

【第 28 回 九州電子顕微鏡技術研究会 抄録】

10:02-11:00 特別講演① (座長：中村 桂一郎)

レーザースペックル揺動を利用した細胞観察

○平川 靖之 (久留米高専 電気電子工学科)

【緒 言】

細胞にレーザーを照射すると観察される縞模様の揺動を、我々はレーザースペックル (LS) 揺動と呼んでいる。この LS 揺動を観察・解析することで細胞の情報を得ることができる。本講演では、細胞と LS 揺動の周波数スペクトルとの関係について説明するとともに、周波数スペクトルの時間変化を求めることができるウェーブレット解析を紹介する。

【原 理】

LS は、ホログラフィーと同じ光の干渉現象の一つで、表面等に光の波長オーダーの物理的変化のある散乱体にレーザーのようなコヒーレントな光が照射されると発生する小さな干渉縞のことである。散乱体に何らかの動きがあれば、当然干渉縞は揺らぐことになる。これを LS 揺動と呼んでいる。LS 揺動の解析法には、これまで様々な手法が提案され、特に血流観察などに多用されているが、我々は LS 揺動のフーリエ変換を用いた解析により得られる周波数スペクトルに着目し、LS 揺動の原因を探っている。

これまでの LS 揺動の周波数スペクトル解析により、図 1 に示すように周波数 1~2 Hz 以下の低周波域は細胞の生体活動の影響を受けていることが分かっているものの、細胞内の何の活動によるものであるのかは明確にできていない。一方、8~10 Hz の比較的高周波成分は、細胞小器官等のブラウン運動に由来することが分かっている。そこで、周波数スペクトルの時間変化を求め、LS 揺動の要因を明確にさせるための一つの手法として、ウェーブレット変換を利用した解析を行った。フーリエ変換は、時間変化する信号に正弦波を当てはめて周波数スペクトルを求めていくが、ウェーブレット変換では、小さい波 (ウェーブレット) の周波数と遅れ時間を変えて、周波数スペクトルの時間変化を求める手法である。

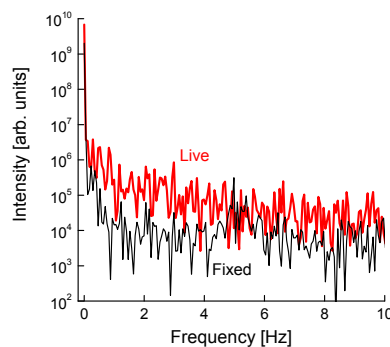


図 1 生細胞と固定細胞の LS 揺動スペクトル。

【実 験】

ウェーブレット変換処理を行った細胞上の LS 揺動は、以下のようにして取得した。通常の生物顕微鏡の観察試料の入ったディッシュに、レーザー光 (635 nm, 3.5 mW) を水平方向から照射することで得られる LS 揺動を CCD カメラにより撮影し、コンピューターに取り込んだ。試料にはヒト肝細胞癌細胞株(KIM1)細胞を使用し、様々な刺激を与えて LS 揺動を観察、解析した。LS 揺動解析をウェーブレット変換した結果は、スカログラム (ウェーブレットスペクトログラム) として表すことができる。結果の一例として、細胞をハーフカルノフスキー液により固定した際の LS 揺動周波数スペクトルの時間変化を示すスカログラムを図 2 に示す。この図は、LS 揺動を記録した動画の画素 (計 1600 点) の一つ一つについて LS 揺動をウェーブレット変換し、算出されたスカログラムの平均値を求めたものをプロットしたものである。実験では、LS 揺動の動画撮影開始 10 s 後に固定液を投与したが、その後に細胞が固定されていく様子が本スカログラムにより明確に分かる。すなわち、15 s 付近では、1 Hz 以

上の揺らぎの高周波成分が急激に弱くなっていくとともに、1 Hz 以下の低周波成分も時間が経つにつれ緩やかに弱くなっていることが見て取れる。一方、0.15 Hz 付近の極低周波の揺らぎ成分は固定液投与後、一度強くなった後に弱くなっている。これは、投与された固定液により当初細胞に急激な変化が生じ、徐々にその変化が広がりながら落ち着いていっている様子を示しているものと考えられる。図には示していないが、生細胞の LS 揺動は、時間に対して安定しており、周波数スペクトルの各成分の強度はほぼ一定である。

このことから、ウェーブレット解析は、視覚的に LS 揺動の変化、つまり細胞状態の時間変化を追跡するのに適しており、LS 揺動の低周波成分の要因を調べるのに有力なツールとなるポテンシャルを有しているものと判断している。

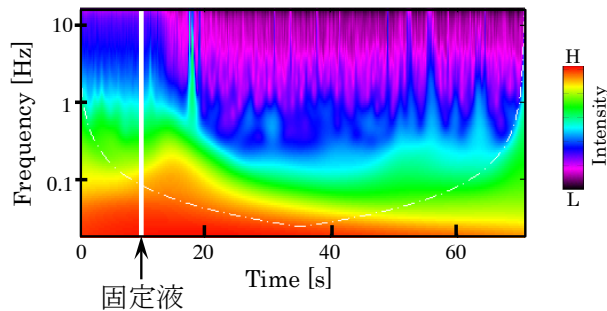


図 2 細胞固定を記録した LS 揺動をウェーブレット解析した結果得られたスカログラム。記録 10s 後に固定液を投与した。

【謝 辞】

本研究は、久留米大学医学部 中村桂一郎 教授、太田 啓介 准教授、並びに久留米高専学生諸君のご支援、ご協力の下に行われたものである。ここに深謝する。

物理学から見た苔防止法

○吉田 聡 (日揮触媒化成株式会社 ファイン研究所 新商品化グループ)

【背景】

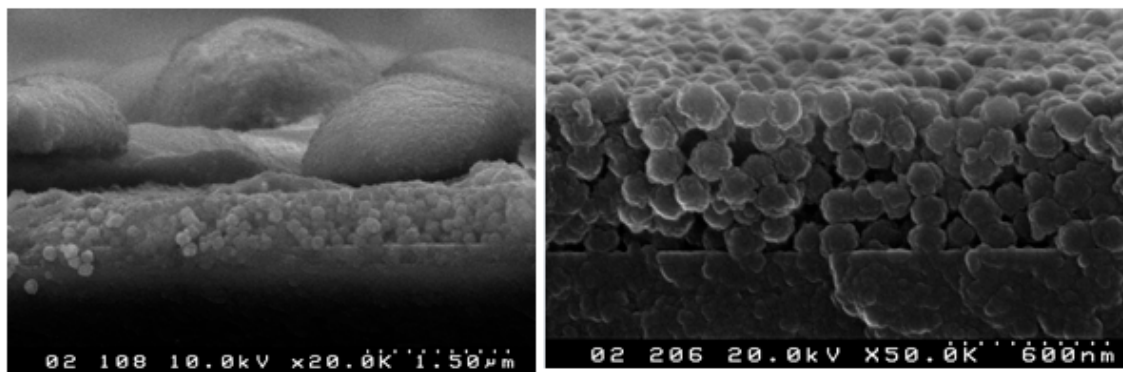
現行の抗菌材は、樹脂基に金属を結合させたものや、また当社材に限って言えば金属イオンを無機単体に担持したものが多く、屋外で使用するには、前者は紫外線環境下では三年間程度、後者も酸性雨などで流失してしまう恐れがあり、広い PH で安定な抗菌無機粒子を作る必要があった。その為たとえば抗菌に効果のある Ag^+ や Cu^{2+} イオンと同じような還元力をもつ複合金属粒子を作成しその防藻効果を確認した。

【実験方法】

前記金属が、還元力を維持する酸化状態をもつ粒子を作るために、他金属 (今回のケースでは、Ti や Si) 酸化物との酸素共有をさせる方法、たとえば Ag-O-Ti-O-Si-O などの構造をもつ複合酸化物粒子を作成した。前記粒子を含む塗膜をガラス上に形成し、MIC 法などにより屋外で繁殖する代表的なクロロコッカム族などの生菌を前記塗膜含むシャーレの中で培養、その抗菌効果をガラス上の生菌有で防藻効果を確認した。

【結論】

Ag^+ や Cu^{2+} イオンと同じような還元力をもつ複合金属による防藻効果は、確認出来た。粒子をバインドする膜を前記シリカ粒子に修飾し自己整合的に膜化する方法をとり、生菌に対して物理的なインターアクションを持たせた。



本評価面、分析等は、産業医大共同開発センター横山先生に多大なるご尽力ご協力をいただきましたことを感謝します。

共焦点レーザー顕微鏡の基礎とアプリケーション技術のご紹介

○亀岡 豊史、上田 正道 (株式会社ニコンインステック)

【背景】共焦点レーザー顕微鏡は、レーザーをスキャンさせて焦点面のみの蛍光を検出するため、厚い試料でも高解像度、高コントラストの光学切片像及びそれらによる立体構築像を把握することが可能である。さらにレゾナントガルバノミラーを利用したレーザー走査共焦点顕微鏡は 512×512 の画角でビデオレート 30Hz 以上での高速画像取得が可能となり、生きた細胞で現実に行っているダイナミックな生理現象をリアルタイムで観察し、解析することが可能となる。また、蛍光スペクトル情報を同時に取得することで、多重蛍光プローブによる細胞機能関連分子の同定及び分子間ネットワーク解析等を行うことができ、最先端生命分子情報学の独創的に富んだ探求研究に極めて有用である

【実験方法】

- ・2次元多重染色画像取得
- ・光学断層像連続取得による3D画像構築、
- ・タイムラプス画像取得または光刺激画像取得による継時変化解析
- ・スペクトルイメージング取得による近接蛍光及び自家蛍光の分離
- ・レゾナントスキャナ使用による高速画像取得と解析

【結論】

弊社共焦点システムを使用する事により、様々な実験体系に合わせたイメージングが可能であることが確認できます。

Limitless panorama を用いた網羅的形態観察

○春田 知洋¹、福島 英剛²、西岡 秀夫¹

1、日本電子株式会社 EMアプリケーション部

2、株式会社システムインフロンティア 技術部

【背景】

TEM は生物学研究の分野において、シナプスによる神経細胞の接続や、微小管や小胞体などのオルガネラの形態を明らかにしてきた。これらの微小構造は生物の行動様式や形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。近年、TEM の分解能を維持して組織全体や個体全体を観察することによって、形態形成などのマクロな現象におけるオルガネラの機能の解析等が試みられている。

【手法開発】

我々は Limitless Panorama (LLP) と名付けた自動広視野撮影・観察ソフトを開発した。LLP は TEM と CCD カメラを制御して隣接した視野を連動的に撮影するモニタージュ撮影機能と、取得した画像を正しく配置し1枚の画像として表示する Viewer ソフト (LLP viewer) で構成される。モニタージュ撮影の際、自動的に解像度の異なるサムネイル画像(ビニング 1~4)を同時にキャプチャーされる。LLP viewer は、取得した画像を詳細な位置合わせならびに画像の諧調補正を行う。さらにこのビニングの異なる画像をそれぞれ用いることにより LLP viewer で画像を表示する際、低倍の全体像から高精細像まで拡大・縮小をスムーズに行うことができる。このような表示法を用いることで PC 環境に依存せず高精細な広域画像をストレスなく観察することができる。

【結果】

本研究では LLP を用いて、マウスとゼブラフィッシュの組織のアトラス作成を試みた。その結果、ミトコンドリアや小胞体などのオルガネラの形態が観察できるほどの分解能 (分解能: 2 nm 以下) の組織アトラスを作成することに成功した。

大気圧走査電子顕微鏡の画質改善技術

○大南祐介 (株式会社日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部
科学システム設計開発本部 電子顕微鏡第二設計部)

ソフトマテリアル材や生体材料などの含水率が高い試料を SEM 観察するために、大気圧室温下で観察可能な大気圧 SEM 装置を開発した。本装置は、隔膜に試料を密着させないためバルク試料が観察できるという特徴がある。しかし、隔膜と試料との間に大気ガスが存在すると、大気ガスによる電子線散乱による SEM 像画質劣化が問題となる。

本報告では、大気圧 SEM 画像から電子線散乱成分を画像から除去することが可能な電子線散乱補正 (Electron Scattering Corrector: ES-Corrector) アルゴリズムを開発した結果について報告する。本 ES-Corrector アルゴリズムでは、散乱を受けない一次電子のビーム強度分布と散乱の影響で広がったビームフレア強度分布を分離して考え、取得された大気圧 SEM 画像からビームフレア強度分布の成分を低減することができる。図1にカイワレ大根葉の大気圧 SEM 取得画像と、ES-Corrector アルゴリズムによる画質補正前後の画像を示す。本発表では ES-Corrector アルゴリズムの原理や結果を紹介し、本手法の有用性と応用可能性について議論する。

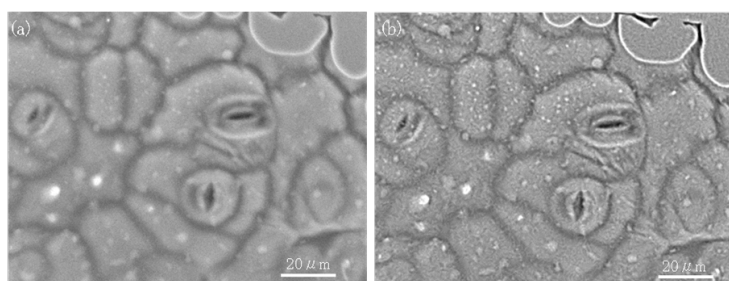


図1 カイワレ大根の大気圧SEM像 (1気圧、室温で撮像) (a)画質補正前 (b)補正後

電子顕微鏡による3次元イメージング

○葦原 雅道
日本エフイー・アイ株式会社 営業部・アプリケーションスペシャリスト

近年、生体試料を対象とした電子顕微鏡による3次元イメージング法は飛躍的な進展を遂げた。タンパク質複合体やウイルスなど生体超分子複合体とよばれる分子の3次元構造解析にはクライオ電子顕微鏡法の利用が急速に増えている。検出器や解析プログラムのブレークスルーにより、大きな分子量のタンパク質だけでなく、膜タンパク質までも原子分解能での構造解析が可能となってきている。次に、オルガネラを対象とした3次元イメージング法として電子線トモグラフィ法がある。本手法は一般的な手法として定着しつつあるが、その現状と問題点に言及する。さらに細胞・組織を対象とした3次元イメージング手法として3D-SEM法の進展が近年著しい。3D-SEM法には代表的な手法として、Array Tomography, Serial Block Face Imaging, FIB/SEM tomographyの3手法が知られている。これら各種法の特長と利点、さらには課題も言及することで、今後の発展可能性について議論したい。

本講演では、上記観察ターゲットとなり得る生体試料に対して3次元イメージングを行う際、どういった手法が利用可能なのか、さらには各手法が今後進展するためにはどのような技術的課題が存在するかについて議論する。

14:30-15:00 メーカー講演⑤ (座長：蔵田 耕作)

バイオサンプル向け最新 AFM 装置と測定技術

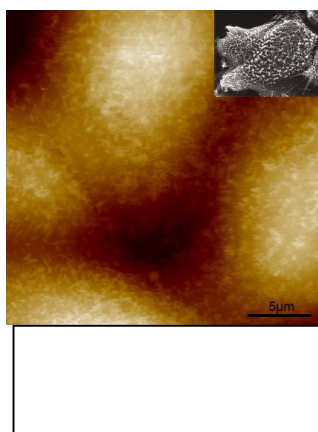
○川口 哲成 (ブルカー・エイエックスエス株式会社 ナノ表面計測事業部)

高分解能倒立型顕微鏡一体 AFM システム

BioScope Resolve

原子、分子スケールで物質表面の 3 次元の形状評価ができる走査型プローブ顕微鏡/原子間力顕微鏡 (SPM/AFM) が世に出て、25 年余り経った。SEM や TEM に比べてその歴史は浅いが、大気中のみならず溶液中等の環境制御雰囲気下での高分解能形状測定が可能であるとともに、ナノオーダーでの弾性率や吸着力といった機械特性が測定できるという他の顕微鏡には無い特徴がある。

新たに発表された最新の Bruker AFM 装置・測定技術の紹介とそれらによる最新応用事例についてご紹介したい。



15:10-15:40 メーカー講演⑥ (座長：蔵田 耕作)

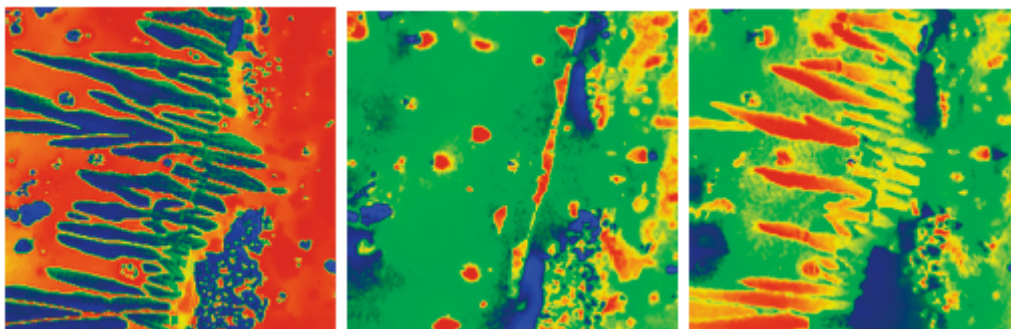
わずか 2 秒で AFM スキャンを実現: Keysight 9500

○ 小森 研治 (株式会社東陽テクニカ 分析システム営業部)

【内容】

キーサイト・テクノロジーズ (旧アジレント・テクノロジーズ社) がリリースした 9500AFM は、取込み処理スピードが驚異の 10MHz という最新コントローラと、全自動調整機構を搭載した最新 NanoNavigator ソフトウェアにより制御され、2 秒で 1 枚のイメージを取り込むことができます。まさに電子計測界のリーディングカンパニーであるキーサイト・テクノロジーズの技術が結集された新製品です。まるで光学顕微鏡を使っているかと思えるようなユーザインターフェースが開発されており、次々と見たい箇所をズームできたり、表面の変化をリアルタイムでとらえることができます。また、キーサイト・テクノロジーズが得意な環境制御も同時に動作させることができます。

【環境制御&超ハイスピード】



高速 (10秒/フレーム) で取り込んだPDSE (ポリマー材料) の温度変化に伴う位相イメージ。左から順に25°C、46°C、28°C。

ゲム編集技術とエレクトロポレーションへの期待

○平川一憲 (トキサイエンス(有) ネットサイン(株))

第 23 回の金丸先生の「簡易型暗視野蛍光顕微鏡作製の紹介」ではネットサイン社取扱い製品、「ダークライト」が使われていました。そのシステムを使い、第 26 回特別講演の斎藤先生と金丸先生とでプロトスピラ菌、幅 20nano 長さ 100nano のスプリング形状の動画を撮影されましたので紹介します。

また弊社では、この会で、遺伝子導入法として、EP 法の NEPA21 を紹介してきました。InVivo、InVitro では NEPA21 の最大設定電圧 300V で大方の細胞、生体に有効でした。しかし大腸菌、バクテリア、酵母菌等への導入は厳しく、従来の EP の高電圧 1,500V~3,000V が必要と、高電圧出力設定可能な ELEPO21 を発売に至りました。

ゲム編集技術、Crispr/Cas 9 等を駆使し、エレクトロポレーションで遺伝子導入を行う事での、遺伝子解析の可能性に期待します。



ELEPO21

アルミニウム真空蒸着で生成したイオン液体中の金属ナノ粒子観察

望月俊成¹, ○牧 禎², 長崎秀昭¹, 田口敦清³, 梅田倫弘¹

(1 東京農工大学大学院工学研究院, 2 東京農工大学学術研究支援総合センター, 3 大阪大学大学院工学研究科)

【背景】近年、イオン液体中に特定の金属を真空蒸着してナノサイズの金属粒子を生成する手法が注目されている。均一な粒子を比較的簡単に作製できる上に、イオン液体が粒子表面の保護膜として働くことで、粒子の安定性にも寄与すると考えられている。そこで我々はこれまでに報告例がなかったアルミニウム(Al)ナノ粒子の合成を試みた。Al ナノ粒子は紫外域に局在表面プラズモン共鳴をもち、この値は DNA の吸収波長域(270nm)に近いことから高感度バイオセンサーやデバイスへの応用が期待できる。今回はその実現のための基本情報となる粒子状態について詳細に調べた。

【実験方法】イオン液体は 1-Ethyl-3-methylimidazoliumBis(trifluoro-methanesulfonyl)imide(EMImTFSI)を、蒸着金属は市販の Al を使用し、蒸着量は水晶振動子膜厚計で測定された値から評価した。液体内の Al ナノ粒子は光吸収スペクトル分析と動的光散乱法を用いた。また Al ナノ粒子の直接観察には TEM を、組成分析には EDS を用いた。粒径測定はフリーソフト *Image J* を用いた。

【結論】Al 蒸着後の EMImTFSI の光吸収スペクトル測定から、Al 量に依存した深紫外波長域 300nm 付近の吸収ピークが観察された。また動的散乱の測定でも粒径 400nm 付近に極大値を 1 つだけ持つ分布図が得られた。これらの結果は Al 蒸着後の EMImTFSI 中に Al ナノ粒子が溶存していることを示している。また、支持膜上に担持した EMImTFSI を TEM 観察しても Al ナノ粒子が確認され、回折パターンから多結晶体であることが分かった。平均粒径は $9.6 \pm 2.7 \text{ nm}$ で、更にこれらの粒子(一次粒子)が凝集して直径 200-500nm の会合状態(二次粒子)を形成していた。EDS の組成分析では Al の検出位置に一致してフッ素の存在が確認されたが、アニオンを構成するそれ以外の酸素や硫黄は Al の場所だけでなく一様に分布していた。このことは Al ナノ粒子の表面でフッ素が溶媒和錯体を形成するのではなく、フッ化アルミニウムとして粒子内に存在している可能性が示唆された。これはセンサー作製時のイオン液体選択の重要性を改めて示す結果であった。

SEM 用環境制御型セルへの光照射システム導入

○大尾岳史 (九州大学)

【背景】

近年、クリーンエネルギー関連材料にはナノレベルでの材料設計が求められている。

水素関連材料の光との相互作用は多くの材料(セラミックス材料・光触媒等)に基礎的な知見を与えることが期待されるが、電子顕微鏡内のその場観察で捉えた例は未だない。

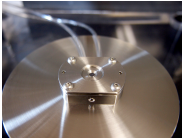
【実験方法】

まず、我々は種々の観察を実現できる環境制御型セル(商標等保有)を構築した。これは電子線を透過する薄い半導体膜を透過させて大気圧・液中の観察を行うものである。また、汎用装置で実験を行うために、世界最小レベルのコンパクトな機構(特許保有)によって汎用的な電子顕微鏡の試料室内で、これら一連の実験を実現可能にした。

【結論】

大気圧で水素吸蔵する試料を用いて、電子顕微鏡での観察を行いながら、ガス雰囲気は大気圧のアルゴンガスから大気圧の水素ガスへと置換した。このとき数パーセントの試料の体積膨張を観察することに成功した。これによって環境制御型電子顕微鏡でも困難な大気圧の水素雰囲気下観察をダイナミックに観察することが可能になった。

さらに我々は材料と光との相互作用を電子顕微鏡観察するために、大気圧または液中で試料に光照射し、また検出する設計を着想し、実現への足掛かりをつかんだので、これを報告する。



癌細胞内におけるシスプラチンの検出

○松本 忍¹、横山 満²、田中敏子³、森本 泰宏¹

¹: 九歯大歯科放射線学分野、²: 産業医大共同利用研究センター、³: 九歯大外科学分野

【背景】 プラチナ系抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)は、DNA鎖内及び鎖間にPt-DNA架橋を形成し、DNAの複製及び転写を阻害することで抗癌作用を発揮する。CDDPは優れた抗癌剤ではあるが、癌細胞の獲得耐性が臨床上的隘路となっている。耐性の機序は様々である。これに関しては多くの研究がなされているが、形態学的にCDDPの細胞内での局在を示したものはない。そこで、今回、耐性機序の異なる2種類の癌細胞株(KBR1.2及び2780CP)とその親株(KB及びA2780)におけるCDDPの分布についてX線分析装置を用いて検討した。

【実験方法】 細胞を145cm² dishに播種し、37°C、5%CO₂下で培養した。72時間後、160μMのCDDPを投与し、6時間後及び24時間後に細胞を回収し、透過電顕試料とした。細胞は2% glutaraldehyde + 2% paraformaldehydeで単独固定し、脱水、樹脂包埋を行った。一部の試料はオスミウムの2重固定とした。樹脂ブロックから厚さ2μmの光顕用切片、および厚さ80nmの透過電顕用超薄切片を作製、HITACHI TM3000 日本電子 JEM1200EXで観察した。また、X線分析はTM3000+ Bruker QUANTAX 70、およびJEM-1400Plusで行った。

【結果および考察】 未染色切片の電顕観察において、6時間経過した細胞では核膜に、24時間経過した細胞では核膜及び核内に多くの反応が見られた。2780CPにおいてはミトコンドリア様構造物にも反応が見られた。KBにおいては6時間後に比べて24時間後に核内に多くの反応が認められたが、KBR/1.2では明らかな変化は認められなかった。いずれの反応も各細胞株の特性を反映しており、電子密度の高い白金が電子染色の役目を果たしコントラストが得られたものと考えられる。超薄切片のX線分析ではPtのピークは得られず、厚さ2μmの光顕切片をQUANTAX 70で分析を行ったところ、Ptのピークが得られた。X線分析では切片の厚さを考慮する必要があると考えられた。

◆其他のご案内

【産業医科大学アクセスマップ】

最寄りのJR駅 折尾駅

JR鹿児島本線折尾駅下車
徒歩約20分

■タクシーで……………約5分

■北九州市営バスで……………約10分

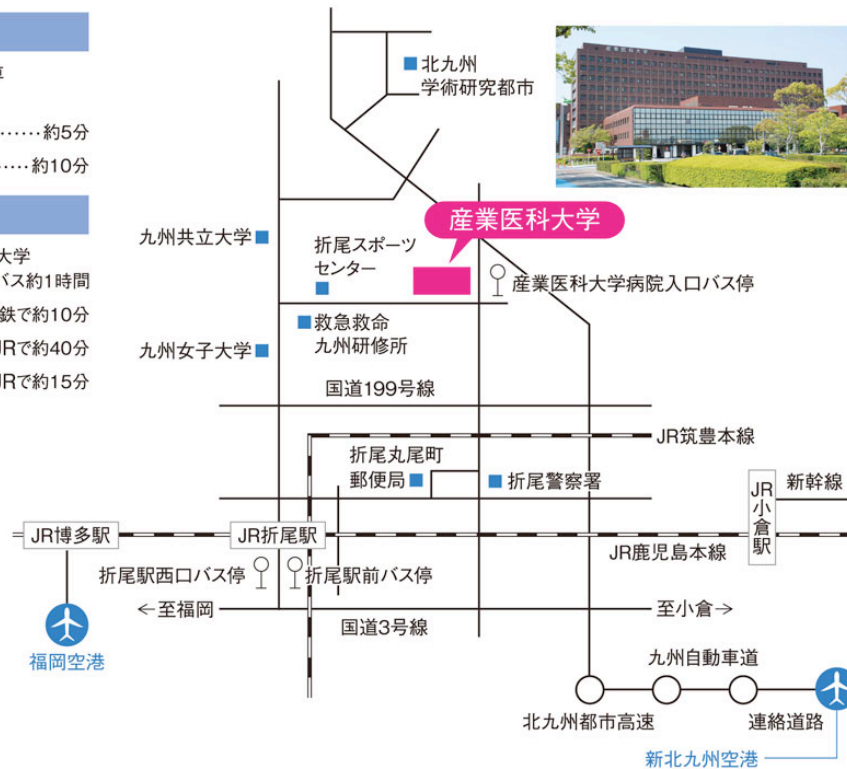
主な交通手段

■北九州空港～産業医科大学
……………エアポートバス約1時間

■福岡空港～博多…地下鉄で約10分

■博多～折尾……………JRで約40分

■小倉～折尾……………JRで約15分



【キャンパスマップ】会場：1号館 1階 1102 教室



【連絡先】

〈平日〉 事務局 TEL : 092-642-5740

Email : kanemaru@med.kyushu-u.ac.jp

〈当日〉 事務局・金丸 (080-5252-6649)

【懇親会】

〈懇親会会費〉 5,000 円

〈懇親会会場〉

割烹旅館 かねやす

〒808-0123

福岡県北九州市若松区大字有毛 2464

電話 : 093-741-1131

<http://www.kaneyasu.com/>

* 17 時 30 分に産業医大から送迎バスにて懇親会会場へ向かいます。

★お願い★

研究会会場では、携帯電話の電源は OFF あるいはマナーモードに！