

平成 26-28 年度厚生労働省研究助成金
(化学物質リスク研究事業)

短・中期バイオアッセイ系の開発に関する研究
サンプル取り扱いマニュアル

研究課題番号 H26 - 化学 - 指定 - 001

目 次

【一】サンプル収集マニュアル

A. 肺	3
B. 消化管	
. 胃	4
. 大腸	5
. 消化管の腺管分離	5
C. 肝臓	7
D. 膀胱	8
E. 前立腺	8

【二】サンプルの送付について

A. 肺	10
B. 消化管	
. 胃	10
. 大腸	10
C. 肝臓	11
D. 膀胱	11
E. 前立腺	11
F. 凍結サンプルについて	12

【一】 サンプル収集マニュアル

A. 肺

(ア) 固定方法

1. 気管より肺に固定液（10%リン酸緩衝ホルマリン）を注入する。
ピンセットで気管切断口をつまんで閉じたまま、気管切断部よりやや尾側の気管本幹に注射針（ラット、マウスとも25G針を使用）を刺入する。
2. 全ての肺葉が膨らむまで固定液を注入し、すべての葉が膨らんだ直後に注入をストップする。（注入し過ぎると肺胞壁が破壊されるため、適切な圧での注入が要求される。）
3. 注入後、それぞれの肺葉を全て気管より切離し、6葉全てを固定液中に浸漬する。
4. 24~48時間、固定を行う。
5. 固定終了後すぐ切り出しを行えない場合は、固定時間終了時にエタノール浸漬へ変更する。

吉見班のプロジェクトでは、ここままでパッキング（肺+100%エタノール）し香川大学へ送付する。肉眼的に病変のある肺のみ送付する。必要個体数としては5匹分程度で十分である。

(イ) 切り出し（参考）

1. 全個体の肺について、一定の切り出し線で切り出しを行い病理組織切片を作成する。
2. 可能な限り1動物につき、1ブロックに収め、実験計画毎に切り出し線を一定にする。結節数がかなり少ない場合にはその結節が切片上に現れるように切り出しを行う。
3. 基本的に、肺門部に直交する線で切り出しを行う。（図1）
4. 切り出した肺を包埋し、ブロックを作成する。

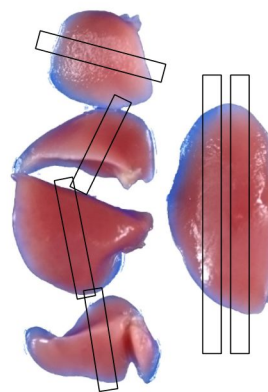


図1. 基本的に肺門部に直交する線で切り出しを行う。

(ウ) 凍結方法

香川大学への凍結サンプルは不要。静岡県立大学への送付用に凍結サンプルを採取する。凍結サンプルは2本分作成し、1本は伊吹先生、もう一本は戸塚先生へ送付する。

(以下、伊吹先生に要確認)

1. 肺摘出後、素早く 1.5 mL エッペンチューブに入れ、液体窒素で凍結させる。摘出部位は香川大学へ送付する肉眼的結節のある肺以外から採取する。

B. 消化管

胃

(ア) 固定

1. 実験動物（ラット、マウス、スナネズミ等）から胃を摘出する（図 2 はマウスの写真）
2. 大弯切開し（図 2A）、PBS で洗浄後、広げてピン（注射針などでも可）でシリコン板（発泡スチロール板でも可）に貼り付ける（図 2B）
3. 必要に応じて凍結サンプルを採取する。
4. 適当な固定液（10%中性緩衝ホルマリン等）で 16~24 時間程度固定する。
5. 70% エタノール浸漬に替える。

70%エタノール浸漬の状態で発送してください。切り出し、包埋等その後の処理は藤田保健衛生大学の方で行う。

(イ) 切り出し

1. 前胃から十二指腸方向に短冊状に 6~8 本程度割を入れる（図 2C）
2. 包埋カセットに入れて、パラフィン浸透機にかける。

(ウ) サンプルの凍結

1. 腺胃の胃底腺・幽門腺境界部あるいは幽門腺領域から 2~5 mm 角の検体を採取し（図 2B）複数個に切り分け、マイクロチューブの側面に貼り付け、凍結する。

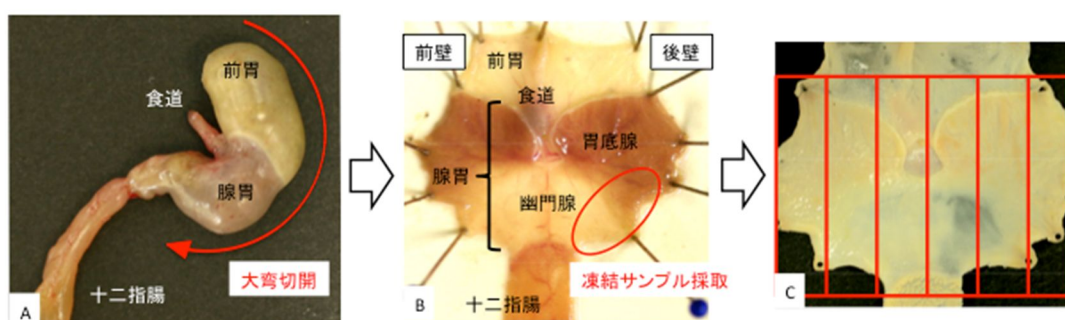


図 2. マウス胃のサンプリング方法。(A)胃を摘出後、大弯切開し、PBSで洗浄する。(B) 台湾切開後、シリコン板に貼付する。必要に応じて凍結サンプルを採取する。10%中性緩衝ホルマリン等で固定する。(C)固定後、割を入れて 6~8 本程度の短冊を作り、包埋カセットに入れる。

・ 大腸

(ア) 固定

1. 肛門から回盲部回腸末端部までの大腸を摘出し、冷生理食塩水で大腸内部の糞便を洗い流す。
2. 周囲の余分な組織（脂肪など）を除去する。
3. 肛門部を鉗子ないし縫合糸で閉じ、回盲部から上行結腸開始部で切り離す。そこから 10%ホルマリン液を 15 mL (F344 ラットの場合) 注入する。
4. 鉗子で上行結腸部を閉じ、30 分間ホルマリン液に水平に浸す。
5. 腸間膜側に沿って大腸を開き、濾紙の上で伸展させる。腸管の両端と 1/3 ずつの場所にてホッチキスで濾紙に固定する。
6. 濾紙に貼り付けた大腸は内腔側に湾曲しているため、内腔側を伸展させるためにガラス板(10 cm 平方のものを 2~3 枚程度使用する)で押さえ、ホルマリン液中で 12~24 時間固定する。

(イ) サンプルの凍結

上記の固定する大腸の一部を凍結することは前癌病変が肉眼上判別困難であるため特定できない。そのため、凍結材料を収集する場合、予め実験開始時より凍結用に 3 匹程度を各グループ群に追加しておくこと。

1. 外科用のメス (FEATHER surgical blade No. 24) を用いて大腸粘膜面をスクレープして収集する。
具体的には、大腸の肛門側から 1/3 ずつ、スクレープした粘膜組織をまとめてアルミホイルで包み液体窒素で凍結する。
また、付加体解析用に、摘出した大腸の一部をそのまま凍結する。
2. 凍結サンプルは - 80 で保存する。

・ 消化管の腺管分離

1. 実験動物 (ラット、マウス、スナネズミ等) から消化管を単離する。
2. 胃は大弯側で、小腸・大腸は長軸方向に開く。
3. 適当量の組織 (胃 1/2、小腸数 cm、大腸 1/4 から 1/2 程度) を採取する。
4. 検体を 15 あるいは 50 mL チューブに入れ、ハンクス緩衝液 (Hanks' balanced salt solution, HBSS、細胞保護のため糖分を含む HBSS を使用) で 10 秒 × 2 回ボルテックスにかけて洗浄し、表面の食物残渣や粘膜を除去する。

5. 小腸、大腸は予め 37℃ に加温しておいた 30 mM EDTA 加 HBSS に入れ、15~20 分インキュベートする。胃は、粘膜内が深いので、EDTA の浸透をよくするため、粘膜内に 30 mM EDTA 加 HBSS を注入し、短冊状に割を入れてから EDTA 加 HBSS に入れる。
6. 時間が来たら、5 mL ほどの HBSS に移し、10 秒×数回ボルテックスにかけ、粘膜から腺管を分離する。
7. 適当な固定液（エタノール、ホルマリン、パラホルムアルデヒド等）を入れ、細胞保護のため直ちに固定する。100%エタノールを 10 mL 入れれば最終濃度が 70%程度になる。
8. 800~1,500 rpm×3 分遠心し、上清を捨てる。
9. 分離腺管を適当な固定液(70%エタノール等)で置換する。懸濁後、1.5 mL チューブ等に移す。
10. 検体は-20℃あるいは4℃で保存可能である。
11. 形態学的、機能的解析あるいは遺伝子発現を解析する。図 3 に解析例を示す。

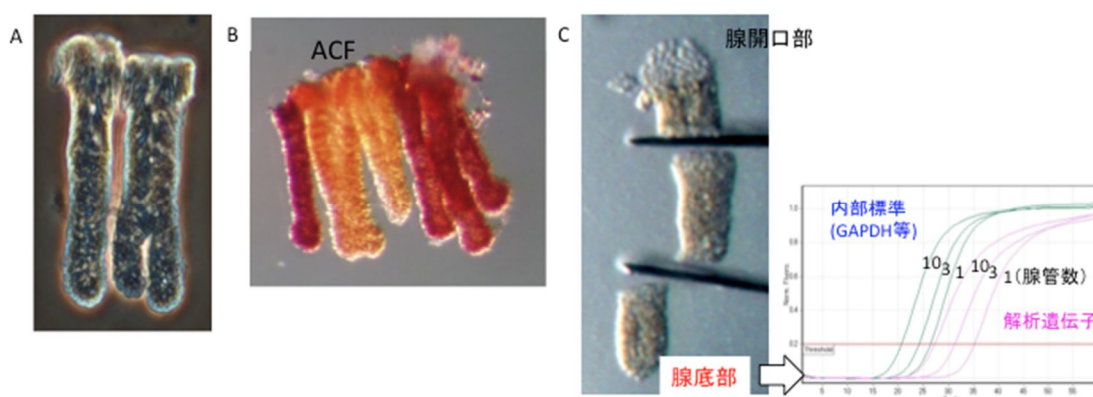


図 3. ラット/マウス大腸腺管分離。(A)形態学的観察の例。左右の腺管を比較すると、左は単腺管だが右では腺底部に分枝がある。(B)機能的解析の例。正常腺管は小型でヘキソースアミナーゼ陽性（赤く染色）だが、Aberrant crypt foci (ACF)は大型でヘキソースアミナーゼ陰性である。(C)必要に応じて遺伝子障害刺激に対して感受性の高い腺底部幹細胞領域を単離し、RNA 等を抽出して定量的 RT-PCR 等種々の解析に供する。

C. 肝臓

(ア) 固定

1. 肝臓を生理食塩水で十分に洗い、キムタオルなどで水気を拭きとった後に重量測定を行う。
2. 肝臓を切り出し、組織片をカセットにおいて 10%ホルマリンにて固定させる。
3. ホルマリンによる固定は通常 48 時間浸透固定させる。また、解剖の翌日に一回はホルマリンの交換を行う。

*今回は試験的に、剖検時に肝臓を葉ごとに 3 つに分け、72 時間ホルマリン浸漬の後、70%アルコールに浸漬した状態で発送する。

(イ) 切り出し

1. 図 4 の容量で切り出しを行う。
2. 外側左葉 (LL)、内側右葉 (RM) および右葉尾部 (R2) を辺縁部から 5 mm 程度の位置より約 5 mm 幅で計 3 切片切り出す。

(ウ) サンプルの凍結

魏先生用と戸塚先生用に 2 本作成する。

1. 外側左葉 (LL) の切り出しの際に生じた断片を素早く 1.5 mL エッペンチューブに入れ、液体窒素で凍結させる。

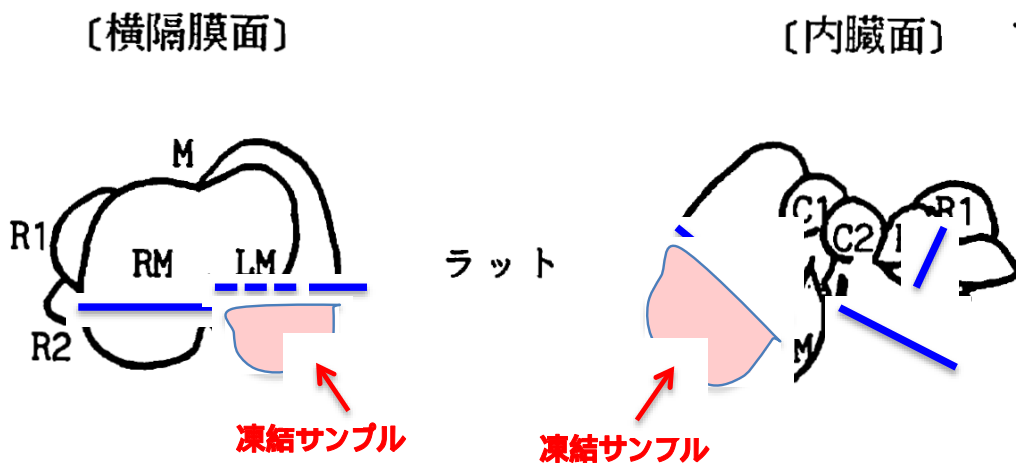


図 4. 肝臓の切り出し図

D. 膀胱

(ア) 固定

1. 尿道より 10%ホルマリンを約 0.8 mL 注入し、適度に膨らませ、糸で膀胱の付け根を結紮する。
2. 10%ホルマリン内にて 24 時間固定する。
3. 固定後、長軸に沿って正中で半割および水洗し、70%エタノール中で冷蔵保存する。(通常 1 週間以内に細切し、包埋過程に移す。)

(イ) サンプルの凍結

肉眼的に確認できる病変がない場合には、凍結を採取することは少ないが、注入前に隆起性病変が認識される場合は、半割病理組織標本と凍結標本を採取する。

肉眼的には認識できないが採取が必要な場合は、尿道から切断した膀胱の頂部を爪楊枝か竹串の鈍端にあて、かぶせるようにして膀胱を裏返し、粘膜上皮を掻き取ってチューブにいれるか、裏返した状態で適切な抽出溶液内にてホモジナイズし採取する。

E. 前立腺

(ア) 固定

1. 尿道の一部を含む状態で膀胱とともに前立腺を採取する。
2. 前立腺腹葉周囲の脂肪組織を剥離し、前立腺腹葉を他の葉から切り離し、臓器重量を測定する(図 5-)。
3. 背側葉および前葉は膀胱および尿道を付けたまま、単離した前立腺腹葉とともに 10%ホルマリンで 24 時間固定する。

(イ) 切り出し

1. 他の葉から切り離した前立腺腹葉はそのまま標本作製する。
2. 前立腺背側葉はホルマリン固定後、尿道に対して垂直に(水平断)、側葉および背葉が検討できる部位で切り出す(図 5-)。同部位を標本作製する。
3. 前葉は精嚢と一緒に左右少なくとも 1 片ずつ切り出し、標本作製する(図 5-)。

(ウ) サンプルの凍結

1. 腹葉はホルマリン固定する前の片側を凍結する。
2. 背側葉は周辺の脂肪織を剥離後に、片側を切り分けて凍結する。
(基本的に前葉については凍結組織を用いた検討を行うことは少ない。)

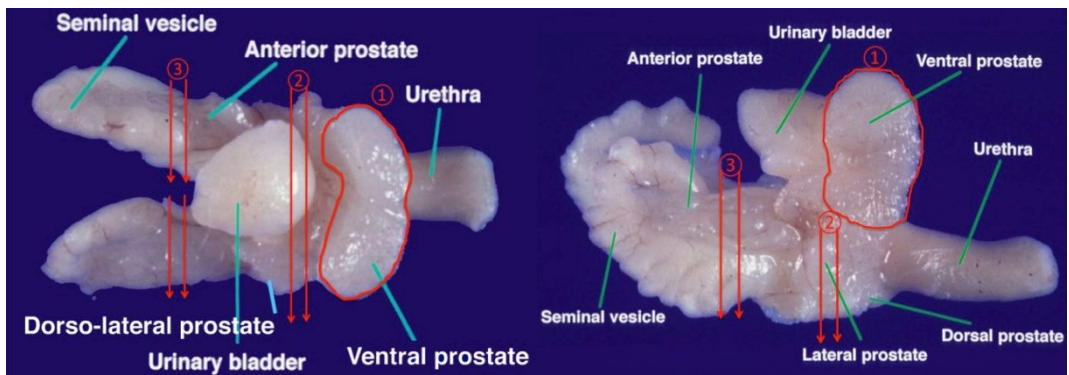


图 5. 前立腺切り出し図

【二】 サンプルの送付について

A. 肺

送付先

横平 政直 香川大学医学部腫瘍病理学

住所：〒761-0793 香川県木田郡三木町池戸 1750-1

e-mail：yokohira@med.kagawa-u.ac.jp

備考

基本的にはホルマリン浸漬までを統一基準で行い、肉眼的に肺結節様の病変が有った場合には48時間程度でエタノール浸漬に変更し、この状態でパッキングし香川大学へ送付とする(1群につき5匹程度、肉眼的結節がある個体が少ない場合には5匹未満でも良い)

肉眼的結節のない場合、肺の摘出、気管から肺内へのホルマリン注入、ホルマリン浸漬までを行う。プロジェクト終了までホルマリン浸漬状態でパッキング保存する。

余力があれば、切片作製し、組織学的な確認を行う。組織学的に病変があれば香川大学へ連絡する。

B. 消化管

I. 胃

送付先

塚本 徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科

住所：〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1 番地 98

e-mail：ttsukamt@fujita-hu.ac.jp

備考

ホルマリン等で固定し、翌日70%エタノールに替え、4℃で保存可。この状態で発送する。切り出し、包埋等その後の処理は藤田保健衛生大学の方で行う。

II. 大腸

送付先

吉見 直己 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学

住所：〒903-0215 沖縄県西原町字上原 207 番地

e-mail：yoshimi@med.u-ryukyu.ac.jp

備考

サンプルは固定した状態で発送する。空輸はできず、船便での輸送になる。70%エタノール浸漬し、クール便で送付。

C. 肝臓

送付先

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学

住所：〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1 丁目 4 番 3 号

e-mail：mwei@med.osaka-cu.ac.jp

備考

72 時間ホルマリン固定後 70%エタノール浸漬の状態を送付する。

ホルマリン固定した材料と合わせて凍結材料も送付する。

D. 膀胱

送付先

小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部実験病理学

住所：〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

e-mail：ogawa93@nihs.go.jp

備考

膀胱のサンプルはホルマリン固定後、半割・洗浄しカセットに入れ、70%エタノール浸漬の状態を送付する。

クール宅急便で 1 週間以内に送付いただけなのが理想。

1 群 5 匹あれば十分と思われる。

E. 前立腺

送付先

鈴木 周吾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学

住所：〒467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町 字川澄 1

e-mail：shugo@med.nagoya-cu.ac.jp

備考

前立腺サンプルは前立腺腹葉単独と、他の前立腺組織を尿道を付けたままで送付ください。もしくは、腹葉前立腺や周囲脂肪織を外さず、尿道を付けたまま前立腺組織塊で固定後、送付してください。

送付までに時間がかかる場合は 70%エタノールに浸漬する。

F. 凍結サンプルについて

送付先

戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野

住所：〒104 - 0045 東京都中央区築地 5 - 1 - 1

e-mail : ytotsuka @ ncc.go.jp

送付先

伊吹 裕子 静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学

住所：〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

e-mail : ibuki@u-shizuoka-ken.ac.jp

備考

付加体解析用サンプルは、固定前の状態で、ある程度の大きさのまま、クライオチューブ等に入れて凍結する。