

オスミウム染色の脂肪滴流出に対する有効性および膠原線維染色との重染色の検討

篠田琴未・村上舞・土谷明穂・加藤友美・阿部麻紀・出口聡子・重末由紀子・金林智倫
株式会社 バイオ病理研究所

【Key words】

オスミウム染色、Oil red O 染色、脂肪染色

1. はじめに

一般的に脂肪染色は凍結切片による染色法 (Oil red O 染色等) で実施されることが多い。しかし、ホルマリン固定を用いる Oil red O 染色では脂質の大部分が固定されないため、染色された脂肪滴が流出してしまうことがあり、定量性が十分ではない。対してオスミウム染色は、四酸化オスミウムおよび重クロム酸カリウムとの反応で脂肪をアルコール不溶性にすることによりパラフィンブロックで作製可能であり、脂肪の詳細な観察が可能である¹⁾。そこで今回、大滴性の脂肪および線維化を伴った肝臓の評価を想定し、Oil red O 染色時の脂肪滴流出に対するオスミウム染色の有効性について、定量性の評価を含めて検討し、種々の膠原線維染色との重染色を評価した。

2. 材料および方法

2.1 材料

10%中性緩衝ホルマリン液に固定した、提供施設において、動物実験倫理関連委員会の承認を得たマウスの脂肪肝、ラットの大動脈および皮膚を使用した。

2.2 検討 1

マウス脂肪肝を用いて、Oil red O 染色時の脂肪滴流出に対するオスミウム染色の有効性について検討した。

1) Oil red O 染色

10%中性緩衝ホルマリン液に固定したマウスの脂肪肝を約 3 mm厚に切り出し、常法に従い凍結ブロックを作製し、約 6 μm厚の切片を作製した。凍結切片の O.C.T コンパウンドを蒸留水で

除去後、60%イソプロピルアルコールになじませてから Oil red O 染色液で 37℃、60 分間染色した。その後、60%イソプロピルアルコールで分別、水洗し、マイヤーのヘマトキシリン液で核染色を 3 分行った。染色後切片を水溶性封入剤で封入した。

2) オスミウム染色

染色前日に 5%重クロム酸カリウム水溶液と 2%四酸化オスミウム水溶液 (四酸化オスミウム: ナカライテスク株式会社) を作製し、染色当日にろ過し、1:1 の割合で直前混和しオスミウム固定液を調製した²⁾。10%中性緩衝ホルマリン液で固定したマウスの脂肪肝を約 2 mmに切り出し、カセットに入れ、約 1 時間流水水洗し、オスミウム固定液を入れたヒストパック内で約 4 時間オスミウム固定 (オスミウム染色) した。この時、固定液の浸透を促すためカセット内の空気を抜き、バイブレーター (サクラバイブレーター VF-5: サクラ精機株式会社) を使用した。検体が黒く染まっていることを確認し、約 2 時間流水水洗し、バイブレーターを用いて 70%アルコールに約 1 時間浸漬した。その後、常法に従いパラフィンブロック包埋し、約 3 μm厚の切片を作製した。薄切時はブロック内の組織に水分を含ませ、組織を軟化させて行った。作製したパラフィン切片を脱パラフィンし、対比染色としてエオジンで 10 分染色、そして脱水、透徹し封入した。

3) 組織評価

マウス脂肪肝の Oil red O 染色標本およびオスミウム染色標本について、画像解析

(WinROOF2021: 三谷商事株式会社) を行い、脂肪滴の自動抽出の可否を評価した。

2.3 検討 2

マウスの脂肪肝並びにラットの大動脈および皮膚を用いて、オスミウム染色および膠原線維染色（マッソン・トリクローム染色、エラスチカ・マッソン染色もしくはワンギーソン染色）の重染色を評価した。

2.2 2)と同様に作製したオスミウム固定後のパラフィン切片を脱パラフィンし、膠原線維染色し、脱水、透徹し封入した。

マウスの脂肪肝並びにラットの大動脈および皮膚のオスミウム染色および膠原線維染色（マッソン・トリクローム染色、エラスチカ・マッソン染色もしくはワンギーソン染色）の重染色標本について、通常の単染色像と比較して染色性に影響がないかを評価した。

3. 結果

3.1 検討 1

マウス脂肪肝の Oil red O 染色標本およびオスミウム染色標本を画像解析した結果、オスミウム染色標本は解析ソフトにより脂肪滴の自動抽出が正確に実施できた。オスミウム染色では、脂肪滴が黒色に染められ、小滴性や大滴性の脂肪滴まで観察可能だった。Oil red O 染色では、脂肪滴を赤色に染色することは出来たが、一部脂肪滴で染色液が流出し、巨大な脂肪滴の凝集像が組織上に認められた（写真 1）。

3.2 検討 2

マウス脂肪肝では肝細胞の、ラット大動脈では褐色脂肪細胞の、ラット皮膚では皮下組織の脂肪細胞の脂肪滴がオスミウム染色により黒色に染められ、マッソン・トリクローム染色では膠原線維を青色に、エラスチカ・マッソン染色では緑色に、ワンギーソン染色では赤色に染め分けられた（写真 2、3、4）。オスミウム染色、膠原線維染色各々の染色性に、重染色による影響は認められなかった。

4. 考察

本検討において、Oil red O 染色では脂肪滴の流出および組織上の巨大な脂肪滴の凝集像により、画像解析において脂肪滴部位の正確な抽出が困難であった。オスミウム染色では大部分の視野にわたり脂肪滴部位の正確な自動抽出が可能であったことからオスミウム染色を用いた脂肪染色による脂肪滴の定量評価の有効性が示

された。

また、マウス脂肪肝等においてオスミウム染色および種々の膠原線維染色（マッソン・トリクローム染色、エラスチカ・マッソン染色もしくはワンギーソン染色）の重染色が評価可能であることが確認できた。よって、線維化等の病変との関連について、より詳細に評価できる可能性が広がった。

上記のように脂肪染色としてのオスミウム染色の有効性が示されたが、標本作製に関していくつかの注意点がある。

1) 注意点 1：四酸化オスミウムは中心部への浸透力が弱いのでパラフィンプロックを削りすぎると固定液が浸透していない部分が出てくる

（写真 5）。固定液が浸透していない部分が出てきたら、反対側を包埋すると改善できる。また、浸透力が弱いので、一つの検体から多くの切片をとることや大きな組織の作製が難しい。検体を切り出すときは平行に切り出し、まっすぐに包埋した方が作製しやすい。

2) 注意点 2：オスミウム固定液を作製する際、器具が黒くなる（写真 6）。そのため、オスミウム固定液専用の器具を用意し作製するとよい。密閉式自動固定包埋装置の液やタンクも黒くなるため、密閉式自動固定包埋装置を 1 台オスミウム専用にし、1 回セットするごとに液交換を実施した方がよい。

3) 注意点 3：四酸化オスミウムは揮発性があるため、ヒストパックが少しでも開いていると、置いていた場所全体が黒く染まってしまう。オスミウム固定液を保存する場合、ヒストパックなどで密閉し袋を二重にし、密閉される容器にビニール袋を入れ保存するとよい。また、オスミウム固定液に使用する四酸化オスミウムは毒性が強く、呼吸器および皮膚に有害で、特に目の粘膜に対して危険性が高いため保護眼鏡、保護手袋を着用し、ドラフト内で取り扱う必要がある。

【参考文献】

- 1) 山谷幸恵，他：-step up 編-FFPE ブロックを利用した脂肪染色の有用性．検査と技術，45 巻 5 号：542-546，2017
- 2) 畔川一郎：四酸化オスミウム酸固定によるパラフィン切片での染色．検査と技術，27 巻 12 号：1409-1410，1999

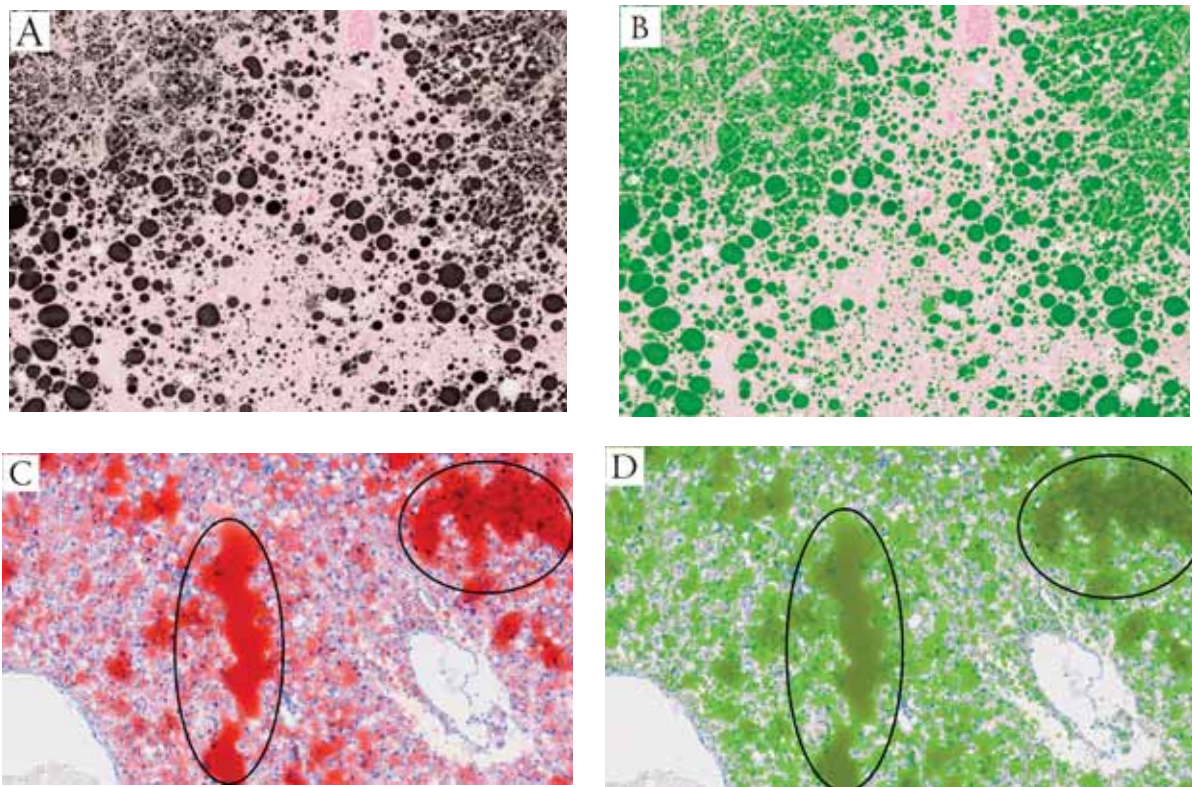


写真 1 : オスミウム染色および Oil red O 染色の画像解析像 (マウス脂肪肝)

A. オスミウム染色像。(×100)

B. A に対して、画像解析ソフトにより、光学濃度を用いて脂肪滴を自動抽出 (緑色部) した画像。(×100)

C. Oil red O 染色像。染色液が流出し、巨大な脂肪滴の凝集像がみられる (黒枠)。(×40)

D. C に対して、画像解析ソフトにより、光学濃度を用いて脂肪滴を自動抽出 (緑色部) した画像。染色液が流出し、巨大な脂肪滴の凝集像がみられる (黒枠)。(×40)

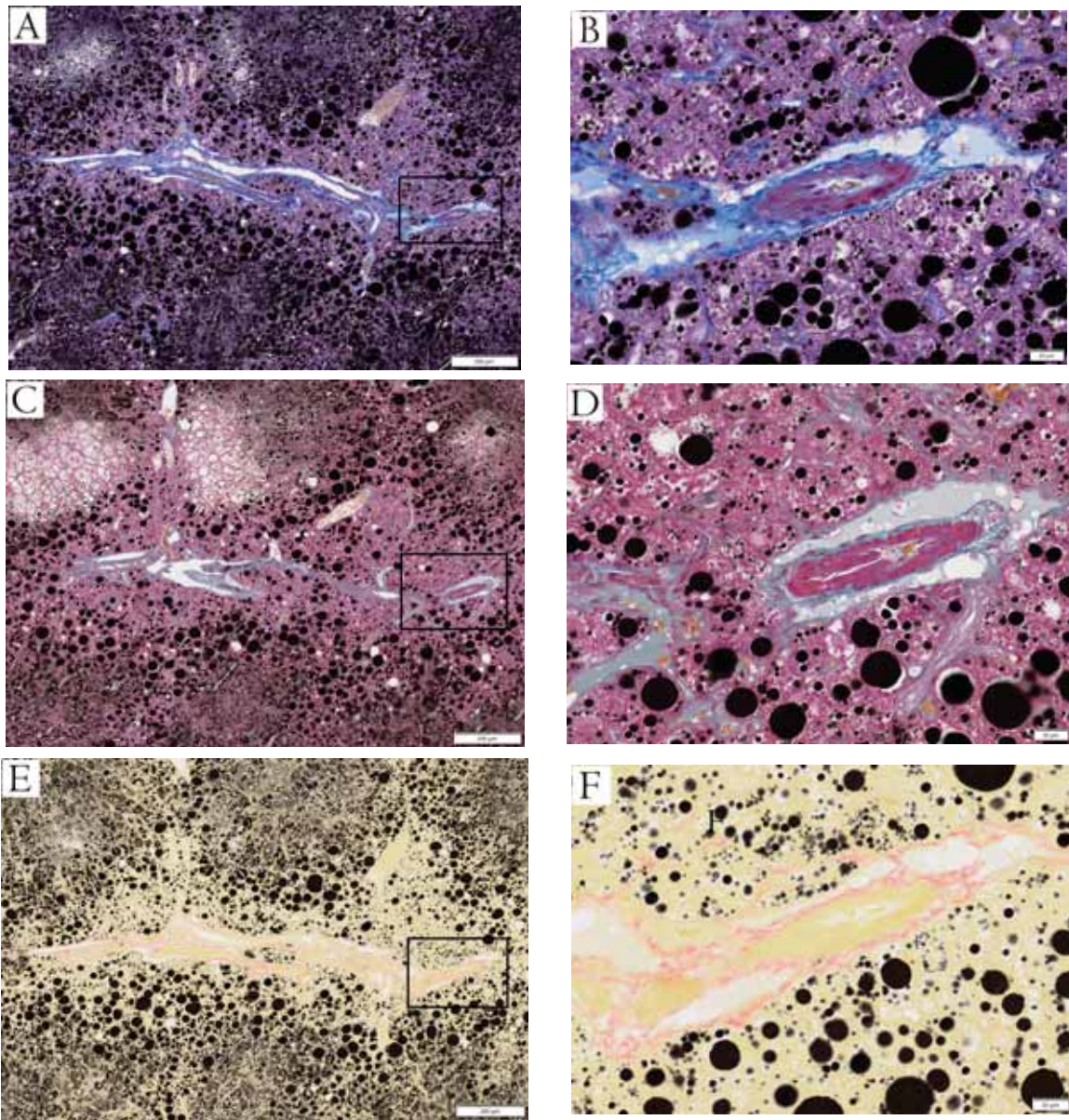


写真 2 : オスミウム染色および膠原線維染色の重染色 (マウス脂肪肝)

- A. オスミウム染色およびマッソン・トリクローム染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- B. A 黒枠部の拡大像。(bar : 20 μ m)
- C. オスミウム染色およびエラスチカ・マッソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- D. C 黒枠部の拡大像。(bar : 20 μ m)
- E. オスミウム染色およびワンギーソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- F. E 黒枠部の拡大像。(bar : 20 μ m)

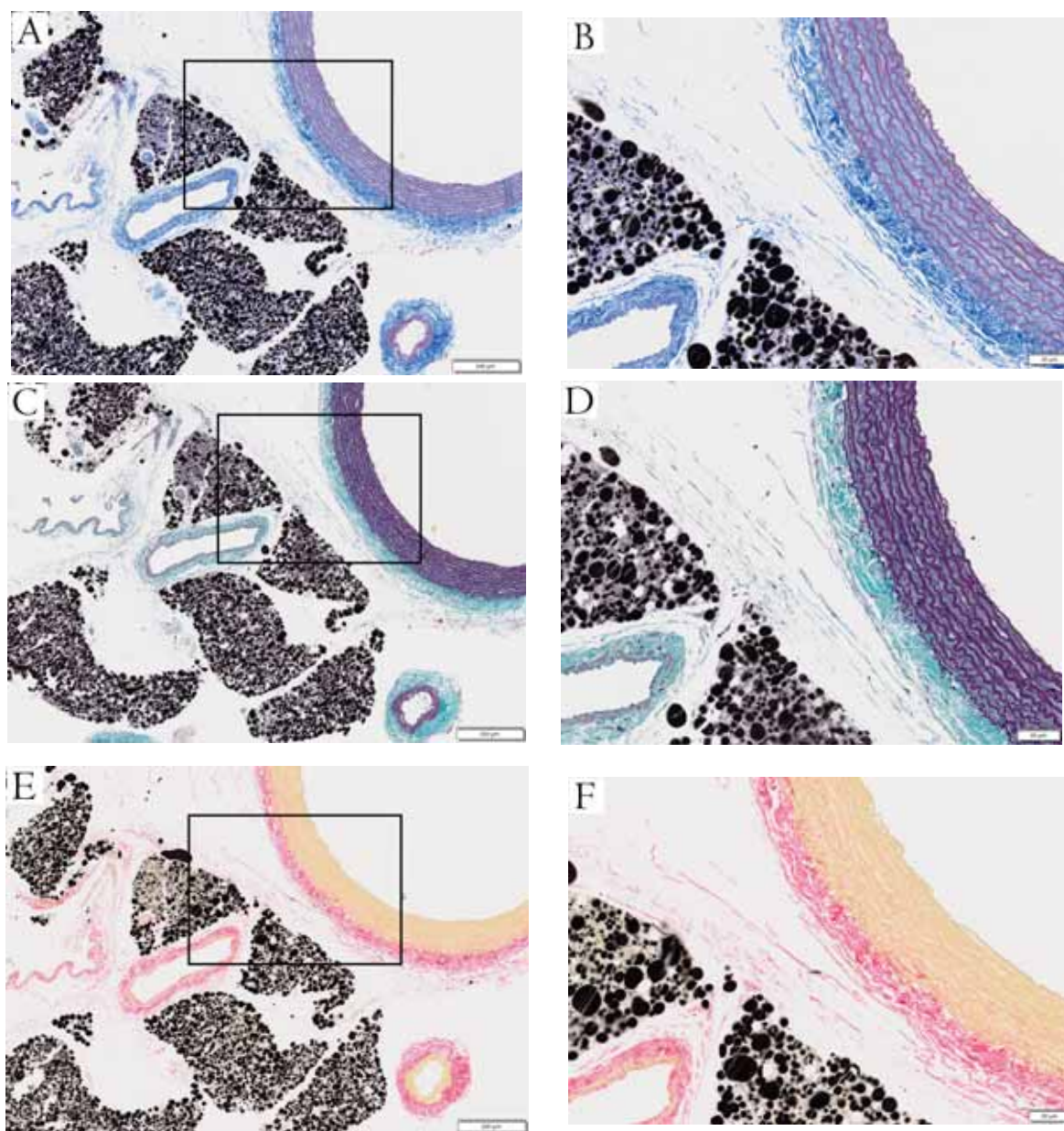


写真 3 : オスミウム染色および膠原線維染色の重染色 (ラット大動脈)

- A. オスミウム染色およびマッソン・トリクローム染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- B. A 黒枠部の拡大像。(bar : 50 μ m)
- C. オスミウム染色およびエラスチカ・マッソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- D. C 黒枠部の拡大像。(bar : 50 μ m)
- E. オスミウム染色およびワンギーソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- F. E 黒枠部の拡大像。(bar : 50 μ m)

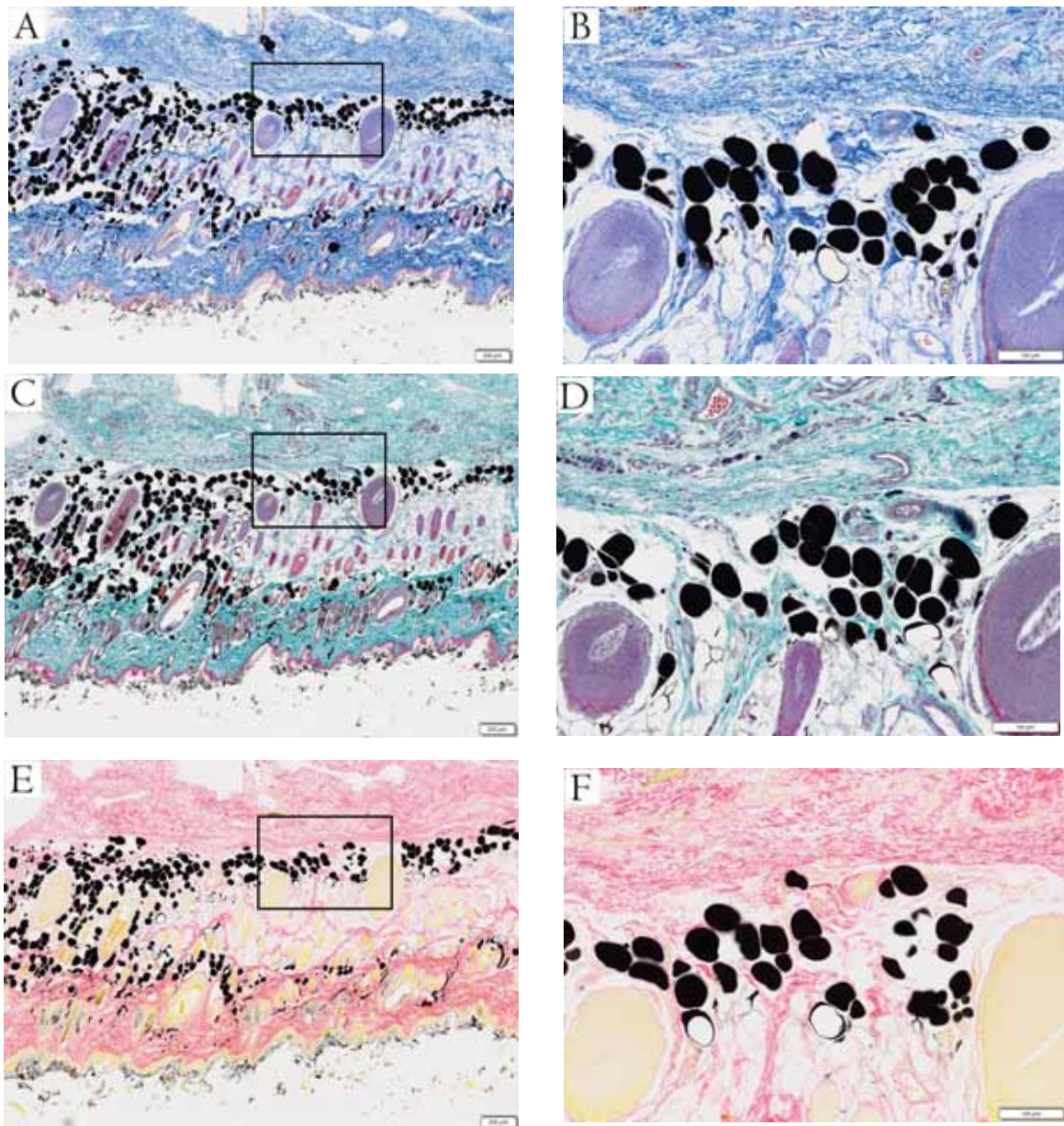


写真 4：オスミウム染色および膠原線維染色の重染色（ラット皮膚）

- A. オスミウム染色およびマッソン・トリクローム染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- B. A 黒枠部の拡大像。(bar : 100 μ m)
- C. オスミウム染色およびエラスチカ・マッソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- D. C 黒枠部の拡大像。(bar : 100 μ m)
- E. オスミウム染色およびワンギーソン染色の重染色像。(bar : 200 μ m)
- F. E 黒枠部の拡大像。(bar : 100 μ m)

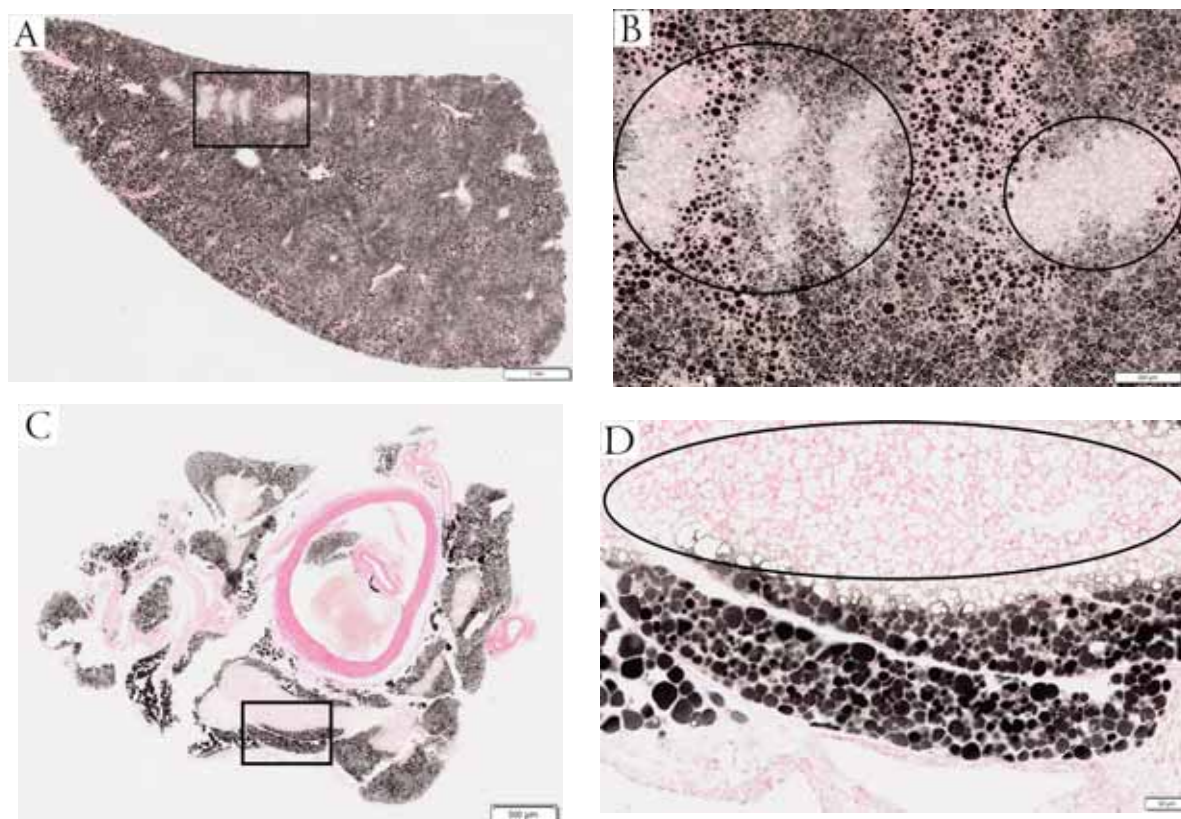


写真 5 : オスミウム固定液の浸透不足部位

A. マウス脂肪肝のオスミウム染色像。(bar : 1mm)

B. A 黒枠部の拡大像。広範囲のオスミウム固定液の浸透不足部位が認められる (黒枠)。(bar : 200 μ m)

C. ラット大動脈のオスミウム染色像。(bar : 500 μ m)

D. C 黒枠部の拡大像。広範囲のオスミウム固定液の浸透不足部位が認められる (黒枠)。(bar : 50 μ m)



写真 6 : オスミウム固定液専用の器具