

# 超薄切片の脱成分処理による ベスチャーおよびいぼ状層の化学成分

森 奈々子・藤田 稔・原田 浩・佐伯 浩

Chemical Composition of Vestures and Warts Examined by  
Selective Extraction on Ultrathin Sections

Nanako MORI, Minoru FUJITA, Hiroshi HARADA and Hiroshi SAIKI

## 要 旨

広葉樹の道管壁孔に見られるベスチャーと針葉樹仮道管に見られるいぼ状層について、超薄切片上の脱成分処理法によってその化学成分を検討した。

その結果、ベスチャーといぼ状層は脱リグニン（亜塩素酸ナトリウム）、脱ヘミセルロース（水酸化カリウム）の各単独処理ではかなり蝕刻されても消失することはなかったが、両処理を組み合わせると完全に消失した。したがって、両者の主成分はリグニンとヘミセルロースであると思われる。また、ベスチャーでは脱リグニン・脱ペクチン（シュウ酸アンモニウム）の組み合わせ処理で蝕刻の度合いが進んだことから、ペクチンもいくらか含まれると思われる。いぼ状層においては脱ペクチン・脱ヘミセルロースの組み合わせ処理によって、いぼ状層が  $S_0$  に接した一層とその上に載ったいぼ状突起部とに分かれて見えることがあった。

## 1. はじめに

ある種の広葉樹の道管壁孔に見られるベスチャーや主に針葉樹仮道管内壁に現われるいぼ状層については、その特異な形態や分布について古くから注目されてきた。近年では走査型電顕 (SEM) などによって詳しく観察されるようになったが、これらの形成過程や成分については不明な点が多い。SCHUMID<sup>1)</sup> はベスチャーの形成過程に関する研究の中で、ベスチャーは主にペクチンの複合体であると述べている。また、CÔTÉら<sup>2)</sup> は試料を亜塩素酸ナトリウムで75°C、4時間処理し、包埋、薄切後に電顕観察した。その結果、リグニンに富む細胞間層は完全に除去されたが、いぼもベスチャーもあまり除去されなかったことから両者の成分の類似性を指摘した。これに対して、SCURFIELDら<sup>3)</sup> はセイタカユカリに種々の化学処理を行なった後、SEM でその表面構造を調べた。その結果、ベスチャーはフッ化水素酸でわずかに攻撃されるが、脱リグニン試薬によって分離、分解することからその主成分はリグニンであると結論した。WARDROPら<sup>4)</sup> はフトモ科の樹木のベスチャー壁孔を透過型電顕 (TEM) で観察した結果、ベスチャーは道管壁内表面から続く高電子密度の膜で内張りされており、この膜は紫外線を強く吸収し、過酢酸で除

去されたと述べている。OHTANI ら<sup>5)</sup> は20種の広葉樹についてベスチャーの出現状況、形態的差異をSEMで詳しく調べた。その中で予備観察として化学処理を行っており、ベスチャーはアルコール・ベンゼン抽出(24時間)では変化せず、亜硫酸ナトリウム処理(80℃, 5時間)でかなり分解し、過酢酸(90℃, 1.5時間)でほとんど分解したと述べている。

いぼ状層については、BAIRD ら<sup>6)</sup> がバルサムファーに化学処理、酵素処理、物理的処理、腐菌処理をした後、レプリカを作製してTEMで観察した。その結果、いぼ状層の大部分はリグニンであり、これに非セルロース性物質、おそらくペントサン、ペクチン物質を含んでいるのであろうと述べている。また、滝谷ら<sup>7)</sup> は主にいぼ状層の形成過程について調べたが、脱リグニン処理、アセトン処理によっていぼが分解、分離することから、リグニン様物質、フェノール系物質の存在を指摘している。

著者らが以前にベスチャー壁孔の発達過程について各種の染色切片像を観察した時に<sup>8)</sup> 成熟したベスチャーは過マンガン酸カリウム、PATAg<sup>9)</sup>、ルテニウムレッドで染色されることが確認できた。一般に、過マンガン酸カリウムはリグニン、PATAgは多糖類、ルテニウムレッドはペクチンをそれぞれ染色すると言われている。したがって、ベスチャーはリグニンに富んでおり、多糖類とペクチンも含むと推測できたが、染色反応だけの結果からはその化学成分は明確にできない。

以上の予備知識をもとに、今回は超薄切片の脱成分処理によってベスチャーといぼ状層の化学成分を調べた。前述したように、これまでに化学処理を用いた報告がいくつかあるが、それらは木材ブロックに脱成分処理し、これをSEM、あるいはそのレプリカをTEMで観察したものである。これに対して、連続的に切り出した超薄切片に各種の脱成分処理を行なってTEMで観察する方法<sup>10)</sup> は、試薬の浸透がより容易で反応が均等であると期待される。

この研究に進めるにあたり助力をいただいた林産工学科木材構造学研究室の各位、特に貴重な試料を提供していただいた滝谷恵子氏、実験方法について助言していただいた藤井智之氏に深謝の意を表す。なお、この報告の大部分は第30回、および第31回日本木材学会大会(昭和55年4月、京都、昭和56年4月、東京)で口頭発表した。

## 2. 試料と実験方法

ベスチャーの観察には、京大演習林上賀茂試験地と農学部グラウンドに生育中のハリエンジュ(*Robinia pseudoacacia* L.) とネムノキ(*Albizia julibrissin* DURAZZ)を用いた。春から夏にかけて、立木の幹から前年の晩材を含むブロックを採取し、ただちに3—6%グルタルアルデヒドで固定した。これらのブロックから当年輪を含む小ブロック(*ca.* 2mm×2mm×2mm)を作製し、1%四酸化オスミウム、あるいは、3%過マンガン酸カリウムで後固定してエポキシ包埋した。

いぼ状層の観察には、滝谷ら<sup>7)</sup> によって同様にエポキシ包埋されたコノテガシワ(*Thuja orientalis* L.)を用いた。

包埋試料からダイヤモンドナイフ装着のLKBウルトラミクロトームで木口超薄切片(*ca.* 100nm厚さ)を連続的に切り出し、ホルムバル支持膜をはったグリッドに載せてMayer法<sup>12)</sup>で脱包埋した。

つづいてTable 1に示した脱成分処理を行なった。使用するグリッドは試薬に対する抵抗性を調べて決定した。それぞれの処理は切片を載せたグリッドを試薬に浮かべて行なった。処理後の切片はTEM(JEM 100C, 加速電圧100KV)で観察した。

Table 1. Chemical treatments of ultrathin sections for selective removal of wall materials

Mayer's Sol.	Treatments				Pt-Pd Shadow	Grid Used
	NaClO <sub>2</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	KOH	HF		
*					*	Cu
*	*				*	Au
*			*		*	Cu
*	*		*		*	Au
*		*			*	Cu
*	*	*			*	Au
*		*	*		*	Cu
*					*	Cu
*				*		Mo
*				*	*	Mo

Mayer's solution: for removal of embedding epoxy medium  
 acidified NaClO<sub>2</sub>: 80°C, 1-4 hr. for delignification  
 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 80°C, 1-4 hr. for removal of pectic substances  
 24% KOH: room temp., 1 hr. for removal of hemicelluloses  
 55% HF: room temp., 8-43 hr. for removal of polysaccharides (lignin skeleton)  
 Treatments applied are marked by the symbol \*.

### 3. 結果と考察

ベスチャーは道管相互壁孔に多く見られるので、晩材部分の後期につくられる小道管群で観察した。ハリエンジュのベスチャーはネムノキほどの著しい発達は見られないが、その個々の大きさはネムノキより大きく、形は単純であった (Fig. 1)。そこで、各処理の結果はハリエンジュで比較した。一方、ネムノキでは道管壁内表面でもベスチャー様の突起が見られ<sup>9)</sup>、特に晩材の小径道管ではその発達が著しくなる (Fig. 2)。そこで、ネムノキについては壁孔に見られるベスチャーと壁内表面に見られるベスチャー様突起との処理効果を比較した。

Fig. 3と Fig. 4はそれぞれ、いぼ状層とベスチャーを過マンガン酸カリウムで染色したものである。ベスチャーもいぼ壁の他のどの部分よりも強く染色され、リグニンに富む構造であることが推定できた。しかし、過マンガン酸カリウムの染色反応については議論の余地もあるので<sup>12)</sup>、Table 1に示すように連続超薄切片を用いて脱成分処理による実験を進めた。観察結果は無処理のコントロール試料、また、組み合わせ処理の場合には前段階の処理の試料と比較しながら、処理によってベスチャーといぼ状層がどの程度まで分解除去されたかを調べた。また、細胞間層や二次壁各層とも比較しながら処理効果を判断した。

これらの処理によって得られた結果を Table 2 と Table 3 に要約し、さらにそれぞれの処理の特徴について以下に述べる。

**亜塩素酸ナトリウムによる脱リグニン処理<sup>13)</sup>** ハリエンジュの場合、1時間処理では道管二次壁や道管相互間の細胞間層にはあまり効果が見られなかった。ところが、4時間に延長すると道管の二次壁と細胞間層においてかなりの成分流出が認められた。ベスチャーでは成分流出による蝕刻の程度が道管二次壁よりも進んだが、完全に消失することはなく、元の形をとどめて残存した (Fig. 5)。コノテガシワでは、2時間処理で細胞間層、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>が蝕刻され始め、5時間処理ではフィブリル状のS<sub>2</sub>とノン・フィブリルのいぼ状突起との境界が明らかになった (Fig. 6)。こ

Table 2. Effects of removal treatments of cell wall components in *Robinia pseudoacacia* L.

de-component treatments	vestures	IL	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
NaClO <sub>2</sub>	++	+++	+	+	+
KOH	++	—	+	+	+
NaClO <sub>2</sub> -KOH	++++	+++	++	++	++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	+	—	—	—	—
NaClO <sub>2</sub> -(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	++	+++	+	+	+
HF	—	—	++	++	++

Notes: IL : intercellular layer  
 S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>: secondary wall layers  
 ++++ : completely removed  
 +++ : remarkably removed  
 ++ : moderately removed  
 + : slightly removed  
 — : almost unchanged

Table 3. Effects of removal treatments of cell wall components in *Thuja orientalis* L.

de-component treatments	warts	IL	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>
NaClO <sub>2</sub>	++	+++	+	+	+
KOH	+	—	+	++	++
NaClO <sub>2</sub> -KOH	++++	+++	++	++	++
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	—	—	—	—	—
NaClO <sub>2</sub> -(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	—	++	—	—	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -KOH	+	—	+	+	+
HF	—	—	++	++	++

の結果は、脱リグニンによっていぼ状層が消失するという滝谷ら<sup>7)</sup>の観察結果と相違するが、これは、切片処理法ではいぼのはがれ落ちによるアーティファクトのないことに起因すると思われる。

**水酸化カリウムによる脱ヘミセルロース処理** ハリエンジュではベスチャーの蝕刻が壁の他の部分より進んだ。特にベスチャーの基部の分解の進む場合がしばしば見られた (Fig. 7)。コノテガシワではS<sub>3</sub>の蝕刻が進んだ。その結果、いぼ状層は浮き出て見えるようになった (Fig. 8)。

以上のように、脱リグニン、脱ヘミセルロースの各単独処理は、ともにベスチャー、いぼ状層の成分の一部を溶出させただけである。ところが、両処理を組み合わせると、ベスチャーもいぼ状層も二次壁から完全に除去された。したがって、ベスチャーもいぼ状層も主成分はリグニンとヘミセルロースであると考えられる。

**シュウ酸アンモニウムによる脱ペクチン処理** 2時間処理するとベスチャーは二次壁よりも蝕刻されたが全体にあまり効果はなかった。ところが、あらかじめ、脱リグニン処理を1時間行なっておくと、続いて1時間、脱ペクチン処理を行なうだけでベスチャーはかなり蝕刻され、細胞間層はさらに激しく蝕刻された (Fig. 9)。したがって、リグニンやヘミセルロース程には多くはないが、ベスチャーにペクチンが存在すると思われる。

いぼ状層については、脱ペクチンの単独処理も脱リグニンとの組み合わせ処理もあまり効果が

見られなかった。したがって、いぼ状層にはペクチンはあまり存在しないと判断できる。また、脱ペクチン、脱ヘミセルロースの組み合わせ処理で、 $S_3$ が流出したために浮き出て見えるいぼ状層が、いぼの突起部分と $S_3$ の内側全面にある薄い層とに分かれて見えることがあった (Fig. 10)。この $S_3$ の内側の層はいぼの突起部を内側からおおうのではなく、いぼがこの層の上に載っているように見えた。

**フッ化水素酸による脱多糖類処理** この手法では処理の効果を正確に検定するためシャドウイングを行わず、コントロール試料も脱包埋しただけのものを用いた。Fig. 11 はネムノキの脱多糖類処理の写真である。道管の二次壁部分は多糖類が除去されて典型的な二次壁のリグニンスケルトンになったが、ベスチャーには多糖類が除去された形跡が二次壁ほど明らかではない。

Fig. 12 はコノテガシワの脱多糖類処理の写真である。ベスチャーと同様、いぼには多糖類が除かれた跡が見られず、"density"は低下しなかった。

以上に述べた各処理の結果から考えて、ベスチャーの主成分はリグニンとヘミセルロースであり、ペクチンが少量存在すると判断できる。ベスチャーが、フッ化水素酸による脱多糖類処理でノン・ポーラスであったこと、種々の処理を通してノン・フィブリルであったことから、ベスチャーにはフィブリル状のセルロースは存在しないと判断できる。

一方いぼ状層も主成分はリグニンとヘミセルロースであり、ヘミセルロースはリグニンでマスクされていると考えられる。ペクチンはあまり含まれず、フィブリル状のセルロースも存在しない。

ネムノキの道管壁内表面に散在するベスチャー様突起については、すべての処理に対して壁孔に見られるベスチャーと同様の処理効果を示した。また、この内表面の突起は、早材道管ではいぼ状の単純な形であるが、晩材では分岐した複雑な形となり壁孔に見られるベスチャーとの見分けがつかなくなる (Fig. 2)。したがって、化学組成と形状の類似性から、両者をまとめてネムノキのベスチャーと言える。

いぼ状層とベスチャーとを比較すると、特に脱リグニン処理に対する抵抗性が、ベスチャーよりいぼ状層の方が大きかった。また、ベスチャーと二次壁とは異質で、処理によって容易に境界が見られたが、いぼ状層では、脱ヘミセルロース処理を除いて、 $S_3$ との境界のはっきりする場合が少なかった。

最後に、脱包埋剤である Mayer 液の切片に及ぼす影響を調べるために木粉の重量減少を測定したのでその結果を示す。ハリエンジュ、コノテガシワの木粉 (60—80mesh) 約 1 g をガラスフィルター上で、Mayer 液原液 (10分)、ベンゼン・メタノール (15分)、アセトン (15分×2)、酢酸 (15分×2)、蒸留水洗浄の手順で処理し、処理前、処理後の木粉の全乾重量を測定した。その結果、重量減少量の処理前の重量に対する比を求めると、ハリエンジュで 3—4%、コノテガシワで 2—3%であった。この程度の減少ではシャドウイング像に及ぼす影響は少ないと判断できるが、アルカリ抽出の可能性があるのでさらに検討する必要がある。

## 引用文献

- 1) SCHUMID, R.: The fine structure of pits in hardwoods, in "Cellular Ultrastructure of Woody Plants", Syracuse Univ. Press, Syracuse, N. Y., 291-304 (1965)
- 2) CÔTÉ, W. A. and A. C. DAY: Vestured pits — Fine structure and apparent relationship with warts, Tappi, 45 (12), 906-910 (1962)
- 3) SCURFIELD, G. and S. R. SILVA: The vestured pits of *Eucalyptus regnans* F. Muell.: a study using scanning electron microscopy, Bot. J. Linn. Soc., 63 (4), 313-320 (1970)

- 4) WARDROP, A. B., W. LIESE and G. W. DAVIES: The nature of the wart structure in conifer tracheides, *Holzforschung*, **13**, 115-120 (1959)
- 5) OHTANI, J. and S. ISHIDA: Study on the pits of wood cells using scanning electron microscopy, Report 5. Vestured pits in Japanese dicotyledonous woods, Res. Bull. College Exp. For., Hokkaido Univ. **33** (2), 407-436 (1976)
- 6) BAIRD, W. M., M. A. JOHNSON and R. A. PARHAM: Development and composition of the warty layer in Balsam fir. II. Composition, *Wood and Fiber*, **6** (2), 211-222 (1974)
- 7) 滝谷恵子・原田浩・佐伯浩: 針葉樹仮道管におけるいぼ状構造の形成, *京大演報*, **48**, 187-191 (1976)
- 8) 森奈々子: ベスチャード壁孔の形成と構造, *京大農学部修士論文* (1978)
- 9) THIÉRY J. P.: Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique, *J. Microscopie*, **6**, 987-1018 (1967)
- 10) FUJII, T., H. HARADA and H. SAIKI: Ultrastructure of "Amorphous layer" in xylem parenchyma cell wall of angiosperm species, *Mokuzai Gakkaishi*, **27** (3), 149-156 (1981)
- 11) MAYER, H.D., J. C. HAMPTON and B. ROSARIO: A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue, *J. Biophys. and Biochem. Cytol.*, **9**, 909-910 (1961)
- 12) HOFFMANN, P. and N. PARAMESWARAN: On the ultrastructural localization of hemicellulose within delignified tracheid of spruce, *Holzforschung*, **30** (2), 62-70 (1976)
- 13) WISE L. E., M. MURPHY and A. A. D'ADDIECO: Chlorite holocellulose, Its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses, *Tappi Section*, 11-19 (1946)

### Résumé

Chemical compositions of vestures and warts were examined by means of de-component treatments of the ultrathin sections. The current year wood blocks of *Robinia pseudoacacia* L., and *Albizia julibrissin* Durazz., which were offered for the examination of vestures, and *Thuja orientalis* L. for the warts were embedded in epoxy resin after the GA-OsO<sub>4</sub> or GA-KMnO<sub>4</sub> fixations. Transverse sections of ca. 100nm thick were sliced successively from the specimen block and the main part of them were washed with several reagents for removal of cell wall components after the de-embedding of epoxy resin<sup>1)</sup> (Table 1), and the rest was post-stained with lead citrate. The effects of these de-component treatments were examined under TEM, and summarized in Tables 2 and 3.

(1) Both vestures and warts were etched moderately by the treatment of either NaClO<sub>2</sub> or KOH (Figs. 5, 6, 7, 8), whereas they were removed completely by the combined treatment of them. Therefore, the main components of vestures and warts are thought to be lignin and hemicelluloses.

(2) Since the vestures were removed moderately by the treatment of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> after NaClO<sub>2</sub> (Fig. 9), a small amount of pectic substances are thought to be contained in vestures. On the contrary, such effects were not observed in warts.

(3) After the treatments of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-KOH, "warts" and "warty membrane" were discerned in the warty layer (Fig. 10). The warts were not covered with the membrane, but they simply adhered to it.

(4) The density of the vestures and the warts was almost unchanged by the HF treatment, and porous structure observed in the secondary wall was not detected in the vestures (Figs. 11, 12). Based on the observations, it was concluded that the fibrillar cellulose does not exist in the vestures and the warts.

(5) As to the vesture-like projections on the lumen surface in *Albizia* vessel, the same effect as the vestures were noticed. Judging from their morphological resemblance (Fig. 2) and the similarity in chemical components, the projection also can be called a "vesture".

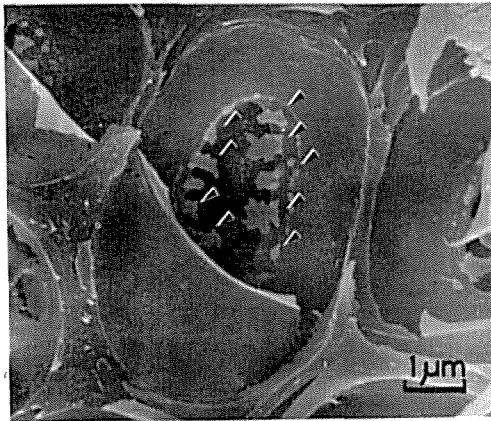


Fig. 1 *Robinia pseudoacacia*. Scanning electron micrograph of vestures (arrows).

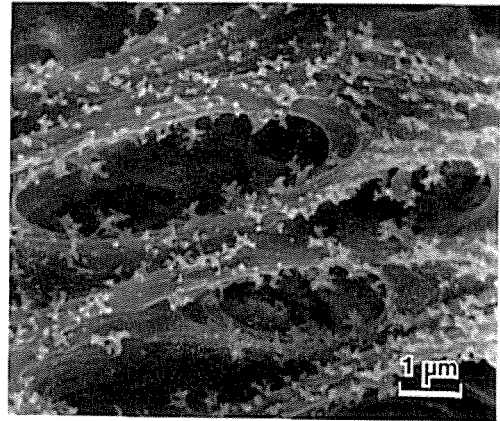


Fig. 2 *Albizia julibrissin*. Late wood. Scanning electron micrograph of vestured pits and vesture-like projections of the inner surface of a vessel wall.

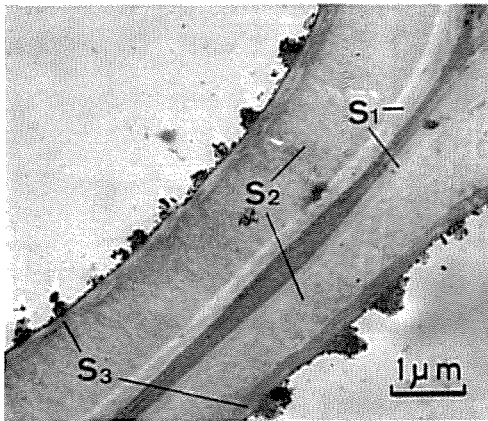


Fig. 3 *Thuja orientalis*. GA-KMnO<sub>4</sub> fixed and Pb stained. Lots of large warts and membranes which are stained intensely are seen on the inner surface of tracheid walls.

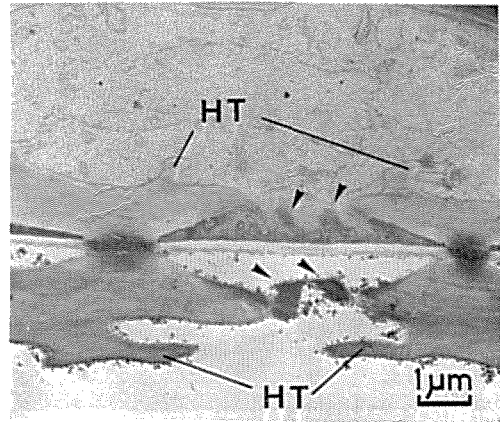


Fig. 4 *Robinia pseudoacacia*. GA-KMnO<sub>4</sub> fixed and Pb stained. Cell organelles are still discerned in an upper vessel, but the cytoplasm disappears in a lower vessel and the vestures are stained more intensely than the secondary wall.

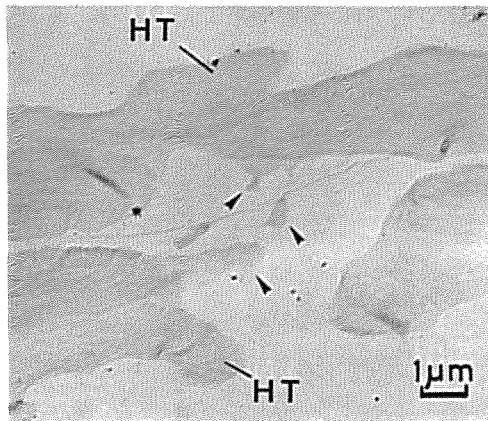


Fig. 5 *Robinia pseudoacacia*. NaClO<sub>2</sub> for 4 hr. Vestures (arrows) are removed considerably as compared with the secondary wall.

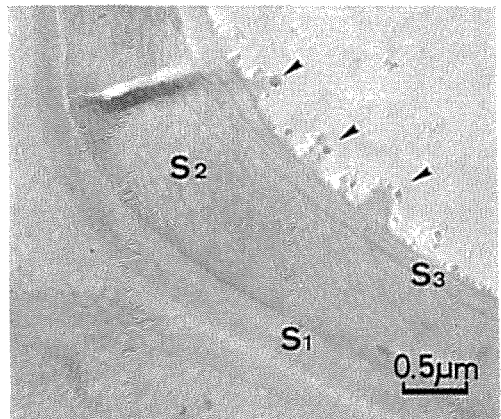


Fig. 6 *Thuja orientalis*. NaClO<sub>2</sub> for 5 hr. The fibrillar texture is seen at the secondary wall, whereas warts are non-fibrillar.

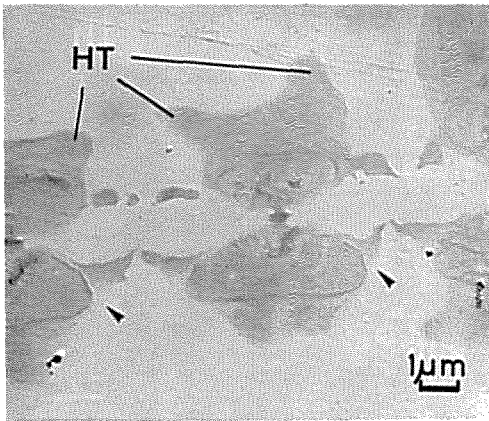


Fig. 7 *Robinia pseudoacacia*. KOH for 1 hr. The base part of vestures (arrows), where the vestures are adjacent to the pit border, is often removed selectively.

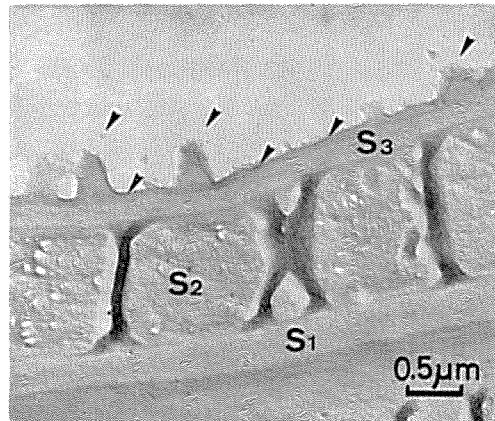


Fig. 8 *Thuja orientalis*. KOH for 1 hr.  $S_3$  is removed moderately, so the warty layer (warts and warty membrane) becomes relieved (arrows).

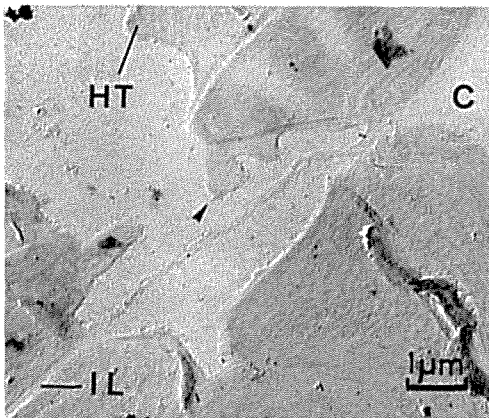


Fig. 9 *Robinia pseudoacacia*.  $\text{NaClO}_2$  for 1 hr.  $-(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  for 1 hr. An intercellular layer (IL) and a cell corner (C) are removed remarkably, and vestures are also removed as compared with the secondary wall (arrow).

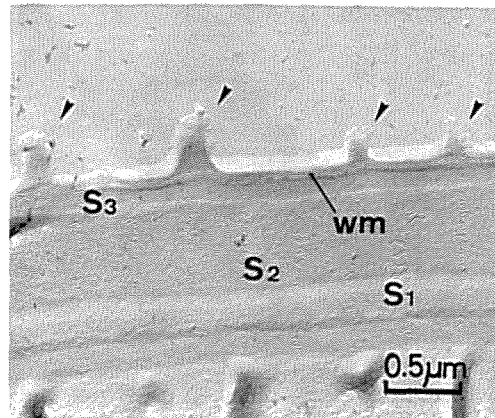


Fig. 10 *Thuja orientalis*.  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$  for 1 hr.  $-\text{KOH}$  for 1 hr. "Warts (arrows)" and "warty membrane (wm)" can be distinguished in a warty layer. Warts simply adhered to the warty membrane.

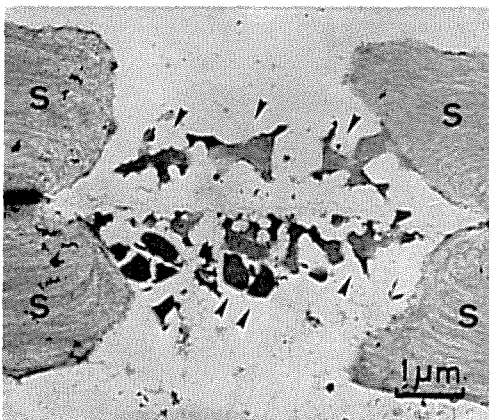


Fig. 11 *Albizia julibrissin*. HF for 18 hr. Non-shadow-casting. Secondary walls become porous, while vestures (arrows) are still non-porous.

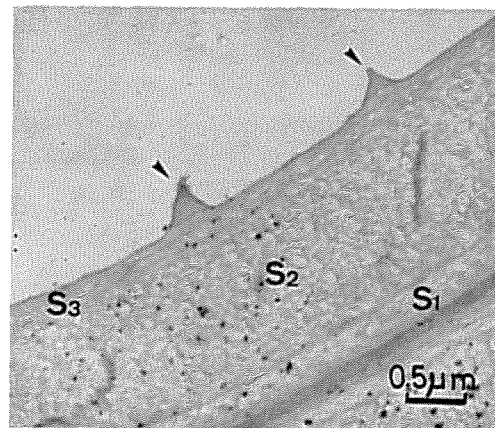


Fig. 12 *Thuja orientalis*. HF for 35 hr. Non-shadow-casting. Secondary walls become porous, while warts (arrows) are non-porous. The warts and the intercellular layer keep "high electron density".