

腎生検標本は液体窒素凍結をしよう

重井医学研究所免疫部門

佐渡義一

腎生検は腎臓病の診断に欠かせない方法となっている。重井医学研究所では遺伝性腎症であるアルポート症候群の診断のため、凍結切片が送られてくる。これらの中には、明らかに凍結方法が良くないと感じるものがある。アルポート症候群を含め、切片の良否は診断の信頼性を左右する。

腎臓の凍結には液体窒素を用いて凍結するのがよいことは明らかであるが、ドライアイスアセトンを用いて凍結を行うところも多い。ラット腎臓を用いて3種類の凍結方法を用いて凍結し、その切片を私たちが作製した IV 型コラーゲン 5鎖に対する抗体で染色して、切片の良否を見た。この方法は重井医学研究所が販売している蛍光色素標識アルポート症候群研究用モノクローナル抗体の染色に準ずる方法である。

この実験の結果から、液体窒素を用いて急速に凍結することを薦める。生検した施設で液体窒素を使用できないときは、腎組織片を PBS に入れ、液体窒素凍結ができる施設まで低温で輸送し、液体窒素凍結をすることである。それもできない場合はドライアイスアセトンを用いて出来るだけ急速に凍結することである。

材料と方法

動物:ラットは日本チャールス・リバー社の WKY/NCrjCrlj ラットメス 12 週齢を用いた。

ラット腎臓の凍結

ラット腎臓を約 2 から 3 mm の厚さにスライスし、皮質が多い半分を得る。それをさらに中央で 2 分した。クリオモルド 2 (Tissue - Tek 4566、15x15x5 mm) に腎臓スライスを入れ、その上から室温の OCT コンパウンドを入れ凍結を開始した。

凍結方法は以下の 3 種類の方法を用いた。

1. 液体窒素
2. ドライアイスアセトン
3. - 80 冷凍庫内の鉄板上

腎臓スライスの保存と凍結

ラット腎臓のスライスを 2 日間または 4 日間、4 の燐酸緩衝生理的食塩水 (PBS、0.02% の NaN₃ を含む) で保存した。PBS から取り出したのち、周りの PBS をよく取り除き、液体窒素で凍結した。

ラット腎臓の凍結

(1)液体窒素凍結

液体窒素を用いた凍結(図1)に要した時間は液体窒素では18秒から21秒であった。この凍結時間は腎臓スライスが入ったクリオモールドの底部を液体窒素に浸け、腎臓スライスが完全に凍結しているがコンパウンドの中央上部に透明の部分が直径約5mm程度残っているときに液体窒素から離すまでの時間である。透明の部分を残すのは液体窒素でコンパウンドを完全に凍結するとコンパウンドが割れてしまうからである。凍結した腎臓は-80の冷凍庫で保存した。

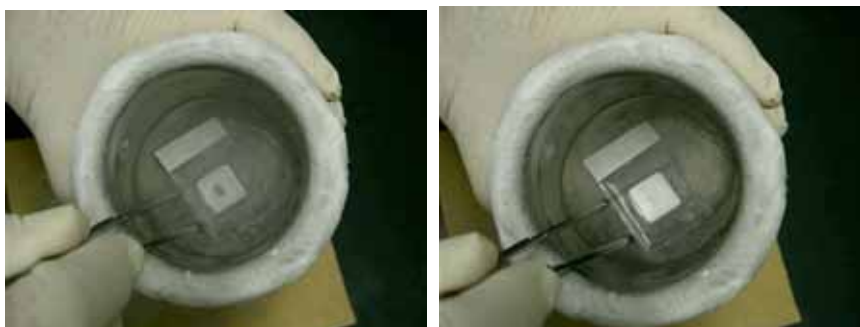


図1 液体窒素を用いて凍結(左 凍結の途中、右 凍結の終了時)

(2)ドライアイスアセトン凍結

ドライアイスアセトンで凍結(図2)に要した時間は45秒から52秒であった。この凍結時間は腎臓スライスが入ったクリオモールドをドライアイスアセトンに浸け、そして、腎臓スライスが完全に凍結しドライアイスアセトンから離すまでの時間である。ドライアイスアセトンの場合はコンパウンドが割れてしまうことはなかった。凍結した腎臓は-80で保存した。



図2 ドライアイスアセトンを用いての凍結(左 凍結の途中、右 完全に凍結した状態)

(3)-80 の冷凍庫内凍結

-80 の冷凍庫(図3)では3分から4分間で凍結した。冷凍庫内の鉄板上で凍結したのはできるだけ急速に凍結するためである。腎臓スライスが入ったクリオモールドを鉄板上に置くと2分から3分で透明感のある凍結が起こり、さらに1分間で白色の不透明の凍結になった。凍結した腎臓は-80 で保存した。

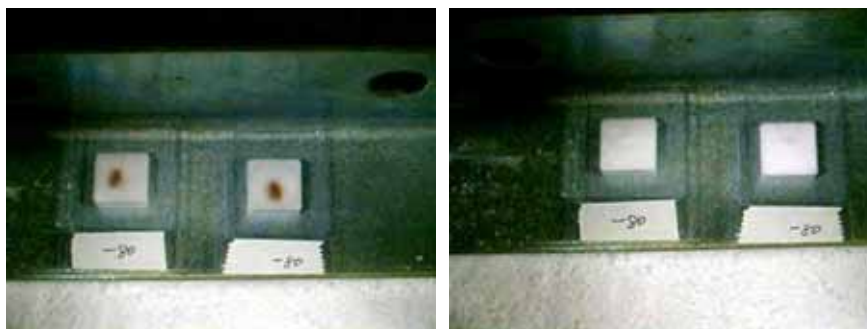


図3 -80 冷凍庫を用いての凍結(左 凍結の途中、右 完全に凍結した状態)

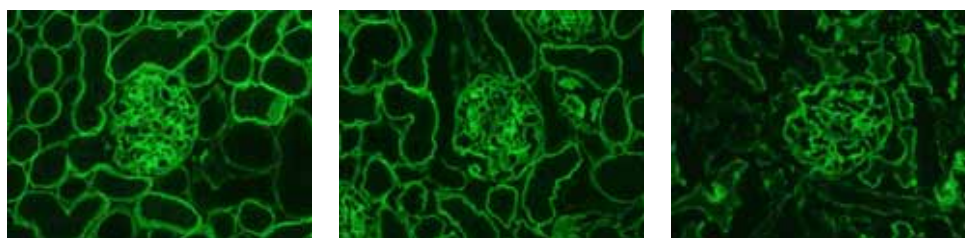
FITC標識b14 抗体染色によるラット腎臓の比較

3種類の凍結方法で凍結したラット腎臓をクリオスタットで4 μm の切片を作製した。

図4はFITC標識したb14抗体で基底膜染色したものである。顕微鏡撮影において露出時間を一定にして撮影したものである。液体窒素で凍結した腎臓の切片の染色が明らかに強かった。b14抗体はIV型コラーゲン 5鎖に対する抗体で分子の表面にでているエピトープに反応する抗体である。液体窒素による凍結の場合に染色が強いことは予期しない結果であった。

液体窒素で凍結した腎臓の切片は糸球体、尿細管の構造がDubosqu Brazil固定した切片の構造に近い。尿細管と尿細管の間にすき間が無く、糸球体も円形に近かった(図4a)。これに比べてドライアイスアセトンで凍結した腎臓の切片は尿細管、糸球体ともに形が変形していた。尿細管には凹凸が生じて、尿細管と尿細管のすき間ができていた(図4b)。

-80 の冷凍庫内の鉄板上で凍結したものは著しい形態の変化が認められた(図4c)。ラットでは糸球体にも変化は起きているが尿細管の変化に比べて軽いように思われた。

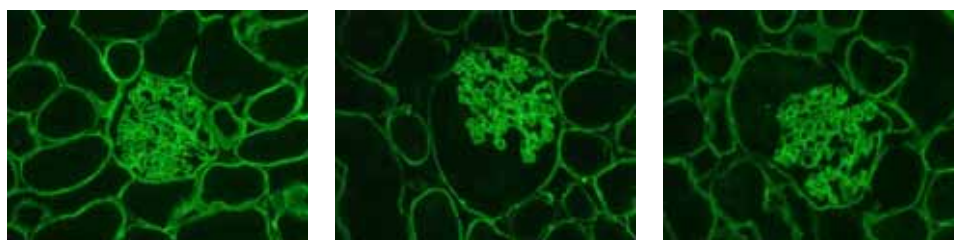


a 液体窒素凍結 b ドライアイスアセトン凍結 c -80 凍結

図4 ラット腎臓の凍結切片(b14抗体染色、蛍光顕微鏡の対物レンズ倍率 x20)

4 で保存した腎臓スライスの凍結

ラット腎臓のスライスそれぞれ4枚を48時間(2日間)または96時間(4日間)PBS中で保存したものを液体窒素で凍結した。切片を作製しFITC標識b14抗体で染色した。図5にはラット腎臓の48時間(2日間)後と96時間(4日間)後の典型的なものを示した。尿細管と糸球体の膨潤が起きたと考えられ、尿細管基底膜には保存の影響と考えられる明らかな断点があること、ならびに、糸球体係蹄が血管極側に圧迫されていることも特徴的であった。尿細管基底膜と糸球体基底膜の染色を見る限りIV型コラーゲンの抗原性は保持されており、蛍光染色への使用は十分可能と思われた。



a すぐに凍結

b 48 時間後凍結

c 96 時間後凍結

図5 4日間PBSに保存したラット腎臓スライスの凍結切片(b14抗体染色、蛍光顕微鏡の対物レンズ倍率:x20)

液体窒素を用いている場合にもOCTコンパウンド内の腎臓組織片が急速に凍結するようにしなければならない。液体窒素への浸け方が浅いとゆっくり凍結するので注意が必要である。ゆっくり凍結した場合はドライアイスアセトンに見られるような尿細管の萎縮が認められる。

凍結方法によりFITC標識b14抗体を用いた染色の強度に違いが認められたことも重要な点である。液体窒素では明らかに強い染色であり、-80℃の凍結ではかなり弱い染色となっている。重井医学研究所で開発したアルポート症候群研究用のモノクローナル抗体は凍結切片を直接染色するものである。この抗体の染色でも、b14抗体と同様に重井医学研究所で凍結染色した切片の適正露出時間は2秒から4秒である。これに対してドライアイスアセトン凍結と思われる切片の適正露出時間は4秒から16秒である。液体窒素の凍結は形態が保存されているうえに、染色性も高いことから、凍結には液体窒素を用いるべきであるとの結論に達する。

液体窒素凍結が使えない場合の対策

凍結を行う際に、その場で液体窒素凍結ができない場合は、対策として2つの方法が考えられる。

第一選択肢は凍結用組織片をPBS(0.02%NaN₃を含む)に入れ、速やかに低温で輸送し、輸送先で液体窒素による凍結を行うとよいと考えられる。アルポート症候群の診断するための基底膜のIV型コラーゲンの染色に関しては、ラット腎臓を用いたモデル実験から4℃の冷蔵庫内で4

日間は保存可能であった。動物種による組織の安定性の差があっても最近の宅配便の状況を考えて 2 日間で十分に目的地に届くことから、ヒト腎生検検体もこの方法が使用できると期待される。

第二選択肢は切片の多少の変性を覚悟して、ドライアイスアセトンを用いて出来るだけ急速に凍結することである。アセトンは十分量のドライアイスを使い、アセトン内に十分量のドライアイスが残っている状態で凍結することである。50 秒程度で凍結するようにする。ヒト腎生検の組織は小さいためテッシュティックのクリオモールドは 10x 10x 5 mm の小サイズを用いるとよい。OCT コンパウンドは冷蔵庫で冷やしてあるものを用いる。

ドライアイスアセトンの代わりにドライアイスアルコールを用いる凍結方法も存在している。しかし、この場合は万が一、アルコールが腎臓組織に触れた場合は組織の抗原性が大きく変性するので使用しないほうがよい。重井医学研究所のアルポート症候群研究用抗体はアルコール変性した切片ではまったく反応しなくなる。

ヒト腎生検検体ではテッシュティックのクリオモールド(10x 10x 5 mm)小サイズを用いるとよい。ただし、このサイズでは底面のプラスチックが薄いために底面に歪みがあるものがある。そのようなものは組織の切り出しが大変であるため避けた方がよい。OCT コンパウンドに包埋された腎臓組織からクリオスタットで必要枚数の切片を切り終えたならば、乾燥を防ぐため、OCT コンパウンドをブロックの表面に塗り、凍結させ、再びクリオモールドを被せて、台からブロックをはずし、小さなプラスチック袋に入れて保存するとよい。