

花粉の透過型電子顕微鏡試料作製法

中村 澄夫・三木 寿子

Techniques for Transmission Electron Microscopy of Pollen

Sumio NAKAMURA* and Hisako MIKI-HIROSIGE*

Biological Laboratory, Kanagawa Dental College, Yokosuka 238, Japan

透過型電子顕微鏡で植物材料を観察する場合、その試料作製は動物の場合と比べてかなり難しいものとされているが、植物材料の中でも、とりわけ、花粉や孢子は難試料の代表と言ってよいであろう。近年、種々の固定剤、包埋剤が開発され、花粉を扱う分野でもすぐれた超薄切片像を報告する研究者が多くなってきたが、花粉や孢子の超薄切片法を手掛けて間もない人たちにとっては、依然として難試料であることに変わりはない。これらの試料では、固定剤や包埋剤の浸透のよいごく普通の動植物材料を扱う場合のように、常法をそのまま適用してもある程度の像が得られる、という訳にはなかなかいかないからである。そこには、常法プラス種々の工夫が要求される。このような花粉（または孢子）が難試料である主要な原因が、スポロポレンより成る外壁にあることは間違いないと思われる。この強固な外壁の存在によって、花粉内部への固定剤や包埋剤の浸透が悪く、さらに、細胞壁（外壁+内壁）と原形質の固さが極度に異なるため、包埋剤の浸透が不十分な場合には切削時に細胞膜を境にして両者が分離しやすいことなど、花粉材料を扱う場合、しばしば経験することであるが、これらはすぐれた微細構造を得るためにはどうしても乗り越えなくてはならない重要な問題点である。

ここでは、これらの困難な問題を克服するための一助となるよう、筆者らがこれまで手掛けた花粉の試料作製法について（固定・包埋・電子染色法を中心に）記し、少しでも諸兄の参考に供したい。

1. 固定前の操作

花粉試料は微小であり、試料作製の際には常に個体の集団として取扱われるが、観察は1個1個の細胞が対象となるという特殊性がある。そこで試料を取扱う際に、微小なものをいかにして動植物試料のような組織片に近い状態にするかという配慮が必要になる。例えば、テッポウユリ花粉のように大型の花粉の場合は、各操作を低速で遠心分離しながら進めると容易に沈殿するので、固定前の操作は特に難しくないが、低速の遠心分離ではなかなか沈まない小型の花粉の場合には、試料を寒天に一度包埋して小ブロックを作ってから、その後の操作を行なう必要がある。もし、この方法をとらない場合には、それぞれの過程についてかなり高速の遠心分離をして試料を落さねばならず、広々して試料の損失をまねき、とくに包埋の段階で、操作が非常に面倒になる。そこで次に試料を寒天に包埋する方法を述べる。⁽¹⁾

- (1) 2%寒天を沸騰した三角コルベンの中でとかした後、45℃の盪煎に保つ。
- (2) 試料を緩衝液（または固定液）に入れ、1800×gで5分間遠心分離を行う。
- (3) 上清を捨て、試料の入った遠心管を45℃の盪煎に保つ。
- (4) 45℃の寒天を1滴（0.03 ml）、暖めたピペットで遠心管中に滴下し、遠心管を振って寒天を試料と混ぜる。
- (5) ただちに冷たいスライドガラスの上に流す。

(6) 1 mm²に切り分ける。

以上のようにすれば、固定、脱水、包埋のすべての操作を組織標本と同様に扱うことができる。

多くの虫媒花の成熟花粉粒表面には、pollenkittと呼ばれる色素を含んだ油性の物質が付着している。このような花粉を固定する場合（但し、花粉の細胞壁の構造を調べる場合には適さない）には、その前に100%アセトンなどの有機溶媒で軽く洗い（1分以内で）、pollenkittを除去すると、より固定液の浸透がよくなる。また、若い花粉を用いる場合は、葯のまま固定し、葯に針で適当に穴をあけておく。

2. 固定

一般に、細胞の微細構造を観察する目的にはグルタールアルデヒド-オスミウム酸二重固定法⁽²⁾が、また細胞内の膜構造を観察する目的では、過マンガン酸カリウム法⁽³⁾⁽⁴⁾がよく用いられる。前者は、膜構造はもちろん、細胞質や細胞内器官の基質、核などほとんどすべての構造についてよい結果を与えるので、現在、最も広く用いられている。後者は膜構造については非常によいコントラストを与えるが、リボゾームや基質の微細構造が失われるので、これを使用する際には像の解釈に注意しなくてはならない。筆者らの経験では、花粉の場合は通常、グルタールアルデヒド-オスミウム酸固定法が最もよい固定像を与え、膜構造の観察には過マンガン酸カリウム法よりもフェロシアン化カリウム法⁽⁵⁾の方が固定液の浸透性と微細構造の保存（リボゾームの構造も保存される）の点ですぐれていると思われるので、ここでは、この2法について記す。

a. グルタールアルデヒド-オスミウム酸固定法⁽²⁾⁽⁶⁾

(1) グルタールアルデヒドをリン酸緩衝液（またはカコジル酸緩衝液）で薄め、通常2.5～3%にする。緩衝液の最終濃度とpHは0.05～0.1 M、pH 6.8～7.6（通常7.3）とし、試料を30分～4時間固定する（前固定）。

(2) 試料を緩衝液でよく洗ったのち、1%オスミウム酸で30分～3時間固定する（後固定）。

注1)、水溶液にしたグルタールアルデヒドは長期保存がきかないので、使用時に調整する。

注2)、グルタールアルデヒドで固定したあとは、十分に洗浄する。洗浄が不完全であると、後固定のオスミウム酸が浸透しにくい。

注3)、リン酸緩衝液の作成法—まず、ストック用として0.2 Mリン酸緩衝液（pH 7.3）を作る。それには、0.2 M KH_2PO_4 (27.2 g/ℓ) 200 ml と0.2 M Na_2HPO_4 (71.65 g/ℓ) 500 ml を混合する。この一部（例えば250 ml）をとって、蒸留水で倍に希釈したのち（全部で500 ml）、0.1 Mの蔗糖（17.1 g/500 ml）を加えると、0.1 M緩衝液（0.1 M蔗糖入り、pH 7.3）ができる。さらに、この一部をとって、倍に希釈すると、0.05 Mのリン酸緩衝液（0.05 M蔗糖入り、pH 7.3）となる（この希釈法は便法である）。

b. フェロシアン化カリウム固定法⁽⁵⁾

膜構造がよく保存される固定法で、過マンガン酸カリウム固定のように、リボゾームの消失がない利点がある。

(1) 3%グルタールアルデヒドで3時間前固定する。

(2) 緩衝液で十分洗浄したのち、1～2%オスミウム酸とフェロシアン化カリウムを等量混合した溶液で3時間、後固定する。

固定の条件は材料の種類によって、細胞の分化や発達段階によって、また細胞の生理的条件によって異なるから、上に述べた方法を参考にして各自の材料に合った条件を工夫すれば、必ずよい結果が得られるはずである。

3. 脱水

固定後の試料を包埋するためには、試料の完全な脱水が必要である。脱水剤としては、エタノールまたはアセトンを用いる。エタノールを用いた場合の脱水～包埋の手順は、以下の通りである。

50%エタノール（3回、計10～15分）
→70%エタノール（3回、計10～15分）

- 80%エタノール（2回、計10～15分）
- 90%エタノール（1回、10～15分）
- 95%エタノール（1回、10～15分）
- 100%エタノール（3回、計20～30分）
- 100%エタノールと酸化プロピレン（1：1、30分）
- 酸化プロピレン（30分）
- 酸化プロピレンと包埋剤等混（一晚）
- 包埋剤中に1日放置（室温）。ここで十分に減圧してガス成分を排除する。

4. 包埋

ここでは、筆者らが花粉材料の包埋に用いて大変よい結果を得ている2つの方法を紹介する。

a. エポソール-アラルダイト包埋法

この方法は、はじめ Mollenhauer (1964)⁽⁷⁾ が考案し、のちに Johnson & Porter (1968)⁽⁸⁾ がクラミドモナスを包埋するために改良した処方に基づいている。その組成は次の通りである。

アラルダイト 6005	19.5%	(重量)
エポソール 812 (現在, Quetol 812)	29.5	"
DDSA	51	"
DMP-30	1.5	"

適当な容器を上皿天秤にのせ、秤量しながら上記モノマーを順次加え、ガラス棒で静かに混ぜ合わせる。気泡とガス成分は減圧して排除する。この樹脂に試料を包埋し、再度十分減圧して24時間放置したのち、60℃で24時間重合させる。

b. 低粘性エポキシ樹脂 (Spurr の樹脂) 包埋法

従来のエポキシ樹脂は粘度が大きく、植物試料への浸透がよくなかった。この問題を解決するため、Spurr (1969)⁽⁹⁾ は粘性の低い樹脂モノマー ERL-4206、D.E.R.736、NSA および S-1 の混液を用いてすぐれた結果を得た。Spurr はこれらのモノマーの性質と反応性を検討して、表1に示すような組合せを考案している。⁽¹¹⁾

筆者らは、これらの処方のうち、標準処方Aと変

Fig. 1 Spurr による低粘性エポキシ樹脂⁽¹¹⁾

成分 (g)	標準処方 A	変 法				
		B	C	D	E	
ERA-4206	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
D E R 736	6.0	4.0	8.0	6.0	6.0	
NSA	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	
S-1	0.4	0.4	0.4	1.0	0.2	
重合時間, 70℃	8	8	8	3	16	
硬さ(Aに比較して)		硬い	軟かい			
備 考				短時間で重合する	重合に時間がかかる	

法Cを適時を用いてよい結果を得ている。表に示されている成分を秤量しながら順に加え、よく混合する。その後、減圧して気泡を排除する。樹脂に包埋して、十分減圧したのち、12時間真空中に放置する。この方法で大切な点は、湿気を極力避けることである。重合は70℃で8時間またはそれ以上行なう。重合時間が多少長くなっても細胞構造の保存や切片切削に著しい影響はない。

包埋の次の過程である超薄切法については紙面の都合上、省略する。

5. 電子染色法

電子染色は、それぞれ研究者によって、いろいろな方法があるが、ここでは筆者らが行なっている、花粉をはじめとして植物材料の切片染色によいウランと鉛の二重染色法を紹介する。

a. 酢酸ウラン染色

- (1) 染色液の作り方：10%飽和酢酸ウラン液（50%エタノール）を作り、ろ過する。
- (2) 染色時間：10～15分（室温）。水溶液の場合よりも高いコントラストが得られる。
- (3) 洗浄：染色後は50%エタノールで数回洗浄する。

注1)、エタノールを使用するため、切片が破れやすいので支持膜（コロジオン膜）を張った方がよい。

注2)、酢酸ウランは室温で光に当たると黒くにごってくることがあるので、染色時には箱のふたなどで覆って光を遮る必要がある。

b. 硝酸鉛染色 (Reynolds 法)⁽¹⁰⁾

(1) 染色液の作り方:

{	硝酸鉛	1.33g
	クエン酸ナトリウム	1.76g
	蒸留水	30 ml

50mlのメスフラスコに上記の薬品を入れ、溶解後30分間放置する(液は乳白色)。1N NaOHを8 ml加え(液は無色透明になる)、全量が50mlになるまで蒸留水を加える。使用時にろ過する。

(2) 染色時間: 5~10分(室温)。

(3) 洗浄: 染色後、N/10 NaOHで、手早く1回洗い、後は蒸留水で3回洗う。

注1)、染色液作製時または染色中に、試料の汚染の原因となる因子(特に炭酸鉛の形成防止)をとり除くように心がける。

注2)、長時間の染色を避ける。その理由は、切片の汚染を防ぐこと、長時間染色してもその割に効果は上がらないため、および試料面が荒れることなどである。

以上、筆者らが主に花粉材料で用いている方法を紹介した。ここに述べた以外にも多くのすぐれた方法があり、それらについては文献(11)、(12)を参照していただきたい。これらを参考にして、それぞれの花粉材料の性質と固定・包埋・電子染色などの原理や機構を考慮すれば、難試料とされる花粉でもすぐれた切片像が得られるであろう。

引用文献

- (1) Ryter, A and E. Kellenberger : J. Ultrastruct. Res., 2, 200 (1958)
- (2) Sabatini, D. D., Bensch, K. and R. J. Bannett : J. Cell Biol., 17, 19 (1963)
- (3) Luft, J. H. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 799 (1956)
- (4) Mollenhauer, H. H. and W. Zebrun : J. Biophys. Biochem. Cytol., 6, 431 (1959)
- (5) Karnovsky, M. : Proc. 11th Ann. Meeting Am. Soc. Cell Biol., p. 146 (1971)
- (6) Nakamura, S. : J. Electron Microsc., 28, 275 (1979)
- (7) Mollenhauer, H. H. : Stain Tech., 39, 111 (1964)
- (8) Johnson, U. G. and V. Porter : J. Cell Biol., 38, 403 (1968)
- (9) Spurr, A. R. : J. Ultrastruct. Res., 26, 208 (1963)
- (10) Reynolds, E. : J. Cell Biol., 17, 208 (1963)
- (11) 日本電子顕微鏡学会関東支部編 : 電子顕微鏡生物試料作製法、丸善 (1975)
- (12) Hall J. L. (Ed.) : Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant cells. Elsevier / North-Holland (1978)

(受理日 1986年10月30日)