

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域 「生命現象の解明と応用に資する
新しい計測・分析基盤技術」

研究課題 「ns-nm 分解能の電子・光子ハイブリッド
顕微鏡の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成22年3月

研究代表者： 永山國昭
(自然科学研究機構 岡崎統合バイオ
サイエンスセンター・教授)

§ 1. 研究実施の概要

研究内容:

生物試料を見る電子顕微鏡技術は最近まで重金属染色が必須だったが、急速凍結技術と位相差法の融合で無染色の凍結試料の電顕像が高コントラストで撮れるようになった。本研究ではこれをさらに一歩進め常温常圧の生きた試料をそのまま電顕で観察する方法を確立するために、i) 位相差電子顕微鏡の高度化と応用、ii) パルス電子銃による電線損傷軽減法、iii) 電子・光子ハイブリッドレンズ系の確立、iv) 雰囲気試料室開発などを進め、それら要素技術が一体化された電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発を目指した。

研究成果:

1. 位相差電子顕微鏡の高度化と応用
ベクトルポテンシャルによる電子線位相変調現象、いわゆる AB (Aharonov-Bohm) 効果を位相差法の 1 つヒルベルト微分法に応用した。各種微小磁石 (コバルト、ニッケル、パーマロイ) の加工法を確立し、各種性能テストを行い、ほぼ期待通りの位相変化が見られた。
また導入された基本体 200 kV 電顕にトモグラフィシステムを付加し応用の高度化を図った。蛋白質、ウイルス、オルガネラ立体構造観察に大きな成果があった。
2. パルス光電子による電子線損傷軽減法の開発
可視光に対し量子効率の高いセシウム素光電子材料 (Cs_3Sb) を塗布した光電子を高効率に発生させる光電子銃の製作に供される光電子銃作製装置 (光電子エミッター作製用蒸着装置) を作製した。装置内に形成された Cs_3Sb エミッターからの光電子放出は確認されたが、電子顕微鏡への組みこみは時間切れとなった。
3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発と電子像光子像同時観察
位相差法は無染色または光顕染色生物試料の観察に有効であり、その利点を生かした電顕と光顕のハイブリッド顕微鏡の製作を行った。装置は完成し、生物テストを開始、電子像光子像同時観察に関しいくつかの成果を得た。またこのハイブリッド顕微鏡の持つ新規性 (電子と光同時照射と同時検出) が有利に作用し、有機物蛍光体に関し電子と蛍光のカップルに関する新規発見があった。
4. 雰囲気試料室の開発
日本電子製の雰囲気試料室をベースに新規デザインの雰囲気試料室を作製し、溶液中バクテリア電顕像を常温で観察した。
5. まとめ
パルス光電子銃開発を除いて他の 3 つの要素技術開発は所期の目標を達成した。さらにハイブリッド顕微鏡によりはじめて有機蛍光分子の電子と蛍光のカップルに関する新規発見があり、ハイブリッド法の次への飛躍が見込まれた。

§ 2. 研究計画に対する成果

(1) 当初の研究構想

1. 位相差電子顕微鏡の高度化

位相差法の応用が本プロジェクトの目的なので位相差法自体の性能向上が重要性を持つ。そのためベクトルポテンシャル由来の AB 効果を用いた無損失位相板 (AB 位相板) の開発を行うこととした。

2. パルス光電子による電子線損傷低減法の開発

生物試料の観察を常温常圧で行う場合、電子線損傷をどう避けるかが重要課題となる。可能性の 1 つとしてパルス電子が提案されてきた。パルス発生法として特に可視光励起の場合パルスレーザによる高速パルスを作りやすいので、可視光パルス光電子顕微鏡を作製し損傷低減を試みることにした。

3. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

無染色試料または光顕染色試料を可視化し得る位相差電顕は従来法に比べ光顕と電顕の相関観察を格段と容易にする。そこで同一生物試料の両顕微鏡による相関観察をより緊密にするため、同一視野を同時に光顕・電顕観察できるハイブリッド顕微鏡を開発することとした。

4. 雰囲気試料室の開発

浸水性生物試料を電顕の分解能で見えるため雰囲気試料室 (常温常圧の小さな試料部屋) を開発した。重金属染色を必要としない位相差電顕は特に常温常圧での生体試料の動態観察に適合するため本研究の開発目標とした。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

i) 電子顕微鏡トモグラフィーによる位相差法の高度化は当初目標でなかったが、次の理由で本研究に追加した。i) 4 種 (AB 位相板、光電子銃、ハイブリッドレンズ、雰囲気試料室) の要素技術開発を 1 度に 1 つの電顕装置で行うことが不可能 (開発過程での技術衝突) であると分かり 4 種の開発についてそれぞれ固有の電顕を用いて行うこととした (共同研究者の日本電子から 2 台の 200kV 電顕の使用供与を受けたことで可能となった。) 平成 20 年夏に位相差用電子顕微鏡 200 kV が要素技術を統合する基本体として導入されたが、要素技術未完なためその能力が遊んでしまう。そこでトモグラフィーという位相差法応用の高度化を追加項目とすることですぐに成果につながる研究を始めた。事実導入後 3 か月目に画期的なウィルスの立体像が観察され内部のゲノム構造まで立体的に示すことができた (新聞報道)。

ii) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の完成直後に蛍光染色細菌を用いて、電子と有機物蛍光のカップルする新規発見があった。終了までの 4 カ月間この新規発見の現象理解のため全力投球を行い全く新しい顕微鏡の着想を得た。

§3 研究実施体制

(○：研究代表者または主たる共同研究者)

(1)「岡崎統合バイオサイエンス」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	永山 國昭	自然科学研究機構	教授	H18.10～
	DANEV, Radostin	自然科学研究機構	助教	H18.10～
	箕田 弘喜	東京農工大学	准教授	H20.4～
	臼田 信光	藤田保健衛生大学	教授	H18.10～
	大河原 浩	自然科学研究機構	技術職員	H18.10～H21.3
	小原 正裕	自然科学研究機構	技術職員	H21.4～
	飯島 寛文	自然科学研究機構	博士課程3年	H18.10～
	永田 麗子	自然科学研究機構	技術職員	H18.10～H.21.5
	小金丸 奈巳	自然科学研究機構	研究補助員	H18.10～H20.3
	近藤 淑恵	自然科学研究機構	研究補助員	H18.10～H20.7
	重松 秀樹	自然科学研究機構	ポスドク	H20.4～H21.9
	稲吉 悠里	東京農工大学	修士課程2年	H20.4～
	河口 美江	自然科学研究機構	研究補助員	H20.4～
	福田 善之	自然科学研究機構	ポスドク	H.21.4～H21.9

② 研究項目

- i) 位相差法の高度化と応用
- ii) 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発

(2)「日本電子」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	大蔵 善博	日本電子(株)	チームリーダー	H18.10～
	飯島 寛文	自然科学研究機構	博士課程3年	H18.10～
	寺川 進	浜松医科大学	教授	H18.10～

② 研究項目

- i) 電子・光子ハイブリッドレンズ系の開発
- ii) 光電子銃の開発

(3)「物質・材料研究機構」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	木本 高義	物質・材料研究機構	主席研究員	H19.4～

② 研究項目

- i) 電子エミッターの開発と電子線損傷低減

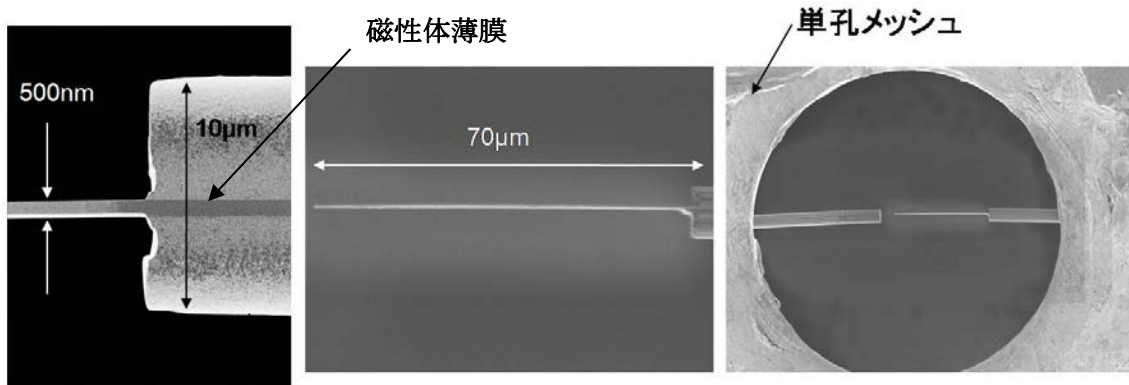
§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 位相差電子顕微鏡の高度化と応用（岡崎統合バイオ永山グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

- a. 顕微鏡用の位相板には、薄膜位相板を使う薄膜型と微小電極の静電ポテンシャルや微小磁石のベクトルポテンシャルを用いるポテンシャル型の2種がある。現在、ポテンシャル型が次世代位相板として世界的に開発されているが、永山グループではベクトルポテンシャル型を採用

図 1. FIB で作製された 10nm 径白金線より削出された AB 位相板の概観

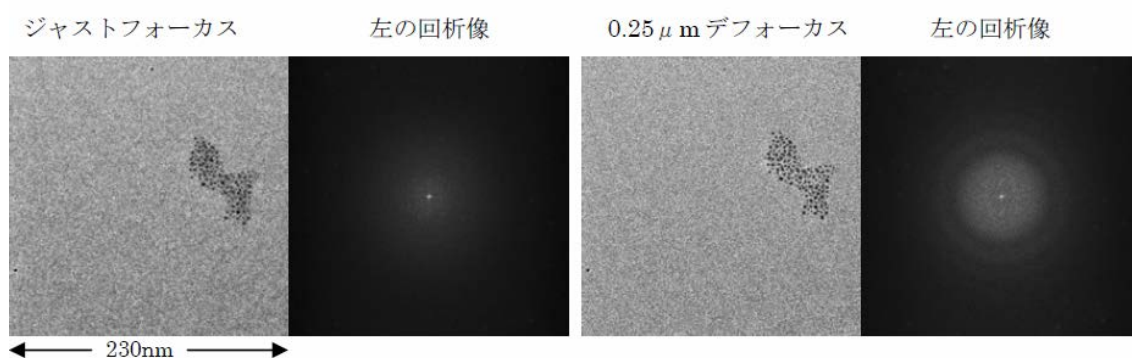


した。微細加工技術の1つFIB (Focus Ion Beam)を用いて、AB位相板用微小磁石(10~20nm厚×300~500nm幅×50~70µm長)の作製を試みた(実際には板でなく図1のような細線)。無垢の白金線(10µm)から出発して微小磁石にいたる作成プロトコルを完成し、図1に示すようにFIB切削された日本刀様ブレードの刃の上に磁性薄膜を作りAB位相板とした。金属を位相板として使う場合表面酸化物は強力な帯電源となり位相板性能を破壊する。図1に示す加工法完成後も目に見えない難問、帯電問題で苦しんだ。しかし有機物除去のための高温保持、酸化物シールドのための導電コートなどの工夫により帯電問題を解消した。

こうして製作された最良のAB位相板を用いて行った位相板性能テストの結果を図2に示した。収束電子線ビームを接触ぎりぎりにAB位相板の中央近傍に設定した時の3nm金コロイドの位相差像を通常像と比較して示した。

図 2. 3nm 金コロイドを試料とした AB 位相板の性能テスト(×50,000)

A. 位相板がない状態



B. 新規 AB 位相板によるヒルベルト微分像

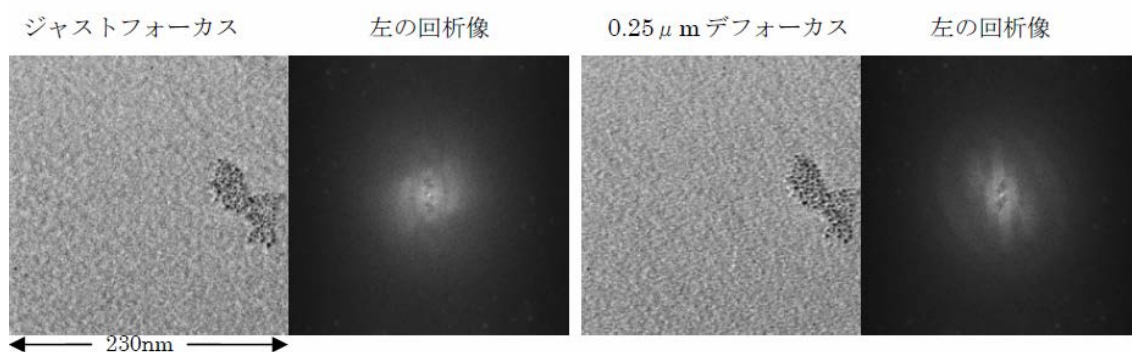


図 2A、B を比較すると新規 AB 位相板挿入時の金コロイド像は明らかにヒルベルト微分的様相を呈しており、かつコントラストは図 5A に示す通常像より高い。これはジャストフォーカス、デフォーカス両条件で同じであった。

しかし回析像に現れる CTF 性能で見ると新規 AB 位相板の Thon ring (CTF 対応) は同心円からやや外れており(傾いた平行線は図 1 に述べた電子線ビームと AB 位相板細線の距離を反映)、まだ磁束漏れがあると考えられる。しかし帯電問題は完全に解消された(特許化予定)ので残された課題、磁束漏れ問題の解決法を探索する。

b. ピエゾ制御過熱位相板ホルダーの基本体 200kV 組み込みと生物試料の低温トモグラフィー

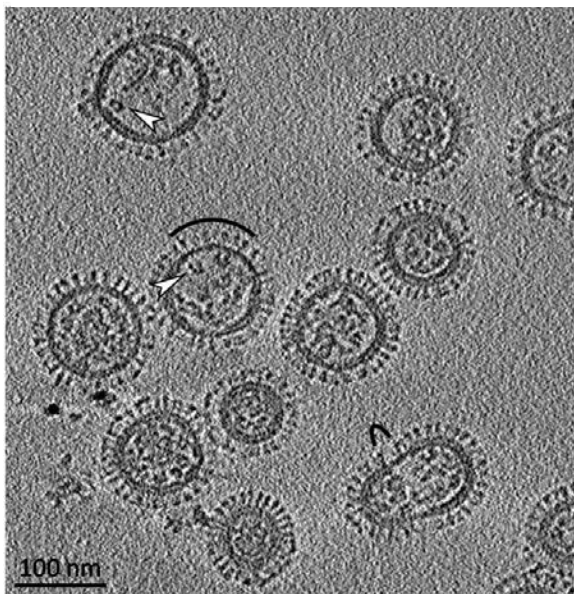
高度な位置制御を行える新規の加熱型位相板ホルダーが、2007 年度に完成したので新規導入した。200kV 電顕に組み込み、位相差トモグラフィーを行った。低温トモグラフィーでは一回の実験で傾斜角度の異なる 100 枚近い投影像を扱う。このとき 1 枚当たりの電子線照射量が 1/100 となるため、像が見えなくなる。高コントラスト像を示す位相差法はこの内在的問題を解決し、ウイルスにつき図 3 に示すように位相差トモグラフィーの有効性を示すことができた。その成果はいくつかの論文として発表された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

(a) AB 位相板は無損失となるので現状の位相差法のコントラストを 100kV で 2 倍、200kV で 1.4 倍、300kV で 1.25 倍それぞれ改善できる。これにより蛋白質、ウイルス、細胞などの構造解析に高分解能化が図られる。

(b) トモグラフィーによる立体構造解析はウイルス、オルガネラの内部構造を 3 次的に表現できる強力な手法である。AB 位相板と組み合わせられればたとえばウイルス内ゲノム立体構造等の新しい形態学研究が切り拓かれ医学応用が展開される。

a. 通常トモグラム(デフォーカス条件)
(Harris et al., PNAS(2006))



b. 位相差トモグラム (正焦点条件)

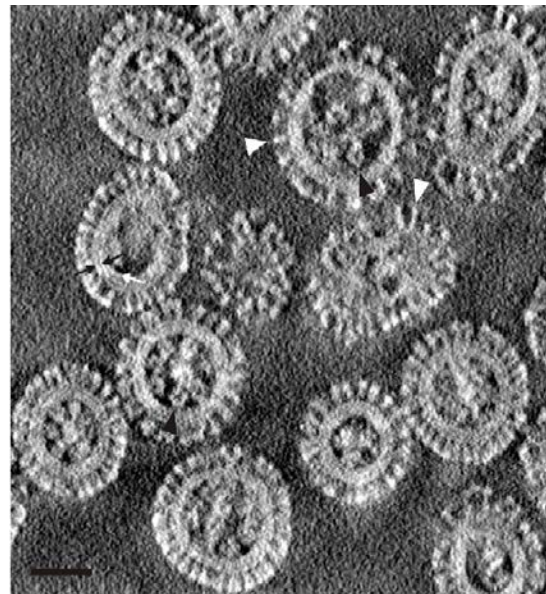


図 3. インフルエンザウイルストモグラム像(断層像)の通常法と位相差法の比較

4.2 パルス光電子による電子線損傷低減法の開発 (物材研 木本グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

光電子銃を作製する装置(真空蒸着によってエミッター先端の微小領域にセシウムとアンチモンを付着させ、高効率光電子発生体セシウムアンチモン(Cs_3Sb)薄膜を形成させる装置)の開発を行った。 Cs_3Sb は可視光励起という特徴を持つが、酸素下にさらされると量子効率が急速に低下して光電子を放出しなくなる。正しく機能する光電子エミッター作製のため、性能評価も行える以下の特徴を持つ装置を作製した。

- i) 陰極先端の近くに微小穴のある「蒸着絞」を置く、ii) 陰極先端の中心の同じ領域に Cs と Sb が蒸着、iii) 上記のための軸合わせ用光学系を真空外に置く、iv) 作動排気により、蒸着中も陰極収納室は高真空、v) 陰極先端にレーザー照射して、光電子の量を計測、vi) エミッター先端部をペルチェ冷却し、量子効率を高める、vii) 陰極先端を密閉カバーで覆い外部に取り出せる。

図 4 に概観を示す。また光電子エミッター作製装置を用いて図5に示す光電子エミッターを作製し、性能を検定した。Cs₃Sb は極めて容易に酸化するため Cs と Sb の交互蒸着において新規工夫を行い酸化防止と Cs₃Sb 合成を行った。

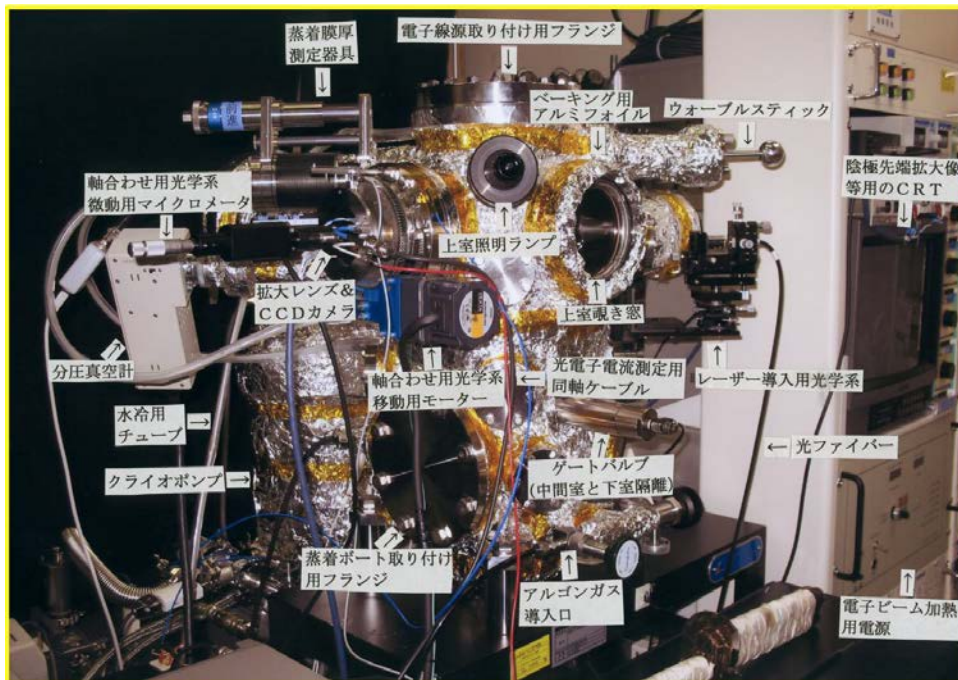


図 4. 光電子エミッター作製装置の概観



図 5. Cs₃Sb 形成テスト後に撮影した陰極ユニットの写真

図 5 に示す細かい陰極先端に 1kV の負電圧を印加し、陰極先端部で直径が約 1mm となるように集光調整をしたアルゴンイオンレーザー(波長 488nm)を照射しながら、Cs₃Sb 化合物作製のため陰極先端部を-20℃から徐々に 80℃まで加熱した。その結果 0.085 μA の電流が検出された。フォトダイオードヘッドでレーザー光を遮断すると電流値は 0.000 μA となった。ちなみに、488nm の波長のレーザー光が 0.55mW (推定値) の強度だけ照射されて 0.085 μA の光電子が発生することから、量子効率 は 0.0394% と計算される。波長 488nm での Cs₃Sb の最大量子効率は約 10% であるので、これよりも約 250 分の 1 と極めて低い。しかし光電子による電流は確認された。今後はこの量子効率の向上を図る。

(2) 研究成果の今後期待される成果

安定に稼働する可視光光電子銃が完成できれば電顕コミュニティには良いニュースであり、各メーカーにおいて電子顕微鏡の新光源としてその性能をテストされ実用化が図られよう。

4.3 電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発 (岡崎統合バイオ永山 G、日本電子大蔵 G)

(1) 研究実施内容及び成果

市販光学対物レンズを装着可能なハイブリッド顕微鏡の外観を図 6A に、デザインを図 6B に示す。

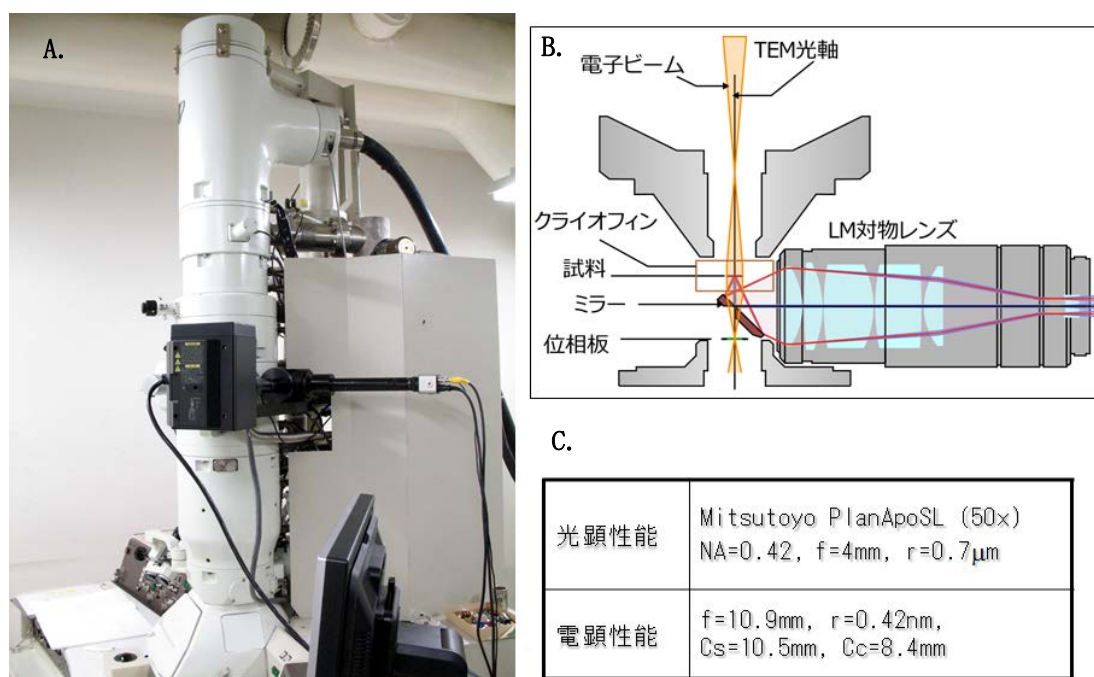


図 6. 電子・光子ハイブリッド顕微鏡 概観(A)、デザイン(B) と性能 (C)

個別的な顕微鏡の性能テストによりハイブリッドレンズ系においても電子顕微鏡分解能は 4 Å が確保され、パイロフェライトの光子像 4.5 Å が観察できた。

ハイブリッド顕微鏡性能評価観察の試みとして、DNA を蛍光染色(アクリジンオレンジ)したシアノバクテリアの電子像蛍光像同時観察をした(図 7)。その結果、同一試料の同一視野を光顕(図 7A)と電顕(図 7B)で同時に観察することができた。電顕試料は、通常光顕で扱うもの比べて極めて薄いものである。こうした超薄切片の光学像につき、今回の実験は充分性能の出ることを示した。

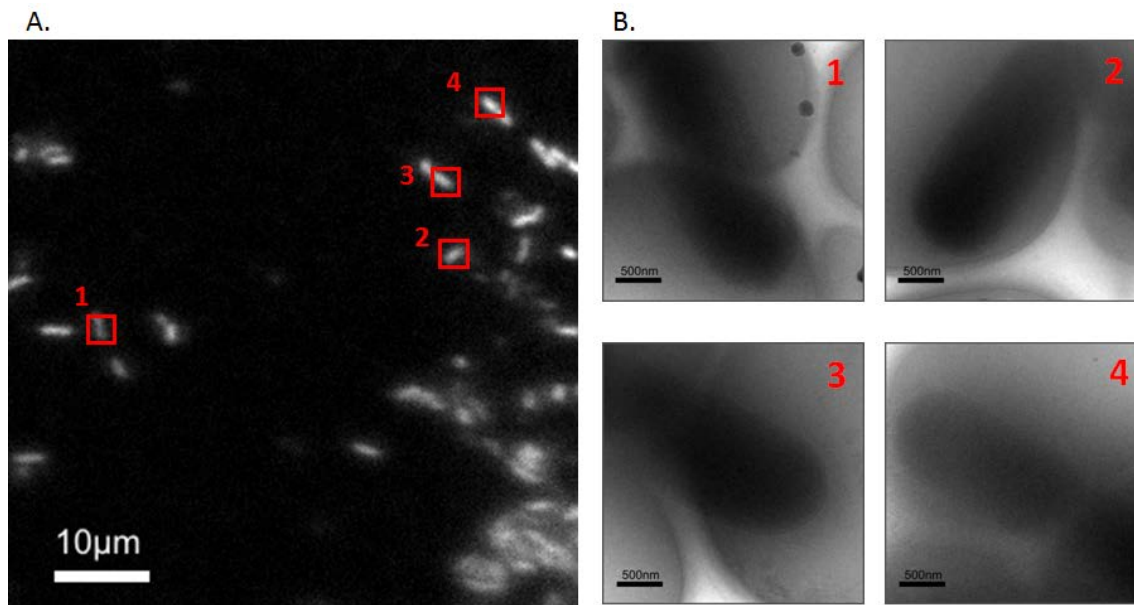


図 7. アクリジンオレンジ蛍光染色シアノバクテリアの光顕・電顕同時観察

A. 光顕蛍光像 B. 電顕明視野像 (番号は A の番号に対応)

生物試料は電子線損傷に対して極めて弱いことから、観察時には必要最低限の電子線のみを試料に照射したい。そのために要求される照射系の特性として、

- (1) 試料の大まかな視野探しは光顕で行い、撮影の瞬間のみ電子線を照射可能
- (2) 電子線量と照射範囲を独立可変とし、必要な観察領域のみに最低限の電子線を照射可能と考えられるが、従来の電顕ではこれらを実現できなかった。そこで上記の仕様を満たすハイブリッド顕微鏡を作製した。電顕像はあまりにも視野が狭いため低い確率の現象につき見たい場所を探す手間が莫大である。ハイブリッド顕微鏡はこの点を高効率化し電顕に現場性を付与することができる。

(2) 研究成果の今後期待される成果

電子・光子ハイブリッド顕微鏡は医学・生物学分野で従来独立に発展してきた光顕分野と電顕分野の融合し、顕微鏡の生物学・医学応用の新しい道を切り拓くと期待される。

4.4 雰囲気試料室の開発 (岡崎統合バイオ永山グループ)

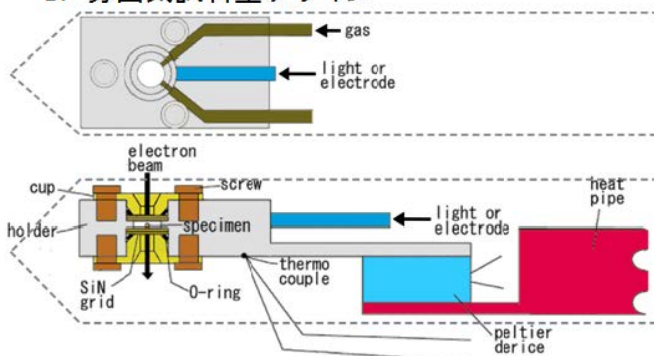
(1) 研究実施内容及び成果

炭素膜またはチッ化シリコン薄膜を窓に用いた窓開型雰囲気試料室は仕様が完全に固まり、試作段階に入った。これは日本電子の持つノウハウに温度制御、光注入制御機構を組み込んだ新規デザインである(図 8A)。新規デザインでは、試料室は完全密閉型で試料室と電顕内真空部分は炭素膜またはチッ化シリコン膜で遮断されている。試料室は外部と3か所の開口部でつながり、2ヶ所がガス流路として使われ、1か所が電極挿入光照射などに利用される(図 8B 上参照)。全体は新規デザインの試料ホルダー上に乗っている(図 8C)。

A. 雰囲気試料室外観



B. 雰囲気試料室デザイン



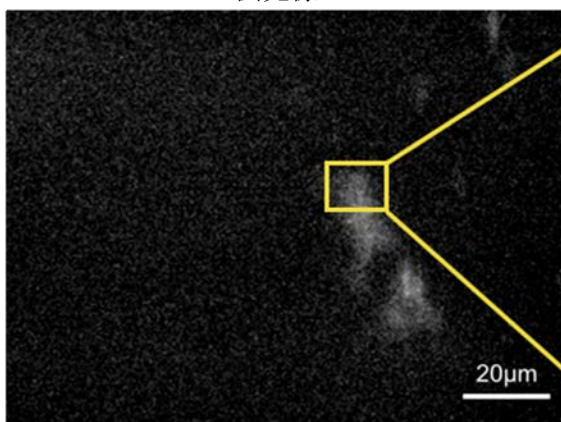
C. 雰囲気試料室ホルダー



図 8 新規デザイン雰囲気試料室とホルダー

この新規デザイン雰囲気試料室を用いて蛍光(アクリジンオレンジ)染色したシアノバクテリアの溶液条件下常温観察を行った。結果を図 9 に示す。

A. 蛍光像



B. 電顕像

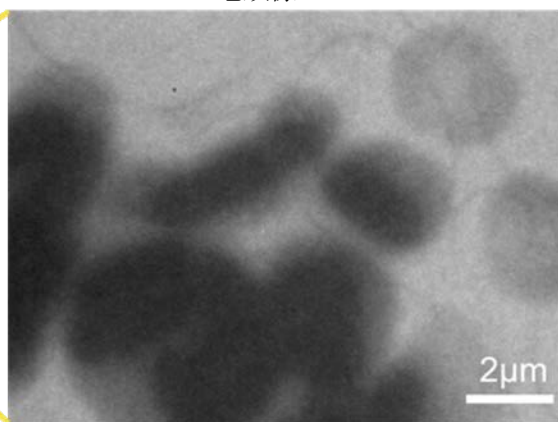


図 9 アクリジンオレンジ染色シアノバクテリアの雰囲気試料室内電子像蛍光像同時観察

蛍光像からすぐにシアノバクテリアの領域が探索され(図 9A)、そこをクローズアップすると何匹かのシアノバクテリア像が固まりとして見えた(図 9B)。今回の結果はまだ位相差像ではないが、浸水条件下での生物試料観察がハイブリッド顕微鏡と雰囲気試料室の組み合わせで可能なことが有効に示された初めての事例と言える。

(2) 研究成果の今後期待される成果

生きた生物試料の高分解能実時間観察が完成されれば生物学、医学分野での新しい応用が拓かれる。特に電子・光子ハイブリッド顕微鏡と雰囲気試料室との統合が有効性を発揮する。

§ 5 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内(和文) 0 件、国際(欧文) 4 件)

1. Kuniaki Nagayama, “Development of Phase Plates for Electron Microscopes and their Biological Application”, *Eur. Biophys. J.*, **37**(2008)345-358
2. Kuniaki Nagayama & Radostin Danev, “Phase Plate Electron Microscopy: A Novel Imaging Tool to Reveal Close-to-Life Nano-structures” *Biophys. Rev.* **1**(2009):37-42
3. Hideki Shigematsu, Takaaki Sokabe, Radostin Danev, Makoto Tominaga, and Kuniaki Nagayama, “A 3.5-nm Structure of rat TRPV4 Cation Channel Revealed by Zernike Phase-contrast Cryoelectron Microscopy”, *J. Biol. Chem.*, doi: **285**(2010)11210-11218.
4. Radostin Danev, Shuji Kanamaru, Michael Marko, Kuniaki Nagayama “Zernike Phase Contrast Cryo-Electron Tomography”, *J. Struct. Biol. in press*

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

1. 山口正、岡田仁、ダネフ ラドスティン、西山清人、菅原敬信、永山國昭(2008) 位相差顕微鏡によるウイルス観察. 顕微鏡 43:115-120.
2. 永山國昭(2008) ナノバイオロジーを切り拓く位相差電子顕微鏡. パリティ 23:30-40.

(3) 国際学会および主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内 4 件、国際 11 件)

(国内)

1. 永山國昭 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター) “An Aharonov-Bohm Design for Hilbert Differential Contrast” 2008 年度日本顕微鏡学会年会、京都、5 月 2008
2. 永山國昭 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター) “Nano-Imaging with Phase Contrast Cryoelectron Tomography” The 9th NIBB-EMBL Symposium 岡崎、4 月 2009
3. 永山國昭 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター) 「生物電子顕微鏡法の将来像 “Future Prospects of Biological Electron Microscopy”」日本顕微鏡学会創立 60 周年記念講演会、仙台、5 月 2009
4. 細木直樹、重松秀樹、寺島浩行、本間道夫、永山國昭 “Cryo-electron tomography of *Vibrio flagellar hook-basal body* with Zernike phase-contrast transmission electron microscopy”, 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009 神戸、9 月 2009

(国際)

1. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “A Submicron Design for Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate” Janelia Workshop on Electron Microscopy, Ashburn (USA), September 2008
2. Radostin Danev (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “In-focus phase contrast will lead to a major expansion of what cryo-EM can contribute to structural biology” Janelia Workshop on Electron Microscopy, Ashburn (USA), September 2008.
3. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “An Aharonov-Bohm Effect Design for Hilbert Differential Phase Plate” APMC9, Jeju (Korea), November 2008.
4. Radostin Danev (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “The Structure of *Helicobacter pylori* VacA by Zernike Phase Contrast TEM”

APMC9, Jeju (Korea), November 2008.

5. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “A Submicron Design for an Aharonov-Bohm Effect Hilbert Differential Phase Plate” 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging”, Okazaki (Japan), November 2009.
6. Radostin Danev (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “Zernike Phase Contrast for Single Particles and Cryotomography” 39th NIPS International Symposium/ 7th OIB Symposium “Frontiers of Biological Imaging: Synergy of the Advanced Techniques”, Okazaki (Japan), November 2009
7. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “In Vivo Electron Microscopy for Biological Specimens from Virus to Brain”, The 6th Asian Biophysics Association Symposium, Hong Kong, January 2009.
8. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “Phase Contrast Cryo-electron Tomography Reveals Close-to-life Ultrastructures in Three Dimension”, Joint Intl. Conference on Biophysics & 14th Annual Conf. Biophys. Soc. ROC, Tainan (Taiwan). June 2009
9. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “Phase Plate Electron Microscopy Revealing Close-to-Life Nano-Structure for Specimens from Protein to Brain”, 7th Iberoamerican Congress of Biophysics 2009, Rio de Janeiro (Brazil), September 2009
10. Nagayama Kuniaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institutes of Natural Sciences), “Phase Plate Electron Microscopy Revealing Close-to-Life Nano-Structure for Specimens from Protein to Tissues”, The 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology GAP, Diyarbakir (Turkey), October 2009
11. Hiroki Minoda, Yuhri Inayoshi, Yoshihiro Arai, Kuniaki Nagayama, “Development of the direct observation of protein motion in aqueous solution using phase contrast Environmental TEM”, JST/CREST symposium Watching Biomolecules in Action, Osaka (Japan), December 2009 発表予定

② 口頭講演 (国内 8 件、国際 0 件)

1. 重松秀樹 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター) “Structural analysis of recombinant channel proteins by cryo TEM” 2008 年度日本顕微鏡学会年会、京都、5 月 2008
2. 飯島寛文 (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター) 「電子・光子ハイブリッド顕微鏡の開発」2008 年度日本顕微鏡学会年会、京都、5 月 2008.
3. 稲吉悠里 (東京農工大学) 「溶液中生体高分子の直接観察への位相差透過電子顕微鏡法の適用」日本物理学会第 64 回年次大会、立教大学 3 月 2009.
4. 飯島寛文、新井善弘、寺川進、永山國昭 「高性能光子-電子ハイブリッド顕微鏡の開発」日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月 2009
5. 永山國昭、大河原浩、Danev Radostin、伊藤俊之、喜多山篤 「アハラノフ・ボーム (AB) 効果位相子の作製法と性能評価」日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月 2009
6. Danev Radostin, Nagayama Kuniaki “Phase contrast cryotomography of viruses” 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月 2009
7. 稲吉悠里、岡部経弘、箕田弘喜 「位相差法を用いた透過電子顕微鏡による生きた生体高分子の観察へ向けて」日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月 2009
8. 稲吉悠里、岡部経弘、箕田弘喜 「位相差透過電子顕微鏡法による溶液中生体高分子の直接観察へ向けて」日本物理学会 2009 年秋季大会 熊本、9 月 2009

③ ポスター発表 (国内 2 件、国際 0 件)

1. 細木直樹、重松秀樹、寺嶋浩行、本間道夫、永山國昭 “Phase contrast cryo-electron tomography of vibrio flagellar hook-basal body” 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月、

2009

2. Murata Kazuyoshi, Liu Xiangan, Danev Radostin, Nagayama Kuniaki, Chiu Wah “Evaluation of Zernike phase contrast image at subnanometer resolution”, 日本顕微鏡学会第 65 回学術講演会 仙台、5 月、2009

(4) 知財出願

- ① 国内出願：(1 件)
「複合顕微鏡装置」、特願 2010-088201(2010 年 4 月 6 日)、永山國昭、新井善博、飯島寛文、寺川進(自然科学研究機構、日本電子(株)、Nagayama IP Holdings)
- ② 海外出願：(0 件)
- ③ その他の知的財産権：なし

(5) 受賞・報道等

- ① 受賞：なし
- ② 新聞報道：
 1. 読売新聞 (2009 年 5 月 21 日夕刊)
“インフルなぜ流行ーウイルス変異繰り返す” A型ウイルス電顕断層像
 2. 信濃毎日新聞 (2009 年 6 月 22 日朝刊)
“A型インフルエンザウイルス鮮明に撮影” 位相差電子顕微鏡の断層像で内部構造示す
- ③ その他の成果発表：なし

(6) 成果展開事例

- ① 実用化に向けての展開
なし
- ② 社会還元的な展開活動
 - ・ 本研究成果について、アウトリーチ活動として、第 51 回愛知小児科医会総会にて講演「電子線 CT で観る蛋白質、ウイルス、ニューロンの立体世界」を行った。

§ 6 研究期間中の主な活動 (ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2008 年 11 月 10 日～12 日	“Frontiers of Biological Imaging”, The 39 th NIPS International Symposium	岡崎	120 人	各種イメージング法の最先端開発につき紹介し将来展望した。CREST も一部協力

§ 7 結び

4 種の要素技術を開発し、それを統合することで生物試料の実時間高分解能観察を目指した。電顕コミュニティとして完全に未踏の技術光電子銃の開発は必ずしも最終結果に到達しなかったが、位相差法の応用として電子・光子ハイブリッド位相差 live imaging 法がスタートできたと考えている。また位相差法の高度化としてのトモグラフィーはそれ自体で将来の応用可能性を示し得たと思う。一度に4つの要素技術を3年半で全て開発することは、研究費の抑制、我々の研究能力、地の利を考えると無謀であったが、電顕コミュニティとメーカーの協力で約 9 割の目標結果は得られたと自己評価している。