

エポキシ包埋法について

京都大学医学部外科学第2講座（指導：青柳安誠教授）

内 田 幸 夫

〔原稿受付 昭和36年12月12日〕

EMBEDDING METHOD WITH EPON FOR ELECTRON MICROSCOPY

by

YUKIO UCHIDA

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. YASUMASA AOYAGI)

EPON, epoxy resin, was applied in an improved way for embedding the biological specimen in the electron microscopic study, and the satisfactory results were obtained as follows.

In processing the specimen, it was found that the infiltration of resin into the specimen was excellent and the hardness of a block could be easily regulated. One of the greatest advantages of EPON-embedded specimen was its great stability against electron bombardment. Much less tissue damage due to polymerization was also observed.

緒 言

従来、電子顕微鏡(以下電顕と略記)標本の包埋剤としては、ひろくメタクリル樹脂が用いられているが、最近、エポキシ樹脂包埋法が行われるようになった。

エポキシ樹脂というのは、1分子中に少なくともエポキシ基 $\text{-CH-CH}_2\text{}$ を2以上有する3次元重合の合成樹脂  で、接着剤、注型品、塗料等工業的にひろく用いられているものであるが、まず Maløe et al (1956) によつて電顕用包埋剤として採用され、その後、Glauert et al (1956) はAralditeを用いて、串田(1959)、Finck(1960)、Luft(1960)等はEponを使用してそれぞれの改良法を発表した。

われわれも亦、これら各種の方法を追試検討することによつて、従来の方法を改良し、ほぼ満足すべき結果を得たのでその大要を報告する。

従来のエポキシ樹脂包埋法の検討

表1は従来の方法における包埋剤の組成を示すもの

表1 従来のエポキシ樹脂包埋法における包埋剤の組成

包埋剤の成分	Glauert	串 田	Finck	Luft
樹 脂	Araldite M	Epon 812 Epon 815	Epon 812	Epon 812
硬化剤	Hardner 964B	D.D.S.A.	D.D.S.A. H.H.P.A.)	D.D.S.A. M.N.A.)
加速剤	Accelerator 964C	Pyridin	B.D.M.A.	D.M.P.-30
加塑剤	Dibutyl phthalate		Cardolite NC 513	

(註) D. D. S. A.: dodecenyl succinic anhydride
H. H. P. A.: hexahydrophthalic anhydride
B. D. M. A.: benzyldimethylamine
M. N. A.: methyl nadic anhydride
D. M. P.-30: 2,4,6-tri(dimethylaminomethyl) phenol

である。

包埋の操作に関しては種々の問題点があるが、そのうちの主なものについてのべると、

1) 包埋剤の試料への滲透のよいこと。

Glauert et al の用いた Araldite M (Ciba社製のエポキシ樹脂) は粘度が非常に高い (25°Cで1,500 c.p.) ので、取扱いが不便で且つ試料への滲透が非常に悪いという欠点があった。

そこで串田は、それよりも粘度の低い Epon (Shell社製のエポキシ樹脂) (串田法では25°Cで400~580c.p.) を導入したのであるが、それでもなお、メタクリル樹脂に比べるとはるかに粘稠で試料へ滲透しにくいのである。

またLuft も Epon を用いたが、彼は滲透の段階で揮発性のエポキシ化合物プロピレンオキサイドを、包埋剤に混合してその粘度を下けているので、試料への滲透が非常によい。しかもプロピレンオキサイドはすみやかに包埋剤と置換し、重合を阻害しないから便利である。

2) ブロックの硬度の調節が容易であること。

この点に関してメタクリル樹脂包埋の場合には、2種の樹脂 (n-ブチルメタクリレートとメチルメタクリレート) の混合比を変えることによって、ブロックの硬さを調節出来るが、もしエポキシ樹脂包埋法においても、このようにブロックの硬度が自由に調節出来れば便利であろう。

即ち Glauert et al は加塑剤 dibutyl phthalate を用いているが、硬度を自由に調節する事は出来ない。

また Finck は硬化剤の種類 (D.D.S.A. と H. H.P.A.) 及びその量を変えて、更に加塑剤 Caldolite NC513を加えているが、硬度を広範囲に変化させる事は出来ない。

更に串田は、2種の樹脂 (硬化後に軟いEpon 812と硬化後に硬いEpon 815) の混合比によつて、またLuft は2種の硬化剤 (硬化後に軟い D.D.S.A. と硬化後に硬い M.N.A.) の混合比によつて、いずれも広範囲の硬度的変化を可能としているが、Luft 法は2種類の硬化剤にそれぞれ、樹脂 (Epon 812) を混ぜたものを氷室内に保存し、使用時にこの2者を混合して、その混合比によつて硬度を調節しているので、保存が長期になるとこの混合物が重合を起してくるという不都合がある。この点では串田法の方が合理的である。

3) 操作が簡単に標本の出来上るまでの時間が短いこと。

使用前の包埋剤は、氷室に保存する必要がなく室温に保存出来る方が取扱いやすい。

また混合を要する薬品類は室温では液状であつて、

なるべく粘度の低いものがよく、そしてその種類の少ない方が便利である。

その上、調製した包埋剤は可使時間の長い方がよい。標本作製の全過程のうちでは、脱水がすんでからカプセルに入れるまでが最も手数がかかるから、この段階を簡略化する必要がある。

われわれの行なっている Epon 包埋法

そこでわれわれは以上の諸点を検討した結果、表2に示したような包埋法を行つて効果をあげている。

表 2

われわれの行っているエポン包埋法

固定

50%エタノール

10分

70%エタノール

10分

95%エタノール

10分

100%エタノール

15分

100%エタノール

15分

プロピレンオキサイド

10分

プロピレンオキサイド

10分

プロピレンオキサイド1容と包埋剤2容の混合物

3時間~1晩

カプセルの中で硬化

37°C約20時間

又は60°Cで1晩

60°C約10時間

表 3 包埋剤の組成 (容量比)

ブロックの硬度	硬い←————→軟い			
Epon 815	6	5	4	3
Epon 812	4	5	6	7
D. D. S. A.	16	16	16	16
D. M. P.-30	0.45	0.45	0.45	0.45

1) 包埋法の概要

包埋剤としてはEpon 812とEpon 815の混合物を硬化剤 D.D.S.A. 及び加速剤 D.M.P.-30を用いて硬化させるのだが、表3のように2種類の樹脂の混合比を変えることによって、出来上りのブロックの硬度を広範

皿に調節出来る。われわれの経験では樹脂の混合比が5:5の場合が薄切に最適であつた。

包埋剤の可使時間は長く、又脱水後の段階で、プロピレンオキシドを用いるから包埋剤の試料への滲透は非常によい。従つてこの際、包埋剤の粘度を下げるために特に加温する必要はないのである。

しかも、操作は出来るだけ簡略化し、標本の出来上るまでの時間も短縮されているので都合よく考えられる。

2) 包埋操作上の注意

あらかじめ、Epon 812とEpon 815との混合物を作つておくことと便利で、これはLuft法の場合と異つて、デシケーターに入れておけば室温で長期間保存しておいても安定である。

包埋に際しては、この樹脂の混合物とD.D.S.A.及びD.M.P-30の3者を混合すればよいわけで、D.M.P-30はツベルクリン用注射器で量を測り、これらの混合には小型のメートルガラスを用い、ガラス棒でゆるやかに攪拌すればよい。

包埋剤は、硬化後は通常の溶媒には不溶性となるので、用いた器具類は包埋操作後にアルコール又はアセトンで洗滌しておかなければならない。なお、この際、Luftは包埋剤が皮膚炎を起す事があると注意しているが、最近、Eponの発癌性の問題が論じられているので、手指に附着した包埋剤は十分に洗い去つておく必要がある。

なお、プロピレンオキシドは揮発性の毒物であるから取扱いに注意し、これはまた燐タングステン酸と激しく反応するので、脱水段階で燐タングステン酸染色を行なう時には、アルカリで処理しなければならない。

滲透後にカプセルへ移す際にはプロピレンオキシドの混入を出来るだけ少なくする方がよい。

3) 試料の薄切

薄切は従来のメタクリル樹脂包埋のものに比べてやや困難で、ナイフマークと直交するすだれ状のしわが入りやすい。これをさけるには、ブロックの硬度を適当なものにし、機械的なぶれの少ないミクロトームを用いる事は勿論で、試料の切削面積を小さく(約0.5mm²以下)し、35°~40°のガラスナイフをクリアランスアングル5°以下にしてミクロトームに取りつけ、出来るだけ切削速度をおそくするのがよいようである。

前述のように硬化した包埋剤は、通常の溶媒には溶解しないので、メタクリル樹脂包埋の場合のように切

片のしわをクロロフォルム等の蒸気で伸す事は出来ない。

また、同様の理由から、従来エポキシ樹脂包埋の場合、切片を脱包埋して光学顕微鏡標本を作り観察する事は出来なかつたが、最近Major et al (1961)は金属ナトリウム、メタノール、ベンゼンを用いて脱包埋する方法を考えたので、このことによつて本包埋法の有用性は更に増大することになる。

試料は電子線衝撃に対して強いのでコロジオン等の支持膜なしでも直接メッシュにすくつて鏡検する事が出来る。

4) 電顕像

本包埋法による試料の電顕像は、Aralditeやポリエステル樹脂包埋の場合と同様に、メタクリル樹脂包埋のものに比べてコントラストが低い。試料のコントラストを増すために、切片に対して醋酸ウラニール、燐タングステン酸、水酸化鉛による染色を試みたが、メタクリル樹脂包埋の場合よりもやや染まりにくいようである。

電子線衝撃に対してはメタクリル樹脂包埋のものよりも強いので、特に高倍率撮影の場合に問題となるSublimationによる像の変型も少ないと考えられる。又、組織によつては重合時の試料の損傷が著しいものがあるが、そのような組織でも本包埋法によれば損傷は少なく、微細構造がよく保たれている。

総括及び結語

われわれは、最近電顕標本作製に導入されたエポキシ樹脂包埋法を検討し、これを改良した。

この方法によれば、包埋剤の試料への滲透はよく、出来りの上ブロックの硬度を広範囲に調節出来る。

また、本包埋法は、例えば、哺乳類中枢神経白質、細菌等のように重合時の損傷の起りやすい組織の場合、高倍率撮影の場合に特に適していると考えられる。

稿を終るにあたり、終始御指導賜つている教室の木村忠司助教授、種々御助言を賜つた皮膚科特別研究施設西占貢教授、実験にあたり快く設備の使用をお許し下さつた生理学教室井上章教授及び同教室品川嘉也氏に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Finck, H.: Epoxy resins in electron microscopy, J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 7, 27, 1960.



Fig 1 犬肝臓の Epon 包埋の電顕像。コントラストを増すために水酸化鉛染色を行つたもの。(×28,000)



Fig. 2 家兎脊髄のメタクリル樹脂包埋の電顕像、哺乳類中枢神経白質は他の組織と異つて重合時の試料の損傷が大きい。(×2,900)

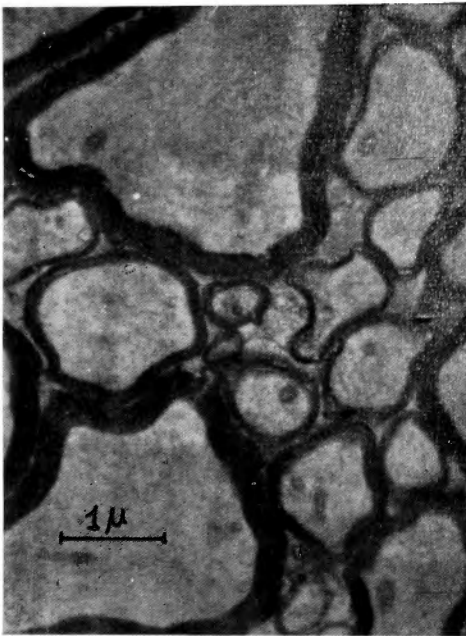


Fig. 3 同上組織の Epon包埋の電顕像。本法を行えば組織の損傷は少ない。(×14,000)

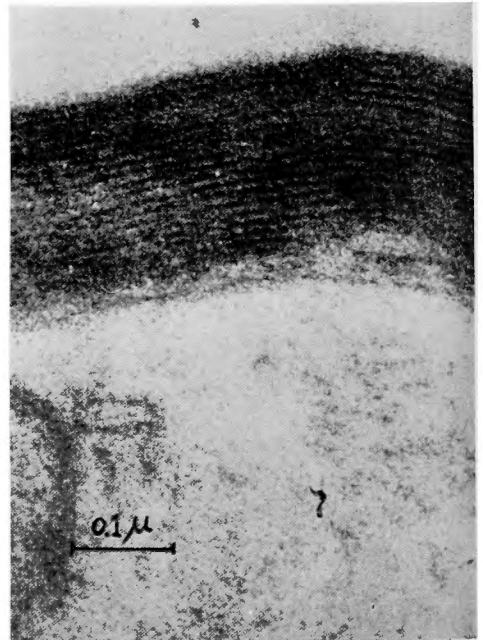


Fig. 4 同，強拡大で髄鞘の層状構造を示す。(×130,000)

- 2) Glauert, A. M., Rogers, G. E., and Glauert, R. H.: A new embedding medium for electron microscopy. *Nature*, **178**, 803, 1956.
- 3) Glauert, A. M., and Glauert, R. H.: Araldite as an embedding medium for electron microscopy. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **4**, 191, 1958.
- 4) 串田弘: エポキシ樹脂包埋法について. *電子顕微鏡*, **8**, 72, 1959.
- 5) Luft, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **9**, 409, 1961.
- 6) Maaløe, O., and Birch-Andersen, A.; On the organization of the Nuclear material in *Salmonella typhimurium*, in *Bacterial Anatomy*, 6th Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge, The University Press, 261, 1956.
- 7) Mayor, H. D., Hampton, J. C. and Rosario, B.: A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **9**, 909, 1961.
- 8) Pease, D. C.: *Histological techniques for electron microscopy*. Academic Press, New York and London 1960.
- 9) Watson, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals, *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **4**, 475, 1958.
- 10) Watson, M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containig lead and barium. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, **4**, 727, 1958.