

第 20 回 九州電子顕微鏡技術研究会

日 時： 2007 年 9 月 8 日(土)10:00-16:30

場 所： 福岡県青少年科学館 3 階集会室

プログラム

■9:30 受付開始

■10:00-12:00 一般演題発表

10:00-10:20 『ウイルスのネガティブ染色技法の開発 - 酢酸ウラニル代替染色剤を探る -』

長崎大学熱帯医学研究所共同研究室電顕部 一ノ瀬昭豊

10:20-10:40 『電子顕微鏡による形態観察から考察される石灰化機構について』

長崎大学大学院医歯薬総合研究科 小野俊雄他

10:40-11:00 『樹脂包埋生物試料の電子線トモグラフィー法における試料作成と撮影条件』

久留米大学医学部解剖学講座 太田啓介他

11:00-11:20 『nanolego 構造体構築のための環境設計』

科学技術振興機構 CREST 牧 禎 他

11:20-11:40 『癌細胞における低酸素の有効生について』

(株)ニコンインスティック 上田正道他

11:40-12:00 『Miniscope による無蒸着観察と新たな展開』

(株)日立ハイテクノロジーズ先端製品営業本部営業技術部 山本康夫

■12:00 - 13:00 休憩・昼食

■13:00 - 15:00 ワークショップ及びメーカー講演

A: ワークショップ (2階木工室) 《協力》(株)日立ハイテクノロジーズ、日本電子株式会社

B: メーカー講演 (3階集会室)

13:00-13:30 『STEMトモグラフィの生体試料への応用 - 厚切り切片の3D観察 -』

日本エフイー・アイ(株)アプリケーションラボラトリー 青山一弘

13:30-14:00 『オメガフィルターを備えた超高压電子顕微鏡の開発 -九州大学設置装置の紹介-』

日本電子株式会社電子光学機器技術本部 大崎光明他

14:00-14:30 『invivo イメージングの最前線 -生体分子内に迫る蛍光イメージング-』

オリンパス(株)ライフサイエンスカンパニー 天川玄太

14:30-15:00 『顕微鏡の前処理を10秒で! -材料分野における迅速前処理装置の紹介-』

株式会社堀場製作所分析センター 石川純代

■15:00 - 16:30 特別講演

15:00-15:45 『顕微鏡でみる身近なかたち』 上原康生先生

15:45-16:30 『目刺しから鯛へ: 超薄切片法の進歩』 天児和暢先生

■16:30 閉会挨拶

■18:00 懇親会 (ハイネスホテル「春宴」)

要 旨 集【一般演題発表】

10:00-10:20 『ウイルスのネガティブ染色技法の開発 - 酢酸ウラニル代替染色剤を探る -』

長崎大学熱帯医学研究所共同研究室電顕部 一ノ瀬昭豊

現代は流行性の新興再興感染症が蔓延する危険性が指摘されている中にあり、ウイルス病原体は分類の同定のため微細構造解析が必要の為、手早くネガティブ染色を行い電子顕微鏡を用いての観察をする必要がある。従来は酢酸ウラニルを用いて、ウイルスのネガティブ染色法による電子顕微鏡観察が一般的であったが、この染色剤の規制と管理不便のため代替え染色剤を用いての技法の開発を試みた。酢酸ウラニルはウイルス微細構造に良く浸透し、支持膜にも親和性があり適度な厚さで良く伸び広がり、透明度のある高いコントラストで微細構造が観察できる。今回はこれらの特徴に匹敵する様な、染色剤に成り得る重金属化合物の探索と、ウイルスの微細構造をコンスタントに観察できる様な染色技法を開発する事を目的とした。前回は細菌のネガティブ染色について話したが、ウイルスでは大きさが小さい事による染色のトラブルが生じる。そこで、今回はウイルスに適した染色剤の選択と調整と手技の方法を詳しく述べたい。

10:20-10:40 『電子顕微鏡による形態観察から考察される石灰化機構について』

長崎大学大学院医歯薬総合研究科口腔分子生化学分野 ○小野俊雄、根本孝幸

歯牙や骨の石灰化はコラーゲンをマトリックスとする場で進行する。そのメカニズムは Landis のホールゾーン説で完成したかのように考えられているが、まだ推定の域を出ていない説明も多い。ホールゾーンの形態やトロポコラーゲンの側方会合を示す形態を、360度いろいろな方向から観察した報告は今だない。視点を変えて、今まで観察してきた電顕像を再考してみると、桂説「ナノスペース説」が魅力的な検討課題となってきた。

10:40-11:00 『樹脂包埋生物試料の電子線トモグラフィー法における試料作成と撮影条件』

太田啓介¹・東龍平²・中村桂一郎¹ 1. 久留米大学 医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門 2. 久留米大学 電子顕微鏡室

樹脂包埋試料の超薄切片を電子線トモグラフィー法で観察する場合、試料の厚さ、傾斜シリーズ画像の枚数、試料コントラストに依存して得られる分解能が変わる。ここに挙げた3つのファクターはいずれもトレードオフの関係にある。また、生物試料の場合は試料の固定条件自体が得られる結果に大きく影響する。そこで、今回、樹脂包埋された生物試料を電子線トモグラフィー法で観察する上で、求める分解能によって選択すべき試料作成の条件について検討した。加速電圧 100kV の透過型電子顕微鏡を用いた場合、電子線トモグラフィー法では通常 100nm 厚の超薄切片を観察試料として用いる。この条件で一般的なタンパク粒子(直径 3nm)の位置関係を解析しようとする場合、3nm の分解能が必要であるが、それを得るためには計算上 $\pm 60^\circ$ の撮影範囲で 70 枚以上の傾斜画像を撮影しなければならない。つまり撮影には1時間以上の電子線照射が必要となるため、包埋樹脂はエポキシ系などの比較的電子線に強い樹脂が適しているといえる。そこで今回我々はエポキシ樹脂包埋した小腸上皮試料を用い、固定法と染色法の違いにより獲られる像の違いについて比較を行った。固定法では、金属圧着法がもっとも良い保存

状態を示していたが、化学固定でもアクチンフィラメントの走行を追うことができるレベルであった。一方、ウランの単染色であれば、電子線の透過性が維持されるため加速電圧 100kV でも 150nm 厚の切片でトモグラムを作製することができた。アクチンフィラメントの直径は 5nm 程度であるので、走行を調べるだけであれば、化学固定試料で解像度 5nm 程度のデータを得ることで解決できると考えられる。そこで計算上 $\pm 60^\circ$ の撮影範囲で 61 枚の傾斜画像撮影により目的が達成できると考えられる。そこで今回、上記条件で目的の分解能が得られたか否かを小腸微絨毛内のアクチンフィラメントについて観察し検討した。

11:00-11:20 『nanolego 構造体構築のための環境設計』

○ 牧禎¹、臼井健悟¹、伊藤吹夕¹、木戸秋悟^{1,2}、伊藤昌可^{1,4}、鈴木治和^{1,4}、松田武久^{1,3}、林崎良英^{1,4}
¹(科学技術振興機構 CREST) ²(九州大学先導物質化学研究所分子集積化学部門生命分子化学分野)
³(金沢工業大学ゲノム生物学研究所) ⁴(理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター遺伝子構造・機能研究グループ)

我々は、骨格となる多量体タンパク質に特異的相互作用部位を接着素子として導入した人工融合タンパク(nanolego)を作製し、これらの接着素子部位が互いに結合し合うことで自己組織的に高次構造体が組み上がるタンパク分子の開発を行っている。しかしこれらを制御して秩序構造体を構築させるには、素子対間の特異的相互作用以外にタンパク分子同士を互いに接近させるための周辺環境まで含めた設計が必要になる。今回、私はタンパク素子対間の速度論的・力学的解析とともに、気液界面を利用してタンパク分子を平面的に集合させる方法について報告する。

11:20-11:40 『癌細胞における低酸素の有効生について』

株)ニコンインスティック バイオサイエンス営業本部 九州営業部 ○上田正道
九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野 野田 百美、井福 正隆

今日、細胞培養は、CO₂は勿論、低酸素O₂下における研究が主体になると考えられる。特に低酸素環境は、幹細胞の増殖や分化、体外受精における環境の変化が細胞に多大な影響を及ぼすことが確認されつつあります。アポトーシスとガンについては、アメリカのスタンフォード大学のグループが「がん化した細胞が低酸素状態にさらされると、細胞が自発的に死ぬ、つまりアポトーシスを引き起こす」ことを、最近発見し発表しています。ガン抑制遺伝子「P53」が欠けた細胞ではガンは悪性化するとい、このことから、抗がん剤や放射線による治療が効かなくなる現象も、説明できるようになるのではないかと期待されています。今回は、癌細胞における低酸素濃度1%、5%、における細胞の行動解析を行いコントロールとの比較・検討を報告します。

11:40-12:00 『Miniscope による無蒸着観察と新たな展開』

(株)日立ハイテクノロジーズ先端製品営業本部営業技術部 山本康夫

SEM の利用分野の拡大に伴い、高性能・多機能な SEM が多く使用される一方で、光学顕微鏡のように手軽に使用・導入できる卓上型 SEM の需要も高まっています。そのような需要に応えるため、「光学顕微鏡のように使い易く、低価格で購入しやすい」という新しいコンセプトに基づいて卓上顕微鏡 Miniscope を開発しました。ここでは、装置のご紹介と材料から生物試料までの応用例をご紹介します。

要旨集【メーカー講演】

13:00-13:30 『STEMトモグラフィの生体試料への応用 -厚切り切片の3D観察-』

日本エフイー・アイ(株)アプリケーションラボラトリー 青山一弘

透過型電子顕微鏡を用いての結像法には、通常用いられる TEM 法のほかに STEM(Scanning Transmission Electron Microscopy)法がある。医学、生物学の分野において STEM はなじみの薄い結像法であるが、トモグラフィと組み合わせた場合、以下のような数々のメリットがある。1) 試料に厚さに対して強い。ボケが少ない。2) 傾斜時にも全視野にフォーカスが合う。3) HAADF を含む暗視野が使いやすいため、高コントラストが得やすい。4) コントラストがリニアである。

1) 厚い試料を観察する場合、STEM を用いれば TEM 像よりも鮮明な像が得られることは良く知られている。これは STEM では基本的に対物レンズの色収差の影響を受けないためである。トモグラフィに厚い試料を用いることができるということは、当然のように、より多くの三次元情報を得ることができるということである。2) トモグラフィでは高角度まで試料を傾斜し像を撮影する必要があるが、試料を高傾斜した時、TEM では試料のごく一部にしかフォーカスをあわせることができない。これに対し、STEMではフォーカスを変えながらプローブをスキャンすることにより像全体にわたりフォーカスをあわせることが可能である。3) トモグラフィでは100枚程度の画像を取り込む必要があるため、実用上、データの自動取得は不可欠である。TEM トモグラフィでは自動取得を行うにあたり条件を統一した暗視野像シリーズの取得が技術的に非常に困難であるが、STEMでは環状暗視野像を容易かつ安定した条件で得ることが可能であり、また取り込む散乱角度の選択も容易である。4) STEMでは対物レンズの球面収差の影響も受けず、またデフォーカスする必要も無いため、これらに由来するフレネルフリッジなどの正確な3次元構造解析の妨げとなるアーティフィシヤルなコントラストとは無縁である。STEM 像の結像条件(ビームの照射条件)の検討を行った結果、STEM プローブの収束角を小さくすることにより、より厚い試料の観察が可能となることが明らかになった。これは一眼レフなどで写真撮影するとき小さい絞りをうれば被写界深度が深くなるのとよく似た理屈である。小さいプローブ収束角を実現するために、特別に小径のコンデンサー絞りを導入した。これにより加速電圧 300kV の通常市販タイプの顕微鏡(TECNAI F30)を用いても、厚さ $2\mu\text{m}$ にも達する樹脂包埋切片の3次元構造再構築も可能となった。これは超高圧電子顕微鏡にも匹敵する厚さである。STEM-Tomography は回折波の影響が回避できるという特徴から、現在、材料系の分野から普及が進んでいるが、本研究により生物試料に対しても非常に有力な手法であることが明らかとなった。医学生物学分野においては STEM 自体があまり広く普及していない現状から考えて、今後、大きく展開することが期待される。

13:30-14:00 『オメガフィルターを備えた超高圧電子顕微鏡の開発 -九州大学設置装置の紹介-』

大崎光明¹、松村 晶^{2,3} (1 日本電子(株), 2 九州大学超高圧電子顕微鏡室,
3 九州大学大学院工学研究科)

インカラム形電子損失分光装置を装着した超高圧電子顕微鏡 JEM-1300NEF を開発し、九州大学に設置したのでその装置概要と性能を報告する。

JEM-1300NEF は LaB₆ 電子銃を用い加速電圧 1300kV まで印加(常用 1250kV)可能であり強励磁対物レンズの採用により電子線をナノレベルまで絞ることを可能にすると共に球面収差係数(Cs)を小さくした。更に高電圧電源の低ノイズ化、レンズ電源の高安定化および装置の振動対策に加え設置環境(風量、音圧、室温など)に関しても細心の注意を払い、超高分解能機能を実現した。また、オメガフィルタの装着により、エネルギー選択像及びエネルギー損失スペクトルの観察が可能となり、厚い試料においても高コントラスト像が得られ生物系試料の3D 観察の可能性が広がった。

以下に主な装置性能をまとめる。

- ・加速電圧(kV): 1300, 1250, 1000, 800, 600, 400
- ・エネルギー安定度: 1.28eV /min (at1250kV)
- ・対物レンズ電流安定度: 3×10^{-7} /min
- ・粒子分解能: 0.112nm(Cs:2.2mm)
- ・格子分解能: 0.1 nm・最小ビーム径: ϕ 1.6nm

14:00-14:30 『invivo イメージングの最前線 -生体分子内に迫る蛍光イメージング-』

オリンパス(株)ライフサイエンスカンパニーバイオ事業推進室バイオ営業部バイオ営業1G 天川玄太

オリンパスは遺伝子分野、タンパク質分野、細胞分野、さらには臨床分野と光を通して幅広く生物・医療分野に関わってきました。近年、研究分野と臨床分野の架け橋としてトランスレーショナルリサーチが重要視されています。そこで、このトランスレーショナルリサーチで注目される in vivo イメージングについてオリンパスが現在どのように取り組んでいるかを紹介いたします。

in vivo イメージング分野では蛍光を用いた製品を目的別に3種類を御用意しています。

[OV110]小動物全体から細胞レベルまでを高感度、高速イメージング

[IV100]スティック対物レンズを用いて、低侵襲で生体内を高倍率イメージング

[FMT システム]非侵襲で生体内を三次元断層イメージング

これらどのような目的で使用できるか、将来どんな分野に適応できるかを実際のデータを紹介しながらご説明いたします。また、in vivo イメージング分野で注目を集めている近赤外線蛍光試薬についてもデータを交えながらご紹介いたします。

14:30-15:00 『顕微鏡の前処理を10秒で！ - 材料分野における迅速前処理装置の紹介 -』

株式会社堀場製作所 平野彰弘、藤本明良、岩崎俊典、宮坂真太郎、石川 純代

材料における解析・評価は、近年の組織微細化にともない組織構造、粒界、析出物・介在物の形態、組成を把握するために益々重要度を増してきている。材料の組織観察は、研磨処理、ケミカルエッチング実施後、光学顕微鏡・電子顕微鏡等にて行なっている。しかし、研磨による残留ひずみ、研磨ダレ、エッチングによる汚染など妨害要因が多く、真の表面状態を得るには熟練した高度な技術が必要である。

一般的に、析出物や介在物の電気化学的な反応性は母相と異なることから、選択的溶解を引起さないようにエッチングするためには、エッチング液及び処理条件の選択に多くの経験や知識が必要となる。一方、環境負荷への関心が高まる中、エッチング液の廃液処理なども大きな問題となってきている。本報では、高周波グロー放電プラズマ(特長:高スパッタリングレート、低エネルギーイオン)を用いた簡単で短時間に環境への負荷が小さく真の表面状態を得ることが可能な前処理手法および観察結果について紹介する。

第 20 回九州電子顕微鏡技術研究会 ご案内

【日 時】 2007 年 9 月 8 日(土) 10:00-16:30

【場 所】 福岡県青少年科学館 3 階集会室

【参加費】 研究会 1000 円 (科学館への入館料は不要)

【懇親会】 ハイネスホテル「春宴」18 時開始 (会費)飲み放題付 5000 円

【交通案内図】

福岡県青少年科学館

〒830-0003 福岡県久留米市東櫛原町 1713 TEL: 0942(37)5566 <http://www.science.pref.fukuoka.jp/>



●西鉄久留米駅から徒歩 15 分
または、西鉄バス「ゆめタウン久留米行き」、乗車 5 分 青少年科学館前下車、23 番(百年公園経由)系統乗車 5 分 青少年科学館前下車

●JR久留米駅から西鉄バス 23 番(百年公園経由)系統乗車 16 分 青少年科学館前下車
または、1,7,9,20,22,25,40 番(西鉄久留米方面行き)系統乗車 15 分 五穀神社下車 徒歩 5 分

●九州縦貫自動車久留米インター(佐賀・日田方面出口へ)から 5 分(車)

ハイネスホテル久留米

〒830-0003 福岡県久留米市天神町 1-6 TEL:0942(32)7211 <http://www.highnesshotel.co.jp/>



交通 ●西鉄久留米駅と電車・バスに直結
●JR久留米駅まで車で5分
●久留米インターまで車で10分