

＜第23回 九州電子顕微鏡技術研究会＞

【日 時】平成22年9月4日（土曜日） 9：30～17：00

【場 所】九州大学 馬出（病院）キャンパス 基礎A棟1階 第1講義室

【参加費】500円 飲物付き

【プログラム】

（敬称省略）

- 10：00-10：02 開会のあいさつ （金丸孝昭）
- 10：02-10：45 特別講演「精子の先体反応を巡って」
放送大学 星 元紀
日本顕微鏡学会九州支部指定特別講演
- 10：45-11：30 特別講演「微視的構造の観察に基づいた骨の機能的適応現象に関する研究」
九州大学大学院工学研究院機械工学部門 藏田 耕作
- 11：30-11：50 一般演題1「電子線照射に伴う樹脂収縮特性と電子線トモグラフィ法観察の最適化」
久留米大学医学部 電子顕微鏡室 都合亜紀暢
- 11：50-12：10 一般演題2「簡易型暗視野蛍光顕微鏡作製の紹介」
九州大学病院 中央形態分析室 金丸孝昭
- 12：10-13：00 昼食 （外来レストラン・近隣の食堂などを利用）
- 13：00-13：20 一般演題3「イオン液体による坑酸菌の電子顕微鏡観察」
産業医科大学 生体情報研究センター 横山 満
- 13：20-13：50 メーカー講演1「SEMによる含水試料のそのまま観察」 島津製作所・宮本文司
- 13：50-14：20 メーカー講演2「日立卓上顕微鏡 Miniscope[®] TM3000 のご紹介」日立ハイテクノロジーズ・上村健
- 14：20-14：50 メーカー講演3「GL装置の原理と構成 ～分解能に寄与するパラメータ」
オックスフォード・インスツルメント・森田博文
- 14：50-15：05 コーヒーブレイク
- 15：05-15：35 メーカー講演4「超解像顕微鏡 N-SIM/N-STORM のご紹介」 ニコンインステック・及川 義朗
- 15：35-16：05 メーカー講演5「超解像 STED (Stimulated Emission Depletion) 顕微鏡」
ライカマイクロシステムズ・伊集院 敏
- 16：05-16：35 メーカー講演6「ヘリウムイオン顕微鏡のご紹介」 カール・ツァイス・足立達哉
- 16：35-16：55 会計報告・議題2件<1>名称変更の件 2)「顕微鏡画像解読技術」セッション>（金丸孝昭）
- 16：55-17：00 閉会の挨拶 （中村桂一郎）

<17：10> バスにて懇親会会場へ

懇親会費5千円

第 23 回 九州電子顕微鏡技術研究会抄録

受付開始 (09 : 30) 開演挨拶 (10 : 00) 開会 (10 : 02) 閉会 (17 : 00)

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/nano/>

(10 : 00-10 : 02) 司会 : 金丸孝昭

開会の挨拶

* 講演時間には質疑も含めます。

(10 : 02-10:45) 座長 : 飯田 弘

特別講演 1) : 「精子の先体反応を巡って」

演 者 : 星 元紀

所 属 : 放送大学 教授

要 旨 : 1947 年祖国アメリカへの里帰りを果たした Jean M. Clark Dan (団 仁子) は、位相差顕微鏡の市販第一号機を手にもって日本へ戻った。彼女は、この顕微鏡によって、ヒトデやウニの受精過程を東京大学三崎臨海実験所で観察し、1950 年には先体反応に関する最初の論文を発表した。彼女はさらに、東京工業大学において金属表面の観察に使われていた日立製作所の電子顕微鏡 4 号機による観察へと進み、1951 年には最初の電子顕微鏡像を手にし、1952 年には先体反応の概略を明らかにした。彼女の発見は、古く 1927 年 G. Popa が記載した現象の再発見ともいえるが、その生物学的な意味を明らかにしたという意味で、先体反応の発見と呼ぶに相応しい快挙である。その結果、細胞としての精子が再認識され、精子細胞学の幕開けとなった。

ここでは、Dan による先体反応発見にまつわるエピソードを紹介するとともに、先体反応誘起機構に関する現在の知見を、われわれの得た成果を中心に紹介したい。

(10 : 45-11:30) 座長 : 横山 満

特別講演 2) : 「微視的構造の観察に基づいた骨の機能的適応現象に関する研究」

演 者 : 藏田 耕作

所 属 : 九州大学大学院工学研究院機械工学部門・准教授

要 旨 : 我々の体の中には約 206 個の骨がある。この骨は、体を支え、筋肉に付着点を与え、さらに脳や内臓などの臓器を保護する重要な組織である。静的に体幹を支持している骨は、まるで高層建築物や橋梁の柱と同じようなものに思えるかもしれないが、実は毎日ダイナミックな作り替え、すなわち代謝を行っている動的な組織である。さらに驚くべきことに、我々の周囲の環境変化に適応するように、この骨代謝はコントロールされている。

「運動をすると骨が強くなる」とか「寝たきりで骨粗鬆症になった」とか言われるのは、骨が力学的環境の変化を感じ取り、代謝を行った結果である。環境に適応して構造や強度を変え、骨折が発生するとその場所を修復する骨は、エンジニアにとって模倣すべき最良のインテリジェントマテリアル (知的材料) であると言える。本講演では、我々が取り組んでいる骨の機能的な適応現象に関する話題を提供し、骨に加わる力と骨形態の変化の関係、骨に生じる疲労亀裂と骨細胞の応答、微小振動による骨の増強法などに関する研究を紹介する。また、これらの研究に欠かせない X 線マイクロ CT や pQCT による骨形態計測、種々の顕微鏡による骨組織の観察について触れる。

(11:30-11:50) 座長：佐々木 正文

一般演題1)：「電子線照射に伴う樹脂収縮特性と電子線トモグラフィー法観察の最適化」

演者：○都合 亜記暢¹，東 龍平¹，太田 啓介²，中村 桂一郎²

所属：¹久留米大学医学部電子顕微鏡室，²久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

要旨：【背景】樹脂包埋試料を用いた電子線トモグラフィー法（ET法）は試料内部を立体再構築する有用な技術である。電子線照射により生ずる樹脂の収縮は三次元再構築を行う上で再現性、定量性という点で大きな問題となる。特にET法用の傾斜電顕写真撮影期間中に樹脂の収縮が進み、撮影開始時と終了時との間で観察切片の厚さに差が生じると、立体再構築および解析時に大きな障害となる。この為従来ET法では傾斜撮影前に予備照射を行いある程度収縮を進めた上で撮影を行う事で対応してきた。しかしこの予備照射時間は経験に基づくものであった。そこで我々は樹脂の収縮特性を明らかにすることによってトモグラフィー撮影における予備照射時間の至適条件を明らかにすることを目的とし検討した。【実験方法】樹脂の収縮過程は約100nm厚の生体試料を含まない生物用包埋樹脂として一般的なEPON812を中心に数種類の樹脂切片を用いて検討した。試料表面に5nmコロイド金粒子をラベルし厚さ計測用の標準点とした。撮影は電子線強度を一定にし、経時的に3点傾斜撮影(+30°, 0°, -30°)を行った（電子線照射量は $1 \times 10^3 \text{e}^-/\text{nm}^2 \sim 8 \times 10^6 \text{e}^-/\text{nm}^2$ ）。切片の厚さは各撮影画像の金粒子の位置をIMODを用いて追跡し、三角関数的手法によって行った。【考察】電子線照射量と切片厚の計測値をプロットした所、樹脂の収縮は一次関数的な推移を示した。そこでプロット値より近似関数を得て、これを電子線照射量に伴う樹脂収縮特性と考えた。我々は正確な再構築を行う為の条件として撮影期間中の樹脂収縮の許容範囲を1%未満であると仮定し、この条件に合う予備照射量を計算した。その結果EPON812では撮影に必要な電子線照射量の1.75倍であることが予想される。

(11:50-12:10) 座長：平田 和穂

一般演題2)：「簡易型暗視野蛍光顕微鏡作製の紹介」

演者：金丸孝昭

所属：九州大学病院 中央形態分析室

要旨：【はじめに】

暗視野顕微鏡は、生物系では神経組織の銀染色などの観察に使用されているが、これは所謂「エバネッセント光」を利用し観察している為にコントラストが高い。今回、入射光をスライドガラス側面より照明したエバネッセント光を利用し、通常の蛍光顕微鏡で観察出来なかったQ-dot 蛍光画像を撮影できた。市販品を組み合わせることで高分解能観察装置を作製したので紹介する。【方法】一般の正立型蛍光顕微鏡（オリンパス社製 BX50）のクレンメルをDL（Derck Light）装置（ネッパジーン）と交換し、光ファイバーの元を蛍光顕微鏡用LED光源precisExcite（日本モレキュラーデバイス）に接続し、蛍光顕微鏡と組み合わせて観察・撮影した。

【結論】蛍光剤は、一般のものでも観察できるが、「暗視野顕微鏡」にはQ-dotのような微粒子系蛍光剤がより適していると考えられる。

(12 : 10-13 : 00)

昼 食

病院外来のレストラン・サブウエー・ファミマー、近隣のレストランなどをご利用下さい。

(13 : 00-13 : 20) 座長 : 菊池 亮

一般演題3) : 「イオン液体による抗酸菌の電子顕微鏡観察」

演 者 : ○横山 満¹⁾・小川みどり²⁾、市原剛志²⁾

所 属 : 1) 産業医科大学生体情報研究センター 2) 産業医科大学微生物学

要 旨 : 【背 景】抗酸菌 (スメグマ菌) は脂質に富んだ厚い細胞壁を有している。本研究に用いた株は電子顕微鏡観察の試料作製に於いて固定液に浮いた状態でなかなか沈まず、浸透が極めて難しい。また、脱水過程に於いて脂質が除去されている可能性を考える。そこで今回、脱水操作を必要としないイオン液体を用いた走査型電子顕微鏡観察を試みたので紹介する。【実験方法】普通寒天培地で培養した抗酸菌のコロニーを数ミリ角に切り出し、オスmium酸による蒸気固定を行った。固定した試料はSEM 試料台に乗せ、イオン液体を1滴垂らし余分な液を吸い取った上で走査型電子顕微鏡試料とした。【結 論】コロニー表面には通常法では認められない厚いシート状の無構造物が観察された。本法により、抗酸菌コロニー本来の構造と考えられる像を得ることができた。

(13 : 20-13 : 50) 座長 : 太田 啓介

メーカー講演1) : 「SEMによる含水試料のそのまま観察」

演 者 : ○宮本丈司¹⁾・中村美樹²⁾

所 属 : 1) (株)島津製作所, 2) 日本エフイー・アイ(株)

要 旨 : FEI の環境制御型走査電子顕微鏡 (ESEM) は、試料室内の真空度を一般的な高真空領域から極低真空領域 (4000Pa) まで自在に設定することができる。ESEM の極低真空領域における観察手法は、これまで走査電子顕微鏡 (SEM) では観察が不可能とされていた様々な観察を実現し、多岐にわたる分野で利用されてきた。

その1つに含水試料のそのまま観察法が挙げられる。生物、食品、高分子などの含水試料を一般的なSEMで観察する場合、試料をそのまま試料室に持ち込むと変形してしまうため、試料を真空中に耐えられる状態にするための前処理を必要とする。一方、ESEMの極低真空領域で試料の冷却機構を有するステージを使用すると、試料温度および試料室内の真空度を自在に操作でき、試料室内の湿度の制御が可能となる。すなわち、湿度を制御することで試料からの水分蒸発を抑制し、従来の前処理を省略あるいは簡略化して含水試料を長時間保持および観察することが可能となる。なお、観察画像は試料表面の情報を反映するSEM像の他に、試料内部の情報を得ることができる走査透過電子 (STEM) 像が取得できる。本発表ではその観察原理および観察事例を紹介する。

(13 : 50-14 : 20) 座長 : 瀬川 勝

メーカー講演2) : 「日立卓上顕微鏡 Miniscope[®] TM3000のご紹介」

演 者 : 上村 健

所 属 : 株式会社日立ハイテクノロジーズ

要 旨 : 今般、(株)日立ハイテクノロジーズは新型卓上顕微鏡「Miniscope[®] TM3000」を発売いたしました。卓上

顕微鏡「Miniscope®」は、電子顕微鏡の枠を超え、簡単に操作、観察ができ、初めて電子顕微鏡に触れる方でも、手軽に使用することができる新しいタイプの卓上顕微鏡です。卓上顕微鏡「TM3000」は「TM-1000」（2005年4月発売）の後継機で、小型化、操作性、観察倍率など、従来機の持つ特性を飛躍的に向上させています。今回は、日立卓上顕微鏡 Miniscope® TM3000 の特徴とともに、オプションである、エネルギー分散型 X 線分析装置のご紹介をいたします。

【卓上顕微鏡 Miniscope® TM3000 の主な特長】

1. 連続通電不要の省エネ設計。立ち上げ時間は約3分
2. 絶縁物試料を前処理なしで観察できる低真空タイプ
3. 15倍～30,000倍まで、観察したい倍率に瞬時に対応
4. 表面観察、通常観察、高輝度観察の3つの観察条件
5. オートスタート、オートフォーカス、オート輝度などのオート機能
6. イメージシフト機能等による操作性の向上
7. 焦点深度の深い立体的な形態観察

(14:20-14:50) 座長：渡辺 美登里

メーカー講演3)：「CL装置の原理と構成 ～分解能に寄与するパラメータ」

演 者：森田博文

所 属：オックスフォード・インストゥルメンツ株式会社

要 旨：【背 景】CL(Cathodoluminescence)測定には、低加速や試料を冷却しての分析などで高分解能のCL像を収集するのが一般的である。しかしスペクトロメーターのパラメータを変化させても空間分解能や波長分解能が変化する。特にGratingの選択やスリットの調整、それに対応した収集条件の選択などいくつかのパラメータの組合せによって、近接した波長の分離や感度にも影響してくる。今回はCLスペクトロメーターのパラメータを変化させることで得られるデータを元に、CL装置の原理と構成の特長について解説する。【実験方法】CLスペクトルおよびCL像に関して、Grating、スリット幅の変化、SEMの加速電圧、試料電流、試料のチャージの影響、フィルターの有無などを変えた場合のデータの変化を見ながら、原因を解説していく。【結 論】Czerny-Turner分光器の特長である、スリット幅と波長分解能の関係が得られ、1.2nm程度の波長の違いは十分分離可能である。

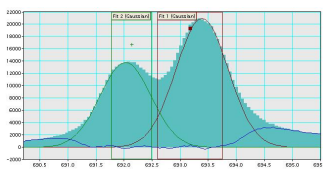


図1 ルビーの1.2nmの違いを持つ2つのピークの分離例

(14:50-15:05)

コーヒーブレイク

(15:05-15:35) 座長：廣瀬 英司

メーカー講演4) : 「超解像顕微鏡 N-SIM/N-STORM のご紹介」

演 者 : 及川 義朗

所 属 : 株式会社ニコンインステック バイオサイエンス営業本部

要 旨 : カリフォルニア大学サンフランシスコ校との共同研究で実現した構造化照明法 (Structured Illumination Microscopy) と、Apo TIRF 100×H 対物レンズ (NA=1.49) など、ニコンの高度な光学技術との組み合わせにより、空間分解能を従来の光学顕微鏡の約 2 倍 (約 100nm) まで向上させ、生細胞内の微細構造の超解像による可視化を実現しました。ローカライゼーション法の一つである STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) 法を採用した N-STORM は、ニコンの研究用倒立顕微鏡 Ti-E との組み合わせで、従来の顕微鏡の約 10 倍 (約 20nm) の超解像度を実現。分子レベルの検出を可能としたことで、「構造レベルの理解」から「分子レベルの理解」に踏み込む情報が得られます。

(15 : 35-16 : 05) 座長 : 金丸 孝昭

メーカー講演5) : 「超解像 STED (Stimulated Emission Depletion) 顕微鏡」

演 者 : 伊集院 敏

所 属 : ライカマイクロシステムズ(株)

要 旨 : 光学顕微鏡は、電磁波の一種である光を使って試料の拡大像を観察する装置です。従来、分解能は 0.2 μm 程度とされ、それはレンズの回折限界により制限されてきました。1994 年、光学顕微鏡の分解能を大幅に向上させる可能性を持った革新的技術の概念が Dr. Stefan Hell らによって初めて発表されました。STED 顕微鏡です。この概念はその後着々と実用化が進められ、2007 年には誰もが容易に使いこなすことのできるレベルの装置が完成しています。STED 顕微鏡は誘導放出制御顕微鏡と訳されますが、蛍光顕微鏡の一種です。誘導放出と呼ばれる現象を応用することにより、回折限界に依存されずに分解能を高めることが可能となりました。また、蛍光染色試料が観察対象となるため、利用可能な色素の制限はあるものの従来となんら変わらない染色技術で試料作成が可能なのもバイオイメージングの発展には重要な要素です。今回は STED 顕微鏡の最新技術と実用例をご紹介します。

(16 : 05-16 : 35) 座長 : 岩崎 雅行

メーカー講演6) : 「ヘリウムイオン顕微鏡の原理とその応用」

演 者 : 足立達哉

所 属 : カール ツァイス (株) NTS ディビジョン

要 旨 : 電子ビームによる走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope : SEM)、液体金属イオン (Ga+) を用いた集束イオンビーム装置 (Focused Ion Beam : FIB) に次ぐ、第3の集束荷電ビーム技術としてガスイオン源 (Gas Field Ion Source : GFIS) がある。希ガスイオンを集束するこの研究はその可能性について大いに期待され、30年あまり前から国内外で進められてきたが、イオン源の安定性や寿命の課題をクリアできず実用化された装置技術とはいえなかった。しかしながら2005年に設立された米国のベンチャー企業ALIS. 社 (現カール ツァイス : Carl Zeiss SMT) が2006年のセミコンウエストに、集束Heイオンを用いたLookingGlass2 (LG-2, 現

ORION™) を発表し、諸問題を解決し、イオン源寿命1000時間以上、2次電子 (Secondly Electron : SE) 像1nm以下を保証したので急激に関心が高まった。SEMとは異なった試料走査2次電子情報が得られ、また反射イオン (Back Scattering Ion : BSI) によりに元素分析の可能性を示している。これらの結果からGFIS技術の中で集束Heビームは、Heイオン顕微鏡 (Helium Ion Microscope : HIM) として認知されつつある。ここでは、主要技術であるイオン源の原理、集束光学系、2次電子やBSIの検出器などのハードウェアについて、および応用例を紹介したい。現在全世界で10数台の装置が、研究所、大学に納入されており、半導体やカーボンナノチューブ、グラフェンなど材料系の研究がなされている。医学、生物系の応用についてはほとんど未開拓であるが、皆様のご興味を刺激できれば幸いである。

その他のご案内

【会場までの道順】*なるべく公共機関をご利用下さい。

公共機関利用による場合

<http://www.hosp.kyushu-u.ac.jp/access/index.html>

*市営地下鉄や西鉄バスにSUICAカードが利用できます。

車で来る場合

正門から入構します。駐車場は有料です。東門から研究会参加のためと言う事に入る場合、守衛所で記載しカードを貰い入構しますが、料金は同じだと思います。半日駐車すると2000円ほどになります。

【地図】

馬出(病院)キャンパス 基礎A棟 1F 講義棟1

<http://www.kyushu-u.ac.jp/access/map/hospital/hospital.html>

この地図の3番です。

【連絡先】

<平日>事務局・電話 092-642-5740

(アドレス) kanemaru@mccore.med.kyushu-u.ac.jp

<当日>事務局・金丸 連絡先

(携帯番号)080-5252-6649

【懇親会】

<懇親会会費>5,000円

<懇親会会場>「石蔵酒造 博多百年蔵」

*17:10までに集合し、会場から送迎バスにて懇親会会場へ向かう

(URL) <http://www.ishikura-shuzou.co.jp/enkai.shtml>

電話・092-651-1986

<注意>研究会会場では、携帯電話のスイッチはOFFかマナーモードに