

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第37回学術講演会および総会

電子顕微鏡技術
～次のステージへ～

予稿集



2021年10月30日(土)、31日(日)

Web開催



TECHNOLOGY FOR MEDICINE AND BIOLOGY
JAPANESE SOCIETY OF ELECTRON MICROSCOPY

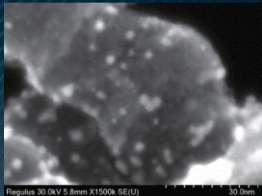
Regulus Series

Advanced Ultra-High Resolution FE-SEM

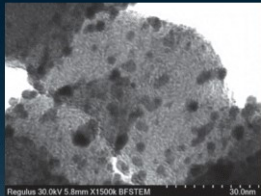
- UHR imaging with a cold-FE gun and an improved electron optical system
- High-contrast imaging with multiple signal-detection systems
- Easy to acquire high-resolution images with a new GUI

■ UHR Imaging

Enhanced magnification up to 2000k X for nano-material investigation



SE Image



BF-STEM Image

Specimen: Catalyst Vacc: 30 kV

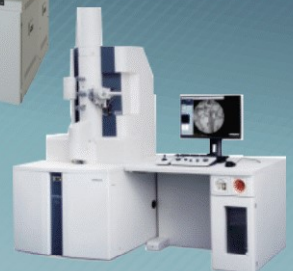
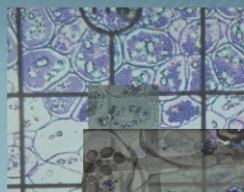


Correlative Light and Electron Microscopy

MirrorCLEM on FE-SEM and TEM

- SEM / TEM linkage
with any manufacturer/model of LM.
- Real time overlay LM image to EM GUI
with adjustable transparency,
and vise versa.
- Various Signals and Resolution.

Images and specimen courtesy of
Dr. Kiminori Toyooka from RIKEN CSRS, Japan
Specimen: Toluidine Blue O stained mung bean root



Hitachi High-Tech Corporation

Global/Asia

+81 3 3504 7111 customercenter.ev@hitachi-hightech.com
www.hitachi-hightech.com/global/science/

Europe

+49 2151 643 50 eminfo@hht-eu.com
www.hitachi-hightech.com/eu/

Americas

+1 800 548 9001 emdwebsite@hitachi-hita.com
www.hitachi-hightech.com/us/

目 次

I.	ご挨拶	1
II.	第 37 回学術講演会および総会 日程表	2
III.	参加者への皆様へのご案内	3
IV.	発表者ならびに座長への皆様のご案内	5
V.	各種会議のご案内	7
VI.	学術講演会プログラム	8
VII.	講演要旨	
	特別講演	1 3
	公開講座	2 0
	ワークショップ I WS-1	2 1
	ワークショップ II WS-2	2 4
	学会賞「技術部門」 受賞講演	3 1
	一般演題（口演発表）	3 2
	一般演題（学術ポスター発表）	3 6
	実行委員会事務局案内	4 0
	実行委員一覧	4 0
	支援企業一覧	4 1

I. 第37回学術講演会開催にあたり

謹啓

この度、医学生物学電子顕微鏡技術学会第37回学術講演会及び総会を開催する運びとなりました。当初、2020年5月に予定しておりました金沢医科大学（石川県）を会場としての開催の予定でしたが、新型コロナウイルス感染症の影響により、現地開催は行わず、オンラインによる開催となります。

本学会は、医学生物学における電子顕微鏡技術の向上と維持発展に寄与することを目的に、昭和63年に「医学・生物学電子顕微鏡技術研究会」として正式発足後、平成13年より「医学生物学電子顕微鏡技術学会」と改名しました。そして、平成17年に有限責任中間法人「医学生物学電子顕微鏡技術学会」として登録し、平成20年に一般社団法人「医学生物学電子顕微鏡技術学会」に移行し、現在に至っております。この間、本学会は学術集会や実技講習会を開催し、電子顕微鏡技術を通して広範な学問領域の研究者の交流の場として発展してきました。

第37回では従来の基本技術の継承に加え、近年進展が目覚ましい再生医療での応用などに重点を置いた「電子顕微鏡技術 ～次のステージへ～」をメインテーマに、多分野の人々が参加できる学術講演会を目指し、稔りある成果をあげるために鋭意準備を進めております。

本学会の運営につきましては、出来るだけ簡素を旨といたす所存でございます。また、その経費は参加者からの会費を主体に考えておりますが、必要経費を賄うには十分ではございません。本学術講演のプログラムを充実させ、高い成果を得るためには、各方面からのご支援をお願いせざるを得ない状況でございます。

つきましては、諸費ご多端の折、誠に恐縮ではございますが、本学術講演会の趣旨をお汲み取りいただき、格段のご高配を賜りたくご協力の程、宜しくお願い申し上げます。

謹白

2021年6月吉日

医学生物学電子顕微鏡技術学会 第37回学術講演会および総会 実行委員会
会 長 石垣 靖人（金沢医科大学総合医学研究所）
実行委員長 古賀 博則（石川県立大学生物資源環境学部）
副 会 長 永山 元彦（朝日大学歯学部）
実行委員 一同

II. 第37回学術講演会および総会 日程表

テーマ：電子顕微鏡技術 ～次のステージへ～

会 期：2021年10月30日(土)～31日(日)

会 場：完全オンライン方式（ZoomおよびSpatialChatを使用）

	1日目 10月30日(土)	2日目 10月31日(日)
	8:50 開会式	
9:00	9:00 80分 一般演題 口演発表	9:00 90分 ワークショップ WS-II 「腎生検Up To Date」 山田壮亮先生 高木孝士先生 上杉憲子先生
10:00		
	10:30 90分 ワークショップ WS-I 「動植物と他生物との相 互作用の世界」 片山高嶺先生 馬場保徳先生 古賀博則先生	10:30 閉会式
11:00		11:00 60分 市民公開講座 「新型コロナウイルスの 電子顕微鏡観察」 吉田勲先生
12:00	12:00 社員総会 (評議員会)	
		以下はシンポジウムの日程
13:00	13:00 50分 特別講演 金沢医科大学 石垣靖人先生 「再生医療における電顕観 察の活用」	13:00 開会の辞
		13:10 70分 特別講演 「走査電子顕微鏡法 -画力に魅了されて-」 甲賀大輔先生
14:00	14:00 45分 企業セミナー	
		14:30 45分 シンポジウム I 電子顕微鏡の臨床応用 「今臨床医が求める電子顕微鏡 技術と像の解説」 島田達生先生
15:00	14:45 60分 学会賞受賞講演 研究プロジェクト 助成報告	15:15 45分 シンポジウム II 植物病理「植物-微生物間 相互作用解析における 電子顕微鏡技術」 池田健一先生
16:00	16:00 90分 一般演題 ポスター発表 (16時～16時30分 奇数番号 16時30分～17時 偶数番号 以降はフリータイムとします)	16:10 閉会の辞
17:30		

III. 参加者の皆様へのご案内

本学術講演会のイベントは全てオンライン方式で開催します。以下の各配信方法をご参照いただき、ご参加への準備をお願いいたします。

1. 口演発表、各種講演における案内

1) Zoom のご用意

各種口演発表・イベントは「Zoom」にて配信を行います。通信上のトラブル忌避のため最新版の Zoom アプリをダウンロードしてご視聴されることを推奨いたします。詳細は Zoom のウェブサイトをご覧ください。

また長時間による動画での接続上、インターネットの接続環境は特にご注意ください。安定的に接続できる無線接続か、有線接続を推奨します。

2) オンライン会場入室

オンライン会場へは以下の Zoom 会場に入室してください。Zoom 会場 URL を入力するか、Zoom アプリを開きミーティング ID を入力し、入室します。入室の際、パスワードの入力が求められますので、以下のパスワードを入力してください。

Zoom 会場 URL : <https://us02web.zoom.us/j/82067398862>

ミーティング ID : 820 6739 8862

パスワード : 37thKNZW

※ Zoom 会場は開催両日の朝 8 時 30 分から受付をいたします。

また、Zoom 内での表示される名前は「フルネーム（所属）（例：武井史郎（中部大）」をお願いします。オンライン会場では、Zoom の表示名が名札の代わりとなります。

●使用方法を説明した PDF ファイル

こちらは「参加者専用サイト」内で公開しております。

※「参加者専用サイト」への入り方はメールでご案内しておりますが、ご不明な点等ございましたら大会事務局 kanazawa2021@37th-emtech.com までお問い合わせください。

3) オンライン会場での注意事項

各演者の発表時は、マイクおよびカメラをオフにしてください。演者以外のマイクがオンによる雑音やハウリング、カメラのオンによる通信負荷の増加を避けるため、ご協力をお願いいたします。

また、質疑応答などで発言を希望される際には、各セッションの座長の指示に従い意思表示をしてください（口頭、チャット、挙手機能のいずれかです）。座長に指名されましたら、マイクとカメラをオンにし、発言をして下さい。発言を終えた後は再びマイクとカメラをオフにしてください。

2. ポスター発表における案内

1) SpatialChat の利用

ポスター発表はバーチャルな空間にアバターとなって入室していただきます。この空間ではアバターを移動させることでポスターを閲覧し発表者と直接討論することができます。

2) ポスター会場への入室

ポスター会場への入室は以下の SpatialChat の URL にアクセスしてください。

ポスター会場 URL <https://spatial.chat/s/Poster-EMTEC-2021-37>

名前と所属を入力していただき、カメラとマイクの接続状況を確認すれば会場へ入室できます（カメラとマイクはオンの状態をお願いします）。最初に入室する場所は前室となっておりポスターは掲示されておりません。右側に表示されているポスター番号の表示された部屋へと移動してください。

SpatialChat の使用方法の詳細については、以下のリンク先にてご案内しています。

●動画での紹介

<https://www.youtube.com/watch?v=X09oKSVtQ0k>

●使用方法を説明した PDF ファイル

「参加者専用サイト」内で「説明資料 pdf ファイル（参加者用）」を公開しております。

※「参加者専用サイト」への入り方はメールでご案内しておりますが、ご不明な点等ございましたら大会事務局 kanazawa2021@37th-emtech.com までお問い合わせください。

※ ポスター会場での討論は 16 時から開始し、16 時から 16 時 30 分まで奇数番号の方、16 時 30 分から 17 時まで偶数番号の方が説明していただき、以降は自由討論とします。

3) ポスター発表での注意事項

SpatialChat ではアバターが近づくとお互いの音声が大きくなる仕組みとなっています。発表者と討論を行う際には、発表者の近くに自身のアバターを近づけてから声をかけるようにしてください。また、会場にいる参加者同士でも会話を行うことができます。ポスターと関係のない会話を行う際には討論の妨げとなりますので、会場中央のニュートラルゾーンへ移動してから会話を行ってください。

IV. 発表者ならびに座長の皆様へのご案内

1. 発表形式

(1) 口演発表

- ・ 一般演題の発表時間は、10 分（口演 7 分、討論 3 分）です。
※ 他の講演につきましては、それぞれの担当者から連絡がなされます。
- ・ 口演は Zoom を用いて行います。各発表時間に間に合いますよう、あらかじめ入室してください。また、すみやかに発表できるよう、パソコン内で発表用のファイル（パワーポイント等）を開いておいてください。
- ・ 口演時は座長より紹介されました後、Zoom の「画面共有」を用いて発表画面を表示するとともに、カメラとマイクもオンにし、発表を開始してください。
- ・ 口演を終えたのち、座長の指示で質疑応答を行います。カメラとマイクはオンにしたまま、質疑応答に臨んで下さい。
- ・ 質疑応答を終えたら、Zoom の「画面共有」、カメラ、マイクをオフにしてください。

(2) ポスター発表

- ・ ポスターの作成要領；これまでに皆さんが学会でポスター発表されていた形式と同様のものをご用意ください。パワーポイントで一枚刷り用のもの（縦長サイズの方が枠に収まりやすいです）、あるいは複数ページのものでも構いません。用意していただいたファイルを「別名で保存」と選択し、ファイル名を記入できる場所の下側にプルタブでファイルの種類を選択するメニューがあります。そちらの「JPEG ファイル交換形式」を選択して保存してください（複数ページの方は「全て変換」とするとまとめて変換されます）。
- ・ ポスターの貼り付け；JPEG ファイルが完成しましたら、学会前日までにポスター受付担当の池田（ikeken@phoenix.kobe-u.ac.jp）までお送りください。会場への貼り付けが完了しましたら、メールを送信しますのでご確認いただき、修正が必要でしたら改めてファイルを送信してください。ご自身で貼り付けを試みられる場合には、「参加者専用サイト」内で公開しております「説明資料 pdf ファイル（発表者用）」に従って行って下さい。（ただし、ポスターを貼り付けた後に SpatialChat から退室されると管理者以外は削除できなくなりますので、このような場合にはポスター受付担当の池田までご連絡ください。）。

●動画での紹介

<https://www.youtube.com/watch?v=X09oKSVtQ0k>

●使用方法を説明した PDF ファイル

「参加者専用サイト」内で「説明資料 pdf ファイル（発表者用）」を公開しております。

※「参加者専用サイト」への入り方はメールでご案内しておりますが、ご不明な点等ございましたら大会事務局 kanazawa2021@37th-emtech.com までお問い合わせください。

- ・ポスター会場への入室；ポスター会場への入室は以下の SpatialChat の URL にアクセスしてください。

ポスター会場 URL <https://spatial.chat/s/Poster-EMTEC-2021-37>

名前と所属を入力していただき、カメラとマイクの接続状況を確認すると会場へ入室できます（カメラとマイクはオンの状態をお願いします）。最初に入室する場所は前室となっておりポスターは掲示されておりません。右側に表示されているポスター番号の表示された部屋へと移動してください。

- ・ポスター討論；ポスター会場での討論は 16 時から開始し、16 時から 16 時 30 分まで奇数番号の方、16 時 30 分から 17 時まで偶数番号の方が説明していただき、以降は自由討論とします。割り当て時間の間は、それぞれのポスター枠の発表者待機場所付近にて説明を行ってください。

説明を行う際に、ポスターのどの部分について示しているのかうまく伝わらない場合があります。発表者の皆様に事前に添付送信した「矢印ファイル」を当日に各自でポスター枠付近に貼り付けていただき、図示する際に使用してください（貼り付け方法はポスター（「参加者専用サイト」内に記載）同じですので、そちらの説明を参照してください）。

2. 座長の皆様へ

- ・各担当時間に間に合いますよう、あらかじめ Zoom の入室をしてください。
- ・担当時間になりましたら、カメラとマイクをオンにし、担当の講演を開始してください。
- ・演者による口演時はカメラとマイクをオフにしてください。
- ・口演後の質疑応答はカメラとマイクはオンにして開始してください。
- ・質問は口頭、チャット、挙手のいずれかの方法で受け付けるようにしてください。方法はいずれでも構いませんが、できるだけ受け付ける方法を口頭でお伝えください。
- ・質問者を指名されました際、質問者に「所属と名前」を名乗ってもらうようお伝えし、質問に進んでください。
- ・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、座著推薦の論文としてご推挙くださり、その旨、会長または編集委員会まで事務局へご通知ください。

※ 発表者ならびに座長の皆様には、特にインターネット接続環境にご注意ください。通信上のトラブルなく発表していただけるよう、安定的に接続できるインターネット環境のご準備をお願いします。

V. 会議のご案内

第 17 回社員総会（第 34 回評議員会）のご案内（一般会員の方も参加いただけます。）

日 時：2021 年 10 月 30(土) 12:00 ～ 13:00

会 場：Zoom によるリモート開催（10 分前、会議室 Open）

会議室 URL：① 評議員各位には、案内送付の際に、URL をご案内します。

② 評議員以外の会員の皆様でご出席される方は、
学会事務局 office8@emtech.jp へご連絡下さい。

VI. 学術講演会プログラム

特別講演： 10月30日（土）13時00分～14時00分

座長 武井 史郎（中部大学 応用生物学部 環境生物科学科）

「再生医療における電顕観察の活用」

石垣 靖人（金沢医科大学総合医学研究所）

公開講座： 10月31日（日）11時00分～12時00分

座長 石垣 靖人（金沢医科大学総合医学研究所）

「新型コロナウイルスの電子顕微鏡観察」

吉田 勲（東京都健康安全研究センター）

ワークショップ WS-I

「微生物と動植物との相互作用の世界」

10月30日（土）10時30分～12時00分

オーガナイザー 古賀 博則（石川県立大学生物資源環境学部）

座長 霜村 典宏（鳥取大学農学部）

WS-I-1 「母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成機構とその意義」

片山 高嶺（京都大学大学院生命科学研究科）

WS-I-2 「エネルギーをつくり、植物病原菌の生育を抑制する微生物コンソーシア」

馬場 保徳（石川県立大学）

WS-I-3 「植物寄生性線虫と植物との相互作用の世界を電子顕微鏡で見る」

古賀 博則（石川県立大学生物資源環境学部）

ワークショップ WS-II

「腎生検Up To Date」

10月31日（日）9時00分～10時30分

オーガナイザー 高木 孝士（昭和大学電子顕微鏡室）

座長 及川 理（名古屋市立大学大学院医学研究科）

WS-II-1 「腎病理の基礎～実験病理医だからこそのお話～」

○山田 壮亮¹⁾、名和田 彩²⁾

金沢医科大学臨床病理学¹⁾、産業医科大学第一病理学²⁾

WS-II-2 「誰でもできる透過電子顕微鏡による腎生検の撮影方法」

○高木 孝士¹⁾、坂上 万里²⁾

昭和大学電子顕微鏡室¹⁾、日立ハイテク²⁾

WS-II-3 「病理診断確定に役立った電子顕微鏡所見」

上杉 憲子（福岡大学医学部病理）

企業セミナー

10月31日(日) 14時00分～14時45分

座長 田村 友樹(東京医科歯科大学病院病理部)

CS-1 「低真空SEMによる顕微鏡用生物切片観察への応用
～組織観察と発現の可視化～」

上村 健(株式会社日立ハイテク評価解析システム営業本部)

CS-2 「ウルトラマイクローム用ダイヤモンドナイフSYMKnifeの紹介」

永田 恭平(株式会社シンテック)

2021年度学会賞ならびに2019年度学会賞受賞講演・2019年度研究プロジェクト採択結果報告

10月30日(土) 14時45分～15時45分

2021年度学会賞結果報告 表彰者選考委員長 中澤 英子(日立ハイテク)

2019年度学会賞「技術部門」 受賞講演 桑畑 進(大阪大学大学院工学研究科)

座長 表彰者選考委員長 中澤 英子(日立ハイテク)

2019年度研究プロジェクト結果報告 採択者 高木 孝士(昭和大学電子顕微鏡室)

座長 技術普及委員長 石垣 靖人(金沢医科大学総合医学研究所)

一般演題 口演発表

10月30日(土) 9時00分～10時20分

座長 高木 孝士(昭和大学電子顕微鏡室)

永山 元彦(朝日大学歯学部口腔病理学)

0-1 清拭素材が皮膚に及ぼす物理的刺激の影響

○樋口 幸¹⁾、森 楓¹⁾、安田 愛子²⁾、島田 達生²⁾

大分県立看護科学大学¹⁾、大分大学²⁾

0-2 抗ミトコンドリア抗体陽性心筋炎のミトコンドリア像

○石井 悠海¹⁾、島田 達生²⁾、高橋 正起¹⁾、安田 愛子³⁾、川里 浩明³⁾、
高橋 尚彦¹⁾

大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断学講座¹⁾、大分医学技術専門学校²⁾、大分大学医学部実験実習機器部門³⁾

0-3 高血糖、および血糖変動がマウスのGanglionic plexusの微細構造変化に及ぼす影響

○高橋 正起¹⁾、島田 達生²⁾、石井 悠海¹⁾、安田 愛子³⁾、川里 浩明³⁾、
高橋 尚彦¹⁾

大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断学講座¹⁾、大分医学技術専門学校²⁾、大分大学医学部実験実習機器部門³⁾

- 0-4 ヒト股関節における寛骨臼関節唇の微細構築
○野上 龍太郎¹⁾、加来 信広²⁾、津村 弘²⁾、安田 愛子³⁾、矢野 信次³⁾、
島田 達生⁴⁾
大分大学基礎看護学講座¹⁾、整形外科講座²⁾、実験実習機器部門³⁾、
大分大学名誉教授⁴⁾
- 0-5 ヒラタケ子実体におけるオートファゴソームの内容物の多様性
○尾崎 佑磨¹⁾、會見 忠則²⁾、霜村 典宏²⁾
鳥取大学大学院連合農学研究科¹⁾、鳥取大学農学部²⁾
- 0-6 ヒト消化管アウエルバッハ神経叢観察用試料作製のための工夫について
○田北 薫子¹⁾、柴田 智隆¹⁾、小川 雄大¹⁾、田北 沙和²⁾、安田 愛子¹⁾、
矢野 信次¹⁾、猪股 雅史¹⁾、島田 達生¹⁾
大分大学医学部¹⁾、岩手医科大学医学部²⁾
- 0-7 ヒラタケ子実体細胞のTEM観察における電子染色効果の評価
○山口 共生、會見 忠則、霜村 典宏
鳥取大学大学院持続性社会創生科学研究科
- 0-8 電顕検索が心筋生検組織評価に役立つ電子染色法の紹介と検索例
○根本 典子¹⁾、石井 俊介²⁾、阪上 洋行^{1, 3)}
北里大学医学部バイオイメージング研究センター¹⁾、同循環器内科²⁾、
同解剖学³⁾

一般演題 ポスター発表

奇数番号 10月30日(土) 16時00分 ~ 16時30分
偶数番号 10月30日(土) 16時30分 ~ 17時00分
フリータイム 10月30日(土) 17時00分 ~ 17時30分
座長 池田 健一 (神戸大学大学院農学研究科)
座長 洲崎 敏伸 (神戸大学大学院理学研究科)

- P-1 3D-プリンタの電子顕微鏡技術への利用
○堀田 康明
朝日大学歯学部口腔科学共同研究所
- P-2 微粒子モデル噴霧後マスクの走査電子顕微鏡(SEM)観察
○宮本 侑果¹⁾、堀田 康明²⁾、松下 貴裕³⁾、松岡 太相¹⁾、中尾 寿奈¹⁾、
江原 道子¹⁾、落合 隆永¹⁾、永山 元彦¹⁾、住友 伸一郎³⁾、村松 泰徳³⁾
朝日大学歯学部口腔病理学分野¹⁾、朝日大学歯学部口腔科学共同研究所²⁾、
朝日大学歯学部顎顔面外科学分野³⁾

- P-3 Shear bond strength of orthodontics tubes cemented with different adhesive system.
○Andira Mar-Ramirez¹⁾, Rogelio J. Scougall-Vilchis¹⁾, Elias N. Salmeron-Valdes¹⁾, Laura E. Rodriguez-Vilchis¹⁾, Motohiko Nagayama²⁾ and Yasuaki Hotta²⁾
Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Odontologia¹⁾, Asahi University School of Dentistry²⁾
- P-4 白紋羽病菌におけるウイルス伝搬能を獲得した変異株の細胞壁の特性評価
○畑中 郁穂、坂口 耕太、中屋敷 均、池田 健一
神戸大学大学院農学研究科
- P-5 ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* の神経組織を覆う髄膜構造の微細形態学的解析
○六車 香織、武井 史郎
中部大学応用生物学部環境生物科学科
- P-6 ミドリフサアンコウ *Chaunax abei* の新鮮な標本を用いた視覚系の形態学的解析
○武井 史郎、六車 香織、宗宮 弘明
中部大学応用生物学部環境生物科学科
- P-7 光-電子相関顕微鏡システムを用いた植物組織の TEM-CLEM 観察
○和山 真里奈¹⁾、川元 寛章¹⁾、許斐 麻美¹⁾、豊岡 公德²⁾、株式会社 日立ハイテク¹⁾、理化学研究所 環境資源科学研究センター²⁾
- P-8 植物透明化用試薬によって透明化したダイズシストセンチュウ感染ダイズ根の微細構造の検討
○古賀 博則
石川県立大学

VII. 講演要旨

特別講演

再生医療における顕微鏡の活用

金沢医科大学病院再生医療センター
石垣 靖人

はじめに

我が国における再生医療は、各地の研究者、臨床家の地道な努力を礎として、iPS 細胞技術のノーベル賞受賞や法令整備により急速に発展し臨床への応用が続々と進められている。電子顕微鏡を活用した培養細胞や人工組織の観察や品質チェックについても多数の先人の努力が報告されている。その中で、金沢医科大学においても大学病院に再生医療センターを設置して、再生医療の推進に力を入れてきた。臨床面では、同センター内に Cell Processing Center (CPC) を設置して患者さんへ投与できる安全な培養細胞の供給を可能にしてきた。また、研究面においても文部科学省事業のご支援を受けて様々な治療方法の開発と実用化に取り組んでいる。

特に脂肪由来幹細胞 (ADSC) は、細胞治療に用いられる間葉系幹細胞のなかでも近年広く研究が行われており様々な培養技術や培養法が開発されていることから重点的に研究を進めている。その中でも細胞シートは任意の大きさに幹部へ広く貼り付けるという投与方法が可能であり、様々な治療への有効性が期待されている。温度応答性培養皿は細胞シートを簡単に回収できるツールで、我々は DIC 社の Cepallet® を用いて ADSC の細胞シートを作製することに初めて成功した。一方で温度応答性培養皿で作製された細胞シートでは、剥離の工程で作製された細胞シートに物理的なダメージがあるのではないかと懸念があった。しかし、これまでに剥離面を電子顕微鏡で観察し損傷の有無などを評価し検討した報告はほとんどなかった。そこで、我々はイオン液体法を用いて迅速に試料を作製し、走査型電子顕微鏡での迅速な観察を可能とすることで細胞シートの観察に成功したので、ほかの実験成果と合わせて報告する。

1) 緒言

近年、様々な怪我や病気の治療に、体外から細胞を投与するという細胞治療の注目が集まっている。これまでに臨床応用されてきた細胞治療は多岐にわたり、整形外科領域では靱帯損傷に対する多血小板血漿 (PRP) 療法に挙げられるような変形性関節症や軟骨損傷の治療で注目されている^{1) 2) 3)}。このような医療は万能細胞である胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の研究が進むと共に注目を集め、今後は iPS 細胞由来の心筋細胞や神経細胞を用いて心筋梗塞、脊髄損傷、アルツハイマー病などの病気の治療に役立てることが期待されている^{4) 5) 6)}。

しかし、胚を壊してつくられる ES 細胞の使用に関する倫理的観点における議論や、体細胞に特定の遺伝子を組み込むことで作られる iPS 細胞の安全性とリスクをどこまで許容するかといった課題は大きな問題点として残っている。一方で間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) などの体性幹細胞はこれらの倫理的問題点や、発癌性のリスクを避けて用いることができるため、再生医療の現場において有用性の高い幹細胞であると言える。特に MSC は骨髄や脂肪組織に加え、筋組織、臍帯組織、歯髄など様々な体組織にも存在しており、組織幹細胞の中で近年広く研究が行われている^{7) 8)}。

また、MSC は骨や軟骨に加え外胚葉や内胚葉由来の組織へも分化する特性が報告されており、現在は骨髄 MSC 移植が多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経麻痺などに対して治療効果があることも報告されている^{9) 10)}。特に MSC のなかでも脂肪由来幹細胞 (Adipose-

Derived Stem Cells: ADSC)は入手が容易であり幹細胞の割合が高いため魅力的な選択である¹¹⁾。

これまで臨床応用されてきた細胞治療法では、プラスチックの培養ディッシュなどで単層培養された細胞を酵素的に剥離してきて組織内に直接投与することが一般的となっている。これらの酵素処理による剥離時には必ず細胞にダメージがある上に回収された単個細胞は環境の変化などに対して必ずしも耐性を持たないために理想的な投与条件とは言いがたい¹²⁾¹³⁾。上記の問題を解決すべく、従来とは異なる培養法や培養技術が注目されている。その中でも、細胞をシート状に作製することで、貼り付ける投与方法が注目されており、骨折や褥瘡、皮膚潰瘍などの治療への有効性が期待でき、臨床への応用も活発に行われている¹⁴⁾¹⁵⁾。

この細胞シートを作成する際に用いられるツールに、温度応答性培養皿という細胞培養容器が普及しており、臨床応用に供されている¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。これは培養表面に温度応答性ポリマーが固定化されており、温度制御することで表面の性質が疎水性から親水性に変化することで、細胞外マトリックスを保持したまま細胞をシート状に剥がすことができるというものである²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾。この方法ならば、剥離操作にはトリプシンなどの酵素を使用せず、またスクレーパーで掻きとるといった操作も不要であるため、細胞を損傷なく簡便に高収率で細胞シートを回収可能である。これまでに多くの治療用細胞シートが作製されてきたが、剥離によるダメージを直接的に検討した報告はほとんどない。しかし、細胞シートの損傷がないことを確認できれば、治療の品質を担保するために非常に有用であることが期待される。

このような臨床応用を前提とした細胞シート表面の検査のためには、剥離してから治療に使用する前に、細胞シートの表面を迅速に観察し確認できる手法が有用である。しかし、光が透過することで可視化する光学顕微鏡で細胞シート表面の構造を観察することは困難である。微細な表面構造を観察するには走査型電子顕微鏡が有用であるが、観察試料の作製法には、固定、導電処理、乾燥、コーティングなどの工程に時間と手間がかかる²⁶⁾。つまり細胞シートを治療に用いる場合に、従来法での電子顕微鏡用の観察試料の完成を待っていると時間がかかってしまい、迅速さが求められる臨床応用には不向きである。このような場合には、イオン液体をコーティング剤とした試料作製が有効である。近年試験的に活用されているイオン液体法は、固定からそのままコーティングに進むことができるために、非常に簡便で迅速な試料作製が可能である²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾。

今回我々は、美容外科的に採取した脂肪から ADSC を分離して培養した。さらに培養して細胞表面の各マーカーの発現と分化能を確認した。その上でイオン液体法を用いた脂肪幹細胞シートの作製と観察を試みた。DIC 株式会社の新しいツールである温度応答性培養皿 Cepallet®を用いて ADSC 細胞シート作成とその評価を行った³⁰⁾³¹⁾。温度応答性培養皿で作成した細胞シートの剥離表面の損傷程度を走査型電子顕微鏡によるイオン液体法で観察評価した報告はこれまでにない。我々は作成した ADSC の細胞シートをトリパンブルー染色で細胞の状態を評価することに加えて、剥離表面を上記のイオン液体法による走査型電子顕微鏡で観察し、その形態学的な評価を行った。

2) 材料および方法

ADSC とその培養

本研究では、金沢医科大学特定認定再生医療等委員会、遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得てインフォームドコンセントを行った患者(35 歳男性, 身長 173 cm, 体重 125 kg)の側腹部から美容外科的に採取した皮下の脂肪組織について、脂肪組織幹細胞分離シート(Bio Future Technologies)を用いて ADSC を分離したものを使用した。これに対して Lonza Group AG 社の脂肪由来幹細胞を Control として使用した。

使用機材は細胞培養ディッシュ (Techno Plastic Products AG) を用いて培養を行い解凍後 3 日程度経過した段階で富士フイルム和光純薬株式会社 (Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.) の 0.05w/v% トリプシン-0.53 mmol/l EDTA・4Na 溶液を用いて継代操作を行った。その後さらに培養を行い、ディッシュ面積に対して 8 割程度の細胞数まで増殖した段階で細胞を剥がし実験に使用した。

本研究で使用する ADSC の Control に対する細胞表面マーカーの発現の割合変化を比較した。Becton Dickinson and Company の StemFlow Human MSC analysis kit を使用した。Accutase detachment solution (Becton Dickinson) で剥離後に PBS で懸濁し、キットのプロトコルに従って FACS Calibur (Becton Dickinson) で解析した。

また、ADSC の分化能を確認するために脂肪分化培地、骨芽分化培地、軟骨分化培地で 14 日培養した。脂肪分化培地は hMSC - BulletKit™ hMSC - Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium BulletKit™ (PT3004, Lonza) を使用した。骨芽分化培地は Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (C-28013, Takara Bio Inc) を使用し、骨芽分化への確認は Alizarin S (011-01192, Wako Pure Chemical) により染色を行った。軟骨分化培地は Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium (C-28012, Takara Bio) を使用し、軟骨分化への確認のためにアルシンプール染色を行なった。

Cepallete®によるシート形成と剥離

Cepallete® (DIC Corp.) には多様な細胞の培養に対応するため、異なる表面処理とポリマー加工を行った S-Type と W-Type が存在する。S-type は幹細胞向けであり、W-type は汎用細胞向けである。細胞密度が 6.0×10^5 cells となるよう培地と細胞懸濁液を混合し全量 10 mL として、Cepallete® の S-type, W-type それぞれで 6 日間培養を行い、細胞シートを形成した。その後に、室温で 20 分静置したのち 4 度で 20 分静置しシートの剥離を行い、軽いピペティングで細胞シートを回収した。

トリパンブルー染色法

細胞シートを浮遊させた後に、0.4% トリパンブルー試薬 (Thermo Fisher) を等量加えて速やかに顕微鏡下で観察を行った。

走査型電子顕微鏡によるイオン液体コーティング細胞シートの表面解析

剥離後に 2.5% グルタルアルデヒドで固定された細胞シートは、日新 EM 株式会社カーボンテープ (Nissin EM Co., Ltd.) 上で SEM 用の試料台に接着した。イオン液体には HILEM IL-1000 (Hitachi HighTech, Ltd.) を選択した。イオン液体と純水の混合液を滴下し、1 分間放置した。その後、標本上の余分なイオン液体をキムワイプ (Nippon Paper Industry Co., Ltd.) ですばやく吸収させた。これらの手順によって、従来の SEM のサンプルを作成するために必要とされている導電性染色や、脱水、乾燥、金属コーティングといった工程を必要とせず短時間で作成できる。本研究では電子顕微鏡は S3400N (Hitachi HighTech) を使用し、真空モードは High を選択し、1Pa 以下の真空状態で観察を行った。また、焦点距離は 6 mm として、加速電圧は 10kV 程度に設定し適宜調整しながら SEM で観察された各サンプルについて様々な倍率の顕微鏡写真を記録した。

DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

細胞シートおよび通常培養細胞からの全 RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて行い、抽出した RNA は -80°C で保存した。抽出した全 RNA は、NanoDrop 2000 Photometer (Thermo Fisher) を用いて濃度を測定し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies,

Inc.) を用いて各サンプルの RNA Integrity Number (RIN) を測定した。本研究では、通常の単層培養細胞は細胞継代後 3 日目、細胞シートは Cepallet®での培養開始後 6 日目における遺伝子発現を Affymetrix Genechip Human Genome 2.0 ST Array (Thermo Fisher) により検出した。試薬は GeneChip® WT PLUS Reagent Kit、GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit を使用した。また、解析に使用した機器は GeneChip® Fluidics Station 450、GeneChip® Hybridization Oven 645、GeneChip® Scanner 3000 7G で、データ解析には Genespring14.9.1 (Agilent) と INGENUITY® Pathway Analysis (IPA, QIAGEN) を使用した。cDNA の合成には SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。cDNA の PCR には TaKaRa Ex Taq® (Takara Bio) を用いて行った。

3) 結果

分離した ADSC の細胞表面の各マーカーの発現と分化能を確認した。LONZA の ADSC と比較してマーカーの発現に遜色はみられず、それぞれの分化培地を用いて脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への分化能を確認できた。

続いて、新しい温度応答性培養皿ツールである DIC 社の Cepallet®を用いて ADSC の細胞シート作製を行った。播種細胞数は 6×10^5 cells/well で培養日数は 6 日間とした。Cepallet®の S-type と W-type それぞれで ADSC を培養し細胞シートを作製した。これらの観察に際して、室温から 4°C に 20 分間冷却し温度制御を行うことで細胞シートを剥離した。まれに剥離しにくい場合には、細胞シートの辺縁をチップにてなぞることで容易に剥離した。これらの剥離した細胞シートについて光学顕微鏡で観察し形態学的な評価した。まず、冷却によってシートが剥離していることが観察され、収縮することでめくれて皺になっているところは見られるものの、シート自体に穴があいたり破れていたりする所見は観察されなかった。また、剥がしたあとの剥離表面にも同様に皺がみられるがシートの損傷を疑う所見は指摘できなかった。

さらに、細胞シートの超微細表面構造を形態学的に観察するために走査型電子顕微鏡での観察を行った。S-type の細胞シートの上面の観察では、細胞で形成された立体的に凹凸の激しい形態の構造を観察することができた。また、倍率を上げていくと一つ一つの細胞を分別することが可能であり上に盛り上がった構造も観察された。一方、剥離された接着面を観察してみると、極めて平滑な構造が観察された。表面と違って細胞ひとつひとつの分別は困難であった。低い倍率から高い倍率まで観察を行ったが、細胞間の断裂や表面構造の破壊と見られるような像を観察することはできなかった。このため、少なくとも電子顕微鏡下での観察では、剥離してきた細胞シートに損傷はないものと判断できた。表面にみられたような立体的な構造は確認できず平坦な構造が観察されたが、剥離に伴う構造への損傷は認められなかった。同様の観察を W-type でも行ったところ、S-type と同じように表面では立体的な構造が観察されるが接着面には認めず、剥離された面は連続して平滑であり破れや穴などは認められず、少なくとも観察された範囲内ではシート構造表面に損傷を与えていないことが初めて明らかになった。

以上から、ADSC に関しては S-type と W-type それぞれ双方とも損傷なくシートを剥離することが可能であると考えられた。そこで、SEM 観察での結果をさらに確認するために、細胞シートに損傷を受けた死細胞には取り込まれるトリパンブルーの染色を行い上記の SEM における結果を追試してみた。S-type と W-type の細胞シート双方ともトリパンブルーでほとんど染色は認められなかった。S-type の細胞シートでは染色前のシートでめくれて皺になっている部分を含めて、トリパンブルー染色液を混和しても細胞シートの染色は認められなかった。これは温度制御によって細胞膜の損傷なくシートが剥離できており、接着面の細胞が生細胞であることを示す。また、チップなどでわざと損傷させた部位や、30 分

程度染色した場合には染色液自体の細胞毒性によってトリパンブルーが取り込まれて染色されている細胞像が観察できた。このため、Cepallet®を用いて作成された ADSC シートは、ほとんど細胞に対して破壊や細胞死を引き起こさないことが明らかとなった。

続いて、作成された細胞シートの特性を遺伝子レベルで明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて ADSC におけるシートを形成した細胞の遺伝子変動に関する比較を行った。シートと通常培養された ADSC より全 RNA を抽出し Affymetrix human Gene ST2.0 microarray で網羅的遺伝子発現解析を行った。DNA マイクロアレイを用いて ADSC における Cepallet® S-type と W-type それぞれで形成した細胞シートの、変動した遺伝子に関する比較を行った。まず、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析において、W-type と S-type では大きな違いは認められなかった。続いて、ADSC における単層培養細胞の Control 群と、Cepallet®で培養し作製した細胞シートでの比較では Fold Change3.0 でそれぞれ S-type では 100 個程度、W-type では 150 個程度の発現変動遺伝子がみられた。また、Control 群と比較して S-type, W-type で共通で変動した遺伝子で共に発現が向上したものと低下したものはそれぞれ 50 個程度であり、単層培養細胞をシート化することで多くの遺伝子の発現変動が確認された。

さらに、DNA マイクロアレイによる解析結果を IPA により再解析した。多数の遺伝子の発現変動と遺伝子同士のネットワークの形成を確認できた。また、Control に対して S-type, W-type それぞれで共通の変動がみられた遺伝子の RT-PCR を行い、バリデーションを行った。DNA マイクロアレイで確認した発現変動遺伝子について RT-PCR においても同様の変動を認め、DNA マイクロアレイの解析結果を検証することができた。

4) 考察

これまでたくさんの治療用の脂肪由来幹細胞の細胞シートが作成されてきたが、走査型電子顕微鏡を用いて剥離によるダメージを直接的に検討した報告はほとんどない。本研究では、温度応答性培養皿を用いて作成された細胞シートの剥離に伴う細胞シートの剥離面のダメージを電子顕微鏡での観察し評価した。加えてトリパンブルーでの染色でも温度制御による剥離直後の細胞シートにほとんど染色を認めず、本研究で使用した Cepallet®によって培養された ADSC の細胞シートには、剥離に際してダメージがみられないことが明らかとなった。剥離したあとの剥離面に損傷がないことを確認できれば、品質を担保するために非常に有用であることが期待される。これまで電子顕微鏡で観察された報告がなかった所以としては、試料作成の際に、時間と手間がかかるため、細胞シートを治療に用いる場合に臨床応用には不向きであることが挙げられる³²⁾。本研究ではこの問題点を克服すべく、イオン液体をコーティング剤とした試料作製法を採用した。近年走査型電子顕微鏡観察に試験的に活用されているイオン液体法は、固定からそのままコーティングに 20 分程度で進むことができる。さらにトリパンブルー染色を行うことで細胞シートの生死判定を行ったところ、細胞シートにはほとんど染色がみられず、剥離に伴って細胞膜の損傷がないことがこれによっても確認できた。以上より、Cepallet®を用いた細胞シートの作成において、その品質が担保されると予想される。温度応答性培養皿で培養された細胞シートと単層培養細胞の DNA マイクロアレイ解析の結果より、細胞をシート化することによって多くの遺伝子に変化が現れることがわかった。これは、細胞の接着対象がディッシュの基盤から細胞同士になったことが要因になったと考える。接着対象が細胞同士となることで細胞の密度やネットワークを形成することにより、これらの要因が遺伝子の変化に結びついていると考える。

また、遺伝子解析ソフト：IPA によって抽出された変動遺伝子の機能では、炎症や好中球の遊走に関する遺伝子の変化がみられた。また、細胞周期に関する遺伝子群の変化もみられたことから、細胞をシート化することで細胞同士の結合を形成することで、細胞間の相

相互作用に関連した遺伝子が増加したと考える。遺伝子ネットワーク図では血管新生に関連する遺伝子変化もみられたことから、単層培養ではみられなかった機能を発現していることが示唆された。

細胞シートを臨床に提供するにあたっては、シートの構造や形態に関する評価が必須と考えられるが、現在までに妥当な方法の提案は少ないように思われる。投与時には当然シート構造が保たれていて、破れなどが見当たらないことが必要と考えられる。山本らの報告³³⁾では、臨床試験で使用するために製造された細胞シートの安全性と品質の双方を検証するための評価項目や設備、システムについて報告しており、細胞シートの培養上清を用いてマイコプラズマ試験及び滅菌試験の評価を行ったうえで細菌および真菌、ウイルス内毒素試験を実施し、培養された細胞シートの汚染を評価し、細胞数とその生細胞率を測定することで品質を確認している。葛西ら³⁴⁾は臨床応用可能な細胞シートの安定した製造のプロトコールについて述べており、その細胞シートの剥離手技を提示したうえで細胞数や生存率のほかにケラチンサイト陽性率を確認することで品質チェックを行うと報告していた。製造した細胞シートの回収および分析を行った Jongbeom らの報告³⁵⁾を参照すると ADSC シートを形成するための最適な細胞濃度を調査することや、作製された細胞シート内の隣接する細胞間の距離を計測するなどして、最適な細胞濃度かつ細胞数の品質での細胞シートの設計と提供に関して述べている。温度応答性培養皿の Cepallet®を用いた培養において温度制御によって剥離されたシート表面には損傷がみられないことが、イオン液体法による電子顕微鏡での観察でわかった。またトリパンブルーでの染色でも追試を行い、細胞シートにほとんど染色がみられないことも確認することができた。イオン液体を用いた電子顕微鏡での観察は、非常に効率のよい品質確認試験であることが期待される。

これによって細胞シートの品質確認することが可能となり、治療に用いられる細胞シートのなかで、均一で一定の機能を期待できるものを選択しえることが期待される。また、作成された細胞シートから抽出した Total RNA を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、複数の遺伝子が増動していることが示唆された。血管新生や組織形成に関わる遺伝子が大きく増動しており、単一の細胞として存在していた細胞がシート構造をとることにより、1つの組織としての機能していることが示唆された。本研究より、Cepallet®を用いて作製した細胞シートでは血管新生や組織形成に関する遺伝子が有意に増動し、単一で培養された細胞と比較して、より生体内の組織としての働きをする可能性が示唆された。

5) 謝辞

Cepallet®を供給いただき、様々なご助言とご支援をいただきました DIC 株式会社の皆様に深く感謝いたします。本研究は文部科学省私立大学研究ブランディング事業及び金沢医科大学細胞治療プロジェクトの支援を受けて進めることができました。また、金沢医科大学総合医学研究所の辰野貴則助教、中村有香助手、及び金沢医科大学病院・再生医療センターと薬剤部の皆様、金沢医科大学・整形外科講座、金沢工業大学の大澤・谷田研究室の皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Harrell C. R., Markovic B. S., et al. (2019). *Biomed. Pharmacother.*, 109, 2318.
- 2) Collins T., Alexander D., et al. (2021). *EFORT Open Rev.*, 64, 225.
- 3) Moraes V. Y., Lenza M., et al. (2014). Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries., *Cochrane Database Syst. Rev.*
- 4) Yoshida Y., Yamanaka S., (2011). *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 50, 327.
- 5) Suzuki H., Sakai T. (2021). *Int. J. Mol. Sci.*, 22.
- 6) Yamazaki K., Kawabori M., et al. (2020). *Int. J. Mol. Sci.*, 21.

- 7) Huang L., Fu C., Xiong F., et al. (2021). *Cell Transplant.*, 30, 1.
- 8) Kern S., Eichler H., et al. (2006). *Stem Cells*, 24, 1294.
- 9) Sanchez-Ramos J., Song S., et al. (2000). *Exp. Neurol.*, 164, 247.
- 10) Trownson A., McDonald C., (2015). *Cell Stem Cell*, 17, 11.
- 11) Scherl A., Coute Y., (2002). *Mol. Biol. Cell*, 13, 4100.
- 12) Kurashina Y., Hirano M., et al. (2017). *Biotechnol. Bioeng.*, 114, 2279.
- 13) Piercy K. T., Donnell R. L., et al. (2001). *J. Surg. Res.*, 100, 211.
- 14) Imashiro C., Shimizu T., (2021). *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 1.
- 15) Shi X., Jiang L., et al. (2021). *Cell Dev. Biol.*, 9, 1.
- 16) Jakob M., Démarteau O., et al. (2001). *J. Cell. Biochem.*, 81, 368.
- 17) Sawa Y., Miyagawa S., et al. (2012). *SurgToday*, 42, 181.
- 18) Miyagawa S., Domae K., et al. (2017). *J. Am. Heart Assoc.*, 6, 1.
- 19) Chen F. M., Gao L. N., et al. (2016). *Stem Cell Res. Ther.*, 7, 1.
- 20) Kondo M., Kameishi S., et al. (2021). *Emerg Top Life Sci.*, 4, 677
- 21) Thorp H., Kim K., et al. (2020). *Sci. Rep.*, 10.
- 22) Thorp H., Kim K., et al. (2021). *Cells.*, 10
- 23) Kim H., Kim Y., et al. (2019). *Polymers.*, 11
- 24) Reed J. A., Lucero A. E., et al. (2008). *J. Appl Biomater Biomech.*, 6, 81
- 25) Bou-Ghannam S., Kim K., et al. (2021). *Sci. Rep.*, 11, 1.
- 26) Nogami R., Kaku N., et al. (2020). *Med. Mol. Morphol.*, 53, 21.
- 27) Ishigaki Y., Nakamura Y., et al. (2011). *Microsc. Res. Tech.*, 74, 1104.
- 28) Ishigaki Y., Nakamura Y., et al. (2011). *Microsc. Res. Tech.*, 74, 415.
- 29) Susumu K., Anusorn K., et al. (2006). *Chemistry Letters.*, 35, 600.
- 30) Sasaki N., Gomi F., et al. (2020). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 522, 881.
- 31) Kubouchi K., Mukai H., (2021). *Biochem. Biophys. Reports*, 25.
- 32) Iezaki T., Horie T., et al. (2018). *Stem Cell Reports*, 11, 228.
- 33) Yamamoto K., Morino T., et al. (2021). *Regen. Ther.*, 18, 59.
- 34) Kasai Y., Takagi R., et al. (2020). *Regen. Ther.*, 14, 87.
- 35) Na J., Song S. Y., et al. (2018). *Sci. Rep.*, 8, 1.

新型コロナウイルスの電子顕微鏡観察

東京都健康安全研究センター 微生物部 病原細菌研究科
吉田 勲

細菌や真菌は、光学顕微鏡でその形態を観察することができる。また、寒天培地に発育した状態であればコロニーを肉眼で見ることにもできる。しかし、ウイルスは、光学顕微鏡では観察することはできず、電子顕微鏡によらなければならない。

2019 年 12 月、中華人民共和国の湖北省武漢市で不明肺炎が発生した。これが、COVID-19 のはじまりであり、原因ウイルスは SARS-CoV-2 と同定された。年が明け 2020 年 1 月には、武漢市からの邦人退避を目的としたチャーター便が運航され、帰国者の PCR 検査の一部を担当センターも担った。このときの、PCR 陽性者検体から初めて、SARS-CoV-2 を分離することに成功し、電子顕微鏡でそのウイルスの写真撮影を行なった。その後、引き続き分離ウイルスの電子顕微鏡による観察をおこなってきた。

電子顕微鏡試料作製には様々な工程がある。まず、ウイルスが含まれているだろうと思われる臨床検体（咽頭拭い液や唾液など）からウイルスを分離培養し、その数を増やす。その培養液をホルマリンなどにより固定し、ウイルスの不活化を行う。SARS-CoV-2 ではここまでの工程を BSL3 実験室内で行わなければならない。BSL3 実験室から病原体に汚染されたものを持ち出すには、滅菌を行ってからでなければならない。新型コロナウイルスを培養したプレートやフラスコを持ち出すには工夫を要した。その後、培養上清はネガティブ染色を施し透過型電子顕微鏡で、培養細胞の方は脱水、乾燥後、走査型電子顕微鏡で観察を行った。

本発表では、SARS-CoV-2 やこれまで実施してきた様々なウイルスの電子顕微鏡像を示し、当センターにおける電子顕微鏡検査の活用例を紹介したい。

母乳栄養児の腸管におけるビフィズスフローラ形成機構とその意義

片山 高嶺

京都大学大学院生命科学研究科

授乳は真獣類における共通した給餌戦略であるが、ヒトにおいてはそれ以上の価値を持っていると思われる。一般に、母乳栄養児の腸管ではビフィズス菌優勢な細菌叢（ビフィズスフローラ）が形成される。ビフィズスフローラの形成はワクチン接種効果を高めることや喘息リスクを低減させることなどがコホート研究から明らかとなっており、免疫系の発達に重要であることが分かってきた。しかし、どのようにしてビフィズスフローラが形成されるのかについては最近までそのメカニズムは分かっていなかった。

人乳は、ラクトースおよび脂質に次ぐ3番目に多い固形成分として重合度3以上のオリゴ糖を10~20 g/L程度含有している。母乳オリゴ糖と総称されるこの成分は200種類以上の分子種で構成されるが、ヒト消化酵素に耐性を有しているために、そのままの形で大腸に到達する。言い換えれば、母親は乳腺において多大なエネルギーを消費してヒトの栄養にならない糖質を合成し、児に与えている。

ここ10年ほどの間に、我々を含むいくつかの研究グループによってビフィズス菌には母乳オリゴ糖資化能があることが報告され、その分解に関わる遺伝子や酵素の解析が行われてきた。しかしながら、これらの母乳オリゴ糖資化経路が本当に *in vivo* で機能しているのか、つまり、ビフィズスフローラ形成に寄与しているのかということは不明であった。最近、我々は母乳オリゴ糖トランスポーターを研究する過程でそれらの遺伝子群がビフィズスフローラ形成に深く関与していることを強く示唆する結果を得た。今回のワークショップでは、ビフィズス菌の母乳オリゴ糖トランスポーターの構造機構および生理機能について紹介することで、ビフィズス菌とヒトの糖鎖を介した共生・共進化のメカニズムに迫りたい。

また上記の内容とは別に、講演の後半部分においては、私どもの研究室で開発中の「腸管内の酸素濃度を模倣したアピカル嫌気共培養装置」について紹介したい。

エネルギーをつくり、植物病原菌の生育を抑制する微生物コンソーシア

馬場 保徳
石川県立大学

1. はじめに

農作物の非可食部、雑草および古紙などのリグノセルロース構造をもつ植物バイオマスは、わたしたちの身の回りの至るところに存在する。エネルギーへの変換法を確立することができれば、化石資源の代替エネルギーとして利用できることに加えて、震災時にライフラインが復旧するまでのあいだのエネルギー源にもなりうる。わたしたちは、牛のルーメン(第一胃)液に棲む微生物を活用し、植物バイオマスからの高効率バイオガス生産(メタン発酵)技術を開発した。さらに、その残さ液は肥料となり、且つ、植物病原菌の生育を抑制することを見出した。

2. 牛の胃に棲む微生物を用いて雑草からエネルギー(メタン)をつくる

メタン発酵という言葉を目にしたことはあるだろうか?数千種を超える微生物が連携しながら、有機性廃棄物からメタン(=都市ガスの主成分)を生産することを指し、再生可能エネルギーとしても知られる。あまり知られていないかもしれないが、じつは全国の下水处理施設の300カ所以上がメタン発酵を採用しており、メタン発酵はわたしたちにとって身近な技術といえる。その他にも、畜産廃棄物や食品廃棄物などを原料として、全国590カ所でメタン発酵施設は稼働し、これらの施設では、自家消費もしくは売電の形でメタンをエネルギーとして利用している。

わたしが東北大学にてメタン発酵の研究に従事していた時に東日本大震災が起きた。停電および停ガスが発生した震災下で、メタン発酵装置を稼働させることができれば、暖をとることや、夜の明かりを灯すこともできたが、それは叶わなかった。当時、食品工場から廃棄される廃棄物をメタンに変換する発酵装置を運転していたが、道路が寸断された状況下では、食品廃棄物など運ばれてくるはずがなかった。この震災を契機に、災害直後であろうと、いつでもどこにでも存在する植物バイオマス(雑草、農業残さ、紙ゴミなど)をメタンに変換する研究に注力した。わたしたちは、常に植物バイオマスを食べている牛の胃(=ルーメン)に棲む微生物に着目し、これを活用することで効率よくメタンを生産する発酵システムを開発した(図1)1), 2), 3)。本技術の大きな特徴は、通常、胃袋から取り出されたルーメン微生物は24時間ほどで植物バイオマスの分解活性を著しく低下させるが、それを克服した点である。特許申請および論文化前であるため、詳細は割愛するが、ワークショップ当日に概略を紹介したい。

3. メタン発酵後の残さは植物病原菌の生育を抑制する

メタン発酵液には少なくとも5000種を超える細菌群が存在する。わたしたちは、このメタン発酵液に植物病原菌の生育を抑制する効果を認めている(図2)。

*Fusarium oxysporum*はおよそ140種の作物に感染する宿主領域の広い土壌伝染性の植物病原菌であり、日本でもハウレンソウやトマトに難防除病害である萎凋病をもたらす問題となっている。現在のところ、燻蒸剤による土壌消毒が実施されているが、燻蒸剤は毒性の強い化合物であるため、作業員へ危険が及ぶことから、新しい防除法が求められている。植物病原菌(*F. oxysporum*)にメタン発酵残さ液を添加したのち、寒天培地上でその生育

を観察したところ、メタン発酵残さ液の添加により、病原菌は生育しなくなった。DAPI 染色により、病原菌の核が消失していることが確認された。SEM 観察から、病原菌糸が部分的に破損していることや、病原菌が何かに包囲されている様子が確認された。現在、この作用機序の解明に取り組んでおり、その概略について紹介したい。

引用文献

- 1) Baba, Y., Matsuki, Y., et al. (2019). Microbes Environ. 34(4): 421.
- 2) Baba, Y., Matsuki, Y., et al. (2017). J. Biosci. Bioeng. 123(4): 489.
- 3) Baba, Y., Tada, C., et al. (2013). Bioresour. Technol. 128: 94.

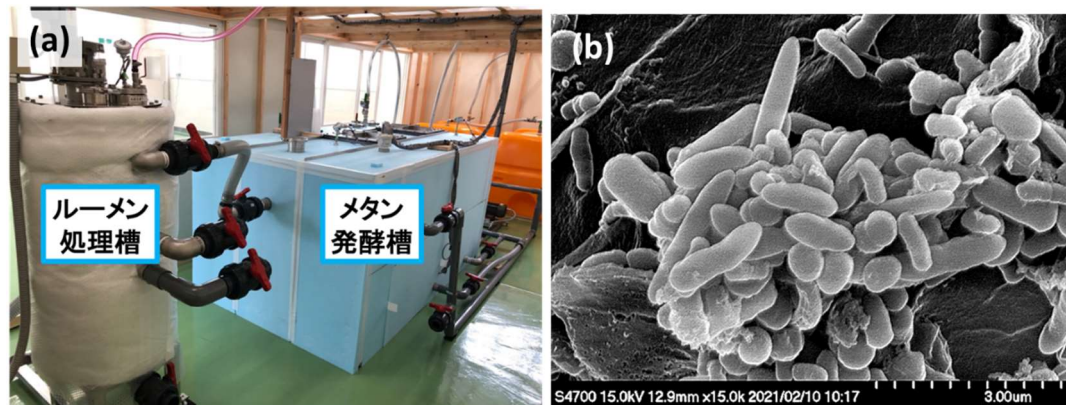


図1 牛のルーメン(=第一胃)微生物を用いたメタン発酵装置

- (a) 植物バイオマス分解するルーメン処理槽と、その分解物をメタンに変換するメタン発酵槽
 (b) ルーメン処理槽内で、植物バイオマス分解する微生物群

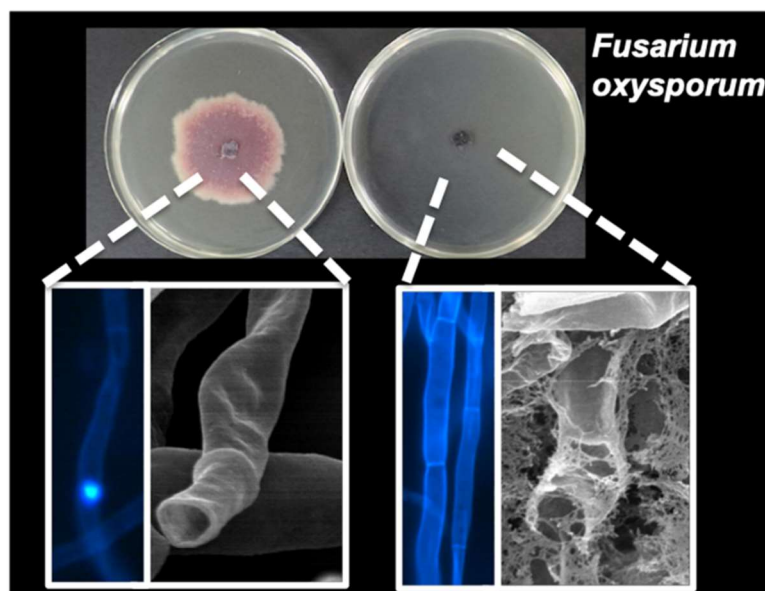


図2 メタン発酵残さ液を添加された植物病原菌 *Fusarium oxysporum*

- (a) 対照区(メタン発酵残さ液が添加されていない *Fusarium oxysporum*)
 (b) 対照区の菌糸のDAPI染色像
 (c) 対照区の菌糸のSEM観察像
 (d) 試験区(メタン発酵残さ液添加後の *Fusarium oxysporum*)
 (e) 試験区の菌糸のDAPI染色像
 (f) 試験区の菌糸のSEM観察像

植物寄生性線虫と植物との相互作用の世界を電子顕微鏡で見る

古賀 博則

石川県立大学生物資源環境学部

はじめに

植物寄生性線虫のなかでもネコブセンチュウとシストセンチュウによる農作物の被害は甚大で、世界中で非常に問題視されている。これらの線虫は根に侵入後、ともに口針を根細胞に挿入し、被挿入細胞を、それぞれ巨大細胞、シンシチウム（合胞体）へと誘導する（図1）。線虫は一生を通して、これらからのみ養水分を摂取し、成熟後には数百個の卵を産むことが知られている。これらの線虫の卵成分の50%以上が脂質であり、線虫自らは脂質を生合成できないことが報告されている。しかし、根細胞が大量の脂質を線虫に供給できるとは考えられない。それではどのようにして、根細胞から誘導された巨大細胞やシンシチウムが大量の脂質を線虫に供給できるようになったのか、この謎を解くために微細構造解析からアプローチしたので紹介したい。

オスミウム浸軟処理した試料のFE-SEM 1)

オスミウム浸軟処理した巨大細胞やシンシチウムをFE-SEMで観察すると良く見えるのに、通常の透過電顕観察ではほとんど見られない構造があった。しかもそれは、巨大細胞でもシンシチウムでも相当な部分を占めていた。この構造は扁平嚢状の小胞体(cisternal ER)と連続していることから管状の滑面小胞体(tubular smooth ER)と見なされた。

ヨウ化亜鉛-0s04(ZI0)後固定で管状の滑面小胞体をTEM観察

TEMで観察が難しかった理由は、管状の滑面小胞体の直径が切片の厚さとほぼ同じかやや厚いためであると考えられた。そこで、TEMで管状の滑面小胞体を観察できるようにするため、小胞体の染色性を高めるZI0後固定2)を行った。この結果、ZI0後固定することにより、管状の滑面小胞体を明瞭に観察できるようになった。

超高圧電顕での撮影画像の3D トモグラフィー解析

超高圧電顕による画像のトモグラフィー解析で、巨大細胞およびシンシチウム内の三次元構造を示すことを試みた。ZI0後固定した500 nm厚切り樹脂切片をウラン・鉛による電子染色後に超高圧電顕観察を行った。 -60° から $+60^{\circ}$ まで 2° 毎傾斜して撮影した61枚の画像の3D トモグラフィーを作製した。超高圧電顕による画像のトモグラフィー解析では、FE-SEMで観察された管状の滑面小胞体が形成する構造体と同様の構造体の三次元像が示された。

管状の滑面小胞体は脂肪の生合成に関わっている

イミダゾール水溶液に浸漬後の試料を0s04で後固定すると、脂肪滴が強く染色される3)。この染色法を使うことによって、巨大細胞とシンシチウム内だけでなく、侵入している線虫体内にも脂肪滴が大量に蓄積されていることが明らかとなった。これらの線虫は自ら脂肪を生合成できないと報告されている。このことと脂肪は滑面小胞体で生合成されることが報告されていることから、線虫体内の脂肪滴は巨大細胞あるいはシンシチウム内に膨大な量存在する管状滑面小胞体で生合成されたものと推測される。

管状の滑面小胞体 は養水分の移動に関わっている

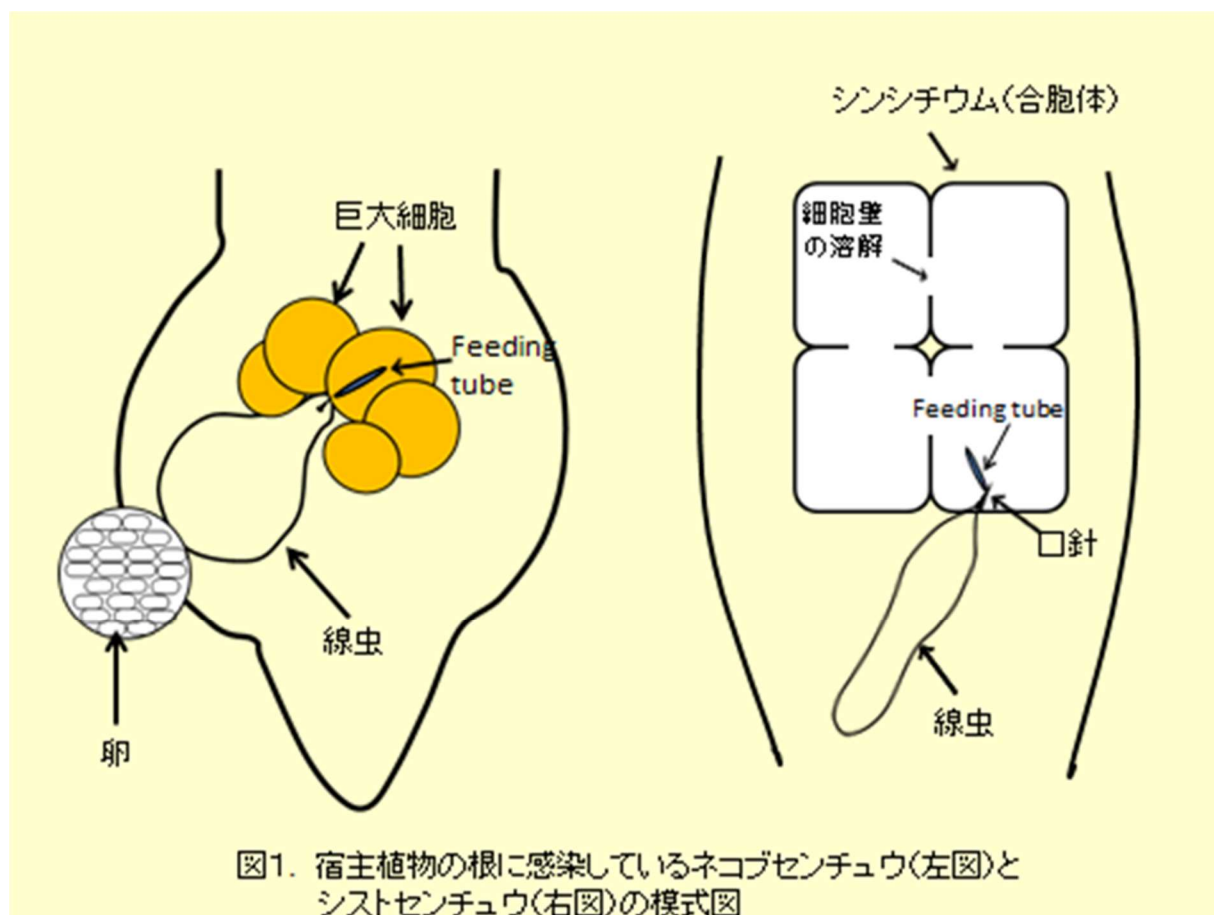
管状滑面小胞体の束が巨大細胞とシンシチウムの中を通っており、その一方の端は、線虫への養水分を集積する feeding tube と結合しており、他方は様々なところまで伸展しているのが観察された。小胞体は物質を外部環境から守りながら、移動させることが知られている。このことから、管状の滑面小胞体が養水分を巨大細胞あるいはシンシチウムの隅々から feeding tube まで運搬しているのではないかと推測される。

おわりに

ここでは、管状の滑面小胞体について述べたが、巨大細胞とシンシチウム内にはまだ微細構造解析が充分でないものが多数ある。例えば、養水分を集積していると考えられている feeding tube であるが、これは古くなると廃棄され、また新しいものが形成されるなど、この形成と分解過程などまだほとんど明らかにされていない。近年、巨大細胞やシンシチウムの誘導に関わるエフェクターたんぱく質の分子生物学的研究が精力的に行われている。これらの研究と微細構造解析の成果を統合することによって、これらの線虫の寄生戦略の全体像が明らかになるものと考えられる。

引用文献

- 1) Miyashita, N., Koga, H. (2017) Protoplasma 254:1941–1951, DOI 10. 1007/s00709-016-1072-x
- 2) Harris, N., Chrispeels, M. J. (1980) Planta 148:293–303.
- 3) 堀田康明(1992). 透過電子顕微鏡の試料作製法 よくわかる電子顕微鏡技術(平野 寛、宮澤七郎編)、朝倉書店、東京、p. 1–19.



腎病理の基礎～実験病理医だからこそのお話～

山田 壮亮¹⁾、名和田 彩²⁾

金沢医科大学臨床病理学¹⁾、産業医科大学第一病理学²⁾

近年、慢性腎臓病の患者や透析に至る患者は年々増加傾向にあり、腎疾患に対する適切な診療の重要性は増してきている。その中で、腎機能悪化の原因検索、治療の決定に繋がる腎生検の病理診断は中心的役割を担っている。腎生検組織標本の診断は通常、光学顕微鏡、蛍光抗体法、電子顕微鏡の3種類でなされ、それらを総合して的確な診断を下す。ここでは、腎生検病理診断の基礎的な内容、光顕・蛍光抗体法・電顕のそれぞれの役割に関して触れる。

まず、他の臓器の病理組織診断と腎生検の診断において、異なった点としては、臨床経過や臨床情報からある程度の鑑別診断が絞りやすいことである。病歴聴取（家族歴・基礎疾患・臨床兆候）、検査結果（ネフローゼか否か、自己抗体、低補体血症など）を確認し、臨床医と密な連携を取ることが的確な診断・治療に繋がる。

光学顕微鏡では、腎生検検体の全体像を評価することが可能で、4種類の染色を組み合わせることで評価を行う。PAS染色では糸球体病変、PAM染色では糸球体基底膜の正常、Masson-T染色では沈着物の有無、間質の線維化、H&E染色では全体像、特に間質の炎症細胞浸潤などの評価も可能である。

蛍光抗体法では糸球体あるいは尿細管に沈着している物質を同定する。通常、免疫グロブリンIgG、IgA、IgM、補体C3、C4、C1qを染色し、生検組織における免疫沈着物の有無、補体の活性化の同定を行い、沈着の程度・広がり进行评估する。軽鎖（κ鎖、λ鎖）の染色ではmonoclonalityの有無、その沈着部位やパターンにより骨髓腫に関連した腎症の分類に有用である。さらに膜性腎症ではIgG subclass, PLA2R, THSD7Aを染色することにより一次性あるいは二次性の鑑別が可能となっており、病因を推定することができる。

電子顕微鏡ではさらに詳細な検討が可能である。電顕の役割の1つは光顕あるいは蛍光抗体法で得られた所見を裏付け、詳細に検討することである。例えば高電子密度沈着物の局在による病因の鑑別診断が可能である。強拡大では沈着物の特殊構造の有無や線維性沈着物の微細構造の確認、その太さを測定でき、Organized deposition diseaseの鑑別に有用である。また、光顕では診断できない細胞内小器官などの観察、例えばミトコンドリアの形態異常、基底膜の厚さや基底膜の内部の性状を観察することで、ミトコンドリア異常症やAlport症候群の診断が可能である。

腎生検の診断では、臨床所見・光顕・蛍光抗体・電顕所見を併せて総合的に判断することが非常に重要であり、実際の診断の過程や電顕が有用な疾患について症例を提示する。また、腎生検検体を用いた臨床病理研究に関して少し触れたい。

誰でもできる透過電子顕微鏡による腎生検の撮影方法

高木 孝士¹⁾、坂上 万里²⁾

昭和大学電子顕微鏡室¹⁾、日立ハイテク²⁾

腎臓の撮影方法が判らない？何を見たらいいのですか？教科書と構造が違うのは何故なんですか？という質問をよくされます。皆さんは下記の質問に答えられますか？

- 1) 国内では、コマーシャルラボによっては何百枚も電顕写真を撮影するところもあるが、多くの施設では、腎臓の撮影枚数は10枚程度となっているのは何故か。
- 2) フィルム写真とデジタルで腎臓の撮影方法は変えなければいけないのは何故か。
- 3) 患者さんの臨床状態、光顕・蛍光の病理診断、電顕診断で異なる結果になる事があるのは何故か。

これは、電子顕微鏡で病理診断のために腎臓を撮影している方には、必ず理解していて欲しい内容です。そのため、私は電顕撮影の指導前に必ず聞いていますが、皆さん判るでしょうか？

腎生検診断では通常、光学顕微鏡、蛍光抗体法、電子顕微鏡の3種類を用いて行われています。この中の電子顕微鏡検査は、光学顕微鏡や蛍光顕微鏡に比べて試料作製方法が煩雑で、その習得にはスキルが必要です。また、撮影に関しては、電子顕微鏡の性質上、装置操作方法と試料観察方法の2つのスキルが必要でありこの習熟は非常に困難です。試料作製方法に関しては、様々な方法が開発され、多くの良書もあり、様々な学会で技術研修会が行われていますので、習熟は必要ですが、比較的簡単に技術の取得をすることが可能です。装置の操作方法も状況は同様で、技術の取得をする機会は多くあります。また、近年は装置メーカーの努力によって、ユーザーフレンドリーで操作性の簡易な装置が開発されてきており、使用に対してのハードルはさらに低くなってきています。

しかし、腎臓組織の電子顕微鏡観察方法に関しては別です。所見を示した教科書は多数ありますが、観察方法を解説したような良書は国内外でもほぼ皆無で、それを習うような場もほぼ皆無です。日本全国及びアメリカ、中国などの病院、コマーシャルラボの電子顕微鏡室で指導を行ってきましたが、各施設で様々な異なった撮影ルールがありました。これは、腎臓の撮影方法が、世界的にも未だにスタンダードと呼ばれるような常法が無く、腎臓の診断に必要な見方について理論的に論じられていないためです。このため、国外でも国内でも施設や地域、指導者によって観察方法に大きな差がでてしまっています。この解消には、指導者の電子顕微鏡・組織の理解度、施設の技術者育成の考え方などを含め、解決しなければならない大きなハードルがいくつもありますが、今回は、電子顕微鏡の基本に戻り、腎臓の糸球体を観察する際に、最低限必要となる組織、構造物に焦点をあてて解説しながら、電子顕微鏡での腎生検撮影のコツを下記の流れで時間が許す限り解説していこうと思います。

- 1) 腎臓とは？分解能とは？
- 2) 撮影方法 何を見る？ 何処を見る？
 - ・ 何故撮影できないのか？
 - ・ 通常教わる電顕での腎臓観察法
- 3) どう考えて糸球体を撮影するか
 - ・ 沈着物
 - ・ 沈着物内の構造物

- ・ 基底膜
- ・ 足細胞
- ・ 内皮細胞
- ・ メサングウム細胞
- ・ 増殖病変、その他

4) 新たな腎撮影の可能性

4) の新たな腎撮影の可能性では、高価な電子顕微鏡が無い、すべての試料を商業ラボに外注しているという方、もっと簡単に電顕をとという方たち向けに、私たちが研究、検討している新たな電顕の可能性について少し話せればと思っている。

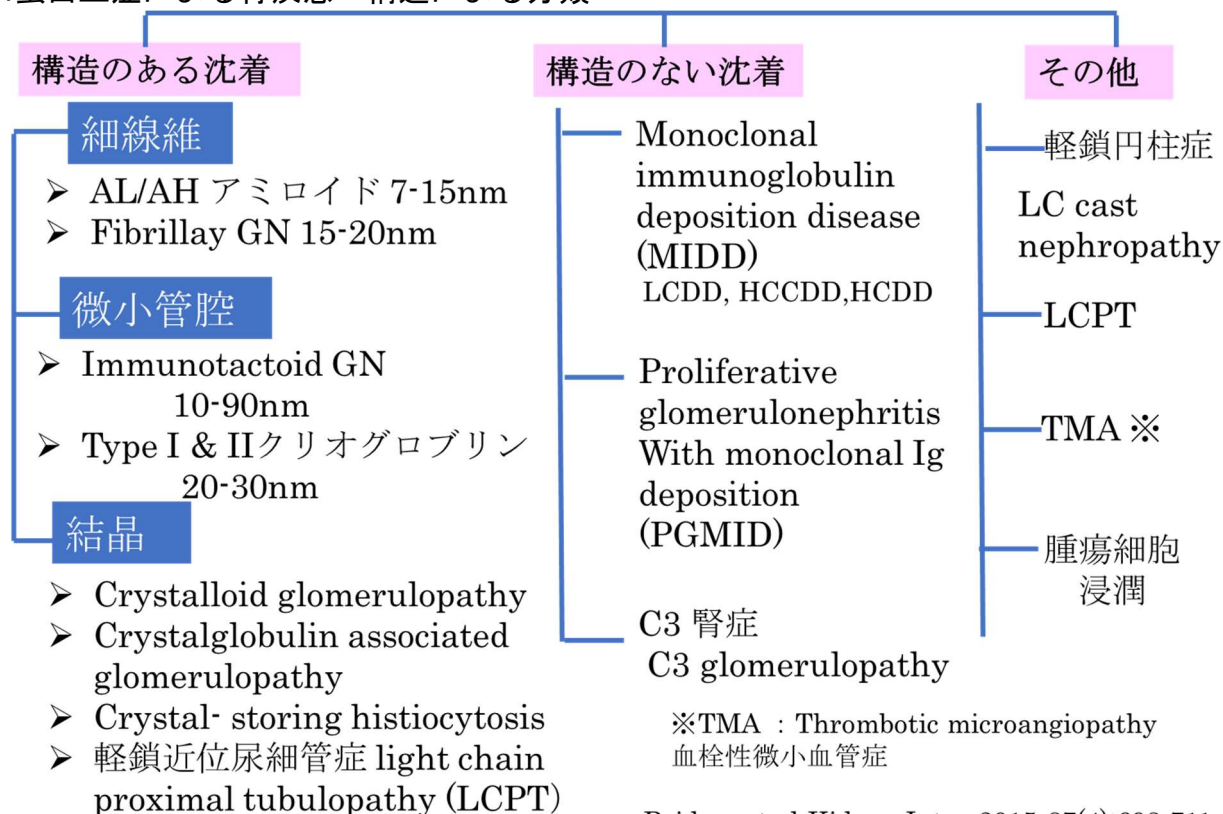
病理診断確定に役立った電子顕微鏡所見

上杉 憲子
福岡大学医学部病理

腎生検では、電顕所見が、診断確定に必須である疾患が、少数だが存在し、またそれ以外の日常的な疾患でも、電顕所見は病理診断を深めるため有用な役割を果たしている。

I: 電顕診断が確定となる疾患:電顕診断が確定となる疾患のひとつに電顕的にOrganized deposit (構造のある沈着)がある疾患群がある。これは大きくは、M蛋白血症を呈する/呈しうる疾患とそれ以外の疾患に分けられる。後者では、Fibronectin 腎症とCollagenofibrotic 腎症がある。M蛋白血症ありの疾患では、沈着物そのものが炎症を引き起こしたり、基質や線維を合成するなどし、光顕所見が多岐にわたり、診断が難しいものが多い。近年、沈着物は免疫染色や質量分析により、構成成分が明らかになり、疾患概念が確定され、電顕所見への feed back も行われている。電顕診断は必須ではあるが、沈着物の同定には、それほど簡単ではない。いくつかの疾患について、診断のポイントや最近の知見について紹介する。

M蛋白血症による腎疾患 構造による分類



Bridoux et al Kidney Int 2015 87(4):698-711

II 病理診断をより深める画像。

診断に大切な電顕画像は、以下に分類されるが、疾患によりみるポイントが異なる。

1. 疾患の活動性を示唆する画像：基底膜の断裂、管内細胞増多、炎症細胞浸潤、フィブリン析出、内皮下浮腫、滲出性病変
2. 疾患の慢性度を示唆する画像：メサングウム基質の沈着、分節性硬化、癒着
3. 免疫複合体沈着の部位と頻度（蛍光抗体法の所見を確定するのに必須）
4. 疾患の予後を示唆する画像：3と被る。基底膜の肥厚や変性。糸球体変性の程度

疾患群ごとの診断のポイント。

- A. IgA 腎症：Podocytopathy とは巣状分節性硬化を形成する上皮異常やそれに関連する光顕所見（上皮腫大、過形成、糸球体滲出性病変）で、IgA 腎症の予後や尿異常に関与すると報告される。電顕的には、基底膜の融解性の変化や高度菲薄化が上皮細胞の障害に密接に関与するため、電顕でこの病変をとらえることが、必要である。
- B. 膜性腎症：膜性腎症では沈着物に誘発される基底膜の変性（不規則な肥厚や菲薄化、density の変化）が予後を決定する。基底膜の変化は、光顕では確定しづらいため、電顕での確定が必要である。
- C. ループス腎炎：免疫複合体の沈着物は、沈着部位や density が多彩で、構造のある沈着物を来す。内皮下の明瞭な沈着は、ループス腎炎で頻度が高い。上皮下の沈着物の分布範囲は膜性ループス腎炎の診断の確定のため必須。電顕的にもっともループスに特異的なのは内皮細胞内の Virus like particle で、現時点でループスがなくともその後ループス発症する症例もある。また沈着物がなく、蛋白尿が多い
- D. 糖尿病性腎症。現在糖尿病性腎症の組織診断は糸球体病変から以下に分類される。
- Class I 早期腎症。電顕の基底膜肥厚（GBM>393nm 女性、> 435nm 男性）
- Class II メサングウム拡大（軽度 IIa, IIb）
- Class III 1 個以上の KW 結節
- Class IV 進行した糖尿病性糸球体硬化症 50%を超える糸球体が全節性硬化基底膜の厚さの計測は 30 か所以上、しかも平均をとることが推奨され、電顕画像もそれに見合うようにとる必要がある。KW 結節は疾患の進行をはかる指標であるが、その形成には高度内皮細胞障害の関与があるとされる。内皮細胞障害の程度をもっともよく反映するのは電顕であることに注意して、電顕を検討する必要がある。
- E. その他内皮細胞障害が強く関与するとされる疾患。悪性高血圧、TMA（血栓性微小血管症）、Atypical HUS、強皮症、TAFRO 症候群は内皮異常やその障害が主体であり、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤も糸球体の内皮細胞障害をきたすことが知られている。内皮細胞障害の所見は多岐にわたり、かつ急性病変とともに慢性病変も存在し、進行すると内皮以外の箇所にも進展する。糖尿病性腎症との類似点も多い。その所見の一部を紹介する。

イオン液体は、室温でも液体状態の塩(えん)である。食塩(NaCl)に代表されるように塩は正イオンと負イオンで構成されており、クーロン力で強く結合しているので通常は堅い結晶で融点も高い。しかし、正イオンの形状を非対称としクーロン力が弱くなるように設計すると、融点が室温以下となる。電池や電気分解層などの電気化学装置に使われる電解液は、水や有機溶媒に塩を溶かしたものである。1990年代初めに発明されたイオン液体は、それ自身が溶媒のない電解液であるゆえ多くの電気化学者が注目し幅広く用いるようになった。イオン液体以外の全ての液体は中性の分子の集合体であり、正イオンと負イオンで構成されるイオン液体の特徴は 1) 蒸気圧が計測できないほど小さい、2) 有機溶媒であるのに引火や発火が起こらない、3) 電導性を有している などである。

本講演者は、それら特徴の中で特に 1) に着目した。液体は蒸発するがゆえに、試料室を真空にしなければならない計測器で計測することができない。しかし、蒸発しないイオン液体だと固体と同じように扱えるので、そういう計測器の試料として用いることができるのではないかと考えた。早速、研究室で所有している卓上走査型電子顕微鏡の試料室にイオン液体滴を乗せたスライドガラスを入れ、試料室を真空にしてフィラメントに電流を流して画像をだしてみたのが図 1(左)である。いくらイオン液体と言えども、電子伝導性は有していないので帯電するであろうと思っていたが、予期に反してグレーの安定した SEM 像が得られた。「本当に帯電しないのか？」との疑いから、確実に帯電するであろうシリコンオイルの油滴を同卓上 SEM で同じ条件で観察したところ、図 1(右)のようにしっかり帯電した像が得られたので、イオン液体が SEM 用の導電材として機能する材料であることを発見した。

イオン液体が導電剤として機能するなら、絶縁材料の電子顕微鏡観察の際にスパッター前処理の代わりにイオン液体処理で済むなら簡単ではないかと考えた。しかし、SEM 観察する試料にスパッタ膜のようにごく少量だけイオン液体を塗布しないと、液体そのものが写ってしまうアーティファクトとなってしまう。これには頭を痛めた。極々少量の液体を塗布する方法や、塗布してから余分の液体を除去する方法などを試していた中、この研究を修士論文研究として取り組んでいが学生(杉村 昌治 2008 年修了) が水やアルコール等の溶媒にイオン液体を溶解し、それを塗布して溶媒を蒸発させるという方法を考案した。言われてみれば当たり前のことであるが、その後の発展につながる大きな一歩であったことから、まさにそれが「コロブスの卵」であったと言える。生体試料の場合は 2~5 wt% の濃度が適切であるとのことで、綺麗な SEM 像が撮影されてきている(図 2)。

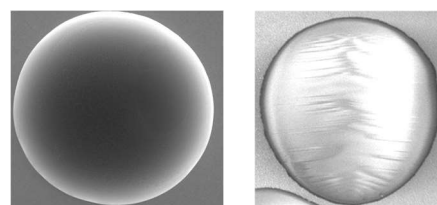


図 1 イオン液体(BMI・PF₆; 左) とシリコンオイル(右)の SEM 像。

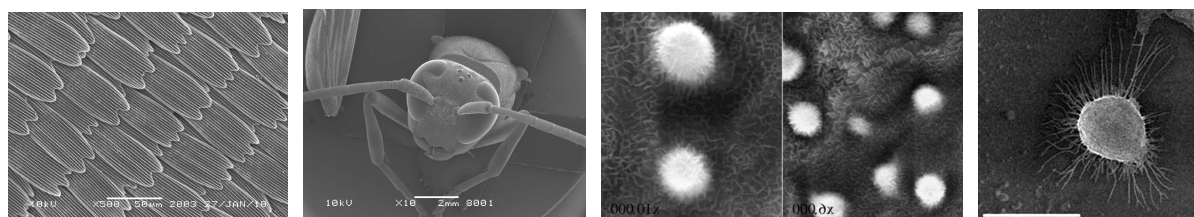


図 2 種々の生体試料 SEM 像 : (左から) 蝶の羽の鱗粉、蟻 (根本先生)、稲の葉表面 (古賀先生)、人の肺の上皮細胞 (石垣先生)。

一般演題（口演発表）

0-1

清拭素材が皮膚に及ぼす物理的刺激の影響

樋口 幸¹⁾、森 楓¹⁾、安田 愛子²⁾、島田 達生²⁾
大分県立看護科学大学¹⁾、大分大学²⁾

乳児は、流涎・発汗や排泄等で皮膚を清拭する頻度が高い。乳児の皮膚は大人と比べて薄く、清拭による物理的刺激も皮膚トラブルの原因となるため、素材の検討は重要である。そこで本研究では、皮膚へ及ぼす刺激が少ない清拭素材を見つけることを目的に、ヘアレスマウスに対する清拭実験を実施し、実体顕微鏡ならびに走査電子顕微鏡を用いて皮膚への影響を観察・評価した。実験方法は、実験群 3 種類（綿ガーゼ・マイクロファイバータオル・不織布）とポジティブコントロール群 1 種類（ナイロンタオル）の 4 つの素材に、対照群（清拭なし）を加えた 5 群とした。1 群 5 匹の 5 週齢のヘアレスマウス（HR-1）に対して、1 日 1 回の清拭を 14 日間実施した。清拭方法を統一するために、吸入麻酔で昏睡しているマウスを計量器に載せ、マウスの背部（2cm×2cm）を 40g の負荷で 30 回摩擦した。

その結果、実体顕微鏡観察は皮膚表面の形状と毛の様相をとらえることができた。さらに、走査電子顕微鏡観察は表皮の角質層の詳細な変化をもとらえた。清拭素材によって毛や角層の脱落など皮膚の表面の形態に違いがみられることが示唆された。

0-2

抗ミトコンドリア抗体陽性心筋炎のミトコンドリア像

石井 悠海¹⁾、島田 達生²⁾、高橋 正起¹⁾、安田 愛子³⁾、川里 浩明³⁾、高橋 尚彦¹⁾
大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断学講座¹⁾、大分医学技術専門学校²⁾、
大分大学医学部実験実習機器部門³⁾

抗ミトコンドリア抗体は原発性胆汁性肝硬変に特異的な自己抗体として有名であるが、稀に筋炎の合併例も報告されている。症例は、69 歳の男性。55 歳で原発性胆汁性肝硬変と診断されていた。57 歳より心機能障害及び心不全症状をきたすようになった。64 歳で心不全が増悪し入院となり、呼吸不全の遷延を認め、呼吸筋麻痺が疑われた。さらに、四肢筋力の低下も出現し、抗ミトコンドリア M2 抗体陽性であったことから、抗ミトコンドリア抗体陽性筋炎と診断しステロイド治療を開始した。その後も進行性の心機能低下を認め、両心室ペースング機能付き植込み型除細動器の移植術を行った。69 歳で肺炎を契機に心不全が悪化し、治療を行うも奏効せず、永眠された。本症例の心筋、腸腰筋、肝臓を透過電子顕微鏡で観察した。観察した全ての組織において、ミトコンドリア内のクリステは崩壊し、ミトコンドリアは膨化していた。さらに、膨化したミトコンドリア内には一律に小型顆粒が存在していた。心筋組織の筋原線維は配列異常を伴い萎縮していた。今回、抗ミトコンドリア抗体陽性であり心筋障害をきたした剖検例の貴重な心筋組織を電子顕微鏡で観察したため報告する

0-3

高血糖、および血糖変動がマウスの Ganglionic plexus の微細構造変化に及ぼす影響

高橋 正起¹⁾、島田 達生²⁾、石井 悠海¹⁾、安田 愛子³⁾、
川里 浩明³⁾、高橋 尚彦¹⁾

大分大学医学部循環器内科・臨床検査診断学講座¹⁾、
大分医学技術専門学校²⁾、大分大学医学部実験実習機器部門³⁾

Ganglionic plexus (GP) は、心臓周囲に存在する心臓自律神経叢であり内因性自律神経系の一部として独自に心房筋に作用し、心房細動の発症・維持に関与していると考えられている。これまで GP を電子顕微鏡で観察した報告はなく、GP の微細構造に関して詳細は明らかになっていない。

一方、高血糖や血糖変動などの血糖異常は、全身の神経障害を増悪させ、自律神経機能異常を引き起こすことが知られている。

我々は今回 C57BL マウスをコントロール群・高血糖負荷群・血糖変動負荷群に分け、透過型電子顕微鏡を用いて 洞房結節周辺の GP の微細構造を観察した。

コントロール群と高血糖負荷群、および血糖変動負荷群では神経細胞内の粗面小胞体の減少や、ゴルジ装置の萎縮が認められた。これらの所見は細胞のタンパク合成能や水分代謝機能の低下を表しており、高血糖負荷や血糖変動負荷により神経細胞が障害を受けている可能性が示唆された。

0-4

ヒト股関節における寛骨臼関節唇の微細構築

野上 龍太郎¹⁾、加来 信広²⁾、津村 弘²⁾、安田 愛子³⁾、矢野 信次³⁾、島田 達生⁴⁾
大分大学基礎看護学講座¹⁾、整形外科講座²⁾、実験実習機器部門³⁾、大分大学名誉教授⁴⁾

二足歩行をするヒトにとって、股関節は多軸性で運動力が強い反面、重力がかかり加齢によって変形性股関節症にかかりやすい部位です。股関節は球関節に属し、脱臼防止のために寛骨臼の辺縁に、補助装置である関節唇が付着している。関節唇は組織学的に線維軟骨に属するが、電子顕微鏡観察は全くなくて、微細構築は不明である。本研究はヒト寛骨臼関節唇を透過と走査電子顕微鏡下で観察し、その微細構築を理解することで、股関節の構造・機能と疾病の発生について理解を深める。

大腿骨頭壊死症患者と大腿骨頸部骨折患者に施行された人工股関節置換術時に摘除された寛骨臼関節唇を使用し、パラフィン包埋した。光学顕微鏡観察後、残りのパラフィンプロックから、SEM 用試料を作製した。脱パラフィン後、細胞外マトリックスを消化するために 2 N NaOH 処理した。

寛骨臼関節唇表層の軟骨膜は平行配列した約 150 nm の I 型コラーゲンから成っていた。その下層は軟骨細胞とコラーゲン線維から成る軟骨組織が存在した。軟骨細胞の周囲は密で、約 80 nm の II 型コラーゲンによって覆われていた。さらに、約 150 nm の I 型コラーゲンが II 型コラーゲンの間に介在し、軟骨組織を補強しているように見えた。

0-5

ヒラタケ子実体におけるオートファゴソームの内容物の多様性

尾崎佑磨¹⁾、會見忠則²⁾、霜村典宏²⁾

鳥取大学大学院連合農学研究科¹⁾、鳥取大学農学部²⁾

細胞内自食作用であるオートファジーは菌類の形態形成に関与することが知られている。これまで、ヒラタケ子実体細胞におけるオートファジー関連構造体の検出を試みてきた。今回は食用きのこヒラタケ子実体細胞のオートファジー過程において、細胞質成分の隔離を担う隔離膜、および、オートファゴソームの内容物に焦点を当て調査したので、その結果について報告する。おが屑培地で培養した幼子実体の柄または成熟子実体のヒダ組織をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで二重固定し、Quetol812 樹脂に包埋した。超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色し、TEM で観察した。その結果、細胞質中に細胞質成分を含む円形から楕円形（平均直径 760 nm）のオートファゴソームが観察された。主に細胞質ゾルを含むオートファゴソームには、その内容物が周囲の細胞質ゾルと比較して形態的に同質なタイプと、リボソームをほとんど含まない、または全体的に電子密度が低い、あるいはその両方の特徴を有する異質なタイプが観察された。その他、膜系を伴った高電子密度物質や、ヒラタケを含む担子菌類特有の隔壁の構成要素である括弧体もオートファゴソーム内で観察された。

0-6

ヒト消化管アウエルバッハ神経叢観察用試料作製のための工夫について

田北 薫子¹⁾、柴田 智隆¹⁾、小川 雄大¹⁾、田北 沙和²⁾、安田 愛子¹⁾、
矢野 信次¹⁾、猪股 雅史¹⁾、島田 達生¹⁾
大分大学医学部¹⁾、岩手医科大学医学部²⁾

アウエルバッハ神経叢はヒト消化管の内輪筋と外輪筋の間に存在し消化管の蠕動運動に関与していると考えられているが、観察が難しいことからその形態学的な詳細な報告は少ない。今回我々は、いろいろ工夫をして光学電子顕微鏡、電子顕微鏡を用いて観察したので報告する。免疫染色でアウエルバッハ神経叢の所在を突き止め、食道と結腸では存在場所に微妙な違いがあったのでその違いに応じて、走査型電子顕微鏡用の試料を作製するときに工夫した。食道では、最初の塩酸消化ののちに、内輪筋と外輪筋の間を分け入ったが結腸では、凍結乾燥したのちに内輪筋と外輪筋の間に分け入ることに成功した。走査電子顕微鏡での観察像については、消去法によって、神経であろうと想像して撮影した像であるので、何らかの方法で、積極的に肯定する方法が必要であると考えた。

ヒラタケ子実体細胞の TEM 観察における電子染色効果の評価

山口 共生¹⁾、會見 忠則²⁾、霜村 典宏²⁾
鳥取大学大学院持続性社会創生科学研究科¹⁾、鳥取大学農学部²⁾

酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色（UA-Pb）法は透過型電子顕微鏡観察で一般的に利用されている。本染色法でこの細胞試料の切片染色を行うと、細胞全体が高電子密度を呈するため細胞内小器官の識別が困難である。したがって、きのこ子実体形成などの形態形成を細胞学的に解析するためには、きのこ細胞に適した染色法が求められている。本研究ではグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる二重固定を行い Quetol812 樹脂に包埋したヒラタケ *Pleurotus ostreatus* の子実体ヒダおよび担子胞子の試料を作製し、アルカリビスマス染色（AB）、リンタングステン酸染色（PTA）、過酸化水素とリンタングステン酸染色（H-PTA）、過ヨウ素酸とクロム酸、リンタングステン酸染色（PACP）、過ヨウ素酸メテナミン銀染色（PAM）による染色を行い、各染色液の細胞内小器官に対する染色効果を調査した。その結果、AB と PTA は、細胞壁、細胞膜、隔壁構造、グリコーゲン顆粒を、HPTA は、細胞膜、液胞膜を、そして、PACP は細胞膜、グリコーゲン顆粒を識別することに有効であることが判明した。今回得られた細胞内小器官に対する特異的染色効果に関する情報は、きのこの子実体形成などの形態形成を細胞学的に解析する上で有益であると思われる。

電顕検索が心筋生検組織評価に役立つ電子染色法の紹介と検索例

根本 典子¹⁾、石井 俊介²⁾、阪上 洋行^{1, 3)}
北里大学医学部バイオイメーjing研究センター¹⁾、同循環器内科²⁾、同解剖学³⁾

病理組織検査として、腎、心、筋、皮膚などを初めとする様々な病変組織の生検が実施される。その中で、ミクロレベルの解析だけでは判断に苦慮する微細構造変化につき、古くより電子顕微鏡検索が実施され一定の評価が得られている。特に、腎疾患においては WHO 診断基準で明らかにされているように病理検査の一環として長年ルーチン化されている現状である。筋生検、皮膚生検、心生検、腫瘍等の術時摘出組織など、かなり以前は、頻繁に電顕検索が実施されていたが、免疫染色や遺伝子検査等で判断できる場合は、電顕検索までの実施は遠のく傾向にあった。一方では、オートファジー研究が進むにつれ、電顕の有用性も見直されている現状もある。我々は、以前より、全身の病変組織の電顕による評価を継続しているが、特に、心不全などの病態を呈する心生検組織では、糖の代謝異常や異常物質の蓄積、オートファゴソームの確認等に、従来の電子染色では分り難い組織成分や構造物もあるため、数種の特殊染色を、通常の電子染色とともに隣接切片で染色し、比較評価してきた。今回は、我々が心生検に実施しているグリコーゲン染色と弾性線維染色の効果とその一例を紹介する。

一般演題（ポスター発表）

P-1

3D-プリンタの電子顕微鏡技術への利用

堀田 康明

朝日大学歯学部口腔科学共同研究所

3D-プリンタの利用が急速に普及し、低価格な機種でも充分に実用的な造形が可能になってきた。今回の報告では、安価な熱溶解積層方式（FDM 方式）の 3D-プリンタ（Ender3 Pro、Creality 社）を使用して SEM 試料台などを作製したので報告する。SEM 試料台は導電性が必要である。一般の PLA フィラメントには導電性がないので、市販されている「導電性 PLA 樹脂フィラメント」（Protopasta 社）を使用して一般的な試料台（15mmX5mm、M4）を作製し、市販のカーボン製試料台と比較してその実用性を確認した。さらに、円形カバーガラス（10mm）をセットできる特殊な試料台などを試作した。観察したい試料の形状や観察方法に適した試料台の作製が自由自在である。その他に、超薄切片作製用ガラスナイフポートなどの部品の製作などへの利用も可能であり、研究室に 1 台あれば非常に便利な道具である。

P-2

微粒子モデル噴霧後マスクの走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

宮本 侑果¹⁾、堀田 康明²⁾、松下 貴裕³⁾、松岡 太相¹⁾、中尾 寿奈¹⁾、江原 道子¹⁾、
落合 隆永¹⁾、永山 元彦¹⁾、住友 伸一郎³⁾、村松 泰徳³⁾

朝日大学歯学部口腔病理学分野¹⁾、朝日大学歯学部口腔科学共同研究所²⁾、
朝日大学歯学部顎顔面外科学分野³⁾

マスクの着用は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）感染拡大防止策に大きな影響を与えているが、空気感染を主体とするウイルスを含むエアロゾルは普段の生活の中では粒子径が変化することが予想される。またマスクの種類や線維における静電効果などによってこれらを捕捉する効果は様々であるが、単純なエアロゾルをモデルとした超微細構造での実験データは意外に少ない。そこで、エアロゾルを種々の粒径のポリスチレンラテックスビーズ溶液のエアロゾルとして数種類のマスクフィルター線維への微粒子付着状態を走査電子顕微鏡（SEM）で観察した。簡易エアロゾルモデルはポリスチレンラテックスビーズ（粒径 $1.0\mu\text{m}$, $6.0\times 10^{12}/\text{mL}$, $0.4\mu\text{m}$, $6.0\times 10^{11}/\text{mL}$, qNano, MeiwaFosis）を超音波洗浄器で 30 分間処理後、対面クリーンベンチ内のマネキンに装着したマスク（3 層式不織布マスク、3 層式 N95 マスク、1 層式ポリウレタンマスク、いずれも市販品）に 30cm の直線距離でネブライザー（スプレー）2 回噴霧し、マスクをオスミウムコート後、走査型電子顕微鏡（S-4000, HITACHI）を用いて観察した。いずれのマスク表面でもエアロゾルモデル粒子はミスト塊あるいは散在性に付着していた。中には 3 層式不織布マスクや N95 マスクのフィルターまで届いているものもあった。ポリスチレンラテックスビーズはエアロゾルミストモデルとして使用用途が広がることが明らかとなった。

P-3

Shear bond strength of orthodontics tubes cemented with different adhesive system. Shear bond システムによる歯科矯正用チューブの接着強さ

Andira Mar-Ramirez¹⁾, Rogelio J. Scougall-Vilchis¹⁾, Elias N. Salmeron-Valdes¹⁾,
Laura E. RodriguezVilchis¹⁾, Motohiko Nagayama²⁾ and Yasuaki Hotta²⁾
Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Odontologia¹⁾,
Asahi University School of Dentistry²⁾

To compare shear bond strength (SBS), two kinds of orthodontics tubes bonded with self-etch and universal adhesive, scanning electron microscopic observation was performed. 120 human molars were randomly divided into 6 groups (n=20). Groups V (15.4 ± 5.3 MPa) and VI (15.4 ± 7.5 MPa) showed significantly superior to groups I (8.0 ± 5.2) and II (8.9 ± 2.8) in SBS. Residual adhesive was observed higher in SEM's images when universal adhesive was used. Universal adhesive can be recommended to cement molar tubes due to the significant higher SBS, and prior acid etching potentiates the adhesion force in system, SEM is very useful for analysis of bond failure and amount of adhesive remnant.

2種類の接着剤（セルフエッチングとユニバーサル）による歯科矯正用チューブの歯面に対する接着強さ（SBS）を走査型電子顕微鏡（SEM）で比較した。120本のヒト臼歯を無作為に6群（n=20）に分けた。V群（ 15.4 ± 5.3 MPa）およびVI群（ 15.4 ± 7.5 MPa）は、I群（ 8.0 ± 5.2 ）およびII群（ 8.9 ± 2.8 ）よりも接着強さが有意に高かった。ユニバーサルを使用した場合はSEM像で残留接着剤が多かった。ユニバーサル接着剤はSBSが高いため、矯正用チューブの接着に推奨できる。さらに、酸エッチングを行うことで接着力が増強され、SEM観察は接着不良や接着剤残量の分析に有用である。

P-4

白紋羽病菌におけるウイルス伝搬能を獲得した変異株の細胞壁の特性評価

畑中 郁穂・坂口 耕太・中屋敷 均・池田 健一
(神戸大学大学院農学研究科)

白紋羽病菌を防除するために病原力低下効果を有するマイコウイルスを利用したヴァイロコントロールの開発が進められている。これまでに、変異株 W1032BF は野生株と異なり、培地上で分生子形成を行い、分生子を介して遺伝子型の異なる菌株に対してもマイコウイルスを伝搬させていることが示唆されてきた。変異株 W1032BF の特性を明らかにするために、走査型電子顕微鏡による観察を試みた。走査型電子顕微鏡における従来の試料作製方法では、試料を液体に浸す過程により分生子が脱落してしまう懸念があった。そこで、本研究では化学固定法の代わりに、オスミウムによるガス固定後に凍結乾燥を行った。結果、変異株において菌糸先端で分岐しやすく分生子が形成されている様子が観察された。しかし、変異株の菌糸は扁平になりやすい傾向が認められた。カルコフラワー染色によりキチン含量を調査したところ、菌糸基部における陽性反応が極端に低下し、キチンシンターゼファミリー遺伝子の発現も低下していた。キチン合成の低下が菌糸強度および分岐に影響を及ぼしていることが示唆された。

P-5

ヌタウナギ *Eptatretus burgeri* の神経組織を覆う髄膜構造の微細形態学的解析

六車 香織、武井 史郎

中部大学応用生物学部環境生物科学科魚類生物学研究室

髄膜は脳や脊髄といった中枢神経系を覆う膜構造であり、硬膜、クモ膜、軟膜の3層で構成される。髄膜の機能として中枢神経系の保護がよく知られているが、近年では中枢神経系と末梢組織との相互作用に関与する組織として、医学・生物学研究の分野で注目されている。しかしながら進化生物学の観点においては、未だ明瞭ではない部分が多い。脊椎動物の進化において、髄膜は魚類からの存在が確認されているものの、ヒトと同じ3層の髄膜は両生類以降の四肢動物で形成されたと考えられている。魚類の髄膜は、ヌタウナギ類では軟膜の1層のみ、ヤツメウナギ類以降の魚類では硬膜と軟膜の2層であると述べられている (Trends Immunol 23:23-30, 2002) もの、既知の研究では魚類における髄膜構造の形態学的研究が不十分と我々は考えた。著者らは既知研究で行われている標本作製法 (10%ホルマリン) では髄膜の形態解析に重大なアーティファクトが発生することを見出し、当研究室での髄膜の形態観察に適した固定液 (ブアン液) を用いた標本作製によって、ヌタウナギにおいてもクモ膜と思われる構造の存在を見出した。今回、静岡県駿河湾産のヌタウナギの生体標本を1個体入手できたため、本発表ではヌタウナギにおける髄膜の微細形態解析について報告する。本発表により、これまで不明瞭であった脊椎動物における髄膜の起源と進化を追究していきたい。

P-6

ミドリフサアンコウ *Chaunax abei* の新鮮な標本を用いた視覚系の形態学的解析

武井 史郎、六車 香織、宗宮 弘明

中部大学応用生物学部環境生物科学科魚類生物学研究室

ミドリフサアンコウ *Chaunax abei* はアンコウ目フサアンコウ科に属し、水深 30~590 m の岩礁および砂泥の海底に生息する底生魚である。我々は 2018 年度の学術講演会において、本種における虹彩に付属した特異な薄膜構造の存在を発表した。この薄膜構造は透過電顕観察において約 170nm の規則正しく配列されたラメラ構造であったことから、ある特定方向からの光を選択的に瞳孔内へ入射させる偏光板の役割と担っていると考えている。しかしながら本種は新鮮な標本の入手が困難であり、以前の発表においてもホルマリン固定標本を用いた観察であったことから、確実な評価ができない状態であった。2021 年 2 月に駿河湾で漁獲された新鮮な標本の入手に成功したため、本研究ではこれらの標本を用いた薄膜構造の形態学的観察を行った。麻酔下で眼の外観を観察した際、前斜め上~上方向からの観察では瞳孔における虹色の反射が観察されたが、横方向や前方向からではこの反射は観察されなかった。虹彩にはホルマリン固定標本と同様に薄膜構造が存在し、光学顕微鏡下においても虹彩の内皮層から伸長した構造が観察された。透過電顕観察においては外層および内層のそれぞれの上皮細胞層には含まれたコラーゲン層の構造が観察され、このコラーゲン層はホルマリン固定標本と同様の規則正しく配列されたラメラ構造であった。以上から本種は、この薄膜構造を実際に利用し上方向からの過剰な光の減少させる、といった独自の視覚特性を有していると推察された。

光-電子相関顕微鏡システムを用いた植物組織の TEM-CLEM 観察

和山 真里奈¹⁾、川元 寛章¹⁾、許斐 麻美¹⁾、豊岡 公德²⁾
株式会社日立ハイテク¹⁾、理化学研究所環境資源科学研究センター²⁾

近年、光-電子相関顕微鏡(CLEM: Correlative light and electron microscopy)法を用い、微細構造と機能性物質の局在との関係を相関して解析することが盛んに行われている。我々は、CLEM 法における観察と相関解析をより簡便・迅速に行うためのシステム「MirrorCLEM」を開発し、SEM や TEM を用いた CLEM 観察フローを検討している[1][2]。MirrorCLEM は光学顕微鏡像を読み込み、電子顕微鏡のステージと 3 点アライメントを行うことで、光学顕微鏡像のどこを観察しているかを確認しながら、同一箇所の電子顕微鏡像を簡便に取得でき、相関像を作る事ができるシステムである。本報告では日立透過電子顕微鏡 HT7800 と MirrorCLEM システムを用いて、植物細胞における細胞小器官の TEM-CLEM 観察を実施した。トルイジンブルー染色したシロイヌナズナの胚珠の準超薄切片、GFP ラベルしたペルオキシソームを含むシロイヌナズナ発芽子葉の超薄切片について、それぞれの CLEM 観察フローを検討したので報告する。

[1] 吉原 他 (2019) 医学生物学電子顕微鏡技術学会誌, Vol. 32, No. 1, 29p-30p.

[2] SI NEWS <https://www.hitachi-hightech.com/jp/sinews/reports/6220206/>

植物透明化用試薬によって透明化したダイズシストセンチュウ感染ダイズ根の
微細構造の検討

古賀 博則
石川県立大学

線虫を接種した根を電顕観察のために固定する場合、線虫がどこにどのような状態にいるか把握しておく必要がある。しかし多くの場合、根表面から線虫を観察することは困難である。そこで、グルタルアルデヒドで前固定した感染根を、植物透明化用試薬 ClearSee™ により透明化して、線虫侵入部位を細切した後に、電顕試料の作製を行なった、その結果、この透明化の後に電顕試料の作製を行っても、植物と線虫の微細構造は透明化をしなかった無処理とほぼ同様に観察された。しかし、感染によって誘導された細胞壁の溶解部位の近傍では、無処理では観察されない微粒子が多く沈着していた。この微粒子の沈着は透明化処理の結果、生じたものと推測された。

第37回学術講演会および総会 実行委員会事務局

〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1
金沢医科大学内
TEL: 076-286-2211 内線3963
Email: kanazawa2021@37th-emtech.com
URL: <http://emtech.jp/37thgakkai/>

学会事務局

〒113-0034 東京都文京区湯島2-31-25 太陽ビル4F
TEL: 03-3815-4584
FAX: 03-3815-4626
Email: office8@emtech.jp
URL: <http://emtech.jp/>

実行委員会

会 長: 石垣 靖人 (金沢医科大学総合医学研究所)
副 会 長: 永山 元彦 (朝日大学歯学部)
実行委員長: 古賀 博則 (石川県立大学生物資源環境学部)
会計責任者: 高木 孝士 (昭和大学電子顕微鏡室)

実行委員 (五十音順)

実行委員 池田 健一 (神戸大学大学院農学研究科)
実行委員 海野 和俊 (帝京大学医学部)
実行委員 及川 理 (名古屋市立大学大学院医学研究科)
実行委員 桑畑 進 (大阪大学大学院工学研究科)
実行委員 洲崎 敏伸 (神戸大学大学院理学研究科)
実行委員 武井 史郎 (中部大学応用生物学部環境生物科学科)
実行委員 田村 友樹 (東京医科歯科大学病院病理部)

主催: 社) 医学生物学電子顕微鏡技術学会

支援企業一覧（五十音順）

企業セミナー協力

株式会社シンテック

株式会社日立ハイテク

バナー広告掲載協力

株式会社日立ハイテク

広告掲載協力

株式会社日立ハイテク

日新EM株式会社

平野純薬株式会社

協賛協力

岐阜歯科学会

第37回学術講演会を開催するにあたり、ご支援を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げますとともに、ますますのご発展を心よりお祈り申し上げます。

第37回学術講演会 実行委員会一同

ダイヤモンドナイフ

最高級・最高品質の **DiATOME** 社製(スイス)



大好評 交換販売も実施中

お手持ちのダイヤモンドナイフをご提供下さい。
DiATOME社の新品のナイフが再研磨価格に！

*スミナイフ(シムナイフ)XAC・トリミングナイフは対象外です。

NanoSuit®溶液

販売開始しました！



製造元: NanoSuit株式会社
販売元: 日新EM株式会社



NanoSuit®溶液Ⅰ
微小生物・個体・生体組織用



NanoSuit®溶液Ⅱ
病理標本・CLEM用



NanoSuit®溶液Ⅲ
細胞用

サンプルあります！



日新EM株式会社

〒160-0007 東京都新宿区荒木町23-9

Tel.03-3355-3001 Fax.03-3353-2888 URL <http://nisshin-em.co.jp/>

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第37回学術講演会および総会 抄録集
2021年10月15日 発行

発 行 者

〒920-0293
石川県河北郡内灘町大学1-1
金沢医科大学内
医学生物学電子顕微鏡技術学会
第37回学術講演会および総会
会長 石垣 靖人
電話番号 076-286-2211 内線 3963

編集責任者

医学生物学電子顕微鏡技術学会
第37回学術講演会および総会
実行委員長 古賀 博則
電話番号 076-227-7444



人と人とのふれあいを
大切にする企業であり続けたい。



平野純薬株式会社
Creative Power & Technical Innovation

〔福井本社〕 福井市下馬2丁目1420番地
〔金沢支店〕 金沢市直江西1丁目100番地
〔富山支店〕 富山市石坂1117番1

TEL.0776-37-4890 FAX.0776-50-1707
TEL.076-239-0758 FAX.076-239-0753
TEL.076-442-4890 FAX.076-442-1707

平野純薬



<http://www.hirano-j.co.jp/>