

HITACHI SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS

MAY/JUN. 1991
VOL.34 NO.3

U.D.C. 57.083.3:57.086.3

目次

免疫電子顕微鏡特集

巻頭言

免疫組織化学への応用……………
……………安田健次郎- 1

報文

高分解能免疫電顕法—急速凍結置換試料への免疫電顕法の適用…
……………市川 厚- 3

免疫金コロイド法によるエイズウイルス構成蛋白の局在性……………
……………中井益代 後藤俊幸- 8

免疫金コロイド粒子の走査電顕的観察 ……田中敬一 山県 昇-12

解説

V-3000形日立走査トンネル顕微鏡…
羽崎栄市 山田 理 福原 悟
青木一雄 中泉 泰 飯田一志-15

新製品紹介

日立医用液体クロマトグラフ
L-9100形日立グリコヘモグロビン分析計/L-9200形日立カテコールアミン分析計 ……-19
AI-1000形日立GC用オートインジェクタ ……- 2

トピックス

第10回日立MSカンファレンスを開催 ……- 7
日立Hi-SEMテクノセミナーを開催 ……- 7
European Winter Conference on Plasma Spectroscopy開催さる ……- 7
ピッツバーグ会議/展示会開催さる ……-20
外村氏(日立製作所)学士院賞に選ばれる ……-11

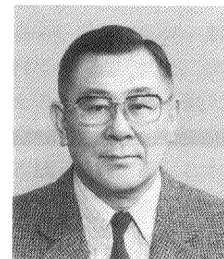
免疫電子顕微鏡特集

巻頭言

免疫組織化学への応用

Application to Immuno Cyto-Chemistry

安田 健次郎*



電子顕微鏡レベルの免疫組織化学的研究には、一般的に次のような点への留意が必要となる。1. 局在を探究しようとする物質(抗原)に対する抗体が真に特異的であるか。2. 抗体価が免疫組織化学的研究の目的に充分であるほど高いか。3. 標識物質が目的とする抗原の局在を表現する点で適当であるか。4. 標識物は特異抗体一分子につき何分子標識されているか。5. 標識抗体液の中に標識されない標識物や無標識抗体が含まれているか否か。6. 標識抗体の保存が適切であるか否か。すなわち使用時に作製時と同じ状態を保っているか。7. 組織内の抗原の抗原性を保持し、かつ組織・細胞の構造を生きた状態に可及的維持する固定液、または固定操作の工夫。8. 組織片の取扱いの選択。9. 標識抗体を組織内の抗原に反応する時点で、一段法か二段法のどちらを用いるか、また、Pre-embedding法を用いるか、あるいはPost-embedding法を用いるかの選択。10. 鏡検に際して電子染色をどの程度行うか。11. 対照実験は、充分に行われているか否か。12. 電子顕微鏡写真上での判定で、陽性部位については過剰な反応(非特異的)が出ていないか、また、陰性部位については、あるべき反応が出ていないのではないかの吟味の必要性。13. 光学顕微鏡標本における免疫組織化学反応との対比において、大きな差異はないか否かの吟味。

一般的に言えば上記の諸点に留意して実験を行うことが必望される。しかし、抗体および標識抗体の性質の分析には、免疫学および生化学的技術が要求される(1.~7.)。近時は定評ある抗体が市販されているが、真に研究者が自分の求める抗原の局在を知るためには、研究者自身で臓器から抗原を純なものとして単離し、自身で特異抗体を作製しなければならない。これは時として安易なことではない。この点から、信用に足るその分野の研究者から抗体などの提供を受け、共同実験とすることも多いように思われる。この場合に、一度の研究は良いであろうが、二度、三度と同じ抗体を用いる場合には、やはり一定のルールが必要となろう。逆に抗体を持っている者が電子顕微鏡を取り扱えないで、形態学者に撮影と解説を依頼する場合も同様なことが言えるであろう。

* 慶應義塾大学 教授、医学部長 医博

免疫組織化学的手法は、タンパク質、ポリペプチド、時にアミノ酸、糖、脂質の一部、生物活性物質等などの組織・細胞内における分布を研究する上で確かに有効な手段である。求める抗体や標識抗体も、一時に比較すると入手しやすくなっている。しかし、あくまでも素材が比較的整っているだけで、抗原側の反応性は組織の取扱いや抗原そのものの性質により多様である。光学顕微鏡におけるヘマトキシリン・エオジン染色のような安定さは決してないことを知っておく必要があると思われる。

筆者略歴

昭和45年6月 北里大学教授(医学部解剖学)
55年9月 慶應義塾大学教授(医学部解剖学)
55年10月 慶應義塾大学大学院医学研究科委員を兼ねる
60年10月 慶應義塾大学医学部副部長を兼ねる
(平成元年9月まで)
平成元年10月 慶應義塾大学医学部長・大学院医学研究科委員長・医学部附属薬化学研究所長を兼ねる

賞罰

昭和40年6月 昭和40年度三四会賞(北里賞)受賞
61年5月 日本電子顕微鏡学会 瀬藤賞受賞
平成元年10月 日本組織細胞化学会功労賞受賞

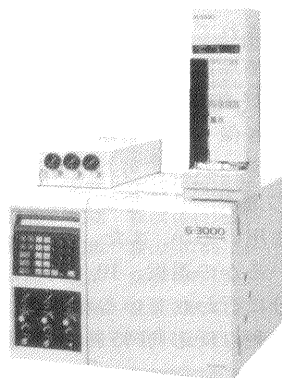
学会、その他の活動

日本解剖学会理事長 昭和63年4月～平成2年3月
日本組織細胞化学会常任理事 昭和59年11月～現在に至る
日本電子顕微鏡学会会長 平成元年5月～平成2年5月
日本学術会議 解剖学研究連絡委員会委員(幹事)
文部省国際局 学術審議会専門委員
オカジマ・フオリア・アナトミカ・ヤボニカ編集長
米国組織化学会会員
日本細胞生物学会会員
日本医学教育学会会員

新製品紹介

ガスクロマトグラフの 試料注入を自動化 AI-1000形 日立GC用 オートインジェクタ

近年、ガスクロマトグラフの分野でも、試料注入時の精度や注入速度などの諸条件がますます重要になってきました。とりわけ最近普及の目覚ましいキャピラリーカラムを用いた分析では、液体試料の注入法によって分離、再現性が大きく異なってしまうことがあります。そこで、ガスクロマトグラフによる分析をより信頼性のあるものにするため、再現性よく試料を注入できるオートインジェクタが必要となってきました。



AI-1000形は、そのニーズにおこたえするため、日立がメカトロニクスの粋を駆使して開発した、ガスクロマトグラフ用液体オートインジェクタです、

■主な特長

(1) 高速注入です。

キャピラリー分析のように、試料の気化拡散を最小限にするためには、それに合わせた迅速注入が必要です。今回、AI-1000によって手動注入では困難な高速注入が可能となりました。

(2) サンプルごとにパラメータの設定

ができます。

サンプルごとに洗浄回数、注入回数、注入量、分析周期などの設定ができます。したがって、サンプルに合わせた最適分析が可能です。

(3) 微量量の注入ができます。

0.1～50 μ lまでの0.1 μ l単位で注入量を設定することができます。

(4) 試料の粘性に合わせて吸入速度を選ぶことができます。

試料の吸入速度が変えられるので、比較的高粘性試料も安定して吸入することができます。

(5) システム化対応機能が豊富です。

LA化時代を迎え、オートインジェクタもシステムに組み込まれることが多くなっています。システム化に対応したRS-232C入出力端子があり、外部システムとの効果的な連携が可能です。

(6) 洗浄用溶媒の残量アラーム機能があります。

所定の洗浄回数に達したら、アラーム表示をします。

報 文

高分解能免疫電顕法 — 急速凍結置換試料への免疫電顕法の適用

High Resolution Immunoelectron Microscopy : Application of Immunoelectron Microscopic Technique to Quick-frozen, Substitution Fixed Materials

市川 厚*

(平成 3 年 2 月 5 日受理)

1. はじめに

分析精度の高い電子顕微鏡レベルの免疫組織化学的手法—高分解能免疫電顕法は、検体である細胞や組織の微細構造が生きていたときの状態を反映する組織像の上に、検出しようとする抗原物質の局在が正確に示されるものでなければならない。すなわち、検体を固定し、薄切して鏡検可能な状態にもってゆく間に、(1) 検出しようとする物質が抽出されたり、移動したりしていないこと、(2) 抗原性が損なわれていないこと、(3) 抗原が標識抗体と反応しやすい状況が保障されていること、そして、(4) 試料処理の際に予想される細胞や組織の微細構造の形態変化が最小限に食い止められていること、などの諸条件を満たしていることが必要である。しかし、これらの諸条件をすべて満足させるような確立した手法は今のところない。生の材料にいろいろな操作を加えることができる安定した状態を作り出すためには、まず組織を固定しなければならないが、通常行われている化学固定法は前記(1)、(2)、(4)に多かれ少なかれかなりの影響を及ぼす。また、(3)については、現在ある手法の中で凍結超薄切片法と包埋前免疫染色法がベターなものと考えられているが、これらはいずれも化学固定法で処理した試料について行われている。包埋前免疫染色法にも問題がないわけではない。未包埋試料でも、抗体の組織または細胞内への浸(し)み込みは、試料各部分の構成タンパク分子の密度によって左右されると言われているからである。近年、目覚ましい発展を遂げた急速凍結法は、瞬時に(数ミリ秒のオーダーで)細胞の諸構造を氷の中に封じ込んでしまうので、微細形態を凍結直前の姿のまま固定化すると同時に、構成物質の抽出や移動も起こらない。したがって、固定法としては理想的なものである。問題は、いかにしてこの状態を維持したまま以下の操作を行うかである。凍結試料を薄切して電子鏡検するためには、凍結置換固定法によって安定化したのち、通常の場合と同じく樹脂に包埋する必要がある。このようにして得られた超薄切片像は、従来の化学固定試料とは比べものにならないほど微細形態が良く保存されている。しかし、これを免疫染色するには包埋後免疫染色法を用いるが、ここで前記(3)が問題となる。また、置換固定に使われる化学固定剤や、包埋剤による抗原性の損失も考えなければならない。そこで、急速凍結試

料について(2)と(3)をクリアーすることができれば、きわめて精度の高い免疫電顕法—高分解能免疫電顕法が実現することになる。現時点で、これらの問題点を完全にクリアーできる手立てはないが、現在考えられる手法を用いて、これまで以上に精度の高い分析が可能か否か、以下、手順を追ってこれまでに得られた実験結果を述べ、考察を加えてみたい。

2. 急速凍結固定法

今日、急速凍結法には、(1) 金属圧着法、(2) 浸漬法、(3) スプレー凍結法、(4) 高压凍結法などがあるが、(1)と(2)が一般的であり、凍結効果の点からは(1)が優れている。また、(2)は操作が容易なので、簡便な手法と言える。ここでは主として(1)と(2)を用いた実験結果について述べる。

凍結法の最大の難点は氷晶形成による構造破壊で、これをできるだけ少なくするためには、凍結を起こさせる冷却速度が速いほどよい。純水で1秒間に 1×10^6 K、細胞質で 1×10^4 Kの割合で冷却するとアモルファスな氷の形成、ガラス様凍結が起こると言われている¹⁾。したがって、できるだけ沸点の低い冷却剤を用いることが必要で、通常、液体ヘリウム(沸点 -269°C)、液体窒素(-196°C)、液化プロパン(-169°C)などが用いられる。試料をこれらの冷却剤で冷やす場合、熱は試料の表面から熱伝導によって奪われるので、試料と冷却剤との間の熱伝導率、試料自体の熱伝導率によって凍結効果は著しく異なる。液化プロパンは試料を浸したときに生ずるガスの量が少ないので、冷却剤と試料の間での熱伝導が妨げられることが比較的少なく、浸漬法に適するが、液体ヘリウムと液体窒素は試料が冷却剤に触れた際に多量のガスが発生し、熱伝導率が著しく低下するので浸漬法には適さず、金属圧着法に用いられる。金属圧着法は、試料を冷却剤温度に冷やした金属面に圧着するので、両者間の熱伝導が良いこと、試料を金属表面にかなり強い圧力で押し付けることによって、試料内の熱伝導性を高めることができるなどの利点がある。現在、数種類の急速凍結装置が市販されているが、機種を選定には、(1) 使用する冷却剤の沸点が低いものほど効率が良い。(2) 熱伝導率の点で金属圧着法が優れている。(3) 圧着の際に試料がブレたり、金属面上でバウンドして試料と金属面が密着しにくいものなどは避けるなどの注意が必要である。筆者らは、



* 横浜市立大学 名誉教授、医博

液体ヘリウムによる急速凍結にはHeuserら²⁾の考案した装置にならった手作りのものを使用した。また、液体窒素による金属圧着法と液化プロパンを用いた浸漬法には、Reichert-Jung社製のKF-80型を用いた。後者は試料支持装置を付け換えるだけで両様に使えること、凍結した試料を空气中に曝(さら)すことなく液体窒素中に移し、次の操作が行える、などの利点がある。ただし、金属圧着法に用いる試料台は鉄製の円盤に厚目のスポンジを貼(は)り付け、これに両面セロテープを貼って、この上に試料を載せる方法をとっている。スポンジが厚目なのは、金属に圧着した際、試料が変形するのをできるだけ和らげるためと説明されているが、金属圧着法では圧着による試料全体の変形は問題ではなく、金属面に圧着する際に試料表面に加わるインパクトが強いほど好効果を生むと考えられるので、スポンジはもっと薄く、硬目のものを用いたほうが良いと思われる。事実、筆者らが実験した限りでは、この点を改良して好結果が得られたように思う。

筆者らが試みたこれら3つの方法による腺組織(唾液腺腺房細胞と肝細胞)の急速凍結効果は、液化プロパンに浸した場合、望ましい凍結状態(その判定の基準は人によってまちまちであるが、我々は通常、氷晶の大きさが20 nm以下であることを基準としている。これは10万倍の倍率で細胞内の氷晶が辛うじて判別できる程度である。)が得られる範囲は、冷却剤に接した試料表面から3~5 μm であるのに対して、液体窒素温度に冷やした銅ブロックに圧着した場合は8~10 μm 、液体ヘリウムを用いた場合は20 μm 前後であった。これは、用いる試料中に氷の結晶核になる分子の密度が比較的高い場合であって、水分を多く含み、結晶核になる分子が分散しているような細胞ないし組織では、氷晶の成長が急速に進み、いわゆる氷晶形成による構造破壊が起こりやすく、本来均質に見えるべきはずの細胞質基質や細胞間質が細かい網目状に見えてくる。急速凍結法は、生の組織を瞬時に(数ミリ秒のオーダーで)凍結し、その構成要素を生きていた時の状態のまま氷の中に封じ込んでしまうので、短時間内に経過する動的变化を含めて、形態の保存がきわめて良く、また、この段階で可溶性タンパク、その他の組織細胞成分が抽出されることはない。

3. 凍結置換固定法

氷点以下の温度に保たれたアセトンやアルコールなどの有機溶媒中で、氷がこれらの溶媒に溶ける性質を利用して凍結試料の脱水を行うと同時に(凍結置換)、これらの溶媒中にあらかじめグルタルアルデヒドや四酸化オスミウムなどの化学固定剤を溶かしておき、化学固定(置換固定)を行おうとする凍結置換固定法は、凍結試料を包埋するための前処理として必須(す)のものである。ここで行われる化学固定は、細胞の構成要素を氷の中に封じ込んだままの状態で行われるので、通常の化学固定のように可溶性のタンパクその他の構成成分が固定中に抽出されたり、また、これらの物質が水分によって膨潤化し、細胞内の諸構造が変形したり、膜構造が断裂して小胞形成をきたしたりすることはほとんどない。これらは、免疫組織化学にとって微細形態の保存と抗原物質の保持という点で、最も望ましい利点である。置換剤として用いられる有機溶媒は、アセトン

が最も優れている。その他にテトラヒドロフランが用いられることがあるが³⁾、免疫電顕法には適さない。またメタノールはいずれの場合も好結果を期待できない。

免疫電顕法で置換剤として用いられる化学固定剤としては、グルタルアルデヒド、パラフォルムアルデヒドなどがある。抗原性の保持の点ではアルデヒド系の固定剤が優れているが、アルデヒド系試薬単独では膜構造がネガティブ像を示し、ゴルジ装置や小胞体、その他の小胞構造が切線方向に切れた場合、これらの構造の輪郭が不鮮明になり、切片上の標識抗体の所在部位を決定しにくくなる欠点がある。この点、 OsO_4 を用いれば膜構造が鮮明に染め出されるので、この欠点は取り除かれるが、抗原性の保存の点では前者に劣る。筆者らの経験では OsO_4 の濃度は低いほど良く、0.4% OsO_4 ・アセトン溶液を用いて好結果を得ている(図1)。手技の実際は他の解説書⁴⁾⁵⁾に譲るが、通常筆者らはいずれの置換固定剤でも-80℃で20~36時間固定を行っているが、約15時間で十分との説もある³⁾。また、筆者らが試みた簡便法として、-80℃に保った置換固定液を入れた試料瓶の中にいったん凍結試料を入れたのち、瓶ごと液体窒素中に浸して中の固定液を凍結させ、これを発泡スチロール製のアイスボックス中に並べる(瓶の蓋(ふた)はあらかじめ緩めておくことが必要)。次いで、ガラスファイバーで試料瓶を覆い、包み隠すようにして、ここに相当量の液体窒素を振りかける。こうしておいて、アイスボックスの蓋(ふた)を軽く開けておき、室温で一晩ドラフト内に放置する。翌日(約15~18時間後)試料瓶は室温に戻っており、試料を取り出して次の操作(洗浄、ブロック染色、包埋)に移ることができる。この方法では液体窒素がしだいに気化して、試料瓶の中の固定液が凍結状態からゆっくり室温まで上昇する間に置換固定が行われる。固定液が溶けてから試料に対し固定剤として作用している時間がどれくらいかを正確

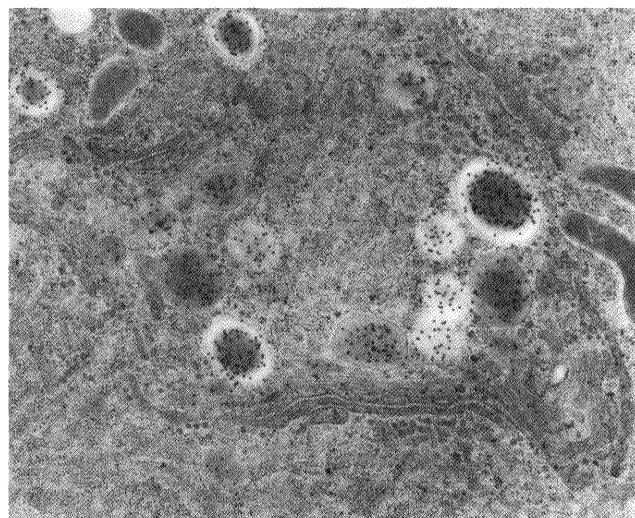


図1 スナエズミ耳下腺細胞のアミラーゼの免疫電顕写真
0.4% OsO_4 ・アセトン溶液で置換固定、エボン・アララダイト包埋。金粒子が分泌果粒の芯、濃縮胞、ゴルジ槽をよく標識していることに注意。

に計ることはできないが、十分な固定効果は表われていた。観察に耐えられる試料の範囲が試料表面から数 μm ないし数十 μm というきわめて限られた範囲であることを考えると、固定時間はこれまで考えられているよりはるかに短時間で十分なのかも知れない。一般にこの段階の操作は、 -80°C で約 20~36 時間 (あまり長いのは不可)、次いで -20°C 、 4°C で各 2 時間という具合に段階的に温度を上げて室温に戻すが、上記の簡便法ではこれらの操作が一切不要であり、短時間でできる。一方、慎重を期して温度と時間を正確に設定して置換固定を行いたい場合には、Reichert-Jung 社製の CS Auto 凍結置換装置を用いれば、一連の操作を自動的に行うことができる。免疫電顕法では、この段階の操作が次の包埋操作とともに最もクリティカルで、使用する化学固定剤の種類と濃度、固定時間によって著しく結果が異なる (表 1 参照)。なお、置換固定の間に有機溶媒中に溶出してくる組織中の水分を吸収するため、Molecular sieve (4A Linde pellets, Union Carbide) を用いることが推奨されているが、筆者らの経験では試料 1 個に約 5~8 ml の置換固定液を用いれば、特に Molecular sieve を用いる必要はない。

4. 包埋

室温に戻した試料は、包埋する前にトリミングを行い、凍結がうまく行われたと思われる部分 (試料が金属表面にはじめに接着した部分) だけを切り出し、細切する。これをアセトンで洗浄後、酸化プロピレンを通して樹脂に包埋するが、操作の実際は他の解説書^{4),5)}に譲る。

免疫電顕法では、検出しようとする物質の抗原性を保存するという点で、どんな包埋剤を選ぶかが特に重要である。一般に、用いる樹脂の重合温度が低いものほど良いとされ、 -30°C で紫外線重合するロイクリール K4M が賞用されている⁶⁾。ここでは、これまで筆者らが試みた 3 種類のものについて述べる。

(1) エポン・アラルダイト混合液

通常の超薄切片試料用に広く用いているもので、下記の混合液を常時冷蔵庫内に保存し、使用時に常温に戻して DMP30 を正確に 2% の割合で加え、よく混和して使用する。重合温度 60°C 、Luft によるエポン混合液に比べて非常に安定しており、重合の失敗はほとんどない。

Epon 81210 容
Araldite M10
DDSA24

エポン 812 はポリベッド 812, TAAB812 など代用できる。

(2) アラルダイト 6005

使用時に下記の混合液を作り、よく混和して使用する。
重合温度 50°C

Araldite 600527 g
DDSA23 g
DMP 301.8 %
Dibutyl phosphate2.0 %

(3) ロイクリール K4M

紫外線による低温重合 (-30°C)。化学固定法で処理した従来の試料では、抗原性の保存が最も良いとされているが、筆者らが行った唾 (だ) 液腺細胞内のアミラーゼの局在に関する免疫電顕観察では⁷⁾、分泌果粒に含まれる酸性糖タンパクの固定効果が弱く、標識密度の点でもあまり良い結果は得られなかった (表 1)。しかし、その後試みた肝細胞内のカタラーゼの局在に関する実験では好結果を得た (図 2)。紫外線重合のため、試料が黒化する OsO_4 は置換固定剤に用いることができず、アルデヒド系試薬で固定するので膜構造はネガティブ像を示すが、最近、Rothら⁸⁾は K4M 切片を免疫染色後、酢酸ウランとメチルセルロースの混合液で染めることによって、膜構造のコントラストを上げることが

表1 種々の置換固定剤と包埋剤の組み合わせによる分泌顆 (か) 粒上の標識抗体の密度

(μm^2 当たりの金粒子数)

置換固定剤	エッチング	エポン・アラルダイト 混合液 (60°C)		アラルダイト 6005 混合液 (50°C)		ロイクリール K4M (-30°C) (注)	
		心	辺縁部	心	辺縁部	心	辺縁部
4% OsO_4 ・ アセトン溶液	(-)	150.5 $\pm$ 6.3	12.7 $\pm$ 2.0	101.6 $\pm$ 3.8	15.7 $\pm$ 2.1		
	H_2O_2	305.7 $\pm$ 7.3	13.5 $\pm$ 2.0	286.7 $\pm$ 8.0	21.9 $\pm$ 2.5	不	適
	MPI	326.2 $\pm$ 8.9	23.0 $\pm$ 3.3	295.7 $\pm$ 7.2	19.7 $\pm$ 2.8		
0.4% OsO_4 ・ アセトン溶液	(-)	183.1 $\pm$ 5.0	9.9 $\pm$ 1.3	144.2 $\pm$ 1.7	17.6 $\pm$ 1.5		
	H_2O_2	334.0 $\pm$ 11.4	14.0 $\pm$ 1.7	306.6 $\pm$ 9.2	18.7 $\pm$ 1.9	不	適
	MPI	405.0 $\pm$ 6.9	10.0 $\pm$ 1.6	342.2 $\pm$ 11.0	20.7 $\pm$ 2.9		
0.3% グルタルアルデヒド・ アセトン溶液	(-)	261.0 $\pm$ 7.3	2.3 $\pm$ 0.3	319.9 $\pm$ 6.3	54.2 $\pm$ 4.9	274.3 $\pm$ 6.5	19.9 $\pm$ 1.6
	H_2O_2	281.8 $\pm$ 7.9	10.1 $\pm$ 1.1	458.6 $\pm$ 11.5	34.2 $\pm$ 2.6	(注)	
	MPI	286.8 $\pm$ 6.9	26.3 $\pm$ 3.2	451.5 $\pm$ 14.0	37.6 $\pm$ 4.0	(注)	
通常のグルタルアルデヒド・ OsO_4 化学固定	(-)	97.3 $\pm$ 4.3	5.7 $\pm$ 1.0				
	H_2O_2	213.4 $\pm$ 6.9	14.4 $\pm$ 1.6			不	適
	MPI	245.3 $\pm$ 7.8	10.4 $\pm$ 1.2				
2.3% グルタルアルデヒド による灌流固定	(-)					107.9 $\pm$ 3.4	12.2 $\pm$ 10.9

注：ロイクリール K4M は、紫外線重合のため OsO_4 固定試料には用いられない。またその切片は、エッチングできない。

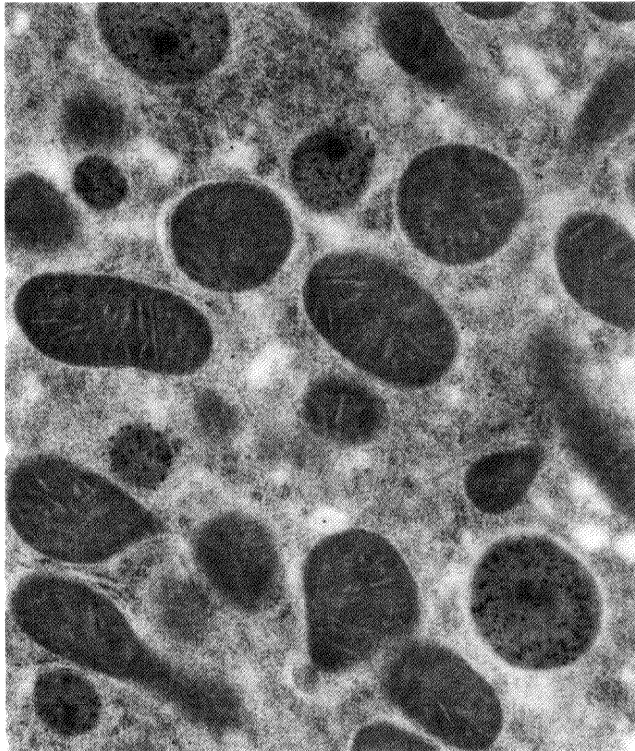


図2 スナネズミ肝細胞のカタラーゼの免疫電顕写真
0.2%グルタルアルデヒド・アセトン溶液で置換固定。ロイ
クリールK4Mに包埋、ペルオキシゾームの基質がよく標識され
ている。

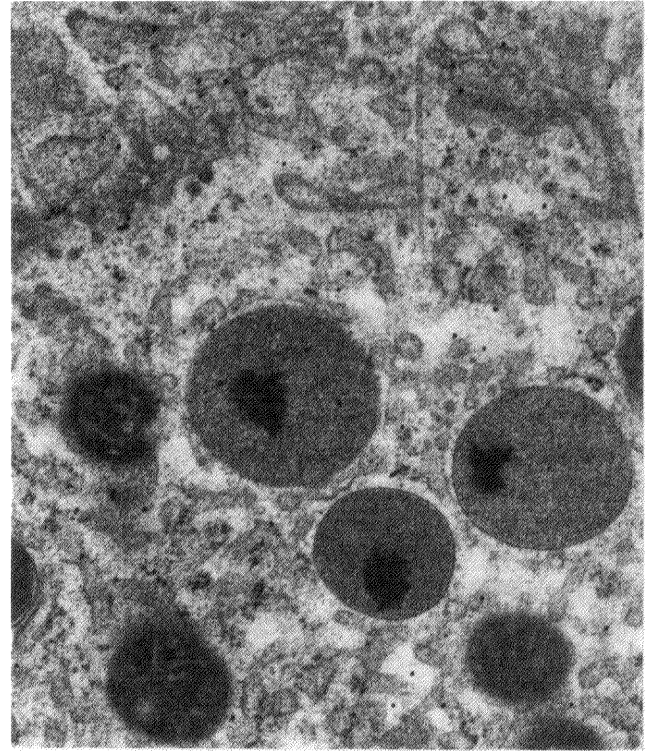


図3 ラット肝細胞のキサンチンオキシダーゼの免疫電顕写真
0.2%グルタルアルデヒド・アセトン溶液で置換固定。アラ
ルダイト6005に包埋。細胞質基質の金粒子に注意。

できると報告している。(1)と(2)で包埋した超薄切片では、免疫染色前に10%過酸化水素水またはメタ過ヨウ素酸飽和水溶液に10~30分間浸すことによってエッチングを行い、より多くの抗原基を露出させて標識密度を上げることができる⁹⁾。ただし、K4M切片は酸に弱く、エッチングができない。

5. 免疫染色

標識精度が高いことから、プロテインA・金コロイドを用いた包埋後免疫染色を行う(手技の実際については解説書^{4),5)}に譲る)。

以上の手技をスナネズミの耳下腺腺房細胞に適用して、抗スナネズミ・アミラーゼ抗体を用いた免疫電顕観察を行い、置換固定剤と包埋剤の種々の組み合わせによって、標識密度にどんな差が表われるかを調べた結果を表1に示す。これらの結果は、化学固定法を用いた通常の試料に比べ、はるかに標識密度が高いこと、標識部位の微細形態が優れていることから、高分解能免疫電顕法の特徴を見事に示していると言える。

6. むすび

免疫電顕法では、検出しようとする抗原の量と性質(試料処理における抗原性保存の良否)、抗体との反応性(抗体価、抗体の浸透性)などによって、染色法(凍結超薄切片法、包埋前染色法、包埋後染色法)のいずれを選ぶか、固定液、包埋剤の選択など、より良い結果を得るための種々のくふう

が必要である。ここに述べたアミラーゼの場合は種々の試料処理に対してきわめて安定な特殊なケースと言えるかも知れないが、最近我々が試みている肝細胞のカタラーゼ(図2)や同じくキサンチンオキシダーゼ(図3)の場合も好結果を得ており、置換固定法や包埋法の改良、開発によって、ここに述べた高分解能免疫電顕法の利用範囲はますます広がってゆくに違いない。

参考文献

- 1) A.W.Robards and U.B.Sleytr : Freezing , in Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy , A.M.Glauert (ed.) p.5 , Elsevier , (1985)
- 2) J.E.Heuser , T.S.Reese , M.J.Dennis , Y.Jan , L.Jan , & L.Evans : Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantum transmitter release.J.Cell Biol ., 81 : 275~300 , 1979.
- 3) P.C.Bridgman and T.S.Reese : The surface of cytoplasm in directly frozen cultured cells. I.Filamentous meshworks and the cytoplasmic ground substance.J. Cell Biol ., 99 : 1655~1688 , 1984.
- 4) 市川 厚 : 急速凍結置換法, 電子顕微鏡, 16 : 47-52, 1981.
- 5) 市川 厚, 市川 操 : 急速凍結固定法の免疫組織化学への応用, 組織細胞化学 1988, 日本組織細胞化学会編, 学際企画, p.117 (1988)
- 6) J.Roth , M.Bendayan , E.Carlemalm , W.Villiger and M. Garatvito : Enhancement of structural preservation and

immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue J.Histochem. Cytochem., 29 : 663 ~ 671, 1981.

- 7) M.Ichikawa, K.Sasaki and A.Ichikawa : Immunocytochemical localization of amylase in gerbil salivary gland acinar cells processed by rapid freezing and freeze-substitution. J.Histochem. Cytochem., 37 : 185 ~ 194, 1989.
- 8) J.Roth, D.J.Taatjes, K.T.Tokuyasu : Contrasting of Lowicryl K4M thin sections. Histochemistry, 95 : 123 ~ 136, 1990.
- 9) M.Bendayan and M.Zollinger : Ultrastructural localization

of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. J.Histochem.Cytochem., 31 : 101 ~ 109, 1983.

Topics

第10回日立MS カンファレンスを開催

第10回の日立MSカンファレンスを平成2年12月12日・13日の両日、東京と大阪で開催した。12日は都市センターホテル(東京)、13日はチサンホテル新大阪(大阪)に、合計230人を超える参加者を得て活発な技術交流と懇親が行われた。

今回はテーマを絞り、時間を半日に短縮して密度濃く実施した。ユーザーからのご講演として、高砂香料工業(株)総合研究所の野原 功研究主任から「質量分析計PC-LANシステム」と題して、データ管理の最新の例をご紹介いただいた。また、メーカー側からは最近の成果として、「M-2500形」、「LC-MSの現状と将来」、「エレクトロスプレー法の応用」、「大気圧噴霧LC/EI-MS」など、LC/MSを中心に紹介した。

これらの中で、アンケートでも特に高い関心を集めたのが、中・小形の装置で1万ダルトンを超えるタンパク質の分子量を0.01%オーダの高精度で分析できるESI(エレクトロスプレー法)であった。近年注目されているライフサイエンスの中でも、最も重要と言われるタンパク質分析への関心の高さを裏づけている。また、ほとんど同一の構

成で無極性から高極性まで、EI, APCI, ESIと切り替え対応ができるLS/MSシステムの提案も多くの賛同をいただいた。

発表の合間、懇親会では、参加者相互の交流も行われ、盛況のうちに閉会した。

(望月 康平 記)

日立Hi-SEM テクノセミナーを 開催



昨年11月30日、12月14日および2月15日にSIセンタで開催された本セミナーは、これからSEMを使われる方を対象として、SEMの原理、応用、EDXシステムの講義と操作実習がプログラムされており、それぞれ10人程度の少人数で行われる1日コースのセミナーです。

このようなセミナーは初めての試みですが、ご好評を得たため、'91年度は年8回程度の定期開催を予定しています。コースは、バイオ分野と材料・半導体分野に分かれていますので、お客

様の目的に合ったコースをお選び下さい。

(高垣 直人 記)

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 開催さる

首記の学会がドルトムント(ドイツ)で開催(1月4日~18日)されました。Boumans, Barnes, Hieftje, Horlik, Mermet, Montaserなど世界各国から約300人の研究者などが一堂に会し、ICP-OES & MS, MIP-OES & MS, Laser関係、試料導入法、ガスの種類などについて、招待講演(8件)、口頭発表(39件)、課題討議(3件)、ポスター(85件)で熱のこもった討議が行われ、展示会も併設されました。日本からは東大(1件)と日立(2件)の発表がありました。日立の窒素ガスを用いた新しいMIP-MSは従来のアルゴンガスを用いたICP-MSに比べて妨害イオンが低減でき、鉄などの重要な元素を高感度で分析できたため注目を集めました。次回('92年)はサンディエゴ(アメリカ)で開催(1月6日~11日)されます。

(岡本 幸雄 記)

免疫金コロイド法によるエイズ・ウイルス構成蛋白の局在性

Localization of HIV Proteins

中井 益代* 後藤 俊幸**

(平成 3 年 3 月 5 日受理)

1. はじめに

1959年BrennerとHorn¹⁾によってネガティブ染色法が開発され、ウイルスの微細構造は明確に観察されるようになった。それ以後、電子顕微鏡本体や試料作製技術の進歩により、既知のウイルスの形態構造はもちろん、新ウイルスの発見にも電子顕微鏡が大きな威力を発揮してきた。最近では、エイズウイルス(正式にはヒト免疫不全ウイルスと言ひ、HIVと略す。)の発見にも電子顕微鏡が多大の貢献をなしてきた。このように電子顕微鏡法は形態構造をとらえるのには有効な手段であるが、電子顕微鏡で観察される像をただ単に形態としてとらえるばかりでなく、そのものが生体中でどのように分布・機能しているかを知る必要性が年々増加してきた。物質の機能を知る第一歩として、どのような成分でできているかを知る必要がある。電子顕微鏡による化学分析手段としては、X線分析法、オートラジオグラフィなどがあるが、後者はアイソトープを使用しなければならず、迅速な結果が得られない。最近開発された金コロイド標識・免疫電顕法は今までのフェリチン抗体法や酵素抗体法に比べ、より微細なものまで感度よく標識できるようになり、生物試料について応用されることが多くなった。特に、ウイルス粒子の場合、粒子径の大部分が100~200 nmと比較的小さく、その粒子を構成している個々の蛋白量も極めて少ないので、標識する反応としては感度が高く、非常に特異性のあることが要求される。

本稿では、われわれが、HIVのウイルス蛋白成分の粒子内と感染細胞内の局在性を明らかにするのに、金コロイド免疫抗体法を応用した例を述べる。

2. 反応性の検討

エイズウイルスを識別するため、HIV粒子を構成する蛋白のうちgag蛋白p18とp24に対するモノクローナル抗体を作成した²⁾。また、細胞としてHIVが常に感染しているMOLT-4細胞やMT-4細胞を用いた。特にMT-4細胞では完全な形態の粒子のほかに、不完全な形態をした不完全粒子を産生する細胞もあり、それらをクローン株化して用いた。各細胞を0.5~1.0%グルタルアルデヒドで固定し、37℃、45℃、60℃の通常の加熱重合によるエポキシ樹脂包埋、または-30℃での低温紫外線重合法によるLowicryl K4M樹脂包埋した。超薄切片作製後、p18、p24に特異的なモノクローナル抗体とし5 nmまたは15 nm金コロイド標識抗マウスIgGヤギ血清を用いて、金コロイド免疫電顕法を行い、日立H-800形電子顕微鏡により観察した。電顕観察の前に、抗原を加熱することによりモノクローナル抗体との反応性が



どのくらい低下するかを、蛍光抗体法で検討した。作製したモノクローナル抗体が蛍光抗体法でほぼ100%を示すHIV抗体陽性の細胞のプレパラートを用い、通常のエポキシ樹脂包埋法と同じ樹脂重合スケジュールで、-30℃の保存プレパラートから37℃に1日おき、一部を45℃に移し、さらに、翌日一部を60℃に移して温度の影響をみた。温度処理したときのモノクローナル抗体に対する反応性はp18、p24の抗体それぞれ、37℃で70%、50%に減少し、60℃では40%、35%程度まで低下した。このように温度だけを見ると、モノクローナル抗体により多少の減少の差はあるが、ともに温度の上昇に従い、反応性は低下した。

次に、金コロイド免疫電顕法における包埋剤の種類や重合温度の影響について検討した。われわれは切片の片面にのみ反応させているので、反対側の面や切片の中に埋もれているウイルス粒子には反応できない。したがって、この方法ではウイルス粒子の反応性は、観察されるすべてのウイルス粒子とは反応できないので、100%にはならない。前の重合スケジュールで包埋した試料の反応性は、図1の結果のようであった。標識率は金粒子径が5 nmでも、15 nmでも、またモノクローナル抗体がp18、p24でもLowicryl樹脂包埋のほうがよかった。しかし、通常60℃重合のエポキシ樹脂で包埋したものでは、高コントラストで、微細構造の保持がよい[図3(a)と(b)]。また、45℃のp18の抗体の場合だけ、意外とLowicryl樹脂包埋とほぼ同程度によく標識された。さらに、ウイルス粒子当たり何個の金粒子が付着するかをみてみると5 nmの金粒子の場合、Lowicryl樹脂包埋では7、8個付いているが、エポキシ樹脂ではせいぜい3個程度であった。このように低温樹脂包埋では、金粒子径、抗体の種類にかかわらずエポキシ樹脂の2~3倍多く反応しているが、バックグラウンドが汚い。またエポキシ樹脂に比べてコントラストが少ない。したがって、ウイルス内部の微細構造をみるにはかなり難しいので、微細な局在性が必要なときはエポキシ樹脂とLowicryl樹脂の包埋法とを併用して、比較検討したほうがよいと考えられる。

* 大阪医科大学・微生物学教室 教授、医博

** 大阪医科大学・微生物学教室 講師、農博、医博

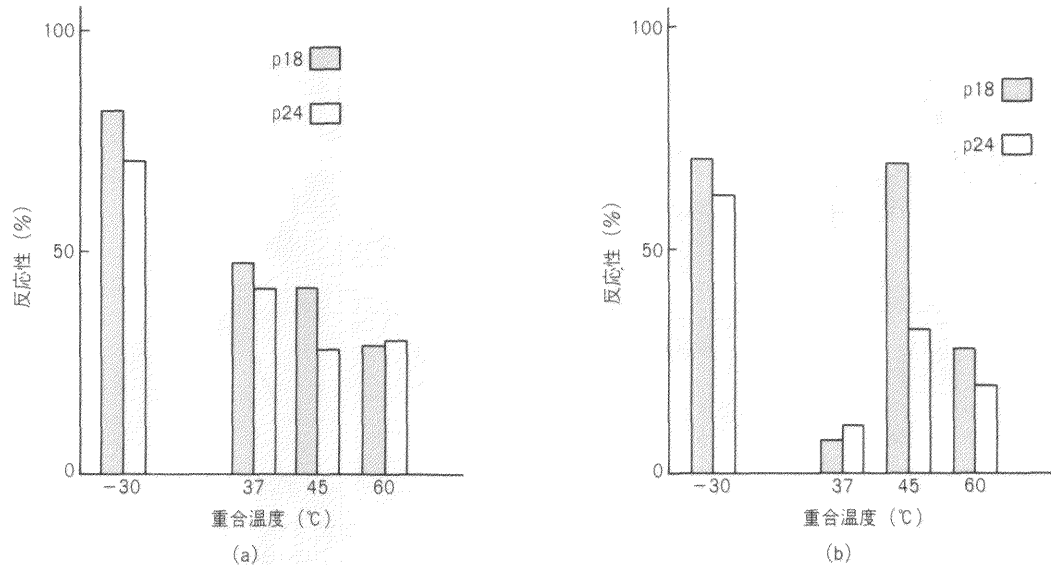
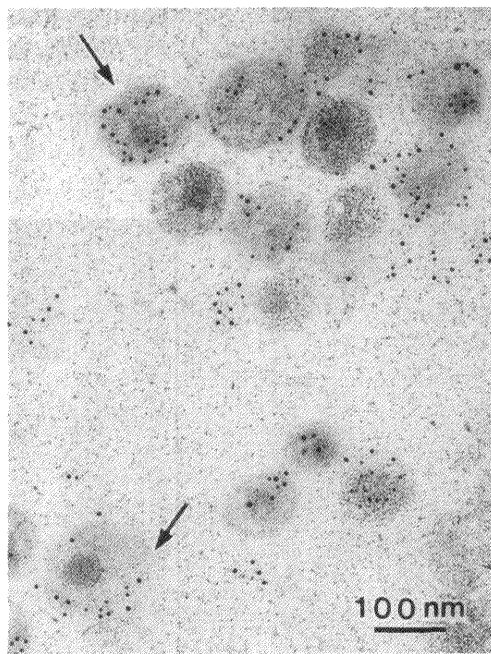


図1 金コロイド電顕での樹脂重合温度による反応性の変化
HIVのgag蛋白p18とp24に対するマウスモノクローナル抗体と、5 nm(a)または15 nm(b)径の金粒子で標識している抗マウス・ヤギ抗体を用いた。

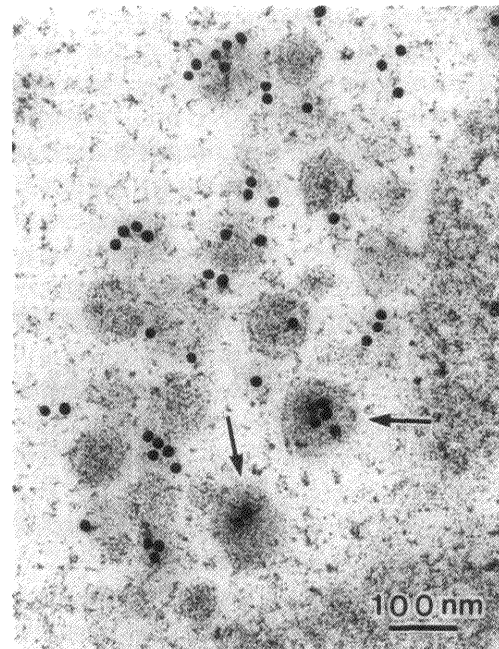
3. HIV粒子内のウイルス蛋白の局在性

ウイルス粒子の構成蛋白組成を知ることは、ウイルス学的にも興味のあることであるが、さらにこのウイルスが引き起こす病気の予防や治療にも有効な示唆を与える。HIV粒子の構成蛋白に特異的に反応するモノクローナル抗体を反応させると、粒子の中心に電子密度の高いコアをもつ成熟した完全粒子では、p24の抗体は内部のコアに、p18の抗

体がエンベロープ近くに反応した(図2)⁴⁾。一方、未熟なドーナツ状にみられる不完全粒子では、二重のリングの内側の電子密度の高い層のそれぞれ外側と内側に反応部位がみられた(図3)。ドーナツ型粒子が細胞外でそのままの形態で維持され、核様体を持った成熟型へと移行しないときは、粒子内部の環状構造物に存在すると考えられるgag蛋白の前駆物質であるp53がp18やp24などへ解裂するときに必要なプ



(a)



(b)

図2 中心にコアのある完全粒子
p18(a)とp24(b)のモノクローナル抗体と反応した金粒子[(a)は5 nm径, (b)15 nm径]。Lowicryl包埋。(a)では粒子の周辺部, (b)ではコア部に金粒子が分布している(矢印)。

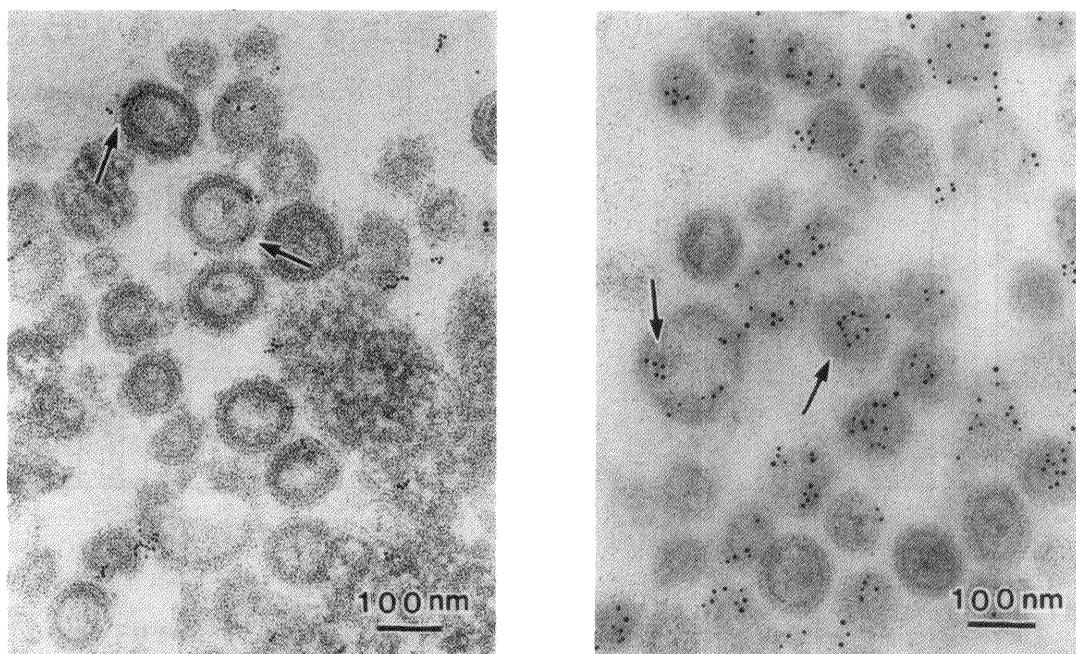


図3 ドーナツ状をした不完全粒子

pl8(a)とp24(b)のモノクローナル抗体と反応した金粒子(5 nm径)。(a)はエポキシ包埋, (b)はLowicryl包埋。(a)では二重のリングの間, (b)では内側に金粒子が分布している(矢印)。

ロテアーゼが欠損するか、酵素活性がなくなっているかなどのためと思われる。

4. 感染細胞内でのウイルス蛋白の局在性

HIVではウイルスの侵入から出芽までの期間は、電子顕微鏡によってもウイルスの形態がみられない時期⁵⁾で、一般に暗黒期と呼ばれている。この時期にどのようにウイルス感染が進行しているかを可視化することは、ウイルス形成過程を知る上で意義があるが、HIV感染により、細胞質や核にはきわだった変化は認められない。しかし、形態的に変化はなくてもウイルスの遺伝子やその構成要素は感染細胞内に存在するはずである。ウイルス由来のRNA遺伝子の存在は*in situ*ハイブリダイゼーション法によりみることができるが、まだ光学顕微鏡レベルで電顕的に細胞内の局在を詳細に観察する方法が確立されていない。感染後期にウイルス蛋白が産生される時期になると、その蛋白が細胞質内に多く存在することになる。HIV蛋白特異抗体を用いて、金コロイド標識抗体法によりウイルス構成蛋白の存在位置をみると、HIV-1gag蛋白はER(小胞体)、ゴルジ体などの膜状構造物や細胞内骨格線維上、さらに細胞膜近くの出芽付近に多く存在するのがみられた(図4)⁶⁾。したがって、ウイルスgag蛋白はERやゴルジ体で作られ、細胞内骨格線維に沿って細胞膜近くへと運ばれると推定される。ウイルス粒子の形成は、電顕観察では細胞膜、空胞膜からの出芽像が初期像として観察されるが、それ以前には細胞質内あるいは核内での粒子形成の過程を示す像は全く認められない。すなわち、粒子形成の初期は、細胞膜の一部が半球状に盛り上がり、将来、その内部に粒子の核様体となるウイルス構成蛋白gagと考えられる電子密度の高い構造物が

形成される(図5)。また、これと相前後して隆起部の細胞膜にウイルス・エンベロープと同一の抗原が発現することが、Palmerら⁷⁾によっても認められるが、基本的な膜の組成は宿主由来のものである。その後、細胞膜の隆起部は半球状に突出し、その内部の高電子密度の構造物も同じく半球状となり、この半球状の突出部はしだいに球状となり、内部の高電子密度の構造物も環状になって、細胞膜との連絡

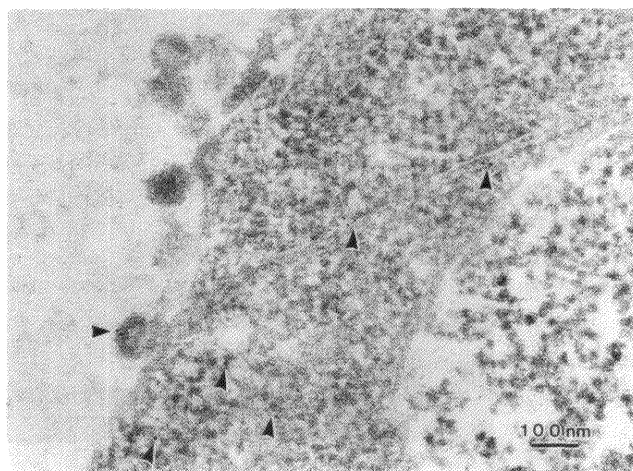


図4 感染細胞内のgag蛋白の局在性

ER、細胞膜付近の出芽部に反応した金粒子(5 nm径、矢印頭)がみられる。Lowicryl包埋。

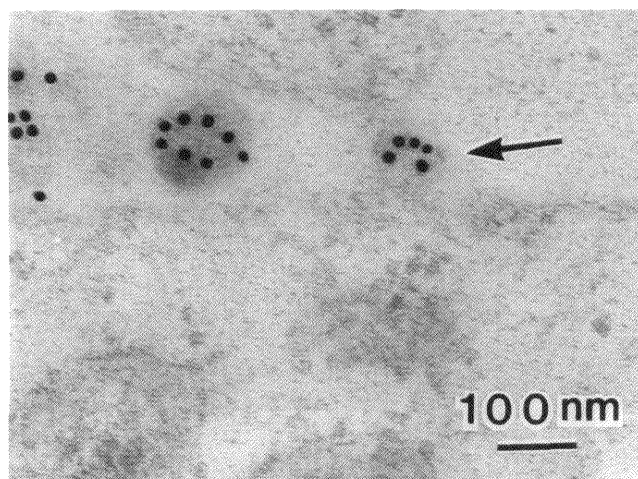


図5 感染細胞表面の出芽粒子
ウイルス粒子表面および細胞表面の出芽部(矢印)にpl8(a)のモノクローナル抗体による金粒子の吸着がみられる。

部はくびれて茎状となり、やがて粒子はドーナツ状となって基部で切断され、ドーナツ型粒子の状態に細胞膜から離脱する⁸⁾。このような粒子出芽の過程は、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)あるいはマウス白血病ウイルス(MuLV)などのレトロウイルスのC型粒子の場合と同様であり、D型粒子形成時のように粒子の出芽前に、細胞質内に粒子の前駆物質と考えられるような構造物は全く観察されなかった。なお、細胞外にドーナツ型の状態で放出された粒子内部の環状構造物は、しだいに中心部に濃縮され、二重の層状構造を持った粒子から中心部に核様体を持った成熟粒子へと移行するようであるが⁹⁾、感染培養細胞のクローン化した株の中には、核様体を持った粒子が出芽時にすでに形成され、細胞外に離脱する場合のあることも認められた⁴⁾。このような過程で形成される粒子は、既知のC型粒子とは異なった過程をとるもので、今後さらに、詳細な検討をしなければならない。

4. 結 び

ウイルス蛋白の粒子内局在は、Gelderblomら¹⁰⁾によっても報告されているが、まだウイルス粒子内の蛋白の局在をすべて明らかにしたものではない。また、*gag*蛋白以外の構成蛋白についての細胞内局在は、まだ十分な結果が得られていない。それらが判明すると、ウイルス粒子構成蛋白全体の構築過程が解明され、HIV感染様式の全貌が明らかになるであろう。

参考文献

- 1) Brenner, S. and Horn, R.W. : Biochim. Biophys. Acta, 34 : 103-110 (1959).
- 2) Ikuta, K., Morita, C., Miyake, S., Ito, T., Okabayashi, M., Sano, K., Nakai, M., Hirai, K. and Kato, S. : Virology 170 : 408-417 (1989).
- 3) Goto, T., Morita, C., Ashina, T., Ikuta, K., Kato, S., and Nakai, M. : Electron Microscopy 1990. 3 : 340-341 (1990).
- 4) Goto, T., Ikuta, K., Zhang, J. J., Morita, C., Sano, K., Komatsu, M., Fujita, H., Kato, S. and Nakai, M. : Arch. Virol. 111 : 87-101 (1990).
- 5) Goto, T., Harada, S., Yamamoto, N. and Nakai, M. : Arch. Virol. 102 : 29-38 (1988).
- 6) Goto, T., Morita, C., Nakano, T., Ashina, T., Ikuta, K., Kato, S., Yokota, Y., and Nakai, M. : J. Clin. Electron Microscopy 24 (1991) (投稿中).
- 7) Palmer, E., Sporborg, C., Harrison, A., Martin, M. L. and Feorino, P. : Arch. Virol., 85 : 189-196 (1985).
- 8) Nakai, M., Goto, T. and Imura, S. : J. Electron Microscopy Technique 12 : 95-100 (1989).
- 9) Katsumoto, T., Hattori, N. and Kurimura, T. : Maturation of human immunodeficiency virus, strain LAV, in vitro. Intervirology, 27 : 148-153 (1987).
- 10) Gelderblom, H. R., Özel, M., Hausmann, E. H. S., Winkel, T., Pauli, G. and Koch, M. A. : Micron and Microscopica 19, 41-60 (1988).

Topics

外村氏(日立製作所)
学士院賞に選ばれる

平成3年度(第81回)の日本学士院賞受賞者(9人)が発表され、日立製作所基礎研究所の外村彰主管研究長の受賞が決まった。外村氏は一貫して電子線ホログラフィの研究に従事され、電子顕微鏡を干渉顕微鏡として用いる新分野を開拓された。特にアハラノフ・ボ

ーム効果の実証は世界的に有名である。氏の受賞は民間企業の研究者としては始めてであり、また恩賜賞も併せて受賞することになった。授賞式は6月上旬に行われる予定である。

(永田 文男 記)

免疫金コロイド粒子の走査電顕的観察

Fine Structure of Gold-immunolabels Observed by Scanning Electron Microscopy

田中 敬一* 山県 昇*

(平成 3 年 1 月 25 日受理)

1. はじめに

走査電子顕微鏡は、組織細胞の表面観察に有効であることから、細胞表面の抗原観察に早くから用いられている。はじめは、マーカーを本来存在するものから見分けるため、特殊な形態を持つマーカー、例えばファージなどが用いられた¹⁾。しかし、金コロイドがこの方面に応用されるようになってからは²⁾、金粒子が反射電子によって容易に識別される有利さから、専ら金コロイドによる免疫細胞化学的研究が行われるようになった³⁾。そして、細胞表面における各種抗原の分析およびその存在様式などが広く研究され報告されている。最近、我々はこの方法を用い、その標本を超高分解能走査電顕で観察することにより、金コロイド粒子の付着した細胞表面レセプターを直接観察することに成功している⁴⁾。

本稿では、走査電顕による免疫細胞科学的研究に広く用いられている金コロイド粒子、およびこれに付着したプロテインA、IgGなどの形態について述べてみることにする。

2. 材料と方法

材料はすべて市販のものを用いた。コロイド金粒子、またプロテインAおよびヤギIgG(抗ヒトIgG)を付けた金粒子はE. Y. Labs. Inc. (U.S.A.)のものを、一方、IgG単独観察の材料であるラットIgG2b(抗Mac・1抗原)はHybritech Inc. (U.S.A.)のものをを用いた。

方法はカーボン板法⁴⁾を用いた。すなわち、上述の材料を適当な濃度に希釈し、研磨したカーボン板上に滴下し数分放置した。この間に試料はカーボン板上に付着する。蒸留水でかるく水洗い後、重金属染色を行った。重金属染色には燐タングステン酸(PTA)、またはタンニンで媒染した四酸化オスミウム(OTO)を用いた。

PTAの場合、1%PTA水溶液で1分、OTOの場合は0.5%四酸化オスミウム水溶液-0.2%タンニン酸水溶液-0.5%四酸化オスミウムで、それぞれ1分間処理した。重金属染色の後、試料は蒸留水で洗い、液体エタンで急速凍結・凍結乾燥(エイコー凍結乾燥器使用)するか、または上昇エタノール列を通して、臨界点乾燥(日立HCP-2使用)した。乾燥した試料は特別な試料ホルダーを用いて、銀ペーストを使用することなく機械的に試料台に装着し、超高分解能走査電顕UHS-T1(S-900の原型)^{5,6)}を用いて観察した。

3. 観察所見

3.1 Protein A

Protein Aの分子の形態は、比較的長い形であると想像されている⁷⁾が、よくわかっていない。金コロイドに付着させると、金コロイドの周囲にハロー状に観察される(図1)。



このProtein Aの層は、燐タングステン酸染色よりもOTO染色のほうがはっきりする。そして無染色の場合はほとんど観察できない。このハロー状のProtein Aの層は、試料を傾斜させても、その形態が変わらないことから、鉢巻状に金コロイド粒子を取り巻いているのではなく、粒子の表面全体を覆っているものと考えられる。なお、1個1個のProtein A分子は識別できなかった。

3.2 Immunoglobulin G

IgGについての電顕による研究は、Negative染色やfreeze replica法などで研究されているが、最近ではSEMでの観察も行われている。我々の観察においても、その形は3個の類円体がY字またはV字状に配列した複合体として見られた(図2)。そしてその類円体の外側の2個は、Fabフラグメント、中央の1個はFcフラグメントに相当し、各フラグメントはそれぞれ2個のサブユニットから構成されていた。さらに、Fabの1個のサブユニットとFcの1個のサブユニットはヒンジによって連結され、ヘビーチェーンを造っており、残りのFabフラグメントのサブユニットは、ライトチェーンを形成していた⁸⁾。

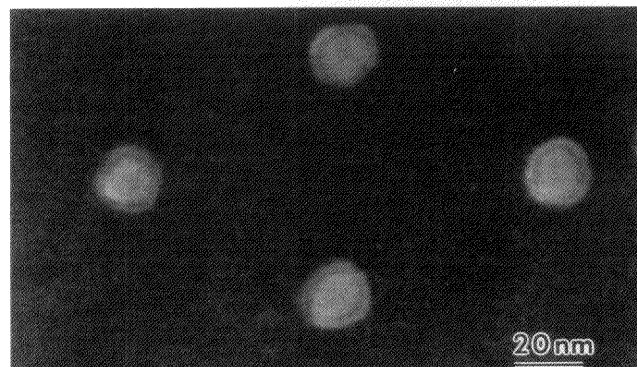


図1 金コロイド粒子(15 nm)についたプロテイン A 周囲にハロー状に見える。

* 鳥取大学 医学部 解剖学教室

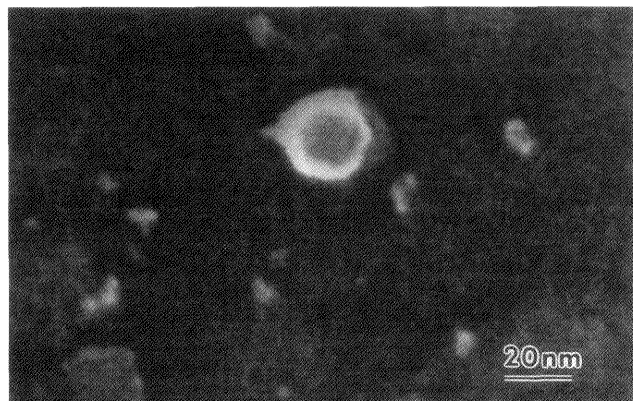


図2 免疫グロブリンG
3個のフラグメントからできている。

3.3 IgGを付着させた金コロイド

金コロイド粒子に直接IgGを付着させた場合には、IgGの姿を金コロイド粒子の表面に見ることができる。しかし、その形態はIgG単体で見たときと少し異なることが多い。ときに、3個のフラグメントを完全に見ることもできるが⁴⁾、多くの場合、IgGはフィラメント状を呈する(図3)。金コロイドに付着し得るIgGの数について言えば、コロイド粒子の大きさによって異なるが、15 nmの金コロイドの場合は1個から数個で、多くの場合3個以内のことが多かった。

山県ら⁹⁾の研究によれば、金コロイドの表面に1個のIgGが見える粒子では、カーボン板と粒子の間にさらに1個のIgGがあり、金粒子がカーボン板へ接着するための役割を果たしていると報告している。この結果から言えば、一見IgGを付着していない金粒子も1個のIgGを付着させていることが考えられる。

5 nmの金コロイド粒子の場合は、逆に1個のIgGが数個の金粒子を付着させていることが多い。したがって、5 nmのIgG金コロイド粒子で抗原を標識すると1個の抗原に数個の金粒子が付着する可能性がある。

3.4 Protein AとIgGを付着させた金コロイド粒子

Protein A-金コロイドとよく似た形を示すが、その一部

にIgGによる突起を持つことが大きな特徴である(図4)。

金粒子は、この突起の部分で抗原に付着するものと考えられる。

4. 考察

走査電顕でProtein AやIgG, さらにはリセプターを直接見るなどということは、数年前までは考えられもしなかったことである。それが超高分解能走査電顕の出現によって可能になってきた。しかし、それに伴って従来の試料作製法や装置による観察法は大きく改善されなければならなかった。ではどのような点でかえねばならなかったか、また、どういう点に注意して観察しなければならないかについて考察してみよう。

まず、その第一は導電法についてである。走査電顕観察においては、試料に導電操作をしないと試料にチャージが起り、像の歪曲がおこる。導電法としては金属被着法、導電染色法などがあり、一般には金属被着が用いられる。しかし、この方法は、細胞あるいは細胞小器官など比較的大きな対象の観察には有用であるが、金コロイド粒子に付けたProtein AやIgGのような小さいものに対しては適していない。なぜかという、被着した金属粒子がこれらの構造を覆い隠してしまうからである。したがって、これらの高分子の観察の場合は、金属被着以外の導電法を用いなくてはならない。その方法としては、カーボン板法が有効である。

試料台にカーボン板を用いると、高分子など10 nm直径以下の試料は、チャージなしにSEM観察をすることができる。これは、入射した大半の一次電子が試料を通過して試料台に達し除去されてしまい、一方、試料に残った電子と試料から出て行く二次電子の量が、おおよそバランスするためと考えられる。しかし、導電性のある物質であっても金属またはシリコン板を試料台に用いると、それから出てくる反射電子が多いため試料からの二次電子信号が覆い隠され、十分なコントラストを得ることができない。その点、カーボン板は反射電子の発生が少ないので、良いコントラストを得ることができるのである。

したがって、カーボン板法を用いると、フェリチンのような試料は、載せて乾燥するだけでチャージアップなしに、



図3 金コロイド粒子(15 nm)に付着したIgG
フィラメント状をしている(矢印)。

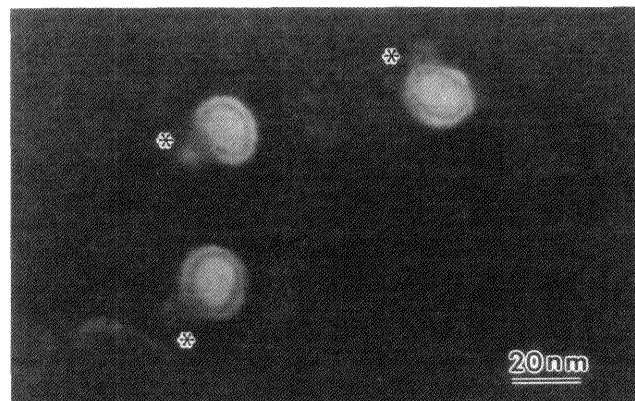


図4 プロテインAとIgGが付着した金コロイド粒子(15 nm)
ハローのついた粒子の一部に突起物(星印)がある。

またコントラストよく観察することができる⁸⁾。

次に問題となるのは、電子ビームによるコンタミネーションの問題である。高分解能、高倍の観察においては、試料面上における走査面積は非常に小さくなるので、コンタミは観察に甚大な影響を及ぼす。したがって、高分解能観察においては、コンタミをできるだけ避けなければならない。

コンタミの原因は、鏡体内の真空中に残存する炭水化物が電子ビームによって高分子化され、試料面上に堆積するためと言われている。この炭水化物は、鏡体内の真空度に関係するものと試料に関係するものの2種があり、鏡体の真空度に関係するものに対しては、鏡体の真空度を良くすることで改善できる。例えば、UHS-T1形SEMにおいて、我々はターボ分子ポンプを2台直列に使うことによって 10^{-6} Paまで真空度を良くしている。この真空度は従来のSEM試料室の真空、 10^{-4} Paに比較して格段に良い。

また、試料室だけでなく、試料交換室の真空も大切である。交換室はふつう油回転ポンプだけで引いていることが多いので、真空度自体の問題以外に、ポンプのオイルミスト逆流による試料汚染が大きな問題となる。したがって、油回転ポンプだけを用いた試料交換室の場合は、試料をここに長くおかないようにしなくてはならない。また、できるならばターボ分子ポンプまたはドラッグポンプなどの清浄な真空を得ることのできるポンプに交換したほうがよい。

その他、観察中はコールドトラップを用いて、コンタミを減少させるように努力することも有効で、それもできるだけ効率の良い装置を用いるのがよい。

次に、試料自体からくるコンタミについて考えてみる。生物試料は、その構成要素自体がコンタミの原因になり得るので、この種のコンタミをすべてなくすることはできないが、構成要素以外のコンタミの原因はできるだけ避けねばならない。その種の最も大きな汚染源としては試料の接着に用いる銀ペーストがある。銀ペーストは、よく乾燥させた後でも大きな汚染源となる。たとえ、ペーストの部分に電子ビームが直接あたなくても、その近くを観察するだけでコンタミが強く起こってくる。したがって、高分子の観察時には銀ペーストの使用は避け、試料は機械的に試料台に装着するようにしなければならない。機械的に装着するためには、そのための特別な試料装着装置が必要である。

以上、鏡体および試料からくるコンタミについて述べてきた。その他、良い結果を得るためには撮影の技術も重大な因子の一つとなる。走査電顕の場合、視野を1回走査するごとにコンタミは付加されていく。したがって、全く走査していない視野を直ちに撮影すれば、最もコンタミが少なく写真を撮ることになるのである。しかし、そんなことは事実上できないから、できるだけその視野における走査を少なくすることが肝要である。それに撮影しようとする場所の近所で、あらかじめ非点収差を補正し、焦点合わせをしておく。そして、目的の場所に移動し、すばやく焦点を合わせて写真を撮る。そのようにすると、比較的コンタミの少ないシャープな写真を撮ることができる。しかし、これにはかなりの修練が必要であろう。

さらに、積極的にコンタミを少なくする方法としてヒーティングステージの使用がある。

ヒーティングステージの使用法としては、カーボン板は $\phi 3$ mmのものをいい、もちろん銀ペーストは用いず、機械的に試料を装着する。ヒーティングは試料交換室で60℃、2時間行い、十分冷却した後に試料を試料室に挿入して観察する。試料室中で加温するほうがコンタミを避ける意味ではより良いのであるが、この場合は試料のドラフトが起こりやすいので、次善の方法として試料交換室で加温し、冷却してから試料室に入れる。

以上、観察上の注意点について述べてきたが、金コロイド粒子や生体高分子のような微細な試料を見るには、いかに良い試料をつくるか、いかにコンタミを避けるかが、結果の良否を決める最大の問題となっている。それがうまくいけば、SEMによる免疫学的研究はより良い結果を得ることができることであろう。

5. おわりに

金コロイド粒子を用いた走査電顕による免疫細胞化学的な研究は、広く行われている。しかし、金コロイド粒子とそれに付着するProtein AやIgGの相互関係はいまだ明らかにされていない。本稿では、できるだけコンタミの少ない状態でこれらを観察し、免疫金コロイド粒子がどのような形態をしているかを走査電顕的に明らかにした。その結果をまとめてみると次のようである。

- (1) 金コロイド粒子についてProtein Aは粒子の周囲にハロー状に見える。
- (2) 金コロイド粒子に直接付着させたIgGはY字状でなくてフィラメント状に見えることが多い。
- (3) 金コロイド粒子にProtein AとIgGの両方をくっつけたものは、ハロー状のProtein A層の外にIgGによる突起を持っている。

参考文献

- 1) Hodges, G.M., Southgate, J. and Toulson, E.C. (1987) Scanning Microsc. 1, 301-318.
- 2) Horisberger, M., Rosset, J. and Bauer, H. (1975) Experientia 31, 1147-1149.
- 3) De Harven, E., Leung, R. and Christensen, H. (1984) J. Cell Biol. 99, 53-57.
- 4) Tanaka, K., Mitsushima, A., Yamagata, N., Kashima, Y. and Takayama, H. (1991) J. Microsc. 161, 455-461.
- 5) 田中敬一, 松井 功, 黒田勝広, 満嶋 明(1985) 医生物走査電顕 14, 23-25.
- 6) Tanaka, K., Mitsushima, A., Kashima, Y. and Osatake, H. (1986) Proc. Xth Int. Congr. E.M. Kyoto, Vol. III (eds. Imura T. et al.) pp.2097-2100 (The Jpn Soci. E.M. Tokyo).
- 7) Björk, I. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 579-584.
- 8) Tanaka, K., Mitsushima, A., Kashima, Y., Nakadera, T. and Osatake, H. (1989) J. Electron Microsc. Tech. 12, 146-154.
- 9) 山根 昇, 満嶋 明, 田中敬一(1990) 医生物走査電顕19, 77-80.

解 説

V-3000形日立走査トンネル顕微鏡

Hitachi Model V-3000 Scanning Tunneling Microscope

羽崎 栄市* 山田 理* 福原 悟* 青木 一雄* 中泉 泰* 飯田 一志**

(平成3年3月6日受理)

1. はじめに

走査型トンネル顕微鏡 (STM: Scanning Tunneling Microscope) は、先の尖(とが)った細い探針と試料間に電圧を印加することによって流れる微弱なトンネル電流を利用した新しい表面観察装置であり、1982年にG. Binnig, H. Rohrerらによって初めて発表された¹⁾。

STMは、従来の表面観察装置であるSEM, TEMに比較し、特に垂直分解能に優れ、nmオーダーあるいは原子オーダーで三次元の表面観察ができる。また、AES, SIMSなどを用いた元素分析は面分解能が低いのに対し、STMはSTS (Scanning Tunneling Spectroscopy)²⁾, CITS (Current Imaging Tunneling Spectroscopy)³⁾等の手法により、高い分解能で表面の電気的な情報が得られるという特長を持っている。しかし反面、広い領域の測定ができず、測定視野を捜すのが困難であり、また低倍像を得るのに長時間を要するなどの短所を持つ。

SEMは、試料の前処理が簡単なこと、試料寸法への制約が小さいことなどの長所により、種々の分野でその利用が急速に伸びてきた。しかし、現在分解能の面で限界に近づいており、また表面の物質的情報が得られないという欠点を持つ。

このようにSEMとSTMはそれぞれ長所と短所を持つが、V-3000形走査トンネル顕微鏡は、SEMとSTMを複合化することにより、互いの長所を生かして短所を補い、表面観察法をより高度化、容易化するシステムとしたものである。

以下、STMの概略について述べるとともに、V-3000形STMの構成、応用例などについて紹介する。

2. STMの原理と構成要素

2.1 STMの原理

先の尖った細い金属性探針と導電性試料との間隔を1 nm程度に近づけると真空障壁を素通り(トンネル)して両方の伝導電子が行き来できるようになり、数ボルト以下の電圧を印加することによってトンネル電流が流れる。この電流は自由電子近似で次式で表わすことができる⁴⁾。

$$J_t = (\beta V / 2\pi\lambda Z) \exp(-2Z/\lambda)$$

ここで、

β : 金属の種類に左右されない定数($\beta = e^2/h$)

e : 電子電荷

h : プランクの定数

V : 印加電圧

λ : 波動関数の金属の外の減衰距離($\lambda = h/2\pi\sqrt{2m\phi}$)

m : 電子質量

ϕ : 仕事関数

Z : 探針と試料の距離

このトンネル電流 J_t は距離 Z の変化にきわめて敏感で、これがSTMの高分解能化を実現した大きな要因である。

STMは図1に示すように、x, y, z方向に独立に制御可能なピエゾ素子から成る微動機構に探針を取り付け、トンネル電流が一定になるように探針と試料間の距離 Z をサーボ回路で制御しながら試料表面をx, y方向のピエゾ素子で走査する。このとき、xy走査した各画素でのz方向のピエゾ素子の駆動電圧を変位量に換算して画像化したものが、試料表面の形状を示すSTM像である。

2.2 STMの構成要素

STMは、探針、微動機構、粗動機構、除振機構、制御用電子回路、画像処理系から成る。

探針はSTMの分解能を決める重要な要素であり、理想的には先端が1個の原子で構成されている必要がある。また表面の形状を正確に測定するためには、先端ができる限り細いことが望ましい。通常、タングステンや白金線を機械的あるいは電気化学的に研磨し、先端半径を約0.15 nm以下にしたものが使われている。

微動機構(スキャナ)は探針をx, y方向に走査し、表面の凹凸に従って移動させる機構で、ピエゾ素子(PZT)が用いられる。微動機構にはトライポッド形とチューブ形がある。前者はx, y, zの3方向がそれぞれ四角柱の素子で構成され、電極に電圧を印加することによる軸方向の伸縮を利用

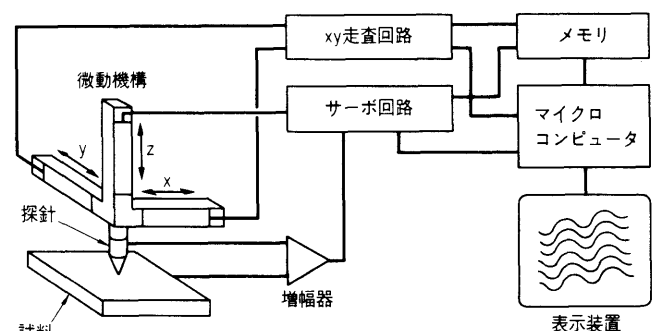


図1 STMの測定原理

* 株式会社 日立製作所 那珂工場

** 株式会社 日立製作所 計測器事業部

する。後者は薄い円筒の内側と外側に電極を設け、x、y方向走査は電圧印加による曲げ変形で与え、z方向変位は軸方向の伸縮を利用して行う。

粗動機構は、探針と試料間の距離を数ミリメートルからトンネル電流が流れる1 nm程度まで近づけて保持する機構である。マイクロメータヘッドを利用したもの、てこを利用して移動量を縮小するDemuth形、マウスと呼ばれるピエゾ素子による尺取り虫機構と静電吸着する足を組み合わせた機構などがある。

STMでは、床の振動や音が機構部に伝わって探針と試料の距離が変動すると測定が困難になるので、除振機構が必要となる。除振機構には、機構部をばねでつる方式、ばね特性と減衰特性を持つゴム片を介して、金属板を数枚積み重ねたスタック方式などがある。

STMの制御用電子回路は、微動機構の制御に関するものが主体に構成されている。x、y方向走査にはサーボ制御の機能はない。z軸のサーボ回路は、トンネル電流を電圧に変換して増幅し、比較器であらかじめ設定した電圧と比較し、その差を出力として取り出して積分器と増幅器を介してピエゾ素子に印加することにより、探針と試料間の距離を一定に保持する。このときのz軸信号とx、y走査信号を同期してコンピュータに取り込むことによって、各素子へ加えた電圧値の形で試料表面の3次元測定データとして蓄積される。蓄積されたデータは画像処理系で処理され、必要な画像を得る。

3. V-3000形STMの特長

V-3000形STMは、STMとSEMの複合した新しい表面観察システムであり、次のような特長を持つ。

- (1) 超ワイドレンジの表面観察・計測(数十倍～数千万倍)ができる。STMはサーボ性能の面から探針の走査速度に限界があり、数十マイクロメートルの領域を測定するのに数十分以上を要し、また測定中に探針の状態が変化し、像質が変わることも考えられる。低倍像はSEMで観察し、数万倍以上の高倍像はSTMで得るのが適切なやり方である。
- (2) SEMによりSTMで測定する位置を高精度に選択でき、従来の光学顕微鏡で問題となっていた倍率限界、浅い焦点深度による視野捜しの困難さが解消できる。
- (3) 同じ部位のSTMとSEMの両方の画像を比較観察することができ、より多くの知見を得ることができる。
- (4) SEMであらかじめ探針の状態をモニターできるので、データの信頼性が向上する。
- (5) STMステージユニットとSEMステージは互換性があり、SEMステージに交換することによってSEMとしての性能をそのまま利用できる。
- (6) インチウオーカー方式の高速探針自動接近システムの採用により、試料に接触することなく安全にトンネル領域まで探針を接近させることができる。

4. V-3000形STMの構成

4.1 システムの構成

V-3000形STMをS-2700形SEMに組み合わせたシステムの外観を図2に示す。STMの機構部が取り付けられたSTMステージユニットは、SEM本体の試料室に装着され、制御、画像処理装置はSEMディスプレイの右側に配置される。

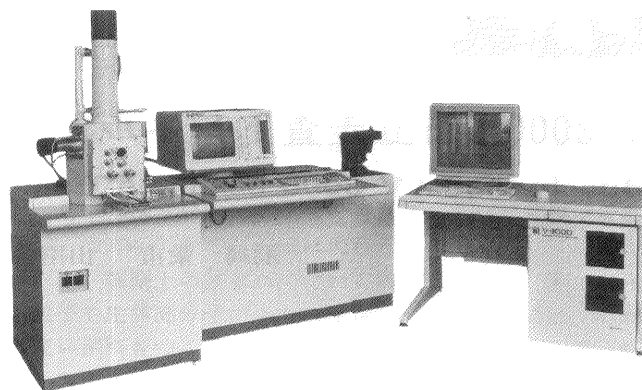


図2 STM-SEM複合機
(V-3000形STMをS-2700形SEMに組み込んだ例)

4.2 STMステージユニット

STMステージユニットをSEMの試料室から引き出した様子を図3に示す。STM機構部はSTM機構部をSEMの電子ビームと直角をなす面内で移動させるXYステージ(移動量5 mm)上に配置される。STMステージユニットは容易に試料室から着脱することができ、SEMステージと交換することにより、SEM本来の使い方ができる。

4.3 STM機構部

(1) 構成

STM機構部を図4に示す。試料と探針は直角に対向するように配置され、両者がSEMの電子ビームに対して45°の角度をなすように取り付けられている。この構成によって同じ部位のSEM像とSTM像を得ることができる。

(2) 探針および試料

探針は先端半径0.1 μm以下、コーンアングル約10°に電解研磨したタングステン線を用い、精度の高い三次元の表面形状の測定ができる。試料は10 mm×10 mmを標準の大きさとし、試料ステージによって10 mm×10 mm移動が可能である。

(3) スキャナ

探針を微動させるスキャナはトライポッド形を採用し、

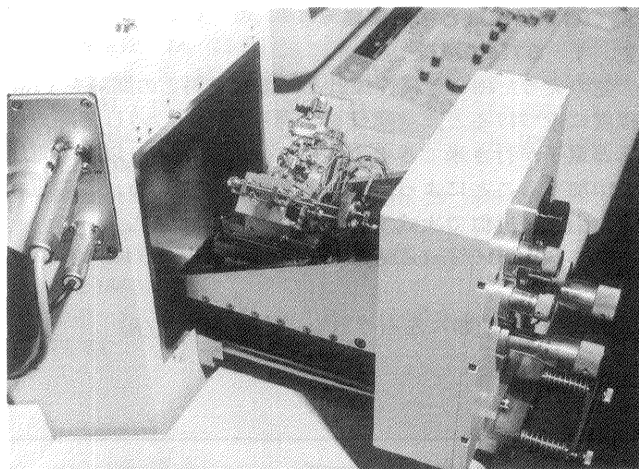


図3 STMステージユニット

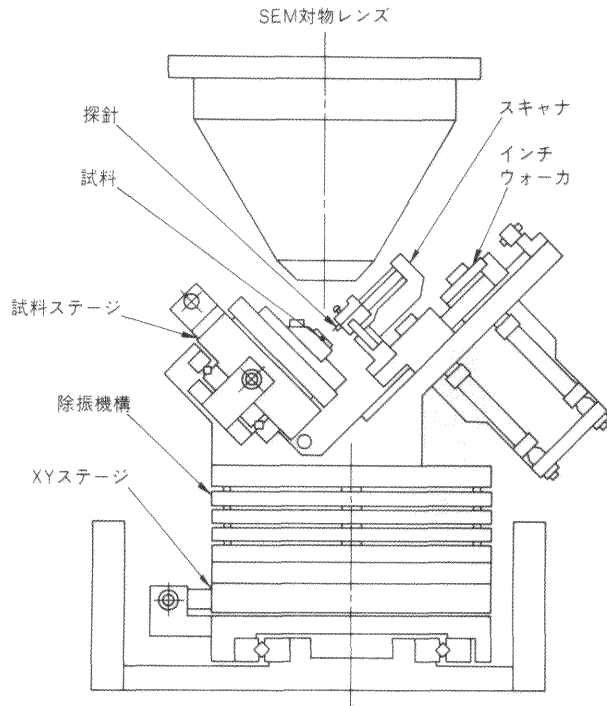


図4 STM機構部

観察する表面構造の大きさによって広域用と高分解能用を使い分ける。

(4) 粗動機構

粗動機構はピエゾ素子と2個のクランプ機構とを組み合わせたインチウォーク(尺取り虫方式)を採用し、独自の探針自動接近法を持つ。インチウォークによって探針を一步一步前進させ、トンネル電流を検知した瞬間にスキナのz方向のピエゾ素子とインチウォークのピエゾ素子を縮め、クランプを持ち代えてインチウォークの位置を調整した後、ピエゾ素子をゆっくり伸ばし、最終的に両方のピエゾ素子が全ストロークの約50%伸ばした位置で測定が始められるシステムとなっている。このシステムより、探針は試料にぶつかることなく安全にトンネル領域に接近させることができ、同時に傾斜した試料も効率的に測定が可能である。

(5) 除振機構

除振機構に関しては、3段のスタック方式を採用し、またSEMに備えられている除振装置もそのまま利用し、床からの振動を効果的に防ぐことができる。音響振動は、試料室内の真空中にSTM機構部が配置されるので、伝搬を抑えることができる。

(6) 試料ステージとXYステージの機能

STMで測定したい位置は、STM機構部移動用のXYステージを操作して探針をSEMの視野内にとらえ、試料ステージで試料を動かして高精度に捜すことができる。図5は光ディスクの表面と探針のSEM像である。破線の部分のSTM像が図6であり、破線内のピットに探針を合わせて測定したものである。図7は先の曲った探針のSEM像であり、測定中に試料とぶつかったものである。この状態で測定した像は凸部は大きく凹部は小さく現われ、正確な像が得られ

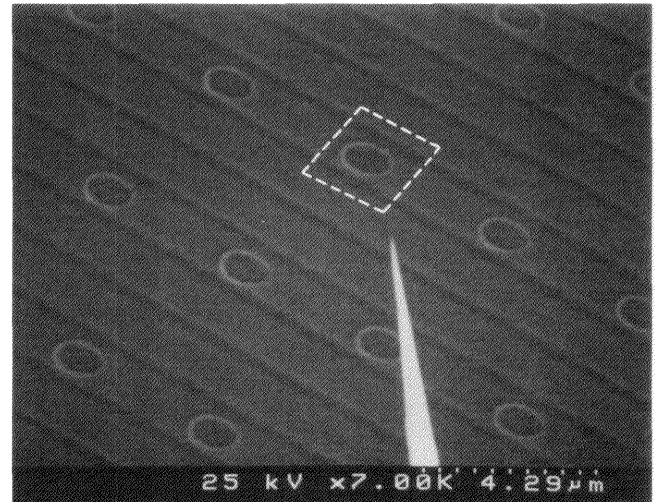


図5 光ディスクの表面と探針のSEM像

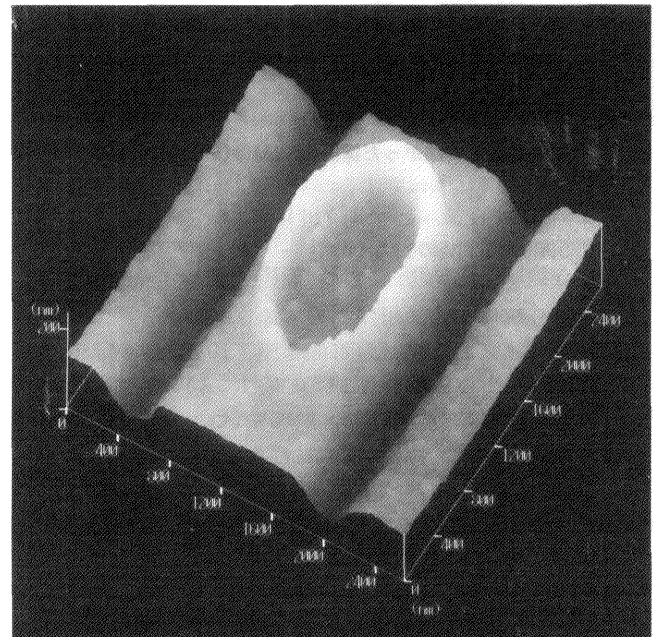


図6 図5の探針が指した部分のSTM像

なかった。測定前に探針の状態をモニタすると、誤った像をとるのを防ぐことができる。

4.4 制御・画像処理装置

スキナの制御は、32ビットパーソナルコンピュータに組み込んだ専用的高速プロセッサ(DSP)で行う。z軸のサーボ制御はDSPのソフトウェア演算で行う方式と、専用のハードウェア回路で行う方式を持ち、前者は高精度測定、後者は高速測定用に使用する。後者では、VTRと組み合わせることで変化する試料の像を連続観察、記録が可能である。

STMの操作は主にマウスを使用し、補助的にキーボードを使う。モニタ上に表示されるメニューを選択することにより、測定モードの決定、パラメータのセット、測定の実行、画像データの表示などを行うことができる。

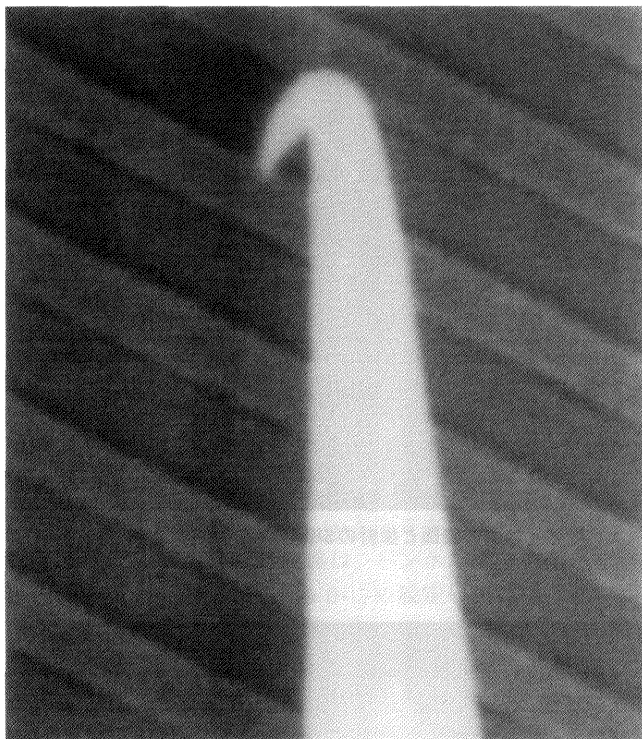


図7 試料と接触して曲がった探針のSEM像(約15,000倍)

5. V-3000形STMの主な仕様

- (1) 走査領域：広域用／高分解能用 $9\ \mu\text{m} \square / 0.1\ \mu\text{m} \square$
- (2) 走査分解能：広域用／高分解能 $0.15\ \text{nm} / 0.01\ \text{nm}$
- (3) 試料サイズおよび観察可能範囲： $10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm}$
- (4) 測定モード：STM, CITS, V-I, STS各モード
- (5) 表示データ：輝度変調画像(明暗像), 鳥瞰像, 立体陰影像, 断面形状像, 電圧-電流特性など
- (6) STMと組み合わせが可能なSEM：S-2500CX, S-2700, S-4000

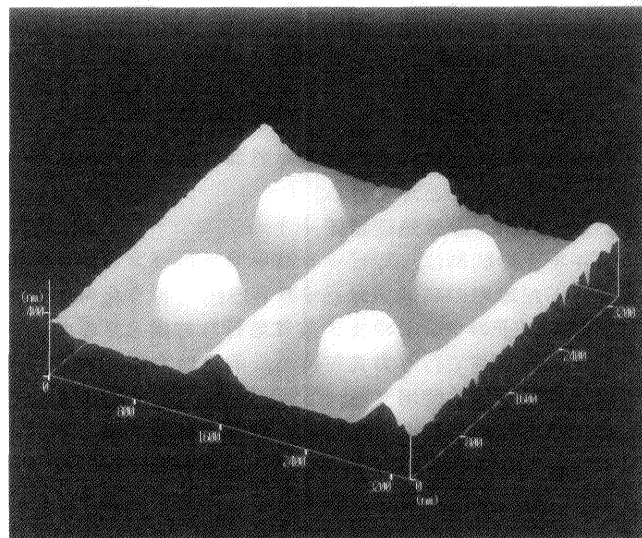


図8 光ディスクのスタンパ

6. 応用データ

光ディスクのスタンパ、レジストパターン、グレーティング、磁気記録用薄膜媒体、グラファイト(原子像)の立体像を図8～12に示す。

7. おわりに

V-3000形STMは、STMとSEMを複合させることにより、表面観察法をより高度に容易化するものであり、STM測定位置の高精度選択、SEMによる探針のモニタなど種々

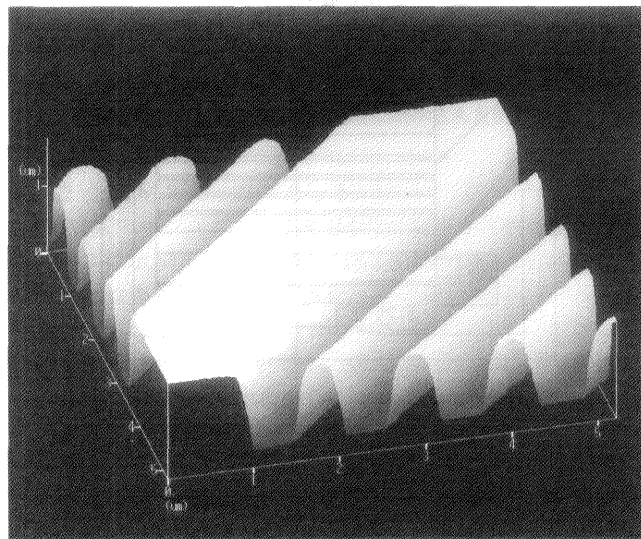


図9 レジストパターン

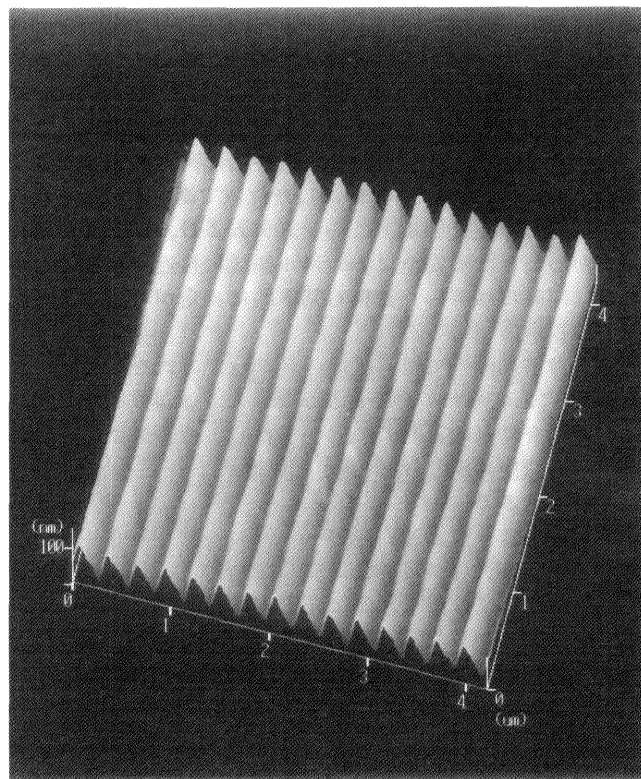


図10 グレーティング

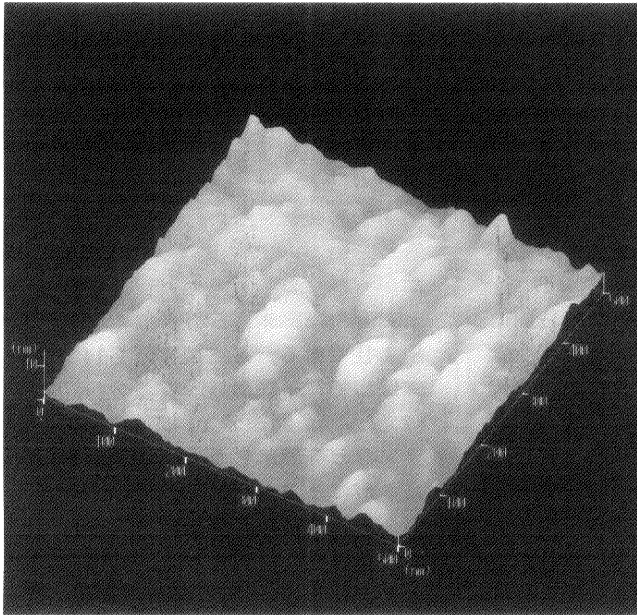


図11 磁気記録用薄膜媒体

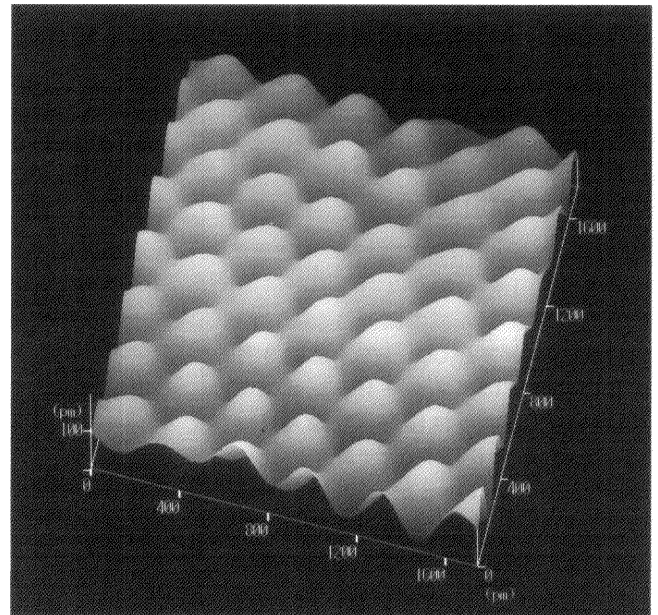


図12 グラファイト(HOPG)

の特長を持っている。材料、エレクトロニクス、半導体などの分野での表面観察ツールとして大いに期待できる。

この装置を基に、今後原子レベルでの研究開発用の超高真空STM、絶縁物が測定でき、V-3000形STMと互換性を持つ原子間力顕微鏡(AFM: Atomic Force Microscope)を開発し、多様化するニーズにこたえていきたい。

参考文献

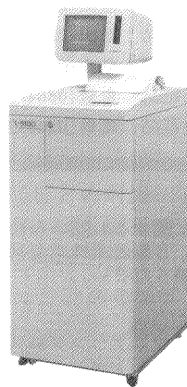
- 1) G.Binnig, et al.: Physica, 109 and 110 B(1982)2075
- 2) R.S.Becker, et al.: Phys. Rev. Lett., 55(1985)2023
- 3) R.T.Harmers, et al.: Phys. Rev. Lett., 56(1986)1972
- 4) J.G.Simmons: J.A.P., 34(1963)1793

日立 製品紹介

新製品紹介

日立医用液体
クロマトグラフ
L-9100形
日立グリコヘモグロビン
分析計
L-9200形
日立カテコールアミン
分析計

2機種とも操作・保守が簡単で、液体クロマトグラフをご存知ない方でも



十分使用できます。コンパクトな一体化構造で、床面積を取らない利点もあります。

L-9100形
日立グリコヘモグロビン分析計

血液中のグリコヘモグロビンを測定することにより、糖尿病の診断を行います。通常の5成分分析モードは、1分析当たり3.3分と高速度です。これとは別に、6成分分析を行う高分離モードも得られます。

L-9200形

日立カテコールアミン分析計

血液や尿の中のエピネフリン、ノルエピネフリン、ドーパミン(カテコールアミンと総称される。)を測定するものです。神経科系の老人性痴呆(ぼけ)症、パーキンソン病、内科系の神経腫(しゅ)瘍、心臓病などの診断に用いられます。1分析当たりの時間は15分と、従来の方法の1/2以下です。

(野上 太郎 記)

Topics

ピッツバーグ会議／ 展示会開催さる

42回の同上の会議が3月3日～8日にわたって、シカゴで開催された。発表件数の多いこともあって、急遽3月3日の日曜日にポスターセッションを設け消化するようにした。登録人員は29,138名(3月6日現在)で昨年に比べると3,014名少なかった。これは湾岸戦争のため欧州、日本からの参加者が減ったためである。しかし、発表の方は1,605件で昨年の1,389件に比べれば増

加している。また15年間を通して見ても一本調子で増加している。特に液体クロマトグラフ、赤外分光(FT/IR)、質量分析に関する発表は増加の一方である。これに反し、イオンクロマトグラフ、ICPの発表は一山を越した感じである。新しいものとして、センサーに関係するものが増え光ファイバーの応用は不可欠になっている。バイオセンサーについての第2回目の日米合同のシンポジウムもこのピッツバーグ会議の中に組み込まれて開催された。分析室に対する考え方も装置は24時間稼働させるが、人は8時間の稼働である。これができるような装置、システムに焦点がしばられている。同時に測定値の信頼度に対する評価も行なわれ始めた。

注目されている分野は環境と生命科学である。特に前者については、'70年代は水の時代だったが、'90年代は大気の時代であるとして、酸性雨、温暖化そして湾岸戦争による大気汚染に興味が集中していた。

米国の機器メーカーは吸収・合併を繰り返しているのが昨年あった名が今年にはなかったりしているが常に名前が出て来るものは、米国5社、日本3社、欧州1社である。日立製作所も14コマを確保して電子顕微鏡、質量分析、原子吸光、蛍光、顕微分光、液体クロマトグラフなどを展示した。日本製品の質の良さがここでも認められているのか、引合い件数は毎年増加の一方をたどっている。

(保田 和雄 記)

訂正

先般、お送りしました本NEWS, Vol, 34 No, 2に、右記のような誤りがありました。謹んでお詫びの上、訂正させていただきます。

記

位 置	P.18 脚注欄
訂正前	** 岡山大学 医学部 公衆衛生学教授
訂正後	** 岡山大学 医学部 公衆衛生学教室

日製産業株式會社

本 社 電話 東京(03)3504-7211
筑波支店 電話 土浦(0298)23-7391
千葉営業所 電話 千葉(0472)47-4151
新潟営業所 電話 新潟(025)241-3011
中部支店 電話 名古屋(052)583-5841
四国営業所 電話 高松(0878)62-3391
九州支店 電話 福岡(092)721-3501

北海道支店 電話 札幌(011)221-7241
北関東営業所 電話 大宮(048)653-2341
横浜支店 電話 横浜(045)671-5421
北陸営業所 電話 富山(0764)24-3386
京都営業所 電話 京都(075)241-1591
岡山営業所 電話 倉敷(0864)25-1316
沖縄出張所 電話 那覇(0988)78-1311

東北支店 電話 仙台(022)264-2211
西関東営業所 電話 八王子(0426)43-0081
厚木営業所 電話 厚木(0462)27-1391
豊田営業所 電話 豊田(0565)28-5191
関西支店 電話 大阪(06)366-2551
中国支店 電話 広島(082)221-4514

＜編集後記＞

1930年代に誕生した透過電子顕微鏡の製作の第一目的は、微生物を光学顕微鏡よりもっと詳細に観察したいためであったようです。その後、電子顕微鏡と医学・生物とは相補関係で発展してきた。最近生物分野で注目され、電子顕微鏡の威力が発揮されているものに免疫学への応用があります。本号では免疫電子顕微鏡特集を企画し、この方面の先駆者の先生方に執筆していただきました。本号の編集、外村氏の日本学士院賞決定の嬉しいニュースが入りました。電子線ホログラフィの生物学への応用もまもなく実現され、DNAなどの解析がなされることでしょう。

(永田 文男 記)

■本ニュースに関するお問い合わせは、下記へ、または、日製産業株式会社の上記各事業所へご連絡ください。

- 日立計測エンジニアリング株式会社
テクノリサーチセンタ
〒312 茨城県勝田市市毛882番地
電話 勝田(0292)73-2111(代)
- 日製産業株式会社
科学システム営業本部企画開発部
〒105 東京都港区西新橋1-24-14
電話 東京(03)3504-7195(ダイヤルイン)
FAX (03)3504-7756

HITACHI
SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS
MAY/JUN. 1991 VOL.34 NO.3

発行 平成3年5月1日(年6回発行)
発行人 上村昌司
編集人 高田芳矩
発行所 株式会社 日立製作所 計測器事業部
科学機器システム部
〒100 東京都千代田区丸の内1-5-1新丸ビル
電話 東京(03)3214-3123(直通)
印刷所 日立印刷株式会社