

透明骨格標本の樹脂封入法について

畑 中 恒 夫

千葉大学教育学部

A Resin Embedding Method for Transparent Skeletal Specimens.

HATANAKA Tsuneo

Faculty of Education, Chiba University, Japan

以前の報告で、現行の学生実験授業中に、骨格観察のための透明骨格標本作りのテーマを組み込むための実験方法を検討し、日程案を示した。今回は、その骨格標本を生かすための樹脂封入方法を検討し、授業実践を行った。その結果、生物観察の教材に適した透明骨格標本作製と実際の観察が、授業時間内で可能なことが示され、標本作りの経験も将来の教員になったときの教材作成に生かされる可能性が示された。しかし、それを樹脂封入標本として作製するのは、個人経験としてはよいだろうが、教材づくりとしては時間、手間、費用、安全性の面を考慮すると不適であることが示された。

In order to embed for transparent skeletal specimens in a biological laboratory work, the utilization of three types of plastics, polyester, acryl and epoxy resin were compared. As a result, the polyester type resin was chosen because of hardening stability and low exothermic reaction. In a laboratory work, participants made transparent skeletal specimens of mouse and observed the skeletal structure. Some applicants embedded those specimens in a resin. Then, the utility of transparent skeletal specimens in a biological laboratory work was discussed.

キーワード：透明骨格標本 (Transparent Skeletal Specimens) マウス (Mouse) 二重染色 (Double Staining)
樹脂封入 (Resin Embedding)

はじめに

昨年度の本紀要で、教育学部の理科の学生対象に行っている生物学実験の1テーマであるマウスの解剖において、テーマの整理の過程で取りやめてしまった、筋肉と骨格の観察の一部を、内臓観察に使ったマウスをそのまま透明骨格標本に作製し、生物学実験の既定の回数と期日内でテーマに追加する可能性について言及した(畑中, 2012)。同時二重染色法を用い、昼休みあるいは放課後に溶液の交換を行い、生物学実験の他のテーマの時間に水洗を行うことで、解剖の時間の内臓観察を終わったマウスの透明骨格標本作製し、動物組織の観察の時間に骨格標本の観察も追加する計画は、日程によっては可能なことが示された。解剖と組織観察の間に2週間必要であるが、実験後半の5週の中で、祝日の有無、2人の教員の他の仕事の都合と、その日の天候でずれるテーマなどで、実際に講義を開始して進めていく中で日程的に可能か不可能か決まってくるので、実際に実験を始め、学期の途中までテーマに入れられるかどうかは不明である。幸いに、提案後の、2011年度後期及び2012年度前期の生物学実験において日程的に可能であったので、透明骨格標本の作製と観察をすることができた。

骨格標本はグリセリン漬にして保存する。状況によってはカビなどが生えることがあるが防腐剤を加えることで防ぐことができ、また、グリセリンはアルコールやホ

ルマリンなどと異なりほとんど揮発しないので、密封せず、長期保存が可能である。多くの場合は蓋つきのビンに入れて保存する。マウスの骨格などの観察にはピンセットや有柄針などを使って、位置を動かし触って確認するなどの操作をするので、ビンではなく、蓋つきのプラスチック容器で作成、保存した。今回は教員養成課程の学生対象の実験で、透明骨格標本を将来教員となったとき教材として作成することも考慮して作製法から入ったが、市販の組織プレパラートの観察のように、標本観察だけの利用法もある。グリセリン漬のままのほうが観察には都合がよいが、人数分の標本を仕舞うのに場所をとるし、溶液の漏れも心配であり、運搬時には揺れや波で組織の損傷の恐れもある。何回も観察する標本にするにはプラスチック(樹脂)封入が使われる。また、透明化溶液や染色剤など有害であったり、匂いが強すぎたりする場合も樹脂封入標本にして、持ち運びが容易になる(Yamamoto et al., 2001)。

樹脂封入標本は昆虫などの小動物や骨格標本など様々なものが教材として市販されているほか、アクセサリなどとしても利用されている。また、封入キットが教材として市販されているほか、児童・生徒を対象とした講座でも昆虫などの樹脂封入を実践が行われている。樹脂封入剤が容易に入手できるので、ホームページなどでは様々な物の樹脂封入例や封入法が公開されているが、多くは表面の乾燥した昆虫や非生物など、あるいは表皮構造のしっかりした生物などで、内部組織がむき出しになった標本は少ない。

連絡先著者：畑中恒夫

そこで、今回は市販の3種の樹脂封入剤（不飽和ポリエステル樹脂、エポキシ樹脂、アクリル樹脂）による透明骨格標本の封入を試み、学部で生物学実験において、テーマとして組み込むことができるか検討した。また、2011年度後期及び2012年度前期の生物学実験において透明骨格標本作りとその観察を行い、さらに、希望者のみ封入標本作製を行ったので、そのことについて報告する。

方 法

樹脂封入の検討

平成11年度後期の学生実験で染色状況の良かったグリセリン漬の透明骨格標本を用いて樹脂封入を試みた。

封入に使った樹脂は市販の不飽和ポリエステル樹脂、アクリル樹脂、エポキシ樹脂の3種を用いた。そのうち、不飽和ポリエステル樹脂は理科教材会社で、教材用のキットとして市販しているものを用いた。それぞれのプラスチック、あるいはキットの説明書に書かれているような配合で樹脂と硬化剤を配合し、剥離剤を塗ったプラスチック容器の底に数mm～1cmの厚さになるように入れ、ある程度硬化してから標本を乗せ、その上に新しく調合した溶液を加え、硬化させた。標本はグリセリンから取り出した後、濾紙の上で半日位半乾燥させてから封入した。

硬化したプラスチックは容器から出し、紙ヤスリを使用して形を整え、表面を順次細かいやすりで磨いていき、最後にコンパウンドで磨いて透明化した。

授業実践

2011年度後期（22名）及び2012年度前期（26名）の生物学実験において、前回の報告（畑中，2012）の作成法や日程に基づいて透明骨格標本の作製と観察を行った。また、今回検討した封入法を用いて、2012年前期の受講生のうち希望者4名で樹脂封入標本作製を行った。

結 果

1. 樹脂の硬化

三種プラスチックはともに硬化剤を加え、重合を促進することになるが、不飽和ポリエステル樹脂及びアクリル樹脂は気温によって硬化剤の量を加減する必要がある。効果に必要な時間はおおよその目安であり、実際取り扱いが可能な硬化が終了するのは1週間以上後であり、また、不飽和ポリエステル樹脂は硬化しても表面は空気の混入で完全には硬化せず、2か月後でもべとついていた。柔らかいままであったりした。樹脂を硬化させる容器には今回は耐熱温度120℃のポリプロピレン製容器を用いた。

不飽和ポリエステル樹脂

促進剤と触媒（硬化剤）の2種の薬液を加えるが、液体であり、少量であるため注射器を用いて加えた。促進剤と触媒（硬化剤）ともに、気温による調整幅は3倍の差があり、同じ気温でも1.5倍の幅があった。実際多少の添加量の差は硬化程度にあまり差となって現れず、同じような結果が得られた。この樹脂は促進剤を加えるこ

とで、低温での硬化を可能にし、封入物の変性や加熱による後の樹脂のひび割れを防ぐなどの長所がある（Burgmanns J., 1968）。実際、硬化時に発熱は感じられなかった。

アクリル樹脂

説明では硬化剤の量に幅があるが、その上限の硬化剤を混ぜると、初めはあまり変化がないが、1時間位後で、急激に反応が進み発熱・発泡しそのまま硬化してしまった（図1）。写真のように発熱で容器が変形した。また、下限では硬化の程度が不足し、3日後でも硬化は不十分であった。しかし、その場合でも、反応時には容器底面に接する実験台面は暖かくなり、発熱が確認された。その中間では適度に硬化した。

エポキシ樹脂

本来、エポキシ樹脂では硬化剤は主剤と結びつき、硬化を生じ、プラスチックの構成要素となっているので、主剤と硬化剤の配合比は一定であり、温度による硬化剤配合比の変更はない。しかし、規定通りの硬化剤の量では硬化程度が不十分であった。そこで、それを高温槽内で60℃で3日間加熱してみたが、さらなる硬化は見られなかった。1月後硬度はやや、増したがまだ不十分であった。既定の一割増しの硬化剤を用いて混合したところ、2日くらいで十分な硬度が得られた。ただ、エポキシ樹脂は硬化時に発熱量が多いので、本来、あまり厚いブロックを作るには向いていない。今回はポリエステル樹脂では5.3mm厚のブロックを作ってみたが、エポキシ樹脂では最大9.5×13.7×3.2cmのブロックにとどめた。表面で50℃位の発熱を生じた。

2. 封 入

不飽和ポリエステル樹脂は水分を含む試料を入れると水と反応して発泡するというので、乾燥させた標本を用いたり、スチレンモノマーでなじませたりするのが一般で、キットにもスチレンモノマーが付属している。水分を含む標本はグリセリンなどで置換した後、できるだけグリセリンを吸い取り、半乾き状態で封入する。今回はグリセリンを吸い取り、半乾きにした標本と、グリセリンを吸い取った後、スチレンモノマーに1時間ほど浸した標本を封入してみたが、封入状態に差は見られな

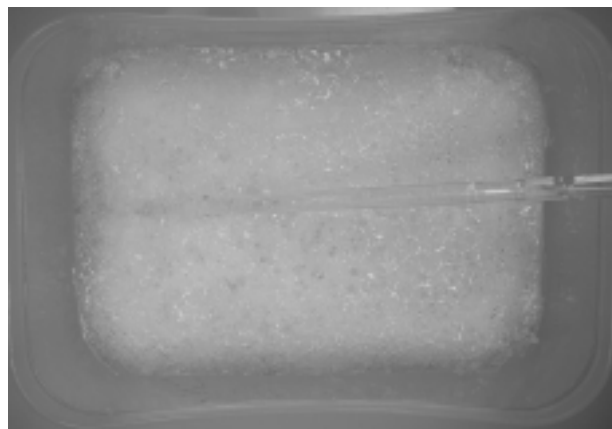


図1 発泡固化したアクリル樹脂

硬化剤が多すぎ、発泡固化したアクリル樹脂。熱発生が強かったため、ポリプロピレン容器（耐熱120℃）も変形している。

かった。封入時には底部となる樹脂をある程度硬化させた後、標本をいれ、そのあと標本上面まで樹脂を加え2段階の封入を行った。Burgmanns (1968) はポリエステル樹脂封入の際、底部の上に標本を仮止めするように2段目に樹脂を固め、その上に全体を覆うような3段階の封入を行っている。今回3段階を試してみたが、側面では3層の境界がはっきり分り、きれいな標本ではなかった。現在普通に行われている2段階の方で十分と思われる。図2はこの樹脂で2段階封入後、通常の方法で研磨した標本である。また、底部の削りは不十分で、底部に溜まっていた多数の小さな気泡が残っている。

アクリル樹脂にはグリセリンを吸い取り、半乾きにした標本を封入してみた。他の樹脂と同様に上面が隠れるように樹脂を注入したのであるが、アクリル樹脂は収縮率が大きいので、表面に収縮によるしわができるとともに、標本の一部が露出してしまった。また、大きな収縮のためか容器の壁近くに大きな気泡が並んで生じてしまった(図3)。

エポキシ樹脂は規定量の硬化剤では硬度が不足したので、1割増して適当な硬度を得た。

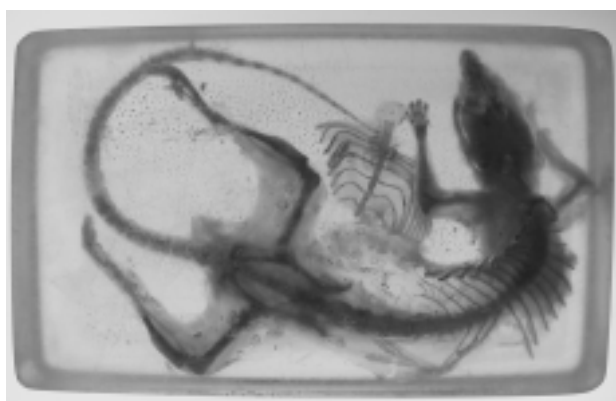


図2 不飽和ポリエステル樹脂で封入した標本

一応表面を研磨した封入標本。まだ、底部の削りが不十分で、底の方にたまった小さな気泡が多数残っている。解剖実験で胸部内臓を観察するため、胸骨や胸部肋骨を切り離しているの、切り離した骨は傍に添えてある。

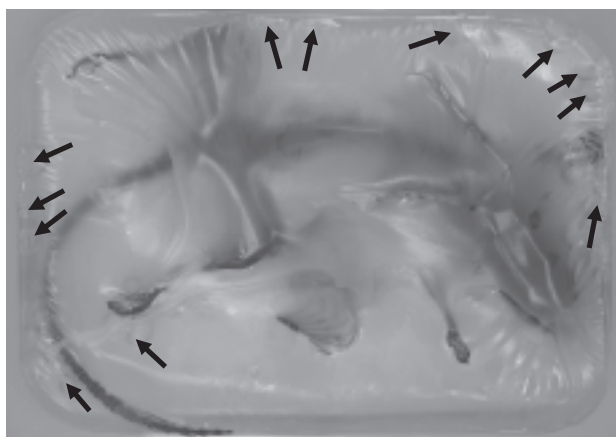


図3 アクリル樹脂で封入した標本

表面は白く濁る。収縮率が高いため、試料に合わせて表面が凹凸変化したり、一部試料が露出したりしている。周辺部表面にはしわが、周辺部内部には大きな空洞(矢印)が目立つ。

電子顕微鏡用の組織のエポキシ樹脂包埋ではキシレンから樹脂に置換できるので、グリセリン漬け標本のキシレン置換を試みたが、キシレンに長く保管すると骨の染色が退色してしまった。電子顕微鏡標本ではその後樹脂になじませるが、今回混合剤は硬化が始まってしまうので樹脂になじませる時間が取れず、キシレン半乾きの標本を封入したが、樹脂が柔らかくなり硬化しなかったため、結局グリセリン半乾き標本しか封入できなかった。また、かなり反応熱を生じ、また、若干の収縮があるため、内臓を除去するため体腔を開いているマウスでは体腔面も半乾きになっているが、内臓をそのままにして骨格標本にしたメダカでは体内のグリセリンが絞り出され、標本の周辺に塊を作ってしまった(図4)。

結局のところ、気温によって硬化材の量を調節することが多いが、必ずしも一度で適当な硬さになるとは限らないので、少量で試しを行うことが必要と思われる。ただし、少量を扱うときは計測も少量となるので、制度の良い秤が必要となる。特にアクリル樹脂の硬化剤は粉末で100mLに対し0.1g単位で扱うので0.01g精度の秤が必要であり、少量の試しではさらに精度が必要で電子天秤などがないと難しいかもしれない。また樹脂により、2か月から半年と使用期限が短く設定されており、購入後の保存期間により硬化剤の量を加減することも必要であったかもしれない。

今回扱った3種の樹脂の中では、安定して硬化できる飽和ポリエチレン樹脂が硬化という点では一番扱いやすかった。

3. 授業実践

以前の報告で提案した「透明骨格標本作製と観察を現行の生物学実験で扱うための日程」案に沿う日程が、平成11年度後期及び平成12年度前期の生物学実験において可能であったため、テーマに組み入れ透明骨格標本作製を行った。Haqueら(2004)の方法を利用した2重染色法での標本作製を平成11年度後期に22名、平成12年度前期に26名の受講者が実習した。解剖実験後、使用した動物を固定し、交代で昼休みあるいは放課後に溶液を取り換え、3週後の実験授業中に骨格標本の観察を行った。染



図4 エポキシ樹脂で封入した標本

表面はまだ研磨していない。一緒に封入したメダカ体内から、高温・高圧のためかグリセリンが、絞り出された(矢印)。

表1 透明骨格標本に関するアンケートの結果

1. 骨格の染色はうまくいきましたか。 うまいった (4), まあまあ (2), 筋が染まってしまった (2),
2. この標本を樹脂封入したいですか。 封入したい (3), 迷っている (2), したくない (2), 作りたいが持ち帰りたくない (1), 持ち帰りたくない (1)
3. 骨格観察はうまくいきましたか。 うまいった (2), まあまあ (2), うまくなかった (1), 観察しにくい部分があった (3)
4. このような骨格標本は学校現場で教材として役立つと思いますか。 役に立つと思う (7), 不要である (1)
5. このような骨格標本作りを大学 (教員養成学部) で体験することについてどう思いますか。 必要なこと・体験すべきこと (6), あまり必要でない (2)
6. 骨格標本をつくってみたい動物がありますか。 ヘビ (1), 小動物 (1), ヒトの構造に近いもの (1)
7. 以前の授業では水酸化ナトリウム溶液で筋を溶かして骨を取り出して観察していましたが小さな骨がばらばらになりやすかったです。今回の観察法についてどう思いますか。 今回のほうが良いと思う (体の中にある状態で観察, 全体の構成がわかる, 残酷性が少ない) (5) 以前のほうが良いと思う (筋で見にくかった) (2)
8. その他の意見などありましたら記入して下さい。 いい経験になった (2), 市販品の利用で十分 (1), もう少し時間をかけ, 筋の透明化を完全にしたほうがよい (1)

色状況は個体差があり、筋肉まで染色され骨の観察が困難な標本もできた。その場合はうまく染色された標本を複数の受講生で観察した。染色が不足な標本は見られなかったため、今後は過染色を抑えるようにしたいが、曜日などの組み合わせの関係で全体での染色過程を短縮するのは難しいので、染色液の濃度で調節することになるだろう。本当は、各標本それぞれ染色状況を観察しながら適度に染色されたものから順次、次の過程に移るのであるが、学生実験では任意に時間をとることができないので、できるだけ多くの標本が適切に染色される条件で操作を行い、不都合な標本ができた時は、うまくできた標本を複数の受講生で観察することで対応するしかないであろう。平成12年度前期の実験で、26名の受講生にアンケートを取ったところ、9名の回答(回収率34.5%)が得られた。染色は半数以上がうまくいき、半数位は染まってしまった筋などのせいで、骨の観察がうまくいかなかった部分があった。骨格標本の教材としての有効性についても回答者の多くが役立つと思うと答えており、骨格標本作りの体験も有意義と考えている。半数位が樹脂封入を希望しているので、実験の最後の補講日に樹脂封入をすることにし、希望者を募ったところ4名の受講生が希望した。そこで、全員に安定した硬化を見せた不飽和ポリエステル樹脂で封入を行わせた。1段目の底部を作り、硬化がある程度進んだところで(2~3時間後)、グリセリンを吸い取り半乾きにした標本を入れ、新しい樹脂を追加してから、ドラフト内に移し作業を終えた。翌日ある程度硬化した後、各自、自宅に持ち帰り、さらなる硬化を進めた後、研磨は各自に任せた。

考 察

1. 教育現場での安全性

封入に使う樹脂や硬化剤は化学薬品であり、取扱いに注を要するものも多い。説明書類には防護手袋、マスク、防護眼鏡あるいは必要に応じては防毒マスクの使用など

が記載されていたりし、皮膚などへの付着は避けなければならない。不飽和ポリエステル樹脂にはスチレンモノマーが大量に含まれており、その臭気が激しく、発がん性については2つの意見が対立しており、可燃性の危険もある。特に、臭気は換気扇だけでは対応できず、実験室ではドラフトを利用した。教材として封入キットが売られているが、教室や理科室で使用すると部屋だけでなく、周辺にも漏れる可能性がある。しかも、完全に硬化するまで1か月ぐらい匂いがこもることもある。今回用いた不飽和ポリエステル樹脂は、複数の理科教材会社や生物採集機器会社で取り扱っている同じキットであるが、使用説明書はついていないが、どこにも製造会社名の記載が無かった。

今回用いたアクリル樹脂は2012年春に入手できたが、夏にはその会社で販売を停止している。

今回用いたエポキシ樹脂を販売している会社では、新旧2種の製品を販売している。今回は新しい方の製品を用いたが、旧製品は主剤と硬化剤を10:5の比率で混入するようになっていたのが、新製品では主剤が変わっているので10:4の比率に変わっている。ホームページでも両方の説明書が公開されており、確認可能である。

実際の封入作業の際、こぼれた樹脂(缶の中の量によっては、注ぎにくくこぼれやすい形状のものもある)、かき混ぜ棒についた樹脂、樹脂のついた手袋で他のものを持つためそこに付着した樹脂等結構汚れやすく、また、一般に捨てやすさのため樹脂を混ぜるのに紙コップを利用するが、紙コップは軽く底が狭いので不安定で倒れやすい。濡れ雑巾で拭いて済むというわけにはいかず、拭うための溶剤(アセトンなど)も用意しておく必要もある。整理した場所で、注意深く、作業する必要がある。また、残った樹脂や硬化剤などの薬品も簡単には捨てられず、と言って成分も分からないと正式にも捨てられない。学校で使用する教材として市販するならば、きちんと使いきれない薬品の最終的な廃棄方法も説明書に記載して欲しい所である。一般の、学校の設備では、大勢の児

童・生徒を対象とした授業・実験での樹脂封入は行わない方がよいと思われる。

2. 大学授業における封入

2012年度前期の生物学実験で透明骨格標本作製・観察後、希望者4名で樹脂封入を行った。封入には匂いはきついが、一番硬化の確実性が高かった不飽和ポリエステル樹脂を用いた。各期の生物学実験では通常の10回（前半5回、後半5回、動物の解剖及び組織観察は後半に入っている）の授業の後に、学校行事（1年次学生は基礎見学実習、2年次学生は観察実習、2011年度までは1年次学生に介護等体験も行われていた）参加もしくは病気による欠席者のための補講実験を1～2回行っている。今回も、補講実験の時間を利用して、補講受講者が実験を行っている間に樹脂封入を行った。実際の作業は樹脂を調合し、容器に入れ、2～3時間ぐらい硬化するのを待ち（ときどき硬化具合を確かめながら待つので、長時間抜け出すわけにはいかない）、その後標本を入れ新しい樹脂を調合して追加するという作業だけで、3時間ぐらいかかるが、他の作業に集中できないという中途半端な状況になってしまう。各自持ち帰るにはおよそ全体が硬化する必要があるので、その後ドラフト内に移し、換気下で一晩硬化させ、翌日の午後取りに来させた。硬化した標本は取り出してそのまま観察できるが、凸凹が残るので、平らに磨いた方がよい。完全硬化して、研磨に取り掛かれるまでさらに1週間ぐらいかかり、研磨はただひたすらヤスリかけるだけで、マウスくらいの大きさの標本には半日以上が必要である。このようなことから大学の授業の中で樹脂封入を行うことは、時間効率から言っても無理がある。このように補講時間で封入、その後各自の空き時間で研磨というのが妥当なところと考えられる。

3. 骨格標本の利用

本実験で制作した透明骨格標本は、もともと学生実験において2日間で筋肉と骨格の観察を別々に行っていたのを同時に筋と骨の関係を考慮しながら観察できるように考えた、半透明骨格標本ともいうべきもので、骨格の観察だけを目指したもの（須田、2005；辻、1995）ではない。今回は時間の都合で、骨格だけ観察させたので、筋によって観察しにくい部分が見られ、アンケートのように時間をかけて完全透明化を求める意見も出た。大勢の受講生のいる実験で、標本数も多いので、半分は完全透明化、半分は半透明化で標本にすることを検討したい。

観察する標本はグリセリン漬けで十分であり、むしろ樹脂包埋しない方が針やピンセットで触ることでより観察しやすい。グリセリン漬けなので観察時に、匂いや刺

激蒸気などの問題もないが、保管・運搬の便だけを考えたと樹脂包埋が考えられる。しかし、グリセリン漬け標本を作るだけでも、かなり薬品代がかかる。封入樹脂はホームセンターや通販品を探せばかなり安く入手できるが、教材のキットはかなり高価である。完全に硬化して、研磨に取り掛かれるのに1月以上かかり、マウスの大きさを研磨するのに半日かかるとなると時間も手間もかなりかかる。教員となって、珍しいもの1つなら何とかできるが、児童・生徒の教材として多数用意するのは無理であろう。市販品利用の方が安くはないが、時間と手間の節約となる。封入標本作りは体験しておくことで、今後の教材づくりに生かせる可能性を身に付けておくことと、作った標本を自分のものとして今後の活用の可能性を備えることで、今回の学生実験の観察そのものに利用できるものではない。

今後は、日程上可能な時にグリセリン漬け透明骨格標本作製を行い、良い標本だけをグリセリン漬けで保存し、毎年の観察に使用するとともに、少数の希望者には封入も体験させるというカリキュラムで進むことになるであろう。

本研究は千葉大学動物実験委員会承認番号「動23-5」及び「動24-74」の学生実験及び「動24-271」で承認された実験であり、科学研究費補助金基盤研究(B)研究課題番号2230244の支援を得て行ったものである。

参考文献

- 1) Burgmans J. (1968) Embedding entomological specimens in an improved polyester resin. *New Zealand Entomologist* 4, 61-66.
- 2) 畑中恒夫 (2012) 透明骨格標本の有効利用について 千葉大学教育学部研究紀要, 60, 447-450
- 3) Haque S F, Izumi S, Aikawa H, Suzuki T, Matsubayashi H, Murano T, Kika G, Ikeda M, Goya K and Makino T (2004) Anesthesia and acoustic stress-induced intra-uterine growth retardation in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 50, 185-190.
- 4) 須田透 (2005) 両生・爬虫類染色骨格透明標本の有効性 群馬県立自然史博物館研究報告, 9, 121-125
- 5) 辻彰洋 (1995) 二重染色法によって作成した透明骨格標本とその教材性の検討 生物教育 35, 221-225
- 6) Yamamoto T., Domon T., Takahashi S., Islam Md. N. and Suzuki R. (2001) A resin embedding method for transparent teeth with ink-infiltrated pulp cavities. *Annals of Anatomy*, 183, 481-483.