

研究

アセトンと加温式スターラを利用した迅速組織脱脂法

富澤雄一¹⁾ 田中 茂¹⁾ 鈴木秀行²⁾ 横尾英明³⁾原町赤十字病院検査部¹⁾ 同内科²⁾
群馬大学医学部大学院病態病理学分野³⁾The rapid method to remove fat from adipose tissue
that uses acetone and the hot-plate stirrer

要旨

脂肪を多く含む組織は、アルコールやキシレン、パラフィンとの親和性が低く、定型的な組織処理手順では、パラフィン浸透が行き渡らず、薄切の大きな妨げとなる脱脂不良をきたすことがある。脱脂を迅速に進行させるため、加温式スターラとアセトンを利用した。スターラによる水流と加温とにより、脱脂操作は、約6から8時間で終了する。アセトンの沸点が56.5℃であるため、組織変性を招きかねない高温になることはなく、面倒な温度管理は必要ない。検体処理当日にパラフィン浸透装置に移すことができ、標本作製、並びに、病理診断報告の迅速化が可能となった。

Yuuichi Tomizawa, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 42 : 35—37, 2009 (2009.1.25 受理)

KEYWORDS

adipose tissue, acetone, rapid method, delipidization, histopathology

はじめに

病理検査標本作製時、脂肪組織は、パラフィン浸透が行き渡らず、薄切の大きな妨げとなる脱脂不良を経験する。脱脂不良を避けるため、乳腺や腸管、郭清リンパ節、皮膚などの脂肪を多く含む組織はあらかじめ、キシレンアルコールやアセトン、クロロホルムなどの溶剤に一昼夜浸漬して、脂肪を除去し、溶剤を除くために、さらにアルコールに一昼夜浸漬し、脱溶剤操作をしている。通常の脱脂操作は、2日間を要し、病理診断報告の遅れを余儀なくしている。

従来から脱脂に使用されている純物質であるアセトンの沸点と加温スターラの水流に着目し、脱脂を促進する方法で、アセトン煮沸法とした。組織標本カセットをアセトンに浸漬、スターラで加温し、脱脂を行い、次にア

ルコールに浸漬し、脱アセトン(脱アセトンは省略可能)を行う。この行程を約6から8時間で実施し、当日中にパラフィン浸透装置に移すことが可能となり、脂肪を多く含む組織の病理組織標本作製の迅速化が可能となった。以下に、詳細を報告する。

【準備】

(主な器具は、写真1に示した。)

1. アセトン1級(和光純薬)
2. アルコール エタノール100(武藤化学)
3. 加温式スターラ(パソディナ)
4. スターラ回転子
5. ガラス容器
6. ステンレスの網(スターラ回転子のカバーに使用する。)



写真1

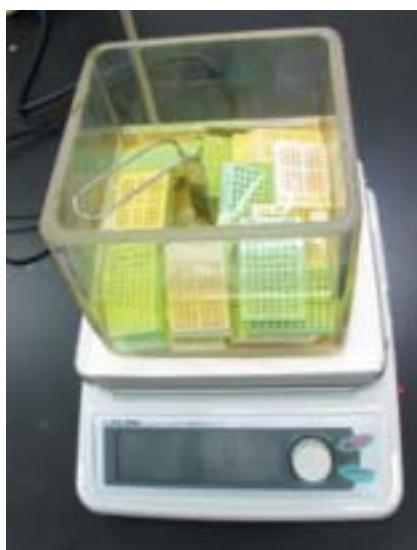


写真2

【方法】

1. 切出しされた組織の入ったカセットの水分を良くきる。
2. 加温式スターラにガラス容器を乗せ、スターラ回転子を入れ、回転子をステンレスの網でカバーする。1のカセットをガラス容器に入れ、アセトンを注ぐ。スターラの回転数は、500rpm、ホットプレートの温度は、70℃としている。
3. スターラの回転と加温を開始、1時間。アセトンの沸点が、56.5度なので、軽く沸騰している程度で温度は一定となる。脱脂が進行し、アセトンは黄色となる(写真2)。
4. アセトンを交換、スターラ回転、加温、1時間。

5. 同様に、アセトンを交換、スターラ回転、加温、1時間。
6. 組織を肉眼で観察。組織が黄色みがあり、脂肪が残っているようであれば、30分ほど、アセトン浸漬、加温を追加。黄色みが抜け、脂肪組織が白色ならば、脱脂完了。
7. アセトンを捨て、アルコールに交換、スターラ回転、1時間。(温度管理が可能ならば、加温すれば、脱アセトンが早まる。省略可能。)
8. アルコールを交換、スターラ回転、1時間。
9. 同様に、アルコールを交換、スターラ回転、1時間。アルコールへの置換完了。置換完了の目安は、アセトン置換に要した時間としている。
10. 自動固定包埋装置へセットする。他の検体と一緒に70%アルコールからでよい。100%アルコールに置換されているため、100%アルコールからでも可。

【考察】

脂肪を多く含む組織はアルコールやキシレンの浸透性が低く、通常の組織検体と同様に処理するとパラフィン浸透が不完全で、薄切が困難となるため、脂肪と親和性の高い溶剤で脂肪を除去し、さらに溶剤を除去するために、アルコールでの脱溶剤が必要で、病理標本作製の前処理に多くの時間を費やし、病理組織診断報告の遅延を招いていた。

当院ではこの問題に対処するため、加温と攪拌、さらに、純物質であるアセトンの沸点

に着目し、加温式スターラを使用した迅速脱脂法であるアセトン煮沸法を考案した。

キシレンやキシレンアルコール、クロロホルム、アセトンなどの溶剤を加温し、スターラの攪拌水流により、常に脂肪濃度の低いアセトンと組織が接することにより、迅速な脱脂効果が得られた。どの溶剤でも、加温により、迅速に脱脂することは可能であったが、脱脂中の溶液温度を一定の温度(60度付近)に保持することが非常に困難であった。加温する上で、最も重要な点は温度管理で、パラフィン溶融温度を上回することは、組織変性を招くことが予想され、溶液温度が低いと迅速化は不可能である。60度付近で一定に保つためには、高価な温度管理装置付属の加温式スターラを使用する必要がある。脱脂のためだけに購入することには抵抗がある。今回、脱脂に使用したアセトンは、純物質であるため、沸点が56.5度と一定で、温度管理が非常に容易な点である。軽く沸騰している状態で、56度付近を保持する。組織中の脂肪、固定組織に含まれるホルマリン、電解質等の不純物による沸点上昇を考慮しても、60度を上回ることはないものと考えられ、脂肪が高濃度に溶解し、黄色に変化したアセトン中での実際の計測でも、58度が最高温度であった。他の脱脂溶剤の沸点は、キシレン139度、メタノール64.7度、エタノール78度、ジエチルエーテル35度で、生物学的毒性が低い溶剤で、パラフィンの溶融温度に近く、これを越えないものはアセトンであった。また、アセトンは、従来より、脱脂溶剤として使用されており、組織変性に対する安心感もある。脱脂が目的であり、温度管理を必要とする混合溶液であるキシレンアルコール、クロロホルムエーテル等を使用する必要はないものと思われる。

コスト面でも、加温式スターラ、温度計、スターラ回転子の保護のためのステンレスの網などがあれば、数万円程度の出費で容易に実施できる。また、アセトンの生物学的毒性

は、エタノールと同等なレベルで、キシレンよりも低いとされている。

ひとつ注意すべきことは、有機溶剤やアルコールに共通した欠点として、引火性の高さがある。アセトンを沸点付近で扱うことになり、引火の危険性もある。しかし、実際には、60度以下という温度のため沸騰したアセトンに非常に熱いと言う印象はなく、火花やバーナーのようなものでなければ、引火の危険性は低いと思われる。しかしながら、室内の換気を十分に行うことは必要であろう。

大きな課題は、加温による染色性の変化である。中でも、乳癌症例のホルモンレセプターと癌遺伝子検索のための免疫染色は必須であり、これらの染色性に変化を与える操作は避けなければならない。当院の乳癌症例の中で、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、HER2の染色性の異なる症例を対象として、アセトン一晩、エタノール一晩の過程で常温処理した組織と当院で考案したアセトン煮沸法で処理した組織の免疫染色所見の違いを検討した(表1)。このように、常温処理と煮沸処理による差異は、今回の検討では認められなかった。

【まとめ】

アセトン煮沸法は、加温式スターラによる攪拌作用と加温の効果により、脱脂を効率よく行い、組織変性を招きかねない温度管理をアセトンの沸点を利用して回避する迅速脱脂法で、加温、攪拌、温度管理の三つを基本としている。アセトンの引火性を除けば、コスト面、温度管理の容易さ、生物学的毒性、染色性など問題は認めず、ルーチン検査に常用できる迅速脱脂法と考えられた。

予算が許すならば、振盪機能付恒温槽でも、同様の効果が期待できる。

(前橋赤十字病院病理部に免疫染色を実施していただきました。前橋赤十字病院病理部の皆様に深謝いたします。)

表 1

| | | HE | HER 2 | ER | PgR |
|------|----|----|-------|-----|-----|
| 症例 1 | 常温 | 常 | + | +++ | ++ |
| | 煮沸 | 常 | + | +++ | ++ |
| 症例 2 | 常温 | 常 | - | - | - |
| | 煮沸 | 常 | - | - | - |