

第46回組織細胞化学講習会（Web開催）のご案内

形態学を基盤とする組織細胞化学は、生体分子情報を細胞内あるいは細胞間の位置情報と統合し解析することを可能とする極めて有益な手法として医学・生物学分野の研究に活用されてきています。日本組織細胞化学会では、組織細胞化学技法の普及を目指して1976年より毎年、免疫組織化学法、in situ hybridization法、蛍光抗体法、GFPイメージング技法、画像解析法、実験動物の取扱法などを内容に技術講習会を開催してまいりました。令和3年の第46回講習会につきましては8月18日～20日に神奈川県横浜市・伊勢原市で開催を予定しておりましたが、新型コロナウイルス感染拡大の状況に鑑み、現地での通常開催は行わず、昨年度、大変好評でありましたストリーミング動画のWEB配信方式による座学講習会を行うことといたしました。今回は各座学講習をじっくりとご覧いただけるよう講習会期間を3週間延長し、期間中（8月18日～9月14日）は受講者限定で全ての講演動画を自由に何度でも視聴いただけるよう、また、講演者への質疑応答にも対応できるように致します。更に技術講習会（Wet Lab）に代わるものとして、11テーマの技法動画を大学・企業からご提供いただき、ご覧いただけるようにいたしました。講習会テキスト（通常販売価格ですと9500円程度の例年講習内容の詳細をまとめた250ページ程度の書籍になります）は例年通り事前に配布します。Web開催の講習会となりますが、組織化学の基礎から最新の知見・技法を心行くまで習得いただけるよう、また少しでも皆様のお役に立ちご満足いただけるよう鋭意準備させていただきます。

詳細は第46回組織細胞化学会講習会HP（<http://kjshc.nacos.com>）よりご確認ください。多数の皆様にご参加いただきますようご案内申し上げます。

日本組織細胞化学会 理事長 小澤一史
日本医科大学大学院医学研究科 教授
第46回組織細胞化学講習会 実行委員長 竹腰 進
東海大学医学部基礎医学系生体防御学 教授
事務局 加藤主税、井上奈穂美

ros-tokai@tsc.u-tokai.ac.jp



第46回組織細胞化学講習会 (Web開催)

会期：2021年8月18日(水)～9月14日(火)(ストリーミング動画 Web 配信)

主催：日本組織細胞化学会

実行委員長：竹腰 進 東海大学医学部基礎医学系生体防御学 教授

主題：生体分子の機能・局在を正しく捉えるための組織細胞化学の基礎と応用

URL：<http://kjshc.nacos.com>

座学講習演題：

1. 細胞・組織の基本構造と機能

江原 鮎香 獨協医科大学医学部解剖学

組織細胞化学研究の基本は、細胞・組織の構造や機能を可視化する形態学にある。この形態学において、正常な細胞・組織に関する知識は、基礎知識として必須である。最小の生命単位である『細胞』。これは構造的に類似したものが集まり、特定の機能を発揮する『組織』を形成している。組織は『上皮組織・結合組織・筋組織・神経組織』の4つに大別され、各組織の組み合わせにより器官(臓器)を形成する。このような細胞・組織の基本構造や機能について、本講演で概説する。

2. 組織の取扱いと固定法の基礎

宮崎龍彦 岐阜大学医学部附属病院病理部

組織・細胞の観察に適切な組織の処理と固定が必須である。固定の理想は生体活動がそのまま不溶化、不動化されることであり、組織、細胞の構造を正確に観察するために分子の迅速、厳密な不動化を行うことと、その機能を捉えるために、それらの生物活性をできるだけ元のまま保存することという矛盾する2つの要件をバランスよく満たすことが重要である。本講演ではまず、組織の取り扱いの基礎を概説したのち、化学固定と物理固定という固定の原理と固定剤の種類、固定の条件および標準的なプロトコール、固定をよくするための工夫について詳細に述べ、その後、実験動物の固定に理想的と目される灌流固定の実際について実例とともに解説する。

3. 光学顕微鏡の原理と正しい使い方

望月健太郎 京都府立医科大学大学院医学研究科 細胞分子機能病理学

光学顕微鏡は細胞や組織の観察に有用かつ便利であるが、正しい使い方をしないと正しい光学像は得られず、正確な観察や結果の解釈が難しくなる。本講演では、明視野顕微鏡/位相差顕微鏡/蛍光顕微鏡を含む各種光学顕微鏡の原理を説明した上で、原理に基づくそれぞれの正しい使い方や効果的な使用例について述べる。また、判断の助けにしてもらおうべく、誤った使い方をした際の観察像の様子についても実例を用いて紹介する。最後に、近年組織細胞化学へも応用が進みつつある超解像顕微鏡やラマン散乱顕微鏡についても、その効果や適用例を紹介する。

4. 免疫組織化学の原理を知り、基礎と応用を学ぶ

小澤一史 日本医科大学 大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野

「鍵」と「鍵穴」の関係で表現されることもある免疫組織化学の基本原則を解説し、その原則に基づいて実際の免疫組織化学染色が行われる。この実際の免疫組織化学の染色に当たっての基礎的な手順や手法について、「資料の固定」、「抗原」、「抗体（特異性、力価）」、「直接法と間接法」、「抗原抗体反応の可視化」、「対照実験（コントロール）」等の解説を行い、加えて多重免疫組織化学染色、蛍光免疫組織染色、免疫電子顕微鏡法への応用についての総論を解説する。

5. 蛍光抗体法の基礎と実際

松崎利行 群馬大学大学院医学系研究科 生体構造学

蛍光抗体法は今日のライフサイエンス分野において、最も広く用いられている標準的な手法の一つである。難しい手法ではないが、ちょっとした工夫でクオリティーの高い結果が得られたり、思いがけないことが原因で良好な結果が得られなかったりするのも事実である。本講演では動物組織の凍結切片やパラフィン切片、さらに培養細胞からの蛍光抗体法、とくに間接法について、以下の点を中心に解説する予定である。①蛍光抗体法の基礎的な知識、②蛍光抗体間接法の実際の手順と工夫点・注意点、③蛍光多重染色の実際の手順と工夫点・注意点、④バックグラウンド蛍光への対処。初心者の皆様にはもちろんだが、見様見真似で始めてみたもののうまくいかない、原理がわからない、何か工夫できないか、といった悩みをお持ちの経験者の皆様にも参考になるよう、演者の経験を踏まえて解説する。

6. 抗原性賦活化法の基礎と実際

増田しのぶ 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

免疫組織化学における抗原性賦活化法の開発は、一つの重要な契機であった。抗原性賦活化により、微量蛋白の可視化が可能となり、固定条件による染色性の不安定性が

軽減され、染色結果の評価に再現性がもたらさせるようになった。その結果、研究分野においては免疫染色の応用可能性が広がり、さらに、実診療の現場においても応用可能な技術的進歩を遂げた。本講演においては、抗原性賦活化の理論と実践について解説する。抗原性賦活化法の留意点と今後の発展性についても触れ、より実践的な内容となるよう解説する。

7. FISH法の原理と応用

稲澤謙治 東京医科歯科大学・難治疾患研究所（分子細胞遺伝）

FISH法が開発され40年余りとなる。その開発は、染色体微細構造異常や由来不明マーカー染色体の識別・同定を可能とすることで、それまでの細胞遺伝学と分子遺伝学のギャップを埋める breakthrough をもたらした。マルチカラー法やデジタル画像解析・情報処理技術の発達により、FISH法はさらに進化を遂げた。間期核を用いた標的遺伝子の転座、欠失、重複、増幅の検出や、比較ゲノムハイブリダイゼーション（Comparative Genomic Hybridization, CGH）法による微細コピー数異常の検出、間期核染色体テリトリーの可視化と3次元構造解析などの応用技術へと発展した。分子標的薬のコンパニオン診断や白血病の微小残存検出の遺伝子診断法としての実装化だけでなく、液相FISH法（フローFISH）の新展開も始動している。

8. In situ hybridization法の原理と応用

菱川善隆 宮崎大学医学部解剖学講座組織細胞化学分野

in situ hybridization (ISH)法は細胞・組織切片上で特定の遺伝子を同定する方法です。この方法は、細胞レベルで遺伝子を視覚化できるだけでなく、タンパク質に翻訳されない non-coding RNA 検出や、免疫組織化学で判別しにくい相動性の高いタンパク質の mRNA 発現の判別、更に、分泌タンパク質の実際の産生細胞の同定、等に関して、PCR等の他の遺伝子検出法に比べて有用な解析法です。しかし、実際の操作と結果の評価については、ある程度の「熟練」と「的確な対照実験」が必須です。本講習会では実験器具の準備、試料の固定・薄切等の注意点を含め、初心者にも扱いやすいオリゴ DNA プローブを用いた ISH 法の基本的手技と応用例について具体的に解説します。

9. 病理組織を用いたレーザーマイクロダクション法

中西陽子 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

ヒトや動植物の組織には様々な細胞が混在しています。レーザーマイクロダクション法は、染色標本を顕微鏡で観察しながら解析対象の細胞を同定し、対物レンズを通して発振されるレーザーで切り取って回収する方法です。新鮮凍結組織やホルマリン固定パラフィン包埋組織などを薄切して染色した標本の他、培養細胞や細胞

診検体にも応用が可能です。本法の開発によって、組織や細胞の形態学的所見とそこに発現している様々な分子の発現を関連付けて解析することが可能となりました。本報では病理組織を用いた場合を例として、レーザーマイクロダイセクション法に関連する基本的手技やピットフォールについて解説します。

1 0. 生体機能を反映させた組織細胞形態解析のための電子顕微鏡試料作製法

寺田信生 信州大学大学院 医学系専攻保健学分野 医療生命科学ユニット

動物臓器内にある組織細胞の機能は、生体物質の構造や分布の変化に基づいて起きているので、それらを正確に可視化して光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察する形態学的アプローチが重要となっています。この形態観察のために、生体内の状態を保持できる凍結技法を含めて機能解析を行うための種々の試料作製法について、原理と生体組織への応用例を紹介しながら解説したいと思います。

1 1. 各種免疫電子顕微鏡法の実践

小池 正人 順天堂大学大学院医学研究科 神経機能構造学

研究者が自身の研究目的に応じて最適なイメージング技術を選択できることは重要である。本講演の主目的は、光学顕微鏡や CLEM などに加えて免疫電子顕微鏡法も含めて最適な手法を選択するための情報を提供することである。具体的には、化学固定を施した組織、細胞、細胞分画を用いた免疫電子顕微鏡法について、実際に論文発表された事例を通して practical な観点で紹介する。さらに、免疫電子顕微鏡法の有用性と限界、他のイメージング技術と関連付けた解析法について概説する。

1 2. ボリューム電子顕微鏡イメージングにおける組織細胞化学の応用

大野伸彦 自治医科大学医学部解剖学講座組織学部門

組織細胞化学的手法は特定の分子や構造を同定する上で、電子顕微鏡を用いた微細構造観察において重要な役割を果たしてきました。近年、急速に普及してきた、連続電子顕微鏡画像の効率的な取得によるボリューム電子顕微鏡イメージングにおいても、組織細胞化学的手法は 3 次元微細構造解析を行う上で強力なツールになっています。本講演では、ボリューム電子顕微鏡イメージングの概要について解説し、さらに組織細胞化学的手法の応用の利点や注意点、そして実際の手技について、研究に応用する上での一助になることを目標に、わかりやすく説明します。

1 3. 蛍光・生物発光タンパク質を利用したバイオセンサーの作製法

永井健治 大阪大学 産業科学研究所

本講義では細胞内の生体分子動態を定性的・定量的に可視化解析するための斥候 (ス파이) 分子について解説する。生理機能を捉える蛍光プローブや簡便かつ細胞にやさ

しい条件で超解像イメージングが可能な光スイッチング蛍光タンパク質、さらに光遺伝学的ツールとの併用を可能にする超高性能化学発光プローブなど既存のツールを紹介するだけでなく、自身の研究に合わせてプローブを開発したい研究者向けに、蛍光団の物理化学特性変化に基づくプローブデザインや共鳴エネルギー移動に基づくプローブ作成のポイントなどについて詳述する。

1 4. 組織透明化技術の基礎と実践

日置寛之 順天堂大学医学部 神経生物学・形態学講座

組織透明化技術は、生体組織に起因する光散乱の低減化を図ることで、生体試料の深部まで観察することを可能にする技術である。透明化技術を用いることで厚みのある標本を観察することが可能になり、三次元構造をそのままデジタル・データ化できることが大きな利点である。透明化処理は誰もが実行できる簡単な作業であるが、光学顕微鏡で観察する際には特段の注意が必要である。各種透明化法で使用する封入剤は屈折率が高いため、その屈折率に対応した対物レンズを選択することが必要不可欠である。屈折率のミスマッチが生じると光が結像せず鮮明な画像を取得することができない。本講習では ScaleS 法を例に、透明化処理の基本から光学顕微鏡によるイメージング法までを解説する。また、演者らが開発を進めている「電子顕微鏡観察にも対応する新規透明化技術」についても紹介したい。

1 5. エピジェネティクスと組織化学

北澤荘平 愛媛大学大学院医学系研究科分子病理学講座

エピジェネティクス制御とは、DNA のメチル化、ヒストン蛋白修飾、non-coding RNA などにより、最終的にクロマチン構造の変化（凝集と弛緩）をもたらす、遺伝子発現の ON/OFF を調節するメカニズムです。この講習会では、特に DNA メチル化を組織細胞レベルで検出する方法について、プローブの設計、プローブのオーダの仕方、組織の準備（固定、前処置）、プローブ結合後の処理、Hyperbranching 法による増感などの各ステップの手順について、具体的な例を示しながら解説していきます。

1 6. デジタル画像の取り扱いとデータ数値化の基礎

宮東昭彦 杏林大学医学部 顕微解剖学

美しい顕微鏡写真は実験データの提示法として説得力がありますが、画像の取り扱い方を間違えるとその信頼性が低下してしまいます。主要な学術誌の画像処理についてのガイドラインを参照しながら、適切な処理の範囲について説明します。また、画像解析の手法を用いると、陽性細胞数や面積比率、染色強度、共局在の有無といった、画像のもつ特徴情報を数値化して定量的に評価したり、多数の画像を対象として

統計学的に検討したりすることが可能となります。無料で利用できる画像解析ソフト ImageJ を利用して、画像解析の考え方、画像解析でできること、よく使われるテクニックの具体例など、基礎的な画像解析の概略を説明します。

17. Immunoblotting 法の基礎と実践

竹腰進 東海大学医学部基礎医学系

イムノブロッティング法は、医学・生物学分野の研究に広く用いられている基本的な実験法の一つである。本法の大きな特徴は抗体によって検出された蛋白質の分子量を確認することが出来る点であり、標的とする蛋白分子に対する特異抗体を入手することができれば、正確な発現解析が可能となる。最近では、抗リン酸化蛋白抗体、抗アセチル化蛋白抗体など化学修飾された蛋白質に対する抗体が市販されるようになり、単なる発現解析ばかりでなく、細胞内情報伝達系や転写制御に関する情報を本法により得ることが出来るようになった。本講習会では、イムノブロッティング法の原理、基本的な手技、実際に本法を行う際に注意すべき点などを中心に解説する。

18. i-GONAD 法：体外での胚操作が不要なゲノム編集動物作製法

大塚正人 東海大学医学部基礎医学系

最近我々は、新規ゲノム編集動物作製法「i-GONAD (improved genome editing via oviductal nucleic acids delivery) 法」を開発した。i-GONAD 法では、1) 採卵、2) 体外での胚操作、3) 偽妊娠動物への移植、と言う従来法に必須の熟練した技術を要するステップに代わり、受精卵を有する妊娠メス卵管への CRISPR 試薬の注入と、卵管全体への *in vivo* エレクトロポレーションを行う。これにより、ノックアウト動物やノックイン動物を含めた各種ゲノム編集動物を作製することができる。高度で煩雑な一連の工程をスキップできる i-GONAD 法を用いることで、胚操作技術を持たない研究者が自分自身でゲノム編集動物を作製することが可能である。

技法動画演題（内容につきましては若干の変更の可能性がございます）：

1. 光学顕微鏡の基礎と使い方
2. 初心者のための免疫染色入門
3. Free Floating 法による免疫組織化学の基礎
4. 病理組織検体を使用した *in situ* ハイブリダイゼーション法の基礎と応用
5. レザマイカが他クオンにおけるシンプル調製のコツとアプリケーションの紹介
6. 画像解析ソフトによる細胞画像の定量化手法
7. 三次元画像解析の基礎
8. ウエスタンブロッティングの最先端技術の紹介 (全自動ウエスタンブロッティング)

9. 全自動電気泳動装置による核酸サンプルの品質確認
10. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析の基礎から応用
11. *i*-GONAD 法：自分で作るゲノム編集技術