

藻類の固定方法についての検討
——*Undaria pinnatifida* の電子顕微鏡的観察——

奥 田 弘 枝

Study on Fixation Method of Algae
——Electron microscopic observation of *Undaria pinnatifida*——

Hiroe OKUDA

Abstract

There is a large number of algae containing much water and mucoid substance in there bodies. As they thrive in sea water, are susceptible to the osmolarity of fixative solution, and it is said that fixation of the various structures in their cells are difficult.

This report, seeking the optimum fixation method to observe in details and correctly the form of the tissue, organella and the cell of *Undaria pinnatifida*, 3 kinds of fixation methods, viz. single fixation of osmic acid employed since olden times, mixed fixation of osmic acid and glutaraldehyde, and double fixation of prefixation by glutaraldehyde and postfixation by osmic acid have been tried, compared and studied.

Materials are healthy lamina of *Undaria pinnatifida* collected on the coast of Onomichi in April, 1978. After fixing the material with the respective fixing solution, alcohol dehydration, and after embedding with epoxy resins making them in ultra thin sections, double staining by Millonig solution and uranyl acetate solution, has been applied, and observed with electron microscopes (HS-7 type and JEM100-B type).

Findings were that single fixation by osmic acid proved effective for observation of nucleus, nucleolus, vacuole, vesicle, ground substance and cell wall, while unfit for observation of chloroplast, mitochondria and Golgi body. With mixed fixation of osmic acid and glutaraldehyde, vacuole, ground substance and cell wall can be observed very well, however, on other organella, electron density was low, and the structure is obscure. It can be said that with glutaraldehyde pre-fixation, osmic acid post-fixation, fixation effect and electron staining effect of every organella was good showing that this is the most optimum fixation method.

I 緒 言

電子顕微鏡(以下、電顕)による海藻の研究は、1945年 Brown によって初めてなされた。初期の研究では主として鞭毛 (Manton, 1952) (Wolken and Palade, 1952) に関する電顕的

研究が行われたようである。

海藻は体内に水分や粘液物質を多く含むものが多数あり、海水中に生育していることから、固定液の張性に敏感であり、細胞内の諸構造の固定が困難であるといわれている。1960年代以降、それまで用いられていた aldehyde 固定に改良が加えられ、Gibbs (1962), Parker (1961) らは 1% osmic acid 固定を試みている。Glutaraldehyde 前固定, 1% osmic acid 後固定の二重固定法が Sabatini, Bensch & Barnett (1963) らによって始められ、Bouck (1965), Evans (1966), Bourne (1968), Chr (1977) らはこの方法を用いている。黒住 (1970) は 1% osmic acid と glutaraldehyde の混合固定を行っており、その idea は Wood によって始められたといわれている。Glutaraldehyde の濃度は 2%~6% の範囲で使用されており、固定時間も 30 分~24 時間と非常に幅が広い。これらの文献をもとに、本報は *Undaria binnatifida* に最適な固定方法を見い出すため、1960 年代の初期から用いられている osmic acid の単独固定, osmic acid・glutaraldehyde の混合固定, glutaraldehyde 前固定, osmic acid 後固定の二重固定の三種類の固定方法を試み、比較検討を行ったのでその結果を報告する。

Ⅱ 試料および実験方法

1. 試 料

実験に用いた試料は、1978 年 4 月、瀬戸内海尾道市の海岸で採取した生ワカメ (*Undaria binnatifida*) の健全な葉状部である。葉体長は約 80 cm で、成実葉をつけた十分に成熟した藻体である。

採取後、藻体を 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) で軽く洗い付着物を除去した後、葉状部の中央部 (葉体長の 1/2 くらいの部位で羽状裂片と中肋の中間部分) から一片約 5 mm の小四角片を切り出し試料に用いた。

2. 実験方法

(1) 固 定

切り出した試料をそれぞれ下記の a, b, c, 三種類の固定液の中に投じ、5°C (海藻は変質が早いことから低温固定の方が試料の死後変化を抑えるのに効果的である) で 2 時間の固定を行った。但し、C の二重固定の場合は glutaraldehyde の前固定 2 時間, osmic acid の後固定 2 時間とした。

Glutaraldehyde の濃度は Borne (1968), Chr (1977) らは 5%~6% の高張液のものを使用しており、Toth (1973), Hori (1971) らは 3% のものをを用いている。松本 (1979) は 1% でも可としている。筆者は b の混合固定で 1.04%, c の二重固定で 3.5% に調整した。また、

glutaraldehyde は酸化され易く不安定であることから pH の調整に特に慎重を要する。文献では低いもので pH 6.9 (Bouck, 1965), 高いもので pH 7.9 (Gibbs, 1962) にわたっているが, 松本 (1979), 水平 (1971) らは pH 7.2~7.4 が適当であるとしている。筆者は pH 7.2 に調整して用いた。

Osmic acid の濃度はほとんどの文献で 1~2% で使用されていることから 2% のものを用いた。

(a) Single fixation of osmic acid

{ 2% OsO_4	10 ml
{ 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)	10 ml

(b) Mixed fixation of osmic acid and glutaraldehyde

{ 2% OsO_4	6 ml
{ 25% glutaraldehyde (pH 7.2)	1 ml
{ 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)	17 ml

(c) Double fixation of osmic acid and glutaraldehyde

Prefixation

{ 25% glutaraldehyde (pH 7.2)	3 ml
{ 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4)	21 ml

Postfixation

{ 2% OsO_4	10 ml
{ 0.1 M cacodylate buffer	10 ml

(2) 脱 水

脱水操作は単に組織内の水分を除去するという目的の外に, 組織内の余剰の固定液を還元し, 除去することによって電顕像の contrast を高める目的があるが, 海藻の場合, 浸透圧の変化が細胞の形態に与える影響を十分に考慮する必要がある。そこで次のような順序で脱水を行った (室温)。

10~40% cacodylate buffer alcohol	20 minutes each
50~90% alcohol	20 minutes each
100% alcohol (2 times)	10 minutes
propylene oxide (2 times)	5 minutes

まず, 10, 20, 30, 40% cacodylate buffer alcohol でそれぞれ試料を20分間つけて脱水し, ついで 50, 60, 70, 80, 90% alcohol 系列で20分間脱水, その後100% alcohol で10分間づつ2回脱水, 最後に propylene oxide で5分間, 2回脱水した。

(3) 包 埋

包埋剤は Glauert (1958) らによって改良された Epoxy resins を用いた。この方法は粘性が高く、やや取扱いにくい欠点はあるが、硬化に伴う収縮がほとんどなく、硬化反応が均一に行なわれ、接着性がよく、気泡が生じにくい等の利点があり、電子衝撃に対しても強い。ここでは Luft 法(1961)に多少の変更を加えて、次のような包埋操作を行った(室温)。

propylene oxide 1 : Epoxy resins 1 12~15 hours

Propylene oxide で脱水した試料を、上記の propylene oxide と Epoxy resins の混合液に12~15時間浸漬し、試料によく resins を透徹させる。Epoxy resins の組成は次のようにした。

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

(4) 重 合

Embedded Epoxy resins

24 hours	at 40°C
48 hours	at 55°C

Gelatin capsules に試料を resins とともに埋め込み、最初に40°Cで24時間、その後55°Cで48時間加温し、重合させる。

(5) 超薄切片の作製

Epoxy resins に包埋した試料から 3~5 μ m の切片を作製し、toluidine blue または Richardson 染色を施して光顕で観察し、電顕観察の部位を決定した後に、実体顕微鏡下で trimming を行った。Trimming の方法は、厚さが約 0.5 mm 前後ある試料の葉状部全体が含まれるように試料切片面の縦方向を 1~2 mm に短く cut し、横方向は 5~10 mm 程度の幅にした。この矩形の切片面の横軸が glass knife の刃と平行に位置するように、knife と trimming した試料を microtome (LKB urtra microtome) に装着した。こうした操作は次のような点を防止するのに有効である。試料を固定液に浸漬する前に、sodium cacodylate buffer で洗浄しても、なお除去されずに試料表面に付着している微小な異物粒子によって、knife mark が生じたとしても、超薄切片面の短い縦方向に mark が生じ、切片面の横の方向、つまり試料でいえば横に連なる表層細胞および皮膚細胞全体に被害がおよばないためである。

Glass knife の水槽には、切片が表面張力によって十分に伸展するように、10% acetone 水溶液を満たし、microtome で 200~400 Å の超薄切片を作製した。

前述した a, b, c の三種類の固定法によって各々固定、脱水、包埋された材料はいずれも切片作製に適した硬さで、固定間における差異は認められなかった。

(6) 電子染色

試料の contrast を高めるための切片染色法として、Millonig (1961) や初心者でも容易に contamination が少なく contrast が高い試料を得ることが出来るとされる Reynolds (1963), Venable ら (1965) の方法があるが、ここでは始めに uranyl acetate 液で染色し、Millonig の lead acetate 液で後染色する二重染色法を用いた (室温)。

2% uranyl acetate 20 minutes

Millonig's staining 10 minutes

Composition of Millonig's solution

A	{ lead acetate	6.3 g
	{ H ₂ O	100 ml
B	{ sodium hydroxide	1.45 g
	{ rochelle salt	0.25 g
	{ H ₂ O	100 ml

Filtration after A+B

2% uranyl acetate 液に mesh の試料面を下にして20分間染色し、蒸留水で10~30秒くらい水洗する。次にA液、B液をそれぞれよく溶解し、混合し、濾過した Millonig 液に浸漬して10分間二重染色を行ない、蒸留水で水洗終了後、室温で乾燥させ、電顕の観察に供した。電顕は HS—7 型・JEM 100—B 型透過型電子顕微鏡を使用した。

III 実験結果および考察

葉状部組織の概略は、最外層として薄い部分で約 0.2 μm, 厚い部分で 1.0 μm の波状形をした細胞壁があり、その内側に1~2, 3層の細胞から形成される表層がある。さらにその内側には2~3層の細胞で形成される皮層細胞があり体の中央部には管状の篩管細胞と厚い間層からなる髓組織がある。

細胞の構造は、ほぼ中央部に核が一個存在している。核小体も一個見られる場合が多く、その他細胞質には葉緑体, mitochondria, Golgi body, 液胞等が認められる。これらの組織、小器官および細胞の形態を詳細にしかも正確に観察するために、実験方法の項で述べた三種類の固定方法を試みた結果、次のような観察像の差異が認められた。(以下, osmic acid 単

独固定を単独固定, osmic acid · glutaraldehyde 混合固定を混合固定, osmic acid 前固定, glutaraldehyde 後固定の二重固定を二重固定と記す)

核・核小体

核は中等度の電子密度を有し、二重固定が最も明瞭に核質の微小な顆粒物質が観察され、電子密度の高い球状の核小体が見られる (Figs. 8, 9)。単独固定の場合も他の小器官と区別することが出来る (Fig. 1)。しかし混合固定は他の固定法に比較して電子密度がやや低く、電子染色効果が劣る (Fig. 4)。

葉緑体

単独固定 (Fig. 1)、混合固定 (Fig. 4) は葉緑体の数や形が判別しがたく、わずかに带状の thylacoids が観察されることから葉緑体であろうと推定するにとどまり、強拡大での観察は不可能である。二重固定の場合は葉緑体の観察に適しており、一個の細胞に通常 5～6 個存在し、大きさは長径 3～4 μm 、短径 1.5 μm 前後の紡錘形をしており、微細構造の観察が可能である。表層細胞では細胞質の構造が緻密であるが、皮層細胞は表層の細胞に比較して数倍の大きさで、細胞質の構造自体が比較的粗であるため、小器官の観察も容易である。葉緑体を強拡大で観察すると (Fig. 7)、葉緑体全体を包む二重の葉緑体包膜 (Fig. 7, 矢印) や、その内部に平行に走る 6 枚の膜が一つの単位となって形成されている band が見られる。Stroma にやや電子密度の高い顆粒で点状の carotenoids が明確に観察され、固定効果、電子染色効果がよいことを示している。これらは固定される物質と、固定剤の種類により、反応の仕方が異なるものと考えられる。

Mitochondria

二重固定で観察した場合、mitochondria は長径 0.5 μm 、短径 0.3～0.4 μm の大きさで楕円形を呈し、cristae は短く小管状構造をしているのがわかる (Fig. 8)。高等植物の mitochondria に見られる mitochondrial granule は認められない。他の固定では正確にとらえることは不可能であり、混合固定の場合はその特徴的な輪郭からわずかに mitochondria であろうと推定される程度である。単独固定ではほとんど識別出来ない。

Golgi body

Golgi body は広く種々の細胞に存在しており、その微細構造は Dalton (1953), Sjöstrand (1945) らによって初めて明らかにされた。藻類では藍藻植物の細胞内には Golgi body をもたないが、他の門の藻類には存在している。二重固定では Golgi complexes と見られる構造が核や葉緑体に近接して観察され (Fig. 8)、一つの細胞に平均して数個あり、Golgi sac も明瞭に観察出来る。単独固定、混合固定では不明瞭な場合が多い。

液胞

単独・混合・二重固定法ともに高電子密度の一層の膜で包まれた液胞が観察される (Figs. 2, 5, 9)。二重固定による試料のある部位では液胞膜は黒く染まり (Fig. 9), tannine の貯蔵を示唆している。内皮層の細胞では液胞が細胞内の大部分を占めるようになり、内部には種々の有機物質や無機物質が含まれており (Dodge, 1973), 固定像ではこのような物質が凝集した状態で高電子密度の像として観察されるものと考えられる。

細胞質

細胞内を充填する細胞質は細胞により、いろいろな電子密度を示すが、二重固定の場合は平均して中等度の電子密度を示し (Fig. 8, ※印), 混合固定, 単独固定の順に電子密度が低くなる。細胞質の構造物は固定剤や固定の仕方によって、違ったあらわれ方を示し、二重固定の場合には ribosome の顆粒構造が見られるが、他の固定法では不鮮明な場合が多い。

細胞壁

単独固定, 混合固定, 二重固定ともに細胞壁を構成する網目状の微小繊維が観察出来る (Figs. 3, 6, 10)。単独固定, 二重固定は像が鮮明であるのに対して、混合固定の場合は contrast がやや低く、平面的な像になる。

山田 (1963), Robertson (1959) らによると、高等植物の細胞壁は unit membrane の形をとり、中央の電子密度の低い層と、両側の電子密度の高い層から構成され、膜の分子配列を示すものであるとしている。今回用いた試料では最外層の細胞壁、表層、皮層の細胞壁、粘液腺の細胞壁ともに一様な構造であるのに対して、篩管の細胞壁や篩板 (Figs. 3, 10), 原形質連絡では壁構造は一様ではなく、電子密度の高い層と、低い層とが識別された (Fig. 6)。

最小限の artifact のもとに、生きた細胞の構造が維持されるようにして細胞成分を保存するのが固定であるが、固定に影響を与える因子として固定剤の側からみると、(1)試料内へ固定剤が浸透する時間、(2)構造蛋白質の保持力、等があげられるが、(1)に影響をおよぼすものとして、固定剤自身の組織への浸透力および緩衝液浸透圧が関連してくる。Glutaraldehyde は osmic acid に比べてわずかに浸透力が強い。また固定剤の組織への拡散度は、組織の外周で起こる沈澱による蛋白質障壁によっても左右され、osmic acid による蛋白質沈澱はきわめて微小で、固定剤はこれによる障壁によってそれ以上組織の内部へ拡散することが出来ない。Glutaraldehyde や osmic acid を使用する場合には試料の厚さは 1 mm^3 以下が望ましいとされている (De Robertis, 1975) が、今回用いた試料は元来薄いもの (0.5 mm 以下) であるから、固定時間はさほど問題がないと考えられる。次に(2)の構造蛋白質の保持力の問題については、大部分の固定剤は主として細胞の蛋白質成分に作用すると考えられるが、勝れた固定剤は最小の微細な蛋白質沈澱をもたらしうなものでなくてはならない。Osmic acid は Palade (1952) 以来、細胞構造の電顕的研究に最も使用されている固定剤の

一つであるが、osmic acid の単独固定は核、核小体、液泡、細胞質、細胞壁の観察には効果的であるが、葉緑体、mitochondria, Golgi body 等の観察にはやや不適當である。その理由として、osmic acid が生体膜の脂質配列に変化を与え、多くの場合磷脂質に固定効果を発揮するのに対し、蛋白質要素には数種のものを除き有効でないと考えられる。一方、glutaraldehyde は1分子内に2個の aldehyde 基を有し、この aldehyde 基の二重結合で蛋白質構造内の amino 基、carboxyl 基、indole 基と反応して、他の蛋白質分子との間に bridge を形成し、構造を保つ効果があり、細胞質の一般構造をよく保持する。Glutaraldehyde を使用した二重固定では葉緑体、mitochondria, Golgi body 等の電子密度が高く、構造も緻密である。これは glutaraldehyde の作用により、これらの小器官に含まれている可溶性蛋白質（酵素）がよく保存されるためではないかと考えられる。De Robertis ら (1975) によると特に microtubule, filament 等をよく現わし、各種の膜構造の形態保存に利点を有し、粘液その他の分泌物の電子密度を高めるとしている。欠点は脂質配列にはほとんど影響せず、特に磷脂質の固定には難点があるといわれている（松本, 1979）。また mitochondria の膨化、破裂を起すこと、mitochondria, Golgi body などに myelin 像を出現させるなどの人工産物を招来し易いとされている。以上の点から osmic acid 単独固定よりも、glutaraldehyde 固定併用の方が細胞成分に対し、互いに補助的な作用をおよぼし、効果的な固定が行なわれる。両固定剤を同時に細胞に作用させる混合固定法は、両固定剤の特徴を生かしあった固定法であり、二重固定法よりも時間と手間を節約出来、黒住(1970)らによって種々の組織に利用され、良好な結果が得られているが、今回用いた試料では、osmic acid・glutaraldehyde 混合固定は効果がうすく、glutaraldehyde 前固定、osmic acid 後固定の二重固定が適している所見が得られ、細胞成分と固定剤との複雑な反応が示唆された。

IV 要 約

高等植物に比較して、藻類の電顕による細胞学的研究が遅れているといわれているが、その理由の一つとして、固定の困難さが挙げられている。藻類には高等植物に存在しない多種類の粘液物質が細胞間を埋めており、生育場所が海水中であることから、浸透圧の変化を十分に考慮した固定が必要である。

今回、*Undaria pinnatifida* の組織・器官および細胞の形態を、詳細にしかも正確に観察するため、今までに発表された文献から三種類の固定方法を試み、その良否を検討した結果 (Table 1), glutaraldehyde に 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) を加え、5°C にて2時間前固定を行い、さらに 2% osmic acid に 0.1 M cacodylate buffer を添加し、後固定を行う二重固定法が固定効果、電子染色効果がよく最も良好な結果が得られた。

Table 1 Results of the fixative states of organelle

Types of fixation		Single fixation of osmic acid	Mixed fixation of osmic acid and glutaraldehyde	Double fixation of glutaraldehyde and osmic acid
Fixing hours (5°C)		2 hours	2 hours	Prefixation 2 hours Postfixation 2 hours
State of the hardness for sectioning		good	good	good
Results of the electron micrographic contrast and reservation	Nucleus · Nucleolus	good	not so good	excellent
	Chloroplast	bad	bad	excellent
	Mitochondria	bad	bad	excellent
	Golgi body	bad	bad	excellent
	Vacuole	good	good	good
	Ground substance	rather good	rather good	good
	Cell wall	excellent	good	excellent

終りに本実験に終始御懇切な御指導を下さいました筑紫女学園短大 川上いつゑ教授, 広島大学原爆放射能医学研究所 岡本直正教授, 佐藤幸男助教授に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- Brown, H. P. and Ohio J. Sci., 1945, 45 : 247-301.
Manton, I. Symp. Soc. exp. Biol., 1952, 6 : 306-319.
Wolken, J. J. and Palade, G. E. Nature, 1952, 170 : 114-115.
Gibbs, S. P. J. Cell. Biol., 1962, 14 : 433-444.
Parker, J. and Philpott, D. E. Bull. Torrey bot. Club., 1961, 88 : 85-90.
Sabatini, D. D., Bensh, K. and Barrnett, R. J. J. Cell Biol., 17 : 19-58.
Bouck, G. B. J. Cell Biol., 1965, 26 : 523-524.
Evans, L. V. J. Cell Sci., 1966, 1 : 449-454.
Bourne, V. L. and Cole, K. Can. J. Botany, 1968, 42 : 1369-1377.
Chr, B. G. Phycologia, 1977, 16 : 139-151.
黒住一昌 電顕試料技術集, 誠文堂新光社, 1970. 304.
Toth, R. and Markey, D. R. Nature, 1973, 243 : 236-237.
Hori, T. Bot. Mag. Tokyo, 1971, 84 : 231-242.
松本明 電子顕微鏡的研究の実際, 近代出版, 1979. 89.
水平敏知 電子顕微鏡, 医歯薬出版株式会社, 1971. 94-95.
Glauert, A. M. and Glauert, R. H. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1958, 4 : 191-194.
Luft, J. H. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1961, 9 : 409.
Millonig, G. J. Biophys and Biochem. Cytol., 1961, 11 : 736.
Reynold, E. S. J. Cell Biol., 1963, 17 : 208.
Venable, J. H. and Caggeshall, R. J. Cell Biol., 1965, 25 : 409.
Dalton, A. J. Anat. Rec., 1955, 121 : 281.
Sjöstrand, F. S. and Hanzon, V. Exper. Cell Res., 1954, 7 : 393-414.
Dodge, J. D. Academic Press, London New York, 1973, 189-194.

山田英智 電子顕微鏡による膜の研究, 蛋白質, 核酸, 酵素, 8 : 130—140.

Robertson, J. D. Biochemical Society Symposia, 1959. 16 : 3—10.

De Robert, E. D. P. et al. ed. Cell Biology, Sanders. W. B. Comp. 1975. 内閣府二監訳, 細胞生物学, 出版センター, 89—91.

Palade, G. E. J. Exp. Med. 1952, 95 : 285—298.

Explanation of the Figures

- Fig. 1~3.** Electron micrographs of the *Undaria pinnatifida* fixed by single fixation of osmic acid.
- Fig. 1.** Epidermal layer cells of the *Undaria pinnatifida*. Though the cell walls are well fixed, the nucleus (N), chloroplast (c) and other cytoplasmic organelle are not so clear. ×7000
- Fig. 2.** In the dilatated cortical layer cells vacuole (V) and chloroplast (C) are observed. The fine structure of the chloroplast is obscure. ×4500
- Fig. 3.** Sieve tube and sieve plate of the medulla. The fine structure of the wall (W) of the tube (matrix of the medulla) is recognized. ×3500
- Fig. 4~6.** Electron micrographs of the *Undaria pinnatifida* fixed by mixed fixation of glutaraldehyde and osmic acid.
- Fig. 4.** Epidermal layer cells of the *Undaria pinnatifida*. The fine structure of the nucleus (N), chloroplast (C) are obscure. ×8000
- Fig. 5.** Vacuole (V) in the cortical layer cells are not so clear. ×6000
- Fig. 6.** Fine structure of the wall (W) of the sieve tube is observed. ×5500
- Fig. 7~11.** Electron micrographs of the *Undaria pinnatifida* fixed by double fixation of the glutaraldehyde and osmic acid.
- Fig. 7.** In the epidermal cells the fine structure of the lamellar bands formed by three thylacoids, carotenoids (CA) and double layer chloroplast membrane (↑) are seen. ×84000
- Fig. 8.** In the cortical layer cells, nucleus (N), mitochondria (M), Golgi body (G) and cytoplasmic ground substances (※) are well recognized. ×20000
- Fig. 9.** Vacuole (V), nucleolus (N) and dense materials (D) are also clear in the cortical layer cells. ×6900
- Fig. 10.** Fine filamentous materials of the wall (W) of the sieve tube and sieve plate are observed. ×15000
- Fig. 11.** Fine structure of the wall (W) of the sieve tube are also clear. ×9500







