

第2節 組織切片の作製法と染色法

2.1 組織の固定法とパラフィン包埋法

【安全上の注意】 標本作製に用いるホルマリン等の固定液，キシレンやクロロホルムなどの透徹液は有毒である．皮膚などにつけないように注意し，蒸気を吸入しないようにすること．もし接触した場合にはすぐに良く水洗すること．また包埋操作中は換気に注意してエタノール，キシレン，クロロホルムなどなどの蒸気が充満しないようにし，火気を避けること．

【試薬】 生理食塩水（0.9%NaCl水溶液），ピクリン酸飽和水溶液，ホルマリン原液，氷酢酸，脱水用エタノール（アルコール系列），キシレン，硬パラフィン

【器具】 解剖用具，アセトンで脱脂洗浄した片刃カミソリ，プラスチック製カップ，ろ紙，30～50 mlサンプル瓶（固定用），10 mlメスピペット3本，50 mlサンプル瓶12個（脱水包埋用），ピンセット，パラフィン溶融器，包埋用金枠，カッター，ガスバーナー，スパーテル（金属へら），台木

【固定】 摘出した各臓器は余分な脂肪や血餅などを生理食塩水中で丁寧に取り除き，ろ紙にて水分を十分に拭った後，一辺が5～10mm以下の直方体となるように，片刃カミソリ（あらかじめアセトンにて錆止め用として表面に塗布されている機械油を脱脂洗浄しておく）にて整形し（副腎のような小組織は臓器全体を用いる），固定液に浸漬する．光学顕微鏡観察用の組織標本のための固定液として代表的なものには，ホルマリン液ならびにBouin（ブアン）液がある．ホルマリン原液はホルムアルデヒドの35～40%（多くは36%）水溶液であり，固定液として使用する際には蒸留水または緩衝液で希釈して10%（v/v）ホルマリン水溶液として用いる（通常これを10%ホルマリン液と呼ぶ．注意：10%ホルマリン液≒4%ホルムアルデヒド溶液）．固定は常温で24時間～48時間を要し，組織の大きさ等により延長が必要な場合もある．リン酸緩衝液などで希釈して固定液を調整した場合，長期保存が可能である．包埋操作に入る前に，水洗する（最長12時間）．Bouin液は，使用直前に，ピクリン酸飽和水溶液，ホルマリン原液，氷酢酸を各々15：5：1（v/v）混合して調製する．Bouin液は，溶血を起こすという欠点はあるが，組織の収縮が小さく，固定時間が短時間（2～6時間）であるという長所がある．固定終了後，水洗することなく直ちに70%エタノール水（v/v）で溶液の黄色が消えるまでよく洗った後，エタノール系列にて脱水する．

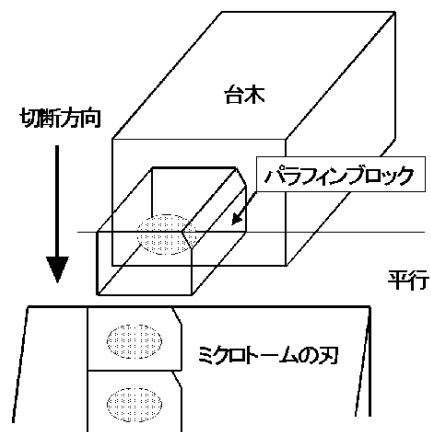
【脱灰】 小さな個体をそのままパラフィン切片にする時は，硬骨がサンプル中に含まれているため薄切が困難となることがある．このような場合には硬骨中のカルシウムを酸によって溶解・除去する操作（脱灰）が必要となる．固定液であるブアン液は酢酸を含み，それ自身が酸性であるため，弱いながらも脱灰力がある．そのため小さなサンプルではブアン固定の時間を長くするだけで十分な場合も多い．ただしヘマトキシリンの染色性はやや低下する．それ以外の非酸系の固定液では，固定終了後に5%蟻酸に1日以

上浸漬する。脱灰後は十分に水洗したのちに脱水・包埋する。

【脱水・置換】 組織の70～80%は水分なので、そのままではパラフィンが組織内に入らない。まず、組織内の水をアルコール系列（メタノールあるいはエタノール）で完全に除く。メタノールは安価で、組織への浸透がエタノールの約2倍速く、かつ組織の硬化の程度が軽いので推奨されているが、吸引などで体内に取り込むと代謝されてホルムアルデヒドおよび蟻酸となり、毒性が高いので取扱に注意しなくてはならない。この時、脂肪も取り除かれる（脱脂）。脱脂はパラフィンの融点降下を防止するのに効果がある。エタノールを使用する場合、固定後、70%エタノール中で1晩、99.5%エタノール中で30分x5回、100%エタノール（市販のエタノールには水が含まれるので脱水剤で取り除く処理が必要）中で30分の順で脱水する（このプロセスは簡便法である。研究用にはもっと手間暇をかけることもある）。エタノールはパラフィンに馴染まないで、両者を取り持つキシレンやクロロホルム等の中間剤による置換を経て、組織に溶けたパラフィンを浸透させる。クロロホルムはキシレンの2倍毒性が高いが、組織への浸透速度が速く、引火性がないなどの点では優れている。キシレンを使用する場合、30分置換を2回行う。

【包埋】 中間剤置換後、60℃に設定したパラフィン溶融器中で溶融した硬パラフィン（60℃）に30分、4回浸透させる（包埋操作の際に、時間がかかりすぎてパラフィンが硬化することを避けるため、最終のパラフィンの時には、1ピンに組織片は5個以下になるように分割しておくこと）。包埋用の枠に流し込む分を見込んで、パラフィンの量は多めにしておく。組織標本を摘んで移動させるためのピンセットを予め加温しておく。

【台木付け】 パラフィンが固まったらブロックを枠から外し、組織ごとにカッターまたはカミソリで切り離して台形に整形する。サンプルが入っていないパラフィン部分を切除（トリミング）し、薄切面に対して垂直・平行な平面をもつ直方体に近い形に整形する。この際、薄切面のサンプルの上下に少なくとも1mm程度、できれば周囲に3mm位のパラフィンが残るようにする。回転式マイクロームで作製する場合は、薄切面の上下はできるかぎり平行にしておかないとパラフィンリボンが湾曲してしまい扱いづらい。一方、薄切面の左右はやや斜めにしておくと一枚一枚の切片の判別が容易となる。パラフィンブロックの薄切方向を考えて下になる面（薄切面と平行な面）を加熱したスパーテル（金属へら）で溶かし、台木に密着させて冷やし固める。実際にはブロックの下面を台木に当て、ガスバーナーの炎で加熱したスパーテルを台木とパラフィンブロックの間に挟んでパラフィンブロックを台木に押しつけながら引き抜き、そのまま少し待つ。出来上がったブロックは、薄切まで冷暗所に保存する。



2.2 パラフィン切片の作製法

【安全上の注意】 ミクロトームのナイフはたいへん鋭利であるので注意すること。薄切を行うためにナイフを動かすときや、ナイフから切片を取り上げるときにナイフに触らないようにするのは勿論であるが、滑走式ミクロトームでは、ブロックの装着、取り外しなどを行うためにナイフをレールの途中に止めているとき、ナイフの乗っているレールは手前が低く傾斜しておりナイフは重いので、勝手に滑り落ちてくることもあることにも注意。けがをした場合、直ちに教官に告げる。傷口を開いて流水（水道水）で良く洗浄した後にエタノール、希ヨードチンキ等で殺菌するなど、必要な処置をとる。

【試薬】 卵白グリセリン、蒸留水

【器具】 ミクロトーム、ピンセット、柄付針、筆、スライドガラス、ガーゼ、キムワイプ、ダイヤモンドペン、ガラス棒、パストゥールピペットか注射器

【スライドガラスの前処理】 スライドガラスの切片を載せる面は清浄でなければならぬので、必要に応じ、70%エタノールに浸し糸屑などがスライドガラス表面に残らないように注意してガーゼで拭く。標本を区別するためスライドガラスの端にダイヤモンドペンなどで印をつける場合は、その後でガラスを拭き、ガラスの粉などの汚れがスライドガラス上に残らないようにする。洗浄済みとして市販されているスライドガラスは、汚染のないように保管されていれば清浄化の必要はない。表面の端の一部が磨りガラス状になっているスライドガラスの場合は、そこに鉛筆で必要事項を記入する。染色過程ではがれやすい組織を載せる場合、スライドガラス表面に薄く卵白グリセリンを塗布しておく。細いガラス棒の先に卵白グリセリンを付け、清浄なスライドガラスを裏向きにし、表面を軽くガラス棒に触れさせて卵白グリセリンをつけた後、小指（石鹸で丁寧に手洗しておく）でごく薄く塗り広げる。卵白グリセリンが多すぎると染色したときに卵白そのものが染色されてしまい、全体に赤く色が付いて汚くなる。

【ブロックの装着・試料台の角度調節・面出】

- 1) **滑走式ミクロトーム**：パラフィンブロックを付けた台木をミクロトームのブロック台の金具の間に挟み、ねじを締めて固定する。ブロック台は高さや前後左右の傾きを調節できるが、傾きについては基本的にほぼ水平にしておく（特に切片の向きを微妙に調節したい場合のみ傾ける）。ブロック中の組織を露出させる。ブロック台の高さ調節用の固定レバーをゆるめ、ねじを回してブロックの上の面をナイフに近づける。ナイフをブロックの上で前後に動かしながら、ナイフがブロックより向こう側に行った時に少しずつブロックを上昇させ、厚めに薄切を行いながら本当に切片を作りたい部分の近くまで切っていく。
- 2) **回転式ミクロトーム**：ミクロトーム内部（あるいは外部）のハンドルを調節し、試料台をもっとも引き込んだ位置まで戻す。安全ロックをかけて試料台が動かないように固定した後、パラフィンブロックの台木を挟み込むようにして試料をミクロトームに取り付け

る。刃の角度は通常は5°で良い。また切片の厚さの設定はダイヤルを回転して行うが、通常は5マイクロメートルで良い。刃の位置を調節してパラフィンブロックの近くに移動させておく。この状態で、試料台の角度を調節し、パラフィンブロックの下面がマイクロトームの刃に対して平行になるようにする。

【薄切・貼付】

- 1) **滑走式マイクロトーム**：ブロック台のダイヤルでマイクロトームの切削厚さを設定する（5マイクロメートル）。ナイフをブロックより向こうにおいて、マイクロトームのブロック台送りレバーを1回上下させ、ナイフを手前に引いて薄切する。ナイフは一様にゆっくり引く。ブロック台送りレバーを動かすのは、必ずナイフがブロックより向こう側にある時にすること。スライドグラス上にパスツールピペットか注射器で蒸留水を盛り、マイクロトームのナイフ上にできた切片をピンセット、柄付針、筆などでとって蒸留水の水面に浮かべる。ナイフから切片をとるときにナイフに傷をつけないように注意すること。切片を載せたスライドグラスは、40℃に暖めたパラフィン伸展器上にて切片を伸ばし水分を蒸発させて、切片をスライドグラスに張り付ける。
- 2) **回転式マイクロトーム**：マイクロトームの安全ロックを解除する。ハンドルを右手で持ち、時計回りにゆっくりと（1～2秒に一回転程度）回転させる。すると試料台が上下に動き、固定されている刃に当たった部分がそぎ取られる。一回上下するごとに、設定した厚さ分だけ試料台が前方に移動し、順次そぎ取られるためリボン状となる。左手には筆を持ち、切れてくるパラフィンリボンを操作し、絡まないようにする。最初の切片はカールしないように、筆でそっと上から押さえてやると良い。その後はつながって切れてくるリボンを適宜切断し、紙の上に並べていく。必要部分を薄切し終わったら、スライドグラスに並べられる枚数の切片ごとにメスで切断する。これを卵白グリセリンを塗布したスライドグラス上に少量の水を張って並べ、40℃に暖めたパラフィン伸展器上にて乾燥させる。

2.3 凍結切片の作製法

【安全上の注意】ドライアイスやドライアイスで冷却した器具などを扱うときは必ず軍手を使用すること。イソペンタンを机上にこぼさないこと。凍傷を負った際には、流水にしばらく浸してから医師に見せるなどの処置をとること。イソペンタンは引火し易いので「火気厳禁」とする。

【試薬】生理食塩水（0.9%NaCl水溶液）、OCTコンパウンド（凍結用包埋剤）、ドライアイス、イソペンタン（冷媒）

【器材】解剖用具（一式）、アセトン脱脂・洗浄済片刃カミソリ、プラスチック製カップ、ビーカー（100ml）、発泡スチロール製保冷箱、金槌、鉛筆、ろ紙、ピンセット（3本）、軍手、プラスチック製サンプル瓶、スライドグラス、マップ、染色かご、デシケーター（

乾燥剤を入れた密閉容器), ドライヤー, クリオスタット

【ドライアイス・イソペンタンの準備】 発泡スチロール製保冷箱に金槌で適当な大きさに割ったドライアイス (-79℃) を入れ, イソペンタンを入れたビーカーを置いて冷却する (約30分を要する). イソペンタンが冷えたらビーカーの中にも小さく割ったドライアイスを入れて低温を保つこと. ピンセット (1本) とサンプル瓶も同時に冷却しておく.

【組織の凍結】 摘出した臓器の余分な脂肪や血餅などを生理食塩水中で丁寧に取り除き, ろ紙にて水分を十分に拭いた後, 一辺が5mm以下の直方体となるように, 片刃カミソリにて整形する (小型の場合は臓器全体を凍結する). 組織片をOCTコンパウンドに封入し, 組織を区別できるように裏に鉛筆で情報を記載したろ紙の小片に添付する. 冷却していないピンセット (軍手を介して持つ) でろ紙の端を持ち, ドライアイス・イソペンタン中に底にぶつけないように注意して, 完全に沈め, 激しく泡が出なくなるまで (凍結が完了) 保定する. 凍結後, 標本をビーカーの中に落とす. 急速に凍結しないと氷晶が粗大化して良い標本ができない.

【凍結切片の作製】 凍結切片法は, 固定剤や有機溶剤の使用, 加熱などの組織・細胞の蛋白質を変性させる操作が少ないので, 酵素活性の検出や膜蛋白などの不安定な抗原性物質の免疫組織化学的検索のために有用な方法である. 組織切片の作製までにかかるプロセスが少なく, 短時間で切片を作製することも利点である. クリオスタット, スライドグラス, ピンセット, マップ, 染色かご, デシケーターを準備する. クリオスタットを薄切する標本に適した温度 (一般に-20℃) に設定しておく. ピンセット (1本) をクリオスタット内で冷却しておく. クリオスタット内に標本を入れたプラスチック製サンプル瓶を移し, 冷却したピンセットで標本を取り出す. クリオスタット内のブロック台表面にOCTコンパウンドを少しのせ, 素早く標本をろ紙を下にして載せて凍り付かせる. しばらく待って標本の温度をクリオスタット内の温度に合わせる. 面出しをした後, アンチロール板を刃に当て, ハンドルを回して厚さ8マイクロメートルで薄切する (切片は刃とアンチロール板の間に入る, 薄い切片ほど観察時に美しい). つまみを回してアンチロール板を静かに手前に倒して刃から離す. 切片は刃の上に残る. 前扉を開け, スライドグラスを刃の上に残った切片に接近させる. スライドグラスが切片に接触すると, 切片はすぐに融けてスライドグラスに接着するので, スライドグラスをクリオスタット外に出し, 前扉を閉める. 切片を添付したスライドグラスはドライヤー (冷風) にて素早く風乾した後, デシケーター内で冷凍保存する. 使用時には, デシケーターごと冷凍庫から出し, 霜がつくのを防ぐために全体を室温まで昇温させてから開封する. 酵素染色の場合は未固定で供する. 免疫染色のためには, 切片を冷アセトン固定 (-80℃に冷却したアセトンに5分間浸漬後, 素早く風乾), ホルマリン固定 (緩衝液で調製した10%ホルマリンに室温5分間浸漬後, 水洗) などの適切な固定を行った後供する.

2.4 ヘマトキシリン・エオジン染色法

【試薬】 キシレン, エタノール (アルコール系列), ヘマトキシリン染色液, エオジン染

色液，塩酸アルコール，カナダバルサム（封入剤）

【器 材】 染色籠（スライドグラス15枚につき1個），染色槽（コップリンジャー：17個），カバーグラス，ピンセット，柄付針，マッペ

【試料の準備】 パラフィン切片を作製し，以下の手順により脱パラフィンを行う．切片を添付したスライドグラスを染色用かごに立て，染色槽に入れたキシレン，99%エタノール，90%エタノール，80%エタノール，70%エタノールに順に5～10分間ずつ浸漬する．スライドグラスを染色槽の間を移動させるときに前の液が次のところに入らないようにし，よくよくきること．

【ヘマトキシリン・エオジン染色】 脱パラフィンが終わった切片を5分くらい流水中で水洗したあと，ヘマトキシリン染色液で3～5分染色する．その後，流水中で20分以上水洗する（切片が紫色から青に近い色に変わる）．途中で検鏡し，濃く染まりすぎていたら塩酸アルコールにごく短時間（数秒）浸して脱色することで分別する（核のみが染まるようにする．細胞質の部分は細胞の種類によって比較的ヘマトキシリンに染まりやすく，核がはっきり染まる程度まで染めると細胞質も共染を避けられない場合もあるので，結合組織の細胞間の基質部分が透明であることを目安にした方がやりやすい）．エオジン染色液で1～3分染色する．

【脱水・透徹・封入】 エオジン染色の終わった切片をアルコール系列で脱水する．すなわち，70%エタノール，80%エタノールに数秒ずつ，90%エタノールに3分間，99%エタノール，100%エタノール（2回）に数秒ずつの順に浸漬して脱水する．その後，キシレンに数分ずつ2回浸漬して透徹する．エオジンの染色は低濃度のエタノール中では急速に脱色されるので注意すること．エオジン染色が強すぎた場合には，70%エタノールの前に流水中で洗浄して少し脱色しても良い．キシレンからスライドグラスを1枚ずつ取り出し，表を上にしてろ紙またはキムワイブの上に置く．スライドグラス上の切片の左にカナダバルサムをガラス棒で2滴ほど落とす．右手に柄付針を持ち，左手でカバーグラスの左端をスライドグラス上のバルサム滴の左につけて斜めに立て，柄付針でカバーグラスの右端を支えてゆっくりと倒していく．カバーグラスを寝かせるにつれてバルサムがスライドグラスとカバーグラスの間に広がって行くが，カバーグラスを急速に倒しすぎると泡が入るので注意すること．封入が終わったスライドグラスはマッペの上に並べて乾燥させる．

【検 鏡】 核は青紫，細胞質は桃色に染まる．その他の物質も青紫から赤色のさまざまな色調に染まる．初心者は濃染しすぎる傾向がある．細胞の内部構造を判別するためにも淡く美しく染色するよう努める．