

非脱灰骨組織標本の有用性の検討

等々力舞¹, 熊谷文明¹, 千坂亜希子¹, 野口 聡¹, 白見憲司¹, 丸茂秀樹¹,
今野和則², 又吉 健², 斉藤義明¹, 桑形麻樹子¹

Usefulness of non- decalcification for bone tissue specimen

Mai TODOROKI¹, Fumiaki KUMAGAI¹, Akiko CHISAKA¹, Satoshi NOGUCHI¹, Kenji USUMI¹,
Hideki MARUMO¹, Kazunori KONNO², Ken MATAYOSHI², Yoshiaki SAITO¹, Makiko KUWAGATA¹

諸言

骨や歯などの硬組織は、脱灰操作により石灰塩を溶出させ薄切可能な硬さにして病理組織標本にする必要がある。硬組織を脱灰せずに標本を作製する代表的な手法として研磨法があるが、標本作製には専用の研磨標本作製装置が必要となり標本作製にも膨大な時間と費用がかかる。一方、近年開発された新多目的凍結切片作製法(川本法)は、既存のクリオスタットに専用のホルダーとタングステンナイフを装着し、専用のフィルムを用いるだけで硬組織非脱灰標本が作製可能な新たな手法である。

当研究所病理学研究室では、各種脱灰液を用途ごとに選択し、硬組織標本を作製しているが、化学脱灰法の脱灰液としては無機酸を主剤とする強酸性のK-CX(ファルマ、東京)を用いている。この方法は、迅速に脱灰が完了して標本作製時間が短縮できる一方で、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色では骨髓細胞が一様に好酸性になり細胞の識別が困難なことや、特殊染色においては酵素反応で染色される細胞や軟骨が偽陰性になる場合がある。骨埋植試験では標本作製過程で吸収性埋植試料が溶出し、試料の残存が不明瞭になるなどの問題点もあった。別の化学脱灰法にはEDTAを主剤とする中性脱灰液もある。中性脱灰法は、脱灰による組織の変性が起こらず、染色性の影響もない。事前に行った検討では酸性脱灰法と比較し、中性脱灰法の骨髓細胞の染色性が良好であったため、本実験では中性脱灰法を用いることとした。

今回、簡便かつ初期費用が少ない川本法を用い

た標本作製技術を検討し、川本法と中性脱灰法の染色性さらに埋植試料とその周囲細胞の識別を比較したので報告する。

材料および方法

すべての動物実験操作は、「一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づき実施した。実験には日本白色種雄ウサギ(Kbs:JW, 北山ラベス, 長野)を7匹用い、温湿度および明暗サイクルが制御された動物室内で飼育した。

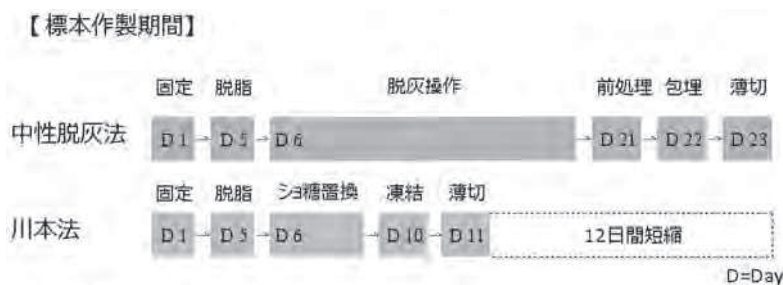
埋植試料は吸収性歯科用人工骨補填材として使用されるセラソルブM(Lot no. C014C; 白鵬, 東京)を使用し、ウサギの大腿骨骨髄内に1か所充填した。埋植4週間後、埋植試料を含む埋植局所を採取し、ダイヤモンドソーを用いて3分割し、2つは川本法による非脱灰凍結切片に、残りの1つは中性脱灰法によるパラフィン包埋切片作製に用いた。各組織片は、HE染色、サフラニンO染色(軟骨の染色)、TRAP/ALP染色(骨芽細胞と破骨細胞の識別)、ピラヌエバ染色(石灰化骨と類骨の識別)を実施した。

中性脱灰法は脱灰液B(和光純薬工業, 大阪)を使用し、川本法の標本作製スケジュールと比較して図1に示した。

中性脱灰法では、常法に従い骨組織を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、脱脂・中性脱灰操作をし、組織の切り出しを行った。さらに、パラフィンと組織片とをなじませるために浸透操作を行った。その後、パラフィン包埋し、パラフィンブロックを薄切した。中性脱灰法では固定から薄切までの工程に約23日を要する。

1 病理学研究室

2 毒性学研究室



【川本法作製方法】

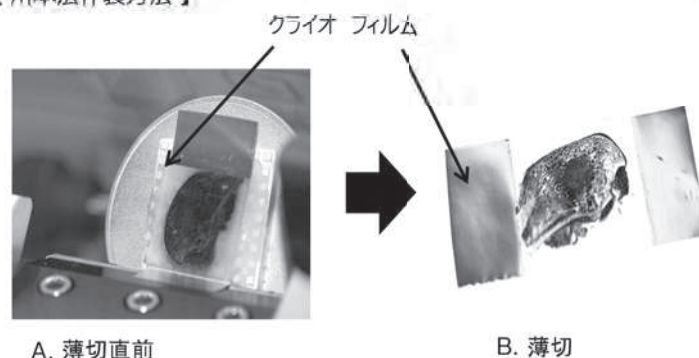


図1 標本作製スケジュール

A, 薄切時の面出し後, 薄切直前にフィルムを凍結ブロックに貼る
 B, フィルムごと薄切する

表1 中性脱灰法と川本法の比較

		中性脱灰法	川本法
HE染色標本	標本の染色性	○	○
	骨髄細胞の識別	○	×
	標本上の亀裂(クラック)	○	×
特殊染色の染色性	TRAP	○	○*
	ALP	×	○*
	サフラニンO	○	○
	ビラヌエバ	-	○
埋植試料の残存性		×	○

○:良好 ×:不良 -:実施せず
 ※封入時に色素の流出あり

一方, 川本法では, 骨の切り出し後に, 10% 中性緩衝ホルマリン固定・脱脂操作・ショ糖置換と進め, 凍結包埋操作を行った. なお, ビラヌエバ染色に用いた組織の固定はアルコールで行った. 脱灰操作がないことから, 中性脱灰法と比較して12日間程度を短縮することが可能であった. 薄切面の面出し後, 専用のフィルム(クライオフィルム, Section-lab, 広島)を凍結ブロックの薄切面に直接貼り, フィルムごと薄切した. 薄切したフィルムは完全乾燥した後, 各染色を行った.

結果および考察

HE染色および各特殊染色の結果を表1に示した. HE染色: 中性脱灰法では, 骨梁および骨髄の形態は保持され, 骨髄細胞も明瞭に識別された(図2A). 埋植部位では, 脱灰操作により試料が溶解したと考えられる空隙がみられたが, 周囲の骨細胞は良好に保持され観察も可能であった(図2B).

川本法では切片が全体的に濃紫色を示したほか, 小さな亀裂(クラック)が目立った(図2C). 骨髄細胞の染色性に問題はなかったが, 染色後のアルコール脱水で細胞が収縮する傾向があり, 骨

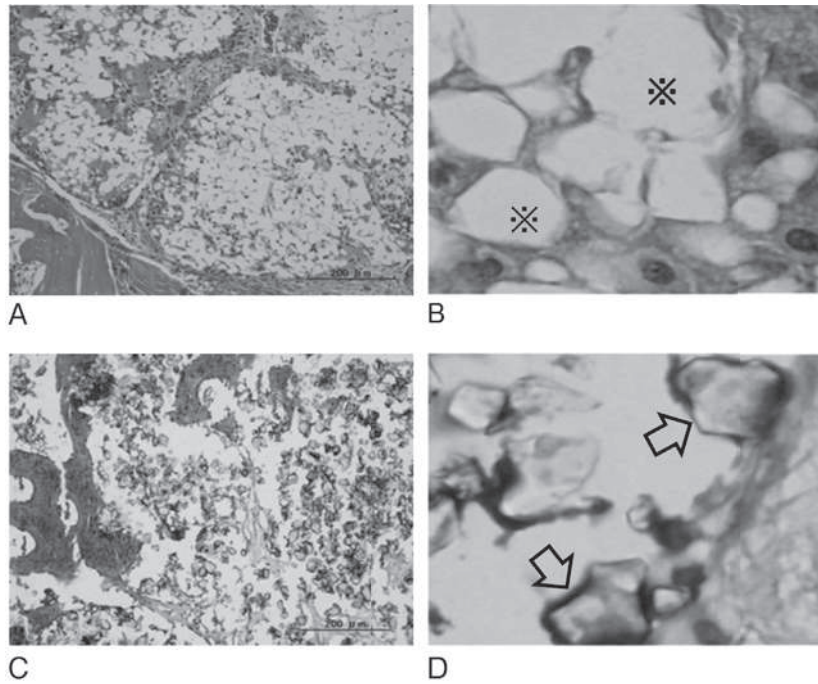


図2 セラソルブMの4週間埋植のウサギ大腿骨骨顆部(HE染色)

A, 中性脱灰法切片; B, Aの拡大像; C, 川本法切片; D, Cの拡大像。
 中性脱灰標本では埋植試料(セラソルブM)が存在したと類推される空隙(※)が観察されたが, 残存は確認できない(B).
 川本法では埋植試料は残存し(矢印), その周囲の細胞も観察された(D).

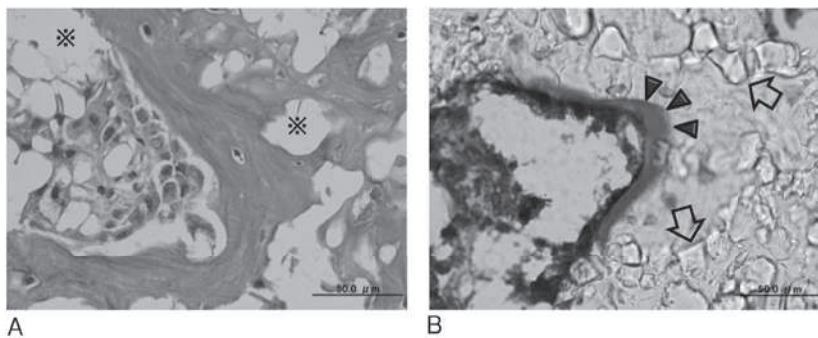


図3 埋植試料周囲の新生骨(類骨細胞)形成像

A, 中性脱灰法切片(HE染色); B, 川本法切片(ピラヌエバ染色).
 HE染色では埋植試料(セラソルブM)は白く抜けて残存は確認できなかった(※). しかし, 新生骨の形成過程は観察された(A).
 川本法では, 埋植試料(矢印)とともに新生骨の形成過程がみられ, ピラヌエバ染色により類骨(矢頭)の局在も明らかであった(B).

髓細胞の識別はやや困難であった. しかし埋植局所では, 埋植試料の形状がほぼ変化せずに確認でき, 骨界面と周囲細胞も識別できた(図2D).

TRAP/ALP染色: 中性脱灰法では, TRAP染色は良好な染色性を示したが, ALP染色は染色されなかった(後述). 川本法はTRAPおよびALP染色ともに良好な染色性を示したが, 封入時に色素が封入剤であるバルサム中に溶出したため, 封入後の観察が困難であった.

サフラニンO染色: 中性脱灰法および川本法ともに良好な染色性を示した.

ピラヌエバ染色: 類骨の明確な識別法であるピラヌエバ染色は, 通常は脱灰せずに染色して標本作製する. 中性脱灰法のHE染色では類骨は石灰化骨と比較して大きな核を有し, 弱い染色性を示した(図3A). 川本法では類骨が良好な染色性を示し(図3B), 埋植試料の残存とともに新生骨の形成過程が観察された. しかし, 染色後のアルコール

表2 川本法の利点・欠点

利点	欠点および課題
1. 標本作製時間が短縮できる	1. 薄切切片にできるアーチファクト A. 薄切時の刃傷 原因：包埋剤浸透不足 ⇒検討事項① ショ糖と包埋剤の置換方法の検討
2. 埋植試料の形状が観察できる	B. 薄切後の乾燥による亀裂 原因：時間経過とともに切片とフィルム間の密着性低下 ⇒検討事項② 紫外線硬化封入法による時間短縮の検討
3. 埋植試料と骨界面の生体反応が観察できる	
4. 非脱灰標本でのみ染色可能な染色法が実施できる (類骨形成過程の評価)	2. 色素の流出 原因：染色後のアルコール脱水過程および封入後の退色 ⇒検討事項③ 樹脂包埋による検討

ル脱水工程において色素がアルコールに溶出し染色が弱くなった。

川本法の利点および欠点を表2に示した。

従来の脱灰標本作製は、脱灰工程に多くの時間を要した。川本法では、長時間の脱灰の必要がなく、短時間で硬組織の標本作製が可能であった。さらに、脱脂操作を加えたことによりフィルムとの密着性が増し、より良好な標本作製が可能になった。しかし、切片上に薄切時の刃傷が入ることがあった。この原因として包埋剤の浸透不足があげられ、ショ糖と包埋剤の置換方法の検討が必要と考えられた(検討事項①)。また、切片上に小さな亀裂(クラック)が生じるため、切片の乾燥時間や封入方法の検討も必要と考えられた(検討事項②)。

川本法は、埋植試料の残存や形状、埋植周囲の細胞と骨界面の位置関係を観察することに優れていた。また、非脱灰硬組織用のビラヌエバ染色が実施できたことにより、類骨を特異的に染色し識別することが可能となった。類骨を特異的に染め

分けることにより、骨の新生過程をより詳細に観察することができると考えられた。しかし、染色後のアルコール脱水による色素の流出などの問題もあることから今後は、樹脂包埋による標本作製の検討も必要と考えられた。TRAP/ALP染色は、川本法では染色されたにもかかわらず、封入時に色素が流出したことから、封入時に色素が流出しない工夫あるいは封入後に退色しない封入剤の検討が必要と考えられた(検討事項③)。また、中性脱灰法でALP染色が染色されなかったが、これはALP染色が酵素染色であり、固定液や脱灰の影響で酵素が失活したと考えられた。

今回の川本法の検討により、いくつかの課題は残されたが非脱灰硬組織の標本作製の導入は可能と考えられた。川本法の導入より、非脱灰で標本作製が必要なビラヌエバ染色および脱灰操作により酵素が失活して染色できない染色法も実施可能であり、骨埋植試験における有効性および安全性評価に有用な方法と考えられた。