

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 5月 18日現在

機関番号：13901
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00422
研究課題名：-196℃下で柔軟性を保つ多孔体マッシュマロゲルを利用した凍結ブロック作製法の検討

研究代表者
牛田 かおり (USHIDA, Kaori)
名古屋大学・全学技術センター (医学)・技師

交付決定額 (研究期間全体) (直接経費)：520,000 円

研究成果の概要：

細胞や組織を顕微鏡で観察するための病理標本作製法の一つに凍結標本があり、標本の出来不出来は凍らせ方の違いによって大きく左右される。液体窒素を用いる方法が一般的であるが、-196℃の液体窒素に室温の組織や細胞を入れることで起こる気泡の発生や手技のばらつきによって液体窒素の超低温性が十分に生かされていない現状がある。このような問題点を解決するために、スポンジなどと違い液体窒素をこぼさず吸収することができる柔軟多孔性ゲル (通称マッシュマロゲル) を用いて安定して標本作製法を考案、従来法と比較して凍結標本作製におけるマッシュマロゲルの有用性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義：

病院での手術中に行われる迅速病理診断や研究の場において凍結標本作製法は広く利用されている。正しい病理診断や研究データの取得には、良質な標本作製することが不可欠だが、凍結標本は短時間で標本の作製が可能である一方、安定して液体窒素の超低温下で迅速に凍らせることが難しく標本の出来栄えにばらつきが大きい。液体窒素をマッシュマロゲルに含ませる凍結法は冷却効率が良く、良質な標本作製が可能だった。また、市販のスポンジなどと比較し本法では液体窒素がこぼれることがなく、かつ有機溶媒を使用しないため安全に作業をすることができた。

研究分野：病理学 (病理標本作製法)

キーワード：病理標本作製法 凍結標本 マッシュマロゲル シリコン組成モノリス多孔体
液体窒素 超低温保冷剤

1. 研究の目的

迅速病理診断や生物学研究の場において作製される凍結標本の良し悪しは、凍結ブロックの作製方法、特に凍結方法によって大きく左右される。凍結には-196℃の超低温を供することができる液体窒素を用いることが多く、過剰凍結によるブロックの破損やライデンフロスト現象を防ぐためイソペンタンやアセトンなど有機溶媒を介す凍結法が推奨されているが、有機溶媒のブロック中への混入や、実際には冷却が不十分であるために起こる中心部の凍結不良などが問題点として存在する。このようなトラブルを回避するために有機溶媒の代わりに、液体窒素の低温性を長時間保持することが可能なシリコン組成モノリス多孔体 (通称マッシュマロゲル) と、より冷却効率を上げ型からブロックを外しやすいテフロン加工済金属包埋皿を併用して良好な凍結標本作製のためのブロック凍結法を検討することを今回の研究目的とした。

2. 研究成果

(1) 凍結ブロックを作製する際、速やかな凍結を妨げる要因としてプラスチック包埋皿・凍結包埋剤・空気層・予冷の不十分な有機溶媒などがあり、できるだけそれらを除いた凍結方法が推奨される。この研究課題において従来法と比較し、液体窒素を充分含んだマシュマロゲルに金属製包埋皿を密着させることにより優れた熱効率で液体窒素の超低温性を充分に活用することができた。(図1)

最適条件下で凍結した組織から得られた凍結切片は、免疫染色の結果も良好であり抗原性の保持にも優れていると考えられた。

(2) 液体窒素を含んだマシュマロゲルが室温下でどのくらいの時間低温を保つことができるかを検証してみたところ、マシュマロゲル(130×130×50 mm)は、本体重量の約6倍の液体窒素を吸着し、約1時間30分-150℃以下を、2時間0℃以下を保つことができた。(図2)

培養細胞を用いた実験で、運搬時に-150℃を超えると細胞が死滅するという報告もあり、マシュマロゲルをお茶パックのような不織布でくるみ超低温保冷剤としての利用することで、抗原などタンパク質の保存や細胞の維持にも有効ではないかと示唆された。例えば、バイオバンクのように大量の液体窒素を扱う施設では、この保冷剤を用いることで庫内の超低温状態を安定して保つことができ、最低限の温度変化の条件下で試料の出し入れが可能である。また、災害時における液体窒素流出も抑えられると推測される。

今回使用したゲルは通称のとおりマシュマロのような柔らかさを持つ反面、もろく崩れやすい特徴もあり、現在その加工方法も検討中である。

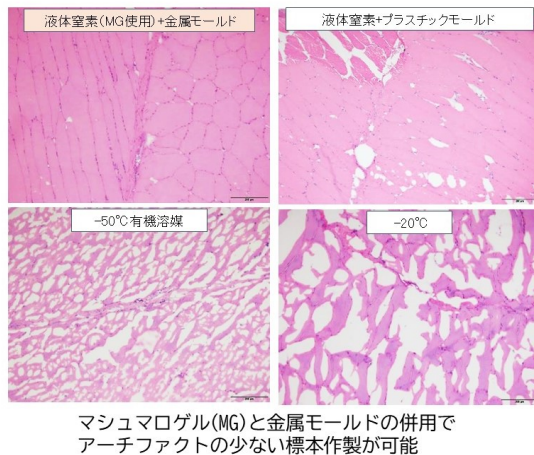


図1 凍結法の違いによる標本への影響(魚骨格筋)

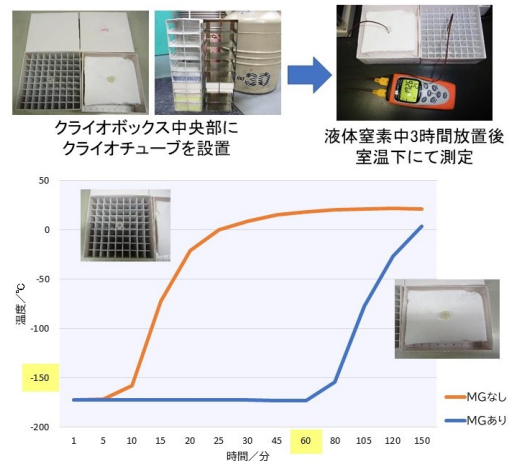


図2 マシュマロゲル(MG)の温度変化

3. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

発表者名：牛田かおり

発表タイトル：-196℃下で柔軟性を保つ多孔体マシュマロゲルを利用した凍結ブロック作製法の検討

学会等名：第16回 奨励研究採択課題技術シンポジウム(自然科学研究機構 愛知県)

発表年：2020年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

4. 研究組織

研究協力者
研究協力者氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。