

短 報

スパー樹脂切片の脱樹脂法による光学顕微鏡観察の一改良*

和田 富吉・三宅 博・鈴木 完明

鈴木 克己・武岡 洋治

(名古屋大学農学部)

An Improved Method for Light Microscopy Using Extraction
Techniques of Spurr's Resin Sections

Tomikichi WADA, Hiroshi MIYAKE, Hiroaki SUZUKI

Katumi SUZUKI, and Yoji TAKEOKA

(Faculty of Agriculture, Nagoya University, Chikusa, Nagoya 464-01, Japan)

1992年4月30日受理

Key words: *Oryza sativa*, Resin removal, Spurr's resin.

キーワード: イネ, スパー樹脂, 脱樹脂.

スパー樹脂¹⁾, 植物材料を電子顕微鏡観察するための包埋剤として広く用いられている。この樹脂はエポキシ系樹脂の一種で, 低粘度で浸透性が良いという特長をもっている。しかし, その光学顕微鏡観察用の準超薄切片は組織内構造に対する染色の鮮鋭度が他のエポキシ系樹脂と比べて劣り, また染色用アルカリ性水溶液の処理などにより切片上に皺や剝離を生じ易い。動物組織の光学顕微鏡観察では切片内のエポキシ系樹脂を溶脱処理する脱樹脂法が広く行われている^{3-6,9)}。しかしここでも組織切片の剝離や破損が問題視されている⁴⁾。植物の場合, 脱樹脂法の用例は非常に少なく, 細胞壁の観察などに用いられているにすぎない^{1,8,10)}。従って, この方法の植物材料における利用の可能性については, 検討の余地が残されている。著者らはイネ種子根などのスパー樹脂準超薄切片を脱樹脂処理した後, 染色することを試み, 組織切片の比較的鮮明な染色像を得ることができたので, 以下に報告する。

材料と方法

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種日本晴の種子を消毒後, ペトリ皿内の濾紙上で催芽処理し, 30°C に設定したグロースキャビネット内において栽培し, その種子根根端部を材料として用いた。常法に従ってカコジル酸緩衝液で pH 7.2 に調整したアルデヒド液とオスミック酸液で二重固定した後, 上昇エタノール系列で脱水し, プロピレンオキサイドに置換した。

* 大要は, 第 193 回講演会 (1992 年 4 月) において発表。

次にスパー樹脂に浸透し, シリコン平板内に包埋し, 重合した。包埋ブロックよりウルトラミクローム (Porter-Blum 2 B) に装着したガラスナイフで, 厚さ 0.2 から 0.5 μm の切片を作製した。この準超薄切片をナイフボードからスライドガラス面に展着させた。展着を補強するために, ホットプレート上における加温を乾燥後さらに数分から 2 日間行った。次に Imai らに従って³⁾, 水酸化カリウムエタノール液で脱樹脂処理した。この方法は簡便であり, 特別な設備を必要としない。数滴の処理液をパスツールピペットで切片上に滴下し, 数秒から 1 分間浸漬した。本研究では組織切片の破損を避けるために浸漬時間を従来より短縮し, また処理液を切片上で激しく攪拌しないよう注意した。処理後, エタノール, 水道水で洗浄し, 風乾した。この切片をスタンブラック¹⁾, 塩基性フクシン²⁾, ヘマトキシリン⁵⁾, PAS 反応³⁾, チオニン⁷⁾, トルイジンブルー⁸⁾ で染色処理し, 水洗した後, 風乾した。封入剤オイキットにより封入し, 組織標本とした。なおオイキットには溶剤としてキシロールが含まれている。この組織標本を光学顕微鏡 (Olympus BH-2) で観察し, その写真を撮影した。

結果と考察

図はイネ種子根の厚さ約 0.25 μm の準超薄切片を脱樹脂処理し, チオニン染色したものである。この組織切片の染色像は鮮鋭度が高く, 細胞内の数種の構造が識別された。切片内の樹脂部分は脱樹脂処理後, 全く染色されなくなる一方, 組織部分の被染度は著しく向上した。この効果はトルイジンブルーやヘマトキシリンで染色した厚さ約 1 μm の組織切片でも認められたが, 今回, 薄い組織切片を用いて

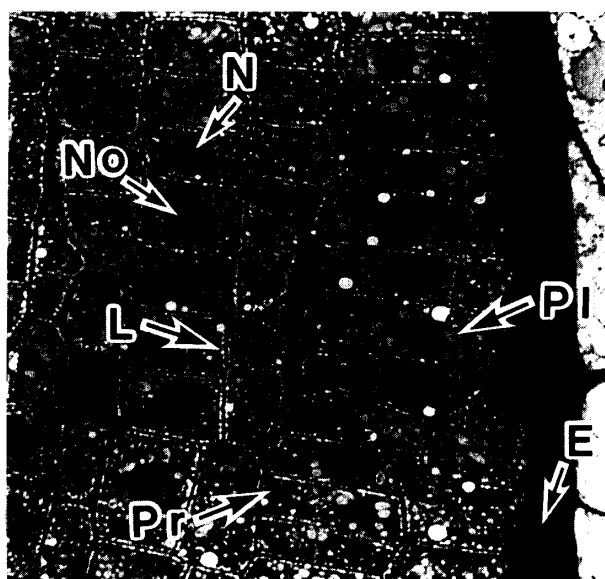


Fig. A high magnification light micrograph of the peripheral region in rice seminal root, 24 hours after soaking. The section is c. $0.25 \mu\text{m}$ in thickness and is stained with thionin after Spurr's resin-removal with potassium hydroxide-ethanol ($\times 1,000$).

Abbreviations: E; epidermal cell wall, L; lipid body, N; nucleoplasm, No; nucleolus, PI; plastid, Pr; proteinous deposit.

染色法を検討し、さらに鮮鋭度の高い像を得ることができた。すなわち、厚さ 0.2 から $0.5 \mu\text{m}$ の切片を塩基性フクシン、PAS 反応、チオニン、スタンブラックで染色処理して良好な結果を得た。厚さ約 $0.1 \mu\text{m}$ の切片では塩基性フクシンにより淡染の像が得られたが、これを光学顕微鏡で観察することは可能であった。なお、この切片はやや厚い電子顕微鏡用切片に相当する。薄い光学顕微鏡用切片の作製により包埋ブロックの切削面は滑らかに保持されるので、この面から直ちに超薄切片作製し、光学顕微鏡と電子顕微鏡の像を対比することが比較的容易にできる。

脱樹脂処理した組織切片は光学顕微鏡観察^{1,3-6,8)}のほか、免疫組織化学的観察⁹⁾や蛍光顕微鏡観察¹⁰⁾にも用いられるが、この処理による組織内物質の変化には注意が必要である。上記のスタンブラック染色の場合、脂質粒は Bronner の報告¹⁾と同様に、反

応陰性となった。この結果は顆粒内の脂質が脱樹脂処理液により脱脂されたために生じたものである。なお、蛋白顆粒や細胞質は陽性の黒灰色ないし褐色の色調であり、脂質粒の球形の構造は他の細胞内構造との呈色の相違により識別された。

未脱樹脂処理のスパー樹脂切片を染色用アルカリ性水溶液で染色処理したり、キシロールを溶剤を含む封入剤で封入した場合、切片上に剝離や皺を生じ易かった。ところが脱樹脂用アルカリアルコール液による処理では、これらの損傷はほとんど認められなかった。これは、予想外の結果であった。この脱樹脂の機構として、塩基の求核置換反応により樹脂のエポキシドが解裂し、その分解物が溶解することが考えられている⁴⁾。上記のアルカリ性水溶液や有機溶媒入り封入剤の処理では、樹脂はあまり分解されずに膨化し、このために切片上に損傷が生じたものと考えられる。

本研究に用いた調製方法によりイネの種子根以外に、イネの若い茎葉組織、穎花および子実、さらに数種マメ科植物の根粒や茎粒の組織でも良い結果が得られた。この方法は今後、他の植物材料においても利用できるものと期待される

謝辞：本研究に当り貴重な御助言をいただいた名古屋大学名誉教授前田英三氏に感謝いたします。

引用文献

1. Bronner, R. 1975. *Stain Technol.* 50: 1-4.
2. Huber, J.D. et al. 1968. *Stain Technol.* 43: 83-87.
3. Imai, Y. et al. 1968. *J. Electronmicrosc.* 17: 84-85.
4. Iwadare, T. et al. 1990. *Stain Technol.* 65: 205-209.
5. Lane, B.P. et al. 1965. *J. Histochem. Cytochem.* 13: 579-582.
6. Mayor, H.D., et al. 1961. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 909-910.
7. Paul, R.N. 1980. *Stain Technol.* 55: 195-196.
8. Peterson, R.L. et al. 1978. *Stain Technol.* 53: 1-9.
9. Rodning, C.B. et al. 1980. *J. Histochem. Cytochem.* 28: 199-205.
10. Russel, S.D. 1990. *Stain Technol.* 65: 259-261.
11. Spurr, A.R. 1969. *J. Ultrast. Res.* 26: 31-43.