

＜ニジマス稚魚の組織染色標本の作製＞

(動物組織学/実演生物学

文責：羽曾部正豪)

はじめに . . . p. 1

【1】 組織切片作製法の概要 . . . p. 2

【2】 標本作製に関わる主な試薬や備品と調製法 . . . p. 4

【3】 実技操作Ⅰ：前処理・固定/脱灰・整形 (1st Stage) . . . p. 7

【4】 実技操作Ⅱ：脱水・パラフィン浸透処理・ブロック作成 (2nd Stage) . . . p. 8

【5】 実技操作Ⅲ：マイクロトームによる薄切・伸展/選取/接着 (3rd Stage) . . . p. 10

【6】 実技操作Ⅳ：脱パラ/親水化と染色、脱水/透徹・封入 (4th Stage) . . . p. 11

【7】 パラフィン置換蠟人形の作成 . . . p. 12

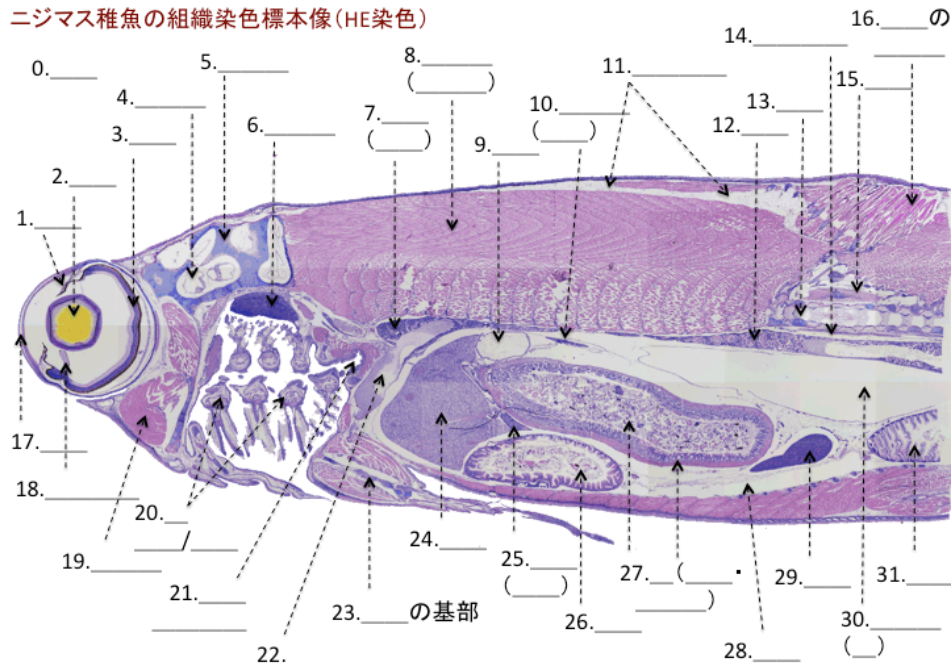
【8】 参考文献等 . . . p. 13

. 本編は Web 動物組織学/実演生物学の一部です

はじめに

- ・本編では、4, 5cm 程度のニジマス稚魚を材料に、組織標本として最も一般的であり、且つ汎用性の高いパラフィン切片のヘマトキシリン・エオシンの2重染色標本の作製法について解説する。
- ・パラフィン包埋組織切片染色標本の作製では、それぞれの行程において、いろいろな方法が考えられるが、本編では、ニジマス稚魚に対し確実に採用できる方法のみを以下に示す。
- ・なお、マイクロトームによる薄切操作は、気温が高いと薄いパラフィンリボン (4~6 μ m) の切り出しが難しくなるので、気温の低い季節が作業に向いている。もちろん、工夫次第で夏場でも行える。
- ・本編では、付録として、パラフィン置換蠟人形の作成法も記載する。蠟人形とは、パラフィン浸透後のサンプルをブロックとして包埋せず、パラフィン置換状態で魚体の形状を観察できるサンプルである。

ニジマス稚魚の組織染色標本像(HE染色)



補足: 切断面にはない主な臓器: 1) __、2) __、3) __、4) __、5) __、6) __、

【1】パラフィン包埋組織切片染色標本の作製:概要

本作製法は、下記<1-1>のように、その作業行程から4ステージに区分することが出来る。ただし、それぞれのステージ内の操作は途中で作業を中断することはできない。

全ての作業は約13ステップ(①~⑬)であり、その概略と使用する主な試薬機器を<1-2~>に記す。

<染色標本作製の行程概略:6日間>

1st Stage【固定/脱灰】:4日間

前処理→固定→(整形)→(脱灰)→(保存)

(すぐ脱水・パラフィン浸透処理を行わないときには、70%EtOHで保存)

2nd Stage【脱水/パラフィン浸透】:2日間

脱水→中間剤→パラフィン浸透→ブロック作成

(包埋後、パラフィンブロックとして保存)

3rd Stage【薄切・伸展/選取/接着】:1日間

薄切→湯水盤での伸展→スライドグラスへの選取/接着

(乾燥後、未染色プレパラートとして保存)

4th Stage【染色/封入】:1日間

脱パラフィン→親水化処理→H/E染色→脱水→透徹処理→封入

(完成した染色標本は永久標本である。)

<実技実験に関する注意事項>

1) 動物組織のパラフィン切片染色(H/E)標本作製では、有機溶媒(エタノールやキシレン)、パラフィン、マイクローム(刃)や染色液など、いずれも取り扱いに注意を要する試薬器具を用いる。不明の点等があったら調べる、または質問するなどして、正しい知識の基に実験を進めるようにする。また、廃液処理などにも充分配慮する。

2) 組織切片作製法は幾分慣れやコツが必要である。よって、このテキストでは基本的なことしか書いていません。例えば、手順Ⅱのパラフィン包埋ブロック作成や手順Ⅲのマイクロームによる薄切などは、このテキストでは網羅していません。参考書等をご参照ください。またはご質問ください。我々が汎用する参考書は下記です。

病理組織学標本作成技術(上、下巻)(1981)

病理技術マニュアル3 日本病理学会 編:医歯薬出版 ¥7500

病理組織標本の作り方(1986)

渡辺陽之輔・坂口弘・細田泰弘監修:

慶應義塾大学 医学部病理学教室 編、医学書院、¥4000 (ISBN 4-260-10343-1)

新染色法のすべて(1999)

月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊: 医歯薬出版(株) ¥4800

<標本作製に関わる主な試薬や備品と調製法>

1st Stage【固定/脱灰】

- ① 前処理：新鮮な組織と変形を防ぐため麻酔死させる。「フェノキシエタノール」を使用。
- ② 固定/脱灰/整形：固定液として「ブアン液」を利用する。本液では脱灰も同時進行する。固定中に試料（標本）をパラフィンブロックに出来るよう、大きさを切り揃える（整形）。引き続き固定を継続（固定期間 3 日間）。その後、70%エタノール保存。

2nd Stage【脱水/パラフィン浸透】

- ③～⑤：自動脱水パラフィン浸透装置がない場合は、人為操作で行う。
- ③ 脱水：試料中の水分を EtOH 系列（エチルアルコール系列）で徐々に除く。
- ④ 中間剤処理：パラフィンが浸透できるようキシレンで中間処理する
- ⑤ 溶融パラフィンの浸透処理：指定のパラフィンを使用する。約 75℃設定の溶融パラフィンでキシレン処理試料（中間剤処理）をパラフィンに置換する。必要に応じて引圧処理 20 分による効果的なパラフィン浸透処理も行う。
- ⑥ 包埋/ブロック作成：パラフィン置換試料を包埋皿に注いだ溶融パラフィン中に埋め込み固化させ、パラフィンのブロック標本とする。さらに整形（トリミング）し、台木に張り付け、マイクロトーム試料台に固定する。

3rd Stage【マイクロトームによる薄切・伸展/選取/接着】

- ⑦ 薄切（パラフィンリボンの作成）：回転式マイクロトームにより薄切 4-6 ミクロン（刃角 12 度）でパラフィンリボンを作成する。
- ⑧ パラフィンリボンの温水伸展とスライドガラスへの選取：パラフィンリボンをお湯（温水 43℃前後）の上に浮かべ伸展させ、標本としたい切片をスライドガラスの上ですくい取る。
- ⑨ 接着・乾燥：切片をスライドガラスに張り付けるためを約 55℃一晩で乾燥。

4th Stage【染色/封入】

- ⑩ 脱パラフィン/親水化处理（キシレン・EtOH 系列）：薄切パラフィン試料（未染色プレパラート）を染色するため、パラフィンをキシレンで除き、更に EtOH 系で親水化する。
- ⑪ 染色（H/E）：ヘマトキシリン染色、水洗・色出し後、エオシンで染色する。
- ⑫ 脱水/透徹：EtOH 系列で脱水、更にビオライトで封入するためキシレン置換並びに透徹（透明化）を行う。
- ⑬ 封入：永久標本作り。ビオライト試料の上に落とし、カバーガラスをかけ、封入する。

【2】標本作製に関わる主な試薬・備品と調製法

以下に、各ステージ・行程における必要物品の一覧及び試薬調製法を述べる

1st Stage 【固定/脱灰行程の物品】

- ① 前処理：麻醉剤（フェノキシエタノール）、ニジマス稚魚
- ② 固定/脱灰：ブアン液（飽和ピクリン酸水溶液、ホルマリン、酢酸の混液）、整形：マイクロトームの替え刃、発泡スチロール板、ビニール手袋、ピンセット

2nd Stage 【脱水/パラフィン浸透行程の物品】

本行程を行うためには自動脱水パラフィン浸透装置があると便利であるが、ない場合には蓋付きのガラス瓶（マヨネーズ瓶など）などに系列液を作る。パラフィン溶融のためには、70℃設定の恒温槽を利用。

- ③ 脱水：エチルアルコール（EtOH）系列、無水（Abs.）EtOH 調製には Molecular Sieves 3A 1/8（和光：133-08645）を利用、
- ④ 中間剤処理：キシレン、I～IIの2槽を準備する。
- ⑤ パラフィンの浸透処理：組織用パラフィン（HISTPREP568：和光 415-25791、mp56-58℃）パラフィン I～IIIの3槽を準備する。
- ⑥ 包埋/ブロック作成：使い捨てのお醤油皿、薬包紙、鉛筆、レフランプ、ガスバーナ、ピンセット、大型カッターの刃（ブロックトリミング用）

「100% (Abs) エタノールの調製法」

エタノールの脱水に使用できるのは、モレキュラレシーブ 3A タイプ。アルコール 1L 中に 70g 程度を入れ、一晩放置すれば脱水が完了し使用できる。水で飽和したら再生すれば新品と同等の吸水力を回復し、数十回以上の反復使用が可能である。99.5%エタノールにモレキュラレシーブズ入れるときには、紅茶かご（ステンレス製）やガーゼなどで包み糸で結わえいれると便利。

3rd Stage 【マイクロトーム行程（薄切）の物品】

- ⑦ 薄切：回転式マイクロトーム、替え刃、筆、薬包紙、
- ⑧ パラフィンリボンの温水伸展とスライドガラスへの選取。
温水 43℃前後のバット（湯水盤）、スライドガラス、ガスバーナ（アルコールランプ）、柄付き針、スライドガラス立て
- ⑨ 接着・乾燥：約 55℃一晩用の乾燥機、

4th Stage 【染色行程の物品】

- ⑩～⑫ではキシレンと所定濃度の EtOH、ヘマトキシリン、エオシン、80%EtOH、染色壺、染色かご、
- ⑬ 封入：ビオライト（Bioleit：応研商事 940728、製造元 高研）、カバーガラス（MATUNAMI 22 x 40mm, No.1 0.12- 0.17mm）、オモシ、キシレン、竹串

「麻醉剤」

- ・フェノキシエタノール、またはベンゾキン (p-アミノ安息香酸エチルエステル：30% in EtOH)
濃度：数滴/2L、麻醉死させるときには濃度を高める、10分くらい放置

「固定液」

・ブアン液

- 1) 飽和ピクリン酸/ホルマリン/氷酢酸 (酢酸でOK)を、15対5対1の割合で要時調製する。1週間くらい保存しても使える。
- 2) 飽和ピクリン酸：DWにピクリン酸を加え、沈殿ができるまで溶解 (DW100mlに2gで飽和) し室温保存。ブアン液調製の時、その上清を濾過して使用。

固定液についての補足

ブアン固定液が使えない場合には、下記のリン酸緩衝ホルマリンで標本を数日固定後、5%EDTA-2Na (NaOH粒を加えてpHを中性にする) に標本を入れ、2日おきにEDTA液を交換し脱灰する (4-7日程度) ことも可能である。脱灰状態の確認には、マイクロトームの替え刃で、背骨を切ってみて、スムーズに引き切りできればOK。

・リン酸緩衝ホルマリン (pH7.2)

ホルマリン	100ml
第1リン酸Na ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4.4g
第2リン酸Na ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	25.9g
DW	900ml
Total	1000ml

「染色液」

・マイヤー・ヘマトキシリン液：Mayer's Hematoxylin

以下の試薬を順次溶解

500mlのポリプロピレン製ボトルに、

- 1) ヘマトキシリン (Hematoxyline) 0.5 g
- 2) 蒸留水 (DW) 500 ml
- 3) ヨウ素酸ナトリウム (NaIO_3) 0.1 g
- 4) カリウム・ミョウバン ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 25 g
- 5) 酢酸 (または氷酢酸) 2.5 ml

・ **エオシン液 : Eosin solution**

以下の試薬を順次溶解。調製後のエオシン液は透明ではないが 80%EtOH を加えると透明になる。
実際の染色にあたっては、下記の注意事項に従い濃度を調整する。

250ml のポリプロピレン製ボトルに、

- | | |
|-----------------------------------|--------------|
| 1) エオシン Y (Eosin Y 水溶性) | 2g |
| 2) 蒸留水 (DW) | 200ml |
| 3) 酢酸 (または氷酢酸) | 0.2 ml [少なめ] |

注意事項：上記の条件で酢酸を入れると作成したエオシン液（原液）は濁る。不溶性になるがこれを原液とする。実際の染色に使う時には、良く均一攪拌懸濁後、80%エタノールで等倍希釈する。希釈すると透明になります。しかし、この 2 倍希釈液では染まりが良すぎて、切片が真っ赤になるので、更に 40%エタノールで等倍希釈し、**最終 4 倍希釈の 40%エタノール染色液**とする。

.....

【3】実技手順 1st Stage 【前処理/固定/脱灰行程】

生きているニジマス稚魚（約4 cm, 0.4g くらい）を材料にする。固定する前日くらいから絶食させる。

- ①-1：1リッターくらいの飼育水にニジマス稚魚を取り、フェノキシエタノール（麻酔液）を数滴（または数 ml）加え、苦悶させずに麻酔死（安楽死）させる。
- ①-2：固定（ブアン液）と整形
- 1) 麻酔死させたニジマスシャーレ等に静置し、体が浸るまでブアン液を入れ、体が湾曲しないよう（背骨が真っ直ぐ）に注意し、前固定1時間程度（短くても良い）。体表面を硬直させる。（麻酔死が不十分だとブアンを入れたとき暴れるの注意、シャーレに入れたらすぐ蓋をする。学生が行うときにはゴーグル着用）。
 - 2) 硬直させたニジマス体重の x20 容量のブアン液に入れ3日間程度の固定処理。ブアン固定液では脱灰反応も平行して進む。
 - 3) ただし、途中1日目にブアン液から取り出し、発泡スチロール板に硬直した標本を静置し、不必要な部分、例えば尻鰭以下、をマイクロトームの使用済み替え刃で切り落とす。整形する。その後、再度、固定脱灰を進行させる
 - 4) 固定脱灰後、すぐ脱水パラフィン浸透処理へ進行しない場合には、水道水（流水）で30分～数時間洗い、ブアン液を除いた後、70%エタノールで保存する。

<注意事項>

- 1) 肛門直前で切れば腹腔が露出するので固定脱灰や脱水/パラフィン浸透が効率良く進む。
- 2) 3日程度のブアン固定で、稚魚なら骨も良く切れるようになる。固定途中で整形切断するとき、剃刀の刃がスムーズに降りないとき、骨の感触が残る時には脱灰不十分。
- 3) 操作の際には、体表にダメージを与えないために、ピンセットで尾部などを掴んで操作する。
- 4) ブアン液は皮膚に有害。皮膚が固定染色されるので、ゴム手袋等をする。ゴーグルを着用。
- 5) 切るときは刺身を切るときのように、引切り1回でシャープに落とす。余分な圧力を加えて組織/細胞に損傷を与えないよう注意。

【4】実技手順 2nd Stage【脱水/パラフィン浸透行程】

③～⑥までの行程である。下記の時間割に従い、自動脱水パラフィン浸透装置で行う。

自動脱水パラフィン浸透装置がない場合には、マヨネーズ瓶などに系列液を作る。パラフィン溶融のためには、70℃設定の恒温槽を利用。マニュアル操作についての補足は、下記参照。

脱水/パラフィン浸透行程の時間割

処理・操作	処理時間
-------	------

③ 脱水処理 (Dehydration)

- | | |
|--------------------------------------------|--------------------|
| <input type="checkbox"/> 0) 70%EtOH (又は流水) | 数時間 (ブアン除去、なくても良い) |
| <input type="checkbox"/> 1) 70%EtOH | 1 時間 (又はそれ以上でも良い) |
| <input type="checkbox"/> 2) 80%EtOH | 1 時間 (又はそれ以上) |
| <input type="checkbox"/> 3) 90%EtOH | 1 時間 (又はそれ以上) |
| <input type="checkbox"/> 4) 95%EtOH | 1 時間 (又はそれ以上) |
| <input type="checkbox"/> 5) 99.5%EtOH | 1 時間 (又はそれ以上) |
| <input type="checkbox"/> 6) Abs. EtOH 1 | 1 時間 |
| <input type="checkbox"/> 7) Abs. EtOH 2 | 1 時間 |

④ 中間剤処理 (Cleraing)

- | | |
|------------------------------------|------|
| <input type="checkbox"/> 8) キシレン 1 | 1 時間 |
| <input type="checkbox"/> 9) キシレン 2 | 2 時間 |

(必要に応じて長くする、一晩放置しても OK)

⑤ パラフィン浸透処理 (Infiltration)

・パラフィン槽の温度は第 1 槽を約 58℃、第 2 槽を約 72℃、第 3 槽を約 77℃に設定 (全部を 75℃位にしても OK)。

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------|
| <input type="checkbox"/> 10) パラフィン 1 | 1 時間 |
| <input type="checkbox"/> 11) パラフィン 2 | 1 時間 |
| <input type="checkbox"/> 12) パラフィン 3 | 1-2 時間 |
| <input type="checkbox"/> 12+ α) 減圧処理 (可能なら行う : 吸引減圧処理 20 分でパラフィン浸透) | |

休まず、包埋 (パラフィンブロックの作成) を行う。

⑥ 包埋 (Embedding : パラフィンブロックの調製)

- | | |
|-----------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> 13) 下記参照 | |
|-----------------------------------|--|

<マニュアル操作について>

- 1) 処理時間は下記に従う。マニュアル操作（自動機器を用いない）の時には、全行程が最短で約 13 時間なので、実質時間は早朝から深夜の操作になる。そこで、キシレンⅡの時間を長くすることも可能なので、キシレンⅠまでを夕方まで行い、キシレンⅡは夜に開始し、翌朝にパラフィン処理を開始する。午後にブロック作成。
- 2) 下記の系列試薬を保存容器に調製する。パラフィンは 70℃設定の恒温槽を利用し、マヨネーズビンや陶器壺（マグカップ）中に融解しておく。
- 3) 通常実験室で、固定試料をマヨネーズビンに入れ、系列液を加える。15 分おきに液をゆっくり揺する。処理時間終了後、液を完全に保存容器に回収し、再度、試料ビンに次の系列液を加える。操作を繰り返す。
- 4) キシレンⅡからパラフィンⅠに移し替えるときには、試料が乾かないように素早く溶融パラフィン槽に入れる。パラフィン浸透の時はできるだけ、頻繁に揺り動かし、浸透を助ける。マニュアル操作の時には時間を長めに取る方がよい。

<系列試薬の調製と補足>

- ・エタノール系列の所定濃度液はポリプロピレン製のサンプルボトルなどに調製し保存しておくとう便利。
- ・キシレンはガラス瓶に保存すること（密封）。

<⑥：包埋操作>

- ・パラフィン浸透したサンプルの包埋には専用皿があるが、使い捨てのお弁当用醤油皿（大型）などを利用し、パラフィン包埋する。
 - ・溶融パラフィンは室温ですぐ固化するので、レフランプ（発熱ランプ）の下などを作業スペースとして確保すると便利。溶融槽の試料を冷えたピンセットなどの摘むと、パラフィンが固化して作業が困難になるので、ガスバーナ（小火炎）でピンセットなどを温めながら操作する。
- 1) 包埋皿に溶融パラフィンを入れ、サンプルのパラフィンが冷え固まらないよう、できるだけ早くサンプルをお皿に入れる。その時、サンプルが中央に位置するよう、また切り易いような配置を考慮する。
 - 2) サンプルがパラフィンからはみ出さないように考慮する。
 - 3) 包埋するとき、小紙片（薬包紙）にサンプル名等を鉛筆記入し、パラフィンプロックに張り付けておくと便利。

.....

【5】実技手順 3rd Stage【ミクロトーム行程（薄切）、その他】

（ミクロトームによる薄切・伸展/選取/接着）

以下の項目は実技指導を受ける等して、コツを修得するすることが肝要。

文章では上手く説明できないので省略するが、幾つか思いつく要点を上げる。記述する。

詳細は参考書等を参照。

例えば、

病理組織学標本作成技術（上、下巻）（1981）

病理技術マニュアル3 日本病理学会 編：医歯薬出版 ￥7500

⑥ ブロック整形と台木接着/ミクロトームに固定

- ・ミクロトーム台木にパラフィン接着するブロックはあまり大きすぎないこと（幅3cm、高さ1.5cm程度を限度にする）。
- ・パラフィンブロック中のサンプルの大きさは、その60%面積くらいとする。ミクロトームの切り出し面にしめるサンプルの面積が大きすぎるのは扱いにくくなる。

⑦ 薄切（切片作成：回転式ミクロトームによるパラフィンリボンの作成）

- ・刃角は12度にセットする。
- ・ミクロトームに幾つもある固定ハンドルは十分に絞める。ひとつでも絞めが不十分だと途中で手こずる。
- ・切り出し前には、サンプルステージの位置が、スタート近辺であることを確認する。
- ・リボンは筆先などで引きのぼしながら、リボンを連続薄切すると良い。
- ・薄切中のリボンが長すぎると手こずるので、薬包紙の長さ程度になったら、薬包紙上にすくい取る。あまり長く切り出さない。

⑧ パラフィンリボンの温水伸展とスライドガラスに選取。

- ・伸展させる温度は適時確認する。
- ・温水盤にリボンを静かに浸けると、浸けた部分から広がるので、その広がり度で伸展させる。

⑨ 接着・乾燥（一晚）：未染色標本のまま長期保存可能。

- ・55℃の乾燥機で、スライドガラスに選取した標本を充分乾燥し、ガラス面に接着させる。

注意：ミクロトームにブロックなどを固定する時には、刃を外して行うこと。

.....

【6】実技手順 4th Stage【染色行程】

(薄切後、スライドガラスに接着伸展・乾燥させたパラフィン切片の染色)

以下の1~14の操作は連続して染色壺を利用して行う

脱水/染色行程の時間割

処理・操作	処理時間
⑩-1 脱パラフィン (deparafinization)	
<input type="checkbox"/> 1 : Xylene 1st	10分
<input type="checkbox"/> 2 : Xylene 2nd	10分
<input type="checkbox"/> 3 : Abs. EtOH (キシレン除去)	5分
⑩-2 親水処理 (Hydration)	
<input type="checkbox"/> 4 : 95% EtOH	2~3分, またはそれ以上でも良い
<input type="checkbox"/> 5 : 80% EtOH	2~3分, またはそれ以上でも良い
<input type="checkbox"/> 6 : 70% EtOH	2~3分, またはそれ以上でも良い
<input type="checkbox"/> 7 : 50% EtOH	2~3分, またはそれ以上でも良い
<input type="checkbox"/> 8 : Water (DW)	2~3分, またはそれ以上でも良い
⑪ 染色 (H/E)	
<input type="checkbox"/> 9 : Mayer's Hematoxylin	15分 (試し染色で処理時間を決めておく)
<input type="checkbox"/> 10 : 水洗 (流水、水道水)	10~20分 (青みがかかるまで流水で脱色、標本に直接流水をかけない)
<input type="checkbox"/> 11 : Eosin (x 4 希釈液の場合)	30秒~1分程度 (試し染色で処理時間を決めておく)
<input type="checkbox"/> 12 : Water (DW/水道水)	1 dip (数回上下させる) (染色判定法 : 軟骨が青く筋肉が赤く染まるようにする)
⑫ 脱水処理 (Dehydration)	
<input type="checkbox"/> 13 : 70% EtOH	1 dip (または数回上下させる)
<input type="checkbox"/> 14 : 80% EtOH	1 dip (または数回上下させる)
<input type="checkbox"/> 15 : 90% EtOH	1 dip (または数回上下させる)
<input type="checkbox"/> 16 : 95% EtOH	few dips
<input type="checkbox"/> 17 : 99.5% EtOH (くみ出し*)	few dips
<input type="checkbox"/> 18 : Abs. EtOH 1st	3分, またはそれ以上も可
<input type="checkbox"/> 19 : Abs. EtOH 2nd	3分, またはそれ以上も可
<input type="checkbox"/> 20 : Xylene 1st (中間剤)	3分, またはそれ以上も可
<input type="checkbox"/> 21 : Xylene 2nd (透徹/保存)	3分, またはそれ以上も可
⑬ 封入 (Mounting)	
<input type="checkbox"/> 22 : ビオライト/カバーガラスで封入	

<バイオライト封入法>

・本操作ではキシレンガスが多量に出るので、換気や風向きに充分注意して、ガスをなるべく吸引しないような実験台で行うこと。

- 1) プレパラートを安置した移動用のキシレン壺を封入操作を行う実験台に移動させる。
- 2) プレパラートを「フスマ（封入用に市販されているプレパラートケース、私は襖と呼んでいる）」に置く。染色切片の向きは上向き。
- 3) バイオライトを染色切片の上に数滴ほど滴下し、カバーガラスを載せる。ガラスの自重でバイオライトが多少、広がってから、重りを載せ、スライドガラスとカバーガラスを密着させる。そのまま放置し乾燥させる。

<バイオライト扱いのヒント>

- ・バイオライトはキシレンで溶解するが、キシレンは揮発性が高いので、バイオライト瓶のキャップを解放すると、すぐ堅くなり使いにくくなる。そこで時折、微量のキシレンをバイオライト瓶の中に滴下し柔らかさを加減する。
- ・また、使用するバイオライト滴下用の竹串はキシレンに浸けておき、要時、キシレンを紙タオルなどで軽くふき取ってから、キシレン壺に入れると使いやすい。

.....

【7】パラフィン置換蠟人形の作成

実技手順Ⅰ（前処理、麻酔、固定と整形）の操作課程に準じて操作を進め、最終段階のパラフィン包埋のステップを行わず、そのまま蠟人形とする。

コツとしては、パラフィン浸透魚を金網などに載せ、レフランプや温風ドライヤーなどで、余分なパラフィンを除く、また表面が綺麗にできるよう心掛ける。固定の段階で鱗などが損傷していない物が好ましい。

できあがった蠟人形を、再度パラフィン溶融槽にいれ、上記の操作を行えばいつでも組織切片染色標本を作製する事ができる。

.....

【8】参考文献等

- 1) 病理組織標本の作り方 (1986)
渡辺陽之輔・坂口弘・細田泰弘監修：慶應義塾大学 医学部編・
医学書院 ¥4000 (ISBN 4-260-10343-1)
- 2) 新 染色法のすべて (1999)
月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊：, 医歯薬出版 (株) ¥4800
- 3) 病理組織学標本作成技術 (上、下巻) (1981)
病理技術マニュアル 3 日本病理学会 編：医歯薬出版 ¥7500
- 4) 光学顕微鏡で見る比較動物学 (1994)
越田豊・常木和日子 培風館 ¥2500 (ISBN4-563-07730-5)
- 5) 魚類組織図説 正常組織と病理組織 (1989)
日比谷京 編：講談社 ¥5000 (ISBN 4-06-139394-4)
- 6) 動物の顕微鏡観察 (1997)
井上勤, 新版 顕微鏡観察シリーズ 3：, 地人書館 ¥3000
(ISBN4-8052-0600-4)
- 7) 魚類組織学図説 (1969)
川本 信之・福田 芳生, 石崎書店 ¥ (ISBN)
- 8) 目でみる組織学実習図譜 (An advanced atlas of histology) (1979)
W.H.Freeman (駒林隆夫 訳), 廣川書店 ¥ (ISBN)
- 9) 標準組織学 (総論、各論) (1988)
藤田 尚夫・藤田 恒夫 : , 医学書院 ¥8000 (ISBN4-260-10047-5)
- 10) カラースケッチ 生理学 (1990)
永田豊、坪井實 監訳, 廣川書店 ¥3900 (ISBN4-567-51110-7)
- 11) 魚類解剖図鑑 (1992)
落合明, 緑書房 ¥9800 (ISBN4-89531-063)
- 12) MICROSCOOPIC ANATOMY OF SALOMNIDS:AN ATLS (1983)
YASUTAKE W. T.& J.H. WALES , RESOURCE PUBLICATION150 :
U.S.Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service ¥ (ISBN)