

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659038

研究課題名（和文） 親水性高分子モノマーを用いた組織包埋剤の開発

研究課題名（英文） New tissue embedding agent for TEM and LM with hydrophilic macromolecular monomer.

研究代表者

北村 裕和 (KITAMURA HIROKAZU)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70115559

研究成果の概要（和文）：平成 24 年 3 月 30 日に取得した特許（第 4956839 号）を基礎にして、親水性高分子モノマーとして、N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) を用い、親水性の調節、重合速度の調節のために重合阻止剤と架橋剤を加えることにより、適度な強度の包埋剤を作製した。適度な硬度を得るため硬化剤を加え、さらに切片が水没するのを避けるためにアクリル系包埋剤を加えて、光顕・電顕において免疫組織化学に使用できる親水性包埋剤を開発した。

研究成果の概要（英文）：We executed tissue embedding medium containing N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) as hydrophilic macromolecular monomer, polymerize inhibitor and cross-linker that were founded on the patent No4956839 (March 30, 2012). And furthermore, hydrophilic embedding medium for immunohistochemistry to light and electron microscopy was made with hardener to obtain the hardness and acrylic medium to prevent the sections sink in the water.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	0	2,000,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	210,000	2,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：組織包埋剤、生体分子、免疫組織化学、環境対応、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡並びに透過型電子顕微鏡において、免疫組織化学的観察を行う上で、パラフィン切片上では証明できる抗原が電顕用包埋剤で包埋した切片上では全くまたは極弱い程度でしか観察できない事を多く経験してきた。

これらの原因としては、重合した樹脂の密度が高いために抗体が抗原に付着出来ない事が考えられる（エポン樹脂等）。また紫外

線重合を行う樹脂では、紫外線によって抗原構造が破壊されてしまう事があった。

これらの事から新しい包埋剤を常に探し求めている。

2. 研究の目的

この事態を解決する方法の1つが、新しい包埋剤を作り出すことである。

すでに出願中で、平成 24 年 3 月 30 日に取得した特許（第 4956839 号）を基礎にして、親水性の

高分子化合物で、生体内の水分と置換し、細胞内化学物質と反応して硬化し、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡における免疫組織化学に使用できる包埋剤を作製する。

本研究は、新しい包埋剤を作る事と同時に、それぞれが既存の包埋剤 (LR White, K4M 等) と同等以上の組織形態保存性と組織内の分子 (抗原) の保存と免疫組織学的に良好な検出性の確保を目指す物である。

3. 研究の方法

平成 24 年 3 月 30 日に取得した特許(第 4956839 号)を基礎にして、親水性高分子モノマーとして、N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) を用い、親水性の調節、重合速度の調節のために重合阻止剤と架橋剤を加えることにより、適度な硬度の包埋剤を作製する。そのため硬化剤を加え、さらに切片が水没するのを避けるためにアクリル系包埋剤を加える。これらの試薬の品目と配合比率をサンプル組織にて検討する。

サンプル組織としてラットの膵臓、耳下腺などを用いた。採取した組織片を a 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、アルコールで脱水後上記 NVP 混合液に一夜振盪浸透 (4℃) してゼラチンカプセルに包埋した。b 比較のため同様に処理をして LR White にて包埋した。a, b 両方とも 60℃の恒温器に入れて一夜重合させる。光顕のために 1µm 切片を作製して、硬度と水に浮遊して十分伸展するかどうか確認して、トルイジンブルーによる染色と抗インスリン、抗グルカゴン抗体等で免疫染色をおこなった。電顕のために 10nm の超薄切片を作製して、抗インスリン、抗グルカゴン等の抗体で免疫染色を行って LR White 包埋切片と比較した。

*包埋剤の検定のための免疫染色法

a. 抗インスリン抗体 (モルモット IgG 抗ヒトインスリン、Dako) -PAG-5nm-Gold-PD(23℃, 28 分、電顕-8 分)

b. 抗グルカゴン抗体 (ウサギ IgG 抗ヒトグルカゴン、Dako) -ヤギ抗ウサギ IgG-6 nm-Gold-PD(23℃, 28 分、電顕-8 分)

PD: 物理現像法-銀増感法

他の抗体についても同様に行った。

*抗体希釈試験

LR White と新規 NVP 混合包埋剤に包埋した膵臓の 1µm 切片に対して 1 時抗体である抗グルカゴン抗体を 1000 倍、2000 倍、4000 倍、8000 倍、16000 倍、32000 倍に希釈し、染色結果を比較検討した。

4 研究成果

(1) 包埋前に、NVP 混合包埋剤を混合した後に窒素ガスを注入した方が良く固まった。

(2) 硬化後のチップの性状

ガラスナイフによる厚切り (1-2 µm)

LR White は少し厚めに切ったらかなり深い割れ目が入り、20-30 µm 削り落とす必要があり、非常に脆い性質があった。

NVP 混合包埋剤によるチップは、少し厚めに切った場合でも割れ目は入らず、脆さが無く滑らかであった。

(3) 切片の浮遊と伸展

NVP 混合包埋剤の切片は LR White の切片と同様に水に浮遊し、かつ LR White の切片以上に良く伸展した。少しの皺が有っても伸展した。これらの切片はトルイジンブルーで同様に染色する事ができた。

(4) 抗体希釈試験

	X1000	X2000	X4000	X8000	X16000	X32000
LRW	○	○	○	X	X	X
NVP	○	○	○	○	△	X

NVP 混合包埋剤は LR White と比較して 1 段階と少し染色の感度が良かった。

以下 Fig. 1 から Fig4 にて結果を示す。

免疫染色は抗グルカゴン抗体 (ウサギ IgG 抗ヒトグルカゴン、Dako) -ヤギ抗ウサギ IgG-6 nm-Gold -PD(23℃, 28 分)である。

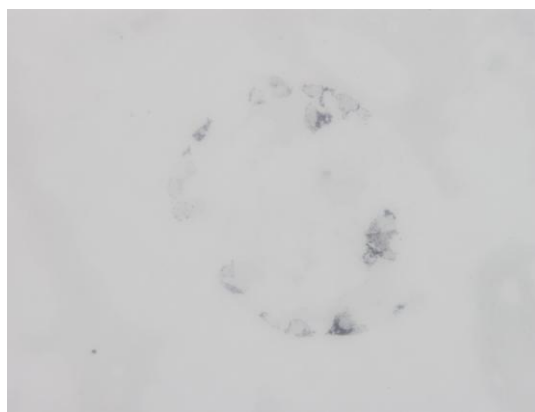


Fig. 1 LR White 抗グルカゴン X4000



Fig.2 LR White 抗グルカゴン X8000



Fig.3 NVP 混合包埋剤 抗グルカゴン x4000

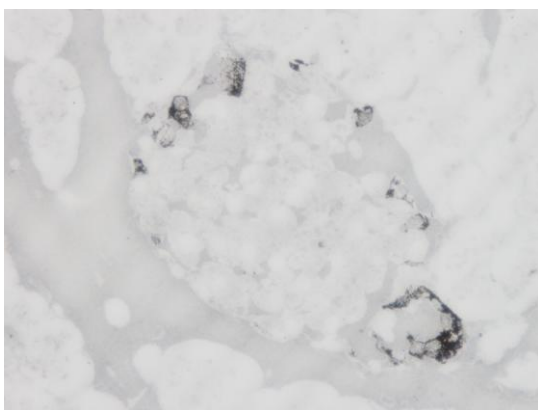


Fig. 4 NVP 混合包埋剤 抗グルカゴン x8000

*透過型電子顕微鏡による観察結果

抗インスリン抗体（モルモット IgG 抗ヒトインスリン、Dako）-PAG-5nm-Gold-PD(23°C, 8分)の結果を示す。

NVP 混合包埋剤を用いた方 (Fig. &) が陽性のドットの密度が高い。

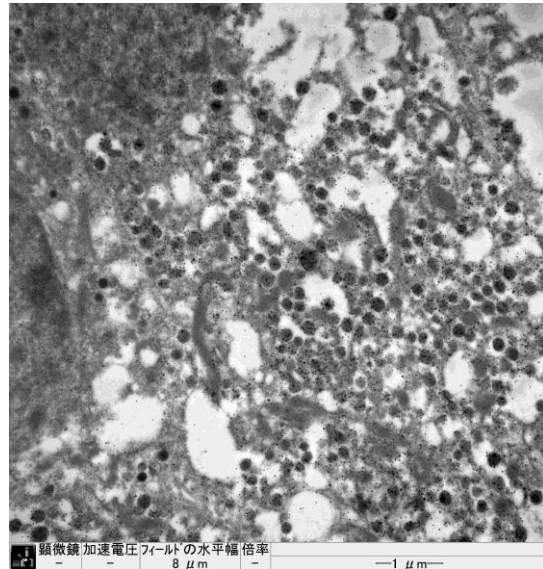


Fig.5 LR White 抗インスリン x4000

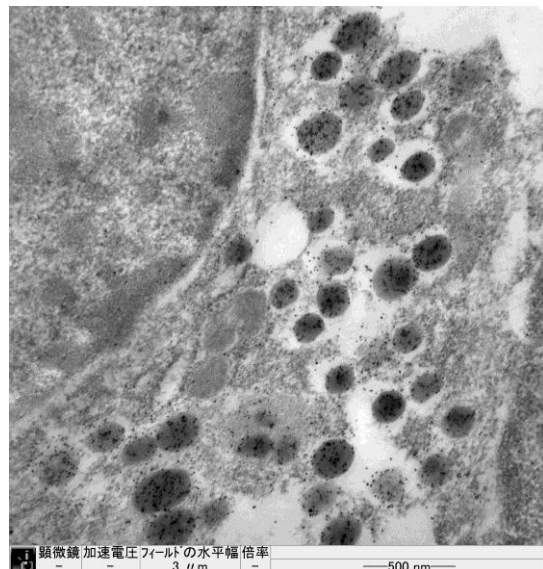


Fig.6 NVP 混合包埋剤 抗インスリン x4000

以上の結果から、この度新規に考案した NVP 混合包埋剤は免疫組織化学を行うための光学顕微鏡、特に透過型電子顕微鏡における包埋剤として、従来の包埋剤に比して非常に有用で、実用出来る可能性も大で有り 特許申請準備中で有る。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）出願準備中

名称：NVP 混合包埋剤とアクリル系包埋剤を混合した免疫組織化学用包埋法

発明者：北村裕和 藤倉義久 伊奈啓輔

権利者：国立大学法人 大分大学

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：日本

○取得状況（計 1 件）

名称：高親水性高分子モノマー水溶液による組織包埋方法

発明者：藤倉義久 北村裕和 藤田憲明

権利者：国立大学法人 大分大学

種類：特許

番号：第 4956839 号

取得年月日：2012 年 3 月 30 日

国内外の別：日本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 裕和 (KITRAMURA HIROKAZU)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70115559

(2) 研究分担者

伊奈 啓輔 (INA KEISUKE)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：20203193

藤倉 義久 (FUJIKURA YOSHIHISA)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：10165368

(3) 連携研究者

なし