

令和元年度第4専門技術群(生物・生態系)「専門研修」報告書

医学研究科附属動物実験施設 中西 聡

1. はじめに

大学における教室系技術職員の職務は多様であり、それぞれの分野において専門的かつ高度な知識や技術が要求される。第4専門技術群は生態・農林水産分野と医学・実験動物分野で構成されており、社会的に重要な研究や、貴重な動植物の維持管理などに従事している。今年度の専門研修では、医学研究科附属総合解剖センターで行われている病理組織標本作製、種々の疾患の診断、治療効果の判定など実際の医療現場で用いられる病理診断法について学ぶことを目的とした。

2. プログラム

開催日 令和元年10月15日（火）

開催場所 京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター 基礎第三講堂、第四実習室

研修内容

- | | |
|-------------|--|
| 8:30～8:45 | 受付 |
| 8:45～9:00 | 開講式、諸連絡 |
| 9:00～9:40 | 講義 1
「病理標本作製について」
技術専門員 阿比留 仁 |
| 9:40～10:50 | 講義 2
「病理診断と人工知能」
解剖センター 准教授 吉澤 明彦 |
| 10:50～11:00 | 休憩 |
| 11:00～11:30 | 講義 3
「共同利用施設としての電子顕微鏡室の紹介及びアレイトモグラフィ法から得られる最先端データ（三次元再構築法について）」
技術専門職員 古田 敬子 |
| 11:30～12:00 | 講義 4
「免疫染色について（原理と役割）」
技術専門職員 國領 久美子 |
| 12:00～13:00 | 昼食・昼休み 昼食後、解剖センター東入り口に集合 |
| 13:00～14:30 | 実習（1）病理組織標本作製（薄切） |
| 14:30～15:30 | 施設見学 |
| 15:30～15:40 | 休憩 |
| 15:40～17:15 | 実習（2）顕微鏡観察 |
| 17:15 | 解散 |

3. 講義

講義 1

「病理標本作製について」

技術専門員 阿比留 仁

最初に解剖センターの概要について紹介があった。解剖センターは、昭和 57 年に開設され解剖学、病理学、法医学を集約させて人体解剖を中心に形態学の講義、実習、解剖業務及び研究を実施する役割をもつ施設である。センター内には、各解剖室、標本保管庫、電子顕微鏡室に実験室、標本作製室を備え、肉眼解剖実習室、講堂、組織学実習室が配置されている。平成 15 年から学内外の研究者や大学院生を対象に形態研究支援を開始した。支援内容は、組織学的研究支援と超微細構造研究支援に分けられている。組織学的研究支援は、パラフィンブロック作製や凍結標本作製の他、免疫染色などの特殊染色、標本観察など形態解析である。一方、超微細構造研究支援は、電子顕微鏡（透過型と走査型）を用いた標本作製、標本観察、技術指導を行っている。また、学生教育として Whole slide image (WSI) を用いた形態学の実習を実施している。

次に、組織学的研究支援の基礎となる組織標本作製の流れについて説明が行われた。組織標本作製の基本的な流れは、通常、①組織をホルマリンにて固定、②小さく切り出し水洗後、脱水・脱脂、③パラフィン包埋、④ミクロトーム（薄切器）による薄切、⑤染色、⑥顕微鏡による観察となる。組織の固定は、タンパク質を安定させることで組織や細胞の自家融解による腐敗を抑え本来の組織構造を保つ事が目的である。組織の大きさや種類、染色方法によって固定液の種類や固定時間を変えなければならないそうである。パラフィン包埋は、以前は手動で試薬の交換などを行っていたが、現在は機械による自動化がなされており効率化が図られている。パラフィンブロックに置換された標本は、ミクロトームで薄切された後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により核は濃紫色、細胞質は赤色に染めて観察を行い組織全体の構造の確認が行われる。その後、対象となる組織や物質等を特異的に染め分ける特殊染色が行われる。組織や細胞内のタンパク質等の抗原の局在を検出する場合は免疫染色を行うそうである。

最後に、午後の実習で行うミクロトームによる薄切の作業内容と注意点について説明があった。作業内容は、①準備されたパラフィン包埋された組織ブロックの表面を粗削りによって薄切面を出す、②厚さ 3 マイクロメートルと非常に薄く均一に薄切を行い、③スライドグラスに回収するまでを実際に行う。パラフィンブロックを均一の厚さで薄切することが特に難しく、熟練を有するらしい。現在、組織標本作製には自動包埋装置や自動薄切装置などによる自動化がすすんでいるが、固定液の選定や管理、染色手技や染色法の選定など、技術職員の経験や技術がなくてはならないことが良く分かった。



写真-1 阿比留技術専門員による講義

講義 2

「病理診断と人工知能」

解剖センター 准教授 吉澤 明彦

最近、人工知能 (AI) による画像解析によりホクロと悪性黒色腫（癌）とを区別できるかという論文が海外のトップジャーナルに発表され話題となったそうである。AI とは、人間の脳内で行っている知的な作業をコンピューターで模倣をしたソフトウェア・システムである。ディープラーニングというヒトが AI に正しい情報を学習させることにより、AI が自分で考えて再現性の高い結果をだせるようになるそうである。AI の大きな特徴は、ヒトが学習させた作業については、毎回、忠実に実行をすることができ、ヒトと違い疲れないことである。例えば、患者の細胞が正常か異常な癌なのかを判断する場合、スライドグラスに乗った細胞を

顕微鏡でヒトが目みて判断を行うが、個々の経験や知識に依存しており、人によって判断が異なることが多いそうである。そこで、海外では AI の画像解析処理技術を用いて正常な細胞か癌の検知を AI に処理させることによりヒトの曖昧さや疲れによる誤差を少なくしようという研究が行われているそうである。現在、日本国内では病理医の減少と高齢化による人手不足が問題となっているそうである。また、都心部に医者が集中し地方では不足している地域格差も深刻だそうである。経験豊富な病理医の経験や知識を AI に学習保存させることで医療技術や地域格差の解消が期待されている。従来、顕微鏡などで観察されていた病理標本スライドであるが、画像処理技術や通信技術の発達により全体画像をデジタル化することが可能となり、ネットワークに繋がれば誰でもモニターを通じて様々な倍率で観察することができるバーチャルスライドも普及してきている。

AI に病理診断をさせるためには、ヒトが画像の分類、病変の場所、病変の性質など膨大な量のデータを順番にディープラーニングにより学習させていく必要がある。しかし、病理標本で行われている基本的な HE 染色であっても大学や検査機関によって仕上がりにバラツキがあるので、スライドごとに AI による判定にもバラツキがみられるそうである。この様な問題も、ヒトが一つずつタスクを AI へ学習させながら解決を行っていくことが必要となるそうである。医療というのはヒトの命に関わることなので責任、総合的に判断することが求められる。しかし、AI が出した判断に対し AI 自身は責任を取れないので AI だけで医療を支えて行くのは難しいのでは無いかと思われる。今後、AI をどのように活用していくのか、管理するヒトの存在が重要で有り、まだまだ多くの課題が残っているという印象を受けた。



写真-2 吉澤准教授による講義

講義 3

「共同利用施設としての電子顕微鏡室の紹介及びアレイトモグラフィー法から得られる最先端データ（三次元再構築法について）」

技術専門職員 古田 敬子

本講義では、超微細構造研究支援（電子顕微鏡室）の業務について説明があった。ここでは、電子顕微鏡用組織標本の作製後、電子顕微鏡にて観察するといった研究支援が行われている。部局を問わず利用することができる共同利用施設であり、未経験者でも使用することが可能である。電子顕微鏡は分解能が非常に高く、光学顕微鏡では見ることができない細胞内の超微細構造を観察することができる。電子顕微鏡には透過型（TEM）と走査型（SEM）の二種類がある。TEM はサンプル内部を、SEM はサンプル表面を観察することができる。この事を利用して細胞小器官（ゴルジ装置・小胞体）・ウイルスなどの構造解明に利用されてきた。TEM サンプル作製は作業工程が多いため、持ち込みから観察ができるまで最低で 7 日～10 日間を要する。また、切片の厚みを 60～70 ナノメートルと非常に薄く切り出す必要があり、極めて高度な技術が求められる。ノーベル賞を受賞された大隅博士の研究「オートファジーの仕組みの解明」でも電子顕微鏡が重要な役割を果たしたことから、生命科学の研究には超微細構造の形態学が必要不可欠であり、電子顕微鏡への注目が増している。学内においても電子顕微鏡の需要は高く、年々利用者も増加しているようである。しかしながら、学内には電子顕微鏡が利用できる施設が希少な事もあり、利用の過密化、さらに現有機器の老朽化により故障が頻発しており研究成果の生産性に大きな影響が生じ、利用者の予約待ちの状態が続いているのが現状である。2019 年度全学経費で TEM、SEM 及びウルトラマイクロトームの更新が決定



写真-3 古田技術専門職員による講義

したが、今後、新規電子顕微鏡の立ち上げによるサンプル依頼の増加が予想され、また、サンプル作製には経験に基づく知識や技術継承など、今以上に人員不足が深刻化することが懸案事項である。この電子顕微鏡室は、京都大学にとって、注目度も高く貴重な共同利用施設であると思われた。

講義 4

「免疫染色について（原理と役割）」

技術専門職員 國領 久美子

本講義では、免疫染色について原理と役割について紹介があった。最初に、組織染色は組織の構造を可視化することが目的あり、①全体像の把握、②組織や細胞の構造や性質、分泌物・細菌などを染め分ける、③目的とする特定タンパクだけを染め出すという流れで行われる。具体的には、①細胞の核を濃紫色、細胞質を赤色に染めて組織の基本的な全体像の把握するヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、②特定の染色液で組織や物質等を特異的に染め分け、組織の形態や構造を観察する特殊染色、③抗原抗体反応を利用し、特定タンパクのみを染め出し、病因特定や診断補助に活用される免疫染色に分けられる。免疫染色は染色操作が簡便であるうえ、抗体の種類が非常に豊富で、多様な発色方法による2種類以上の抗体での多重染色も可能である。抗原・抗体の性質や特徴の習熟が必要であるが、非常に特異性の高い染色であり、腫瘍の分類、悪性度や予後の推定、特定のウイルス・細菌の検索など病理診断検査に必要不可欠である。近年、多数の癌遺伝子の発見で、特定タンパクの過剰発現が癌化につながることが明らかとなってきており、この特定異常タンパクを狙い撃ちして癌化を抑える分子標的療法や免疫療法などの癌治療にも免疫染色が応用されてきている。今後、さらに抗体数が増加することが予想され、それに伴う分子標的治療法の適応拡大など免疫染色の応用範囲拡大が期待される。



写真-4 國領技術専門職員による講義

4. 実習及び施設見学

各班3～4名に分かれマイクロトームによる薄切を体験した。予めマウスの肝臓、心臓、腎臓のパラフィンプロックが用意されていた。今回の実習では、①粗削りを行いブロックとブレードの高さを合わせる、②ブレードの面を変えて3マイクロメートルに薄切を行う、③切片を水面上でしわを伸ばしスライドグラスに乗せるという工程までを体験した。マイクロトームは非常に鋭利なブレードを使用するので、怪我がないように説明を受けた。

初めて薄切を行う受講者にとって均等な厚さで薄切を行う事は難しい作業であったと思う。うまく切れた場合、パラフィンの屑で掬い取って、水をはったバットに浮かせるのだが、ちぎれてしまったり、水面でしわが伸びなかったりなかなか難しい作業の連続であった。スライドグラスに回収できた切片は、解剖センターのスタッフによってHE染色が行われた。染色が終わるまでの約1時間、電子顕微鏡室と法医解剖室を2班に分かれて順番に見学を行った。

電子顕微鏡室ではサンプルの作製方法について説明を受けた。サンプルの作製方法は透過型、走査型で異なるが、作業工程が多く、最短で7～10日間の作業時間がかかり、サンプル作製から観察までの大変さがうかがえた。

次にCT室、解剖室と法医討議室の見学に移った。CT室は地下の機械などが設置されている区画に新たに設置されていた。CT室の次は解剖室、法医討議室へと移った。ドラマで見るよう



写真-5 薄切実習の様様

な薄暗い感じはなく、明るくきれいな部屋だった。また、解剖室と見学室とはガラスで完全に仕切られており、臭いはもちろん防音対策もとっているため会話はマイクを用いておこなっている。見学室は学部学生や検察官、警察官が解剖を学ぶために利用している。法医討議室と、CT 室、解剖室とはそれぞれオンラインになっており、法医討議室や解剖室で CT 画像などから死因の検討ができるようになっていた。

施設見学の後、自分で薄切をしたスライドと予め用意された見本のスライド、心筋梗塞など 3 種類の疾患の標本が用意されていた。見本のスライドの観察は、モニターに映し出された画像を頼りに顕微鏡で観察を行うというものであった。慣れない



写真-6 顕微鏡実習の様様

顕微鏡操作や標本全体から特定の領域を探し出すのはなかなか骨の折れる作業であった。途中、阿比留さんより疾患標本観察のポイントや自分たちの切片について解説があり非常に分かりやすかった。

5. 終わりに

本研修は、総合解剖センターの協力のもとで行われた研修であり、忙しい業務の中、研修の準備、当日の案内をしていただき大変感謝いたします。技術職員と教員による講義により、解剖センターの研究支援の概要の他、病理組織標本の作製と病理学的所見、AI を用いた病理診断など最新の検査法について学んだ。実習では、実際に動物の組織から薄切を行い、顕微鏡観察を行い正常組織や疾患による組織変化について学んだ。

本研修では、病理標本を用いて細胞や組織について学ぶことで改めて疾患の成り立ちを理解することができた。普段ではほとんど立ち入ることのできない、解剖室を見学できたことは大学の技術職員だからこそできた見学あり、代えがたい経験であった。業務の経験、苦労話は共感するものも多かった。実習で行ったミクロトームを使つての切片作製は、その難しさを実感するとともに技術職員に求められている技術の高さ、個々のスキル向上意識が職場環境を向上させることに重要であることを改めて気付かされて大変意義のある研修であった。



写真-7 研修参加者の集合写真

6. 京都大学技術職員研修（第4専門技術群：生物・生態系）受講者名簿

No	所 属	氏 名	所属専門技術群	その他
1	人間・環境学研究科	大野 理沙	第4専門技術群	
2	ウイルス・再生科学研究所	俣野 真帆	第4専門技術群	
3	農学研究科附属農場	野中 勝利	第4専門技術群	
4	ウイルス・再生科学研究所	吉田 暖	第4専門技術群	
5	医学研究科附属動物実験施設	山根 知恵美	第4専門技術群	
6	農学研究科附属農場	小西 剛	第4専門技術群	世話人
7	生存圏研究所	反町 始	第4専門技術群	世話人
8	ウイルス・再生科学研究所	小中 さつき	第4専門技術群	
9	農学研究科附属農場	岡本 憲茂	第4専門技術群	世話人
10	医学研究科附属動物実験施設	中西 聡	第4専門技術群	世話人
11	理学研究科	高谷 真樹	第3専門技術群	
12	生態学研究センター	松本 明	第4専門技術群	世話人
13	医学研究科総合解剖センター	阿比留 仁	第4専門技術群	講師
14	医学研究科総合解剖センター	國領 久美子	第4専門技術群	講師
15	医学研究科総合解剖センター	古田 敬子	第4専門技術群	講師