

# 硬組織の未固定非脱灰凍結切片作成の紹介

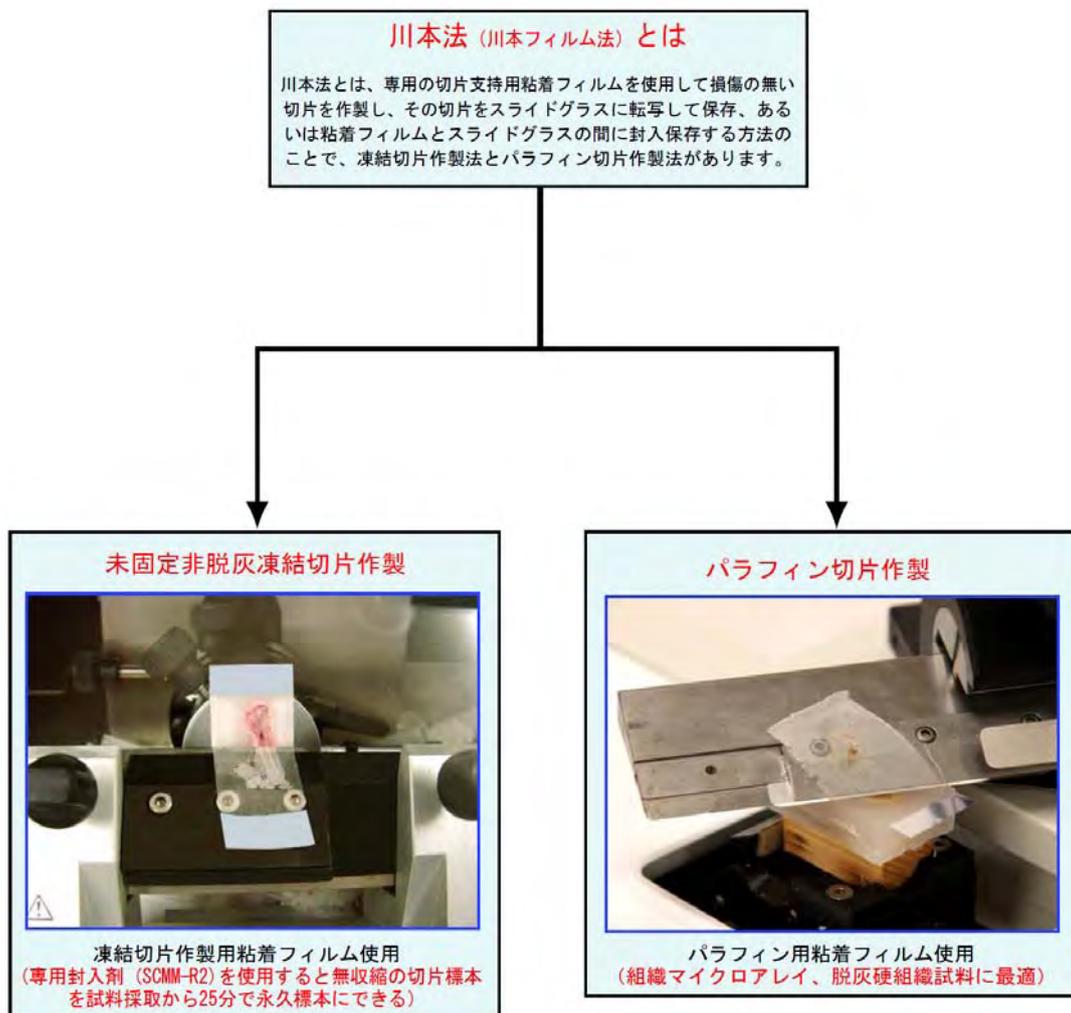
○安井正佐也<sup>A)</sup>、正岡 実<sup>A)</sup>、高木 佐知子<sup>A)</sup>、程 晶磊<sup>A)</sup>

<sup>A)</sup> 医学系技術支援室 第1技術班

## 概要

従来より、骨や歯などの硬組織の組織標本作成には、組織をホルマリン固定したのち脱灰という操作によって、カルシウム塩の結晶を溶出させて軟化することで薄切を容易にする技法が使われてきた。しかし、脱灰や組織の過剰な固定は、免疫染色を目的とする場合、抗原性を失活させることが問題とされている。また、骨、皮膚、筋肉を一様に観察したい場合、その形態を温存して薄切するのは非常に困難であり、熟練した高度な技術を要する。

今回紹介する川本法は、従来の方法では作製困難な試料でも粘着フィルムを使用することで、未固定非脱灰の硬組織を簡便にしかも形状が保持された凍結切片を作成できるという優れた技法である。これにより従来から問題とされてきた免疫性の維持のみならず、標本完成までの時間短縮が可能となり、さらに特別な習得訓練を必要としないため誰でも簡単に標本が作成できる。今回、開発者である鶴見大学歯学部 RI 研究センター川本忠文先生の許可を頂いたので、その方法を紹介する。



# 1 材料と方法

## 1.1 凍結包埋

- ① 試料を「試料凍結用ステンレス製カゴ」に載せて冷却剤中に入れ、カゴを動かしながら急速凍結する（図1）。

注意1：ヘキサンドライアイスを使用する場合、冷却剤の温度上昇を避けるために500ml以上のヘキサンを準備する。

注意2：氷晶による組織の損傷が著しい場合、液体窒素で冷却した下記の冷却剤を使用する。

	沸点	融点
n-Hexane	64°C	-94°C
Pentane	36°C	-130°C
Isopentane	28°C	-160°C
Propane	-45°C	-190°C

- ② 包埋容器に専用包埋剤を入れ、包埋剤を少し凍結する（図2右）。

注意1：冷蔵庫で冷却した包埋剤を使用する。

- ③ 凍結試料表面の冷却剤を拭き取り、凍結試料を包埋剤中に入れる。

注意1：包埋容器の下側が薄切面になる。

- ④ 直ちに包埋容器全体を冷却ヘキサン中に沈め、包埋容器を動かして凍結する（図3A）。

注意1：③、④の操作は、凍結試料の解凍を避けるために迅速に行う。

- ⑤ 包埋剤上部の凍結が始まった時（約10秒）に、包埋剤の上面を冷却剤の液面上まで引き上げ、その状態で包埋剤を完全に凍結する（図3B）。

注意1：沈めた状態で凍結すると包埋ブロックにクラックが発生する。

- ⑥ 包埋剤の凍結後、包埋容器を「凍結包埋ブロック取出台」に置き、木槌で凍結包埋ブロックを押し出す（図4）。

- ⑦ 凍結包埋ブロックの接着側を試料ホルダーに強く押しつけ、表面を少し解凍させて試料ホルダーに接着する（図5）。

- ⑧ 試料ホルダーを冷却剤中に入れて凍結包埋ブロックを試料ホルダーに凍結固定する（図5）。



図1 試料の凍結

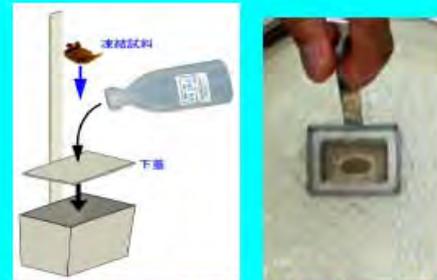


図2 試料の凍結包埋

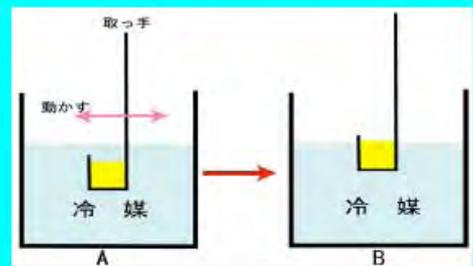


図3 包埋剤の凍結操作  
A：初期凍結、 B：完全凍結

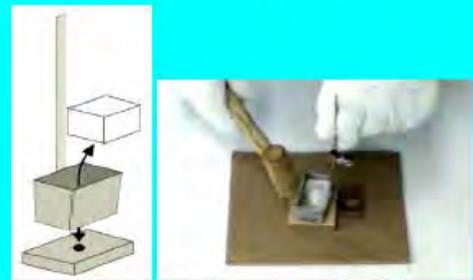


図4 凍結ブロックの取り出し  
A：凍結包埋試料取出し模式図  
B：凍結ブロック取出し操作

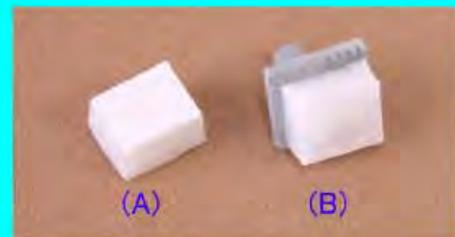


図5、凍結包埋ブロック  
A：凍結試料ブロック  
B：試料ホルダーに固定されたブロック

## 1.2 凍結薄切

- ① 凍結包埋ブロックを接着した試料ホルダーを凍結ミクロトームに取り付け、試料温度がクリオスタット内の温度に達するまで放置（20～30分）する。

注意1：試料に応じて、試料温度、クリオスタット内温度を調節する。

注意2：クリオスタット内の温度は、試料近傍を測定する。

- ② トリミング後、薄切面に粘着フィルムを貼付する（図1）。

注意1：厚さ 3～5 $\mu\text{m}$  で連続して切れることを確認してから切片採取作業に入る。

注意2：硬組織の薄切では、刃先の損傷を避けるために厚切りしない（5 $\mu\text{m}$  以下）。

- ③ 粘着フィルムを密着用具で薄切面に粘着した後、一定速度でゆっくりと薄切する（図2、3）。

注意1：硬組織の場合は、切削部を「切片押え用筆」で軽く押え、筆を左右に動かしながら一定速度で薄切する。

- ④ 凍結切片をクライオスタットから取り出し、解凍する（図4）。

注意1：解凍後の放置（乾燥）時間は、試料により決定する。動物組織では10～30秒程度、植物試料では60秒程度。

注意2：切片を完全に乾燥すると、組織により乾燥収縮によるクラックが現れる。

- ⑤ 切片面を下に向けて100%エタノール中に入れる。

注意1：アルコールを経ないで解凍切片を固定液に浸漬すると組織が剥離する可能性がある。

注意2：アルコールへの浸漬時間は、10～120秒程度とする。5時間以上になると、両端の非粘着域のテープが剥離する可能性がある。

- ⑥ 次いで、切片面を下に向けて固定液（4%PFA）に入れる。

注意1：固定時間は数分で十分である。

- ⑦ 水洗後、染色操作に移る。

注意1：未固定で免疫染色する場合、凍結乾燥切片を使用する。



図1 粘着フィルムの貼付



図2 粘着フィルムの密着



図3 凍結薄切



図4 切片の解凍



図5 切片の固定

### 1.3 染色・封入

- ① 切片面を上に向けて、粘着フィルムをスライドグラス上に置く。
- ② 切片上にヘマトキシリンを滴下し、90～120 秒間染色する (図 1)。
- ③ 流水中で約 5 分間の水洗後、エオジンで 10～20 秒間染色する (図 2)。
- ④ 水洗後 (10～30 秒間)、100%エタノールを切片面に滴下し、粘着剤に付着したエオジンを洗浄除去する (10～20 秒)。
- ⑤ 水洗後 (10～30 秒間)、H-E 染色用封入剤を切片面に滴下し、放置する (図 3 A)。

注意 1 : エタノール中への浸漬により白くなった粘着剤表面が透明になるまで放置する (約 2 分)。

注意 2 : H-E 以外は、30%グリセリンを使用する。

注意 3 : Super Crymounting Medium (R2) を使用すると永久標本にできる。

- ⑥ 粘着フィルムの切片側を、同封入剤を塗布したスライドグラスに密着する (図 3 B)。
- ⑦ 余剰の封入剤を濾紙で押し出しながら吸収除去する。  
注意 1 : 封入剤を除去し過ぎると乾燥中に切片に気泡が現れる場合がある。
- ⑧ 次いで、粘着フィルムの両端の不要な部位を切り取る (図 3 C 矢印)。
- ⑨ 切片の放置 (一昼夜以上) 後、切片はスライドグラスと粘着フィルム間にサンドイッチ状態で保存される (図 3 D)。

注意 1 : 硬組織封入に Super Crymounting Medium (R2) が適している。



図 1 染色

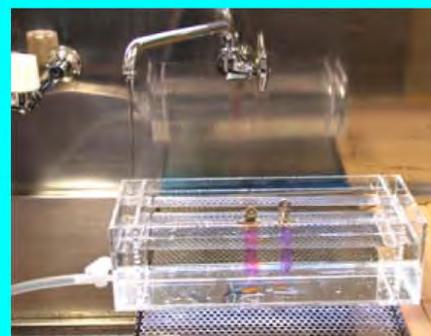


図 2 水洗

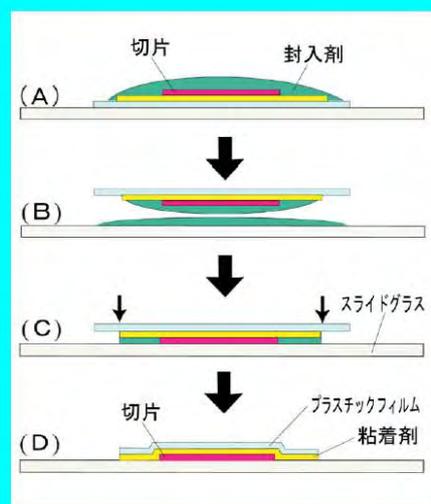
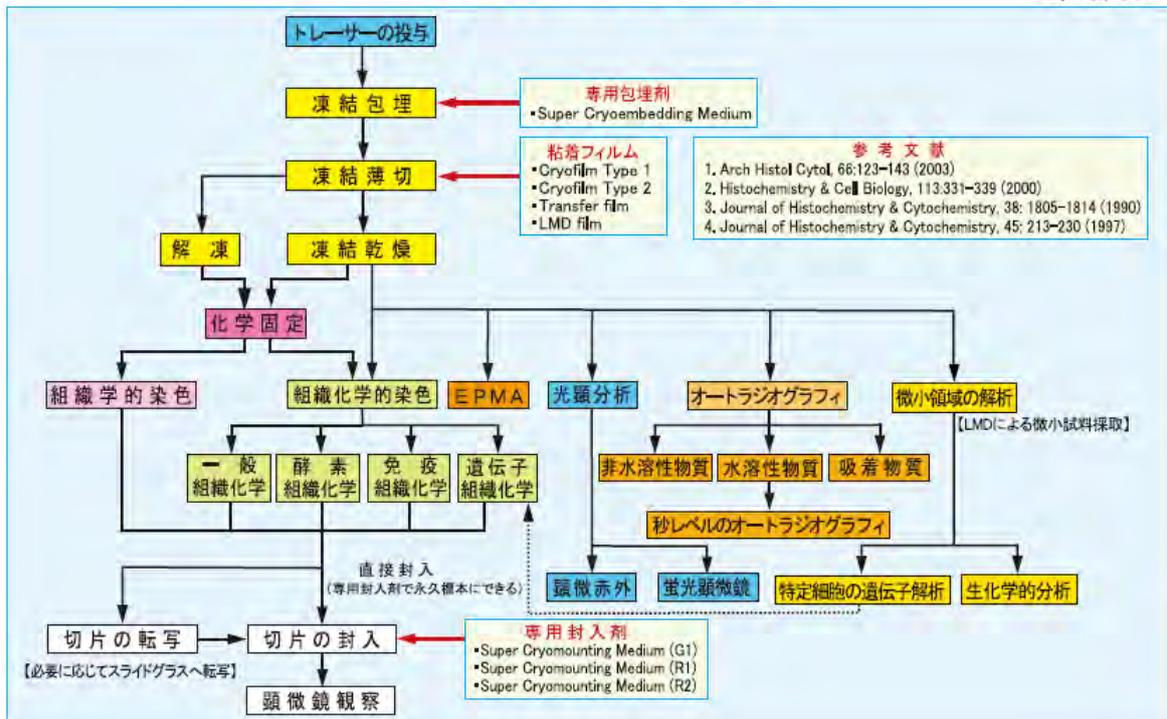


図 3 封入手順

## 2 応用

# 切片の応用

H19-9-4  
By 川本忠文



## 3 まとめ

本法は、従来の試料に加え、凍結切片の作製が困難な試料からも再現性よく、しかも形状が保持された凍結切片を作製するために開発実用化された。凍結切片は、専用の凍結切片支持用粘着フィルム（Cryofilm）を使って、切片の損傷を回避しながら作製でき、粘着フィルムに貼り付いた状態で染色が可能である。最終的に粘着フィルムとスライドガラスの間に封入保存できるという優れた方法である。以下にこの川本法の利点をまとめる。

- ① 硬組織、大きな試料から薄い凍結切片を作製できる。
- ② 組織成分が完全に保持されている。
- ③ 組織の形状が保たれている（収縮のない切片）。
- ④ 色々な試料から凍結切片を作製できる。
- ⑤ 切片を多目的に利用できる（切片の応用を参照）。
- ⑥ 未固定非脱灰切片を用いて酵素組織化学、免疫染色を行える。
- ⑦ 専用包埋剤を使用することにより切片を永久標本として保存できる。
- ⑧ 切片を粘着フィルムからスライドガラスに転写できる。
- ⑨ 試料採取から 30 分に永久標本を作製できる。
- ⑩ 切片を LMD 法に使用できる。
- ⑪ 特別な訓練や技術を必要としない。
- ⑫ 低ランニングコスト