



Title	光学顕微鏡標本切片作製における水溶性樹脂包埋法の技術確立をめざして（第1報）：関連機器の作製と応用および標本切片作製法の検討
Author(s)	笠井，登；今野，繁雄
Description	北海道大学農学部技術部職員研修（第5回）研究・技術発表
Citation	北海道大学農学部技術部研究・技術報告，4，10-12
Issue Date	1997-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/35323
Type	departmental bulletin paper
File Information	4_p10-12.pdf



光学顕微鏡標本切片作製における水溶性樹脂包埋法の 技術確立をめざして（第1報）

— 関連機器の作製と応用および標本切片作製法の検討 —

園芸学講座 笠井 登（作物・分析系 共同利用班）
作物生産システム学講座 今野 繁雄（作物・分析系 共同利用班）

はじめに

水溶性樹脂包埋法の利用は、医学・獣医学（免疫抗体染色等）での動物組織及び骨の光学顕微鏡標本作製技術として発展し、その利用例が多く報告されている。近年、この技術が植物組織にも応用され、多くの利点があることが報告されている。

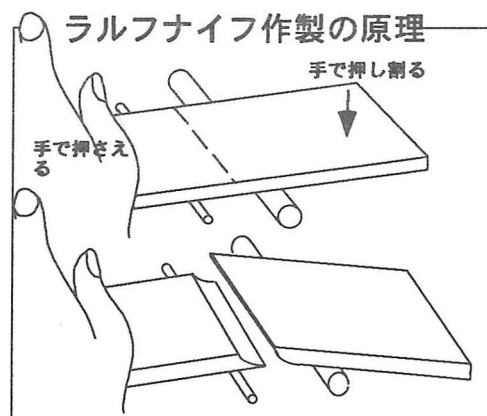
従来、光学顕微鏡標本作製に一般的なパラフィン包埋法は、連続切片作製に有利であるが、強度の脱水・透徹及び加熱による組織の収縮が強いうえ、比較的大きく硬い組織では、薄い切片が作製できない（せいぜい $10\mu\text{m}$ が限界）という欠点があった。このため、茎頂、種子胚、培養組織など比較的小さな細胞で構成されている植物組織の切片を作製する場合、細胞が2～3層に重なり、観察像が不明瞭となることが問題であった。

これに対し、より硬度の高い水溶性樹脂を用いると、 $1\mu\text{m}$ 前後の薄い切片が作製できるばかりでなく、エポキシ樹脂とは異なり、従来のパラフィン切片染色法の利用が可能であるという利点がある。さらに、光学顕微鏡観察を行ったものと同一の試料を透過型電子顕微鏡で観察することも可能であり、限られた試料からより多くの情報を得ることが可能である。このため、水溶性樹脂は、エポキシ樹脂と異なり、組織・器官といった広い視野からの観察による全体的な情報を得る目的に適しているといえる。一方、標的部位が確実に探せるので、研究の正確さが増すことになる。また、水溶性樹脂は低温重合により、免疫組織化学、酵素組織化学やオートラジオグラフィへの展開もなされている。

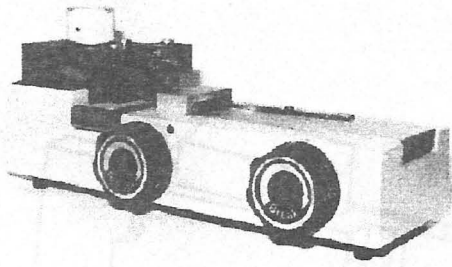
植物細胞には細胞壁が存在するので、固定・包埋剤の浸透が動物組織に比べて悪く、植物組織独自の固定・包埋法等いくつかの検討課題も残されているが、このような幾つもの利点を有する水溶性包埋剤は、今後、さらにその利用が拡大すると思われる。

<ラルフナイフ作製について>

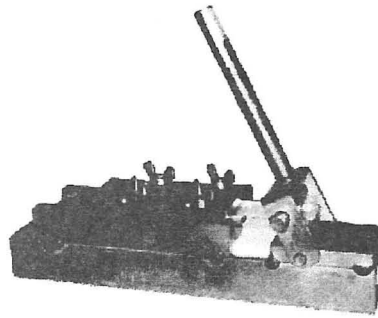
Bennettら（1976）は刃渡りの長いガラスナイフをつくる方法を発表した。今から40年ほど前ワシントン大学のJohn LuftがPaul Ralphから学んだとされ、彼らはこのナイフの方法を発明した故 Paul Ralph 博士の荣誉をたたえて、ラルフナイフと名付けた。これは、ガラス板の幅そのものがナイフの刃渡りになり、理論的には無限の長さの刃渡りをもつナイフの作製が可能である。



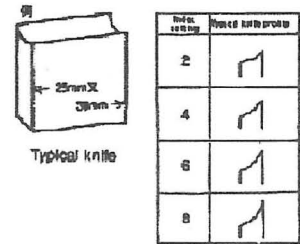
TAAB HISTOKNIFEMAKER
¥590,000



応研カタログより転載

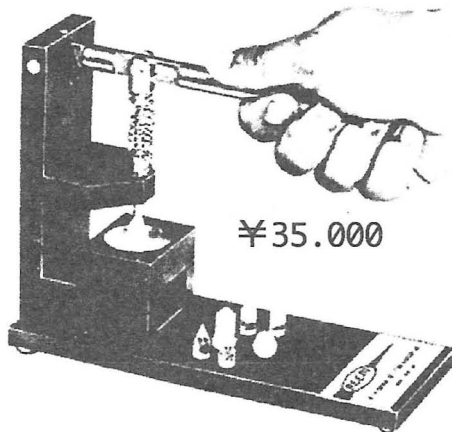


試作ガラスナイフ作製機

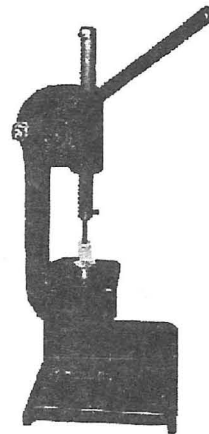


任意の刃角が可能

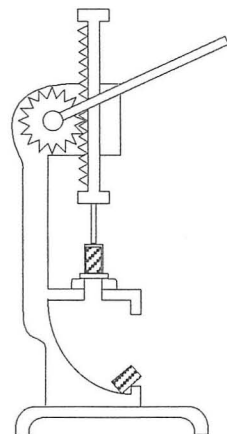
<樹脂包埋ビームカプセルプレスの作製>



応研カタログより転載



試作品

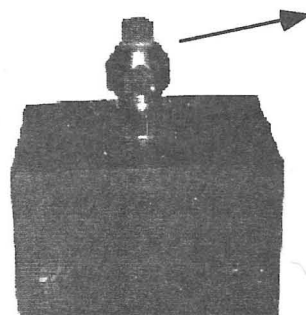


断面図

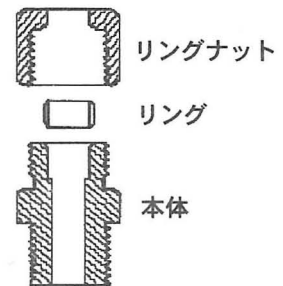
<マイクログラインダー及び試作トリミング台>



マイクログラインダー



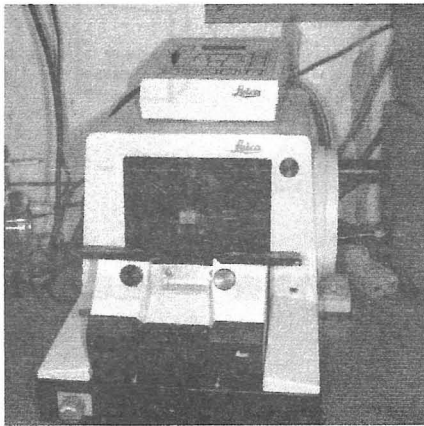
試作トリミング台



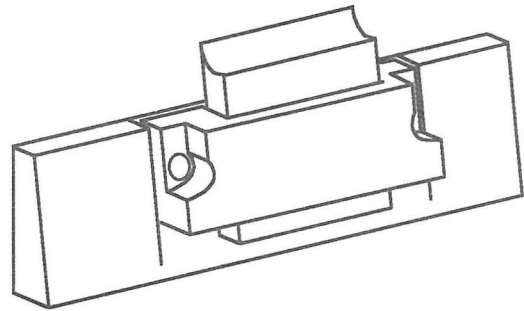
黄銅製配管継手
リングジョイント

ウス刃カッター (丸ノコ) で包埋樹脂のトリミング及び試料作製に使用する。
例えば、ナイフでは切れないもの、樹皮・種子などの硬く、もろい試料にはとても便利である。

＜セミシンミクロトーム及び試作ナイフホルダー＞



セミシンミクロトーム（ライカ社製）



試作ナイフホルダー

まとめ

ラフナイフについては、市販機で作った切片を見たことがないので比較出来ないが、十分使えるものであった。

現在まで、アズキ種子、果樹の芽及び樹皮、培養組織（カルス及び不定胚）を材料に、組織切片作製を行ったが、以下のような問題点が明らかになってきた。

- 1、樹脂浸透及び重合が完全であっても、切削によって組織の一部が樹脂から剥がれ易い。
- 2、種子の貯蔵物質であるデンプン粒が切片の表面から脱落してしまう。
- 3、染色程度は、パラフィンと同じかそれ以上である。
- 4、染色法によっては、スライドガラスから切片が剥がれることがある。
- 5、植物組織の表面にはろう物質や毛（細胞）など特殊な構造が存在し、細胞内部にも多くの貯蔵物質を含むほか、細胞間隙が発達しているので、組織が固定液に沈みにくい。

以上の点を踏まえ、今後以下について検討したい。

樹脂の種類の検討、固定法、樹脂浸透の時間と方法、樹脂の硬度と切削適性、ミクロトーム刃の種類と切削角度、切片の伸展及びスライドガラス面への接着、などの点について検討したいと考えている。

参考文献

- 1) 透過電子顕微鏡生物試料作製ハンドブック 長野俊雄 監訳（丸善）
- 2) Bennett, H. S., Wyrick, A. D., Lee, S. W. and McNeil, J. H. (1976). Science and art of preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stain. *Stain Technol.* 51, 71.