

## 医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室の紹介と心臓移植時代の 電子顕微鏡を用いた心筋超微形態観察の有用性

地家豊治<sup>1)</sup>, 大矢俊之<sup>2)</sup>, 加藤真帆人<sup>2)</sup>, 高山忠輝<sup>2)</sup>, 廣 高史<sup>2)</sup>,  
楠美嘉晃<sup>3)</sup>, 山田 勉<sup>4)</sup>, 石井敬基<sup>1)</sup>, 杉谷雅彦<sup>1,5)</sup>, 平山篤志<sup>2)</sup>

### Introduction to Electron Microscopy Laboratory, Morphological Section of Research Institute of Medical Research Support Center, and The Usability of Ultrastructural Morphometrical Study using Endomyocardial Biopsy in the Era of Heart Transplantation

Toyoharu JIKE<sup>1)</sup>, Toshiyuki OHYA<sup>2)</sup>, Mahoto KATO<sup>2)</sup>, Tadateru TAKAYAMA<sup>2)</sup>,  
Takafumi HIRO<sup>2)</sup>, Yoshiaki KUSUMI<sup>3)</sup>, Tsutomu YAMADA<sup>4)</sup>, Yukimoto ISHII<sup>1)</sup>,  
Masahiko SUGITANI<sup>1,5)</sup>, Atsushi HIRAYAMA<sup>2)</sup>

#### 1. 電子顕微鏡室の紹介

医学研究支援部門 形態系 電子顕微鏡室では、形態学的観点から、電子顕微鏡および全自動免疫染色装置を用いた研究支援を行っている。当室に設置されている電子顕微鏡関係の機器は、透過電子顕微鏡2台、走査電子顕微鏡1台、それらの試料作製を行うための周辺機器、更に2011年にはin situ Hybridizationと免疫染色が全自動で施行可能なベンタナXTシステム ディスカバリーが導入されている。

透過電子顕微鏡は日本電子のJEM-1200EXおよびJEM-1200EX IIの二台が設置され、通常観察倍率は800～60万倍である。走査電子顕微鏡は日立S-4000が設置され、観察倍率は25～30万倍である。電子顕微鏡を用いた超微形態観察においては観察対象組織・細胞の試料作製が肝要で、特に組織・細胞の固定法については観察目的にそった固定を選択しなければ正確な所見は得られない。当室にて電子顕微鏡観察を行う際、試料の種類・観察対象や目的を担当者にお知らせいただければ、最適な試料作製法・固定液の選択や以降の実験研究過程に於ける様々な示唆を提供している。ただ、当室の電子顕微

鏡は1990年前後に購入され、撮影記録媒体が銀塩フィルムを用いており、いまだにデジタル化がなされておらず、経年からメーカーにおいてもすでに修理対象外となっている。機器の老朽化は否めないが、試料作製の確かな技術・経験を活かし「より正確な観察」を施行し、できうる限りの研究支援を行っている。

ベンタナXTシステム ディスカバリーはin situ Hybridizationや免疫染色などをランダムアクセスで処理できる全自動染色システムで、研究用に開発された機器である。脱パラフィン、熱処理・酵素処理などの賦活化からプローブ添加、変性、ハイブリダイゼーション、洗浄、発色、対比染色までの一連の工程を自動処理可能で、反応温度も個別に設定でき、30種類の異なる条件を同時に処理できる。そのため、非常に手間と時間のかかる反応条件の検索も一度の処理で行える。FISHはもちろんTUNEL法や免疫染色も自動化、DNAチップなどのハイブリダイゼーションにも応用可能である。受け付けた免疫染色に関しては病理医の指導の下、適切に施行している。

1) 日本大学医学部 総合医学研究所 医学研究支援部門  
2) 同 内科学系 循環器内科学分野  
3) 病態病理学系 腫瘍病理学分野  
4) 同 人体病理学分野  
5) 同 形態機能病理学分野  
地家豊治: jike.toyoharu@nihon-u.ac.jp

本稿では当電子顕微鏡室を頻繁に利用している循環器内科学分野（大矢俊之）による研究を次に紹介する。

## 2. 電子顕微鏡を用いた心筋超微形態観察の有用性

重症心不全治療において2010年代は飛躍の年であった。世界的には標準的治療であった心臓移植は1999年に本邦に於いて再開されたものの移植件数は年に数人であった。しかし、2010年臓器移植法改正後、心臓ドナー数は急激に増加（図1）、心臓移植は「ごく一部の患者が行う治療法」から「誰もが適応を考えうる治療選択肢の一つ」へと変わった。また、2011年には植え込み型人工心臓という新たなデバイスが認可され、重症心不全の治療にさらなる選択肢が広がった。日本大学医学部附属板橋病院も2013年9月より植え込み型人工心臓移植の認定施設となり、重症心不全患者の希望となりつつある。しかし、心臓に関してはドナー数が増えたとはいえ未だ需要に対する供給数は十分とはいえず、数多いレシピエントの中から心臓移植の適応を決定し選定をする必要がある。その際「検討患者の不全心臓は本当に不可逆的な変化が起きているのか？」という命題に対して客観的なDataを提示することは移植優先順位選定に大きな影響を与える。

心不全心筋の病態病理を把握するためには心臓超

音波、心臓MRIなど様々な検査方法があるものの、決定的な心筋の不可逆性変化は光学顕微鏡・電子顕微鏡による組織形態の観察で得られると考えられている。しかし、電子顕微鏡を用いた心筋評価には高度なシステムが必要であるにもかかわらず、長い期間心臓移植が困難な時代が続いたため、検査システムの破綻した施設は多く、現時点で心筋の超微形態を評価できる施設は全国的にも数少なくなってしまった。

そこで、我々は2010年より動物及びヒト心筋の超微形態学的な評価を可能にするため、大阪国立循環器病センター、大分医大、北里大学、大阪大学、国立国際医療センターの諸先生方に御指導を受けながらシステムの構築と研究を進めている。動物を用いた心筋細胞の基礎Dataの蓄積（図2, 3）はもとより、現在では年間40-50件、延べ164名の心筋生検検体が電子顕微鏡標本に作製され、その全ての検体を、循環器医、小児医、病理医が集まり心筋生検臨床病理カンファレンスとして定期的に評価している（図4, 5）。

これにより得られた結果を基に、心臓移植検討委員会での移植適応判断のDataとして、また、重症心不全患者の診断における特定心筋疾患の鑑別を行い、ミトコンドリア心筋症、アミロイドーシス、巨細胞性心筋炎、Fabry病などを検出している。また、

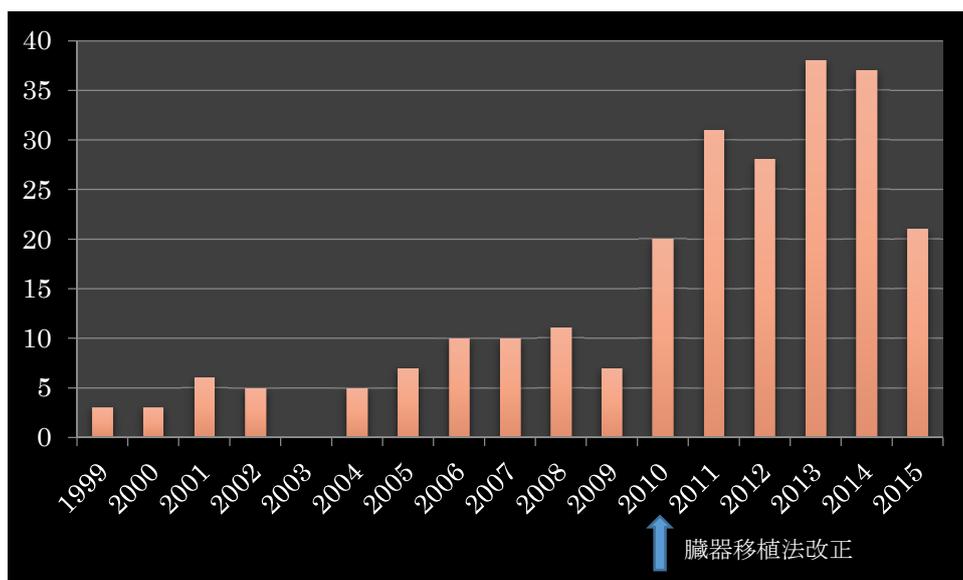


図1 我が国における心臓移植件数

矢印：2010年臓器移植法改正。2010年度は改正後の件数、2015年は6月までの半年間の件数。（公社）日本臓器移植ネットワーク <https://www.jotnw.or.jp> 資料より作成。

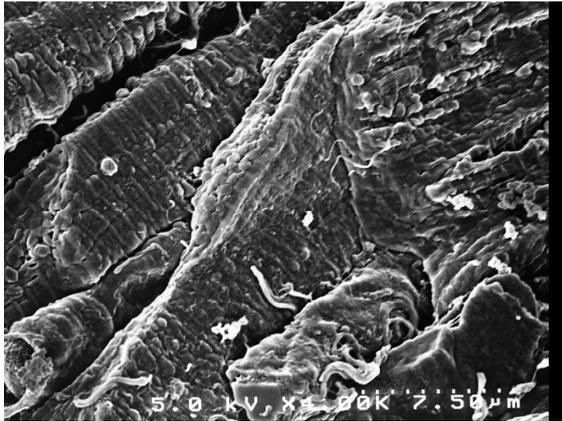


図2 モルモット心筋像 (SEM HITACHI S4000)  
モルモット心筋走査型電子顕微鏡 (SEM) 像。凍結判断法により得られた心筋をSEMを用いて撮像した。走行する心筋細胞を認める。

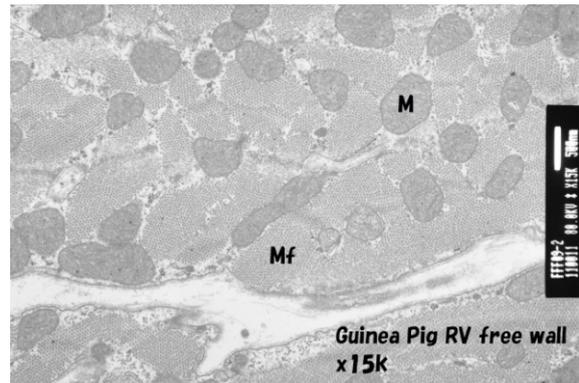


図3 モルモット心筋像 (TEM JOEL JEM-1200EX II)  
モルモット心筋透過型電子顕微鏡 (TEM) 像。モルモット右室筋をグルタルアルデヒド、オスミウムを用いて固定し超薄切後TEMを用いて撮像した。心筋細胞の横断面を示している。M：ミトコンドリア，Mf：筋原線維

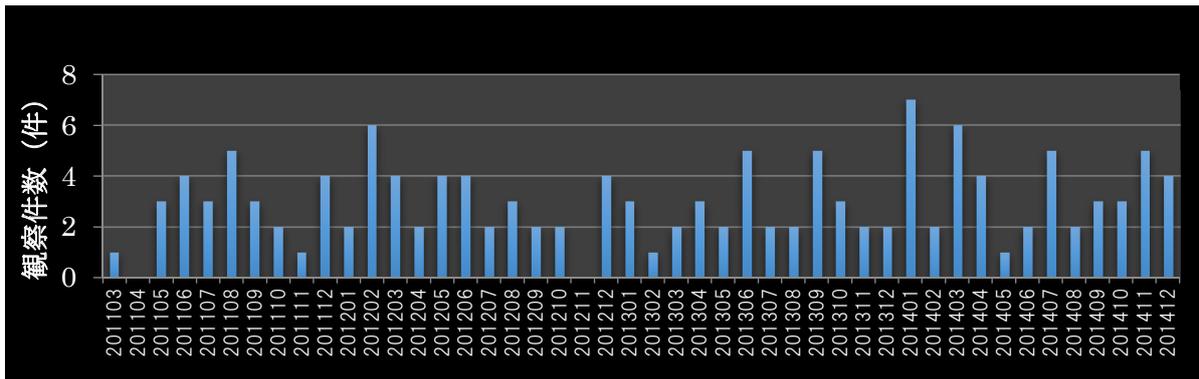


図4 日本大学医学部における心筋生検電子顕微鏡標本観察件数  
日本大学医学部付属板橋病院で行われた経皮的な心筋生検の内、電子顕微鏡標本を作製した件数。

表1 心筋生検関連発表

院内検討会	心臓移植検討委員会 (第1回～第6回) 心筋生検臨床病理カンファレンス (第1回～第17回)
学会発表	心筋生検研究会 (第34回, 第35回, 第36回, 第37回) 第46回日本臨床分子形態学会 第29回医学生物学電子顕微鏡技術学会 AECVP conference 2014 日本大学例会 (第510回) 他 症例発表
研究会発表	東京心臓病理フォーラム (第9, 10, 11, 12回) 他

その際検討された新たな知見を国内外に発信している。(表1)

**結語**

電子顕微鏡を用いた動物およびヒト心筋細胞の観察システムを開発した。基礎・臨床研究、心不全患者の鑑別診断、心臓移植検討の資料として有用であった。

**謝辞**

未経験の状態から電子顕微鏡技術につき懇切丁寧にご指導いただきました宮澤七郎先生、島田達生先生、根本典子先生、植田初江先生、廣江道昭先生に感謝致します。また、心筋生検を施行していただいた内科学系循環器内科の諸先生方、循環器・小児科の病棟医の先生方、病理部の関係者の方々、また、カンファレンスに御参加いただき貴重な御意見を賜りました先生方に感謝の意を表します。

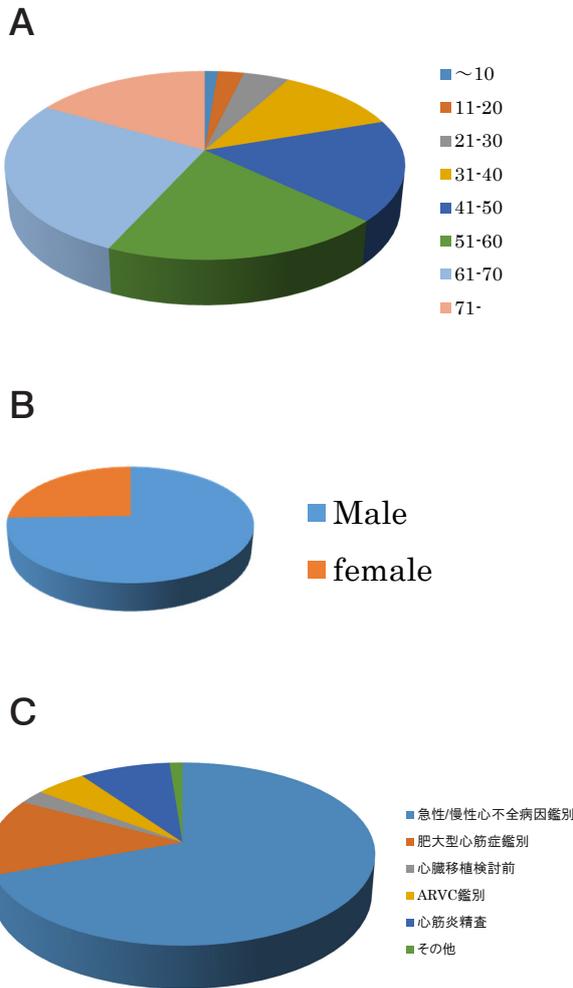


図5 日本大学医学部附属板橋病院における心筋生検電子顕微鏡標本作製患者年齢・性別構成 (2011/3-2015/5)

日本大学医学部附属板橋病院で行われた心筋生検うち、電子顕微鏡標本作製した症例。A) 患者年齢構成, B) 男女比, C) 依頼目的