

# Overview

## 非脱灰凍結骨組織標本の可能性 組織化学への応用と最新知見

鶴見大学講師 歯学部  
R I 研究センター  
川本忠文

### はじめに

従来の硬組織非脱灰切片標本は、樹脂包埋試料を硬組織切断装置で数十ミクロンに切断して目的の厚さまで研磨するか、マイクロームで切削することにより作製される。それらの方法では、切片標本作製に長時間（数日以上）を要し、しかも作製された切片は樹脂包埋されているために染色に限られ、特に酵素組織化学、免疫染色、in situ hybridization への応用はできなかった。

そのような問題を解決するために著者が開発した非脱灰硬組織凍結切片作製法<sup>1)</sup>について、2004年に「非脱灰骨組織の凍結切片作製法」とのタイトルで本誌に技術紹介を行った<sup>2)</sup>。その方法は、使用直前に凍結切片作製用粘着剤(Cryogluue)とサランラップで切片支持用粘着フィルムを作製し、それを薄切面に貼付し、次いで試料を切削して粘着フィルムに貼り付いた状態で凍結切片を採取する。染色は、切片が粘着フィルムに貼り付いた状態でを行い、切片はスライドガラスと粘着フィルムの間で水溶性封入剤(グリセリン等)で保存される。その方法により、厚さ2 μmの硬組織凍結切片を作製できるようになり、未固定非脱灰切片標本を用いた研究(特に酵素組織化学や免疫染色)への道が開かれた<sup>3)</sup>。

しかしルーチン作業や病理分野で使用するには幾つかの問題点があった。例えば、切片支持材として用いたサランラップの耐熱性が低いために加熱処理ができず、in situ hybridization や免疫染色での抗原性賦活化処理ができない。切片をキシレンやアセトンに浸漬すると、切片が粘着フィルムから剥離する。グリセリンによる切片封入は、屈折率の関係で

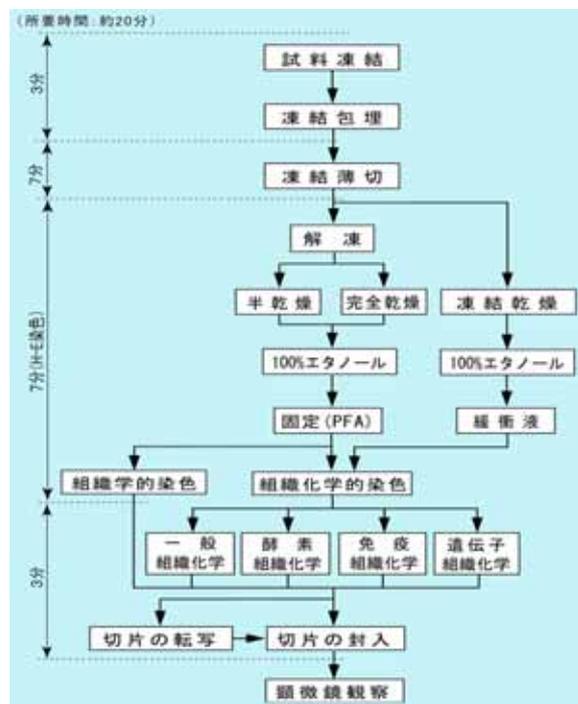


図1 凍結切片標本作製手順  
H-E染色、トルイジンプルー染色では、試料採取後20分で永久切片標本ができる<sup>4)</sup>。

高倍率での硬組織観察に適さない。切片保存中に水溶性色素が拡散する、などがあった。

前回の技術紹介後、本手法(図1)をルーチン作業に導入するために、包埋材、粘着フィルム(図2)封入剤(図3)等を新たに開発し、それらの問題を解決した。さらに最新材料を使用することにより、硬組織と軟組織が混在した試料、大きな試料等から、試料採取後20分で変形や収縮のない永久切片標本を

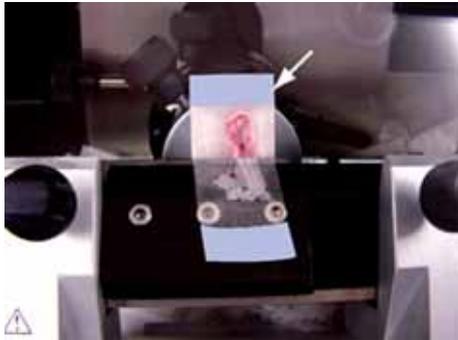


図2 クライオフィルムを用いた凍結薄切  
成熟ラット大腿骨(厚さ4 $\mu$ m)、矢印がク  
ライオフィルム。

作製できるようになり、研究室や臨床病理のルーチンワークで使用できるようになった。

本法による硬組織切片標本作製手順は、基本的に前回の技術紹介と同じで、図1に示す手順で行う。凍結包埋、凍結薄切、組織学的染色、組織化学、酵素組織化学、免疫組織化学、封入、蛍光トレーサーの観察、水溶性トレーサーの観察、遺伝子解析用試料採取等の各処理の詳細については病理技術研究会誌<sup>4)</sup>と組織細胞化学2005<sup>5)</sup>を参照のこと。

### 非脱灰凍結切片の可能性について

研究や病理診断等で使用される組織化学への本手法(非脱灰凍結切片作製)の導入の可能性を探るには、切片の品質、切片の応用、切片の保存、技術的な難易さ、適用試料、迅速性、経済性等について検討しなければならないであろう。本手法は、軟組織と硬組織の区別なく同じ手順で切片標本作製できることから、以後の考察は軟組織と非脱灰試料の両者に当てはまる。

#### 1) 切片の品質

切片の品質を決める要素は、切片の厚さ(均一性)、形態の保存状態、鮮明さ、細胞情報あるいは組織情報の保存状態等であろう。

切片の厚さについては、最新装置では1 $\mu$ mの厚さで試料を切削できる。しかし、従来法で形状が保たれた厚さ1 $\mu$ mの切片を作製することは、比較的

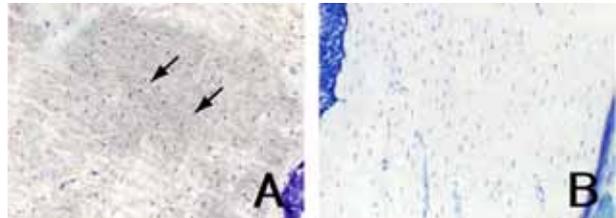


図3 封入剤の比較

成熟ラット大腿骨の非脱灰骨切片、トルイジンブルー染色、A:グリセリン系封入剤(SCMM-G1)使用、B:樹脂系封入剤(SCMM-R3)使用。Aでは石灰化部位にすだれ状の模様(矢印)が現れているが、Bでは骨組織を鮮明に観察できる。

容易な軟組織試料でさえ困難であろう。しかし、本手法では未経験者でも装置限界の厚さ(例えば1 $\mu$ m)の切片を作製できる。硬組織試料では、ナイフが鋭利であれば、骨や歯から厚さ2 $\mu$ mの切片を作製できる。

次いで、組織形態の保存状態であるが、本手法では粘着フィルムで凍結切片を粘着支持しながら作製するため、薄切面の形状を正確に保った切片を作製できる。もちろん、厚みが1 $\mu$ mのような極薄切片でも形状は正確に保たれている。骨髄の凍結切片作製は骨髄が脱落するために非常に難しいが、図4に示すように骨髄が完全に保たれた切片を容易に作製できる。歯の切片作製は更に困難であるが、図5に示すようにほぼ完全な切片を作製することができる。切片封入では、専用封入剤(水溶性樹脂、SCMM-R2)を使用することによりアルコールやキシレン操作が不要になり、組織収縮のない生体内サイズを保った切片標本作製できる。

鮮明さについては、従来のグリセリン系封入剤を使用すると図3-Aに示すように硬組織部分に回折光によるスダレ状の模様が現れる欠点がある。しかし、専用封入剤を使用すると図3-Bに示すようにスダレ上の模様は観察に影響しない程度まで減少し、組織を鮮明に観察できる。また、軟組織についても同様にパラフィン切片と同様の鮮明さで組織を観察できる。

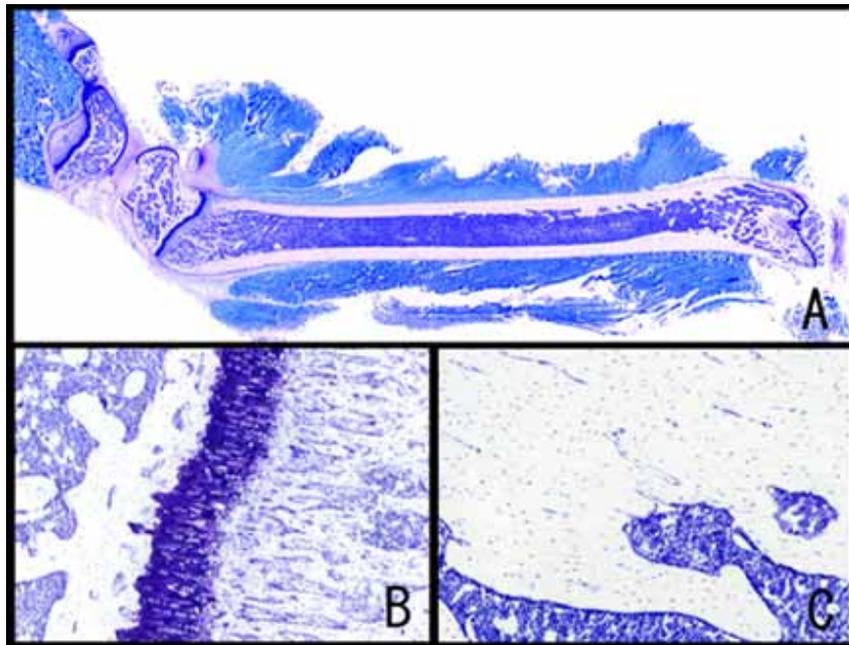


図4 7ヶ月齢ラット大腿骨の未固定非脱灰凍結切片(厚さ4 $\mu$ m) トルイジンブルー染色、使用粘着フィルム:Cryofilm type 2C(9)、封入剤:SCMM-R3.

組織情報の保存状態については、従来法の切片と同程度以上に組織化学、免疫組織化学、遺伝子組織化学等で特定物質を検出できるかが判断基準であろう。本手法では、未固定非脱灰試料から凍結切片を作製することができるため、酵素活性の低下、蛋白等の変性、水溶性物質の移動・流出(凍結乾燥する)等が起こらず、生体内組織情報を限りなく保存した切片を作製できる。更に、凍結乾燥することにより水溶性物質(トレーサー等含む)の体内分布を研究することができ、組織情報の保存状態は従来法よりも優れていると考えて良いであろう。

## 2) 切片の応用

本手法の切片は、従来の組織学、組織化学、免疫組織化学、蛍光組織化学、遺伝子組織化学、水溶性物質のオートラジオグラフィ等、従来の切片を用いた研究に使用することができる。

さらに、未固定非脱灰切片を用いて酵素組織化学、免疫組織化学を行うことができるために、酵素活性、免疫反応への固定液や脱灰液の影響を正確に評価することができる<sup>6)</sup>。たとえば、免疫反応がな

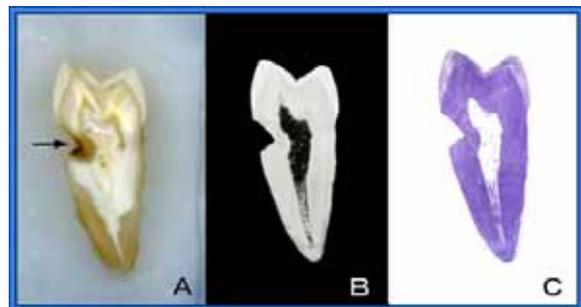


図5 成人の抜去歯  
A: 薄切片(矢印は齶触部位)、B: 凍結切片(厚さ5 $\mu$ m)、C: トルイジンブルー染色。

い場合、固定や脱灰の影響で抗原性が低下したか、抗原そのものがないか、あるいはその他の要因によるのかを判断する事が困難であるが、本切片利用はそのような問題を解決する一つ的手段になる。一例として、図6に免疫反応への脱灰液の影響を示している。脱灰に伴って免疫反応強度と部位が変化しているのがわかる。このように本切片を使用することにより、本実験に先立ち固定液や脱灰液の酵素組織化学や免疫組織化学への影響を正し

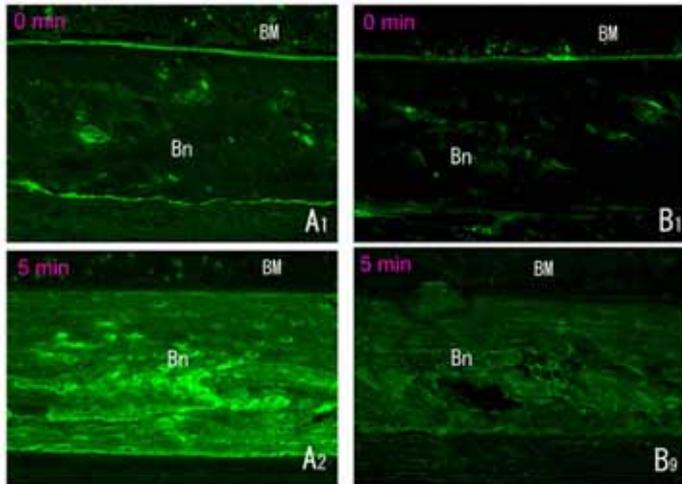


図6 免疫染色への脱灰の影響

A1,A2 : Bone sialoprotein(BSP).

B1,B2 : Osteocalcin(OCN).

A1,B1 : 未脱灰切片 .

A2,B2 : 5 %EDTA 脱灰切片 .

BSP は、未脱灰では骨表面に免疫反応が現れる。脱灰後は骨表面の反応は弱くなっているが、深層の反応は強くなっている。

OCN も同様に、未脱灰では、骨表面に反応が現れるが、脱灰後は弱くなっている。

Bn : 骨、BM : 骨髄 .

( 細矢明宏博士提供 : 松本歯科大学 )

く評価することができ、本実験の解釈をより正確に行うことができるようになる。所見は示していないが、短時間（数十秒）の固定（PFA 等）でも免疫反応が得られない場合があるが、本手法の未固定非脱灰切片を使用することにより解決した例が何度か経験している。

### 3) 切片の保存

これまで、切片標本をグリセリン系封入剤で封入することを推奨してきたが、長期保存できない欠点があった。しかし、新たに開発した専用封入剤を使用することによりその問題は解決された。専用封入剤は、切片を脱水することなく染色後直ち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。封入剤は封入剤重合装置 (UV Quick Cryosection Mounter) により1分で硬化し、切片を永久標本にすることができる。専用封入剤による封入は、染色剤の流出が起こる場合があるが、封入硬化後は色素の拡散は現れない。退色については、2年間の保存例しかないが、H-E染色切片では退色は殆ど起こらず、またABC法による免疫染色切片においても退色は殆ど認められなかった。

### 4) 技術的難易さ

切片の品質が優れていても、高度な技術や複雑なステップを必要とするようでは実用性は低くなるであろう。本手法は、SCEMで凍結包埋した試料

の薄切面に専用粘着フィルム（クライオフィルム）を貼付して薄切し、切片が粘着フィルムに貼り付いた状態で染色を行い、切片をスライドガラスと粘着フィルムの間に保存する。各ステップに特別な技術は必要なく、初心者でも良好な切片を作製することができ、従来法よりも容易な手法と言えるであろう。

### 5) 適用試料

本手法は、粘着フィルムで切片を粘着支持しながら切片を採取するため、粘着フィルムが貼りつく試料であれば適用できる。動物組織試料においては、粘着フィルムに強く貼りつく組織から、貼り付きの弱い試料、まったく貼り付かない試料がある。最新の粘着フィルム (Cryofilm type 2C(9)) は、かなり低温 (-35 程度まで) でも強い粘着力を示し、ほとんどの試料を粘着支持できる。しかし、靱帯、軟骨、滑膜等のように、粘着フィルムへの付着力が弱い試料もある。その様な組織の場合、鋭利なナイフを使用し、染色中も細心の注意を払うことにより良好な切片標本作製できる。粘着剤は、基本的に脂肪には粘着しないため、100%脂肪の組織には適用できないが、脂肪と一般組織が混在した試料は温度を下げれば切片を採取できる。

従来法で、眼球、肺、皮膚、爪、骨髄、大試料

(全身マウス)等から凍結切片を作製することは熟練した技術が必要であったが、本手法では初心者でも安定して凍結切片を作製できる。更に、図4, 5に示すように従来法では凍結切片作製が不可能であった骨や歯からも切片を作製することができる。哺乳動物以外の試料にも適用でき、魚、昆虫、植物等の凍結切片も容易に作製することができ、従来法よりも適用試料が多い。

## 6) 迅速性

本手法は、軟組織や硬組織を問わず、図1に示す手順で切片標本作製する。標準的な試料であれば、H-E染色切片標本は、試料採取20分後に永久標本となっている。もちろん、硬組織においても20分で永久切片標本作製できる。硬組織試料の免疫染色は、結果を得るのに2週間以上が必要であるが、本手法では試料採取当日に結果が得られ、研究を格段に早める事ができる。

病理診断への応用は、特別なトリミングを要しなければ、切片標本作製時間をH-E染色であれば硬組織を含む試料からでも10分程度まで短縮する事が可能で、迅速性が問われる病理診断等にも十分に利用できるであろう。迅速診断での本手法の利点は、試料の大小、組織(硬組織・軟組織)を問わず変形のない高品質の切片を短時間で確実に作製できる事にある。

## 7) 経済性

新手法の導入は、従来法と新手法の結果や難易性等を比較する事で判断される。それに加えて得られた結果に対して経済的に見合う効果があるか、否かであろう。

本手法は、前述しているように切片作製の難易性、品質、応用面等で従来法よりも優れている。経済的には、従来法に粘着フィルムを追加するのみで

よい。永久標本にする場合は、専用の封入剤を使用しなければならないが、標準的試料(切片サイズが20mm×25mm)では切片一枚当たり100円程度である。

従来法で使用する装置、試薬等が不要になることと、確実性、労力、迅速性、応用等を考慮すると経済的な手法と言えるであろう。

## おわりに

前回の技術紹介<sup>2)</sup>は、未固定非脱灰硬組織凍結切片を用いた研究の扉を開いた事で多くの関心が寄せられた。本項では、その手法と材料を改良し、研究や臨床病理で日常的に使用できるレベルに達した事を紹介した。本手法が多くの分野で利用され、新たな研究分野が生まれる事を願っている。

## 参考文献

- 1) T. Kawamoto Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. J. Histochem Cytochem 38: 1805-1814, 1990
- 2) 川本忠文: 非脱灰骨組織の凍結切片作製法 Medical Technology 31: 771-777, 2003
- 3) T. Kawamoto: Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants, Arch Histol Cytol 66: 123-143, 2003
- 4) 川本忠文: 特集コーナー(硬組織) <非脱灰硬組織凍結切片標本作製技術(川本法2008)とその応用>、病理技術第72巻2号: 76-83, 2009.
- 5) 川本忠文: 未固定非脱灰試料からの多目的凍結切片の作製と応用、日本組織細胞化学会編、組織細胞化学2005(pp.95-107)、2005
- 6) Hosoya Akihiro et al.: Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localization of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections, Histochem Cell Biol 123: 639-646, 2005.



