

九州大学中央分析センター

センター
ニュース

29

平成 2 年 6 月

目 次

分析機器解説シリーズ (29)	1
細胞生物学における顕微蛍光分析の利用	
平成 2・3 年度センター委員	5
中央分析センター (筑紫地区) 装置利用状況	9
中央分析センター工学分室装置利用状況	10
中央分析センター工学分室装置利用経費表	11
お 知 ら せ	13
1 . 新設装置の紹介	
2 . 登録装置についての変更	
3 . 走査型電子顕微鏡 (ABT-32, WET-SEM) の利用料金について	

分析機器解説シリーズ(29)
細胞生物学における顕微蛍光分析の利用

中央分析センター 西山 宣昭

1. はじめに

近年、生化学、分子生物学における微視的知見の集積により、細胞レベルでのマクロな現象の解釈が可能となりつつある。このような状況において、細胞生物学における蛍光分析利用の重要性は、モノクローナル抗体等の特異性の高い蛍光標識の開発に伴って、広く認識されるようになった。

本センターには、線回折装置と顕微蛍光分析装置とから成る超高压物性測定装置が平成元年度に設置され、材料、物性物理の研究者の利用に供されているが、このうち顕微蛍光分析装置の部分はシステムを変更することなく、細胞研究に応用することができる。本稿では、顕微蛍光分析装置について概説するとともに、本システムにおいても測定可能な若干の研究例を紹介する。固体研究に用いる場合の超高压物性測定装置については、すでに詳しい解説があるので参照されたい。(センターニュース、Vo1. 7, No.2 (1989))

2. レーザー顕微蛍光分析

細胞生物学の領域で用いる蛍光分析の装置としては、蛍光分光光度計が最も一般的であり、したがって観測される蛍光強度は細胞集成での総和となる。本稿で紹介する顕微蛍光分析装置は、光源としてレーザー光を用いており、顕微鏡の光学系を通過させることによって極めて微小な領域を照射できること、及び照射領域を接眼レンズを通して特定できることが大きな特徴である。したがって、単一細胞内の特定領域あるいは細胞集団における不均一性など部位特異的な情報を引きだすことが可能であり、蛍光分光光度計では得られない知見を得ることができる。

本システムは、He - Cd レーザーを光源としている。レーザー光は顕微鏡に導入された後に、対物レンズを通して試料に照射される。試料より生じた蛍光は、分光器を経て、ホトマル、フォトンカウンターによって光子計数される。(装置の構成については、上述のセンターニュースを参照) レーザー光は40mW、441nmの波長を持つが、生じた蛍光のうち530nmより短波長の蛍光は、検出系に導入される前にダイクロイックミラーでカットされる。用いるホトマルの感度も考慮すると、測定波長範囲は現システムにおいては550~700nm程度である。したがって、用いる蛍光剤に制約がある。本システムにおいて、腔腸動物ヒドラを材料として、いくつかの蛍光色素を検討した。核酸結合性蛍光剤として知られるアクリジンオレンジ(0.1μg/ml)でヒドラ組織、解離細胞を処理した。ヒドラの解離細胞は、70mOsm程度の高イオン強度塩溶液で処理することにより得て、軟寒天中に固定して測定に供した。アクリジンオレンジは、2本鎖DNAに対しては塩基対間にインターカレートする

ことにより 530nm の蛍光を、また RNA 等 1 本鎖核酸に対しては、リン酸基との静電相互作用によりスタッキングを起こして 640nm の蛍光を発する。ヒドラ解離単一細胞に対して十分な蛍光が検出できた。膜カルシウム結合性蛍光剤クロロテトラサイクリンについても検討した結果、本システムで検出可能であった。現在用意されている対物レンズは×10、×20 であり、照射領域は×20 レンズで直径 20 μm 程度のスポットとなる。さらに高倍率のレンズを用いれば、単一細胞内の微小領域を照射できる。但し、位相差でなく金属顕微鏡を用いているため、細胞内構造物の判別は難しい。

細胞内の特定の微小領域の蛍光分析を行なった例としては、Nd - YAG レーザーの 4 倍波による微小管の切断と蛍光標識した α -チューブリン抗体を用いた微小管の回復過程の研究⁽¹⁾、Ca²⁺ 指示蛍光剤を使って、細胞分裂の際の細胞内コンパートメント間における Ca²⁺ 移動を調べた例⁽²⁾などがある。

細胞の増殖、分化に関連して、最近注目されているのは細胞間情報伝達の問題である。発生系においてはよく知られているように、分化因子に対する応答は、単一細胞ではなく細胞集団として生じる。⁽³⁾ 培養系においても、3 T 3 細胞を用いたギャップジャンクションと細胞増殖との相関を示す実験⁽⁴⁾などは、細胞集団に注目することの重要性を示すよい例である。レーザー光を光源とする本システムは、このような細胞集団を研究対象とする上で、極めて有効な手段となる。本来、固体研究用として設置された装置であるため、細胞研究には不備な点があるが、光源がレーザー光である利点を生かした実験が望まれる。

3 . 蛍光退色回復法

先に述べたように、本装置により試料の特定の領域について蛍光強度及び蛍光スペクトルの測定が可能であるが、レーザーと顕微鏡との間の光軸に若干の改良（本来の超高圧物性測定装置としての機能は損なわずに）を加えることによって、原理的には以下に述べる蛍光退色回復法を使うことができる。

この方法では、ある微小領域をレーザー光など強い光で照射して蛍光分子を光退色させた後、励起光強度を $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 程度に減少させ、その後の蛍光強度の変化を測定する。光退色後、照射領域外の退色されていない分子の流れ込みによって、蛍光強度は退色前の値へと近づく。この蛍光強度の回復過程を解析することによって、蛍光分子の拡散に関する情報を得ることができる。図 1 は、光退色に伴う蛍光強度の時間変化を示している。図 2 は、蛍光退色回復法に用いられる装置の概略図を示している。レーザー光はビームスプリッターにより 2 本に分割され、1 本は測定用（図中 1）として、もう 1 本は光退色用として（図中 2）用いる。光退色光は、通常はシャッターによりカットされている。測定光は、ニュートラルデンシティーフィルターによって強度を落として用いる。

蛍光退色回復法は、本来細胞膜中の分子のダイナミックスの解析のために開発されたものであり、赤血球膜中の蛍光プローブの並進拡散係数が求められている。⁽⁵⁾ その他の測定例としては、神経細胞

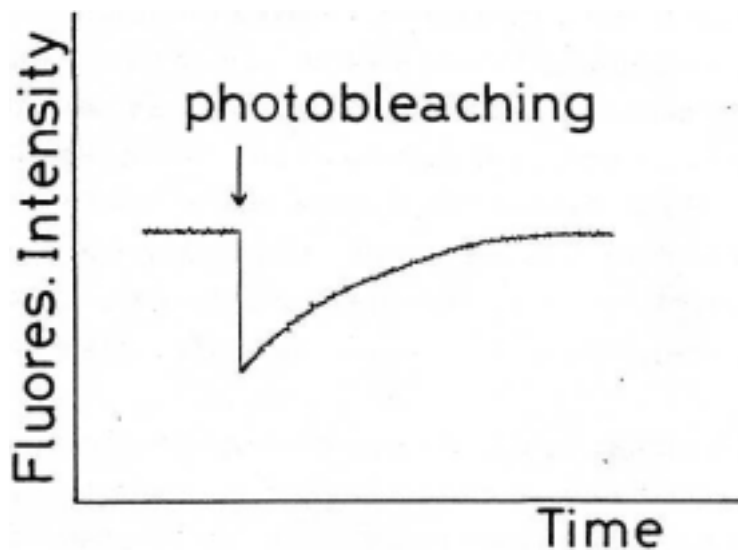


図1 光退色後の蛍光強度の回復曲線

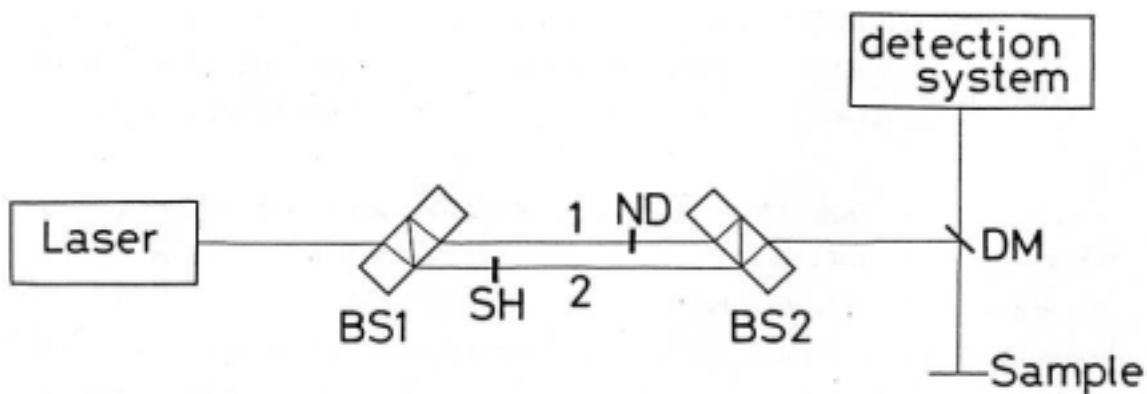


図2 蛍光退色回復法に用いられる装置の概略図。レーザー光1は測定用、2は光退色用である。BS1、BS2：ビームスプリッター、ND：ニュートラルデンシティフィルター、SH：シャッター。

の分化に伴う細胞膜流動性の変化を測定した研究⁽⁶⁾などがある。実験的に得られた蛍光回復曲線を拡散方程式により解析するが、いくつかのモデルに対しては、すでに解析解が得られている。⁽⁷⁾

以上述べた蛍光退色回復法は、膜流動性の測定以外にも顕微分光装置と組み合わせて用いる利点を生かして、様々な用途が考えられる。筆者は、この方法をギャップジャンクションのダイナミックスの研究に使えないか、現在検討中である。拡散係数の決定に必要なモデル化が困難な系に対しても、半定量的な物質移動の情報を引き出すことができると考えられる。本システムを使って蛍光退色回復法を用いる場合、大きな問題はレーザー強度が弱いことである。本システムに装着された He - Cd レーザーは、40mW であるが、通常は 2 ~ 4W の Ar イオンレーザーが用いられている。どの程度の光退色が可能か現在検討中である。

4. ま と め

本センターに設置されている超高压物性測定装置は、本来固体研究用のものであるが、この装置に含まれるレーザー顕微蛍光分析システムは、何ら変更することなく細胞生物学の分野の研究にも応用することが可能である。細胞生物学の領域におけるレーザー顕微蛍光分析は、ここ数年急速に普及しつつある。すでに、共焦点レーザー顕微鏡が市販されており、上述した部位特異的な蛍光分析及びいわゆる蛍光顕微鏡としては、きわめて高い解像度が実現されているが高価である。本稿で紹介した顕微蛍光分析システムを構成するユニットは、細胞研究用としては必要最小限のものであるが、通常の蛍光分光光度計による測定からの知見をさらに進めた情報を得ることが期待できる。

(謝辞)

本システムの性能を見るために用いたヒドラは教養部生物・小早川義尚助教授よりいただいた。ここに感謝致します。

(参考文献)

- (1) J. Cell Biol. 107, 1025 (1988)
- (2) J. Cell Biol. 96, 598 (1983)
- (3) Development (Suppl) 149 (1989)
- (4) Exp. Cell Res. 185, 535 (1989)
- (5) Biochim. Biophys. Acta 367, 282 (1974)
- (6) FEBS Lett. 140, 117 (1982)
- (7) Biophys. J. 16, 1055 (1976)

平成2・3年度センター委員
九州大学中央分析センター委員会委員
(平成2・3年度)

委 員	セ ン タ ー 長 機能物質科学研究所	教 授	小 林 宏
	工 学 部 長	"	原 田 耕 介
	大学院総合理工学研究科長	"	斎 藤 省 吾
	理 学 部	"	岡 崎 篤
	理 学 部	"	香 月 勗
	工 学 部	"	加 藤 昭 夫
	工 学 部	"	林 安 徳
	農 学 部	"	箴 島 豊
	農 学 部	"	江 藤 守 総
	医 学 部	"	関 口 睦 夫
	歯 学 部	"	太 田 道 雄
	薬 学 部	"	古 森 徹 哉
	教 養 部	"	井 手 悌
	大学院総合理工学研究科	"	吉 永 日出男
	応用力学研究所	"	吉 田 直 亮
	機能物質科学研究所	"	金 政 修 司
	工 学 分 室 長	"	梶 山 千 里

九州大学中央分析センター運営委員会委員

(平成2・3年度)

委員長	センター長	教授	小林	宏
委員	工学分室長	"	梶山	千里
	理学部	"	香月	勗
	薬学部	"	古森	徹哉
	工学部	"	高木	誠
	農学部	"	箴島	豊
	大学院総合理工学研究科	"	沖	憲典
	歯学部	"	松家	茂樹
	機能物質科学研究所	"	金政	修司
	中央分析センター	助教授	坂下	寛文

九州大学中央分析センター幹事

幹事長	センター長	教授	小林	宏
幹事	工学部	"	高木	誠
	理学部	"	岡崎	篤
幹事	大学院総合理工学研究科	"	荒井	弘通
	機能物質科学研究所	助教授	森	章
	中央分析センター	"	坂下	寛文

九州大学中央分析センター工学分室委員会委員

(平成2・3年度)

委員 長	分 室 長	教 授	梶 山 千 里
工学部委員	(土 木 系)	助教授	神 野 健 二
	(建)	教 授	松 藤 泰 典
	(電 気 系)	助教授	円 福 敬 二
	(機 械 系)	教 授	山 本 雄 二
	(化 機)	助教授	川 上 幸 衛
	(応)	教 授	梶 山 千 里
工学部委員	(合)	助教授	中 村 博
	(資 源)	助教授	井 澤 英 二
	(冶)	教 授	福 島 久 哲
	(鉄 冶)	教 授	林 安 徳
	(造 ・ 航)	助教授	宇 田 暢 秀
	(応 原)	教 授	杉 崎 昌 和
	(応 理)	教 授	高見沢 徹一郎
理学部委員	地 質 学	教 授	青 木 義 和
	生 物 学	助教授	太和田 勝 久
農学部委員	農 芸 化 学	教 授	江 藤 守 総
	食料化学工学	教 授	箴 島 豊
中央分析センター運営委員会工学部委員		教 授	高 木 誠

九州大学中央分析センター工学分室幹事

(平成2・3年度)

幹事長	分室長	教授	梶山千里
(応)	(化)	教授	加藤昭夫
(工)	(分)	助教授	今坂 藤太郎
(合)	(化)	教授	松尾 拓
(合)	(化)	教授	新海 征治
(材)	(工)	教授	林 安德

中央分析センター幹事

(合)	(化)	教授	高木 誠
-----	-----	----	------

中央分析センター（筑紫地区）装置利用状況
（平成元年1月～12月）

No.	センター機器名	件数	時間
1	エスカ・オージェ表面分析装置	71	129
2	蛍光線分析装置	130	194
3	ワイセンベルグカメラ	80	89日間
4	4軸型自動X線回折計	8	50日間
5	島津X線回折計	16	47
6	集中法粉末X線回折計	41	72
7	示差走査熱量計	7	14
8	セイコー熱分析装置	222	332
9	雰囲気中液体急冷装置	8	72
10	高周波2極スパッタ装置	96	2,185
11	ラバープレス	55	54
12	真空蒸着装置	25	86
13	超高压物性測定装置	35	81
14	超伝導核磁気共鳴装置	82	617

No.	登録機器名	件数	時間
1	多核種用FT型NMR	27	46
2	GSX-270H-FTNMR	8	10

中央分析センター工学分室利用状況

(平成元年度)

装置名	所属	件数	時間	装置名	所属	件数	時間
NMR (GSX-400)	センター	1268	2161	走査型電子顕微鏡	応・1	1010	1000
X線回折計(ADG-302)		127	469	イオンコーティング装置	応・1	436	179
フーリエ変換赤外分光光度計		343	382	示差走査熱量計	応・2	248	527
原子吸光分光装置		20	1	プラズマデポジション装置	応・2	112	549
熱天秤(TG-30)		39	72	透過型電子顕微鏡	応・2	261	1140
示差熱分析装置(DTA-30)		17	48	イオンシンニング装置	応・2	0	0
双子型恒温壁熱量計		0	0	光透過式粒度分布測定装置	応・3	129	136
微量水分測定装置		10	2	表面積測定装置	応・3	29	38
シンクログラフ		0	0	NMR (R-600)	応・4	4278	356
マイクロフォトメーター		282	188	精密分留装置	応・4	4	20
ガラスキャピラリー作成装置		3	8	精密天秤	応・4	306	35
表面張力測定装置		35	286	ガスフロー質量分析計	応・4	339	184
X線発生装置		0	0	二波長分光光度計	工分	0	0
ゼーマン水銀分析計		0	0	分光けい光光度計	工分	390	820
金属中水素分析装置		18	8	レーザーラマン分光光度計	合・1	87	147
インピーダンス測定装置		39	160	ESR	合・2	233	534
電気炉		59	65	シンクログラフ	合・4	1717	343
金属顕微鏡		4	6	NMR (R-24B)	合・5	2484	787
高速液体クロマトグラフ		161	268	赤外分光光度計	合・5	0	0
走査型電子顕微鏡(ABT-32)		20	71	直読式自動旋光計	合・5	0	0
イオンコーティング装置	60	20	円二色分散計	電子・5	157	266	
			発光分析装置	冶金・2	9	25	

中央分析センター工学分室（箱崎地区）装置利用経費表

装 置 名	利 用 経 費 (円)				備 考	
	A		B			
	1件当り	1時間当り	1件当り	1時間当り		
* 超伝導核磁気共鳴吸収装置 (JNM-GSX400)	2,000					
高速液体クロマトグラフ				400		
X線回折計	1,500	1,500		500		
X線発生装置	1,500	1,500		500		
走査型電子顕微鏡(ABT-32) (WET-SEM)	2,000			1,000		フィルム代は別料金
イオンコーティング装置			200			
フーリエ変換赤外分光光度計	1,500			500	Nujol 法 KBr 法	注)1件についての測定時間が1時間を超える場合は1時間につき1件とみなして件数を加算する
	2,500			1,000	溶液法 ATR 法	
原子吸光分析装置	200		100			基本経費 500 円を加算 検量線作成 500 円/件
熱天秤(TG-30)	1,000			500		
示差熱分析装置(DTA-30)	1,000			500		
双子型恒温壁熱量計	3,000			2,000		
金属中水素分析装置	600		300			校正 A:1,000 円/回 B: 600 円/回
微量水測定装置			150	100		
シンクログラフ						チャート 1m 当り 100 円 シンクロットは利用者負担
マイクロフォトメーター						チャート 100 円/m を加算
表面張力測定装置		600	50	300		
インピーダンス測定装置				100		

ガラスキャピラリー作成装置				1,000	単位時間は4時間とする
金属顕微鏡				100	フィルムは各自持参
電気炉				150	
核磁気共鳴吸収装置(R-24B)	1,000			700	
* 核磁気共鳴吸収装置(R-600)	2,000				
核磁気共鳴吸収装置(R-90H)	1,000		700		
ガスクロマトグラフ質量分析計	3,000		1,000		チャート2m以上の場合は 1,000円/m(A) 500円/m(B)を加算
走査型電子顕微鏡(MSM-6)	2,000		1,000		200円/写真1枚
* イオンコーティング装置		200			
* 透過型電子顕微鏡	4,000				
* イオンシンニング装置	2,000				
二波長分光光度計		500		250	
分光けい光光度計	700			300	
レーザーラマン分光光度計	1,500			1,000	
円二色分散計				500	
* 発光分析装置	1,000				
示差走査熱量計	1,000			500	
シンクログラフ				100	
直読式自動旋光計				300	
光透過式粒度分布測定器	1,000			500	
表面積測定装置	1,000			500	
精密天秤	300			100	
プラズマデポジション装置				1,000	

お 知 ら せ

1. 新設装置の紹介

顕微画像解析システム

平成元年度教育研究学内特別経費により顕微画像解析システムを中央分析センター工学分室(箱崎地区)に設置しました。顕微鏡画像のデジタル画像解析等に使用することができます。仕様は以下の通りです。

装置の構成

(1) 面像処理装置	日本アビオニクス(株)	Excel
(2) ビデオモニター	Sony	PVM1442Q
(3) ハードコピー装置	日本アビオニクス(株)	FR - 1000
(4) パーソナルコンピューター	NEC	PC9801RX4
(5) スキャナー	EPSON	GT - 6000
(6) TV カメラ	東京電子(株)	CS 3430
(7) 顕 微 鏡	NIXON	XF - VM

項 目	内 容	備 考
画像入力	(1)TV カメラ (2)外部ビデオ入力 (3)スキャナー	(1) 顕微鏡写真をコピースタンドで撮影入力 TV カメラを顕微鏡にとりつけ直接入力 (2)ビデオに記録した面像を入力(VTR はユーザーが用意) (3)面像をスキャナーでデジタル化し、フロッピーにデータファイルを作製する。
画像メモリ	512 画素 x512 画素 x8bit x3 プレーン	
機 能	(1)画像入力及び濃淡処理 (2)二値画像化処理 (3)計測処理 (4)2次元フーリエ変換	(1)積分入力、差分入力、濃度変換、シェイディング補正、エッジ強調 (2)膨張、収縮、粒子除去 (3)粒度分布、漁度計測、統計処理 (4)フーリエ変換、フーリエ逆変換
出 力	(1)ハードコピー (2)フロッピー・ディスク (3)プリンター	(1)処理画像(35mm フィルム、ポラロイドフィルム) (2)処理画像データ(MS-DOS) 計算結果 (3)処理画像データ、計算結果
利用料金	1 時間 1,000 円	フィルム、フロッピーはユーザーが用意する

尚、この装置の講習会を7月に予定しておりますので、ご希望の方は工学分室事務室(内線 5973)までお問合せ下さい。

2. 登録装置についての変更

・登録取消装置

常磁性共鳴吸収装置

型 式：日本電子製 JESME - 3

管理講座：工学部合成化学科第2講座

・新規登録装置

核磁気共鳴吸収装置

型 式：日立 R - 90H

管理講座：工学部工業分析化学講座

装置管理者：石橋信彦

装置責任者：川畑祐司

担当オペレーター：川畑祐司

利用料金：A：1000円/件

B：700円/件

(A：担当オペレーターが測定、B：依頼者が測定)

3. 走査型電子顕微鏡 (ABT - 32、WET - SEM) の利用料金について

下記のように改定しました。

・改定料金

A：2000円/件

B：1000円/時間 (但し、フィルム代は別料金)

・尚、本装置の付属装置としてのイオンコータの利用料金は1回の使用につき200円とします。