

# 第 26 回 九州電子顕微鏡技術研究会 抄録

10:02-11:00 特別講演 (座長：金丸 孝昭)

## レプトスピラ感染症-ウイルス病病原体発見から百年

○演者：齋藤光正<sup>1</sup>、宮原 敏<sup>1</sup>、金丸孝昭<sup>2</sup>、吉田眞一<sup>1</sup>

所属：<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院細菌学分野、<sup>2</sup>九州大学病院中央形態分析室

要旨：レプトスピラは微細ならせん状の細菌である。1915年、九州大学の稲田龍吉、井戸泰がはじめて菌を分離し、野口英世の提唱で属名が *Leptospira* に決まった。レプトスピラ感染症は、日本をはじめ世界各地に広範にみられる最も代表的な人畜共通感染症の一つであり、症状は風邪程度の軽微なものから、黄疸、肺出血、腎不全等を伴う重篤なもの（いわゆる「黄疸出血性レプトスピラ症（＝ウイル病）」）まで様々である。その病態については、菌の培養方法が繁雑で研究自体が難しかったこともあり、未だ全容が解明されていない。最近私達は、黄疸のメカニズムについて、感染動物モデルの肝臓を走査型電子顕微鏡で詳細に解析することにより明らかにした。freeze-cracking 法と cross-cutting 法の 2 方法で試料を作成し、SEM で解析した結果、レプトスピラは肝細胞間に侵入し、細胞間結合を破壊して毛細胆管を消失させ、胆汁排泄障害によって黄疸を引き起こすことがわかった（図1）。レプトスピラの肝細胞間への侵入性は、分離した肝細胞にレプトスピラを *in vitro* で感染させることでも確かめられた（図2）。黄疸を呈する病気は多数あるが、このような機序で黄疸が生じる例は過去に報告がない。その他の最新研究成果も交えながら、病原体発見から百年間の研究の進歩と問題点を論じたい。

図1

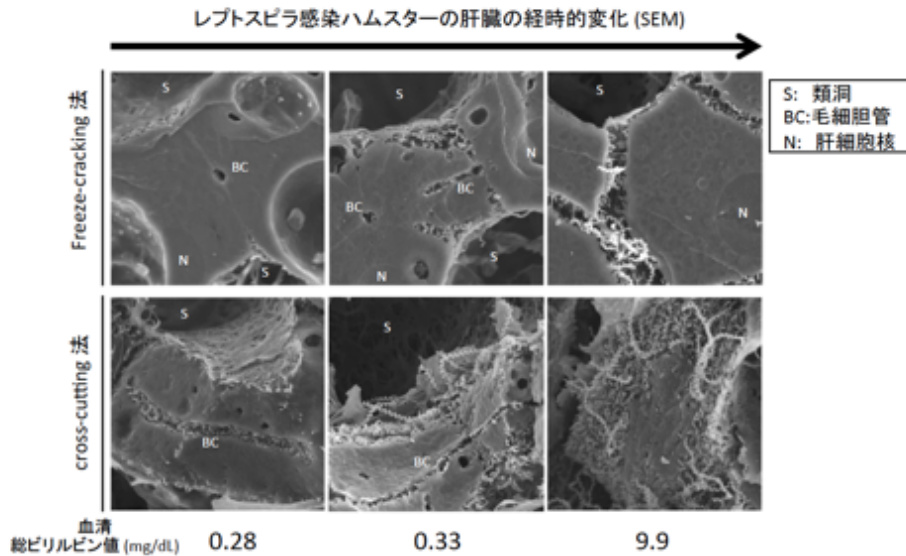
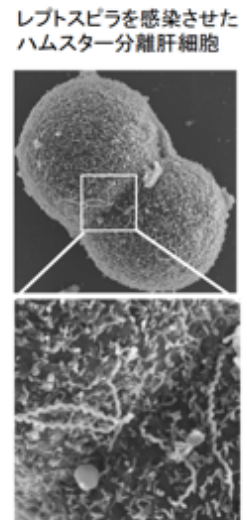


図2



### FIB/SEMのための水を添加させた凍結置換試料の *en bloc* 染色法

○都合 亜記暢<sup>1</sup>, 東 龍平<sup>1</sup>, 太田 啓介<sup>2</sup>, 岩根 敦子<sup>3,4</sup>, 永井 里奈<sup>3</sup>, 川本 晃大<sup>3</sup>, 中村 桂一郎<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>久留米大学医学部電子顕微鏡室, <sup>2</sup>久留米大学 医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門,  
<sup>3</sup>理化学研究所生命科学システム研究センター, <sup>4</sup>大阪大学大学院生命機能研究科特別研究推進講座)

〔目的〕急速凍結固定を行った試料はより生体に近い構造と時間分解能が期待される。しかし、我々が行っている FIB/SEM 三次元解析に最適化された凍結技法標本の *en bloc* 染色法は確立されていない。FIB/SEM 法では平滑な樹脂包埋生物試料表面を走査電子顕微鏡(SEM)で観察することにより、透過電子顕微鏡(TEM)像に類似した構造情報を組成コントラスト像として取得する。良好なコントラストを得るには、包埋前に通常の TEM 用標本に比べ強く電子染色する必要がある。化学固定標本と異なり凍結置換標本の場合、水液中での染色は行えない。また、一般的に膜の染色性については化学固定標本に比べ良好ではないことが指摘されている。ここで Walther らは凍結置換液に 1~5%の水を加える事によって、膜コントラストが上昇することを報告している。また我々はチオカルボヒドラジド(TCH)やフェロシアン化カリなど化学固定で *en bloc* 染色に用いる試薬がアセトンに対し若干の溶解性を持つことを確かめてきた。そこで今回、我々は FIB/SEM のための凍結置換試料の *en bloc* 染色法の開発を目指し、置換液への水添加、アセトン中での *en bloc* 染色の効果について検討した。

〔材料・方法〕単細胞性紅藻類シアニディオシゾンを高圧凍結(EMPACT2, Leica)し、置換液として 1%OsO<sub>4</sub> アセトン溶液に、0.1%酢酸ウラン、1%H<sub>2</sub>O、またはフェロシアン化カリ(飽和)を添加したものをを用いて凍結置換を行った。その後、アセトン中での TCH-OsO<sub>4</sub> *en bloc* 染色を試みた。染色後、EPON812 に包埋し試料表面をウルトラミクロトームにて平滑面を作製、カーボン蒸着の後、SEM(Quanta3DFEG, FEI 社; 加速電圧 2kV, 逆電位 2kV, 反射電子モード)にて観察した。

〔結果〕凍結置換液に 1%の水を添加させた実験群は、水を添加していない実験群と比較すると膜コントラストが上昇した。置換液へフェロシアン化カリを添加することで更なるコントラストの増強効果がえられた。置換後の TCH-OsO<sub>4</sub> *en bloc* 染色法もコントラストの増強に寄与し、膜の視認性が改善した。今回の成果は FIB/SEM による急速凍結置換標本の全膜構造解析を可能にするものである。

### チクソトロピー性ハイドロゲルの階層的構造評価

○牧 禎<sup>1,2</sup>, 金田 恵介<sup>1</sup>, 森 佐織<sup>1</sup>, 増永 啓康<sup>3</sup>, 長田 義仁<sup>4</sup>, 重原 淳孝<sup>1</sup>, 敷中 一洋<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京農工大, <sup>2</sup>日本電子株式会社, <sup>3</sup>JASRI/Spring-8, <sup>4</sup>理化学研究所)

【背景】粘土鉱物である棒状高分子電解質イモゴライト(IG)は高いアスペクト比を有する剛直中空円筒状クレイである。我々は IG と低分子二塩基酸の混合物(水溶液)が一定条件下で鋭敏なチクソトロピー性を有するハイドロゲルになることを発見した。チクソトロピー性発現に寄与する分子(集合体)構造について解明が求められるが、時間依存的に変化していく不安定なゾル・ゲル転移過程を直接観察することは難しく前例がない。そこで、我々はフリーズエッチングによるステレオ観察法、および Cryo-STEM/EDS 法による反応時間を制御した実験系を構築し、ゲル内部の局所構造解析を行った。動的な構造転移過程は時分割 SOR-SAXS 法を構築し評価した。得られた結果を元に、マクロな物性現象とミクロな相転移現象の間で見られる階層的構造変化を考察した。

【実験方法】IG と二塩基酸(マレイン酸; MA)および一塩基酸(アクリル酸; AA)の混合物(MA; ゲル, AA; ゾル)、①ゾル-ゲル転移を引き起こす IG と MA を等モル(80 mM)混合したゲル IG-MA、②塩基酸を加えていない IG のみ、③ゾル-ゲル転移を起こさない IG と AA を等モル(80 mM)混合したゾル IG-AA1、④長時間の静置でゲル化する IG に AA 6 モル倍量(480 mM)加えた IG-AA2、の 4 種類で比較した。

【結論】フリーズエッチング法で作製したレプリカ膜のステレオ観察から、サンプル①と②では IG に方向性と分布の違いが見られた。また、塩基酸濃度のみが違うサンプル③、④でも同様の違いが認められた。Cryo-STEM/EDS 法による観察から IG が平板状に会合しゲルの骨格を形成していることが示唆された。この結果は SOR-SAXS 法から示された結果と矛盾しなかった。また、各塩基酸の酸解離定数から計算した生成分布曲線から、ゲルの準安定状態である pH4 付近では IG と各塩基酸の間にプロトンを介した相互作用のあることが示唆された。この相互作用力が IG の平板状会合体を形成する駆動力となり、チクソトロピー性発現を寄与している可能性が示唆された。

### 遺伝子解析におけるエレクトロポレーション法の役割

○平川 一憲 (トキワサイエンス(有)、ネッパジーン(株))

ゲノム配列の解析が終わり、ヒトと猿の配列差が数%しか違わなかったとショックな話題が走った記憶がまだ新しい所です。そして最近、ゲノム編集が出来る最新技術が出てくるすざましい時代に突入していると実感しているところです。その遺伝子解析を行う為に、さまざまな細胞への遺伝子導入法が開発され使用されています。方法としてウイルスベクター法、非ウイルスベクター法とがあります。私達は、1997 年来、エレクトロポレーション法の遺伝子導入装置を国産化して発売してきました。

特許第 3735641 号 (遺伝子導入法及び薬剤導入法)

今回、細胞工学 5 月号 (ゲノム編集革命) で、iPS 細胞のノーベル賞を受賞した山中先生の教室における導入方法の性能比較がされていまして、弊社取扱エレクトロポレーター NEPA21 を推奨してある記事が掲載されるまでの経緯と EP について紹介致します。

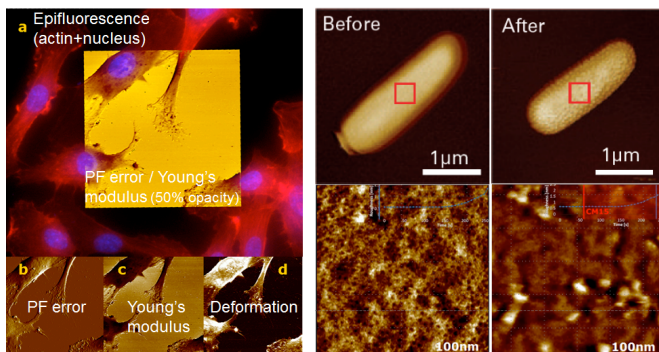


### 最新の原子間顕微鏡(AFM)技術の生体試料解析への応用

○粕谷 有造 (ブルカー・エイエックスエス株式会社 ナノ表面計測事業部)

#### 【要 旨】

微小な短針で試料表面をなぞる事で形状を可視化する原子間力顕微鏡(AFM)が開発され、25 年余りが経った。金属や高分子等の材料表面を解析する有力なツールとして AFM が使用される一方、細胞や DNA、タンパク質等の柔らかく、傷つき易い生体分子に対する応用例はそれほど多くない。当社では非常に弱い力で走査を制御する事で柔らかい生体試料の高分解能観察ができ、表面形状と同時に弾性率等の機械的特性を定量できる新しい AFM 測定モード、ピークフォースタッピング (PFT) を 2009 年に発表した。又、倒立型光学顕微鏡と AFM を統合した新システムや高速画像取得が可能なシステムも既に提供しており、光学顕微鏡では取得できない表面特性のマッピングや「生きた」細胞、「動く」分子の AFM 測定を可能とした。



左図はヒト臍帯静脈内皮細胞の AFM 像 (形状、弾性率、変形量) と二重蛍光染色像の重ね合わせである。右図は抗菌ペプチド添加に対する大腸菌外膜形状の高速・高分解能観察結果である(上図：全体像、下図：拡大像、8 sec/frame)。このように光学顕微鏡との組み合わせや走査速度の高速化によって、従来の顕微鏡では得られない多角的な表面特性の解析が可能となる。講演では当社装置の概要やその他幾つかの生体試料の解析例を紹介させて頂く。

### イオン液体を用いた微小甲殻類の解剖と SEM 観察

○塩野 正道<sup>1</sup>, 許斐 麻美<sup>1</sup>, 中澤 英子<sup>1</sup>, 河合 功治<sup>2</sup>, 桑畑 進<sup>3</sup>, 米澤 徹<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>株式会社日立ハイテクノロジーズ, <sup>2</sup>ミヨシ油脂株式会社,  
<sup>3</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>4</sup>北海道大学大学院工学研究院)

【背景】微小甲殻類の外骨格は、真空中で形態を保持できるほど強硬ではないために、試料前処理が必要であるが、固定液が浸透しにくく、型通りの電顕用前処理は難しい。一方、蒸気圧がほとんどないイオン液体（常温熔融塩）は導電付与材などの電顕応用が進められている<sup>1)</sup>。今回、我々はイオン液体を用いて微小甲殻類の SEM 観察を試みた。微小甲殻類の同定は脚などの付属肢を剖出して形態観察を行うことが必須のため、微小甲殻類の同定に必要な情報が得られるか検証した。

【実験方法】微小甲殻類は茨城県ひたちなか市の平磯海岸から採取したヨコエビを用いた。イオン液体は日立電子顕微鏡用イオン液体 HILEM IL1000 (エチル(2-ヒドロキシエチル)ジメチルアンモニウム メタンスルホネート)を用いた<sup>2)</sup>。蒸留水希釈の 10 %イオン液体水溶液をヨコエビに滴下し、4 時間後に、余分なイオン液体をキムワイプで除去した。SEM 観察には日立 S-3400N 形 SEM、付属肢の剖出は光学顕微鏡下で行った。

【結論】イオン液体処理を行った微小甲殻類を SEM 観察することで、乾燥処理せずに付属肢の微細な形態を観察できた。イオン液体処理では個体の柔軟性が保持されているので、光学顕微鏡観察下での付属肢の剖出と SEM 観察を繰り返して、微小甲殻類の同定に必要な情報を得ることができた。

- 1) Kuwabata, S., Kongkanand, A., et al. (2007). Chem. Lett., 35 : 600.  
2) Kawai, K., Kaneko, K., et al. (2011). Langmuir, 27 : 9671.

### 最新 Phenom-World 社卓上走査型電子顕微鏡の特長とアプリケーション

○和田 祥子 (ジャスコインタナショナル株式会社)

2013 年 7 月、Phenom-World 社は最大観察倍率 100,000 倍、分解能 17nm を実現する最新モデルを発表しました。

Phenom-World 社では、“スピーディーな観察”、“簡単な操作”、“観察から EDS 分析まで”を三大コンセプトに掲げ、卓上最大の利点である「使いやすさ」を根幹に、卓上に勝る「高性能」を追求しています。高輝度電子源を用いた SEM、一体で組み込まれた EDS、直感的でわかりやすいソフトウェアの全てを自社開発しており、高画質観察から分析までを一連で提供します。また、内蔵の光学顕微鏡は、観察時のナビゲーションとして利用可能です。

本発表では、最新 Phenom-World 社卓上 SEM の特長とともに、SEM 観察や EDS 分析によるアプリケーション例をご紹介します。

### JSM-7800F によるナノ構造材料の解析

○菊地 真樹、朝比奈 俊輔、作田 裕介 (日本電子株式会社 SM 事業ユニット)

**【要旨】**電界放出型走査電子顕微鏡(以後 FE-SEM)はナノ構造材料の表面観察に威力を発揮してきた。しかしナノ構造材料のより一層の微細化に伴い空間分解能もさらなる向上を望まれているのが現状である。これまでは入射電子のエネルギーをより高くすることで空間分解能の向上を図ってきたが、この方法では試料最表面の構造が見難くなることや、絶縁物試料の場合のチャージアップや損傷が問題視されるようになった。このような課題を解決する手法として低入射電子エネルギーFE-SEM 法がある。JSM-7800F はこのような要求を満たすために開発された次世代 FE-SEM である。本装置は極く低い加速電圧でも高い分解能を得るために減速法(GB モード)を用いることが可能である。本手法は試料に負のバイアス(最大 5 kV)を印加して入射電子を試料直前で減速させる手法である。検出器としては UED(上方検出器)を使用した。本検出器は光軸上にあり、GB モード時に試料から放出された二次電子を効率よく検出することが出来る構造となっている。また、UED の直下にはフィルターグリッドがあり、グリッドに電圧を印加することによって、検出する電子のエネルギーの選別が可能となる。本研究では UED による極低入射エネルギーでの二次電子像やエネルギー選別で得られた低入射エネルギーでの反射電子像を用いたナノ構造材料や生物試料への応用例を報告する。

### 多角的な分析手法 “In-SEM 技術” ～AFM, インデントー, CT スキャナ～

○橋本 拓 (東陽テクニカ 分析システム営業部)

**【要旨】**

AFM (Atomic Force Microscope) では、近接する 2 つの物体間に働く力(ファンデルワールス力、Pauli 斥力、静電気力など)を、先端曲率が数 nm の探針がついたカンチレバー(板ばね)を用いて検出することにより、原子レベルの分解能を持った画像を得ます。さらに AFM を SEM 中で実施することにより探針と試料の位置関係を SEM 像で確認できるようになり、試験位置の特定を容易にします。また AFM の電気特性評価や SEM の EDS と組み合わせることにより多角的な物性情報の取得を実現します。SEM 中でのインデントー、CT と共にご紹介致します。

### 真空電子染色装置のご紹介

○鈴木 直人 (フィルジェン (株) ナノサイエンス部)

#### 【概要】

従来の電子染色は、大気中で行うため、ドラフト内で行う必要があり、安全面が危惧されておりました。また、染色を終了したつもりでも試料内部にたまった染色剤がなかなか抜けきれず過染色が起り、脱落あるいはひび割れてしまうことがありました。真空電子染色法 (特許取得済) は、真空チャンバー内に試料を設置し、四酸化オスミウムや四酸化ルテニウムガスを真空チャンバー内に導入することにより染色を行う、全く新しい染色法です。

真空電子染色装置により、TEM・SEM 試料の電子染色を安全にかつ再現性よく行えます。



### 含水材料のための最新 SEM 前処理技術のご紹介 ～臨界点乾燥装置から、多機能コーター&クライオ SEMトランスファーまで～

○伊藤 喜子 (ライカマイクロシステムズ(株))

【背景】含水材料の SEM 観察には、固定・脱水・乾燥・導電性材料コーティングが基本ステップとなる。弊社では、全てのステップを可能な限りラボ内オート化を目指して装置ラインナップしている。中でも、臨界点乾燥装置は、自動化により、より簡便に省資源で行える工夫を行っている。更に、含水材料観察では、水も含む全ての物質があるまま観察したいという試みも行われている。これには、凍結技術が欠かせない。高圧凍結から始まり、前処理・コーティング・トランスファー技術が低温・真空環境下で必須となる。これら、常温・クライオ含めた最新 SEM 前処理装置の技術をご紹介したい。

#### 【実験方法】

常温 SEM 観察：TP 及び、CPD300、ACE600、SEM 観察

クライオ SEM 観察：HPM100/PACT2、ACE600FF or クライオマイクロトーム、VCT100、SEM 観察

### 試料凍結乾燥装置 FD-6500 の紹介

○鈴木 武雄 (株式会社サン・テクノロジーズ)

微生物の組織を維持したまま乾燥する、  
簡便で環境にやさしい走査電子顕微鏡用の試料作製装置です。

#### ≪凍結乾燥法の説明≫

従来の生物試料を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察する為には、試料中に含まれる水分を完全に除去する必要があり、形態の損傷を防ぐ為には有毒、危険な化学薬品を使用し、化学固定や脱水を実施しなければなりません。

試料乾燥法には、**臨界点乾燥法** と **凍結乾燥法** が開発され広く普及されているが、多くの問題点があります。そこで様々な問題点を解決すべく開発を進めた結果 **水凍結乾燥法** を考案し製品化を実現したのが本装置となります。

#### ≪特長≫

本装置は、脱水乾燥に薬品等を一切使用しない水凍結乾燥法として唯一の装置となります。多くの試料で化学固定や脱水等に化学薬品を使用しない環境に配慮した装置として開発されました。 **\*注 (動物組織などは化学固定を行った方が良い結果が得られる場合があります。)**

試料の凍結には、-100℃で冷却出来るスターリングクーラを内蔵しており、液体窒素、t-ブチルアルコールは使用せず、乾燥までの時間が 20 分～1 時間程で完了するので、他の研究に時間を有効的に使える事にもなります。

## その他のご案内

【研究会】\*なるべく公共交通機関をご利用下さい。

＜開催場所＞ 福岡大学病院 新館多目的室 1&2 (地下 1 階)  
〒814-0133 福岡市城南区七隈七丁目 45 番 1 号

＜会費＞ 500 円

＜アクセス＞ 福岡市営地下鉄七隈線「福大前」下車。  
2 番出口「福岡大学病院方面」を通って福岡大学病院の入口に入る。  
スターバックスコーヒーを左手に見ながら、角を左折し、廊下を進むと会場。  
(地図：電技研提供) <http://www.med.kyushu-u.ac.jp/nano/Kaijyou.html>  
(地図：福大提供) <http://www.fukuoka-u.ac.jp/help/map/>  
<http://www.fukuoka-u.ac.jp/aboutus/facilities/map.html>

お車の場合は、外来駐車場を利用してください。

駐車から最初の 4 時間まで 200 円。以降 1 時間が経過するごとに 100 円が加算されます。場所はキャンパスマップの 2 2 番、陸上競技場に隣接したところにあります。

【懇親会】

＜懇親会会費＞ 5,000 円

＜懇親会会場＞「福岡大学 文系センター棟 スカイラウンジ (最上階)」

【連絡先】

＜平日＞ 事務局 電話： 092-642-5740

アドレス：kanemaru@mcore.med.kyushu-u.ac.jp

＜当日＞ 事務局・金丸 (携帯：080-5252-6649)

\*研究会会場では、携帯電話の電源は OFF またはマナーモードに！