

令和7年度 TC 論文

生物試料を対象とした走査電子顕微鏡および光学顕微鏡によるイメージング研究支援の体系化ならびに技術職員組織活動の展望

TC カレッジ 物質分析系 TC コース (バイオ)

北海道大学 技術連携統括本部

理学・農学系技術部門

安 井 雅 範

目次

第1章 緒論

第1節 職務内容	3
第2節 バイオ分野における大学の役割	6
第3節 担当イメージング機器の概略	8
第4節 TC 申請に至った経緯	12
第5節 本論文の構成	15

第2章 走査電子顕微鏡 (SEM) に関する研究支援

第1節 バイオ分野の SEM 試料作製法	16
第2節 アウトレンズ方式 SEM の有用性	21
第3節 アウトレンズ方式 SEM を用いた研究支援	23
第4節 老朽化したアウトレンズ方式 SEM の運用	33
第5節 クライオ SEM の研究支援	35

第3章 光学顕微鏡に関する研究支援活動

第1節 共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究支援	40
第2節 STED 超解像顕微鏡を用いた研究支援	43
第3節 レーザー顕微鏡の管理および運用	49

第4章 技術交流ネットワークおよび組織運営に関する活動

第1節 学内技術交流による機器横断的課題解決	51
第2節 学内電子顕微鏡系技術職員交流会の活動	53
第3節 光学顕微鏡トレーニングコースに関する活動	55
第4節 学内技術職員組織での専門部会活動	59
第5節 衛生管理者としての業務	61

第5章 総括および展望

第1節 総括	62
第2節 展望	63
第3節 TC への抱負	64

謝辞	65
----	----

参考文献	66
------	----

研究支援業績	68
--------	----

第1章 緒論

第1節 職務内容

著者は、2008(平成20)年4月1日に国立大学法人北海道大学大学院農学研究院の教室系技術職員として採用された。本学における教室系技術職員組織は、近年の国立大学法人を取り巻く教育研究支援体制の一元化の潮流に応じ、段階的な改組を経て発展してきた経緯がある。2018(平成30)年10月1日からは、北海道大学の全教室系技術職員が、各所属部局と全学一元化組織である「技術支援本部」を兼務する形式となり、部局横断的な教育研究支援体制の整備が進められた。しかし、組織の一元化は依然として形式的なものにとどまっていた。

その後、2025(令和7)年7月1日に、技術支援本部が改組され、実質的な全学一元化組織である「技術連携統括本部」が発足した。この改組に伴い、教室系技術職員は、教育研究系技術職員(以下、技術職員)に改称され、約230名の全技術職員が技術連携統括本部所属として一元化され、各部局に派遣される形式に移行した。図1-1に、現在の技術連携統括本部の組織図を示す。本部内での技術職員が所属する組織は、学内の各部局の位置関係や技術職員数の配置バランスに基づき、5つの技術部門に分かれている。著者は現在、理学・農学系技術部門に所属し、大学院農学研究院に派遣される形式で業務に従事している。

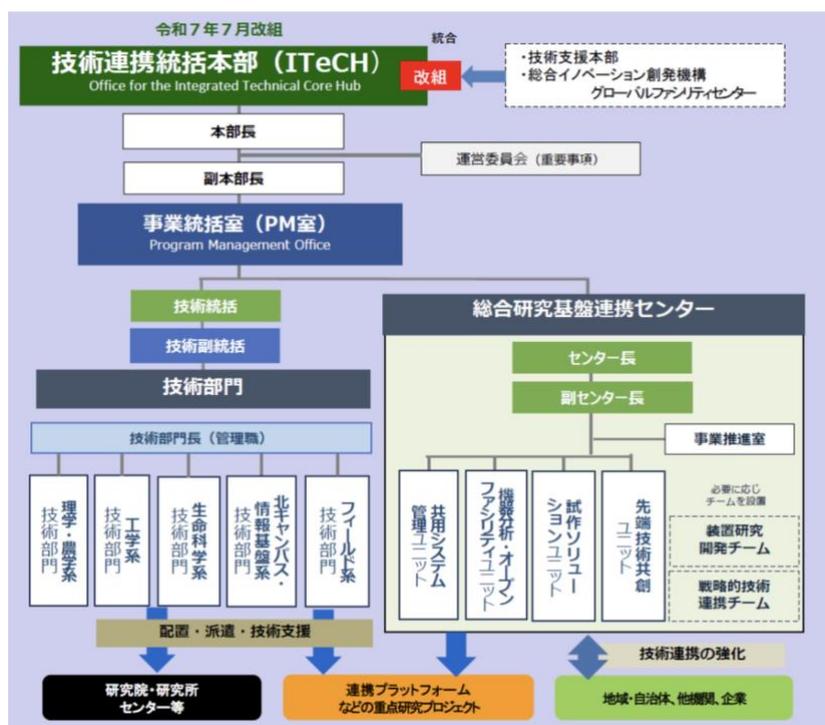


図 1-1 技術連携統括本部の組織図

著者が入職時より所属する北海道大学大学院農学研究院の「生物組織構造解析センター」は、主に生物試料を対象とした微細形態のイメージングに関する教育研究活動を支援するための学内共用機器利用施設(以下、共同利用施設)である。本センターは技術職員2名で運営されており、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope, TEM)、走査電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)および電子顕微鏡試料作製装置群ならびに光学顕微鏡が設置されている。著者は、SEMと光学顕微鏡を主担当とし、高分解能SEM、汎用SEM、クライオSEM、共焦点レーザー顕微鏡、超解像顕微鏡、SEM試料作製装置の運用と研究支援を実施している。なお、TEMは別の技術職員が主担当であり、協力体制を築くことで共同利用施設全体の効率的な運用を実現している。

本センターは、1988(昭和63)年度から1998(平成10)年度まで「電子顕微鏡センター」として電子顕微鏡とその試料作製装置の運用に特化していた。平成11年度より、現名称へ改称され、共焦点レーザー顕微鏡や蛍光顕微鏡などの光学顕微鏡も導入された。これにより、電子顕微鏡と光学顕微鏡を組み合わせた多角的なイメージング研究支援が可能となった。本センターの機器は、同じ農学部局(大学院農学研究院、大学院農学院、農学部)内だけではなく、学内すべての部局の教職員(非常勤職員である学術研究員、博士研究員、技術補助員などを含む。)および学生(大学院生、学部生、研究生)に広く開放されている。図1-2に、近年の年度別利用研究室数の推移を示す。特に、2017(平成29)年度以降は、他部局からの利用に増加傾向が見られる。具体的な利用部局は、理学、医学、歯学、薬学、工学、水産学の大学院・学部に加え、低温科学研究所、遺伝子病制御研究所、電子科学研究所、北方生物圏フィールド科学センターなどの附属研究所・センターにまで及んでいる。この理由として、当時、本学内で分野横断的に研究基盤の共用化を推進する機運が高まっていたことが背景にあると考えられる。

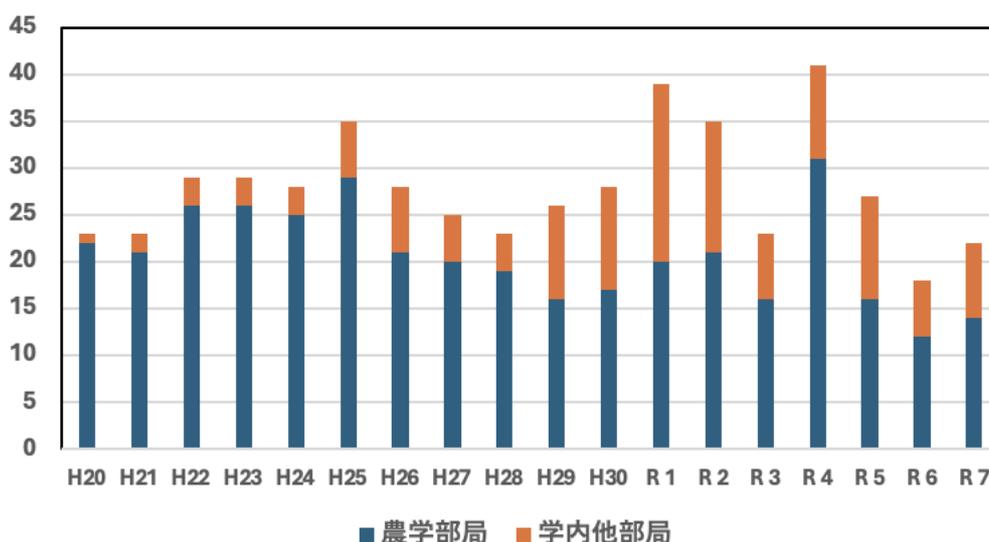


図1-2 生物組織構造解析センターの年度別利用研究室数の推移

注)令和6年度は施設の改修につき7月以降は一部機器のみ稼働のため減少、令和7年度は12月時点

著者の日常業務は、生物組織構造解析センターにおける共用イメージング機器の保守管理および研究支援を中心として構成されている。具体的には、SEM および SEM 試料作製装置、ならびに光学顕微鏡について、日常点検、定期保守、トラブル対応を含む保守管理業務を担当している。また、これらの機器を利用する研究者や学生に対して、操作講習を実施するとともに、利用マニュアルの作成や必要に応じた改訂を行い、安全かつ円滑な利用環境の整備に努めている。さらに、著者は本センターの利用ルールの策定や利用料集計など、共同利用施設としての運営業務にも携わっている。

実際の研究支援業務としては、SEM 観察を目的とした生物試料作製法に関する技術指導を行っているほか、生物試料の SEM 試料作製および観察、画像取得について受託業務として対応している。これらの業務を通じて、多様な生物種や試料特性に応じた適切な前処理条件の選択や観察手法の提案を行い、研究目的に即したイメージング結果の取得を支援している。

加えて、令和 6 年 6 月までの期間には、リアルタイム PCR 装置の保守管理および操作講習を担当し、分子生物学的解析を含む研究支援にも従事してきた。このように、形態解析のみならず、バイオ分野における基礎的な分析機器の運用支援にも関与してきた点が、著者の業務の特徴である。

日常業務以外の活動として、著者は 2020(令和 2)年 3 月に第一種衛生管理者資格を取得し、同年 4 月より衛生管理者としての業務を担当している。具体的には、学内の衛生管理者連絡会議への参加や、産業医による職場巡視への同行を通じて、研究・教育現場における安全衛生環境の維持や向上に取り組んでいる。また、2025(令和 7)年 10 月からは、技術連携統括本部の事業統括室専門部会の活動に参画し、技術連携広報専門部会および将来構想検討専門部会の活動を通じて、学内技術職員間の情報共有や連携強化、将来的な教育研究支援体制のあり方に関する検討に携わっている。こうした活動は、現場での研究支援業務に加え、技術職員組織全体の発展に寄与するものである。

第2節 バイオ分野における大学の役割

第1項 バイオ分野における構造的課題

バイオ分野の研究には、生命現象を対象とする特性上、産業界が単独で取り組むには多くの困難を伴うという、分野固有の構造的な課題を有している。

第一に技術的課題として、基礎研究から実用化に至るまで長期の開発期間を要することが挙げられる。生命現象は非線形的であり、生物の種差や個体差の影響を強く受けるため、実験結果の再現性確保や将来予測が極めて困難である。このような研究特性に対応するためには、実験操作を担う「ウェット技術」と、機器操作やデータ解析を担う「ドライ技術」の双方に精通した高度専門人材が必要となるが、その育成には多大な時間を要する。

第二に経済的課題として、細胞培養施設や高度分析機器などへの巨額な初期投資に加え、継続的な維持管理費が発生する点が挙げられる。また、酵素、抗体、核酸などの特殊試薬は高単価であり、研究の進展に伴って継続的な支出が必要となる。これらのコスト構造は、短期的な収益性を重視する企業活動とは相容れない部分が多い。

第三に、規制および倫理的課題が存在する。遺伝子組換え実験、動物実験、病原体取扱いなどには厳格な法規制が課されており、適切な管理体制の構築が不可欠である。さらに、新規バイオ技術に対しては社会受容性が確立していない場合も多く、研究開発そのものが社会的議論の対象となり得る。このような状況下では、企業単独での大規模な投資は高いリスクを伴う。

第2項 大学に期待される役割

以上のような背景から、バイオ分野においては大学が果たす役割が極めて重要となる。内閣府の「バイオ戦略2020」においても、大学は産学官連携のハブとして、知的基盤や高度な解析環境を提供する役割が期待されている(内閣府 2020)。これを受けて、大学は、企業が単独では担いきれない研究基盤を提供する存在であり、その果たすべき役割は主に以下のとおりである。

第一に、高額機器の共用化と研究基盤の安定的な提供である。バイオ研究に必要な高度な分析機器や設備は、導入・維持に多大な費用を要する。そのため、大学は高度機器を共用化し、研究者がアクセスできるインフラを提供することで、研究効率の向上とコスト削減に貢献する役割を担っている。文部科学省は2022(令和4)年に「研究設備・機器の共用推進に向けたガイドライン」を策定し、大学等の研究設備・機器の共用体制の整備を後押ししている。このガイドラインは、研究設備の計画的整備・共用の促進と有効活用を目的としており、各大学が組織内や組織間で機器を共有する体制を構築することを推進している(文部科学省 2022)。

第二に、高度技術専門人材の育成と技術教育の強化が挙げられる。バイオ研究支援には、試料作製から観察・解析までの一連の手法を理解し運用できる“複合型技術者”が不可欠である。しかし専門分野が細分化し、ウェット(実験)とドライ(解析)の両面に精通した人材育成は容易でない。大学は教育課程の中でこれらを体系的に学ばせる場を提供し、研究者・技術者双方

の基盤能力の向上を図るとともに、学内トレーニングや講習会を通じて次世代技術者の育成に寄与する。

第三に、法規制や倫理的課題に対応した安全で安定的な研究環境の確保である。バイオ研究は遺伝子組換え、動物実験、病原体取扱いなど高度な法規制や倫理的配慮を要するため、適切な安全管理体制が不可欠である。大学は研究倫理や安全基準を組織的に運用し、研究者が安心して研究に取り組める環境を整備する責務を負っている。

これらの役割は、設備や制度が存在するだけでは機能しない。設備機器の維持管理、利用支援などを通じて研究基盤を日常的に運用する高度技術専門人材の存在によって、研究インフラは実質的に機能する。

以上のように、大学は研究インフラの運用、人材育成、安全環境の整備という3つの側面からバイオ研究を支える基盤を提供しており、これらの側面は、政府が掲げる知的基盤整備および研究設備共用推進の方針とも合致している。大学は科学技術・イノベーションシステムの中核を担う存在であり、共用機器と高度技術専門人材による支援体制のもとで研究成果の創出と人材育成が進められている。

このような大学の役割の中で、著者の職務はとりわけ「高額機器の共用化と研究基盤の維持」および「複合型技術人材の育成」に関わる位置にある。生物組織構造解析センターにおいてSEM および光学顕微鏡の運用を担うことは、研究インフラとしての共用機器を安定的に維持することに直結している。これにより、研究者は高度なイメージング装置を日常的に利用でき、多様なバイオ研究を実施することが可能となる。また、著者は機器の操作講習や試料作製技術の指導を通じて、利用者が単に装置を使用するだけでなく、観察原理や試料特性を理解した上で研究を進められるよう支援している。これは、ウェット操作とドライ解析を橋渡しする技術的視点を研究現場へ還元する活動であり、バイオ分野で求められる複合型人材の育成にも寄与するものである。さらに、法規制や安全管理に配慮した装置運用、適切な試料取扱い指導、研究環境の維持といった業務も、大学が担う「安全で安定した研究環境の提供」の一端を構成している。著者は、バイオ分野の研究を支える技術職員として、共用研究基盤の安定運用と高度技術支援の両面から、学術成果の創出と専門人材の育成に資することができる施設運営を担うことを使命としている。

第3節 担当イメージング機器の概略

第1項 イメージング技術の進歩

バイオ分野の発展は、イメージング技術の進歩と密接に関係している。イメージング技術は、生物の微細形態や生命現象を可視化するための基盤技術であり、「見えなかったものを見えるようにする」ことで生命科学の理解を飛躍的に前進させてきた。

17世紀には顕微鏡が誕生し、生物観察は肉眼の限界を超えた段階へと進んだ。ロバート・フックは複合顕微鏡を用いてコルク組織を観察し、「細胞 (cell)」の存在を報告した (Hooke 1665)。一方、アントニ・ファン・レーウェンフックは単レンズ顕微鏡を改良し、微生物や精子、血球などを観察した (Leeuwenhoek 1677)。これらの発見は、生命の構造が微小な単位から構成されていることを示した初期の成果である。

19世紀には顕微鏡の光学理論が確立された。エルンスト・アッベは顕微鏡の分解能が光の回折現象によって制限されることを理論的に示し、その分解能 d を下記の式で定義した (Abbe 1873)。

$$d = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n\sin\theta}$$

λ : 光の波長, NA: 対物レンズの開口数,

n : 標本と対物レンズの間の媒質の屈折率, θ : 対物レンズの開口角

この理論により、光学顕微鏡の分解能が約 200 nm 程度に制限されることが理解され、顕微鏡開発は理論に基づく精密化の時代へと進んだ。

19世紀末から20世紀初頭にかけて、顕微鏡光学系は大幅に改良され、対物レンズの収差補正や明視野・位相差観察が可能になった。蛍光顕微鏡の登場により、特定タンパク質や細胞内構造の可視化が可能となり、細胞機能や分子動態の解析が進んだ。

20世紀後半には光学顕微鏡の高度化が進んだ。共焦点レーザー顕微鏡の実用化により、試料内部の光学的断層像を取得できるようになり、三次元構造の解析が可能となった。さらに、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) の発見と蛍光タンパク質技術の発展は、生細胞内での分子動態や遺伝子発現の可視化を可能にし、機能解析の時代を切り開いた。21世紀に入ると、回折限界を超える超解像顕微鏡が登場した。誘導放出抑制 (Stimulated Emission Depletion, STED) や構造化照明などの技術により、従来の光学顕微鏡では観察できなかった細胞内小器官の微細構造やタンパク質の局在を数十ナノメートルの分解能で可視化できるようになった。これにより、光学顕微鏡と電子顕微鏡の間に存在していた分解能のギャップが縮小した。これにより、形態と機能を統合的に解析する新たな研究領域が広がっている。(Pawley, 2010, Albert et al. 2014)。

一方で、電子顕微鏡は、20世紀初頭に電磁レンズの原理を用いたTEMが開発されたことから始まる。1930年代にエルンスト・ルスからにより初めて実用的なTEMが開発され、分解能は光学顕微鏡を大幅に超え、細胞内小器官やウイルス粒子の詳細構造が観察可能となった。1950年代にはSEMが登場し、細胞や組織の表面微細構造を高解像度で観察できるようになった。SEMは試料を電子線で走査することにより、表面の形態を立体的に把握できるため、細胞形態学や材料界面解析に幅広く応用されるようになった。さらに、電界放出型SEM(Field Emission SEM, FE-SEM)の導入により、高分解能かつ高コントラストでの観察が実現し、生物試料の表面微細構造解析に不可欠な技術となっている(Bozzola and Russell, 1999)。

第2項 SEM および共焦点レーザー顕微鏡について

SEMは、電子線を試料表面上で走査し、その表面から放出される二次電子または反射電子を検出して像を形成する機器である(図1-3)。電子線は可視光に比べて波長が極めて短いため、高い空間分解能で試料表面の微細構造を観察できる。主な構成要素は、電子銃、収束レンズ、偏向コイル、対物レンズ、試料室、二次電子検出器、および真空系である。電子銃から放出され電磁レンズにより収束された電子プローブが試料表面を走査し、試料表面で電子が相互作用することで発生する二次電子は表面の凹凸形状を示し、生物試料の立体的な微細形態観察に適している。一方、反射電子は原子番号依存性を示すため、組成コントラストの取得に有用である。

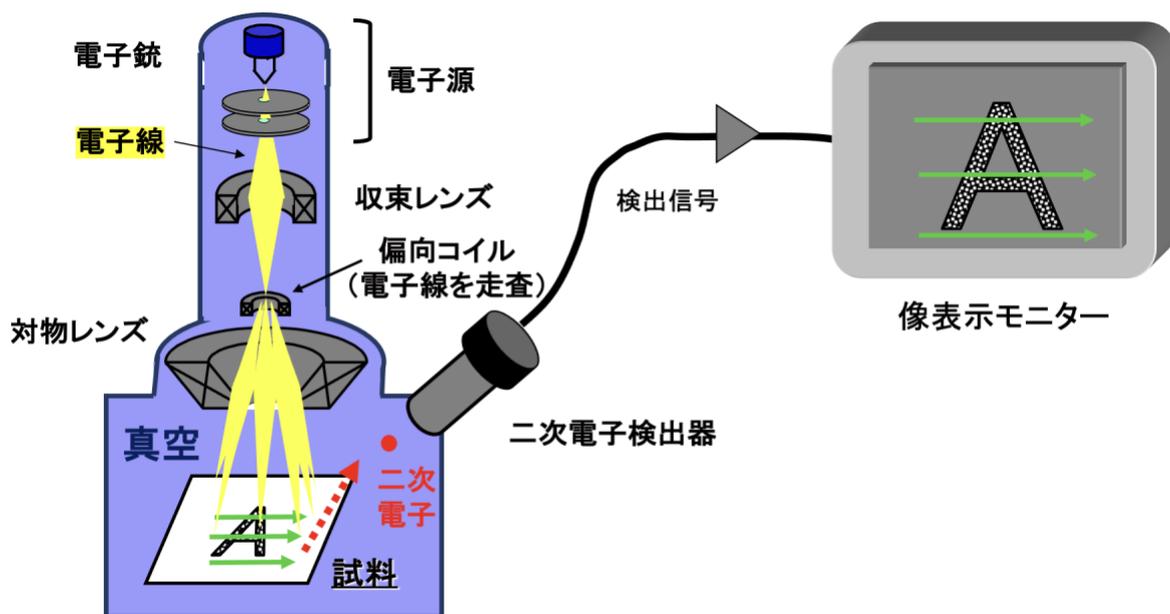


図1-3 SEMの構造図

一般的に水分を多量に含み、導電性を持たない生物試料の SEM 観察では、試料の脱水、固定、乾燥、導電性付与といった試料作製技術が、最終的な取得する画像の質を決定づける。さらに、装置の性能を最大限に発揮させるためには、電子光学系の緻密な調整が不可欠である。具体的には、電子銃の軸合わせ、対物絞りの調整および非点収差の補正といった操作技術が、高倍率観察における分解能や画質を左右する。このように、生物試料特有の試料作製技術と、装置の性能を最大限に発揮する電子光学系の調整の両立が、高度な研究支援に不可欠である。

一方、図 1-4 で示すように、共焦点レーザー顕微鏡は、レーザー光を光源とし、対物レンズを通して試料中の蛍光標識分子を励起し、発生した蛍光を検出する顕微鏡である。最大の特徴は、ピンホールを用いた共焦点光学系により、焦点面以外からの不要な散乱光や背景蛍光を除去できる点にある。これにより、光学的断層像の取得が可能となり、厚みのある試料の三次元構造解析が実現する。主な構成要素は、レーザー光源、ダイクロイックミラー、対物レンズ、ピンホール、蛍光検出器である。この原理により、試料内の任意の深さで観察が可能となり、細胞内構造や組織内における分子局在解析に広く用いられている。また、ピンホール径を適切に設定することで高さ方向の光学分解能が向上し、精密な三次元イメージングが実現する。

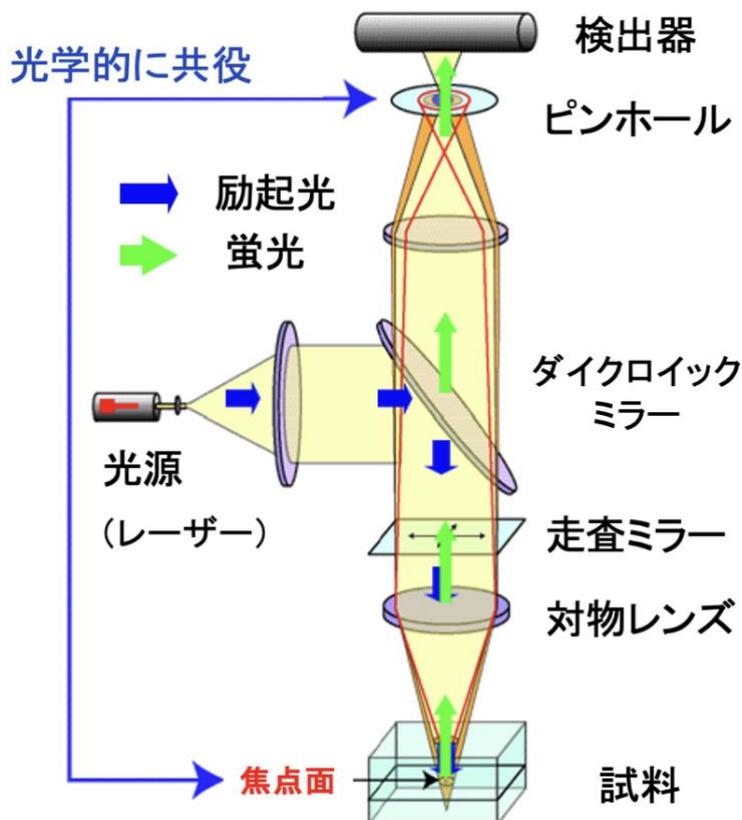


図 1-4 共焦点レーザー顕微鏡の構造図
ピンホールによって焦点面以外の光が除去される。

実際の観察においては、試料への光毒性や蛍光の退色を抑えるための励起レーザー出力の最適化や、微弱な信号を正確に捉えるための検出器感度の微調整が不可欠である。さらに、本手法は多色蛍光観察やライブイメージングにも適しており、形態と機能に関する情報を統合的に取得できる点に特徴がある。

SEMは、細胞や組織表面の微細形態を高分解能で可視化する形態学的解析技術として、共焦点レーザー顕微鏡は、蛍光標識を用いて細胞内部構造や分子局在を三次元的に解析する機能解析技術として、それぞれ異なる強みを有している。現代のバイオ分野の研究では、形態情報と機能情報を統合して包括的に生命現象を理解することが要求されており、両者は相補的なイメージング技術として利用されることがある。しかし、これらの高度な機器は、単に導入するだけでは十分な研究成果には結びつかない。SEMでは試料の固定、脱水、乾燥、導電処理などの前処理が観察結果を大きく左右し、共焦点レーザー顕微鏡では蛍光標識法や観察条件の設定が解析精度に直結する。このように、機器の性能を最大限に引き出すためには、試料作製技術、観察条件の最適化および装置特性の理解が技術職員として不可欠である。

本センターでは、電子顕微鏡と光学顕微鏡を同一施設内で運用しており、生物の微細形態情報と蛍光標識による機能情報を補完的に取得できる体制を提供している。例えば、共焦点レーザー顕微鏡によって細胞機能や分子局在を可視化した後、同一試料系についてSEM観察を行い微細形態との対応関係を検討するといった解析が可能であり、形態学的知見と分子生物学的知見を橋渡しする上で重要な役割を果たしている。

第4節 TC申請に至った経緯

第1項 TCカレッジ受講の動機

著者がTCカレッジを受講するに至った背景には、学内外における研究基盤強化の動向がある。北海道大学は2020(令和2)年度に文部科学省「先端研究基盤共用促進事業(コアファシリティ構築支援プログラム)」に採択され、研究設備の共用化および高度技術専門人材の育成体制の強化が推進された。この流れを受け、令和5年度に本学技術支援本部より、同事業の一環として「令和5年度北海道大学高度技術専門人材育成長期研修(TCカレッジ)」の受講生募集が行われ、学内技術職員を対象とした長期的かつ体系的な育成プログラムが提示された。著者は、本学から選抜された5名の受講生のうちの一員として本研修に参加した。

本研修への参加を志望した最大の動機は、技術職員を対象とした体系的な長期研修に魅力を感じた点にある。技術職員に特化した従来の研修は、汎用機器の操作法といった短期間の技術習得に限定される傾向があった。しかし、TCカレッジは、技術職員を単なる機器管理者や裏方としてではなく、「研究者のパートナー」として位置付ける理念のもとに設計されており、著者はこの考え方に深く共感した。日常の研究支援業務を通じて、技術職員が研究活動を支える中核的な存在であることを実感していた著者にとって、本研修は自身の役割を見直し、より幅広い知識と高度な技術を習得することができる重要な機会であると考えた。

また、2016(平成28)年に開催された北海道大学GFCキックオフシンポジウムにおいて、当時本学GFC副センター長だった江端新吾TCカレッジ長より、大学の研究力向上のために技術職員の活躍促進と地位向上に尽力していることを直接伺った。この経験もまた、本研修受講を志望する原動力となった。技術職員の存在意義を明確化しようとするその姿勢に深い感銘を受け、TCカレッジは、自身の専門性向上のみならず、大学技術職員という職種としての発展にも寄与し得る取り組みであると認識した。

カリキュラム面においては、特に中級・上級カリキュラムで、担当機器の枠を超え、質量分析装置や核磁気共鳴装置など、多様な汎用性の高い分析機器に関する知識と技術に触れることができる。このことにより、研究支援を俯瞰的に遂行する能力の向上が期待される。また、マネジメントカリキュラムでは、共同利用施設や学内技術職員組織の運営に不可欠なコミュニケーション能力、調整力、交渉力など、従来の技術職員向けの研修では学習する機会がほとんどなかった能力の習得が可能である。さらに、対面形式の研修を通じて全国の大学に所属する技術職員や機器メーカー企業の技術者との人的ネットワークを構築できる点も大きな強みであり、学外との連携強化に資する重要な機会と捉えた。

以上の理由から、著者はTCカレッジへの参加を、自身の専門性の高度化のみならず、将来的に研究者と対等に議論し研究を支援できる次世代技術職員のロールモデルとして研究支援体制の発展に貢献するための重要なステップと位置付けた。本研修で得た知識、技術および人的ネットワークを基盤として、研究支援力の最大化を図ることを目標に受講を志望したものである。

第2項 物質分析系(バイオ)TCの申請に至った経緯

TC カレッジの受講を通じて、著者は技術職員に求められる役割が、機器の保守管理や操作支援にとどまらず、研究の方向性に影響を与え得る高度な研究企画力へと拡大していることを認識した。特にバイオ分野においては、生命現象の理解のために形態情報と機能情報を統合的に扱う必要があり、イメージング技術、分子生物学的手法、データ解析など複数の専門領域を横断する支援体制が不可欠である。このような研究分野において、単一技術の提供にとどまらず、研究全体を俯瞰して研究者に助言や提案を行うことができる高度専門技術人材が重要であるという考えに至った。

著者はこれまで、SEM および光学顕微鏡を中心とした研究支援に従事し、生物試料の形態観察や画像処理に関するドライプロセスと、SEM 試料作製や光学顕微鏡プレパレート作製などのウエットプロセスの双方に関わる経験を積んできた。また、共焦点レーザー顕微鏡や超解像顕微鏡の運用を通じて、分子レベルの機能情報と形態情報を結びつける解析の重要性を実感している。これらの経験は、真核生物および原核生物の構造と機能を理解し、ドライとウエットの両面から研究にコミットするという旧バイオ系(現物質分析系(バイオ))TC 像(図 1-5)に合致するものであると考えた。

東工大
TCカレッジ TECHNICAL CONDUCTOR
バイオ系テクニカルコンダクター "TC"
コース担当：高田 綾子 (バイオ部門) 監修教員：和地 正明 教授
Tokyo Tech

目指すべきTC像

真核生物と原核生物の構造と機能を理解し、ドライとウエット双方のプロセスを用いた研究にコミットする。バイオ関連分野の広範囲におよぶ研究への支援に必要な高度な技術力を有するとともに、最新の解析手法や研究動向にも敏感である。異分野連携を視野に入れた共同研究の企画・支援において、専門分野では研究者をリードし、適宜的確な助言や提案を与える。次世代後継者の育成にも積極的に取り組み、組織の発展に貢献する。

図 1-5 旧バイオ系(現物質分析系(バイオ))TCコースの目指すべき TC 像
※著者が TC カレッジに入学した令和 5 年度当時のもの

さらに、研究支援の現場では、イメージング機器の特性を踏まえた試料作製法や観察法の最適化、画像データの解釈に関する助言など、研究者との協働が課題解決に求められている。著者はこうした実践の中で、専門分野において研究者をリードし得る立場の技術人材像を強く意識するようになった。また、講習会やトレーニングコースの実施を通じて次世代技術者の育成に関わる機会も増えており、教育的役割の重要性も認識している。

これらの経験と問題意識から、著者は自身の専門性をバイオ分野という枠組みの中で体系化し、学術的に棚卸する必要性を感じた。以上の経緯から、著者は、高度技術専門人材としてのさらなる成長、研究企画力の強化、次世代技術者の育成および技術職員組織の発展を推進するために、TC への申請に至った。

第 5 節 本論文の構成

本論文は、生物試料を対象としたイメージング機器の研究支援活動を軸として、著者の技術的専門性および組織的貢献の実績をまとめ、物質分析系 TC(バイオ)としての役割と今後の展望を明らかにすることを目的とする。全体は、以下の 5 章で構成される。

第 1 章 緒論

本章では、本論文の前提となる著者の職務、所属環境、バイオ分野における大学の役割、および担当するイメージング機器の概要を述べる。さらに、著者の研究支援活動がどのような環境のもとで行われているのかを示したうえで、物質分析系 TC(バイオ)を申請するに至った論理的背景を示し、本論文全体の構造を概説する。

第 2 章 走査電子顕微鏡(SEM)に関する研究支援

本章では、著者の主担当機器である SEM を用いたバイオ分野の研究支援活動について詳述する。生物試料特有の試料作製法、アウトレンズ方式 SEM の有用性、その特性を活かした研究支援事例、老朽化装置の運用上の工夫、さらにクライオ SEM による研究支援を取り上げる。試料作製から画像取得までを一貫して支える、著者のドライおよびウエット技術の実践力を示す。

第 3 章 光学顕微鏡に関する研究支援活動

本章では、著者のもうひとつの主担当機器である光学顕微鏡を用いた研究支援活動について述べる。共焦点レーザー顕微鏡および STED 超解像顕微鏡の研究支援を通して、蛍光観察、機能解析、超解像技術への対応力を示すとともに、レーザー顕微鏡の管理・運用業務を通じて、高度機器を安定的に運用する体制整備について論じる。

第 4 章 技術交流ネットワークおよび組織運営に関する活動

本章では、現場での研究支援業務を超えた、組織横断的活動や人材育成、運営面での貢献を扱う。学内技術交流による課題解決、電子顕微鏡系技術職員交流会の活動、光学顕微鏡トレーニングコースへの関与、専門部会活動、および衛生管理者としての業務を通して、技術の共有、人材育成、安全管理および組織運営に関わる取り組みを示す章である。目指すべき TC 像における「組織貢献」「次世代育成」「連携推進」に対応する部分にあたる。

第 5 章 総括および展望

本章では、本論文の内容を総括し、著者の研究支援活動の意義を整理する。また、今後の技術発展への対応、研究支援の高度化、異分野連携の推進、後継者育成に関する展望を示し、物質分析系 TC(バイオ)としての抱負を述べる。

第2章 走査電子顕微鏡 (SEM) に関する研究支援活動

第1節 バイオ分野の SEM 試料作製法

第1項 生物試料に前処理が必要な理由

SEMにおいて高分解能な画像を取得するためには、鏡筒および試料室内を高真空環境に維持する必要がある。これは、残留気体分子による電子の散乱を防止し、電子線プローブの安定性と分解能を維持するためである。しかし、多量の水分を含む生物試料をそのまま高真空中に導入すると、急激な蒸発に伴う試料の収縮や変形が生じる。このことは、本来の微細構造が著しく損なわれるだけでなく、蒸発した水分は SEM 鏡筒内の真空度低下や電子光学系の汚染の原因となり、機器の運用にも悪影響を及ぼす。また、生物試料は主として有機物から構成されるため電気伝導性が比較的低く、電子線照射により試料表面に電荷が蓄積するチャージアップ現象が起こりやすい。この現象は、像の歪みや異常なコントラストを引き起こす。したがって、生物試料の SEM 観察では、一般的に構造保持のための化学固定、脱水、乾燥および導電処理といった一連の前処理工程が必要となる。

第2項 生物試料の SEM 試料作製法

著者の実務における標準的な試料作製プロセスを以下に詳述する。

①洗淨

試料表面に付着した粘液、分泌物、培地成分などの不要物を除去する。多くの場合、生理的条件に近い pH 7.0-7.4 の緩衝液を用いる。使用する緩衝液は、リン酸緩衝液、カコジル酸緩衝液などである。この際、緩衝液の濃度を適切に調整し、試料の細胞内浸透圧と等張させることが重要である。浸透圧が不適合である場合、細胞の膨潤や収縮を招く。

リン酸緩衝液は安価で扱いやすい反面、試料中のカルシウムイオン等と反応し不溶性の沈殿を生じる懸念がある。これに対し、カコジル酸緩衝液は、カルシウム沈殿を生じないため、生体構造の保存性に優れるが、砒素化合物を含有するため法令に基づく厳格な安全管理のもとで取り扱う。

②前固定

グルタルアルデヒドやホルムアルデヒドなどの架橋型固定剤を用いてタンパク質を架橋し、細胞や組織の微細構造を安定化させる。固定液そのものの濃度に加え、緩衝液成分による浸透圧の影響を考慮する必要がある。

固定力に関しては、分子内に2個のアルデヒド基を有するグルタルアルデヒドが、1個のみのホルムアルデヒドよりも優れている。一方で、浸透速度は、ホルムアルデヒドの方がグルタルアルデヒドよりも分子量が小さいため優れている。試料の大きさや性質に応じてこれらを混合した固定液(例:カルノフスキー固定液(Karnovsky 1965))を用いることがある。

なお、固定法には動物の血管系を利用する「灌流固定」と、切り出した組織を固定液に浸す

「浸漬固定」がある。著者の研究支援においては浸漬固定しか経験がないが、浸漬固定では固定液の浸透が外側から進行するため、試料の細切(1mm 角程度)や、固定時間の調整を適切に行うことが、微細構造の保存において重要となる。

さらに、植物組織では、細胞間隙に含まれる空気によって試料が完全に浸漬せず、固定液の浸透を妨げることがある。その場合、固定液中で減圧による脱気操作を行い(図 2-1)、均一な固定を可能にする。



図 2-1 バイアル瓶に入れた植物組織試料の減圧脱気

③洗淨(後固定を行う場合)

前固定後、緩衝液で3回程度洗淨を行う。これは、前固定液(還元剤)と後固定液(酸化剤)が相互反応するのを回避するためである。この洗淨を十分に行うことで、固定剤同士の反応による沈殿物の形成を防ぎ、試料表面を清浄な状態に保つことができる。

④後固定

必要に応じて、四酸化オスミウムによる後固定を行う。これにより、前固定では保持しにくい生体膜などの脂質成分(不飽和脂肪酸)が固定される。また、オスミウムは重金属であるため、二次電子の発生効率を上昇させ、膜構造のコントラストを向上させる副次的効果も有している。

⑤脱水

固定後の試料は依然として水分を多量に含むため、エタノールまたはアセトンの有機溶媒による段階的な置換(脱水)を行う。50%程度の低濃度から最終的に99.5%まで段階的に濃度を上昇させる上昇系列を適用することで、急激な浸透圧変化による収縮を最小限に抑制する。

なお、TEMの試料作製では樹脂包埋を行うため、モレキュラーシーブ等で無水化した100%エタノールまたはアセトンでの厳密な脱水が必要だが、SEM試料作製においては、99.5%を最

終ステップとすることで良好な結果が得られる。

※凍結割断法

組織内部の三次元的な微細構造を観察する場合、脱水の過程で「凍結割断法」を導入することがある。これは、エタノール等に置換した試料をゼラチンカプセルに封入し、液体窒素中で凍結させ、物理的に割断する手法である。これにより、細胞内小器官や組織の層構造を、機械的歪みを最小限に抑えた断面を露出させることが可能となる。

⑥乾燥

生物試料のSEM前処理において最も形態保存に影響する工程が乾燥である。自然乾燥では、液体から気体への相変化時に発生する表面張力により、試料表面の微細構造が収縮しやすい。エタノールやアセトンは、水と比較して表面張力が小さいものの、依然として形態崩壊を引き起こす要因となる。そのため、表面張力の影響を物理的に回避する試料乾燥法として、以下のいずれかの手法が用いられる。

(i) 臨界点乾燥法

脱水後の溶媒を(使用する臨界点乾燥装置の仕様に応じて、中間液である酢酸イソアミルを介して)液体二酸化炭素(液化炭酸)に置換し、二酸化炭素の臨界温度(31.1°C)および臨界圧力(7.38 MPa / 72.8 atm)を超える超臨界流体状態から減圧して乾燥する(図2-2)。気体と液体の界面を消失させることで、表面張力による試料収縮を最小限に抑制しながら乾燥を行う。

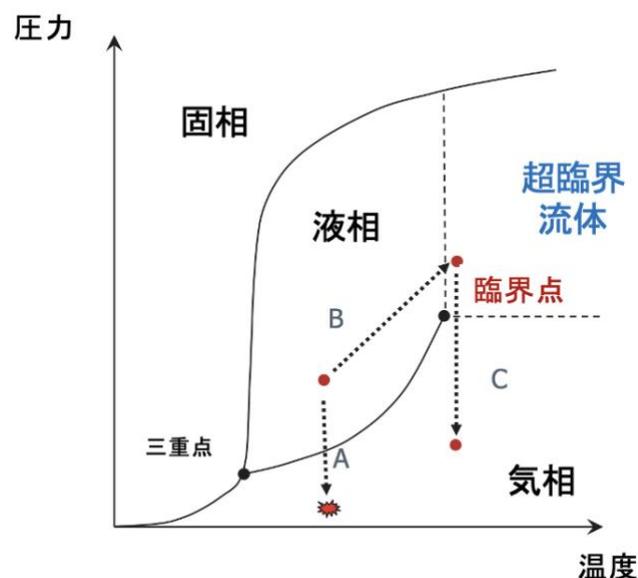


図2-2 相図 (Aは空気乾燥法、BおよびCは臨界点乾燥法である。)

本乾燥法では液化炭酸と装置の試料チャンバーの温度差を利用して液化炭酸を試料チャンバーに導入するが(図2-3)、北海道のような寒冷地の冬季においては、液化炭酸容器の温度低下によりこの温度差が確保できず、液化炭酸の導入が困難になる特有の課題がある。こ

のため、冬季の間は、臨界点乾燥装置の設置環境の温度管理を徹底する必要がある。

なお、臨界点乾燥装置は高圧ガスを使用するため、以前は自治体への「高圧ガス製造施設」としての届出義務があった。現在は法令改正により指定要件を満たす装置の届出は不要となったが、依然として高圧ガス容器の取り扱いには安全管理が不可欠である。



図 2-3 臨界点乾燥装置 (Leica CPD300) と液化炭酸ガス容器

(ii) *t*-ブチルアルコール凍結乾燥法

脱水溶媒を *t*-ブチルアルコール (凝固点 25.5°C) に置換し、凍結後に真空中にて昇華させる手法である。液体を経由せず固体から直接気体へ相変化させるため、表面張力による収縮を抑制できる。*t*-ブチルアルコールは凝固点が 25.5°C であるため、室温以下で容易に凍結させることが可能で、操作が比較的簡便である。

⑦ 載台

乾燥後の試料は、カーボン両面テープ (図 2-4A) または導電性ペースト (カーボンペースト等、図 2-4B) を用いて、アルミニウム製の試料台へ固定する。この際、試料と試料台の間の導通を確実に確保することが、観察時の像の安定性に寄与する。カーボンペーストは、高い導電性と強固な固定力が得られる反面、SEM 鏡筒内で多量の脱ガスを発生させ、真空度低下や電子光学系への汚染を招く恐れがある。そのため、十分な予備乾燥時間を設けるとともに、試料のサイズや性質に応じて基本的には脱ガスの少ないカーボンテープを使用するなど、機器負荷の低減と観察の安定化を両立させる必要がある。

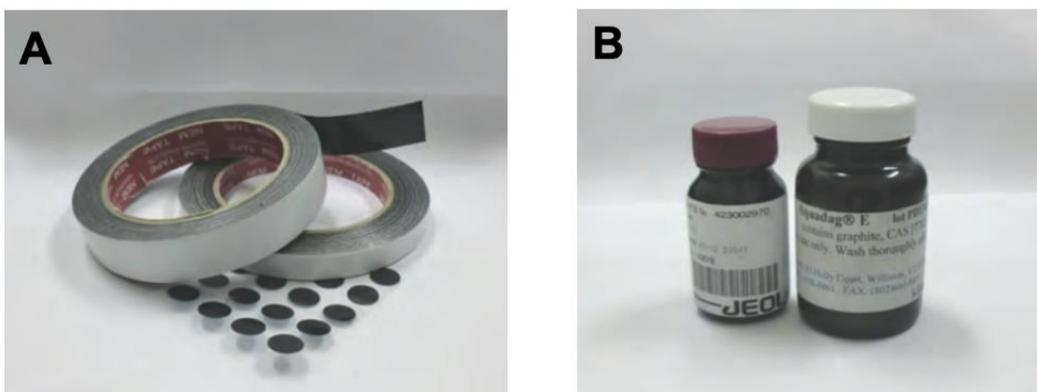


図 2-4 (A) カーボン両面テープ, (B) カーボンペースト

⑧導電処理

乾燥後の生物試料は非導電性であるため、二次電子放出効率が高い金、金パラジウム、白金パラジウム、パラジウムなどの金属をスパッタリングにより数 nm～十数 nm の膜をコーティングする。これにより試料表面に導電層を形成し、電子線照射時の試料のチャージアップを防ぐとともに、二次電子放出効率を上昇させることにより像コントラストを向上させる。加えて、試料の電子線損傷を抑制することができる。コーティングには、専用のイオンスパッタリング装置(図 2-5)を用いる。

その他、下記のコーティング法を用いることがある。

オスmiumコーティング: 表面の凹凸が著しい試料や、より高倍率での微細構造観察が必要な場合に用いる。オスmium薄膜は膜質が極めて緻密なアモルファス状で薄いため微細構造の隠蔽が少ない。また、コーティング時の回り込み性が良好なため、複雑な立体構造の深部まで均一なコーティング膜の形成が可能である。オスmiumは重金属であるため、高い二次電子放出効率による高コントラストな像が得られる。

カーボンコーティング: エネルギー分散型 X 線分析(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS)の元素分析を主目的とする場合は、炭素をコーティングする。これにより、金属コーティング膜由来の特性 X 線ピークの干渉を排除し、試料由来の元素を正確に特定することができる。

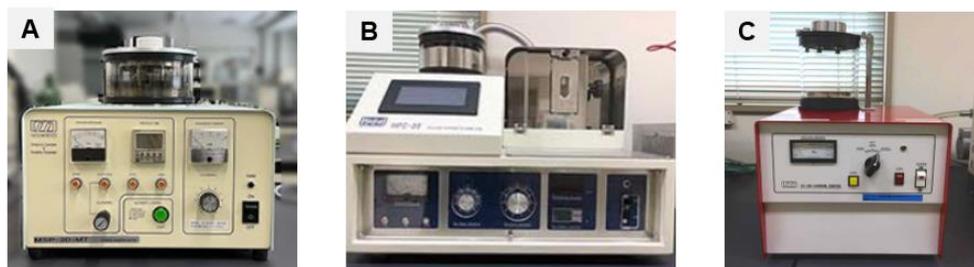


図 2-5 イオンスパッタリング装置 (A) 金属用, (B) オスmium用, (C) カーボン用

実際の研究支援では、観察目的や試料特性に応じて試料作製法を最適化する必要がある。例えば、微細な表面形態を優先するか、あるいは組織内部の三次元的なつながりを優先するかといった判断に際して、著者は利用者との事前協議を通じて研究目的を的確に把握し、最適な手法を提案することで、良好な SEM 画像が得られるよう支援を実施している。

第 2 節 アウトレンズ方式 SEM の有用性

高分解能 SEM (FE-SEM) は、対物レンズの構造および二次電子検出方式の違いにより、インレンズ方式、セミインレンズ方式、アウトレンズ方式の 3 種に分類される (Mulver 1982, 図 2-6)。これらは、分解能や被写界深度、試料適応性などの特性に差異がある。本節では、各方式の特性を比較しつつ、生物試料の観察に対するアウトレンズ方式の有用性を述べる。

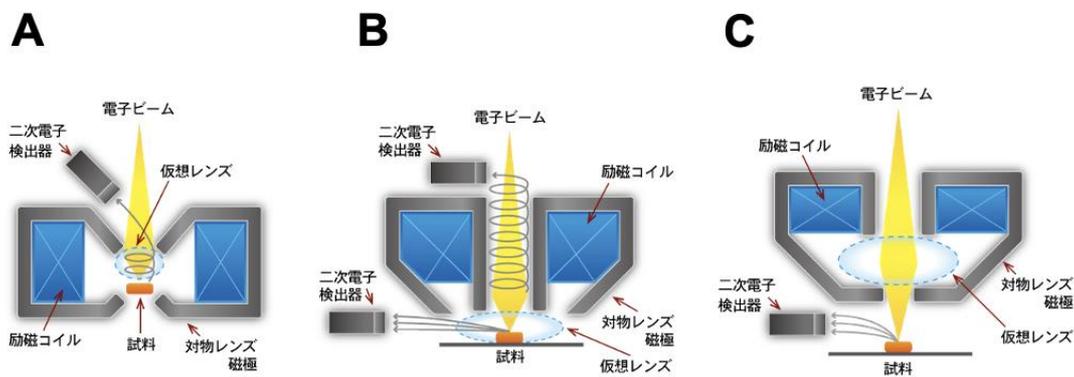


図 2-6 対物レンズの構造の違いによる FE-SEM の分類
(A) インレンズ方式, (B) セミインレンズ方式, (C) アウトレンズ方式

インレンズ方式は、対物レンズ内部に検出器を配置し、対物レンズ内部の強い磁場中に試料を配置する。表面近傍の低いエネルギーの二次電子を極めて高感度に検出できるため最高の空間分解能を実現することができる一方で、試料サイズに厳しい制限がある。

セミインレンズ方式は、対物レンズ下部付近に検出器を配置し、インレンズとアウトレンズの中間的な電子軌道で二次電子を収集する方式である。高分解能性能を維持しつつ、観察条件の自由度をある程度確保した設計であり、材料科学分野で広く用いられている。

アウトレンズ方式は、レンズ外部に配置された検出器で二次電子を検出する。表 2-1 でも示したとおり分解能では他の 2 つの方式に劣るものの、電子軌道がレンズ磁場に強く拘束されないため、以下の 2 点で生物試料観察に対して優れた特徴を有する。

第一に、深い被写界深度が得られ、試料の形状や大きさへの許容度が高いことである。生物

試料は一般に、表面の凹凸が著しく、立体的かつ複雑な形状を示す。細胞群や植物表面構造などは三次元的起伏が大きく、観察視野内で大きな高低差が生じやすい。このような試料では、被写界深度が浅い条件では一部しか焦点が合わず、形態全体の把握が困難となる。アウトレンズ方式 SEM は、長い作動距離の設定が可能であり、被写界深度が深く、試料形状やサイズに対する許容度が高いという特性を有している。これにより、複雑な表面形状を有する生物試料の全体に焦点が合った俯瞰的な観察が可能となる。また、アウトレンズ方式は二次電子検出との相性が良く、試料表面から発生する二次電子を効率よく利用できる。これにより、表面凹凸に起因する形態コントラストが得られやすく、生物試料の微細構造観察において有用性が高い。

第二に、帯電への耐性があることである。生物試料は非導電性であり、比較的帯電が起こりやすい。インレンズ方式では低加速電圧かつ表面極近傍の二次電子を主信号とするため、帯電による電場変動の影響を受けやすく、像の歪みや輝度変動が生じやすい。セミインレンズ方式はインレンズ方式ほど極端ではないが、電子軌道がレンズ磁場の影響下にあるため、帯電による電子軌道の乱れが像質に影響する。一方、アウトレンズ方式では広角度の二次電子を収集するため、帯電の影響が相対的に平均化され、像が安定しやすい。

以上の理由から、分解能を最優先とするナノ材料観察とは異なり、三次元的形態情報の把握が重要となるバイオ分野においては、アウトレンズ方式 SEM は実用性の高い機器と位置付けられる。実際に、昆虫や植物の形態観察は北海道大学で継続的に行われてきた伝統的な研究分野であり、アウトレンズ方式 SEM は、その研究を支える基盤的な観察手法として長年にわたり活用されてきた。本方式 SEM は、本学のバイオ分野研究の進展を支える不可欠な共用機器となっている。

	インレンズ方式	セミインレンズ方式	アウトレンズ方式
分解能	極めて高い (<1 nm)	高い	中程度 (数nm)
被写界深度	浅い	中程度	深い
試料サイズの制限	厳しい (数mm角程度)	緩和されている	制限が少ない
帯電への耐性	弱い	中程度	強い

表2-1 FE-SEM における対物レンズ方式の差異による特性の比較

第3節 アウトレンズ方式 SEM を用いた研究支援

第1項 序論

本節では、アウトレンズ方式 SEM を用いた生物試料観察に関する著者の研究支援活動について述べる。

著者が行っている生物試料の SEM 観察では、標準的な試料作製および観察条件として、前固定に 2~2.5% グルタルアルデヒド、後固定に 1% 四酸化オスミウムを用い、エタノール系列による脱水後、臨界点乾燥を行い、金または金パラジウムによる導電処理を施している。観察条件は、低加速電圧 (5 kV 以下) および中程度の作動距離 (約 15 mm) を基本としている。

しかし実際の研究支援では、試料の特性や観察目的に応じて、これらの条件を適宜調整することが不可欠である。本節で述べる各事例では、これら標準条件からの最適化の過程についても併せて示す。

なお、本研究支援には、日本電子製 JSM-6301F 型のアウトレンズ方式冷陰極 FE-SEM (図 2-7) を用いて像を取得した。



図 2-7 日本電子社製 JSM-6301F 型アウトレンズ方式 FE-SEM

第2項 動物組織試料の SEM 観察～ミオシゲルの微細構造解析による SEM 研究支援(著者の共著論文: Hayakawa et al., 2012)

○背景

ミオシンは筋タンパク質の主要構成成分であり、加熱によりゲルを形成することで、肉製品における結着性に大きく寄与する。ミオシゲルは条件によって透明または不透明に形成されるが、外観や濁度測定のみでは、内部構造の違いを十分に説明できない。特に、低イオン強度条件下に L-ヒスチジン(以下、L-His)を添加した場合は透明ゲルが形成され、高イオン強度条件下では不透明ゲルとなることが報告されている。この外観差を構造面から明確に理解するため、SEM 観察による微細構造解析が必要である。SEM により、ゲル内部のストランド太さや網目の

密度を直接観察することが可能であり、透明・不透明ゲル形成の分子メカニズムを検討できる。

○目的

本研究支援では、鶏胸筋由来ミオシンの熱凝固によるゲル形成が、条件によって透明または不透明に見える現象を、微細構造の観点から解明することを目的として、SEM 観察を実施した。特に、低イオン強度条件下で L-His を添加した透明ゲルと、高イオン強度条件下で形成される不透明ゲルの比較に重点を置いた。

○ミオシン溶液の調製

低イオン強度条件 + L-His 添加:透明ゲル形成、加熱温度 40-50°C

高イオン強度条件:不透明ゲル形成、加熱温度 60-70°C

L-His は、低イオン強度条件下でミオシン分子間の相互作用を安定化させ、均一な細網構造の形成を助けると考えられる。高イオン強度条件では、ミオシン分子間の静電的遮蔽により L-His 添加は必須ではなく、自然な凝集により粗いストランドが形成される。

○研究支援内容

著者は、非常に柔らかく変形しやすいミオシンゲルの微細構造をできるだけ保持するため、試料作製条件の検討および SEM 観察条件の最適化を行った。以下に、

[前固定]

2.5%グルタルアルデヒドを3日間浸漬することにより、十分な架橋形成を確保した。架橋形成により、ゲル内部ネットワークを保持し、変形を回避することができる。

[後固定]

1%四酸化オスmiumを一晩浸漬し、タンパク質内部の電子密度を高くすることにより、細いストランドが観察できるよう主に画像コントラスト向上目的で使用した。

[脱水および乾燥]

エタノール濃度上昇系列で脱水後、*t*-ブチルアルコール凍結乾燥法により乾燥した。高温高圧での溶媒置換に伴うタンパク質の変性を回避するため、柔らかいゲル構造への影響が少ない凍結乾燥法を採用した。

[導電処理]

帯電防止や画像コントラストの向上のため、金をコーティングした。

[SEM 観察]

加速電圧を 10 kV と比較的高めに設定した。加速電圧を高くすると電子線のエネルギーが上昇し、電子線がゲル内部まで透過できるようになるため、内部のネットワーク構造も SEM で観察できるようになった。作動距離は 15 mm に設定し、加速電圧を高め設定している分、作動距離を短くしなくても高分解能と被写界深度を両立できるようにした。

○SEM 観察結果

低イオン強度条件 + L-His 添加(図 2-8A): 細かい均一なネットワークが形成され、網目が均一で細かい。光散乱がほとんどみられない。

高イオン強度条件(図 2-8B): 不透明ゲル形成: 太く粗いストランドからなる不規則な網目構造が観察される。光散乱が大きく不透明性の原因となる。

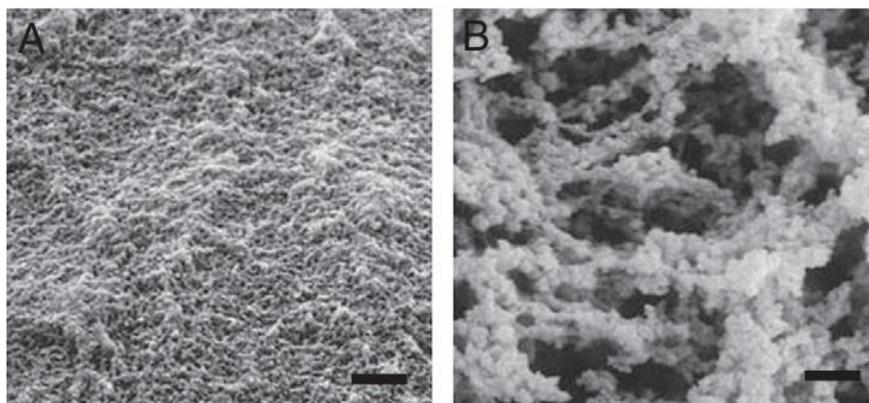


図 2-8 熱凝固ミオシゲルの SEM 像

(A) 0.1 mM KCl および 5 mM L-His 添加、45°C でゲル化

(B) 0.6 M KCl、70°C でゲル化

スケールバー 1.0 μm

○他実験データとの比較

本研究では SEM 観察以外に以下のデータを取得している(Hayakawa et al., 2012)。

濁度測定

低イオン強度+ L-His 添加条件では濁度が低く、透明性を示す。

高イオン強度条件では濁度が高く、不透明性を示す。

粘弾性測定

低イオン強度+ L-His 添加条件では高イオン強度条件より粘度が低く、柔軟性が高い。

温度依存性観察

透明ゲルは 40–50°C で形成されるのに対し、不透明ゲルは 60–70°C で形成される。

このため、SEM 観察では、それぞれ適切な加熱温度での構造保持が重要である。

以上の物性データと SEM 観察データから、透明・不透明ゲルの形成機構と物性の関係を体系的に説明することができる。

【工夫した点および困難点】

ミオシゲルは含水率が高く、極めて柔軟で外力により容易に変形するため、通常の組織試料と同様の固定・乾燥操作では網目構造が崩壊する危険性があった。特に、ゲルはピンセット操作による圧縮の影響を受けやすく、試料切り出し段階から形態変化が生じ得る点が大きな課題であった。

そのため、固定前の物理的ストレスを最小限に抑えるため試料の移送にピペットを使用し、さらに通常より長時間である3日間の前固定を行うことで、網目構造の架橋安定化を優先した。また、臨界点乾燥では高温高圧によるタンパク質の変性のおそれを考慮し、より温和な条件である t-ブチルアルコール凍結乾燥法を選択した。これにより、ストランドの収縮を抑制し、透明ゲルと不透明ゲルの構造差を明瞭に観察可能となった。

第3項 植物組織のSEM観察～ダイズ生長点形態解析によるSEM研究支援

(著者の共著論文: Kuwabara et al., 2024)

○背景

ダイズのシュート頂端(以下、生長点, 図2-9)に存在するシュート頂分裂組織(Shoot Apical Meristem, SAM)は、ゲノム編集を成功させる上で極めて重要な標的組織である。SAMは柔軟で微細であり、種子の吸水後には短時間で葉原基が形成されるため、試料の取り扱いや観察のタイミングに高度な注意が求められる。また、従来ゲノム編集が成功しているコムギのSAMと比較すると、ダイズSAMは細胞密度が高く、細胞サイズが小さく、組織がより緻密であることが知られている。この構造的な特徴は、Cas9タンパク質とガイドRNAの複合体であるリボヌクレオタンパク質(Ribonucleoprotein, RNP)の導入効率や到達層に影響を及ぼす可能性がある。からなるRNP複合体の導入効率や到達層に影響を及ぼす可能性がある。そのため、RNP導入に適した細胞層および処理タイミングを決定するには、SAMの微細構造を精密に把握することが不可欠である。

SEM観察は、光学顕微鏡では把握が難しい立体構造および表面形態を高分解能で可視化できる手法であり、RNP導入条件の最適化や、将来的な変異の次世代伝達可能性の評価に資する重要な形態情報を提供する。

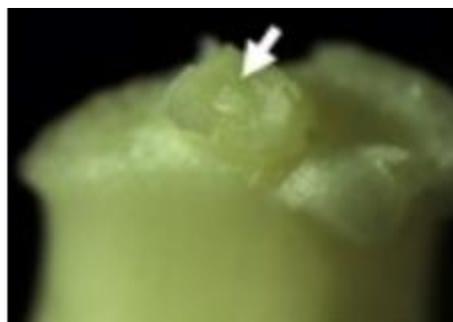


図2-9 ダイズの生長点の実体顕微鏡像

○目的

ダイズ生長点の微細形態を高分解能で可視化し、コムギ生長点との比較解析を行うことで、ダイズをゲノム編集対象とする合理性を検証した。さらに、種子吸水後の生長点における葉原基形成の時間的変化を明らかにした。これらの形態解析に基づき、生長点構造の特性を評価するとともに、RNP 導入に最適な処理タイミングの検討を支援することを目的として、生長点の SEM 観察を実施した。

○研究支援内容

[試料の準備]

吸水後の胚軸を準備し、小さな葉を除去して生長点を露出した。柔らかく損傷を受けやすい生長点組織の取り扱いには十分気をつける必要がある。

[固定]

FAA (Formalin-Acetic acid-Alcohol) 固定液で組織の安定性を随時確認しながら 1~7 日間浸漬し、細胞構造を保存しつつ、組織の過度な硬化を防止した。

[脱水および乾燥]

エタノール濃度上昇系列で脱水後、臨界点乾燥法により乾燥した。

[導電処理]

帯電防止や画像コントラストの向上のため、金パラジウムをコーティングした。

[SEM 観察]

加速電圧を 5 kV に設定した。作動距離は 40 mm と通常の観察よりも長く設定し、丸いドーム状で高さのある生長点組織の観察では、分解能より被写界深度を優先した。

○SEM 観察結果

まず、ダイズの SAM はコムギの SAM と比較して細胞サイズが小さく、細胞数が多いことが確認された(図 2-10)。次に、種子の吸水後 2 日目で葉原基が形成され始め、さらに 4 日目には毛状突起であるトライコームが出現することが明らかになった(図 2-11)。

以上の結果から、生長点露出直後の吸水後 1~2 日目に RNP 導入を行うのが最適であることが示唆された。このような形態情報は、RNP 導入の深さやタイミングの最適化に直接的に貢献し、次世代への変異伝達の効率向上に寄与する研究支援として位置付けられる。また、本支援を通じて得られた形態データは、第 3 章第 1 節で述べる共焦点レーザー顕微鏡観察における RNP 局在の解析や、さらにはゲノム編集成功の評価につながる。

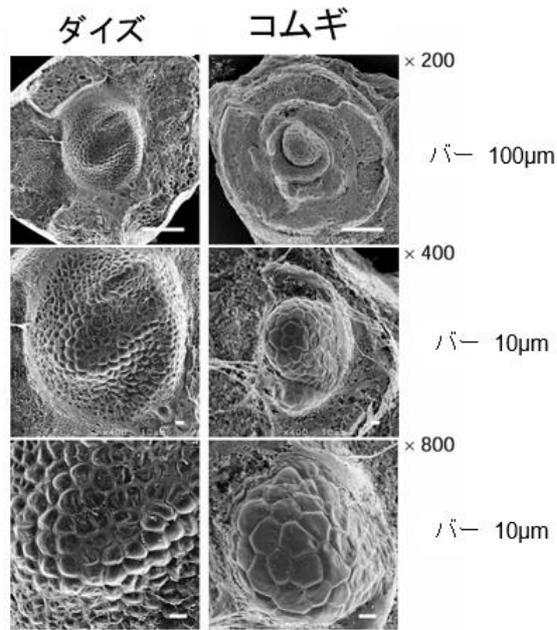


図 2-10 ダイズとコムギの生長点 SEM 像の比較

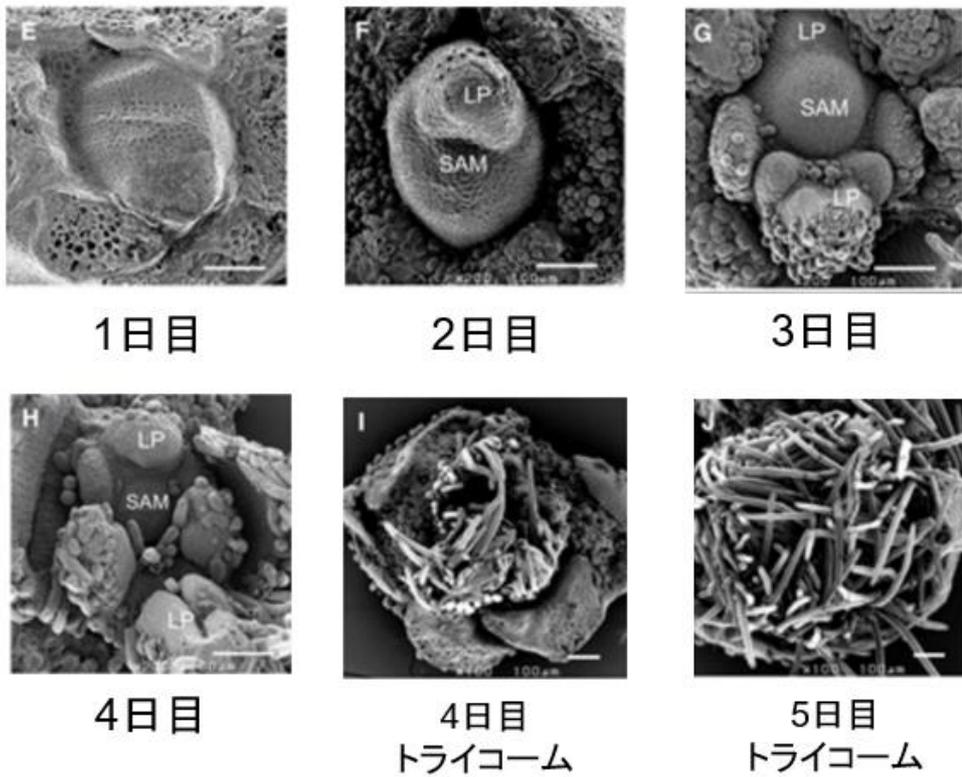


図 2-11 ダイズ生長点の吸水 1~5 日目の SEM 像の比較

LP: 葉原基 スケールバー 100 μm

【工夫した点および困難点】

ダイズの生長点は直径数百 μm 程度と微小で、かつ含水量が高いため、機械的損傷や乾燥収縮の影響を受けやすい試料であった。特に、吸水後の時間経過に伴う形態変化が著しいため、固定開始までの時間管理が観察結果に影響する要因であった。

解剖から固定までの時間を最小化するために、実体顕微鏡を用いて作業を効率化した。

また、FAA 固定では組織硬化による収縮が生じやすいため、試料ごとに固定日数を調整した。これは、生長点の微細構造の保持に一定の架橋強度が必要である一方、過剰な固定による組織硬化の可能性を回避するためである。

さらに、ドーム状構造の全体像を保持するため、観察条件では分解能よりも被写界深度を優先し、長作動距離条件を選択した。

第4項 細菌試料の SEM 観察～腸内細菌の膜安定性解析による SEM 研究支援

(著者の謝辞掲載論文: Kato et al., 2019)

○背景

腸内細菌は消化管内で胆汁酸に曝露され、これが生存や増殖に重要な影響を与えることが知られている。胆汁酸は界面活性作用を有するため、細胞膜脂質を溶解または損傷させ、細菌の膜透過性や膜機能に影響を及ぼす。特に *Lactobacillus gasseri* は腸内常在菌として重要な役割を持つが、胆汁酸に対する耐性獲得メカニズムは完全には理解されていない。

先行研究で、非致死濃度のコール酸(以下、CA)に適応した *L. gasseri* JCM1131T が、従来致死濃度とされる CA に対して耐性を獲得することが示され、さらに膜脂質組成の変化が耐性獲得に関与していることが報告された。しかし、これら脂質組成の変化が細胞表層構造としてどのように現れるかは不明瞭であり、形態学的な評価が求められていた。

○目的

本研究支援では、胆汁酸に適応した *L. gasseri* の膜安定性変化を形態学的に評価することを目的とした。具体的には、非致死濃度の胆汁酸で適応処理した細菌を用い、アウトレンズ方式 SEM を用いて致死濃度 CA 存在下での細胞表層構造の微細形態を観察し、膜脂質組成変化と形態変化の対応関係を明らかにすることを目指した。

○研究支援内容

[試料の洗浄および接着]

非致死濃度(4 mM)の CA で適応処理した *L. gasseri* と未処理の *L. gasseri* を、それぞれ遠心分離によりペレットとして回収し、リン酸緩衝液(pH 6.5)に再懸濁するという操作を3回繰り返し、培地成分を完全に除去した。

ポリ-L-リジンコートしたスライドガラス小片に、細胞を静電的相互作用により接着させた(図

2-12)。L-リジンの α 側鎖に存在するアミノ基が中性から酸性の pH で正に帯電しているのに対し、*L. gasseri* はグラム陽性菌であり、細胞表層が負に強く帯電しているためである。なお、グラム陰性菌でもこの手法を適用できる場合がある (Matsuo et al., 2025)

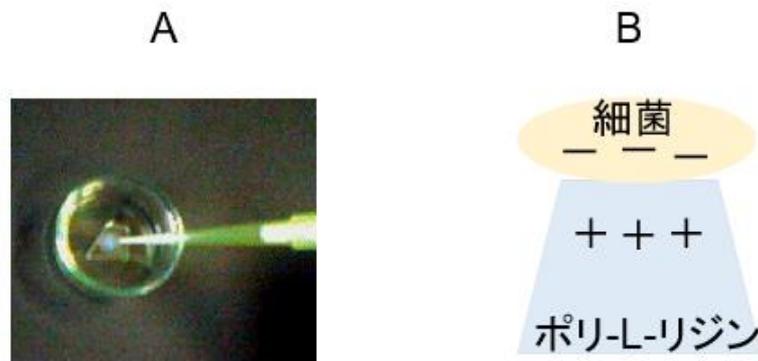


図 2-12 (A) ポリ-L-リジンをコートしたスライドガラス小片への細菌の接着
(B) ポリ-L-リジンと細菌表層の静電的相互作用の模式図

[前固定]

2.5%グルタルアルデヒドを 1 時間浸漬することにより、タンパク質を架橋して構造を保持した。

[後固定]

1%四酸化オスmiumを 30 分浸漬し、脂質膜を固定した。膜の微細構造を正確に観察することができる。加えて、電子密度を高くなるため、画像コントラスト向上に寄与する。

[脱水および乾燥]

エタノール濃度上昇系列で脱水後、臨界点乾燥法により乾燥した。細菌のように比較的小さい生物試料は、 t -ブチルアルコール凍結乾燥法を用いると氷晶の成長により構造が破壊するおそれがある。

[導電処理]

帯電防止や画像コントラストの向上のため、金パラジウムをコーティングした。

[SEM 観察]

加速電圧を 5 kV に設定した。作動距離は 6 mm に設定し、細菌は 1 μm と小さいため被写界深度よりも分解能を優先した。

○SEM 観察結果

致死濃度 CA 存在下での *L. gasseri* の表面微細構造を比較した。

非致死濃度 CA 未処理株 (図 2-13A)：細胞表層に不均一な凹凸が観察される。

非致死濃度 CA 処理株 (CA 適応株、図 2-13B)：細胞表層の形態に損傷は見られない。

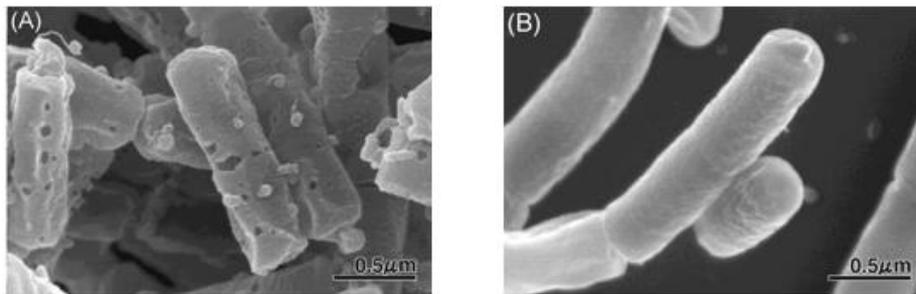


図 2-13 致死濃度(15 mM)CA 存在下での *L. gasseri* の SEM 像
(A) 非致死濃度 CA 未処理株、(B) 非致死濃度 CA 処理株 スケールバー 0.5 μm

○他実験データとの比較

CA 適応に伴う膜脂質組成の変化(Kato et al., 2019)が、細胞表層構造の安定化として SEM 観察で可視化されることが明らかとなった。

この成果は、*L. gasseri*の胆汁酸耐性獲得機構の解明に寄与するとともに、形態学的評価の有用性を示すものである。

【工夫した点および困難点】

緩衝液の pH を *L. gasseri*の生育至適条件である 6.5 に調整し、環境変化による膜の形態変化を最小限に留めた。

原核生物である細菌は直径約 1 μm と肉眼では視認できないほど微小であり、洗浄や固定の操作中に失われやすいこと、さらに乾燥過程で細胞壁の収縮や膜の剥離が起こりやすいことが課題であった。また、浮遊性細菌では試料載台時の位置保持が難しく、観察視野の確保が難しい。

そこで、ポリ-L-リジンコートのスライドガラス小片を用いて細胞を静電的に接着し(図 2-13)、35 mm 径のガラスシャーレでの処理工程中の細胞剥離を抑制した。観察では高分解能を優先するため短作動距離である 6 mm を選択し、細胞表層の微細形態を可視化した。

第 5 節 小括

第 2 節から第 4 節で紹介したアウトレンズ方式 FE-SEM を用いた研究支援実績に加え、標本昆虫での観察支援の経験(菊地と大原 2024)に基づき、一般的な生物試料の試料作製および SEM 観察の条件を表 2-2 にまとめる。なお、標本昆虫は保管を前提とするために、導電処理を施すことができない。そのため、帯電のみならず電子線損傷を防止すべく、加速電圧を 1 kV 程度まで低減させる特殊な SEM 観察を行う。なお、標本保管を前提としない昆虫試料の場合は、通常の生物試料と同様に導電処理を行ったうえで、加速電圧 5 kV 程度での安定的な観察を行うことが可能である。また、昆虫は、表面の凹凸に富む試料が多いため、作動距離を長く設定し

て深い被写界深度を確保して観察することが基本となる。

それぞれの生物試料の特性に応じた、SEM 試料作製および観察条件の一般的な指針を表 2-2 にまとめる。同一の区分であっても、試料の特性や観察目的によって最適条件に差異はあるが、そのことを前提としつつ著者の研究支援の経験をもとに、生物試料の SEM 観察の条件最適化に向けた指針として体系化した。

試料区分	優先すべき特性	乾燥法	加速電圧	作動距離
動物組織	内部構造の透過	凍結乾燥法	5-10 kV	15 mm
植物組織	被写界深度	臨界点乾燥法	2-5 kV	> 20 mm
微生物	高分解能	臨界点乾燥法	5 kV	5-10 mm
昆虫標本	被写界深度 損傷回避	臨界点乾燥法	1 kV程度	> 20 mm

表 2-2 生物試料の特性に応じた SEM 試料作製および観察条件の指針

第4節 老朽化したアウトレンズ方式 SEM の運用

生物組織構造解析センターで長年運用してきたアウトレンズ方式 FE-SEM である日本電子製 JSM-6301F 型は、1994(平成6)年度にされ利用開始から20年以上経過した装置であり、近年は経年劣化に起因する不具合が頻発していた。しかし、本機器は学内のバイオ分野研究における基幹観察装置の一つであり、運用を停止することは研究活動へ大きな影響を及ぼす状況であった。そのため、装置更新が実現するまでの期間、可能な限り運用を継続するための延命的対応を実施してきた。主な不具合と実施した技術的対応は以下のとおりである。

まず、表示系の老朽化により観察像を確認するためのブラウン管モニターが不表示となる事象が発生した。メーカーのサポート終了により純正部品の入手はもちろんのこと、中古市場においても同型品の調達も極めて困難な状況であった。そのため、著者は学内の技術職員ネットワークを通じて情報を収集し、他部局で廃棄予定となっていた同系機種からブラウン管モニターの電源部品を譲受し、日本電子株式会社のエンジニアによる交換作業を実施することで、表示機能を復旧させ、装置の寿命を繋ぎ止めることに成功した。

次に、試料交換棒の機構部摩耗により空回りが発生し、試料の着脱が円滑に行えない状態となった。これに対して、学内の電子科学研究所の機械工作室所属の技術職員によって破損部の補修および溶接加工を施した代替部品を作製してもらい、運用を継続した。

また、試料交換時の試料室の照明不点灯という軽微ではあるが作業性に直結する不具合も発生した。部品供給が停止していたため、懐中電灯などの外部光源で照明を代用し、作業性を維持するための暫定措置を講じた。

さらに、高圧タンクの故障が生じ、安定動作に支障をきたす事例もあった。この際は中古部品を調達し交換を実施することで対応した。他には、北海道の冬季特有の問題として、冬季には積雪による冷却水循環装置チラー室外機の不具合が発生し、冷却機能不全にも直面した。この際は、市水を濾過して代替冷却水として使用するなど、運用維持のための応急的措置を講じた。

これらの対応はいずれも、メーカーによる正式なサポート体制が終了した装置を研究基盤として維持するための現場対応であり、技術職員の判断と学内連携によって実施されたものである。しかし、このような延命措置は根本的解決ではなく、突発的な停止リスクの増大、利用者の不便、ならびに機器担当者である著者の業務的負担の増加を招いていた。さらに、サポート終了後は、メーカーによる修理や点検の技術料経年割増率が急激に上昇し、施設運営の圧迫が大きな課題となっていた。その間、装置停止を回避し研究支援機能を維持することは、単なる機器管理ではなく、研究基盤を支える技術職員の責務としての側面が大きかった。

このような状況のもと、北海道大学が文部科学省「地域中核・特色ある研究大学強化促進事業(J-PEAKS)」に採択されたことに伴い、農学部局が重点部局の一つとして選定され、待望の機器更新が実現した。2025(令和7)年度より、最新のアウトレンズ方式 FE-SEM である日本電子製 JSM-IT700HR/LA 型(図2-14)が当センターに導入された。

運用開始から半年余りであるが、新装置の導入は以下の飛躍的な改善をもたらしている。

高輝度ショットキー型電子銃により、1 kV 以下の低加速電圧でも極めて鮮明な像取得が可能となり、電子線による熱に比較的弱い生物試料や非コーティング試料の観察精度が向上した。また、大容量試料室と自動ナビゲーションにより、作業時間が大幅に短縮された。さらに、窒素ガス容器を使用した大気開放が不要となるなど、安全管理上の負荷も軽減されている。また、同社製の EDS が附属しており、形態観察と元素分析を統合した高度な解析が当センターでも実施可能になった。本機器は「北海道大学オープンファシリティシステム」に登録しており、学内のみならず他大学や民間企業といった学外からの利用も広く見込まれている。J-PEAKS の理念である研究環境の共用化を推進し、本機器がバイオ分野を中心とした幅広い研究の発展に寄与できるよう、技術職員としての専門性を活かし、持続的な研究支援体制の構築に貢献したい。



図 2-14 日本電子製 JSM-IT700HR/LA 型 FE-SEM

第5節 クライオ SEM の研究支援

第1項 クライオ SEM の概要

従来の生物試料の SEM 観察では、本章第1節で示したとおり、化学固定、有機溶媒による脱水および乾燥といった前処理が必要であり、その過程で細胞体積の収縮、膜構造の変形などが生じるおそれがあった。特に凍結耐性や脱水応答のように水の挙動そのものを解析対象とする場合、これらの処理は、生物本来の構造を改変する致命的なアーティファクトの原因となり得る。

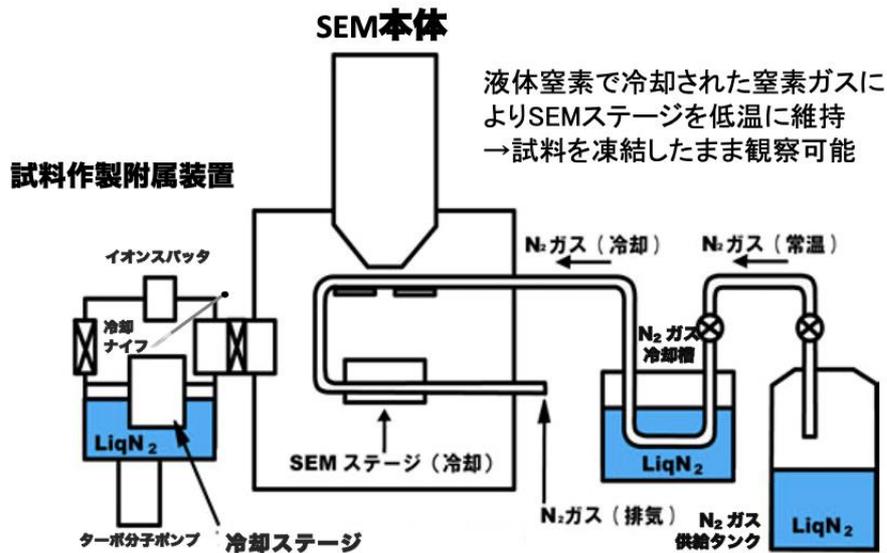
クライオ SEM 法は、試料を急速凍結する物理固定を適用することで、この課題を解決する技術である。化学固定によって形態を保持するのではなく、温度を急激に低下させることで氷晶の成長を抑制し、細胞内外の水分分布や構造配置を凍結直前の状態に近い形で保持する点に特徴がある。急速凍結により細胞内水は組織破壊的な氷晶成長を抑え、ガラス状または非晶質(アモルファス)の状態として固定することができる。このように物理固定された生物試料は、細胞の体積状態や細胞壁・細胞膜の位置関係、細胞間隙の構造などが比較的良好に保存される。そのため、水分を含んだ「インタクト」な微細構造観察を可能にする。

クライオ SEM の概略図と主な操作手順を、図 2-15 に示す。まず、温度伝導性に優れた金属(銅など)製のホルダーに取り付けた試料を急速凍結固定したのち、高真空環境下の附属の試料作製装置内に導入し、低温状態を維持したまま試料を切断し、内部構造を露出させる。凍結状態の切断面は、細胞壁、細胞間隙、細胞内部などの組織構造を反映する自然な断面となる。その後、低温真空下で試料表面の氷をわずかに昇華させるエッチング操作を行う。氷は細胞構造を覆うため、その一部を除去することで細胞壁や膜表面の微細形態が明瞭に観察できるようになる。さらに低温状態のまま金属をコーティングして導電性を付与することで、帯電を抑制し、含水状態を反映した安定した観察が可能となる。

クライオ SEM 法は、脱水に伴う構造変化を直接形態として捉えられる点において、低温生物学の研究に極めて有用である。示差熱分析(Differential Thermal Analysis, DTA)などの熱分析法では凍結に伴う発熱ピークから凍結温度を推定できるが、どの細胞がどのような構造変化を受けたかまでは明らかにすることができない。一方、クライオ SEM 法では、細胞の体積収縮、細胞間隙の変化、氷晶形成後に生じた空隙などを直接観察することができる。したがって、本手法は、熱力学的解析により検出された凍結現象を形態学的に裏付ける役割を担う。

ただし、クライオ SEM 観察には条件検討が必要である。エッチング条件が不適切であれば構造が過度に昇華し、実像が失われる可能性がある。また凍結試料は帯電しやすく、観察条件の設定によって像質に影響を及ぼす。さらに観察される細胞内空隙は氷が昇華した跡であり、必ずしも生体内に存在した実空間そのものではない場合がある。このような特性を理解した上で条件最適化を行うことが、信頼性の高い像取得に不可欠である

A



B

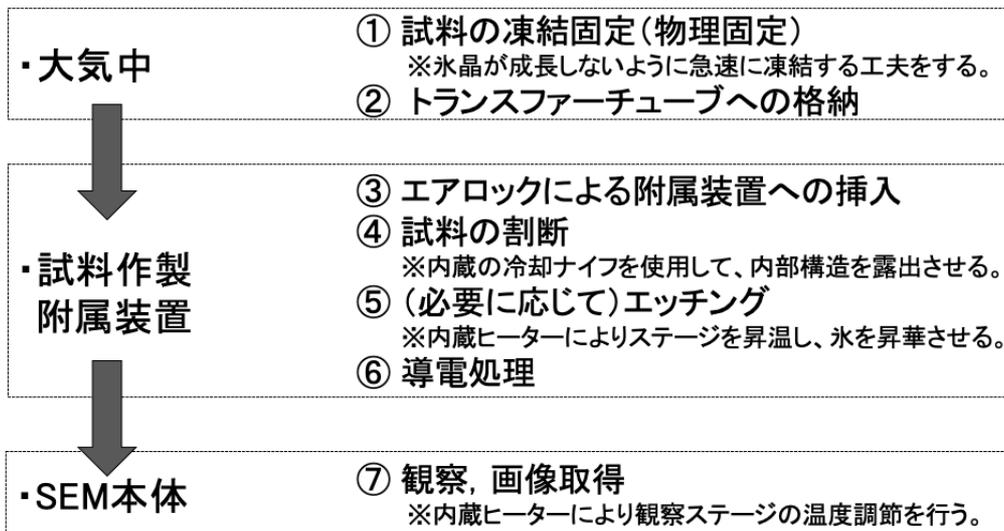


図 2-15 クライオ SEM の (A) 概略図および (B) 主な操作手順

クライオ SEM 法は、脱水に伴う構造変化を直接形態として捉えられる点において、低温生物学の研究に極めて有用である(Echlin et al., 1970)。示差熱分析 (Differential Thermal Analysis, DTA) などの熱分析法では凍結に伴う発熱ピークから凍結温度を推定できるが、どの細胞がどのような構造変化を受けたかまでは明らかにすることができない。一方、クライオ SEM 法で

は、細胞の体積収縮、細胞間隙の変化、氷晶形成後に生じた空隙などを直接観察することができる。したがって、本手法は、熱力学的解析により検出された凍結現象を形態学的に裏付ける役割を担う。

ただし、クライオ SEM 観察には条件検討が必要である。エッチング条件が不適切であれば構造が過度に昇華し、実像が失われる可能性がある。また凍結試料は帯電しやすく、観察条件の設定によって像質に影響を及ぼす。さらに観察される細胞内空隙は氷が昇華した跡であり、必ずしも生体内に存在した実空間そのものではない場合がある。このような特性を理解した上で条件最適化を行うことが、信頼性の高い像取得に不可欠である。

第 2 項 クライオ SEM を用いた研究支援(著者の謝辞掲載論文 Kasuga et al., 2020)

本研究支援では、北海道に生育する醸造用ブドウの耐寒性品種である種間雑種 ‘Yamasachi’ の冬眠芽を対象とし、冬季の耐凍性獲得機構を形態学的に明らかにすることを目的としてクライオ SEM を用いた観察が実施された(Kasuga et al., 2020)。ブドウ冬眠芽は細胞外凍結と深過冷却の維持によって凍結回避を行うと考えられているが、深過冷却状態にある細胞内水が低温下で部分的に脱水しているかどうかは未解明であった。本研究では、DTA によって熱力学的に得られた放熱を形態学的に検証する手段としてクライオ FE-SEM が用いられ、その試料前処理条件の確立と観察条件の最適化に関する技術支援を行った。機器は、FE-SEM 本体が日本電子社製 JSM-6701F およびプレパレーションチャンバー附属装置であるガタン社 Alto2500(図 2-16)を用いた。

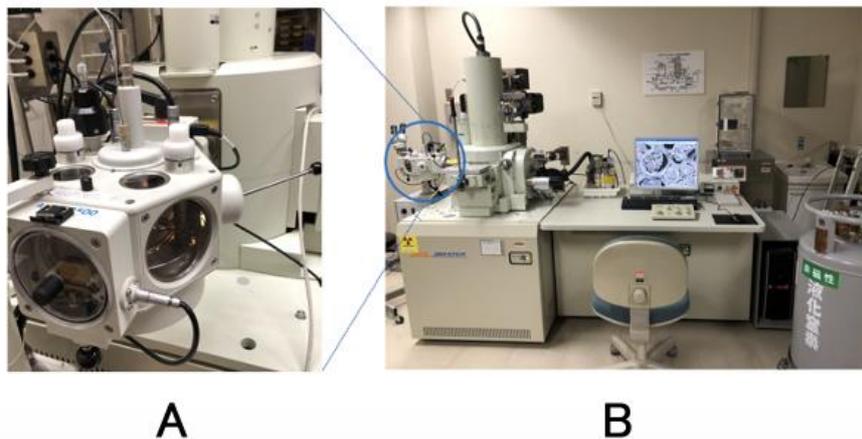


図 2-16 クライオ FE-SEM

(A) 試料作製附属装置(Gatan Alto2500), (B) JEOL JSM-6701F 型 FE-SEM

対象試料は水を多量に含む柔らかい植物組織であり、さらに凍結・脱水という水の相変化そのものが解析対象であるため、前処理条件のわずかな違いが観察像に大きく影響する特徴を

持っていた。試料は所定の温度履歴を与えた後に急速凍結固定され、低温下で割断し内部構造を露出させた。割断後の表面は氷に覆われているため、形態を可視化するにはエッチングが不可欠である。しかし、エッチングが不十分であれば氷が残存して構造が見えず、過度であれば氷のみならず細胞構造由来の水分まで失われ、本来存在しない空隙や形態崩壊を生じる。そこで昇華温度と時間の検討を繰り返し、本研究では試料温度 -100°C 、処理時間5分を基本条件として設定した。この条件により、細胞壁内面や細胞膜外面に形成された微細なしわ構造、ならびに細胞内空隙の輪郭を過度な昇華損傷なしに観察できる像が安定して得られた。

クライオ SEM 観察時の加速電圧は 2.5 kV と比較的lowめに設定し、作動距離は 15 mm に設定した。

冬眠芽の形態観察は、室温から急速凍結した対照試料、 -15°C で12時間保持後に凍結固定した試料、 -40°C まで冷却した後に凍結固定した試料の三条件で実施された。DTA を用いた冬眠芽の熱力学的解析から、 -5°C で水の細胞外凍結が起こり、 -32°C まで冷却すると細胞内凍結が起こり始めることが示唆されている (Kasuga et al., 2020)。

クライオ SEM を用いた観察から、室温から凍結した試料では、氷晶形成に起因すると考えられる構造の乱れが観察され、細胞形態は比較的不明瞭であった (図 2-17A)。一方、 -15°C 保持試料では、細胞壁の内面および細胞膜外面に多数のしわ構造が認められた (図 2-17B)。これは細胞体積の減少を反映する形態学的変化であり、低温下で細胞内水が細胞外側へ移動した結果生じた部分脱水の直接的証拠と解釈された。この温度条件では細胞内に大きな氷晶由来の空隙は認められず、細胞内水は凍結せず深過冷却状態を維持していたことが示唆された。 -40°C まで冷却した試料では、細胞内部に氷結晶の痕跡が確認され、細胞死に至っていると考察された。以上の結果は、DTA の解析結果と整合性がとれるものであった。

【工夫した点および困難点】

観察時の加速電圧は 2.5 kV と比較的lowめに設定した。凍結生物試料は氷由来の絶縁体を多く含むため帯電しやすく、高加速電圧では像の流れやコントラスト低下が顕著となる。低加速電圧条件により電子線侵入深さを抑制し、表面形態コントラストを高めると同時に帯電の影響を軽減した。

凍結割断面は凹凸が大きく導電性が不均一となるため、コーティング時間を長めに設定することで膜厚の調整を行い、像の安定化を図った。

低温観察では試料温度変動が昇華速度に影響し像再現性に直結するため、ステージ温度の安定化にも注意を払った。

エッチングの温度条件検討で、時間を5分にすることを基本条件として温度(5度刻み)で試行錯誤した結果、 -100°C が過不足なくエッチングされていることが示された。

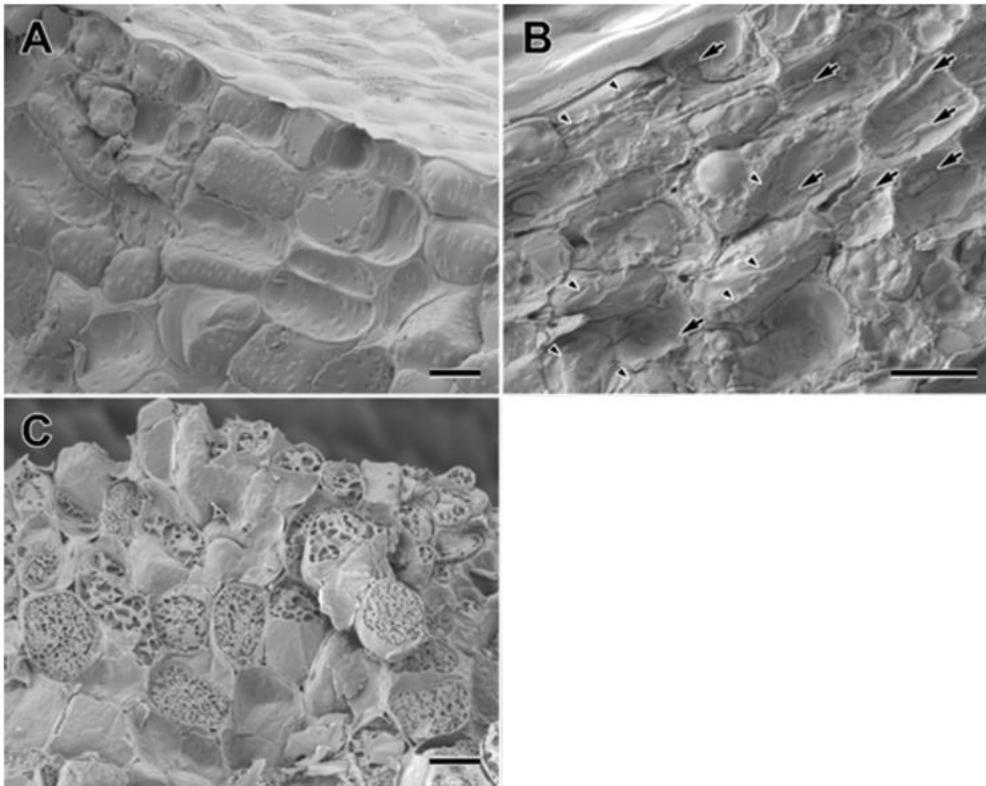


図 2-19 ‘Yamasachi’ の冬眠芽のクライオ SEM 像
(A) 室温から急速凍結, (B) -15°C で 12 時間保持後に急速凍結,
(C) -40°C 冷却後に急速凍結
矢印はしわ構造を示す。
スケールバー 10 μm

第3章 光学顕微鏡に関する研究支援活動

第1節 共焦点レーザー顕微鏡を用いた研究支援

ダイズ生長点における RNP 到達深度解析(著者の共著論文: Kuwabara et al., 2024)

○背景

CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集植物を作成する場合、外来 DNA を植物のゲノムに導入し、ゲノム編集が生じた細胞から植物体を再生させる方法が一般的であり、外来 DNA を導入した場合は、最終的に外来 DNA を取り除く必要がある。外来 DNA を用いないゲノム編集法(iPB-RNP 法)は、ダイズ生長点に Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体である RNP を金粒子で物理的に導入する。この手法では、RNP が生長点のどの細胞層まで到達したかが、次世代への変異伝達効率を決定する極めて重要な要素となる。

ダイズの SAM は L1・L2・L3 層からなる多層構造を有し、特に L2 層が次世代生殖系列につながる層であるため、RNP が L2 層に到達しているかを確認することが必要であった。この RNP の空間的分布を非破壊で評価する手段として、GFP 蛍光を指標とした共焦点レーザー顕微鏡観察が用いられた。

本研究支援は、RNP 導入の空間的妥当性を検証する解析に相当し、単なる蛍光観察ではなく、外来 DNA を用いないゲノム編集法の成立性を検証する重要な研究支援である。

なお、使用機器は、ライカマイクロシステムズ社製 Leica TCS SP5 型(図 3-1)である。対物レンズは、20x プランアポクロマート PL APO CS ドライレンズ(開口数 0.70)を用いた。

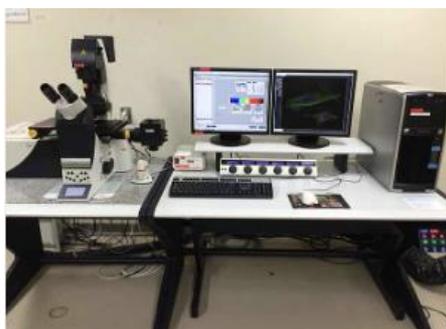


図 3-1 ライカマイクロシステムズ社製 Leica TCS SP5 型共焦点レーザー顕微鏡

○目的

金粒子導入条件下で、GFP による蛍光シグナルが生長点表層のみか、内部層まで到達して

いるかを確認する。GFP 蛍光の深さ方向分布を解析し、RNP が L2 層相当位置まで到達しているかを評価するし、RNP が L2 層相当位置まで到達しているかを評価する

○観察結果

共焦点レーザー顕微鏡観察により、GFP 蛍光が生長点表層のみならず内部層にも検出されることが示された(図 3-2)。この結果により、RNP が L2 層相当領域まで到達していることを示唆し、本ゲノム編集法が次世代へ変異を伝達可能である構造的根拠が得られた。

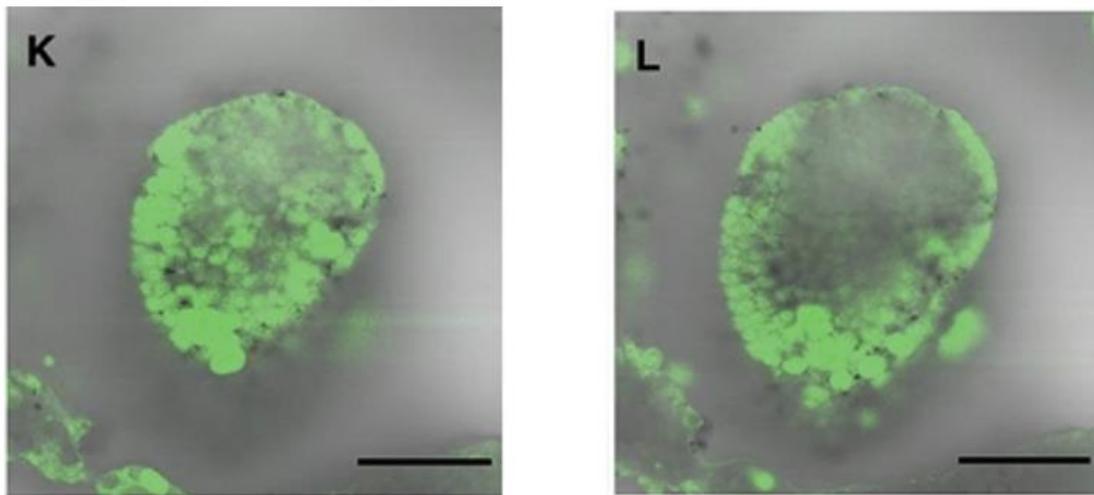


図 3-2 ダイス生長点下部の GFP 傾向観察

(K) L1/L2 境界付近(成長点から 25 μm 下部), (L) L2 中層(成長点から 35 μm 下部)
スケールバー 100 μm

【工夫した点および困難点】

本研究は、外来 DNA を用いないゲノム編集技術の確立を目指し、研究者が長期間にわたり継続して取り組んだものであり、それに伴う研究支援も約 3 年間にわたり実施した。実験は反復的に行われ、その都度試料作製や観察条件の見直しが求められ、継続的支援であった点が特徴である。

本支援における重要な配慮事項の一つは、研究者がパーティクルガンによって金粒子に付着させた RNP を生長点へ導入してから、共焦点レーザー顕微鏡による GFP 蛍光観察を行うまでの時間間隔であった。導入直後は GFP シグナルが十分に発現していない場合があり、一方で時間が経過すぎると細胞分裂や組織変化により導入位置の空間情報が不明瞭になる可能性がある。そのため、蛍光強度と組織構造の保持の両立を考慮し、観察タイミングの調整を行う必要があった。

また、本観察は単に蛍光の有無を確認するものではなく、RNP 導入が生長点のどの細胞層まで到達したかを空間的に評価することが目的であった。このため GFP を指標として観察を行ったが、ダイズ生長点では表層細胞と内部細胞の境界が形態的に明瞭ではなく、蛍光像のみから層構造を判別することは容易ではなかった。そこで、生長点頂部を基準とした Z 方向位置を一定の間隔で取得する連続光学断面像を用い、深さ情報を得られる観察を実施した。

さらに、ダイズ生長点はドーム状の立体構造を呈しているため、焦点面が均一になりにくく、試料間での比較が困難であった。

第2節 STED 超解像顕微鏡を用いた研究支援

第1項 STED 超解像顕微鏡の原理

従来の光学顕微鏡では、光の回折限界により空間分解能は約 200 nm 程度に制限される。このため、細胞内におけるタンパク質の微細な配置やナノスケールの構造的特徴を明瞭に識別することは困難であった。STED 顕微鏡法は、この回折限界を突破するために開発された超解像蛍光顕微鏡法の一つであり、励起光と誘導放出光の空間分布を制御することで実効的な蛍光発光領域を極小化し、高い空間分解能を実現する。

なお、STED を含む超解像顕微鏡技術に対して、2014 年にノーベル化学賞が授与された。

STED 法で、まず通常の共焦点レーザー顕微鏡と同様に励起レーザーにより蛍光色素を励起する。その直後に、ドーナツ状の強度分布を持つ STED レーザーを照射し、中心部を除く周囲の励起分子を誘導放出によって基底状態へ戻す。これにより、蛍光を発する領域はドーナツの中心部に限定され、実効的なスポットサイズが大幅に縮小する。結果として、観察可能な分解能は数十 nm スケールにまで向上する(図 3-3)。

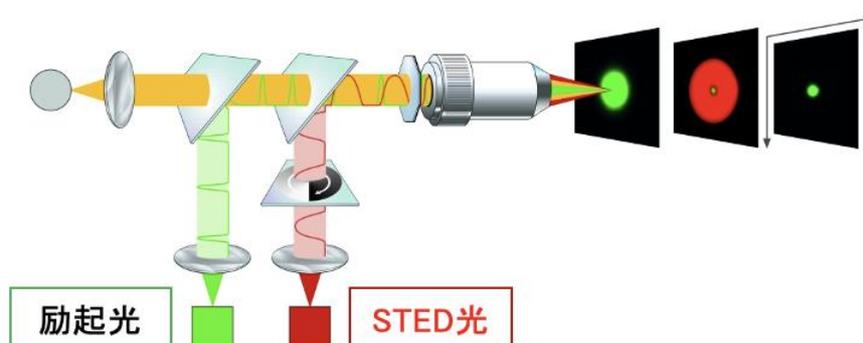


図 3-3 STED 光による分解能向上の模式図

本研究支援で使用された系では、標識蛍光色素として Alexa Fluor 488 および Alexa Fluor 555 を使い、これらに対して共通の 660 nm STED レーザーを適用する 2 色 STED 観察系を構築した。複数波長蛍光の同時超解像観察では、蛍光スペクトルの分離、STED 光による退色抑制など多くの技術的課題が存在する。したがって、単なる装置操作にとどまらず、色素選択、レーザー強度条件、検出帯域設定などの総合的な光学条件設計が不可欠となる。

このように STED 顕微鏡は、装置特性と蛍光標識条件が密接に結びつく手法であり、安定した超解像像取得には機器担当技術職員による系統的な条件最適化と運用管理が極めて重要となる。

理論的には、分解能は STED 光強度に依存して向上するが、同時に蛍光信号減少や光退色、光毒性の増加を伴うため、実際の観察では分解能と信号保持の最適化が重要となる。また、パルスレーザー励起と時間分解検出(time-gated detection)を組み合わせることで、短寿命蛍光や散乱光を排除し、コントラスト向上と分解能改善を両立できる。この time gate 技術は、特に背景蛍光の多い試料において有効である。

STED 法は理論上あらゆる蛍光試料に適用可能であるが、実際には試料の光学的性質、蛍光標識効率、光退色耐性などの要因が大きく影響する。そのため、対象試料に適した観察条件の構築が超解像観察成功の鍵となる

第 2 項 植物核ラミナ様構造解析に関する STED 研究支援(著者の謝辞掲載論文; Masuda et al., 2021)

○背景

動物細胞では、核膜直下に存在する中間径フィラメントタンパク質ラミンが核ラミナを形成し、核形態維持、クロマチン配置制御、遺伝子発現制御などに重要な役割を担うことが知られている。一方、植物ゲノムにはラミン遺伝子が存在しないものの、ラミンと類似したドメイン構造を持つ植物特異的コイルドコイルタンパク質群 NMCP(Nuclear Matrix Constituent Proteins)が機能的アナログとして注目されてきた。NMCP は核周縁局在性や核形態制御機能を示すが、フィラメントとして高次構造を形成している直接的形態証拠は不十分であった。

核ラミナ様構造の実在性を証明するには、100 nm 以下のスケールの線維状ネットワークを直接観察する必要がある。しかし、植物細胞は厚い細胞壁や高い光散乱性を有し、さらに抗体浸透効率が低いため、超解像顕微鏡の適用例は動物細胞と比較して極めて少ない。このような技術的障壁が、植物核ラミナ研究の停滞要因の一つであった。

○目的

セロリ(*Apium graveolens*)細胞における NMCP1 および NMCP2 の高次構造を STED 超解像顕微鏡で可視化し、植物核ラミナ様構造がフィラメントネットワークとして存在するかを形態学的に検証することであった。著者は、そのために必要となる観察条件の構築、蛍光標識法の最適化、画像解析支援を担当した。

○研究支援の内容

使用機器機器は、ライカマイクロシステムズ社製 Leica TCS SP8 STED 3D(図 3-4)である。

対物レンズは、100x プランアポクロマト PL APO CS2 油浸レンズ(開口数 1.40)を用いた。

対象試料はセロリ培養細胞であり、NMCP1 を Alexa Fluor 488、NMCP2 を Alexa Fluor 555 で蛍光標識し、660 nm STED レーザーによる 2 色 STED 観察を実施した。

植物細胞は光学的散乱が大きく、蛍光シグナルが弱くなりやすいという問題があった。そこで以下の最適化を行った。

- 検出器ゲインを低く設定し、背景ノイズを抑制した。

- 励起レーザー強度を上げて信号量を確保した。
- STEDレーザー強度を最大(100%)に設定し超解像効果を最大化した。
- ピンホール径を 1.0 Airy Unit(AU)から 2.0 AU へ拡大し、光量不足を補った。
- time gate を 0.5-6.5 ns に設定しシグナル周辺部の短寿命成分を排除した。
- 撮像後、デコンボリューション処理条件を試行錯誤した。

これらは信号強度・ノイズ・分解能のトレードオフ関係を考慮した調整であり、植物試料での STED 成立のための重要な技術的貢献であった。

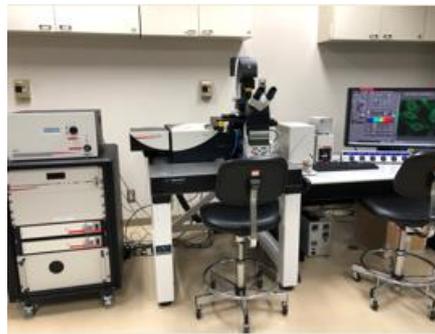


図 3-4 ライカマイクロシステムズ社製 Leica TCS SP8 STED 3X 型超解像顕微鏡

○得られた結果

NMCP1/2 が核表面に沿ってフィラメント状ネットワークを形成する様子が可視化された(図 3-5)。

太いフィラメントが核膜直下に集中することが示された(図 3-6)。

両タンパク質のフィラメントが近接・連結する様子が確認された(図 3-7)。

これらは従来顕微鏡では確認困難であった微細構造であり、STED 条件最適化により達成された。

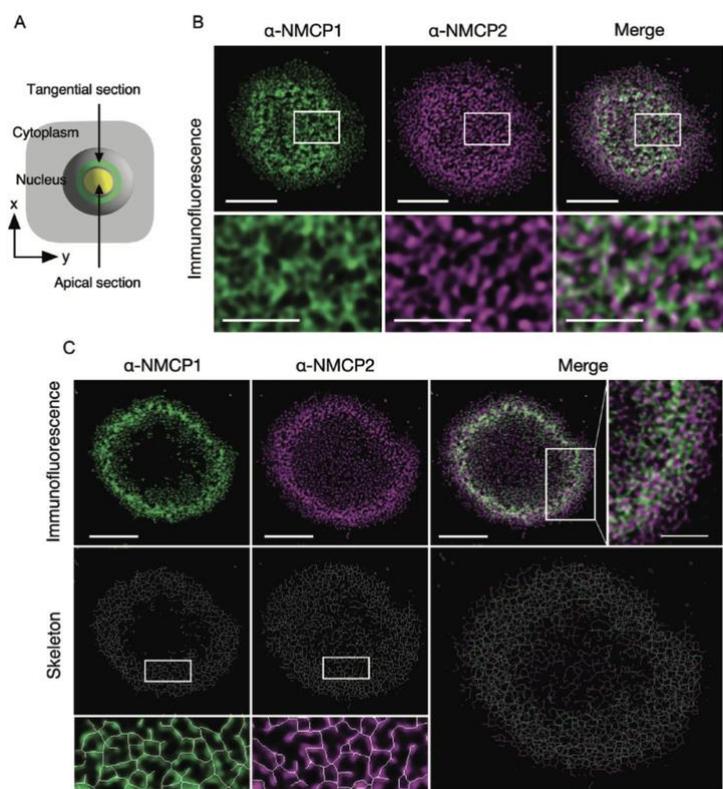


図 3-5 NMCP1 と NMCP2 からなるフィラメント状ネットワーク

(A) 核の頂端面および接線面の断面を示す模式図

(B) 核の頂端面に焦点を合わせた断面像, 上段パネル中の枠で囲んだ領域を下段に拡大

(C) 核の接線面に焦点を合わせた断面の蛍光像

スケールバー 2.5 μm

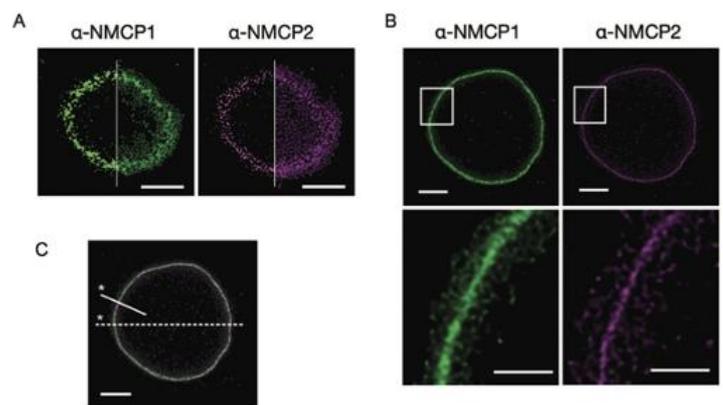


図 3-6 核ラミナにおける太い NMCP フィラメントの局在

(A) NMCP1 および NMCP2 の分布, (B) 核の中央面に焦点を合わせた断面像

(C) (B)に示した各色チャンネルから作成したマージ像, スケールバー 2.5 μm

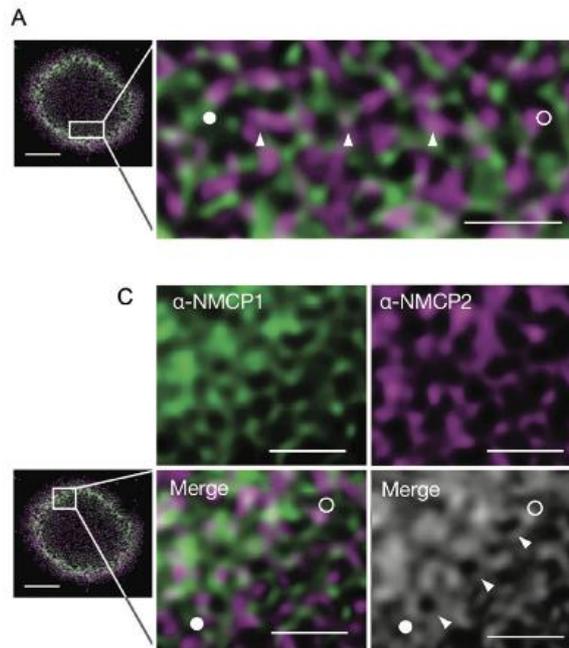


図 3-7 NMCP1 および NMCP2 フィラメント間の相互関係
 (A) NMCP1 および NMCP2 フィラメント間の密接な会合(矢頭)

(C) NMCP が欠失したホール状領域周縁部の NMCP1 および NMCP2 フィラメントの会合
 スケールバー 2.5 μm

【工夫した点および困難点】

STED レーザーを一度試料に照射すると、その照射部分の蛍光は著しく退色して再び蛍光観察することは困難である。そのため、STED レーザーを OFF にした共焦点レーザー顕微鏡の条件で、視野や焦点を調整して、画像を取得する。その後、STED レーザー強度を 100% に設定した。

励起レーザーの強度を上げると、STED の効果が弱くなる。まず、植物細胞は動物細胞と比較して、光散乱が強い、蛍光退色しやすいという制約があった。特に STED レーザー強度増加に伴うシグナルの減衰と分解能確保バランス調整が困難である。

検出器のゲインを高くすることは、ノイズの増加につながったため、励起レーザー強度と STED レーザー強度のバランスを段階的に調整し最適点を探索した。

また、高分解能は特に平面方向で必要とするため、ピンホールの径を 2 倍に開き、高さ方向の分解能を犠牲にしてでもシグナルの増加を優先した。

○成果

本研究支援により、植物核ラミナ構造の超解像可視化が実現し、NMCP1/2 がフィラメントネットワークを形成することを示す基盤画像が得られた。植物細胞における STED 応用例は少なく、本支援は光学顕微鏡技術の適用領域拡大に貢献した。

第3節 レーザー顕微鏡の管理および運用

本センターでは、共焦点レーザー顕微鏡であるライカマイクロシステムズ社製 TCS SP5 と、その同社後継機種である STED 超解像顕微鏡 TCS SP8 STED 3X を用いた研究支援を継続的に実施している。これらの装置は、単に高性能であるだけでなく、光学系、機械系、電子系、ソフトウェア制御が高度に統合された精密機器であり、性能は使用環境や日常管理に依存する。したがって、装置の能力を最大限発揮させるためには、単なる操作支援にとどまらず、環境整備、保守管理、利用ルール整備を一体として運用することが不可欠である。本節では、研究支援の基盤として実施している管理・運用体制について詳述する。

第1項 設置環境および温湿度管理の重要性

レーザー顕微鏡では、光軸整合性と検出感度の安定性が観察結果の再現性を左右する。温度変動は光学ベンチ、レンズ鏡筒、ステージ機構の微小膨張・収縮を生じさせ、焦点位置の変動やスキャン位置のずれを引き起こす。また湿度変動は、結露、光学部品のコーティング劣化、電子回路の不具合の要因となる。

STED 顕微鏡では特に、励起レーザーと STED レーザーの空間的重なりが分解能に直結するため、え。このため本センターでは、空調による基本的な室温管理に加え、湿度が上昇する夏季(7~9月)には除湿機を複数台(3~4台)稼働させ、湿度変動を抑制している。この対応により、日をまたいだ測定でもレーザー出力や検出感度の変動が小さく抑えられ、定量的蛍光解析の信頼性向上にも寄与している。

第2項 光学部品・対物レンズ管理とレボルバートラブル防止

対物レンズは顕微鏡の分解能やコントラストを規定する最重要部品であり、適切な清掃と丁寧な取り扱いが不可欠である。油浸などの液浸レンズでは、使用後の浸液残存が問題となる。浸液はレンズ先端から鏡筒外周を伝ってレボルバー部へ移動し、機械部への付着や内部侵入を引き起こす可能性がある。浸液の付着は回転機構の摩擦特性変化、エンコーダーの位置検出誤差、センサー誤動作などを誘発し、自動レボルバーの位置決め精度低下や動作異常につながることもある。これらは単なる機械不具合ではなく、対物選択の誤差や焦点再現性低下を通じて観察データの信頼性に影響する。

このため使用後の浸液除去を徹底し、清掃には綿棒または専用レンズペーパーのみを使用するよう指導している。ティッシュペーパーやキムワイプの使用は、レンズへの微小傷の原因となるため禁止している。これは光学性能維持と機械系保護の両面から定められた運用ルールである。

第3項 光源運用と出力安定性

励起レーザーおよび水銀ランプ等の光源は、点灯回数や点灯直後の状態が出力安定性に影

響する。特に、レーザーの頻繁な ON/OFF 操作は光源への熱的・電氣的負荷を増加させ、寿命短縮や出力ドリフトを招く。そのため、利用が継続する時間帯では光源を維持したまま運用するよう指導している。

この運用は部品寿命延長だけでなく、日内の励起条件変動を抑えることにより、蛍光強度の比較実験や長時間観察時の信号安定化にも寄与している。また、顕微鏡接眼レンズで蛍光を目視確認する際に使用する水銀ランプもまた、頻繁な ON/OFF 操作は寿命短縮につながるため、同日に継続使用する場合は、電源を ON のままにするよう利用者に徹底している。

第 4 項 2 台設置環境での光干渉低減対策

同室に 2 台のレーザー顕微鏡を設置しているため(図 3-8)、迷光や作業動線の影響を考慮した環境整備を行っている。装置ごとに暗幕カーテンでエリアを区画し、蛍光灯電源もエリア別に分割した。これにより STED 観察時の背景光影響を低減しつつ、通常観察時の作業性を確保している。

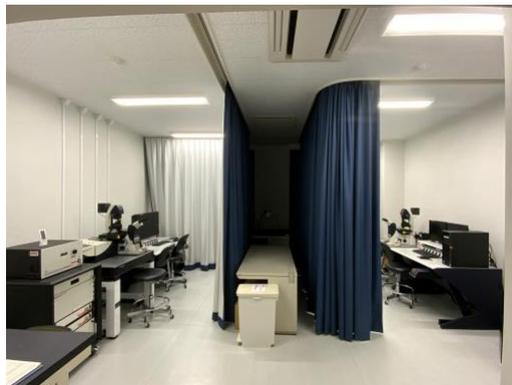


図 3-8 同室に設置されている 2 台のレーザー顕微鏡
左: Leica TCS SP8 STED 3X 右: Leica TCS SP5

第 5 項 利用ルール整備と安全運用

装置の高稼働状況に対応するため、原則、用時間帯、予約時間、予約回数の制限を設け、利用者間の利用機会公平性を確保している。タイムラプス撮影などの長時間継続利用を行う場合、単独操作可能な利用者限定し、指導教員の承諾を得た場合のみ例外的に時間外利用を認めている。これは装置保護、安全管理、研究効率のバランスを考慮した運用である。

第4章 技術交流ネットワークおよび組織運営に関する活動

第1節 学内技術交流による機器横断的課題解決

本学では多様な共用研究機器が整備されているが、それぞれの装置は専門性が高く、個別分野の枠内で運用されることが多い。一方、実際の研究課題は単一の分析手法では解決できない場合も多く、機器横断的な技術連携が重要となる。本節では、学内技術交流を契機として実施された学内技術職員間の連携により課題解決を試みた事例として、電界イオン化(Field Ionization, FI)質量分析装置のエミッター評価に関する取り組みを紹介する。エミッターを図4-1で示す。



図4-1 FI質量分析に用いられるエミッター(赤色で囲んだ部分をSEM観察した。)

FI質量分析は高電界下で分子を穏やかにイオン化できる手法であり、分子イオンの観測に優れるとされる。しかし、質量分析装置担当技術職員から、特定の化合物で分子イオンの検出が困難になる事例があるとの相談を受けた。対象となったのは、嵩高いアルキル基を有するモデル化合物であり、イオン化効率や断片化挙動に関してエミッター形状との関連が疑われた。

FI質量分析に用いられるエミッターは、極めて鋭い先端構造により高電界を形成する微細電極である。エミッターの先端形状は局所電界強度に直結するため、使用に伴う形状変化がイオン化特性へ影響を与える可能性が考えられた。そこで、質量分析装置担当技術職員と電子顕微鏡担当である著者が連携し、SEMによるエミッター形状評価とを実施した。SEM観察の結果、新品エミッターでは鋭利な先端構造が確認されたのに対し、使用済みエミッターでは先端部の丸みや微細突起の消失が認められ、形状変化が明確に可視化された(図4-2)。これらの形状変化は、局所電界強度の低下を引き起こし、分子イオン生成効率の低下やイオン断片化挙動に影響を与える可能性が示唆された。すなわち、使用履歴に伴うエミッター先端形状の変

化が、FI 質量分析におけるイオン化特性の変動要因の一つである可能性が考えられる。

この取り組みは、分野の枠を超えた学内技術職員間の協働により、分析現象の背後にある物理的要因の可視化を試みた事例である。装置担当者間の専門性を融合することで、質量分析の現象を電子顕微鏡による形態情報と結び付けて解釈できる点に意義がある。今後は、加速劣化試験によるエミッター形態変化の再現性評価や、形状変化とイオン化効率との定量的相関の検討を進める予定であり、本事例は機器横断的技術交流が研究支援の質向上に寄与する一例と位置付けられる。

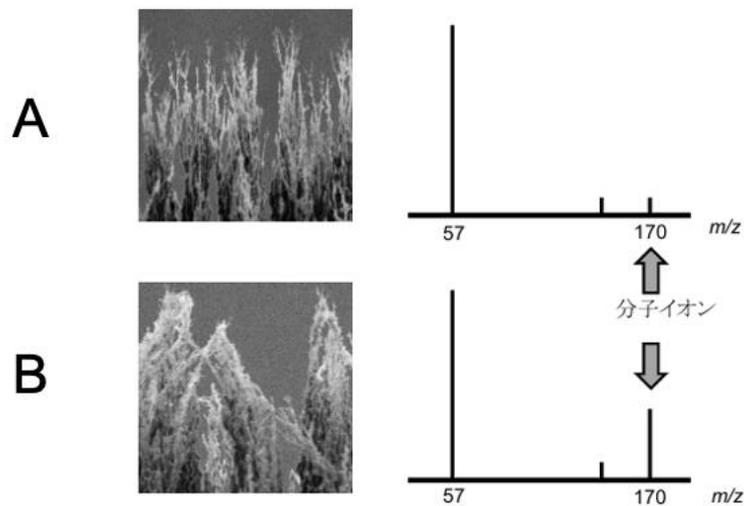


図 4-2 SEM を用いたエミッターの形態解析 (A)新品エミッター (B)使用済みエミッター (A)では分子イオンの断片化が発生している。

第2節 学内電子顕微鏡系技術職員交流会の活動

本学における電子顕微鏡関連技術の向上と技術職員間の連携強化を目的として、2016(平成28)年に学内の電子顕微鏡(TEM および SEM)に携わる有志技術職員により交流会が結成された。本交流会には、6部局12施設から約20名の技術職員が参画しており、部局の枠を超えた横断的な技術ネットワークが形成されている点に特徴がある。電子顕微鏡装置は設置環境や運用方針が施設ごとに異なるため、他施設の運用事例や技術的工夫を共有できる本交流会は、学内における貴重な情報交換の場となっている。

発足当初の平成28～29年度には、所属職員の施設見学会を持ち回り形式で実施し、各施設の装置構成や運用体制、試料作製設備などについて理解を深めた。また、基礎的な勉強会も複数回開催し、装置原理や観察条件設定に関する知識の共有を行った。これらの活動により、日常業務では接点の少ない他部局技術職員との関係構築が進み、技術相談を気軽に行える体制が醸成された。

2018(平成30)年度には、学内技術交流会企画「SEMの性能をチェックしよう～空間分解能検証のためのセミナーとラウンドロビンテスト～」において、著者はコーディネーターとして参画した。本企画では、SEMの性能評価に関する理論講義に加え、複数施設間で共通試料を用いたラウンドロビンテストを実施し、装置性能や観察条件の違いが結果へ与える影響を検討した。これにより、各施設の装置特性の理解が進むとともに、観察条件最適化の指針が共有された。

令和2～4年度には、学内技術交流会(コアファシリティ構築支援プログラムの一環)として、「SEMで身近な生物を見てみよう～生物試料観察の理論と実践講座～」を企画し、著者は継続してコーディネーターを務めた。新型コロナウイルス感染症流行による行動制限の影響により、本講座は時期を2段階に分けて実施され、2020(令和2)年9月にオンラインによる理論編、2022(令和4)年9月に実地講習による実践編が行われた。実践編には著者を含むコーディネーター5名、学内技術職員6名が参加し、シソ葉、ダイコン、ユリ花粉、水生生物など身近な生物試料を対象として観察を行った。試料作製法としては、通常の固定・脱水・臨界点乾燥法に加え、イオン液体法も取り入れ、方法間の違いや適用条件について比較検討を行った。イオン液体は、カチオンとアニオンから構成されていて、常温で液体として存在する塩である。最大の特徴は、極めて低い蒸気圧(不揮発性)と高い導電性を併せ持つ点にある。生物試料に親水性のイオン液体を浸透・被覆させることで、SEM試料室の高度真空下においても液体の状態を維持したまま観察が可能となる。これにより、従来の化学固定、脱水、乾燥や導電処理を一切行わずに、含水状態に近い形態を維持し、かつ導電性を確保できる点が大きな利点である。しかし、本交流会を通じ、イオン液体法は前処理工程自体が簡便であるものの、最適な観察像を得るための条件検討は複雑であることを再認識した。

著者は臨界点乾燥法の原理および操作に関する説明を担当し、生物試料のSEM観察にお

ける乾燥工程の成否が像質に及ぼす影響や、その背後にある物理化学的プロセスを解説した。その際の様子を図 4-3 に示す。

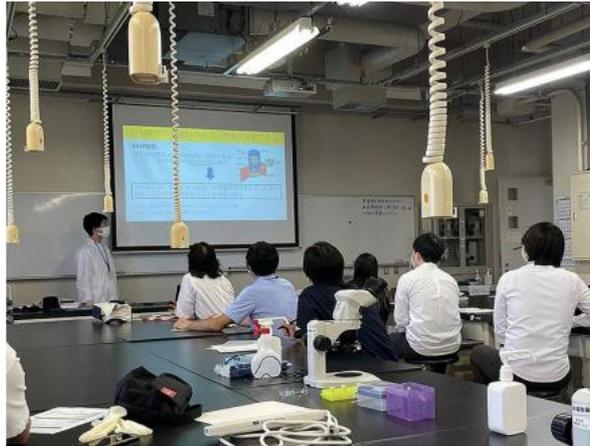


図 4-3 技術職員交流会で臨界点乾燥法の説明をする著者

以上の活動を通じて、本交流会は単なる情報交換の場にとどまらず、学内における電子顕微鏡技術の標準化や技術力の底上げに寄与する組織的基盤へと発展している。著者にとっても、他施設の技術的工夫を学ぶ機会であると同時に、専門知識や技術を自身が運営する共同利用施設へ還元する場となっており、部局横断的な研究支援体制の強化に資する重要な活動であるといえる。

第3節 光学顕微鏡トレーニングコースに関する活動

第1項 開催趣旨と背景

光学顕微鏡は、バイオ分野の研究において不可欠な観察ツールであると同時に、近年では定量解析を含む高度なイメージングが求められる研究機器となっている。しかし、バイオ系研究者のイメージングに関する教育機会は従来限定的であり、光学顕微鏡の原理や光路設計を体系的に学ぶ場がほとんど存在しなかった。また、研究者の支援を担う技術職員においても、光学顕微鏡の原理から先端顕微鏡技術に至る知識を習得する機会は限られており、施設利用者への助言や定量解析支援において十分な体制が整っていない場合があった。このため、論文や学会報告において、技術的に妥当でない解析や不適切な画像処理が見られることが散見されている。

このような課題を背景として、自然科学研究機構基礎生物学研究所 超階層生物学センター バイオイメージング解析室室長の亀井保博教授は、技術職員を含む全国の研究支援者が光学顕微鏡の基礎から応用までを体系的に学ぶ機会を提供する「基礎から学ぶ顕微鏡光学系実習(OPT)～きいて、みて、さわって！原理から学ぶ光学顕微鏡」を企画し、運営してきた。開催趣旨としては、以下の点が示されている。第一に、生物系研究者に光学イメージングを体系的に学ぶ機会がほとんどないため、研究者自身の知識が不足していることである。第二に、技術職員も同様に光学顕微鏡の原理や先端顕微鏡技術に関する学習機会が少ないことである。

これに加え、OPTは基礎生物学研究所開催だけでなく、各大学でのサテライト開催も実施されている。サテライト開催は、基礎生物学研究所開催への参加が物理的、時間的、経済的により難しい研究者や技術職員に学習機会を提供するとともに、各大学のイメージング共同利用施設に所属する技術職員が指導に関わることで、教育能力向上とネットワーク形成を同時に達成できる仕組みとなっている。サテライト開催は地域拠点での実施であるため、トレーニングコースの質を担保するために一度の参加者数が数名程度に限定される本部開催の補完的役割を果たすだけでなく、技術職員自身が運営や光学顕微鏡の教育に関わる経験を積む貴重な場ともなっている。以上の問題に関して、技術職員の教育を充実させることにより、研究者への支援体制を強化することが最も効率的であると位置づけられる。また、技術職員がOPTのサテライト開催に携わることは、技術職員自身の専門性向上のみならず、地位向上にも資するものであると強調されている。OPTは単なる技能習得の場にとどまらず、技術職員の専門性を学内外に可視化し、研究者支援の質を高める社会的意義をもつプログラムとして位置づけられる。

第2項 OPTの受講

著者は2024(令和6)年12月に、基礎生物学研究所にて開催のOPT(OPT2024)に受講生として参加した。本研修への参加は、当時の北海道大学技術支援本部(現在は技術連携統括本部に発展的改組)の旅費支援により実現した。

OPT2024は、事前のオンデマンド講義と2日間の対面実習から構成される日程と、3日間の

対面による講義および実習から構成される日程があり、著者は前者の日程で受講した。オンデマンド講義では、光学顕微鏡の基礎原理から共焦点レーザー顕微鏡、二光子顕微鏡、超解像顕微鏡、光シート顕微鏡に至る先端イメージング技術までを体系的に学習した。特に、光の物理学的性質、レンズ、顕微鏡光学系、検出器の特性、蛍光標識試料調製法、カスタム顕微鏡設計の基礎などが取り上げられ、書籍に依存せずイメージを重視した内容であったため、短期間で効率的に知識を体系化することができた。現地での対面実習では、2名1組で光学定盤上に各種光学素子を配置し、顕微鏡光路を自ら構築する光学系組立実習が中心となった(図4-4)。1日目には撮像光路および透過照明光路の構築を行い、2日目午前には蛍光観察光路の構築と光路改変を実施した。特にケーラー照明光路の構築では、開口絞りを用いた分解能および被写界深度の制御、視野絞りによる照明範囲の調整を自ら体験することで、光学顕微鏡の原理に対する理解を深めることができた。さらに、2日目午後には全視野顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いた実機実習を実施し、蛍光輝度の定量解析におけるカメラ入射光量と出力輝度の直線性の重要性を再認識した。また、基礎生物学研究所にある世界最大級の大型分光照射施設の見学を通じて、最先端施設の運用や研究基盤の理解を得た。

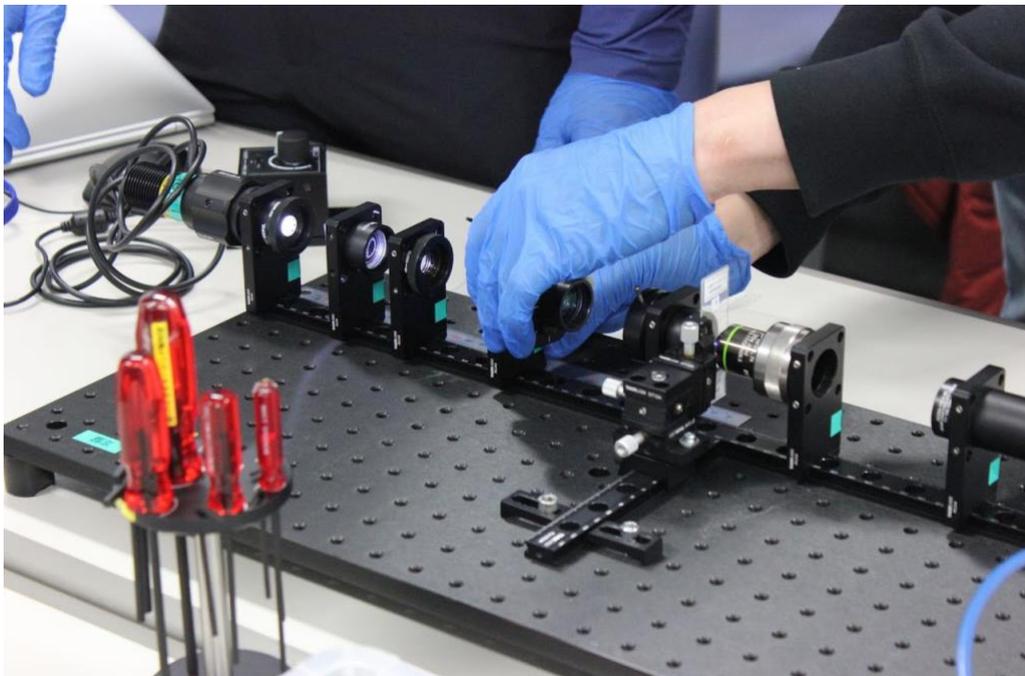


図 4-4 OPT での光学系組立実習の様子

OPT2024の受講を通じて、著者は光学顕微鏡の原理、光路設計、定量解析の基礎知識を体系的に習得したのみならず、施設利用者への助言や解析支援に必要な教育技術も向上させることができた。また、受講後には他大学のイメージング施設に従事する技術職員との交流を通

じてネットワーク形成も図っている。

第3項 OPT サテライト開催へのスタッフ活動

著者は2025(令和7)年3月に北海道大学電子科学研究所で開催されたOPT サテライト(OPT 北海道2025 札幌)に、スタッフの一員であるティーチングアシスタント(TA)として参加し、運営に一部携わった。受講生は教員や大学院生などからなる8名であり、主に光学系組立実習の補助を担当した。TAとしての役割は、単なる指導に留まらず、受講生に説明しながら自らも光学顕微鏡の操作・原理を再確認し、亀井教授ら講師と受講生の間で実践技術の橋渡しを行うものであった。当時の開催ポスターを図4-5に示す。

2026(令和8)年1月にも同様に北海道大学電子科学研究所でOPT サテライト(OPT 北海道2026 札幌)の開催が予定されており、著者は引き続きTAとして参加する予定である。TA活動を通じ、受講生への技術還元だけでなく、技術職員としての専門性向上やイメージング研究支援の強化に貢献したいと考えている。



図4-5 OPT 北海道2025 札幌の案内ポスター

第4項 今後の活動方針

OPT での受講経験およびサテライト開催でのTA参加を通じ、著者は将来的に北海道大学大

学院農学研究院での OPT サテライトの主催者として活動することを目標としている。OPT では技術職員がサテライト開催を主導したのは一例しかなく、著者が主催者として取り組むことは、学内外の研究者へのイメージング教育の機会提供に加え、技術職員の幅広い知識や高度な専門技術、研究企画力および技術継承力を可視化するモデルケースとなる可能性がある。今後は、OPT 受講やサテライト開催での運営の知見を活かし、光学系組立実習の内容を講師陣とともにブラッシュアップすることで、学内外の研究者のイメージングリテラシー向上と技術職員の教育研究支援能力の向上に寄与することを目標とする。

第5項 小括

OPT への受講および TA 活動は、光学顕微鏡の理論理解、実習技術、教育能力、ネットワーク形成のいずれにおいても重要な経験となった。光学系組立実習や蛍光光路構築を通じて、受講生や施設利用者に対して正確で実践的な助言を行う能力を養うことができた。さらに、将来的なサテライト主催を視野に入れた活動は、技術職員の専門性可視化と地位向上、学内外の研究者支援体制の強化につながるものである。本節で述べた OPT 関連の活動は、技術交流ネットワークの形成と組織運営に関する取り組みとして、著者のバイオイメージング分野における教育研究支援業務に直接的に寄与している。

第4節 学内技術職員組織での専門部会活動

第1項 技術連携統括本部事業統括室専門部会

北海道大学では、令和7年7月1日に技術職員の全学一元化組織として技術連携統括本部が発足した。技術連携統括本部の事業統括室には、研修実施専門部会、技術連携広報専門部会、将来構想検討専門部会の3つの専門部会が設置されている。これらの専門部会は、技術連携統括本部の前身である技術支援本部において設置されていた専門部会を改組したものであり、令和7年10月1日より、技術連携統括本部事業統括室の専門部会として新たに活動を開始した。

著者は、技術支援本部時代の専門部会活動への参画経験はなかったが、令和7年10月より、事業統括室専門部会のうち技術連携広報専門部会および将来構想検討専門部会の2部会に参画している。任期はいずれの専門部会も令和7年10月1日から令和9年9月30日までの2年間である。これらの専門部会への参画は、著者の活動領域が装置運用や個別研究支援にとどまらず、大学全体の技術支援体制の可視化および将来設計に関わる段階へと拡張していることを示している。これは、技術職員の専門性を組織的資源として活用するための仕組みづくりに参画するものであり、研究支援人材としての役割が実務支援から組織運営へと発展していることを意味する。

第2項 技術連携広報専門部会での活動

技術連携広報専門部会は、学内技術職員および技術連携統括本部の活動を学内外へ発信する役割を担う組織である。公式ウェブサイトや技術職員データベース「ほくたい技術者図鑑」(図4-6)の運用、広報誌やパンフレットの制作、イベント取材などを通じ、技術職員の専門性と研究支援活動の可視化を推進している。これらの取り組みは、研究者に対する技術職員の認知向上と連携促進に直結するものであり、共用研究基盤の有効活用を支える重要な基盤整備活動と位置付けられる。

著者は、大学技術職員という職種がまだ広く周知されていないと感じているため、単なる情報発信にとどまらず、技術職員という職種の役割や価値を学内に広く伝えることを目的とした広報活動に取り組みたいと考えている。研究支援の現場では、技術職員が多様な分野で専門性を発揮している一方、その業務内容や貢献は研究者に十分に認識されていない場合も多い。このような状況を踏まえ、技術職員の業務全体を俯瞰的にとらえて、組織としての機能や強みを可視化することが重要であると考えている。技術職員という専門人材が教育研究支援活動にどのように関与し、どのような形で組織として活躍をいのかを学内のみならず、学外にも積極的に発信したいと考えている。



図 4-6 技術職員データベース「ほくだい技術者図鑑」のホームページ

第 3 項 将来構想検討専門部会での活動

将来構想検討専門部会は、技術職員が専門性を発揮しながら安定して働ける環境整備を目的とし、中長期的な組織方針の策定に関与している。技術職員の能力向上、業務環境改善、人材確保を柱とし、現場ヒアリングやアンケート調査に基づき課題を抽出し、技術連携統括本部の今後の方向性について提言を行っている。研究林や牧場などのフィールド系に携わる技術職員のなかには、北海道大学札幌キャンパスから離れた地方で勤務している職員が多く、本部会では現場への出張訪問によるヒアリングの機会がある。本部会の活動は、技術職員組織の持続的発展と大学全体の研究支援生産性向上に寄与する制度設計に関わる取り組みである。

著者は日常業務を通じていくつかの課題を認識している。技術職員が担う研究支援業務の持続性に関していくつかの構造的課題を認識している。第一に、特定機器や高度な試料作製技術が属人化しやすく、休暇取得時に業務が停滞する可能性が高いことである。これは個々の技術職員の努力の問題ではなく、代替体制が難しい組織的課題である。そのことが原因で、休暇を容易に取得できない技術職員が多いと感じられる。第二に、技術継承の困難さである。研究支援業務には経験によるコツが多く含まれるが、それらが十分に形式化されていない場合、後進育成や技術継承に負担が集中する状況が生じる。これは将来的な研究支援力の低下につながり得る要因と考えられる。第三に、部局間の連携の難しさが挙げられる。大学内には多様な専門技術が存在するにもかかわらず、部局、さらには部署単位での分断により情報共有や人的連携が十分に進まない場面も見られる。これは大学全体としての研究支援力を最適化する上での課題である。これらの問題意識は、将来構想検討専門部会の活動と密接に関連しており、著者は現場の実情を踏まえた視点から、技術職員が安心して能力を発揮できる体制整備に貢献したいと考えている。

第5節 衛生管理者としての業務

著者は北海道大学大学院農学研究院において衛生管理者として選任されており、労働安全衛生法に基づき、職場における労働者の健康障害の防止および快適な作業環境の形成を目的とした業務に従事している。研究者や技術職員の職場は、一般事務の職場とは異なる特有の安全衛生上のリスクを内包している。そのため、衛生管理者の役割は、法令遵守の確認にとどまらず、現場実態に即した予防的視点での環境整備が重要となる。

定期的な職場巡視を通じて、作業環境および作業方法の安全性を確認している。具体的には、実験室内の棚や高圧ガス容器の転倒リスク、毒劇物、有害廃液の保管状況などを重点的に確認している(図4-7)。また、軽微なトラブル事例についても共有し、個人の経験を組織の知識として蓄積することで、再発防止につなげている。

学内の安全衛生委員会への参加や関連情報の共有を通じて、部局内外の安全衛生活動との連携を図っている。部局ごとに環境や業務内容が大きく異なるため、他部局の事例を参考にしながら、著者自身の職場への適用可能性を検討することも重要な役割の一つである。

衛生管理者としての業務は単なる点検業務ではなく、事故や健康被害を起こさない仕組みづくりを担う予防的な活動である。著者は今後も、現場の実態に根ざした安全衛生活動を継続し、研究者や技術職員が安心して教育研究活動に専念できるよう、職場環境の改善に貢献していきたいと考えている。



図4-7 有害廃液の保管状況の確認

第5章 総括および展望

第1節 総括

本論文では、著者が生物組織構造解析センターおよび学内技術職員組織において実施してきた研究支援活動および組織運営に関する取り組みを整理した。まず、SEMに関する研究支援活動では、多様な生物試料を取り扱い、各試料の特性に応じた試料作製法や観察条件の体系化を目指した支援を行った。これにより、研究者が得られる観察結果の再現性および解析精度の向上に寄与するとともに、試料作製および観察手法の標準化を促進することができた。

次に、光学顕微鏡に関する研究支援活動では、従来の植物試料解析では前例の少なかったSTED超解像顕微鏡を用いた支援にも参画した。これにより、植物細胞内の微細構造の可視化や蛍光標識分子の局在解析に貢献するとともに、技術職員として光学顕微鏡の原理・操作・解析支援能力を体系的に習得する機会となった。さらに、OPTなどの研修受講やサテライト開催へのスタッフ参加を通じ、学内外の技術職員ネットワークの形成や教育支援能力の向上も実現した。

また、日常的な機器管理や個別研究支援にとどまらず、学内技術職員組織や専門部会での活動を通じて、大学全体の研究支援力の可視化や持続可能な体制づくりに貢献している。これらの取り組みは、単なる技術職員の業務にとどまらず、組織運営やマネジメント能力の向上を通じて、教育研究支援環境の改善に寄与するものである。

第2節 展望

著者はまず、SEMにおける生物試料の試料作製法の経験をさらに蓄積し、従来の手法に加えて、新規技術である、電子線照射により試料表面に数十 nm の被膜を形成し新空中での水分蒸発を抑制するナノスーツ法の先端的試料作製法の開発にも、現在積極的に取り組んでいる(図5)。これにより、従来の手法では観察が困難であった微細構造の解析や新規生物試料への対応を可能とし、研究支援の幅を拡張することが期待される。

次に、最新機器であるSEMや共焦点レーザー顕微鏡の機器担当者として、学内外の利用者に対する円滑かつ安全な運用体制を確立することを目指す。単に施設内での利用にとどまらず、地域中核の拠点としての技術支援の役割も担い、学術研究の活性化および地域連携の促進に寄与することを意図している。

さらに、技術職員として前例の少ない光学顕微鏡トレーニングコースの企画・主催に挑戦することで、研究者および技術職員双方の教育機会の拡充を図る。これは、光学顕微鏡に関する基礎から先端技術までの体系的学習機会を提供し、学内外におけるイメージング研究支援力の向上に資するものである。

加えて、技術職員という専門職の重要性が学内外で社会的に認知されることを目指し、魅力ある職業としての地位向上に資するマネジメント活動への参画や、全国的な技術職員ネットワークの構築にも取り組む。これらの活動は、個々の技術職員の専門性を可視化するとともに、研究支援人材の育成、組織運営力の向上、学術研究基盤の持続的発展に寄与するものである。



図5 ナノスーツ法を用いたSEM試料作製の取り組み

第3節 TC への抱負

著者は、物質分析系 TC コース(バイオ)の理念に基づき、真核生物および原核生物の構造と機能を理解し、ドライおよびウエット双方の研究プロセスを駆使した支援にコミットすることを目標としている。バイオ関連分野における幅広い研究活動を支援するため、高度な技術力を維持するとともに、最新の解析手法や研究動向に敏感であることが求められる。さらに、異分野連携を視野に入れた共同研究の企画・支援において、専門分野では研究者をリードし、適宜的確な助言や提案を提供する能力が重要である。加えて、次世代の後継者育成に積極的に取り組み、組織の発展に貢献する姿勢も TC としての使命とされる。

具体的には、SEM による生物試料の微細構造観察および試料作製を通じ、研究者のドライ・ウエット双方の研究活動を支援する。さらに、超解像顕微鏡をはじめとする先端イメージング技術の更新や適用に挑戦し、技術力と解析能力を向上させる。また、光学顕微鏡トレーニングコースや学内技術交流会への参加・企画を通じ、技術職員のネットワーク構築と次世代人材育成に貢献する。

著者は研究者の「裏方」ではなく、対等な「パートナー」としての自覚を持つことを重視している。現場での研究支援に加え、技術職員組織のマネジメントにも積極的に参画することで、組織全体の研究支援力を向上させる。また、他大学の TC コース参加者との交流を通じて、全国規模での研究支援体制の構築に貢献することを目指す。最終的には、技術職員のロールモデルとして専門性と実践力を示し、次世代の研究支援人材の育成に資することが著者の目標である。

以上の取り組みを通じ、著者は「目指すべき TC 像」に近づくべく、今後も研鑽を重ね、学内外の研究支援体制の強化と技術職員としての専門性向上に努めていきたい。

謝辞

本 TC 論文審査の主査としてご快諾いただき、ご指導ご鞭撻を賜りました、北海道大学技術連携統括本部本部長 網塚浩教授に、深く感謝申し上げます。

また、本論文審査の副査としてご承諾いただきました、北海道大学技術連携統括本部副本部長 佐崎元教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本論文審査の副査の申し出をご快諾いただき、TC カレッジ旧バイオ系 TC コースの前コース担当としてご指導いただきました東京科学大学 高田綾子博士・TC、ならびに同コースの前コース監修としてご支援くださいました東京科学大学 和地正明教授に心より感謝申し上げます。

TC カレッジ受講の機会提供にご尽力いただきました、北海道大学技術連携統括本部総合研究基盤連携センター副センター長 岡征子技術専門員に深謝いたします。また、多大なるご支援をいただきました同副センター長 佐々木隆太特任准教授、技術連携統括本部技術副統括 永井謙芝技術専門員にお礼申し上げます。

著者が所属する共同利用施設生物組織構造解析センターの運営に関してご指導いただきました、前運営委員長の北海道大学副学長 西邑隆徳教授、運営委員長の同大学院農学研究院 佐野雄三教授、同技術連携統括本部 伊藤利章特命職にお礼申し上げます。

FI 質量分析装置のエミッター観察に関する技術連携にご協力いただきました、北海道大学大学院農学研究院 松浦英幸教授、同技術連携統括本部 高田祐輔技術専門員に感謝いたします。

光学顕微鏡トレーニングコースのサテライト開催に際してご指導いただきました、自然科学研究機構基礎生物学研究所 亀井保博教授、斎田美佐子技術主任に深く感謝いたします。

北海道大学の技術交流会の運営にあたりご協力いただきました、本学技術連携統括本部 松本亜希子技術専門職員、牛島夏未技術専門職員、下田周平技術専門職員、鈴木啓太技術専門職員、山本宏子技術専門職員にお礼申し上げます。

最後に、TC カレッジの受講および本論文の執筆にあたり、多方面から支えてくださった関係者の皆様に、心より感謝申し上げます。

参考文献

- Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Archiv mikroskopische Anatomie*, 9, 413 (1873)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.), Garland Science (2014).
- Bozzola, J. J., and Russell, L. D. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists* (2nd ed.), Jones and Bartlett Publishers (1999).
- Echlin, P., Paden, R., Dronzek, B., Wayat, R. Scanning electron microscopy of labile biological tissues maintained under controlled conditions, *Scanning Electron* 1970, 51-56 IITRI(1970)
- Hayakawa, T., Yoshida, Y., Yasui, M., Ito, T., Iwasaki, T., Wakamatsu, J., Hattori, A. and Nishimura, T. Heat-induced gelation of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine, *Meat Science*, 90(1), 77-80 (2012)
- Hooke, R. *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses.*, Royal Society (1665)
- Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137A (1965)
- Kasuga, J., Tsumura, Y., Kondoh, D., Jitsuyama, Y., Horiuchi, R. and Arakawa, K. Cryo-scanning electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape ‘Yamasachi’ is accompanied by partial dehydration, *Journal of Plant Physiology*, 253, 153248 (2020)
- Kato, S., Tobe, H., Matsubara, H., Sawada, M., Sasaki, Y., Fukiya, S., Morita, N. and Yokota, S. The membrane phospholipid cardiolipin plays a pivotal role in bile acid adaptation by *Lactobacillus gasseri* JCM1131T, *BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 403-412 (2019)
- Kuwabara, C., Miki, R., Maruyama, N., Yasui, M., Hamada, H., Nagira, Y., Hirayama, Y., Ackley, W., Li, F., Imai, R., Taoka, N. and Yamada, T. A DNA-free and genotype-independent CRISPR/Cas9 system in soybean, *Plant Physiology*, 196(4), 2320-2329 (2024)

Leeuwenhoek, A. Brief Observations on Living Animalcules, Philosophical Transactions of the Royal Society (1677).

Masuda, K., Hikida, R. and Fujino, K. The plant nuclear lamina proteins NMCP1 and NMCP2 form a filamentous network with lateral filament associations, *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6190-6204 (2021)

Matsuo, R., Watanabe, S. and Okabe, S. Microbial photoelectrochemical cell using hybrid CuO/ZnO/CuO and *Shewanella oneidensis* MR-1 anode for hydrogen production, *Chemical Engineering Journal*, 505(1), 159093 (2025)

Mulver, T. Unconventional lens design, magnetic electron lenses, ed Hawkes. P. W., *Topics in Current Physics*, 18,359-412 (1982)

Pawley, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed.), Springer (2010)

菊地那樹, 大原昌宏 エンムムシダマシ(鞘翅目エンムムシダマシ科)の分類学的考察, *昆虫*, 27(1), 21-31 (2024)

内閣府 総合科学技術・イノベーション会議(CSTI) 知の基盤の安定的提供に関する提言 (2020)

文部科学省 研究設備・機器の共用推進に向けたガイドライン(2022)

研究支援業績

共著論文

Kuwabara, C., Miki, R., Maruyama, N., Yasui, M., Hamada, H., Nagira, Y., Hirayama, Y., Ackley, W., Li, F., Imai, R., Taoka, N. and Yamada, T. A DNA-free and genotype-independent CRISPR/Cas9 system in soybean, *Plant Physiology*, 196(4), 2320-2329 (2024)

田中大介, 佐久間義範, 安井雅範, 川村浩平, 荒川圭太 Cryo-plate 法を用いた交雑ポプラ培養体の超低温保存技術の開発, *低温生物工学会誌*, 67(1), 47-51 (2021)

Hayakawa, T., Yoshida, Y., Yasui, M., Ito, T., Wakamatsu, J., Hattori, A. and Nishimura, T. Role of Heavy Meromyosin in Heat-Induced Gelation in Low Ionic Strength Solution Containing L-Histidine, 80(8), *Journal of Food Science*, C1641-C1645 (2015)

Hayakawa, T., Yoshida, Y., Yasui, M., Ito, T., Iwasaki, T., Wakamatsu, J., Hattori, A. and Nishimura, T. Heat-induced gelation of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine, *Meat Science*, 90(1), 77-80 (2012)

謝辞掲載論文

Lang, W., Watanabe, T., Lee, C., Fukushima, S., Li, F., Yamamoto, T., Tajima, K., Tagami, T., Borsali, R., Takahashi, K., Satoh, T. and Isono, T. Self-assembly of malto-oligosaccharide-block solanesol in aqueous solutions: Investigating morphology and sugar-based physiological compatibility, *Carbohydrate Polymers*, 352, 123207 (2025)

Lang, W., Watanabe, T., Lee, C., Tagami, T., Li, F., Yamamoto, T., Tajima, K., Borsali, R., Takahashi, K., Satoh, T. and Isono, T. Fully biosourced amphiphilic block copolymer from tamarind seed xyloglucan and solanesol: synthesis, aqueous self-assembly, and drug encapsulation *Carbohydrate Polymers*, 352, 123181 (2025)

Matsuo, R., Watanabe, S. and Okabe, S. Microbial photoelectrochemical cell using hybrid CuO/ZnO/CuO and *Shewanella oneidensis* MR-1 anode for hydrogen production, *Chemical Engineering Journal*, 505(1), 159093 (2025)

菊地那樹, 大原昌宏 エンマムシダマシ(鞘翅目エンマムシダマシ科)の分類学的考察, *昆蟲*, 27(1), 21-31 (2024)

Taira, S., Tanouchi, I., Suzuki, S., Iwata, T. and Uraki, Y. Facile preparation of optically transparent film of acetylated cellulose nanofiber-reinforced poly(methyl methacrylate) utilizing cosolvency in aqueous ethanol, *Cellulose*, 31(3), 1559-1568 (2023)

Ohiki, M., Saito, T., Nakaya, Y., Satoh, H. and Okabe, S. Growth of the *Nitrosomonas europaea* cell in the biofilm and planktonic growth mode: Responses of extracellular polymeric substances production and transcriptome, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 136(6), 430-437 (2023)

Katsura, N., Itoh, K., Matsuhira, H., Kuroda, Y., Kubo, T. and Kitazaki, K. Two cytoplasmic male sterility phenotypes in beet (*Beta vulgaris* L.): implications of their simultaneous onset and divergent paths, *Euphytica*, 219(11) (2023)

渋井宏美, 佐野雄三 軟X線写真法による広葉樹12種の樹皮組織の観察, *木材学会誌*, 68(3), 107-116 (2022)

Jomori, T., Matsuda, K., Egami, Y., Abe, I., Takaie, A. and Wakimoto, T. Insights into phosphatase-activated chemical defense in a marine sponge holobiont, *RSC Chemical Biology*, 2(6), 1600-1607 (2021)

Masuda, K., Hikida, R. and Fujino, K. The plant nuclear lamina proteins NMCP1 and NMCP2 form a filamentous network with lateral filament associations, *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6190-6204 (2021)

Horiuchi, R., Arakawa, K., Kasuga, J., Suzuki, T. and Jitsuyama, Y. Freezing resistance and behavior of winter buds and canes of wine grapes cultivated in northern Japan, *CRYOBIOLOGY*, 101, 44-51 (2021)

Horiguchi A., Sakamoto, S., Mitsuda, N. and Miwa, K. Golgi-localized membrane protein AtTMN1/EMP12 functions in the deposition of rhamnogalacturonan II and I for cell growth in *Arabidops*, *Journal of Experimental Botany*, 72(10), 3611-3629 (2021)

Yamagishi, S., Shigetomi, K., Fujiyasu, S., Aoki, D., Uno, T., Fukushima, K., and Sano, Y. Artfactual lipid coatings on intervessel pit membranes in dried xylem tissue of some angiosperms, *IAWA Journal*, 42(4), 365-383 (2021)

Kasuga, J., Tsumura, Y., Kondoh, D., Jitsuyama, Y., Horiuchi, R. and Arakawa, K. Cryo-scanning

electron microscopy reveals that supercooling of overwintering buds of freezing-resistant interspecific hybrid grape ‘Yamasachi’ is accompanied by partial dehydration, *Journal of Plant Physiology*, 253, 153248 (2020)

Tsugama, D., Fujino, K., Liu, Shenkui. And Takano, T. A GDSL-type esterase/lipase gene, GELP77, is necessary for pollen dissociation and fertility in *Arabidopsis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(4), 1036-1041 (2020)

Kato, S., Tobe, H., Matsubara, H., Sawada, M., Sasaki, Y., Fukiya, S., Morita, N. and Yokota, S. The membrane phospholipid cardiolipin plays a pivotal role in bile acid adaptation by *Lactobacillus gasseri* JCM1131T, *BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 403-412 (2019)

Sato, K., Jitsuyama, Y., Yamada, T., Liu, B. and Abe, J. Structural features of the aleurone layer of the seed coat associated with immitation injury in soybean, *Breeding Science*, 69(2), 364-370 (2019)

Ogawa, N. and Yoshizawa, K. Structure and evolution of the stigmaphysis -A unique repose wing-coupling structure in Psocodea, *Arthropod Structure and Development*, 47(5), 416-422 (2018)

Ogawa, N. and Yoshizawa, K. Origin and transformation of the in-flight wing-coupling structure in Psocodea (Insecta: Paraneoptera), *Journal of Morphology*, 279(4), 517-530 (2018)

Ikeda, S., Hoshino, T., Matsumoto, N. and Kondo, N. Taxonomic reappraisal of *Typhula variabilis*, *Typhula laschi*, *Typhula intermedia* and *Typhula japonica*, *MYCOSCIENCE* 56(5), 549-559 (2015)

Endoh, K., Kuwabara C., Arakawa, K. and Fujikawa, S. Consideration of the reasons why dormant buds of trees have evolved extraorgan freezing as an adaptation for winter survival, *Environmental and Experimental Botany*, 106, 52-59 (2014)

Takanashi, R., Ishihara, W., Sawata, K., Sano, Y., Azuma, T., Mori, M., Koizumi, A., Sasaki, Y. and Hirai, T. Fractography of shear failure surface of softwood decayed by brown-rot fungus, *Journal of Wood Science*, 60(3), 186-193 (2013)

遠藤圭太, 岡田香織, 鈴木伸吾, 藤川清三, 荒川圭太 カツラ冬芽の細胞の凍結挙動, *低温生物工学会誌*, 58(2), 179-184 (2012)

ENDO, K., FUJIKAWA, S. and ARAKAWA, K. Freezing behavior of cells in evergreen needle

leaves of fir (*Abies sachalinensis*), 低温生物工学会誌, 58(2), 125-134 (2012)

Katayama, T., Kato, T., Tanaka, M., Douglas, T. A., Brouchkov, A., Abe, A., Sone, T., Fukuda, M. and Asano, K. *Tomitella biformata* gen. Nov., sp. Nov., a novel member of the suborder *Corynebacterineae* isolated from a permafrost ica, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60(12), 2803-2807 (2010)