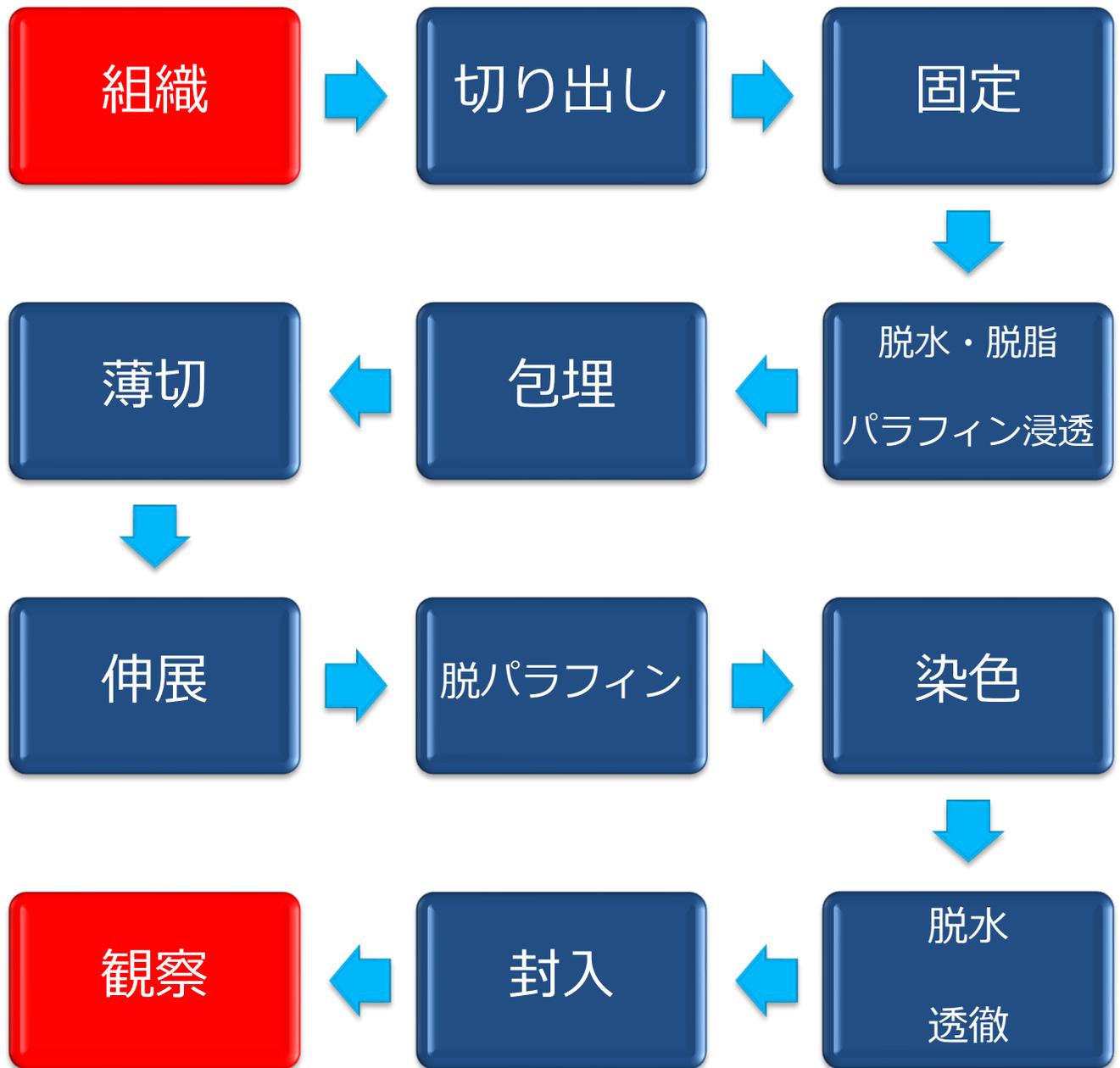




ホルマリン固定パラフィン包埋切片 作製実習マニュアル

ホルマリン固定パラフィン包埋切片 作製実習編 回転式マイクロトームを用いた切片作製法

標本作製のワークフロー

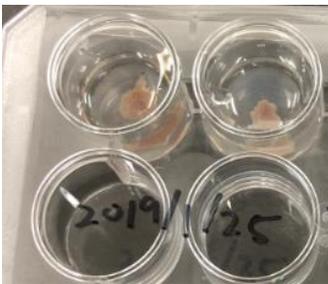


組織の固定～パラフィン浸透

【準備】

- 10%中性緩衝ホルマリン
- 無水エタノール
- 蒸留水
- パラフィン
- 解剖用ナイフ、ハサミ、ピンセット
- 各溶媒を加える適切な容器
- シェーカー
- カセット

1. 必要用のパラフィンを60℃程度の温度で溶解させておきます。使用するまで恒温機等の中で溶解させた状態を保ちます。
2. 切り出したサンプルを中性緩衝ホルマリンに加え室温で一晩以上浸します。



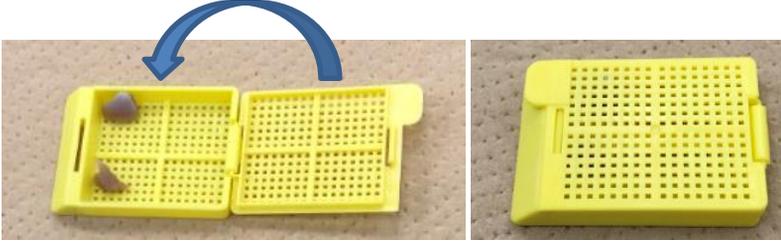
3. 組織をピンセットで固定液より取り出し、簡単に蒸留水ですすぎます。
4. 組織周りの水分を拭き取り清潔なコルク板の上に置きます。
5. 必要な場合、解剖用のナイフを使用して、適切な部分を切断します。



【ポイント】

- 感染性物質を用いて作業する場合は、適切な安全消毒対策を実施してください。取扱いの際には、各ラボで定められた規定に従って、防護服（防塵マスク、手袋、安全靴カバー）等を着用します。
- 固定液の浸透が浸透しやすいように組織は5mmほどの厚さにします。
- 固定液は組織体積の5-10倍程度用します。
- 核酸を抽出する場合は、固定時間は24時間以内推奨。固定時間が長いと核酸の断片化が起こります。
- ホルマリンが揮発しないように蓋が閉められる容器を使用するか、パラフィルム等で密閉します。
- 脂肪の多い組織は、脂肪内に水分が残りやすいため、脱水処理前に脱脂を行う。
- 骨や石灰化組織など硬組織は、薄切に影響をきたすため、脱水処理前に脱灰処理を行う。

6. カセットを用意し、割断面を下にしてピンセットでカセット内に入れ蓋をします。



7. カセットに鉛筆で検体名を記入します。
8. カセットを100%エタノール溶液が入った密閉式のボトルに加え、シェーカーに載せ室温で2時間程度振盪処理します。



9. 7の操作をさらに5回（計6回）繰り返します。
10. カセットを取り出し、よく溶媒をきりキシレンが入った密閉式のボトルに加え、シェーカーに載せ室温で2時間程度振盪処理します。
11. 9の操作をさらに2回（計3回）繰り返します。
12. カセットを取り出し、よく溶媒をきり60°Cで溶解したパラフィン溶液に加え2時間攪拌処理します。
13. 11の操作をさらに2回（計3回）繰り返します。

Stop point



【ポイント】

- 割断面を下にし、切った面がわかるようにする。
- 組織がカセットより小さく、カセット内で動いてしまう場合は、専用の綿やガーゼを詰めて動かないように固定する。この際キムタオルやキムワイプの使用は避ける＝脱水時の液の対流が適切に行われないため。
- 有機溶媒を使用するため油性マジックは使用しないで下さい。
- 無水エタノール溶液内には2、3日間組織を浸すことが可能。
- キシレンは劇物のためドラフト内で処理します。
- 代替キシレンの場合は、浸透速度が遅くなる場合があるため、浸透時間を検討します。
- 使用した有機溶媒、キシレン等は再利用可能です。
- パラフィンブロックは室温で長時間保存可能です。
- 脱水・パラフィン浸透処理は専用のプロセッサ（自動包埋装置）が便利です。



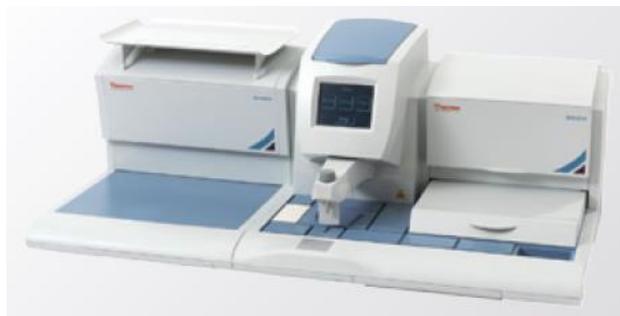
閉鎖型ティッシュプロセッサ

パラフィン包埋

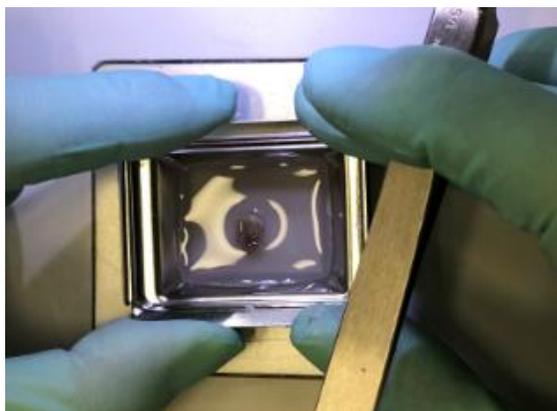
【準備】

- パラフィン
- パラフィン包埋装置
- 包埋皿
- ピンセット

今回はパラフィンの溶解、冷却のためのブロック作製装置を用いた包埋方法を紹介いたします。



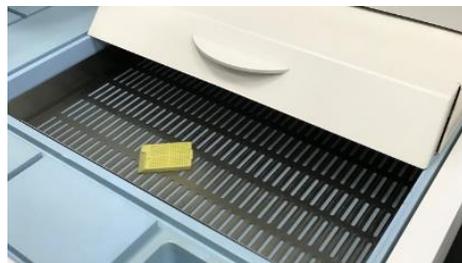
1. 包埋処理までカセットはパラフィン溶液に浸しておきます。
2. 包埋皿をホットプレート上等に置き60℃に温めます。
3. 包埋皿の底に溶解したパラフィンを加えます。
4. カセットの蓋をあけて、ピンセットで組織ブロック断端（観察したい面）を下に向けて包埋皿に移します。
5. 包埋皿を低温（5度程度）に冷やしパラフィンが半透明になるまで待ちます。



冷却台で包埋皿を冷やす

【ポイント】

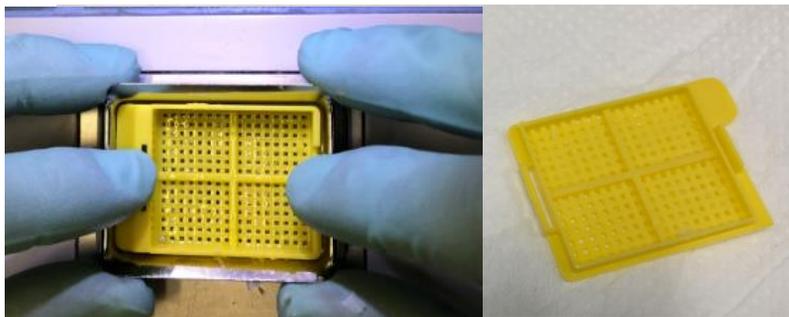
- 実験台にはパラフィンがこぼれるため、予め新聞紙等を敷いておくと片付けが簡単です。
- 包埋皿には様々な大きさがあります。組織ブロック、カセットに合わせて選択します。



ヒストスターのパラフィン溶液層にカセットを浸している状態

- 包埋装置によってはホットプレート（加熱エリア）が付いています。
- 組織を包埋皿へ置いたときに動かない程度のレベルまでパラフィンを加えます。
- 包埋皿に組織ブロックを移す際は断面を下になるように移します。
- 包埋装置によっては冷却台が付いています。

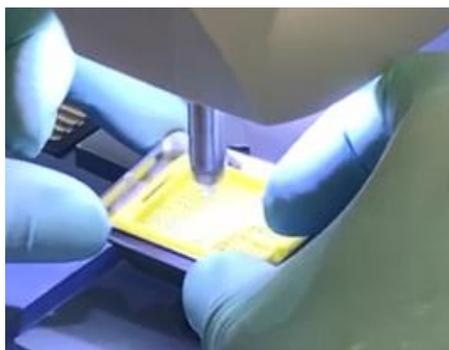
6. カセットの蓋を取り外し下図のように組織ブロックの入った包埋皿をカセットの部品を使って蓋をします。



包埋皿へカセット容器をセット

取り外したカセット蓋は
使いません

7. さらに包埋皿にパラフィン溶液を満たします。



ヒストスターによるパラフィン溶液の添加

8. 包埋皿を0°C以下の冷却台へ移しパラフィンを急速に固めます。



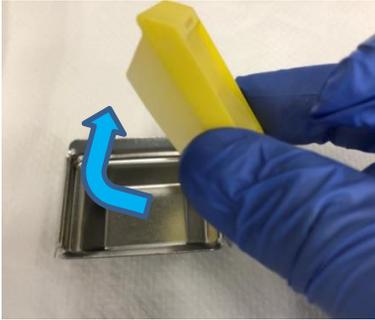
冷却台に置いてパラフィンが固まりつつあるサンプル

【ポイント】

- パラフィンを満たすときは空気が入らないように注意します。
- パラフィンは30分～1時間程度で固まります。長時間冷却するとパラフィンにひび割れが生じる可能性があります。

- 包埋した組織ブロックは室温で長期間保存可能です。

9. パラフィンが固まったら包埋皿からカセットを取り外す。



Stop point



マイクロトームによる薄切

【準備】

- 包埋済みサンプルブロック
- マイクロトーム
- ウォーターバス
- ホットプレート
- ふで
- スライドガラス
- 蒸留水



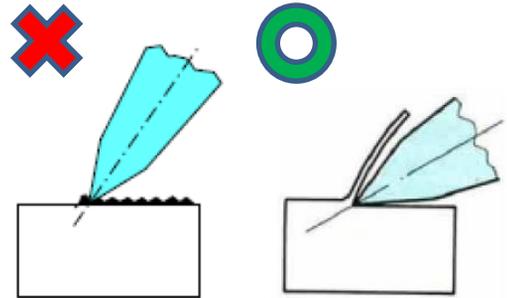
薄切するときは室温で実施します。
ウォーターバスの温度は40℃程度に温めておきます。
今回は回転式マイクロトームを用いた薄切方法を紹介いたします。

1. 各施設にあるマイクロトームに新しいナイフ、装置用アクセサリを取り付けます。
2. 包埋済みサンプルブロックを装置に取り付けます。



3. 切片厚を設定します。
トリミング：10-30μm程度
薄切：3-10μm程度
4. マイクロトームを操作しサンプルブロックとナイフの刃を近づけます。

- ナイフを取り扱う際は、刃先に触らないよう注意します。
- 温度が高いとパラフィンが柔らかくなる場合があります。そのため直射日光や他の熱源によりブロックが暖まらないよう注意します。場合によっては、パラフィンブロックを薄切前に、氷上で冷やすことも検討します。
- ハンドルのホイールをロックできる場合は、サンプル交換時は安全のため必ずロックをしてください
- サンプルブロックに対してナイフの角度が急すぎる場合は、ブロック表面にチャタと呼ばれる並行した縞模様ができてしまいます。切子面の角度とブロック表面の間の角度は通常10度です。



- サンプルブロックが下に下がったときに薄切されます。

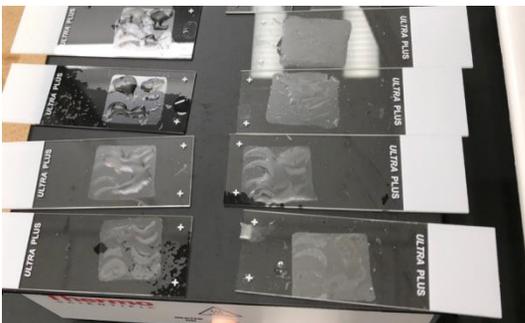
5. 目的領域に達するまでトリミングを行います。
6. 切片厚を調整し、目的領域を薄切します。削りかすが付いている場合は、筆で取り除きながら薄切します。



7. 切片を注意深くウォーターバスの中へ移し、切片を浮かせ、伸展させます。
8. 組織切片を観察し適切に切除されている切片をスライドガラスの面へ筆を使って注意深く載せます。



9. スライドガラスを50℃程度のホットプレートに30分-1時間程度乗せ水分を完全に乾燥させます。



- 適切な薄切スピードで薄切します。サンプルブロックが硬いほど、薄切スピードをゆっくりにします。
- 薄切スピードが速すぎるとチャタが生じる可能性があります。
- 薄切終了後は、さび防止のためマイクロームからは刃は取り外してください。
- 連続切片を作る場合は、順番を間違えないように、1枚ずつスライドガラスへ載せていきます
- ホットプレートに長く載せすぎるとパラフィンが過剰に進展し、組織のオリエンテーションが悪くなるため注意が必要です。

10. 残ったパラフィンブロックは再度使用することができます。薄切面に溶けたパラフィンをかぶせて空気に触れないようカバーします。

切片のHE染色

【準備】

- ドーゼ
- 染色バスケット
- 無水エタノール、キシレン、蒸留水
- 染色用バット
- 塩酸（オプション）
- ヘマトキシリン、エオジン
- 封入剤
- カバーガラス、ピンセット、キムタオル

予めドーゼに染色に必要な溶液を用意する

ドーゼ①：キシレン

ドーゼ②：キシレン

ドーゼ③：キシレン

ドーゼ④：100%エタノール

ドーゼ⑤：100%エタノール

ドーゼ⑥：70%エタノール

ドーゼ⑦：蒸留水

ドーゼ⑧：ヘマトキシリン溶液

ドーゼ⑨：1%塩酸アルコール

ドーゼ⑩：蒸留水

ドーゼ⑪：エオジン溶液

ドーゼ⑫：70%エタノール

ドーゼ⑬：100%エタノール

ドーゼ⑭：100%エタノール

ドーゼ⑮：キシレン

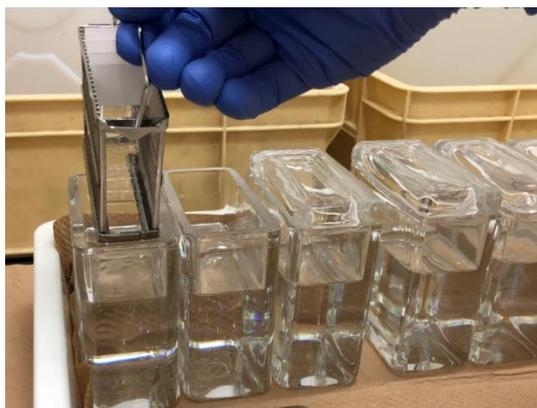
ドーゼ⑯：キシレン

ドーゼ⑰：キシレン

- キシレンはドラフト内で用意する。



1. スライドガラスを染色用バスケットに入れてキシレン入りのドーゼ①に室温で5分間浸します。



2. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液をきってから次のドーゼ②に移し替え室温で5分間浸します。
3. 室温で5分間処理した後、染色用バスケットを同様にドーゼ③に移し替え室温で5分間浸します。
4. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから次の100%エタノール入りのドーゼ④へ移し替え室温で5分間浸します。
5. 室温で5分間処理した後、染色用バスケットを同様に100%エタノール入りドーゼ⑤に移し替え室温で5分間浸します。
6. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから次の70%エタノール入りのドーゼ⑥へ移し替え室温で5分間浸します。
7. 大きめのバットに水道水を流水し、染色用バスケットごとつけて洗浄します。



バットの中に染色用バスケットを通して洗う。

- 染色用バスケットをドーゼに移した後は、バスケットを上下に動かして溶液をよくなじませます。
- スライドガラスは1-2時間、キシレン内に静置することが可能です
- キシレン処理により組織内のパラフィンを溶かします（脱パラフィン）
- エタノールへ移すと透明であった組織が若干白くなります。

1. 染色用バスケットを蒸留水入りのドーゼ⑦へ移し替えます。
2. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから次のヘマトキシリン入りのドーゼ⑧へ移し替え室温で5分間浸します。



1. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから流水の水道水のバットの中で染色液を洗います。



バットの中に染色用バスケットを通して洗う。

2. ドーゼ⑨の1%塩酸アルコールに手早く2回浸し、すぐに流水中のバットの中に染色用バスケット移し、20分ほど置き、色出しを行う。



- ヘマトキシリン染色で細胞の核が染色されます
- 古いヘマトキシリンを使用した場合染色性の低下がみられる可能性があります。

- ヘマトキシリンの種類によっては、1%塩酸アルコールによる分別が必要になります。分別の必要のないヘマトキシリンは染色後すぐ流水で色だしを行って構いません。

1. 染色用バスケットを蒸留水入りのドーゼ⑩へ移し替え室温で5分間浸します。
2. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから次のエオジン入りのドーゼ⑪へ移し替え室温で3分間浸します。



3. 軽く水道水で洗浄した後、染色用バスケットを70%エタノール入りのドーゼ⑫へ移し替え室温で5分間浸します。



4. 染色用バスケットを取り出し、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから100%エタノール入りのドーゼ⑬へ移し替え室温で5分間浸します。
5. 室温で5分間処理した後、染色用バスケットを同様に100%エタノール入りドーゼ⑭に移し替え室温で5分間浸します。
6. 室温で5分間処理した後、ドーゼ上でできるだけ溶液を切ってから染色用バスケットをキシレン入りドーゼ⑮に移し替え室温で5分間浸します。
7. 同様の操作をドーゼ⑯、⑰で繰り返します。

- エオジンで細胞質が染色されます。

- キシレンに移し替える時にはできるだけ水分を切ってから行います。

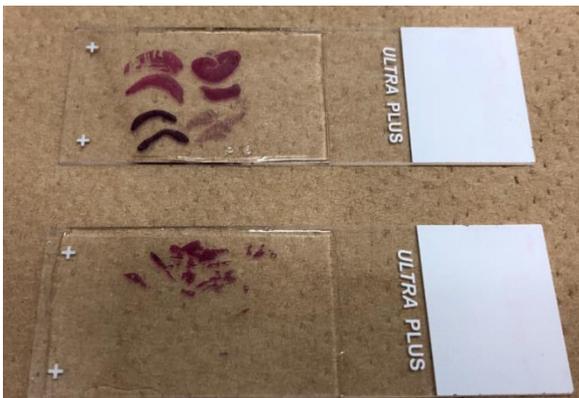
1. キシレンからスライドガラスを取り出し、キムタオル等の上に乗せます。
2. 封入剤を広口チップを付けたピペットマン等でとりスライドガラス上に1, 2滴の載せます。



3. カバーガラスの端が封入剤に触れるようにし、空気が入らないようにカバーガラスを少しずつ傾けながら封入します。



4. 封入剤が固まるまで室温で数十分静置します。



- 空気が入った場合は、カバーガラスの上からピンセットで優しく押し、空気を外に押し出します。



- 封入後はスライドガラスを横にスライドさせないようにご注意ください。組織が傷つくことがあります。

■アプリケーションサポートについて

製品に関するアプリケーション情報、技術資料サイト
<https://www.phchd.com/jp/epredia>

テクニカルサポートへのお問い合わせは

TEL: 0120-878-279 (お客様専用)

(受付時間：月曜日～金曜日9:00-17:30 *祝祭日除く)

メール（お問い合わせフォーム）でのお問い合わせは、

https://www.phchd.com/jp/epredia/forms/Input?form_id=%7b25B052E7-89B4-4157-8A2C-C22DC7EA5627%7d

PHC株式会社

<https://www.phchd.com/jp>

本社：〒105-8433 東京都港区西新橋2-38-5