

研 究

イソペンタンを用いた凍結切片作成方法の検討

岡田 珠里亜, 菊地 利紀, 佐々木 秀樹

宮城県食肉衛生検査所

病理組織検査において細胞の形態的な評価を的確に行うためには、標本作製時にアーティファクトの発生を抑えることや良好な染色結果を得ることが必要である。しかし、現在当所で運用している凍結切片作成方法では、アーティファクトが発生し、診断が困難となる場合があった。そこで本研究では、アーティファクトの発生を抑制する凍結方法の確立を目的として、イソペンタンを用いた凍結方法の検討を行った。併せて、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した際に良好な染色結果を得られる薄切厚と固定液の検討を行った。その結果、検体を冷却イソペンタン中で45秒間凍結させることでアーティファクトの発生を最小化できると考えられた。また、薄切厚は6～7 μm 、固定液にはエタノールーホルマリンー酢酸混合液を用いることで良好な染色結果を得られた。

キーワード：アーティファクト，HE染色，色相，凍結切片，病理

病理組織検査は、疾病を診断するうえで重要な検査の1つであり、顕微鏡を通して見えた組織構造や細胞を基に診断する検査である。通常、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を基本とし、診断にあたっては核や細胞質の状態という細胞の形態的な評価を的確に行うことが重要である。そのため、標本作製時における人為的な組織損傷やメス傷、切片のすだれ状のひび割れといった、いわゆるアーティファクトの発生を抑えることや、良好な染色結果を得ることが条件となる。

現在当所で運用している標本作製方法の一つである凍結切片作成方法（現行法）では、凍結に伴う組織損傷によりアーティファクトが発生し、細胞や組織に間隙が生じて形態診断が困難となる場合がある。そこで、アーティファクトの発生を抑え、よりの確な形態診断が可能な凍結方法を確立することを目的として、 -80°C の冷却イソペンタンを用いた凍結方法を検討した。併せて、良好な染色結果を得るため

の薄切厚及び固定液について検討を行った。

材料及び方法

1) 材料

当所で所管すると畜場において廃棄となった豚の肝臓、腎臓及びリンパ節を検体とした。

2) 方法

(1) 凍結方法の検討

凍結切片作成用包埋皿に2 mm厚に切り出した検体を入れ、包埋剤（ティッシュ・テック[®]O.C.T. コンパウンド，サクラファインテックジャパン(株)，東京）を重ねた。その後、予めディープフリーザー内で -80°C に冷却したイソペンタン中に検体を入れ、検体を細かく動かしながら凍結した。凍結時間はそれぞれ30秒，45秒，1分，3分とした。その後速やかに -20°C のクリオスタット (Leica CM1860 UV，ライカバイオシステムズ(株)，米

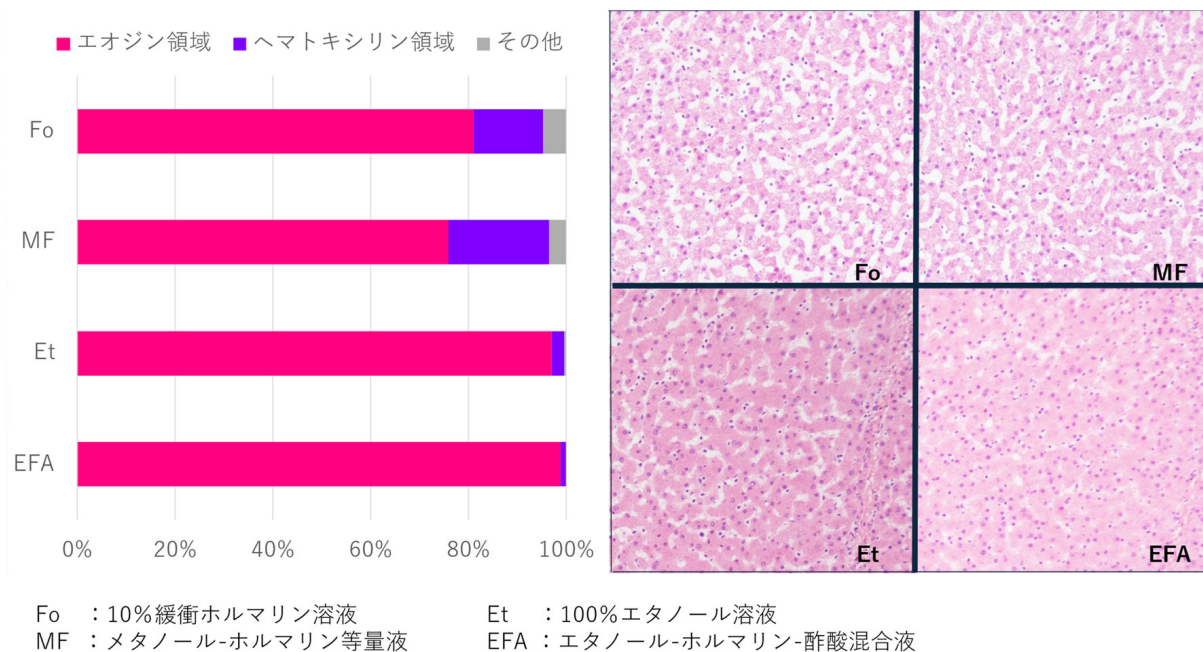


図1 固定液の検討例（肝臓，薄切厚 6 μm）

国）庫内に移動し，定法に従い凍結切片を作成，HE染色を実施した．薄切厚は 4 μm，固定液はメタノール-ホルマリン等量液を使用した．現行法では，凍結過程において予めディープフリーザー内で -80℃に冷却したアルミ板で検体を上下から挟んで3分間凍結後，前述と同様に凍結切片を作成した．

画像評価は対物10倍で撮影した画像について，ImageJ JSを用いて細胞を黒く，バックグラウンドを白く二値化し，全体に対する黒色領域の面積割合を算出し評価した．

(2) 薄切厚の検討

イソペンタン中で45秒凍結させた検体をそれぞれ 4，5，6，7 および 8 μm 厚で薄切し，HE染色を実施した．

画像評価は対物10倍で撮影した画像をImageJ JSを用いてグレースケール化した後，Microsoft Excelのマクロ機能を用いてHSV表色系に変換し，算出した明度により評価した．

(3) 固定液の検討

イソペンタン中で45秒凍結させ，6～7 μm 厚で薄切した検体をそれぞれ10%緩衝ホルマリン溶液 (Fo)，メタノール-ホルマリン等量液 (MF)，100%エタノール溶液 (Et)，100%エタノールを450ml，ホルマリンを50ml，氷酢酸を5 mlの割合で

混合したエタノール-ホルマリン-酢酸混合液 (EFA) に1分間浸漬し固定した後，HE染色を実施した．

画像評価は対物10倍で撮影した画像をMicrosoft Excelのマクロ機能を用いてHSV表色系に変換したのち，12色相環に基づくヒストグラムを作成し，各色相の比率を算出し評価した（図1）．

成績

1) 凍結方法の検討

肝臓及びリンパ節において，凍結時間が45秒の場合に最も黒色領域の割合が高くなった．腎臓においては，凍結時間1分の場合に黒色領域の割合が最も高く，次いで45秒で高値を示した．また，凍結時間が1分を超えると黒色領域の割合に大きな変化は認められなかった．肝臓及び腎臓では，現行法で最も黒色領域の割合が低くなった（表1）．

表1 凍結時間による黒色領域の面積割合 (%)

	30sec	45sec	1min	3min	従来法
肝臓	75.4	83.8	78.8	78.9	68.1
腎臓	51.5	54.2	54.5	53.1	45.8
リンパ節	49.6	53.2	49.2	48.4	50.1

2) 薄切厚の検討

薄切厚の増加とともに、明度が低下する傾向が認められた (表 2)。リンパ節において、4 μm で薄切した切片は 6 及び 7 μm で薄切した切片と比較して低倍率での組織構造が不明瞭であり、8 μm では細胞がよれて重なることで間隙が生じていた。

表 2 薄切厚による明度 (%)

	4 μm	5 μm	6 μm	7 μm	8 μm
肝臓	85.0	85.3	83.0	83.0	78.7
腎臓	81.3	80.7	80.3	78.7	79.0
リンパ節	84.7	84.0	85.3	82.0	84.0

3) 固定液の検討

エオジン染色領域は赤紫～赤の色相で示され、ヘマトキシリン染色領域は青～紫の色相で示される。

Fo 及び MF では、Et 及び EFA と比較してエオジン領域の割合が低かった (表 3)。これらの切片は検鏡すると核や細胞質の染まりが悪く、視野全体が白っぽく観察された。染色結果が良好であった Et と EFA を検鏡により比較したところ、EFA で核縁がよりシャープに観察された。

考 察

1) 凍結方法の検討

肝臓とリンパ節では、イソペンタン中で 45 秒凍結させる条件が最も高い黒色領域の面積割合を示し、腎臓では 1 分に次いで高い割合を示した。組織内で氷晶が形成されると、物理的に組織を圧排し、アーティファクトの原因となる¹⁾。氷晶は HE 染色で染まらず、二値化した画像では白色で表現される。よって、氷晶が多く形成された切片は黒色領域の割合が低くなる。以上のことから、凍結時間 45 秒の条件がアーティファクトの発生を最小化することができると考えられた。

凍結時間が 30 秒の場合、45 秒と比較してアーティファクトが増加した。水分は最大氷結晶生成帯と呼ばれる 0℃ から -5℃ の温度域で凍結した場合に最も大きな結晶となる²⁾ ため、いかに迅速にこの温度帯を通過させ、組織を凍結させるかが適切な凍結切片作成の重要な要因の一つである。凍結時間 30 秒ではイソペンタン中での組織の凍結速度が不足しているため、45 秒と比較してアーティファクトが増加したと考えられた。

表 3 固定液による色相の割合 (%)

		エオジン領域	ヘマトキシリン領域	その他の色相領域
肝臓	Fo	81.1～82.4	13.4～14.2	4.2～4.8
	MF	76.0～84.2	12.3～20.6	3.4～3.5
	Et	95.7～97.1	2.6～3.6	0.4～0.7
	EFA	98.9～99.1	0.8～1.0	0～0.1
腎臓	Fo	73.3～73.9	6.9～7.2	19.1～19.5
	MF	85.6～88.0	1.2～2.0	10.8～12.4
	Et	95.9～96.7	0.6～0.7	2.6～3.4
	EFA	96.7～97.7	0.7～0.9	1.6～2.4
リンパ節	Fo	36.3～39.6	45.9～46.7	14.5～14.8
	MF	35.9～36.4	46.5～48.0	16.1～17.1
	Et	56.3～68.5	28.4～35.2	3.2～8.5
	EFA	75.5～79.7	18.5～22.1	1.8～2.4

Fo : 10% 緩衝ホルマリン溶液
MF : メタノール-ホルマリン等量液

Et : 100% エタノール溶液
EFA : エタノール-ホルマリン-酢酸混合液

臓器別のアーティファクト発生状況は、肝臓や腎臓で凍結時間によるアーティファクト発生の差異が認められたものの、リンパ節では大きな差は認められなかった。肝臓や腎臓では、細胞質や間質の水分量が豊富な一方、リンパ節はリンパ球主体の臓器であり水分量に乏しいことから、凍結による影響が少なかったと考えられた。

2) 薄切厚の検討

薄切厚が増加すると明度が下がる傾向が認められた。これは細胞の厚みが増し、染色液の浸透量が増えたためと考えられた。4 μm では細胞密度の低下により、低倍率での観察において組織構造が不明瞭であった。薄切厚が薄くなると薄切自体がしづらく、切片の断裂が起こりやすくなった。また、リンパ節は結合組織や支持組織に乏しい組織であり、薄切厚が8 μm になると細胞がよれて重なることで間隙が生じていた。薄切のしやすさと細胞形態を鑑み、薄切厚は6～7 μm が最適であると考えられた。

3) 固定液の検討

Fo及びMFでは赤紫～赤で示されるエオジンの染色性が低い結果となった。また、HE染色において発生し得ない色であるオレンジ～水色の色相が検出された。ヒストグラム作成にあたり、画像の白色部位はいずれかの色として数値化し処理するため、白色部の多い画像ではオレンジ～水色がノイズとして検出される。固定液にFo及びMFを使用した切片は染色性が悪く、画像全体が白色傾向となった結果ノ

イズが多くなったと考えられた。一方、臓器による染色性に差はなく、Et及びEFAにおいてエオジンの染色性が良好であった。検鏡の結果、EFAはEtと比較して核縁がシャープに観察できた。HE染色標本の評価基準として核縁がシャープに表現されていること及び細胞質内に十分エオジンの色素が入り込み、細胞質の形態が低倍率で把握できることが挙げられており³⁾、EFAが固定液として優れていると考えられた。

以上より、凍結方法は-80℃のイソペンタン中で45秒凍結すること、薄切厚は6～7 μm であること、固定液はエタノール-ホルマリン-酢酸混合液を使用することによりアーティファクトが少なく、良好な染色結果が得られる凍結切片を作成できると考えられた。より観察のしやすい切片の作成により、正確な診断を下せるよう努めていきたい。

参考文献

- 1) 水口國雄：術中迅速H E 染色，Medical Technology別冊 最新染色法のすべて，10，医歯薬出版，東京（2011）
- 2) 青木裕志：乳腺組織の凍結切片の作り方，標本道場，廣井禎之，2－3，サクラファインテックジャパン，東京（2013）
- 3) 廣井禎之：Hematoxylin-Eosin染色法，JAMT技術教本シリーズ病理検査技術教本，一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会，122，丸善出版，東京（2017）