

# 第4回腎生検LVSEM研究会 総会・学術集会 プログラム・抄録集

【日時】 2020年11月28日(土) 14:40~17:45

【形式】 Teamsを使ったオンライン開催  
(運営本部：日立ハイテク本社内・会議室)

【参加費】 Web開催につき無料

## 第4回腎生検LVSEM研究会 プログラム

14:40-14:55	<b>総会 (年次報告, 会計報告)</b>
<b>【プログラム】</b>	
14:55-15:00	<b>開会のあいさつ</b> 大会長：藤乗嗣泰先生 (獨協医科大学 腎臓・高血圧内科)
<b>教育講演 1</b>	司会：岡田晋一先生 (米子医療センター小児科・鳥取大学医学部周産期小児医学分野)
15:00-15:20	<b>卓上型走査電子顕微鏡の有効な使い方</b> 演者：上村健先生 (株式会社 日立ハイテク) (発表15分+質疑応答5分)
<b>シンポジウム: 低真空走査型電子顕微鏡の腎生検への応用</b> 司会：清水章先生 (日本医科大学 解析人体病理学) 江原孝史先生 (信州大学医学部 病理組織学) 各演者発表15分+質疑応答5分	
15:20-15:40	<b>講演 1 腎生検LVSEM観察法の基礎:パラフィン切片を用いた三次元微細構造解析法</b> 演者：稲賀すみれ先生 (鳥取大学医学部 解剖学講座)
15:40-16:00	<b>講演 2 LVSEMで見えるもの見えないもの</b> 演者：柳内 充先生 (北海道腎病理センター、札幌徳洲会病院病理診断科)
16:00-16:20	<b>講演 3 LVSEMを用いた移植腎組織における抗体関連拒絶反応の診断</b> 演者：小口英世先生 (東邦大学医学部腎臓学講座)
16:20-16:40	<b>講演 4 FFPE切片とLV-SEMを用いた免疫電顕法の検討</b> 演者：高木孝士先生 (昭和大学電子顕微鏡室)
16:40-16:45	休憩

## 教育講演 2

司会：藤乗嗣泰先生（獨協医科大学 腎臓・高血圧内科）

（発表40分＋質疑応答5分）

16:45-17:30

### ポドサイトの三次元観察：手法と解析事例

演者：市村浩一郎先生（順天堂大学医学部解剖学講座）

17:30-17:40

### 日立ハイテクより腎生検向け装置の開発ロードマップの報告と意見交換のお願い

17:40-17:45

### 閉会の挨拶

世話人：大橋隆治先生（日本医科大学 統御機構診断病理学）

## 第4回 腎生検 LVSEM 研究会

### 発表抄録集

#### 教育講演 1：

### 卓上型走査電子顕微鏡の有効な使い方

株式会社 日立ハイテク

上村健

LVSEM 研究会における、卓上走査電子顕微鏡の装置貸出助成に伴い、卓上型走査電子顕微鏡に

よる腎病理症例も諸先生方から発表頂いております。

卓上型走査電子顕微鏡のアプリケーションを担当している中、「現在観察できている画像が正当なも

のか」というご質問を頂くことがあります。

今回は本研究会にてお時間を頂き、卓上型走査電子顕微鏡ひいては低真空走査電子顕微鏡（LVSEM）

を観察する上で留意する点を纏めました。

今後、本発表が LVSEM を用い、病理切片を観察する先生方の一助になれば幸いです。

#### 1. 前処理・基礎編 ～今何を観察しているのか～

(1) 固定について

(2) 染色について

(3) 観察画像（二次電子・反射電子）について

#### 2. 操作編 ～よりきれいな画像を観察するために～

(1) チャージアップの軽減について

(2) フォーカス・非点について

(3) コントラストについて

講演 1

腎生検 LVSEM 観察法の基礎：パラフィン切片を用いた三次元微細構造解析法

鳥取大学医学部 解剖学講座 稲賀すみれ

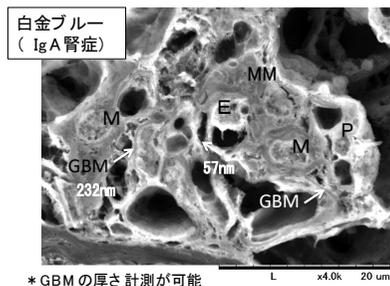
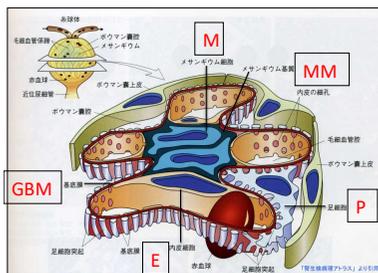
腎生検病理組織診断では、通常の光顕法、免疫染色法などに加えて、確定診断のためにしばしば電子顕微鏡法（主に透過型電子顕微鏡：TEM）が用いられている。中でも、最近増加しつつある腎臓移植に際しては、Banff 分類（2015）で移植糸球体症の評価に TEM 観察が必須項目とされており、拒絶反応などの早期発見、早期治療に電顕診断の重要性が指摘されている。それにもかかわらず、現在全国的に電顕技術者や設備が減少しつつあり、腎臓疾患の鑑別診断や移植腎病理診断における需要に、今後十分対応できるのか危惧されている。

一方、近年の低真空走査型電子顕微鏡（Low Vacuum Scanning Electron Microscope：低真空 SEM、LVSEM）の装置と観察技術のめざましい進歩によって、試料を煩雑な前処理や金属コーティングなしに容易に数万倍で観察をすることが可能となった。

そこで演者らは、LVSEM の特長、特に“簡便性と迅速性”に着目し、通常の腎生検パラフィン切片を用いて“電顕レベル”の高倍率での三次元微細構造の解析が可能で、実用的で新しい「腎生検 LVSEM 解析法」を開発した。本法では、従来の光顕法や TEM 法を補う広範囲での観察・評価ができる点にも大きな意義がある。

本講演では、本法の基本的な手技、腎生検標本への応用および各症例における特徴的な観察所見などについて紹介する。

<糸球体基本構造のLVSEM 像：断面>



\* GBM の厚さ計測が可能

白金ブルーとPAMの相補的な染色効果

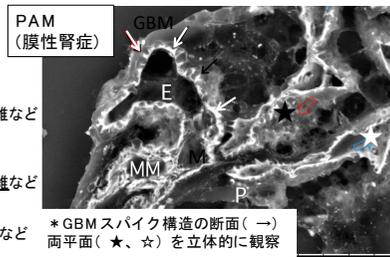
<白金ブルー染色像>

- ・ 陽性（明るい）：足（上皮）細胞、血管内皮細胞、メサンギウム細胞、血球など
- ・ 陰性（暗い）：基底膜、メサンギウム基質、膠原線維など

<PAM染色像>

- ・ 陽性（明るい）：基底膜、メサンギウム基質、膠原線維など
- ・ 陰性（暗い）：足（上皮）細胞、血管内皮細胞、メサンギウム細胞、血球、免疫物質など

相補的



\* GBM スパイク構造の断面（→）  
両平面（★、☆）を立体的に観察

講演 2

LVSEM で見えるもの見えないもの

北海道腎病理センター、札幌徳洲会病院病理診断科

柳内 充

腎生検 LVSEM 研究会の過去の発表で各施設からいろいろな知見の集積がはじまっていたが、解析が始まったばかりで正常像の知見の集積は乏しい状態であった。そこで、移植腎 0h と 1h 検体の正常像を観察することを主眼とし「移植腎における LVSEM 像の経時的変化の検討」という課題を腎生検 LVSEM 研究会助成研究に応募したところ、LVSEM を貸与される機会をいただいた。日常業務に応用できるよう、一般病院でできる染色法・薄切方法で何が見えるのか、見えないのか、見るとすると、どのような像がみえるのか、臨床応用ができるのか試行錯誤してきた。

本演題では、今後の LVSEM の発展に寄与することを目的に試行錯誤の検討写真を時間の限り供覧したい。諸先生方のご意見をいただければ幸いです。

## 講演3

### LVSEM を用いた移植腎組織における抗体関連拒絶反応の診断

東邦大学腎臓学講座

小口英世、大西弘夏、酒井謙

移植腎病理診断の Banff 2013 分類 (Haas et al. Am J Transplant 2014)の改定で、抗体関連拒絶反応の組織診断における糸球体基底膜二重化の検出に電顕評価が必要になった。本シンポジウムでは LVSEM の移植腎病理診断への応用として、LVSEM を用いた抗体関連拒絶反応の早期診断について、最近行われた 2 研究を中心に概説する。

本年度に報告された Yokoyama らの報告 (Yokoyama et al. Biomedical research (Tokyo), 2020)によると、光顕と LVSEM で抗体関連拒絶反応の PAM 切片を解析し、13 検体中 7 検体 (54%) で、LVSEM で評価を行った方が、cg スコアが高くスコアリングされ、4 検体で光顕で評価できない二重化病変が LVSEM により観察されたことを報告している。

我々も LVSEM を用いた抗体関連拒絶反応の早期診断に関する研究を行い、ベースとなる観察行程は既報 (Inaga et al. Arch histol cytol 2010)に従って、今回の検討では同既報で報告されている 5-10  $\mu$  m パラフィン切片厚ではなく、早期の基底膜複製病変の検出を目的に、1  $\mu$  m PAM 標本を作成し、光顕・透過電顕で評価できない基底膜複製病変を LVSEM で観察することができた (Onishi, Oguchi et al. Nephron in press 2020)。

これらの研究は LVSEM を用いた、抗体関連拒絶反応の診断への有用性を示唆するものであり、今後多施設での検証や、実臨床への応用が望まれる。

## 講演 4

### FFPE 切片と LV-SEM を用いた免疫電顕法の検討

1) 昭和大学電子顕微鏡室 2) 日立ハイテク 3) 昭和大学医学部顕微解剖学

高木孝士<sup>1) 3)</sup>、坂上万里<sup>2)</sup>、中村恵<sup>2)</sup>、康徳東<sup>3)</sup>、本田一穂<sup>3)</sup>

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いた病理診断において、免疫染色は必要不可欠なものであるが、その標本を電子顕微鏡で観察する手法は確立されていない。電子顕微鏡を用いた免疫電顕では金粒子標識した 2 次抗体を用いて陽性部位の金粒子を観察する方法が一般的である。この手法では 5~15nm のサイズの金粒子を使うが、低真空走査型電顕 (LV-SEM) でこれを確認する事は装置の性能上困難である。また、光顕の免疫染色の標識の DAB にオスミウムを反応させて生成したオスミウムブラックは透過型電子顕微鏡 (TEM) の免疫電顕に応用されるが、これを走査型電子顕微鏡 (SEM) の 2 次電子や反射電子で検出することは困難である。これを解消するために DAB に重金属を添加するいくつかの報告はあるが、SEM 観察での実用化には至っていない。

我々は FFPE 切片を用いたオスミウムブラックに変わる DAB 発色後の増感染色方法を検討し、これを確立した。この手法は抗原性の局在を LV-SEM で観察する方法として有用性が示され FFPE 切片を用いた簡便な免疫電顕法として、腎生検診断に有用な情報を提供し、将来的には腎生検電顕診断の簡便化や迅速化、低コスト化、他臓器の病理診断への貢献ができることを期待し今回紹介をする。

## 教育講演 2

### ポドサイトの三次元観察：手法と解析事例

順天堂大学大学院医学研究科解剖学・生体構造科学

市村浩一郎

FIB-SEM トモグラフィーなどの連続断面観察法をもとに、組織・細胞・オルガネラの 3D 超微形態が従来よりも緻密に可視化・解析できるようになり、主として神経科学の領域で利用が進んできた。演者らはこの手法を糸球体足細胞（ポドサイト）の 3D 超微形態解析にいち早く導入し、ポドサイトの正確な構造階層（Fig. 1）[1]、発生期における突起と細胞間結合装置の形成過程 [2]、病態時における突起消失課程 [3] などを明らかにしてきた。さらに最近では、無脊椎動物に存在するヘモシアニン（酸素運搬タンパク質）産生細胞として知られているネフロサイトの 3D 構造や組織構築を解析したところ、ポドサイト関連細胞群のひとつに位置することが判明した [4, 5]。本講演では、FIB-SEM トモグラフィーの活用事例として、これまでのポドサイト研究の成果を紹介し、細胞の構造解析における本手法の有用性を示したいと考えている。さらに、FIB-SEM 解析における今後の課題と解決策についてもお話したい。

#### 略歴

2001 年 順天堂大学医学部医学科 卒業

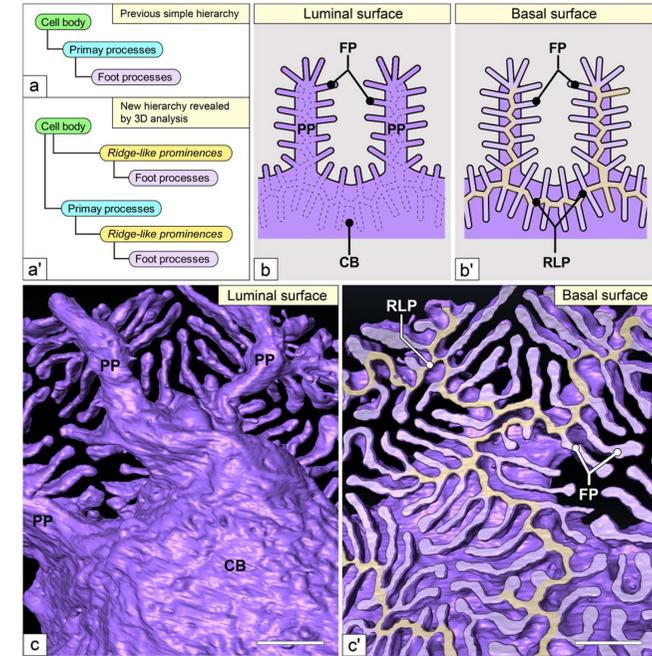
2001 年 順天堂大学医学部解剖学第一講座（坂井建雄教授） 助手

2009 年 順天堂大学医学部解剖学・生体構造科学講座 准教授

2011 年～2013 年 米オクラホマ大学医学部細胞生物学講座 リサーチスカラー（留学）

2016 年 順天堂大学大学院研究基盤センター形態解析イメージング研究室 室長（兼務）

2020 年 順天堂大学医学部解剖学・生体構造科学講座 主任教授（現職）



- [1] Ichimura K, et al. *Sci Rep* 5:8993 (2015).
- [2] Ichimura K, et al. *J Cell Sci* 130: 132-142 (2017).
- [3] Ichimura K, et al. *J Am Soc Nephrol* 30(1): 96-108 (2019)
- [4] Kawasaki Y, et al. *Cell Tissue Res* 378(2): 289-300 (2019)
- [5] Miyaki T, et al. *Cell Tissue Res* (in press) doi:10.1007/s004

#### 腎生検 LV-SEM 研究会事務局

〒142-8555 東京都品川区旗の台 1-5-8  
昭和大学医学部解剖学講座 顕微解剖学部門  
本田 一穂  
電話 (03) 3784-8104  
FAX (03) 3784-6815  
E-mail : [lvsem@med.showa-u.ac.jp](mailto:lvsem@med.showa-u.ac.jp)