

凍 結 薄 切

1)凍結包埋ブロックを接着した試料ホルダーを凍結マイクロームに取り付け、試料温度がクライオスタット内の温度に達するまで放置(20～30分)する。

注意1: 試料に応じて、試料温度、クライオスタット内温度を調節する。

注意2: クライオスタット内の温度は、試料近傍を測定する。

2)トリミング後、薄切面にCryofilmを貼付する(図1)。

注意1: 厚さ 3～5 μm で連続して切れることを確認してから切片採取作業に入る。

注意2: 硬組織の薄切では、刃先の損傷を避けるために厚切りしない(5 μm 以下)。

3)Cryofilmを密着用具で薄切面に粘着した後、一定速度でゆっくりと薄切する(図2、3)。

4)凍結切片をクライオスタットから取り出し、解凍する(図4)。

注意1: 解凍後の放置(乾燥)時間は、試料により決定する。動物組織では 10～30 秒程度、植物試料では 60 秒程度。

注意2: 切片を完全に乾燥すると、乾燥収縮によるクラックが現れる。

5)切片面を下に向けて 100%エタノール中に入れる。

注意1: アルコールを経ないで解凍切片を固定液に浸漬すると組織が剥離する場合がある。

6)次いで、切片面を下に向けて固定液(4%PFA)にいれる。

注意1: 固定時間は数分で十分である。

7)水洗後、染色操作に移る。

注意1: 未固定で免疫染色する場合、凍結乾燥切片を使用する。



図1 Cryofilmの貼付



図2 Cryofilmの密着



図3 凍結薄切



図4 切片の解凍



図5 切片の固定

[次ページあり](#)

凍結薄切上の注意点

凍結薄切で、切片の品質に影響するのは、ナイフ、切削角、切削温度、切削速度等である。

1) ナイフについて

薄切操作で最も切片の品質に影響を与えるのはナイフの鋭利さである。現在は替刃が主流で、ナイフの研磨が問題になることは殆どなく、いかに目的に適した替刃を選択し、刃先の状態を正確に把握するかにかかっている。

- ・軟組織用には、数社から異なった形状の替刃が販売されている。大きく分けると、切片の流れを良くするためにフッ素樹脂でコートした替刃と、切片のカーリングを防ぐための無コートの替刃がある。クライオフィルムを用いる方法では、切片のカーリングを心配する必要がないため切削性の良いものを使用する。
- ・硬組織用には、特殊鋼製とタングステンカーバイド製があり、切削性と耐久性においてタングステンカーバイド製が圧倒的に優れている。タングステンカーバイド製には、一本刃と替刃式があり、替刃式は専用替刃ホルダーが必要になるが、切片の品質、作業性、経済性等を総合的にみて優れている。

2) 切削角について

物を切削すると、「せん断」(刃先の切削部位で切削片(切片)が折れる現象)が起こる。この現象は、切削角、切片の厚み、試料の硬さ等により異なり、切削角が大きいほど、切片が厚いほど、試料が硬いほど顕著になる。軟組織では、軟組織用ナイフの切削角が小さく、しかも組織が柔らかいので問題になることは少ない。しかし、硬組織では、硬組織用ナイフの切削角が大きく、しかも試料が硬いので「せん断」が起こりやすい。硬組織試料は 3 μ m 程度以下にしないと解決できない場合が多い。

3) 切削温度について

従来の OCT コンパウンドに包埋した試料であれば-15 $^{\circ}$ C程度で良好な凍結切片を作製することができる。CMC ゲル包埋の場合も同様に、軟組織であれば、-15 \sim -20 $^{\circ}$ C程度で良好な凍結切片を作製できる。しかし、組織により-20 $^{\circ}$ Cでは硬さが足りず良好な切片を作製することが困難な場合がある。その様な試料は、温度を下げて試料を硬くして薄切する。例えば、老齢マウスの脳は、-20 $^{\circ}$ Cで薄切すると脳組織にスタレ状の模様が現れる場合があり、より低い温度(例えば、-30 $^{\circ}$ C)で薄切することにより改善する。硬組織についても同様に、-20 $^{\circ}$ C以下にしないと硬組織周囲組織が硬組織を支持するのに十分な硬さにならず、硬組織が壊れる場合がある。切削温度は試料近傍で測定しないと意味がなく、温度センサーの位置を確認する必要がある。温度センサーの位置が、試料近傍にない場合は、センサーを移動するか、新たなセンサーを取り付けて測定する。

4) 切削速度について

薄切は、試料によるが、ゆっくりと薄切すると良い切片を作製できる。切片の厚みは、薄切速度により変化するので一定速度で薄切する。

[次ページあり](#)

硬組織の凍結薄切手順

- 1) タングステンカーバイド製替刃で目的試料面までトリミングする(-20°C以下)。
- 2) トリミング後、鋭利な刃先を切削部位に移動し、次いで切片の厚みを 3 μm 程度に設定して切片が連続して切削できることを確認する。
- 3) Cryofilmを薄切面に密着する。
- 4) 切削部位(刃先)での凍結切片の剥離を避けるために、綿棒等で粘着フィルムを軽く押し、左右に動かしながら、ゆっくりと一定速度で切削する。
- 5) 切片が貼り付いたCryofilm(Cryofilm-切片)の切片面をクリオスタット内の金属板にに向けて置き、密着用具等で切片を粘着フィルムに確実に密着する。
- 6) 粘着フィルム切片をクリオスタットから取り出し、解凍する。
- 7) 解凍後、切片面を下に向けて 100%エタノール中に入れる。
- 8) 次いで切片面を上に向け、容器を真空容器中に置き、気泡が出なくなるまで脱気する(数十秒で気泡がでなくなる)。
- 9) 直ちに、粘着フィルム切片の切片面を下側に向けて PFA 等の固定液に入れる。

注意: 硬組織の封入は、グリセリン系の封入剤と骨の屈折率の差が大きいため観察時に骨周囲に回折現象が顕著になる。この現象は、SCMM-R2あるいは R3 を使用することで解決する。