

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号： 12102  
研究種目： 奨励研究  
研究期間： 2021～2021  
課題番号： 21H04120  
研究課題名 ガラス化を利用した質の高い凍結組織包埋標本作製法の検証

## 研究代表者

竹内 朋代 (TAKEUCHI, Tomoyo)

筑波大学・附属病院・技術専門官

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000円

研究成果の概要：腎臓組織（手術検体の残余試料）を使用して、ガラス化法で研究用の凍結包埋標本を調整することで再現性の高い組織切片の作製が実現できるか検証した。市販されているガラス化液を使用してガラス化凍結を行い、凍結包埋標本を作製した。ガラス化法で調整した凍結包埋標本より薄切切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を実施したところ、コントロールと比較して染色生が弱い傾向にあった。ガラス化法を施した標本の組織像をコントロールと比較した組織像の差は認められなかった。さらに再凍結した標本についても検証したが差は認められなかった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

凍結包埋標本は抗原性の保持や細胞膜の構造維持に優れており、研究用試料としても利用されている。しかし、凍結時の氷晶形成による組織損傷や出入庫を繰り返すと細胞核の空砲化が生じるという欠点がある。本研究は氷晶形成による組織損傷や細胞核の空砲化の少ない質の高い凍結包埋標本を調整・保存することを目的として、ガラス化法の有用性を検証した。ガラス化法により従来の凍結包埋標本作製における欠点を克服できれば、信頼性の高い研究結果に繋がる高品質な研究用試料の保存が実現できると考えられる。

研究分野： 生体試料保存

キーワード： 凍結包埋標本 生体試料 保存

## 1. 研究の目的

術中迅速診断に使用する凍結包埋標本は、標本作製から薄切切片の調整までを数十分で実施することができ、また、加熱や有機溶媒の使用をしないため、抗原性の保持や細胞膜の構造維持に優れており、研究用試料としても利用されている。しかし、凍結時の氷晶形成による組織損傷や出入庫を繰り返すと細胞核の空砲化が生じるという欠点がある。凍結包埋標本を研究用試料として有効に利用するためには、これらの欠点を補う質の高い凍結包埋標本の作製が望まれる。そこで、生殖医療分野で卵子や受精卵を保存するために実施されている「ガラス化法」を凍結包埋標本作製に応用することを思案した。ガラス化法は高濃度の凍結抑制剤を使用して急速凍結することで細胞中の水を結晶化させずに凍結する方法で細胞へのダメージが少ない。本研究は氷晶形成による組織損傷や細胞核の空砲化の少ない質の高い凍結包埋標本を調整・保存することを目的として、ガラス化法の有用性を検証する。ガラス化法により従来の凍結包埋標本作製における欠点を克服できれば、信頼性の高い研究結果に繋がる高品質な研究用試料の保存が実現できる。

腎臓の組織を用いた予備検証では、術中迅速標本の作製方法で凍結包埋した標本では初回の薄切組織切片と2回目の切片では大きな差はないが、3回目以降の切片では著しい核の空砲化が認められた。本研究の実施で凍結包埋標本はガラス化法により、3回目以降も再現性を保ち切片作製が可能であるか、もしくは再現性を保つことは困難であるため、1-2回の使い切りで調整することが推奨されるかを明らかにすることができる。

## 2. 研究成果

腎臓組織（手術検体の残余試料）を使用して、ガラス化法で研究用の凍結包埋標本を調整することで再現性の高い組織切片の作製が実現できるかを検証した。

### (1) ガラス化法による凍結包埋標本の作製

受精卵や霊長類の細胞用に市販されているガラス化液を使用した。組織をガラス化液に浸漬した後、凍結包埋標本作製した。ガラス化液に浸漬した組織は肉眼的には非処理のコントロール組織と変わらず、また凍結過程においても固まりにくいなどの差は認められなかった。

### (2) 組織切片の作製・染色

ガラス化法で調整した凍結包埋標本より薄切組織切片を作製してヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin Eosin:HE)染色を実施した。切片の調整はコントロールと同じように実施でき他が、コントロールと比較して染色性が弱い傾向にあった。

### (3) 組織像の評価

HE染色標本を観察してガラス化法を施した標本の組織像をコントロールと比較した。さらに標本を再凍結、再薄切してHE染色を行い組織像の変化、再現性について検証した。コントロールと比較して組織像の差は認められなかった。再凍結、再薄切した標本についてもガラス化法とコントロールで組織像の変化は認められず、共に形態が良好に保たれていた。

以上のことより、ガラス化法により組織形態が著しく向上することはなく、形態については通常の作製法でも十分であることがわかった。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------