

動物の硬組織と軟組織を同時観察する薄片作製のための新たな包埋法

浦野雪峰*・高木菜都子**・田上 響***・藤原慎一****

*名古屋大学大学院環境学研究所・**名古屋大学全学技術センター・***福岡大学理学部・****名古屋大学博物館

A new embedding method for preparing thin section of animal hard and soft tissues

Yukine Urano*, Natsuko Takagi**, Kyo Tanoue*** and Shin-ichi Fujiwara****

*Graduate School of Environmental Studies, Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya, 464-8601 Japan (urano.yukine@c.mbox.nagoya-u.ac.jp); **Technical Center of Nagoya University, Furocho, Chikusa, Nagoya, 464-8601 Japan; ***Faculty of Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka, 814-0180 Japan; ****The Nagoya University Museum, Furocho, Chikusa, Nagoya, 464-8601 Japan

Abstract. We propose a new method of embedding animal samples in epoxy resin Devcon ET (Illinois Tool Works Inc.). This new method provides simultaneous observations of hard and soft tissues of extant animals on thin sections. Comparing to methods previously proposed, our method has advantage that the resin is inexpensive, colorless and transparent. The procedure is; (1) dehydrate the formalin-fixed samples sufficiently with acetone; (2) impregnate the sample with a heated mixed solution of Devcon ET and 99.8% acetone under reduced pressure; (3) impregnate the sample with Devcon ET under reduced pressure and heat it until the resin cures. The second procedure enables to lower the viscosity of the resin. By this method, it became possible to make colorless transparent biological thin sections at low cost. The sample should more effectively be impregnated by the resin with a longer period of the dehydration and drilling of small holes on the surface.

Keywords: resin-embedding method, thin section, formalin-fixed, tissue observation, muscle fiber

はじめに

多くの動物の体は、皮膚や筋肉などの軟組織と、骨や貝の殻などの硬組織で構成されている。近年、絶滅動物の研究として、現生動物の硬組織と軟組織を理解し、絶滅動物に応用する手法が盛んになっている (e.g., Fujiwara, 2009; Fujiwara *et al.*, 2010; Tsuihiji, 2010)。絶滅動物を含めた動物の運動能力や成長方向を知る上で、現生動物の軟組織と硬組織の分布や結合の様子を観察することは、非常に重要である (Suzuki *et al.*, 2002)。そのためには、軟組織と硬組織を分離することなく同時に観察することが求められている。現在、組織切片の作製には主にミクロトームが用いられるが (e.g., Bragulla and Homberger, 2007; Van Hemert *et al.*, 2012; Tokita *et al.*, 2013)、ミクロトームを使った手法では、作製できる切片のサイズが最大60mm四方程度であり、大きな標本の全体をマクロな視点で観察することは難しい。また、切片作製の過程で骨質部の脱灰を行うため、骨質部が柔らかくなり、切片作製の際に変形が生じる恐れもあり、骨質部の本来の形態の観察や、試料全体の形態比較には適さない。

以上のような問題点は、標本全体に樹脂を浸透させて固化し、岩石に用いられる手法を応用して樹脂ブロックを薄片に仕上げることで、ある程度解決する。岩石薄片

の手法を応用した生物薄片作製手法が近年開発され、現在ではSpurr樹脂 (Polysciences, Inc.: Spurr, 1969) を包埋材として薄片作製を行う事で、硬組織と軟組織の同時観察が可能になった (田尻・藤田, 2013)。しかし、Spurr樹脂は高価であり、薄片の大量作製が難しい。また、硬化したSpurr樹脂は黄色がかっているため、標本に浸透した際に標本本来の色を損ねてしまう。そのため、薄片観察ならば大きな支障はないものの、ブロックのまま落射光で試料の色調を観察することには適さない。更に、Spurr樹脂は一時的に製造中止になった例もあり (日新EM株式会社HP: <http://nisshin-em.co.jp/information/erl.html>)、安定した入手が見込めない可能性がある。また、Spurr樹脂に代わる樹脂として、低粘度エポキシキット Embed-It™ (Polysciences, Inc.) が開発されたが (Ellis, 2006)、こちらはSpurr樹脂より更に高価であるため、このキットを使用すると、従来と比べると薄片作製のコストが大幅に上がってしまう。よって、これらの樹脂を使用しない、より低コストで済む代替手法の開発が強く求められる。

そこで本研究では、無色透明かつ比較的安価な樹脂で、硬組織と軟組織の構造の同時観察をすることを目標に、樹脂の種類や温度などの様々な条件を変え、試料包埋の実験を行った。試料には、キタクシノハクモヒトゲ

表1. 本研究で使用した器具・装置.
Table 1. Instruments and devices used in this study.

機器・薬品等	備考
電子秤	樹脂の計量用
減圧装置	100 kPaまで減圧できるもの
岩石カッター	一次切断用, 二次切断用
超音波洗浄機	研磨後に試料に付着している研磨粉を洗うために使用
プレパラップステップオートMG-315	任意の設定数値ずつ樹脂ブロックの自動平面研削が可能
グラインダー	薄片研磨用
インキュベーター	40 °C程度の保温が可能なもの. 樹脂の保温・固化促進用
紫外線ライト	UV樹脂固化用
10%ホルマリン	標本の固定用
アセトン	アセトン置換用及び樹脂混入用. 99.8%以上
ピーカー	アセトン置換用. サイズや個数は標本の大きさに合わせて選択. 本研究では, 300 mlのものを1個使用
デブコンET	無色透明のエポキシ系樹脂
シリンジ	アセトンを樹脂に混入させる際に使用. 本研究では1 mlを1本用いた
樹脂攪拌の棒	プラスチック製の使い捨てのもの
ポリプロピレン容器	樹脂固化用. アセトンで溶けない素材のものであれば可. サイズや個数は標本に合わせて決定する.
超硬金属研磨板	手磨り研磨用. 150×150×5 mm, 2枚
シリコンカーバイド研磨剤	#400, 粒径20–75 μm
アルミナ研磨剤	#1000, 粒径12–25 μm. #3000, 粒径2–6 μm
ダイヤモンドカップホイール	#2000, 粒径5–10 μm. プレパラップステップオートに装着して使用.
ダイヤモンドペースト	粒径1 μm
常温硬化型エポキシ系接着剤	試料接着用, 本研究ではボンドEセットを使用
スライドガラス	岩石薄片用. 標本のサイズに合ったものを選択する. 本研究では28×48 mmのものを使用
カバーガラス	標本のサイズに合ったもの
マイクロメーター	薄片厚みの計測用
UV硬化型樹脂	カバーガラスをかける際の封入剤

Ophiura sarsii (棘皮動物門, クモヒトデ綱) とニワトリ *Gallus gallus domesticus* (キジ目, キジ科) の上顎を用いた. キタクシノハクモヒトデは, クモヒトデ類の薄片を作製した先行研究の田尻・藤田 (2013) との比較のために選択した. ニワトリの上顎 (頭蓋の最大幅約50 mm) は, 主要な実験動物のひとつであることと, クモヒトデ (盤径約20 mm) よりも標本が大きく全体の体積も大きいため, 試料の大きさによる樹脂の浸透性や硬化の進み方への影響を調べるために選択した. 以下に, 試行の結果最も観察に適していると判断した手法を紹介する.

手法

薄片製作に用いた試料

10%ホルマリン溶液で24時間固定したニワトリの80日令の上顎15個を, それぞれ異なる条件において樹脂で固化し, 薄片作製に最適な条件を模索した. その後, ニワトリで成果がみられた条件で, エタノールで長期保存されていたキタクシノハクモヒトデ1個体 (盤径17 mm) を用いて検討した. 使用した機器や機材等は表1を参照.

試料作製の全体的な手順は, 標本をアセトン溶液に浸して十分に脱水した後, 減圧下で樹脂に含浸させ, 浸透

させる樹脂の入れ替えを一度経てから, 40°Cで保温しながら固化させる, というものである (図1). なお, 本研究で用いる樹脂やアセトン溶液は揮発性が高く, 危険なため, 脱水から樹脂の固化までの過程は全てドラフトチャンバー (FHC 150, ヤマト科学株式会社: 名古屋大学博物館) 内で行った.

脱水

多くの樹脂は固化に至る過程で水分などの混入があると, 硬化不良を起こすことが知られている. そのため, 本研究のように生物標本を封入する際は, 生物標本からの樹脂への水分の混入を防ぐ必要がある. 生物標本に含まれる水分を全て99.8%アセトン溶液に置換し, その後樹脂に浸透させる過程でアセトンが揮発することで, 完全な樹脂置換が行われることが知られている (田尻・藤田, 2013) が, 本研究もそれに倣った.

脱水は, ドラフトチャンバー内でピーカーに標本を入れ, アセトン溶液に浸すことによって行った. この際, アセトン溶液の濃度や浸透時間は, 田尻・藤田 (2013) に倣った濃度上昇系列ごとの浸透時間で行った (表2). まずは, 80%アセトン溶液に20分浸透させ, 次に90%アセトン溶液に30分含浸させる. その後, 95%アセトン

溶液に30分含浸させてから、99.5%以上のアセトン溶液に30分浸透させる工程を3回、99.8%以上のアセトン溶液に40分含浸させる工程を2回済ませることで、完全に脱水させた。本研究では、ニワトリでもクモヒトデでも同様に、上記の脱水工程を用いた。濃度の低いアセトン溶液に関しては、99.8%のアセトンを水道水で薄めるこ

とで用意した。アセトン溶液の量は、標本に合わせ、標本全体が浸かるようにした。アセトン溶液を交換する際は、標本がビーカーから落ちないように留意しつつ、液体のみを捨て、すぐに新しいアセトン溶液を流し入れて行った。本研究では、試料のアセトン溶液への含浸工程の際に、溶液の攪拌等は行っていない。

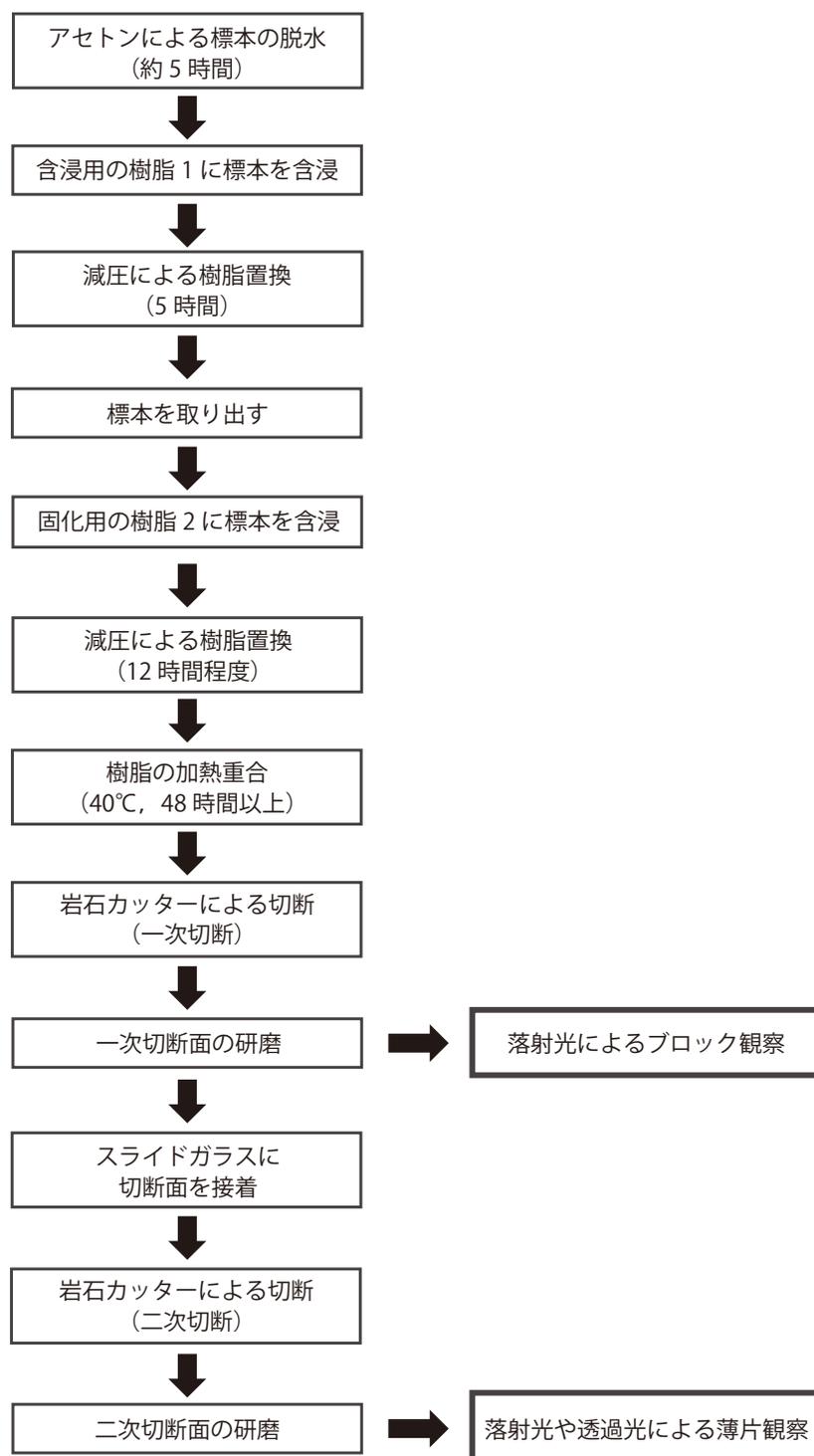


図1. 薄片製作の流れ

Fig. 1. The flow of making thin section

表2. アセトン置換の際のアセトン溶液の濃度と含浸時間. 図1のアセトンによる標本の脱水の項目に相当. 田尻・藤田 (2013) に基づく.

Table 2. The concentration and impregnation time of acetone during acetone substitution based on Tajiri and Fujita (2013). They correspond to the part of dehydration of specimen by acetone in Fig. 1.

工程	アセトン溶液濃度	浸透時間(分)	浸透回数
1	80%	20	1
2	90%	30	1
3	95%	30	1
4	99.5%以上	30	3
5	99.8%以上	40	2

樹脂の選定

Spurr樹脂に代わる樹脂として本研究で求める条件は、①硬化後の強度が十分であること、②重合の際の収縮や膨潤が少ないこと、③粘性が低いこと、④硬化までの時間が長いこと、⑤無色透明であること、⑥比較的安価で安定的に入手が見込めることである。樹脂硬化後の強度については、生物標本全体を固化した後、変形を避けながら切断、薄片化するという工程のため、岩石薄片作製と同様の工程に耐えられる程度の樹脂の強度が必要となる。また、試料の切断後には研磨の工程を踏む必要があるが、樹脂が柔らかいと、表面に研磨剤粒子が刺さる等するため、研磨が困難となる。重合の際の収縮や膨潤については、包埋した試料の変形を防ぐため、可能な限り少ない方が良い。樹脂の粘性に関しては、粘性が高いと標本への浸透が難しいため、可能な限り粘性の低い樹脂を用いる必要がある。また、粘性の低い状態で長時間含浸させた方が、より標本の内部まで浸透するため、硬化までの時間が長く粘性が低い状態が長続きする樹脂の方が良い。そして、薄片にしなくても、硬化樹脂のブロックのままでも色を含めた観察が可能ないように、樹脂は無色透明である必要と、多数の試料を作製しやすいよう、樹脂の値段はSpurr樹脂よりも安価である必要がある。

樹脂の選択肢としては、Spurr樹脂以外のエポキシ樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、アクリル樹脂があるが、アクリル樹脂は、薄片の大量作製に向いているほど安価であるとは言い難く、また、硬化させるのに一週間程度かかる等、今回の目的にそぐわなかったため除外した。続いて不飽和ポリエステル樹脂 (リゴラック、昭和電工株式会社) を用い検証したところ、色が橙色でやや濁っており、ブロック観察には不向きであった (図2a)。更に、アセトン溶液による脱水過程を経た標本に長時間浸しても、標本内部まで樹脂が浸透することはなかった (図2a)。

上記の樹脂との比較の結果、本研究ではSpurr樹脂と同じエポキシ樹脂に注目し、その中でも無色透明で、博

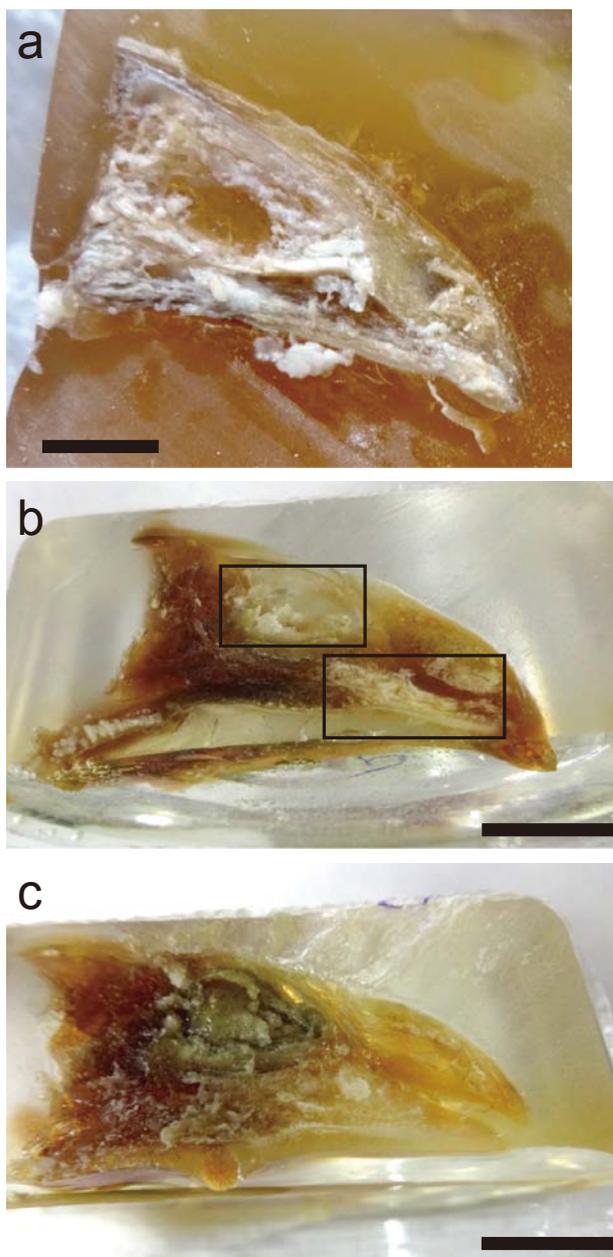


図2. 樹脂に包埋した試料 (ニワトリ *Gallus gallus domesticus* の上顎) : a. 不飽和ポリエステル樹脂 (リゴラック) に包埋した場合; b. アセトン溶液を混入したデブコンETに包埋した場合. 黒枠は樹脂が浸透しきらなかった箇所; c. アセトン溶液を混ぜなかったデブコンETに包埋した場合. スケールは10 mm. b, cでは体液が漏れ出したため、樹脂に少し色が着いているが、樹脂本来の色ではない。

Fig. 2. Samples (upper jaw of chicken: *Gallus gallus domesticus*) embedded with different kinds of resin: (a) unsaturated polyester resin (Rigolac); (b) Devcon ET mixed with acetone; (c) Devcon ET with no mixture of acetone. The resin was not fully penetrated in the regions indicated in black frames. The scale bar is 10 mm. In (b) and (c), the resin (Devcon ET) is slightly colored due to the body fluid distilled from the sample.

物館等の封入標本にも用いられているデブコンET (Devcon ET; 株式会社ITW パフォーマンスポリマーズ & フルイズジャパン) を用いて、標本中の水分の完全な樹脂置換を試みることにした。デブコンETは、主剤と硬化剤を2:1で混合することで硬化する2液混合型のエポキシ樹脂で、収縮率が小さく、全光線透過率が89.4%と、非常に高い光線透過性を持っている (株式会社ITW パフォーマンスポリマーズ & フルイズジャパン, 2015)。また、エポキシ樹脂の中では低粘度で、標本への浸透も期待でき、硬化後は研磨剤で磨くことも可能である。さらにメーカー小売希望価格と比較すると、硬化樹脂ブロック作製にまでかかるコストは、Spurr樹脂やEmbed-It™ と比べ、それぞれおよそ1/20と1/60となっている。

樹脂の浸透と硬化

本研究では、含浸させるための樹脂1と硬化させるための樹脂2の、2種類の樹脂を用いる。含浸させるための樹脂1を用いて標本を5時間含浸させた後、硬化させるための樹脂2に浸け直し、硬化させる (図1)。樹脂1と樹脂2は、いずれもデブコンETを元に作る。

樹脂は、試料を脱水している間に、混合前の主剤と硬化剤をそれぞれインキュベーターに入れ、40°Cで保温しておく。これは、適度に温めることで樹脂の粘性が下がり、標本に浸透しやすくなるためである。標本の脱水が完了したら、まずは含浸させるための樹脂1の混合を行う。本研究で用いたデブコンETは、重量比で主剤と硬化剤が2:1になるように量って混合するものだが、このときに、主剤と硬化剤を合わせた樹脂全体に対し、99.8%アセトン溶液を、質量比で5%混入する。これは、硬化までの時間を遅らせ、粘性が低い状態を可能な限り長く保つための操作である。樹脂1に混入するアセトン溶液は、少なすぎると粘性を下げる役割を十分に果たせず、多すぎると重合不良を起こし、硬化後の樹脂の硬度が下がってしまうため、注意が必要である。

樹脂1を作るための上記の液体 (主剤, 硬化剤, アセトン溶液) を混合する際、初めは白く濁り、筋目が目立つが、攪拌しているうちに完全な透明になるため、無色透明になるまでしっかり混ぜる。以上のように、含浸させるための樹脂1を用意したら、標本を含浸用の容器の中に入れ、標本が完全に浸かるように樹脂1をそっと流し込む。その後、容器ごと減圧装置に入れ、10 kPaまで減圧する。減圧することで、内部の気泡が抜け、アセトンが揮発し、樹脂が浸透しやすくなる。10 kPaまで減圧したら、そのまま5時間ほど置く。このとき、可能であれば標本周辺の気温を10°C以下に保つと良い。気温が低い方が反応の進みが遅く、粘性が低い状態を維持できるからである。

5時間後、続いて硬化させるための樹脂2の用意をする。樹脂1と違い、樹脂2ではアセトンは混入させず、主

剤と硬化剤のみを2:1になるように混合する。樹脂2の準備が終わったら、減圧装置の中の容器を取り出し、中の標本を新しい硬化用の容器に移す (図1)。このとき、樹脂1が標本を薄く覆う程度にまで切ってから新しい容器に移すと良い。その後、樹脂2を容器に流し込み、標本が完全に浸るようにしてから、再び減圧器で10 kPaまで減圧し、12時間程度放置する (図1)。その後、容器ごとインキュベーターに入れ、40°Cで48時間保温し、硬化させる (図1)。硬化後の樹脂2は無色透明で、封入されている試料を観察することができる。樹脂2が完全に硬化したら、試料を取り出し、次の切断工程に進む。

上記のように、樹脂にアセトン溶液を混入したものを浸透用の樹脂として用いた場合 (図2b)、樹脂にアセトン溶液を混ぜなかった場合 (図2c) よりも浸透するため、より完全な樹脂置換に近づけることができる。

試料の切断と研磨

通常、岩石等の固体試料の薄片作製では、マイクロトームのように試料ブロックをスライスすることが難しいため、固体試料面を研磨し厚みを減じることで薄片とするのが一般的である。今回は生物標本を樹脂で含浸包埋、固化させた後、できあがった樹脂ブロックに対して岩石等と同じ手順で薄片化の処理を行う。薄片化の手順の概要は、まず樹脂ブロックを切断、トリミングし (一次切断)、観察したい面を出して表面を平滑に研磨する。ここで研磨して仕上げた面は、スライドガラスへの接着面となる。次に、ブロックをスライドガラスに貼付けた後、試料をガラス面に薄く残してブロックを切断、除去する (二次切断)。さらに二次切断面側から試料が適切な厚みになるまで研磨し、ガラス上に削り残した薄い試料を以て薄片試料とする (力田, 1983)。以下、具体的に今回行った操作を説明する。

硬化した試料を、岩石カッターで切断する。カッターで切断することによる損失分と、切断面の研磨による損失分を考慮し、観察したい面よりも少し離れた箇所から切断するのが好ましい。このとき、できるだけ観察したい面が切断面と平行になるようにすると、後々観察しやすい。

切断後、スライドガラスに貼りつける切断面の研磨を行う。これは、貼り付け面が滑らかでないとなら観察がしにくく、また、時間経過によってスライドガラスから剥離する可能性があるためである。まずは、#400シリコンカーバイド研磨剤と適量の水を混ぜたものを用いて、切断面の刃の跡が消えるまで、グラインダーで研磨する (表1)。このとき、研磨剤や水分が徐々に失われるため、両者を少しずつ足しながら作業する。#400シリコンカーバイド研磨剤での研磨が完了したら、続いて、#1000アルミナ研磨剤と水を用いて、金属板の上でより切断面が滑らかになるまで手磨りで研磨する。その後、#3000アルミナ

研磨剤でも同様に手磨りで研磨する。この時点で研磨面が綺麗な場合はここで一旦研磨の工程は終了となるが、表面の様子がまだ綺麗ではなかった場合は、更にダイヤモンドペーストで仕上げの研磨を行う。試料研磨の作業では、研磨剤の混入を防ぐため、研磨剤の種類を変えるごとに、試料と手を超音波洗浄機（Branson 12 Ultrasonic Water Bath, ヤマト科学株式会社）でよく洗う。

以上の工程を済ませると、研磨面を落射光で観察することが可能となる。デブコンETは無色透明であるため、奥行きも含めた観察をしたい場合は、この時点で試料の作製を完了しても良い。一定の厚みごとに面を観察し、三次元的な構造を把握したい場合は、プレパラップステップオート（MG-315, 株式会社マルトー）にセットし、一定の厚みごとに#3000アルミナ研磨剤やダイヤモンドペーストなどで仕上げの研磨をして観察すると、試料の平行性が保たれやすい。

試料を薄片にし、透過光による観察をする場合は、仕上げの研磨が終わった段階で、その面をスライドガラスに貼りつける。貼り付けの際は、2液混合型のエポキシ系接着剤を用いた。このとき、試料とスライドガラスの間に気泡ができる限り入らないように、気泡を押し出すようにして圧力をかけながら貼りつける。その後、使用した接着剤の指定する硬化時間分だけ室温で放置し、実用強度に達したことを確認してから次の作業に移る。そのときの気温にもよるが、1~3日置いてから次の作業に入ると、試料の剥離を防げる。2液混合型のエポキシ系接着剤は加熱によって重合が促進されるため、加熱処理をして硬化時間を短くすることができるが、樹脂や試料の変質を防ぐため、本研究では加熱処理は行わなかった。

接着が完了したら、続いて岩石カッターを用いて二次切断を行う。二次切断では、ガラス面に残る試料の厚みが1mm程度になるように試料を切断する。その後、上記の工程と同様に、#400シリコンカーバイド研磨剤で刃の跡がなくなるまで研磨した後、プレパラップステップオートにセットし、300 μ m程度の厚みまで研磨する。そこからは、自分が観察したいものに合わせた厚みまでプレパラップステップオートを用いて徐々に研磨し、最後に#3000アルミナ研磨剤とダイヤモンドペーストを用いて仕上げの研磨を行う。本研究では、薄片の厚みは、200 μ m前後にした。

最後に試料にカバーガラスをかける。カバーガラスは試料面を保護し、試料の剥離や乾燥による割れを防止すると同時に、試料表面での光の乱反射を防ぎ、光学顕微鏡下での観察を容易にする。本研究では封入剤としてUV硬化型樹脂を用いた。UV硬化型樹脂を適量試料表面に乗せ、上からカバーガラスをそっとかぶせ、カバーガラスが割れない程度の圧力をかけて気泡を抜く。その後、試料に紫外線ライトを当て、UV硬化型樹脂を硬化させ

る。紫外線ライトに当てる時間がライトの強度/電力にもよるが、5~10分程度当てれば概ね十分である。

結果

上記の方法で作製したキタクシノハクモヒトデの試料（図3）を、背側から徐々に研磨していき、実体顕微鏡下で100 μ mごとの連続断面を撮影した（図4）。このように、ブロックの試料を少しずつ研磨しつつ撮影することで、標本の立体情報を得ることが可能である。また、無色透明の樹脂を用いているため、落射光のみならず透過光での観察も可能である。

薄片は、キタクシノハクモヒトデの腕の一部と盤を対象に作製した（図5）。厚みはそれぞれ、腕が400 μ m、盤が280 μ mである。実体顕微鏡の透過光で観察すると、骨質部は灰色、筋肉や管足は透明度のある薄い茶色と、色彩で組織を判断することが可能だった（図6）。また、筋肉では筋繊維の走る方向などを、骨質部では、骨に空いている孔の様子などを捉えることができ、細部の観察にも向いている（図6）。更に、骨と筋肉の配置や筋肉の付着部位等の観察から、標本の体のつくりを把握することができる（図6）。

一方で、ニワトリの上顎は、この手法では完全に樹脂置換が成されることはなく、樹脂が浸透しにくい箇所は樹脂置換されないままであった（図2b）。ただし、試料の一部の薄片観察を行わない箇所に、ピンバイスで直径0.2mm程度の小さな孔をいくつか開けることで、浸透しやすくすることは可能であった。

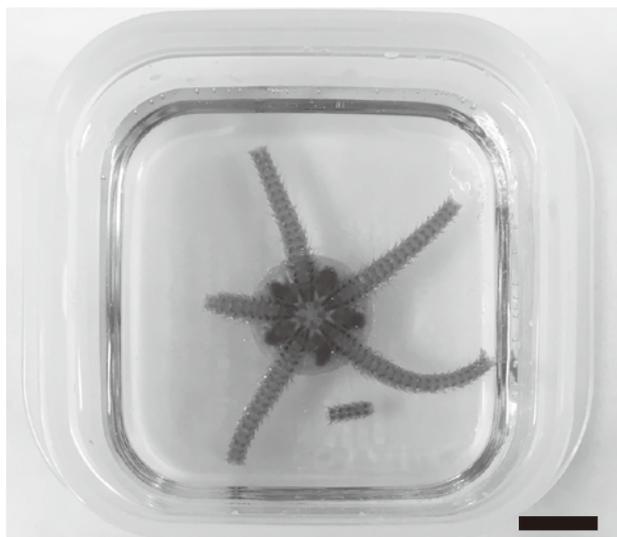


図3. キタクシノハクモヒトデ *Ophiura sarsii* を包埋した樹脂（デブコンETにアセトン混入したもの）。スケールは10mm。

Fig. 3. *Ophiura sarsii* embedded with resin (Devcon ET mixed with acetone). The scale bar is 10 mm.

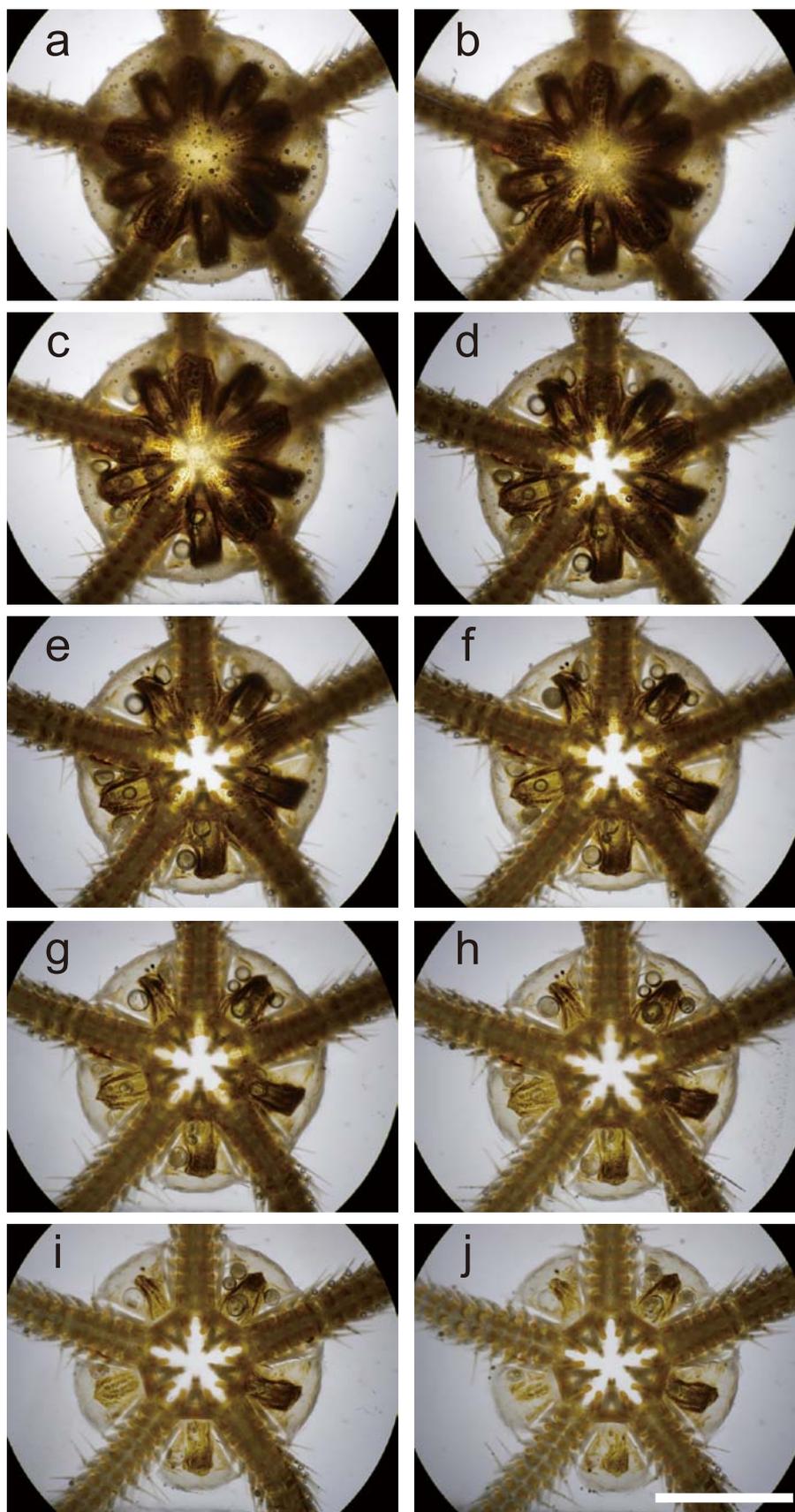


図4. キタクシノハクモヒトデ *Ophiura sarsii* の連続する断面. 100 μm ずつ反口側より研磨して撮影したものの一部を示す. 断面a-jのスライス間隔は, 全て200 μm . スケールは10 mm.

Fig. 4. Continuous cross sections of *Ophiura sarsii* in aboral views. The thin sections were sliced in 100 μm intervals. The photographs (a)–(j) are the slices in 200 μm intervals. The scale bar is 10 mm.

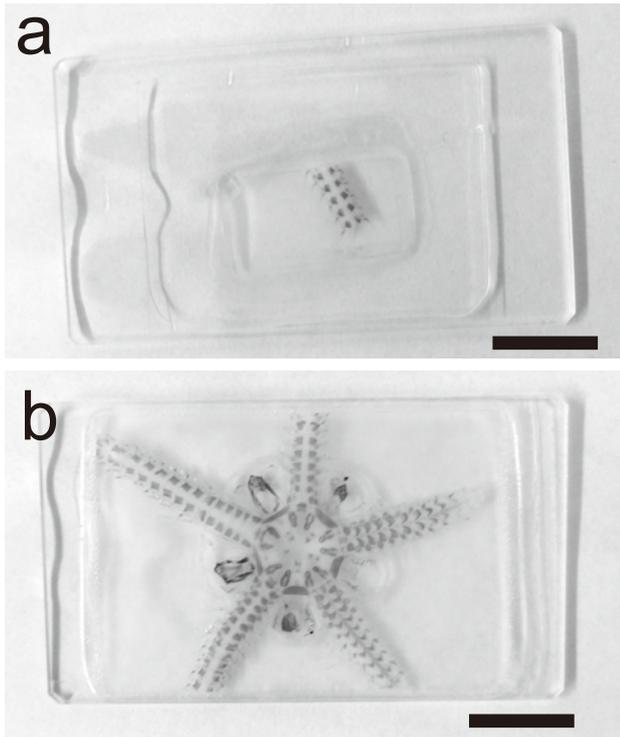
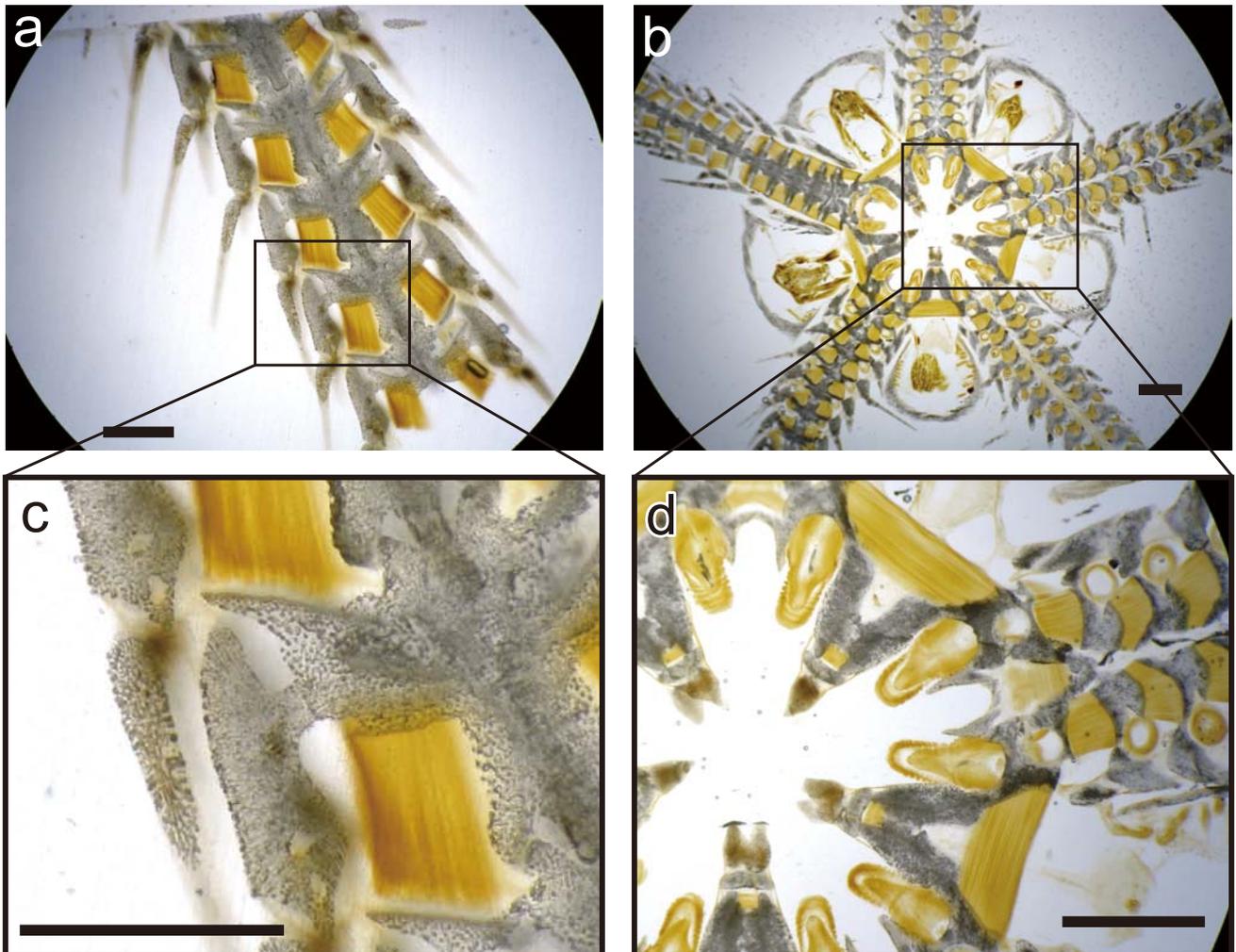


図5. 作製したキタクシノハクモヒトデ *Ophiura sarsii* の薄片：a. 腕の一部（口面）；b. 盤と腕の基部（反口面）. スケールは10 mm.
 Fig. 5. Thin section of *Ophiura sarsii*. (a) part of the arm in adoral view; (b) central disk and the base of arm in aboral view. The scale bars are 10 mm.

図6. キタクシノハクモヒトデ *Ophiura sarsii* の薄片を実体顕微鏡の透過光で観察したもの：a. 腕の一部（口面），薄片の厚さは400 μm，スケールは2 mm；b. 盤と腕の基部（反口面），薄片の厚さは280 μm，スケールは1 mm；c. aの一部を拡大したもの，スケールは2 mm；d. bの一部を拡大したもの，スケールは1 mm.
 Fig. 6. The thin sections of *Ophiura sarsii* observed using stereoscopic microscope under transmitted light: (a) part of the arm in adoral view (thickness of the section = 400 μm; scale bar = 2 mm); (b) central disk and the base of the arms in aboral view (thickness of the section = 280 μm; scale bar = 1 mm); (c) enlarged view of (a) (scale bar = 2 mm); (d) enlarged view of (b) (scale bar = 1 mm).



考察

本研究で用いた樹脂（デブコンET）は、硬化後の強度が十分であり、重合の際の収縮や膨潤が少なく、安価で無色透明な点が、樹脂包埋に用いるのに適していたが、Spurr樹脂と比較すると粘性がやや高く、樹脂が硬化するまでの時間が短い点が適していなかった。しかし、この樹脂にアセトン定量を混入することで、弱点だった粘性の高さと硬化時間の短さを克服し、樹脂包埋に適した溶液にすることが可能だった。

従来法であるSpurr樹脂を用いて作製した標本では、クモヒトデの筋繊維のような細かい構造が観察できたが（田尻・藤田, 2013）、本研究で開発した新たな樹脂を用いた包埋法でも、キタクシノハクモヒトデのような、薄く、表面積に対する体積が小さい標本においては、同様に筋繊維の観察が可能だった。また、薄片にせずにブロックのまま観察する場合は、樹脂が無色透明であるため透過光による観察にも適している新手法の方が優れていると考えられる。

一方で、新手法は、標本に対する浸透性においてはSpurr樹脂に劣っており、ニワトリの上顎のような大きな標本を用いる際は、更なる工夫が必要であることが示唆された。具体的には、①樹脂を浸透させたい標本の部位に孔を開ける、②標本が破壊されない程度に減圧の値を上げる、③アセトンによる脱水時間を延ばす、といった対応が考えられる。本研究ではクモヒトデとニワトリの頭部に対して同様の脱水時間を用いていたことと、標本が大きい場合や軟組織部分が厚い場合はアセトンが浸透しにくいこと（田尻・藤田, 2013）を考慮すると、③が最も有効である可能性が高い。よって、今後は標本に合わせた脱水時間を調査し、サイズの大きな標本にも適応できるようにする必要がある。それにより、本手法はより汎用性の高いものになるだろう。

謝辞

本研究に際し、名古屋大学博物館の加藤萌博士、淡路フーズ株式会社様には標本をご提供頂いた。昭和電工株式会社様には一部樹脂をご提供頂いた。田尻薄片製作所の田尻理恵さん、北海道大学の中村晃輔さんにはご指導、ご助言を頂いた。静岡大学の北村晃寿博士には機材の一

部をお貸し頂いた。匿名の査読者1名と東京大学の對比地孝亘博士、早稲田大学の守屋和佳博士には、本論文をより良くするためのコメントを多数頂いた。以上の方々に対して、ここに記して深く謝意を表す。また本研究はJSPS科研費 JP15K05331の助成を受け行われた。

文献

- Bragulla, H. H. and Homberger, D. G., 2007. The role of the specific, profilaggrin-containing keratohyalin granules in the developing epidermis of the fetal horse hoof. *Pferdeheilkunde*, **23**, 5–20.
- Ellis, E. A., 2006. Corrected formulation for Spurr low viscosity embedding medium using the replacement epoxide ERL 4221. *Microscopy and Microanalysis*, **12**, 288–289.
- Fujiwara, S.-i., 2009. Olecranon orientation as an indicator of elbow joint angle in the stance phase, and estimation of forelimb posture in extinct quadruped animals. *Journal of Morphology*, **270**, 1107–1121.
- Fujiwara, S.-i., Taru, H. and Suzuki, D., 2010. Shape of articular surface of crocodylian (Archosauria) elbow joints and its relevance to sauropsids. *Journal of Morphology*, **271**, 883–896.
- 株式会社ITW パフォーマンスポリマーズ&フルイズ ジャパン, 2015. Devcon ET. Devcon Plexus テクニカルデータシート, QO02-920009, <http://www.itwppfjapan.com/devcon/tds/TDS/DL-TDS/accessary/QO02-920009%20devconET.pdf>. Accessed September 25, 2017.
- 力田正一, 1983. 岩石薄片の作り方. 77p., ニューサイエンス社, 東京.
- Suzuki, D., Murakami, G. and Minoura, N., 2002. Histology of the bone-tendon interfaces of limb muscles in lizards. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, **184**, 363–377.
- Spurr, A. R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, **26**, 31–43.
- 田尻理恵・藤田敏彦, 2013. 樹脂包埋と研磨による動物組織観察試料作製法——硬組織と軟組織の同時観察——. 日本動物分類学会誌タクサ, **35**, 24–34.
- Tokita, M., Chaeychomsri, W. and Siruntawineti, J., 2013. Developmental basis of toothlessness in turtles: insight into convergent evolution of vertebrate morphology. *Evolution*, **67**, 260–273.
- Tsuihiji, T., 2010. Reconstructions of the axial muscle insertions in the occipital region of dinosaurs: evaluations of past hypotheses on Marginocephalia and Tyrannosauridae using the extant phylogenetic bracket approach. *Anatomical Record*, **293**, 1360–1386.
- Van Hemert, C., Handel, C. M., Blake, J. E., Swor, R. M. and O'Hara, T. M., 2012. Microanatomy of passerine hard-cornified tissues: Beak and claw structure of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*). *Journal of Morphology*, **273**, 226–240.

(2017年6月15日受付, 2017年10月31日受理)

