

軟組織を含む硬組織非脱灰大型標本の作製方法について

大 竹 秀 明 古 沢 寛 花 田 晃 治

新潟大学歯学部歯科矯正学教室（主任：花田晃治教授）

（昭和 58 年 5 月 2 日受付）

An Investigation for the Systematization on Preparation of
Undecalcified Hard Tissue Specimen with Soft Tissue.

Hideaki OHTAKE, Hiroshi FURUSAWA and Kooji HANADA

Department of Orthodontics, School of Dentistry, Niigata University

(Director: Prof. Kooji Hanada)

KEY WORDS: *hard tissue, undecalcified specimen, resin embedding,
polychromatic labelling, polarizing microscopy.*

要 旨

従来、硬組織非脱灰薄切研磨標本作製する際には、研磨片の破碎を防ぐために、付着している軟組織は極力除去されていた。しかし、これでは周囲の軟組織と骨や歯の関係が観察できないので、脱灰切片を用いて観察することが多かった。非脱灰標本の特長を生かしつつ、周囲の軟組織を観察することができる標本を得るために、我々は従来より行われていた非脱灰標本の作製方法に改良を加えて、軟組織を含む非脱灰標本の作製方法をシステム化すべく検索し、それに成功した。実験材料として、犬の口蓋粘膜、歯を含む上顎骨を用い、対照として、従来の方法に従って軟組織を除去した犬の大腿骨を試料として、研磨標本作製した。同時に、染色標本、および蛍光、偏光顕微鏡の観察に適した未染色標本の厚さについて検討し、それぞれ、30 μm 、50 μm の値を得た。

緒 言

歯や骨などの硬組織の研究に際して非脱灰切片を用いて観察を行う方法は、脱灰切片のみを用いる方法に比べて多くの情報が得られるが、連続切片がとれない、包埋用樹脂浸透に長時間を要する、試料の薄切に特殊で高価な機械を必要とす

る、染色方法など普遍的な切片の観察方法が確立されていない、などの理由によりあまり利用されていない。また、骨に付着している骨膜などの軟組織は、試料の薄切研磨の際に、この部分から切片が破碎する危険があることから、試料包埋の際には極力除去されていたために、骨とそれに付着する骨膜、筋などの周囲軟組織との相互関係を観察することは不可能であった。しかし、この目的のために脱灰切片を用いたのでは、骨の石灰化などの重要な情報は失われてしまうし、大型切片の作製が難しくなる。非脱灰切片の利点を生かしつつ、同時に周囲軟組織の観察を行うには、軟組織を含んだ硬組織非脱灰標本の作製が必要であるが、これに類した研究報告はこれまでのところほとんど行われていない。そこで従来から行われてきた硬組織非脱灰標本作製法^{1)~4)}に改良を加え、硬軟両組織を含む試料から非脱灰薄切研磨大標本作製する方法を確立するために、この実験を行った。

実験材料・方法

実験材料として、体重 10 kg 前後の中型雑種成犬 5 頭の歯や軟組織を含む上顎骨および、これと比較する目的で、骨膜など軟組織を除去した大腿骨を用いた。

蛍光像を観察するために、須賀^{4)~6)}、高橋ら⁷⁾、徳田ら⁸⁾の方法に従って、オキシテトラサイクリン（台糖ファイザー：テラマイシン筋注液）を体重 1 kg 当たり 30 mg、また、カルセインブルー、アリザリンレッド S、カルセイン（いずれも半井化学薬品）を生理食塩水に溶解して、それぞれ、4%、4%、2%の溶液としたものを体重 1 kg 当たり、40 mg、40 mg、4 mg、を 1 週間の間隔をおいて、それぞれ 1 回ずつ筋肉内注射して、多色ラベリングを行った。

ラベリング終了後、ケタラル 50（三共：塩酸ケタミン）を、3 cc 筋肉内注射して、麻酔した後に、サクシン（山之内製薬：注射用塩化スキサメトニウム）を 1 バイアル 200 mg 腹腔内投与して、屠殺し、速やかに上顎骨および大腿骨を切り出し、軟組織を含む上顎骨は 10% 中性ホルマリン溶液に、軟組織を除去した大腿骨は直接 70% エタノールに浸漬して固定を行った。

固定後、図 1 に示すようにエタノール系列にて脱脂脱水し、次いでスチレンモノマー置換法⁹⁾にて樹脂浸透した。包埋用樹脂には BPS 樹脂（京都科学標本）を用いた。試料の薄切には大小 2 種類のダイヤモンドディスク型硬組織薄切機を使用し、上顎骨を含む大きなブロックは、大型薄切機（マルトー、MC 202、ディスク寸法：直径 150 mmφ、厚さ 400 μm）（図 2）を用い、大腿骨を包埋した小さなブロックは、小型薄切機（小坂製作所、CT-1、ディスク寸法：直径 120 mmφ、厚さ 400 μm）（図 3）で薄切した。

薄切後の切片は、大型自動研磨機（マルトー、ML-150 Dc、ダイヤモンドラップ盤寸法：直径 150 mmφ、粒度 #700）（図 4）を用いて、上顎骨の切片については、蛍光、偏光像の観察に適した標本の厚さを調べるために、研磨によって 100 μm から 30 μm までの各種の厚さの標本を作り、大腿骨の切片については、作製可能な標本の厚さの限界を調べるため、30 μm 以下の各種の厚さの標本を調整した。

研磨後、蛍光像、偏光像を観察するための未染色標本と、組織像観察のための H・E 染色標本とを作製し、切片のヒビ割れ、収縮、変形等の異常

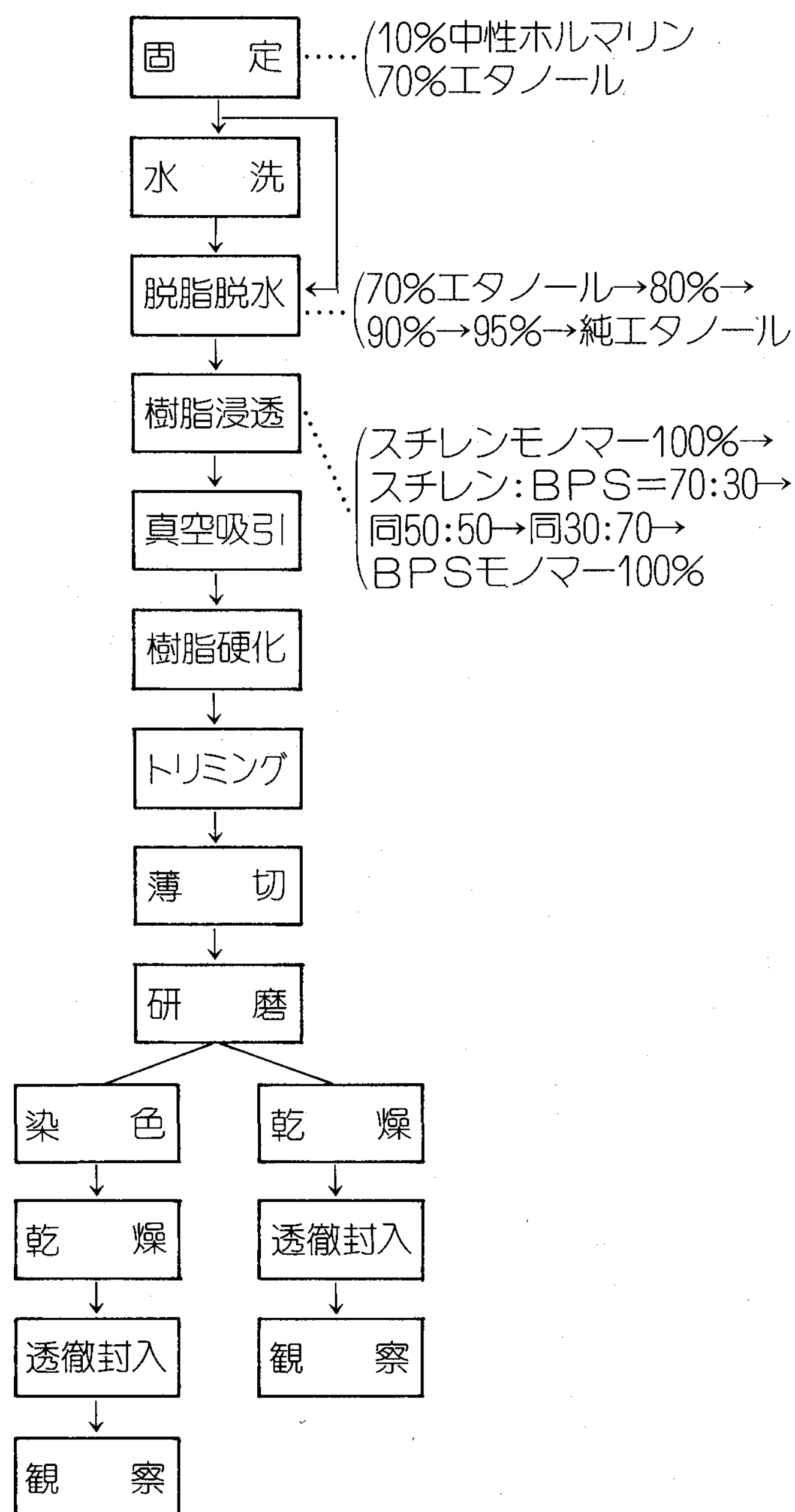


図 1 非脱灰薄切研磨標本の作製方法

の有無、蛍光像、偏光像の明瞭さ、染色性などについて観察し、切片の厚さとの関係について調べた。

結 果

口蓋粘膜等の軟組織や歯を含む上顎骨の試料ブロックでは、大型薄切機を用いて、縦 30 mm、横 30~60 mm ほどの大きさの前額断切片を 400 μm 程度の厚みで薄切した後、研磨によって 50 μm の厚さの非脱灰研磨標本を破碎することなく、コンスタントに作製することが可能であった。薄切に要した時間は切片 1 枚につき、およそ 30 分、そ

の後の研磨に 30 分であった。一部の切片では研磨の途中で、軟組織、とくに口蓋粘膜下の疎性結合組織の部分で、破碎がみられた。

骨膜等の周囲軟組織を除去した大腿骨の試料ブロックは、小型薄切機を用いて、縦 15 mm、横 20 mm の大きさで厚さ 100 μm ほどの横断切片を作製し、研磨によって厚さ 20~30 μm の研磨標本を破碎することなくコンスタントに作製することができた。薄切に要した時間は 15 分で、研磨には 10 分であった。研磨の際に、ディスクに加える圧力をかなり増しても、切片が破碎することはなかったが、一部の切片では、研磨中に骨髓の脱落が認められた。

大小 2 種類の切片について、未染・染色標本を観察した結果、切片のヒビ割れなどの異常はなかった。また、標本の厚さと組織像の関係では、蛍光像・偏光像・染色標本ともに、切片の厚みが 80 μm 以上では観察に不適當であった。とくに染色標本においては、それが顕著で、骨芽細胞、破骨細胞、歯根膜線維の走向などを観察するには、少なくとも 30~40 μm 程度まで薄くする必要がある。偏光顕微鏡による観察では 30 μm 以下まで薄く研磨すると、骨や歯などの偏光像は明瞭であったが、歯肉や口蓋粘膜などの軟組織中の線維束の

像は干渉色が弱くなって観察しにくかった。蛍光顕微鏡による観察でも 30 μm 以下に研磨すると、テトラサイクリン、カルセインブルーのラベリング像の蛍光強度はやや弱くなり、観察中に徐々に褪色していくことが認められた。

考 察

1) 固定について

光学顕微鏡による組織レベルの観察を行う場合、試料の固定に 10% 中性ホルマリンを用いることが多い。この方法によれば組織の収縮は比較的少なく¹⁰⁾、硬組織が脱灰されることもない。しかし、ホルマリン固定の試料を用いた非脱灰標本では硬組織の染色性がやや劣ることが経験的に知られているため、従来からアルコール固定が推奨されてきた。歯科領域では、硬組織だけでなくその周囲に存在する歯根膜、口腔粘膜等の軟組織をも含めて検索することが多いが、本実験のように軟組織を含んだ非脱灰標本を作製するためには、アルコール固定では軟組織が大きな収縮をおこす¹¹⁾恐れがあるので、中性ホルマリンを固定に用いる。

2) 脱脂脱水について

脱脂脱水は通法に従いエタノール系列で行う

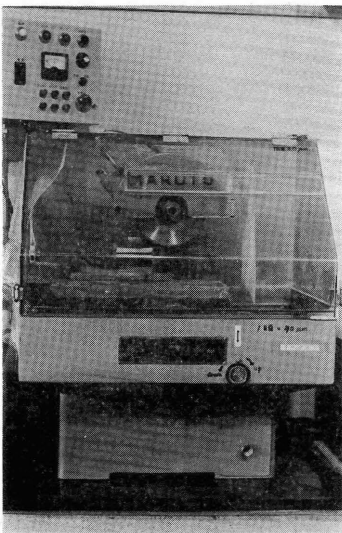


図 2 大型薄切機
(ディスク直径 150 mm ϕ)

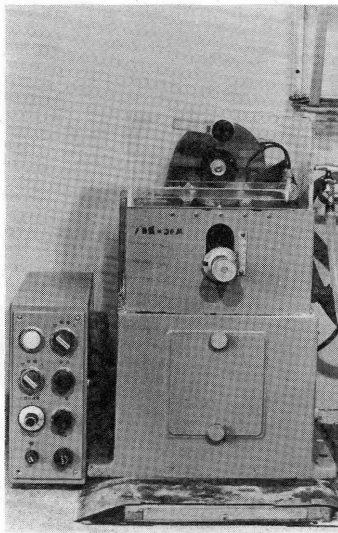


図 3 小型薄切機
(ディスク直径 120 mm ϕ)

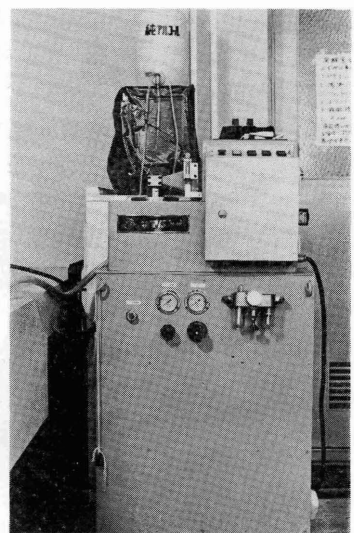


図 4 大型自動研磨機
(補綴学第二教室所属)

が、特に注意すべき点は、長管骨のように骨髄を多く含む試料では、充分な脱脂である。脱脂が不十分な場合、その後の樹脂浸透が完全に行われなため、薄切研磨時に切片が破碎してしまう。脱脂が標本作製の一連の操作の成否のキーポイントといえる。

3) 樹脂浸透・包埋について

包埋用樹脂に要求される条件、(1) 物理的性質が優れている、(2) 操作性が良い、(3) 組織に対する為害性がない、(4) 安価で入手し易い、について詳しく述べる。

(1) 物理的性質：無色透明、組織浸透性が良い、硬化後の寸法変化が少ない、包埋する試料の種類や作製する標本の厚さに適した硬さである、靱性に富んでいて薄切研磨の際に破碎しにくい。

(2) 操作性：粘調度があまり高くない、特別な器具を必要としない、樹脂溶剤が毒性を有しない、保管が容易で変性しにくい。

(3) 組織為害性：樹脂溶剤が組織を変性させない、硬化の際の発熱が少なく、また高温にまで加熱する必要がない。

そこで、本実験に用いたポリエステル系の BPS 樹脂について、これらの条件と比較検討すると次のようになる。

(1) 物理的性質：BPS 樹脂は無色透明で光の透過性が良いので、通常光、蛍光の観察に適している。本実験に用いたような試料から 20~50 μm の薄切研磨標本作製するには、その硬さは適当であった。また、BPS 樹脂は硬さを任意に調整す

ることはできないが、所望される硬さに合致していれば、常に一定の硬さの包埋試料が得られるという長所となりうることから、本実験のような試料から大量の薄切研磨標本作製するには、好都合であった。ポリエステル系樹脂であるため、スチレンモノマー置換法を用いることにより、多少時間を要するが、簡単かつ確実に樹脂浸透を行うことができる。時間に制約がある場合には、アセトン置換法によって浸透を行うことも可能である。

(2) 操作性：脱泡のために真空ポンプを使用する以外には、特別な器具は必要としない。かなり粘調で、ベタつくために多少使いにくい、操作性は概して他製品より優れているようである。

(3) 組織為害性：硬化の際に加熱する必要がなく、硬化剤の添加量を加減して、硬化速度を調節することで、硬化時の発熱を低く抑えることができるため、熱による試料への影響を最小限に抑えることができる。

(4) 価格、入手し易さ：比較的安価であり、入手し易く、補充も容易である。

このように、BPS 樹脂は包埋用樹脂としての要件をほぼ満たしていると考えられる。

ポリエステル系樹脂の浸透の方法には、前述のようにスチレンモノマー置換法とアセトン置換法があるが⁹⁾、大型の試料に対して樹脂浸透を確実にを行うためには、多少時間を要するが、スチレンモノマー置換法が優れていることから、その手技について述べる。脱脂脱水の終了した試料はスチ

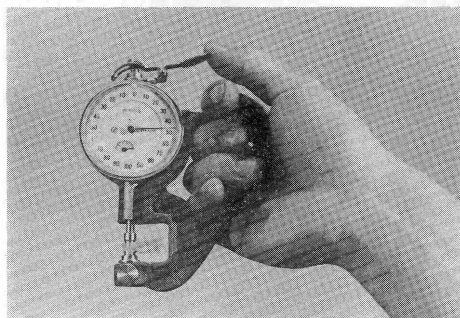


図 5 ダイアルゲージで標本の厚さを測りながら、所望する厚さまで研磨する。

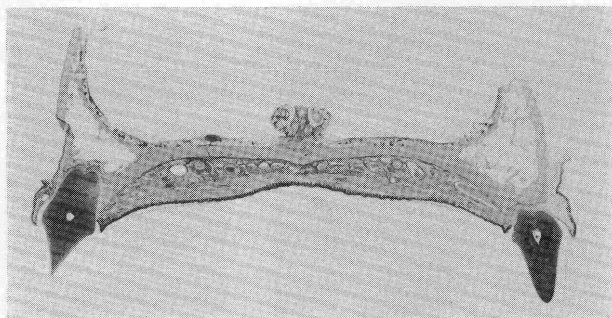


図 6 犬上顎骨 (H・E 染色) ($\times 2$)

レンモノマーに浸漬し、試料全体がアメ色になるまで十分に時間をかけて浸透させる。本実験で用いた犬の上顎骨には1週間要した。スチレンモノマーを十分に浸透させるが、樹脂100%液は粘調のため試料を浸漬する際に、気泡がはいりこんでしまうので、1時間ほど真空ポンプで吸引し、予め脱泡しておくが良い。

包埋に使う容器として、試料の大きさに合わせてケント紙で箱を作り、内面にワックスを流して被膜を作ったり、アルミ фольで内面をおおったりして、硬化のあとでブロックを取り出しやすいようにしているが⁵⁾、最近では使い捨ての角型モールドが既製品として販売されている。

試料を包埋する前に容器の底に硬化剤を混和したBPS樹脂を5~10 mmの厚さに注入して硬化させ、この上に少量の硬化剤を混和したBPS樹脂を注ぎ、その中に静かに試料を沈めて重合を行う。これにより、試料の全周にわたって充分な量の樹脂が存在することになり後ほどの薄切に都合が良い。

重合の際に注意すべきことは、樹脂の重合硬化をゆっくり行わせるために、混和する硬化剤の量を少なくすることである。硬化を遅らせ、硬化時の発熱による試料への影響を最小限にすることができ、また脱泡のための真空吸引の時間を充分にとることができる。

4) 薄切・研磨について

試料の種類・大きさによって、ディスク径150 mm ϕ と120 mm ϕ の大小2種類のダイヤモンドディスク型硬組織薄切装置を使い分けており、大型の硬組織薄切装置(ディスク径150 mm ϕ)を用いると、最大で縦40 mm、横70 mmぐらいの大きさの切片を作ることができ、あまり大きくない試料では200~400 μ mの厚さで薄切できるが、本実験で用いたような軟組織を含む大きな試料では、400~600 μ mと厚めに薄切し、研磨で薄くする方が時間を要するが、切片の破損が少なく確実である。

また、縦25 mm、横20 mm以下の小さなブロックは小型薄切機(ディスク径120 mm ϕ)で薄切が可能であり、本実験で用いた犬の大腿骨の試料

ブロック(縦15 mm、横20 mm)では数~10 μ m程度の誤差範囲で70~100 μ mの厚さに薄切が可能である。

薄切した大切片はかなりの厚みがあり、そのままでは観察に不適當なので、必要な薄さにまで研磨する必要がある。たとえば、骨芽細胞や破骨細胞などの細胞を観察するには、20~30 μ mぐらいの薄さにする必要がある、蛍光顕微鏡による観察では標本が薄いほどラベリング線は境界が明瞭となるが、30 μ m以下ではテトラサイクリン、カルセインブルーの蛍光が弱まり、褪色も起こりやすくなる⁷⁾。また、偏光顕微鏡により、軟組織の線維束の走向を観察するには、やはり30 μ m以下の薄い標本では干渉光が弱くなる。須賀^{4,6)}はラベリング像観察のための標本の厚さとして、40~80 μ mを推奨しており、大野¹²⁾、木津喜¹³⁾、千葉¹⁴⁾、原¹⁵⁾は、それぞれ犬の顎骨を材料として、50~80 μ mの研磨標本作製している。偏光顕微鏡による観察の標本として、三好^{16,17)}は歯の硬組織の観察のために60 μ m~80 μ mを推奨している。本実験の結果から、未染色の蛍光、偏光観察用の標本は30~50 μ mの厚さに調整するのが適當であると考えられる。

本実験に用いたような硬軟両組織を含んだ切片を、30 μ m以下の薄さまで研磨するのはかなり難しい。骨や歯などの硬組織と歯根膜や粘膜などの軟組織の吸水による膨張率が異なることが破砕の主たる原因として考えられる。これを防ぐために、必要に応じてエタノールを研磨面に滴下して、軟組織の膨化を抑えながら研磨すると良い。さらに薄い標本を得ることは、このような大型切片では非常に困難なので、試料をいくつかに分割して標本作製することも必要である。

結 論

(1) 当教室で従来から行ってきた硬組織非脱灰標本作製法に改良を加えて、硬軟両組織を含む非脱灰薄切研磨大型標本の作製方法をシステム化した。

(2) 本法を用いて、軟組織や歯を含む犬上顎骨の非脱灰薄切研磨標本(縦30 mm、横60 mm、厚

さ 50 μm) を作製することができる。

(3) 本法を用いても硬軟両組織を含む大型標本を 50 μm 以下に研磨することはかなり難しく、アルコールを滴下しながら研磨することで、軟組織の吸水膨張を抑えれば、30 μm まで研磨が可能である。

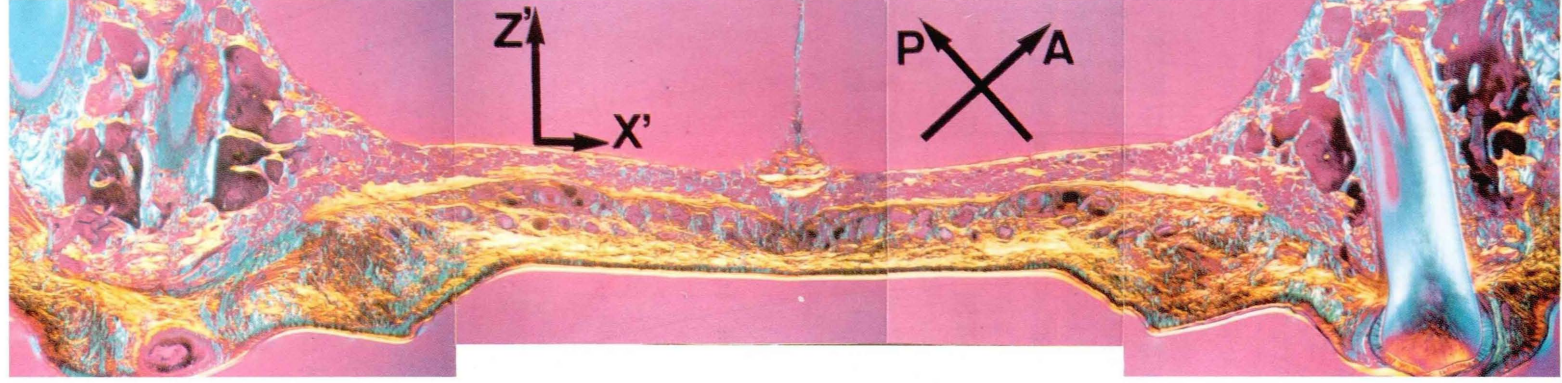
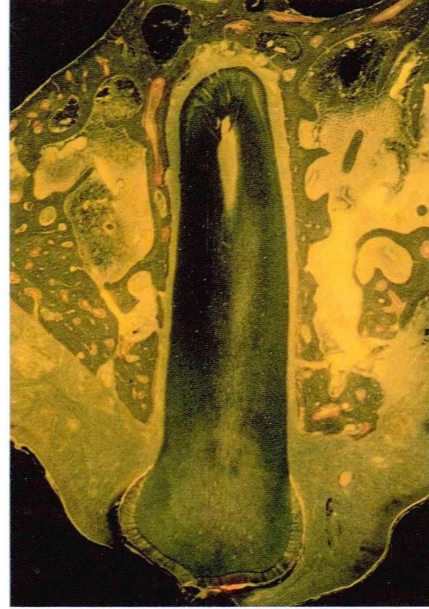
(4) 蛍光顕微鏡によるラベリング像の観察には 30~50 μm の厚さが適当である。

(5) 偏光顕微鏡を用いた軟組織の線維束の走向の観察には、50 μm 程度の厚さが適当である。

なお本研究の一部は、56 年度文部省科学研究費のうち、一般研究 C (課題番号 56570696) および奨励研究 (課題番号 56771006) の補助によった。

引用文献

- 1) 磯川宗七：硬組織薄切片の作り方．顕微 X 線法，12-23，医学書院，東京，1970.
- 2) 片桐正隆：研磨片の作製法．歯の研究法，42-54，医歯薬出版，東京，1973.
- 3) 清野和夫：硬組織標本の作り方．I, II, III, Medical Technology, 2: 113-117, 247-253, 323-326, 1974.
- 4) 須賀昭一：歯槽骨変化のラベリング法とマイクロラジオグラフィーによる観察．骨形態計測，153-164，医歯薬出版，東京，1981.
- 5) 須賀昭一：歯の動きに伴う歯槽骨変化の組織化学．歯界展望，51: 59-69, 251-264, 417-431, 1978.
- 6) 須賀昭一：テトラサイクリンによるラベリング法．歯の研究法，227-242，医歯薬出版，東京，1973.
- 7) 高橋 学，川口哲郎他：石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤と投与方法について．歯学，67: 53-66, 1979.
- 8) 徳田信春，古沢 寛他：大型実験動物に対する硬組織多色ラベリング法の改良に関する研究．新潟歯学会誌，13: 1-7, 1983.
- 9) マルトー：硬組織標本作成機器総合カタログ．第 2 版，31-32, 1982.
- 10) 影山圭三，渡辺陽之輔他：病理組織標本の作り方．17-25，医学書院，東京，1978.
- 11) 佐野 豊：組織学研究法，64-66，南山堂，東京，1976.
- 12) 大野康亮：抜歯窩骨性治癒過程の micro-radio graphy ならびにラベリング法による研究．歯学，60: 839-868, 1973.
- 13) 木津喜孝：上顎骨の実験的急速側方拡大による変化のラベリング法とマイクロラジオグラフィーによる研究．歯学，66: 686-722, 1976.
- 14) 千葉博茂：歯牙抜去につづく歯槽骨変化のラベリング法とマイクロラジオグラフィーによる研究．歯基礎誌，18: 1-52, 1976.
- 15) 原 林作：実験的な歯牙移動による歯槽骨変化のラベリング法とマイクロラジオグラフィーによる研究．歯学，65: 361-406, 1977.
- 16) 三好作一郎：偏光顕微鏡法．歯の研究法，244-261，医歯薬出版，東京，1973.
- 17) 三好作一郎，出口和邦他：ネコの歯小皮の偏光顕微鏡による観察．歯基礎誌，14: 136-141, 1972.



上図 7 犬上顎偏光顕微鏡写真 ($\times 5$)

←Pは, Polarizer の振動方向, ←Aは Analyzer の振動方向を示す。また, 鋭敏色検板 ($R=530\text{ m}\mu$) のZ' 軸は, 写真の上下方向である。この条件では, Z' 軸に平行なコラーゲン線維は青色に、垂直なものは黄色に観察される。背景は1次干渉色で赤紫色になる。標本の厚さは $50\mu\text{m}$ である。

右図 8 蛍光顕微鏡像 ($\times 8$)

図7の右側の歯の部分, B筋起, テトラサイクリンが黄色に, アリザリンレッドSが赤色にラベリング像が観察される。