が得られない。筆者らのこれまでの実験では、すくなくともカリウムとマグネシウムの一部が、塩素と同様に内部への移動を行なっているのではないかと考えられるが、これらについてはなお確証を得て別に報告する機会があらう。

要 約

米粒貯蔵中の粒内塩素の動向を、米粒各部の化学分析によって観察してつぎのごとき結果を得た。

- (1) 新米の状態において米粒の果種皮・糊粉層・胚芽等の外層に多く含まれる塩素は、普通の環境ならば4月から7月にかけて大部内胚乳部に移行する。
- (2) 塩素が粒内移動するには、ある量以上の水分を米粒が保有していることが必要である。この水分量の限界は12%と16%の間にある。
- (3) 温度は移動速度を早めるが、絶対要件ではない。米粒を冷蔵しても塩素は移行する。
- (4) 塩素の移動は、米粒の吸湿放湿のごとき水そのものの移動とは関係ない。塩素の内部への移動は非可逆的である。

(1) 久保彰治, 樋口キヨ, 堤忠一: 栄養と食糧, 投稿中.	AOAC, "8th. ed., p. 116, AOAC, Washington, D. C. (1955).
(2) AOAC: "Official Method of Analysis of	(3) 久保彰治, 樋口キヨ: 栄養と食糧, 投稿中.

米粒に含まれる塩素の粒内移動 (第2報)*

米粒中の塩素の組織染色法による観察

久保彰治, 藤田恭子 (農林省食糧研究所)

昭和33年9月16日受理

第1報⁽¹⁾において、筆者らの一人久保および堤は、米粒各部の経時的な化学分析によって、最初にはおもに米粒のぬか層に含まれている塩素の大部分が、収穫翌年の春から夏にかけて、胚乳部に移動することをみとめた。この移動は米粒の水分と特に密接な関係があると考えられるので、筆者らは主として米粒の水分、米の種類と産地との関係に焦点を合わせて、第1報よりさらに広範な実験を行いつつある。

米粒内の塩素の移動を観察するには、第1報のごとく米粒を各部分に分け、おのおのの塩素含量を化学的に定量することが、もっとも正確なみちであらう。しかし、米粒各部の塩素量はわずかであり、特に大部分の塩素が移動したあとのぬか部のごときは、はなはだ微量の塩素を含むに過ぎない。このような試料について通常の化学分析を遂行するには、分析に供する試料の量の相当大量を必要とする。米粒各部の分離についても、これに必要な量を徒手で切りわけるとは非常に手数がかかり、またとう精によって分離するとすれば、機械の構造上必然的に大量の試料処置が必要になる。

このような方法で経時的な観察を続けることは、実験のスケールをいたずらに大きくし、広範な観察は多大の制約を受けざるを得ない。

筆者らはそのために、米粒内の塩素移動観察の便法として、米粒の組織染色による方法の可否について検討を行い、かなりの好結果を得たので、現在は化学分析を標準的チェックにのみ用い、日常の観察はすべてこの方法によっている。これによって少量の試料で長期間の実験が可能になった。

本法では、この組織染色の方法と、それによる二三の基本的観察の結果を報告する。

実験および考察

1. 米粒の組織切片の塩素染色法 塩素の生体染色法としては、植物組織における実験例にはあまり接しないが、植物体より塩素含量の多い動物組織に適用されたものに、古くから MacCallum 法、Groebels 法、Defrise 法、Leschke 法など⁽²⁾がある。これらの方法の原理としては、塩素と銀塩による塩化銀沈澱反応、硝酸液による塩素以外の生体内陰イオンと銀との沈澱物の溶解反応、および塩化銀の感光反応が利用されている。

* Movement of Chlorine in the Rice Kernel. Part II. Histochemical Observation of the Chlorine Distribution in the Rice Kernel.
By Shoji KUBO and Kyoko FUJITA (Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry)

筆者らの方法も基本的な線においては、これらの方法を脱するものではないが、処理法にいくつかの改良工夫を加え、米粒中の塩素分布の検出に適用したものである。

その概略を第 1 図に示し、説明を加える。

観察用切片としては、生体状態の保持と操作の簡易な点から、厚さ約 0.5mm の横断切片を、鋭利な安全カミソリを用いて徒手にて作成した。(米粒を水浸することなしに作った非常に薄い切片は、単に作りにくいのみでなく、後のやや手のこんだ操作中に破壊されやすく、一方米粒を水浸することは、それによって塩素の移動がおこるおそれがある。)

その切片を、硝酸銀 1g を 90% アルコール 100ml に溶解した液に約 7 分間浸漬する。前述の方法⁽²⁾の多くは、硝酸銀(もしくは亜硝酸銀)の溶媒に水を用いているが、これは対象として塩素含有量も多く結合形式もかなり強固な動物組織を用いているため差支えないのであろう。米組織においては、第 1 報にもふれたように、存在する塩素の大部分がはなはだ水に溶けやすく、塩化銀として沈澱するよりさきに塩素が流出するおそれがある。したがって硝酸銀の溶媒として種々のものを試みたとえ、90% アルコールが適当であることがわかった。

なお水を溶媒とした場合は、米粒の組織が膨潤してきわめて観察しにくい状態になるが、アルコールで処理した場合は組織が緊縮したまま透明となつて都合がよい。以下洗浄用硝酸、還元用ヒドロキノンの溶媒に 90% アルコールを用いているのもこの理由による。

つぎに 0.5% 硝酸(90% アルコール溶液)に浸して切片を洗う。この操作中にリン酸銀その他の銀塩沈澱物を溶解し、塩化銀のみを組織に残すので、洗浄液を 1 分ごとに 3 回とりかえ、時折り振りまぜる。

切片を液からとり出し、紫外線燈(マツダ AH 70 型)により、15cm の距離で 1.5 ないし 2 時間照射する。はじめ筆者らは日光光線によって感光させる方法を用いたが、試料の定時的処理が天候に支配され、照射量も一定にならない不便がある。整色されてないハロゲン化銀の感光および吸光範囲はきわめて短波長側にあり、塩化銀においては 120 m μ 附近が最大吸収波長となっている。したがってこの紫外線照射が有効と考えた。この操作は写真における露出操作に相当する。この処理で感光した塩化銀は淡褐色を帯びるが、筆者らはつぎの現像操作によって像を鮮明化することを試みた。

すなわち照射済みの切片は、1% のヒドロキノン液(90% アルコール)に 15~20 時間浸漬して還元し、銀粒子を析出させ、発現した褐色斑によって塩素の存在を検出することができる。ヒドロキノン液をアルカリ性にして短時間で硬調に染色させることもできるが、液が急速に黒化して微細な切片をとり扱うのに困難で、また仕上がった標本の保存も悪いので、中性液で長時間かけて還元した。最適な還元時間は、温度に反比例して長短がある。ヒドロキノン以外の還元剤も考えられるが、90% アルコール溶性などの要件に制約されて、もっぱらヒドロキノンのみを使用した。

還元後はヒドロキノンの洗浄と脱水を兼ねて、無水アルコールで処理して乾かす。標本の保存性はよく、長時間変色も起らない。

本法の特長とするところは、溶媒に一貫して 90% アルコールを用いたこと、紫外線照射とヒドロキノン還元という、写真の露出・現像に当る操作を用いたことで、これによって方法の感度を上げ、微量の塩素分布を検出することを可能にした。

2. 米粒内塩素の組織化学的観察 上の塩素染色法を応用して米粒切片について観察した二三の結果を示す。

2・1 塩素の粒内移行：米粒内における塩素の分布は、新米においては、果種皮、糊粉層、胚芽の各部に多く、胚乳部に少ない。その状態を米粒の胚芽部分を横切る切断面について塩素染色を行ったもので示せば第 2 図のごとくなる。これは第 1 報における化学分析による所見とよく一致している。

古米、すなわち常温常湿で夏を越した米粒においては、これとまったく逆の図形が得られ、第 3 図のごとく果種皮・糊粉層・胚芽部分にすくなく、胚乳部のほうが塩素が多くなっている。

第 1 図 米組織切片の塩素染色法

第2図 新米の組織切片の塩素染色
(反射光による拡大写真)

第3図 古米の組織切片の塩素染色
(反射光による拡大写真)

常温常湿において、米粒の塩素がぬか層から胚乳部に移動する現象は、この染色法ではっきりみとめられる。米粒の各部について、いくぶん細かくこの移動状況を観察し、大約つぎのようなことをみとめた。

2・2 果種皮：果種皮における塩素の量は、米の種類や産地によって相当大きな差があるように見える。ある種の米では、糊粉層や胚芽の部分の塩素が完全に移行したのちも、果種皮にはいくぶん多量の塩素が残っているようであった。

2・3 糊粉層：糊粉層は、米粒の腹側（胚芽のある側）で1層まれには2層、背側では5～6層の四角い細胞からなるが、この層における塩素の移動の検鏡観察は容易である。背側の移動は腹側のそれよりいくらか時期的に後れるようにも見えるが、それはその側の細胞層が厚いためであろうかと思われる。

2・4 胚芽部・胚乳部：胚芽部における塩素の移動は、最初に胚乳部との境界より遠いところから始まる。まずこの部分の染色が淡くなるとともに、胚乳側に接した胚盤部分の染色が濃くなってくる。このころ、合成胚軸、胚盤の中心柱部分に塩素が多く検出されることもある。

胚乳部への移行は、まず吸着層部分の染色がしだいに濃くなり、塩素はいったん吸着層にかなり集積したのち、漸次胚乳全域にひろがって行く。胚芽中の塩素が胚乳中にほとんど移りおわたったのちも、なお吸着層の部分にはかなりの塩素が集まっているように見える。胚乳部内ではまず吸着層に近いところと米の腹側にあたる部分にかけ

て最初塩素がひろがり、それからしだいに均一化するようである。

第 4 図は、塩素の移動がすでに行われた米の、縦断切片の染色図形である。これはいったん米を水浸したのち作った薄い切片を同様処理し透過光で観察したもので、吸着層の部分の特色がみとめられる。

この胚芽の部分は、果種皮や糊粉層に比して構造的にまとまって大きいので、肉眼的観察も容易であり、多数の試料を処理する場合において、塩素の移動を知るには最も有効な対象となると考えられる。

以上のような塩素の移動現象が、米の貯蔵生理上なにを意味するかは明らかでないが、その貯蔵条件、ことに水分関係に強く支配されていることは確実らしい。そのため種種の環境下に置かれる米は、おのおの異った塩素移動開始時期と速度をもっている。しかし生体染色による観察では、条件による差はあるであろうが、その速度は第 1 報の化学定量で知られた速度 (1~2 カ月にわたる) よりかなりはやく、あるいは数日もしくは旬日の間に行われるかのように見える。

すなわち、一定の条件下でも、米粒の塩素移動開始の時期には、相当の個体的な差があり、化学分析によって数百ないし数千粒を併せて分析すると、すでに移動した粒とまったく動いていない粒、それに真に中間的な粒と、三者の混合比率によって、平均的な中間値が定量され、全体としての移動開始から終了までにかかなり長期間を要するように見えるのであろう。

筆者らがこの手法を主な武器として、さらに詳細な検討を行った結果は、第 3 報以下に報告したい。

要 約

米粒中の塩素の分布移動を、少量の試料について簡単に観察するため、米粒の組織染色法を考案した。

米の切片を硝酸銀のアルコール溶液に浸漬後、硝酸性アルコールで洗浄、一定時間紫外線にさらして感光後、ヒドロキノンのアルコール溶液で還元現像した。この方法は標本の保存もよく、米粒内の塩素移動状況を適確に捉えうる。

染色法によって、米粒内のぬか部の塩素が、胚乳部に大部分移行する現象を確認した。果種皮、糊粉層、胚芽から塩素の移動する状況を、やや詳細に観察した。米粒の塩素の移動の観察には、胚芽部からの塩素の離脱に注目することが、最も簡易なみちと思われる。

本報の実験に関しては、当研究所の堤忠一氏、竹生新治郎氏らから、多くの協力と御助言を頂いた。ここに深謝の意を表する。

(1) 久保彰治, 堤 忠一: 本誌, 33, 421 (1959).

(2) 森 優: 組織化学の理論と方法, 第 3 版, p. 47, 南山堂 (1951).

第 4 図 塩素移動後の縦断切片の塩素染色
(透過光による検微鏡写真)