

令和7年度 TC論文

電子顕微鏡試料作製及び観察支援業務と
高度専門人財養成に向けた取り組み

医工系 TC コース

岡山大学 総合技術部 医学系技術課

塚野萌美

目次

第1章 緒論

- 1.1 医学部共同実験室の概要
- 1.2 医学部共同実験室の受託サービス
 - 1.2.1 電子顕微鏡試料作製サービスについて
 - 1.2.2 電子顕微鏡試料作製サービスの依頼件数の推移
- 1.3 岡山大学の TC カレッジ参画及び医工系 TC コース受講の経緯
- 1.4 本論文の構成

第2章 医学部共同実験室における電子顕微鏡試料作製

- 2.1 透過型電子顕微鏡試料作製法
 - 2.1.1 超薄切片作製法
 - 2.1.1.1 固定
 - 2.1.1.2 脱水
 - 2.1.1.3 置換・樹脂浸透
 - 2.1.1.4 樹脂包埋
 - 2.1.1.5 重合（硬化）
 - 2.1.1.6 薄切
 - 2.1.1.7 電子染色
 - 2.1.1.8 カーボン蒸着
 - 2.1.2 培養細胞のブロック作製方法
 - 2.1.2.1 浮遊培養細胞の場合
 - 2.1.2.2 接着培養細胞の場合
 - 2.1.3 免疫電顕法
 - 2.1.3.1 包埋前免疫電顕法（Pre-embedding 法）
 - 2.1.3.2 包埋後免疫電顕法（Post-embedding 法）
- 2.2 走査型電子顕微鏡試料作製法
 - 2.2.1 表面形状観察法
 - 2.2.1.1 固定
 - 2.2.1.2 脱水
 - 2.2.1.3 置換
 - 2.2.1.4 乾燥
 - 2.2.1.5 試料台への設置
 - 2.2.1.5 導電処理

第3章 医学部共同実験室における試料作製及び観察支援

- 3.1 マウスを用いた皮膚創傷治癒過程における基底膜の微細構造観察支援
- 3.2 培養細胞の細胞間接着部位の超微細構造観察支援
- 3.3 マウスを用いた腎臓糸球体における Dynamin1 の局在観察支援
- 3.4 核内封入体の観察
- 3.5 常在細菌の観察

第4章 TC カレッジ医工系コースの構築及び業務への活用

- 4.1 TC カレッジ医工系コースの構築
 - 4.1.1 医工系 TC コースとなった経緯
 - 4.1.2 医工系 TC コースの概要
 - 4.1.3 医工系 TC コースの独自カリキュラムの構築と実施
 - 4.1.3.1 医工系 TC コースの独自カリキュラムの構築
 - 4.1.3.2 医工系 TC コースの独自カリキュラムの実施
- 4.2 業務での活用事例
 - 4.2.1 分析機器カリキュラムの受講による業務時の変化
 - 4.2.2 3Dプリンタを用いたガラスナイフスタンドの作製

第5章 まとめと展望

- 5.1 まとめ
- 5.2 展望

参考文献

業績

謝辞

第1章 緒論

1.1. 医学部共同実験室の概要

岡山大学医学部共同実験室は、学内研究の円滑な推進を目的として昭和24年に設立された共同機器利用施設である。研究分野に応じて4つの分室に分かれており、第一分室は電子顕微鏡、第二分室は光学顕微鏡、フォトセンター、第三分室は核酸、細胞、蛋白、第四分室は岡山大学病院のバイオバンクとなっている。設置機器は約100台に及ぶ。組織としては、医学部長が共同実験室長を兼務し、その下に分室長、副分室長、専任職員が配置されている。また、運営に関する事項を審議する「医学部共同実験室運営委員会」や、企画・調整を担う「共同実験室常任委員会」が設置されている（図1-1）。

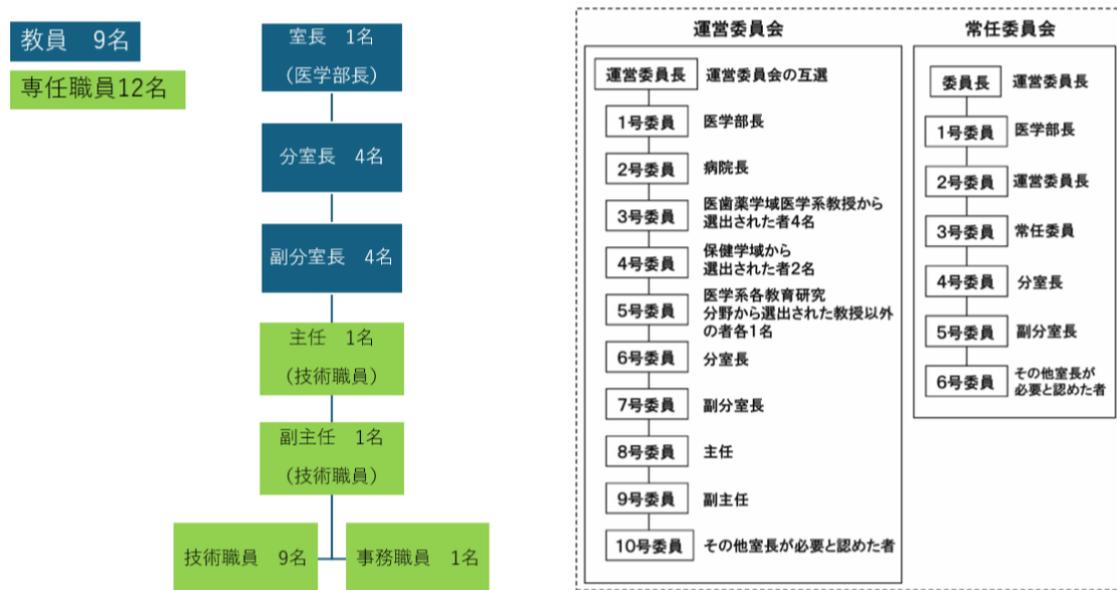


図 1-1. 共同実験室の組織図

1.2. 医学部共同実験室の受託サービス

医学部共同実験室では、機器利用の他、受託サービスを実施している。筆者は2017年度に採用されて以来、電子顕微鏡担当として電子顕微鏡試料作製の受託サービスを担当してきた。

1.2.1 電子顕微鏡試料作製サービスについて

電子顕微鏡試料作製サービスとは、透過型電子顕微鏡および走査型電子顕微鏡に用いる試料作製を、共同実験室の専任職員に委託できる仕組みである。生物試料の電子顕微鏡観察には多くの前処理工程を要し、その中には高額な装置や高度な技術を必要とするものも含まれる。そのため、単独の研究室ですべての工程を担い、機器を維持・管理しているところは少なく、本サービスは共同実験室のある鹿田地区のみならず、津島地区を含む学内の多くの研究室に利用されている。さらに、電子顕微鏡の利用時には操作説明や観察サポートも行っており、受託試料や持込試料を初心者でも安心して観察できる体制を整えている。

加えて、岡山大学病院や岡山大学の臨床系講座から提供された検体を用いた電子顕微鏡観察用の試料作製も行っている。特に、電子顕微鏡でのみ確認可能な微細構造の観察を目的とした症例に関しては、依頼元の医師の指示に基づき、適切な試料処理および観察を実施している。依頼の流れとしては、電話または対面での事前打ち合わせにより、日程、手順、ならびに必要な準備物について確認を行った後、依頼医師が検体を採取し、医師本人または医局関係者により検体が持ち込まれる。筆者は医療従事者ではないため臨床現場には立ち会わず、検体受領後に適切な処理と試料作製を担当している。観察については、依頼医師が同席する場合と、筆者が観察を代行する場合がある。

また、外部機関で樹脂包埋された電子顕微鏡用ブロックを受け取り、超薄切片の作製を行う業務にも対応している。これらの切片は、主に研究を目的とした細胞・組織の微細構造観察に使用される。必要に応じて、準超薄切片のトルイジンブルー染色による対象部位の適正を事前に評価することで、観察の精度向上を図っている。

なお、臨床検体の取り扱いにおける倫理的および法的配慮については、依頼医師が所属機関の規定に従い、必要な手続きを実施している。

1.2.2 電子顕微鏡試料作製サービスの依頼件数の推移

医学部共同実験室の電子顕微鏡試料作製サービスは、2003年度からスタートし、2024年度までに、2244件の依頼を受けてきた。内訳は、透過型電子顕微鏡試料作製が1915件、走査型電子顕微鏡試料作製が329件となっている（表1-1、図1-2）。筆者は採用以降、先輩職員の指導の下、徐々に対応可能な依頼を増やし、共同実験室で提供しているほぼ全ての電子顕微鏡試料作製依頼項目に対応できる状態にしている。

表 1-1. 電子顕微鏡試料作製サービスの依頼件数の推移

年度	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
透過型電子顕微鏡 (件)	41	30	49	64	104	57	55	94	67	51	52	49	58	55	134	117	185	151	131	94	124	153
走査型電子顕微鏡 (件)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	8	15	35	37	34	44	43	31	19	24	26
合計 (件)	41	30	49	64	104	57	55	94	67	52	64	57	73	90	171	151	229	194	162	113	148	179

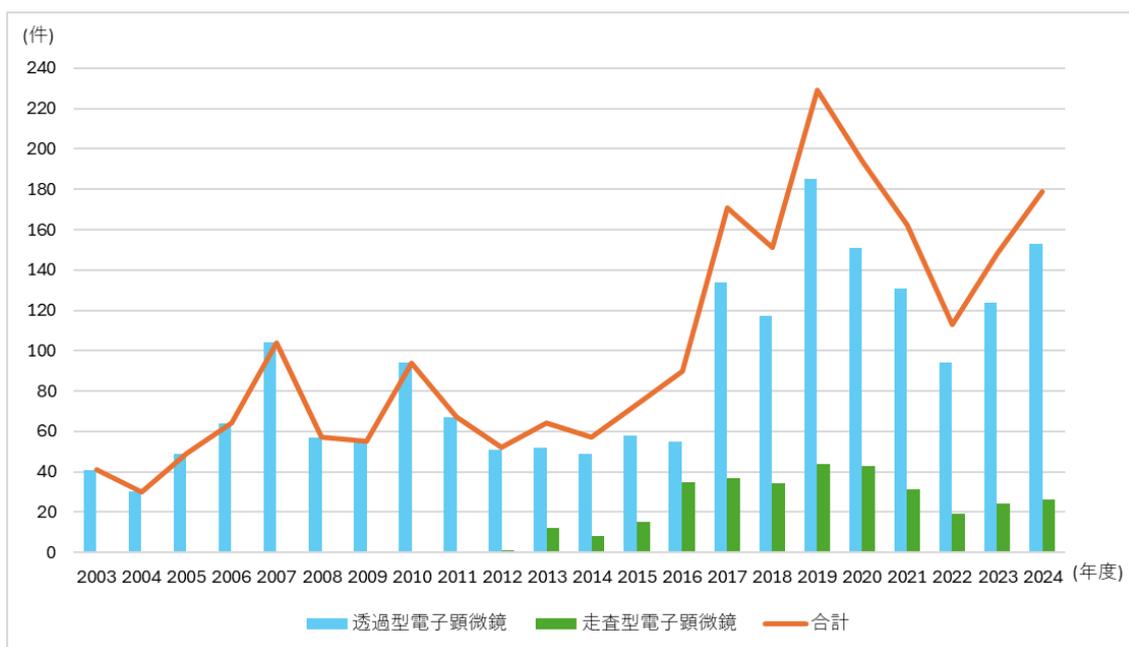


図 1-2. 電子顕微鏡試料作製サービスの依頼件数の推移

透過型電子顕微鏡の試料作製では依頼件数が多いため、筆者の採用以降では2017年4月～2024年9月まで3名、2024年10月より2名の職員で分担して依頼を受託している。透過型電子顕微鏡試料作製サービスは、電子顕微鏡用ブロック作製から超薄切片作製、染色を行う「透過型電子顕微鏡試料作製」と、溶液中の小胞やウイルスなどをグリッドに貼りつけて染色を行う「ネガティブ染色」の大きく2つ項目にわかれている。筆者は主に、「透過型電子顕微鏡試料作製」担当しており、採用された2017年度以降は年間60～70件前後の依頼件数となっている。試料作製依頼の近年の傾向として、免疫電顕の依頼が増加傾向にある（表1-2、図1-3）。

表 1-2. 透過電子顕微鏡試料作製サービスの依頼件数の推移

年度	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
透過型電子顕微鏡 (件)	41	30	49	63	98	53	45	72	67	49	48	46	49	40	71	74	54	74	63	65	59	70
免疫電顕 (件)	0	0	0	1	3	1	6	6	0	2	4	0	6	0	5	5	5	12	12	8	8	17
ネガティブ染色 (件)	0	0	0	0	3	3	4	16	0	0	0	3	3	15	58	38	126	65	56	21	57	66

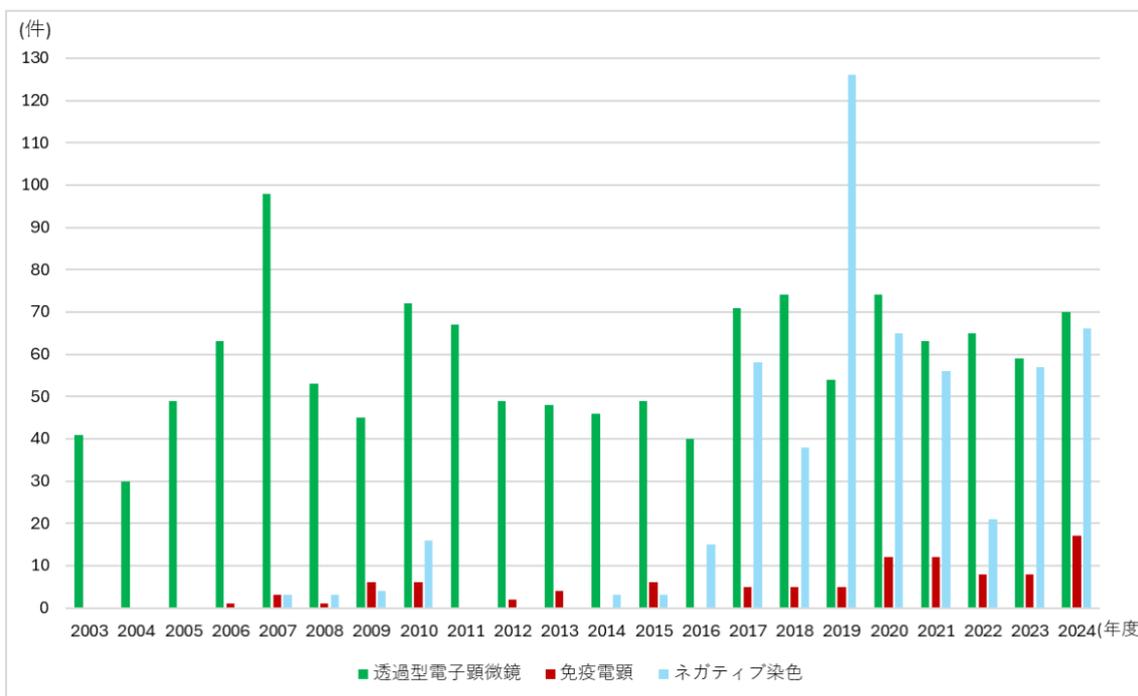


図 1-3. 透過型電子顕微鏡の試料作製サービスの依頼件数の推移

1.3. 岡山大学の TC カレッジ参画及び医工系 TC コース受講の経緯

岡山大学は令和 3 年度に国立大学経営改革促進事業③-1 を受け、研究支援体制の全学的マネジメント化を推進してきた。令和 4 年度にはコアファシリティ設置準備室を開設し、「1. 研究設備の一体運用」と「2. 技術・スキルの一体的運用」を柱とする体制構築を開始した。「2. 技術・スキルの一体的運用」は「2-1. 新職階制度」「2-2. 技術力向上」「2-3. 技術共用」から構成され、「2-2. 技術力向上」においては、技術職員が研究者と協働して課題解決に取り組むパートナーとして、高度かつ専門的な知識・技術を備える必要性があげられた（図 1-4）。

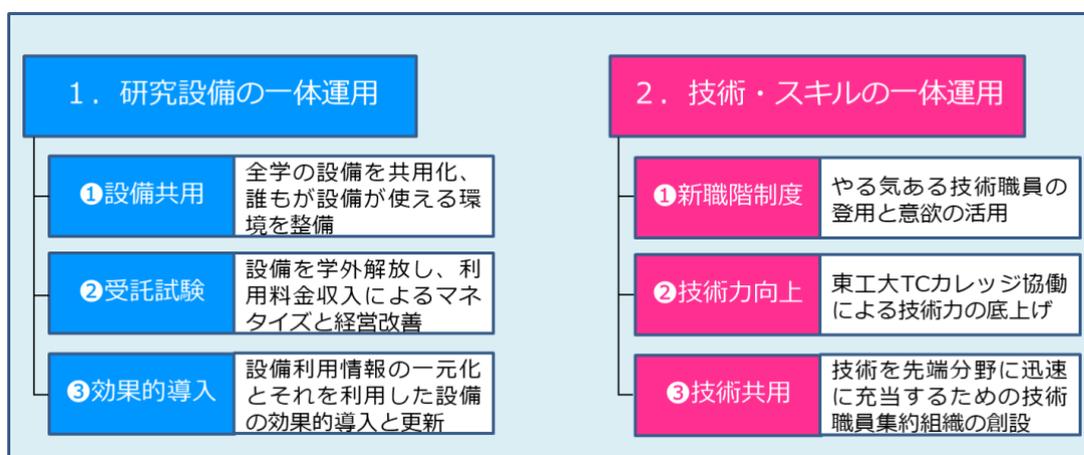


図 1-4. コアファシリティ（研究支援の中核組織）の創設

その検討過程において、他大学も含めたオープンな仕組みを活用することとなり、東京科学大学が令和 3 年度より主導している研究者と対等な立場で課題解決を行うプロフェッショナルな人材を「テクニカルコンダクター（TC）」として認定する研修プログラム「TC カレッジ」に、岡山大学はサテライト校として参画することとなった。TC カレッジは、高度な技術力と研究企画力を備えた「高度専門人財」の育成を目的としており、その体系的な研修プログラムを活用することで、岡山大学における技術職員の高度化が期待された。

しかし、当時の TC カレッジにおいては医学系技術職員を対象としたコースが開設されていなかった。そのため、医学系分野の独自コースの設計を岡山大学にて実施してほしいとの要請があり、令和 5 年度に「医工系 TC コース」を新設した。同年度は試行期間として開講し、翌令和 6 年度より本格的な開講を開始した。

筆者はコアファシリティ設置準備室のメンバーとして当初から独自コースの設計に携わるとともに、医工系 TC コースの第 1 期生として受講した。これは、コース設計および運営に必要な情報収集や実習内容の検証（デモンストレーション）を目的として推薦を受けたものであり、令和 5 年度より受講を開始した。

1.4. 本論文の構成

本論文は全 5 章から構成される。

第 1 章「緒論」では、岡山大学医学部共同実験室の概要、電子顕微鏡担当としての業務内容、および TC カレッジ医工系コース設立の経緯について述べた。

第 2 章「医学部共同実験室における電子顕微鏡試料作製」では、電子顕微鏡の試料作製方法をまとめた。

第 3 章「医学部共同実験室における観察支援及び観察」では、マウス皮膚や腎臓を用いた観察支援や臨床検体の電子顕微鏡検鏡サービスについてまとめた。

第 4 章「TC カレッジ医工系コースの構築・受講および業務への活用」では、医工系 TC コースの設立過程、受講を通じて得られた知見、さらに業務への応用事例について述べた。

第 5 章「まとめと展望」では、第 2 章から第 4 章を総括し、今後の展望を示した。

第2章 医学部共同実験室における電子顕微鏡試料作製

電子顕微鏡には透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscopy : TEM) と走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope : SEM) の2種類があり、いずれも本体内部が高真空のため、直接試料を観察することはできない。そのため、各装置に適した試料作製が必要である。本章では医学部共同実験室で行っている電子顕微鏡試料作製法について述べる。

2.1 透過型電子顕微鏡試料作製法

2.1.1 超薄切片作製法

TEM の試料作製法で最も広く用いられる方法が、超薄切片作製法である。作製工程は、一般に固定、脱水、樹脂包埋、重合 (硬化)、超薄切片作製、電子染色の順に行われる。固定から重合 (硬化) までがブロック作製の過程であり、用いるサンプルによって様々な工夫がされている。さらに、湿気を嫌う作業のため、実験室内の湿度管理には十分に気を使う必要がある。

2.1.1.1 固定

固定とは、組織や細胞の構成成分を化学的に不溶性にし、細胞外への成分の流出を防ぐ操作である。特に、試料作製における最初のステップである固定は、細胞構造を可能な限り生体に近い状態で保存するうえで極めて重要であり、最終的な電子顕微鏡像の質を大きく左右する。動物組織の微細構造は、生体の死後すぐに変化が始まるとされており、血流の停止とともに自己融解が進行するため、迅速な固定処理が求められる。

固定法には、化学的固定法と物理的固定法があるが、ここでは化学的固定法について述べる。

・浸漬固定

浸漬固定は、摘出した組織を細切し、直接固定液に浸す方法であり、最も一般的に用いられている。しかし、以下のような欠点があるため、注意が必要である。

- 1、組織摘出や細切の際に、試料を挫滅するおそれがあるため、摘出時には幅の広いピンセットを使用することが望ましい。細切の際には、無理に小さくせず、まず3~5 mm程度の厚みにスライスして数分間固定液に浸漬する。この処理により、組織がある程度硬化し、取り扱いが容易になる。その後1 mm程度の厚さに細切する。
- 2、固定液の浸透速度および固定剤の到達深度が不十分な場合、試料中心部に変性やアーテifactsを生じやすい。一般に使用されるグルタルアルデヒド (Glutaraldehyde : GA)

や四酸化オスミウムは浸透速度が遅いため、前固定には GA より浸透速度の速いパラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde : PFA) を加えた混合液を用いることが多い。また、試料は通常 1 mm 角に細切し、最低でも一晩固定する。可能であれば、ローテーターなどで固定液中の試料を揺動させるとよい。

さらに、固定容器には底が平らなものを使用し、固定液を十分量加えることが推奨される。

・還流固定

還流固定は、目的の臓器や組織を支配する血管を介して固定液を流すことにより、組織全体に固定液を行きわたらせる方法である。以下のような特徴がある。

1、動物の死以前に固定が始まるため、死後に生じる細胞の構造変化を最小限に抑えられる。また血管を介しているため、諸臓器の深部まで固定液が迅速かつ比較的均等に浸透させることができる。ただし、適切な条件設定と技術的な熟練が必要である。例えば、還流圧が高すぎると血管内皮細胞が破壊される可能性がある。

さらに、還流固定後も、摘出した組織に対して浸漬固定を追加することで、固定のムラを抑えることができる。

2、組織摘出前に固定が行われるため、摘出時の構造変形や損傷が少ない。特に神経系や精巢のように、浸漬固定時の細切操作で組織に変形が生じやすい臓器には、還流固定が有効である。

3、GA は強力な固定剤であるが、同一動物から複数用途の試料を採取する必要がある場合、その使用が制限されることがある。そのような場合、GA 以外の固定液を使用することでの組織の固定が可能であり、さらに電子顕微鏡試料にも適用できる PFA が使用できる場合は、4 %PFA 等で還流固定を実施し、その後、浸漬固定を GA 含有固定液で行うという二段階固定が有効である。この方法により、摘出および細切時の物理的損傷を軽減し、深部組織への固定液浸透を補完することが可能となる。

2.1.1.2 脱水

電子顕微鏡包埋樹脂は水溶性を除いて水と混ざり合わないため、組織内に樹脂を浸透させるためには、組織を完全に脱水する必要がある。しかし、組織を急速に高濃度の脱水剤に浸すと、収縮や構造の破壊が生じるため、低濃度から始め、徐々に濃度を高めていくことが重要である。脱水剤としてはエタノールやアセトンが使用されるが、アセトンはエタノールと比較して吸湿性が高く、揮発性が強いため、吸入すると有害である。したがって、ドラフト内で使用するなど、取り扱いには十分な注意が必要である。

動物試料の脱水にはエタノール脱水が最も一般的であり、低濃度から徐々に濃度を上げたエタノール溶液で脱水を行う。脱水時間は、上昇するエタノール濃度に応じて以下のように設定する：30%~90%では 10~15 分、100%（または試薬特級の 99.5%）では 30 分程度で

ある。また、静置ではなくローテーターや振とう機等を使用して試料を揺らしながら脱水を行うことが推奨される。

2.1.1.3 置換・樹脂浸透

脱水後の試料を樹脂包埋する際、樹脂の浸透性を高めるために、脱水剤と樹脂の両方に溶けやすい置換剤で試料を処理する。この置換剤にはプロピレンオキサイドを使用する。置換剤の浸透時間はおおよそ 15 分程度であるが、その後、組織への樹脂浸透を促進するため、置換剤と樹脂の混合液に一定時間浸漬させる。混合液の割合や浸漬時間は、試料の大きさや硬さに応じて適宜調整する。以下に一部の例を示す。

・通常の試料（軟組織）

置換剤：樹脂 = 1 : 1 1 時間

・硬組織（骨など）

置換剤：樹脂 = 2 : 1 2 時間

置換剤：樹脂 = 1 : 1 2 時間

置換剤：樹脂 = 1 : 2 2 時間

2.1.1.4 樹脂包埋

超薄切片を作製するためには、まず包埋剤を組織に浸透させ、その後組織を樹脂に埋め込み、一定の硬度に硬化させる必要がある。この硬化した樹脂が切片作製時の支持体となる。包埋樹脂は大きく分けて、エポキシ樹脂、ポリエステル樹脂、メタクリレート樹脂、アクリル樹脂の 4 種類があり、それぞれの樹脂は性質が異なるため、目的に応じて適切な樹脂を選択することが重要である。一般的には、エポキシ樹脂が広く使用されている。エポキシ樹脂は、他の樹脂と比較して重合時の収縮が少なく、また電子線照射に対して安定しているため、支持膜なしでも十分に観察可能であるという特徴がある。

さらに、使用する樹脂によっては、包埋に使用する容器が制限される場合があるため、事前に確認しておく必要がある。また、電子顕微鏡用の樹脂は不可逆的な硬化を特徴としており、一度硬化させてしまうと、再度包埋をやり直すことができない。そのため、試料に方向性がある場合は、正しい向きで確実に硬化させるように注意する必要がある。後固定の際に四酸化オスミウムを使用すると、組織が黒く変色し、色による判別が困難になる。そのため、細切の際に試料の方向が分かるように切り出しを行うことも重要である。

2.1.1.5 重合（硬化）

使用する樹脂によって重合の方法が異なるため、説明書等で確認の上、適切な方法で行う。医学部共同実験室で多く使用している Spurr 樹脂 (cat#01916、Polysciences) の場合の重合

時間は 70°Cで 24~48 時間であるが、30°Cで 1 時間、60°Cで 1 時間と徐々に温度を上げていく。この間、恒温機の扉の開閉は控えるようにする。また、恒温機で温度をタイマー設定しておくると便利である。

2.1.1.6 薄切

電子顕微鏡で組織や細胞内の微細構造を観察するためには、電子線が透過可能な厚さの切片を作製する必要がある。超薄切片の厚さは通常 60~80 nm が適切とされるが、観察や解析の目的、使用する電子顕微鏡の設定条件に応じて適宜変更する。樹脂で包埋された組織は超薄切片作製前に、まず厚さ 400 nm の準超薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色を行う。この段階で、組織の状態を確認し、トリミング位置を特定することが重要である。

ブロックのトリミングは一般的に剃刀を用いて行うが、大きなトリミングを行う場合は、糸鋸や超音波カッターを使用し、また、微調整を行う際にはウルトラマイクロトームを使用することが推奨される (図 2-1)。特に、ウルトラマイクロトームを用いてガラスナイフでトリミングを行うと、薄切面の周囲が整い、切片作製時にブロック内に水が伝わるなどのトラブルを防止できる。



図 2-1. 剃刀を用いたトリミング (左) とウルトラマイクロトームを用いたトリミング (右)

2.1.1.7 電子染色

超薄切片の電子顕微鏡像は、組織に結合した重金属と樹脂との間に生じる相対的なコントラストの差として表現される。生物組織の大部分は炭素などの軽元素から構成されているため、無染色の切片ではコントラストがほとんど生じない。しかし、近年はカメラ技術の進展により、無染色切片でもある程度のコントラストで観察できるようにはなってきたものの、コントラストを増強するために重金属による電子染色が行われる。

一般的に使用される酢酸ウランと鉛の二重染色では、酢酸ウランが核やリボソームなどを染色し、鉛が脂肪、タンパク質、グリコーゲン顆粒などを染色する。これらの物質は細胞の膜系や基質に多く存在し、染色剤と結合することで、細胞全体のコントラストが向上する。

鉛の染色液には、いくつかの染色液がある。共同実験室では、佐藤法 (Sato, T.1968) で作製した鉛染色液を使用している。佐藤法で作製する鉛染色液は、1%クエン酸鉛、1%硝酸鉛、1%酢酸鉛、2%クエン酸鉛の混合液である。

2.1.1.8 カーボン蒸着 (切片の補強)

完成した切片に薄いカーボン膜を塗布することで、切片の補強をすることができる。そうすることで TEM 観察時の切片へのダメージが軽減され試料ドリフトを軽減する効果がある。また、カーボン蒸着を行うタイミングは超薄切片作製後、電子染色前後、どちらでも可可能である。

2.1.2 培養細胞のブロック作製方法

培養細胞の場合、細胞の培養形態 (浮遊または接着) や観察目的に応じて、適切なブロック作製法を選択する必要がある。本項では、浮遊培養細胞および接着培養細胞における試料作製方法を述べる。

2.1.2.1 浮遊培養細胞の場合

浮遊性の培養細胞では、遠心操作によりペレットを形成させる方法が最も一般的かつ簡便である。具体的には、培養液中の細胞を遠沈管に回収し、1500 rpm、5 分間の遠心操作を行う。遠心後、上清を除去し、沈渣部分に固定液を重層する。

しかし、細胞数が少量である場合や、実験操作により細胞が損傷を受けている場合には、この方法では十分な大きさ及び密度を有するペレットが得られないことがある。その際には、培養液の代替として少量の血清を添加して遠心操作を行い、その後に固定液を重層することで、より強固なペレットが形成される。この操作により、後続の処理過程においてペレットが崩壊することを防ぐことが可能となる。ただし、血清を使用した場合、TEM 観察時にバックグラウンドが見られる。

バックグラウンドを回避する手法として、寒天包埋法が有効である。この方法では、遠心後の細胞沈渣に寒天を添加し混和した後、再度遠心操作を行って細胞を容器底部に集める。その後、寒天のゲル化により細胞の塊を得ることができる。通常の寒天は室温下で速やかに凝固するため素早く操作する必要があるが、低温ゲル化型寒天を用いることにより、室温下でも安定した作業が可能となる。この手法は、後述する接着培養細胞を剥離後に処理する場合にも応用可能である。

2.1.2.2 接着培養細胞の場合

接着性培養細胞の場合、培養ディッシュ上に増殖させた細胞をスクレーパーによる機械的剥離あるいはトリプシン等の酵素処理によって回収し、遠心操作によりペレット化する方法が広く採用されている。この方法は、十分な細胞量を確保できる場合、超薄切片を繰り返す

返し作製できるという利点を有する。

一方、酵素処理を行った場合には、細胞間接着も同時に解離してしまう。また、スクレーパーによる機械的剥離と酵素処理では、それぞれ細胞形態に影響を及ぼす可能性があり、観察対象や研究目的に応じて適切な方法を選択する必要がある。さらに、細胞種や実験条件によっては基板からの剥離が困難な場合もあり、その場合には使用基板の種類に応じた処理方法を選択する必要がある。以下に代表的な例を示す。

・カバーガラスおよびスライドガラスを用いた場合

細胞を基板上に培養した状態のまま、化学固定、脱水、樹脂浸透を順次行う。その後、あらかじめ樹脂を充填したポリエチレンカプセルまたはゼラチンカプセルを基板上の細胞に逆置し、恒温器内でプロトコルに従い重合を行う。重合終了後、室温に戻したブロックを100-110°Cに設定したホットプレート上で加熱することで、ガラス基板からブロックを剥離することができる。特にカバーガラスは破損しやすいため、重合の際にスライドガラス上に貼付しておくことで、剥離操作を安定的に実施できる（図 2-2）。

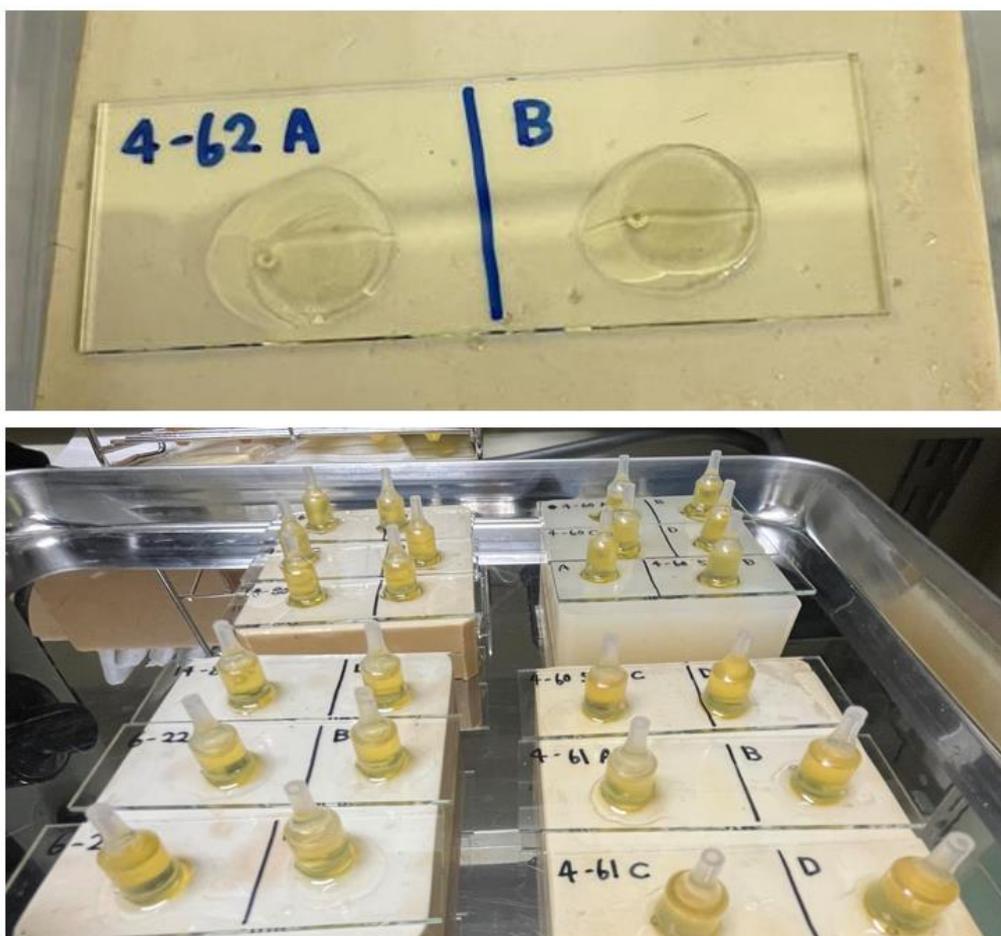


図 2-2 カバーガラスをスライドガラス上へのせ（上）、ポリエチレンカプセル（ビームカプセル，Cat.No.4142，日新 EM）を倒立包埋させた（下）様子

・培養用プラスチックシートを用いた場合

プラスチックシート上で培養した細胞についても、基板から剥離させることなく、固定、脱水、樹脂浸透を行う。ただし、シートの材質によっては、置換剤であるプロピレンオキシドにより溶解や歪曲が生じることがあるため、事前にシート単体で処理試験を行うことが望ましい。プロピレンオキシドに対する耐性が不十分な場合には、プロピレンオキシドによる置換操作を省略し、100%エタノールから直接樹脂浸透へと移行する。

樹脂浸透後には、シートを適切な大きさに切断して樹脂包埋を行う。シートごと薄切を行う場合、樹脂とシートの伸縮特性の差異により切片にシワが発生することがある。このため、可能であれば観察に適したシートを事前に選定することが望ましい。ただし、軽度のシワについては、TEM 観察時に電子線照射により伸展させることが可能である（図 2-3）。

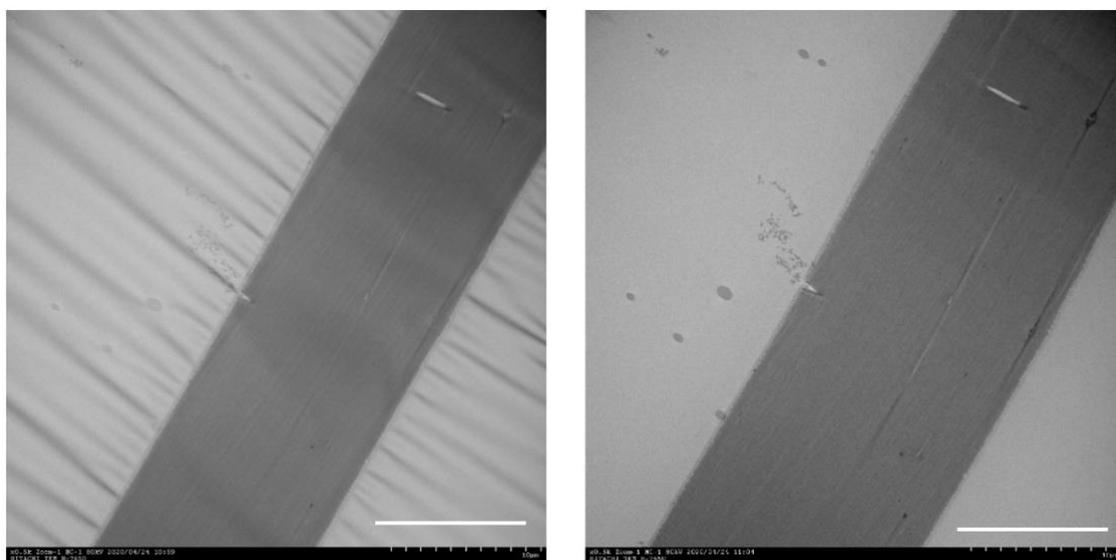


図 2-3. 軽度のシワが生じている切片（左）と電子線照射後の切片（右）

スケールバー：10 μm

2.1.3 免疫電顕法

免疫電顕法は抗原抗体反応を行う試料作製過程のステップによって、①包埋前免疫電顕法 (Pre-embedding 法)、②包埋後免疫電顕法 (Post-embedding 法)、③凍結超薄切片法の3つに分類される。本項では①と②の手法について詳細を述べる。免疫電顕法における重要な前提は抗原性の保持である。通常の TEM 試料作製で広く用いられる GA は、強力な架橋作用を持つため抗原決定基を変性させやすい。このため免疫電顕では、4% PFA 単独固定や、GA を用いる場合でも 0.1%以下の低濃度条件で使用する事が推奨される。さらに、包埋後免疫法では抗原性が著しく低下するものの、形態保持 (特に膜系構造) を優先する場合には還元オスミウムによる後固定が導入されることもある。ただし、還元オスミウム後固定を行った場合は十分な洗浄が不可欠であり、不完全な洗浄は、残留オスミウムが触媒作用を示し樹脂浸透中に不完全な重合を引き起こす原因となる。したがって、検体に余裕がある場合は複数条件でブロックを作製し、光学顕微鏡レベルで予備的に免疫反応を確認することが有効である。

本項では、間接法を用いて免疫染色を行った方法について述べる。間接法とは、非標識の一次抗体を抗原に反応させ、その後に標識化した二次抗体を結合させる方法である。この手法は、抗原が異なっても免疫動物が同一であれば共通の二次抗体を利用可能である点に利点がある (図 2-4)。なお、調製したすべての試薬は $0.2 \mu\text{m}$ フィルターで滅菌濾過し、無菌容器に保存した。また、銀増感を伴う場合には、リン酸緩衝液生理食塩水 (PBS) 中の塩素イオンが反応を阻害するため、緩衝液としてはリン酸緩衝液 (PB) を使用する必要がある。



図 2-4. 間接法の抗原と抗体の模式図

2.1.3.1 包埋前免疫電顕法 (Pre-embedding 法)

培養細胞に対する包埋前免疫電顕法では、カバーガラスまたはスライドガラス上で培養した細胞を固定後に免疫染色を行う。組織では凍結切片やパラフィン切片を作製し、その後洗浄、脱パラフィン後に免疫染色を行う。まず、非特異的結合を抑制するためにブロッキング処理を施し、ブロッキング液には二次抗体作製に使用した動物血清を用いた。一次抗体は4°Cで一晩反応させ、その後0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を添加したPB (0.1%BSA-PB) で洗浄する。続いて、二次抗体を反応させ、PB 洗浄後に2% GA で固定した。本法における二次抗体は、1.0~1.4 nm の金コロイド標識を使用し、シグナルの可視化には銀または金増感法を用いる。なお、手法では二重染色は行えない。

免疫染色後、細胞は樹脂包埋および薄切、染色の工程に進む。脱水から樹脂包埋までの手順は、2.1.1 で示した方法に従う。超薄切片を作製する際には、ブロックに トルイジンブルー染色を施し、細胞の位置を確認しながらトリミング範囲を決定する。細胞が非常に薄い場合は、準超薄切片を作製せずに直接超薄切片を作製し、グリッドに回収することもある。作製した切片は、一晩乾燥させた後にカーボン蒸着を行い、切片の補強を行う。必要に応じて、ウラン・鉛等で電子染色を施す。

2.1.3.2 包埋後免疫電顕法 (Post-embedding 法)

包埋後免疫法では、細胞は前述の方法 2.1.1 に従い固定・脱水後、LR White などのアクリル系樹脂に包埋する。樹脂硬化は、紫外線による低温重合、または 50-55 °C の低温加熱重合により行う。超薄切片を作製する前に、厚切り切片 (約 400 nm) で組織構造を確認する。免疫染色用の超薄切片は前日に作製し、保存は1週間以内を目安とする。切片厚は標準的に約 80 nm で、必要に応じて調整する。使用するグリッドはニッケル製であり、銅グリッドでは長時間の溶液浸漬によって腐食が生じるため適さない。切片は免疫染色途中の剥離を防ぐため、一晩以上室温で乾燥させることが推奨される。

免疫染色はまず、包埋操作により隠蔽された抗原を露出させるエッチング処理から開始する。一般的には3-10% 過酸化水素水が用いられるが、6 M 尿素などの方法もある。続いて、非特異的結合を防ぐためにブロッキング処理を行う。ブロッキング液は二次抗体作製に用いた動物血清を用いて調製する。一次抗体は4°Cで一晩反応させ、その後0.1%BSA-PB で洗浄する。次に二次抗体を反応させる。使用する二次抗体の金コロイド標識の大きさは観察対象によって使い分けるが、10nm~20nm を用いることが多い。PB 洗浄後、2% GA で固定を行う。さらに蒸留水で洗浄後乾燥させる。

また、免疫動物の異なる一次抗体と金コロイド標識の大きさが異なる二次抗体を使用することで、二重染色が可能になる (図 2-5)。

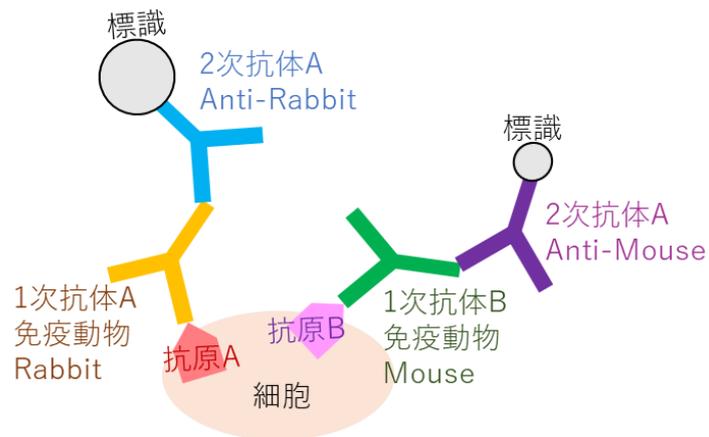


図 2-5. 包埋後免疫電顕法での二重染色の模式図

ブロック作製時に還元オスミウムによる後固定を行っていない場合には、オスミウム蒸着を施すことで観察時のコントラストを向上させることが可能である。蒸着方法は密閉容器内にオスミウム酸溶液滴とグリッドを並置し、約 1 時間暴露する。なお、免疫電顕観察では金コロイドと組織のコントラストを重視するため、電子染色を省略する場合もある。加えて、切片破損を防ぐ目的でカーボン蒸着を行うことがあり、この操作は電子染色の前後いずれに実施してもよい。

2.2 走査型電子顕微鏡試料作製

2.2.1 表面形状観察法

試料の表面観察では、試料表面は必ずしも露出しているとは限らないため、前処理を行うなど、観察の目的に応じて試料作製法を選択することが必要である。本項では、一般的な生物試料の作製方法について述べる。作製工程は、固定、脱水、置換、乾燥、試料台への設置、導電処理である。

2.2.1.1 固定

TEM の試料作製法の固定 (2.1.1.1) と基本的に準ずる。しかし TEM と比較して試料台に搭載できるサイズが大きいことや (約 1 cm~3 cm)、切出した面がそのまま観察表面となる場合もあることから、目的に応じて適切なサイズで細切を行う。

2.2.1.2 脱水

TEM の試料作製法の脱水 (2.1.1.2) と基本的に準ずる。

2.2.1.3 置換

次工程の乾燥でどのような方法を用いるかにより置換方法が異なる。本項では医学部共同実験室で用いられている、*t*-ブチルアルコール凍結乾燥法のための置換について述べる。脱水の終了した試料を *t*-ブチルアルコールに浸漬置換する。この際、30 分で 3 回液交換を行う。また、*t*-ブチルアルコールの凝固点は 25°C と高いため、冬季など室温が低い場合には 30~38°C の恒温機の中などで行うと良い。

2.2.1.4 乾燥

SEM の生物試料においては、変形を起こさずに試料の構造を保ったまま乾燥させるかが重要である。

本項では、医学部共同実験室で用いられる *t*-ブチルアルコール凍結乾燥法について述べる。*t*-ブチルアルコール凍結乾燥法とは、試料中の水分を *t*-ブチルアルコールに置換し、凍結して真空中で *t*-ブチルアルコールを昇華させて試料を乾燥させる方法である。この方法は、古くから用いられてきた臨界点乾燥法と比較して、乾燥時の収縮が小さく、培養細胞のような収縮の影響が目立つ試料には特に効果的である。さらに、高圧ガス製造許可の申請が不要なことから、臨界点乾燥法に変わる方法として一般化している。

2.2.1.5 試料台への設置

SEM の試料台はアルミニウム、真鍮、カーボンなどの板、もしくは円柱で、使用する装置や試料サイズに応じて適切なものを選択する。材質はアルミニウムが一般的で、試料台の

大きさは直径 10～32mm、高さ 5～14cm のものが使用されている。試料台への接着には、導電性接着剤が用いられ、一般的には導電ペースト、導電性両面テープが用いられている。適切に接着させないと、観察中に試料の移動、振動、帯電が生じる。

以下に各接着剤の利点と注意事項を述べる。

・導電性両面テープ

導電性両面テープを試料台上に貼付し、その上に試料を設置するのみで固定が完了するため、極めて簡便な手法である。試料を設置後、直ちに観察を行うことが可能である点も利点として挙げられる。一方で、試料とテープとの接着面積が十分でない場合には、電荷の蓄積（チャージ）の原因となる可能性がある。そのため、必要に応じてテープを試料の隙間部分に挿入するなど、導電経路を確保する工夫が求められる。

・導電ペースト

導電ペーストはペースト状の材料であるため、試料との接触面において良好な密着性を示す。しかしながら、試料がペースト中に沈み込む傾向があるため、使用量には十分な注意が必要である。また、この特性により、粉末試料などの微小な試料への適用には不向きである。さらに、導電ペーストの乾燥には一定の時間を要することから、観察直前の使用には適さない点にも留意する必要がある。

2.2.1.5 導電処理

乾燥した生物試料には導電性はほとんどないため、乾燥後の試料表面に導電層をコーティングする必要がある。導電コーティングは試料に導電性を付与するだけでなく、二次電子発生効率の増加と電子線による試料損傷を軽減する効果がある。導電コーティングに使用されるのは、炭素（カーボン）、金、白金、オスミウムなどがあり、コーティング法にはイオンスパッタ法、オスミウムプラズマ重合膜法などがあるため、観察目的に応じて金属の種類とコーティング方法を選択する。医学部共同実験室では、オスミウムプラズマ重合膜法を用いている。オスミウムプラズマ重合膜法は四酸化オスミウムガス雰囲気中（10Pa 程度）でグロー放電を行い、試料表面に 1～2 nm 程度のオスミウム膜を作る方法である。この方法は表面構造が複雑な試料でも回り込みがよく、ムラなく蒸着ができるため、電解放出型 SEM を用いた高分解能観察に適している。

第3章 医学部共同実験室における観察支援及び観察

3.1 マウスを用いた皮膚創傷治癒過程における基底膜の微細構造観察支援

マウス全層皮膚欠損創傷治癒モデルを用いて、治癒過程における表皮基底膜の微細構造を明らかにするため、TEM 試料作製及び観察支援を行った。

マウス皮膚の創傷後3日目および6日目に創部を採取し、2%GAと2%PFAの混合液で一晩浸漬固定を行った。細切時には、皮膚の治癒過程において創傷部位のどの部分を観察するかを明確に把握することが重要であり、包埋方向を正確に確認する工夫が必要であった。具体的には、正常皮膚部分に注射針で小孔を設ける方法や、ケーキ状に切り分ける方法を用いた。マッチ棒型のカットでは、後固定時に四酸化オスmiumによる組織の黒変が生じ、視認性が低下するため、この方法を避けた。CBで洗浄したのち、四酸化オスmiumで1.5時間後固定後をした。上昇系エタノール(30~99.5%)で脱水し、Spurr樹脂(cat#01916、Polysciences)に包埋した。包埋時には実体顕微鏡を用いて方向確認を行い、硬化中の転倒防止に留意した。薄切はウルトラミクロトーム(Leica UC7)を用いて行い、400nmの準超薄切片を作製した後、トルイジンブルー染色を施し、目的部位の確認を行った。その後、対象領域をトリミングし、厚さ80nmの超薄切片を作製した。酢酸ウランおよび鉛で電子染色を行った後、TEM(HITACHI H-7650)で観察を行った。

その結果、マウスの創傷治癒モデルにおいて、創傷3日目では、ラミナデンサが不連続であり、ヘミデスマゾームの直下にのみ確認ができた。創傷6日目では、正常部近位ではラミナデンサは連続的になり、基底膜の正常な構造が確認できた。しかし、正常部遠位では、3日目と同様な不連続なラミナデンサが認められた。これにより、表皮基底膜の再生における経時的变化が確認できた(図3-2)。これらの成果は、「Collagen XVIII Deposition in the Basement Membrane Zone beneath the Newly Forming Epidermis during Wound Healing in Mice」(Maeba et al., Acta Med. Okayama, 2019)として発表された。

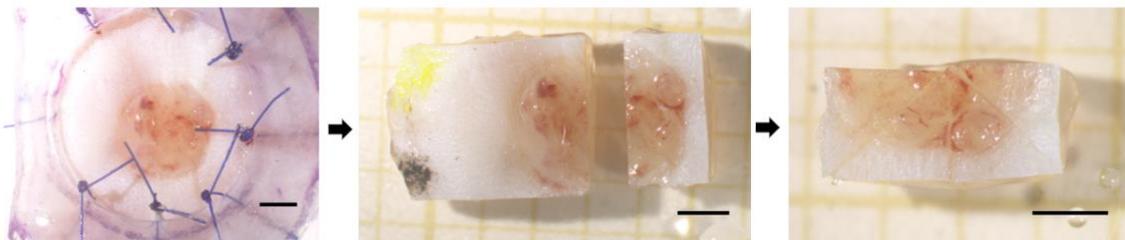


図3-1. 細切時の様子 スケールバー：2mm

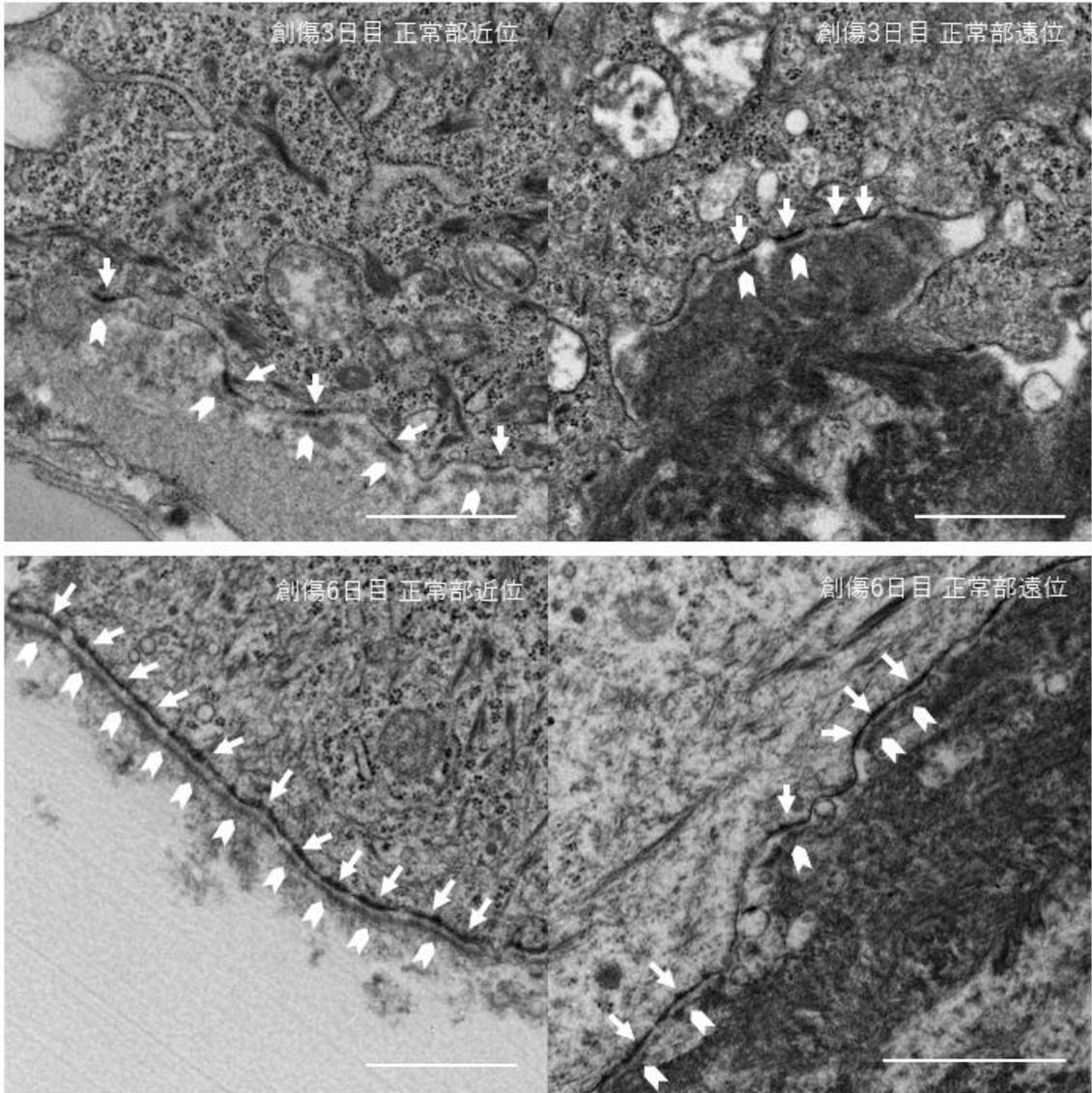


図 3-2. 創傷後 3 日目と 6 日目のマウス再生表皮の TEM 像
 矢印 (↑) : ヘミデスモゾーム、矢印 (▲) : ラミナデンサ
 スケールバー : 1 μ m

3.2 培養細胞の細胞間接着部位の超微細構造観察支援

Pacsin 2 RNAi によって誘導される細胞間接着部位の超微細構造を明らかにするため、TEM 試料作製及び、観察支援を行った。細胞は、培養ディッシュからスクレーパーを用いて剥離し、遠心操作（1500 rpm、5 分間、室温）によって回収した。得られた細胞ペレットは、2% GA と 4 %PFA の混合液にて 4 °Cで一晩前固定を行い、カコジル酸緩衝液（CB）で洗浄したのち、2% 四酸化オスミウム溶液により 1.5 時間後固定した。固定後は、上昇系エタノール（30~99.5%AL）により脱水の後、Spurr 樹脂（cat#01916、Polysciences）に包埋した。

樹脂に包埋した細胞サンプルから、ウルトラマイクロトーム（Leica UC7）を用いて超薄切片（80 nm）を作製し、2%酢酸ウランで 15 分、鉛（佐藤法）で 5 分、試料を溶液中に浸漬させて電子染色を行った。その後、TEM（HITACHI H-7650）を用いて観察を行った。観察の結果、Pacsin 2 RNAi T24 細胞においては、細胞間接着部位に多数の膜状突起が認められ、これらの突起がしばしば相互に食い込み合う様子が観察された(図 3-3)。一方、Control RNAi T24 細胞においても細胞間接着の形成は確認されたが、隣接する細胞膜の形態は比較的滑らかであった。

これらの成果は「Pacsin 2-dependent N-cadherin internalization regulates the migration behaviour of malignant cancer cells」（Haymar et al., Journal of Cell Science, 2023）として発表された。

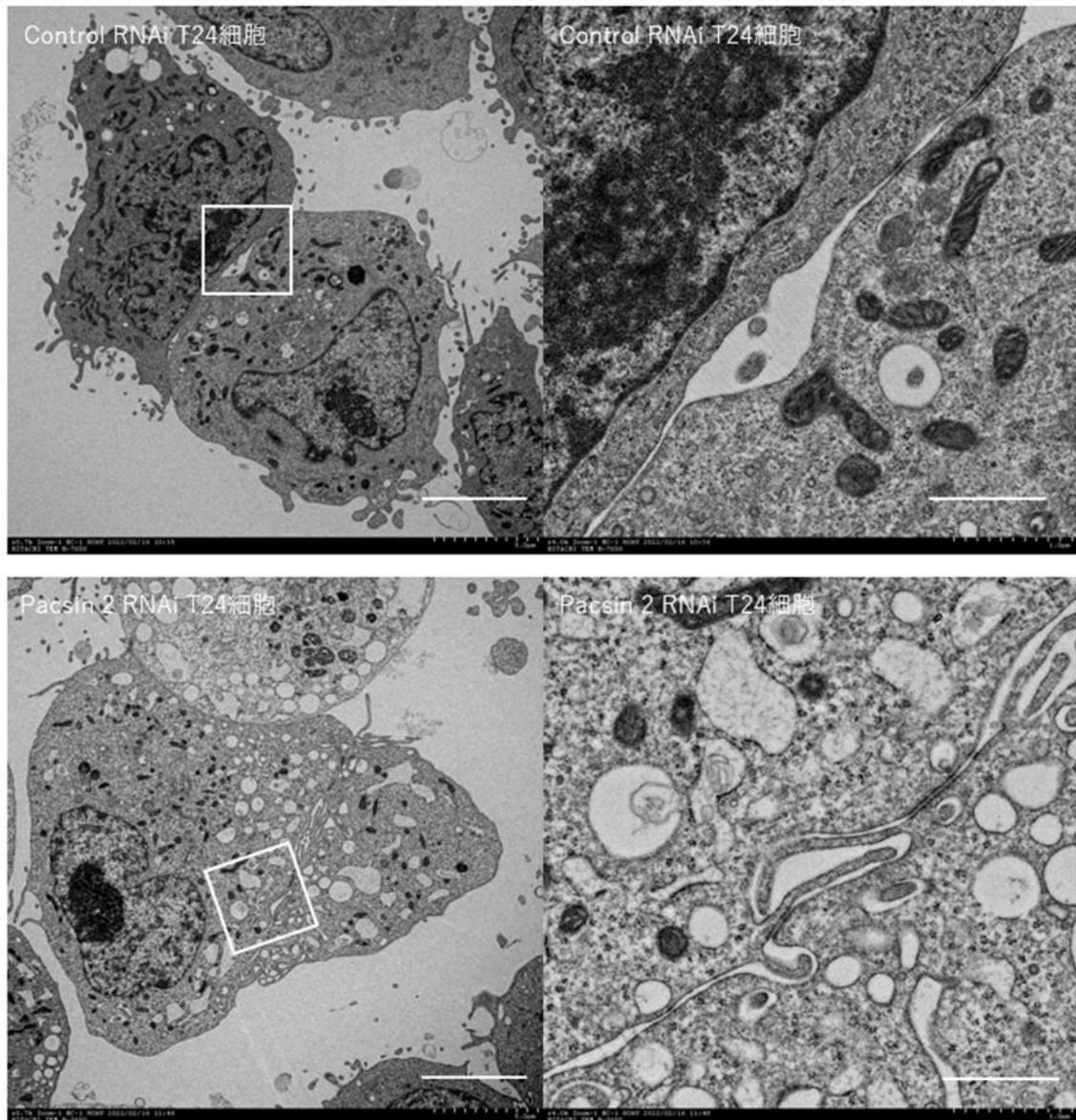


図 3-3. Control RNAi T24 細胞と Pacsin 2 RNAi T24 細胞の TEM 像
スケールバー：5 μ m (左)、1 μ m (右)

3.3 腎臓の糸球体ポドサイトにおける Dynamin1 の局在観察支援

Dynamin1 の組織内の局在を調べるため、ラットの腎臓の糸球体及びマウスポドサイト細胞株 (MPCs) を用いて免疫電子顕微鏡法を行った。

3.3.1 ラットの腎臓糸球体の免疫電子顕微鏡法

7週齢のオスのラットを麻酔後、4%PFA と 0.1%GA を含む固定液を用いて還流固定を行った。腎臓を単離し、同固定液にて浸漬固定を 5.5 時間行った。その後、上昇系エタノール (30~99.5%) で脱水し、LR-White (cat#3963, Agar) に包埋した。ウルトラミクロトーム (Leica UC7) を用いて厚さ 80 nm の超薄切片を作製した。6 MUrea で 5 分エッチング後、1%BSA 及び 10%ヤギ血清を含むリン酸緩衝液にて 15 分ブロッキング処理を行った。ブロッキング液で 10 倍に希釈したウサギポリクロナール抗 Dynamin1 抗体 (1:10, cat#PA1-660, Thermo Fisher Scientific) で、4°C にて一晩反応させ、0.1%BSA を含むリン酸緩衝液 (0.1%BSA -PB) で 5 回洗浄後、10 nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:50, cat#EMGAR10, BBI Solutions) で室温にて 2 時間反応させた。PB で 3 回洗浄した後、2%GA (リン酸緩衝液) で固定し、2%酢酸ウランで 5 分、鉛 (佐藤法) で 1 分、試料を溶液中に浸漬させて電子染色を行った。

TEM (HITACHI H-7650) を用いて観察した。Dynamin1 は、主にポドサイトの一次突起及び細胞体に存在しており、足突起にはほとんど見られなかった。また、一次突起では、Dynamin1 は、繊維状構造物に近接して存在していた。(図 3-4)。

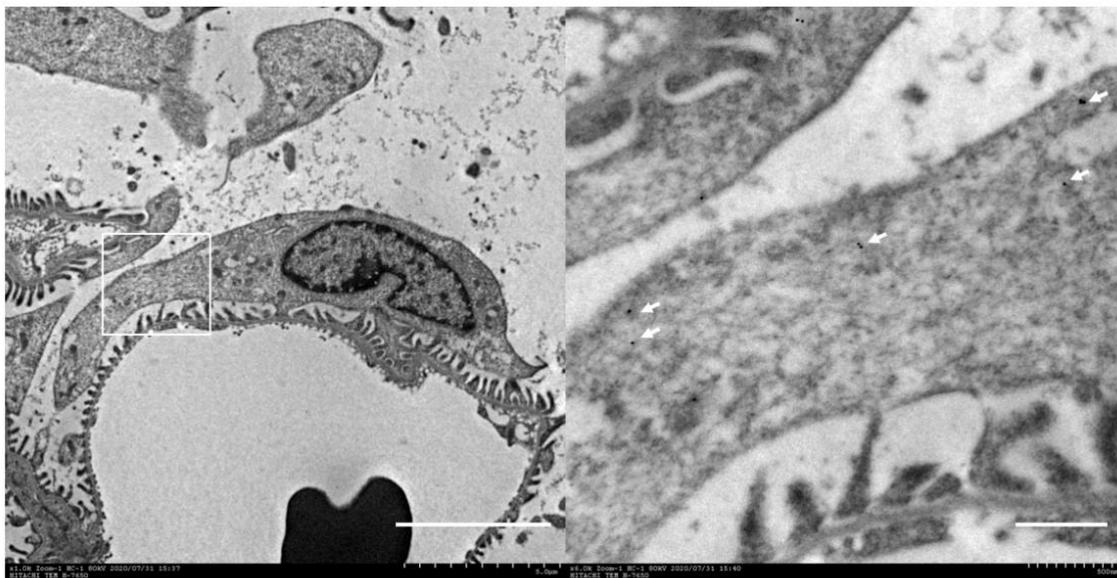


図 3-4. ラット腎臓切片の Dynamin1 の局在 (免疫電子顕微鏡像)
スケールバー : 5 μ m (左)、500nm (右)

3.3.2 マウスポドサイト細胞株における Dynamin1 の局在

3.3.1の結果から、Dynamin1はポドサイトの一次突起、細胞体に局在することがわかった。そこで、ポドサイト細胞内でのDynamin1の詳細な局在を調べた。世界で広くポドサイト研究に使用されているマウスポドサイト細胞株(MPCs)は、分化させるとポドサイトの性質をよく保存していることが知られている。分化させたMPCsを4%PFAにて15分間固定し、その後洗浄した。次に、0.25%サポニンを含むリン酸緩衝液にて透過処理を30分間行った。続いて1%BSA及び10%ヤギ血清を含むリン酸緩衝液にて15分ブロッキング処理を行った。ブロッキング液で10倍に希釈したウサギポリクロナール抗Dynamin1抗体(1:10、cat#PA1-660、Thermo Fisher Scientific)で4°Cにて一晩反応させた。0.1%BSA-PBで洗浄後、1.4nm金コロイド標識二次抗体(1:50、cat#2002、Nonoprobes Inc)で室温にて2時間反応させた。さらに、試料を1%GA(リン酸緩衝液)で5分間再固定し、銀増感キット(silver enhancement kit、cat#2012、Nano probes Inc)を用いて銀増感を行った。さらに0.5%四酸化オスミウムで90分間、後固定を行った。その後、上昇系エタノール(30~99.5%)で脱水し、Spurr樹脂(cat#01916、Polysciences)に包埋した。ウルトラミクロトーム(Leica UC7)を用いて厚さ80nmの超薄切片を作製し、2%酢酸ウランで5分、鉛(佐藤法)で1分、試料を溶液中に浸漬させて電子染色を行った。TEM(HITACHI H-7650)で観察した。細胞の周辺部に向かって放射状に伸びる微小管の束上に、Dynamin1の免疫反応が確認された(図3-5)。これらの結果から、ポドサイトのDynamin1は微小管に局在することが初めて明らかになった。

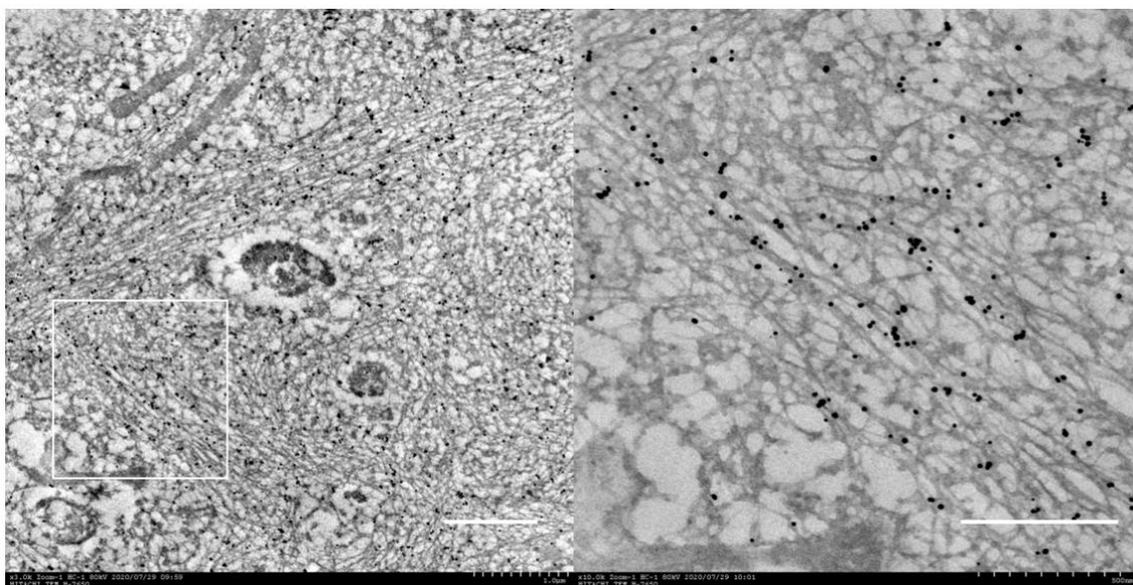


図 3-5. 分化させた MPCs の Dynamin1 の局在 (免疫電子顕微鏡像)
スケールバー : 1 μ m (左)、500nm (右)

3.3.1 及び 3.3.2 で得られた成果は、「Dynamin 1 is important for microtubule organization and stabilization in glomerular podocytes.」 (The Mon La et al., The FASEB Journal, 2020) として発表された。

3.4 核内封入体の観察

岡山大学脳神経内科との共同で、神経核内封入体病 (neuronal intranuclear inclusion disease; NIID) の診断的精査を目的として皮膚パンチ生検を実施し、得られた検体から TEM 観察用の超薄切片を作製した。試料は 2%GA 及び 2%PFA の混合液で固定後、2%四酸化オスミウムで後固定を行った。上昇系エタノール (30~99.5%) で脱水の後、Spurr 樹脂 (cat#01916、Polysciences) に包埋した。ウルトラミクロトーム (Leica UC7) を用いて超薄切片 (80 nm) を作製し、2%酢酸ウランで 5 分、鉛 (佐藤法) で 1 分、試料を溶液中に浸漬させて電子染色を行った。観察は TEM (HITACHI H-7650) を用いて実施した。その結果、図に示すように、核内に限局した封入体構造が確認され、これらは膜構造を有さず、糸状の構造物から構成されていた (図 3-6)。これらの所見は、NIID に特徴的な核内封入体の存在を示すものである。

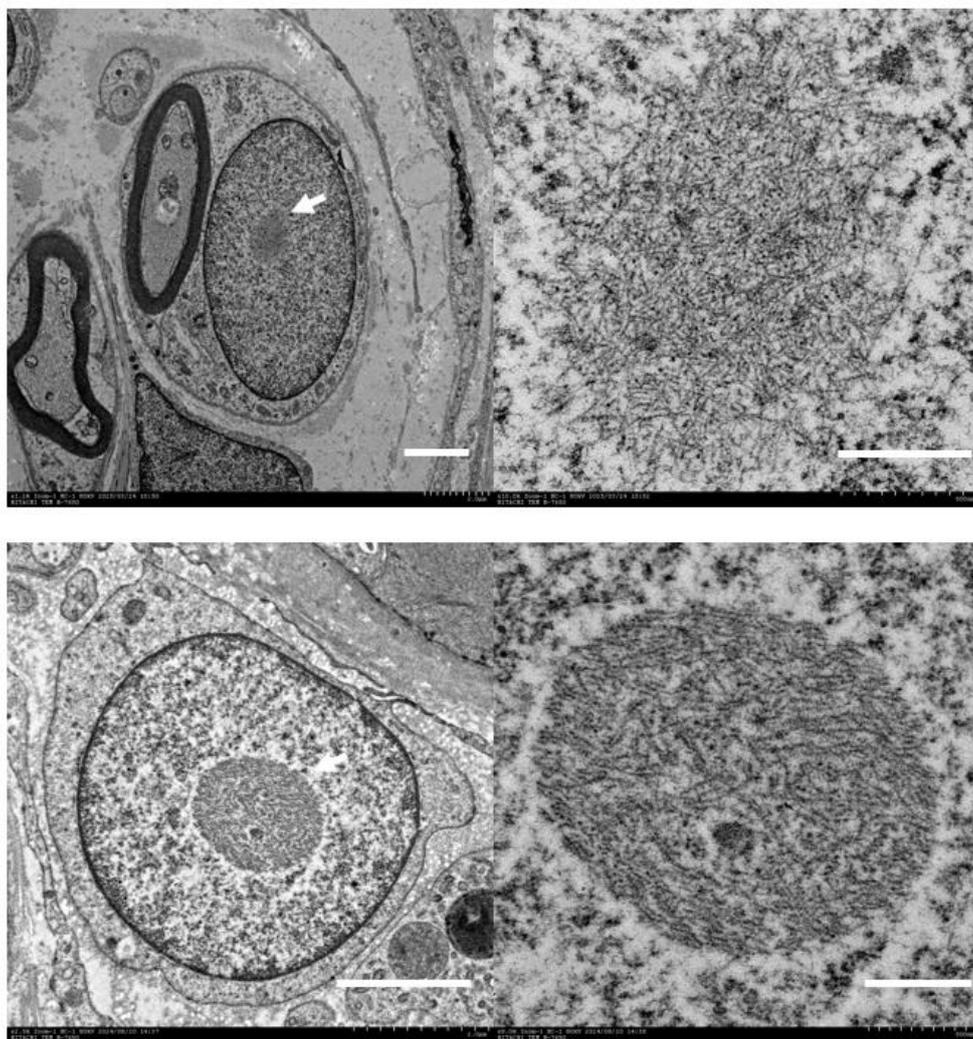


図 3-6. 観察された核内封入体の TEM 像
スケールバー：2 μ m (左)、500nm (右)

3.5 常在細菌の観察

岡山大学病院ゲノム医療融合推進センターとの共同で皮膚及び歯垢に含まれる常在細菌の形態観察を目的とし、手術で得られた検体の一部を用いて SEM 試料を作製した。試料は 2%GA 及び 2%PFA の混合液で固定後、2%四酸化オスミウムで後固定を行った。上昇系エタノール (30~99.5%) で脱水した後、t-ブチルアルコール (cat# 75-65-0、関東化学) に置換し、t-ブチルアルコール凍結乾燥機 (EIKO ID-2) により凍結乾燥を行った。試料台にはアルミ製の円柱試料台 (cat#S-CM、日新 EM) を使用し、導電性カーボン両面テープ (cat#731、日新 EM) で試料を固定した。オスミウムコーター (真空デバイス HCP-1S) を用いて導電処理を施し、観察は走査型電子顕微鏡 (HITACHI S-4800) により実施した。その結果、図に示すように、皮膚の上皮表面付近および歯垢中に多数の細菌様構造物が観察された (図 3-7、図 3-8)。これらの所見は、皮膚および口腔内に存在する常在細菌叢の存在を形態学的に示すものである。

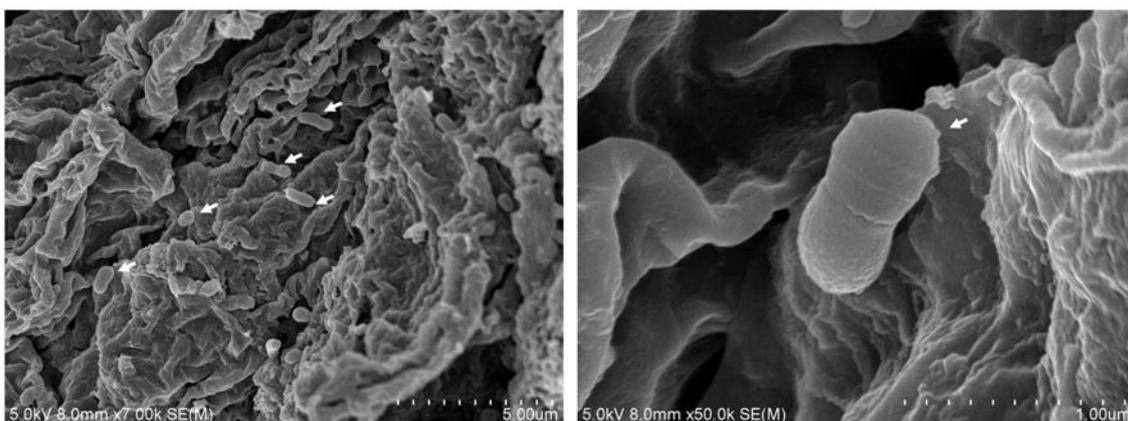


図 3-7. 皮膚の上皮付近で観察された細菌様構造物の SEM 像

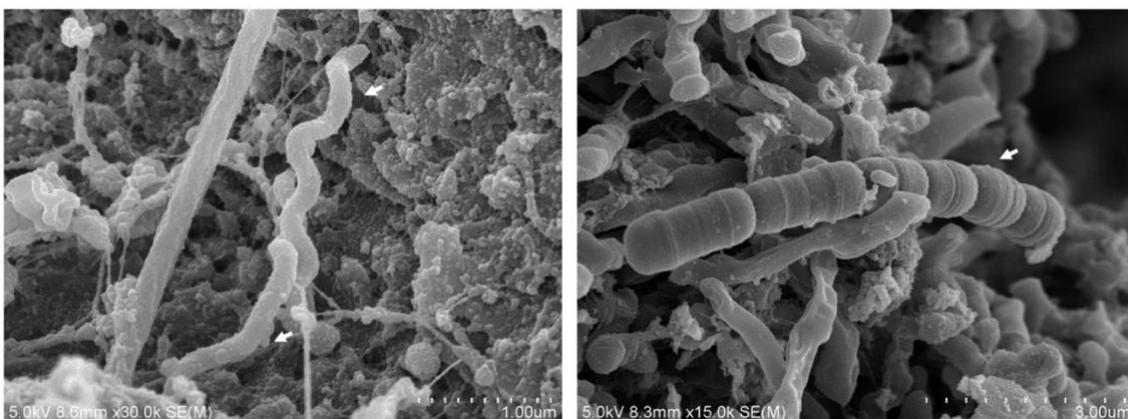


図 3-8. 歯垢で観察された細菌様構造物の SEM 像

第4章 TC カレッジ医工系 TC コースの構築及び業務への活用

4.1 TC カレッジ医工系 TC コースの構築

4.1.1 医工系 TC コースとなった経緯

岡山大学は技術職員の高度化を目的とした取り組みの一環として、令和4年度にコアファシリティ設置準備室を開設し、研究設備と技術・スキルの一体運用体制を整備した（1.3参照）。その中で、東京工業大学（現：東京科学大学）が主導するプロフェッショナル技術職員（テクニカルコンダクター：TC）育成プログラム「TC カレッジ」へのサテライト校参画を決定した。

先行する TC カレッジのコースには医学系技術職員向けのカリキュラムが存在しなかったことから、東京工業大学（現：東京科学大学）からの打診を受け、岡山大学独自のコースを令和5年度に新設することとなった。当初は「医学系技術職員向けコース」として構想されたが、岡山大学が総合大学であることを活かし、工学部と連携してカリキュラムを構築し、コース名を「医工系 TC コース」とした。

4.1.2 医工系 TC コースの概要

医工系 TC コースでは、医学分野に加えて、工学的な知識・技術を習得することにより、医学系分野における課題に対して工学的な手法やアイデア、工作などを柔軟に取り入れながら解決・改善できるテクニカルコンダクターの養成を目的としている。

カリキュラムは以下の主に以下の領域で構成されている。

1. 医学部共同実験室での分析機器の操作実習
光学顕微鏡、電子顕微鏡、フローサイトメーター
2. 試料作製関連の実習
(マウス・ラット実技講習、試料採取実習、電子顕微鏡試料作製実習)
3. 工作センターでの加工実習
旋盤、フライス盤、3Dプリンタ、ワイヤ放電加工
4. 共通カリキュラム
安全講習、機器メーカー見学、技術・研究支援発表会等

特に工作センターでの実習は、本コースの特徴の一つである。医学部や岡山大学病院からの実務依頼を受託していることから、医学系技術職員も加工機器の特性を理解し、研究支援のための工学的創意工夫や問題解決力を養うことができる。

対象者は、医学系の講座や研究センターに所属する技術職員を中心に、主に生物試料を扱う職員が想定されている。

4.1.3 医工系 TC コースの独自カリキュラムの構築と実施

4.1.3.1 医工系 TC コースの独自カリキュラムの構築

医工系 TC コースの TM 課程の独自カリキュラムの構築にあたっては、TC カレッジ事務局から先行コースのカリキュラム構成や学習レベルの目安について説明を受けたうえで、医工系 TC コースの目指すべき TC 像に掲げる「医学及び工学関連分野における知識を有し、科学的思考で技術開発および医学系分野の研究支援に必要な技術をもつ」ことを達成するため、医学分野と工学分野の双方の視点からカリキュラムを整理した。

独自カリキュラムは中級および上級で実施し、初級カリキュラムは TC カレッジ共通の内容とした。また、TC 認定までに必要な単位数は先行コースと同様であり、TC カレッジ全体の基準との整合性を確保している。

カリキュラム構築においては、筆者を含むコアファシリティ設置準備室の医学部所属技術職員が中心となり、医学部共同実験室をはじめとする学内共同利用施設および協力企業（株式会社日立ハイテク、株式会社大熊）と連携しながら、各カリキュラムの講義概要と実習内容を構成した。加えて、各大学で実施する研究室見学では、岡山大学病院の協力により、遺伝子ゲノム融合推進検査室の見学を実施し、臨床検査領域における先端技術の実装例を学ぶ機会を設けた。また、津島地区における医工連携研究の紹介や、医学部以外の共同利用施設の見学も取り入れ、医工融合領域の研究支援に求められる多角的な視点の獲得を促した。これらにより、学内の多様な研究環境を理解し、異分野協働の重要性を実感できる、実践的かつ包括的なカリキュラムを構築した。

また、中級および上級の学習レベルについて明確な基準を設定した。中級カリキュラムでは、基礎基本の理解を重視し、初心者や未経験者でも安全に機器使用および基礎的実験操作が行えるようになることを到達目標とした。一方、上級カリキュラムでは、基礎知識と基本操作を既に備えた者や実務経験者を対象とし、中級では扱わない応用的内容や高度機器の操作、トラブルシューティングなど、実践性の高い内容を取り扱うこととした。

これらのレベル定義により、複数のカリキュラムで扱う内容や難易度の統一性が保たれ、受講者が段階的にスキルを獲得できる体系的な教育構造を実現している。

4.1.3.2 医工系 TC コースの独自カリキュラムの実施

医工系 TC コースでは、学内外の多様な受講希望者が参加しやすいよう、原則ハイブリッド形式（対面・オンライン）で実施をしている。令和 5 年度は試行期間であったため、参加者は医工系 TC コース関係者に限られていたが、令和 6 年度の本開講以降は他機関からも受講可能となり、令和 7 年度までに延べ 7 名（うち学外参加者 2 名）が医工系 TC コースを選択した。さらに令和 6 年度からは他コースの受講生も医工系 TC コースのカリキュラムを聴講できるようになった。ハイブリッド開催ではオンライン参加者が不利にならないよう、会場にはマイクスピーカーシステム YVC-1000 を設置し、iPad による広角・定点撮影、さらに GoPro による実習手元映像の配信を行うなど、遠隔環境の最適化に努めた。

座学に関しては大きな問題なく運営できた一方で、実習時には、話者とマイクの距離の変動や、周囲の機器の運転音により音声聞き取りにくいといった指摘が寄せられた。また、対面参加者との自然発生的な会話や質疑がオンライン側に十分伝わらない、逆にオンライン参加者の様子が現場に伝わりにくいといったハイブリッド形式特有の構造的課題も確認された。

これらの課題に対しては、講師用ピンマイクの導入や補助マイク・カメラの追加設置などの映像、音響環境の改善や、オンライン参加とのカメラを通じた意見交換を取り入れるなどを検討している。対面・オンラインのいずれの参加形態においても、可能な限り均質な学習効果が得られる環境整備を今後も進めていく。

4.2 業務での活用事例

4.2.1 分析機器カリキュラムの受講による業務時の変化

医工系コースのカリキュラムの受講により、分析機器に関しては、業務で担当している電子顕微鏡についての学び直しに加え、光学顕微鏡の基礎やフローサイトメーターの基礎についても理解を深めることができた。その結果、これまでは先輩職員に依頼していた電子顕微鏡の軸調整を、自ら確認しながら実施できるようになった。また、一度調整を行った後でも、試料の高さ変化などにより生じるわずかなズレを意識して観察を進めるようになり、必要に応じて適宜再調整を行う姿勢が身についた。

さらに、日常的に使用している光学顕微鏡については、日常メンテナンスを自ら行えるようになったほか、これまで十分に意識していなかった絞りの調整についても、より良い顕微鏡像を得るために対物レンズに適した値に設定する、あるいは無染色標本のコントラストを高めるために大きく絞るなど、目的に応じた使い分けができるようになった。

4.2.2 3D プリンタを用いたガラスナイフスタンドの作製

工作系カリキュラムの受講により、日常業務で使用している実験器具を自ら改良、新たに作製するための基礎的な知識と技術も習得できた。これらの知識・技術を実際の業務に応用することで、既存器具の利便性向上や作業効率の改善につながる成果が得られている。本節では、その具体的な活用例として、3D プリンタを用いた器具作製の事例を紹介する。ガラスナイフスタンドは、電子顕微鏡の試料作製に用いるガラスナイフを保管するための器具である。市販品も存在するが、筆者はこれまで、ガラスナイフの出し入れの容易さを考慮した形状のスタンドを紙箱により自作していた。しかし、紙製スタンドは、ガラスナイフに付着した樹脂の削りカスが内部や表面に付着した際に水洗いができず、清掃が困難であるという問題があった。この問題を解決するため、3D プリンタ実習（基礎）で習得したモデリング技術を用いて、3D プリンタを用いたガラスナイフスタンドの作製を行った（図 4-1）。

STL (Stereolithography) データの作成には 3D CAD ソフトウェア (Autodesk Fusion、

Autodesk) を用いた。得られたデータを、3D プリンタ (PartPro300xT、XYZ Printing) により出力した。造形材料には、強度および耐水性に優れる ABS 樹脂 (Acrylonitrile Butadiene Styrene copolymer) を選定した。

作製したガラスナイフスタンドを実際に使用した結果、従来の紙箱製スタンドと比較して使用感に大きな差は認められなかった。ただし、材質がプラスチックであるため、ガラスナイフを置いた際に若干の硬さを感じた。しかしながら、ガラスナイフに傷が生じることはなく、実用上の支障はないと判断される。また、スタンドをコの字型構造としたことにより、内部に落下する樹脂の削りカスの回収が容易になり、清掃性が大幅に向上した。

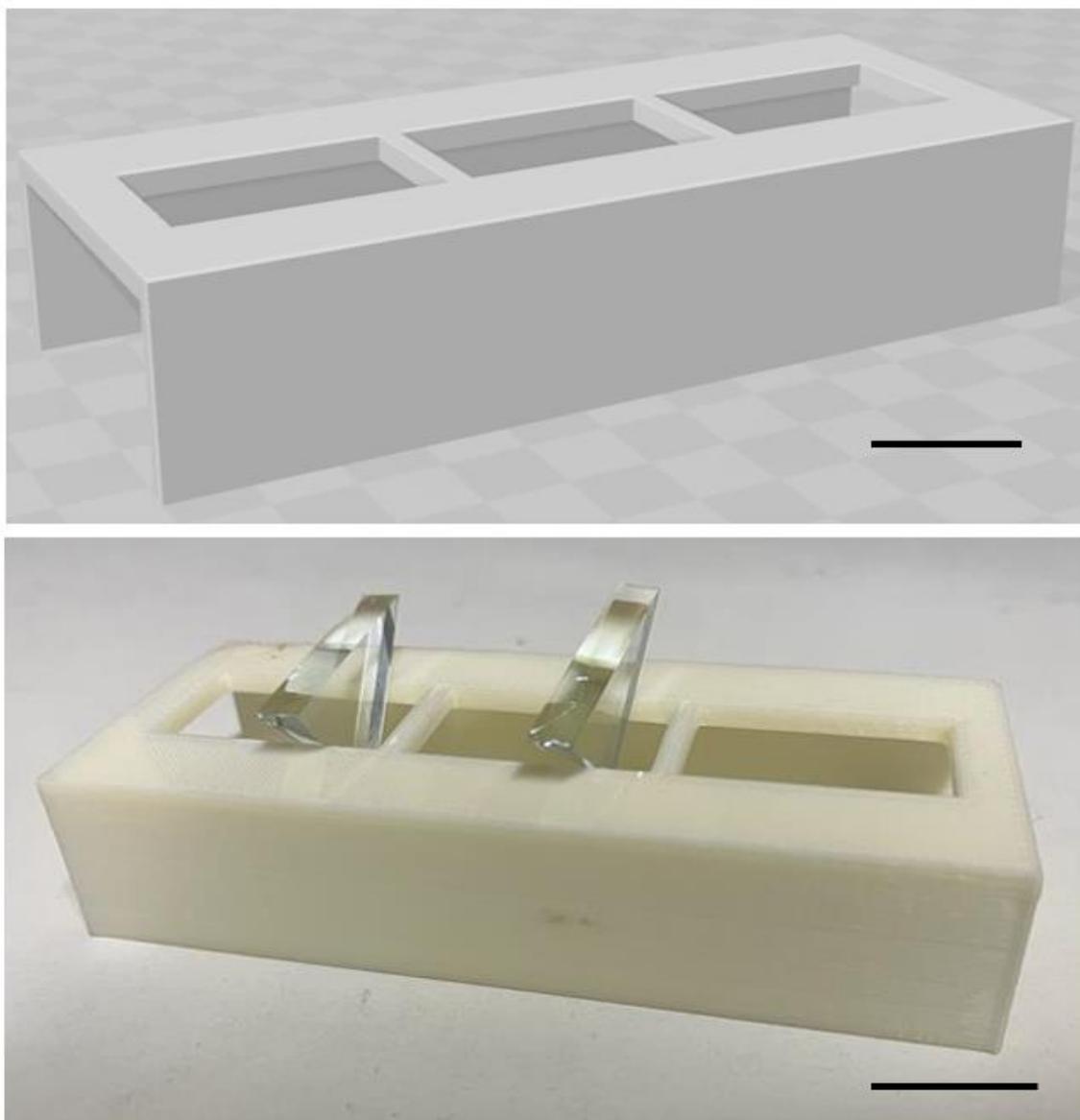


図 4-1. 作成した STL データ (上) と
出力したガラスナイフスタンドとガラスナイフを乗せた写真 (下)
スケールバー：20mm

第5章 まとめと展望

5.1 まとめ

筆者は8年にわたり、医学部共同実験室において電子顕微鏡試料作製および観察支援を中心とした研究支援業務に従事してきた。試料作製では、TEM試料を主軸として、動物組織、培養細胞、さらには臨床検体に至るまで、多様な試料に対する超薄切片作製や免疫電子顕微鏡法を実施してきた。これらの作業には、試料の種類や観察目的に応じた固定液の選択、包埋およびブロック作製方法の調整など、多岐にわたる専門的知識と技術が求められる。そのため筆者は、単一の手法の習得にとどまらず、多様な技術を習得し実践することに努めてきた。また、

また、作製した試料のTEM観察にも同席し、研究者の要望に応じた操作や撮影を行うことで、試料作製から観察工程に至るまで一貫した支援を提供してきた。こうした支援活動は、形態学的解析をはじめとする電子顕微鏡を用いた研究成果の創出に寄与し、論文での共著や参画、謝辞として反映されている。これらの経験を通じて、筆者は電子顕微鏡試料作製における前処理条件の最適化や、観察目的に応じたプロトコル設計の重要性について体系的な理解を深めるに至った。

さらに筆者は、岡山大学TCカレッジ参画に伴い独自コースの設計に携わり、現在は副コース担当として運営に関与している。医工系TCコースは、生物系および工作系のカリキュラムから構成されており、生物・医学系技術者が自身の専門分野のみならず工作・機械加工といった異分野技術を学ぶことで、研究現場における課題解決能力の向上が期待されている。筆者自身も3Dプリンタ実習(基礎)で得た知識と経験を活かし、電子顕微鏡試料作製に関連する器具の製作を行うなど、異分野技術の応用に取り組んでいる。

以上の経験より、筆者は電子顕微鏡技術の高度化と研究支援体制の強化に寄与するとともに、TCカレッジにおける異分野連携教育を通じて新たな専門性の拡張にも努めてきた。

5.2 展望

今後は、これまでに培ってきた電子顕微鏡試料作製技術および観察支援の経験を基盤として、さらなる改良と知識・技術の向上に努め、さまざまな試料作製に対応できる技術職員として電子顕微鏡研究に貢献していきたい。電子顕微鏡には多くの種類があり、それぞれに得意とする解析手法や観察対象が存在する。普段扱っている装置の性能を最大限に引き出した観察が行えるよう支援するとともに、最適な解析手法や機種を選択について助言できる技術者となることを目指す。

さらに、技術職員が技術的な実習を受ける機会は必ずしも多くなく、スキルアップが現場の環境に左右されがちな現状がある。その点において、TC カレッジは大学を挙げた研修プログラムとして、より多くの技術職員が受講でき、スキル向上の機会が拡大することが期待される。しかし現状の内容では、医学系における幅広い専門分野に十分対応できていない部分もある。今後は、TC 取得者をはじめ、TC カレッジに関心を持つ技術職員の協力を得ながら、カリキュラムの幅を広げるとともに、内容のアップデートや継続開講に向けた準備、ハイブリッド開催に向けた環境整備を進め、より充実したプログラムを構築していきたい。また、医工系 TC コースの工作センターのカリキュラムは、工学分野以外が専門の技術者を対象として設計された実習であり、他に類を見ない特徴であると考えられる。さらに、研究室見学は、医学系の技術職員が交流機会の少ない分野の研究者や大学病院の医療技術者と接点を持つ貴重な機会である。今後は、こうした特徴を生かして異分野の研究者との共同研究や技術支援、大学病院との連携による研究活動につなげるとともに、学際的な知識交流を促進したい。

TC カレッジ医工系 TC コースという人材育成プログラムが、専門分野の知識・技術の向上に寄与するのみならず、異分野への興味を喚起し、より広い視野を持つ技術職員の育成に貢献する場となるよう今後も活動していきたい。

参考文献

平野寛, 宮澤七郎. よくわかる電子顕微鏡技術. 東京都, 朝倉書店, 1992, 301 p.

日本顕微鏡学会電子顕微鏡技術認定委員会. 新・電顕入門ガイドブック(電顕入門ガイドブック改訂第3版). 東京都, 国際文献印刷社, 2011, 248 p.

玉木英明. IIRS 顕微鏡ラボマニュアル 8 免疫電顕法の実際. 東京都, 西村書店, 2013, 121 p.

Sato, T. J. Clin. Electron Microsc. 21: 37-51, 1989.

業績

【共著論文】

1. Vesicular Glutamate Transporter 3 Is Involved in Glutamatergic Signalling in Podocytes. Naoko Nishii, Tomoko Kawai, Hiroki Yasuoka, Tadashi Abe, Nanami Tatsumi, Yuika Harada, Takaaki Miyaji, Shunai Li, Moemi Tsukano, Masami Watanabe, Daisuke Ogawa, Jun Wada, Kohji Takei, Hiroshi Yamada . *Int J Mol Sci.* 2025 Mar 11;26(6):2485. doi: 10.3390/ijms26062485.

【論文謝辞】

1. Pacsin 2-dependent N-cadherin internalization regulates the migration behaviour of malignant cancer cells. Haymar Wint, Jianzhen Li, Tadashi Abe, Hiroshi Yamada, Takumi Higaki, Yasutomo Nasu, Masami Watanabe, Kohji Takei, Tetsuya Takeda. *J Cell Sci.* 2023 May 15;136(10):jcs260827. doi: 10.1242/jcs.260827. Epub 2023 May 31.

2. Thioredoxin interacting protein protects mice from fasting induced liver steatosis by activating ER stress and its downstream signaling pathways. Hiroyuki Miyahara. Kosei Hasegawa, Masato Yashiro, Toshiaki Ohara, Masayoshi Fujisawa, Teizo Yoshimura, Akihiro Matsukawa, Hirokazu Tsukahara. *Sci Rep.* 2022 Mar 21;12(1):4819. doi: 10.1038/s41598-022-08791-z.

3. Cnm of *Streptococcus mutans* is important for cell surface structure and membrane permeability. Shuhei Naka, Daiki Matsuoka, Kana Goto, Taro Masaki, Yasuyuki Nagasawa, Seigo Ito, Ryota Nomura, Kazuhiko Nakano, Michiyo Matsumoto-Nakano. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 ; 13 : 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.994014

4. Changes in the intra- and peri-cellular sclerostin distribution in lacuno-canalicular system induced by mechanical unloading. Osumi R, Wang Z, Ishihara Y, Odagaki N, Iimura T, Kamioka H: *J Bone Miner Metab*, 39, 148-159, 2021.

5. Self-assembling A6K peptide nanotubes as a mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) delivery system for boron neutron capture therapy (BNCT). Hiroyuki Michiue, Mizuki Kitamatsu, Asami Fukunaga, Nobushige Tsuboi, Atsushi Fujimura, Hiroaki Matsushita, Kazuyo Igawa, Tomonari Kasai, Natsuko Kondo, Hideki Matsui, Shuichi Furuya. *J Control Release.* 2021 ; 10 : 330. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.001.

6. *Streptococcus mutans* induces IgA nephropathy-like glomerulonephritis in rats with severe dental caries. Shuhei Naka, Kaoruko Wato, Taro Masaki, Seigo Ito, Daiki Matsuoka, Yasuyuki Nagasawa, Ryota Nomura, Michiyo Matsumoto-Nakano, Kazuhiko Nakano. *Sci Rep.* 2021 Mar 11;11(1):5784. doi: 10.1038/s41598-021-85196-4

7. KCNJ13 Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. Kanzaki Y, Fujita H, Sato

K, Hosokawa M, Matsumae H, Shiraga F, Morizane Y, Ohuchi H. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020; 61: 38. doi: 10.1167/iovs.61.5.38

【報告書謝辞】

糖尿病重症化における「歯周病菌由来の小さな分泌物」の役割. 岡村 裕彦. 医科学応用研究財団研究報告. 2018.

【学会等発表】

1. 塚野萌美

結合組織除去法による腎臓血管周囲の末梢神経の SEM 観察, 第 15 回中四国電子顕微鏡研究会, 2023 年 12 月 9 日. 香川県高松市.

2. 大橋俊孝, 塚野萌美, 古谷満寿美, 大野充昭

アグリカン欠損は成長板軟骨細胞のアポトーシスを誘導する, 第 33 回日本軟骨代謝学会, 2020 年 3 月 6 日-7 日, オンライン

3. 大橋俊孝, 塚野萌美, 古谷満寿美, 宝田剛志, 大野充昭

アグリカン欠損は成長板軟骨細胞のアポトーシスを誘導する, 岡山大学次世代拠点シンポジウム 2020, 2020 年 1 月 10 日. 岡山県岡山市.

4. 塚野萌美, 大野充昭, 大橋俊孝

Acan ROSA26-/-マウス長管骨成長板の透過型電子顕微鏡観察, 第 15 回北海道結合組織勉強会, 2019 年 10 月 26 日. 北海道江別市.

5. 塚野萌美

低倍率・高解像度での糸球体撮影, 第 12 回中四国電子顕微鏡研究会, 2017 年 12 月 2 日. 香川県高松市.

謝辞

本論文の執筆にあたり、ご指導いただきました岡山大学副理事・副学長・上級 URA・総合技術部本部長・医工系 TC コース監修教員・主査の佐藤法仁先生に、心より深く感謝申し上げます。また、岡山大学学術研究院医歯薬学域分子医化学の大橋俊孝教授、同学域生化学の竹田哲也助教には、お忙しい中 TC 論文の副査をご快諾いただき、ご助言とご指導を賜りましたことに心より御礼申し上げます。

TC カレッジ医工系 TC コースの構築および運営に際し、総合技術部の阿部匡史技術主幹、総合技術部医学系技術課の檜崎正博課長には、立ち上げ当初から現在に至るまで安定した運営のために多大なるご尽力を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。さらに、カリキュラム設計・実施にあたり、監修教員の佐藤法仁総合技術部本部長、自然生命科学研究支援センターの多田宏子教授、総合技術部の田村義彦部長をはじめ、栗本有紀子課長、堀格郎課長、石井誠課長、中堀智之技術専門員、総合技術部事務室の皆様には、学内外への協力要請や体制構築等においてご支援いただきました。また、カリキュラム講師として、総合技術部から堀格郎課長、磯本幸成技術専門職員、岩佐哲志技術専門職員、石原すみれ技術専門職員、尾崎亮太技術専門職員、藤本幸輝技術主任、木村亮太技術主任にご担当いただき、テキスト作成にもご協力いただきましたこと、深く感謝申し上げます。加えて、岡山大学医学部共同実験室、工学部工作センター、自然生命科学研究支援センター動物資源部門の皆様には、カリキュラムの実施場所および機器をご提供いただきましたこと、厚く御礼申し上げます。研究見学では、多田宏子教授をはじめ、舟橋弘晃教授、内田哲也教授、沈建仁教授、宮地孝明研究教授、沼本修孝准教授、冨田秀太准教授、青江伯規副臨床検査技師長、井上博文主任臨床検査技師に多大なるご協力を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。

電子顕微鏡カリキュラムにおいては株式会社日立ハイテク、光学顕微鏡カリキュラムにおいては株式会社大熊の担当者の皆様にも多大なるご協力を賜りましたこと、ここに深く御礼申し上げます。

東京科学大学 TC カレッジ長の江端新吾教授、TC カレッジ事務局統括の裕見吉朗博士、前 TC カレッジ事務局統括の梶谷孝博士、TC カレッジ事務局の皆様には、コース企画・運営において多大なるご支援を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。

最後に、研究支援内容の執筆にあたり、山田浩司研究教授、冨田秀太准教授、米澤朋子助教、ならびに脳神経内科学の先生方にはご協力を賜り、心より感謝申し上げます。また、古谷満寿美様には、電子顕微鏡試料作製について基礎から丁寧にご指導賜り、電子顕微鏡技術者として育てていただきましたこと、深く感謝申し上げます。さらに、浦田晴生技術専門職員には、TC カレッジ受講や運営のために対応できない際に代替対応していただき、お力添えを賜りましたこと、ここに深く御礼申し上げます。