

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08150

研究課題名(和文) NanoSuit法に元素分析法を組み合わせた、生きたままの昆虫表面解析と工学応用

研究課題名(英文) In situ elemental analyses of living biological surface using NanoSuit and EDS methods in FE-SEM.

研究代表者

高久 康春 (Takaku, Yasuharu)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任研究員

研究者番号：60378700

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)：我々は、昆虫が潜在的に備えているバリアー能を模倣・利用するという視点から、生物を生きた状態のまま電子顕微鏡で観察するNanoSuit法の開発に取り組んできた。本研究では、NanoSuit法にEDS元素分析法を組み合わせて、生体の超微細構造を濡れたままの状態高分解能・元素分析する技術「NanoSuit-EDS法」を完成させた。この新技術を用いて昆虫の発生過程を継時的に追跡し、金属濃縮に関わる形態形成の過程を明らかにした。また、NanoSuit-EDS法では、高真空下でも生体内の水が保持されるため、水に起因するO(酸素)の状態・変化を、超微細構造においてLive解析することも可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により確立された新技術により、生きたままの生物試料を高分解能観察・EDS解析することで解明される生命現象は、これまでの観察結果を正確にするだけでなく、生命現象そのものについて新たな超微形態的知見を与えることは明白である。本研究によるNanoSuit法とそれを基礎とした生きた元素分析による解析結果は、生命科学全体に新たな視点をもたらし、農学・生物学・医学・物理化学・材料工学などの分野にこれまでにない新機構を提案するとともに、バイオミメティクス研究の推進に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：An energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) carried out with a scanning electron microscope (SEM) is a common technique for elemental analysis. However, for studying the 'wet' biological systems, conventional sample preparation methods require complex pre-treatments to stabilize these specimens under high vacuum conditions of high-resolution SEM, which often produces unwanted artifacts. In the present study, we have examined the suitability of the NanoSuit method (e.g. Takaku et al, 2013) for the elemental analyses of living biological specimens in FE-SEM. We found that the specific fine hairy structures in some living insects collected from the natural environment showed the expression and distribution of aluminum (Al) elements. The specimens prepared by the conventional methods did not display such the elemental signal in the EDS data due to the various pre-treatments. The proposed NanoSuit method can improve the quality of in situ elemental analysis for biological samples.

研究分野：形態学

キーワード：NanoSuit 高真空 元素分析

1. 研究開始当初の背景

電子顕微鏡は、光学顕微鏡では見ることが出来ない極微細な構造を高分解能で観察可能なため、開発・改良を重ねながら様々な分野で用いられてきた。しかし、イメージングに用いる電子線の特性を最大限に引き出すには、顕微鏡内を宇宙ステーション軌道レベルに相当する『高真空環境 (10^{-3} - 10^{-6} Pa)』に保つ必要があった。そのため構成成分の70~80%が水である生物試料を観察する場合には、事前の化学固定や脱水・乾燥作業(従来法)が不可欠と考えられ、生きた超微細構造の動的観察は不可能であった。またこれらの処理は、試料の変形やアーティファクトを生じさせる為、従来の試料作成法による観察・解析による結果は、生体本来の構造を正確に捉えてはいなかった。これに対し我々は、既に、全く新しいアプローチで生物試料の高真空・高分解能観察に成功している。昆虫の体表面物質(もしくは人為的に塗布した疑似物質)に、電子線およびプラズマを照射することにより、体表全面に高気密 NanoSuit を形成し(図1)、高真空中で試料を生きたまま維持・観察することが可能となった(図2)(Takaku et al, 2013; Suzuki and Takaku et al, 2013; Ohta and Takaku et al, 2014; Takaku et al, 2015; Takaku et al, 2017; Takehara and Takaku et al, 2018; Takehara and Takaku et al, 2020; 特願 2011-197685; 特願 2012-044383; 特願 2012-197927; 国際出願番号 PCT/JP2015/052404 他)。

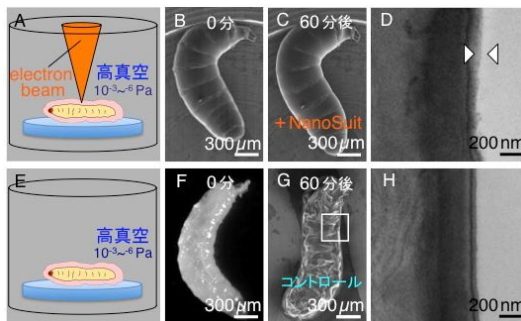


図1. 電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM) の高真空中における NanoSuit 法による生命維持(A-C)と、NanoSuit (矢頭間) 形成後の、試料(キイロショウジョウバエの幼虫) 体表面の透過型電子顕微鏡像 (D)。NanoSuit で保護していない試料は脱水・脱気されてしまう (E-H)。

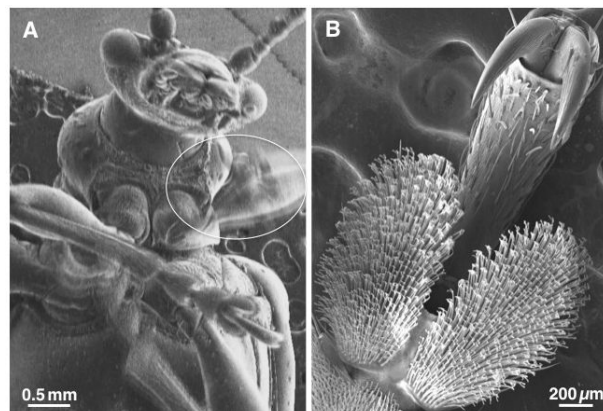


図2. NanoSuit 法で動的観察したユリクビナガハムシの FE-SEM 像 (A)。脚先の超微細構造が生きた状態のまま観察できる (B)。

2. 研究の目的

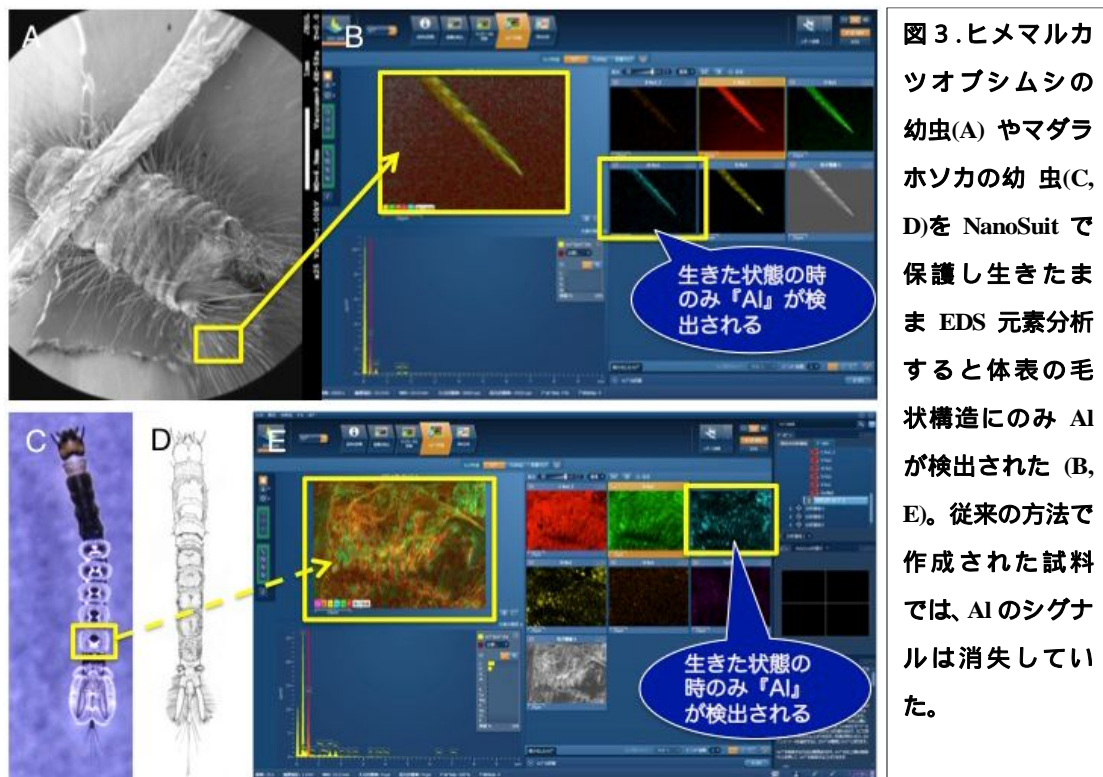
本研究では、この方法を展開し NanoSuit 法に EDS 元素分析(エネルギー分散型 X 線分析・Energy Dispersive x-ray Spectrometry : どこにどのような元素が分布しているか、元素ごとに Mapping できる解析技術)を組み合わせることにより、「微細構造を壊すことなく、FE-SEM による、生きたまま・濡れたままでの高分解能・元素分析」する新技術(NanoSuit-EDS 法)の開発に取り組む。さらにこの技術を用い、これまでの試料作成法では失われていた生きたままの試料が示す生来の元素の状態を解明する。同時に、サブセラー・サイズで刻々と変化する昆虫の発生現象を、元素を指標に追跡する。

3. 研究の方法

本研究では、主に昆虫試料を実験材料として用い、NanoSuit 法と従来法の元素分析の比較解析を行った。従来法で必要とされる、化学固定・脱水・導電性素材による極薄コーティングなどの前処理を行わずに、NanoSuit 法では、生きたままの試料をSEM チャンバーに導入し、電子ビームの照射によりNanoSuit を形成させEDS で測定した。

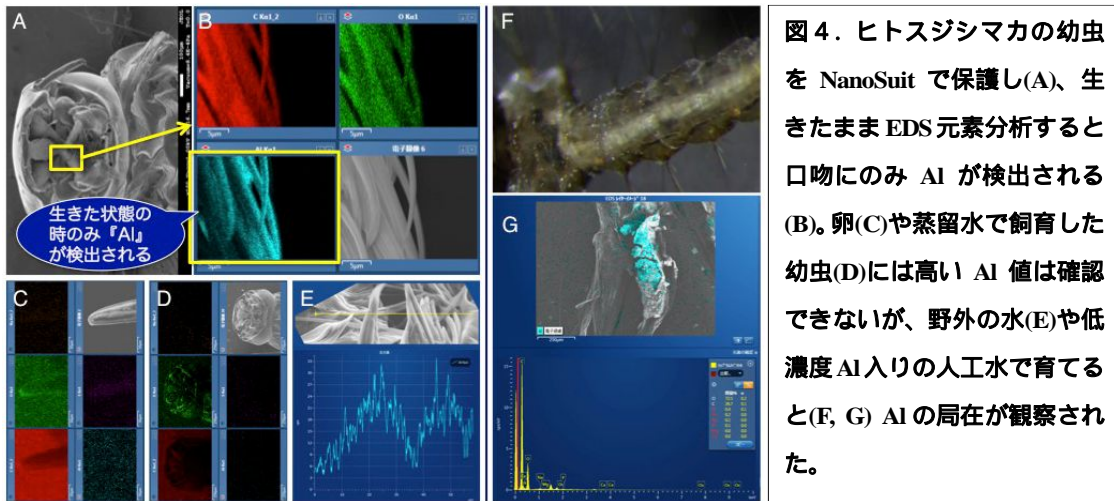
4. 研究成果

自然環境から採取した幾種かの昆虫を、蒸留水で洗浄した後、NanoSuit-EDS 法で解析すると、これまでに報告されていなかった元素の発現・分布が明らかになった。その一つが Al (アルミニウム) である。この元素は生きている個体体表の毛状構造に局在していた (図 3)。



ヒトスジシマカの幼虫 (ポウフラ) では、口吻の毛状構造にのみ Al 元素が検出された (図 4 A, B)。卵からの発生過程を NanoSuit-EDS 法により解析し、特定元素の局在がどのように変化して行くのか追跡した。その結果、卵からは標的としている特定金属元素は検出されなかった (図 4 C)。また、金属元素が含まれていない環境 (蒸留水) で卵をふ化させても、これらの幼虫には金属元素の発現はみられなかった (図 4 D)。しかし、野外でポウフラが良く繁殖する場所から採取した水で育てると、1 令、2 令、3 令とステージが進むごとに Al の検出量は増加した (図 4 E)。この間幼虫は 2 回脱皮していること、また、この水自体を元素分析しても高い値の Al は同定されなかったことから、検出された元素は、外液等に含まれる元素の単なる付着に起因するとは考えられず、金属元素を濃縮する機構の存在が示唆された。そこで、Al を低濃度で含む人工水を作成し、特定元素の局在がどのように変化して行くのか調べた。この人工水で飼育した幼虫では、腸管内皮において Al の局在が確認され、令が進むに従い Al 値は有意に上昇し周辺組織への広がりもみられた (図 4 F, G)。しかし、発生が進んでも口吻の毛状構造には Al 値の分布は確認できず、現在のところ、金属元素の口吻への発現過程には未だ解明されていない機構の存在が示唆された。

このような研究を通して、NanoSuit 法に EDS 分析法を組み合わせた、生きた状態の生物試料を高分解能で元素分析する新技術 (NanoSuit-EDS 法) を確立した。NanoSuit-EDS 法では、高真空環境下で、生体本来の微細構造を観察できるのみならず、含水標本を用いて 20,000 倍を超える高倍率・高分解能で元素組成を分析できる。この新分析法による元素の状態と比較すると、従来の生物元素分析法では、化学固定・脱水・乾燥処理を施した試料を用いていた為、収縮・変形により本来の微細構造を維持していないだけでなく、多様な溶液処理を行う結果として、生体試料中の元素は洗い流され、残っていても局在や分布は修飾されていることが示唆された。一方、NanoSuit-EDS 法では、高真空下でも生体内の水が保持されるため、これまでの低真空 SEM や環境 SEM 機を用いても成し得なかった、例えば水に起因する O (酸素) の状態・変化を、超微細構造において高分解能で解析することも可能となった (Takaku et al, 論文投稿準備中)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takehara S, Takaku Y(共筆頭著者), Shimomura M, Hariyama T	4. 巻 15(5)
2. 論文標題 Imaging dataset of fresh hydrous plants obtained by field-emission scanning electron microscopy conducted using a protective NanoSuit.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hariyama T, Takaku Y, Senoh C, Yamada S, Itoh T, Suzuki C, Takehara S, Hirakawa S, Kawasaki H	4. 巻 In press
2. 論文標題 Living organisms under an electron microscope: the NanoSuit method aiming for medical and industrial applications.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Photopolym. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki H, Itoh T, Takaku Y, Suzuki H, Kosugi I, Meguro S, Iwashita S, Hariyama T	4. 巻 100
2. 論文標題 The NanoSuit method: a novel histological approach for examining paraffin sections in a non-destructive manner by correlative light and electron microscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab. Investig.	6. 最初と最後の頁 161-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0309-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kasahara M, Akimoto SI, Hariyama T, Takaku Y, Yusa SI, Okada S, Nakajima K, Hirai T, Mayama H, Okada S, Deguchi S, Nakamura Y, Fujii S.	4. 巻 35(18)
2. 論文標題 Liquid marbles in nature: craft of aphids for survival.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 6169-6178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b00771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司, 平川 聡史, 平井 悠司, 下村 政嗣, 河崎 秀陽	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 NanoSuit法による生体の生きたまま濡れたままの電子顕微鏡観	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takehara S, Takaku Y(共筆頭著者), Suzuki H, Ohta I, Shimomura M, Hariyama T	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 A 'NanoSuit' successfully protects petals of cherry blossoms in high vacuum: examination of living plants in an FE-SEM.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19968-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高久 康春, 針山 孝彦	4. 巻 68(4)
2. 論文標題 生きた生物試料のSEM観察を可能にする表面処理: ナノスーツ法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 表面技術	6. 最初と最後の頁 178-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司, 平川 聡史, 平井 悠司, 下村 政嗣, 河崎 秀陽	4. 巻 32(1)
2. 論文標題 NanoSuit法による生体の生きたまま濡れたままの電子顕微鏡観察	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 針山 孝彦, 高久 康春, 河崎 秀陽
2. 発表標題 電子顕微鏡を用いた生きたままの生物表面微細構造解析 NanoSuit法の応用展開
3. 学会等名 バイオメティクス研究会（JASISコンファレンス）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高久 康春, 鈴木 千晶, 鈴木 浩司, 石井 大佑, 下澤 楯夫, 野村 周平, 下村 政嗣, 針山 孝彦
2. 発表標題 水面直下で移動する水棲昆虫の、疎水性-親水性部位の組み合わせ構造とその機能
3. 学会等名 第65回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井 秀司, 笠原 萌恵, 秋元 信一, 針山 孝彦, 高久 康春, 遊佐真一, 中村 吉伸
2. 発表標題 自然界における粘着性液体の粉体化技術：アブラムシが作製するリキッドマーブルの構造評価
3. 学会等名 第65回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高久 康春
2. 発表標題 NanoSuit法による生きたままの生物表面解析
3. 学会等名 バイオメティクス研究会（JASISコンファレンス）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 針山 孝彦, 高久 康春, 河崎 秀陽, 太田 勲, 鈴木 浩司, 山濱 由美, 外山 美奈, David Wilcockson, Alice Ciofini, Alberto Ugolini
2. 発表標題 濡れたまま・生きたまま電子顕微鏡観察するNanoSuit法 - ハマトビムシなどを例にして
3. 学会等名 第88回 日本動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠原 萌恵, 秋元 信一, 針山 孝彦, 高久 康春, 中村 吉伸, 藤井 秀司
2. 発表標題 アブラムシに学ぶ粘着性液体の粉体化
3. 学会等名 日本接着学会 第13回関西支部若手の会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高久 康春	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版(株)	5. 総ページ数 2
3. 書名 「動物の百科事典」ナノスーツ法による昆虫微細構造の機能解明	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	針山 孝彦 (Hariyama Takahiko) (30165039)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任教授 (13802)	