈴木 浩司、石井 大祐、下村 政嗣「ナノスーツ法による生きたままの生物のSEM内生態観察」表面化学,36(4),201-206(2015).査読有

Hariyama T, Takaku Y “Dressing Living Organisms in the NanoSuit® for FE-SEM Observation” JEOL News,50(1),1-10(2015).

針山 孝彦「生きたまま濡れたままの試料を高真空下で観察可能にする NanoSuit®法」日本電子 news,47(1),28-33(2015).

Hameed S, Ikegami K, Sugiyama E, Matsushita S, Kimura Y, Hayasaka T, Sugiura Y, Masaki N, Waki M, Ohta I, Hossen MA, Setou M: Direct profiling of the phospholipid composition of adult *Caenorhabditis elegans* using whole-body imaging mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 407: 7589-7602(2015).査読有

高久 康春、鈴木 浩司、針山 孝彦、石井 大祐、森 直樹、平井 悠司、下村 政嗣「Biomimetic BiofilmとしてのNanoSuit®:生態観察の革新的手法」表面化学,37(5),202(2016).査読有

Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, Ohta I, Ishii D, Hirakawa S, Tsutsui T, Matsumoto H, Takehara S, Nakane C, Sakaida K, Suzuki C, Muranaka Y, Kikuchi H, Konno H, Shimomura M, Hariyama T: A modified ‘NanoSuit®’ preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in FE-SEM. Royal Society Open Science, R Soc Open Sci;4(3):160887 (2017).査読有

〔学会発表〕(計23件)

河崎 秀陽、高久 康春、目黒 史織、太田 勲、小杉 伊三夫、針山 孝彦、岩下 寿秀「Nano-suit」を用いたウイルス濃度の迅速測定法の検討」第103回日本病理学会総会(2014/4月 広島)

(招待講演)Hariyama T, Ohta I, Hirakawa S, Kawasaki H, Suzuki H, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Takaku Y “Dressing living organisms by a thin polymer membrane, NanoSuit, for the FE-SEM observation.” The 70<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Microscopy (2014/5月 千葉)

針山 孝彦、高久 康春、太田 勲、鈴木 浩司、村中 祥悟、平川 聡史、河崎 秀陽、石井 大祐、下村 政嗣「ナノスーツ-薄膜重合による高真空と大気における生命維持」第63回高分子討論会(2014/11月 長崎)

Tsutsui T, Matsumoto H, Takaku Y, Ohta I, Hariyama T “The NanoSuit method to observe the real living mammalian tissue and cell for the salutary life” 静岡健康・長寿フォーラム(2014/11月 沼津)

河崎 秀陽、高久 康春、目黒 史織、太田 勲、小杉 伊三夫、針山 孝彦、岩下 寿秀「ナノスーツ法を用いたウイルス濃度の迅速測定法の検討」第62回日本ウイルス学会学術集塊(2014/11月 横浜)

川村 亮平、石井 大祐、鈴木 浩司、高久 康春、針山 孝彦、下村 政嗣「酸化防止能と腐食防止能を有する両親媒性分子のプラズマ重合膜“ナノスーツ”」第52回高分子と水に関する討論会(2014/12月 東京)

(招待講演)針山 孝彦「ナノスーツ法:自然史学を変える電子顕微鏡観察法」自然模倣技術・システムによる環境技術開発に関するワークショップ,北海道大学工学部,札幌(2015年3月19日)

(招待講演)針山 孝彦「バイオミメティクスとしてのNanoSuit®法」國武豊喜先生文化勲章受章記念シンポジウム-分子組織化学ならびにナノ高分子科学の創成と発展-,東京コンベンションホール,東京(2015年4月17日)

(招待講演)針山 孝彦「ナノスーツが拓く構造観察の世界」第60回高分子夏季大学,朱鷺メッセ・新潟観光コンベンションセンター,新潟(2015年7月9日)

Hirakawa S, Takaku Y, Ishii D, Hariyama T “EGFRi-induced skin adverse events assessed by the NanoSuit®” 第75回日本癌治療学会学術集会(2015/10月 横浜)

平川 聡史、高久 康春、石井 大祐、針山 孝彦「EGFRiによる皮膚障害:ナノスーツ法を応用した新たな評価法」第53回日本癌治

療学会学術集会(2015/10月 京都)

(招待講演) Takaku Y  
“NanoSuit® preserves hydrous organic samples in high vacuum” International Symposium on Nature Inspired Technology (ISNIT 2016) (2016/1月, Daejeon, Korea)

(招待講演) Takaku Y, Suzuki C, Hariyama T “The NanoSuit method to observe the living mammalian tissue and cell” 日本化学学会第96回春期年会(2016/3月 京都)

(招待講演) 高久 康春 「NanoSuit®法によるリアルな生物表面観察のバイオミメティクスへの展開」日本化学学会第96回春期年会(2016/3月 京都)

針山 孝彦 「ナノスーツ法: SEM 観察法の新潮流」国立科学博物館企画展「生き物に学び、暮らしに活かす博物館とバイオミメティクス」併設講演会(2016/6月)

坂井田 佳奈, 高久 康春, 河崎 秀陽, 針山 孝彦 「NanoSuit®法による生きたままの培養細胞観察」日本顕微鏡学会第72回学術講演会(2016/6月 仙台)

村中 祥悟, 太田 勲, 熊切 葉子 「100kV 汎用 TEM の Computer Tomography(CT)による3D 像を用いた細胞小器官の細胞活性に伴う構造比較」日本顕微鏡学会第72回学術講演会(2016/6月 仙台)

Matsumoto H, Takaku Y, Shimomura M, Hariyama T “The combination of Nanosuit and EDS methods revealed the elements of biopolymer included in alive aspmle”, 第65回高分子討論会(2016/9月 横浜)

針山 孝彦 「ナノスーツ法が拓く走査顕微鏡の新展開」16-2 バイオミメティクス研究会 “バイオミメティクスにおける生物機能解析と工業的応用”(2016/9月)

Hariyama T “The NanoSuit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum, seeks the new vision for the sustainable world” Asia NANO 2016 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (2016/10月 札幌)

④ (招待講演) 針山 孝彦 「多機能性を持つ生物の表面構造-バイオミメティクスの視点から」2016 真空・表面科学合同講演会, 名古屋国際会議場, 名古屋(2016年11月29日)

② 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司,

石井 大祐, 下村 政嗣 「ナノスーツ法による生きたままの生物の SEM 内生態観察」2016 真空・表面科学合同講演会, 名古屋国際会議場, 名古屋(2016年11月29日)

③ 太田 勲 「生きたままの生物を FE-SEM で観察可能にするための高分子薄膜 “NanoSuit®の装着”」第146回電子顕微鏡研究会, 東京(2016年12月3日)

〔図書〕(計2件)

高久 康春 他、日刊工業新聞社、電子顕微鏡のための宇宙服、2016、52-53

針山 孝彦, シーエムシー・リサーチ、第4章 ナノ重合膜(NanoSuit®法)による生きた状態での生物の高解像度電子顕微鏡観察、2016、40-48

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 含水状態の生物試料の電子顕微鏡観察用保護剤、電子顕微鏡観察用キット、電子顕微鏡による観察、診断、評価、定量の方法並びに試料台

発明者: 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司, 平川 聡史, 河崎 秀陽, 下村 政嗣, 石井 大祐, 太田 勲, 村中 祥悟

権利者: JST

種類: 基礎出願

番号: PCT/JP2015/052404

出願年月日: 2015年1月28日

国内外の別: 国際出願

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 勲 (OHTA, Isao)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門員

研究者番号: 20464133

(2) 研究分担者

針山 孝彦 (HARIYAMA, Takahiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30165039

(3) 研究分担者

高久 康春 (TAKAKU, Yasuharu)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号: 60378700