

生物標本の樹脂置換包埋・薄片化手法についての基礎調査

○高木菜都子^{A)}、池田晃子^{A)}、板倉広治^{B)}

^{A)} 教育・研究技術支援室 分析・物質技術系

^{B)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

生物の体の構造や成長方向、運動機能を知るためには、皮膚や筋肉などの「軟組織」と、骨や貝の殻などといった「硬組織」を同時に観察する必要がある。顕微鏡観察用の組織切片の作製手法としてはマイクロトームがあるが、骨と肉のような硬さの著しく異なる組織を同時に切片化し観察することは容易でない。マイクロトームにおいては、骨質部を脱灰して柔らかくする処理が必要で、かつ切片は非常に薄く歪みを生じやすいため、形態学分野のような生物本来の形状を観察・計測したい用途ではこの手法は適切とは言えない。このような問題を解決するため、生物標本を樹脂で置換包埋して全体を固化させ、できあがった樹脂ブロックを地質学などで用いられる岩石薄片作製の手法で処理する方法が提案された（田尻・藤田, 2013）。この手法の基礎的な情報収集と、本センターにおいて昨年度から試行している試料処理手法の情報共有のため、本年度の技術研鑽プログラムにおいて、日本薄片研磨片技術研究会討論会に参加したので報告する。

1 経緯

2016年度より、形態学関連の研究者・博士学生らから生物標本（現生鳥類の頭部）の樹脂固化試料作製や薄片化について技術相談を受けている。しかし、要求を満たす確立した樹脂包埋方法は今のところ存在しない上、学内にこのような特殊な技術を習得している技術職員もいないのが現状である。そこで、第60回日本薄片研磨片技術研究会討論会（島根県松江市 2017.10.5-6）に参加し、試料の樹脂固化処理について情報を収集するとともに、包埋試料の作製について、予備実験などから得られた知見を報告した。

2 Spurr 樹脂を用いた従来法

硬組織と軟組織を同時に薄片化し観察するため、Spurr 樹脂（Polysciences, Inc. : Spurr, 1969）を使った手法が考案された（田尻・藤田, 2013）。この方法では、以下のような手順で組織片を包埋する。

- 1) アセトン置換による脱水（アセトン上昇系列による 計 250 分）
- 2) Spurr 樹脂含浸 → 減圧し樹脂浸透（半日×5 回） 含浸と減圧浸透を樹脂を交換しながら 5 回繰り返す
- 3) 加熱重合（60℃ 48 時間）

上記の手順で組織片を樹脂に包埋することで、試料は岩石カッターによる切断・研磨等の加工が可能な樹脂ブロックとなり、この後岩石試料とほぼ同様の工程で薄片にすることができる。組織片を完全に樹脂に置換するためには入念な脱水と樹脂含浸が必要となる。包埋に使用する Spurr 樹脂は、低粘度、4 液混合型のエポキシ系樹脂で、各液の混合の比率を調整することで硬化までの時間や硬化後の硬度等が調整できる。

1 キットあたり 687g で 26,000 円ほど（2018.2 現在）と比較的高価である。従来法では置換や含浸のため樹脂を複数回取り替える必要があるため、使用量が多くなりがちでサイズの大きい試料や大量の試料作製にはかなりの経費がかかる。固化後の樹脂は黄色がかかった色を呈する。Spurr 樹脂は一時生産中止になっていた時期があり、また国内生産品でないため供給が不安定で、価格も代理店によってばらつきがあるようである。依

頼のあった鳥類の頭部のような、比較的容量の大きい試料で作製を行った例はまだなく、脱水工程や樹脂の混合について検討が必要であるとみられる。

3 包埋試作の報告

Spurr 樹脂の一時生産中止を受け、他の樹脂で同様の試料処理ができないか昨年度から本センターにおいて試行が行われている（本学学生、名古屋大学博物館研究室などと共同）。先行研究との比較が容易なクモヒトデ類の標本や、依頼のあったニワトリの頭部などの標本を使用し、試料の包埋と固化の試作を行った。第 60 回日本薄片研磨片技術研究会討論会にてその結果を報告した。以下は報告した試料処理の手順である。

- 1) アセトン置換による脱水（アセトン上昇系列による 計 250 分）
- 2) 樹脂含浸（含浸用樹脂 A）→ 減圧し樹脂浸透（5 時間）
- 3) 樹脂含浸（固化用樹脂 B）→ 減圧し樹脂浸透（12 時間）
- 4) 加熱重合（40℃ 48 時間以上）

試作では DevconET（株式会社 ITW パフォーマンスポリマーズ&フルイズジャパン）という市販樹脂を使用した。2 液混合型のエポキシ系樹脂で、クラフト用封入剤などとして一般店でも取り扱われており、比較的安価で供給も一定している。博物館などの展示用封入剤などとしても使用される。

今回の試作では含浸用の樹脂 A と固化用の樹脂 B を用意し（表 1.）、樹脂の硬化までの時間を引き延ばすことで試料の含浸時間を調整した。硬化後の樹脂は Spurr 樹脂使用の試料と同じく、岩石カッター等の加工に耐える硬度を持っており、また固化後の樹脂色がほぼ無色透明であることから、試料本来の色の観察やブロックのままの断面観察等も容易である。樹脂の単価が安いコストの面で従来法より優れているが、一方で大型の試料では脱水や硬化までの時間調整が難しいため含浸・置換の工程に課題が残る。

表1. 包埋に使用する樹脂の調製

	樹脂配合	特徴
樹脂 A	DevconET 主剤 + 硬化剤 + アセトン アセトンは樹脂全量（主剤+硬化剤）の 5%（質量比）	粘性が低く試料に浸透しやすいが固まりにくい
樹脂 B	DevconET 主剤 + 硬化剤	粘性がやや高く浸透しにくい但し固化後は硬度高い

4 その他

第 60 回日本薄片研磨片技術研究会討論会では、他大学や他機関の参加者らから試作についてコメント・助言等が寄せられ議論することができた。試料の脱水時間をより長くとることや、アセトン濃度などについての議論、コストの問題等について情報を共有することができた。

5 まとめ

2017 年度の技術研鑽プログラムとして、第 60 回日本薄片研磨片技術研究会討論会に技術職員 1 名が参加した。生物試料の樹脂包埋・薄片化法について、基礎的な情報収集を行うとともに、本センターでの試料作製実験の情報共有のため学生と共同で発表 1 件を行った。他大学・他機関の技術職員との意見交換を通じて樹脂包埋薄片についての理解を深め、技術者間での連携の維持に努めた。

参考文献

- [1] 田尻理恵・藤田敏彦, 2013. 樹脂包埋と研磨による動物組織観察試料作製法 —硬組織と軟組織の同時観察—. 日本動物分類学会誌タクサ, **35**, 24–34.