

題目：液体凍結法評価の為の細胞組織観察

目的及び内容：液体凍結法による食品の保存状態を評価する為、サンプルの凍結方法に関する指導及び細胞組織観察に基づく有効性について助言をする。

実施日：2019年11月1日（金）

実施場所：富田商事株式会社及び名古屋大学医学系研究科腫瘍病理学実験室

当日参加者：富田文雄様（富田商事株式会社）、松山豊様（公益財団法人あいち産業振興機構）、浅井直也（藤田医科大学）、牛田かおり（名古屋大学）

1. サンプルの選定

- ・ 冷凍操作のない生魚（鮭、ぶり）で実験のシミュレーション
 - ・ 輸出用として和牛も同様に検討
- 今回は鮮魚には生鮭、和牛をサンプルとして使用

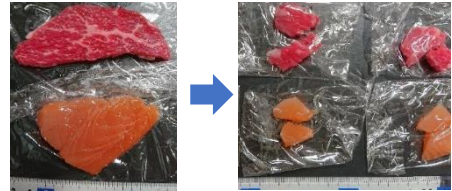


写真1.

2. 実験の方法

- ① サンプルを約 10 mm × 10 mm × 5 mm にスライスする。

（写真1.）

サンプル1、2に分ける。

- ② サンプル1：ラップにくるみ名大冷凍庫にて凍結2時間（写真2.）

サンプル2：真空保存フードシーラー専用ロール（kitchenBoss）・脱気シーラー（Crenova）を用い真空パック後（写真3.）、ReCella80にて6分間攪拌しながら凍結。

- ③ 凍結後のサンプル2をクライオポーターに入れ名大まで搬送。



写真2.



写真3.

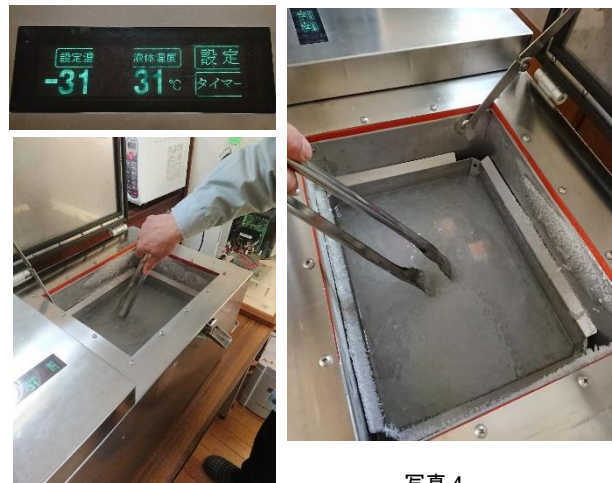
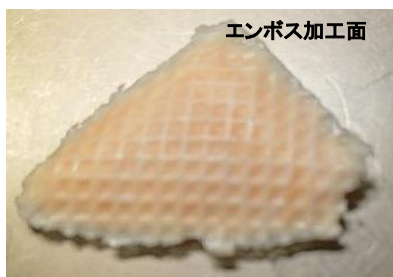


写真4.

④ 凍結切片作製 (ReCella80 凍結 生鮭)



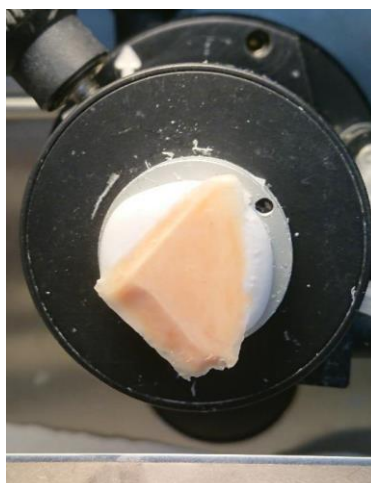
1. ReCella80 凍結真空パック



2. 真空パックから組織を取り出す



3. 試料台に OCT で凍結接着



3. クライオスタットに装着



3. 凍結薄切

ReCella 凍結和牛・家庭用冷凍庫凍結生鮭・家庭用冷凍庫凍結和牛も同様に凍結薄切後 HE 標本作製

※参照



ReCella80 凍結 和牛



家庭用冷凍庫凍結 生鮭



家庭用冷凍庫凍結 和牛

⑤ 凍結 HE 標本作製

薄切した切片 (④-3) をスライドガラスに転写する

→ 10%中性緩衝ホルマリン液+99.5%エタノール等量混合液に 1 分間浸漬

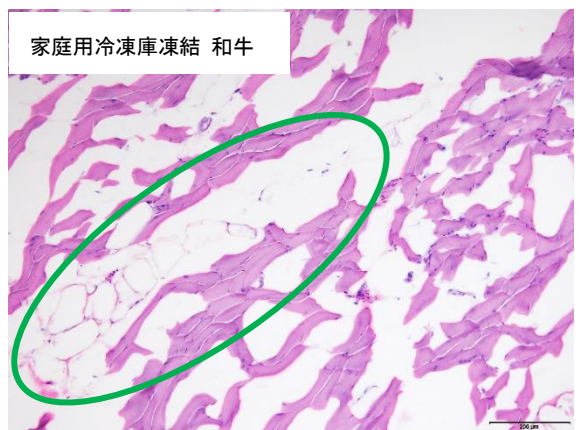
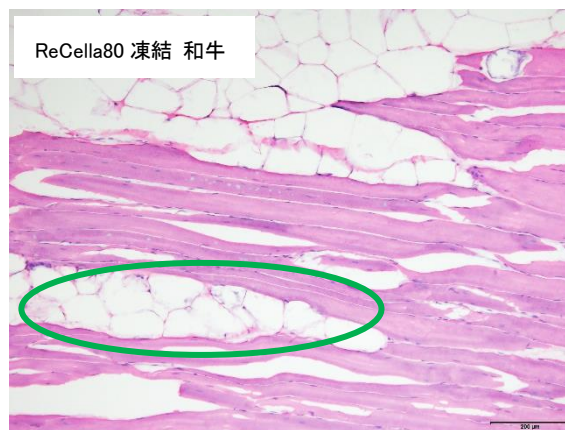
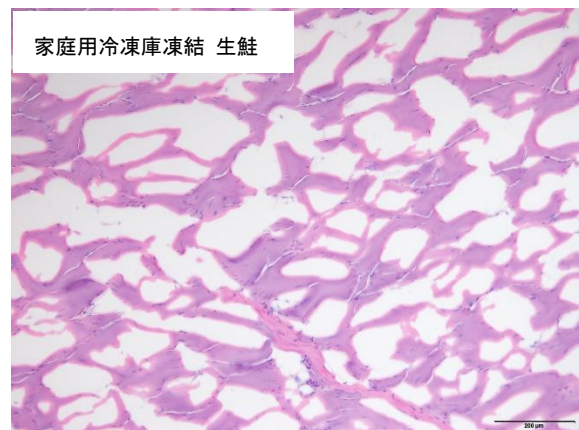
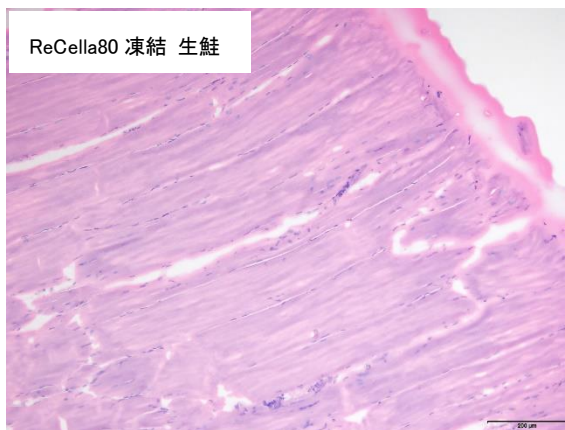
→ 軽く水洗後、ヘマトキシリン染色液にて 1 分染色

→ 10 分間流水水洗 → エオジン液数秒 → アルコール、キシレンにて脱水透徹

→ カバーガラスを封入剤にて接着させ乾燥



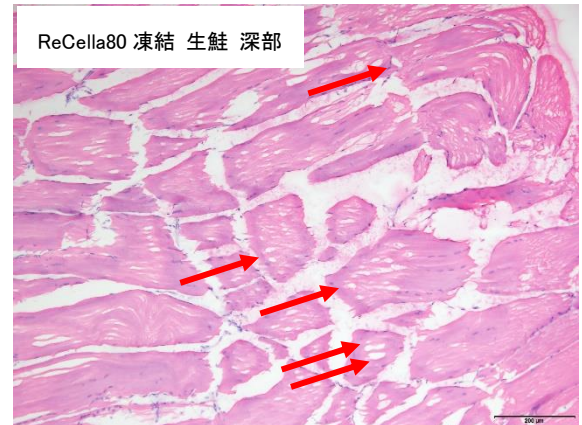
⑥ 結果



- 生鮭・和牛ともに、ReCella80 凍結では骨格筋組織の構造が保たれているが、家庭用冷凍庫を用いた凍結では氷晶形成により組織の構造が崩れている。
- 和牛脂身（緑丸）部分が、ReCella80 凍結標本では、脂肪組織の網目構造が保たれているが、家庭用冷凍庫凍結では網目構造が崩れている。



- ReCella80 凍結の場合も深部へ切り進めると表層部分と比較して、氷晶形成が目立つようになる。



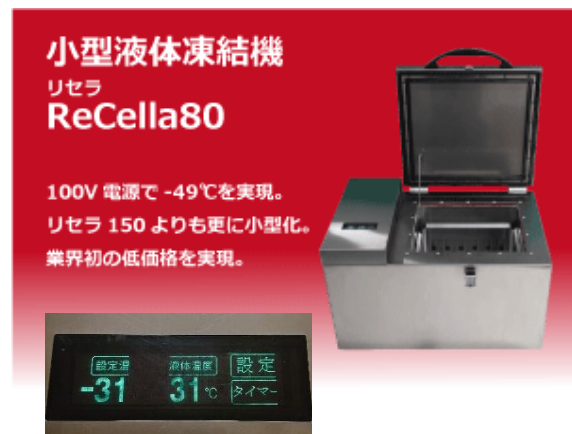
- 真空パックすることにより清潔に凍結可能。空気の層を形成しないため熱効率が良い。
- 今回使用した真空パックフィルムはダイヤモンドエンボス加工のため、より凍結効率がよかった？
- マグネチックスターラーを ReCella に搭載しスラリーを常時攪拌することで、さらに凍結効率が上がることが期待できる。

※今回使用した装置及び条件

(株)アルバネクス様分

小型液体急速凍結機

- ・ 型番：NLF-80N
- ・ 品名：ReCella80 (リセラ 80)
- ・ 製造元：アルバネクス株式会社
- ・ ReCella80 設定温度：-31°C
- ・ 冷媒温度：-31°C
- ・ 凍結時間：約 6 分間



名古屋大学分

クライオポーター

- ・ 型番：PINO-600
- ・ 品名：ヒストテック・ピノ
- ・ 製造元：サクラファインテックジャパン株式会社
- ・ 設定,実測温度とも -75°C



凍結マイクロトーム

- ・ 型番：CM3050SIV
- ・ 品名：リサーチ用高機能クリオスタット
- ・ 製造元：ライカバイオシステムズ株式会社
- ・ 試料温度 -17°C、庫内温度 -17°C



生物顕微鏡

- ・ 型番：OLYMPUS BX53
- ・ 製造元：オリンパス株式会社
- ・ 画像取得：イメージングソフトウェア OLYMPUS CellSens Standard

- ・ スライドガラス：MAS01 (MATSUNAMI)
- ・ カバーガラス：NEO MICRO COVER GLASS (MATSUNAMI)
- ・ 替刃：サージパス DB80 (ライカバイオシステムズ)

※今回使用した試薬

(株)アルバネクス様分

- ・ 冷媒：梅酒果実酒用 HOKURIKU ホワイトリカー35% 焼酎甲類 (アルコール度数 35%)
- ・ 製造元：北陸醗酵工業株式会社

名古屋大学分

- ・ 10%中性緩衝ホルマリン液 (ナカライテスク)
- ・ エタノール (関東化学)
- ・ ヘマトキシリン染色液：ヘマトキシリン (メルクミリポア社)、エタノール (関東化学)、
ヨウ素酸ナトリウム (Wako)、硫酸カリウムアルミニウム 12 水 (Wako)
- ・ エオジン染色液：エオジン (メルクミリポア社)、塩酸 (Wako)、エタノール (関東化学)
- ・ キシレン (Wako)
- ・ 封入剤：エンテランニュー (メルクミリポア)

※用語

- ・ **OCT コンパウンド**：“Optimal cutting temperature compound” ミクロトームクライオスタットで凍結切片化する際に組織サンプルを埋め込むための包埋剤。ポリビニルアルコールなどのポリマーで構成される。今回の実験ではコンパウンドの影響を避けるため埋め込むことはせず、サンプルと試料台との接着にのみ使用。
- ・ **クライオスタット**：凍結組織切片作製装置。組織を凍らせた状態で数 μm の厚さに薄切する装置。今回の実験では、庫内温度 -17°C 、試料温度 -17°C の条件で 10 μm の厚さにスライス。
- ・ **HE 標本**：ヘマトキシリンとエオジンの2種類の色素を用いて細胞核と核以外の組織成分を青藍色と赤色とにコントラストよく染め分ける染色法。病理組織学的診断のファーストステップで必要となる基本的な染色法。
- ・ **マグネチックスターラー**：磁力を利用する攪拌(かくはん)機。攪拌子とよばれる樹脂で覆われた棒磁石を容器の中に入れ、誘導電動機と同様の原理により、外部からの磁場をかけて、長時間、攪拌子を回転させて液体などを攪拌する。