

# 新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製の一改良法： 骨格筋線維の人工的収縮抑制法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8791">http://hdl.handle.net/2297/8791</a>

## 新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製の一改良法

## —骨格筋線維の人工的収縮抑制法

金沢大学医学部解剖学第三講座

高 橋 暁

金沢大学医学部神経情報研究施設

(神経物性研究部門) (主任: 中村俊雄教授)

鳥 越 甲 順

中 村 俊 雄

(昭和54年8月23日受付)

1938年, Linderstrøm-Lang<sup>1)-2)</sup>らによってクリオスタットが創案されて以来, 短時間で標本作製可能なこと, 酵素活性の保存が良好なことなどから, クリオスタット切片法は組織学や組織化学領域で広範に利用されてきた. 特に骨格筋については, 骨格筋を構成する個々の筋線維の酵素組織化学的特性が, 筋の機能に密接な関連があることが知られ, 現在は, 筋線維型の分類や筋病理学にクリオスタット切片作製は必須のものとなってきている<sup>3)-6)</sup>. ところで, クリオスタット切片作製法として, 一般的な方法は, まず材料を急速に凍結させ, その材料をクリオスタット内(-15°C~-25°C)で, 通常5 $\mu$ から30 $\mu$ の厚さに切り, その切片をカバーガラスに載せ, 切片を載せた反対側からカバーガラスに指頭を当てて切片を融解させ, 切片をガラスに付着させた後, カバーガラスと共に切片をクリオスタットから取り出す方法である. 新鮮骨格筋の場合, 横断切片については, このような方法で, ほとんど支障はないが, 縦断切片の場合は, 切片融解時に起こる筋線維の収縮のため, 筋線維に断裂や「くびれ」などの人工的変形が生ずる. このような変形は, 骨格筋の組織学的検索のみならず, 病理学的診断, 神経筋接合部の検索や支配神経の終末分布の追究に著しい支障を来している.

われわれは, 上記の支障を寒天溶液を塗布したカバーガラスを使用すること, 4°Cでホルマリン蒸気を

作用させることによって抑制する簡便な方法を案出したので報告する.

## 材 料 と 方 法

材料として, ddN系マウス前脛骨筋を用いた. まず緒言で述べたような通常のクリオスタット切片作製法により, 前脛骨筋の縦断切片を作製し, ヘムアラウム・エオジン染色(以下「H-E染色」と略記)とアセチルコリンエステラーゼ活性検出法(以下「AchE法」と略記)を施して鏡検し, クリオスタット切片融解時における収縮による筋線維および神経筋接合部の変形を観察した. 次ぎにそれらの標本を対照とし, 標本作製操作のうち, 凍結切片をカバーガラスに接着させる段階と, 凍結切片を融解させる段階の2点について, 種々の改善を試み, 筋線維の変形が最少になる条件を調べた. その結果得られた至適操作法を次に記載する.

## 1. 材料の凍結と薄切

頸椎脱臼によって屠殺したマウスから, 直ちに前脛骨筋を, 起始から停止の全長にわたって取り出し, 濾紙を敷いた腎臓あるいは肝臓片の上に載せ, その上からO. C. T. Compound液(Lab-Tek・三共製)をかけ, 次いで, 濾紙の下面にもO. C. T. Compound液を塗り, あらかじめクリオスタット(サクラ・コールドトームCM-41型)中で冷した金属製ブロック台(-35°C以下)上に濾紙と共に材料を載せる. クライオ

An improved method for the preparation of frozen longitudinal sections of the fresh skeletal muscle - The procedure of inhibiting artificial contraction in skeletal muscle - Akira Takahashi, Kojun Torigoe & Toshio Nakamura, Department of Anatomy & Department of Biophysics, Neuro-Information Research Institute (director: Prof. T. Nakamura) School of Medicine, Kanazawa University.

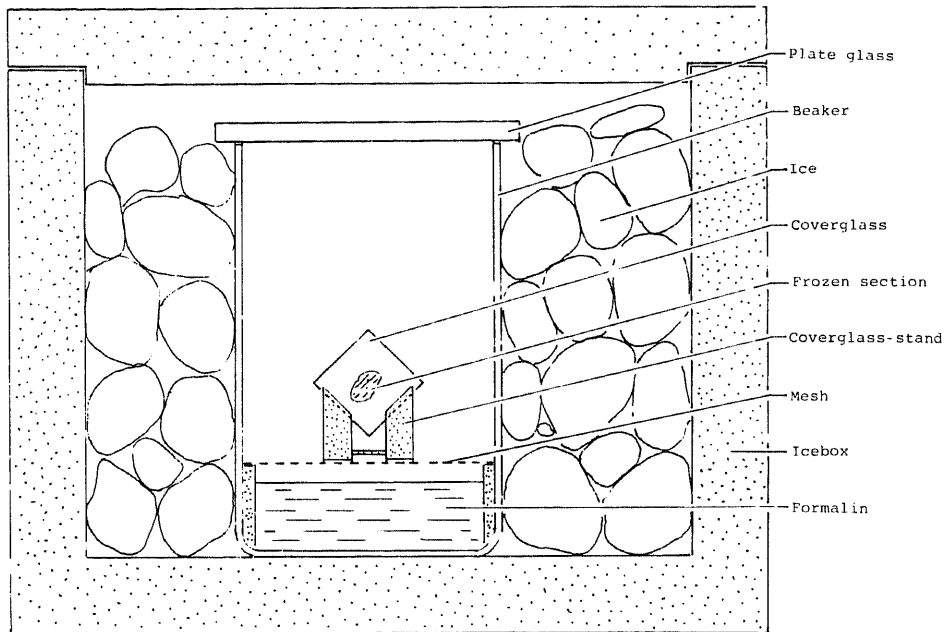


図1 低温でのホルマリン蒸気固定装置の模式図

ン・スプレー（日酸商事製）で材料を急速に凍結させ、30分間放置後、 $-20^{\circ}\text{C}$ で $15\mu$ または $30\mu$ クリオスタット切片を作製する。

#### 2. クリオスタット切片のカバーガラスへの付着

あらかじめ、 $65^{\circ}\text{C}$ に保った寒天水溶液を用意し、それにカバーガラスを瞬時浸してから、 $37^{\circ}\text{C}$ で1晩乾燥後、クリオスタット中で冷やしておく。

この寒天塗布のカバーガラスで、薄切されてマイクロトームの刀上に載った切片を上から圧迫し、カバーガラスに切片を付着させる。

#### 3. ホルマリン蒸気中でのクリオスタット切片の融解

あらかじめ、ホルマリン原液（ホルムアルデヒド含量約30%）を底に入れたピーカーをアイスボックスで冷やしておき（図1）、カバーガラスに付着させた、なお凍結状態にある切片を手早く、この中に移して蓋をし、約1分間放置後、取り出す。

#### 4. 切片の乾燥

取り出した切片をヘア・ドライヤーで室温約1分間乾燥後、室温で保存する。

#### 5. 染色

##### i) ヘムアラウム・エオジン染色（H-E染色）

切片をカルノア液（エタノール60ml、氷酢酸10ml、クロホルム30ml）で5分間固定後、100%エタノールに1分間浸してから蒸留水に移す。以下、常法に従

ってH-E染色を行ない、エタノール脱水-キシロール透徹-バルサム封入をする。

##### ii) アセチルコリン・エステラーゼ検出法（AchE法）

Karnovskyら<sup>7)</sup>の方法の著者の変法によった。すなわち、 $30\mu$ クリオスタット切片を10%ホルマリン0.9%食塩水溶液で室温30分間固定後、0.9%食塩水で1分間洗滌し、基質液[1/7Mペロナル・酢酸塩緩衝液(pH5.5)6.0ml、0.1Mクエン酸ナトリウム水溶液0.5ml、30mM硫酸銅水溶液1.0ml、5mM赤血塩水溶液1.0ml、 $10^{-4}\text{M}$ DFP 0.9%食塩水溶液1.0ml、ホルマリン0.5ml、沃化アセチルチオコリン5mg]に $37^{\circ}\text{C}$ 10分間浸漬し、蒸留水で1分間水洗後、ヘムアラウムで1分間後染色し、エタノール脱水、キシロール透徹後、エンテラン（和光純薬）に封じた。

#### 成 績

通常のクリオスタット切片作製法によって作製した骨格筋の横断像（写真1.2）はパラフィン切片の場合に比して、筋線維の収縮が少ないため、隣接筋線維間には、ほとんど隙間が認められない。クリオスタット切片の融解時に起る筋線維収縮に基づく変形は、横断切片では、ほとんど見当たらない（写真1.2）。筋紡錘を構成する筋線維にも変形は見られない（写真2）。

写真1.2の標本と同じ方法で作製した骨格筋の縦断

切片では、写真3,4のように、切片の融解時におこる筋線維の収縮のため、筋線維に断裂や「くびれ」、過収縮などの著しい変形が認められる。1本の筋線維を見ても、強く引伸ばされた部位と逆に強く収縮した部位が認められる(写真4)。従って、横紋間距離(筋節)は、部位によって長短さまざま、著しく不均一である(写真4)。また筋線維の太さも、引伸ばされたところでは細く、逆に収縮したところでは太くなっている(写真4,5)。強く収縮した部位では、筋線維の縦方向に長軸を有していた楕円形の核が球形さらには、横方向に長い楕円形を呈している(写真4)。AchE法で神経筋接合部を検出すると、写真5のように、筋線維の断裂や変形に伴って、その位置と形の変化が認められる。特に強く収縮した筋線維の部分に位置する神経接合部では、神経筋接合部は縮小し、鹿の角状を呈する内部構造は識別しにくい(写真5)。逆に強く伸展された部位では、神経筋接合部も伸展している。

今回の著者の改良法で、縦断切片を作製した結果を写真6~8に示した。断裂や「くびれ」などの変形はほとんど見られず(写真6)、横紋間距離も筋線維の太さも一様で、かつ、核の変形も見られない(写真7)。AchE法標本でも、神経筋接合部の分布と構造に、変化は認められず、鹿の角状の樹枝分岐も明瞭に認められる(写真8)。

## 考 察

新鮮骨格筋のクリオスタット切片は、正常のみならず、種々の筋疾患、神経性筋疾患の検索、特に組織化学的検索に広く用いられている<sup>9)</sup>。一般には、横断切片が用いられているが、各筋節内でグリコーゲンのように分布差のあるものの検索、変性あるいは再生筋の検索、神経筋接合部や支配神経の検索には、縦断切片が必要になってくる。しかし前述のように、通常の方法では、凍結切片融解時の筋線維収縮により、著しい人工的変形が生じ、検索時に著しい支障を来している。そのため、縦断切片のみパラフィン包埋切片を作製するとか、2~5 $\mu$ 程度の薄い切片を作製し、収縮が進行する前に迅速にヘア・ドライヤーで乾燥するなどの彌縫策が一般にとられている。ところが神経筋接合部の全体像を観察する場合のように、30 $\mu$ 前後の厚い切片を必要とする場合が、しばしばある。そのような場合、一旦固定した骨格筋から、凍結切片を作る方法があるが<sup>9)</sup>、biopsy材料のようなごく限られた量の材料では、材料を一旦固定すると多目的の検索に支障を来して、

また、一旦固定した材料は、凍結時に氷晶が出来易

く、かつ薄切した切片をカバーガラスに付着させることもむつかしくなり、いきおい操作の困難な浮遊法による染色を行なわねばならない。

凍結切片融解時の筋線維の収縮を顕微鏡下で観察すると、早くガラスに付着した部分が支点となって筋線維が収縮し、2支点間で筋線維が引張られ、しばしば途中で断裂する。それでAdamstoneら<sup>9)</sup>の推奨したような、凍結切片を凍ったまま、直接、固定液に投ずる方法を用いると、切片は全体として収縮し、筋線維の断裂は防げる。この方法だと、切片は固定液中に浮遊しているので、以後染色操作は著しく困難になり、連続切片の作製などは不可能に近い。

上述の諸点を考慮して、まず凍結切片を凍らせたまま、カバーガラスに付着させる方法を検討した。凍結切片に暖かいカバーガラスを接着させると、切片はガラスに容易に付着するが、-20°Cに冷やしたカバーガラスでは切片は付着して来ない。Suzuki<sup>10)</sup>が報告したgelatin塗布ガラスを用いても、-20°Cでは切片を付着させることはできなかった。カバーガラスにセロイジン、アラビヤゴムなど10数種の塗布を試み、低温での切片で接着効果を調べた結果、0.3%寒天溶液を塗布したものが、最も接着効果があったので、これを用いた。

次に、凍結状態のまま切片を固定することを考え、最初に-20°Cでホルマリン蒸気固定を試みたが、固定中に筋線維の乾燥による人工産物が生じたので、前述のように4°Cで1分間、ホルマリン蒸気中で、切片を、ゆっくり融解させ、固定と同時に、切片をガラスに密着させた。この方法で作製した切片がカバーガラスから別離することはなく、連続切片も容易に作製できた。

今回、報告した新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製についての改良法は、特殊な試薬や装置を必要とせず、至って簡単な方法なので、骨格筋の縦断凍結切片を必要とする検索に広く応用できると考えられる。またこの方法は、alkaline phosphataseなどホルマリン蒸気固定で、あまり活性に影響のない酵素の組織化学的検索やコリンエステラーゼ活性検出法を用いる神経筋接合部の研究<sup>11)</sup>などにも有用であろう。

## 結 論

新鮮骨格筋の凍結縦断切片作製中に出現する筋線維の人工的収縮を抑制する方法を考案した。この方法の要点は、クリオスタット切片を、融解させずに、冷やした寒天塗布カバーガラスに付着させ、次いで4°Cに冷やしたホルマリン蒸気中で1分間切片を固定と同時に融解する点にある。

この方法によって、凍結切片融解時におこる、筋線維の収縮に基づく、断裂、くびれなどの変形や、随伴しておこる神経筋接合部の変形は、ほとんど抑制される。

この方法は、至って簡単で、正常および病的骨格筋の縦断切片の組織学的ならびに組織化学的検索に広く応用できるであろう。また、コリンエステラーゼ活性検出法を用いる神経筋接合部の研究にも有用であろう。

稿を終るに臨み、本研究に有益な御助言を賜った、本学解剖学教室本陣良平教授に謝意を表します。

### 文 献

- 1) Russell, W. O., Chang, J. P. & Ibanez, M. L. : Cryostat frozen section and freeze substitution techniques. p2, The American Society of Clinical Pathologists. 1961.
- 2) Linderström-Lang, K. & Mogensen, K. R. : Studies on enzymatic histochemistry. XXXI. Histological control of histochemical investigations. Compt. Rend. Trav. Lab. Carsberg. Ser. chim., 23, 27-35 (1938). (Russellら1961より引用)
- 3) Engel, W. K. : The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurol.*, 12, 778-794 (1962).
- 4) Stein, J. M. & Padykula, H. A. : Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Amer. J. Anat.*, 110, 103-124 (1962).
- 5) 中村俊雄 : マウス外眼筋の神経筋接合部と筋線維型の構造特性に関する組織化学的研究. 十全医会誌, 85, 526-545 (1976).
- 6) 宇尾野公義 : 筋肉病学 (里吉・豊倉編), 180-210頁, 東京, 南江堂. 1973.
- 7) Karnovsky, M. J. & Roots, L. : A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 219-221 (1964).
- 8) Coërs, C. & Woolf, A. L. : The innervation of

muscle. A biopsy study. p.8, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1959.

- 9) Adamstone, F. B. & Taylor, A. B. : The rapid preparation of frozen tissue sections. *Stain Technol.*, 23, 109-116 (1948).
- 10) Suzuki, H. : Usefulness of gelatin-coated slides in preparation of frozen sections for diverse histochemical method. *Acta Histochem. Cytochem.*, 8, 78 (1975).
- 11) Namba, T., Nakamura, T., Takahashi, A. & Grob, D. : Motor nerve endings in extraocular muscles. *J. Comp. Neurol.*, 134, 385-396 (1968).

### 写 真 説 明

H-E : ヘムアラウム・エオジン染色, AchE :

アセチルコリンエステラーゼ検出法.

- 写真1. 新鮮骨格筋の凍結横断切片. 常法による. 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  100.
- 写真2. 新鮮前脛骨筋の凍結横断切片. 矢印は筋紡錘を示す. 常法による. 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  400.
- 写真3. 新鮮骨格筋の凍結縦断切片. 常法による. 筋線維に「くびれ」(上向き矢印)や過収縮(下向き矢印), さらに筋線維の断裂が認められる. 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  100.
- 写真4. 写真3の拡大像. 上向きの矢印は, 筋線維が強く引伸ばされて細くなった部位を下向きの矢印は, 過収縮部の筋線維の核を示す. この核は, 縦方向に長い本来の核が著しく変形している. 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  400.
- 写真5. 新鮮骨格筋の凍結縦断切片. 常法による. 神経筋接合部も筋線維の変形に随伴して形を変え, 強く収縮している部に存在する神経筋接合部(矢印)は著しく縮小している. 30 $\mu$ , AchE.  $\times$  100.
- 写真6. 新鮮骨格筋の凍結縦断切片, 著者の改良法による. 筋線維の変形は, ほとんど認められない. 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  100.
- 写真7. 写真6の拡大像. 横紋間距離は均一で(下向き矢印), 筋線維の核は, 縦に長い楕円形を呈している(上向き矢印). 15 $\mu$ , H-E.  $\times$  400.
- 写真8. 新鮮骨格筋の凍結縦断切片. 著者の改良法による. 矢印で神経筋接合部を示す. 筋線維ならびに神経筋接合部にほとんど変形は認められない. 30 $\mu$ , AchE.  $\times$  100.

**An Improved Method for the Preparation of Frozen Longitudinal Sections of the Fresh Skeletal Muscle —The Procedure of Inhibiting Artificial Contraction in Skeletal Muscle** — Akira Takahashi,\* Kojun Torigoe\*\* & Toshio Nakamura,\*\* Department of Anatomy\* & Department of Biophysics,\*\* Neuro-Information Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, 88, 617—622(1979).

**Abstract** A method for obtaining frozen longitudinal sections of the fresh skeletal muscle without contraction artifacts was described. The essential feature of the method involves the mounting of the frozen sections on chilled coverslips previously coated with agar in order to prevent sections from thawing, and the simultaneous fixing and thawing of the frozen sections in formaldehyde vapour at 4°C for one minute.

By this method, the damages of muscle fibers such as tearing and constriction, and also the deformation of neuromuscular junctions were fully inhibited.

As the procedure is simple and easy, this method is considered widely applicable to histological and histochemical investigations of the longitudinal sections of the skeletal muscle fibers taken from the normal as well as pathological subjects. This method may also be useful for the study of the neuromuscular junction combined with the cholinesterase technique.

