

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6721899号  
(P6721899)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月23日(2020.6.23)

(51) Int. Cl.	F I		
<b>GO 1 N</b> 1/36 (2006.01)	GO 1 N	1/36	
<b>GO 1 N</b> 1/28 (2006.01)	GO 1 N	1/28	J
<b>CO 8 F</b> 26/10 (2006.01)	CO 8 F	26/10	
<b>HO 1 J</b> 37/20 (2006.01)	HO 1 J	37/20	Z
<b>GO 1 N</b> 33/48 (2006.01)	GO 1 N	33/48	R

請求項の数 3 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2016-69228 (P2016-69228)	(73) 特許権者	304028726
(22) 出願日	平成28年3月30日 (2016. 3. 30)		国立大学法人 大分大学
(65) 公開番号	特開2017-181316 (P2017-181316A)		大分県大分市大字旦野原 700番地
(43) 公開日	平成29年10月5日 (2017. 10. 5)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成31年2月25日 (2019. 2. 25)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高親水性高分子モノマーを主剤とする電子顕微鏡用包埋方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

高い親水性を有し、重合すると高分子になる N - ビニル - 2 - ピロリドンを用いて、当該 N - ビニル - 2 - ピロリドンの濃度を 98 ~ 100% にした水溶液に、該水溶液 100 重量部に対し 1 ~ 5 重量部の架橋剤、0.0001 ~ 0.001 重量部の重合促進剤、ならびに他のモノマーとして、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ドデシル、2 - メチル - 2 - プロペン酸、(1 - メチルエチリデン)ビス(4, 1 - フェニレンオキシ - 2, 1 - エタンジイル)ビスメタクリレートからなる群から 1 種以上選択される 0 ~ 100 重量部のモノマーを添加した包埋用液体に組織を浸漬し、静置して重合させることを特徴とする組織包埋方法。

【請求項 2】

架橋剤が、N, N' - メチレン - ジアクリルアミドが選択される、請求項 1 に記載の組織包埋方法。

【請求項 3】

重合促進剤が、Qcu - 1 および Qcu - 3 からなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の組織包埋方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホルマリン代替液となる高親水性高分子モノマーを主剤とする電子顕微鏡用

包埋方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫組織細胞化学における透過型電子顕微鏡による観察領域では、既存のLowicryl K4MやLR-White等の電子顕微鏡用包埋剤を用いても、生物学的試料、例えば抗体の種類によっては観察できないか、または非常に不十分な結果しか得ることができない場合が多い。

【0003】

例えば、透過電子顕微鏡試料の電子染色法として、エポキシ樹脂に包埋・重合し薄切した細胞組織を酢酸ウラニウム水溶液に浸漬し、これを洗浄後、鉛染色液に浸漬後、洗浄する方法が知られている（特許文献1）。また、細胞内に水分とラジカルソースを含む組織を包埋標本化するに際して、組織を高親水性高分子に架橋剤と重合開始制御剤を含有させた高親水性高分子モノマー溶液に浸漬し、窒素ガスバブリング後、静置して重合させる組織包埋方法も知られている（特許文献2、3）。しかしながら、これらの包埋方法では、例えば、100nm以下の極薄透過電子顕微鏡用の試料を調製することが困難であり、多種の抗体の染色観察には不適用である。そのため、高親水性樹脂を基礎素材とした新しい包埋剤を開発する必要があった。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特許第4292296号公報

【特許文献2】特許第4374435号公報

【特許文献3】特許第4956839号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、ホルマリン代替液となる高親水性樹脂を基礎素材とした新規な包埋剤、および該包埋剤を用いた電子顕微鏡用包埋方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

すなわち、本発明は、以下の通りである。

[1] 高い親水性を有し、重合すると高分子になるN-ビニル-2-ピロリドンを用いて、当該N-ビニル-2-ピロリドンの濃度を98~100%にした水溶液に、該水溶液100重量部に対し1~3重量部の架橋剤、0.0001~0.001重量部の重合促進剤、ならびに他のモノマーとして、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ドデシル、2-メチル-2-プロペン酸、 $C_{12-16}$ アルキルエステル、(1-メチルエチリデン)ビス(4,1-フェニレンオキシ-2,1-エタンジイル)ビスメタクリレートからなる群から1種以上選択される0~100重量部のモノマーを添加した包埋用液体に組織を浸漬し、静置して重合させることを特徴とする組織包埋方法。

[2] 架橋剤は、N,N'-メチレン-ジアクリルアミドが選択される、上記[1]に記載の組織包埋方法。

[3] 重合促進剤は、Qcu-1およびQcu-3からなる群から選択される、上記[1]または[2]に記載の組織包埋方法。

【発明の効果】

【0007】

本発明は、高親水性モノマーであるN-ビニル-2-ピロリドン(NPV)を主剤とし、架橋剤、重合促進剤、およびメタクリルメチルなどの他のモノマーを添加した包埋剤を提供し、該包埋剤を用いることによって、100nm以下の薄い試料を安価かつ容易に得ることができ、さらに、多種の抗体を用いた染色観察を可能にした。

【図面の簡単な説明】

50

## 【0008】

【図1】金標識した抗IgG抗体を反応させ銀による増感(PD法)後、光学顕微鏡下で観察した結果を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0009】

本発明は、ホルマリン代替液となる高親水性高分子モノマーを主剤とする電子顕微鏡用包埋方法に関し、これまで、例えば、観察対象とされる抗体の種類によっては十分な効果が得られなかったという技術的欠点を解決するものである。そこで、本発明によれば、電子顕微鏡に用いる包埋剤に求められる条件として、切片作製時に程良い硬度と弾性を持つこと、切り出された切片が水に浮くこと、および電子線に耐え、多様な染色に対応することを満たす、高親水性樹脂を基礎素材とした新規な包埋剤、および該包埋剤を用いた生物学的試料(臓器、組織等)の包埋方法が提供される。

10

## 【0010】

より具体的には、本発明は、高い親水性を有し、重合すると高分子になるN-ビニル-2-ピロリドンを用いて、当該N-ビニル-2-ピロリドンの濃度を98~100%にした水溶液に、該水溶液100重量部に対し1~5重量部の架橋剤、0.0001~0.001重量部の重合促進剤、ならびに他のモノマーとして、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ドデシル、2-メチル-2-プロペン酸、C<sub>12-16</sub>アルキルエステル、(1-メチルエチリデン)ビス(4,1-フェニレンオキシ-2,1-エタンジイル)ビスメタクリレートからなる群から1種以上選択される0~100重量部のモノマーを添加した包埋用液体に組織を浸漬し、静置して重合させることを特徴とする組織包埋方法を提供する。

20

## 【0011】

## (1) 電子顕微鏡用試料

本発明において、本発明の包埋方法に適した生物学的試料としては、限定されないが、各種動物の臓器、器官、組織、および細胞が挙げられる。また、本発明においては、タンパク質固定のための、ホルマリン(4%程度のホルムアルデヒド水溶液)による生物学的試料の前処理を必須としない。すなわち、本発明の包埋剤に直接、生物学的試料を包埋することによって、タンパク質固定に起因したその構造変更に伴う抗体の結合阻害等の感度低下を防ぐことが可能となる。しかしながら、生物学的試料を長期保存するために、または他の包埋材を使用する前提として予めホルマリンまたはパラホルムアルデヒド固定を要する場合等には固定処理を行ってもよく、この場合であっても、本発明の包埋方法を適用することが可能である。

30

## 【0012】

## (2) 包埋剤

本発明の包埋方法に使用される包埋剤は、高親水性高分子モノマーであるN-ビニル-2-ピロリドン(NVP)であって、所定の重合条件下で重合することにより高親水性高分子を主剤とするものである。本発明によれば、組織等の生物学的試料を包埋し、重合前の包埋用液体としては、上記の主剤からなる98~100%濃度の水溶液、該水溶液100重量部に対して、1~5重量部の架橋剤、および主剤とは異なる1種以上の0~100重量部のモノマーを添加した液体が挙げられる。

40

## 【0013】

生物資料の樹脂への包埋方法は、ホルマリン等で固定された資料または未固定の生試料をエチルアルコールで脱水した後に包埋用樹脂に浸漬して樹脂を浸透した後重合する方法と、生試料を水で希釈して低濃度から高濃度にした包埋剤に浸漬して樹脂を浸透させた後重合する方法がある。本発明においては、前項のエチルアルコールによる脱水後に包埋用液体を浸漬し重合する方法か、後項の低濃度のNVPモノマー(50%)から高濃度のNPVモノマー(100%)に浸漬した後包埋用液体に浸漬し重合する方法がある。特に後項において、50%未満の濃度のNPVモノマーに浸漬すると水分過多になり細胞の破壊を招き、高濃度特に100%NPVモノマーでは試料の脱水と収縮を招き試料表層部において短時

50

間でNVPモノマーが資料自体のラジカルの作用で重合され、固化されるため、適切な電子顕微鏡用試料の作製が困難になる。よって、本発明においては前項の方法を主として用いた。

#### 【0014】

本発明において、包埋用液体に添加される架橋剤の例としては、主剤(NVPモノマー)の重合を可能にするものであれば限定されないが、例えば、N,N'-メチレン-ジアクリルアミドが挙げられる。NVP水溶液中の架橋剤の添加量は、NVPモノマーが適切に架橋重合される範囲が好ましく、例えば、NVP水溶液100重量部に対し1~5重量部、より好ましくは2~3重量部であってもよい。なお、当業者であれば、使用される架橋剤の種類に応じて、架橋剤の添加量を適宜変更することができる。

10

#### 【0015】

本発明において、包埋用液体に添加される重合促進剤の例としては、主剤(NVPモノマー)の重合を可能にするものであれば限定されないが、例えば、Qc u - 1およびQc u - 3等が挙げられる。NVP水溶液中の重合促進剤の添加量は、NVPモノマーの重合が適切に促進される範囲が好ましく、例えば、NVP水溶液100重量部に対し0.0001~0.001重量部、より好ましくは0.0004~0.0005重量部であってもよい。なお、当業者であれば、使用される重合促進剤の種類に応じて、重合促進剤の添加量を適宜変更することができる。

#### 【0016】

さらに、包埋用液体には、重合後の樹脂ブロックの硬度を調節するために、NVPモノマー以外のモノマーが調合されてもよい。このようなモノマーとして、限定されないが、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ドデシル、2-メチル-2-プロペン酸、C<sub>12-16</sub>アルキルエステル、(1-メチルエチリデン)ビス(4,1-フェニレンオキシ-2,1-エタンジイル)ビスメタクリレートからなる群から1種以上選択され得る。好ましくは、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ヒドロキシエチルである。また、包埋用液体に添加される上記モノマーの添加量は、0~100重量部、より好ましくは40~60重量部であってもよい。なお、当業者であれば、使用される重合促進剤の種類に応じて、重合促進剤の添加量を適宜変更することができる。

20

#### 【0017】

##### (3) 包埋方法

本発明の包埋方法は、本発明の包埋剤に生物学的試料を浸漬し、静置して重合させることを特徴とする。包埋剤に生物学的試料を浸漬させ、静置しておく時間は、限定されないが、少なくとも試料の厚さ1mmに対して10時間以上であればよく、一態様としては試料の厚さ0.5mmに対して12時間である。また、モノマーの重合は、当該技術分野において周知の一般的な条件に準じて行うことができる。例えば、本発明の包埋剤を大気圧下、40~70℃にて12~72時間で重合させることにより、所望の硬度および弾性を持つ樹脂ブロックを得ることができる。好ましい重合条件は、大気圧下、58~62℃にて18~24時間である。

30

#### 【0018】

##### (4) 包埋後の試料の評価

本発明の包埋剤により包埋された生物学的試料に対する抗体反応の評価は、光学顕微鏡による観察用に切片(例えば、1-2μm厚)を作製し、生物学的試料に固有の一次抗体を反応させ、次に、該一次抗体に対する標識二次抗体を反応させて、免疫組織細胞化学的に行うことができる。例えば、生物学的試料が膵臓である場合、一次抗体として、抗グルカゴン抗体、抗インスリン抗体などのIgGを適切な濃度で反応させ、その後、該抗体に対する標識二次抗体として、IgG-Goldを適切な濃度で反応させ、次に、光学顕微鏡下で標識のGoldを検出することにより、包埋された試料に対する抗体の反応性を検討することができる。

40

#### 【0019】

以下の実施例は、本開示の様々な態様を例証する。材料と方法の両方に対する多数の修

50

飾は、本開示の範囲から逸脱せず実施されてもよいことは当業者に明らかである。市販品供給業者から購入される全ての試薬および溶媒は、さらに精製または加工することなしに使用される。

【実施例】

【0020】

実施例1：各種組成の包埋剤の検討

#### 1. 方法

包埋剤の主要な成分として高親水性モノマーであるN-ビニル-2-ピロリドン（和光純薬）を選択し、この成分の所定量に対して、下記の表1に列挙した架橋剤、重合促進剤、および他のモノマーを所定量で配合して、各包埋剤の性状を観察した。具体的には、試料として雄性（雌8～12週齢ラット（SD系）（九動株式会社）の膵臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、下垂体、脳、精巣、および心臓のそれぞれを最初に4%パラホルムアルデヒド固定液で固定し、各包埋剤に包埋し、ガラスナイフで厚切り（1～2μm）の切片を作製し、包埋剤の成分の組み合わせの割合の変化による切片の状態（硬化の状態、硬度、水への反応）、およびトルイジンブルー（Merck）染色での観察により評価した。

10

【0021】

免疫染色に関して、包埋された膵臓の切片に対しては、抗インスリン抗体と抗グルカゴン抗体（DAKO）の2種類を用いて染色し、評価した。また、膵臓以外の肝臓等の臓器の切片については、各臓器に特徴的に発現している抗原に対して免疫染色を行った。評価は、抗体の反応性を透過型電子顕微鏡（日立）を用いて観察することにより行った。なお、免疫染色は、いずれの抗体もLR-White（London Resinn Co.Ltd）切片と比較して評価した。

20

【0022】

#### 2. 結果

各包埋剤の配合の割合を表1に示す。

【0023】

【表1】

表1. 各種の包埋剤

No	NVP (重量部)	架橋剤 (重量部)	モノマー(メ タクリル 酸メチル)( 重量部)	Qcu-1 (重量部)	モノマー(メ タクリル酸ヒ ドロキシエチ ル)(重量部)
1	30	2.1	40	0.0245	7
2	35		35		
3	40		30		
4	50		20		
5	60		10		
6	65		5		
7	70		0		

30

40

【0024】

No. 1～7のそれぞれについてモールド2本を作製し、モールドの変形および1μm切片での各々の水への浮遊性と伸展性を評価した。結果を表2に示す。

【0025】

## 【表 2】

表 2. 包埋剤の特性

No.	モールドの変形	対水
1	2/2あり	浮遊、伸展
2	2/2あり	浮遊、伸展
3	2/2あり	浮遊、伸展
4	1/2あり	浮遊、伸展
5	なし	水没、伸展
6	なし	水没、伸展なし
7	なし	水没、伸展なし

10

## 【0026】

No. 1、No. 2、およびNo. 3は、モールドの変形が比較的大きく硬く脆いため、トリミングの段階で不適切であると評価した。No. 5、No. 6およびNo. 7は切片が水没したり、伸展しなかった。よって、モールドの変形が2本のうち1本であり、浮遊性および伸展性があるNo. 4の包埋剤を以下の臓器の免疫染色実験に採用した。

## 【0027】

## 実施例 2: 免疫染色

実施例 1 で良好と評価されたNo. 4の包埋剤を用いて、ラットの膵臓を包埋後、光学顕微鏡的に免疫染色 (IgG-Gold PD法) して検討を行った。簡単には、1~2 μm厚の切片を作製し、豚グルカゴンに対する一次抗体 (DAKO) を反応させ、次に、金標識した抗IgG抗体を反応させ銀による増感 (PD法) 後、光学顕微鏡下で観察した (図1) 参照。結果の抗豚グルカゴン抗体の希釈適応を表3に示す。

20

## 【0028】

## 【表 3】

抗豚グルカゴン抗体の希釈倍率	LR-White	NVP (本発明法)
×1000	+	+
×2000	+	+
×4000	+	+
×8000	-	+
×12000	-	+

30

## 【0029】

本発明の包埋剤を用いた免疫染色は、調べた希釈倍率の全てにおいて、従来の包埋法であるLR-Whiteと同程度に良好な結果を示した。

40

## 【0030】

他の免疫染色として、マウスの膵臓について、インスリンに対する一次抗体を用いて同様の試験を行った。結果として、従来法 (LR-White) では、抗体を4000倍まで希釈しても反応し観察できたが、本発明では8000倍以上まで希釈しても同程度の反応を示した。また、マウスの膵臓を対象として、一次抗体として抗グルカゴン抗体を用いた場合、従来法では4000倍であり、本発明では12000倍であった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0031】

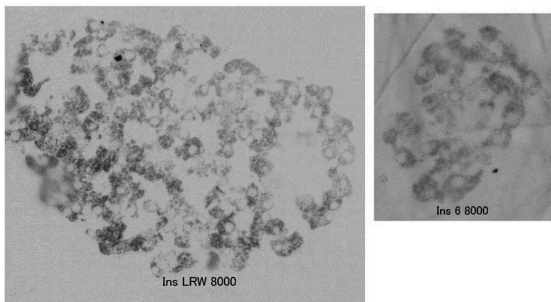
本発明は、免疫組織化学における透過型電子顕微鏡により、抗体を明確に観察するニーズに応えるものである。また、従来法を用いた場合のコストをおよそ4分の1まで削減す

50

ることができる。

【図 1】

図1



---

フロントページの続き

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 北村 裕和

大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内

(72)発明者 伊藤 葵

大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内

(72)発明者 藤倉 義久

大分県由布市挾間町医大ヶ丘1丁目1番地 国立大学法人大分大学医学部内

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開2004-085219(JP,A)

特表2015-533210(JP,A)

特開2000-346770(JP,A)

国際公開第2013/035681(WO,A1)

特開2009-191125(JP,A)

特開2006-036957(JP,A)

特表2006-519376(JP,A)

特開2002-340900(JP,A)

特公平07-006893(JP,B2)