

プレパラート作成過程における木材切片の大きさの変化

木材生物第1研究室 貴島 恒夫・林 昭三

(昭和34年6月2日受理)

Tsuneo KISHIMA and Syōzō HAYASHI : Dimensional Variation of Wood Sections Caused in the Process of Making Slides.

木材組織の顕微鏡的観察にはプレパラートが必要であるが、木材切片のそれは果して木材組織のありのままを示しているであろうか？

木材切片プレパラートの作成には、予め軟化処理を加えた木片（ブロック）から切片（セクション）を採り、その切片に脱水・透化処理を施し、それをスライドガラスに貼り付けて仕上げるのが普通であるが、これらの処理はいずれも可なり激しいものであつて、当然細胞や組織には変化が起つている筈である。しかもこの作成操作は相当複雑である。

現状では切片による観察が建前になつている以上、切片採取を省略することは出来ないまでも、プレパラート作成操作を簡潔にしながら、組織を一層ありのままの状態を観察し、計測の精度を高め得る方向への改善が望まれる。

かかる観点から、とりあえず数種針葉樹材の木口切片の大きさを指標に選んで、プレパラート作成過程におけるその変化を測つてみた。

実 験 材 料

構造の簡単な針葉樹材を主とした。すなわちヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.), スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don), クロマツ (*Pinus Thunbergii* Parl.) の3種を試料 (Table 1) とし、その各々より約 1.5×1.5×2.0 (cm) の二方矩角柱形ブロックを5個ずつ切り取り、さらにその各ブロックより 25μ 厚の横断面切片 (x-セクション) を5枚ずつ採つて測定に供した。

参考のため、広葉樹材15種——内、環孔材はクヌギ、ミズナラ、シイ、ケヤキ、ネムノキ、キハダの6種、非環孔材はヤマモモ、オニグルミ、ミズメ、クマシデ、サクラ属、カエデ属、ツバキ、ヒメシャラ、ミズキの9種——からも各1個ずつブロック (1×1×2 (cm)) を取り、そ

Table 1. Characters of softwood materials.

Species	Specific gravity in air dry	Average annual ring width (mm)	Proportion of summer wood (%)	Moisture content in air dry (%)
Hinoki	0.48	2.47	18.6	18.2
Sugi	0.34	2.55	24.4	17.6
Kuromatsu	0.54	1.78	29.4	18.4

Table 2. Characters of hardwood materials.

Species	Specific gravity in air dry	Average annual ring width (mm)
Ring porous wood	0.68	2.83
Non ring porous wood	0.70	2.72

の各ブロックから1枚ずつ x-セクションを採つて測定した。(Table 2)

実 験 方 法

A. 永久プレパラートの作成 (permanent preparation)

ブロックからセクションをとり、それを永久プレパラートにする過程は次の如く、ほぼ当研究室の常法により、その各段階において、ブロックにはマイクロメーター (screw micrometer)、セクションには読取顕微鏡 (screw comperator)——最小目盛は共に 1/100mm——を用いて、半径方向と接線方向の長さを測定し、ブロックの最初の大きさ (気乾) を基準として膨張率を算出した。

(1) 浸水 (soaking) ブロックを 24hr 水中に浸漬した。

(2) 煮沸 (boiling) 浸水済みブロックが器底に沈むまで煮沸した。ただし本実験ではその時間を針葉樹材で 2hr 広葉樹材で 3hr と一定した。

この程度ではブロック全体が飽水状態に達するには至らないが、セクションを切りとる範囲すなわち表面から数 mm の深さまでの所では、飽水状態とみなされる。

(3) 軟化 (softening) 煮沸済みブロックを水を満した蒸和罐に入れ、この蒸和罐を高圧釜で処理——145°C, 3.3kg/cm² 程度——して、ブロックの軟化をはかつた。その時間は針葉樹材で 30min 広葉樹材で 60min とした。

(4) 一時貯蔵 (reserving) 軟化済みブロックは一応水洗して50%エチル・アルコール中に貯蔵して切片作成に備え、貯蔵時間 (a) 1日, (b) 10日, (c) 20日の3段階において測定した。

(5) 切片作成 (sectioning) ミクロトーム (Jung 型の sliding microtome を用い、ナイフを軟化済みブロックの木裏から髓線方向に進めて、x-セクションのみを切取つた。切削潤滑剤には水を使つた。

(6) 一時貯蔵 切り取つたセクションは引続いて染色する建前で一時水中に貯えた。

(7) 染色 (staining) セクションは1%のサフラニン水溶液で 5min 染色後水洗した。

(8) 脱水 (dehydrating) 染色済みのセクションは脱水の目的でまず 75%アルコールに浸漬し、

(9) 続いて同じく 95%アルコールに移し、

(10) さらに無水アルコールを経て、

(11) 最後にキシロール・アルコール (キシロール 1, 無水アルコール 3 の混合液) に浸漬した。

(12) 透化 (clarifying) 脱水したセクションは直ちにキシロールに浸漬して透化をはかつた。

脱水，透化(8)～(12)の各段階における浸漬時間については 1min と 5min の 2 種類に区別してみたが，無効であつた。

浸漬時間は 1min ずつで充分と解される。

(13) 封入 (mounting) 透化をおわつたセクションは，スライドガラス上に展開し，カナダバルサムのキシロール溶液を滴下し，カバーガラスをかけた。

(14) 定着 (fixing) かくて得たプレパラートは 50°C の恒温器に 2 日間入れて，セクションの定着をはかつた。

(16) 仕上 (finishing) 恒温器から取り出したプレパラートは外面を清拭して仕上げた。

この間少くとも数分経過し，プレパラートは自然冷却，室温に復し，一応保存にたえる状態となるけれども，バルサムが完全に硬化するには余程の時日を要する模様である。

なお最終測定値は恒温器から取出して 1hr 後のものである。

B. 臨時プレパラートの作成 (temporary preparation)

永久プレパラート作成が時間的に許されない場合，屢々グリセリンで封入した臨時プレパラートが用いられるのに鑑み，下記臨時プレパラート作成過程についても同様に測定した。

(1)～(6)上記永久プレパラートの作成に同じ。

封入＝仕上 水中に貯えられたセクションをスライドガラス上に展開し，直接グリセリンで封入し，1時間，2日，5日，10日，15日，20日，25日，30日後の大きさを測定した。

実験結果と考察

A. 永久プレパラート作成過程における切片の大きさの変化 (Fig. 1)

この過程においてセクションを切り取るまでの測定値は無論ブロックの大きさである。

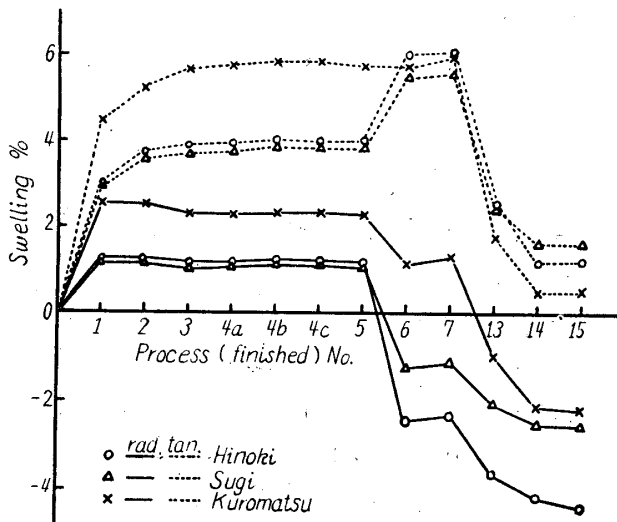


Fig. 1. Dimensional variation of softwood materials in permanent slide making. (Each point at the processes (1)～(5) show the average of four blocks and at after process (6) shows the average of twenty sections measured.)

また脱水・透化過程中(8)～(11)の各段階において，一々セクションの大きさを測定することには時間的な無理があり，かつ測定のため，スライドガラス上にセクションを展開し，仮封入を繰返すのは，却つて実際の変化から遠ざかることになるので，測定を省略した。

さて測定平均値を示す Fig. 1 によつて試料の大きさの変化を見るに，ブロックはまず浸水(1)，煮沸(2)によつて著しく膨張し，その半径・接線両方向膨張率の間にはすでに明らかに大きな開き（異方度 $a_t/a_r = 2 \sim 3$ ）が生じている。さらに軟化(3)処理を行えば，ブロックは僅かに半径方向に収縮，接線方向に膨張して開きは大きくなる。

この膨張率の異方性は主に McINTOSH

(1957)¹⁾, HALE(1957)²⁾ 等のいう半径方向に働く髓線の牽制作用に基づくものと思われる。煮沸後の高温高压処理によつて細胞膜質は多少共溶脱を免がれないに拘わらず、ブロックの大きさには余り影響のないのは意外である。

続くアルコール中での一時貯蔵(4)においては期間の長短 ((a) 1日, (b) 10日, (c) 20日) にかかわらずブロックの大きさは殆んど変らない。

ところがブロックからセクションを切り取つて水中に貯蔵(6)する間にそのセクションは著しく半径方向に収縮, 接線方向に膨張する。

これには勿論髓線の牽制作用が考えられる以外に, 切削ナイフの進行が半径方向であること, およびミクロトームにブロックを装着する時, その下半部を接線方向に締めつけるために上半部では却つてその方向に扇形に拡げられることにもよるものと思われる。

ただしクロマツのみはスギ, ヒノキと異なり, 接線方向にも殆んど膨張していないように見える。

これはセクション切り取りに当つて, 水平樹脂溝の存在が屢々そのセクションを分離せしめる原因となるとともに, 接線方向の膨縮に対し緩衝的役割をなすためかと思われる。事実水平樹脂溝断面のセクション全面積に対する割合は1~2%に及び, 接線方向の膨縮を相殺するに充分な量である。

サフラニン染色(7)の段階では, 半径・接線両方向ともに僅かながら同程度に膨張を見る。

これはサフラニン (酸性) 分子と細胞間層等のリグニンとの結合の結果かと思われる。

脱水・透化(8)~(12)過程を経た後の測定値を見れば, 半径・接線両方向共に著しい収縮が現われている。ただしこの収縮率は半径方向に小さく接線方向に大きく, その間にかなりの差異がある。

この異方性もやはり髓線の牽制作用と矛盾するものではないが, この外にも, 春材と秋材とでは収縮量に差のあること³⁾, 細胞膜の数によつても収縮量に差の生じること⁴⁾, 生長輪の構成状態が収縮の異方性を来たすこと²⁾, 等の点をも考え合わせる必要がある。ことに後述広葉樹材にあつては構成要素の多様性と配列の差異にもとづく, セクションの大きさの変化が一層複雑になる筈である。

脱水・透化(8)~(12)過程における収縮がとくに顕著な点より, この部分の各段階別詳細実験の必要を感じて一部のセクションを使つて追試した結果は Fig. 2 の如くである。この場合アルコール或はキシロール中での浸漬時間は各々 5 min である。ただしその間に数次に亘るセクションの仮封入と測定の時間が介入している点はプレパラート作成の實際に即しないが止むを得ない。

追試の結果 (Fig. 2) によれば, このセクションとしての収縮の60~70%は透化(12)すなわちキシロール浸漬中に起つたもので, 脱水(8)~(11)過程における収縮は

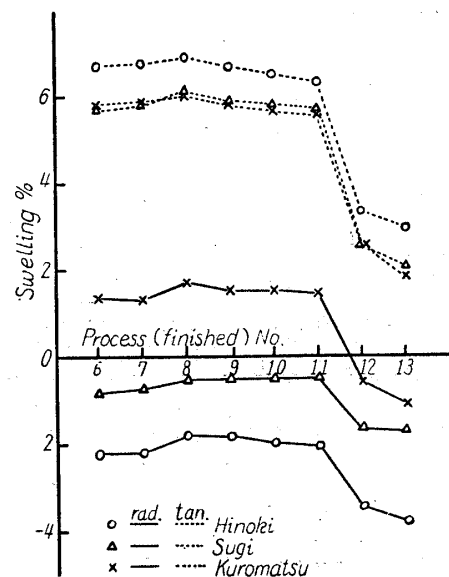


Fig. 2. Dimensional variation of softwood materials in dehydrating and clarifying processes in detail.

(Each point shows the average of ten sections.)

殆んど問題にならない。ことに脱水(8)すなわち75%アルコール中では半径・接線両方向ともに却つて膨張し、脱水(9)(10)すなわちアルコール濃度の高まるにつれて、少なくとも接線方向には明らかに収縮する。

アルコールによる脱水は直ちにセクションの収縮を意味するかの如き概念は是正すべきである。脱水(8)~(11)過程ではセクションに含まれる水がアルコールに置換されるが、それだけでは別にセクションに著しい収縮が現われる筈のないことに気付く。(white pine (*Pinus strobus*) 材ではアルコールによる膨潤量は水のその83%)⁹⁾。従つて収縮の大半は透化(12)中になることになり、ここで特にアルコール・キシロール浸漬(11)の段階を採用していることは、この急激な変化を緩和するに役立つしているものと思われる。また普通脱水過程の最初に採用されている50~55%アルコール浸漬の段階を、ここでは経験的に省略しているのは、却つて脱水初期の膨張抑制に有利である。

封入操作(13)中もなおセクションは収縮の経過を辿るが、一応スライドガラス上に定着(14)後はその大きさに大体変化がない。すなわち出来上つたプレパラートでは、針葉樹材切片の大きさが元のブロック(気乾)における大きさに対して、半径方向に2~4.5%の収縮、接線方向に0.5~1.5%の膨張を示している。ただしプレパラート作成の途中では、半径方向に1~2.5%(この場合ブロックの状態)、接線方向に5.5~6%(セクションの状態)の膨張率に達する段階がある。

B. 臨時プレパラート作成過程における切片の大きさの変化 (Fig. 3)

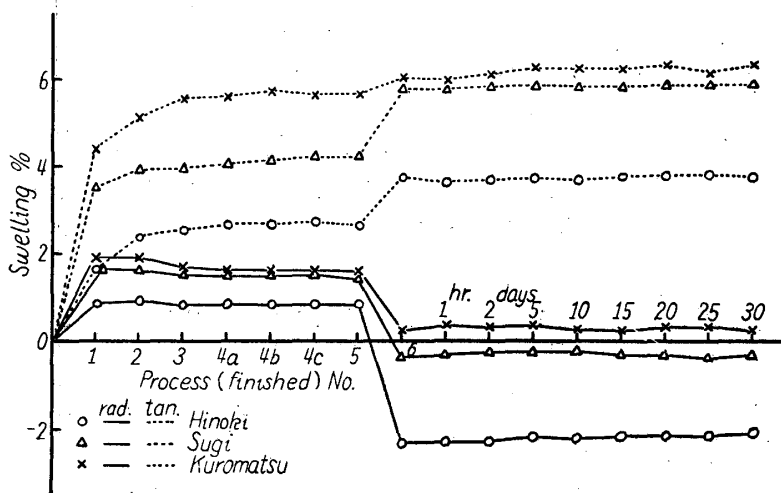


Fig. 3. Dimensional variation of softwood materials in temporary slide making.

(Each point at after process (6) shows the average of five sections.)

さにおいて、半径方向の収縮は2.5%以下に止まるが、接線方向の膨張は3.5~6.5%に達することには注意を要する。

(附) 広葉樹材について

参考的に実験した前記15種の広葉樹材については、ブロックをやや小さく採つたこと、ブ

ブロックの状態での大きさの変化は永久プレパラートの場合 (Fig. 1) と変わらないが、セクションにしてそれをグリセリンに封入(7)してから後は、30日間の測定範囲内では殆んど大きさの変化は見られない。すなわちセクションを切り取つて一時水中に貯蔵(6)している間におこる半径方向の収縮と、接線方向の膨張とが、そのままの状態で保持される。従つて臨時プレパラートでは針葉樹材切片の大き

ロック、セクション共に夫々1個、1枚ずつに過ぎないこと、および軟化(3)時間を倍(60min)にした以外はすべて針葉樹材の場合と同様に取扱った。

実験結果は環孔材6種と非環孔材(散孔材その他)9種に分けて、永久プレパラート作成過程に従ってFig. 4に示した。

広葉樹材の構造は針葉樹材に比して遙かに複雑であるが、ここでは先ず孔圏の有無に着目して環孔材、非環孔材別の取扱いを行った。しかし髄線の牽制作用からすれば、髄線の樹種別大小による区分を行つて見るのも面白いに違いない。

Fig. 4によれば、ブロックの浸水(1)、煮沸(2)による膨張率は、半径・接線両方向とも非環孔材が環孔材のほぼ2倍に達している。

これは或は基準にした気乾ブロックの含水率が一定でなかつたためかと思われ、散孔材の膨張率が半径方向にも環孔材に比してやや大きい傾向⁶⁾のみを以てしては理解できない。

軟化(3)過程では非環孔材の半径方向において針葉樹材同様の収縮が見られる。

ブロックからセクションを切り取つてからの大きさの変化は、半径方向については、非環孔材がクロマツ(Fig. 1)に、環孔材がスギによく似ていることは興味深い事実である。接線方向についても、変化の趨勢は針葉樹材のそれと変りはないが、膨張率は針葉樹材のほぼ2倍に達している。

半径方向の収縮、接線方向の膨張が共に環孔材で大きいのは、ナイフの進行方向の影響と孔圏のもつ膨縮性によるものと解する外はない。

結局出来上つた永久プレパラートにおける広葉樹材切片は、当初のブロック(気乾)に比して、半径方向には1~2%収縮し、接線方向には7%前後膨張していることになる。

結

論

プレパラート作成過程における試材(ブロック~セクション)の横断面の大きさの変化を通覧して、その要点を挙げれば次の如くである。

1. ブロックにおいても、セクションにおいても、その大きさの変動の最も大きく、激しく現われるのは吸水或は脱水の過程においてである。
2. 吸水の過程では、ブロックは半径方向にも接線方向にも膨張するに対し、セクションは半径方向に収縮し、接線方向に膨張する。
3. ただしこの異方性も、セクションの脱水過程において幾分緩和される。これは正確には、

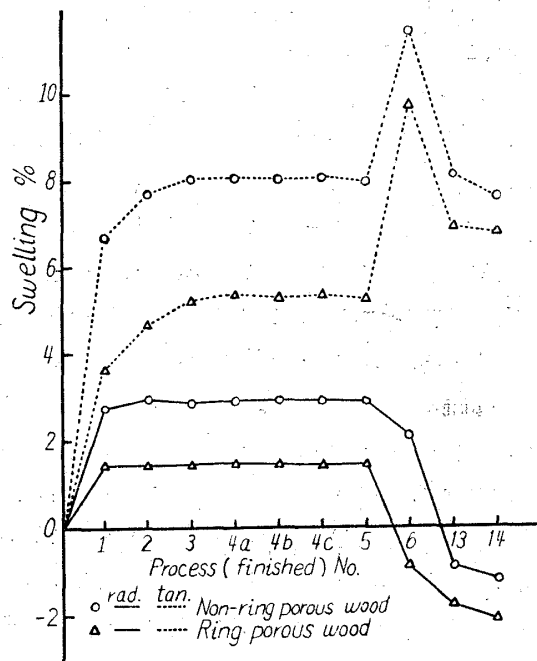


Fig. 4. Dimensional variation of hardwood materials in permanent slide making.
(Each point shows the grouped average (ring and non-ring porous wood) of one block or section of each species.)

セクションが通例脱水過程と呼ばれるアルコール浸漬中には大して収縮しないが、最後のキシロール浸漬による透化過程において、半径方向にも接線方向にも著しく収縮し、後者接線方向の収縮の方が大きいことに依る。

4. 最も激しい処理過程として大きさの変動を期待したブロックの軟化、すなわち高温高压処理過程においては、すでに多分に吸水膨張した直後なるためか、意外に変動が少なかった。

5. 出来上った永久プレパラート中の針葉樹材切片の大きさは、当初の気乾ブロックのそれに比して、半径方向には2~4.5%小さく、接線方向には0.5~1.5%大きい。

6. グリセリンで封入する臨時プレパラート作成過程には脱水透化の段階がないので、切片は、接線方向には3.5~6.5%大きい、半径方向には却つて2.5%以下の収縮に止まり、ほぼ当初のブロックの大きさ(±0.5%)を示している場合もある。

要すにプレパラート作成方法としては、少なくとも大きさの変化を抑制する意味において水を用いての処理から脱することが望ましい。

Résumé

For the purpose of improving the ordinary method of making microscope slides, dimensional variation of wood blocks or sections caused in each process of the method was, first of all, investigated in this work.

Experimental Materials : Wood species used were mainly the softwoods, i. e. *Hinoki* (*Chamaecyparis obtusa* SIEB. et ZUCC.), *Sugi* (*Cryptomeria japonica* D. DON) and *Kuromatsu* (*Pinus Thunbergii* Parl.) (Table 1), and some hardwood species were also used subordinately (Table 2). All the test pieces were measured in cross-sections of the materials. And the shrinking and swelling rates were culculated on the basis of original air dried dimensions of wood blocks adopted.

Experimental Methods, the Process of making Slides :

A. Permanent Preparation : In block state, (1) **Soaking** in water, (2) **Boiling** in water, (3) **Softening** in autoclave, (4) **Temporary Reserving** in alcohol, (5) **Sectioning** by microtome, and in section state, (6) **Temporary Reserving** in water, (7) **Staining**, (8)~(11) **Dehydrating** by 75% to absolute alcohol and xylene-alcohol, (12) **Clarifying** by xylene, (13) **Mounting** on slide-glass, (14) **Fixing** on it, and (15) **Finishing**.

B. Temporary Preparation : In block state, (1)~(6) similar as the above, and after that the **Mounting** in glycerine, i. e. **Finishing**.

Experimental Results, the Dimensional Variation of Test Pieces :

A. Permanent Preparation : Shown in Fig. 1 and Fig. 2, the latter is in detail about the dehydrating processes.

B. Temporary Preparation : Shown in Fig. 3.

And Fig. 4 is of hardwood pieces subordinately investigated.

In conclusion, the essential points of the results obtained are as follows :

1. In either block or section, the largest and most severe variations are always caused by the water absorption and desorption processes of the materials.

2. During the process of water absorption, the wood blocks swell in both radial and tangential directions, while the wood sections shrink in radial direction but swell in tangential direction.

3. As to the final process of water desorption of the sections, they do not shrink so much in the so-called dehydrating processes i.e. soaking in alcohol, but shrink hardly in the last process of clarifying by xylene.

4. In spite of the softening by autoclave, the treated blocks show merely small variations in size beyond expectation, perhaps, because of the almost enough swelling caused in preceding process.

5. The final dimension of softwood sections in the permanent preparations are $-(2\sim4.5)\%$ in radial direction and $+(0.5\sim1.5)\%$ in tangential direction.

6. According to the lack of desorption process in the temporary slide-making, the final dimensions of the sections are $+(0.5)\sim-(1.5)\%$ in radial direction and $+(3.5\sim9.5)\%$ in tangential direction.

In short, for the purpose of controlling the dimensional variation, it is desired to get rid of the water-treatment in the slide-making procedure.

文 献

- 1) D. C. McIntosh : For. Prod. Jour. 7 March (1957).
- 2) J. D. Hale : For. Prod. Jour. 7 140 (1957).
- 3) 中戸莞二 : 木材学会誌 4 94 (1958)
- 4) 中戸莞二 : 木材学会誌 4 134 (1958)
- 5) A. J. Stamm and E. E. Harris : Chemical Processing of wood. 125 (1953).
- 6) 林業試験場 : 木材工業ハンドブック 163 (1958)