

スズで還元し、生じた青色（モリブデンブルー、660 nm）の吸光度を測定することによって行った。

C. 研究結果

1. Lon プロテアーゼの基質特異性（切断箇所）の解析

大腸菌では、Lon プロテアーゼは細胞内の変性タンパク質などの構造異常タンパク質の分解に関与しているほか、いくつかの特異的な基質タンパク質が知られている。そのうちの1つ SulA タンパク質は Lon プロテアーゼによる分解を通じて細胞分裂を調節している。この SulA タンパク質が大腸菌 Lon プロテアーゼによって分解される際の切断部位とその前後の配列を解析し、その認識機構を推定した。SulA タンパク質は約 27 箇所切断され（図 1）、そのうち比較的速く切断される切断部位は 6 箇所あるが、その P₁ 部位（ペプチド配列を N 末端から C 末端の方向に並べた場合の切断箇所の直前のアミノ酸残基）は Leu で、P₁' 部位（切断箇所の直後のアミノ酸残基）は Ser であることが多いことがわかった（表 1）。また、これらの切断箇所では P₂ から P₃ 部位（切断箇所の 2 から 5 残基上流のアミノ酸残基）に Gln が 1 つまたは 2 つ現れているという特徴がある。Lon プロテアーゼは ATP 依存性プロテアーゼであり、これらの箇所の切断に関しても ATP 存在下で切断効率が大きく上昇していた。これらの切断箇所は SulA タンパク質の中央部分から C 末端領域の一部にかけて存在するが、この領域は SulA の細胞分裂調節機能に重要な領域で、 α ヘリックスや β 構造を取っていると予想され、これらの構造を

ほぐすために ATP のエネルギーが使われていると推測される。他方、比較的柔軟な構造を取っていると考えられる N 末端付近や C 末端付近には ATP 非依存的に切断される箇所が存在した（図 1 の白矢尻）。

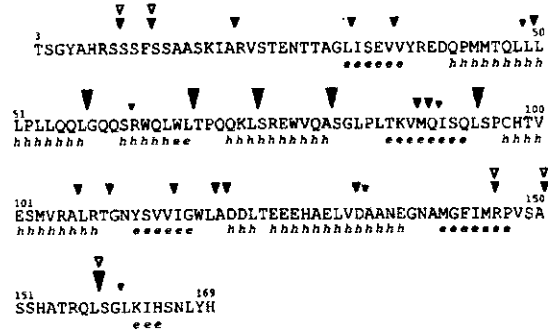


図 1. 大腸菌 Lon プロテアーゼによる大腸菌 SulA タンパク質の切断箇所。黒い矢尻は ATP 存在下、白抜き矢尻は ATP 非存在下での切断箇所を示す。矢尻の大きさ（3 段階）は切断速度を示す。二次構造予測プログラムにより推定された二次構造を h (α ヘリックス)、e (β 構造)で示している。

表 1. 大腸菌 Lon プロテアーゼによる大腸菌 SulA タンパク質の主な切断箇所。

切断箇所										
P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	
W	Q	L	W	L ₆₇	T ₆₈	P	Q	Q	K	
L	L	Q	Q	L ₅₇	G ₅₈	Q	Q	S	R	
E	W	V	Q	A ₈₀	S ₈₁	G	L	P	L	
A	T	R	Q	L ₁₅₈	S ₁₅₉	G	L	K	I	
P	Q	Q	K	L ₇₃	S ₇₄	R	E	W	V	
Q	I	S	Q	L ₉₄	S ₉₅	P	C	H	T	

2. Lon プロテアーゼの活性発現機構

大腸菌 Lon プロテアーゼは活性残基にセリンをもつセリンプロテアーゼであるが、SH 修飾剤ヨードアセトアミドで失活することから、活性に必須となるシステイン残基の存在が示唆されていた。Lon プロテアーゼは 1 種のサブユニットの多量体であるが、そのサブユニットは大腸菌では 784 アミノ酸残基からなり（分子量 87,564）、

システイン残基が6つ含まれるため、その特定はなされていなかった。われわれは Lon プロテアーゼの立体構造の解明をめざし、結晶化に適していることが期待される高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の Lon プロテアーゼの遺伝子 (*lon*) の単離を行い、その大腸菌内での大量発現と精製法を確立してきた。高度好熱菌の Lon プロテアーゼサブユニットは785アミノ酸残基からなるが、そのなかにシステイン残基は1つしか含まれていなかった (Cys_{357})。この残基は進化の過程での保存性が非常に高い (図省略)。そこでこのシステインをアラニンに変換したが、活性の変化は蛍光発生的ペプチド基質 Suc-Phe-Leu-Phe-MNA に対する K_M が2倍に上昇しただけであった (表2)。したがって、このシステイン残基は基質ペプチドの結合に関与していることになる。面白いことに、このシステイン残基は ATP 結合モチーフに近接しているにもかかわらず (図2a)、ATP に対する反応速度論的パラメータ (K_M , k_{cat}) に変化はない (表3)。さらにこの変異体 (S357A) は、システイン残基を1つも含まないにもかかわらず、野生型のものと同程度 SH 修飾剤により失活した (図省略)。そこで、SH 修飾剤がシステイン以外の残基を修飾していることを検討するため、S357A 変異体を SH 修飾剤モノプロモビマンで修飾し、AP1 (リシルエンドペプチダーゼ) で完全消化してペプチド解析を行った結果、 His_{324} が修飾されていることがわかった。この残基も進化の過程での保存性が高い (図省略)。これをチロシンに置換した変異体 (H324Y) のプロテアーゼ活性の k_{cat} (pH 7.3) は 1/10 に低下していた

が、高い pH (pH 8.9) では野生型と同程度の活性を示す (表2、図2b) ことから His_{324} は中性の pH において活性に関与する残基の電子、あるいは水素イオンの授受を補佐していると考えられる。

表2. 各変異体 Lon のペプチダーゼ活性

基質:	pH 7.3		pH 8.9	
	k_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)
wt	0.39	53	1.7	220
C357A	0.51	100	n.a.	n.a.
H324Y	0.036	7.1	1.2	130

表3. 各変異体 Lon の ATP アーゼ活性

基質: ATP	pH 7.3		pH 8.9	
	k_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (sec^{-1})	K_M (μM)
wt	1.0	570	1.4	400
C357A	1.1	580	n.a.	n.a.
H324Y	0.56	230	1.2	280

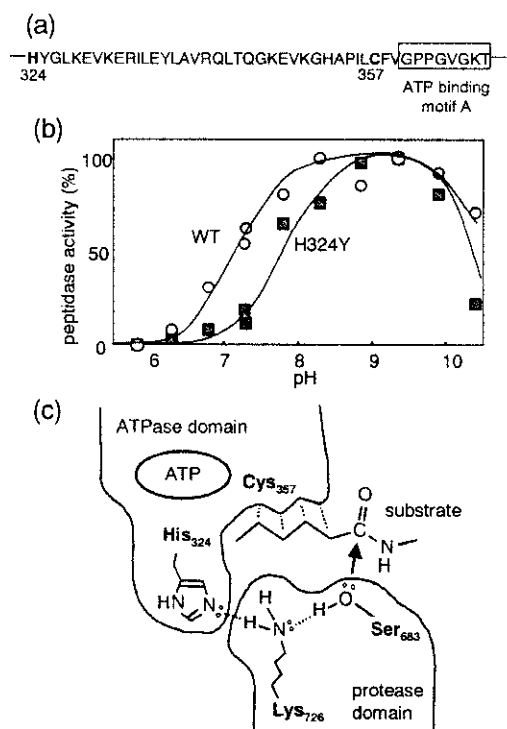


図2. (a) Cys_{357} および His_{324} の ATP 結合モチーフとの位置関係。(b) H324Y 変異体のペプチダーゼ活性の pH 依存性。(c) 推定活性発現機構。

D. 考察

1. Lon の認識する配列

Lon プロテアーゼによるペプチド結合切断反応では、 P_1 部位は Leu、 P_1' 部位は Ser、 P_2 から P_5 の間に Gln が (1 つまたは 2 つ) 含まれる箇所が好まれることが、明らかとなった。これまでにも、いくつかのペプチド基質を用いて Lon プロテアーゼによる切断反応における切断部位の解析が行われてきたが、切断箇所周辺にはっきりとした規則性を見出すにいたらず、基質の高次構造を認識するのではないかと考えられてきたが、どのような構造を認識するか、ということについて全くわからなかった。ところが、他のすべてのプロテアーゼと同様に Lon プロテアーゼにおいても、切断箇所周辺の配列特異性というものが存在すると考えるほうが自然であろう。このようなことから考えても、今回、Lon による切断箇所周辺の配列のはっきりした規則性が見出されたのは画期的なことである。

2. Lon のプロテアーゼ活性発現機構

キモトリプシンなどの典型的なセリンプロテアーゼでは、Ser-His-Asp の三つ組み触媒 (catalytic triad) 機構が知られているが、Lon プロテアーゼでは活性残基 Ser 以外の Asp 残基、His 残基は見つからず、His-Asp の代わりに Ser 残基の約 40 残基 C 末端側に存在する保存性の高い Lys 残基が活性残基 Ser の水素イオンの引き抜きに関与しているという考え方が提案されている (catalytic dyad)。好熱菌 Lon プロテアーゼでは Lys₇₂₆ がこれに相当し、これをアラニンに変換した変異体ではプロテアーゼ活性が完全に失われた (データ省略)。こ

れと、今回得られた His₃₂₄ 変異体の結果をあわせ、図 2c に示すメカニズムを考えている。Lys₇₂₆ の変異体が完全に活性を失うのに対し、His₃₂₄ の変異体はプロテアーゼ活性の pH 依存性の変化にとどまることから、Ser₆₈₃-Lys₇₂₆-His₃₂₄ が通常のカリシムプロテアーゼの catalytic triad の代わりをしているとまではいかず、His₃₂₄ の役割は Ser-Lys dyad の Lys の陰性度を高めることにより、中性領域での活性を高める作用をしているという程度であろう。

3. プロテアーゼドメインと ATP アーゼドメインの近接

以上に示したように、His₃₂₄ は Lon プロテアーゼのプロテアーゼ活性に影響を及ぼしていることがわかった。ところが、これはプロテアーゼドメイン内に存在しているのではなく、ATP 結合モチーフの 36 残基 N 端側に存在することから ATP アーゼドメインに含まれていると考えられる。また、Cys₃₅₇ についても、ATP 結合モチーフのすぐ 2 残基 N 端側に存在するにもかかわらず、ATP アーゼの活性には影響を及ぼさず、ペプチド基質に対する K_M の上昇のみが見られることから、この残基はペプチド基質の結合に関与しているらしい。このようなことから考えると、Lon プロテアーゼにおいてはプロテアーゼドメインと ATP アーゼドメインが接触し、ペプチド/タンパク質結合部位を形作っているのかもしれない (図 2c)。これは、26S プロテアソームなどの円筒の内部にプロテアーゼ活性中心をもち、円筒の両端に ATP アーゼ複合体を配しているような形とはまったく異なる可能性を示しており、ATP 依存

的なペプチド結合切断活性の発現機構もこれらと異なっていると考えられる。

E. 結論

サルモネラ菌などの胃腸粘膜への感染の際に果たす Lon プロテアーゼの役割は大きく、lon 破壊株では感染能が低下するだけでなく、これらのマウスへの経口投与はマウスのサルモネラへの抵抗性を著しく上昇させるという報告もある。このことは、Lon プロテアーゼの阻害剤を開発すれば、これらの細菌感染による食中毒や炎症反応の予防・治療法につながると考えられる。このためには、Lon プロテアーゼの基質特異性や活性発現機構を明らかにする必要があり、本研究もこのような考えに基づいて行われている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wataru Nishii, Takafumi Maruyama, Rieko Matsuoka, Tomonari Muramatsu, and Kenji Takahashi : The unique sites in Sula protein preferentially cleaved by ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* **269**, 451-457 (2002)

2) Yoriko Sawano, Tomonari Muramatsu, Ken-ichi Hatano, Koji Nagata, and Masaru Tanokura : Characterization of genomic sequence coding for bromelain inhibitors in pineapple and expression of its recombinant isoform, *J. Biol. Chem.* **277**, 28222-28227 (2002)

2. 学会発表

1) 村松知成, 青柳一彦, 佐々木博己, 北中千史, 口野嘉幸 : ヒト GALGT2 遺伝子とその発現制御, 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年 10 月

2) 村松知成, 伊藤三恵, 湯元史明, 足立恭子, 田之倉優 : 真核生物 eRF1 終止コドン認識ドメインの立体構造解析, 第 75 回日本生化学会大会, 2002 年 10 月

3) 西井亘, 村松知成, 高橋健治 : ATP 依存性プロテアーゼ Lon の安定性に及ぼす ATP とそのアナログの影響, 第 75 回日本生化学会大会, 示説, 2002 年 10 月

4) 村松知成, 小田佳史, 湯元史明, 伊藤三恵, 田之倉優 : 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 による終止コドンの多重認識メカニズム, 第 11 回日本バイオイメーjing学会学術集会, 2002 年 10 月

5) 村松知成, 小田佳史, 湯本史明, 伊藤三恵, 田之倉優 : 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 の構造と終止コドン認識メカニズム, 第 25 回日本分子生物学会年会, 2002 年 12 月

6) 澤野頼子, 秦野賢一, 村松知成, 永田宏次, 田之倉優 : パイナップル (*Ananas comosus*) 由来プロメラインインヒビターの構造機能相関の解析, 第 25 回日本分子生物学会年会, 2002 年 12 月

7) 村松知成, 小田佳史, 湯本史明, 伊藤三恵, 田之倉優 : 真核生物ポリペプチド鎖終結因子 eRF1 による終止コドン認識メカニズム, 公開シンポジウム「バイオイメーjingとナノテクノロジー」, 2003 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

標識モノクローナル抗体による神経障害防御機構の解析と診断治療への応用

分担研究者 新井孝夫 東京理科大学工学部応用生物科学科教授
研究協力者 大内 敬 東京理科大学工学部応用生物科学科助手

研究要旨

活性酸素による神経細胞死を防御する薬物のスクリーニング系を開発し、このような効果をもつモノクローナル抗体と微生物代謝産物を得、それらの防御機構についての予備的な研究を行った。また、蛍光標識モノクローナル抗体をリポソーム法により生細胞内に導入し、細胞骨格の動的変化をイメージングした。

A. 研究目的

成熟した個体における神経細胞死は、異常に活性化したミクログリアから放出される活性酸素類 (O_2 , $OCIO$, $ONOO$ など) により引き起こされると考えられており、これが神経疾患の原因のひとつと言われている。本研究の目的は、(1)活性酸素による神経細胞死の防御効果を有するモノクローナル抗体を作製し、(2)標識したこの抗体をもちいて神経障害の防御機構を解析し、診断治療への応用を検討することである。本年度は、(1)活性酸素による細胞死を防御する薬物のスクリーニング系の確立とモノクローナル抗体の作製、(2) 標識抗体の生細胞内導入をイメージングに応用する際の基礎技術の検討を目的とした。

B. 研究方法

1. 初代培養細胞の調製

ラット胎児脳 (E17) の軟膜を剥離し、ピペッティングにより懸濁後、bFGF を混

入した DF 培地で 7 日間培養した。96 ウェルプレートに DF 培地を用いて蒔き、スクリーニングに使用した。

2. 活性酸素による細胞死の測定

ペルオキシナイトライト供与剤として SIN-1 を、SOD 阻害剤としてジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム三水和物 (DDC) を活性酸素による細胞死誘導剤として用いた。生細胞数測定は、細胞数計測キット (kit-8) を用いた。

3. リポソーム法による抗体の細胞内導入

モノクローナル抗体とカチオン性脂質リポフェクトアミン (1%) を導入溶液 OPTI-MEN 中で室温、1 時間混合した。あらかじめ培養しておいたアストロサイトまたは繊維芽細胞株 3Y1 細胞を OPTI-MEN で洗浄後、モノクローナル抗体・リポフェクトアミン混合液を加え、炭酸ガスインキュベーター中 ($37^{\circ}C$, $5\% CO_2$) で 3 時間反応させた。

生細胞への抗体導入効率は、Cell ELISA 法により確認した。

(倫理面への配慮)

実験動物の動物愛護上の配慮は、本大学実験施設の指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. 活性酸素による神経細胞死の防御効果をもつモノクローナル抗体の作製

1-1 スクリーニング系の確立

ラット胎児脳初代培養細胞の培養条件、SIN-1、DDC 濃度の検討を行い、図1のようなスクリーニング系を確立した。この系の信頼性は、bFGF の神経細胞死防御効果が測定できることにより確認した。

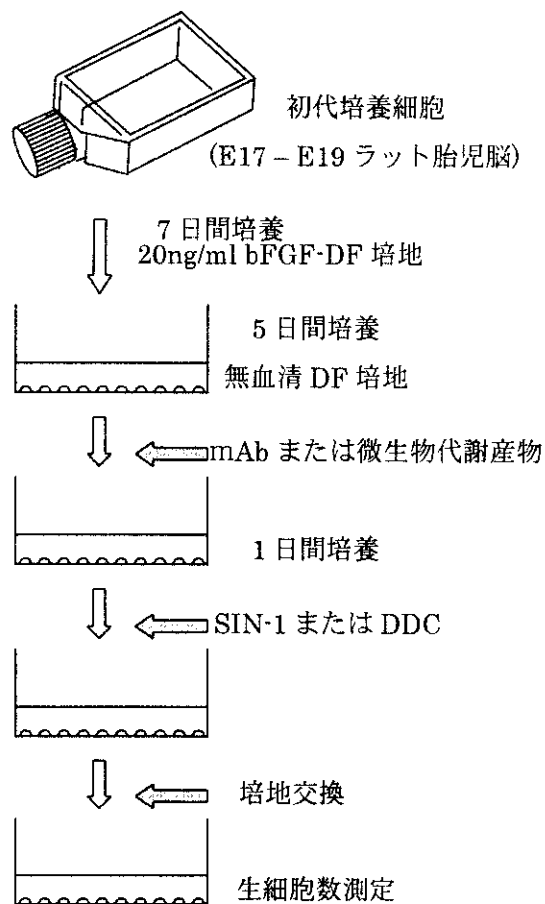


図1 活性酸素による神経細胞死の防御効果をもつ薬物のスクリーニング系

図1の系を 20,000 種のモノクローナル抗体、200 種の微生物代謝産物に適用し、モノクローナル抗体 DT-1 と微生物代謝産物ネオエキヌリン A がそれぞれ、DDC と SIN-1 による細胞死を特異的に防御することを見いだした (図2)。

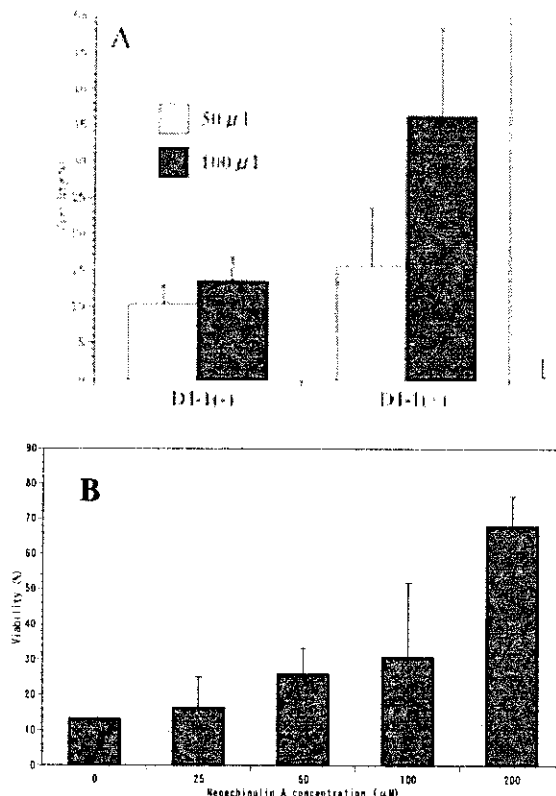


図2 モノクローナル抗体と微生物代謝産物による神経細胞死の防御
(a)DT-1、(b)ネオエキヌリン A

1-2 DT-1 とネオエキヌリン A の作用機構の解析

モノクローナル抗体 DT-1 は、初代神経培養細胞のグリア細胞表層を特異的に染色した。一方、ネオエキヌリン A は、ONOO⁻ に特異的なスカベンジャー活性を有していた (図3)。また、細胞死の防御効果が細胞の種類によって異なり、この物質とあらか

じめ反応させれば SIN-1 添加時に存在しない場合でも細胞死は防御された。

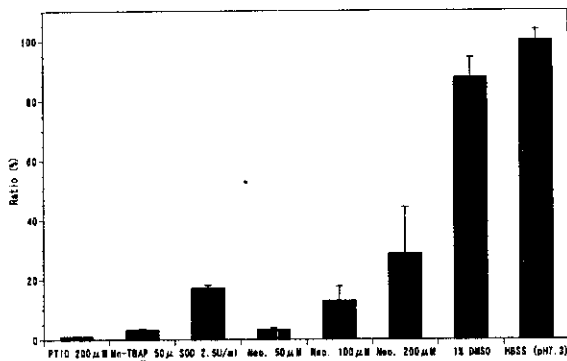


図3 ネオエキヌリンAのONOO⁻スカベンジャー活性

2. リポソーム法のイメージングへの応用

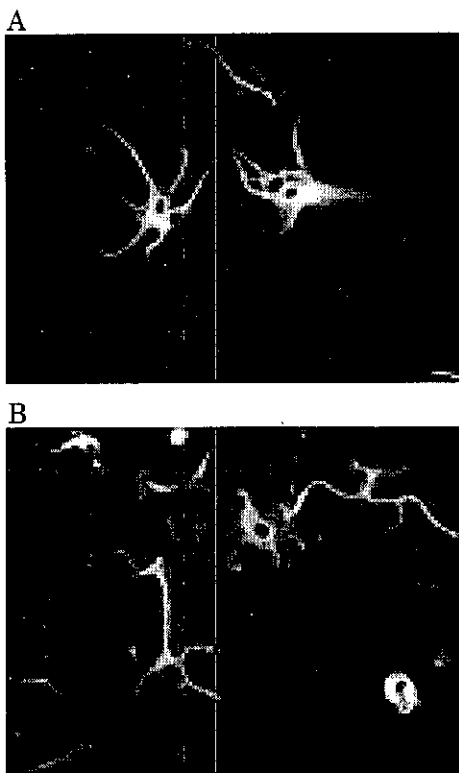


図4 リポソーム法によるアストロサイ
細胞骨格のイメージング

(A)リポソーム法、(B)通常法
蛍光色素標識抗 GFP (グリア線維性酸性

タンパク質)モノクローナル抗体をリポソーム法により生きているアストロサイトに導入した。この方法により観察されるグリア細胞の細胞骨格の蛍光像は、固定細胞を蛍光免疫染色する通常法と同程度の鮮明な像を得ることができた(図4)。さらに、細胞の形態変化に伴う細胞骨格の動的変化の観察にも成功した。

D. 考察

モノクローナル抗体 DT-1 が神経細胞ではなくグリア細胞表層を染色したことは、この抗体がグリア細胞からの栄養因子等の分泌を促進している可能性が考えられる。

ネオエキヌリンAは、活性酸素の消去と細胞生存促進の二つの作用を有している可能性がある。この薬物は、神経障害機構の解析と診断治療への応用に有用なものと考えられ、このような作用をもつモノクローナル抗体の開発の重要性を示唆する。

E. 結論

活性酸素による神経細胞死の防御活性をもつ物質のスクリーニング系を開発し、このような活性をもつモノクローナル抗体 DT-1 と微生物代謝産物ネオエキヌリンAを得た。DT-1については、グリア細胞の表面分子に作用すると考えられる。また、ネオエキヌリンAについては、活性酸素に対してスカベンジャーとして、細胞に対して生存促進活性をもつことを示唆している。以上のことは、次年度以降の課題の遂行に重要な知見と思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi, R., Suzuki, W., Seki, N., Kohyama, M., Inoue, T., Arai, T. and Kubo, M. (2002) The IL-4 production capability of different strains of native CD4+ T cells controls the differentiation of the helper T cell response. *Int. Immunol.* 14, 1-11.
- 2) Yagi, R., Nagai, H., Iigo, Y., Akimoto, T., Arai, T. and Kubo, M. (2002) Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J. Immunol.* 168, 2020-2027.
- 3) Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D. M. A., and Iwatsubo, T. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J.* 21, 1524-1534 (2002)
- 4) Ohuchi, T., Maruoka, S., Sakudo, A., Arai, T. Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation. *J. Neurosci. Methods* 118, 1-8 (2002)
- 5) Namekawa, S., Hamada, F., Sawado, T., Ishii, S., Nara T., Ishizaki, T., Ohuchi, T., Arai, T. and Sakaguchi, K. Dissociation of DNA polymerase α primase complex during meiosis in *Coprinus cinereus*, *E. J. Biochem.* in press

2. 学会発表

- 1) 吉田健二、丸山清稔、長谷川晃子、島田稔彦、大内 敬、新井孝夫：ペルオキシナ

イトライトで誘因される神経細胞死からの回避活性を持つ Neoechinulin A の作用機構の解析、第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜、2002 年 5 月

- 2) 石川広平、砂堀毅彦、鳥飼祐介、大内 敬、新井孝夫：抗 Thy-1 抗体及び抗ポリグルタミン酸化抗体による神経幹細胞分化の研究、第 55 回日本細胞生物学会大会、横浜、2002 年 5 月

- 3) 丸山清稔、吉田健二、大内 敬、菅原二三男、新井孝夫：神経細胞死を回避させる Neoechinulin A はペルオキシナイトライト消去能を有する、第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月

- 4) 大内 敬、柴田麻衣、前川原淳、新井孝夫：カチオン性脂質を用いたモノクローナル抗体導入法による細胞の機能解析、第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会、名古屋、2002 年 10 月

- 5) 石川広平、鳥飼祐介、岡田陽介、大内 敬、新井孝夫：抗 Thy-1 抗体を用いた神経幹細胞分化の研究、第 11 回日本バイオイメージング学会学術集会、名古屋、2002 年 10 月

- 6) 新井孝夫、佐々木次雄、田之倉優：血管炎の治療に有効なモノクローナル抗体作製の戦略と戦術、公開シンポジウム「血管炎の発症機構解析とその治療：IVIG 治療をめぐって」、京都、2002 年 11 月

- 7) 大内 敬、新井孝夫：モノクローナル抗体の生細胞導入のための新しい技術の開発、公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」、東京、2003 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

神経細胞再生因子の動的解析

分担研究者 霜田幸雄 東京女子医科大学 総合研究所 研究部

研究要旨

神経系の再生に関して神経幹細胞、胚性幹細胞などの幹細胞あるいは骨髄間質細胞などを用いた再生実験が多くなされている。また、神経軸索の再生についても神経成長因子あるいは神経成長阻害因子などを含めた再生機構の解析がすすめられている。本研究は神経軸索の再生に関与する物質の解析と再生の機構を解析することを目的に行った。神経軸索の再生を組織学的に電子顕微鏡レベルで観察するために魚類の視神経を用い、再生の時間的経過あるいは外部からの刺激に対する再生への影響を調べた。視神経は完全に切断された状態でも形態的には1週間で再生することが認められた。次に、培養神経芽細胞を用い神経軸索の成長および神経細胞の生存維持に及ぼす神経成長因子(nerve growth factor, 以後 NGF と略記)の効果を蛍光色素 calcein-AM を用いて検討した。NGF の投与により軸索の成長は顕著になった。また、高 K⁺に対する耐性も非投与細胞に比較して大きく増加するのが認められた。

A. 研究目的

近年、細胞再生医療の研究が盛んになり多くの臓器で研究、開発が行われている。かつて、カハールは「神経細胞は神経組織が成熟した後には分裂、増殖することはない。」と述べ、それ以来そのように理解されてきた。しかし、現代の再生医療研究から神経細胞も例外ではなく他の細胞と同様に再生することが示されるようになった。

これらのことは、パーキンソン病などの脳細胞の変性による疾患あるいは脳梗塞による神経細胞の壊死からの回復、さらには脊髄損傷といった外傷からの回復に新たな治療方法を示すものとなっている。

このような細胞再生医療において基本的なこととなっているのが幹細胞であるといえる。未分化の胚性幹細胞やある程度分化の

進んだ神経幹細胞などの細胞を用いて組織を形成させる方法である。一方、神経細胞はそれ自体再生する能力があり、軸索などの再生は比較的下等な動物ではよく知られていた。本研究の目的は損傷を受けた神経細胞の再生に関与していると考えられる物質を明らかにし、その物質の作用機序を知ることにある。初年度は損傷神経の再生の経過を組織学および生理学的に動的に検討した。

B. 研究方法

実験は大きく2つに分けられる。一つは魚類網膜の視神経を用いた電子顕微鏡による変性と再生の形態学的な観察であり、これにより神経再生の時間的な経過を観察した。他方は培養神経芽細胞による NGF の作用をレー

ザースキャン顕微鏡で動的な解析を行った。

神経軸索の再生の形態学的観察

比較的下等な脊椎動物、たとえば両生類のイモリなどでは眼球の再生についてはよく知られている。魚類の眼球は視神経の再生を観察するのに有利な形態的特徴を持っている。ほ乳類などでは眼球内を還流する動・静脈は視神経束の中を走行しているが魚類では視神経束の外側を走行している。したがって、血管を残し視神経だけを切断することが容易である。

実験には体長 18cm 前後のウグイ (*Tribolodon hakonensis*) および 25cm 前後のコイ (*Cyprinus carpio*) を用いた。動物を冷血動物用の麻酔薬 MS222 にて麻酔させ、眼球をわずかに引き出し視神経を切断した。その後、水槽に戻し飼育した。光刺激が再生に与える影響をみるために、飼育する光の条件により 24 時間全暗黒、12 時間交替の明暗、24 時間明という 3 つの群に分けた。

それぞれの群の動物について切断直後 (コントロール)、3 日目、1 週間目に眼球を摘出し網膜を剥離させ電子顕微鏡の超薄切片を作成した。電顕試料の作成および観察は従来の方法に依った。

培養細胞による NGF の効果

軸索再生を動的に観察するには視神経束では不可能であるので、ラット褐色細胞種由来の PC12 細胞 (神経芽細胞) を培養した標本を用いた。神経突起の成長を促し神経細胞

の生存を維持する作用のある因子の一つとして NGF (nerve growth factor) が知られている。軸索の再生と神経細胞の生存に対する NGF の作用を検討した。マウス神経芽細胞 (PC12 細胞) を DMEM 培養液中に FCS を加え一晩培養し、その後無血清培地で 48 時間培養した。培養液中に 200-300ng/ml の NGF を添加したものと無添加のものに分けた。培養後それぞれの群の細胞に calcein-AM を取り込ませた。Calcein-AM は生細胞では 515nm の蛍光を発するため細胞の生死を判別するために用いられることが多い。Calcein-AM を洗浄した後、顕微鏡ステージに置きレーザー共焦点顕微鏡で観察しながら、培養皿中に 20mM の KCl 液をスポット投与した。投与後の蛍光強度の変化から細胞の生・死を動的に観察した。

C. 研究結果

神経軸索の再生の形態学的観察

切断直後 (コントロール) の像に示されるように魚類の視神経は大部分が有髄神経である (付図 1)。魚類の視神経軸索の直径はおよそ 1 μ m であり、約 1 万本の神経が存在する。また、astrocyte や microglial cell も多数見られる。切断後 3 日目 (図には示していない) では、いずれの光の条件でも同じであり、神経細胞は変性していた。変性したミエリン細胞の残渣が視神経束内に多く存在した。この実験においては形態学的に観察してコントロールと同じように軸索にミエリン鞘が巻き変性したミエリン細胞が見られなくな

るのを「再生」とした。

切断後1週間全暗黒中で飼育した個体では神経は切断後3日目と同じように変性したままであり再生した神経はほとんど観察されなかった(付図2)。

一方、12時間毎の明暗を繰り返し与え飼育した個体ではその再生は顕著であり、軸索が神経束を形成しているのが見られた。また、microglial cellも神経束の周りに観察され食胞された空胞も見られた(付図3)。同じ光条件による切断後1週間目の高倍率の像(付図4)で見られるように再生した軸索はまだ髄鞘の巻き方は正常に比べては少ないが、微細構造を見ると、軸索内には通常の神経軸索に特有の構造物である neurofilaments や microtubules が観察された。

恒常的な光刺激も試みたが、再生する神経線維の比率は全暗黒のものに比較すれば多いが光を交互に照射したものに比べると少なかった。

以上のように魚類の網膜ではあるが視神経は損傷後一旦変性し、その後1週間以内に再生することが示された。

しかし、その再生に関しては明暗を繰り返す光刺激が大きな影響を与えていることが示された。これは大変興味深いことであり考察の項で述べる。

培養細胞による NGF の効果

前述のような視神経束を用いた実験では再生の動的な過程あるいは種々の神経成長因子などの効果をリアルタイムで観察する

ことはほとんど不可能である。このため神経芽細胞を用いた実験を行った。培養液中に NGF を添加した細胞では非添加のものに比較して神経突起の成長が促進されているのが見られた(付図 5A, 6A)。この図は calcein-AM で染色したもので、以下の実験のコントロールとなるものである。

図には示していないが、成長促進の効果は NGF に限らず塩基性線維芽増殖因子(bFGF)でも同様に観察できた。次に、培養液中に 20mM KCl をスポット投与しその後の変化をレーザー共焦点顕微鏡でリアルタイムに観察した。

NGF を添加した細胞では KCl 投与後も、細胞の蛍光は減弱することはなく、形態的な変化も見られなかった。すなわち高カリウムに対して耐性があることが示された(付図 5B-E)。一方、NGF 非添加の細胞群は付図 6A に示したように神経突起を出している細胞は元々少なかった。これらの細胞に KCl をスポット投与すると蛍光は急激に減弱する。とくに、比較的長い突起を出している細胞では、あたかも突起が萎縮するように見える。すなわち、これらの細胞は高カリウムによって、アポトーシスを起こしたと考えられた。この時間経過はきわめて早く、短いものでは 10 秒以内で起き始めた(付図 6B-E)。

D. 考察

神経軸索の再生の形態学的観察

視神経の再生の時間経過は魚類の網膜ということも考慮しても早い時期に起きてお

り切断後（損傷後）1週間以内には再生が始まっていることが示された。この再生が始まる前、すなわち切断後2～3日で神経細胞は変性を起こしている。一旦変性を起こした後には再生が始まるのは損傷を細胞体に伝達する物質的基盤があるのではないかと考えられた。このような物質の有無などを検討するために切断直後と切断後1週間目の視神経を摘出して中枢側、末梢側それぞれをTOFMAS（飛行時間型質量分析器）で分析した。切断後1週間目の視神経の細胞体に近い部位の断端の標本から分子量約11,000のピークが得られた。この物質がどのようなものであるかは現在のところ不明ではあるが差違があったことは興味を持たれる点である。

光刺激が神経再生に影響を与えている点もまた興味を持たれる。視神経は神経節細胞の軸索であり神経節細胞は網膜内における光情報処理の最終段階の神経細胞である。これらの細胞は直接的には双極細胞からの情報を受けている。したがって、神経節細胞は光刺激により脱分極する細胞や反対に過分極する細胞が存在する。光によって再生が促進する細胞がいずれの種類の神経節細胞であるかこの実験からは不明であるが、少なくとも膜電位変化が神経節細胞の再生を促進させている可能性があると考えられる。

培養細胞による NGF の効果

培養細胞に対する NGF の効果についてはすでに知られているが PC12 細胞においても神経突起の成長、生存率の高さなど同様の

結果が示された。

NGF の KCl に対する耐性についての分子生理学的な機構は現在のところ不明であるが、NGF 非存在下での細胞のアポトーシスは以下のように考えられている。

培養液中には 5mM KCl が含まれている。したがって、20mM KCl のスポット投与量と培養液の量から計算すると培養細胞は約 30mV 脱分極したと推定される。この脱分極は電位依存性の Ca^{2+} チャンネルを開かせるのに十分な値である。その結果、外液中の Ca^{2+} はその濃度勾配に従って細胞内に流入すると考えられる。

細胞内の Ca^{2+} の増加によるアポトーシスの機構についても完全には明らかにされてはいないが、アポトーシスに特異的なタンパク分解酵素 caspase 群の caspase-12 が関与していると考えられている。Caspase-12 は粗面小胞体膜に局在する酵素で、粗面小胞体のカルシウムホメオスタシスの異常などによって活性化される。すなわち高カリウムによる細胞内の Ca^{2+} の増加が caspase-12 を活性化されたと考えられる。この caspase-12 を介するアポトーシスの過程の詳細はまだ不明であるが、核の変性を引き起こしアポトーシスに至るものと考えられている。

NGF を添加した細胞群でアポトーシスが生じなかった機構についても不明である。実験結果的には NGF が上述の caspase-12 の活性を抑制するような働きを示しているが詳細については不明である。

E. 結果

1. 視神経の切断による神経線維の再生を電子顕微鏡レベルで経時に観察した結果、神経線維は切断後 3 日で再生が始まることが示された。
2. 視神経の再生は光刺激の影響をうけた。12 時間周期の明暗を繰り返して飼育した場合が、暗あるいは明のみに比較して再生する神経の割合が増加していた。
3. 切断後、細胞体側の段端部分に分子量約 11,000 の物質が特異的に検出された。
4. ラット褐色細胞種由来の PC12 細胞 (神経芽細胞) に NGF を添加すると神経突起状の突起が生じ細胞の生存率も高くなった。
5. NGF を添加した細胞群を高カリウム液に暴露させても細胞のアポトーシスは生じなかった。
6. NGF 非添加の細胞群では高カリウム液の暴露によって、きわめて短時間のうちにアポトーシスを生じた。

F. 研究発表

1. 霜田幸雄、呉桂栄、中西敏雄、重松康秀 肺動脈単離平滑筋における Ca イオンの動態 日本バイオイメーjing学会 第 11 回学術集会(2002)
2. 霜田幸雄、呉桂栄、中西敏雄、重松康秀 肺動脈平滑筋における Ca イオンの動態 日本バイオイメーjing学会 第 11 回学術集会(2002)
3. 霜田幸雄 膜電位感受性色素による脊椎動物網膜細胞のグルタミン酸応答の記

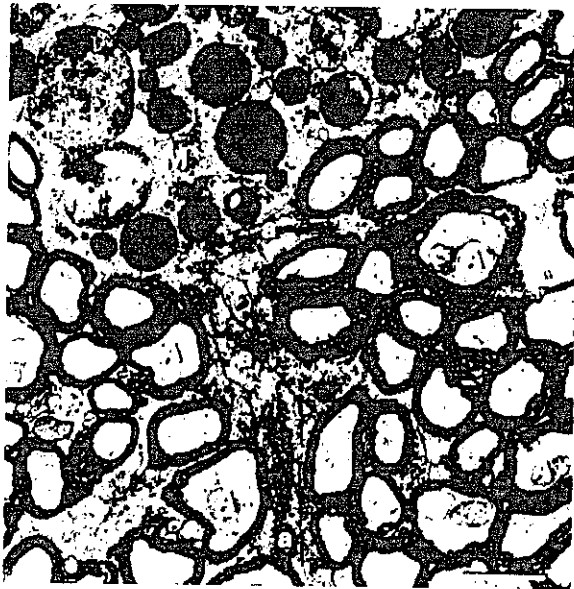


図1 切断直後の視神経束の電子顕微鏡写真
 魚類網膜の視神経は大部分が有髄神経である
 A: 視神経軸索、a: astrocytes、M: microglial cells
 較正 1 μm

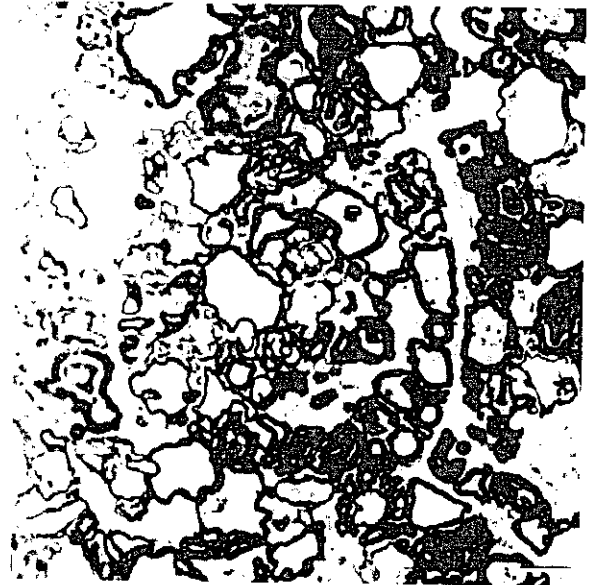


図2 切断後1週間全暗黒中で飼育したものの
 視神経束の電子顕微鏡写真
 軸索の変性が顕著であるが、とくにミエリン鞘の
 変性が著しくその残渣が多数見られる。
 較正 2 μm



図3 切断後1週間12時間周期の明暗の状態
 で飼育したときの神経軸索の再生
 再生した軸索が束状になり周囲にミクログリアが
 見られる
 A: 視神経軸索、M: microglial cells
 較正 2 μm

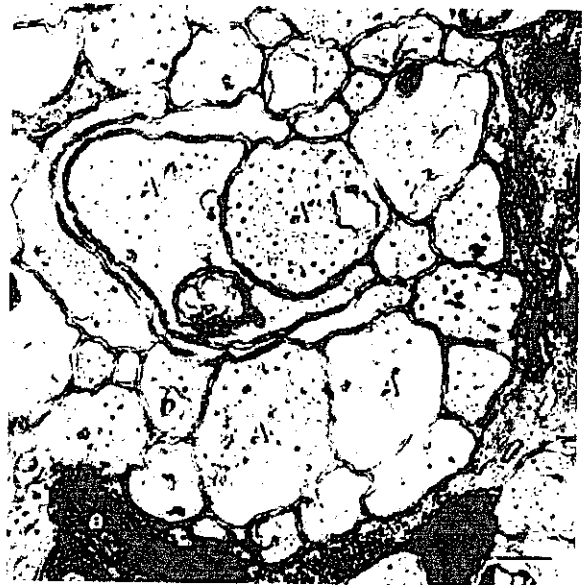
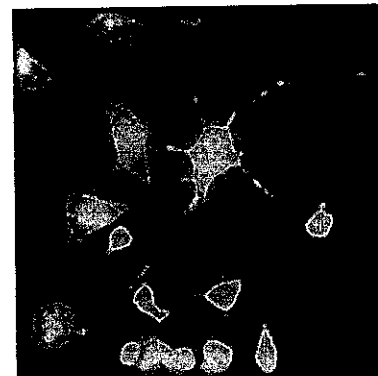
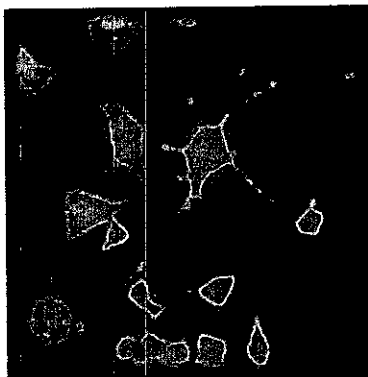


図4 切断後1週間12時間周期の明暗の状態
 で飼育したときの神経軸索の再生
 再生した軸索にはニューロフィラメントやミク
 ロチューブルなどの構造が見られる見られる
 A: 視神経軸索、a: astrocytes
 較正 0.25 μm

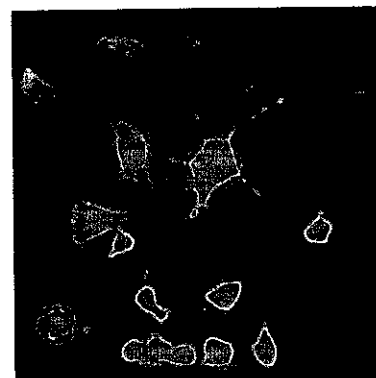
図5 PC12細胞におけるアポトーシスに対するNGF（神経成長因子）の作用
Calcein-AMによるレーザー顕微鏡写真
A:control, B-E:それぞれ20mM KCl投与後5,
15, 60, 120秒後の画像
NGFを添加した細胞では高カリウムによるアポトーシスを起こすことはなくNGFの細胞生存の維持作用が認められた



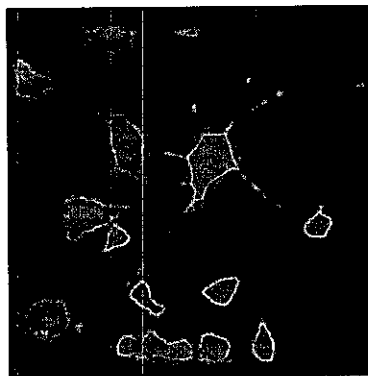
A: control



B: KCl投与5秒後



C: KCl投与15秒後



D: KCl投与60秒後



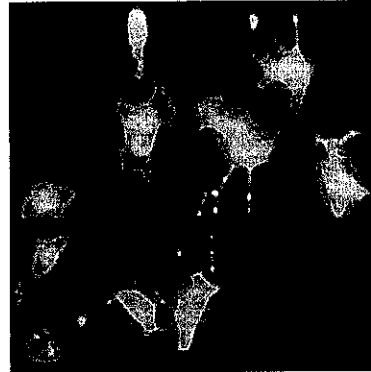
E: KCl投与120秒後

図6 NGF未添加のPC12細胞におけるアポトーシス

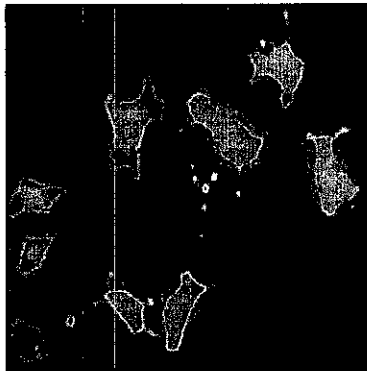
Calcein-AMによるレーザー顕微鏡写真

A: control, B-E: それぞれ20mM KCl投与後5, 15, 60, 120秒後の画像

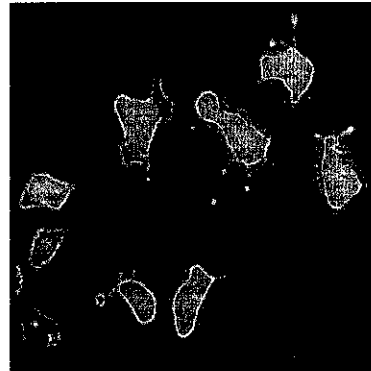
NGFを添加していない細胞では高カリウムによるアポトーシスが起こることが示された



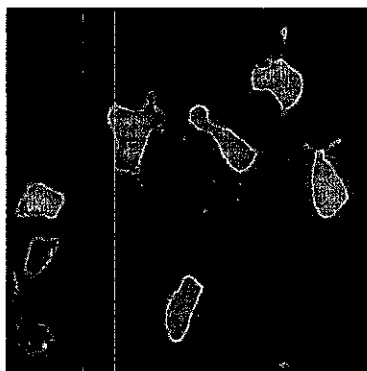
A: control



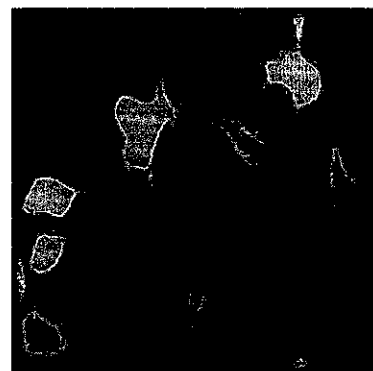
B: KCl投与5秒後



C: KCl投与15秒後



D: KCl投与60秒後



E: KCl投与120秒後

細胞組織動態の解析に向けた密着型フラッシュ軟X線顕微鏡技術開発

分担研究者：眞島利和 独立行政法人産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員
研究協力者：松村英夫 独立行政法人産業技術総合研究所光技術研究部門 主任研究員
研究協力者：新井孝夫 東京理科大学理工学部応用生物科学科 教授

研究要旨 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、卓上型のパルスレーザーとX線露光部、および原子間力顕微鏡により構成されるシステムであり、実験室レベルで設置できる利点がある。この装置は、微生物などを水の中で生きたまま観察することができ、40 nmの空間分解能を有している。本研究では、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡をとりあげ、新たな超高感度バイオイメージング技術としての可能性を検証する。初年度は、1) X線顕微鏡による細胞試料観察法の問題点の検討、2) X線感光材料PMMA薄膜上での細胞培養法の検討、3) 複合系リボソームの観察法の検討をおこなった。特に1) に関して、同一試料の蛍光顕微鏡像とX線顕微鏡像とを比較することにより、X線像と試料との対応関係を明確にできることを明らかにし、X線像に基づいた定量的な議論への可能性を示した。

A. 研究目的

生体試料をナノメートル(nm)オーダーの高分解能で観察できる代表的な汎用装置としては、走査型や透過型電子顕微鏡があるが、電子顕微鏡で観察するには生物試料に固定・脱水処理を施す必要があり、さらには樹脂に包埋し超薄切片に加工しなければならない。このため、生きている状態のままでの観察はできない。また、新たなナノイメージング法として光学顕微鏡による一分子イメージング法や光ピンセットによる一分子操作法が開発されているが、細胞内で特定の分子を対象として扱うには有力な方法であるが、細胞を高分解能で観察するには必ずしも適切ではない。

可視光線よりも波長の短いX線を用いたイメージング法は、レントゲン検査やX線CTスキャンなど医療診断法として生体を対象に幅広く用いられている。X線の中でも波長が短く透過性の高い硬X線を用いるこれらの方法は、波長が長い軟X線を用いる場合に比べ生体試料に損傷を与えにくいことが特徴であるが、炭素や窒素などの軽元素を中心とする生物試料では得られるX線像にコントラストが付きにくい。これに対して、軽元素に吸収されやすい軟X線を用いるイメージング技術は、生物試料を生きたまま光学顕微鏡よりも高分解能で観察できる手法として注目されている。

本研究では、超高感度バイオイメージング技術の一つとして、レーザー生成プラズマを軟X

線源とする密着型フラッシュ軟X線顕微鏡を取り上げる。この装置は、水中のバクテリアや微生物を固定処理や脱水処理を施すことなく、40nm以下の空間分解能で観察できる装置である。生きている試料を直接に炭素密度分布としてイメージングできるこの手法を、適切なプローブと併用することにより、より汎用性の高い超高感度バイオイメージング技術へと発展させることが重要である。

初年度は、細胞レベルで組織・細胞傷害を可視化するための基礎として必要となる、培養細胞など大きな試料を密着型フラッシュ軟X線顕微鏡で観察する上での技術的課題について主として研究をおこなった。

B. 研究方法

1. 軟X線顕微鏡の原理

生体を構成している元素の95%以上が、炭素、窒素、酸素などの軽元素であり、これらの軽元素は、軟X線領域にk吸収端に由来する急峻な吸収ピークをもっている。酸素の吸収端の波長(2.3nm)と炭素の吸収端の波長(4.4nm)の間の波長領域では、炭素のX線吸収が酸素のそれをほぼ一桁上回っている。「水の窓」と呼ばれるこの波長領域の軟X線を用いると、水分子の酸素によるX線吸収の影響を低く抑えて、水中の生物試料を炭素密度分布としてイメージングすることができる。光学顕微鏡や電子顕微鏡とは異なるコントラストをもち、生物試料を

理論的には数 nm の高分解能で観察できる軟 X 線顕微鏡観察に期待が寄せられている。

しかしながら、炭素に吸収される波長の軟 X 線を照射するため、試料に吸収された X 線のエネルギーは最終的には熱エネルギーとなり、試料の熱変性や熱膨張などを引き起こす。シンクロトロン放射光などを X 線源とする結像型の X 線顕微鏡では、波長選択性は高いが X 線像を得るには長時間露光が必要であり、露光中に生じる試料変性の影響による X 線像の乱れは避けられない。

これに対して、分担研究者らが研究・開発を進めているレーザー生成プラズマを軟 X 線源とする密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡は、ナノ秒オーダーでの X 線露光が可能である。X 線露光により不可避免的に生じる生物試料の熱変性には熱伝導過程が含まれているために、変性が始まるには露光から 20 ナノ秒程度の時間遅れがある。このため、露光時間の短いこの装置を使用すれば、試料変性が始まる前に、変性の影響を受けていないきれいな X 線像を撮ることができる。

2. 密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡

本研究で用いる密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡は、分担者らが電子技術総合研究所（現在の産業技術総合研究所）において研究・開発を進めて来た装置である。卓上型パルスレーザーと X 線露光部、試料観察用光学顕微鏡、および原子間力顕微鏡により構成されるシステムであり、実験室レベルで設置できる利点がある。装置の全体像を図 1 に示す。下段奥のパルスレーザー（Nd:YAG laser (Qunta-Ray Pro350, Spectra-Physics) の第 2 高調波（波長 532nm））を用いている。パルス光は 2 枚のミラーで曲げられ、写真右側の光学顕微鏡の下部に位置する X 線露光装置へ導かれる。写真右上のモニターには、X 線窓の内部が映し出される

図 2 に X 線露光装置の概要を示す。露光装置内に置かれたイットリウム製の金属標的の表面に、図には示されていない凸レンズを用いてパルス光を集光させ、プラズマを生成させる。プラズマを生成させる真空チェンバーと大気圧に保持された水中の生物試料を収納した試料ホルダーの間は、X 線を透過させるとともに圧力隔壁としても機能している窒化シリコン薄膜製の X 線窓で区切られている。X 線窓は、厚み 200 μm のシリコンウエハーの上に厚み 100nm の窒化シリコン薄膜を形成したのち、中央部分の 200 μm ~ 1 mm 角の範囲のシリコ

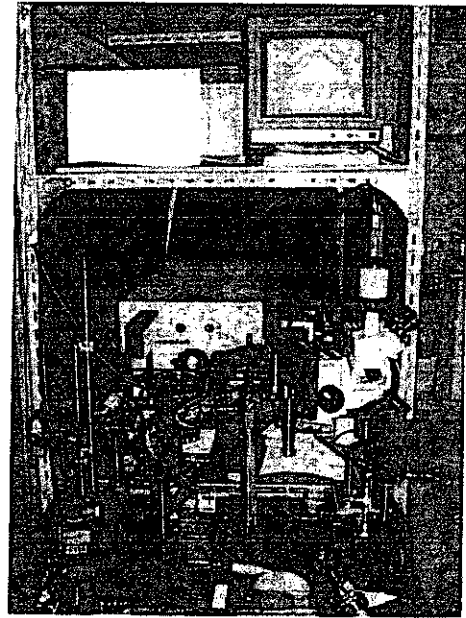


図 1 密着型フラッシュ軟 X 線顕微鏡

ン層をエッチングにより取り除き、窒化シリコン薄膜の窓を作成したものである (Silson Ltd. (England))。

X 線像の記録媒体である PMMA チップは、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) をシリコンウエハー上に 500nm の厚みに塗布してあるもので、図 2 ではレジストと記されている。

ここに適量の試料を載せて試料ホルダー内にセットする。長焦点対物レンズを用いることにより、露光装置の上部に設けられた観察用ガラス窓から X 線窓の内部にある試料 (X 線露光の対象となる試料) が光学顕微鏡でモニターできる。X 線露光により PMMA の主鎖を構成する炭素に X 線が吸収されると、主鎖が切断され分子量が小さくなる。

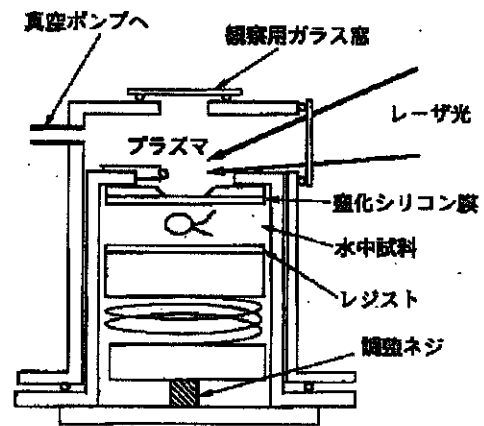


図 2 X 線露光装置の概念図

X線露光後、PMMAチップを取り出し、表面に付着している露光済みの試料残滓や未露光の試料を洗浄・除去したのち、これを有機溶媒で現像すると、試料の影となった部分と直接X線に露光された部分とでは有機溶媒に対するPMMAの溶解速度が異なるため、PMMA表面に薄いレリーフ状のX線像が得られる。原子間力顕微鏡（セイコーインスツルメント社SPA400）を用いてこれを拡大し観察する。

X線像の具体例として、羊赤血球のX線像を図3に示す。試料には、アルセバー氏液と混合し市販されている縮羊保存血液を用いた。図3はX線像を原子間力顕微鏡で読み出したもので、高さ方向の情報がカラーバーの表示に置き換えられている。赤血球の特徴ある形態がきれいに観察できる。左側にいくつか見られる赤血球が重なり合った部分では、投影方向の炭素密度が高くなるためX線像の厚みが増している。軟X線顕微鏡は炭素密度分布に敏感であるため、電子線や可視光線を用いるのとは異なったコントラストをもつ画像情報が得られる。

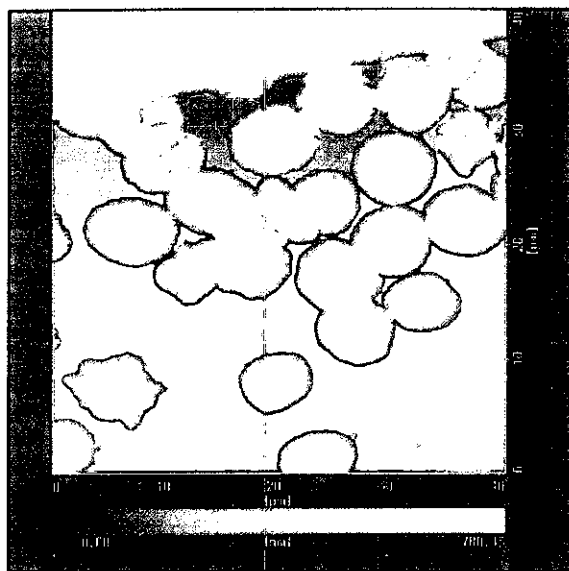


図3 縮羊保存血液のX線像
縦軸横軸ともに40 μ m。上部の平らな部分
はX線窓の端の部分。

C. 研究結果

1. 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡法の検討

1-1. X線像と試料との対応関係の同定

密着型フラッシュ軟X線を用いて試料の撮影をおこなった場合、得られるX線像は投影像であるため、例えば一つの細胞のX線像の中に複数の細胞小器官のX線像が見られる。このた

め、それぞれのX線像について細胞小器官との対応付けをする必要がある。このため、試料を蛍光染色して試料ホルダー内に収め、落射照明型の蛍光顕微鏡によりX線露光直前に蛍光像を撮影し、これをX線像と比較する方法について検討した。

実験材料としてタマネギの表皮細胞をもちい、DAPIにより細胞核を染色した。この試料をPMMA上へのせ、試料ホルダーにセットしたのち、蛍光顕微鏡を用いてX線窓内部の試料の蛍光像を撮影した。次いでX線露光をおこないX線像を撮影した。こうして得られたX線像を蛍光像と比較した結果、細胞核の位置は蛍光顕微鏡増像とX線顕微鏡像とでよい一致を示していることが確認された。

1-2. X線像の改質

本装置では、大気圧に保たれた試料ホルダーとプラズマを生成させる真空チェンバーとはX線窓により区切られている。X線窓にかかる圧力差により真空チェンバー側に凸に撓んでいる。X線窓の中央部分では周辺部分と比べて試料を取り巻く水の層の厚みが増しているため、周辺部分に比べて水によるX線吸収の影響が強く現れて、X線像のコントラストが低下する。培養細胞のように大きな試料を扱う場合には、これは難点となる。

圧力差を解消してX線窓の撓みを除くことにより、X線窓内部の水の層の厚みを均等にできれば、X線窓内部のX線像を均一にできると考えられる。このため、真空チェンバー内に気体を導入する方法について検討した。

X線像の比較をおこなう試料として個体差の少ないバクテリアを用いた。軟X線の吸収が少ないヘリウムガスを真空チェンバー内に導入して圧力差を解消した場合、周辺部と中央部とで均質なX線像を得ることができた。

2. PMMA上での細胞培養

シリコンウエハー上に形成されたPMMA薄膜にポリLリジンコートをし、PC12細胞と3Y1細胞の培養をおこなった。PC12細胞の場合は、細胞分裂をおこなっている条件ではPMMA表面への細胞の接着が弱い。神経成長因子(NGF)の投与により突起の伸展を始めると接着性は強まるが、3Y1細胞と比較すると全般的に接着性は低い。これに対して3Y1細胞はPMMA表面においてもよく増殖し、接着性もよい。

3. 複合リポソームの観察

機能性プローブとしての応用が期待される酸化鉄をコアとする複合リポソームについて、細胞との混合系に先立ち、水溶液系でのX線顕微鏡観察をおこないX線像を得た。水中での存在形態が問題となるこうした試料について、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡が有効な手法であることが判明した。詳細については、本研究課題報告書の分担研究者松村英夫の報告書を参照のこと。

D. 考察

DAPI染色した細胞の蛍光像とX線像との比較結果から、蛍光色素や組織特異性をもつモノクローナル抗体でラベルした試料の蛍光像とX線像とを比較することにより、X線像の由来を決定できることが判明した。

密着型フラッシュ軟X線顕微鏡では、ショットごとのレーザーパルス光強度やプラズマ強度のばらつきなどのため、異なるショットで得られたX線像の断面の高さなど試料の炭素密度に関するデータを直接に数量的に比較することは一般的には難しい。しかしながら、浮遊試料の場合には、正常細胞と病理細胞のいずれかを蛍光ラベルしたのち、両者を混合してX線露光することにより、同一のX線像を用いて両者の炭素密度の違いを比較することができることが示された。

細胞など比較的大きな試料を扱う場合、X線窓の内部で均質なX線像が得られることは、X線顕微鏡が汎用装置として今後発展するためには不可欠な特性である。真空チェンバー内にヘリウムガスを導入することにより、得られるX線像の改質ができたことで、汎用化に一步近づくことができた。しかしながら、新たな問題として、プラズマ生成時に起きる急激なヘリウムガスの体積膨張の結果、X線窓がPMMA側に押し付けられ画像を乱す原因となることもあり、本方法を確立するには、尚検討を要する。

E. 結論

レーザー生成プラズマをフラッシュX線源とする密着型フラッシュ軟X線顕微鏡は、生体を生きたまま40nmの分解能で観察できる装置である。同一試料を用いて蛍光顕微鏡像とX線顕微鏡像とを比較することにより、X線像と試料との対応関係を明確にすることができた。これにより、蛍光染色法や蛍光標識した組織特異性を持つモノクローナル抗体などを用いて標本を識別することにより、正常細胞と病理細

胞とを同一のX線像に記録し、その違いを定量的に比較検討することが可能であることが示唆された。

この結果は、電子顕微鏡では出来ない生きたままの試料の観察を、光学顕微鏡を超える数10nmの分解能で観察することができる、密着型フラッシュ軟X線顕微鏡が、ナノメディシン領域の開拓のために必要となる超高感度バイオイメージング手法として有力であることを示している。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amemiya, K., Takahashi, H., Nakazawa, M., Shimizu, H., Majima, T., Nakagawa, Y., Yasuda, N., Yamamoto, M., Kageji, T., Nakaichi, M., Hasegawa, T., Kobayashi, T., Sakurai, Y. and Ogura, K.

Soft x-ray imaging using CR-39 plastics with AFM readout.

Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B. **187**, 361-366. (2002)

- 2) Toshikazu Majima, Toshihisa Tomie, Hideaki Shimizu.

Comparative studies of x-ray images and fluorescence images of the same specimens.

Journal de Physique IV, Proceedings X-Ray Microscopy. in press.

2. 学会発表

- 1) Toshikazu Majima, Toshihisa Tomie, Hideaki Shimizu.

Comparative studies of x-ray images and fluorescence images of the same specimens.

7th International Congress on X-ray Microscopy and Spectroscopy.

XRM2002 Programme and Abstracts pp190. July 29-August 2, 2002, Grenoble, France.

- 2) 眞島利和、丸岡幸生、加藤薫. X線顕微鏡による成長円錐の観察. 日本バイオイメージング学会第11回学術集会要旨集 pp205-206. 2002. 10. 30-11. 1. 名古屋

- 3) 眞島利和、大谷圭司、富江敏尚. 密着型フラッシュ軟X線顕微鏡の画像改良. 日本生物物理学会第40回年会講演予稿集 ppS114. 2002. 11. 2-11. 4. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし