

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℃	- 94℃
Pentane	36℃	-130℃
Isopentane	28℃	-160℃
Propane	-45℃	-190℃

2) 包埋容器に専用包埋剤(SCEM, SCCEM-L1)を入れ、包埋剤を少し凍結する(図2右)。注意: 冷蔵庫で冷却した包埋剤を使用し、包埋剤は包埋容器の5~9割程度まで入れる。

3) 凍結後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: 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: 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(包埋容器(大)で約 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: 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、木槌で包埋容器から凍結ブロックを押し出す(図4)。

7) 凍結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

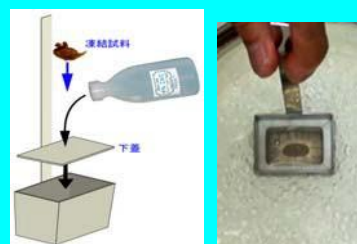


図2 試料の凍結包埋

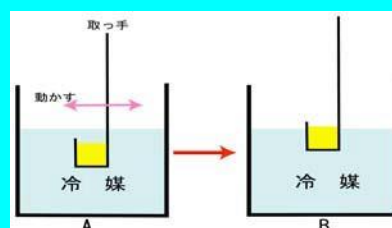


図3 包埋剤の凍結操作
A: 初期凍結、B: 完全凍結

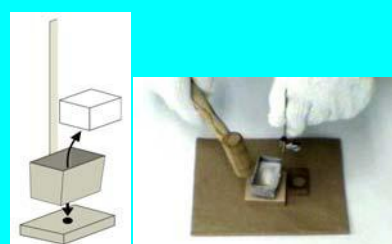


図4 凍結ブロックの取り出し
A: 凍結包埋試料取出し模式図
B: 凍結ブロック取出し操作

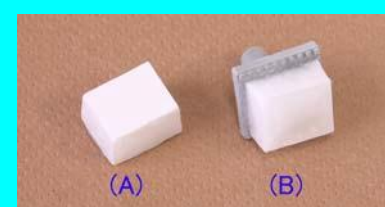


図5、凍結包埋ブロック
A: 凍結試料ブロック
B: 試料ホルダーに固定されたブロック

次ページあり

凍結包埋の注意点

凍結切片の品質は、試料の凍結包埋で決まると言っても過言ではない。新鮮試料は、特に試料凍結時の氷晶形成により損傷を受けやすいので、可能な限り試料を急速凍結し、凍結試料が再解凍することなく凍結包埋する等の注意が必要である。

1) 冷却剤について

試料凍結には、種々の冷却剤が使用され、液体窒素を除いて、冷却装置あるいはドライアイスか液体窒素で冷却して使用する。液体窒素は温度が最も低いために試料凍結に適していると思われるが、試料を没入すると気泡が試料表面を包み込み、冷却能を低下させる欠点がある。冷却能は、液体窒素で冷却した液体プロパンが最も良く、次いでイソペンタンである。ペンタンとヘキサンは沸点がイソペンタンより高いために安全で扱いやすい冷却剤で、しかも比較的良好な凍結試料を作製することができる。

氷晶形成による損傷は組織により異なり、未固定の筋組織や赤血球などは冷却プロパンあるいはイソペンタン等を使用しなければ良好な組織像を呈さない。大部分の組織は他の冷却剤でも十分に組織を観察することができる。冷却剤として冷却アセトンを推奨する文献もあるが、アセトンは凍結試料や凍結包埋剤中に浸透し、薄切面への Cryofilm の貼付の妨げとなるために避けなくてはならない。

2) 化学固定試料の凍結

氷晶形成による組織の損傷はパラフォルムアルデヒド(paraformaldehyde: PFA)等で組織を化学固定することにより改善するが、固定時間が長くなると Cryofilm の粘着支持力が低下する。化学固定による氷晶形成による組織損傷の軽減は、数分間の還流固定でも顕著である。Cryofilm の粘着支持力は、還流固定を 10 分程度行っても殆ど低下しないので、実験に問題がなければ短時間の還流固定、還流固定ができない試料は短時間の浸漬固定をするとよい。

3) 氷晶防止剤

従来の凍結包埋では、氷晶形成による組織の損傷をさけるために氷晶防止剤(ショ糖、DMSO、PVP、グリセリン等)が使用されている。氷晶防止剤の濃度が高くなると効果が大きいですが、凍結ブロックが柔らかくなり、組織を支持できなくなって組織の脱落やチャタリング等の原因になる。硬組織試料には硬い包埋ブロックが望ましく、氷晶防止剤を使用する場合は、できるだけ低濃度で使用する。本法のように試料のみを急速凍結する場合、固定試料であれば氷晶防止剤を用いなくても顕微鏡観察に問題ない凍結試料を作製できる。

4) 凍結包埋剤

OCT コンパウンドは、氷晶の出来にくい包埋剤で、クリオスタット内で氷晶防止剤中に浸漬した試料を凍結包埋することができる便利な包埋剤である。しかし、凍結 OCT の硬さでは硬い組織を支持することができない場合がある。

カルボキシメチルセルロース(CMC)ゲルは、全身オートラジオグラフィ用切片を作製するために使用されてきた包埋剤で、急速凍結しないとCMCゲル中に氷晶が形成され、凍結薄切の障害となる欠点がある。しかし、凍結 CMC は非常に硬く、骨などの硬組織を十分に支持することができる。更に、切片のカーリングは OCT に比べて少なく、且つ薄切による切片の縮みが少ない利点がある。また、Cryofilm との粘着性においても OCT より優れている。

本法のために開発されたSCEM(Super Cryoembedding Medium)はCMC系包埋剤で、粘着フィルムとの粘着性と切削性が改善され、本法に最適な包埋剤である。脂肪が多く含まれている組織は低温での切削が適しているために-40℃以下で切削する場合がある。その場合は低温切削ように開発されたSCEM-L1が適している。SCEM-L1は-50℃でも使用できる。

[次ページあり](#)

特殊な試料の凍結結包

1) 大きい試料

基本的手順は、通常のプロトコールと同じであるが、試料凍結時のクラックを避けるために次の事に注意する。

- ・試料のクラックは、試料により一定の経過時間(試料の大きさにより異なる)に発生するので、その直前に試料を包埋剤中に入れ、直ちに凍結包埋することによりクラックを軽減する事ができる。
- ・低温度の冷却剤(液体窒素等)を使用するとクラックが発生しやすいので、氷晶による組織の損傷に問題がなければ、ヘキサン+ドライアイス(約-75℃)、装置で冷却したヘキサン(-94℃)等を使用することにより軽減することができる。

2) 小さい試料

基本的手順は、通常のプロトコールと同じであるが、凍結包埋時に解凍するような小さな試料は、試料の解凍を避けるために次の手順で凍結包埋する。

包埋容器中の包埋剤を冷却剤で少し凍結した後、凍結試料を包埋剤中に入れて凍結包埋する。あるいは包埋容器中の包埋剤を完全に凍結した後、凍結ブロックに試料より少し大きめの穴を作り、そこに包埋剤と試料を入れて凍結包埋する。

3) 極めて小さい試料

上記の方法でも試料が凍結包埋中に解凍するような試料は、次の方法により試料の解凍を避けながら凍結包埋する。

- ・凍結試料を包埋剤中に入れて試料表面に少量の包埋剤を付着させ、直ちに冷却剤に入れて急速凍結する(試料の解凍を避けるために敏速に行う)。凍結試料を包埋容器に入れて凍結包埋しても解凍する恐れがなくなる大きさになるまでこの操作を繰り返す。
- ・凍結試料に包埋剤をコートする方法でも試料が解凍するような小さい試料は、包埋剤をコートした試料を急速凍結し、それを上記の方法により解凍しないように凍結包埋する。

4) 植物試料

- ・植物は組織中に気泡を含んでいるので脱気操作を行ってから凍結包埋する。
- ・豆等の乾燥穀類から凍結切片を作製する場合は、水分をしみこませてから凍結包埋する。
- ・稲の葉のように撥水性の試料から凍結切片を作製する場合は、表面活性剤(例えば、Tween20 等)で親水処理してから凍結包埋する。

5) 昆虫

- ・昆虫は組織中に気泡を含んでいるので脱気操作を行ってから凍結包埋する。
- ・比較的大きい昆虫はプロトコール1で凍結包埋する。ショウジョウバエ等の小さい昆虫は包埋剤中に入れて凍結包埋する。

凍結包埋ブロックの保存

試料をクリオスタット内に放置すると試料中の氷晶が成長し、数時間で組織を損傷するまで成長するので注意が必要である。通常、凍結包埋試料はチャック付ビニール袋に入れて超低温庫(-80℃)に保存する。薄切中の試料は、薄切面に Cryofilm を貼付してから保存する。超低温庫保存では、1 年以上の保存が可能である。