急速凍結技法の病理診断への応用と生きた 臓器・組織の観察

逸 見 明 博

日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野

はじめに

従来の一般的な光顕および電顕の標本作製法では、臓器摘出後にホルマリンやグルタル等の化学物質で固定し、その後、脱水しパラフィンや合成樹脂に包埋して試料作製がされてきた。このような試料作製法では、固定・脱水・包埋などにもなう人工的な形態の変化を避けることはできなかった。一方、化学固定に対し物理固定である急速凍結法では、特殊な器具を用いたり、手技の難しさのためほとんど行われてこなかったが、組織を急速凍結後にレプリカ膜や凍結置換固定試料を作製することにより、従来の化学固定の多くの問題点を軽減し、生体により近い像を観察することができる^{1,2)}。

私は以前より、急速凍結法、特に“急速凍結ディープエッチング (QF-DE) 法”での病理検体の観察を行ってきたが、この方法での臨床検体の観察は世界でもほとんど試みられていない。本稿では、QF-DE 法による病理検体の観察例を提示し、次に最近の試みとして生きた臓器・組織を観察するための“生体内凍結技法”を紹介する。

I. 急速凍結法の原理

組織を凍結すると細胞内の水分子が結晶化し、これが微細構造を破壊する。急速凍結法では如何に結晶形成を防ぎ硝子状 (非結晶化) の氷を作るかがポイントとなる。硝子状の氷を作るには急速 (10^5 K/sec) な冷却が必要で、液体窒素で冷やした金属表面に組織を圧着する金属圧着法や、液体窒素で冷却した特殊な液性寒剤 (イソペンタン・プロパン) に組織を浸す浸漬固定法が用いられる。このような方法で組織を急速凍結すると、凍結表面から $15\ \mu\text{m}$ ほどの深さの範囲は結晶の無い硝子状の氷ができ電顕観察に適した凍結領域が得られ、また表面から $300\ \mu\text{m}$ ほどの範囲は光学顕微鏡で観察可能な領域が得られる^{1,2)}。

II. 急速凍結ディープエッチング法による 病理検体の観察

QF-DE 法は、急速凍結組織を切断し切断面にできる超

微構造の凹凸に対して金属のレプリカ膜を作製し、そのレプリカ膜を透過電顕で観察する方法である。

1. 材料および方法

手術室で切除された手術検体は直ちに病理検査室に運び、光顕標本と通常電顕標本、および QF-DE 法によるレプリカ標本を作製した。QF-DE 法は大野らの手技³⁾を用いた。具体的には、手術検体を $5\ \text{mm}$ ほどの大きさに剃刀を用いて切り出し、リン酸緩衝液で軽く洗浄して組織表面から可溶性蛋白を除去した後、切り出し面に対し金属圧着法を用いて急速凍結を行う。凍結面の最表層部は剃刀による挫滅があるため、その部分を切断でそぎ落とす操作を行う。切断は液体窒素の中で行い、試料の凍結面にメスで細かく傷をつけるという大野方式³⁾を用いた。凍結切断後の試料は -180°C に冷やされた専用の装置 (EIKO FD-3AS etching machine) の中に移し、 10^{-7} Torr の高真空下で、温度を約 -95°C まで 10 分間ほどかけて徐々に上げていく。この作業によって試料の凍結切断面から氷が昇華し超微構造を浮き立たせること (ディープエッチング) ができる。次に、同じ装置内で白金と炭素を薄く蒸着するとレプリカ膜が完成する。最後に組織を装置より取り出して家庭用の塩素系漂白剤で溶かし、金属のレプリカ膜をグリッドで回収して透過電顕で観察した。

2. 結 果

ここでは平滑筋肉腫の通常電顕とレプリカ像を提示する⁴⁾。Fig. 1a は通常電顕の平滑筋肉腫細胞の弱拡大像である。レプリカの観察では、細胞膜に多数のカベオラが明瞭にみられ、細胞膜周囲にはコラーゲン線維も立体的に観察できる (Fig. 1b)。Fig. 1c の通常電顕像では細胞質にミトコンドリアがみられるが、Fig. 1d のレプリカ像ではミトコンドリアの間の中間径線維の編み目構造まで観察が可能である。また、細胞膜直下にはマイクロフィラメントの網目構造も明瞭に観察される (Fig. 1e)。

3. まとめ

QF-DE 法を用いることにより細胞骨格や細胞外マトリックスなどの線維構造や、小器官等の膜構造と細胞骨格との関連性など、通常電顕では観察の難しい種々の超

Fig. 1 平滑筋肉腫細胞の通常電顕とレプリカ像 (文献⁴⁾ から引用)

a: 通常電顕の平滑筋細胞 (N: 核), b: 細胞膜と間質マトリックスのレプリカ像 (矢印: カベオラ, CF: コラーゲン線維, inset: 対応した通常電顕像), c, d: 細胞質の強拡大像 (c: 通常電顕, d: レプリカ像, N: 核, M: ミトコンドリア, IF: 中間径線維), e: 細胞膜直下のレプリカ像 (CS: 細胞膜, 小矢印: ミクロフィラメント, 大矢印: 中間径線維)

Fig. 2 生体内凍結技法の概要

微構造が三次元的に高解像力で観察できる。私は、レプリカ標本で観察することによって診断できた“いわゆる食道癌肉腫”の症例⁵⁾や、スケノイド線維や弾性線維腫線維の立体的超微構造^{6,7)}、軟骨肉腫細胞と粘液様間質マトリックスとの関連など^{8,9)}、QF-DE法を用いないと観察できない三次元的な超微形態像を多数報告してきた。

QF-DE法は特別な機器が必要であり、また手技の難しさなどから臨床検体での観察は世界でもほとんど行われ

ていなかった。しかし実際に試みると病理検査材料でも写真で示したような良好な電顕標本を得ることができる。地道に症例を積み重ねることにより多くの知見が得られると考えている。

III. 生きた臓器・組織の観察“生体内凍結技法”

化学固定の多くの欠点を急速凍結法で補えるが、切除した組織についていくら速やかに急速凍結を行っても摘

Fig. 3 イソペンタン・プロパン混合寒剤の作製

Fig. 4 生体内凍結腎と通常固定腎組織

a : 生体内凍結の正常腎, b : 生体内凍結のうっ血腎, c : 通常固定の正常腎, d : 通常固定のうっ血腎 (HE 染色, Bar ; 20 μ m)

出組織は血流がストップしており、さらに酸素欠乏などの影響も加わるため組織の形態変化は避けられない。そこで血流動態を保ったまま動物生体内で急速凍結する方法、つまり“生体内凍結技法”が始まった。

生体内凍結技法では、臓器の一部を生体内で瞬時に凍結し、凍結組織を切除し、凍結置換固定法で化学固定に戻す。後は通常の方法で光顕・電顕・免疫染色標本などを作製し観察を行う^{1, 2)}。

1. 生体内凍結技法

本稿では、ラットの急性うっ血腎の生体内凍結例を提示する。ラットは麻酔下で開腹し肝静脈分岐部直下で下大静脈を結紮し両腎に急性うっ血を作り、5分後に左腎

臓は生体内凍結を行い、右腎臓は切除後2%パラフォルムアルデヒド(PFA)で浸漬固定し対照にした。また、正常ラット腎も同様に生体内凍結と2% PFA 浸漬固定をおこなった。生体内凍結は血流の保たれた生きた状態の腎臓にイソペンタン・プロパン混合寒剤をかけると同時にメス刃で切り込みを入れ、腎臓の深部まで瞬時に生体内凍結されるようにした (Fig 2)。イソペンタン・プロパン混合寒剤は液体窒素で冷却したイソペンタンにプロパンガスを吹き込んで作製し使用した (Fig. 3)。

摘出した凍結組織は凍結置換固定法を用いることにより、生体内凍結時の超微形態像を保持したまま PFA やオスミウムなどの化学固定に戻すことができる。概要

は、光顕試料では2% PFA (電顕試料の場合は2% オスミウム) アセトン溶液に生体内凍結試料を入れて -80°C で1~2日間保ち、その後徐々に温度を上げ、最終的に室温に戻して化学固定に置換する。その後は通常の方法でパラフィンやエボンなどに包埋し光顕や電顕標本、免疫染色標本などを作製する^{1, 2)}。

2. 結 果

光顕写真は正常腎の生体内凍結、5分うっ血腎の生体内凍結、正常腎の通常固定、うっ血腎の通常固定である (Fig. 4a-d)。生体内凍結を行った正常腎では、尿細管管腔が著しく拡張している。また間質の毛細血管には赤血球がみられる。一方、うっ血腎では尿細管は完全に閉鎖しており、間質も幅広く多量の赤血球を入れて拡張した毛細血管がみられた。通常固定標本では正常腎とうっ血腎とも尿細管管腔は開いているものの、生体内凍結の正常腎ほどの拡張はなく、また間質の幅は狭く毛細血管内の赤血球も極少数であった。生体内凍結により、うっ血と正常腎では尿細管および間質で異なる形態像を示した。

4. まとめ

結果に示したように生体内凍結技法によって、切除検体とは異なる真の生きた臓器組織の観察が可能となった。近年、組織を生体から摘出することで特定の蛋白の局在が変化したり、消失する現象があることが報告されており、免疫染色や *in situ* hybridization で特定物質の局在を調べても摘出組織では正確な情報が得られない可能性が指摘されている。生体内凍結法は、このような場合にも有効である。また、レセプター反応や生体内チャネルの開閉といったミリ秒単位で起こる生体内の反応の解析、標識物質を注入し組織内の血流分布の像を調べる等、種々の応用方法が考えられる。さらに、生体内凍結することにより生きた状態の細胞成分を瞬時に凍結保存できるので、形態像のみならず種々の分析に応用可能である^{1, 2)}。

現在、生体内凍結法を発展させたクライオ生検法²⁾が考案され動物の生きた臓器から組織を繰り返し採取することも可能となり、ヒトへの応用も時間の問題と思われる。形態学者にとって生きた臓器や組織そのものを観察することは究極の目標であり、今回はその1つの試みである“生体内凍結技法”を紹介した。

文 献

- 1) 大野伸一, 寺田信生, 大野伸彦, 他. 免疫染色のための固定試料作製法: 凍結技法の意義. 日本組織細胞化学会編, 組織細胞化学, 2012; 1-10.
- 2) Ohno S, Terada N, Ohno N, et al. Significance of 'in vivo cryotechnique' for morphofunctional analyses of living animal organs. *Journal of Electron Microscopy* 2010; **59**: 395-408.
- 3) Ohno S, Fujii Y. Three-dimensional studies of the cytoskeleton of cultured hepatocytes: a quick-freezing and deep-etching

study. *Virchows Arch A. Pathol Anat Histopathol* 1991; **418**: 61-70.

- 4) Hemmi A, Komiyama A, Ohno S, et al. Poorly differentiated desmin-negative and vimentin-positive leiomyosarcoma of the stomach examined by the immunohistochemical and quick-freezing and deep-etching methods. *Virchows Archiv* 1998; **432**: 377-383.
- 5) Hemmi A, Terada N, Mizutani G, et al. Squamous cell carcinoma with sarcomatous feature (so-called carcinosarcoma) of stomach probably metastasized from esophageal tumor: a case report with quick-freezing and deep-etching method. *Medical Electron Microscopy* 2004; **37**: 119-129.
- 6) Hemmi A, Inaniwa Y, Ohno S, et al. Relationship between skeinoid fibers and stromal matrix in gastrointestinal stromal tumors: Morphometric analysis with quick-freezing and deep-etching method. *Pathology International* 2001; **51**: 338-348.
- 7) Hemmi A, Tabata M, Homma T, et al. Application of a quick-freezing and deep-etching method to pathological diagnosis: A case of elastofibroma. *Journal of Electron Microscopy* 2006; **55**: 89-95.
- 8) Hemmi A, Osaka S, Ohno N, et al. Chondrosarcoma with myxoid change: A study using quick-freezing and deep-etching method. *Ultrastructural Pathology* 2007; **31**: 293-302.
- 9) Hemmi A, Osaka S, Sunagawa K, et al. Extraskelatal myxoid chondrosarcoma: a study using a quick-freezing and deep-etching method. *Medical Molecular Morphology* 2009; **42**: 180-184.

氏名: 逸見 明博 (へんみ あきひろ)

所属: 日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野
主な研究領域と抱負: 本稿でも述べたが、病理組織検体を用いて従来の電顕試料作製法と異なった急速凍結ディープエッチング法で、種々の超微構造を三次元的に高解像力で解析してきた。今後は、動物実験において循環血流を遮断せずに生きたままの細胞組織を生体内で直接凍結する方法 (生体内凍結技法) を用いて肝臓や腎臓、消化管などの動的な病理形態像の解析を進めたいと考えている。将来的には生体内凍結生検法により動物レベルからヒトへの応用に発展させたい。