

硬組織と軟組織を顕微鏡で観察してみよう

田尻薄片製作所 田尻 理恵 (Tajiri, Rie)

薄片って何？

動物組織を透過顕微鏡で観察しようとするとき「切片」を作ることは、ご存知の方も多いと思います。切片は、生物の組織を顕微鏡で透過光観察するためにナイフやマイクロームで薄く切って観察する技術です。主に柔らかい組織を観察するために使います。

ところで、うみうし通信の読者の皆さんは「薄片」ってご存知でしょうか？ 薄片は、岩石のような硬いものをスライドグラスに張り付けて、研磨剤を使って20～30μmの薄さまで磨き減らし、顕微鏡で観察できるようにする地学系の技術です。岩石の薄片を作ると、透過光や偏光による構成鉱物の観察ができるだけでなく、さらに微細な研磨を施すことで化学分析も可能になります。動物の硬組織である骨や歯や爪などについても、薄くして顕微鏡で透過光観察したいときに「薄片」が適しています。

ただし、体内に硬組織を持つ動物の多くは、硬組織だけでできているわけではありません。骨にも歯にも爪にも肉の部分、つまり軟組織が付いています。そして硬組織と軟組織を別々に見るより、両方一緒に見たい、硬組織と軟組織の関係性も知りたい、と思うのが人間の常です。ではどうすればいいのでしょうか……？

柔らかいものを薄く切って観察できる切片と、硬いものを薄く磨き減らして観察できる薄片。切片と薄片それぞれの手法のなかに、硬組織と軟組織を同時に観察できる方法があります。切片では、硬組織部分を「脱灰」（だっかい：カルシウム成分を溶かして柔らかくする）してから樹脂で柔らかめの包埋を行ったのちに切る方法があります。マイクロームを使うと、ほとんど透明になるほど薄く切ることができ、その切片に染色を施すことで組織による違いをはっきり際立たせて観察します。連続切片も切ることができます。ただし、硬組織は脱灰されているので、直接見ることはできません。硬組織の中に含まれている有機物部分が輪郭として残っているので、それを観察することによって硬組織の輪郭を判別することができるのです。ただし、マイクローム

は薄く切ることはできますが、10μm以上の厚さに切ることはかえって難しいようです。

一方、薄片の手法では、標本に樹脂を含浸させて硬く固めたのちに薄片にする方法があります。薄片は前述の通り研磨剤ですり減らして薄くするので、厚さを自由に調節することが可能です。よって、動物組織本来の色やコントラストが残っている厚めの状態、およそ60～100μmで研磨をストップして観察することができます。また硬組織の部分は、前述の通りさらなる微細研磨を施すことによって化学分析を行うことができます。

硬組織と軟組織を同時観察できる薄片

樹脂含浸による薄片は、通常は1辺が2cmくらいまでの大きさの標本に適用しています。図1はそのプロトコルを示したものです。この方法は脱水に時間がかかったり、Spurr樹脂の調合にコツが要ったり、薄片の端から端まで同じ厚さに均等に研磨するのが難しかったりと非常に手間のかかる方法ですが、出来上がった薄片は普段見ることのできない素晴らしい画像を提供してくれます。設備も必要となり、いきなり初めての方がこの方法に挑戦するのは難しいかもしれません。詳細を記すと長くなってしまうので、ここでは紹介しませんが、ご興味のある方は田尻薄片製作所までお問い合わせください。

図2aはトゲクモヒトデの一種を薄片にしたものです。図2bはその腕の部分拡大したものです。骨片と筋肉が繋がっている部分や、腕の中心部を貫く水

管、腕の側面に並ぶ管足も見えます。図2cは管足の部分を拡大したものです。図2dは口板とその周辺部を拡大したものです。口部を囲む筋肉が骨片と繋がって五角形に配置されています。歯舌の根元にも小さな筋肉が見えます。また、中心部には食べていたものと一緒に観察できます。図2eは口板周辺の骨片と筋肉の接合部をさらに拡大したものです。ピンと張った筋肉と骨片が繋がっている様子が美しいですね。

次の図3は無脊椎動物ではありませんが、ガラパゴスザメの肌の薄片です。サメ肌という言葉の通り、表面が鉤状に立ち上がっています。その一つ一つの鉤のなかに血管があるのがわかるでしょうか。また、図4は陸の無脊椎動物、カブトムシの角の断面の薄片です。クチクラが何層にも重なることによって角の強度を確保していることがわかります。また、内部の薄いハニカム構造も観察できます。

大きな設備を使わずにクモヒトデの断面観察ができるプロトコル

さて、これまで多くの方から自分にもできるようなもう少し簡単な方法はないか、とのご質問をいただきました。そこで、クモヒトデの断面を観察できるプロトコルをご紹介します。

図5は、およそ盤の直径が1cm以下のクモヒトデ標本に適用できるプロトコルです。クモヒトデ以外の動物にも適用できますが、粘液を伴っている、透水性が悪い、軟組織が硬組織に囲まれているなどの場合にはうまくいかないことがありますのでご承知おきください。このプ

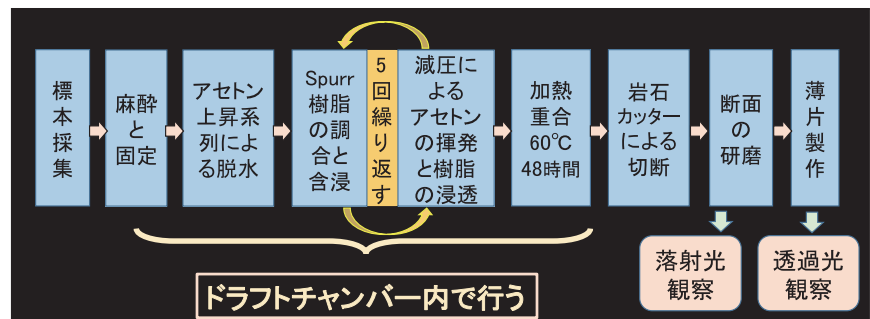


図1. 樹脂含浸薄片作製の流れ

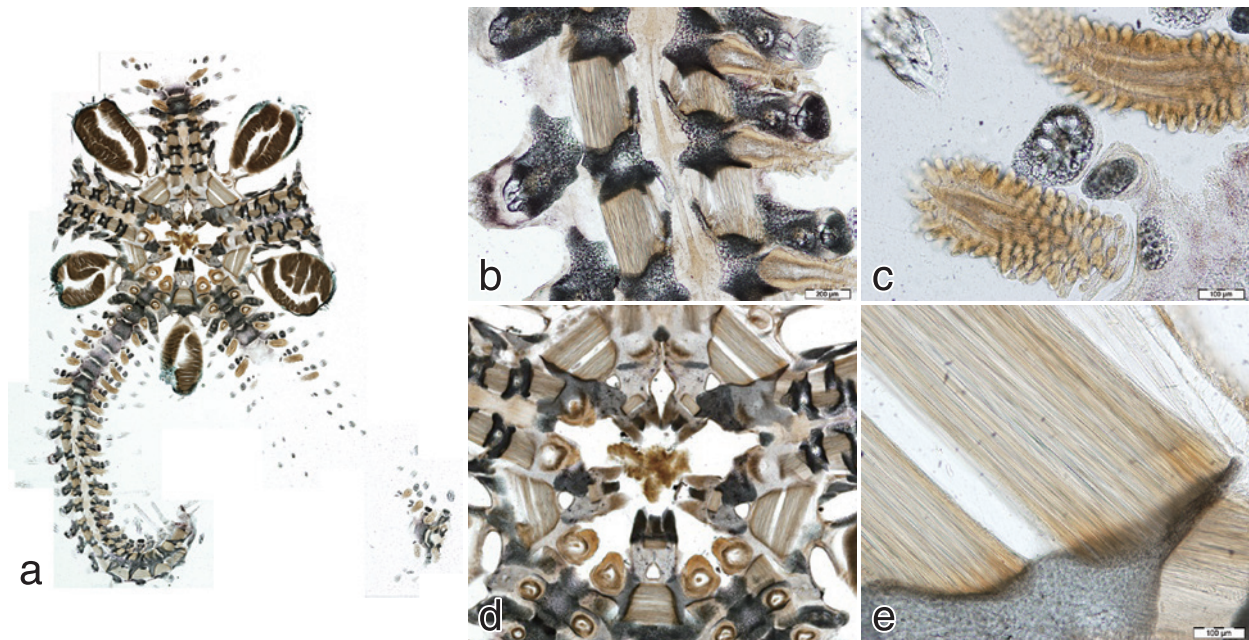


図2. a: トゲクモヒトデの一種の薄片, b: 腕部, c: 管足, d: 口板とその周辺部, e: 口板周辺部の骨片と筋肉

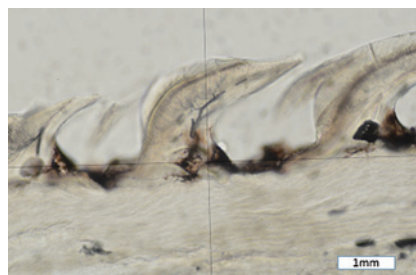


図3. ガラバゴスザメの肌の薄片

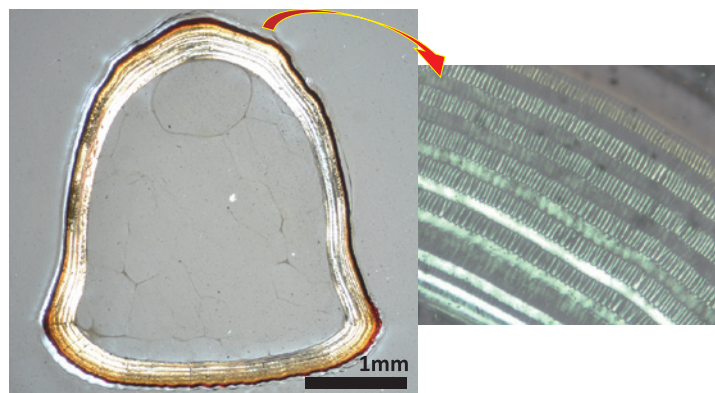


図4. 左: カプトムシの角の断面の薄片, 右: さらに拡大して偏光顕微鏡で観察

ロトコールでは薄片ではなく断面観察になりますが、中学校や高校などの設備でも行えるように、グラインダーや岩石カッターなどは使わずある程度手に入りやすい材料で構成しています。ただしアセトンや樹脂を使うので、必ず換気ができる環境のもと、子どもや生徒が行う際には必ず大人が付き添ったうえで行ってください。

【準備するもの】

- ・作業台に敷く新聞紙（樹脂がこぼれても大丈夫のように敷いておく）
- ・断面を観察したい標本（できるだけ小さいサイズの方が、水分置換が早くできて良い）
- ・エタノール（標本採集時の液浸用）

- ・アセトン（1級もしくは特級のアセトン）
- ・ニガリ（麻酔用）
- ・サンドペーパー（＃100、＃500、＃1000、＃2000番数は多少違って構いません）
- ・エポキシ樹脂：ここではE205（コニシ株式会社：主剤と硬化剤を3：1で調合する）を使っています
- ・ビーカー2個（アセトンによる脱水時に使う）
- ・樹脂固化用の型2個（PPやPEなどの保存容器。卵豆腐の容器などがいいかも）
- ・樹脂を調合する容器（ヨーグルトのプラスチックカップなどでも可）
- ・プラスチックスプーン（樹脂調合時の攪拌用）
- ・割りばし（クモヒトデを移しかえるときに使う）

【作業工程】

- ①海で採集したクモヒトデは海水にニガリを入れて麻酔をかけてから、アルコール液に浸しておく
- ②ビーカーにアセトンを用意して、クモヒトデを完全に浸るように入れる。アセトン浸漬は、樹脂包埋の前段階としての脱水作業です。樹脂は水分との相性が悪いので、樹脂が完全に固化するかどうかは、水分をアセトンに置換する脱水が完遂するかどうかにかかっています。
- ③1時間後にビーカーに新しいアセトンを用意して、そこにクモヒトデを移す
- ④また1時間後にビーカーに新しいアセトンを用意して、そこにクモヒトデを移す

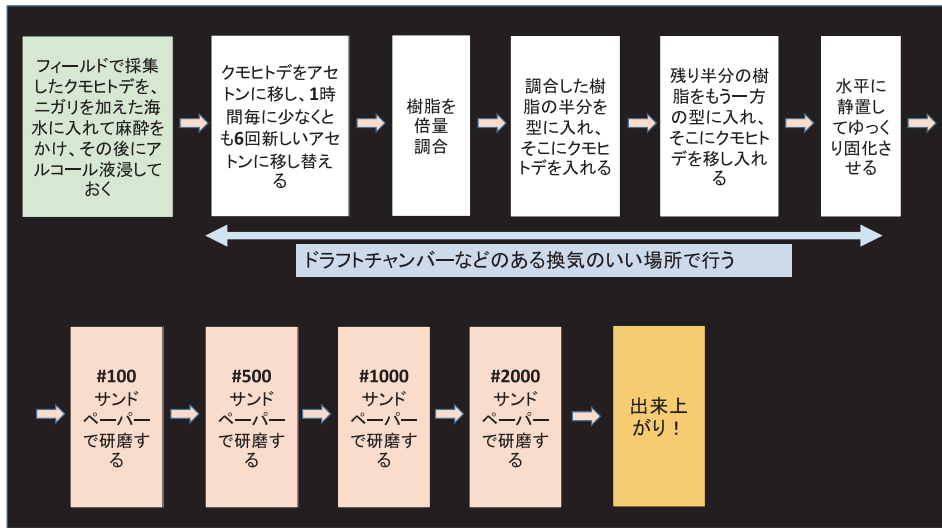


図5. クモヒトデ断面観察のためのプロトコール

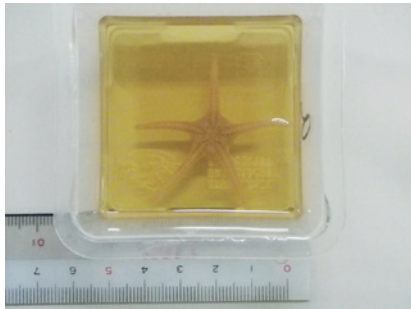


図6. 樹脂固化したクモヒトデ



図7. クモヒトデの断面観察

- ⑤ 1時間毎の新しいアセトンへの交換作業を、さらに5回行う。大きめの標本の場合はさらに数回追加して行う。(一日で作業が終わらない場合、途中で半日くらい置くことがあっても構わないが、その際アセトンが揮発してしまわないようにピーカーの上に時計皿もしくは陶器の皿を、凹型を上にして蓋をしておく)
 - ⑥ 樹脂 E205 を主剤→硬化剤の順に調合容器に入れ、必要量の倍量を調合する(主剤：硬化剤は体積比3：1。よく攪拌すること)
 - ⑦ 調合した樹脂の半分を樹脂固化用の型に入れ、そこにクモヒトデを入れる→すると、クモヒトデに浸透していたアセトンが樹脂に溶けだし、樹脂が薄まる(この時、もし減圧装置があれば軽く減圧を行う。減圧時、まれに突沸することがあるが、その際はすぐに減圧を中止する)
 - ⑧ もう一方の型に残りの樹脂を注ぎ、こにクモヒトデを移しかえる(ここでも、もし減圧装置があれば減圧を行う)
 - ⑨ 数日水平に静置して固化を待つ(図6) 冬季10℃以下では固化しにくいので、20℃くらいのところに置く
 - ⑩ 樹脂が完全に固化したら研磨作業に取り掛かる。まずサンドペーパー #100で観察したい断面の近くまで磨る(1mm手前くらいまでがいいでしょう)
 - ⑪ #500 でほとんど観察したい面まで磨る
 - ⑫ #1000 で #500 の研磨傷がなくなるまで磨る
 - ⑬ #2000 で磨って表面を整える
 - ⑭ 出来上がり！(図7) クモヒトデの五放射がきれいに観察できます♪
- 内部の固化が十分でない場合は、水分が標本内部に残っていることが原因です。樹脂は水分との相性が良くないので、そのために樹脂含浸の前段階として水分のアセトンへの置換によって脱水を

行うわけです。水分が少しでも残っていると、減圧を行う際に突沸することがありますので気を付けてください。一旦重合不良を起こした標本は使えなくなります。固化が不十分だった場合はもう一度新しい標本を使ってははじめから、アセトン原液交換の回数と時間を増やしてやり直してみてください。アセトン置換がしっかり行われて脱水が完遂できているかどうかは成否の分かれ目です。苦勞もありますが、見られる画像は美しい五放射です。興味のある方はトライしてみてください！

使用したアセトンの廃棄については各自治体の方針に従ってください。

ご質問などがありましたら田尻薄片製作所 (<http://www.thinsection.net/>) 問い合わせページから「うみうし通信の記事について」の表題でお気軽にお問い合わせください。