

## 最近の電子顕微鏡のための包埋法

## 第二報 ポリエステル樹脂包埋法

慶応義塾大学電子顕微鏡研究室

申 田 弘  
クシ グ 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)

申田つゆ香・荒川克巳  
クシ グ カ アラ カワ カツ ミ

(受付 昭和 35 年 2 月 9 日)

## I 緒 言

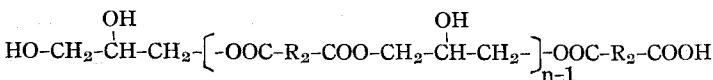
電子顕微鏡超薄切片作製のさいの包埋法としては従来ほとんどメタクリル樹脂包埋法であつたが、最近ではエポキシ樹脂包埋法がよりすぐれ、広く用いられてつあることは既報<sup>1)</sup>のごとくである。なおその他の包埋法としては最近Kellenberger<sup>2)</sup>のらにより提唱されたポリエステル樹脂によるものがある。ポリエステル樹脂包埋のさいも収縮および発泡がなく、均一反応をおこす点でメタクリル樹脂よりすぐれているといわれている。著者らはこれらの方法を追試した結果、ポリエステル樹脂および触媒の選定、硬化物の硬さの調節などの点について満足すべきものでないことを認めたので改良研究を行つた。

## II ポリエステル樹脂

ポリエステルはエステル結合の形成によつて組立てられた高分子化合物であつて、その構造、性質により線状構造で可溶、可融性のポリエステルと、三次元構造をもち不溶、不融性のポリエステルに大別される。後者はさらに三次元構造の成因をもつエステル結合の形成に負うアルキッド樹脂と、分子中に不飽和結合の反応にもとづく不飽和ポリエステル樹脂に分類される。

著者らが用いたのは不飽和ポリエステルで、この研究は1937～8年ごろ始められたが、第2次大戦にいたつて注射用樹脂として脚光をあびるにいたつた。

ポリエステル樹脂は不飽和二塩基酸と二価アルコールとを反応させることにより不飽和ポリエステルすなわちアルキッドが得られ、主鎖がエステル結合からなる直鎖状高分子物で次のような構造をもっている。



この不飽和ポリエステルをビニル系体(スチレン)に溶解した透明な流動性の粘性液体を通称「不飽和ポリエステル樹脂」といい、用いられている。不飽和ポリエステル樹脂に過酸化触媒を加えて加熱するか、または過酸化触媒と促進剤を加えて室温に放置すると不飽和ポリエステル分子中に残存する炭素-炭素間の二重結合とビニル単量体との共重合反応により分子間に架橋が行われる。すなわち三次元網状構造をもち、不溶不融性樹脂になる。不飽和ポリエステル樹脂の種類および硬化条件により、いろいろの異なつた性質の硬化物が得られる。それは注型、積層、接着剤などに用いられている。

## III 包埋剤の組成

不飽和ポリエステル樹脂として理研合成樹脂社製のリゴラック2004とリゴラック70Fとを用いた。硬化して硬くなるリゴラック2004と硬化して軟くなるリゴラック70Fとを試料の硬さ、薄切時の室温などの諸条件を考慮して両者の混合液を作つた。この混合液中に理研合成樹脂社製の過酸化ベンゾイルペーस्टを1% (wt./vol.) 加え、55°Cの恒温器中で18時間～24時間加熱硬化すると無色透明の硬化物が得られる。硬さはリゴラック2004と70Fとの比率が8:2～6:4の状態のものが適していた。

## IV 包 埋

ポリエステル樹脂はアルコールに不溶性で、アセトンにはよく溶解するので、従来行われているアルコール系列のかわりにアセトン系列による脱水を用いた。常法によ

Hiroshi KUSHIDA (Electron Microscope Laboratory, Keio-Gijuku University) Tsuyuka KUSHIDA,

Katsumi ARAKAWA (Department of Anatomy, Tokyo Women's Medical College): A new embedding method for electron microscopy. 2 On polyester resin embedding method.

り固定された組織片を25%, 50%, 70%, 90%, 100%アセトンにおのおの15~30分脱水後次のような順序で操作する。

- (1) アセトン-リゴラック2004, リゴラック70F, 過酸化ベンゾイルペースト等量混合液 1~2時間(室温)
- (2) リゴラック2004, リゴラック70F, 過酸化ベンゾイルペースト 1~2時間(室温)
- (3) リゴラック2004, リゴラック70F, 過酸化ベンゾイルペースト 1~2時間(室温)

リゴラック2004, リゴラック70F, 過酸化ベンゾイルペーストの混合液にて, ゼラチンカプセルの中で55°Cにおいて18~24時間加熱硬化する。

#### V 実際の包埋法

ポリエステル樹脂と触媒の混合液を目盛のついた遠沈管に入れる。このさい細いガラス棒を用いて管壁につけないように注意する。まず比重の重いリゴラックを入れ, ついでリゴラック2004を加えた後, ガラス棒にてよく混合する。この場合40°C位にあため粘度を下げると取扱が容易である。ついで過酸化ベンゾイルペーストを1%(wt./vol.)加えて均一の混合液を作る。気泡が入った場合には放置するか, 遠沈を行うことにより除去できる。このようにして作った混合液とアセトンとの等量混合液中に, アセトン脱水を行った組織片をうつす。ついで組織片をリゴラック2004, リゴラック70F, 過酸化ベンゾイルペースト混合液中に2回うつしかえる。最後にゼラチンカプセル中の混合液の上に組織片を移すと5~20分にて底部に沈む故, 後55°Cの恒温器中で加熱硬化せしめる。

#### VI 薄 切

従来行われているようにブロックの先をできるだけ平たいピラミッド状となし, 切断表面は0.5mm<sup>2</sup>以下とする。ガラスナイフの角度は40°~45°ぐらいのものを用い, clearance angleは5°以下に超ミクロトームにとりつける。切断速度をゆるめると容易に薄切することができる。薄切した切片をエタノールまたはアセトンの稀釈液面上に切出し, そのまま約20分ぐらい放置するか約50°Cの蒸溜水面上に浮べるか又はクロロホルムの蒸気で切片をのばす。

硬化したポリエステル樹脂は不溶, 不融でほとんどの薬品におかされなくなる。しかしクロロホルムの場合には溶解しないが, 切片を蒸気で伸ばすことができる。また切片から脱包埋することはできないが, そのまま切片の中の試料を見ることが出来る。

#### VII 切片の電子顕微鏡的観察

ポリエステル樹脂にて包埋した切片を電子顕微鏡で観察すると, 試料と樹脂とのコントラストがメタクリル樹脂の場合に比較して低く, 観察しにくいのがエポキシ樹脂

より観察しやすいように思われる。電子衝撃にたいしては強い。これはポリエステル樹脂が, エポキシ樹脂と同様に三次元構造をもった熱硬化性樹脂であることによるものと思われる。

#### VIII 実際的な応用例

組織片1mm<sup>3</sup>のものを用いてポリエステル樹脂で包埋し, 超薄切片を作製して電子顕微鏡で観察した。

著者らは成熟ラットの精巣組織を用い, メタクリル樹脂およびエポキシ樹脂包埋のさいとの比較観察を行った。ポリエステル樹脂包埋の場合はエポキシ樹脂包埋法を行ったさいとほぼ同様で, 全体に細胞質の基質がよく保持されている。いわゆるendoplasmic reticulumは精細胞質内にかなり発達した像としてみとめられ核膜にほぼ平行して走っている。おのおのは二重膜を呈する限界膜よりなり, 表面には小顆粒はもたずいわゆるsmooth surfaced varietyに属する構造を有する。endoplasmic reticulumの一部分が核膜に連続している像にしばしば遭遇する。核膜も二重膜構造であり, これらの線構造がくつきりと鮮明である。また核分裂の前期および中期の時期に明瞭なる核膜をみとめた。細胞と細胞との境界部には, いずれも二重膜の隔壁を有し, この部分は精細胞と支持細胞との境界部であるが従来の所見では3000~5000倍程度の倍率においてこのような二重膜構造に接することはできなかった。従来細胞膜が三層構造を呈する所見はEkholm<sup>4)</sup>や Zetterevist<sup>5)</sup>, 安澄ら<sup>6)</sup>により報告されているが, いずれも20~40万倍という超高倍率写真による結果であつた。精祖細胞, 精母細胞および成熟前期の精子細胞核はエポキシ樹脂包埋法の場合と同様に, ほとんど円形に近い形状を示している。成熟前期の精子細胞においてみとめられるGolgi小体はGolgi膜, Golgi胞およびGolgi顆粒の定型的な三要素からなり, 尖体および頭巾形成の時期にしたがい, 形状および量などにことに著しい変化を来す。ミトコンドリアも精細胞を通じ, ほとんど円形であり内部へ三方向に突出するいわゆるミトコンドリア櫛をみとめる。ミトコンドリアの限界膜および櫛も鮮明なる二重膜構造を呈している。精細胞の種類および機能状態などによりミトコンドリア櫛の厚さに著しい変動をきたすことは既報のごとくである。

#### IX 考察および検討

包埋剤としては, まず組織への滲透をよくするために粘度の低い液体の樹脂であることが必要である。Kellenbergerが用いたVinox 3およびVestopal Wは粘度が高いように思われるため, 著者らは理研合成樹脂社製のポリエステル樹脂リゴラックを用いた。多くの製品のうち粘度が低い, 低収縮および低発熱などのつごうのよい特性をもつたリゴラック2004とリゴラック70Fとの混合液を用いることにより包埋に適した状態にすることができ

た。つぎに触媒を加えると粘度が上昇して使用できなくなる迄の時間すなわち可使時間が滲透の上からも長いことが必要である。Kellenberger らは触媒加速剤を用いているため可使時間を短かくして行っているが、著者らは常温にて可使時間を長くするために加速剤は用いないで、触媒として過酸化ベンゾイルを用いた。過酸化ベンゾイルは樹脂に溶解性のよい理研合成樹脂社製の過酸化ベンゾイルペーストを用いた。過酸化ベンゾイルが多過ぎると可使時間が短くなるばかりでなく、硬化反応も急激となるため気泡および亀裂を生ずる。

つぎに硬さの調節が容易であることが必要であるが、Kellenberger らははじめ硬さの調節はできなかつた。ついで硬い場合および軟かい場合に依りて異なつたものを用いて、おのおの別々に硬さを調節した。著者らはリゴラック 2004 とリゴラック 70 F との 2 つの樹脂の混合比をかえることにより硬さの調節を容易にした。

ポリエステル包埋法の利点は 1) ポリエステル樹脂はエポキシ樹脂と同様ほとんど収縮しない。2) 接着性がよいため、薄切の場合に硬い試料を保持することができる。3) 均一に反応硬化する。4) 硬化によつて気泡が生じにくい。5) 電子衝撃にたいして強いので、電子照射による変形が少ない。6) メタクリル樹脂包埋法と全く同様の操作で、しかもエポキシ樹脂包埋法より取扱が容易である。7) エポキシ樹脂が輸入にまたなければならないのに反してポリエステル樹脂は国産にて充分優秀であり入手も容易である。

## X 結 語

電子顕微鏡的超薄切片作製のさいの包埋剤としてポリエステル樹脂を採用した結果、細胞内超微細構造をよく保持し、すぐれた包埋剤であることを確認した。すなわち著者らはリゴラック 2004 とリゴラック 70 F の混合比を変えることにより、はじめて硬さの調節を容易にした。

ことにラット精巣組織についてメタクリル樹脂包埋法のさいと比較検索した結果、1) 精細胞内にはかなり発達した endoplasmic reticulum がみとめられる。2) 精細胞と支持細胞との境界部は 3000 倍程度の倍率においても明瞭なる三層構造を呈する。3) endoplasmic reticulum および核膜などの一般線構造は、いずれも二重膜構造であり鮮明である。4) 有糸分裂核のさいも明瞭なる核膜をみとめた。5) 細胞質内の基質がよく保持され、細胞小器官などの構造もよりすぐれている。などエポキシ樹脂包埋

法の場合とほぼ同様の所見をうることができた。現在エポキシ樹脂は入手困難なるため、本包埋法がすぐれていることは意義あることである。

擱筆に臨み終始懇篤なる御指導と御校閲を賜つた久保田教授に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) 串田 弘・串田つゆ香・荒川克己：東女医大誌 30 412 (1960)
- 2) Kellenberger, E., Schwab, W. et Ryter, A. : *Experientia*, 12 421 (1956)
- 3) Ryter, A. et Kellenberger, E. : *J. Ultrastruct. Res.*, 2 200 (1958)
- 4) Ekholm, R. & Sjöstrand, F.S. : *J. Ultrastruct. Res.*, 1 178 (1957)
- 5) Zetterqvist, H. : *The Ultrastructural Organization of the Columnar Epithelial Cells of the Mouse Intestine*. Stockholm. (1956)
- 6) 安澄権八郎：第 15 回電子顕微鏡学会学術講演会予稿集 70 (1959)

## 附 図 説 明

成熟ラット精巣組織の電子顕微鏡像。

いずれもポリエステル樹脂包埋法を行つたもの。

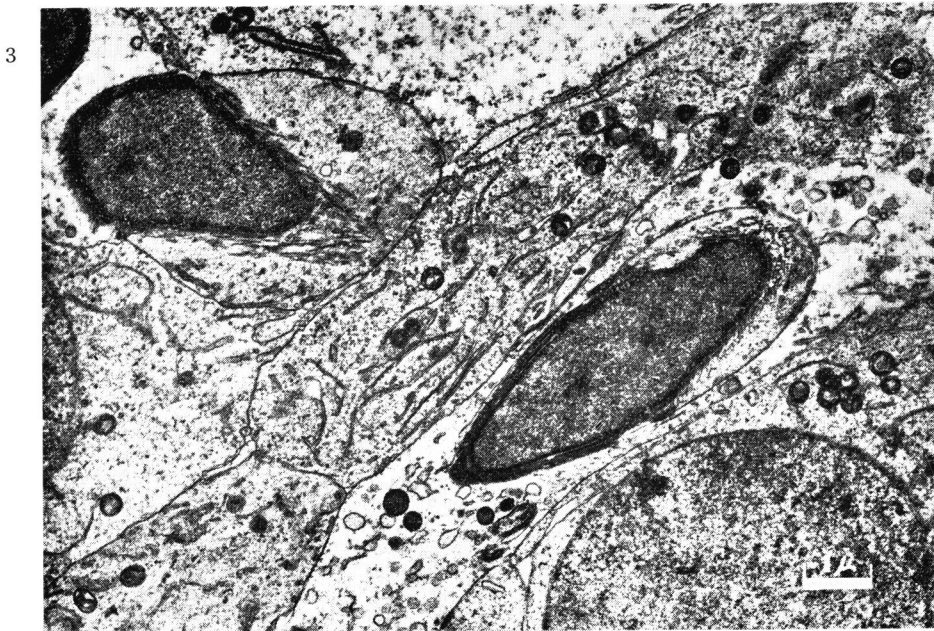
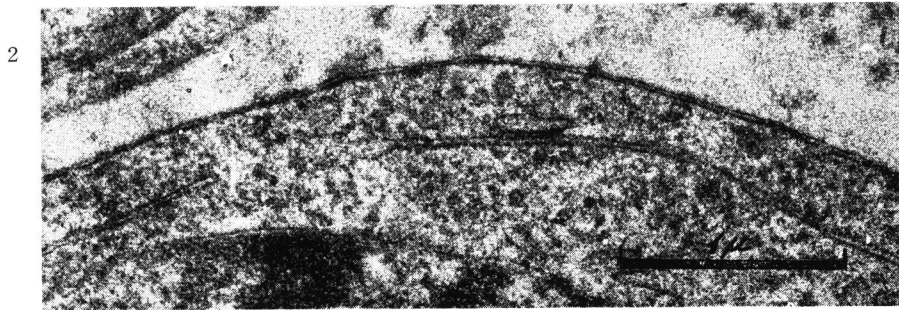
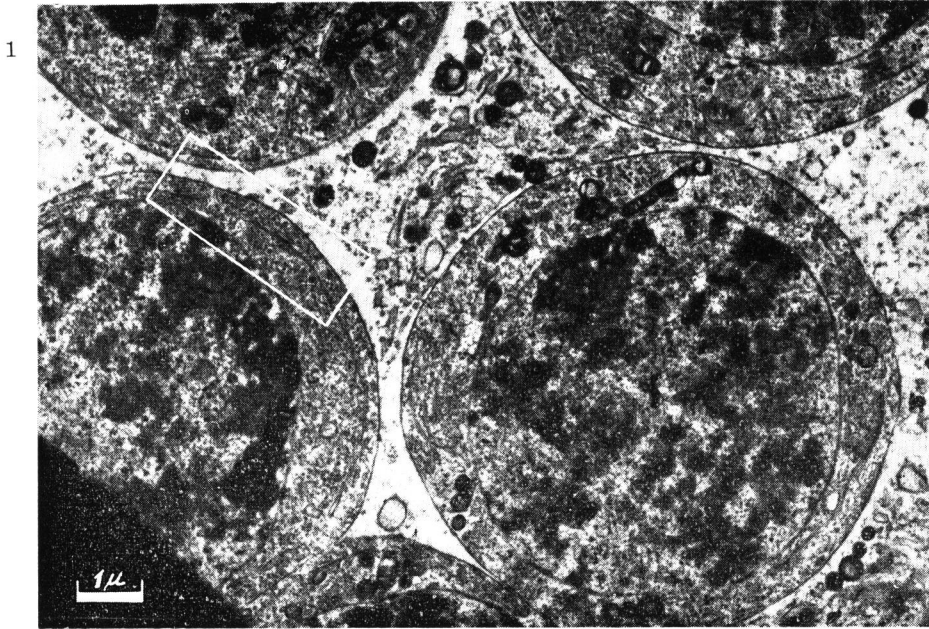
第一図：精母細胞の有糸核分裂前期の像。明瞭なる核膜をみとめる。

第二図：精細胞と支持細胞の境界部は二重膜構造を呈する（第一図の一部拡大した像）

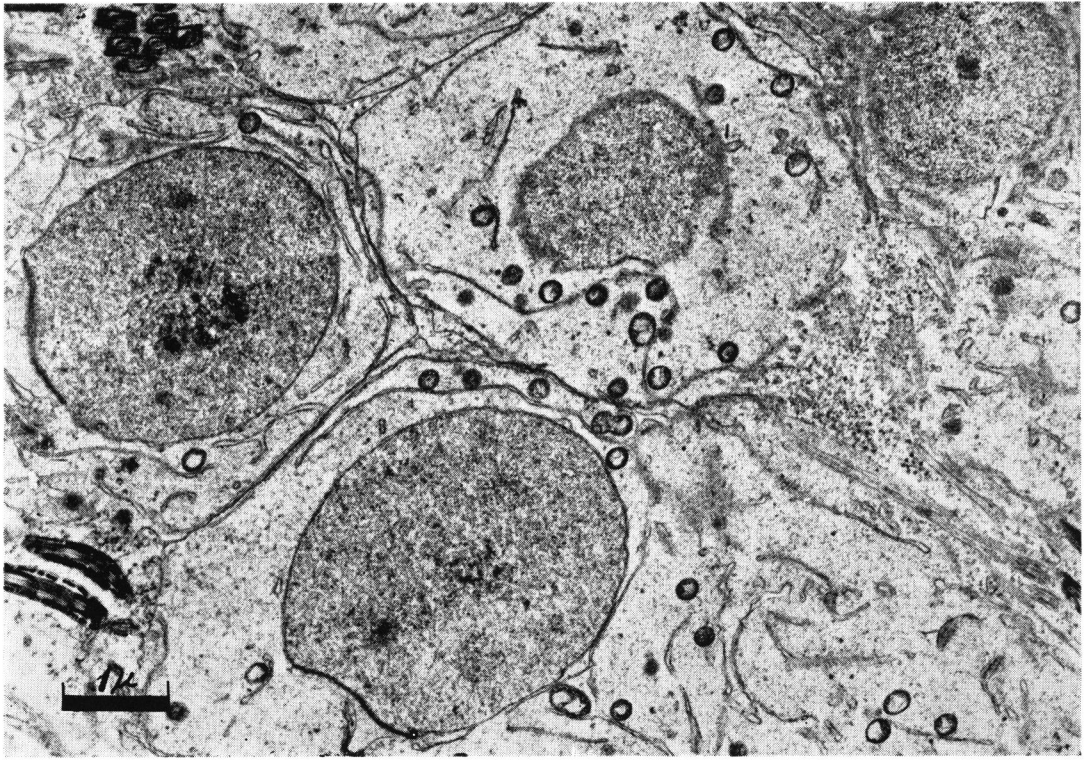
第三図：成熟後期の精子細胞。細胞質内の基質がよく保持されている。

第四図：成熟前期の精子細胞。精細胞の境界部および核膜とも三層構造を呈す。核膜には所々に小孔を有す。細胞質内には、いわゆる endoplasmic reticulum をみとめ、核膜にほぼ平行した走行をしめす。endoplasmic reticulum は、しばしば細胞膜および核膜と連絡している。円形のミトコンドリアには明瞭なる限界膜、櫛構造をみとめ、基質の部分は細胞質より明瞭である。

第五図：成熟前期の精子細胞および支持細胞。尖体および頭巾形成に関与すると思われる Golgi 小体をもとむ。Golgi 小体は Golgi 膜、胞および顆粒のいわゆる三要素を区別することができる。



4



5

