

骨・歯の組織標本作製法（光顕）

歯学部口腔解剖学第1講座 坂井 日出男

歯学部口腔解剖学第1講座では、骨筋学、内蔵脈管学、神経感覚器学、口腔解剖学、組織学総論、組織学各論、口腔組織発生学、一般発生学及び各実習（光学顕微鏡で組織標本を作成し、学生が観察する）など色々な講義、実習を担当しております。特に、組織実習標本には、人間、さる、ラット、ウサギ各種の内臓、皮、脳、骨、歯など色々な材料があり、100種類以上の実習標本があります。学生1人に1枚ずつ観察するので各組100枚作り、ヘマトキシリン、エオジン(H.E)（一般にH.Eが多い。）の他、観察する場所により色々な染色方法を用います。（アザン、マッソングールド、PAS、フクシン、ゴルジ、鍍銀など）

硬組織の標本には脱灰、非脱灰、樹脂包埋、研磨標本などがあり、今回は、脱灰標本による骨細胞とその突起の染色（鍍銀染色）を例として示します。手順としては、以下の通り。

固定→脱灰→中和→水洗→脱水→脱アルコール→パラフィン浸透→パラフィン包埋→脱パラ
→染色→封入→光顕観察

【固定】

10%ホルマリン（3～7日）

【脱灰】

プランクリクロー液の作り方

塩化アルミニウム 7.0g

塩酸 8.5ml

ギ酸 5.0ml

蒸留水を加えて100mlとする



*材料をサンプルパックで吊り下げ室温でスターラーで攪拌しながら4～7日間で3～4回脱灰液を換える。

材料をメスで少し切ってみてよく切れなかったら、まだ多くの脂肪を含んでいるので、骨組織は脱灰液の浸透をよくするために、アルコール系列による脱脂が必要である。

（70%～100%エタノール（1～2日）→100%～70%エタノール→水洗→脱灰すると良い。）

【中和】

0.5%～25%硫酸ナトリウム液で一晩スターラー回しながら、水道水で1～3時間位水洗いをしてから脱水する。

*中和しないとヘマトキシリンが染まりにくい。

【脱水】 【包埋】

エチルアルコール50% 70% 80% 90% 95% (100% 各3回)

無水アルコール1回 各半日～2日 (完全に水分をなくすこと)

*100%にすぐ入ると組織が収縮するので50%から始める。

クロロホルム3回 各1時間

*スターラーで攪拌しながら室温で

クロロホルムパラフィン37℃恒温器 2時間～一晚

パラフィンI II III IV 各60℃恒温器 30分～1時間

*十数年前までキシロールを使用していたが長く入ると組織が硬く切るとバラバラになり苦労したが、クロロホルムは長く入れても標本がよく切れるので硬組織標本に適している。

【パラフィン】

パラプラスト. ヒストプレップ 1:1 (混合) で使用する。

*液の浸透時間は試料の大きさによって変える。

【シランコーティング法】

標本ガラスに張り付けるとき軟組織は卵白グリセリンを使用し硬組織を染色しているうちに組織がはがれるのでシランコーティングガラスを使い、シランコーティングは簡単に作れます。(市販されているコーティングガラスは1枚の単価が高い)

試薬: 3-アミノプロビルトリエトキシシラン

○コーティング法 (卵白グリセリンの代用)

スライドガラス20枚入りバスケットを

a) 2%シラン溶液に5秒間浸漬

b) アセトン " "

c) アセトン " "

d) 蒸留水 " "

e) 蒸留水 (水を切る) "

f) 乾燥 (37℃、一晚)

*b～eは3バスケット毎に新しくする

*2%シラン溶液100mlで12バスケット処理可

*スライドガラスは数日間、100%エチルアルコール入れた物を使用し、アセトンで超音波をかけてからコーティングする。新しいスライドガラスだと染色しているうちに組織がはげることがある。

*マイクロームで骨、歯を切るときに標本の中まで刃が入ることがありますが、そのときは標本と台木の接着および、マイクロームにブロックの止めをしっかりと確認すること。脱灰した骨、歯、切りにくいので氷で冷やしながら1枚1枚切りだし、必要なところまで切るので大変苦労した。

【脱パラ】

レモゾールI 5分
↓
レモゾールII 5分
↓
100%アルコール（2回）各2分
↓
95%アルコール 2分
↓
90%アルコール 2分
↓
80%アルコール 2分
↓
70%アルコール 2分
↓
水洗 2分
↓
染色に入る

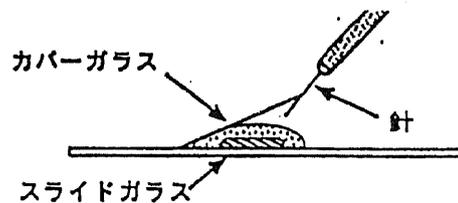
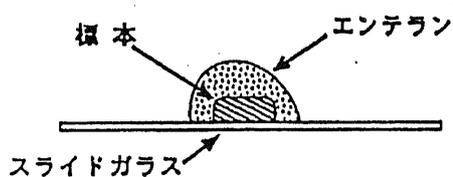
*数年前までキシロールを使用していたが有害であり室中息苦しいにおいで体に良くなかった。しかし、レモゾール（食品添加物）に代えたので最近では室中レモンのおいでいっばいで、さわやかな気分で標本作製を行っております。

【脱水】

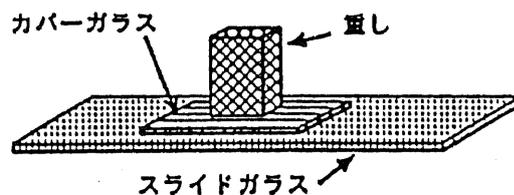
染色の終わったものを
70%アルコール 30秒～1分（エオジン分別）
↓
80%アルコール 1～2分
↓
90%アルコール 1～2分
↓
95%アルコール 1～2分
↓
100%アルコール 各3回 2分
↓
レモゾール 各2回 5分
↓
キシロール 各2回 5分
↓
封入

*レモゾールの成分リモネンは、オレンジ油特有のべとつきをスライドガラス上に生じるので、べとつきをなくすためにキシロールを使用すると良い。

【封入】



上の図のように、標本の上にエンテラン・ニュー（メルク）1～2滴、片側上げ、静かに気泡が入らないよう注意しながらゆっくりと封入する。1～2時間したら封入用重石をして、1日後光顕観察する。数年前までは、カナダバルサムを使用しており、封入しキシロールが蒸発するには2～3日かかったが、エンテランは1日で良い。



封入用重石は、材料は古い鉛水道管を溶かし、歯用石膏で1.5cm長方形の形を5個作り、ドラフトの中で鉛を流し入れ作りました。

【鍍銀】（ポテアン染色）

- 1) 1% プロタゴール 37°C (12~48時)
(銅板、液の作り方 右①)
- 2) 蒸留水 (D.W.)で洗う 3~4回
- 3) アグファー (増感液) 2分
(液の作り方 ③)
- 4) D.W.で洗う 3~4回
- 5) アミドール (現像液) 5分
(液の作り方 ⑤)
- 6) D.W.で洗う
- 7) 1%塩化金 2分
- 8) D.W.で洗う 3~4回
- 9) 2%蔞酸
- 10) D.W.で洗う 3~4回
- 11) 5%ハイポー (チオ硫酸ナトリウム) 5分
- 12) 流水で 5分
- 13) ヘマトキシリン・エオジン染色
ヘマトキシリンはカラチ液を使用

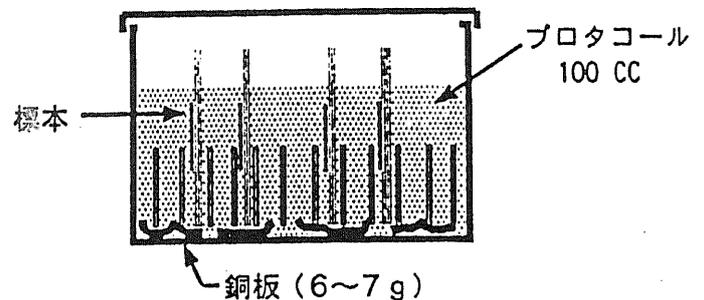
【エオジンY】（メイク）

0.3%エオジンは赤色であるが、氷酢酸をピペットで2~3滴入れるとオレンジ色になる。5~10分染色

【カラチ】

ヘマトキシリン 1.0g
カリウムミョウバン 50g
ヨウ素酸ナトリウム 0.2g
グリセリン 200cc
D.W. 800 cc
5~10分染色→流水

①プロタゴール液100cc、銅板6~7g、図のように下に敷き、紙ヤスリできれいにした銅板を使用する。



①D.W.100ccにプロタゴール1gを前日冷蔵庫で溶かす。
それを黒い袋に入れ、37°Cの恒温器に入れる。

③アグファー液

(A)

D.W.500cc

ヒドロキノン1.5g

クイン酸1.5g

(B)

D.W.200cc

硝酸銀5g A : B使用直前に混ぜる。

⑤アミドール

(A)

D.W.200cc

無水亜硫酸ナトリウム5g

臭化カリ (ブロムカリ) 1g

A液200ccにアミドール1g、使用直前に。

*ステン染色かごを使用すると反応が出るので、1枚ずつ染色バットに入れること。また、染色バットはきれいな物、できればクロム硫酸で処理した物を使用すると良い。

組織標本を作っただけこれ30数年になりますが、様々な苦勞、工夫をしたことを思い出します。小生は、医学部第3解剖で約3年間学生実習標本を作製し、当時、マイクロトームの刃には1本、1本角度があり、砥石研磨をしました。中砥、仕上げ砥と段階を踏みますが、水道水を流しながらの作業のため、真冬は手が冷たくなり苦勞しました。仕上げ砥の後は木製の台の1面に直接皮を張った形に研磨パスターを使用して仕上げ、良い切片ができるかどうかは刃の切れ味の良否にかかっているのが大変苦勞しました。その後、自動研磨機が出てからは楽になり、最近ではフェザーマイクロトーム替え刃を使用しているので、誰でも簡単に組織標本が作れます。

小生は、解剖実習の仕事柄か焼酎が大好きで2回手術をし、肺、胆嚢を取り、自分で標本を作製しました。肺の標本は、医・歯学部学生実習に使用しています。胆嚢は組織が正常でないので使用できませんでした。

終わりに、技術発表でスライド作成時には小林技官のご協力を、また鍍銀染色では医学部第二解剖高橋技官からアドバイスをいただきました。お二人に心から感謝いたします。

