ヨウ素染色によるエポキシ包理切片の光学顕微鏡的観察法

藤田　稔・佐伯　浩・原田　浩

A Staining Method with Iodic Reagents for Light Microscopy of Wood

Minoru FUJITA, Hiroshi SAIKI and Hiroshi HARADA

目　次

要　旨 ……294
1. まえがき ……294
2. 方　法 ……295
3. 結果と考察 ……296
引用文献 ……297
Résumé……298

要　旨

電子顕微鏡の試料作製技術を光学顕微鏡の試料作製に応用し，これに新しい染色方法を併用することによって好結果を得た。その方法は，まず試料をエポキシ樹脂に包埋して約1μ厚の薄切片を作成し，ついでヨウ素によって染色をおこない光学顕微鏡で観察するというものである。

本法の特色は，薄切片のコントラスト増大のしくみが，観察対象の組織そのものを染めるのではなくて，まわりのエポキシ樹脂を染めることによって組織を浮きだすという負染色的効果によることである。

1. まえがき

生物材料の光学顕微鏡観察に固定法や超薄切片法などの電子顕微鏡試料作製技術を応用することにより，さらに詳細な観察が期待される。とくに薄切技術については，通常の方法によればせいぜい5μ厚が限度であり，光学顕微鏡像の良否がこの切片の厚さによって左右される場合が多い。しかし電子顕微鏡用には超薄切片法によりこれよりも格段に薄い0.1μ厚以下の切片が作られており，この技法を用いれば，光学顕微鏡観察に適した十分に薄い切片（0.5～2μ厚）を作ることは容易なことである。

しかしながら，このような薄切片を光学顕微鏡で観察する方法は一般にはあまり用いられていないようである。それはこのように非常に薄い切片に通常の染色処理をほどこしても，その染色効果が切片が薄いために小さく，コントラストが弱いという大きな欠点をもつからである。切片のコントラストが弱いと実際の観察が非常に困難となる。コントラストを増大するためには位相差顕微鏡を使用する方法や[1]，組織を特に強く染色してコントラストを得る2.3の方法[2)3)]が報告されているが，これらの方法は特別な装置を必要としたり，染色処理がかなり複雑で対象が限られることなどの点から，必ずしも一般的な方法ではない。

藤田[4] は引張あて材の観察において，薄切片に塩化亜鉛ヨウ素試薬を滴下して検鏡した際，包埋剤のエポキシ樹脂がヨウ素によって濃い赤褐色に染色されることを見いだした。そこでこの染色反応を利用して薄切片を染色する方法を工夫した。この方法は観察対象物のまわりのエポキシ樹脂を強く染色し，対象の組織を浮きだしてコントラストを増大するという点で，電子顕微鏡の負染色 (negative staining) 法によく似ている。

この染色方法は非常に簡便でありながら応用範囲が広く，電子顕微鏡観察と光学顕微鏡観察の比較対応を容易なものとすることができるので，その具体的手法と応用例を報告する。この内容の一部は第 20 回日本木材学会大会において発表したが，その後行なった補足的実験結果をも加えて記述する。

なお，この研究の実施にあたり，御協力・御助言くださった当農学部木材構造学研究室各位に心からお礼申しあげる。

2. 方　　法

(1) 固定，脱水

目的とする材料から小片 (3×3×6 mm 程度) を切りだし，グルタルアルデヒド，過マンガン酸カリウム，四酸化オスミウム，FAA などの固定液中に投入する。固定終了後はよく洗浄して低濃度のエタノールより順次高濃度のエタノールに移し脱水する。電子顕微鏡観察を併用する場合にはグルタルアルデヒドで前固定 (3～6%, 6 hrs. 4°C) し，四酸化オスミウム (1%, 2 hrs. 4°C) で再び固定する 2 重固定法がもっとも適切であろう。光学顕微鏡観察のみの場合はグルタルアルデヒド単独固定がよい。なお細胞内容物を観察対象としない場合はこの固定処理を省略することができる。

(2) 包埋

包埋剤はエポキシ樹脂を使用する。エポキシ樹脂の調合は Epon 812 を主成分とする Luft の方法[5] による。固定，脱水終了後の試片はプロピレンオキサイド，プロピレンオキサイド・エポキシ等量混液の順に移し，ゼラチンカプセル中のエポキシ樹脂に投入して重合硬化させる。

(3) 薄切

包埋した試片ブロックの希望する部分をカミソリの刃でトリミングし，ウルトラミクロトームにガラスナイフを取付け 0.5～2 μ 厚の薄切片を作成する (2 μ 程度の切片であればガラスナイフを取付けたロータリーミクロトームを用いてもよい)。薄切片は白金ループを用いて清浄なスライドガラス上に移しとり，60°C の乾燥器中に 30 分以上おき乾燥する。この乾燥各処理により薄切片はガラス面に強く付着し，そのまま染色処理や保存に供することができる。なお，その面積については，超薄切片と交互に連続して作製する場合には 0.5×0.5 mm 以下に制限されるが，薄切片だけの場合は 2×1 mm 程度のかなり広い面積とすることができる。とくに形成層帯のように軟かい組織の場合はさらに 4×2 mm 程度に広くしてもよい。

(4) 染色

スライドガラス上の薄切片にヨウ素試薬 (Table 1) を滴下し数秒ないし数分間放置する。その後過剰の染色液を濾紙で除去してカバーガラスでおおい検鏡する。染色の程度は薄切片の厚さ，染色液の種類と濃度，染色時間などによって異なるが，観察に最適の条件はこれらを組み合わせて決定すればよい。ヨウ素試薬の染色効果などについては結果の項で述べる。

なお，これらの試薬は昇華性のヨウ素を主成分としているので，染色後長時間放置すると染色

の効果が低下することに注意しなければならない。この場合には染色液を再び滴下するとよい。しかし薄切片を染色液中に長時間おくことはその膨潤を招く原因となるので，観察後の薄切片はスライドガラスに付着させたまま水洗し，再び乾燥して保存するとよい。

3. 結果と考察

1) ヨウ素染色による負染色的効果

エポキシ樹脂包埋薄切片にヨウ素を含む試薬 (Table 1) を滴下して観察した光学顕微鏡写真の1例を Fig. 1 に示す。細胞膜（壁）や核などに比べて，包埋剤としてこれらの間隙を埋めているエポキシ樹脂の部分が濃い赤褐色に染色され，細胞膜や核は濃赤色の背景の中にちょうど暗視野中の輝部のように浮きでてみえる。このようにして得られる像のコントラストは非常に強いので薄切片の観察が容易となった。観察対象の組織を直接染色してコントラストを増大するのではなく，組織のまわりを強く染色してコントラストを増大するという機構は，電子顕微鏡の負染色法とよく似ているので，このヨウ素染色法を光学顕微鏡的負染色法と呼ぶことができよう。

なお，このヨウ素染色に至るまでの処理過程が電子顕微鏡の試料作製法によっているので，その固定，包埋処理により組織の損傷，変形が防止され，また，この試料をそのまま用いて電子顕微鏡用切片ができる利点がある。この染色方法はエポキシ包埋した試料全般に適用できるので，エポキシ包埋した電子顕微鏡用試料の光学顕微鏡による予備的観察にも好都合である。

2) ヨウ素試薬の種類と染色効果

エポキシ樹脂がヨウ素試薬によって染色される現象は塩化亜鉛ヨウ素試薬について見いだされた[4]。その後各種のヨウ素を含む試薬でこの染色反応をためし，いずれの場合にも同様の染色反応が認められた。その結果を Table 1 に示す。エポキシ樹脂がヨウ素によって発色される機構は不明であるが，発色がヨウ素によることは確実である。また，その程度は染色液の種類よりも，その染色液中のヨウ素の濃度に依存していると思われる。

Table 1. Staining effects of several iodic reagents for epoxy resin.

Iodic reagents	Recipes				Staining effects for epoxy resin
1. chlorzinciodine sol.	I(1g)	KI(5g)	$ZnCl_2$(30g)	H_2O(14ml)	++
2. chlorcalcium iodine sol.	I(1g)	KI(5g)	$CaCl_2$(20g)	H_2O(100ml)	++
3. chlorcalcium iodine sol.	I(1g)	KI(1g)	$CaCl_2$(1g)	H_2O(10ml)	+++
4. potassium iodine iodine sol.	I(1g)	KI(3g)	H_2O(100ml)		+
5. iodine phosphoric acid sol.	I(1g)	KI(2.5g)	$H_3(PO_4)$(50ml)	H_2O(50ml)	++
6. iodine xylen sol.	I(1g)	$C_6H_4(CH_3)_2$(20ml)			+++

Table 1 の3に示した塩化カルシウムヨウ素は染色効果が非常に大きく，0.2 μ の超薄切片でも観察に十分なコントラストが得られる。また薄切片の膨潤も比較的少ない。しかし 1 μ 以上の厚さの切片の場合は染色過剰を招いたり，膨潤が無視できないこともあるので，その場合はこの染色液を水で 2～10 倍に希釈して用いるとよい。

3) 観察例

A 樹木の形成層

Fig. 1 はイチョウ (*Ginkgo biloba* LINN.) の形成層付近の横断面の像である。師部，形成層，木部を含む広い面積にわたって，形成層細胞を始めとする非常に薄い細胞膜（壁）が暗視野中の輝

部のように観察される。

Fig. 2 は Fig. 1 の一部拡大像である。形成層細胞の薄い細胞膜がよく示され，細胞分裂の状態がよく解る。矢印に示すのは分裂の結果生じた新しい細胞膜や細胞板である。放射柔細胞中の核，仁なども同時に示されている。

B　アカマツの樹脂道

Fig. 3 はアカマツ (*Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC.) の木口切片で観察される垂直樹脂道周辺の構造を示す。写真に示すように，放射組織をはさんで2個の樹脂道が観察されるが，樹脂道自体の径は意外に小さく，それをエピセリウム細胞やさらに軸方向柔細胞と考えられる細胞群が取囲み，小さい樹脂道を中心としたひとつの樹脂道域と呼ぶべきものを形成している。

Fig. 4 は木口切片に現れた水平樹脂道の縦断面を示す。エピセリウム細胞の薄い細胞膜がよくわかる。

C　アカマツの膜孔

Fig. 5 は半径切片に現れた放射柔細胞と放射仮道管の縦断面の構造を示す。放射仮道管中の小さな有縁膜孔対や二葉松に特徴的な鋸歯状突起の構造がよくわかる。

Fig. 6 は分化中の有縁膜孔対の断面を示す。

Fig. 7 は放射柔細胞と仮道管との間の窓状の分野膜孔を示す。

D　接着層の剝離状態

Fig. 8 は小麦粉で増量した尿素樹脂接着剤の剝離試験片の断面像である。写真中で尿素樹脂および木材の部分は白色に，尿素樹脂中のでん粉粒と空隙部を埋めているエポキシ樹脂の部分は黒色に観察される。矢印に示すのは木材と尿素樹脂の剝離面である。

E　細胞中の結晶

Fig. 9 はアカマツの師部細胞中に存在する2個の柱状結晶 (C_1, C_2) を示す。C_1 は結晶の長軸に平行に，C_2 は斜めにそいだ断面である。

以上の観察例が示すように，像のコントラストは染色液と組織の染色反応によるものではなく，染色液とエポキシ樹脂の反応によって得られる。したがって，どのような試料でも，エポキシ樹脂に包埋できればこの染色方法を利用できるので，応用範囲がきわめて広い。また現在エポキシ樹脂包埋法が多く使用されている電子顕微鏡用試料に適用できることはいうまでもない。

引　用　文　献

1) ITOH, T. HAYASHI, S. and KISHIMA, T.: Cambial activity and radial growth in Sugi trees (Japanese Cryptomeria). Wood reserch No. 45, 23, (1968)
2) 渡　仲三・佐藤道子：隣接切片対応法のための光顕用切片の作製法，電子顕微鏡試料技術集，誠文堂新光社，p. 344, (1970)
3) 榎本康弘：エポン包埋組織の光顕標本作製，電子顕微鏡試料技術集，誠文堂新光社，p. 349 (1970)
4) 藤田　稔：引張あて材形成過程の細胞学的研究，京都大学農学部卒業論文，(1969)
5) LUFT, J. H.: Improvements in epoxy embedding method, J. Biophys. Biochem. Cytol. **2**, 499, (1961)
6) 木島正夫：植物形態学実験法，廣川書店，p. 80, (1965)
7) 植田利喜造：植物組織化学実験法，生物学実験法講座第8巻下，中山書店，p. 40, (1966)

Résumé

A new staining method using iodine has been developed in the field of light microscopy. It was applied in the study of wood structure together with preparation techniques for electron microscopy. Thin sections for light microscopy are made according to the following procedure: i. e. small blocks of samples are embedded in epoxy resin, cut in the thickness range of 0.5~2 μm, with a glass knife using an ultramicrotome, picked up on glass slides and dried. The sections obtained are then stained with iodic reagents as shown in Table 1. This staining method is based on the fact that iodine preferentially stains the embedded epoxy resin without staining the objects to be observed, which is similar to the negative or background staining method for electron microscopy. Excellent contrast in light microscopy is thus provided resulting in a phase contrast appearance without the halo effects.

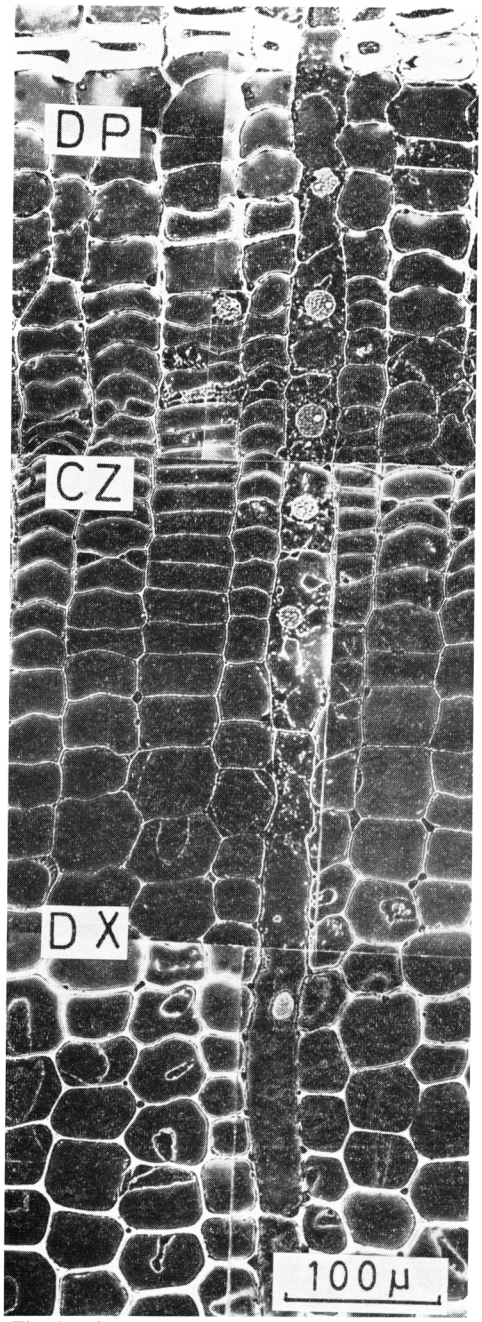

Fig. 1. *Ginkgo biloba* LINN. A cross section of cambial zone showing the differentiating phloem (DP), cambial zone (CZ) and differentiating xylem (XD).

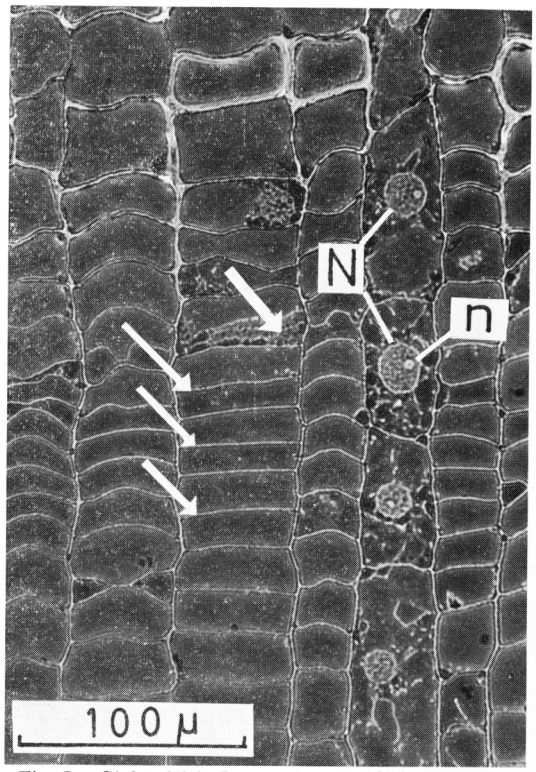

Fig. 2. *Ginkgo biloba* LINN. A magnified photo of a part of Fig. 1 showing newly formed cell walls and a cell plate in deviding cells (arrows). The nuclei (N) and nucleolus (n) are shown in the ray parenchyma cells.

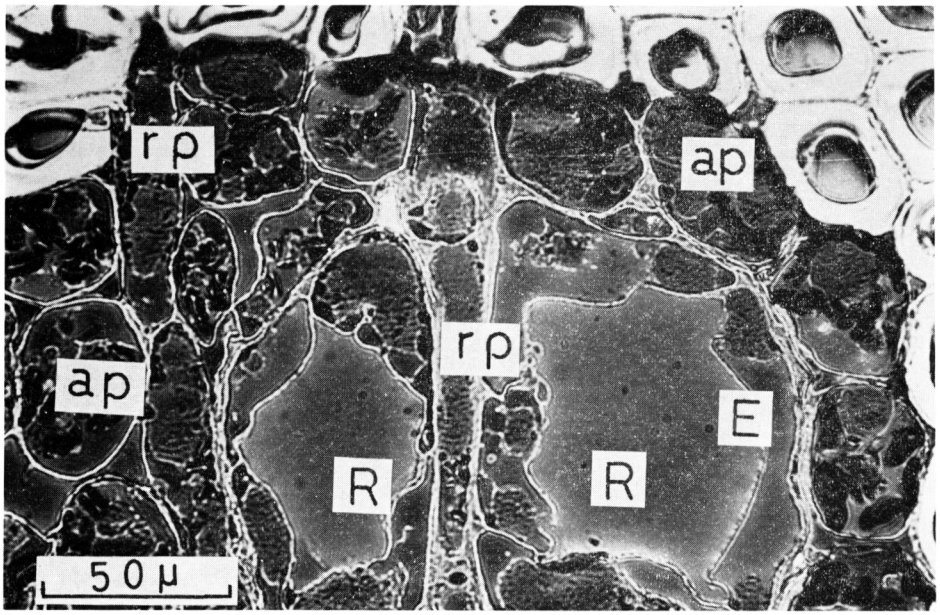

Fig. 3. *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. A cross section showing axial resin canal (R) surrounded by epithelial cells (E), axial parenchyma cells (ap) and ray parenchyma cells (rp).

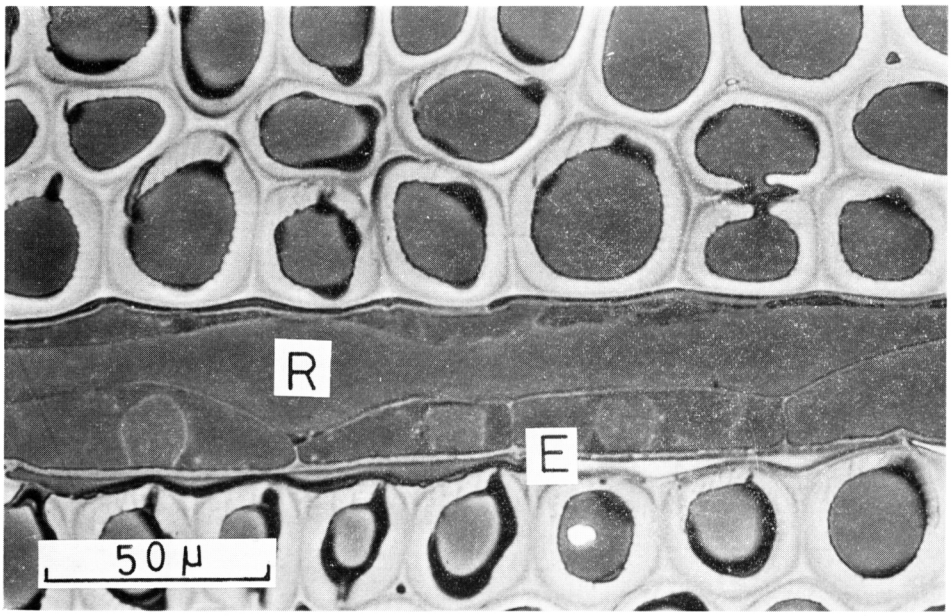

Fig. 4. *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. A cross section showing a radial resin canal (R) and epithelial cells (E).

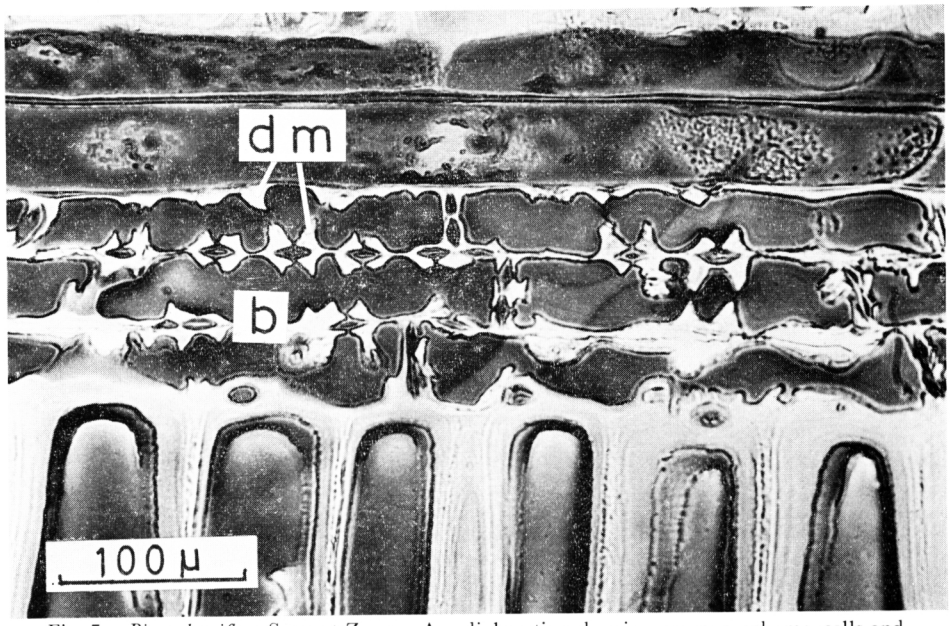

Fig. 5. *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. A radial section showing ray parenchyma cells and ray tracheids having dentate margins (dm) and bordered pit pairs (b).

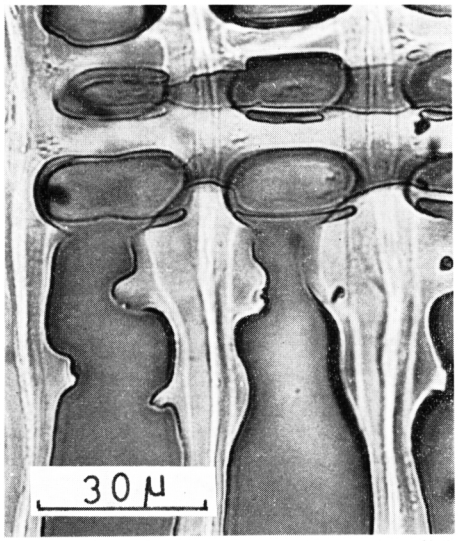

Fig. 7. *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. A radial section showing window-like cross field pittings.

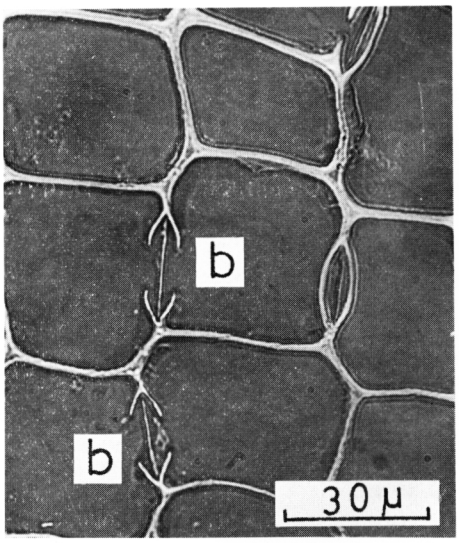

Fig. 6. *Pinus deniflora* SIEB. et ZUCC. A cross section showing differentiating bordered pit pairs (b).

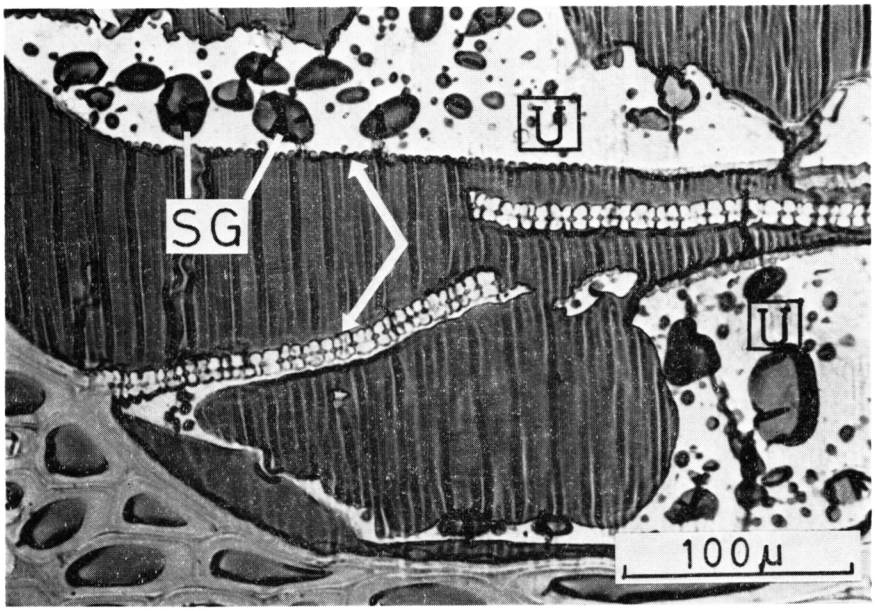

Fig. 8. *Betula Maximowiczii* REGEL. A section through the glue line area of birch plywood with urea resin (U) extended wheat flour (SG) showing a sectional view of fracture surface (arrows) exposed by the shear test.

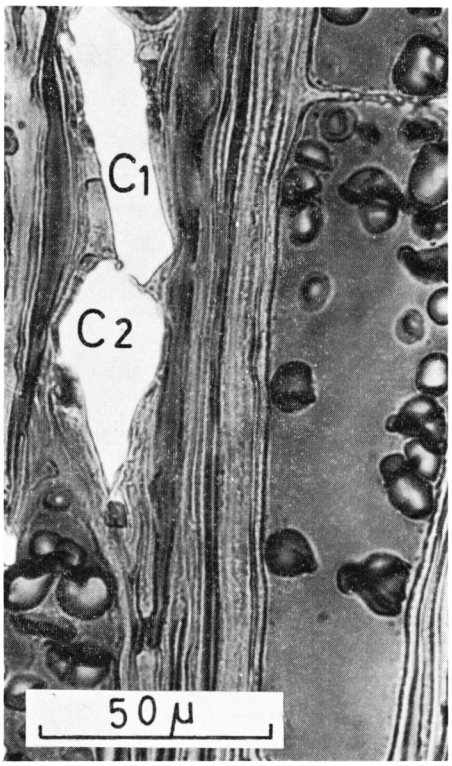

Fig. 9. *Pinus densiflora* SIEB. et ZUCC. A radial section of phloem showing the crystals (C_1, C_2) in a phloem parenchyma cell.