

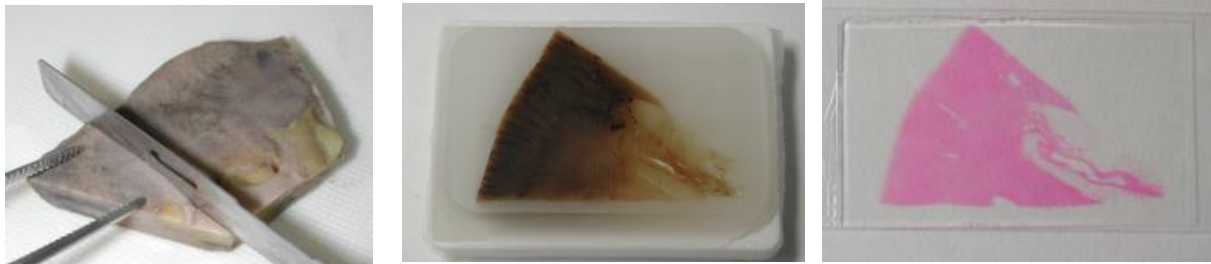
組織マイクロアレイ標本の簡便な作製法

京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター
○國領久美子, 長井秀樹, 谷口久美, 阿比留仁, 戸田好信
qkokuryo@cas.med.kyoto-u.ac.jp

1. 光学顕微鏡標本作製法

通常、光学顕微鏡標本は取り出した臓器の変性を防ぐため、10%ホルマリンで1週間ほど臓器を固定し硬化させた後に、正常と病変部を含む組織部分を切り出して、パラフィンという樹脂に埋め込みパラフィン包埋ブロックにする。包埋ブロックとは溶けたパラフィン液に組織を入れて、冷却硬化させたもので、パラフィン液が入った金型中央に組織を入れて沈め、プラスチックの台座を被せ、冷やし固めた後に金型から取り出すとパラフィン包埋ブロックが完成する。次に、このブロックを $3\mu\text{m}$ の厚さに薄切し、プレパラートに貼付、一晚乾燥させた後、顕微鏡で観察する為の染色を施し、標本が完成する(Fig.1)。

従って固定時間を除いても、組織の切り出しから薄切標本作製までに4日間、その後の一般染色(HE染色)で1日間、特殊染色なら2日間必要で、標本作製には計5~6日間掛かることになる。



固定後組織の切り出し → パラフィン包埋ブロック → 光学顕微鏡標本 (HE 染色)

Fig.1 光学顕微鏡標本作製の流れ

2. その問題点と解決法

このように標本作製には手間が掛かるため、約50検体の標本を作製するだけで1週間、さらにそれらを観察・解析する時間まで含めると20日間は必要となる。一本の論文に200~500検体のデータ解析が求められる現在、通常の標本作製方法では、多大な労力と時間が費やされることとなり、迅速な解析結果は出せない。

しかし実際のところ、標本は顕微鏡で100~400倍に拡大して観察するので解析に必要な組織部分は、小さくても充分で大部分の組織は必要ない。不要な部分が含まれるのは、切り出し時に必要部分を外さないように大きく組織を切り取るためである(Fig.2)。

必要な部分のみを1枚のプレパラートに集めた標本を作製すれば、多数の検体を1枚で観察・解析でき、時間と手間の短縮が可能になる。



Fig.2 必要な組織部分をマーキングした標本

3. 組織マイクロアレイ (TMA) 標本とは

20 世紀末から開発が進んだ DNA マイクロアレイは、多数のプローブを固定したプレパレートを用いて一度に大量の DNA、RNA を検出、定量する方法で、このプローブを組織に置き換えて 1 枚のプレパレートに多数の組織を配列したものが、1998 年に米国で発表された組織マイクロアレイ (TMA) 標本である¹⁾。

すでに TMA 作製専用器械や多数の標本が販売されているが、それらはいずれも非常に高額で、実験や試行錯誤を繰り返し結果を出してゆく研究の現場では大量に使用することが難しいのが現状である。そこで我々は TMA 標本を簡便に作製することを試みた。

4. 通常方法での TMA 標本作製

まず多数の微小组織をすべてパラフィン液の中に並べて包埋したが、液の中で組織が倒れたり、移動したりで配列の乱れたブロックとなってしまった。いったん金型の底面冷やし、硬化しつつあるパラフィンに組織を並べて埋め込む方法では、組織を並べている間にパラフィンの硬化が進行してしまい、すべての組織を観察可能なかたちで包埋することができなかった。

通常法では、小さめに切り出した組織を 6 個並べたブロック標本を作製するに留まり、500 検体の解析時間を大幅に短縮するまでにはいかなかった(Fig.3)。

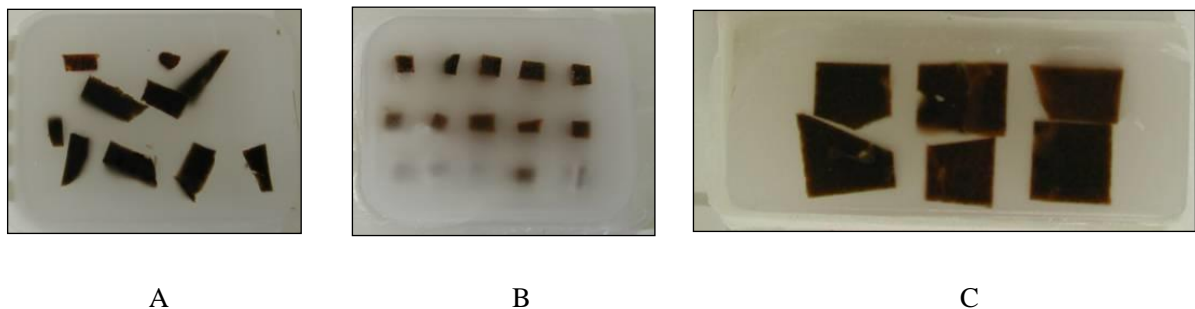


Fig.3 通常方法で試みた多数組織のブロック

A: 組織配列の乱れたブロック B: 包埋途中で硬化したブロック C: 最終的に出来たブロック

5. 今回試みた TMA 標本作製法

これらの失敗を踏まえ、今回は多数の穴を開けたパラフィン台に必要な組織を差し込み、そのままパラフィン台と共に包埋する方法で TMA 標本ブロックを作製した。

まず金型の底面より少し小さくパラフィンを板状に固め、このパラフィンに生検で用いる直径 2mm の punch biopsy で 12 穴×4 列、計 48 個の穴を規則正しく開けたパラフィン台を作製した(Fig.4)。

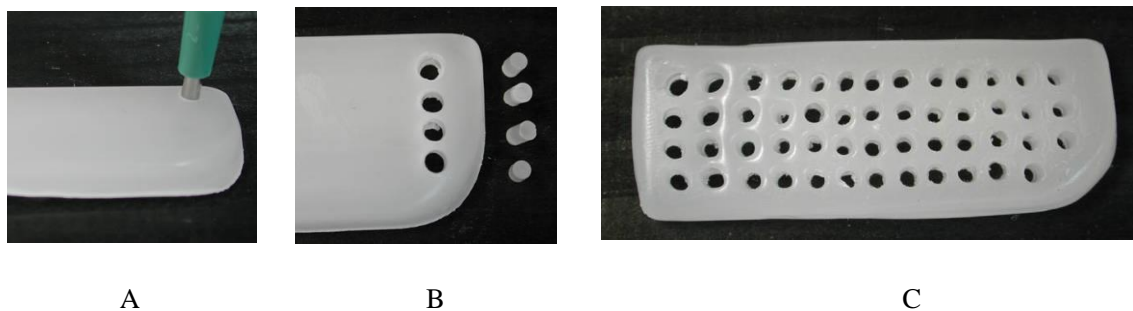


Fig.4 パラフィン台の作製

A: 板状パラフィンに punch biopsy を突き刺す B: punch biopsy で開けた穴と抜き取ったパラフィン C: 完成したパラフィン台

次に HE 染色標本を観察して必要な組織を確認した後、その標本のブロックから対応する組織部分を同じく直径 2mm の punch biopsy で抜き取った。この抜き取った組織を先ほど作製したパラフィン台の穴に一つずつ差し込んでいき、すべての穴を埋めていく (Fig.5)。

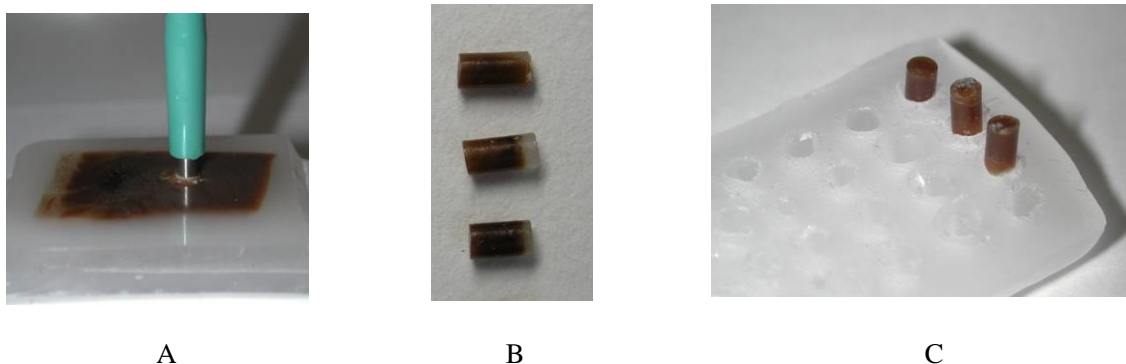


Fig.5 組織をパラフィン台に差し込む

A : 組織ブロックに punch biopsy を突き刺す B : 抜き取った必要組織 C : 組織をパラフィン台に差し込む

穴が埋まったら、そのまま金型にパラフィン台ごとに入れて、上からパラフィン液を流し込む。台に使用したパラフィンと流し込むパラフィンは元々同じものなので、すぐ一つに馴染んだ。プラスチックの台座を被せて冷やし固めて金型から出すと、48 個の組織が整然と並んだ TMA ブロック標本が完成した (Fig.6)。

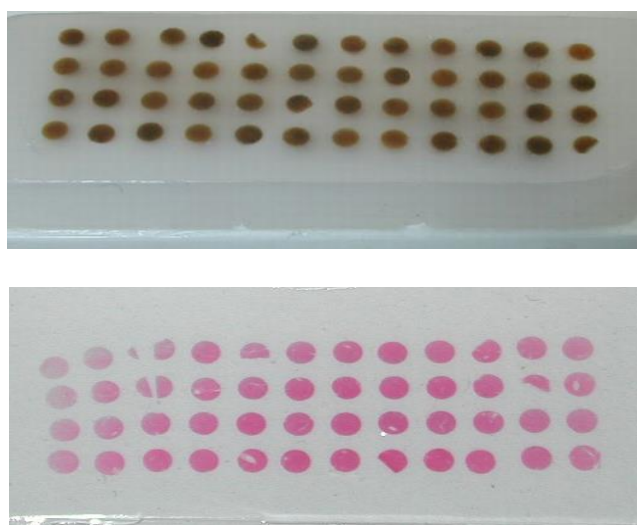


Fig.6 今回作製した TMA 標本 上 : ブロック 下 : HE 染色標本

今回の方法は、組織と同じ大きさの穴が開いたパラフィン台に組織を差し込むことで、組織が倒れることも移動することもなく、また一度に 48 個を同時に包埋できたのですべての組織が観察可能な標本となった。そして、予め HE 染色標本を観察してから必要な部分を抜き出すことで、極めて選択性が高い必要部分だけが配列した TMA 標本を作ることができた。

6. TMA 標本の可能性

多数の組織を配列可能な TMA 標本を用いれば、人体の全臓器組織を 1 枚のプレパラートに並べ、1 枚で人体すべてを観察できる標本を作製することも可能である。また、悪性腫瘍を組織別や、分化度

の高低別など、様々な配列に組み合わせれば、短時間で多くのスクリーニングを行えるようになり、実験解析の迅速化にも役立つと考えられる。

今回の簡便な方法で作製した TMA 標本は、1 枚のプレパラートで約 50 検体が観察可能であり、予め HE 染色標本で確認した必要な組織部分のみを並べた選択性の高い TMA 標本となった。さらに市販のプレパラートは違い、自ら組織配列を自由に組めるので、解析方法に最も適した TMA 標本を作り上げることが可能である。また、今回の方法では TMA 標本をブロックから作製するので、それを薄切するだけで何百枚のも TMA 標本を量産できる。この方法を活用すれば、多様な TMA 標本を研究現場へ安価で大量に供給でき、多くの分野で貢献できると考えられる。

また現在、TMA 標本は大学や研究室での利用が主であるが、今回の作製方法は特別な器具必要としないので、病院検査室などでの TMA 標本作製も可能である。今後、TMA 標本の活用が検査の現場へも広がっていけば、検査の効率化、迅速化などにも役立つと思われる。

7. 参考文献

- 1) Kononen, J. et al. : Nature Med., 4 : 844-847, 1998