(9) 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

はじめに

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・エオジン染色(以下 HE 染色)標本を基本とし、診断するにあたって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。そのためには標本作製の段階で、人為的な組織の損傷やメス傷、切片のすだれ状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(以下現行法)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 の凍結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のでその概要を報告する。

材料及び方法

・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。

・方法

(1) 凍結方法の検討

凍結切片作成用包埋皿に 2mm厚に切り出した検体を入れ、包埋剤(ティッシュュー・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式会社、東京都)を重層した。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式会社、米国)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°C 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、比較した。

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、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 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 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グレースケール化した後、Microsoft Excel で HSV 表色系に変換し、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 μm 及び 7 μm で薄切した検体をそれぞれ 10%緩衝ホルマリン溶液(以下 Fo)、メタノール-ホルマリン等量液(以下 MF)、100%エタノール溶液(以下 Et)、100%エタノールを 450ml、ホルマリンを 50ml、氷酢酸を 5mlの割合で混合したエタノール-ホルマリン-酢酸混合液(以下 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 に取り込み、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。

結果

(1) 凍結方法の検討

黒色領域の面積割合を表 1 に示す。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分の黒色領域の割合 54.5%に次ぐ高値を示した。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 黒色領域の面積割合(%)

	凍結時間				
	30sec	45sec	1min	3min	現行法
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

明度の結果を表 2 に示す。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。

リンパ節において、4 μm で薄切した切片は 6 μm 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 明度

	薄切厚				
	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。色相の割合について、肝臓を表 3 に、腎臓を表 4 に、リンパ節を表 5 に示す。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。これらの切片は顕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 を顕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。

表 3 肝臓における色相の割合(%)

	エオジン領域	ヘマトキシリン領域	その他の色相
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

表 4 腎臓における色相の割合(%)

	エオジン領域	ヘマトキシリン領域	その他の色相
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

表 5 リンパ節における色相の割合(%)

	エオジン領域	ヘマトキシリン領域	その他の色相
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

考察

(1) 凍結方法の検討

イソペンタン中で 45 秒凍結させる方法で最も黒色領域の面積割合が高くなった。組織内で氷の結晶が形成されると、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ため、氷晶によるアーティファクトが多く形成された切片は黒色領域の割合が低くなる。このことから、凍結時間を 45 秒に設定した場合に最もアーティファクトの発生を抑え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となる。凍結時間 30 秒では組織が凍結しきらず-20℃のクリオスタット庫内でゆっくり凍結される状態になったことにより、最大氷晶生成帯の迅速な通過ができずアーティファクトが増加したと推察された。臓器によるアーティファクトの発生状況について、細胞質が豊富な肝細胞や、水分量が豊富な腎組織では凍結時間や凍結方法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。リンパ節はリンパ球主体の臓器であり、リンパ球は N/C 比の高い細胞であるため水分量に乏しく、凍結による影響が少なかったと考えられた。現行法では、凍結時間は 3 分間必要だが一度に大量の検体を処理することができる一方で、今回検討した方法は、凍結時間は 45 秒で済むものの一検体ずつしか処理することができない。実際の運用は検体数に応じて現行法と使い分けることも必要と考えられた。

(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付近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ると薄切厚は 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、ヘマトキシリン・エオジン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、画像全体が白いものとなったためにこのような結果になったと考えられた。一方、臓器や薄切厚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。顕鏡の結果、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°C のイソペンタン中で45秒凍結すること、薄切厚は $6\sim 7\ \mu\text{m}$ 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でアーティファクトが少なく、良好な染色結果を得ることができる凍結切片が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] Medical Technology 別冊 最新染色法のすべて 水口國雄 医歯薬出版株式会社 p10
- [2] 凍結温度と氷晶の生成 <https://www.sakura-finetek.com/ja/customer-support/faq/110-faq/110-faq-4411/>
- [3] 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 丸善出版 p122