

(社)日本顕微鏡学会 第67回学術講演会
S-30 様々な生物試料作製のノウハウ(技術認定者の集い)

16Hpm_S30-2

固定・包埋の基礎のノウハウ

自治医科大学医学部
形態学研究共同利用システム(解剖学講座組織学部門)

幸喜 富, 屋代 隆

はじめに

動物組織純形態の透過電顕観察時に汎用される二重固定法とエポキシ樹脂包埋法について、技術上の注意点を述べる。

ここでは両法を以下のように細別して説明する。

二重固定法

前固定

後固定

エポキシ樹脂包埋法

脱水

溶媒置換

樹脂調合

樹脂浸透

包埋

二重固定法

前固定

後固定

前固定

固定液の調製

一般的な組成: 2-3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer

(数%のショ糖を添加)



グルタルアルデヒドと緩衝液



希釈後氷冷

要点. 固定液の適切な調製

アルデヒドは新しく品質の良いものを選ぶ.

観察対象・目的, 固定法に応じて浸透圧を調整する.

前固定

固定の実施



組織を固定液に浸す**浸漬固定**



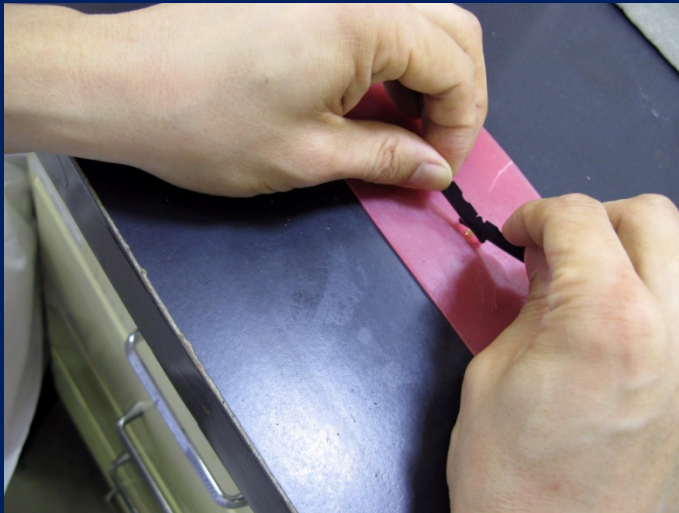
血管に固定液を注入する**灌流固定**

要点. 迅速な固定

組織は摘出後速やかに固定液に浸す.

前固定

固定の実施



カミソリによる組織の細切



固定液中で 1 mm 角前後に

要点. 迅速な固定

組織は摘出後速やかに固定液に浸し, 手早く細切する.

前固定

前固定とその後の洗浄



細切後の浸漬固定



終了後は緩衝液に移し4回ほど洗浄

要点. 必要にして十分な固定時間

対象に応じ固定時間を一定に保つ.

要点. 十分な洗浄

浸透圧や pH に留意し、固定液調製時と同じ緩衝液で充分行う.

後固定

後固定液の調製

一般的な組成: 1-2% OsO_4 in 0.1 M phosphate buffer

洗浄には標準的な緩衝液や蒸留水を用いてよい.



四酸化オスミウム溶液と緩衝液



ドラフト内で氷冷し浸漬固定

要点. 必要にして十分な固定時間

過固定を避け, 浸漬時間は通常90分間までに止める.

二重固定法の要点

前固定

固定液の適切な調製

迅速な固定

必要にして十分な固定時間

十分な洗淨

後固定

必要にして十分な固定時間（過固定を避ける）

エポキシ樹脂包埋法

脱水

溶媒置換

樹脂調合

樹脂浸透

包埋

脱水

段階希釈したエタノールが汎用される.

エタノールは新しく高品質のものを選ぶ.

各ステップ15分間程に止める.



段階希釈したエタノール



新しく高品質のものを使用

要点. 徐々に濃度を上げていく

要点. 組織の乾燥を避ける

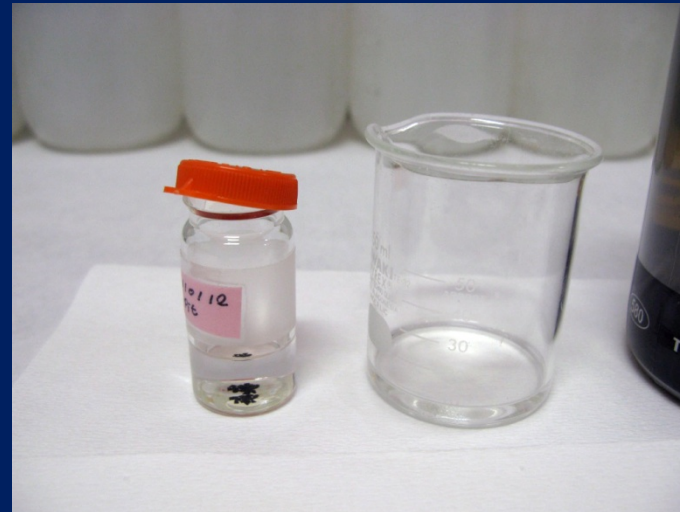
溶媒置換

より未重合樹脂を溶解しやすい溶媒へ置換する.

エポキシ樹脂包埋では一般に酸化プロピレンが用いられる.



半量交換を繰返し徐々に置換
最後に全量交換し完全に置換



揮発性が高いので注意

要点. 徐々に濃度を上げていく

要点. 組織の乾燥を避ける

樹脂調合

主剤と架橋剤とを, Luft 法に沿い目的に応じた比で十分に混合する.
湿気は重合を阻害するので乾燥した環境で行う.



主剤 Quetol-812
硬化剤 DDSA, MNA
慌てず量り取り充分に混合



加速剤 DMP-30
添加後さらに充分混合

要点. 樹脂の吸湿を避ける

Luft 法原法

A 液		B 液	
Epon 812	62 ml	Epon 812	100 ml
DDSA	100 ml	MNA	89 ml

A, B 液の混合比で樹脂の硬さを調節可能

A 液	B 液	硬さ
4	6	やや硬(ダイヤモンドナイフ)
5	5	やや軟(ガラスナイフ)

樹脂調合

混合後，充分脱気する.



少量を残しポリ瓶へ



真空チャンバーで充分に脱気



密封し冷凍庫で保存

要点. 樹脂の吸湿を避ける



残した樹脂は希釈し樹脂浸透に使用

樹脂浸透

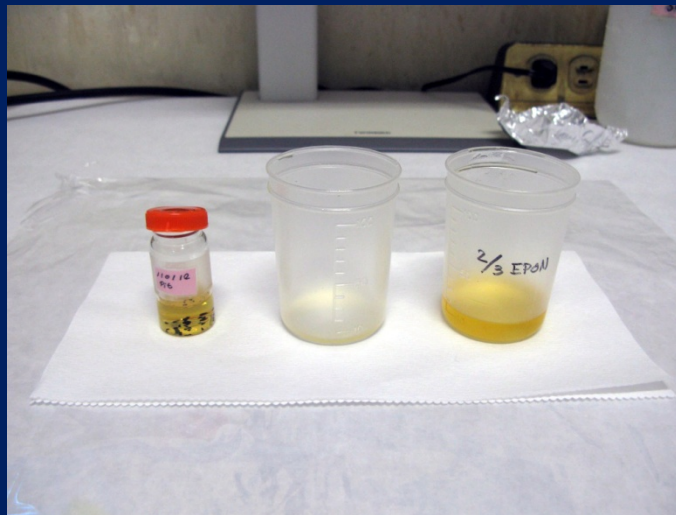
酸化プロピレンで低粘度に希釈したものからはじめる.

数回の交換を通じ樹脂濃度を7割程に上げる.

湿気・埃を避けて一晩静置し溶媒を揮発させる.



浸透用に希釈した樹脂



半量交換を繰返し徐々に濃度を上げ
最後に全量交換



湿気・埃を避け
一晩放置し酸化プロピレンを揮発

要点. 樹脂の吸湿を避ける

樹脂浸透

翌日、試料を樹脂原液に移す。



前日より保存しておいた樹脂
このままでは結露する



樹脂を常温に戻す
温め過ぎぬよう注意



粘度が高く交換に工夫が必要

要点. 樹脂の吸湿を避ける

樹脂浸透

脱気と樹脂交換を3回ほど繰り返す。



試料をキムワイプ等の上に載せ

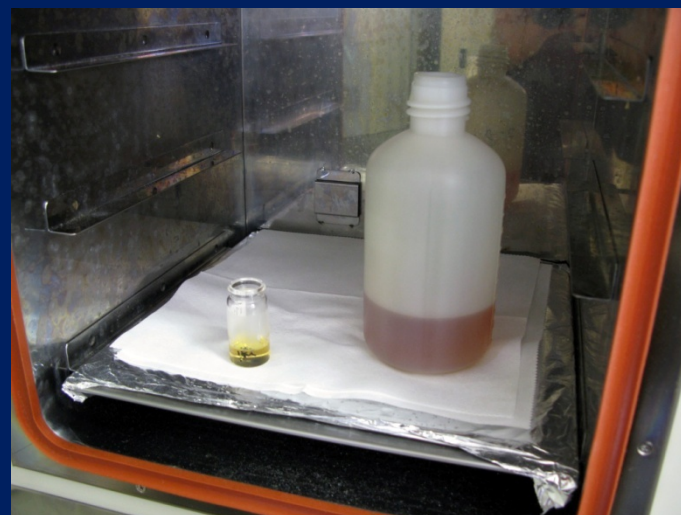


転がして樹脂を拭い去り



新しい樹脂の入ったバイアルに回収

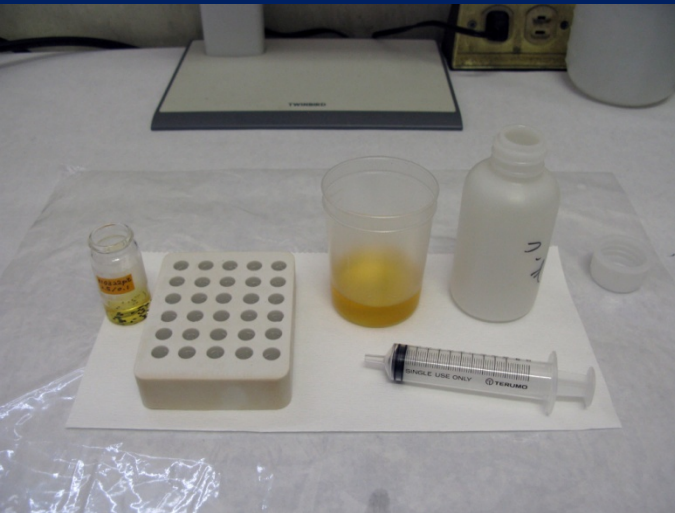
要点. 樹脂の吸湿を避ける



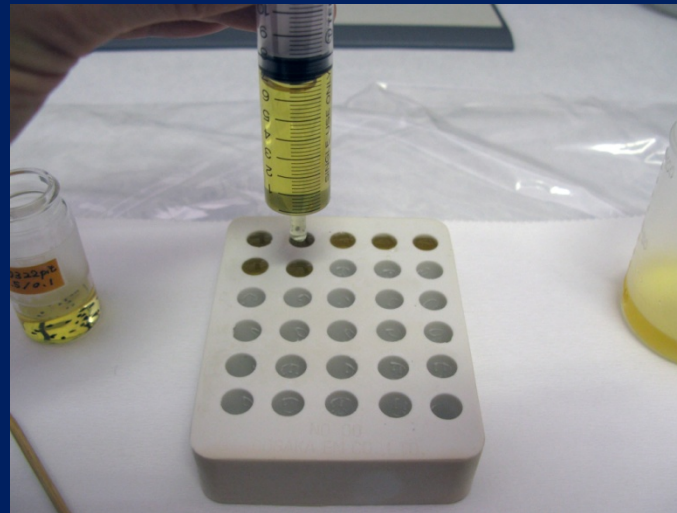
十分に脱気
ここまで3回ほど反復（樹脂拭取りは省略可）

包埋

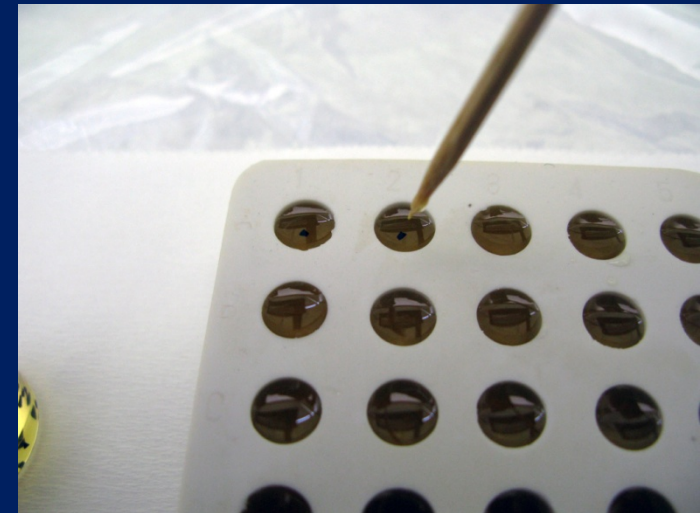
鋳型に納め、加温し重合促進する.



カップに移しシリンジで採ると容易



樹脂の鋳型への注入



樹脂表面中央に試料を安置

要点. 樹脂の吸湿を避ける

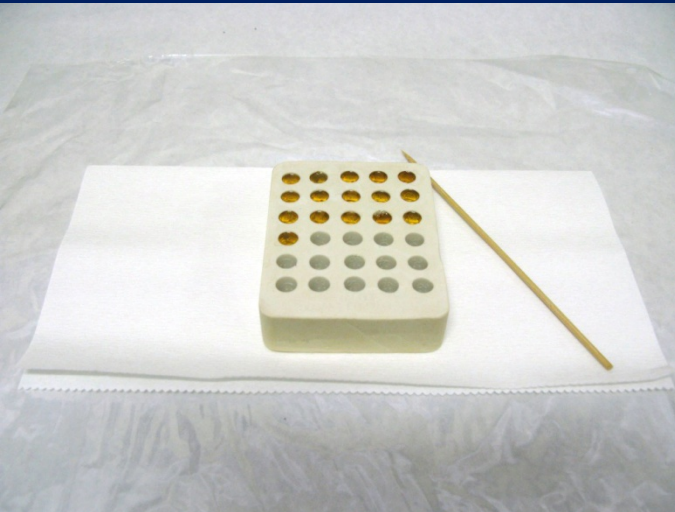


30℃ 8 時間, 45℃ 8時間, 60℃ 48 時間と段階的に温度上昇させ重合促進

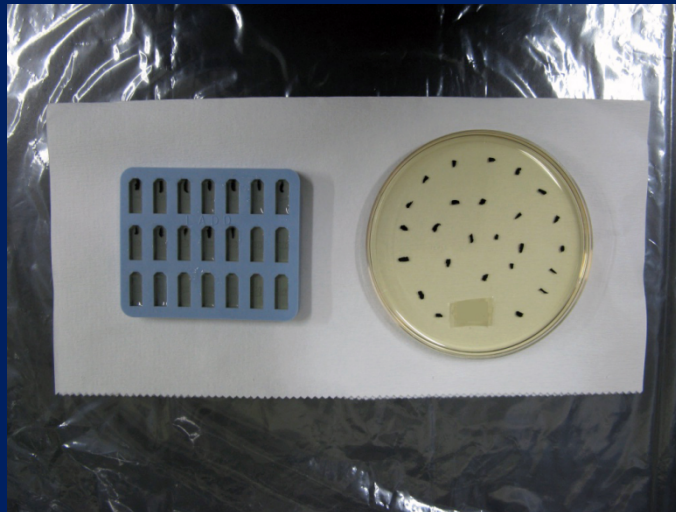
包埋

目的に応じ、鋳型を選ぶ.

重合完了後の試料は湿気と紫外線を避け保存する.



方向不問ならペンシル型鋳型が適当
マイクロームに直接取付可能



方向性を要するなら短冊形鋳型
あるいはシャーレが適当



湿気と紫外線を避けて保存

要点. 樹脂の吸湿を避ける



培養細胞も同様に可能

エポキシ樹脂包埋法の要点

脱水

溶媒置換

試料の乾燥を避ける

樹脂調合

樹脂浸透

包埋

樹脂の吸湿を避ける

二重固定法の要点

前固定

固定液の適切な調製

迅速な固定

必要にして十分な固定時間

十分な洗浄

後固定

必要にして十分な固定時間

エポキシ樹脂包埋法の要点

脱水

溶媒置換

試料の乾燥を避ける

樹脂調合

樹脂浸透

包埋

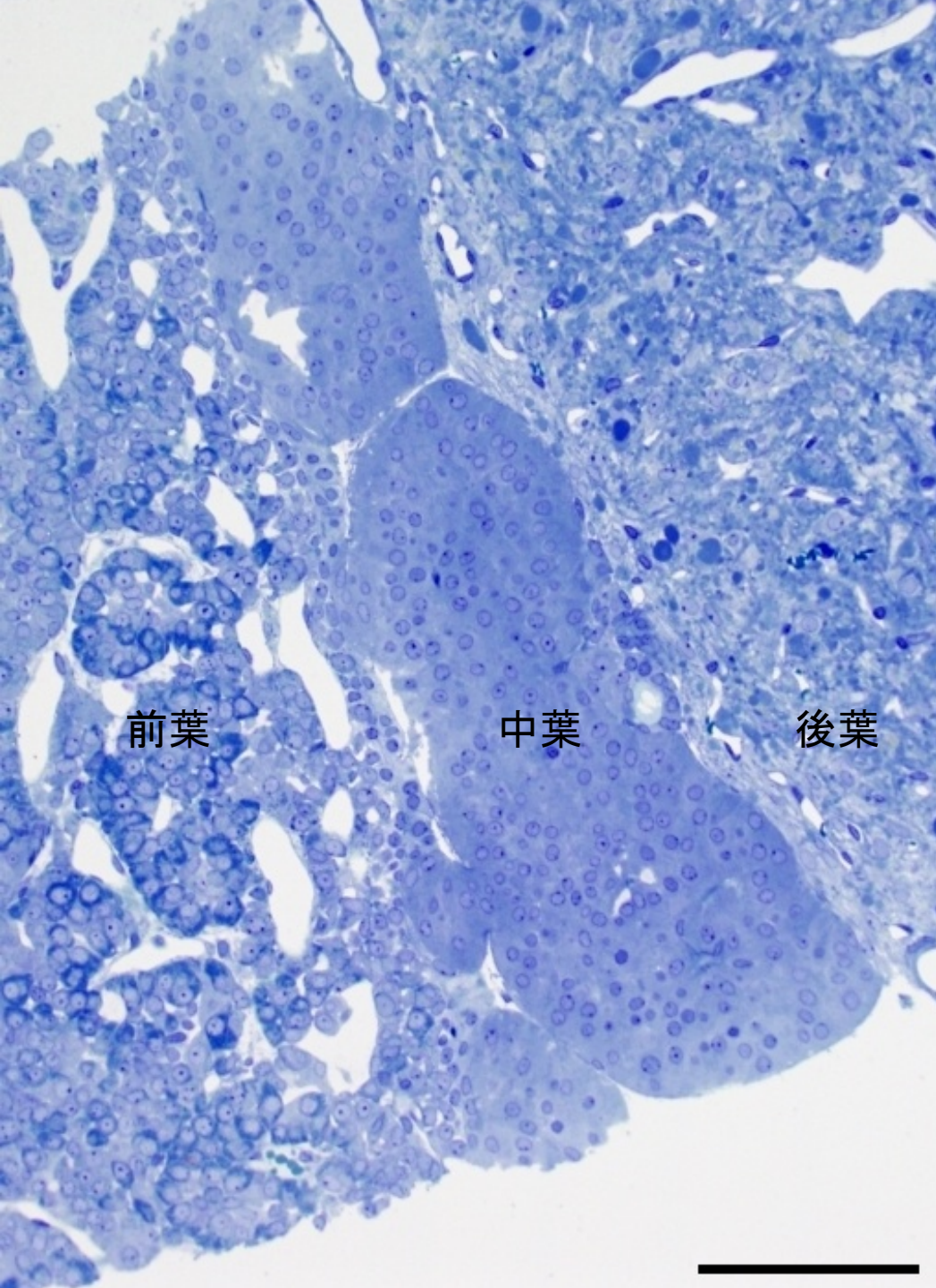
樹脂の吸湿を避ける

おわりに

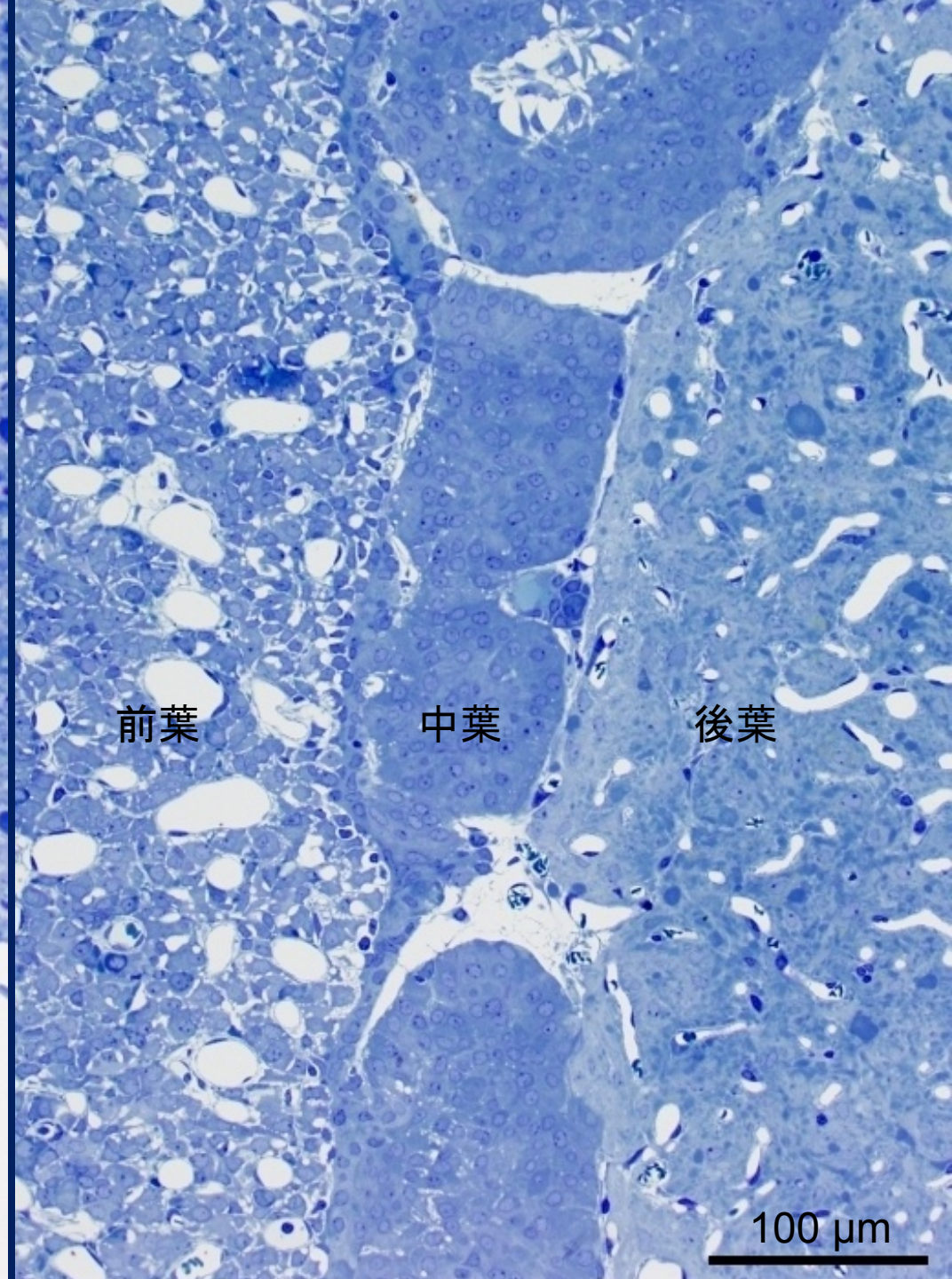
後固定以降は定法に従い着実に行えばよい。

前固定を適する条件で行うことがなかなか難しいため、習熟者に相談しつつ試行するのが何よりの近道であろう。

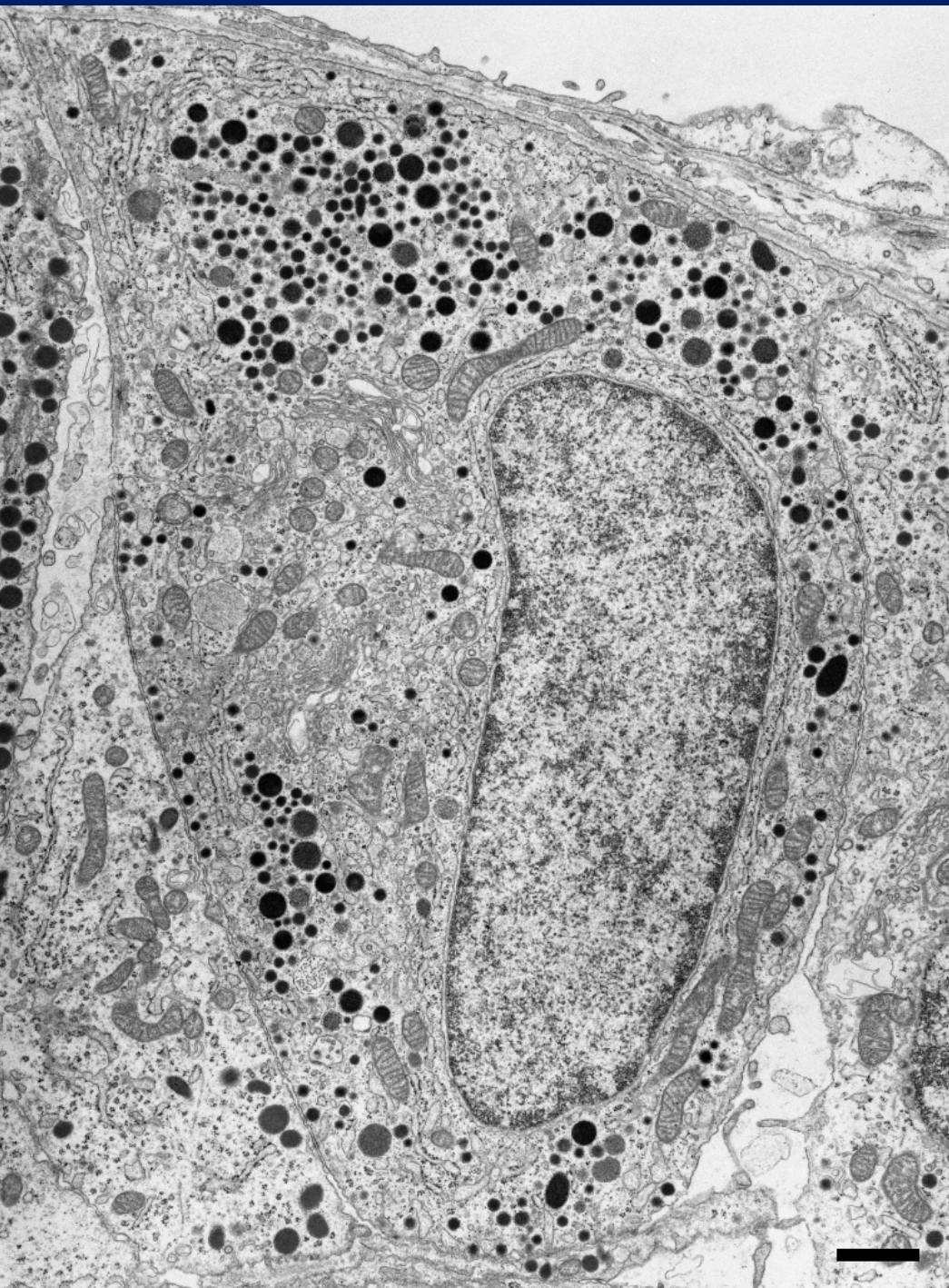
成熟 Wistar ラット下垂体
2% GA in 0.05 M PB 灌流固定



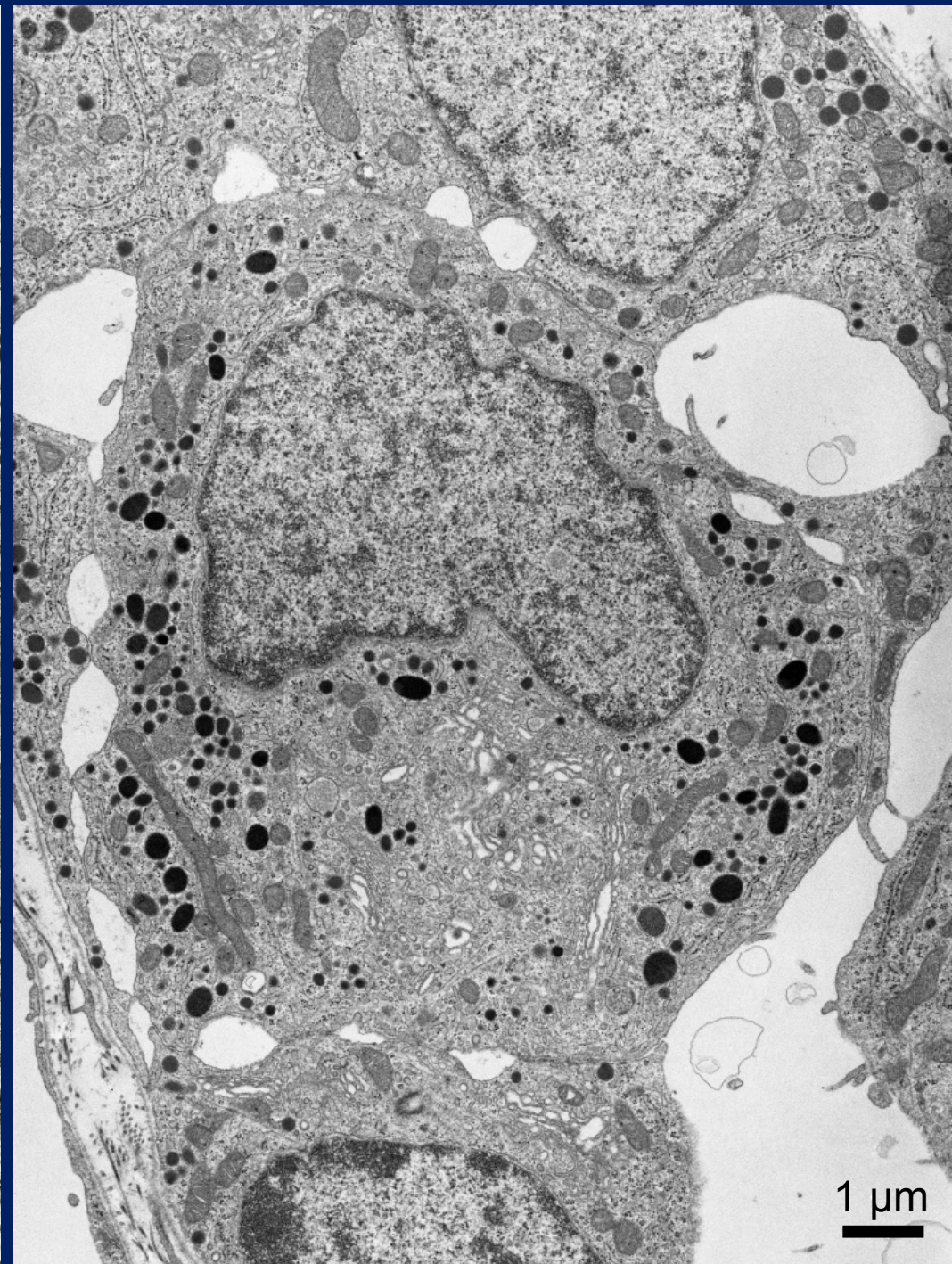
2.5% GA in 0.1 M PB 灌流固定



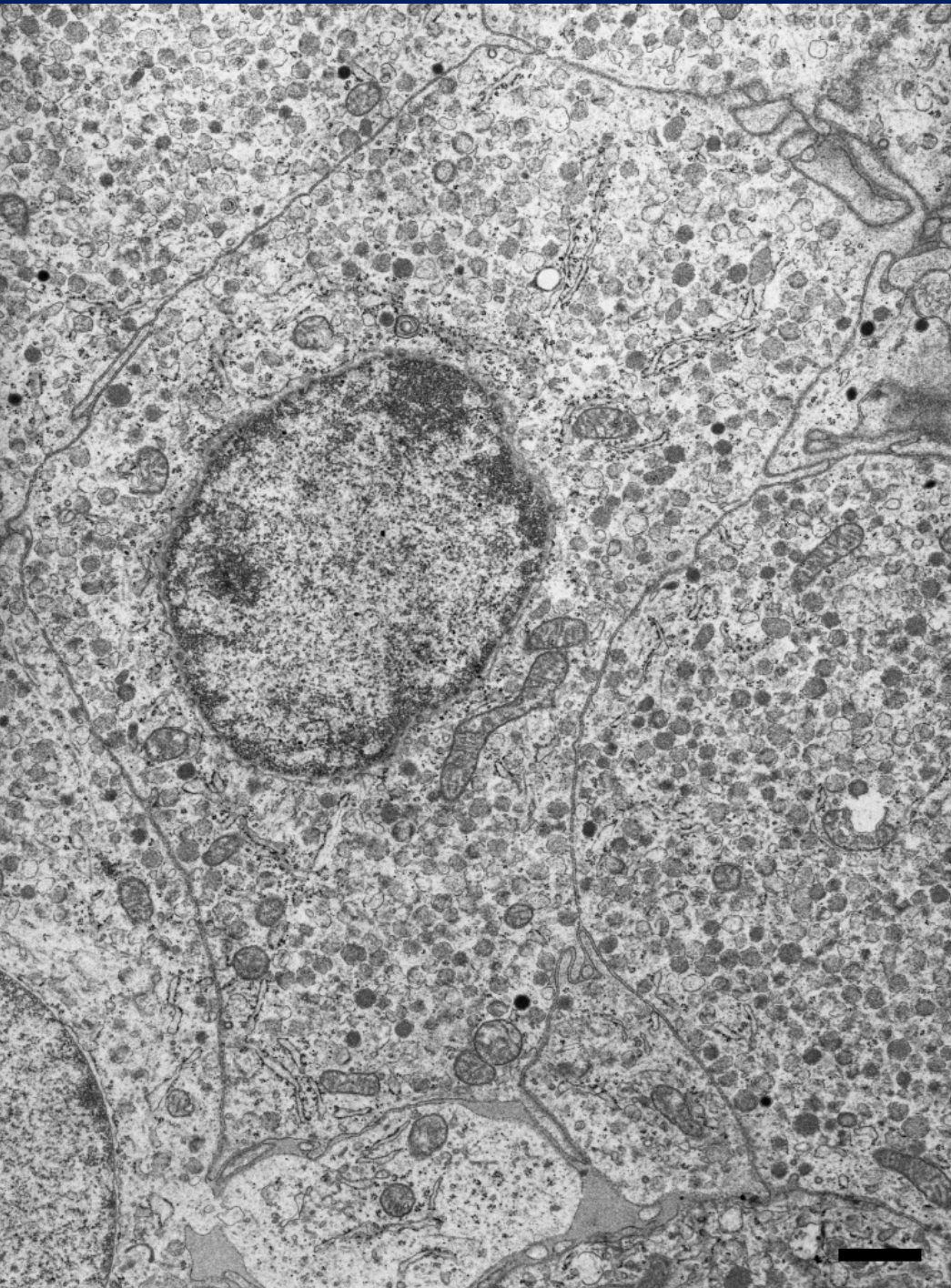
成熟 Wistar ラット下垂体前葉細胞
2% GA in 0.05 M PB 灌流固定



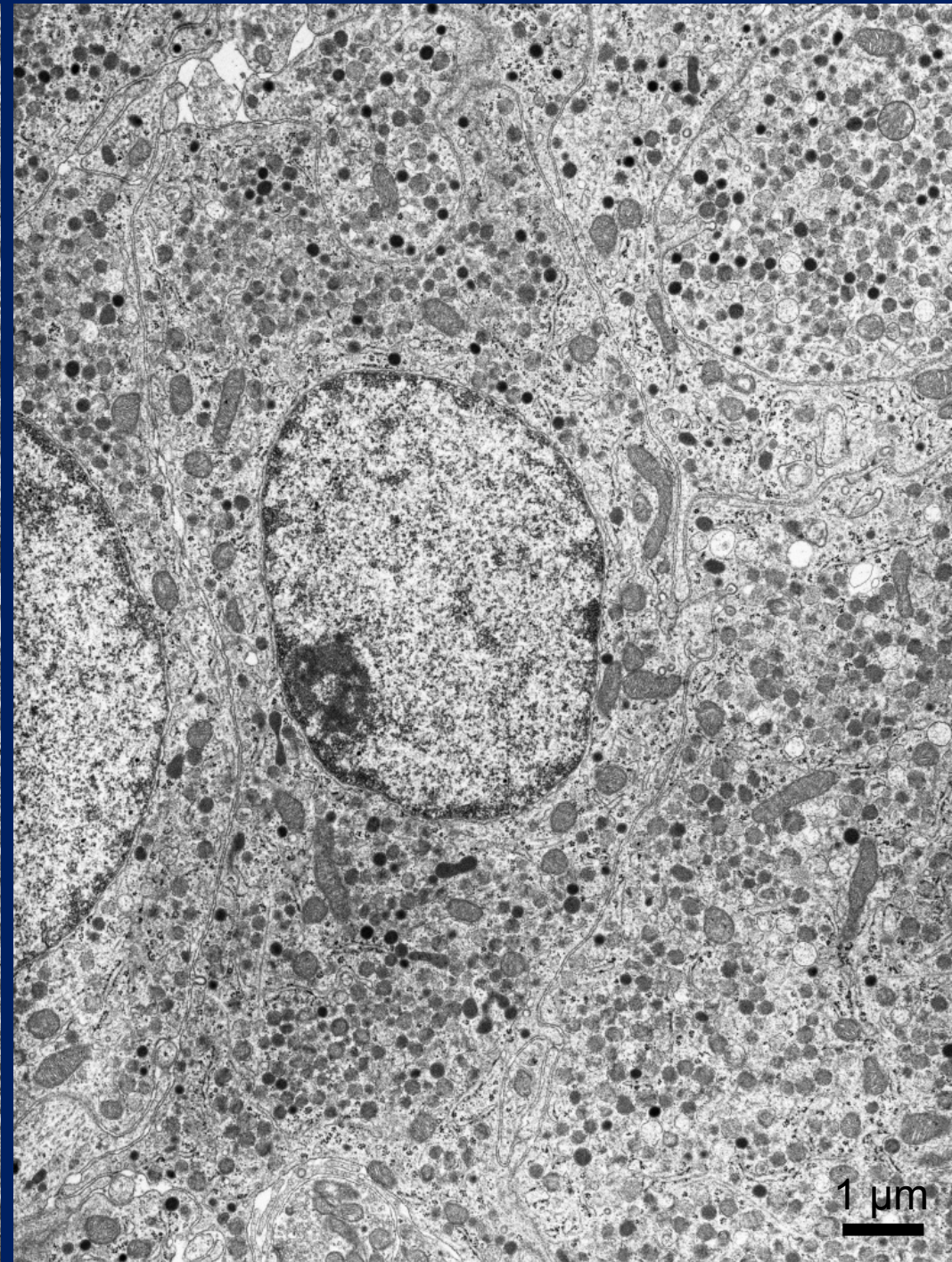
2.5% GA in 0.1 M PB 灌流固定



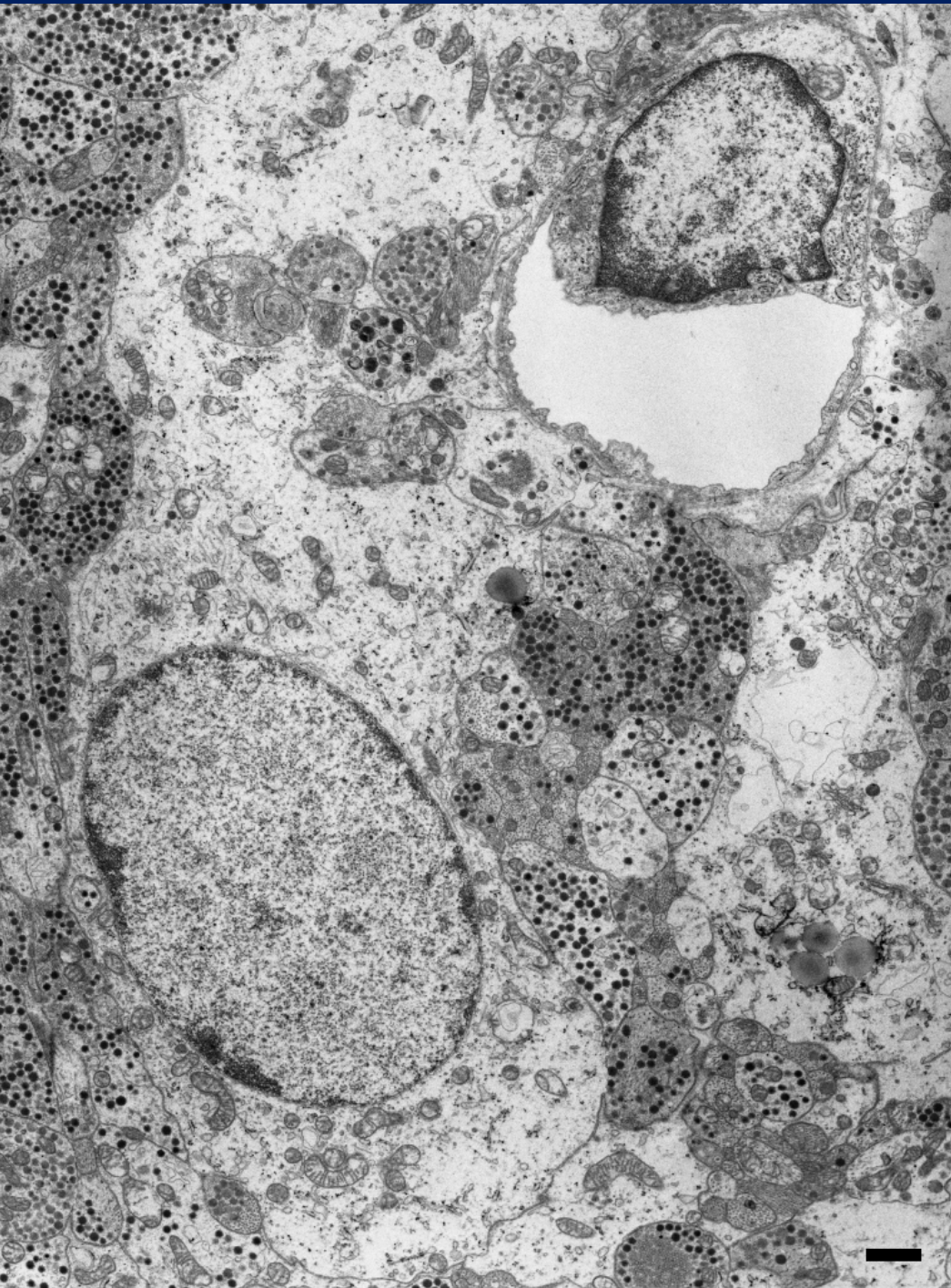
成熟 Wistar ラット下垂体中葉細胞
2% GA in 0.05 M PB 灌流固定



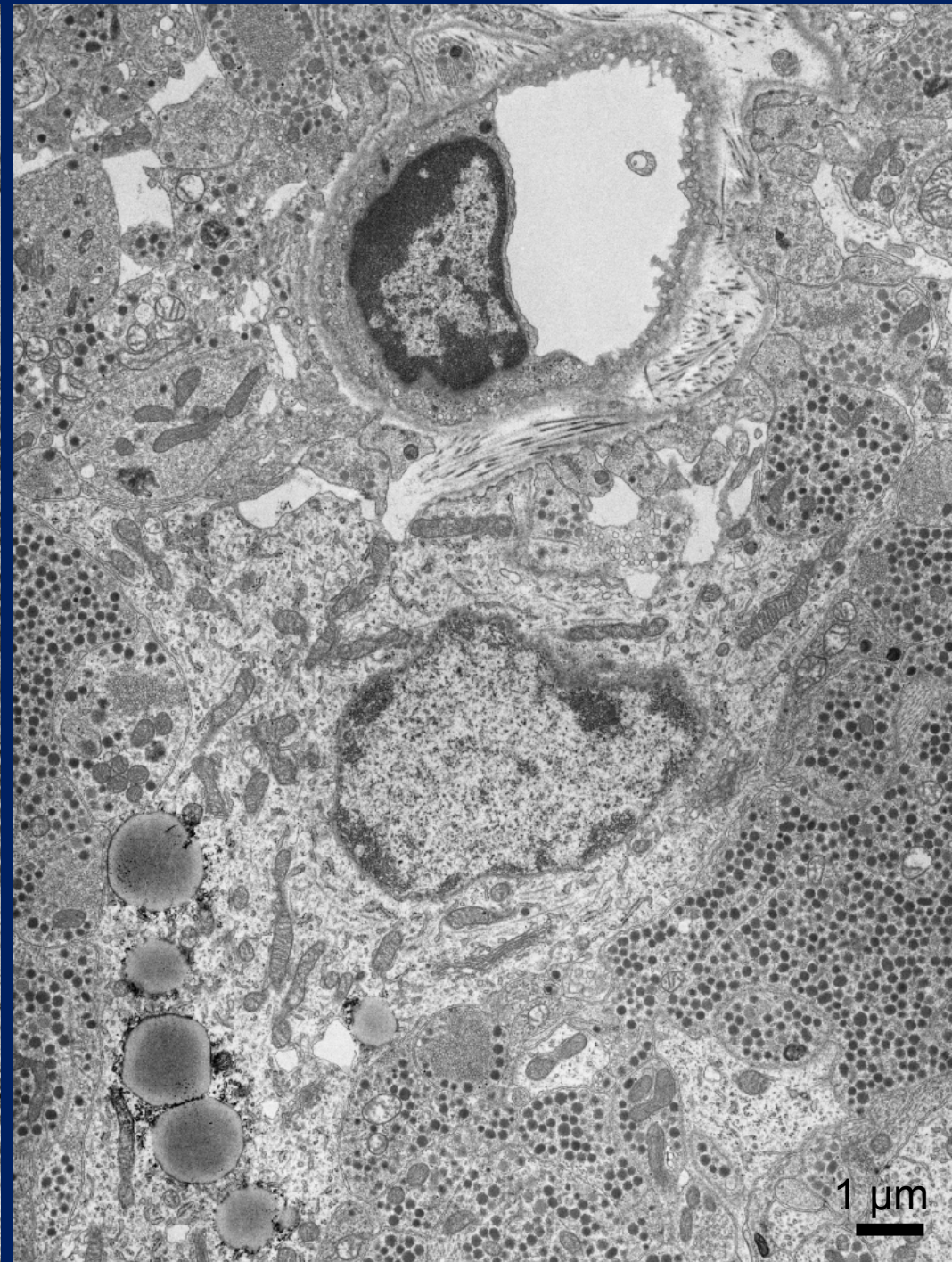
2.5% GA in 0.1 M PB 灌流固定



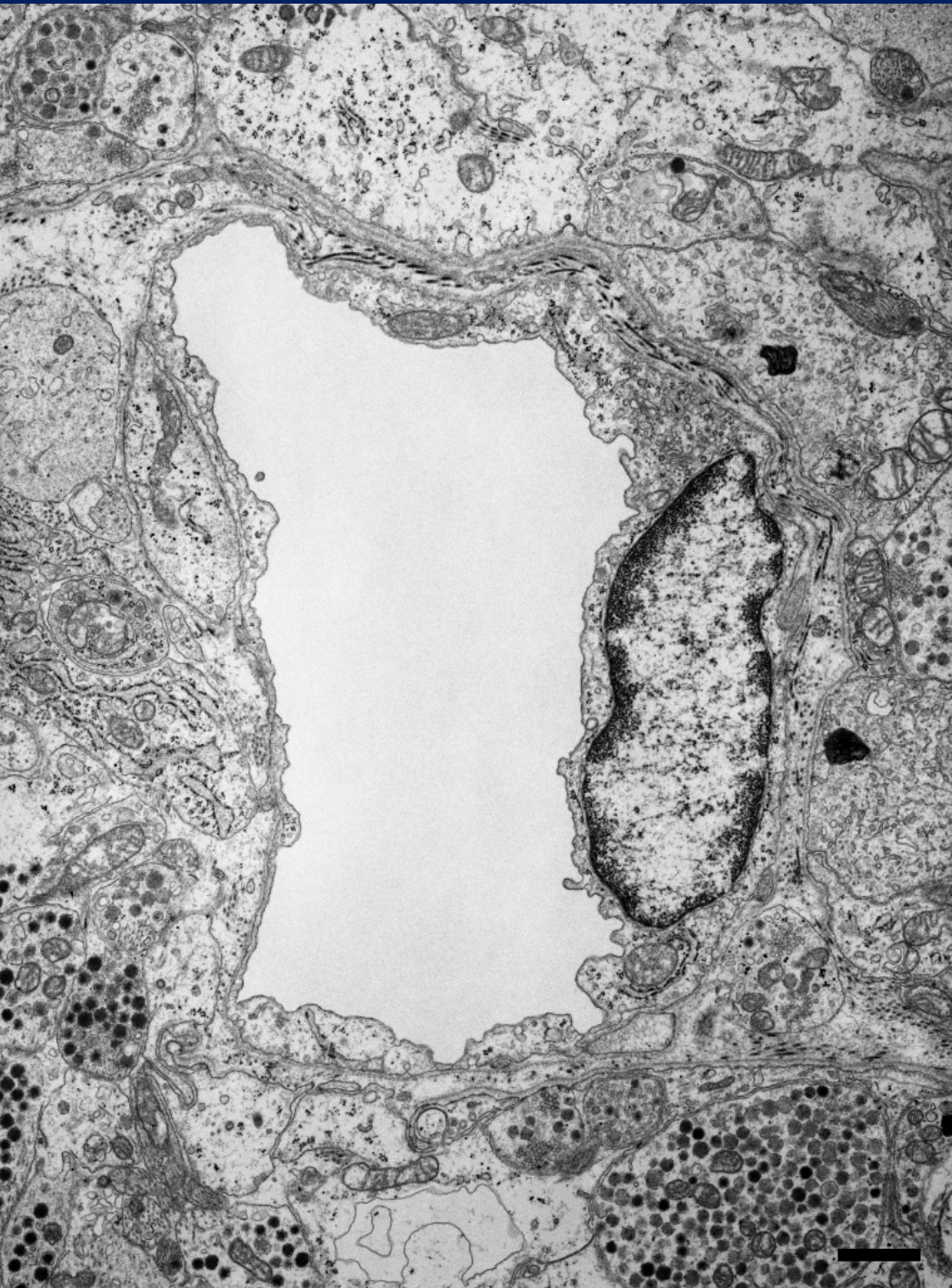
成熟 Wistar ラット下垂体後葉組織
2% GA in 0.05 M PB 灌流固定



2.5% GA in 0.1 M PB 灌流固定



成熟 Wistar ラット下垂体後葉組織
2% GA in 0.05 M PB 灌流固定



2.5% GA in 0.1 M PB 灌流固定

