
研究ノート

凍結包埋剤を用いた凍結切片の作製法と 簡易ミクロトームの開発

渡 辺 克 己

元北里大学獣医学部

はじめに

小学校6年生「植物のつくりと働き」の授業で、教材で用いたセイタカアワダチソウの茎の切片を作り断面を顕微鏡で見せたところ、維管束の構造に児童は大いに関心を示し、先生からは大変喜ばれた。先生の話では、通常の授業で実物を見る機会はほとんど無いとのことであった。

通常茎や葉の断面観察用標本の作製には、植物片をニワトコの随やブロッコリーの茎などで挟み、安全カミソリの刃を用いて徒手切片を作ることが行われている。しかし、薄く均一に切るにはそれなりの技術が必要であり、観察用に児童・生徒が行うにはなかなか難しい。

そこで、児童・生徒が実物の教材に触れる機会を増やすことを目指して、容易に、且つ多数の顕微鏡用切片を作ることができる方法について開発を行った。

I 簡易ミクロトームの作製

ミクロトームは顕微鏡での観察に用いる試料を極薄の切片にするために、試料を薬剤で固定した後パラフィンに包埋し、特別な刃を用いて切る装置である。植物組織など比較的固い試料を切るための簡便な器具として、ボルトを回転させ、資料を押し出し、せり出た部分をカミソリで切る簡易型ミクロトームが市販されている。今回はこれと同様のネジせり出し方式のミクロトームを開発した。

1 ミクロトームの構造

・本体の構造

厚さ14mm、幅30mm、長さ25cmの白松材の端から7cmのところに直径10mmの穴を開ける。この穴に合わせて、直径10mmの穴を開けた、厚さ3mm、幅3cm、長さ15cmの銅板をエポキシ樹脂系接着剤で貼り付け、さらに、直径10mmの穴を開けた、厚さ1mm、幅2.5cm、長さ8cmのステンレス板を貼り付ける。ステンレス板は30cmの物差しを切断して

用いた。銅板は熱伝導性が良いため試料を冷却するのに有効であり、ステンレス板は固いため剃刀の刃が食い込むのを防ぐ効果がある。白松材のもう一方の端はクランプで挟み実験機に固定する部分で、これにより切片の作製に際して両手が自由になる利点がある。

・ネジの検討

①M6×50さら小ねじは、直径6mm長さ5cm、ピッチ1.0mmであり、30度の回転で約0.08mmボルトがせり出される。直径5.5mmの穴を開けた木材に無理にボルトをねじ込むと、木材がナットの代わりとなり、作製作業が容易である。

②M10×40細めボルトは、直径10mm長さ4cm、ピッチ1.25mmであり、30度の回転で約0.10mmボルトがせり出される。ナットは白松材に開けた10mmの穴の下部に補強材を付けてエポキシ系樹脂で固定する。ボルトの先端を研磨し、せり出し方向と直角になるよう調整することが肝要である。(写真1、2)

・回転盤の作製

ボルトに回転を調整するための円盤を取り付ける。厚さ3mmの塩ビ板をホールソーを用いて切り、直径6cmの円盤を作製する。これに分度器を用いて30度ごとの目盛りを付け、ナットに固定する。上から見るとボルトは反時計回りでせり出すので、回転方向の矢印を書く時に留意する。

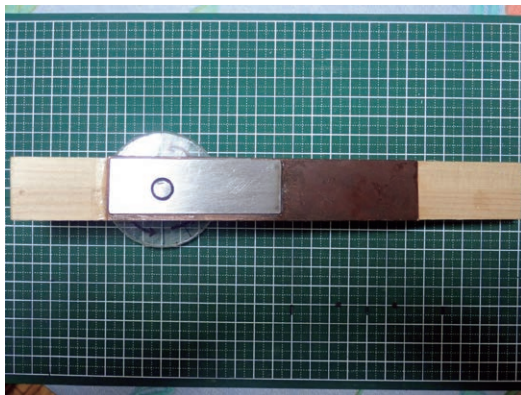


写真1 簡易ミクロトーム（上面）

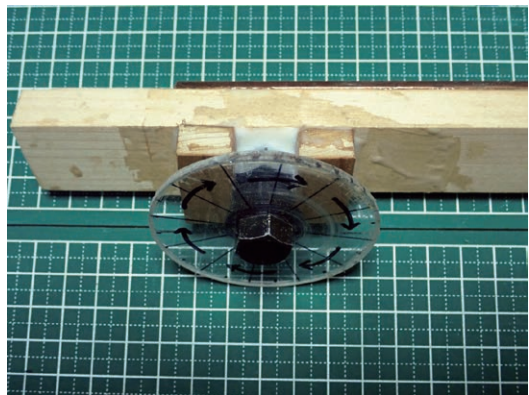


写真2 簡易ミクロトーム（側底面）

2 使用する刃の検討と結果

せり出た凍結した試料を、ステンレス板上で刃を滑らせて切る場合に適した刃の種類と形状について検討を行った。

①安全カミソリの刃（フェザー剃刀S両刃）：フェザー安全剃刀（株）製、厚さ0.1mm幅3.7cm。徒手切片の作製ではよく使われるが、凍結した試料は固いため、広い部分を切ろうとすると力が入るため刃が変形してしまう。

②長柄カミソリ（長刃カミソリ）：貝印カミソリk.k製、厚さ0.1mm幅5cm。徒手切片の作製ではよく使われる。使い勝手は良いが、広い部分を切ろうとすると力が入るため刃が

試料に食い込んでしまう。

③レーザーカット用カミソリ（フェザーカットスペシャル）：フェザー安全剃刀（株）製、厚さ0.2mm幅5.7cm。刃が固くしっかりしているため、力を入れた場合の刃の試料への食い込みも少なく最も使いやすかった。

④工作用カッターの刃（高硬度チタンコーティングカッター替刃）：株式会社ミツキ製、厚さ0.5mm幅5cm。これを長柄カミソリのホルダーに挟んで使用した。刃が厚いためか切片の作製には余り良い結果は得られなかった。

いずれの刃も、試料を切る前にはドライアイスで十分冷却して使用した。

Ⅱ 凍結包埋剤を用いた凍結切片の作製法

・凍結包埋剤

医療用の組織切片を作るための広く利用されているTissue-Tek O.C.T. Compound を使用した。-15℃～-20℃が切片作製の良好な凍結温度とされており、常温では粘性のある透明な液体である。インターネットで購入した場合、1mLあたり25円ほどである。

・包埋容器の作製

今回作製したマイクロトームの直径10mmの穴に、ぴったり入る円筒状の凍結ブロック作製の包埋用容器を作製した。ブロックの底には、直径10mmよりやや細い高さ6～8mmの円柱の木栓を置き、幅15mm長さ25cmのアルミホイルを巻き付けた。木栓は市販されている直径10mmの棒を紙やすりで削ったものから作り、アルミホイルは厚さ17 μ mの厚手フライパン用魚焼きホイルを用いた。この容器を用いた場合の包埋剤の単価は15.7円ほどである。

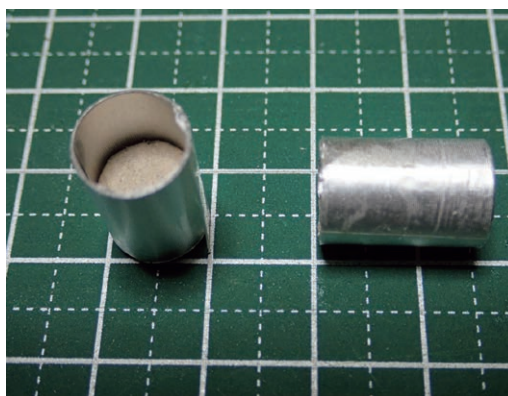


写真3 包埋容器

・材料の調整

葉などには空気が含まれるため試料の位置決めが難しいこともあるが、試料の幅を9.7mm程度に調整し、包埋容器内で押さえておけば、1分ほどで包埋剤が凍り始めるので固定できる。今回は脱気や固定等の処理は行わなかった。

・冷凍容器の作製

家庭用冷凍庫の温度は-14℃ほどであり、包埋剤は完全に凍結する。凍結した試料の保存には支障が無いが、試料の作製には極低温で急速に凍結することが望ましい。そこでペレット状ドライアイスを用い、試料を周囲から急速に冷やす冷凍容器を作製した。

家庭用のツナ缶の空き缶（直径7.6cm、高さ2.8cm）に鉛を溶かし入れ、底から直径

10mm深さ15mmの穴を開け、ドリルの刃を壁面に押しつけることで穴の直径を若干広げる。ペレット状ドライアイスは、スーパーマーケットでも購入することができる。

・冷凍ブロックの作製

冷凍容器を発泡スチロールなどの容器に入れ、ドライアイスを振りかけて十分冷やす。試料を入れた包埋容器を冷凍容器内の穴に入れ、包埋剤を注入すれば5～6分で試料の凍結ブロックを作ることができる。この方法により特別な冷凍装置を用いなくとも簡単に凍結ブロックの作製が可能である。



写真4 冷凍容器

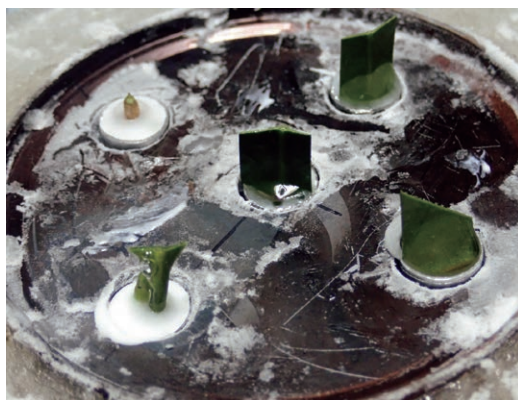


写真5 凍結した状態



写真6 包埋剤注入1分後



写真7 注入3分後



写真8 注入5分後

・切片の作製

ミクロトームやピンセット、カミソリ等必要な器具は冷凍庫で十分冷やしておく。軍手を付け、ミクロトームを素早くクランプで実験机等に固定する。ミクロトームの回転盤を回し、ボルトの先端を15mm下げておく。ミクロトームの金属部分にドライアイスを載せながら、アルミホイルをはがした凍結ブロックを、試料の位置を考えながら穴に押し込む。葉の位置が刃と平行になる位置が望ましい。カッター等でミクロトームからはみ出している凍結ブロックを切り取りステンレス面と平らにする。回転盤を回し、せり出たブロックをカミソリの刃をスライドさせながら切る。この作業は常にドライアイスで冷やしながらかう必要がある。

・プレパラートの作製

切り取った切片は包埋剤ごと水を張ったシャーレに落とし、適当なものをスライドガラ

スに取りプレパラートにする。切片を水に落とす際、カミソリが暖まってくると包埋剤が溶け刃にくっついてしまうので、刃は常にドライアイスで冷やしておく必要がある。

Ⅲ 作製した切片の観察結果

ツバキ等の固い葉は徒手切片を作り易いが、ハウレンソウなど柔らかい茎の切片作製は難しい。さらに、オオバマルバマンネングサは多肉植物であり、葉の断面の徒手切片作製は極めて難しいと思われる。凍結包埋剤を用いることにより、ツバキでは広い範囲の切片を作ることができ、柔らかい植物でも顕微鏡観察用の切片を作ることができた。

・ツバキ：



写真9 葉の断面



写真10 葉柄の断面

・ハウレンソウ：

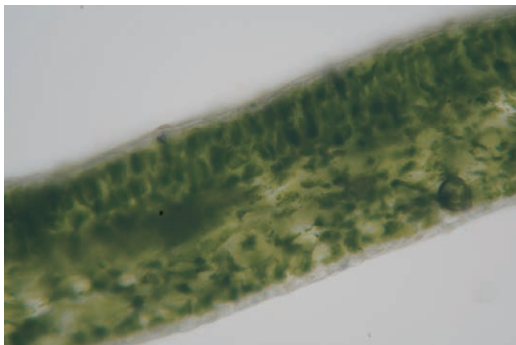


写真11 葉の断面

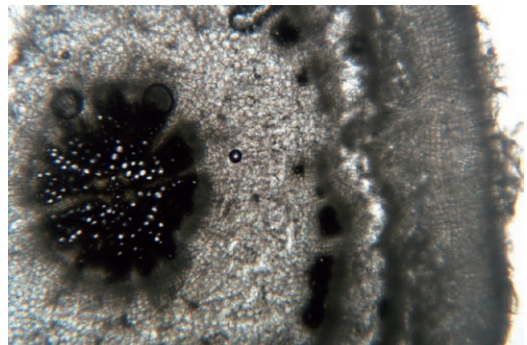


写真12 根の断面

・オオバマルバマンネングサ：

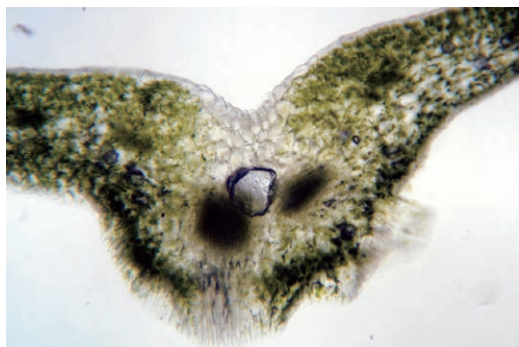


写真13 葉の断面 (中心部)



写真14 葉の断面 (先端部)

Ⅳ 今後の展望

・凍結包埋剤とドライアイスを用いる方法は、色々な材料を顕微鏡観察用標本に作ることができる有効な方法であり、教育現場での活用が期待できる。ただし、直径10mmの凍結ブロックでは刃の準備に難があり、7mm程度が適当であると思われる。

・簡易ミクロトームは、ナットを回転させボルトを上下させる様式も作製したが、今回のモデルは構造が単純で安価に作製できる。数を揃えることで生徒実験で活用可能になると期待される。

終わりに

今日、理科教育に活用するデジタル教材の進歩には目を見張るばかりである。であるからこそ、児童・生徒が実物に接し、科学的感動を味わう体験がより重要であると考え。本開発により、生物分野の最も基本である生物の形を知る手立ての一つが得られたと考えている。

本開発に際し、元北里大学理学部生物科学科 内山孝司先生に、凍結包埋剤を提供していただき、技術的なご指導をいただいた。茨田理髪店 茨田敏雄氏より、レザーカット用カミソリ刃を提供していただいた。(有)堀端製作所社長 堀端明雄氏より銅板を提供していただいた。改めて感謝申し上げます。

参考文献

- 1 梶原裕二・八十田茂希 (2011)「凍結包埋剤を用いた簡便な徒手切片法による動物組織とニワトリ胚の観察」『生物教育』第52巻 第3号
- 2 梶原裕二 (2009)「ブロッコリーを用いた徒手切片法による身近な植物の葉や花の組織実験例」『生物教育』第49巻 第1号