

第50回組織細胞化学講習会 受講報告

○山本樹、内山孝蔵

生物・生体技術支援室 生体機能解析技術グループ

概要

パラフィン組織標本は生物の組織、細胞の観察に優れた手法であり長期の保存に向くため、病理学検査はもちろん、近年の大規模解析の為のデータ入手方法としても着目されている。この組織固定からパラフィン標本までの技術手法は多くの研究機関や病院で行われているが、多くは前任による技術継承でその知識は伝達されている。この技術の技術交流および継承、そして新たな知見や技術開発の為の講習会として開催されている組織細胞化学講習会について、その内容と参加しての感想を交えて紹介したい。

1 背景と参加の狙い

私は入職二年目になり、入職時から病理組織標本作製(固定、切り出し、包埋、薄切、染色)を主業務としている。依頼される組織は多種にわたり、美しい標本作製の為にはその組織に応じた適切な処理選択が必要であり、そのためには組織細胞化学を体系的に学び、最新の手法を習得する必要がある。同時に標本の精度と再現性の向上のために、本講習で得た知識を通常業務に応用するのを狙いとして講習会に参加した。

2 講習会概要及びプログラム

2.1 講習会概要

日程：令和7年8月10日ー12日

会場：岐阜市文化センター、岐阜大学（Wet Labo）

主催：日本組織細胞化学講習会実行委員会

2.2 プログラム

第一日（8月21日木曜日）

Basic 1 基礎から学ぶ細胞・組織の構造と機能

江原 鮎香

Basic 2 組織の取り扱いと固定について

宮崎 龍彦

Basic 3 硬組織の標本作製・免疫組織化学・ISH

宇月 美和

ランチョンセミナーI （45分）

ロシュ・ダイアグノスティクス

Basic 4 免疫組織化学の原理と基礎・歴史と温故知新

谷 洋一

Basic 5 抗原賦活化法の基礎と実際

柴田 恭明

Basic 6 蛍光抗体法の基礎と実践

松崎 利行

Basic 7 In situ hybridization 法の基礎と実践

菱川 善隆

Basic 8 組織透明化技術の基礎と実践

日置 寛之

Advanced 1 空間トランスクリプトーム技術「Visium」

を用いた病理学研究応用事例の紹介

原口 竜摩

Advanced 2 FISH 解析の臨床応用と精度管理

郡司 昌治

第二日（8月22日金曜日）

Basic 9 理論に基づいた電子顕微鏡試料作製方法の基礎とコツ	高木 孝士
Basic 10 凍結固定法と関連技法	寺田 信生
Basic 11 免疫電子顕微鏡の実践	坂本 浩隆
Basic 12 電子顕微鏡における組織細胞化学の活用	大野 伸彦
Advanced 3 PhenoCycler による皮膚癌微小環境と 三次リンパ様構造の空間的プロテオミクス	中村 元樹
Basic 13 デジタル病理と人工知能	高松 学
Basic 14 Immunoblotting 法の基礎と応用	多胡 憲治
Basic 15 Laser microdissection 法の基礎と臨床応用	中西 陽子
Advanced 4 免疫組織化学の診断・治療への臨床応用	近藤 哲夫

第三日（8月23日土曜日）

Wet Labo（手技実習） 各コースに分かれて実施

- A 実験小動物の取扱い及び処置・灌流固定の基礎技術（12名）
- B 顕微鏡・顕微鏡画像の基礎を知る（16名）
- C 透明化脳標本のイメージング技術を知る（16名）
- D 初学者のための免疫組織化学実習（12名）
- E 蛍光抗体法による二重染色（15名）
- F 培養細胞の免疫組織染色実習（12名）
- G In situ hybridization の実際（12名）
- H レーザーマイクロダイセクション法による遺伝子解析用試料回収と川本法の講演（18名）
- I 先端共焦点顕微鏡観察実習（10名）
- J 三次元画像解析の基礎（20名）
- K 画像解析の基本的な流れ～入門編・～実践編～（20名）
- L パラフィン包埋切片の薄切実習（10名）
- M CODEX 法による多重免疫測定と空間プロテオミクスデータ解析の基礎（10名）

3 講習内容の紹介

講習内容のうち、筆者が学びになったと感じた点を紹介する。

3.1 組織の取り扱いと固定について（第一日目 Basic 2）

形態学的解析、組織・細胞の観察には組織の取り扱いや固定の最初のプロセスが非常に大切である。固定とは生物を構成する分子を不動化し安定化させることによって達成されるものであり、これは分子を本来の場所にとどめておくことである。固定には化学固定と物理固定がある。細胞組織内の高分子物質の分子内または分子同士を架橋固定材によって架橋する固定を化学固定といい、凍結もしくは加熱による熱変性によって分子を固定するものを物理固定という。ホルムアルデヒドによる化学固定においては、組織を2～3 mm程にカットして24時間の固定を行う。この際に72時間以上固定を行ってはならない。

固定処理については、私が配属されている研究室では主に研究者自身が行っていることもあり、その仕組みや意義については十分に理解できていなかった。今回の講習会を通じて、固定の意義や種類、手法について体系的に理解することができた。講習会後は固定に関する相談を受ける機会もあり、講習会で得た知識を実際に業務に活かしている。

3.2 硬組織の標本作製（第一日目 Basic 3）

病理組織標本を作製するにあたって、骨や石灰化した組織の標本を作製する際、通常のナイフでは切れないことがある。切り出しの際は硬組織用の刃やノミやハンマーを用いてなるべく厚さが固定できる範囲まで行う。固定は通常の中性ホルマリン溶液を用いる。パラフィンブロックにするには固定した組織を十分に脱脂し、そのあとカルシウム分を抜くため脱脂を行う。脱脂が十分にできていないと脱灰液の浸透が悪くなる。脱灰にはギ酸や硝酸、プランク・リュクロ、K-CX、EDTA、G-Chelate 等があり、一般的には EDTA 溶液が用いられる。

私は、支援業務において骨や石灰化した硬組織を取り扱う機会が多い。講習会以前にもマウス骨組織の標本作成を行った経験はあるが、当時は切り出しおよび薄切時での脱灰が不十分であったため、良好な薄切標本結果が得られず、顕微鏡下での形態観察に十分な標本作製に失敗していた。講習において骨標本などの石灰化組織における脱灰の知識を得たことで講習後に行った骨組織の標本作成では、脱灰の時間などの調節によって切り出しおよび薄切ともに十分に脱灰した状態で行えており、染色後の観察において、骨組織と周囲組織が明瞭に識別できる良好な標本を作製することができた。

今後も硬組織の標本作製に携わる機会が多いと考えられるため、本講習会で得た知見を基に、さらなる技術の向上に努めていきたい。

3.3 手技実習（第三日目 Wet Labo）

私は A コースの「実験小動物の取り扱い及び処置・灌流固定の基礎技術」を選択した。

灌流固定法は麻酔下で心臓の左心室から固定液を注入し、細胞・組織を生体に近い状態で迅速に固定できる方法である。血液除去と固定液灌流を組み合わせることで、高い再現性と良好な組織保存性が得られる。

実習で行った、灌流固定法の手順は以下の通り。

1. 麻酔

マウスに麻酔薬を投与

2. 左心室穿刺・排液路の確保

開胸後、心尖部から 左心室へ注射針で穿刺

右心房を切開し、血液・灌流液の排出路を確保

3. 生理食塩水による灌流

生理食塩水を注入

灌流の進行に伴い肝臓：赤色 → ピンク色

右心房からの排出液：透明化

4. 固定液の灌流

固定液の循環により筋肉が収縮し、固定が進行

灌流後、注射針を抜去し、観察対象臓器を切除

2～3 mm 四方に細切し、追加浸漬固定液へ

5. 追加浸漬固定・保存

今回の Wet Labo では、これまで経験のなかった灌流固定法を選んだ。通常、解剖から固定までは標本を必要とする研究者によって行われることが多く、業務として携わることは少ないのだが、解剖と同時に固定を行う灌流固定法は良好な標本を得るための土台ともいえる技術である。これまでは用語や概念としては理解していたものの、実際の手技については十分に把握できていなかったことから、具体的な操作方法を習得す

ることを目的とした。

講習会后、現時点では灌流固定に関する業務依頼はないが、今後、新たな研究者の着任に伴い、これまでやってこなかった支援業務をやる機会も出てくる。そのような時に今回の **Wet Labo** で得た知見を活かして研究者の研究をより円滑に支援できると考える。

私が配属されている研究室に新しく入られる方もおり、そういった方に研究内容に応じて手法として灌流固定を勧めることや研究手法に合わせた提案をよりしていけると確信している。

4 まとめ

本講習会に参加し、標本作製の基礎である固定のメカニズムやその重要性について理解を深めることができた。また、骨や石灰化組織を取り扱うにあたり、過去に自分で挑戦した際にはうまくいかなかった要因についても理解することができ、不足していた知識を補うことができた講習会であった。

Wet Labo では実験動物の安楽死の仕方や灌流固定を行う理由と方法について実践的に学ぶことができた。本講習会で得た知見を基に、今後はどんな依頼が来ても臨機応変に対応できるよう努めていく。

参考文献

- [1] 日本組織細胞化学会, 組織細胞化学 2025