

# 標本作製法の改善～低融点ゼラチンを活用して～

○牛田かおり<sup>A)</sup>、内山孝蔵<sup>A)</sup>

<sup>A)</sup> 医学系技術支援室 生物・生体技術系

## 概要

組織標本作製法の代表的な方法としてパラフィン標本があるが、目的によって有機溶媒の影響やパラフィンによる加熱を避けるためにマイクロスライサー標本や凍結標本が選択される場合がある。いずれの方法においてもマウス脳や胎児など軟らかく小さな組織を正確な方向・位置関係を保ちつつ標本作製することは難しい。従来から用いられているアガロースで固めてから切り出す方法は<sup>[1]</sup>、操作が手軽である一方①アガロースと組織が分離してしまう②融点が高いため組織への熱侵襲の影響が懸念される③手早い操作が必要ななどの問題点があった。これら問題点を解決するために、室温で液化し 4℃で固化し、ホルマリン固定後は室温に戻しても液化しない魚由来低融点ゼラチンでの予備包埋法等を試みることにした。<sup>[2]</sup>

## 1 低融点ゼラチンの特徴

表 1. 低融点ゼラチンの特徴

今回使用した低融点ゼラチンの特徴を表 1 に示す。セラピア、イトヨリダイの鱗などを原料とし、試薬としてだけでなく製薬用、またハラルフードとしても各社より販売されている。

名称	低融点ゼラチン	通常のゼラチン
溶解性	常温水可溶 (20℃以上)	加熱溶解 (60℃)
融点 (2%濃度)	約 16℃	約 22℃
凝固点 (2%濃度)	約 8℃	約 12℃

## 2 各種利用方法

### 2.1 パラフィン標本

#### 【方法】

融点が高く、組織と馴染みの悪いアガロースを扱いやすくするために、予め低融点ゼラチンを混合する。混合比は検討の結果、室温で直ちに固まらず、ゼラチンの染色性を最小限に抑えることのできる最適比を 0.5% アガロース : 5% 低融点ゼラチン(Nippi 社製 Max-f) = 4 : 1 とした。

この混合液を用いて予備包埋・冷却後、冷ホルマリン液で再固定し通常通りパラフィンブロックを作製した。

#### 【結果】

この混合液は室温での操作が可能であり、固めた後も組織との馴染みがよく操作性が良かった。マウス下垂体や胎児など小さく脆弱な組織を予備包埋することによってピンセットなどで損傷することなく正しい方向でのブロック作製が可能だった。(図 1.) また、血管や腸管、皮膚など不安定な形態の組織を複数個所同時に包埋することで厚さなど条件のそろった標本作製することができた。(図 2.)

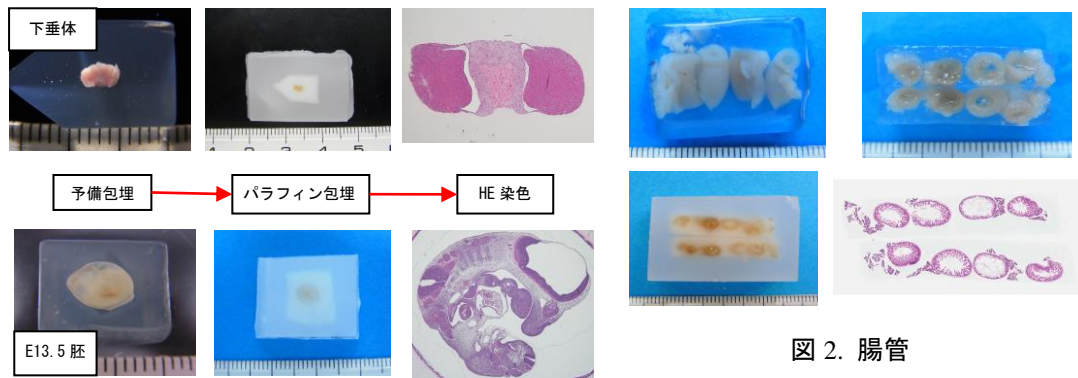


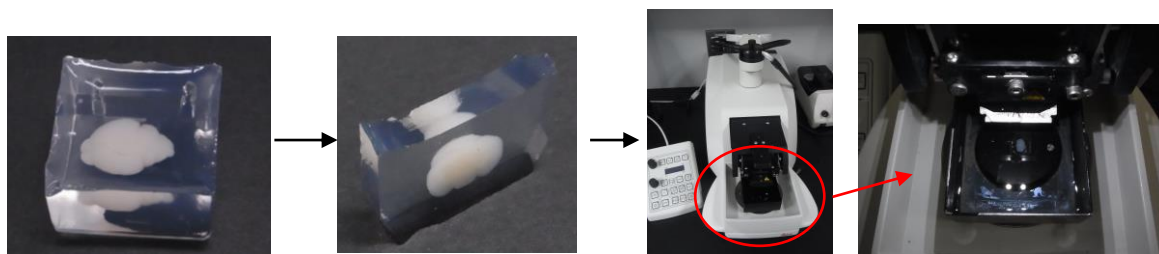
図 1. マウス下垂体・E13.5 胚

図 2. 腸管

## 2.2 マイクロスライサー標本

### 【方法】

図 3. の要領でマイクロスライサー切片を作製する。



①5%程度に溶解した低融点ゼラチンを用いて組織を包埋し冷やし固める

②冷ホルマリン液で固定後、目的の方向でトリミングする。

③マイクロスライサー（振動刃マイクロトーム：Leica 社製 VT1200S）にて 50～150  $\mu\text{m}$  に薄切する。

図 3. マイクロスライサー標本作製法

### 【結果】

通常用いられるアガロースで組織を包埋後作製した時アガロースが組織と離れてしまい切片がバラバラになってしまうことがあるが、ゼラチンを使用することにより組織と密着し、一枚のシート状となり肺や胎児の観察も容易となった。（図 4.）

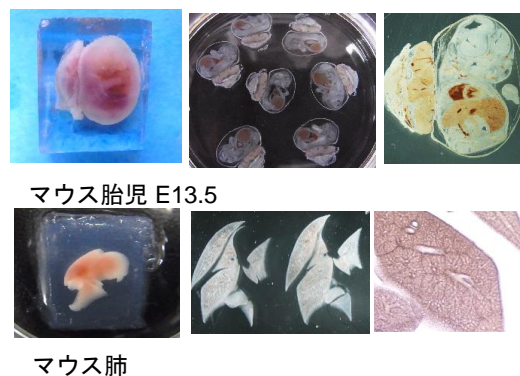


図 4. マイクロスライサー切片

## 2.1 凍結標本

### 【方法】

マイクロスライサーサンプル同様に包埋し、冷やし固めた後凍結包埋剤を用いて凍結ブロックを作製しクライオスタット（Leica 社製 CM3050SIV）にて凍結切片を作製する。また、予め既存の凍結包埋剤と混合して使用する。

## 【結果】

凍結標本作製時、低融点ゼラチンで予備包埋を行うことや、既存の凍結包埋剤に加えることによって切片の強度が増し、しわや破れが少なく剥がれにくくなることから様々な組織の凍結切片の切削性が改善された。(図 5. 6)

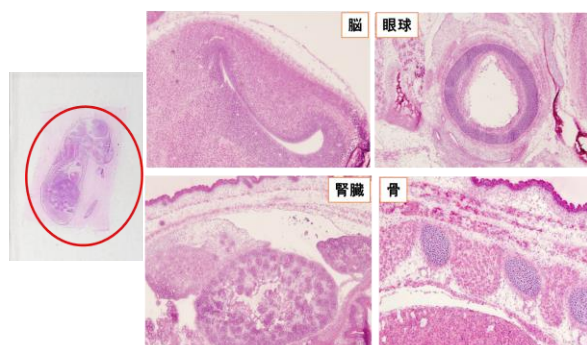


図 5. マウス胎児凍結 HE 標本

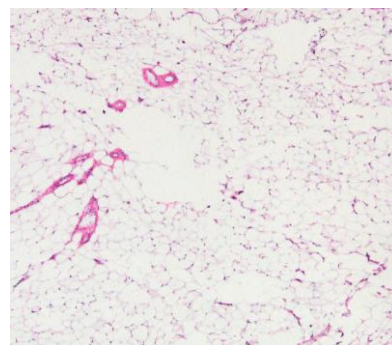


図 6. メタボラット脂肪組織

浮遊細胞や脆弱な組織の形態も保持しながら凍結切片を作製することも可能となった。<sup>[3]</sup> (図 7.)

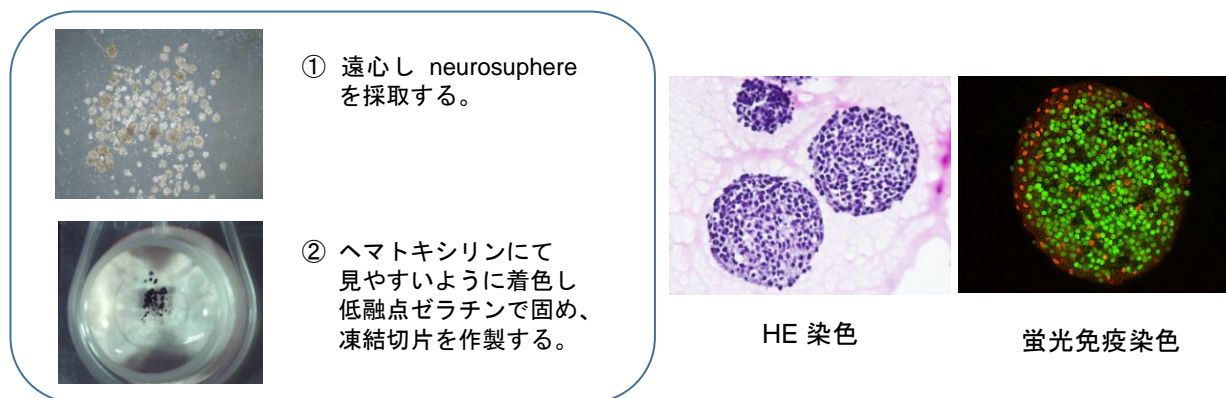


図 7. neurosphere 凍結切片 IHC

## 2.3 血管造影標本

### 【方法】

マウス左心室から PBS を環流し血液を洗い流す。続いて、血管壁から漏れ出さないよう Dextran を結合させた FITC-Dextran を 1mg/ml に添加した低融点ゼラチンを環流・置換し、4℃に冷却してゼラチンを固めた後冷ホルマリン液で組織と血管内ゼラチンを固定する。その後、マイクロスライサー切片を作製するなどして蛍光顕微鏡にて観察した。

### 【結果】

低融点ゼラチンは加熱の必要がなく粘度が低いため、簡便に組織の隅々まで蛍光色素加ゼラチンを行き渡らせることができた。また、ゼラチンが血管内で固定されるため薄切後 SeeDB にて透明化しても血管断面から抜け落ちることなく蛍光顕微鏡観察が可能となった。(図 8.)

切片浮遊法による免疫染色も可能であり、細胞と血管の関係性を検索することができた。(図 9.)

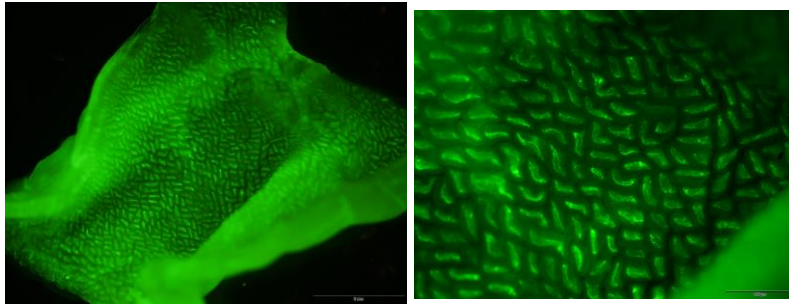


図 8. マウス腸管・絨毛

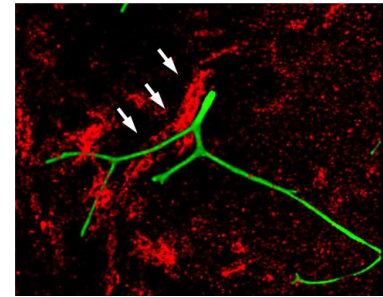


図 9. 蛍光免疫染色  
+FITC-Dextran 加ゼラチン血管造影

### 3 まとめ

以上の結果より、魚由来低融点ゼラチンは熱侵襲なく包埋剤として各種標本作製法に応用することができ、作製が困難だった組織や細胞の標本作製を簡便に行うことが可能となった。今後、研究施設や医療現場において役立つよう、操作方法を確立し実用化に向けて検討を重ねていく。<sup>[4]</sup>

### 参考文献

- [1] Elliot, M.D., and Moores, B.D. (1975) A Method for the Preparation of Histological Sections on Bone Marrow Aspirates : Med. Lab. Tech. 32:105
- [2] 牛田かおり (2014) 室温にて液化し 4℃で固化する超低融点ゼラチンの組織標本作製への応用 生理学技術研究会報告 第 36 号 : 66 - 69
- [3] 波多野礼香 (2015) MYCN-Tg マウスにおける神経芽腫発生初期イベントの特定 : 名古屋大学学位論文 公開発表会
- [4] 牛田かおり、浅井直也、高橋雅英 (2015) 標本作製用包埋剤、硬化性基材非浸透標本の作製方法、硬化性基材浸透標本の作製方法、硬化性基材非浸透標本、凍結包埋剤の薄切性改善剤、及び凍結包埋剤 : 国際特許出願 PCT/JP2015/068402