

## ワカメの粘液腺について

— 主として連続組織切片法による所見 —

奥田 弘枝・請川 琴子

On the mucilage gland of *Undaria pinnatifida*

—Findings on the serial sectioning method—

Hiroe OKUDA and Kotoko UKEGAWA

### Abstract

Although much attention has been given to the nutritive value of the seaweeds, we find few reports on the relation of the tissue and its microingredients. Up to date the authors reported on the light and electron microscopic observations on the tissue of *Undaria pinnatifida*, the distribution of its microingredients and a fading of the pigment. This time some observations on the mucilage gland, which is under the outermost layer and whose finestructure has not yet been studied, were carried out.

The fresh materials were obtained in the sea along the coast of Onomichi in Hiroshima. One of them was non-treated, another was frozen, a third paraffin embedded and the last two were Epon embedded after double fixation of 2% glutaraldehyde and 1% osmic acid and dehydration. For the light microscopic observations Epon embedded materials were serially sectioned in 5  $\mu$ m thick and stained by toluidine blue. For the electron microscopic observation both Millonig staining and uranyl acetate were used.

The contents of the mucilage gland are clear and it is difficult to observe its finestructure without staining. The followings are the results obtained from the above staining methods.

- 1) The contents of the mucilage gland consist of glucoprotein and the lipid is not observed.
- 2) The density of the sticky contents and the membrane structure are easily observed by the toluidine blue staining.
- 3) Electron microscopic observation reveals the different stages of the development and the finestructure of the sticky contents in the mucilage gland.

## I 緒 言

ワカメは海藻のなかでも食用法の幅が広く、消費量も多い。けれどもその組織や化学成分の存在状態についてはあまり明らかでない。そこで前報以来光学顕微鏡・電子顕微鏡による組織観察・成分の分布状態・色素の消長等を検討してきた。ワカメの成分の中でも食味に大きく関係するものの一つは粘質物と考えられるので、本報ではこの粘質物の貯蔵・排出等に関係する粘液腺 (mucilage gland) の構造を光学顕微鏡および電子顕微鏡により観察したのでその結果を報告する。

## II 試料および試料の調整

### 1. 試料

観察に用いた試料は、尾道市尾崎町の沿岸より、直接採取した生のワカメ (*Undaria pinnatifida*) 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、pH 7.4, 0.1 M の cacodylate buffer で軽く洗い、汚物を除去して葉状部の中央部 (葉体長の約 1/3 程度の部位で、羽状裂片と中肋の中間部分) を一辺約 5 mm の小四角片に切り、試料に供した。

### 2. 試料の調整

観察の試料は観察目的・染色方法に応じて次の 5 種類の方法で調整した。

#### A. 光学顕微鏡 (以下、光顕) 観察用試料の調整

##### (1) 生切片法

safranin solution・pyronine-methyl green 染色液を用いた試料は針またはメスで引裂くか、ピスにはさんで薄片にした。

##### (2) 凍結切片法

粘液腺における脂質の存在を見る試料は sudan black B 染色液を用いて、10  $\mu$ m の凍結切片とした。

##### (3) paraffin 包埋切片法

PAS・light green solution・Delafield's hematoxylin solution・acrolein-schiff reaction の各染色液を用いた試料はまず Bouin 氏固定を行い、70~100% alcohol で脱水の後、常法により paraffin 包埋して 10  $\mu$ m の切片とし Ceadax で封入した。

##### (4) Epon 包埋による連続組織作製法

toluidine blue 染色液を用いた試料では、固定法は pH 7.4, 0.1 M の sodium cacodylate

緩衝による 2% glutaraldehyde 前固定と 1% osmic acid 後固定の二重固定法を行った。その後 10~40% の cacodylate 緩衝 alcohol で脱水し、ついで 50~100% の alcohol 系列で順次脱水の後、Epon 包埋した。光顕観察の試料はこれを 5  $\mu\text{m}$  の連続切片とし、染色を行った。

#### B. 電子顕微鏡（以下、電顕）観察用試料の調整

Epon 包埋切片法と同様に固定脱水の後、L. K. B ultramicrotome で 500~600  $\text{\AA}$  の超薄切片を作製し、Millonig 染色法で 10 分間、uranyl acetate 液で約 20 時間の二重染色を施し、透過型電顕（日立 HS-7 型あるいは JEM 100-B 型）で観察を行った。

### III 実験結果および考察

葉状部表皮層の細胞は 1 層~2・3 層の円柱状をした小型細胞からなる。粘液腺は表皮のすぐ下にあり、直径約 50  $\mu\text{m}$  前後の大きさで厚さ 0.1  $\mu\text{m}$  の細胞膜で包まれ、周囲の細胞と比べて著しく大きく、表皮層の細胞の約 10 倍である。形は球状あるいは梨状をしており、頂部は表皮の表面に開口している。コンブのような粘液腔道 (mucilage canal) や分泌細胞 (secretory cell) を有していない。すでに発表されたワカメの粘液腺についての記述によると (殖田 1967、広瀬 1965、岡村 1930)、粘液腺の内部構造は均一で内部は無色透明な顆粒物を有すると記されており、それ以上の詳細な報告には接し得ない。

我々は粘液腺の構造を明らかにする基礎的研究の一方法として、試料の調整方法の項で述べた種々の染色法について比較実験を行った結果、個々の粘液腺には内部構造の差異が認められ、変化に富んだ構造をとらえることが出来た。

safranin solution で染色した場合、粘液腺の周辺にある皮層細胞がやや褐色がかった橙色に染まるのに対して、粘液腺は濃赤色に近い色に染まり、明確に他の細胞と区別出来る。粘液腺内部には不明瞭ではあるが膜状物質が見られる。

pyronine-methyl green 染色液を用いた場合、細胞膜は薄い藤色に染まり、chloroplast その他の細胞内物質はやや桃色がかった明るい紫色になる。これに対して粘液腺そのものは均一な濃青色に染まる。

sudan black B solution では細胞内物質は黒色に近い緑色に染まるが粘液腺や細胞膜は染色されない。

PAS 染色では Fig. 1 のように細胞膜は濃い赤紫色に染まり、細胞内物質は薄い紫色に、粘液腺は褐色に染まる。粘液腺内部の膜状物質が明瞭に観察される。

light green solution で染色した場合、細胞膜は薄い緑色に、細胞内物質は濃い緑色に染まり、粘液腺はより濃い均一な濃緑色に染色され、他の細胞と区別することが出来る。

Delafield's hematoxylin solution での染色は Fig. 2 に示すように細胞膜、細胞内物質ともにあずき色に染まり、粘液腺は赤みがかった橙色に染まる。

acrolein-schiff reaction では細胞膜、細胞内物質はあずき色に近い明るい紫色に染まり、粘液腺は紫がかった褐色に染まる。内部の膜状物質は褐色に染まって、不明瞭ではあるが多少判別することが出来る。

以上の染色結果から、粘液腺内部の粘質物は糖蛋白質からなるものと考えられ、脂質は認められない。

これら各種の染色方法は粘液腺内部の粘質物がいかなる物質からなるのかについてはおおよそその判別をすることが出来るが、内部の構造をとらえることは出来なかった。そこで試料を Epon 包埋し、5 μm の切片を作製して toluidine blue 染色した結果、Fig. 3~Fig. 8 に示すように粘液腺の内部構造に差異が認められた。

Fig. 3 は2個の粘液腺があり(↑印)、内部には網目状の薄い膜の存在が認められる。一方、左側の粘液腺は薄紫色に染まっており、粘質物があることがわかる。周囲の皮層細胞は腺をとりまくように放射状に配列している。

Fig. 4 の粘液腺(↑印)は Fig. 3 のそれより濃青紫色に染まっており、粘質物の濃度がより高い状態を示す。腺内部には粘質物の濃度が濃いために不明瞭ではあるが網目状の膜の存在が認められる。

Fig. 5 でも2個の粘液腺があり(↑印)、一方は黒紫色に染まって、粘質物の密度が非常に高い状態が観察される。粘液腺の中央部が一部分、色がすこし薄くなっているが、おそらくこの部分は粘質物の密度がやや低い状態にあるものと推察される。

他方の粘液腺においては中央部分が粘質物の密度がやや高く、細胞膜に近い部分の密度が低い状態を示しており、これ等は粘液腺の中に存在する粘質物の密度が一様でない状態を示しているものと考えられる。

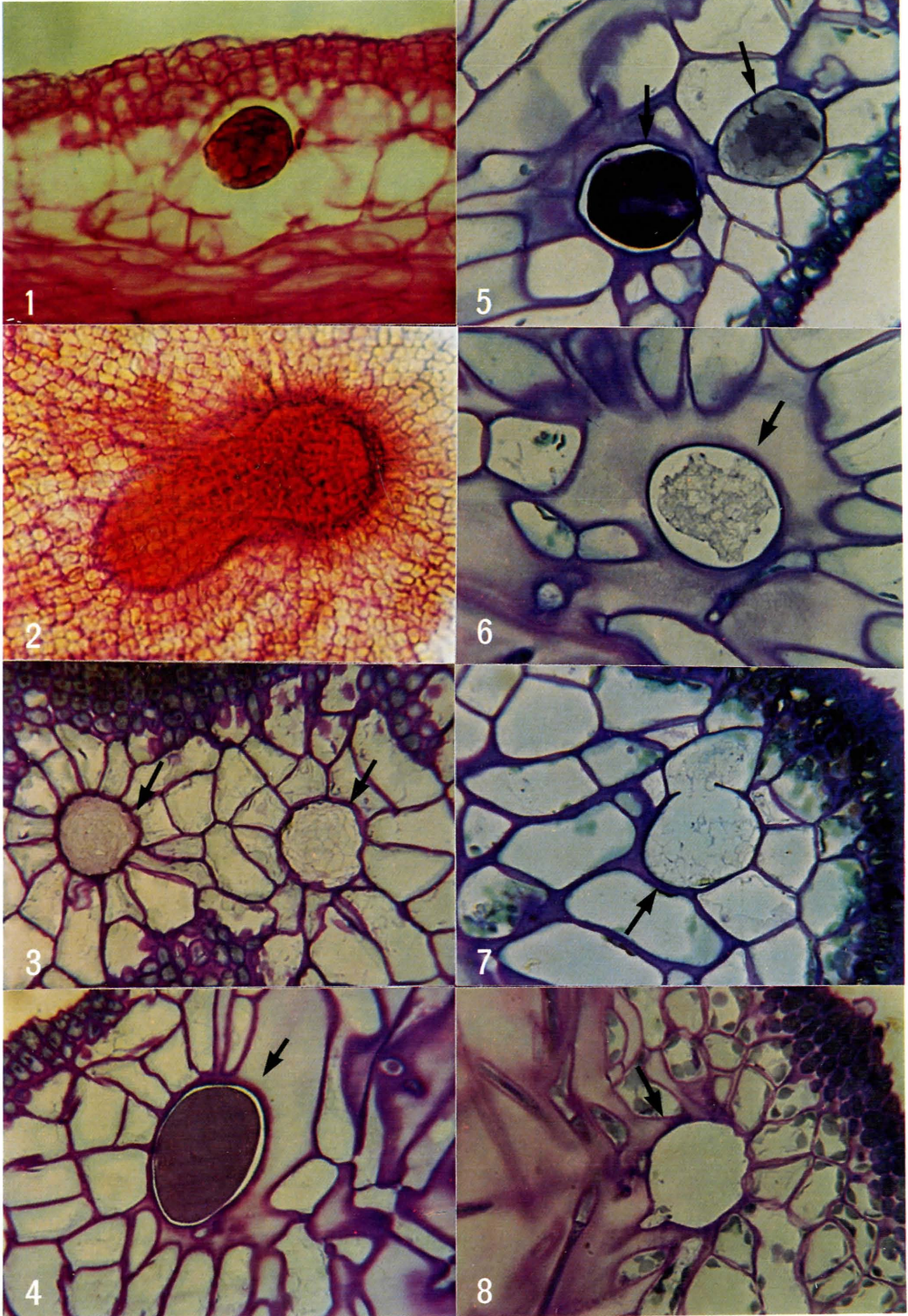
Fig. 6 の粘液腺(↑印)内部に膜状の物質が観察されるが、Fig. 3 に見られた整然とした網目状構造とは異なり、細胞膜に近い部分の膜状物質は消失している。

Fig. 7 の粘液腺(↑印)は隣接する皮層細胞と細胞膜の開口部を通して連絡しており、隣接細胞内にも膜状物質らしきものが認められ、粘質物の移動がみられる。粘液腺内部では

図版 1

第1図	paraffin 包埋	PAS	光学顕微鏡像 ×200
第2図	paraffin 包埋	Delafield's hematoxylin solution	光学顕微鏡像 ×200
第3図	Epon 包埋	toluidine blue	光学顕微鏡像 ×200
第8図			

図版 1



---

図版 2

第 9 図 Epon 包埋による連続組織切片 toluidine blue 光学顕微鏡像 ×500  
第16図



図版 2

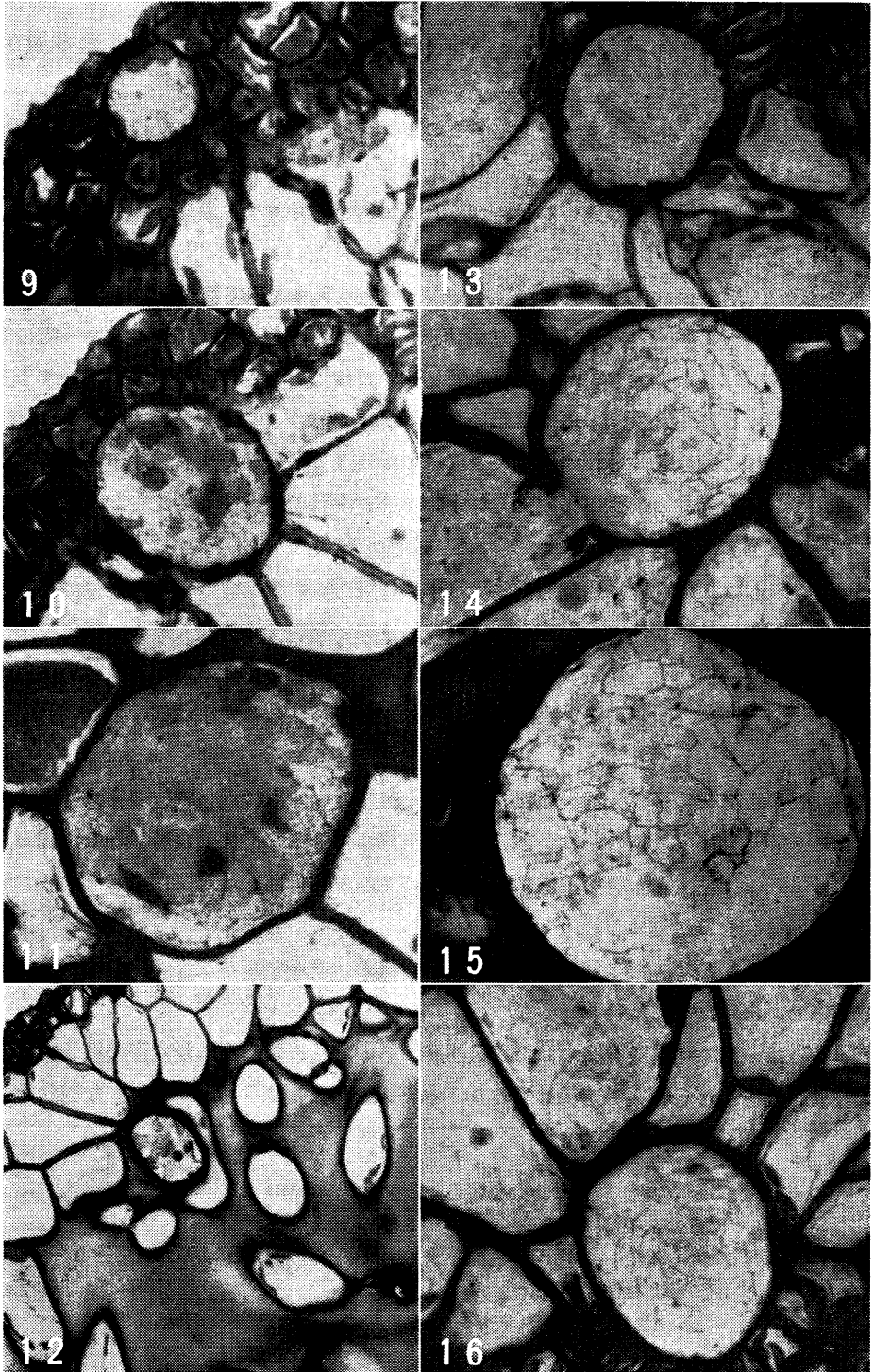


Fig. 3 で見られた網目構造状の膜状物質が部分的に破壊されている。

Fig. 8 の粘液腺 (↑印) は膜状物質・粘質物のいずれも存在しない空洞化した状態である。

以上のように toluidine blue で染色することにより、粘液腺の染色度の違いから粘質物の充満度が明確に判別出来、膜状物質等の内部構造の違いを詳しく観察することが出来る。

次にこのような内部構造の違いが見られるのは試料を切片にする段階での切断面の違いによるものか否かを確認するために次のような観察を行った。

前述と同様に Epon 包埋した試料中の粘液腺全体の  $5\mu\text{m}$  連続切片を作製し、toluidine blue 染色後、粘液腺を連続的に観察した結果、小さい粘液腺は連続切片 5 枚で一方の末端から他方の末端に達し、大きいものでは連続切片が 17 枚にわたるものもあり、平均すると 10 枚前後である。従って粘液腺の直径はだいたい  $50\mu\text{m}$  前後が多いといえる。Fig. 9~Fig. 12 が一個の粘液腺の連続切片を、Fig. 13~Fig. 16 が異なる粘液腺の連続切片の図を示す。これらの図は最初の切片と最後の切片をそれぞれ一枚、中間に位置する切片を 2 枚、計 4 枚の図に構成したものである。

Fig. 9~Fig. 12 は内部に連続した袋状 (小胞様構造) の膜を有し、その内側に粘質物が存在する粘液腺の連続切片で、Fig. 5 の右側の粘液腺に相当する状態である。袋状の膜は連続切片の最初の一枚から、最後の一枚まで観察され、粘質物の密度の異なる状態が染色度による違いで見られ、粘質物の濃い部分は写真では黒色の塊状として小胞様単位で観察される。

Fig. 13~Fig. 16 は一部分消失した袋状の膜を有する Fig. 7 に近い状態の粘液腺の連続切片である。連続切片の最初の一枚から、最後の一枚まで一部が消失した膜状物質が観察される。Fig. 14 では粘液腺と隣接細胞は間にある細胞膜の開口部を通して連絡しており、隣接細胞内にも膜状物質が認められる。

以上の観察結果から試料を切片にする段階での切断面の違いではなく、個々の粘液腺そのものに違いがあると考えられる。

Fig. 17 は一個の粘液腺を拡大した電顕写真である。粘液腺内部に無定形で電子密度中等度な粘質物と思われる物質が充満しており、中央部の粘質物は high density な球状をなし

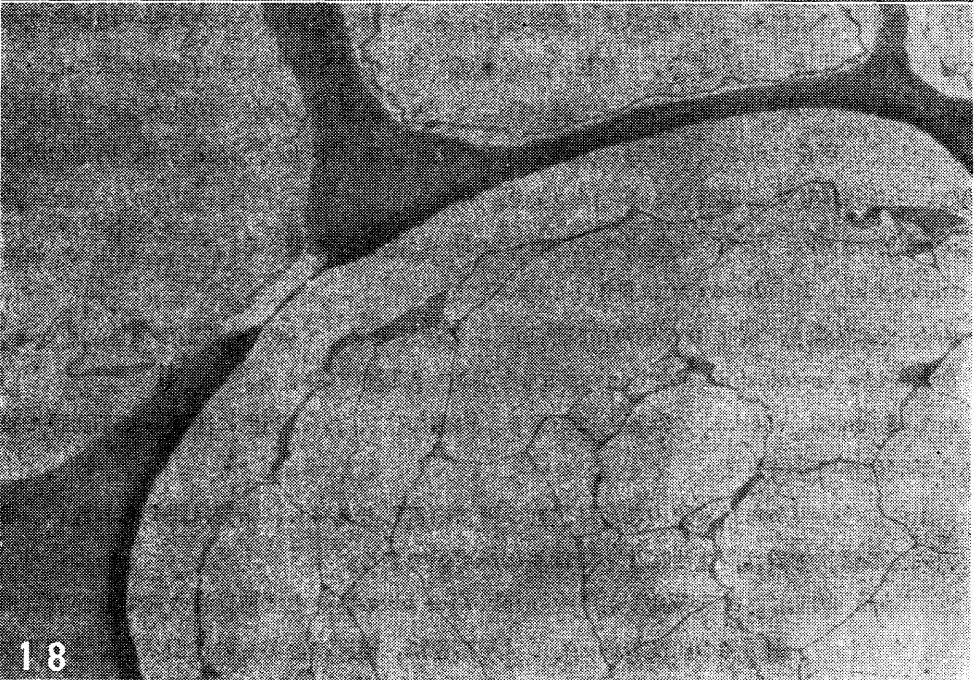
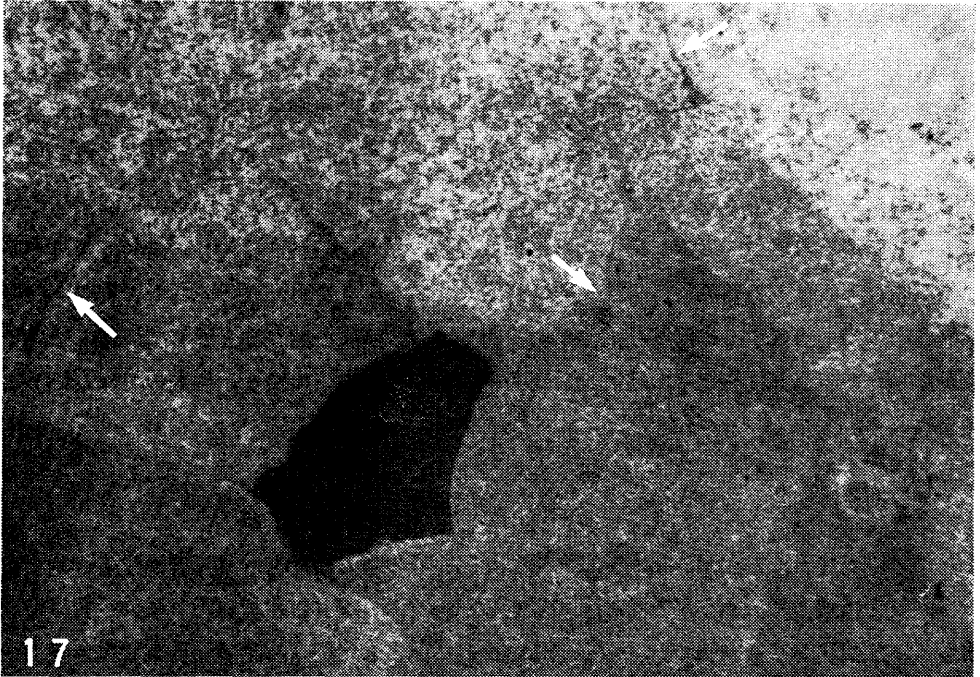
### 図版 3

第17図 Epon 包埋 Milloning 染色法と uranyl acetate 液による二重染色  
電子顕微鏡像  $\times 13500$

第18図 Epon 包埋 Milloning 染色法と uranyl acetate 液による二重染色  
電子顕微鏡像  $\times 6000$



図版 3



て、中央部ほど粘液の密度の濃い状態が観察される。袋状（小胞様構造）の薄い膜（↑印）は各所で断片的に見られる。光顕では Fig. 5 の右側にある粘液腺に相当する状態である。

Fig. 18 は一個の粘液腺と周囲の隣接する細胞を電顕で観察したものである。細胞膜は他の皮層の細胞膜と同じ微小繊維の網目構造から出来ており、細胞膜から  $0.2\sim 0.3\ \mu\text{m}$  内部に入ったところに薄い膜からなる袋状の小胞様構造のものが存在している。大きさは不揃いで隣接する袋は互いに密着しており、袋状の内部は空洞である。また、粘液腺に隣接する細胞との間にある細胞膜が極端に薄くなっている。この試料に連続する別の section ではこの部位が開口部となって粘液腺と隣接細胞は連絡しているように思われる。なお、他の試料の写真によっても隣接する細胞と粘液腺が約  $0.3\ \mu\text{m}$  の細胞膜の開口部を通して連絡している像が見られた。これはワカメの粘液腺と周辺細胞間の特色ある組織を示すものではないかと考えられる。

#### IV 要 約

ワカメの表皮下に存在する粘液腺は食味にも関わりのある粘液を貯蔵・排出する細胞であり、肉眼では葉の表面に小黑点状として見えるが、その大きさは平均直径  $50\ \mu\text{m}$  前後で球状あるいは梨状をした細胞であり、頂部は表皮上に開口している。粘液腺内部は無色透明であり、無染色では構造を判別することは困難である。今回は光顕レベルでの種々の染色法や・連続組織切片法・電顕観察等により、その詳細な内部構造をとらえることが出来た。

1. safranin solution では粘液腺は濃赤色に近い色に染まり、特有の梨状あるいは球状をした細胞で、明確に他の皮層細胞と区別することが出来る。不明瞭ではあるが、内部の膜状物質（小胞様構造）も観察することが出来る。

pyronine-methyl green 染色液では粘液腺は均一な濃青色に染まる。

sudan black B solution では染色されない。

PAS では赤紫色に染まり、内部の膜状物質も褐色に染まって明瞭に観察出来る。

Delafield's hematoxylin solution では赤みがかかった橙色に染まる。

acrolein-schiff reaction で紫褐色に染まり、内部の膜状物質は褐色に染まって不明瞭ではあるが判別が可能である。

以上の染色結果から粘液腺内部の粘質物は糖蛋白質と考えられ、脂質は認められない。また、内部の膜状物質は染色法によっては観察が可能である。

2. Epon 包埋による連続組織切片法の toluidine blue 染色では粘質物の充満度が判別出来る。すなわち、粘質物の密度の薄いものは薄紫色に、密度の高いものは濃紫色に染まるなど、その微妙な染色度の違いから粘質物の密度を推定することが出来る。

また、内部に整然とした網目状の薄い膜（小胞様構造）の観察されるものや、それが部分的に破壊されている状態、空洞化しているものなどが見られ、粘液腺の内部構造は決して均一ではなく、それぞれに差異が認められた。

3. 電顕観察によっては粘液腺内部の密度の異なる粘質物の集合体が観察され、粘質物そのものの微細な構造をとらえることが出来た。

以上、今までに発表された文献では粘液腺は均一な構造であるように記されているが決してそうではなく、粘液腺それぞれに内部構造の差異が認められ、極めて変化に富んだ構造をしていることがわかった。なお、粘液腺と周辺の細胞とのつながりについても多少の所見を得たので今後も検討をすすめ、如何なる cycle で粘質物の生産・貯蔵・排出をくり返しているのかを明らかにしたい。

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期大学 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。

## 文 献

- Frey-Wyssling, A. and Mühlethaler, K. 1965. Ultrastructural cytology. p. 230~235.  
Geoffrey, H. B. 1970. Division of labor in cells. p. 85. Academic Press, inc. New York.  
広瀬弘幸. 1959. 藻類学総説. p. 179~398. 内田老鶴圃, 東京.  
木島正夫. 1974. 植物形態学の実験法. p. 83~86. 広川書店, 東京.  
Lison, L. 1972. 組織化学および細胞化学. p. 398~402. 今泉正編. 白水社, 東京.  
村上悟. 1972. 細胞学研究法. p. 141~149. 田宮博, 渡辺篤編. 藻類学実験法. 南江堂, 京都.  
岡村金太郎. 1930. 藻類系統学. p. 261~262. 内田老鶴圃, 東京.  
奥田弘枝, 請川琴子. 1977. ワカメに関する研究 (第1報). ワカメの一般組織と  $\beta$ -carotene について. 広島女学院大論集. 27: 131~144.  
Porter, K. R. and Bonneville, M. A. 1968. Fine structure of cells and tissues. p. 48~50. Springer-Verlag, New York.  
佐野 豊. 1972. 組織学研究法. p. 177~203. 南山堂, 東京.  
殖田三郎, 岩本康三, 三浦昭雄. 1967. 水産植物学. p. 526~528. 恒星社厚生閣, 東京.