

顕微分光測光法によるスギ心材形成過程の観察

宮本 卓郎・藤田 稔・佐伯 浩

Heartwood Formation Traced by the Microscopic
Spectrophotometry in Cryptomeria

Takuro MİYAMOTO, Minoru FUJITA and Hiroshi SAIKI

要 旨

スギ立木から11月に採取した白線帯と心材部分について、切片の作製法や測光法に検討を加えることにより、放射および軸方向の柔細胞に保有されている内容物や、仮道管内腔に見られる油滴状物質の分光測光を可能とした。

そして、白線帯の放射柔細胞の液胞や仮道管内腔の油滴状物質中に、心材成分もしくはその前駆物質の生成を示すと考えられる紫外域の吸収が検出された。そしてこれらが濃く着色するにつれて、吸収極大が長波長側へとシフトすることが明らかとなった。一方、無染色切片の紫外域探査の困難さを軽減するために染色法が顕微分光測光法に導入され、これによって心材化に伴う油滴状物質中の脂質の減少を検出することができた。

1. 緒 言

心材形成は樹木に特有の現象であり、これによって木材に耐久性や美しい色調が付与される。それゆえに心材成分の特徴や、辺材から心材に移行する領域での細胞の変化、すなわち柔細胞の内容物の変化や仮道管への分泌¹⁾、そして道管へのチロースの膨出など²⁾について従来から研究が進められてきた。細胞壁を構築する主要成分とは異なり、心材成分は量的にはわずかでありかつポリフェノールやテルペンなど多様な化学物質の混合物からなる³⁾。そしてこれら心材成分の有効な染色法も限られている。それゆえに心材成分形成過程を化学的にも顕微鏡的にも研究するのが容易ではなくいまだ不明の点が多い。そしてまた心材形成は樹幹の内部深くで進行することから、心材を形成中の試料を的確に採取することも困難であった。しかしこの点については柔細胞から道管内腔へのチロースの発達時期の観察や²⁾、放射柔細胞の着色進行状況の観察から⁴⁾、心材形成が秋期に活発に進行することが明らかにされ、試料採取における問題点が解決された。

一方、心材成分の多くはリグニンと同様に分子内に炭素間の二重結合を有し紫外線を吸収する。この特性は、微細レベルで化学成分を同定し、その分布を定量解析するために開発された顕微分光測光法が、心材成分の分布や堆積過程の研究にも適用できることを意味する。そしてこの方法はリグニン分布の微細レベルの研究に応用され多くの成果をもたらしたが⁵⁾、心材形成過程にはごく一部の例を除いて未だ活用されていない^{6,7)}。これは細胞壁に多量に含まれているリグニンが分光分析の光路に割り込んでくるために、心材成分だけの解析が困難となることや、明瞭な形態を持たない心材成分の紫外域での検索が現実的には大変煩雑なことによる。

そこで本報では心材形成過程に顕微分光測光法を有効に適用するために、上記のような実験上の問題点を整理し、改善を試みると共に、スギの心材成分の具体的な検出と、形成過程での変化を追跡した。

2. 材料と方法

供試材料としては日本の代表的な針葉樹であり、心材形成過程がこれまでも研究されてきたスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don.) を選んだ。そして京大芦生演習林に植栽されている32年生の智頭スギ(胸高直径, 19.2 cm) を、心材形成活動の盛んな11月に伐木し、胸高部位から円板を切り出し、その着色の違いから辺材、白線帯、心材の境界を定め、ただちに3%グルタルアルデヒド固定した。そして滑走式マイクロトームにより種々の切片を作製し検鏡した。一部の切片は、ニールブルー硫酸塩(ニールブルーA)の飽和水溶液に20分間浸し、水洗後1%酢酸で弁色、水洗し、ニールブルー染色切片とした。

分光分析には顕微分光光度計(カールツェイス社製UMSP 80)と分光分析用ソフトウェア“ラムダスキャン”を使用した。光学系には石英製のレンズ類とスライドガラス・カバーガラスを使用した。そして対物レンズと中間レンズにより拡大された結像面に挿入される円形の測光絞りを通過する光量を計測した。この測光絞りが試料面に投影されると、より微小領域の測光絞りを結び、これによって試料面の特定の場所を探索した。

測定は無染色切片と同様に、ニールブルー染色後の切片も使用して行い、染色法導入の有用性についても検討した。

測定波長範囲は250~700 nm、波長ステップ1 nm、モノクロメータのスリット幅は5 nmとした。

3. 結果と考察

3.1 心材成分の紫外域探索のための実験条件の検討

心材成分は木化した(リグニンを多く含む)細胞壁に沈着する。リグニンは280 nm付近を中心として紫外域に大きな吸収極大を持っているので、通常の切片における紫外域観察では細胞壁リグニンの吸収と心材成分の吸収が重なり合ってしまう。この場合にリグニンは心材成分よりも量的にずっと多いので、紫外域における心材成分自体の分光分析はおろか、それ自体の検出も困難となろう。そこで紫外域の探索には、リグニンの影響を除外する工夫、すなわち測光光路に細胞壁を入れない実験法が要求される。

これまでの研究から、スギにおける心材形成には放射柔細胞の役割が注目され、この観察には通常の20 μm程度の厚さのまま目切片が多く用いられてきた。このまま目切片は作製が容易で、辺材から心材に至る広い面積にわたり、放射柔細胞や軸方向柔細胞、そして仮道管内部を同時に観察できる点で大変好都合である(Fig. 1 A)。さらに細胞の内容物は多くの場合それぞれの細胞壁に包まれているので、切片作製時や各種の染色処理の際にも流出の危険性が少ない。しかしながらこのまま目切片では、検鏡の際に柔細胞や仮道管の細胞壁が光路の測光絞り領域の全面にわたり挿入されることになり、リグニンの影響が避けられないという致命的欠陥を持つ。

そこで細胞内腔部分だけを透かし見るには、それぞれの細胞を横断する切片を作製する必要がある。具体的には、仮道管と軸方向柔細胞の内腔の観察には木口切片を、放射柔細胞内腔観察には板目切片を作製することによりこの問題を解決した(Fig. 1 B, C)。

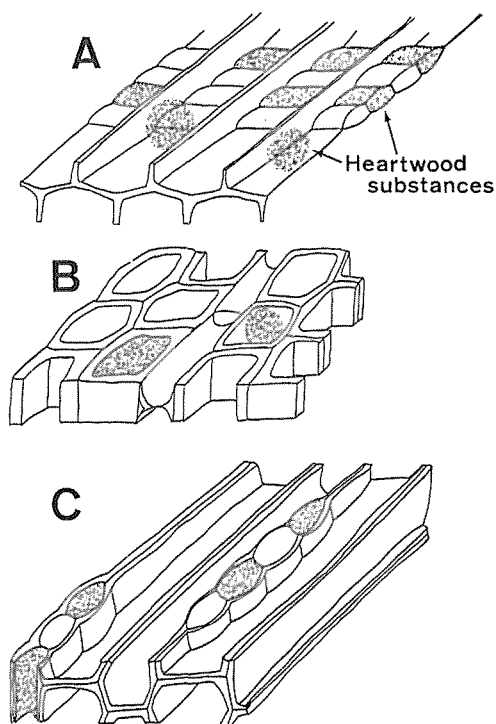


Fig. 1 Heartwood substances (dotted) in tracheids, ray- and axial-parenchyma cells, and their distribution in the ordinary thickness sections. Although overall distribution of heartwood substances can be observed in radial section (A), UV-spectrums on these substances are disturbed inevitably by the lignin absorption contained in cell walls enclosing the cell lumen. The lumen areas of tracheids and axial parenchyma cells, and also that of ray parenchyma cells, are exposed on the cross section (B) and the tangential section (C).

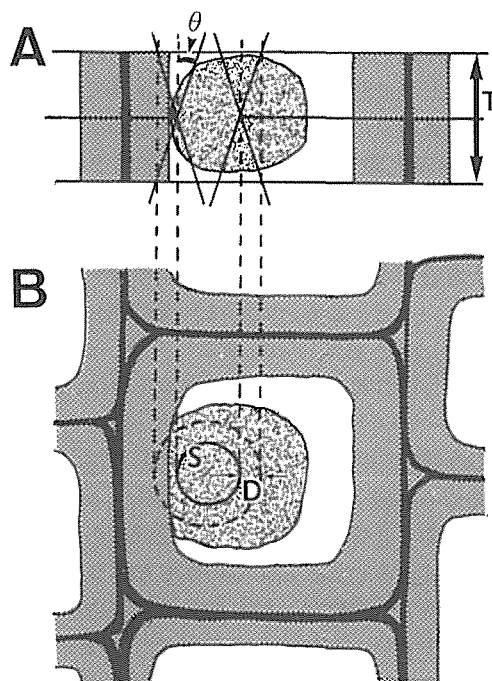


Fig. 2 Cross (A) and face (B) views of the ray path under the non-parallel illumination and the focalized spot-image (S) of a photometric diaphragm in the section. As non-parallel rays concentrated on the spot-image are expanded wider than the area at upper and lower position in a thick section (A, B), so cell walls containing lignin must not be allowed to come near the spot-image. Expanding radius (D) from the spot-image can be calculated by the section thickness (T) and the numerical aperture. θ : angular aperture.

しかしながらここで注意を要することは、顕微分光測光は平行光束で測定されるのではなく、大きな開口角を持つ非平行光束で実施されることである (Fig. 2)。この場合に測光絞り像内の領域はもちろん、これに近接した位置に強い吸収成分 (本研究ではリグニンを含む細胞壁) があると、光軸から離れた位置の光は細胞壁とは無関係に見えても実際には一部の光が細胞壁を通過している危険性がある。そこで検鏡できる絞り像自体の範囲に加えて、測光絞りを実際に通過する光の拡がりの領域 (これを測光領域と呼ぶことにする) を求めておくことが必要となる。これは対物レンズおよびコンデンサーレンズの開口数の小さい方の値と切片の厚さ、測光絞り像の焦点位置に支配されるので、この領域を把握しておくことが定量解析に重要な鍵となる。そこで切片の厚み方向の中央に絞り像を結んだ場合を想定してこれを算出し Fig. 3 に示した。この図では光の拡がりの範囲は円形の測光絞り像のエッジからの距離として表示されている。例えば 20 μm 厚さの切片で開口数 0.3 (開口角 11.9 度) の条件のもとに切片厚さの中央に絞り像を合わせ

ると、測光領域は測光絞りよりも半径で約 2.1 μm 大きくなる。焦点が切片中央からずれると、測光領域はさらに拡大する。すなわち細胞壁の影響を完全に防止するためには、計算の結果からは測光絞りのエッジを細胞壁から少なくとも 2.1 μm 以上離して測定する必要がある。このような理論上の値を参考にしながら、細胞壁の実際の影響を調べた。すなわち木口切片において仮道管の内腔側から、円形の絞り像を壁に近づけていったところ、実際に影響が現れるのは Fig. 3 に示されている距離よりも小さかった。このように計算値と測定値が異なるのは、測光領域の一端が強い吸収を持つ細胞で遮られても、その面積が領域全体のごく一部であれば、他の大部分の面積の情報が実際には優先することや、光路の中で光軸付近の光線量が周縁のそれよりも実際には多いことによるのかも知れない。実験を遂行する際には、絞り像のエッジに細胞壁が接する場合でも、細胞壁の影響が無視できる状態が望ましいことになる。本研究で主として用いた 20 μm 厚さの切片と 6.2 μm 直径の円形測光絞り像を利用して仮道管内腔を検索する場合には、32 倍対物レンズを使用して開口数 0.3 に調整すると、この条件がほぼ満足できた。そして、より微細レベルの検索には切片の厚さを小さくする必要があろう。筆者らがこれまで用いてきた樹脂包埋法とガラスナイフを活用すれば、きわめて薄い切片を得ることは容易ではあるが²⁰⁾、心材成分およびその前駆成分が包埋操作の途中で流失する危険性があるので今回は利用していない。仮道管に比して細胞寸法の小さい放射柔細胞内腔の検索には、より薄い 10 μm 以下の厚さの切片が望ましい。仮道管が大きいスギでは 20 μm 以下の厚さの板目切片を作製すると、切片がばらばらに分散してしまうので、今回はくさび状の板目切片を作製することによりこの問題を解決した。

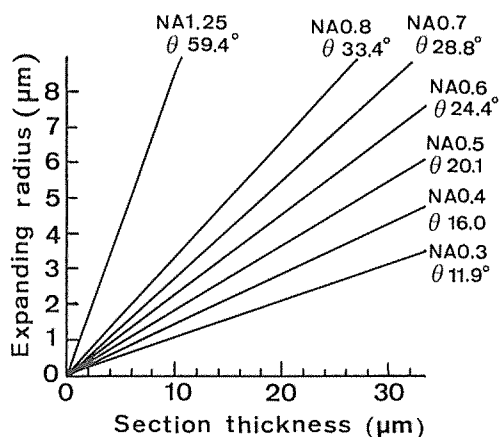


Fig. 3 Relations between the expanding radius (D) and section thickness (T) under the condition that the spot-image was focalized at the central depth of the section in several numerical aperture (NA). θ : angular aperture.

3. 2 心材形成過程における心材成分分布の追跡

上記のような切片作製法や測定条件の検討のもとに、白線帯の最内層の年輪部、そのすぐ内側の心材第1年輪部、そしてさらに内側の心材数年輪部について放射柔細胞、軸方向柔細胞、仮道管の内腔を検索し、分光分析した。まず検索が容易な着色している部分に測光絞り像を合わせて紫外一可視域を分光分析した (Fig. 4)。ここで注目されるのは、着色の程度によって紫外域での吸収極大が異なったことである。かすかに着色している部分では 290—300 nm に吸収極大を示すが、黄褐色に着色している部分では 300—320 nm、そして濃い赤褐色の部分では 320—360 nm と吸収極大が長波長側へとシフトしていることが注目される。濃く着色した部分では可視域でもいくつかのショルダーを示しているが、明瞭な吸収極大を見いだすには至らなかった。

つづいて、着色を示さない部分について紫外域で分光分析を実施した。この場合には場所の選定が大変困難となるが、放射および軸方向の柔細胞については液胞と思われる部分を、仮道管内腔については屈折率の変化により心材成分が集合しているかに見える部分 (油滴状物質) を多数選び、そして実際に吸収が認められた場合の結果を Fig. 5 に示した。但し、この吸収スペクトルは、3 から 9 箇所スペクトルを平均した。

白線帯から心材へと各部分での吸収スペクトルを比較していくと、白線帯の放射柔細胞液胞では吸収のピークが275—280 nmであり、心材に入るとすこし長波長側に変化し285 nm付近となっている。仮道管内腔の油滴状物質については、白線帯では非常になだらかな吸収を示し、295 nm付近にかすかな吸収極大を持つ。心材部では290—300 nmの範囲に吸収極大を持ち、長波長側での吸収の減少が著しい。野淵らは仮道管内腔の油滴状物質が放射柔細胞から分泌され、この油滴状物質に心材成分の前駆物質が含まれている可能性を指摘した¹⁾。また、スギ心材中より、スギレジノール、ヒドロキンスギレジノール、セクイリンCらの心材フェノール成分が単離同定されており⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、それらの紫外域吸収の最大吸収波長は290—300 nmである。これらを参考にすると油滴状物質にやはり心材成分が含まれていると考えられる。

3. 3 染色切片の紫外—可視域探査

紫外域での顕微鏡観察は石英光学系を必須とすることや、得られた顕微鏡像を可視域に変換しなければ実際には観察できないことなど、種々の実験上の問題が付きまとう。例えば前項に述べたように、可視域で着色していない油滴状物質などでは、そのままでは目的とする物質自体を捜し出すことが容易ではない。そこでこれまでに試みられてきた染色法を、紫外—可視域分光分析と組み合わせることにより、心材成分の分布とその代謝過程の追跡を可視域で探査する方法を試みた。

心材成分に特異的な染色法はこれまでも報告されてはいるが、野淵らは白線帯の放射柔細胞から仮道管内腔に分泌される油滴状物質がナイルブルーによって赤色を呈することを見いだした¹¹⁾¹³⁾。このように染色処理によって、可視域での心材成分の分布が検索できると、紫外域だけの検索における極めて煩わしい作業が著しく軽減される。そこでまず木口切片をナイルブルー染色し、発色した油滴状物質を、白線帯から心材内部にかけて仮道管内腔に探しだし、紫外—可視域で分光分析した (Fig. 6)。この場合、白線帯では油滴状物質は鮮やかな赤色を帯びていたが、心材部になると桃色となり、心材のさらに内部ではかすかに帯色するのみであった。ここで注目されるのは、染色された油滴状物質が紫外域では290—300 nm付近に吸収極大

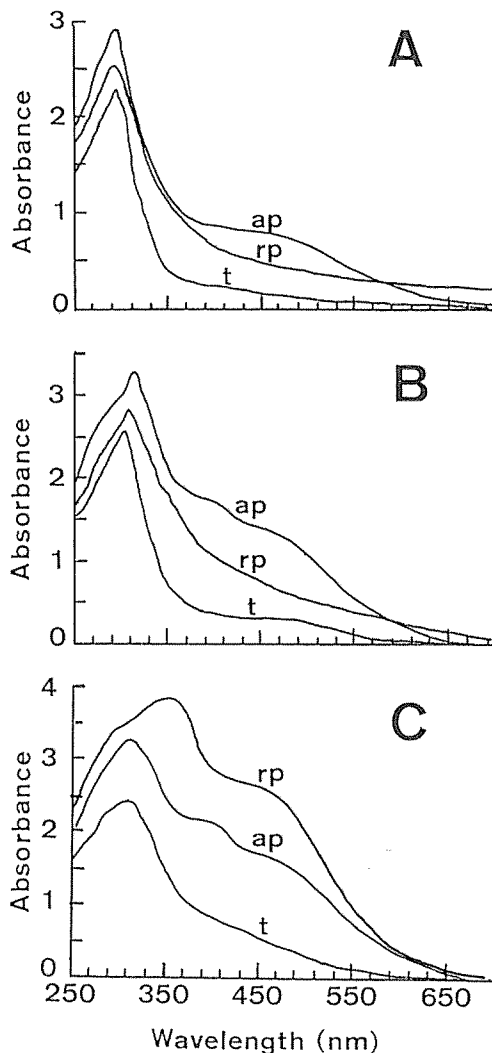


Fig. 4 Absorption spectra on heartwood substances of slight brown (A), orange brown (B) and dense reddish brown (C) contained in the lumens of tracheids (t) and ray- and axial-parenchyma cells (rp, ap). Maximum absorption in the ultraviolet spectrum is shifted from 290 nm to 360 nm in relation to the density of the brown color.

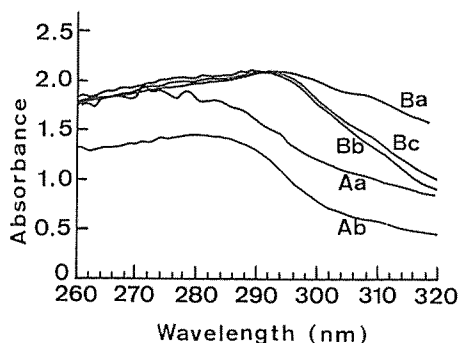


Fig. 5 Absorption spectra on colorless vacuoles on ray parenchyma cells (A) and droplet-like materials in tracheid lumens (B). Each spectrum was the average of some spectrums which were measured in the same tissue. (a), (b) and (c) represent those in innermost ring in white zone, outermost and second outermost rings in heartwood, respectively.

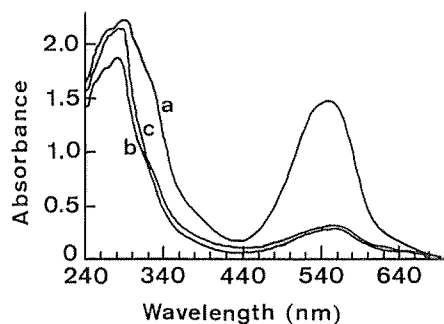


Fig. 6 Absorption spectra on droplet-like materials contained in tracheid lumens stained by Nile blue. The absorption around 540 nm decreased in relation to the heartwood formation, while those at 280-300 nm persisted. (a), (b) and (c) express annual rings in the same way with Fig. 5.

(λ_{max}) を、可視光域では 540 から 550 nm 付近に明瞭な吸収極大を示すことであろう。

このナイルブルーは本来、中性脂質を赤色に染めるものであり¹⁴⁾、心材成分との関係は不明であるが、紫外域における 290 nm 付近の吸収は油滴状物質中における心材成分の存在を、可視域の 540 nm のそれは中性脂質が同時に含まれていることを示唆する。そして後者の吸収が白線帯から心材内部へと明らかに低下することは、油滴状物質の変質、すなわち中性脂質の減少を示すものであろう。ここで重要な検討課題は、心材成分本来の紫外域における吸収スペクトルが、この染色処理により変化している危険性であろう。そこで染色処理前に特定の油滴状物質を選んであらかじめ吸収スペクトルを得たのち、染色処理して同じ場所での分光分析を試みた。しかしながらすでに測定した箇所では染色処理の操作中に油滴状物質の多くが流失した。このため同一場所での染色処理前後の比較ができなかった。これは紫外線照射によって油滴状物質が変性分解され、流失しやすくなったことを意味するのかもしれない。このような紫外線の影響の可能性については今後さらに検討する必要があるであろう。本報では、染色処理前の油滴状物質 9 箇所と染色処理後の 9 箇所を心材第 1 年輪より無作為に選び吸収スペクトルを比較した。その結果、吸収極大は 279—296 nm まで多岐にわたるが、これら 2 種のグループのスペクトル間に特に差異は認められなかった。そこでこのナイルブルー染色の場合には、染色後の切片でも紫外域と可視域の両者での吸光分析が可能であると考えられる。このような染色法の導入は心材形成過程の実際の検索に大変有益であろう。また他の成分やその染色法についても同様の検討を進めると、顕微分光測光法の応用範囲がさらに広がるであろう。

引用文献

- 1) 野淵 正: 心材形成. 木材工業, 41(4), 155-160, 1986
- 2) FUJITA, M., NAKAGAWA, K., MORI, N., and HARADA, H.: The season of tylosis development and changes in parenchyma cell structure in *Robinia pseudoacasia* L.. Bulletin of the Kyoto University Forests. 50, 183-190, 1978

- 3) HILLS, W.E.: Type of extractives. Heartwood and Tree Exudates. Springer-Verlag, Berlin. pp 95-105, 1987
- 4) NOBUCHI, T., KURODA, K., IWATA, R. and HARADA, H.: Cytological Study of the Seasonal Features of Heartwood Formation of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don.). Mokuzaï Gakkaishi. 28 (11), 669-676, 1982
- 5) FERGUS, B.J. and GORING, D.A.I.: The Location of Guaiacyl and Syringyl Lignins in Birch Xylem Tissue. Holzforschung. 24. 113-117, 1970
- 6) BAUCH, J., SCHWEERS, W. and BERNDT, H.: Lignification during Heartwood Formation-Comparative Study of Rays and Bordered Pit Membranes in Coniferous Wood. Holzforschung. 28. 86-91, 1974
- 7) KURODA, H. and SHIMAJI, K.: Distribution of Coloring Substances in Sugi Heartwood. Holzforschung. 37. 225-230, 1983
- 8) 串田 弘: 超薄切片法. 文光堂. 東京. pp 63-154, 1971
- 9) 船岡浩二・黒田義正・甲斐勇二・近藤民雄: スギ材のフェノール成分 (第1報) フェノールの分離と2, 3の性質. 木材学会誌. 9 (4). 139-141, 1963
- 10) 柴田洋一・甲斐勇二・近藤民雄: スギ材のフェノール成分 (第2報) S(1)及びS(2)の定量法について. 木材学会誌. 9 (4). 142-145, 1963
- 11) KAI, Y.: On the Phenolic Constituents from *Cryptomeria japonica* D. Don. III. The Structure of Sugi-resinol. Mokuzaï Gakkaishi. 11 (1), 23-26, 1965
- 12) TAKAHASHI, K.: Heartwood Phenols and Their Significance to Color in *Cryptomeria japonica* D. Don.. Mokuzaï Gakkaishi. 27 (8). 654-657, 1981
- 13) NOBUCHI, T. and HARADA, H.: Physiological Features of the "White Zone" of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don.) -Cytological Structure and Moisture Content. Mokuzaï Gakkaishi. 29 (12). 824-832, 1983
- 14) LILLIE, R.D.: Biological Stains. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. pp 287-288, 1969

Résumé

Heartwood formation was investigated in SUGI (*Cryptomeria japonica*) by an UV-VIS microscopic spectrophotometry. It is a very severe problem in spectroscopic detection of heartwood substances and its precursors to prevent the influence of lignin contained in cell walls which has strong UV absorption, because these substances are generally enclosed with cell walls. In order to analyze the distribution of these substance, in white zone and outer part of heartwood without the lignin affection, sections were chosen to survey only the cell lumen (Fig. 1), and also photometric condition under the non-parallel illumination was examined (Figs. 2, 3).

Colored substances in the heartwood were measured in UV-VIS region, maximum absorption was shown to be shifted from 290 nm to 360 nm according to the density (Fig. 4). The UV spectrums of colorless vacuoles of ray parenchyma cells and droplet-like structure in tracheid lumens were measured, and some maximum absorption at around 275-300 nm were obtained (Fig. 5). Precursors of heartwood substances were supposed to be transferred from ray cells to tracheid lumens.

Stained-sections with Nile blue were applied to UV-VIS spectrophotometry for the coordination between the staining method and spectrophotometry (Fig. 6). Some modifications in droplet-like structures are suggested by the decrease of absorption at 540-545 nm.