

<資料論文>

紫外線硬化樹脂を用いたプレパラート標本封入の検討

西川 洋史

ドルトン東京学園中等部・高等部

Preparation of slide specimens by sealing with ultraviolet curable resin

Hirofumi Nishikawa

Dalton Tokyo Junior and Senior High School

キーワード：紫外線硬化樹脂，封入，プレパラート標本

KEYWORDS：sealing, slide specimens, ultraviolet curable resin

抄録

マニキュアは、プレパラート標本のカバーガラスのシーリングに用いられる。しかし、その乾燥には時間がかかるだけでなく、アセトンやブチル酢酸などの有機溶剤の刺激臭があるため、学校の授業での使用は避けたほうがよい。紫外線硬化樹脂は、表面コーティングや接着あるいはシーリングに使用される工業用素材であるが、ネイルアートではマニキュアの代わりに利用される。この液体状の樹脂は UVA 波長（315～400 nm）の照射によって数分間で硬化するため、作業時間が短縮できるだけでなく臭気も弱い。そこで本研究ではメチレンブルー水溶液を封入したプレパラート標本を用いて、数種類の紫外線硬化樹脂の水分の蒸発抑制能について検討した。その結果、プレパラート標本を 20℃2 週間でインキュベートした場合、紫外線硬化樹脂はマニキュアよりも有意に水分蒸発を抑制した。紫外線硬化樹脂によるシーリング法はその扱いやすさと保存率の高さから、マニキュアの代替になるだろう。

Abstract

Manicure is used for sealing of the cover glass on slide specimen. However, manicure should be avoided to use in classroom, because it not only relatively takes time for drying but also has irritating odor of organic solvent such as acetone and butyl acetate. Ultraviolet curable resins, known as industrial materials for sealing and bonding, is used to coat and decor surface of nail instead of manicure. Ultraviolet curable resins are liquid materials that are polymerized and cured in a few minutes by irradiated with spectral band of UVA (315-400 nm). In this experiment, some ultraviolet curable

resins were evaluated about the evaporation restraint ability by using methylene blue solution. It was found that they clearly prevented water evaporation better than manicure under incubation at 20°C for 2 weeks. Thus, ultraviolet curable resins would replace manicure for the slide glass specimen sealing in school.

1. はじめに

学校教材として入手できる永久プレパラート標本には、花粉や原生生物など 100 種類以上があり、生体標本が入手できない場合に極めて役立つ。しかし、地域の自然環境や教員の独自の性に基づいた多様で効果的な授業を展開するには、やはりオリジナルのプレパラート標本作製したほうがよい。

一般的にプレパラート標本の作製にはかなりの手間と時間を要する。例えば植物の場合、エタノールでサンプルの脱水を行った後、キシレンで透明化してからカナダバルサムまたはオイキットで封入し、カバーガラスをかけてから 2 日間かけて封入液を乾燥させなければならない (山代ら, 2018)。昆虫の場合、水酸化ナトリウムで内容物を溶解除去し、エタノールシリーズで脱水後、カナダバルサムで封入する (榎本ら, 2014)。一方、より簡易的な方法として、標本をカバーガラスで封入した後、その周辺をマニキュアでシーリングする方法がある (千田, 2013)。マニキュアによる封入は専門的な研究や調査でも行われており、プレパラート標本作るとき標準的な封入方法と言える (藤広, 2007)。しかし、マニキュアに含まれるアセトンや酢酸ブチル、酢酸エチル、トルエン、エタノールなどの溶剤は刺激臭があるため生徒に扱わせるのは避けたい。溶剤の臭いは部屋に充満しやすいため、理科室で作業するにしても周囲に気を使う必要があり、完全に溶剤が乾くまでに数時間かかることも多忙な教員としては障壁になる。また、マニキュアを使用したプレパラートでは、標本作製から数日以内で標本が乾燥するため、長期保存が可能な標本作製が難しいという問題がある。

さて、紫外線硬化樹脂は 400 nm 前後の紫外線照射によって数分以内に硬化する特性があり、密封や接着、表面のコーティングなどに用いる工業材料として利用されている。紫外線硬化樹脂は始終過熱を必要とせず、かつ硬化時の発熱が弱い。この利便性をもとに標本封入への応用が検討されている。例えば、透明骨格標本をポリエステル樹脂包埋から紫外線硬化アクリル樹脂に変更することで、製作時間が 1 週間から約 1 時間に短縮したことが報告されている (加藤, 2014)。ポリエステル樹脂標本ではグリセリンと樹脂の混合によって白濁が生じるが、紫外線硬化樹脂では混合前に硬化する。従って透明度の高い樹脂封入標本の作製が可能とされる。この硬化速度に着目して、紫外線硬化樹脂でカバーガラスをシーリングすることでより簡易にプレパラート標本作製する方法が、アイデアとして報告されている (西川, 2019)。しかし、検討された硬化樹脂は 1 種類であり、かつ統計学的解析をするに十分な実験回数も行われていない。

そこで本研究では、市販されている数種類のアクリル系紫外線硬化樹脂を用いてプレパ

ラート標本を作製し、水分の蒸発を防ぐ能力について詳細な検討を行った。

2. 研究・実践方法

2.1. 材料および器具・機器

紫外線照射ランプ「スーパーレジン UV クリスタルランプ 36 W」(清原株式会社, 大阪), 恒温機「ミニインキュベーター UI-50」(アズワン株式会社, 大阪), スライドガラス $76 \times 26 \times 1.2 \sim 1.5$ mm, カバーガラス「トロフィー」 18×18 mm (松浪硝子工業株式会社, 大阪), カバーガラス $22 \times 22 \times 0.13 \sim 0.17$ mm (AGC テクノガラス株式会社, 静岡), メチレンブルー水溶液 (日本動物薬品, 東京) を準備した。紫外線硬化樹脂は「UV クラフトレジン液」(清原株式会社, 大阪), 「クラフトアレンジ」(ケミテック株式会社, 東京都), 「星の雫」(株式会社パジコ, 静岡), 「UV カラーレジン液ホワイト」(株式会社大創産業, 広島) を, マニキュアは「デュカート ベース&トップコート II」(株式会社シャンティ, 東京) を準備した。

2.2. プレパレート標本の作製及び耐久試験

生徒が実験で使用するカバーガラスは通常 18×18 mm であるが, 本校ではより多くの試料が観察できるように 22×22 mm を扱うことがある。そこで本実験では両サイズのカバーガラスで検討した。スライドガラスの左右2か所にメチレンブルー水溶液の量が $0.03 \mu\text{L} / \text{mm}^2$ となるよう, 18×18 mm カバーガラスを使用する際は $9.8 \mu\text{L}$, 22×22 mm では $15 \mu\text{L}$ をマイクロピペットで計量し滴下した (図 1 A)。通常のプレパレート標本作製と同様に, 気泡が入らないようにカバーガラスを載せた (図 1 B)。4隅に1滴ずつの紫外線硬化樹脂を滴下した (図 1 C)。これを紫外線ランプに入れ, 5~10分間の紫外線照射を行いカバーガラスの仮止めをした (図 1 D)。次に残りの4辺に紫外線硬化樹脂を塗布し, 5~10分間の紫外線照射を行ってプレパレート標本を作製した (図 1 E)。紫外線硬化樹脂が固まっていることを確認後, 恒温機にて 20°C または 35°C で14日間インキュベートした。マニキュアによる封入は, カバーガラス周辺をコーティング後, ドラフトチャンバー内で一晩かけて乾燥させ, 恒温機にて同様にインキュベートした。なお, スライドガラス1枚あたりにカバーガラス2枚で封入したのは使用する材料の数を減らすためである。実験データには影響しないよう, カバーガラス同士は数 mm の間隔を開けた。

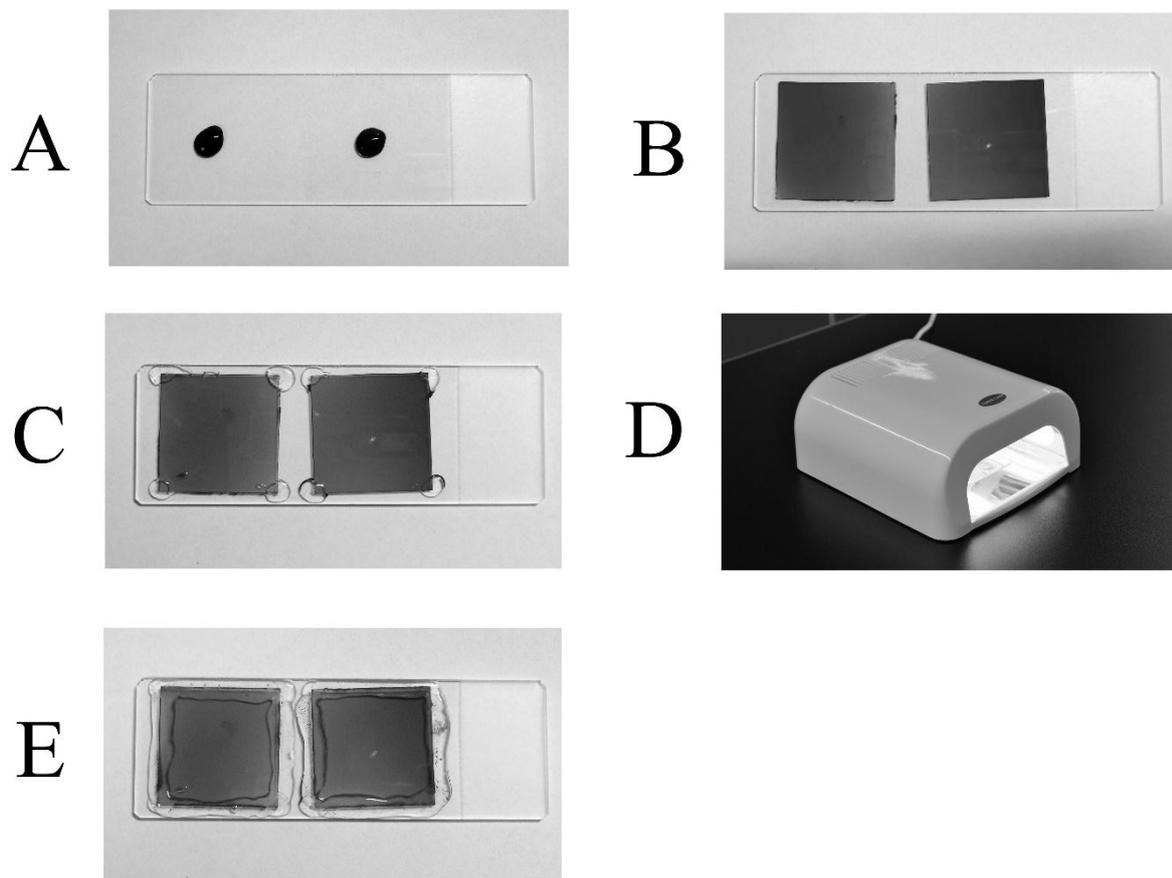


図1 紫外線硬化樹脂によるプレパラート作成手順

(A) メチレンブルー水溶液を滴下した様子。(B) カバーガラスを載せた様子。(C) 四隅に紫外線硬化樹脂を滴下した様子。(D) 紫外線照射による樹脂の硬化処理。(E) 4辺に紫外線硬化樹脂を塗布した様子。

2.3. 判定及び統計解析

メチレンブルー水溶液を封入した直後のカバーガラスは全体が青くなっている(図2A)。しかし、内部の溶液が蒸発すると薄い水色になるため封入の成否が判断できる(図2B カバーガラス封入箇所が薄い灰色の部分)。なお、インキュベート後のカバーガラスは青または水色の2つに分かれ、その中間はなかった。各樹脂における実験1回あたりに作成したプレパラートは5枚とし、メチレンブルー水溶液が保存されているカバーガラスの割合(以下、保存率)を%で求めると共に、同様の試験を6回繰り返して平均値と標準偏差を求めた。得られたデータをさらにEZR(埼玉医療センター, 自治医科大学, 埼玉)で統計解析した(Kanda, 2013)。Kolmogorov-Smirnov 検定の結果、正規分布が棄却された標本があったので、Kruskal-Wallis 検定を行った後にBonferroniの多重比較を行って有意差検定を行った。なお、有意水準は0.05%未満とした。なお、本研究では4種類の紫外線硬化樹脂を用いており、それぞれ樹脂A~Dとする。

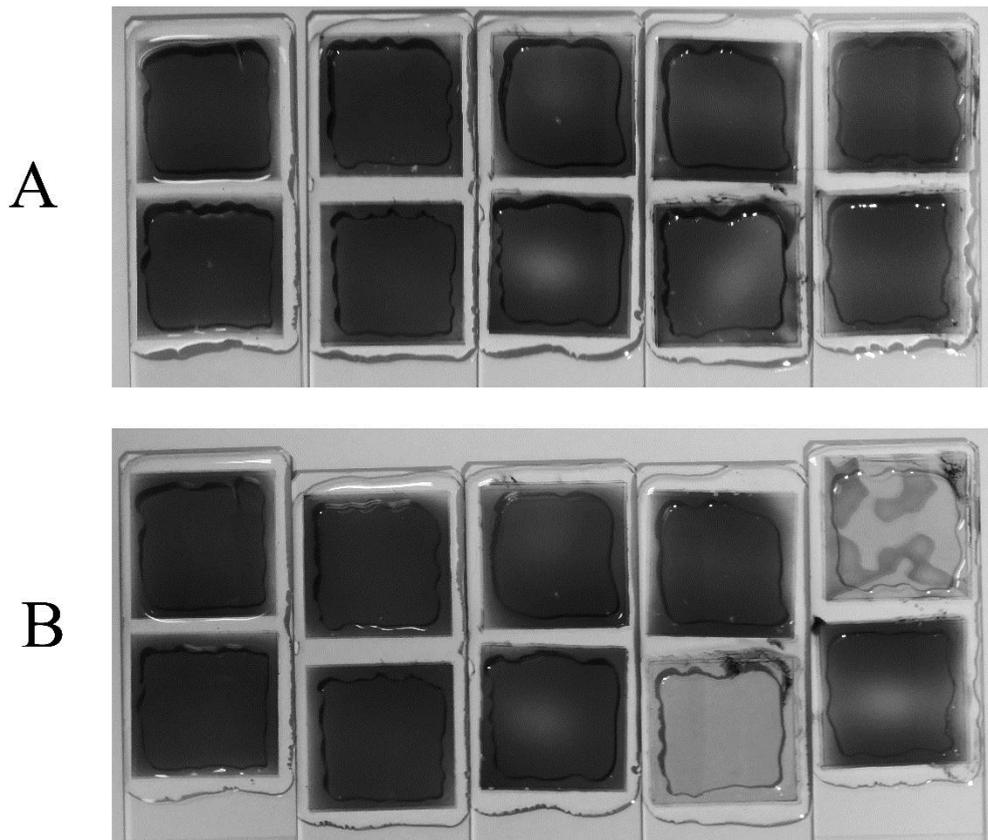


図2 作製直後とインキュベート後のメチレンブルー水溶液を封入したプレパラート標本
 (A) 1つの紫外線硬化樹脂に対してメチレンブルー水溶液を封入したプレパラート標本を5枚用意した。(B) インキュベート後のプレパラート標本では、メチレンブルー水溶液の水分が蒸発した箇所は、カバーガラス全体が薄い水色になった。

3. 結果

図3Aは、メチレンブルー水溶液を22×22mmカバーガラスで封入後、20°C14日間のインキュベートをした際の保存率である。紫外線硬化樹脂Aで封入したプレパラートでは $90 \pm 14\%$ であった。樹脂Bでは蒸発は見られなかった。樹脂C及び樹脂Dにおける保存率は、それぞれ $87 \pm 11\%$ と $80 \pm 15\%$ であった。マニキュアで封入したプレパラートでは、保存率は $22 \pm 19\%$ となり、他に対して有意に低かった。

図3Bは、18×18mmカバーガラスで封入後、20°C14日間のインキュベートをした際の保存率である。紫外線硬化樹脂Aで封入したプレパラートでは $87 \pm 17\%$ であった。樹脂BとC、Dにおける保存率はそれぞれ $88 \pm 11\%$ と $87 \pm 12\%$ 、 $73 \pm 26\%$ であった。マニキュアで封入したプレパラートでは、 $12 \pm 8.9\%$ であり、他に対して有意に低い値となった。

図3Cは、22×22mm又は18×18mmカバーガラスでメチレンブルー水溶液を紫外線

硬化樹脂 B 又は D で封入後、35°C 14 日間のインキュベートをした際の保存率である。22 mm 四方のカバーガラスでは、樹脂 B と D における保存率はそれぞれ 78 ± 14% と 83 ± 9.4% であった。しかし、18 mm 四方のカバーガラスでは樹脂 B と D における保存率はそれぞれ 3.3 ± 7.5% と 0% であった。

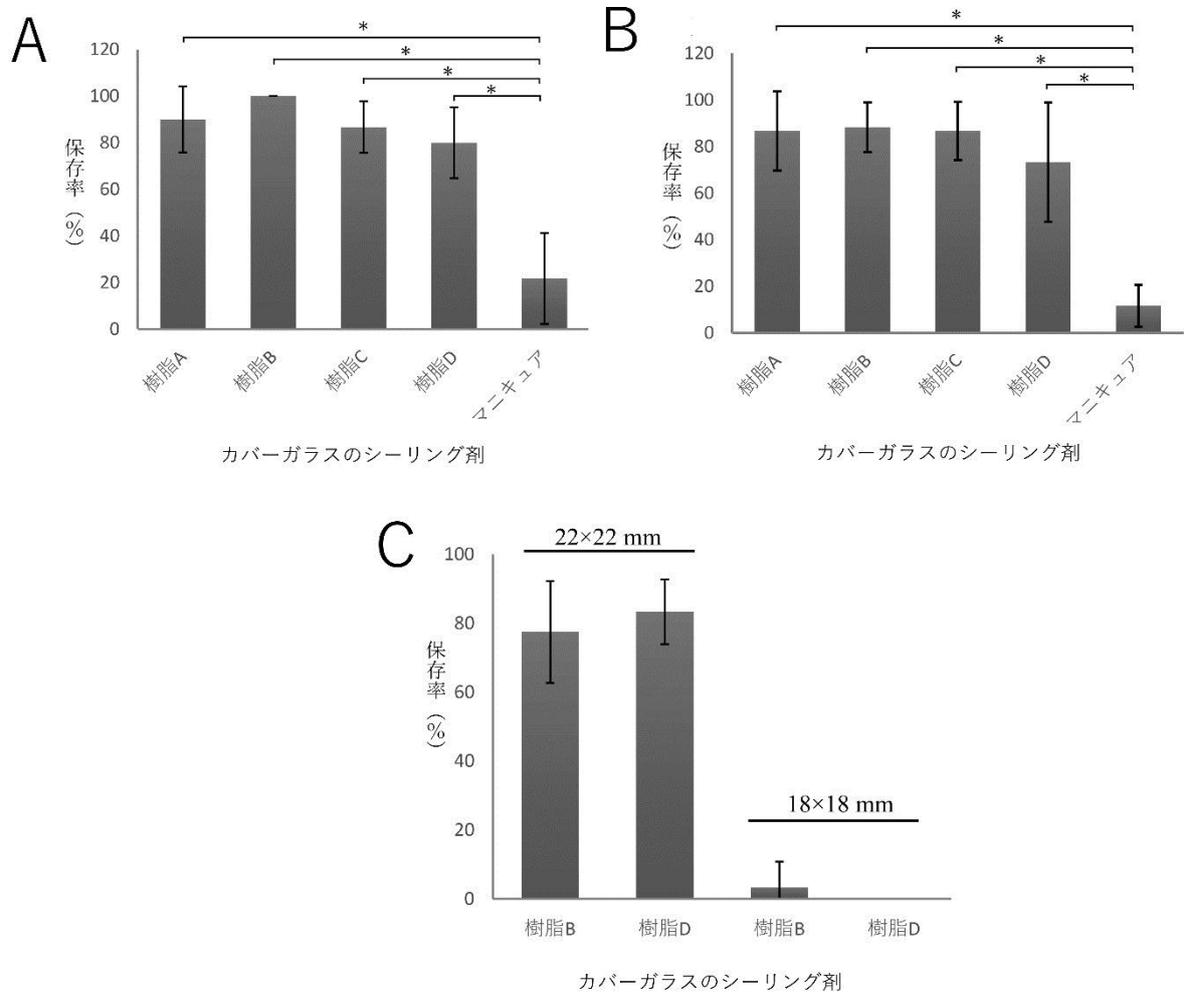


図3 カバーガラスのシーリング剤の種類とプレパラート標本の水分保持率

(A) メチレンブルー水溶液を 22 mm × 22 mm のカバーガラスで封入し、各社の紫外線硬化樹脂およびマニキュアでシーリングした後、20°C 2 週間のインキュベートを行った。

(B) 18 mm × 18 mm のカバーガラスを用い、20°C で 2 週間のインキュベートを行った。

(C) 22 mm × 22 mm 又は 18 mm × 18 mm のカバーガラスを用いてメチレンブルー水溶液を紫外線硬化樹脂で封入後、35°C で 2 週間のインキュベートを行った。結果は平均値 ± 標準偏差で示し、有意水準 0.05% 未満で差があったものに * を表示している。(C) については、差が明らかなので有意差検定はしていない。

4. 考察

マニキュアはプレパラート標本を作る際のシーリング材として一般的に使用されてい

るが、本研究では水分の蒸発を防ぐ能力が低いことが示された。この原因はマニキュアに含まれる被膜形成剤の水分蒸発能が高いためと考えられる。爪表面からは、手のひら等に次いで多くの水分が蒸発しており、これが妨げられると爪は通常より膨潤し、変形することが知られる。そのため水分蒸発を促す方法が検討されている。マニキュアに配合される被膜形成剤にはニトロセルロース、可塑剤（クエン酸アセチルトリブチル）、アクリルポリマーが挙げられるが、なかでもグラフトポリマーの透過性は高く、シリコーンの含有量が多いほど水分蒸発が高まる（鈴木ら、1996）。グラフトポリマーとは主鎖のポリマーに対して他のポリマーを枝状に結合させた重合体であり、本研究で使用したマニキュア中の（アクリレート／ジメチコン）コポリマーが該当する。ジメチコン（ジメチルポリシロキサン）は水分蒸発を高めるため、マニキュアでシーリングした標本の水分保持は紫外線硬化樹脂に比べ低くなったのだろう。マニキュアをシーリング剤として使用する場合は、少なくとも（アクリレート／ジメチコン）コポリマーを成分とするもの以外が推奨される。

マニキュアには刺激臭のある各種有機溶剤が含まれる。この臭いは生徒によっては気分が悪くなるため、授業において使用を避けたほうが良い。また、教員が教材開発をするために使用する場合、時間が限られる教育現場では即時に結果が必要なケースもあり、マニキュアが乾燥するまで待つことができないこともある。教員が活用することを想定するととにかく作業の時間を短くする必要がある。

しかしながら、プレパラート標本作成は多数の試料を扱うことができるため、データ解析や共通性を見出す考察をさせるなどより探究的な活動が可能となる。また、教員にとっても独自の教材を作りやすくなるため、地域や学校文化に即した授業展開がしやすくなる。そこで本研究では生徒及び教員がより簡易にプレパラート標本作成ができるよう、市販されているネイルアート用の紫外線硬化樹脂によるプレパラート標本のシーリング方法を検討した。その結果、今回使用した4種類の樹脂において、20℃14日間のインキュベート後の水分保持能力がマニキュアに比べて約60%高いことが明らかになった。この結果は、標本プレパラート作成において、紫外線硬化樹脂によるシーリングのほうがマニキュアによる方法よりも優れていることを示す。マニキュアによるプレパラート標本づくりは学校現場で行われることがあったが、紫外線硬化樹脂の導入によりさらに簡単に行えるようになるだろう。本実験ではカバーガラスのサイズについても検討した。プレパラート標本を20℃でインキュベートした場合、カバーガラスのサイズによる保存率の差はほとんど見られなかったが、35℃では18 mmではメチレンブルー水溶液の乾燥を十分に防ぐことができなかった。なお、他の紫外線硬化樹脂及びマニキュアでも35℃における蒸発が見られた。教室では夏期の室温がそのような温度になるので、カバーガラスのサイズはなるべく大きいほうがよいことが示唆される。

ネイルアート用紫外線照射ランプは数千円程度で手に入れることができ、教材としてのハードルが低い。また、今回使用した紫外線硬化樹脂は、硬化前の段階で無臭あるいは溶剤の臭いが弱いことや数分間の紫外線照射で硬化するので、生徒に扱わせることも容易と

考えられる。例えば、生徒が授業中に発見した標本を即座に封入し、後の授業で活用することや標本を作りためて、あとで時系列変化を観察するということもできるだろう。具体的には、植物組織標本の観察実験が挙げられる。葉や茎の組織を薄切してからそれを顕微鏡観察してスケッチを描き上げるまでは、1回の授業内でこなすことが難しいが、保存が可能であれば最初から最後まで同じ組織切片で仕上げるができる。また、長期期間にわたって取り組む必要のある実験としてはウニの発生実験などが挙げられる。ホールスライドガラスなどで封入すれば、同じ幼生個体の変化を経時的に観察することが可能となる。今後は紫外線硬化樹脂を用いて実際の生体を使ったプレパラート標本を作製し、保存状況を検討したい。

引用文献

藤広満智子（2007）簡便な真菌検査法，『真菌誌』48(3):132-136.

加藤 陽一郎（2016）透明骨格標本プラスチックの開発と授業での活用，『早稲田大学高等学院研究年誌』60:98-92.

Kanda, J. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplantation*. 48:52-458.

柘本雅身・箕浦和重(2014)我が国で新たに発見された *Neohydatothrips medius* Wang（アザミウマ目，アザミウマ科）及び日本産 *Neohydatothrips* 属種への検索表，『植物防疫所調査研究報告』50:111-118.

西川洋史（2019）紫外線硬化樹脂によるプレパラート標本の簡易作成，『理科教室』62(2):80-83.

鈴木 一弘，朱 信良，清水 徹（1996）櫛型ポリマーの開発と化粧品への応用シリコーン側鎖を有する新規ポリマーのマニキュアへの応用，『日本化粧品技術者会誌』30(2):161-168.

千田和則（2013）土壌動物の永久プレパラートの作成方法，『高等学校「生物基礎」観察実験サポート資料』岩手県立総合教育センター，118.

山代一成・栢野彰秀・大谷修司（2018）植物染色体標本の永久プレパラート作製法の検討，『日本科学教育学会研究会研究報告』32(9):23-26.