組織標本作製室の紹介—検体試料の取り扱いについて

菊川　浩子
筑波大学医学系技術室(組織標本作製室)
〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

概要

2012 年、第 12 回技術発表会で「組織標本作製室の紹介」を発表、組織標本作製室における固定・脱水・薄切・染色の説明と設備・利用状況の報告を行った。今回は、これから組織標本作製室を利用する人に、良好な組織標本を得てもらえるような検体試料の取り扱い方のヒントと、組織標本作製室への申し込み方法を紹介する。

キーワード：組織標本作製

１．はじめに

組織標本作製室は、1977 年（昭和 52 年）に筑波大学医学系の研究用組織標本作製のために作られ、教官・学生を支援している。現在は医学系以外の部門からも標本作製の依頼があり、昨年度(2014.4.1～2015.3.31)は、766 件の利用申し込みがあった。また、2014 年 1 月からはヒト以外の動物組織、細胞のみ取り扱うようになった。

組織標本作製室に標本作製を依頼する際は、固定処理後の試料を持ち込むことになっている。そのため、試料の採取、固定液の選択、切り出しは研究者が行うことになる。組織標本作製室へ検体試料を持ち込む前に試料が既に乾燥していたり、変形をおこしたりしていては、良好な組織標本が作製できず、目的が達せられないことになる。そのため、日頃の受け付け業務中に気づいた“利用者に注意してほしいヒント”を報告することにした。

２．検体試料の取り扱い

組織標本作製室へ持ち込まれる検体試料の種類は、利用者によって様々である。しかし、どのような検体試料であっても、何を、どの向き、どんな形で薄切片とするのか考慮した上で採取されることが、良好な組織標本につながる。

2.1 採取

組織を採取中、採取後に乾燥させてしまうと、ひどい場合、ひび割れ、薄切困難や染色の色調の変化を引き起こす場合がある。そのため、採取する時は生理的食塩水や固定液などをそばに用意しておき、採取した組織をその中に入れて組織を乾燥させないよう注意すると良い。

2.2 固定処理

採取した検体試料は、自己融解や乾燥を防ぐため、速やかに固定液に浸漬することが求められる。

固定液の選択は研究目的により研究者自身が決定する。組織標本作製室に持ち込まれる試料は、10 % 中性緩衝ホルマリン（全体の約 58 %）か、4 %パラホルムアルデヒド（全体の約 22 %）で固定処理されていることが多い。その他、低刺激性のホルマリン代替品やブアン固定液もみかける。

固定処理中に使用する容器に特に指定はないが、薬液に耐えうるもの、また、組織に対し十分大きいものを選択する。固定前の組織は柔らかいので多少容器の口が小さくても入れられるが、固定が完了すると組織は容器内で硬化して、最悪、容器から取り出せないことになる。

固定開始後、しばらくすると組織から出た水分により固定液濃度は薄まり、固定力が低下する。そのためそのままにしてしまうと、固定不良・組織の腐敗をおこす可能性がある。それらを防ぐため、静置しなければならない場合を除き、十分な量の固定液を用い、振盪したり、かき混ぜたり、組織表面が常に新しい固定液と接するようにするとよい。

固定液中に組織が沈み、容器の底や側面と密着してしまうことがあるが、接着面には固定液が届かないため固定不良になる。これを防ぐためには、放置せずときどき振盪するとよい。

また固定液に浮く組織の場合、液面より上の部分は固定液と接しておらず、固定不良、さらには組織の乾燥を招く。そのため金属製のかごやメッシュの袋を利用するなどして、完全に固定液中に沈むような工夫が必要である。脱脂綿等をかぶせ、乾燥を防ぐ方法もあるが、脱脂綿と接している部分は固定液の循環が悪いので、やはりときどき振盪してやる必要がある。

固定液は少しずつ蒸発するので、液量減少による乾燥にも注意が必要となる。

2.3 切り出し

不要な組織を取り除く切り出し（トリミング）を行うと、固定液が目的の組織に早く浸潤することになるため、良好な固定結果を得ることができる。

切り出しは、どんな薄切片を作製するのか、向き・形・大きさを考え、組織を損なわないように注意深く行う。固定中の組織の変形や、後の薄切時の荒削り（面出し）による組織表面の損失を考慮し、目的の組織、細胞の中心より離したところを切り出さなければならない。

固定による組織の変形が始まった後に切り出しを行うと、固定中の組織のねじれ・反り返りなどの変形を抑えられる。但し、切り出しせず完全に固定による変形が終わるのを待っていては、組織内部に固定液が行き渡らず、固定不良を招く恐れもあるので、タイミングを見計らって切り出しし、固定を進める。しかし、固定による変形がなくなった組織片でも、それ以降の脱水・脱脂・パラフィンに包埋する過程で再び変形の可能性があると言われている。

変形が著しい組織の場合は、コルク板に貼り付けたり、メッシュの袋や包埋用カセットに入れたりして変形を抑えることもできる。

組織のタテヨコの大きさは、スライドグラスに余裕をもって収まるように切り出す。標準的なスライドグラスの大きさは、26 x 76 mm であるが、組織標本作製室で使用しているものは、片側に試料名など記入するためのスリが 15 mm あり、その部分に試料を載せることはできない。更に大きな標本が必要な場合、52 x 76 mm のスライドグラスが用意されているので、これに収まる大きさまでは対応可能である。

組織の厚さは固定液の浸潤を考え、5mm 以下にすると良い。

切り出しにはナイフ・メス・ミクロトーム用替刃などが利用される。切るときは「引き切り」で一気に切るようにすると良い。刃を動かさず上から押し付けるように切ると組織の挫滅を招き、また、何度も前後に刃を動かしながら切ると、固定後、脱水され、パラフィンが透徹していく過程で組織にひびが入ることがあるので避けた方が良い。ハサミは切り口が挫滅するので細小な組織の切り出しには適切ではない。

３．標本作製依頼の申し込み

組織標本作製室は、現在(H27 年 12 月)医学系棟耐震改修工事のため、医学エリア内の病棟 E301 にある。今後移動することが予想されるので、利用の際は組織標本作製室のホームページ[1]などで確認してほしい。

組織標本作製室に検体試料を持ち込むタイミングは、利用者による固定処理と切り出し作業が終わってからである。受付窓口で、所定の申込書に、申込者氏名・連絡先・作製費用の請求先・染色の種類・枚数・厚さなどを記入する。申込書は受付窓口、またはホームページ[1]からダウンロードにより入手する。

申込時に利用者と、切り出し面・包埋する方向・薄切面などについて打ち合わせている。この場合、組織標本作製室で検体試料がどう取り扱われるか、何ができるかを利用者に知ってもらうと、スムースに打ち合わせが進むことがあるので、少しではあるが次に報告する。

3.1 包埋・パラフィンブロック作製

検体試料をパラフィンブロックにするためには、エタノール、キシレン、パラフィンの順に組織内に薬液を浸潤させることが必要である。

標本作製室では、自動脱水包埋装置（サクラファインテック）を利用している。自動脱水包埋装置には複数の利用者の申し込み分をまとめて投入するので、それぞれの検体試料が判別できるよう、名前を付けてメッシュの袋、金属かごなどに移し替えている。その作業中に検体試料が固定不足であることが分かれば固定を追加し、不要な組織部分があれば後の包埋、薄切作業が容易に行えるように切り出し除去している。

パラフィンブロックには、一つの組織片だけでなく、複数個をまとめて包埋することもできる。包埋する組織の角度や方向に専門知識が必要な場合は、申込者の立ち合いや申込者自身に包埋をお願いすることがある。

昨年度、ブロック作製数は 6842 個。うち、薄切しないブロック作製のみの依頼は 35 件 399 個であった。

4.3 薄切・染色

手動の滑走式ミクロトーム（ヤマト）を用いパラフィンブロックを薄切し、申込書に記入指定された厚さの薄切片を作製している。薄切するパラフィンブロックは、他施設で作製されたものも受け付けている。

薄切片の厚さは、2μm から十数μm までの指定が多く、染色の種類・利用目的（組織の観察、DNA 抽出、マイクロダイセクションなど）によって決定される。

薄切片が小さい場合、スライドグラス 1 枚に連続した、または不連続な複数枚の薄切片をのせる要望にも対応している。

組織標本作製室が準備しているスライドグラスには、薄切片の剥離脱落防止処理された MAS コートスライドグラス（マツナミ）・ MAS-GP コートスライドグラス（マツナミ）、コーティング剤が塗装されていないスターフロストスライドグラス（ムトー）がある。また、利用者自身が準備したスライドグラスや容器を用いて標本作製する事も可能である。

染色は主に HE、PAS、MT などの組織染色を行っている。染色後は封入剤(オイキットまたはグリセロールゼラチン)を使用し、カバーガラスをかけている。

免疫組織化学染色(免疫染色)は行っていないが、利用者自身で免疫染色するための未染色薄切片を乗せたスライドグラスを作製している。

昨年度、染色・未染色を合わせたスライド作製枚数は 26,890 枚であった。

まとめ

固定液の選択・切り出しは、顕微鏡標本を作製するための第一歩であり、それらは標本が出来上がる最後まで影響を与えると言われており、非常に重要な操作である。

この度の報告が、より良い標本作製の一助になることができれば幸いである。

謝辞

組織標本作製室の世話人教員の野口雅之教授、技術専門職員の福中康子様には、この度の発表を快くご承諾下さり、厚く感謝を申し上げます。

参考文献

[1] 日本病理学会編　病理技術マニュアル 3　病理組織標本作製技術　上巻　切出しから薄切まで　医歯薬出版

[2] 第 12 回筑波大学技術職員技術発表会報告集「組織標本作製室の紹介」

[1] http://www.md.tsukuba.ac.jp/local/light-microscope/（筑波大学医学部内のみ閲覧可能）

Introduction to the Tissue Sample Preparation Room: Sample handling

Hiroko Kikukawa

Technical Service Office for Medical Science, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki: 305-8575 Japan

Keywords: tissue specimen