

医学生物学電子顕微鏡技術学会 第30回学術講演会および総会

医学生物学と工学の連携

2014年5月23日(金)～25日(日)
大阪大学吹田キャンパス(銀杏会館)



医学生物学電子顕微鏡技術学会

Japanese Society of Electron Microscopy Technology for Medicine and Biology

<http://emtech.jp/>

目 次

I. ご挨拶	1
II. 講演会および総会日程表	2
III. 会場のご案内	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	6
VI. 学術講演会プログラム	7
VII. 講演要旨	
特別講演 I	17
特別講演 II	20
モンゴル招待者特別講演	22
ワークショップ I	23
ワークショップ II	29
ワークショップ III	34
一般演題（口演発表）	40
一般演題（ポスター発表）	48
実行委員会事務局案内	57
実行委員一覧	57
平成26, 27年度の本学会主催事業のご案内	58
支援企業一覧	59

I. 第30回学術講演会開催にあたり

本学会は昨年に30周年を迎え、本年は第30回学術講演会を開催する運びとなりました。今回は、工学部に所属する会員が初めて会長を務めることとなり、「医学生物学と工学の連携」をテーマといたしました。“医工連携”という言葉が言われるようになってから久しいですが、医学生物学における顕微鏡というツールの利用とその進化は、人類にとって最も古い“医工連携”であったと言えるのではないのでしょうか。そもそも、細胞の発見は光学顕微鏡によってもたらされたものであり、生命の真理をもっと詳細に直視したいという願望から光学顕微鏡の改良はその光学的限界まで重ねられました。しかし、人類はそれで満足することはなく、その限界を突破するために工学的技術によって光学顕微鏡から電子顕微鏡へと進化させました。事実、電子顕微鏡の父である Ernst Ruska 博士（ベルリン工科大学）は物理学者であります。観察対象として生物組織を選んでおります。そして、国内における電子顕微鏡の第1号を開発した 菅田栄治博士（大阪帝国大学工学部）、国産化に貢献した瀬藤象二博士（東京帝国大学工学部）らも電気工学研究者であり、これらの先駆的工学研究者のお陰により、電子顕微鏡が誰でも使えるツールとなりました。

これまでの歴史において、電子顕微鏡が医学生物学領域の研究分野に果たした役割は極めて大きく、組織細胞の化学研究の発展は電子顕微鏡の発展とともに飛躍的に進化し、今日の分子生物学の基礎を築き、ゲノム生物学の時代を到来させました。そして、自然科学研究はプロテオーム解析へ移行し、一見すると電子顕微鏡解析法が入る余地がないのではとも思えます。しかしながら、自然科学研究の流れがどのように変化しようとも、その高い解像力に優れた電顕解析法の重要性は不変です。

医工連携、農医連携は日常的となった昨今、多くの国公立大学が複合医工学に重点を置き、医学と工学を融合することにより、生体環境学や疾病分子工学を創生し、そこで研究と人材育成が推進されております。このような着眼点のもと、今回の講演会では医学、生物学、工学が関わった超微形態研究に注目してみました。特別講演では、「X線顕微鏡」ならびに「オートファジー」に関する講演をお願いし、ワークショップでは、「イオン液体観察法の新展開」、「植物研究における電子顕微鏡の関わり」、「臨床における電子顕微鏡観察の重要性」というテーマを設定して、幅広い分野に所属する方々に有益な講演会となるよう企画しました。また、一般演題においても、十分な数の講演を行ってもらえるように日程を組みました。本学術講演会が皆様の更なる研究の進展と電子顕微鏡技術の向上の一助となることを実行委員会一同、節に願っております。

尚、モンゴルとの医学生物学学術交流ワークショップの一環として、本学術講演会に数名のモンゴルの研究者を招待し、「モンゴル招待者特別講演」を行って頂くことになりました事、書き添えさせていただきます。

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第30回学術講演会実行委員会
会長、委員一同

II. 第30回学術講演会および総会 日程表

テーマ：医学生物学と工学の連携

会 期：2014年5月23日(金)～25日(日)

会 場：大阪大学吹田キャンパス・医学部学友会館「银杏会館」

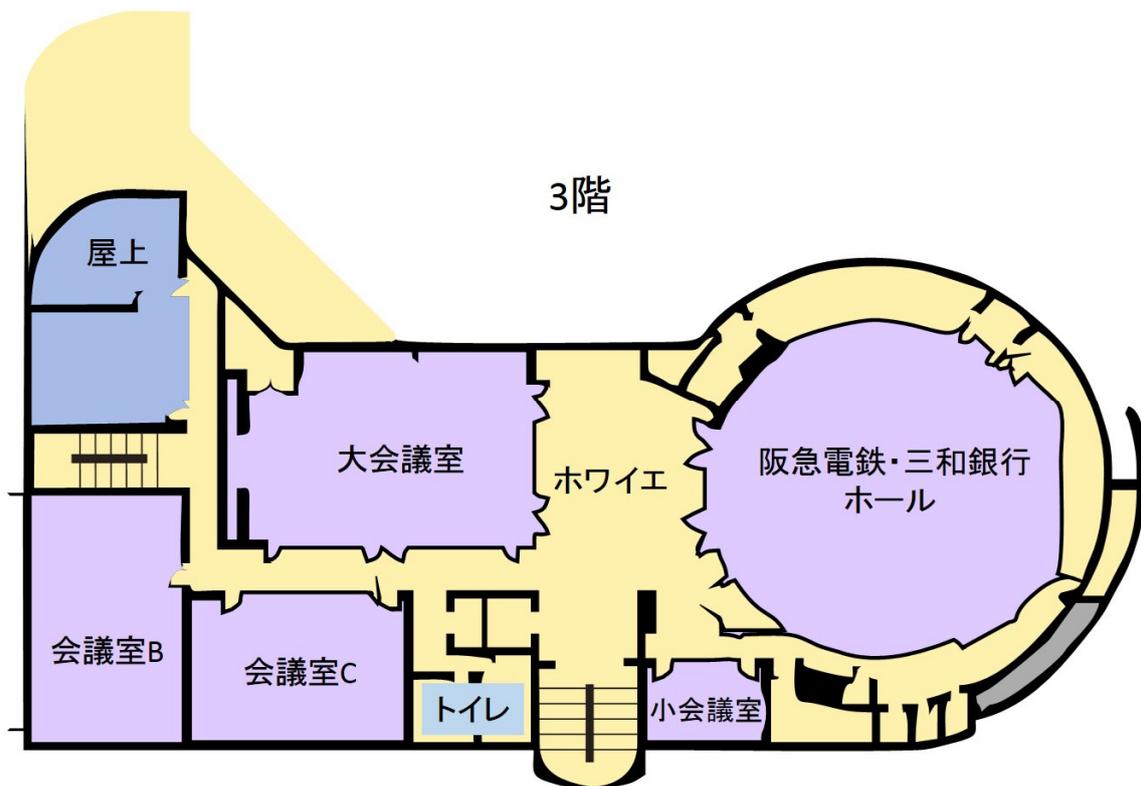
	1日目 5月23日(金)	2日目 5月24日(土)	3日目 5月25日(日)
8:00			
8:10			
8:20		8:20	
8:30		受付開始	
8:40			
8:50		8:50 開会式	8:50 一般演題
9:00		9:00 一般演題 O-01～O-07	9:00 学術ポスター発表会場討論
9:10			
9:20			9:30 一般演題 O-14～O-16
9:30			
9:40			
9:50			
10:00			10:00 学会賞受賞講演
10:10		10:10 休憩	
10:20		10:20	
10:30		ワークショップI イオン液体観察法の新展開	10:30 モンゴル招待者特別講演
10:40			10:50 休憩
10:50			11:00 特別講演II オートファジー研究が切り拓く電 顕ワールド
11:00			
11:10			
11:20			
11:30			
11:40			
11:50	11:50	11:50 休憩	
12:00		12:00	12:00 休憩
12:10		社員総会(評議員会)	
12:20			12:20
12:30	常務理事会		ワークショップIII 臨床における電子顕微鏡観 察の重要性
12:40			
12:50			
13:00		13:00 学術ポスター発表 一分間スピーチ	
13:10			
13:20	13:20 休憩	13:20	13:20
13:30	13:30		
13:40	各種委員会 編集委員会	13:40 バイオ電顕 オープンスク ール	13:40 一般演題 学術ポスター発 表会場討論
13:50			
14:00	14:00		13:50 閉会式
14:10	各種委員会 技術普及委員会		
14:20			
14:30	14:30		
14:40	各種委員会 学術委員会		
14:50		14:50	
15:00	15:00		
15:10	各種委員会		
15:20	財務委員会	15:00 各種委員会 広報委員会	
15:30	15:30		
15:40	各種委員会		
15:50	法務委員会		
16:00	16:00		
16:10		16:00 一般演題 O-08～O-13	
16:20			
16:30			
16:40			
16:50	理事会	16:50	
17:00		ワークショップII 植物研究における電子顕微 鏡の関わり	
17:10			
17:20			
17:30			
17:40			
17:50			
18:00		18:00	
18:10		学会賞授与式・会員報告	
18:20		18:20	
18:30		記念撮影	
18:40		18:40	
		懇親会 (会場:大阪大学生協 カフェテリア「匠」)	

Ⅲ. 会場のご案内

1. 講演会場

- 受付：銀杏会館 3階 ホワイエ
- 総会会場：銀杏会館 3階 阪急電鉄・三和銀行ホール
- 講演会場：銀杏会館 3階 阪急電鉄・三和銀行ホール
- ポスター会場：大会議室
- 写真コンクール会場（写真コンクール投票箱も設置してあります）：会議室C
- 商業展示：大会議室および会議室C
- 喫茶コーナー（休憩エリア）：ホワイエ
- バイオ電頭オープンスクール：会議室B
- 懇親会会場：カフェテリア「匠」

銀杏会館 3階



2. 控え室

- 実行委員会控え室：小会議室

3. 会議会場

- 常務理事会：会議室B
- 各種委員会：会議室B、小会議室
- 理事会：会議室B
- 社員総会（評議員会）：阪急電鉄・三和銀行ホール

※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。

昼食場所のご案内



- ① 阪大食堂くじらや 最寄・便利、生協もあります。カフェテリア形式・定食380円～ 徒歩3分
- ② 医学部附属病院内 食堂、コンビニなどがあります。スカイレストランは土曜休業。 徒歩5分
- ③ 工学部生協食堂 一番広い・カフェテリア形式・定食380円～ 徒歩10分
- ④ 食堂さわらび 定食550円～ 徒歩10分

IV. 参加者の皆様へのご案内

1. 懇親会 当日参加受付

懇親会の当日申し込みも可能です。登録受付にて取り扱いたします。

2. 商業展示と製品紹介

商業展示スペースにおいて、各企業の製品の展示やデモがございます。是非ともご見学下さい。

3. 写真コンクール

下記の5課題にご応募いただいております。

写真コンクール 課題

- 1 自分の興味の持った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 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）

1) 応募写真の貼付

写真コンクール掲示場所（会議室C）に、5月24日（土）13：00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

優秀と思われる作品2点以内を選び、受付時にお渡しした投票用紙に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5月24日（土）18：00までにご投票ください。

3) 表彰

5月24日（土）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。

4. バイオ電顕オープンスクール

バイオや医学を学んでいる方、あるいは電子顕微鏡に興味はあるが敬遠している方を対象としたオープンスクールを開講します。一流の講師が短時間で凝縮したエッセンスを伝授します。初心者大歓迎ですので、奮ってご参加ください。空席があれば、当日の飛び込み参加も可能です。

5. 記念撮影

5月24日（土）18：20 参加者全員の記念撮影を阪急電鉄・三和銀行ホールにて行います。

6. 懇親会

5月24日（土）18：40～20：00 カフェテリア「匠」で行います（当日申込可）。会場まで引率いたします。

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

- 発表時間は、10分（口演7分、質疑応答3分）です。
- 発表は発表者が持参したPCを使用して投影します。スライドはMicrosoft Office PowerPointなどで作成し、動作確認したものをご使用下さい。発表にはMacintoshも使用できますが、接続アダプターはご持参ください
- 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。
- 学会会誌（後抄録）掲載用の原稿は参加登録受付へご提出下さい。

2. 座長の皆様へ

- 次座長は、セッションの開始前に「次座長席」ご着席下さい。
- 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. 一般演題 ポスター発表

5月24日（土）13：00までに貼付パネルのポスター発表番号に従い、各自、指定の場所にポスターを貼付けて下さい。貼付に必要な画鋲等は会場に準備してあります。

- パネルは、横90cm×縦210cm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。
- 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（発表者全員で約20分間）があります（場所：阪急電鉄・三和銀行ホール）。スピーチ後は、ポスター発表会場へ速やかに移動し、質疑応答に対応して下さい。
- 学会誌（後抄録）掲載用の原稿は参加登録受付へご提出下さい。
- ポスターの撤去は、5月25日（日）9時30分以降です。その前に撤去を希望の場合は、受付にお申し出下さい。また、何らかの理由にて撤去出来ない場合についても、受付へご連絡下さい。実行委員会にて取り外させていただきます。

4. 写真コンクール応募の皆様へ

「参加登録受付」へお越しください。写真の掲示場所および掲示番号をお知らせいたします。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 5月24日(土) 14:50~15:50

座長 津田 哲哉 (大阪大学 大学院工学研究科応用化学専攻)

「コヒーレント X 線回折イメージングが拓く構造可視化の新しい世界」

高橋 幸生

(大阪大学 大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻 准教授)

特別講演Ⅱ 5月25日(日) 11:00~12:00

座長 桑畑 進 (大阪大学 大学院工学研究科応用化学専攻)

「オートファジー研究が切り拓く電顕ワールド」

和栗 聡

(福島県立医科大学 医学部解剖・組織学講座 教授)

モンゴル招待者特別講演

5月25日(日) 10:30~10:50

座長: 医学生物学電子顕微鏡技術学会 理事長

高橋 常男 (神奈川歯科大学 大学院3次元画像解剖学講座)

「ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF EPIDERMAL MELANOCYTES ON THE MONGOLIAN BLUE SPOTIC REGION IN INFANTS」

Dr. Battuvshin Lkhagvasuren

(Lecturer, Department of Mental Health, Health Sciences University of Mongolia)

ワークショップⅠ 「イオン液体観察法の新展開」

5月24日(土) 10:20~11:50

座長 佐々木 博之 (帝京平成大学 地域医療学部理学療法学科)

森藤 哲史 (神戸大学 医学部附属病院)

WSI-1 イオン液体による木材組織の SEM 観察
～ハリのある細胞の可視化を目指して～

阪上 宏樹

九州大学 大学院農学研究院サステイナブル資源科学講座

WSI-2 イオン液体を用いたハイドロキシアパタイト湿潤成形体の電子顕微鏡観察
高橋 知里

愛知学院大学 薬学部製剤学講座

WSI-3 RTIL-SEM による内耳形態観察

勝野 達也

京都大学 大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

ワークショップ II 「植物研究における電子顕微鏡の関わり」

5月24日(土) 16:50~18:00

座長 和泉 伸一 (名桜大学 人間健康学部)
中村 澄夫 (神奈川歯科大学 生物学教室)

WSII-1 ライブセルイメージングとSTEM トモグラフィーを用いた
植物細胞解析の最前線

岩野 恵
大阪大学 産業科学研究所

WSII-2 高圧凍結技法を用いた細胞内小胞輸送経路の解明

豊岡 公德
理化学研究所 環境資源科学研究センター

ワークショップ III 「臨床における電子顕微鏡観察の重要性」

5月25日(日) 12:20~13:50

座長 永井 薫子 (大分大学 医学部消化器小児外科)
野口 教彦 (大阪警察病院 病理技術科)

WSIII-1 腎生検病理診断における電顕観察の重要性

原 重雄
神戸大学 医学部附属病院病理診断科

WSIII-2 関節リウマチ (RA) にみられる Nursing 現象の超微形態学的特徴と
その生物学的意義

澤井 高志
東北大学 大学院医学系研究科病理形態学

WSIII-3 急速凍結法を用いた臨床電顕応用への試み

逸見 明博
日本大学 医学部病態病理学系人体病理学分野

学会賞受賞講演

5月25日(日) 10:00~10:30

座長: 学術委員会委員長
逸見 明博 (日本大学 医学部病態病理学系人体病理学分野)

一般演題 学術口演発表

5月24日(土) 9:00~9:30

座長 海野 和俊(帝京大学 医学部附属溝口病院電子顕微鏡室)
井淵 康史(前 大日本住友製薬株式会社)

O-01

フェレット糸状乳頭の上皮乳頭、結合組織乳頭および微細血管構築の比較

○竹村 明道、方 剛、諏訪 文彦
大阪歯科大学 解剖学講座

O-02

イオン液体処理は固定された培養細胞内部に影響するか?

○石垣 靖人¹⁾、中村 有香¹⁾、島崎 猛夫²⁾、松原 考宜³⁾、桑畑 進⁴⁾
金沢医科大学 生命科学研究領域¹⁾、金沢医科大学 先進医療研究領域²⁾
横河電機(株) ライフサイエンスセンター³⁾、大阪大学 大学院工学研究科⁴⁾

O-03

柔組織のSEM観察のためのイオン液体処理法の検討

○振木 昌成¹⁾、坂上 万里¹⁾、許斐 麻美¹⁾、塩野 正道¹⁾、中澤 英子¹⁾、
河合 功治²⁾、桑畑 進³⁾
株式会社日立ハイテクノロジーズ¹⁾、ミヨシ油脂株式会社²⁾、
大阪大学 大学院工学研究科³⁾

5月24日(土) 9:30~10:10

座長 太田 勲(浜松医科大学 実験実習機器センター)
堀内 喜高(近畿大学 ライフサイエンス研究所)

O-04

大気圧SEMによる生物試料の観察

○坂上 万里¹⁾、大南 祐介²⁾、河西 晋佐²⁾、伊東 祐博²⁾、中澤 英子¹⁾
(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⁾

O-05

癒着防止ゲルのTEMによる可視化方法の検討

○広瀬 治子¹⁾、荻山 明日香¹⁾、伊東 雅弥²⁾
帝人(株) 構造解析研究センター¹⁾、帝人(株) ヘルスケア新事業推進班²⁾

O-06

FE-SEMのリターディング法による生物切片試料の高解像度反射電子観察

○檀 紫¹⁾、中澤 英子¹⁾、佐藤 博文²⁾、石田 欣二³⁾、花坂 智人³⁾、遠山 稿二郎³⁾
(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⁾、岩手医科大学 バイオイメーキングセンター³⁾

O-07

グリッド剥離／Cryo-SEM 法によるヒト皮膚上塗布膜の微細構造観察

○小栗 雅史、吉田 修

花王株式会社 解析科学研究所

5月24日(土) 15:50～16:20

座長 川里 浩明 (大分大学 全学研究推進機構電子顕微鏡室)

安藤 正史 (近畿大学 農学部水産学科)

O-08

電顕ブロックトリミングへの超音波カッターの応用

○尾関 教生

愛知医科大学 教学監

O-09

走査型電子顕微鏡で観察できるアクリル樹脂脈管注入鑄型法の改良

○上村 守、諏訪 文彦、竹村 明道、戸田 伊紀

大阪歯科大学 解剖学講座

O-10

スギ花粉の電子顕微鏡試料作製の検討 -第二報-

○根本 典子、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画像部門

5月24日(土) 16:20～16:50

座長 高橋 常男 (神奈川歯科大学 大学院3次元画像解剖学講座)

三浦 治郎 (大阪大学 歯学部附属病院口腔総合診療部)

O-11

象牙質微小亀裂進展様相の形態学的評価

○久保 美寿穂¹⁾、三浦 治郎¹⁾、清水 真人¹⁾、松田 祐輔¹⁾、竹重 文雄¹⁾、
坂田 孝夫²⁾、西 竜治²⁾、保田 英洋²⁾

大阪大学 歯学部附属病院 口腔総合診療部¹⁾、大阪大学 超高压電子顕微鏡センター²⁾

O-12

歯肉増殖症における毛細血管後細静脈の形態変化について

○盛口 敬一¹⁾、福田 光男²⁾、吉成 伸夫³⁾、前田 初彦⁴⁾、野口 俊英²⁾、
三谷 章雄²⁾、大野 紀和¹⁾

愛知学院大 歯 口腔解剖学講座¹⁾、愛知学院大 歯 歯周病学講座²⁾、

松本歯科大学 歯科保存学第一講座³⁾、愛知学院大 歯 口腔病理学講座⁴⁾

O-13

ヒト成人舌骨体・大角連結部の組織学的検討（第1報）

○一條 幹史¹⁾、川股 亮太²⁾、林 省吾³⁾、伊藤 正裕⁴⁾、尾関 教生⁴⁾、高橋 常男¹⁾

神奈川歯科大学 大学院3次元画像解剖学講座¹⁾、放射線応用科学講座²⁾、東京医科大学 人体構造学講座³⁾、愛知医科大学 教学監⁴⁾

5月25日（日）9：30～10：00

座長 山本 敏男（岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科口腔形態学分野）
及川 理（名古屋第二赤十字病院）

O-14

SBF-SEMを用いたマラリア感染赤血球の三次元構造解析

○坂口 美亜子¹⁾、宮崎 直幸²⁾、藤岡 壽³⁾、金子 修¹⁾、村田 和義²⁾
長崎大学¹⁾、生理学研究所²⁾、ケースウェスタンリザーブ大学³⁾

O-15

黄色ブドウ球菌 α ヘモリジンがタイトジャンクションの構造と機能に与える影響

○関 啓子¹⁾、佐々木 博之²⁾

東京慈恵会医科大学 基盤研究施設¹⁾、帝京平成大学 大学院健康科学研究科²⁾

O-16

Tannerella forsythia に対するヒト多形核白血球の食作用とフリーラジカル生成局在に関する光顕、電顕検出法について

○盛口 敬一¹⁾、長谷川 義明²⁾、樋口 直也³⁾、村上 幸孝⁴⁾、吉村 文信²⁾、中村 洋³⁾、中田 和彦³⁾、大野 紀和¹⁾

愛知学院大学 歯学部 口腔解剖学講座¹⁾、愛知学院大学 歯学部 微生物学講座²⁾、愛知学院大学 歯学部 口腔治療学講座³⁾、朝日大学 歯学部 口腔微生物分野⁴⁾

一般演題 学術ポスター発表

5月24日(土) 13:00~14:50および5月25日(日) 8:50~9:30

一分間スピーチ

5月24日(土) 13:00~13:20

座長 畠中 芳郎(大阪市立工業研究所 食品工学研究室)

川上 洋司(大阪市立大学 大学院工学研究科)

ポスター会場での質疑応答 5月24日(土) 13:20~14:50
5月25日(日) 8:50~9:30

PS-01

同一生物切片(LR White 樹脂)による機能と超微形態解析を目指して

○松浦 絵里、花坂 智人、小笠原 勝利、石田 欣二

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

PS-02

光-電子相関顕微鏡法ワークフローの開発

○細木 直樹、西岡 秀夫

日本電子株式会社 EM事業ユニット EMアプリケーション部

PS-03

反射電子像を用いたモンタージュ処理の検討

○小笠原 勝利、花坂 智人、松浦 絵里、石田 欣二

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

PS-04

イオン液体を用いた TEM 試料支持法の検討

○仲野 靖孝¹⁾、許斐 麻美¹⁾、河合 功治²⁾、中澤 英子¹⁾

株式会社日立ハイテクノロジーズ¹⁾、ミヨシ油脂株式会社²⁾

PS-05

生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎の観察

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

PS-06

走査電子顕微鏡による反射電子像観察 一複数試料観察の効率化を目指して一

○花坂 智人、松浦 絵里、小笠原 勝利、石田 欣二

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

PS-07

プランクトンの電子顕微鏡観察のためのイオン液体を用いた前処理方法

○宮本 賢治、山下 泰史

鳴門教育大学 大学院学校教育研究科

PS-08

I、II、III型コラーゲンの三次元構築

○島田 達生^{1,2)}、張 娟娟¹⁾、永井 薫子³⁾、安田 愛子⁴⁾、川里 浩明⁴⁾、
吉岡 秀克¹⁾

大分大学 医学部マトリックス医学¹⁾、大分医学技術専門学校²⁾、

大分大学 医学部外科³⁾、大分大学 総合科学支援センター⁴⁾

PS-09

弾性線維の不思議-その2

○永井 薫子¹⁾、永井 沙和²⁾、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⁾

PS-10

FIBを用いた動物の毛の断面観察

○島中 芳郎、山内 朝夫、渡辺 嘉

大阪市立工業研究所

PS-11

間葉系幹細胞の3次元培養により形成された硬組織の微細観察

○中塚 美智子、隈部 俊二、乾千 珠子、上田 甲寅、森下 愛子、岩井 康智

大阪歯科大学 口腔解剖学講座

PS-12

太陽電池内蔵電動歯ブラシの酸化チタン光触媒作用による

バイオフィルム除去効果

○佐藤 武則、渡辺 清子、浜田 信城

神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

PS-13

イオン液体によるカラーコンタクトレンズのSEM観察

—高倍率観察を目的とした撮影条件の検討—

○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⁾

PS-14

76カミソリの使用経験と評価について

○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

PS-15

***Porphyromonas gulae* 線毛による破骨細胞分化誘導と
サイトカイン産生について**

○佐々木 悠、渡辺 清子、浜田 信城

神奈川県立歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

PS-16

***Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株の線毛精製とその性状**

○古谷田 泰徳、渡辺 清子、浜田 信城

神奈川県立歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

PS-17

齲蝕罹患象牙質における基質蛋白の多面的評価

○松田 祐輔¹⁾、三浦 治郎¹⁾、清水 真人¹⁾、久保 美寿穂¹⁾、竹重 文雄¹⁾、
坂田 孝夫²⁾、西 竜治²⁾、保田 英洋²⁾

大阪大学 歯学部附属病院 口腔総合診療部¹⁾

大阪大学 超高压電子顕微鏡センター²⁾

PS-18

ヒト皮膚上塗布膜微細構造観察のための角質層と塗布膜の同時採取法開発

○吉田 修、小栗 雅史

花王株式会社 解析科学研究所

VII. 講演要旨

特別講演 I

コヒーレント X 線回折イメージングが拓く構造可視化の新しい世界

高橋 幸生^{1),2)}

大阪大学大学院工学研究科¹⁾, 理化学研究所放射光科学総合研究センター²⁾

1. はじめに

1895年にレントゲンの発見した X 線は、高い透過力と短波長性を有する電磁波であり、構造可視化に広く使われている。例えば、X 線写真や X 線 CT は、厚い物体の内部を透視する技術として、病院での臨床診断や空港での手荷物検査など、身近なところで使われている。また、ブラッグの法則に基づく X 線回折を利用した結晶構造解析法は、原子配列を決定する強力なツールとして確立され、物質科学や構造生物学において重要な役割を果たしている。このように、X 線は物質の構造を調べるための強力なプローブ光であるが、必ずしも高空間分解能での構造可視化において万能ではない。X 線結晶構造解析法では、原子分解能で構造を決定できるが、試料は良質な結晶に限られる。また、X 線領域は物質の屈折率が 1 に極めて近く、可視域で使用されているような開口数の大きなレンズの作製が困難である。現在、放射光施設では、回折型の光学素子を駆使して~15nm の空間分解能を有する X 線顕微鏡が実現しているが、今後、飛躍的な空間分解能の向上は期待できない。

2. コヒーレント X 線回折イメージング

近年、レンズを必要としない斬新な X 線イメージング手法であるコヒーレント X 線回折イメージングが、高空間分解能を達成できる方法として注目を集めている。コヒーレント X 線回折イメージングは、1952年に Sayre[1]が位相問題を解決する方法論の一つとしてオーバーサンプリング位相回復法の可能性を説いたことに始まる。1999年に Miao ら[2]が軟 X 線を用いたコヒーレント回折イメージングの実証実験に成功し、これが契機となって多くの放射光施設で研究が行われるようになった。コヒーレント X 線回折イメージングでは、位相の揃った X 線(コヒーレント X 線)による試料の回折強度パターンに位相回復計算を実行し、試料の電子密度分布を再構成する。コヒーレント X 線回折イメージングは、これまでレンズの性能によって制限されてきた空間分解能や被写界深度の問題も解消できる。我々は、2005年頃より西播磨の大型放射光施設 SPring-8 においてコヒーレント X 線回折イメージングの研究を開始した。

3. 高分解能コヒーレント X 線回折イメージング

コヒーレント X 線回折イメージングの空間分解能を向上させるためには、高波数領域における回折強度を高い信号対雑音比で測定することが不可欠である。従って、コヒーレント回折実験において高強度のコヒーレント X 線を試料に照射することが求められる。我々は、高精度に加工された全反射集光鏡を駆使することで、試料に照射するコヒーレント X 線のフラックス密度を 100 倍程度増加させることに成功した[3]。そして、1 辺の長さ約 100nm の銀ナノキューブ粒子の測定を行ったところ、世界最高の 2nm の分解能を達成した[4]。また、本手法を金/銀ナノボックスの観察に応用し、10nm より優れた空間分解能で三次元電子密度分布を可視化することに成功した[5]。

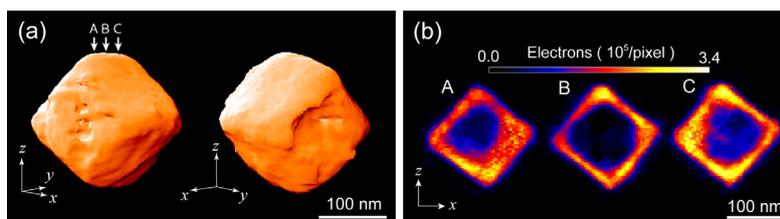


図 1 高分解能コヒーレント X 線回折イメージングにより可視化した金/銀ナノボックス粒子の電子密度分布。(a)表面像、(b)断面像。

4. 高分解能走査型コヒーレント X 線回折イメージング

X 線を集光することにより、X 線のフラックス密度を増加させることはできるが、X 線の照射領域は小さくなり観察対象となる試料のサイズは制限される。この問題を解決するのが、走査型コヒーレント X 線回折イメージング(通称: X 線タイコグラフィー)である。X 線タイコグラフィーでは X 線照射領域の一部が重なり合うように試料をステップ走査させ、試料各点からのコヒーレント回折強度パターンを取得し、像再生を行う。X 線タイコグラフィーでは、試料は孤立物体に限定されないが、X 線照射位置の正確性が空間分解能を大きく左右するため、装置系のドリフトを抑えることが極めて重要である。我々は、実験ハッチ内を恒温化することに加えて、X 線照射位置を修正する方法を開発し、視野 $\sim 5\mu\text{m}$ 、空間分解能 $\sim 10\text{nm}$ で観察可能な X 線タイコグラフィーを開発した[6]。また、空間フィルターを備えた集光光学系を開発し、 $\sim \lambda/320$ の位相感度を達成した[7]。さらに、この高分解能・高感度 X 線タイコグラフィーで金/銀ナノボックス粒子の観察に応用し、粒子の電子密度マッピングに加え X 線異常散乱現象を利用した金元素のマッピングにも成功した[8]。

5. シングルショットコヒーレント X 線回折イメージング

2011 年 3 月、SPRING-8 キャンパスに X 線自由電子レーザー施設 SACLA が完成し、同年 6 月に X 線レーザーの発振が観測された。そして、2012 年 3 月より SACLA で共同利用研究が開始された。SACLA では、空間的に完全にコヒーレントな X 線が得られる。また、そのピーク輝度は SPRING-8 の 10 億倍と極めて高く、パルス幅は 30 フェムト秒以下である。この超短パルス性能を利用すると、試料が壊れる前にコヒーレント X 線回折強度測定を行うことが原理的に可能となる。コヒーレント X 線回折イメージングの高分解能化を進めていくと、試料の放射線損傷が分解能を制限する主要因になることから、SACLA において、究極的な分解能を有するコヒーレント X 線回折イメージングが実現すると期待される。また、SACLA では、1~30Hz の繰り返し周波数で X 線レーザーパルスが発振され、SPRING-8 に比べて高いスループットで回折パターンを収集できる。近年、我々は、SACLA において 1000 枚を超える銀ナノキューブおよび金/銀ナノボックス粒子のコヒーレント X 線回折強度パターンを高い効率で収集し、粒形分布とナノ組織を複合的に分析することに成功した[9]。

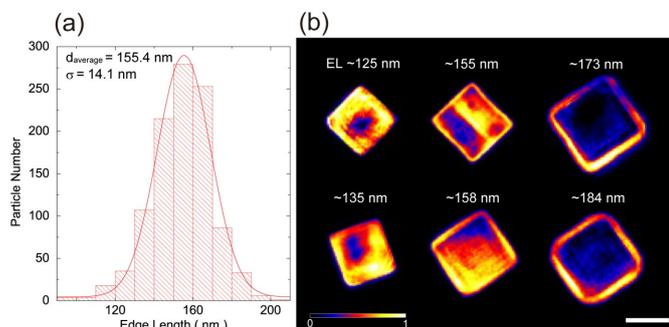


図 2 金/銀ナノボックス粒子の粒形分布と電子密度投影像。

6. おわりに

近い将来、SPRING-8 サイトでは放射光と X 線自由電子レーザーを相互利用することが可能であり、放射光を用いて広い領域を観察し、X 線自由電子レーザーで局所領域のダイナミクスを捉えるマルチスケール時空間イメージングが実現する。これを触媒材料やエネルギー変換素子等の機能性材料や細胞などの生体試料の観察に応用することで、物質・生命が創発する機能の発現機構の理解に繋がることが期待される。

本研究は、科学研究費補助金若手研究 A および X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題の事業の一環として実施された。

参考文献

- 1) D. Sayre, *Acta Crystallogr.*, **5**, 843 (1952).
- 2) J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz, D. Sayre, *Nature* **400**, 342 (1999).
- 3) Y. Takahashi, Y. Nishino, R. Tsutsumi, H. Kubo, H. Furukawa, H. Mimura, S. Matsuyama, N. Zettsu, E. Matsubara, T. Ishikawa, K. Yamauchi, *Physical Review B* **80**, 054103 (2009).
- 4) Y. Takahashi, Y. Nishino, R. Tsutsumi, N. Zettsu, E. Matsubara, K. Yamauchi, T. Ishikawa, *Physical Review B* **82**, 214102 (2010).
- 5) Y. Takahashi, N. Zettsu, Y. Nishino, R. Tsutsumi, E. Matsubara, T. Ishikawa, K. Yamauchi, *Nano Letters* **10**, 1922-1926 (2010).
- 6) Y. Takahashi, A. Suzuki, N. Zettsu, Y. Kohmura, Y. Senba, H. Ohashi, K. Yamauchi, T. Ishikawa, *Physical Review B* **83**, 214109 (2010).
- 7) Y. Takahashi, A. Suzuki, S. Furutaku, K. Yamauchi, Y. Kohmura, T. Ishikawa, *Applied Physics Letters* **102**, 094102 (2013).
- 8) Y. Takahashi, A. Suzuki, N. Zettsu, Y. Kohmura, K. Yamauchi, T. Ishikawa, *Applied Physics Letters* **99**, 131905 (2011).
- 9) Y. Takahashi, A. Suzuki, N. Zettsu, T. Oroguchi, Y. Takayama, Y. Sekiguchi, A. Kobayashi, M. Yamamoto, M. Nakasako, *Nano Letters* **13**, 6028-6032 (2013).

特別講演 II

オートファジー研究が切り拓く電顕ワールド

和栗 聡

福島県立医科大学 医学部 解剖・組織学講座

オートファジー-リソソーム分解系は、ユビキチン-プロテアソーム分解系と並ぶ細胞内の大規模分解系として知られ、細胞内タンパク質やオルガネラの恒常的なターンオーバー、あるいは飢餓や各種ストレス下における細胞対応機構として極めて重要な役割を有する。最近のオートファジー研究の広がりには目を見張るものがあるが、その理由として、30以上の Atg 関連遺伝子群 (Atg; autophagy-related genes) とその相互作用分子が発見されたこと、そして神経変性疾患や癌などに代表される様々な病態における重要性および他の細胞内シグナル伝達系とのクロストークが明らかになってきたことが挙げられる。10年程前までは、飢餓時のアミノ酸供給を目的とした現象で選択性のない分解系、と説明されてきたが、最近の研究ではマイトファジー (ミトコンドリアの分解) やアグレファジー (凝集体の分解) に代表されるように、選択的オートファジーの存在とその重要性が指摘されている。

オートファジー現象は極めて動的な膜動態を伴う。まず隔離膜が生成、伸張し、これが閉じてオートファゴソームが形成される。その後リソソームが融合して分解酵素が供給されて内容物の分解が進む。オートファゴソーム自体は直径 0.5-1 ミクロン程度の大きさであり、その過程で生じる詳細な形態変化を捉えるには電子顕微鏡解析が欠かせない。しかし隔離膜の形態保存は通常の固定法では困難であることも知られており、そのため、例えば還元オスミウム液による後固定が良く使われている。また、オートファジー研究分野の未解決課題として、隔離膜の由来とその生成機構がある。最近の研究によれば、小胞体やミトコンドリアの関与が報告されており、一方で光学顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより隔離膜の前駆体構造としてオメガソームが同定された。

本講演では、まずオートファジー研究における形態学的アプローチについて、特に各種関連オルガネラを電子顕微鏡観察する上での留意点や固定処理法などについて概説する。次に、隔離膜生成機構の研究に有用な固定処理法として私達が最近開発した方法、およびその開発過程で見出した隔離膜に付随する極細管クラスターについての研究を紹介したい。

【参考文献】

- Waguri S. and Komatsu M., *Methods Enzymol.*, **453**, 181-196 (2009)
- Tanida I. and Waguri S.: *Methods Mol. Biol.*, **648**, 193-214 (2010)
- 谷田以誠, 上野隆, 和栗聡, *実験医学*, **29**, 2054-2062 (2011)
- Uemura, T, et al., *Mol. Cell Biol.*, **34**, 1695-1706 (2014)

**ELECTRON MICROSCOPE STUDIES OF EPIDERMAL MELANOCYTES
ON THE MONGOLIAN BLUE SPOTIC REGION IN INFANTS**

**Avirmed A¹, Batchimeg D², Juramt B¹, Shine-Od D¹, Ayurzana A¹, Enebish S¹,
Amgalanbaatar D¹**

¹ School of Bio-medicine, Health Sciences University of Mongolia

² School of Govi-Altai, Health Sciences University of Mongolia

Melanocytes and melanin granules have been studied by electron microscopy in normal adult human skin and in normal blue spotic skin of the 1 month and 8 months old children. The melanocytes have always been found as free cells within the epidermis, i.e, on the epidermal side of the dermal membrane. Melanocytes frequently rest on the dermal membrane or bulge towards the dermis. In such cases the uninterrupted dermal membrane is uniformly thin and smooth in appearance, in contrast with the regions alongside Malpighian cells, where it appears appreciably thicker and seemingly anchored to the basal cell layer. Two types of melanin granules have been distinguished according to their location in the melanocytes and to morphological characteristics which may only express different stages in the maturation of the granules: (a) light melanin granules in which a structure resembling a fine network is apparent. The light granules were detected predominantly in melanocytes of blue spot on the sacral region in one month old infants. (b) dense melanin granules which, in osmium-fixed preparations, appear as uniformly dense masses surrounded by a coarsely granular, intensely osmiophilic shell.

Treatment of sections of osmium-fixed tissues with potassium permanganate has revealed within the dense granules the existence of an organized framework in the form of a regular, crystalline-like lattice. It is suggested that this basic structure is protein in nature and may include the enzymatic system capable of producing melanin. The existence is reported of fine filaments located in the cytoplasm of melanocytes and morphologically distinct from the tonofilaments found in Malpighian cells.

Key words: Mongolian blue spots, melanocyte, Malpighian cells

イオン液体による木材組織の SEM 観察
～ハリのある細胞の可視化を目指して～

阪上 宏樹¹⁾、松村 順司¹⁾、津田 哲哉²⁾、桑畑 進²⁾
九州大学大学院農学研究院¹⁾、大阪大学大学院工学研究科²⁾

木材の研究分野において走査型電子顕微鏡 (SEM) は細胞の機能解明や形態学的特徴による樹種同定、材質の評価まで幅広く利用されている。近年では薬剤で処理した木材の性能評価等にも X 線分析装置を搭載した SEM が利用されており¹⁾、研究を遂行するためには SEM は必要不可欠なツールである。

絶縁体である木材を SEM 観察する際、金や炭素等で蒸着を行い高真空下で観察することが一般的である。従ってサンプルは常に水分を含まない全乾状態となる。木材は高木類の木本植物である樹木から得られる生物材料であるため、部分的に水分が少ない部位もあるが、立木時の状態、すなわち細胞に多量の水分を含んでいる状態が本来あるべき細胞の姿である。樹種によっては樹高 50m 以上もの樹体を維持するため、細胞は厚い細胞壁で構成されるが、乾燥させて木材として利用する際に、この厚い細胞壁に水分子が吸・脱着するため、環境の変化で膨潤・収縮による寸法変化が可逆的に常時生じる。従って、SEM で映し出される細胞の形態は常に水分ゼロの収縮した状態であり、時には乾燥による細胞や組織の変形、破壊等も観察される。大気中の僅かな水蒸気であっても水分子は細胞壁に吸着されて寸法が変化するため、観察対象が目的とする状態を維持しているか、すなわち SEM 観察によるアーティファクトの影響を受けていないか考慮する必要がある。

木材を利用する際、この膨潤・収縮は大幅な品質の低下 (割れや変形) を引き起こすため細胞の変形メカニズムを解明することは重要である。変形や割れを微細レベルで検討した多くの研究が報告されているが²⁻⁵⁾、SEM で含水状態の細胞を観察することが出来ないため、細胞壁の膨潤・収縮挙動を電子顕微鏡レベルで詳細に検討することが難しい。また乾燥に伴って不可逆的に変化する組織も存在するため⁶⁾、細胞が生きていた際の形態、もしくは水分を含んだ形態を観察することができれば新たな知見が得られる可能性が高い。

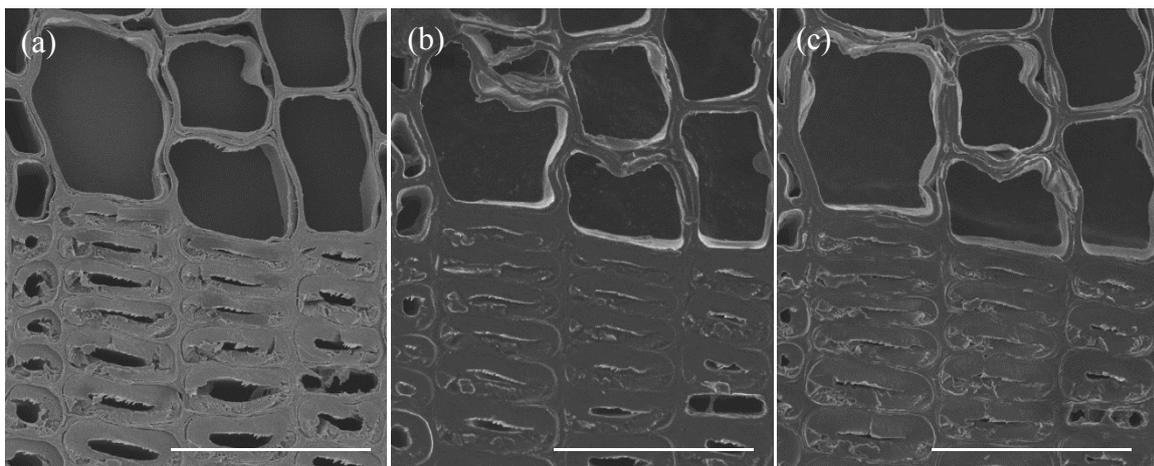


図 金蒸着およびイオン液体処理による木材切片の SEM 画像
(a)金蒸着, (b)5% [C₄mim][BF₄]+Ethanol, (c)5% [C₂mim][CH₃COO]+Ethanol
(加速電圧 : 5kV, 倍率 : ×500, Bar : 50μm)

近年新たな電子顕微鏡観察方法として注目されているイオン液体法⁷⁾は真空下でも揮発しない液体を使用するため、水分子と同様に細胞壁内に取り込まれ、細胞が生きていた際の状態を高真空中でも維持できれば、乾燥履歴（収縮履歴）の無いハリのある細胞を可視化できる可能性が高い。

そこでまず、イオン液体を用いた SEM 観察が木材でも可能かどうかを検討するため、水溶性かつ水への溶解度が高い 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [C₄mim][BF₄]、および細胞へのダメージが少ないと考えられる 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate [C₂mim][CH₃COO]の2種類のイオン液体を使用して SEM 観察を行った。木材は吸水性が高く、多孔質かつ複雑な立体構造を有するうえ、木材中には疎水性の化学物質も含まれるため、これまで報告されているイオン液体による観察条件とは異なる可能性がある。従って、木材サンプルは吸水量の低い切片および SEM 観察で一般的に使用するブロック状の試験片を使用し、純水およびエタノールで各種濃度に希釈したイオン液体を含浸させて観察試料とした。次に、ハリのある細胞が可視化出来ているかを検討するため、従来の金蒸着による全乾状態の細胞形状とイオン液体法による細胞形状を比較する（図）とともに、比較的大きな木材サンプルを使用して、全乾状態および純水もしくはイオン液体を含浸させた木材の寸法を測定し、それぞれの形態を比較した。

本講演では、イオン液体による木材組織の SEM 観察について、これまでの研究でわかってきた最適な観察条件、およびイオン液体が木材の寸法変化に与える影響についてご紹介するとともに、現状で抱える検討課題について皆さまのご意見を頂ければ幸いである。

謝辞

本研究を遂行するにあたりイオン液体に関してご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科望月衛子博士には心より感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Philip Evans, Hiroshi Matsunaga, Makoto Kiguchi, *Nature nanotechnology* 3(10):577(2008)
- (2) 三河尻尚人, 松村順司, 大熊幹章, 小田一幸, *木材学会誌* 47(4):289-294(2001)
- (3) Koji Murata, Minoru Masuda, *Materials science research international* 7(3):200-205(2001)
- (4) Hiroki Sakagami, Junji Matsumura, Kazuyuki Oda, *IWA Journal* 28(1):29-37(2007)
- (5) Hiroki Sakagami, Kosuke Tsuda, Junji Matsumura, Kazuyuki Oda, *IWA Journal* 30(2):179-187(2009)
- (6) Tomoyuki Fujii, Youki Suzuki, Naohiro Kuroda, *IWA Journal* 18(1):69-76 (1996)
- (7) Susumu Kuwabata, Anusorn Kongkanand, Daisuke Oyamatsu, Tsukasa Torimoto, *Chemistry Letters* 35:600(2006)

イオン液体を用いたハイドロキシアパタイト湿潤成形体の電子顕微鏡観察

高橋 知里

愛知学院大学 薬学部 製剤学講座

【諸言】

ハイドロキシアパタイト (HAp) は、生体適合材料として良く知られており、骨や歯などに広く用いられている。HAp セラミックスの性質として、骨伝導や骨誘導が報告されており、アパタイト相を通じて生来の骨に直接、結合できることがわかっている。さらに、骨融合や埋め込みデバイスの機械的連結、組織再生を円滑に進めるため、HAp 成形体の作製方法に注目が集まっている。成形過程でセラミックス焼結体の構造が決定づけられるため、より良い作製方法を確立するには、含水状態にある成形体の複雑な微細構造を理解することが必要である。しかし、一般的に電子顕微鏡は真空環境を必要とするため、含水状態にある成形体の観察には不向きとされる。

近年、室温で液体の熔融塩であるイオン液体が報告されており、アニオンとカチオンの組み合わせで様々な性質を持ったイオン液体がデザインできることがわかっている[1]。桑畑らは、不揮発性や難燃性、高導電性の性質を持つイオン液体を用いることにより、生物試料などを電子顕微鏡で観察可能であることを見出した[2]。本研究では、含水状態にある HAp 湿潤成形体を材料に、イオン液体を用いた電子顕微鏡観察手法を確立するとともに、今まで評価の難しかった乾燥焼結過程における HAp の固化挙動を明らかにする。

【実験方法】

本実験では、水を含むスラリーを用いたゲルキャスト法により、HAp 成形体を作製した[3]。湿潤成形体としては、乾燥直後及び相対湿度 90%~50% (1 日毎に 10% ずつ相対湿度を減少) で乾燥後のものを試料とし、焼結体としては、1000 度で 2 時間焼結したものを観察試料に用いた。イオン液体は親水性の 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 ([BMIM][BF₄]、関東化学株式会社) を用い、HAp 成形体中の水分量に対し 30mol% 水濃度になるようにイオン液体を処理した。その後、デシケーター内に一定時間置きイオン液体を試料に浸透させた後、真空乾燥機で余分な水分を十分乾燥させた。観察装置としては、電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM、日本電子株式会社) を用い、加速電圧 5kV で行った。また、比較観察には、マイクロフォーカス X 線 CT (島津製作所) を用いた。サイズ収縮および含水量測定としては、5mm 角に切り出した HAp 成形体を用いた。

【結果・考察】

図は、イオン液体を処理した乾燥過程における HAp 成形体の FE-SEM 像を示している。乾燥直後の成形体では、300-600 μ m の細孔径で形成されているのに対し、乾燥過程を経て細孔径が 200-400 μ m まで減少していることがわかる。また、それぞれの細孔内部を観察した FE-SEM 像から、乾燥過程において膨潤したような表面構造が徐々に乾燥していく様子がわかる。特に相対湿度 50% 下にある HAp 成形体では、細孔内部全体に細かい微粒子がみられ、膨潤したような構造はみられなかった。さらに、本実験では比較観察として、マイクロフォーカス X 線 CT を用いて、HAp 成形体及び焼結体の構造観察を行った。HAp 成形体の乾燥過程において、FE-SEM 像と同様の細孔径が観察された。また、FE-SEM 像とマイクロフォーカス X 線 CT 像から得られた細孔径の分布から、マイクロフォーカス X 線 CT では、100 μ m 以下の細孔では観察が難しいということがわかった。一方で、FE-SEM を用いた観察では、数十 nm レベルの構造も明確に捉えられることが明らかとなった。

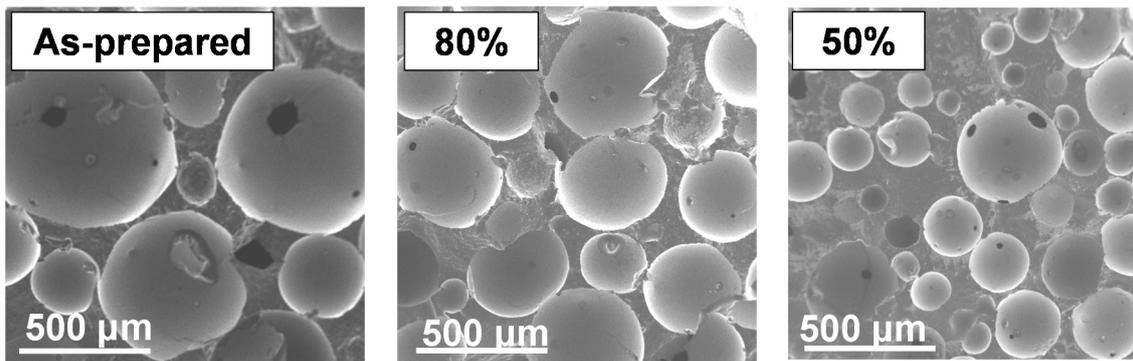


Fig. FE-SEM images of (a) as-prepared porous HAp green body just after removal from the mold and those were kept in humid chamber (b) 90, and (c) 50 % relative humidity.

乾燥過程で成形体中の水分が 20%程度減少しており、乾燥過程におけるサイズ収縮が 20%程度であったため、サイズ収縮は HAp 中の水分揮発によるものと示唆された。さらに、イオン液体処理による HAp サイズ収縮の結果から、サイズ収縮が 1%以下であるということがわかり、イオン液体の影響による構造変化はほぼ無いことがわかった。上記の結果から、乾燥過程の HAp 湿潤成形体構造をサブミクロンスケールで捉えられることが明らかとなった。

【結言】

簡便な HAp 湿潤成形体の微細構造の電子顕微鏡観察手法を確立することができた。さらに、この手法を用いた FE-SEM 観察により、HAp 成形体の乾燥過程における細孔の収縮挙動を捉えることに成功した。また、比較観察から、湿潤成形体のマイクロフォーカス X線 CT による観察限界も明らかとなった。親水性イオン液体を用いることで、湿潤セラミックス成形体の微細構造観察が可能であると考えられ、より良い性質を持つセラミックスの作製方法の確立に貢献できるものと思われる。

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導を頂きました名古屋工業大学先進セラミックス研究センターの藤正督教授に深く感謝致します。また、試料作製にあたり、ご協力を頂きました Central Electrochemical Research Institute の Deepak K. Pattanayak 博士にお礼申し上げます。

【参考文献】

- [1] T. Welton, Chem. Rev. 99 (1999) 2071-2083.
- [2] S. Kuwabata, A. Kongkanand, D. Oyamatsu, T. Torimoto, Chem. Lett. 35 (2006) 600-601.
- [3] C. Takahashi, D.K. Pattanayak, T. Shirai, M. Fuji, J. Euro. Ceram. Soc. 33 (2013) 629-635.

RTIL-SEM による内耳形態観察

勝野 達也¹⁾、 戎 富美²⁾、 北尻 真一郎¹⁾

京都大学 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科¹⁾、大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質化学研究部門²⁾

<緒言>

内耳有毛細胞は、微絨毛が 10~50 μ m の長さに大きく発達した特徴的な聴毛という構造を細胞表面に持つ。聴毛は、各有毛細胞に数十~数百本ほどずつ存在し、列状に規則正しく並んでいる。この聴毛はチップリンク等の糸状の構造で繋がっており、音刺激による機械的な揺れに対し剛体の「てこ」のように動き (Flock, 1977)、先端の連結部にある機械刺激応答チャンネルを介し、音刺激を電気信号に変換する (Paul JL et al., 1995)。このように、聴毛は音刺激を神経伝達情報に変換する重要な役割を担う。難聴の原因の 1 つとして、この聴毛の変性が知られており、有毛細胞の形態の所見は、その診断のポイントの 1 つとなる。この有毛細胞の微細構造を確認する方法として、走査電子顕微鏡による観察がよく用いられるが、固定(前・後)-脱水-置換・乾燥-蒸着-観察、と多岐のステップを必要とし、より簡便な形態観察の方法が望まれる。また、これらのステップでアーチファクトを生じている可能性もあり、ステップを減らすことでより生体に近い形態を観察できる可能性も高い。イオン液体による SEM 観察 (RTIL-SEM) 法は、サンプルをイオン液体に浸すことによって導電性を持たせ、SEM 観察を可能にする。通常の方法と比べ、脱水-置換・乾燥の行程のみならず、条件次第では、固定すら省略して SEM 観察することも可能と言われている。今回、我々はこの RTIL-SEM 法を用いて内耳有毛細胞の形態観察を行い、従来の金属コーティングによる観察方法との比較の下、内耳有毛細胞の形態学的観察の際の一助となるか検討した。また、内耳感覚上皮細胞にも存在すると言われている、細胞表面の糖鎖などの多糖外被(Glycocalyx)の可視化の可能性も検討した。

<材料および方法>

生後 3 日齢のマウス蝸牛内耳コルチ器の器官培養組織において、1) 固定-脱水-置換・乾燥、2) 固定-脱水、3) 固定、4) 無固定、の各条件において、イオン液体 (Choline Lactate 等) を用いた SEM 観察を行なった。

多糖外被の観察については、生後 3 日齢のマウス蝸牛内耳コルチ器の器官培養組織に加え、ヒト骨芽細胞株 (MG-63) を用いた。また、多糖外被にコントラストを付ける目的で 500 μ g/ml の ruthenium red 及び 1% Alcian blue 液を混合した固定液を用いた。

<結果>

1), 2), 3), 4), のいずれの条件でも個々の聴毛を区別できる像が得られた。しかしながら、従来の方法で見られる様な細胞表面から直立している状態の聴毛は観察されず、横倒しに

なっているか、丸まってしまっている状態のものが多く観察された。また、細胞表面の多糖外被の可視化についても、これまでのところ明確に可視化できたものはなかった。

<考察>

イオン液体を用いた内耳有毛細胞の SEM 観察において、個々の聴毛を区別できる像を得ることは出来たが、本来、細胞表面から直立しているはずの聴毛が倒れていた。これは SEM 観察ため試料を観察前に減圧乾燥させる際に生じるアーチファクトである事が想像される。

そこで、現在、厚めのイオン液体コートと色素染色を組み合わせ、乾燥の影響を減少できないか検討しており、また、加速電圧を変化させる事でイオン液体内の色素結合部位（多糖外被⇨細胞表面）の観察が可能かも併せて検証している。

ライブセルイメージングと STEM トモグラフィーを用いた植物細胞解析の最前線

岩野 恵

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科
(現 大阪大学・産業科学研究所)

アブラナ科のモデル植物であるシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* では、雌蕊先端の乳頭細胞に花粉が受粉すると、花粉は乳頭細胞から水の供給を受けて発芽し、花粉管は乳頭細胞壁内に侵入・伸長する。さらに、花粉管は花柱の花粉管通導組織を伸長して胚珠へ誘導される。胚珠の先端には珠孔という孔があり、花粉管はその孔から胚珠に侵入して胚嚢の助細胞に達する。その後助細胞の前で花粉管はいったん伸長を止め、花粉管先端がバーストすることで、2つの精細胞が放出される。2つの精細胞はそれぞれ卵細胞、中央細胞の核と融合して受精が成立する。

花粉管の柱頭から助細胞への一方向的伸長は花粉管ガイダンスと呼ばれ、精細胞を胚嚢に運搬して受精を成立させるための重要な過程であり、花粉管と雌蕊細胞間の相互作用により制御されている。花粉管と雌蕊細胞間の相互作用の実体はトレンニア *Torenia fournieri* で研究が進み、助細胞から分泌される小型のシステインリッチタンパク質 LURE が花粉管の珠孔への最終的な誘導に関わる花粉管誘引物質であることが証明された。続いて、*A. thaliana* でも LURE 様のタンパク質が誘引物質として機能することが報告されている。一方、1960年代に Brewbaker と Kwack が Ca^{2+} が花粉管の発芽伸長に必須であることを明らかにして以来、花粉管伸長時や受粉・受精過程における Ca^{2+} の重要性が調べられてきた。また助細胞については、 Ca^{2+} が高濃度に蓄積していることが示され、花粉管誘導や受精過程においても Ca^{2+} の重要性が示唆された。

そこで、花粉管ガイダンスから花粉管バーストまでの花粉管と助細胞内の Ca^{2+} 動態を詳細に観察するため、 Ca^{2+} センサータンパク質 yellowameleon 3.60 を花粉管と助細胞で高発現する *A. thaliana* を作出し、CCDカメラと蛍光顕微鏡による高感度 Ca^{2+} モニタリング系を構築した。そして花粉管ガイダンスから花粉管バーストまでの花粉管と助細胞の Ca^{2+} 動態を semi-*in vivo* 受精系により調べた。花粉管の Ca^{2+} 動態については、野生型 (WT) と助細胞機能を失った myb98 の胚珠を並べたところ、WT胚珠をおいたときのみ振幅の大きい Ca^{2+} オシレーションが誘起され、珠孔に誘引されることが明らかとなり、助細胞由来の物質は花粉管の Ca^{2+} 動態を変化させることが示唆された。一方助細胞では、花粉管の接近、接触によって Ca^{2+} オシレーションが誘導され、その後花粉管の破裂 (バースト) が誘導されることが明らかとなった。 Ca^{2+} オシレーションは細胞外や細胞内のカルシウムストアから細胞質への Ca^{2+} の流入と流出によりおこると考えられているが、助細胞のカルシウムストアについては不明な点が多い。

花粉管より放出された2つの精細胞は、各々卵細胞と中央細胞と (重複) 受精することが知られている。最近、semi-*in vivo* 受精系において、花粉管バーストから受精に至る過程での精細胞核の挙動が可視化されるようになったが、精細胞が卵細胞あるいは中央細胞とどの様にして受精するのかは不明であった。精細胞膜と卵細胞膜が融合するという説や、精細胞が卵細胞に取り込まれると言った説が提唱されてきたが、受精機構の詳細は未解明のまま残されている。

そこで、助細胞の細胞内カルシウムストアの詳細を解析することと、精細胞と卵細胞、中央細胞との受精様式を明らかにすることを目的として研究を行っている。そのための前段階として、花粉管バースト前後の胚珠を固定する方法を確立し、走査透過型電子顕微鏡を用いる STEM トモグラフィー法によって、精細胞および胚嚢を構成する細胞の高解像度・

3次元構造解析系の構築を行なった。

電子線トモグラフィーとは、様々な角度から電子線を照射して撮影した試料の投影像を基にコンピュータ上に三次元像を再構成し、試料内部の三次元構造を解析する手法である。生物試料の場合、一般的には加速電圧 300kV の透過電子顕微鏡(TEM)を用いて解析が行われてきたが、電子線が透過できるサンプルの厚さが 300nm 程度に限られていたため解析対象となる構造はベシクルや微小管などといった微細な構造に限られていた。一方、加速電圧が 3000kV の超高压電子顕微鏡を用いると、2 μ m 以上の厚い切片の観察が容易になり、神経細胞のゴルジ体、ミトコンドリア、液胞などのオルガネラの解析も可能となった。

走査透過型電子顕微鏡(STEM)とは、小さく収束した電子線を試料上で走査させ、試料を透過した電子線を検出器により補足し、その電子染料の多少によるコントラストで画像を表示する顕微鏡で、TEMモードでは透過できない1 μ m以上の厚い生物試料を観察できる。このSTEMと電子線トモグラフィーを組み合わせた技法を使うことによって、これまで超高压電子顕微鏡でしか扱えなかった2 μ m以上の厚い試料の解析が可能になった。さらに、傾斜時にも全視野に焦点が合う、明視野・暗視野の切り替えが容易、コントラストがリニアであるなどといったメリットが報告されている。つまり、STEMトモグラフィーを用いれば、厚い切片について細胞小器官やそれらの膜の連続性を追うことができるので、小胞体などの細胞内膜構造や配偶子融合過程における細胞膜構造の詳細な解析が可能となることが期待できる。

本報告では、最近得られたライブセルイメージングとSTEMトモグラフィーの結果について紹介したい。

高圧凍結技法を用いた細胞内小胞輸送経路の解明

豊岡 公德

理化学研究所 環境資源科学研究センター

植物は、種子・根など貯蔵器官に蓄えた脂質やタンパク質、葉緑体で光合成により水と二酸化炭素から合成した糖を、根や茎の先端に転流して生長する。この際、各々の細胞内でタンパク質や多糖、脂肪の合成と分解が盛んに行われ、細胞間・オルガネラ間でそれら物質の輸送を行いながら、細胞の形態・構造を巧みに変化させ、植物は生存している(文献1-3)。

植物細胞は、動物に比べて大きく、厚い細胞壁を持っている。この細胞壁は、セルロースと共に、ペクチン等の多糖類、細胞壁タンパク質やリグニン等から形成されている。植物の生育には、生長中の細胞の細胞壁と細胞膜の増大・伸長が必要であり、芽生えや根端、培養細胞など急速に増殖している植物の組織や細胞においては、細胞膜と細胞外への膜成分と細胞壁多糖やタンパク質の効率良い供給が必用である。これらの細胞外成分は、小胞体やゴルジ装置で合成され、ゴルジ装置等で液胞への輸送経路に向かう分子と仕分けされ、細胞外へと輸送されるということが判っている。このうち小胞体からゴルジ装置への輸送には COPII 被覆小胞という構造体が、ゴルジ装置から液胞への輸送にはクラスリン被覆小胞と呼ばれる構造体が関わるということが知られている。しかし、ゴルジ装置から細胞外への輸送、すなわち植物細胞において最も大量の物資の輸送に関わる構造体の同定はなされておらず、動物や酵母での研究から、分泌小胞と総称される膜小胞が関わるということが類推されていた。

我々は、マウス神経細胞で見つかったSecretory carrier membrane protein 2 (SCAMP2)⁴⁾という分泌に関与する4回膜貫通タンパク質のタバコホモログ遺伝子を単離した。このSCAMP2をマーカーとし、タバコの培養細胞 BY-2株を主な研究材料に用いて、植物細胞におけるゴルジ装置から細胞外への輸送機構を解析した。蛍光タンパク質を指標とした共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、SCAMP2 はドット状構造体と細胞膜に局在し、そのドット状構造体の一部はゴルジ装置の末端に位置するトランスゴルジ網と、これ以外にゴルジ装置と離れた同様な構造体にも存在した。そして、そのドット状構造体は細胞内を動き回り、最終的には細胞膜に移行している可能性が示唆された。そこで電子顕微鏡(TEM)によりこの構造体の同定を試みた。

ところで植物は、厚い細胞壁や大きな液胞、固いデンプン顆粒を持つことから、動物細胞と比較すると固定液・樹脂の浸透が悪く、TEM で植物の組織や細胞を観察するのは難しい。さらに分泌に関わるゴルジ装置や輸送小胞などの細胞内輸送系オルガネラは、細胞内での動きが動物細胞より速いため、一般的な化学固定法ではその動きを瞬時に止めた微細構造を観ることはできない。そこで、我々は高圧下でミリ秒内に細胞を凍結する高圧凍結技法を取り入れ、植物培養細胞と植物組織に最適な凍結・固定・包埋条件を確立した。

高圧凍結技法によりタバコ培養細胞を高圧凍結/凍結置換を行い、微細構造観察および免疫TEM観察を行った。抗SCAMP2抗体を用いた免疫TEM観察を行った結果、SCAMP2 は、ゴルジ層板と接した直径50~100 nmの膜小胞が5~12個集まった小胞のクラスター、トランスゴルジ網に局在することが明らかとなり、さらに、その小胞クラスターはゴルジ層板から離れて存在することを見出した。また、この構造体には、分泌性タンパク質や細胞外多糖であるペクチンが存在していたこと、この構造体が細胞膜に繋留され、その膜が細胞膜に融合している像がTEMにより観察されたことから、この構造体は、細胞膜/細胞

外への分泌に関わる分泌小胞が集まった構造体であることが判明し、この構造体を分泌小胞クラスター(Secretory Vesicle Cluster: SVC)と名付けた。

SVC が広く植物の細胞に存在しているかを、TEM観察により検討した。イネ培養細胞、シロイヌナズナ表皮細胞など、異なる種や異なる器官の細胞、特に大きな細胞にこの構造体は観察された。従って、この構造は広く植物界に存在している構造であり、ゴルジ体から細胞外への物質の長距離輸送に関わる構造体である可能性が示唆された。

植物の細胞分裂の過程において、分裂した2個の核の間に新たな細胞壁が形成され、その過程では多量の細胞外物質がこの形成過程の細胞板に輸送されると考えられている。そこで細胞分裂過程における SVC の動きを観察したところ、細胞の内部から細胞板に多数の SVC が動いてゆくことがわかった。以上の結果から、SVC が植物細胞の分裂と伸長という増殖に不可欠な2つの出来事に深く関わっていることを示した⁵⁻⁶⁾。

タバコ培養細胞は培養培地中の炭素源やリンなどが減少するに伴い、分裂が盛んな細胞増殖期から細胞が伸長する定常状態期に移行する。この移行の際、光学顕微鏡解析や生化学的な解析により、合成に関わる分子機構が低下し、オートファジーなどの分解に関わる分子機構が活性化することが知られている^{3,7,8)}。蛍光イメージングによる SVC やゴルジ装置など分泌に関与するオルガネラ数を細胞増殖期と定常状態期で比較した結果、定常状態期では、ゴルジマーカは液胞へ、SCAMP2 は細胞膜に移行することがわかった。しかし、そのような細胞の分化や形態変化に伴う超微形態は明らかになっていない。そこで、組織や細胞におけるオルガネラ分布とその超微形態を明らかにするために、組織や細胞などの TEM 像を高解像度でかつ広域に渡って自動撮影するシステムと、撮影した TEM 像をつなぎ合わせ1枚の高解像度 TEM 写真を構築するプログラムを組み合わせ「広域 TEM 像自動取得システム」を開発した。本システムを用いて、高圧凍結技法により調製した植物組織や培養細胞などの数万枚の TEM 像を自動撮影し、結合させることで、ギガピクセルクラスの写真の取得に成功し、動的なオルガネラの分布を広域に渡り把握することに成功している⁹⁾。

細胞増殖期および定常状態期の培養細胞を高圧凍結/凍結置換し、Epon812 樹脂包埋後、通常より大きめの超薄切片を作製した。そして、凍結が良好でかつ目的の細胞周期・方向性を持つ細胞を選び、倍率 12,000 倍で広域 TEM 撮影システムにより撮影し、1細胞あたり 3,000~5,000 枚の写真を取得した。そして、タイリングプログラムと Photoshop を併用し、1枚の広域高解像度 TEM 像を得た。細胞全体の微細構造が容易に見えるとともに、高圧凍結技法で固定したことにより、ライブイメージングでないと見えないような輸送途中の小胞や膜構造など多数確認した。細胞増殖期と定常状態期の広域 TEM 像から輸送系オルガネラを定量し比較した結果、定常状態期ではゴルジ装置の層板数と大きさ、SVC などの小胞クラスターの数とその小胞数は細胞増殖期に比べて減少していた。一方、多胞体とエンドサイトーシス小胞の数は細胞増殖期から定常状態期もほとんど変化がなかった。以上の結果から、環境変化や成長に伴い、細胞の形態が変化するだけでなく、細胞内分泌系オルガネラも変化することが示唆された¹⁰⁾。

参考文献

- 1) **Toyooka, K.**, T. Okamoto, and T. Minamikawa. 2000. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol.* 148:453-464.
- 2) **Toyooka, K.**, T. Okamoto, and T. Minamikawa. 2001. Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *J Cell Biol.* 154:973-982

- 3) **Toyooka, K.**, Matsuoka K. 2006. Autophagy and Non-Classical Vacuolar Targeting in Tobacco BY-2 Cells. Tobacco BY-2 Cells: From Cellular Dynamics to Omics *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 58: 167-179
- 4) Wu TT, Castle JD (1997). "Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs)". *J. Cell. Sci.* **110**: 1533–41.
- 5) **Toyooka, K.**, Y. Goto, S. Asatsuma, M. Koizumi, T. Mitsui, and K. Matsuoka. 2009. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *Plant Cell.* 21:1212-1229.
- 6) **Toyooka, K.**, and K. Matsuoka. 2009. Exo- and endocytotic trafficking of SCAMP2. *Plant Signal Behav.* 4: 1196-1198
- 7) **Toyooka, K.**, Y. Moriyasu, **Y. Goto**, M. Takeuchi, H. Fukuda, and K. Matsuoka. 2006. Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy.* 2:96-106.
- 8) Matsuoka, K., Demura, T., Galis, I., Horiguchi, T., Sasaki, M., Tashiro, G., and Fukuda, H. (2004). A comprehensive gene expression analysis toward the understanding of growth and differentiation of tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 45: 1280–1289.
- 9) 豊岡公德, 佐藤繭子, 朽名夏磨, 永田典子 2014 「高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用」 *Plant Morphology* (印刷中)
- 10) Toyooka K., Sato M., Kutsuna N., Higaki T., Sawaki F., Wakazaki M., Goto Y., Hasezawa S., Nagata N., Matsuoka K. Wide-range High-resolution Transmission Electron Microscopy Reveals Morphological and Distributional Changes of Endomembrane Compartments during Log-to-stationary Transition of Growth Phase in Tobacco BY-2 Cells (再投稿中)

腎生検病理診断における電顕観察の重要性

原 重雄

神戸大学医学部附属病院病理診断科

腎生検の適応になる疾患は原発性糸球体腎炎のほか、膠原病や糖尿病、血管炎、感染症などの全身疾患、遺伝性腎疾患、腎移植例が含まれ、直接に関与する科だけでみても、腎臓内科、リウマチ・膠原病内科もしくは免疫内科、小児科、泌尿器科と多岐にわたる。腎生検の病理診断を行うには3つの柱が欠かせない。光学顕微鏡を用いる光顕診断、蛍光顕微鏡を用いる蛍光診断、そして電子顕微鏡を用いる電顕診断である。

光顕診断と蛍光診断で多くの腎疾患が診断可能である一方、疾患の定義上、最終診断を行う上で電顕診断が絶対に欠かせない疾患や、電顕所見が決定的な役割を果たす疾患群が存在する。高度の蛋白尿をきたす微小変化型ネフローゼ症候群では、糸球体上皮細胞足突起の広範な癒合がみられる(図1)。微細な繊維状構造物の沈着により腎障害を引き起こす疾患群(アミロイドーシス、クリオグロブリン腎症、Fibrillary/Immunotactoid腎症など)では、腎組織に沈着する線維状構造物の直径が疾患毎に固有の値をとることが知られており、30,000~50,000倍での詳細な観察が必須である(図2)。基底膜を構成するIV型コラーゲンの遺伝子変異により引き起こされるAlport症候群および基底膜菲薄病ではそれぞれに特徴的な糸球体基底膜所見が認められ(図3、4)、ミトコンドリア異常症では腫大した異常ミトコンドリアが尿細管上皮細胞や糸球体上皮細胞に充満する(図5)。先天性脂質代謝異常症のひとつであるFabry病では、糸球体上皮細胞内にスフィンゴリン脂質の蓄積が認められ、電顕所見上Zebra bodyと呼ばれる高電子密度物質を形成する(図6)。

上述したこれらの疾患以外でも、様々な糸球体腎炎ないし腎症で特徴的な電顕所見が観察できる。日常的に腎生検病理診断に携わる立場から、本講演では腎生検病理診断における電顕観察の重要性について述べるとともに、超微形態像からとらえた腎疾患についても俯瞰する。腎生検病理への理解の一助になれば幸甚である。

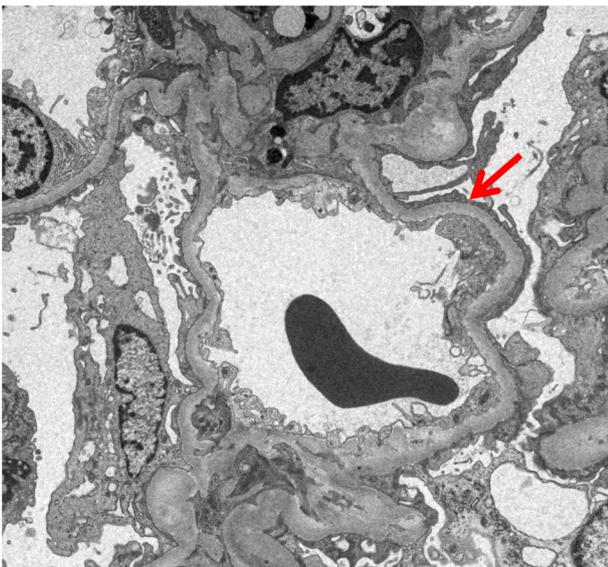


図1. 微小変化型ネフローゼ症候群。上皮細胞足突起は癒合している(↑)。

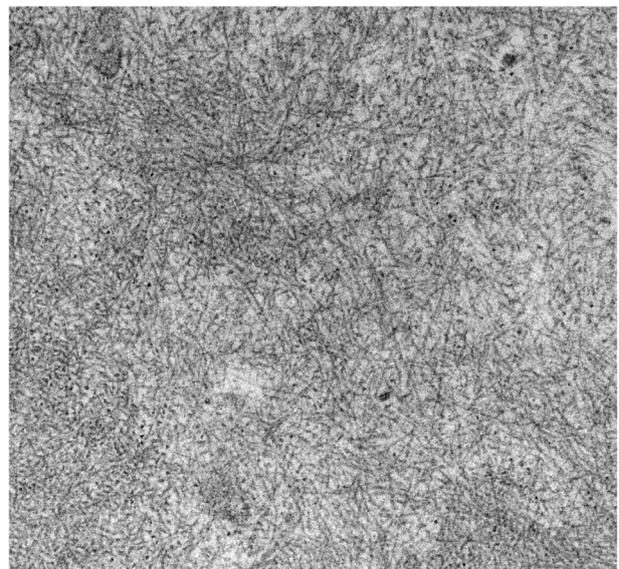


図2. アミロイドーシス。微細な線維状物質が多数観察される。

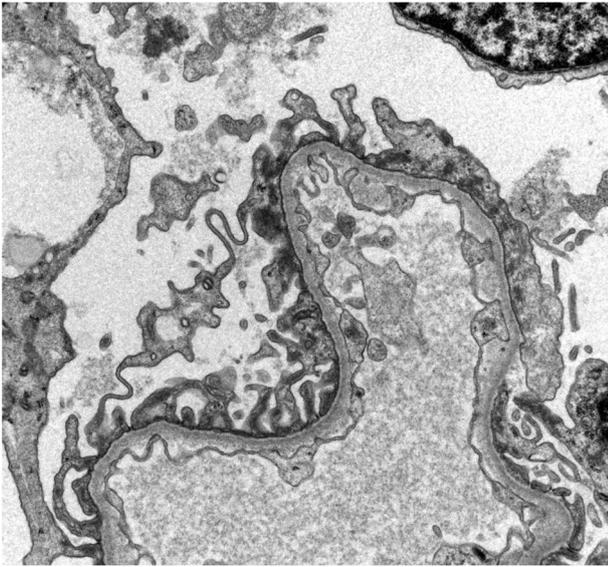


図3. 基底膜菲薄病。糸球体基底膜は高度に薄くなっている。

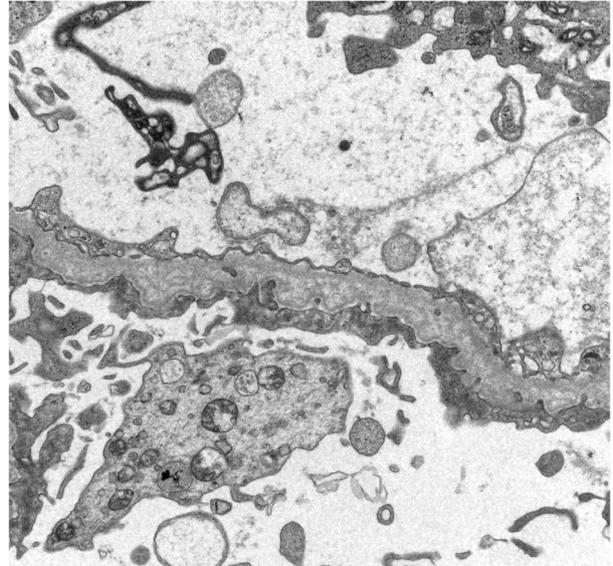


図4. Alport 症候群。糸球体基底膜に網目状変化がみられる。

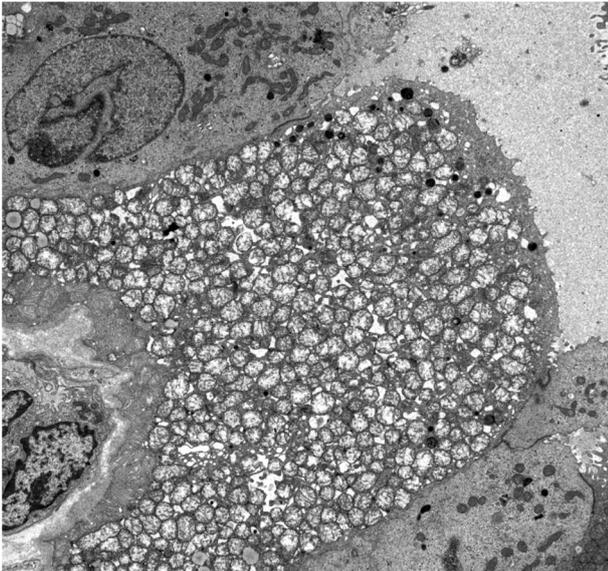


図5. ミトコンドリア異常症。尿細管上皮内に腫大したミトコンドリアが充満している。

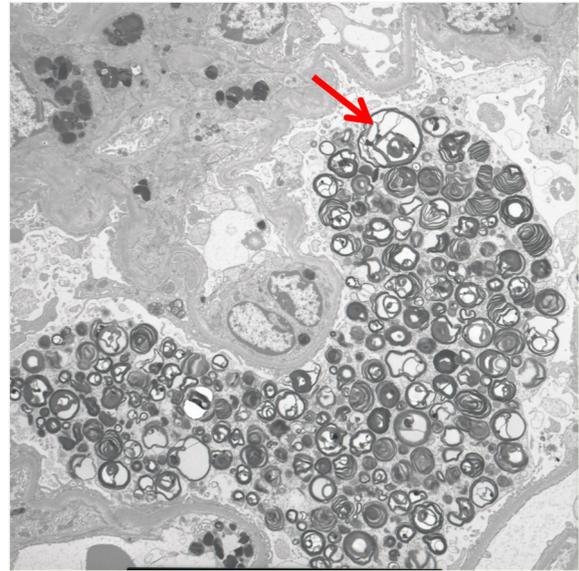


図6. Fabry 病。糸球体上皮細胞内に Zebra body (↑) が多数認められる。

関節リウマチ (RA) にみられる Nursing 現象の超微形態学的特徴とその生物学的意義

澤井 高志¹⁾²⁾、石田 欣二³⁾、宇月 美和⁴⁾、鎌滝 章央⁴⁾、花坂 智人³⁾、
松浦 絵里³⁾、小笠原 勝利³⁾、遠山 稿二郎³⁾、越智 隆弘⁵⁾
東北大学病理形態学¹⁾、仙台オープン病院²⁾、岩手医科大学バイオイメージングセンター³⁾、
岩手医科大学機能病態学分野⁴⁾、大阪警察病院⁵⁾

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は関節に始まり、関節に終わるといわれる免疫異常による全身性の疾患で、関節には疼痛、変形と運動障害をひき起こす。本疾患における課題はなぜ関節に病変が起こるかであるが、そのほかに 10 年も 20 年も続く炎症性病変が如何なる機序で持続するのかである。

RA 学の研究について、最近では、急速な免疫学の発達に伴う遺伝学的研究、さらに炎症を持続させるサイトカインを抑制する治療の進歩などが注目されている。一方、形態学的には、最近、特に目立った進歩はみられなかった。

我々は、関節病変、とりわけ炎症性滑膜の組織像のなかに炎症の慢性化つながる手がかりはないかを探してきた。その結果、RA の炎症は通常の外傷による炎症と同様、非特異的炎症として扱われてきたが、実は、そのなかに多くの特異的な病像が含まれていことが明らかになった (文献 1)。その一つが今回、取り上げる Nursing 現象である。

Nursing 現象は樹状細胞が形質細胞あるいはリンパ球を抱き抱えるような像を示す像であり、従来、胸腺などでリンパ球が保護、あるいは排除されるときに類似した像がみられるということでこのような表現が使われた (文献 2)。しかし、この Nursing 現象はこれまでも多くのリウマチ学者、病理学者の目にふれてきたにも関わらず積極的に取り上げられてはこなかった。

今回、我々は、この Nursing 現象に注目し、最新の集束イオン/電子ビーム加工観察装置 (FIB-SEM) と透過電子顕微鏡 (TEM) による電子線トモグラフィ法を用いて観察した (文献 3)。

方法

常法に従い、エポキシ樹脂に包埋した滑膜組織を次の方法で観察した。

TEM 観察：ウルトラマイクロトームで作製した超薄切片 (厚さ 70nm) を酢酸ウラン・鉛による電子染色後、加速電圧 100kV、撮影倍率×10k (1.75nm/pixel)、±60°、2°ステップで二軸の連続傾斜像を取得後、トモグラフ作成は、EM-IP (日立) により合成した。再構築にはアルゴリズムの一つである逆投影法を用い三次元再構築を行った。

FIB-SEM 観察：超薄切後の樹脂ブロックを加速電圧 3kV、撮影倍率×700 (70.87nm/pixel)、100nm 間隔で合計 106 枚の連続断面 SEM 観察を行い、取得したデータを基にソフトウェア Avizo (Mercury Computer Systems 社) を用い三次元再構築を行った。尚、FIB 加工条件は、加速電圧 40kV、電流値 18.75nA、スライスピッチ 100nm、加工幅 200µm、加工時間 30sec/slice で実施した。

結果

FIB-SEM によって Nursing 現象の主役となる二つの細胞を観察すると、包み込む側の細胞 (Nurse cell) である樹状細胞は包み込まれる側の細胞 (patronized cell) である形質細胞、リンパ球を長い突起を出して包み込むような状態にあることが分かる (図 1、2)。また、二

軸トモグラフィでは、Nursing 現象を構成する二つの細胞の間には、部分的ではあるが、両者の間に細胞膜の融合が観察された。

考察

RA がなぜ長期にわたって持続し、しかも RA 因子という免疫グロブリンを産生し続けるのか。その機序はこの Nursing 現象にあるかもしれない。細胞間での膜の融合については最近、trocytosis (ラテン語ではぶちぎり)とも呼ばれ、腫瘍や白血病の培養などでしられるようになった。つまり、Nurse 細胞が庇護される細胞をアポトーシスから守り、あるいは、細胞の活性化によって延命を図るのではないかということである。これを RA にあてはめてみると炎症の持続性の機序につながると思われる。最近の RA については、さまざまなサイトカインやその受容体などとの関係などで理解されているが、炎症の持続性についてはあまり触れられていない。この点、Nursing 現象は、今後の解析の発展が待たれるテーマといえる。

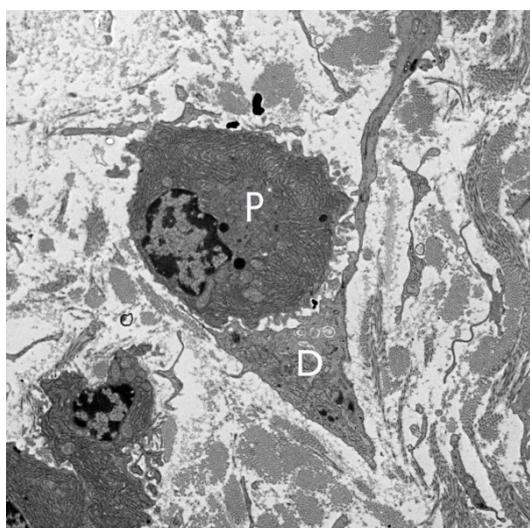


図 1：滑膜組織 TEM 像。P:形質細胞 D:樹状細胞。

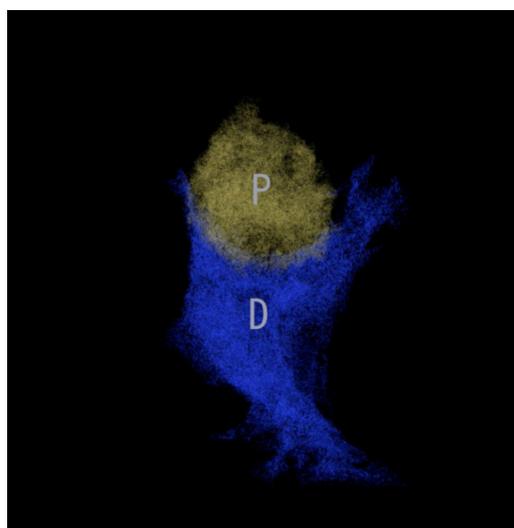


図 2：三次元構築像。P:形質細胞 D:樹状細胞。

参考文献

- 1) 京極方久：慢性関節リウマチ（2）再び、滑膜細胞とは何ぞや？免疫・Immunology Frontier 3(5):65-72,1993.
- 2) 越智隆弘：関節リウマチの病因に迫る：腸骨骨髓の場で、ナース細胞と CD1 (+) 細胞を焦点にあてて、厚生省労働科学研究班 報告書（平成 22 年度まで）、関節リウマチ骨髓血中の疾患誘導因子解明と根治治療法開発研究班、2011.
- 3) Sawai T, et al: Serial block-face scanning electron microscopy combined with double-axis electron beam tomography provides new insight into cellular relationships. Microscopy (Oxf) 62(2):317-320.2013.

急速凍結法を用いた臨床電顕応用への試み

逸見 明博

日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

近年、動物実験レベルでイソペンタン・プロパン混合寒剤と凍結置換固定法の組み合わせによる生体内凍結技法が行われ、血流の保たれた生きた臓器組織の観察が可能になった¹⁾。ホルマリンやグルタル等²⁾の化学物質で組織を固定する従来法との対比からは化学固定法では固定に時間がかかるため、その間に形態変化や可溶性物質の消失、局在の変化といった多くのアーティファクトが生じることが示され、急速凍結法の重要性が示された¹⁻³⁾。物理固定である急速凍結法のなかで、イソペンタン・プロパン混合寒剤を用いジャブ漬け法による急速凍結や液体窒素で冷却した純銅ブロックを用いた圧着法は光顕標本のみならず電顕標本にも適した凍結組織を得ることができ、凍結置換固定法と組み合わせることで、病理診断において一般的に用いられているパラフィン切片やエポン包埋切片での光顕や電顕観察、さらに免疫組織化学にも応用できる。また、組織を切除し速やかに急速凍結を行った組織は、従来の化学固定の欠点を軽減し、生体により近い像を光顕や電顕で観察することができる⁴⁾が、これらの方法を用いた病理検体の観察はまだほとんど行われていない。

我々は生体内凍結技法の臨床応用を念頭において、急速凍結法による病理検体の光顕や電顕観察を試みている。今回、臨床応用への試みとして、始めに“急速凍結ディープエッチング (QF-DE) 法”を用いた病理検体の電顕観察例を提示し、次に、急速凍結を行った人体組織の免疫染色性について日常病理診断に用いている抗体での検討について紹介する。

急速凍結ディープエッチング法による病理検体の観察

手術室で切除された手術検体は直ちに病理検査室に運び、光顕標本と通常電顕標本、および QF-DE 法によるレプリカ標本を作製した。QF-DE 法は大野らの手技⁴⁾を用い、組織の切り出し面に対し液体窒素で冷却した純銅ブロックへの圧着法で急速凍結を行った。

手術室切除された病理検体でも QF-DE 法により電顕観察が可能であり、細胞骨格や細胞外マトリックスなどの線維構造や、小器官等の膜構造と細胞骨格との関連性など、通常電顕では観察の難しい種々の超微構造が三次元的に高解像力で観察することができた。特に腫瘍細胞における細胞骨格の量や分布といった通常電顕とは異なる QFDE 標本ならではの視点で診断できた腫瘍症例などを提示する^{6, 7)}。

急速凍結人体組織の免疫染色性について

剖検および手術組織から採取した組織や細胞診検体をイソペンタン・プロパン寒剤のジャブ漬け法により急速凍結を行った。その後、4%PFA アセトンを用いた凍結置換固定法で化学固定に置換し型の如くパラフィンブロックを作製し、通常ホルマリン固定組織と染色性を比較した。免疫染色では多くの抗体で染色性の増強効果がみられた。

文献

- 1) Ohno S, Terada N, Fujii Y, et al. Dynamic structure of glomerular capillary loop as revealed by an in vivo cryotechnique. *Virchows Arch* 1996; 427(5):519-527
- 2) Ohno N, Terada N, Ohno S, Histochemical analyses of living mouse liver under different hemodynamic conditions by "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol*. 2006; 126(3):389-398
- 3) Zea-Aragon Z, Terada N, Ohno N, et al. Effects of anoxia on serum immunoglobulin and albumin leakage through blood-brain barrier in mouse cerebellum as revealed by cryotechniques. *J Neurosci*

Methods. 2004; 138(1-2):89-95

4) 大野伸一, 寺田信生, 大野伸彦, 他. 免疫染色のための固定試料作製法: 凍結技法の意義. 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学. 2012; 1-10.

5) Ohno S, Fujii Y. Three-dimensional studies of the cytoskeleton of cultured hepatocytes: a quick-freezing and deep-etching study. *Virchows Arch A. Pathol Anat Histopathol.* 1991; 418: 61-70.

6) Hemmi A, Terada N, Mizutani G, et al. Squamous cell carcinoma with sarcomatous feature (so-called carcinosarcoma) of stomach probably metastasized from esophageal tumor: a case report with quick-freezing and deep-etching method. *Medical Electron Microscopy.* 2004; 37:119-129.

7) Hemmi A, Inaniwa Y, Ohno S, et al. Relationship between skeinoid fibers and stromal matrix in gastrointestinal stromal tumors: Morphometric analysis with quick-freezing and deep-etching method. *Pathology International.* 2001; 51: 338-348.

一般演題(口演発表)

O-01

フェレット糸状乳頭の上皮乳頭、結合組織乳頭および微細血管構築の比較

竹村 明道、方 剛、諏訪 文彦

大阪歯科大学 解剖学講座

フェレット舌背に存在する糸状乳頭の上皮乳頭、結合組織乳頭、微細血管構築の形態を調査・比較し、形態的特徴を明らかにした。成フェレット 8 頭を用い、2 頭は上皮乳頭標本、2 頭は上皮剥離結合組織標本を、残り 4 頭はアクリル樹脂注入後、微細血管鑄型標本を作製した。各標本を舌尖部、前部、中部、後部に 4 等分した。各部位別に上記標本を走査電顕で観察した。

上皮乳頭は楕円柱状または円柱状の基部と基部上面から突出する円錐形の突起で構成されていた。舌尖部は同じ大きさの 4~6 対の小突起が環状に、前部は最も咽頭側に位置する 1 個の大きな主突起と 2, 3 対の小さな副突起で、中部は 1 個の主突起と 1 対の副突起で、後部は 1 個の主突起のみで構成されていた。結合組織乳頭は楕円柱状の基部と基部上面周囲に楕円状に配列する 10~17 個の円錐状突起で構成されていた。舌尖部は同じ大きさの突起で、前・中・後部は、最も咽頭側に位置する 1 個の突起が最も大きく、後方ほど大きさが増していた。微細血管構築は、基部は上行脚に分岐する細動脈と下行脚が集合した細静脈がみられ、各部は 10~18 個の上行脚と下行脚からなる毛細血管ループが楕円状に配列していた。前・中・後部は、最も咽頭側に位置する 1 個の毛細血管ループは最も高さが高く、後方ほど高さが増していた。

フェレット糸状乳頭の上皮乳頭は、部位により突起数と配列に変化を示すが、結合組織乳頭の突起数と配列、毛細血管ループの数と配列は、部位により変化していなかった。

O-02

イオン液体処理は固定された培養細胞内部に影響するか？

石垣 靖人¹⁾、中村 有香¹⁾、島崎 猛夫²⁾、松原 考宜³⁾、桑畑 進⁴⁾

金沢医科大学 生命科学研究領域¹⁾、金沢医科大学 先進医療研究領域²⁾

横河電機(株) ライフサイエンスセンター³⁾、大阪大学 大学院工学研究科⁴⁾

SEM のコーティング剤として有効なイオン液体は、様々なサンプルでの有用性が認められてきた。われわれの研究グループでも培養細胞の微細な表面構造の観察に有効であることを報告してきたが、イオン液体処理が固定した細胞の内部の構造等に影響するかどうかは未だに明らかにされていない。この点を明らかにするために、蛍光タンパク質を発現させた培養細胞で蛍光像を確認することにより内部への影響を観察してみた。純水で希釈したイオン液体を、SEM サンプル作製時と同様に処理していくと、蛍光像の減弱が観察された。この変化は用いたイオン液体によって異なり、蛍光の種類によっても結果は異なっていた。以上の結果から、イオン液体処理は、おそらく固定された細胞内部に浸透し、内部構造に影響を与える可能性が示唆された。今回紹介する方法は、より生体構造に影響を与えないイオン液体の選別やプロトコールの開発に有用であると考えられる。

O-03

柔組織のSEM観察のためのイオン液体処理法の検討

振木 昌成¹⁾、坂上 万里¹⁾、許斐 麻美¹⁾、塩野 正道¹⁾、中澤 英子¹⁾、
河合 功治²⁾、桑畑 進³⁾

株式会社日立ハイテクノロジーズ¹⁾、ミヨシ油脂株式会社²⁾、
大阪大学 大学院工学研究科³⁾

海藻などの柔組織は、空胞を多く有するため、通常のSEM前処理では形態保持が難しい。今回、我々は、高親水性のイオン液体 HILEM® IL1000 を含水状態の柔組織（ビーンズスプラウト、双子葉植物の茎、海藻など）に適用した。希釈濃度、浸漬時間、余剰溶液の除去方法など観察前処理法を検討した。ビーンズスプラウトでは、希釈濃度 10 %水溶液に浸漬後観察し多孔質構造を確認した。双子葉植物の茎では浸漬した試料を遠心分離法にて余剰溶液を除去することにより、維管束内の細胞壁の厚い木部を明瞭に観察した。また、採集後海水中に保存していた海藻を直接希釈イオン液体に浸漬した結果、海藻表面の細胞の密な配列や内部の多孔質な状態を観察した。これらの結果から、イオン液体は、含水性の空胞構造の試料においても、試料内部まで浸透し、構造の保持や導電性付与に効果があることが示された。

O-04

大気圧 SEM による生物試料の観察

坂上 万里¹⁾、大南 祐介²⁾、河西 晋佐²⁾、伊東 祐博²⁾、中澤 英子¹⁾
(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⁾

今回我々は、卓上型顕微鏡をベースとして、試料室内に、電子線が透過可能な隔膜を上面に備えた大気室を配置することにより、大気圧下での試料観察が可能な卓上型大気圧SEMを開発した。本装置では、大気室側に試料ステージを配備し、試料と隔膜の距離を制御することができるため、隔膜に非接触な状態でバルク試料を観察することができる。大気室内圧力は、大気圧（約 100,000 Pa）から真空度 10,000 Pa まで幅広い圧力範囲可変させて観察が可能である。さらに位置リンケージ試料台によって、実体顕微鏡と同一部位観察も可能である。

今回は、本装置を使用した食品や生体組織の観察例や光顕との相関観察例などを紹介する。また金コロイドで免疫染色した赤血球観察では、反射電子像観察により、大気中での赤血球の形状観察および標識されたタンパク質の同定が可能となった。

O-05

癒着防止ゲルのTEMによる可視化方法の検討

広瀬 治子¹⁾、荻山 明日香¹⁾、伊東 雅弥²⁾

帝人(株) 構造解析研究センター¹⁾、帝人(株) ヘルスケア新事業推進班²⁾

我々は、生体適合性ポリマーCMC-PE（カルボキシメチルセルロース誘導体）ゲルを用いて癒着防止ゲルの開発を行っている。ウサギ腹壁にCMC-PEゲルを塗布して癒着防止効果を確認しているが、開腹評価時において、ゲルが透明であるために、目視でのゲルの存在状態の評価が困難であった。また、組織中でのゲルの状態を確認するために、従来のTEM用サンプリング方法を用いて観察したが、ゲルの存在は確認できなかった。CMC-PEゲルは、2.5%グルタルアルデヒドや1%四酸化オスミウムでは、溶解することがわかり、エタノールを用いることで、その存在を評価することが可能になったので報告する。CMC-PEゲルは網状構造を呈しており、腹膜塗布1週間後でもその存在が確認され、部分的に分解が始まっていることが明らかとなった。

O-06

FE-SEMのリターディング法による生物切片試料の高解像度反射電子観察

檀 紫¹⁾、中澤 英子¹⁾、佐藤 博文²⁾、石田 欣二³⁾、花坂 智人³⁾、遠山 稿二郎³⁾
(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⁾、岩手医科大学 バイオイメージングセンター³⁾

昨年の本学会において我々はFE-SEMを用いてTEM用生物切片の反射電子像観察のための条件を検討した結果、加速電圧0.8 kVから3 kVで切片の表面から内部の情報を確認できること、加速電圧1.5 kV、観察倍率50,000倍で細胞内小器官が鮮明に観察できることを示した。FE-SEMを用いた低加速電圧観察では、試料に負電圧（減速電圧）を印可し、試料直前で入射電子線を減速させるリターディング法が色収差を抑えた高分解能観察法として利用される[1]。SU8200形FE-SEMでは電子銃室の高真空化により低加速電圧での高輝度、低ノイズ、長時間安定観察が可能となっている。今回このSU8220を用いてリターディング機能を生物切片の反射電子像観察に適用するための観察条件を検討した。液体ヘリウム急速凍結・凍結置換ラット小脳の切片（厚さ100 nm、酢酸ウラン-鉛二重染色）を照射電圧1.5 kV（減速電圧3.5 kV）、観察倍率250,000倍で観察し、シナプス小胞やミトコンドリアにおいて単位膜構造を確認した。これらの結果は、FE-SEMのリターディング法が低加速電圧での生物切片試料観察に有効であることを示唆している。

[1]小柏ら：日本顕微鏡学会第61術講演会発表予稿，p63，2005

O-07

グリッド剥離／Cryo-SEM 法によるヒト皮膚上塗布膜の微細構造観察

小栗 雅史、吉田 修

花王株式会社 解析科学研究所

スキンケア製剤／化粧品の性能発現には、ヒト皮膚上での製剤の塗布膜構造を制御することが重要と考えられる。しかし、ヒト皮膚に塗布した製剤の塗布膜をありのまま採取することは困難である。そこで我々は、ヒト角質層の細胞間脂質の構造解析に用いられているグリッド剥離法⁽¹⁾を応用し、ヒト皮膚上の塗膜採取を試みた。片面に接着剤を塗布したスリット型グリッド(スリット: 30 μm \times 100 μm)を作製した。これをヒト皮膚に貼り付けた後、スキンケア製剤を塗布し、10分後にグリッドを剥離した。Cryo-FIB法によりグリッドのスリット部分の断面を作製し、Cryo-SEM観察を行った。塗布膜層には製剤に配合された直径数・ $\text{m}\Phi$ の粒子や複数の粒子が合一した様子が観察され、それ以外の領域には水分が昇華して形成されたスポンジ様構造が観察された。製剤のバルク構造と比較した結果、ヒト皮膚上で製剤が受ける変化(浸透、蒸発など)を反映したと考えられる塗布膜構造の変化を捉えることができた。グリッド剥離／Cryo-FIB-SEM法により初めてヒト皮膚上の塗布膜の微細構造を観察することができた。

(1) G. S. K. Pilgram et al., Journal of Microscopy, 189, 71-78 (1998).

O-08

電顕ブロックトリミングへの超音波カッターの応用

尾関 教生

愛知医科大学 教学監

生物試料の電顕観察の手技のうち、エポキシ樹脂ブロックの面出しおよびトリミングの工程は初心者にとって難易度の高いもののひとつとなっている。

これは通常は実体顕微鏡下で行う手技のために指先の細かい動作を要求されるのに対して、硬い樹脂ブロックの切削を行わなければならないと樹脂の切削ができないことによる。

今回、演者は初心者の電顕入門講座で本多電子製の超音波カッターを使用したところ、ほとんど力を入れなくても容易にトリミングを行うことができた。

本器はホビー用として市販されているため安価であり、メンテナンスを正しく行えば初心者でも扱いやすい機器であるため利用価値が高いと思われる。

今回は本器を使用した経験を報告する。

O-09

走査型電子顕微鏡で観察できるアクリル樹脂脈管注入鑄型法の改良

上村 守、諏訪 文彦、竹村 明道、戸田 伊紀

大阪歯科大学 解剖学講座

【目的】アクリル樹脂（AR）脈管注入鑄型法は、脈管の三次元的形態の観察には優れているが、改善点もある。液体モノマーからヒドロキノン（HQ：重合防止剤）を蒸留しないで除去する点、注入用 AR を非加熱重合で粘度を一定にする点、注入の圧力・速度を一定にする点である。これらを改善し、注入時における注入粘度・量・速度・圧力の数値化を試みた。【材料と方法】市販の液体モノマーから HQ の除去は、NaOH 法を用いて行った。注入用 AR の粘度調整を一定化するために、液体モノマーと固体ポリマーを混和による方法とした。また、手指圧による注入を行わずに、機械的に AR を注入し、圧力・速度を測定した。なお、実験動物に Wistar 系雄性 8 週齢ラットを使用した。【結果】NaOH 法で、HQ が除去され、無色透明の液体モノマーを得ることができた。液体モノマーと固体ポリマーを混和比は、低粘度 AR：重量比 9：1、高粘度 AR：重量比 7：3 が適正であった。低粘度 AR（粘度： $9.07 \pm 0.52 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、量：45ml、速度：5ml/min、圧力 $11.17 \pm 1.60 \text{ mPa}$ ）を注入した後、高粘度 AR（粘度： $1036.33 \pm 144.02 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 、量：5ml、速度：1ml/min、圧力 $58.50 \pm 5.75 \text{ mPa}$ ）を注入し、走査型電子顕微鏡で、微細血管構築を観察した結果、毛細血管まで十分に注入されていることが確認された。

O-10

スギ花粉の電子顕微鏡試料作製の検討 -第二報-

根本 典子、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画像部門

スギの花粉は、即時型アレルギー反応を生じる花粉症の原因物質として多方面から着目されており、1964 年以降、構造解析や吸着物質なども含めて幅広い分野で研究されている。しかし、スギ花粉の超微形態観察は容易ではなく、特に透過電子顕微鏡像は、部分的な構造は報告されているが、組織像全体においては良好な結果が報告されていない。この原因は、スギの花粉粒は水に接触すると、瞬間的にパピラが破れ、原形質体が飛び出す脱皮現象によるものである。これは中性から弱アルカリ性で大半が生じる現象で、我々が汎用する緩衝液、緩衝固定液でも同様である。最外壁表面には orbiculus と呼ばれる微細な顆粒が付着しており、この場アレルゲン物質が存在することが同定されており、脱皮現象を抑えた状態で処理することが望ましい。花粉壁は外壁と内壁があり、内壁は 4 層で構成され、内壁は他の花粉にはない特殊な構造を有している。エタノール等の有機溶媒下では凝集し易い特徴もあり、試料作製処理が容易でなく、我々は、数種の処理を検討し、本学会第 28 回学術講演会において紹介した。その後、多少の検討を加え、従来の組織像よりも良好な結果が得られたため報告する。

O-11

象牙質微小亀裂進展様相の形態学的評価

久保 美寿穂¹⁾、三浦 治郎¹⁾、清水 真人¹⁾、松田 祐輔¹⁾、竹重 文雄¹⁾、
坂田 孝夫²⁾、西 竜治²⁾、保田 英洋²⁾

大阪大学 歯学部附属病院 口腔総合診療部¹⁾、大阪大学 超高压電子顕微鏡センター²⁾

象牙質における微小亀裂と加齢に関しては多くの研究が行われているが、多くは象牙質の石灰化に関連したものが主体であり、象牙質の基質タンパクであるコラーゲンに着目した研究は未だ少ない。本研究の目的は微小亀裂進展におけるコラーゲン様相を電子顕微鏡により評価し、象牙質亀裂におけるコラーゲンと加齢との関連性を多面的に明らかにすることである。

被験歯としてヒトの抜去歯（若年、高齢）を使用し、セメントエナメル境により歯冠部と歯根部の象牙質に分け、歯軸に対し垂直方向に1mm厚に切り出しエポキシ樹脂包埋を行った。インデーターにて亀裂を付与後に再度包埋を行い、ウルトラミクロトーム(Ultrame V: LKB社製)及びダイヤモンドナイフにて4 μ m厚の薄切切片を作製して、10%EDTAにて脱灰した後倒立包埋法を用いて透過型電子顕微鏡(H800: Hitachi)にて評価を行った。脱灰した切片を用いて押し込み試験にてコラーゲンの物性値測定と免疫化学組織染色にてコラーゲンの糖化の評価を行った。

亀裂破断面においてコラーゲンの断裂している様子を観察できたが、若年者と高齢者においてコラーゲン様相における著明な差は認められなかった。象牙質において加齢によりコラーゲンの弾性が低くなっていく傾向が認められた。また加齢によりコラーゲンの糖化陽性反応が強くなる傾向が認められた。亀裂走行が加齢により変化する事からコラーゲンの加齢変化はコラーゲンの物性値を変化させ微小亀裂伸展抵抗性にも影響を与えていると推測される。

O-12

歯肉増殖症における毛細血管後細静脈の形態変化について

盛口 敬一¹⁾、福田 光男²⁾、吉成 伸夫³⁾、前田 初彦⁴⁾、野口 俊英²⁾、
三谷 章雄²⁾、大野 紀和¹⁾

愛知学院大 歯 口腔解剖学講座¹⁾、愛知学院大 歯 歯周病学講座²⁾、
松本歯科大学 歯科保存学第一講座³⁾、愛知学院大 歯 口腔病理学講座⁴⁾

高血圧や狭心症を治療する薬として使われるニフェジピンによりその副作用として歯肉増殖症を呈する歯肉では、細動脈血管系へのカルシウム拮抗作用により動脈系の拡張が起こるが、それに対する静脈系の拡張が平行せず、いわゆる動脈・静脈系のアンバランスによりうっ血や浮腫が生じる可能性が知られている。我々はすでに歯肉増殖症における伸長した歯肉上皮突起の細胞で、変性に伴う形質膜変化による遊離リン脂質をセリウムが捕捉し沈殿したものであることを証明した。今回、毛細血管後細静脈について電顕観察を行った。その結果、真皮乳頭の部分に認められた毛細血管後細静脈と赤血球を含む毛細血管の拡張と共に出血像も確認された。さらに近隣の部分の上皮には上記のセリウム反応陽性の変性細胞も認められた。

O-13

ヒト成人舌骨体・大角連結部の組織学的検討（第1報）

一條 幹史¹⁾、川股 亮太²⁾、林 省吾³⁾、伊藤 正裕³⁾、尾関 教生⁴⁾、高橋 常男¹⁾
神奈川歯科大学 大学院3次元画像解剖学講座¹⁾、放射線応用科学講座²⁾、
東京医科大学 人体構造学講座³⁾、愛知医科大学 教学監⁴⁾

舌骨 (hyoid bone) は舌骨体と左右1対の大角と小角から構成される。頭蓋とは骨性結合がなく、靭帯・筋のみによって結合している。舌根を支持し、呼吸・咀嚼・嚥下・構音などに筋生理学的に機能する以外に、舌骨体と大角の結合部の化骨化が年齢によって変化することから、結合状態は年齢推定にも利用される。しかし、その結合部の詳細な形態学的知見は限られている。本研究は、学生解剖実習後、解剖体から摘出した舌骨25症例の舌骨体と大角、小角の連結状態を μ CT装置で撮影し、結合状態の特徴を分類した。さらに連結部が骨化していない症例を抜粋し、併せて凍結切片を作製し、オリエンテーションとした。その切片の残りの連結部組織片について走査型電子顕微鏡で観察した。

結合部周囲には関節腔が残っており、滑膜と思われる構造を確認できた。結合部の基質は微細な膠原線維断端がわずかに露出した所見で、膠原線維が完全に埋没してみえる骨組織とは明瞭に区別できる軟骨基質を観察した。以上から、成人舌骨は結合部で軟骨成分が観察され、その線維の走行から、結合部分が長期にわたって可動性を残していたことが推測された。

O-14

SBF-SEM を用いたマラリア感染赤血球の三次元構造解析

坂口 美亜子¹⁾、宮崎 直幸²⁾、藤岡 壽³⁾、金子 修¹⁾、村田 和義²⁾
長崎大学¹⁾、生理学研究所²⁾、ケースウェスタンリザーブ大学³⁾

マラリアは亜熱帯・熱帯地方に見られる病原原虫性感染症であり、蚊によって媒介されたマラリア原虫 (*Plasmodium*) が宿主内に侵入し寄生することによって感染する。宿主赤内期において原虫は寄生胞膜内で増殖するが、その際原虫によって感染赤血球の細胞質内に原虫分子の輸送装置として必要となる膜状構造 (マウレル裂) が形成される。

本研究では、Serial Block Face-Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) を用いて各生活環における複数の熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) 及び感染赤血球全体の三次元微細構造を再構築し、原虫の核や食胞あるいは感染赤血球内に形成されたマウレル裂などについて定量解析を行ったので報告する。

O-15

黄色ブドウ球菌 α ヘモリジンがタイトジャンクションの構造と機能に与える影響

関 啓子¹⁾、佐々木 博之²⁾

東京慈恵会医科大学 基盤研究施設¹⁾、帝京平成大学 大学院健康科学研究科²⁾

上皮細胞や内皮細胞の細胞接着部位最頂部にはタイトジャンクション(TJ)が存在し、隣接細胞間との溶質や水の透過を制御している。TJは膜貫通タンパク質のクローディング分子群やオクルーディングで構成され、細胞の頂上領域近くでリボン様の分子ネットワークを形成している。

我々は、細菌が産生する毒素がTJのバリア機能にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、細胞膜孔形成毒素である黄色ブドウ球菌 α ヘモリジン(HIa)がヒト腸管系培養細胞(Caco2細胞)の、バリア機能、TJ構成分子の局在、TJストランド、TJを中心とした微細構造に与える影響を検討している。頂上側からHIaを作用させると細胞のバリア機能は濃度依存的経時的に破綻し、クローディング-1分子は細胞-細胞接触領域から細胞質内に分散した。また、TJストランドはHIa処理により断片化し、透過電顕観察によるとTJの間は拡大した。これらの変化はHIa除去20時間後にはほぼ正常に戻った。一方、基底側からHIaを作用させると細胞は形態的にも機能的にも著しく損傷し毒素除去後の回復も認められなかったが、TJは破壊されなかった。

O-16

*Tannerella forsythia*に対するヒト多形核白血球の食作用とフリーラジカル生成局在に関する光顕、電顕検出法について

盛口 敬一¹⁾、長谷川 義明²⁾、樋口 直也³⁾、村上 幸孝⁴⁾、吉村 文信²⁾、
中村 洋³⁾、中田 和彦³⁾、大野 紀和¹⁾

愛知学院大学 歯学部 口腔解剖学講座¹⁾、愛知学院大学 歯学部 微生物学講座²⁾、
愛知学院大学 歯学部 口腔治療学講座³⁾、朝日大学 歯学部 口腔微生物分野⁴⁾

歯周疾患に強く関連した細菌の一つと考えられている *T. forsythia*(*T. f.*)と多形核白血球(PMN)との関係機序については不明な点が多い。そこで我々は、PMNが *T. f.* に対し食作用を示し、抗菌的な酸素傷害を与えるかを明らかにするために、二次抗体としてHRP標識ヤギ抗ウサギIgG抗体で免疫反応し、酵素組織化学、免疫組織化学併用による光顕、電顕観察、さらにルミノールによる微弱発光観察も合わせて行った。その結果、PMNの食胞内に貪食された270K陽性の菌体の存在とヒトPMNが非オプソニン化 *T. f.* を貪食することが明らかになった。さらに同部位に一致して、NBTによる O_2^- とCe元素の検出によって、 H_2O_2 の生成が証明された。

一般演題(ポスター発表)

PS-01

同一生物切片 (LR White 樹脂) による機能と超微形態解析を目指して

松浦 絵里、花坂 智人、小笠原 勝利、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

走査型電子顕微鏡を用い、スライドガラス上に回収した樹脂包埋超薄切片 (生物試料) の反射電子像 (BSE) を観察すると試料の組成を反映したコントラスト情報が得られる。このコントラスト情報の輝度を反転させると、透過電子顕微鏡の画像 (透過像) と同様な情報が得られる為、組織・細胞の解析が可能となる。私達はこの特徴を活かし、水溶性樹脂 (LR White) を用いることで免疫染色への応用を試みた。免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡による抗原の局在部位の同定に引き続き、BSE による同一部位の電子顕微鏡観察を行い、その有用性を確認した。

PS-02

光-電子相関顕微鏡法ワークフローの開発

細木 直樹、西岡 秀夫

日本電子株式会社 EM 事業ユニット EM アプリケーション部

蛍光物質等で標識した生体分子の位置や動的な挙動は、光学顕微鏡 (光顕) により観察するのが一般的であるが、標的分子の微細構造を観察することはできない。一方、電子顕微鏡 (電顕) は光顕に比べて高い空間分解能を持つが、動的な観察が困難であること、標識手法が少ないこと等が短所として挙げられる。光-電子相関顕微鏡法 (Correlative Light and Electron Microscopy: CLEM) は、各手法の長所を活かした解析を行うことができる。

我々は“picture overlay program”を用いた CLEM のワークフローを開発した。“picture overlay program”は、任意の二点を指定することで二つの画像の重ね合わせを行うソフトである。本ソフトにより、透過電顕 (JEM-1400Plus) の操作画面上に、電顕画像と光顕画像を重ね合わせることができる。重ね合わせ後は、光顕画像の座標と電顕試料ステージの座標が合致するので、光顕画像の関心領域を指定することで自動的に試料ステージが移動し、関心領域の微細構造の観察を行うことができる。本ソフトは、重ね合わせ画像の保存もできるので、各画像を対照して比較することができる。本ワークフローにより特別な装置を用いることなく、広範囲の観察手法を自由に用いて CLEM を実現できる。

PS-03

反射電子像を用いたモンタージュ処理の検討

小笠原 勝利、花坂 智人、松浦 絵里、石田 欣二
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

私達は、樹脂包埋した試料を、TEMに加え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、スライドガラスに大型切片を回収し観察することができるので、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方法を確立するため、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。

観察は、電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM SU-8010）を用いて、加速電圧1.5kV、WD 2mmの条件で行い、ラット小脳の表層から顆粒層までの領域をモンタージュ撮影（20×15枚）した。その後、Fiji ImageJ(NIH)のソフトを用いて、撮影画像のつなぎ合わせを、自動機能と手動で行った。撮影画像のつなぎ合わせを行うことで、全体像から高精細画像まで連続的に解析できるようになった（領域：1,023×591 μ m、画像サイズ：41,238×23,807 pixels）。

PS-04

イオン液体を用いたTEM試料支持法の検討

仲野 靖孝¹⁾、許斐 麻美¹⁾、河合 功治²⁾、中澤 英子¹⁾
株式会社日立ハイテクノロジーズ¹⁾、ミヨシ油脂株式会社²⁾

電子顕微鏡用イオン液体 HILEM® IL1000 を TEM 観察用試料の支持材として適用するための試料前処理条件を検討した。IL1000 は分子量も小さく、高親水性であるため、純水で希釈可能であり、SEM 用試料の導電付与効果(1) やリポソームなどの溶媒としての適用(2) が報告されている。

実験では、5~10 %の IL1000 希釈水溶液に、試料を混ぜて適宜攪拌し、試料液滴をマイクログリッドに滴下、余分な溶液を吸い取った。その後、日立 HT7700 を用いて加速電圧 100~120 kV で観察した。酸化チタン粒子の場合、5 % IL1000 水溶液に分散した結果、20~200 nm の異なる粒径の粒子が凝集も少なく分散している様子を観察した。また IL1000 がアモルファス状態であることも電子回折で確認している。以上の結果から IL1000 は TEM 試料支持材として利用可能であることがわかった。

[1] 塩野ら：医生電顕技術誌 27 (2) 92, p41, 2013

[2] 中澤ら：日本顕微鏡学会第 64 回学術講演会発表予稿, p136, 2008

PS-05

生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎の観察

逸見 聖一朗¹⁾、地家 豊治²⁾、松本 なつき³⁾、尾花 ゆかり⁴⁾、中西 陽子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。今回腎の近位尿細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分および5分、さらに5分のうっ血後10分間血流を再開した）群とコントロール群を加えた4群において、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】コントロール群では、近位尿細管は立方上皮からなり内腔は開いていた。うっ血群では、尿細管径は増加し、腫大した尿細管細胞と虚血により破壊された細胞片により内腔の閉塞がみられた。さらにうっ血解除群ではうっ血群と同様に尿細管径の増加が続いていたが、尿により細胞片が流され内腔は開存していた。このような所見は通常固定法では観察できず生体内凍結技法で観察が可能であった。

PS-06

走査電子顕微鏡による反射電子像観察 — 複数試料観察の効率化を目指して —

花坂 智人、松浦 絵里、小笠原 勝利、石田 欣二

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

私たちは、樹脂包埋ブロックより作製した超薄切片をスライドガラスに回収し、走査電子顕微鏡(SEM)の反射電子(BSE)による超微形態観察を行っている。この方法を用いると、透過電子顕微鏡(TEM)と同等の解像度が得られる。

また、試料ステージ可動範囲が広いため、連続切片法による三次元的な体構造解析や大型切片の広領域観察に適している。

この様な SEM-BSE による観察法の特長を利用すれば、撮影視野を動かすだけで複数の異なる組織が観察でき、煩雑な試料交換が必要最小限で済む。例えば、実験モデルのコントロール標本とノックアウト標本を比較しながらの観察が容易で、効率の良い形態観察が可能と考える。

PS-07

プランクトンの電子顕微鏡観察のためのイオン液体を用いた前処理方法

宮本 賢治、山下 泰史

鳴門教育大学 大学院学校教育研究科

プランクトンのような表面構造が柔らかく水分を含んでいる試料を SEM 観察する際、変形が生じることが多いという問題がある。その解決方法として従来では、凍結乾燥法と呼ばれる試料の前処理法が採られてきた。しかし、この方法は多くの作業ステップと時間を要する上に、蒸着装置や液体窒素などの様々な機器や薬品が必要になる。

本研究では、従来の凍結乾燥法に比べて簡単に行える前処理法としてイオン液体を用いた方法に着目し、その方法がプランクトンの SEM 観察に適用可能な条件について検討した。実験では、イオン液体として 1-メチル-3-メチルイミダゾリウム メチルホスホネート (EMI・BF₄) を用いて、アルテミア・サリーナ、ミジンコ、ミカヅキモのプランクトンの像観察を行った。イオン液体はエタノールで希釈して試料に塗布した。その結果、イオン液体濃度が重量比で 0.5~1% で、かつイオン液体との置換回数は 3 回が最適な条件であることが分かった。

PS-08

I、II、III型コラーゲンの三次元構築

島田 達生^{1,2)}、張 娟娟¹⁾、永井 薫子³⁾、安田 愛子⁴⁾、川里 浩明⁴⁾、吉岡 秀克¹⁾
大分大学 医学部マトリックス医学¹⁾、大分医学技術専門学校²⁾、
大分大学 医学部外科³⁾、大分大学 総合科学支援センター⁴⁾

結合組織を構成する線維成分は、膠原線維、細網線維(好銀線維)、弾性線維である。人体において、最も多く分布している線維が膠原線維で、その密度や配列は、部位によってかなり異なっている。その主成分は、コラーゲン蛋白で、現在 12 種類のコラーゲンが同定され、特に I 型、II 型、III 型コラーゲンが普遍的である。I 型コラーゲンは、皮膚の真皮、靭帯、腱、骨に分布している。II 型コラーゲンは、軟骨組織に見られ、III 型コラーゲンは、リンパ器官に広く分布している。骨や軟骨は、基質にカルシウムや大量の糖蛋白が存在しているために、光学顕微鏡レベルでも観察不能である。また、膠原線維を走査電子顕微鏡で三次元的に観察することも難がある。本研究は、種々の技法を使って、上述 3 種類のコラーゲンの三次元構築を明らかにし、それぞれの機能的特質を考える。

真皮、靭帯、腱および軟骨については、Karnovsky 固定後に、細胞外基質を 70% 処理した。骨は EDTA 処理で、カルシウムを除去した。すべての試料を導電染色し、走査電子顕微鏡で観察した。

真皮、腱、靭帯における I 型コラーゲンは、コラーゲン細線維が束を作って、交織または平行配列していた。骨組織においては、束を作ることなく、膠原細線維が密集していた。軟骨の分布する II 型コラーゲンは、I 型よりも径がかなり小さく、密な網目を持って軟骨細胞を包圍していた。消化管や心臓で見られる III 型コラーゲンは、I 型よりも細い細線維からなり、輪状または網状配列をしていた。

PS-09

弾性線維の不思議-その2

永井 薫子¹⁾、永井 沙和²⁾、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⁾

前回 ヒト真皮の NaOH 消化法は、弾性線維を SEM で三次元的に観察することを可能にした。その走行と構築に違いが認められた。また 日光露光部の弾性線維は、線維の束の太さが増し、長さが短くなって絡み合っ一見ダンゴ状となっていた。この部位をアルデヒドフクシン(またはレゾルシンフクシン)・ライトグリーンで染色し光学顕微鏡で観察すると、試料によってはごく淡くしか染色されないものが認められた。今回 この染色ムラが何によって起こるのかを確認するために透過型電子顕微鏡で観察し従来のものと比較検討した。

PS-10

FIB を用いた動物の毛の断面観察

畠中 芳郎、山内 朝夫、渡辺 嘉

大阪市立工業研究所

食品や工業製品などに動物の毛が混入していた場合など、その毛がどのような動物に由来するものか鑑定が求められることがある。近年では DNA を用いた方法なども用いられるが、顕微鏡を用いた形状観察により動物に特徴的な構造を観察することで、種の判別に有益な情報が得られることが知られている。毛の構造、特に内部の髄質の構造については、動物の種類ごとに特徴的な構造があることが古くより知られており、表面のキューティクル構造と併せて判定の重用な要素とされてきた。

髄質を光顕、SEM 等で観察するため、内部を露出させる必要がある。簡便な方法としてはカミソリで切断するだけでも光顕観察できるが、SEM での観察に耐える試料にするには、樹脂に包埋してマイクロトームで平滑な断面を露出させる必要がある。マイクロトームを用いる方法は包埋、トリミング等煩雑で時間を要する作業であるうえ、堅い毛の繊維によりダイヤモンドナイフを傷つける危険性が高いという難点がある。今回、FIB(収束イオンビーム装置)を断面作製に利用する機会を得て、マイクロトームを用いない各種動物毛の髄質観察を行えたので、その方法、画像について報告する。ガリウムイオンビームによるダメージの問題など、検討の必要な要素はあるが、非常に簡便に試料作製が可能であった。

PS-11

間葉系幹細胞の3次元培養により形成された硬組織の微細観察

中塚 美智子、隈部 俊二、乾 千珠子、上田 甲寅、森下 愛子、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次元培養した際形成された硬組織の微細構造について検討する。【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コラーゲンゲルに包埋し、直径10cmのdishにて培養した。培養終了後インプラント体周囲のスキャホールドから凍結切片とエポン超薄切片を作製し、硬組織形成について組織学的に観察した。【結果】スキャホールドにおいて、細胞はコラーゲンゲル内の3次元網状構造を基礎にコラーゲン線維を分泌し、硬組織を形成した。また細胞外マトリックスのターンオーバーを制御する組織像がみられた。【結論】HMS0014由来の骨芽細胞様細胞は、インプラント体表面および周囲のスキャホールドに硬組織形成を開始する。

PS-12

太陽電池内蔵電動歯ブラシの酸化チタン光触媒作用による バイオフィーム除去効果

佐藤 武則、渡辺 清子、浜田 信城
神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

酸化チタン(TiO_2)は、化学的安定性、光触媒作用、生体親和性に富む純チタンの化合物で、歯科領域において、インプラント体や歯磨剤などに応用されている。本研究では、棒状 TiO_2 半導体を応用した太陽電池内蔵歯ブラシを用いて TiO_2 光触媒作用によるバイオフィーム除去効果を検討した。実験には太陽電池を付与した TiO_2 棒内蔵電動歯ブラシとステンレス棒内蔵電動歯ブラシを用いた。供試菌株は歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* をBHI液体培地で37°C、18時間嫌気培養したものを用いた。 TiO_2 棒の光触媒作用によるバイオフィーム除去効果は24ウェルのマイクロプレートに菌体を付着させた後、電極にブラックライトを7cmの距離から照射させて、60分後までの生菌数測定と電子顕微鏡(SEM)より評価した。電動歯ブラシの効果は菌体を付着させた円形カバーガラスに歯ブラシの機械的振動を1分間、昼光色6Wの蛍光灯を照射させて加えた後、1%クリスタルバイオレット液で染色し、得られた染色液の濃度から評価した。その結果、*P. gingivalis*バイオフィームに対して TiO_2 棒の光触媒作用により生菌数の経時的な減少と菌体バイオフィームの破壊が認められた。さらに電動歯ブラシの作用により機械的除去効果と TiO_2 棒の光触媒作用による相乗効果が認められた。以上より本研究で供試した太陽電池内蔵電動歯ブラシは歯周病予防に有用であることが示唆された。

PS-13

イオン液体によるカラーコンタクトレンズの SEM 観察 —高倍率観察を目的とした撮影条件の検討—

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⁾

昨年第 29 回学術講演会において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 Tributylmethylphosphoniumdimethylphosphate [P4441] [DMP] を用い「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」について報告した。今回、前回使用した同一のレンズとイオン液体を用い、高倍率観察を目的にイオン液体の浸漬時間、撮影条件の検討を試みたので報告する。

PS-14

76 カミソリの使用経験と評価について

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

昨年度第 29 回医学生物学電子顕微鏡学会にて、「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、0.76mm 厚のカミソリでの試料の細切について報告を行った。

今回も同様に、①76 カミソリでの押し切り細切、②従来の 0.1mm 厚カミソリでの押し切り細切、③従来の 0.1mm 厚カミソリでの引き切り細切（通常細切）、以上 3 つの方法で細切を行い、様々な試料で挫滅による影響の比較検討を行ったので報告する。

PS-15

Porphyromonas gulae 線毛による破骨細胞分化誘導と サイトカイン産生について

佐々木 悠、渡辺 清子、浜田 信城

神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

【目的】 *Porphyromonas gulae* ATCC 51700 株 (*P. gulae*) はイヌの歯肉溝から高頻度に検出される細菌である。我々は、本菌の線毛を精製し *P. gulae* 41-kDa 線毛の歯周組織破壊への影響を検討した。【材料と方法】 *P. gulae* 41-kDa 線毛タンパク質は、DEAE-Sepharose CL-6B を用いて陰イオンカラムクロマトグラフィーにより精製した。この精製タンパク質による破骨細胞分化誘導は、BALB/c マウス骨髄細胞と破骨細胞分化支持細胞である MC3T3-G2/PA6 の共培養系を用いて行った。また、サイトカイン誘導能については、BALB/c マウス腹腔マクロファージを用いて検討した。実験的歯周炎は3週齢の Sprague-Dawley 系ラットを用いて5% CMC と混和した *P. gulae* 菌液を口腔内に一日おきに5回接種して行った。

【結果と考察】 *P. gulae* 41-kDa 線毛は破骨細胞誘導能、炎症性サイトカイン産生能を有し、ラット実験的歯周炎モデルにおいて顕著な歯槽骨吸収を示した。以上の結果からイヌの歯周炎において *P. gulae* 41-kDa 線毛が重要な病原因子であることが示唆された。

PS-16

Porphyromonas salivosa ATCC 49407 株の線毛精製とその性状

古谷田 泰徳、渡辺 清子、浜田 信城

神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 微生物感染学講座

【目的】 *Porphyromonas salivosa* は、様々な動物の歯肉溝に存在する偏性嫌気性グラム陰性の黒色色素産生細菌で、ヒト歯周病に深く関わる *Porphyromonas gingivalis* と同属の細菌である。今回、我々は *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株から線毛の分離精製を行い、その性状について検討を行った。

【方法】 線毛の精製：*Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株を超音波処理後、40%硫酸により粗線毛を分画し、DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換クロマトグラフィーを行って精製した。線毛タンパク質の分子量決定：分子量は12% SDS-PAGE を用いて決定した。線毛の局在：精製線毛に対する特異抗体を作製し、Western blot 法と金コロイド法による免疫電子顕微鏡観察を行った。

【結果と考察】 *Porphyromonas salivosa* ATCC 49407 株から分離した線毛タンパク質の推定分子量は60Kであった。この60K線毛は、*Porphyromonas gingivalis* に存在する41K線毛および67K線毛とは異なった抗原性を示した。従って、*Porphyromonas salivosa* 菌体表面には、*Porphyromonas gingivalis* の線毛とは抗原性と分子量の異なるタンパク質で構成される線毛が発現していることが明らかになった。

PS-17

齲蝕罹患象牙質における基質蛋白の多面的評価

松田 祐輔¹⁾、三浦 治郎¹⁾、清水 真人¹⁾、久保 美寿穂¹⁾、竹重 文雄¹⁾、
坂田 孝夫²⁾、西 竜治²⁾、保田 英洋²⁾

大阪大学 歯学部附属病院 口腔総合診療部¹⁾、大阪大学 超高圧電子顕微鏡センター²⁾

【目的】齲蝕は齲蝕原因菌 (*S. mutans*) がエナメル質象牙質を脱灰することにより起こるが、無機質の脱灰だけではなく、基質においても様々な変化が起こることが知られている。本稿では齲蝕罹患象牙質における基質の変化を電子顕微鏡や蛍光顕微鏡を用いた蛍光寿命測定による形態学的手法と生化学的手法により分析および検討を行った【方法】齲蝕罹患歯質と健全歯質を比較するため治療歴のない齲蝕に罹患した抜去歯を透過型電子顕微鏡用は未脱灰、光学顕微鏡用試料は 1mm 厚切片にて 2 週間脱灰し、罹患部と健全部に分けた。TEM 用試料は固定後エポキシ樹脂にて包埋後にウルトラミクロトームで薄切し TEM 観察を行った。光学顕微鏡用のサンプルは固定後パラフィンにて包埋した。ミクロトームにて薄切し、type1 コラーゲンに対する免疫染色とグラム染色にて観察を行った。Western blottingにて健全部と齲蝕罹患部の基質の変化を検出した。蛍光寿命測定に関しては、Time correlated single photon counting (TCSPC)において蛍光寿命の測定を行った。【結果】齲蝕罹患象牙質においてグラム染色で象牙細管への菌の侵入が、TEM では象牙細管周囲のコラーゲン構造が健全部位と比べて不明瞭になる様相が認められた。免疫染色において菌侵入部においては抗コラーゲン抗体では弱染しており、齲蝕部周囲の健全歯質に比べて明らかなコラーゲンの変性を認めた。Western Blotting においても基質の減少を認めた。【結語】齲蝕罹患象牙質において細菌侵入が起こった象牙細管周囲のコラーゲンは齲蝕に罹患することで象牙細管周囲のコラーゲンが分解されることが明らかになった。

PS-18

ヒト皮膚上塗布膜微細構造観察のための角質層と塗布膜の同時採取法開発

吉田 修、小栗 雅史

花王株式会社 解析科学研究所

スキンケア剤の性能発現において、塗布膜の微細構造は性能に関わる重要な情報と考えられる。しかし、ヒト皮膚上で製剤塗布膜をありのままの状態で採取することは困難だった。そこで我々は、グリッド剥離法（片面に接着剤を塗布しグリッドを用いた角質層採取法）をヒト皮膚上の塗布膜の採取に応用し、塗布膜と角質層を同時に採取する方法について検討した。片面に接着剤を塗布したメッシュグリッドを皮膚に貼りつけた後、スキンケア剤を塗布し、10 分後に剥離した。剥離したグリッドを凍結切断し、塗布膜断面の Cryo-SEM 観察を行った。同じ製剤を豚皮上に塗布し、塗布膜断面を観察した結果、どちらも同様の製剤に特徴的な構造が認められた。また、平滑な基板上に塗布した製剤とヒト皮膚から剥離したグリッド上製剤について、X 線回折チャートを解析した結果、どちらも同様の規則構造（ラメラ構造）を有すると考えられた。よって、グリッド剥離法により、皮膚上の製剤が採取されていることが確認された。さらに、グリッドをメッシュから単孔 (30×100µm) にすることで、皮膚に対する接着面積を増し、角質層と塗布膜の同時採取の確率を高める検討を行った。Cryo-FIB-SEM を用いて、前述の手順で皮膚から剥離した単孔グリッドの断面作製、および観察を行った結果、角質層上に塗布膜が存在している状態が観察され、製剤の特徴的な構造が保存されていることが確認された。以上の結果から、本手法により初めてヒト皮膚上の塗布膜と角質層を同時に採取し、ありのままに近い状態で微細構造の解析が可能となった。

第30回学術講演会 実行委員会事務局

〒565-0871 吹田市山田丘2-1
大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 桑畑研究室内
Tel : 06(6879)7372 ; Fax : 06(6879)7373
電子メールアドレス : 30gakujutu@emtech.jp
医学生物学電子顕微鏡技術学会 第30回学術講演会事務局

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/>

実行委員会

会 長	桑畑 進	(大阪大学大学院工学研究科)
副 会 長	及川 理	(名古屋第二赤十字病院)
実行委員長	津田 哲哉	(大阪大学大学院工学研究科)
実行委員 (五十音順)		
	安藤 正史	(近畿大学農学部水産学科)
	池田 健一	(神戸大学大学院農学研究科)
	石垣 靖人	(金沢医科大学総合医学研究所) 庶務
	井淵 康史	(大日本住友製薬前臨床研究所安全性第2G病理)
	川上 洋司	(大阪市立大学大学院工学研究科機械物理系専攻)
	中澤 英子	((株)日立ハイテクノロジーズ 科学・医用システム事業統括本部)
	野口 教彦	(大阪警察病院病理部)
	畠中 芳郎	(大阪市立工業研究所)
	堀内 喜高	(近畿大学ライフサイエンス研究所電顕室)
	前野健一郎	(大阪赤十字病院病理部)
	三浦 治郎	(大阪大学歯学部付属病院口腔総合診療部)
	望月 衛子	(大阪大学大学院工学研究科) 会計責任者
	森藤 哲史	(神戸大学医学部附属病院)

主 催 : 医学生物学電子顕微鏡技術学会

共 催 : 国立大学法人 大阪大学

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27回電子顕微鏡技術研修会「夏の学校」 in 横浜 開催のご案内

今回は、神奈川県横浜市金沢八景にて開催致します。

本学会は、電子顕微鏡の技術を広く普及する目的で、学生から研究者、医療従事者、基礎研究に携わる方々を対象とした電子顕微鏡技術のコツとノウハウをマスターする研修会を夏季休暇期間に2泊3日を実施しております。

今回の募集コースは、例年の基礎TEMコース、応用TEMコース「免疫電顕」に加え、SEMコースを設けました。講義と実技のバランスを重視し、経験豊富な講師陣が柔軟に対応致します。

初心者の方々には電顕づくめの2.5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。夏季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。奮ってご参加下さい。

開催日：平成26年8月28日（木）～30日（土）

会場：横浜市立大学医学部校舎 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。

実行委員会事務局：実行委員長 跡部 好敏

〒36-0004 横浜市金沢区福浦 3-9 E-mail: 27natsu@emtech.jp TEL: 045-787-2571

詳細は、<http://www.emtech.jp/event/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年度は、残念ながら1回延期となりましたが、平成26年度は例年の通り、11月下旬の土曜日を計画しております。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。

実行委員長 海野 和俊（帝京大学溝の口病院）

詳細は、<http://www.emtech.jp/event/index.html> をご覧下さい。

◇第31回学術講演会および総会のご案内

平成27年度は、名古屋市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：及川 理（名古屋市立大学医学部第三内科）

詳細は、逐次学会ホームページ <http://www.emtech.jp/event/index.html> 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、本学会誌へ投稿下さい。総説、原著、短報など分類も様々です。投稿件数の多い方は、学会賞の候補となります。是非、寄稿下さい。

事務局・庶務より：会員の皆様の登録情報（所属名称、住所、氏名、転職等）が変更となった場合は、速やかに会員登録調査専用アドレス touroku.johou@emtech.jp または、学会事務局専用アドレス office@emtech.jp へご連絡下さい。

支援企業一覧（五十音順）

商業展示協力

エルミネット株式会社
株式会社 協和
株式会社 ケー・エー・シー
株式会社 真空デバイス
日新EM株式会社
日本電子株式会社
株式会社 日立ハイテクノロジー

広告掲載協力

株式会社 アズバイオ
エルミネット株式会社
大阪薬研株式会社
株式会社 ケー・エー・シー
有限会社 宏洋
三進金属工業株式会社
株式会社 サンマグ
株式会社 真空デバイス
大研科学産業株式会社
株式会社 東海電子顕微鏡解析
日新EM株式会社
日本エフイー・アイ株式会社
日本電子株式会社
株式会社 日立ハイテクノロジー
八洲薬品株式会社
株式会社 安田商店
ライカ マイクロシステムズ株式会社
和田精密歯研株式会社

賛助協力

イーエムジャパン株式会社
株式会社 サンマグ
株式会社 セプトサピエ
株式会社 東京技研

第30回学術講演会を開催するにあたり、ご支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げますとともに、益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。

第30回学術講演会 実行委員会一同

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第30回学術講演会および総会 抄録集
平成26年5月16日 印刷
平成26年5月23日 発行

発 行 者

〒565-0871
大阪府吹田市山田丘2-1
大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻
応用電気化学領域内
医学生物学電子顕微鏡技術学会
第30回学術講演会 実行委員会
会長 桑畑 進
電話番号 06-6879-7372

編集責任者

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第30回学術講演会 実行委員会
津田 哲哉
電話番号 06-6879-7374

印 刷 所

〒563-0032
大阪府池田市石橋3丁目3-1
ドラゴン印刷
電話番号 072-762-7169