

Title	組織化学のための新凍結溶解法について
Author(s)	安富, 正幸
Citation	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28614
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	安 富 正 幸 やす とみ まさ ゆき
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 518 号
学位授与の日付	昭和 39 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科外科系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	組織化学のための新凍結溶解法について (主査) (副査)
論文審査委員	教授 陣内伝之助 教授 岡野 錦弥 教授 清水 信夫

論 文 内 容 の 要 旨

I 目 的

組織化学に於ては種々の固定法があり、目的とする染色法により適当な固定液が用いられているが、夫々の固定液に長所と欠点があり、又一種類の固定による可能な染色は限られている。従って標本の組織化学的検索に際しては、目的に応じた多種類の固定液を必要とし、組織片も多くを要する。そのため手術摘出材料などの如く限られた材料、或は、ごく小部分の病変に対しては、種々の反応の結果を対比するのに困難を感ずることが多い。そこで私は従来主として形態学的な面に重点を置かれた凍結溶解法を導入、簡素化し少しの材料で形態学的検索と共に一般組織化学、酵素組織化学的所見をも満足しうる様な方法を見出そうとした。

II 実験方法及び成績

a) 実験材料

体重100~130gm, 雄, 純系 Ratte (呑竜) の肝臓を用い, 2乃至4耗立方大の組織片とした。

b) 実験方法

口径 14cm, 高さ 30cm の広口魔法瓶内に, 口径 10cm, 高さ 10cm の広口魔法瓶を挿入して二重魔法瓶とし, 魔法瓶内の Dryice 飽和 Acetone が 42乃至52時間で -80°C より $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ まで徐々に上昇する様に魔法瓶の蓋を調節する。

採取した組織を Dryice 飽和 Acetone により -70°C 以下に冷却した純 Acetone 中で急速に凍結させ, 前もって上記二重魔法瓶中で -70°C 以下に冷却した試験管内の純 Acetone に移し, 約48時間を要して徐々に $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ に上昇させる。復温後, 常温の純 Acetone 中に1時間おき, Xylol 透徹後, 低融点 Paraffine 中に包埋する。尚試験管は底部より約 2cm の所に狭窄部を作り, 組織片が試験管の中間部に位置する様にし, 脱水による溶媒の稀釈を防ぐ様にした。

上記の方法の対照として、新鮮肝組織を位相差顕微鏡で観察し、又他の組織化学的方法に対する特有な固定液も、いろいろ使用し比較した。(1)凍結法としては、Dryice 飽和 Acetone により $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ に冷却した、Alcohol, 或は液体窒素により $-160\sim-190^{\circ}\text{C}$ に冷した Acetone, Alcohol, Isopentane とを比較した。(2)脱水のための溶媒としては、Acetone, Ethanol, Methanol などの有機溶媒を用い、(3)凍結溶解のための時間と温度は $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ の低温 Acetone 中に、又 Philip 氏法により $-40\sim-50^{\circ}\text{C}$ の Acetone 中に長時間おおくか、 -70°C よりやや速やかに温度を上昇させる場合も比較検討した。

c) 形態学的検討

1) 凍結の条件、本実験の $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ の Acetone による凍結は上述の他の方法との間に著明な差がなかった。

2) 脱水のための溶媒としては Acetone によるものが最もすぐれた組織像を示した。浸漬時間及び温度は $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ に保つ場合は1週間経っても脱水はほとんど進まず、 $-40\sim-50^{\circ}\text{C}$ では約1週間を要するが組織像は良好である。 -35°C 以上では温度が高いほど脱水は早い但し組織像の乱れが目立つ。 -70°C より比較的速やかに温度を上昇させた場合、中心部で組織像は乱れることが多い。本実験の二重魔法瓶によるものは組織構造の乱れは少い。

d) 組織化学的な結果

1) RNA 染色; Pyronine-Methylgreen 染色により、本法によって良好な染色性と細胞内局在性を示し、Carnoy 氏液固定より優れている。 $-40\sim-50^{\circ}\text{C}$ 、或は $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ で長時間浸漬したものは、幾分染色性が弱く、局在性が不明瞭である。

2) PAS 染色; Hotchkiss-McManus 氏法による PAS 染色では、ほぼ Carnoy 氏固定によるものと同様の強さで陽性物質が出現するが、細胞内の局在性は Carnoy 氏固定よりも優れている。とくに偏奇現象は極めて少い。長時間の浸漬のものは一般に陽性物質の出限度が弱いようである。

3) 酵素; Acid 及び Alkaline Phosphatase, Esterase, Lipase, Phosphamidase, Aminopeptidase などについて本法によるものと従来これらの酵素染色に用いられて来た Acetone 固定法とを比較すると、ほぼ同様な活性と、はるかに優れた局在性を示す。この際溶媒として Alcohol を用いると著明に活性の低下する酵素があることを知った。

■ 総 括

組織の固定のための新凍結溶解法を考案し、検討を加えた。従来の凍結溶解法は特殊な装置により長時間一定の低温を維持するのに対し、私の方法は簡単な装置で比較的短時間に徐々に温度を上昇させる簡単な方法であり形態学的に良好な像が得られる。一方、本法によって処理した同一の組織片から、PAS, RNA 染色に於ても、Esterase, Lipase, Acid 及び Alkaline phosphatase, phosphamidase などの酵素でも同時に優れた標本が得られ、便利であるとともに、これらの形態学的局在が優れているので、今後多用されうるものと信ずる。

論文の審査結果の要旨

手術材料を組織化学的に検索するさいに、得られる材料が微小なことがしばしばあり、一般に用いられ

ている多種類の固定法を行ないえない場合が多い。凍結溶解法は、多くの優れた利点をもつにもかかわらず、ごく一部でしか利用されていないし、手技も全くまちまちで、方法自体が研究の対象とされている現状である。

安富は、従来から行なわれている凍結溶解法について検討し、従来の方法では脱水の溶媒が組織の内部ほど薄くなるため、組織全体の脱水が均一に進まない点に気づき、凍結後の脱水を -70°C から 0°C まで徐々に温度を上げ、組織全体の脱水が一様に進むような方法と装置とを考案した。また凍結の温度、脱水の溶媒と温度とについても検討を加えた。

本法を用いて作成した標本は、従来の凍結溶解法に見られなかった優れた形態学的な所見が得られるばかりでなく RNA 染色、PAS 染色にも、又酸性およびアルカリ性 Phosphatase Esterase, Lipase. Phosphamidase などの酵素染色にも、従来用いられている冷アセトン固定、カルアノ氏固定、一般の凍結溶解法と比較して局在、反応の強さなどの点において優れた所見が得られた。

本法は従来の凍結溶解法を合理的に改良し、良好な所見が得られる上に、簡便であるため、今後多く使用されうるものと信ずる。