

技術講座〈病理〉step up 編

粘着フィルム(川本法)を用いた
凍結切片作製
術中迅速診断用凍結切片作製への応用

川本忠文

検査と技術

第46巻 第11号 別刷
2018年11月1日 発行

医学書院

粘着フィルム(川本法)を用いた凍結切片作製 術中迅速診断用凍結切片作製への応用

鶴見大学歯学部 RI 研究センター

かわもとただふみ
川本忠文

Point

- 凍結切片は切片支持用粘着フィルム(Cryofilm)を用いて作製する。
- 切片が Cryofilm に貼り付いた状態で染色し、川本法専用封入剤でスライドガラスと Cryofilm の間に切片を封入保存する。
- 切片は油浸レンズで高倍率観察できる。
- 切片は組織学的染色、組織化学的染色、酵素組織化学的染色、免疫組織化学的染色(FIHC 含む)、遺伝子組織化学的染色、遺伝子発現解析、MS イメージング、水溶性物質の分布研究など、多くの研究に使用できる。
- 大きな試料(マウス、ラットなどの全身)から切片標本作製できる。
- 専用替刃を使用することで骨などの硬組織から厚さ 1 μm の凍結切片を作製できる。

はじめに

凍結切片標本作製で最も難儀するのは、形態が保たれた切片を作製する作業であろう。

筆者はこの問題を解決するために粘着フィルムを用いて凍結切片を作製する方法を開発、実用化した¹⁻³⁾。専用材料(包埋剤、粘着フィル

ム、替刃、封入剤)を使用することにより、全身ラットなどの大きな試料から厚さ数ミクロンの切片を作製することができる。また専用替刃(SL-T シリーズ)を使用することにより非脱灰ラット大腿骨などから厚さ 1.0 μm の凍結切片を作製することが可能になった¹⁾。

本法は種々の試料に適用でき、しかも切片を

表 1 川本法の応用

1. 適用試料	<ul style="list-style-type: none"> ・動物試料(哺乳類, 魚介類, 昆虫, 爬虫類など) ・植物試料(葉, 花卉, 樹木, 根, 穀類, 果実など) ・食物(麺, 練り製品など)
2. 適応組織	<ul style="list-style-type: none"> ・全身臓器, 脳, 骨, 軟骨, 骨髄, 皮膚, 眼球, 肺, 爪など
3. 切片の染色への応用	<ul style="list-style-type: none"> ・組織学的染色(HE 染色, トルイジンブルー染色など) ・組織化学的染色(GBHA, アリザリンレッド S, アルシアンブルー, アゾカルミン G, アニリンブルー, オレンジ G, ゲンチアナバイオレット, サフラニン, ズダン(脂肪染色), ニュートラルレッド, メチルグリーンピロニン, メチレンブルー, ヤマスグリーン, ライトグリーン, ローダミン, オーラミンなどを用いた染色) ・酵素組織化学(ALPase, ACPase, TRAP, X-gal 染色など) ・免疫組織化学(ABC 法, FIHC など) ・遺伝子組織化学(<i>in situ</i> hybridization) ・蛍光標識の観察(カルセイン蛍光, アリザリンレッド蛍光, GFP 蛍光など)
4. 切片の生化学的分析への応用	<ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子発現状態の解析(LMD への応用) ・特定分子量の組織内分布観察(MS イメージングへの応用)
5. 水溶性物質の分布	<ul style="list-style-type: none"> ・オートラジオグラフィへの応用 ・水溶性トレーサー(薬剤)の組織内分布観察 ・元素分布(EPMA)

GBHA : glyoxal bis(2-hydroxyanil), ALPase : alkaline phosphatase(アルカリフォスファターゼ), ACPase : acid phosphatase(酸性フォスファターゼ), TRAP : tartrate-resistant acid phosphatase(酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ), ABC : avidin-biotin-enzyme complex(アビジン・ビオジン・酵素複合体), FIHC : fluorescent immunohistochemistry(蛍光免疫染色), GFP : green fluorescent protein(グリーン蛍光蛋白質), LMD : laser microdissection, EPMA : electron probe micro analyzer(電子プローブマイクロアナライザー).

多くの研究に利用できる(表 1). 免疫染色, 遺伝子発現解析, MS(mass spectrometry) イメージングなどでは従来法で作製された切片よりもよい結果が得られる. 切片作製の確実さ, 切片の応用面の多さから, 本法は世界の多くの研究室で“川本法”(Kawamoto's film method)として使用されている. 近年, 川本法が術中迅速診断用凍結切片作製にも有用であることが理解され多くの病院で使用されるようになった⁴⁾.

本稿では, 川本法の基本的手順を示すとともに, 利点と問題点とその解決策を記載し, 応用例として, センチネルリンパ節の切片標本とラット大腿骨の非脱灰凍結切片標本を示す.

川本法

川本法では, まず箱型の凍結包埋ブロックを作製し, 次いで切片支持用粘着フィルム(Cryofilm)を薄切面に貼付して薄切する. 切片がCryofilmに貼り付いた状態で染色を行った後, 直ちに専用封入剤でCryofilmとスライドガラスの間に切片を保存する. 川本法の利点, 問題点と解決策を表 2 としてまとめる.

材料と方法

材料と方法は原法に基づいて記載するが, 各施設の状況に合わせて変更できる.

表 2 川本法の利点、問題点と解決策

1. 利点
 - ・形態が正確に保たれた切片を容易に作製できる。
 - ・熟練技術を必要としないので初心者でも良好な切片標本を作製できる。
 - ・非脱灰硬組織を含む試料からも薄くて良好な切片を作製できる。
 - ・Cryofilm は低温下(−35℃)でも凍結切片を粘着支持できるため、低温薄切が適した試料にも適用できる。
 - ・種々の大きさの試料に適用できる(1×1 cm~20×25 cm)。
 - ・Cryofilm がカバーガラスの代わりとなるため、大切片の封入保存が容易である。
 - ・従来法では凍結切片の作製が困難、あるいは不可能であった試料〔硬組織(骨、歯)、眼球、乳腺、皮膚、肺、昆虫、植物など〕からも良好な凍結切片を作製できる。
 - ・切片をいろいろな研究に利用できる。
 - ・未固定で、しかも非脱灰の切片で免疫染色をすることができるために固定液や脱灰液の影響を受けやすい抗原の免疫染色にも使用できる。
 - ・LMD による遺伝子発現解析用試料採取では、従来法よりも高品質の遺伝子を採取できる。
 - ・MS イメージングでは、従来法よりも感度よく試料を分析できる。
 - ・術中迅速診断用凍結切片作製にも利用できる。
2. 問題点と解決策
 - ・Cryofilm type 2C で凍結切片を十分に粘着支持できない場合は、さらに強い粘着力を有する Cryofilm を使用する。
 - ・高倍率観察時の Cryofilm によるバックグラウンド(微粒子)の問題、弱蛍光物質観察時の Cryofilm の自家蛍光による影響は、低バックグラウンドで低自家蛍光の Cryofilm を使用することにより改善できる。
 - ・Cryofilm の基材に生じた傷は、Cryofilm 上にカバーガラスとパラフィン切片用封入剤で再封入することにより解決できる。

LMD : laser microdissection.

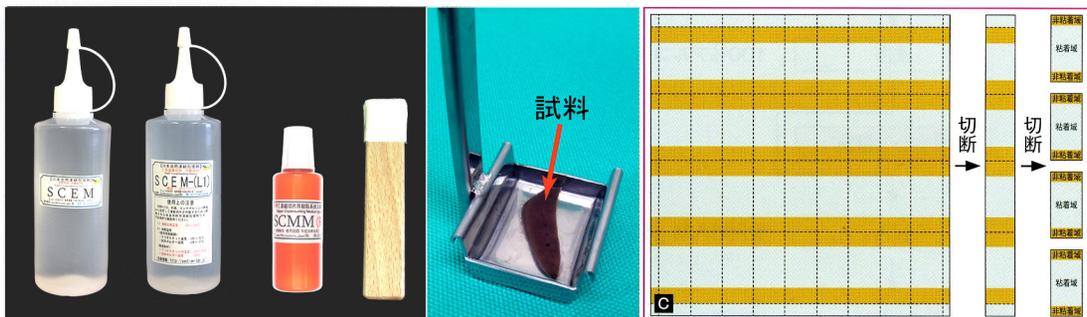


図 1 川本法で使用される主な材料と用具

a : 左から包埋剤(SCEM), 包埋剤(SCEM-L1), 専用封入剤(SCMM), Cryofilm 密着用具, b : 凍結包埋容器と試料, c : Cryofilm(試料の大きさに切断して使用する)。

■ 川本法で使用される器材(図 1)

- ・凍結切片作製キット(SECTION-LAB 社)(内容: 包埋剤, 封入剤, 密着用具, Cryofilm など)
- ・凍結マイクロトーム
- ・軟組織薄切用替刃(ステンレス製替刃: 市販品)
- ・硬組織薄切用替刃〔タングステンカーバイド

製替刃(SL-T シリーズ: SECTION-LAB 社)〕

■ 切片採取用粘着フィルム(Cryofilm)

凍結切片を採取するための粘着フィルムは、使用目的によりいくつかのタイプが準備されている。現在、術中迅速診断用凍結切片作製に使用されている Cryofilm type 2C(9)は、2006 年に研究用として開発した粘着フィルムで、脂肪

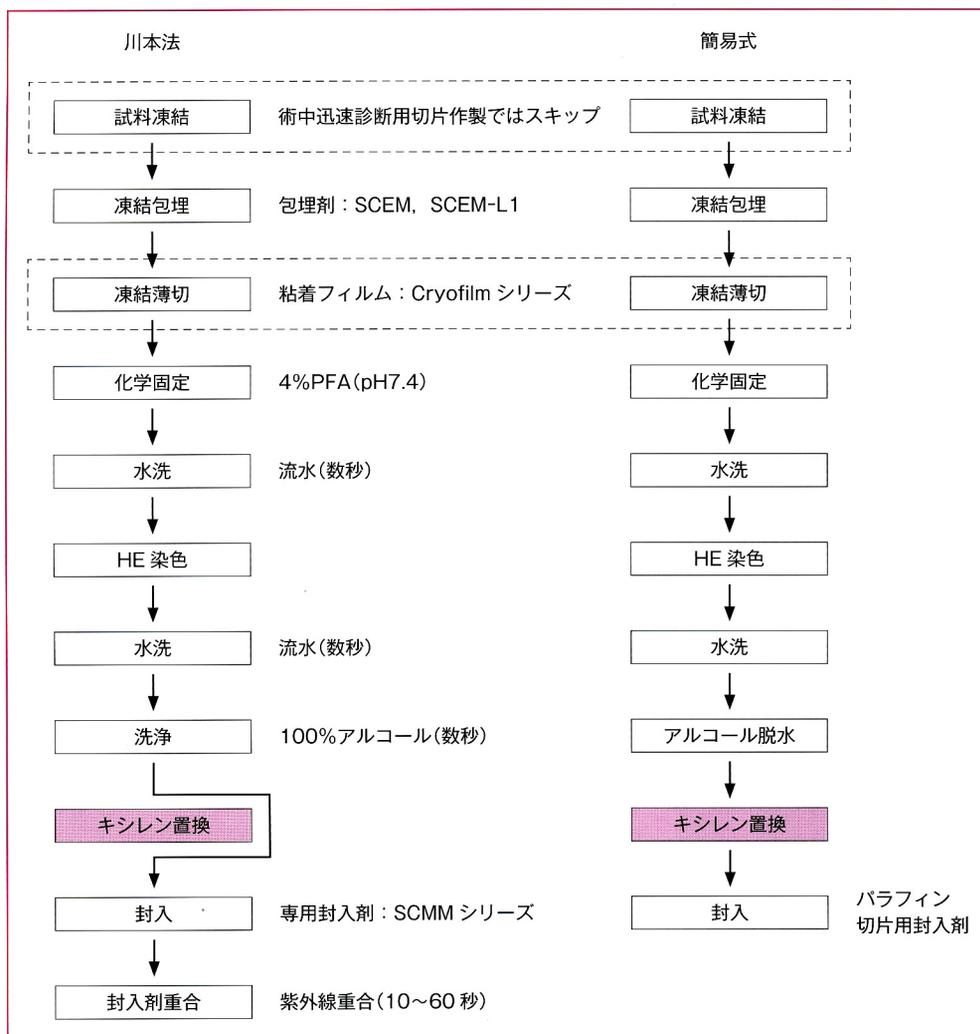


図2 迅速診断用切片標本の作製手順

川本法ではキシレン処理が不要であるが、簡易式ではキシレン処理が必要である。川本法では封入剤の重合硬化(10~60秒)が必要であるが、全工程の所要時間に大きな差はない。
PFA：paraformaldehyde(パラホルムアルデヒド)。

を多量に含んだセンチネルリンパ節や乳腺の凍結切片作製には粘着力不足で良好な切片を作製することが困難な場合がある。これは粘着力の強いCryofilmを使用することにより解決できることから、安定して良好な切片を作製するためにはCryofilmの供給元(SECTION-LAB社)

に直接相談し、低温度(例えば-40℃)でも強い粘着力を有するCryofilmを使用することで改善することができる。

■ 方法

川本法による凍結切片標本作製は、図2に

示す手順で行うが、術中迅速診断用凍結切片作製では専用封入剤に代わってパラフィン切片用封入剤を使用する簡易式が行われている。下記、手順に沿ってポイントを解説する。

1. 試料凍結

川本法を使用すればほぼ完全な切片を作製できることから切片標本の品質は試料の凍結包埋で決定されると言っても過言ではない。凍結切片の組織像に最も影響するのは試料凍結時の氷晶形成による組織の損傷で、損傷の少ない凍結試料を作製することが最も重要となる。氷晶による損傷は急速凍結、あるいはショ糖などの氷晶形成抑制剤の使用により小さくすることができる。術中迅速診断用凍結切片作製では、検体の化学固定、氷晶形成抑制剤の使用ができないため、可能な限り凍結速度を速める必要がある。

凍結速度を速めるために液体窒素が使用される場合があるが、凍結温度が低いために凍結中に試料が割れることがあるので注意が必要である。一般的には冷却した有機溶媒が使用される。有機溶媒としてアセトンやアルコールなどを使用している場合があるが、それらは親水性のため試料中に浸透して凍結ブロック中に残り、凍結薄切の障害となる場合がある。筆者は確実性から非親水性のドライアイス・ヘキサンあるいは冷却ペンタンを推奨している。

2. 凍結包埋

従来の凍結包埋ではO.C.T.コンパウンド(optimal cutting temperature compound)などが一般的に使用されているが、川本法ではCryofilmが強く貼り付き、骨などの硬組織を含む試料を確実に凍結保持するために開発した川本法専用包埋剤(SCEM, SCEM-L1)を推奨している。両包埋剤とも従来の包埋剤に比べて薄切時の切片のカーリングが小さいためにCryofilm

を用いない従来の凍結切片作製にも適している。

SCEMは通常の軟組織や、骨などの硬い試料の凍結包埋に適している。SCEM-L1は低温薄切(-30度以下)が適した試料(脂肪組織を含んだ試料など)に使用され、術中迅速診断用凍結切片作製にはSCEM-L1が使用される。

3. 凍結薄切

通常の凍結薄切は-20℃程度で行うが、脂肪組織を含む検体の場合はより低い温度(例えば、-30℃程度)が適している。現在、術中迅速診断用凍結切片作製に使用されているCryofilm type 2C(9)は-35℃程度まで使用できるが、脂肪が多量に含まれている場合は粘着力不足で良好な切片を作製することが困難になる。良好な凍結切片を作製するにはCryofilm type 2C(9)よりも粘着力の強いCryofilmを使用する。石灰化組織を含まない検体の場合は、通常のスチレン製替刃で問題なく切片を作製できる。

4. 染色・封入

術中迅速診断用凍結切片作製での切片封入には川本法と簡易式が使用されている(図2)。

簡易式ではパラフィン切片用封入剤を使用するためにキシレン処理が必要で、キシレン処理により組織にヒビ割れが発生する問題がある。一方、川本法ではキシレン処理が不要の専用封入剤(SCMMシリーズ)が使用されるために組織にヒビ割れのない良好な切片標本作製できる。専用封入剤は専用紫外線照射装置で重合硬化し、切片を長期保存することができる。封入操作に要する時間(封入剤の重合硬化)は、最新封入剤と最新装置の組み合わせでは10秒で完了することから簡易式と大差ない。

最終的な切片の保存状態は、川本法と簡易式では異なる(図3)。川本法では切片はCryofilmとスライドガラスの間に封入保存され、簡易式

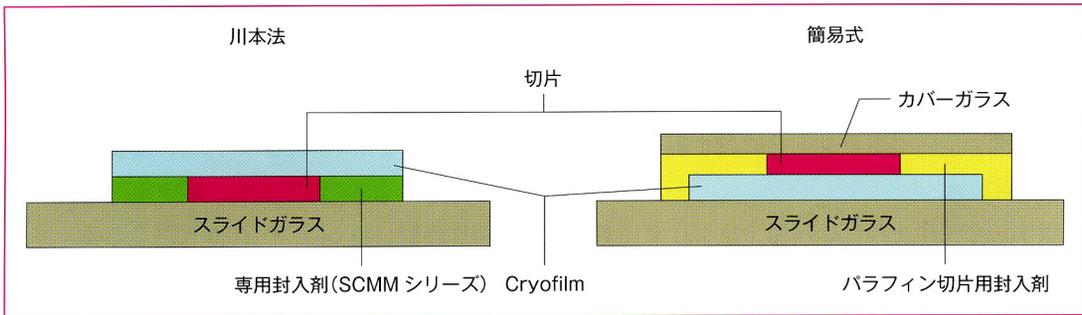


図3 切片の封入状態の比較

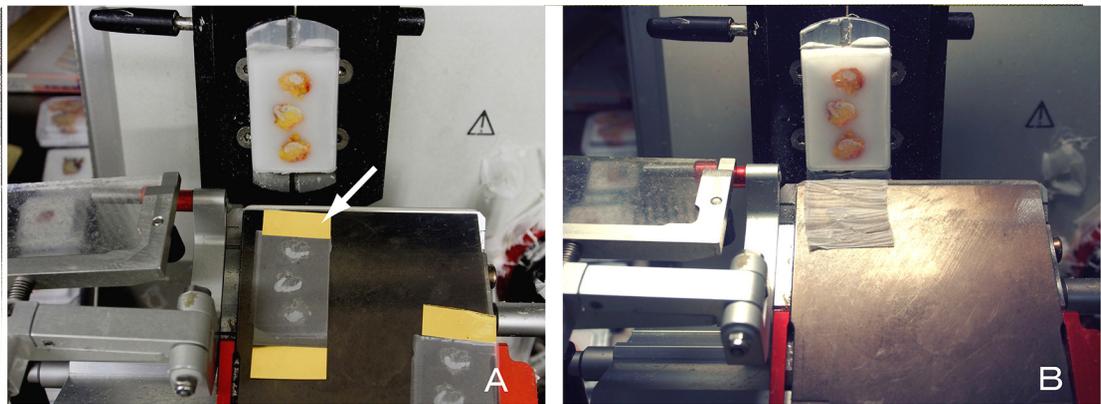


図4 センチネルリンパ節の凍結薄切

a: 川本法による薄切 [Cryofilm(⇔)使用].

b: 従来法(Cryofilmなし)による薄切.

凍結ブロックは図1に示す包埋容器と川本法用包埋剤(SCEM-L1)で作製した.

では切片面を上に向け、Cryofilmと切片はカバーガラスとスライドガラスの間に封入保存される。簡易式ではCryofilmとスライドガラスの間に空隙ができるために、高倍率での観察時に干渉模様が見られる場合がある。

術中迅速診断への応用

術中迅速診断用凍結切片作製において、最も難儀している検体の1つはセンチネルリンパ節であろう。従来法(Cryofilmを用いない方法)では、ほとんどのケースで組織の重なりや脱落が起こり、最悪の場合は組織が完全に脱落し

て、正確な病理診断が難しい場合がある。

川本法は理想的な研究用切片を作製するために開発した方法であり、費用や時間的制約がある術中迅速診断用凍結切片作製に適用するには以下に挙げるメリットを踏まえ、導入を検討すべきであろう。

- ・診断を正確に行うことができれば、研究で求められるような高品質な切片でなくてもよい。
- ・従来法と同程度の作業時間で切片標本作製できる。
- ・確実に切片標本作製できる。
- ・導入に多額の追加費用が生じない。

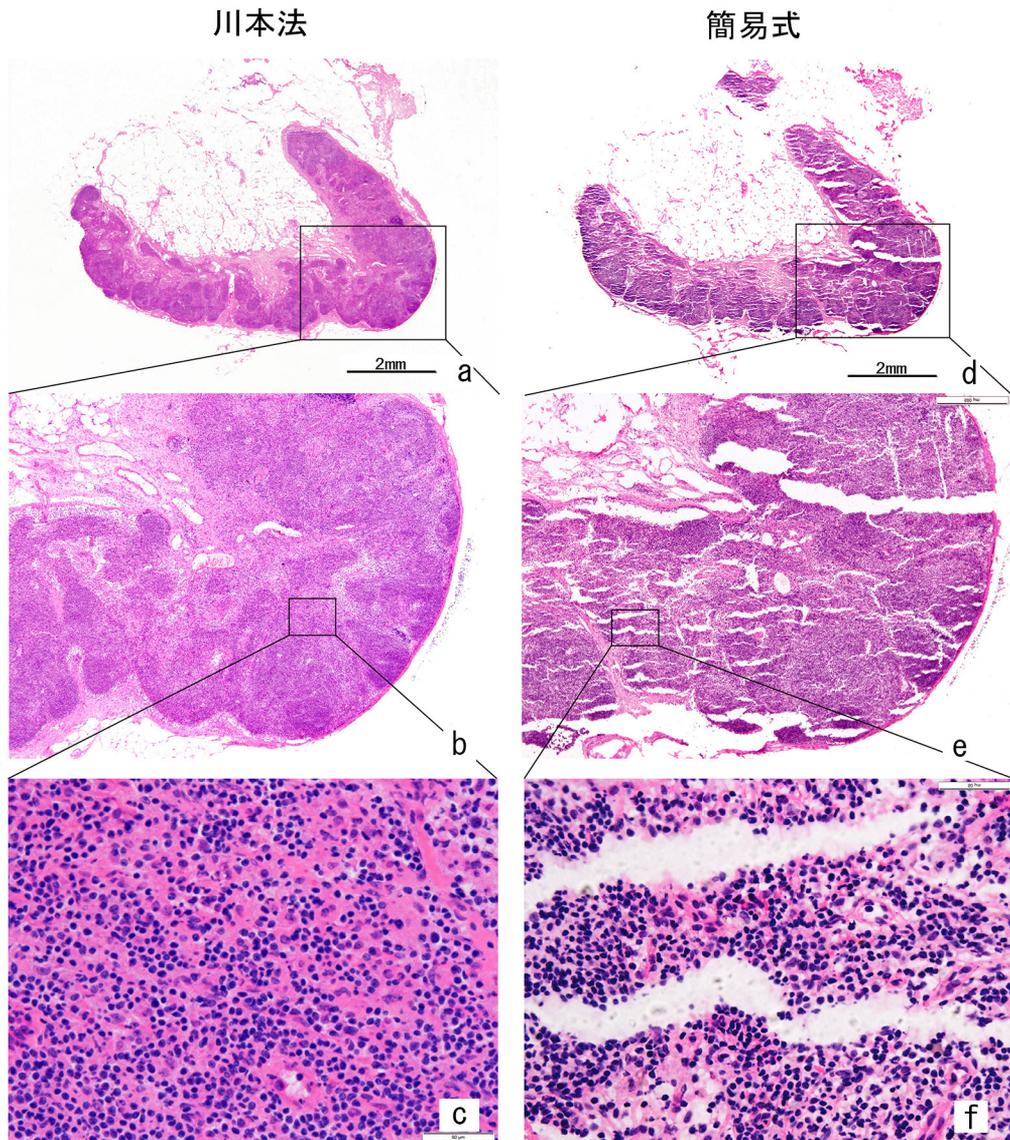


図5 川本法と簡易式で作製された切片標本の比較

a~c: 川本法で作製された切片, 組織にヒビ割れはなく, 高倍率で各細胞を明瞭に観察できる。

d~f: 簡易式で作製された切片, 組織全体にヒビ割れと細胞の重なりが観察される。

Cryofilmを用いて作製した検体(センチネルリンパ節)の連続切片を使用した(厚さ: 5 μ m, HE染色)。

HE: hematoxylin-eosin.

応用例 1(センチネルリンパ節)

図4にセンチネルリンパ節の薄切状態を示している。切片作製が比較的容易な検体であったが、従来法では切片の皺、脱落などを完全に

防ぐことは困難であった。しかし、川本法では脂肪組織が混在している検体にもかかわらず組織全体が完全な切片として採取できた。

図5に川本法で作製された切片標本と簡易式で作製された切片標本を示している。川本法

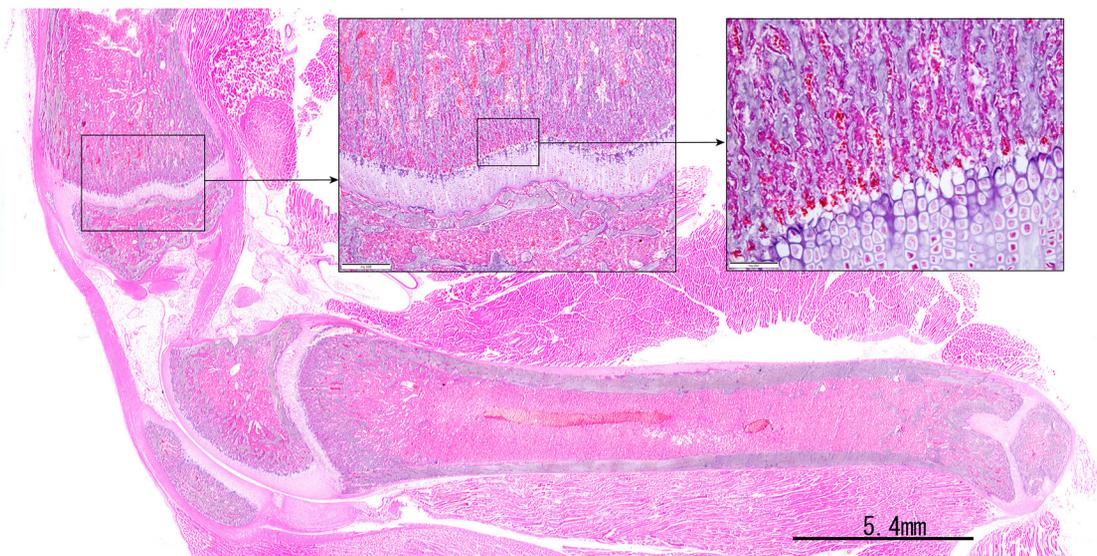


図6 ラット大腿骨(6週齢)の非脱灰凍結切片(厚さ: 3 μ m, HE染色)

では、検体全体が完全に保たれ、ヒビ割れのない組織像を示し、各細胞と正確な細胞分布を明瞭に観察することができる(図 5a~c)。一方、簡易式では組織中に多くのヒビ割れが観察され、ヒビ割れの周囲に細胞の重なりが認められる(図 5d~f)。

応用例 2(石灰化組織)

石灰化物(硬組織)が含まれる組織も凍結切片作製が困難な典型的な検体である。未脱灰硬組織の切片作製例としてラット大腿骨から作製した切片標本を示す。

川本法と専用替刃(SL-Tシリーズ)を使用することにより図 6 に示しているようにチャタリングや組織の脱落がほとんどないほぼ完全な薄い非脱灰凍結切片を作製できる。石灰化領域、軟骨、靭帯、骨髄、骨端部などがほぼ完全に保たれ、骨芽細胞や線維芽細胞などの細胞を明瞭に観察でき、パラフィン切片と同レベルの品質であることがわかる。

病理診断用検体は同じ物が2つとないことから切片作製の失敗は許されず、従来法では切片

作製に熟練技術が必要であった。しかし、川本法では切片をCryofilmで採取するため、装置や切削条件が整えられていれば初心者でも確実に良好な切片を作製することができる。

川本法を正しく実施する場合、追加材料(費用)としてCryofilmと専用封入剤が必要となる。専用封入剤の使用によりカバーガラスが不要となるので実質的にはCryofilmの費用が追加費用となる。正確な診断に耐えられる切片標本作製に費やされる人的、時間的経費を考慮すると、確実に良好な切片標本を作製するための経費として、上記の追加費用は許容される範囲ではないだろうか。一部が脱落したり、組織が重なったりした切片標本で病理診断を行うよりも、本例(図 4~6)が示しているように検体の全領域、また組織形態が正確に保たれ、組織を鮮明に観察できる切片標本で正確に病理診断することは患者にとって朗報となるのではないだろうか。

おわりに

近年になって実用化された川本法は、多くの

可能性を秘めた最新の凍結切片作製法である。しかし、従来の凍結切片作製法と材料(従来法の)を川本法に混在して使用したり、間接情報による古い方法・材料を利用したりすることにより、川本法本来の性能が十分に発揮されていないのが現状である。トラブルや最適材料(最新材料)などについては材料供給元のSECTION-LAB社に直接相談し、正しい情報のもとに最新の川本法を利用することで素晴らしい成果を生み出すことを願っている。

川本法の問い合わせについて

下記 URL 初期画面の問い合わせページより質問をすることができます。

<http://www.section-lab.jp>

謝辞

業務中で多忙にもかかわらず迅速診断用凍結切片作製にご協力いただきました横浜労災病院病理診断科の長谷川直樹博士ならびにスタッフ一同の皆さまに心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Kawamoto T, Kawamoto K : Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamoto's film method (2012). *Methods Mol Biol* 1130 : 149-164, 2014
- 2) 川本忠文 : 夢の切片—まるごと 2 μm. *ミクロスコピア* 16 : 11-17, 1999
- 3) 川本忠文 : 世界が認めた「夢の切片」. *ミクロスコピア* 26 : 39-41, 2009
- 4) 佐藤正敏, 秋山直子, 加藤志津夫, 他 : Cryofilm を用いた術中迅速組織標本作製. *病理と臨* 28 : 207-211, 2010

川本法で作製された切片の写真は
これ以後のページに掲載しています。

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

皮膚付属器腫瘍アトラス

編集 安齋真一・後藤啓介

●A4 頁264 2018年
定価: 本体16,000円+税
[ISBN978-4-260-03546-0]

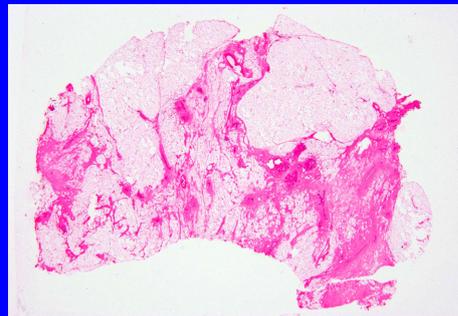
皮膚付属器腫瘍は、症例数が限られていることや、同じ疾患であってもバリエーションのある病理組織像を呈するため、しばしば診断に苦慮すると言われている。本書は、選りすぐりの病理組織写真を多数掲載し、臨床上の悩みに応える1冊となっている。皮膚科医や皮膚疾患の病理診断に携わる病理医必読のアトラス。

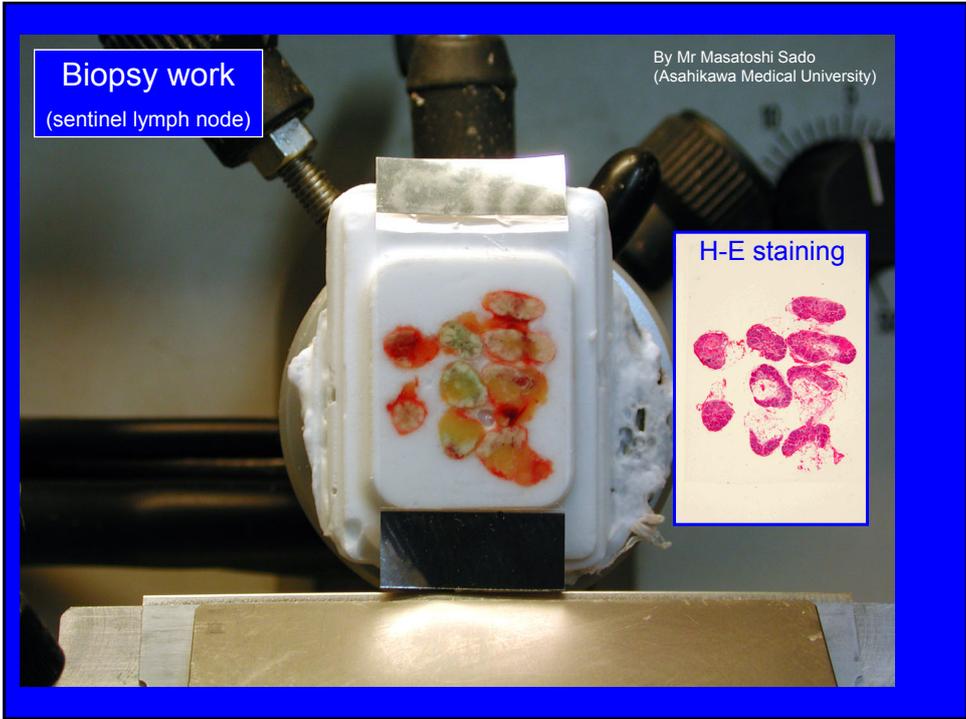
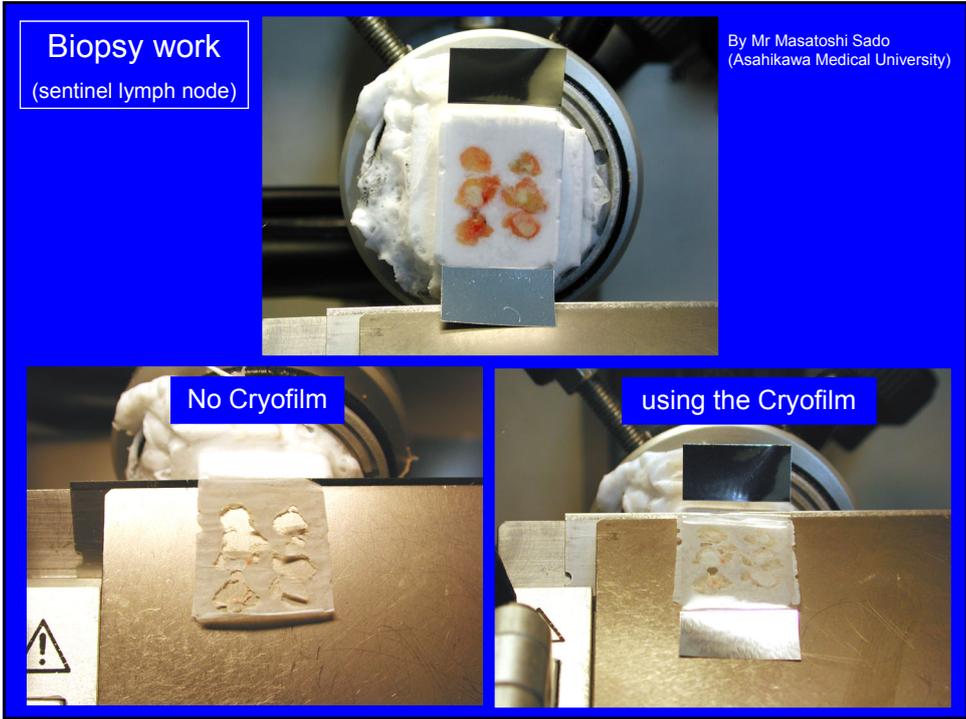
Application of Kawamoto's method

Hospital work

Biopsy work

By Mr Masatoshi Sado
(Asahikawa Medical University)





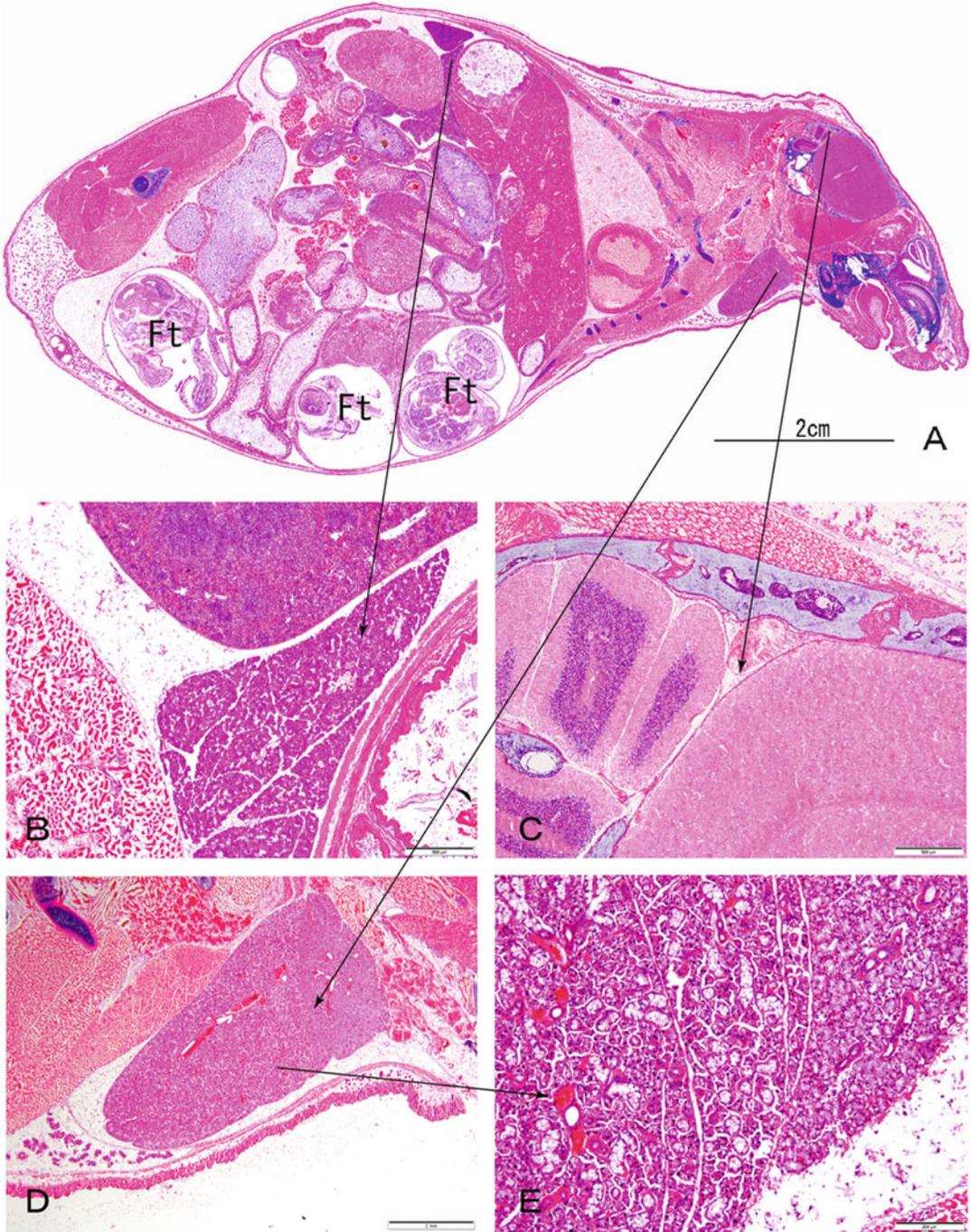


Fig. 12 The figures show a picture of 3 μm thick frozen section (A) prepared from a fresh pregnant mouse and the enlarged pictures (B, C, D, and E) of the section. Staining: hematoxylin and eosin, embedding medium: SCEM, mounting medium: SCMM-R2, blade: SL-T30UF, adhesive film: Cryofilm type 4D(16UF). Ft: fetus

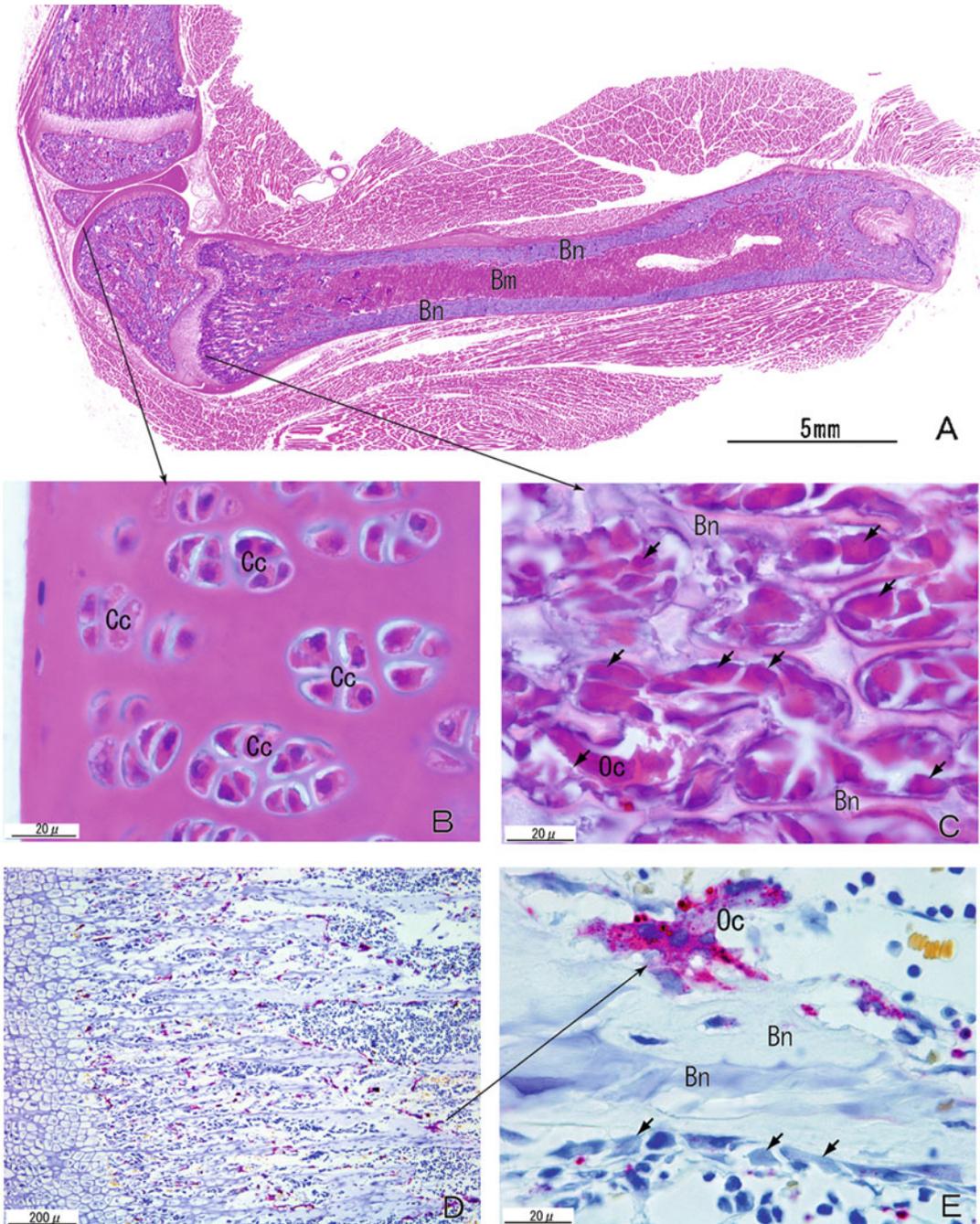


Fig. 13 The figure shows a 3 μm thick frozen section prepared from an undecalcified hindlimb of a 7-week-old rat. The pictures (B, C, and E) were taken with an oil immersion lens. Staining: hematoxylin and eosin (A, B, and C), and TRAP staining (D, E), embedding medium: SCEM-L1, mounting medium: SCMM-R2, blade: SL-T30UF, adhesive film: Cryofilm type 4D(16UF). *Bn* bone, *Bm* bone marrow, *Oc* osteoclast, *Cc* chondrocyte, and arrows in the panel C: osteoblasts

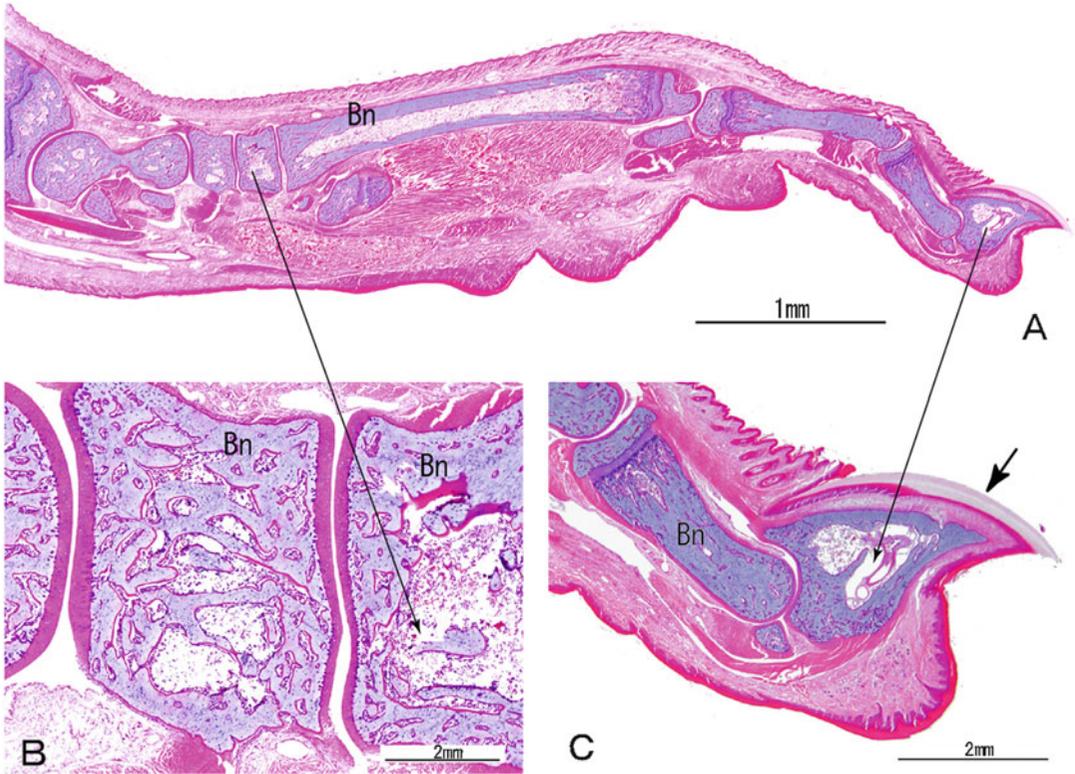


Fig. 14 The figures show a 3 μm thick frozen section prepared from an undecalcified 7-week-old rat foot. Staining: hematoxylin and eosin, embedding medium: SCEM-L1, mounting medium: SCMM-R2, blade: SL-T30UF, adhesive film: Cryofilm type 4D(16UF). *Bn* bone and arrow in the panel C: nail

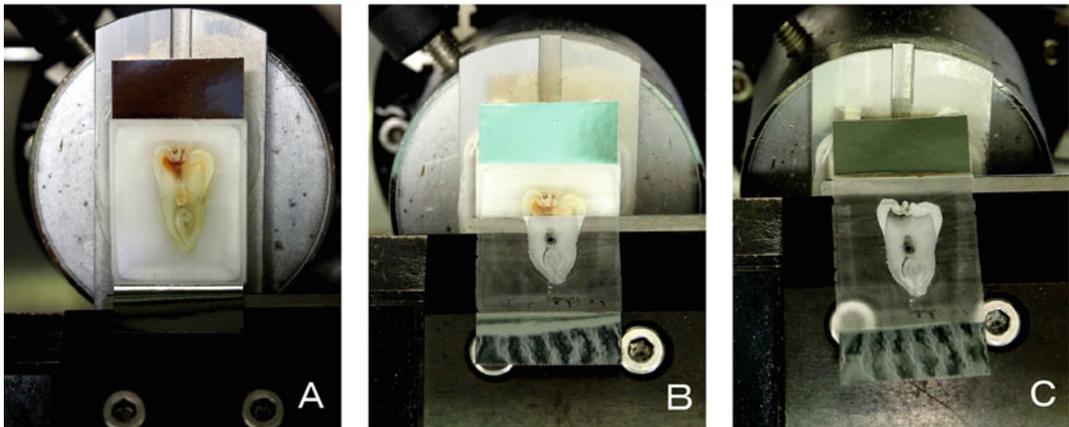


Fig. 15 The figure shows a 3 μm thick frozen section prepared from an undecalcified human molar tooth. Embedding: Embedding medium: SCEM, blade: SL-T30UF, adhesive film: Cryofilm type 4D(16UF), (A) the cut surface, (B) the section on cutting, and (C) the cut section



Fig. 16 The figure shows a 3 μm thick frozen section prepared from an undecalcified 10-week-old rat head. Staining: hematoxylin, embedding medium: SCEM-L1, mounting medium: SCMM-R2, blade: SL-T30UF, adhesive film: Cryofilm type 4D(16UF). *Bn* bone