

### 3 花粉形態観察法

#### (1) 光学顕微鏡観察

##### (a) はじめに

私が花粉の形態を光学顕微鏡下で観察をはじめたのは、1946年の終戦の翌年頃だったと思う。

そして日本全国のなるべく多くの植物の花粉形態を調べようと思ったきっかけは、1950年か1951年夏「横浜川崎ゼンソク」と新聞紙上で騒がれた原因不明の病気が、横浜方面に駐留していたアメリカ兵の間に発生し、当時GHQでは、その原因調査のための日本の各方面の方々の協力を要請し、空中の浮遊有害成分の解明のため、化学班・微生物班・花粉班などが編成されたことがあった。そのころ少しばかり花粉の形態を調べていた関係で、恩師で植物分類学にくわしい東邦大学薬学部の故久内清孝教授より、上記の花粉班の一員としてこの調査の手伝いをするようにいわれた。その結果毎日ワセリンをぬったスライドガラスを横浜のビルの4階に置いたのを顕微鏡で観察し、いろいろの形態の花粉がみられるのに驚いた。この時の結果は空中の化学物質が原因と判明し、花粉班は解散したが、お礼としてDr. Karakawaから、Wodehouse著の570頁の貴重なPollen Grains (花粉粒) という単行本をいただき、これにより花粉についていろいろのことを学ぶことができ益々花粉に興味をもつようになった。

そして空中浮遊花粉を調査するためには、日本中の植物を広く調べて、その形態を知りたくなりそれ以来現在までに花粉のプレパラート14,000枚(約190科・1,100属・2,700種)作成することができた。

##### (b) 花粉プレパラートの作り方の一例

用意するもの ; ピンセット, スライドガラス, カバーガラス, アルコール (90-100%), グリセリン

エリー, 色素液としてリンドウ紫 (0.01% アルコール溶液), キシレン (油脂質の多い花粉の場合)

##### ◦グリセリンジェリーの作り方

良質の粉末ゼラチンに水を加えて水分を吸わせたのち、ガーゼなどにつつんで余分の水分をのぞいた

ゼラチン	1
グリセリン	1.5

フェノール (石炭酸) 防腐の目的にごく少量

上記のゼラチンを、ピーカーなどに入れ、水浴の中であたためて溶けたら、火をとめて、これにグリセリンを加え、少し冷えたらフェノール (固っていたら暖めて溶かし、その1-2滴) の少量を加え、ゼラチンが固まらないうちに、シャーレなどに約3ミリメートルの厚さに流して固める。

◦リンドウ紫 (ゲンチアナ紫) の0.01% アルコール溶液をつくり、ろ過する。

##### プレパラートの作り方

スライドガラスの中央に、アルコール (90-100%) を1-2滴おとし、この中央へピンセットで花の中のオシベの葯 (花粉ぶくろ) を入れるとこのアルコールの中に花粉がおちてくる。そのまま少したつとアルコールがとんで花粉がスライドガラスに付着する (図1・a-c)。次に花粉表面に着いている油脂質を除くためスライドガラスを少し傾斜させてキシレン少量を滴加引きつづきアルコールを滴加 (図1・d)。スライドの右下方にピーカーなどを置いて流れるキシレンやアルコールを受ける。次にスライドガラスを平にして、リンドウ紫液を1-2滴加え、アルコール分が揮散してから図1・dのようにしてアルコールで洗い余分の色素を除く (図1・e, f)。カバーガラスに約2-3ミリメートル角のグリセリンジェリーのをせ、小さな火で暖めてとかし、これで中央の花粉の部分を封じ

て花粉のプレパラートができる〔図1・g, h, i〕. iは横からみたところ. なお植物名・採集地・採集場所・年月日をスライドのラベルに記しておく.

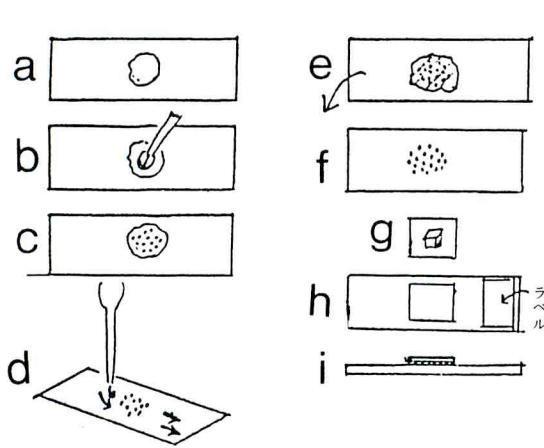


図1 プレパラートの作り方: Preparation of microscope slides

#### (c) 単粒・複粒

花粉 (Pollen) は, 花粉母細胞から減数分裂の結果4個の花弁となり, この1個を単粒という. 植物の種類により, 2-4個が分裂しないままの2集粒・4集粒, また多くの花粉が集った多集粒やラン科のように花粉塊 (団) をなしているものがある.

例 単粒: バラ科 キク科などの他多くの科の植物  
複粒: 2集粒 ホロムイソウ カワゴロモなど少数

4集粒 ツツジ科の多く ガマ ガンコウラン  
多集粒 ネムノキなどのマメ科の数種

花粉塊 ラン科 ガガイモ科

#### (d) 極性と花粉管口を主とした分類

花粉管口は受精のとき, 花粉管を伸ばす口で, 発芽口ともいう. 植物の種類によりその形や数, 極軸との関係を調べると面白い.

図2 は, 4集粒から単粒への極軸との関係を示した例で, A・Bの単粒がaで, 中心から外方へ極軸を考えると, aのd:遠心面, aのp:向心面, aのe:赤道面でこれらは単口粒となる. C・Dの単粒が

bで, bのd:遠心面, bのp:向心面, bのe:赤道面でこれらは3溝粒となる.

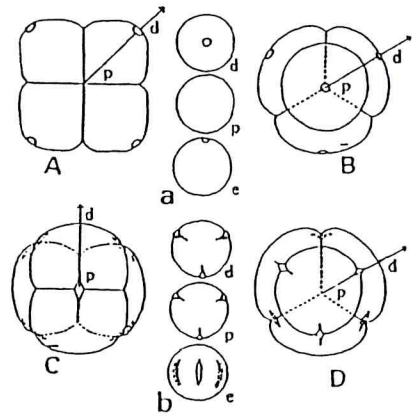


図2 極性について: Polarity

花粉管口を主として単粒を分類すると, 上記したように極軸と関係したものが多いが, 単粒となってしまうと次に示す例のうちで, 無口粒・散溝粒・散孔粒はわからなくなってしまう.

花粉管口を主とした分類の例

無口粒 口がみられない (クスノキ科)〔図5・1 A型〕

長口粒 遠心面に長口 (ユリ科)〔図5・2型〕

単口粒 遠心面の中央に1個の円形口 (イネ科)〔図5・3型〕

溝粒 赤道上に極軸の方向に巾:長さが $1 > 2$ の口 (溝の数により, 3溝粒アブラナ科の多く, ナンテン, 3・6溝粒シソ科)〔写真1・A, B〕

溝孔粒 溝粒の溝の中央にさらに内口がある (溝孔の数により, 3溝孔粒バラ科・キク科など多くの双子葉類〔写真1・C, D〕, 多溝孔粒で9-20溝孔粒ヒメハギ科, ゴマ)〔溝孔並びに溝孔粒は図5・6 B型〕

散溝粒 巾:長さ $1 > 2$ の細長い口が, 先端部をつき合せた形で, 花粉全球面に散在 (6散溝粒フサザクラ, 12-24散溝粒スベリユリ科)〔図5・4 D型〕

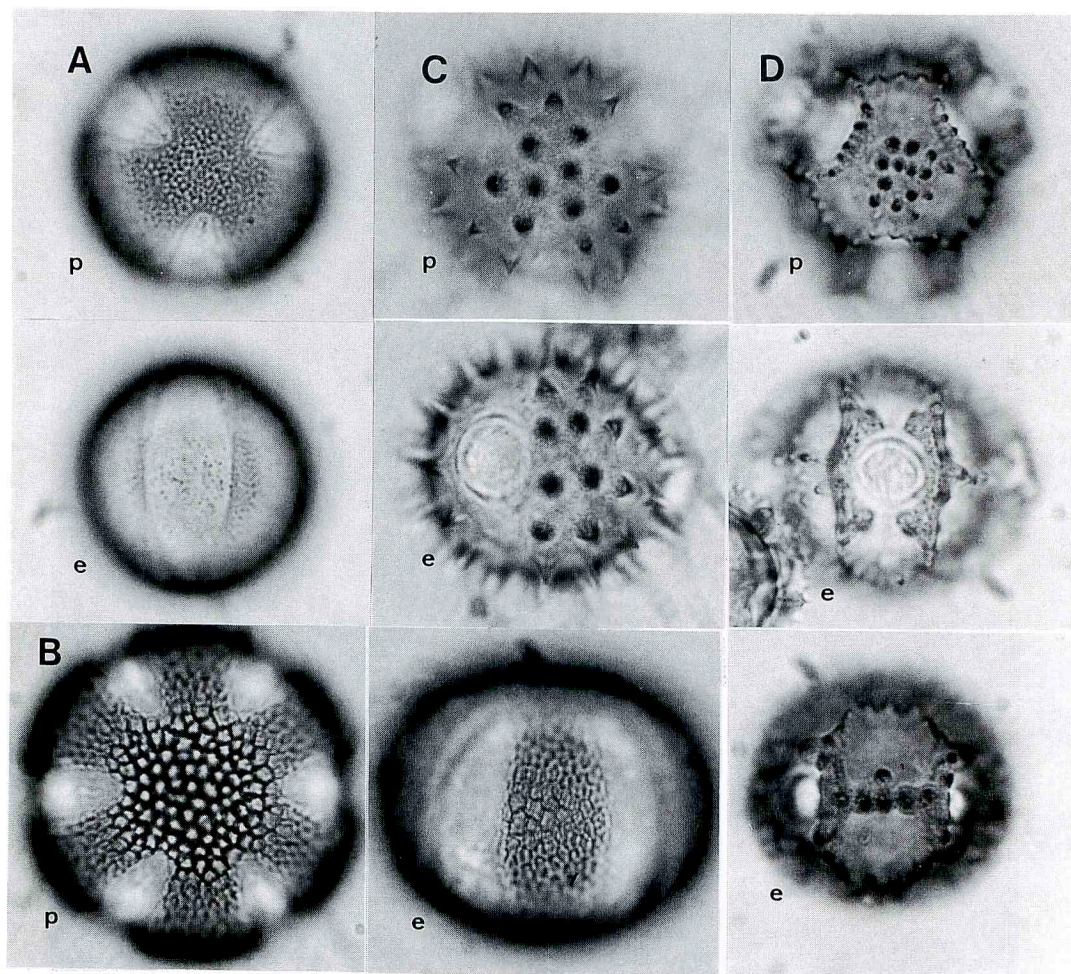


写真1 溝粒と溝孔粒 Colpate and colporate grains A, B, 溝粒; C, D, 溝孔粒; p, 極観; e, 赤道観  
 A, ナンテン *Nandina domestica*; B, アキギリ *Salvia glabrescens*; C, フキ *Petalites japonicus*; D, ノゲシ  
*Sonchus oleraceus*.

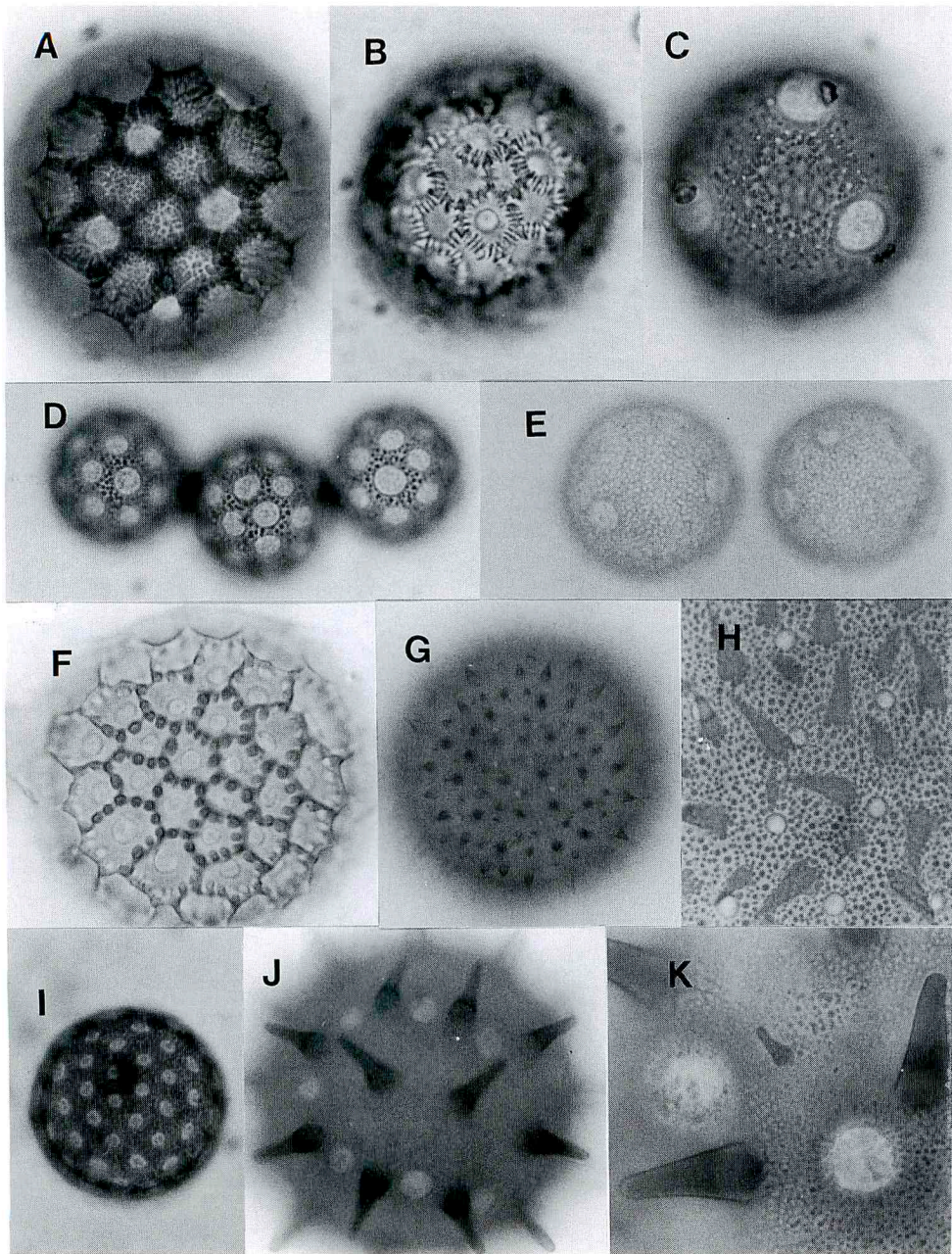


写真2 花粉型, 4C型 Ikuse pollen types, type 4C 4C型: 4C<sup>a</sup>, A-E; 4C<sup>b</sup>, F-I; 4C<sup>c</sup>, J-K  
 A, タデアイ *Polygonum tinctorium*; B, フツキソウ *Pachysandra terminalis*; C, ハマナデシコ *Dianthus japonicus*; D, イノコズチ *Achyranthes japonica*; E, タケニグサ *Macleya cordata*; F, ハマビシ *Tribulus terrestris*; G, H, ゼニアオイ *Malva sylvestris* var. *mauritiana*; I, ハマアカザ *Atriplex subcordata*; J, K, ムクゲ *Hibiscus syriacus*.

散孔粒 ほぼ円形の孔が、花粉全球面にほぼ間隔に散在（孔 < 50 個ナデシコ科 タケニグサ，孔 > 50 個ゼニアオイ アカガ，孔がラセン状に並ぶムクゲ）〔図 5・4C 型，写真 2〕

合流口流・叉状合流口流 極の部で溝や溝孔の先端が合流した合流口粒（シキミ），合流部が叉状になりここに三角形の小島ができる叉状合流口粒（アサザ サクラソウ）〔図 5・6D 型〕

(e) 外壁の彫紋模様〔図 3〕

光学顕微鏡で×100 ではみにくいが，×400，×600，×1,000 ではいろいろの彫紋模様がみられる。その主な例を示す。以下数字はすべてミリマイクロン（3 = 0.003 ミリ）

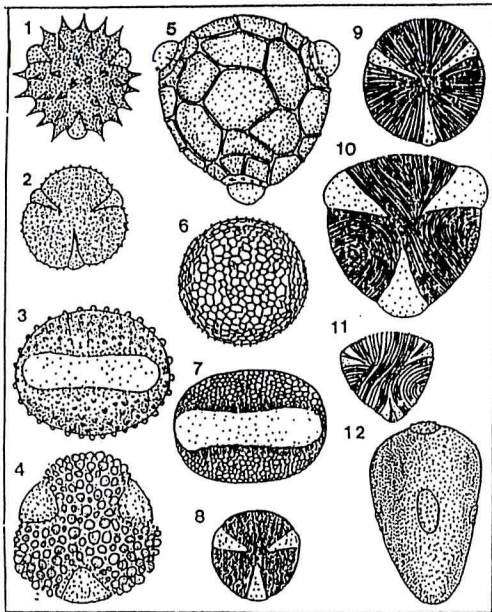


図 3 花粉壁彫紋模様例：Types of exine ornamentation

1, 刺状紋（ハハコグサ）：2, 小刺状紋（ヨモギ）：3, 疣状紋（ヒロハユキザサ）：4, 頭状有柄紋（モチノキ）：5, 網状紋（ヤブツルアズキ）：6・7, 小網状紋（センリョウ・ユキザサ）：8, 細網状紋（ユキノシタ）：9, 線状紋（チャンチンモドキ）：10・11, 指紋状紋（ヤマザクラ・ヘビイチゴ）：12, 顆粒状紋（カンスゲ）。

刺状紋 刺状模様で，< 1 - 30 の長さがみられる。  
< 1 〔図 3・2〕

1 - 10 〔図 3・1〕

20 - 30 〔ムクゲ トロロアオイ写真・2・JK〕

頭状有柄紋 先端が頭状で柄がある〔図 3・4〕

網状紋 網目状の模様で，網目の径で分類すると

細網状紋 < 1 〔図 3・8〕

小網状紋 1 - 3 〔図 3・6, 7〕

網状紋 > 3 〔図 3・5〕

線状紋 ほぼ平行線状模様〔図 3・9〕

指紋状紋 線状紋が特に指紋状の曲線模様〔図 3・10, 11〕

(f) 大きさの計り方〔図 4〕と花粉の大きさ〔数はミリマイクロン〕

図 4 は，花粉の大きさの計り方の例を示した。AB 共に p は極観，e は赤道観，P は極軸部径，E は赤道部径，P と E 部の長さを顕微鏡下で計り， $P \times E$  として一般に現わす。

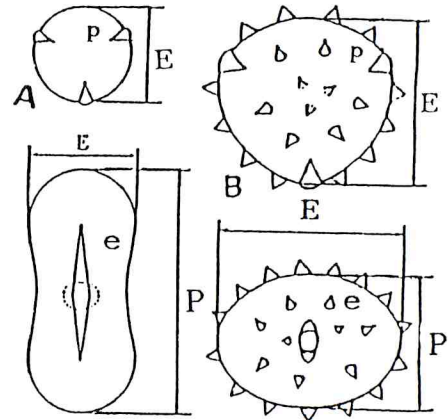


図 4 大きさの計り方：Size measurement

例： 25 × 10 は [図4のAのような形]

15 × 20 は [図4のBのような形]

大きさの例

単粒 (赤道径)

3 - 10 ムラサキ ホルトノキ

10 - 30 ネコヤナギ スミレ

30 - 60 スギ サクラ ツバキ

60 - 100 マツムシソウ科 フウロソウ科

100 - 200 カボチャ タチアオイ

1,000 - 3,000 アマモ (長さ)

複粒 (長さ)

8 - 10 オジギソウ

10 - 40 アセビ

40 - 100 ネムノキ

100 - 500 アカバナ

500 - 1,000 カガイモ

1,000 - 4,000 エビネ

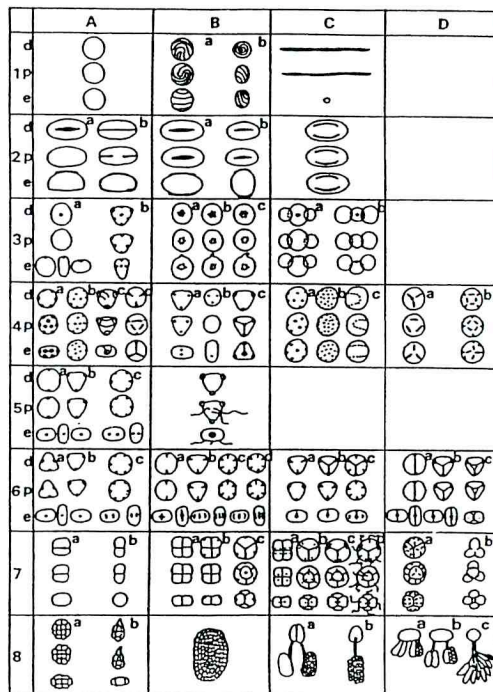


図5 花粉型模型図：Ikuse (1956) model picture of pollen types

(g) 花粉の色

黄色が一般的で最も多いが、淡黄 黄赤 黄褐などがある。その他灰白 褐 茶 赤褐 黒褐 紫褐など。この色については特にミツバチの集めてくる花粉荷 (Pollen loads) の色の研究報告 (文献後記) がある。

(h) 花粉型模型図について (1956年以來1部改正 [図5]。なお8型について目下改正図作成中)

日本の植物の花粉について作ったもので、空中花粉・蜂蜜や花粉荷・地表への落下花粉などの調査に応用できる。その場合まず何型かを知り、次に外壁の彫紋・大きさ・採集時期 (花粉荷は色) などを加味することにより、花粉から原植物を知る目安となる。

1-6型は単粒、7・8型は複粒 (2・4集粒、多集粒・花粉塊)

単粒については主として花粉管口の有無・形・数・位置などを特徴とし、左方のワク内のdは遠心極面、pは向心極面、eは赤道面を示す。

複粒については集合状態・数などで分類した。

なお 図6 は花粉型を分類と比較して表にしてみたものだ。

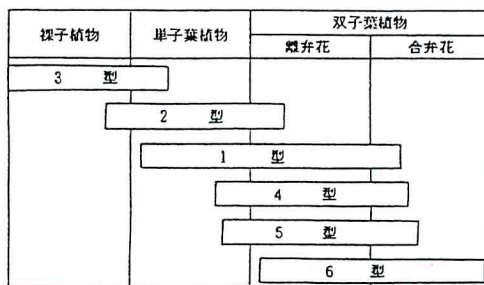


図6 花粉型と分類との関係：The relation between Ikuse pollen types and the plant taxonomy

(i) その他の特徴をもつ花粉について

- ラセン状口 [図5・1B型] 例 (ホシクサ科)
- ヒモ状花粉 [図5・1C型] 例 (アマモ属)
- 卵形状花粉 [図5・3Ab型] 例 (スゲ科) 赤道観卵形、遠心極面に1個、赤道面に6個の花管口

○ 単口部カギ状突出花粉〔図5・3B<sup>c</sup>型〕例（スギ）〔写真・3〕

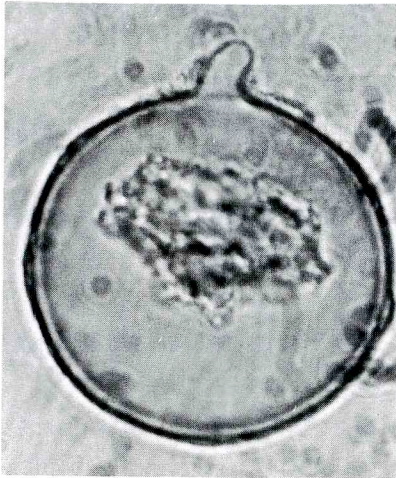


写真3 スギ *Cryptomeria japonica* (×1,200)

- 有囊花粉〔図5・3C型〕例（マツ科 モミ科）  
花粉を中心に側面に気嚢をもつ。
- 遠心極面と向心極面との花粉管口数・異極花粉〔図5・4A, 4B<sup>b</sup>, 4B<sup>c</sup>・6C型〕例（4A<sup>a</sup> オニグルミ, 4B<sup>b</sup> ムラサキ, 4B<sup>c</sup> ポロポロノキ, 6C<sup>a</sup> タンキリマメなど）
- ラセン状孔花粉〔図5・4C<sup>c</sup>型, 写真2・J〕例（ムクゲ フヨウ）
- 向心極面粘着糸花粉〔図5・5B型, 写真・4〕例（アカバナ科）
- 遠心極面粘結糸花粉〔図5・7C<sup>d</sup>型〕例（ツツジ科の多く）
- 花粉塊花粉〔図5・8B・C・D型〕例（ガガイモ科 ラン科）花粉塊には粘着部（虫などが蜜を吸いに来たとき、体につき他の花へはこぼれやすくしてある部分）、花粉塊柄、花粉塊の数その他によりさらに分類することができる。

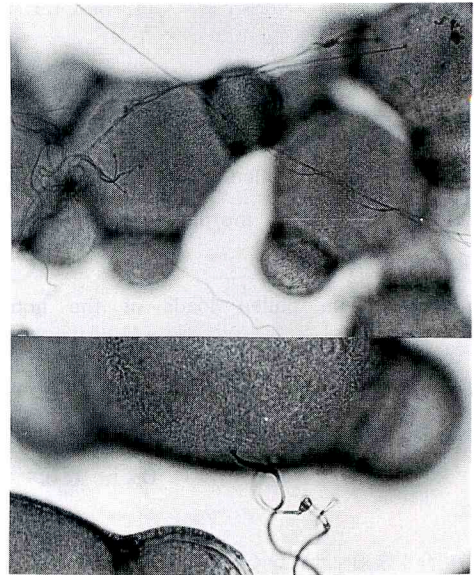


写真4 粘着糸, オオマツヨイグサ *Vicin thread, Oenothera lamarckiana* (Top ×250, Bottom ×500)

#### (j) まとめ

花粉の多くは黄色の粉のようなものだが、これを水で封じ顕微鏡でみると、多くの場合水分を吸収しすぎて外壁がやぶれ形をみるのがむずかしい。そこで上記したような方法でプレパラートを作ってみるとよく観察することができる。

なお雄しべから花粉をとるとき、×10くらいのルーペでのぞいて、花粉ぶくろから花粉が沢山でてくるものを材料にする。種類によっては花が開いてしまう前が材料によいもの（例 キキョウ科）また夕方から夜にかけて咲くものもある（マツヨイグサ カラスウリ）。そのほか雄花と雌花が一本の植物で別々に咲く（マツ カボチャ フキソウ）ものや、雄花と雌花が別々の株に咲く（イチヨウ チョウセンゴミシ ハナイカダ）植物があるので、ルーペでのぞきながら花を観察することが大切だ。

最後に植物名などにつき、長年に亘ってお教え下さった故久内清孝先生（東邦大・名誉教授）、故原寛

先生（東大・名誉教授）その他多くの方々。また顕微鏡写真撮影を最初にご指導下さった巨理俊次先生（東大元教授）に感謝します。

(k) 主な文献

R. P. Wodehouse : Pollen grains (1945).

G. Erdtman : Pollen morphology and plant taxanamy (1952).

D. Hodges : The pollen loads of the honey bee (1952).

幾瀬マサ : 日本植物の花粉 (1956) 増改版予定.

豊国秀夫 : 植物学ラテン語辞典 (1987) 他.

(以上 幾瀬マサ)

著者紹介 : 幾瀬マサ (いくせ まさ)

〈生年月日〉 1914 (大正 3) 年 11 月 13 日 埼玉県生まれ.

〈略歴〉 1935 年帝国女子医薬専業学科卒 (現東邦大学薬学部の前身), 同年母校に勤務後 1960 年東邦大学薬学部教授, 1969 年から 8 年間東邦大学薬学部長, 1980 年東邦大学名誉教授, 1986 年日本花粉学会々長 (前会長).

〈研究テーマ〉 花粉の形態・分類など.

〈著書〉 日本植物の花粉 (1956 年), その他花粉に関連した共著.

〈抱負〉 上記著書の増改版にむけ, 現在までに作成した約 14,000 枚の花粉プレパラートを顕鏡下で, 一日も早く全プレパラートの見なおしを終えて再版したい. このため毎日 4-5 時間楽しく顕微鏡をのぞいている.

〈趣味〉 山野を歩き自然の花々を眺め, これらをカメラで接写して楽しんでいる. 昔, 女学校の頃バレーボールのキャプテン, 今もバレーボールをみるのが楽しみ.



## (2) 蛍光顕微鏡観察

### (a) はじめに

蛍光顕微鏡観察法とは、標本に紫外線または短波長の可視光を照射し、それによって励起された蛍光を光学顕微鏡下で観察する手法である。生物試料のなかには、紫外線照射を受けると自ら蛍光を発するものがあり、この蛍光を一次蛍光（または自家蛍光、固有蛍光）という。一方、以下で述べる花粉管や花粉細胞の細胞器官では照射を受けても観察が可能な程度の蛍光を発しない。したがって、観察にはあらかじめこれらに特異的な蛍光色素を結合させ、照射によってその色素が発する蛍光（これを二次蛍光という）によって観察を行う。使用される蛍光色素の種類は多く、被染色物質との特異性が強いいため、目的に応じた使い分けが必要である。また、色素の種類によって励起に有効な照射波長が異なるため適当な励起法を用いねばならない。

蛍光染色による観察では、通常の染色法にくらべて微細な構造の解析には適さない面もあるが、近年、光学系の改良に加えてモノクローナル抗体法や蛍光抗体法などの開発・改良が進み、通常の染色方法では観察できない程度の微量な物質の分布や動態の解析が可能になってきた。花粉学の分野においても、また、その活用は年々高まりつつある。以下、花粉内細胞の核、微小管やアクチンなどの細胞骨格、および花粉管の蛍光顕微鏡観察法について述べるが、基礎的な蛍光顕微鏡の構造、操作法については小机(1983)<sup>(1)</sup>を参照されたい。

### (b) DAPI 染色法による花粉内細胞核の観察法

被子植物の花粉形成過程では小孢子と生殖細胞の分裂がおきる。小孢子分裂では、分裂が不均等であり、2娘細胞は生殖細胞と栄養細胞へと細胞分化を遂げる。また、二細胞性花粉の生殖細胞は花粉管という生理的・空間的に特殊な環境のもとで分裂する。これらの特異的な現象を有する花粉は、細胞の分裂と分化に関する研究の好材料である。これらの多くの研究は電子

顕微鏡法によるほか、光学顕微鏡的にはアセト・カーミン染色法などによってなされているが、蛍光観察は主に DAPI 染色法やアクリジンオレンジ染色法が用いられている。DAPI は DNA と結合特異性が高い色素であり、また後述する FITC やローダミンなどの蛍光色素との二重染色も可能であり、染色手順も比較的簡単なことから、今日、広く用いられている。アクリジンオレンジ染色法は、DNA と RNA の分染が可能である。アクリジンオレンジ染色法は、Bhaduri と Bhanja (1962)<sup>(2)</sup>による方法を、また、アセト・カーミン染色法は寺坂(1983)<sup>(3)</sup>を参照されたい。

(i) 試料の収集：花粉粒を葯からとりだし遠心管にあつめ、花粉管はカバーガラス上での人工培養法によって誘導する。花粉管の培養法は寺坂(1984)、<sup>(4)</sup>岩波(1980)、<sup>(5)</sup>Brewbaker と Kwack (1963)<sup>(6)</sup>を参照されたい。

(ii) 固定：4-10℃に冷却したカルノア変液（エチルアルコール、クロロホルム、酢酸の2:1:1混液）を使用する。花粉粒は30-60分間、花粉管はカバーガラス上に1, 2滴注ぎ10分間固定する。核はこのほか後述する微小管やアクチンの固定法によっても固定可能である。花粉管の場合には、固定後、固定液をろ紙で除去し、カバーガラス上で1時間以上放置し、自然乾燥させたのち、次の段階に進む。固定液やその他の処理液の交換は、花粉粒では1,000×g、5分間の遠心操作によって、花粉管ではシャーレ内で行う。

(iii) 洗浄：固定後の試料は蒸留水または適当な緩衝液で30分間洗浄する。この間、洗浄液は2, 3回交換する。

(iv) 染色：1μg/ml 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 水溶液または緩衝溶液で5分間染色する。なお、緩衝液の種類によっては DAPI の粉末が完全には溶けないことがあるが、上清液でも十分に染色可能である。

(v) 洗浄：蒸留水または緩衝液によって30分間。

(vi) 封入、封かんおよび観察：100 mg/ml の1,

4-diazabicyclo [2, 2, 2] -octane (DABCO) 水溶液と無蛍光グリセリンとを等量ずつ混ぜて封入液とし、遠心管よりスライドガラス上に取り出した花粉粒、カバーガラス上の花粉管に1, 2滴注ぐ。DABCOの添加は紫外線照射による蛍光の退色をできるだけ防止するためである。パラフィンによってカバーガラスの周囲を封かんしたのち、UV励起法によって観察する。核および染色体は鮮やかな青白色の蛍光色を呈する。

### (c) 細胞骨格観察法

花粉における細胞骨格の研究は、これまで主に花粉管の伸長と原形質流動とに関連して行われてきた。一方、花粉粒については、その厚い花粉壁が障害となっ

て研究がやや立ち遅れ気味であったが、近年、花粉壁のうすい種を用いたり、内壁を消化するなどの工夫がなされ進展をみせている。小孢子における特異な分裂様式、生殖細胞と栄養細胞との細胞分化、花粉成熟から発芽にかけての脱水状態から吸水への生理的変化などは顕花植物の雄性配偶体形成過程に共通した現象であり、これらの過程で微小管やアクチンなどの細胞骨格がどのように関与するかは興味ある研究課題である。以下、抗- $\alpha$ -チューブリン間接蛍光抗体法による微小管の観察法とローダミン・フェロイジン染色法によるアクチンの観察法について述べるが、試料の収集、処理液交換など標本作製に関する基本的手法は前述のDAPI染色法に準じて行う。

#### (1) 抗- $\alpha$ -チューブリン間接蛍光抗体法による微

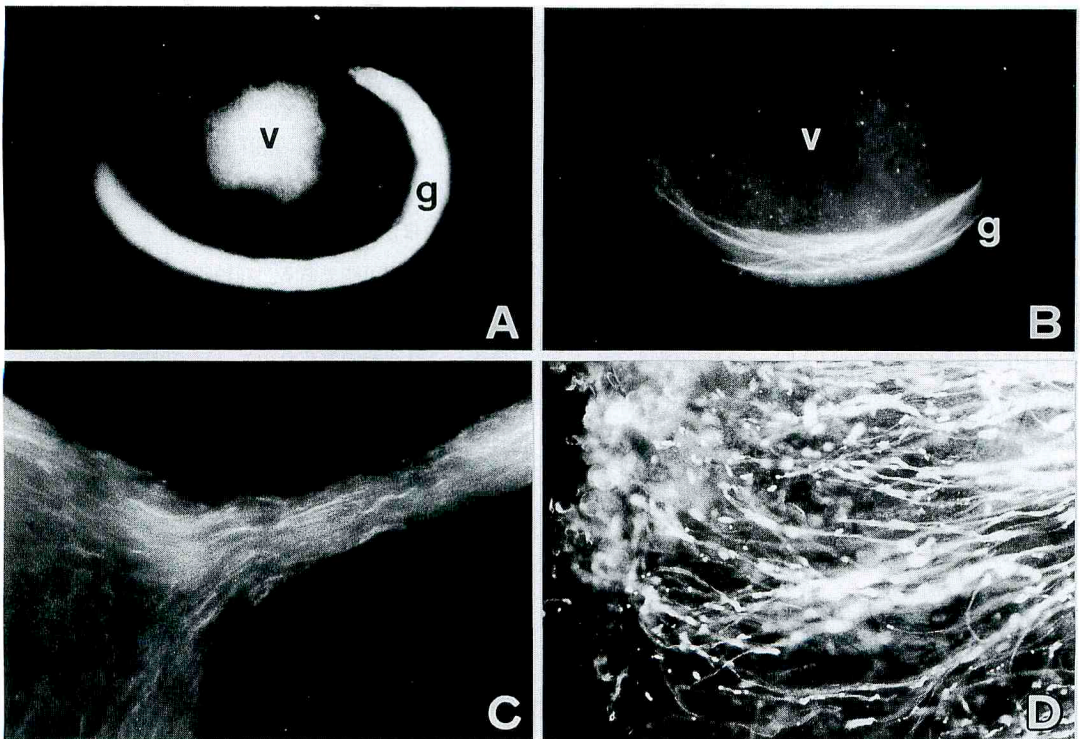


図 花粉における各種蛍光染色像 A, DAPI 染色法による成熟花粉粒内の生殖細胞 (g) 核と栄養細胞 (v) 核 (ヌママラサキツユクサ); B, 抗- $\alpha$ -チューブリン間接蛍光抗体法による成熟花粉粒内の微小管 (ヌママラサキツユクサ); C, ローダミン・フェロイジン染色法による花粉粒より花粉管内へ移入中のアクチン (ミドリアマナ),  $\times 875$ ; D, アニリンブルー染色法による花柱内の花粉管 (ハナニラ),  $\times 60$ .

## 小管の観察法

間接蛍光抗体法は Coons (1941) によって開発された方法で、抗原となるタンパク質に対する一次抗体と、あらかじめ FITC などの蛍光色素で標識した二次抗体を使用して、細胞内に存在する抗原物質を蛍光により検出する方法である。以下に述べる方法は Wickら (1981)<sup>(7)</sup> による方法を筆者らが一部改良したものである。

(i) 固定：5 mM の EGTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (PPB) で pH 6.8 に調整した 3.7% パラホルムアルデヒドによって、花粉粒または花粉管を室温で 1 時間固定する。パラホルムアルデヒドは常温では溶けにくいので、沸騰させない程度に加熱して溶かす。

(ii) 洗浄：PPB によって試料を 30 分間洗浄する。PPB はこの間 2, 3 回交換する。

(iii) 壁の消化：1% セルラーゼ、1% マセロザイムおよび 0.1 M ショ糖を含む酵素液によって花粉粒内壁を 30-60 分間、花粉管壁を 15-20 分間室温で消化する。

(iv) 洗浄：PPB で 10 分間。

(v) 塗抹：よく洗浄したカバーガラスを 1% ポリ-L-リジン水溶液に 5-10 分間浸したのち乾燥させ、カバーガラスにポリ-L-リジン被膜をつくる。この被膜作成は花粉粒をカバーガラスにはりつけるためである。このカバーガラス上に花粉粒を塗抹し、約 1 時間放置乾燥させる。花粉管の場合には、(v)、(vi) の過程は不要である。

(vi) 洗浄：カバーガラス上の花粉粒をシャーレ内の PPB で 10 分間洗浄する。

(vii) 微小管の安定化：0.15 M 水酸化ナトリウム水溶液に 1% トリトン X-100, 0.1 M の PIPES, 2 mM の EGTA, 1 mM 無水硫酸ナトリウム, 0.4 M マンニトールを溶かし、さらに水酸化ナトリウムで pH 6.9 に調整した微小管安定化緩衝液に 20-30 分間浸す。

(viii) 一次抗体標識：0.1% アジ化ナトリウム, 1 mg/ml 牛血清アルブミンを含む PBS (phosphate

buffered saline, シグマ社) で、1,000 倍に希釈した市販の抗- $\alpha$ -チューブリン抗体を一次抗体とする。この抗体を試料に 1, 2 滴注ぎ、37°C で 1 時間、湿室でインキュベートする。アジ化ナトリウム、牛血清アルブミンの使用は抗体を安定保存するためである。

(ix) 洗浄：0.05% トリトン X-100 を含む PBS で 30 分間。

(x) 二次抗体標識：一次抗体に対応する FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗 IgG 抗体を二次抗体とする。0.1% アジ化ナトリウムを含む PBS で 40 倍希釈し、試料に 1, 2 滴注いだのち、37°C で 1 時間、湿室でインキュベートする。一次および二次抗体は数回の使用が可能である。また、筆者は一次抗体として Amersham 社のマウスモノクローナル抗- $\alpha$ -チューブリン抗体、二次抗体として TAGO 社のヤギ-抗-マウス IgG-FITC を併用し好結果を得ている。

(xi) 洗浄：PBS で 30 分間洗浄する。核染色が必要な場合は、この過程で DAPI 染色法により行う。

(xii) 封入、封かんおよび観察：100 mg/ml DABCO を含む PBS と無蛍光グリセリンの等量液を封入液として使用する。試料に 1, 2 滴封入液を注いだのち、パラフィンで封かんし、B 励起法により観察する。微小管は黄-黄緑色を呈する。

(II) ローダミン・ファロイジン染色法によるアクチンの観察法

ローダミン・ファロイジンはアクチン様タンパク質との結合性が高いファロイジンとキサンテン染料の一種であるローダミンが結合したものである。アクチンの構造は固定など、標本作製過程での影響を受けやすいため、ネイティブな構造を得るためには細胞の種類よっての注意深い工夫が必要である。

(i) 固定：5 mM EGTA を含む PPB (微小管の観察法参照) で pH 6.9 に調整した 4% ホルマリンで 1 時間、室温で固定する。

(ii) 洗浄：試料を PPB で 1 時間洗浄する。この間 PPB を 2, 3 回交換する。

(iii) 壁の消化：0.1 M ショ糖を含む 1% セル

ラーゼ, 1% マセロザイムの酵素液で花粉粒内壁を30-60分間, 花粉管壁を15-20分間, 室温で消化する。

(iv) 洗浄: PPBにより30分間。

(v) 塗抹: 1% ポリ-L-リジン被膜をつくったカバーガラス上に花粉粒を塗抹し, 約1時間放置乾燥させる。花粉管の場合, (v), (vi) の過程は不要である。

(vi) 洗浄: PPBにより10分間。

(vii) 染色: 市販のローダミン・ファロイジン液をPBSで10倍稀釈し, 試料に1, 2滴注ぎ, 45分間, 室温で染色する。

(viii) 洗浄: PBSにより30分間洗浄する。核染色が必要な場合はこの過程でDAPI染色法を行う。

(ix) 封入, 封かんおよび観察: 試料に封入液(微小管の観察法参照)を1, 2滴注ぐ。パラフィンで封かんのち, G励起法により観察する。アクチンは赤橙色を呈する。

#### (d) 花粉管染色法

花粉管の蛍光染色法は, 植物の交雑における和合, 不和合性をすみやかに判定するため, 花柱や子房内の花粉管を検出する方法である。この方法は, 同時に花粉管に発達するカロス栓もよく染色する。以下, アニリンブルーを用いたKhoとBaër(1968)<sup>(8)</sup>, Kasten(1985)<sup>(9)</sup>の方法を筆者らが一部改良したものについて記すが, BhaduriとBhanja(1962)<sup>(2)</sup>はアクリジンオレンジ染色法によっても観察している。また, 蛍光染色ではない通常の染色法についてはPhillips(1985)<sup>(10)</sup>を参照されたい。

(i) 固定: 受粉後2, 3日目めしべを採集し, 約10°Cのカルノア変液で1時間またはFAA液(ホルマリン5ml, 酢酸5ml, 70%エチルアルコール90ml混液)で48時間固定する。

(ii) 洗浄: 50%エチルアルコールで1時間洗浄する。この間, 洗浄液を2, 3回交換する。

(iii) 解離: めしべを60°Cの1M水酸化ナトリ

ウム溶液に90秒間, または室温の溶液に1時間浸し, 花柱や子房組織を解離する。めしべの大きさに応じて解離時間を適宜調整する。

(iv) 洗浄: 蒸留水で30分間。

(v) 染色: 0.1Nリン酸三カリウム溶液に溶かした0.1%アニリンブルー(水溶性)溶液で12時間以上染色する。

(vi) 洗浄: 蒸留水で30分間。

(vii) 押しつぶし: 試料をスライドガラス上にとりだし封入液(DAPI染色法参照)を1, 2滴注ぐ。カバーガラスをかけたのち上からかるく押しつぶす。

(viii) 封かんおよび観察: パラフィンで封かんし, UV励起法により観察する。花粉管は黄色または黄緑色を呈する。

#### (e) 写真撮影法

蛍光顕微鏡の写真撮影法は, 基本的には普通照明による場合と同じである。しかし, 蛍光色素の種類によっては撮影に長時間の露光が必要であり, 長時間露光によって蛍光が退色するおそれがあるので, フィルムは高感度のものを使用する。モノクロームフィルムの場合, 筆者らはコダック・トライXパン(ASA400)を用いて, コピナール(フジ写真フィルム)による現像を行っている。

#### (f) 引用文献

- (1) 小机弘之: 実験生物学講座2(新津・平本編) 丸善株式会社 pp. 114-121(1983).
- (2) Bhaduri, P. N. and P. K. Bhanja: Fluorescence microscopy in the study of pollen grains and pollen tubes. *Stain Techn.* 37, 351-355(1962).
- (3) 寺坂治: 実験生物学講座2(新津・平本編) 丸善株式会社 pp. 11-20(1983).
- (4) 寺坂治: 実験生物学講座8(新津・沖垣編) 丸善株式会社 pp. 160-170(1984).
- (5) 岩波洋造: 花粉学, 講談社サイエンティフィック

- (1980).
- (6) Brewbaker, J. and B. H. Kwack: The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* **50**, 859-865 (1963).
- (7) Wick, S. M., R. W. Seagull, M. Osborn, K. Weber and B. E. S. Gunning: Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. *J. Cell Biol.* **89**, 685-690 (1981).
- (8) Kho, Y. O. and J. Baër: Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* **17**, 298-302 (1968).
- (9) Kasten, F. H.: Staining Procedures (4th ed.) Biological Stain Commission 編 (金子・新井訳) pp. 37-38 (1985).
- (10) Phillips, R. L.: Staining Procedures (4th ed.) Biological Stain Commission 編 (金子・新井訳) pp. 284-288 (1985).

(以上: 寺坂治・新津恒良)

#### 著者略歴

寺坂 治 (てらさか おさむ)

〈生年月日〉1947 (昭和22) 年5月6日愛媛県生まれ

〈略歴〉1970年山口大学教育学部中等理科卒, 1974年広島大学大学院理学研究科博士課程中退, 1974年広島大学助手, 1975年東京慈恵会医科大学助手, 1980年より同大学講師

〈研究テーマ〉花粉の分裂と分化に関する細胞生物学的研究

〈趣味〉路傍植物の写真撮影

新津恒良 (にいづ つねよし)

〈生年月日〉1929 (昭和4) 年12月13日東京生れ

〈略歴〉1954年東京大学理学部卒業, 1959年同大学院修了, 理学博士, 日本学術振興会奨励研究員, 1960年東京慈恵会医科大学助教授, 1964年同大学教授

〈著書〉図説現代生物学 (丸善), 生物科学実験法 (東京教学社), 実験生物学講座 (丸善, 編著), 現代生物学大系補遺 (クロマチン, 核小体) (中山書店), 科学の辞典改訂3版 (細胞) (岩波書店), 生物学辞典 (岩波) など分担執筆

〈訳著〉細胞生物学 (丸善), 要説・分子細胞生物学 (HBJ 出版)

〈研究テーマ〉細胞の分裂と分化

〈趣味〉写真

### (3) 電子顕微鏡観察

#### (a) 走査型電子顕微鏡による形態観察

花粉の外部形態は、最初光学顕微鏡 (light microscope, 以下省略記号を LM とする) によるスケッチで表現され、続いてその写真が撮影されるようになった。透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, 以下省略記号を TEM とする) の発達とともに、レプリカ法が導入され、花粉外膜表面の微細構造が明らかになった。その後、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, 以下省略記号を SEM とする) が登場し、焦点深度が大きくて立体感のある花粉像を得ることが出来るようになった。このように LM によるスケッチの第一世代、LM 写真による第二世代、TEM によるレプリカ像の第三世代に続いて、SEM 像は第四世代にあたり、恐らく現時点では、花粉の外部形態をもっとも立体的で鮮明に表現してくれる最良の手段であろう。本稿では、できるだけきれいな花粉の SEM 像を得るためには、どのような花粉処理を行い、どのような状態で SEM を操作したらよいかについて解説する。

なお、SEM は確かに立体的な花粉の外部形態を一つの平面上に写し出してくれる有力な機器であるが、これにもいくつかの欠点のあることを承知しておかなければならない。例えば、光がある程度花粉を透過する LM では、カバノキ属とクマシデ属の花粉は、発芽孔の前腔 (vestibulum) の有無によりたやすく区別できるが、花粉の表面しか走査しない SEM では、前腔の有無を確認出来ない。さらに、SEM は高価な機器であるから、小型でも数 100 万円、本格的な大型では数 1000 万円もするため、誰でもが LM のように手軽に利用できない。このようなことから、花粉学の研究手段としての LM によるスケッチや写真は、SEM 像と共に今後も重要視しなければならない。

#### (1) 試料の作成

##### (i) アセトリシス法

花粉は試料台に両面テープをはったり、導電性樹脂塗料 (ドータイド) を薄くぬり、その上に何の化学処

理もしない花粉を散布したりして金属蒸着しただけでも、ある程度きれいな SEM 像を得ることができる (図版 III. 6a)。特にクスノキ科やカンナの花粉は、花粉外膜がひじょうに弱いため化学処理をすると壊れてしまうので、むしろ無処理の方がよい結果が得られる (図版 I. 3, 4)。しかし、大多数の現生花粉は、無処理の乾燥した状態で撮影すると発芽孔が内側に入りこんでしまい、膨潤状態の花粉とはかなり異なった形態を示すことが多い (図版 II. 5a, 5d)。

今日では現生花粉の LM による形態学的研究にあたっては、アセトリシス処理して花粉内部の細胞質を除去し、花粉外膜表面に付着している粘液 (図版 II. 5b) のようなものも取り除いて観察するのが、国際的な慣例になっている。さらに花粉分析で堆積物中から化石花粉を分離・抽出する際にも、ほとんどの場合アセトリシス処理が行われるので、SEM で花粉を観察する時もアセトリシス処理を行って処理方法を LM と同一条件にしておく方がよい。

##### アセトリシス処理の手順<sup>(1)</sup>

- イ. 花粉、葯、花あるいは植物全体を 10 cc の遠心管に入れる。
- ロ. 醋化液 5 ml を加えて攪拌してから湯煎器の中で 3 - 5 分加熱する。醋化液は、無水酢酸 9 部に濃硫酸 1 部を混入した液で、水気のないメスシリンダーで使用する直前に調合する。
- ハ. 加熱の終わった醋化液に氷酢酸を 5 ml 加えて、攪拌してから遠心分離。
- ニ. 残渣に蒸留水を加えて、ふるいにかけて異物を除去してから遠心分離。
- ホ. 残渣に蒸留水を加えて遠心分離。

##### (ii) 異物の除去

花粉だけを集めてアセトリシス処理をすれば、花粉以外の異物の混入はほとんど問題にならないが、葯や花ごとあるいは植物全体をアセトリシス処理して花粉を集めなければならないことも多い。このような時ふるいで大きな植物組織は除去しても、花粉の中に小さな異物が多数混入していて、写真像の質的低下をもた

らし困らされる。そこで最近、ナイロンメッシュのさまざまな径のものが売られているので、大きな異物だけでなく、微細な異物の方もふるいにかけて除去するとよい。ふるいの大きさは、花粉の大きさにより適当に選択すればよいが、花粉は $20\mu\text{m}$ 以上の大きさのものが多く、筆者は異物が多く混入している場合には $20\mu\text{m}$ のふるいで小さな異物を除去している(図版Ⅲ. 8a, 8b)。

### (iii) 試料の固定・脱水・乾燥

生物試料をSEMで観察する場合、試料中の水分の除去、すなわち脱水・乾燥は必須条件ともいえるきわめて重要な操作である。花粉外膜が丈夫なものでは、自然乾燥させたり、アルコールで脱水処理をただけでも十分きれいなSEM像が得られる。しかし、花粉外膜の薄いものでは、自然乾燥やアルコールによる脱水だけでは凹凸ができたり、発芽口が内側にめりこんでしまうことがしばしばある(図版Ⅲ. 7a)。このような欠点を生じない簡便なカルノア法を堀江(1973)<sup>(2)</sup>が考案しているので、ここに紹介しておく。

イ. アセトリシス処理の終わった残渣にカルノア液(エチルアルコール3部:氷酢酸1部)を5ml加えて攪拌し、半日前後固定してから遠心分離。

ロ. 残渣にエチルアルコールを加えて洗い、遠心分離。

ハ. 残渣にキシレンを加えて洗い、遠心分離。

ニ. 残渣をスポイトに取り、試料台に一滴落として拡散させながらキシレンを揮発させて乾燥する。

アセトリシス処理をしてカルノア液で固定した後乾燥させた花粉は、無処理のまま乾燥した花粉より長軸の径が50%以上も縮小して花粉の大きさを左右することがあるので、必ず処理方法を明記しておくことが大切である(図版Ⅲ. 6a, 6b)。

### (iv) 試料台

カルノア法で処理した花粉は、銅製支持台に直接一滴落して乾燥させただけでも十分きれいなSEM像を得ることができるが、銅の丸棒から支持台を製作した時に生じる切断跡や研磨による傷などが花粉の周囲に現れて見苦しい(図版Ⅰ. 1a)。そこでSEM像の

バックグラウンドをきれいにするために、さまざまな工夫がなされている。一番手軽な方法は、上質の石英質スライドガラスを支持台に乗る大きさにガラスナイフで切って両面テープではりつけ、その上に試料を一滴落してやる。ガラスは表面がなめらかな微粒子のため、きれいなバックグラウンドになる。スライドガラスの代わりに雲母、カバーガラス、アルミホイルなどを使っている研究者もいる。スライドガラスの欠点は、導電が悪くチャージアップがよく起こることであるが、これはスライドガラスの周囲に導電性樹脂塗料を塗布してやることで、ある程度は防げる。雲母やアルミホイルは、軟らかいため集合した花粉を針で拡散させているときに、すぐに傷がつく欠点がある。一番よい試料台は、半導体の基板として使われる電気伝導度の高いGaAs基板(Siドープ)である。これは導電性がよくて、しかもきめのこまかい鏡面を持つので優れたバックグラウンドが得られる(図版Ⅰ. 1b, 2a-b, 3)。ただ、これの欠点は、高価でしかも壊れやすいことである。

### (v) 真空蒸着

乾燥した生物試料は、非導電性のためそのままではSEMで観察しても、試料表面にチャージアップが起こる。そのため試料に導電性を与えてやる必要があり、その操作が金属蒸着法である。蒸着物質として用いられる金属は、金(Au)、白金(Pt)、金-パラジウム合金(Au-Pd)などで、蒸着は次のような目的をもっている。<sup>(3)</sup>

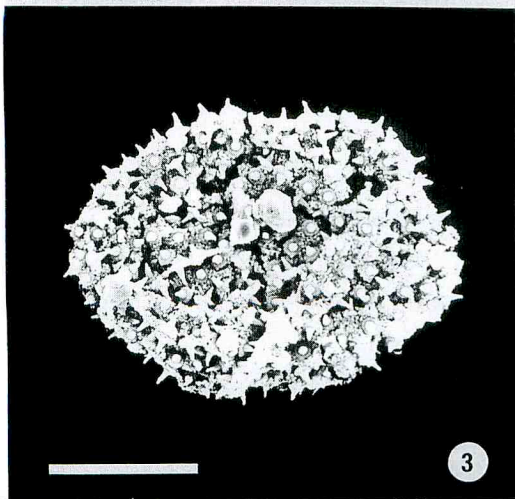
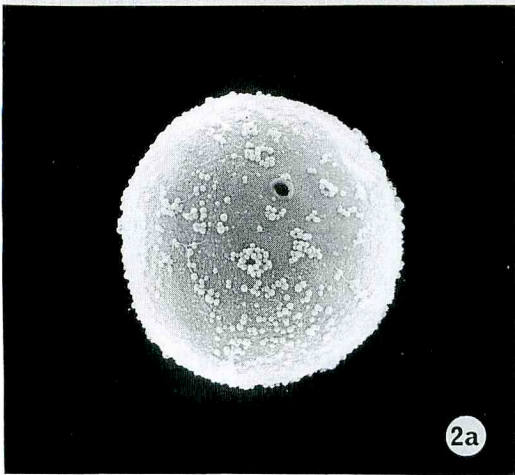
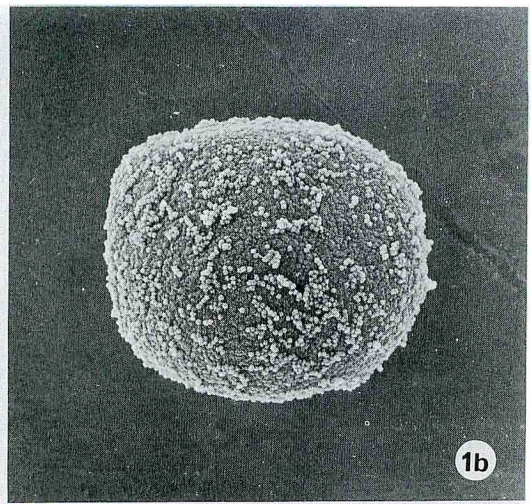
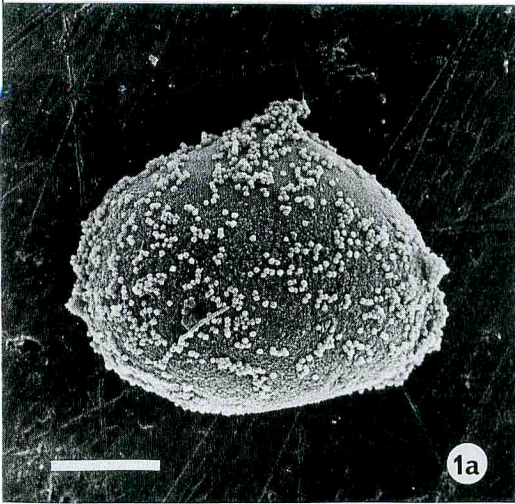
イ. チャージアップ現象の防止。

ロ. 電子線損傷の軽減。

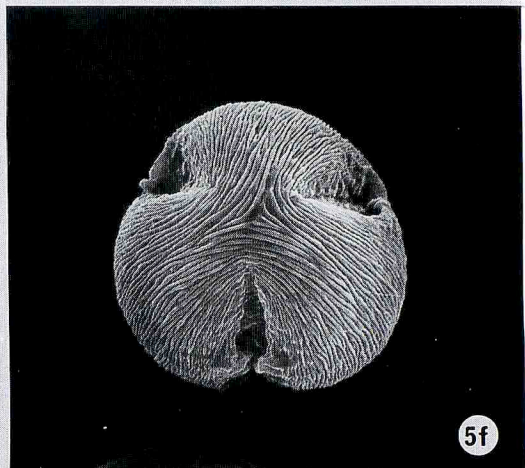
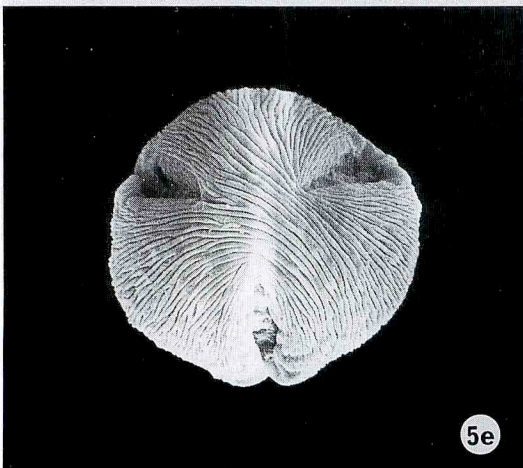
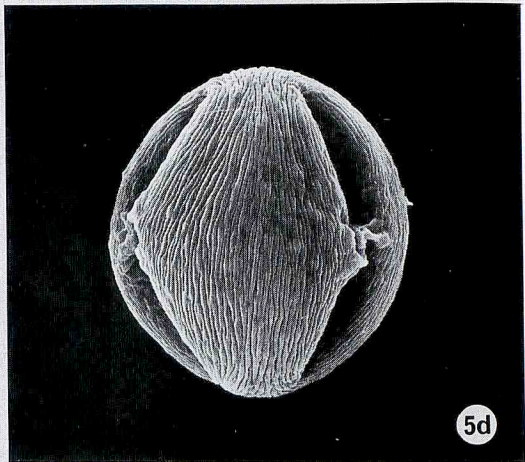
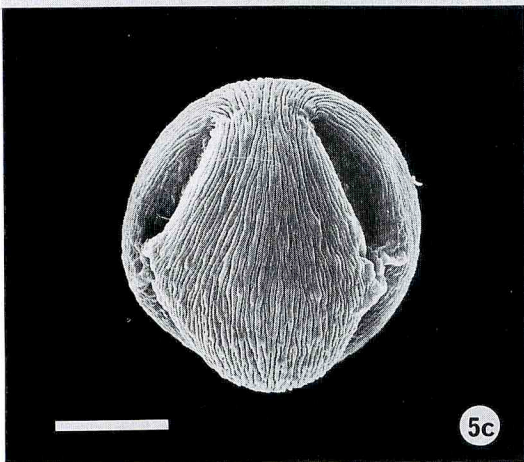
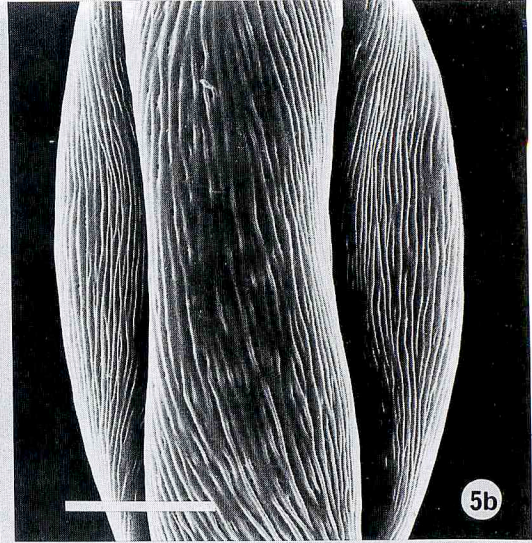
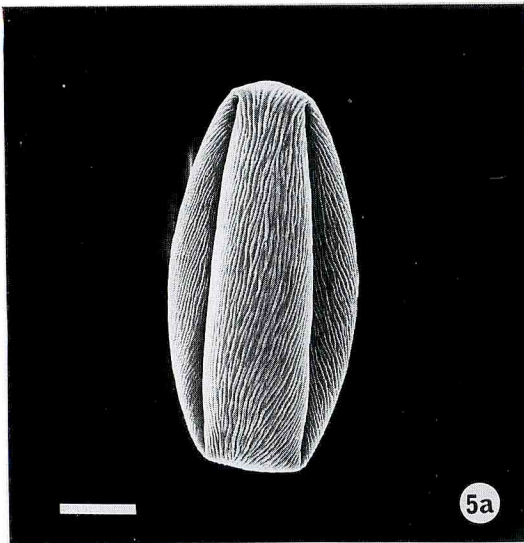
ハ. 二次電子放出の増加(明るい像を得る)。

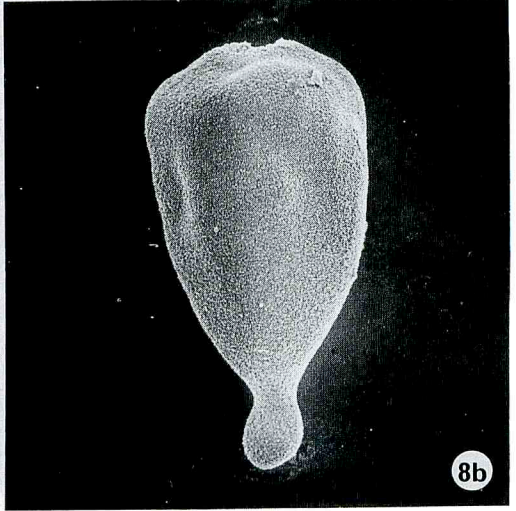
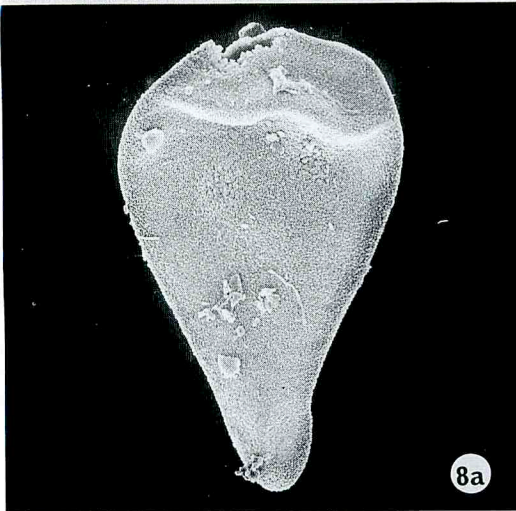
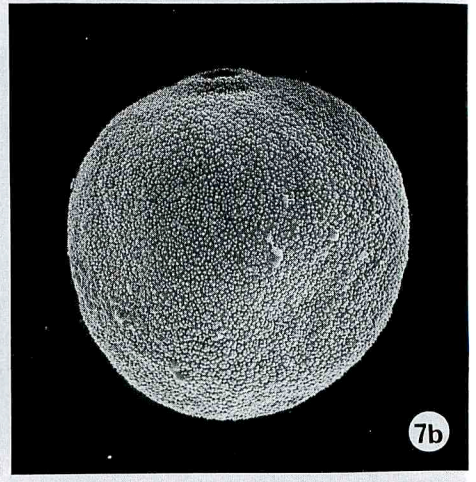
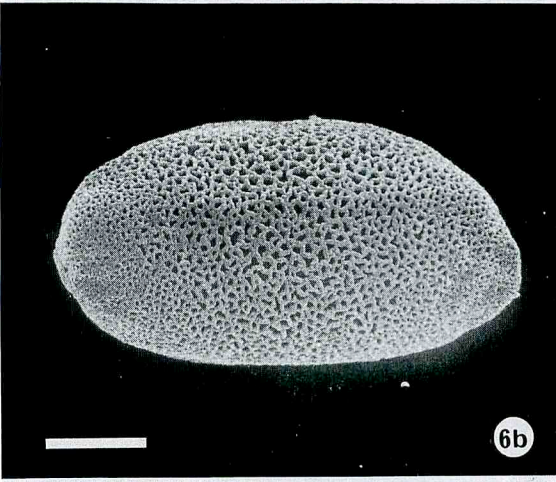
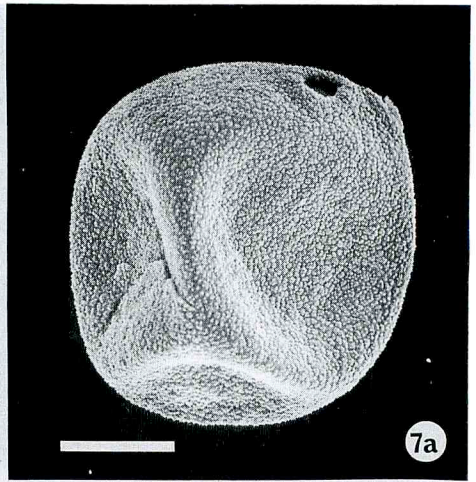
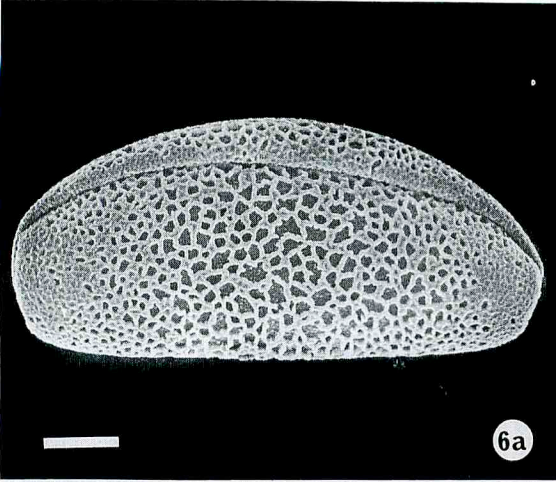
ニ. 表面からだけの情報に限定する(レプリカ法に近い)。

花粉では発芽溝が大きくくぼんでいる場合など十分蒸着できないため、チャージアップすることがある(図版Ⅱ. 5e)。このようなチャージアップを防ぐためには、試料台回転装置がついていない蒸着装置では、例えば7分間蒸着する場合、4分間蒸着したら一度装









置を停止して、試料台の上下を逆方向に変えてから残り3分間蒸着すれば、よい結果が得られる。蒸着時間は、長すぎると花粉外膜表面の模様が金属蒸着膜で消失してしまうので、できるだけ薄く蒸着することが望ましいが、逆に短かすぎても蒸着膜が薄すぎてチャージアップの原因になる。筆者の経験では、花粉の大多数の種類は、5-8分間ぐらいの蒸着で十分のように思われるが、経験をつめば花粉の大小によって蒸着時間の調節も可能になる。

最近 SEM の電子銃をタングステンフィラメントでなく電界放射 (field mission) を利用した高輝度電子銃を用いることにより無蒸着で高分解能が可能になってきている。しかし、まだその写真は金属蒸着したものと比べると不鮮明で、花粉学の研究に導入出来る域には達していない。

## (II) SEM の操作

研究体制のととのった大学や研究所の SEM 室には専属の技師がいて、試料さえもって行けば撮影してもらえる。ただ、花粉についての専門知識の乏しい技師まかせでは、研究者が希望する最良の SEM 像を得られないこともあるので、できれば SEM の操作は、研究者自身で行えることが望ましい。

### (i) 加速電圧

高い加速電圧にすると、微細構造が不鮮明になり、像のコントラストが透き通った感じになったり、エッジ効果が顕著となり異常コントラストの原因となる<sup>(3)</sup>

(図版 I. 2a) などの不都合を生ずるので、電子ブ

ローブの径が大きくなる程度に加速電圧を低くして観察する必要がある。生物試料では一般に 10-15 kV の間を利用している。5 kV 程度で使用すると微細構造ははっきり観察できる場合が多いが、電子ブローブの径が大きくなるため、高倍像の観察がむづかしくなる。

### (ii) 試料の傾斜と回転

試料を傾斜させることは、像のコントラストを増大させる意味で有効な方法であるが、それに加えて花粉の観察にあたっては、極観像や赤道観像が典型的な位置になっていない場合に、傾斜を使うことによってよりよい像を得ることができるので、活用しなければならない。例えば、3 溝孔型花粉の赤道観で 2 つの発芽溝がきちんと赤道面上に現れていない場合、傾斜をかけることにより上下、左右対称に発芽溝の並んだ像を得ることができる (図版 II. 5c, 5d)。また、花粉の赤道観像は、撮影前に必ず試料回転を使って赤道軸や極軸が上下か左右になるようにセットしておく、印画紙への焼付けをする時の作業が楽である。

## (III) 引用文献

- (1) 三好教夫：花粉分析 (2) — 試料の採取から測定まで —。遺伝 39, 66-71 (1985)。
- (2) 堀江延治：走査電子顕微鏡観察の際の花粉処理法。花粉誌 12, 33-34 (1973)。
- (3) 日本電子顕微鏡学会関東支部編：走査電子顕微鏡 — 基礎と応用 —。共立出版 東京 (1976)。

(以上：三好教夫)

## 図版 I, II, III. 花粉の SEM 写真像 (Plate I, II, III. SEM micrographs of pollen grains)

図版 I (Pl. I) 1. セコイア *Sequoia sempervirens* Endl. (a, b: ×1500). a. 銅製の試料台。b. GaAs 基板; 2. ヒノキ *Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endlicher (a, b: ×1500). a. 加速電圧 20kV. b. 7kV; 3. クスノキ *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. (×2000). アセトリシス処理; 4. イヌガシ *Neolitsea aciculata* (Bl.) Koidzumi (×2000). 無処理。

図版 II (Pl. II) 5. ツメイヨシノ *Prunus × yedoensis* Matsumura (a. ×1000, b. ×2000, c-f. ×1500). a. 無処理。b. 無処理のため花粉外膜表面に粘液が付着している状態。c. 傾斜を使う前の状態。d. 傾斜を使って修正した状態。e. 蒸着時間の不足で発芽溝の部分でチャージアップした状態。f. 再度蒸着してチャージアップしなくなった状態 (c-f. アセトリシス処理, カルノア固定)。

図版 III (Pl. III) 6. クンシラン *Clivia miniata* Regel (a. ×1000, b. ×1500). a. 無処理。b. アセトリシス処理; 7. カモガヤ *Dactylis glomerata* L. (a, b: ×1500). a. アセトリシス処理後アルコールで脱水してから乾燥。b. アセトリシス処理後カルノア液で固定してから乾燥; 8. ヒトモトススキ *Cladium jamaicense* Cranz. subsp. *chinense* (Nees) T. Koyama (a, b: ×1000). a. 80μm のナイロンメッシュで大きな異物だけ取り除いた状態。b. 80 μm と 20μm のナイロンメッシュで大小両方の異物を取り除いた状態。

著者紹介：三好教夫（みよし のりお）

〈生年月日〉1937（昭和12）年12月26日 香川県  
生れ

〈略歴〉1959年高知大学文理学部生物学科卒，1964年  
広島大学大学院理学研究科博士課程植物学専攻修  
了，1966年岡山理科大学常勤講師，1974年より同  
教授

〈研究テーマ〉SEMによる花粉の形態学的研究，中  
国山地第四紀堆積物の花粉分析学的研究

〈抱負〉SEMで撮影した花粉の図鑑を作ること，西  
日本における第四紀更新世200万年間の植生変遷史  
を解明すること

〈趣味〉囲碁（2段），草木の手入れ

#### (b) 透過型電子顕微鏡による細胞組織化学的観察

この分野には花粉だけに用いられる特殊な方法はま  
ずないと考えられる。常にいろいろの文献に注意して  
いて、自分の疑問とする問題の解明に利用できると考  
えられる方法を自分の材料に応用し、自分で利用を開  
拓してゆくものである。

私は花粉の発達状況を透過型電顕法により分析して  
いたが、形態の変化を追うだけではあき足らず、物質  
の移動や蓄積の度合を追跡できたらと考え、学会講演  
や文献の中から使えそうな方法を取りだして利用した  
のでその例をいくつか紹介する。

#### (I) 光学顕微鏡を用いる法

透過電顕用に樹脂に包埋した材料を用いる。

##### (i) Sudan Black B染色：脂肪滴の染色。

厚切切片（0.5-1.0 $\mu$ m・ウルトラミクロトーム使  
用）をスライドガラスに数枚貼付。50%エタノール  
にスライドガラスごと切片を一寸浸してエタノールに  
なじませる。Sudan Black B染色液（70%エタノール  
100 mlにSudan Black B 0.5 gを入れて加温溶解。  
冷却後濾過して使用）で10-20分間染色。（注意：こ  
の染色液は2-3週間で染色効果がおちるので、大量  
に作らずに必要な量を作るようにした方がよい。）50%  
エタノールで切片についた余分な染色液を洗い流す。

蒸留水で洗浄。ヘマトキシリンなどにより通常の染色  
を行う。常法により脱水，封入，検鏡。文献<sup>(1)</sup>

##### (ii) Aniline Blue BlackまたはCoomassie Brilliant Blueによる染色：蛋白質の染色。

厚切切片（0.3-2 $\mu$ m）をスライドガラスに貼付。  
1% Aniline Blue Black 7% 酢酸溶液中10分，  
50-60°Cまたは0.25% Coomassie Brilliant Blue  
7% 酢酸溶液中3分，30°Cで染色。  
7% 酢酸溶液で洗浄。5% 酢酸を含むグリセリンで  
封入し検鏡。文献<sup>(2)</sup>

#### (II) ふつうの透過電顕用に切った切片を染めて透 過電子顕微鏡を用いて観察する法

(i) タンニン酸染色：弾性繊維（elastic fiber），  
微小管，微小繊維，coated Vesicleのクラスリン，  
細胞壁などが強く染色される。

染色液を作る。下記（イ）（ロ）（ハ）を混合する。

（イ） タンニン酸 0.3 gを蒸留水 25 mlに溶かす  
（80°Cに加温，40°Cに冷やして（ロ），（ハ）を  
とくす）

（ロ） *p*-ニトロフェノール 0.5 g

（ハ） 5% 酢酸ウラン 0.5 ml

銅メッシュに貼付した超薄切片を上記染色液（40°C  
位）で10-15分染色。つぎに通常の硝酸鉛染色液で  
後染色。水洗後検鏡。文献<sup>(3)</sup>

##### (ii) 銀メテナミン染色：多糖類の検出。

ニッケルメッシュ（銅メッシュは硝酸銀に冒される  
ため使用不可）に超薄切片を貼付。1% 過沃素酸処  
理。室温15-20分。蒸留水で水洗。銀メテナミン溶  
液で40-60分処理（60-70°C）。：5% 硝酸銀（2  
ml）を1滴ずつ3% ヘキサメチレンテトラミン（18  
ml）に加え，その後2% 硼砂を加える。毎回新しく  
調整する。水洗。3% チオ硫酸ナトリウムで5分  
（室温）処理。水洗後検鏡。文献<sup>(4)</sup>

(iii) ルテニウムレッド染色：酸性ムコ多糖類の  
検出。細胞壁に存在するペクチンを強く染色する。こ  
れは固定法が通常と異なるわけで，超薄切片作成後の  
染色処理は通常に行う。また固定時間は材料により異

なるのであるが、ここには筆者のテッポウユリ小孢子に用いた方法を示す。

前固定. 3% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジル酸緩衝液. 1000 ppm ルテニウムレッドを含む. pH 6.9) 4°C, 15時間, 同緩衝液で洗う.

後固定. 2% オスミウム酸 (上記と同じ緩衝液. 1000 ppm ルテニウムレッドを含む) 4°C, 5時間. 文献<sup>(5)</sup>

(III) 電子顕微鏡用オートラジオグラフィー

放射性同位元素 (ラジオアイソトープ; RI) で標識した物質を生体に投与し, その物質の行方を追跡することにより, 生体の代謝過程と形態とを直接関連づける方法がオートラジオグラフ法である. 特別の代謝経路に適合する RI で標識した物質をトレーサーとして投与した生体を, 経時的にその RI の動向を追跡する為に切片を作り, その上に生じた RI による感光現象像銀の出現状態を見て, 生体の組織又は細胞でどの位置に RI があるかを検出する.

電顕によるオートラジオグラフ法は光顕によるものと操作の点では殆ど変わらないが, 切片の厚さが著しく異なる (光顕用: 5-10 $\mu$ , 電顕用: 約 600 ~ 800 Å) ので, 感光用に用いる乳剤と RI が異なる. 乳剤に含まれる臭化銀に対してストップエネルギーの大きい核種をもつ<sup>3</sup>H (トリチウム) が一番好ましい RI となる.

(i) RI の投与方法

材料の切り口から吸わせる方法, 注射, 培養基に入れるなどいろいろ考えられるが, 筆者の用いた方法を参考までに述べる.

図1. これは成長する小孢子の細胞壁に RI をとりこませたもので,<sup>(6)</sup> 蕾の中で葯だけを残して他の部分は切除してあるが, 吸収のため花柄は切除してはならない.

図2. これも成長する花粉の細胞壁に RI をとりこませるもので,<sup>(7)</sup> 蕾を植物体から切り離さないで, 葯以外の部分を切除した. *in vitro* 培養だとどうしても植物体が弱まるので, なるべく元気な状態を保つ為工

夫したものである. 注射と同じ原理であるが, 植物体は注射液は動物体と異なり吸収しにくいいためこのような試みをした.

図3. これは培養中の花粉管壁に RI をとりこませるもので,<sup>(8)</sup> RI を含む培地で一定時間培養した後 RI を含まない培地に移して培養をつづけたり, その反対の培養条件を用いたりして花粉壁内にとりこませた様子を檢した.

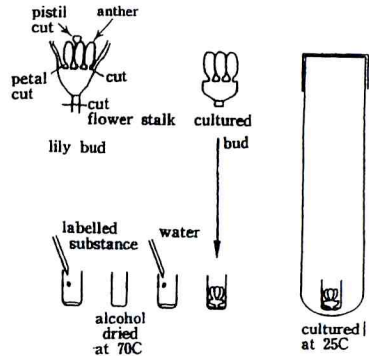


図1 *in vitro* で RI をとりこませる例

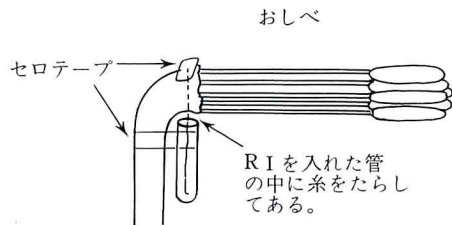


図2 *in vivo* で RI をとりこませる例

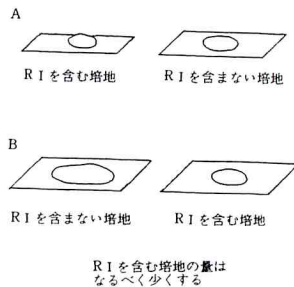


図3 培地に RI を入れて取りこませる法

図4の写真Aは上記Aの例、BはBの条件で培養したもので、培地内にあったRIがその時合成された細胞壁中にとりこまれた様子が歴然としている。



図4 テッポウユリ花粉管内への $^3\text{H}$ -*myo*-inositol のとりこみを示す

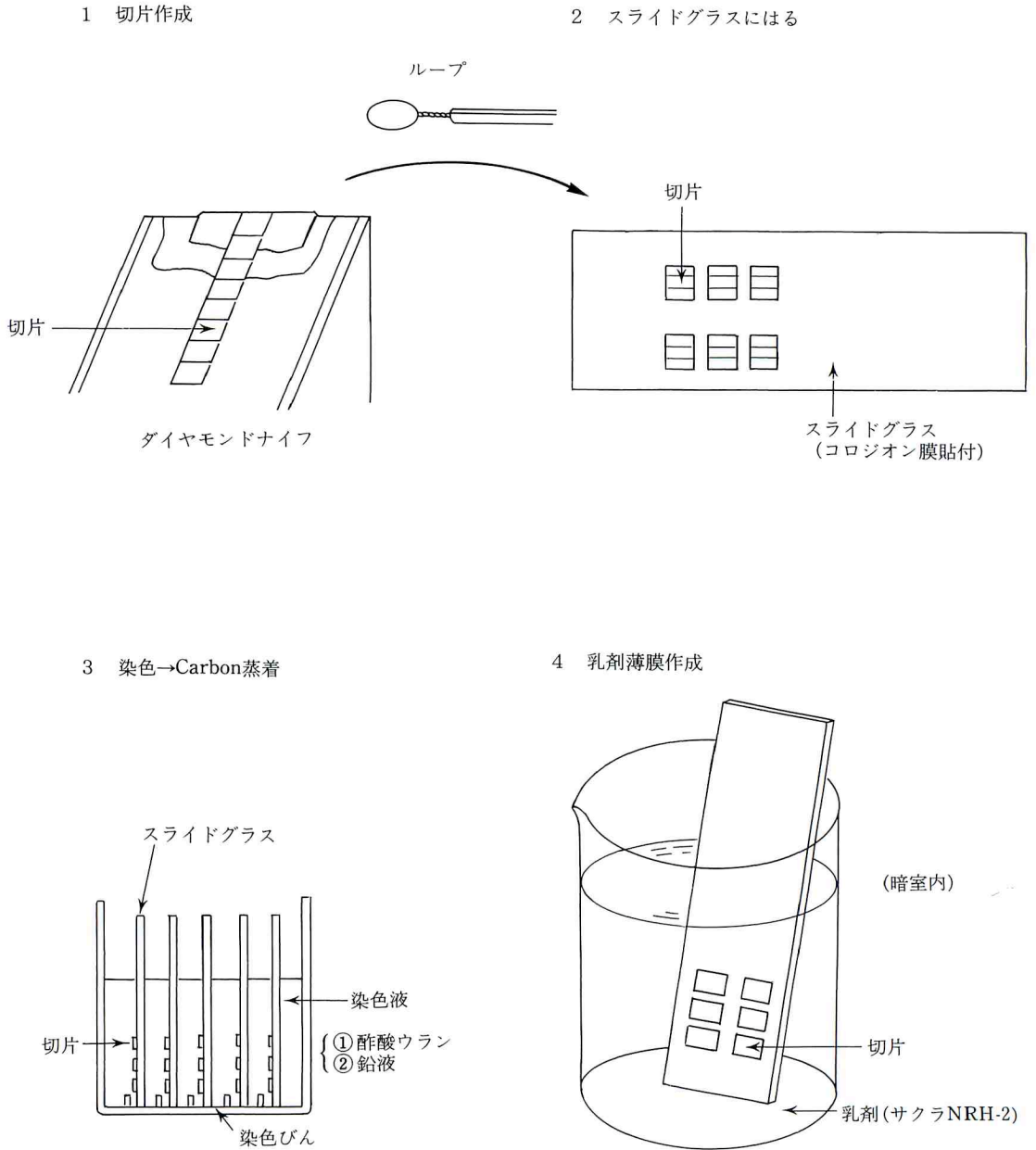


図5 Dipping 法(1)

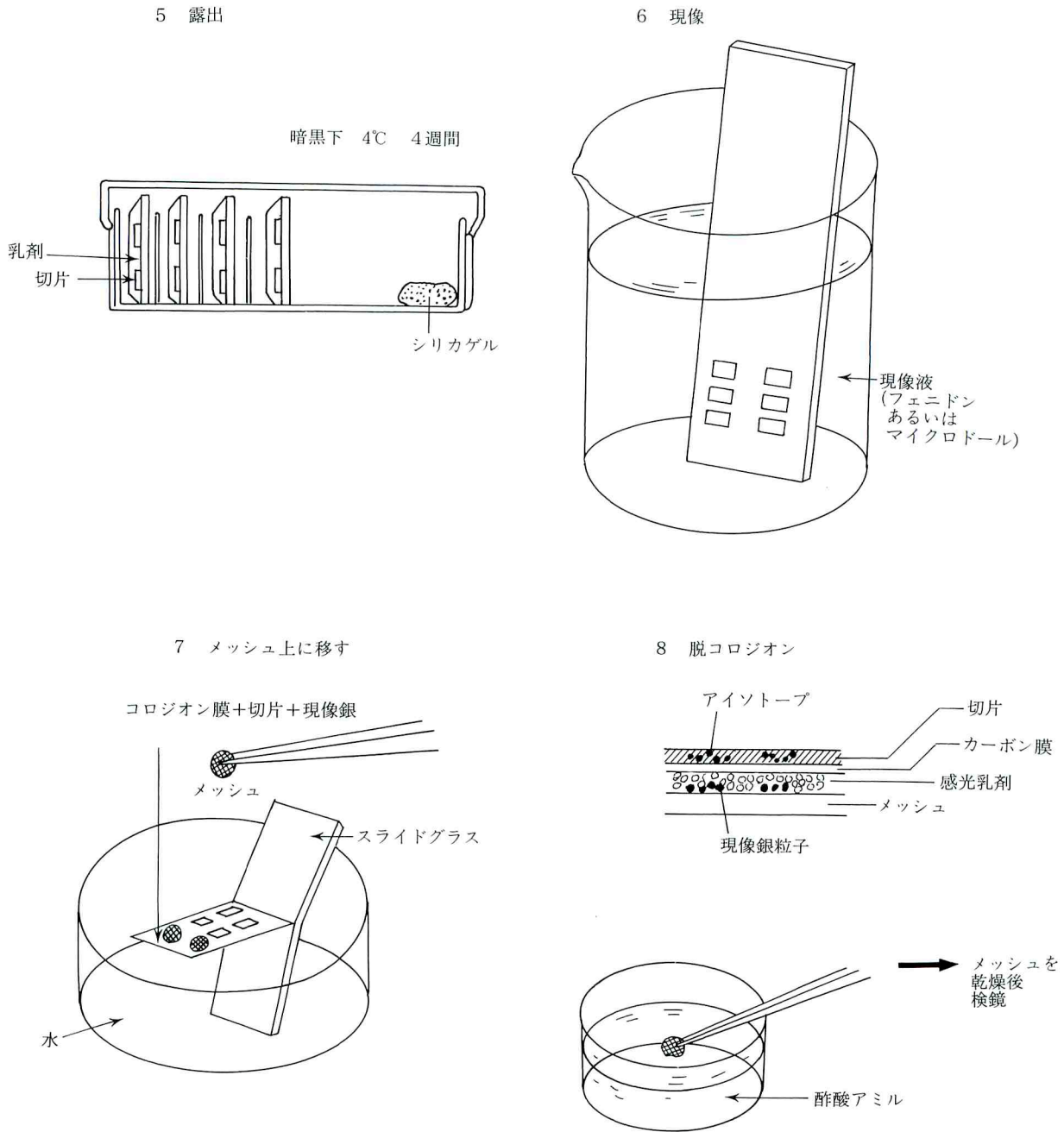


図5 Dipping 法(2)



## (ii) 投与量

電顕用切片は光顕用と比べて1/100のうすきであることから十分な密度のRIが分布する必要がある。動物ではその体重当り1-20 $\mu$ Ciが目安となるが自分で1-2回試してからきめるとよい。

(iii) 実際の操作：ここではDipping法を説明する(図5参照)

①RIをとりこませた材料を通常の方法で樹脂に包埋し、超薄切片を作る。②切片をループですくって、予めコロジオン膜を貼付して乾燥したスライドガラス上にのせる。③スライドガラスにくっつけた切片を酢酸ウランと鉛液で通常の方法により染色する。④乾燥後、暗室内でスライドガラスに乳剤(サクラNRH-2)を塗布する。⑤乾燥後、遮光できる黒いプラスチック箱内に保存し露光する(4 $^{\circ}$ C, 約4週間)。時々露光状況を確認する為1枚出して現像してみる。⑥フェニドンまたはマイクロドールで現像・水洗後乾燥する。⑦スライドガラスの端をカミソリで切り、図のようにそっと水にうかべる。切片上に1ヶずつメッシュをのせる。濾紙ですくい上げて乾燥。⑧結局メッシュ上には感光乳剤、カーボン膜、切片、コロジオン膜がのっていることになる。コロジオン膜を取除くため、メッシュを酢酸アミルで洗浄・乾燥後検鏡する。文献<sup>(9)</sup>

## (III) 文献

- (1) 月刊 Medical Technology 編「染色法のすべて」p. 39 医歯薬出版。
- (2) Fisher, D. B.: *Histochemie* 16, 92-96 (1968).
- (3) Kajikawa, K. et al.: *J. Electron Microscopy*, 24, 287-289 (1975), Makamura, S. and H. Miki-Hiroshige: *J. Ultrastruct. Res.* 80, 302-311 (1982).
- (4) Rambourg, A. and C. P. Leblond: *J. Cell*

*Biol.* 32, 27-53 (1967).

- (5) Colombo, P. M. and N. Rascio: *J. Ultrastruct. Res.* 60, 135-139 (1977), Nakamura, S. and H. Miki-Hiroshige: *J. Ultrastruct. Res.* 80, 302-311 (1982).
- (6) Miki-Hiroshige, H. and S. Nakamura: *Phytomorphology* 32, 85-94 (1982).
- (7) Miki-Hiroshige, H. and S. Nakamura: "Pollen: Biology implication for plant breeding" ed. D. L. Mulcahy and E. Ottaviano (1983) pp 141-147.
- (8) Miki-Hiroshige, H. and S. Nakamura: *J. Electron Microsc.* 31, 51-62 (1982).
- (9) 「オートラジオグラフィ」水平敏治編 医歯薬出版。

(以上：三木壽子)

著者紹介：三木壽子(みき ひさこ)

〈略歴〉1952年京都大学理学部植物学科卒。直ちに同大学同教室大学院に入学。10年在籍1962年3月理学博士を授与。海星短期大学教授、駒沢大学非常勤講師を経て1964年より神奈川歯科大学講師となる。現在同大学教授。

〈研究テーマ〉高等植物の授精が大きいテーマですが、花粉の発芽生理・花粉の発達とその内容物の変遷・開花・授精に伴うしずい内の変化など、形態とその形態のもつ必然性およびその変化を微細構造的に追っています。現在"Sexual Plant Reproduction"の編集委員。

〈抱負〉何にでもすぐ疑問を持ちやりたいこと一杯。今秋イタリヤから留学生が私の所に來られるのでいい仕事をまとめたい。

〈趣味〉探鳥。写真撮影。自然に親しむこと。

