

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292198

研究課題名(和文) 昆虫体表面物質を規範とした高真空下での生命維持機構の解明と電子顕微鏡技術への応用

研究課題名(英文) A thin polymer membrane, NanoSuit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum

研究代表者

高久 康春 (Takaku, Yasuharu)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60378700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物試料は成分の70～80%が水であるため、高真空環境(10<sup>-3</sup>-10<sup>-7</sup>Pa)を必要とする電子顕微鏡で観察するには、事前の化学固定や脱水が不可欠と考えられてきた。しかしこれらの処理は、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。本研究では全く新しいアプローチで生物試料の高真空・高分解能観察に取り組んだ。昆虫の体表面物質(および疑似物質)を試料に塗布し、電子線およびプラズマ照射により体表全面に高気密"NanoSuit"を形成することにより、高真空中で試料を生きたまま維持・高分解能観察することがはじめて可能となった。

研究成果の概要(英文)：Although field-emission scanning electron microscopy (FE-SEMs) has proven very useful in biomedical research, the high vacuum required precludes direct observations of living organisms at high resolution and often produces unwanted structural changes. In this application, we improved a method that allows the investigator to keep a variety of specimens alive in the high vacuum environment of the electron microscope by encasing the organisms in a thin, vacuum-proof suit, the "NanoSuit". However, it was impossible to protect wet tissues freshly excised from intact organisms or cultured cells. We further improved the technique to overcome this limitation. We protect the specimens with a Surface Shield Enhancer (SSE) solution and find that the fine structure of the SSE treated specimens is superior to that of conventionally prepared specimens. The SSE based NanoSuit affords a much stronger barrier to gas and/or liquid loss than the previous NanoSuit did.

研究分野：形態学

キーワード：電子顕微鏡 高真空 生きたまま NanoSuit

1. 研究開始当初の背景

形態学的解析法は、生物のありのままの姿を捉える方法として、長年に渡って開発・改良が進められている。イメージングに電子線を用いる電子顕微鏡は、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することが可能であるため、開発・改良を重ねながら様々な分野で用いられてきた。しかし高真空条件を必要とするため、生物を“生きたまま”観察することが出来なかった。そのため、低真空 ( $<10^{-2}$  Pa) を用いた様々な改良型電子顕微鏡が開発され観察が試みられたが、解像度は極めて低いレベルにとどまっていた。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫の体表面物質を生物試料の保護溶液として利用し、電子線およびプラズマ照射により、生物試料をナノ薄膜バリアーで覆う。この方法により、これまで誰も成し得なかった生きた生物の運動/変化をリアルタイム・高解像度で追跡することが可能となる。生物が潜在的に備えているバリアー能を模倣・利用するという新しい視点から、革新的電子顕微鏡技術の開発/完成を主な目的とする。

3. 研究の方法

生物本来の姿を実時間・高分解能で解析するために、生物を生きたまま電子顕微鏡で観察する新技術を完成させる。初年度は、様々な昆虫体表面物質の解析・分析を行い、保護液として応用出来る成分を特定する。同時に、ミメイクスから得た溶液を用いて、昆虫微細構造の動的解析を展開する。次年度以降、昆虫以外の生物、および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。

4. 研究成果

(1) 申請者らは、様々な生物を、化学固定や脱水作業を行わず、生きたまま電子顕微鏡内に入れ状態の変化を調べた。ほとんどの生物がしわくちゃになって死んでしまうなか、ショウジョウバエの幼虫が真空中でも通常の動きを示しながら、FE-走査型電子顕微鏡観察 ( $10^{-3}$ - $10^{-7}$  Pa) (SEM) に長時間に渡って耐えうることを発見した。驚いたことにこれら幼虫は、 $10^{-3}$ - $10^{-7}$  Pa の高真空条件下のみの環境にさらすと極短時間のうちに脱気・脱水されて死んでしまう。つまりこの結果から、『電子線照射』が生体の保護に重要であることが示唆された。実際、電子線照射を受けた個体では、体表全面が約 50~100 nm 厚の膜 (NanoSuit) で覆われていることが明らかになった。同様の膜は『プラズマ照射』によっても形成可能で、これら照射エネルギーによって形成された“NanoSuit”が、高い耐久性を生み出すことを我々が世界で初めて明らかにした (Takaku et al., 2013) (国際

特許出願中) (図1・図2)

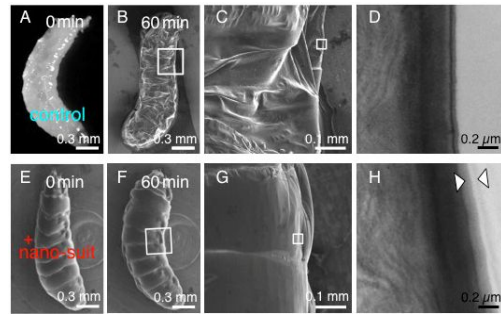


図1. ショウジョウバエ幼虫(A)を高真空に暴露する(B-D)と個体は脱気・脱水されて死亡するが、真空暴露直後に電子線照射すると生存し(E-G)、固体表面にNanoSuitが形成される(H)。

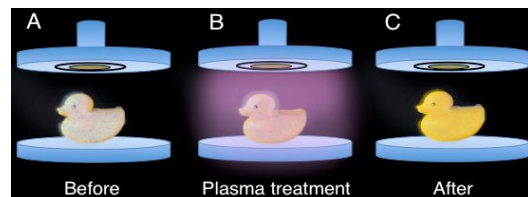


図2. 電子線照射と同様の効果を与えるプラズマ照射法の模式図。

(2) この方法の展開によって、個体のままであれば、五界説で分類される原核生物、原生生物、菌類、植物、動物ほぼすべてを電界放射型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) 内で観察可能にし、また一部の生物を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察できる方法を確認した(高久 他, 2014) (Ohta et al., 2014) (Takaku et al., 2015) (図3)

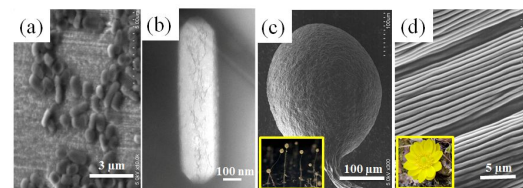


図3. 大腸菌のFE-SEM像(a)とTEM像(b)、タマホコリカビ(c)、福寿草の花弁(d)のFE-SEM像。すべて生きたまま(未処理)の生物試料である。

(3) しかし、残された大きな課題は、個体から切り出した器官・組織、あるいは単離状態での真核細胞をいかに本来の姿を損なうことなく高真空下で保護するかであった。切除したばかりの組織はその傷口から容易に脱水・脱気されてしまう為、また真核細胞の場合は、細胞壁や(真性細菌がもつ)莢膜で覆われていない故に、初期のNanoSuit溶液を用いても高真空環境下での保護ができなかった。申請者らは、昆虫の体表面物質を規

範とし、様々な保護溶液を考案する中で (Suzuki et al, 2013) グリセリンなどを主成分とする Surface Shield Enhancer (SSE) の開発に成功した (国際出願番号 PCT/JP2015/052404)。この新型溶液を利用することにより、切り出した哺乳動物の組織・単離した真核細胞などを FE-SEM 内で含水状態のまま観察することに世界ではじめて成功し (図 4) 従来のものとは全く異なる画像を得ている (Takaku et al, 論文投稿中)。

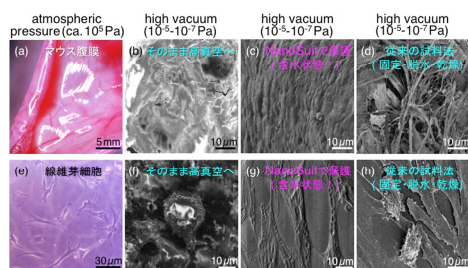


図 4. 新規 SSE 溶液で作成した NanoSuit で保護した、生きたままの試料と死んだ試料 (従来法) 切り出したマウス腹膜の一部(a)や線維芽細胞(b)をそのまま高真空環境にさらすと脱水・脱気される(b,f)。NanoSuit 法で処理したものは瑞々しく(c,g)、化学固定・脱水・乾燥処理を行った従来の試料像(d,h)とは大きく異なる。

## 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 14 件)

Takaku Y, Suzuki K, Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T: “A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum” Proc Natl Acad Sci USA, 110(19), 7631-7635 (2013). 査読有

高久康春 「生物を生きたまま電子顕微鏡で高解像度観察する手法」～昆虫が分泌する物質を規範とした“防護服”ナノスーツの開発～ むしコラ (2013). 査読有

Suzuki H, Takaku Y(共筆頭著者), Ohta I, Ishii D, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T “In-Situ Preparation of Biomimetic Thin Films and Their Surface Shield Effect for

Organisms in High Vacuum” PLoS ONE, (Manuscript ID: PONE-D-13-30036R1) (2013). 査読有

針山孝彦 高久康春 鈴木浩司 太田 勲 石井大祐 村中祥悟 下村政嗣 「ナノスーツの開発—高真空下で生命維持—」O PLUS E アドコムメディア 35(9), 963-964 (2013). 査読有

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, NanoSuit, for high vacuum FE-SEM observation” Microscopy, Published online (DOI: 10.1093/jmicro/dfu015) (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

針山孝彦 「電子顕微鏡で生きたまま虫を観る」遺伝, 68(2), 90-94 (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: observations on living organisms in an FE-SEM” Proc Bio. Sci, 282(1802), pii: 20142857 (2015). 査読有

針山孝彦, 高久康春, 鈴木浩司, 石井大佑, 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」 表面科学, 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 「表面保護薄膜「NanoSuit®法」による生体測定技術とその活用戦略」工業材料, 63(8), 34-38 (2015). 査読有

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).

〔学会発表〕(計 20 件)

(招待講演)高久康春 鈴木浩司 太田勲 石井大佑 村中祥悟 下村政嗣 針山孝彦 「「ナノスーツ」を用いた生きた状態での生物の高解像度電子顕微鏡観察」日本顕微鏡学会・第 69 回学術講演会, ホテル阪急エキスポパーク (2013 / 5 月 吹田)

(招待講演) Hariyama T “Nano-suits; Observation of living organisms in high vacuo using electron microscopes” 2nd Nagoya Biomimetics International Symposium (NaBIS), ウィンクあいち(愛知県産業労働センター), Nagoya (2013 年 11 月 18 日)

(招待講演) Takaku Y “A Successful Surface Shield “Nano-suit” to Protect Living Organisms in a FE-SEM.” Joint international symposium on “Nature-inspired Technology (ISNIT) 2014” and “Engineering Neo-biomimetics V” (2014 / 2 月 札幌)

(招待講演) Hariyama T “NanoSuit, biomimetic ultra-thin polymer membrane, protects organism in high vacuum” Joint Workshop on Bio-inspired Engineering and Bio-supercomputing, Chiba University, Chiba (2014 年 3 月 3 日)

(招待講演) 針山孝彦 「ナノスーツ法をもちいた電子顕微鏡観察」日本顕微鏡学会 第 38 国関東支部講演会, 日本女子大学目白

キャンパス, 東京 (2014 年 3 月 8 日)

(招待講演) 針山孝彦 高久康春 太田勲 鈴木浩司 村中祥悟 石井大佑 下村政嗣 「“ナノスーツ法”による生きた状態での生物の高解像度電子顕微鏡観察」日本化学会第 94 春季年会 (2014 / 3 月 名古屋)

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 A, 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 the 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 石井大佑 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 / 9 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 太田勲 小杉伊三夫 目黒史織 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会 (2014 / 11 月 横浜)

川村亮平 石井大佑 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<sup>®</sup>” 第75回日本癌学会学術総会 (2015/10月 横浜)

平川 聡史 高久 康春 石井 大佑 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<sup>®</sup> 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春期年会 (2016/3月 京都)

(招待講演) 高久 康春 「NanoSuit<sup>®</sup>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春期年会 (2016/3月 京都)

〔図書〕(計 1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

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3件)

名称: 有機重合薄膜とその製造方法

発明者: 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司, 下村 政嗣, 石井 大佑, 太田 勲, 村中 祥悟

権利者: JST

種類: 基礎出願

番号: PCT/JP2013/074141

出願年月日: 2013年9月6日

国内外の別: 国際出願

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方法並びに試料台

発明者: 針山 孝彦, 高久 康春, 鈴木 浩司, 下村 政嗣, 石井 大佑, 太田 勲, 村中 祥悟

権利者: JST

種類: 特願

番号: 2014-014910

出願年月日: 2014年1月29日

国内外の別: 国内出願

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 大佑, 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)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(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