

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11659

研究課題名(和文)新規ホールマウント骨染色法の多重染色解析への展開

研究課題名(英文)A new method of rapid whole mount bone staining and its application for multiple staining

研究代表者

坂田 ひろみ (SAKATA-HAGA, Hiromi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50294666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が開発した小型魚類/アフリカツメガエルの迅速骨染色法(RAP-B)をラットおよびマウスの胎児・新生児用に最適化した。さらに、成獣マウスなどの有毛動物に応用するため、RAP-Bに除毛法を組み合わせた骨染色法(RAP-B/HR)を開発した。また、骨病変を持つ動物でRAP-Bによる骨染色と画像取得を行い実用性の検証を行った。組織透明化法が特定の構造や分子の3次元局在の描出に利用されていることを鑑み、マウスの胎児や成獣の各種臓器のWhole mount標本や厚切りスライス標本で免疫染色や各種標識法を行う際の組織透明化法としてRAP-Bの組織透明化法を応用し、有用性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、組織透明化技術は、骨格の観察だけでなく、神経組織内部のネットワークの解析や、病理組織標本の解析に応用されている。古典的な組織透明化はアルカリ溶液による軟部組織の脱色・透明化を基本としているが、この処置は時に過剰な組織破壊をもたらすことが問題となっていた。そのため、近年新しい組織透明化法が複数考案されている。我々の考案したRAP法はアルカリ溶液であるにも関わらず、加温や長時間の反応を行っても軟部組織の崩壊が起こらず、標本の形態や骨格の原位置が保たれるという優れた特徴を持つ。近年開発された他の組織透明化法とは異なる組成のものであり、安価、簡便、迅速などの点で優位であることが特徴である。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported a rapid bone staining procedure (RAP-B) which based on a rapid and non-destructive tissue clearing system (RAP system). We applied RAP-B not only to mouse and rat fetuses, but also to adult mice by combination with a hair removal procedure (RAP-B/HR). It was revealed that the RAP system was available to preparation of highly transparent bone-stained specimens of the mouse fetuses and adult mice. Observations by fluorescence zoom microscopy of these specimens delineated severe pathological bone feature such as joint deformities, narrowing of the joint fissure, bone fusion, as well as fine bone surface pathologies, such as bone erosion and osteophyte formation in the swollen joint area. RAP tissue clearing system also improved antibody permeation in both thick tissue sections and whole-mount specimens. Thus, we concluded that RAP tissue clearing system would be a powerful tool for immunohistochemical analysis in whole mount and thick-sliced specimens.

研究分野：先天異常学 発生毒性学

キーワード：骨染色 免疫染色 マウス コラーゲン誘発関節炎

1. 研究開始当初の背景

組織透明化技術は、古くから骨格の観察に用いられており、現在、化学物質の毒性試験や遺伝子改変動物の表現型解析において不可欠な技術となっている。古典的な組織透明化の手法は、KOH や NaOH を含むアルカリ溶液による軟部組織の脱色・透明化を基本としているが、透明性の追求は、時に過剰な組織破壊をもたらし、骨格がバラバラになってしまうなどの問題が頻繁に生じていた。そのため、アルカリ溶液に代わる脱色・透明化処理としてトリプシンなどのタンパク分解酵素による軟部組織の消化や過酸化水素による脱色が考案された。近年では、Scale、DISCO、CLARITY、CUBIC といった新しい透明化法も考案されている。そのような中、我々の考案した迅速組織透明化法(RAP)は古典的な組織透明化法を応用したアルカリ溶液による軟部組織の迅速脱色・透明化法を基本としている。我々は近年、RAP による組織透明化を応用した小型魚類及びアフリカツメガエルの迅速骨染色法(RAP-B)を開発した。RAP-B は、透明化しても軟部組織の崩壊が起らず、標本の形態や骨格の原位置が保たれるという優れた特徴を持つ。

近年、組織透明化技術は、骨格の観察だけでなく、例えば神経組織内部のネットワークの解析や、病理組織標本の解析への応用が進み、目的も方法も多様化している。我々の研究グループでも新しい組織透明化法の開発、さらには透明化された標本の観察・解析法の考案に取り組んできた。我々が開発した RAP 組織透明化法の特徴の一つは、試料を最初に浸漬する「透明化固定液(RAP-FIX)」である。この溶液は、試料の固定、脱色、透明化を同時に行い小型魚類であれば内臓、皮膚、筋肉を除去することなく、極めて透明度の高い骨格標本をわずか3日で作製することを可能にした。現在、この手法の骨-軟骨二重染色、および遺伝的蛍光導入動物の透明化への応用を進めている。このような背景の中、我々は、次の目標として毒性試験において不可欠なラットおよびマウスの骨染色の迅速・簡便化と、骨染色と免疫染色を組み合わせた多重染色法の確立を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、我々が考案した小型魚類及びアフリカツメガエルの迅速骨染色法(RAP-B)をマウス・ラットに応用すること、また、RAP 組織透明化法を免疫染色等の組織化学的解析に応用して多重染色法を開発することを目的としてしている。

化学物質の毒性試験において、ラットまたはマウスでの骨格観察は必須項目であり、時間と手間をかけた標本作製と解析が行われてきた。よって、ラットまたはマウスで骨染色標本作製を迅速・簡便化するニーズは非常に高い。魚類・両生類と哺乳類では、皮膚の組織構築、骨のカルシウム量、筋肉を含む軟部組織のミオグロビン、ヘモグロビン、ビリルビン等の透明化の際に問題となる色素性物質の含有量など、相違点が多い。本研究では、我々が小型魚類や両生類で確立した迅速骨染色法をラットやマウスに応用するため、溶液組成や染色条件を最適化し、ラット・マウスでの骨染色の迅速・簡便化を目指す。また、成獣マウスを含む有毛動物に RAP-B を応用するため、RAP-B と組み合わせ可能な脱毛法を検討し、成獣マウスでの迅速骨染色法を開発する。

我々はこれまで、ラットやマウス胎児の whole mount 免疫染色を行い、発達異常の評価を行ってきた。例えば、胎生期バルブプロ酸曝露マウスでは脊髄神経の分節性が乱れ、脊髄神経の走行異常が引き起こされるが、これらのマウスでは生後に脊椎や肋骨の形成異常が観察される。このような個体において骨染色と免疫染色による脊髄神経線維の検出を同時に行うことで、病態や発症機序の理解につながる。そこで本研究では、RAP 組織透明化法をマウスやラット胎児の Whole mount 標本、成獣マウスの各臓器の Whole mount 標本や厚切りスライス標本における各種染色法に応用できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1)透明化固定液の組成と反応条件の検討

ラットおよびマウスの胎児を氷冷または三種混合麻酔薬の腹腔内投与により麻酔・安楽死させた後、中性ホルマリン、Triton X-100、および KOH を含む透明化固定液に浸漬した。さらにエチレングリコール、Triton X-100、および KOH を含む透明化促進液に浸漬した後、骨染色を行った。作製した骨染色標本を 50~100%のグリセリンに浸漬し、軟部組織の透明度をさらに高めて骨格の撮影を行った。その際、通常の光学顕微鏡画像に加え、アリザリンレッド S の蛍光性を利用して蛍光ズーム顕微鏡で Z スタック撮影を行った。取得した画像を統合して鮮明な 3D 画像が得られるような撮影条件および画像処理条件(Maximum intensity projection[MIP]処理およびスティッチング処理等)を検討した。

(2) RAP-B を有毛動物に応用するための検討(除毛法の開発と RAP-B 手順との統合)

C57BL/6J マウスを深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(PFA)にて灌流固定した後、背部の皮膚を採取した。皮膚片を種々の濃度条件で調整したメルカプト酢酸カルシウム/KOH 水溶液、又はメルカプト酢酸ナトリウム/KOH に浸漬し、除毛に有効な条件を検討した。

その結果、2%メルカプト酢酸ナトリウム/3%KOH 水溶液で 42℃、16h のインキュベーションにより、皮膚をこすることなく除毛できることが明らかになった。次に、この除毛法と RAP-B 法を応用した成獣マウス四肢の骨格標本作製法を検討した。4%PFA で灌流固定した成獣 ICR マウスの四肢を採取し、透明化固定液に 42℃、48h 浸漬した後、2%メルカプト酢酸ナトリウム/3%KOH 水溶液で 42℃、16h 浸漬して除毛した。その後、RAP-B 法の手順に従って骨染色を行った。成獣マウスの四肢は上述したグリセロール浸漬では十分な透明度が得られなかったため、メタノール脱水後、BABB(ベンジルアルコール:安息香酸ベンジル=1:2)で透徹した。蛍光ズーム顕微鏡(AxioZoom, Zeiss)で Z-stack した画像を MIP 処理し、3D 像を再構築した。

(3) コラーゲン誘発関節炎マウスおよび胎生期バルプロ酸曝露マウスでの骨病変の描出

また、骨・関節変形モデルとして II 型コラーゲン誘発関節炎(collagen-induced arthritis: CIA) マウス(DBA/1JmsSlc, 日本 SLC)を用いた。CIA マウスはウシ II 型コラーゲンを含む抗原液と、結核死菌体 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, Difco) を含む Freund's 不完全アジュバントを等量混合し、最終濃度 4 mg/ml のコラーゲン・エマルジョンを作成し、7 週齢の雄の DBA/1JmsSlc マウスの耳介基部において、0.025 ml のエマルジョンの皮内注射を 2 回行い(1 回目感作) その 3 週間後、2 回目の感作として尾根部皮内に同様の投与を行うことで作製されたものである。外表の肉眼観察によって、前肢・後肢の変形性関節炎を発症しているマウスを選別し、関節炎モデルマウスとして、上述した RAP-B/HR の手順で骨染色、蛍光ズーム顕微鏡にて骨格病変の描述を行った。また、妊娠 8 日の ICR マウス(日本 SLC)に 400 mg/kg のバルプロ酸を皮下投与した。この母獣を妊娠 14 日に深麻酔下で開腹し、胎児を得た。胎児を RAP-B で骨染色し、肋骨および椎骨の形態を実体顕微鏡、および焦点レーザー顕微鏡(LSM710, Zeiss)で観察した。

(4) 免疫染色への RAP 組織透明化法の応用

妊娠 ICR マウス(妊娠 10 日目又は 11 日目, 日本 SLC)を深麻酔して開腹し、胎児を採取した。胎児は 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(PFA)中で浸漬固定した。また、成獣 ICR マウス雌(8 週齢以降, 日本 SLC)を深麻酔下で 4%PFA にて灌流固定し、脳を採取した。

マウス胎児は従来法に RAP による組織透明化を加えた手順で、Whole mount 免疫染色を行った。また、成獣マウス脳は 100 ~ 500 μm 厚の前頭断凍結切片を作製し、Whole mount 免疫染色と同様の手順で染色した。染色後の標本は高屈折率マウント剤で透徹し、実体顕微鏡、蛍光 Zoom 顕微鏡、または共焦点レーザー顕微鏡(LSM710, Zeiss)で撮像した。また、Z-stack 撮影した画像から MIP 処理により、または Imaris (BITPLAN)を用いて 3 次元像を再構築した

4. 研究成果

(1) RAP-B 法で作製したマウス・ラット胎児骨格標本は、皮膚や筋肉の除去は行っていないため、従来法より軟部組織が多く残った状態だが、軟部組織はほぼ完全に透明化しているため、観察や写真撮影も問題なく行うことができた。内臓を除去したマウスや、胎齢の若いマウスでは、透明化固定液のみの処理でも骨染色が可能であったが、透明化促進液で処理することで、内臓(特に肝臓)の色が抜けやすくなり、また、それ以外の軟部組織がより透明化する。よって、マウスやラットの骨染色では透明化促進液での処理が推奨される。RAP-B 法で作製した骨染色標本は、皮膚や筋肉の除去を必要としないため、従来法より軟部組織が残った状態であるが、観察や写真撮影のためにはその軟部組織が完全に透明化していることが求められる。従来より、骨染色標本の保存・撮影にグリセロールが用いられてきたが、高濃度のグリセロールが標本に浸透するには時間がかかり、不十分の浸透状態では標本の透明度も低くなる。そこで我々は、素早く浸透して標本を透明化する透明化マウント液を考案した。透明化マウント液に浸漬した骨染色標本は軟部組織がさらに透明化することが示された。ラットにおいても、マウス同様の手順で RAP-B 法による骨染色が可能であった。標本サイズが大きい場合は、各ステップ(骨染色液への浸漬時間以外)の処理時間を長くすることで対応が可能であった。

(2) 除毛処理条件の検討では、2%メルカプト酢酸ナトリウム/3%KOH、42℃、16h の処理で最も高い除毛効果が得られた。除毛後の皮膚組織では角層が消失し、表皮が薄くなっていたが、真皮では大きな変化は認められなかった。また、除毛後の皮膚切片ではエオジンの染色性が低下していたが、HE 染色前に切片に酢酸アルコール処理を施すことでエオジン染色性が回復した。骨染色法の検討では、RAP-B と 2%メルカプト酢酸ナトリウム/3%KOH による除毛処理を組み合わせることで、成獣マウスの全身および四肢のような大型標本であっても、軟部組織の透明度が高い骨格標本を約 5 日間の処理時間で作製することが可能であった

(3) CIA マウスを RAP-B/HR で骨染色し、骨染色標本を波長 Ex559-585/Em600-690 nm で、蛍光ズーム顕微鏡を用いて観察したところ、骨の融合や関節の変形などの顕著な関節破壊や関節裂隙の狭小化などの変化に加えて、関節腫脹部の骨びらんや骨棘形成などの微細な骨表面の病理学的変化が検出された。CIA マウスの手根部の観察においては、対照マウスでは認められない微小な遊離骨が複数描出された。また、中手指節関節背側部にも対照マウスでは認められない微小な骨が描出された。さらに蛍光ズーム顕微鏡を用いて、excitation450-490/emission500-550

nm の波長で蛍光観察すると、指屈筋群の腱束を描出できることが分かった。骨染色のためのアリザリンレッド S と屈筋腱のための青から緑色蛍光に対して、2チャンネル蛍光観察を行うことによって、関節周囲に認められた微細な複数の遊離骨が、屈筋腱の内部に含まれることが分かった。これらの遊離骨の大きさは68~95マイクロメートルであった。以上より、RAP-B/HRによる骨染色と蛍光ズーム顕微鏡による深部イメージングを組み合わせた場合、100マイクロメートル以下の小さな骨までも標本の深部まで非破壊でスクリーニングして、検出できることが明らかとなった。妊娠8日のICRマウスに400mg/kgのバルプロ酸を投与した母獣から得られた胎生14日のマウス胎児では、その多くに外脳症(頭蓋骨形成不全を伴う)と肋骨形成異常が認められた。肋骨形成異常が認められた部位を共焦点レーザー顕微鏡で10マイクロメートル毎にZ軸撮影し、得られた画像から3次元像を構築したところ、肋骨の癒合や異常な分岐が明瞭に描出された。

(4) Anti-neurofilament antibody (Mouse monoclonal, 2H3, DSHB)は、E10のマウス胎児およびE12ラット胎児のWhole mount免疫染色において、従来法でも良好な染色像が得られるため、広く用いられている抗体である。RAP-IHCの手順で染色した場合は、従来法よりも更に染色性が向上し、組織深部において単一細胞レベルの解像度を有する画像を取得することが可能であることが示された。従来法では、E11マウス胎児でanti-neurofilament抗体を用いたWhole-mount免疫染色を行っても明瞭な染色像は得られないが、RAP-IHCでは脳神経や脊髄神経の神経線維が明瞭に描出可能であった。マウス成獣脳の厚切り切片の免疫染色においても同様に通常の染色よりも抗体の浸透性がよく、500マイクロメートル厚の組織スライスでも全層に渡って陽性反応の検出が可能であった。RAP-IHCで蛍光二重免疫染色した成獣マウス脳スライス標本(200マイクロメートル厚)を共焦点レーザー顕微鏡で、1マイクロメートル毎に合計31枚のスライス像をZ-stack撮影により取得し、MIP処理し3D画像を再構築したところ、parvalbumin陽性神経細胞の細胞体や突起、およびGFAP陽性アストロサイトの形態が明瞭に描出された。

<引用文献>

Sakata-Haga H, Uchishiba M, Shimada H, Tsukada T, Mitani M, Arikawa T, Shoji H, Hatta T. A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and Xenopus. *Sci Rep*, 8: 7453, 2018

Kariyama N, Sakata-Haga H, Tsukada T, Shimada H, Taniguchi M, Hatta T. Rapid bone staining with hair removal (RAP-B/HR): a non-destructive and rapid whole-mount bone staining protocol optimized for adult hairy mice. *Sci Rep*,11:1950, 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kariyama Nobuo, Sakata-Haga Hiromi, Tsukada Tsuyoshi, Shimada Hiroki, Taniguchi Makoto, Hatta Toshihisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid bone staining with hair removal (RAP-B/HR): a non-destructive and rapid whole-mount bone staining protocol optimized for adult hairy mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81616-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamada K, Shiga H, Noda T, Harita M, Ishikura T, Nakamura Y, Hatta T, Sakata-Haga H, Shimada H, Miwa T	4. 巻 45
2. 論文標題 The impact of ovariectomy on olfactory neuron regeneration in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Senses	6. 最初と最後の頁 203-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemse/bjaa005. [Epub ahead of print	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda K, Kitahara T, Ito T, Fukushima M, Fukuda J, Sato G, Kitamura Y, Abe K, Uno A, Tomita K, Sakata-Haga H, Fukui Y, Takeda N	4. 巻 139
2. 論文標題 A new immunohistochemical method to evaluate the development of vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 505-510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2019.1599140. Epub 2019 Apr 16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noda T, Shiga H, Yamada K, Narita M, Nakamura Y, Ishikura T, Kumai M, Kawakami Z, Kaneko A, Hatta T, Sakata-Haga H, Shimada H, Miwa T	4. 巻 44
2. 論文標題 Effects of tokishakuyakusan on regeneraon of murine olfactory neurons In vivo and In vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Senses	6. 最初と最後の頁 327-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemse/bjz023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakata-Haga H, Uchishiba M, Shimada H, Tsukada T, Mitani M, Arikawa T, Shoji H, Hatta T	4. 巻 -
2. 論文標題 A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and Xenopus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 SCIENTIFIC REPORTS	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25836-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bold J, Sakata-Haga H, Fukui Y	4. 巻 93
2. 論文標題 Spinal nerve defects in mouse embryos prenatally exposed to valproic acid	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 anatomical science international	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-016-0363-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 塚田剛史、小田紘久、増田なつみ、坂田ひろみ、森 建策、八田稔久
2. 発表標題 組織標本における核膜染色を併用した細胞数カウントの有用性
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、増田なつみ、有川智博、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 迅速骨染色法 (RAP-B法) によるマウス・ラット胎児の全身骨格標本の作製
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩山信生、坂田ひろみ、塚田剛史、島田ひろき、八田稔久
2. 発表標題 有毛動物への迅速骨染色法(RAP B法)の応用
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田ひろみ、内芝舞実、狩山信生、島田ひろき、塚田剛史、増田なつみ、三谷真弓、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 マウスおよびラットの迅速骨染色法(RAP-B)
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakata-Haga H, Uchishiba M, Tsukada T, Shimada H, Masuda N, Hatta T
2. 発表標題 Application of a rapid and nondestructive tissue clearing system for immunohistochemistry
3. 学会等名 第 59 回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kariyama N, Sakata-Haga H, Tsukada T, Shimada H, Hatta T
2. 発表標題 Preparatio of whole-mount bone staining specimens in adult mice using a rapid tissue clearing system
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八田稔久、塚田剛史、坂田ひろみ、松原孝宜、小田紘久、森 健策
2. 発表標題 組織透明化技術のハイコンテンツ・イメージングへの応用
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八田稔久、坂田ひろみ、塚田剛史、松原孝宜
2. 発表標題 透かしの技でかたちを楽しむ
3. 学会等名 第70回日本皮膚科学会中部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚田剛史、王 賀、増田なつみ、島田ひろき、坂田ひろみ、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 母体ウイルス感染モデルにおける胎盤での免疫応答部位の探索
3. 学会等名 第54回北陸生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田剛史、島田ひろき、王 賀、坂田ひろみ、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 母体Poly (I:C) 投与による胎盤TLR3 シグナルの亢進部位の検索
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、三谷真弓、有川智博、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 小型魚類とアフリカツメガエルのための新規迅速骨染色法とその応用
3. 学会等名 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、有川智博、東海林博樹、八田 稔久
2. 発表標題 迅速骨染色法(Rap-B)のマウス・ラットへの適用
3. 学会等名 第58回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukada T, Sakagami H, Shimada H, Takata S, Sakata-Haga H, Iizuka H, Shoji H, Hatta T
2. 発表標題 Leukemia inhibitory factor signaling and STAT3 phosphorylation at Ser727 in fetal mouse brain development
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩山信生、坂田ひろみ、塚田剛史、島田ひろき、八田稔久
2. 発表標題 骨格観察における除毛処理の有効性に関する研究
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田ひろみ、内芝舞実、島田ひろき、塚田剛史、狩山信生、増田なつみ、有川智博、東海林博樹、八田稔久
2. 発表標題 迅速骨染色法(RAP-B法)の開発とその応用
3. 学会等名 第78回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八田稔久, 松原孝宜, 塚田剛史, 増田なつみ, 島田ひろき, 坂田ひろみ
2. 発表標題 脳組織のハイコンテンツアナリシス
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田剛史, 王 賀, 増田なつみ, 島田ひろき, 坂田ひろみ, 東海林博樹, 八田稔久
2. 発表標題 EGFP 発現マウスを利用した母体ウイルス感染モデルにおける胎盤TLR3 シグナル亢進部位の検討
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 坂田ひろみ、八田稔久	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 7
3. 書名 病理と臨床・別冊	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	八田 稔久 (Hatta Toshihisa) (20238025)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関