

免疫組織化学染色に使用されるコートスライドガラスの組織切片接着メカニズム

Adhesion mechanism of tissue section on the coated slide glass in immunohistochemistry staining.

松浪硝子工業株式会社 技術開発部 主席技師 **新道 弘規**
HIRONORI SHINDO

TECHNICAL DEVELOPMENT, MATSUNAMI GLASS IND., LTD.

1. はじめに

病理検査では組織切片をスライドガラスに貼付し、組織染色や免疫組織化学染色を行い、標本を作製するが、この作製過程において組織切片がスライドガラス表面より剥離することが問題となっていた。この問題を改善する為に、スライドガラス表面に正電荷を付与した剥離防止コートスライドガラスが利用されている。

2. 剥離防止コートスライドガラスの歴史

剥離防止コートスライドガラスの歴史は、1990年までの概況が「病理と臨床」に川島ら¹⁾によってまとめられている。これによると、1883年にMayer²⁾により初めて卵白グリセリンコートが使用され、1898年にKoninski²⁾によりゼラチンコートが使用されるようになった。染色液による共染の問題があったが、溶媒にクロムミョウバンやホルマリンを加えた共染防止方法が考案され、凍結切片や合成樹脂包埋切片に応用されたという。1930年にはUlrika³⁾らによりポリ-L-リジン(PLL)コートが考案された。この手法は現在でも利用されており、病理診以外にも細胞培養ディッシュやプレートへのコートとして使用され、培養細胞接着に利用されている。

染色液による共染の問題を解決する新たな手法として、1963年に深見ら⁴⁾により、ネオプレンコートが考案され、クロロプレンゴムをトルエンで0.2%に希釈してスライドガラスにコートし、免疫組織化学の耐熱接着コートとして使用された。さらに1986年Martin Rentrop⁵⁾らにより3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APS)をコートしたスライドガラスが

考案され、1998年頃まではコートスライドガラスとしてPLLコートとAPSコートがよく認知されており、国内外のスライドガラスメーカーで広く販売されてきた。また、APSコートはコートの容易さから、病理技師によって自作されている施設もある。

しかし、PLLコートやAPSコートには、次のような問題点があった。

①コート表面が疎水性を示し組織切片伸展作業時の水抜けが悪く、乾燥に長時間を要することがある。これを改善するものとして極低濃度APSコートも存在したが、接着性そのものが弱く限定的使用に限られていた。

②ガラスと組織切片の間に気泡や水が入り組織切片の破れや、シワの原因になることがある。

③免疫組織化学染色で行われる抗原賦活化処理(マイクロウェーブ処理、オートクレーブ処理、ER-PgRの抗原賦活化処理<アルカリ処理pH10,95-99°C,40分>等)において接着力が十分でないため組織切片や細胞の剥離が発生することがある。

日本の市場ではこれらの問題点を解消するため、コート表面が親水性で、かつ強固な接着性を有するコートスライドガラスが求められていた。そして1996年に、初めて実用的な親水性剥離防止コートスライドガラスが、松浪硝子によりMASコートの名称で開発された。その約2年後には他社からも同様の親水性を有した剥離防止コートスライドガラスが発売され、日本の市場において剥離防止コートスライドガラスは、表面親水性であることが一般的となった。現在では70%程度を親水性剥離防止コートスライドガラスが占め、APSコートは25%程度となっている。さらに新規開発ガラスを使用し、MASコートの一部共染性を改良した

MAS-GPコートも開発されている。

3. 細胞膜と接着原理について

細胞同士の接着機構は、大きく分けて2つに分類される。

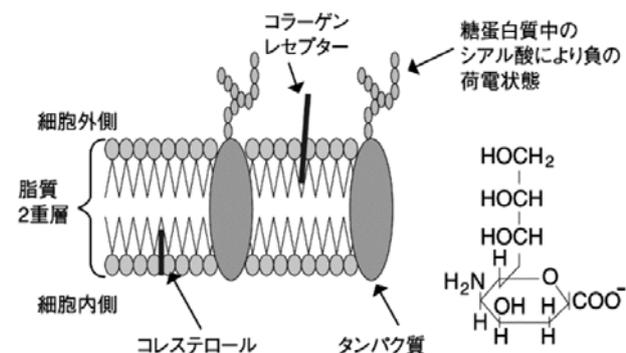
3.1 細胞外マトリックスを介する細胞同士の接着

細胞の成長分裂には足場との接着が必要であり、細胞膜には仲立ちをする細胞外マトリックスが存在している。細胞外マトリックスの例としては、コラーゲン、ラミニン、糖タンパク質群、フィブロネクチンならびにビトロネクチンなどがある。細胞培養には、コラーゲン等をコートしたポリスチレンやガラス基材が広く利用されている。

3.2 細胞接着分子による接着

細胞膜には多くの膜タンパク質や糖脂質より成る糖鎖が接着分子として数種類存在し、細胞同士の接着や相互作用に関与している。糖鎖の末端にはシアル酸という負の電荷を持った糖が結合している。シアル酸は、COO⁻基を持つため、負電荷を有しており細胞接着などに関係している(図1)。

病理組織標本や免疫組織化学標本における剥離防止用コートスライドガラスの接着効果は、基本的には細胞表面が負電荷を有していることを利用している。



4. PLL、APSおよびMAS コートの接着機構

4.1 PLLコート

ガラス表面にPLLコートを付与することでガラス表面は正電荷に帯電しており、負電荷を有する細胞や組織切片

を静電結合で接着する様にしている。PLLは塩基性アミノ酸の一種であり、側鎖にアミノ基(正電荷)を有したリジンのポリマーであり、PLLのアミノ基がガラス表面のOH基と静電的に結合している。PLLと組織切片や細胞との接着は、細胞表面の負電荷とPLLの正電荷により静電結合している。すなわちスライドガラスと組織切片とはPLLを介して接着固定されている。細胞や組織切片の接着力は、コート剤の特性上、特に免疫組織化学、*in situ* hybridization等の使用では、APSコートやMASコートと比較して弱く注意が必要である。また、コート表面は、少し疎水性を有している(図2)。

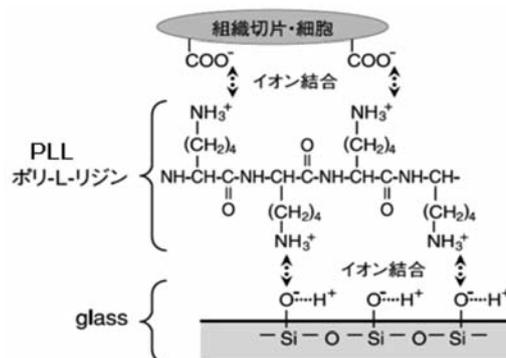


図2 PLLコートの接着機構

4.2 APSコート

APSはガラス表面のOH基と脱水縮合反応して共有結合によるコート膜が形成されている為、ガラス表面上にPLLコートと比較して化学的に安定なアミノ基の正電荷が付与されている。APSコートは、PLLコートと比較して、細胞や組織切片の接着力が強く、特にマイクロウェーブ処理、オートクレーブ処理等の熱処理にも耐久性を有している(図3)。

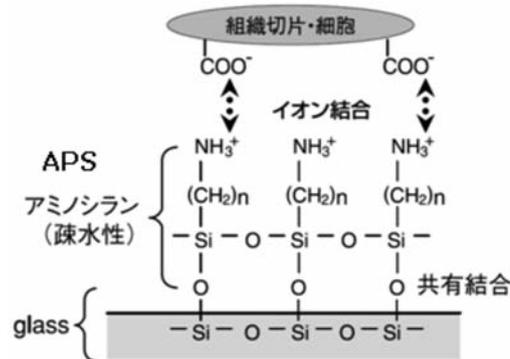


図3 APSコートの接着機構

コート剤の特性上、疎水性が高く切片を固定する場合、適切な温度の水に切片を浮かべてすくい上げたあと、スライドガラスと切片の間の水分を十分乾燥させる必要がある。この手法には技術的にある程度の熟練が必要であり、シワも発生しやすい(図4)。

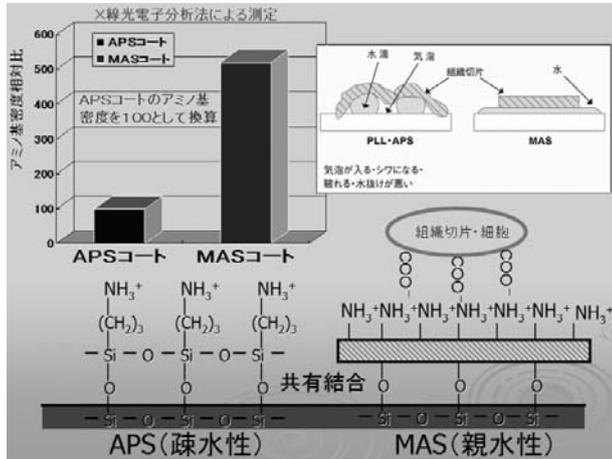


図4 表面親水性・疎水性による切片シワ発生とMASコートの接着機構・アミノ基密度

4.3 MASコート

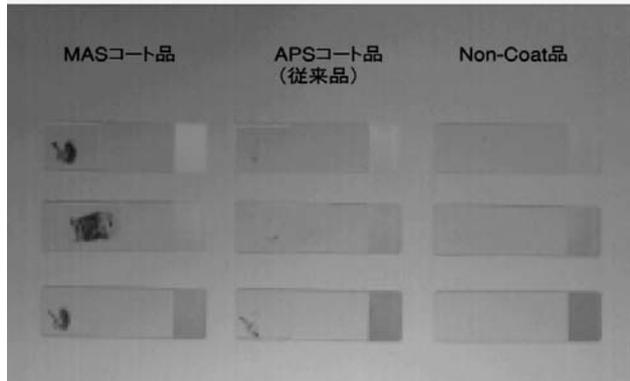
新しいコート剤を、試薬の選定という手法ではなく、新たに合成することを視野に入れて独自技術により開発を行った。従来のPLLコートやAPSコートでは実現不可能であった、細胞や組織切片の接着力の飛躍的な向上と、切片伸展作業を容易にするコート表面の親水性の2大特長を併せ持つMASコートを実現した。コート層は、ガラス表面のOH基と脱水縮合反応後の共有結合によりコート膜が形成され、化学的に安定なアミノ基による正電荷が付与され、かつアミノ基密度がAPSコートより高密度化されており、細胞や組織切片の接着力が向上している。また、APSコートと比較してガラス表面と組織切片の間の水抜け性が良好で乾燥時間の短縮が可能である(図4)。

4.4 PLL、APSおよびMASコートの接着比較

従来のPLLコートやAPSコートでは免疫組織化学等で行われる抗原賦活化処理(マイクロウェーブ処理、オートクレーブ処理、ER-PgRの抗原賦活化処理<アルカリ処理pH10,95-99℃,40分>等)では接着力が十分でないため組織切片や細胞の剥離が発生することがある。MASコート、APSコートおよびNon-Coat(コート無し)のスライドガラスについて、パラフィン切片と凍結切片を用いた組織切片剥離防

止効果を確認した結果を図5に示す。この結果からMASコートの優位性が確認できるが、アルカリ処理においてはMASコートでも剥離発生がある。これはコート剤の問題より、ガラスそのものがアルカリには弱いという問題であり、次に述べるMAS-GPコートを開発し改善した。

1) オートクレーブ処理後の切片剥離防止効果



2) その他の評価結果

	MAS(開発品)	APS(アミノシラン)	Non-Coat
切片伸展作業性	○親水性	×撥水性	○親水性
パラフィン	HCl	○	○
	NaOH	△	×
	プロナーゼ	○	○
	オートクレーブ	○	×
	マイクロウェーブ	○	×
凍結	HCl	○	○
	NaOH	×	×
	プロナーゼ	○	×
	オートクレーブ	○	×
	マイクロウェーブ	○	△

○剥離発生無し △一部剥離 ×剥離発生

図5 組織切片剥離防止効果

4.5 MASコートの改良(MAS-GPコートについて)

MASコートは、抗原賦活化処理での剥離防止等の免疫組織化学染色エリアでの使用を想定し開発を行った。発売後、一部ユーザーにおいてエオジン染色等を行った場合のガラス表面に対する共染の低減やER-PgRの抗原賦活化処理(アルカリ処理pH10,95-99℃,40分)等でも耐えうるコートスライドガラスの要望があり、新たにMAS-GPコートを開発し、2005年末より販売を開始した。MAS-GPコートは、以下の特長を有している。

①光学特性、耐アルカリ性に優れ、かつ低価格な新規

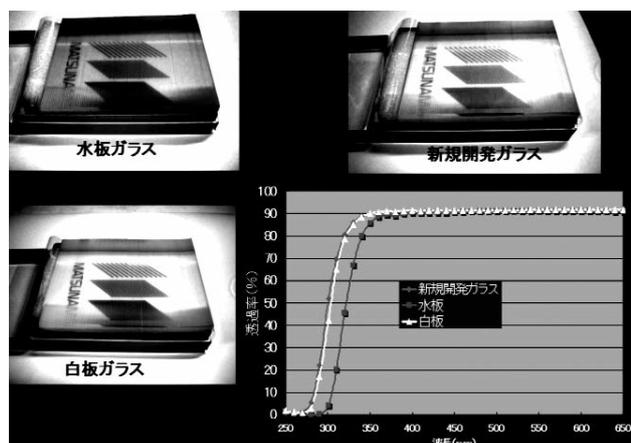


図6 新規開発ガラスの透過率と外観

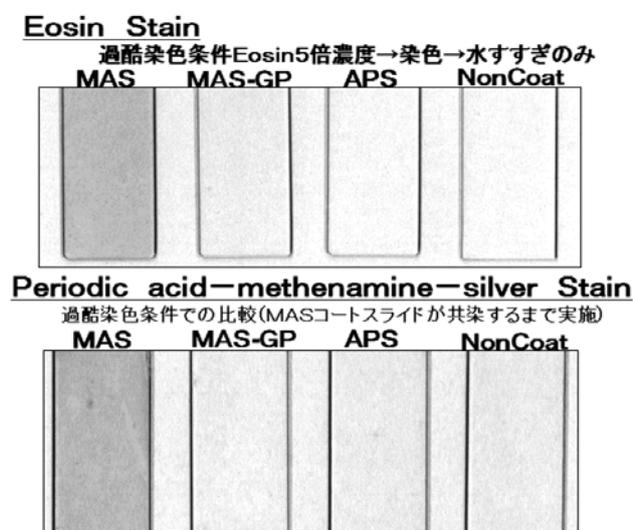


図7 ガラス表面の過酷共染テスト結果
(白黒写真で確認しづらいがMASのみ共染が確認される)

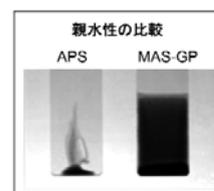
開発ガラスを採用(光学特性に優れるが価格が高い白板ガラスと同等の透過率を有したガラスを新規に開発した)(図6)

②一般染色用途でのガラス表面の共染を低減(エオジン染色、PAM染色等で、MASコートより大幅に共染性を低減した)(図7)

③切片伸展作業が容易(コート表面が親水性)(図8)

④組織切片・細胞接着力が高い(各種組織切片に対し、優位な接着固定性を有し、ER-PgRでのアルカリ処理<pH10,95-99℃,40分>等での使用にも耐える)(図8)

切片伸展作業を容易にする
・コート表面の親水性の比較
→親水性:APS<MAS-GP



組織切片・細胞接着力
・各種組織切片を使用し、検証を実施
→良好な接着固定性

	乳腺1	乳腺2	乳腺3	皮膚	骨髄1	骨髄2	子宮	脳	肺	十二指腸
切片の厚さ	25 μm	4 μm	25 μm	5 μm	25 μm	25 μm	5 μm	5 μm	25 μm	25 μm
MAS-GPコートスライド	良好	良好	一部剥がれる	良好	良好	良好	一部剥がれる	良好	良好	良好

オートクレーブ処理(115℃ 15分)

・ER-PgR等のHigh pH領域での使用にも耐える
→pH10 温浴槽95~99℃ 40分での賦活化処理において有効性確認済み

図8 コート表面の親水性比較と各種組織切片を用いた接着試験&ER-PgRでの使用試験

5. 剥離防止コートスライドガラス使用上の注意

ガラスは、一般的には安定した材料という見方がなされている。しかし、組織切片や細胞を直接接着させる剥離防止コートスライドガラスにおいては僅かなガラス表面の化学的変化が、スライドガラスとしての品質性能に大きく影響することがある。特にガラス表面は保管される環境中の水分により、大きな影響を受けることがある。ガラス表面に水分が吸着すると、ガラス成分と反応し、 Na^+ 、 Ba^{2+} およびシリカ等が形成され、さらに炭酸ガス雰囲気や酸性ガス雰囲気によっては、炭酸塩など塩類の結晶が析出し表面が白く焼けたように観察されることがある。析出したアルカリ成分は、シラノール結合(O-Si-O)を切断する様に働き、結果として剥離防止効果を低減させるように作用する。

また、薄切片を貼付けする際の乾燥方法の違いにより、その後の染色ムラ等の影響を受けることがある。特に70℃以上の温度で長時間乾燥すると、免疫組織化学染色の染色ムラに影響があると考えられる。

最近では自動免疫染色装置が普及してきており、各装置に最適化した、装置メーカーが推奨する標本作製法に従って剥離防止コートスライドガラスを使用する必要がある。

6. 剥離防止コートスライドガラスの今後

従来、免疫組織化学染色における抗原の賦活化処理においては、オートクレーブ処理やマイクロウェーブ処理が利用されてきており、その際の剥離発生防止にコートスライドガラスが多く利用されてきた。さらにここ数

年は、免疫染色の自動化装置が各社より販売され広く普及してきている(ベンタナ社 BENCHMARK XT、ダコ社 Autostainer、三菱化学ヤトロン社 Bond-Max システム、協和メディックス社 i6000、ニチレイ社 ヒストステイナー等)。

各社は、自動免疫染色装置に独自の加熱処理や染色機構を採用し、専用試薬、バッファー等を使用している。また、剥離防止コートスライドガラスがそのまま装置に適合し性能を効果的に発揮するか検証を行い、各社の標本作製法において推奨使用方法を提供している。自動免疫染色装置は、今後も広く普及していくと考えられるので、剥離防止コートスライドガラスも、これら自動化装置と連携した開発が一つのキーとなることは確実である。

7. 剥離防止コートスライドガラスの世界事情

アメリカでは日本以上に自動免疫染色装置が普及しているが、日本同様、親水性剥離防止コートスライドガラスが使用されているかという点、そうではない。アメリカで使用されている剥離防止コートスライドガラスの大半はAPSコートである。切片のシワ発生、伸展貼付作業性の悪さを重視していないのか、或いは少々のシワ発生等、診断に影響しないことは気にしないのか、APSコートを越える開発が実現していない状況である。

日本でのみ、親水性剥離防止コートスライドガラスが普及しており、かつ標本作製技術の追求を行っていると言える。欧米のスライドガラスメーカーは数社存在するが、実質1社が大きなシェアを有している状況であり、競争による開発が進んでいないかもしれない。また、中国には大小様々なスライドガラスメーカーが存在しているが、現時点では日本に展開できる品質には到達していない状況である。

今後、世界各国の病理診断事情が明らかになり、有効な情報が共有され、病理技術レベルの世界的な向上につながり、世界中の病気で苦しむ人々を少しでも救う事になることを希望する。

引用文献

- 1) 川島,喜納,石: 病理と臨床,Vol.8 No.3 (1990)
- 2) Siegfried, Fink: Some new method for affixing sections to glass slide. Aqueous adhesives. *Stain Tech.*, **62**, 27-32 (1987)
- 3) Ulrika, V. Mikel: A simple method for study of the same cells by light and scanning electron microscopy. *Acta cytological*, **24**, 252-254 (1980)
- 4) Fukami, A.: On an adhering method of thin film specimens to specimen grids. *J Electronmicroscopy*, **13**, 26-27 (1964)
- 5) Martin, Rentrop: Aminoalkylsilan-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment condition. *Histochem J*, **18**, 271-276 (1986)