

組織標本作製室の紹介

深谷 貴子、福中 康子、菊川 浩子
筑波大学医学系技術室（組織標本作製室）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

組織標本作製室は、1977 年（昭和 52 年）に筑波大学医学系の研究用組織標本作製のために、共同利用施設として設けられた。

組織標本とは、人体・実験動物などを形態学的に観察、特に顕微鏡による微細構造の観察をするために必要とされているものである。

今回は、組織標本の作製方法と組織標本作製室について紹介する。

キーワード：組織標本作製、パラフィン切片、HE 染色

1. はじめに

組織の形態学的観察、とりわけ顕微鏡による微細構造の観察が、医学の研究に果たした役割は大きい。病変部位の特定とその異常構造の正確な把握は、医学研究において、広い分野で要求される重要事項である。微細構造の異常より病気の概念や発病のメカニズムを知ることができる。

組織標本作製室では、顕微鏡用標本作製し、教官、学生への研究・教育支援を行っている。

2. 組織標本作製の手順

臓器、組織を薄く切り、スライドグラスに貼り付けたものを組織標本という。組織標本は、切出し→固定→脱水・脱脂→パラフィン包埋→薄切→染色という工程で作られている。

2.1 切出し

組織標本作製室へ標本作製を依頼する教官、学生は、臓器を適度な大きさに切り出し、目的に応じた固定液に浸漬した状態で持参する。

組織片は標本ビンや 15 ml チューブ、50 ml チューブに入れられて持ち込まれることが多く、当方で検体ごとにナイロンメッシュ袋や、金属製のかごとと呼ばれる容器に移し替え、固定を継続して進める。

2.2 固定

固定時間は、組織の種類、大きさ、固定液の種類にもよるが、10%中性緩衝ホルマリンの場合は 48 時間、4 %パラホルムアルデヒド・PBS の場合は 12 ～24 時間を目安にしている。

固定中、組織片が大きい場合、不要なところがあれば切除し固定が円滑に進むようにする。

2.3 脱水・脱脂、包埋

固定完了後、組織片を水道水で洗浄し、70 % エタノールに浸ける。70 % エタノールには少なくとも 8 時間～一晩は浸漬してから、次の高濃度のエタノールに移す。ここで組織片はエタノールにより、脱水、脱脂される。

次に、一般に自動脱水包埋装置と呼ばれる機械でエタノールからパラフィンまで置換される。当方ではエタノール 7 槽、クロロホルム（中間剤）3 槽、パラフィン（64 °C）4 槽の順で運転している。これで組織片にパラフィンが十分に浸透する。

パラフィンに浸かった組織片を、観察したい面を下側にして包埋皿（トレイ）に入れる。冷やし固めてから適度な大きさに切り、台木にしっかり固定する。もしくは包埋用装置により樹脂製のカセットで包埋する（図 1）。



図 1 完成したパラフィンプロック、カセット

2.4 薄切

ミクロトームを用いてパラフィンプロックを切削し、染色、未染色に適した厚さの切片を作製することを薄切という（図 2-1）。

薄切したパラフィン切片はいったん水に浮かべた後、スライドグラスに乗せ、55～60 °C の伸展板上で伸張させる。この時、剥離防止のために特殊なコーティングが施されたスライドグラスを使用する（図 2-2）。

その後、染色過程での剥離防止のため、45 °C の乾燥機に一晩入れ、次の染色へと進む。



図 2-1 伸展器とパラフィンプロック薄切用ミ
クロトーム

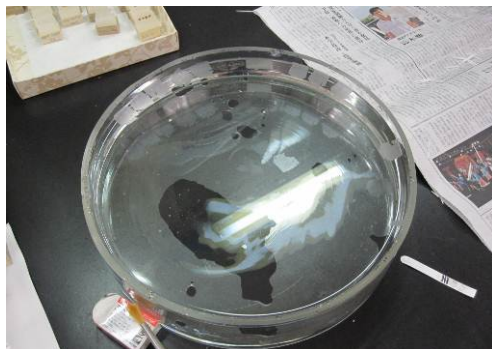


図 2-2 薄切したパラフィン切片
は水面に浮かべられる。

図 2 薄切風景

2.5 染色

染色を行う前に、スライドグラス上の切片のパラ
フィンを取り除く。(脱パラフィン操作)

キシレン<パラフィンを除去。>

↓
エタノール<キシレンを除去。>

↓
(水 <エタノールを除去。>)

上記作業の後、染色を行う。

例) HE 染色、PAS 染色など。

染色終了後、エタノール・キシレンを通して脱水・
透徹し、封入剤を用いてカバーグラスを被せ、標本
が完成する(図 10、図 11)。

組織サンプルの準備、切出しから、固定液に入れ
るところまでは依頼者本人が必ず行うが、それ以降
はどの時点で組織標本作製室へ持ち込んでも構わな
い。当方では 10 %中性緩衝ホルマリンを常備して
おり、固定が完了していない組織片を継続して固定
することができる。他の固定液や固定時間の細かな
指定には対応できないことがある。

完成した標本はパラフィンプロックと共に依頼者
に渡される。

詳しくは筑波大学医学部内のみで閲覧可能なホーム
ページに掲載し、案内している。

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/local/light-microscope/>

3. 組織標本作製室の設備について

医学学系棟 6 階 (662 号) にある組織標本作製
室について紹介する。



図 3 組織標本作製室 入り口



図 4 組織標本作製室 (662 室) の簡易見取り図

3.1 「受付・切出し・包埋」スペース

受付入り口で検体と所定の申込用紙を受け付ける。
以前は申込用紙と台帳で申込み内容を管理していた
が、平成 23 (2011) 年度よりパソコンでも管理する
ようにし、過去の申込内容の問い合わせに対応しや
すくした。

切出し時の組織の整形、袋詰め作業は、ホルマリ
ンの蒸気を吸わないよう、上から下へのプッシュ
プル方式のラミナーテーブル (HD-01 KOKEN) 上
で行っている (図 5)。



図 5 ラミナーテーブル

現在、包埋用に密閉式の自動脱水包埋装置を3台設置している。組織片をセットすると、エタノールからパラフィンへ順次設定した時間で溶液交換を行う。加圧・減圧の機能付きで、組織への液の浸透がより確実に行われる。安定した結果を出せるよう、溶液は一定回数使用した後廃棄し、落第¹を行い、新規に補充している。

この受付・切出し・包埋スペースでは換気扇を常時運転して換気に気を付けている(図4)。

3.2 「薄切」スペース

マイクローム(大和光機) 2台。

リトローム(大和光機) 1台。

以上、3台のマイクロームを使用し、全て手作業による薄切を行っている(図6)。

当方では、切片の厚さは、1 μm から数十 μm に対応しており、パラフィンブロックの大きさは、通常の $26 \times 76 \text{ mm}$ のスライドグラスに収まるものから、 $65 \times 100 \text{ mm}$ の大型ブロックまで薄切可能である。

切片を貼りつけたスライドグラスを乾燥させるための 45°C の乾燥機が1台設置されている。



図6 滑走式マイクローム

3.3 「染色・封入」スペース

染色・封入スペースには以下のものを設置している(図7～図9)。

- ・脱パラフィン系列
(キシレン 4槽、エタノール 5槽)
- ・脱水透徹系列
(エタノール 4槽、キシレン 3槽)
- ・一般的な染色の系列
(HE染色、PAS染色、MT染色など)
- ・封入用キシレン槽と封入剤。

環境安全衛生の面より、キシレンはドラフト(日本エアテック SS-MAC フィルターユニット)の内に設置してある。

また天井には光触媒環境浄化装置(CET-20i 盛和工業)を5台設置し、なるべくキシレンからの暴露を減らす努力をしている。



図7 脱パラフィン系列



図8 染色系列



図9 封入作業場



図10 台付けされたパラフィンブロックと組織標本

¹ 落第とは、第1槽液を廃棄し、第2槽から最終槽液を順次前の槽に移し、最終槽には新しい液を補充すること。

4. 利用状況について

設立当初は、医学系の組織標本を大量に必要としている部門のみが対象であったが、教官、学生の要望により、すぐに医学系全体から組織標本作製を請け負う共同利用施設となった。

さらに、平成 8 年からは応用生物化学系、その後も体育学系、生物学系など、医学系外からの依頼組織標本も作製している。

昭和 52 年から平成 23 年までの 33 年間で、合計 1,137,709 枚の組織標本作製している(図 12)。

作製枚数が増加したのは、利用者数が増えたことに加え、分子生物学、再生医学など、新しい分野の研究に組織標本が利用される様になったことが一因であると考えられる。



図 11 仕上がった組織標本
(HE 染色)

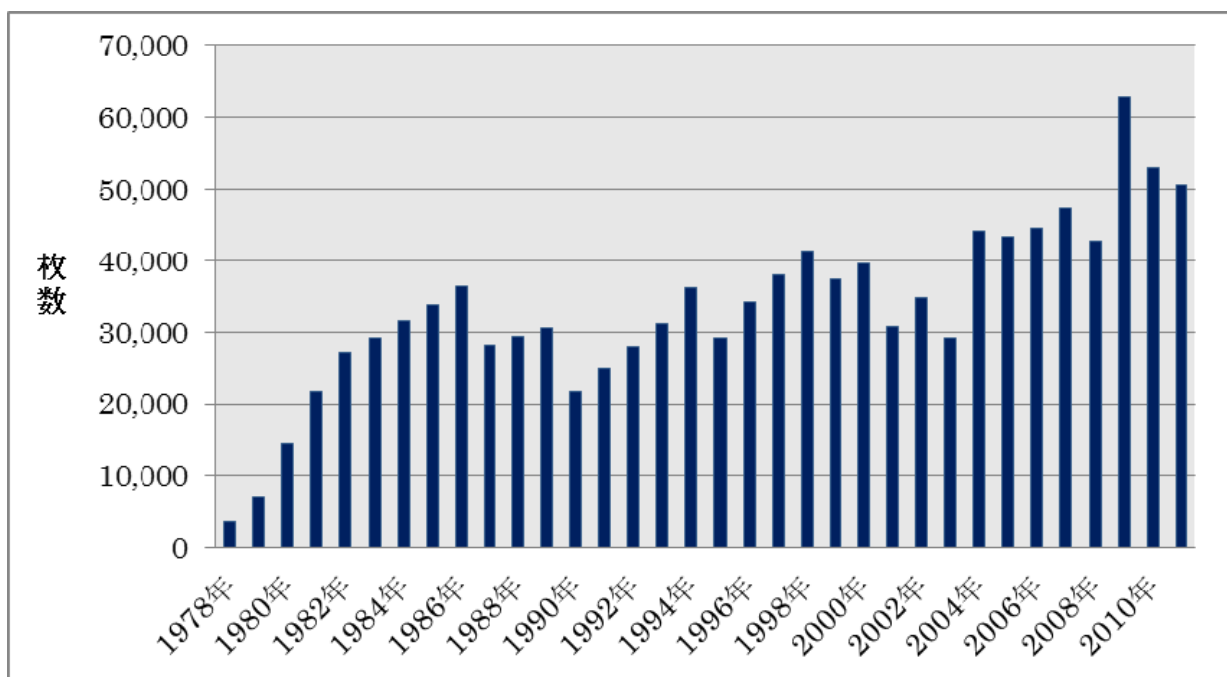


図 12 標本総枚数 (染色+未染色)

5. まとめ

旧来、国立大学では、研究室ごとに組織標本作製のための技術者や設備などに多額の費用をかけてきた。筑波大学では組織標本作製室があるため、個々の設備をそろえる必要がなく、簡単に美しい組織標本を手にすることができるようになった。また、専属の技術職員を配置しているため、標本の質は安定しており、コスト面では消耗品の原価とほぼ変わらない料金で標本を提供している(表 1)。

表 1

スライドガラスの 大きさ	染色 標本	未染色 標本	ブロック
規格 (26 mm×76 mm) ※フロスト部分 16mm を含む。	300 円	40 円	100 円
中 (40 mm×76 mm) (52 mm×76 mm)	600 円	140 円	200 円
大 (100 mm×76 mm)	700 円	240 円	300 円

このように、組織標本作製室は教官、学生の研究・教育へ支援を行っている。今後も大学全体の研究・教育支援の一端を担っているという意識を常に持ち、日常業務の遂行に努めていきたい。

参考文献

- [1] 日本病理学会編 病理技術マニュアル 3 病理組織標本作製技術 上巻 切出しから薄切まで 医歯薬出版
- [2] 日本病理学会編 病理技術マニュアル 3 病理組織標本作製技術 下巻 染色法 医歯薬出版
- [3] 茂木高夫、深谷貴子、福中康子：マスターしょう検査技術 大切片作製法 検査と技術 第 21 巻第 2 号別刷 医学書院