

光学顕微鏡観察用試料の合成樹脂包埋法

田村 咲江*

(Sakie Tamura)

はじめに

近年、食品科学領域の研究に走査電子顕微鏡を使用した研究が多く行われるようになってきている。しかし、走査電子顕微鏡は表面構造の観察が得意で、一般的に内部構造の観察は容易ではない。光学顕微鏡（以下、光顕）観察は、食品の内部構造が比較的広範囲に観察できるので、食品の品質評価や貯蔵・調理による食品内部の構造変化を調べるうえで、依然として有用な研究方法である。

光顕で観察する組織切片の標本作製するにあたっては、包埋剤としてパラフィンが従来もっとも多く用いられてきた。パラフィン包埋した試料では、薄切後の切片に脱パラフィン処理を行い、多様な色素の中からそれぞれの観察目的に合った色素を選択して染色を行ったり、各種含有成分を特異的に検出する組織化学の手法を施して、食品組織¹⁾のみならず生物学・医学分野の研究²⁾においても大いに活用されてきた。

しかし、パラフィン包埋には若干の問題点がある。その一つは、パラフィン包埋するためには徹底した脱水が必要で、標本作製過程で必ずキシレン等の溶媒を用いなければならない。また染色にあたって脱パラフィンを行う際にもキシレン等を使用しなければならない。そのために組織構成成分のうち脂質のような有機溶媒に溶けるものは流出して後に残らないことである。二つ目は、パラフィンは冷却時に組織内に結晶を生じたり、冷却硬化時の収縮が大であるので標本に人工産物を生じる恐れがある。また三つ目は、パラフィンの硬さでは薄切に限度があって厚さ10 μm 程度の薄切が通常で、4 μm 以下の切片を作るのは難しいとされている。

以上のようなパラフィン包埋の問題点をふまえて、合成樹脂による包埋法が近年かなり利用されるようになってきているので、本稿では食品の光顕観察のための合

成樹脂包埋法について紹介することにする。

包埋用合成樹脂の種類としては、親水性樹脂とエポキシ樹脂が多く用いられている。親水性樹脂は、当初電子顕微鏡用包埋剤として使用されたが、今日では光顕観察用試料の包埋剤として主に開発されているものである。エポキシ樹脂は、現在も透過電子顕微鏡観察用試料の包埋剤としての使用が主であるが、光顕観察用標本も同時に作製することができるものである。いずれも重合の起きていない単量体(monomer)を用い、これに硬化剤、加速剤等を加えた後組織片に浸透させて、加温などにより大分子の重合体(polymer)を作ることによって硬さを与えて包埋するものである。

1. 親水性樹脂による包埋

親水性樹脂包埋剤としては、グリコールメタクリレートを主体とした重合体が最初 Cathey³⁾, Conkie⁴⁾ 等によって用いられ、わが国では串田⁵⁾によりこの包埋法が検討された。1975年には日本組織細胞化学会主催の講習会で広く紹介されている⁶⁾。

親水性樹脂に包埋した標本は、収縮が少ないので像のゆがみも少なく組織構造の保存がよい。切片は1~2 μm の厚さに切ることが可能であり、パラフィン切片より像が鮮明で解像力の高い標本が得られる。また親水性樹脂であるので、染色の前に包埋剤を溶かし去る必要がなく、そのままの切片で種々の染色が可能である。試薬のグリコールメタクリレートを直接用いた包埋法も行われているが⁷⁾、本稿ではその後改良を加えられてキットとして市販されている2種の包埋剤について、包埋方法の概要を紹介する。

1.1 固定・水洗

固定剤としては、4% 緩衝ホルマリン液や3% 緩衝グルタルアルデヒド液が多く用いられるが、筆者は後者の固定液を用いている。25% グルタルアルデヒドと蒸留水、0.2M リン酸緩衝液(pH7.4)の比が1:3:4の割合で混合したものに、2 \times 2 \times 1mm³以下の大

* 広島大学学校教育学部生活科学教育講座

きさの試料を4°Cで24時間程度浸漬している。その他Zenker液、Bouin液、Carnoy液等も使用可能である。

水洗は、パラフィン包埋と同様に水道水の洗水で行ってもよいが、筆者の場合のような小片は緩衝液で30分水洗(2~3回取り換える)した後、脱水している(脱水中も水洗される)。

1.2 脱 水

氷冷した70%、80%、90%、室温の95%の各エチルアルコール水溶液に15~20分ずつ(試料片の質や大きさによって時間は変える)順次浸漬する。その後は室温に置き、100%アルコールを2回換える(水溶性樹脂の場合は、脱水は完全でなくてもよい)。

1.3 包 埋

1) JB-4による包埋

JB-4は米国ポリサイエンス社製のキットで、グリコールメタクリレート系の包埋剤であるが、室温で包埋することができる。

組織の微細な構造や脂質の保存のために90%アルコールまでは4°Cで脱水を行い、100%アルコールで脱水後JB-4キットのA液100mlに触媒を0.9gの割合で加えて完全に溶かしたものの中に試料を入れて数時間浸透させる(なじませ)。途中液を2~3回換える。

包埋は、触媒を溶かしたA液にB液をA:B=20~25:1の割合で加えてよく混合したものを用い、カプセル又はシリコン包埋板に注入し、その中に試料片を入れて上面をパラフィルム等で覆って空気を遮断し、室温で3時間以上置いて重合させる。重合の際に発熱するので、熱に弱い試料は冷蔵庫内に入れておく。

2) Quetol 523 Mによる包埋

Quetol 523 M(日新EM社製)⁸⁾はグリコールメタクリレートとQuetol 523が8:2の混合液で、触媒としてQCU-1(2,2'-アゾビスイソプロピロニトリルペースト)を、Quetol 523 M 100mlに対して0.05g混合して樹脂混合液とする。

試料を上述のようにして脱水した後、100%アルコールと樹脂混合液を1:1に混ぜたものの中に1~2時間浸漬し、途中数回振り混ぜる。次いで樹脂混合液に換えて数回振り混ぜながら2~4時間置く(なじませ)。

包埋は、ゼラチンカプセルに新たな樹脂混合液を注入してその中に試料片を入れて、60°C 12時間放置して重合させる。

3) その他の包埋剤

その他にも、ヒドロキシエチルメタクリレートを主剤とした包埋樹脂のテクノビット7100(応研商事)、ア

クリル樹脂を主剤としたLRホワイトレジン(ロンドンレジン社)等が市販されているので試してみるとよい。

1.4 薄 切

切片作製に用いるマイクロームは、JB-4型Porter Blumマイクロームか顕用ミノ(ロータリー)型マイクロームに特殊ガラスナイフホルダーのついたものか、ディスプレイのステンレス製ヒストナイフを用いるホルダーを取り付けたもの、セミシンマイクローム、又は透過電子顕微鏡で観察する超薄切片作製のウルトラマイクロームを用いる。

切削用のガラスナイフは、5~8mm厚さの板ガラスをガラスナイフメーカーで割って作る⁹⁾。使用して刃こぼれしたら新しいものと交換する。ステンレス製のナイフを使用すればより大きい試料が扱える。いずれにしてもナイフマークがなく、1~2μmの厚さに切れた切片をピンセットでつまみ、スライドガラスに載せた少量の水のうえに浮かべる(dry cutting)。次にスライドガラスを温めて乾燥して切片を密着させる。スライドガラスには卵白グリセリンなどの接着剤を使用しなくても、その後の染色の際に切片が剥離する心配はない。

1.5 染 色

上記いずれの包埋法によっても、薄切した切片は脱包埋することなく、従来の各種光学顕微鏡観察用染色法を行うことができる。ヘマトキシリン・エオシン染色、マロリーアザン染色等のような重染色や、トルイジン青染色、ギムザ染色等のような単染色のいずれもパラフィン切片用染色液をそのまま使用できる。また組織化学染色として食品に多く用いられるPAS反応による多糖類の染色においても好結果が得られる。その一例として、図1に第一加熱後、及び鶏卵添加後のシュウペーストを、PAS反応とライトグリーンで二重染色した結果を示す。

2. エポキシ樹脂による包埋

エポキシ樹脂は、1950年代に透過電子顕微鏡観察用試料の包埋剤として使用され、現在も広く使用されている包埋剤である。しかし、透過電子顕微鏡用としてばかりでなく、その厚さ1~2μmの切片は顕用標本としても広く用いられている。

エポキシ樹脂包埋は、透過電子顕微鏡用包埋剤としての用途が本来で、一般に顕用専用の包埋剤としてはほとんど用いられないので、ここでは簡単にその概要を述べるにとどめるが、詳しくは文献を参考にされた

光学顕微鏡観察用試料の合成樹脂包埋法

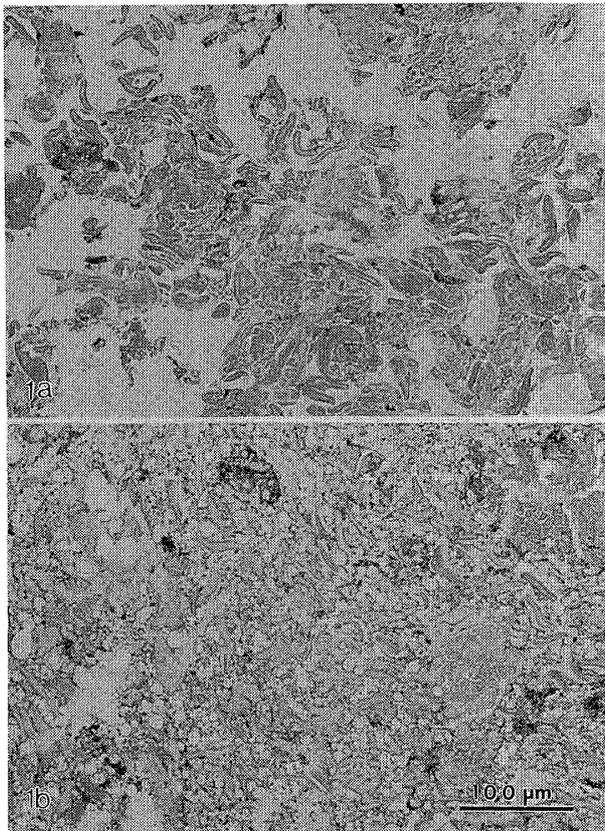


図1. PAS反応とライトグリーンにより二重染色したシュウペースト (JB-4包埋切片)

1a: 60秒間第一加熱を行ったペースト。偏平に膨潤したデンプン粒の断面がPAS反応で赤紫色に染色され、その中にライトグリーンで染まったグルテン等からなるその他の小麦粉成分が散在している。空隙のように見える部分には、バターが存在している。1b: 第一加熱後のペーストに鶏卵を加えて攪拌した焼成直前のペースト。図1aで塊状になっていたデンプン粒がほぐれてほぼ均一に分散し、その間に直径10 μm 程度の細かい気泡が包含されているのが観察される。(三好雅子・田村咲江原図)

い^{9,10}。

試料の切り出しは、1mm³の小片とし、グルタルアルデヒドとオスミウム酸の二重固定を行う。脱水は、アルコール濃度を順次上げていき、100%アルコールによる最後の脱水の後酸化プロピレンに置換し、次いで酸化プロピレンとエポキシ樹脂(エポック812など)混合液を等量混合したものに数時間浸漬する(なじませ)。シリコン包埋板に樹脂混合液を注入し、その中に試料を入れて加温して重合させる。

薄切はウルトラミクロトームを用い、1~2 μm の切片とし、親水性樹脂と同様にしてスライドガラスに載せる。多様な染色をするためには脱包埋をしなければならないが、アルカリ性の溶媒で溶出するため像が荒れるので、通常はエポキシ樹脂に包埋したままの切片

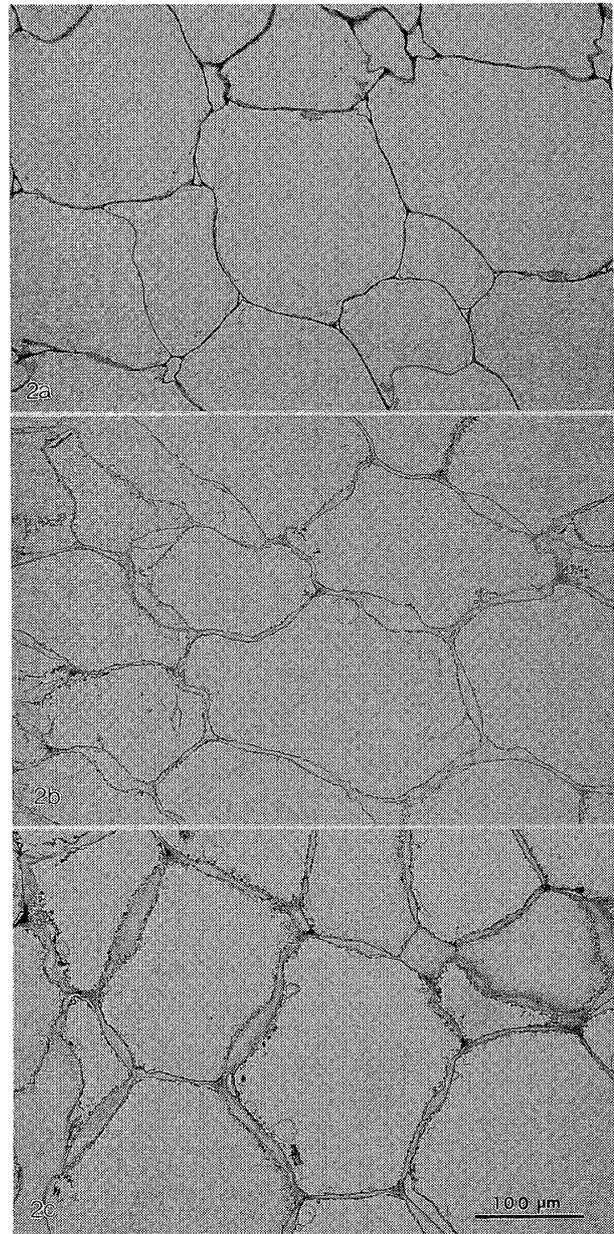


図2. トルイジン青により染色した生及び煮熟後のダイコンの木部柔組織 (エポキシ樹脂包埋切片)

2a: 生, 2b: 蒸留水で30分間煮熟したもの, c: 2%食塩水で30分間煮熟したもの。細胞壁の調理による変化が詳細に観察される。いずれもグルタルアルデヒド固定液に2%タンニン酸を加えて、細胞膜の染色性を強調している。

で染色する。染色可能な色素の数は少なく、トルイジンブルーやメチレンブルーのような塩基性タール色素で単染色を行う。トルイジンブルーの場合、酸性多糖はメタクロマジーによって桃色に染色されるので、加熱により野菜の細胞壁から溶出したペクチン質の濃度が大きな部分は、染め分けられる利点がある。

図2に、エポキシ樹脂(エポック812)に包埋した試

料の顕微鏡観察例としてダイコン木部柔組織の調理による変化を示している。

終わりに

樹脂包埋は、はじめ透過電子顕微鏡観察用試料の超薄切片(厚さ0.05~0.07 μ m)を作成するために開発されたもので、パラフィンよりはるかに硬くできていて、より薄い切片を作製することができる。従って像は格段に鮮明で、細胞内の微細な構造も保存されやすい点で得られる情報もより正確であるといえる。

しかし、これまで多くの組織学的研究に用いられてきたパラフィン包埋の手法も、その利点を活かして使用することは意義あることである。

参考文献

1) 市川収：食品組織学—組織化学的食品構造論—，光生

館(1966)

- 2) 佐野豊：組織学研究法，南山堂，東京(1965)
- 3) Cathey, W. J. : Stain Technol., **38**, 213~216 (1963)
- 4) Conkie, C. : Acta Anat., **60**, 531~538 (1965)
- 5) Kushida, H. : J. Electron Microsc., **13**, 200~203 (1964)
- 6) 水平敏知：日本組織細胞化学会第1回組織細胞化学講習会テキスト，104~110 (1975)
- 7) 小松正伸，日浦昌道，田村咲江：広島医学，**29**，101~105 (1976)
- 8) 串田つゆ香，長戸康和，串田弘：解剖誌，**52**，1~9 (1977)
- 9) 田村咲江：調理学実験(川端晶子・大羽和子編)，40~45 (1990)
- 10) 永野俊雄監訳：透過電子顕微鏡生物資料作成ハンドブック，丸善，東京(1990)