

電子顕微鏡による木材細胞膜の空隙構造に関する研究 I

細胞膜内の各膜層別の空隙構造の差異

矢田茂樹・椋代純輔

SHIGEKI YATA and JUNSUKE MUKUDAI: Electron microscopical studies on the porous structure of wood cell walls I The difference in porous structure of various layers of the cell wall

要旨：木材細胞膜の空隙構造を明らかにするための一実験として、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) の心材小試片を硝酸銀30%水溶液および30°C飽和水溶液（約260%）中に浸漬し溶質を十分拡散させたのち、試片を①-85°Cで凍結しそのまま減圧乾燥、②シリカゲルを入れたデシケーター中で常温で乾燥、③105°Cの乾燥器内で乾燥、の3方法で乾燥し仮道管細胞膜内に沈着した粒子を電子顕微鏡で観察した。そして細胞膜内の各膜層における粒子の直径および数を測定しさらに粒子体積を計算して、各膜層別の空隙直径とその分布、空隙数、空隙体積についてのデータを得た。得られた結果はつぎのとおりである。1) 乾燥方法および濃度の差異により粒径分布の範囲は変化した（最大：15~200Å, 最小：15~100Å）。しかし2次膜ではピーク値は変わらず、つねに直径40~45Åであった。このことから細胞膜中にはこの径の空隙が最も多数存在していると推察される。②各膜層別の平均空隙直径についてはI+P層が2次膜よりも30~60%大きかった。2次膜内の各膜層間にはほとんど差は認められなかった。③各膜層別の空隙数はS₁層が最も多くS₂層の1.3~1.8倍であった。I+P層、S₃層はバラツキが大きかった。④各膜層別空隙体積についてはI+P層が最も大きくS₂層の2~3倍であった。つづいてS₁層がS₂層の1.2~2.0倍であった。S₃層は乾燥方法による変化が大きかった。

I 緒 言

木材は多孔性材料として種々の大きさの空隙をもっており、それは細胞内腔や膜孔室などの粗大な永久毛管と水などの収着にともなう膨潤のさいに発生する微細な一時毛管とに大別される¹⁾。なかでも一時毛管は木材の防腐、防火などの薬剤処理、木材のパルプ化などの化学処理過程において薬剤の通路としてまた同時に実際の反応の場として重要な役割をはたしている。したがって膨潤状態にある細胞膜の空隙構造を明らかにすることは実用的な面からも非常に重要である。近年種々の方法を用いて細胞膜の空隙構造が研究されている。すなわちN₂吸着法により材料の内部表面積および直径約300Åまでの細孔分布が明らかにされ^{2), 3), 4)} また水銀ポロシメーター法によって、N₂吸着法より大きなオーダーの空隙の細孔分布、表面積が測定されている^{5), 6)}。これらの方法は定量的方法として優れた

方法であるが、いずれも材料を乾燥してから供試しなければならず木材のような水の吸脱着に伴ない膨潤収縮するような材料への適用に関しては若干の疑問がある。また水蒸気吸着にもとづく吸着等温線からケルビン式により細孔分布を求める試みもなされた¹⁾が低相対蒸気圧下ではケルビン式の適応性に難点がある。Frey-Wyssling⁷⁾は以前にX線回析法で細胞膜中の空隙の平均径を算出しているが一方、近年電子顕微鏡の分解能の向上および試料作製技術の改良により木材細胞膜についても非常に微細なオーダーでの論議が可能となり、細胞膜の空隙構造についても電子散乱性の大きい金属化合物を沈着させることにより空隙の直径、形、長さ、配向および各膜層別の空隙構造の差異など主として定性的な面の解明への寄与が期待される。本実験では硝酸銀水溶液中に木材を浸漬し溶質を拡散させたのち乾燥し、沈着した粒子を電子顕微鏡で観察した。そして粒子の直径および数を測定することによっ

京都府立大学農学部木質材料学研究室

Laboratory of Wood Materials, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University,
Kyoto, Japan.

本報の要旨は第22回日本木材学会大会において発表した。
昭和47年7月27日受理。

て細胞膜中の各膜層別の空隙直径とその分布、空隙数および空隙容積を明らかにした。そして硝酸銀水溶液の濃度およびその後の乾燥方法の差異が結果に影響をおよぼすことが十分考えられるのでこの点の検討も行なうこととした。

II 実験方法

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) 気乾材の心材から春材部を含む小試片 ($1_{(T)} \times 1_{(R)} \times 5_{(L)}$ mm) を切り取り、蒸留水中に浸漬し減圧下で飽水にした。つぎにこの試片を硝酸銀30%水溶液(重量パーセント)あるいは30°Cでの飽和水溶液(約260%)中に3日間浸漬し溶質を十分細胞膜内に拡散させた。その後試片を取り出しつぎの3方法で乾燥した。①ドライアイス—アセトン(約-85°C)中で凍結しそのまま減圧乾燥(以下 F.D)。②シリカゲルを入れたデシケーター中で室温にて乾燥(以下 D.D)。③105°Cの乾燥器内で乾燥(以下 O.D)。乾燥を終えた小試片は断面での細胞膜の割れなどによる影響を除き、かつ包埋用樹脂の浸透を容易にするため軸方向に対し直角に3等分し、その中央部の試片をエポキシ樹脂に包埋した。包埋には樹脂を直接減圧注入する方法と、プロピレンオキシド浸漬—エポキシ樹脂置換法の2方法を採用した。常法による硬化後、LKB ウルトラマイクロームでガラスナイフを使用し春材部仮道管の木口の超薄切片を切削した。この切片化のさい、ナイフポート中の水に切片を浮かべるため未還元硝酸銀が再溶解し artifact 形成の原因になることが考えられたため3~4枚の切片を切削後、直ちに銅メッシュにすくい取り口紙で水をふきとってから乾燥器中で乾燥させた。観察は本学所在の JEM 100 B 型大型電子顕微鏡で行ない同一細胞膜の木口断面を直視倍率10万あるいは6万倍で撮影した。さらにこのフィルムを引伸し器で約9倍に拡大し印画紙に焼きつけた。そして同一細胞膜断面中の各膜層内(中間層および1次膜:I+P, 2次膜外層:S₁, 2次膜中層:S₂, 2次膜内層:S₃)に Plate I-1 に示すように一定面積を設定し、その中の全沈着粒子についてディバイダーを使用し0.5mm単位で直径を測定した。なお粒子はほぼ球形を示しているので測定した直径から体積も計算した。そして細胞膜内の膜層別の粒径分布図を作製した。

III 結 果

低拡大率のヒノキ春材仮道管の横断面の一例を Plate I-2 に示す。また各条件別の試片の仮道管細胞膜横断面の拡大写真を Plate I-3, 4 および Plate II-5, 6, 7, 8 に示す(S₃層は省略)。そして90万あるい

は54万倍に拡大された断面の写真にもとづいて測定した各膜層別粒径分布図を Fig. 1 に一括して示す。なお各条件別の観察切片はそれぞれ全てその厚みに差異があるので、粒子数、総粒子体積については各条件間での絶対値の比較は意味をもたない。そこで膜層別の粒子数、総粒子体積についてはS₂層を100とした時の比で表現することにした。

まず硝酸銀30%水溶液浸漬試片の乾燥法別の粒径分布についてはつぎのように言うことができる。①乾燥温度の上昇につれ粒径分布範囲は広くなる。すなわち F.D 試料では直径15~120Å, D.D 試料では15~140Å, O.D 試料では15~200Åであった。したがって平均粒子径についても F.D 試料で最も小さく、2次膜:45~47Å, I+P 層:60Å, つづいて D.D 試料で2次膜:45~50Å, I+P 層:約70Å, O.D 試料では最も大きく2次膜:約60Å, I+P 層:95Åであった。しかし I+P 層を除く他の2次膜での粒子径のピーク値はいずれの乾燥方法でもほとんど変化せず、直径40~45Åの間にあることは注目に値する。②各膜層別粒子直径については I+P 層が2次膜よりも30~60%大きかった。また2次膜内の各膜層別の差はほとんどない。③各膜層別の単位断面あたりの粒子数については S₁ 層が最も多く S₂ 層の1.7~1.8倍であった。S₃ 層は S₂ と大差なく、I+P 層は乾燥法によるバラツキが大きかった。④各膜層別単位断面あたりの総粒子体積は I+P 層が最も大きく S₂ 層の2~3倍、つづいて S₁ 層が大きく S₂ 層の約1.5倍であった。S₃ 層はバラツキが大きい。

つぎに硝酸銀飽和水溶液浸漬試片についてはつぎのように言うことができる。①粒径分布範囲は30%水溶液の場合より狭まくなり、F.D および D.D 試料では直径15~90Å, O.D 試料では15~120Åであった。30%水溶液の場合に比較して大径の粒子が減少し相対的に小径の粒子が増加していることがわかる。したがって平均粒子径も小さくなり、2次膜で36~45Å, I+P 層で50~60Åを示した。しかしこの場合にも、2次膜中の粒径のピークは30%水溶液の場合と同様に40~45Åに存在している。また直径30Å近辺にも小ピークが認められる。②各膜層別平均粒子径については I+P 層が2次膜よりも25~40%大きかった。また2次膜内の各膜層の差は小さい。③各膜層別の単位断面あたりの粒子数は30%水溶液の場合と同様 S₁ 層が最も多く S₂ 層の1.3~1.5倍であった。I+P 層および S₃ 層は乾燥温度の違いによる変化が多しい。④各膜層別の単位断面あたりの粒子体積については、I+P 層が最も大きく S₂ 層の2~3倍、つづいて S₁ 層が大きく S₂ 層の1.2~2.1倍であった。S₃ 層は S₂ 層

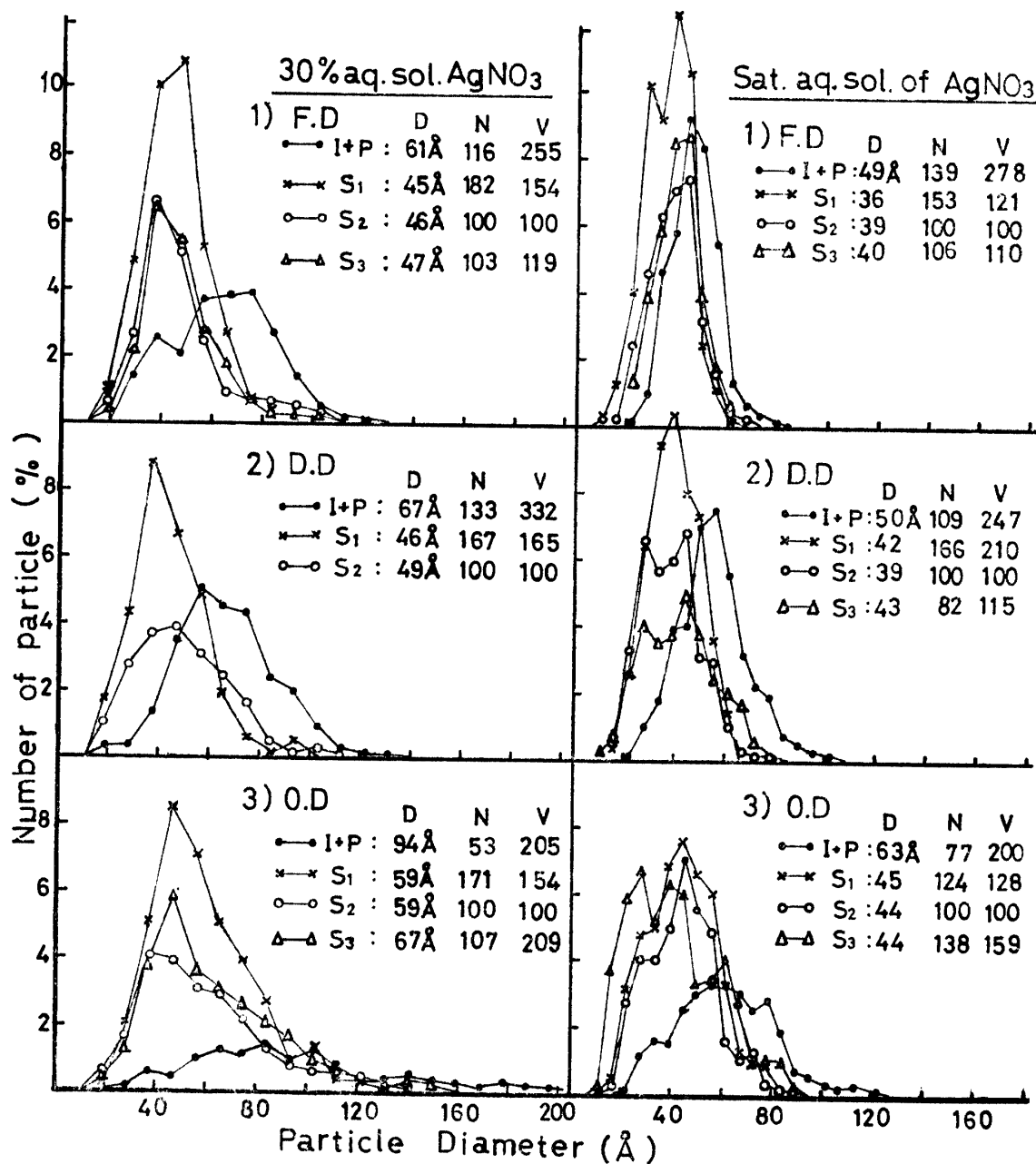


Fig. 1. Particle size distribution curves of each layer of the cell wall from a sample treated with aqueous solution of silver nitrate and then dried at different temperature. F. D: The sample freeze-dried at -85°C . D. D.: The sample dried in desiccator containing silica gel at room temperature. O. D: The sample oven-dried at 105°C . D: Average diameter of particles. N: Number of particles in each layer of the cell wall relative to the particle number of S₂ layer. V: Volume of particles in each layer relative to particle volume of S₂ layer.

よりも10~60%大きい。

つぎに細胞膜横断面における各膜層の大約の面積比をI+P:S₁:S₂:S₃=1:1:7:1とおき、上記のデータを換算して細胞膜全体としての粒径分布を表わすとFig. 2のようになる。硝酸銀30%水溶液に浸漬した試料の場合、図から明らかなように乾燥温度が上昇するにつれ、ピークの値は変わらないが、小径の粒子

が減少し大径のものが相対的に増加してゆく。飽和水溶液に浸漬した試片の場合にも同様の傾向が認められるが前者の場合ほど顕著ではなく、また30Å近辺に小ピークが認められる。

本実験では細胞膜の木口断面を非常に大きく拡大しており、加速電圧の変化、レンズ材料の磁気ヒステレシス、準焦不良などによる倍率誤差およびその後の拡

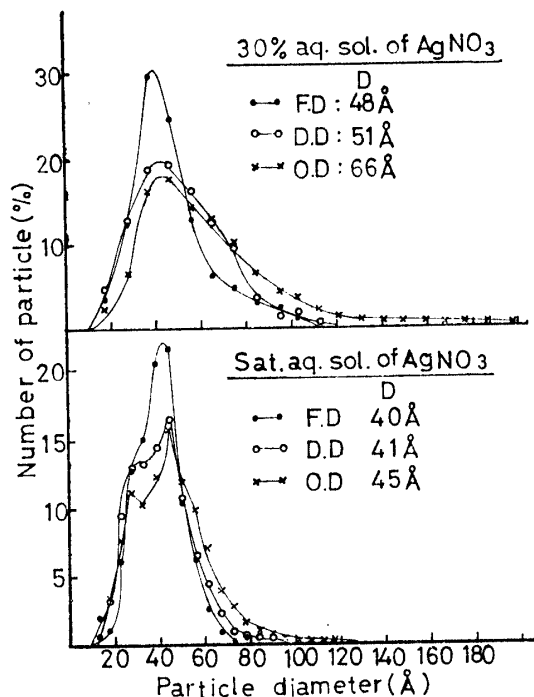


Fig. 2. Particle size distribution curves of the whole cell wall from a sample treated with aqueous solution of silver nitrate and then dried at different temperature. (The ratio of cross sectional area of each layer in cell wall; I+P: S₁: S₂: S₃=1: 1: 7: 1). D: Average diameter of particles.

大の過程で誤差を生ずる可能性がある。そこでこの点を明らかにするためβ型フタロシアニン銅の結晶を使用して、細胞膜断面の場合と全く同様に拡大処理して001面の格子間隔を測定した(Plate III-9)。この間隔は12.6Åであることがすでに解明されている⁸⁾が本実験では13.4Åと実測され約6%過大に評価していることが判明した。電子顕微鏡の観察にあたっては試料位置の不同も倍率誤差に関与してくるのでこの程度の誤差は避けられないと見るべきであろう。

IV 考 察

本実験の結果、ヒノキの仮道管細胞膜内の沈着粒子の粒径分布は、硝酸銀の濃度およびその後の乾燥方法の違いにより変化することが明らかになった。すなわち、硝酸銀30%水溶液浸漬試片をO.Dした時よりも分布範囲が広く直径15~200Å、飽和水溶液に浸漬しF.Dした時が最も狭く15~90Åであった。このように分布が変化していることから、これらの粒径分布は膨潤中の細胞膜内の空隙分布を直ちに示しているとは考えられず、むしろ単に大約のオーダーを示唆するにすぎないと見るべきであろう。すなわちO.Dの

ような急激な乾燥の過程ではイオンの移動距離は長くなり大きく凝集することが考えられ、真の空隙を押し拡げ過大な結果をもたらす可能性がある。一方これとは逆にF.D試料では、細胞膜の微細な空隙中での結合水の凍結に対しては疑問が提起されている^{9,10)}にせよ毛管凝縮を起こすような比較的大きな空隙中では凍結も可能とみられる¹¹⁾ため、少なくとも乾燥過程での溶液の移動は著しく防げられるであろう。したがって溶解していたイオンは実際の空隙をみたくすほどには凝集し得ず過小な結果をもたらす可能性がある。しかしながら濃度や乾燥温度の違いにかかわらず2次膜では、直径40~45Åに常にピーク値が表われることは注目し値する。N₂吸着データ¹²⁾によれば細孔分布のピークは直径38Å近辺に認められており本実験の結果は若干大きいながらもほぼ同一のオーダーとみなせる。ただしN₂吸着データにもとづく細孔分布は空隙容積という定量的なものであるのに対し本実験のデータは粒子の数であり細胞膜中の毛管の数を示唆するにすぎない。一方Frey-Wyssling⁷⁾は塩化金、硝酸銀を繊維細胞膜内に浸透させ、ヒドラジン水化物で還元した後、X線回析法で沈着粒子の直径を求め、ラミー繊維で約85Åという結果を得ている。またRudman¹²⁾はユーカリ属の2樹種について10%硝酸銀水溶液で処理しヒドラジン水化物による還元の後、電子顕微鏡で観察しS₂, S₃層中に300~350Åの粒子を認めている。いずれも本実験の結果よりも大きい、このような差をもたらす原因はヒドラジン水化物での還元の際の粒子径が著しく大きくなること(Plate III-10)によるものであろう。最近Heyn¹³⁾はSlash pineを酢酸ウラニルで負染色し電子顕微鏡で観察した結果、エレメンタリーフィブリル間の間隙は放射方向で20~30Åであったと報告している。本実験の結果はこれよりも大きい硝酸銀飽和水溶液浸漬試片の場合、直径30Å近辺に小ピークが認められており、もしこれがエレメンタリーフィブリル間の間隙を示すものとみなせば、40~45Åのピーク値は主としてマイクロフィブリル間の間隙を示すとみなしてよいだろう。Davies¹⁴⁾はすでに高濃度硝酸銀水溶液に浸漬した試片では沈着粒子径が小さくなることを明らかにし、200%水溶液では約60Å以下になると報告している。また彼は沈着粒子は主として硝酸銀であろうとしているが、木材は還元性の水酸基を有しているため銀イオンを還元して粒子状の銀を形成する可能性がある。この点を解明するためつぎの処理をした。①飽水小試片を30%水溶液に3日間浸漬した後、水洗し未還元硝酸銀を溶出させ、その後乾燥一包埋一硬化して観察(Plate III-11)。②飽水小試片を30%水溶液に3日間

浸漬し乾燥—包埋—硬化後切片化し切片を水および10%チオ硫酸ナトリウムで洗って未還元物を除去後、観察した (Plate III-12)。Plate III-11 から明らかなように3日間の浸漬処理後の水洗では2次膜中の粒子の多くは流失し、この段階では未還元物の多いことを示唆しているが、乾燥—硬化後の試料ではチオ硫酸ナトリウムで洗っても粒子はほとんど流失しない (Plate III-12) から多くのイオンは還元されて銀に変化していることが示唆される。したがって最終的な沈着粒子は硝酸銀ではなく主として還元された小粒子状の銀と考えられる。

つぎに各膜層別の空隙構造の差異については、I+P層は粒径が2次膜よりも30~60%大きく、また粒子体積もS₂層の2~3倍を示し、各膜層中では最大である。したがってI+P層は2次膜よりも多孔性に富むといえることができる。2次膜の中では平均粒子径はどの膜層においても大差ないが粒子数についてはS₁層がS₂層よりも30~80%多いことから、S₁層が2次膜の中では最も空隙の数が多くそれだけ多孔性に富むといえるであろう。S₃層はバラツキが大きい。以上をまとめて各膜層間の大小関係を表わすと、まず空隙の直径についてはI+P>S₁≒S₂≒S₃、空隙数についてはS₁>S₂ (他の膜層は不明確)、空隙容積についてはI+P>S₁>S₂ (S₃層は不明確)ということになる。Wardrop and Davies¹⁵⁾は*Eucalyptus regnans*と*Pinus radiata*材への硫酸銅および塩化第2鉄水溶液の浸透の結果、S₂層に比較しS₁層、I+P層は比較的多孔性に富むと報告しており、本実験の結果はこれと一致する。なおBailey and Preston¹⁶⁾はDouglas fir材への硝酸銀水溶液の浸透経路を追究し細胞膜中の通路は一定直径、一定長さの毛管というよりはむしろマイクロフィブリル間のいろいろな形の毛管系よりなると示唆しているが、本実験では毛管の形、配向および長さについての示唆は得られなかった。今後さらに

これらの点の解明が必要であろう。

引用文献

- 1) Stamm, A. J. (1964): Wood and Cellulose Science, 386, New York.
- 2) Stone, J. E. (1964): Pulp and Paper Mag Can. 65; 3—12.
- 3) 葉石猛夫(1970): 第20回日本木材学会発表要旨集 36.
- 4) 大沢純二・中戸莞二(1971): 第21回日本木材学会発表要旨集, 15.
- 5) Stayton, C. L. and C. A. Hart (1965): Forest Products Journal, 15; 435—440.
- 6) Sneek, T. and H. Oinonen (1970): The State Institute for Technical Research, Finland. Report, 1~60.
- 7) Frey-Wyssling, A. (1937): Protoplasma, 27; 372—411.
- 8) 水渡英二・滝山一善(1971): 電子顕微鏡分析, 122 (東京化学同人).
- 9) Merchant, M. V. (1957): Tappi, 40; 771—781
- 10) Cudinov, B. S. and V. I. Stepanov (1968): Holztechnologie, 9; 14~18.
- 11) Puri, B. Y., L. R. Sharma and M. L. Lakhanpal (1954): J. Phy. Chem, 58; 289—292.
- 12) Rudman, P. (1965): Nature, 208; 55~56
- 13) Heyn, A. N. J. (1969): J. Ultrastructure Research, 26; 52—68.
- 14) Davies, G. W. (1968): Appita, 21; 117~130.
- 15) Wardrop, A. B. and G. W. Davies (1961): Holzforschung, 15; 129—141.
- 16) Bailey, P. J. and R. D. Preston (1969): Holzforschung, 23; 113—120.

Summary

As a part of electron microscopical investigations of the porous structure of wood cell wall, small blocks (1_(T)×1_(R)×5_(L)mm) of water saturated wood of Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) were immersed in aqueous solution of silver nitrate at different concentration for three days and then dried at different temperature. Cross sections of the specimens were examined by electron microscope and measured the diameter of deposited particles of silver and its number in definite area of each layer (I+P, S₁, S₂, S₃) of the cell wall.

The results obtained are as follows.

- 1) As the concentration of the silver nitrate solutions and the drying temperature were altered, particle size and its distribution range were changed (Maximum: 15—200Å, Minimum: 15—90Å). However the most common particle size, namely the peak value of distribution curves, was unchangeable in every case and the value was 40—45Å (Fig. 1. and Fig. 2.).
- 2) On the difference of average particle size

among each layer of the wall, I+P layer was 30—60% larger than the layers of secondary wall. The difference of the size in each layer of secondary wall was slight. (Fig. 1.)

3) On the difference of particle number per unit area among each layer of the wall, S₁ layer had the most particles and the value was 1.3—1.8 times as many as S₂ layer.

4) On the difference of particle volume per unit wall volume among each layer of the wall, the particle volume of I+P layer was greatest and the value was 2—3 times as much as S₂ layer. Next to the I+P layer, the particle volume of S₁ layer was 1.2—2.0 times as much as S₂ layer. (Fig. 1.).

Explanation of plates

(Except for plate III-9, all other plates are electron-micrographs of cross section of tracheids in *Chamaecyparis obtusa* Endl.)

Plate I

- 1: The measurement limits of each layer in the cell wall.
- 2: A example of double cell wall from a sample treated with 30% aqueous solution of silver nitrate and then dried at 105°C.
- 3: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with 30% aq. solution of silver nitrate and then freeze-dried at -85°C.
- 4: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with 30% aq. solution of silver nitrate and then dried in a desiccator containing silica gel at room temperature.

Plate II

- 5: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with 30% aq. solution of silver nitrate and then dried at 105°C.
- 6: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with saturated aq. solution of silver nitrate and then freeze-dried at -85°C.

7: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with saturated aq. solution of silver nitrate and then dried in a desiccator containing silica gel at room temperature.

8: High magnified cross section of the cell wall from a sample treated with saturated aq. solution of silver nitrate and then oven-dried at 105°C.

Plate III

- 9: A image of the crystal lattice of β -form phthalocyanine-copper (001; 12.6Å). Direct magnification; 100,000. Final magnification; 900,000. It was used for the check of the magnification.
- 10: A cross section from a sample treated with 30% aq. solution of silver nitrate and then reduced by hydrazine hydrate.
- 11: A cross section from a sample treated with 30% aq. solution of silver nitrate and then washed by water. In this stage the most of particles are lost by washing.
- 12: The same sample as shown in plate I-2. After sectioning, the sections were washed by 10% aq. solution of sodium thiosulfate.

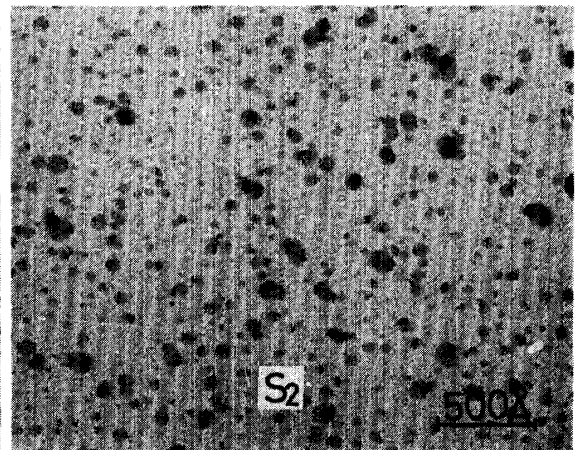
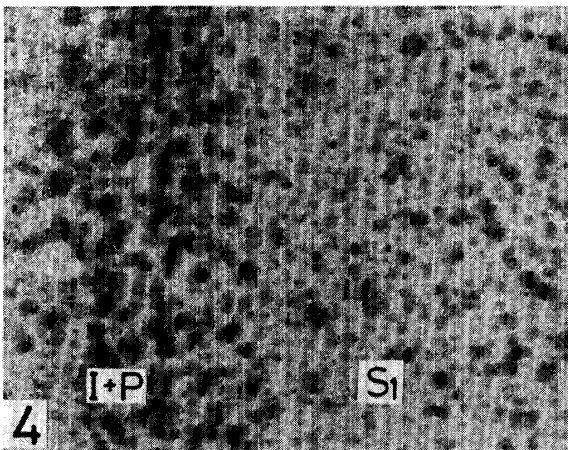
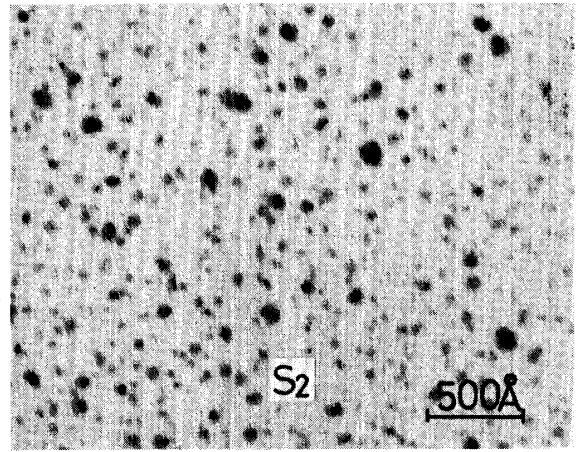
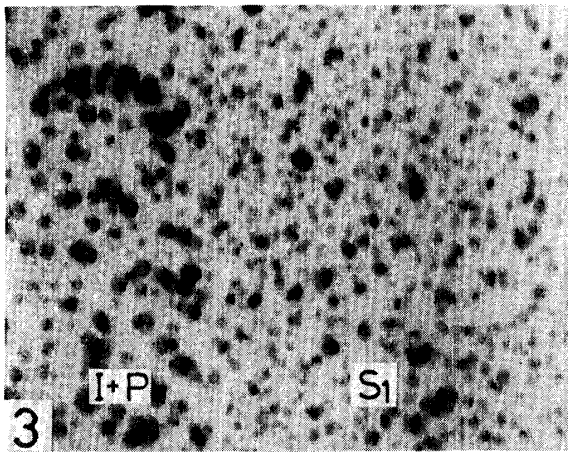
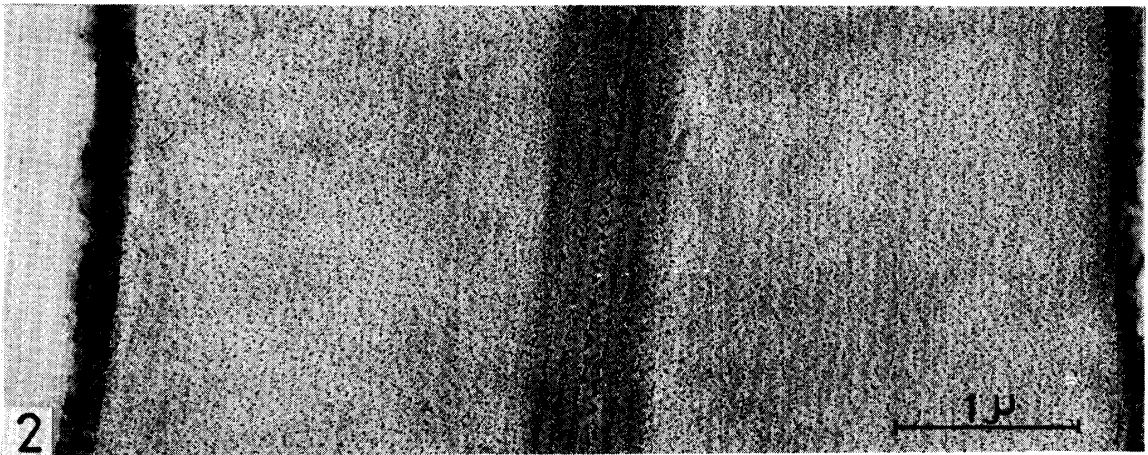
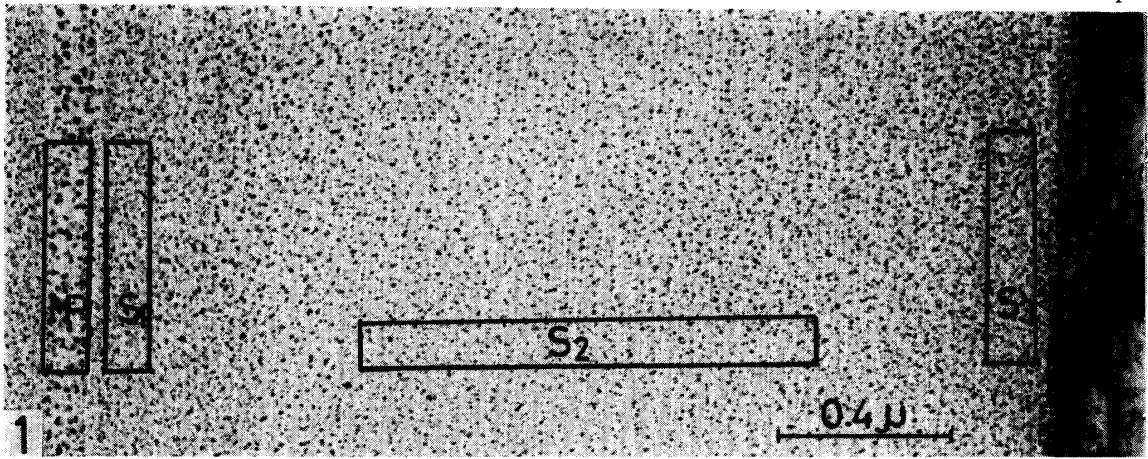


Plate II

