

2017電顕サマースクール FAQ

講義番号	全体		
講義名			
講師名	勝又 修		
質問事項	試料作製実技講習会開催希望	回答	すでに、毎年関東支部電子顕微鏡試料作製実技講習会が開催されています。受け入れ先によって人数に制限がありますが、できるだけ希望に添えるようにしたい。
質問事項	学会webに人材募集の関連ページがあると双方のニーズがあると思う。	回答	若手会員(未就職)にとって有用に思いますので、学会本部に提案したい。 →学会HPのトップページ http://microscopy.or.jp/ に「Jobs & Grants 募集」として掲載していますのでご覧ください。
質問事項	スケールバーに数字を入れない場合が多いのはなぜですか？	回答	デジタル化に伴い倍率表示方法が変わってきていますが、基本的には単位を入れた方が良いです。数字がないスケールバーは1μmが慣例です。
質問事項	午前中の講義は、ほとんどがTEM像と感じました。生物試料は今後"超薄切片+TEM"が主流なのでしょうか。昨日の講義を参考にすると、SEMの分解能が高くなり、過渡期的なのでしょうか。SEMとTEMの使い分けについてもかたんにコメントが欲しいです。	回答	超薄切片法は試料の内部構造を、走査電顕は試料の外部構造を観察する事がメインです。目的に応じて使い分けします。分解能の良いSEMで超薄切片を観察する方法も開発されていますが、まだ一般的ではありません。
全体を通じて	<p>全体的に時間が押していたことや、マイクトラブルにより集中力が切れてしまった事が多々ある。動画や画像が多用されていたため分かりやすく、興味を持ちやすかった。</p> <p>・サマースクール全般 講演される先生がたが交代される時間を数分設けた方がスムーズに進んだかと思えます。</p> <p>電顕初心者の私にとって今回の講義はどれも興味深く、勉強になりました。特に試料作製方法の講義では動画がとても効果的に用いられており、大変参考になりました。また、単なる技術の紹介が行われるだけでなく、高額な機器を購入せずにどのように各々の職場で実用化させられるかというところまで話をしていただけただけ点も有難かったです。 ただ、駆け足で話をされる先生が多く話についていけない部分があったので、1日の講義数を少し減らしても少しゆっくり話を進めていただければ有難いと感じました。 また、個人的な事情で申し訳ないのですが、台風の影響による飛行機の便の変更で最終日の質疑応答に参加できなかったため、サマースクール中におっしゃっていたようにFAQのようなかたちで内容を教えていただければ幸いです。 よろしく願いいたします。</p> <p>実技なしの講義のみでしたが動画を見せて頂くことによって実技の内容が非常にわかりやすかったです。質問事項に関しましては講師の方々が丁寧に説明して頂きまして、ありがとうございました。講師の方々の熱意が非常に感じられました。また機会があれば是非参加したいです。</p> <p>非常に充実した内容で、多くのことを学ぶことができました。 特に試料作成関連ではただテキストに書いてあるようなことだけでなく、色々な手技やコツも知ることができて参考になりました。鏡体理論など基本的な知識はあったことに関してもより理解が深まり有意義なものとなりました。 まさにテーマの通り、基礎を再認識してステップアップできたと思います。 ただ、講師の先生方がとても熱心なのは非常にありがたく興味深いお話をたくさん聞けるというのもとても貴重なことではあるのですが、時間が予定よりも大幅に長引いてしまって少々困ってしまった面もありました。 質問や相談の時間ももう少しあると嬉しいです。 ラグビーピンバッジありがとうございました。ラグビーは好きです。父がトヨタ社員だったので、昔よくトヨタの試合観戦に連れていかれました。生で見る試合はルールがよく分からなくてもエキサイティングでおもしろかったです。</p> <p>電顕についてまったく知らないど素人で参加しました。 ですので包埋の動画など、大変参考になりました。 ですが、当たり前のように真空とか電子ビームなど出てきて理解するのに時間がかかってしまいました。もう少し基礎となる部分は言葉の説明を加えていただけるとありがたかったです。 また電顕写真の見方についても講義があるとうれしいです。 質問コーナーはこれからもぜひ続けてください。紙に書いて質問する形式は質問しやすくてよかったです。</p>		

講義番号	5		
講義名	透過電顕の構造と基本操作		
講師名	濱元 千絵子		
質問事項	電流軸と電圧軸とは何か	回答	<p>対物レンズのワブラー機能を利用して対物レンズの励磁電流を周期的に変動させると、その変動に伴い像が回転する。その回転中心を電流軸と言う。</p> <p>一方、高圧のワブラー機能を利用して加速電圧を周期的に変動させると、像はある一点を中心にして放射上に拡がったり縮んだりする。その不動点を電圧軸と言う。</p> <p>数万倍程度までの観察であれば電流軸を、より高倍率での観察であれば電圧軸を調整するとよい。</p>
質問事項	エミッション電流とかバイアス電流とか、何がどうなのか、を教えてください。	回答	<p>フィラメントから放出される電流をエミッション電流と言い、ウェーネルト電極に印加する電圧をバイアス電圧と言う。バイアス電圧を印加することにより、ウェーネルト電極は(電子銃から発生した)電子線を集束させる作用を持つ。</p>

講義番号	L-1, 7		
講義名	TM4000のご紹介、走査電顕の構造と基本操作		
講師名	上村 健、多持 隆一郎		
質問事項	テーブルトップSEMでは、低真空モードでもEDXの高感度を実現したとの説明でしたが、高真空モードの方が高感度と理解して宜しいでしょうか。	回答	<p>EDXの感度は、検出器の立体角に依存します。高真空でも立体角が小さい検出器を使用すると、感度が低下します。ただし、低真空モードの場合、空間分解能が高真空モードに比較し悪くなります。また、低加速電圧領域では、高真空モードで分析することをお勧めします。</p>
質問事項	SEMの倍率は、取得した像を自由に変わることができるため、倍率という表現は使わず、FOV(Field of View)やマイクロバーなどを使用するとの説明がありました。しかし、依頼者から倍率を記載していただくほうがわかりやすいと言われております。現在、撮影倍率としてデータを提出しているのですが、他に適切な表現があるでしょうか。	回答	<p>撮影倍率の表現でよいと思います。撮影倍率を示し、マイクロバーなどを併用すればベターです。</p>
質問事項	反射電子信号は、観察対象試料の構成元素によりコントラストが決定されると説明がありました。決勝方位の違いでもコントラストは変わるでしょうか。	回答	<p>反射電子信号は、結晶方位の違いによりコントラストが得られます。ただし、観察対象試料表面に機械研磨による歪などが残っていると良好な観察ができません。そこで、仕上げ加工としてイオン研磨をお勧めします。また、結晶方位を観察する場合、低加速電圧での観察をお勧めします。</p>
質問事項	低真空下でのSEM-EDX測定においてどの程度高真空と差が出るのか、定量的なデータがあれば教えてくださいませんか？	回答	<p>低真空下では残留ガスにより一次電子ビームが散乱され、試料以外の箇所にも電子線が照射されます。そのため、数μm程度のエリアを分析することになります。真空度や試料のサイズによっては、試料台の成分を検出する場合がありますので、注意が必要です。</p>
質問事項	私の仕事において蛍光体粒子(数十 μm 程度、半導体)の断面をSEM-EDX測定して粒子内の成分の異なる相を比較することがあります。このとき(1)高真空Auコーティング(2)低真空コーティング無し のどちらがよいでしょうか？	回答	<p>分析する元素によって観察条件の選択が必要ですが、まずは、2)低真空コーティング無しでお試しするのがベストと思います。ただ、分析箇所が微小エリアの場合、高真空での観察が有効ですが、金を蒸着すると金により検出分析の元素信号が低下する場合がありますので、カーボンやアルミの蒸着をお勧めします。</p>

講義番号	8		
講義名	走査電顕試料作製法		
講師名	豊岡公德		
質問事項	超薄切片上でFISHを行いたいのですが、テキストP124のCLEM法に加え、注意する点はあるでしょうか。(RNAがダメージを受けそうなステップが見当たらないでいる)	回答	FISHを行う場合、通常はパラフィン包埋すると思うが、テクノビットやLRホワイトなど電顕用樹脂に包埋してもハイブリダイゼーション反応が起きるかテストする必要があると思います。CLEMではなく、金コロイドラベルしたDNAプローブを使って観察するのはどうでしょうか？超薄切片の染色体をFISHでラベルして電顕で観察して何か有意義な情報が得られるかは疑問に思います。
質問事項	臨界点乾燥には不向きでt-butyl凍結乾燥に向いている試料はありますか。	回答	思いつきません。臨界点乾燥が上手くいかない場合は凍結乾燥を試すと良いかと思います。
質問事項	臨界点乾燥とt-butyl凍結乾燥で観察された構造が違っていた場合、どのように判断・解釈したら良いでしょうか。また乾燥法で起こりやすいアーティファクトなどあれば、教えてください。	回答	光学顕微鏡観察や透過電顕観察した結果と総合して判断すると良いでしょう。凍結乾燥だと細胞または細胞壁が潰れ安いです。

講義番号	12		
講義名	固定・脱水・包埋の基礎		
講師名	立花 利公		
質問事項	培養細胞の場合、酸化プロピレンの代わりにアセトンではどうですか。あるいは培養細胞をカバーガラス上に培養して、通常の包埋(酸化プロピレンを通す)をして、最後にカバーガラスを割ったりして取り除くという方法はいかがでしょうか。	回答	アセトンでもプラスチックシャーレを溶解してしまいます。カバーガラスを使って通常の包埋をということですが、カバーガラスをきちんと剥がすのが難しく、もしガラスの破片が残っていた場合、ダイヤモンドナイフに傷をつけることになります。ダイヤモンドナイフはまだ高価ですし、その勇氣は私にはありません。ただ、カバーガラス上で培養した後、倒立包埋して重合させた後、カバーガラスの裏面にスライドガラスをアロンアルファなどで接着させ、後は倒立包埋の要領でホットプレートで温めた後、剥がすという方法もあります。
質問事項	固定の緩衝液ですが、0.1Mリン酸緩衝液を使用する方と、0.01Mリン酸緩衝生理食塩液を用いる方がいるようですが、どちらを用いるのが良いのでしょうか。また0.1Mリン酸緩衝液を使用した場合Caの沈着などは怒らないのでしょうか。	回答	私は0.1Mリン酸緩衝液を用いていますし、基本的に0.1Mリン酸緩衝液を用いていると思います。Ca沈着の経験はありません。
質問事項	前固定、後固定の後、どのくらい保存が可能でしょうか。	回答	純形態を観察するのであれば、前固定(グルタルアルデヒド)で固定した後であれば1ヶ月程度は保存可能だと思います。どうしてもこの試料しかないという場合は1年経ったものでも使用します。後固定(四酸化オスミウム)したあとは保存せず脱水を始めてください。どうしても時間がないということであれば、90%エタノールのときに一晩程度であれば放置しても良いと思います。
質問事項	固定・脱水の際に低温にする理由は？常温で行った場合像に違いが出ますか。	回答	低温にした方が、タンパク質などの流失が少ないという報告があります。像的な違いですが、しっかり観察すると違いがあるようですが、一度ご自分で低温と常温で固定・脱水を行ってみて試してみたいはいかがでしょうか。
質問事項	四酸化オスミウムは劣化しないのでしょうか。またテキストでは2%オスミウム溶液を調整するときにアンブルごと保存ビンに入れ、水を入れて溶解するのですか。溶解は室温で放置で良いのでしょうか。	回答	結晶のものは劣化しませんので、溶解して使用できます。溶液(アンブルでも自分で溶解したものでも)の場合、液が黒っぽく(灰色も含めて)なっているようでしたら使用しないほうが良いと思います。
質問事項	皮膚などの硬さが均一でない組織の固定法についてポイントなどがありましたら教えてください。	回答	皮膚などの場合も基本的には通常の固定で良いと思います。できれば灌流固定のほうが良いと思いますが、ヒトの試料では浸漬固定するしかないと思います。固定液にハーフカルノフスキー固定液を用いるほうが良いかもしれません。
質問事項	樹脂の硬さを調節するとのことでしたが、具体的な硬さ別の臓器を教えてください。	回答	昔はガラスナイフを用いて超薄切をしていましたので、なるべくナイフにダメージを与えないようにするために、柔らかい組織(通常の肝臓や腎臓など)の場合は樹脂も柔らかく、硬い組織(脱灰した骨など)の場合は仕方がないので樹脂も少し硬めにしていたようです。しかし、現在はダイヤモンドナイフを使用することが殆どなので、組織の硬い、柔らかいについてはあまり気にせず、少し硬めの樹脂を用いることが多いようです。

講義番号	12		
講義名	固定・脱水・包埋の基礎		
講師名	立花 利公		
質問事項	固定のメカニズム(GA, PFA, OsO4)が化学構造にどのように反応するのか)を教えてください。	回答	下記参照(山下先生担当)

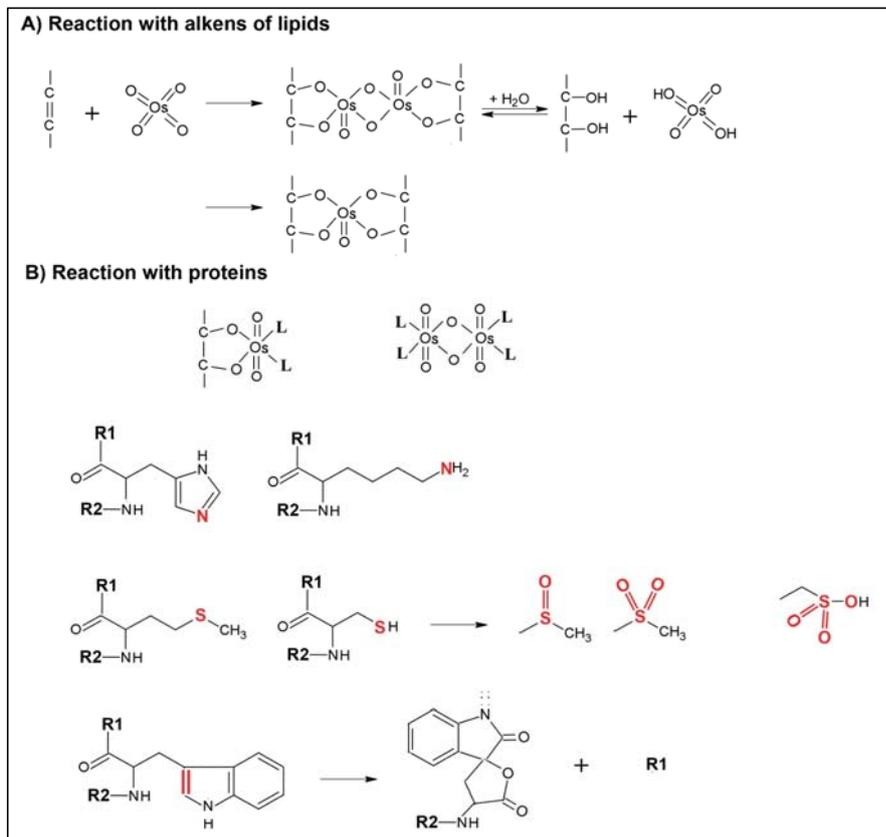
ホルムアルデヒド(FA)については今回のサマースクールのテキストに書いたメカニズムが多くの教科書に書いてあります。アミノ基などにFAが付加してメチロール基が形成され、さらに加水分解されてシッフ塩基(テキスト図2-b)ができる。さらにシッフ塩基が種々のアミノ酸の側鎖とメチレン橋を形成して結合する。システインのメチロール基はチロシンなどと結合する。

グルタルアルデヒド(GA)については諸説あり複雑ですが、多くの研究者は単純に2個のアルデヒド基がアミノ基と反応するのでは無いと考えています。その理由は他の2価のペプチド合成試薬に比べ反応が著しく早く、強固で様々な長さの架橋が形成されるためです。複数の教科書にはGAがポリマー(オリゴマー?)を作って(図3-f)、それがアミノ基などと結合すると書かれています。結果的にはタンパク質のタンパク質のアミノ基と結合して共鳴構造を持つ非常に安定な架橋が形成されます(図3-g)。しかしGAのポリマーが溶液中に存在すると235 nmにも吸収の極大を示すはずですが、Kawaharaらはアミノ基などと結合すると同時に235 nmの吸収が急増することから、アミノ基との結合と同時にGAの重合する(図3-g)と考えています。私はこのメカニズムが正しいように思います。他に記載されているメカニズムは、GAの架橋反応が酸素を要求することから、ピリジウム塩が形成されているというものです。反応の一部はそうかもしれませんが、私は主にKawaharaらのメカニズムに従っているように思います。GA-OsO4の反応と加熱による賦活化(テキスト図10)の結果も、彼らのメカニズムに従って考えると理解し易いと思います。

ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドは45 C以下ではDNA間やRNA間の架橋を形成しないと報告されています。したがって組織内では、近傍に存在するタンパク質と核酸間の架橋や、ゲル化したタンパク質に埋め込まれるために、核酸は不動化するものと考えられます。

四酸化オスmiumは脂質の不飽和(二重)結合に付加、架橋することによって脂質を固定することは多くの教科書に書いてありますし、種々の分子の二重結合への付加やその加水分解は化学合成にもしばしば利用されています。タンパク質との反応は複雑ですが、良く知られている反応は1)トリプトファン残基の分解によるポリペプチド鎖の切断。私の実験においてもトリプトファンを含まないRibonuclease Aではポリペプチド鎖の切断は認められないが、トリプトファンを含むBSAやOvalbuminは四酸化オスmium処理によって分解されることが確認されています。また無固定のactin線維をOsO4とインキュベートすると時間とともに線維が消失するとの論文もあります。走査電顕のO-D-O法もこの作用の応用だと思います。2)メチオニンやシステインを酸化する反応も良く知られています。3)タンパク質間の架橋や脂質とタンパク質の架橋反応も教科書に書いてあります。私は上記のようにタンパク質にOsO4/0.1 M PBを加えてみましたが、分解は観察されましたが架橋反応があるのか不明でした。トリプトファンを含まないRibonuclease Aでも明らかな架橋反応は証明できません。

四酸化オスmiumの反応図



講義番号	13		
講義名	ラット及びマウスの灌流固定法		
講師名	勝又 修		
質問事項	人工呼吸は必要でしょうか？	回答	マウスなどは、数秒で固定液が全身に回るので、ほとんどの場合は必要ないと考えられます。しかし、ラットより大きい動物を固定する場合には望ましいと考えます。また、体内の酸素濃度に構造が影響されやすいと思われる実験を行う場合は必須になると思います。肺の拡張時の微細構造を見る場合は気管より固定剤を注入する場合があります。
質問事項	注入固定について固定の確認はどうしたらよいでしょうか？	回答	目的臓器を確認しつつ注入して下さい。目的臓器の支配血管があれば注入しやすいです。浸透や灌流状態を見やすくするために、固定液にゼンボーニ液を用いたり(ピクリン酸で黄色になる)メチレンブルー(青くなる)などで固定剤を色づけして使用する場合があります。微細構造には影響しません。
質問事項	ペリスタポンプは注入液が波打つので良くないと聞きましたが？	回答	そういった経験はありません。
質問事項	脱血の祭に生食をスキップすることは可能でしょうか？	回答	4%パラホルムは可能です。グルタールの場合は生食を数cc先行させた方が固定剤と血液が触れて起こる血栓が出来にくいのでこの手法を推奨します。
質問事項	横隔膜や骨格筋の固定にも有用ですか？	回答	もちろん有用ですが、伸縮時の状態を見る場合は滴下固定も有効です。
質問事項	動物の大きさにより方法や容量は変わりますか？	回答	マウス、ラット(), モルモット、ウサギ、など体重によって増加します。おおよそ100gbw/100mlを目安に準備しましょう。灌流固定後は通常、10分から30分静置後に切り出します。
質問事項	精巣や生後数日のマウスの固定についてのポイントは？	回答	精巣は、固定が難しい臓器なので灌流圧を上げて注入すると良い場合があります。また、精巣を見える状態にしてラセン動脈が白く抜けているか確認する事や、注射器で注入する場合があります。 P0-P7のマウスは、実体顕微鏡下で、同様に前処理して、右心耳を切ってから、シリンジで25G翼状針で左心室から注入します。

講義番号	14		
講義名	硬組織の固定と脱灰法		
講師名	西川 純雄		
質問事項	脱灰は手を抜けば抜くほど像質も免疫染色も悪くなると聞いています。一番手を抜いてはいけないのはEDTAの濃度、脱灰時の温度、その他なんでしょうか。	回答	脱灰不全で先に進むことが一番問題です(後で薄切ができません)。軟X線で確認はできますが、脱灰期間を長めにとることがよいと思います。
質問事項	photoconversionで用いることができる蛍光色素はほかにあるのでしょうか。Bodipyを使った例は見たことがあるのですが、どのような構造を持つものが使えますか。	回答	過去に使われたものはFM1-43,AM1-43以外では、Lucifer yellow CH, acridine orange, propidium iodide, ethidium bromide, FITC, TRITC, DiI, eosinなどです。私の経験ではC5-DMB-Ceramide (ゴルジの検出)で成功裡に使用できました。適切な構造についてはわかりません。

講義番号	15		
講義名	植物の固定法		
講師名	川崎 通夫		
質問事項	植物の組織形態を勉強したいのですが、良い教科書はありますか？	回答	植物の組織形態でしたら、Esau's Plant Anatomy (meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function and development), A Jhon Wiley & Sons, Inc., Publicationが良い本とだと思います。朝倉書店の「よくわかる電子顕微鏡技術」は植物の固定についての解説もあり良いかと思ひます。
質問事項	シュウ酸カルシウム結晶の脱落の見分け方がよく分からなかったのですが目安となるような構造上の特徴はありますか？	回答	シュウ酸カルシウム結晶は、TEMでは高電子密度(黒色)で観察されますが、切片上から脱落すると脱落部が低電子密度(白色)で観察されますので、容易に見分けがつかます。
質問事項	デンブンプ粒を固定する方法はないのか	回答	化学固定・樹脂包埋法においては、デンブンプ粒ほどの市販の樹脂に対しても浸透性が悪く、歪みや切片上から脱落することが多いです。それでも切片からデンブンプ粒が完全に脱落する訳ではないので、粘り強く観察すれば良い像が撮れることもあります。画質はやや落ちますが、支持膜を張ったグリッドを利用したり、通常よりやや厚い切片で観察するのも手段の1つかと思ひます。
質問事項	植物組織の固定における減圧浸漬を過度におこなうことによって、何らかのアーティファクトは生じますか？	回答	減圧が強くと気泡が急激に組織から出るような時は組織・細胞が損傷する可能性があります。気泡は、細胞間隙に多く含まれていますので、組織から緩やかに気泡を出すよう減圧をかければ大きな悪影響は少ないと思ひます。
質問事項	維管束などの細胞壁がナイフの刃を傷つけるのを防ぐ処理方法はあるのでしょうか？	回答	基本通り、薄切前に刃をしっかりと濡らし、なるべく薄切面を小さくします。薄切面が長方形の場合は、その長辺と刃が平行になるように切ると刃へ負担が軽減されます。また、当たり前ですが、硬い試料については特に薄切枚数を必要最低限することもナイフの寿命を延ばす上で重要です。可能でしたらなるべく維管束や細胞壁の発達程度の低い「若い組織」を利用すると良いかと思ひます。

講義番号	16		
講義名	微生物の固定法		
講師名	山田博之		
質問事項	GA-OsO ₄ 固定で細菌を感染させた培養細胞を観察した際、細菌の細胞壁より内部が穴が空いてしまっていました。良い改善方法ありますか？	回答	1. 固定を充分時間をかけて行う。 2. 低粘度の樹脂を使って、時間をかけて浸透。包埋する。 3. 超薄切片を支持付きグリッドに載せる。 4. 急速凍結・凍結置換法を試行する。

講義番号	18		
講義名	急速凍結とフリーズレプリカ電子顕微鏡法		
講師名	諸根 信弘		
質問事項	タンパク質のクラスターをTEM観察する場合、固定と染色はどうすれば良いか？	回答	通常のネガティブ染色法：酢酸ウラニルには固定と染色の両方の効果があります。(2) GraFix: Kastner et al., Nature Method (2008) 5:53-55.
質問事項	フリーズフラクチャー法では、試料温度を上昇させて表面をナイフで削りますが、その際の温度は試料によって適切値が異なるのでしょうか？	回答	基本的に、同じです。
質問事項	上記の質問の続きで、またナイフ温度も制御が必要でしょうか？	回答	必要ありません。液体窒素温度付近ですね。

講義番号	20		
講義名	超薄切片法		
講師名	幸喜 富		
質問事項	超薄切の切削はスピードが遅い方が良好な切片が得られるのでしょうか。	回答	遅く切れば刃先に掛かる負荷が減るので、広い切片を切る際になどにチャターを防ぐ手立ての一つとなります。反面、連続切片がリボン状につながらない、温度変化の影響で切片の厚みが不安定となる、偶発的な振動の影響を受けやすい等、別の問題が生じる虞があります。
質問事項	ダイヤモンドナイフはNACCとダイヤモンド社のもつちが性能が良いですか。価格はNACCの方が安いと思いますが。	回答	私個人の経験では、NACCのナイフに特に問題はありませんでした。
質問事項	ダイヤモンドナイフの刃先が水をはじくようになってしまいました。親水化装置、イオンスパッタを持っていないのですが何か親水化の方法はありますか。	回答	食器用洗剤原液を刃先に載せ、水道水で十分に流水洗浄したのち、蒸留水で十分に濯ぎ、ブロワ等で水滴を完全に飛ばすとよいでしょう。
質問事項	超薄の切片回収時、50や75などの目の大きなメッシュに回収するのにシワになるべく入らないようにするための注意点がございましたら、お願いします。(引き上げ法)	回答	ナイフポートの水を水平よりやや盛り上げ、ピンセットでつまんだグリッドを一旦水中に浸したのち一部が水面上に出よう引き上げます。グリッド面は水面に対し30-45度の傾斜に保ちます。グリッド上に直線的な波打ち際を作り、そこに切片の一边を寄せて引っ掛けたのち、グリッドを傾斜方向に沿って引き上げます。引き上げ法から話が逸れますが、是非ループ法も検討してみてください。

講義番号	21		
講義名	電子染色法		
講師名	山口 正視		
質問事項	支持膜をはる場合、親水化処理が必要か？	回答	必要ありません。
質問事項	ネガティブ染色について:グリッドを酢酸ウラニルにつけるとは、液中に沈めるのですか？	回答	いいえ、試料のついている面に、酢酸ウラニル液をつけるのです。
質問事項	酢酸ウラニルの扱いについて:素手で扱っていいのですか?ドラフトでなくていいのでしょうか?	回答	はい、素手で扱ってかまいません。ドラフトでなくても大丈夫です。
質問事項	酢酸ウラニルが入手しにくいようですが、代替品はありますか？	回答	はい、日新EMから、代替品として、EMステイナー(主成分は酢酸ガドリニウム)が販売されています。ウランは原子番号は92ですが、ガドリニウムは64なので、染色性は酢酸ウラニルの方がすぐれています。
質問事項	染色時に、クロスピンセットで挟んだ状態のまま、染色、洗浄をしているのですが、問題あるでしょうか(サンプル数が少ないので)?	回答	問題があるかどうかは、撮影した電顕写真から判断します。染まりがよくて、コンタミもないようでしたら問題ありません。
質問事項	8%ウランをろ過したフィルターの処分はどうしていますか?捨てていますか?保管ですか?	回答	捨てています。量が少ないので、問題ありません。
質問事項	孔の大きい単孔グリッドを扱う時、膜を破らないか、いつもドキドキしてしまいます。取り扱いのコツはありますか?	回答	電子顕微鏡の仕事全般に言えることですが、慎重に作業を進めることが大事です。それから、切片を染色するには、染色チューブを用いると、一切グリッドに触れることなく、染色、洗浄ができるので、お勧めします。
質問事項	フォルムパール膜がなかなかスライドガラスからはがれないことがあります。考えられる原因や、コツがあれば教えてください。スライドガラスの種類にもよるのでしょうか?	回答	私は、Matsunami の切り離しのスライドガラスを使っています。スライドガラスの洗浄は、ハイゼガーゼでふく方法です。スライドガラスにできた膜は、カミソリで四角にキズを入れた後、息を吹きかけて、10度くらいの角度で静かに水面に沈めると、剥がれてきます。フォルムパール液にスライドガラスをつける前に、親水化処理(20秒)をすると、膜が剥がれやすくなることがわかりました(サマースクールが終わってから発見)。松波のファインフロスタクア(FF-006)使用の場合は、70%アルコールに数秒浸して風乾後に用いると剥がれやすいです。(勝又追記)
質問事項	グリッドをジェット水流で洗浄すると、切片や支持膜が破れたりしませんか?」	回答	グリッドが200~400メッシュの時は、全く問題ありません。2 mm x 1 mm の単孔メッシュの場合は、染色チューブを用いて、ジェットが直接グリッドにあたらないように、洗浄することをお勧めします。

講義番号	24		
講義名	LSMを用いた蛍光観察法		
講師名	勝又 修		
質問事項	パラフィンと凍結切片の使い分けはどのようにしていますか?	回答	求める抗体がパラフィン切片で染色される場合はパラフィンで行いますが、免疫電顕も同時に行う場合は、包埋前免疫電顕法も行うために凍結切片を用います。そのまま、又は熱による抗原賦活法などを用いてパラフィン切片で染色される抗体は、ほとんどが免疫電顕法でも同様な処理で検出染色可能と思われます。

講義番号	25		
講義名	免疫組織細胞化学の基礎と応用:包埋前染色法		
講師名	秋元 義弘		
質問事項	ゼラチンカプセルは60°Cの重合で溶けて無くなるのでしょうか？	回答	ゼラチンカプセルは60°Cの重合では溶けません。重合したエポンブロックをトリミングをする時に、エポンと一緒にカミソリで切削できます。
質問事項	最近スケールバーに単位を入れないのが多いのはなぜですか	回答	最近のジャーナルでは論文投稿規定に、スケールバーだけ図に挿入し、単位は図の説明に記すよう指示しているのが多いと思います。論文に掲載された図をそのまま口頭発表に使用すると、単位が入りません。口頭発表の際は、スケールバーに単位を入れた方がよいと思います。

講義番号	26		
講義名	免疫電顕法:包埋後染色法		
講師名	山下 修二		
質問事項	標識物質として包埋後染色でHRPやFNG (fluoronanogold)が使用できないのはなぜでしょう	回答	1)HRPはDAB反応産物がdiffuseです。OsO ₄ 処理によって電子密度が高くなりますが、電子密度の増加が反応によるものかOsO ₄ 処理やU-Pbなどの電子染色によるものか判別が困難です。DABの代わりに4-Cl-1-naphtholを使用すると反応産物はドット状になり、電顕で観察しやすくなりますが、ドットの径が大きくかつ不均一です。2)FNGを銀増感度することによって使用することはできます。立体障害が少なく、10 nm程度の金コロイド標識抗体を使用するよりも、より強い反応が得られると思います。
質問事項	免疫染色において三重、四重など多重染色は可能ですか。可能であれば包埋前方と後法のどちらが良いでしょうか。	回答	免疫電顕においても多重染色は可能です。包埋前染色法でも秋元先生の講義の手法(nanogoldを使用して銀増感の時間を変える)やDAB反応とnanogoldの併用などで二重染色は可能ですが、三重、四重染色は難しいと思います。包埋後染色では切片の両面を染色すれば二重染色は簡単に行えます。また抗体が異種動物(ウサギとマウスなど)で作製されている場合は片面で2種類の抗原を検出でき、裏面を使えば三重、四重も可能です。しかし抗原の局在を正確に観察するためには抗体の組み合わせを変えて二重染色を行う方がよいと思います。電顕では局所しか観察できないので、反応陽性の構造物や細胞内小器官に注目していると、他の場所に非特異的な反応があっても気が付かないことがあります。粒子径の異なるコロイド金が多いほど、特異的な反応と非特異的な反応を正確に判別することが難しくなります。
質問事項	通常に作製した心筋生検検体(2.5%グルタルアルデヒド/リン酸緩衝液で前固定、1%オスミウム後固定、エポン包埋)でNP顆粒(ANP、BNP)を免疫電顕できますか。	回答	ANPもBNPも検出できる可能性はありますが、染色してみないとわかりません。準超薄切片を脱樹脂して、テキストの手法に従って免疫染色してみてください。光顕で反応陽性であれば、電顕でも観察できるはずですが。複数の抗体が手元があれば、それぞれ試してください。抗体によって結合するエピトープも異なってしまうかもしれないので、陽性反応を得られる可能性も高くなると思います。
質問事項	固定でMgとCl添加で形態保存されるメカニズムはどのようなものでしょうか	回答	カルシウムイオンやマグネシウムイオンは負に荷電した生体膜のリン脂質、糖脂質、糖タンパク質などと結合して膜を安定化し、膜の変形、膜構成物質や膜で囲まれた細胞内小器官内の物質の抽出を防ぐ役割があります。組織細胞化学の分野ではリソソーム酵素などの拡散を防ぐために、カルシウムイオンがしばしば添加されています。またマグネシウムは細胞分画において核を保存する目的で添加することもあり、核膜のみならず、DNAの膨化などを妨げる役割があると思います。

講義番号	29		
講義名	デジタル画像処理の基礎		
講師名	植松 勝之		
質問事項	本日の内容だけで画像処理をするならば、学術的用途として利用可能なのか	回 答	問題ないと思いますが、論文の投稿の際には、処理を明記すれば確実かと思います
質問事項	2つの画像を比較して見せる際には、明るさとコントラストを同じくらいにした方が良いのか	回 答	見やすくなるので、揃えた方が良いと思います
質問事項	画像の再サンプリングをチェックして解像度を変更するのは、どのような時か	回 答	画像の再サンプリングをチェックして解像度を変更するとドキュメントサイズは一定のまま画素数が変化します。再サンプルとは、画像のサイズを変えて、ピクセル間を補間するアルゴリズムとなります。特に拡大する場合、新たな画素が追加されることになり、それがボケとなりますので、電顕画像の場合、再サンプリングをチェックして解像度変更を行わないようにして下さい
質問事項	SEM画像についても同様な処理で問題ないと考えて良いか	回 答	問題ありません。SEMでは白飛び・黒つぶれに注意してください
質問事項	別の講習会で”トーンカーブをS字にするのはNG”と聞いたのですが、どれくらいならば良いのか	回 答	画像を定量的に取り扱うことがなく、美化処理のために行うのであれば、問題ないと思います。ただ、効果を強くし過ぎると画像が荒れることがあるので、プレビューを見ながら行うなど注意してください