

# 「夢の切片」

## 誕生から世界普及まで

ミクロスコピアより

2009年9月完

- 1) 「夢の切片」  
固定も脱灰もせず2ミクロンで切る
- 2) 世界に旅立つ「夢の切片」
- 3) 世界を目指す「夢の切片」
- 4) 「夢の切片」台湾にわたる
- 5) 世界が認めた「夢の切片」

鶴見大学歯学部RI研究センター  
e-mail:kawamoto-t@tsurumi-u.ac.jp

川本忠文著



# ミクروسコピア

vol. 16 no. 4

## microscopia

虫の装いと衣替えの細胞生物学

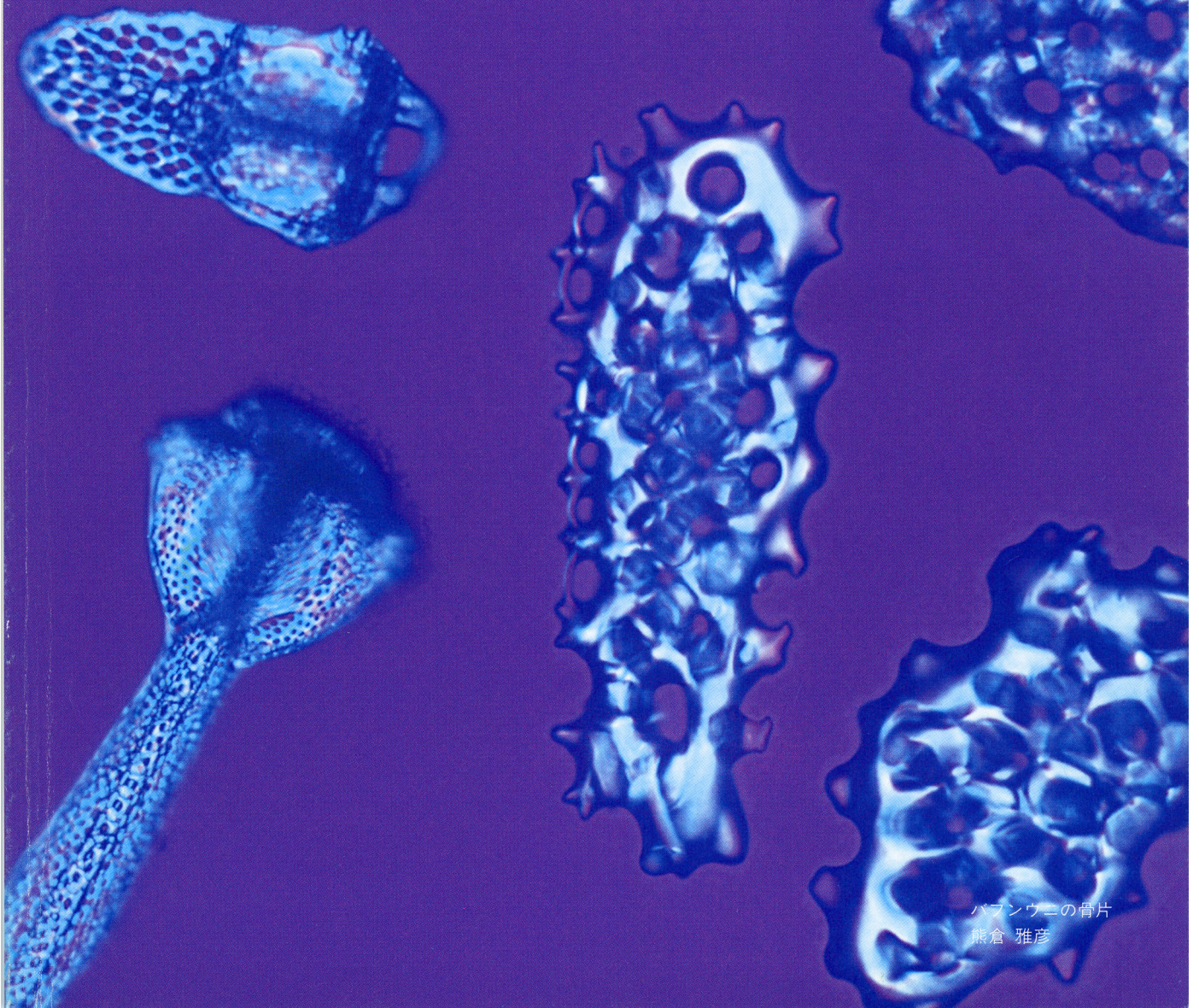
藤原 晴彦

夢の切片—まるごと2ミクロン

川本 忠文

巡礼の路に病院の歴史を訪ねて

木村 明



ハブウエの骨片  
熊倉 雅彦



# <夢の切片>

## 固定も脱灰もせず2ミクロンで切る

川本 忠文



大学そばの総持寺勅使門前で

硬い骨や歯をふくむ組織や、実験動物の全身を、まるごと2ミクロンの切片に切れないだろうか。固定も脱灰もせず、カルシウムや酵素など、水に溶ける物質もそのままの状態ですべて凍結して。そんな夢が18年の模索の末に実現し、「驚異の切片」としていま学界に衝撃を与えている。(編集部)

骨や歯を研究する者は、いつも「脱灰」という問題に悩まされる。脱灰(骨からカルシウムなどのミネラルを溶かし出すこと)をしなければ、厚さ数ミクロン( $\mu\text{m}$ : 1 mmの千分の1)の切片を切ることが出来ず、その脱灰の「前ごしらえ」として、組織をホルマリンなどで化学固定しなければならない。これらの過程で、生体成分が溶出したり、蛋白が変性するなどして、組織から多くの情報が失われる。固定や脱灰処理なしに薄い切片を作ることが出来たならば、蛋白の変性がなく、酵素活性が完全に保たれ、しかも水溶性の物質なども全て保存された理想的な切片が得られ、骨や歯を研究する者ばかりでなく、生命科学の多くの研究者に新しい世界を開いてくれることになるだろう。またこのような技術によって、実験動物の全身から数ミクロンの切片を作ることが出来れば、顕微鏡の下に全身の物質分布を検索することが可能となる。題名の「夢の切片」とは、そのような切片のことである。

### 良き理解者との出会い

この「夢の切片作製」の話は、清水正春先生(鶴見大学 前歯学部部長、生化学教授、1998年9月没)との出会い抜きには語れない。私が19歳の時、学費と生活費を得るために鶴見大学を訪ねた時に始まった先生との付き合いは、先生が昨年急逝されるまで続いた。清水先生は、硬組織の石灰化について

研究されていた生化学者でありながら、形態学にも強い関心を抱いておられ、卒業のときに生物学の分野で仕事をするなどとは思ってもいなかった私に、「そのまま残らないか」と言われた。先生とは妙に気が合っていたので、思いきって清水先生のもとで働きながら勉強することにした。清水先生は、どんなに忙しい時にでも気軽に質問や相談に応じてくださり、自分の考えを押しつけることなく、納得いくまで自由に研究させてくださる先生で、私のように「凝り性」の人間にとって本当に有難い存在であった。

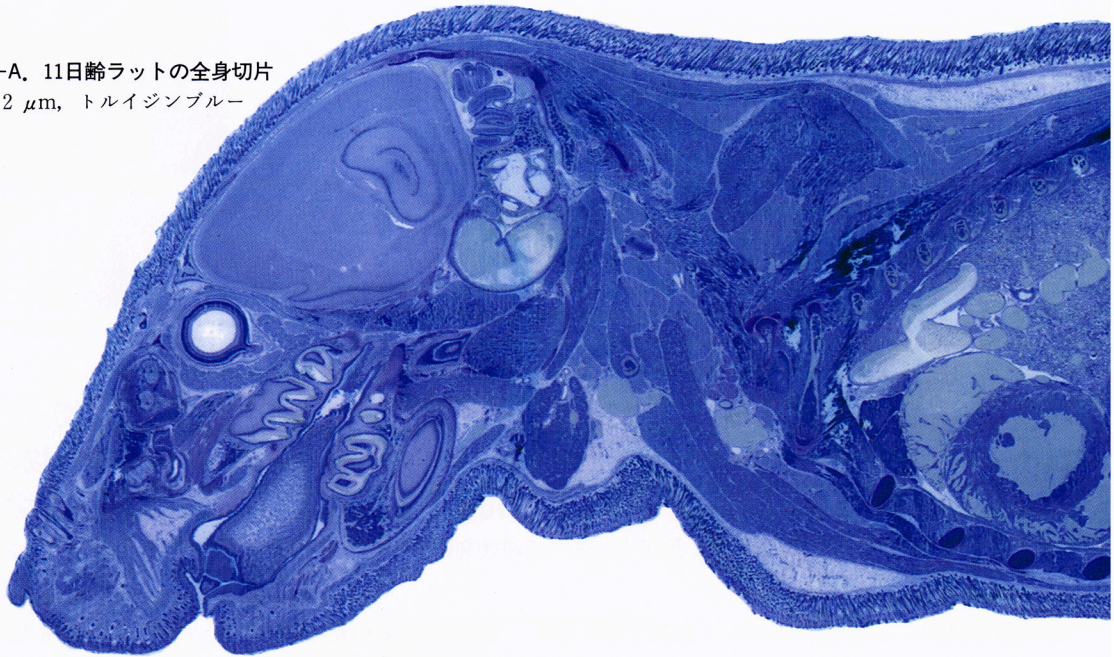
先生から「第一種放射線取扱主任者の資格を取れ」と言われた時、放射線の物理的なことしか知らない私には大変な課題だったが、運良く合格した。その時、お祝いに先生が大切にしていた高価な洋酒をプレゼントしてくださり、本当に喜んでくださっているのがわかった。それから3年後に先生の念願だった放射性同位元素ばかりでなく、生物組織の機能や形態などを総合的に研究できるRI研究センターが完成し、先生の意図がわかり、先生との二人三脚の研究が始まった。

### 「夢の切片」を求めて

組織を切片にするには二つの道がある。組織を処理(固定や脱灰など)してから切片を作る方法と、切片を作ってから処理する方法である。骨や歯の形成過程について研究するには、固定や脱灰の処



図1-A. 11日齢ラットの全身切片  
厚さ2  $\mu\text{m}$ , トルイジンブルー  
染色



理のしていない切片が必要で、さらに骨や歯へのカルシウム輸送について研究するには、水溶性物質が溶けずに残っている切片が必要である。

私たちは、こうした色々な研究目的に利用できる切片があれば…と考えていた。つまり、1枚目は組織学、2枚目は酵素組織化学、3枚目は免疫組織化学（免疫反応を利用して特定物質の局在を調べる方法）、4枚目は遺伝子組織化学（*in situ* hybridization：組織のどこに、どのような遺伝子が発現しているかを調べる方法）、5枚目は光顕オートラジオグラフィ（放射性同位元素で標識された化合物を用いて代謝経路を調べる方法）、6枚目は元素分析、7枚目は赤外顕微鏡観察、8枚目は微小領域の生化学的分析等への利用。

それには未固定で、しかも非脱灰の切片を作るという選択肢しかなかった。しかし、従来の技術では、骨や歯のような硬い組織を含む試料を、固定も脱灰もせず数ミクロンの凍結切片にすることは不可能だった。そこでまず切片を作る新しい方法を開発しようということになった。

RI研究センターには、全身オートラジオグラフィ用の全身凍結切片作製装置（凍結したラットを丸ごと切れる）があり、それを納めた業者は「どんな物でも切れますよ」と説明していた。素人の私たちは大喜びで骨と歯を含んだ試料を切ってみた

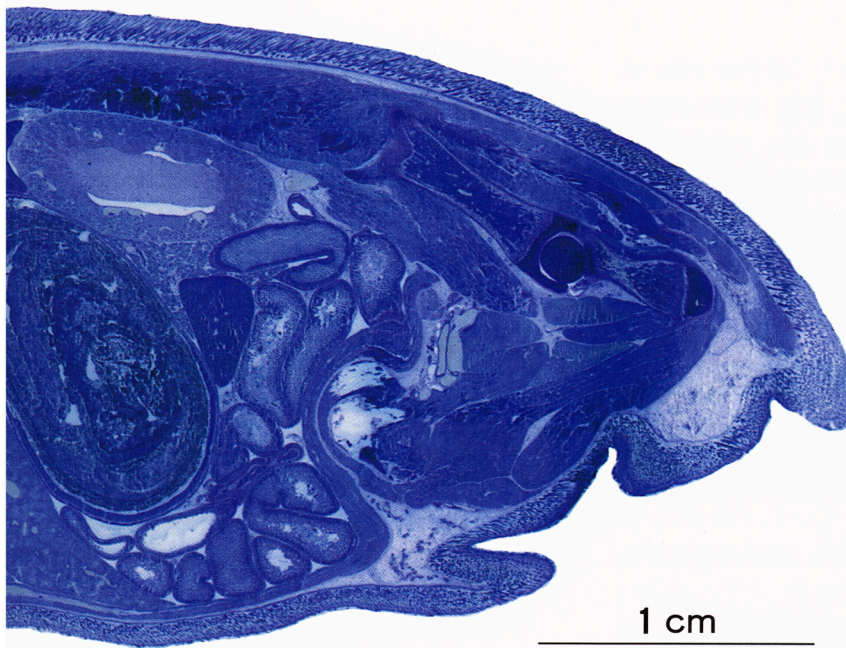
が、知識と経験の不足もあって、切片と言えるものは作れなかった。

そんな時、某会社主催のオートラジオグラフィの講習会があり、専門外の私たち二人も参加した。その時、未固定で非脱灰の試料を凍結し、この試料の表面に湿らせた和紙を凍着させてから切ると、広い面積の凍結切片でも和紙に貼り付いた状態で採れるという話があった。「私たちが探し求めている切片はこれだ」と思い、帰ってすぐに試したが、聞いた話のようにはいかなかった。この時（1981年）から「夢の切片」を求める旅が始まった。

### ナイフがなければ組織は、ただの肉塊

全身凍結切片作製装置では、骨を含んだ試料から簡単に切片を作ることが出来るが、その切片は全身オートラジオグラフィには使えても、さまざまな目的の顕微鏡観察用としては厚すぎるので、まず試料を薄く切ることに着手した。指導書ののっとり凍結試料を凍結包埋し、骨も切れる特殊ステンレス鋼製の新品のナイフで切ってみた。すると試料は厚さ5  $\mu\text{m}$ で簡単に切れ、「思ったよりも簡単！」と喜んだ。ところが続けて切っていると、だんだんと切れ味が落ち、10  $\mu\text{m}$ で切るのがやっと。「おかしい、このナイフは何枚でも切れ





巻いてしまったり、小さくちぎれてしまったりして、切片として使用することができない。その「削りかす」を「切片」に変えるにはどうすればよいか。まずは、「原著に従って粘着テープに取ってみよう」と粘着テープを試料の表面に貼り付けて切ると、「削りかす」がテープに支えられて「切片」になっている。「これで解決だ！」と喜んだのもつかの間、切片を染めてみると、まずい！染色中に切片がテープから離れて壊れていく。この方法が普及しな

るとの説明だったのに」と思いながら実態顕微鏡で刃先を見るとシャープさがなくなり、一部が欠けている。「新しいナイフを」と思っても10万円以上(言いづらい)、国内で研磨できないために研磨に出しても数ヶ月(待てない)。

どうしようかと悩んでいる時、学内にパラフィン切片用ナイフの研磨装置を見つけ、「自分で研磨すれば解決だ」と借用してナイフを取り付けたものの、ナイフの形状が違いすぎて研磨できないことがわかった。しかし、ナイフの問題解決には、その研磨装置の利用以外に考えられず、しばらく思考錯誤を重ねた結果、アタッチメントを作ることによって解決できることがわかり、すぐに試作して研磨を試した。ところがナイフが硬いためか、なかなかナイフの刃先がシャープにならず、ただ砥石が磨り減っていくばかりだった。やはり自力での研磨は無理かとあきらめかけていた時に、骨や歯を研磨する時に使う研磨紙がこの装置の砥石の代りになるのでは…と思い、砥石の上に両面テープで接着して試したところ、これが大成功で、ナイフに関する問題は解決した。

### 利用できない切片は、ただの「削りかす」

ナイフで薄く切られた凍結組織は、木に鉋をかけて出る「削りかす」のようなもので、クルクル

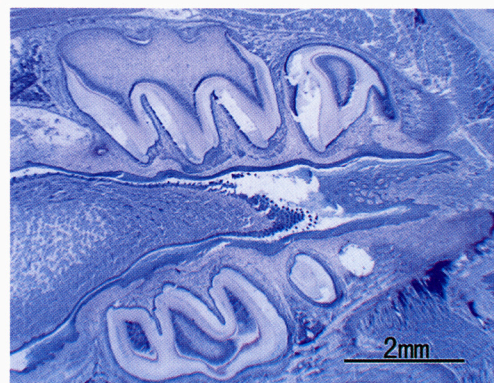


図1-B. 口腔領域の拡大像 白歯と舌が見える。

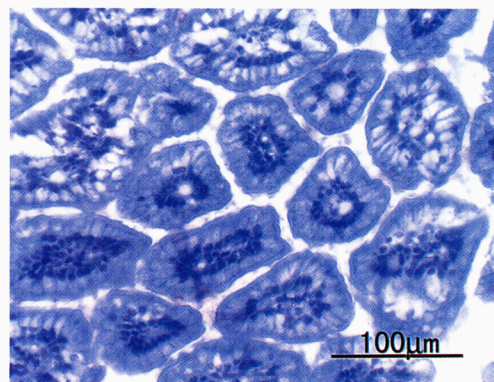


図1-C. 腹部から腸絨毛を拡大して見る。



かった理由がわかった。やはり「講習会で聞いた和紙を使う方法しかない」と、再度 指定の和紙を用いて薄切に挑戦するが、何度 試しても、完全に伸展した切片を得ることが出来なかった。

その頃は、真冬だったので実験室の環境は最悪状態だった。昼間はボイラー室から蒸気が送られて暖かいが、湿度は10%程度で体は常に静電気を帯びた状態、蛇口に近づくと体から火花。夜は暖房が切れ、冷たい外気の吹きさらし(放射性同位元素を使用する実験室は、常時 換気されている)。そんな実験室で 時間も忘れて  $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内で手作業を続けていると、指がだんだんと動かなくなり、次いで感覚もなくなっていく。「まずい、凍傷だ！」急いでゴム手袋を外し、温水の中に手を入れ10分ほどすると指が動き出す。

こんな苦勞の甲斐もなく、和紙を用いる方法では、和紙を試料の全表面に凍着することが難しく、逆に和紙の性質が欠点となって、良好な切片が得られなかった。思いきって、和紙よりも薄く 緻密で 伸縮性の少ないコピー用紙を、湿らせないで用いることにした。その紙を薄切面の試料の観察すべき部位にのみ置き、その上から薄切面の全面に粘着テープを貼り付けて薄切する方法に切りかえた。しばらくやってみると、時どき切片が取れるようになった。ナイフの形状と角度、薄切スピード、薄切中の切片押さえなどを微妙に変えながら薄切を繰り返していると、数ヶ月後に9日齢ラットの全身(約4 cm×10cm)から切片が作れるようになった。この結果、未固定非脱灰の試料から水溶性物質など全ての情報を含んだ切片を作るという「夢」が現実のものになった(1984年)。

## ひとつと多い

早速 この切片作製法を外国の専門誌に発表しようとして投稿したが、現実には甘くなかった。一人の審査員からクレームがついて却下された。「組織学の標本としては問題ないが、切片をスライドグラスに接着するために用いた卵白グリセリンは、水溶性物質の移動を引き起こす恐れがあり、水溶性物質のオートラジオグラフィーに利用するには問題がある」との理由だった。論文の最後に、一言「水溶性物質のオートラジオグラフィーにも利用

できる」と書いたのが まずかったのだ。

こうなったら反論の余地のない切片を作り実証するしかない。「組織学的研究、組織化学的研究、水溶性物質のオートラジオグラフィー等が光顕レベルで行える全身切片の作製法」という大目標を掲げ、再挑戦することにした。その時、清水先生が「おしっこを切片にして水溶性物質のオートラジオグラフィーに利用できることを証明すれば」とお酒を飲みながら気楽に一言。「その一言が大変なのだ！」とは思っても、この方法の確立のためには、「おしっこ」を切片にしてみせるしかない。最終的に実験動物に放射性カルシウムを投与し、膀胱内の尿中における放射性カルシウムの分布を示すことになった。

## 町の研究者

問題となった卵白グリセリンに代わる接着剤を探さなくては、と町に出て、文房具店、雑貨屋、建築材料店等を回って接着剤と名のつく物は、片っ端から買い集めて試した。その中に紙を貼り付ける時に使用する「粘着のり」という製品があり、これは透明で強い粘着力をもっていた。この接着剤をスライドグラスに塗布することで、コピー用紙上の切片をスライドグラスに簡単に移すことが出来るようになった。

次に、この切片が水溶性物質の光顕オートラジオグラフィーに利用できることを証明することになった。通常の光顕オートラジオグラフィーで用いられている乳剤膜(標識化合物から出てくる放射線を検出するために用いるゼラチンと臭化銀で出来た膜)を切片に密着する方法では、乳剤膜が厚いために湿らせなければ、乾燥した切片に密着することが難しく、この密着過程で水溶性の標識化合物が移動して、正確な情報が得られなくなる。この移動を避けるために、薄い乳剤膜を作る方法と、乳剤膜を切片に密着する方法を開発しなければならなかった。

乳剤膜開発のヒントになったのが、子供たちが遊んでいるシャボン玉だった。乳剤に表面活性剤を加えて直径約6 cmのシャボン玉を作ると、厚さ約1  $\mu\text{m}$ の乳剤膜を作ることが出来、このシャボン玉が半乾き状態の時に二枚の切片で挟む



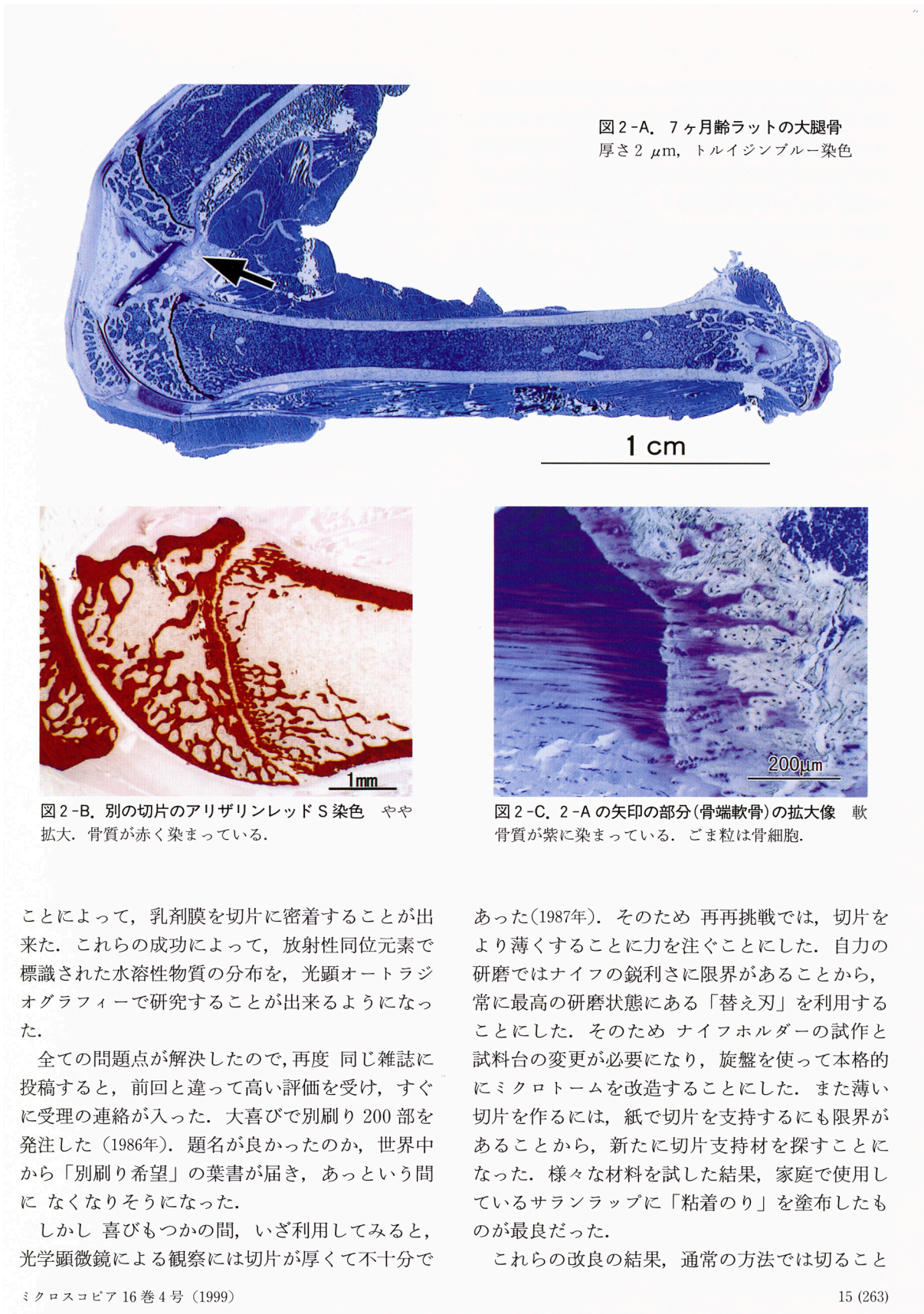


図2-A. 7ヶ月齢ラットの大腿骨  
厚さ2  $\mu\text{m}$ , トルイジンブルー染色



図2-B. 別の切片のアリザリンレッドS染色 やや拡大. 骨質が赤く染まっている.

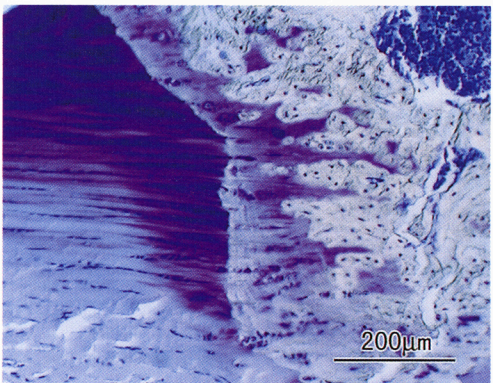


図2-C. 2-Aの矢印の部分(骨端軟骨)の拡大像 軟骨質が紫に染まっている. ごま粒は骨細胞.

ことによって、乳剤膜を切片に密着することが出来た。これらの成功によって、放射性同位元素で標識された水溶性物質の分布を、光顕オートラジオグラフィーで研究することが出来るようになった。

全ての問題点が解決したので、再度 同じ雑誌に投稿すると、前回と違って高い評価を受け、すぐに受理の連絡が入った。大喜びで別刷り200部を発注した(1986年)。題名が良かったのか、世界中から「別刷り希望」の葉書が届き、あっという間になくなりそうになった。

しかし 喜びもつかの間、いざ利用してみると、光学顕微鏡による観察には切片が厚くて不十分で

あった(1987年)。そのため 再再挑戦では、切片をより薄くすることに力を注ぐことにした。自力の研磨ではナイフの鋭利さに限界があることから、常に最高の研磨状態にある「替え刃」を利用することにした。そのため ナイフホルダーの試作と試料台の変更が必要になり、旋盤を使って本格的にマイクロトームを改造することにした。また薄い切片を作るには、紙で切片を支持するにも限界があることから、新たに切片支持材を探すことになった。様々な材料を試した結果、家庭で使用しているサランラップに「粘着のり」を塗布したものが最良だった。

これらの改良の結果、通常の方法では切ること



の出来ない大きな試料(4 cm × 12 cm)から厚さ 5 μm の切片を作ることが出来るようになった。これらの方法を用いて放射性トレーサーの静脈内投与後 3 秒後の組織内分布を追跡できるオートラジオグラフィ法を開発し、それが学位論文となった(1990年)。

その頃、日本を訪れていた全身切片作製装置の製造元(スウェーデン)の責任者が、この方法を代理店で聞きつけ、夜遅く訪ねて来た。実験動物の全身を凍らせた試料を用いて実演をして見せたところ、あまりにも簡単に薄い切片が作られるので、信じられないといった様子で、いつまでも眺めていた。

この改良した方法で作られた切片の最初の実用として、放射性カルシウムと放射性リン酸を投与した実験動物から作製した切片の硬組織(エナメル質、象牙質、骨)から顕微鏡下で微小領域(0.5 mm × 0.05 mm)を採取し、その試料中に含まれている放射性カルシウムと放射性リン酸の比を調べることによって、硬組織に輸送されているカルシウムとリン酸の比が細胞によってコントロールされていることを明らかにした(1990, 1994年)。また放射性カルシウムを用いて、血中からエナメル質へ輸送されるカルシウムの移動経路を研究し、世界で初めてカルシウムがエナメル芽細胞(エナメル質を作る細胞)の中を通過する時間を明らかにした(1997年)。しかし、成熟ラットの骨や歯を含んだ試料から切片を作るという初期の目標はクリアできず、切片作製法になお限界があることが明らかになり、再再再挑戦が必要となった。

## 別れ

成熟ラットの骨と歯を薄く切るためには、その硬さに負けないナイフが必要である。炭素特殊鋼で作られている替え刃の硬さでは不十分であることから、さらに硬い材料のタングステンカーバイドで作られたナイフ(一本刀)を用いることにした。その結果、成熟ラットの骨と歯から厚さ 2 μm の切片を作るという目標の目途がつき(1994年)、清水先生は「宝の山を掘り当てたね」と言って大変に喜んで下さった。このナイフの変更によって厚さ 3 μm 以上の切片であれば、連続して

かなりの数の切片(50枚以上)を作ることが出来るようになった。

しかし、こんなに硬い材料のタングステンカーバイドのナイフといえども、成熟ラットの骨や歯を切ることは大変なことで、使用中にナイフの鋭利さが失われたり、刃先が欠けたりして、厚さ 2 μm の切片を作ることが出来なくなる。それに、ナイフは高価(1本24万円以上)で、しかも作業性が悪かった(ナイフ交換時に再度調整しなくてはならなかった)。やはりこれが限界かとあきらめかけていた時、業者からタングステンカーバイド製の替え刃ナイフが市販されていることを知らされ、大喜びで取り寄せた。そしてすぐに替え刃が利用できるようにナイフステージを改良し、安くて鋭利なナイフ(3万円)を使用できるようにした。

その頃から14年間使用していた1号機の補修部品の手配が難しくなり、清水先生に相談して2号機を購入することにした。2号機はこれまでの問題点を考えて改造を行ない、1年半で希望の性能を出せるようになった。この装置で、成熟ラットの骨、歯から 2 μm の切片を作ることが出来るようになり、18年目の昨年の夏に「夢の切片」を追い求める旅は終了した。

しかし、清水先生は完成の2週間前に急に体調を崩され、「あとは頼むよ」の一言を残して帰らぬ人となった。これから始まる私一人の「応用への旅」には、どんな世界が待っているのだろうか。

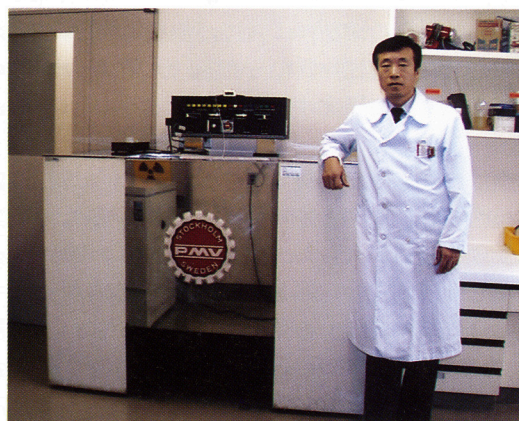


図3. 全身凍結切片作製装置の前で



## 「夢の切片」の世界

夢の切片は、どんな世界を私たちに見せてくれるのだろうか。固定、脱灰、包埋等の処理が不要なので、これまでの多くの問題点を解決してくれることは間違いない。

固定液や脱灰液によって組織中の酵素が失活しているのではないだろうか、蛋白が変性して免疫反応が起こらないのではないだろうか、といったこれまでの心配は不要となる。実際に酵素組織化学に応用した実験では、酵素の再活性を行なっても30分以上の反応時間を必要としていた反応が、今や1-2分となった。また免疫組織化学においても、従来の方法よりも強くて鮮明な反応結果が得られた。組織学分野では、大きな試料から切片を作るには長い日数を必要としていたが、この方法では試料の採取後1時間もしないうちに顕微鏡で観察できるようになった。しかもこの切片はほとんどの染色に利用することが出来る。光顕オートラジオグラフィの分野では、これまで不可能と考えられていた標識化合物の体内での動きを、投与後3秒目から研究することが出来るようになり、これまで研究することの出来なかった標識化合物の投与から1分以内の動きを明らかにすることが出来るようになった。

さらに組織中での元素分布の観察、赤外顕微鏡による生体分子の観察、遺伝子組織化学、微小領域の生化学的分析、硬組織形成過程の記録描写、硬組織成分の分析、マイクロビームX線回折法などへの応用。次から次へと夢が広がっていく。

## おわりに

実際の光学顕微鏡観察には、厚さ3-5 $\mu\text{m}$ 程度の切片で十分である。それにも関わらず、厚さ2 $\mu\text{m}$ の切片作製にこだわった理由は、金属性ナイフで切れる限界は2 $\mu\text{m}$ 程度であることと、厚さ3 $\mu\text{m}$ の切片を安定的に作るには2 $\mu\text{m}$ の薄切技術が必要だと考えたからである。そんな理由で、全て厚さ2 $\mu\text{m}$ の切片の写真を示している。

成熟ラット(7ヶ月齢)の大腿骨からは、厚さ3 $\mu\text{m}$ であれば80%程度、5 $\mu\text{m}$ であればほとんど100%の確かさで良好な切片が得られる。当然、

薄切は石灰化度の低い試料ほど簡単であるが、11日齢ラットのように大きな試料から厚さ2 $\mu\text{m}$ の無損傷の切片を得ることは難しい。図に示している程度の切片であれば80%程度、もう少し小さい試料(9日齢ラット)では、厚さ3 $\mu\text{m}$ 程度の切片であれば、ほとんど100%良好な切片として得られる。

それにしても「人との出会い」は、本当に大切なことだ、とつくづく感じる。27年前に清水先生との出会いがなければ、だれもが不可能と信じて疑わなかった方法の完成に18年間も打ち込むことが出来ただろうか。今まで以上に「人との出会い」を大切にしたいと感じるとともに、私の経験と研究への思いを若い人たちに伝えたいと思うこの頃である。

## 参考文献

- 1) Kawamoto T., Shimizu M.: A Method for preparing whole-body sections suitable for autoradiographic, histological and histochemical studies. *Stain Technol.* 61:169-183, 1986.
- 2) Kawamoto T., Shimizu M.: Distribution of calcium and phosphate in cells of the enamel organ in the rat lower incisor. *Adv. Dent. Res.* 1:236-244, 1987.
- 3) Kawamoto T., Shimizu M.: Changes in the mode of calcium and phosphate transport during rat incisor enamel formation. *Calcif. Tiss. Int.* 46:406-414, 1990.
- 4) Kawamoto T.: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. *J. Histochem. Cytochem.* 38:1805-1814, 1990.
- 5) Kawamoto T., Shimizu M.: Changes of the ratio of calcium to phosphate transported into the mineralizing enamel, dentin and bone. *Jpn. J. Oral Biol.* 36:365-382, 1994.
- 6) Kawamoto T., Shimizu M.: Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J. Histochem. Cytochem.* 45:213-230, 1997.

## かわもと ただふみ

昭和52年 東京電機大学工学部電子工学科卒業、歯学博士。鶴見大学歯学部RI研究センター主任、生化学教室助手。東京医科歯科大学歯学部非常勤講師。研究センターの性格上、専門を問わず、色々な研究相談に応じる毎日である。研究テーマは硬組織の石灰化機構の解明で、とくに放射性カルシウムを自由に使用できることから、硬組織へのカルシウム輸送を主に研究している。中学生と高校生の子供がいることから「子供達に夢を」と地域活動に頑張っている。



# ミクروسコピア

vol. 21 no. 2

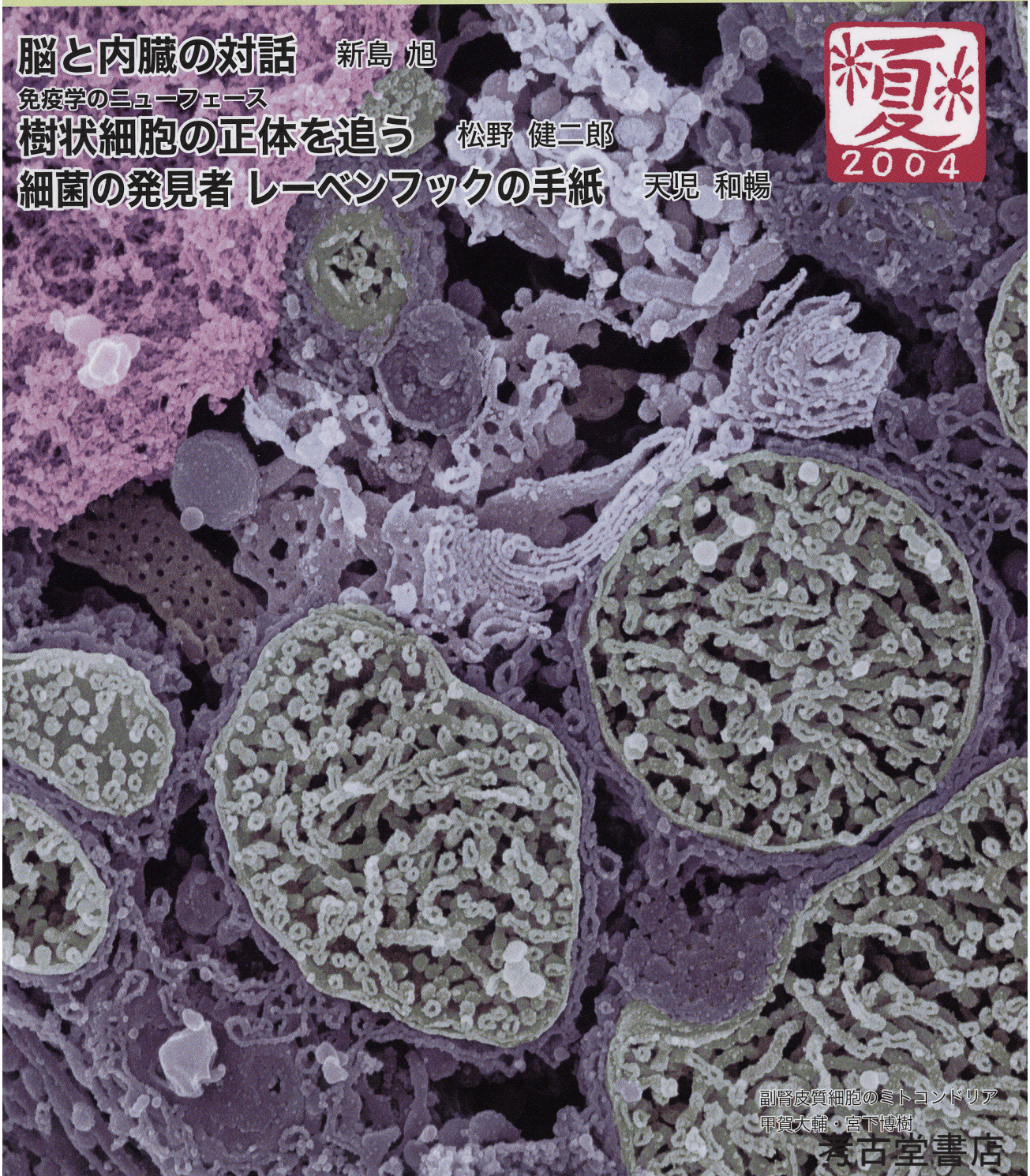
## microscopia

脳と内臓の対話 新島 旭

免疫学のニューフェイス

樹状細胞の正体を追う 松野 健二郎

細菌の発見者 レーベンフックの手紙 天児 和暢



副腎皮質細胞のミトコンドリア  
甲賀大輔・宮下博樹

考古堂書店



# 世界に旅立つ 夢の切片

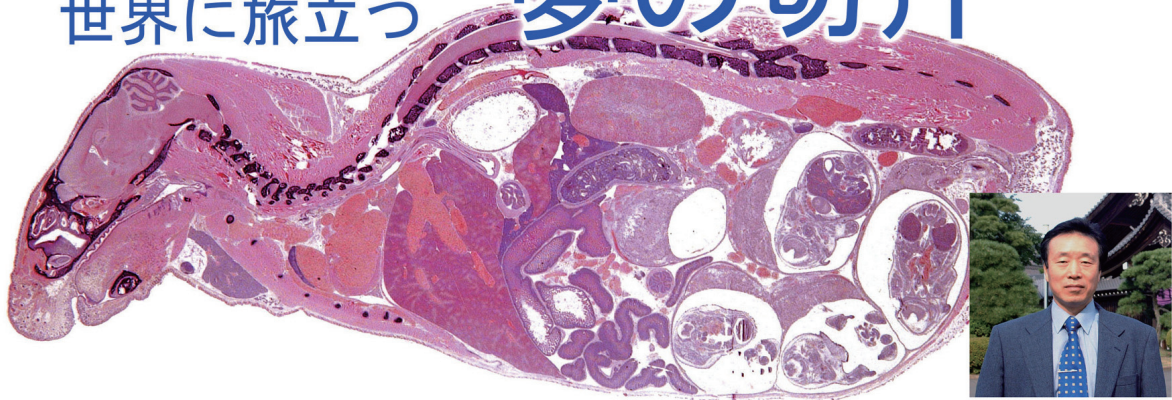


図1 A. 妊娠マウス（12日目）の全身切片 厚さ5  $\mu\text{m}$ , HE染色 (Arch Histol Cytol 66: 123-143, 2003)

生命科学の研究には、組織を薄く切った切片標本が不可欠で、とくに生体内の物質分布や性質（機能）などの情報を正確に保ったものが望まれる。しかし、情報を大切にすれば形態が悪くなり、形態を大切にすれば情報が失われる。この矛盾を解決するために、半世紀以上にわたって多くの努力が払われてきた。私が開発した方法は、やっとそれを両立させたもので、従来の方法と装置に検討に検討を重ね、18年の歳月を費やした。この「川本法」により、これまで極めて困難、不可能とされていた骨などの硬い試料や全身のような大きな試料からも組織の情報を正確に保った状態で薄い切片（2ミクロン=1000分の2 mm）を簡単に、誰にでも作ることが出来るようになった。しかも従来切片よりも多くの応用の可能性を秘めている。

この「夢の切片」の誕生物語が、平成11年の秋に「ミクロスコピア」<sup>1)</sup> (16巻4号, 1999年) に掲載され、これが、この方法が日本全国はもとより海外にも知られ普及する、そもそものきっかけとなるうとは、誰が想像できただろう。

## ミクロスコピアとの出会い

出会いとは日常的なことで、多くの人が特別な意識を持たないで体験しているのだろう。しかし、私にとって若いときの私を拾って薫陶して下さった清水正春先生（鶴見大学 生化学教授、歯学部長、1998年9月1日逝去）との出会いと、5年前に私の仕事を世に知らせてくれたミクロスコピアとの出会いは特別なものである。清水先生との出会いがなければ研究者としての私はなかったであろう



図1 B. 切れたばかりの図1 Aの凍結切片

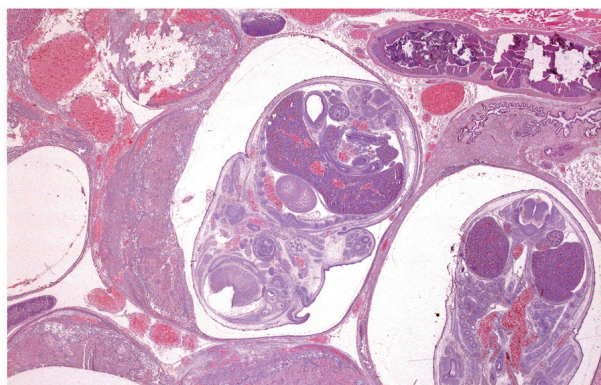


図1 C. 母体の中のマウス胎児の拡大像 母体内にあるままの状態での研究することが出来る



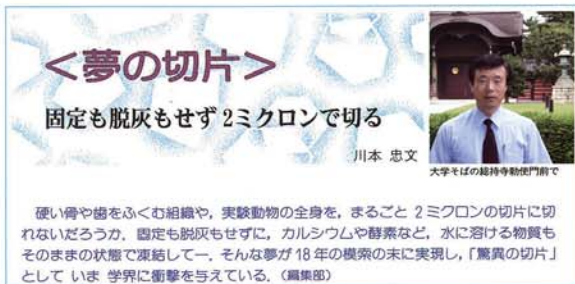


図2. 「川本法」が世に知られるきっかけとなったミクロスコピアの見出し (ミクロスコピア 16 巻4号, 1999)

し、またミクロスコピア編集長の藤田恒夫先生との出会いがなければ、「夢の切片」は人知れずゴミ箱に消えていたことは間違いない。

ミクロスコピアとの出会いのきっかけとなったのは、1996年のエナメル質比較発生学懇話会だった。参加者全員が寝食をともにし、発表以外の事についても思う存分に討論できる有意義な会だった。この懇話会に藤田恒夫先生が出席しておられ、私は先生がミクロスコピアの編集長とも知らず、夜の親睦会のわずかな時間に数枚の写真を見せて説明する機会があった。先生は「これは面白い！こんな大きくてきれいな切片が出来るとは素晴らしいですね」の一言で終わったが、私には十分な喜びがあった。

その後なにごともなく月日が過ぎ去った。が、



図3. 新研究法を紹介した朝日新聞の記事 (2000年2月2日)

ミクロスコピア編集長の脳裏には、私の切片の写真がインプットされて、消えていなかったようだ。3年後にミクロスコピアから原稿依頼の手紙が舞い込んだのである (1999年9月)。それは清水先生が突然の病から亡くなられ私の身の状況が一変し、途方にくれていた時だった。

### 拾い出された「夢の切片」

ミクロスコピアからの手紙は、研究の目途も立たなくなっていた私にとって、神様からの手紙のようなものであった。苦勞して開発した方法に託した私の願いを理解してくれる読者が一人でもいれば…と、淡い夢を抱いて寄稿した。

ところが、掲載誌 (図2) の刊行直後から大きな反響があった。たくさんの電話や手紙が舞いこむ中に、朝日新聞の科学欄担当の記者から取材申し込みがあった。また、それまでの研究成果を外国雑誌 (ドイツの Histochemistry and Cell Biology) に投稿することを、経済的に支援して下さる企業が現れた。朝日新聞の方は、二ヶ月もたって思ったよりも小さな記事が掲載された (図3) が、全国版だったので反響は予想外に大きかった。

新聞掲載後、講演依頼が次々と舞い込むようになり、これはすでに50回以上に達している。個人的な研究相談も多く、国内はもとより海外から直接訪ねて来られる研究者もあとを絶たない。

例年8月に催されている組織細胞化学学会主催の組織細胞化学技術講習会においても2001年から新しい方法として採用され、毎年多くの受講希望者がいる。研究者への技術紹介も企業により行われ、医科系大学においては全ての大学で実施され、これも好評を得ている。その普及過程で思わぬ展開があり、遺伝子操作による農産物の品種改良の成果を確認する時に本切片が有効であることがわかり、農学分野でも注目されるようになった。また、上記の雑誌に掲載された論文<sup>2)</sup>は、支援企業のおかげで1,000部も別刷をつくったが、ほとんどなくなってしまった。





図4. マルディグラ (Mardi Gras) 町中の全てが祭り一色になる。フレンチクォーターで

### 初めての海外講演

新聞に掲載された直後の5月に、ドイツの世界のメーカーの製造責任者が見学を訪れた。実演してほしいとの希望に応じて、ネズミの全身を切った。高品質の全身切片が連続して簡単に採取できるこの方法の有用性を納得してくれたのだろう。その場で、世界に普及させようとの話に移り、まずニューオーリンズで開催される国際会議(2001年2月)で発表することが決まった。

海外での発表は初めてだったが、単身で参加することになった。どうにか手続きを終えて搭乗したところ、飛行機は離陸しようとしないうちにやがて説明があり、飛行コースの火山が爆発し、離陸できないとのこと。結局、機内に2時間以上も閉じ込められることになった。その結果、ニューオーリンズに到着後の全ての予定が狂い、日没前にホテルに着く予定が深夜にずれ込み、ホテルへの道順がまったく分からなくなった。その上、私の英語力を知らない現地の人々はニューオーリンズ弁で早口で話すため、ほとんど理解できない。この時ほど不安に襲われ、家に帰りたと思ったことはなかった。こうまでしてアメリカで発表する必要があるのかと、すべてを投げだしたくなった。

しかし、一昼夜過ぎると精神的に落ち着き、町に出て歩き回り異国を楽しんだ。とくに、会議中に「リオのカーニバル」に匹敵する盛大な祭り(マルディグラ)があり、私にアメリカの面白さ、凄さを感じさせるに十分だった(図4)。

会議は、全身切片を使う研究法とその応用に関



図5. 会議の懇親会で 会頭の Dr. Eric (右から二人目) と記念写真 (筆者右端)

することで、世界各国からの出席者がいた。私の講演は初日の午後で、講演と質疑を合わせて45分間だった。英語での講演の経験はなかったが、始まると自然に緊張がとけ、聴衆に合わせてながら講演を進めることが出来た。話が進むにつれて会議場の雰囲気が変わり、これまでに感じたことのない熱い視線を感じ、終わるとともに盛大な拍手を何回も頂いた。また、演台から下りるのを待ちかねるように、何人かの人が駆け寄って握手を求めた。日本から遠く離れたこの地で、やっと私の研究のねうちを本当に理解してくれる人たちに出会えた喜びを実感した(図5)。

この講演の成功から、アメリカは日本と違い、学歴、出身、身分などに関係なく、良い仕事は良いとして公正に評価する社会であることを感じ、多くの人がアメリカを目指す理由を理解できた。また、海外講演を支援して下さったドイツの企業の方々から、オリジナリティーや私の意見を最大限尊重して頂き、この点でも日本との違いをつくづく実感した講演旅行であった。

### 「夢の切片」に託す夢

「川本法」は、私の研究テーマである「組織内でカルシウムが骨や歯にどう運ばれて代謝されるか」を解明するために見いだした方法で、方法の開発はメインテーマではなかった。研究の思わぬ一面が評価されたのであった。

しかし、どんなに高い評価を受けた方法でも、特別な装置と熟練が必要となれば世界に普及させることは出来ないと考え、初心者でも熟練者と同様



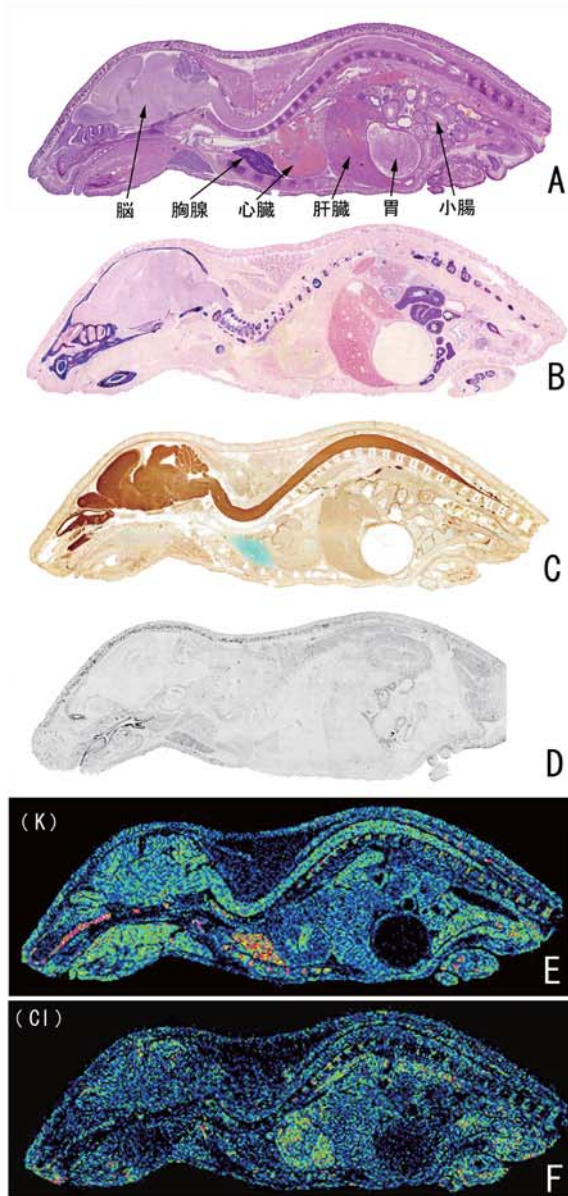


図6. 6日齢マウスの連続凍結切片 全身切片を使って色々な研究が出来る。

- A) H-E 染色 (形態観察)
  - B) 酵素組織化学 (酵素の分布, 赤:酸性ホスファターゼ, 青:アルカリホスファターゼ)
  - C) 免疫組織化学 (特定蛋白の分布, 茶色: PGP9.5)
  - D) 遺伝子組織化学 (特定遺伝子の発現, 黒色:28SrRNA5)
  - E) 元素分析 (カリウムの分布, 胸腺に沢山あるのがわかる)
  - F) 元素分析 (塩素の分布, 血中に沢山あるのがわかる)
- (CとDの提供 中野裕紀子:東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科硬組織構造生物学分野)

に高品質の切片を再現性よく簡単に作製できるように改良した<sup>3)</sup>。

運がよいことに 新聞報道後, 私を支援して下さる会社が現れ, その会社を通して私の願いを載せたキットが各研究者に届けられ, すでに 300 ヶ所以上の研究機関で採用され, 成果を出し始めている. 利用分野は 歯学部に限らず, 医学部, 獣医学部, 薬学部, 水産学部, 農学部, 病院など多くの分野にわたっている. とくに最前線の研究では, 遺伝子の発現部位や特定蛋白の分布を明らかにすることは必須のことで, それらの情報を正確に保った「夢の切片」は重要な役割を担うようになってきている.

私自身の本来のテーマの研究は, いつ再開できるか分からないが, それ以上に, 「生体内の情報を限りなく正確に保った試料から連続切片を作製し, 組織と細胞の働きや代謝を多角的に分析する」という私の方法の目標が現実のものとなっていること, に大きな喜びを感じている.

海外の研究者からの問い合わせに応じているうちに, 試料の薄切直前に切片支持用粘着フィルムを作らなければならない点が, 海外普及のネックであることが分かった. この問題を解決するためにシート状の粘着フィルムを開発し, 使用時に切断すれば使用できるようにした. さらに染色した切片を永久標本とするために, 粘着フィルムに貼りつけた切片をスライドガラスに転写する技術を開発した.

その結果, 海外での普及にも企業の支援が得られることになり, 手始めとして一昨年 (2002年) の秋に韓国で講演会と実演会を行なった. 会場の都合で, 各研究機関から選抜した人々を対象に行なったが, これまでと同様に, 切片作製が不可能と思われていた試料 (植物や実験動物の全身) から形のよい薄い凍結切片が簡単に確実に作られることに驚愕の顔で見入っていた. 引き続いて, アメリカで講演を行なう予定 (2003年4月) だったが, 直前にイラク戦争で中止になっている.

思い上がった考え方も知れないが, 私の方法が「川本法」として各研究機関で採用され, 世界中で私の夢を実現していくと考えると, 私は世界に数千の弟子と数百の研究機関をもつことになる





図7. 故 清水正春先生（左端） 中国からの留学生と近くの公園で花見（1994年3月）

と言えるのではないだろうか。

### 不可能に挑戦する環境

研究者の誰もが不可能と思っていることに挑戦し、18年もの模索の年月を費やすことが出来たことについて、考えることがある。私は恵まれない環境にいたために、かえって自分に妥協せず納得できるまで続ける強い意志をもつことが出来たのではないだろうか。

21年前に、朝の連続ドラマで「おしん」が、多くの人に感銘を与えた。見る人により、それぞれ感じるものがあつたと思うが、私は、「おしん」と「私」を重ね合わせながら最後まで見た。戦前と戦後、雪のあるなしの違いはあるが、「おしん」と私の境遇は、似た部分が多かった。食べ物がなくて腹を空かした子供時代、「おしん」では、尋常小学校の先生がおにぎりを持たせて帰らせていたが、私の場合は幼稚園の先生が、かばんにおにぎりや餅を内緒に入れておいてくれた。また、「おしん」は学校に行けず、働きながら米問屋の女主人から読み書き、算術を学んでいる。私は高校へ行くべき立場にないと思っていたが、運よく夜間高校へ通わせて頂ける会社が見つかり、瀬戸内海の片田舎から喜んで上京した。

清水正春先生とは、そんな時に会った。清水先生は、私がおんな環境で育ったことを知ってかどうかわからないが、私にどんなことでも納得いくまでさせて下さった。また、思ったことを思う存分に述べさせて頂いた。その思いやりにあまえて、カルシウム輸送の研究に必要な方法を開

発する段階で18年もの年月が流れ、気がつくとき清水先生は病に侵されていた。

### 「思いやり」の寺小屋

学問的な指導はそれほど心に強く残っていないが、「思いやり」をはじめとして、人にとって最も大切なすべてのことを教えて下さった先生を、一日として思い出さないことはない。

これまで私を導き支えて下さった人たちへの恩返し of 気持ちをこめたボランティア活動として、子供たちのために教室を主宰して16年になる。教室では、スポーツを通して「自主性」や「思いやり」を伝えたいと思っているが、それらは教えるものでなく感じとってもらふことなので、根気のいる仕事で研究よりも難しい。これまで休まず毎週火曜日と金曜日(19:00~21:30)に開いてきたが、講演や研究相談などで時間的に難しくなってきた。しかし、子供を育てることは研究以上に大切なことで、なんとしてもこの寺小屋を維持したいとがんばっている。最近、私の夢を理解してくれる若者が何人か入り、子供たちの手本となってもらっている。若者たちには、全てを取り払って裸の状態になった時に慕ってもらえる人間になつてもらいたい、と願っている。

謝辞：本文中に氏名を省略させていただいたが、今日に至るまでに多くの人から心温まる支えを頂いた。ここに心より謝意を表したい。

#### 参考文献

- 1) 川本忠文：「夢の切片」, ミクروسコピア, Vol.16, No 4 : 11-17, 1999
- 2) Kawamoto T, Shimizu M: A method for preparing 2- to 50- $\mu$ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. Histochem Cell Biol 113: 331-339, 2000.
- 3) Kawamoto T: Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol 66: 123-143, 2003.

#### かわもと ただふみ

昭和52年 東京電機大学電子工学科卒業, 歯学博士。鶴見大学歯学部 RI 研究センター 助手。東京医科歯科大学歯学部 非常勤講師。研究テーマは硬組織の石灰化機構の解明で、主に放射性カルシウムを使って硬組織へのカルシウム輸送を研究している。



# ミクروسコピア

vol. 23 no. 1

## microscopia

BSE 騒動を振り返って 堀内基広

たこ足細胞がおもしろい 栗原秀剛

足のうらから見たヒト 荒川高光

ひとつの肝細胞に世界を見たターラー先生 河野 宏



桜の雄蕊に溢れる花粉  
牛木 辰男



# 世界を目指す「夢の切片」

川本 忠文

骨や歯などの硬組織を含む大きな切片をつくること、そして物質の移動・流出や活性物質の変化などの起こらない未固定（なまのまま）、未脱灰の切片をつくることは、生体のミクロの研究者、とくに組織化学者の夢だった。私は5年前、大型クリオスタットを用いて5-12cmもの（たとえばまるごとの妊娠マウス）大切片を作製する方法を開発し、本誌に紹介した。<sup>1)</sup>

その後、この「夢の切片」が多くの研究者に受け入れられたことを報告した。<sup>2)</sup> 私は、いつの日か「夢の切片」が世界の標準切片として受け入れられ、世界の研究者の役に立ってくれればと願って努力してきた。今回、「夢の切片」がいよいよ世界を目指すことになった事情について報告をすることが出来るようになった。

5年前に私の開発した研究法の公開後、朝日新聞の科学欄に取り上げられるとともに、国内の医学部、研究所を中心に講演会は60回近く、実技指導は200回近く行なわれている。科学の諸分野において、個人名で研究法が広まることは極めてまれなことであるが、幸運にもこの切片作製法は「川本法」として普及してきている。

国内では、すでに400ヶ所以上の研究機関で採用され、生命科学の研究において基本的技術の一つとして定着してきている。この方法により得られた研究成果が海外で発表されることにより、この方法についての海外からの問い合わせが急増し、海外普及が緊急課題となってきた。

これまでに何度か「夢の切片」の世界普及についての計画があったが、なかなか具体化できずにいた。私自身、世界のスタンダードを目指すとなると、国内技術を世界の研究者が採用しても問題が起こらないレベルまで洗練させなくてはならないと考えていたため、どうしても数年の月日を必要としていた。昨年末、やっと世界に挑戦できるまでに改良することが出来、全ての準備が整った。そこへ幸運にも、生物試料の切片標本作製する

装置に関して世界の代表的企業であるライカマイクロシステムズ（ドイツ）から、2005年の4月にハイデルベルグに関係者が集まる機会があるので、そこで「川本法」を紹介してはどうかとの連絡が入った。願ってもないチャンスなので、直ぐに了解との返事をした。しかし、準備期間は3週間ほどしかなく、準備に追われる毎日となった。

4月16日に川島賢一君（ファインテック社）とともに日本を旅立った。旅立つ前に、テロ活動の影響で荷物検査が厳しく、鍵を壊してトランクが開けられることがあると聞いていた。フランクフルト空港で荷物を受け取った時、川島君のトランクの様子がおかしく、中を見てみるとガラガラになっていた。私は、用心として“Dr. T. Kawamoto, Tsurumi University”と大きくシールを貼っていた。海外では博士号が役に立つと聞いていたので、Dr付きの名前を貼っていたのが役



図1. 「哲学者の道」からハイデルベルグの旧市街と古城を望む

かわもと ただふみ

昭和52年東京電機大学電子工学科卒業、歯学博士、鶴見大学歯学部RI研究センター主任、助手。ボランティアで子供達のために「思いやりの寺子屋」（火曜日、木曜日、金曜日の夜）を主宰して17年になる。思いやりを大切に、一生懸命努力する子供達を一人でも多く育てたいと頑張っている。



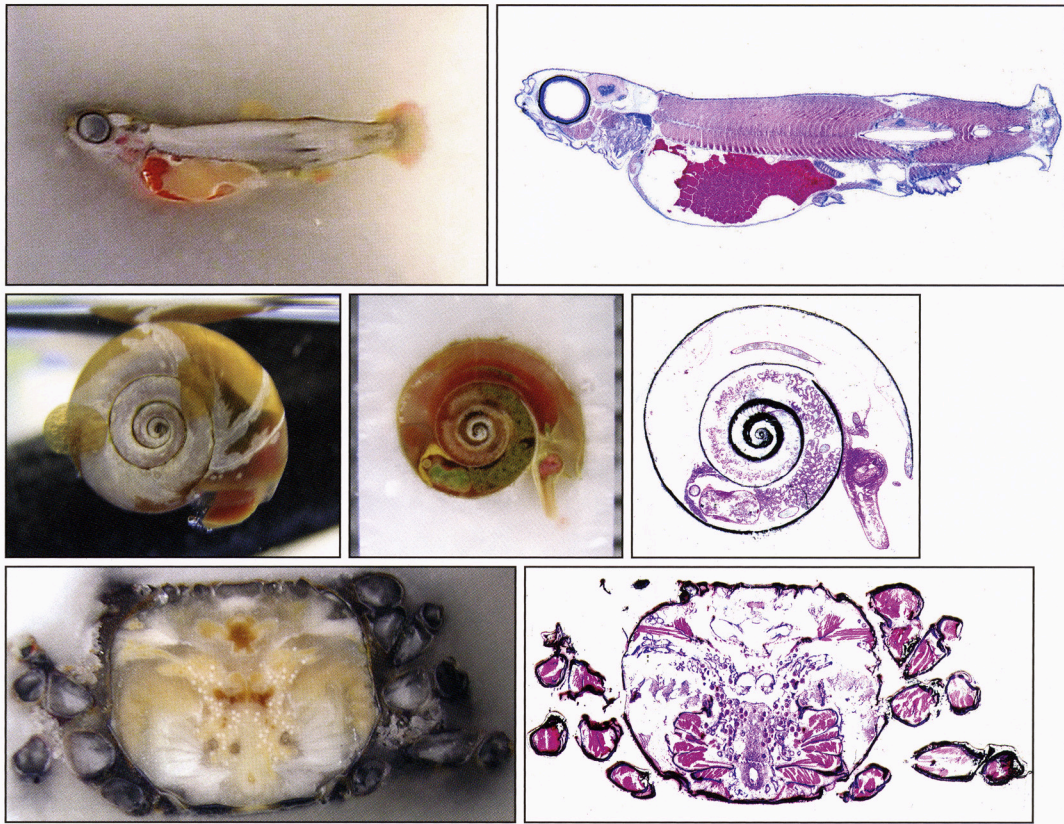


図2. 講演で使用した写真の一部. いずれも従来の方法では、切片を作製することが不可能な標本である. 凍結包埋した標本 (左側) と, 作製された切片 (右側: H-E 染色). 上段: 虹マスの稚魚, 中段: カタツムリ, 下段: カニ. 切片の厚みは全て 0.005 mm 写真提供: ファインテックアプリケーションセンター, 泉 恵子氏

立ったようで、講演と実演に必要な器材を失わずに済み、二人で胸をなでおろした。

ドイツに着いて最初に驚いたことは、ホテルとデパートの階数表示であった。日本では、地面と同じ階は1階と表示されるが、ドイツでは0階と表示され、ドイツでの1階は日本の2階に相当する。また、一日の始まりと終わりがかなり違い、時計で夕方5時を示しているにも関わらず太陽は昼下がりの方向にあり、夕方と感じるのは8時頃からであった。これに慣れるには思ったより時間がかかり、帰国までかかった。ドイツを訪れたら、まず本場のビールとソーセージを堪能しようと思っていたが、それ以上にホワイトアスパラが絶品だった。これは季節限定のもので、なかなか食べることが出来ないそうである。日本のホワイトアスパラよりも大きくて柔らかく、私はあまり

のおいしさに毎日 主食代わりに食べた。

私が訪れたハイデルベルグは、ネッカー川沿いに古城とともに中世の町並みが当時の状態で保存され、しかも生活が営まれているため、中世にタイムスリップすることが出来る美しい街である。街にはドイツ最古のハイデルベルグ大学 (1386年創設) があり、街の人口の五分の一が学生という大学の街である。現在も当時の建物が使用され、講堂の石階段はかなり磨り減り、長い歴史を感じさせる。また街には娯楽施設はなく、全てが学問のための街という雰囲気です。この街を歩いていると、自然に学問に励まなくてはとの意欲が湧いてくる。対岸には、ゲートをはじめ多くの哲学者が思索にふけりながら歩いた「哲学者の道」があり、ここからの市街の眺めは絶景である (図1)。私は偉大なる哲学者達が踏みしめた小道を歩きなが





図3. 川本法の実演風景 白衣が筆者

ら、これから始まる世界への挑戦について思いを馳せた。

会議は4月20日にライカマイクロシステムズ本社で行なわれ、本社責任者と関係者、ヨーロッパ担当責任者、アメリカ担当責任者等が出席した。日本からは、同行した川島君が出席した。

午前中に川島君より日本での実績について、5年間で400ヶ所以上の研究機関で採用され、高い評価を得ていることが説明された。次いで、私が「川本法」について1時間半の講演を行ない、基本的な手順と応用について説明した。応用例として、これまで不可能であった、骨、昆虫、植物、貝等から作製した新鮮切片を紹介したところ(図2)、信じられないといった目で見入っていた。出席者は、すでに多くの研究機関からの問い合わせがあったため関心が高く、熱の入った質疑応答となった。

午後は標本作製から観察までの実演を行ない、高品質の切片が容易に、しかも確実に作製できることに驚いていた(図3)。その後、出席者全員が試み、従来の方法よりも格段に優れていることを実感して頂いた。実演中に、出席者のために持参した切片標本をテーブルに置いた途端、奪い合いの状態になり、「川本法」の価値が認められたと実感することが出来た。最後に海外への普及について話し合いが行なわれ、「大いに普及すべき」との意見で一致した。

今回の会議は、それぞれの地域、部門を代表し



図4. 講演後に残った人々と。左から2番目が、今回の企画をして下さった Ms. Claudia Dorenkamp (Leica Microsystems, Product Manager), 座っているのが筆者

た人達に限定した少人数の会議であった。しかし、これらの世界の情報に精通した人達から与えられた評価は、世界に通用する確かな評価として受け取って良いと思う。

普及方法については、国内で行なわれているように講演と実技をセットにして、世界の拠点で講演会を企画するか、各国の希望に応じて行なうか未定であるが、やっと世界に向けて一歩を踏み出すことが出来たという達成感で一杯である。

私は、いつも原稿の終わりに出会いの大切さについて書かせて頂いている。私のような立場の者が、研究成果を認めて頂き、世界に挑戦することが出来るようになったことは、ミクロスコピア読者の皆さんが「夢の切片」を評価して下さいのに始まって、領域や立場を越えて私を激励し、支援して下さいの方々と、の良き出会いによるものと信じている。改めて心より感謝申し上げたい。

#### 参考文献

- 1) 川本忠文:「夢の切片」, ミクロスコピア 16 巻4号: 11-17, 1999
- 2) 川本忠文:「世界に旅立つ夢の切片」, ミクロスコピア 21 巻2号: 19-23, 2004
- 3) Kawamoto T: Use of a new adhesive film for the preparation of multipurpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole animals, insects and plants. Arch Histol Cytol 66: 123-143, 2003

筆者紹介は40頁、写真の下にあります。



# ミクروسコピア

vol. 24 no. 1

microscopia

ダーウィンの「性淘汰」に挑む 長谷川真理子

日本最大級の恐竜化石発見 足立 洸

うま味も苦味も味蕾から① 豊島 邦昭

食欲は脳でつくられる 塩田 清二



小脳プルキンエ細胞による  
マリファナ様物質の合成  
吉田 隆行



# 「夢の切片」 台湾に渡る

川本 忠文

ライフサイエンスの研究では、組織の形態から機能を推測することが重要なテーマの一つです。そのために、組織中の水溶性の成分や酵素の性質が保持されたまま、厚さ数ミクロン(千分の数mm)に切った標本(凍結切片)が必要となります。しかも、骨や歯を含んだ硬い組織、実験動物の全身、植物などから、そのような切片を作りたいのですが、これは非常に難しいことでした。

私は、そのような難しい試料から切片を容易に作る手法の開発を目指して、装置、材料、技術を模索し、17年後にようやく成功しました。その方法で得られた成果は、ミクロスコピア(16巻4号)に「夢の切片」として大きく取り上げていただきました。早いもので、それから7年の年月が過ぎ、国内で60回以上の講演会、海外ではソウル(韓国)、ニューオーリンズ(USA)、ハイデルベルグ(独)で講演を行ない、実用段階に入ってきました。

「夢の切片」を作製する方法は、今では「川本法」と呼ばれ、国内の数百箇所の研究施設で採用されています。この成果をもとに、昨年(平成18年)から本格的に海外普及に力を注ぐことにしました。このたび、国立台湾大学で「川本法」の講演の機会を得ましたので、ミクロスコピアの読者の皆さんに報告させていただきます。

国立台湾大学は、1928年に日本政府が設立した「臺北帝國大學」で、東大、京大と並ぶ「帝大」として人気が高かったそうです。終戦後、中華民国政府に接収され、「國立臺灣大學」として生まれ変わり、学生数約2万8千人、教職員数約3千人、文学部、理学部、工学部、農学部、医学部など10以上の学部を擁する総合大学で、エリートを輩出している超名門校だそうです。

昨年7月中旬(平成18年)に台湾の病理用実験器材を扱っている会社の担当者が、「夢の切片」の噂を聞きつけ、大学に私を訪ねてきました。折

角の機会なので実演しましたところ、その場で台湾での講演が可能か打診され、願ってもないチャンスなので、快諾しました。数日後、8月上旬の講演を依頼してきましたが、準備に2週間ほどしかなく、準備不足の講演は評価を落とすことになると思い、辞退しました。すると10月末に再度、11月13、14、15日に講演と実技指導をお願いしたいとの依頼が届きました。これも準備期間は2週間でしたが、すでに会場等を手配しているとのことなので、覚悟を



図1. チャングン記念病院での実習を終えてネクタイ姿が筆者

決めて引き受けました。

講演は3回で、初日は国立台湾大学医学部で主に大学院生、2日目はチャングン(Chang Gung)記念病院で病院スタッフ、3日目は再び台湾大学で、主に大学スタッフを対象に行なうことになり、午前中に約90分の講演、午後には研究指導と研究相談を実施することになりました。

初日は、私の言葉(英語)が通じるだろうか、「夢の切片」の意義を理解してもらえるだろうか、実習は順調に進められるだろうかなど、不安な気持ちで大学を訪れました。これまでの経験から講演開始までに30分ぐらいはあり、名刺交換などの挨拶があるものと思っていました。ところがスケジュールの手違いがあったのか、到着後すぐに教室に案内され、いきなりマイクを渡されて講演を始めてほしいと言われ、びっくりしました。しかし「災い転じて福となす」で、講演前の不安な気持ちは何処かに飛んでいき、緊張することなく講演を始めることが出来ました。この予想外の出



来事のお陰で、台湾講演をうまくスタートすることが出来、以後の講演、実技指導などでも緊張することなく、国内と同様に行なうことが出来るようになりました。

さて、第1日目に戻りますが、実習では、開始後しばらく遠慮気味に私を遠巻きにしていた参加者が、一人始めると次々に切片づくりに挑戦し、16時終了予定が18時過ぎまで続けることになりました。参加者は、初回からきれいな切片を作製することが出来、その切片を自慢そうに大切に持ち帰っていました。この成功に気を良くしたのか、企画担当者から2日目の講演に新しい内容の追加をたのまれ、深夜まで講演原稿の手直しが必



図2. 台湾大学医学部での実習後 受講者たちがうれしそうに自作の「夢の切片」を持っている。

要となり、疲労困憊の初日となりました。

2日目のチャンゲン記念病院は、3,500床のベッドを有する巨大病院で、研究と医療の設備は、想像を絶する規模でした。私が訪れたのは、薬剤の代謝を研究する部門で、非常に高価な分析装置が設置されていました。それらを十分に活用するために、新しい切片技術が必要となり、今回の講演依頼となったようでした。ここでは、ネズミなどの小型実験動物の全身切片作製を中心に、講演と指導を行ないました。参加者は病院スタッフが中心で、全員が凍結切片作製の未経験者、しかも英語はあまり使用しないようでした。言葉が通じなくても理解できるように、講演内容にビデオ映像、模式図を多用していたのが役立ったのか、参加者全員が最初から良好な切片を作製することが出来、参加者にも、企画し

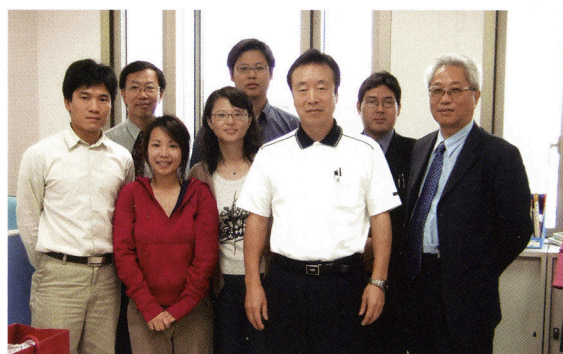


図3. 講演会の企画スタッフ 右から台湾側責任者 Mr. Alex Lie (Union Optical & Instruments Ltd), 日本側責任者 川島賢一氏 (ファインテック社), 中央に筆者。

た人たちにも喜ばれました。(図1)

3日目は、初日と同じ台湾大学の会場でした。それまでの各講演、実習で参加者が理解しづらかった点を毎夜修正してのぞんだため、この最終日の講演は余裕をもって進めることが出来、納得できる講演となりました。実習も、参加者の皆さんと色々な話をかわし、フレンドリーな雰囲気で見終えることが出来ました(図2)。

各会場には30名前後の参加者があり、非常にハードな3日間でしたが、参加者から「川本法」に“Amazing!” “Unbelievable!” “Beautiful!”などの賛辞をいただき、終わった時は疲れを忘れ、全身が満足感で満たされました。しかし、体は思ったより疲れていたようで、予備日として市内観光にとっておいた16日は、起きたのが夕方近くで、楽しみにしていた台北市内の観光が出来なくなりました。

今回の企画担当者(図3)は予想以上の成果に、2007年中に、「台湾の学会で特別講演と講演後の特別実習」、「中国を対象に上海での講演会」などを企画したいとの提案がよせられました。さらに、「川本法」を世界に普及するために、各国の病理用実験器材を扱う関係者を集めて講演会を開催したいとの希望もよせられました。これらが実現し、「夢の切片」に高い評価をいただければ、「川本法」が世界各国で、ライフサイエンスの重要な研究手法の一つとなって、多くの人の役に立つことになるのではないのでしょうか。

かわもと ただふみ 昭和52年東京電機大学卒業、歯学博士、鶴見大学歯学部RI研究センター講師。思いやりの心を大切に、一生懸命努力する子供を一人でも多く育てたいと、19年前から「思いやりの寺子屋」を開いている。



# ミクروسコピア

vol. 26 no. 3

## microscopia

日本では何故

ピロリ菌を発見できなかったか 多賀須幸男

シナプス刈込みの原動力を探る 渡辺雅彦

成体脳でのニューロン新生  
発見者 J. アルトマン

石 龍徳



ラットの腸壁の神経網  
甲賀 大輔・牛木 辰男



# 世界が認めた「夢の切片」

川本 忠文

「夢の切片」は、私のライフワークの一つである。硬い骨や歯を含んだ試料や小実験動物を丸ごと凍らせて、厚さ2ミクロン（1000分の2mm）の切片を、確実に作ることが出来れば、これまで困難（不可能）であった研究が容易に出来るようになる。例えばマウスの全身切片を使うと、カルシウム等の代謝状態や特定遺伝子の発現状態などを全身で検討でき、またノーベル賞受賞で話題となったGFP（蛍光蛋白）を使った研究も全身で検討でき、研究の信頼性が高くなる。私は29年前からそのような「夢の切片」の作製法開発に執念を燃やし、夢は今現実のものとなった。

開発をスタートした当時（1981）、発表されている手法を片っぱしから試みたが、私の目的に合う切片は出来なかった。そこで街中をあるいて色々な材料を買い集め、それで小道具を手作りし、来る日も来る日も冷凍庫の中で凍らせた試料を切り続けた。1986年にリコー製コピー用紙を使う切片作製法にたどりつき、論文発表した<sup>1)</sup>。

さらに切片の品質を高めるために、ナイフとナイフホルダーの試作と、新しい切片支持材を探し求め、1990年にサララップと粘着剤の組み合わせにたどり着き、それが学位論文となった<sup>2)</sup>。

その後、各研究者からの要望に応じて改良に改良を重ね、今ではこれが「川本法」だと自信をもって言えるレベルに達した。最新の「川本法2008」では、骨や歯の硬い構造を含め、どのような試料からでも、試料採取20分後には詳細な顕微鏡観察にたえる永久切片標本をつくる事が出来るようになり、朝日新聞（2008）の科学欄に取り上げられた（図1）。この「夢の切片」が、顕微鏡に拾い出されてから10年になる。この間、4回の拙稿を掲載して頂いたので（16巻1号、21巻2号、23巻1号、24巻1号）、これまで応援して下さい

顕微鏡 26巻3号（2009）

た読者の皆さんに感謝の気持ちを込めて、最近の成果を報告したい。

## 「夢の切片」の始まり

今から10年前（1999年）の秋、恩師清水正春先生（鶴見大学歯学部生化学教授）が突然亡くなられ、途方にくれていた私に原稿依頼が舞い込んだことから、顕微鏡との関係が始まった<sup>3)</sup>。きっかけは、脇田稔先生（北海道大学副学長）が毎夏主催されていた「エナメル質比較発生学懇話会」だった。この会は二日間寝食を共にし、時間はお構いなしに自説を述べ合うユニークな勉強会である。1997年の会の世話人は石山巳喜夫先生（日本歯科大学新潟歯学部 第二解剖学教室）（図2）で、東海大学 齋藤高原研修センターを会場として、「緑の高原で歯の進化を考える集い」という粋な副題を掲げて開催された。石山先生が主任教授の藤田恒夫先生をお連れすると、この情報を耳にした私は、数枚の写真を持って出席し、藤田先生と話すチャンスが二日間狙っていた。そして、ほんの数分間であったが、写真をお見せしながら自説を聞いていただくことが出来た。2年後の1999年、藤田先生の脳裏に私が見せた写真が呼び起こされ、石山先生の強いご推薦もあったようで、「夢の切片」についての寄稿のお誘いを頂いたのだった。

### 探究人

鶴見大講師 川本忠文さん（54）



「初心者でも、この遺40年のベテランのように簡単にできます。」  
生物を瞬間凍結、断面に粘着フィルムを張り付け、千分の数という薄い観察切片をつくる技術の普及につとめている。18年かけて開発した「川本法」だ。骨や歯のような硬い組織でも、形や成分を保ったまま切片にして顕微鏡で観察できる。ネズミの全身の切片を作り、組み込んだ遺伝子などの臓器で働いているのか調べたり、カルシウムなどの物質の生体内での移動を追ったりする研究にも

### 世界が認めた切片製法

「再生医療など新たな分野でも使われる」と期待される。川本は、600を超える研究室で利用されている。

（瀧川茂子）

「初心者でも、この遺40年のベテランのように簡単にできます。」  
生物を瞬間凍結、断面に粘着フィルムを張り付け、千分の数という薄い観察切片をつくる技術の普及につとめている。18年かけて開発した「川本法」だ。骨や歯のような硬い組織でも、形や成分を保ったまま切片にして顕微鏡で観察できる。ネズミの全身の切片を作り、組み込んだ遺伝子などの臓器で働いているのか調べたり、カルシウムなどの物質の生体内での移動を追ったりする研究にも

海外の学会からも講演を頼まれた。緊張して発表すると、盛大な拍手を受けた。「学歴や出身に関係なく、良い仕事は良いと評価してくれた」と感動した。

「再生医療など新たな分野でも使われる」と期待される。川本は、600を超える研究室で利用されている。

（瀧川茂子）

図1. 「川本法2008」の完成直後、朝日新聞に掲載された記事 2008年2月4日



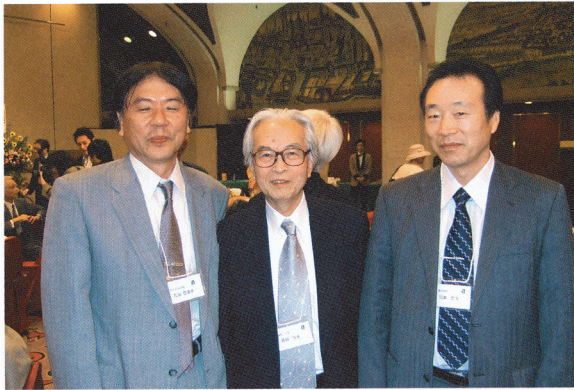


図2. ミクロスコピア創刊25周年パーティで再会した 藤田恒夫先生(中央)、石山巳喜夫先生(左)と筆者

最初原稿依頼は、開発の経過と苦労話を若い研究者がわかるように書いてほしいとのことだったが、己の立場も考えず5回シリーズで書かせて頂きたいとお願いした。あっさりご快諾を得て、4回の報告を掲載していただき、さて5回目の最終報告は、いつにすべきか悩んでいた。昨年12月に台湾での2回目の講演を終えて帰国し、届いていたミクロスコピアを開くと、巻頭に「26巻をもってミクロスコピアを終刊する」との文字が目飛び込んできた。「夢の切片」の最終章を報告できなくなると思い、我を忘れて藤田先生に電話で5回目を寄稿させてほしいとお願いをした。藤田先生は、いつものように快く了解して下さいました。ミクロスコピアが拾い出して下さった「夢の切片」が、間違いでなかったことを報告できるようになり、ホッとしました。


### 「川本法2008」をたずさえて

「夢の切片」の作製法は、「1986版」、「1990版」、「1992版」、「2000版」、「2003版」、「2008版」へと改良した。現在の原型は1990年に完成し、1992年から新たに発売されたタングステンカーバイド製ナイフ(盟和商事製 SHK-I2SA)を使用することにより、骨などの硬い試料からも切片を作れるようにした。さらにタングステンカーバイド製替刃(ライカマイクロシステムズ TC-65)が発売になったので、それを導入し作業性を改善し、ライカマイクロシステムズの支援のもとに論文とした<sup>4)</sup>。完成と同時に、藤田先生から英文総説の依頼(組織細胞学記録)が届いた。一生に一度のチャ

## 瞬間凍結で高精度標本

大崎上島出身  
鶴見大講師開発

動物観察用の切片



川本忠文さん

鶴見大歯学部(横浜市の講師川本忠文さん(55)は広島県大崎上島町出身。骨や歯を含む動物などを観察用の薄い切片に加工する独自技術を開発した。標本を瞬間凍結し薬品を使わないことで高精度な切片ができる

「川本法」と呼ばれる手法は、標本を瞬間凍結を可能にした。川本さんはもと、骨や歯にカルシウムが運ばれるプロセスを研究していた。満足いく切片がなかったため、一九八一年に自ら開発を始めた。二〇〇〇年に基礎技術を確認。改良を重ねて昨年六月、カナダの学会で完成版を発表した。今年一月には、独自で論理を組み立てる習慣がこの開発につながった。世界のスタンダードになってほしい」と川本さんは期待している。(藤原毅)

クリック

切片、顕微鏡で観察するため、生体組織などを薄く切った標本をスライドグラスに張り付けて染色することが多い。骨や歯は硬いため、カルシウム分を長時間かけて取り除き、軟らかくして加工する一般的な手法だったが、組織中の物質が失われたり、変質したりする欠点がある。

図3. 中国新聞に掲載された記事 2009年3月9日

ンスなので、私の考えていることの全てを書き込みたいと思い、2年かけて書きあげた<sup>5)</sup>。

それ以後は、日常的に使用できるように、切片支持用粘着フィルム、包埋剤(試料を切り易くするために試料を包む材料)、封入剤(切った切片を長期間保存するための材料)などの改良を行ない、最新の「2008版(川本法2008)」は私の集大成である。この手法は、これまでの概念を突き破るもので、形態と組織情報を正確に保持し、マクロからマイクロまでの研究に利用でき、切片を用いた研究全てに使用できる。しかも試料採取からわずか20分後には永久切片標本が完成しているという理想的な手法である。(従来法だと早くても1日以上、ときに1ヶ月以上かかる。)この手法により、切片作製の経験のない人でも、20年以上の熟練者が従来法で作製した品質以上の切片を、確実に短時間で作製できるようになった。

本年(2009)3月、中国新聞より郷土出身者(広



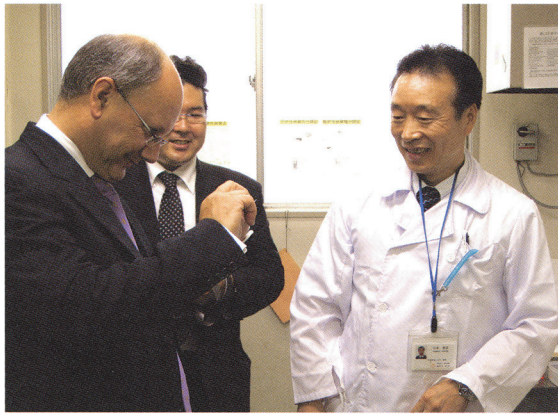


図4. 自ら作製した切片に見入る Dr. Marter (ライカマイクロシステムズ CEO) と筆者

鳥島) が独学で、28年かけて世界的手法を確立した話題として取材があり、立派な記事が掲載された(図3)。小さい時にお世話になった方々や、同級生からお祝いのメッセージを頂き、郷里の方々へ恩返しが出来たと感じた。

### 世界に向かって

昨年(2008)の2月に、私の活動が朝日新聞科学欄の「探求人」コーナーで取り上げられた(図1)。この記事のタイトルは、私が目指していた目標にピッタリであった。講演回数が80回を越え、演題を決めるのに苦労していたので、これ以後は新聞記事タイトルの「世界が認めた切片製法」に演題名を統一して講演を行なっている。

昨年6月にトロントで開催された国際学会(IADR)総会で、完成版の「川本法2008」を発表した。多くの参加者の注目を集め、常に誰かがポスターの前に立ち、最終的に29グループの人達が立ち寄っていた。

帰国直後の7月には、ライカマイクロシステムズ(切片作製装置の世界トップメーカー)の最高経営責任者(CEO) Dr. Marterが、ドイツから私を訪ねてきた。みずから切片作製を試み、まったく経験がないにも関わらず、一枚目から完璧な切片が作製でき、「川本法2008」が評判通りであることを認識したようである(図4)。

国内では、「川本法」と言えば「夢の切片」を作製する方法として広く用いられるようになった。これからは世界に“Kawamoto's Film Method”として普及させて行きたい。すでに、

ミクロスコピア 26巻3号(2009)

アメリカの幾つかの大学が導入し、「川本法」の成果を出している。韓国、台湾からの講演依頼も多い。メールでの問い合わせ(研究相談など)は急激に増え、昼間は日本と東南アジア、夕方から深夜までヨーロッパ、深夜から朝方までアメリカと、休む時間がなくなってきた。国内の普及経過から考えると、アメリカや諸外国において数年後には多くの大学に導入され、“Kawamoto's Film Method”が生命科学の有効な研究手段として、世界に通用するようになるであろう。

### おわりに

「出会い」は、毎日風のごとく私たちの前を通り過ぎていく。しかし、私にはライフワークに結実する素晴らしい出会いがあった。学歴も地位も何もない私であるが、良き師と暖かい支援者にめぐり合ったおかげで、不可能と思われていた手法を完成することが出来た。

最後に、私を拾い上げ薫陶し育てて下さった故清水正春先生に感謝し、長年ご理解と応援を賜ったミクロスコピアの読者の皆様に、改めて心より御礼申し上げたい。

### 参考文献

- 1) Kawamoto, T and M Shimizu: A method for preparing whole-body sections suitable for autoradiographic, histological and histochemical studies. *Stain Technology* 61: 169-183 (1986)
- 2) Kawamoto, T: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. *J Histochem Cytochem* 38: 1805-1814 (1990)
- 3) 川本忠文: 夢の切片 - まるごと2 $\mu$ m -。ミクロスコピア 16: 11-17 (1999)
- 4) Kawamoto, T and M Shimizu: A method for preparing 2- to 50- $\mu$ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol* 113: 331-339 (2000)
- 5) Kawamoto, T: Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch Histol Cytol* 66: 123-143 (2003)

かわもと ただふみ 1953年 広島県の瀬戸内海の島に生まれる。東京電機大学工学部卒、歯学博士、鶴見大学歯学部RI研究センター講師。