

原 著

パラフィンブロック冷却装置付きマイクロトームと義歯安定剤の
ブロック裏面隙間充填による連続薄切への効果の検討

齊尾 征直¹, 羽鳥 瑞歩¹, 守谷 駿一¹, 小川 愛¹, 保戸山央弓¹, 藤森 美沙¹,
農見 友梨¹, 小林さやか¹, 木村 公則²

1 群馬県前橋市昭和町 3-39-22 群馬大学大学院保健学研究科生体情報検査科学

2 東京都文京区本駒込 3-18-22 東京都立駒込病院肝臓内科

要 旨

目 的 : ミクロトーム連結式パラフィンブロック固定台冷却装置を用いたパラフィンブロックの薄切時連続冷却の有用性を検討した。

方 法 : 検体のない疑似試料をパラフィンのみで作製し, 冷却装置使用時と未使用時のブロック表面温度 (温度) 測定と連続薄切可能な厚みを検討した。また, その際ブロック裏面の隙間を充填するための義歯安定剤の検討も併せて行った。

結 果 : 冷却装置を用いると, 義歯安定剤充填により一種類を除いてブロック温度は, 開始時と5分後, 開始時と20分後の差が充填なしと比較して有意に大きかったが, 20分後のブロック温度に充填剤の有無で有意差はなかった。また, 義歯安定剤充填・冷却条件での薄切は, 1 μm 厚まで失敗することなく連続薄切でき, 未冷却では, 2 μm 厚まで連続薄切できた。

結 論 : パラフィンブロックの薄切時持続冷却によって安定した連続薄切が可能であった。

文献情報

キーワード :

病理検査学,
マイクロトーム,
パラフィンブロック薄切時冷却,
連続薄切,
義歯安定剤

投稿履歴 :

受付 平成30年11月19日
修正 平成30年12月3日
採択 平成30年12月6日

論文別刷請求先 :

齊尾征直
〒371-8514 群馬県前橋市昭和町3-39-22
群馬大学大学院保健学研究科生体情報検査
科学
電話 : 027-220-8942
E-mail: saio@gunma-u.ac.jp

I 目的

光学顕微鏡観察用の標本をパラフィン包埋ブロックから薄く切ることを薄切といい, 組織片を薄切する器械をマイクロトームというが, ミクロトームは滑走式と回転式に大別される。¹ 標本の薄切を行う際, 欧米では回転式のマイクロトームが用いられ, 日本では滑走式を用いることが多く, いずれの場合においても薄切の際には, ブロックの硬度が増すため薄切が容易になるという理由で, ブロックを氷や冷却材で冷やす。¹ ただし, パラフィンブロック固定台に固定した後はブロックが冷却できないので, ブロックが膨張することも念頭に入れて薄切すべきであると述べられている。¹ その点を考慮し, 現在市販されている自動切片作製装置では, 温度が $17-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で湿度が $50 \pm 5\%$ 前後に保たれ一定の温度での薄切が可能となっている。²

他方, 欧米では回転式が日常のパラフィン切片作製で用いられている反面, 日本では一般に滑走式が用いられている。しかし, 日本でも回転式はその特徴を生かして, 連続切片の作製や一つのブロックから多数の切片を得る際に用いられている。³

今回我々は, 滑走式マイクロトームの一つであるユング型のマイクロトームのパラフィンブロック固定台を直接冷却できる装置を用い, 薄切中もパラフィンブロック温度を一定に保つことで, どの程度薄切の精度が向上するのかを, 検

体を含まないパラフィンのみ疑似試料を用いて検討した。また、その際パラフィンブロック裏面の空間を義歯安定剤で充填すると、より早く安定した温度でパラフィンブロックを冷却状態で温度維持できることを見出し、どの義歯安定剤が最もブロック裏面の空間充填に適しているかも検討したので、併せて報告する。

II 材料と方法

1. パラフィンブロック作製

検体を含まないパラフィンブロック作製には包埋センター（クライオコンソール, TEC-P-CC-J0, ディスペンシング・コンソール, TEC-P-DC-J0, サクラ精機, 中央区, 東京都）を用いた。あらかじめ60℃に加熱したパラフィンブロック作製の包埋皿（2.4×3 cmのブロック作製用, 14号, サクラファインテックジャパン, 中央区, 東京都）を包埋センターから取り出し、ホットプレート上に置き、容器の中に加熱されたパラフィン（病理組織包埋用パソプレップ568, 富士フィルム和光純薬, 中央区, 大阪市）をディスペンサーから注いだ。次にパラフィンブロック用のカセット（ティッシュ・テック固定包埋用カセット, 41870 ホワイト, サクラファインテックジャパン）を容器の内側にセットし、さらに、加熱されたパラフィンをディスペンサーからカセットの網目が隠れる程度まで注いだ。その後クライオコンソールの上で30分以上冷却したあと、包埋皿を取り外し、パラフィンブロックとして本研究の検討に用いた。

2. パラフィンブロック裏面への義歯安定剤充填

本研究では次の5種類の義歯安定剤を用いた。コレクトクリーム（以下CRC）（シオノギセルスケア, 中央区, 大阪市）、新ポリグリップSa（以下PGS）（アース製薬, 千代田区, 東京都）、タフグリップ（以下TGP）（小林製薬, 中央区, 大阪市）、クッションコレクト（以下CCO）（塩野義製薬, 中央区, 大阪市）、新ライオデント（以下LDN）（ライオン, 墨田区, 東京都）。主成分と性状については表1にまとめた。用事、義歯安定剤をパラフィンブロック裏面の窪みにカセット裏面が埋まるまで充填して研

究に用いた。

3. パラフィンブロック表面温度測定

パラフィン表面の温度を赤外線放射温度計（AML00021, A Life, 深セン市, 広東省, 中国）をパラフィンブロックの表面から18 cmの高さに固定し、最初の7分は10秒毎、その後は30秒毎に測定した。温度計のマニュアルでは「検体からの距離12 cmで直径1.5 cm³の表面温度の平均値を測定し表示する」とのことであり、この条件では直径2.25 cmの円形のエリアの平均温度を計測していることになる。

4. パラフィンブロックの薄切

大型滑走式マイクロトーム（TU-213, 大和光機工業, 朝霞市, 埼玉県）にマイクロトーム替刃（A35 フェザー, 美濃市, 岐阜県）を取り付けて薄切に用いた。またブロック固定台連結型固定台冷却装置（PARA COOLER, PC-110, 大和光機工業）を用いた。23℃にエアコン温度設定された実験室内で、あらかじめ1時間装置を稼働させて温度の安定した固定台連結型固定台冷却装置に、パラフィンブロックを取り付けて、あらかじめパラフィンブロック全面が出るように荒削りをしてから薄切を開始した。薄切は3-0.5 μm厚で行い、刃を滑走させて、厚紙で薄切パラフィンをすくえた場合、薄切成功とし、薄切パラフィンがすくえずに縮まったままであった場合は薄切失敗とし、連続成功の回数を数え、失敗した時点で終了した。薄切が10回連続でできた場合も10回で打ち切った。また、連続薄切が10回連続でできなかった薄切の厚さの場合、薄切の成功率を求めるために薄切時の薄切成功回数と失敗回数を60回以上数えた。

5. 統計学的解析

統計学的解析にはJMP Pro 12.2.0（SAS Institute Japan, 港区, 東京）を用いた。義歯安定剤なし群と各義歯安定剤充填群との2群間の値の比較をt検定で行った。その際事前に等分散性の検定をF検定で行い、群間の分散にいずれの場合も有意差がないことを確かめた。また、 $p < 0.05$ を統計的な有意差ありと判定した。

表1 本研究に用いた義歯安定剤とその主成分及び性状

タイプ	文中表記	商品名	発売元	主成分	柔らかさ	成型難易度	粘着性
クリーム	CRC	コレクトクリーム	塩野義製薬	CMCNa, MEMACP, PEG	歯磨き粉様	易	有
クリーム	PGS	新ポリグリップSa	アース製薬	CMCNa, MEMACP, PEG	歯磨き粉様	易	有
クッション	TGP	タフグリップ	小林製薬	酢酸ビニル樹脂, エタノール	グミ様	難	無
クッション	CCO	クッションコレクト	塩野義製薬	酢酸ビニル樹脂, エタノール	グミ様	難	無
クッション	LDN	新ライオデント	ライオン	酢酸ビニル樹脂, エタノール, PPG	ガム様	易	無

CMCNa: カルボキシメチルセルロースナトリウム, MEMACP: メトキシエチレン無水マレイン酸共重合体 PEG: ポリエチレングリコール, PPG: ポリプロピレングリコール

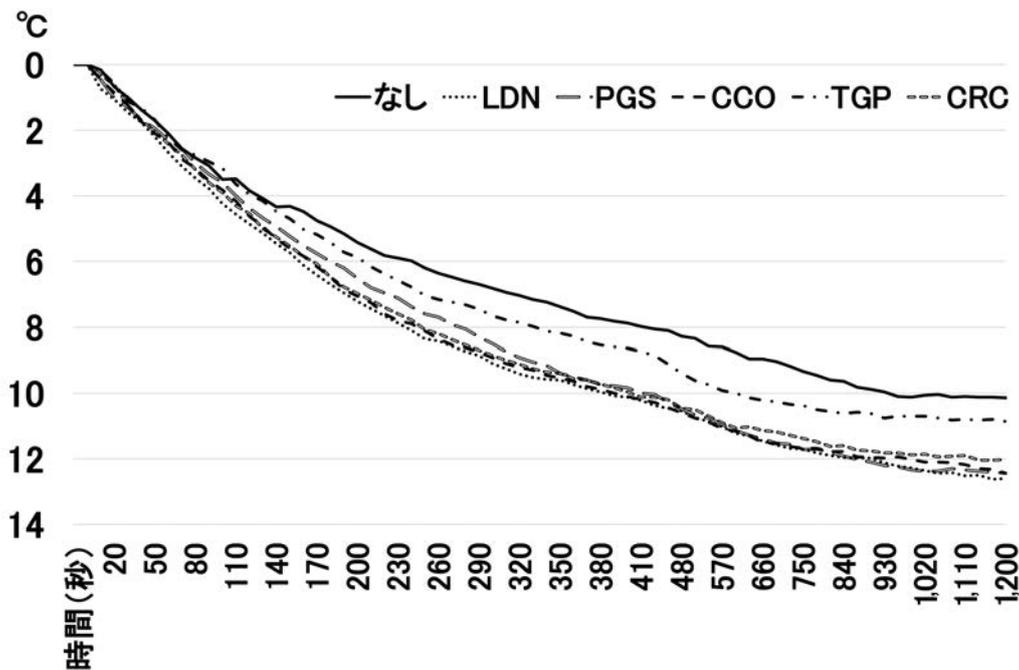


図1 義歯安定剤充填の有無とブロック固定台連結型固定台冷却装置装着後のパラフィンブロックの表面温度の経時変化：測定開始時のパラフィンブロック表面温度を基準にして、測定開始時のパラフィンブロック表面温度と各時点におけるパラフィンブロック表面温度の差を求め、各群5回の検討の平均値についてプロットしてある。

III 結果

1. 義歯安定剤の主成分と扱いやすさの検討

まずはじめに、パラフィンブロックの裏面に充填する義歯安定剤の取り扱いのしやすさを検討した。表1に本研究に用いた義歯安定剤とその主成分及び性状などをまとめた。表1に示すように、クリームタイプは成形しやすいため、ブロック固定台とパラフィンブロックの隙間に隙間なく充填できたが、粘着力があるため、パラフィンブロックから剥がしにくかった。また、クッションタイプは粘着性がないため、使用後にパラフィンブロックから剥がしやすい反面、TGPとCCOはグミ様の硬さがあり、ブロック固定台とパラフィンブロックの隙間を毎回安定して完全に充填させることは難しかった。他方、LDNはポリプロピレングリコールが添加されているため、クッションタイプの中では硬さは柔らかく、クッションタイプの特徴である粘着性がない点も併せ持っているため、ブロック固定台とパラフィンブロックの隙間を毎回安定して完全に充填させることができ、使用後もパラフィンブロックから容易に剥がすことができた。以上より、義歯安定剤の素材としての取り扱いのしやすさは、我々が検討した5種類の中ではLDNが最も優れていた。

2. 義歯安定剤の隙間充填とパラフィン冷却性能の検討

次に、義歯安定剤のパラフィンブロック裏面の隙間への充填とパラフィンブロックの冷却性能の比較検討を行った。図1に義歯安定剤なしと各義歯安定剤充填時のパラフィン

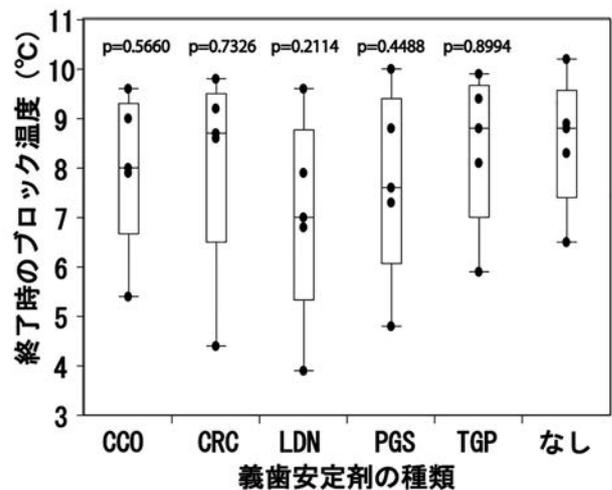


図2 義歯安定剤充填の有無と冷却20分後のパラフィンブロック表面温度：図1のデータの測定開始後20分時のパラフィンブロック表面温度について、各群5回の検討の平均値を示す。義歯安定剤なし群と義歯安定剤が充填された各群間の比較をt検定で行いそのp値を示してある。

ブロックの表面温度低下の推移（5回の平均値）を示す。TGPを除いて約2℃の温度低下が測定開始後20分でみられたが、測定開始20分後のブロックの実際の表面温度には統計学的な有意差は認められなかった（図2）。他方、測定開始時と5分後におけるパラフィンブロック表面温度の差の平均値及び測定開始時と20分後におけるパラフィンブロック表面温度の差を検討してみたところ、TGPを

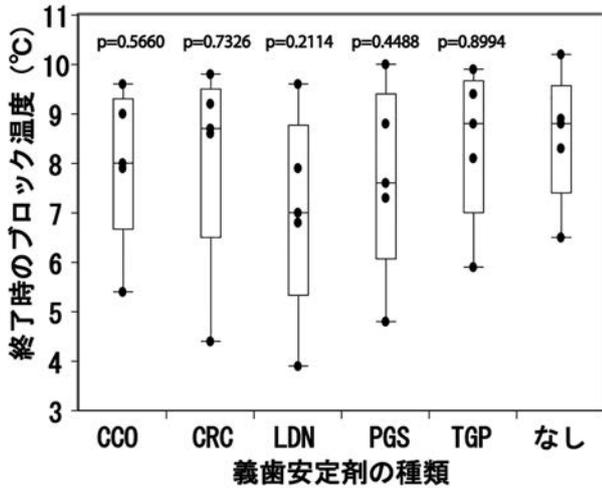


図3 義歯安定剤の有無と開始時パラフィンブロック表面温度と冷却後5分のパラフィンブロック表面温度の差：図1のデータの測定開始後5分時のパラフィンブロック表面温度と開始時の表面温度の差について、各群5回の検討の平均値を示す。義歯安定剤なし群と義歯安定剤が充填された各群間の比較をt検定で行いそのp値を示してある。

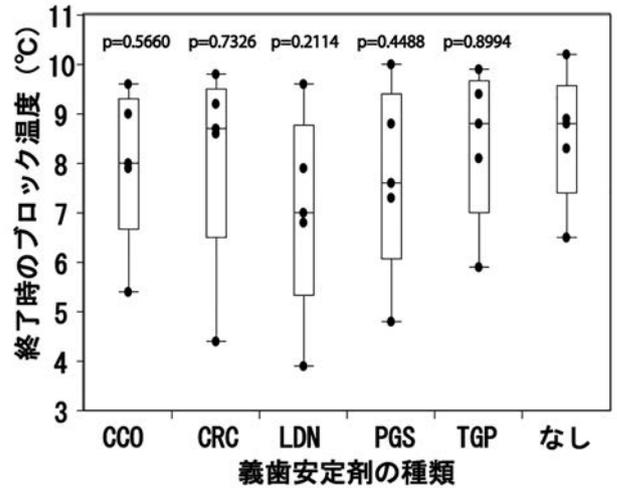


図4 義歯安定剤の有無と開始時パラフィンブロック表面温度と冷却後20分時のパラフィンブロック表面温度の差：図1のデータの測定開始後20分時のパラフィンブロック表面温度と開始時の表面温度の差について、各群5回の検討の平均値を示す。義歯安定剤なし群と義歯安定剤が充填された各群間の比較をt検定で行いそのp値を示してある。

表2 ブロック連続冷却の有無と薄切初回からの連続成功回数*¹

パラクーラー：あり (ブロック温度：11.2°C)					パラクーラー：なし (ブロック温度：22.5°C)				
切片的厚さ	3 μm	2 μm	1 μm	0.5 μm	切片的厚さ	3 μm	2 μm	1 μm	0.5 μm
1回目	10	10	10	6	1回目	10	10	0	
2回目	10	10	10	1	2回目	10	10	1	
3回目	10	10	10	3	3回目	10	10	0	
4回目	10	10	10	0	4回目	10	10	0	実施せず
5回目	10	10	10	0	5回目	10	10	0	
6回目	10	10	10	0	6回目	10	10	0	

* 1：薄切初回から10回連続して成功した場合終了した。

除いて義歯安定剤なしと比較して、5分後のパラフィンブロック表面温度と開始時の表面温度の差および20分後のパラフィンブロック表面温度と開始時の表面温度の差のいずれについても有意差が認められた (図3, 4)。

以上より、義歯安定剤の充填をおこなっても最終的な冷却温度には統計的な差異はみられないものの、TGP以外の充填剤を用いると速やかにパラフィンブロックを冷却することができることが示された。

3. 連続切片作製における至適温度の検討

最後にLDNは義歯安定剤の中で取り扱いが容易で安定してブロックを冷却できる特徴を持っていたため、充填剤としてLDNを用いてブロックを固定台に固定後20分以上経過し完全に温度が安定したところで、薄切の厚さを変えて何枚連続で薄切できるか検討した。表2と表3にその結果を示す。ブロック冷却なしの場合でも薄切は3 μmと2 μmでは一度も失敗することなく薄切することが可能で

表3 ブロックの連続冷却と室温時と連続成功しない厚さでの成功率

	連続冷却	室温
パラフィンブロック温度	11.2°C	22.5°C
薄切の厚さ	0.5 μm	1 μm
成功 (回)	14	14
失敗 (回)	46	50
薄切回数 (回)	60	64
成功率 (%)	23.3%	21.9%

あった。しかし、1 μmの厚みでは安定して連続薄切することはできず (表2)、薄切成功率は21.9%であった (表3)。他方LDN充填パラフィンブロックの冷却下薄切では、3 μm、2 μm、1 μmまでいずれも一度も失敗することなく薄切可能であったが、0.5 μmでは安定した薄切を行うことができず (表2)、薄切成功率は23.3%であった (表3)。

IV 考察

入れ歯義歯安定剤には大きく分けて、粉末タイプ、クリームタイプ、テープタイプ、クッションタイプがあり、粉末タイプの主成分は、カラヤゴム、アラビアゴムなどの天然ゴムの粉末やカルボキシメチルセルロースナトリウム塩であり、クリームタイプは粉末タイプと同様の成分に親水性ポリマーであるポリエチレングリコール、白色ワセリン、流動パラフィンなどが用いられている。⁴ テープタイプはシート状の不織布にクリームタイプと同様の高分子ポリマーや吸水性のあるアルギン酸ナトリウムを吸着させている。⁴ 他方クッションタイプは、酢酸ビニルに溶剤であるエタノールを添加してあり、剥離しやすくなるようにポリプロピレングリコールが添加されているものもある。⁴ 表1に示すように、今回最も取り扱いがしやすかったのは、ポリプロピレングリコールが添加されているクッション型の義歯安定剤であるLDNであり、歯科で義歯に用いている場合と同様、パラフィンブロック裏面からの剥離も容易であった。また、今回我々は、パラフィンブロックに直接義歯安定剤を充填したが、今後診療時に用いたブロックの薄切を行うことを想定すると直接ブロックに充填することはブロックに余分な材料が微量でもとどまるべきではないと考えられる。そのため、ブロックに義歯安定剤を充填する際に義歯安定剤をサララップに包んで使用するなどの工夫をして今後改良すべきと考えられた。また、図1-4に示した結果からは義歯安定剤を用いることで急速にパラフィンブロック温度を低下させることができることが示された反面、統計的にはブロックの20分後の冷却温度に義歯安定剤充填なしと比較して、有意差はいずれの義歯安定剤の充填を行ってもみられなかった。ただし、図1においてTGP以外の義歯安定剤のブロック表面温度の平均値は義歯安定剤なしの状態より、ブロックの冷却開始前と比較して約2℃低くなっているように見える。したがって、今後試行回数をもっと増やして検討することでTGP以外の4剤については有意な温度差が認められるようになるかもしれないため、今後の検討課題であると考えられた。

次に薄切温度について考察する。今回我々はブロック固定台連結型固定台冷却装置を用いてブロックを冷却し続けたことで、義歯安定剤の有無にかかわらず7-9℃でブロックを安定して冷却し続けることができた(図2)。Brittingらは、冷却条件とパラフィンブロック冷却可能温度を報告しているが、その中で、Ice dish(氷冷)は7-8℃、Cold plate(冷却板)では、4℃でパラフィンブロック温度が安定する。⁵ 目的の項でも述べた通り、パラフィンブロックの薄切では事前に氷冷や冷却材で冷やしたブロックであっても冷やしたパラフィンブロックは室温で温められ膨張し切片的厚みが増すとされている。¹ すなわち、氷冷で7-8℃、冷却板で4℃にされたパラフィンブロックであっても、薄切時に冷却ができないと、室温に温められてゆ

ということである。従って、繰り返し同一のパラフィンブロックを薄切しなければならない時は、当初氷冷あるいは冷却板で冷却しておいたパラフィンブロックでも、薄切途中で温度が上がってくると一旦ブロック固定台から外し、パラフィンブロックを冷却しなおして固定台に戻し薄切するという手順を繰り返さざるを得ないという欠点がある。今回特筆すべきは、連続冷却条件下では、温度が一定に保たれていたため、連続薄切時にブロックを外さなくても済んだということである。また、もう一つの特筆すべき点は、連続冷却下では、1µmの厚さでも連続して薄切が可能であったということである(表2)。通常、腎生検検体の薄切には2µm以下が望ましいとされているが、^{6,7} 今回の検討では冷却し続けることで1µmの厚さはパラフィンのみ疑似試料ではあるが、連続切片を確実に作製できた。すなわち、2µm厚の連続切片作製には十分な余力があると考えられた。従って連続冷却下での薄切は特に連続切片作製においては大変有用であることが示唆された。他方、今回用いた市販の冷却装置は、温度管理ができないため、室温の変化によって冷却能力が若干影響されるため、常にエアコンをつけて室温を一定に保つ必要がある。したがってサーモスタット付き冷却装置など、冷却温度が一定に保たれる改良をされた装置が市販されることが望まれる。

V 結語

今回我々はパラフィンブロックの滑走型マイクロトームによる連続薄切には薄切時連続冷却装置の使用が有用であることを示した。また、パラフィンブロック裏面の隙間と冷却装置の間の隙間充填に義歯安定剤を用いると速やかにブロックが冷却できることも示した。

VI 謝辞

本研究は、AMEDの課題番号JP18ek0109326h0001の支援を受けた。

利益相反

いずれの著者についても開示すべき利益相反はない。

引用文献

1. 鴨志田伸吾, 大河戸光章. ユング型マイクロトーム(逆V字型)を用いた薄切の実際. 松原修, 鴨志田伸吾, 大河戸光章ら(編), 最新臨床検査学講座 病理学/病理検査学. 東京: 医歯薬出版, 2016.
2. 吉田美穂, 倉岡和矢, 菅亜里紗ら. 組織切片自動作製装置の薄切精度向上への取り組み. 医療 2017; 71: 256-263.
3. 服部 進, 末吉徳芳. ローターマイクロトームの使い方. 検査と技術 1979; 8: 643-650.

4. 高橋英和. 義歯安定剤の種類と性質. 補綴誌 2003; 47: 474-483.
5. Brittig, F, Weinkauff, P, Karchner, H. Ideal cooling process for paraffin-embedded tissues. Pathol Oncol Res 2004; 10: 172-173.
6. 鴨志田伸吾, 大河戸光章. 腎糸球体基底膜の染色法. 松原修, 鴨志田伸吾, 大河戸光章ら (編), 最新臨床検査学講座 病理学/病理検査学. 東京: 医歯薬出版, 2016.
7. 山中宣昭. 腎生検に必要な各種染色法. 日本腎臓学会人病理診断標準化委員会日本人病理協会 (編), 腎生検病理アトラス. 文京区, 東京都: 東京医学社, 2010, 21-29.

Denture Adhesive Used as Gap Filler when Using a Cooling System Installed Microtome: Effects on Preparation of Thin Serial Sections

Masanao Saio¹, Mizuho Hatori¹, Syunichi Moriya¹, Mana Ogawa¹, Hiroyu Hotoyama¹, Misa Fujimori¹, Yuri Nomi¹, Sayaka Kobayashi¹ and Kiminori Kimura²

1 Department of Laboratory Sciences, Gunma University Graduate School of Health Sciences, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8514, Japan

2 Department of Hepatology, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center, Komagome Hospital, 3-18-22 Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8677, Japan

Abstract

Objectives: We evaluated the usefulness of a cooling system and the use of denture adhesive (DA) as a gap filler in preparing thin serial sections with a sliding microtome.

Methods: We prepared paraffin blocks alone (i.e., no patient sample) and initially examined how DA affected paraffin block cooling by the cooling apparatus. Then, we examined how thin serial sections could be prepared using the cooling system installed in the sliding microtome.

Results: With DA, differences in the block surface temperature between 0-5 min and between 0-20 min after cooling were significantly larger than that without DA, although the block temperature (20 min) was not significantly different with or without DA. Additionally, the cooling system installed in the microtome enabled the generation of 1 μ m-thick serial sections.

Conclusions: In daily pathology practice, we typically pre-cool blocks using an ice plate or a cooling equipment, but we do not cool the block during sectioning. This condition sometimes leads to difficulty in preparing serial sections. To solve this problem, a cooling system was installed in the microtome.

Key words:

Pathological examination technology,
Microtome,
Paraffin block cooling during sectioning,
Serial sectioning,
Denture adhesive
