

## 硬組織の病理組織標本作成法

仙波伊知郎・形岡 英子

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科腫瘍学講座口腔病理解析学分野

### Technical notes for histopathological preparation of hard tissues

Ichiro Semba and Fusako Kataoka

Department of Oral Pathology, Division of Oncology, Course of Advanced Therapeutics,  
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan.

#### Abstract

Technical notes about calcified hard tissues including tooth and bone were described for new comers such as postgraduate students and young researchers. The macroscopic examinations are essential procedures before histological examinations. Especially, the examination by means of soft x-ray might provide useful findings about calcified hard tissue specimens. Decalcified method such as Plank-Rychlo quick decalcified procedure is commonly used for basic histomorphological examination using acids. Although the method might result decrease of Hematoxyline staining and over-staining of Eosin, it would be avoid by the decalcification under lower temperature in a refrigerator. The difficulty of sectioning for decalcified hard tissue specimens might be not due to insufficient decalcification but for the cutting skills for dens fibrous tissue composition of the hard tissue specimen.

The cutting and grinding method of undecalcified preparation is an essential one for hard tissue specimens containing metals and ceramics. The adhesion method of resin embedded undecalcified specimen to slide glasses and/or acrylic plates allows easy handling the specimen during the grinding preparation not only for using a programmed machine but also for a manual preparation. The surface staining with an etching is applied for relatively thick grinding specimen. The surface staining provides as clear staining as that of in the case of thin sectioning preparation.

The technical tips about the histological preparation methods should be precisely hand over by young researchers and it might not be replaced by machinery even in the future. Furthermore, the histological methods might be an essential method for integration of knowledge about human diseases that are depended on specificity of individuals.

**Key words:** hard tissues, histopathology, decalcified preparation, undecalcified preparation,

## I. はじめに

口腔領域の病理組織検索には、歯や顎骨などの硬組織を取り扱う頻度が高いが、硬組織の標本作成は軟組織に比較すると、一般に困難である。一方、硬組織標本作成のための方法論や技術的な問題点についての記載は一般的な学術誌では希であり、特にこれから標本作成を行おうとする者にとって、参考になる文献が乏しいのが現状である<sup>1-7)</sup>。今回は硬組織標本作成法について、初めて組織標本を作成しようとしている大学院生などを想定しながら、主に技術的な注意点などを実践的な観点から記しておきたい。

口腔病理解析学講座では、これまで病理組織標本の作成について、教育、研究、診断業務を通して研鑽を積み重ねてきたが、これらの技術は学生、大学院生や若い研究者に継承されてこそ、その成果が結ばれるものと考えている。標本作成に必要な技術教育はこれまでも共同研究を通じて行っており、また、ここで紹介している機器も講座で管理しているが学部共同の資産でもあり、有効な活用によってより一層、教育、研究、臨床に資することが出来ると思われる。この拙校が、標本作成を志す者が講座を訪れる契機になれば幸いである。

## II. 硬組織標本の取り扱い

### A. 固定

歯や骨などの硬組織は、一般に緻密な組織で、固定液の浸透が困難であり、また、内部に歯髄や骨髄などの軟組織を含むため、固定には充分留意する必要がある。人体例では浸漬固定しか行えないが、ラット、マウスあるいは犬などの実験動物では環流固定法を行う方が良い。いずれの場合にもさらに浸漬固定を行うが、後述するように組織片の厚みを5 mm程度に切り出しを行い、充分な固定効果が得られる様にする必要がある。

硬組織の固定には中性緩衝ホルマリンを用いる。未緩衝のホルマリン液ではギ酸が生じるので、特に非脱灰標本を作る際は緩衝ホルマリンが必須である。また、軟組織もこの酸による障害が生じるので、免疫組織化学染色を行う場合も緩衝ホルマリンが良い。一般的にはリン酸緩衝10%ホルマリン液を用いるが、固定効果を促進したい場合や人体剖検例など死後変化が強い場合などは、20%程度までの高濃度のホルマリン液も用いる。浸漬固定を0.5気圧程度の陰圧下で行えばより効果的である。なお、固定後、長時間の水洗は避け、水洗は軽く流水をくぐらせる程度で良く、非脱灰標本

の場合は70%アルコールに浸漬し、脱灰標本の場合は固定後直ちに脱灰液に浸漬する。

### B. マクロおよび軟X線写真

#### 1. 肉眼所見

組織観察の入り口は肉眼観察である。全てを組織標本にして観察することは不可能であるので、標本作成部位を決めるための肉眼観察と肉眼診断は組織検索には欠かすことが出来ない。その肉眼観察に基づいて標本にする部分を切り出すことになる。この際に標本の全体像や断面の所見を写真に記録することが大切である。最近はデジタルカメラの普及と性能向上によって、写真撮影も容易になった。フィルムの現像を待つ必要がないので、様々な条件を試して撮影し、良い条件のものだけを残す事が出来る。

#### 2. 軟X線写真

さらに、硬組織では標本全体および5 mm程度の厚みに切り出しをした標本の軟X線写真が肉眼像と共にマクロ観察には有用である。現在、本講座で用いているソフテックス社 CSM-2 では、CMB-M焦点を用いて、管電流3 mA、照射時間60秒、焦点距離38cm、現像(レンドール)20℃、5分の条件を一定にして、管電圧を変化させ、対象標本に適正な条件を求めている。ヒトの顎骨などの緻密な皮質骨や歯などでは35から40kVpの管電圧とし、海面骨やその他の石灰化物では25から30kVp、マウス、ラットなどの小動物の頭部では20から25kVpを目安としている。フィルムは専用のもの(Industrial X-ray Film FR, 富士フィルム)を用いる。

### C. 切り出し

この様な全体像や大まかな断面などのマクロの観察が終わると、さらに精密な標本の切り出しを行い、標本作成が可能な大きさに細切する。標本の固定効果をあげる為には、標本の厚みは薄ければ薄い程よいが、切り出し時に生じる組織破壊や極端に薄すぎる標本では標本作製が困難になる事を考慮すると、厚みは5 mm程度にする。硬組織の切り出しには、水冷機構を備えたダイヤモンドバンドソー(EXAKT BS3000, 盟和商事)を用いると簡便で良い。最終的な標本の大きさは、一般的にはティッシュテックの標本カセット(28×25×4 mm)に入る大きさを標準と考えれば良い。

### Ⅲ. 脱灰標本の作製

#### A. 脱灰

##### 1. 迅速脱灰法

硬組織の非脱灰標本の作成法については後述するが、一般的に用いられるパラフィン包埋薄切標本作製するためには脱灰操作が必須である。脱灰法には様々なものがあるが、病理組織検査では迅速で確実な脱灰方法が求められるため、酸を用いた迅速脱灰法が汎用されている。ここでは、Plank-Rychlo法（表1）について述べる。なお、マウス、ラットなどの小実験動物の頭蓋骨などではキレート剤であるEDTAを用いた脱灰法が用いられるが、歯を含む顎骨では迅速脱灰法の方が簡便である。

標本体積の約30倍量の脱灰液を用いる。脱灰に伴ってガスが生じるので密閉容器を用いてはならない。標本カセットに入れると、容器や標本同士が密着しないので良い。通常は室温で24から36時間、薄く小さなものでは8から12時間で良く、一方、歯や緻密な皮質骨では48時間程度かける。脱灰不足の標本では、表面の薄切は出来ても、切り込むに従って薄切出来なくなるので、充分な脱灰が出来ているのか否かの判断が確実に出来なければならない。24時間頃を目安に一部分をカミソリで切ったり、針を刺して脱灰の程度を確認し、必要であれば脱灰液を更新して続ける。

表1 迅速脱灰液 (Plank-Rychlo<sup>9)</sup>)

塩化アルミニウム (結晶)	70g
蒸留水	1000ml
ギ酸	50ml
濃塩酸 (37%)	85ml

##### 2. 中和と低温脱灰

過脱灰は後の薄切や染色に大きく影響するので、必要最小限の時間で脱灰する必要がある。対象標本が多数ある場合や動物実験では、軟X線写真を撮影して2かから4時間おきに撮影し、脱灰速度を確認し脱灰時間を目安を立てることもある。酸を用いた脱灰なので、ヘマトキシリン・エオジン重染色では、ヘマトキシリンに染まりにくく、エオジンに過染しがちになる。この様に好酸性になりがちな染色性を改善するために、脱灰後、中和液（5%硫酸ナトリウム水溶液）に浸漬する。また、脱灰を冷蔵庫内（4℃）で行うと染色性の低下を回避できる。低温脱灰では1.5から2倍の時間が必要となる。また、週末などで標本作成スケジュール

ルの調整が必要なときには、この低温脱灰で時間を調整することも可能である。

#### B. パラフィン包埋

硬組織は脱灰を行っても、多くの場合、基質が緻密な線維性組織であるため、その後の薬液浸透も容易ではない。最終的にパラフィンが十分に浸透するためには、脱脂と脱水が欠かせない。その為に上昇アルコール系列を用いるが、温度や加圧・減圧の設定が細かく行えるパラフィン含浸装置（ETP120、サクラ精器など）を用いるのが良い。本来は病理組織標本に求められる迅速な標本作成を目的として用いられている機器であるが、条件設定を脱灰標本用にプログラムして用いると良い。脱灰標本では初めの70%アルコールの時間を長くし（2時間以上）、キシレンの時間を長くし過ぎない（合計1時間以内）、パラフィン含浸時間を長くする（2時間以上）等の設定を行う事が肝要である。包埋には比較的高融点（62℃）のパラフィンを用いる方が硬く緻密な硬組織標本には有利である。また、包埋時には切り出し面を良く圧接して、薄切面が平行になるように留意し、薄切時にマイクローム上での面出しが容易になるよう配慮する。

#### C. 薄切

##### 1. ミクロトームの選択

初心者が最も困難を感じるのが、薄切の工程である。硬組織を薄切する前に、軟組織を用いて、マイクロームの扱いや調節方法に習熟しておくことは必須である。一般的に用いられているユング型の滑走式マイクロトーム

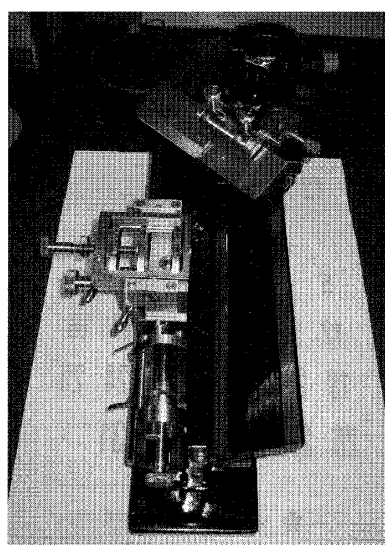


図1 ユング型滑走式マイクロトーム (ヤマト社)

ム(図1)は、引き角(刃が標本となす角)を45度以下に調節できるのに対して、回転式マイクロームでは引き角は90度に固定されてしまう。硬組織は脱灰後も緻密な線維性組織からなり、薄切抵抗が大きく硬いので引き角を小さく設定できる滑走式が有利である。特に的確な面出し操作の為に標本台の三次元の位置調節操作が肝要であるので、その点でも微調整が容易な滑走式が良い。

また、滑らかな薄切を維持するためには、マイクロームの滑走面の注油が欠かせない。特に硬組織の場合は、薄切抵抗が大きいため留意する必要がある。一般に用いられているマシン油は比較的粘稠度が低く油切れを生じやすいので、頻回の注油と普段の整備が肝要である。

## 2. 面出し

硬組織標本を薄切する際に留意することは、確実な面出しと滑らかな薄切面を得ることである。面出し時から、厚切りはせず、せいぜい10ミクロン程度の送りで行う。不用意に厚切りを行うと、刃先が標本内に食い込んで、その後の薄切が著しく困難になる。面出し時には、どうしてもチャター(波状の疵)が生じるが、おおよそ標本面が出たら、一度、替え刃を交換、あるいは新しい部分に変え、5ミクロン程度の送りで、チャターが無くなるまで丁寧に面出しを行う。面出しが終わり、滑らかな面が出たら、替え刃を交換、あるいは新しい部分に変えて薄切する。

## 3. 薄切抵抗

チャターが無くなると却って薄切抵抗が大きくなるので、薄切時に滑らかな刃の動きを維持、コントロールする事が肝要であり、刃先の抵抗を指先で感じながら薄切する。また、薄切抵抗を少なくするためには、引き角を45度以下に調整する。

薄切抵抗に負けて刃の動きが一定で無くなると、刃先が標本に食い込み易くなり大きな疵が出来る。この様な食い込みが生じた場合は、2ミクロン程度の送りで徐々に疵をとる事が肝要である。疵を取らなければ滑らかな薄切は出来ず、当然薄切標本にも疵が入り、薄切片を拾うことも困難になる。替え刃の代わりに、従来のマイクローム刀を用いると、刃の食い込みは比較的生じにくいだが、刃の研ぎ出しが困難であり、また、薄い標本を得ることも困難である。なお、替え刃は刃角の小さなもの(S22, フェザー)は刃先が弱いので比較的刃角が大きなもの(S35, フェザー)を用いる。

## 4. 薄切方向

歯や長管骨の縦断など、基質の線維に走行がある場合には、線維の走行に沿った方向に薄切する方が良い。薄切時の抵抗も少ないが、一般にパラフィン標本は薄切時に30%程度収縮するので、薄切後伸展が必要となり、その際、線維方向に沿った薄切の方が伸展しやすい。

一般に、硬組織脱灰標本ではやや厚めの4から6ミクロンの厚さとするが、10ミクロン以上の厚切り切片を得ることは困難である。薄い標本を得ようとして、すくい角あるいは逃げ角(図2)を小さくしすぎると、刃が滑って一定の厚みでの薄切が出来なくなり、厚い切片と薄い切片とが交互に出来ることになる。

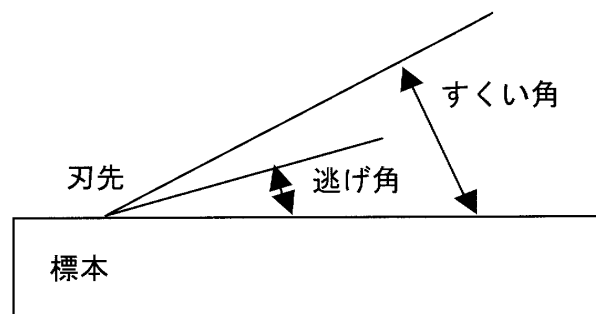


図2 ミクロームの刃角

## 5. 加湿

硬組織は脱灰後も緻密な線維組織であり、パラフィン浸透後も組織そのものが薄切面に露出する割合が相対的に大きいため、薄切時のカーリング防止に用いられる自動加湿器あるいは息かけによる加湿の影響を大きく受ける。適度な息かけによって、加湿による標本の僅かな膨潤や軟化が薄切を容易にする。また、息かけによる加湿は、室温との関係もあるが、標本面の冷却の一助となり、パラフィンの硬度を保つ事になる。なお、パラフィンの硬度を保つためにも、室温は25℃より高くないように調節すべきである。夏季にはパラフィンブロックを冷蔵庫に保存し、また、薄切時に氷などで薄切面を冷却することもある。

## D. 伸展と貼り付け

### 1. 伸展と水切り

薄切切片の伸展には、温水に浮かべる方法や、スライドガラス上の水に浮かべる方法がある。この際使用する水は蒸留水を更に沸騰させ、空気を十分に抜いた物を用い、伸展貼り付けの際に、切片とスライドガラ

空間に気泡が生じない様にする。切片の貼り付けを充分に行うためには、伸展が終了した後、スライドガラスと切片間の水を除いて（水切りして）から、乾燥する。切片周囲がスライドガラスに先に付き、切片下に水が溜まっていると、乾燥も進みにくく、貼り付きも悪くなる。通常の伸展器上に傾斜板（パラフィン伸展板 TK-10, サンテクノ, 図3）を設置すると水切りも行いやすい。

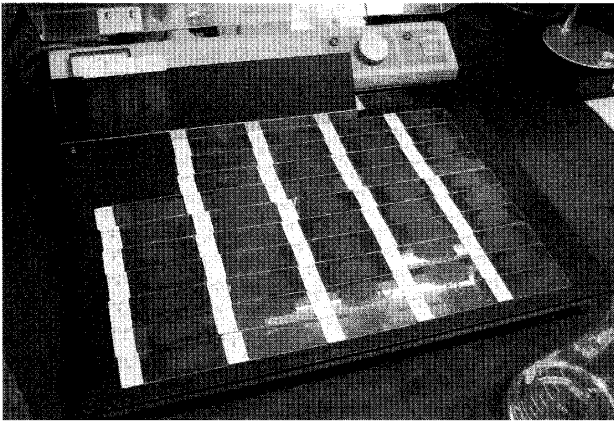


図3 伸展器と傾斜板

## 2. 乾燥と貼り付け

乾燥は通常1時間以上行うが、37℃で一晩以上行った方が良い。また、緻密な骨組織を多く含む標本は、伸展、貼り付け、乾燥が不十分になりがちなので、それぞれ時間をかける必要がある。免疫組織化学染色や剥がれやすい標本には、シランコートスライドガラス（DAKO）やマスコートスライドガラス（マツナミ）を用いる。さらに、染色直前に、60℃20分間程度、高温で再加熱すると剥がれにくくなり、通常の染色には問題はない。

上記の様な処理を行っても、歯や皮質骨を含む標本、あるいは病変によっては剥がれやすい場合がある。この場合は、脱パラフィン後に5%程度に薄めたセロイジン液を通し、乾燥させ、セロイジン被膜で切片を覆ってから染色すると良い。しかし、セロイジンの小売は中止されており、少量の入手は困難な現状である。

## E. HE 染色

迅速脱灰液などの酸性脱灰液を用いた脱灰標本では、標本が酸性になっているため、ヘマトキシリンの染色が不良になりやすい。中和液を通して、この傾向は大きくは改善できない。長時間の染色はかぶりを生じやすいので、濃い染色液を用い出来るだけ短時間で染

めた方がコントラストは良くなる。マイヤーよりカラッチのヘマトキシリンを用い、さらに二倍、三倍カラッチを用いると良い。また、エオジンには過染になりやすいので、染色液の濃度を下げる、染色時間を短くする、水洗後の70%アルコールで脱色するなどの調整を行う必要がある。適切な染色条件を得る為には、標本毎の試し染めが必要であり、その為の切片を用意しておくべきである。

## F. 過脱灰と脱灰不良

### 1. 過脱灰

脱灰標本は一般に薄切が困難であるが、その原因として脱灰不足を考えがちであり、返って過脱灰になってしまう傾向がある。薄切が困難であるのは、多くの場合、歯や緻密な皮質骨など、基質の線維成分が緻密であるためであり、他施設から薄切困難であると云うことで、依頼された標本でも、脱灰自体には問題はなく、薄切することが可能であることが多い。

過脱灰標本では、基質の膠原線維やその他の基質成分が酸によって変性し、組織が脆弱になり薄切時に薄く切れなかったり、あるいは伸展時にもろく壊れやすくなったりする。さらに、骨層板間が解離し、骨大理石病時に見られる様な病的変化と見誤る可能性もある。また、染色性が著しく不良になる。

### 2. 脱灰不良

脱灰が不足している標本では、未脱灰部分による刃こぼれが生じ、メスマークが付き、薄切が出来ない。この場合は、緊急避難的処置として、表面だけを脱灰液に5分間程度漬け、表面だけの脱灰を図る。この際、長く漬けすぎると、標本がふやけ、返って薄切が困難になる。

## VI. 非脱灰標本

硬組織を脱灰せずに樹脂などに包埋し、薄切あるいは研磨して非脱灰組織標本を得ることが出来る。しかし、いずれの方法も、特殊なマイクロームや機器が必要となり、時間や労力も多く必要となる。一般的な組織変化を観察するためには、脱灰標本の方が良い。一方、非脱灰標本でなければ見ることが出来ない所見としては、組織の石灰化の状態や脱灰によって溶出してしまう物質、また、金属やセラミックなど脱灰できない物質の変化やその周囲組織の変化などがある。脱灰標本と非脱灰標本の両者をうまく組み合わせた検索方法を計画する必要がある。

### A. 包埋まで

非脱灰標本の目的の一つは、石灰化状態の観察であるので、包埋までに脱灰が生じない様に留意しなければならない。特に固定液は中性に保たなければならない。また、脱灰標本以上に薬液の浸透が不十分になりやすいので、浸漬時間を長くし、さらに、出来るだけ厚みが薄くなる様に切り出しを行う。非脱灰薄切標本で薄切可能なものは、主に海面骨であり、歯や緻密な皮質骨の標本は十分な薄さには薄切できないので、目的に応じた方法を計画することが肝要である。

一方、凍結標本として薄切片を得ることも出来るが、特殊なマイクロームが必要である。さらに、技術の習熟の困難さもあるが、目的によっては有用な方法である。

### B. 非脱灰薄切標本

非脱灰薄切標本の作成には、高硬度のタングステンカーバイト刃を備えた、電動の、いわゆるヘビーデューティ・マイクローム (Type-K, ユング) を用いる。標本の大きさは10×10mm程度に限られ、また、専用のマイクローム刃が高価である難点はあるが、人体の腸骨生検による骨代謝評価に用いられる。

薄切標本用包埋樹脂にはメチルメタクリレート (MMA)、あるいはMMAとグリコールメタクリレート (GMA) の混合樹脂が用いられるが (表2)、硬化時の発熱のコントロールが困難であるので、MMAにポリエチレングリコールを20%程度混合したのを用いると (表3)、硬化時の発熱を押さえ、また薄切や伸展が容易になる。薄切といっても、微小に見れば、弾性に乏しい硬組織には破壊が生じる事は避けがたい。海面骨表面の変化を形態計測したり、石灰化速度を計測するためにラベルしたテトラサイクリンを蛍光顕微鏡で観察したりするなどの目的には良いが、一般的な

表2 硬組織薄切用樹脂 (1)

Methyl methacrylate	18ml
Dianal beads resin (BR-83)	12g
Glycol methacrylate	70ml
Benzoyl peroxide	1g

表3 硬組織薄切用樹脂 (2)

Methyl methacrylate	80ml
Polyethylene glycol (Mono-p-nonylphenyl ether)	20ml
Benzoyl peroxide	1g

組織形態の観察には限界がある。一方、多くの染色法を用いることが可能である。

### C. 非脱灰研磨標本

#### 1. 研磨方法

非脱灰研磨標本は、脱灰出来ない金属やセラミックスなどを含む標本の観察には他に代わる手段がない。また、顕微鏡レベルでの石灰化状態を観察する方法としての顕微 X 線写真 (CMR) には欠かせない手法でもある。

CMRの為には、標本そのものを50から100ミクロン程度の薄片に研磨する必要がある。脆弱な硬組織を薄く研磨する技術的困難が大きい。薄く平行な標本を得るための専用機器 (マルトー) もあるが、最終的には用手研磨の工程が必要であり、習熟が必要とされる。一方、組織形態観察のみであれば、アクリル板やスライドガラスに片面を接着したまま、研磨して薄片を得る事が出来るため、標本の取り扱いが格段に容易になる。専用の研磨機器 (EXAKT 4000, 盟和商事) もあるが、用手研磨も比較的容易である。

接着には光重合レジンやアロンアルファなどの瞬間接着剤を用いるが、長時間の研磨や、加温染色などによって、アクリル板と標本との接着が剥がれ易くなる。特に金属やセラミックスなどを含む場合は、十分な接着性が得られない事が多い。研磨時間の短縮や、常温での染色など加えて、接着剤の選択や標本側にもシラン処理を行うなどの工夫が必要とされる。

研磨には耐水研磨紙を用い、#800位から#1200までを荒研磨として、主に厚みを調整し、約100ミクロン程度にする。#2000から#2400までを仕上げ研磨として、疵の消去と厚みの最終調整を行い、50から30ミクロンの厚さにする。#4000を用いて更に鏡面研磨を行うこともある。

研磨標本の作成には、長時間水を用いながらの研磨が必要になるので、非親水性のポリエステル樹脂など (表4) に包埋する必要がある。非親水性である為、組織の包埋には、上昇アルコール系列とアセトンによる脱水、脱脂や樹脂浸透に長時間を要する。

表4 硬組織研磨標本用樹脂

Rigolac 2004	90ml
Rigolac 70F	10ml
Benzoyl peroxide	0.8g

## 2. 表面染色

研磨標本では薄切標本の様に数ミクロンの厚さにする事は困難であり、数十ミクロン程度の厚みになる。しかし、研磨標本の染色には、表面のエッチング（軽度の脱灰処理、0.1%ギ酸60秒）を行い、表層数ミクロンだけを染色することが可能であるので、薄切標本が標本の厚み全層に渡って染色されるのに比べて、返って染色層が薄く、観察時には厚みが薄い標本として見ることが出来る。しかし、皮質骨や金属など、光が透過し難いものの部分では、標本が厚すぎると、光の屈折や樹脂が浸透していない骨小空などの構造が重複して見えてしまう。さらに、非親水性樹脂であるため免疫染色が行えない事や、染色法にも制限が多い。

## V. その他

### A. 免疫組織化学染色法

組織標本は細胞、組織成分そのものを含んでいるので、それらの物質を標本上で特異的に検出できれば、機能物質の局在をみる事が出来、大変有用である。特定の蛋白質を検出する方法として免疫組織化学があり、特定の核酸（DNA や RNA）を検出する方法として *in situ* hybridization がある。多数の抗体が市販されているが、これらの抗体が全て、組織標本で使用可能である訳ではない。western blot などメンブレン上では特異的な反応が得られても、標本上でもうまく行くとは限らない。メーカーの添付書や文献上での情報検索と共に、実際に使用し、特異的な反応が得られるか否かを自己検証しなければならないことも多い。自己検証するためには、一定のプロトコルに従って、一次抗体の条件だけを変化させることが肝要である。また、陽性コントロールも必要である。

特に脱灰操作を行った標本に関しては情報が乏しい。一般には迅速脱灰液などの強酸を用いる脱灰液は免疫染色には不適で、EDTA 脱灰（表5）などが用いられるが、組織を出来るだけ薄く小さく切り出すことによって、脱灰時間を短くする事が必要である。また、EDTA 脱灰では脱灰液を頻回に変える事も肝要である。

表5 10%EDTA 脱灰液

EDTA 二ナトリウム	100g
トリスアミノメタン	12.1g
蒸留水	900ml
(1N KOH で pH7.4 に調整)	

### B. 凍結標本作成法

硬組織に限らず、凍結標本では固定操作が無いので、生体内の生の状態に近い標本が得られる。一方で、固定していないので形態の保持は悪い。また、凍結することによって、組織が硬くなるので、硬組織も薄切することが可能になる。硬組織の全てが薄切できる訳ではない事は樹脂包埋薄切標本でも同様であるが、小動物の海面骨などは薄切可能である。

様々な凍結技法があるが、簡便な方法としては、O.C.T. コンパウンドに包埋して、 $-80^{\circ}\text{C}$  のディープフリーザー内で、あらかじめ庫内で冷却しておいたイソペンタン液に浸漬し凍結する方法がある。パラフィン標本用のパラフィン包埋皿を用いると、整形する手間も省ける。ただし、表面の水分を可能な限り濾紙などで吸い取ってから O.C.T. コンパウンド包埋する事が肝要である。これを怠ると、氷晶が生じ形態観察が出来なくなる。また、イソペンタン量は300ml 以上の充分量を用意しておく。実験動物など、迅速性が求められる場合は、固定後、20から30%の濃度になるまで順次上昇濃度シヨ糖液系列に入れて置換すると氷晶形成が抑制される。

## VI. おわりに

今回は、光顕標本作成に関して、特に硬組織の標本作成法について記したが、この他にも、電子顕微鏡、蛍光顕微鏡、*in situ* hybridization, whole-mount *in situ* hybridization, など多数の形態観察に関連した組織標本作成方法がある。また、パラフィン標本でも、HE 染色の他に、様々な物質を染め分ける特殊染色法がある。それらの方法についても、成書には書き表し難い様々な技術的なノウハウがあるが、これらの技術が人から人へと継承され、また、改善工夫されて行く場合は、大学という教育の場でしかなかなか行えないものである。大学が果たさなければならない社会的使命の一つでもあると考えられる。

分子生物学的手法の多くはいかに再現性と簡便性を高めるかを求めて、市販のキットを用い、また、その様な標準化キットの開発が求められてもいる。DNA や RNA という物質にまで還元してしまえば、生物の種や個体差は無関係になるので、その様な方法の標準化もある程度可能である。しかし、最終的には特定の個人の疾病にまで還元しなければならない医学の場では、常に、個体差や特異性を考慮した、要素還元とは逆向きの統合性を考えなければならず、その為には、多種類の細胞と組織が構成する生体そのものの構造と

機能を観察するという手法は、古くさくとも、相変わらず新しい発見の場であり続けているといえる。

組織標本作成方法は、人に大きく依存する技術であり、機械に置き換えがたいものであるが、できるだけ標準化し、個人の技術から、誰もが手に出来る技術にして行く努力も必要であろう。

#### 参考文献

- 1) 病理組織標本作成技術 (上) (下), 日本病理学会編, 医歯薬出版, 1981
- 2) 骨形態計測, 高橋英明編, 医歯薬出版, 1981
- 3) 骨形態計測ハンドブック, 高橋英明編, 西村書店, 1983
- 4) *Methods of calcified tissue preparation*, G. R. Dickson ed, Elsevier, 1984
- 5) 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際, 永井教之編, 学際企画, 1991
- 6) 硬組織研究の基礎技術, 日本硬組織研究技術学会編, 学際企画, 1994
- 7) 形態形成・分子メカニズム研究の最新技術, 永井教之編, 口腔保健協会, 1998
- 8) Plank, J. and Rychlo, A.: Eine Schnellentkalkungsmethode. *Zbl. Allg. Path. Path. Anat.* 89: 252, 1952.