Aug. 2015

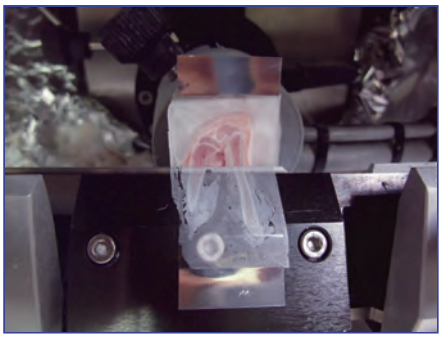
(Kawamoto's Film Method)

「川本法」による切片作製キット

(SECTION-LAB Co. Ltd.製)

最新情報：http://section-lab.jp

1) 新多目的凍結切片作製キット (Ver.6)
(Multi-Purpose Cryosection Preparation Kit)

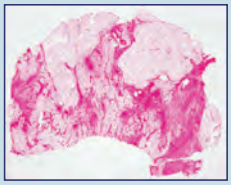


(7ヶ月齢ラット大腿骨未固定非脱灰凍結切片、厚さ3μm)

- 川本法(2008)にもとづいた凍結切片作製キットです。
- 非脱灰硬組織試料から薄い凍結切片を作製できます。
- 大きな試料から薄い凍結切片を作製できます。
- 未固定非脱灰切片で免疫染色等を行えます。
- 切片を多くの目的に使用できます(参照:切片の応用)。
- 脱水、キシレン処理等が不要です。
- 組織収縮が殆どない切片標本を作製できます。
- 短時間(試料採取後20分以内)で永久切片標本を作製できます。
- 骨、植物等からも遺伝子解析用試料を採取できます。
  (ライカマイクロシステムズ社製LMD使用)

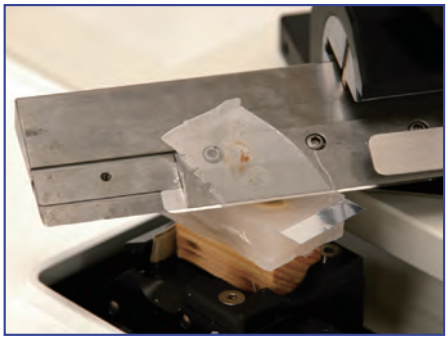
2) 術中迅速組織診断用凍結切片作製キット
(Rapid Cryosection Preparation Kit)

- 川本法(2008)を術中迅速組織診断用に特化したキットです。
- 短時間で切片標本を作製できます(全行程10分以内)。
- 乳腺、軟骨を含む検体からも凍結切片を作製できます。
- 複数の検体を同時に凍結切片にできます。
- 大きな検体から良好な凍結切片を作製できます。
- 脱水、キシレン処理等が不要です。



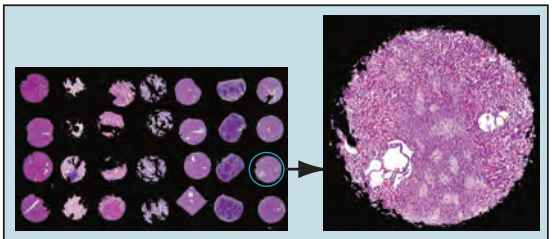
川本法2003による乳腺凍結切片
(旭川医大病院病理部御提供)

3) パラフィン切片作製キット
(Paraffin section preparation kit)



(7日齢マウス全身切片、厚さ3μm)

- 薄い切片、大きな切片を確実に作製できます 。
- 眼球、骨組織等からも良好な切片を作製できます。
- 組織マイクロアレイ用切片作製に適しています。
- 薄切環境に影響されず切片を安定して作製できます。



組織マイクロアレイ用切片

【注】:特許法の解釈変更(H16)に伴い、企業・大学等を問わず、本法により切片標本を作製する場合、許可が必要となる場合があります。本法で切片標本を作製する場合、弊社に御相談ください。

凍結切片作製用品

【非脱灰硬組織凍結切片作製】

・新多目的凍結切片作製キット
・消耗品（Cryofilm,専用包埋剤、専用封入剤）
・川本法封入剤重合装置
・凍結ミクロトーム （Leica 凍結ミクロトーム）
・タングステンカーバイド製替刃 （硬組織を含む場合）
・タングステンカーバイド製替刃ホルダー
・CNホルダー （Leica 凍結ミクロトーム用）

【軟組織凍結切片作製】

・凍結ミクロトーム （一般の凍結ミクロトーム）
・新多目的凍結切片作製キット
・専用封入剤重合装置
・消耗品（粘着フィルム,専用包埋剤、専用封入剤）

【迅速診断用凍結切片作製】

・凍結ミクロトーム （一般の凍結ミクロトーム）
・迅速診断用凍結切片作製キット
・専用封入剤重合装置
・消耗品（粘着フィルム,専用包埋剤、専用封入剤）

【包埋容器】

・包埋容器（ 特小 ：1.5cm x 1.0cm）
・包埋容器（ 小 ：2.0cm x 1.5cm）
・包埋容器（ 中 ：2.0cm x 2.5cm）
・包埋容器（ 大 ：3.5cm x 2.5cm）
・包埋容器（ 特大 ：4.5cm x 2.5cm）
・包埋容器（大腿骨用：4.5cm x 1.5cm）

【包埋剤】

・専用包埋剤 （SCEM：260ml） 通常薄切用 （−10 ～ −35℃）
・専用包埋剤 （SCEM−（L1）：260ml） 迅速薄切用 （−28 ～ −50℃）

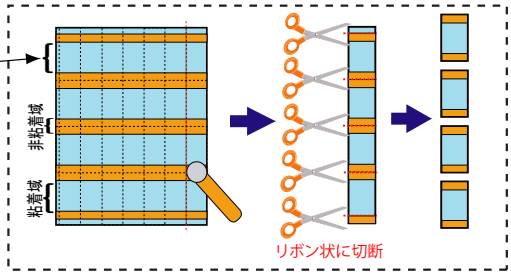
【専用封入剤】

・SCMM−G1 ：グリセリン系（自然乾燥）
・SCMM−R1 ：樹脂系（自然乾燥）
・SCMM−R2 ：樹脂系（紫外線重合）、約150枚/1本
・SCMM−R3 ：樹脂系（紫外線重合）、約150枚/1本

【切片採取用粘着フィルム】

フィルムの種類	粘着域（幅）cm				
	1.5（64枚）	2.0（48枚）	2.5（36枚）	3.5（28枚）	4.5（21枚）
Cryofilm type 2C(9)	○	○	○	○	○
Cryofilm type 2C(10)	○	○	○	○	○
Transfer film	×	○	○	○	○
LMD film （特注）	×	○	×	×	×

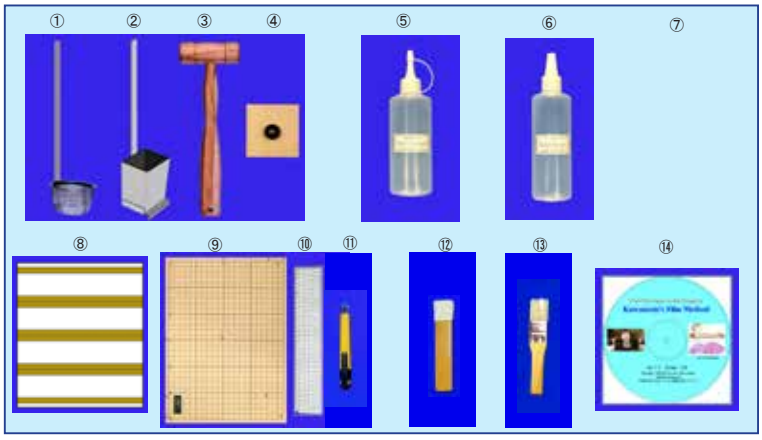
（カッコ内は、1シート当たりの作製枚数）



【切片の用途】

粘着フィルム	用 途	アルコール	Aceton, Xylene	蛍光観察*	耐熱温度	使用封入剤
Cryofilm type 2C(9)	組織学、組織化学、免疫組織化学	短時間	使用可	問題なし	120℃	SCMM-G1, -R1, -R2, -R3
Cryofilm type 2C(10)	組織学、組織化学、免疫組織化学	短時間	不 適	問題なし	40℃	SCMM-G1, -R1
Transfer film	スライドガラスへ切片転写用	問題なし	転写後可	問題なし	—	SCMM-R2, -R3
LMD film (2) & (4)	LMD用（遺伝子解析用試料採取）	—	—	—	—	—

（*：DAPI, FITC, Loadamine, Texas red, Tetracycline, GFP等、 蛍光免疫染色ではメーカー指定の封入剤を使用する）

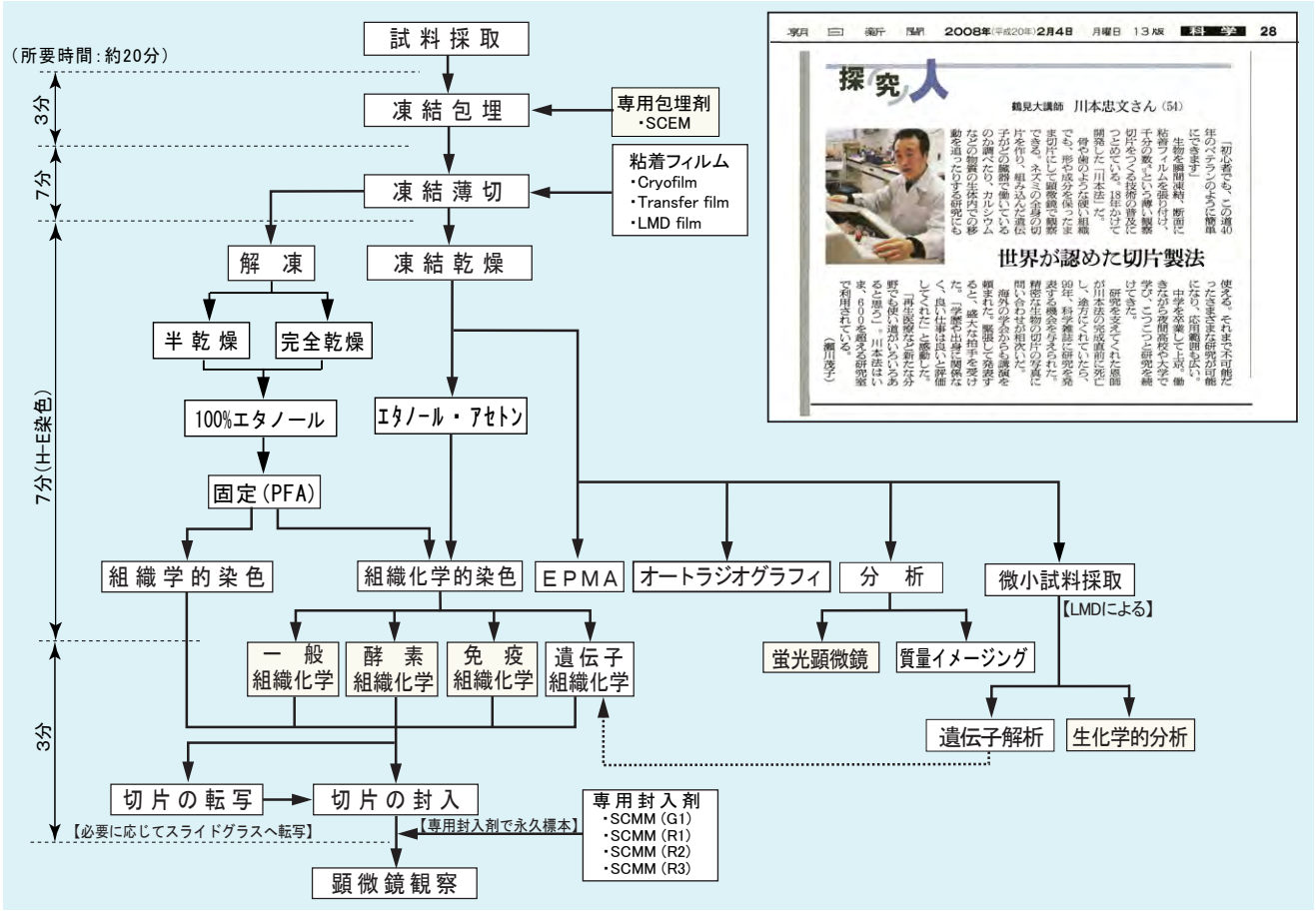


キット構成

① 凍結包埋用ｽﾃﾝﾚｽ製ｶｺﾞ（1個）
② 包埋容器（1個）
③ 木 槌（1個）
④ 凍結包埋ブロック取り出し台（1個）
⑤ 専用包埋剤（260ml、1本）
⑥ 専用封入剤（H-E染色用（SCMM-G1：1本））
⑦
⑧ Cryofilm type 2C(9)、（5枚）
⑨ カットマット（1個）
⑩ 定 規（1個）
⑪ カッター（1個））
⑫ 切片密着用具（1個）
⑬ 清掃用刷毛（1個）
⑭ 説明用CD（映像付）

（注意）：改良に伴いキット構成が変更される場合があります。

川本法による凍結切片の作製と応用



探究人

鶴見大講師　川本忠文さん（54）

世界が認めた切片製法

「初心者でも、この通40年のベテランの方に簡単にできます」

生物を瞬間凍結、断面に粘着フィルムを張り付け、千分の数ミリという薄い観察切片をつくる技術の普及につとめている。18年かけて開発した「川本法」だ。

骨や歯のように硬い組織でも、形や成分を保ったまま切片にして顕微鏡で観察できる。ネズミの全身の切片を作り、組み込んだ遺伝子がどの臓器で働いているのか調べたり、カルシウムなどの物質の生体内での移動を追ったりする研究にも使える。それまで不可能だったさまざまな研究が可能になり、応用範囲も広い。

中学を卒業して以来、働きながら夜間高校や大学で学び、こつこつと研究を続けてきた。

研究を支えてくれた恩師が川本法の完成直前に死亡し、途方にくれていたとき、40年、科学雑誌に研究を発表する機会を与えられた。精密な物の切片の写真に問い合わせが相次いだ。

海外の学会からも講演を頼まれた。驚愕とともに発表すると、盛大な拍手を受けた。「歯や出身に関係なく、良い仕事は良いと評価してくれた」と感動した。

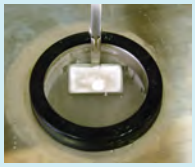
「再生医療など新たな分野でも使い道がいろいろあると思う」。川本法はいま、600を超える研究室で利用されている。

（瀬川茂子）

凍結包埋・凍結薄切・染色・封入

①試料の急速凍結

②試料の凍結包埋

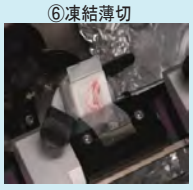


③凍結ﾌﾞﾛｯｸの取出し

④凍結ﾌﾞﾛｯｸの取付け

⑤粘着フィルム密着

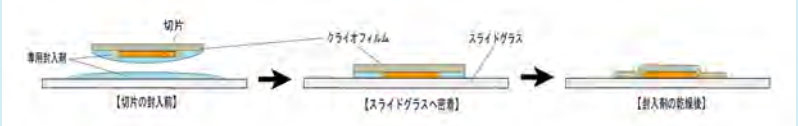
⑥凍結薄切



⑦染 色

⑧切片の封入

切片の封入手順



川本忠文博士（鶴見大学歯学部RI研究センター）によって考案実用化されました凍結切片作製法（川本法）は、硬組織や性状の異なった組織を含む大きな試料等、従来の方法で良好な凍結切片作製が不可能であった試料から形態が保たれた薄い凍結切片を容易に作製することができ、しかも形態観察に加えて、組織化学、免疫組織化学、遺伝子組織化学等、従来の研究目的に使用できる事から広く利用されています。

最新の川本法2008は、新たに開発されました封入剤（SCMM－R2, R3）を使用することにより、硬組織等からでも試料採取から20分以内に永久切片標本を作製でき、組織を鮮明に観察できます。

参考文献

1）川本忠文：－ Overview －非脱灰凍結硬組織標本の可能性－組織化学への応用と最新知見、Medical Technology、Vo37, No11:1209-1213、2009

2）川本忠文：－ 特集（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、病理技術研究会誌、72：76-83、2009

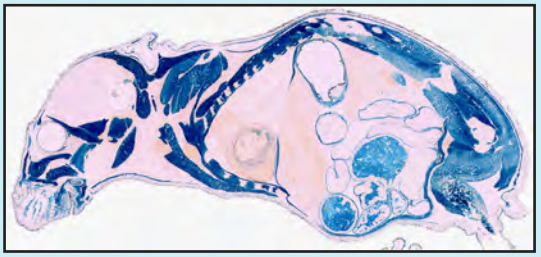
3）川本忠文：未固定非脱灰試料からの多目的新鮮凍結切片の作製と応用、組織細胞化学2005、日本組織細胞化学会編、pp. 95-107、2005

4）Kawamoto T. : 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 Vol. 66: 123-143, 2003

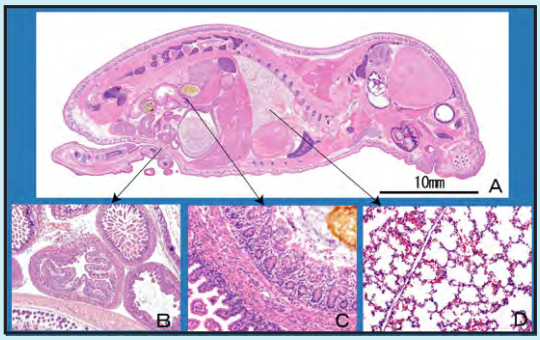
凍結切片の応用

最新応用例は下記HP参照
(http://section-lab.jp)

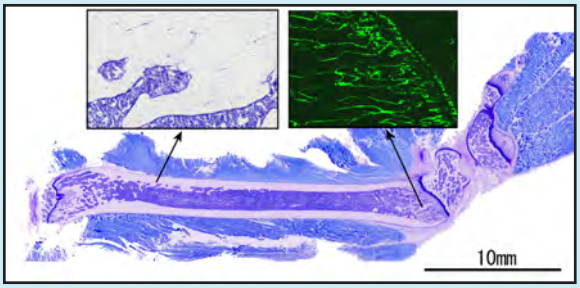
新鮮凍結切片　(5μm)



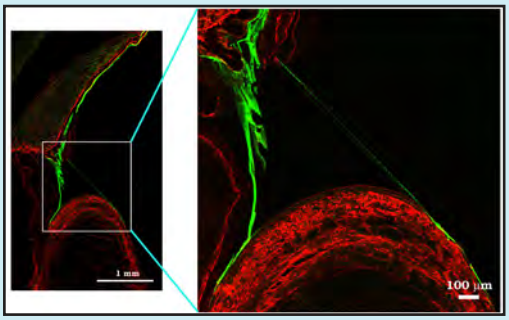
β-ガラクトシダーゼ活性染色（成熟マウス未固定非脱灰凍結切片）
（御提供：塩塚政孝先生（東京大学大学院総合文化研究科））



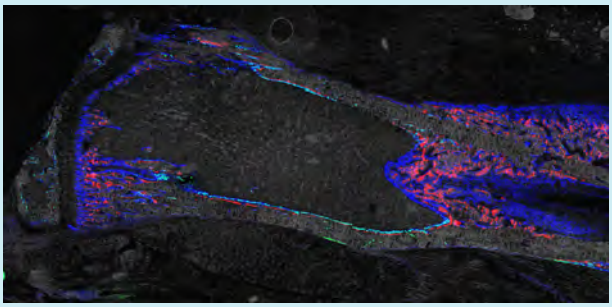
未固定非脱灰凍結切片（7日齢マウス、5μm）、H-E染色



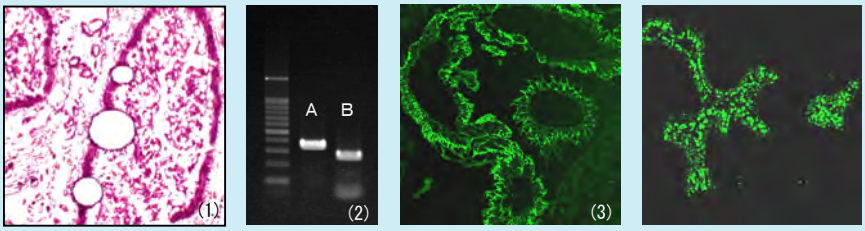
未固定非脱灰凍結切片（7ケ月齢ラット大腿骨、4μm）
トルイジンブルー染色



免疫染色（猿の眼球）、（緑:Fibrillin-1、赤:α-elastin）
（写真：平岡満里先生（秋田大学医学部解剖学第二講座）御提供）



GFPで標識された細胞（成熟マウス脛骨非脱灰凍結切片）
（御提供：牛久智加良先生（慈恵医大整形外科））



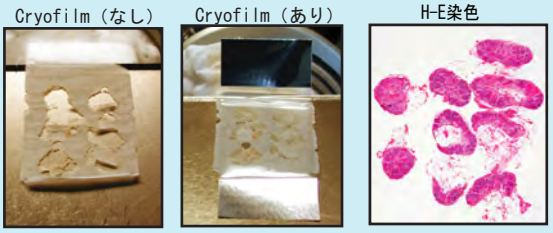
(1):LMDフィルムによる切片採取後、
　LMDによる標的細胞の採取
(2):採取試料の発現遺伝子解析結果
　A：GAPDH,　B: Caspase
(3):in-situ hibridizationによる
　発現遺伝子の分布
(4):TUNEL染色によるアポトーシス細胞
　の検出

遺伝子解析への応用（写真：川本孔明氏（日本大学大学院生物資源科学研究科）御提供）
LMDによる採取試料、その遺伝子解析、標的遺伝子のin-situ hybridization)

術中迅速組織診断用凍結切片作製

乳腺組織のように脂肪組織が混在した検体、軟骨を含む気管断端のような検体、石灰化組織を含む検体等から形態が保たれた良好な凍結切片を短時間で作製するにはかなりの苦労が伴います。

本キットは、多目的凍結切片作製キットを術中迅速組織診断用の凍結切片作製に適した構成にしたもので、乳腺、軟骨、石灰化組織、センチネルリンパ節等の検体を確実に切片標本にすることができます。



（センチネルリンパ節の切削状態）

（御提供：旭川医科大病院病理部）