

Laminaria japonica Areschoug の 皮層細胞における微小部X線分析

奥 田 弘 枝

X-ray Microanalysis of the Cortical Cells in *Laminaria japonica* Areschoug

Hiroe OKUDA

Abstract

Energy-dispersive X-ray microanalysis (EDX) of a tangle (*Laminaria japonica* Areschoug) was performed using an analytical electron microscope (JEM 1200EX-Tracor Northern TN2000).

Fresh tangle was dried in the sun and fractured by a razor blade. A small piece of fractured tissue was placed on a holder, coated with carbon in vacuum, and examined at scanning electron microscopic (SEM) range. Some dried samples were soaked in distilled water for 60 minutes. The soaked and not-soaked samples were fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide before being dehydrated and embedded in Epon. Semithin sections were obtained, and examined at scanning-transmission electron microscopic (STEM) range.

Results are as follows:

1. Fractured specimens of dried tangle were adequate for EDX-SEM analysis to show exact contents of all contained elements.
2. X-ray peaks of Cl, K, Na, Mg, P and S were detected in the cortical cells and their cell walls of untreated samples.
3. X-ray peaks of Cl, K, Na, Mg, P and S were disappeared in the soaked tangle.
4. Ca element localized in the cell walls, but was not extracted, probably because of its tight bound to some polysaccharides in the cell wall structure.

I 緒 言

乾燥コンブを調味液中で煮熟した場合の調味成分による藻体の物性変化の機構を明らかにするため、これまで、調味成分による藻体の軟化と形態学的変化（奥田ら 1987^(a), 1987^(b)), ア

ルギン酸の性状 (奥田 1986), および, 細胞壁構成物質に及ぼす調味成分の影響 (奥田ら 1987^③, 1987^④, 1988) について検討してきた。これらの研究結果から, 藻体組織の電解質組成が軟化に影響があるのではないかと考えられることから, 藻体組織や細胞を構成する電解質元素の種類や含有量, および, 試料表面上の二次元的な電解質元素の分布状態などを調べる目的で, 分析電子顕微鏡を用いて, これらの検出方法を検討した。

II 実 験 方 法

1. 材料

本研究に用いた材料は, 1985年8月, 函館市石崎町で採取された, 2年生の天然マコンブ (*Laminaria japonica* Areschoug) を天日乾燥させたもので, 葉体の中帯部を 2×2 cm に切り取って使用した。用いた葉体の平均値は重量 120 g, 葉長 280 cm, 葉幅 (最大) 17 cm, 中帯部 5~6 cm, 水分量は湿量基準で 9%, 乾量基準で 15% であった。

2. 分析電子顕微鏡 (AEM) 用試料の調製

(1) 走査電子顕微鏡 (SEM) による微小部 X 線分析用試料の調製

葉体中央部の中帯部 (2×2 cm) のさらに中心部から, 一片約 5 mm の四角片を切り出し, 微小部 X 線分析用試料に用いた。

試料は, 葉体組織をカミソリで切断して皮層部を露出し, カーボンの真空蒸着を施して, ホルダーに導電性接着剤 (グラファイトペースト) で固定した。AEM は, JEM 1200EX-Tracor Northern TN 2000 (エネルギー分散型) に装置した SEM を用い, SEM 像装置にスイッチを切り換え, 加速電圧 20 kV でスポット分析を行った。直接倍率は 800 倍, 測定のスロットサイズは実測 $7.5 \times 7.5 \mu\text{m} \approx 56.3 \mu\text{m}^2$, 分析時間は 100 秒間とした。

(2) 走査透過電子顕微鏡 (STEM) による微小部 X 線分析用試料の調製

SEM 用試料と同様に, 葉体中央部の中帯部 (2×2 cm) のさらに中心部から, 一片約 2 mm の小四角片を切り出し, 試料に用いた。

水に浸漬処理を施した試料は, 葉体中央部の中帯部 (2×2 cm) を恒温水槽で 25°C に調整した蒸留水 (pH 5.7) に 60 分間浸漬して引き上げ, 濾紙 (No. 2) で表面付着水を拭き取った。これらの試料の中心部から, 一片約 2 mm の小四角片を切り出し, 試料に用いた。

微小部 X 線分析用試料の調製方法は, 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) で稀釈した 2% グルタルアルデヒドで 5°C, 2 時間の前固定した後, 1% オスミウム酸で 2 時間後固定を行う二重固定法によった。脱水はまず, 10~40% のカコジル酸緩衝アルコールでそれぞれ試料を 20

分間浸漬脱水し、ついで50～100%アルコール系列で順次脱水の後、エポン包埋した試料から、X線像の空間分解能が1～2 μm 前後であることから、ウルトラミクロトーム (LKB III 型) で1 μm の切片を作製した。一般的な電顕観察の場合は、切片上に電子染色を行うが、Pb, Uなどの重金属元素を人工的に付加することになるので、カーボンの真空蒸着を施して、切片を補強した。カーボン蒸着は試料の帯電現象を防止し、X線の放出を良くするためにも必要である。ナイロン・グリッド (nylon grids) の上に試料を載せ、AEM は JEM 1200EX-Tracor Northern TN 2000 を用い、加速電圧 100 kV で行った。直接倍率5,000倍、測定のスポートサイズは実測 $1.2 \times 1.2 \mu\text{m} \approx 1.4 \mu\text{m}^2$ であった。分析時間は200秒間とした。

3. 電解質元素の定量

(1) Na, K, Ca の定量

乾燥試料 2.5 g を用い、乾式灰化法で 50～100 ml の検液を得た後、希釈を行い、日立 FPF2 型蛍光光度計で定量した。

(2) Cl の定量

乾燥試料 2.5 g を灰化後、95°C の蒸留水 (pH 5.7) で1時間抽出 (30分間2回抽出) した。濾液を合して全容を 150 ml にし、そのうち 5 ml について、Mohr 氏法により検索した。

III 実験結果および考察

1. 乾燥試料における皮層細胞断面の微小部X線分析 (SEM による)

乾燥試料の皮層細胞の細胞質 (cytoplasm) と細胞壁 (cell wall) を含む部分を100秒間スポット分析した (Fig. 1)。X軸にカウント数を、Y軸にX線エネルギー・スペクトル (keV) を表わした、完全なスペクトルが得られた。Cl ($K\alpha^1=2.622$ keV), K ($K\alpha^1=3.313$ keV), Na ($K\alpha^1=1.041$ keV), Ca ($K\alpha^1=3.691$ keV, $K\beta^1=4.012$ keV), Mg ($K\alpha^1=1.254$ keV), P ($K\alpha^1=2.015$ keV), S ($K\alpha^1=2.308$ keV) のピークが顕著で、多種類の電解質元素を有意に検出した。

試料中にそれぞれの元素がどのくらいの量、含まれていれば検出できるかという検出限界の問題があるが、今回、実験に使用した乾燥試料の主な元素の含有量は定量分析によって、Fig. 2 のような結果が得られた。組織の部位の差等によって含有量に違いがあると考えられ、微小部X線分析の結果に比べて、Ca や K の含有量がやや少ないものの、よく似た傾向が見られ、良好な成績が得られた。同一切片の同一視野内で、同一条件で微小部X線分析を行った場合、定量分析の価値も高いと考えられる。

生物試料のように試料自体が非電導体の場合、導電性を持たせるために AEM では一般的

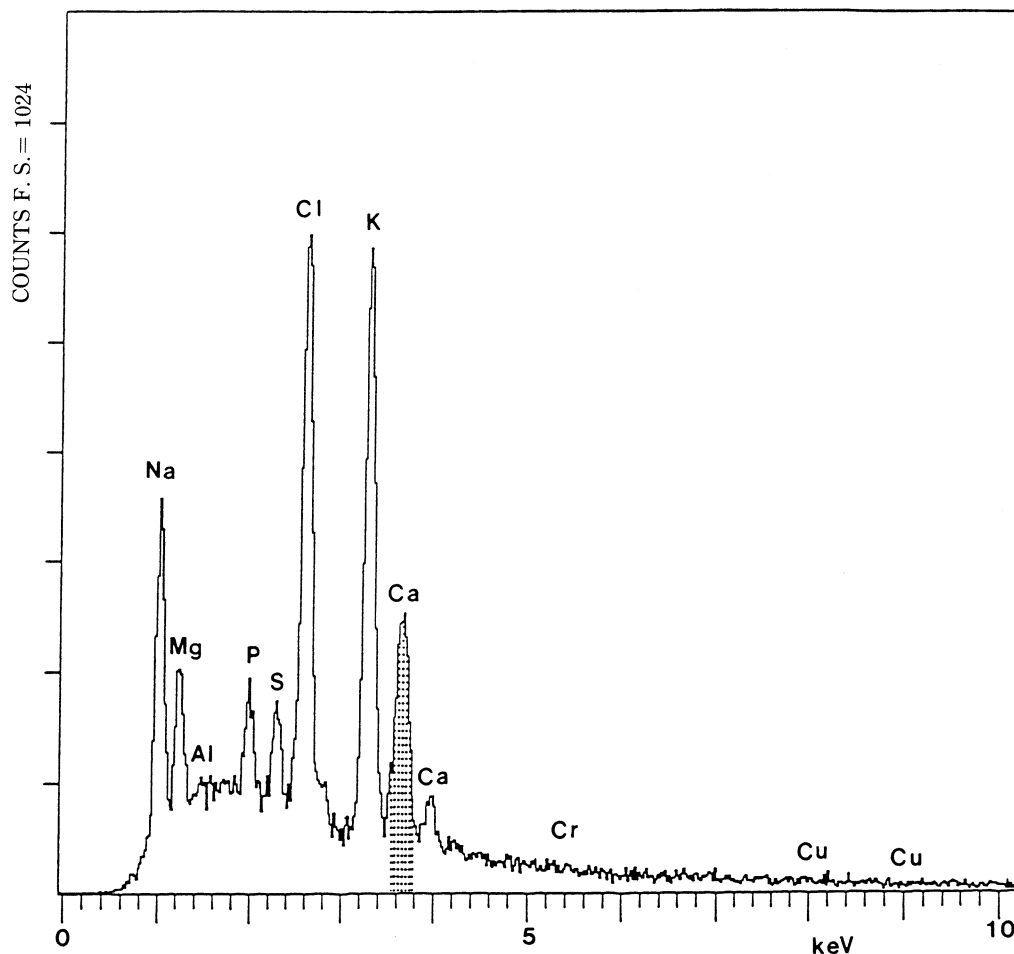


Fig. 1 X-ray microanalysis of the fractured cortical cells in dried tangle.

にカーボンを試料表面に真空蒸着する。蒸着膜の厚さは 20~40 nm で、均一であることが望ましく、コーティングが悪いと、帯電による歪み、画質の低下、試料損傷等による検出効率の低下が起こるが、これらの影響も見られなかった。バックグラウンドのノイズ（白色又は連続X線）の発生も比較的少なく、グリッドからの金属も検出されていない。一般電顕用切片観察のためのグリッドとしては、金属製のグリッドを使用する場合が多く、著者も従来から銅グリッドを使用してきたが、僅かな散乱電子線により、励起された Cu の K- および L-X 線が検出され、金属グリッドは好ましくない。今回使用したナイロン・グリッドやカーボン・グリッド（水平 1978）が適当であり、ノイズの発生防止にもつながる。

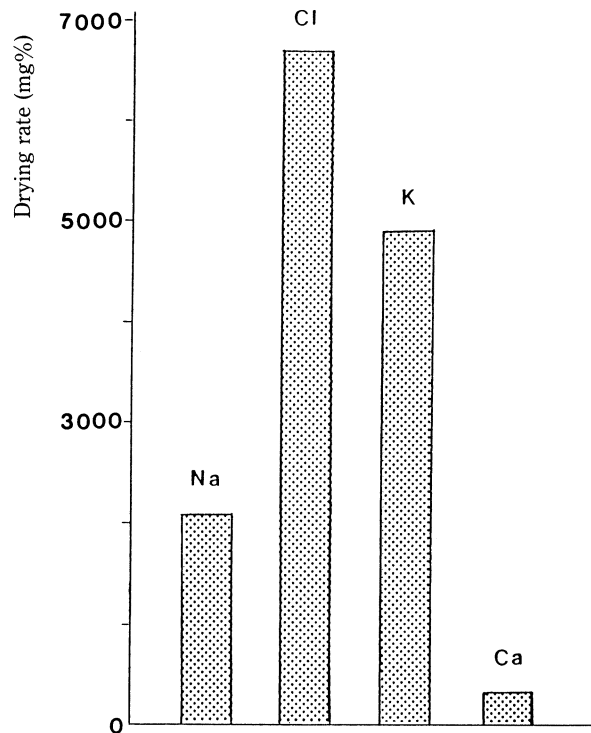


Fig. 2 Electrolytic contents of the fronds of tangle

2. エポキシ・レジンの微小部X線分析 (STEM による)

STEM による試料は全てエポキシ・レジン包埋によるものであることから、エポキシ・レジンの微小部X線分析を行った (Fig. 3)。エポキシ・レジン自体に含有されている種々の元素も検出されると考えられ、今回使用したエポキシ・レジンの組成は次のようなものであった。

Composition of Epoxy resins

Epon 812 (Shell Chem. Corp., USA)	18 ml
MNA (Methyl nadic anhydride)	10 ml
DDSA (Dodecenyl succinic anhydride)	12 ml
DMP-30 (2,4,6-tridimethyl aminomethyl phenol)	0.6 ml

分析の結果、Cl の存在が示された。Cl の高いピークは、上記のエポキシ・レジンの組成に相当量含まれていることを示している。Cu ($K\alpha^1=8.047$ keV, $K\beta^1=8.904$ keV), Cr ($K\alpha^1=5.414$ keV) のピークは、試料ホルダーの材質、およびメッキに由来するものである。

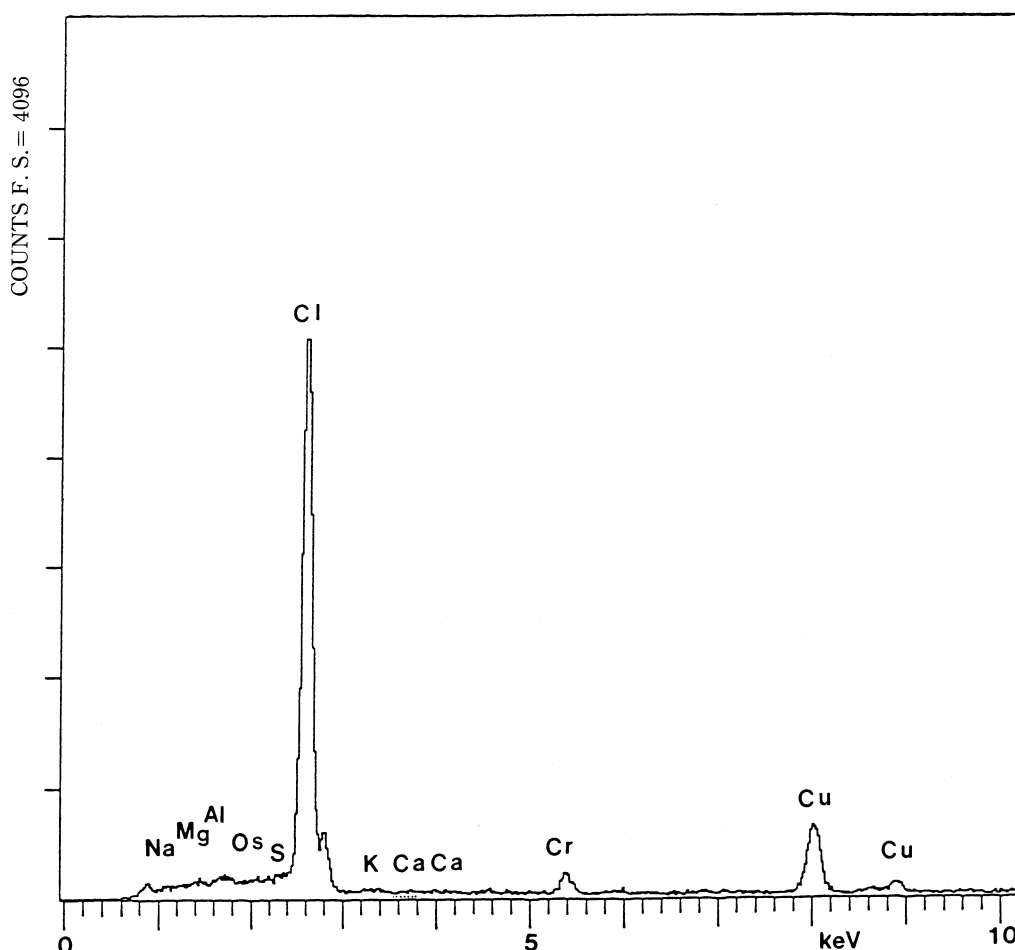


Fig. 3 X-ray microanalysis of the Epoxy resins.

3. 乾燥試料切片における皮層細胞の細胞壁の微小部X線分析 (STEM による)

乾燥試料切片の皮層細胞の細胞壁 (cell wall) におけるスポット分析を行った (Fig. 4)。Cl, Os ($M\alpha^1=1.910$ keV), Ca ($K\alpha^1$) のピークが認められた。

Cl は、試料の固定・脱水・包埋過程で流失し、図中のピークはエポキシ・レジンに由来すると推察される。著者の実験によると (奥田 1984), 今回使用した材料と同じ場所で採取された天日乾燥のマコンブ (葉体中央部の中帯部) を 25°C の蒸留水中 (pH 5.7) で一定時間浸漬して, Cl (6700 mg% 含有) の溶出量を定量したところ, 浸漬 1 分で 34%, 浸漬液中には 126.1 mg が溶出し, 5 分で 63.5% となり, 6 割以上が溶出した。30 分で 88.7%, 60 分で 93.3% が溶出し, 浸漬液中の量は 385 mg であった。120 分後で 93.5%, 浸漬液中には 390 mg 溶

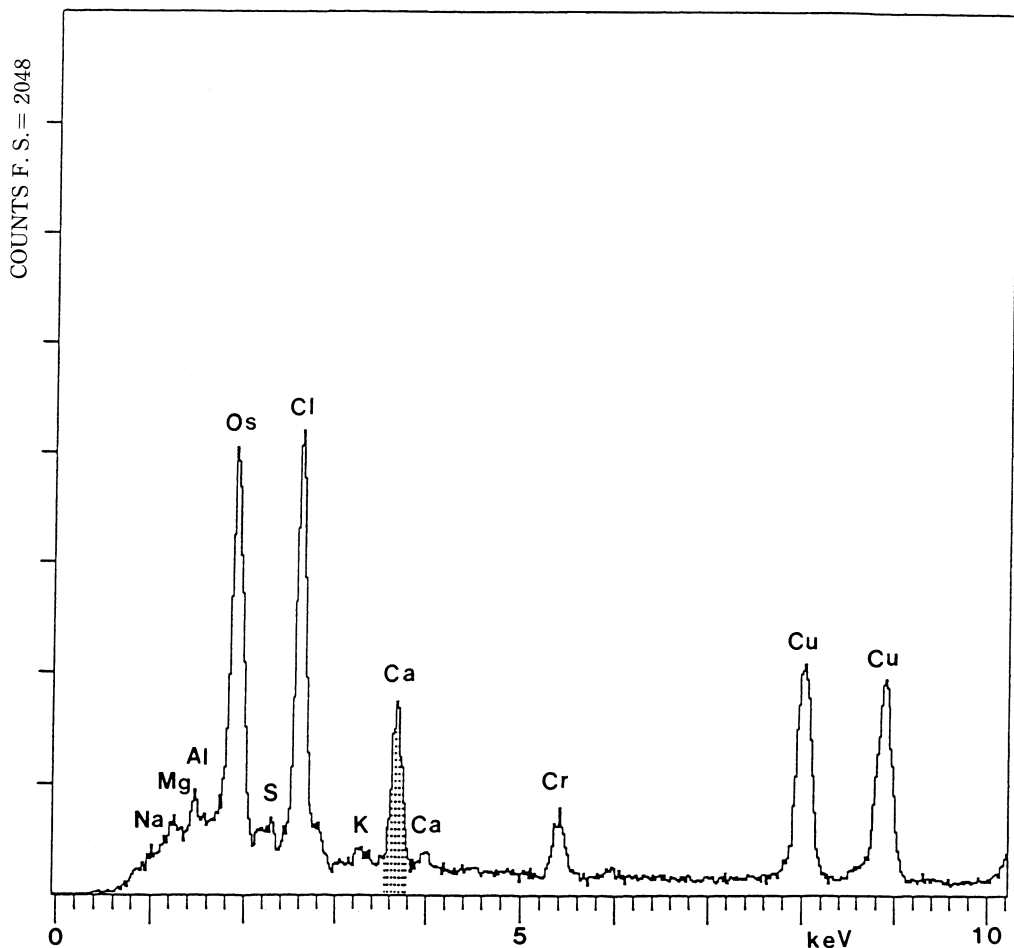


Fig. 4 X-ray microanalysis of the cortical cellwalls in section of dried tangle.

出した。30分以降は非常に緩やかに溶出したが、定量した数種類の元素 (Na, Cl, K, Ca) のなかでは最も溶出し易かった。

Kは、Fig. 1 の無処理バルク試料では Cl について高いピークが検出されたが、Fig. 4 ではその存在を僅かに示すのみで、ピーク形成まで至っていない。K (4899 mg% 含有) の水浸漬による溶出量をみると (奥田 1984)、浸漬後1分で15.1%、浸漬水中には 34.1 mg 溶出し、5分後に33.9%の溶出で3割強が溶出した。30分で62.2%、60分では66.9%、浸漬水中へ177 mg 溶出し、30分以後の溶出量は非常に緩慢であった。120分で76.6%、約7割が溶出し、浸漬水中には 237 mg が溶出した。Kは Cl, Na について溶出し易い元素であるから、Cl と同様に試料調製中に失われたものと推察される。さらに、試料調製過程での電解質流失の可能

性について考えてみると、グルタルの前固定で120分、オスミウム酸の後固定で120分、ついでアルコールとプロピレンオキシドによる脱水で60分を要する。従って、これらの操作中に流失し易い元素のほとんどを失うことになる。

Os は、オスミウム酸固定液の Os が検出されたものである。

Ca は、Fig. 1 の無処理バルク試料で検出されたピークよりもやや低いが、皮層細胞の細胞壁にかなりの量で含有されており、試料調製の操作中にも流失しにくいものと考えられる。著者の実験によると(奥田 1984)、浸漬水中への Ca (278 mg% 含有)の溶出量は、浸漬後1分で9.9%、浸漬水中には 4.4 mg 溶出し、5分で16.4%、30分で41.3%溶出した。60分後で42.4%、浸漬水中には 15 mg 溶出し、30分以降の溶出は非常に緩慢であった。120分後でも43%の溶出にすぎず、Cl, Na, K 等に比べて、最も溶出量が低かった。佐藤ら(1976, 1980, 1981)は、コンブ、ワカメ藻体の煮熟過程における煮崩れについて組織観察し、Ca 含有量の多い部位が煮崩れしにくく、多糖類に結合する電解質の分布状態との関連性を述べている。著者による Ca 溶出量の定量結果等から、これらを総合して考えると、Ca は、他の電解質に比較して、多糖類との結合がより強力であるため、流失しにくいものと推察される。

Fig. 1 で検出された Na, S および P は、僅かな存在を示すのみで、ピーク形成には至っていなかった。Na をはじめとするこれらの元素は、細胞や組織内の可溶性分画部に関連しており、試料調製の操作中での流失が推察され、検出に必要な一定の濃度、あるいは密度を保つことが困難なためと考えられる。Na (2089 mg% 含有)の浸漬水中への溶出量は(奥田 1984)、浸漬後1分で24.4%、浸漬液中には 23.4 mg 溶出した。5分では46.1%、30分で70.3%が溶出し、30分以降は緩慢な溶出となる。60分で86.3%、浸漬液中には 87.5 mg 溶出し、60分で含有量のほぼ9割が溶出した。このように Na は Cl について溶出し易い元素であることから、試料調製の操作中に流失したものと考えられる。

Cu と Cr は、測定時の試料ホルダーの材質に起因する。

4. 乾燥試料切片における皮層細胞の細胞質の微小部X線分析(STEM による)

Fig. 4 と同様、乾燥試料切片の皮層細胞の細胞質におけるスポット分析を行った(Fig. 5)。

Cl は、非常に高いピークを示した。ついで Os のピークが見られた。Fig. 1 の皮層細胞の細胞質で検出された Na, Mg や S は、僅かな存在を示すのみで、ピーク形成には至っていなかった。Cl は Fig. 3 で述べたようにエポキシ・レジンに由来し、Os は固定液に由来するものと考えられる。他の電解質は試料調製中に流失した可能性が大である。

Ca は、Fig. 4 の細胞壁で顕著なピークを形成していたにもかかわらず、Fig. 5 では検出されなかった。Ca は多糖類との結合力が強く、流失しにくい元素であることから、試料調製中

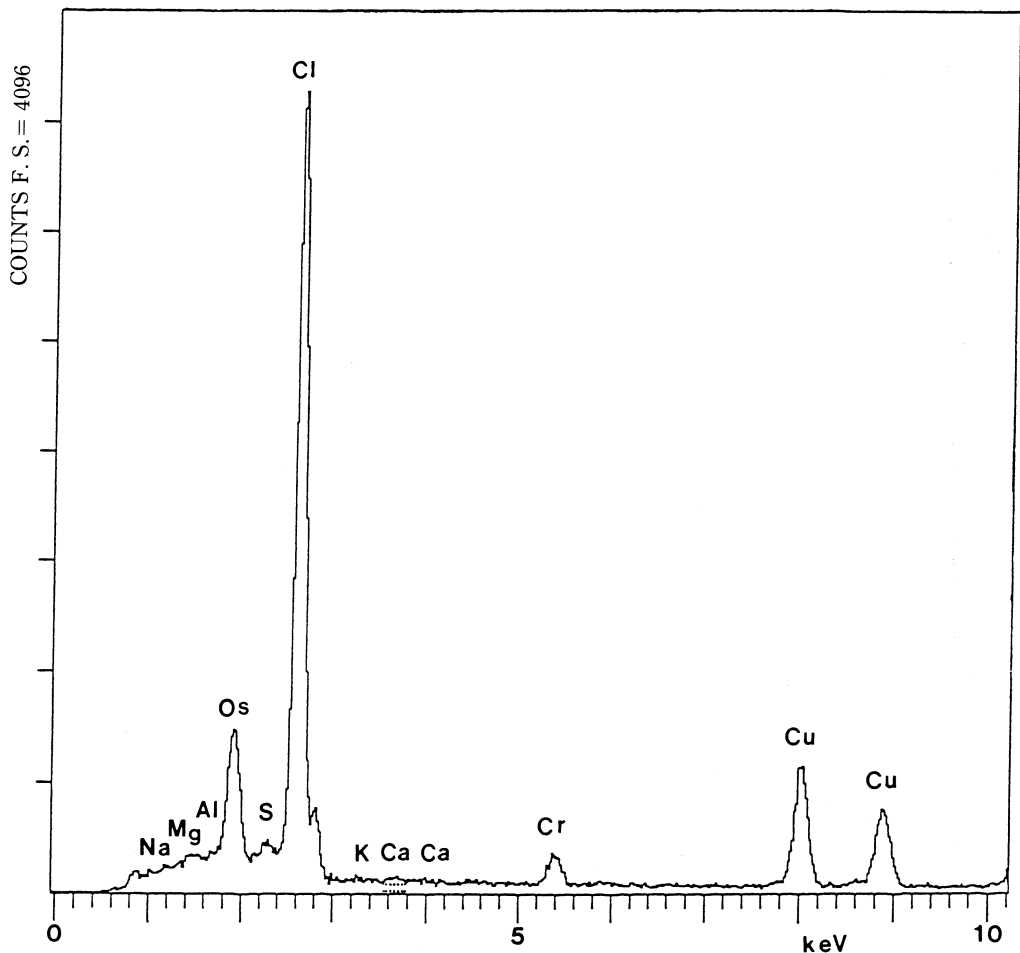


Fig. 5 X-ray microanalysis of the cytoplasm of cortical cell in section of dried tangle.

での流失は考えられず、細胞質には殆ど存在せず、細胞壁に存在しているものと推測される。

Pは、Fig. 1 の無処理の皮層細胞では検出されたが、この試料では検出されず、試料調製中に失われたものと推察される。Ca 以外の各種電解質は、組織や細胞内での凝集や移動はなく、すべて、試料作製過程中に流失した。

Cu や Cr は、Figs. 3, 4 と同様に試料ホルダーに由来するものと考えられる。

5. 水浸漬した試料切片における皮層細胞の細胞壁の微小部X線分析 (STEM による)

水に浸漬した試料切片の皮層細胞の細胞壁におけるスポット分析を行った (Fig. 6)。

同部位で水に未浸漬の Fig. 4 と比較して、Fig. 6 との間に有意の差は認められなかった。

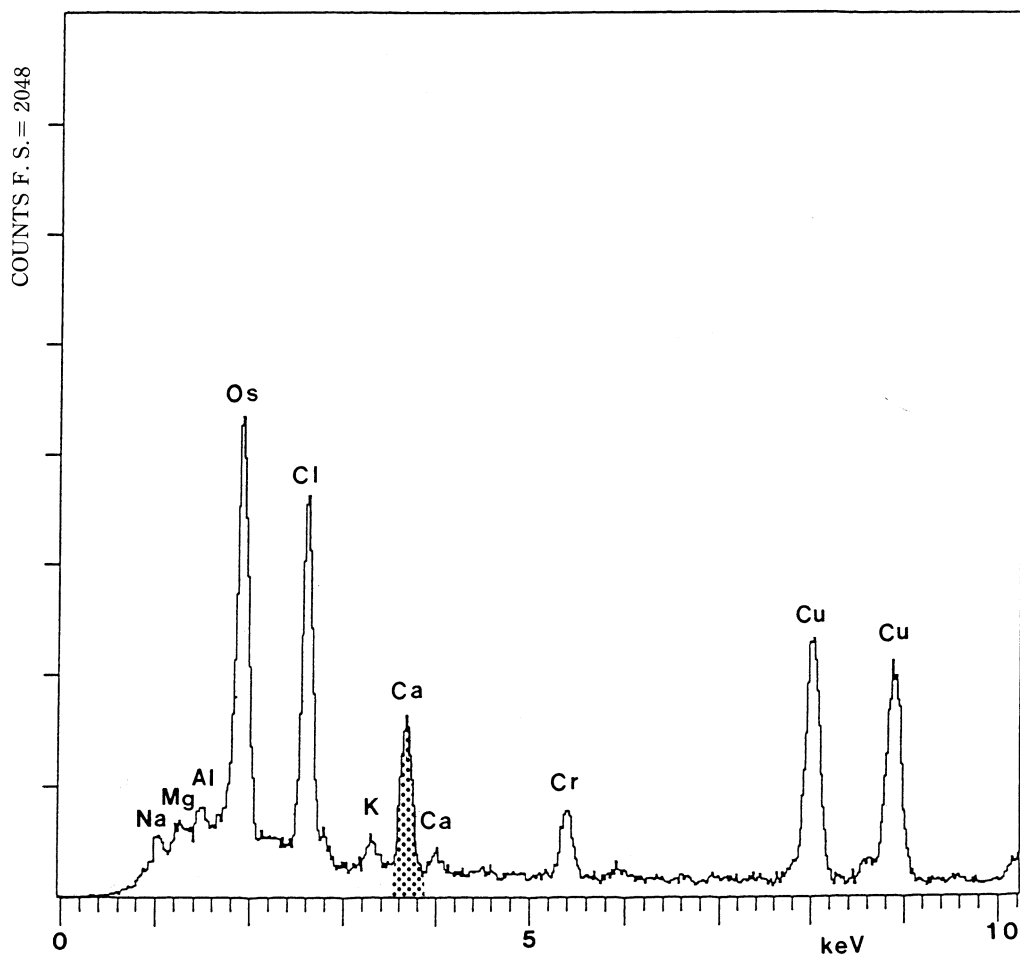


Fig. 6 X-ray microanalysis of the cortical cellwalls in section of soaked tangle in distilled water.

Os は固定液に、Cl はエポキシ・レジンに由来する。S は Fig. 4 と Fig. 5 の水に未浸漬試料の細胞壁と細胞質では僅かに存在が認められたが、Fig. 6 の60分水に浸漬した試料では検出されなかった。

Na と Mg は、Fig. 4 と同程度のピークが示され、僅かな量が存在しており、60分水浸漬を行ったものであっても、流失量はさほど変化しなかったものと考えられる。

Ca は、Fig. 4 と同様に高いピークで検出され、60分水に浸漬しても、変化が見られなかった。前述のように、Ca は水浸漬による流失量が少ないことから、Fig. 6 の図形は信頼度が高く、Ca は細胞壁中に存在することを裏づけている。

Cu と Cr は、Figs. 3～5 で検出されたように、試料ホルダーに由来する。

6. 水浸漬した試料切片における皮層細胞の細胞質の微小部X線分析 (STEM による)

Fig. 6 で用いた試料と同じく、水に浸漬した試料切片の皮層細胞の細胞質におけるスポット分析を行った (Fig. 7)。

Fig. 5 の乾燥材料の切片で検出されたものと、全く同じ元素が検出された。ピークの高さ、面積ともに殆ど同じで、差が認められなかった。

Cl はエポキシ・レジンに、Os は固定液に由来し、Na および Mg は、試料調製中に流失したと考えられる Fig. 5 と同程度の存在で、試料調製前に60分水に浸漬したことによる影響は見られなかった。Fig. 6 の皮層細胞の細胞壁では検出されなかったSが僅かに認められた。

Ca は検出されなかった。Fig. 4 と Fig. 6 の細胞壁では検出され、Fig. 5 と Fig. 7 の細胞

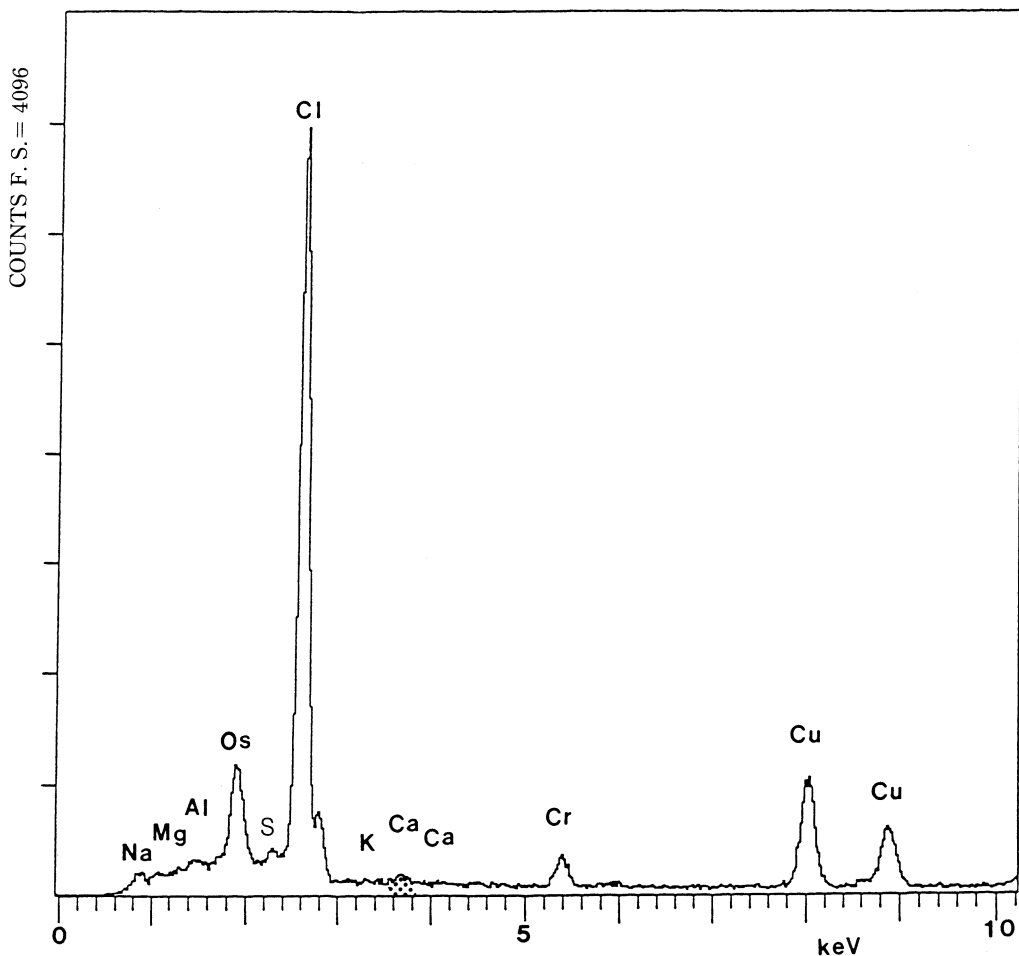


Fig. 7 X-ray microanalysis of the cytoplasm of cortical cell in section of soaked tangle in distilled water.

質には検出されなかったことから、細胞質内には殆ど存在しないと見做される。

Cu と Cr は前述と同様に試料ホルダー、その他に由来するものと考えられる。

今回の実験結果から、エポキシ・レジンに包埋した試料では、電解質元素類の正確な分析は不可能であった。しかし、Ca は多糖類と強く結合しているためか、水浸漬や試料調製でも流失されず、細胞壁に分布することが分かった。Cl, K, Na, Mg, P および S は、未処理の乾燥材料では検出されたが、エポキシ・レジンに包埋したものでは、水に未浸漬の試料でもその存在を僅かに示す程度で、検出されなかった。試料調製の過程中に大部分が流失したものと考えられる。

試料調製の面では、従来行われている生物試料の固定・脱水・包埋の過程で、殆どどの電解質元素群は流失してしまい、X線分析法で捕えることは出来なかった。切片からいかに上手に検出したい元素のピークを得るかが問題になってくる。電解質元素に対する特殊な沈殿固定法で、組織・細胞内に残存させる方法も考えられるが、それも元来の元素が存在していた状況とは異なっている可能性が強い。従って、オスミウム酸による固定を行わず、グルタルアルデヒドのみで固定を行い、アルコール等の有機溶媒による脱水過程を省略し、グリコール・メタクリレート (glycol methacrylate resin) やグルタルアルデヒド・ウレア (glutaraldehyde urea resin) 等の水溶性樹脂 (水平 1978, 石川 1982) による急速包埋方法もある。水平 (1978) はこれらの水溶性樹脂は極めて短時間で包埋できる点有利で、電解質元素がかなり残留すると述べている。Shinagawa ら (1978) はグルタル・ウレア樹脂にメラミン (melamine) を加えることによって、グルタル・ウレア樹脂法の欠点である電顕像のコントラストの悪さを改善している。しかし、出来るだけ固定・脱水・包埋の人工的操作を加えず、Fig. 1 のバルク試料のように、自然の状態で薄切片、分析を行った方がよく、新鮮材料の空気乾燥法 (air dry) によって、Na, Mg, P, S, Cl, K および Ca 等の元素を検出し、かなりよい成績を得ることが出来る。Takaya (1975^{(a)(b)}, 1976^{(a)(b)}, 1977) は銅やナイロン・グリッドの上にコロジオン膜を張っておき、その上に生物材料を圧着し、細胞や組織の一部が付着したものを無固定、無染色で空気乾燥してX線分析を試み、よい結果を得ている。しかし、これらの方法は、鮮明な SEM 像、STEM 像を得ようとした場合にはコントラストが悪く、およその構造を知り得るのみで、細胞内の小器官を詳細に観察したり、厳密な分析を行うのは困難と考えられる。従って、空気乾燥法によるX線分析には限界があり、分析可能な範囲や、分析結果を十分に検討する必要がある。

理想的な試料は、物質の動きを瞬時に固定し、すべての元素がその場に残り、外部から元素の人工的付加のないように作製されたものということになる。この条件を一応満足させると考えられる試料作製法に固定組織片と新鮮組織片の凍結乾燥切片法や凍結置換切片法等が紹介さ

れている。

固定組織片の凍結乾燥切片法は（水平ら 1976^①, 1977, 1978）, 組織片を凍結前にあらかじめグルタルアルデヒドかオスミウム酸で固定するか, あるいは, これらの二重固定をした後に, 急速に凍結・乾燥してから樹脂包埋を施し, 薄片にする方法である。しかし, 短時間でも固定液を通していているため, 細胞内小器官にごく一部の元素が残ることはあっても, Cl やKの電解質元素は固定液中へ流失し易い。しかし, リゾソーム (lysosome) 顆粒内には多くの場合, Kが多量に検出されたと述べている。

新鮮組織片の凍結乾燥切片法（水平 1978）は, 新鮮組織を 1 mm³ 以内に細切し, 液体窒素で冷却した金属棒で凍結（1～2秒）するか, または, 液体フレオン, 液体プロパン, および液体メチルサイクロヘキサン（8% methylcyclohexane を含む 2-methylbutane を液体窒素で冷却, -170°C）で凍結して, 凍結超ミクロトーム (ultracryomicrotome) で薄い切片にしたものを, 2枚のグリッドの間に圧迫して, そのまま乾燥し, 電顕観察やX線分析を行う方法である。STEM 像では核, 核小体やミトコンドリア等は判別できるが, 他の膜系は明確でなく, X線分析では Na, Mg, Si, P, S, Cl, K および Ca が検出されている。

Echlin ら（1974）, Gullash ら（1974）, Saubermann ら（1975）および Varriano-Marston ら（1977）は, 試料を凍結したままで乾燥せず, 水分を残した状態で電顕観察し, X線分析を行う湿性凍結超薄切片法 (freeze hydrated thin sections method) を試みている。この方法はX線分析上, 最も生体の自然状態に近く, 乾燥による電解質元素の凝集, 拡散, 移動を妨げると述べている。

凍結置換切片法は, Malhoutra (1965) によっていろいろな方法が試みられてきたが, Harvey (1976) らによって, 植物細胞内の電解質を試料作製途上, 流失せずに切片内に残し, 電顕像も十分満足でき, かつ比較的容易に試料作製が出来る方法として示された。この方法は, 液体窒素温度で冷却した8%のメチルサイクロヘキサンを含む2-メチルブタン（-170°C）で凍結し, アセトン・ドライアイスで冷却したアセトンまたはエーテル置換し, 低粘性の樹脂（主として vinylcyclohexane dioxide で低クロル性樹脂）で包埋し, 水槽を用いず, ダイヤモンドナイフで薄切にする乾式切片 (dry sectioning) 法である。この方法では Na は4%以内, Cl は1%以内の流失にすぎず, 電解質の残存率が高いと述べている。Van Zyl (1976) も20%のアクロレインのような固定剤をエーテルに混入して凍結置換を行い, 同時に固定することによって像の保持がよくなり, 優れた電顕像を得るとともに, 組織切片内におよそ95～100%の電解質元素が残存すると述べている。水平（1978）は新鮮組織片（シャーレ内）に約3分間アクロレイン・ガスをさらすことによって固定を行い, 優れた固定性を得るとともに, 凍結時に氷結晶を生じにくいと述べている。

今回の実験結果から、得られた分析データは分析条件によって大きく変わるものであり、試料切片がどのように作製されたかにかかっていると言える。化学的処理や水溶液および有機溶媒への浸漬操作をともなうレジン包埋切片は AEM に不適當であった。AEM に適する試料作製方法には空気乾燥切片法、凍結乾燥切片法および凍結置換切片法等であり、それぞれ特長のある方法であるが、目的に応じた使い分けが必要となる。

IV 要 約

2年生の天然マコンブ (*Laminaria japonica* Areschoug) を天日乾燥させた材料を用い、エネルギー分散型分析電子顕微鏡による、微小部X線分析の方法を検討し、次のような結果を得た。

1. 乾燥材料 (air dry) を切断したものが微小部X線分析に適する。但し、バルク試料を用いる場合は分析可能な範囲や、分析結果を充分検討する必要がある。
2. 乾燥材料の皮層細胞の細胞質 (cytoplasm) で Cl, K, Na, Ca, Mg, P および S が検出された。
3. 試料調製の過程中や水による浸漬等で Cl, K, Na, Mg, P および S は溶出された。
4. Ca は試料調製の過程中や水による浸漬等でも溶出されず、細胞壁 (cell wall) に分布していることが明らかになった。細胞壁の構成成分である多糖類と強く結合しているためと考えられる。

終りに、終始御懇切な御指導を頂いた広島大学・川上いつゑ元教授、広島大学原爆放射能医学研究所・佐藤幸男教授に深く感謝申し上げます。

引 用 文 献

- 奥田弘枝・中川禎人 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響 (第1報). 調理科学. 1987⑨. 20 (4) : 75.
- 奥田弘枝・中川禎人 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響 (第2報). 調理科学. 1987⑩. 20 (4) : 81.
- 中川禎人・奥田弘枝 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響と微細構造 (2). 昭和61年度 日本調理科学会研究発表要旨集. 1986. 47.
- 奥田弘枝 *Laminaria japonica* Areschoug の細胞壁の微小繊維と α -セルロースの超微細構造. 広島女学院大学論集. 1987③. 37 : 295.
- 中川禎人・奥田弘枝 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響と微細構造 (3). 昭和62年度 日本調

- 理科学会研究発表要旨集. 1987④. 37.
- 中川禎人・奥田弘枝 乾燥コンブの軟化度に及ぼす調味成分の影響と微細構造 (4). 昭和63年度 日本調理科学会研究発表要旨集. 1988.
- 水平敏知 分析電子顕微鏡. 1978. 41. 日本メディカルセンター出版部. 東京.
- Sato, S. Miyata, Y. and Kunitomi, S. Physical properties of "Narutowakame" and ITS alginate and metal contents. 日水誌. 1976. 42(3) : 337.
- 佐藤孜郎・丹原敬子 昆布藻体の内・外両層組織の金属組成および多糖類組成. 日水誌. 1980. 46(6) : 749.
- 佐藤孜郎・畑 敬子・佐藤邦子 煮熟によるコンブ藻体の多糖類および金属組成ならびにアルギン酸の性状の変動. 日水誌. 1981. 47(3) : 429.
- 石川春律 電子顕微鏡観察法. 1982. 312. 日本電子顕微鏡学会関東支部編. 丸善. 東京.
- Shinagawa, Y. and Schinagawa, Y. Melamine resin as water-containing embedding medium for electron microscopy. J. Electron Microsc. 1978. 27(1):13.
- Takaya, K. Electron probe microanalysis of the dense bodies of human blood platelets. Arch. histol. jap. 1975⑤. 159:227.
- Takaya, K. Energy dispersive X-ray microanalysis of neurosecretory granules of mouse pituitary on fresh air-dried tissue spreads. Cell Tiss. Res. 1975⑥. 159:227.
- Takaya, K. Electron microscopy of unstained, fresh air-dried spreads of mouse pancreas acinar cells and energy dispersive X-ray microanalysis of zymogen granules. Cell Tiss. Res. 1976⑦. 166:117.
- Takaya, K. Preparation of fresh-frozen dried ultrathin section by drying without vacuum. Acta anat. (Basel). 1976⑧. 96:248.
- Takaya, K. Electron microscopy of human melanosomes in unstained, fresh air-dried hair bulbs and their examination by electron probe microanalysis. Cell Tiss. Res. 1977. 178:169.
- 水平敏知・二重作豊 生物試料の微小部X線分析法による元素分析的研究. 日本臨床. 1976⑨. 348 : 35.
- 水平敏知 電解質(イオン)の組織細胞内検出. 新組織化学. 1976⑩. 681. 朝倉書店. 東京.
- 水平敏和 X線分析法の生物医学的应用. 第2回日本組織細胞化学会講義用テキスト. 1977.
- 水平敏知 分析電子顕微鏡の医学生物学領域への応用. 日本電顕学会誌. 1978. 12(2) : 501.
- Echlin, P. and Moreton, R. The preparation of biological materials for X-ray microanalysis. In: Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues. Eds. by T. Hall, P. Echlin and R. Kaufmann. 1973. 159. Academic. Press Lond. and N. Y.
- Gullash, J. and R. Kaufmann Energy-dispersive X-ray microanalysis in soft biological tissues. In: Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissms. Eds. by T. Hall, P. Echlin and R. Kaufmann. 1974. 175. Academic Press Lond. and N. Y.
- Saubermann, A. J. and Ecklin, P. The preparation, examination and analysis of frozen hydrated tissue sections by scanning transmission electron microscopy and X-ray microanalysis. J. Microsc. 1975. 105:155.
- Varriano-Marston, Gordon, E. J. Davis, E. A. and Hutchinson, T. E. Cryomicrotomy applied to the preparation of frozen hydrated muscle tissue for transmission electron microscopy. J. Microsc. 1977. 109(2):193.
- Harvey, D. M., Hall, J. L. and Flowers, T. J. The use of freeze substitution in the preparation of plant tissue for ion localization studies. J. Microsc. 1976. 107(2):189.
- Van Zyl, Forrest, J. Q. G. Hocking, G. and Pallaghy, C. K. Freeze-substitution of plant and animal tissue for the localization of water-soluble compounds by electron probe microanalysis. Micron. 1976. 7:213.