

CryoJane Operating Procedure

Background

従来の切片作製では通常、筆やアンチロール器具を使って、ナイフ上に切片をのせます。熟練者でも、特に 2~4 ミクロンの厚い切片の場合、このステップは簡単ではありません。

切片をのせる際、室温のスライドが凍結切片に接触すると、切片が瞬間融解する事になります。表面張力により溶けた切片がスライドに付着します。氷が溶けると、水が以前氷で満たされていたスペースを満たします。核質および細胞質は水和し、赤血球は溶け、可溶性物質は移動します。溶かされて生じる流れが微細構造をずらしたり変形したりします。その後の問題としても、ステップ中に溶けた切片が乾燥し、表面張力によって組織構造を曲げ、ずらし、壊します。病理学者と臨床医は、変形した微細構造のもとでも正常構造と異常構造を区別する事ができます。

対照的に、本 CryoJane プロセスは、特に融解および風乾とそれによるアーチファクトを回避することを目指しています。ステップの間に、切片を支持し固定するために冷却接着テープを使用します。テープについての凍結切片は特別の低温用接着剤をコーティングしたスライドに移されます。切片は操作の間に溶ける事はありません。その後、スライド上の粘着性のコーティングを重合し、テープを取り除きます。冷凍中の切片は一貫してスライド上に固定されています。

Preparation

- その日に使う粘着性スライドおよびテープを使用するクライオスタットの中に入れます。
- クライオスタットの温度は-25°C~-30°Cにします。(クライオスタットモデルに依存します)
- ECU のライト(左の LED)がグリーンになるまで、クライオスタットを冷却します。
- 右の LED は、パワーと表示されている場合赤、オイルバスと表示されているなら緑になります。

Use

組織標本が凍結し、マイクロームのチャックに取り付けたら、以下の手続きに従います。

単一のセクション用のステップ：

1. Cryo-Vac-Away が設置されている場合、ナイフの端に収集ノズルを配置し、足スイッチを踏んでトリミング中の碎片を自動的に取り除いて下さい。Cryo-Vac-Away が設置されていない場合、十分なブロック表面積、希望の深さにブロックをトリミングして下さい。希望の切片の厚さにマイクロメーターをセットして、完全な切片が切れることを確かめるために何枚か切片を切して下さい。

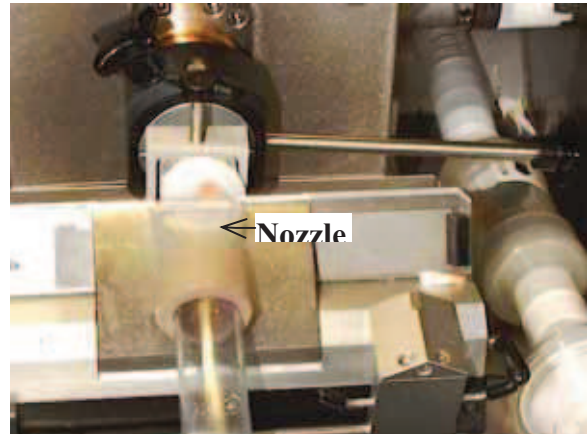


Figure 5. Block trimming and debris removal.

2. あらかじめ冷却された袋から、粘着剤コーティングスライドを持ち、クライオスタットチャンバーの内部でガラススライドを取り出して下さい。



Figure 6. Adhesive coated slide in pouch.

3. 摺りガラス部分でスライドを保持し、接着剤をカバーしている保護フィルムを素早くむいて、廃棄して下さい。



Figure 7. Peeling mylar from adhesive coated slide.

4. ステンレスチールのバネクリップの下にスライドガラスの摺りガラス部分を滑り込ませて、Mech の Blue Pad の上に、粘着剤部分を上にしてコーティングスライドを置きます。

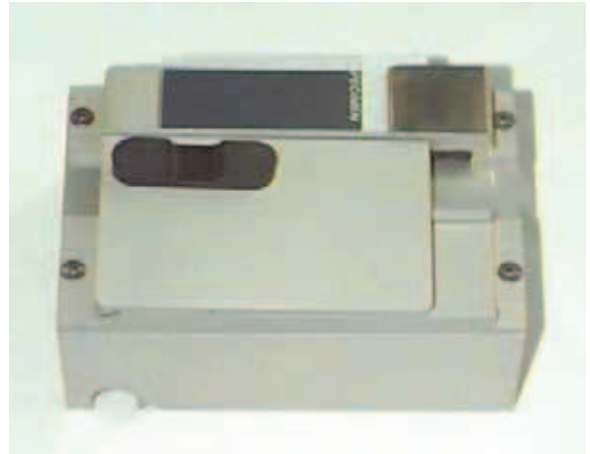


Figure 8. Adhesive Coated Slide on Blue Pad.

5. クライオスタットの内部で、テープウィンドウをとり、粘着性ウィンドウをカバーする保護フィルムを剥いて、廃棄して下さい。



Figure 9. Exposing the Tape window.

6. ブロック表面に粘着性部分に向けて、狭いタブの部分でテープを持って下さい。接着剤の底端がブロックの底端に一致するように、トリミングしたブロックに対してテープの位置を決めて下さい。テープの広いタブの方がナイフの上に出るように、ブロック表面上にテープを置いて下さい。粘着性ウィンドウの部分はブロック表面から出ないようにして下さい。

組織の表面が溶けますから、ブロックをカバーするテープには触れないで下さい。

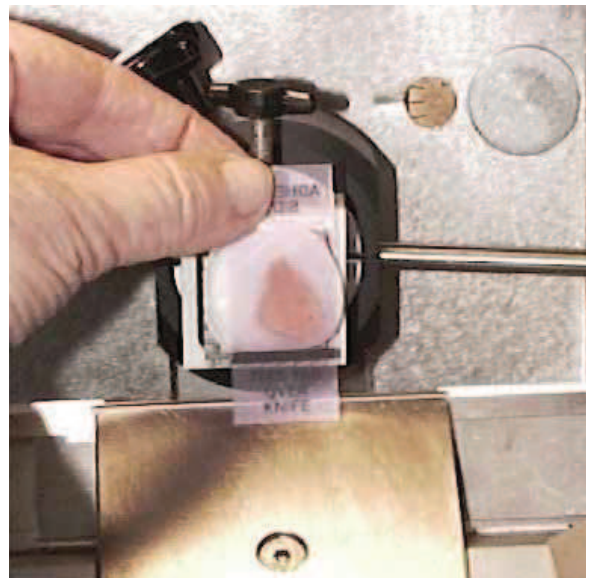


Figure 10. Placing Tape on block face.

7. 冷却されたハンドローラーを使用して、1~2回上下、1~2回左右にローラーを転がして、ブロック表面にテープをよく付着させて下さい。少し強く押す必要があります。終了したら、クライオスタット**内部**にハンドローラーを置いて下さい。

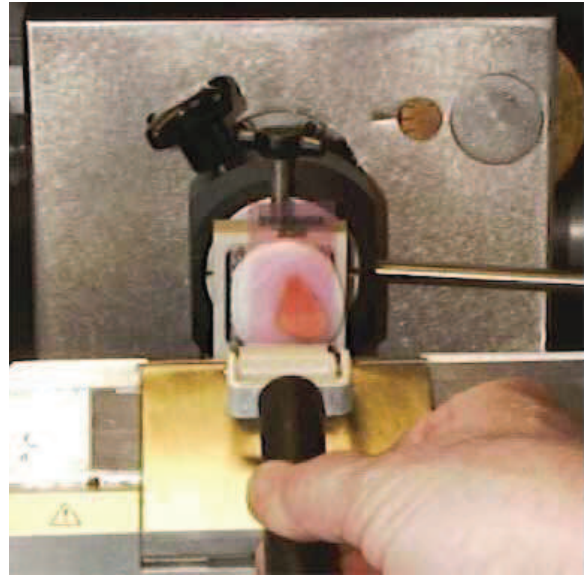


Figure 11. Laminating the Tape to the block face.

8. 切片を作るためにフライホイールをゆっくり均等に回して下さい。鋭いナイフなら、テープ上で固定された切片はフラットでしわのない、2ミクロンの薄切片が得られます。**筆やアンチロール装置は必要ありません。**

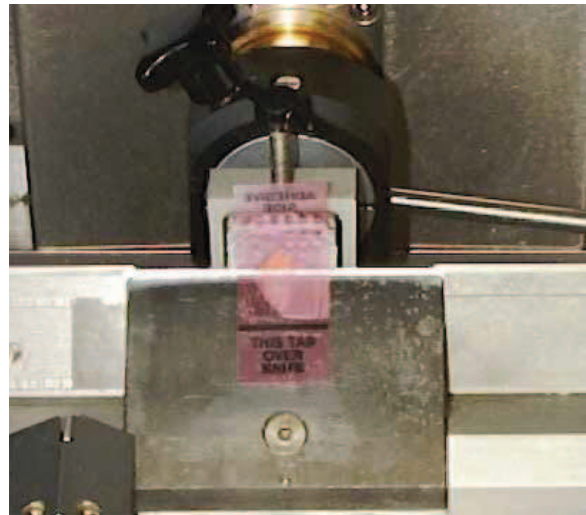


Figure 12. Cutting the section.

9. どちらかのタブを持ってテープを拾い上げ、切片を溶かさないうクライオスタットの内部で、Blue Pad 上のスライドガラスに移して下さい。

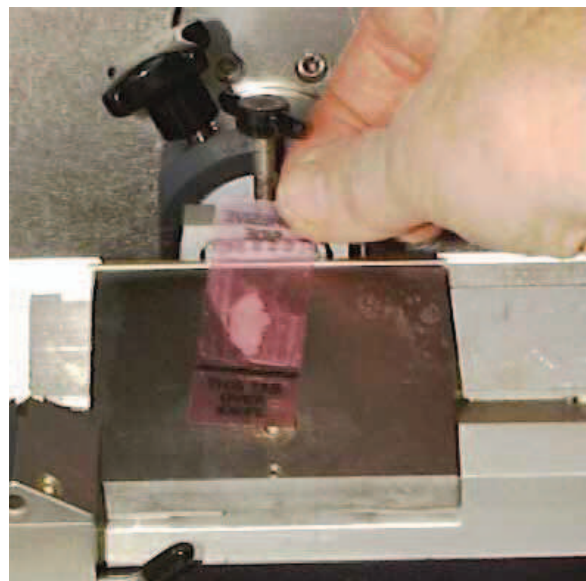


Figure 13. Handling the cut section.

10. 粘着剤コーティングスライド上で切片側を下にしてテープを置いて下さい。多数の切片を載せる場合は、**Steps for Multiple Sections** を参照して下さい。

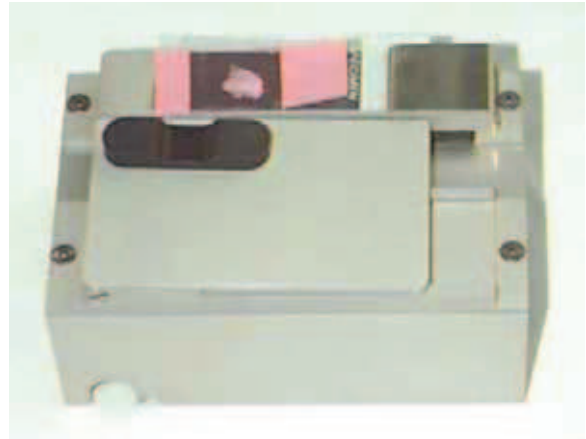


Figure 14. Positioning the Tape on the Slide.

11. スライドにテープを接着するために冷却ハンドローラーを使用して下さい。ローラーを切片のテープの上から 2~3 回回転させます。

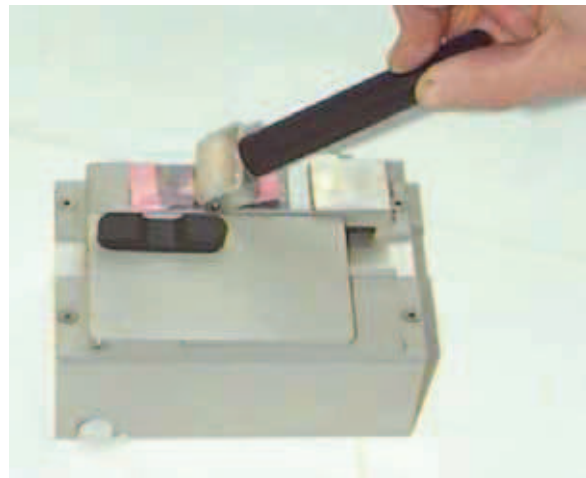


Figure 15. Laminating the section to the Slide.

12. スライドの摺りガラス部分を持ち、Blue Pad からスライドガラスを取り出し、フラッシュ・トレイへ移動して下さい。ストッパーで止まるまで、ゆっくり中へスライドを押しして下さい。(チェックするためには、蓋を上げて下さい。)フラッシュを始動する前に閉じて下さい。

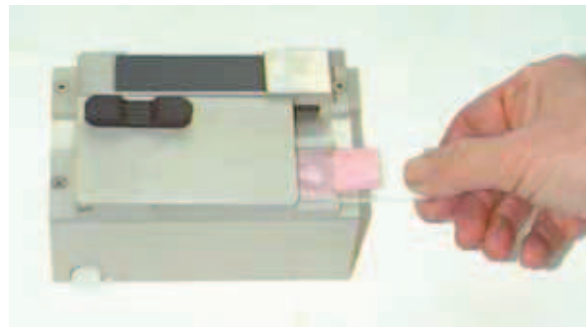


Figure 16. Placing the slide into the Flash Tray.

13. UV フラッシュを始動させるために黒い取手を押して離して下さい。UV はスライド上の接着剤を硬化し、スライドへの凍結切片を固着させます。

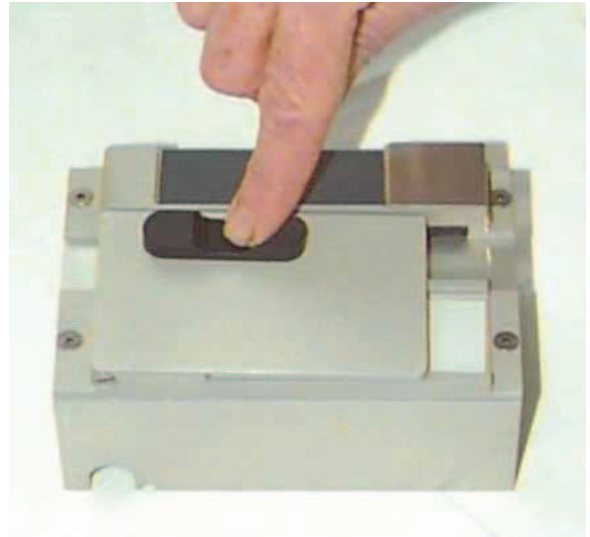


Figure 17. Curing the adhesive on the Slide.

14. 摺りガラス部分を保持して、直ちに固着されたスライドをフラッシュ・トレーから取り出して下さい。切片が溶けますから、クライオスタットの外にスライドを出さないで下さい。

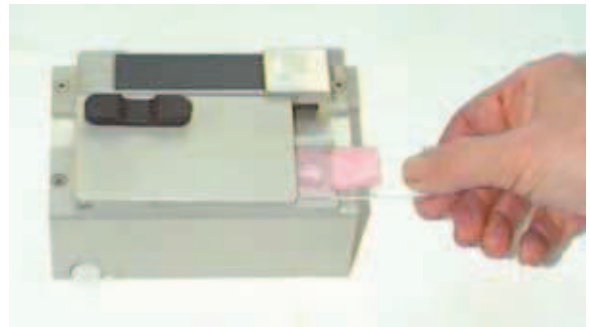


Figure 18. Removing the cured Slide.

15. クライオスタットチャンバーの中で、スライド上の凍結切片を露出するために注意深くピンクテープを剥がして下さい。

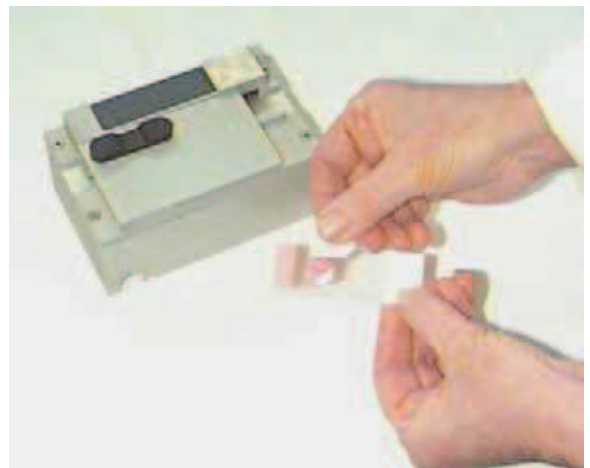


Figure 19. Removing Tape from cured Slide.

16. 切片に力がかからないで、かつ全てが完全に移るようにテープは対角線方向に下方へむいて下さい。切片に指を触れないで下さい。取り除いたテープを廃棄します。

以下、スライドは：

a) *Instrumedics の Aqueous Fixative (水溶性固定液)* で固定できません。

b) 無水性固定の前にクライオスタットの中で凍結乾燥または置換できます。

Note: 切片はクライオスタット内で固定剤に浸して下さい。その後は、室温で継続して結構です。

c) その他特定の固定剤で溶解、風乾、固定できます。



Figure 20. Technique for removing Tape from Slide.

複数の切片を作成する場合：

17. 複数の切片を、テープを並べて 1 枚のスライドにまとめる事ができます。小さな組織標本は、テープを小さくしてステップ 5~9 に従います。
18. スライド上の接着剤を固着するために、Mech の蓋を上げて、フラッシュ・トレーにスライドをおいて下さい。テープ・タブはフラッシュ・トレーの外に出ます。

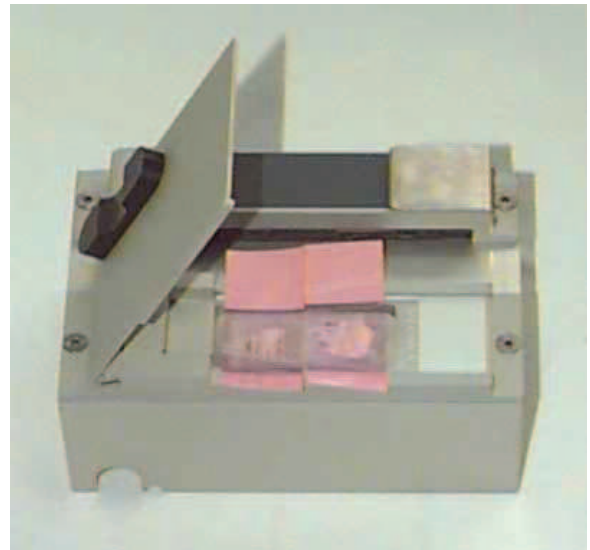


Figure 21. Processing multiple sections.

19. 蓋を閉じて、黒いノブを押し、UV をフラッシュして下さい。次に、蓋を上げて、スライドを取り出し、ステップ 15 および 16 の記述のように注意深くテープを剥がして下さい。

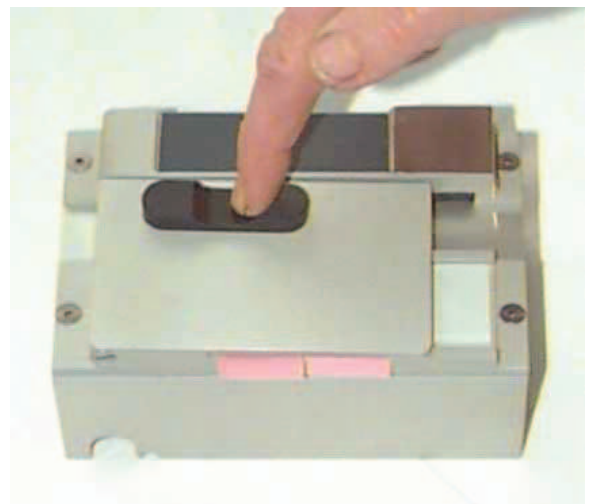


Figure 22. Curing multiple sections.