
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

川 本 忠 文

Key words • F

硬組織(hard tissues)、植物(plants)、昆虫(insects)、新鮮凍結切片(fresh frozen section)、全身切片(whole-body section)、組織化学(histochemistry)、酵素組織化学(enzyme histochemistry)、免疫組織化学(immuno histochemistry)、遺伝子組織化学(in situ hybridization)

はじめに

近年、遺伝子解析や遺伝子工学を主体とする分子細胞生物学が隆盛を極め、生命科学、医療、品種改良等の分野で極めて大きな力を発揮している。これらの研究において、タンパクの局在を免疫組織化学的手法により明らかにすることに加えて、組織における遺伝子の発現部位や発現時期を明らかにすること、遺伝子操作した遺伝子の発現状態を確認すること等が重要になってきている。これらの目的にはパラフィン包埋試料あるいは凍結試料から作製した切片が使用されているが、固定や脱灰等によるタンパクの変性や可溶性成分の溶出等の問題がある。タンパクの変性については抗原性賦活化処理が行われているが、それでも対応できない試料がある。凍結切片は、固定・脱灰等による組織への影響を回避することができるが、形態を良好に保った凍結切片を作製することが困難な試料(例えば、肺、眼球、皮膚、植物など)、極めて困難な試料(骨等の硬組織を含む試料)がある。

そのような試料から形態を保持した凍結切片を作製するために様々な手法が試みられ、それらの中で粘着支持材を使用する方法が最もよい結果となっている。これまで粘着支持材として梱包用粘着テープが使用されてきたが、近年凍結切片作製の粘着フィルム(クライオフィルム)が開発され、実用化された。クライオフィルムを使用することにより、従来の方法で凍結切片を作製することが困難な試料(例えば、硬組織を含む試料、肺、眼球、皮膚、植物等)、性状の異なった組織を含む試料(例えば、全身

マウス)等から形状が保持された極めて薄い(2 μm)凍結切片を特別な技術、訓練なくして作製することができるようになった。凍結切片は、未固定非脱灰の新鮮試料から作製することができるため、図1に示すように様々な目的に使用することができる。

本項では、クライオフィルムを用いた凍結切片作製と応用について述べる。内容は次の通りである。

- ・ 凍結包埋
- ・ 切片支持用粘着フィルム
- ・ 凍結薄切
- ・ 切片の染色
- ・ 切片の封入
- ・ 切片の転写
- ・ LMDによる微小試料採取
- ・ E P M A 観察
- ・ オートラジオグラフィ
- ・ 応用写真

凍結包埋

凍結切片の品質は、凍結包埋時の氷晶形成による組織の損傷程度と、薄切時の切片の均一性(厚さ等)により決まる。前者については研究者自身の知識(経験)、技量により大きな差が現れる。後者については、器材、装置によるところが大で、現在の凍結ミクロトームは特別な試料(硬組織、大きな試料)を除いて均一な凍結切片を作製することができる性能を持っている。つまり、高級機を使用した場合、凍結切片の品質は、凍結包埋で決まってしまうと言っても過言ではない。

新鮮試料や大きな試料は、氷晶による組織の損傷

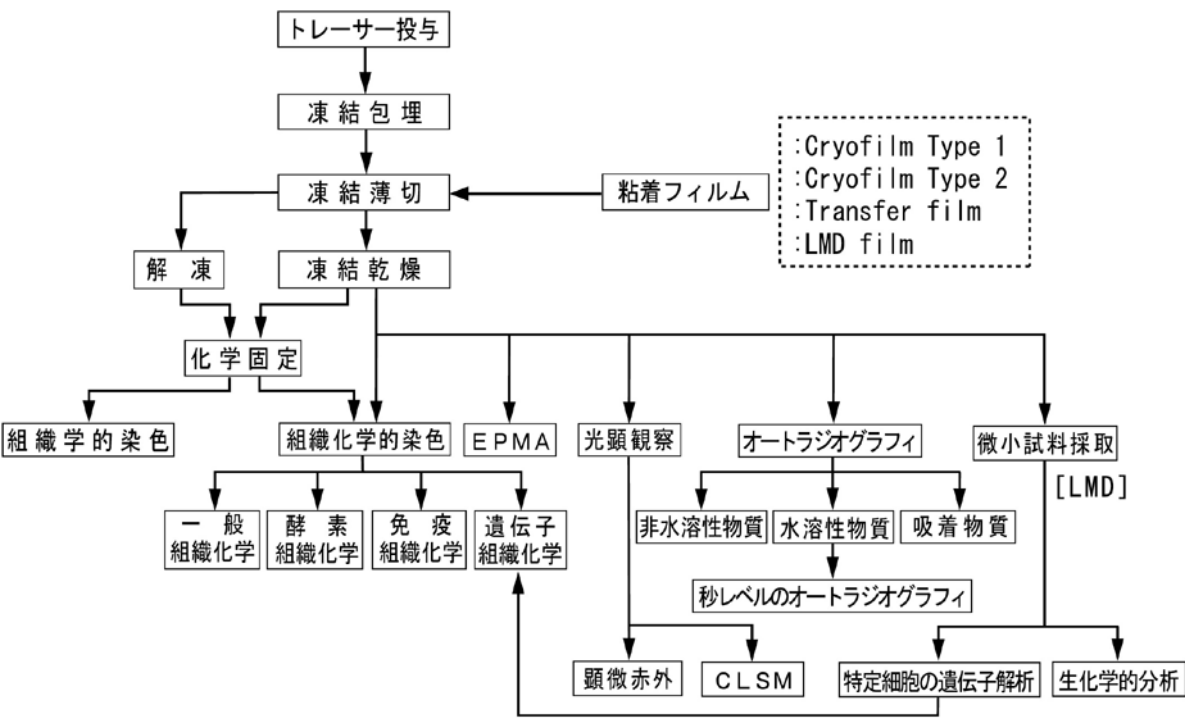


図 1 凍結切片の応用
LMD:laser microdissection, CLSM:共焦点レーザー走査顕微鏡

を受けやすく、赤血球や筋等のように特に損傷を受けやすい組織に対しては細心の注意が必要である。損傷を受け易い試料については、試料のみを可能な限り急速凍結し、試料が解凍しないように迅速に凍結包埋しなくてはならない。

凍結包埋ブロックの作製については、凍結切片の採取にクライオフィルムを使用するため、包埋剤、凍結包埋ブロックの形状に注意が必要となる。

まず凍結包埋上の注意点を述べ、次いで基本的な手技を述べる。

1 . 凍結包埋上の注意

1) 冷却剤について¹⁾

表 1 に示すような冷却剤が試料凍結に使用され、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高く安全で扱いやすい冷却剤で、しかも比較的良好

表 1 冷媒 (国際化学物質安全性カードによる)

冷 却 剤	沸 点	融 点
n-Hexane	69℃	-95℃
Pentane	36℃	-129℃
Isopentane	28℃	-160℃
Propane	- 42℃	-190℃
液体窒素	-196℃	-

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、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、薄切面へのクライオフィルム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ホルムアルデヒド(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クライオフィルム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、還流固定を数分間行うことによっても顕著である。クライオフィルムの粘着支持力は、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いよい。

3) 氷晶防止剤^{2), 3)}

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、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。硬組織試料において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光顕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。

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、クライオフィルムとの粘着性においてもOCTより優れている。試料に応じて3~5%濃度で使用され、自前で作製することができるが、市販の4%CMC(FINETEC Co. Ltd. 府中市)を調整する方が簡便である。

2. プロトコール1(標準的な試料)

1) 試料を採取する(還流固定した試料は、摘出後直ちに凍結してもよい)。

- 2) 試料をステンレス製カゴに載せて冷却剤に入れ、カゴを動かしながら急速凍結する(図2-A、B)。
- 3) 試料の大きさに合ったステンレス製包埋容器に適当量の3~5%CMCゲルを入れる(図2-C)。
- 4) 凍結試料表面の冷却剤を拭き取り、凍結試料をCMCゲル中に没入する。
- 5) 凍結試料の解凍を避けるために包埋容器を冷却剤に沈め、包埋容器を動かして急速凍結する(図2-D)。
- 6) CMCゲルの上部が少し凍結した時に包埋容器を引き上げ(10~20秒後) CMCゲルの上面を液面上に出し、その状態でCMCゲルを完全に凍結する(図2-E)。(注意: 没入状態で完全凍結すると凍結CMCブロックにクラックが発生する。)
- 7) CMCゲルの凍結後、包埋容器から凍結CMCブロックを取り出し、凍結マイクロトームの試料台に強く押し付けることにより試料台に接触した凍結CMCの一部を解凍する(図2-F, G, H)。
- 8) CMCブロックの接着後、試料台を冷却液に没入するか、クリオスタットの試料凍結台に置くことにより一部解凍したCMCゲルを凍結し、CMCブロックを試料台に固定する(図2-I, J)。

3. プロトコール2(特殊な試料)

1) 大きい試料

基本的手順は、プロトコール1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。

- ・試料のクラックは凍結開始後ほぼ決まった時間(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CMCゲル中に入れ、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(-95℃)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

基本の手順は、プロトコール1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

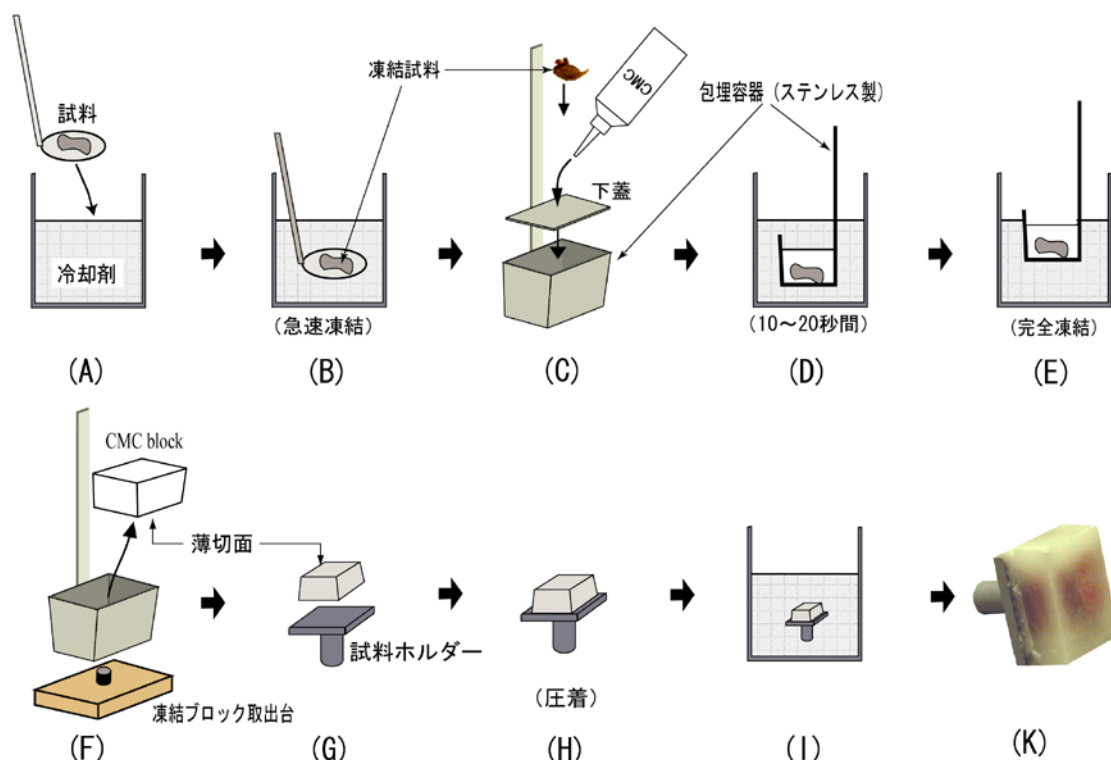


図2 凍結包埋手順

解凍を避けるために包埋方法の一部を修正する。

- ・包埋容器中の CMC ゲルを冷却剤で少し凍結した後、凍結試料を CMC ゲル中に入れて凍結包埋する。あるいは包埋容器中の CMC ゲルを完全に凍結した後、CMC ブロックに試料より少し大きめの穴を作り、そこに CMC ゲル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 CMC ゲル中に入れて試料表面に少量の CMC ゲルを付着させ、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 CMC ゲル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、CMC ゲル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

- ・豆等の乾燥穀類から凍結切片を作製する場合は、穀類に水分を含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⁴⁾。

5) 昆虫

- ・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 CMC ゲル中に入れて凍結包埋する。

4. 凍結包埋ブロックの保存

・切片支持用粘着フィルム

これまで、凍結切片支持用粘着フィルムは使用直前に専用の粘着剤（Cryoglue）をサララップに塗布することにより準備していた^{5, 6)}。現在は、専用の粘着剤を塗布したプラスチックフィルムを剥離紙に密着させたシート状のものが販売（FINETEC Co. Ltd.

府中市)され、使用時に切断するようになっている(図3)。使用目的に応じて、Cryofilm Type 1、Cryofilm Type 2、Transfer film、LMD film の4タイプが用意されている(表2)。各フィルムは随時改良され、現在は-40℃程度まで切片を粘着支持することができ、しかも染色切片を永久標本として封入保存できるようになっている。適当な粘着フィルムがない場合は、特殊用途向けの粘着フィルムも用意されているので、メーカーに問い合わせることもできる。各タイプの特徴は次の通りである。

1. Cryofilm Type 1シリーズ

この粘着フィルムは表2に示すような目的に使用できる。Type 1Bは、Type 1に比べ耐熱性が改善され、70℃中に放置しても殆ど収縮しない。アセトン、キシレン等の有機溶媒に対する耐薬品性も改善され、アセトン固定を行える。また、切片の脱水後、キシレンを経てパラフィン切片封入剤(Entellan Neu等)で永久標本として切片を封入保存できる。切片をグリセリン封入する場合は、Type 1かType 1B(6)を使用しないと保存中に気泡が発生する場合がある。永久標本とする場合は、Type 1B(6)とType 1B(12)を使用することができ、作業性はType 1B(12)がよい。

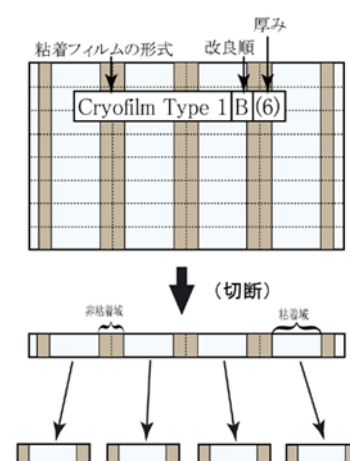


図3 粘着フィルムの準備

このシリーズの欠点は、切片をグリセリン封入すると、保存中に粘着剤が染色される場合(トルイジンブルー等)があることである。

2. Cryofilm Type 2シリーズ

用途は表2に示す通りで、Type 1シリーズに比べて粘着剤が染色されることは殆どなく、トルイジンブルー染色を行うことができる。Type 2Bは、フィル

種 類	用 途
Cryofilm Type 1 シリーズ [Type 1 Type 1B (6) Type 1B (12)]	組織学的染色(トルイジンブルー不) 組織化学 免疫組織化学 蛍光免疫組織化学 in situ hybridization
Cryofilm type 2 シリーズ [Type 2 Type 2B (6)]	組織学的染色(トルイジンブルー可) 組織化学 免疫組織化学 蛍光免疫組織化学 in situ hybridization
Transfer film シリーズ	切片をスライドガラスへ転写
LMD film シリーズ	LMD による微小試料片採取

表2 粘着フィルムの種類と用途 (平成17年2月28日現在)

ムの平滑性が改善されているが、アセトン、キシレン等の有機溶媒に対する対薬品性は低く、現時点（平成17年2月28日）ではパラフィン切片用封入剤で切片を永久標本として封入保存できない（将来的には、永久標本対応型が供給されるであろうから購入時に確認するとよい）。

3. Transfer film

Transfer シリーズは、粘着フィルムを用いて作製した切片を、粘着フィルムに貼り付いた状態で染色を行った（未染色でも転写可）後、スライドガラスに切片のみを転写することができる。凍結切片用とパラフィン切片用があり、目的にあったフィルムとプロトコルを使用する。

4. LMD film

レーザマイクロダイセクションによる微小試料採取のために開発された粘着フィルムで、切片が粘着フィルムに貼り付いた状態でレーザ光で切断し、微小試料片を採取することができる。切断した試料片は遺伝子解析に使用することができる。

凍結薄切

凍結薄切で、切片の品質に影響を与えるのは、ナイフ、切削角、切削温度、切削速度等である。まず良好な切片を得るための注意点を、続いて凍結薄切手順について述べる。

1. 薄切上の注意

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、数社から色々な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う。

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、一本刀と替刃式（Leica TC-65）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

物を切削すると、せん断（刃先の切削部位で切片（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現れる。軟組織用ナイフの切削角は小さく、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、硬組織用ナイフの切削角は大きく、せん断が起こりやすい。筆者の経験では、硬組織試料は3 μm 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

従来の OCT コンパウンドに包埋した試料であれば、-15 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 ~ -20 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 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。そのような試料は、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 で薄切すると脳組織にヒビ割れ状の模様が現れる場合があり、ヒビ割れは、より低い温度（例えば、-30）で薄切することにより改善する。

4) 切削速度

・薄切は、試料にもよるが、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。

2. プロトコル 1（通常薄切）

- 1) CMC ブロックを固定した試料ホルダーを凍結ミクロトームの試料台に装着し、試料温度がクリオスタート温度に達するまで放置する（通常、20 ~ 30 分）
- 2) 目的の試料面までトリミングした後、鋭利な刃先部分を切削部位に移動する。

- 3) 切片の厚みを $3\mu\text{m}$ 程度に設定し、連続して切削できることを確認する。
- 4) 粘着フィルムをフィルム貼付用ピンセットで薄切面に置き、次いでフィルム密着用具（柔らかい紙、布等でもよい）で確実に薄切面に密着する（図4 - A, B）。
- 5) 一定速度（ $2\text{mm}/\text{秒}$ 程度）で、ゆっくりと薄切する（図4 - C）。
- 6) 凍結切片が貼り付いた粘着フィルムの両端を両面テープで冷却したスライドガラス（クリオスタット内）に固定する。
- 7) 粘着フィルムを固定したスライドガラスをクリオスタットから取り出し、凍結切片を解凍する（図5）。
- 8) $15\sim 30$ 秒間の放置（半乾き）後、 100% エタノール中に入れ、次いでPFA等の固定液に移す。完全に乾燥することもできるが、組織によりヒビ割れが現れる場合がある。

3. プロトコル2（切片の大量薄切）

- 1) プロトコル1の1)～5)の手順で薄切する。
- 2) 薄切後、直ちに凍結切片が貼り付いた粘着フィルムをクリオスタットから取り出し、解凍する。
- 3) $15\sim 30$ 秒後、解凍切片の切片面を下に向けて 100% エタノールに入れ、次いでPFA等の固定液に移す（図5）。固定液中の切片を必要に応じて取り出して使用する。
- 4) 水洗は、図6のようにクリップで固定して行う。

4. プロトコル3（硬組織の凍結薄切）

- 1) タングステンカーバイド製替刃で目的試料面でトリミングする。
- 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 $3\mu\text{m}$ 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) 粘着フィルムをフィルム貼付用ピンセットで薄

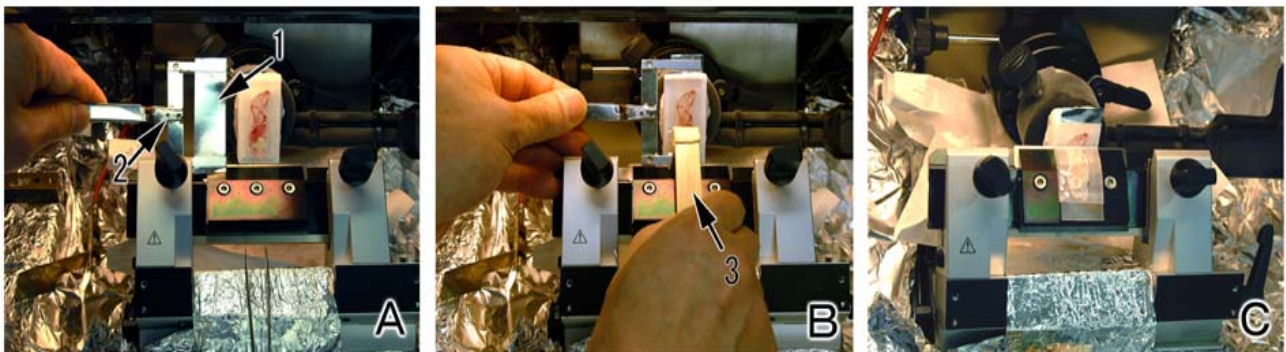


図4 凍結薄切●@

粘着フィルムの貼付、B：粘着フィルムの密着、C：凍結薄切

矢印1：粘着フィルム、矢印2：粘着フィルム貼付用ピンセット、矢印3：密着用具

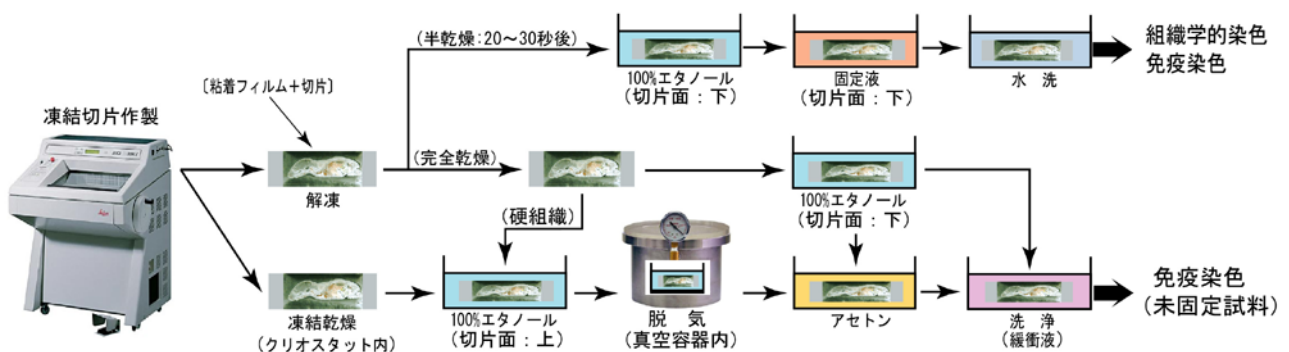


図5 切片の処理

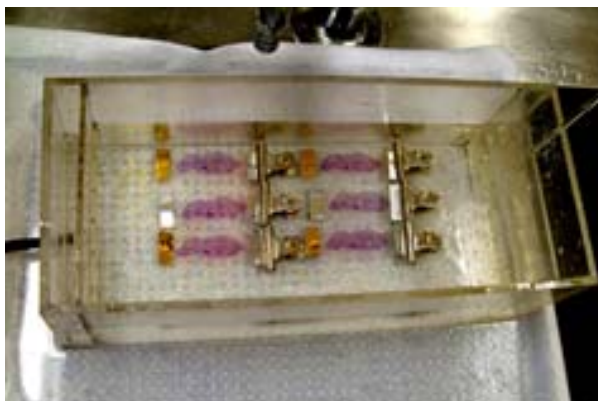


図6 切片の水洗
クリップで固定した切片

- 切面に置き、フィルム密着用具（柔らかい紙、布等でもよい）で確実に密着する（図4 - A, B）。
- 4) 切削部位（刃先）での凍結切片の剥離を避けるために、筆で粘着フィルムを軽く押し、筆を左右に動かしながら、ゆっくりと一定速度で薄切する。
 - 5) 切片が貼り付いた粘着フィルム（粘着フィルム切片）の切片面を冷却したステンレス板に向けて置き、冷却ゴム製ローラーで切片を粘着フィルムに確実に密着する（全てクリオスタット内で操作）。
 - 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) 次に切片面を上に向け、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。

・ 切片の染色

1. 通常の染色、組織化学、免疫組織化学⁷⁾

染色は、粘着フィルムに貼り付いた切片に染色液を滴下して行う。染色性、酵素反応等は、パラフィン包埋切片に比べて格段に良い。免疫染色条件（抗体濃度、反応時間）はパラフィン切片の条件と異なる場合があり、染色条件を決定してから染色する。水洗は切片の剥離を避けるために緩やかな流水中で行う（図6）。腱、軟骨等は、特に剥離し易いので細心の注意を払う。

の注意を払う。

2. 組織化学、免疫組織化学等への未固定非脱灰切片の応用^{8), 9), 10)}

染色手技は上記と同じであるが、未固定非脱灰切片は剥離し易いので染色操作に注意する。切片の剥離は、凍結乾燥、あるいは解凍切片の完全乾燥により改善する。凍結乾燥は、クリオスタット内の温度の低い場所（-20℃以下）で行う。5 μm程度の切片であれば1時間ほどで乾燥し、乾燥状態は切片の色（白くなる）で判定できる。

鮮明さは、抗原の種類にもよるが凍結乾燥切片が優れている場合が多い。凍結乾燥切片を使用する場合、組織中の気泡を除去するために脱気操作（切片を100%エタノールに入れて真空容器内に置く）を行ってから使用する。

上記の方法でも切片が剥離する場合、切片をPFAで1～2分程度の浸漬固定を行う。

・ 切片の封入

切片の封入では、粘着フィルムの基材であるプラスチックフィルムがカバーガラスの代わりになり、粘着フィルムとスライドガラスの間にグリセリンあるいはパラフィン切片用封入剤で切片を封入する。蛍光免疫染色では、蛍光の退色を軽減するために市販の封入剤あるいは自前で調整した封入剤¹¹⁾を使用する。油浸レンズで観察する場合、更にパラフィン用封入剤を用い、カバーガラス下に封入する。

1. グリセリン封入

グリセリン封入は、組織の収縮が殆どなく、非常に綺麗な組織像を示す。標本の保存期間は染色により異なり、免疫染色では6年間保存した標本でも問題なく観察することができる。グリセリンに溶出する染色剤（例えば、トルイジンブルー、エオジン等）が用いられた場合、長期保存中に色素が拡散して鮮明が悪くなる場合がある。そのため、グリセリン封入した標本は、できるだけ早く撮影記録する。

グリセリン封入には、Cryofilm Type 1、あるいはCryofilm Type 1B(6)、Cryofilm Type 2B(6)等の粘着フィルムを使用し、下記の手順で封入する。

- 1) 染色切片の水洗後、30%グリセリンを切片上に滴下する（図7A）。

- 2) 切片を両面テープでスライドグラスに固定している場合は、切片部分を両面テープから切り離す。クリップでスライドグラスに固定している場合は、クリップを外す。
- 3) 粘着フィルム切片の切片面を 30%グリセリンを塗布したスライドグラスに向けて置く (図 7 B)。
- 4) 余分な封入剤を濾紙で押し出しながら吸い取り、粘着フィルムをスライドグラスに密着する (図 7 C)。(注意: グリセリンを除きすぎると保存中に気泡が現れる場合がある (特に硬組織)。対策として、少し多めにグリセリンを残すか、少し高い濃度のグリセリンを使用する。)
- 5) 粘着フィルムの密着後、不要部分を切り取る。
- 6) 切片を一昼夜放置する。切片がスライドグラスと粘着フィルムの上にサンドイッチ状態で保存される (図 7 D)。

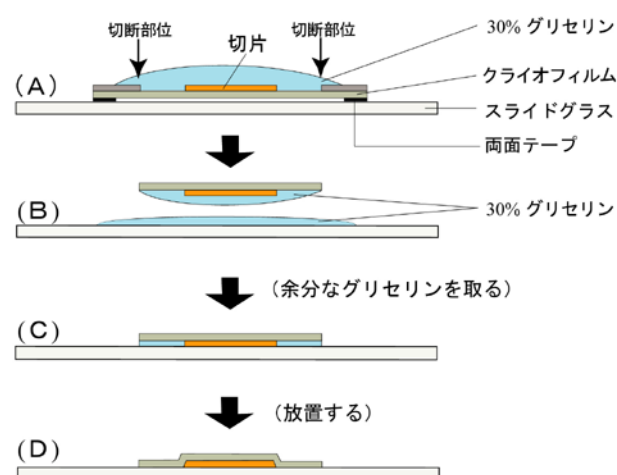


図 7 切片の封入

2. 永久標本

パラフィン切片用封入剤 (Entellan Neu 等) を使用することにより標本をパラフィン切片と同様に永久標本とすることができる。切片はグリセリン封入と同様にプラスチックフィルムとスライドグラスの間にサンドイッチ状態で封入保存される。組織像は鮮明であるが、組織がキシレンにより収縮し、ひび割れが現れる場合がある。

永久標本作製にはキシレン対応型粘着フィルム (Cryofilm type 1B(6), 1B(12) 等) を使用する。封入は下記の手順で行う。

- 1) 凍結薄切の「プロトコル 2」で作製した切片を使用する。
- 2) 染色・水洗 (図 6) 後、クリップを外し、粘着フィルム切片をエタノール系列で脱水する。
- 3) 脱水後、キシレンで約 2 分間透徹する。
- 4) 粘着フィルム切片の切片面をパラフィン切片用封入剤を塗布したスライドグラスに向けて置く。標本の出来上がりは、封入剤の塗布状態で決まり、できるだけ一様な厚さで、薄く塗布する。
- 5) 余分な封入剤を濾紙で軽く押し出しながら除く。

・ 切片の転写

粘着フィルムからスライドグラスへの切片の転写には Transfer film を使用する。転写は染色前あるいは染色後に行うことができる。新鮮凍結切片を未染色の状態転写すると、転写中に組織が融解する場合があります、特別な目的がなければ染色後に転写する。転写手順は下記の通りである。

- 1) Transfer film に貼り付いた染色切片を気泡が入らないようにシランコートスライドグラスに密着する (グリセリン等の封入剤は使用しない)。
- 2) ゴム製ローラーあるいは濾紙等を使って余分な水を除去し、数時間放置する。
- 3) 次に、ヘキサンを入れた密閉ボトルに切片を密着したスライドグラスを入れる (図 8 - A)。
- 4) Transfer film の粘着剤が溶けてプラスチックフィルムがスライドグラスから剥離するまで、スライドグラスを立てた状態でヘキサン中に放置する (図 8 - B)。
- 5) プラスチックフィルムが剥がれ落ちた後、スライドグラスを新しいヘキサン中に移し粘着剤を完全に溶解除去する (この操作は 2 回行う) (図 8 - C)。
- 6) 直ちに封入する場合、キシレンを経てパラフィン切片の封入と同様の手順で永久標本として封入

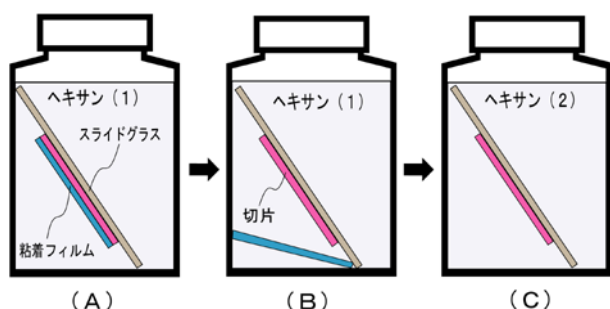


図8 切片の転写・②

A: 浸漬、B: プラスチックフィルムの剥離、
C: ヘキサンによる洗浄

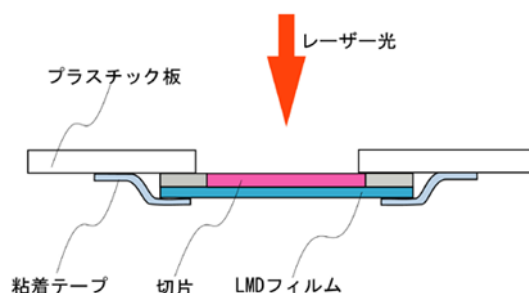


図9 LMDによる切片の切断

する。(注: キシレンへの浸漬時間が長いと収縮により組織が部分的に剥離するので、浸漬時間は短め(1分程度)にする。)

7) 転写切片を染色する場合、下降系列のエタノールでDWに戻し、染色操作を行う。染色後、パラフィン切片用封入剤あるいはグリセリン等で封入する。

・ LMDによる微小試料採取

レーザマイクロダイセクション (LMD) による凍結切片からの微小試料片の採取にはLMDフィルムを使用する。LMDフィルムはレーザー光により容易に切断できるように作製された極薄粘着フィルムで、この粘着フィルムを使用することにより硬組織、可溶性物質を含んだ凍結乾燥切片から微小試料片を採取できる。

1. プロトコル1 (通常試料)

- 1) 凍結薄切「プロトコル2」の手順で、LMDフィルムを用いて凍結切片を作製する。
- 2) トルイジンブルー、H-E染色、免疫染色等を行う。
- 3) 水洗後、図9に示す位置関係で染色切片を穴あきプラスチック板に粘着テープで固定する。
- 4) LMD装置の試料台に粘着フィルムが下になるようにプラスチック板を置く。
- 5) レーザ光により目的部位を切断し、落下させて試料片を回収する。

2. プロトコル2 (可溶性試料)

- 1) 未固定非脱灰試料からLMDフィルムを用いて凍結切片を作製する。
- 2) 凍結切片をクリオスタット内で凍結乾燥する。
- 3) 切片に水滴が付かないように凍結乾燥切片をシリカゲルを入れた密閉容器に入れてクリオスタットから取り出す。
- 4) プロトコル1と同様の手順で、切片が貼り付いたLMDフィルムを穴あきプラスチック板に固定し、レーザー光により目的部位を切断し試料片を回収する。

・ EPMA観察¹²⁾

組織中の元素分析にはCryofilm type 1B(12)を使用し、下記の手順で分析試料を作製する。

- 1) 凍結薄切「プロトコル2」の手順で未固定非脱灰試料から凍結切片(厚さ10~20 μm)を作製する。
- 2) 凍結切片をクリオスタット内で凍結乾燥(-20以下)する。
- 3) 切片に水滴が付かないように凍結乾燥切片をシリカゲルを入れた密閉容器に入れてクリオスタットから取り出す。
- 4) 切片が室温に達した後、分析部位を切り取り、両面テープでEPMA用試料台に固定する。
- 5) 切片の周囲に銀ペーストをコートし、カーボン蒸着を行った後、EPMA観察する。

・ 水溶性物質のオートラジオグラフィ^{13・A14・j}

オートラジオグラフィ用切片作製にはCryofilm type 1B(6)あるいは2B(6)を使用し、下記の手順でオートラジオグラフィを行う。

- 1) 放射性トレーサーを投与した未固定非脱灰試料から、凍結薄切「プロトコール1」の手順で凍結切片を作製する。(切片の厚さは、光顕オートラジオグラフィには2～5 μm、マクロオートラジオグラフィには5～15 μmを目安とする。)
- 2) 凍結切片をクリオスタット内で凍結乾燥(-20以下)する。
- 3) 切片に水滴が付かないように凍結乾燥切片をシリカゲルを入れた密閉容器に入れてクリオスタットから取り出し、室温に戻す。
- 4) 安全光下で、切片に光顕オートラジオグラフィには厚さ約1 μmの乾燥乳剤膜を、マクロオートラジオグラフィにはX線用フィルムを密着する。
- 5) 露光後、現像処理を行い、観察する。

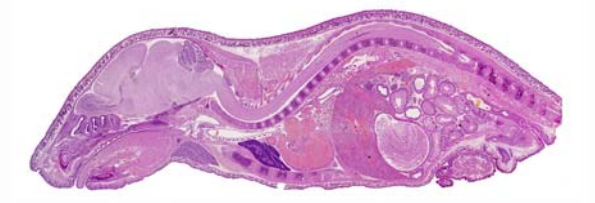
おわりに

本法により作製された凍結切片の組織学、組織化学、酵素組織化学、免疫組織化学、蛍光免疫組織化学、遺伝子組織化学等への応用が始まって数年しか経っていないが、これまで極めて困難、あるいは不可能とされていた研究が可能になり多くの成果を収めている。ここに掲載した写真は、その一部で、これから益々応用が広がっていくものと思われる。

謝 辞

応用例の写真を快く提供して頂きました各先生に心よりお礼を申し上げます。

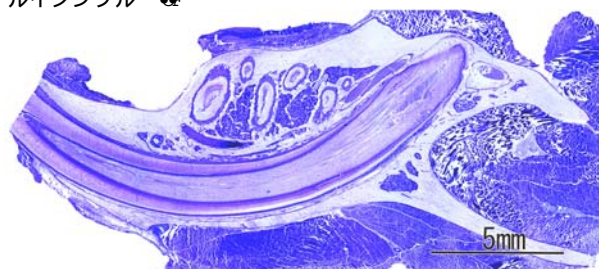
応用例1 . マウス(5日齢、5 μm) 未固定非脱灰、H-E染色



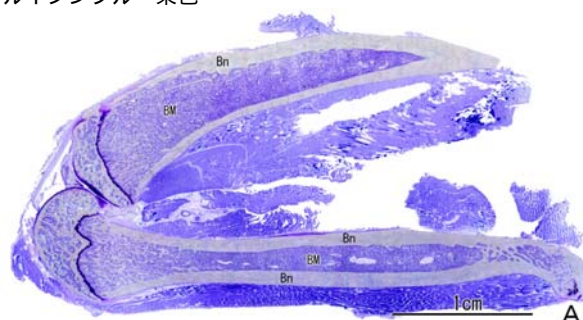
応用例2 . カニ(5 μm) 未固定非脱灰、H-E染色、
提供：泉恵子氏((株)ファインテック、アプリケーションセンター)



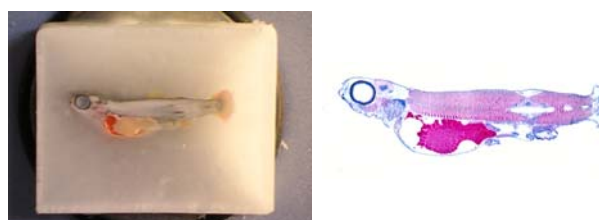
応用例3 . ラット下顎切歯(7ヶ月齢、2 μm) 未固定非脱灰、
トルイジンブルー染色



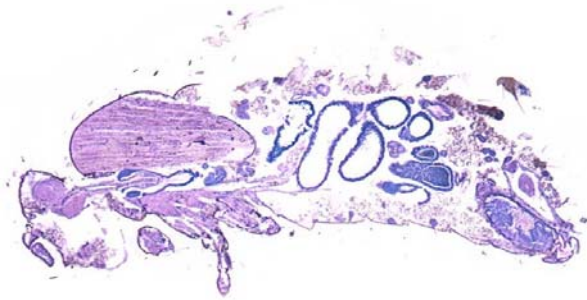
応用例4 . ラット下大腿骨(7ヶ月齢、2 μm) 未固定非脱灰、
トルイジンブルー染色



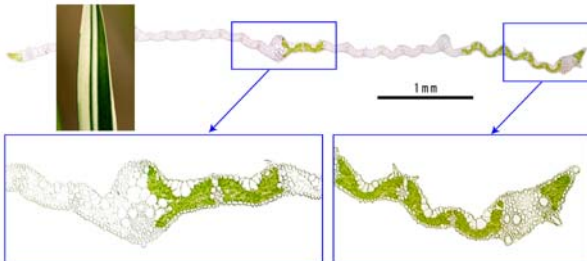
応用例5 . ニジマス稚魚(5 μm) 未固定非脱灰、H-E染色、
提供：泉恵子氏((株)ファインテック、アプリケーションセンター)



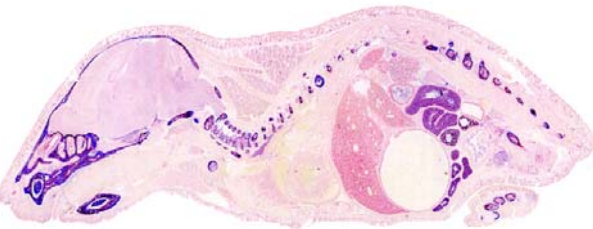
応用例 6 . ショウジョウバエ (5 μm) 未固定非脱灰、トリ
イジンブルー染色、提供：泉恵子氏 ((株) ファインテック、ア
プリケーションセンター)



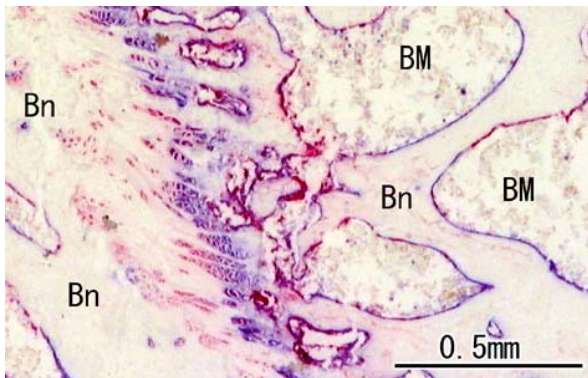
応用例 7 . 稲の葉 (10 μm) 無染色、提供：前川雅彦先生 (岡
山大学資源生物科学研究所)



応用例 8 . ALPase 活性 (青) & ACPase 活性 (赤) マウス (5
日齢、 5 μm) 未固定非脱灰



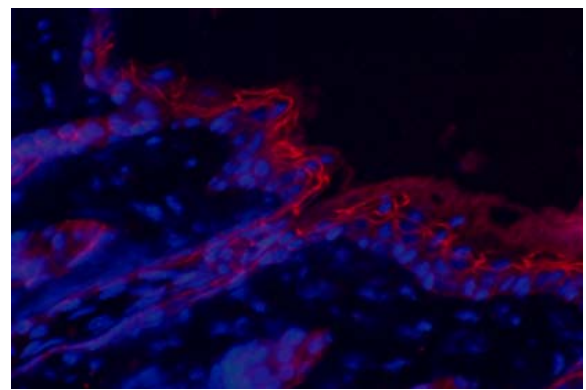
応用例 9 . TRACPase 活性 (赤) & ALPase 活性 (青) ラット大
腿骨 (7 ヶ月齢、 2 μm) 未固定非脱灰



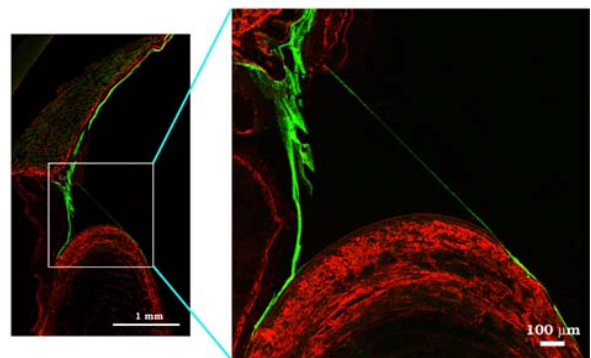
応用例 10 . 免疫染色 (PGP9.5) マウス (5 日齢、 5 μm) 未
固定非脱灰凍結乾燥、提供：中野由紀子先生 (東京医科歯科大学
大学院硬組織構造生物学分野)



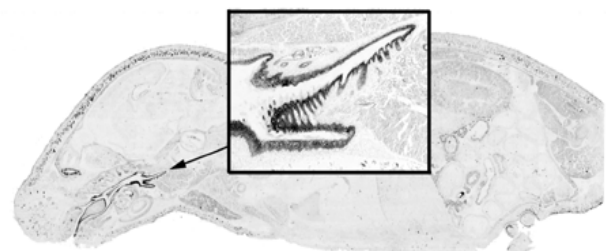
応用例 11 . 免疫染色 (Claudin-1 : 赤、核 : 青) マウス皮膚 (5
日齢、 5 μm) 未固定非脱灰凍結乾燥、提供：秦正樹氏 (岡山大学
歯学部口腔形態学分野)



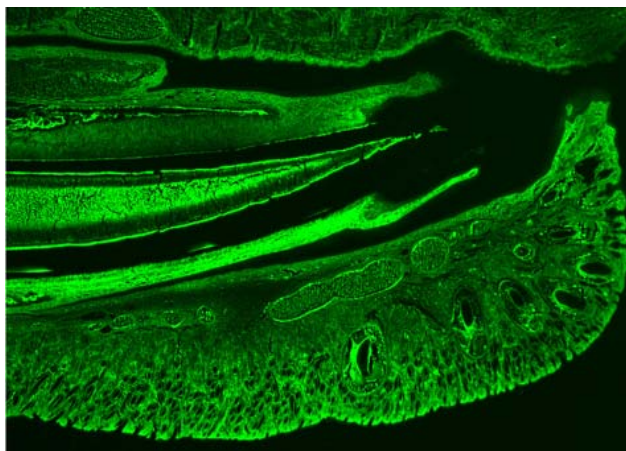
応用例 12 . 免疫染色 (Fibrillin-1 : 緑、 α -elastin : 赤) サル眼 (10
 μm) 平岡満里先生、小嶋直介先生、妹尾春樹先生、(秋田大学
医学部解剖学第二講座)



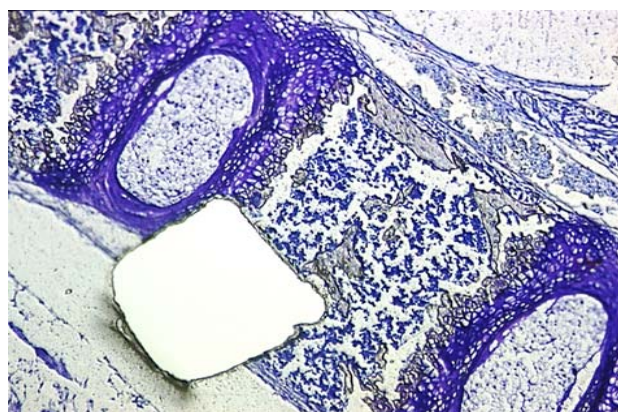
応用例 13 . in situ hybridization (i28SrRNA5 : 黒) マウス (5 日齢、
5 μm) 未固定非脱灰凍結乾燥、提供：中野由紀子先生 (東京医
科歯科大学大学院硬組織構造生物学分野)



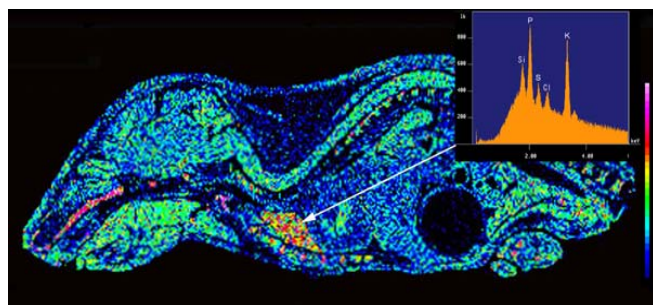
応用例 14. カルセインの分布 (緑、静脈内投与 30 秒後) ラット下顎 (10 日齢、10 μm) 未固定非脱灰凍結乾燥



応用例 15. LMDによる微小試料片採取、マウス (5 日齢、10 μm) 未固定非脱灰



応用例 16. EPMA 分析 (K の分布) マウス (5 日齢、20 μm) 未固定非脱灰凍結乾燥



文 献

1) Schwabe KG, Terracio L: Ultrastructural and thermocouple evaluation of rapid freezing techniques. *Cryobiology* 17: 571-584 (1980).

2) Rosene DL, Roy NJ, Davis BJ: A cryoprotection method that facilitates cutting frozen sections of whole monkey brains for histological and histochemical processing without freezing artifact. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1301-1315 (1986).

3) Skaer H: Chemical cryoprotection for structural studies. *J. Microsc.* 125:137-147 (1982).

4) Maekawa M, Kawamoto T: Intact sectioning of plant tissues with a cryomicrotome. *Breed. Sci.* 52:57-60 (2002).

5) 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 66: *Arch. Histol. Cytol.* 66:123-143 (2003).

6) Kawamoto T, Shismizu M: A method for preparing 2- to 50-mm-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell Biol.* 113:331-339 (2000).

7) Hiraoka M, Naosuke K, Seno-o H: Immunohistochemical Study of the Extracellular Matrices Related to Accommodation in Monkeys. *日眼会誌* 106: 565-573, (2002)

8) Nakano Y, Kawamoto T, Oda K, Takano Y: Alkaline and Acid Phosphatases in Bone Cells Serve as Phosphohydrolases at Physiological pH in Vivo: A Histochemical. *Connect. Tissue Res.* 44:219-222, 2003

9) Nakano Y, Kawamoto T, Takano Y: Phosphatase Activities of Rat Intestinal Enterocytes and its Relation to Diverse Luminal pH, with Special References to Possible Localization of Phytase Along the Brush Border Membrane. *Arch. Histol. Cytol.* 61:483-492, 2001

10) 眼松崎利行, 多鹿・高橋幸子, 多鹿友喜 他: 蛍光抗体法のコツとヒント. *組織細胞化学2004* (日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京, pp.243-253, 2004

11) Hosoya A, Hoshi K, Sahara N, et al.: Effects of fixation and decalcification on the immunohistochemical localization of bone matrix proteins in fresh-frozen bone sections. *Histochem. Cell Biol.* (in press) (2005)

12) Kawamoto T, Shimizu M: Distribution of calcium and phosphate in cells of the enamel organ in the rat lower incisor. *Adv. Dent. Res.* 1: 236-244 (1987).

13) Kawamoto T, Shimizu M: Pathway and speed of calcium movement from blood to mineralizing enamel. *J. Histochem. Cytochem.* 45:213-230 (1997).

14) Kawamoto T: Light microscopic autoradiography for study of early changes in the distribution of water-soluble materials. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1805-1814 (1990).