

動物組織（マウス脾臓）の凍結切片作製の試み

総合技術センター

分析・解析技術分野 友成 さゆり (Sayuri Tomonari)
分析・解析技術分野 佐々木 由香 (Yuka Sasaki)

1. はじめに

生物工学科の生物学実験7では生物学領域の学問分野の中でも動物組織の形態や細胞の観察および免疫化学の分野に関するテーマを取り扱った実験を行っている^[1, 2]。

また今年度は田端助教が留学中であったため、長宗教授のご指導のもと、準備段階から例年以上に密に携わることにもなった。

2. 実験背景について

実習は63名を大きく2班に分け、3つのテーマ（形態観察実験、免疫学実験、免疫化学実験）を順次行う日程になっている。その形態観察実験の一つとして動物組織（免疫応答反応の中心器官である脾臓）の標本をヘマトキシリン・エオシン（HE）染色して顕微鏡観察を行う。そのための標本を予め準備しておく必要があった。まず前半の班において、2回凍結融解した切片化途中の凍結サンプル（ブロック）から薄切りした切片を用意していた。しかし染色作業途中で大半の班がスライドガラスから切片が剥がれ落ちてしまうという事態になった。かろうじて標本の一部のみが観察できた班もあったが、少なかった。そこで後半の班のために、急遽ブロックを作り直すところから行うこととなった。予備サンプルとして、凍結融解していない未切片化ブロックも使用することとした。

ここではこの一連の対応作業について報告する。

3. 実験内容

3-1 準備物について

材料：マウス脾臓組織

試薬：リン酸バッファー（PB, 0.2MNaH₂PO₄・H₂O, 0.2M Na₂HPO₄・2H₂O, mQ）リン酸緩衝生理食塩水（PBS）, 4%ホルマリンin PB, ショ糖溶液（15%, 30% in

PB）, OCTコンパウンド, ドライアイス, 1級エタノール, ヘマトキシリン溶液, エオシン溶液, 封入剤

器具：スパーテル, ピンセット, 50mlチューブ, キムワイプ, アイスボックス, アルミホイル, 型枠鋳型, クライオスタット（Leica Biosystems CM3000）, カバーガラス, 剥離防止スライドガラス, 37°C伸展台, 37°C水浴（染色瓶）, 正立顕微鏡

3-2 脾臓の取り出し

生物学実験7の免疫学実験において、炭酸ガス吸引によって安楽死させたマウスを解剖して摘出した脾臓を対象物として用いた。このマウスはガン化させていたため、取り出した脾臓は通常よりもふたまわり程大きかった。

脾臓は腹腔内の左背部から腹部に存在している帯状の赤褐色をした組織でその大きさは約1cm弱ほどある。白脾髄と赤脾髄という2種類の機能の異なる組織で構成されている。白脾髄はB細胞や形質細胞を成熟させ、赤脾髄は血液をろ過することにより古くなった赤血球を破壊し処理する働きをする^[1, 2]。

3-3 固定～ショ糖置換

固定とは生きている細胞の構造や化学組成をできるだけそのままの状態に保存するための処理である。目的に応じて適当な固定を行う必要があるが、その方法はさまざまである。

またショ糖置換は凍結時にできる氷晶による組織障害を防ぐために行う。

- ① 取り出した脾臓を半分に切断後、4%ホルマリン溶液に浸し、室温で3時間固定した。
- ② 次に、15%ショ糖溶液が入った50mlチュ

ーブへ移した。初めは浮いているが、次第に沈んでくるので、それまで放置した。

- ③ 沈んだら、30%ショ糖溶液が入った50mlチューブへ移し、下に沈むまで放置した。
- ④ 沈んだら、包埋のためにOCTコンパウンドになじませた。

3-4 包埋

- ① アイスバスに5-6cm角に砕いたドライアイスを散らばせた。
- ② その中で100mlビーカーを用いてエタノールバスを作製した。
- ③ アルミホイルで作った型枠の半分ほどまでOCTコンパウンドを入れた。
- ④ OCTコンパウンドが入った型枠をエタノールバスに浮かせ、周囲が白く固まるのを待ったのち、取り出した。この時エタノールが入らないように注意した。
- ⑤ 向きなどを考慮しサンプルをのせ、脾臓が見えなくなるまでOCTコンパウンドを充填し、再びエタノールバスに浮かせた。
- ⑥ 全体が白く固まったら、アルミホイルで包み50mlチューブに入れ、-80℃冷凍庫へ一晩以上保存した。

3-5 切片化

一般的な正立顕微鏡で観察するには7-12 μm の厚さの薄切片が必要となる。今回は10 μm とした。

- ① 今回作製したブロックと凍結融解していない未切片化ブロック



図1
クライオスタット
Leica CM1850

- を-22℃に保たれたクライオスタット内に移動させ、アルミホイルから取り出し、切出したい面を上に向け、専用のブロック台にセットした(図1)。
- ② ブロック台ごと切片台にセットし、薄切片を1枚ずつスライドガラスに作製した。
 - ③ 37℃伸展台で1-2時間乾燥させたあと、-30℃冷凍庫にて保管した。一部はHE染色を行い、確認した。

3-6 HE染色

細胞内の構造を顕微鏡で観察しやすくするために、試料の一部を選択的に着色させる操作が染色である。実習では、古くから汎用され病理組織標本作製のスタンダードとなっているHE染色法を習得することを目標にしている。

この方法ではヘマトキシリンで核を青藍色にエオシンで細胞質・線維類や赤血球をピンク色に染分けすることができる^[1, 2]。

- ① 水道水を穏やかに流しながら、スライドガラスの裏に水道水がかかるようにして軽く洗浄した。
- ② キムワイプなどで余分な水分を除去後、スライドガラス上の切片にヘマトキシリン溶液を1滴滴下して5分間静置し、染色した。
- ③ 水道水を穏やかに流しながら、スライドガラスの裏に水道水が流れるようにして水洗した。
- ④ 37℃に温めておいたイオン交換水にスライドガラスを浸して加温し、ヘマトキシリンの染色像が青みを帯びるまで色出しを行った。
- ⑤ キムワイプなどで余分な水分を除去後、スライドガラス上の切片にエオシン溶液を1滴滴下して5分間静置して染色した。
- ⑥ ③と同様にして軽く流水水洗を行い、キムワイプなどで余分な水分を除去後に風乾させた。
- ⑦ 染色済みの切片上に封入剤を1滴滴下し、気泡が入らないように注意しながらカバーガラスを被せた。カバーガラスが固定するまでしばらく放置した。

3-7 観察結果および考察

凍結融解していない未切片化ブロックのサンプルは外表面が被膜で包まれ白脾髄と赤脾髄が確認でき、今回のよりは良いコンディションであった(図2A)。よって、こちらを学生実習に使用することとした。

その観察結果を図2に示した。点線丸で囲んだ青藍色に染まっているのが白脾髄である。その中に中心動脈が通っており、ピ

ンク色に染まった赤血球が確認できた（図2B）。全体的にピンク色に染まっている箇所は赤脾髄であり，毛細血管（静脈）が迂曲して通っている。

今回作製した切片は切片化の段階から組織が崩れていたため，期待はできなかった。染色効率についてはよく染め分けはできているようにみられた。切断した際の衝撃のためか被膜は確認できなかった。またガン化マウスのためか赤脾髄を構成する脾洞が肥大あるいは脾臓の間を埋める細網組織である脾索が破壊したのであろうか，どちらにしても通常の組織を確認することはできなかった（図2C，図3）。ガン化マウスの組織を切片化するにあたっては，更なる条件検討が必要かもしれない。

謝辞

本実験に関しまして，ご指導いただいた生物工学科長宗教授ならびにお手伝いいただいた院生の安養寺夏希さんに深く感謝申し上げます。

参考文献・図書等

- [1] 平成26年度 生物工学科生物工学実験7 実習書
- [2] 基礎生物学選書2. 細胞生物学 増訂版，太田次郎著，株式会社 裳華房，1992年10月25日増訂第23版発行
- [3] 帝京大学医学部 解剖学教室
http://www.med.teikyo-u.ac.jp/~kaibo/soshiki/lymphatic_organ/02.htm

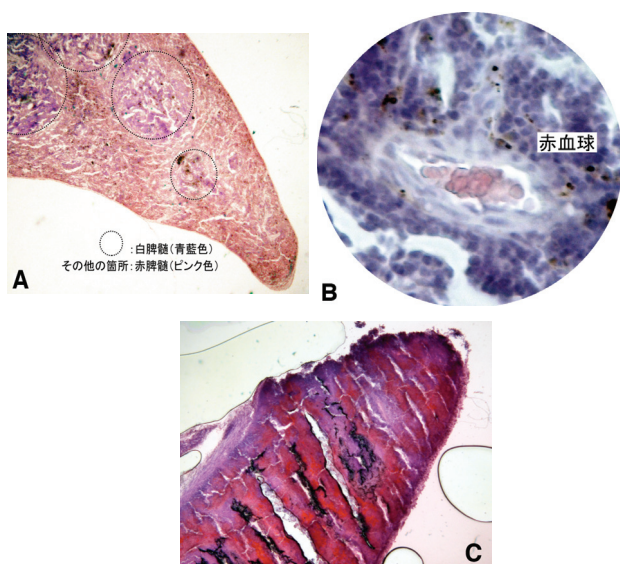


図2 HE染色後の脾臓切片の観察像

A: 凍結融解していない未切片化ブロックからの切片。100倍像。 B: Aをさらに拡大した図。400倍像。 C: 今回新しく作製し直したブロックからの切片。100倍像。

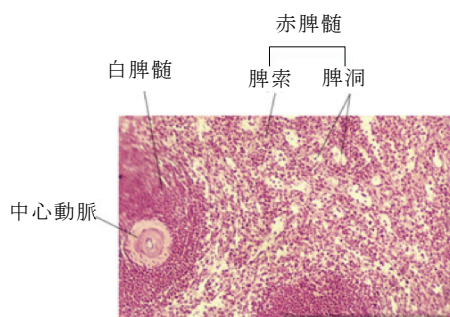


図3 お手本とした脾臓切片像^[3]
 ヘマトキシリン染色のみ。