

最近の電子顕微鏡のための包埋法

第一報 エポキシ樹脂包埋法

慶応義塾大学電子顕微鏡研究室

申 田 弘
クシ タ ヒロシ

東京女子医科大学解剖学教室 (主任 久保田くら教授)

串田つゆ香・荒川克己
クシ タ カ アラ カワ カツ ミ

(受付 昭和 35年 1月 9日)

I 緒 言

現在、電子顕微鏡は医学、および生物学的分野に華々しい注目を集めている。細胞学的应用のためには、ほとんどが超薄切片によるものであり、その切片技術は従来までに多くの工夫がなされてきた。たとえば固定、水洗、脱水および包埋の一つ一つに、めざましい進歩のあとが見られている。

包埋法においては従来ほとんどメタクリル樹脂によるものであったが最近収縮、発泡、接着性の不良および反応の不均一などの欠点を少なくするためにエポキシ樹脂包埋法が行われつつある。著者らは Maaløe ら(1956)¹⁾、Glauert ら(1956)^{2) 3) 4)}により行われたエポキシ樹脂包埋法を追試した結果硬化剤、加速剤および硬化したときの硬さの調節などに改良の必要をみとめた。すなわち既報告⁵⁾においてエポキシ樹脂2種を混合してエタノールを使用する方法をはじめ採用し、初期の粘度を下げることと、混合比をかえて硬化後の硬さを調節することに成功した。さらに、エタノール易溶性の液体の硬化剤と加速剤を選び出し、電子顕微鏡切片の作製に適するような硬化方法を行うことができた。本報告では組織像がメタクリル樹脂包埋の際と比較し、よりすぐれていることがわかり、なお包埋法の補足および実際の包埋法

をまとめることができたので報告する。

II エポキシ樹脂について

エポキシ樹脂の研究は最初1927年ごろアメリカで行われたが、当時はこの樹脂の適当な硬化法が知られていなかったのと、原料が高価であつたため実用化されなかつた。1946年にいたり、石油化学工業の発展にともない、プロピレンからエピクロールヒドリンが安価に合成されるようになり、アメリカのShell Chemical Co. から "Epon", スイスの Ciba Co. から "Araldite" が市販されるようになった。その後アメリカの Houghton Laboratories から "Hysol", Bakelite Co. から "C-8 Resin" などが市販された。本邦ではまだ生産されていないため輸入に依存している。

エポキシ樹脂は別名エポキシサイトまたはエトキシリン樹脂ともいわれ、分子中にエポキシ基 $\begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \diagdown \quad \diagup \end{matrix}$ (—CH—CH₂)

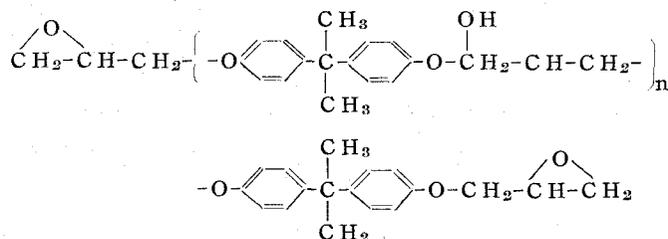
を2つ以上含む熱硬化性樹脂であるエピクロールヒド

リン $\text{Cl}-\text{C}-\text{H}_2-\begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \diagdown \quad \diagup \end{matrix}$ と多価フェノール(ビスフ

エノールすなわちジフェニールプロパン $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$

$\begin{matrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ | \\ -\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ | \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{matrix}$ との縮合物で、次にしめすような分子構造式をもっている。

Hiroshi KUSHIDA (Electron Microscope Laboratory Keio-Gijuku University) Tsuyuka KUSHIDA & Katsumi ARAKAWA (Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical College) : An new embedding method for electron microscopy. 1. On epoxy-resin embedding method.



縮重合度 n の大小により粘度の低い液体 ($n = 0 \sim 12$) から固体までのものが得られる。エポキシ樹脂単独では加熱しても何等化学的变化を起さないため、樹脂としての特性を発揮することはできない。すなわちエポキシ樹脂は必ず硬化剤を加えなくてはならない。適当な硬化剤を反応させると三次元構造となり、機械的強度、耐薬品性などの特性を示すようになる。この樹脂と硬化剤の組合せ方法によって、いろいろの性質の熱硬化性樹脂が得られる。

エポキシ樹脂は初期には主として塗料、接着剤などに使用されていたが、現在では注型、積層などに最も広く利用されている。

III 包埋剤の組成

Maaløe らはエポキシ樹脂 Hysol に硬化剤ジエチレントリアミンを用いて、 60°C にて硬化させた。また Glauert らはエポキシ樹脂 Araldite に硬化剤 964 B と加速剤 964 C とを加えて 48°C にて硬化させた。著者らは Epon 562 と Epon 815 の混合液に無水ドデシニールコハク酸およびピリジンを加え、 50°C で硬化せしめたことは既報のごとくである。すなわち硬化して軟かい Epon 562 と硬化して硬い Epon 815 を用い、試料の硬さおよび薄切の時の室温などを考慮して適した硬さに調節した。すなわち Epon 815 と Epon 562 との比率が $8:2 \sim 5:5$ の状態が最も適していることを発見した。

硬化剤は単に触媒作用を行うのみでなく、エポキシ樹脂と附加反応するので、エポキシ当量とカルボキシ当量がエポキシ樹脂に応じた量を使用することが大切である。硬化剤の量の多少により硬化剤の性質も不適當なものになる。加速剤の量は樹脂が硬化するさいの可使時間に影響するので、量が多くなると可使時間が短くなり、硬化反応が急激となるため、温度が上昇し発泡、亀裂などの障害をおこす。なお色も黄色より褐色となり、脆くなつて硬化樹脂の性質も変化し不適當なものとなってしまう。

IV 包埋

上記のごとき包埋剤の混合液は粘度をもっているが、可使時間が長いために、包埋に際しては 50°C にて粘度を下げ、試料への滲透を充分に行う必

要がある。包埋方法は既報のごとくで、すなわち普通の硬さの組織片を常法により固定、エタノールにて脱水後、次のような順序で処理する。

- (1) エタノール—Epon 562, Epon 815, 無水ドデシニール・コハク酸等量混合液 1~2 時間 (50°C)
- (2) Epon 562, Epon 815, 無水ドデシニールコハク酸 2~3 時間 (50°C)
- (3) Epon 562, Epon 815, 無水ドデシニールコハク酸, ピリジン 2~3 時間 (50°C)

Epon 562, Epon 816, 無水ドデシニールコハク酸, ピリジンの混合液にて、ゼラチンカプセルの中で 50°C において 50 時間加熱硬化する。

硬化反応が均一に行われるため、ブロックの上から下まで一様の硬さになり収縮が生じない。

包埋試料の硬さおよび大きさに応じて、滲透時間を多少変化させる必要がある。

実際の包埋方法

Epon は粘度があり取扱いにくく、その上包埋剤の組成は正確に行わないと適当なる硬化物が得られないから注意しなくてはならない。遠沈管を天秤にて計り、包埋剤組成にしたがつて、Epon 562, Epon 815, 無水ドデシニールコハク酸の順に逐加計量する。この際、いずれもあらかじめ 50°C ぐらいに加熱し、細いガラス棒を用いて、遠沈管に移すと容易である。これらの混合物を 50°C の状態において、ガラス棒で気泡が出ないように緩徐に混合する。まぜ合わせ方が不充分の場合には硬化物は不均一となり使用できない。気泡が入つたさいは放置するか遠沈を行えば消失する。このような Epon の混合液の一部を用いて等量のエタノールを混合すれば(1)液も容易にできる。その中に脱水後の組織を移す、このさい液の方を取替えると粘度があるため(1)液が充分にとれず残っているため困る。組織は液の置換が行われるまで沈まないが、置換後沈むため、時々液を移動させる

とよい。(3)液は丁度(2)液と同様の混合液中に組成にしたがつてピリジンを逐加計量し、徐々に静かに混合する。この液を2分し一方を(3)液として用い、他方は包埋用としてゼラチンカプセルに分ける。(3)液を通した組織片をゼラチンカプセル内の液に移すと、底に沈んで行く。底の中心をはずれたものは細くしたガラス棒で気泡を入れないように直し、後硬化せしめる。

V 薄切および電子顕微鏡的観察

薄切および電子顕微鏡的観察については、すでに詳しく報告した。すなわちエポキシ樹脂包埋を行つたものは薄切した切片が電子衝撃にたいして強いという特徴をもっている。しかしコントラストが低いと観察しにくい。したがってカーボン補強はしない方がよい。またコントラストをよくするために薄切はできるだけ薄いことが必要である。

VII 実際の応用例

Glauert,⁵⁾ら、Huxley,⁷⁾、Birbeck⁸⁾らはエポキシ樹脂包埋後、超薄切片を作製し電子顕微鏡で観察した結果、メタクリル樹脂包埋法による切片像よりすぐれていることを指摘している。

著者らは1 mm³以下の精巢組織片を用い、エポキシ樹脂で包埋し、超薄切片を作製して観察した。従来のメタクリル樹脂包埋法における切片像と比較すると全体として細胞質の基質がよく保たれている。ことに細胞質内のいわゆる endoplasmic reticulum は精細胞では発達が弱いように報告されていたが^{9) 10)}、本包埋法を行うと比較的多くの、そして精細胞質内を不規則に走る smooth surfaced の像としてみとめられる。多くは核膜に平行しているが、しばしば核膜および細胞膜と連絡している像に遭遇する。おのおのはいずれも二重膜構造を呈している。細胞膜、核膜も二重膜構造であることは従来と同様であるが、これらの線構造が、くつきりと鮮明である特色をもっている。精細胞ことに精粗細胞、精母細胞および成熟前期の精子細胞の核の形状は、ほとんどの報告に卵円形または円形と報告されている。しかしエポキシ樹脂包埋法による場合は、ほとんど正円形に近い形を呈している。すなわち現在までの光学顕微鏡および電子顕微鏡的包埋法には、収縮という不利な条件があつたためと思われる。成熟後期の精子および精子頭部のみは長楕円形を呈

している。成熟前期の精子細胞において核膜に接して Golgi 小体のみとめるが定型的な三要素すなわち Golgi 膜、Golgi 胞および Golgi 顆粒からなり、尖体および頭中形成の時期にしたがい形状、量などに変化を来すことは既報のごとくである⁹⁾。ミトコンドリアも精細胞を通じ、概ね円形であり、内部へ三方向に突出するところのいわゆるミトコンドリア櫛のみとめる。ミトコンドリアの限界膜およびミトコンドリア櫛も明瞭なる二重膜構造としてみとめられ、matrix の部分は精細胞質に比較し、著しく明調である。これらの細胞小器管といわれる構造はことに明瞭にみとめられる。

VIII 考 察

エポキシ樹脂包埋法は、従来 Maaløe ら(1956) Glauert ら(1956)により行われたが、著者らは、これらの方法に改良の点のみとめた。これらの方法と著者らの方法を樹脂包埋に必要な条件について比較する。

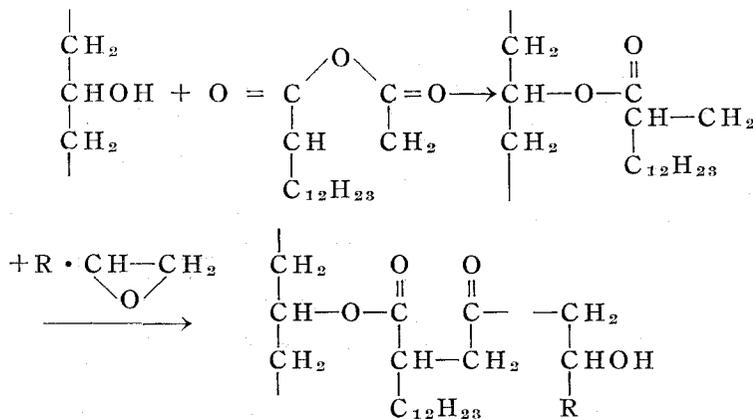
包埋剤としては粘度の低い液体の樹脂を用いることが必要である。Maaløe らが最初用いた Hysol は粘度が高いため、Glauert らは取扱いやすいように1500センチポイズ(25°C)のAraldite Mを用いた。しかしまだ粘度が高すぎるきらいがあるので著者らは Shell Chemical Co. 製のエポキシ樹脂 Epon と Epon 815 との混合液を用いることにより、粘度を400~580センチポイズ(25°C)まで下げることに成功し包埋に最も適した状態とすることができた。

エタノール脱水より包埋に移る場合にはエタノールに樹脂が溶解することが必要である。Hysol, Araldite M はエタノールに難溶性であつたため、Glauert らはエタノールに溶解性のある硬化剤を用いて、とにかく脱水より包埋への移行を可能にした。著者らは Epon 562 と Epon 815 の混合液をエタノール可溶性とし、さらにエタノール易溶性の硬化剤を添加することにより脱水より包埋への移行を一層容易にした。

エポキシ樹脂に硬化剤を混合することによつて、次第に粘度が上昇して、ついに硬化する。粘度が上昇して使用できなくなる状態に達するまでの時間すなわち可使時間は樹脂が試料に滲透するため長いことが必要である。硬化剤としては脂肪属アミン類および酸無水物類がある。Maaløe ら

が用いた脂肪属アミン類の場合には可使時間が短かく適当でなかつた。酸無水物類の場合には、可使時間は長いが反応温度が高いため、不適當で **Glauert** らは一応この類の硬化剤を用いて目的を達した。最近見出された無水ドデシニールコハク酸は低い温度にて反応し、可使時間も長く、加速剤ピリジンをを用いて反応速度を調節することができる。その上エタノール易溶性の液体であるなど、包埋の目的に好都合な硬化剤であることを著者らはたしかめ新しく硬化剤として使用した。次のごとく化学結合して三次元構造をつくる。

エポキシ樹脂と無水ドデシニールコハク酸との反応。



また **Maalpe** らの方法は硬さの調節ができなかつたが **Glauert** らにいたり可塑剤ジブチルフタレートを用いて硬さの調節を行つた。しかし可塑剤は化学結合しないため、硬化剤が不安定であるので、決して好ましい方法ではない。著者らの方法では2つのエポキシ樹脂の混合比をかえることにより、適當の硬さの安定な化学結合をもつ硬化物を得ることができた。

エポキシ樹脂包埋法を行つた場合の利点としては、(1)メタクリル樹脂が15~20%収縮するに反してエポキシ樹脂は2%以下でほとんど収縮しない。そのため組織内の構造がよく保持されている。(2)接着性がよいので硬い試料の薄切の際もよく保持できる。(3)メタクリル樹脂の場合は酸素などの影響により、カプセル中で均一硬化しなかつたが、エポキシ樹脂では均一に硬化する。(4)硬化によつては気泡は生じにくい。(5)電子衝撃にたいして強い。(6)エポキシ樹脂は硬化剤の添加がなければ光、熱および酸素などにより重合をおこす心

配なく、長期間安定である。

IX 結 語

電子顕微鏡超薄切片作製の際の包埋剤として **Epon 851**, **Epon 562** の混合液に硬化剤無水ドデシニールコハク酸と加速剤ピリジンを添加して硬化する方法を新しく採用して、もつとも適當なる組成をしめした。この方法により収縮が少い、接着性がよい、硬化が均一であること、電子衝撃にたいしてつよいなどの利点から、従来のメタクリル樹脂包埋法による切片像よりも、細胞質内の構造がよく維持されている。

ことにラット精巣組織について比較検索した結果

1) 各精細胞内にはかなり発達した、いわゆる **endoplasmic reticulum** が、ほとんど核膜に平行して走っている。

2) 精祖細胞、精母細胞および成熟前期の精子細胞の形状は、ほとんど正円形を呈し卵円形像はほとんど認められない。細胞核も、すべて球形である。

3) 細胞膜核膜、およびいわゆる **endoplasmic reticulum** などは、おのおの二重膜構造を呈しメタクリル樹脂包埋に比較し一般の線構造が鮮明である。

4) 全体として細胞質内の基質がよく保持され、また細胞内小器官などは構造も、よりすぐれている。

上記の所見からエポキシ樹脂包埋法は生物学的資料の包埋法としてもすぐれ、従来の組織像には、なお再検討を要するものがあるように思われる。

文 献

- 1) **Maalpe, O. and Birch-Anderson, A.** : 6th

- Symposium of the Society for General Microbiology, Bacterial Anatomy, Cambridge The University Press, 261 (1956)
- 2) **Glauert, A. M., Rogers, G.E. and Glauert, R.H.** : Nature, **178** 803 (1956)
 - 3) **Glauert, A.M. and Brieger, E.M.** : Proceedings Stockholm Conference on Electron Microscopy, Stockholm, Almqvist & Wiksell, 111 (1956)
 - 4) **Glauert, A.M. and Glauert, R.H.** : J. Biophysic. and Biochem. Cytol., **4** 191 (1958)
 - 5) **串田 弘** : 電子顕微鏡 **8** 72 (1959)
 - 6) **Weiss, H.K.** : Ind. and Eng. Chem., **49** 1089 (1957)
 - 7) **Huxley, H.E.** : Paper at 15th Meeting of Electron Microscope Society of America, Boston (1957)
 - 8) **Birbeck, M.S.C. and Mercer, E.H.** : Paper at 15 th Meeting of Electron Microscope Society of America, Boston. (1957)
 - 9) **串田つゆ香・阿部秀世・野村淑子** : 女医大誌 **27** 19 (1957)
 - 10) **串田つゆ香** : 女医大誌 **28** 232 (1958)

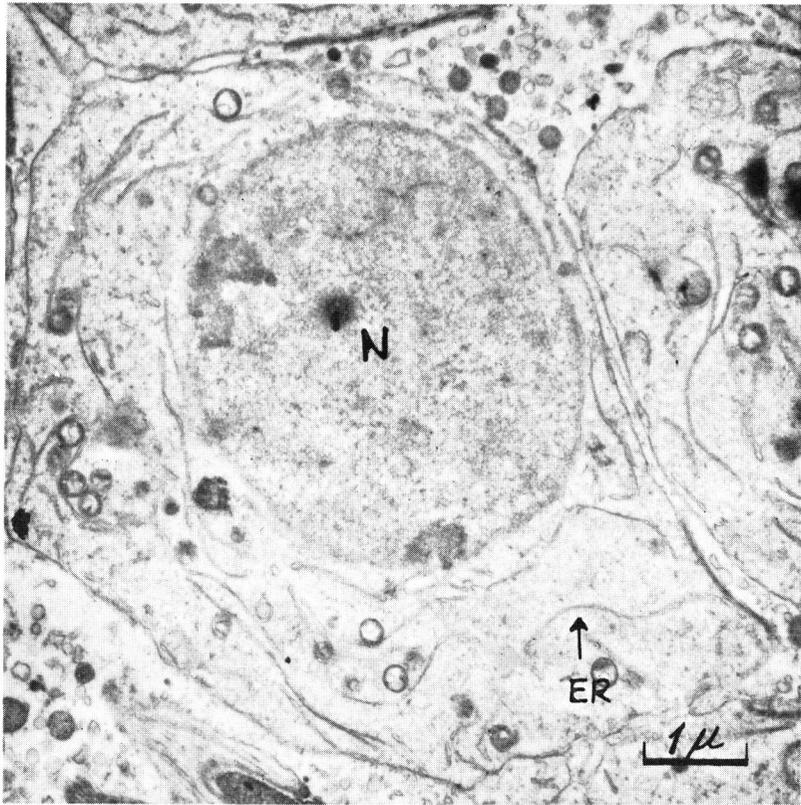
附図説明

第一図：精母細胞内にみとめられるいわゆる endoplasmic reticulum (ER)。

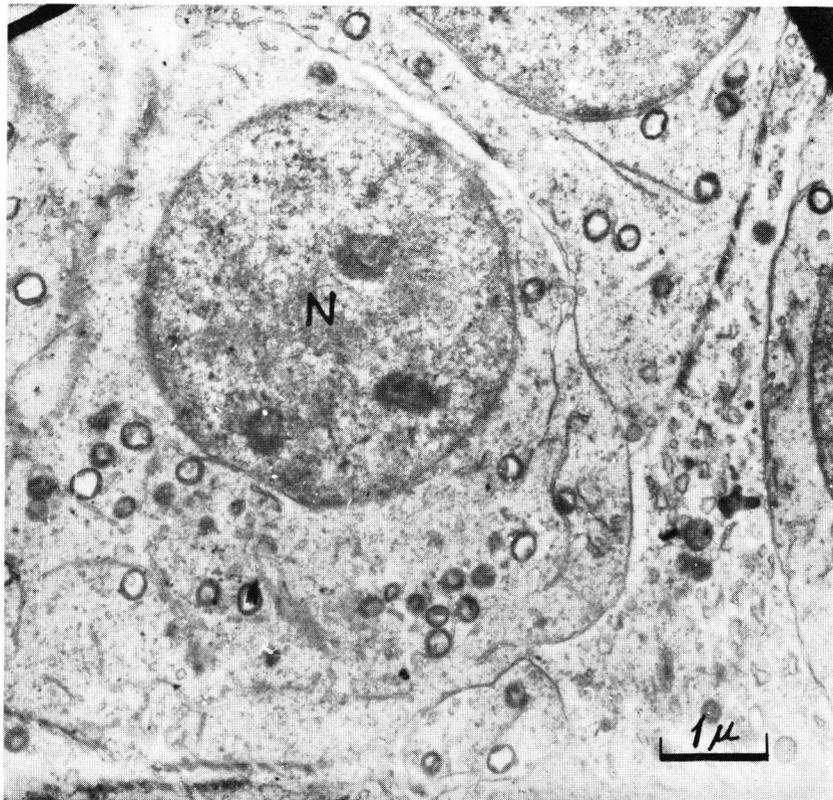
第二図：精細胞核 (N) は、ほとんど正円形を呈している。

第三図：成熟前期の精子細胞。核膜に接して Golgi 小体 (G) を認む。

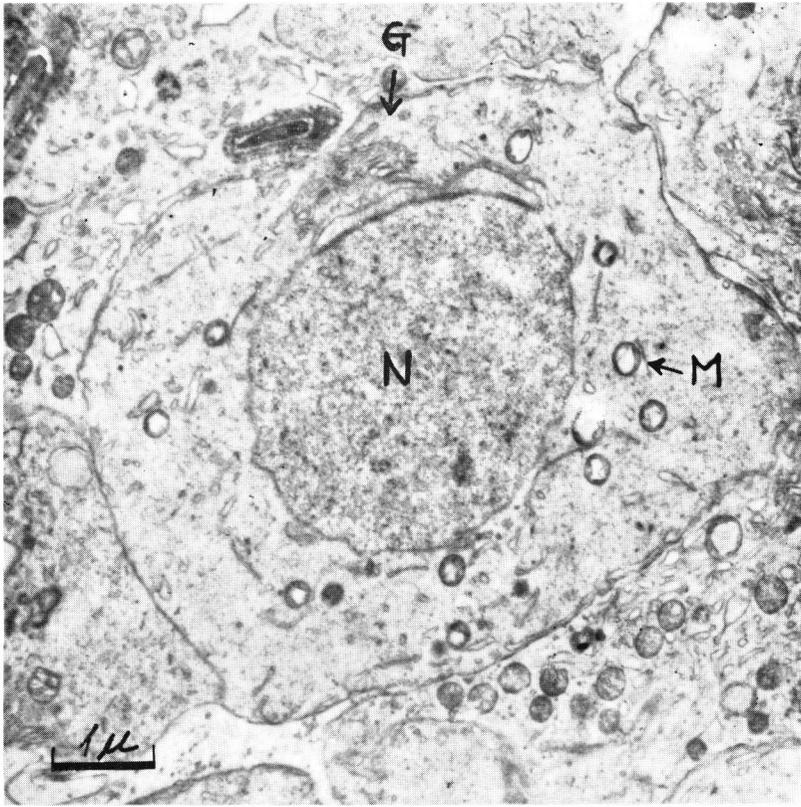
第四図：成熟後期の精子細胞。



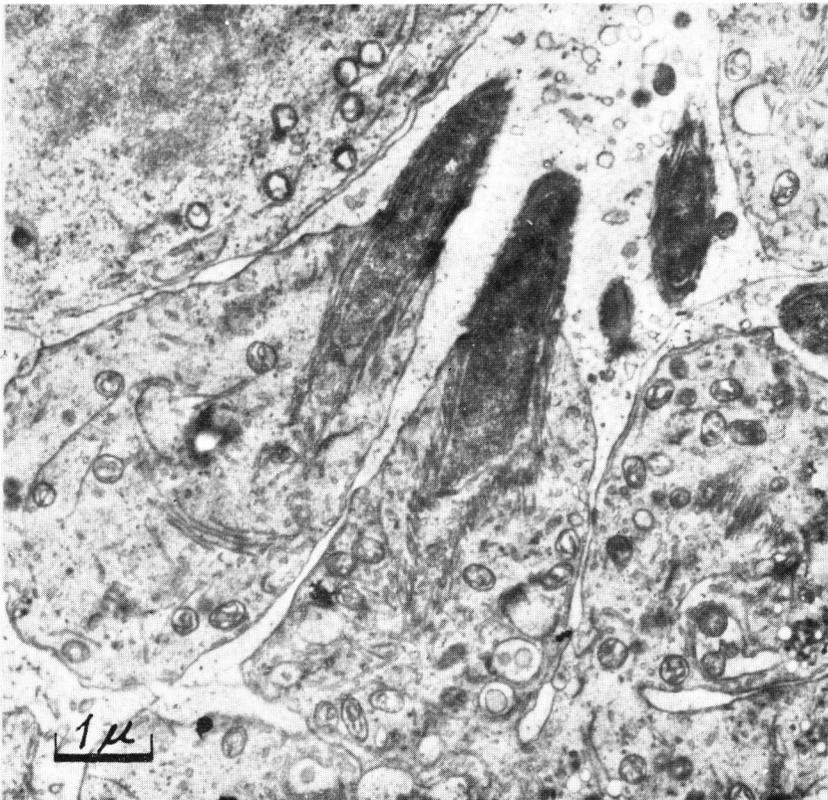
第一 图



第二 图



第三 图



第四 图