筑波大学技術報告
30: 47-50, 2010

脱灰操作が神経組織に与える影響（電子顕微鏡生物試料作製法より）

坂本 順子、井坂 由美、秦泉寺 裕子
筑波大学医学系技術室
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

灌流固定されたラットから肋骨とそれに沿って走る肋間神経を含む組織を取り出して脱灰操作をおこなった。その後、透過型電子顕微鏡（電顕）用試料作製を施し組織を観察した。脱灰液の種類や温度設定の違いにより神経組織にどのような影響があるかを有髄神経に注目して比較検討した。

キーワード：脱灰操作、電顕生物試料作製法、有髄神経

１．はじめに

組織標本作製において骨組織や多量のカルシウム塩が沈着した硬組織は、そのまま包埋したのでは包埋剤の浸透が悪く薄切が困難であるため、包埋前に脱灰操作がおこなわれる[1]。

脱灰操作は硬組織の観察目的のみならず硬組織に囲まれた軟組織を観察する目的で行われる場合がある。つまり、周りの硬組織を取り除かなければ観察できない場合にも利用されるのである。しかし、一般に使用されている脱灰液は強酸が使われることが多く、しかも、脱灰操作には少なくとも一週間以上を要するため組織に与えるダメージも大きいと予想される。

２．方法

サンプル：8 週令 SD ラットの胸部組織
（肋骨、肋間神経、ほか）

2.1 前固定（灌流固定）

灌流固定は目的臓器や組織を、支配する血管を介して固定液を流す方法で、動物の死以前に固定を始め、死後に生じる細胞の構造変化を少なくし、諸臓器の深部まで固定液を迅速かつ比較的均等に浸透させることができる[2]。

灌流器具は輸液セットを用いて、容器とラットの高さの差（重力）を利用して灌流圧を負荷する装置を使用した。

準備するもの
輸液バッグ、輸液セット、注射器、麻酔薬、抗凝固剤、解剖用具
灌流用洗浄液 : 5U/ ml ヘパリン溶液（0.1M-リン酸緩衝液 pH 7.4 ）
灌流用固定液：4%グルタルアルデヒド（0.1M-リン酸緩衝液　pH 7.4 ）

実際の方法
1） 麻酔：ラットの腹腔内にネンブタール（50 mg/ml ）を 1 ml 注射する。
2） 開胸：出血しないように留意し開胸して心臓を露出させる。
3） 留置針の挿入と血管洗浄：左心室から大動弓に 20 G の留置針を挿入し血液の逆流を確認後、針を抜き空気が入らないように注意しチューブを接続する。洗浄液の灌流を開始し右心耳の一部を切り洗浄液の排出口を作る。200 ml の灌流用洗浄液を流す。
4） 固定液注入：血管洗浄後、三方活栓を切り換え灌流用固定液を 200 ml 流す。
5） 組織の摘出と追加固定：灌流固定終了後、胸部組織を摘出し灌流用と同じ固定液で 2 時間、浸漬固定した。

2.2 脱灰操作

肋間神経は肋骨に沿って走行しているので、前固定されたラットの胸部組織を肋骨単位で切り分けた。

脱灰液
① 22.5%（v/v）ギ酸・10%（w/v）クエン酸ナトリウム液（MORSE）
② 4.13%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム EDTA-2Na 液　pH 7.4 （Warshowsky）

脱灰操作群
1） 第Ⅴ肋骨⇒ギ酸・クエン酸ナトリウム液、常温
2） 第Ⅵ肋骨⇒4.13%EDTA-2Na 液、常温
3） 第Ⅶ肋骨⇒ギ酸・クエン酸ナトリウム液、4℃
4） 第Ⅷ肋骨⇒4.13%EDTA-2Na 液、4℃
5） 第Ⅸ肋骨⇒未処理

実際の方法
ナイロン製のサンプルパックに入れた肋骨をそれぞれの脱灰液を満たした容器に入れ、ゆっくりと液を撹拌させた。

我々は電顕試料作製に使用されるローテーターに容器を括りつけておこなった。4℃でおこなう場合、冷蔵庫の中にローテーターを設置し運転した。脱灰液は 2 日毎に新しい液と交換した。組織をカミソリ刃で試し切りして、骨が周りの組織と同じ感触で抵抗なく切れるようになれば脱灰終了とした。今回は 8 日間で脱灰操作を完了した。

2.3 後固定・樹脂包埋・重合

組織から肋骨を切り離し、なるべく余分な筋組織を取り除いた。肋間神経の部分を 1×1×2 mm の大きさに細切し試料瓶に移して 0.25M-ショ糖液で洗浄したあと、後固定を施した。樹脂包埋に至るまでの操作はローテーターで試料瓶を回転させながらおこなった。

準備するもの
試料瓶、パスツールピペット、ローテーター、 包埋板、恒温器（37℃, 45℃, 60℃）
① 0.25M-ショ糖液（0.1M-リン酸緩衝液 pH 7.4）
② 0.1M-リン酸緩衝液 pH 7.4
③ 2％四酸化オスミウム液（0.1M-リン酸緩衝液 pH 7.4）
④ 脱水用エタノールシリーズ（50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99.5%）
⑤ 酸化プロピレン（PO）
⑥ 包埋樹脂：エポキシ樹脂（Poly/Bed 812 , DDSA , MNA , 加速剤 DMP-30）

実際の方法
1） 後固定：2%四酸化オスミウム液、4℃、2 時間
2） 洗浄：0.1M-リン酸緩衝液、室温、15 分×2 回
3） 脱水：50%、70%、80%、90%、95%エタノール、室温、各 20 分
99.5%エタノール、室温、20 分×3 回
4） 置換：酸化プロピレン、室温、20 分×3 回
5） 樹脂浸透：PO とエポキシ樹脂の混合液（1：1 ,v/v）室温、18 時間→PO とエポキシ樹脂の混合液（1：3 ,v/v）室温、18 時間→純エポキシ樹脂、室温、18 時間→新しく作った純エポキシ樹脂、室温、6 時間
6） 樹脂包埋：新しく作った純エポキシ樹脂をシリコン包埋板に注ぎ、その中にサンプルを包埋
7） 重合:37℃恒温器 12 時間､45℃恒温器 12 時間、60℃恒温器 48 時間

2.4 準超薄切片の作製・染色

重合硬化した樹脂ブロックから準超薄切片を採取しトルイジンブルー染色を施す。これが超薄切をする際、トリミングの参考となる。ミクロトームはライヘルトユング社製のウルトラミクロトームを使用した。

準備するもの
スライドグラス、ホットプレート
染色液：0.1%トルイジンブルー液

実際の方法
1） 切片採取: 0.5μm の準超薄切片をスライドグラスに採取
2） 乾燥：ホットプレート上
3） 染色：0.1%トルイジンブルー染色液、加温（約 70℃）
4） 洗浄：蒸留水で流水洗
5） 乾燥：ホットプレート上
6） 観察：光学顕微鏡（光顕）で観察

2.5 超薄切・電子染色

有髄神経の部位から 90 nm の切片を超薄切し、グリッド上に採取して電子染色を施した。
超薄切片の電顕像は組織に結合した重金属と樹脂との相対的なコントラストの差として蛍光板上に表現される。生物組織の大部分は無染色ではほとんどコントラストが生じないため、重金属による染色を施すことにより観察に適したコントラストを得ることができる[2]。

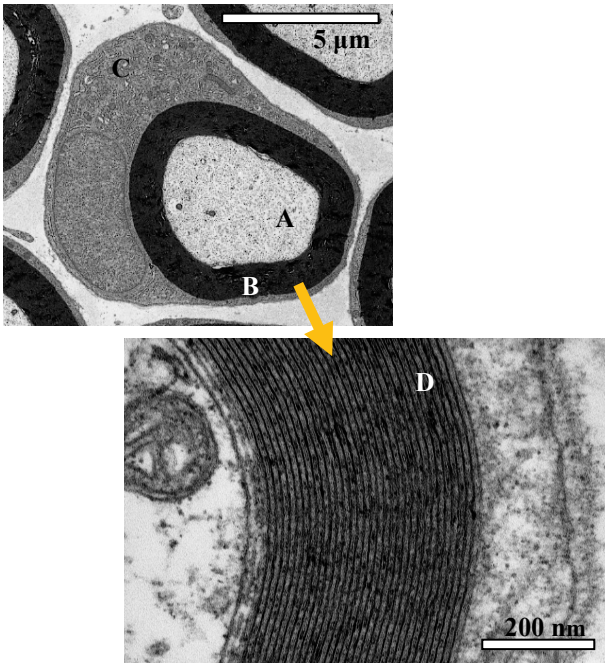
染色液
① ウラン染色液：5%酢酸ウラン水溶液
② 鉛染色液：クエン酸鉛液（Reynolds 法）

実際の方法
超薄切片の付着したグリッドの端をグリッドスティックに接着させ、それを染色液が入った試験管に挿入して染色をおこなった。
1） ウラン染色：15 分
2） 洗浄：蒸留水×4 回
3） 鉛染色：2.5 分
4） 洗浄：蒸留水×4 回
5） 乾燥：ドライヤーで温風乾燥

2.6 電顕観察

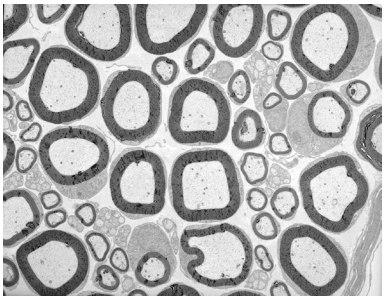
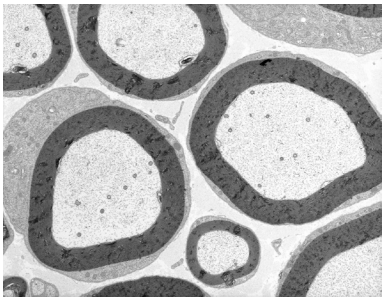
観察：透過型電顕（日立 H-7000）
撮影倍率：2000 倍、5000 倍、70000 倍

＜参照＞
末梢神経線維の髄鞘について
神経線維には、有髄と無髄の 2 種類がある。有髄神経線維は横断面でみると軸索 **A**（明るい中心部）、髄鞘 **B**（黒い輪）とそれらを包むシュワン細胞 **C** が見られる。髄鞘は暗い線と明るい線が厳密な規則性をもって同心円状の輪 **D** を作っている。



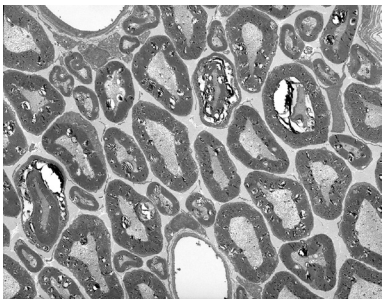
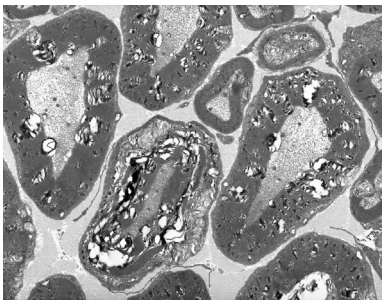
有髄神経線維の電顕写真

10 μm　　4 μm

未処理

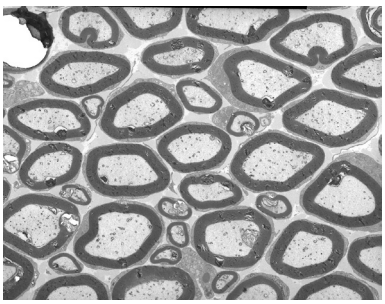
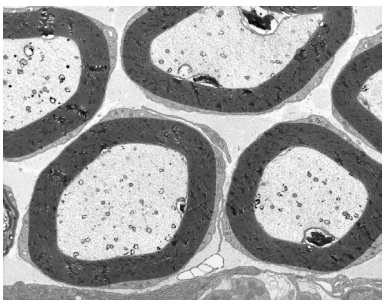
髄鞘の乱れはほとんど見られない

1）ギ酸・クエン酸ナトリウム液

常温

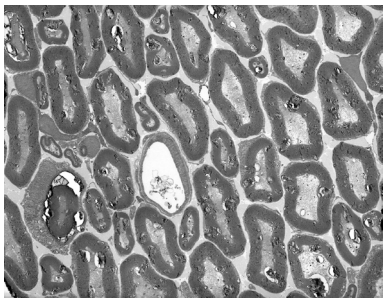
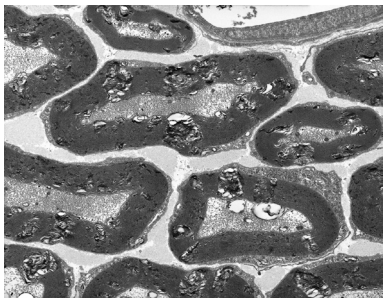
髄鞘の乱れ、壊れの頻度が高い
変形が見られる

2）4.13%EDTA-2Na 液

常温

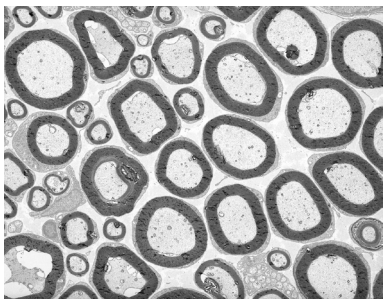
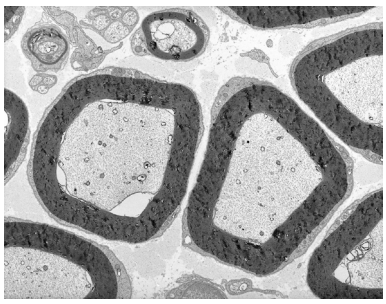
髄鞘の乱れは少し見られる

3）ギ酸・クエン酸ナトリウム液

4℃

髄鞘の乱れの頻度は高いが常温より壊れがやや少ない
変形が見られる

4）4.13%EDTA-2Na 液

4℃

髄鞘の乱れは少ない

３．結果

有髄神経の美しい電顕写真をとることは、大変難しい。脱灰操作をしない一般的な試料作製がなされた神経組織においてもミエリンの乱れはある程度観察される。

本実験では、神経組織に脱灰操作を試みるという特異なケースである。その影響を有髄神経に注目して観察した。光顕レベルでは組織の膨化がほとんど起こらないとされるギ酸を使った MORSE の脱灰液であるが、強酸の影響か電顕観察にまで拡大すると髄鞘の乱れ、壊れが多く観察された。とくに、常温で脱灰操作を行った場合は影響が大であった。通常、電顕試料作製で使用される EDTA 液の場合、未脱灰のコントロールに近い組織像であったが、4℃で行った方がより影響が少なかった。

予想通りの結果であったが、視覚的にそれを確認できたことは有意義であった。また、同一個体から採取したサンプルを使うことにより固定条件を一定にできた。そのことで、脱灰操作以外の影響因子をなるべく少なくしてダメージの程度を比較することができた。

この結果より、脱灰操作の影響が少なからずあることが確認された。硬組織以外に脱灰操作を加えることは避けることが望ましいが、どうしても避けざるを得ない場合は脱灰液を選択しその影響を最小限にとどめることが望ましい。

謝辞

本報告を行うにあたり実験動物サンプルの提供にご協力いただきました本学臨床医学系麻酔科福田妙子講師に感謝いたします。また、報告書執筆にあたりご助言、ご協力いただきました医学系技術室、大野良樹技術専門官に感謝いたします。

参考文献

[1] 佐野豊 著. 組織学研究法, 南山堂 (1979)
[2] 医学・生物学電子顕微鏡研究会編集. 平野 寛, 宮澤郎 監修, よくわかる電子顕微鏡技術, 朝倉書店(1996)
[3] 日本電子顕微鏡学会関東支部編. 電子顕微鏡生物試作製法, 丸善 (1975)
[4] W.Kahle, H.Leonhardt, W.Platzer. Taschenatlas der Anatomie für Studium und Praxis, Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane. 人体解剖図説Ⅲ, 神経系と感覚器, 越智 淳三＝訳, 文光堂
[5] Dr.R.V.KRSTIĆ, Professeur associé, Université,de Lausanne, Institut d'Histologie et d'Embryologie, CH-1011 Lausanne, Switzerland 1935, 立体組織学図譜, Ⅱ 組織篇, 藤田 恒夫 監訳, 高橋 偉子, 新井 昌史, 中村 茂樹, 相馬 孝博, 牛木 辰男, 西村書店

Effects of decalcification on nerve tissue (from Methods of Electron Microscopy for Biological Specimens)

Junko Sakamoto, Yumi Isaka, Yuko Jinzenji

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

Tissue including intercostal nerves that run along the ribs and the ribs themselves were removed from perfusion fixed rats and decalcified. Specimens were subsequently prepared for electron microscopy and the tissue was observed. The effects of different types of decalcifying fluids and temperature settings on nerve tissue were compared with a focus on myelinated nerve fibers.

Keywords: decalcification ; Methods of Electron Microscopy for Biological Specimens ; myelinated nerve fibers