植物徒手切片標本の作製法の改善

根 本 圭 介・原 田 二 郎・山 崎 耕 宇
(東京大学農学部)

An Improvement in the Method of Preparing Hand-Sectioned Plant Materials

Keisuke NEMOTO, Jiro HARADA and Koou YAMAZAKI

(Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113)

昭和60年4月30日受理

植物試料を連続した徒手切片標本として検鏡する場合、切片がスライドガラスに貼付されていない状態では、カバーガラスで覆う際に、切片の配列や方向が乱れるため、満足の観察を行うことは困難である。このため、カバーガラスを用いることなく、グリセリンと50%エタノールの等量混合液を細筆に含ませ、切片に繰返し塗布して観察中の試料の乾燥を防ぐという方法が推奨されている¹⁾。一方、徒手切片をスライドガラスに貼付するためには、溶融したゼラチンや寒天を貼付剤として用いる方法が開発されてきている^{2,4)}。しかし、いずれの方法も、多数の試料を取扱う場合には、操作がやや煩雑に過ぎる上、組織の保存状態や、染色の仕上がりにも難点が残されている。

著者らは、連続横断切片を用いて水稻茎部の肥大の経過を観察しているが、その過程で、簡便で適確な標本作製法を考案したので、その大要を紹介する。

方法の概要

FAA (フォルマリン・酢酸・アルコール) で固定・保存した水稻茎部を対象とした場合について、以下、説明する。

常法により、頂端側から基部側へと連続的に横断した徒手切片を、下記の手順にしたがって処理する (第1図)。

1. シャーレに、水を十分に含ませた脱脂綿を敷き、切片を順次、この脱脂綿の上に方向をそろえて並べ乾燥を防ぐ。水稻茎部の横断切片は基部に残った分げつ基部や1次根基部などにより方向の同定が容易であるが、方向性のわかりにくい試料を扱う場合には、目印として試料にあらかじめ縦方向の溝を切って、局

第1図 徒手切片の接着保存法の模式図。

部的な染色を施しておく、後に切片とした際に方向の同定が容易となる。

2. 切片の数が一定量に達した段階で、1枚のスライドガラスをとり、油性のフェルトペン (色は問わない) で方形の枠を画く。枠の大きさは、その中に配列する切片が、順序よく収まるように決める。カバーガラスを使用する場合には、その大きさに準じて枠の大きさを考慮する。なお、枠の線の太さは、細過ぎると、後に述べるグリセリン水溶液の広がり防止の役に立たなくなる。そのため著者らは太書き用のフェルトペンを用い、線の太さが4~5mmとなるように枠を画いている。

3. 上記枠内のガラス面に瞬間接着剤アロンアルファ (東亜合成化学工業株式会社製、木工用) を筋状に塗布する。ついで、個々の切片を、順次その一部が接着剤に付着するように規則正しく並べる。その際、接着剤が切片の上面にまで広がると、観察の妨げとなるので、切片は接着剤の上に置くような要領で並べるとよい。また、接着剤は盛り上がることなく、薄く引くように塗布する。ただし、薄く広げた瞬間接着剤は固

化が早いので、以上の操作は手早く行う必要があり、とくに、1枚のスライドグラスに、何段にもわたって切片の貼付けを行う場合には、1段ずつ接着剤の塗布と切片の貼付けを繰り返すほうがよい。切片の貼付けが終了した段階で、切片が乾燥しないうちに直ちにスライドグラスごと水を張ったシャーレに沈める（水中で瞬間接着剤を固化させた場合、接着剤の表面が白く濁るが、通常の実体顕微鏡下で観察を行う際の支障とはならない）。

4. 数分後、接着剤が固化した段階で、スライドグラスを水からとり出し、切片を痛めないように注意しながら、ティシュペーパーで余分な水を除く。この際、とくに油性サインペンで画いた枠の上に大きな水滴が残らないように注意する。つづいてグリセリン・水（1:4）溶液（組織染色のために、サフラニンを少量加えてある）を、枠内に盛り上がる程度に、静かに滴下する。油性サインペンで画いた枠のために、溶液は枠外に広がることはない。

5. 水が蒸発するまで1～数日間、埃を避けて室内に静置した後、検鏡に供する。またこの段階で、必要に応じてカバーグラスをかける。

結果および考察

以上の方法にしたがって作製したプレパラートは、組織の保存状態および染色性は良好で、実体顕微鏡下あるいは低倍率の光学顕微鏡下での量的形質の測定やその他の組織観察に好適であった。

用いた接着剤は組織の内部に浸透せず、切片が小型、柔軟であっても固化する際にこれを変形させることがなかった。さらに、接着が強固であるため、試料の上にカバーグラスをかけることも可能であり、また試料に塵等が付着した際には、スライドグラスごと洗浄を行うことができるなど、各種の利点をもつものであると考えられた。ただし、切片が極く薄い場合には、切片の接着部位における染色性が悪くなることがあり、この点については検討の余地が残されている。

徒手切片を長期間保存するにあたっては、従来、試料をグリセリンに封入することが一般的に行われてきている。しかし、対象とした水稻茎部の場合、とくに成熟期前の試料に直接グリセリンの原液あるいは高濃度のグリセリン水溶液を与えると、組織が収縮をおこして観察に不適當であった。そのため、本法では、水で十分に希釈したグリセリンを用い、水分の蒸発に伴ってグリセリンの濃度が徐々に高まるようにした。この種の手法は、植物および節足動物などの観察にすでに用いられているものであるが^{1,2)}、粘性の低い大量の希釈液を用いる場合、液がスライドグラス上に広がってしまう難点がある。油性サインペンによる枠は、この液の広がり防止に極めて有効であった。

なお以上の方法は、連続した徒手切片を低倍率で観察するうえで、簡便で応用範囲の広い方法であると考えられるが、加えて以下の知見を記しておきたい。すなわち、貼付に用いた瞬間接着剤は、一旦固化するとキシレンやエタノールに不溶であり、しかもサフラニンやファストグリーン等の色素に染色されない。このような性質は、通常のパラフィン法等による永久プレパラート作製の際の貼付剤としても、この種の瞬間接着剤を利用し得る可能性を示唆するものといえよう。ただしその場合には、前述のように、水中で固化させる際の接着剤の白濁や、切片が薄い場合の染色の悪さなど、解決すべき問題が残されており、これらの点をも含めて、目下検討を進めているところである。

引用文献

1. GOULET, H. 1977. Coleopt. Bull. 31: 381—382.
2. 熊沢正夫 1956. 植物解剖学実験法. 生物学実験講座. 中山書店, 東京. 24—25.
3. 西山市三 1961. 細胞遺伝学実験法. 西山市三編, 細胞遺伝学研究法. 養賢堂, 東京. 124.
4. 亘理俊次 1957. 植物組織実験法. 戸荻義次他編, 作物試験法. 農業技術協会, 東京. 204, 211—213.