

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第 29 回学術講演会および総会
30 周年記念

今、私達に必要とされる
バイオイメージング解析技術と未来
— 伝承と革新 —

2013 年 6 月 7 日 (金) ~ 9 日 (日)

神奈川歯科大学
神奈川県横須賀市稲岡町 82



医学生物学電子顕微鏡技術学会
Japanese Society of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology

目 次

I.	ご挨拶（開催にあたり）	1
II.	講演会および総会日程表	2
III.	会場のご案内 キャンパスマップ・フロアー案内	3
IV.	参加者の皆様へのご案内	5
V.	発表者ならびに座長の皆様へのご案内	7
VI.	学術講演会プログラム	9
VII.	講演要旨	
	特別講演 I	19
	特別講演 II	22
	教育講演	25
	市民公開講演会	30
	ワークショップ I	31
	ワークショップ II	37
	一般演題（口演発表）	45
	一般演題（展示発表）	55
	実行委員会事務局	66
	実行委員一覧	67
	平成25, 26年度の本学会主催事業のご案内	68
	協力企業・団体一覧	表3

I. 第 29 回学術講演会開催にあたり

医学生物学電子顕微鏡技術学会は、先駆け団体の活動も含めると 30 周年記念を迎える運びとなり、本学会は中間法人を経て社団法人となり、30 年の歴史ある実績を踏まえ、より前進する時期に至りました。ご承知の皆様も大勢おられると存じますが、本学会は、医学・生物学電子顕微鏡技術研究会、電顕技術者交流会が先駆けであります。長い歴史を振り返りますと、神奈川県内所属の本学会主催事業責任者は、学術講演会においては 8 回、電子顕微鏡技術研修会（夏の学校）では 3 回、医学生物学電子顕微鏡シンポジウムでは初回以降 4 回、走査電顕実技講習会は 8 回を重ねてまいりました。30 周年記念の節目に、また神奈川県内で本学会主催事業を開催できることを光栄にまた感慨深く感じております。

さて、この 30 年の歩みのなかで、電子顕微鏡技術を取り巻く環境も大きく変わってまいり、時代の移り変わりを肌で感じております。発足当初は、国内外を問わず“電子顕微鏡”と言う装置がメインとなった学会名称で活動していた時代から、昨今のゲノムプロテオーム解析の時代に移行し、分子生物学と電子顕微鏡との関わり合いを議論するようになってきております。時代は変わりつつも、電子顕微鏡は優れた解像力を有する解析装置で、現在も、また将来も必要不可欠であることは確実です。ただ、我々電子顕微鏡に携わる者にとって従来と異なる点は、より優れた解析法を産み出し、また分野の垣根を越えた技術と研究の交流が要求される時代となりました。一例をあげますと、細胞の機能と構造を理解する上で免疫電顕法等は有効な手段で現在も汎用されており、将来も継承される技術であります。今後は、3 MT 標識を利用した生物分子トモグラフィ法などを始めとする新しい試料作製技術のソフト面の研究開発と、それを解析するハード面の開発発展と言う連携が必要となります。解析装置も蛍光電子相関顕微鏡 (Correlative light electron Microscopy)、大気圧走査電子顕微鏡 (Atmospheric Scanning Electron Microscope)、クライオ電子顕微鏡、連続ブロック表面走査電子顕微鏡：自動電子顕微鏡 (Serial block-face Scanning Electron Microscopy) などが開発されてきており、分野の垣根を越えて活用できる技術が要求される時代となり、3D イメージング (細胞レベルでの立体構築像) の PC 関連技術も重要とされております。勿論、基本となることは、先人が開発した優れた基礎技術の“継承”であります。特に、これから電子顕微鏡に携わる将来を担う若手の研究者・技術者の皆様にとっては過渡期に直面しておりますので、実行委員会では、将来の超微形態研究の発展に必要な“技”と、必要とされる最新の技術に着目し、“種々の解析法と電子顕微鏡との関わり合い・有用性”について考える企画としました。30 周年記念に際し、本学会の“絆”を重視し、諸先輩方に学ぶ、名誉会員、永久会員の皆様と若手の集いも検討しております。また、特別講演 I では、細胞内標識による生物分子トモグラフィ解析関連のご研究の第一人者である 宮澤 淳夫 先生 (兵庫県立大学大学院 生命理学研究科 教授) にご講演を頂き、II では、平成 24 年に山中教授がノーベル医学生理学賞を受賞され話題となった iPS 細胞関連の研究に関する研究をされている江草 宏先生 (大阪大学大学院歯学研究科)、教育講演「光顕から電顕への連携」においては、大野 伸一先生 (山梨大学) へお願い致し、その他、ワークショップ、公開講演会等も企画しております。

本学会は、先にも記しました定例事業の他、国際医学生物学電子顕微鏡シンポジウム (ISEM) の開催、電子顕微鏡に関連する技術書学術書籍の発刊、電顕技術関連の各種 DVD、更には、将来の科学者育成の一助となるべく、一般市民向け写真集等の出版を手掛けております。今回も一般市民の方々にも電子顕微鏡を知って頂くために電顕写真展示や市民公開講座を開催致す予定です。

本学会は、医学、生物学のみならず、生命科学に関与する全ての分野に開かれた学会であり、電子顕微鏡の技術を主な視点とする生命科学的研究において重要な役割を担っている団体です。会員の皆様におかれましては、日頃の研究成果を是非とも一般演題としてご発表頂き、研鑽の場、意見交換、情報交換の場として、若手を始めとするあらゆる層の皆様の積極的なご参加をお待ちしております。最後に、本学会の開催を実りあるものにするために、多数の学会員のご参加を切に願うものであります。実行委員会一同、皆様のご参加をお待ち申し上げます。

医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 29 回学術講演会実行委員

一同

II. 第29回学術講演会および総会 日程表

「今私達に必要とされるバイオイメージング解析技術とその未来 – 伝承と革新 – 」

開催日時 平成25年6月7日(金)、8日(土)、9日(日)

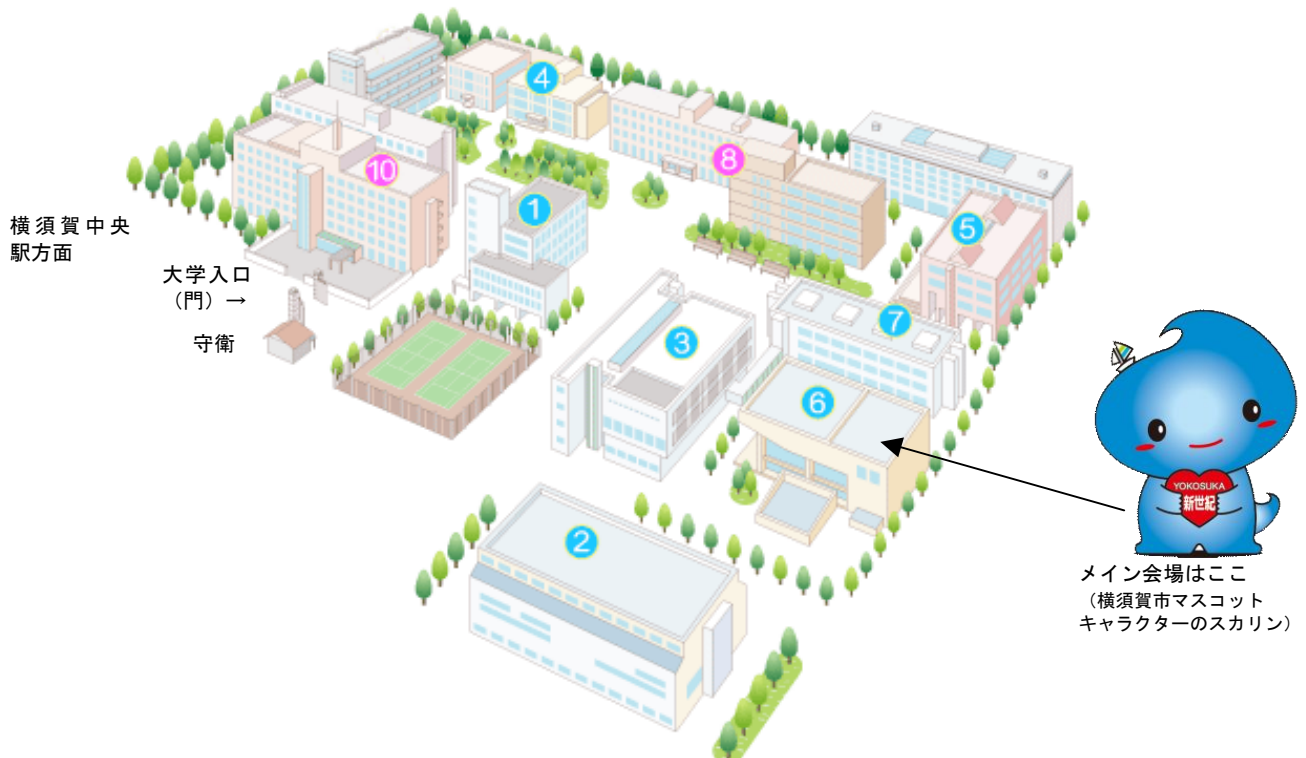
1日目 6月7日(金)	2日目 6月8日(土)	3日目 6月9日(日)
	8:20 受付開始	
9:00	8:50 開会式 9:00 一般演題 30分 技術1:イオン液体観察法	8:50 60分 一般演題 学術ポスター発表 1分間スピーチと会場討論
10:00	9:30 ワークショップ I 70分 「イオン液体観察法」 桑畑 進 先生、津田 哲哉 先生、 石垣 靖人 先生、霜村 典宏 先生	9:50 一般演題 30分 動物組織1:診断への応用
	10:50 一般演題 70分 技術2:新しい観察技術 技術3:新しい観察技術	10:20 一般演題 30分 応用研究2:形態機能解析-2
11:00	12:00 社員総会(評議員会) (会場:第2小講堂)	11:00 60分 特別講演II 江草 宏 先生 「iPS細胞の骨生物学への応用 と歯科臨床への展望」
12:00	昼 食	12:00~12:40 (予定) 学会賞受賞講演 応用部門、技術部門
13:00	13:00 30周年記念行事 (会員報告会を含む) 学術賞表彰 10分	12:40 40分 ランチョンミーティング 昼食 (株)ケー・エー・シー
	13:50 展示企業協賛 各種装置・試薬の使い方講座	13:20 60分 教育講演 大野 伸一 先生 「動物生体内臓器の凍結技法 光イメージング解析の機能形態学的意義」
14:00	14:40 特別講演 I 宮澤 淳夫 先生 「遺伝的コード化標識による 生体分子の電子顕微鏡観察」	14:20 60分 市民公開講演会 高戸 毅 先生 「あごの骨と軟骨の再生医療 -歯科の明るい未来-」
15:00	15:50 一般演題 30分 応用研究1:形態機能解析-1	15:20 『電顕困り事相談』 フリーディスカッション 閉会式
16:00	16:20 ワークショップ II 80分 「電顕技術と病理診断との関わり」 羽賀 千恵 先生、山嶋 哲 盛先生、 柳下 三郎 先生	
17:00	17:40 30周年記念 懇話会 「私の一枚の画像」 諸先輩方と若手の集い	
18:00	18:10 記念撮影 18:30~20:00 懇親会 (会場:学生会館パレット1階)	

Ⅲ. 会場のご案内

- メイン会場は、全て、地図⑥の講堂棟となります。
- 受付 : 地図⑥ 講堂 入り口 (2階)
講演会場 : 地図⑥ 講堂 第1小講堂
総会 (評議員会) : 地図⑥ 講堂 第2小講堂
ポスター発表 : 地図⑥ 講堂 ホール
写真コンクール : 地図⑥ 講堂 ホール
商業展示 : 地図⑥ 講堂 ホール
公開講演会 : 地図⑥ 講堂 第2小講堂
- 昼食 : 地図⑤ 学生会館 クラブ棟 1階 学生食堂
昼食時間帯のみ食事ができます。日替わりランチの他、メニューあり。
日替わりランチ (500円) 6月8日 (土) 横須賀咸臨丸カレー (海軍カレー風)
6月9日 (日) 三崎マグロ漬け丼
- 喫茶コーナー : 地図⑥ 講堂 ホール
地図⑤ 学生会館 クラブ棟 (パレット) 1階もご利用下さい。
(喫煙場所 : 喫煙場所は1カ所のみです。受付にてご確認ください。
横須賀市条例で、路上での喫煙はできません。)
- 懇親会会場 : 地図⑤ 学生会館 クラブ棟 (パレット) 1階

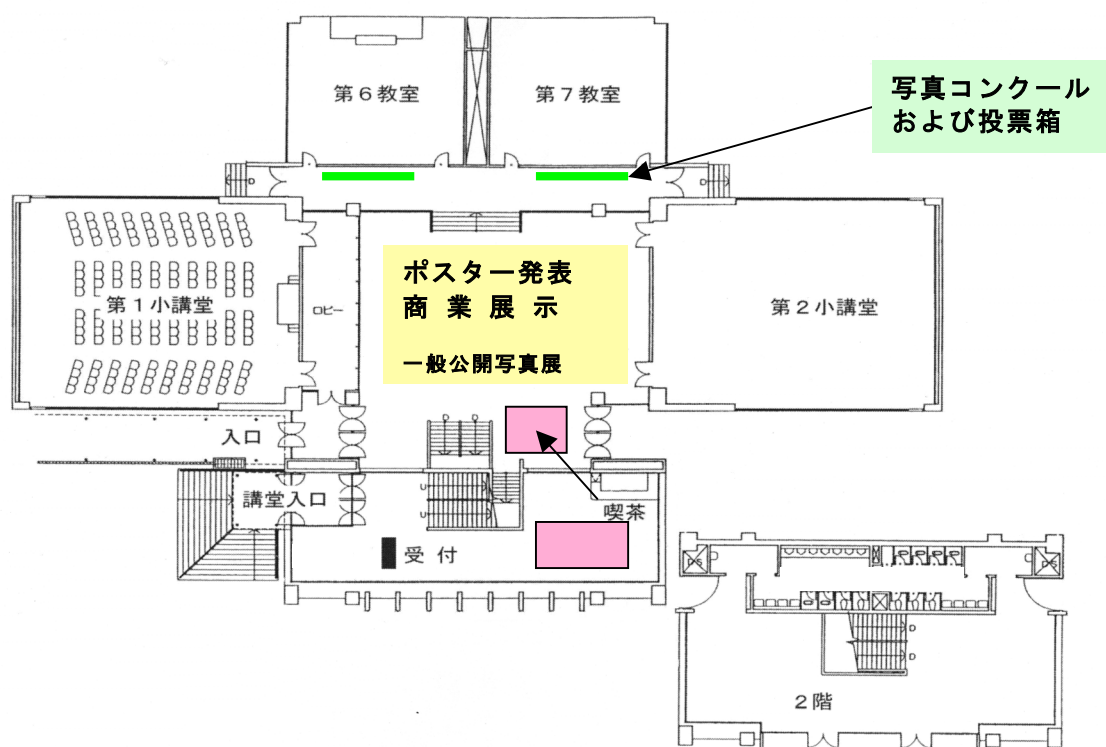
キャンパスマップ

- ①本部棟 ②体育館 ③実習棟 ④図書館 ⑤学生会館 クラブ棟 (パレット)
⑥講堂 ⑦教育棟 ⑧湘南短期大学 ⑩附属病院



⑥講堂から、⑤クラブ棟 (パレット) へは、⑦教育棟の左右二カ所の通路を利用できます。

講演会場 ⑥講堂棟 フローア案内



1. 講演会場

- メイン会場 : 第1小講堂
- 市民公開講演会 : 第2小講堂
- 30周年記念行事 : 第1小講堂
- 商業展示、一般演題（展示発表）、写真コンクール、喫茶コーナー : ホール

2. 控え室

- 来賓控え室 : 第6教室
- 休憩エリア : 受付 右スペース またはパレット1階をご利用下さい。
- 実行委員会控え室 : 第7教室

3. 会議会場

- 常務理事会 : ①本部棟 5階 会議室
- 各種委員会 : ①本部棟 5階 会議室
- 理事会 : ①本部棟 5階 会議室
- 社員総会（評議員会） : ⑥講堂 第2小講堂

※開催時刻等の詳細は、学会本部からの各種会議案内をご覧ください。

4. その他

神奈川歯科大学資料館の見学が可能です。会場内に掲示にてご案内致します。

IV. 参加者の皆様へのご案内

1. 学術講演会および懇親会参加受付

1) 事前登録済み

事前登録受付で、払込票を提示し、名札、領収証、写真コンクール投票用紙、予稿集、その他をお受け取り下さい。

2) 当日登録

事前登録以外は、受付が別になります。

当日登録用紙に必要事項をご記入の上、会員、非会員、学生、協賛学術団体会員、歯科医師会会員受付で、手続きして下さい。

3) 懇親会出席

懇親会の当日申し込みも可能です。参加登録の際、それぞれの受付で取り扱い致します。

3) 歯科医師会会員の方は、生涯教育ポイントの取得をお申し出下さい。

6月9日の招待講演会を受講した歯科医師の方は、6単位が取得できます。短縮コードは'83572'です。参加費用は4,000円となります。

4) クロークは、クローク受付にて貴重品以外をお引き受け致しますが、以下の時間迄に荷物の引き取りをお願いします。

6月8日(土): 18:25分まで(最終引き渡し時刻18:30)。

懇親会会場内に荷物を置くスペースを確保しますが、各自の責任にて置いて下さい。

6月9日(日): 閉会式終了後まで。

2. 各会場は、会場ご案内ならびにフロア案内をご覧ください。

3. 商業展示と製品紹介

1) 商業展示スペースにおいて、各企業の製品、書籍販売などの展示があります。

2) 6月8日(土) 13:50~14:40の間、第1小講堂で、展示企業のご協力により、企業が取扱っている機器、試薬の紹介や、目的達成の活用術などの紹介があります。時間の許す範囲で質問も可能です。奮ってご参加下さい。

4. 写真コンクール

30周年を記念して、10課題に応募戴いております。

1) 応募写真の貼付: ホール写真コンクール掲示場所に、6月8日(土) 10:50までに、貼付けを完了して下さい。遅れた場合、対象外となる場合がありますので、ご注意下さい。

2) 投票: 名札に折込の投票用紙を切り取り、優秀と思われる作品2点以内を選び、応募番号を記載の上、写真コンクール会場にある投票箱に6月8日(土) 16:00迄、投函して下さい。

3) 表彰は、6月8日の懇親会会場で公表し、閉会式にて賞の授与を行います。
なお、電顕に携わった年数が浅い方の表彰も予定しております。

写真コンクール 課題

- 1 自分の興味を持った1枚の写真
- 2 電子顕微鏡が威力を発揮した1枚
- 3 これぞよく撮った！ 自分のスペシャル電顕画像
- 4 電顕が決め手となった症例 一枚の写真
- 5 Art！
- 6 分野別（動物、植物、昆虫、微生物、医動物、海洋生物、非生物、その他）

30周年記念写真コンクール 課題

- 7 電顕を始めて3年未満の経験者が撮った「よく頑張った」電顕画像
- 8 ユニバソロジ（マクロ写真と似た電子顕微鏡画像）
- 9 紹介したいこの1枚
- 10 昆虫の電顕画像！

5. 30周年記念懇話会『私の一枚の画像』 諸先輩と若手の集い

本学会を育てて来られた諸先生方と、将来を担う若手の方々との交流を図る企画です。
苦勞して撮影したここ一番の画像などについてご講演を頂戴し、素晴らしい電顕画像を得るコツやノウハウを知る機会にしてはどうでしょうか。

自由な討論の場として、奮ってご参加下さい。

6. 記念撮影

6月8日（土）18：10 参加者全員の記念撮影を行います。
撮影場所は、当日会場にてアナウンス致します。

7. 懇親会

6月8日（土）18：30～20：00 学生会館パレット1階で行います。

8. ランチョンミーティング

技術的な紹介を軽食をとりながら聴講戴けます。当日、会場にてアナウンス致します。
奮ってご参加下さい。軽食は先着40名となります。

9. フリー・ディスカッション「電顕困り事相談」

6月9日（日）15：20～試料作製や観察結果などで疑問に思っていることを相互に討論しながら解決する場を設定しました。気軽な討論会ですので、是非ご出席下さい。
画像についてはPower point で投影できるデータをお持ち下さり、6月8日迄、受付へご提出下さい。ささいな疑問など、何でも結構です。お気軽にご参加下さい。

10. 写真相談コーナー

不可解な画像について相談を受け付けます。会期会場内に展示し、多くの方のご意見を募集するとともに適切なアドバイスを致します。「電顕よろず相談申し込み用紙」にて事前にご連絡下さい。

V. 発表者ならびに座長の皆様へのご案内

1. 一般演題 口演発表

- 1) 発表時間は、10分（口演7分、質疑応答3分）です。
- 2) 発表受付
講演開始30分前までに第1小講堂のロビー「発表者受付」にて、講演の受付、投影用 Power Point の受付を済ませて下さい。
CD, DVD, USB, などの記録媒体で持参の場合は、受付に設置の PC にコピーさせて戴き、実行委員会担当者が、会場まで運びます。
コピーされたデータを、各自、試写用スクリーンにてご確認をお願いします。
持参した PC で投影を希望の場合は、発表時に速やかに交換できる準備をお願いします。
対応は、Microsoft Office Power Point2007 で作成し、事前に動作確認したもので、Macintosh Office Power Point は使用できませんのでご了承ください。

※なお、コピーしたファイルは、講演終了後、速やかに消去致します。

- 3) 講演者は、セッションが始まる前に会場へ入り、前の講演が始まる際に、「次演者席」にご着席下さい。
- 4) 学会会誌（後抄録）掲載用の原稿は、発表受付の際、同じ受付へご提出下さい。

2. 座長の皆様へ

- 1) 次座長は、セッションの開始前に「次座長席」ご着席下さい。
- 2) 担当セッションの発表の中から、学会誌へ投稿できるとお考えの講演があれば、座長推薦の論文としてご推挙下さり、その旨、会長または編集委員会まで事務局へご通知下さい。
- 3) 招待講演の座長の先生方は、招待者のご講演終了後、感謝状の贈呈をお願い致します。

3. 一般演題 ポスター発表

- 1) 6月7日（金）15:00から貼付けが可能です。受付は行っておりませんので、会場内に居る実行委員へお尋ね下さい。
6月8日（土）に受付の方は、8:30から、第1小講堂のロビー「発表者受付」にて受付致します。その際、1分間スピーチ用の Power Point データもご提出下さい。
貼付けパネルの番号に従い、各自、指定の場所に貼付けを行って下さい。
貼付けに必要な画鋏等は、受付時に受け取って下さい。
- 2) パネルは、横110cm×縦160cmとなります。
上部30cmに演題名、演者名、所属を記載し、代表者の顔写真をお貼り下さい。
- 3) 発表は、第1小講堂で、ポスター発表内容を理解し易くする目的から、1分間のスピーチ（発表者全員約20分間）があります。スピーチ後は、ポスター発表会場へ速や

かに移動し、区分毎に座長がおりますので、座長の進行に従い、質疑応答（約30分間）に対応して下さい。

4) 学会会誌（後抄録）掲載用の原稿は、発表受付の際、同じ受付へご提出下さい。

5) ポスターの撤去は、6月9日（日）14時以降です。その前に撤去を希望の場合は、受付にお申し出下さい。なお、何らかの理由にて撤去出来ない場合も、受付へお申し出下さい。実行委員会にて取り外しさせて戴きます。

4. 写真コンクール応募の皆様へ

第1小講堂のロビーの「写真コンクール受付」へお越し下さい。

指定の場所に、持参した写真を各自貼付けて下さい。

- MEMO -

VI. 学術講演会プログラム

特別講演Ⅰ 6月8日(土) 14:40～15:40

座長 石垣 靖人(金沢医科大学 総合医学研究所)
浜田 信城(神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野)

「遺伝的コード化標識による生体分子の電子顕微鏡観察」

宮澤 淳夫

(兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー専攻 教授)

特別講演Ⅱ 6月9日(日) 11:00～12:00

座長 齋藤 正寛(東北大学大学院歯学研究科口腔修復学講座歯科保存学分野)
高橋 常男(神奈川歯科大学人体構造学)

「iPS細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望」

江草 宏

(大阪大学大学院歯学研究科 歯科補綴学第一教室 助教)

教育講演 6月9日(日) 13:20～14:20

座長 和泉 伸一(沖縄公立名桜大学解剖組織細胞学)
伊東 良子(東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター組織部門)

「動物生体内臓器の凍結技法-光イメージング解析の機能形態学的意義
- 基礎医学的研究から臨床診断応用への挑戦 - 」

大野 伸一、寺田 信生、齋藤 百合花、大野 伸彦、齋藤 成、藤井 靖久
(山梨大学・大学院医学工学総合研究部・解剖学講座分子組織学教室 教授)

市民公開講演会 6月9日(日) 14:20～15:20

座長 高橋 常男(神奈川歯科大学人体構造学)
岡田 周策(神奈川歯科大学口腔治療学講座保存修復学)

「あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来」

高戸 毅

(東京大学大学院医学系研究科感覚・運動機能医学講座口腔外科学分野 教授
東京大学医学部附属病院 22世紀医療センターセンター長
ティッシュ・エンジニアリング部 部長)

ワークショップ I 「イオン液体観察法」 6月8日(土) 9:30~10:40

座長 桑畑 進 (大阪大学大学院工学研究科)
古賀 博則 (石川県立大学生物資源学部)

WS I-1 電子顕微鏡観察に適したイオン液体の探索

津田 哲哉
大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻

WS I-2 SEMによる生体観察とイオン液体の活用

石垣靖人¹⁾、中村有香¹⁾、竹上 勉¹⁾、友杉直久¹⁾、中川秀昭¹⁾、桑畑 進²⁾
金沢医科大学・総合医学研究所¹⁾、大阪大学大学院・工学研究科²⁾

WS I-3 きのこと類におけるイオン液体を用いた SEM 観察法:

菌類の分類学研究と菌根共生の微細構造解析への応用

霜村典宏¹⁾、彌永このみ²⁾、笹本佳裕¹⁾、石垣靖人³⁾、桑畑 進⁴⁾
鳥取大学農学部¹⁾、鳥取大学大学院連合農学研究科²⁾、
金沢医科大学医学総合研究所³⁾、大阪大学大学院工学研究科⁴⁾

ワークショップ II 「電顕技術と病理診断との関わり」

6月8日(土) 16:20~17:40

座長 逸見 明博 (日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野)
伊藤 康雅 (歯科伊藤医院)

WS II-1 病理所見と電顕とのかかわり—神経変性疾患を中心に—

羽賀 千恵
公益財団法人 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト

WS II-2 Reconsider! アルツハイマー病

—「カルパイン-カテプシン仮説」で本疾患の神経細胞死を説明可能か?—

山嶋 哲盛
金沢大学大学院 医学系研究科 再生脳外科 教授

WS II-3 電顕技術と病理診断との関わり 脳腫瘍の診断を主として

柳下 三郎
神奈川県総合リハビリセンター 病理診断科 部長

30周年記念懇話会「私の1枚の画像」 6月8日(土) 17:40~18:10

座長 宮澤 七郎 (名誉理事長)
中村 澄夫 (神奈川歯科大学名誉教授)

会員総会 6月8日(土) 13:00~13:10
30周年記念行事ならびに学会賞表彰 6月8日(土) 13:10~13:50
司会：庶務担当理事 堀田 康明(朝日大学口腔科学共同研究所)
法務委員会委員長 広瀬 治子(帝人(株)構造解析研究所)

学会賞受賞講演(応用部門・技術部門) 予定
6月9日(日) 12:00~12:40
座長：学術委員会委員長
古賀 博則(石川県立大学生物資源環境学部生産科学科)
技術普及委員会委員長
根本 典子(北里大学医学部バイオイメージング研究センター)

展示企業協賛 各種装置・試薬の使い方 6月8日(土) 13:50~14:30
司会：川村 進(永久会員)

ランチョンミーティング 6月9日(日) 12:40~13:20
司会：堀田 康明(朝日大学口腔科学共同研究所)

株式会社 ケー・エー・シー

「電頭困り事相談」フリーディスカッション
6月9日(日) 15:20~15:50

一般演題 学術口演発表

6月8日(土) 9:00~9:30

技術1 「イオン液体観察法」

座長 川里 浩明(大分大学 全学研究推進機構 電子顕微鏡室)
中澤 英子(株式会社日立ハイテクノロジーズ)

0-1. 種々のイオン液体を用いたカラーコンタクトレンズのSEM観察

○佐々木千鶴子¹⁾、夏木靖典¹⁾、四戸 歩¹⁾、高木正之¹⁾、松澤重紀子²⁾、
桑畑 進³⁾、津田哲哉³⁾
聖マリアンナ医科大学 大学院電子顕微鏡研究施設¹⁾、同大学 眼科学²⁾
大阪大学 大学院工学研究科³⁾

0-2. イオン液体を用いた微小甲殻類のSEM観察

○塩野正道¹⁾、許斐麻美¹⁾、中澤英子¹⁾、河合 功治²⁾、桑畑 進³⁾、米澤 徹⁴⁾
(株)日立ハイテクノロジーズ アプリケーション開発部¹⁾、ミヨシ油脂(株)²⁾、
大阪大学・院・工³⁾、北海道大学・院・工⁴⁾

0-3. イオン液体を用いた赤血球の無固定SEM観察

○兵野 篤¹⁾、河合 功治²⁾、阿部 薫明¹⁾、藤原満博³⁾、東 寛⁴⁾、若本 志乃³⁾、
米澤 徹¹⁾
北海道大学¹⁾、ミヨシ油脂(株)²⁾、北海道ブロック赤十字血液センター³⁾、
旭川医大学⁴⁾

6月8日(土) 10:50~11:30

技術2 「新しい観察技術-1」

座長 石田 欣二(岩手医科大学医歯薬総合研究所バイオイメージングセンター)
横山 満(産業医科大学 共同利用研究センター)

0-4. リアルタイムステレオSEMによる生物試料の観察

○坂上 万里¹⁾、許斐 麻美¹⁾、中澤 英子¹⁾、小竹 航²⁾、伊東 佑博²⁾、星野 吉延²⁾、
片根 純一²⁾
(株)日立ハイテクノロジーズ アプリケーション開発部¹⁾、
(株)日立ハイテクノロジーズ 先端解析システム設計部²⁾

0-5. 低加速反射電子による生物切片の広領域・高解像度観察

○檀 紫¹⁾、中澤英子¹⁾、小柏 剛¹⁾、石田 欣二²⁾、花坂 智人²⁾、遠山稿二郎²⁾
(株)日立ハイテクノロジーズ¹⁾、岩手医科大学バイオイメージングセンター²⁾

0-6. 赤外自由電子レーザー照射による生体分子の構造変化追跡

○藤岡 隼¹⁾、川崎 平康²⁾、今井 貴之²⁾、浜田 信哉³⁾、笹倉 裕一⁴⁾、築山 光一¹⁾³⁾
東京理科大学大学院総合化学研究科¹⁾、
東京理科大学総合研究機構赤外自由電子レーザー研究センター²⁾、
神奈川歯科大学細菌学教室³⁾ 神奈川歯科大学インプラント科⁴⁾

0-7. パルスフラッシュ光の効果 ～共焦点および電子顕微鏡観察～

- 伊東 良子¹⁾、伊東 丈夫²⁾、上久 廣昭³⁾、小笠原 弘³⁾、梅木 雅純³⁾、
太田 嘉英⁴⁾
東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター組織部門¹⁾、同細胞部門²⁾、
COMET 株式会社³⁾、東海大学医学部口腔外科⁴⁾

6月8日(土) 11:30～12:00

技術3 「新しい観察技術」

- 座長 鍛冶 光司(東北大学加齢医学研究所)
熊田 秀文(神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学)

0-8. 生体適合性ナノ材料とその細胞内動態の電子顕微鏡評価

- 國廣 桂子¹⁾、池田 牧子¹⁾、酒井 満²⁾、太田 英男²⁾、岸村 顕広³⁾⁴⁾、
安楽 泰孝⁵⁾、片岡 一則⁵⁾⁶⁾、広瀬 治子¹⁾
帝人株式会社構造解析研究所¹⁾、帝人株式会社近藤研究室²⁾、
九州大学大学院工学研究院³⁾、九州大学分子システム科学センター⁴⁾、
東京大学工学系研究科⁵⁾、東京大学大学院医学系研究科⁶⁾

0-9. 健常人血清からのエクソソーム調製法及び検出法の検討

- 河内 佐和子¹⁾、池田 昌郁²⁾、河野 麻理¹⁾、高木 由里¹⁾、和田 淳¹⁾、森川 隆¹⁾
シスメックス株式会社 学術部 セルアナリシスセンター¹⁾、
シスメックス株式会社 中央研究所 第二研究グループ²⁾

0-10. 免疫電顕法による mRNA 構造可視化の限界

- 石垣 靖人、中村 有香、辰野 貴則、馬 小福、竹原 照明、友杉 直久
金沢医科大学・総合医学研究所

6月8日(土) 15:50～16:20

応用研究1 「形態機能解析-1」

- 座長 尾関 教生(愛知医科大学)
跡部 好敏(横浜市立大学医学部 大学院医学研究科 神経解剖学)

0-11. キンギョ脊髄切断後の癒痕内に出現する管状構造の由来

- 武田 昭仁、跡部 好敏、船越 健悟
横浜市立大学 医学部 神経解剖学教室

0-12. ラット脊髄損傷部癒痕組織に生じる筒状構造物についての透過電顕観察

- 跡部 好敏、武田 昭仁、滝口 雅仁、大垣 福太郎、船越 健吾
横浜市立大学医学部 大学院医学研究科 神経解剖学

0-13. マウスに形成誘導された血リンパ節様構造における形態学的解析

- 大塚 裕忠¹⁾、中村 雅典¹⁾
昭和大学歯学部口腔解剖学講座¹⁾

6月9日(日) 9:50~10:20

動物組織1 「診断への応用」

座長 島田 達生 (大分医学技術専門学校)
永井 薫子 (大分大学医学部外科学講座)

0-14. 生体内凍結技法を用いたラット急性うっ血腎集合管の観察

○逸見 聖一朗¹⁾、地家 豊治²⁾、松本 なつき³⁾、尾花 ゆかり⁴⁾、逸見 明博⁴⁾
日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野¹⁾、
日本大学医学部総合医学研究所電子顕微鏡室²⁾、クレハ分析センター³⁾、
日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野⁴⁾

0-15. 日本大学医学部附属板橋病院における心筋生検超微形態診断の意義

○大矢 俊之¹⁾、山田 勉²⁾、地家 豊治³⁾、奥村 恭男¹⁾、高山 忠輝¹⁾、
渡邊 一郎¹⁾、杉谷 雅彦²⁾、石井 敬基³⁾、平山 篤志¹⁾
日本大学医学部内科学系循環器内科学分野¹⁾、
日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野²⁾、
日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門³⁾

0-16. 心筋細胞陥入膜の電気生理学的形態学的解析への試み

○大矢 俊之¹⁾、地家 豊治²⁾、渡邊 一郎¹⁾、逸見 明博³⁾、石井 敬基²⁾、
村井 一郎²⁾、平山 篤志¹⁾
日本大学医学部内科学系循環器内科学分野¹⁾、
日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門²⁾、
日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野³⁾

6月9日(日) 10:20~10:50

応用研究2 「形態機能解析-2」

座長 西川 純雄 (鶴見大学歯学部生物学的研究室)
渡辺 清子 (神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野)

0-17. 人工血管壁における再生内膜平滑筋細胞配列の走査電顕観察

○野一色 泰晴、伊藤 博、跡部 好敏、船越 健悟
横浜市立大学医学部 神経解剖学

0-18. 植物根内におけるネコブセンチュウ雌成虫の微細構造と機能

○宮下 奈緒^{1, 2)}、藪 哲男²⁾、古賀 博則¹⁾、栗原 孝行¹⁾
石川県立大学¹⁾、石川県農林総合研究センター²⁾

0-19. 二種類のナマコ、キンコ (Cucumaria) とマナマコ (Stichopus) の体壁のコラーゲン線維

○大澤 得二¹⁾、松浦 絵里²⁾、小笠原 勝利²⁾、石田 欣二²⁾、遠山 稿二郎²⁾
九州栄養福祉大学食物栄養学部¹⁾、
岩手医科大学医歯薬総合研究所バイオイメージングセンター²⁾

一般演題 学術ポスター発表

6月9日(日) 8:50~9:50

一分間スピーチ 8:50~9:10

ポスター会場での質疑応答 9:10~9:50

技術4 「改良と工夫」 P-01~05

座長:海野 和俊(帝京大学溝口病院電顕室)

技術5 「試料処理と解析法の検討」 P-06~10

技術6 「イオン液体」 P-11~13

座長:井淵 康史(大日本住友製薬 前臨床研究所)

組織化学1 「免疫電顕、酵素組織化学」 P-14~21

座長:安田 愛子(大分大学 全学研究推進機構 実験実習機器部門)

盛口 敬一(愛知学院大学歯学部口腔解剖学講座)

技術4 「改良と工夫」

P-1. 電子顕微鏡試料作製のための新しい細切用カミソリの評価について

○夏木 靖典、佐々木 千鶴子、四戸 歩、高木 正之

聖マリアンナ医科大学大学院電子顕微鏡研究施設

P-2. 超マイクロトーム用デジタルモニタ

○尾関 教生

愛知医科大学教学監

P-3. 超マイクロトームで使用するガラスナイフ用照明装置の試作

○尾関 教生

愛知医科大学教学監

P-4. グリッドサイズを超えた超微形態観察

～ヒストジャンボダイヤモンドナイフの有効活用～

○花坂 智人¹⁾、丸田 節雄²⁾、松浦 絵里¹⁾、小笠原 勝利¹⁾、野崎貴介¹⁾、
石田欣二¹⁾

岩手医科大学バイオイメージングセンター¹⁾、(株)日新EM²⁾

P-5. 急速凍結試料作製 - 任意方向に載物するための工夫 -

○松浦 絵里¹⁾、花坂 智人¹⁾、小笠原 勝利¹⁾、野崎 貴介¹⁾、石田 欣二¹⁾

岩手医科大学 医歯薬総合研究所 バイオイメージングセンター¹⁾

技術5 「試料処理と解析法の検討」

P-6. 迅速試料作製 - 短時間で重合硬化するエポキシ樹脂の検討 第二報 -
○織田 恵理子¹⁾、根本 典子¹⁾、加藤 時雄¹⁾、勝岡 憲生^{1,2)}
北里大学医学部バイオイメージング研究センター画像部門、 同 皮膚科学²⁾

P-7. 迅速試料作製 -24 時間室温重合するエポキシ樹脂の形態観察への応用-
○根本 典子¹⁾、織田 恵理子¹⁾、宮田 聡子²⁾、高須 博²⁾、勝岡 憲生^{1,2)}
北里大学医学部バイオイメージング研究センター画像部門¹⁾、 同 皮膚科学²⁾

P-8. Preyssler 型リンタングステート分子を用いた
フェージのネガティブ染色剤の開発
○定金 正洋¹⁾、佐廣 浩一¹⁾、河東 康彦²⁾、中井 敏博²⁾、小池 香苗³⁾、
佐野 庸治¹⁾
広島大学大学院 工学研究科¹⁾、広島大学大学院 生物圏科学研究科²⁾、
広島大学 自然科学研究支援開発センター³⁾

P-9. 反射電子像を用いた画像解析の検討
○小笠原 勝利¹⁾、花坂 智人¹⁾、松浦 絵里¹⁾、野崎 貴介¹⁾、石田 欣二¹⁾
岩手医科大学 医歯薬総合研究所 バイオイメージングセンター¹⁾

P-10. カラーコンタクトレンズのTEMによる可視化方法の検討
○広瀬 治子¹⁾、荻山 明日香¹⁾、佐々木千鶴子²⁾
帝人(株)構造解析研究所¹⁾、聖マリアンナ医科大学大学院電子顕微鏡研究施設²⁾

技術6 「イオン液体観察法」

P-11. イオン液体によるカラーコンタクトレンズのSEM観察とX線微量分析
○佐々木千鶴子¹⁾、夏木 靖典¹⁾、四戸 歩¹⁾、高木 正之¹⁾、松澤 亜紀子²⁾
広瀬 治子³⁾、桑畑 進⁴⁾、津田 哲哉⁴⁾
聖マリアンナ医科大学 大学院電子顕微鏡研究施設¹⁾、同大学 眼科学²⁾、
帝人(株)構造解析研究所³⁾、大阪大学大学院 工学研究科⁴⁾

P-12. イオン液体の電子顕微鏡への応用
○根本 典子¹⁾、織田恵理子¹⁾、宮澤 七郎³⁾、津田 哲哉⁴⁾、桑畑 進⁴⁾、
勝岡 憲生^{1,2)}
北里大学医学部バイオイメージング研究センター画像部門¹⁾、 同 皮膚科学²⁾、
元 北里大学²⁾、大阪大学工学部大学院⁴⁾

P-13. イオン液体を用いたナノ/バイオマテリアルのSEM観察
○阿部 薫明¹⁾、兵野 篤²⁾、河合 功治³⁾、米澤 徹²⁾
北海道大学・歯学研究科¹⁾、北海道大学・工学研究院²⁾、ミヨシ油脂(株)³⁾

応用研究3 「形態機能解析-3」

P-14. ブドウ品種‘ルビーロマン’における果皮ひび割れ症状の微細構造

- 古賀 博則¹⁾、原田 昂¹⁾、栗原 孝行¹⁾、中野 眞一²⁾
石川県立大学¹⁾、石川県農業総合研究センター²⁾

P-15. カキタンニン含有抗菌剤 (Pancil[®] PS-M) の

ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する付着抑制効果

- 富山 潔¹⁾、向井 義晴¹⁾、齋藤 正寛⁴⁾、渡辺 清子³⁾、熊田 秀文³⁾、
椎谷 亨¹⁾、飯塚 純子¹⁾、長谷川晴彦¹⁾、倉持 江里香¹⁾、寺中 文子¹⁾、
三宅 香²⁾、二瓶智太郎²⁾、浜田 信城³⁾、寺中 敏夫¹⁾
神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学¹⁾、歯科理工学²⁾、
微生物感染学³⁾、東北大学大学院歯学研究科口腔修復学講座歯科保存学分野⁴⁾

P-16. Porphyromonas gingivalis のヒト歯肉上皮細胞への侵入性

および IL-8 産生性におけるトリプシン様酵素の役割

- 渡辺 清子、熊田 秀文、浜田 信城
神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野

P-17. 間葉系幹細胞の3次元培養による歯科用インプラント体周囲の硬組織形成

- 中塚美智子、隈部 俊二、乾 千珠子、上田 甲寅、安 春英、岩井 康智
大阪歯科大学口腔解剖学講座

P-18. 弾性線維の不思議

- 永井 薫子¹⁾、永井 沙和²⁾、安田 愛子¹⁾、川里 浩明¹⁾、猪股 雅史¹⁾、
野口 剛¹⁾、藤原 作平¹⁾、島田 達生¹⁾、北野 正剛¹⁾
大分大学¹⁾、福岡大学²⁾

組織化学1 「免疫電顕、酵素組織化学」

P-19. 精子核のDNAの免疫組織化学

- 西川 純雄、阿部 道生
鶴見大学 歯学部 生物学研究室

P-20. ラット咬筋内の血管評価の再検討 -免疫組織化学とTEMとの比較-

- 三輪 容子¹⁾、佐藤 巖¹⁾、春原 正隆¹⁾、高橋常男²⁾
日本歯科大学生命歯学部解剖¹⁾、神奈川歯科大学解剖²⁾

P-21. インドサイ耳下腺の電顕通常切片での

内因性ペルオキシダーゼ活性検出の検討

- 盛口 敬一¹⁾、城ヶ原 貴通²⁾、織田 銚一²⁾
愛知学院大 歯 口腔解剖学¹⁾、岡山理科大 理 動物学科²⁾

VII. 講演要旨

特別講演 I

遺伝的コード化標識による生体分子の電子顕微鏡観察

宮澤 淳夫

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー専攻

電子顕微鏡法による生体試料観察において、細胞内に存在する様々な大きさや形を持った生体分子の中からある特定の分子を同定するためには、特異的に標識する手法が必要となる。現在、金コロイドを結合させた抗体を用いた免疫染色法が一般的に用いられている。ただし、免疫染色法では、抗原となるタンパク質に対して特異性の高い抗体を手に入れる必要があり、標識融合抗体の非特異的な結合や、組織への浸透性などの問題がある。また、立体構造解析を行う電子線トモグラフィーにおいては厚い組織切片（厚さ 100nm～1 μ m程度）を用いて、試料表面ばかりでなく切片内部の観察も行うため、従来の免疫染色法では十分な標識効果が得られない。さらに、CEMOVIS などにおける凍結試料には、免疫染色法は全く適用できない。そこで、光学顕微鏡における蛍光タンパク質（GFP など）を利用した標識のように、観察したいタンパク質の遺伝子に組み込んで、生きた細胞内で標識融合タンパク質として発現できる電子顕微鏡で検出可能な標識法（図 1）の開発を試みた。

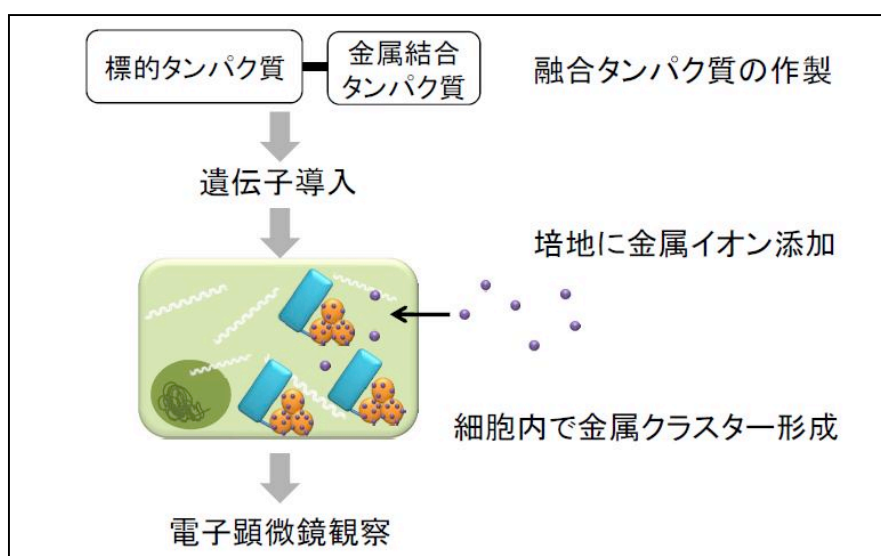


図 1. 電子顕微鏡で観察できる遺伝的コード化標識法

1. GroEL を用いた分子標識用タグの検討

電子顕微鏡で標識として効果的に観察できるのは、金コロイドのような原子散乱因子の大きな重金属により形成されたクラスターである。そこで、金属クラスターを細胞内において形成することが知られている金属結合タンパク質の 1 種であるメタロチオネイン (MT) の遺伝子を、タンデムにつないだ標識タグ (1~5MT) を作製した。これが細胞内で発現できる電子顕微鏡用の分子標識として利用できるか検討するために、ホモ 14 量体タンパク質である GroEL を標的タンパク質として、図 2 のように MT 標識タグ (1~5MT) を遺伝的に融合させた。GroEL の個々のサブユニットに 1~5MT を融合したものを、クラスターを形成させる金属である Cd の存在下、大腸菌で発現させた。その結果、3MT が、最も Cd との結合効率が低いことが明らかになった。また、4MT、5MT では GroEL の 14 量体形成が阻害傾向にあったが、3MT では効率良く 14 量体を形成できることも分かった。そこで、標識タグとして 3MT を用いて、詳細な検討を行うことにした。

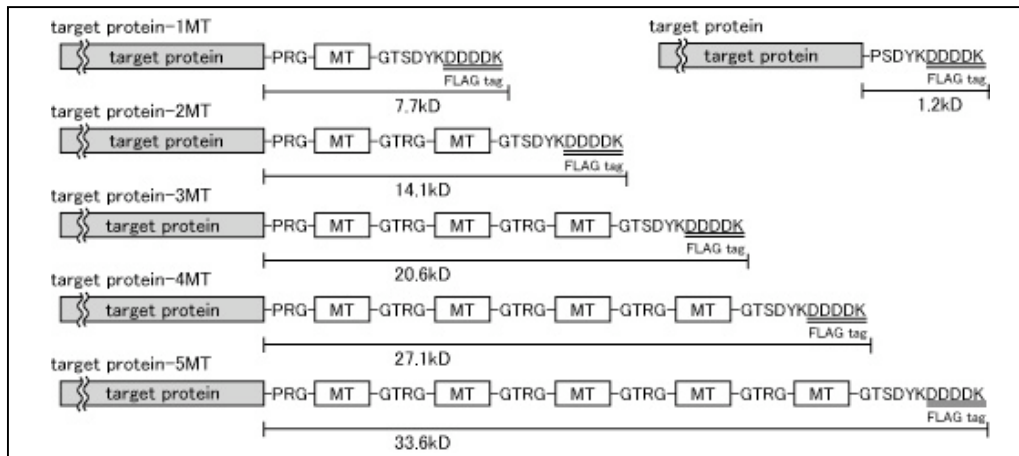


図2. メタロチオネイン (MT) 融合コンストラクトの作製

GroEL-14 (3MT) を大腸菌から精製して電子顕微鏡で観察したところ、電子染色した試料では GroEL と同様の分子形状を確認できた。また、無染色の試料においては電子密度を持った黒いスポットを検出することができた (図3)。

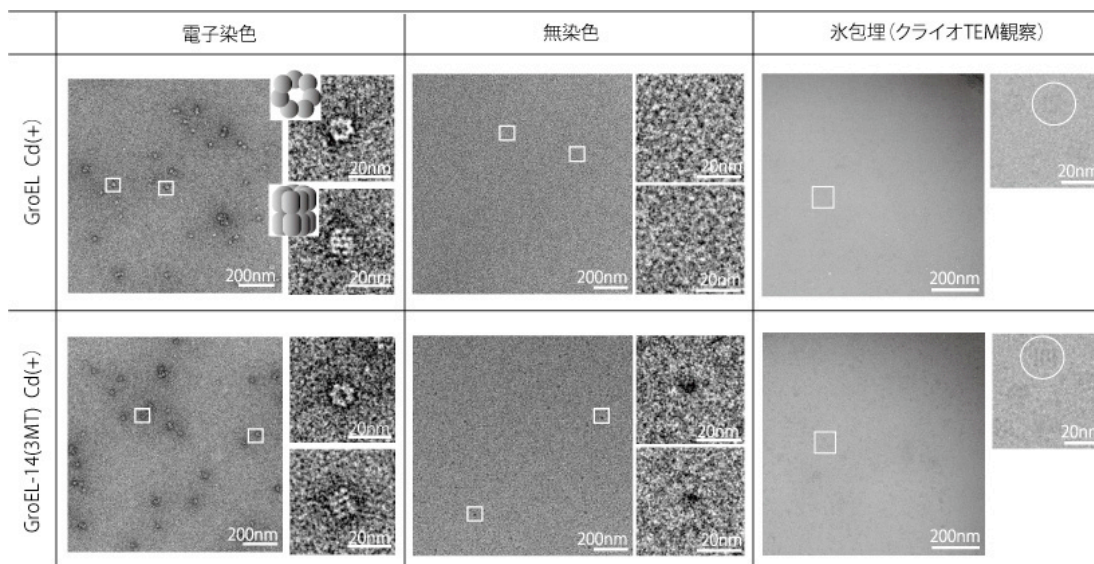


図3. 3MT 融合 GroEL の電子顕微鏡像

さらに、試料を氷包埋してクライオ電子顕微鏡で観察したところ、GroEL-14 (3MT) は 3MT 標識タグを融合させていない GroEL より高いコントラストを持った粒子として検出することができた。氷包埋した GroEL-14 (3MT) の単粒子解析を行った結果、3MT は主に GroEL 分子の内腔部にあり、一部は GroEL 分子の外側へ向かって広がっていることが明らかになった。

2. 細胞内に存在する標識融合 PSD-95 の観察

PSD-95 は、中枢神経のポストシナプスにおける受容体やイオンチャネルの足場タンパク質であり、細胞内情報伝達分子とも相互作用してシナプス伝達において重要な役割を担っている。細胞内での標識タンパク質の観察のため、ポストシナプスに集積する PSD-95 を用いて 3MT 標識タグの検討を行った。海馬初代培養細胞を用いた 3MT 融合 PSD-95 の発現検討の結果、3MT を融合させても PSD-95 本来の機能や局在に影響を及ぼさないことを確認した。また、細胞生存を指標として CdCl₂ の処置濃度と時間を決定した。図4は、PSD-95-3MT を

高発現した神経細胞を電子顕微鏡で観察した結果である。ここでは、Cd クラスター由来の電子密度だけを検出するために、四酸化オスミウムによる後固定や酢酸ウラニル等の電子染色は行っていない。無染色切片では、細胞はバックグラウンドに比べて明るく観察され、Cd を処置した PSD-95-3MT 発現細胞において、高い電子密度を持つ領域が認められた (図 4 a-c)。このような高い電子密度を持つ領域は、無処置の細胞 (図 4 d)、Cd だけを処置した細胞 (図 4 e)、あるいは PSD-95-3MT を発現させただけの細胞 (図 4 f) では認められなかったことから、PSD-95-3MT に結合した Cd クラスターであると考えられる。電子染色を行った細胞の観察により、電子密度の高い領域がポストシナプスであることが明らかとなった。以上の結果より、細胞内に発現した 3MT 標識融合タンパク質は、Cd を処置することで、電子顕微鏡で観察可能となることを示した。

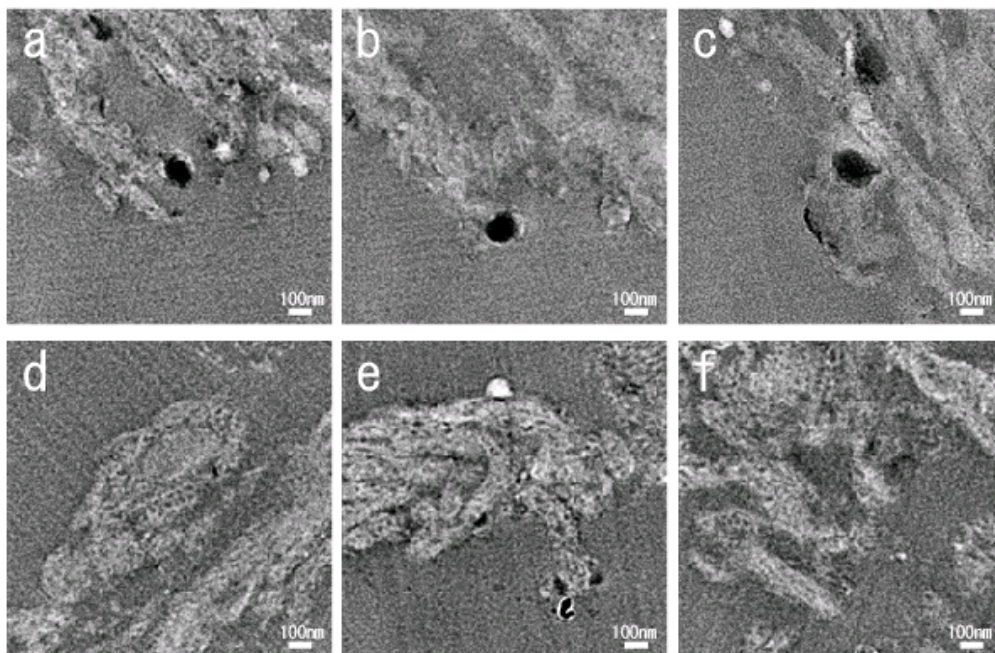


図 4. 3MT 標識融合 PSD-95 を発現した細胞の電子顕微鏡像

これまでの基礎的検討により 3MT 標識タグによる遺伝的コード化標識法は、細胞内で多量体を形成するタンパク質に適用可能であることを示した。今後は、単量体として存在するタンパク質 1 分子の検出に向けた効率的な標識法の検討や、遺伝的標識法がその特徴を最大限に発揮すると思われる凍結試料において、細胞内分子標識の検討を行い、電子顕微鏡観察における遺伝的コード化標識法を確立させたいと考えている。

特別講演Ⅱ

iPS 細胞の骨生物学への応用と歯科臨床への展望

江草 宏

大阪大学大学院歯学研究科 歯科補綴学第一教室 助教

Tel : 06-6879-2946, E-mail : egu@dent.osaka-u.ac.jp

1) 歯科医療における iPS 細胞への期待

歯を失ってしまうと、歯を支えていた周りの歯槽骨は必ず吸収される。この歯槽骨吸収の程度には大きな個人差があるが、多量の歯槽骨を失った場合には、その後のインプラント治療が極端に困難になってしまう（図1：左図）。また、入れ歯（義歯）の治療においても、抜歯後に歯槽骨の吸収が高度に進行すると、歯槽骨と口腔粘膜によって形成される堤状の高まり（顎堤）が平坦になってしまい、義歯を安定して支えることが困難となる（図1：右図）¹⁾。したがって、機能・審美的に良好なインプラントあるいは義歯治療を可能にするために、喪失した歯槽骨を確実に再生し、その骨量を長期的に維持するあらたな技術の開発が待たれている²⁾。

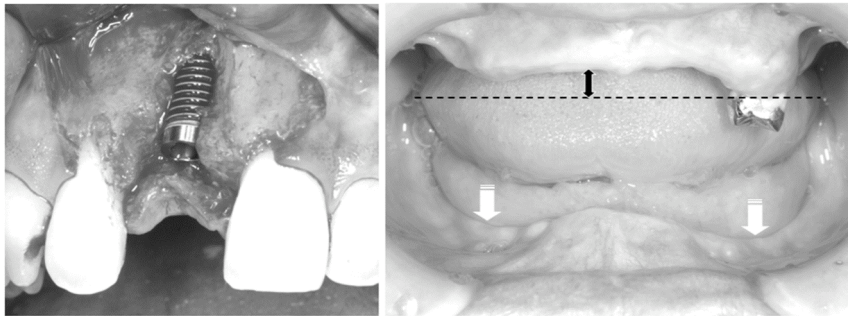


図1 歯を失った後に生じる歯槽骨吸収¹⁾（許可を得て転載）

これに応えるべく、歯科では生体材料および幹細胞に着目した再生医療研究が急速に進展している³⁾。よく知られている幹細胞には、成体組織に少量存在する組織幹細胞、あるいは胚性幹細胞（ES細胞）がある。しかしながら、これらの幹細胞には、細胞採取時の侵襲や限られた分化・増殖能、あるいは受精卵を扱う倫理的問題や移植時の免疫拒絶などの問題がついてまわる⁴⁾。近年、皮膚などの体細胞に数個の遺伝子を導入することで、iPS細胞（人工多能性幹細胞）を作製する技術が報告された⁵⁾。この技術によって、ES細胞のように胚を破壊することなく、個々の患者の細胞から万能細胞が作製可能となるため、その再生歯科医療への応用が期待されている。

2) 歯肉を用いた iPS 細胞の作製

iPS細胞の臨床応用には、採取の容易な組織細胞からiPS細胞を効率よく作製する技術が重要となる。また、体細胞からiPS細胞を作製するためのリプログラミング（初期化）に一般的に用いられている山中因子には、未分化維持機構に重要な役割をするOct3/4およびSox2に加え、癌関連遺伝子であるKlf4およびc-Mycが含まれている。特にc-Mycは、機能が過剰になることにより癌の原因となる癌遺伝子である。したがって、iPS細胞の臨床応用を考えた場合、安全性を確保するためには、この因子を用いずにiPS細胞を樹立することが望ましい。

歯肉は歯科治療の過程で切除される機会の多い組織であり、切除歯肉片は一般的に廃棄されている。我々は、マウスおよび患者の歯肉由来線維芽細胞に山中 4 因子あるいは 4 因子から癌遺伝子 c-Myc を除いた 3 因子を導入することで容易に iPS 細胞が樹立可能であることを見出している⁶⁾。

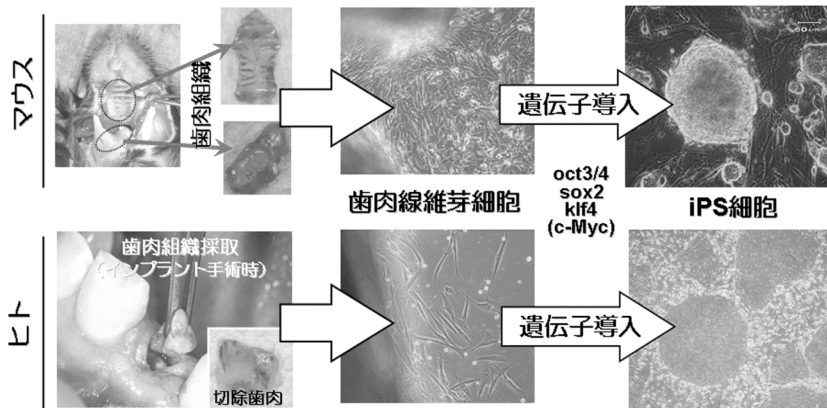


図2 口腔粘膜歯肉を用いた iPS 細胞の作製¹⁾ (許可を得て転載)

3) 歯肉由来 iPS 細胞の骨形成能

iPS 細胞を用いた歯槽骨再生医療を実現するためには、多分化能を有する iPS 細胞を移植した先で腫瘍化させることなく骨組織へ確実に分化誘導する技術を確認することが重要である。我々は、iPS 細胞から骨を作る技術の開発を進めており、歯肉から樹立したマウス iPS 細胞が成熟した骨芽細胞への分化能を示すことを確認している。また、iPS 細胞から誘導した成熟骨芽細胞の機能解析には、走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型 X 線分析装置を用いた元素分析および透過型電子顕微鏡を用いた電子線回折によるハイドロキシアパタイト結晶構造の検出が有用であった。

さらに我々は、温度応答性ハイドロゲル⁷⁾を利用することで、試験管内で三次元的に石灰化した iPS 細胞の凝集体を作製する技術を確認しており、この技術に小分子化合物を用いることで iPS 細胞の腫瘍化を抑制しながら骨形成を誘導することを可能にしている (未発表データ)。

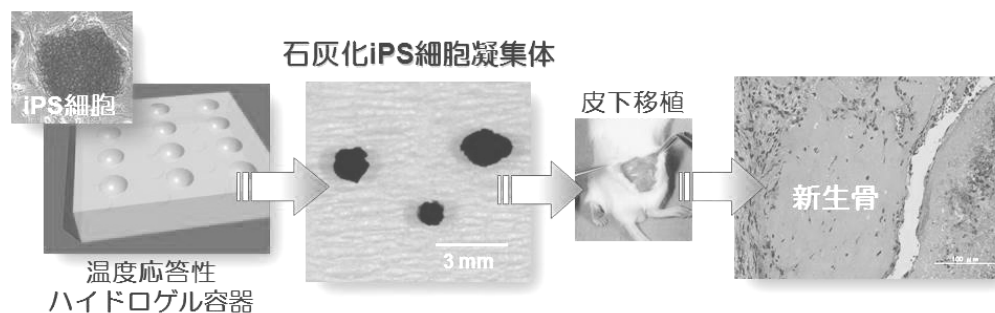


図3 iPS 細胞による異所性骨形成 (未発表データ)

個々の患者から作製された iPS 細胞は、将来的にはさまざまな組織の再生医療への応用が期待されるだけでなく、試験管内で患者固有の歯周組織における生体反応を再現するツールとなる可能性を秘めている (図4)⁸⁾。本講演では、歯肉由来 iPS 細胞の樹立およびその骨生物学への応用について言及しつつ、今後の課題と将来の展望について考察したい。

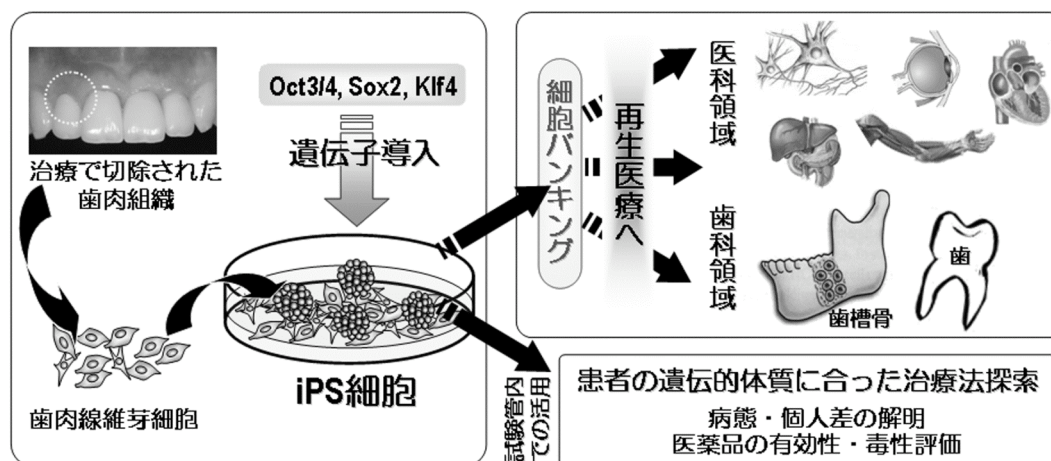


図4 歯肉由来 iPS 細胞の歯科臨床への展望¹⁾ (許可を得て転載)

【参考文献】

- 1) Egusa H. iPS cells in dentistry. Clin Calcium 2012; 22: 67-73.
- 2) Egusa H, Saeki M, Doi M, Fukuyasu S, Matsumoto T, Kamisaki Y, et al. A small-molecule approach to bone regenerative medicine in dentistry. J Oral Biosci 2010; 52: 107-118.
- 3) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. J Prosthodont Res 2012; 56: 229-248.
- 4) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. J Prosthodont Res 2012; 56: 151-165.
- 5) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-676.
- 6) Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, et al. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. PLoS One 2010; 5: e12743.
- 7) Sasaki J, Asoh TA, Matsumoto T, Egusa H, Sohmura T, Alsberg E, et al. Fabrication of three-dimensional cell constructs using temperature-responsive hydrogel. Tissue Eng Part A 2010; 16: 2497-2504.
- 8) 江草 宏, 西村一郎, 中尾 眞. iPS細胞と遺伝子診断で進化する再生医療～最先端の Personalized Dentistry. GC Circle 2012; 142: 4-11.

教育講演

動物生体内臓器の凍結技法-光イメージング解析の機能形態学的意義 - 基礎医学的研究から臨床診断応用への挑戦 -

大野 伸一、寺田 信生、齊藤 百合花、大野 伸彦、齊藤 成、藤井 靖久
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・解剖学講座分子組織学教室

はじめに

最近の医学生物学分野では、遺伝子解析や遺伝子操作による解析法が隆盛を極め、生命の根幹に関わる事実が、明らかにされています。しかも、再生医療分野での iPS 細胞の臨床応用のように、すでに新たな生命科学が展開されています。一方では、生命体を構成する細胞組織の機能が、動物生体内臓器に依存する限り、形態学的解析法は必要とされます。また、最近の分子形態学的解析法の進歩も顕著であり、遺伝子工学的手法や免疫組織化学法を併用し、蛍光標識分子の光イメージング法により、動物生体内の特異的蛋白合成やダイナミック細胞内輸送等が、明らかにされています。本講演の前半では、動物生体内での機能解析に有用な光イメージング法に対応した組織切片作製が可能である「生体内凍結技法」について供覧致します。また後半では、凍結技法のヒト臨床診断応用を目指したクライオ生検装置の開発についても提示致します。

I. 通常顕微鏡試料作製法の留意点

電顕および光顕試料作製法は、細胞組織の固定・脱水、合成樹脂（光顕ではパラフィン等）への包埋・硬化、および切片の作製・染色、最後に電顕および光顕観察に分けられる。最初の固定処理では、組織内物質の移動や形態変化が必ず起こってしまう。特に可溶性小分子蛋白の移動や流出は避けられないし、また生体内で急速に行われている形態学的変化を捉えることができない。次のステップでは、脱水して合成樹脂（光顕はパラフィン等）に包埋しなくてはならない。この過程においても、多くの物質が除かれ、また同時に細胞組織の収縮も避けることができない。さらに電顕用には、液状合成樹脂の重合硬化させるために加熱が行われる。このようにして動物生体内で水分を多量に含んだ細胞組織は、過酷な処理ステップを耐えるわけである。最後に電顕用超薄切片は、高真空の電子顕微鏡体内で観察する。一方、以上に述べた試料作製過程での人工産物形成を極力少なく、生体内により近い形態像を観察しようとする努力がなされてきた。

II. 凍結技法の基礎的事項

(1) 凍結の目的

上記の灌流固定法や浸漬固定法では、主に（パラ）ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドなどを用いた“化学固定”が行われている。しかし、灌流圧の影響や試料切除時の虚血と酸欠が、どうしても起こってしまう。そこで、できるだけ生きている状態に近い組織切片標本をつくるための方法として“凍結技法”がある。これは動物生体内臓器を瞬時に水中に閉じ込める“凍結”という物理現象を用いている。

(2) 急速凍結技法とは何か？

この冷却速度が約 $10^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ の凍結技法では、新鮮切除組織を可及的速やかに急速凍結する。これにより、動物試料切除後に起こる細胞組織の形態学的変化をできる限り少なくすることができる。しかし、電顕レベルでは凍結組織表面より、通常は約 $10\ \mu\text{m}$ 以内で氷

晶形成が少なく(硝子状凍結)、観察が可能である。一方、光顕レベルのパラフィン包埋切片では、解像力が極端に低いために、200~300 μ m くらいの深部まで観察が可能である。

(3) 種々の凍結用寒剤とその物理的特性

一般的に凍結用としてよく使用する液体窒素は、低温(沸点; -196°C)ではあるが、融点(-210°C)と沸点の温度差が 14°C と小さいために、容易に気化して熱伝導を低下させるので、形態観察のための生物試料の急速凍結用寒剤には使用できない。同様の理由により、液体ヘリウムも極低温(-269°C)であるが、融点(-272°C)との温度差が 3°C であるために、液性寒剤としては使用できない。一方、イソペンタン(融点 -160°C)やプロパン(融点 -188°C)は、融点と沸点の温度差が、各々 188°C と 146°C と大きく、凍結用寒剤としては、よく使用されている。なお我々は、このイソペンタンとプロパン両方の長所を生かすために、混合液性寒剤として使用している。

III. 一般的急速凍結技法の留意点

この急速凍結技法の特徴は、生体内の細胞組織に近い形態像が得られることである。もちろん急速凍結試料を凍結置換固定して、電顕用エポキシ樹脂および親水性合成樹脂包埋や光顕用パラフィン包埋することで、形態学的解析や免疫染色も可能である。たとえば、血管内アルブミンを考えてみると、実験動物を灌流固定すれば、それらは固定液とともに流失してしまう。また各臓器の一部を切除して、化学固定液につけたとしても、やはり可溶性物質の移動は避けられない。一方、急速凍結技法では、すべての物質を瞬時に水中に閉じ込めることで、そのような移動と流失を阻止することができる。しかし、新鮮無固定組織の急速凍結技法では、臓器組織の切除による循環血流の停止や酸素欠乏下での形態変化が、必ずおこってしまう。したがって、たとえこの急速凍結技法を使用しても、“生きた動物”での動的な細胞組織の機能分子形態学的特徴を明らかにすることはできない。そこで、動物生体内で循環血流が維持された“生きた”細胞組織を直接に凍結する必要がある。

IV. 生体内凍結技法の手技と特徴

これは、前述の急速凍結技法を麻酔下動物の生体内臓器で直接に行なう方法である。(1) 手技：例えば麻酔下動物を開腹する。肝臓、脾臓や小腸などの臓器表面は、わずかな腹水で湿っているので、乾燥に注意する。また、心臓や肺では開胸するために人工呼吸器に接続して、呼吸管理が必要である。その後できるだけ速やかに、液性イソペンタン・プロパン混合寒剤(約 -193°C)を直接麻酔下動物臓器にかけて生体内凍結する。また、電顕用試料作製のために、液体窒素冷却メス刃で標的臓器に切り込む場合は、市販の生体内凍結処理装置(エイコー社製)で簡便に行なうことができる。(2) 特徴：この生体内凍結技法では、麻酔下動物において、虚血と酸欠の影響がまったく無い細胞組織の形態像が得られることである。特に光顕レベルでは、観察範囲が広く、十分な実験データを収集することができる。

V. イソペンタン・プロパン混合寒剤の作製法

ここでは、上記の液性イソペンタン・プロパン混合寒剤の簡便な作製法について述べる。はじめに針金などで50cc ビーカーを液体窒素中につるすことができるように加工する。そこに約15ccの市販のイソペンタン溶液を分注してから、液体窒素中につりさげる。この時に液体窒素を入れた発泡スチロール箱の下から、マグネットスターラーにより、ビーカー内のイソペンタンを攪拌する。さらに速やかに市販のプロパンボンベに連結したノズル先端をイソペンタン内に完全に埋没させてプロパンガスを吹き出すことで、冷却液化させることができる。この時に、中にあるマグネットですっかり攪拌されていることを確認する。

時には、プロパンガスのふき出しが遅れて、イソペンタンが冷却固化するので注意が必要である。通常では、これにより気体のプロパンガスは、ほぼ完全に冷却液化させることができる。作製される液性イソペンタン・プロパン混合寒剤の容量は、徐々に増加して4~5分で約45cc（イソペンタン：プロパン=1：2）になる。この時の温度は、約-193℃となることが知られている。この作製された混合寒剤に空気中の湿気が、小さな霜となって溶け込むことを防ぐように、ビーカー全体を入れた発泡スチロール箱に蓋をすることも大切である。しかも混合寒剤の作製後は速やかに使用し、いつまでも放置しておかないことである。

VI. 光イメージング法の留意点

近年、急速に発達してきた光イメージング法は、生きた動物生体内臓器や培養細胞等を対象として、種々の機能的分子構造を解析することに、よく利用されている。しかし、このような生きている細胞組織に対応する機能的形態像は、通常の固定・脱水・包埋した光顕用組織切片（死んだ形態像）では、解析することができない。この問題を解決するためには、すでに述べた瞬時に全ての細胞組織内成分を氷中に閉じ込めることができる生体内凍結技法が有用であると考えられる。すなわち、生きた細胞組織のデジタル化された光イメージング像の裏づけとなると共に、その実体を解析できる光顕用組織切片（生きた機能形態像）を作製することが可能である。

VII. 生体内凍結技法による機能分子形態学的応用

i) マウス生体内小脳分子層の電顕的解析

麻酔下マウスを注意深く開頭し、脳表面を露出させる。電顕試料作製には、速やかに脳表面より冷却メス刃で切り込むと同時に液性イソペンタン・プロパン混合寒剤で生体内凍結する。これを2%四酸化オスミウム含有アセトン中で凍結置換固定後、エポン合成樹脂に包埋した。脳循環血流の維持された小脳分子層では、神経細胞やグリア細胞間隙は開大し、正常機能状態下シナプス構造が散在していた。このことは、血行動態が維持された生体内小脳分子層においては、水分含有量は多くあるが、血流遮断の酸素欠乏により、消失してしまうことが示唆された。

ii) 動的シュミットーランターマン（SL）切痕の形態学的解析

麻酔下マウスの坐骨神経を露出して、下肢を伸展させた状態で、液性イソペンタン・プロパン混合寒剤を直接かけて生体内凍結した。型のごとく2%パラフォルムアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定後にパラフィン包埋した。この坐骨神経の伸展により、神経線維の太さは、非伸展時と比較して大小のバラツキが大きくなった。さらにSL切痕に局在するプロテイン4.1Gの免疫細胞化学的解析では、伸展により狭小化した坐骨神経線維の部位に対応しており、SL切痕が伸展力の調整をする機能を有していることが示唆された。

iii) 拍動心筋組織内血清蛋白の免疫組織化学的解析

麻酔下マウスに心電図と人工呼吸器を装着して、心臓拡張期に生体内凍結した。一方、ウシ血清アルブミン（BSA）を尾静脈より注入して、5、30分、4、8、48時間後、同様に生体内凍結した。さらに凍結置換固定後、型のごとくパラフィン包埋した。脱パラフィン切片を、アルブミン、IgG1、コネキシン43、BSA等の各抗体で免疫染色した。正常血行動態下マウス心筋組織では、アルブミンとIgG1は、血管内とともに心筋細胞間基質にも見られたが、特にアルブミンはT細管とコネキシン43免疫染色陽性の介在盤にも局在した。一方、BSA注入マウスでは、30分後にBSAが一過性に介在盤に見られた。以上のように、循環血行動態を維持した心筋組織内での可溶性血清蛋白の局在変化が明らかとなった。

iv) 生きたマウス骨格筋線維内ATP局在の可視化

麻酔下マウスの殿筋を露出して、生体内凍結した。さらに 0.2%グルタルアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定をして、クライオスタット切片を作製後、ATP 可視化のためにルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を行った。光顕でルミネッセンス光の強度を相対的光子数として画像化すると、骨格筋線維内の ATP は、細胞間基質に比較して有意に高値であり、また各筋線維間での ATP 量の相違が見られた。このように生体内凍結技法により作製した光顕用切片で、骨格筋線維内の ATP 量の比較検討が可能となった。

v) 生きたマウス肺胞中隔壁の機能的形態変化と肺血行動態の可視化

麻酔下マウスに人工呼吸装置を装着して、機能状態を維持して胸腔を開き、肺を露出した。①呼気および吸気時の肺を前述のように生体内凍結した。②650nm 蛍光波長を放つグルタチオン被覆 Q-dot (量子ドット) を右心室内持続注入開始から 1、2、5~10 秒後、同様に生体内凍結した。HE 染色では、肺胞中隔壁内の毛細血管は流動赤血球に満たされ、肺胞腔の吸気と呼気を反映した機能的形態像が得られた。また、Q-dot 注入の 1 秒後では、毛細血管をはさんで Q-dot の局在する細動脈と Q-dot の見られない細静脈が交互に認められた。以上のように、機能的呼気と吸気時の肺組織切片像とその血行動態の可視化が可能となった。

vi) 実験的肺高血圧症および肺腫瘍塞栓の循環動態解析法

①上記の麻酔下マウス上行大動脈にクリップをかけて、経時的に肺を生体内凍結した。7 分後の肺胞中隔毛細血管内には赤血球凝集が見られ、さらに肺胞腔内には多量のアルブミン浸出液が同定された。②またマウス悪性黒色腫細胞を右心室内注入後、さらに経時的に Q-dot 注入をして生体内凍結をした。注入腫瘍細胞は凝集して毛細血管内に見られ、さらに周囲には多量の血小板が集合していた。また、一部の腫瘍凝塊周囲には、Q-dot の局在が確認できた。以上のように、生体内凍結技法と Q-dot 注入や免疫染色法を併用して、Q-dot 光イメージング法に対応した光顕用組織切片像が得られた。

VIII. 生体内凍結試料の共焦点ラマン顕微鏡解析法

i) 生体内凍結-凍結乾燥試料での組織構築の解析

ラマン散乱光の波形は、物質の分子組成を反映することが知られている。そこで麻酔下マウス眼球を生体内凍結-凍結乾燥して、その無染色標本を共焦点ラマン顕微鏡で観察した。ラマン波形は、眼球の各層に対応して特徴的なパターンを示していた。特に脈絡膜と網膜色素上皮細胞内メラニン顆粒は、特徴的な波形を示した。また、赤血球ヘモグロビンと光受容蛋白ロドプシンに対応した波形を強膜血管内と視細胞層に各々認めた。以上のように、生体内凍結試料により、無染色のまま組織内機能分子局在を同定できると考えられる。

ii) 低温下共焦点ラマン顕微鏡による酸素分圧解析法

まず凍結したヒト全血の種々酸素化によるラマン波形を低温下 (約-150°C) で比較検討すると 1378cm^{-1} と 1355cm^{-1} の相対的ピーク比が変化し、その値から酸素飽和度が推測できることが分かった。そこで生体内凍結したマウス肝臓試料を低温下 (約-150°C) ステージ上で、共焦点ラマン顕微鏡で解析した。これにより、麻酔下マウス肝臓内流動赤血球酸素化ヘモグロビンの局在を可視化することができた。このように、酵素の結合したヘモグロビンの機能分子形態学的解析が、生体内で時間分解能を高めて可能となる。

IX. 臨床診断応用のためのクライオ生検法の開発

すでに述べた生体内凍結技法では、同一個体から経時的に組織試料を採取することは困難である。一方、臨床現場でのヒト生検法は、経時的に試料採取が可能であることから、新たに“クライオ生検法”を開発した。この“クライオ生検法”では、液体窒素で冷却

した自家製ピンセットにより、凍結試料採取をしたが、肝細胞内グリコーゲン、酸素欠乏により消費され、肝小葉内での部位差が明瞭となった。この“クライオ生検法”を用いることにより、生きたマウスの正常血行動態を保持し、試料切除に伴う虚血と酸欠の影響のない肝組織を、経時的に凍結採取することが可能になった。

X. 生体内凍結技法とクライオ生検法の病理学的解析応用

今後の凍結技法の臨床診断応用を目指して、ヌードマウスに移植した培養ヒト肺癌細胞による腫瘍組織塊を、切除組織の浸漬固定・アルコール脱水(IMDH)、クライオ生検法・凍結置換固定法(Cb)、もしくは生体内凍結技法・凍結置換固定法(IVCT)を用いてパラフィン包埋し、HE染色を行って、比較検討した。IMDHでは、赤血球のうっ滞が著明で、血管構築が不明瞭であり、また腫瘍細胞の収縮と変形が見られた。一方、CbとIVCTでは、血管内の流動赤血球や核異型を伴う腫瘍細胞が、明瞭に観察された。さらに腫瘍組織塊の毛細血管では、流動赤血球を含む機能的血管が部位により発達していた。しかし、未発達な血管周囲組織では、血管新生に関与するVEGFの発現が強くみられた。従って、生きた動物やヒト病理組織の生体内凍結およびクライオ生検試料での病理学的解析が可能である。

XI. ヒト臨床診断用クライオ生検装置（プロトタイプⅢ型）の開発

従来の診断用病理標本では、虚血や酸欠および標本作製に伴う細胞組織の収縮と変形は避けることができなかった。一方、生体内凍結技法では、生きた動物生体内臓器を直接に凍結固定をするために、上記の応用例で示したように、従来の標本作製に伴う人工産物形成を避けることができる。さらにまた、近年の光学技術進歩は目ざましいものがあり、共焦点レーザー（走査型）内視鏡が開発され、病的ヒト組織表面直下（約250 μ m深）の生体内イメージングが可能となっている。しかしながら、通常の生検病理組織像である“死んだ形態像”とその最新の“生きたイメージ像”とは、大きな機能分子形態学的ギャップがあった。そこで、ヒト臓器へのクライオ生検法の応用を目指して、最近では新クライオ生検装置（プロトタイプⅢ型）を開発している（国内外で特許を保有）。このクライオ生検装置の最大の特徴は、胃ファイバースコープ用生検鉗子を使用していることである。さらに、この装置では、生検鉗子を通す内筒と、それを液体窒素下（約-190 $^{\circ}$ C）に冷却して保持する外筒からなっている。しかも、これは現在市販されている腹腔鏡（オリンパスメディカルシステムズ）に装着が可能である。実際には、液体窒素貯蔵タンクから、電気ヒーター加熱により、液体窒素を加圧灌流して、内筒を約-190 $^{\circ}$ Cに冷却する。さらに液体窒素を閉鎖系で使用するために、気化窒素回収タンクを装備している。本クライオ生検装置（プロトタイプⅢ型）が実用化された場合、腹腔鏡や内視鏡により、従来は観察が不可能であった“生きたヒト臓器”の機能分子病理学的解析ができるようになる。

まとめ

以上に述べたように、生体内凍結技法により、生きた動物臓器の形態学的特徴や種々蛋白質の免疫組織化学的局在を明らかにすることができた。今後は、特に生体内機能分子や標識プローブを動的に解析する「光イメージング法」と瞬時の「生体内凍結技法」の融合により、生きた動物臓器の動的形態変化と、機能蛋白質分子や標識プローブの局在を組織切片上で解析することが可能である。また近い将来には、現在開発中のクライオ生検装置（プロトタイプⅢ型）により、ヒト病理診断学的臨床応用ができると思われる。

市民公開講座

あごの骨と軟骨の再生医療 歯科の明るい未来

高戸 毅

東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 口腔外科学分野 教授
東京大学医学部附属病院 22世紀医療センター センター長
ティッシュ・エンジニアリング部 部長

顎顔面領域は四肢骨に比較して荷重負荷がかかりにくく、概して再建で必要とされる組織量も少ないことから、再生組織の移植に適した領域であると考えられる。しかし、人工骨や人工歯根など様々な生体材料を用いた治療法が確立しており、マイクロサージャリーによる組織再建やエピテーゼによる補綴も行われている。従って、顎顔面領域における再生医療の展開は、既存の医療を低侵襲治療として凌駕する、或いは、より卓越した治療効果を発揮することにより可能になると考える。本講演では、われわれのグループが開発し実用段階に達している骨・軟骨再生医療について、基礎と臨床の面から紹介する。

近年、骨延長や骨髄海綿骨移植を用いた下顎骨再建など、いわゆる *in Situ Tissue Engineering* が行われているが、これは自己の骨形成能を利用した治療法である。われわれは、このようにヒトが元来有している骨形成能を最大限に引き出せるようなスカフォールド、すなわち、自己の骨に置換するような人工骨の開発を行ってきた。三次元造形技術もほぼ完成し、複雑な顎顔面形態も容易に再現可能である。また、最近、骨形成因子を含有した新規人工骨の作成にも成功した。

軟骨に関しては、再生医療のなかでも比較的臨床応用が進んでおり、関節軟骨欠損やシリコンインプラント隆鼻術後の合併症症例などに、自家軟骨細胞移植が行われている。しかし、現行の治療法では、細胞を懸濁液/ゲルの性状で移植するため、形態や強度の付与が困難である。我々は、軟骨細胞の増殖培養液や、生分解性ポリマー足場素材の検討を行い、形と硬さを有するインプラント型再生軟骨の開発に成功した。前臨床試験において有効性と安全性を確認し、学内臨床研究審査委員会および厚生科学審議会の審議を経て、現在、口唇口蓋裂患者の鼻変形に対し自主臨床研究を行っている。本講演では、インプラント型再生軟骨組織の研究開発および臨床応用の事例を供覧しつつ、再生医療における臨床応用の問題点と今後の展望を述べる。

電子顕微鏡観察に適したイオン液体の探索

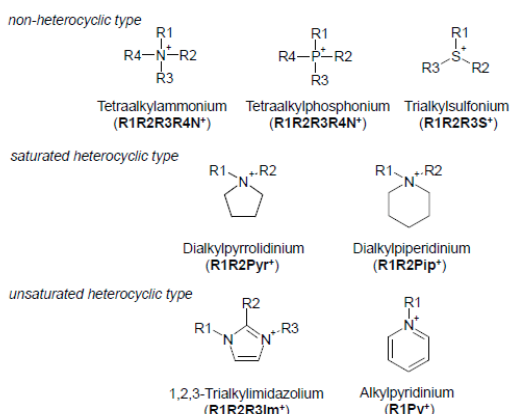
津田 哲哉

大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻

イオン液体 (Ionic Liquid [IL]、室温イオン液体、室温熔融塩、常温熔融塩などと記述される場合もある。)) は、室温で液相を示す塩の総称であり、イオンのみから構成される液体である。図1にイオン液体を構成する典型的なイオン種を示しているが、一般的にイオン液体を構成するイオン種は多原子で構成されるため、大きなイオン体積を有し、その電荷は1または-1である場合がほとんどである。つまり、Na⁺やCl⁻などの単原子イオンと比較するとその表面電荷密度は大きく減少するため、+イオン (カチオン) と-イオン (アニオン) の間に存在するイオン間相互作用は必然的に弱まる。そのため、多原子イオンを有する塩の液相温度はNaClなどの単原子イオンのみから構成されるものより低い値を示すことが多い。また、多原子イオンの分子運動が複雑かつ多様であることも、その低温化の要因の1つとして挙げることができる。イオン液体は難揮発性・難燃性でありながら、比較的高いイオン伝導度を示し、良好な電気化学安定性を有するため、電気化学デバイスや機能材料創成の反応媒体などに利用する試みが古くから行われている¹⁾。近年では、イオン液体が難揮発性を有する液体塩である点に着目し、これを種々の真空装置と組み合わせた新たな溶液系真空技術 (ナノ材料創成技術²⁾、表面分析技術³⁾、質量分析技術⁴⁾など) の開発が盛んに行われている。桑畑らはイオン液体が帯電現象を抑制する効果を有する難揮発性液体であることに着目し、様々な電子顕微鏡技術の構築に貢献してきた⁵⁾。本講演では、その中から生まれたイオン液体観察法の特徴、現時点での本観察法の限界とそのブレイクスルーを目指した新たなイオン液体種の探索について紹介する。

一般的に電子顕微鏡で試料を観察する際には、その原理上、試料の脱水や試料表面への導電性付与など、煩雑な前処理プロセスが必要不可欠である。また、その過程でアーティファクト (artifact) が生じることも少なくない。つまり、試料の前処理技術自体はある程度確立されているものの、誰にでもできる技術とは言い難く、簡便かつアーティファクトの無い新たな前処理技術に対するニーズは極めて大きい⁶⁾。我々はイオン液体の有する特異な特徴を利用して、様々な絶縁性無機材料や生物試料を電子顕微鏡で観察するための前処理技術の開発を行ってきた (図 2)。その結果、絶縁性無機材料についてはイオン液体の種類にあまり依存することなく、良好な電子顕微鏡像を簡便かつ短時間で得ることが

Common Cations



Common Side Chains: CH₃ (Me), C₂H₅ (Et), n-C₃H₇ (Pr), n-C₄H₉ (Bu), n-C₆H₁₃ (Hex), n-C₈H₁₇ (Oct), n-C₁₀H₂₁ (Dec), n-C₁₈H₃₃ (Hexde), CH₂OCH₂ (MeOMe), CH₂OC₂H₄ (MeOEt), CH₂CH₂OH etc.

Common Anions

BF₄⁻, B(CN)₄⁻, CF₃BF₃⁻, C₂F₅BF₃⁻, n-C₃F₇BF₃⁻, n-C₄F₉BF₃⁻, PF₆⁻, (C₂F₅)₂PF₃⁻ (FAP⁻), CF₃CO₂⁻, CF₃SO₃⁻ (TfO⁻), N(SO₂CF₃)₂⁻ (Tf₂N⁻), N(COCF₃)(SO₂CF₃)⁻, N(SO₂F)₂⁻ (FSA⁻), EtOSO₂⁻, N(CN)₂⁻, C(CN)₃⁻, SCN⁻, SeCN⁻, CuCl₂⁻, AlCl₄⁻, ZnCl₂⁻, F(HF)₂⁻, CH₃C(OH)CO₂⁻ (Lac⁻), CH₃CO₂⁻ (Ace⁻) etc.

図 1 イオン液体を構成する典型的なカチオン種とその側鎖およびアニオン種。太字はそれぞれの構造の省略形を示している。

できるようになった⁵⁾。しかし、生物試料については、使用するイオン液体の種類によって、像質が大きく変化する可能性があることがわかった。この傾向はイオン液体と細胞膜が直接接触するような前処理条件でより顕著となった。この原因としては、*i)* カチオン種の疎水部が細胞膜を構成するリン脂質二重膜の疎水部の中に取り込まれ、その構造自体を破壊してしまう、*ii)* イオン液体の水素結合受容性が低い（主にアニオン種に依存する）とライソソーム内のプロテアーゼが活性化し、自己溶解反応を引き起こす、*iii)* イオン液体を水などに希釈して使用する場合、その水溶液は食塩水に似た物性を示すため、試料へダメージを与えることがあるなどの点が挙げられる。イオン液体処理時の像質の変化（アーティファクト）を避けるには、試料の簡便な固定が有効である（図3）。図2の未固定の方法と比較すると前処理に費やす時間は長くなってしまいが、従来法より格段に短く、その像もより自然な形態である（図4）。

IL-based method without a fixation step

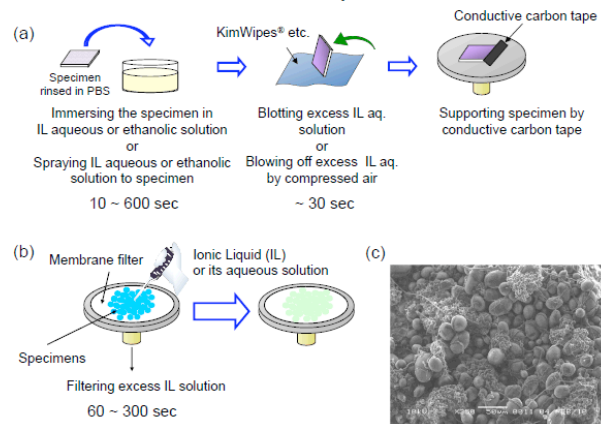


図2 試料の固定プロセスを伴わないイオン液体観察法。(a) ガラス板などに培養した菌などを処理する方法の例、(b) 花粉などを処理する方法の例、(c) このイオン液体観察法を用いて観察したモチに生えたカビのSEM像。

IL-based method with a fixation step

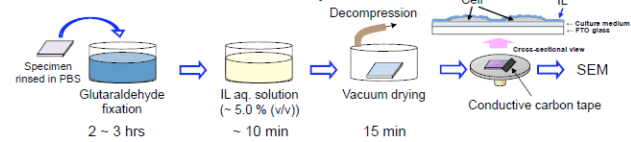


図3 試料の固定プロセスを伴うイオン液体観察法の例。

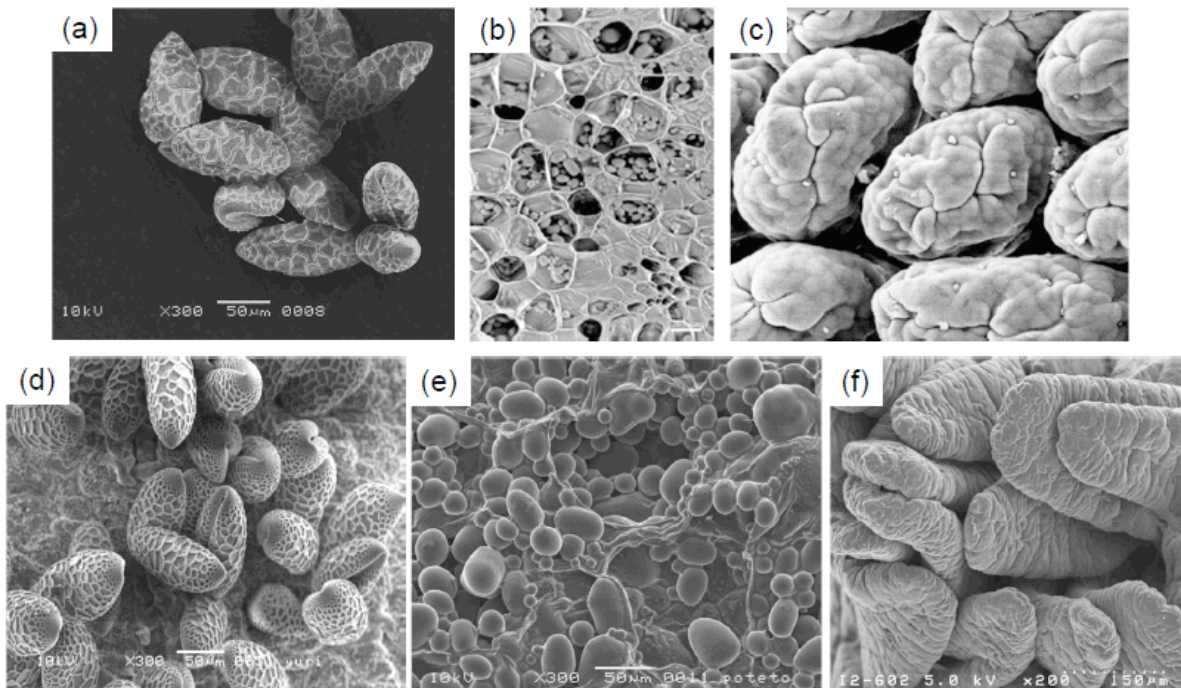


図4 (a - c) 通常の前処理および (d - f) 試料の固定プロセスを伴うイオン液体観察法により得られたSEM像の例。(a, d) ユリの花粉、(b, e) ジャガイモの断面、(c, f) マウスの小腸。

現在の課題は、細胞膜に覆われた試料を未固定で観察できる（コントラスト比を上げるため、できれば重元素を含むような）イオン液体の開発である。イオン液体の種類によっては、そのような試料を無固定で電顕観察できる場合があることや、イオン液体への重元素の導入は比較的容易であることなどが既にわかっている。こういった基礎的知見の蓄積とイオン液体自体の物性評価法・毒性評価法の確立により、電子顕微鏡観察への応用に特化したイオン液体の設計が可能となりつつある。イオン液体観察法は医学生物学電子顕微鏡技術学会の強力なバックアップにより、日本発の新たな電子顕微鏡技術として広く世界に認知されつつあるが、これをワールドスタンダードな技術とするには、多様なニーズを満たすことのできる新規なイオン液体の開発はもちろん、その評価体制の構築が必須であるように思える。

謝辞

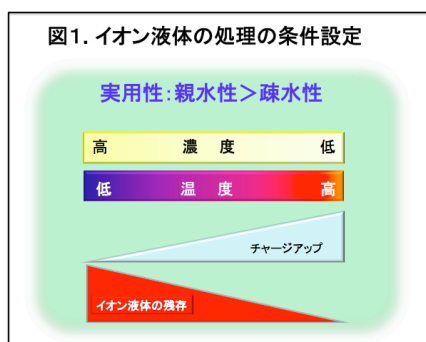
イオン液体の評価は、北里大学 根本典子先生、金沢医科大学 石垣靖人先生、防衛医科大学 櫛引俊宏先生、九州大学 阪上宏樹先生、浜松医科大学 村中祥悟先生、鳥取大学 霜村典宏先生、東京農工大学 新垣篤史先生、京都大学 北尻真一郎先生、岩手大学 安川洋生先生、大阪大学 望月衛子先生、岸田祥子氏、赤木隆美先生、三浦治郎先生、朝日陽子先生、自治医科大学 早川枝李先生、日立ハイテクノロジーズ株式会社 中澤英子博士、株式会社日立ハイテクサイエンス 立花繁明氏、Fischione Japan 海老澤正晴氏、日新 EM 株式会社 丸田節雄氏など多くの方々のご協力により行うことができました。心より感謝申し上げます。また、本講演で紹介したイオン液体観察法の確立は大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻の桑畑 進教授、医学生物学電子顕微鏡技術学会 名誉理事長 宮澤七郎先生のご熱意とご尽力の賜物であることを申し添えます。

1. *Ionic Liquids in Synthesis*, ed. P. Wasserscheid and T. Welton, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2nd edn., 2008; T. Tsuda and C. L. Hussey, in *Modern Aspects of Electrochemistry Vol. 45*, ed. R. E. White, Springer, New York, 2009, pp. 63-174.
2. T. Torimoto, K. Okazaki, T. Kiyama, K. Hirahara, N. Tanaka and S. Kuwabata, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **89**, 243117; S. Kuwabata, T. Tsuda and T. Torimoto, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 3177; K. Yoshii, T. Tsuda, T. Arimura, A. Imanishi, T. Torimoto and S. Kuwabata, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 8262.
3. S. Men, B. B. Hurisso, K. R. J. Lovelock and P. Licence, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 5229; P. Licence, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, **51**, 4789.
4. D. W. Armstrong, L.-K. Zhang, L. He and M. L. Gross, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 3679; Y. Fukuyama, S. Nakaya, Y. Yamazaki and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 2171.
5. S. Kuwabata, A. Kongkanand, D. Oyamatsu and T. Torimoto, *Chem. Lett.*, 2006, **35**, 600; S. Arimoto, H. Kageyama, T. Torimoto and S. Kuwabata, *Electrochem. Commun.*, 2008, **10**, 1901; T. Tsuda, E. Mochizuki, S. Kishida, H. Sakagami, S. Tachibana, M. Ebisawa, N. Nemoto, Y. Nishimura and S. Kuwabata, *Electrochemistry*, 2012, **80**, 308; Y. Ishigaki, Y. Nakamura, T. Takehara, T. Kurihara, H. Koga, T. Takegami, H. Nakagawa, N. Nemoto, N. Tomosugi, S. Kuwabata and S. Miyazawa, *Microsc. Res. Techniq.*, 2011, **74**, 1104; K. Yanaga, N. Maekawa, N. Shimomura, Y. Ishigaki, Y. Nakamura, T. Takegami, N. Tomosugi, S. Miyazawa and S. Kuwabata, *Mycolog. Prog.*, 2012, **11**, 343.
6. Y. Ishigaki, Y. Nakamura, Y. Oikawa, Y. Yano, S. Kuwabata, H. Nakagawa, N. Tomosugi and T. Takegami, *PLoS One*, 2012, **7**, e32676; Y. Takaku, H. Suzuki, I. Ohta, D. Ishii, Y. Muranaka, M. Shimomura and T. Hariyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, in press (10.1073/pnas.1221341110).

SEM による生体観察とイオン液体の活用

石垣 靖人¹⁾、中村 有香¹⁾、竹上 勉¹⁾、友杉 直久¹⁾、中川 秀昭¹⁾、桑畑 進²⁾
金沢医科大学・総合医学研究所¹⁾、大阪大学大学院・工学研究科²⁾

近年報告が相次いだイオン液体による走査型電子顕微鏡観察法は、種々の生体試料の観察に応用が可能であることが示されてきた(1-4)。現在まで同液体が SEM 観察に有用である理由はほとんど蒸発せず導電性を持つ特性にあると考えられる。多少の粘性があるために、イオン液体をそのまま使用するとサンプル上に残存してしまい像の観察が難しい。このため、水などで希釈して表面のコーティング剤として使われることも多く、希釈してもサンプル表面の導電性は保たれていると考えられる。したがって、イオン液体の利用時には、粘性を下げるために適当な溶媒による希釈と加温が有効であるものの、希釈しすぎるとチャージアップを招くために、予備実験による条件設定が必要である(図1)。



一方、溶液で希釈して使用できることから、細胞が生きていけるような PBS や培養液とイオン液体を組み合わせることでコーティング剤として用いれば、生きたままの細胞が SEM 内で観察できる可能性も指摘されてきた。発表者らの実験では、培養液による希釈倍率をうんと上げていけば細胞が生存できる濃度域があることは、タムラプス観察により明らかとなっている。しかし、この希釈倍率は SEM のコーティング剤として利用される濃度よりも低い範囲であり、実際の観察には利用できない。今後は、塩濃度などを検討することにより、細胞が培養できるイオン液体濃度で観察が可能になるかもしれない。

また、昨年の本学会で SEM の高真空中でキチマダニが生存できて観察が可能であること、また電子線の照射が生存に影響することを報告してきた(5)。一方、今年になってからボウフラなどを材料に SEM 中で生体表面に膜構造が生成して真空中の生存が可能になることが指摘されてきた(6)。このため、SEM の生態観察は動物種をうまく選択すれば生きたままの動きを観察できる時代に入ったと考えることができる。また、心筋細胞はイオン液体中で拍動することが報告されており、イオン液体によっては生きたままの細胞の電子顕微鏡観察が可能になるのではないかと期待される(7)。さらには、染色体のようなオルガネラの観

察に成功した事例も報告されている(8)。このような状況で、確立されつつあるイオン液体による SEM 観察は組織や細胞よりも小さなオルガネラの活性を維持して観察するために有用ではないかと考えている。学会では、さらに有用な使用方法に関する模索について紹介していきたい。

参考文献

- (1) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Kurihara T, Koga H, Takegami T, Nakagawa H, Nemoto N, Tomosugi N, Kuwabata S, Miyazawa S: Comparative study of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids for observing cultured human cells by scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* 74 : 110-1108 (2011)
- (2) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Shimasaki T, Tatsuno T, Takano F, Ueda Y, Motoo Y, Takegami T, Nakagawa H, Kuwabata S, Nemoto N, Tomosugi N, Miyazawa S: Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial–mesenchymal transition. *Microsc Res Tech* 74 : 1024-1031 (2011)
- (3) Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Nemoto N, Kurihara T, Koga H, Nakagawa H, Takegami T, Tomosugi N, Miyazawa S, Kuwabata S: Ionic liquid enables simple and rapid sample preparation of human culturing cells for scanning electron microscope analysis. *Microsc Res Tech* 74:415-420 (2011)
- (4) Tsuda T, Nemoto N, Kawakami K, Mochizuki E, Kishida S, Tajiri T, Kushibiki T, Kuwabata S. SEM observation of wet biological specimens pretreated with room-temperature ionic liquid. *ChemBiochem*. 12:2647-2550 (2011)
- (5) Ishigaki Y, Nakamura Y, Oikawa Y, Yano Y, Kuwabata S, Nakagawa H, Tomosugi N, Takegami T. Observation of live ticks (*Haemaphysalis flava*) by scanning electron microscopy under high vacuum pressure. *PLoS One*. 7:e32676 (2012)
- (6) Takaku Y, Suzuki H, Ohta I, Muranaka Y, Shimomura M, Hariyama T. A thin polymer membrane, nano-suit, enhancing survival across the continuum between air and high vacuum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:7631-7635 (2013)
- (7) Hoshino T, Fujita K, Higashi A, Sakiyama K, Ohno H, Morishima K. Contracting cardiomyocytes in hydrophobic room-temperature ionic liquid. *Biochem Biophys Res Commun*. 427:379-384 (2012)
- (8) Dwiranti A, Lin L, Mochizuki E, Kuwabata S, Takaoka A, Uchiyama S, Fukui K. Chromosome observation by scanning electron microscopy using ionic liquid. *Microsc Res Tech*. 75:1113-1118 (21012)

きのこ類におけるイオン液体を用いた SEM 観察法：
菌類の分類学研究と菌根共生の微細構造解析への応用

霜村 典宏¹⁾、彌永 このみ²⁾、笹本 佳裕¹⁾、石垣 靖人³⁾、桑畑 進⁴⁾
鳥取大学農学部¹⁾、鳥取大学大学院連合農学研究科²⁾、
金沢医科大学医学総合研究所³⁾、大坂大学大学院工学研究科⁴⁾

きのこ類の孢子（担子孢子）の形態は、きのこ類の重要な分類形質の一つであり、分類群によっては担子孢子表面の刺状やイボ状突起などの微細構造も重要視されている。通常これらの微細構造の観察には走査型電子顕微鏡（SEM）が用いられているが、試料作製に時間を要し、多量の試料の観察や解析には適さない。本研究において、担子孢子表面に刺状突起などの装飾を有した数種の分類群の乾燥標本を用いて、SEM 観察へのイオン液体（IL）の適用性について検討した。担子孢子の観察において、IL 濃度 5%、加速電圧 15kV での観察が適していた。IL を用いた試料と従来の金属コーティングによる試料の電顕画像を比較解析した結果、分類群によっては金属コーティング試料に認められたアーティファクトが、IL 試料では認められなかった。また、IL 試料においては、観察対象となる孢子のロスが極めて少ないことが判明した。従って、IL を用いた担子孢子の SEM 試料作製法は、従来の煩雑な試料作製法に比べ、有用かつ簡便な手法であると評価された。

一方、多くのきのこ類は宿主樹木の根に外生菌根と呼ばれ特殊な構造体を形成して樹木と共生していることが知られている。しかしながら、宿主樹木根にきのこ類の菌糸が感染して、外生菌根を形成する過程を詳細に解析した研究例は少ない。菌糸が樹木根に接触して、樹木根に定着する初期の過程や菌根から外部に放出される外生菌糸の構造を解析するためには、物理的衝撃を回避した試料作製法が望まれる。そこで、本研究においては人工的にショウロと呼ばれるきのこ類の菌糸を宿主クロマツの実生根に感染させ、人工的に育成した菌根試料に IL を処理して SEM 観察を試みた。その結果、外生菌根表面の網目状構造の観察においては IL の液溜まりが生じ易く、余分な IL を除去する方法の開発が必要であると思われた。一方、外生菌根周辺のクロマツ細根を観察したところ、繊細な菌糸が散見できた。また、根毛と根毛を渡って拡大している様子や菌糸によって束ねられた根毛の塊（クラスター）を形成している様子が観察できた。以上のことから、宿主樹木根上における繊細な外生菌根菌の菌糸挙動を解析するには IL を用いた観察法は有効であると思われた。

病理所見と電顕とのかかわり
—神経変性疾患を中心に—

羽賀 千恵

公益財団法人 東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト

Tel 03-6834-2323 E-mail haga-ce@igakuken.or.jp

中枢神経系の変性疾患として頻度が高いのは、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) ・びまん性レビー小体病 (diffuse Lewy body disease : DLBD) などである。1980年以降、蛋白化学的な解析が進み、ADでは老人斑の主要蓄積蛋白としてアミロイドβ蛋白が発見され、また神経原線維変化の構成蛋白として微小管関連蛋白であるタウ蛋白が同定された。PD・DLBDでは、レビー小体の主要構成蛋白がα-シヌクレインであることが判明した。

その後、タウ蛋白の異常蓄積はAD以外にも様々な疾患で生じることが明らかになった。たとえば進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy : PSP) や皮質基底核変性症 (corticobasal degeneration : CBD) では、神経細胞に加え、グリア細胞にもタウ蛋白が蓄積する。またα-シヌクレインもPD・DLBDだけでなく、多系統萎縮症 (multiple system atrophy : MSA) においてグリア細胞質封入体 (glia cytoplasmic inclusion : GCI) として蓄積する。これら異常蛋白蓄積は神経変性疾患の病態において本質的な変化と考えられるようになり、タウオパチー、α-シヌクレイノパチーという言葉が用いられるようになった。

筋委縮側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) や (タウオパチーであるPick病以外の) 前頭葉側頭葉型認知症 (frontotemporal dementia : FTD) でも、以前からユビキチンでラベルされた神経細胞封入体の存在が知られていたが、2006年にそれが TAR DNA-binding protein 43 : TDP-43 という核蛋白の凝集体であることが解明された¹ (図1~11)。

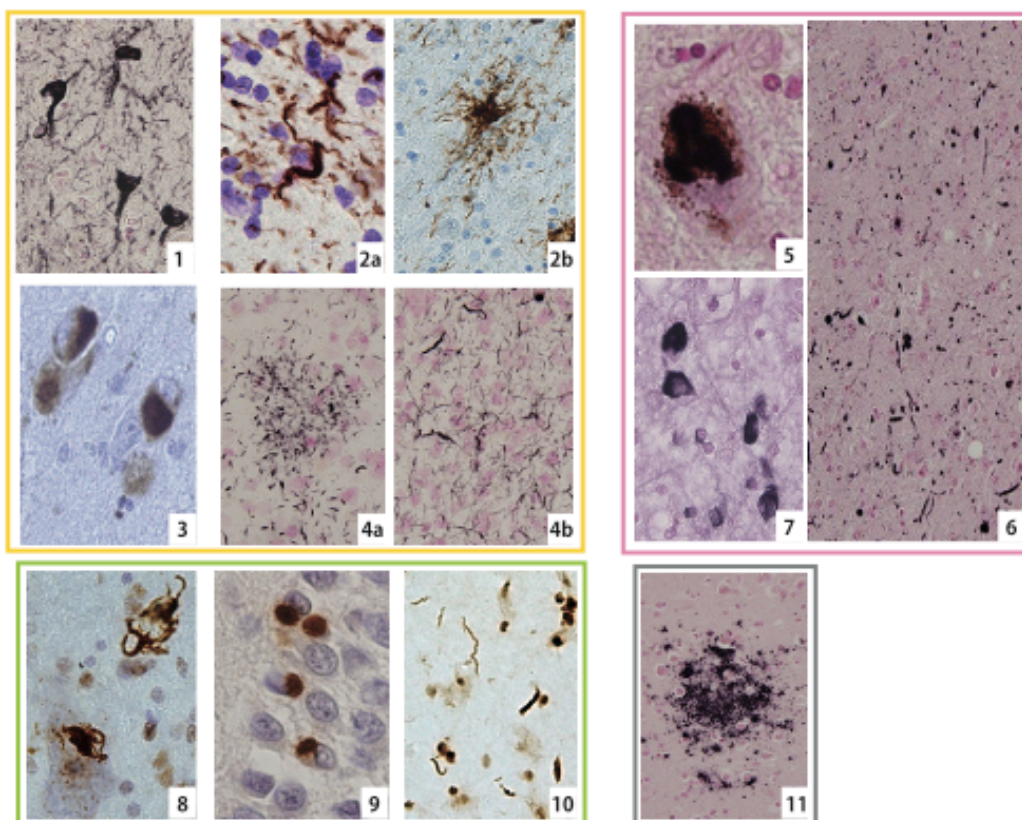
こうして、ほとんど全ての神経変性疾患にそれぞれ特徴的な異常蓄積蛋白の存在が明らかになり、これらは、今日の病理診断において重要な指標となっている²。さらに病態解明の観点からは、これらが「どこ」に「どのように」存在するかが重要な問題であり、そのためには電顕的観察が不可欠であると考えられる。しかし、膜などの微細構造を保つこと (組織の固定) と抗原エピトープを温存して免疫組織化学的に特定の蛋白の局在を同定することを両立させるのは技術的に容易ではない—むしろ、このふたつは相反する要請であることが多い。従来、パラフィン標本からの「戻し電顕」や「pre-embedding法」が試みられてきたが、感度も形態の保存も、ともに満足がいくものとは言い難い。現在も様々な方法が新たに考案され、光顕像と電顕像を対応させる試み～すなわち、光顕で観察される免疫反応陽性物の超微形態を明らかにする努力が続けられている。

参考文献

1、Arai et al, BBRC 351, 602-11, 2006

2、羽賀 千恵、秋山 治彦 : 神経病理入門 4. 脳・脊髄病変における免疫組織化学
Medical Technology Vol.39. No12 P1323~P1330 2011

図 神経変性疾患にみられる免疫染色による異常構造物



図の説明

図の番号	出現する主な疾患	構造名	好発部位
タウオパシー			
1	AD	neurofibrillary tangle	大脳皮質 海馬、海馬傍回
2a	PSP	coiled body	大脳皮質
2b	PSP	tuft-shaped astrocyte	大脳皮質 海馬、海馬傍回
3	Pick病	Pick body	大脳皮質
4a	CBD	astrocyte plaques	大脳皮質
4b	CBD	argyrophilic threads	大脳皮質 頭頂葉
α-シヌクレオパシー			
5	PD	レビー小体	中脳(青斑核)
6	DLBD	レビー小体、Lewy neurites	大脳皮質
7	MS	GCI	基底核
TDP-43パシー			
8	ALS	スケイン様封入体	脊髄 前核細胞
9	FTD	TDP-43細胞質封入体	大脳海馬傍回 顆粒細胞
10	FTD	TDP-43 変性神経突起	大脳皮質
11	AD	老人斑(びまん性)	大脳皮質

Reconsider! アルツハイマー病
「カルパイン-カテプシン仮説」で本疾患の神経細胞死を説明可能か？

山嶋 哲盛

金沢大学大学院 医学系研究科 再生脳外科

Tel: 076-265-2381, E-mail: yamashim@med.kanazawa-u.ac.jp

一過性の脳虚血を負荷すると海馬 CA1 の神経細胞は 5-7 日目に細胞死 (ネクロシス) をきたす。この事実はげっ歯類から霊長類に至るまで良く知られており、そのメカニズムに関して過去 40 年にわたりさまざまな研究がなされてきた。私の研究グループでは実験動物としてニホンザルを用いて、カルパインおよびカテプシンという 2 つのシステインプロテアーゼが重要な働きをすることを発見し、1998 年に「カルパイン-カテプシン仮説」を提唱した。

アルツハイマー病は少なくとも 20 年の準備期間をおいて発症するとされているが、その原因物質としては従来アミロイド β が最有力視されてきた。しかし、1) アミロイド β 産生の責任遺伝子を導入したマウス脳にアミロイド β が蓄積しても神経細胞死や脳萎縮は起きない。2) PET 上、アミロイド β が蓄積している事が判明したにもかかわらず認知機能が正常な高齢者が存在し、また、その逆の場合もあること。および、3) アミロイド β を中和し得る新規薬剤の効果がなかったという 3 つの理由で、近年、アミロイド仮説は疑問視されつつある。一方で、アルツハイマー病の主病変である神経細胞死の原因として、脳動脈硬化による慢性の脳血流低下の関与が示唆されている。本稿では、本来虚血性神経細胞死のメカニズムとして提唱した「カルパイン-カテプシン仮説」によってアルツハイマー病に起きる神経細胞死を説明し得るか否かを報告する。

虚血負荷がかかると、神経細胞内に Ca^{2+} の動員が起これり μ -カルパインが活性化される。一方、虚血後の再灌流によって過剰の H_2O_2 が生じ、リソソーム内でフェントン反応によって $\text{HO}\cdot$ に転換される。この $\text{HO}\cdot$ が膜リン脂質の構成成分である n-6 系の多価不飽和脂肪酸を酸化してヒドロキシノネナルが生じ、これがリソソーム膜を安定化させる Hsp70.1 の活性中心にある 469 番目のアルギニンをカルボニル化する。このカルボニル化 Hsp70.1 は活性化されたカルパインにより効率的に切断され、リソソーム膜の破裂が起こる。その結果リソソーム内のカテプシン B・L・D などの酵素が細胞質へ放出され、神経細胞死が起きる。

以上はアルツハイマー病にも応用し得るが、それは本疾患に冒された神経細胞の電顕的観察からも明らかである。即ち、図 1-C の黄色丸内に示すごとく、光顕的に観察される顆粒-空包変性は電顕的にリソソームの微小空包変性である。さらに、変性途上の神経細胞は図 2 の赤四角内に示すごとく、リソソームの透過性亢進を意味する、限界膜の 2 重膜化や部分的な断裂像を示す。アルツハイマー病においてはアポトーシスの所見が見られることは例外的で、ほとんどの変性細胞は核の濃染と萎縮像を示すが、アポトーシス小体の形成や細胞膜の断裂はみられない。つまり、慢性の脳虚血によるリソソームの「時間をかけた」破裂と膜の透過性亢進によって、カテプシンが細胞質内に漏出し、これが神経細胞のネクロシスをゆっくりと誘発していると考えられる。アポリポプロテイン E やプレセニリン 1 もアミロイドの蓄積機構のみならず、リソソームの膜安定機構に関与していると考えた方が、本疾患の病態を包括的に理解しやすい。

図 3 はアルツハイマー病における神経細胞死の機序を示したカスケードである。

参考文献：

- 1) Yamashita T. Reconsider Alzheimer's disease by the 'calpain-cathepsin hypothesis' -A perspective review. Progress Neurobiology. 2013
- 2) 山嶋哲盛 「サラダ油が脳を殺す」河出書房新社 2012年

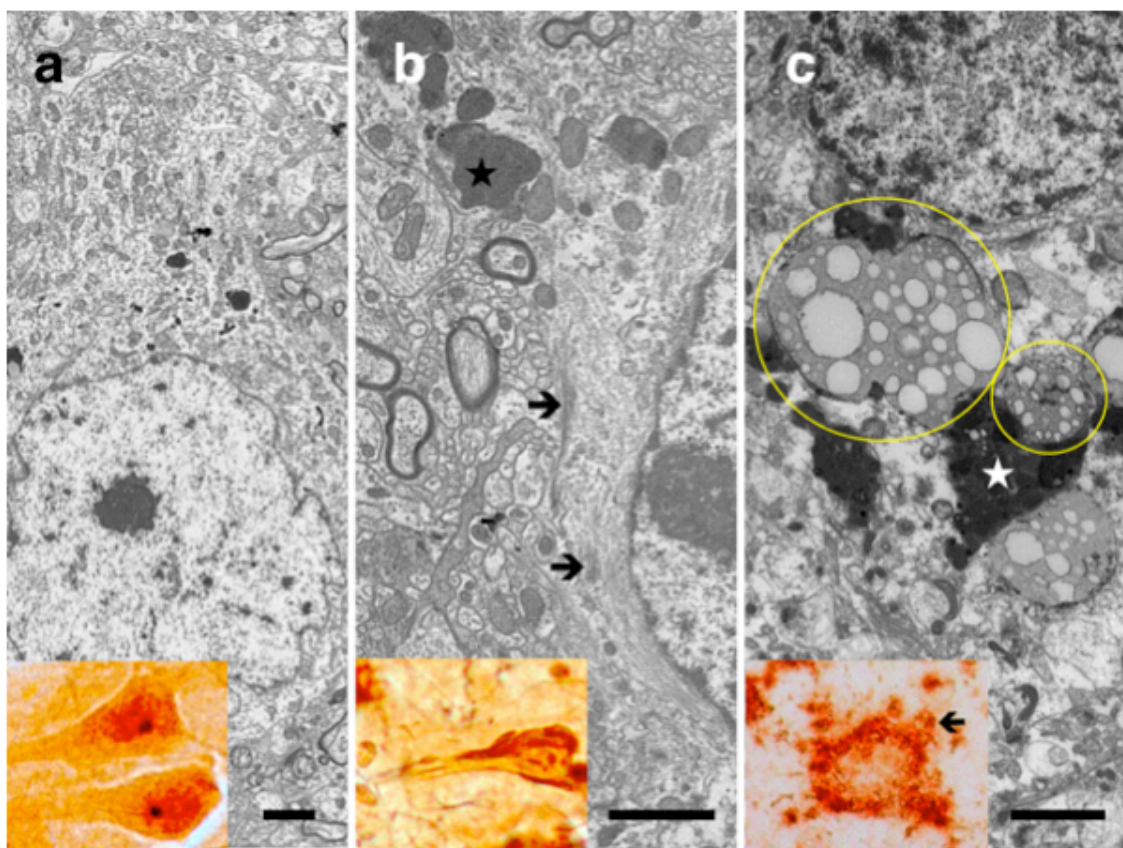


図 1.

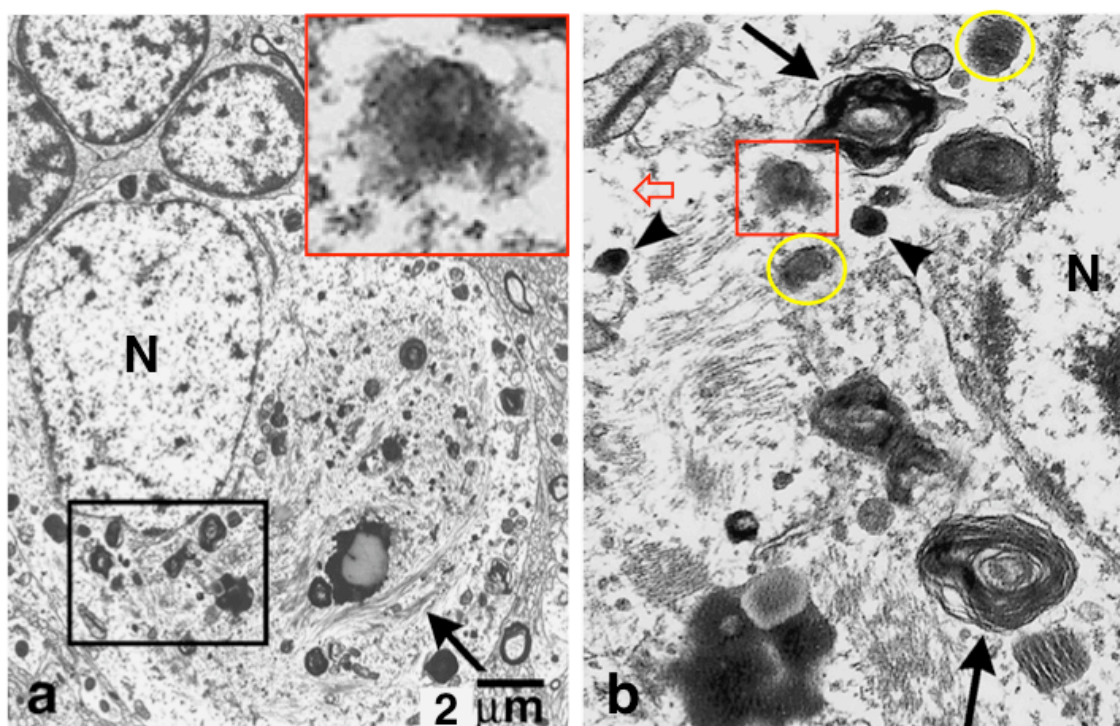


図 2.

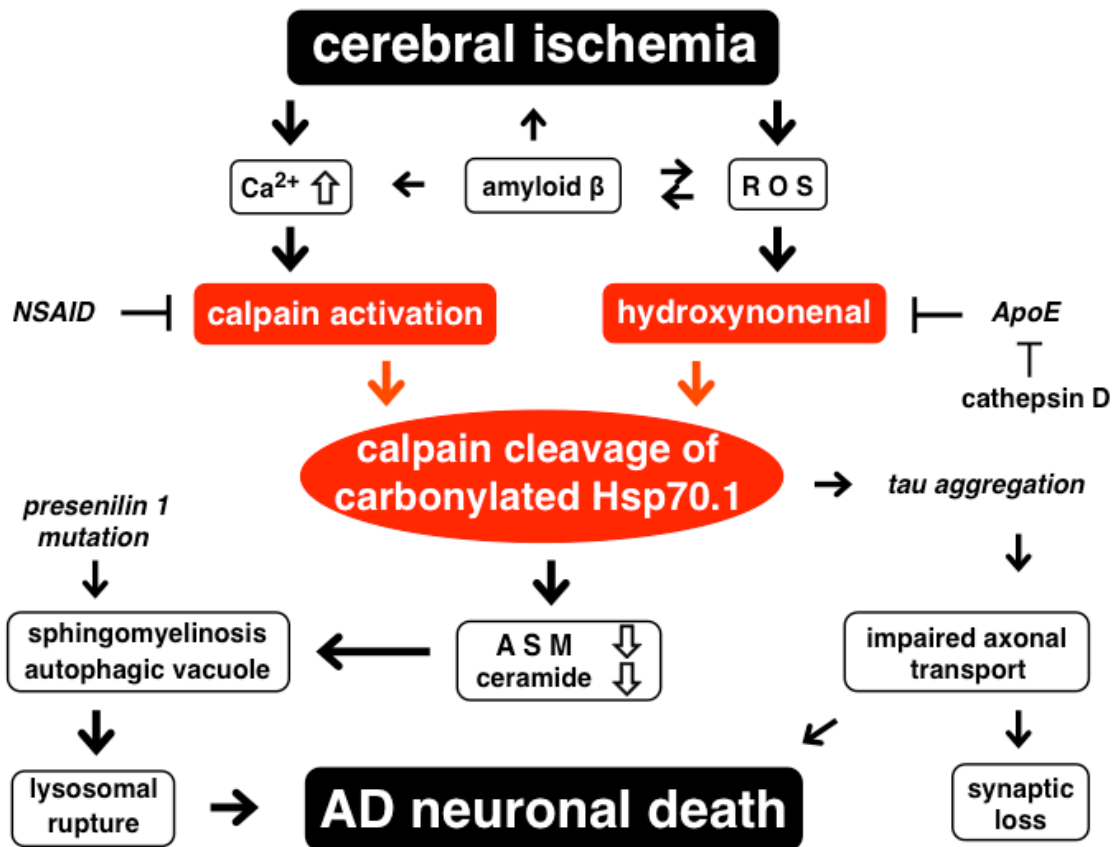


図 3. アルツハイマー病における神経細胞死の機序を示したカスケード

電顕技術と病理診断との関わり 脳腫瘍の診断を主として

柳下 三郎

神奈川県総合リハビリセンター 病理診断科

脳腫瘍の診断も他臓器の病理組織学的診断と同じで、通常はパラフィン切片のヘマトキシリン・エオシン染色(HE)により行われる。しかし、HE 標本の観察では診断が困難な病変に対しては、さらに、特殊染色、酵素組織化学や免疫組織化学的染色、また、電子顕微鏡的観察、さらには、分子病理学的検索を行って腫瘍の本体がなんであるかを明らかにしようとする試みが盛んにおこなわれている。

近年、免疫組織化学の急速な進歩により、通常のパラフィン切片でも多種類の免疫組織化学的検索が可能となり、電子顕微鏡的検索がおろそかにされる傾向が出てきている。後述するが、電子顕微鏡の大きな弱点でもある。

脳腫瘍は一般的に腫瘍が発生する組織の種類（胎生期の幼若な組織も含め）に基づいた分類が行われている。HE 標本による細胞形態の研究の歴史長く、百数十年にわたり細胞分類の真価が問われ現在に至っている。電子顕微鏡の欠点は試料が非常に小さいこと即ち sampling error が起こりやすいこと、特殊な固定液が用いられることである。免疫組織化学的検索で最も留意すべき点は化学的とあるように化学的な反応を可視化して観察する方法で反応過程が見えない点であり、特定の抗原のみと選択的に反応する特異性の高い所見とは理解し難い点である。

以下、代表的な脳腫瘍の電顕所見の特徴を供覧する。

1) 髄膜腫は、ミクロでは多彩の像を示し多数の亜型が存在するが、髄膜皮細胞から発生する腫瘍であるので、この細胞の微細構造の特徴を示す。

腫瘍細胞の細胞質には多数の中間系フィラメントが見られ、細胞間結合装置としてのデスモゾームを認める。細胞質から細い長い突起が伸長することもあるが、基本的構造は上記と同じである。分泌性髄膜腫では腫瘍内に管腔の形成が見られ、分泌能をもつ上皮性細胞に類似している。腫瘍が低分化になるとその特徴が消えてゆくのはどの腫瘍でも共通である。

2) グリオーマ

星細胞系腫瘍では中間系フィラメントが細胞体や突起に認める他に特徴的な電顕所見はない。

乏突起膠細胞系腫瘍では、正常の乏突起膠細胞に見られる突起内に平行に走る microtubule を認めることは殆どなく、星細胞腫瘍と類似の微細構造を示す。

上衣系腫瘍では上衣細胞の特徴が見られ、多数の絨毛を含む微小管構造と腫瘍細胞間に接着装置を認める。細胞突起にはグリオーマとしてのグリアフィラメントを認める。

3) 脈絡叢腫瘍

小児に多い腫瘍で、上衣腫への分化も見られ、管腔面には微絨毛と絨毛が見られるが、微絨毛の先端はクラブ様に腫大しているのが特徴である。成人例では絨毛は見られない。腫瘍細胞間には接着装置を認める。

4) 神経系腫瘍

大型の神経細胞の形態をしめす神経節細胞腫ではニッスル小体と明るい大型の核と大きな核小体が神経細胞の特徴を示すが、電顕的検索は余り役立たない。神経細胞の特徴は突起内に平行に走る微小管構造とシナプスの形成である。中枢性神経細胞腫 (Neurocytoma) でこの所見が見事に表現されている。神経芽腫でも分化の段階で所見が異なるが、神経細胞腫の特徴を彷彿させる。

5) シュワン細胞腫

脳神経では第 VIII 神経の前庭枝から発生するものが多い。シュワン細胞系の腫瘍でありその細胞の特徴を示す。腫瘍細胞は基底膜を有し、細胞間結合装置の発達はない。間質に long spacing collagen (周期性 100-150 nm) - Luse body が頻繁に認められる。

6) 嚢胞性病変

第 3 脳室のコロイド嚢胞、ラトケ嚢胞やクモ膜嚢胞などがある。

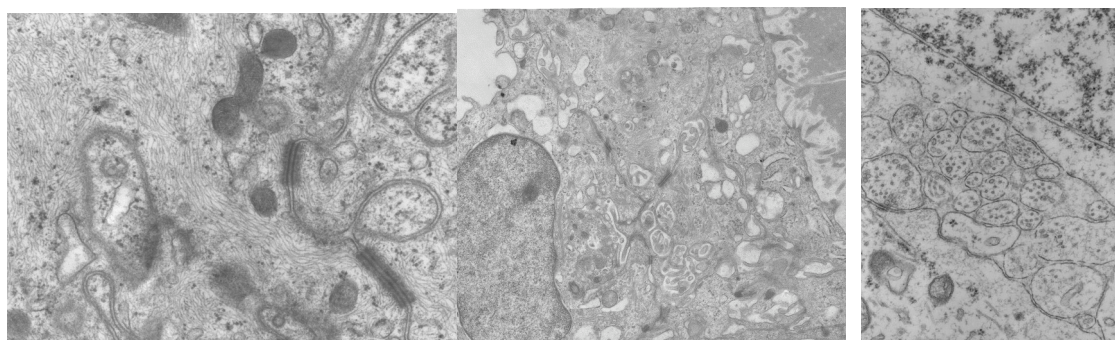
7) 嗅神経 (鼻パラコード) から発生する嗅神経腫や嗅神経上皮腫などがある。

原始神経管の微細構造からグリア細胞や神経細胞への分化、内胚葉、中胚葉、外胚葉系の細胞に微細構造を参考にして上記の腫瘍などにつき自験例を中心に解説する。

終わりに

通常のパッファーホルマリン固定組織でも、比較的組織の保存性は良く、短期間の保存なら十分に電顕的観察が可能であり、検索に値する場合がしばしばある。パラフィンプロックやその薄切切片からの再包埋電顕は診断の役に立たないことが多い。

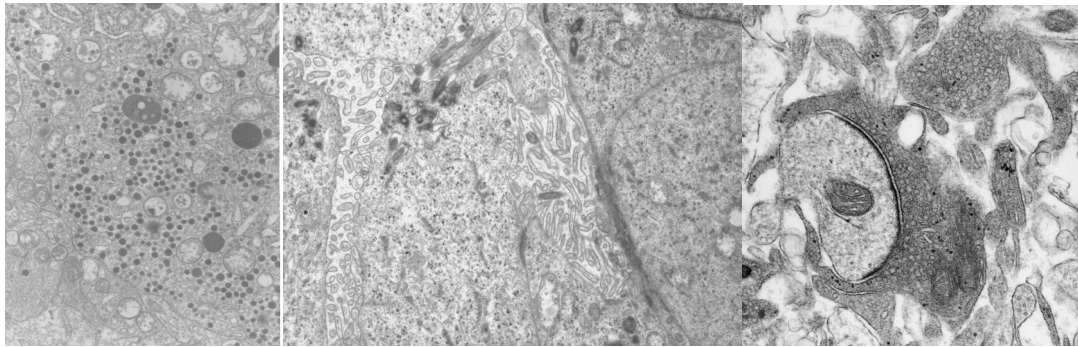
髄膜腫のミクロの像は多彩で多数の variants があるが、meningothelial cell より発生するので、電顕像は基本的に均一である。一見同じに見える像もよく見ると異なることがあり、診断に役立つので注意が必要である。



Meningioma

secretory meningioma

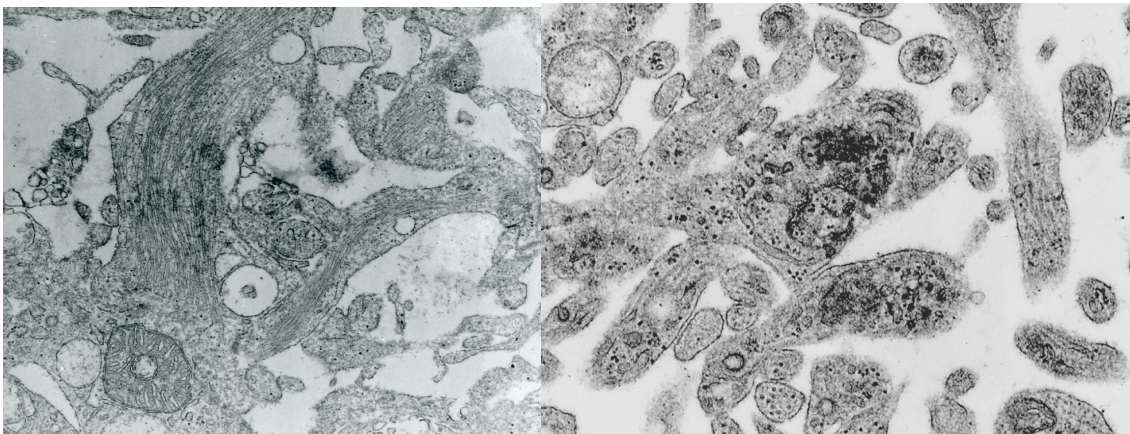
neuroblastoma
Immature axons



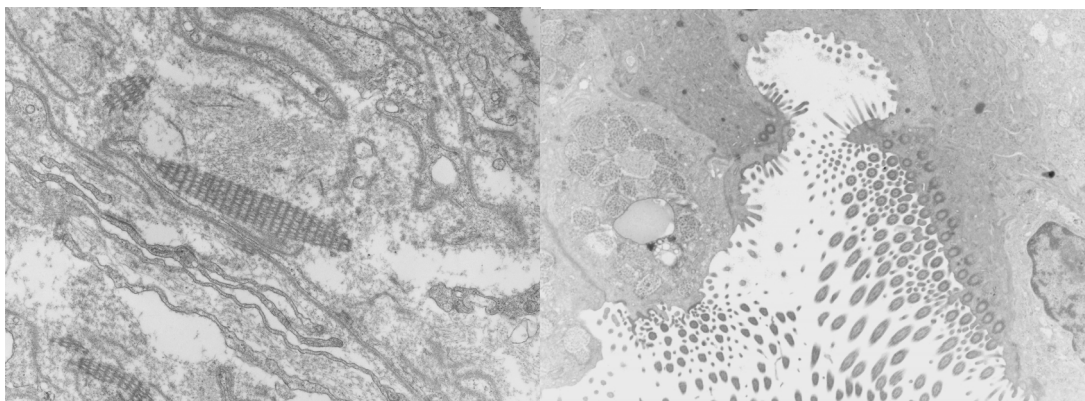
Gangliocytoma

ependymoma

neuroectoma-synapse



Oligodendroglioma- glial filaments oligodendroglioma – oligodendrocyte-like



Schwannoma Luse body
(long spaced collagen)

(neuro)-epthelial cyst
respiratory cyst

一般演題 口演発表

技術1：「イオン液体観察法」

0-1

種々のイオン液体を用いたカラーコンタクトレンズのSEM観察

佐々木千鶴子¹⁾、夏木 靖典¹⁾、四戸 歩¹⁾、高木 正之¹⁾、松澤 亜紀子²⁾、
桑畑 進³⁾、津田 哲哉³⁾

聖マリアンナ医科大学 大学院電子顕微鏡研究施設¹⁾、同大学 眼科学²⁾
大阪大学 大学院工学研究科³⁾

近年、ソフトコンタクトレンズは飛躍的な進歩により数多くの素材が開発され商品化されている。中でもカラーコンタクトレンズはレンズの構成モノマーにより、従来のt-butylalcoholを脱水剤に用いる試料作製において問題が生じるレンズが出てきた。今回我々は3種類の親水性イオン液体として cholin Lactate, 高純度 cholin Lactate, Tributylmethylphosphoniumdimethylphosphate [P4441] [DMP] を用いて未使用のカラーコンタクトレンズの一例について比較検討を試みたので報告する。また、従来の試料作製でのSEM像についても一部触れたい。

0-2

イオン液体を用いた微小甲殻類のSEM観察

塩野 正道¹⁾、許斐 麻美¹⁾、中澤 英子¹⁾、河合 功治²⁾、桑畑 進³⁾、米澤 徹⁴⁾

(株)日立ハイテクノロジーズ アプリケーション開発部¹⁾、ミヨシ油脂(株)²⁾、
大阪大学・院・工³⁾、北海道大学・院・工⁴⁾

微小甲殻類の外骨格は、真空中で形態を保持できるほど強硬ではないために、試料前処理が必要であるが、固定液が浸透しにくいいため、型通りの電顕前処理は難しい。そこで、我々は、蒸気圧が殆どゼロで、帯電防止材として有用なイオン液体を用いて微小甲殻類の観察を試みた。実験試料にはヨコエビとカイアシ類を用いた。イオン液体は、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム テトラフルオロボレート (関東化学) と、エチル(2-ヒドロキシエチル)ジメチルアンモニウム メタンサルホナート (ミヨシ油脂) を用いた。採取した試料をイオン液体希釈溶液中に浸漬後、余分なイオン液体を除去して、高真空状態でSEM観察を行った。イオン液体を浸透させたヨコエビは、化学固定法を施した試料とは異なり、関節の柔軟性が保たれているため、関節が可動でき、また同一個体の表裏観察も行えた。さらに、口器と付属肢を剖出して種の同定に必要な形態情報を得ることができた。

イオン液体を用いた赤血球の無固定 SEM 観察

兵野 篤¹⁾、河合 功治²⁾、阿部 薫明¹⁾、藤原 満博³⁾、
東 寛⁴⁾、若本志乃舞³⁾、米澤 徹¹⁾

北海道大学¹⁾、ミヨシ油脂(株)²⁾、北海道ブロック赤十字血液センター³⁾、旭川医科大学⁴⁾

近年、イオン液体を用いた電子顕微鏡前処理法が注目を集めている。我々は、コリン様の親水性イオン液体を用いることで、赤血球の固定・乾燥処理を行わない簡便・迅速な電子顕微鏡前処理法を試みた。

PTFE メンブレンフィルターを用いて赤血球をろ取り、コリン様親水性イオン液体を希釈せずにかけ、1 分間静置後余剰のイオン液体をふき取って SEM 観察を行った。赤血球は破壊されずに原型をとどめたままで観察することが可能であった。また、サイズも元来の赤血球と同程度の 8mm 程度を維持していた。

技術 2 : 「新しい観察技術-1」

リアルタイムステレオ SEM による生物試料の観察

坂上 万里¹⁾、許斐 麻美¹⁾、中澤 英子¹⁾、
小竹 航²⁾、伊東 佑博²⁾、星野 吉延²⁾、片根 純一²⁾

(株)日立ハイテクノロジーズ アプリケーション開発部¹⁾、
(株)日立ハイテクノロジーズ 先端解析システム設計部²⁾

試料傾斜した画像を立体視するステレオ法を SEM に適用したリアルタイムステレオ SEM¹⁻³⁾を用いて生物試料の 3D 観察を行った。リアルタイムステレオ SEM では、電磁コイルを用いて 1 走査線ごとに入射電子線の傾斜方向を自動的に切り替えることにより、ステレオペア（左右の視差画像）を取得することができる。取得されたステレオペア画像は、赤青メガネを使用することで 3D 観察可能なアナグリフ表示の他、3D モニターに表示することで、倍率可変や視野移動に際しても、モニター上でリアルタイムに 3D 観察することが可能である。本法を樹脂鋳型で処理した腎臓やイオン液体処理した細胞などに適用した結果、微細な血管構造や仮足などの空間的な配置を立体的に観察することができた。

- 【1】 小竹航, 他, 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会発表要旨集, p146 (2012)
- 【2】 伊東佑博, 他, 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会発表要旨集, p259 (2011)
- 【3】 S. Ito, W. Kotake, H. Ito, F. Iwata, T. Ushiki, “Development of a novel real-time 3D Scanning Electron Microscope for biomedical studies”, ISMS, p33(2010)

低加速反射電子による生物切片の広領域・高解像度観察

檀 紫¹⁾、中澤英子¹⁾、小柏 剛¹⁾、石田 欣二²⁾、花坂 智人²⁾、遠山 稿二郎²⁾

(株)日立ハイテクノロジーズ¹⁾、岩手医科大学バイオイメージングセンター²⁾

SEMの反射電子は試料の電子散乱により発生する信号で平均原子番号によって反射率が異なるため試料の組成コントラストを得ることができる。この特性を生かしてTEM観察用に前処理した樹脂包埋超薄切片の反射電子観察を試みた。実験にはSU8020形FE-SEMを用いた。本装置はセミインレンズ方式対物レンズと変換電極板によって、より低加速電圧での反射電子信号を効率よく検出でき、試料損傷や帯電による像障害も軽減できる。液体ヘリウム急速凍結・凍結置換ラット小脳切片(厚さ100 nm、酢酸ウラン-鉛二重染色)の30 mm角領域を連続視野撮影し、130枚のつなぎ写真像を構築した。加速電圧は0.8~3 kVに変化させることで100 nm切片の表面から内部の情報を確認した。加速電圧1.5 kVでは核、ミトコンドリア、リボゾームや核膜孔などの細胞内小器官を鮮明に観察することができた。

赤外自由電子レーザー照射による生体分子の構造変化追跡

藤岡 隼¹⁾、川崎 平康²⁾、今井 貴之²⁾、浜田 信哉³⁾、笹倉 裕一⁴⁾、築山 光一¹⁾³⁾

東京理科大学大学院総合化学研究科¹⁾、東京理科大学総合研究機構赤外自由電子レーザー研究センター²⁾、神奈川歯科大学細菌学教室³⁾、神奈川歯科大学インプラント科⁴⁾

近年、レーザーは計測、診断、加工などの手段として利用が拡大している。レーザーの種類は豊富であるが、分子の指紋領域付近の中赤外領域における波長可変な光源は限定される。その中で、自由電子レーザー(Free Electron Laser; FEL)は放射光を利用した高出力、波長可変、特異なパルス構造という特徴を兼備している。東京理科大学赤外自由電子レーザー(FEL-TUS)は中赤外に発振領域(4-12mm)を有し、物理化学・材料科学・生命科学など多分野への応用が試みられている。中赤外光の生体分子に及ぼす影響は未知な点が多く、報告も少ない。そこで、タンパク質と糖質にFEL光を照射した際の構造変化を追跡した。実験にはアルツハイマー病の原因と考えられているアミロイドタンパクと歯周病原菌が産生する糖であるリポポリサッカライド(LPS)を用いた。これらの生体関連分子についてFT-IRにより赤外吸収スペクトルを測定し、官能基と共鳴する照射周波数を決定した。次にFEL光を照射し、照射前後の赤外吸収スペクトルを測定した。更に、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて照射前後の顕微鏡像を得た。これらの実験より照射前後で、タンパク、糖の両者共にスペクトルに変化が認められた。一方、タンパクにおいては視覚的にも表面性状の変化が認められた。これらの結果から、タンパク、糖のいずれにおいても分子構造が変化している可能性が示唆された。今後、他の生体関連分子にもFELを適応拡大していく予定である。

0-7 パルスフラッシュ光の効果 - 共焦点および電子顕微鏡観察 -

伊東 良子¹⁾、伊東 丈夫²⁾、上久 廣昭³⁾、小笠原 弘³⁾、梅木 雅純³⁾、太田 嘉英⁴⁾

東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター組織部門¹⁾、同細胞部門²⁾、
COMET 株式会社³⁾、東海大学医学部口腔外科⁴⁾

クセノンガスを光源とする 200–1000nm の幅広い分光特性を持つパルスフラッシュ光（サンダーライトと命名；岐阜大学、鷺巣誠教授）照射による培養腫瘍細胞、担癌動物への効果が報告されてきている。また、動物病院の臨床現場ではインフォームドコンセントを経て前試験的治療が始まり、その効果が徐々に報告されてきている。今回は、培養細胞におけるこのパルスフラッシュ光照射効果の共焦点顕微鏡および電子顕微鏡的検証について報告する。

[方法] 1. 照射装置を LSM510META に設置、培養細胞へ 0–40 秒、各 1 回の照射。

2. Propidium Iodide (PI) の取り込みを共焦点顕微鏡で観察した細胞は、固定後通常電顕あるいは免疫電顕の観察を行った。

[結果] 正常細胞ではパルスフラッシュ光の影響は照射時間に関わらず殆ど見られず、腫瘍細胞では共焦点顕微鏡観察で、照射により細胞の死んでいく様子が確認され、電顕では核濃縮や核崩壊が観察された。

[まとめ] パルスフラッシュ光照射効果は腫瘍細胞を選択的に死滅させることが示唆され、またこれまでの実験により深達度も定常光より遥かに深く事が分かってきた。このことは今後、皮下組織への応用が期待されるものである。

技術 3 : 「新しい観察技術- 2」

0-8

生体適合性ナノ材料とその細胞内動態の電子顕微鏡評価

國廣 桂子¹⁾、池田 牧子¹⁾、酒井 満²⁾、太田 英男²⁾、
岸村 顕広³⁾⁴⁾、安楽泰孝⁵⁾、片岡 一則⁵⁾⁶⁾、広瀬 治子¹⁾

帝人株式会社構造解析研究所¹⁾、帝人株式会社近藤研究室²⁾、九州大学大学院工学研究院³⁾、九州大学分子システム科学センター⁴⁾、東京大学工学系研究科⁵⁾、東京大学大学院医学系研究科⁶⁾

静電結合型ナノベシクルである Nano-PICsome は、DDS のツールとしてなど生体内での適用が期待されるポリオン集合体 (polyion complex: PIC) である。Nano-PICsome の細胞内あるいは生体内での挙動を粒子レベルで解析することを目的に作製された金コロイドを埋め込んだ Nano-PICsome (Au-PICsome) を、透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて可視化方法を検討し、生体細胞内での挙動評価を試みている。多種の可視化方法によって、Au-PICsome の、金コロイドが PICsome の膜中にインターカレートされていることを明らかにした。また、この金コロイドをマーカーとして、培養細胞やマウス組織中での Au-PICsome の挙動を明らかにしたので報告する。

0-9 健常人血清からのエクソソーム調製法及び検出法の検討

河内 佐和子¹⁾、池田 昌郁²⁾、河野 麻理¹⁾、高木 由里¹⁾、和田 淳¹⁾、森川 隆¹⁾
シスメックス株式会社 学術部セルアナリシスセンター¹⁾、 同 中央研究所 第二研究グループ²⁾

【緒言】生体内の多くの細胞は、エクソソームと呼ばれる直径約 30~150nm の脂質膜の小胞を細胞外に分泌している。近年、エクソソームには生体内抗原や抗原ペプチド/MHC 複合体・microRNA などが含まれていること、これらのプロファイリングが健常人とがん患者の間で大きく異なることがあること、などが示され、疾患マーカーとしても注目されつつある。エクソソームの調製法には、古くから用いられている超遠心法に加え、近年、通常の遠心機を用いるエクソソーム精製キットが各社から販売されるようになったが、両者の精製効率を比較した検討は行われていなかった。そこで今回我々は、超遠心法および 2 社のキットを用いて調製した血中のエクソソームについて、粒子径測定装置と電子顕微鏡を用いた比較検討を行った。【方法】健常人の血清から、血中エクソソームを①超遠心法、②ExoQuick (Systems Bioscience 社)、③Total Exosome Isolation (Life Technologies 社)により分離し、-80℃に凍結保存した。これを 37℃恒温槽にて融解し、粒子径測定装置(マルバーン社)にて 3 回測定を行った。一方、同様に融解した試料を 0.22 μm フィルターでろ過した後、PFA で固定し、フォルムバルカーボンコートグリッドに滴下、PBS にて洗浄、1%GA 固定を行い、純水にて洗浄、ウラン酢酸溶液、メチルセルロースウラン酢酸の順に電子染色を施した後自然乾燥させて、透過型電子顕微鏡(H-7500, 日立ハイテクノロジーズ社)にて観察した。【結果】いずれの調製法を用いた場合でも、粒子径測定装置でエクソソームの大きさと一致する 30-150 nm の粒子を確認でき、また透過型電子顕微鏡でも、過去の文献によるエクソソームの形態と一致する、膜にくるまれた直径 100 nm 以下の小粒子を多数観察できた。3 種の調製法のうちでは、超遠心法が最も夾雑物が少なく、純度よく回収できていた。【結論】今回、粒子径測定装置及び電子顕微鏡によりエクソソームを検出することができた。また、調製法では、古くから実施されている超遠心法がキットを用いた方法と比較して優れていた。

0-10 免疫電顕法による mRNA 構造可視化の限界

石垣靖人、中村有香、辰野貴則、馬 小福、竹原照明、友杉直久

金沢医科大学・総合医学研究所

メッセンジャーRNA(mRNA)は細胞の核内でDNAから転写されて生成する。転写されたRNAはスプライシングを受けて成熟するが、このときにエキソンとエキソンのつなぎ目付近にエキソンジャンクションコンプレックス(EJC)が結合していることが知られている。発表者らは、このEJCを免疫電顕で検出することにより、細胞内のmRNAの形を観察する手法を提案し本学会で発表してきた。しかし、抗体で検出されるY14とUpf2タンパク質の複合体形成が、細胞内のどの領域で形成されているかが曖昧であったために、分子生物学的な手法と組み合わせて特定することを試みた。細胞分画のウエスタンブロットと免疫沈降実験および免疫染色と組み合わせたproximity ligation in situ アッセイでは、細胞質に加えて細胞核内での複合体形成を観察できた。EJCが翻訳によってmRNAから外されていくことは、既に複数の研究グループにより報告されている。以上より、免疫電顕を用いた本方法により観察できるmRNAの形態は、細胞核内から翻訳にいたる直前までを可視化していると結論された。

0- 1 1

キンギョ 脊髄切断後の癒痕内に出現する管状構造の由来

武田 昭仁、跡部 好敏、船越 健悟

横浜市立大学 医学部 神経解剖学教室

魚類においては脊髄切断後に軸索が損傷部を通過することが確認されている。さらにキンギョにおけるこれまでの研究から、癒痕を囲む基底膜がチューブ状に貫入し、そこを再生軸索や GFAP 免疫陽性の線維が進入することが分かっている。そこで、このような管状構造の由来と形成メカニズムを探る為に、今回の研究では、キンギョの脊髄再生過程における癒痕内の基底膜とそれに近接する細胞との関連を電子顕微鏡で形態学的に検討した。

脊髄切断後 6 週間目の損傷部において、線維芽細胞や肥満細胞の間に膠原線維の走る線維性癒痕が認められた。そして、癒痕内では、1 つ～多数の軸索がシュワン細胞に包まれ、そのシュワンの直径は 10～100 μm 近くに達していた。

癒痕に進入した軸索の周囲をシュワン細胞が囲んでいたことは、シュワンが根より遊走し、末梢神経の再生と同様の方法で軸索をガイドしていることを示唆している。さらに、このようなシュワンによるトンネル状の構造は、内部に複数の軸索を含み直径も光学顕微鏡で見られたチューブ状構造と一致したことから、基底膜の管状構造はシュワンがその外周に形成したものと考えられる。

0- 1 2

ラット脊髄損傷部癒痕組織に生じる筒状構造物についての透過電顕観察

跡部 好敏、武田 昭仁、滝口 雅人、大垣 福太郎、船越 健吾

横浜市立大学医学部 大学院医学研究科 神経解剖学

脊髄は物理的損傷を受けると、損傷部に様々な要素からなる癒痕が形成される。この癒痕は損傷部を保護する機能を持つ反面、軸索再生を阻害する障壁となると考えられている。これまでの研究で、この癒痕中に多数の筒状構造物が存在することが光顕的に確認されており、再生軸索がこの構造物に沿って伸長していると思われる所見を得ているが、詳細な構造は不明であった。

この検討を行うために、下位胸髄をメスで完全切断したラットの脊髄損傷部に生じた癒痕部の前頭断試料について透過電顕観察を行った。その結果、損傷を加えてから 2 週間後では、損傷を受けた神経束はマクロファージに包み込まれ、軸索そしてミエリン鞘の順に分解吸収され、神経束が消失した後も、この管状の構造物は残存することが明らかになった。再生過程にある軸索は、再生血管と同じように、この管状構造物に沿って伸長し、さらにこの管状構造を取り囲む様に、多数のコラーゲン線維が縦走していることを確認した。

以上の結果より、脊髄損傷部では、マクロファージ由来と考えられる管状構造がガイドとなって血管や軸索が再伸長することは確実であることが示された。

マウスに形成誘導された血リンパ節様構造における形態学的解析

大塚 裕忠¹⁾、中村 雅典¹⁾

昭和大学歯学部口腔解剖学講座¹⁾

血リンパ節は、いくつかの哺乳動物に認められる独立したリンパ性器官であり、リンパ節と同様の構造でありながら、血球の破壊や髄外造血の場としての役割も果たしている。この構造については動物種によって若干の形態学的差異を有しており、またマウスにおいては存在が知られていない。

今回我々は、脾臓摘出マウスにフェニルヒドラジン (PHZ) を投与し、溶血性貧血を誘導した上で窒素含有型ビスホスホネート (NBP) を投与し、骨髄内での赤血球造血を抑制し、マウスに重症貧血を誘導した。

その結果、腹腔内、特に大網、すい臓周囲及び腸管膜に暗赤色の粟粒大構造物の形成が確認された。この構造物について、形態学的検索を実施したところ、脾臓やリンパ節の様な被膜に隔てられ中に骨髓様の細胞が密集していた。免疫組織化学の結果から、これらの細胞群は有核の TER119 陽性の細胞がほとんどを占めており、これらの細胞と一致して PCNA 陽性の細胞が分布していた。また、電顕所見においても、細胞分裂像や赤芽球の特徴を有する細胞が確認された。以上の結果から、この血リンパ節様構造は重篤な貧血を回復するための赤血球造血巣であると考えられた。

動物組織 1 : 「診断への応用」

生体内凍結技法を用いたラット急性うっ血腎集合管の観察

逸見 聖一朗¹⁾、地家 豊治²⁾、松本 なつき³⁾、尾花 ゆかり⁴⁾、逸見 明博⁴⁾

日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野¹⁾、日本大学医学部総合医学研究所電子顕微鏡室²⁾、クレハ分析センター³⁾、日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野⁴⁾

【はじめに】近年、生体内凍結技法が行われるようになった。この方法を用いることにより、生体内機能状態下の細胞組織形態が保持され、真の機能形態学的解析が可能である。我々は生体内凍結技法で、ラットに腎うっ血を作製し形態変化を観察したが、今回腎集合管について報告する。

【方法】成獣ラット腎臓を正常血行動態および急性腎うっ血動態（肝静脈直下で下大静脈を結紮後 2 分、5 分）下において、冷却メス刃で腎に切れ込みを入れると同時にイソペンタン・プロパン混合寒剤を流し込み生体内凍結を行った。凍結腎臓は摘出後、2%パラホルムアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定、パラフィン包埋し HE 染色薄切片を光顕観察した。また、通常電顕標本も作製し透過電顕で観察した。

【結果と考察】HE 染色標本では、凍結良好な領域が凍結面より 300-400 μ m の範囲で得られ、一部のラットでは腎髄質の観察も可能であった。正常血行動態下では髄質外帯内層から内帯の集合管はほぼ均一な太さを示していたが、うっ血腎では巣状に拡張した集合管が観察された。この所見から、腎臓にうっ血が起こると特定の領域のネフロンに尿産生が集中し集合管が巣状に拡張した像と考えられた。

日本大学医学部附属板橋病院における心筋生検超微形態診断の意義

大矢 俊之¹⁾、山田 勉²⁾、地家 豊治³⁾、奥村 恭男¹⁾、
高山 忠輝¹⁾、渡邊 一郎¹⁾、杉谷 雅彦²⁾、石井 敬基³⁾、平山 篤志¹⁾

日本大学医学部内科学系循環器内科学分野¹⁾、
日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野²⁾、
日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門³⁾

【背景】平成 22 年度の臓器移植法改正に伴い、本邦における心臓移植件数は飛躍的に増加している。また、平成 23 年には植込型人工心臓の保険適応となり、心臓移植は「夢の治療」から「標準治療」へと劇的に変わりつつある。しかし、心臓移植ドナー数は増加傾向にあるものの未だレシピエント数には足りず、移植適応決定のためレシピエントの心臓の評価はより重要性を増している。慢性心不全の原因疾患の鑑別は困難で、その決定的な材料の一つが心筋生検であるが、電子顕微鏡を用いた心筋生検鑑別法は、法改正以前の心臓移植需要の少なさ、機器の維持コストために実行可能な施設は減少している。

【目的】日本大学医学部附属板橋病院における電子顕微鏡を用いた心筋生検の結果を報告する。

【結果】平成 22 年以前は心筋生検の電子顕微鏡を用いた診断は当院では行われていなかった。平成 23 年には 26 件、平成 24 年には 36 件の心筋生検が行われそのすべてにおいて電子顕微鏡標本が作製され評価された。内 4 件に関して心臓移植の検討が行われ、内 3 名が補助人工心臓の適応となった。また、移植適応には関連が無かったが、電子顕微鏡により Fabry 病、ARVC の診断がなされた。

【結語】心臓移植時代には心筋生検の価値は再評価され施行件数は増加している。電子顕微鏡を用いた診断により有意な臨床情報を得ることが可能であった

0-13 心筋細胞陥入膜の電気生理学的形態学的解析への試み

大矢 俊之¹⁾、地家 豊治²⁾、渡辺 一郎¹⁾、
逸見 明博³⁾、石井 敬基²⁾、村井 一郎²⁾、平山 篤志¹⁾

日本大学医学部内科学系循環器内科学分野¹⁾、日本大学医学部総合医学研究所医学研究支援部門²⁾、日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野³⁾

【背景】心不全における心筋細胞の変化は、陥入膜 t-tubules と筋小胞体とが作るカルシウム動態 calcium-induced calcium release system の破綻であることが知られている。近年分子生物学的研究から FKBP12.6, SERCA などの蛋白の異常が相次いで報告されているものの、t-tubules に関する研究は少ない。

【目的】心不全心筋細胞における t-tubules の形態学的変化を観察するため、Guinea Pig 心筋を電子顕微鏡、共焦点顕微鏡を用いて形態学的・超微形態学的に観察しその特徴を明らかにする。

【結果】透過型電子顕微鏡を用いた観察においては、t-tubules の観察は難しかった。しかし、ルテニウムロットを用いることにより膜を強調することができた。凍結組織をオスミウム浸軟することで t-tubules を露出させ、走査型顕微鏡を用いてその描出を試みたが、間質線維との鑑別が困難であった。苛性ソーダによる浸軟を行った結果、走査型電子顕微鏡により t-tubules 入孔部の観察が可能であり、その分布は共焦点顕微鏡で認めた膜電位部分と一致していた。単離心筋細胞における t-tubules の生理学的・形態学的観察のため共焦点顕微鏡像と走査型電子顕微鏡像の fusion を試みたが一致を認めなかった。結論：共焦点顕微鏡と電子顕微鏡を用いた心筋細胞 t-tubules の観察が可能であった。病的 t-tubules の解明のためには更なる観察技術の向上が必要である。

応用研究 2 : 「形態機能解析-2」

0-17

人工血管壁における再生内膜平滑筋細胞配列の走査電顕観察

野一色 泰晴、伊藤 博、跡部 好敏、船越 健悟

横浜市立大学医学部 神経解剖学

ポリエステル繊維製人工血管を植え込むと、条件が良ければ内膜が再生する。再生内膜内面は血管内皮細胞層に覆われ、その下に数層の平滑筋細胞が並び、細胞間隙には微細な弾性繊維や膠原繊維が見られ、さらには栄養血管をも見ることができる。我々は内膜再生を観察する過程に於いて、光学顕微鏡連続切片から平滑筋細胞には配列に規則性のある様だ、という感触を感じていた。しかしながら平滑筋細胞は内膜内に埋もれており、全体像や配列、細胞間の相互関係などを見ることができなかつた。そこでペプシンが膠原繊維を分解し弾性繊維は分解しないこと、逆にトリプシンは弾性繊維を分解し細胞を裸状態で細胞間組織を洗い流し細胞をばらばらにするが膠原繊維は分解しないこと、という酵素特性に注目し、再生内膜をトリプシン処理する事で表面の内皮細胞層を剥がし、平滑筋細胞をばらばら状態にする工夫を思いついた。幸いなことに平滑筋細胞は膠原繊維網にトラップされ、流されることなく元の位置に留まった。その結果、平滑筋細胞の全体像や相互関係を走査電顕で観察することができた。この観察手法を開発した結果、平滑筋細胞は壁にかかる張力（ひずみ）の方向に配列する、という法則性のあることを明らかにする事ができた。

植物根内におけるネコブセンチュウ雌成虫の微細構造と機能

宮下 奈緒^{1, 2)}、藪 哲男²⁾、古賀 博則¹⁾、栗原 孝行¹⁾石川県立大学¹⁾、石川県農林総合研究センター²⁾

ネコブセンチュウは植物根内に定着し、巨大細胞を誘導して栄養を摂取しながら成長する。根こぶが発達すると根内の線虫観察が困難になるため、雌成虫の行動様式についてはほとんど明らかにされていない。本研究では根内における雌成虫の行動様式を解明するため、光顕および走査電顕を用いて根こぶ内の雌成虫の観察を試みた。生きたまま線虫を観察するため光顕を用いて観察したところ、雌成虫が頭部先端のみを様々な方向へ動かし周囲の巨大細胞へ口針を刺し込んでいた。線虫頭部を詳細に観察するため走査電顕を用いて観察したところ、雌成虫の頭部先端は伸縮できるようにひだが蛇腹状に重なり合うようになっており、根内でも頭部の先端を自在に動かして周囲の巨大細胞に口針を刺し込み吸餌することが可能であると考えられた。

二種類のナマコ、キンコ (Cucumaria) とマナマコ (Stichopus) の体壁のコラーゲン線維

大澤 得二¹⁾、松浦 絵里²⁾、小笠原 勝利²⁾、石田 欣二²⁾、遠山 稿二郎²⁾九州栄養福祉大学食物栄養学部¹⁾、
岩手医科大学医歯薬総合研究所バイオイメージングセンター²⁾

ナマコは棘皮動物に属し、その体壁のコラーゲン線維束はキャッチ結合組織として機能することが知られている。そこで哺乳類の真皮のコラーゲン線維束とは異なる電子顕微鏡像を得ることが期待できる。今回、2種類のナマコの体壁のコラーゲン線維束を透過型電子顕微鏡的に観察し、哺乳類の真皮のコラーゲン線維束とは大きく異なる像を得たので報告する。今回観察したキンコおよびマナマコにおいてはコラーゲン線維の直径のばらつきが大きく、20nm～200nm の範囲にわたっていた。断面形態は不定形で、細い線維が癒合して太い線維を形成していく様々な過程と思われる像を得た。特にキンコにおいては、太い線維の形成過程において周囲の空間を取り込み、中空の線維を形成する傾向が明らかであった。

一般演題 ポスター発表

技術4：「改良と工夫」

P-1

電子顕微鏡試料作製のための新しい細切用カミソリの評価について

夏木 靖典、佐々木 千鶴子、四戸 歩、高木 正之

聖マリアンナ医科大学大学院電子顕微鏡研究施設

一般的に細切用に用いられているカミソリの刃厚は0.1mmだが、今回用いた新しいカミソリでは刃厚が0.076mmとかなり薄くなっている。

組織を摘出して固定液に入るまでの操作は、最終電顕像に大きく影響する。特に細切時の物理的損傷は、極力避けなければならない。押し切るような細切を行うと組織に挫滅による影響が出るため、通常細切方法はカミソリ二枚を用いて引き切りで細切を行うが、この方法は初心者には難しい。簡便にできる押し切る方法で、従来のカミソリと新しいカミソリで組織の細切を行ったときの挫滅による影響の比較検討を行ったので報告する。

P-2

超マイクローム用デジタルモニタ

尾関 教生

愛知医科大学教学監

電子顕微鏡技術の実技面の教育の中で、最も難しいものに超マイクロームの操作がある。これは実体顕微鏡下での作業であるのに、実体顕微鏡は構造的にディスカッションユニットの接続が困難であり、実際の作業が受講生に見えないことにある。

このため安価なウェブカメラを使用して実習を行ったところ、受講生から好評を得たので報告する。

カメラユニットはパソコンショップでウェブカメラ兼用ドライブレコーダとして市販しているものを使用した（フレームレート＝30／秒，画面サイズ＝VGA）。

ライカのマイクロームの実体顕微鏡部の接眼レンズは特殊なものであるために、通常の接眼アダプタが取り付けられない。このために市販のホースバンドとステーを使用してアダプタを作製した。このアダプタの実物をあわせて供覧する。

超マイクロームで使用するガラスナイフ用照明装置の試作

尾関 教生

愛知医科大学教学監

超マイクロームにガラスナイフを取り付けて超薄切片や準超薄切片を作製する場合に、ダイヤモンドナイフと比べて面合せが困難な場合がある。とくに切削面の垂直方向の調整ができる前の「切削面が上を向いている」とときには、ナイフ背面での下方からの反射が見えないことがある。

このために古いLKB社の超マイクロームの照明装置をヒントにして、ガラスナイフ用の照明装置を試作した。原理はガラスナイフ自体をプリズムとして使用し、ナイフ下端にLEDを取り付けてナイフ背面上部からブロックの切削面に光を当てるものである。実体顕微鏡が双眼であるため、LEDは2個を使用している。

この装置を実技講習会で使用してみたところ、受講生から好評を得たので実物を供覧し、報告する。

グリッドサイズを超えた超微形態観察

- ヒストジャンボダイヤモンドナイフの有効活用 -

花坂 智人¹⁾、丸田 節雄²⁾、松浦 絵里¹⁾、
小笠原 勝利¹⁾、野崎 貴介¹⁾、石田 欣二¹⁾

岩手医科大学バイオイメージングセンター¹⁾、(株)日新EM²⁾

私たちは、走査型電子顕微鏡を用いて低加速電圧で反射電子像を観察することで、超薄切片の形態解析をしている。この方法は、スライドガラス上に切片を回収するため、グリッドサイズの制限を受けることなく広範囲の観察が可能である。

試料作製にはヒストジャンボダイヤモンドナイフを使用し、刃幅が6mmと広く、なおかつ、ボート内にスライドガラスを入れられるため切片を直接回収できる利点がある。

今までは主に光顕用切片の作製に使用していたが、電顕用大型切片の作製にも応用出来ることが分かったので報告する。

急速凍結試料作製 - 任意方向に載物するための工夫 -

松浦 絵里¹⁾、花坂 智人¹⁾、小笠原 勝利¹⁾、野崎 貴介¹⁾、石田 欣二¹⁾

岩手医科大学 医歯薬総合研究所 バイオイメーキングセンター¹⁾

私たちは、凍結試料を作製する際、凍結時での氷晶形成を避けるため、氷晶防止剤の一つである20%ポリビニールピロリドン-1,84M ショ糖液に浸漬後、液化プロパンを冷媒とした、浸漬法による急速凍結を行っている。

本試薬は、氷晶防止に加え、切削性にも優れているが、粘度が非常に高いため、浸漬後の試料の取扱いが煩わしく、薄い試料や紐状の細い試料などは、思い通りの方向に、試料ピンへ載物するのは困難であった。10%程度ゼラチンゲルに包埋する方法もあるが、私たちは、目的以外の試料を用いて、試料を挟んだり・埋め込んだりする手技を用いている。

技術5：「試料処理と解析法の検討」

迅速試料作製

- 短時間で重合硬化するエポキシ樹脂の検討 第二報 -

織田 恵理子¹⁾、根本 典子¹⁾、加藤 時雄¹⁾、勝岡 憲生^{1,2)}

北里大学医学部バイオイメーキング研究センター画像部門、 同 皮膚科学²⁾

透過電子顕微鏡観察において、処理時間の短縮は誰しもが望んでいることであり、我々も、マイクロウェーブや加圧を併用した迅速試料作製法につき永年検討してきており、ある程度の結果が得られている。しかしながら、樹脂の重合、硬化の点で迅速化を計る際、重合不良のリスクが生じ易く、樹脂の浸透と重合時間にはリスクの少ない再現性のある包埋剤の選択が必要と考えていた。

近年、この目的に使用出来る可能性のある2種類の樹脂を提供戴き（2時間、24時間で完全硬化する樹脂）、昨年の本学会主催 第28回学術講演会において、これらを動物組織へ応用した評価を報告した。その結果、24時間室温包埋の樹脂が動物組織に適する事が確認できたが、その後、いくつかの問題点があることが判り、現時点での評価を報告する。

迅速試料作製

- 24 時間室温重合するエポキシ樹脂の形態観察への応用 -

根本 典子¹⁾、織田 恵理子¹⁾、宮田 聡子²⁾、高須 博²⁾、勝岡 憲生^{1,2)}
北里大学医学部バイオイメージング研究センター画像部門¹⁾、 同 皮膚科学²⁾

生物組織の透過電子顕微鏡観察において、その処理時間の長さや処理の煩雑さから、光学顕微鏡検索で事足らずことや、遺伝子検索に評価を切り替えるなど、超微形態での解析を敬遠しがちな研究者も少なくない。特に、病理診断に活用する場合には、時間の短縮は重要な課題となる。電子顕微鏡で生物組織が観察できるようになって早、半世紀を過ぎているが、これ迄の間、先人達も迅速試料作製法を度々議論し、マイクロウェーブなどの併用や種々の包埋剤を検討してきたが、現在も試料処理の基本は大きな変化はなく、目を見張るほどの迅速化は図れてない現状である。

我々は、昨年、室温、蛍光灯下 2 時間、24 時間で完全硬化する樹脂の提供を戴き、包埋剤としての評価を行ったところ、ガラスナイフの刃先の摩耗が極めて少なく、均等な 0.5 μm 準超薄切片が連続して得られる事、超薄切片でも連続性があり、切削性に優れる事などから、連続切片による組織の立体構築を検討し、臨床組織診断に応用した一例を紹介する。

Preyssler 型リンタングステート分子を用いた ファージのネガティブ染色剤の開発

定金 正洋¹⁾、佐廣 浩一¹⁾、河東 康彦²⁾、中井 敏博²⁾、小池 香苗³⁾、佐野 庸治¹⁾

広島大学大学院 工学研究科¹⁾、広島大学大学院 生物圏科学研究科²⁾、
広島大学 自然科学研究支援開発センター³⁾

我々はこれまでに水溶液中で安定なタングステン分子がファージのネガティブ染色剤として優れているのではという仮定のに基づきネガティブ染色剤の開発を行ってきた。その中で、Preyssler 型リンタングステートと呼ばれるリンとタングステンの分子性酸化物 $\text{K}_{14}[\text{P}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}\text{Na}]$ が、タングステン系の染色剤として市販されているリンタングステン酸 ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) よりも優れていることを前回までの講演会で報告した。Preyssler 型リンタングステートは対カチオン、分子内に存在する Na イオンを様々に変えることができる。今回はこれらの対カチオンおよび分子内イオンを変えた様々な化合物の合成および染色剤としての性能について報告する。また、水溶液中での安定性以下の大切な要素についても報告する。

反射電子像を用いた画像解析の検討

小笠原 勝利¹⁾、花坂 智人¹⁾、松浦 絵里¹⁾、野崎 貴介¹⁾、石田 欣二¹⁾岩手医科大学 医歯薬総合研究所 バイオイメージングセンター¹⁾

私達は、樹脂包埋した試料を、TEMだけでなくSEMによる観察（反射電子）をし、超微形態解析を行っている。この方法は、スライドガラスに連続超薄切片や大型試料を回収し、観察することができるので、効率のよい連続切片画像の取得と広領域観察が可能である。今回は、得られた反射電子像の画像データを、より正確に解析する技術を確立するため、(1)連続切片画像の3次元解析処理法、および(2)広領域の画像情報を得るためのモンタージュ処理法について、画像解析ソフトウェアを用いて検討した。

具体的には、ラット視神経組織の連続超薄切片をスライドガラスに回収し、連続超薄切片の画像取得と撮影画像のアライメント、3D化をすることで、立体的な情報を得ることができた。

また、広領域の情報を得るために、マウス小脳の表層から顆粒層までの領域をモンタージュ撮影した。その後、撮影画像のつなぎ合わせを、手動（Photoshop(Adobe)）と自動機能（ImageJ(NIH)）で行った。撮影画像のつなぎ合わせを行うことで、全体像から詳細な所までを解析できるようになった。

カラーコンタクトレンズのTEMによる可視化方法の検討

広瀬 治子¹⁾、荻山 明日香¹⁾、佐々木 千鶴子²⁾帝人(株)構造解析研究所¹⁾、聖マリアンナ医科大学大学院電子顕微鏡研究施設²⁾

近年、安価なカラーコンタクトレンズによる角膜の炎症・障害が問題となっている。カラーコンタクトレンズと角膜との関連を調べるにあたり、カラーコンタクトレンズの断面微細構造を把握する必要がある。しかし、ソフトコンタクトレンズはヒドロゲルであるために、通常のTEM観察用のポリマーサンプリング方法では、可視化が不可能であった。生体のサンプリング方法を応用し、3種類のコンタクトレンズの可視化を試みたので、結果を報告する。着色剤層は種類によって存在部位が異なり、レンズ表面に存在するものがあり、明らかに角膜に影響を及ぼすものと推察された。

技術6：「イオン液体観察法」

P-11

イオン液体による カラーコンタクトレンズのSEM観察とX線微量分析

佐々木千鶴子¹⁾、夏木 靖典¹⁾、四戸 歩¹⁾、高木 正之¹⁾、
松澤 亜紀子²⁾、広瀬 治子³⁾、桑畑 進⁴⁾、津田 哲哉⁴⁾

聖マリアンナ医科大学 大学院電子顕微鏡研究施設¹⁾、同大学 眼科学²⁾、
帝人(株)構造解析研究所³⁾、大阪大学大学院 工学研究科⁴⁾

カラーコンタクトレンズはさまざまな色やデザインを楽しみながらお洒落な目元を演出
できることで近年若い女性に人気がある一方、誤った手入れや使い方で角膜の炎症・障害
を引き起こす原因になると指摘されている。今回未使用のカラーコンタクトレンズの一例
について親水性イオン液体 Tributylmethylphosphonium dimethylphosphate [P4441] [DMP]
を用いてレンズのオモテ面、ウラ面をSEM観察した。また、X線微量分析においても明ら
かに角膜に影響を及ぼすと推察される興味深い結果が得られたので報告する。

P-12

イオン液体の電子顕微鏡への応用

根本 典子¹⁾、織田恵理子¹⁾、宮澤 七郎³⁾、津田 哲哉⁴⁾、桑畑 進⁴⁾、勝岡 憲生^{1,2)}

北里大学医学部バイオイメーキング研究センター画像部門¹⁾、
同 皮膚科学²⁾、元 北里大学²⁾、大阪大学工学部大学院⁴⁾

イオン液体を用いての走査電子顕微鏡への活用は、広範囲に渡る。特に、従来法では観
察し難い、電子線による試料損傷を受け易い試料の観察には好適であることが、これ迄の
我々の実験結果より得られている。イオン液体が電子顕微鏡に応用されてから約7年が過
ぎ、全ての組織の電子顕微鏡観察に万能ではないにせよ、試料によっては従来法よりもは
るかに良好な結果を得られる事も多いのも事実である。近年、供給されたコリンラクテ
ートを含めたイオン液体の電子顕微鏡観察への応用として、その評価と有効であった一例を
紹介する。

イオン液体を用いたナノ/バイオマテリアルの SEM 観察

阿部 薫明¹⁾、兵野 篤²⁾、河合 功治³⁾、米澤 徹²⁾北海道大学・歯学研究科¹⁾、北海道大学・工学研究院²⁾、ミヨシ油脂(株)³⁾

常温で液体の有機塩化合物であるイオン液体 (IL) は、その導電性・流動性・低蒸気圧といった特性から、近年 SEM 試料の前処理 (導電性の付加) への利用が注目されている。我々はイミダゾリウム誘導体やコリン様のイオン液体を用い、ナノカーボン物質やセルロース、または生物試料などの SEM 観察を行った。IL 溶液の濃度・過剰分の除去などの条件により、得られた SEM 像の様子は大きく異なるため、これらの実験条件の検討を行った。この結果は、試料表面に存在するイオン液体の量が SEM 観察の重要な要因であることを示唆している。

応用研究 3 : 「形態機能解析-3」

ブドウ品種 ‘ルビーロマン’ における果皮ひび割れ症状の微細構造

古賀 博則¹⁾、原田 昂¹⁾、栗原 孝行¹⁾、中野 眞一²⁾石川県立大学¹⁾、石川県農業総合研究センター²⁾

ブドウ品種 ‘ルビーロマン’ の無核栽培では、果実頂部に同心円状のひび割れ状の亀裂を生じる障害が発生しやすい。本症状は果実外観を損ねるとともに、果肉軟化の原因となるので対策が求められている。しかし、本症状の発生原因については明らかでない。そこで、ひび割れ症状の発生過程を光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察した。ひび割れ部位の果皮表面を実体顕微鏡で観察すると、亀裂の周囲が陥没したようになることで、黄褐色に変色していた。電子顕微鏡で観察すると果皮表面のワックスと果皮細胞層の 1~2 層が断裂しており、その下の 3~4 層の細胞層はつぶれた状態になっていた。これらのことから、本症状はベレゾーン後の果実の急激な肥大により果皮が強く引っ張られたことで、果皮組織の強度の限界を超えたときに表層が断裂したことによって生じたものと推測される。

カキタンニン含有抗菌剤 (Pancil[®] PS-M) の ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する付着抑制効果

富山 潔¹⁾、向井 義晴¹⁾、齋藤 正寛⁴⁾、渡辺 清子³⁾、熊田 秀文³⁾、
椎谷 亨¹⁾、飯塚 純子¹⁾、長谷川 晴彦¹⁾、倉持 江里香¹⁾、寺中 文子¹⁾、
三宅 香²⁾、二瓶智 太郎²⁾、浜田 信城³⁾、寺中 敏夫¹⁾

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学¹⁾、歯科理工学²⁾、微生物感染学³⁾、
東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野⁴⁾

【研究目的】渋柿由来のタンニン酸を含有させた抗菌剤 (Pancil[®] PS-M: リリース科学工業株式会社) のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果を検討することを目的とし、付着能および生菌数に与える影響について検討した。

【材料および方法】円盤状ガラス試片 (直径 12mm) を装着したポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルを用いて、1 被験者から採取した刺激唾液からポリマイクロバイアルバイオフィルムを形成した (4 8 時間嫌気培養)。抗菌剤には、Pancil[®] PS-M および Corsodyl (0.2 vol% グルコン酸クロルヘキシジン: SmithKline) の希釈溶液を用いた。実験群は、非処理群 (陰性対照, cont), 0.05% グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, CHX) および 10.0 mg/ml Pancil[®] PS-M 群 (10P) の 3 群とし (n=6), 各処理あるいは滅菌脱イオン水浸漬 (cont) を 5 分間行った後、通法に従い、走査型電子顕微鏡 (JSM-6301F, JEOL) によるバイオフィルム構造の観察 (倍率: 5000 倍) を行った。

【結 果】電子顕微鏡による観察像は、cont に比較し、CHX および 10P では、バイオフィルムの付着が抑制されている状態を示した。

【結 論】Pancil[®] PS-M が口腔感染症に優れた効果を発揮する可能性が示唆された。

P-16

Porphyromonas gingivalis のヒト歯肉上皮細胞への侵入性 および IL-8 産生性におけるトリプシン様酵素の役割

渡辺 清子、熊田 秀文、浜田 信城

神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野

【目的】慢性歯周炎の原因菌である Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) は、歯周組織への付着能や細胞内侵入性を有しており、局所での炎症やそれに伴う歯槽骨の吸収を誘導している。本菌は Arg-gingipain (Rgp) および Lys-gingipain (Kgp) というトリプシン様酵素を産生することが知られており、歯周病における組織破壊との関連性が示唆されている。また、Interleukin-8 (IL-8) は、好中球走化因子として働く炎症性サイトカインであり、細菌感染の初期防御因子として重要であるが、P. gingivalis はヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の IL-8 産生を抑制することが報告されている。本研究では、P. gingivalis のトリプシン様酵素の歯周病原的意義について検討する目的で、それぞれの酵素の不活化 mutant 株を用いて HGEC への侵入性および IL-8 産生抑制性について検討した。

【方法】細胞内侵入試験は、通法の Antibiotics protection assay で行った。P. gingivalis ATCC 33277 株、rgp および kgp 不活化株を用いて HGEC を刺激した後、培養上清中の IL-8 量を ELISA 法により測定した。

【結果および考察】P. gingivalis 親株は HGEC への侵入性が認められたが、kgp 不活化 mutant である YPP2 株では、細胞侵入性に有意な減少が認められた。また、P. gingivalis 親株を作用させた上皮細胞では明らかな IL-8 の産生抑制が認められたが、細胞侵入性の低い YPP2 株を作用させると IL-8 産生抑制性が減少していた。以上の結果から、P. gingivalis の Kgp は本菌の細胞侵入性に関与しており HGEC の IL-8 産生性を制御していることが示唆された。

P-17

間葉系幹細胞の 3 次元培養による 歯科用インプラント体周囲の硬組織形成

中塚 美智子、隈部 俊二、乾 千珠子、上田 甲寅、安 春英、岩井 康智

大阪歯科大学口腔解剖学講座

【目的】ヒト間葉系幹細胞ならびに歯科用インプラント体をコラーゲンゲルに包埋して 3 次元培養した場合の硬組織形成について検討する。

【方法】ヒト間葉系幹細胞 (HMS0014、理研 BRC、 1.0×10^6 cells/ml) を、歯科用インプラント体とともに Type I collagen gel (新田ゼラチン) に包埋し、直径 10cm の dish にて 21 日間培養した。培養終了後インプラント体表面への初期の硬組織形成について組織学的に観察した。

【結果】SEM 観察において、HMS0014 は歯科用インプラント体と同一処理のチタンプレート表面の微細な凹凸に合わせて硬組織様組織を形成していた。インプラント体周囲では細胞外基質の分泌、ならびにコラーゲン線維の網状構造に関連した石灰化塊の形成がみられた。

【結論】HMS0014 細胞は歯科用インプラント体表面に接着し、インプラント体周囲で細胞外基質の形成と石灰化、硬組織形成を行う。

弾性線維の不思議

永井 薫子¹⁾、永井 沙和²⁾、安田 愛子¹⁾、川里 浩明¹⁾、
猪股 雅史¹⁾、野口 剛¹⁾、藤原 作平¹⁾、島田 達生¹⁾、北野 正剛¹⁾

大分大学¹⁾、福岡大学²⁾

皮膚の張りや弾力性は、真皮の弾性線維によるもの大きいと考えられている。前回、真皮の弾性線維を走査型電子顕微鏡下で三次元的に観察する方法と得られた結果を報告した。日光による弾性線維の変化が一般的に知られているが、今回、露光部とそうでない部分、いろいろな年齢で真皮の弾性線維の走行、構築などを走査型電子顕微鏡で調べた。高齢者の露光部である顔面と普段は日光に当たらない体幹皮膚とでは弾性線維の走行様式明らかな違いが認められた。しかし、体幹皮膚の弾性線維は年齢部位が異なっても走行や走行様式には明らかな違いは認められない印象をもった。今後はさらに詳細な検討を加える予定である。

組織化学 1 : 「免疫電顕、酵素組織化学」

精子核のDNAの免疫組織化学

西川 純雄、阿部 道生

鶴見大学 歯学部 生物学研究室

精巣には精細管が見られ、中にはセルトリ細胞や精子形成細胞が見られる。精子核中にはDNAが凝縮して存在している。減数分裂を終了した精子細胞が変態して精子になるとき、核もその塩基性タンパク質のヒストンから別な塩基性タンパク質であるプロタミンに置き換わることが知られている。本研究では post-embedding 法で精子核中のDNAを検出し、その標識密度から核の凝縮過程をとらえる試みを報告する。Wistar 系成熟ラット（体重 300-400 g）を 4%パラフォルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒドで灌流固定を行い、上顎と下顎を切りだし、5%EDTA により脱灰し、LR White 樹脂で包埋した。超薄切片をニッケルグリッドに回収し、抗 DNA 抗体 (clone, AC30-10) で 60 分、室温で反応させた。10 nm の金コロイド標識抗マウス IgM 抗体で室温、30 分反応させた。電子染色し JEM1200EXII で観察した。標識金粒子数を数え、核や染色体の面積を計測し、単位面積当たりの金粒子数を算出した。精子細胞の核の様子も丸いものから変態し、精子の細長い濃縮したものまで認められた。単位面積当たりの DNA に由来する金粒子数は凝縮中の電子密度の低い精子細胞核で約 60 個/ μm^2 、凝縮した電子密度の高い精子細胞核で約 150 個/ μm^2 であった。すなわち核の凝縮に伴い DNA が濃縮している過程をみていると考えられた。これらの結果は核タンパクのプロタミンへの置き換わりの寄与を疑わせる。さらなる研究が必要と思われる。

ラット咬筋内の血管評価の再検討 -免疫組織化学とTEMとの比較-

三輪 容子¹⁾、佐藤 巖¹⁾、春原 正隆¹⁾、高橋常男²⁾

日本歯科大学生命歯学部解剖¹⁾、神奈川歯科大学解剖²⁾

【目的】哺乳類の成長発育については口腔機能が吸綴から咀嚼へと離乳期に変化し、咬筋の機能も変化することが知られている。咬筋は表層部と深層部に区分され、発生初期では、表層部が発達するものの、離乳期後には深層部が発達する。しかしこの咬筋の機能変化にともなう血管分布およびリンパ管の分布の変化はほとんど知られていない。このため咬筋の成長発育にともなう血管分布・リンパ管の分布を血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血管内皮細胞マーカー (CD31) およびリンパ管内皮特異的分子 (LYVE-1) に対する免疫組織化学染色を行い観察した。また成長発育期の筋肉組織の電子顕微鏡像を観察し毛細血管の血管内皮細胞の構造変化を観察した。

【方法】Wister系雄性ラットを使い、生後3週齢、5週齢、6週齢および7週齢における咬筋を採取し、免疫組織化学染色、TEMによる観察を行った。

【結果】ラット咬筋においてVEGF、CD31およびLYVE-1の発現を表層部と深層部と比較したところ発現に差異が認められた。筋肉組織中の血管内皮細胞の構造は週齢による変化がみられ、5週齢には一部の血管内皮細胞に細胞間隙が存在していたが、6週齢では辺縁ヒダが発達していた。

【考察および結論】離乳期における咀嚼機能の変化は咬筋における毛細血管の構造や分布、リンパ管の分布にも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

インドサイ耳下腺の電顕通常切片での 内因性ペルオキシダーゼ活性検出の検討

盛口 敬一¹⁾、城ヶ原 貴通²⁾、織田 銑一²⁾
愛知学院大 歯 口腔解剖学¹⁾、岡山理科大 理 動物学科²⁾

唾液腺は分泌物により漿液腺と粘液腺に分類される。ラットの耳下腺の終末部分泌顆粒は均質な顆粒で漿液腺である。一方分泌物や形態から両者の中間的な位置にある漿粘液腺も存在する。ヒト耳下腺は漿液腺とされているが、電顕的観察から中心部にcore(芯)を有する二部構成の顆粒様式から、Rivaらは漿粘液腺であると報告している。今回我々は名古屋市立東山動植物園よりインドサイの耳下腺を得ることができた。通常電顕による観察の結果、ヒトと同じようにcoreを有する二部構成の顆粒が観察された。さらに、唾液腺の分泌顆粒を含む細胞小器官に認められる内因性のペルオキシダーゼ活性(PO)検出(H₂O₂を含むDAB反応液)を、電顕通常切片において試みた。その結果、分泌顆粒はDABによりやや濃く染まったが、二部構成は変わらなかった。これは本来Rivaらが行っている、GA固定後の標本でのPO検出によるヒト耳下腺の結果とも酷似していた。したがってインドサイの耳下腺は漿粘液腺である可能性が示唆された。

第 29 回学術講演会 実行委員会事務局

〒252-0374 神奈川県相模原市北里1-15-1
北里大学大学医学部バイオイメージング研究センター内
Tel 042-778-8798 (実行委員長 根本または庶務 織田)
電子メールアドレス 29gakujutu@emtech.jp
医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 29 回学術講演会事務局

第 29 回学術講演会 開催事務局 (会期中)

〒238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町82
神奈川歯科大学 人体構造学講座 肉眼解剖・臨床解剖学分野 内
Tel 0468-22-8845, Fax 0468-22-8729 会長 高橋 常男

学会事務局

〒112-0002 東京都文京区小石川 3-37-2
Tel. 03-3815-4584 Fax. 03-3815-4626 E-mail : office@emtech.jp
<http://emtech.jp/>

- MEMO -

Coffee brak

学会マーク四方山話し。学会のシンボルマークは次の意味を持っています。

Eは、左に90度左に回転すると透過電子顕微鏡の電子銃部、
Mは、クールビームフィラメント、中央の△は薄切用ナイフ、
中央のTは、Technology、下の握手は、Hand、手の“技”、握手が技術の伝承、
参加者の調和と協力を意味します。 考えてみると意味深い絵柄です。

実行委員会

30周年記念特別構成

会 長	高橋 常男 (神奈川県立大学人体構造学)
副 会 長	桑畑 進 (大阪大学大学院工学研究科応用化学)
実行委員長	根本 典子 (北里大学医学部バイオイメージング研究センター)
実行委員	織田恵理子 (北里大学医学部バイオイメージング研究センター) 庶務
	渡辺 清子 (神奈川県立大学染制御学講座微生物学) 会計責任者
	(以下、五十音順)
	跡部 好敏 (横浜市立大学医学部医学研究科神経解剖学)
	石山 宮子 (神奈川県総合リハビリテーションセンター)
	伊藤 康雅 (歯科 伊藤医院)
	伊東 良子 (東海大学教育・研究支援センター細胞組織科学部門)
	海野 和俊 (帝京大学溝口病院電子顕微鏡室)
	大橋 桂 (神奈川県立大学口腔治療学講座保存修復学)
	岡田 周策 (神奈川県立大学口腔治療学講座保存修復学)
	熊田 秀文 (神奈川県立大学感染制御学講座微生物学)
	佐々木千鶴子 (聖マリアンナ医科大学大学院電子顕微鏡室研究施設)
	中澤 英子 (株式会社 日立ハイテクノロジーズモノづくり統括本部)
	中塚 美智子 (大阪歯科大学口腔解剖学講座)
	西川 純雄 (鶴見大学 歯学部 生物学研究室)
	逸見 明博 (日本大学医学部病理学)

30周年記念委員

	和泉 伸一 (元 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)
	川里 浩明 (大分大学全学研究推進機構 実験実習機器部門)
	川村 進 (永久会員)
	古賀 博則 (石川県立大学生物資源環境学部生産科学科)
	広瀬 治子 (帝人(株)構造解析研究所)
	堀田 康明 (朝日大学口腔科学共同研究所)
	中村 澄夫 (神奈川県立大学名誉教授)
顧 問	宮澤 七郎 (名誉理事長)

当日役員	加藤 時雄 (北里大学医学部バイオイメージング研究センター)
	地家 豊治 (日本大学医学部電子顕微鏡室)

主 催：医学生物学電子顕微鏡技術学会

協 賛：日本組織細胞化学会

後 援：神奈川県歯科医師会・横須賀市・横須賀市教育委員会
口腔医科学会・横須賀市歯科医師会・神奈川県立大学同窓会

平成25, 26年度 本学会主催事業開催のご案内

主催：医学生物学電子顕微鏡技術学会

◇第26回電子顕微鏡技術研修会「夏の学校」開催のご案内 in 北九州

第26回電子顕微鏡技術研修会「夏の学校」は、北九州市にて開催致します。募集コースは、例年の基礎TEMコース、基礎SEMコース、応用TEMコースに加え、可能性を多く秘める応用SEMコースを設けました。これら、基礎技術および各分野での実践に対応する技術習得のための研修を2泊3日の期間を通じ、経験豊富な講師陣が柔軟に対応いたします。今回は郊外での合宿形式でなく会場は小倉駅近く、宿泊はビジネスホテルです。初心者の方々には電顕づくめの3日間をご提供し、試料作製から論文投稿までのポイントを可能な限りサポートしたいと考えております。

中級者の方からベテランの方々にもご満足頂ける企画も組み入れるよう検討致しております。

夏期休暇を利用し電顕技術を修得して頂ければと考えております。奮ってご参加ください。



開催日：平成25年8月22日（木）～24日（土）

会場：北九州国際会議場 〒802-0001 福岡県北九州市小倉北区浅野3丁目9-30

募集定員：60名

参加費：会員：45,000円、非会員：55,000円、学生：40,000円

参加費には期間中の宿泊費、懇親会費、その間の食事代、および保険代等を含みます。

宿泊および懇親会：ブルーウェーブイン小倉

教育講演：臨床細胞像を読む 北九州済生会病院 病理診断科 原武讓二先生

基礎教育講演：TEM 藤田 守先生（中村学園大学） SEM 中村桂一郎先生（久留米大学）

実行委員会事務局：実行委員長 横山 満

〒807-8555 北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1 E-mail: 26natsu@emtech.jp

TEL. 093-691-7411

詳細は、<http://www.jupiter-jp.net/26natsu/index.html> をご覧下さい。

◇第14回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム開催案内

平成25年12月～2月の間に、シンポジウムを開催予定です。詳細は、学会ホームページに更新しますので是非ご出席下さい。

◇第30回学術講演会および総会のご案内

平成26年度は、大阪大学での実施を予定しております。全国各地からの多くのご参加、演題のご応募をお待ち致しております。 会長：桑畑 進（大阪大学大学院工学研究科）

詳細は、逐次学会ホームページ<http://emtech.jp/>上で更新致しますのでご覧下さい。

◇その他のお知らせ

技術普及委員会より：本学会では電顕相談「電顕110」に対応しております。学会HP経由でご相談下さい。また、毎年「研究プロジェクト」を募集しております。HPをご覧の上、ご応募下さい。

広報委員会より：本学会は、会員通信を年数回発行しております。皆様の原稿をお寄せ下さい。

編集委員会より：日頃の成果を是非とも本学会誌へ投稿下さい。