

植物柔組織セルロースの存在形態に関する研究

西暦 2011 (平成 23) 年 3 月 15 日

新 村 博

目次

第Ⅰ章. 序論	1
I-1. 天然セルロースの基本構造	1
I-2. 本研究で取り上げる植物組織試料	3
第Ⅱ章. 予備実験	8
II-1. 本章の目的	8
II-2. 実験と結果	8
II-2-1 偏光顕微鏡観察	8
II-2-2 AFM測定の精度検定	15
II-2-3 試料調製条件の検討	22
II-2-4 コンゴレッドによる染色試験	26
II-3. 本章のまとめ	29
第Ⅲ章. 果実柔組織等のセルロース	30
III-1. 本章の目的	30
III-2. 試料と方法	30
III-2-1 試料	30
III-2-2 実験方法	32
III-3. 結果と考察	35
III-4. 本章のまとめ	152
第Ⅳ章. 樹木形成層のセルロース	153
IV-1. 本章の目的	153
IV-2. 試料と方法	153
IV-2-1 試料	153
IV-2-2 実験方法	153
IV-3. 結果と考察	159
IV-4. 本章のまとめ	179
第Ⅴ章. 農林業廃棄物からのナノファイバーの調製	180
V-1. 本章の目的	180
V-2. スギの針葉	181
V-3. ミドリハナヤサイ茎髄組織	191
V-4. カカオポッド	196
V-5. ナツミカン中果皮	201
V-6. 本章のまとめ	207

第VI章. 総括と結論	208
参考文献	210
謝辞	212
報文目録	213

注：本文中の暦年表記は、以下、原則として西暦による。

第 I 章 序論

I-1. 天然セルロースの基本構造

セルロースは、単糖であるグルコースが (1→4) - β -グルコシド結合によって直鎖状に連結したホモ多糖であり、地球上で最多量に存在する天然高分子である。また、セルロースは、光合成によって大気中の二酸化炭素が固定されたもので、植物細胞中では繊維要素として細胞壁を構成する。天然セルロースにおいては、鎖状分子が平行に配列し、分子内および分子間水素結合を形成して結晶化し、マイクロフィブリルを構成する。このマイクロフィブリルとは、通常ひとつの合成装置として機能する酵素複合体が一度に合成するセルロースに相当し、その合成に際して一種の単位とみなすことが出来る。

かつては、すべての天然セルロースの基本単位として「エレメンタリーフィブリル」なるものが存在すると考えられていたが、現在では以下に述べるように否定されている。

1970 年代から 1990 年代の研究の進展によって、天然セルロースは、原形質膜上で直接合成されて結晶化することが明らかになった。すなわち、細胞を急速に凍結して真空中で原形質膜を切断（フリーズフラクチャー法）した試料を電子顕微鏡で観察すると、原形質膜に付随するセルロースマイクロフィブリルの先端部にタンパク質顆粒の集合体が存在するのが見られる。この顆粒集合体が、セルロースの合成と結晶化に関与する酵素の実体であり、「セルロース合成酵素複合体 (cellulose-synthesizing terminal complex)」または単に「末端複合体 (terminal complex)」(したがって、「TC」と略称される。)と呼ばれる (Saxena and Brown 2005 ; 木村・中島 2008)。

TC の顆粒配列の仕方には、幾つかの類型が知られ、進化的に近縁の系統にある生物種では同じ類型に属する。たとえば、緑藻綱 *Chlorophyceae* Wille とアオサ藻綱 *Ulvophyceae* K.R.Mattox et K.D.Stewart に属する緑藻では、顆粒が 3 列または複数列直線状に配列する。他方、共通の起源から進化したと考えられるシャジク藻綱の緑藻と、ほとんど全ての陸上植物では、6 個の顆粒がひとつの円を描くように並んで花模様のような「ロゼット rosette」と呼ばれる配列をする。このように、TC の顆粒配列の仕方が系統的に異なることに伴って、セルロースの合成と結晶化の場の形状と規模が相異し、それによって、そこで生合成されるセルロースマイクロフィブリルの形状も、それらを内在させる生物種によって異なる。

従来、シャジク藻綱 *Charophyceae* 以上の高等植物細胞壁から単離出来るセルロースマイクロフィブリルは、横断面が約 4 nm 角の正方形で、セルロース分子が当該マイクロフィブリルの横および縦方向にそれぞれ 6~7 列配列し、約 40 本のセルロース分子が束になって構成されていると考えられて来た。他方、セルロース分子が縦（厚さ）よりも横（幅）方向に多数配列すると、扁平なりボン状のフィブリルができる。紅藻 *Rhodophyta*、褐藻

Phaeophyceae Hansgirg や黄緑藻 *Xanthophyceae* は、リボン状のセルロースマイクロフィブリルを合成し、その厚さと幅は一定程度変化するとされる[奥田 1999]。緑藻綱やアオサ藻綱に属する数種の緑藻（アオサ藻綱のシオグサ属 *Cladophora* Kützing やバロニア属 *Valonia* C. Agardh）は、厚さと幅が共に 10 nm～30 nm の太いセルロースマイクロフィブリルを合成する。さらに、より原始的なセルロース産生生物である酢酸菌 *Acetobacter acetii* Beijerinck や、唯一のセルロース産生動物である腔腸動物のホヤ *Ascidiacea* Nielsen などでも、1000 本以上のセルロース分子鎖が結晶化して、幅 10 nm～50 nm 程度の太いマイクロフィブリルを形成する（図 1.1）。（木村・中島 2008）

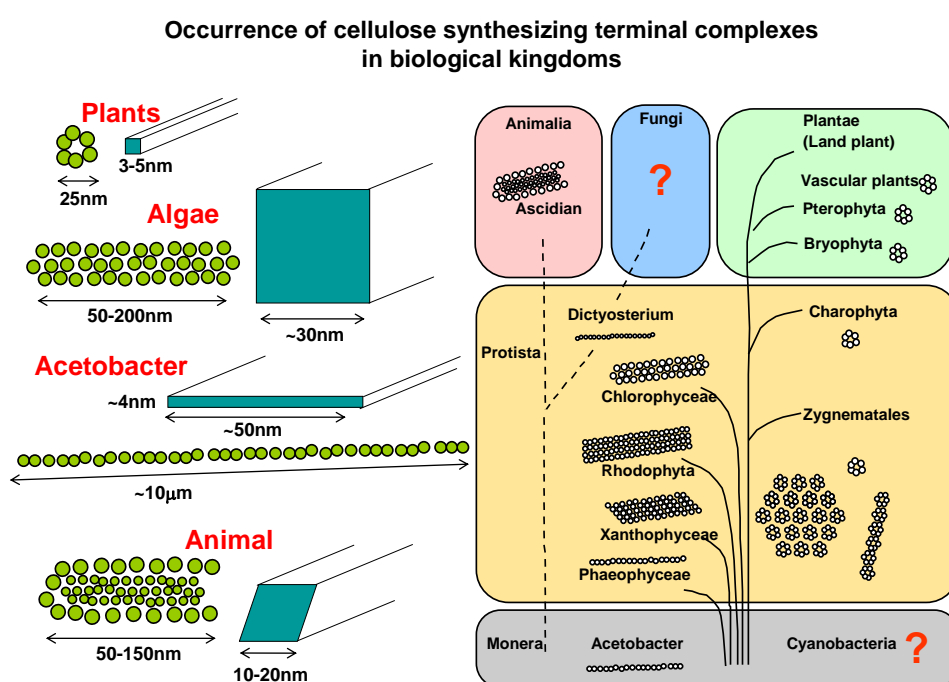


図 1.1 既知の生物の進化系統と彼らの形作るセルロースフィブリルの形態との相関関係
(生物素材科学研究室木村聡博士作成)

セルロースの基本構造については、長年の議論があり、今も落ち着を見ていない。1963 年、Frey-Wyssling らは、電子顕微鏡観察に基づいて天然セルロースの基本構造は 3.5 nm 幅のフィブリルであるとし、これを「エレメンタリーフィブリル」と名付けた(Frey-Wyssling 1963a, 1963b)。この観察は、高等植物の二次壁組織についてのものであったが、続いて、藻類や酢酸菌のセルロースも機械的破碎を受けると同様の太さのフィブリルに割ける現象が見出され、Frey-Wyssling らはすべての天然セルロースに共通の太さ単位、すなわち「エレメンタリーフィブリル」があるという仮説を立て、その太さが 3.5 nm であるとした。

しかし、その後の研究、とくに京都大学の原田・杉山らの研究により、シオグサ属植物

の一種であるチャシオグサ *Cladophora wrightii* Harvey などに含まれる高結晶性セルロースが単結晶であることが格子像観察で立証された (Sugiyama et al. 1982)。これにより、「すべての天然セルロースの基本単位」としての”Elementary fibril”仮説は否定され、海藻などの高結晶性セルロースを解繊したときに観察される細いフィブリルは、機械的細分化の結果と考えられるようになった。そして、前記のように、天然セルロースの基本単位の形状は、細胞膜上のセルロース合成酵素複合体の大きさに対応するという描像が受け入れられるようになった (Saxena and Brown 2005)。

話を高等植物に限れば、様々な手法で単離されたセルロースマイクロフィブリルの幅が、3 nm~4 nm となることは広く認められて来た。そして、この単位は、高等植物に固有の「ロゼット」と呼ばれる合成酵素複合体 1 個の形状に対応するというモデルが受け入れられている (Saxena and Brown 2005)。この 3 nm~4 nm という太さは、セルロース分子鎖 30 本~40 本に相当するので、これはロゼット中の合成酵素の数がこの数であることを意味すると考えられる。しかし、高等植物の合成するすべてのセルロースがこのような単位から成っているか否かについては、異論が少なからず呈せられて来た。その主要なものが、種子植物 *Spermatophyta* における柔組織セルロースに関するものである。

1969 年、Franke and Ermen は、バラ科 *Rosaceae* Juss. ナシ亜科 *Maloideae* 植物の一種の マルメロ *Cydonia oblonga* Miller の種子付属粘質物に含まれるセルロースを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、そのマイクロフィブリルの幅は 1 nm~2 nm であると報告した。しかし、当時の TEM は解像度が低く、しかも重金属塩による負染色に起因する解像度限界もあって、正確なマイクロフィブリル幅は未確定であった。

幅 3.5 nm よりも小さい幅のマイクロフィブリルの存在については、別の実験手法によっても検出が試みられてきた。Chanzy ら (1979) は X 線回折により、また Ha ら (1998) は固体核磁気共鳴 (NMR) により、フィブリル幅を評価し、2.0 nm 程度の幅のフィブリルの存在を報告している。しかし、これらは、間接的かつ平均値での評価に留まるので、直接的観察方法による確認が求められて来た。

I-2. 本研究で取り上げる植物組織試料

人が材料資源として利用する植物体の主なものは、木材である。木材組織は、針葉樹では「仮道管」、広葉樹では「木繊維」と呼ばれる繊維状細胞を主要構成要素とする。いずれの細胞壁も、多層構造からなる強固な構造を持っている。その最外層は、最初に形成される一次壁、その内側には細胞壁の大部分を占める二次壁がある。二次壁は、セルロースマイクロフィブリルが平行に配列した束で構成され、マイクロフィブリルが角度を変えながら積み重なったラメラ構造をとっている [島地 1976]。これに対し、一次壁においてはマイクロフィブリルがランダムに配列することが知られている。しかし、一次壁は細胞形成の初期のみ合成され、量的にわずかであるため、その微細構造はこれまで十分に解明されて来な

かった。

木質細胞の一次壁セルロースの研究にはこのような困難があるが、種子植物には様々な組織があり、木化していない軟らかい組織には、木材の一次壁に類似した性状のセルロースミクロフィブリルがあることが知られている。そこで、本研究では、各種種子植物とりわけ被子植物の植物体を構成する種々の柔組織に含まれるセルロースを、出来るだけ穏和な条件で単離し、それらを様々な手法で分析することを目的とした。

ここで、そのような柔組織の代表として、果肉が挙げられる。その最も身近な例としては、たとえばカキノキ *Diospyros kaki* L.やモモ *Amygdalus persica* L.の果肉がある。これらの果実は、発達した果肉の栄養と風味のゆえに古来人類が賞味して来たものである。また、代表的な果菜であるトマト *Lycopersicon esculentum* Mill.は、その発達した果肉だけでなく、種子のまわりに発達した湿潤なゼリー質の部分が独特の食感をもたらし、そのおいしさを倍増させている。ところが、専ら種子のまわりに発達した湿潤なゼリー質のところばかりを食べる果実もある。アフリカツノキュウリ（ツノニガウリ） *Cucumis metuliferus* E.Mey（図 1.2）やクダモノトケイソウ *Passiflora edulis* Sims の場合がその例である。



図 1.2 アフリカツのキュウリ果実縦断面

トマトやアフリカツノキュウリの種子の周囲にある水分豊富なゼリー状物質は、植物組織・解剖学的には「種衣」と呼ばれ、種子外皮の延長部分に当たる。それは種子を外界から物理的に防護するとともに、魅力的な食味等を備えることによって、種子散布に役立つ捕食動物の摂食を促す。すなわち、果肉と併せて哺乳類や鳥類に採食を促し、その排泄物を介して分布を広げる手段として進化・発達したものと考えられる。

アフリカツノキュウリのみずみずしい種衣の発達は顕著で、まことに興味深い。その分厚い緑色のゲル状物（図 1.3）はセルロースを含むと考えられるが、それはどのようなセルロースか？ 本研究はこのような疑問から出発して、多種多様な種子植物の柔組織全般および木材形成層のセルロースを研究対象とするに至った。



図 1.3 アフリカツのキュウリの種衣

セルロースマイクロフィブリルの構造については、従来、TEM観察によるフィブリル幅の決定が試みられてきた。しかし、TEM観察で常用されるネガティブ染色法においては、フィブリル外縁での染色剤の回り込みや撥水によるぼやけの問題がある。それゆえ、TEM観察では、数ナノメートルレベルの幅の正確な決定は困難である。これに対して、近年発達した原子間力顕微鏡（AFM）は、その高精度の高さ方向計測機能によって、1 nm 以下のフィブリル幅を計測する能力がある。しかし、その性能を活用したセルロースフィブリルの研究は、これまでほとんど行われていない。天然セルロースのAFM観察については幾つか報告があるが、それらはみな平面像の観察のみであった[Hanley et al. 1992; Baker et al. 1997; Davies and Harris 2003; Thimm et al. 2000; Ding and Himmel 2006]。平板上で高さ方向計測を行った唯一の例として Azuma 2003 [Trends in Glycoscience and Glycotechnology, Vol.15 No.81 (January 2003) pp.1–14] があり、そこではシソ科 *Lamiaceae* 一年生草本であるメボウキ *Ocimum basilicum* L. の種子付属粘質物に含まれるセルロースフィブリルの幅を 2.0 nm～2.6 nm としている。しかし、この報文には、AFM観察画像と高さ計測の生データ

の記載がない。

図 1.1 のように、高等植物のセルロースマイクロフィブリルの横断面は正方形として模式化されることが多い。しかし、ナノメートルオーダーでの高分子の挙動を考慮するならば、現実のセルロースマイクロフィブリルの横断面は、正確な四角形ではなく歪んだ円形または楕円形のようなものである可能性が高い。なぜならば、セルロース分子の相互凝集は、水中での表面エネルギーを最小にするために親水性の側鎖を露出し、疎水性のグルコピラノシド環の平面を露出させないように振舞うと考えられるからである。

以上の議論を前提として、本研究では、以下に記述する手法を採用した。

まず、果実や花卉等の組織から、穏和な加工処理方法（4% 水酸化ナトリウム NaOH 室温 1 昼夜浸漬、水洗後 2% 亜塩素酸ナトリウム NaClO_2 ・80°C 加温 1 h 処理を最低 3 回繰返し）によって得られる多糖試料（後記するように、本研究ではこれを「弱アルカリ抵抗性他多糖」Weak alkali-resistant polysaccharide, “WARP” と呼ぶ。）に、前記の AFM の高さ方向計測機能を適用して、フィブリル横断面の幅の決定を試みた。

一般に果肉組織はほぼ純粋な一次壁系組織と考えられるが、発生由来や保水性などの物理的性質等に多様性がある。本研究では、まず、食用果実として馴染み深いオランダイチゴ *Fragaria chiloensis* Duchesne var. *ananassa* (Duchesne)L.H.Bailey 果肉組織を実験対象に選んだ。既述のとおり、セルロースの存在形態は、植物細胞壁の一次壁と二次壁とで大きく異なる（図 1.4）。すなわち、前者ではマイクロフィブリルが分離しランダムに配向しているのに対し、後者では多数のフィブリルが束を作り層状のラメラ構造をとっている。これに対し果肉組織の主成分はペクチンであるが、その構造骨格もまたあくまでもセルロースフィブリルであり、それは共存するキシログルカンなどとともに、より多様な構造を実現している可能性がある。

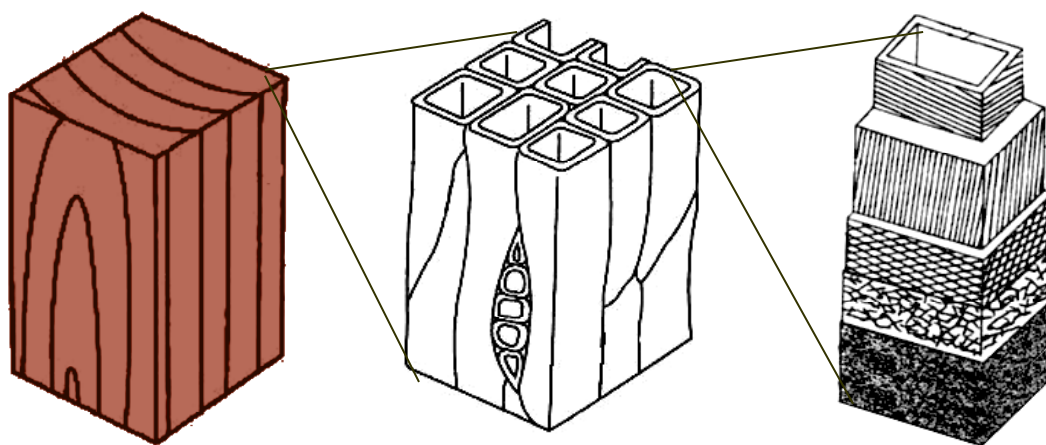


図 1.4 樹木細胞壁の構造

さて、高等植物セルロースの基本単位は 3.5nm 幅のフィブリルであり、この太さ、すなわちセルロース分子鎖の本数は、「ロゼット」と呼ばれるセルロース合成装置の構造に対応するとする説は、木材組織由来セルロースの X 線回折による解析からも支持されて来た。しかし、これらの研究はほとんどの場合、大量に得られるセルロース試料、すなわち成熟した木材組織のセルロースについて行われてきた。これらに対して、北半球中緯度冷温帯における 樹木生長期の細胞壁物質に関する研究として、巖ら(1988)は、日本国内にあるウダイカンバ *Betula maximowicziana* Regel. とカラマツ *Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière 新生二次木部を生木の剥皮によって採取することにより、リグニンの形成過程を組織化学的に調べた。その結果、5 月中の新葉展開の後にほぼ一次壁のみからなる 1~7 細胞の層が形成され、次いで、6 月以降に二次壁が形成され、その後にリグニンが堆積することを明らかにした。本研究では、この知見をもとに、樹木におけるリグニン沈着以前のフィブリル状多糖の形態をも調べることとした。すなわち、ウダイカンバの新生木部に内在する不溶性多糖について、その生長活動の初期から、季節の進行に伴って WARP の形状と幅がどのように変化するかを AFM 観察により調べた。

第Ⅱ章 予備実験

Ⅱ-1. 本章の目的

本研究では、植物体に含まれる自然なセルロースの存在形態およびセルロースマイクロファイブリの形状を出来るだけ人為を加えずに分析・解析することを主眼とした。複雑な生体の構造の中で、他種の多量の高分子と混雑・共存し、言わば生体組織の奥深くに埋もれて潜在するセルロースは、そのままでは決して可視化されない。本章では、生体組織に埋もれて存在するセルロースを可能な限りそのままの姿で可視化することを試みた。

Ⅱ-2. 実験と結果

Ⅱ-2-1 偏光顕微鏡観察

i) 実験の目的

アフリカツノキュウリなど、ある種の植物果実には独特なゼリー状を呈する種衣が発達している。それらに含まれるセルロースは特徴的な結晶性形態をとっている可能性がある。その結晶性を検出する簡便な手段として、まず偏光顕微鏡観察を行った。すなわち、結晶性物質を含む組織を直交偏光板に挟んで観察すると、偏光の回転によってその組織が光って見える（複屈折現象）。高等植物組織においては、そのような結晶性高分子はほぼセルロースに限られるので、複屈折が見られることはセルロースの存在を意味する。

ii) 実験方法

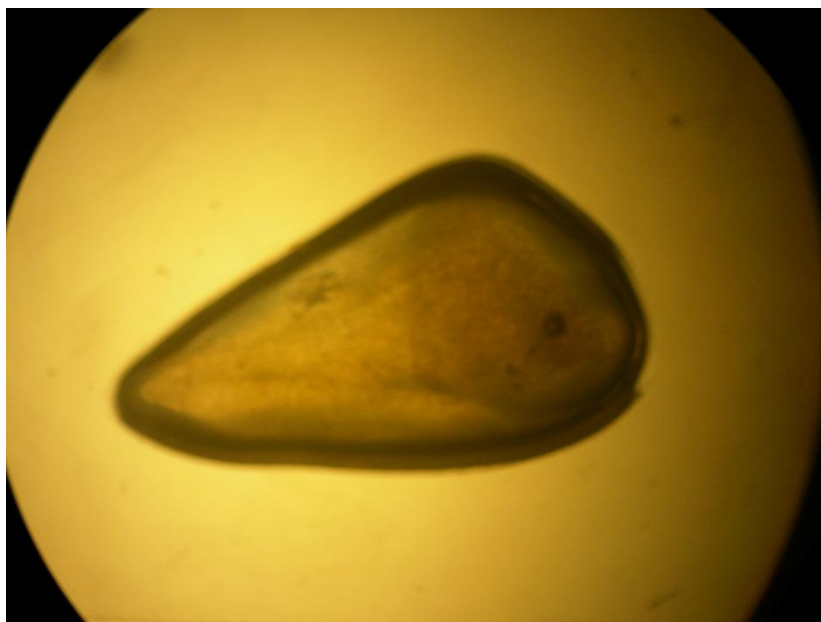
いずれも生鮮なアフリカツノキュウリ種衣、クダモノトケイソウ種衣、トマト種衣、水で濡らして付属物を膨潤させたメボウキ種子、オランダイチゴ果肉の小切片、およびトウガン *Benincasa hispida* (Thunb. ex J.Murr.) Cogn. 果肉の小切片を 4(w/w)%NaOH 水溶液に 24 時間以上浸漬静置した後、蒸留水で洗った。これらをそれぞれ 2 枚のスライドガラス間に挟んで、偏光顕微鏡観察を行った。

iii) 結果と考察

アフリカツノキュウリ種衣由来物による透過像と偏光像を図 2.1、クダモノトケイソウ種衣由来物による場合を図 2.2、トマト種衣の場合を図 2.3、水で付属物を膨潤させたメボウキ種子の場合を図 2.4、オランダイチゴ果肉の場合を図 2.5、およびトウガン果肉の場合を図 2.6 に示す。これらのいずれの試料においても、明瞭な複屈折現象が観測された。ただし、メボウキ種子の場合は、複屈折現象が観測されたのは、水で膨潤した付属物部分のみである。

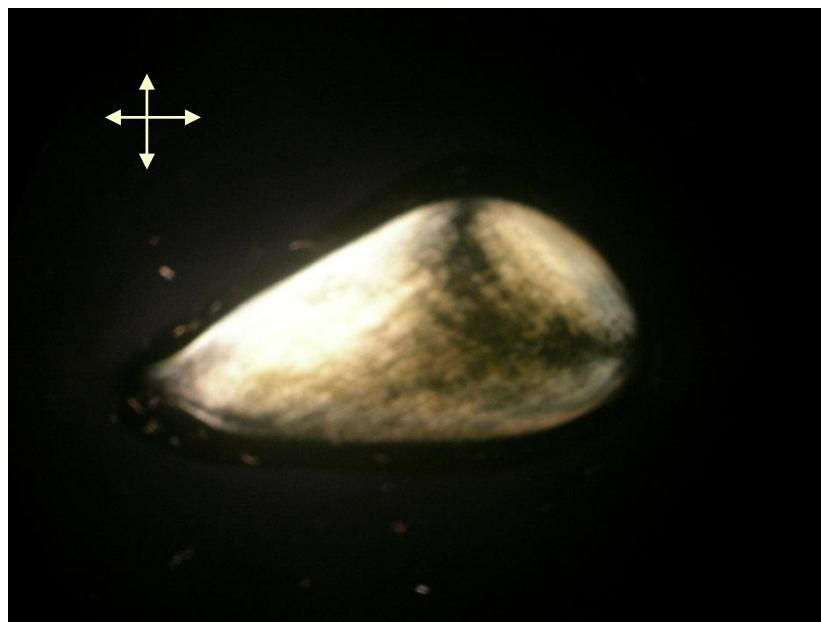
したがって、アフリカツノキュウリ種衣、クダモノトケイソウ種衣、トマト種衣、メボウキ種子付属物、オランダイチゴ果肉およびトウガン果肉の各組織中には、相応量の結晶

性のセルロース分子が含有されている可能性が高いと推測される。



光学顕微鏡透過像

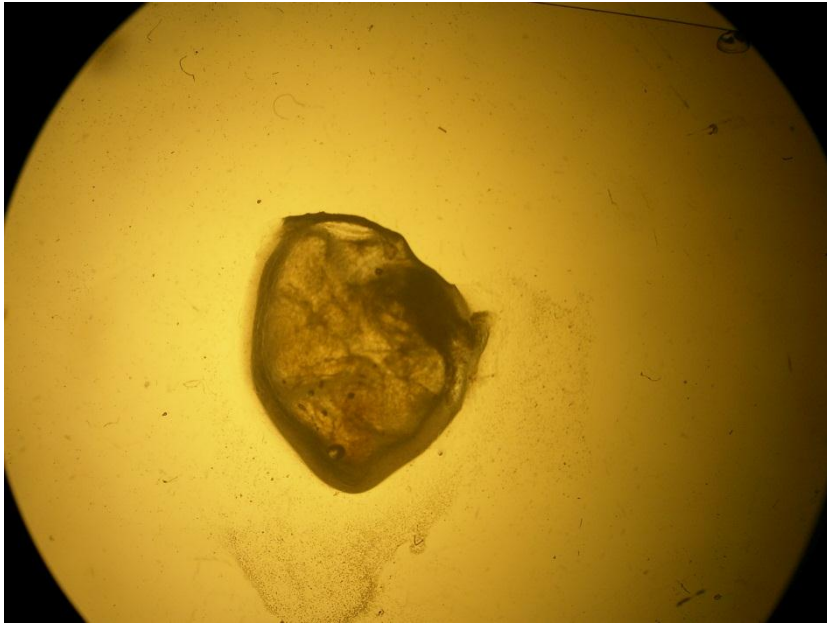
5 mm



偏光像

5 mm

図 2.1 弱アルカリ処理したのみのアフリカツのキュウリ種衣の偏光顕微鏡観察画像



透過像

5 mm



偏光像

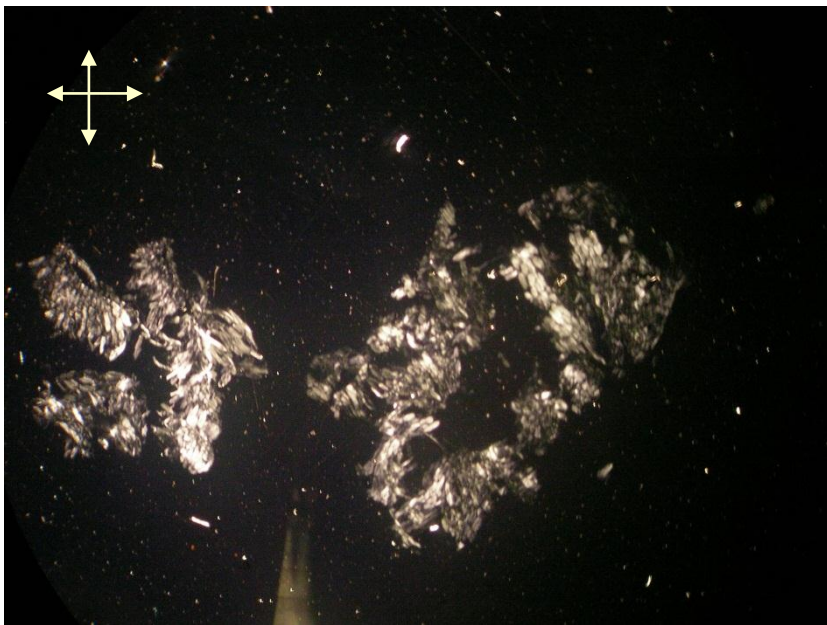
5 mm

図 2.2 弱アルカリ処理したのみのクダモのトケイソウ種衣の偏光顕微鏡観察画像



透過像

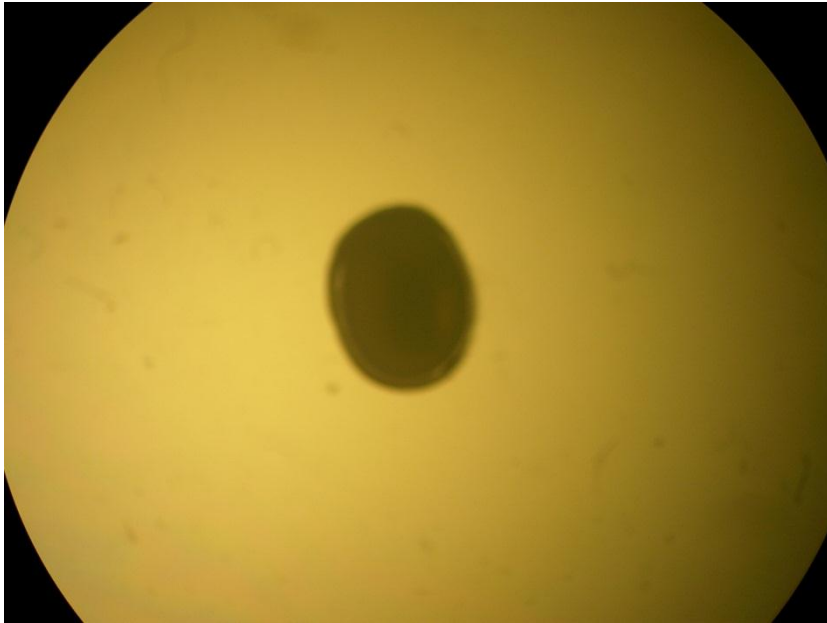
5 mm



偏光像

5 mm

図 2.3 弱アルカリ処理したのみのトマト種衣の偏光顕微鏡観察画像



透過像

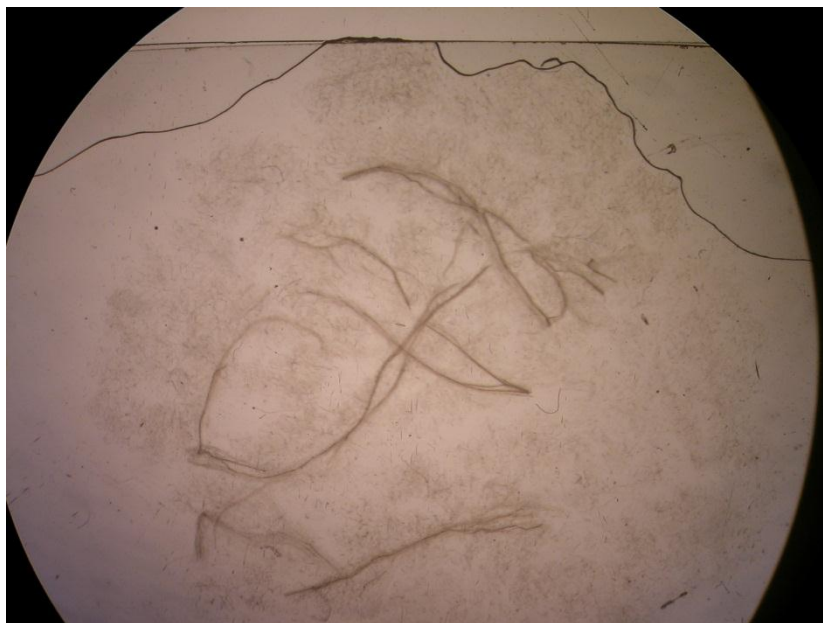
5 mm



偏光像

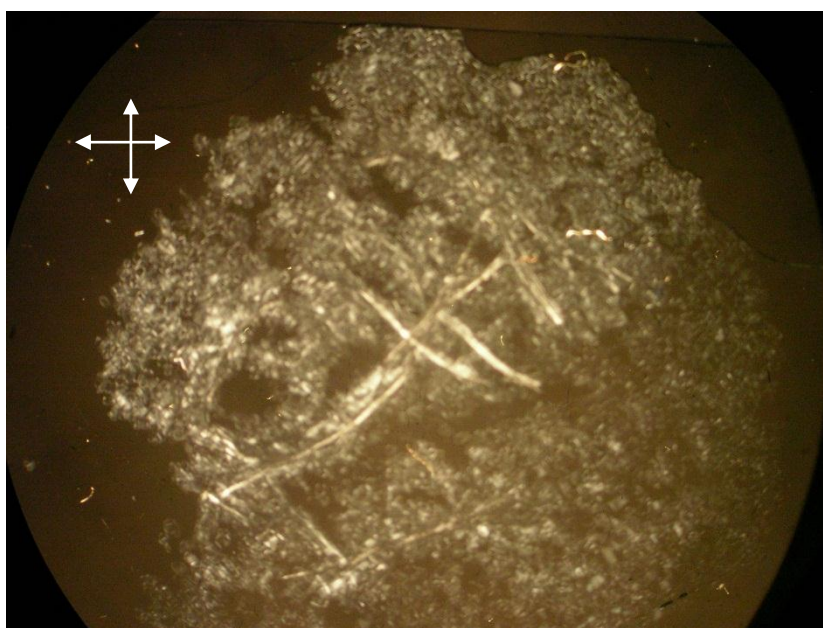
5 mm

図 2.4 弱アルカリ処理したのみの水膨潤メボウキ種子の偏光顕微鏡観察画像



透過像

5 mm



偏光像

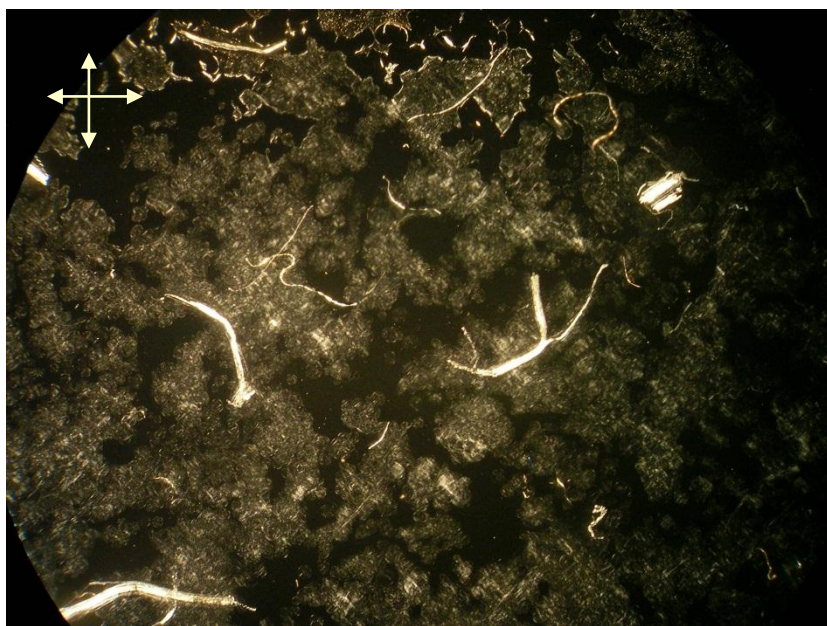
5 mm

図 2.5 弱アルカリ処理したのみのオランダイチゴ果肉小片の偏光顕微鏡観察画像



透過像

5 mm



偏光像

5 mm

図 2.6 弱アルカリ処理したのみのトウガン果肉小片の偏光顕微鏡観察画像

II-2-2 AFM 測定の精度検定

i) 実験の目的

従来のマイクロフィブリル幅評価は、主に TEM での負染色法によっていた。しかし、数ナノメートル幅程度のフィブリルの観察・幅計測においては、結像の際、被検体を被覆する染色剤層の厚さが不均一になるため、少なからぬ誤差が生じることが明らかである。そこで、本研究では、高さ方向に高い測定精度を与える AFM を採用した。すなわち、原子レベルで平滑な雲母劈開面上にセルロースフィブリルの懸濁液を展開してから乾燥し AFM 観察を行った。

AFM の解像度は、機械構造的にプローブの曲率による制限を受ける。図 2.7 に示すように、AFM チップの先端は 75 nm 程度の曲率を持つので、直径 30 nm の粒子に対しては 48 nm 幅程度のぼやけが生じ、2 nm 幅のフィブリルに対しては 12 nm 幅程度のぼやけを生じることになる。このため、粒子/フィブリルの大きさ/幅には大きな誤差を生じる（実際よりも大きく見える。）。

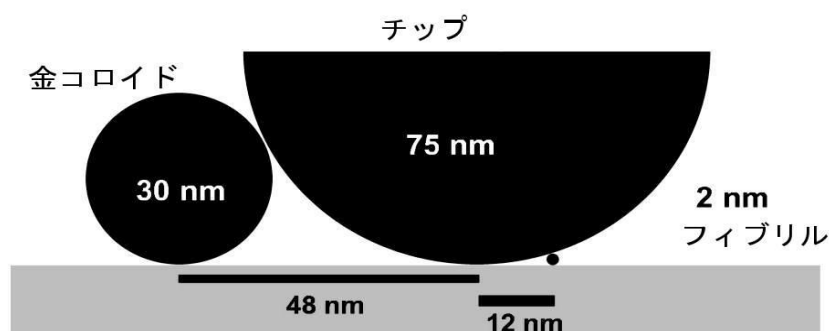


図 2.7 AFM 測定におけるプローブの曲率による制限

他方、AFM プローブの垂直方向変位は曲率とは無関係なので、高精度の高さ計測が期待出来る。本研究の構想は、専らこの AFM の高さ計測の高精度に頼った実験を基礎とするものであるため、使用する AFM の装置について、その精度を確認する必要がある。

加えて、AFM の高さ計測は高精度であるため、わずかでも被検体に何らかの汚染がある場合、それを意図せずに検出して仕舞うおそれがある。たとえば、フィブリルを分散させる分散媒として用いる水が、はじめから不測にナノメートルスケールの粒子を混入していたり、空気中に浮遊する微粒子を吸い寄せる働きをする場合が考えられる。このような場合、仮に被検体上に見るべきフィブリルがあったとしても、不必要に混在する微粒子等と区別することが至難になる。そればかりでなく、AFM の高さ計測の高精度は、被検体の基盤である雲母劈開面の状態にも影響を受けるおそれがあるため、本項の実験では、そのよ

うな影響の有無を確認することを目的とした。

ii) 実験方法

まず、被検体のバックグラウンドとなる、劈開したばかりの雲母劈開面について、その新たに生じた劈開面上をそのままの状態を観察した。すなわち、市販雲母板から一辺約 6 mm の正方形をひとつ切り出し、その側面に金属製ピンセットの先端を差し込んで劈開した。この新たに劈開された面を上にして金属製試料テーブル上に固定して、速やかに原子間力顕微鏡 Shimadzu SPM-9500 (図 2.8) のコンタクトモードで観察した。その AFM の観察画像は、 $2.0 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ の視野を 1 Hz、 512×512 pixel の条件で取得し、同装置付属のソフトウェアで画像処理を行った。画像処理は、平面像の見やすさの改善とノイズ除去のためであり、高さ計測の精度と確度には影響しないと考えられる。そして、同じく装置付属のソフトウェアによる断面形状測定機能＝高さ計測機能によって、雲母劈開面上の状態の調査を試みた（本研究を通じて、特記がない限り、AFM 観察は全てこの方法によった。）。



図 2.8 原子間力顕微鏡 Shimadzu SPM-9500

AFM の高さ計測の精度検定のため、公称直径 30 nm の球状の市販金コロイド (Amersham Life Science, AuroBeads G30 : 紅紫色を呈する分散液) を観察した。すなわち、市販雲母板から再度一辺約 6 mm の正方形をひとつ切り出し、その側面に金属製ピン

セットの先端を差し込んで劈開した。他方、市販試薬瓶に入った上記の金コロイド分散液からプラスチック製スポイトで数滴を分取し、25 mL 容ガラス製試料瓶中に入れた約 20 mL の蒸留水中に散布し、超音波ホモジェナイザ（日本精機製作所 US-150）を使って、10 分程度超音波懸濁処理して水中に十分分散させた。その処理済みの金コロイド水分散液から、プラスチック製スポイトで 0.2 mL 程度を分取して、新たに生じたばかりの雲母劈開面上に滴下し、風乾してから、金属製試料テーブル上に固定して、上記の被検体のバックグラウンドの調査の場合と同様に、AFM 観察を実施した。そして、AFM 装置に付属するソフトウェアによる断面形状測定機能＝高さ計測機能によって、球状粒子の直径の計測を試みた。

原子間力顕微鏡観察においては、分散媒中の極微量の不純物も基板に堆積して汚染を生じる可能性があるので、使用する水の影響を調べた。試料として、市販瓶詰め蒸留水の開封直後のもの、開封後数か月を経たものを用いた。

iii) 結果と考察

新鮮な雲母劈開面は図 2.9a のようにほぼ完全な平面である。これに載せた金コロイド像の一例を図 2.9 b に示す。約 20 個の、直径 100 nm 程度の粒子が散在している。無作為に選択した 15 個の粒子について、平均径を計算すると $27.1 \text{ nm} \pm 1.54 \text{ nm}$ となり、公称値 30 nm とほぼ一致した。したがって、本研究で使用した AFM の高さ計測は信頼出来る。

新鮮な雲母劈開面を、新鮮な蒸留水で濡らした後風乾した面の AFM 像の例を図 2.9c に示す。この像も完全な平面に見えるが、高さ計測を適用すると明らかに凹凸が増加している。これにより、ここで用いた新鮮な蒸留水は、ナノメートルオーダーの汚染粒子を含むことが分かる。

実験室中で数ヶ月間保存されていた蒸留水展開後の雲母面の AFM 像の例を図 2.9d に示す。この像の様相は、上記の新鮮な蒸留水による場合と大きく異なり、雲状の広がりや直径 100 nm 程度の円形に見られる物体の散在が見られる。AFM 高さ計測によれば、直径 100 nm 程度の円形物体には約 5.0 nm の高さがあった。これは、ここで用いた「蒸留水」の汚染物質と考えられる。

以上より、AFM の高さ計測については、試料媒体である水の影響を無視できないことが分かった。したがって、以下の実験においては、可能な限り新鮮で清浄な水を観察媒体として使用した。

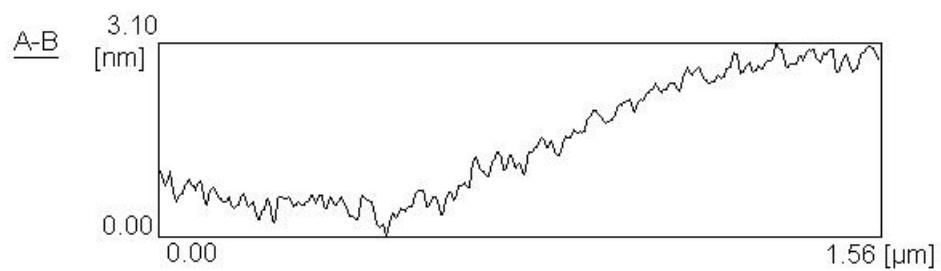
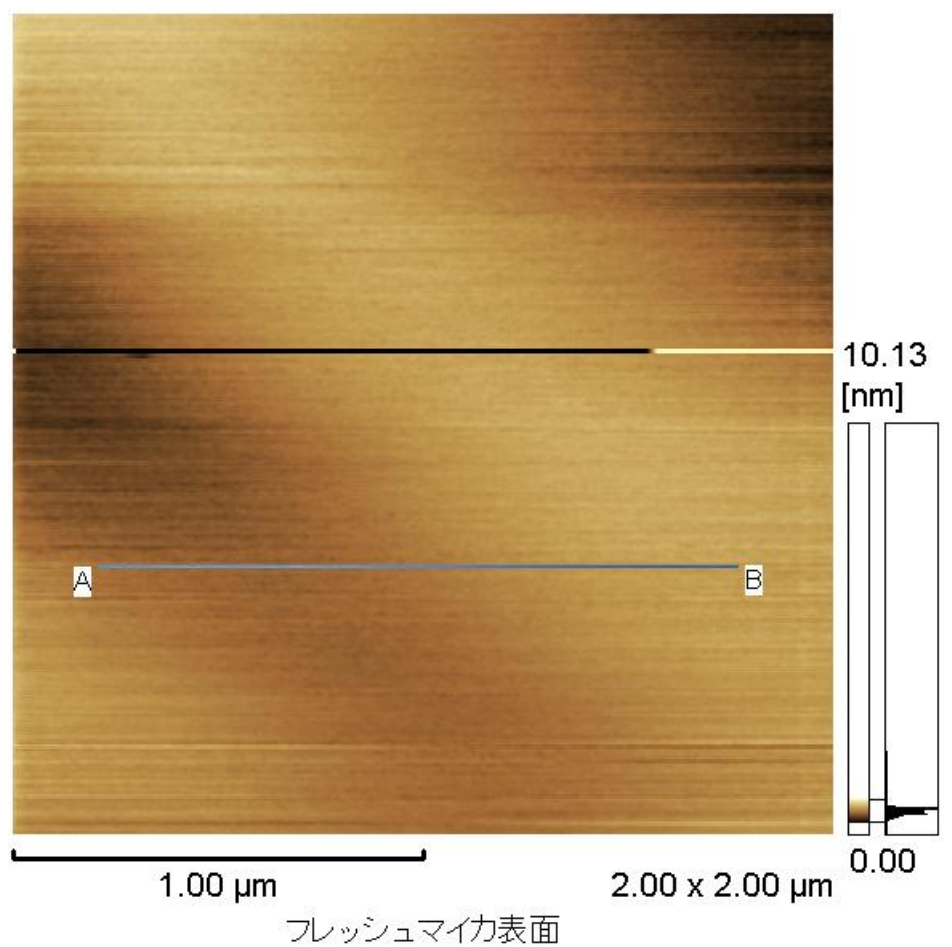


図 2.9a AFM で観察した劈開したばかりの雲母劈開面

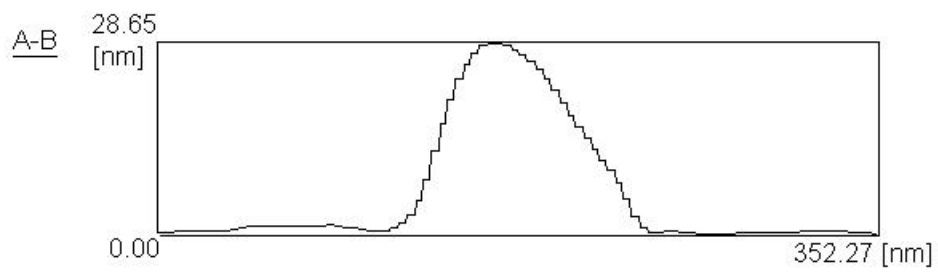
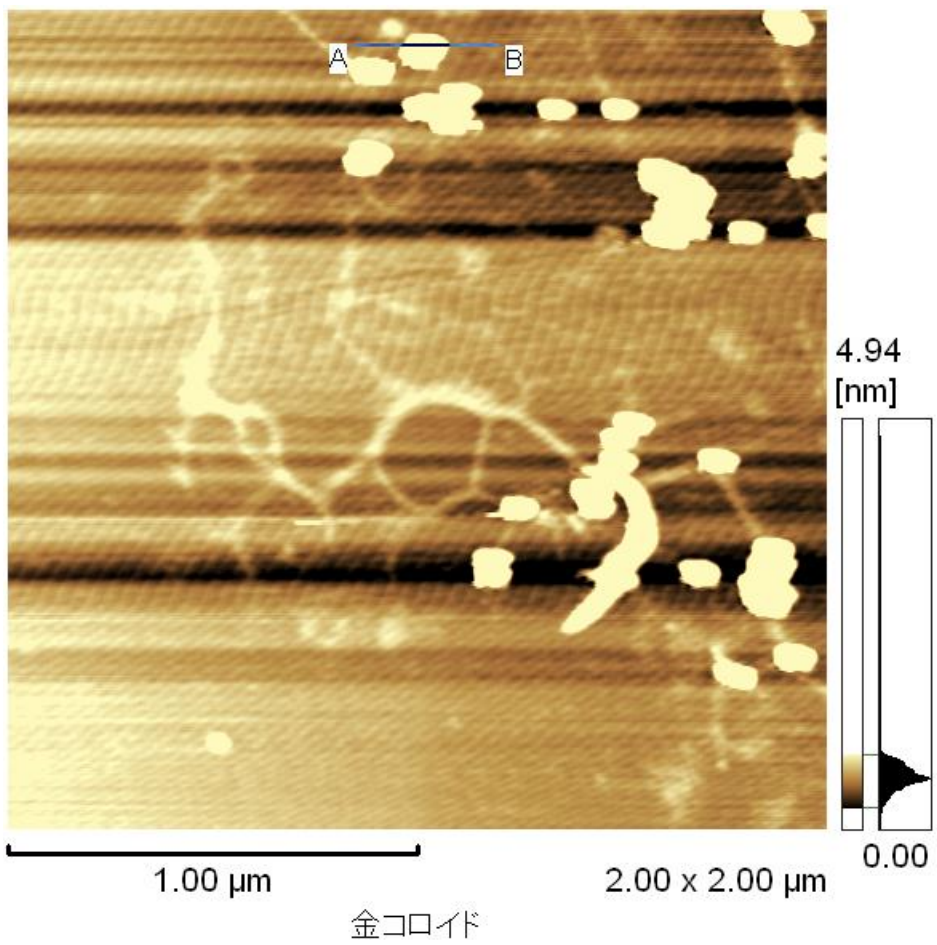


図 2.9b 金コロイドによる AFM の高さ測定精度検定

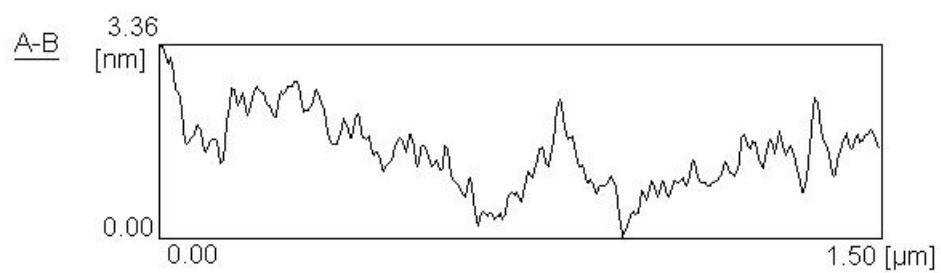
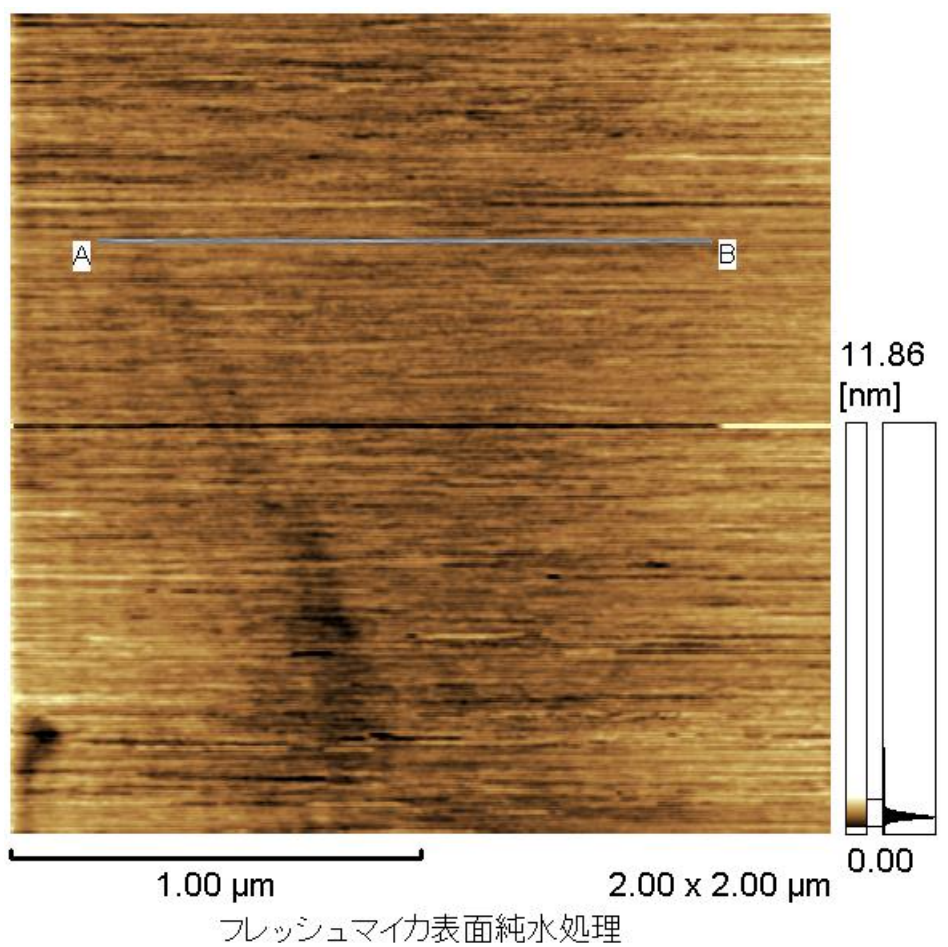


図 2.9c 新鮮な蒸留水で一度濡らして乾かす処理をした雲母劈開面の AFM 像

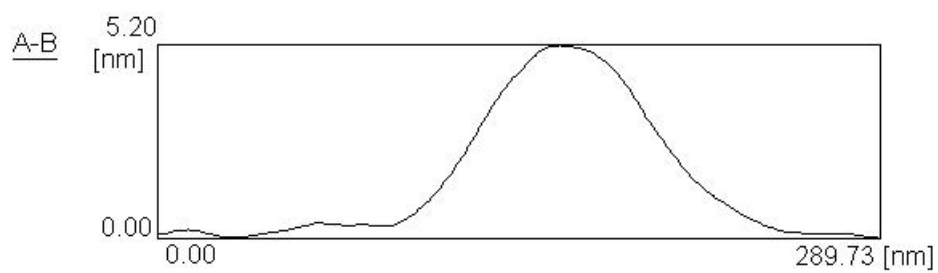
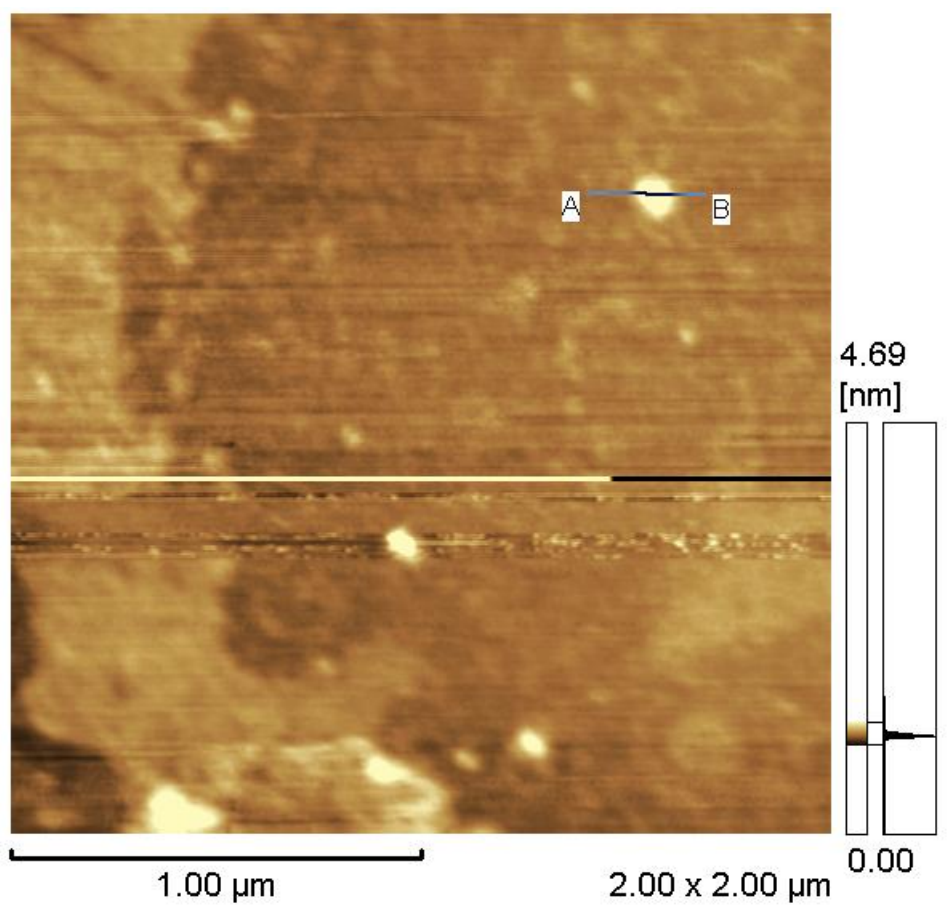


図 2.9d 開封後一か月保存した蒸留水で一度濡らして乾かす処理をを展開した雲母劈開面の AFM 像

II-2-3 試料調製の条件

i) 実験の目的

本研究の目的は、究極的には、植物組織セルロースの自然形態を観察することである。高等植物組織にはセルロースのほか、リグニンとヘミセルロース、少量成分としてデンプン、タンパク質、脂質、抽出成分（精油）、および無機物がある。したがって、セルロースを分離するには、主に脱リグニンと脱ヘミセルロースの処理を行うことになる。その他の成分は、これらの処理および有機溶媒抽出で除去されるはずである。

木材多糖の化学的分析は、通例次のように行われる：

- A. 試料の破砕（Wiley ミルなどによる）、
- B. 微酸性亜塩素酸ナトリウム水溶液による脱リグニン、すなわちホロセルロース（セルロース+ヘミセルロース）の調製
- C. 18(w/w)%水酸化カリウム KOH またはそれに相応の濃度の NaOH によるヘミセルロースの除去（ α セルロースの調製）

柔組織からのセルロースの分離も、基本的には上記の処理で可能である。ただし、セルロースは実質的にアルカリ不溶であるが、その結晶構造は、3.5 mol/L (14%) 程度以上の NaOH により崩壊する。したがって、強アルカリ処理を経て得られる「 α セルロース」は、アルカリ膨潤-再生を経てセルロース II となり、天然のフィブリル形態は崩壊している。

そこで、本研究では、天然セルロースの自然なフィブリル形態を維持するためのアルカリ濃度の限界を検討した。すなわち、いわゆるマーセル化を起こす NaOH 濃度は通例 14(w/w)%以上である。けれども、ごく細いマイクロフィブリルの場合は、8(w/w)%程度でもアルカリ膨潤を起こすという報告がある [Azuma 2003]。

このような事情から、あらかじめ我々は、いくつかの柔組織ホロセルロース試料（市販生鮮青果等から均質な植物組織を分離して亜塩素酸処理だけを行ったもの）について試験し、天然のフィブリル形態が崩壊する臨界 NaOH 濃度は 4 (w/w)%と 6(w/w)%の間にあることを確認した。これにより、本研究では、原則として 4(w/w) %NaOH 水溶液を用いることとした。以下に、その処方に基づく処理の例を示す。

ii) 実験方法

市販の生鮮アールスメロン *Cucumis melo L. var. reticulatus* Naud. (いわゆる「マスクメロン」) 果肉約 700 g を電動ジューサーミキサーで粉碎し、7 等分した。そして、それぞれ次の段階処理による実験を行った。

① 無処理：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、その状態のまま、50 mL 容プラスチック製遠沈管 (旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube) 6 本の中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

② 水抽出：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、まず目の細かい金属製茶漉しで濾過し、その茶漉し上に残った固形分残渣に、上からプラスチック製洗瓶で相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから、水切りした。その水洗済みの湿潤固形分は、ガラス製 300 mL 容ビーカー中に入れた約 250 mL の蒸留水中に散布し、ガラス棒で 10 分間攪拌し続けてから、再度目の細かい金属製茶漉しで濾別した。その茶漉し上に残った固形分残渣に、再度上から蒸留水を注いで、十分に洗ってから、水切りした。そうして得られた湿潤固形分を、50 mL 容プラスチック製遠沈管 (旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube) 4 本の中に注入して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

③ 水抽出+アセトン抽出：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、上記②の凍結乾燥処理前までの実験操作を等しく行った上、得られた湿潤固形分について、以下の操作を加えた。すなわち、それをガラス製 300 mL 容ビーカー中に入れた約 250 mL のアセトン中に散布し、ガラス棒で 10 分間攪拌し続けてから、再々度目の細かい金属製茶漉しで濾別した。その茶漉し上に残った固形分残渣に、再々度上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。これにより得られた湿潤固形分は、50 mL 容プラスチック製遠沈管 (旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube) 4 本の中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

④ 水抽出+アセトン抽出+4.0%NaOH 浸漬処理：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、上記③の凍結乾燥処理前までの実験操作を等しく行った上、得られた湿潤固形分について、以下の操作を加えた。すなわち、それは、あらためて相応量の蒸留水中に散布し、別途調製した相応の濃度の NaOH 水溶液の適量と併せることにより、ガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の 4(w/w)%NaOH 水溶液に浸かるようにした。そして、それは、ガラス棒で 10 分間攪拌した後、室温下で 24 時間以上浸漬静置した。

その浸漬処理物は、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。そして、得られた湿潤固形分は、再び相応量の蒸留水中に散布し、別途調製した相応の濃度の NaOH 水溶液の適量と併せることにより、ガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の 4(w/w)%NaOH 水溶液に浸かるようにして、以降、水洗・水切りした湿潤固形分とするま

での 4%NaOH 処理の操作を 2 回繰り返した。

そうして、結局得られた湿潤固形分は、50 mL 容プラスチック製遠沈管（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）2 本中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

⑤ 水抽出+アセトン抽出+4.0%NaOH 浸漬処理+亜塩素酸処理：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、上記④の凍結乾燥処理前までの実験操作を等しく行った上、得られた湿潤固形分について、以下の操作を加えた。すなわち、それは、あらためてガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の蒸留水中に散布し、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした（つまり、4.0%NaOH 浸漬処理から亜塩素酸処理までの間に、相当量の蒸留水で 2 回浸漬・洗浄処理を加えたことになる。以下、同類条件の処理では同じに行った。）。その水洗・水切り済みの湿潤固形分は、ガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の酢酸ナトリウム・亜塩素酸ナトリウム混合水溶液（ NaClO_2 18.75g/水 1 L : NaOH 27g・酢酸 75 mL/水 1 L=1 : 1 の配合により調製。）に浸漬させ、92°C の恒温条件で 120 分間湯浴処理した。この湯浴処理物は、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。

その後、上記の 4%NaOH 処理と亜塩素酸処理の操作は、相当量の蒸留水で水洗・水切りして湿潤固形分を取り出す繰り返しを介して、同様に 2 回（最終的に合計 3 回）繰り返した。そうして、結局得られた湿潤固形分は、50 mL 容プラスチック製遠沈管（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）2 本の中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

⑥ 亜塩素酸処理（ホロセルロース調製の常法）：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、上記③の凍結乾燥処理前までの実験操作を等しく行った上、得られた湿潤固形分について、以下の操作を加えた。すなわち、それは、ガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の酢酸ナトリウム・亜塩素酸ナトリウム混合水溶液（ NaClO_2 18.75g/水 1 L : NaOH 27g・酢酸 75 mL/水 1 L=1 : 1 の配合により調製。）に浸漬させ、92°C の恒温条件で 120 分間湯浴処理した。この湯浴処理物は、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。

その後、上記の亜塩素酸処理の操作は、水洗して湿潤固形分を取り出す繰り返しを介して、同様に 2 回（最終的に合計 3 回）繰り返した。そうして、結局得られた湿潤固形分は、50 mL 容プラスチック製遠沈管（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）5 本の中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

⑦ 17.5%NaOHaq 浸漬処理（ α セルロース調製の常法）：

上記の 7 等分されたジュースのひとつについて、上記③の凍結乾燥処理前までの実験操作を等しく行った上、得られた湿潤固形分について、以下の操作を加えた。すなわち、それは、あらためて相応量の蒸留水中に散布し、別途調製した相応の濃度の NaOH 水溶液の

適量と併せることにより、ガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の 17.5(w/w)%NaOH 水溶液に浸かるようにした。そして、それは、ガラス棒で 10 分間攪拌した後、室温下で 24 時間以上浸漬静置した。

その浸漬処理物は、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。そして、その水洗・水切り済みの湿潤固形分は、あらためてガラス製 500 mL 容ビーカー中で、約 400 mL の酢酸ナトリウム・亜塩素酸ナトリウム混合水溶液（ NaClO_2 18.75g/水 1 L : NaOH 27g・酢酸 75 mL/水 1 L=1 : 1 の配合により調製。）に浸漬させ、92°C の恒温条件で 120 分間湯浴処理した。

この湯浴処理物は、再び目の細かい金属製茶漉しで濾別し、その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。その茶漉し上に残った固形分残渣には、上から相当量の蒸留水を注いで、十分に洗ってから水切りした。

その後、上記の亜塩素酸処理の操作は、水洗して湿潤固形分を取り出す繰り返しを介して、同様に 2 回（最終的に合計 3 回）繰り返した。そうして、結局得られた湿潤固形分は、50 mL 容プラスチック製遠沈管（旭硝子株式会社 IWAKI Centrifuge Tube）2 本の中に分注して、真空条件下で凍結乾燥処理した。

以上の①～⑦の各工程を経て得られた各凍結乾燥処理物は、それぞれ電子天秤で全量の重量を精密に秤量し、比較検討した。

iii) 結果と考察

前項の①で得られた固形分重量を 100 g に換算し直し、これに対して②～⑦の各処理物の固形分比率 (絶乾重量比) による相当収量は、② 6.35 g、③ 4.80 g、④ 3.93 g、⑤ 3.58 g、⑥ 5.02 g、⑦ 0.54 g、と計算・算出された (表 2.1 参照)。なお、①について、当該処理の出発最初の生鮮果肉組織の湿重量をあらかじめ秤量しておき、凍結乾燥処理の前後の重量比較をすることから、最初の生鮮組織の固形分率を計算したところ、7.64 %であった。

表 2.1 メロン果肉固形分の内訳

No.	素性	収率/%	コメント
①	全固形分	100	～94% が低分子糖類。
②	水不溶分	6.35	
③	水・アセトン不溶分	4.80	1.55%が脂質。
④	4%NaOH 不溶分	3.93	0.87%が ヘミセルか?
⑤	4%NaOH・亜塩素酸不溶	3.58	0.35%が リグニンか?
⑥	ホロセルロース	5.02	③より多いのは不合理。
⑦	α セルロース	0.54	網を抜けた可能性あり。

本研究では、天然セルロースの本来の存在形態を観察することが目的なので、以降の実験においては、植物種や組織種の違いに関わらず、上記の⑤、すなわち <水-アセトン-4%NaOH-亜塩素酸>処理で残る固形分を主たる観察対象とした。この画分は、セルロースを主成分とし、弱アルカリ (4%NaOH) では可溶化されないヘミセルロースを含むはずである。これを本稿では「弱アルカリ抵抗性多糖 (Weak Alkali-Resistant Polysaccharide、**WARP**) と略称する。」と呼ぶこととした。

WARP の顕微鏡観察 (光学顕微鏡、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡) については、原則として、元の材料から湿潤状態を保持したまま調製した観察試料を使用した。いったん乾燥してから再分散した等の特別な履歴を経た観察試料の場合には、その旨を特に記載するものとした。

II-2-4 コンゴーレッド染色

i) 実験の目的

コンゴレッドは、セルロースを良く染める赤色染料として知られている。この染色を組織中のセルロースの検出に使えるとすれば、本研究においても有力な実験手段のひとつとなり得るため、その予備的な実験をすることによって、その可能性を検討することとした。

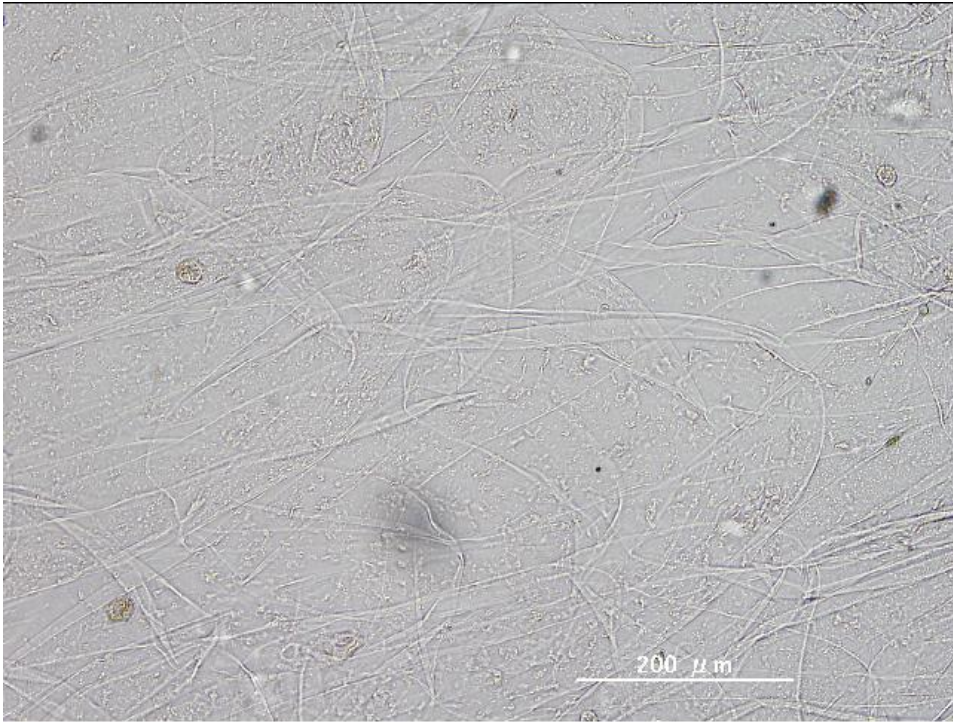
ii) 実験方法

種々の市販生鮮青果類の中からオランダイチゴ果肉とホンアロエ *Aloe vera* 葉肉を採用し、それぞれ金属製剃刀で数ミリメートル角の小薄片を数枚切り出した。これをよく水洗いしてから、80℃に保持した熱水中で2時間煮沸処理し、次いで、4 (w/w) %NaOH 水溶液に常温下24時間浸漬処理して水洗した。

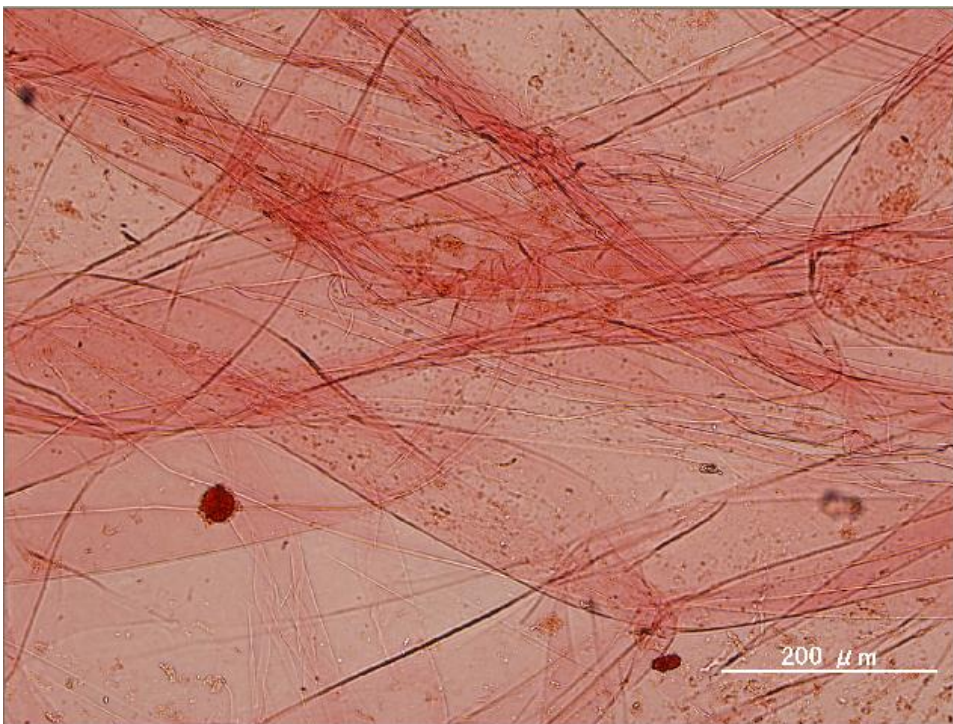
コンゴレッド約1mgを50mLの蒸留水に溶かした液に、上記で調製した2種の薄片状処理物を浸漬し常温で72時間処理した。これを水洗して光学顕微鏡観察を行った。

iii) 結果と考察

上記ii)の光学顕微鏡による実験・観察の結果、オランダイチゴ果肉由来とホンアロエ葉肉由来の何れの場合においても、各薄片状処理物はある程度紅く色着いて見えた。しかしながら、それらの染色の状況・程度は明瞭なものでなく、たとえば、細胞壁部分のみが特に強く染色されて他の部分との区別が明瞭に視認出来るというような程度にまでは至っていなかった(図2.10参照)。



未染色



染色済

図 2.10 ホンアロエ葉肉薄片によるコンゴレッド染色試験

II-3. 本章のまとめ

果肉や種衣などの高等植物組織においては、軽度の物理的または化学的処理を加えて組織薄片を作り、偏光顕微鏡によって結晶性セルロースの存在を可視化することができた。

天然セルロースマイクロフィブリルの直接観察にはAFMが有効であるが、試料を固定する基板の汚染を防ぐため、使用する化学薬品や水等の汚染にも留意する必要がある。

植物体は多種多様な化学物質が複雑に組み合わせられた複合体であり、そこに含まれるセルロースマイクロフィブリルを単離するには、本来強い物理的・化学的処理が必要である。セルロース以外の物質を除去するのに最も有効なのは苛性アルカリ水溶液であるが、高濃度のアルカリは、天然セルロースのフィブリル形態を破壊する。このため、生の生物体から、できるだけ自然な形状を保持したまま効率的にセルロースを分離する方法として、水抽出+アセトン抽出+4.0%NaOH浸漬処理+亜塩素酸処理が最善である。

コンゴーレッドによる染色試料の光学顕微鏡観察では、当初期待した程度の微細構造まで識別することはできなかった。

第Ⅲ章 果実柔組織等のセルロース

Ⅲ-1. 本章の目的

高等植物の果肉はほぼ純粋な一次壁系組織と考えられるが、その発生由来や保水性などの物理的性質は多様である。そのような組織の弱アルカリ抵抗性多糖 WARP の形態や化学的性質を、まずオランダイチゴ果肉（発生学的には果托）について調べた。次いで、多種多様な植物種・組織種から得られる WARP について AFM 観察を行った。

Ⅲ-2. 試料と方法

Ⅲ-2-1 試料

市販の生鮮食用果実などから、実験対象とする植物組織として、以下の組織種、植物種のものを選んだ。

①果肉：

シナサルナシ *Actinidia chinensis* Planch. (「ヘイワード」種のもの)、モモ、パイナップル *Ananas comosus* (L.)Merrill、トウガン (長果種のもの)、青果用ベル群シトウガラシ *Capsicum ananum* L. var. *grossum* Sendtn (いわゆる「レッドパプリカ」種のもの)、スイカ *Citrullus lanatus* (Thunb.)Matsum. et Nakai.、アールスメロン、カキノキ、オランダイチゴ、トマト、リンゴ *Malus pumila* Miller var. *domestica* (Borkh)C.K.Schneid. (「ジョナゴールド」種のもの)、ツルレイシ *Momordica charantia* L.、ホウライショウ *Monstera deliciosa* Liebm.、バナナ (ミバショウ) *Musa acuminata* Colla (甘果種のもの)、ランブータン *Nephelium lappaceum* L.、セイヨウナシ *Pyrus communis* L. var. *sativa* DC. (「ラフランス」種のもの)、ニホンナシ *Pyrus pyrifolia* (Burm.f.)Nakai var. *culta* Rehd. (「豊水」種のもの)、巨峰種ブドウ *Vitis vinifera* L. `Kyohou`、以上果肉 18 種、

②種衣：

アフリカツノキュウリ、トマト (いわゆる「大玉種」のもの)、クダモノトケイソウ、コダチトマト *Cyphomandra betacea* (Cav.)Sendtn.、以上種衣 4 種

③果皮：

ナツミカン *Citrus natsudaidai* Hayata (中果皮)、ウンシュウミカン *Citrus unshiu* Marcov. (外果皮)、ソバ *Fagopyrum esculentum* Moench、(完熟して、既に自然乾燥状態のいわゆる「蕎麦殻」)、カカオノキ *Theobroma cacao* L. (外果皮=カカオポッド)、以上果皮 4 種、

④花卉：

トウガン(長果種のもの)、カボチャ *Cucurbita moschata* (Duchesne) Duchesne ex Poir.、デンドロビウム・サンデラエ・マヨル *Dendrobium sanderae* Rolfe var. *major* Hort (いわゆる原種洋蘭の一種の花、以下、本文中では、「デンドロビウム・サンデラエ」と略称する。)、セイヨウシャクナゲ *Rhododendron hybrida* Hort. (「ピンクパール」種のもの)、フロリバンダ種バラ *Rosa hybrida* Hort.、ダーウィンハイブリッド種チューリップ *Tulipa hybrida* Hort.、以上花卉 6 種、

⑤葉：

ホンアロエ(ゼリー状に見える葉肉部分のみ)、ハナヤサイ *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. (いわゆる「カリフラワー」の葉)、バルボフィラム・グランディフロルム *Bulbophyllum grandiflorum* Bl. (着生性ラン科多年生草本植物の多肉質の葉)、ヤブツバキ *Camellia japonica* Linn.、ウケザキクンシラン *Clivia miniata* Regel (ヒガンバナ科鱗茎性多年生草本植物の多肉質の葉)、ヒマラヤトキワヤマボウシ *Cornus capitata* Wall. ex Roxb.、スギ *Cryptomeria japonica* (L.F.) D. Don (針葉)、レモングラス *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (典型的なイネ科多年生草本植物の葉)、アルノッティアヌスハイビスカス *Hibiscus arnottianus* A. Gray、ニオイテンジクアオイ *Pelargonium graveolens* L'Her. (いわゆる「ローズゼラニウム」の葉)、アフリカスマイレ *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (岩生性イワタバコ科多年生草本植物の多肉質の葉)、チャのキ *Thea sinensis* (L.) O. Kuntze、以上葉 12 種、

⑥茎または葉柄：

シマツナソ *Corchorus olitorius* L. (「モロヘイヤ」の通称で食用に供されるものの若茎)、ミドリハナヤサイ *Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck (いわゆる「ブロッコリ」の茎髓)、フキ *Petasites japonicus* (Sieb. et Zucc.) Maxim. (葉柄)、紅根種ダイコン *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Backer の芽生え(いわゆる「カイワレダイコン」の茎=発生的には胚軸に当たる部分で、将来生長・成熟すれば肥大して「大根」の可食部となる。)、ヴェルティナバナナ *Musa velutina* H. Wendl. et Drude (葉鞘)、リュウビнтаイ *Angiopteris lygodiifolia* Rosenst. (地生シダ植物の葉柄基部の膨隆部)、以上茎または葉柄 6 種、

⑦塊茎または塊根：

タマネギ *Allium cepa* L. (鱗茎)、サトイモ *Colocasia antiquorum* (L.) Schott var. *esculenta* Engl. (塊茎)、ハス *Nelumbo nucifera* Gaertn. (根茎=「蓮根」)、サツマイモ *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (塊根)、青首種ダイコン(成熟した塊茎=発生的には胚軸に当たる部分)、ジャガイモ *Solanum tuberosum* L. (「メイクィーン」種の塊茎)、以上鱗茎、塊茎あるいは塊根 6 種、

⑧その他の組織：

タバコ *Nicotiana tabacum* L. BY2 細胞塊、マツバラ *Psilotum nudum* Griseb. 胞子体、オゴノリ *Gracilaria verrucosa* Papenfuss 藻体、以上その他の組織等 3 種、

以上の 59 植物種・組織種である。

各植物種・組織種は、観察試料を調製するに当たり、その植物種・組織種において典型的かつ均質な部分のみを取り出して扱った。すなわち、観察対象が果肉組織の場合では、原則として成熟した果実を用い、その下処理として、外皮や種子等の非果肉部は除去し、その果肉中に視認できる「すじ」等も徹底的にピンセットで除去した。葉の場合には、視認し得る限りの葉脈を除去した。これらを乾燥させることなく、WARP にするための加工を行った。

III-2-2 実験方法

i) 弱アルカリ不溶性多糖 (WARP) の調製

上記の 59 種の試料素材について、上記の下処理を加えた後、速やかに電動ジューサーミキサーまたは陶製のおろし器で破碎した。破碎物から湿重量約 150 g 程度を採取して 250 mL 程度の蒸留水を加え、円筒刃ホモジェナイザ（「ヒスコトロン」、マイクロテックニチオン(株)）でさらに解繊した。これに蒸留水を加えて全容を約 750 mL とした。この各液について、II-2-3 ii) ⑤の方法を適用し、WARP の調製を行った。



図 3.1 各種原材料を 4(w/w)%NaOH 水溶液に 24 時間以上浸漬静置したところ

なお、TEM 観察、AFM 観察および FT-IR 測定の実施に当たっては、上記により得られた各 WARP 湿潤物より、適量を分取して、蒸留水を加え、超音波ホモジェナイザ（日本精

機製作所 US-150) で 30 分以上処理した。その際、試料によっては、超音波処理でゲル様になることがあった。その場合には、以降の実験操作に不具合であるため、その回避のため、さらに蒸留水で希釈して超音波処理をやり直した。こうして、各固形分比率約 3 (w/w) % の水懸濁液を調製した。

X 線回折、中性糖分析およびヨード澱粉反応試験の実施に当たっては、上記により得られた各 WARP 試料を凍結乾燥処理して用いた。

ii) 偏光顕微鏡観察

オランダイチゴ果肉由来 WARP 湿潤物の少量を分取して、2 枚のスライドガラス間に挟んで偏光顕微鏡観察を行った。

iii) TEM 観察

アフリカツノキュウリ種衣、オランダイチゴ果肉、クダモノトケイソウ種衣、コダチトマト種衣、シナサルナシ果肉、セイヨウナシ果肉、スイカ果肉、ツルレイシ果肉、トウガン果肉、トマト種衣、パイナップル果肉、バナナ果肉、巨峰種ブドウ果肉、ランブータン果肉、リンゴ果肉、シマツナソ若茎およびタバコ BY2 細胞塊から調製した 17 種の WARP 湿潤物について、それぞれ上記 i) に示したように、固形分比率約 3 (w/w) % の水懸濁液を調製した。そして、各少量を分取して、2%酢酸ウラニルを用いた陰染色法により、TEM 観察を行った。ここでは、JEOL E2000EX を 200kV で用いた。

上記の TEM 観察により得られた各観察画像について、それらの画像を A4 大の紙面上に複写・印刷した。それらの各印刷画像上において、よく分散していると見られるフィブリル像上に、平準的に 10 箇所程度の計測点を選び、それらの各点でフィブリルの横断方向に市販金属製ノギスをあてがった。このようにして得られた 10 個の計測値の平均を計算することにより、フィブリルの幅の計測・算定を試みた。

また、オランダイチゴ果肉組織由来およびリンゴ果肉組織由来の場合については、上記した方法に加えて、25° の傾斜で白金シャドウイングを施してから、同様の実験操作で TEM 観察を行う方法も実施した。

iv) FT-IR 測定

上記 iii) の TEM 観察に供した 17 種の WARP 試料のうち、トウガン果肉、アフリカツノキュウリ種衣、オランダイチゴ果肉、リンゴ果肉組織由来およびタバコ BY2 細胞塊由来の 5 例を選んだ。そして、それらの各懸濁液の適量を分取して、メンブレンフィルター上で濾別・乾燥させることにより測定用薄膜を作り、これにより FT-IR 測定を行った。

v) X 線回折測定

上記 i) で調製し、凍結乾燥処理してから保管しておいた各種植物組織由来 WARP 凍結

乾燥物の中から、パイナップル果肉、トウガン果肉、オランダイチゴ果肉、リンゴ果肉、ツルレイシ果肉およびタバコ BY2 細胞塊の 6 種を選び、各約 100mg を分取して測定用ディスクを作成し、X線回折測定を行なった。回折ピークに Scherrer 式を適用して結晶領域の大きさを計算した。

vi) 中性糖分析とヨード澱粉反応試験

上記 i) で調製し、凍結乾燥処理してから保管しておいた各種植物組織由来 WARP 凍結乾燥物の中から、モモ果肉、パイナップル果肉、トウガン果肉、スイカ果肉、オランダイチゴ果肉、リンゴ果肉、ツルレイシ果肉、ランブータン果肉、ブドウ果肉およびカボチャ花卉由来の 10 種を選んだ。それらは、それぞれ金属製ピンセットで約 40 mg を分取して、硫酸加水分解から糖アルコールの還元反応を経てアルジトールアセテート化を行い、ガスクロマトグラフィー（島津製作所 GAS CHROMATOGRAM GC-14B）により中性糖分析を行った。

上記の 10 種の WARP 凍結乾燥物について、それぞれ常法のヨウ素試験によりデンプン含有の有無を確認した。

vii) AFM 観察

上記 i) で調製した各種植物組織由来 WARP のうち、モモ果肉、パイナップル果肉、トウガン果肉、青果用ベル群シシトウガラシ果肉、スイカ果肉、アールスメロン果肉、カキノキ果肉、オランダイチゴ果肉、トマト果肉（ただし、ここで実際に使用したのは、カゴメ(株)の果汁製造工場から提供された果汁搾渣で、その固形分の大部分は果肉組織に当たると考えられる。）、リンゴ果肉、ツルレイシ果肉、ハウライショウ果肉、バナナ果肉、ランブータン果肉、ニホンナシ果肉、巨峰種ブドウ果肉、ナツミカン中果皮、ウンシュウミカン外果皮、カカオポッド、ソバ果皮、トウガン花卉、カボチャ花卉、デンドロビウム・サンデラエ花卉、セイヨウシャクナゲ花卉、フロリバンダ種バラ花卉、ホンアロエ葉肉、ハナヤサイ葉、バルボフィラム・グランディフロム葉、ヤブツバキ葉、ウケザキクンシラン葉、ヒマラヤトキワヤマボウシ葉、スギ針葉、レモングラス葉、アルノッティアヌスハイビスカス葉、ニオイテンジクアオイ葉、アフリカスミレ葉、チャノキ葉、ミドリハナヤサイ茎髄、フキ葉柄、紅根種ダイコンの芽生えの茎、ヴェルティナバナナ葉鞘、リュウビнтаイ葉柄基部、タマネギ鱗茎、サトイモ塊茎、ハス根茎、サツマイモ塊根、青首種ダイコン塊茎、ジャガイモ塊茎、タバコ BY2 細胞塊、マツバラン胞子体およびオゴノリ藻体から調製し、まったく人工乾燥履歴のない 51 種の WARP 湿潤物について、上記 i) に示したように、それぞれ固形分比率約 3 (w/w) %の水懸濁液を調製した。これらの各種 WARP 水懸濁液は、その後の観察操作の必要に合わせて、さらに適量の蒸留水を加えて希釈するなどして、各種 WARP 希薄水懸濁液を調製し、AFM 観察に供した。

各種 WARP 希薄水懸濁液は、それぞれ、その 0.2 mL 程度をプラスチック製スポイト

で分取して、雲母劈開面上に滴下し、風乾してから金属性サンプルテーブル上に固定して、原子間力顕微鏡 Shimadzu SPM-9500 (図 2.8) のコンタクトモードで観察した。なお、オランダイチゴ果肉に関しては、比較対照のために、その果肉を 4 時間沸騰水で処理しただけのものも、上記方法に準じて希薄水懸濁液を調製し、AFM 観察に供した。

AFM の各観察画像は、 $2.0 \mu\text{m} \times 2.0 \mu\text{m}$ または $4.0 \mu\text{m} \times 4.0 \mu\text{m}$ の視野を 1 Hz、 512×512 pixel の条件で取得し、同装置付属のソフトウェアで画像処理を行った。画像処理は平面像の見やすさの改善とノイズ除去のためであり、高さ計測の精度と確度には影響しないと考えられる。そして、同じく装置付属のソフトウェアによる断面形状測定機能＝高さ計測機能によって、フィブリル幅の計測を試みた。

加えて、上記の AFM 観察において、画像中に見られるフィブリル像の多くが、その画像内で全形を確認出来るような事例である場合、そのような観察画像は A4 大の紙面上に複写・印刷した。そして、それらの各画像上において、よく分散し、視野内にはっきりと両端が認められるフィブリル像について、長さ方向に市販金属製ノギスをあてがい、当該のフィブリルの長さの計測・算定を試みた。

また、上記の AFM 観察の結果について、各種植物組織に含まれるフィブリルの幅の自然分布状況を把握するため、得られた観察画像の中から、各種植物種・組織種の分類中において典型的と考えられる各数例を特に選んだ。そして、選出した各観察画像について、当該観察画像中で見られる分散孤立した多数のフィブリル像に注目し、均等で無作為になるように 50 箇所の計測点を選んで、AFM の装置の付属機能によって、フィブリル像の幅の計測を行った。

すなわち、あらかじめ選んだひとつの観察画像上で、画像左上隅に最も近い出発点から、左→右、上→下の優先順位に基づき、計測点を、長さ方向に約 $0.05 \mu\text{m}$ ずらしながら断続的に 50 点を選んで計測した。そして、得られた数値について、0 nm (場合によっては、0.1 nm。) から 0.2 nm 毎に区間を区切り、その区間内に含まれる幅値が観測された頻度を計測した。そして、横軸にフィブリル幅 (上記区間の中央値)、縦軸に計測された頻度を取って、プロットし、得られた各点を曲線で結ぶことによりヒストグラムを作成した。

III-3. 結果と考察

i) 試料の化学処理

以下本節の実験結果については、煩雑を避けるため、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合を標準例として、中心的に記載することを原則とする。他の種の試料による場合は、必要に応じて、補足的に記述する程度に留める。

さて、一般的に生鮮なオランダイチゴ果実の外観は赤色と見られるが、これはその果実表面外皮が赤く着色しているためであり、実はその内部にある果肉の方は、ほとんど無色か白色である (図 3.2)。



図 3.2 新鮮オランダイチゴの横断面

このような新鮮なオランダイチゴ果実の数個を取って、各 2 縦断し、試みに 4(w/w)%の水酸化ナトリウム水溶液で 24 時間以上浸漬処理すると、外皮も含めほとんど無色透明になった (図 3.3)。

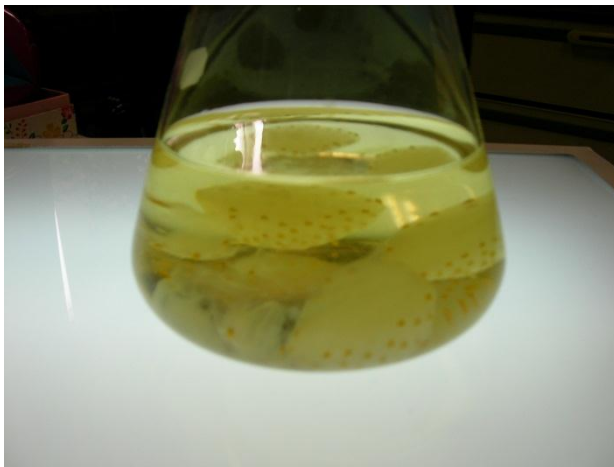


図 3.3 4w/w%の水酸化ナトリウム水溶液で 24 時間以上浸漬処理したオランダイチゴ

あらためて、新鮮なオランダイチゴ果実を相応量準備し、その果肉組織のみから、III-2-2 i)に記載したように、WARP を調製した。これにより得られた WARP 湿潤物は、無色で、やまどのりに似たような半ゲル様を呈した。そして、試みに、その一部を分取して凍結乾燥処理すると、その処理物は純白色の綿状となり、別の一部を分取して、105°Cの恒温に保った電気乾熱器中で乾熱処理を実施したところ、その処理物は純白色の綿状であるだけでなく、さらにその表面が真珠光沢を呈するようになった。

上記のオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 湿潤物について、固形分比率が約 3(w/w)% になるように、その相応量を分取して、適量の蒸留水中に散布し、超音波ホモジェナイザ（日本精機製作所 US-150）で超音波懸濁処理したところ、速やかに均一に無色透明となり、外見的にはほぼ完全に流動性を失って、ゲル様を呈した。そして、それをその後常温下で 72 時間以上静置しても、固形分の沈降現象は全く見られなかった。

そこで、その比較対照として、市販の精製サルファイトパルプ（乾いた白色の綿状）を適量用意して、指で破碎してから、やはり固形分比率が約 3(w/w)% になるように、その相応量を分取して、適量の蒸留水中に散布した。これを、円筒刃ホモジェナイザによる処理と超音波ホモジェナイザによる超音波懸濁処理をそれぞれ 30 分以上加えてから静置し、その後の変化を観察する試験を実施した。そうしたところ、当該処理液中では、超音波懸濁処理中とその直後において、多数の光沢ある無色の細かな針状物体が舞った後、速やか（10 分以内）に、全て沈降するように見られた（図 3.4）。

上記のオランダイチゴ果肉由来 WARP 試料で見られたようなゲル化現象は、繊維成分の分散性が高いことの反映であると考えられる。本研究を通じて、III-2-2 i) に示した方法で調製した全ての各種植物組織由来 WARP の中で、上記のような永続的なゲル様現象を明瞭に示した WARP 試料は、オランダイチゴ果肉由来の場合の他に、モモ果肉、青果用ベル群シシトウガラシ果肉、カキノキ果肉、ランブータン果肉、ナツミカン中果皮およびカカオポッド由来の場合の合計 6 例のみであった。

なお、カボチャ花弁、トウガン花弁およびミドリハナヤサイ茎髓組織由来の場合においても、固形分比率約 3(w/w)% の水懸濁液を超音波ホモジェナイザによる超音波懸濁処理後、しばらくの時間、ゲル化現象の傾向が顕著に見られた。しかしながら、ミドリハナヤサイ茎髓由来による場合では、超音波処理後静置を始めてからおおむね 48 時間経過頃、固形分がほぼ完全に沈降する反応を呈するなど、カボチャ花弁、トウガン花弁およびミドリハナヤサイ茎髓の各由来の場合の何れでも、いったん形成されたゲルは、最終的に融解した。

上記のような永続的なゲル化現象を示さなかった各植物種・組織種由来の WARP 試料の場合では、超音波懸濁処理後に水懸濁液中に多数の光沢ある無色の細かな針状物体の浮遊が見られ、それらは間もなく全て沈降した。



図 3.4 オランダイチゴ果肉由来 WARP (左) とサルファイトパルプ (右) の水懸濁状態の違い

Ⅲ-2-2 i)の実験をした結果、59種の植物種・組織種試料素材から、何れの場合でも、無色または白色の半ゲル状を呈する WARP 湿潤物が得られた。これらは、凍結乾燥処理すると、それぞれ全て白色の綿状となった。果肉や果皮等の組織種で分類した場合の各代表的な事例における、元の材料の固形分に対する収率は、表 3.1 のようであった。

表 3.1 各種植物組織材料の固形分に対する WARP の収率

WARP の材料	元の材料・組織の含水率/%	元の材料・組織の固形分に対する WARP の収率/%
アールスメロン	92.36	3.58
オランダイチゴ果肉	91.04	3.9
ナツミカン中果皮	67.57	8.10
カカオポッド	71.51	85.1
バラ花卉	73.67	6.3
ミドリハナヤサイ茎髓	87.33	18.6
スギ針葉	55.66	18.6

表 3.1 によれば、WARP の材料として、植物種に関わらず果肉を選んだ場合、果皮、茎や葉などの他の組織種を WARP の材料に選んだ場合に比較して、WARP の元の材料の固形分に対する収率は、概して低くなる傾向にあることが認められた。WARP の材料として、カカオポッドを選んだ場合では、WARP の元の材料の固形分に対する収率は、極高いものとなった。このような傾向は、一般に果肉組織の固形分には水溶性の糖（グルコース、フルクトース）が多く、茎や葉ではそれが少ないためであると考えられる。

ii) 偏光顕微鏡観察

オランダイチゴ果肉由来 WARP 湿潤物による偏光顕微鏡観察においては、前章の予備実験での場合と同様に、偏光像において、明瞭な複屈折現象が認められた。それ以外に注目出来る観察所見として、同顕微鏡観察画像中に細胞壁の断片と考えられる構造体が多く検出されたことが挙げられる。この試料は、原材料に相当のホモジェナイザ処理や化学処理を加えているものの、超音波処理を全く経ていないため、細胞壁の物理的構造が比較的多く破壊されずに残存したと考えられる。

iii) TEM 観察

オランダイチゴ果肉、アフリカツノキュウリ種衣、クダモノトケイソウ種衣、トウガン果肉、ツルレイシ果肉、ランブータン果肉、巨峰種ブドウ果肉、パイナップル果肉、バナナ果肉およびタバコ BY2 細胞塊から調製した各 WARP 試料による TEM 観察画像の各一例を、それぞれ図 3.5～図 3.14 に示す。

アフリカツノキュウリ種衣、オランダイチゴ果肉、クダモノトケイソウ種衣、コダチトマト種衣、シナサルナシ果肉、セイヨウナシ果肉、スイカ果肉、ツルレイシ果肉、トウガン果肉、トマト種衣、パイナップル果肉、バナナ果肉、巨峰種ブドウ果肉、ランブータン

果肉、リンゴ果肉、シマツナソ若茎およびタバコ BY2 細胞塊から調製した 17 種の WARP について、各固形分比率約 3 (w/w) % の水懸濁液による TEM 観察によって得られたいずれの観察画像においても、相互に各画像の様相は比較的によく似ていた。すなわち、当該画像中では、専ら相当に細長い糸状の物体すなわちフィブリルが、複数以上で、ゆるやかにカーブを描きながら走行・交差する様子が、観察出来る。ただし、ひとつの画像の視野内において、単一のフィブリルと見られる物体像の全体は収まり切れず、同時に両端を見ることが出来ない。そして、各単一の画像内においては、含まれる複数以上の糸状のフィブリルの形状は、それぞれ均質で、相互にほぼ同様であることも視認出来る。

これらの各 TEM 観察画像中のフィブリル像上において、各 10 箇所程度の計測点を無作為に選び、フィブリル幅を計測・平均した結果は、表 3.2 のようであった。上記のいずれの植物組織材料に由来する WARP の TEM 観察画像上においても、フィブリル幅の計測値は、おおよそ 2.0~4.0 nm の範囲にあると計算された。

シャドウィング法を適用したオランダイチゴ果肉由来 WARP の TEM 観察画像を図 3.15、同じくリンゴ果肉由来 WARP のものを図 3.16 に示す。両図を見ると、いずれでも含まれる糸状のフィブリルの形状がおおよそ立体的に把握出来るが、フィブリル幅の計測のためには解像度が不足している。

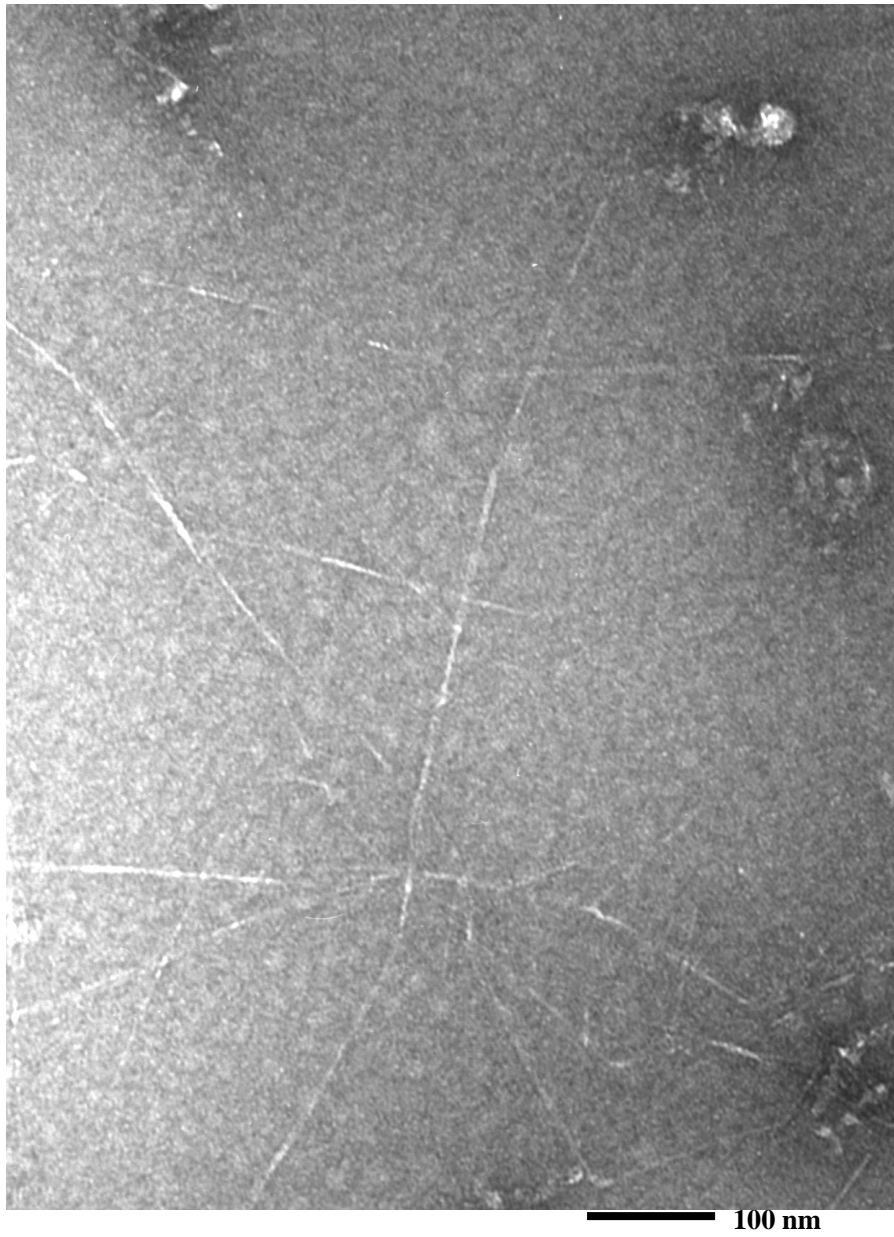
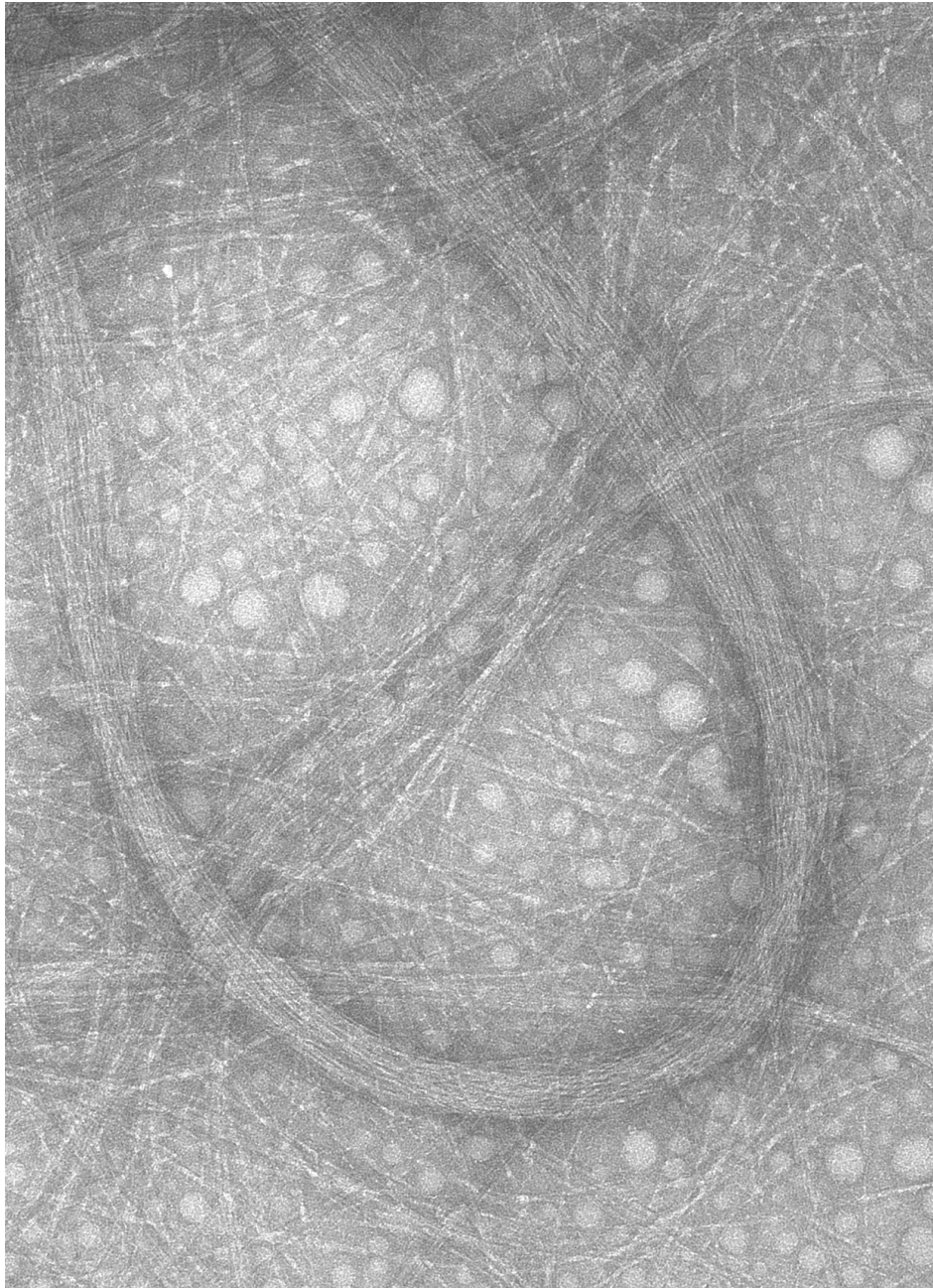
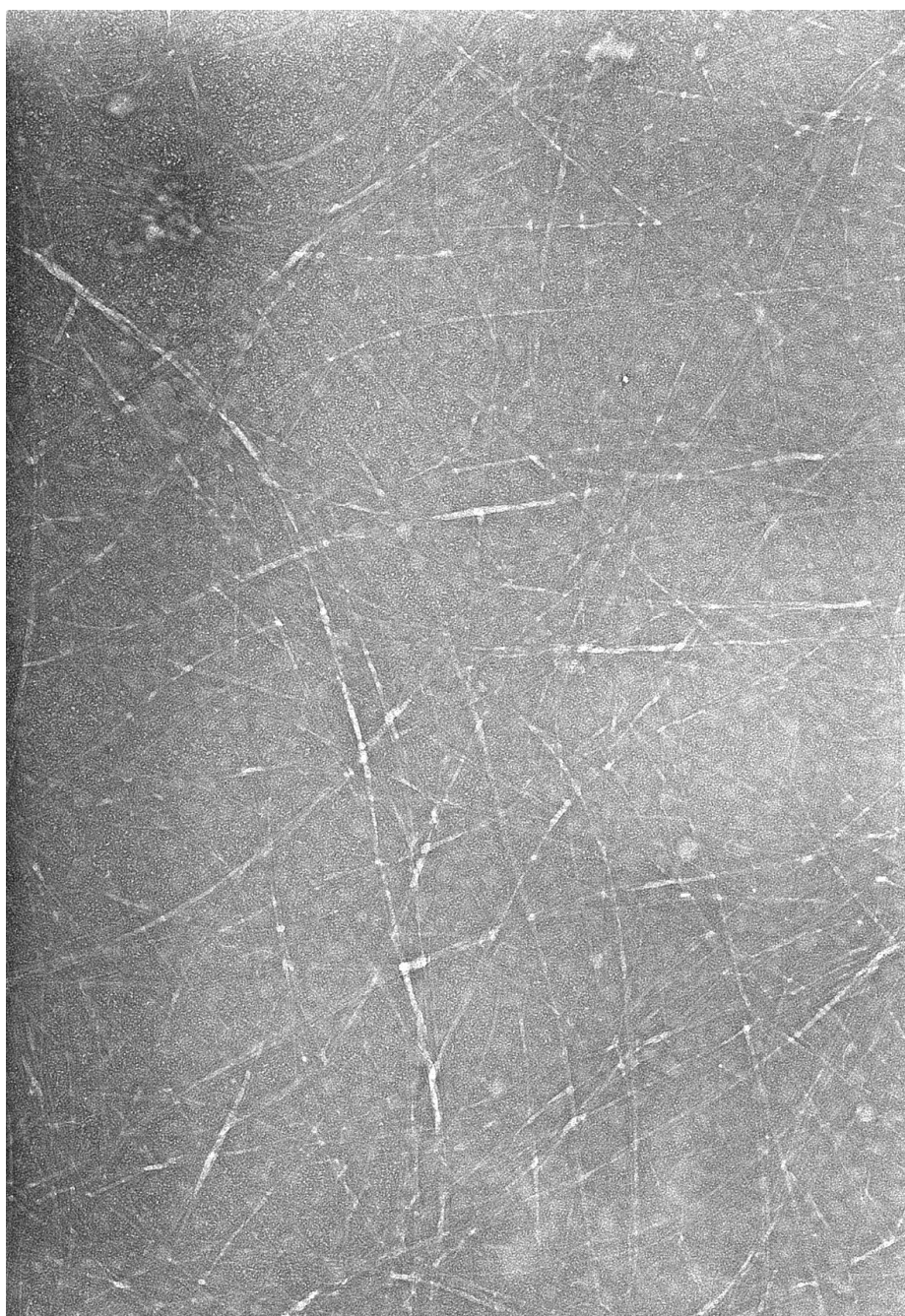


図 3.5 オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



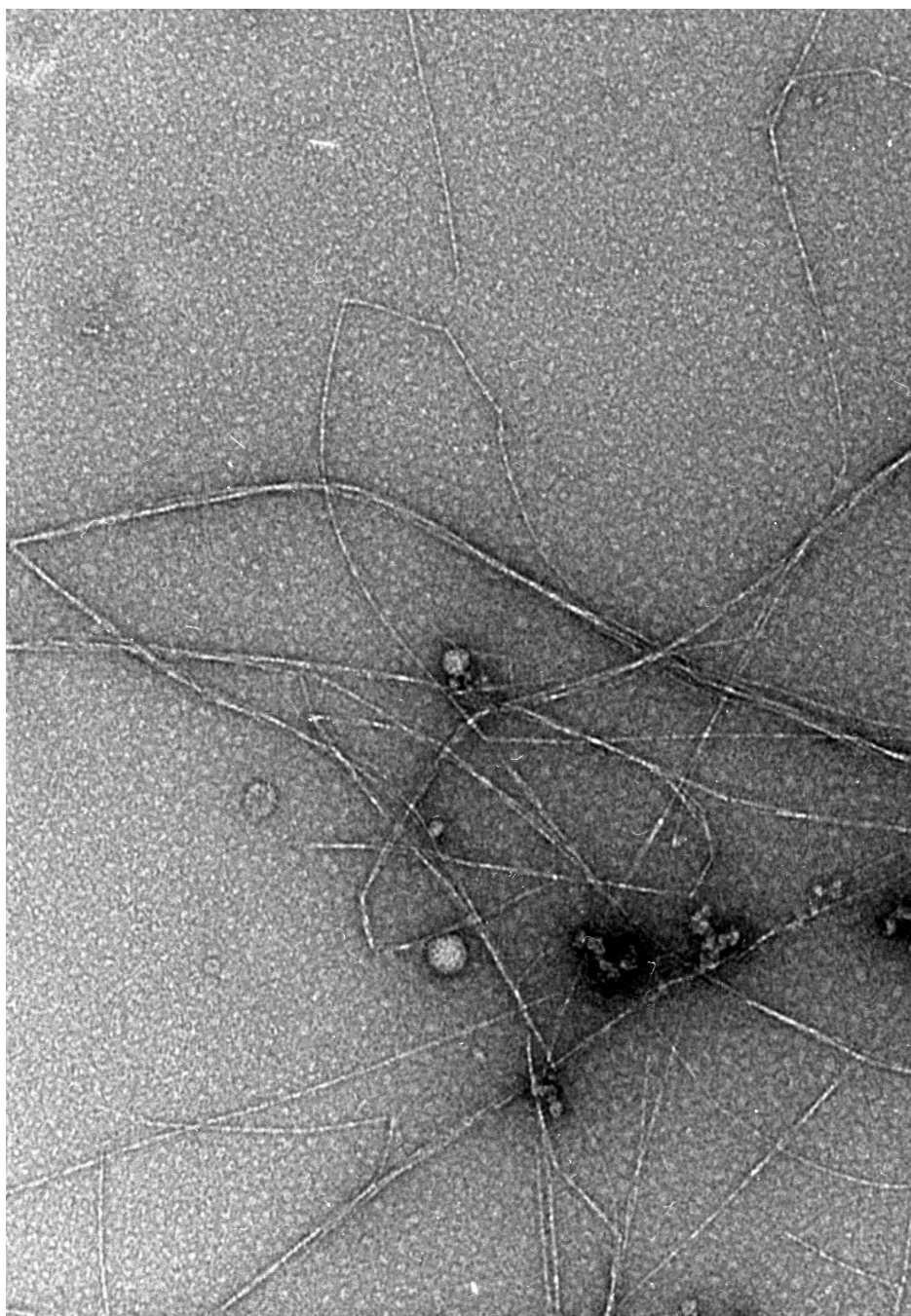
— 100 nm

図 3.6a アフリカツノキュウリ種衣組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像イ.



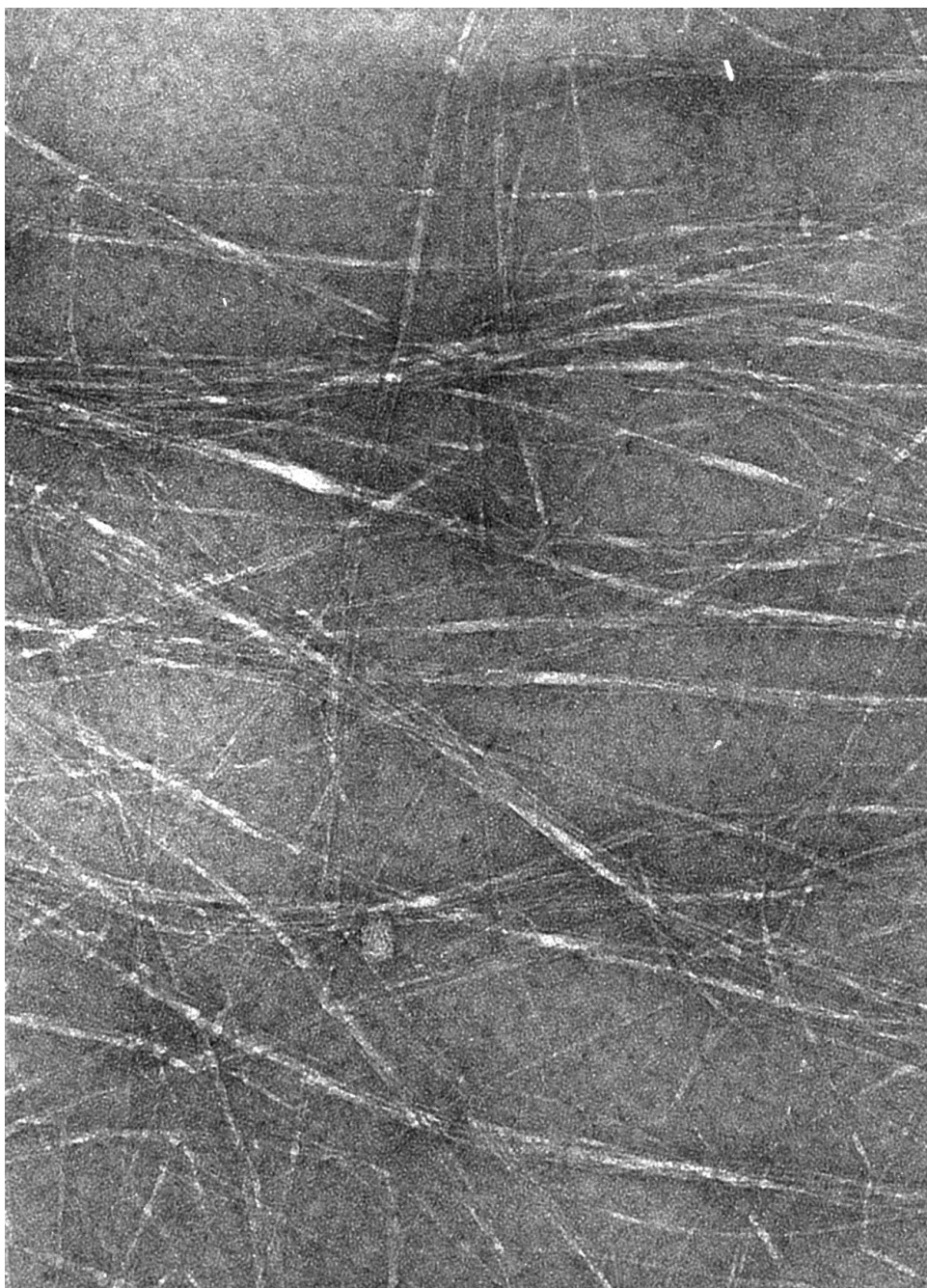
— 100 nm

図 3.6b アフリカツノキュウリ種衣組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像口。
(前掲 a よりも、フィブリルの分散の良い視野。)



— 100 nm

図 3.7 クダモノトケイソウ種衣組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



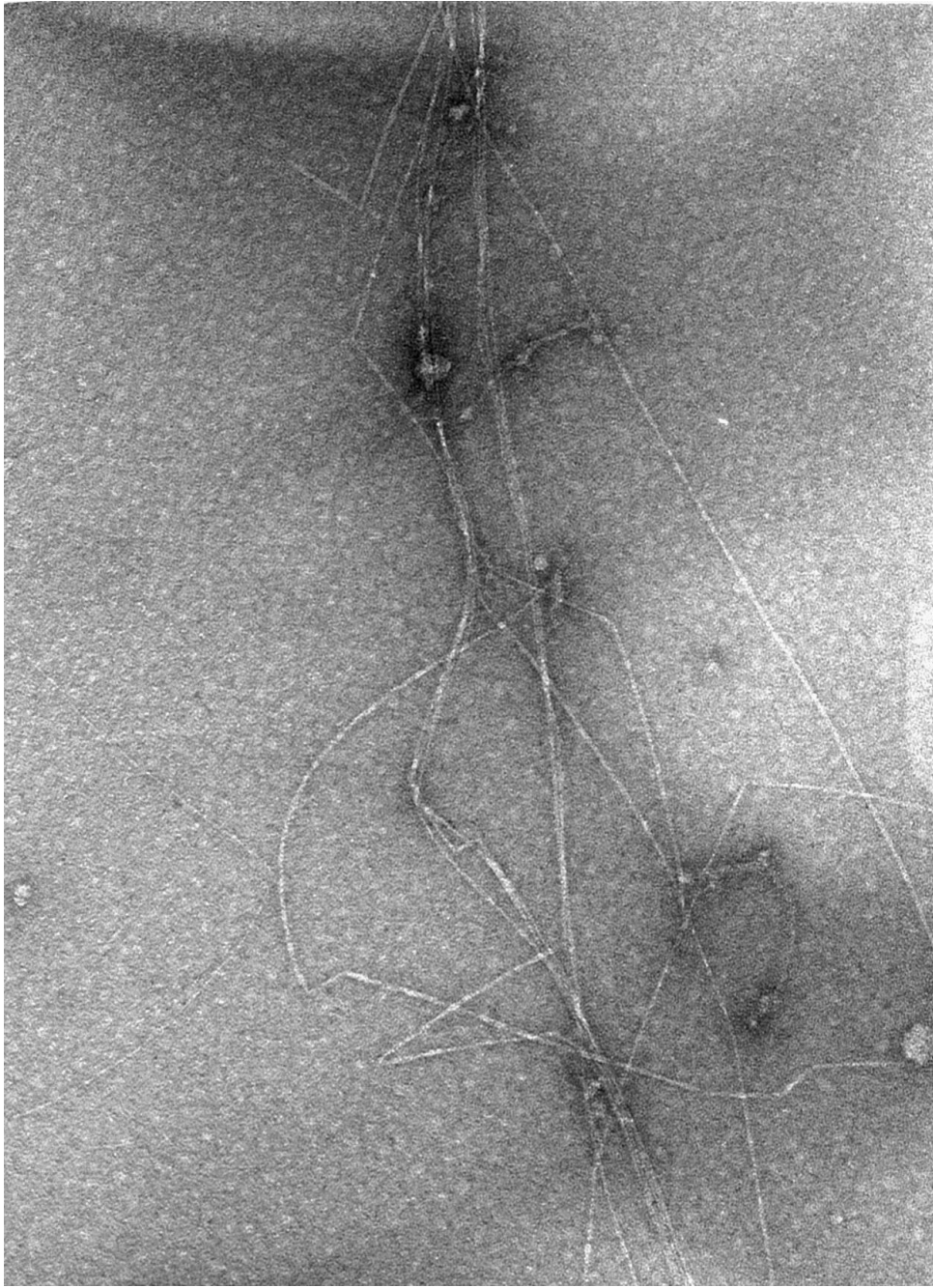
100 nm

図 3.8 トウガン果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



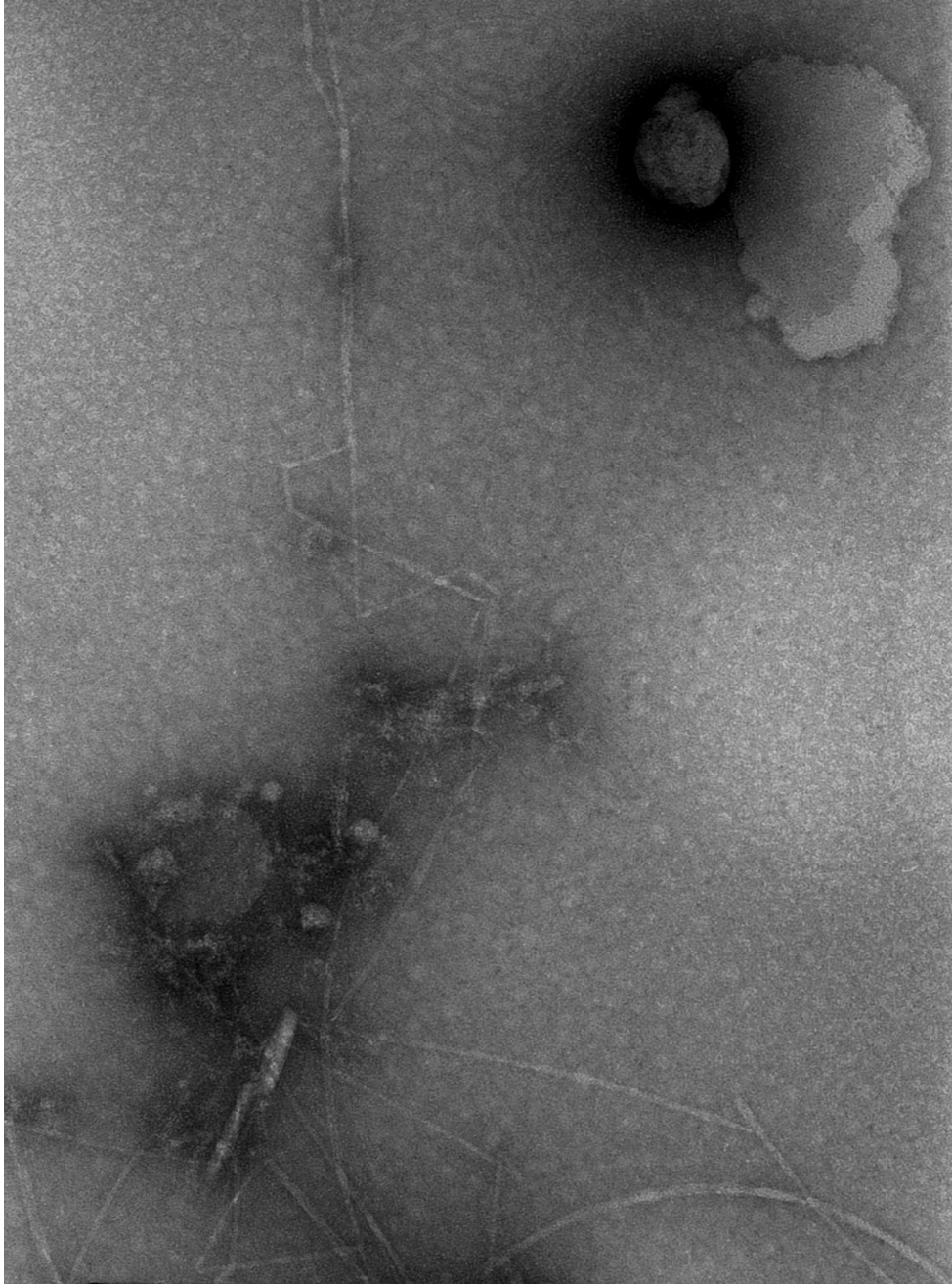
100 nm

図 3.9 ツルレイシ果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



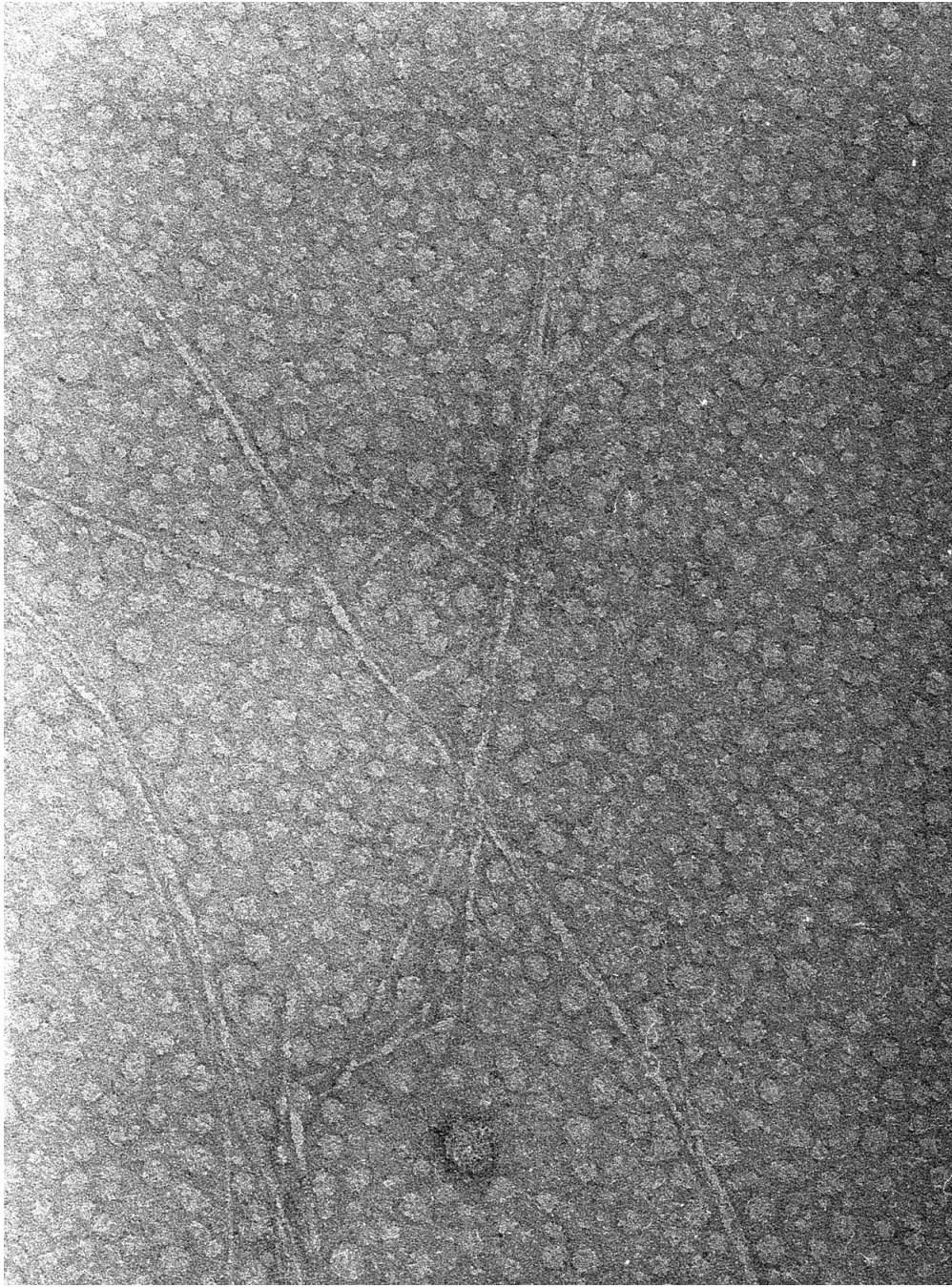
100 nm

図 3.10 ランブータン果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



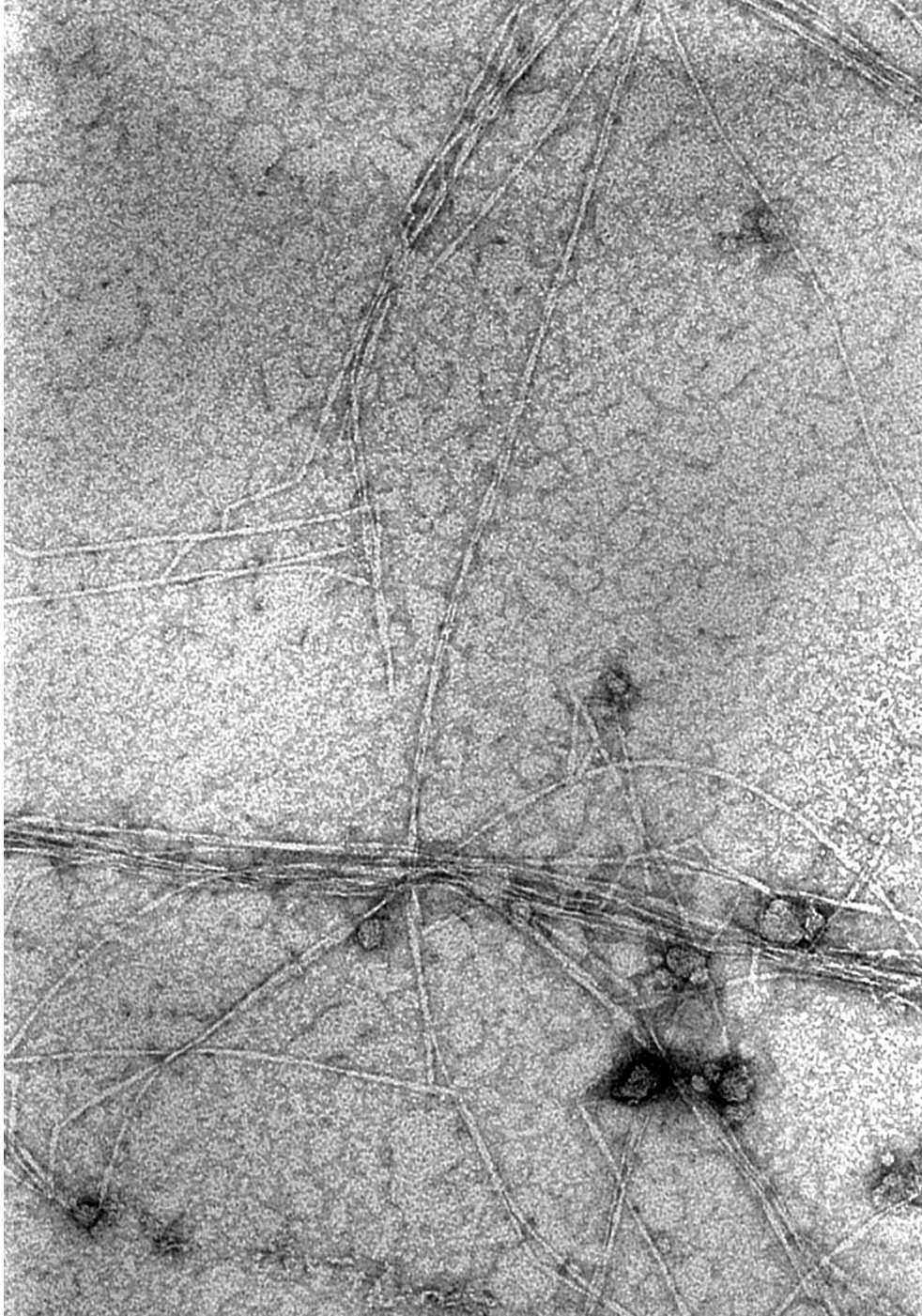
— 100 nm

図 3.11 巨峰種ブドウ果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



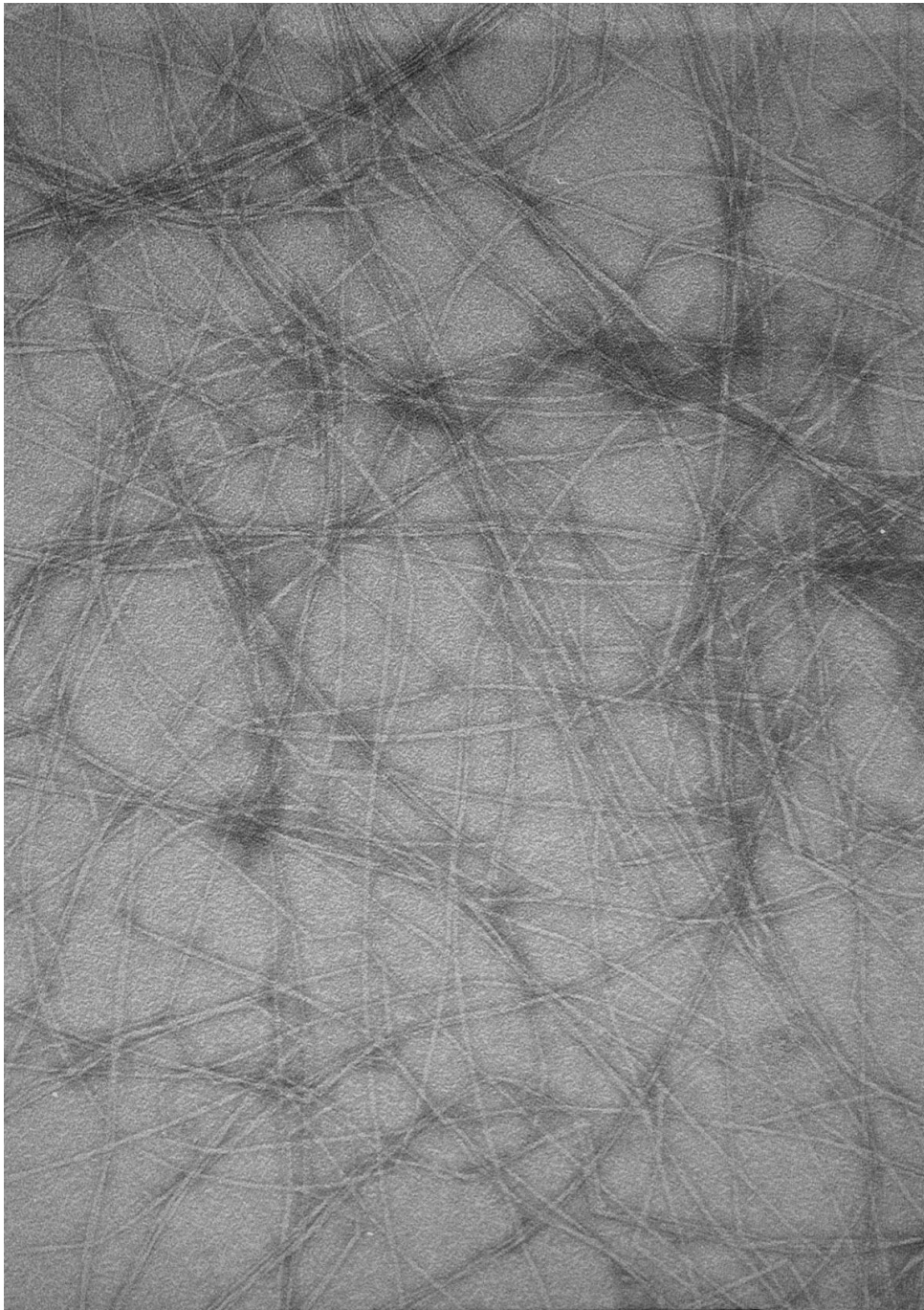
— 50 nm

図 3.12 パイナップル果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.



— 100 nm

図 3.13 バナナ果肉組織由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.

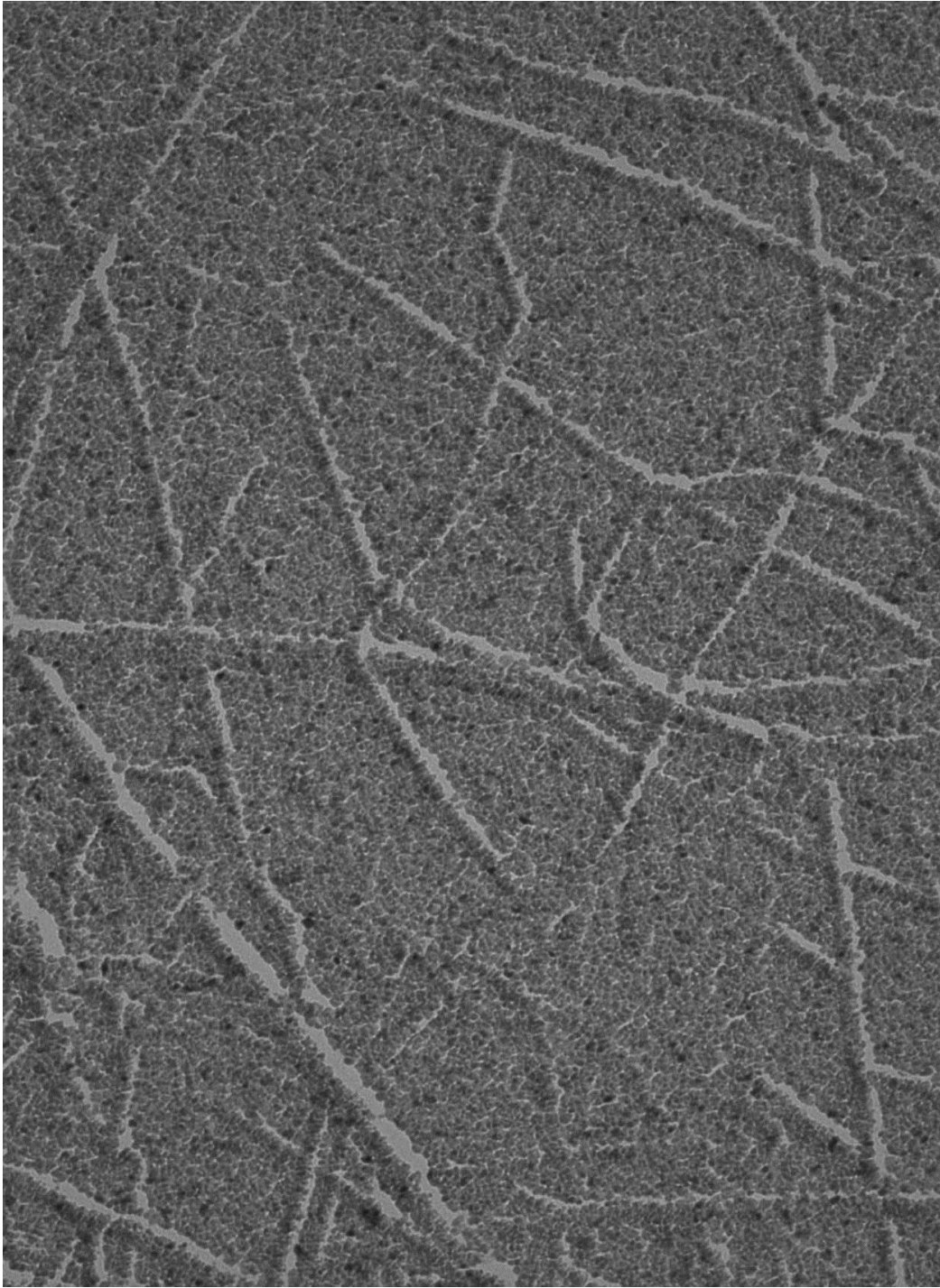


— 100 nm

図 3.14 タバコ BY2 細胞塊由来 WARP による負染色 TEM 観察画像.

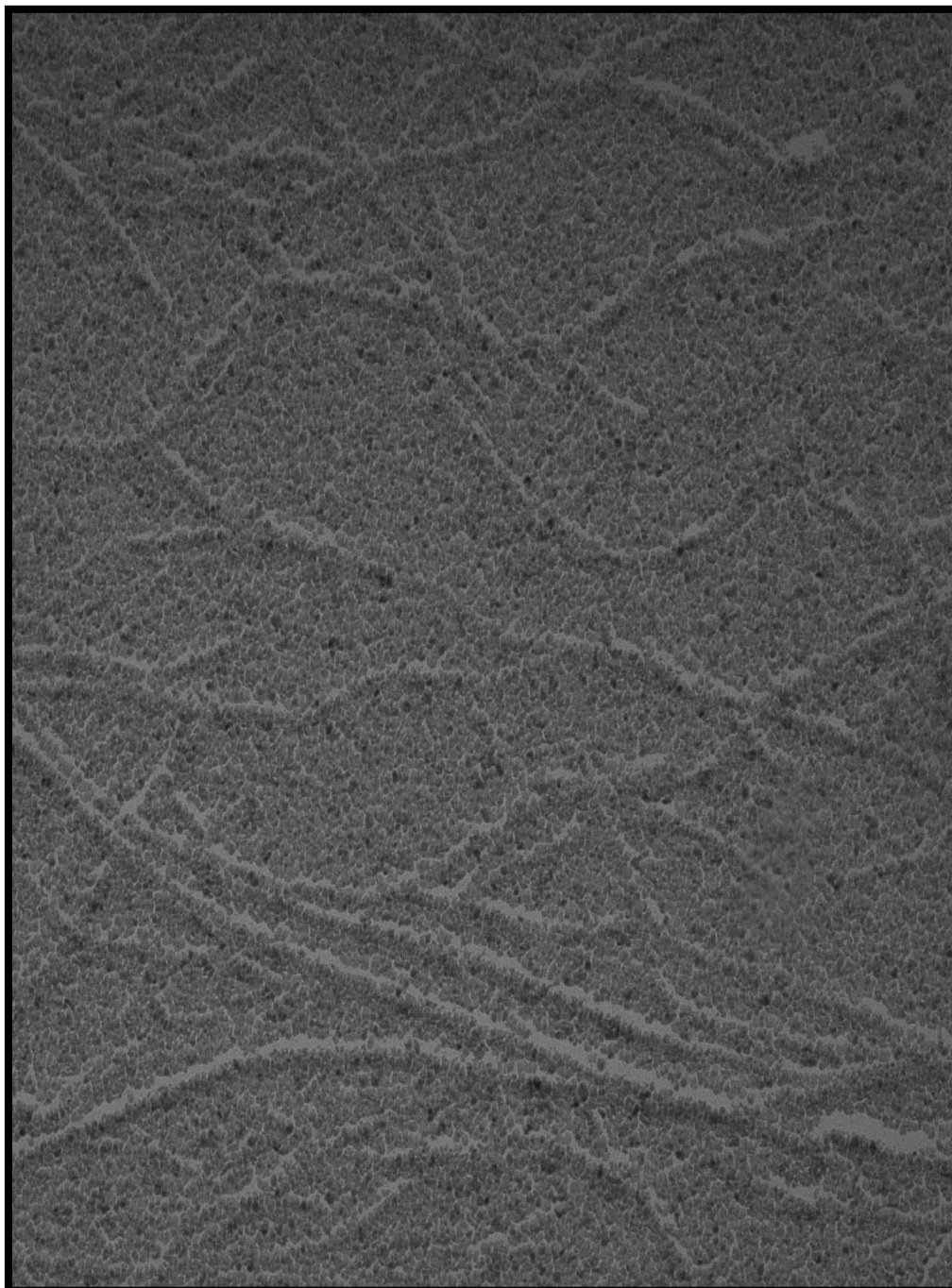
表 3.2 TEM観察画像から計測・算定したフィブリルの幅の計測値

WARP 原材料	計測値
アフリカツノキュウリ (キワーノ) 種衣	: 3 nm
オランダイチゴ果肉	: 1 nm
クダモノトケイソウ (パッションフルーツ) 種衣	: 4 nm
コダチトマト (タマリロ) 種衣	: 4 nm
シナサルナシ (キウイフルーツ) 果肉	: 2 nm
セイヨウナシ果肉	: 3 nm
スイカ果肉	: 4 nm
ツルレイシ果肉 (なかわた)	: 2 nm
トウガン果肉	: 2 nm
トマト種衣	: 4 nm
パイナップル果肉	: 3 nm
バナナ果肉	: 4 nm
巨峰種ブドウ果肉	: 2 nm
ランブータン果肉	: 1 nm
リンゴ果肉	: 4 nm
シマツナソ (モロヘイヤ) の若い葉茎	: 4 nm
タバコ BY2 細胞塊	: 4 nm



100 nm

図 3.15 オランダイチゴ果肉組織由来 WARP によるシャドウィング TEM 観察画像.



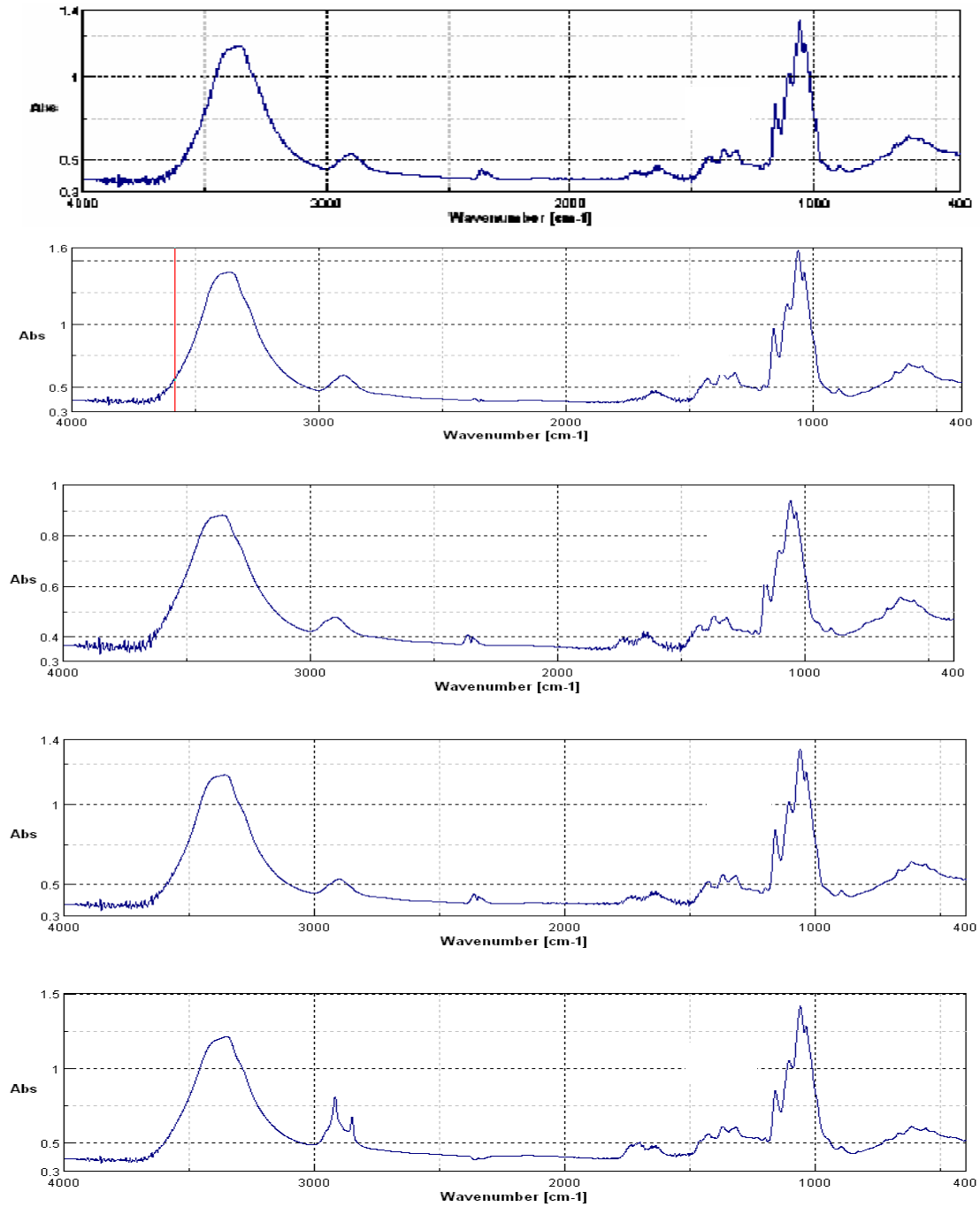
100 nm

図 3.16 リンゴ果肉組織由来 WARP によるシャドウィング TEM 観察画像.

iv) FT-IR 測定

Ⅲ-2-2 iv)の実験・観察をした結果、得られたアールスメロン果肉由来、オランダイチゴ果肉由来、リンゴ果肉由来、トウガン果肉由来およびタバコ BY2 細胞塊由来 WARP の FT-IR 吸収スペクトルパターンを図 3.17 に示す。なお、アフリカツノキュウリ種衣組織由来 WARP による場合については、リンゴ果肉由来およびトウガン果肉由来 WARP による場合とほぼ同等の吸収スペクトルパターンが得られた。

これらを見ると、何れも 1675 cm^{-1} 付近に、ウロン酸由来と推測されるカルボニルに特徴的な吸収パターンが見られ、4%NaOH 処理ではヘミセルロースが完全には除去されていないことが推測される。それ以外のスペクトル全体のパターンは、典型的な天然セルロース（セルロース I、ただし低結晶性）の場合と合致する。



- ① アールスメロン果肉組織由来 WARP ② オランダイチゴ果肉組織由来 WARP
 ③ リンゴ果肉組織由来 WARP ④ トウガン果肉組織由来 WARP
 ⑤ タバコ BY2 細胞塊由来 WARP

図 3.17 アールスメロン果肉組織由来 WARP、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP、リンゴ果肉組織由来 WARP、トウガン果肉組織由来 WARP およびタバコ BY2 細胞塊由来 WARP の FT-IR スペクトル

v) X線回折測定

Ⅲ-2-2 v)の実験・観察をした結果、得られたオランダイチゴ果肉由来、リンゴ果肉由来、トウガン果肉由来およびタバコ BY2 細胞塊由来 WARP の各 X 線回折図を、それぞれ図 3.18 ~ 図 3.21 に示す。各図のいずれも典型的なセルロース I の回折パターンであると認められる。また、ツルレイシ果肉由来およびパイナップル果肉由来 WARP による場合でも同様の回折図が得られた。これらの回折図におけるピーク幅から Scherrer 式で算出した結晶幅値は表 3.3 のとおりで、いずれも 2.6 nm~2.7 nm の範囲内にあった。

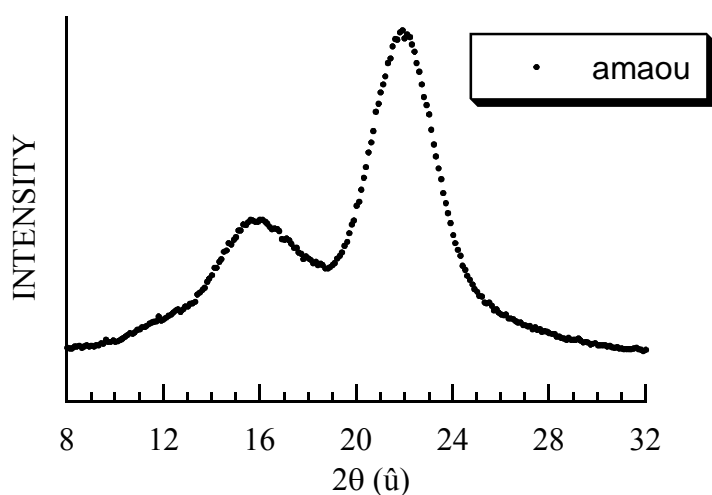


図 3.18 オランダイチゴ果肉 WARP の X 線回折図

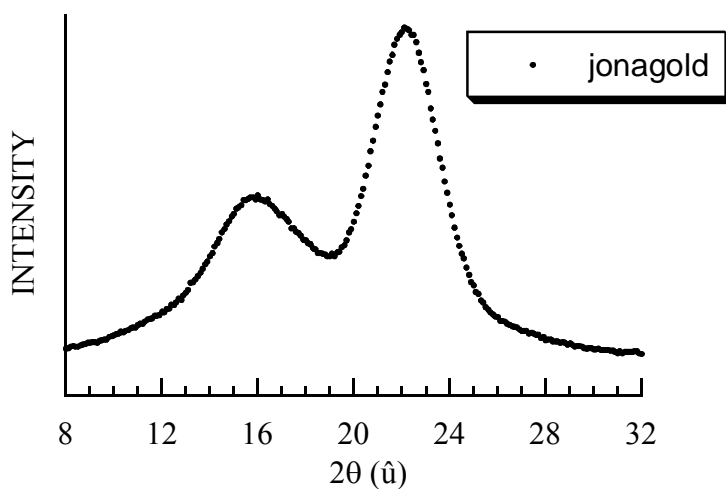


図 3.19 リンゴ果肉 WARP の X 線回折図

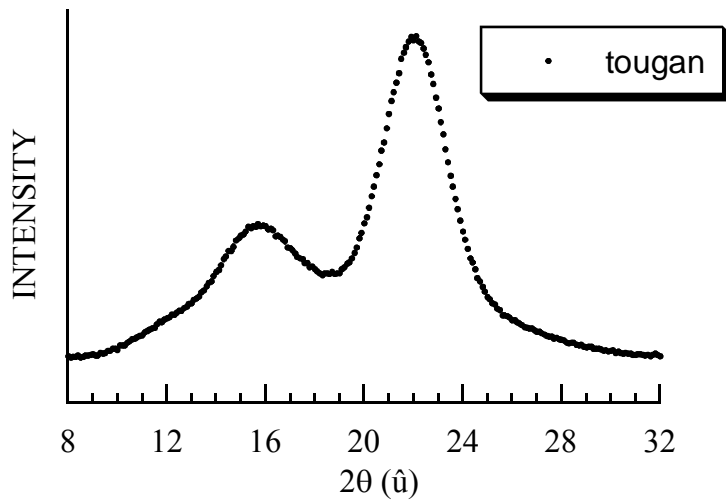


図 3.20 トウガン果肉 WARP の X 線回折図

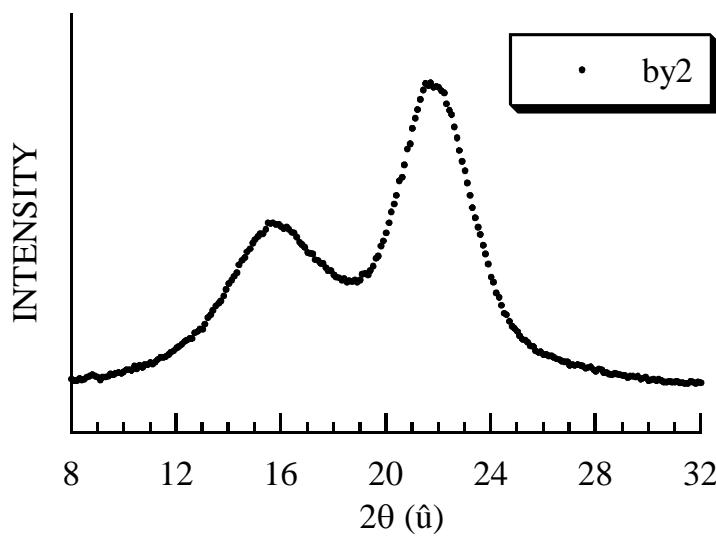


図 3.21 タバコ BY 2 細胞塊由来 WARP の X 線回折図

表 3.3 X線回折の Scherrer 解析による結晶幅

WARP の原材料	計算値
オランダイチゴ果肉 1	: 2.8 nm
オランダイチゴ果肉 2	: 2.7 nm
トウガン果肉	: 2.8 nm
ツルレイシ果肉	: 2.6 nm
パイナップル果肉	: 2.8 nm
リンゴ果肉	: 2.7 nm
タバコBY2細胞塊	: 2.6 nm

注: 「オランダイチゴ果肉 1」は、品種“アマオウ”の果肉より調製した WARP 凍結乾燥物、「オランダイチゴ果肉 2」は、品種“トチオトメ”の果肉より調製した WARP 凍結乾燥物によっている。本研究で、実験で使用したオランダイチゴ果肉は、原則として、品種“トチオトメ”であるが、ここでは、例外的に、品種“アマオウ”も使用した。

vi) 中性糖分析とヨード澱粉反応試験

III-2-2vi)の実験・観察をした結果、得られた中性糖分析の数値情報を、表 3.4 に示す。

これによれば、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP の場合、ここで同じく実験・分析対象とした他種の WARP による場合と比べて、キシロースとガラクトースの割合が大きい傾向にあることが認められた。このキシロースは、ヘミセルロースの一部としてキシログルカンの混在を、ガラクトースの方は、難溶解性のペクチンの混在を示唆するものと考えられる。

表 3.4 各種果肉組織等由来 WARP の中性糖分析

WARP の原材料	供試量 (絶乾重量 /mg)	K-lig /mg (%)	Ara /mg (%)	Xyl /mg (%)	Man /mg (%)	Glu /mg (%)	Gal /mg (%)
スイカ果肉	50.3 (100)	0.2 (0.398)	0.720 (1.43)	3.87 (7.69)	0.618 (1.23)	28.5 (56.7)	1.96 (3.90)
ツルレイシ 果肉	51.1 (100)	0 (0)	0.208 (0.407)	2.45 (4.79)	1.89 (3.70)	35.5 (69.5)	4.80 (9.39)
ブドウ果肉	45.6 (100)	0 (0)	0.437 (0.959)	1.76 (3.86)	1.33 (2.91)	23.6 (51.8)	0.910 (2.00)
リンゴ果肉	51.5 (100)	0 (0)	1.63 (3.17)	4.39 (8.53)	0 (0)	40.5 (78.6)	0 (0)

パイナップル果肉	52.5 (100)	0 (0)	1.87 (3.56)	3.79 (7.21)	1.42 (2.70)	28.3 (53.9)	4.26 (8.12)
バナナ果肉	50.3 (100)	0 (0)	0 (0)	0.973 (1.93)	7.37 (14.6)	20.9 (41.5)	0 (0)
トウガン果肉	47.6 (100)	0 (0)	0 (0)	2.21 (4.65)	1.65 (3.48)	33.2 (69.7)	3.54 (7.44)
ランブータン果肉	52.9 (100)	0 (0)	1.16 (2.20)	2.46 (4.66)	1.87 (3.54)	20.9 (39.4)	1.73 (3.27)
モモ果肉	214.3 (100)	0 (0)	6.94 (3.24)	14.9 (6.95)	9.37 (4.37)	135 (63.1)	16.0 (7.47)
オランダイチゴ果肉	202.5 (100)	0 (0)	2.84 (1.40)	11.4 (5.61)	8.14 (4.02)	149 (73.8)	19.2 (9.48)
カボチャの花冠	200.3 (100)	5.2 (2.60)	2.91 (1.45)	8.28 (4.13)	4.81 (2.40)	85.0 (42.4)	15.7 (7.84)

ヨード澱粉反応試験については、表 3.4 記載の全試料で陰性であり、デンプンは含まれないことが分かった。

vii) AFM 観察

III-2-2vii)の実験・観察をした結果については、まず概略を表 3.5 に示す。

表 3.5 各種植物組織等由来 WARP の AFM 観察所見

No.	植物種	組織種	フィブリル幅/nm	フィブリル長/ μm	フィブリルの外形特徴
1	オランダイチゴ	果肉	0.8~2.0	∞	細長い糸状
2	カキノキ	果肉	1.0~2.0	∞	細長い糸状
3	モモ	果肉	0.9~1.9	∞	細長い糸状
4	トマト	果汁搾滓	3.0~4.0	∞	細長い糸状
5	ランブータン	果肉	1.5~2.5	∞	細長い糸状
6	バナナ	果肉	1.2~2.8	∞	細長い糸状
7	シントウガラシ	果肉	1.5~2.5	∞	細長い糸状

8	ニホンナシ	果肉	0.5~1.0 または、 2.0~3.0	∞	細長い糸状とやや太い糸状の混在。
9	スイカ	果肉	3.0程度 または、 0.5~1.5	0.68以上 または、 0.022 ~ 0.44	線状と楔形の混在。
10	トウガン	果肉	1.5~2.5 または、 0.5~1.5	0.68以上 または、 0.011 ~ 0.38	線状と楔形の混在。
11	アールスメロン	果肉	1.2~3.2 または、 0.5~1.5	1.3以上 または、 0.011 ~ 0.20	細長い糸状と短小な断片状の混在。
12	巨峰種ブドウ	果肉	1.5~2.5 または、 0.5~1.5	1.3以上 または、 0.011 ~ 0.20	細長い糸状と短小な断片状の混在。
13	ハウライショウ	果肉	1.0~2.5	0.056 ~ 0.40	多数の楔形の端部連結による網目状形成。
14	ナツミカン	中果皮	1.5~2.5	∞	細長い糸状
15	ウンシュウミカン	外果皮	2.0~3.0	∞	細長い糸状
16	ソバ	果皮	1.5~2.5	∞	細長い糸状
17	カカオノキ	外果皮	1.0~2.0	1.0以上 または、 0.045 ~ 0.50	細長い糸状と楔形の混在。
18	トウガン	花弁	約 2.5 または 0.5~2.5	0.37以上 または 0.023 ~ 0.12	細長い糸状と短小な断片状の混在。
19	カボチャ	花弁	約 2.5 または 0.5~2.5	0.66以上 または 0.046 ~ 0.23	細長い糸状と短小な断片状の混在。

20	デンドロビウム・サ ンデラエ	花卉	0.5~2.5	∞ または 0.071 ~ 0.67	細長い糸状または短小な破 片状（画像によって異なる。 ）。
21	チューリップ	花卉	1.5~4.5	∞	細長いリボン状
22	セイヨウシャクナ ゲ	花卉	0.6~1.4	∞	細長い糸状
23	バラ	花卉	おおむね 2.5	∞	細長い糸状
24	ミドリハナヤサイ	茎髓	3.0~4.0	∞	細長い糸状
25	ヴェルティナバナ ナ	葉鞘	0.6~1.8	∞	細長い糸状
26	フキ	葉柄	1.5~3.9 または、 0.8~1.5	0.54 以上 または、 0.012 ~ 0.14	細長い糸状と短小な断片状 の混在。
27	紅根種ダイコン	芽生え の茎	0.8~1.8	0.058 ~ 0.30	多数の楔形の端部連結によ る網目状形成。
28	リュウビンタイ	葉柄基 部	4.0 程度 または、 1.5~3.0	0.62 以上 または、 0.048 ~ 0.81	細長い糸状と大小様々な不 定形物の混在。
29	スギ	針葉	0.7~1.8	∞	細長い糸状
30	チャノキ	葉	2.0~3.0	∞	細長い糸状
31	レモングラス	葉	2.0~3.0	∞	細長い糸状
32	ニオイテンジクア オイ	葉	2.5~3.5	∞	細長い糸状
33	アルノッティアヌ スハイビスカス	葉	3.5 程度 または 1.0~6.0 等	1.3 以上 または 0.093 ~ 0.84	細長い線状、不定形の破片 状物および湾曲した短小な 楔形の混在。
34	ヒマラヤトキワヤ マボウシ	葉	1.5~2.5	0.093~1.3	湾曲した比較的短小な楔形 の散在。

35	ヤブツバキ	葉	3.0~4.0 または、 1.0~2.5	1.0 以上 または 0.073 ~ 0.51	細長い糸状と短小な断片状の混在。
36	ハナヤサイ	葉	1.0~2.0	∞	細長い糸状
37	アフリカスマイレ	葉	2.0 程度 または、 0.5~2.0	1.2 以上 または、 0.048 ~ 0.40	細長い糸状と短小な断片状の混在。
38	ウケザキクンシラン	葉	1.0~2.5	0.048 ~ 0.50	短小な楔形物体が点在。
39	バルボフィラム・グランディフロルム	葉	3.5~4.5 または、 1.0~2.5 等	0.40~0.81 または、 0.070 ~ 0.54 等	ひも状の集合体、短小な楔形および密実円形体等の混在。
40	ホンアロエ	葉肉	0.6~1.9	0.012 ~ 0.35	短小な楔形物体が点在。
41	青首種ダイコン	塊茎	0.8~2.0	0.082 ~ 0.45	多数の楔形の端部連結による網目状形成。
42	ジャガイモ	塊茎	1.0~2.0	∞	細長い糸状
43	サトイモ	塊茎	1.0~2.0	∞	細長い糸状
44	サツマイモ	塊根	1.0~2.0	∞	細長い糸状
45	ハス	塊茎	1.5~3.0	∞	細長い糸状（やや太い傾向がある。）
46	タマネギ	鱗茎	1.0~2.0	∞	細長い糸状
47	タバコ	脱分化細胞塊	1.5~2.5 または、 0.5~1.5	0.79 以上 または、 0.012 ~ 0.27	細長い糸状と短小な断片状の混在。
48	マツバラシ	胞子体	1.9 程度	∞	細長い糸状
49	オゴノリ	藻体	1.5~2.5	∞	細長い糸状だが、形状や走行の見栄えが独特。

注:「フィブリル長」欄の「∞」は、当該観察画像中で見られるほぼ全てのフィブリル像が視野に収まらず、長さの測定が出来なかったことを意味する。

また、当該の実験結果については、より具体的かつ詳細には、以下に組織種の分類に従って分けて掲示する。まず、各種果肉組織由来 WARP による実験結果から示す。

Ⅲ-2-2vii)の実験・観察をした結果、得られたオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.22 に示す。その画像全体には、ほとんど分岐のない細長い糸状の物体すなわちフィブリルが、あまり偏りなく、多数走行・屈曲・交差する様子が見られ、それらのフィブリル像は、どれも同じような幅と形状であることが視認出来る。同じ画像内において、明瞭に異なる形様の物質の混在は、ほとんど確認されない。

図 3.22 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測から、上記フィブリルの幅は、おおよそ 0.8 nm~2.0 nm の範囲内にあると認められた。このことは、上記の iii)の TEM 観察による計測値と、ほぼ一致する。

次に、試みに、オランダイチゴ果肉を熱水中で約 2 時間煮沸し、濾別・水洗するのみの処理により得られた湿潤な固形物質にⅢ-2-2vii)に示した実験方法を適用した。これにより得られた AFM 観察画像の一例を、図 3.23 に示す。その画像内の様相は図 3.22 とほぼ同様に、高さ計測によるフィブリル幅もほぼ同程度の範囲内にあると認められた。したがって、オランダイチゴ果肉のフィブリル成分は、熱水煮沸処理のみでも、ある程度精製され得る可能性が指摘出来る。

もっとも、図 3.23 の背景には、明らかにフィブリルとは異なる不定形の微粒子の共存が多数認められ、これらは熱水処理では除去しきれなかったヘミセルロースあるいはペクチンの物質塊の細片が検出されたものであると考えられる。

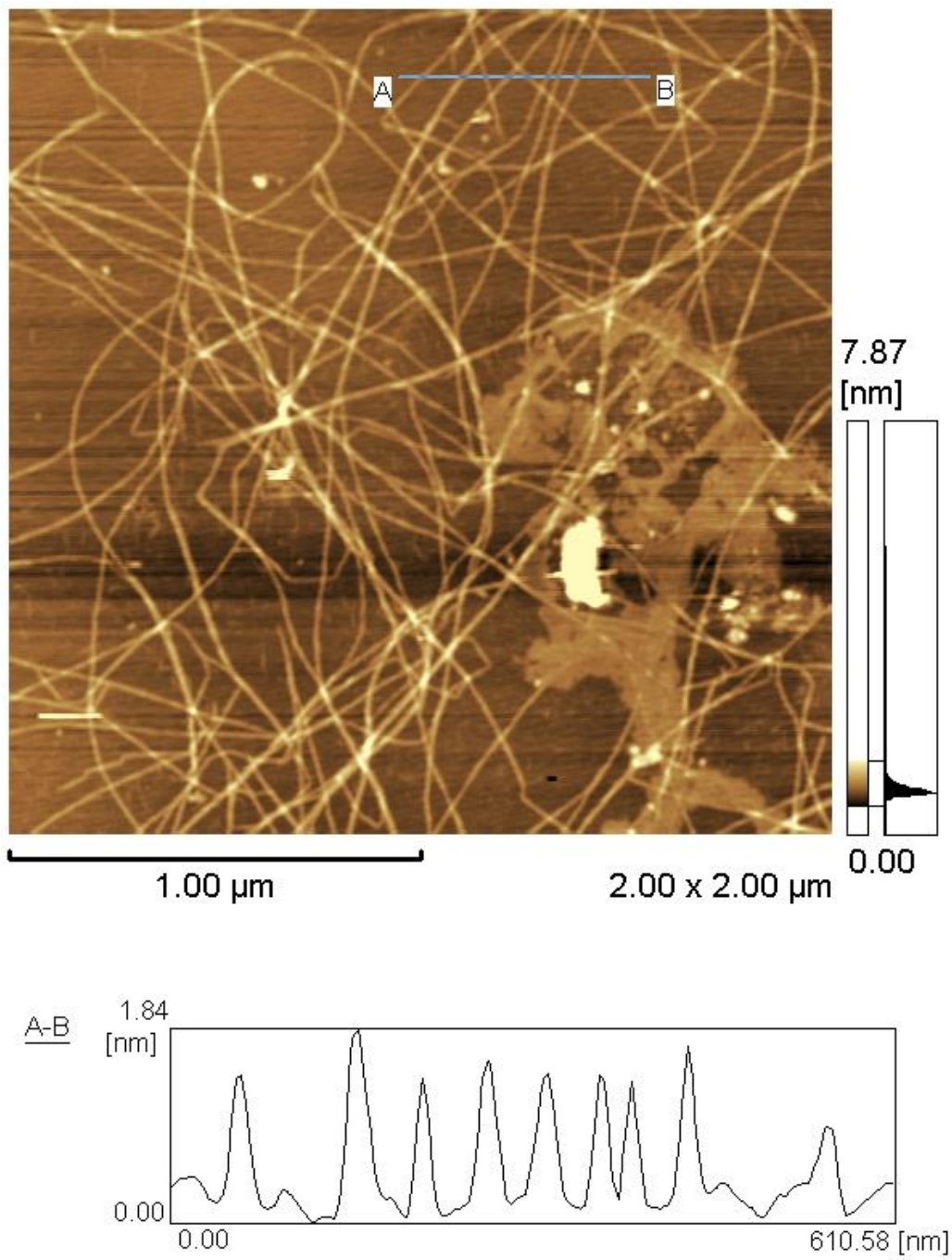


図 3.22 オランダイチゴ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

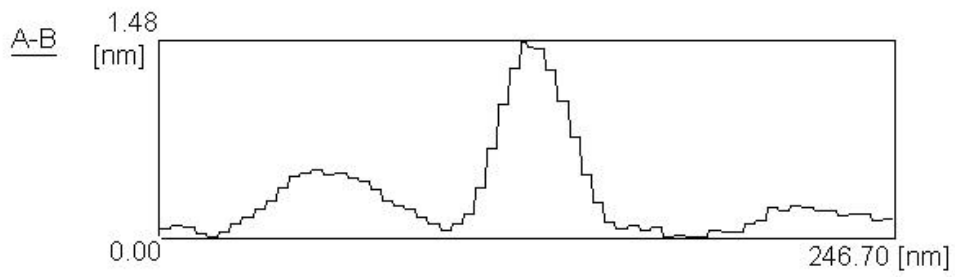
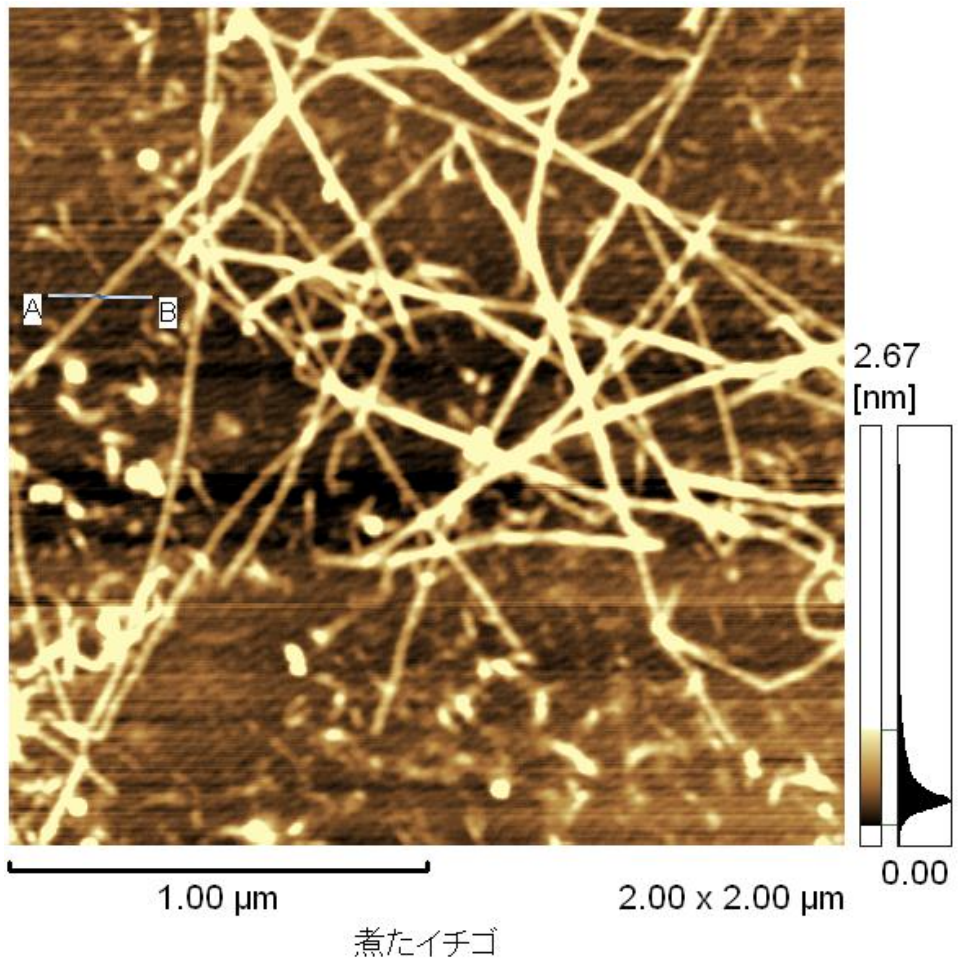


図 3.23 オランダイチゴ果肉の熱水煮沸処理物の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、カキノキ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の例を、図 3.24a および図 3.24b に示す。両観察画像中では、明らかに偏りが認められるものの、それらの様相は全般的に前掲の図 3.22 のオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。すなわち、それらでは、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルのみが、多数走行・屈曲・交差している様子が見られる。

図 3.24a において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、それらのフィブリルの幅は、おおむね 1.0 ~2.0 nm の範囲内であった。

図 3.24a および図 3.24b の両観察画像は、実は同一の観察画像中で、同じひとつのフィブリルの続きと見られるフィブリル像上において、別々の位置で AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した結果である。両観察画像を比較すると、図 3.24a からは、フィブリルの幅として 1.49 nm という数値が与えられ、図 3.24b からは、フィブリルの幅として 1.76 nm という数値が与えられる。従って、そのフィブリル像の一連の続き上では、測定されるフィブリルの幅の数値は、前後ゼロコンマ数ナノメートルの範囲内で変動することが分かった。

次いで、モモ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.25 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。そして、この図において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、検出されたフィブリルの幅は、おおむね 0.9~1.9 nm の範囲内であった。

ところで、図 3.26 の観察画像は、図 3.25 の観察画像を得た同じ WARP 水懸濁液を、ただちに供試することなく、その後 4°C に保った冷蔵庫中で 10 日間静置した後、その後あらためて図 3.25 の場合と同様にして AFM 観察を行った結果である。これと図 3.25 の観察画像中の様相とを比較すると、長さ 0.15 μm 程度、幅およそ 0.9~1.9 nm の範囲内にあると認められる細長い糸が短く切断された断片様の物体が多数に見られる様相に変化している。この際、当該の WARP 水懸濁液は、加熱により滅菌され、フィブリルを化学的に破壊するような成分の混在も考え難いから、当該 WARP 水懸濁液中に含まれるフィブリルは、ただ 10 日程度冷蔵保存した間に、その形状を、およそ細長い糸が分断されたように変化したものと推測される。

よって、果肉組織等から調製した WARP に含有されるフィブリルの形状・形態は、WARP 水懸濁液とした場合、冷蔵保存でも 10 日程度で崩壊する恐れがある。このため、本研究を通じて、実験中、いかなる植物組織材料から WARP 水懸濁液を調製した場合でも、その長期保存は出来るだけ避けることとした。

次に、トマト果汁搾滓由来 WARP による AFM 観察画像の例を、図 3.27 および図 3.38 に示す。この両観察画像も、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似した様相であるが、それらの画像中で確認される細長い糸状のフィブリルは、明らかに上掲のオランダイチゴ果肉組織由来 WARP、カキノキ果肉組織由来 WARP およびモモ果肉組織由来 WARP による場合の 3 例より、太く見られる。

図 3.27 および図 3.28 の両観察画像もまた、実は同一の観察画像中で、異なる別々の位置で AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した結果である。図 3.27 では、1 本の単一のフィブリルと見られる物体上に計測点を設けて計測した場合であり、図 3.28 では、並列する、相互にはほぼ同大に見られる 3 本のフィブリルが次第に接近して、ついに長さ方向で重畳して合一になったように見られる部分上に計測点を設けて計測した場合である。図 3.27 でのフィブリル幅の計測値は、約 2.70 nm であり、これに対して、図 3.28 でのフィブリル幅の計測値は、約 4.95 nm であり、後者の値は前者の値のおおよそ 2 倍である。

そうすると、上記の「1 本の単一のフィブリルと見られる物体」は、前章で言及した、セルロースフィブリルの「基本単位」に当たる可能性が考えられる。だとすれば、AFM 観察画像上のフィブリル像の 1 本に見られる部分でのフィブリル幅の計測値に対して、複数以上のフィブリル像が重畳しているように見られる部分つまり束になっている部分では、フィブリル幅の計測値が約 2 倍になるのであるから、そのような部分上に計測点を設けて計測した場合、自然にひとつに合成された当初そのままのセルロースフィブリルの自然な断面形状を見ることは出来ないと考えられる。

他方、長さ方向に並列する同大幅の 3 本のフィブリルが重畳して合一する場合、I-2 で既に触れたのと同様の理屈で、より表面積を減らすように、各フィブリルの中心が出来るだけ相応の正三角形の頂点に位置するように配列する傾向にあると考えられる。そうすると、この場合、3 本のフィブリルが重畳して合一した束の横断面の幅は、それを構成する元の各フィブリルの幅の 2 倍程度と計算され、上記の「おおよそ 2 倍」という数値と合致する。

このような事情を考慮して、図 3.27 について、複数のフィブリルが明らかに重畳して見られる部分を計測対象から除外した上で、AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した。その結果、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 3.0 nm ~4.0 nm の範囲内であった。したがって、以下、各種植物組織より調製した WARP を実験対象として、その AFM 観察画像について、AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施する場合、実態の把握という研究趣旨に反しない範囲で、複数のフィブリルが明らかに重畳して見られる部分は、任意裁量的に計測対象から除外する取り扱いをすることとした。

次に、ランブータン果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.29 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。すなわち、ほぼ同様の細長い糸状のフィブリルのみが多数走行・屈曲・交差している様子が見られる。そして、図 3.29 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5 ~2.5 nm の範囲内であった。

次に、バナナ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.30 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。そして、図 3.30 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、

そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.2 ~2.8 nm の範囲内であった。

次に、ツルレイシ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.31 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。ただし、同画像中の下半部で、数本の比較的太く見える糸状のフィブリルの走行が認められる。これらは、明らかに、同画像中の他の範囲で単一に見られるフィブリルが複数重畳している部分であるように見られる。

そして、図 3.31 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、上記のフィブリルが複数重畳していると見られる部分を除いて、おおむね 0.8 nm~2.0 nm の範囲内であった。

次に、青果用ベル群シトウガラシ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.32 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。ただし、同画像中の全体にわたって、糸状のフィブリルは比較的太く見られるものから、それよりずっと細かいものまで、様々な幅のものが認められる。

なかでも、比較的太く見られる各フィブリルは、しばしば途中で、複数以上の、より細かいフィブリルに分岐しているように見られる。したがって、比較的太く見られる糸状のフィブリルは、最も細かい程度に見られる糸状のフィブリルが複数重畳している可能性が考えられる。

そして、図 3.32 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、上記のフィブリルが複数重畳していると見られる部分を除いて、おおむね 1.5 ~2.5 nm の範囲内であった。

次に、ニホンナシ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.33 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と似ている。ただし、同画像中では、比較的太く見られる糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する合間に、それよりもずっと細かく見られる糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する状況が混在して認められる。それらの比較的太く見られるものと、ずっと細かく見られるものとは、明瞭に 2 型に区別して視認出来、両者の中間的幅のフィブリル像は全く見当たらない。

もともと、比較的太く見られるものと、ずっと細かく見られるものとは、相互にところどころで絡んでいるようにも見られる。それゆえ、太く見られる各フィブリルは、それらよりもずっと細かく見られるフィブリルが複数以上重畳して形成された可能性が考えられるが、図 3.33 上では、その実態はあまり判然としない。

そして、図 3.33 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、比較的太く見られる方のフィブリルについてはおおむね 2.0 nm~3.0 nm の範囲内であった。他方、ずっと細かく見られる方のフィブリル像の幅は、およそ 0.5 nm~1.0 nm の範囲内であった。

次に、スイカ果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.34 に示す。この観察画像中の様相は、これまでに見て来た図 3.22～図 3.33 までの場合と相当異なる。ここでは、各特徴的な形状の、相互に異なる 2 型のフィブリルと認められる物体が、それぞれ散在しているのが視認出来る。

すなわち、ある程度の長さがある、ほとんど分岐のない真直ぐな線状のフィブリルが散見されるのに加えて、その線状のフィブリルより、ずっと短小で、しばしば屈曲を呈する楔形のフィブリルと、その凝集物とみられる不定形の塊が多数共在しているのが認められる。そして、楔形の短小なフィブリルの方は、その多くが、その端部に向かって細くなっている傾向がはっきりと分かる。

図 3.34 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、線状のフィブリルの方は、ほぼ 3.0 nm 程度であった。そして、より短小で楔形のフィブリルの方は、おおよそ 0.5 nm～1.5 nm の範囲内であった。

なお、図 3.34 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、線状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 0.68 μm 以上となると認められた。また、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおよそ 0.022 μm ～0.44 μm の範囲内であった。

既に触れたように、AFM 装置の付属機能による断面形状測定では水平方向の計測はあてにならないから、全般的に AFM 観察画像上で視認出来る形状にいかほどの信頼性があるか、相当割り引いて考える必要がある。しかしながら、AFM 観察画像上、いかなる方向においてもおおよその形状が把握されることもまた確かである。それゆえ、少なくとも、細長い糸状の形のフィブリルに加えて、短小な楔形の形状のフィブリルが実存することは、間違いなく認められて良いと考えられる。

次に、トウガン果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.35 に示す。この観察画像中の様相は、全般的に、前掲の図 3.34 のスイカ果肉組織由来 WARP による場合と類似している。すなわち、ある程度の長さがある、ほとんど分岐のない真直ぐな線状のフィブリルが散見されるのに加えて、それらの合間に、それらの線状のフィブリルより、ずっと短小で屈曲を呈する楔形のフィブリルが多数混在しているのが認められる。

図 3.35 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、線状のフィブリルの方では、おおよそ 1.5 nm～2.5 nm の範囲内であった。他方、楔形のフィブリルの方は、幅おおよそ 0.5 nm～1.5 nm の範囲内であった。

なお、図 3.35 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、線状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 0.68 μm 以上となると認められた。他方、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおよそ 0.011 μm ～0.38 μm の範囲内であった。

次に、アールスメロン果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.36 に示す。この観察画像中の様相は、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場

合と似ており、その画像全体に、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ均質で多数走行・屈曲・交差する様子が見られる。けれども、それだけでなく、細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する合間に、短小な断片状に見えるフィブリルが、様々な長さあるいは太さで多数混在して見て取れる状況が特徴的である。細長い糸状のフィブリルは、いずれも明らかに比較的太く見られ、短小な断片状に見えるフィブリルの方は、細長い糸状のフィブリルに比べて、明瞭に細く小さく見られる。

図 3.36 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルで、おおむね $1.2 \text{ nm} \sim 3.2 \text{ nm}$ の範囲内であった。他方、短小な断片状のフィブリルの方については、幅およそ $0.5 \text{ nm} \sim 1.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。

なお、図 3.36 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、線状のフィブリルの方は、長さが少なくともおよそ $1.3 \mu\text{m}$ 以上となると認められた。他方、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおむね $0.011 \mu\text{m} \sim 0.20 \mu\text{m}$ の範囲内であった。

次に、**巨峰種ブドウ**果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.37 に示す。この観察画像中の様相は、前掲の図 3.36 のアールスメロン果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。すなわち、その画像全体に、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ均質に多数走行・屈曲・交差する様子が見られる。そして、それだけでなく、細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する合間に、短小な断片状に見えるフィブリルが、様々な長さあるいは太さで多数混在しているのが見られる。細長い糸状のフィブリルの方は、いずれも明らかに比較的太く見られ、短小な断片状に見えるフィブリルの方は、細長い糸状のフィブリルに比べて、明瞭に細く小さく見られる。

図 3.37 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルで、おおむね $1.5 \text{ nm} \sim 2.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。他方、短小な断片状のフィブリルの方については、幅およそ $0.5 \text{ nm} \sim 1.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。

なお、図 3.37 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、線状のフィブリルの方は、長さが少なくともおよそ $1.3 \mu\text{m}$ 以上となると認められた。他方、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおむね $0.011 \mu\text{m} \sim 0.20 \mu\text{m}$ の範囲内であった。

次に、**ホウライショウ**果肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.38 に示す。この観察画像中の様相は、図 3.34 のスイカ果肉由来 WARP による場合および図 3.36 のアールスメロン果肉由来 WARP による場合に比べても、さらに特徴的で相当異なっている。

すなわち、その画像中では、フィブリルに相当すると考えられる、多数の短小な楔形の物体の存在が認められる。そして、その大多数の楔形の物体は、それぞれ先端で相互に隣

接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成しているように見られる。それら個々の楔形の物体が、ひとつひとつのフィブリルに当たるのか、ひとつのフィブリルの部分に当たるのかは、現段階では判断出来ない。

上記の個々の楔形の物体の形は、外形的には、図 3.26 のモモ果肉組織由来 WARP 水懸濁液を、調製後 4℃に保った冷蔵庫中で 10 日間静置してから AFM で観察した場合に見られた、糸断片様の物体の形と酷似する。しかしながら、図 3.38 は、ホウライシヨウ果肉から調製した水懸濁液を即時的に AFM で観察したものであり、二次的に変化したものではない。

図 3.38 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 1.0 nm~2.5 nm の範囲内にあった。なお、図 3.38 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、上記の連結が明瞭な部分は除いて、楔形の物体の長さは、おおよそ 0.056 μ m~0.40 μ m の範囲内であった。

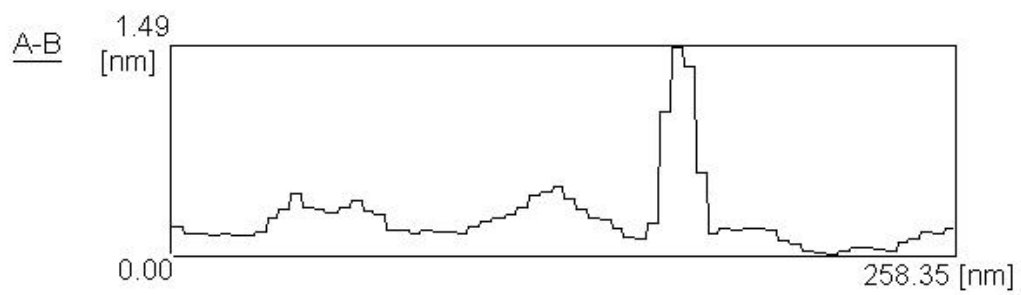
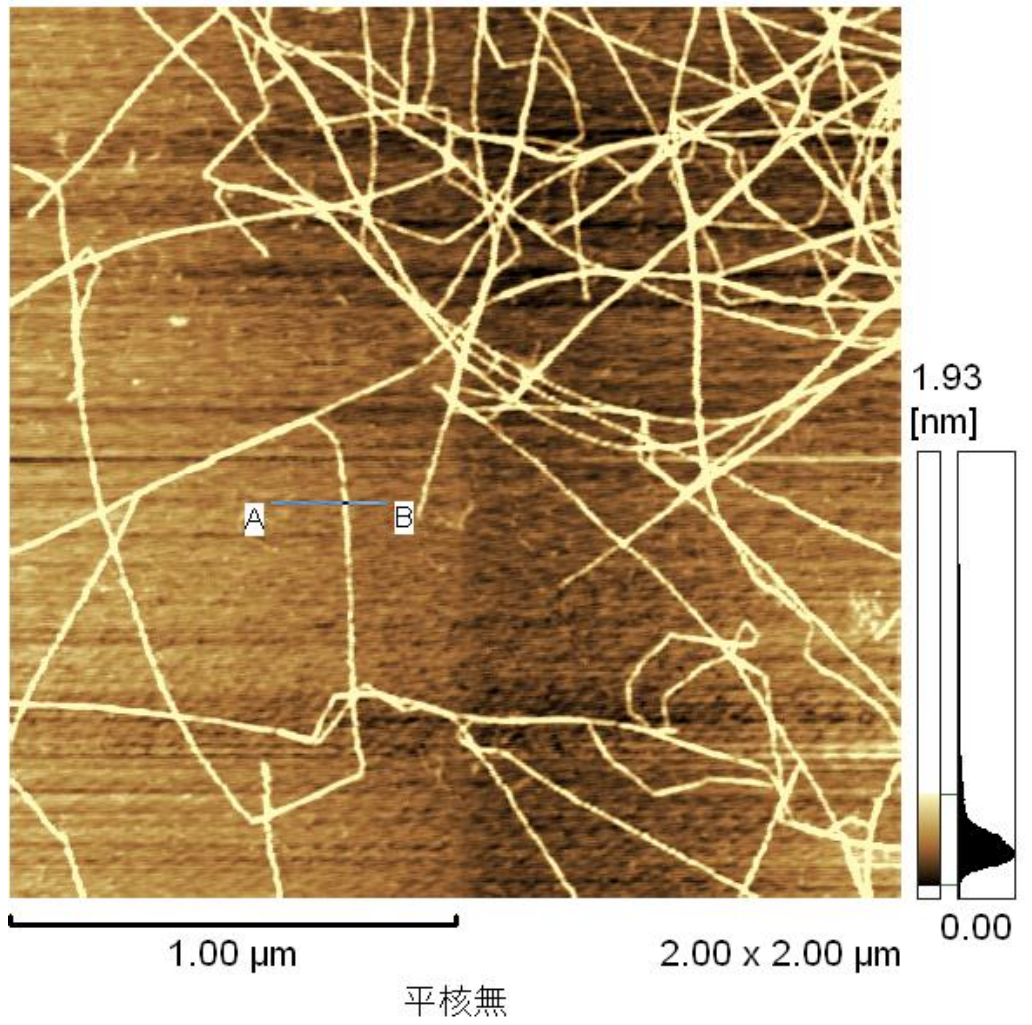


図 3.24a カキ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) イ.

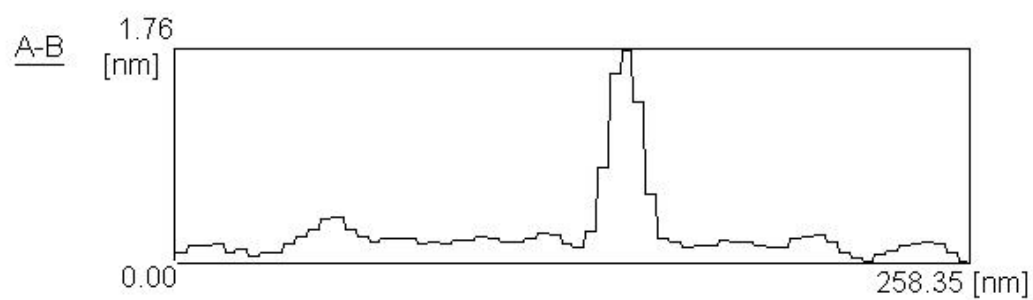
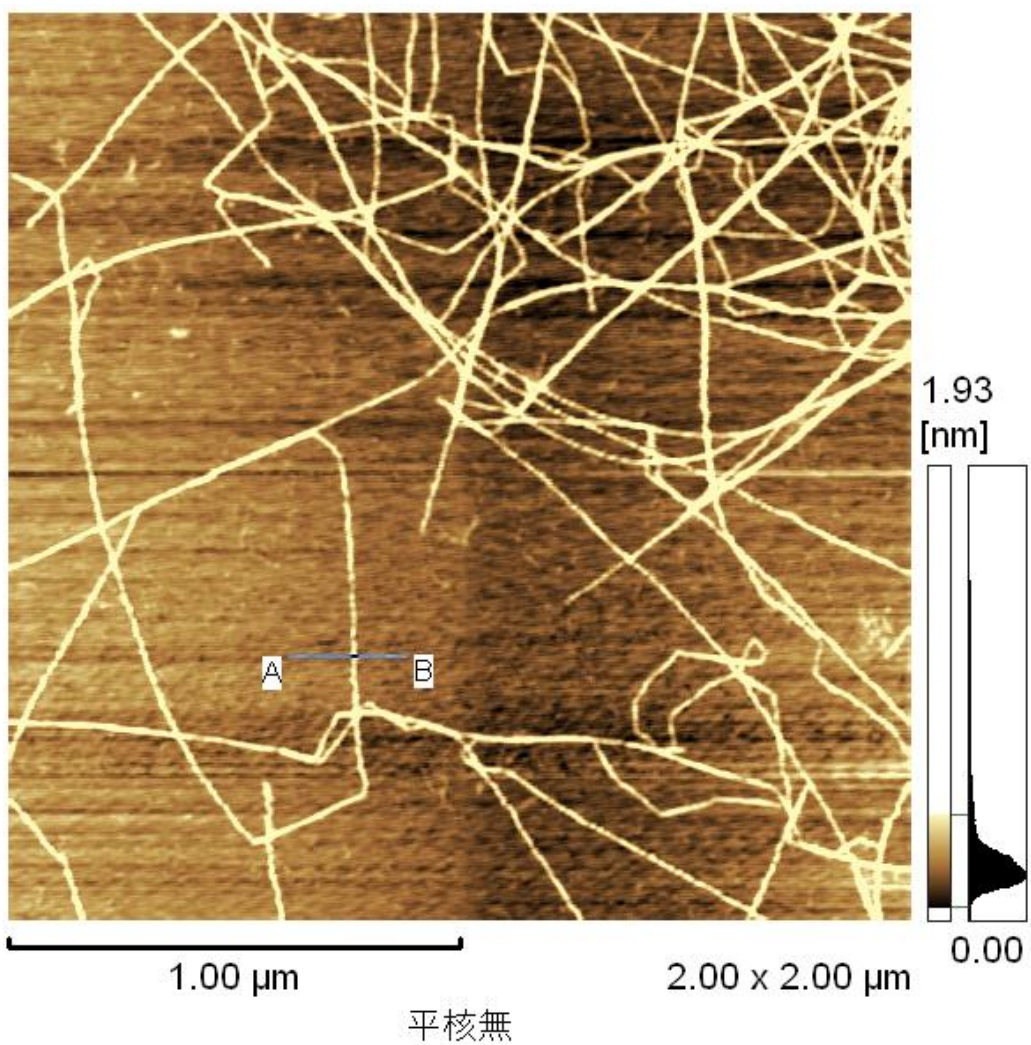


図 3.24b カキ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) ロ.

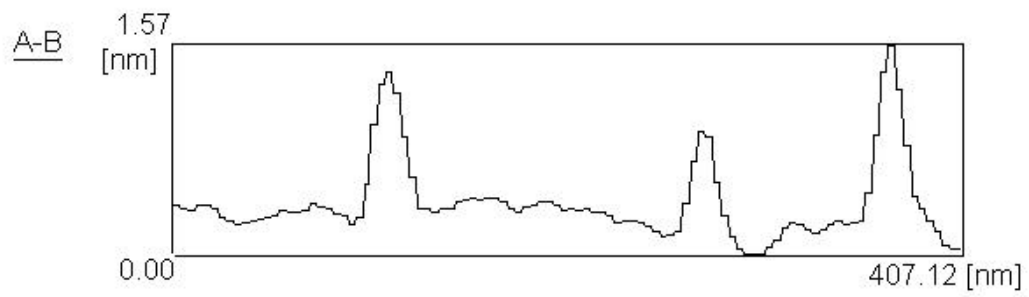
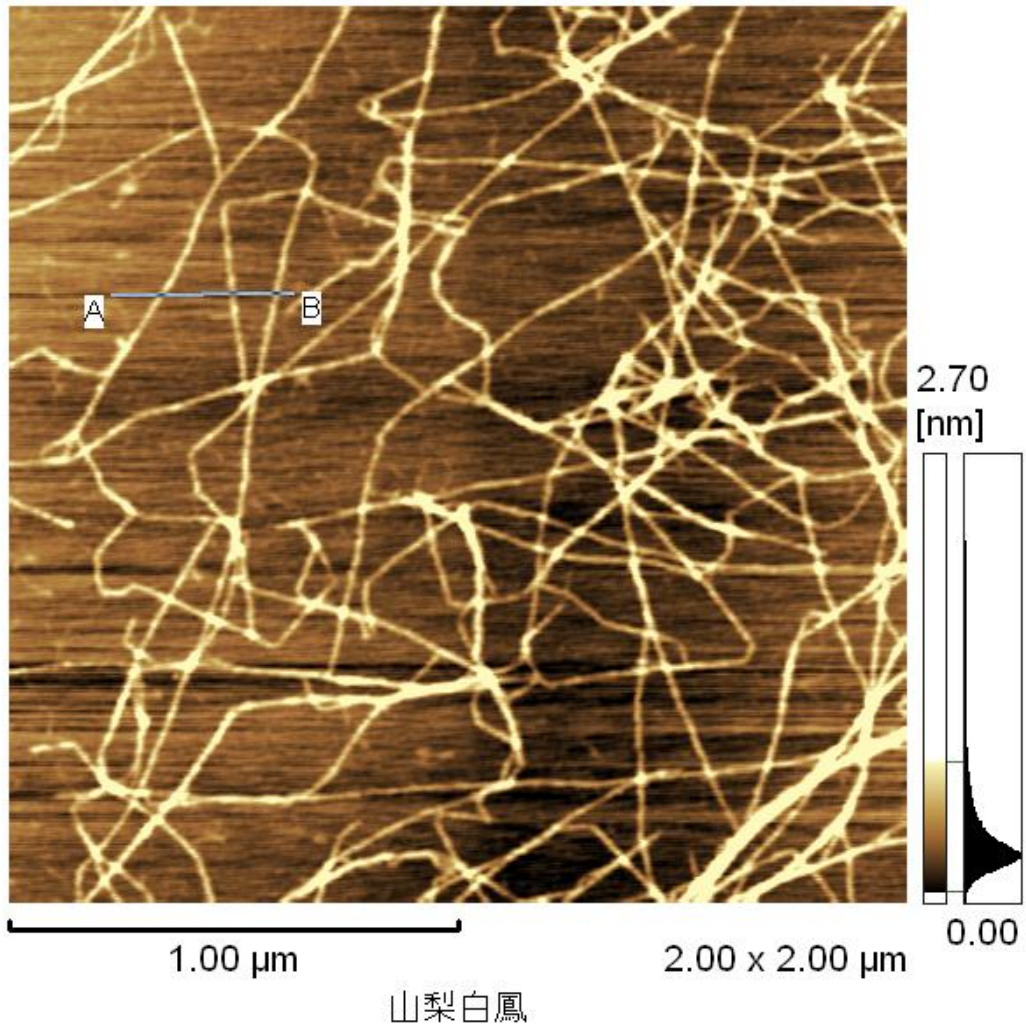


図 3.25 モモ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) イ.

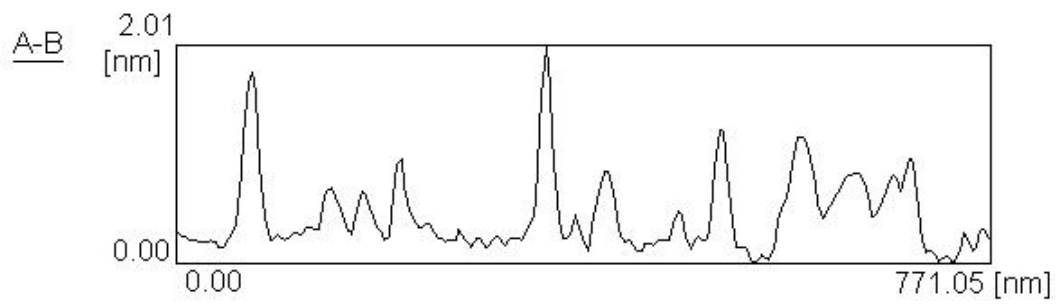
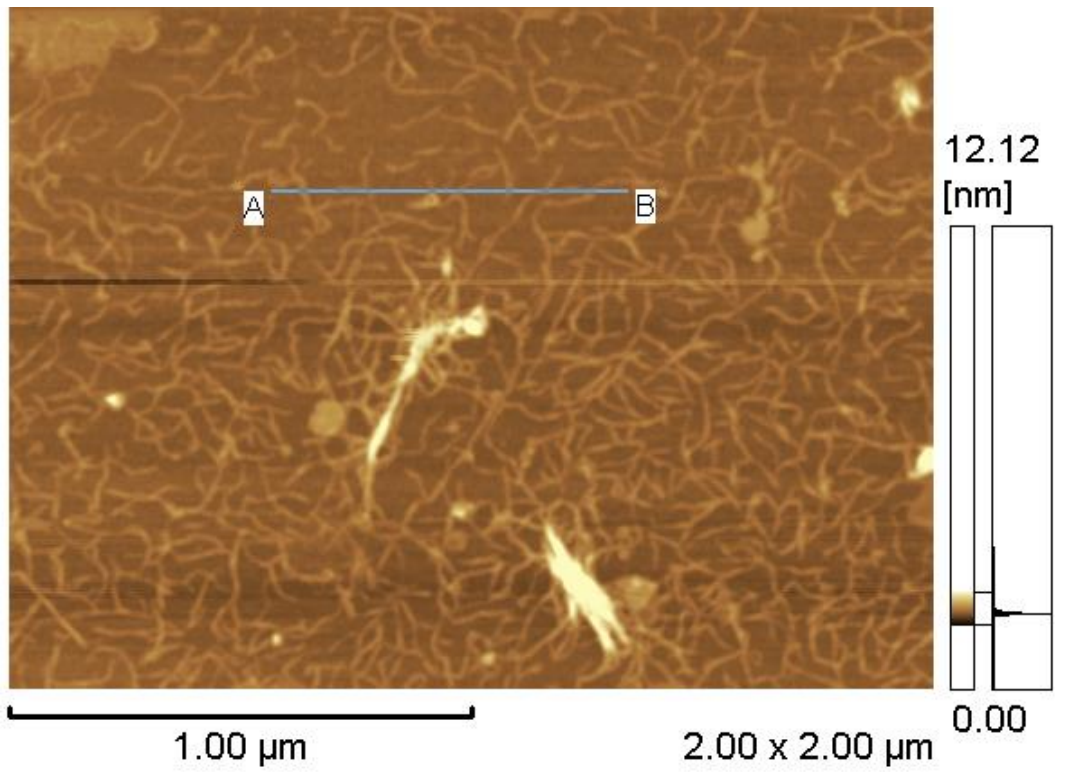


図 3.26 モモ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) ロ.
 (WARP 水懸濁液を調製してから 10 日間冷蔵保存した後、AFM で観察した場合)

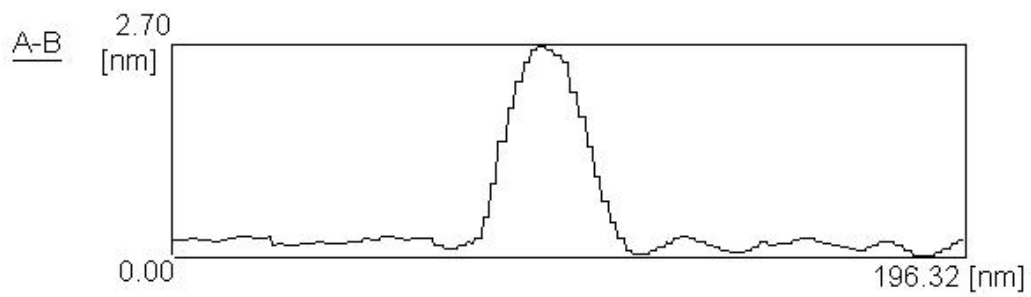
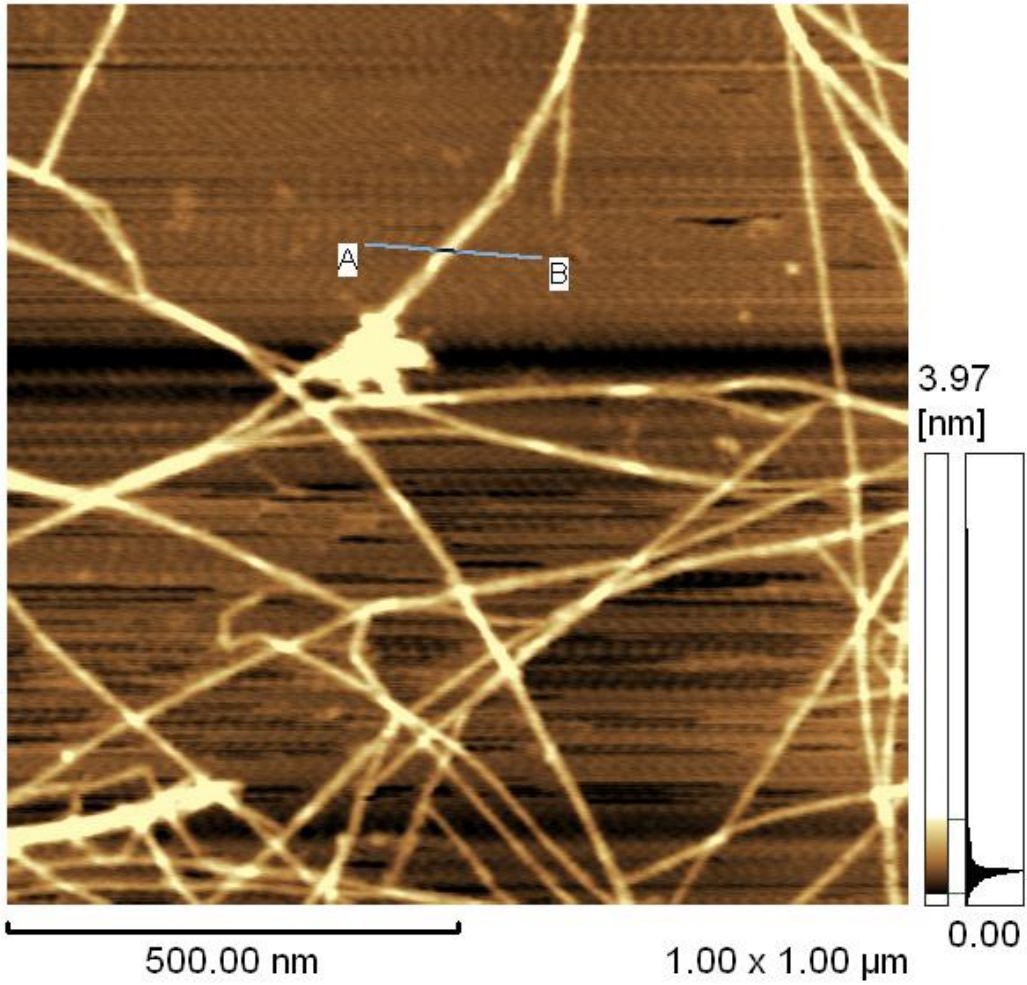


図 3.27 トマト果汁搾滓由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) イ.

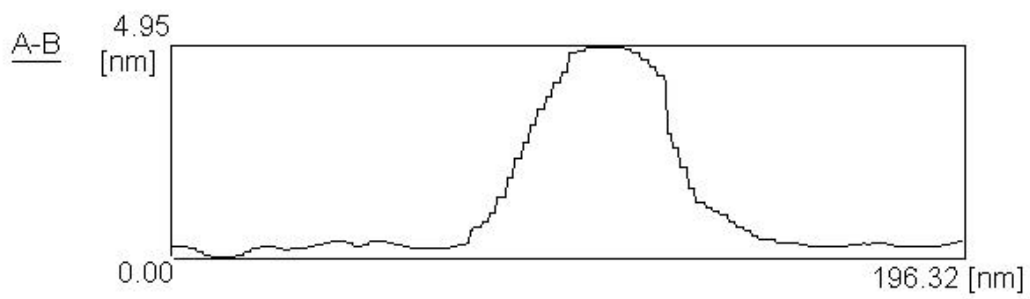
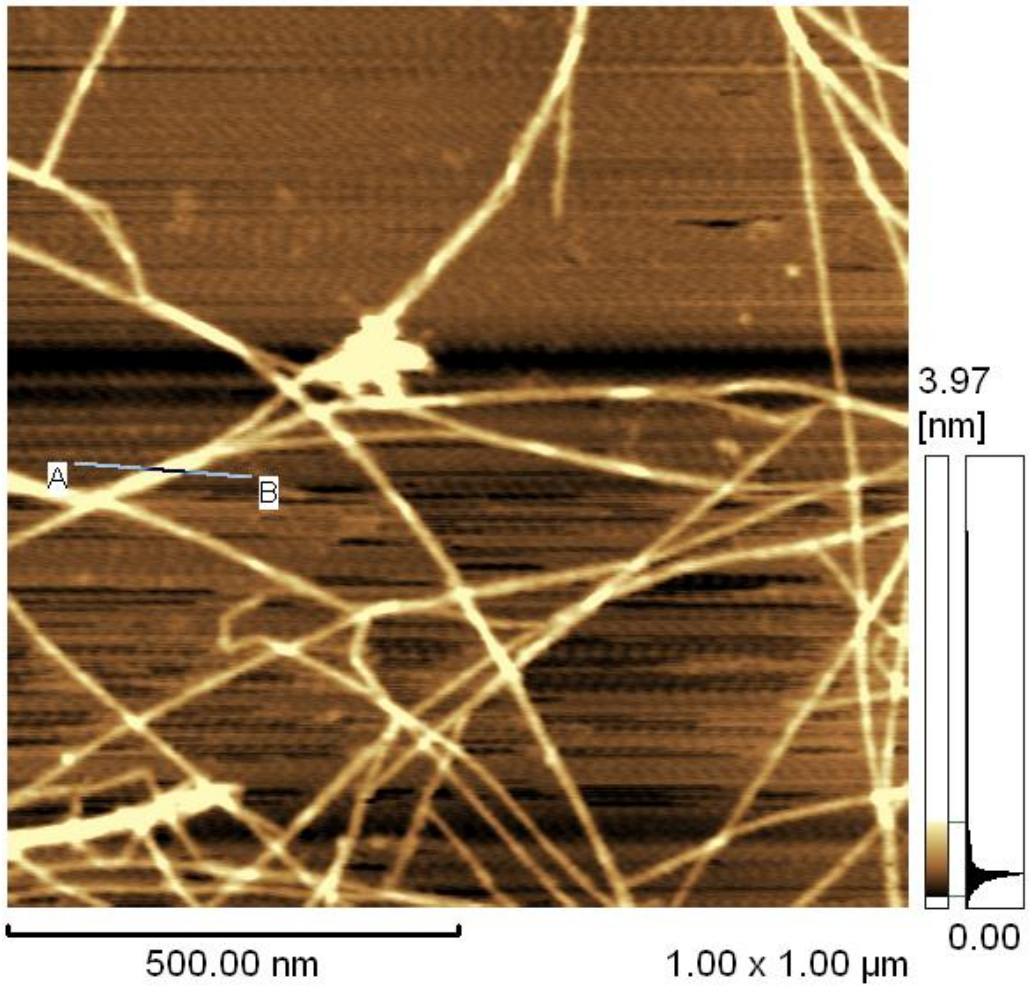


図 3.28 トマト果汁搾滓由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード) ロ.

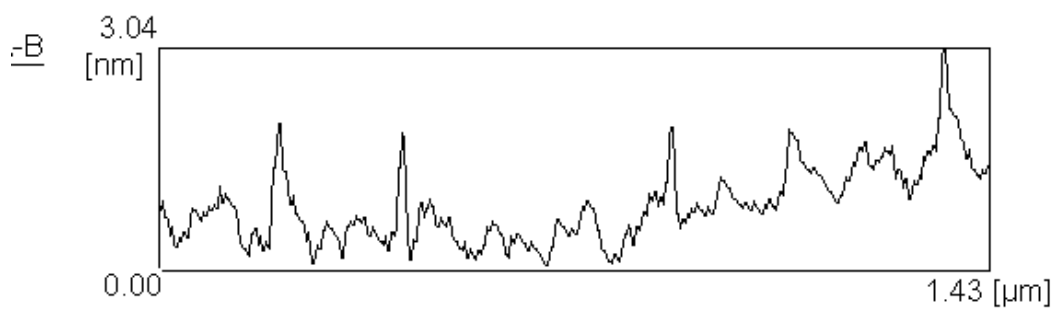
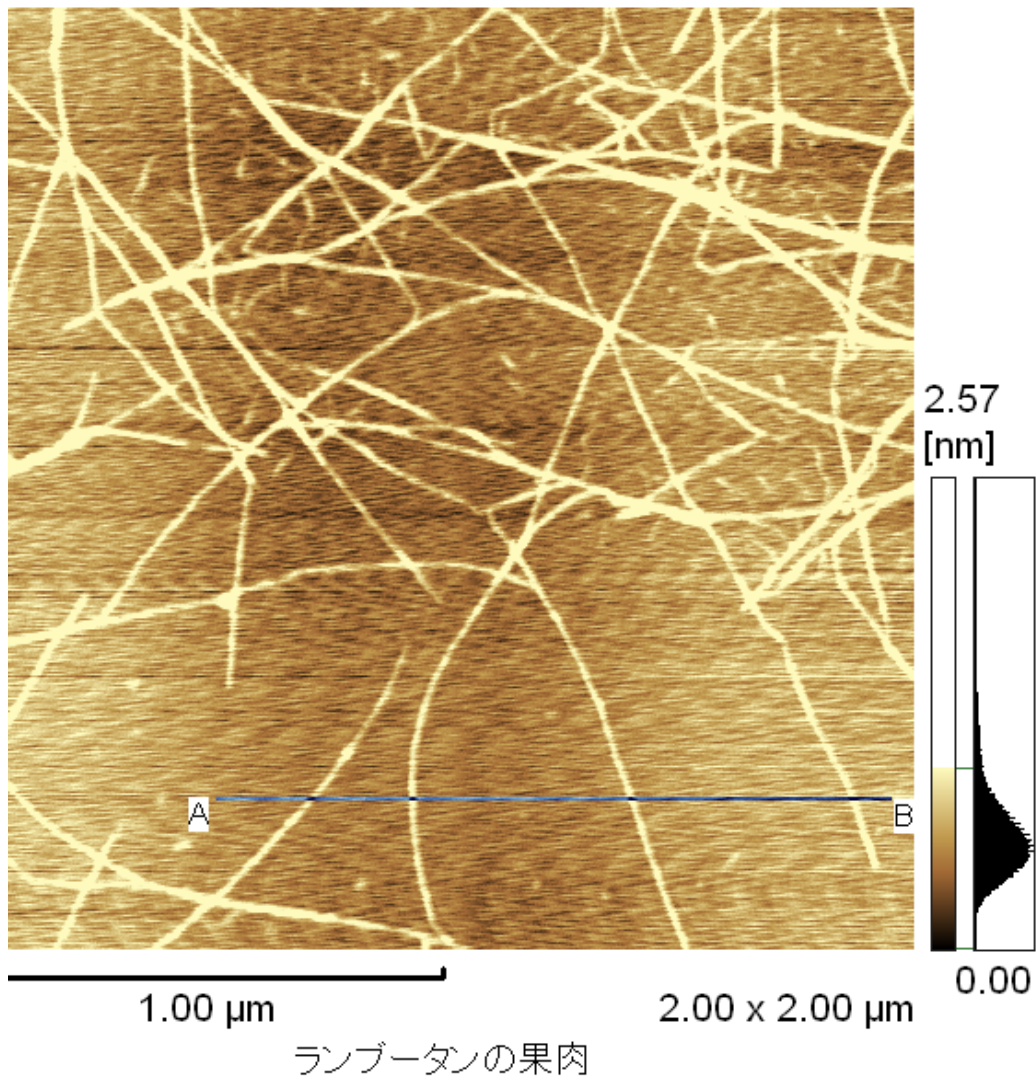


図 3.29 ランブータン果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

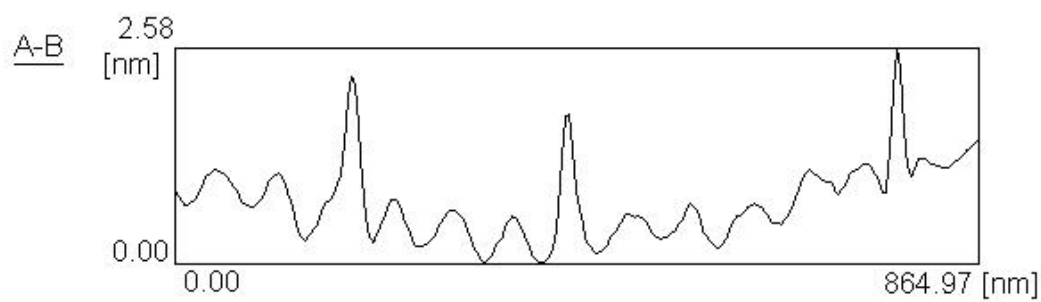
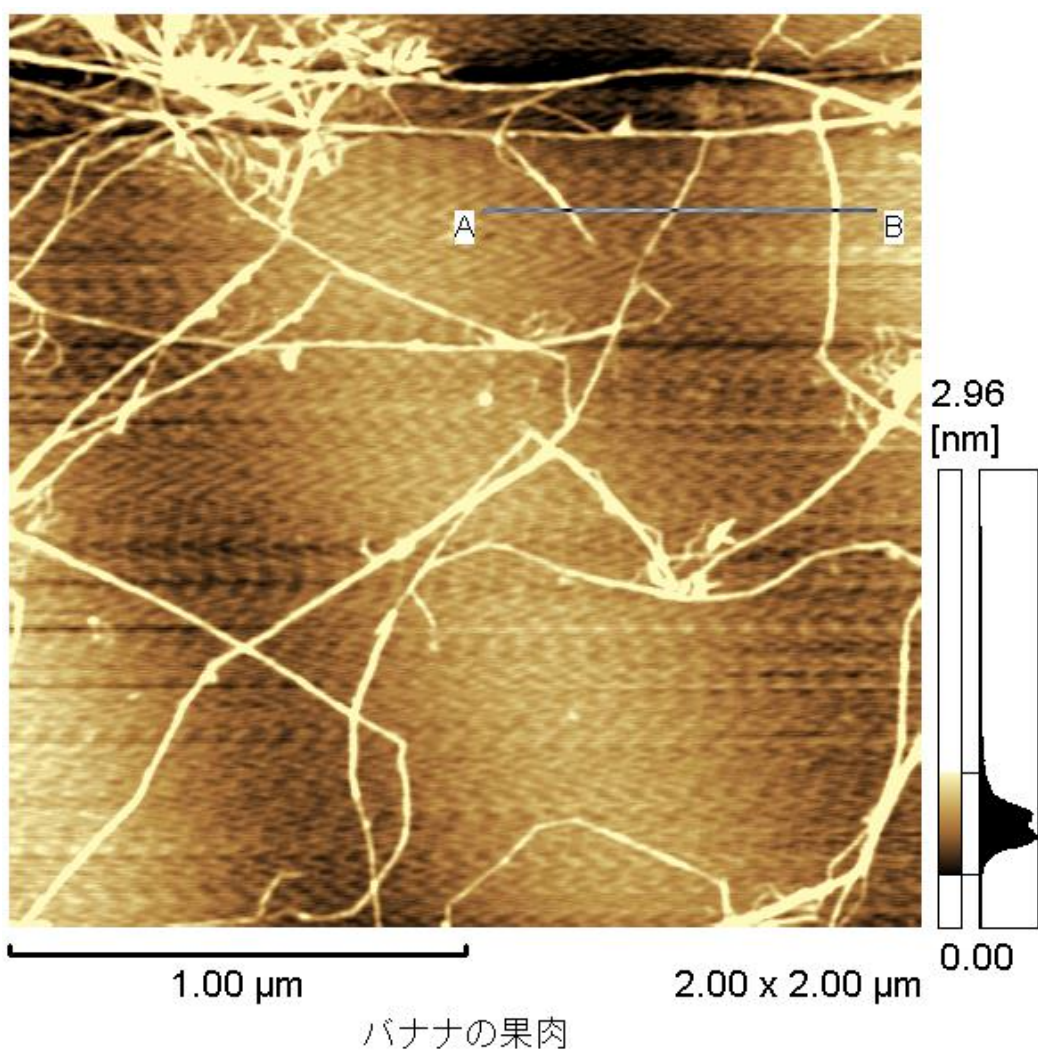


図 3.30 バナナ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

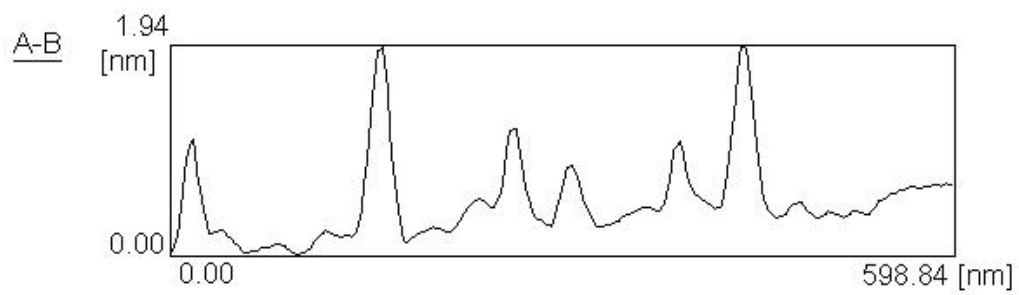
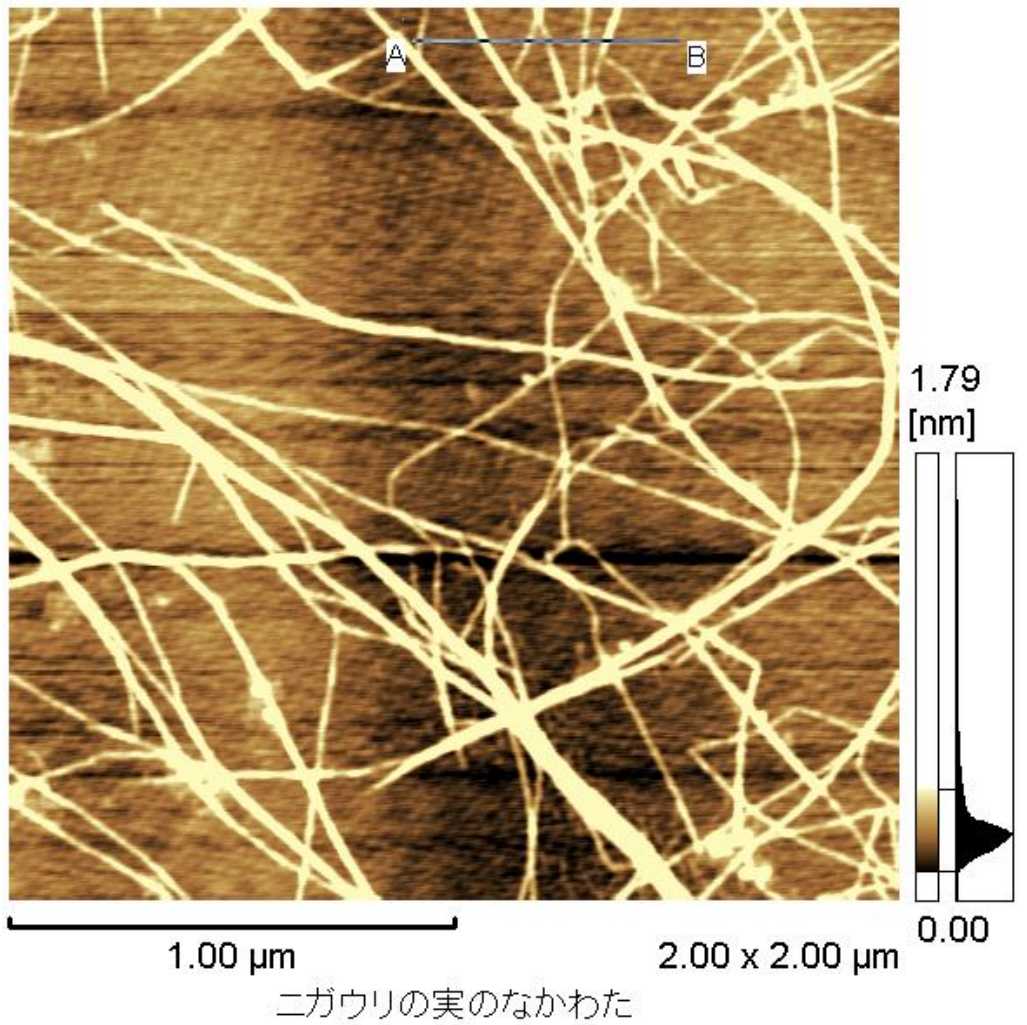


図 3.31 ツルレイシ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

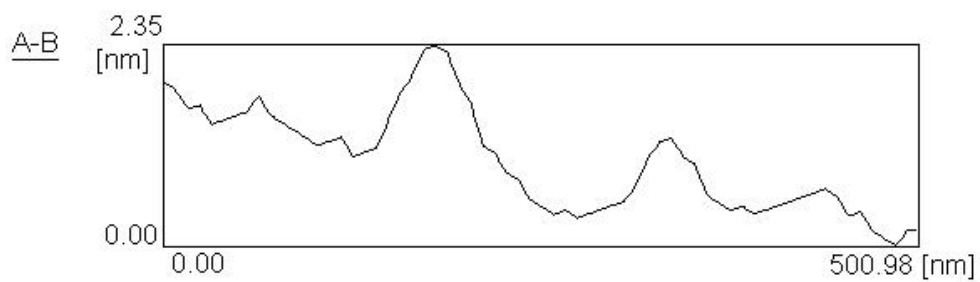
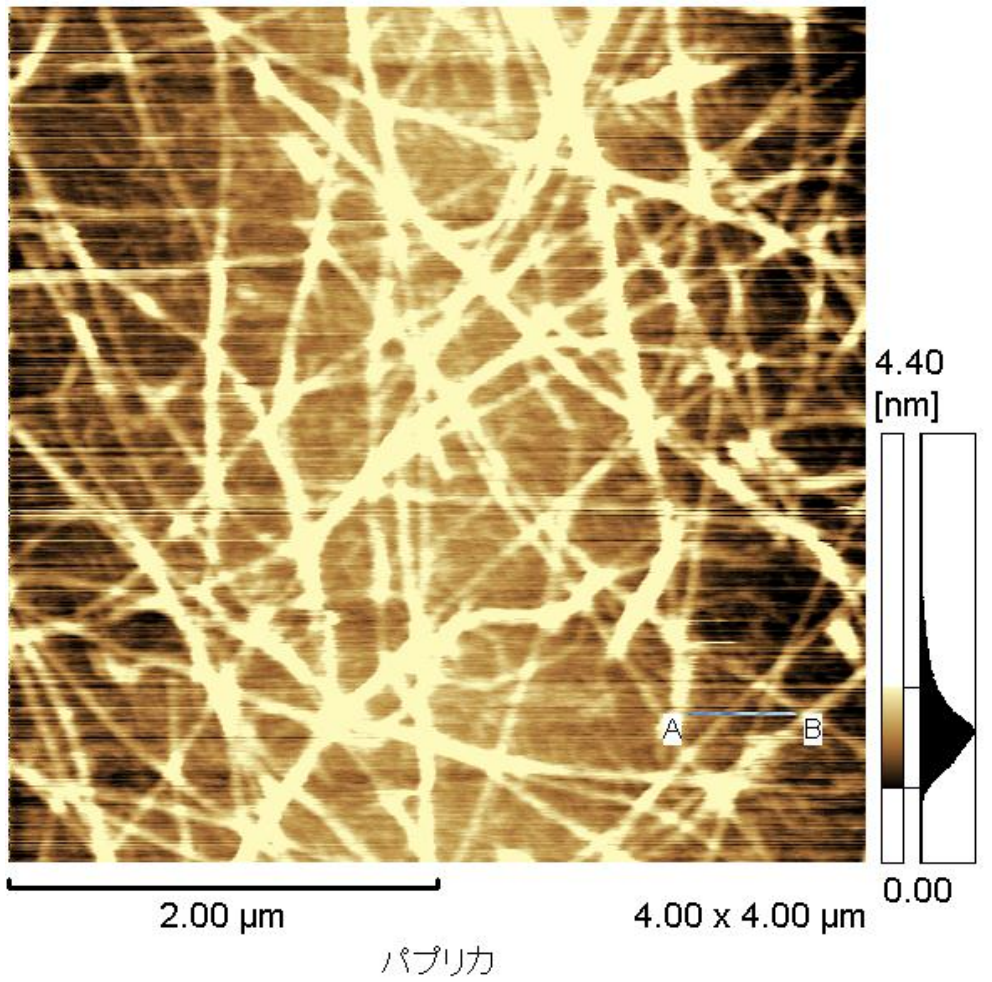


図 3.32 青果用ベル群シトウガラシ果肉 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

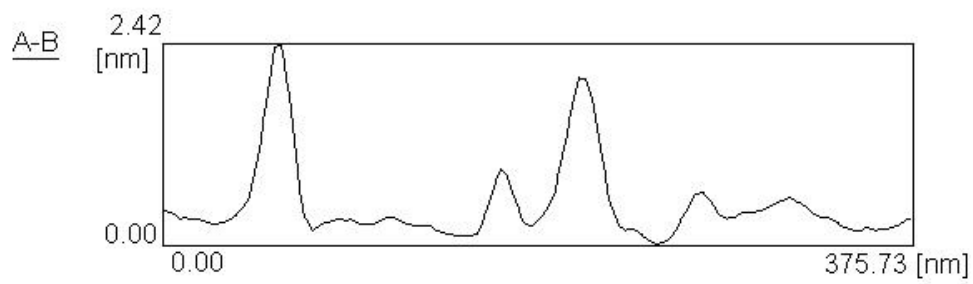
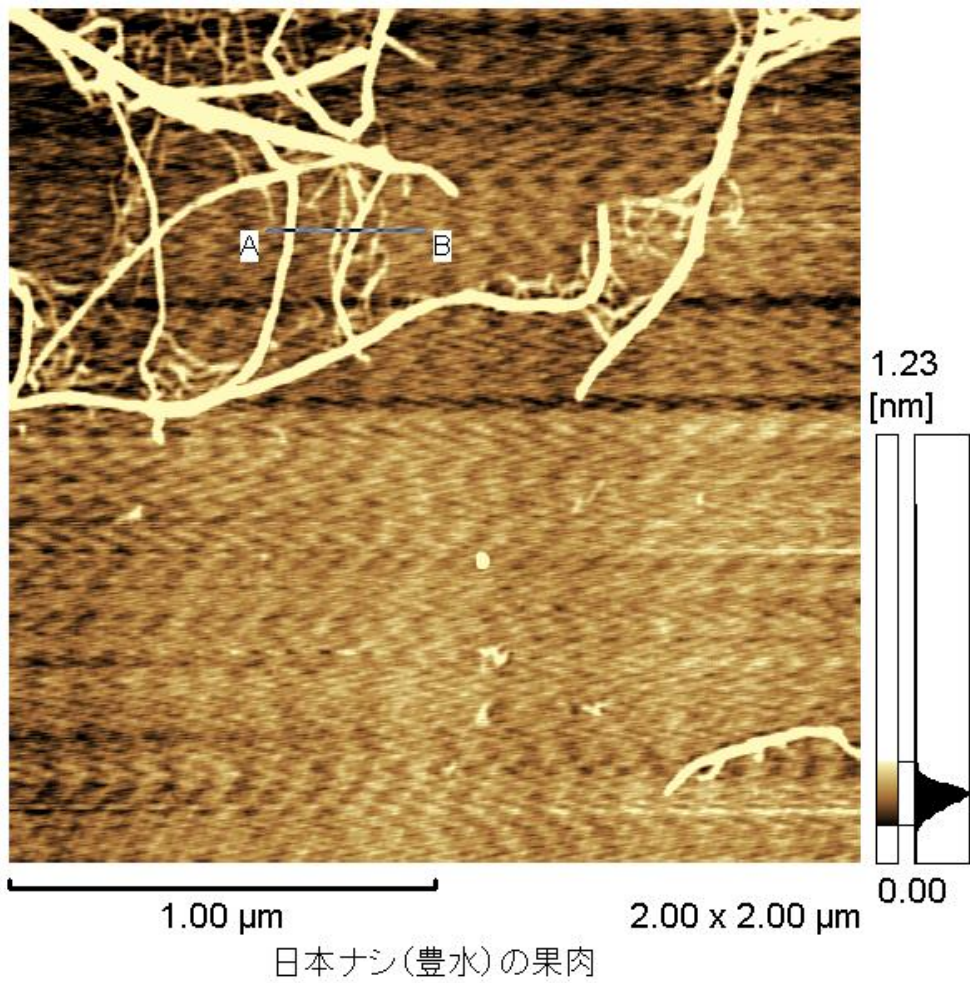


図 3.33 ニホンナシ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

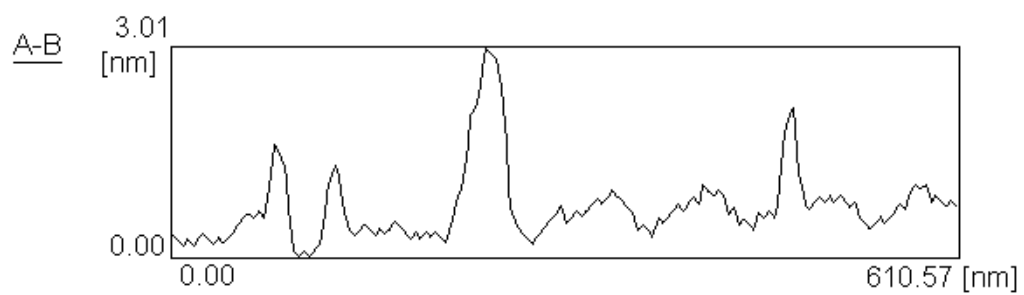
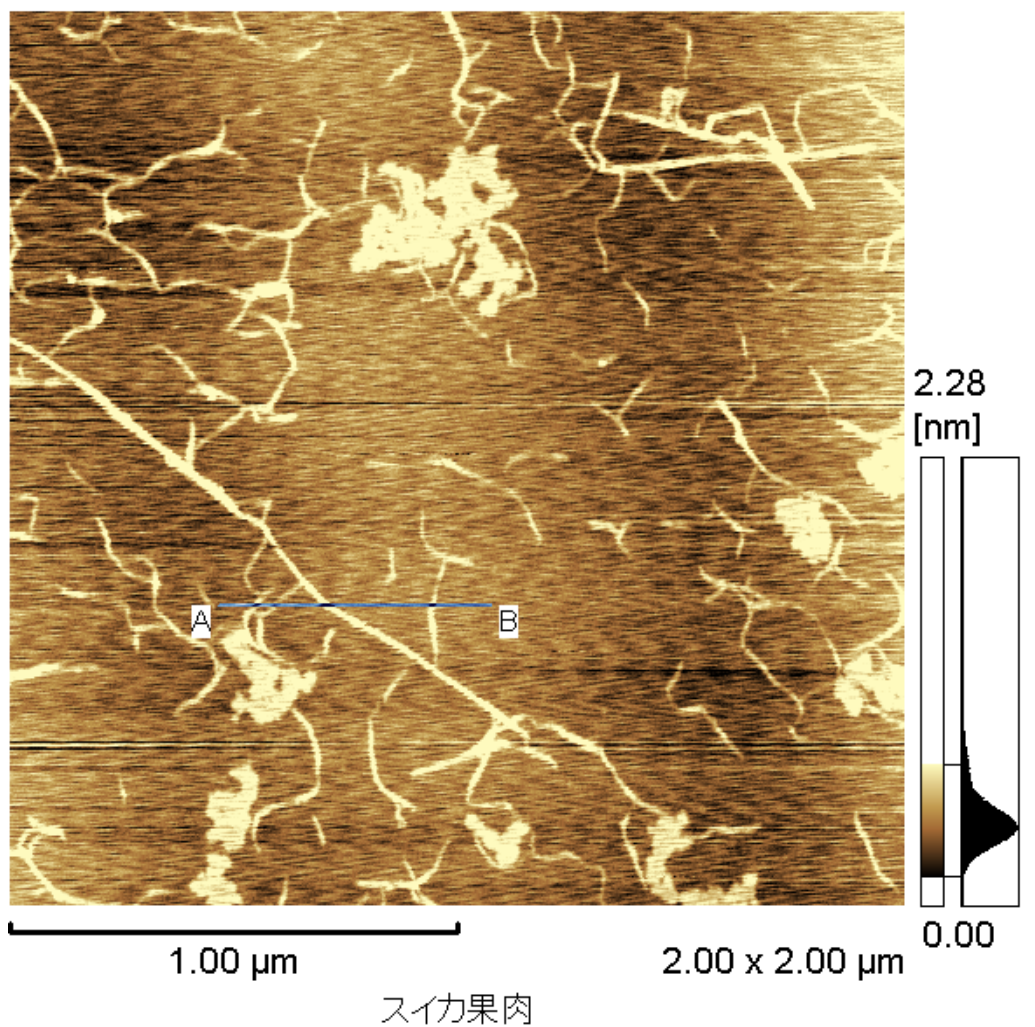


図 3.34 スイカ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

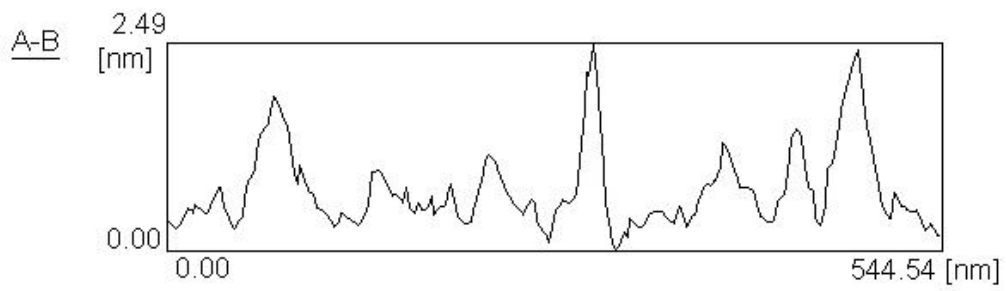
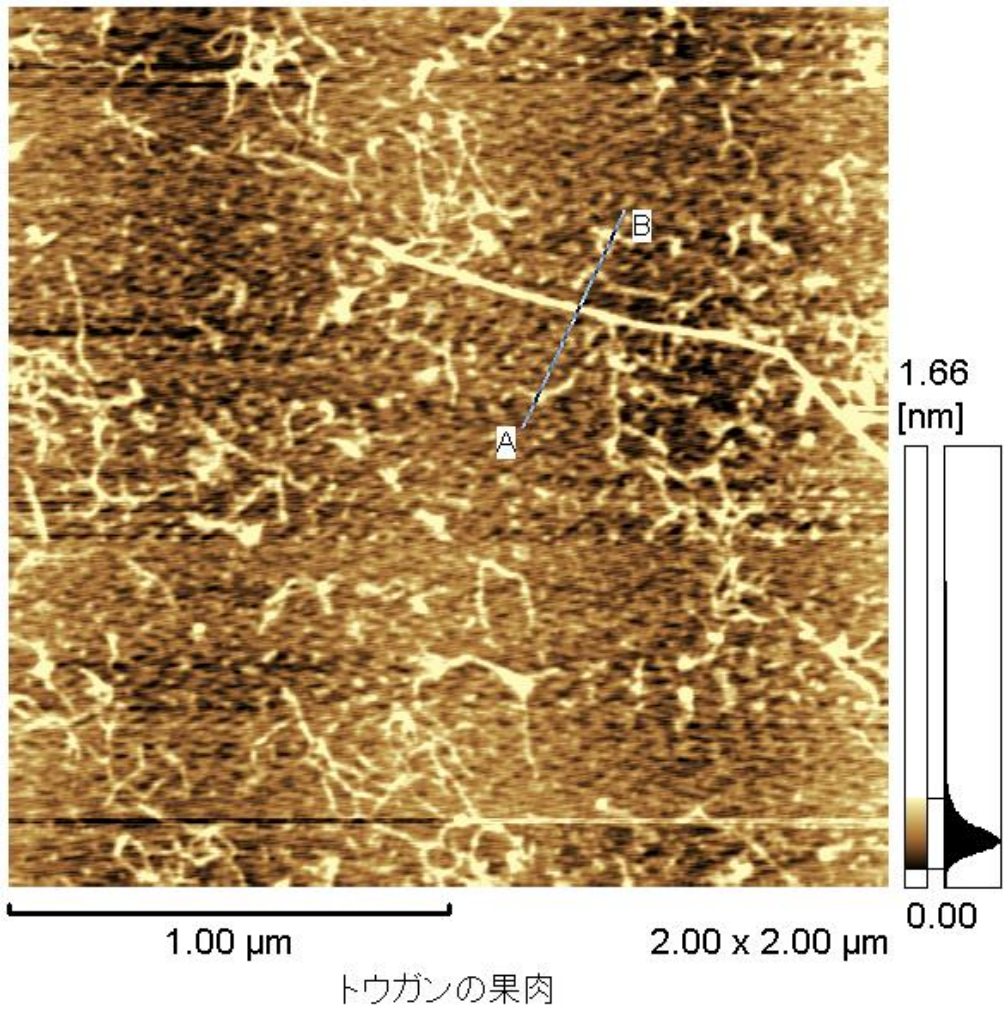


図 3.35 トウガン果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

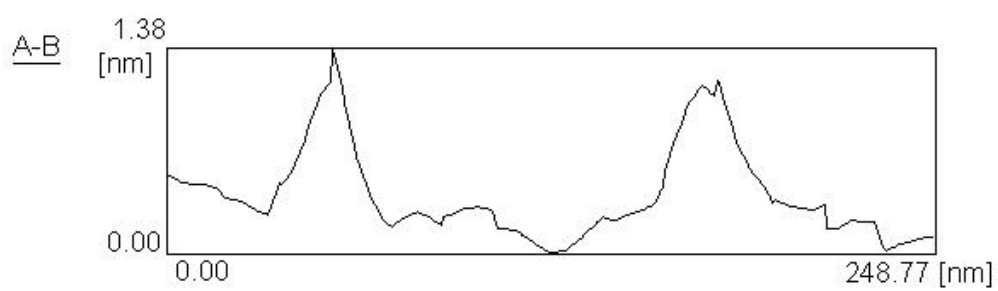
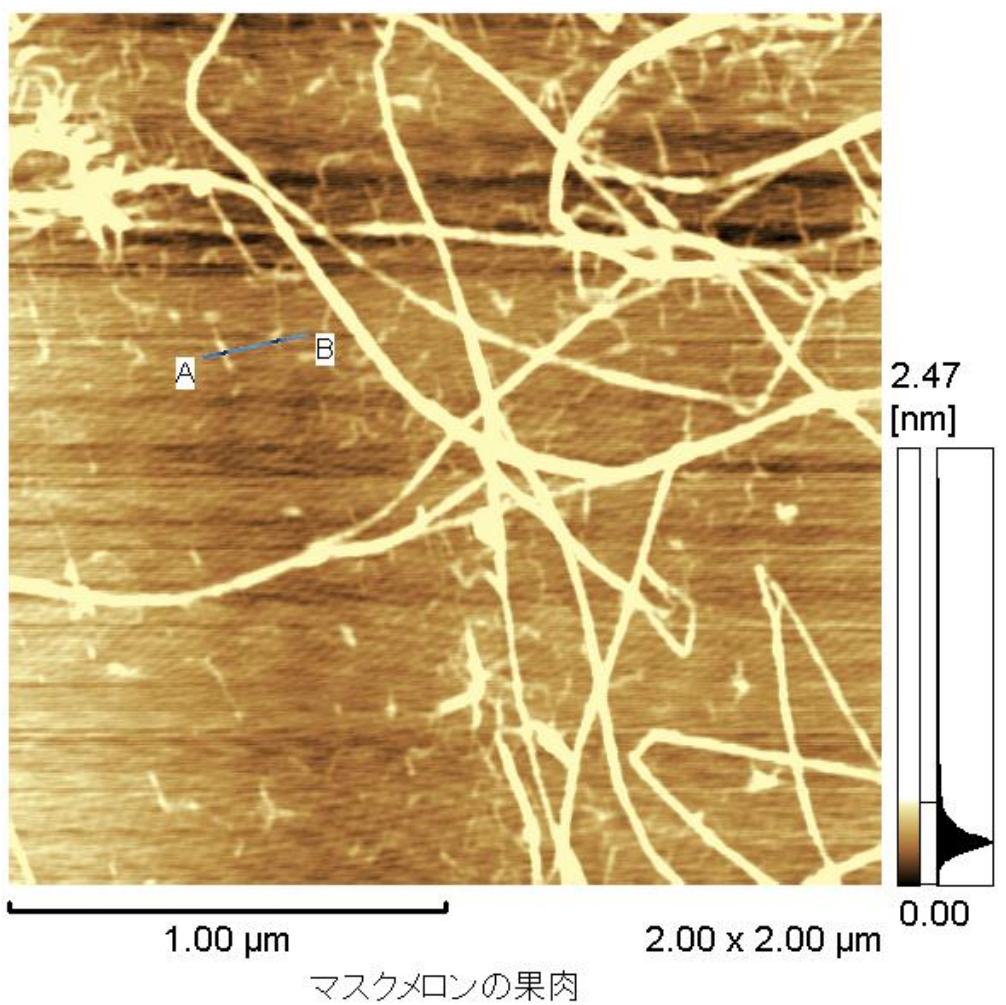


図 3.36 アールスメロン果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

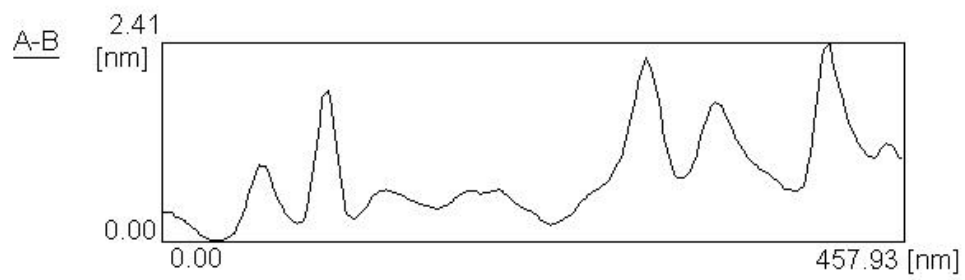
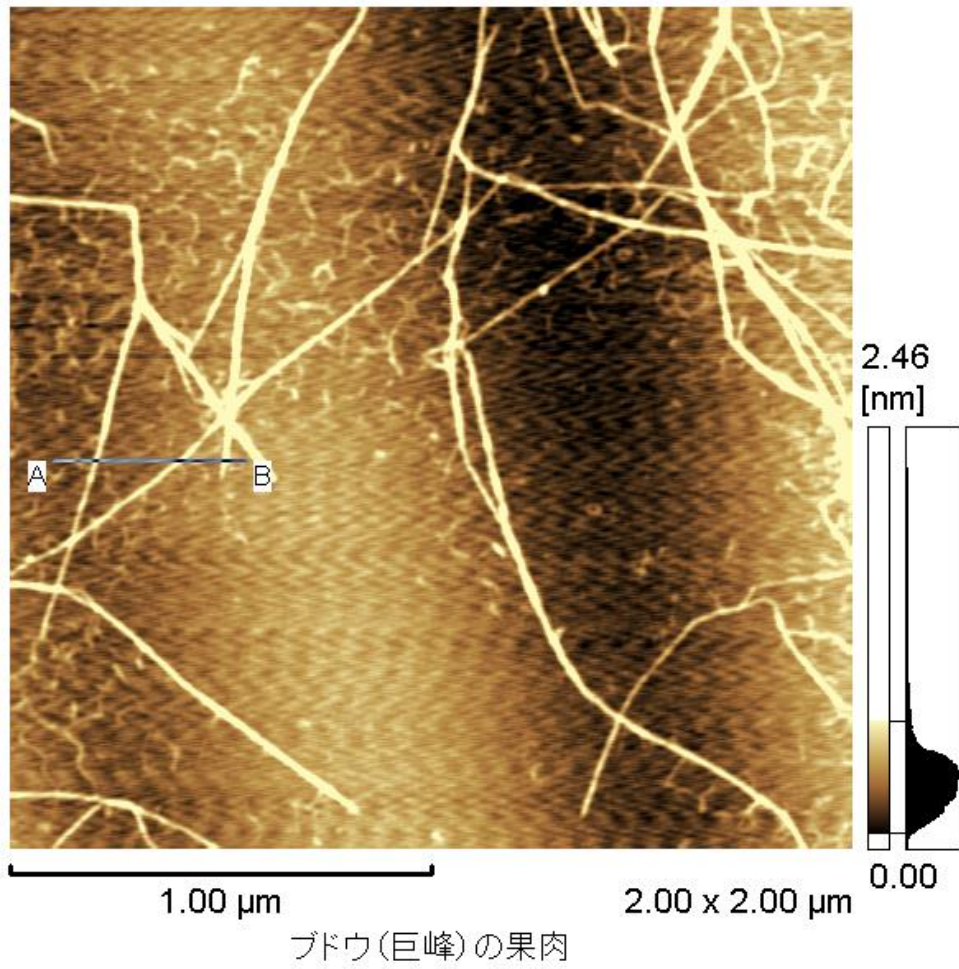


図 3.37 巨峰種ブドウ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

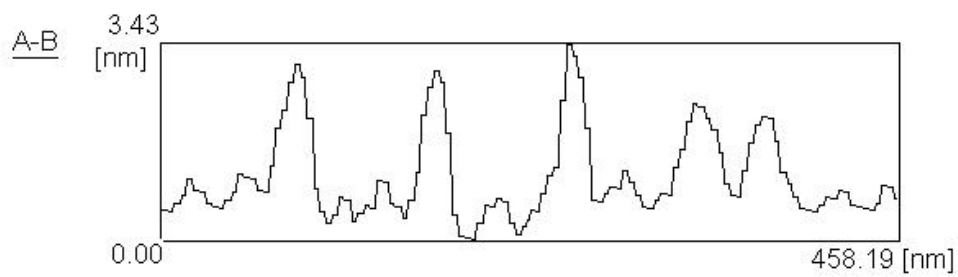
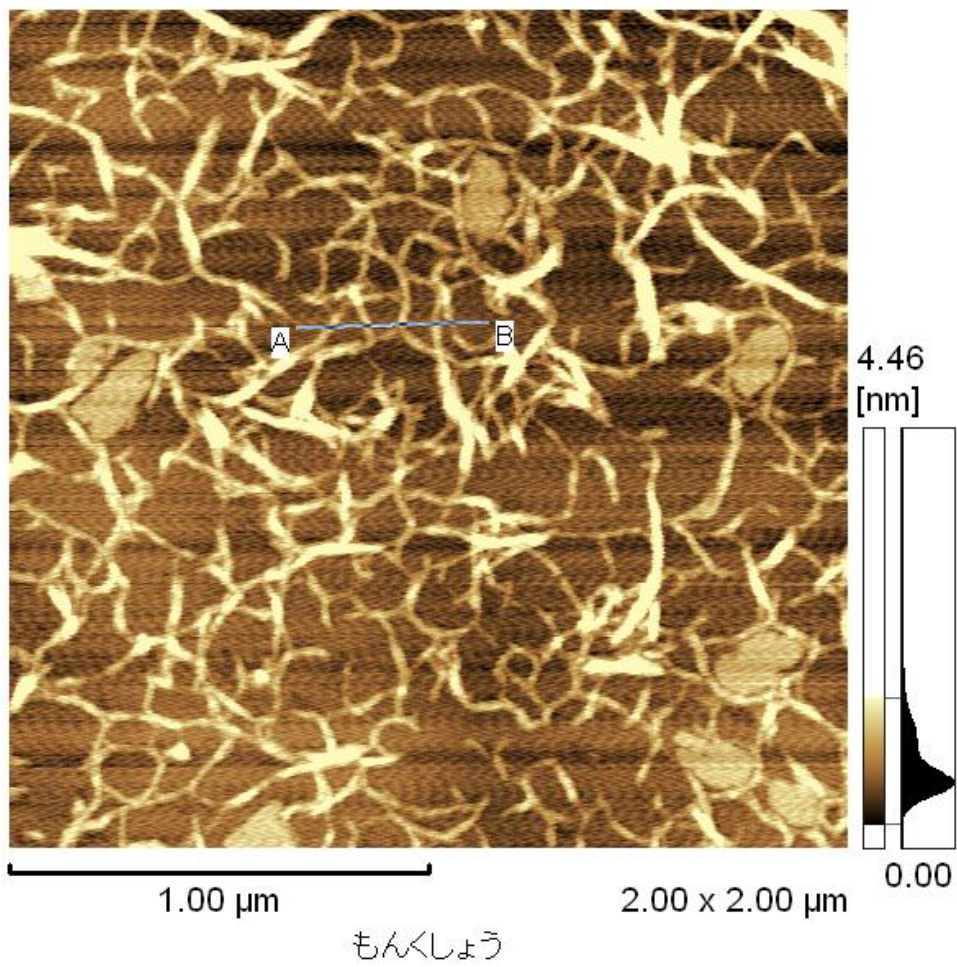


図 3.38 ホウライショウ果肉 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、各種果皮組織由来 WARP による実験結果について示す。

まず、**ナツミカン**中果皮組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.39 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。図 3.39 の観察画像中の一部には、確かに、明らかに太く見えるフィブリル像も見られるが、それらは詳細に見ると、細いフィブリルが多数集まった束のように見ることが出来る。

図 3.39 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5 nm~2.5 nm の範囲内であった。

次に、**ウンシュウミカン**外果皮組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.40 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 3.40 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.0 nm ~3.0 nm の範囲内であった。この数値は、これまでに見て来たフィブリル像の幅としては、比較的太いものである。

次に、**ソバ**果皮組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.41 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。この画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 3.41 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5 nm ~2.5 nm の範囲内であった。

次に、**カカオポッド**由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.42 に示す。ここでは、その観察画像全体に、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ均質に多数走行・屈曲・交差する様子が見られるとともに、その合間に、短小で楔形または糸状断片様に見えるフィブリルが、様々な長さあるいは太さで多数混在しているのが見て取れる。このような状況は、全般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP による場合と似ている。

図 3.42 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの方は、およそ 1.0 nm~2.0 nm の範囲内であった。また、短小で楔形または糸状断片様のフィブリルの方も、おおむね 1.0 nm~2.0 nm の範囲内であった。

なお、図 3.42 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルの方は、長さが少なくともおよそ 1.0 μ m 以上となると認められた。また、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおむね 0.045 μ m~0.50 μ m の範囲内であった。

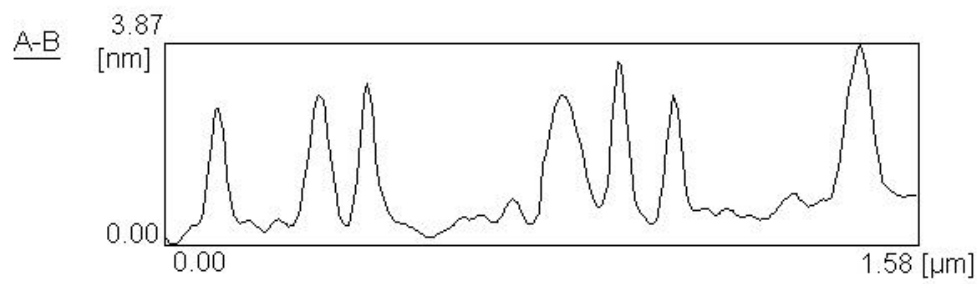
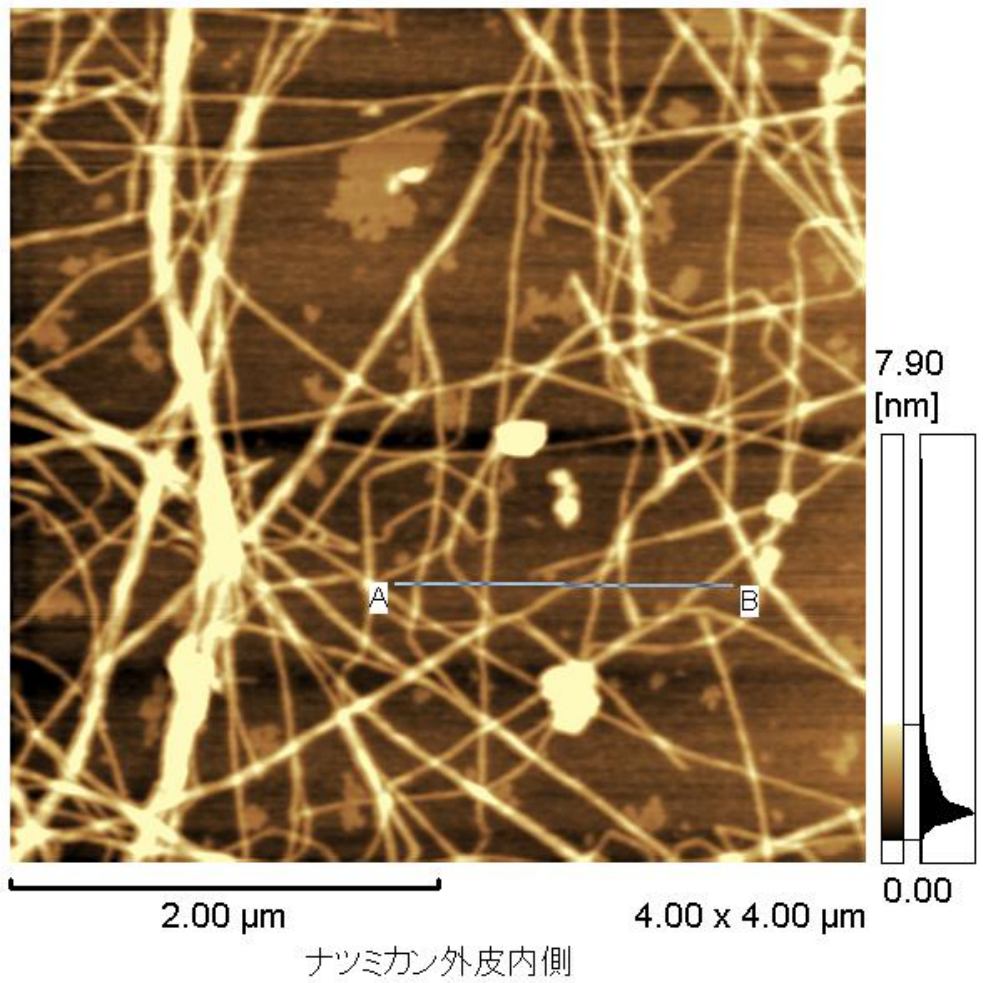


図 3.39 ナツミカン中果皮組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

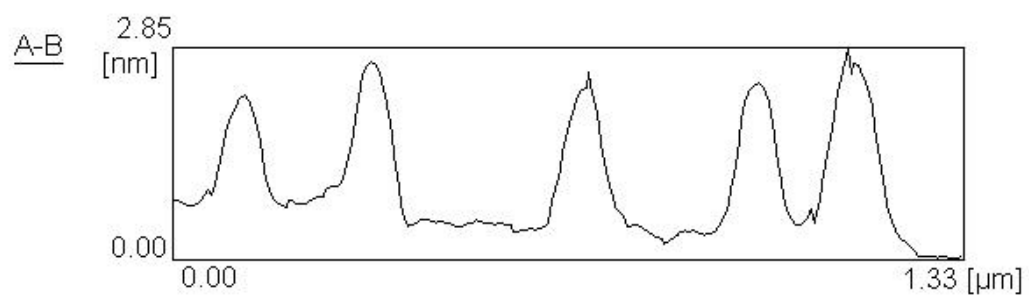
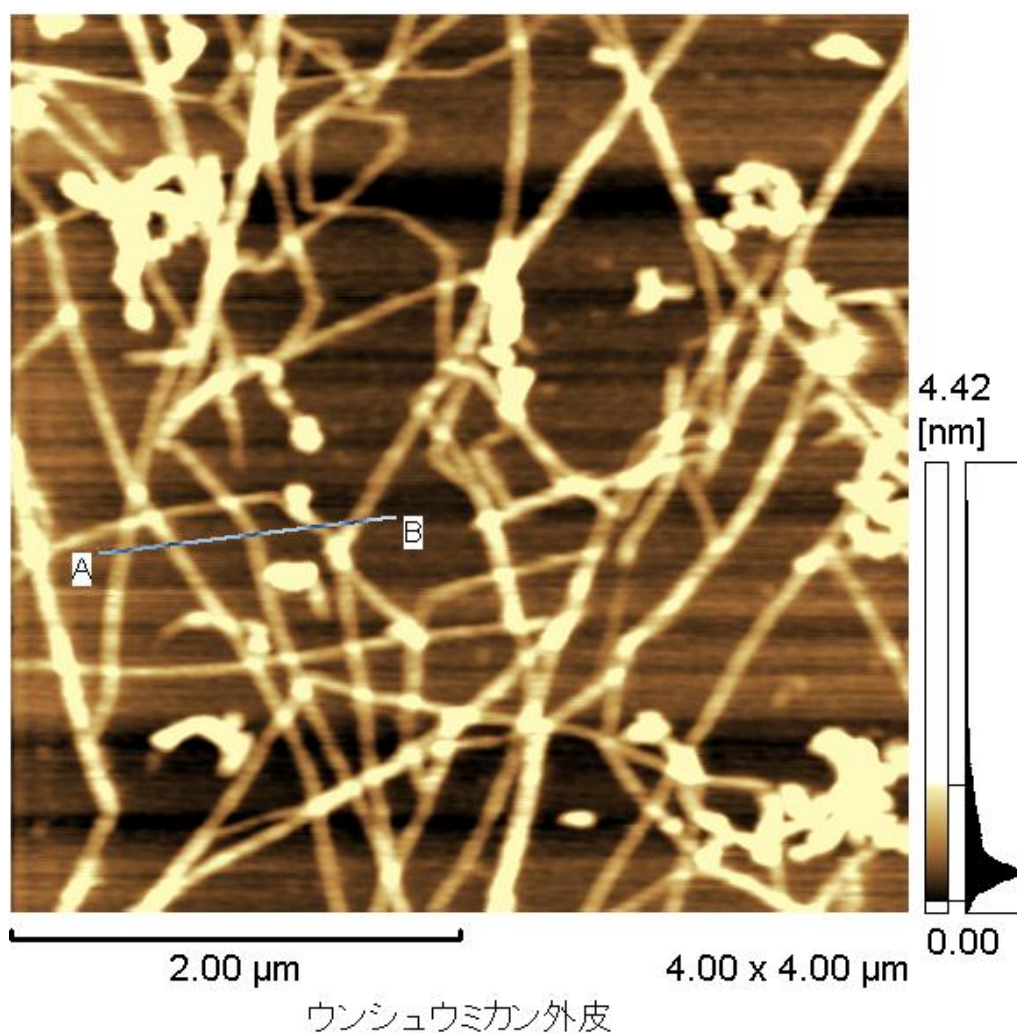


図 3.40 ウンシュウミカン外果皮組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

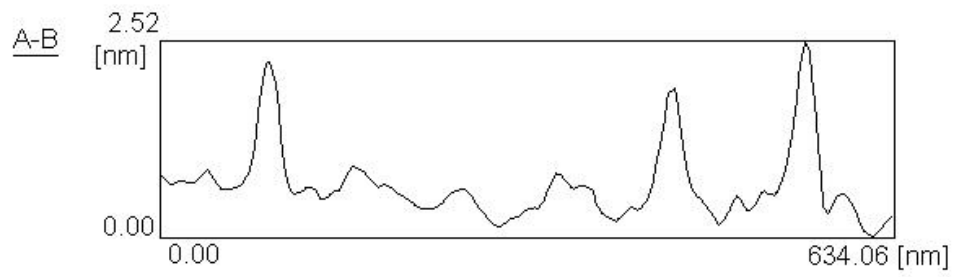
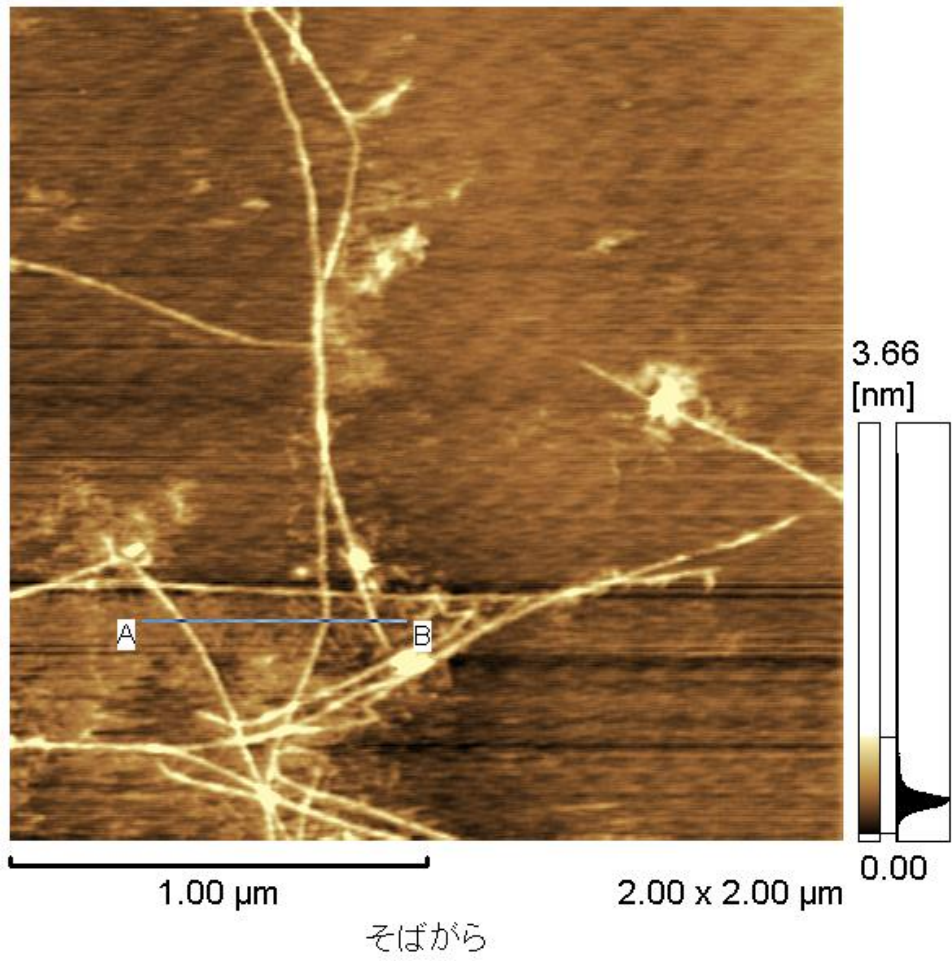


図 3.41 ソバ果皮組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

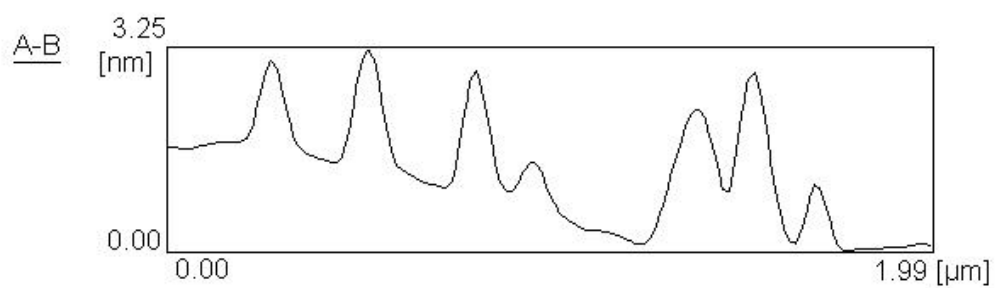
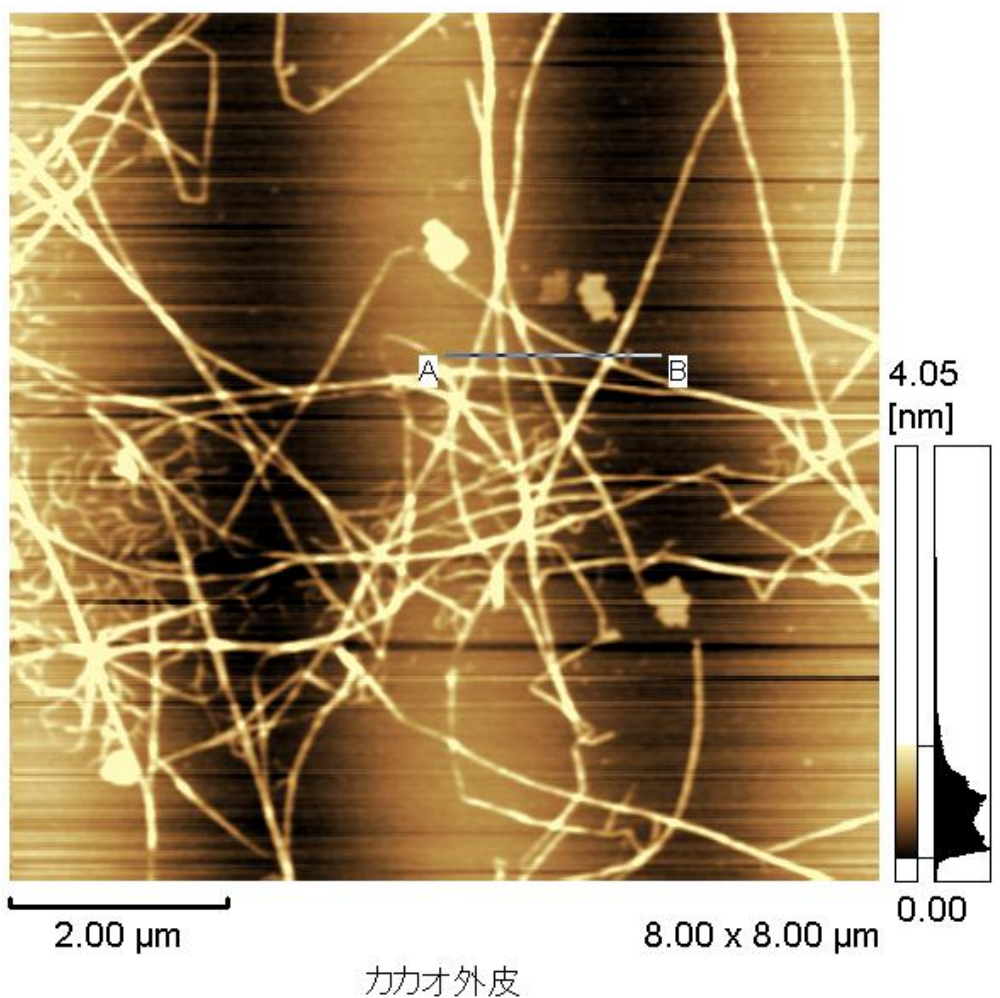


図 3.42 カカオポッド由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、各種花卉組織由来 WARP による実験結果について示す。

まず、**トウガン**花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.43 に示す。この観察画像中の様相は、全般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。すなわち、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する合間に、大小様々な短小な断片状のフィブリルが多数混在している状況が認められる。

図 3.43 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合は約 2.5 nm で、短小な断片状のフィブリルの方の場合は、おおよそ 0.5 nm~2.5 nm の範囲にあると認められた。

なお、図 3.43 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 0.37 μm 以上となると認められた。また、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおよそ 0.023 μm ~0.12 μm の範囲内であった。

次に、**カボチャ**花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.44 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合と近似している。そして、比較的細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差するのに加えて、いずれもほぼ同様に見られる短小な断片状のフィブリルが多数共在している状況が認められる。

図 3.44 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合は約 2.5 nm で、短小な断片状のフィブリルの方の場合は、おおよそ 0.5 nm~2.5 nm の範囲にあると認められた。

なお、図 3.44 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 0.66 μm 以上となると認められた。また、より短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおよそ 0.046 μm ~0.23 μm の範囲内であった。

次に、**デンドロビウム・サンデラエ**花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像の例を、図 3.45a および図 3.45b に示す。このサンプルの観察では、視野によって、見え方の相当異なる 2 タイプの画像が見られる。すなわち、多数のほぼ同様な分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差するのみが見られる画像（図 3.45a）と、陶磁器の茶碗をちぎったときに生じる破片の形に似た、短小の破片状のフィブリルが散在するのみが見られる画像（図 3.45b）である。

図 3.45a において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 0.5 nm~2.5 nm の範囲内にあると認められた。また、図 3.45b において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅もまた、おおよそ 0.5 nm~2.5 nm の範囲内にあると認められた。

なお、図 3.45a の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したとこ

ろ、その画像中で見られる楔形物体の長さは、おおむね $0.071 \mu\text{m} \sim 0.67 \mu\text{m}$ の範囲内であると認められた。

次に、**ダーウィンハイブリッド種チューリップ** 花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像の例を、図 3.46a、図 3.46b および図 3.46c に示す。これらの 3 画像中の様相は、また、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ同様に多数走行・屈曲・交差する様子のみが見られるもので、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と似ている。もっとも、図 3.46a、図 3.46b および図 3.46c の各観察画像中に見られる「糸」は、何れも比較的太く、むしろ「リボン状」と呼んだ方が、より妥当するようにも見られる。

図 3.46a において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね $1.5 \text{ nm} \sim 4.5 \text{ nm}$ の範囲内にあった。

図 3.46a、図 3.46b および図 3.46c の 3 観察画像は、実は同一の観察画像中で、別々の計測位置で AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した結果である。特に、図 3.46b と図 3.46c の両観察画像は、同一の観察画像中で、同じひとつのフィブリルの続きと見られるフィブリル像上において、別々の位置で AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した結果である。それらによれば、図 3.46b からは、フィブリルの幅として 4.47 nm という数値が与えられ、図 3.46c からは、フィブリルの幅として 2.77 nm という数値が与えられた。従って、そのフィブリル像の一連の続き上では、測定されるフィブリルの幅の数値は、前後少なくともおおよそ 1.70 nm の範囲内で変動することが明らかである。このような傾向は、同画像上で見られる他の同じひとつのフィブリルの続きと見られる部分でも普通に観測された。

既に、図 3.24a および図 3.24b のカキ果肉組織由来 WARP による場合で見たように、通常同一の観察画像中で、同じひとつのフィブリルの続きと見られるフィブリル像上において、別々の位置で AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施した場合、計測値の変動は精々前後ゼロコンマ数ナノメートルの範囲内である。ところが、**ダーウィンハイブリッド種チューリップ** 花卉組織由来 WARP による場合では、そのような計測値の変動が実に大きく、前後 2 nm 近くにまで及んでいる。このような現象は、本研究を通じて採用した他の全ての植物種・組織種の組織に由来する WARP の場合において、類例を見ることなく、唯一**ダーウィンハイブリッド種チューリップ** 花卉組織由来 WARP による場合でのみ認められた特徴である。

次に、**セイヨウシャクナゲ** 花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像を、図 3.47 に示す。この観察画像中の様相はまた、特にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。ただし、図 3.22 の画像中で見られるフィブリル像と比較して、図 3.47 の画像中で見られるフィブリル像は、明らかに、より繊細で細く、走行が滑らかな印象が認められる。

図 3.47 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね $0.6 \text{ nm} \sim 1.4 \text{ nm}$ の範囲内にあった。これは、本項の観察結

果中では、観察出来た最も細いフィブリルに当たった。

次に、バラ花卉組織由来 WARP による AFM 観察画像を図 3.48 に示す。やはり、この観察画像中の様相もまた、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と良く似ている。

ただし、図 3.48 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.5nm 程度であった。前掲の図 3.47 のセイヨウシヤクナゲ花卉組織由来 WARP による場合と比べて、明らかにフィブリルの幅が太い。

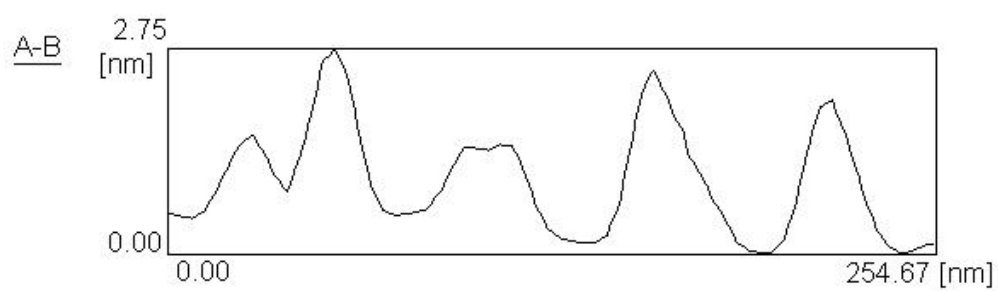
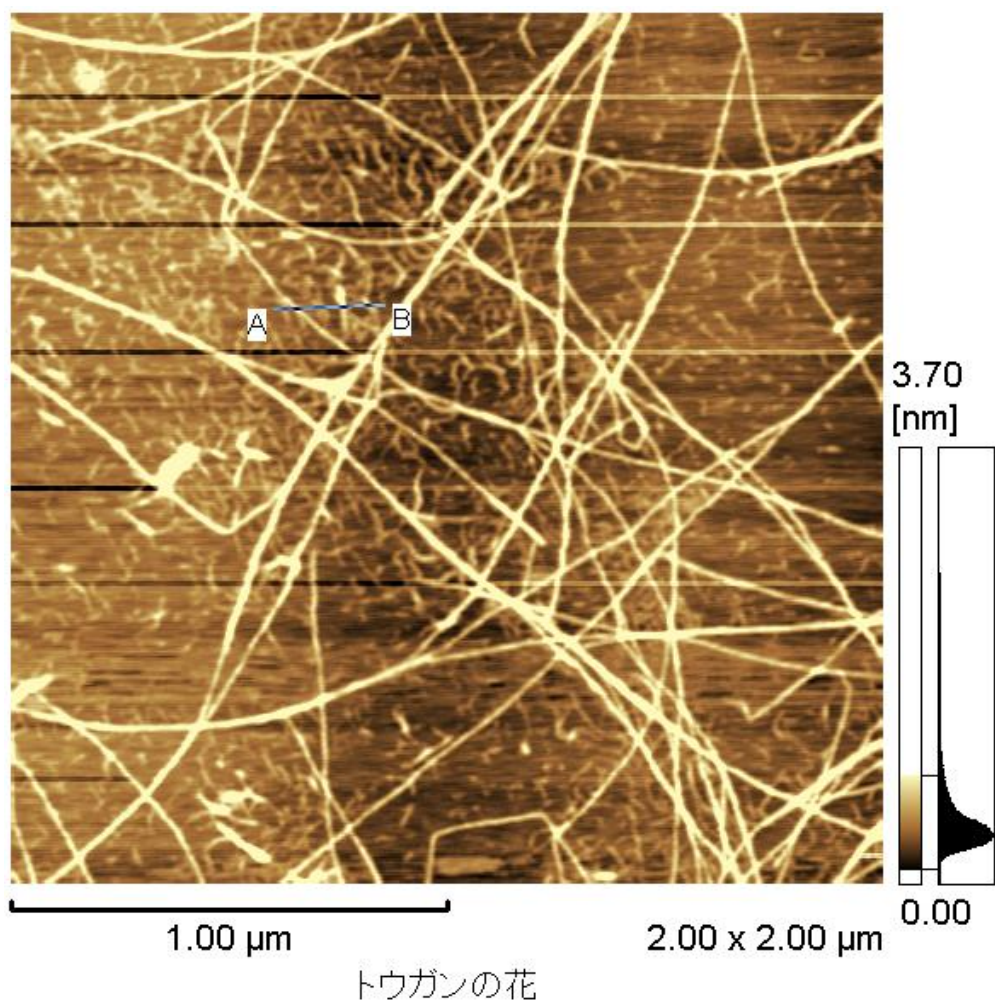


図 3.43 トウガン花卉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

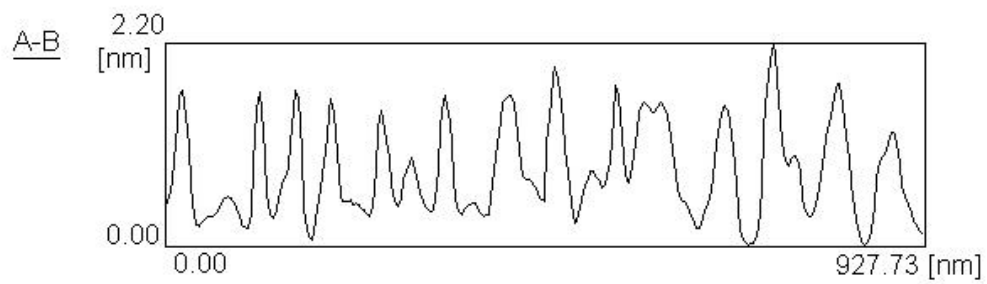
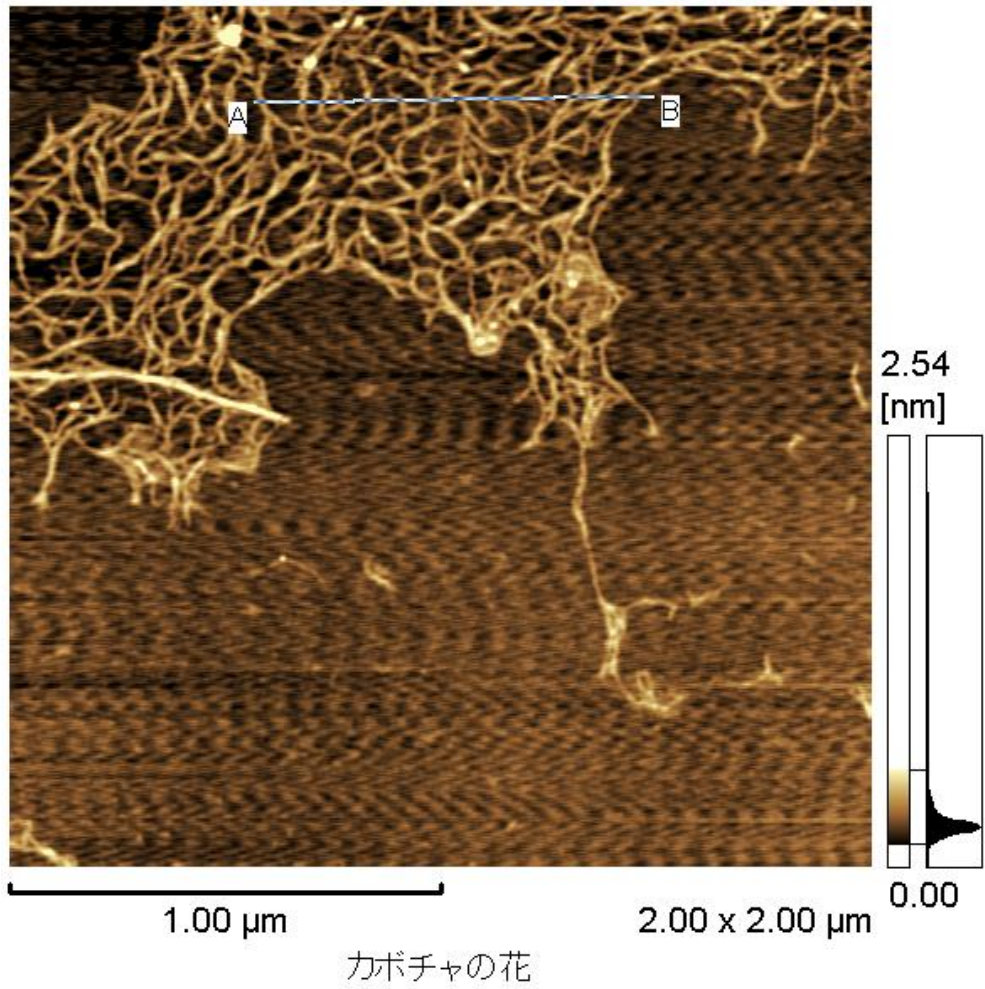


図 3.44 カボチャ花弁組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

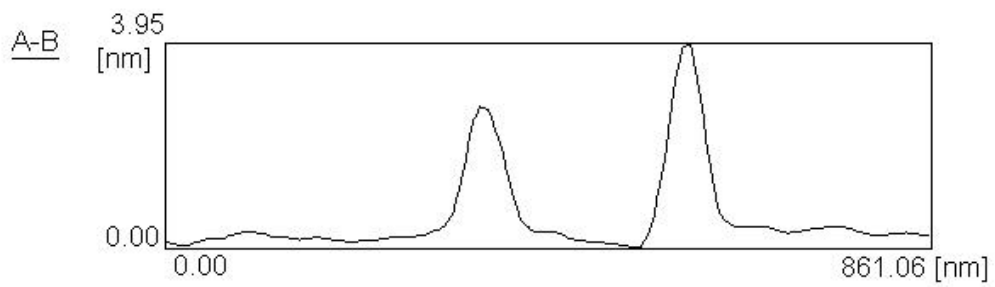
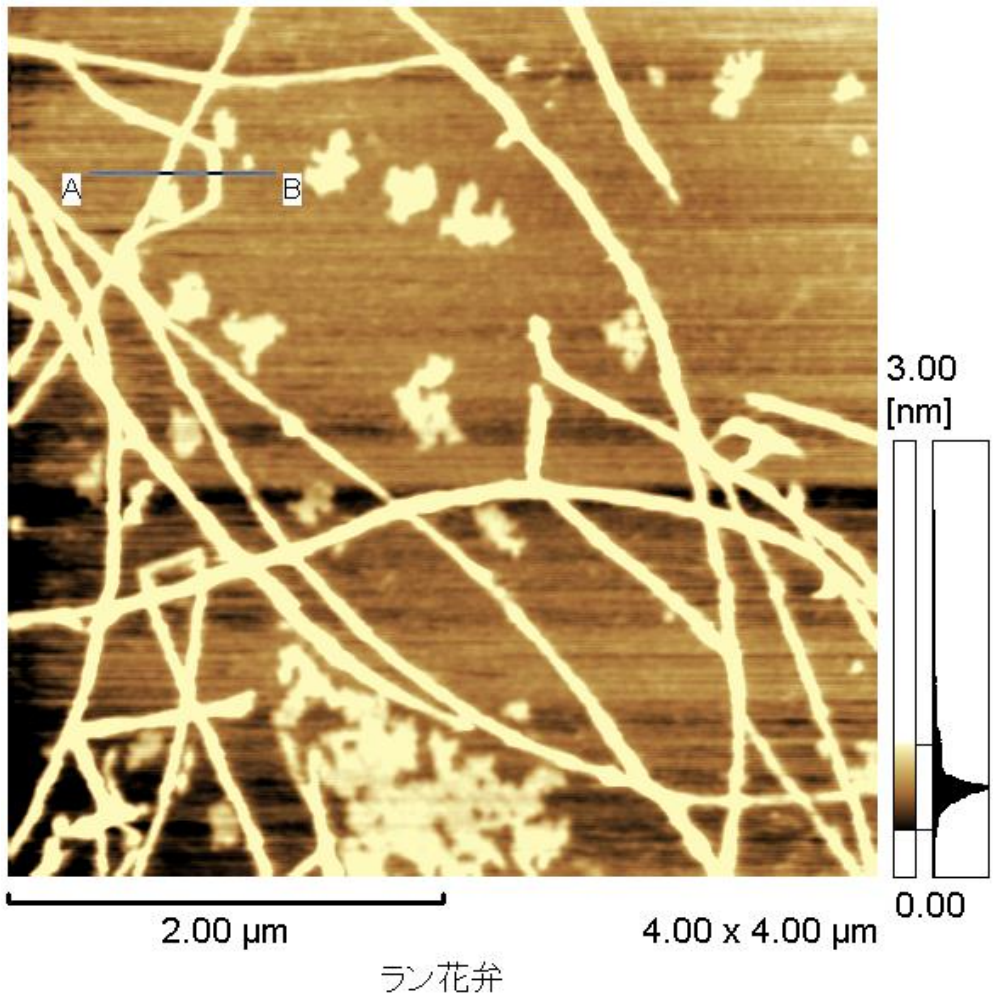


図 3.45a *Dendrobium sanderae var. major* の花より調製した WARP の AFM 像イ。(細長いフィブリルの走行が見られる場合) (コンタクトモード)

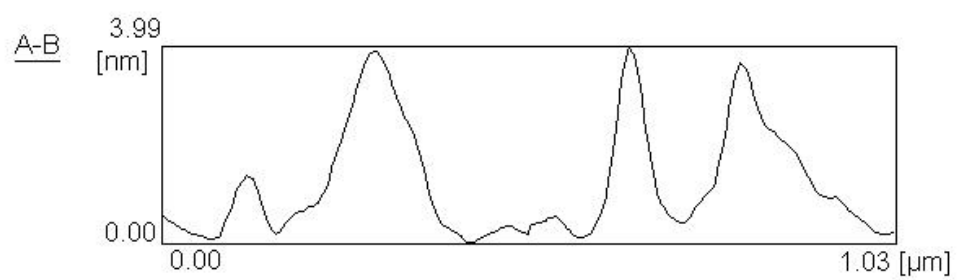
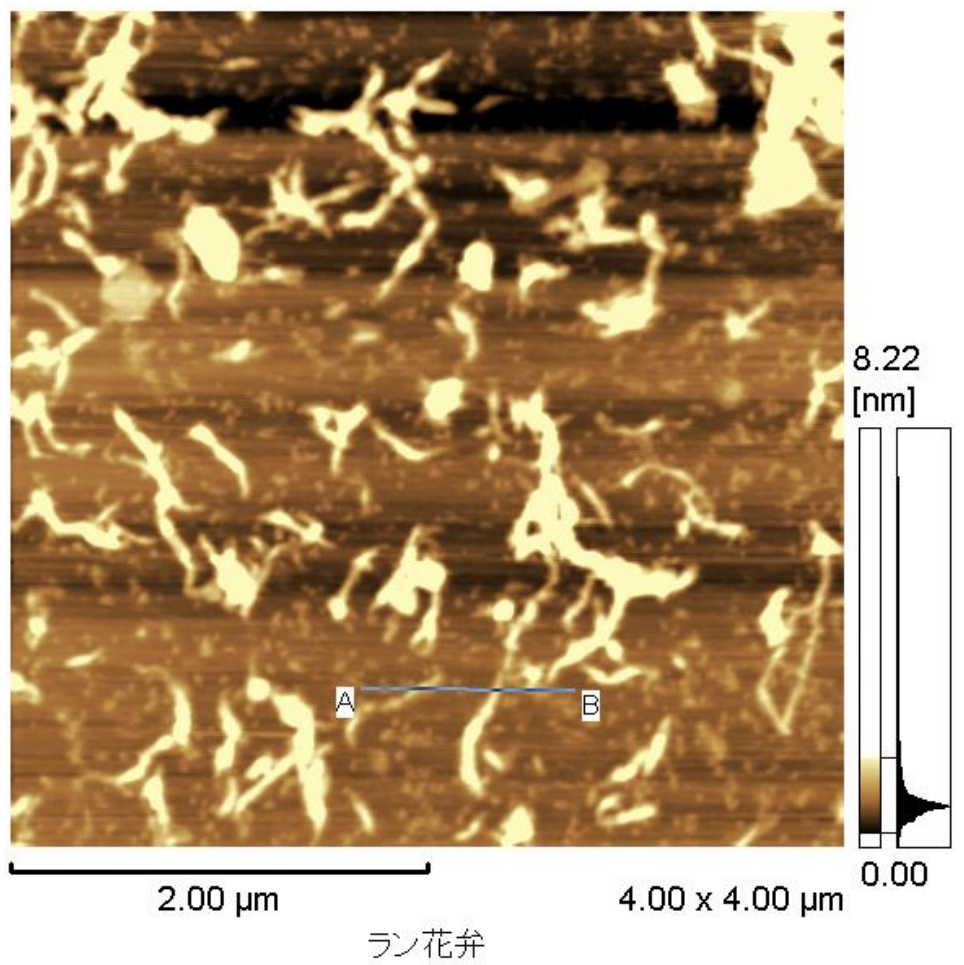


図 3.45b *Dendrobium sanderae* var. *major* の花より調製した WARP の AFM 観察画像。 (破片状のフィブリルが見られる場合) (コンタクトモード)

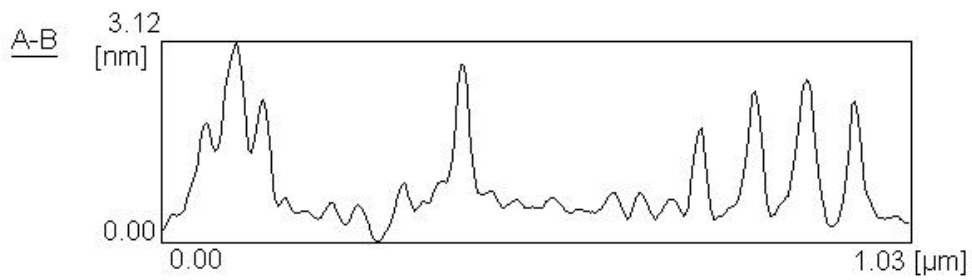
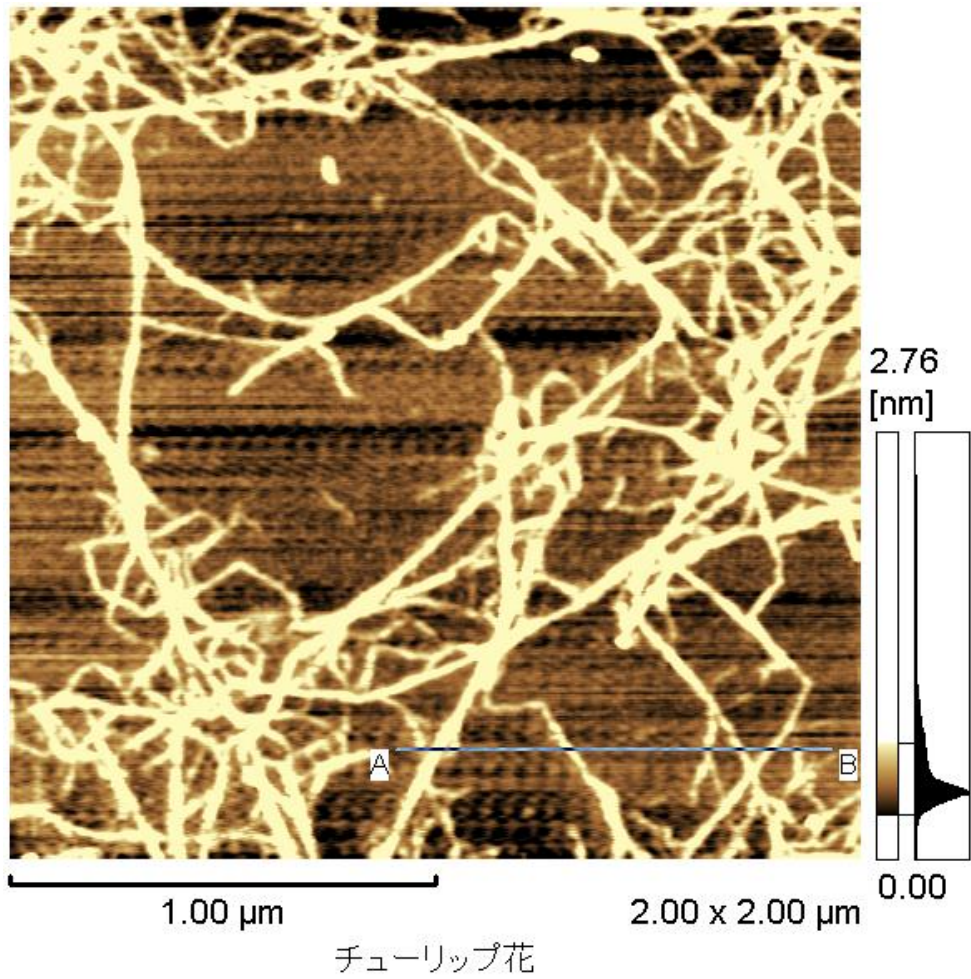


図 3.46a ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP の AFM 像イ. (コンタクトモード)

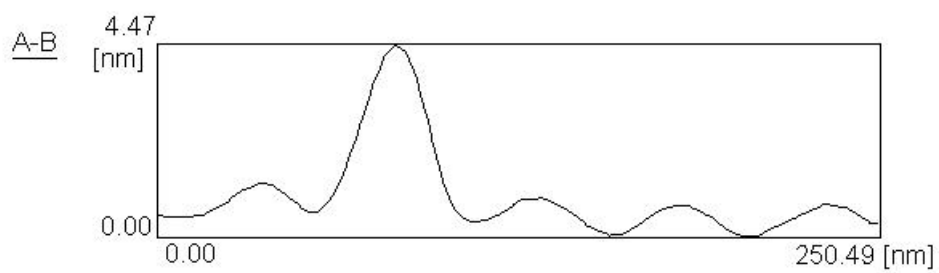
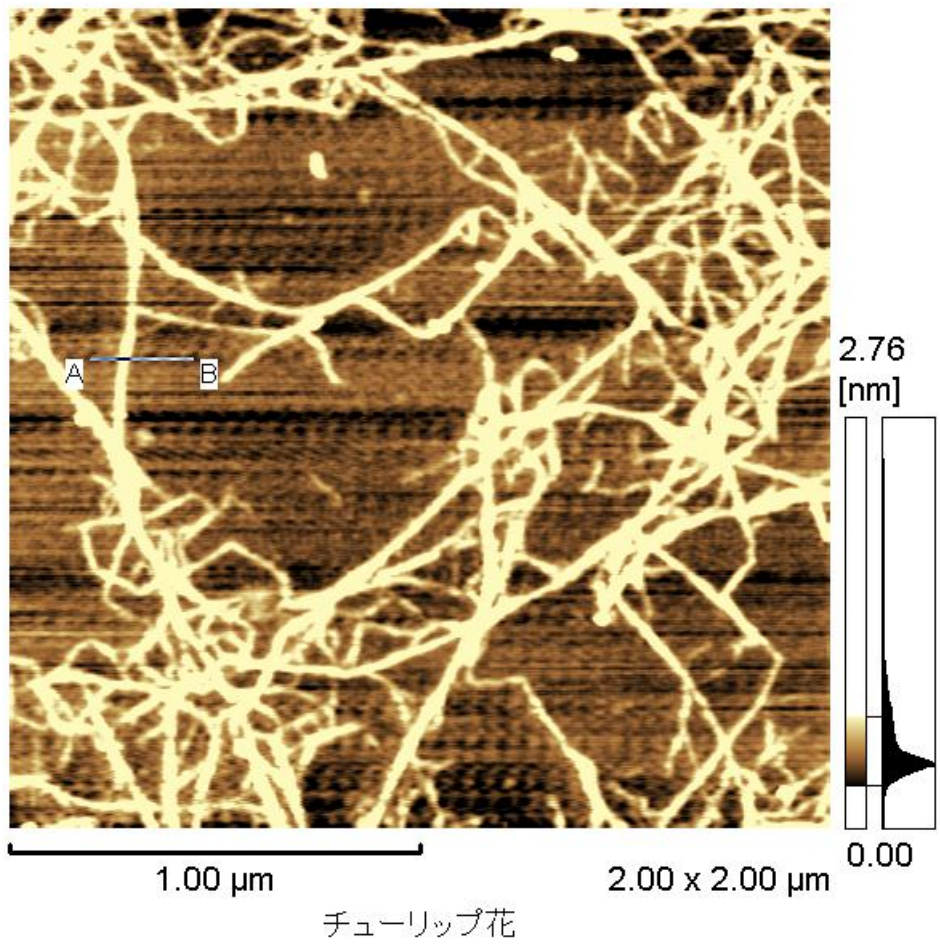


図 3.46b ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP の AFM 像ロ. (コンタクトモード)

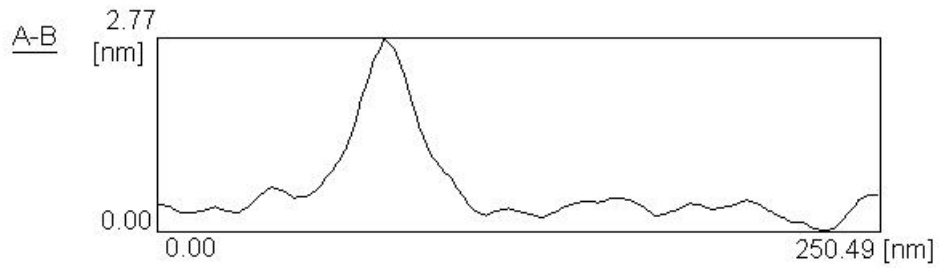
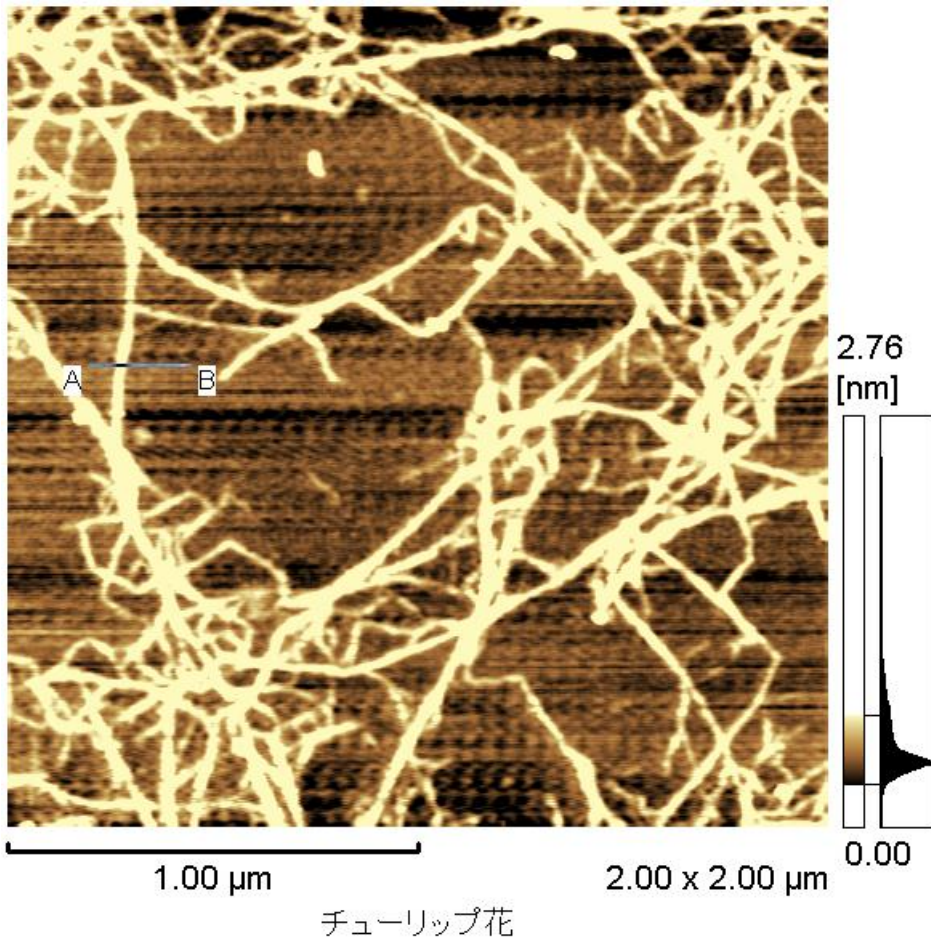


図 3.46c ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP の AFM 像ハ. (コンタクトモード)

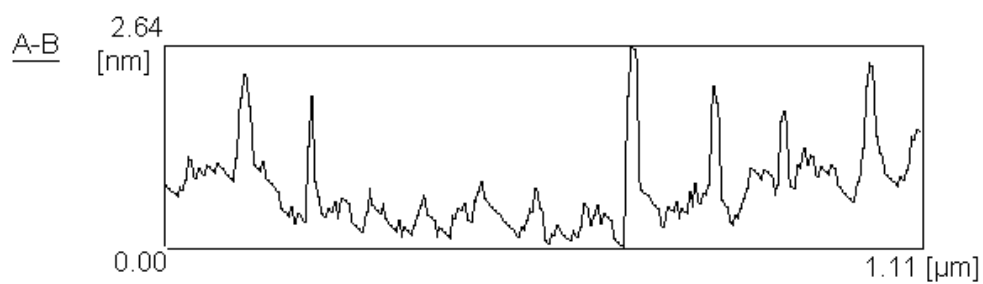
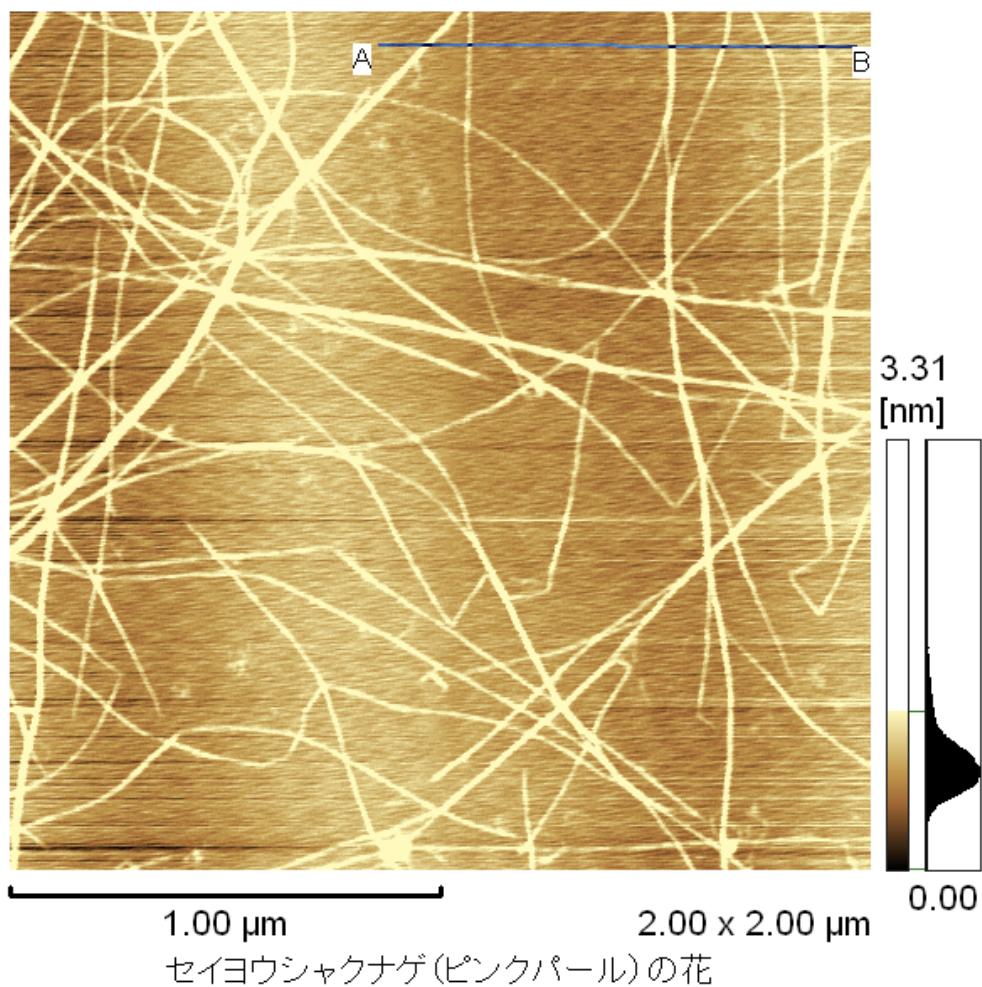


図 3.47 セイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

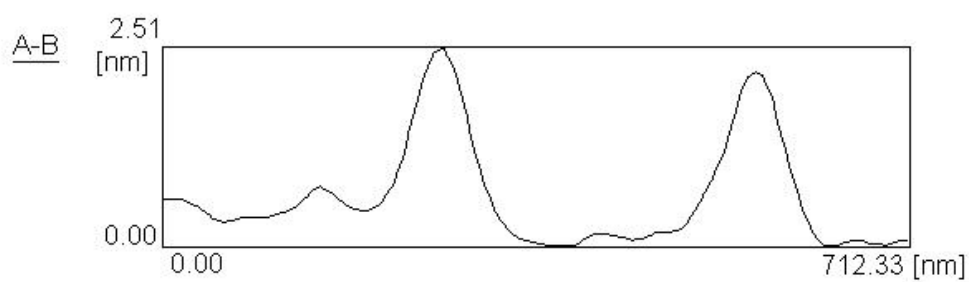
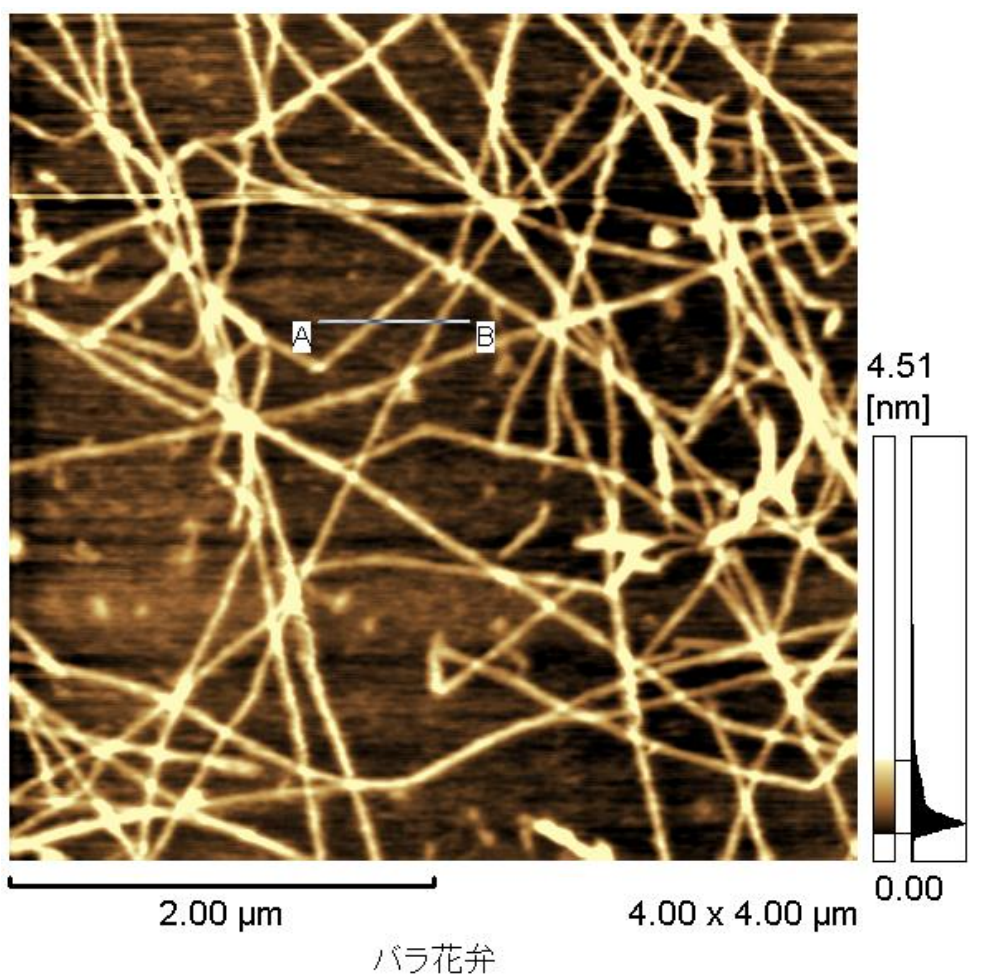


図 3.48 バラ花弁組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、各種茎または葉柄組織由来 WARP による実験結果について示す。

まず、ミドリハナヤサイ茎髓組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.49 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。ただし、画像中のフィブリルの多くは見た目にも太く、複数のフィブリルが重畳しているように見える部分が多い。

図 3.49 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 3.0 nm ~4.0 nm の範囲内であった。

次に、ヴェルティナバナナ葉鞘組織由来 WARP による AFM 観察画像を図 3.50 に示す。やはり、この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。前掲の図 3.47 のセイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP による場合とも酷似しており、ほぼ同様の分岐の少ない非常に細い糸が、長くなめらかに走行・屈曲・交差している様相がまた、印象的に認められる。

図 3.50 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 0.6nm ~1.8 nm の範囲内であった。これは、本項の観察結果中では、セイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP による場合と同様に、観察出来た最も細いフィブリルに当たった。

次に、フキ葉柄組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 3.51 に示す。この観察画像中の様相は、全般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合に酷似している。すなわち、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する合間に、大小様々な短小な断片状のフィブリルが多数混在している状況が認められる。

図 3.51 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合で、およそ 1.5 nm~3.9 nm の範囲内であった。また、短小な断片状のフィブリルの場合は、おおむね 0.8nm~1.5nm の範囲内であった。

なお、図 3.51 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルについては、長さが少なくともおよそ 0.54 μm 以上となると認められた。また、短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおむね 0.012 μm ~0.14 μm の範囲内であった。

次に、紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による AFM 観察画像を、図 3.52 に示す。この観察画像中の様相はまた、一種特徴的で、比較的の前掲の図 3.38 のホウライシヨウ果肉組織由来 WARP による場合に似ている。

すなわち、その画像中では、多糖フィブリルに相当すると思われる多数の比較的短小な楔形の物体の存在だけが認められ、その多くが、それぞれ先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成しているように見られる。

図 3.52 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフ

フィブリル像の幅は、おおむね $0.8\text{ nm} \sim 1.8\text{ nm}$ の範囲内にあり、前掲の図 3.47 のセイヨウシャクナゲ花弁組織由来 WARP による場合および図 3.50 のヴェルティナバナナ葉鞘組織由来 WARP による場合に準ずる細さが認められた。

なお、図 3.52 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、上記の連結が明瞭な部分は除いて、楔形の物体の長さは、おおよそ $0.058\text{ }\mu\text{ m} \sim 0.30\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲内であった。

次に、リュウビンタイ葉柄基部組織由来 WARP による AFM 観察画像を図 3.53 に示す。この観察画像中の様相は、また基本的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似しているが、大小様々な不定形の物体の混在が、他に例を知らず認められる。すなわち、ほぼ同様の多数の細長い糸状のフィブリルが多数走行・屈曲・交差する合間に、幾らかの大小様々な大きさや形の物体が散在して見られる。

図 3.53 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出された細長いフィブリル像の幅は、おおむね 4.0 nm 程度であった。不定形物体の方は、幅おおよそ $1.5\text{ nm} \sim 3.0\text{ nm}$ の範囲内であった。

なお、図 3.53 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルについては、長さが少なくともおおよそ $0.62\text{ }\mu\text{ m}$ 以上となると認められた。また、不定形物体については、長さがおおむね $0.048\text{ }\mu\text{ m} \sim 0.81\text{ }\mu\text{ m}$ の範囲内であった。

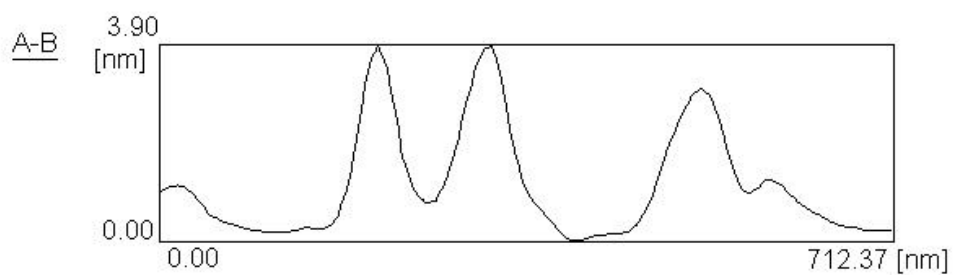
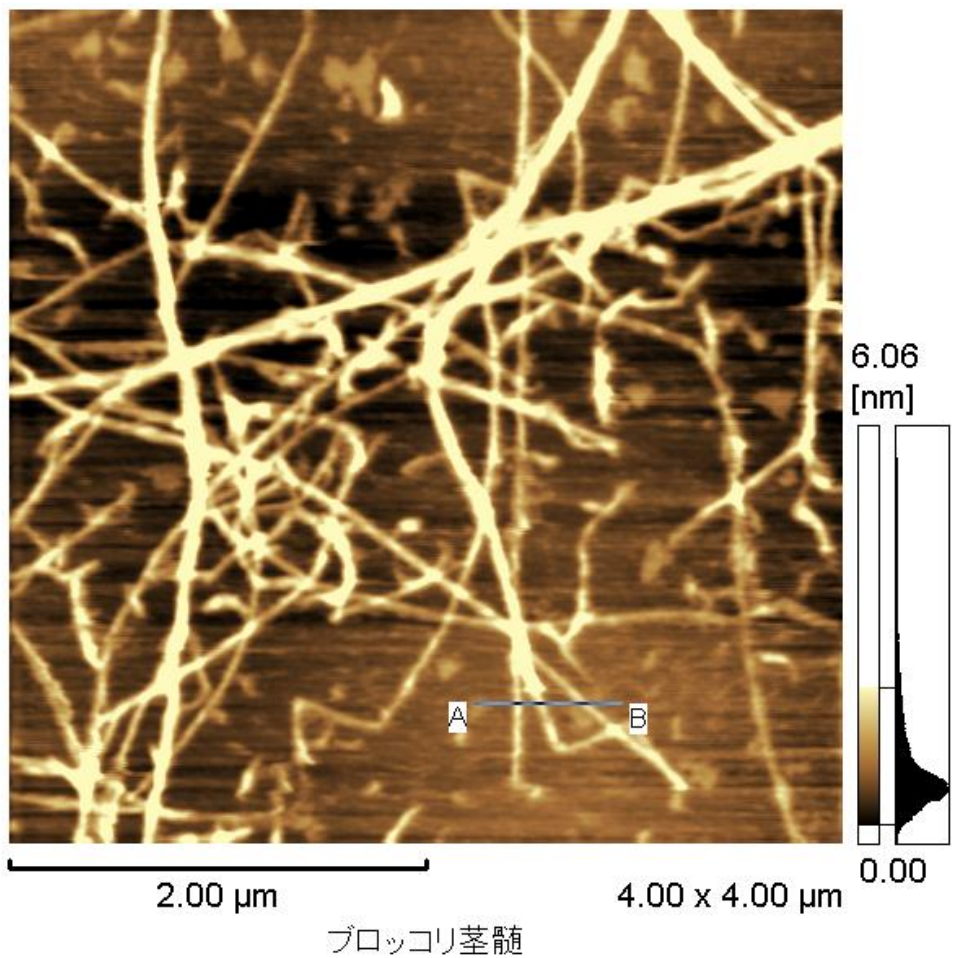


図 3.49 ミドリハナヤサイ茎髄組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

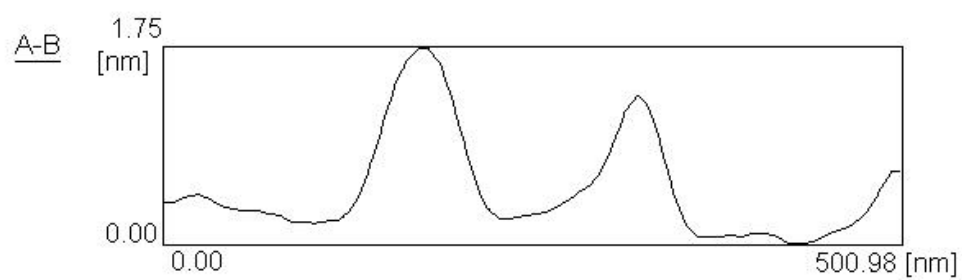
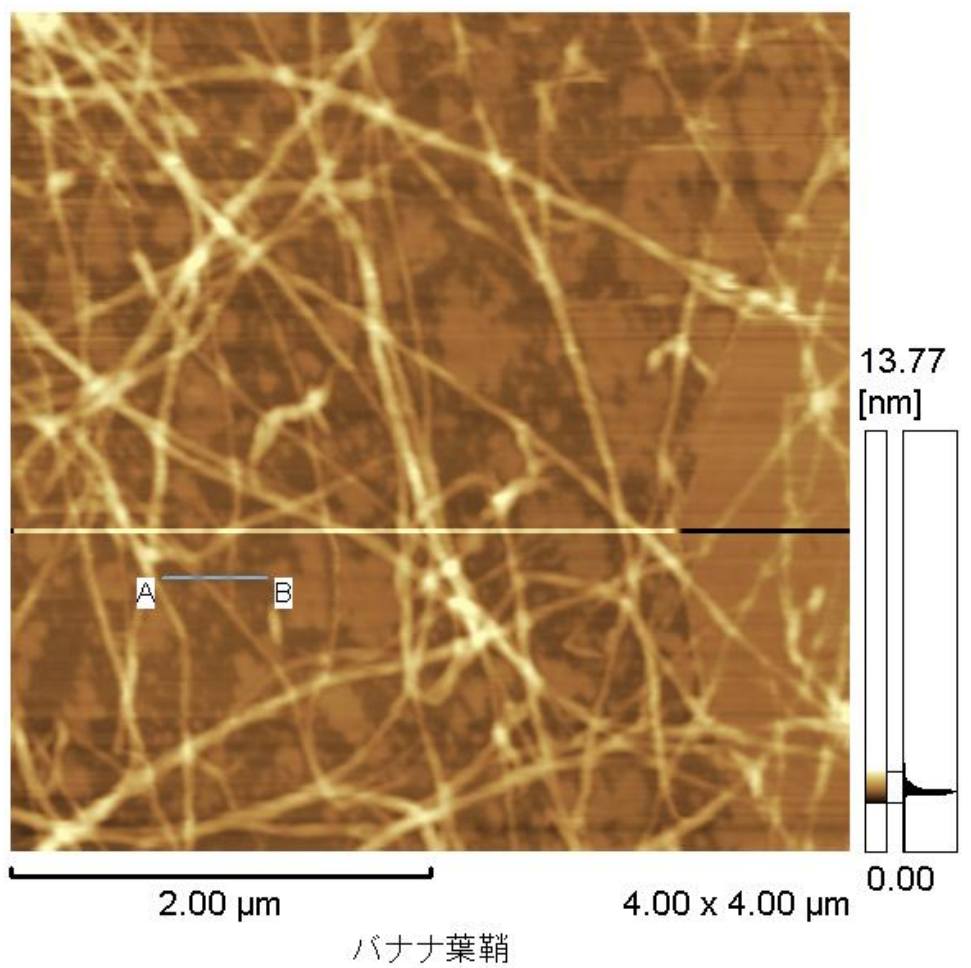


図 3.50 ヴェルティナバナナ葉鞘組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

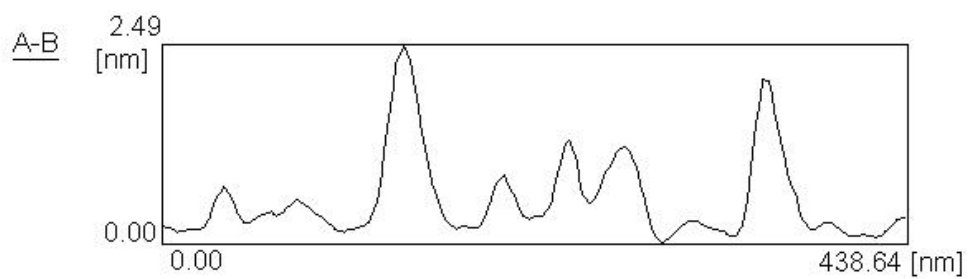
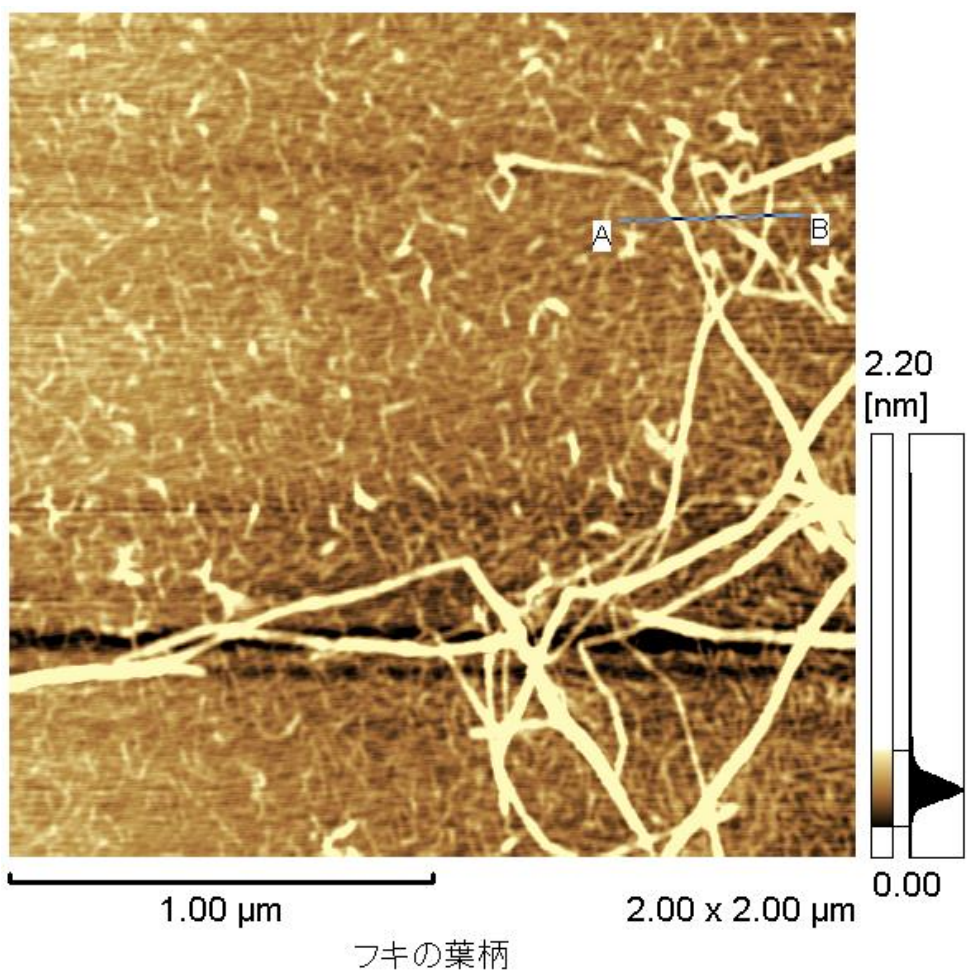


図 3.51 フキ葉柄組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

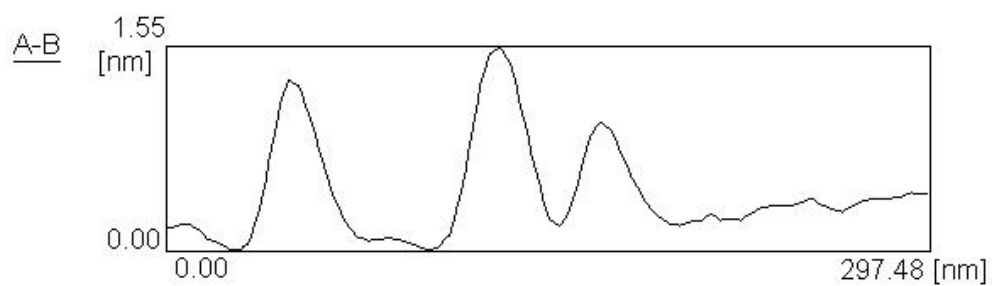
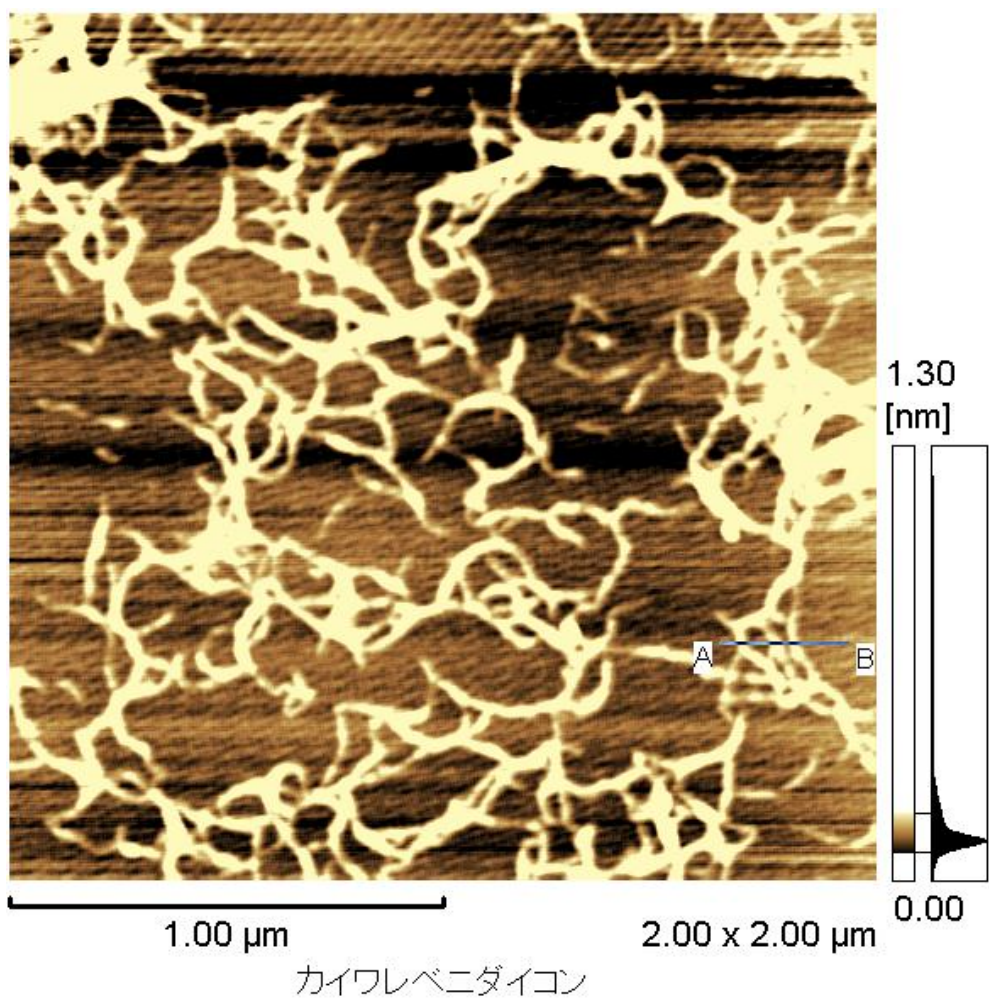


図 3.52 ダイコン（紅大根）芽生え茎組織由来 WARP の AFM 像（コンタクトモード）

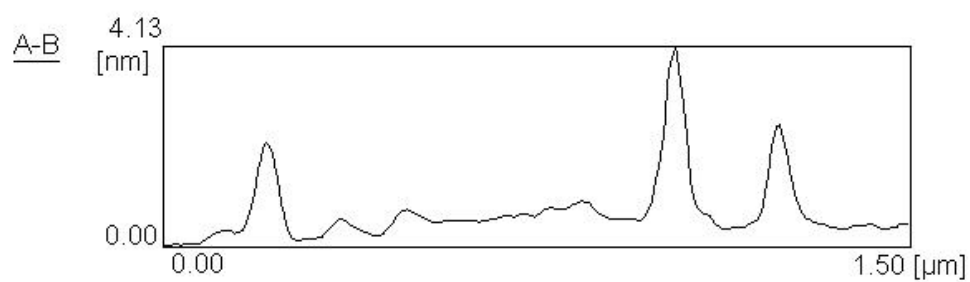
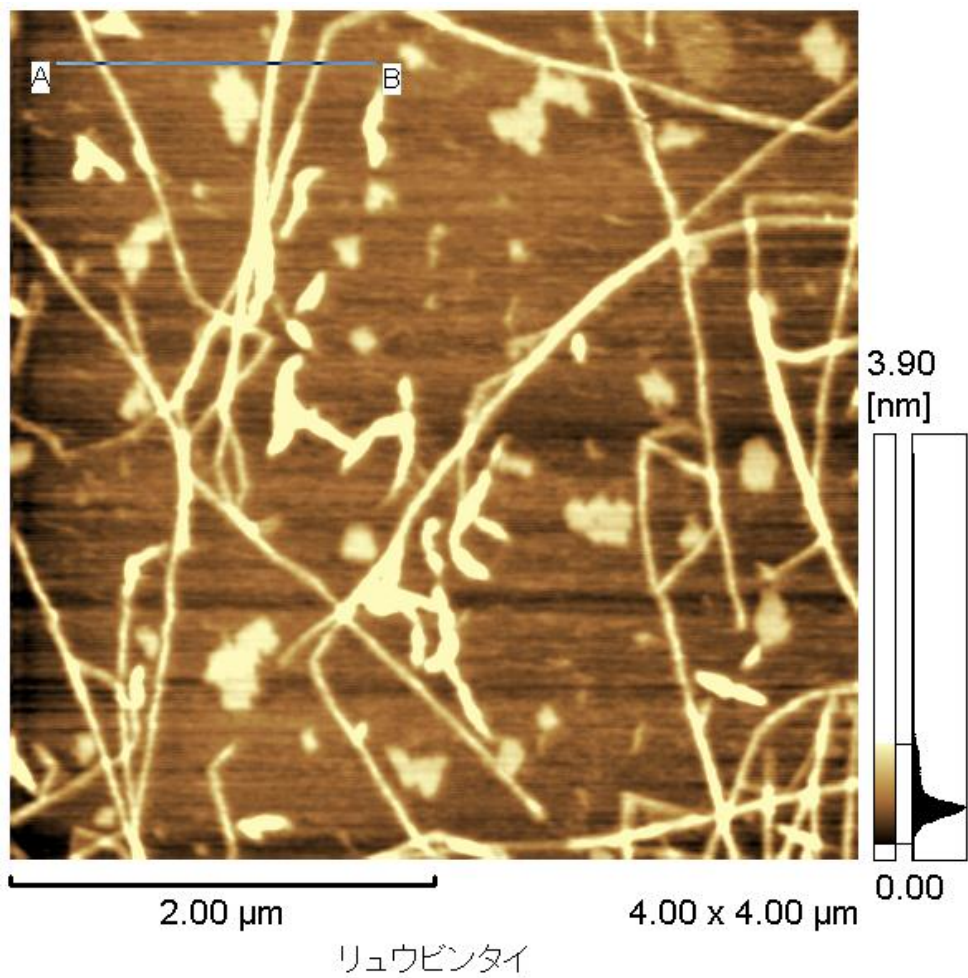


図 3.53 リュウビンタイ葉柄基部組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

次に、各種葉組織由来 WARP による実験結果について示す。

まず、スギ針葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.54 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 3.54 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 0.7 nm~1.8 nm の範囲内であった。

次に、チャノキ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.55 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 3.55 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.0nm~3.0nm の範囲内であった。

次に、レモンガラス葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.56 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 3.56 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.0nm~3.0nm の範囲内であった。

次に、ニオイテンジクアオイ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.57 に示す。この観察画像中の様相もまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。ただし、前掲の図 3.56 のレモンガラス葉組織由来 WARP による場合と比較して、フィブリル幅は、明らかに太く見られる。

図 3.57 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.5nm~3.5nm の範囲内であった。

次に、アルノッティアヌスハイビスカス葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.58 に示す。この観察画像中の様相は、実に一種独特である。ほぼ分岐のない細長い線状のフィブリルがすらっと走行・交差する合間に、多数の不定形の破片状物および湾曲した短小の楔形の物体等が散在しているように見られる。

図 3.58 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い線状のフィブリルの方が約 3.5nm 程度、不定形の破片状物または湾曲した短小の楔形の物体については、1.0 nm から 5.0~6.0 nm 程度までに及んでいた。

なお、図 3.58 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い線状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 1.3 μ m 以上となると認められた。また、不定形の破片状物または湾曲した短小の楔形の物体の長さは、おおむね 0.093 μ m~0.84 μ m の範囲内であった。

次に、ヒマラヤトキワヤマボウシ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.59 に示す。この観察画像中の様相もまた、一種独特である。すなわち、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合で見られたような、分岐が少なく細長く走行する糸状のフィ

ブリルの存在が全く確認されず、湾曲した楔形に見える比較的短く小さいフィブリルのみが散在するように見られる。

図 3.59 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像すなわち分岐が少なく湾曲した楔形に見える比較的短く小さい物体の幅は、おおよそ 1.5nm~2.5nm の範囲内であった。なお、図 3.59 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、分岐が少なく湾曲した楔形に見える比較的短く小さい物体の長さは、おおよそ 0.093 μm ~1.3 μm の範囲内であった。

次に、ヤブツバキ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.60 に示す。この観察画像中の様相は、一般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合に酷似している。すなわち、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する合間に、大小様々な短小な断片状のフィブリルが多数混在している状況が認められる。

図 3.60 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合で、おおよそ 3.0 nm~4.0 nm の範囲内であった。また、短小な断片状のフィブリルの場合は、おおよそ 1.0 nm~2.5 nm の範囲内であった。

なお、図 3.60 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルについては、長さが少なくともおおよそ 1.0 μm 以上となると認められた。また、短小で楔形のフィブリルの方の長さは、おおよそ 0.073 μm ~0.51 μm の範囲内であった。

次に、ハナヤサイ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.61 に示す。この観察画像中の様相はまた、一般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似し、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差するのみに見られる。ただし、複数のフィブリルが重畳しているように見られる部分も、少なからず確認出来る。

図 3.61 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 1.0 nm~2.0 nm の範囲内であった。

次に、アフリカスミレ葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.62 に示す。この観察画像中の様相もまた、一般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合に酷似している。すなわち、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する合間に、大小様々な短小な断片状のフィブリルが多数混在している状況が認められる。

図 3.62 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合で、約 2.0 nm 程度であった。また、短小な断片状のフィブリルの場合は、幅 0.5 nm~2.0 nm の範囲内であった。よって、短小な断片状のフィブリルの幅は、変化の範囲とばらつきの程度が比較的に大きい。

なお、図 3.62 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルについては、長さが少なくともおおよそ $1.2 \mu\text{m}$ 以上となると認められた。また、短小で断片状のフィブリルの方の長さは、おおむね $0.048 \mu\text{m} \sim 0.40 \mu\text{m}$ の範囲内であった。

次に、ウケザキクンシラン葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.63 に示す。この観察画像中の様相は、また一種特有である。前掲の図 3.38 のホウライショウ果肉組織由来 WARP による場合や図 3.52 の紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合に比較的似て見られるが、明らかな違いも認められる。

すなわち、その画像中には、フィブリルに相当すると考えられる、多数の短小な楔形の物体だけが、斑点様に多数散在して見られる。それらの楔形の物体は、各孤立し、ホウライショウ果肉組織由来 WARP による場合や紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合とは異なり、各先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成するようなことは全くない。

図 3.63 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ $1.0 \text{ nm} \sim 2.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。なお、図 3.63 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、楔形の物体の長さは、おおよそ $0.048 \mu\text{m} \sim 0.50 \mu\text{m}$ の範囲内であった。

次に、バルボフィラム・グランディフロルム葉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.64 に示す。この画像中の様相は、まったく独特で、他に類例が見当たらない。

すなわち、同観察画像中において、まず目立つのは、長さ $0.7 \mu\text{m}$ 程度で比較的長さがあると見られる、かつ屈曲が顕著なひも状に見られるフィブリルが数本以上も集まって形成された、ちょっとした物体の散在である。このような物体の散在の間には、長さ $0.1 \mu\text{m}$ 程度でずっと短小に見られる楔形のフィブリルが多数と数個の直径 580 nm 程度の密実円形体の混在が認められる。この混在する直径 580 nm 程度の密実円形体については、その形状から、多糖フィブリルではないと判断される。

上記の長さ $0.7 \mu\text{m}$ 程度の屈曲が顕著なひも状に見られるフィブリルの形状と長さ $0.1 \mu\text{m}$ 程度の短小な楔形のフィブリルの形状には、外形的に相当の相似性があることが認められる。このため、前者は後者の比較的に大型のものである可能性がある。

図 3.64 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、長さ $0.7 \mu\text{m}$ 程度の屈曲が顕著なひも状に見られるフィブリルについては、おおよそ $3.5 \text{ nm} \sim 4.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。他方、長さ $0.1 \mu\text{m}$ 程度の短小な楔形のフィブリルの方は、幅おおよそ $1.0 \text{ nm} \sim 2.5 \text{ nm}$ の範囲内であった。

なお、図 3.64 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、長さ $0.7 \mu\text{m}$ 程度の屈曲が顕著なひも状に見られるフィブリルについては、長さがおおよそ $0.40 \mu\text{m} \sim 0.81 \mu\text{m}$ の範囲内であると認められた。また、長さ $0.1 \mu\text{m}$ 程度の短小な楔形のフィブリルの方の長さは、おおむね $0.070 \mu\text{m} \sim 0.54 \mu\text{m}$ の範囲内であった。

次に、**ホンアロエ**葉肉組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を図 3.65 に示す。この観察画像中の様相も、また一種特有で、前掲の図 3.63 のウケザキクンシラン葉組織由来 WARP による場合に酷似している。

すなわち、その画像中には、フィブリルに相当すると考えられる、多数の短小な楔形の物体だけが、斑点様に多数散在して見られる。それらの楔形の物体は、各孤立し、前記のホウライシヨウ果肉組織由来 WARP による場合や紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合とは異なり、各先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成するようなことは全くない。

図 3.65 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 0.6 nm～1.9 nm の範囲内であった。これも、本項の観察結果中では、図 3.46 のセイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP による場合と同様に、観察出来た最も細いフィブリルに当たった。

なお、図 3.65 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、楔形の物体の長さは、おおよそ 0.012 μ m～0.35 μ m の範囲内であった。

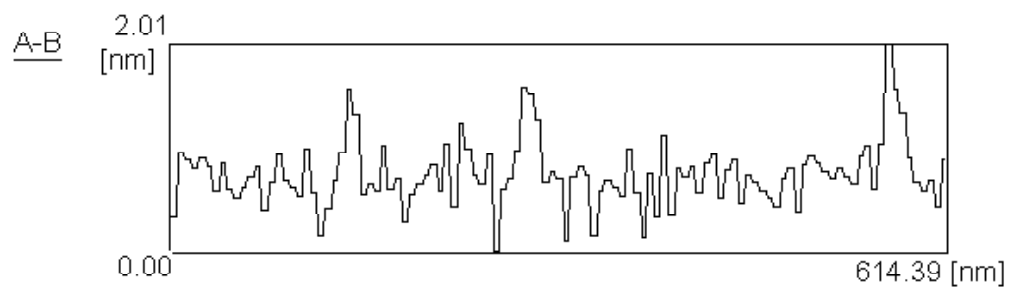
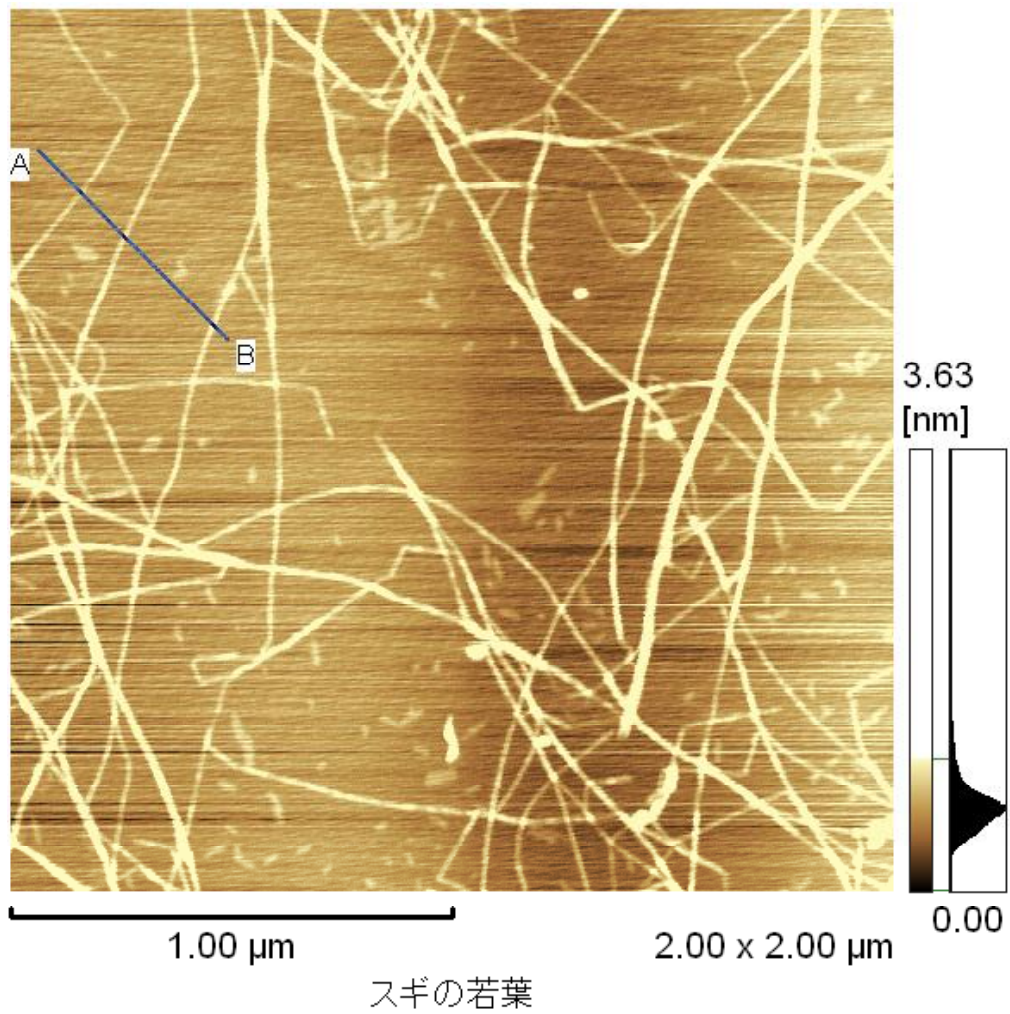


図 3.54 スギ針葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

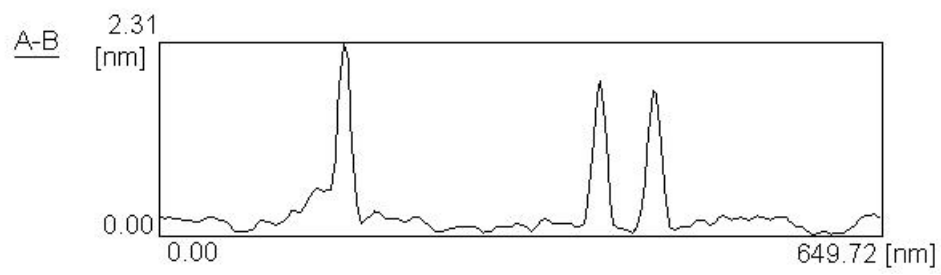
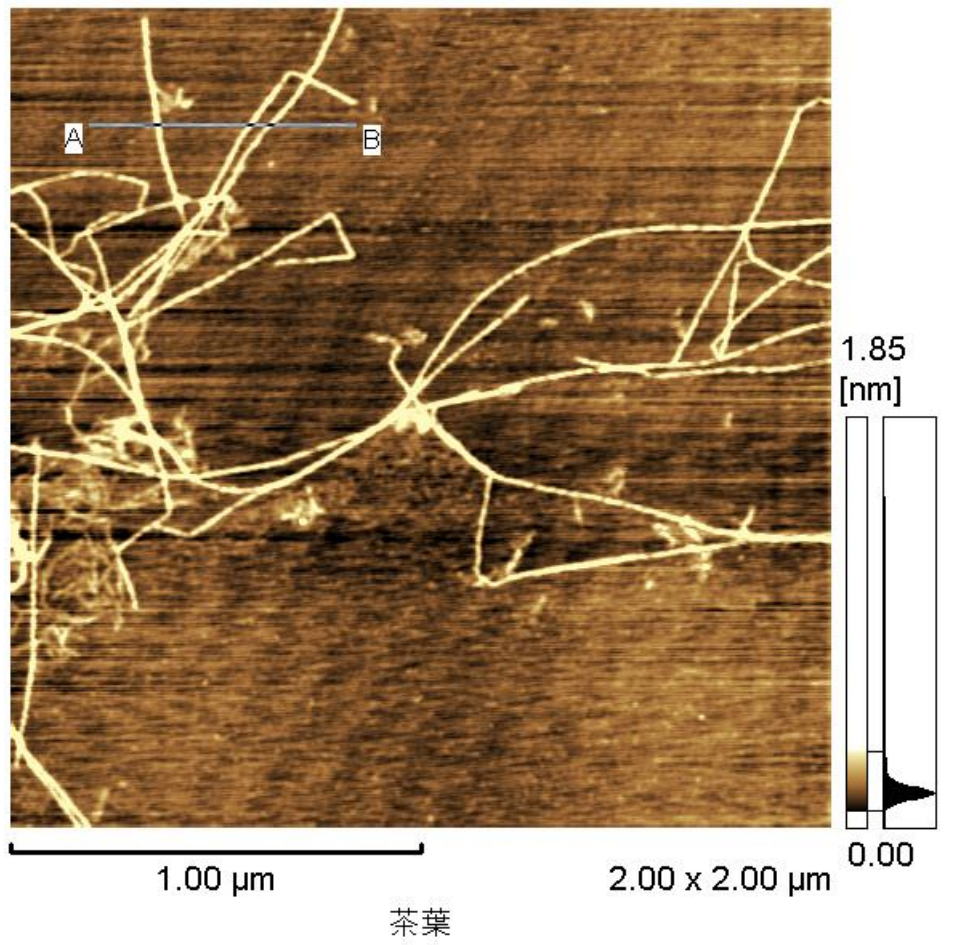


図 3.55 チャノキ葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

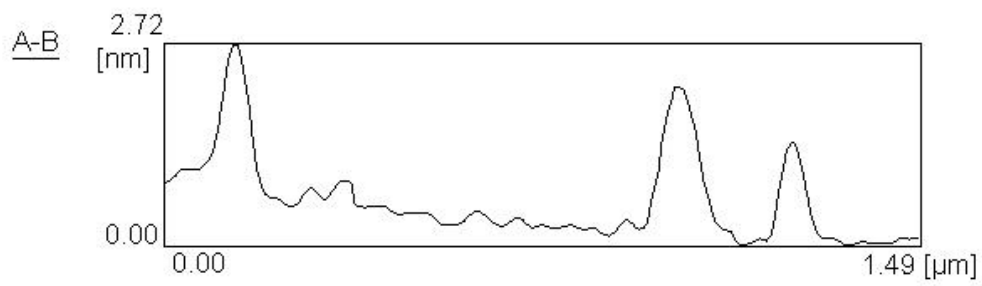
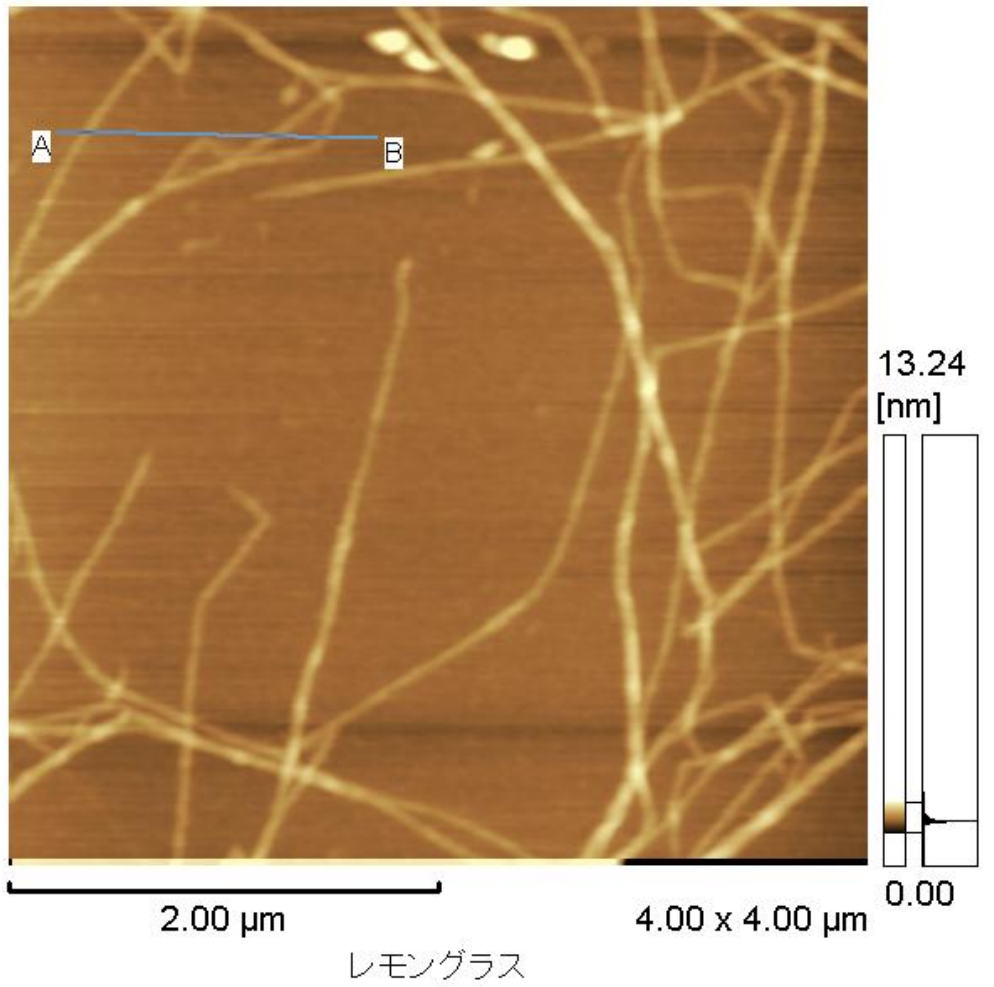


図 3.56 レモングラス葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

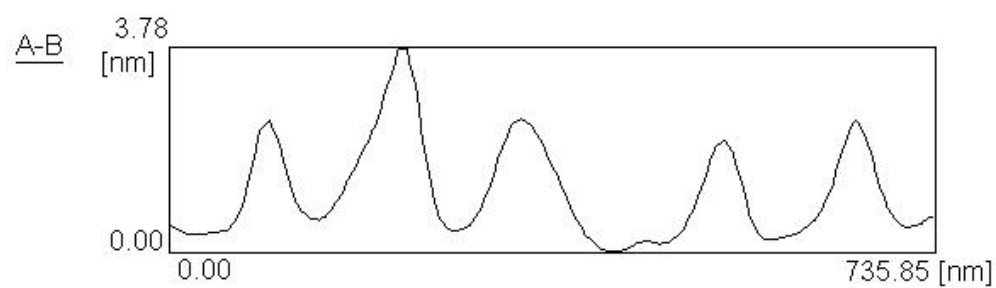
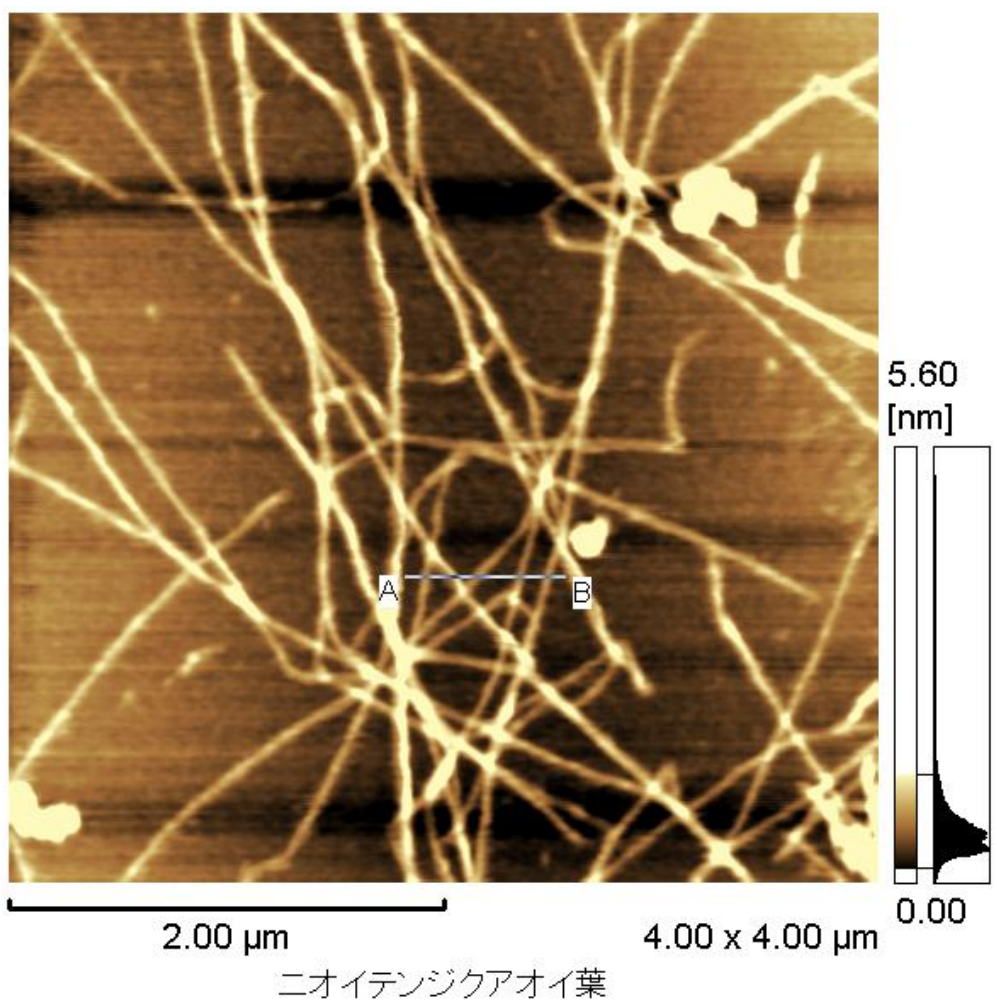


図 3.57 ニオイテンジクアオイ葉組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

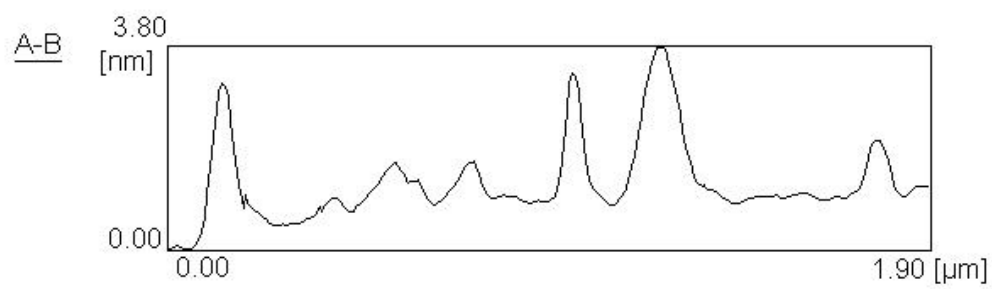
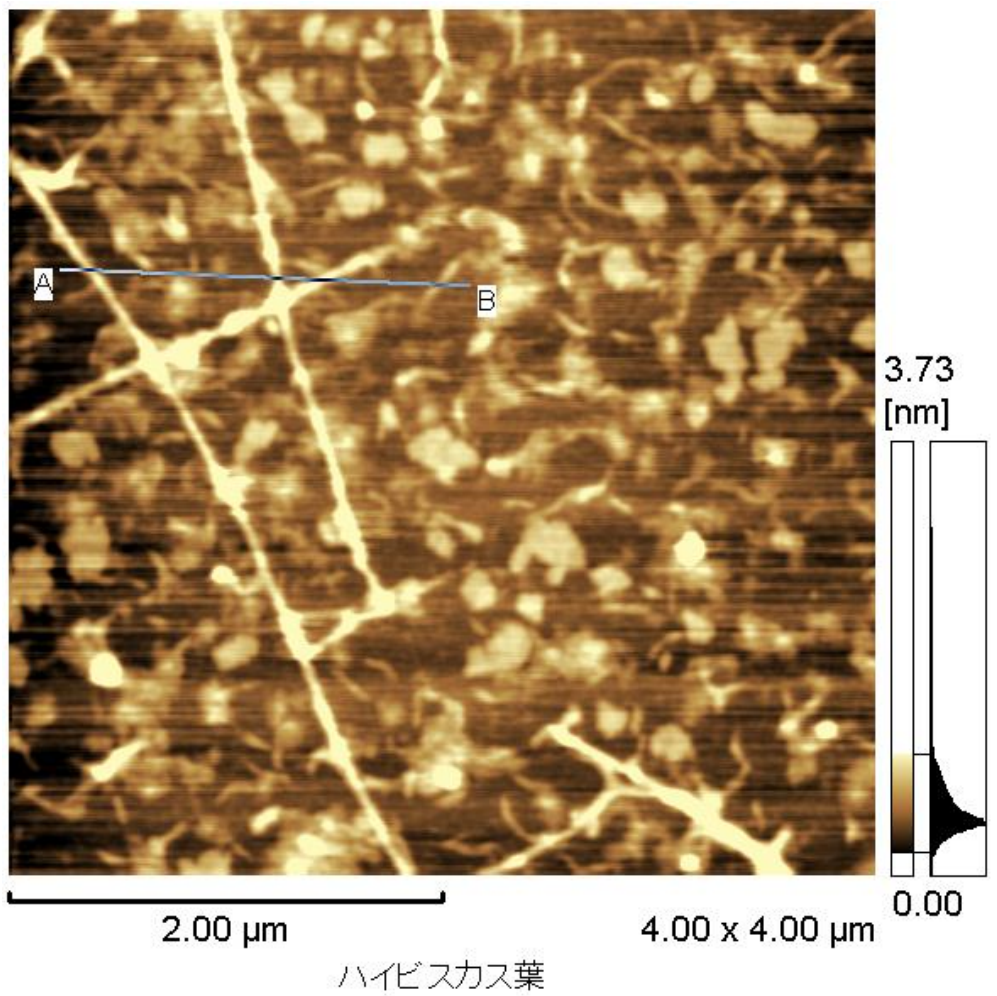


図 3.58 アルノッティアヌスハイビスカス葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

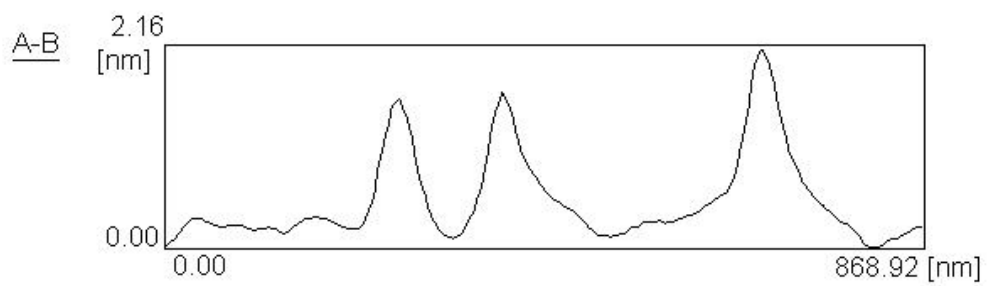
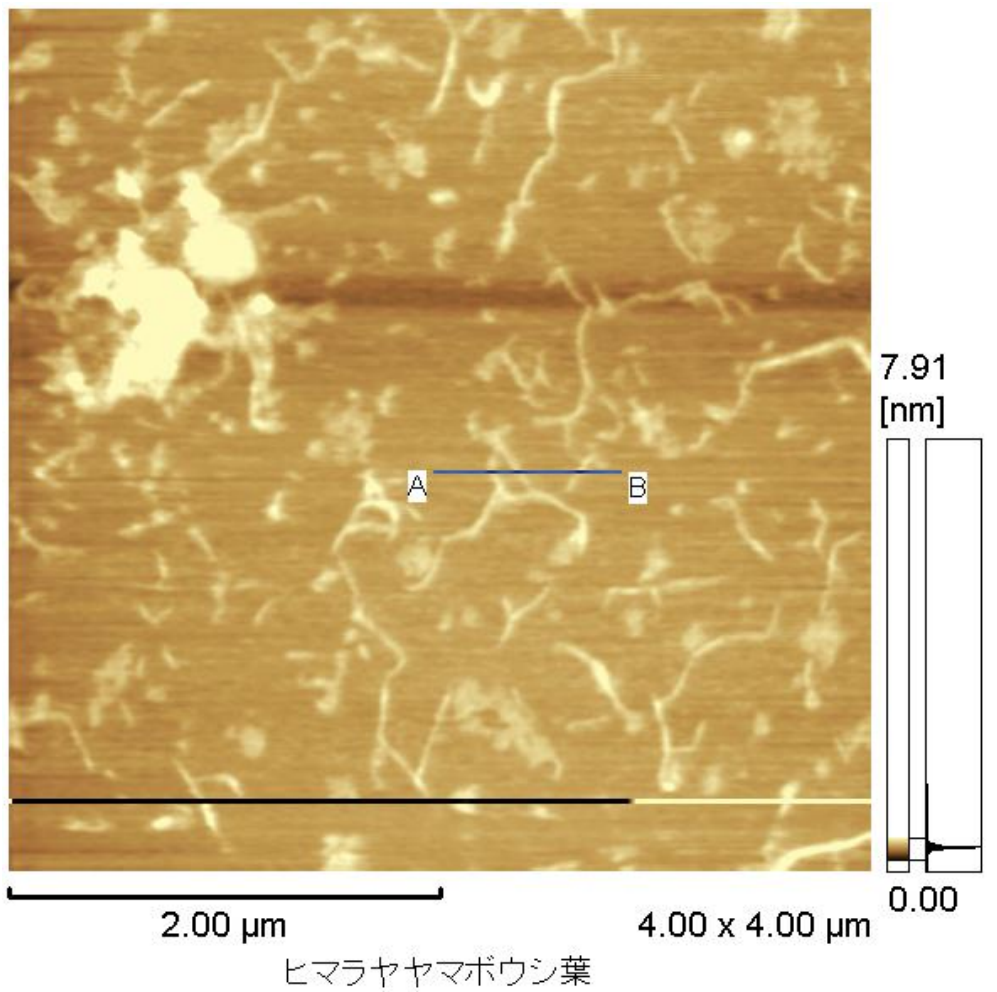


図 3.59 ヒマラヤトキワヤマボウシ葉組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

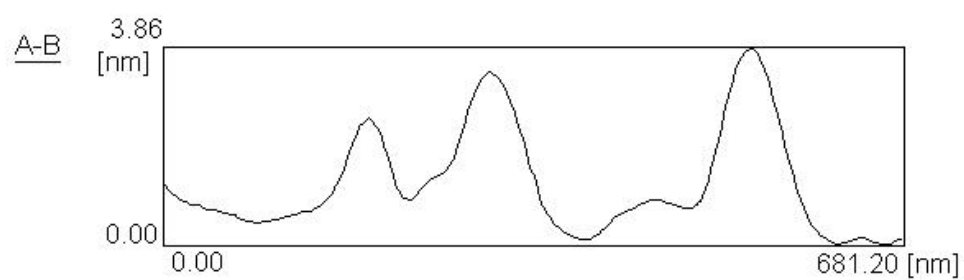
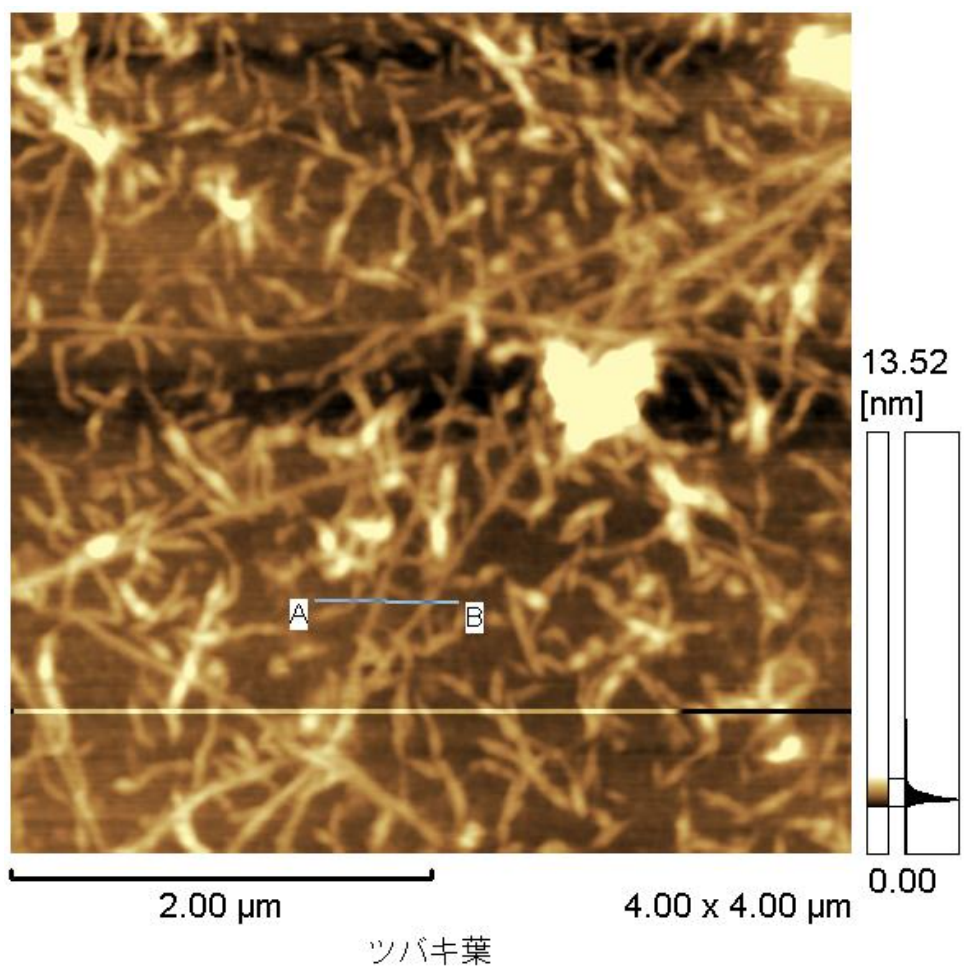


図 3.60 ヤブツバキ葉組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

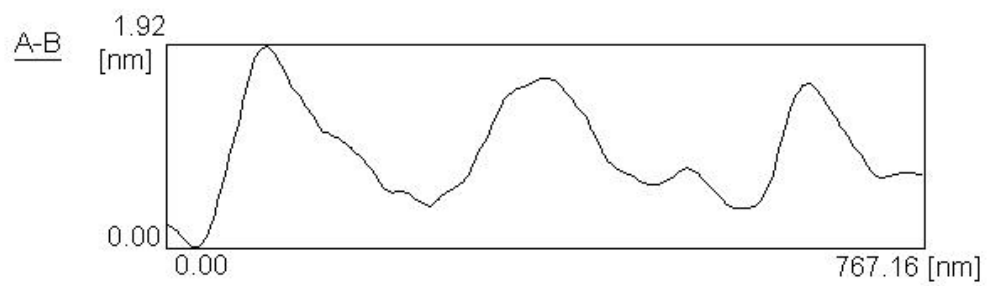
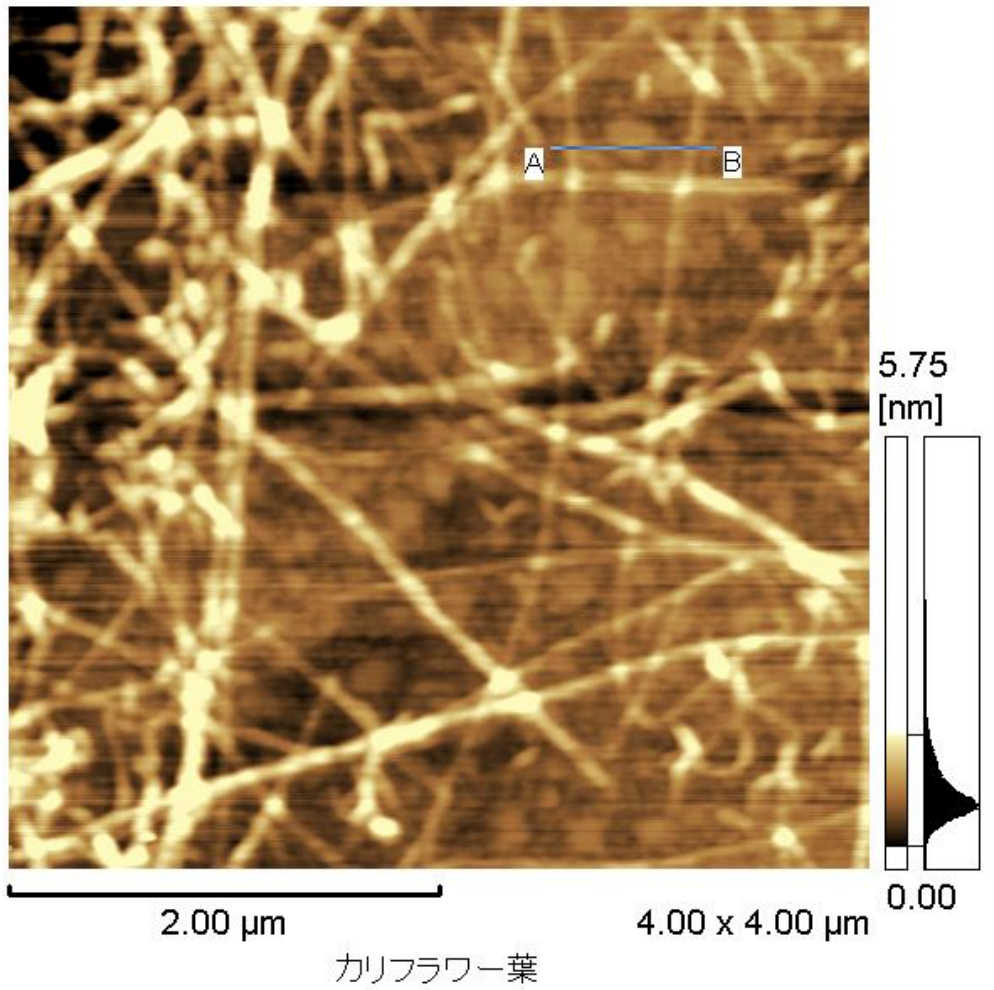


図 3.61 ハナヤサイ葉組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

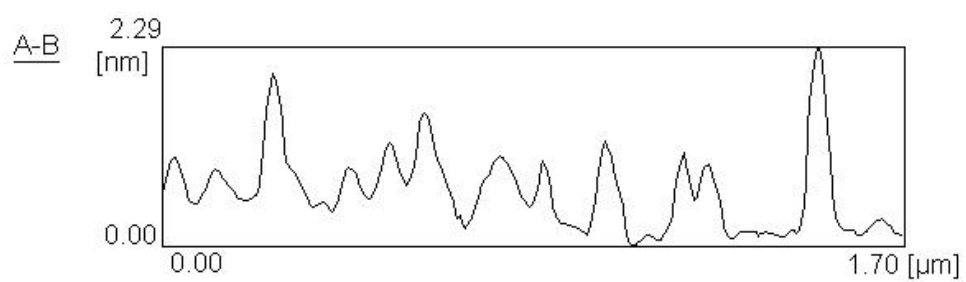
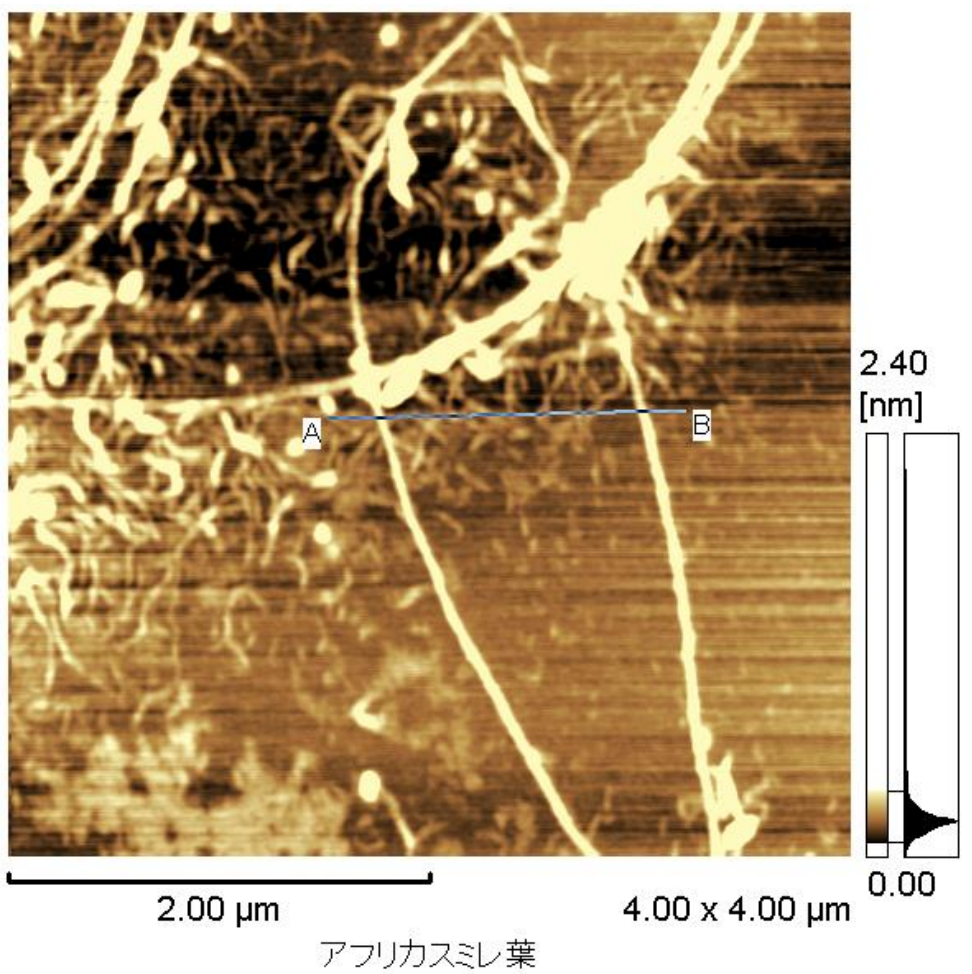


図 3.62 アフリカスミレ葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

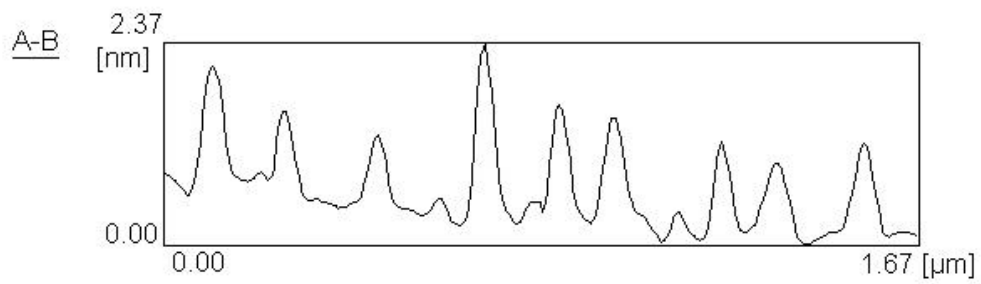
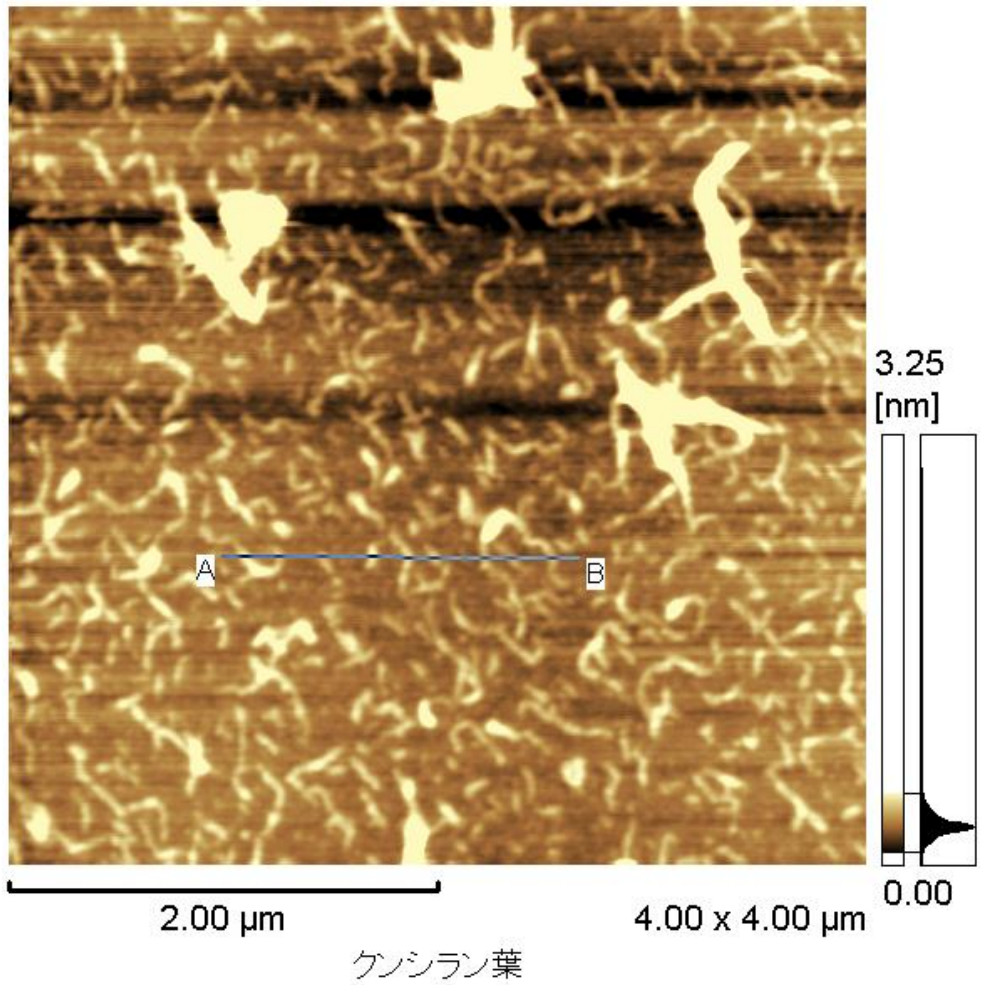


図 3.63 ウケザキクンシラン葉組織由来 WARP の AFM 像
(コンタクトモード)

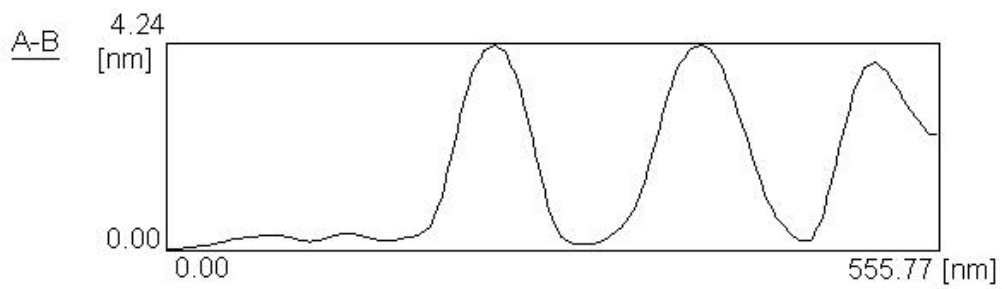
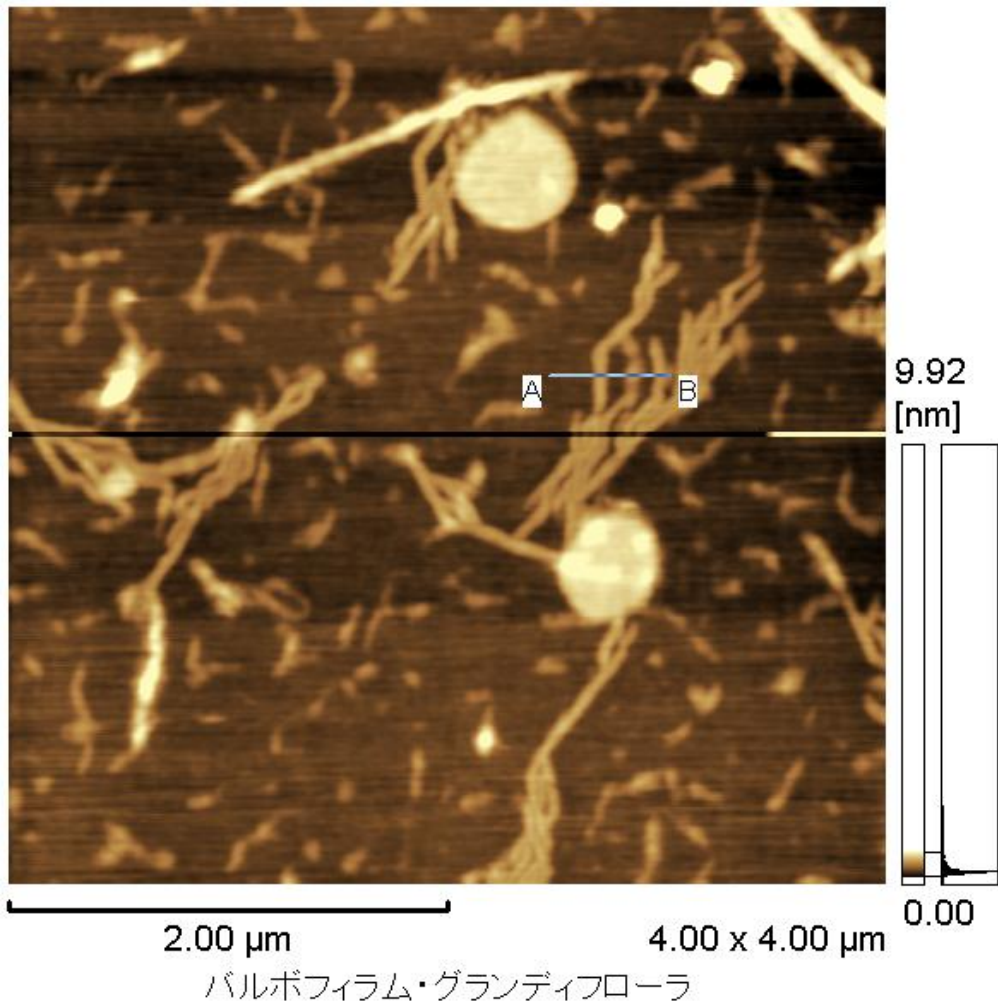


図 3.64 バルボフィラム・グランディフロルム葉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

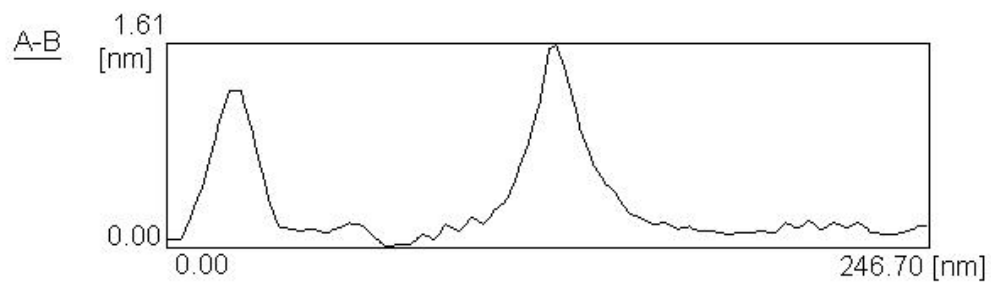
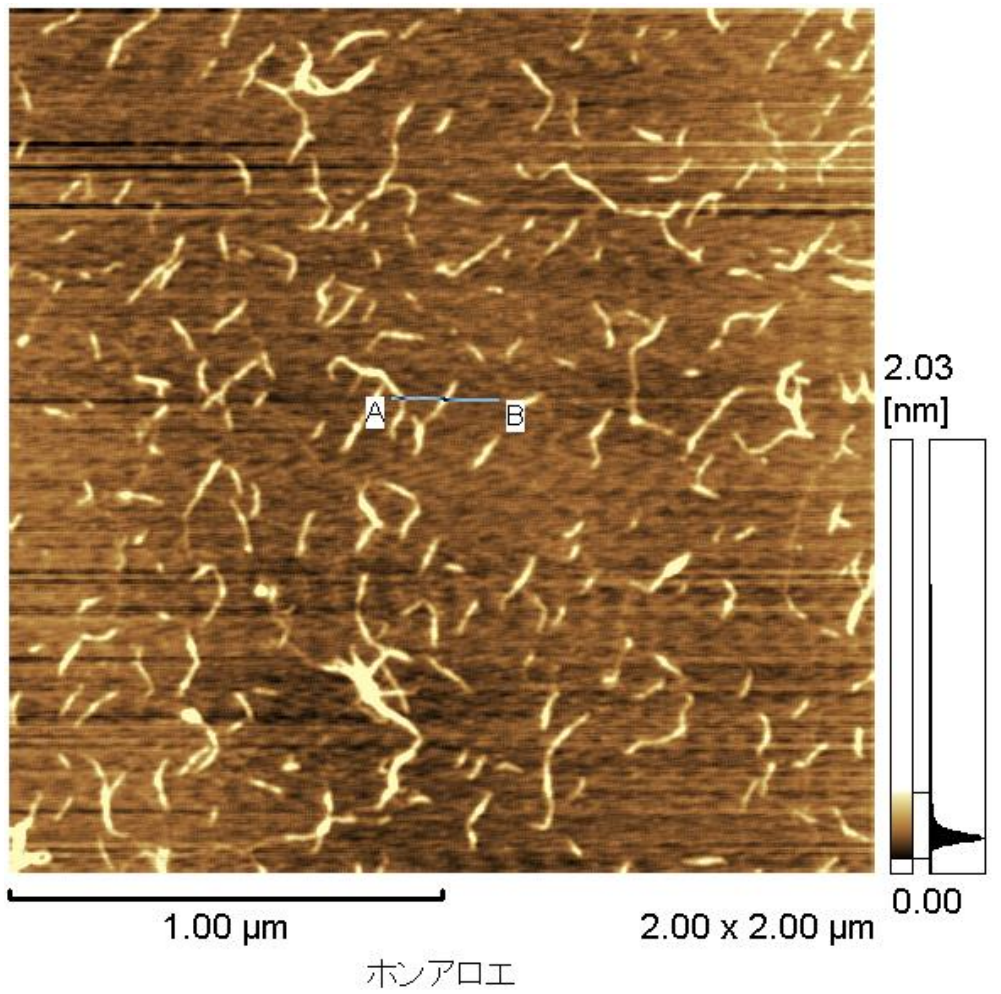


図 3.65 ホニアロエ葉肉組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、各種塊茎・塊根組織由来 WARP による実験結果について示す。

まず、**青首種ダイコン**塊茎（成熟）組織由来 WARP による AFM 観察画像を、図 2.76 に示す。この観察画像中の様相は、実に、ほぼ前掲の図 2.62 の紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合と合致する。すなわち、その画像中では、多糖フィブリルに相当すると思われる多数の比較的短小な楔形の物体の存在だけが認められ、そのほとんどが、それぞれ先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成しているように見られる。

図 2.76 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 0.8nm ~2.0 nm の範囲内にあり、これもまた紅根種ダイコンの芽生えの茎組織による場合とほとんど変わりがなかった。

なお、図 2.76 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、上記の連結が明瞭な部分は除いて、楔形の物体の長さは、およそ 0.082 μm ~0.45 μm の範囲内であった。

そうであるとする、青首種ダイコンと紅根種ダイコンは、ほぼ同一植物種に属し、ダイコンの成熟塊茎はその芽生えの茎が生長・肥大したものであることを考慮すると、ダイコンの主要茎組織では、生長段階に関わらず、同形状のセルロースフィブリルが合成される可能性があることが考えられる。

次に、**ジャガイモ**塊茎組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.77 に示す。この WARP は、その材料となった塊茎組織を、特に長時間水で煮沸してデンプン等を除去する処理をした後、WARP に調製し、当該観察を実現した。

図 2.77 の画像中の様相は、一見、一種独特であるが、それは、画像上でフィブリル像が偏って配置してしまったためである。よく見ると、この画像中の様相は、結局はほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差するのみに見られる。つまり、基本的には、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と大差がない。

ただし、同観察画像中、明らかにフィブリルとは見られない、多数の粒子状の物体等の混在も認められる。それらのものは、元の材料から WARP を調製する過程において、当該観察の目的とならない元の材料の共存成分が不必要に残存したためであると考えられる。

図 2.77 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.0 nm ~2.0 nm の範囲内にあった。

次に、**サトイモ**塊茎組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.78 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似し、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差するのみに見られる。

図 2.78 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.0 nm ~2.0 nm の範囲内にあった。

次に、**サツマイモ**塊根組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.79 に示す。

この観察画像中の様相もまた、一般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。

図 2.78 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.0 nm~2.0 nm の範囲内にあった。

次に、ハス塊茎組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.80 に示す。この観察画像中の様相もまた、一般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合と酷似している。ただし、複数のフィブリルが重畳して、相当太い見栄えになっていると思われる部分も、少なからず目立っている。

図 2.80 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5nm~3.0 nm の範囲内にあった。

次に、タマネギ鱗茎組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.81 に示す。この観察画像中の様相もまた、一般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と酷似している。ただし、同画像中、明らかにフィブリルとは見られない、多数の粒子状の物体等の混在やフィブリルにまわりつくような不定形の物体の混在も認められる。それらのものは、元の材料から WARP を調製する過程において、当該観察の目的とならない元の材料の共存成分が不必要に残存したためであると考えられる。

図 2.81 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.0 nm~2.0 nm の範囲内にあった。

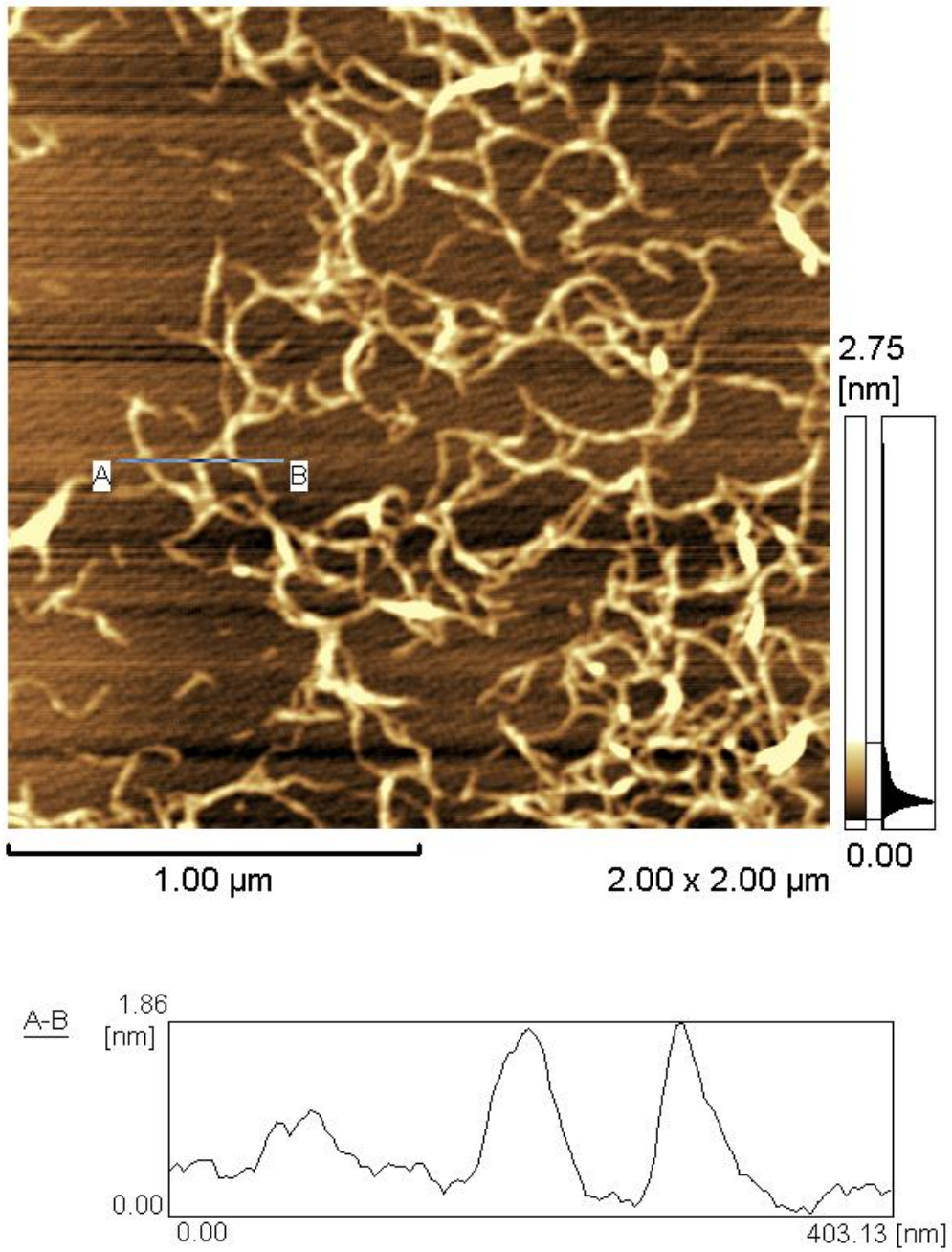


図 3.66 成熟ダイコン（青首大根）塊茎組織由来 WARP の AFM 像
（コンタクトモード）

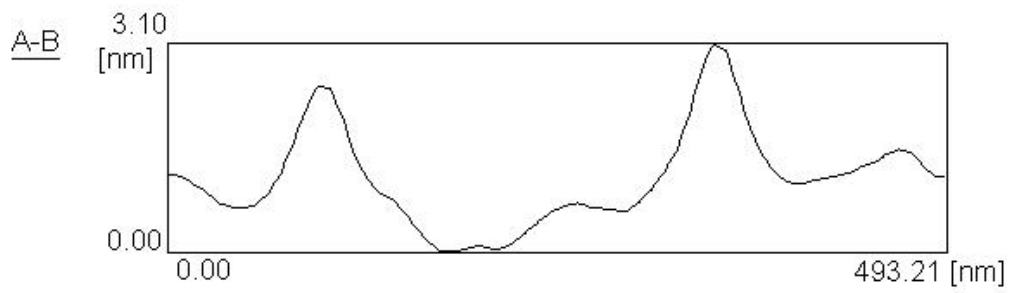
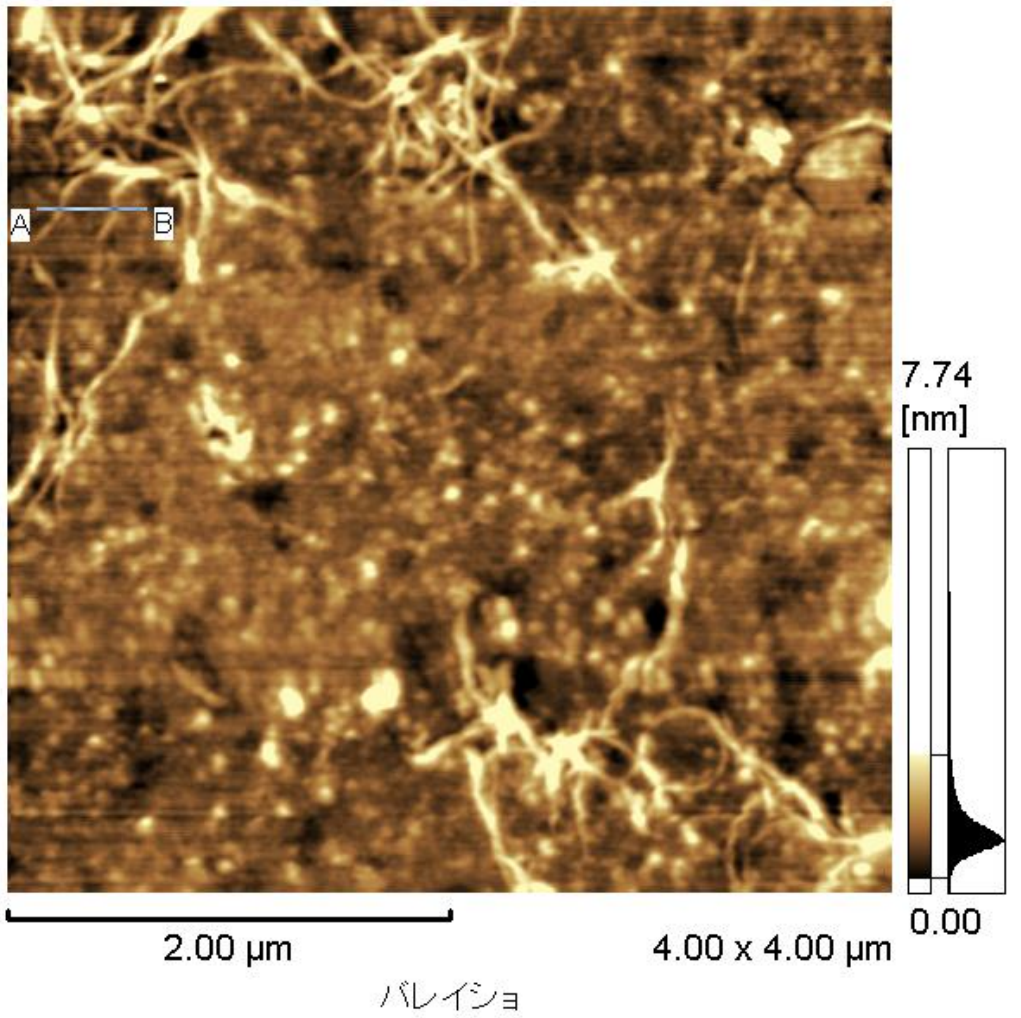


図 3.67 ジャガイモ塊茎組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

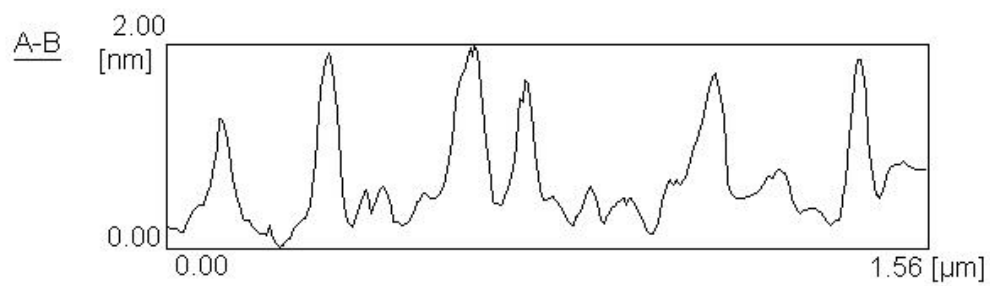
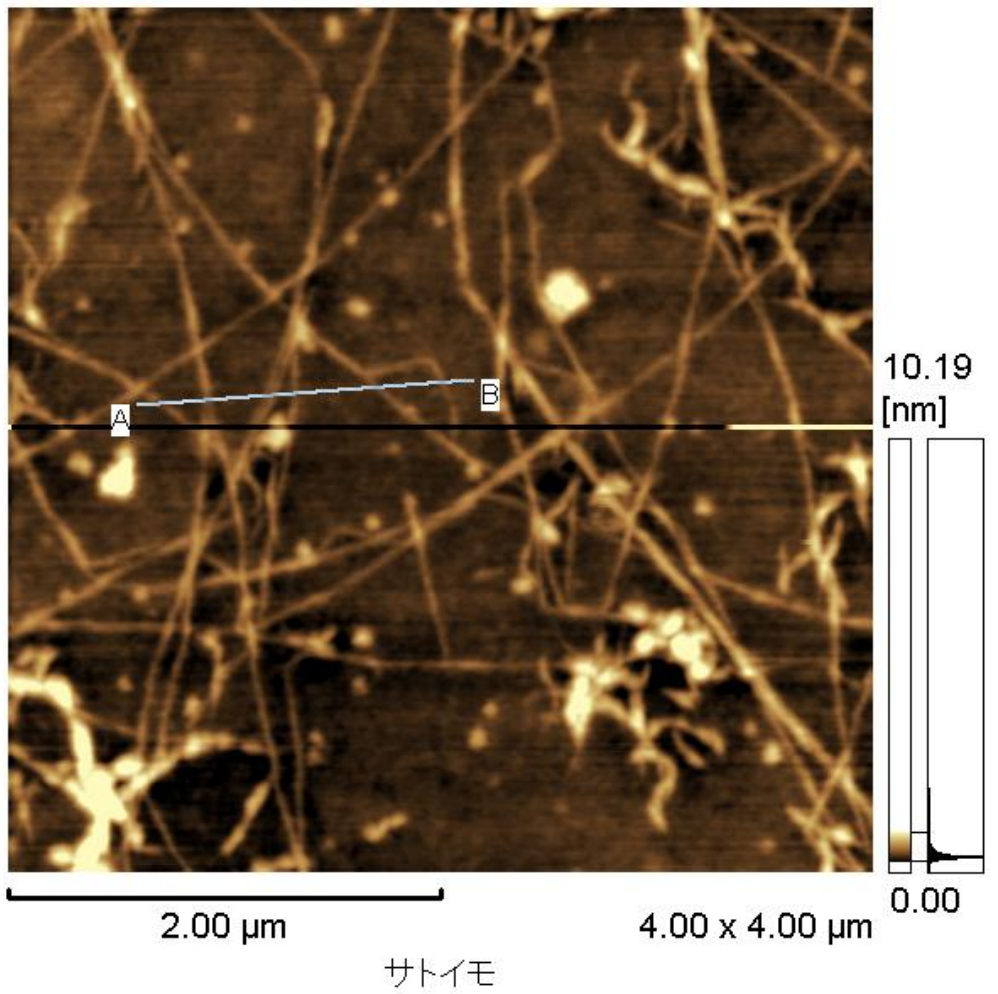


図 3.68 サトイモ塊茎組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

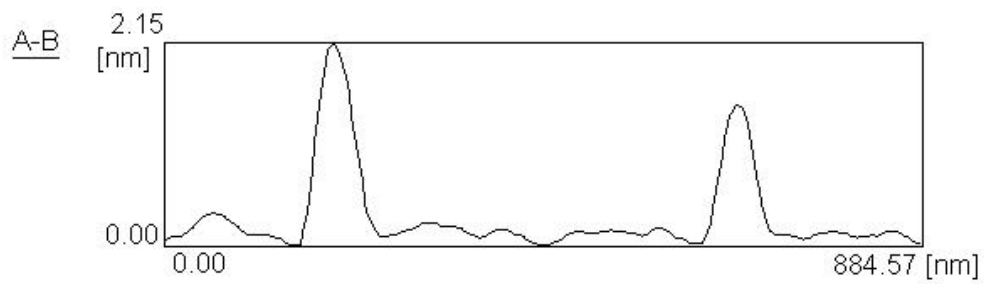
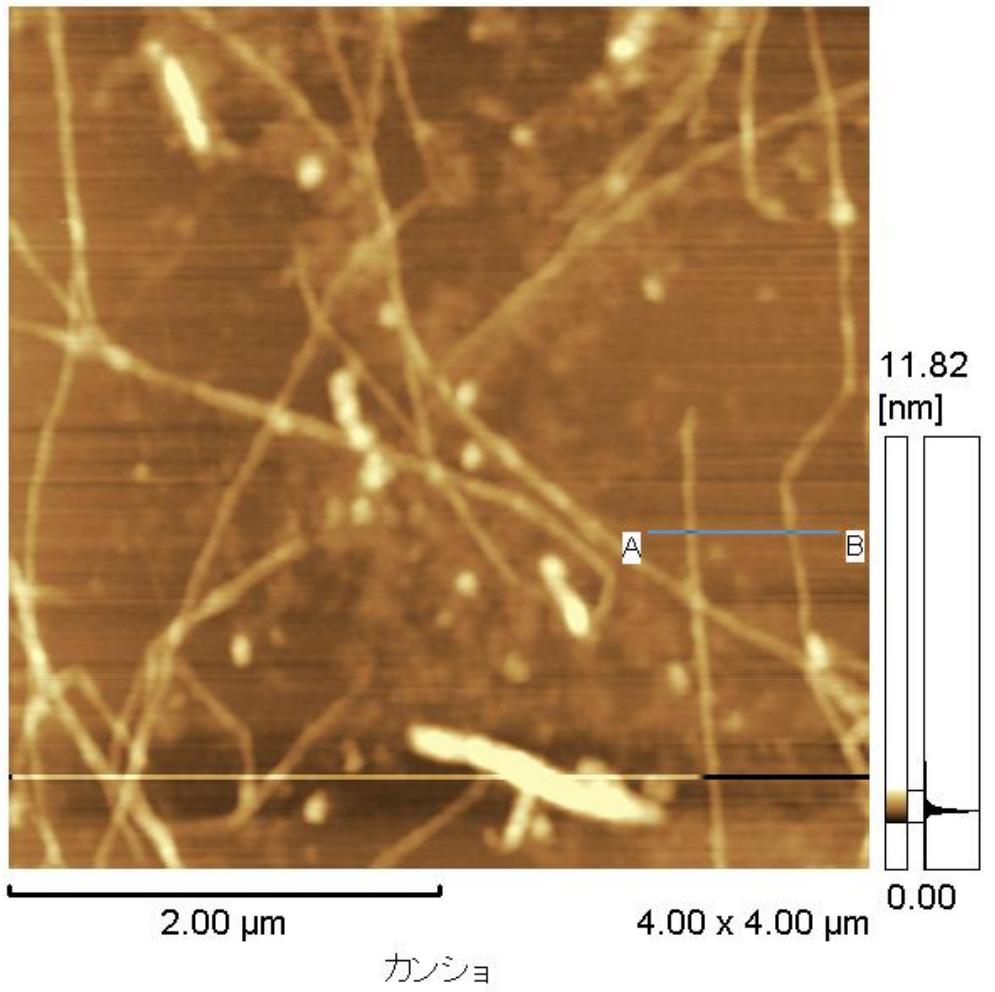


図 3.69 サツマイモ塊根組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

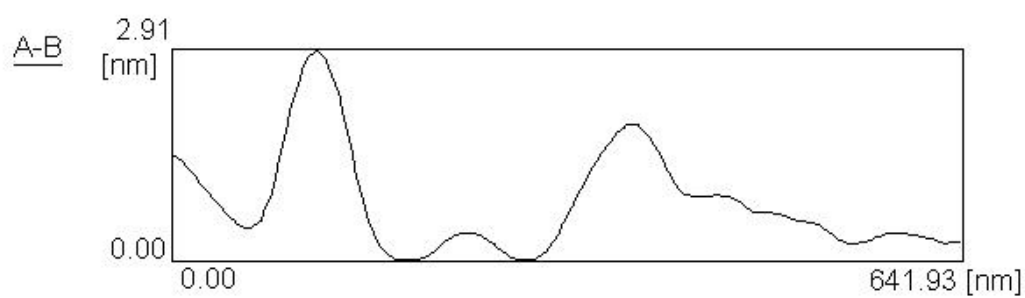
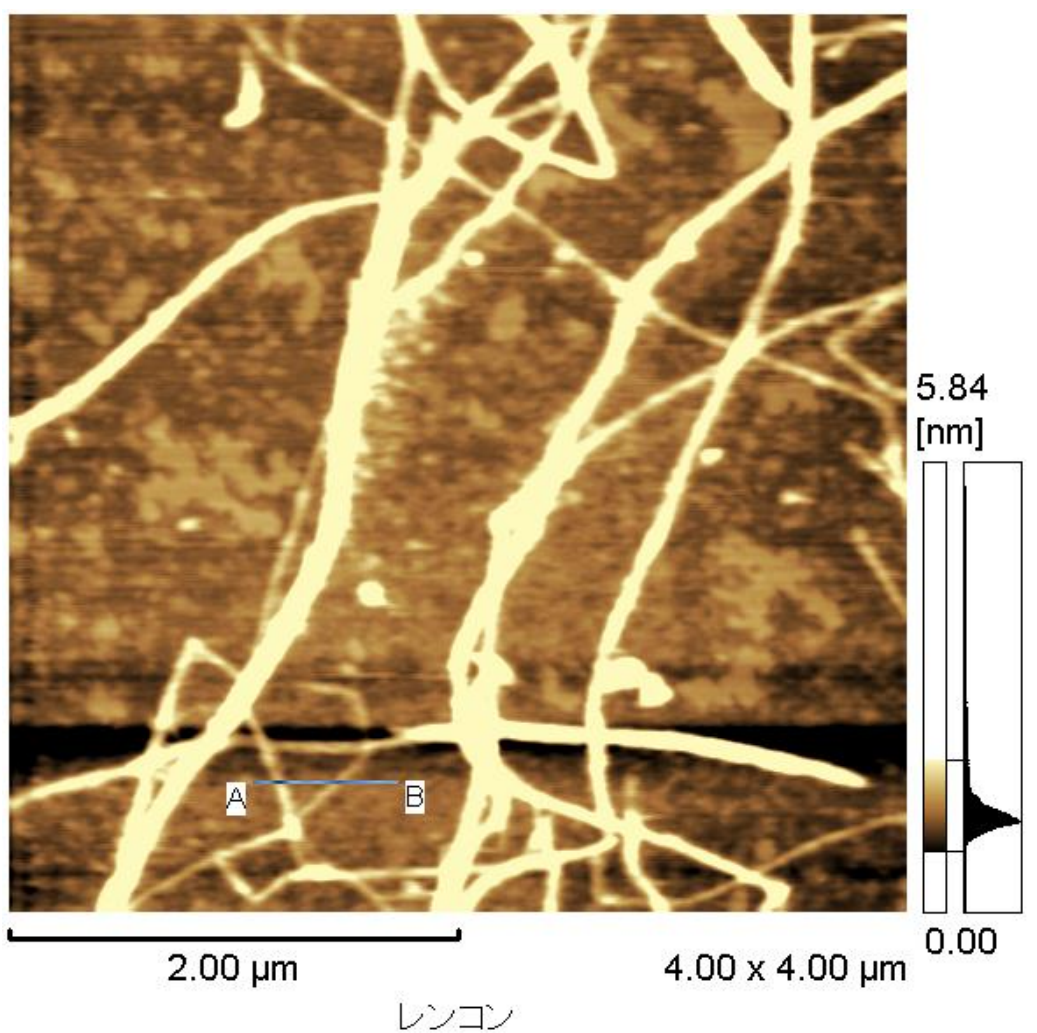


図 3.70 ハス塊茎組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

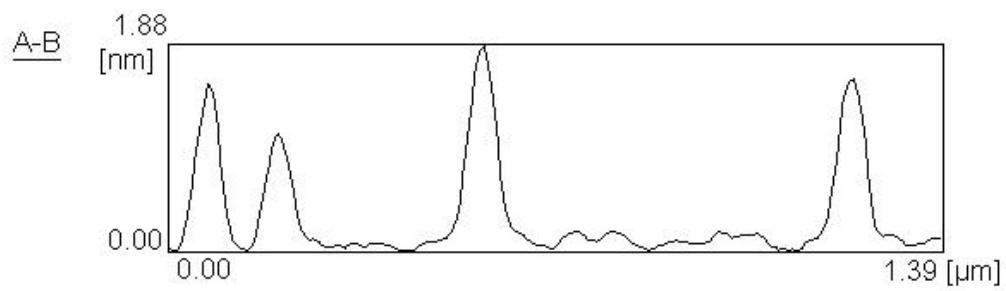
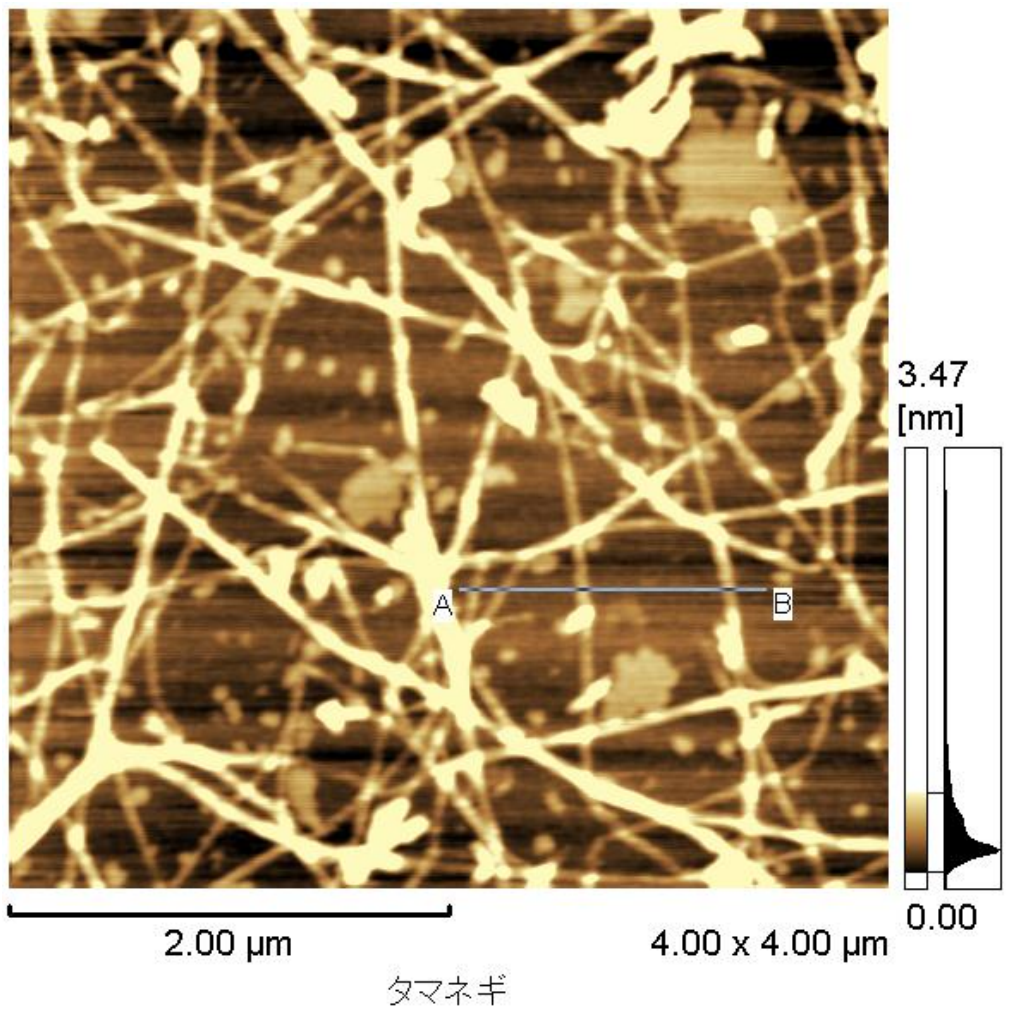


図 3.71 タマネギ鱗茎組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

次に、本項中の上記の分類に属しない各種組織等に由来する WARP による実験結果について示す。

まず、**タバコ BY2 細胞塊**由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.82 に示す。この観察画像中の様相はまた、全般的にアールスメロン果肉組織由来 WARP 等による場合に酷似している。ただし、図 2.82 の画像中では、細長い糸状のフィブリルについては、複数のフィブリルが重畳して、相当太い見栄えになっていると思われる部分が、多く目立っている。

図 2.82 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルの場合は、おおよそ 1.5 nm~2.5 nm の範囲内であった。また、短小な断片状の方のフィブリルの場合は、幅おおむね 0.5 nm~1.5 nm の範囲内であった。そして、短小な断片状の方のフィブリルの幅は、変化の範囲とばらつきの程度が比較的にかい大きいことが認められた。

なお、図 2.82 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルについては、少なくとも長さがおおよそ 0.79 μm 以上であると認められた。また、短小な断片状のフィブリルの方の長さは、おおむね 0.012 μm ~0.27 μm の範囲内であった。

次に、**マツバラン**胞子体組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.83 に示す。この観察画像中においては、ただ 1 本の細長い糸状のフィブリルがゆるやかにカーブを描き走行する様子のみが確認出来る。

本研究を通じて、マツバラン胞子体組織から調製した WARP による AFM 観察を実施した場合、繰り返し試みても、ひとつの画像中に複数以上と認識出来るフィブリルを確認出来たことはなかった。その理由は、当該のフィブリルの正体である高分子物質の分散性が低く、その水懸濁液を調製しても、当該高分子物質は速やかに沈降して仕舞うため、最終的に前記の III-2-2 vii) で示した方法により AFM 観察を実施した場合に、1 回の観察で確認出来るフィブリル像の数が相当少なくなって仕舞うためであると考えられる。

図 2.83 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、約 1.9 nm 程度であった。

最後に、**オゴノリ**藻体組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 2.84 に示す。この観察画像中の様相は、また、一種独特である。

すなわち、その画像中では、見られる物体としては、全般的に前記の図 2.32 のオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合と同様、ほぼ同様の分岐の少ない細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差するのみに見られる。しかしながら、その細長いフィブリルは、いずれもどこか硬くぎこちない形状に見え、端部で激しく屈曲し、隣接する他のフィブリルと相互に交差することが少ない。

図 2.84 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5 nm~2.5 nm の範囲内であった。

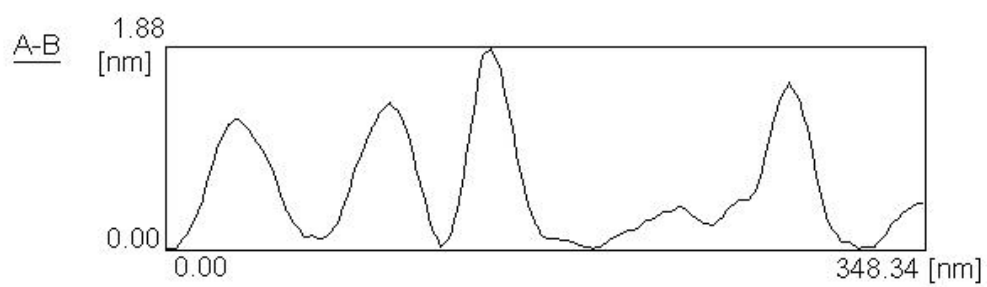
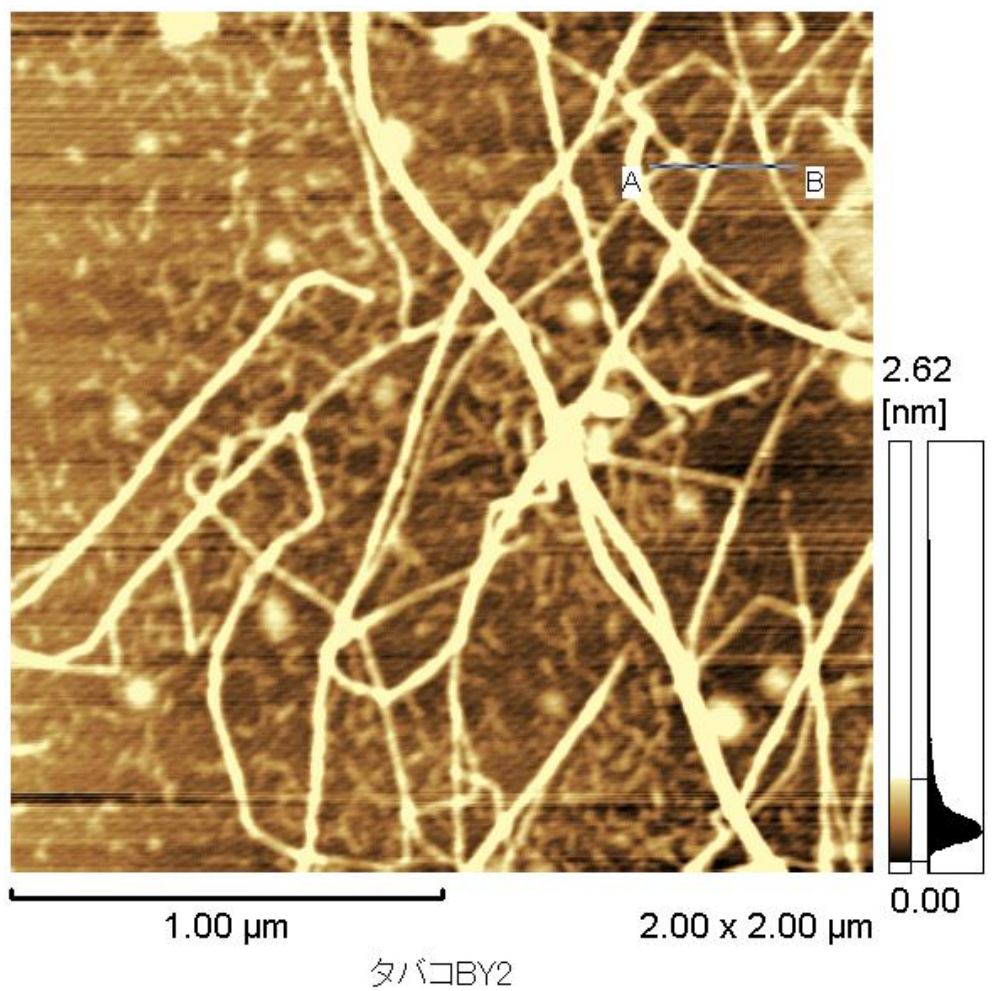


図 3.72 タバコ BY2 細胞塊由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

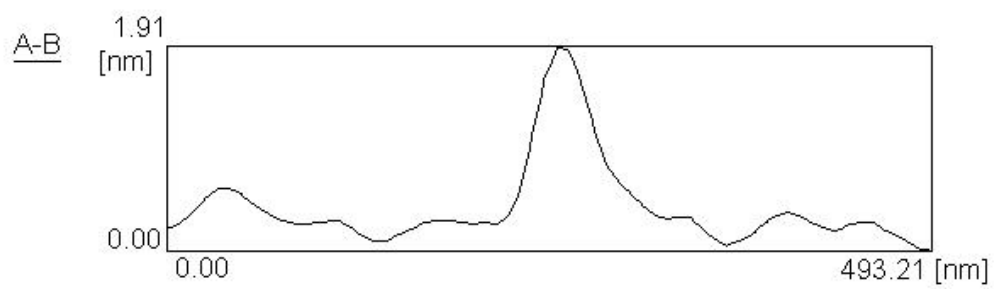
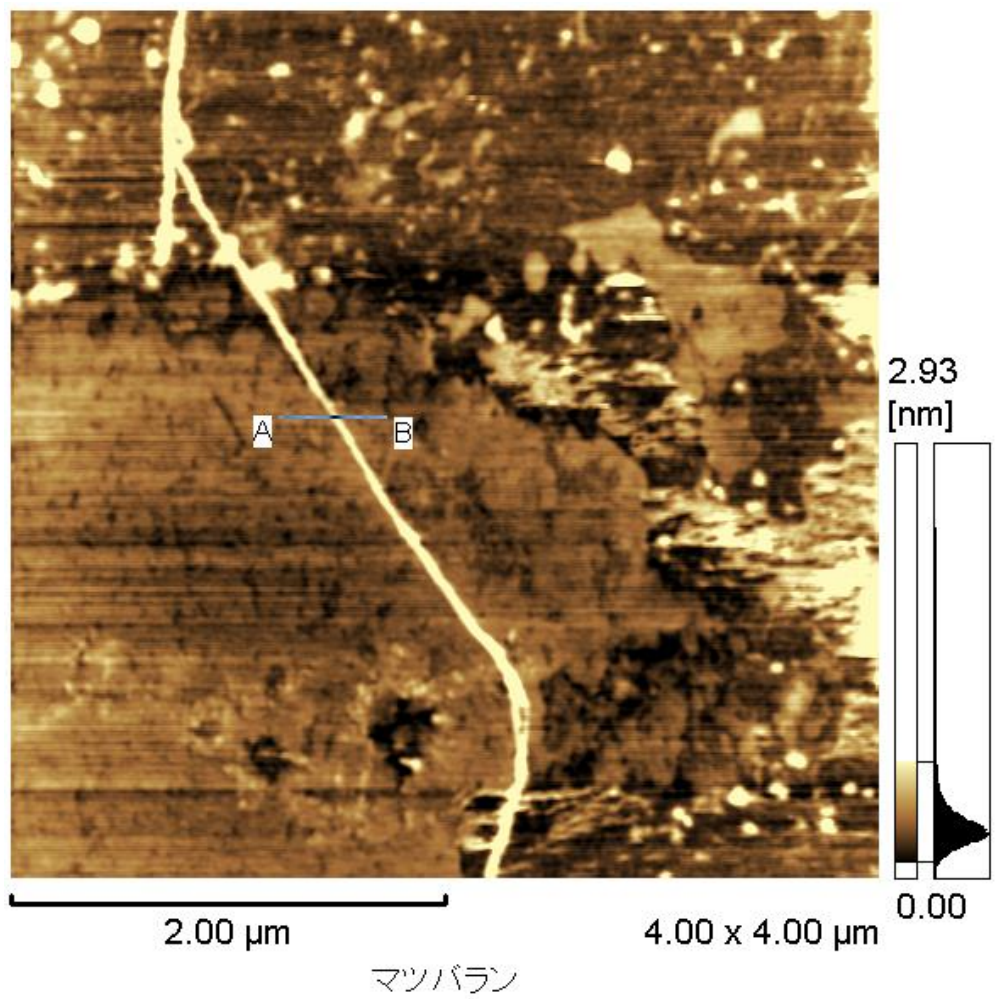


図 3.73 マツバラン胞子体由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

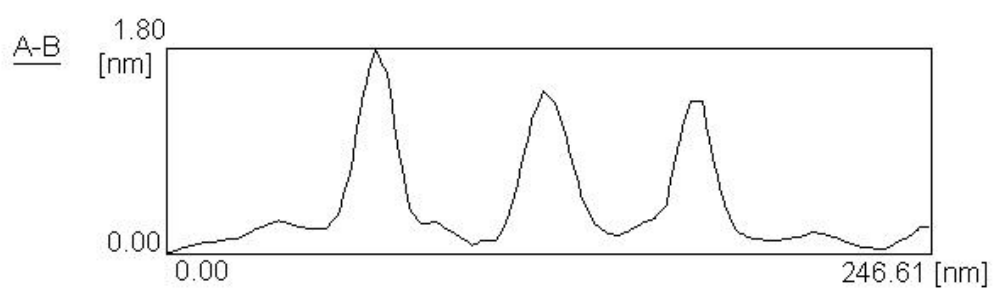
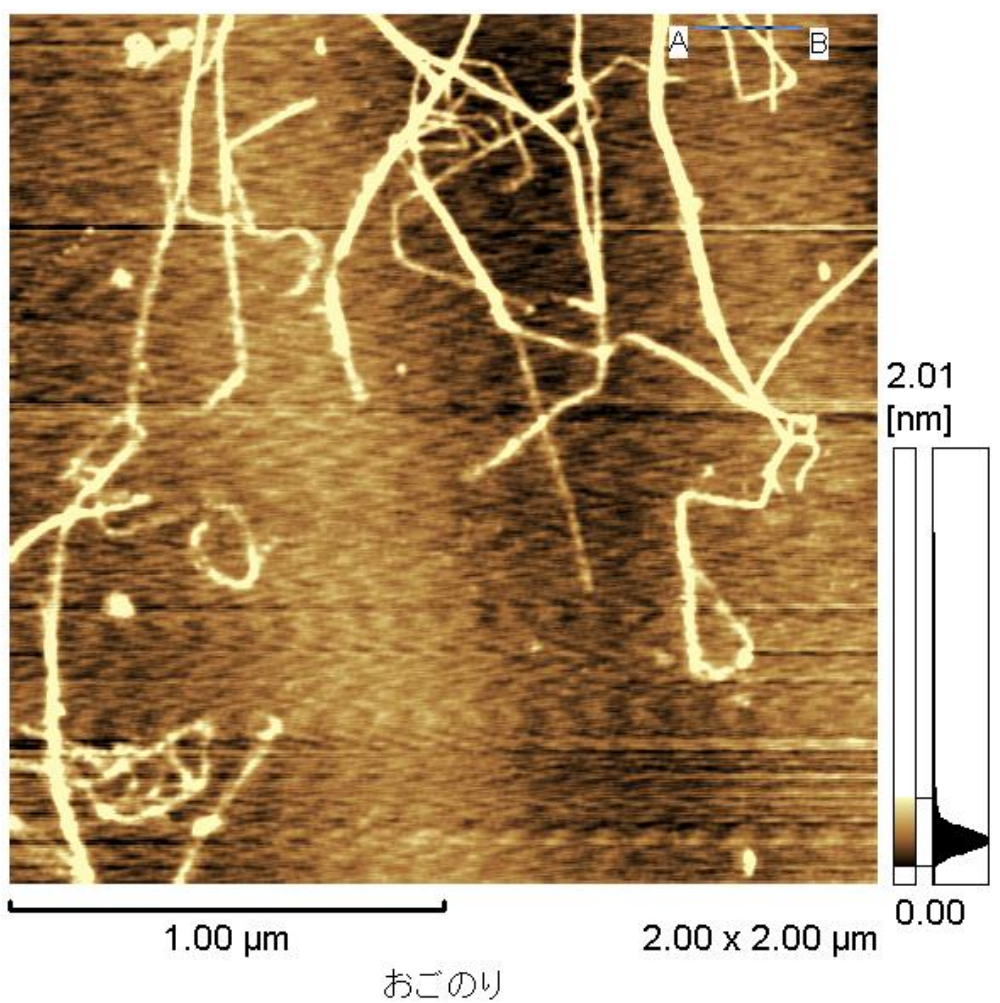


図 3.74 オゴノリ藻体由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

以上の実験結果のうち、各種果肉組織から調製した WARP による AFM 観察の結果から、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合 (図 2.32)、カキ果肉組織由来 WARP による場合 (図 2.34a)、モモ果肉組織由来 WARP による場合 (図 2.35)、バナナ果肉組織由来 WARP による場合 (図 2.40)、アールスメロン果肉組織由来 WARP (図 2.45) による場合ならびに巨峰種ブドウ果肉組織由来 WARP (図 2.47) による場合の 6 例を選んで、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 2.85 のようになった。

これによれば、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 11 で最頻値 1.9 nm であることが認められる。これに対して、カキ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 9 で最頻値 1.7 nm、モモ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 10 で最頻値 1.7 nm、バナナ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 12 で最頻値 1.7 nm、アールスメロン果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 6 で最頻値 1.9 nm および 2.5 nm、ならびに、ブドウ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 8 で最頻値 1.7 nm であることが認められる。つまり、そのときの各頻度は異なるが、カキ果肉組織由来 WARP、モモ果肉組織由来 WARP、バナナ果肉組織由来 WARP およびブドウ果肉組織由来 WARP のそれぞれに含まれるフィブリルの幅の最頻値は、全て 1.7 nm となって一致している。他方、アールスメロン果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、直前 4 例の場合よりも大きい傾向で、1.9 nm および 2.5 nm の 2 つである。

図 2.85 において、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP によるヒストグラムは、フィブリルの幅の最頻値の 1.9 nm を頂点とする最大の尖りを描いている。これに加えて、このヒストグラムは、フィブリルの幅が 1.1 nm で頻度 3、フィブリルの幅が 2.3 nm で頻度 5、ならびに、フィブリルの幅が 2.7 nm で頻度 3 となる、3 つの付随的に見られる小ピークを描いている。このようなヒストグラムの外形は、バナナ果肉組織由来 WARP による場合も類似している。これらに対して、カキ果肉組織由来 WARP によるヒストグラムとモモ果肉組織由来 WARP によるヒストグラムの 2 例については、ともにフィブリルの幅の最頻値の 1.7 nm 付近で、唯一のピークとなる比較的単純な形の山を描いている。

他方、残余の 2 種の果肉組織由来 WARP によるヒストグラムは、何れも複数のピークをたどる、より複雑な形の山を描いている。

一般に、果実は、発生上の由来等に基づき、仁果類 (ニホンナシ、リンゴなど)、核果類 (スモモ *Prunus salicina* Lindl.、モモなど)、液果類 (カキ、ブドウ、ウンシュウミカンなど)、堅果類 (アーモンド *Amygdalus communis* L.、クリ *Castanea crenata* Sieb. et Zucc.、テウチグルミ *Juglans regia* L. var. *orientis* Kitamura など) 等に分類される。本研究では、基本的に湿潤な果肉に相当する組織を持つことが想定されない堅果類は、分析・観察の対象としなかった。それ以外の各類の果肉については、本研究を通じて、いずれかの類に属

する種の果肉中から、2.0 nm 以下の幅の細いフィブリルの存在を確認したことになる。

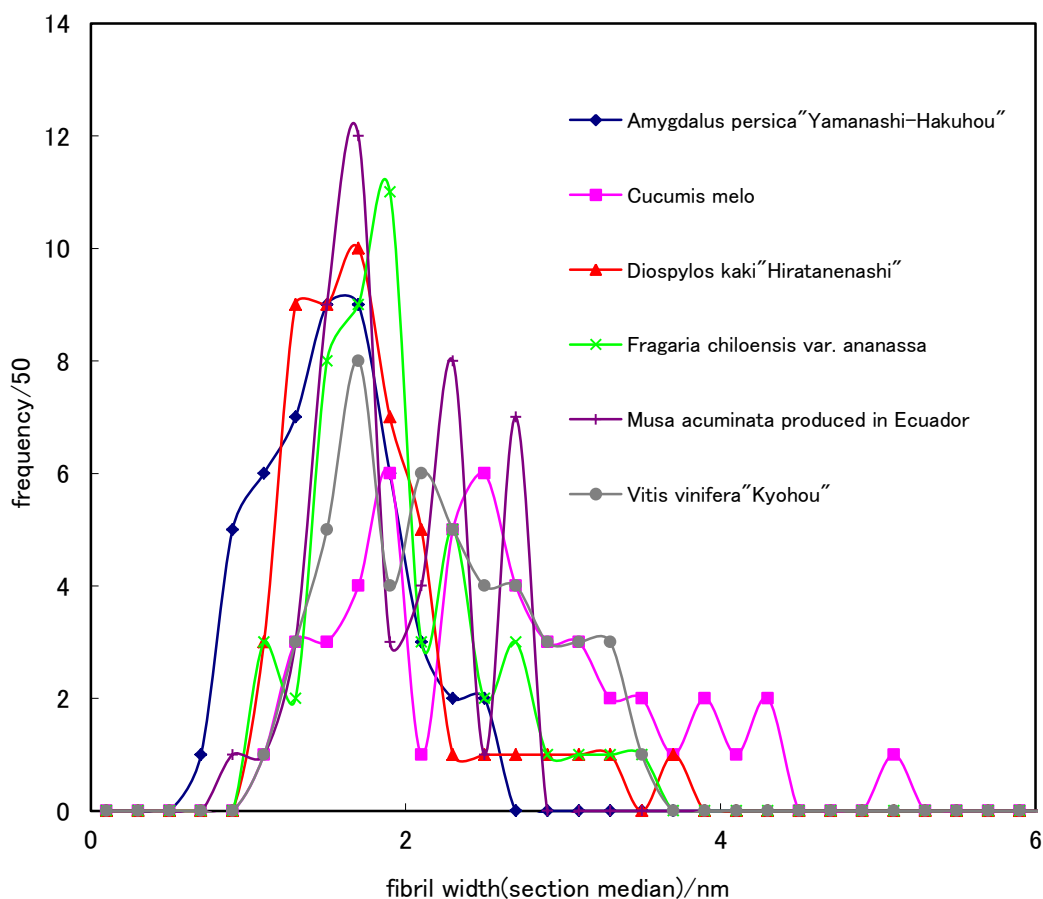


図 2.85 6種の果肉組織由来 WARP のフィブリル幅のヒストグラム

次に、各種花弁組織から調製した WARP による AFM 観察の結果から、トウガン花弁組織由来 WARP による場合 (図 2.53)、ダーウィンハイブリッド種チューリップ花弁組織由来 WARP による場合 (図 2.56a) およびセイヨウシャクナゲ花弁組織由来 WARP による場合 (図 2.57) の 3 例を選んで、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 2.86 のようになった。

これによれば、セイヨウシャクナゲ花弁組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 12 で最頻値 1.1nm、トウガン花弁組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻

度 12 で最頻値 2.1 nm、ならびに、ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 6 で最頻値 2.9 nm であることが認められる。セイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、トウガン花卉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値よりも、ほぼ 1.0 nm 小さい。また、トウガン花卉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値よりも、0.8 nm 小さい。

セイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP によるヒストグラムとトウガン花卉組織由来 WARP によるヒストグラムは、相互に外形が酷似しており、ともに最頻値付近に鋭い尖りを呈すると共に、それよりフィブリル幅が 1.0 nm 程度大きくなる付近に、双耳丘を描く傾向が見られる。他方、ダーウィンハイブリッド種チューリップ花卉組織由来 WARP によるヒストグラムは、比較的同じ標高の 8 個の小山を、波のうねりのように連ねているように見られる

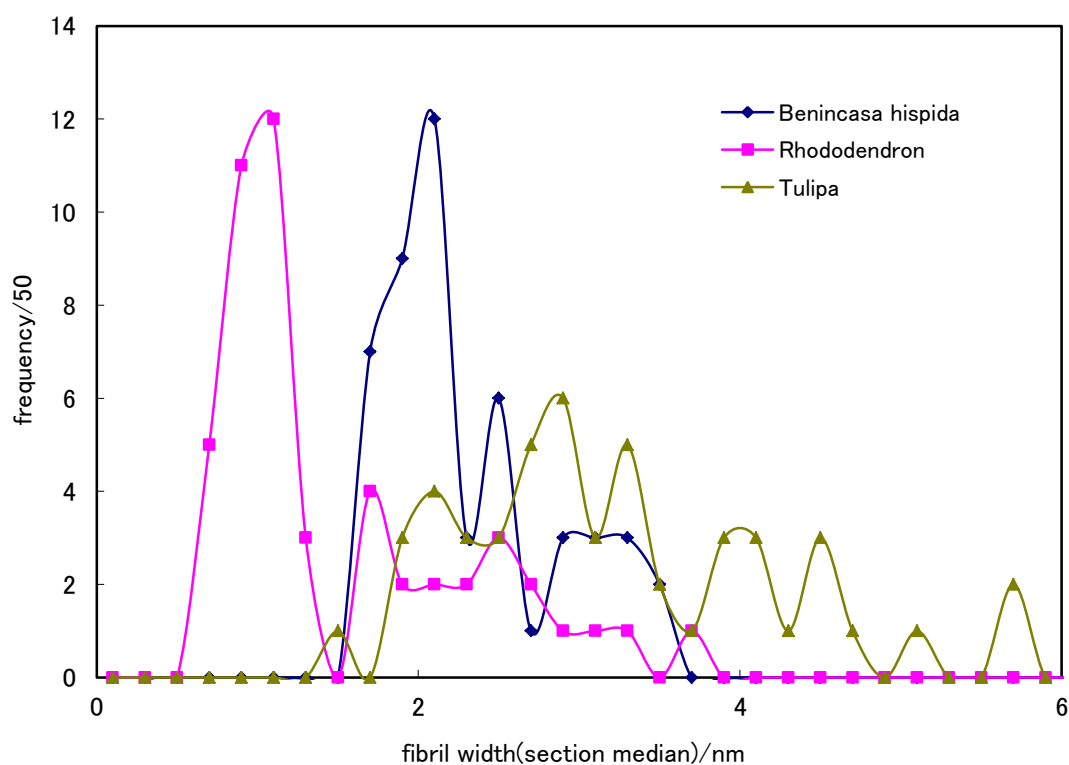


図 2.86 2 種の花弁組織由来 WARP のフィブリル幅のヒストグラム

次に、各種葉、葉柄または茎組織その他から調製した WARP による AFM 観察の結果から、フキ葉柄組織由来 WARP による場合 (図 2.61)、紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合 (図 2.62)、スギ針葉組織由来 WARP による場合 (図 2.64) およびタバコ BY2 細胞塊由来 WARP による場合 (図 2.82) の 4 例を選んで、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 2.87 のようになった。

これによれば、フキ葉柄組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 14 で最頻値 0.9 nm、紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 12 で最頻値 1.1 nm、スギ針葉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 11 で最頻値 1.1 nm、ならびに、タバコ BY2 細胞塊由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 10 で最頻値 0.9 nm であることが認められる。よって、ここで取り上げた 4 種の各植物組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、植物種と組織種の相違に関わらず、おおよそ 1.0 nm に近い数値であった。

図 2.87 において、スギ針葉組織由来 WARP によるヒストグラムは、フィブリルの幅の最頻値の 1.1 nm に加えて、フィブリル幅が 1.7 nm で頻度 8 による準最頻値となり、最頻値と準最頻値のそれぞれを頂点として、2 つの鋭い尖りを呈する。同様に、紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP によるヒストグラムも、フィブリルの幅の最頻値の 1.1 nm に加えて、フィブリル幅が 1.5 nm で頻度 9 による準最頻値となり、最頻値と準最頻値のそれぞれを頂点として、2 つの鋭い尖りを呈する。両ヒストグラムでは、フィブリル幅が 5.0 nm 以上に該当する計測点数が、全く見られない。

他方、フキ葉柄組織由来 WARP によるヒストグラムは、フィブリル幅の最頻値を頂点として単一の鋭い尖りを呈するが、加えて、フィブリル幅 5.0 nm 以上の範囲でも、数個の計測点数が見られる。既に触れたように、図 2.61 のフキ葉柄組織由来 WARP による AFM 観察画像では、分岐の少ない細長い糸状のフィブリルと短小な断片状のフィブリルの 2 型が混在して見られる。このうち、上記の鋭い尖りは、ほぼ全て短小な断片状のフィブリルの存在の反映であり、それよりフィブリル幅が大きい数値の範囲は、その大部分が分岐の少ない細長い糸状のフィブリルの存在の反映である。

タバコ BY2 細胞塊由来 WARP によるヒストグラムについては、フィブリル幅の最頻値でひとつの鋭い尖りを呈するとともに、フィブリル幅が 1.5 nm で頻度 2 までいったん下った後、フィブリル幅が 1.7 nm で頻度 4 を頂点とする小ピークが付随的に見られる。加えて、タバコ BY2 細胞塊由来 WARP によるヒストグラムについては、フィブリル幅 6.0 nm 以上の範囲でも、数個の計測点数が見られる。

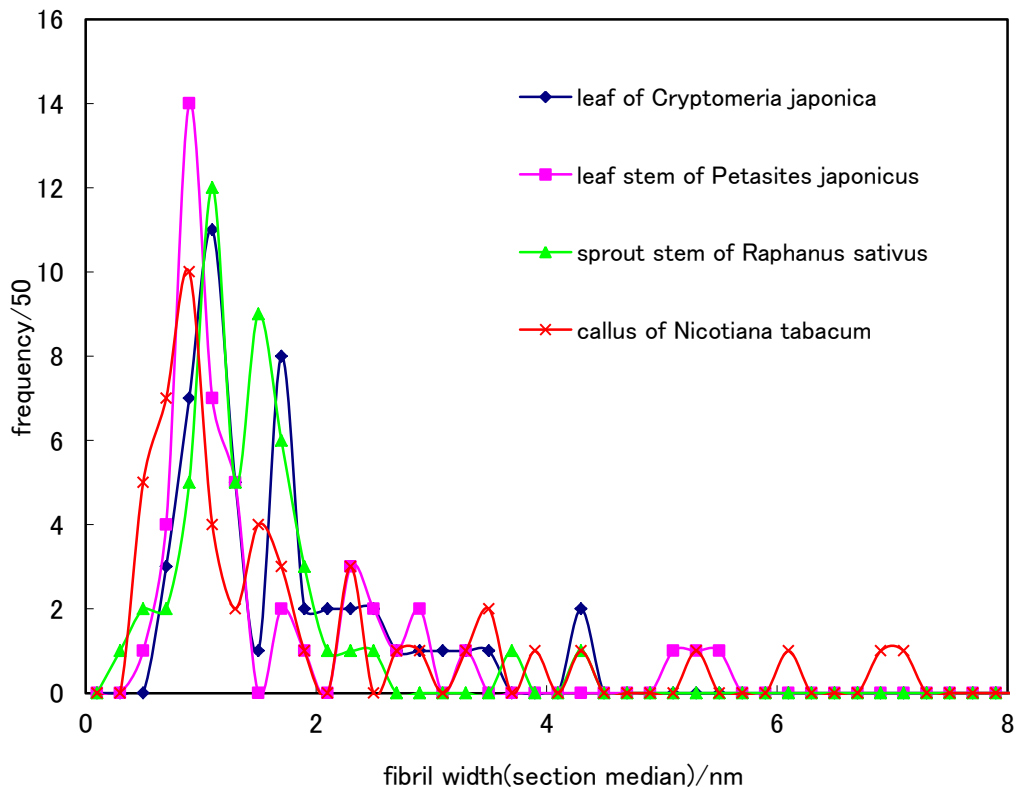


図 2.87 4 種の葉、葉柄、茎組織または細胞塊由来 WARP のフィブリル幅のヒストグラム

次に、各種植物組織から調製した WARP による AFM 観察の結果から、短小な楔形のフィブリルのみが観察された事例に着目し、ホウライショウ果肉組織由来 WARP による場合（図 2.48）およびホンアロエ葉肉組織由来 WARP による場合（図 2.75）の 2 例を選んだ。そして、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 2.88 のようになった。

これによれば、ホウライショウ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 9 で最頻値 1.5 nm、ならびに、ホンアロエ葉肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 11 で最頻値 1.3 nm および 1.5 nm であることが認められる。よって、ホウライショウ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値と、ホンアロエ葉肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、ほぼ一致している。

図 2.88 において、ホウライショウ花卉組織由来 WARP によるヒストグラムとホンアロエ葉肉組織由来 WARP によるヒストグラムは、相互に外形が酷似しており、ともに最頻値付近にひとつの鋭い尖りを呈すると共に、前後に、より小さな鋭い尖りをひとつ連続してい

る。しかしながら、その連続するピークが、ホウライショウ花弁組織由来 WARP によるヒストグラムでは、最頻値よりも大きいフィブリル幅の側に位置し、ホンアロエ葉肉組織由来 WARP によるヒストグラムでは、最頻値よりも小さいフィブリル幅の側に位置する。ホウライショウ花弁組織由来 WARP によるヒストグラムとホンアロエ葉肉組織由来 WARP によるヒストグラムを比べると、全般的に、ホウライショウ果肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、ホンアロエ葉肉組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅よりも、零コンマ数ナノメートル程度太い傾向が認められる。

なお、ホウライショウもホンアロエも、植物分類学的には、ユリ亜綱に属する。この事実が、上記の結果に何らかの影響を及ぼしているか否かは、不明である。

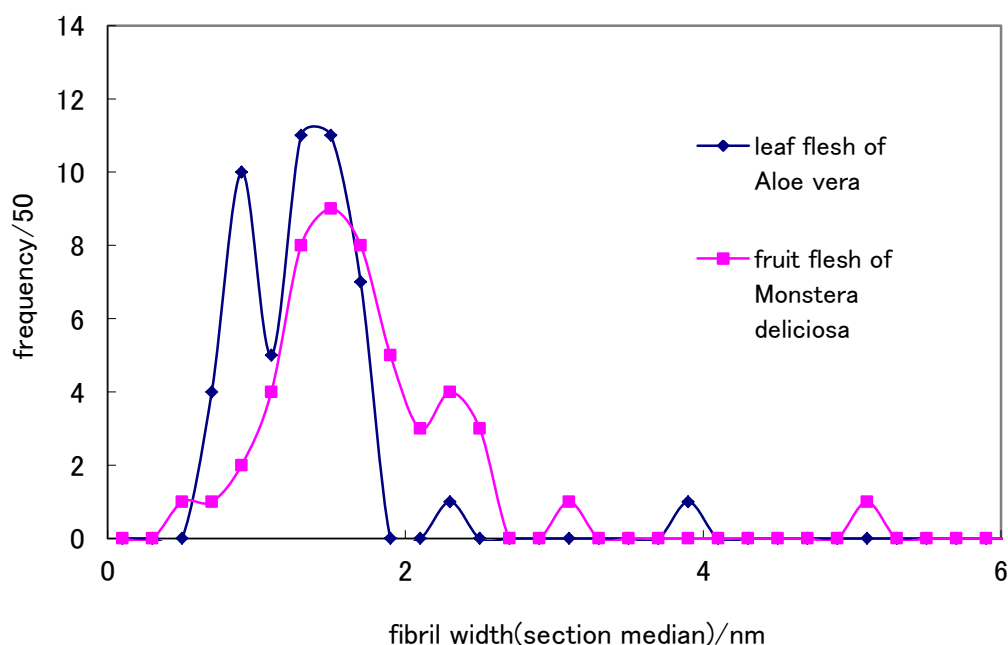


図 2.88 短小な楔形のフィブリルのみが観察された事例である 2 種の植物組織由来 WARP のフィブリル幅のヒストグラム

以上、本章の観察・実験結果をふりかえると、一次壁性組織と考えられる各種植物組織に含有する多糖フィブリルは、植物種や組織種の違いによって、ナノメートルスケールの AFM 観察画像上で両端を確認出来ない程に長さのある細長い糸状の形、それよりずっと短くナノメートルスケールの AFM 観察画像上で両端が確認出来る直線的な線状あるいはさらにはるかに短小で屈曲のある楔形など、非常に多種多様であることが認められる。

もつとも、前掲の図 2.32 のオランダイチゴ果肉組織由来 WARP による AFM 観察の場合が、その典型として見られるように、植物種と組織種の相違に関わらず、おおよそ 0.8 nm ~2.5nm 幅の細長い糸状の多糖フィブリルが、多くの植物種・組織種の植物組織中に実存することを確認した。このような大きさや形の多糖フィブリルは、高等植物界にあって、あらゆる環境・条件中で最も適応して、より広範囲に分布するようになったものと考えられる。

また、たとえば、前掲の図 2.62 の紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による AFM 観察の場合と前掲の図 2.76 の青首種ダイコン成熟塊茎組織由来 WARP による AFM 観察の場合について比較検討すると、両観察画像中の様相が全般的に酷似するばかりでなく、両画像中で検出された各フィブリルの大きさと形状もほぼ合致している。

ここで考えてみると、紅根種ダイコンと青首種ダイコンは、相互に植物分類学的にはまったく同一種であり、いわゆる「カイワレダイコン」の茎部分は、やがて肥大成長して、成熟したダイコンの塊茎部分となる。そうであるから、上記の両例は、事実上同一植物種かつ同一組織種の相互に生長段階の異なる場合に当たる。そうすると、図 2.62 と図 2.76 の両観察画像中の様相が酷似しているのは、そのために自然な結果であるとも考えられる。

次に、前掲の図 2.44 のスイカ果肉組織由来 WARP による AFM 観察の場合と図 2.45 のトウガン果肉組織由来 WARP による AFM 観察の場合の両観察画像中の様相を比較検討すると、ともに、ある程度の長さがある真直ぐな線状のフィブリルと、その線状のフィブリルより、ずっと短小で、しばしば屈曲を呈する楔形のフィブリルが共在している様子が見られる点で、特徴的であり、酷似する。

ここで考えてみると、スイカとトウガンは、植物分類学上ともにウリ科に所属せられる一年生藤本（蔓性草本）植物であり、スイカ果肉とトウガン果肉は、相互にごく近縁の植物種の同等の組織種に当たる。したがって、植物種と組織種がともに合致するか近縁である場合、そのような複数以上の種の組織に含有される多糖フィブリルの形状は、ほぼ同等か似る傾向があることが明らかに認められる。

しかしながら、一見、相互に似ても似つかない植物種・組織種の組織同士で含有される WARP の性状が酷似していたり、逆に、一見、相互にとても似た外観や質感の植物種・組織種の組織同士で含有される WARP の性状が似ても似つかない場合があるようである。

たとえば、前掲の図 2.48 のホウライショウ果肉組織由来 WARP による AFM 観察の場合と図 2.62 の紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による AFM 観察の場合の両観察画像中の様相を比較検討すると、ともに、多糖フィブリルに相当すると思われる多数の比較的短小な楔形の物体の存在だけが認められ、その多くが、それぞれ先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成しているように見られる点で、特徴的であり、酷似する。けれども、ホウライショウは、植物分類学的には、比較的大型のサトイモ科多年生藤本で、ダイコンは、植物分類学的には、典型的なアブラナ科一年生草本として知られている。成熟果実と芽生えの茎組織では、植物組織学的に成長段階も発生上の由

来等も、明らかに異なる。それゆえ、ホウライショウ果肉組織と紅根種ダイコンの芽生えの茎組織は、相互に植物種と組織種および成長段階の大きく異なる植物組織同士であると言える。

また、ナツミカンとウンシュウミカンは、相互に植物分類学のごく近縁の植物種である。前掲の図 2.49 のナツミカン中果皮組織由来 WARP による AFM 観察の場合と図 2.50 のウンシュウミカン外果皮組織由来 WARP による AFM 観察の場合の両観察画像中の様相を比較検討すると、含有される多糖フィブリルの全般的な外形はほぼ合致するものの、両観察画像上において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅には、明らかに 0.5 nm 程度の較差が確認される。そして、前記のⅢ-2-2 i) の実験操作中、ナツミカン中果皮組織由来 WARP とウンシュウミカン外果皮組織由来 WARP について、それらの調製工程の最後の亜塩素酸処理後、濾別・水洗を経た湿潤な状態のままの両固形物質について、乾燥させることなく速やかに、約 3 (w/w) % の固形分比率になるように、各相応量を 25 mL 容ガラス製試料瓶中に入れた約 20 mL の蒸留水中に散布し、超音波ホモジェナイザ（日本精機製作所 US-150）を使って、30 分以上超音波懸濁処理したところ、ナツミカン中果皮組織由来 WARP による場合では、その超音波懸濁処理物が無色透明のゲル様化を呈し、流動性を失った。他方、ウンシュウミカン外果皮組織由来 WARP による場合では、当該の超音波懸濁処理後、その超音波懸濁処理物中では、固形分が速やかに沈降する様子が観察され、流動性が失われることはなかった。よって、柑橘類の中果皮と外果皮のように、同一の植物体の内部に隣接・接触して存在している組織同士でも、含有される多糖フィブリルの性状が相当異なる可能性が認められる。

さて、本章における実験では、原則として、全ての実験対象は、元の植物組織から、加工して、所定の観察・計測の被験体に固定（最終的に脱水状態とする。）する直前まで、人為的に湿潤状態を維持した管理下で取り扱った。しかしながら、前記の図 2.51 のソバ果皮組織由来 WARP による AFM 観察の場合では、元のソバ果皮は、成熟ソバ果実から脱穀・保存に移される過程において、自然乾燥が相当進んだものを用いた。そのようなものから調製した WARP による AFM 観察からも、2.0 nm 程度の比較的細かい幅のフィブリルが多分に検出したことは、興味深い結果であった。

結局、本章で実験対象として採用した各種植物組織由来 WARP については、上記 AFM 観察で確認されたフィブリルの形状から、

- ①：多数の細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差するのみが見られる「オランダイチゴ果肉型」、
- ②：多数の細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する合間に、短小な楔形または糸状断片様の物体が多数散在する「混在型（メロン果肉型）」、
- ③：②に含まれるべきものとも思われるが、ある程度の長さがある線状のフィブリルが散在する合間に、それよりずっと短小な楔形または糸状断片様の物体が多数混在する「スイカ果肉型」

- ④：短小な楔形または糸状断片様の物体のみ多数散在する「ウケザキクンシラン葉型」
- ⑤：④に類似するが、多数散在する楔形の物体の端が、隣接する楔形の物体の端に連結する繰り返しのよって網目状を形成するように見られる「ホウライショウ果肉型」、
- ⑥：その他の場合

の 6 つに分類するのが、合理的であると考えられる。よって、この方法によって、本章の実験において WARP を調製した材料の植物組織を分類すると、以下の通りになる。

- ①オランダイチゴ果肉型：モモ果肉、カキ果肉、オランダイチゴ果肉、バナナ果肉、ランブータン果肉、ナツミカン中果皮、ウンシュウミカン外果皮、セイヨウシヤクナゲ花卉、レモングラス葉、スギ針葉、ヴェルティナバナナ葉鞘、リュウビнтаイ葉柄基部、タマネギ鱗茎、サトイモ塊茎、サツマイモ塊根、など、
- ②混合型：アールスメロン果肉、カカオポッド、トウガン花卉、カボチャ花卉、ヤブツバキ葉、アフリカスマレ葉、タバコ BY2 細胞塊、など、
- ③スイカ果肉型：トウガン果肉、スイカ果肉、
- ④ウケザキクンシラン葉型：ウケザキクンシラン葉、ホンアロエ葉肉、
- ⑤ホウライショウ果肉型：ホウライショウ果肉、ダイコン塊茎、など、
- ⑥その他：デンドロビウム・サンデラエ花卉、バルボフィラム・グランディフロルム葉、など、

上記の 6 分類の各例を見てみると、シダ植物以上の高等植物の世界では、オランダイチゴ果肉型に属する植物組織が、特定の植物種・組織種に偏ることなく、最も普通にまんべんなく存在することが明らかである。また、混合型についても、オランダイチゴ果肉型よりは明らかに数少ないが、特定の植物種・組織種に偏ることなく、これに属する植物組織が少なからず存在する。

スイカ果肉型については、その典型事例は明らかに少ない。スイカ果肉型は、混合型から、同一の AFM 観察画像中で両端が確認出来ない程度の長さがある、細長い糸状の形のフィブリルが除外された場合に当たるため、本来混合型であったのに、たまたま観察上の何らかの事情で誤認した可能性も考えられる。たとえば、上記でスイカ果肉型に分類したトウガン果肉の場合について、同一材料から調製した WARP による被験体によって得た TEM 観察画像 (図 2.18) 中の様相と AFM 観察画像 (図 2.45) 中の様相は、明らかに異なって見える。つまり、TEM 観察画像中では、ほぼ同様の分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルのみが複数以上見られるだけであるのに対し、AFM 観察画像中では、ある程度の長さがある線状のフィブリルが散在する合間に、それよりずっと短小な楔形の物体が多数混在しているのが見られる。このような見え方の相違は、それぞれの観察手段である TEM と AFM の各解像度の相違である可能性が高い。

既に触れたように、負染色法による TEM 観察では、染色部分がそのまま観察誤差となる。このため、TEM 観察の技法は、ナノメートルスケールの物体の詳らかな外形の把握を苦手

とする。他方、AFM 観察では、その装置の高さ計測機能の高精度により、ナノメートルスケールの物体の詳らかな外形の把握が可能である。しかしながら、AFM 観察では、観察視野をナノメートルスケールに適合させると、プローブが被験体表面を、より緻密に走査しようとするため、その走査範囲が、より狭くならざるを得ず、そのためにある程度以上の大きさがある物体は外形を把握し切れなくなる。つまり、見るべきものの中から、ある程度以上の大きさの物体が除外されて仕舞う場合があると考えられる。

したがって、植物組織中に含有される多糖フィブリルの自然な存在形態を、顕微鏡観察により正確に把握するには、調製した WARP について、相異なる原理により解像度が相当異なる複数以上の顕微鏡による観察が必要である。この点、細長い糸状の形のフィブリルは、様々な植物組織より調製した WARP による TEM 観察画像と AFM 観察画像の双方中において、様々な大きさと状況で検出され、その実在が、より確かめられたと認められる。

次に、ウケザキクンシラン葉型は、本研究を通じては、ウケザキクンシラン葉とホンアロエ葉肉のみで、いずれも比較的乾燥気候下で進化・適応したユリ亜綱に属する植物種の多肉質の葉からのみ見出されたことになる。本章の実験対象の採用については、我々がたまたま容易に入手出来た生鮮植物組織・材料を利用したに過ぎないという事情があったため、現実の地上の高等植物界における状況を必ずしも偏りなく解析出来たとは考えられない。また、本研究を通じては、ウケザキクンシラン葉型は、まだいずれの事例についても TEM 観察の対象にしていなかったため、その実在について、明らかに検証が足りない。

ホウライショウ果肉型については、既に上記したように、本研究を通じては、ホウライショウ果肉とダイコン塊茎という、植物種も組織種も随分異なる植物組織中から見出された。しかしながら、これについても、まだその事例を TEM 観察の対象にしていなかったため、その実在について、検証が足りない。

以上のように、果肉、花卉や葉等の一次壁性組織においては、そこに含有される多糖フィブリルの形状は、植物種・組織種の相違に伴って多型を示す。しかしながら、本研究を通じて、現段階においては、多様な多糖フィブリルの個々の形状・形態について、何らかの具体的な物理的特性に関与していることを明らかにすることは出来ていない。たとえば、前記の II-3-1 i) の実験操作中に調製した固形分比率約 3(w/w)% の各 WARP 水懸濁液を超音波ホモジェナイザ（日本精機製作所 US-150）を使って超音波懸濁処理した場合、ゲル様を呈するようになるか否かは、上記の特定の種類の多糖フィブリルと結び付けることが出来ない。概して、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合のように、ナノメートルスケールの AFM 観察画像上で両端を確認出来ない程に長さのある細長い糸状のフィブリルで、2.0 nm 未満の幅の、より細い幅のフィブリルにそのような特性を見ることが多いが、セイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP による場合のように、幅ほぼ 1.0 nm 程度の細長い糸状のフィブリルであるのに、そのような特性を呈さないものも少なからず見られた。

なお、典型的な紅藻植物の一種であるオゴノリ藻体から WARP を調製し、他の植物組織

に由来する WARP による場合と同様に AFM 観察をしたところ、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP による場合とも左程変わらないような、細長い糸状または線状に見られる形状のフィブリル像を検出したことは、興味深い結果であった。

III-4. 本章のまとめ

各種果肉組織等から調製した WARP の各種分析によって、以下の結果が得られた。

- ① X 線回折では、低結晶性のセルロース I のパターンを得た、
- ② それによる赤外スペクトルは基本的にセルロースのパターンに合致した、
- ③ 酸加水分解で得られる中性糖の大部分はグルコースである。

これらにより、WARP の主たる化学成分はセルロースであり、混在成分としていくらかのウロン酸を含むヘミセルロースの関与があるものと認められた。

そもそも、基本的に、ヘミセルロースが単独でフィブリル形態をとることは、考え難いから、この観点からも、WARP の実体であるこれらフィブリルの少なくとも化学的骨格は、セルロースであると考えられる。

他方、各種植物組織より調製した WARP の AFM 観察は、フィブリル幅 1.0 nm 未満から 10.0nm 以上、ほぼ分岐のない細長い糸状の物体、やや短い線状や長さ 0.1 μm 程度の短小な楔形などの複数以上のフィブリルの姿形の存在を明らかにした。それらのフィブリルの様々な各形状は、それぞれ、特定の植物種・組織種と特異的な関係があるものとは認められなかった。

既に触れたように、従来高等植物セルロースの基本単位として、約 3.5 nm 幅のフィブリルがあると考えられて来た。しかしながら、本章での実験結果によれば、これよりも格段に細い幅 2.0 nm 以下のセルロースフィブリルが、植物種や組織種を問わずに、広く高等植物界全般の広範囲に存在する可能性が高いことが明らかになった。したがって、このような極細のフィブリルは、実は、高等植物の非木化組織に普遍的に存在するものであるとも推定される。

モモ果肉組織由来 WARP やセイヨウシャクナゲ花卉組織由来 WARP による AFM 観察において、高頻度で検出された約 1.0 nm というフィブリル幅は、高分子化学的にセルロース分子 4 個程度からなる束に相当するということになる。これは、高分子フィブリルとして、物理的に存在し得る限界であり、まことに興味深い。

第IV章 樹木形成層のセルロース

IV-1. 本章の目的

前章では、果実などの種子植物柔組織から得られる多糖フィブリルを詳細に観察したが、これらの組織は植物組織学的には、木材の一次壁に対応しているとも考えられる。そこで、木材一次壁を構成するセルロースフィブリルの性状にも興味を持たれる。しかしながら、通常木材の構成物質のほとんどは二次壁であり、そこから一次壁部分だけを分離することは事実上不可能である。

もっとも、木質細胞の形成は一次壁から始まるのであるから、樹木生長期に形成層から生み出されたばかりの生活細胞中の細胞壁物質を採取すれば、一次壁成分だけを分離して観察出来る可能性がある。そこで、本章では、主要研究対象として、日本国内において代表的な有用広葉樹であるウダイカンバを選び、年間の樹木生長期の異なる時季・段階において樹木形成層物質を採取し、前章とほぼ同じ方法で WARP を調製・単離して、諸種の分析を行い、その経時的变化を追跡することとした。

IV-2. 試料と方法

IV-2-1 試料

ここでは、主要な実験試料としてウダイカンバ新生二次木部組織と同成熟二次木部組織を採用し、比較対照のため、イロハモミジ *Acer palmatum* Thunb. 新生二次木部組織と同成熟二次木部組織並びにヒノキ *Chacyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Sieb. et Zucc. ex Endl. 新生二次木部組織と同成熟二次木部組織を補助的に採用した。

IV-2-2 実験方法

i) ウダイカンバ樹の伐採と加工

埼玉県秩父市大滝栃本地内に所在する東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林秩父演習林栃本地区、標高約 1200m の天然試験林中において、胸高直径 22 cm ~ 26 cm (樹齢 50 年程度) の天然生ウダイカンバ樹を、時季をずらして 1 本ずつ伐採し、解体した。すなわち、早材形成初期に当たると推測した 2007 年 5 月 30 日、早材形成が終わり晩材形成が始まって日の浅い頃と考えられた同年 7 月 9 日、晩材形成も終盤になる頃と考えられた

同年 8 月 24 日、冬季の休眠期を経て、ちょうど新年度の樹木生長が開始する直前の頃と考えられた 2008 年 3 月 26 日、および、早材形成のごく初期の頃と当たると考えられた同年 5 月 2 日に、各 1 本を伐採・解体した。

伐採対象木は、なるべく樹幹が直立して樹冠まで分岐がなく、下枝がないものをあらかじめ厳選した。そして、その伐採は、その当日午前中に実施し、出来るだけ地際の近くにチェーンソーの刃を入れて切り倒した。その伐採現場において、その主幹部分のみを速やかに根元方向から約 80 cm 長毎に玉切りにし、輸送可能な範囲で 5~6 玉程度を、伐採当日の夜までに、そのために確保した軽自動車等の輸送手段で東京都文京区弥生地内に所在する東京大学大学院農学生命科学研究科弥生キャンパス構内まで移送した。

その後、車内から降ろした各丸太は、約 4 °C に保った低温室内に搬入して保管した。

ii) ウダイカンバ新生二次木部組織の採取

前記 i) により低温室内に保管していたウダイカンバの各丸太は、原則としてその伐採から 72 時間以内に、あらためて常温下の屋内実験室内に移して、そこで金属製鑿を用いて、外表方向から外皮と師部を取り除き (図 4.1)、各丸太表面に露出した軟らかい湿潤組織・物質部分のみを、それぞれ金属片 (フェザー片刃、フェザー安全剃刀株式会社: 研がれていない側を使用する。以下同じ。) で搔き落して、プラスチック製サンプルチューブ (旭硝子(株) IWAKI Centrifuge Tube) 中に採集した。



図 4.1 2008 年 5 月 2 日伐採・解体ウダイカンバ丸太からのサンプル採取(この例では、きれいに外皮が剥けない。)

ここで、上記の金属片で掻き落とされた湿潤物質は、維管束形成層近傍の新生二次木部組織に該当すると考えられる (図 4.2)。その確認のため、2007 年 5 月 30 日、同年 7 月 9 日および同年 8 月 24 日の各日に伐採し、形成層付近の湿潤物質の採集作業を経た各丸太について、それぞれ外皮と師部を除く措置を施した採取材の該当部分を含む一部分を、金属製鋸で切り出して、さらに金属製ナイフで加工し直して薄片とし、別途光学顕微鏡による観察を行った。

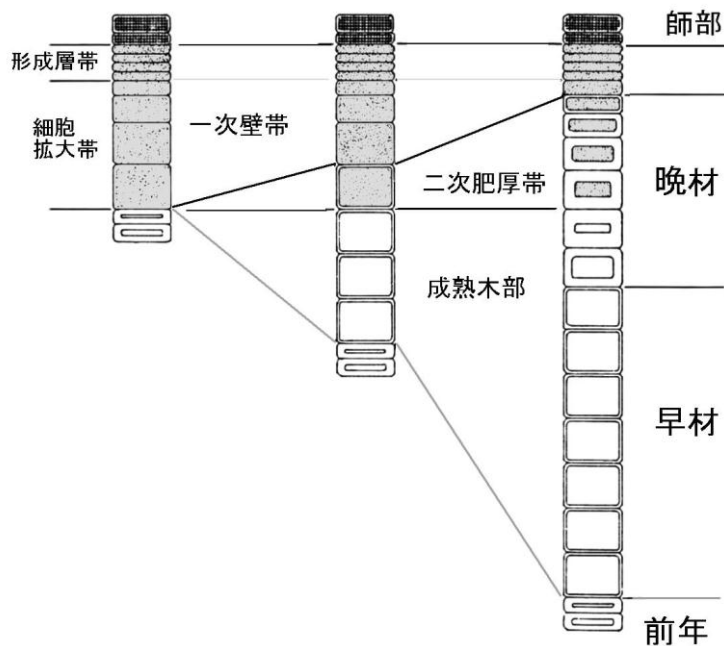


図 4.2 毎年の樹木組織の生長様式 (島地 謙 (1985) より改変)

iii) パッチ式サンプリング

次いで、2010年6月14日と同年8月9日に、上記i)の場合と同じ野外フィールドにおいて、あらかじめ胸高直径23cm前後(樹齢50年程度)で、樹幹が直立して樹冠まで分岐がなく、下枝がない天然生ウダイカンバ樹1本を厳選し、これをを対象として、「パッチ式サンプリング」をそれぞれ1回、合計2回実施した。これは、上記i)の2007年中および2008年中の各野外サンプリングによる被験体でのAFM観察結果の再現性を見ることを目的としたものである。ここでは、2010年6月14日の再サンプリングは、上記の2007年5月30日の野外サンプリングの場合に対応し、2010年8月9日の再サンプリングは、上記の2007年8月24日の野外サンプリングの場合に対応することを意図した。

通例再現性を見ることを目的として試験する場合、出来るだけその先例と同条件に近付けて実施することが望ましい。しかしながら、最近益々自然環境保全が重視されるようになった現代日本において、本章で企画したような実験に容易に利用出来る森林資源は、実に少ない。上記i)の伐採を実施した同じ野外フィールドにおいては、2010年中、当局に申請して、相当のウダイカンバ樹の新たな伐採をする許可が得られなかった。このため、より環境負荷の小さい方法として、「パッチ式サンプリング」方式に変更した。

この「パッチ式サンプリング」方式とは、あらかじめ特定の単一の試験木を決め、その胸高直径付近の出来るだけ平らな幹表面で、約40cm×60cm程度の長方形の面積範囲を数

箇所近接して限定し、時季をずらして毎回その1箇所を立木そのままの状態から剥皮して、そこで被剥皮側の幹表面に剥き出しになった新生二次木部と推測される組織部分の湿潤物質のみを金属片で掻き集めて、プラスチック製サンプルチューブ（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）に採集するという方法である。これにより、サンプリング対象のウダイカンバ樹は、サンプリング後も枯死することなく生長を継続し、かつ、単一個体中におけるサンプルの性状の経時的変化の追跡も可能になる。

iv) ウダイカンバ成熟二次木部組織の採取

木材組織中の細胞壁の完成形態である二次壁における状態を把握し、本章における比較検討の基礎とするため、新生二次木部組織との比較用の成熟二次木部組織の試料として、2007年5月30日に伐採したウダイカンバ丸太の中からひとつを選び、その辺材部分で形成層より約5.0 mm以上内側の成熟二次木部組織（ほぼ2006年10月以前に形成されたと考えられる部位。）を、早材部分と晩材部分の区別をすることなく金属製鑿を用いて採取した。この作業は、上記i)の2007年5月30日に伐採したウダイカンバ丸太から新生二次木部組織を採集する作業と同時平行的に実施し、当該の生鮮な状態が残っている丸太から高さ×長さ×幅＝おおよそ8 mm×50 mm×20 mm大のほぼ長方体の形で十数個程度の成熟二次木部組織片を採取した。そして、得られた各成熟二次木部組織片からその一部を分取し、プラスチック製霧吹を用いて濡らしながら、速やかに金属製ナイフで削り出して0.2 mm～0.3 mm厚の薄片に加工し、プラスチック製サンプルチューブ（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）中に集めた。

v) WARPの調製

上記ii)、iii)およびiv)の実験操作でプラスチック製サンプルチューブ（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）中に採集された各湿潤物質について、それぞれ湿重量で約75 gを分取し、ガラス製500 mL容ビーカー中に入れ、300 mL程度の蒸留水を加え、速やかに円筒刃ホモジェナイザ（通称「ヒスコトロン」、マイクロテックニチオン(株)）で解繊した。それらの各解繊物は、それぞれ全量をガラス製1 L容ビーカー中に移して、相当量の蒸留水を加え、全容を各約750 mLとした。以降、III-2-2 i)の該当記述以下の実験方法と同じく加工処理し、取扱いを行うことにより、それぞれ当該原料に由来するWARPを調製し、偏光顕微鏡観察、AFM観察、TEM観察、FT-IR測定、X線回折測定、中性糖分析あるいはヨード澱粉反応試験に用いた。

ここでの、本項文中の試料や使用器具の大きさや分量等は、一連の1回の実験操作における場合の目安である。したがって、本章の実験を通じて、特定の樹種の組織種に由来するWARPの必要量を確保するため、随時そのために必要な材料を確保した上で、以上の実験操作を必要回数繰り返した。

vi) X線回折測定とヨウ素澱粉反応試験

上記v)の実験操作で調製された2007年5月30日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来WARPおよび同日伐採取ウダイカンバ成熟二次木部組織由来WARPの2種について、III-2-2v)に示したの同様にX線回折測定の実験を行なった。また、同じそれらの2種の試料について、それぞれX線回折測定に供試した同じ凍結乾燥物を別途適量分取して、相応量の蒸留水中に再懸濁して、常法によるヨウ素呈色試験を行った。

vii) AFM観察とフィブリル幅の計測

上記v)の実験操作で調製されたウダイカンバ樹組織由来WARP湿潤物について、固形分比率約3(w/w)%の水懸濁液を調製し、III-2-2vii)に示したの同様にAFM観察とフィブリル幅の計測の実験を行なった。

viii) 木材組織の乾燥による影響

木材組織からのWARPの調製について、その工程中に偶然加わる可能性のある乾燥による影響を見るため、以下の実験を行った。

すなわち、上記iv)の実験操作によって、2007年5月30日に伐採したウダイカンバ丸太から分離した成熟二次木部組織片の一部を別に分取して、新たな実験試料とした。そして、これをさらに底に十分に乾燥したシリカゲルを敷き詰めたガラス製デシケータ中に移して約1ヶ月間静置することにより、十分に乾燥させた。その後、この乾燥処理物より、金属製ナイフで0.2mm~0.3mm厚の薄片を削り出し、各薄片をプラスチック製サンプルチューブ(旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube)中に集めた。

このようにして得られた乾燥薄片物質は、再び蒸留水で十分に湿らした後、上記のv)に示したの同様にWARPの調製を行った。

ix) イロハモミジあるいはヒノキの場合

ウダイカンバ以外の樹種の事例を見る目的で、東京都西東京市緑町地内に所在する東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地において、2010年5月10日、ともに30年齢程度のイロハモミジとヒノキの各1本、合計2本に、上記iii)に記載した「パッチ式サンプリング方式」を適用し該当湿潤物質を収集した。そして、これにより得られた両湿潤物質について、上記v)に示したのと同様にWARPの調製を行い、さらにそれぞれ上記vii)と同様にAFM観察とフィブリル幅の計測の実験を行った。

また、上記の各「パッチ式サンプリング」を実施した当該箇所の下層の辺材部分をそれぞれ金属製鑿で抉り、それぞれ形成層より約5.0mm以上内側の成熟二次木部組織に該当する部分を採取した。この作業は、上記のヒノキおよびイロハモミジの立木から各新生二次木部組織を採集する作業と同時平行的に実施し、高さ×長さ×幅=およそ8mm×50mm×20mm大のほぼ長方体の形で十数個程度の成熟二次木部組織片を採取した。そして、得

られた各成熟二次木部組織片からその一部を分取し、プラスチック製霧吹を用いて濡らしながら、速やかに金属製ナイフで削り出して0.2 mm～0.3 mm厚の薄片に加工し、プラスチック製サンプルチューブ（旭硝子㈱ IWAKI Centrifuge Tube）中に集めた。これにより得られた薄片物質もまた、上記v) に示したのと同様にしてWARPの調製を行い、さらにそれぞれ上記vii)と同様にしてAFM観察とフィブリル幅の計測の実験を行った。

IV-3. 結果と考察

i) ウダイカンバ樹の伐採と加工および組織採集

ウダイカンバの樹木組織の採取に当たっては、樹木生長の進捗段階を展葉の程度から推定した。2007年5月30日には、被験木の葉は、みなまだ小さく、明らかに展開途上の段階にあった。同年7月9日では、被験木の葉は、みなほぼ完全に展開していたものの、幾らかの柔らかさを留めていた。また、その樹冠では新梢の伸長生長が盛んに続いていた。同年8月24日では、被験木の葉は、みな完全に大きく展開し、相当硬くなっていた。また、樹冠では、新梢の伸長生長がほぼ停止していた。

2008年3月26日には、被験木の葉は、全く芽吹いていなかった。同年5月2日には、葉は芽吹いていたもののまだ小さく、ほとんど展葉を認められなかった。2010年6月14日には、葉はほぼ完全に展開していたものの柔らかさを留めていた。同年8月9日には、葉が完全に展開していた。

以上より、2007年5月30日、同年7月9日、同年8月24日、2010年6月14日および同年8月9日の段階では、当該の各ウダイカンバ樹は、各年の樹木生長期の相応の段階にあり、形成層における細胞分裂活動も活発になされているものと判断された。他方、2008年3月26日および同年5月2日の段階では、当該の各ウダイカンバ樹は、まだ各年の冬季休眠期中で、形成層の活動が不活発な状態にあるものと判断された。

2007年5月30日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太（直径約25cm×長さ80cm）は、水分が多く非常に重かった。その剥皮は比較的容易であり、剥皮後の丸太最表層を金属片でなぞったところ、乳白色の軟質で糊状にも見られる、ややゲル的傾向の認められる湿潤な固形物質が、丸太1本あたり約75g（湿重量）が得られた。この湿潤な固形物質は、外表から外気に触れると、その部分が速やかに赤褐色に変色した。

上記の同年5月30日に伐採・解体したウダイカンバ丸太から採集された湿潤物質は、別途実施した組織片の光学顕微鏡観察の結果、図4.3の褐色に色付いている部分に相当することが確認された。

同年5月30日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太のひとつを選び、上記の剥皮と新生二次木部組織の採取の実験操作を終えた後、引き続き、丸太実質のさらに下層の成熟木部組織に該当すると見られる部分を金属製鑿で切り出したところ、通常の木材片と認められ

る状態の木材片が得られた。これを金属製ナイフでさらに薄片に加工したところ、通常の木材の皸屑と色形が同様のものが得られた。

同年7月9日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太（直径約25cm×長さ80cm）も、それぞれ相応に多くの水分を含んでいたが、明らかに同年5月末伐採ウダイカンバ丸太の場合ほどではなく、重量も幾らか軽減の傾向が認められた。

同年8月24日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太は、同年5月30日伐採・解体および同年7月9日伐採・解体の2例に比べて明らかに軽かった。その断面から水が滴ることはなかった。

同年8月24日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太の剥皮は難しくなかったが、同年5月30日伐採・解体および同年7月9日伐採・解体の2例に比べて、明らかに固着傾向が強くなっていた。その剥皮後の丸太最表層を金属片でなぞったところ、それぞれ、乳白色の、やや硬さが認められる幅5mm程度、長さ15cm以上もある細長い紐状の物体を主体とする、湿潤な固形物質が、丸太1本あたり約125g（湿重量）が得られた。この湿潤な固形物質は、同年7月9日に伐採・解体した各ウダイカンバ丸太から得られた湿潤な固形物質と比較して、物質の固形性・組織性が増し、より繊維様に変化しているように認められた。

2008年3月26日の試料では樹皮が樹幹本体に強固に固着しており、剥皮すると樹皮と木部組織が固着したままの多数の碎片が発生し、そこからは全く湿潤物質を採取出来なかった。

2010年6月14日に行った「パッチ式サンプリング」では、剥皮は比較的容易であり、乳白色を呈する紐屑状の湿潤な固形物質約15g（湿重量）が得られた。同年8月9日行った「パッチ式サンプリング」でも、剥皮は比較的容易であり、乳白色を呈する紐屑状の湿潤な固形物質約20g（湿重量）が得られた。

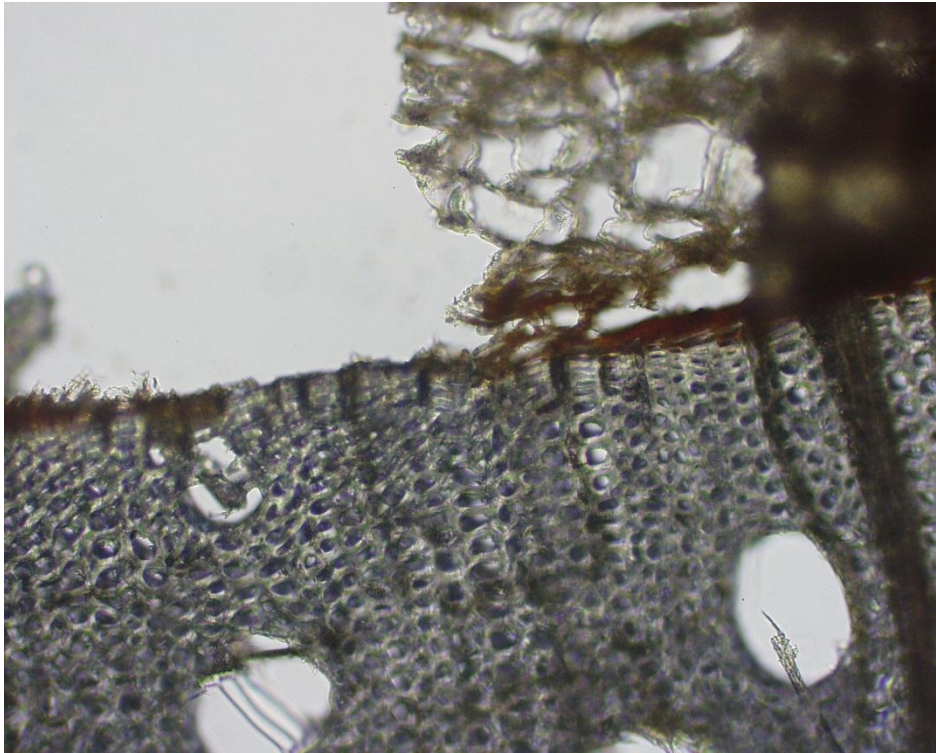


図 4.3 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ材について、その外皮と師部を除き、露出した維管束形成層内側を金属片で掻き落したところの光学顕微鏡観察

ii) WARP の調製

IV-2-2 v) の実験・観察をした結果、伐採した時季を問わず、ウダイカンバ新生二次木部相当組織からは、WARP 湿潤物として白色のふやけた紐状物質が得られた。また、ウダイカンバ成熟二次木部相当組織からは、WARP 湿潤物として白色または無色の薄片状物質が得られた。これらの形状は、いずれも化学処理前の当該物質の形状と左程変わりが認められなかった。

これらの WARP 湿潤物を、相応量の蒸留水中で超音波ホモジェナイザにより 30 分処理して得た懸濁液中では、光沢を有する白色または無色の針状物体が視認され、それらはほとんど全て、超音波処理を止めると数分以内に沈降した。

iii) X線回折測定とヨウ素澱粉反応試験

IV-2-2 vi) の実験・観察をした結果、X線回折測定については、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP および 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟木部組織由来 WARP による場合について、それぞれ図 4.4 に示す X線回折パターンが得られた。両 X線回折パターンは、いずれも低結晶性のセルロース I のものと評価出来る。

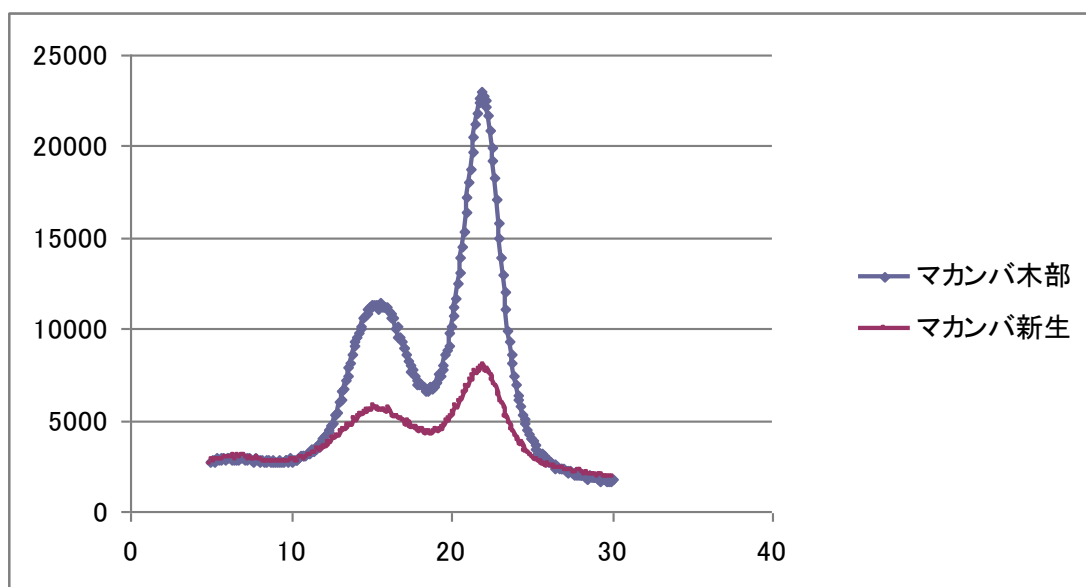


図 4.4 2007 年 5 月末採取ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP と同成熟木部組織由来 WARP の X 線回折プロファイル

ヨウ素呈色試験については、供試したいずれの試料も陰性と認められ、デンプンが混在しないことが確かめられた。

一般に、IV-2-2 v) の実験方法はセルロースを単離する常法であるから、本章の実験で調製した全ての樹木組織由来 WARP の主成分はセルロースとなる可能性が高い。本項の実験結果は、その方向に合致している。

iv) AFM 観察とフィブリル幅の計測 および木材の乾燥の影響について

IV-2-2 vii) の実験・観察をした結果、まず得られた 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.5 に示す。この観察画像中では、ほぼ同様の細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する様子のみが見られる。これを前章での観察実験結果に照らすと、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合 (図 3.22 等) と酷似している。

図 4.5 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 1.0 nm~4.0 nm の範囲内にあると認められた。

ここで、木材組織の乾燥による変化・影響を調べるため、上記と同じ 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟木部組織から、あえて乾燥工程を加えて調製した WARP による AFM 観察画像 (IV-2-2 viii) の実験・観察) の一例を図 4.6 に示す。

その観察画像中の様相は、全く同じ樹木組織部分に由来し、乾燥履歴を全く経ずに調製した WARP による場合である前掲の図 4.5 の様相と比較して、多数の細長い糸状のフィブリルが走行・屈曲・交差する様子が見られる点は変わりがない。しかしながら、同画像の

中央には、むしろ複数以上の相当に太い紐状の物体の走行が目立っている。これらの相当に太い紐状の物体は、より細い糸状のフィブリルが重畳あるいは凝集することにより、すっかり太くなった可能性が考えられる。

図 4.6 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 1.0 nm~10.5 nm の範囲内であると認められた。

他方、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP の AFM 観察画像の一例を図 4.7 に示す。この観察画像中の様相は、全く同じ丸太に由来し、乾燥履歴がないなどの WARP 調製の一連の加工操作も一致している図 4.5 の同日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP による場合と比較して、全く異なる。そして、それは、むしろ前章の実験結果の中で、前掲の図 3.63 のウケザキクンシラン葉組織由来 WARP による場合に酷似している。

すなわち、その観察画像中には、多糖フィブリルに相当すると考えられる、多数の短小な楔形の物体だけが、密な斑点様に多数散在して見られる。それらの楔形の物体は、おおむね長さ 0.16 μm 以下で、各孤立し、前章における図 3.38 のハウライショウ果肉組織由来 WARP や図 3.52 の紅根種ダイコンの芽生えの茎組織由来 WARP による場合とは異なり、各先端で相互に隣接する別の楔形の物体と連結して、網目状を形成するようなことは全くない。

図 4.7 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 0.6 nm~1.4 nm の範囲内であると認められた。なお、図 4.5 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、楔形の物体の長さは、おおよそ 0.022 μm ~0.16 μm の範囲内であった。

次いで、2007 年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.8 に示す。この観察画像中の様相は、図 4.7 の 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合と大差はないが、ある程度以上の長さがある連続する細長い糸状のフィブリルの混在も少数だが明らかに見られる。

図 4.8 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、ある程度以上の長さがある連続する細長い糸状のフィブリルについては、おおよそ 2.0 nm~3.0 nm の範囲内であると認められた。他方、短小な楔形の物体については、幅がおおよそ 0.5 nm~1.8 nm の範囲内であった。

なお、図 4.8 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、ある程度以上の長さがある連続する細長い糸状のフィブリルは、長さがおおむね 0.54 μm ~0.90 μm の範囲内であると認められた。他方、短小な楔形の物体については、長さがおおよそ 0.024 μm ~0.20 μm の範囲内であった。

次に、2007 年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.9 に示す。この観察画像中の様相は、前章での AFM 観察の実験結果に照らすと、もはや図 3.36 のアールズ種メロン果肉組織由来 WARP による場合の画像中の

様相に近似している。すなわち、ほぼ同様の細長いフィブリルが多数走行・屈曲・交差する合間に、図 4.7 の同年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合や図 4.8 の同年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合で専ら見られたような短小な楔形の物体が多数混在して見られる。

図 4.9 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルについては、おおよそ 2.2 nm~3.8 nm の範囲内であると認められた。他方、楔形の物体については、幅が 0.6 nm~1.8 nm の範囲内であった。

なお、図 4.9 の画像を紙面上に複写・印刷して、金属製ノギスを用いて計測したところ、細長い糸状のフィブリルの方は、長さが少なくともおおよそ 0.33 μm 以上となると認められた。他方、より短小な楔形の物体については、長さがおおよそ 0.024 μm ~0.18 μm の範囲内であった。

以上のように、ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP については、2007 年の活動期に時期を追って 3 回のサンプル採取・AFM 観察を行った。そして、その活動期の初期では、専ら短小なフィブリルが孤立して多数散在して見られるように観察された。やがて、季節の進行とともに、次第に長く連続したフィブリルが出現して増加するという変化が検出出来たようにも思われた。さらには、このような傾向は、一次壁セルロースフィブリルの生成過程に対応しているという可能性が考えられた。そこで、年次を変えて、同様の経歴と特性を有すると想定される試料の採集と観察を繰り返した。

そこで、次に、2010 年 6 月 14 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.10 に示す。この観察画像中の様相は、全般的に図 4.5 の 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP による場合と酷似している。また、これを前章での観察実験結果に照らすと、全般的にオランダイチゴ果肉由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 4.10 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 2.0 nm~3.0 nm の範囲内であった。

また、同年 8 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察については、上記の図 4.10 の同年 6 月 14 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察の場合とほぼ同等の実験・観察結果が得られた（観察画像の例等は省略する。）。

そうすると、ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP について、2010 年中に行った実験・観察では、上記した 2007 年中に行った実験・観察の結果をほとんど再現出来なかった。このような結果となった原因としては、以下のものが考えられる：

- ①年次による生育挙動の違い
- ②個体差
- ③試料調製における過誤

これらの因子を検討・評価するには、さらに長期・多数回にわたる綿密な研究とデータ採取が必要である。

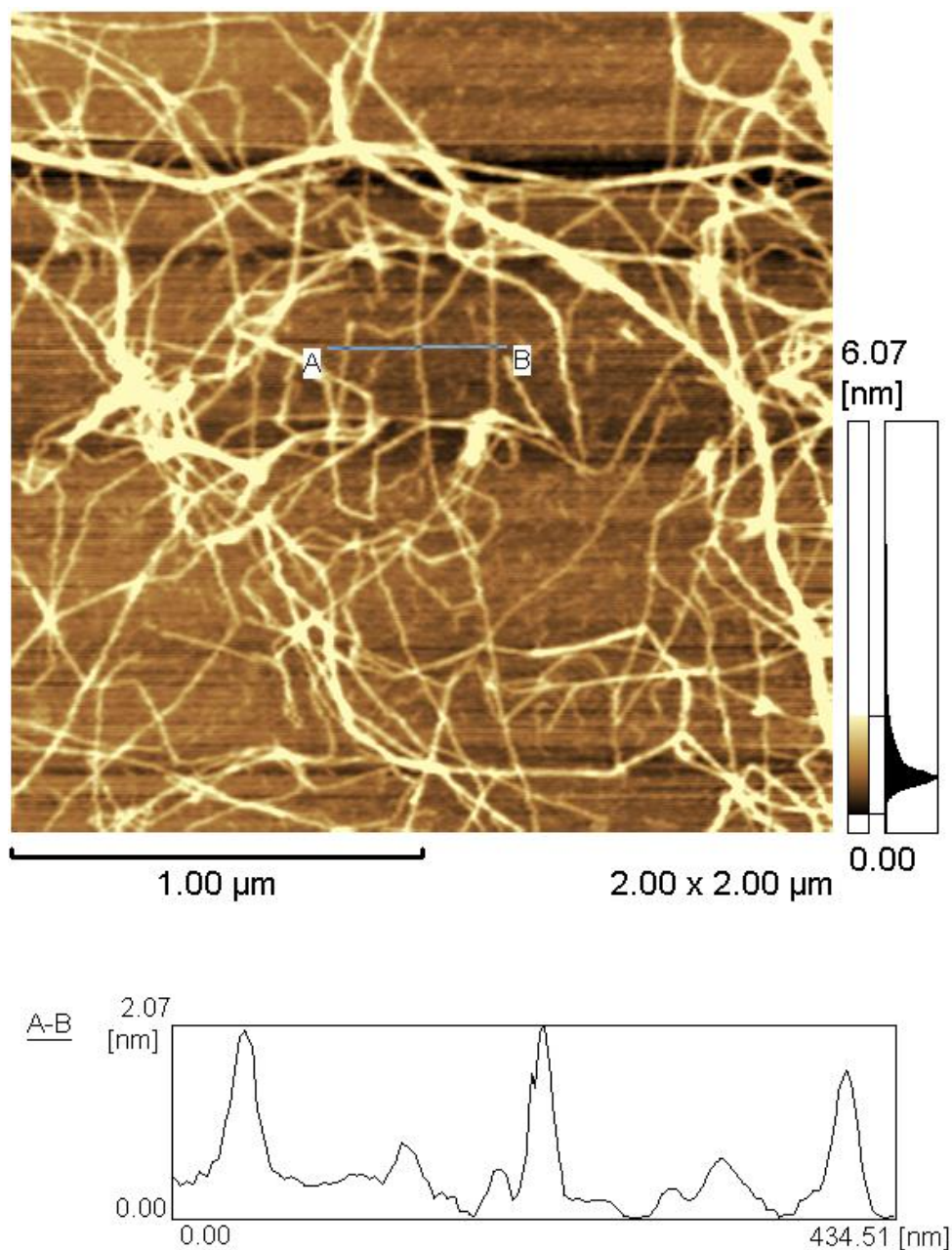


図 4.5 2007 年 5 月 30 日採取ウダイカンバ成熟木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

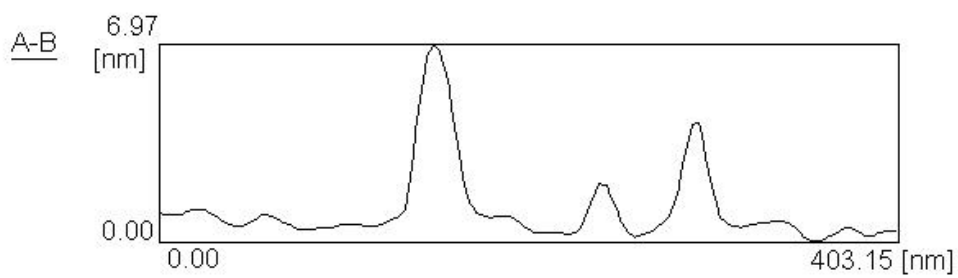
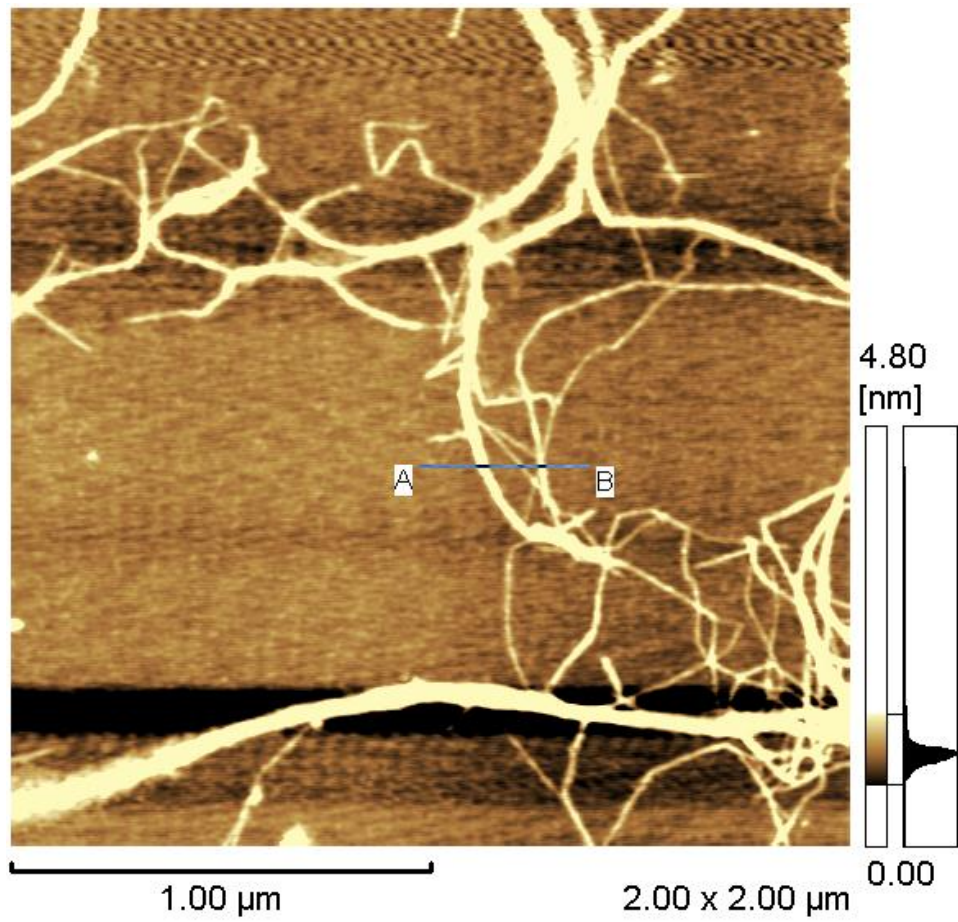


図 4.6 乾燥処理を加えた 2007 年 5 月 30 日採取ウダイカンバ成熟木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

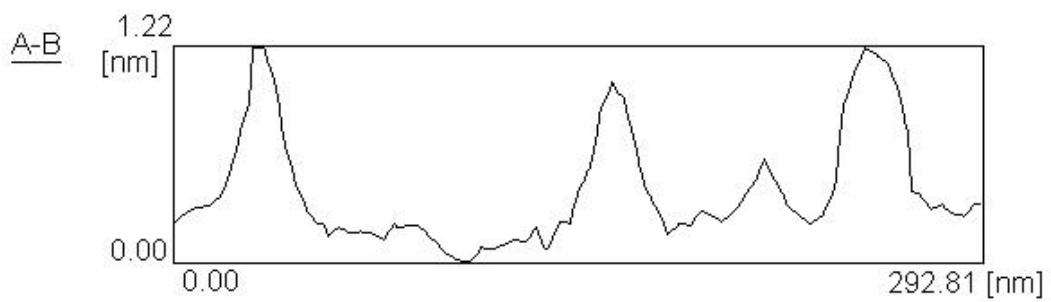
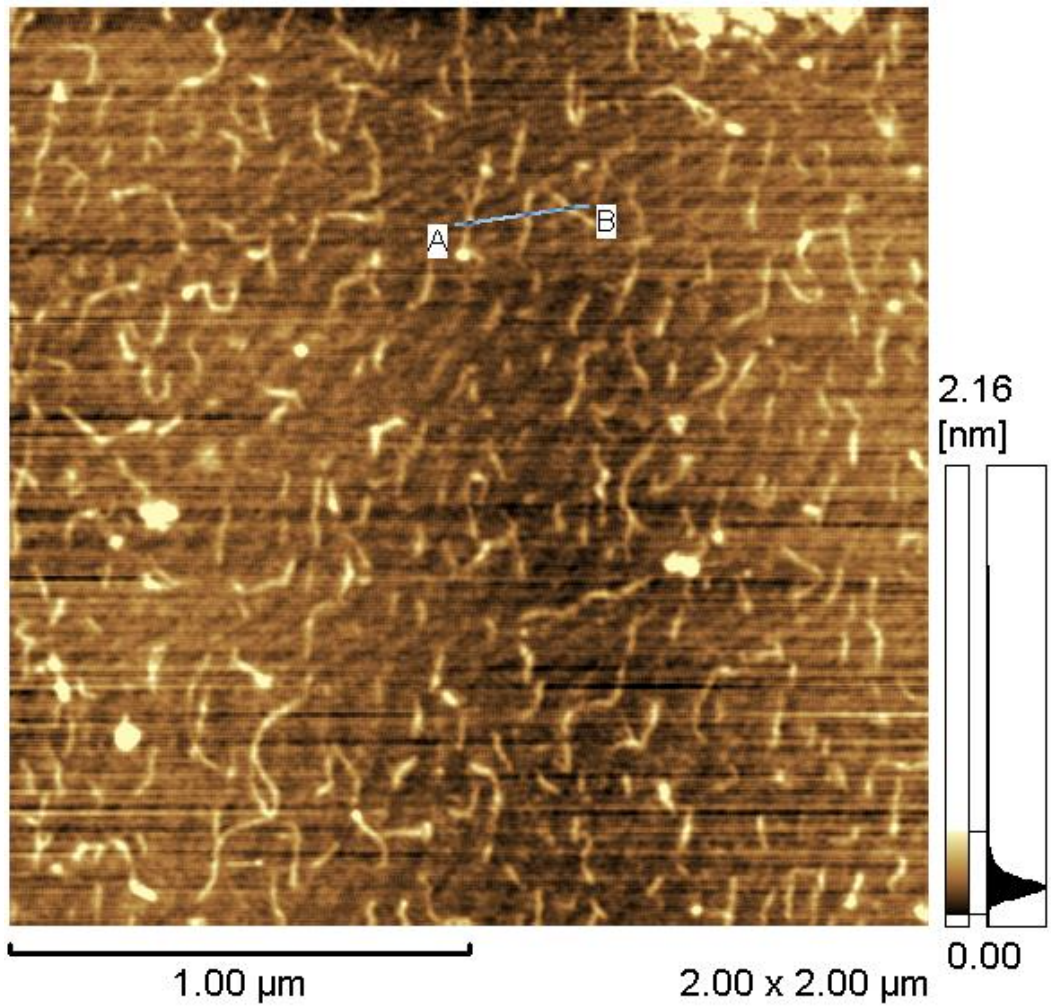


図 4.7 2007 年 5 月 30 日採取ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

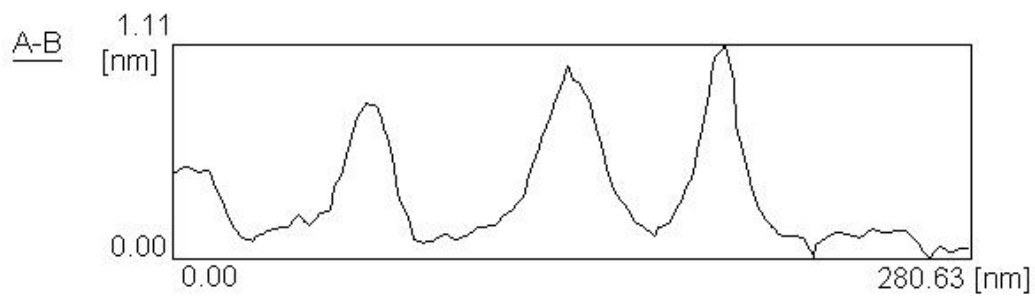
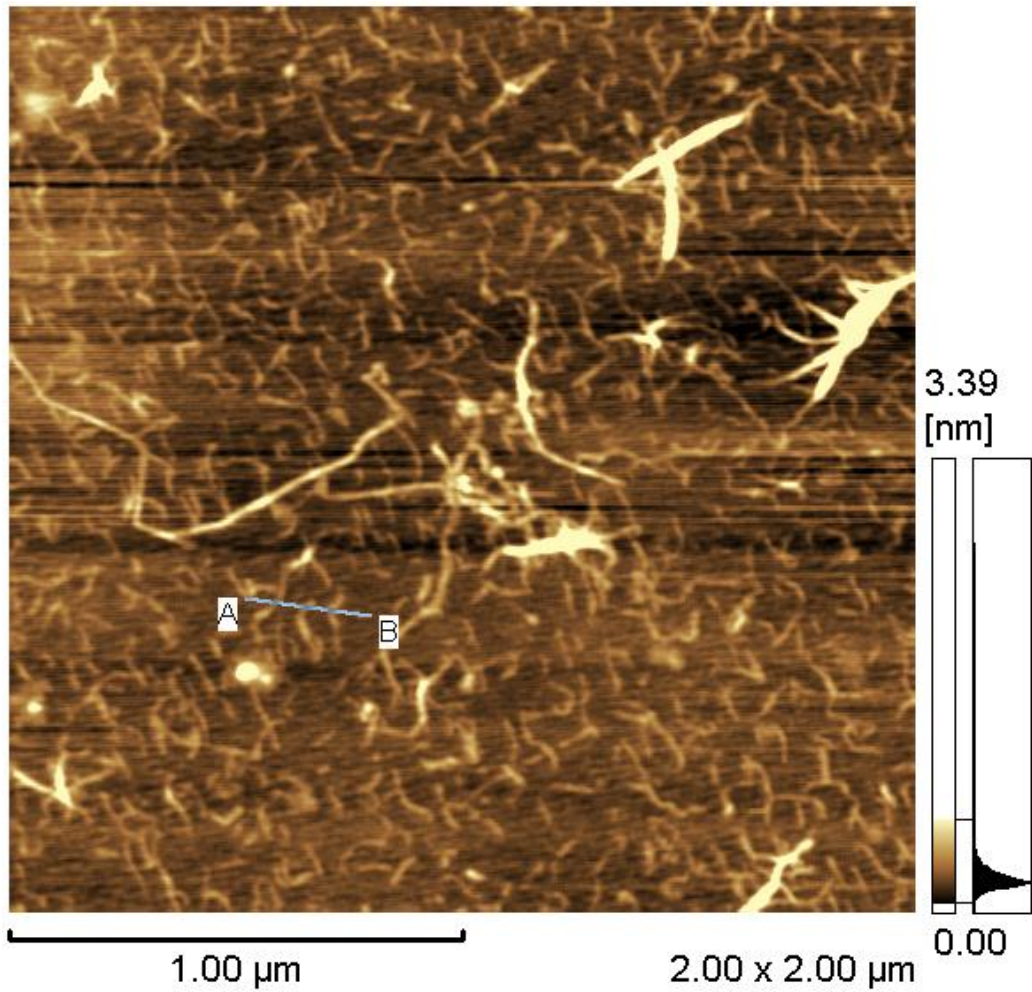


図 4.8 2007 年 7 月 9 日採取ウグイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

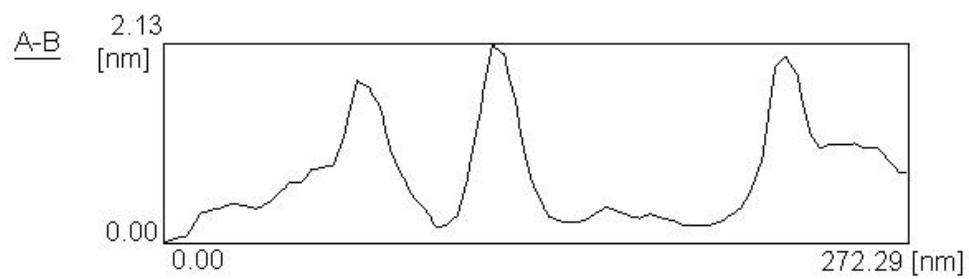
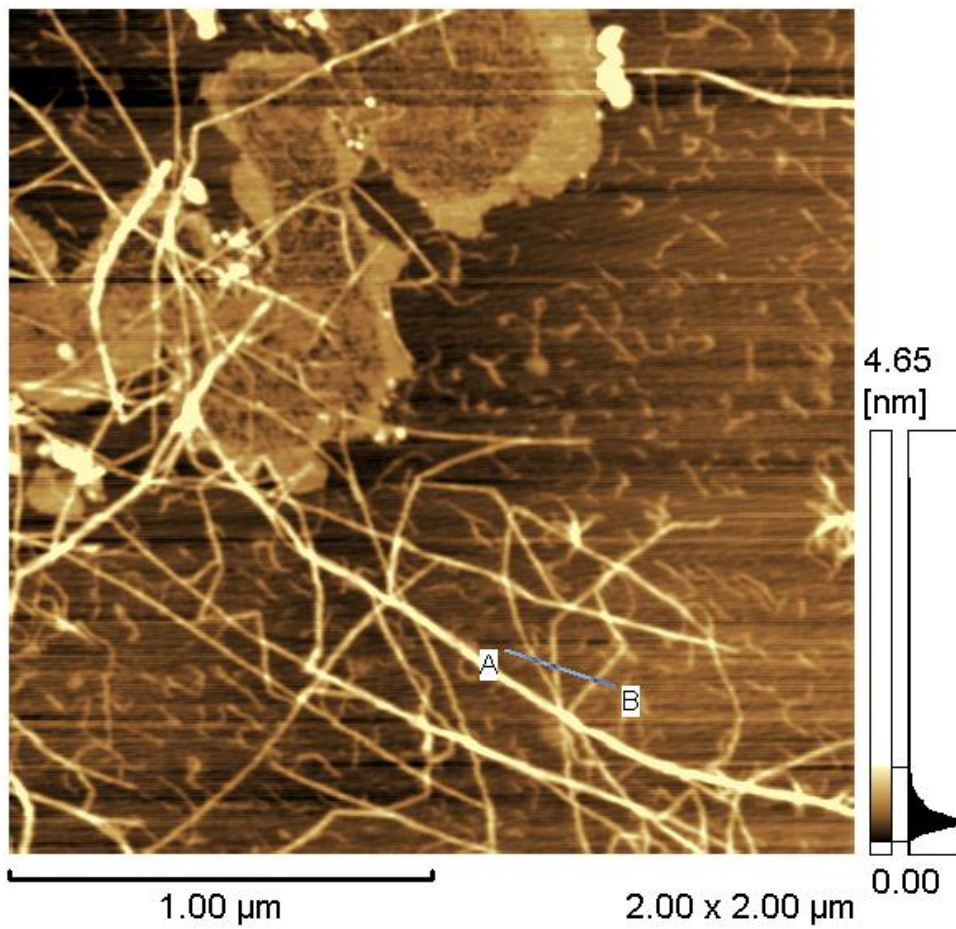


図 4.9 2007 年 8 月 24 日採取ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

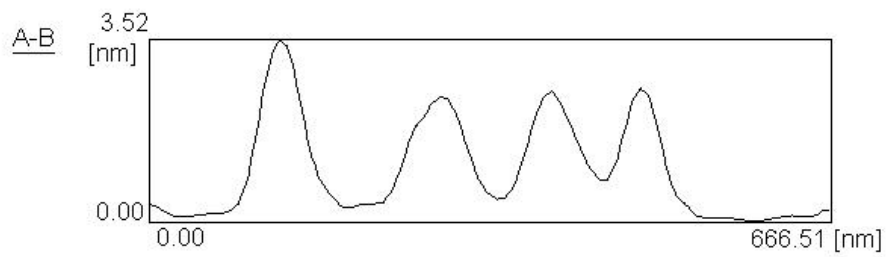
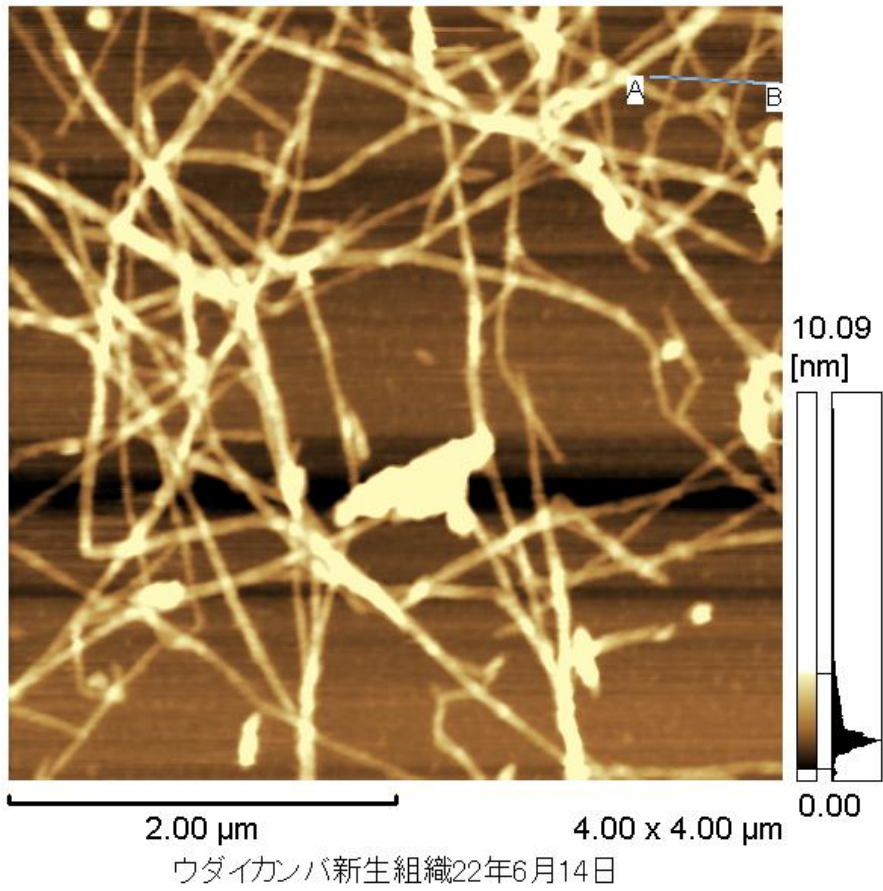


図 4.10 2010 年 6 月 14 日採取ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像 (コンタクトモード)

以上の実験結果のうち、まず図 4.5 の乾燥履歴のない（本研究中で調製したほとんどの WARP の一般的な状態に当たる。）2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP による場合および図 4.6 の乾燥履歴のある同組織由来 WARP による場合の 2 例について、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 4.11 のようになった。

これによれば、乾燥履歴のない場合でのフィブリルの幅は、頻度 9 で最頻値 2.1 nm、乾燥履歴のある場合のフィブリルの幅は、頻度 5 で最頻値 2.1 nm であることが認められ、両例は、そのときの頻度は異なるが、最頻値が同値である。

もっとも、図 4.11 上、乾燥履歴のない場合のヒストグラムは、フィブリル幅の最頻値 2.1 nm を唯一の頂点として、頻度 9 のピーク高さにまで達するひとつの尖りだけが強調されて見られる、比較的単純な形のカーブを描いている。これに対して、乾燥履歴のある場合のヒストグラムは、フィブリル幅の最頻値 2.1 nm で頻度 5 のピーク高さ、フィブリル幅の準最頻値 2.7 nm および同 10.5 nm で各頻度 4 のピーク高さに達し、それら付近で尖りを繰り返すなど、複数以上のピークを比較的低標高で連ねているような、比較的複雑な形のカーブを描いている。このように、全く同一の植物組織片から WARP を調製したにもかかわらず、乾燥履歴があるか否かの違いによって、多糖フィブリルの存在形態に相当の変化が生じる可能性があることが、明らかになった。

次に、図 4.5 の 2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP による場合、図 4.7 の同日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合、図 4.8 の同年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合および図 4.9 の同年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合の 4 例について、各得られた AFM 観察画像中において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を適用し、各画像上 50 の計測点でのフィブリル幅の計測からヒストグラムを作成したところ、図 4.12 のようになった。

図 4.12 は、ほぼ同じ場所に自生していたウダイカンバという同一樹種のほぼ同齢でほぼ同大の異個体について、同じ年内で時季を変えて伐採・解体・観察・計測を実施した結果である。よって、この図は、基本的に、ウダイカンバ新生二次木部組織中における多糖フィブリルの自然存在形態の年内生長の経時変化を反映している。

ただし、図 4.5 は、成熟二次木部組織を分析した結果であるから、これによるヒストグラムは、昨年以前に形成された同樹種の新生二次木部組織が、最終的に生長を完成し、成熟二次木部に移行した結果に当たるとも考えられる。

図 4.12 によれば、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 9 で最頻値 2.1 nm、同日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 16 で最頻値 0.9 nm、同年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 16 で最

頻値 0.9 nm および同年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅は、頻度 11 で最頻値 1.1 nm であることが認められる。つまり、2007 年中に伐採・採取した各ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP については、そのときの各頻度は異なるが、2007 年 5 月 30 日、同年 7 月 9 日および同年 8 月 24 日という伐採・採取時季の相違によらず、それぞれに含まれるフィブリルの幅の最頻値は、0.9 nm または 1.1 nm でほぼ一致している。他方、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟二次木部組織由来 WARP に含まれるフィブリルの幅の最頻値は、新生二次木部組織由来 WARP による場合の 3 例よりも、おおよそ 1.0 nm 程度大きい傾向が認められる。

もつとも、図 4.12 上、2007 年 5 月 30 日採取ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP によるヒストグラムは、フィブリル幅の最頻値 0.9 nm を唯一の頂点として、その 1 箇所のみが頻度 18 のピーク高さで鋭く尖る形状を呈する。同年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP によるヒストグラムは、やはりフィブリル幅の最頻値 0.9 nm を唯一の頂点として、その 1 箇所が鋭く尖るが、そのフィブリル幅の最頻値でのピーク高さが、頻度 16 に低下し、これに加えて、フィブリル幅 1.3 nm で頻度 8 とフィブリル幅 1.7 nm で頻度 4 のふたつの肩状の突起が認められる。

また、同年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP によるヒストグラムでは、フィブリル幅の最頻値は 1.1 nm で、同年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合と 2007 年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP による場合の前 2 例のフィブリル幅の最頻値 0.9 nm と大差がなく、その最頻値を唯一の頂点として、頻度 11 で尖る形状を呈する点も類似する。しかしながら、このヒストグラムでは、最頻値の頂点でのピークの高さがさらに低下して全般的に尖りが平坦化すると共に、前 2 例では全くカウントがないか少なかったフィブリル幅 2.0 nm 以上の範囲で、比較的多くのカウントがあることが認められる。

同図上、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ成熟木部組織由来 WARP によるヒストグラムは、2007 年中に採取した各ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP の場合の前 3 例に比べて、フィブリル幅の最頻値が 2.1 nm になって、明らかに増加傾向を示し、その最頻値を唯一の頂点として、ピーク高さが頻度 9 で前 3 例よりさらに低下し、そのカーブの尖りがより平坦になる傾向が確かになるように見られる。

以上から、図 4.12 のヒストグラムの全般的な様相としては、同じ年次の活動期中、ウダイカンバ新生二次木部組織の野外フィールドでの採集時季が遅れるに従って、フィブリル幅の最頻値は増加傾向を示し、ピーク高さは減少する傾向が現れたものと認められる。この傾向は、2007 年 5 月 30 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP の場合では、孤立した短小な楔形のフィブリルしか検出されなかったが、同年 7 月 9 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP と同年 8 月 24 日伐採ウダイカンバ新生二次木部組織由来 WARP については、短小な楔形のフィブリルに加えて、より長さのある糸状のフィブリルも相当量混在して検出されるようになった事実と、比較的良好に対応しているように見られ

る。

ところで、図 4.7 においては、その画像上、観察画像上で見られる全てのフィブリル像の全長が、同図の内で把握可能である。このため、同図中に見られる楔形物体の全長について、同図を紙上に複写・印刷して、その紙面画像上で 50 個の楔形物体を選び、それら各全長の計測からヒストグラムを作成したところ、図 4.13 のようになった。

図 4.13 によれば、図 4.7 の画像中に見られる楔形の物体は、結局おおむね長さ $0.05 \sim 0.16 \mu\text{m}$ の範囲内にあり、なかでも長さ $0.10 \mu\text{m}$ 程度のものが、最も高頻度に存在することが認められた。

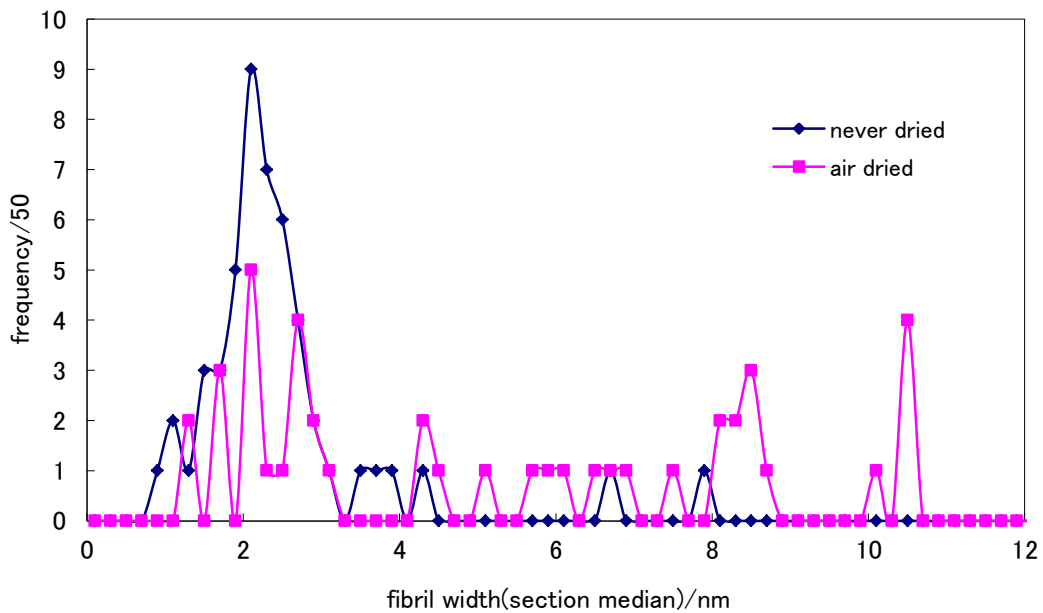


図 4.11 木材組織に含まれる多糖フィブリルの幅の計測値に対する元の木材組織の乾燥履歴の影響

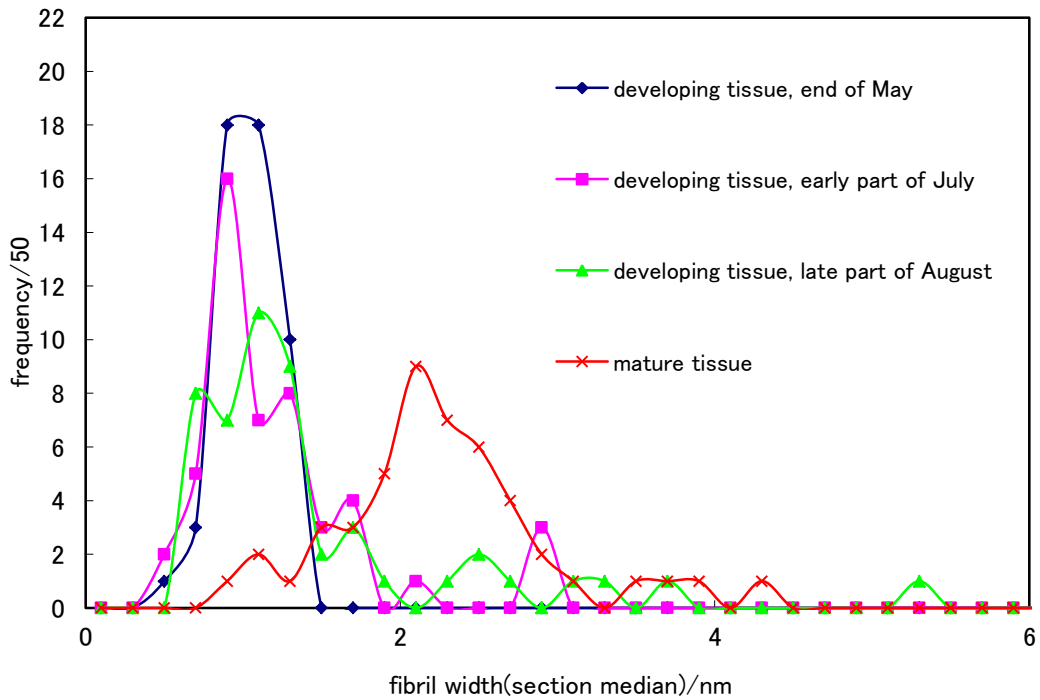


図 4.12 生長時期・段階の異なるウグイカンバ新生二次木部等組織に含まれるフィブリルの幅の計測値の各ヒストグラムと比較

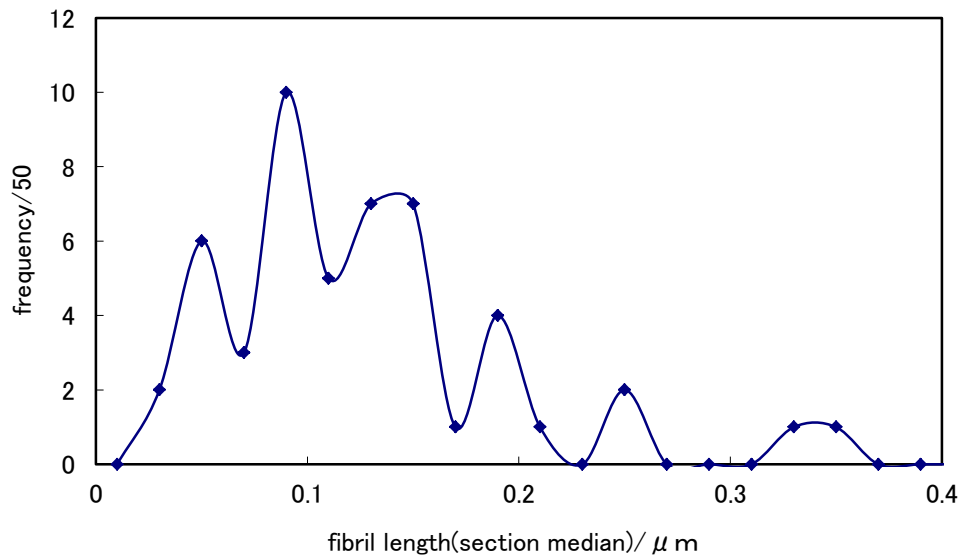


図 4.13 2007年5月30日伐採ウグイカンバ新生二次木部組織由来 WARPに含まれるフィブリル 50 個の全長の計測値によるヒストグラム

v) イロハモミジあるいはヒノキの場合

IV-2-2 ix) の実験・観察をした結果、イロハモミジの場合では、その剥皮は比較的容易であり、剥皮後の丸太最表層を金属片でなぞったところ、乳白色を呈する紐屑状の湿潤な固形物質約 10 g (湿重量) が得られた。上記の剥皮と新生二次木部組織の採取の実験操作を終えた後、引き続き、その樹体の、より下層の成熟木部組織に該当すると見られる部分を金属製鑿で切り出したところ、通常の木材片と認められる状態の木材片が得られた。これを金属製ナイフでさらに薄片に加工したところ、通常の木材の鉋屑と色形が同様のものが得られた。

ヒノキの場合でも、その剥皮は極めて容易であり、その作業ために切開した部分からは、無色の浸出液が多量に発生した。その剥皮後の丸太最表層を金属片でなぞったところ、乳白色を呈する紐屑状の湿潤な固形物質約 20 g (湿重量) が得られた。そして、その金属片でなぞった箇所からは、白色の浸出液が多量に発生した。上記の剥皮と新生二次木部組織の採取の実験操作を終えた後、引き続き、その樹体の、より下層の成熟二次木部組織に該当すると見られる部分を金属製鑿で切り出したところ、通常の木材片と認められる状態の木材片が得られた。これを金属製ナイフでさらに薄片に加工したところ、通常の木材の鉋屑と色形が同様のものが得られた。

次に、2010年5月10日採取イロハモミジ成熟二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.14 に示す。この観察画像中においても、その全体に、ほぼ同様の細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する様子のみが見られる。これを前章での観察実験結果に照らすと、やはり全般的にオランダイチゴ果肉由来 WARP 等による場合と酷似している。

図 4.14 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 2.0 nm~3.5 nm の範囲内であった。

次に、2010年5月10日採取イロハモミジ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察については、上記の図 4.14 の同日採取イロハモミジ成熟二次木部組織由来 WARP による AFM 観察の場合とほぼ同等の実験・観察結果が得られた (観察画像の例等は省略する。)

次に、2010年5月10日採取ヒノキ成熟二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.15 に示す。この観察画像中においても、やはりその全体に、ほぼ同様の細長い糸状のフィブリルが、多数走行・屈曲・交差する様子のみが見られる。

図 4.15 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおよそ 1.5 nm~2.5 nm の範囲内であった。

2010年5月10日採取ヒノキ新生二次木部組織由来 WARP による AFM 観察画像の一例を、図 4.16 に示す。この画像中の様相は、全般的に前掲の図 4.15 の同日採取ヒノキ成熟二次木部組織由来 WARP による場合と大差がない。

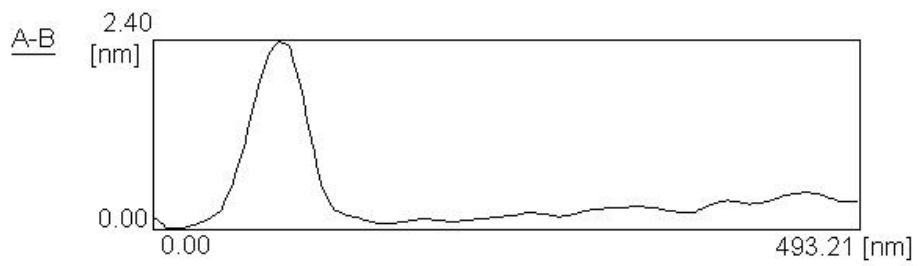
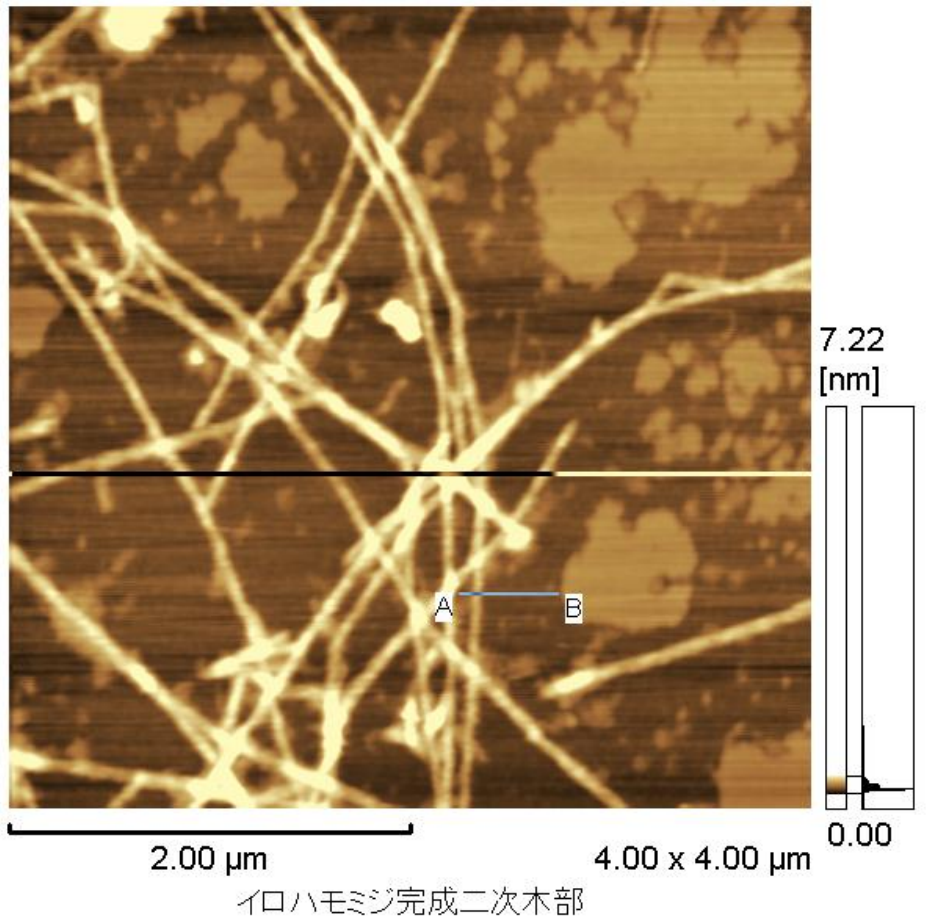


図 4.14 2010 年 5 月 10 日採取イロハモミジ成熟木部組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

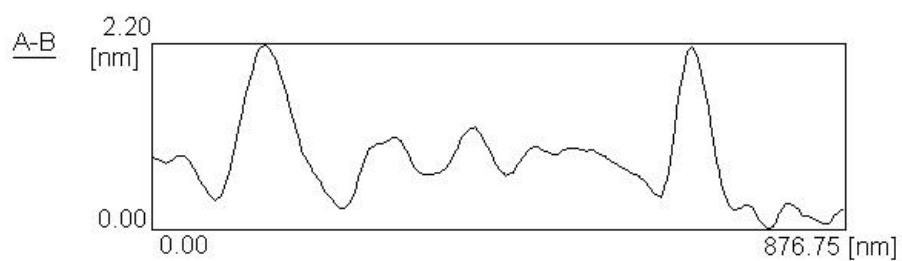
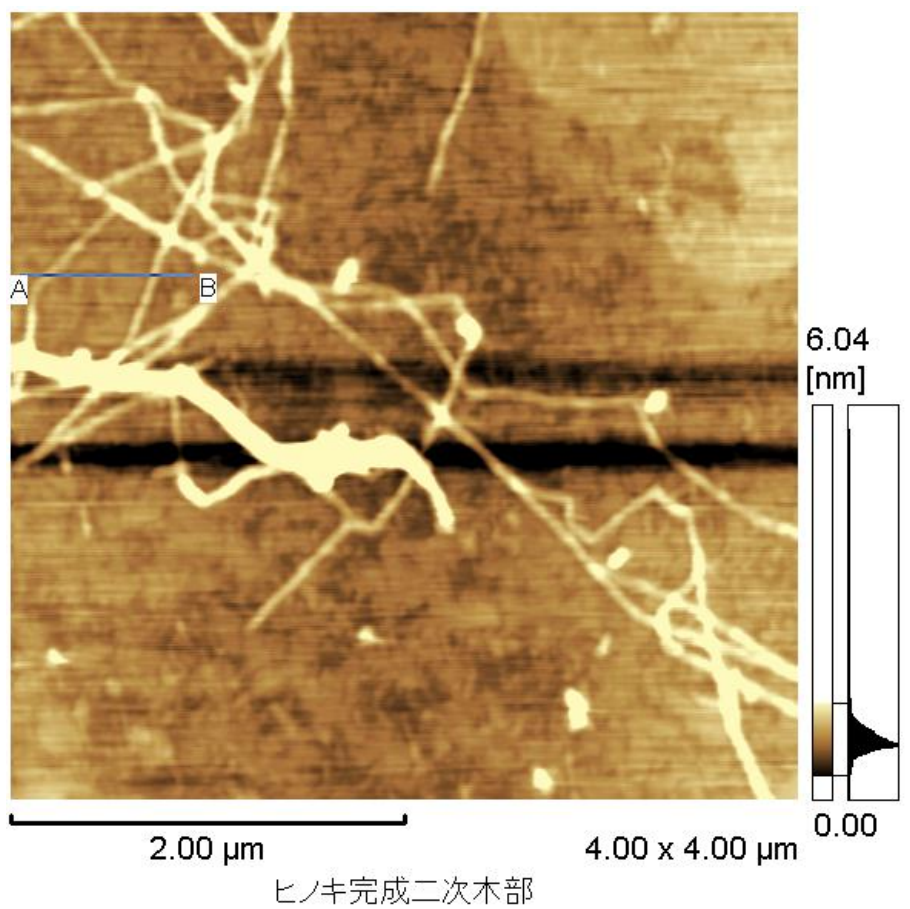


図 4.15 2010 年 5 月 10 日採取ヒノキ成熟木部組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

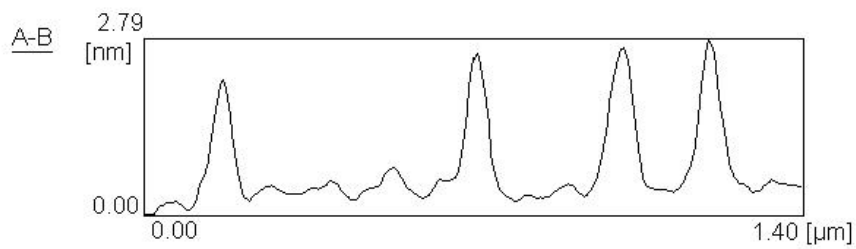
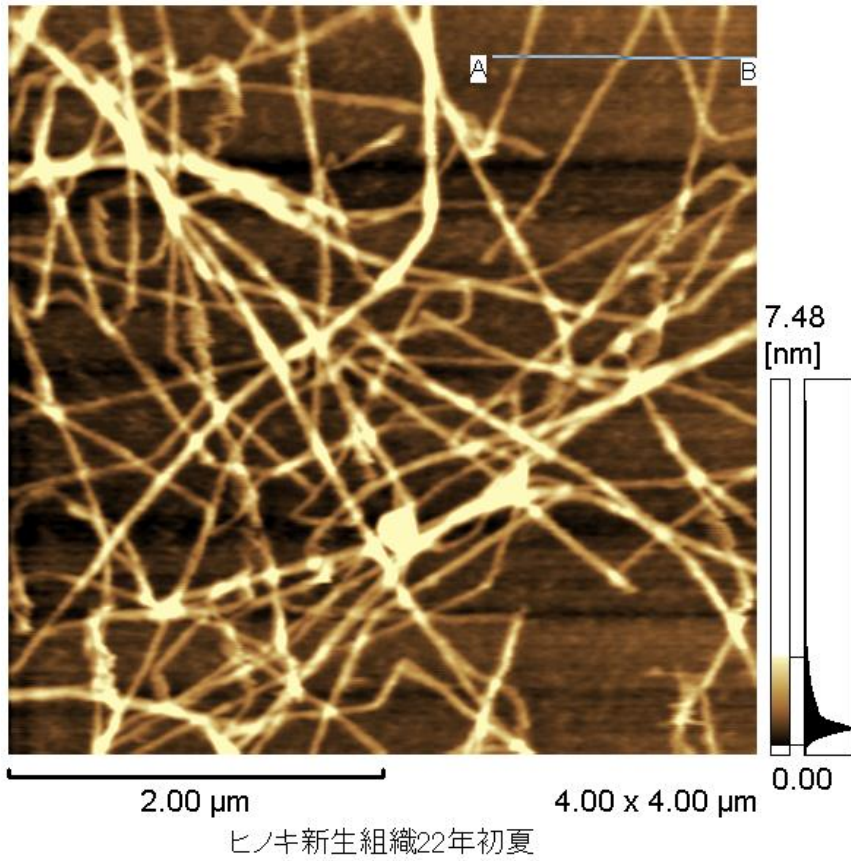


図 4.16 2010年5月10日採取ヒノキ新生二次木部組織由来 WARP の AFM 像 (コンタクトモード)

IV-4. 本章のまとめ

時季と個体、サンプリングの方法等を変えて、ほぼ同じ天然林内からほぼ同齢・同大のウダイカンバ樹から、新生二次木部組織等の採取を繰り返し、WARP を調製して、それぞれ AFM による観察を実施した。その結果、樹木生長活動初期から年間の生長を終えて成熟木部組織に移行した後の段階までの間、2.0 nm～3.0 nm 程度の比較的幅の細いセルロースフィブリルが、生長段階を問わずに木材組織中に広く存在する可能性が高いことが明らかになった。樹種を変え、イロハモミジやヒノキの成熟二次木部組織に由来する WARP による観察においても、2.0 nm～3.0 nm 程度の比較的幅の細いフィブリル像を検出したことから、2.0 nm～3.0 nm 程度の比較的幅の細いセルロースフィブリルの存在は、広葉樹と針葉樹の区別なく、樹種も問わずに木材組織中に比較的広く存在する可能性が考えられる。

2007 年中、分析の対象としたウダイカンバの樹木生長活動初期の試料からは、専ら長さ $0.16 \mu\text{m}$ 程度以下、幅 $0.6 \text{ nm} \sim 1.8 \text{ nm}$ 程度の孤立した短小なフィブリルのみが検出された。しかしながら、このような特徴的な所見は、その後異年次で繰り返し試みたにもかかわらず、いまだ明瞭に再現するに至っていない。

第V章 農林業廃棄物からのナノファイバーの調製

V-1. 本章の目的

第3章での検討の結果、果実・野菜等の柔組織から調製される WARP の主成分は、数ナノメートル幅のセルロースフィブリル、それも従来最小単位とされてきた 3.5 nm よりも明確に細い 1~2 nm 幅のものであることが明らかになった。そして、それらの中には、数パーセントの濃度の水懸濁液を超音波処理するとゲル様化を呈するような、高分散性の特性を示すものもあった。

このような高分散性のナノファイバーとその水懸濁液は、保湿性に優れる等の利点が多く、化粧品・食品用増粘剤、ナノ粒子除去フィルター、ナノコンポジットなどの高機能材料として応用が期待出来る。現在化粧品や食品の増粘剤に使用されている天然多糖にはキサンタンガム、グアーガム、寒天などがあり、半合成高分子としてメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース (CMC)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC) などがある。また、セルロースを強酸処理で微粉化した「微結晶セルロース」(旭化成(株)「セオラス」など)も使用される。

また、ここでひとつ注目されるものとして、マルメロ種子付属粘質物 (quince slime extract) が挙げられる。その主成分は、天然の微細セルロースの一種と言われ、その保湿性の高さから、高級化粧品材料として珍重され、実用化が進んでいる。

このように、植物由来の多糖ナノファイバーの水懸濁液ないし溶液等は、高付加価値の材料になり得るので、セルロースナノファイバーの原料として、やや特殊な素材でも探索することには、相当の産業的意義が期待出来る。しかしながら、果実や野菜は元来比較的に付加価値の高い食品であって、またそれらの多くのものは含水率が 90%程度以上であり、WARP に相当する水不溶固形分の比率は非常に小さい。そこで、本章では、従来食用にならない等の理由で有効利用がされて来なかった未利用植物組織から、効率的に WARP を得る方法を模索・検討することにした。

より具体的には、第3章で取り扱った植物種・組織種の中から、現在人類に有効に利用されておらず、その資源が容易、低廉かつ豊富に入手出来る可能性があり、フィブリルの幅が特に細いかその水懸濁液を超音波処理したところゲル様化を呈した実績のある植物材料から探索することとした。

上記の要件に合致したものとして、本章の研究対象として、スギ針葉、ミドリハナヤサイ茎髓、カカオポッドおよびナツミカン中果皮の4植物種・組織種を選んだ。

V-2. スギ針葉

i) 実験の目的

第3章の実験で供試した結果、まずスギ針葉（図5.1および図5.2）からは幅1.0 nmの程度の細長い糸状のフィブリルが多分に得られる可能性があることが分かった。そこでこれを工業原料として利用するための検討を行うことにした。



図 5.1 施業中の人工林のスギ針葉（2011年2月末、山梨県南部山間において撮影。）



図 5.2 本章の実験で実際に用いた住宅地植栽のスギ針葉（2011年2月末、東京都小平市内において撮影。）

スギ人工林においては、良質な材を生産するために定期的な間伐と剪定が行われる。それらに伴って相当量の針葉が廃棄物として発生するが、ごく一部が線香の原料として用いられる以外には用途がなく、通常は林内に全て遺棄処分されている（図 5.3 および図 5.4）。



図 5.3 人工林内でスギ剪定枝が打ち捨てられた状況（2011年2月末、山梨県南部山間において撮影。）



図 5.4 人工林内に打ち捨てられたスギの剪定枝（2011年2月末、山梨県南部山間において撮影。）

したがって、スギ針葉から付加価値の高い WARP を生産することができれば、林業振興の一助にもなる。

ii) 実験

平成 23 年 1 月中旬に、東京都小平市の樹齢約 20 年のスギ樹（品種：芽白）から、濃赤銅色を呈する小枝頂芽部の針葉を 41.6 g（生重量）採取した。これを沸騰水で 120 時間処理したがほとんど色落ちせず、軟化もしなかった（図 5.5）。そこで、陶器製スリバチと木製スリコギで十分に摩り下ろした（図 5.6）。

スギ針葉磨砕物 92.545 g（湿重量）のうち 10.902g（湿重量）を分取して、再び沸騰した水で 120 時間煮たが、色や形状等にほとんど変化が見られなかった。次いで、これを 4% 水酸化ナトリウム水溶液に 96 時間浸漬した。これを 蒸留水、アセトン、蒸留水の順番で洗浄し（図 5.7）、第 3 章の実験における場合と同様に亜塩素酸ナトリウムで脱リグニン処理をして純白色を呈する湿潤物質 1.178 g（湿重量）を得た（図 5.8）。ただし、この処理による脱色の進捗は低効率となり、純白になるまで、まる 4 回の処理を要した。

こうして得られた湿潤物質の少量を分取して、相応量の蒸留水中に散布して超音波懸濁処理したところ、比較的均質な細かいフィブリル状に分散するのが視認出来たので、これを第 3 章の実験方法と同様にして、AFM 観察とフィブリル幅の計測を実施した。

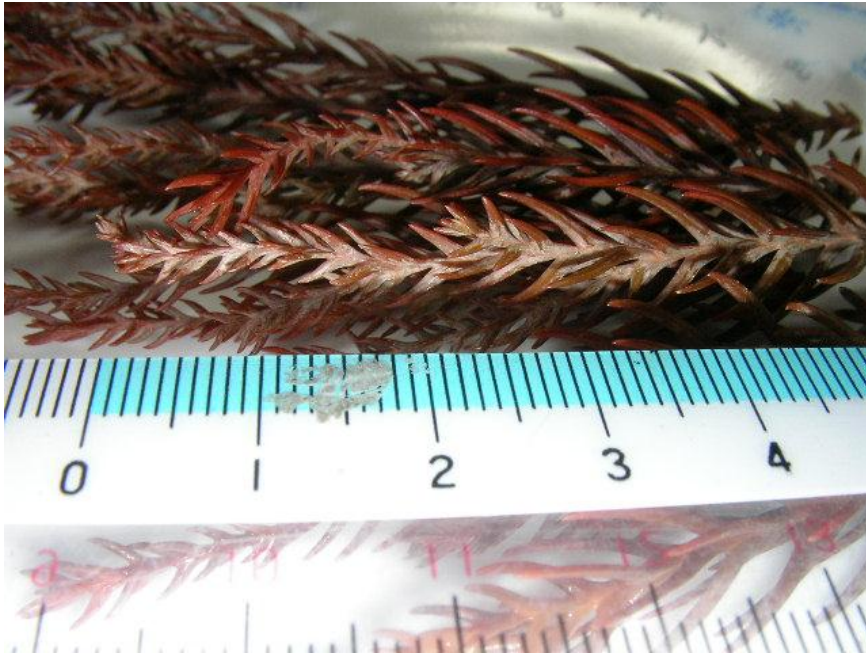


図 5.5 水で 120 時間沸騰したスギ針葉



図 5.6 120 時間沸騰した水で煮続けた後、搗粉木で摩り下ろしたスギ針葉



図 5.7 前図のものを再度 120 時間煮続し、4%水酸化ナトリウム水溶液に 96 時間浸漬し、水-アセトン-水で洗浄したもの（黒褐色を呈している。）



図 5.8 スギ針葉由来 WARP 湿潤物（やっと脱色した。）

iii) 結果と考察

上記 ii) の実験で調製した WARP による AFM 観察画像の例を、図 5.9、図 5.10、図 5.11 および図 5.12 に示す。各画像を見ると、それらの様相は、第 3 章で見た図 3.54 の様相とほぼ合致する。それらの画像では、その全体に、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルのみが、ほぼ均質に多数走行・屈曲・交差する様子が見られる。図 5.9、図 5.10、図 5.11 および図 5.12 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測を実施したところ、多数のフィブリルの形状は比較的均一で、平均幅 2.5 nm であると計測された。

このように、WARP 原料として、同じくスギ針葉を用いたにもかかわらず、本章での実験によるフィブリル幅の数値が、第 3 章での実験によるフィブリル幅の数値より相当大きい傾向となったのは、本章で WARP の調製に供した元の材料のスギ植物体が、針葉部分のみに限られず、剪定枝の形式で「小枝」と言うべき範囲に広がっていたためであると考えられる。つまり、WARP 原料として、若枝の髄等も含まれていたことになるためだからだと考えられる。

今のところ、スギ針葉組織由来 WARP から調製した WARP 水懸濁液は、超音波処理しても、固形分が水中にあまねく分散することなく、数分以内で速やかに、ほぼ全ての固形分が沈降する。超音波処理の継続時間を増やすなどの工夫を試みたが、いまだ改良の兆しを見出すことが出来ない。

以上のように、スギ針葉組織由来 WARP からは、分散性が劣るが、比較的細かいフィブリル幅で、均一性の高いセルロースナノファイバーを高純度で得ることが出来ると認められた。ただし、そこでの問題は、この原料が相当硬質で、かつ非セルロース成分が多いため、WARP を分離する際の機械的・化学的処理を強い条件で行わねばならないことである。

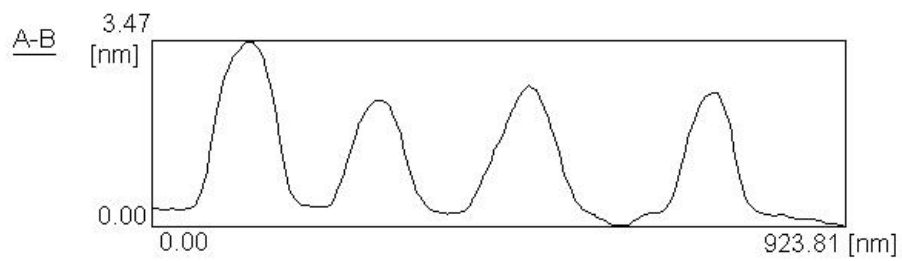
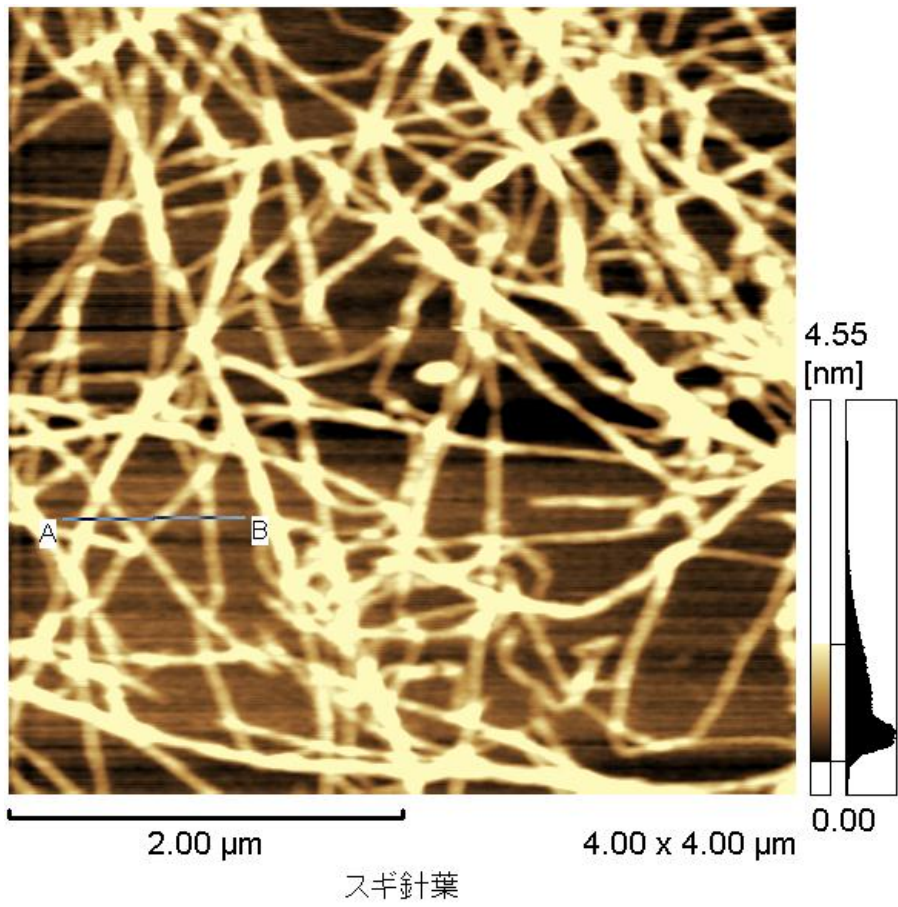


図 5.9 スギ針葉組織由来 WARP による AFM 観察画像イ.

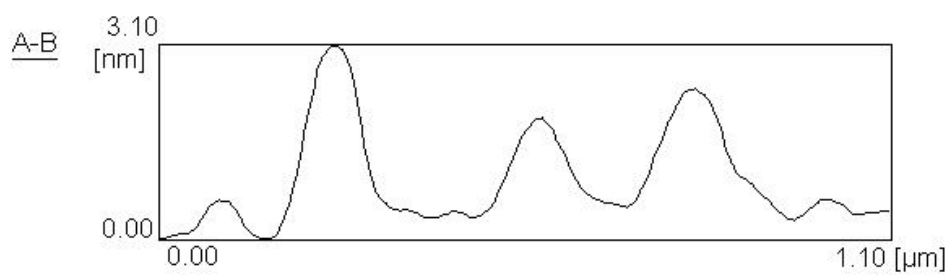
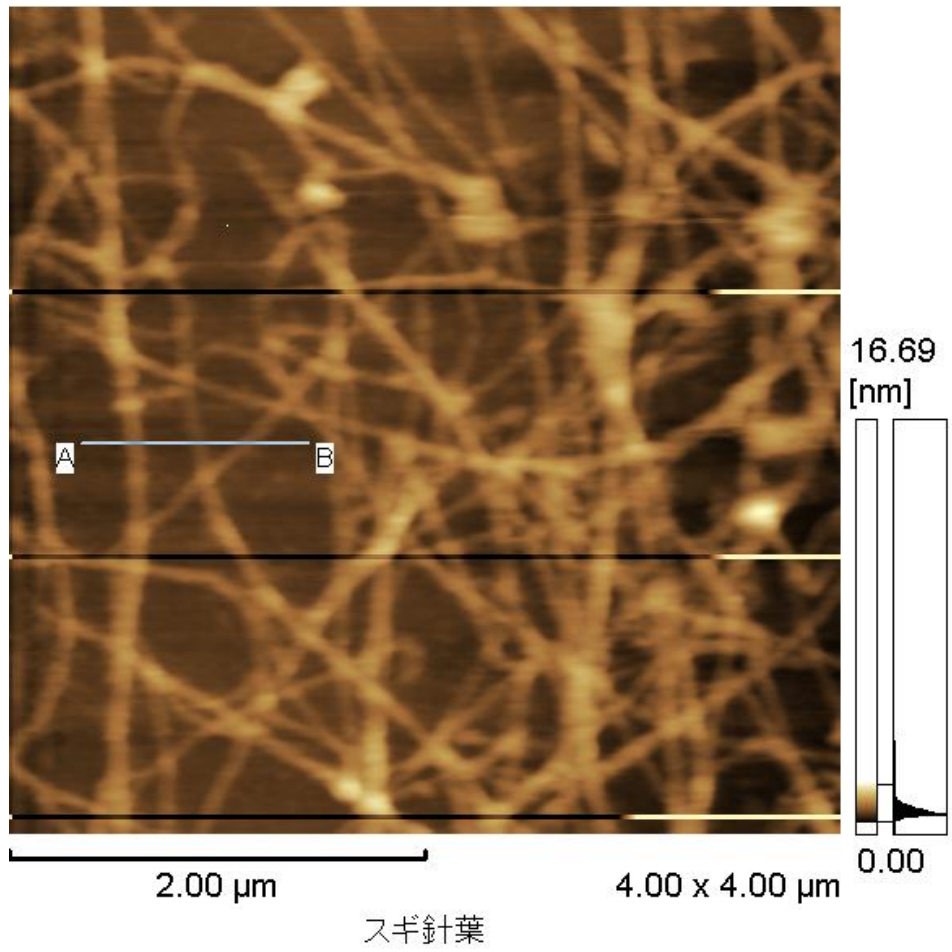


図 5.10 スギ針葉組織由来 WARP による AFM 観察画像口.

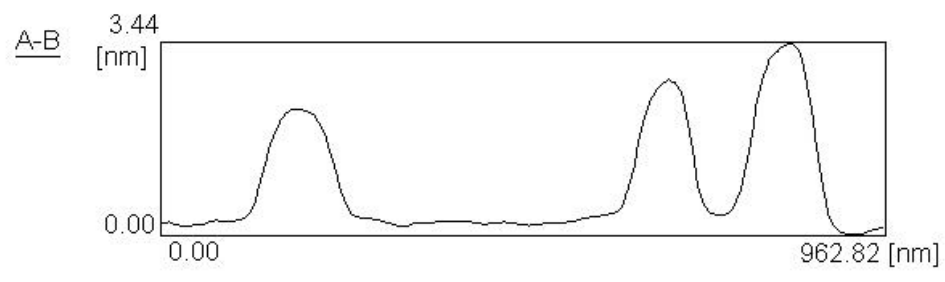
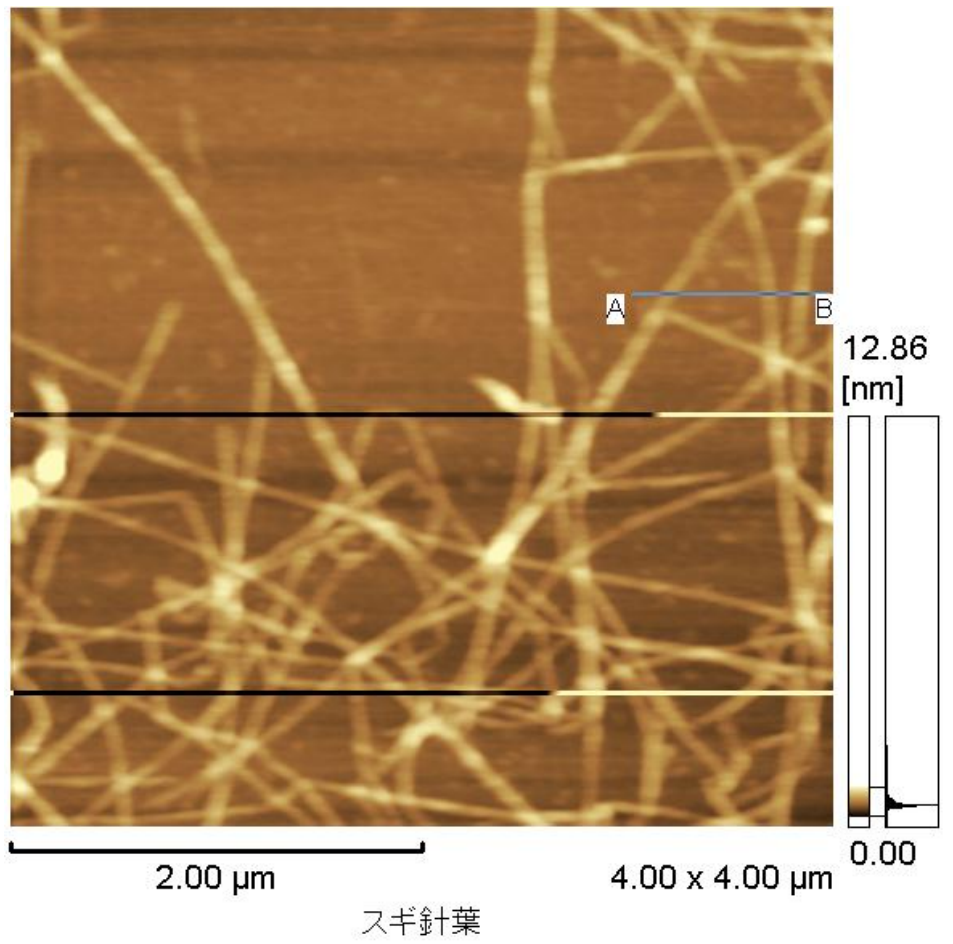


図 5.11 スギ針葉組織由来 WARP による AFM 観察画像口.

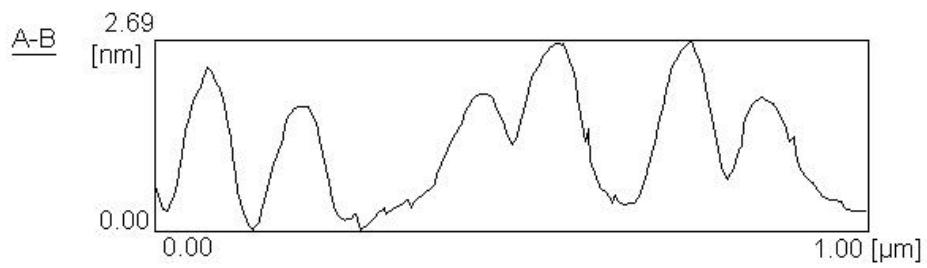
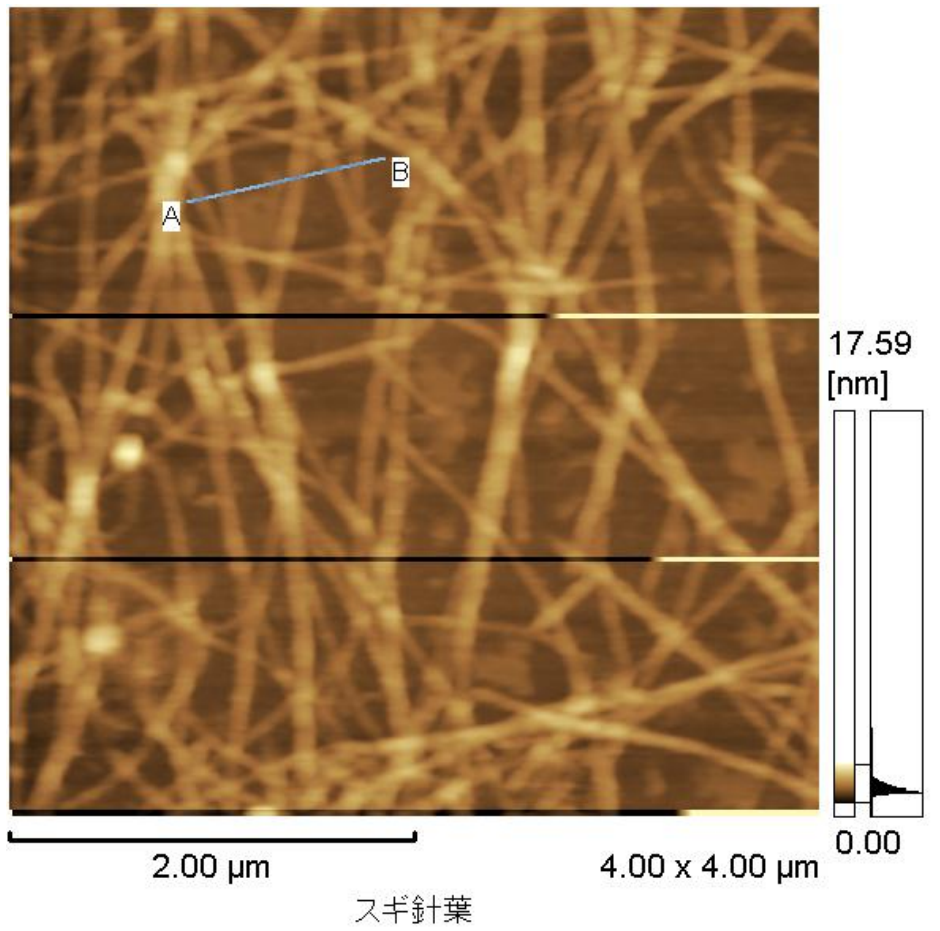


図 5.12 スギ針葉組織由来 WARP による AFM 観察画像ハ.

V-3. ミドリハナヤサイ茎髓組織

i) 実験の目的

ミドリハナヤサイは、カンラン *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. (いわゆる「キャベツ」) やカブカンラン *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* L. (いわゆる「コールラビー」) と同様に、地中海沿岸原産のアブラナ科多年生草本植物の一種ケール *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC. から改良作出された野菜のひとつである。この植物は、同類のハナヤサイと共に、主に花蕾部を食用の対象とするため、特に「花蕾類」と呼ばれて区別される。それは、淡白な味わいのハナヤサイに比べて、食味にややくせがあるため、人によって好き嫌いが激しい代表的な野菜のひとつに数えられる。もっとも、ミドリハナヤサイは、今でも「青汁」の原料として汎用されるケールと同様に、微量栄養素を豊富に含む健康野菜としても知られている。

よって、ミドリハナヤサイは、通例花蕾部のみを食用の対象とするので、その生産現場では、花蕾部のみが摘み取られ、その収穫後の畑には、残りの多肉質の太い茎などが遺棄されることが多い。そこで、もしそのような部分から有用物質が採取できるならば、経済的・技術的意義が大きいと考えられた。

ii) 実験

2010年2月中旬に東京都国分寺市内の畑地において、食用花蕾部の収穫を終えたミドリハナヤサイ1株から主茎部(図5.13)を採取し、包丁で剥皮して茎髓組織49.674g(生重量)を採取した(図5.14)。それを水で24時間煮沸すると組織が淡黄褐色に変化し、組織が軟化した(図5.15)。



図 5.13 ミドリハナヤサイの主茎部



図 5.14 ミドリハナヤサイの主茎部から皮むきをしたもの

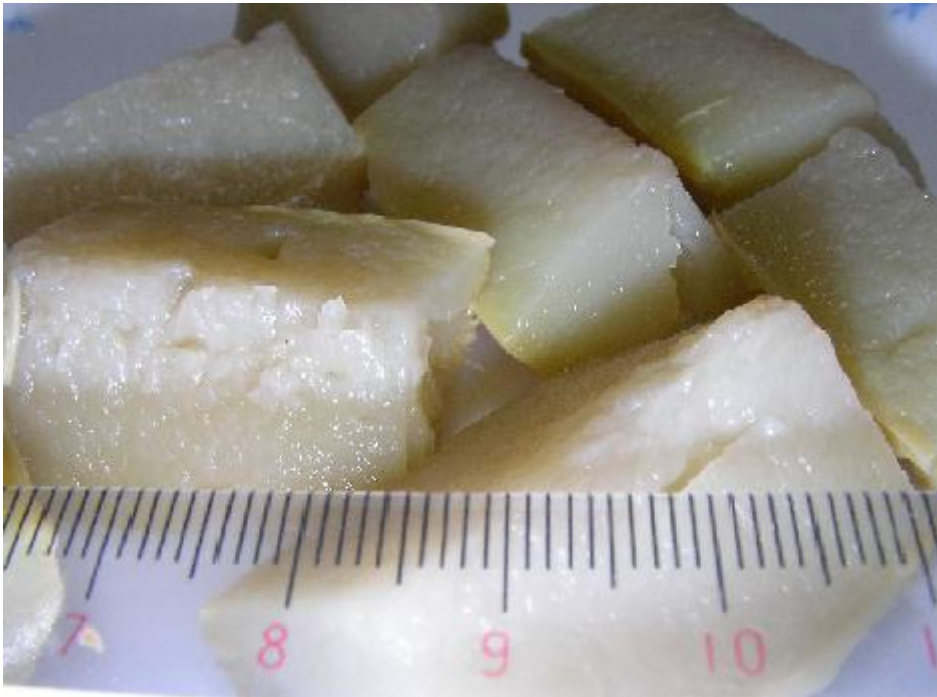


図 5.15 沸騰水で 24 時間煮たミドリハナヤサイ茎髄組織

十分に煮沸処理した茎髄組織は木製へらでつぶし、4%水酸化ナトリウム水溶液に 48 時間浸漬し、蒸留水、アセトン、蒸留水の順で十分に洗った後脱リグニン処理すると、純白色を呈する湿潤物質 1.178 g (湿重量) が得られた (図 5.16)。こうして得られた湿潤物質の少量を分取して、相応量の蒸留水中に散布して超音波懸濁処理したところ、わずかに白濁のあるゆるい無色透明のゲル様を呈するのが視認出来たので、これを第 2 章の実験方法と同様にして、AFM 観察とフィブリル幅の計測を実施した。



図 5.16 ミドリハナヤサイ茎髄組織由来 WARP 湿潤物

iii) 結果と考察

上記 ii) の実験で調製した WARP による AFM 観察画像の一例を、図 5.17 (図 3.49 の再掲) に示す。既に第 3 章中で検討したように、この観察画像中の様相は、オランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合 (図 3.22 等) と酷似している。ただし、図 5.17 の画像中のフィブリルの多くは見た目にも太く、複数のフィブリルが重畳しているように見られる部分が多い。

図 5.17 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 3.0 nm ~4.0 nm の範囲内であった (複数のフィブリルが明らかに重畳して見える場合は、その部分はこの計測対象から除外した。)。もっとも、多数の糸状のフィブリルの形状は、比較的均一で、平均幅 3.5 nm であった。

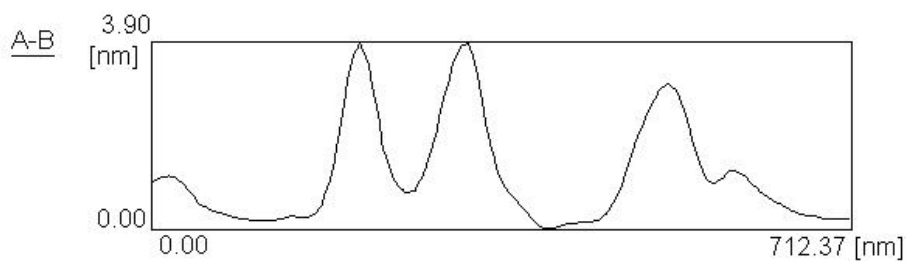
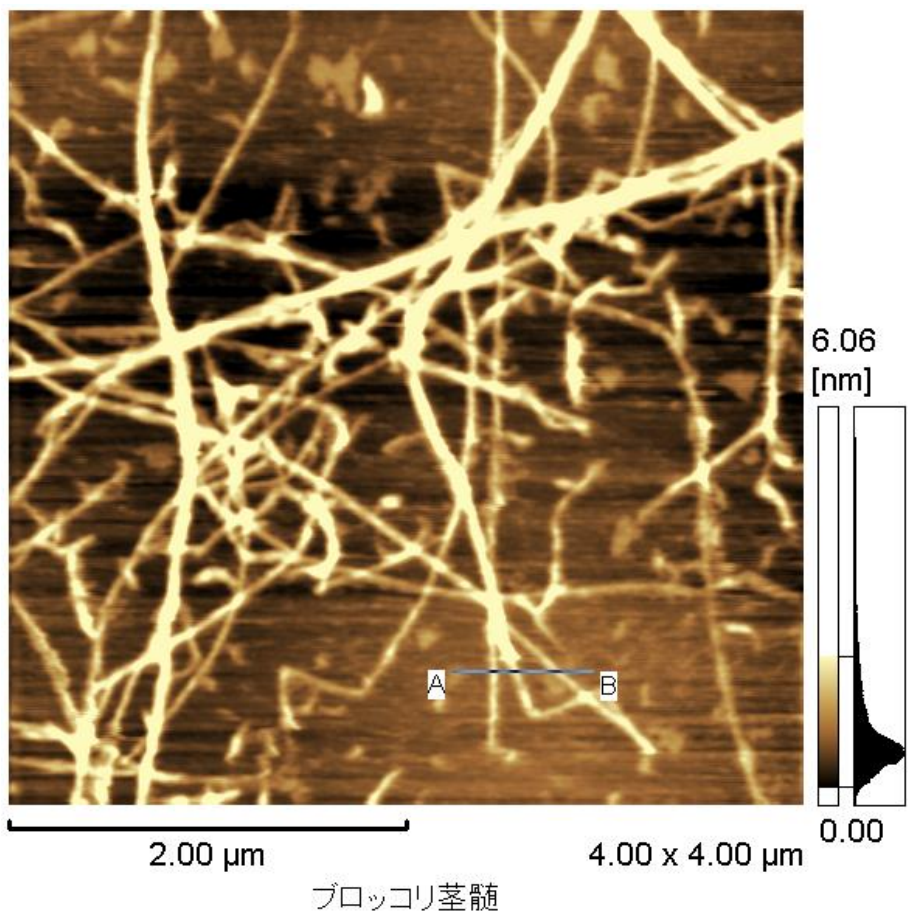


図 5.17 ミドリハナヤサイ茎髓組織由来 WARP による AFM 観察画像 (図 3.49 の再掲)

以上のように、ミドリハナヤサイ茎髓組織由来 WARP からは、均一性の高いセルロースナノファイバーを高純度で得ることが出来ると認められる。ただし、本章で採用した実験

対象の中では、ミドリハナヤサイ茎髓組織から得られる糸状のフィブリルは、比較的幅が太く、3.0 nm 未満の細いフィブリルを得るには不適當であることが判明した。

V-4. カカオポッド

i) 実験の目的

西アフリカや南米の熱帯地方で、その商品価値の高さから栽培が普及し、重要な経済的地位を占める果樹が、カカオノキ (図 5.18a) である。言うまでもなく、そのラグビーボールを髯鬚とさせる外見や質感の果実から、ココアやチョコレートが得られる。

カカオノキは、中南米では 2000 年以上の栽培の歴史があるとされるが、その詳細は不明である。その果実がカカオであり、その滋味のため、貴重なものとして、古代マヤ以降の記録に残され、貨幣として用いられていたことも明らかになっている。

ココアは、中世メキシコで栄えたアステカ帝国 (1521 年滅亡) において神聖な飲み物とされ、同帝国を征服したイスパニア人がはじめて西欧に持ち帰ったことが契機となって広まった。このため、カカオノキは、現在中米原産の印象が持たれがちだが、実は赤道直下付近の南米アンデス山脈の東斜面のアマゾン川源流地帯の森林中に原産するアオギリ科の熱帯性常緑小高木である。

ココアやチョコレートの原料物質は「カカオ脂」と呼ばれ、カカオノキの種子を醗酵させたものである。カカオノキの種子は豆様で、「カカオ豆」とも呼ばれ、牛革を分厚くしたような果皮 (この部分が「ポッド」と呼ばれる。) の中の空間に、白色を呈する湿潤で薄い綿様の果肉に包まれながら、その多数が順序良く配列して充填されている。

カカオノキは、通例熟果が収穫されて、直ぐに種子部分だけが取り出されて風乾・醗酵処理に供されるが、残余の果皮はその場で廃棄される。この果皮が、WARP 原料として有効利用出来る可能性がある。

なお、カカオノキは、通常幹に直接花を着けて、結実する「幹生果」と呼ばれる生育上の特徴でも知られている (図 5.18 b)。

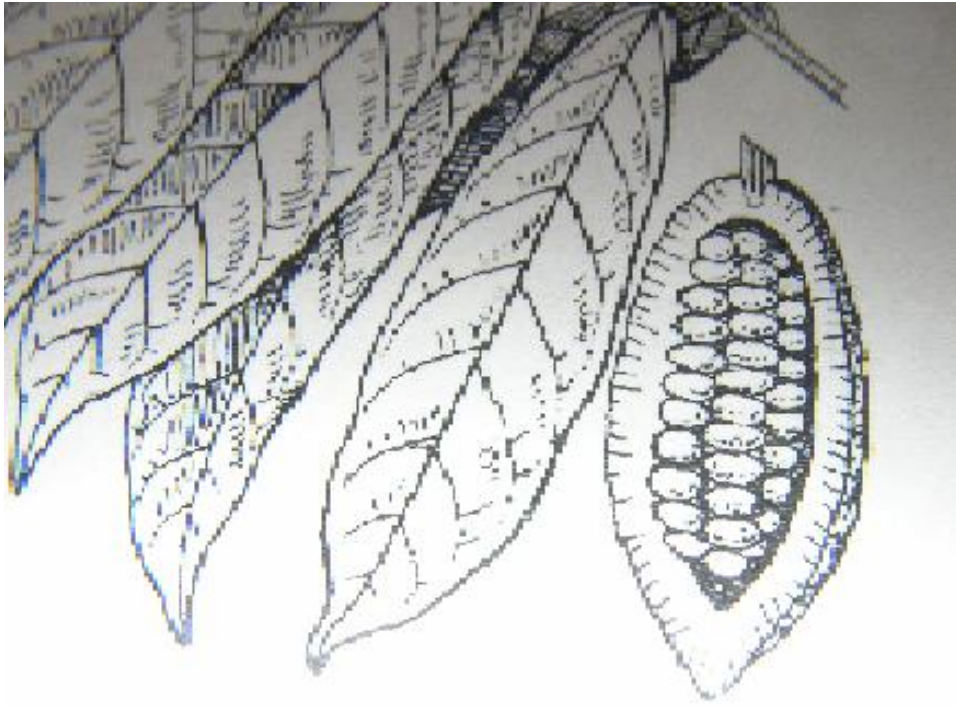


図 5.18a カカオノキの枝と果実 (『世界大百科事典4』初版第5刷、平凡社刊、1966年、136頁より転載)



図 5.18b カカオノキの幹と果実 (2010年3月初め、東京都立薬用植物園大温室にて撮影)

ii) 実験

平成 22 年 5 月半ば、東京都小平市内に所在する東京都立薬用植物園栽培展示ガラス温室中において、栽培・結実中のカカオノキの木 1 本から、カカオノキ成熟果実 1 個（最大長径 14.7cm、最大短径 6.7cm、生重量 171.206 g）の収穫と提供を受けた。この果実を金属製包丁を用いて分解し、内部に充満した果肉・種子部分は除去して、ポッド部分のみ（生重量 130.01 g）を取り出した。

上記のカカオポッド組織のうち、生重量 20.731 g を分取し、金属製包丁でビスケット片様の薄片とし、これをまず沸騰した水で 120 時間煮たところ、その組織はわずかに色落ちした程度で、ほとんど軟化しなかった。

次いで、前記のカカオポッド組織煮物は、4%水酸化ナトリウム水溶液に 96 時間浸漬させた。その処理物は、引き続き、蒸留水、アセトン、蒸留水の順番で十分に洗った後、前章の実験と同様の方法で脱リグニン処理をしたところ、純白色を呈する湿潤物質 34.392 g（湿重量）に変化した。ただし、濁りない純白色に変化させるまで、5 回以上の繰り返しの薬剤処理を必要とした。

こうして得られた湿潤物質の少量を分取して、相応量の蒸留水中に散布して超音波懸濁処理したところ、やや固さが認められる無色透明のゲル様を呈するのが視認出来たので、これを第 2 章の実験方法と同様にして、AFM 観察とフィブリル幅の計測を実施した。

iii) 結果と考察

ここで興味深いことは、カカオポッド生重量 20.731 g から、純白色を呈する湿潤物質が 34.4 g も得られたことである。これは、実は、その加工処理の過程において、次第に水を含み易くなったものと考えられる。

既に第 3 章中で観測・検討したように、カカオポッドから調製した WARP については、その 3 (w/w) %水懸濁液を超音波処理すると無色透明のゲル様を形成する。カカオポッドのような元来硬く思われる組織から、オランダイチゴ果肉組織にも匹敵する性状と機能を有する WARP が抽出されたことは、まことに意外と言うしかない。

上記 ii) の実験で調製した WARP による AFM 観察画像の一例を、図 5.19 (図 3.42 の再掲) に示す。その画像全体に、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ均質に多数走行・屈曲・交差する様子が見られるとともに、その合間に、短小で楔形または糸状断片様に見えるフィブリルが、様々な長さあるいは太さで多数混在しているのが見て取れる。

図 5.19 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、細長い糸状のフィブリルも断片状のフィブリルも区別なく、おおよそ 1.0 nm~2.0 nm の範囲内であった。

以上のように、カカオポッド由来 WARP からは、細長い糸状のフィブリルと断片状のフィブリルが混在するという形状と、その水懸濁液を超音波処理するとゲル様を呈するとい

う性状の 2 点で、まことに特徴的であるセルロースナノファイバーを高純度で得ることが出来ると認められる。

なお、現段階において、その細長い糸状のフィブリルと断片状のフィブリルが混在するという形状的特性とし、その水懸濁液を超音波処理するとゲル様を呈するという機能的特性との間に、何らかの因果関係があるのかないのか、まったく不明である。

いずれにしても、カカオポッド由来 WARP の資源開発にたちはだかる最大の障壁は、カカオポッドの組織体質自体が、見た目だけでなくラグビーボールのようにごついものであるため、その精製に多大な手間を要することである。

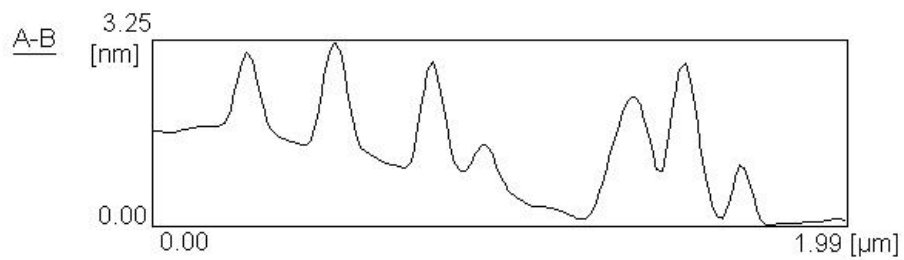
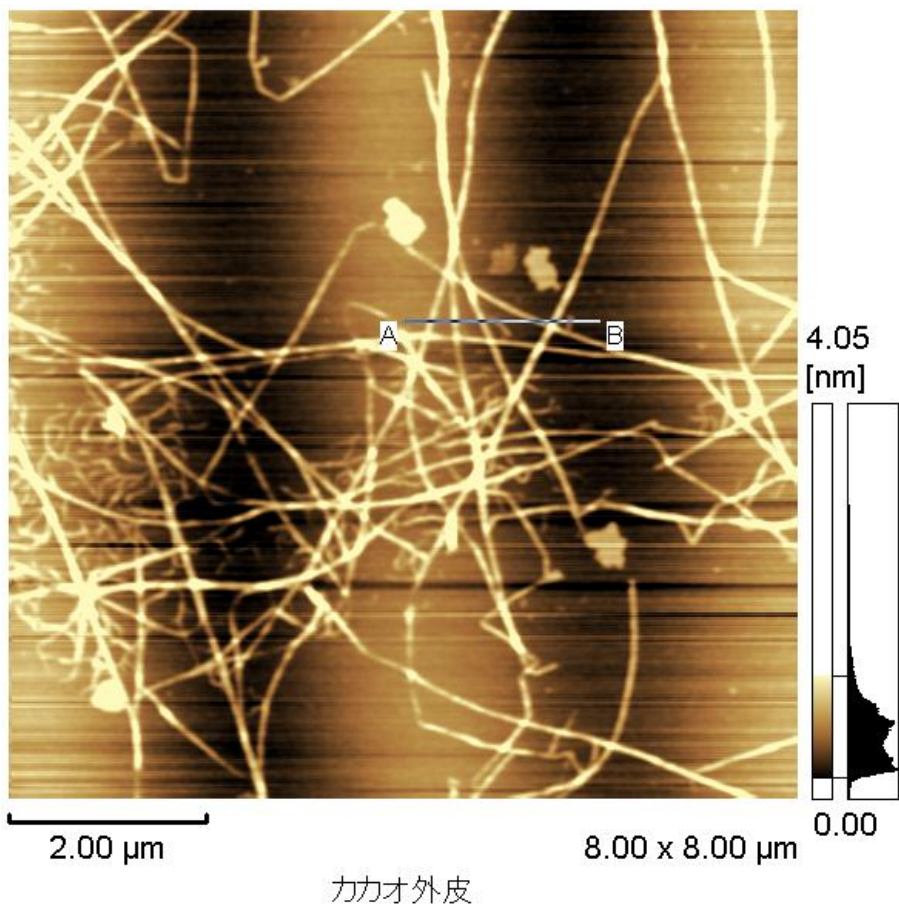


図 5.19 カカオポッド由来 WARP による AFM 観察画像 (図 3.42 の再掲)

V-5. ナツミカン中果皮

i) 実験の目的

第3章の実験で供試した結果、ナツミカン中果皮からは、幅 2.0 nm の程度の細長い糸状のフィブリルが多分に得られる可能性があることが分かった。しかも、このフィブリル性物質は、3 (w/w) %程度で水に懸濁させることにより、ゲル様を呈する。そこで、これを工業原料として利用するための検討を行うことにした。

本研究を通じて、実験対象として採用した全ての植物組織の中で、現在食用等の有用な用途がなく、それから調製した WARP 水懸濁液が超音波処理によってゲル様を呈することが認められた植物組織の中で、平均的に最も細いフィブリルが含有されると考えられるのが、このナツミカン中果皮になる。

第3章では、図 3.40 に示したように、ウンシュウミカン外果皮由来 WARP による AFM 観察と、その付属機能による高さ計測を行ったが、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 2.0 nm ~3.0 nm の範囲内にあった。それは、付加価値の高い工業利用を考える上では、少々期待外れの「太さ」だった上、ウンシュウミカン外果皮由来 WARP より調製した WARP 水懸濁液は、超音波処理によってゲル様を呈することがなかった。

そもそも、柑橘類の果皮は、一般に、果実内側より、内果皮、中果皮および外果皮の 3 層で構成されている。日本在来の代表的な生食用柑橘類であるウンシュウミカンは、果皮が薄いため、薄く発達した外果皮が指で容易に剥がすことが出来るため、その食べ易さから、人々に好まれた。しかしながら、それゆえに、ウンシュウミカンの中果皮は、組織的に発達が悪く、その中果皮の存在は影が薄い。

これに対して、東アジアや東南アジアでは、古くからブンタン *Citrus maxima* Merr. のように中果皮が非常に発達した柑橘類が数多くあった。このため、その発達した中果皮を巧く加工して賞味する工夫も各地でなされたが、次第に果肉だけを賞味する文化が浸透し、かような工夫はもはや絶滅寸前である。

近代以降、ブンタンは、遺伝子資源として生食用柑橘類の育種改良に非常に貢献し、幕末の西日本で発生したハッサク *Citrus hassaku* Tanaka や米国で経済的に一大発展したグレープフルーツ等が誕生した。それらは、いわゆる雑柑類と呼ばれる部類で、みな例外なく、ブンタンの中果皮が発達するという特性を引き継いでいる。

ナツミカンは、園芸学上ではダイダイ節に分類されるが、その果実の形態特性から見て雑柑類類縁であり、中果皮がよく発達する。そこで、本章の実験対象として採用した。

ii) 実験

平成 23 年 2 月初旬、東京都小平市内の住宅地の庭で栽培・結実中のナツミカンの木 1 本から、ナツミカン成熟果実 1 個（最大長径 8.0cm、最大短径 7.7cm、生重量 234.4 g）の収穫と提供を受けた（図 5.20）。この果実を包丁で分解し、内部の果肉と種子部分を除去し、

内果皮と外果皮も削り取って、中果皮部分のみ（生重量 20.677 g）を採取した（図 5.21）。



図 5.20 本章の実験に供したナツミカン果実



図 5.21 ナツミカン中果皮

中果皮組織の 35.6 g を 48 時間煮沸すると、組織はわずかに色落ちしたがほとんど軟化しなかった（図 5.22）。次いで、4%水酸化ナトリウム水溶液に 48 時間浸漬し、蒸留水、アセ



図 5.22 ナツミカン中果皮煮物

トン、蒸留水の順番で十分に洗った後、前章の実験と同様の方法で脱リグニン処理をしたところ、純白色を呈する湿潤物質 15.1 g (湿重量) に変化した (図 5.23)。

こうして得られた湿潤物質の少量を分取して、蒸留水中に散布して超音波処理したところ、ゆるい無色透明のゲル様を呈したので、これを第 2 章の実験方法と同様にして、AFM 観察とフィブリル幅の計測を実施した。



図 5.23 ナツミカン中果皮組織由来 WARP 湿潤物

iii) 結果と考察

ナツミカン中果皮は、それ自体が軟質で加工し易いため、WARP の分離が非常に平易に行うことが出来る。また、WARP 調製において、不要となる非セルロース成分が少ないか容易に除去出来る可能性が高い。

上記 ii) の実験で調製した WARP による AFM 観察画像の一例を、図 5.24 (図 3.39 の再掲) に示す。既に第 3 章中で検討したように、この画像中の様相は、全般的にオランダイチゴ果肉組織由来 WARP 等による場合 (図 3.2 等) と酷似し、分岐のほとんどない細長い糸状のフィブリルが、ほぼ均質に多数走行・屈曲・交差する様子のみが見られる。ただし、画像中のフィブリルの中には、明らかに複数のフィブリルが重畳あるいは凝集しているように見られる部分の存在も認められる。

図 5.24 において、AFM 装置の付属機能による高さ計測によれば、そこで検出されたフィブリル像の幅は、おおむね 1.5 nm~2.5 nm の範囲内にあり、その幅は比較的均一で大部分は 2.0 nm 前後であると計測された。

このように、ナツミカン中果皮から分離出来るフィブリルは、その幅が約 2.0nm で比較的細く、それより調製する WARP 水懸濁液は超音波処理でゲル様を呈することから、高分散性で付加価値の高い WARP 原料として、相当有望であると認められる。したがって、ナツミカン以外の柑橘の中果皮によっても、同様の成果が得られる可能性が高い。

前記したように、ウンシュウミカン外果皮組織由来 WARP については、含有高分子の分散性が低かった。ウンシュウミカンも典型的な柑橘類であることに変わらないから、ナツミカン外果皮組織由来 WARP は、含有高分子の分散性が低い可能性が高い。ゆえに、一般

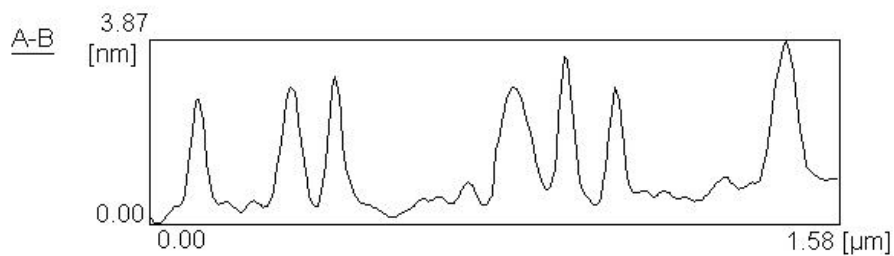
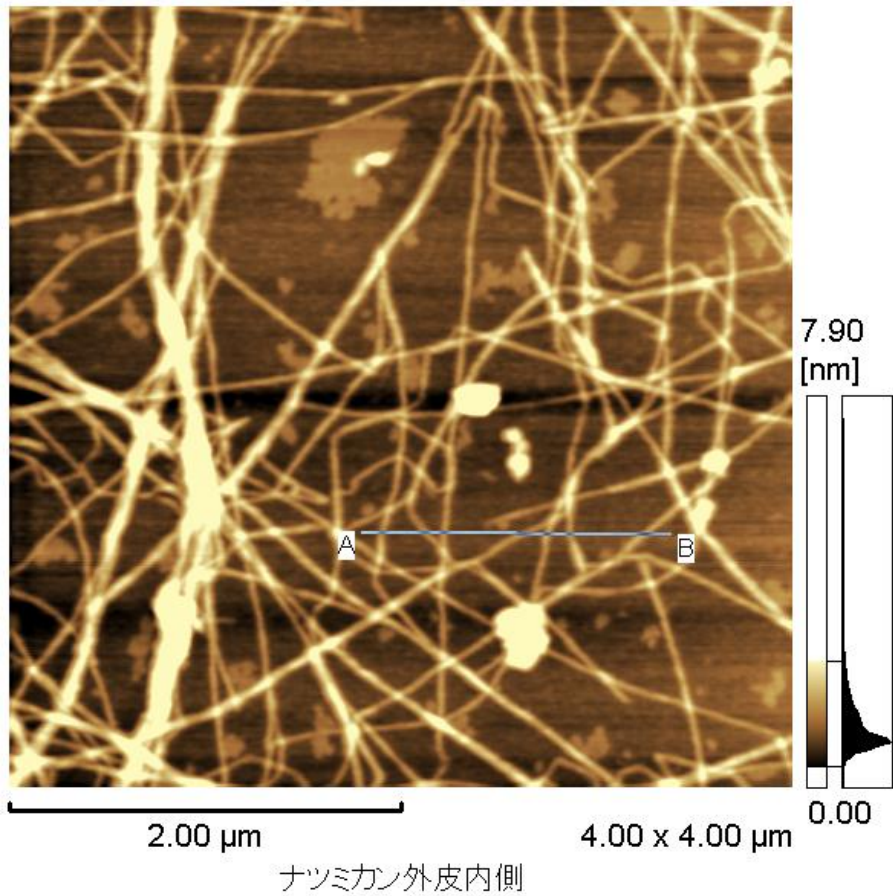


図 5.24 ナツミカン中果皮組織由来 WARP による AFM 観察画像 (図 3.39 の再掲)

則として、柑橘果皮から高分散性の WARP を得るには、外果皮を除去することが必要だと思われる。

結局のところ、本研究を通じて取り扱った植物組織の中で、WARP 資源としては、その物理的性状、化学的性状および経済性を併せ鑑みると、

- ①他にほとんど有用な用途がない、
 - ②成分のフィブリルの幅が比較的細かい（約 2.0 nm）、
 - ③成分高分子が高分散性である、
 - ④材料の加工から、WARP の分離が容易である、
 - ⑤選果場、加工工場等の事業所において、容易かつ廉価に大量に集められる可能性がある、
 - ⑥香り高く、イメージが良い、
- 等の理由から、ナツミカン中果皮が最も優れていると判断される。

V-6. 本章のまとめ

現在人類に有効に利用されていない未利用植物組織の中から、その資源が容易、低廉かつ豊富に入手出来る可能性があり、フィブリルの幅が特に細いかその水懸濁液を超音波処理するとゲル様化を呈するほど高分散性の多糖フィブリル原料として、スギ針葉、ミドリハナヤサイ茎髓、カカオポッドおよびナツミカン中果皮の各展望を実験・検討した。その結果、スギ針葉とカカオポッドについては、幅 **2 nm** 以下の細いフィブリルが得られるが、原料組織が硬いため、加工・精製の手間の面で不利であることが判明した。また、ミドリハナヤサイ茎髓は、原材料としては軟らかく加工し易いが、得られるフィブリルの幅が **3 nm** 以上と比較的に太い結果となった。したがって、元の材質が軟らかく、高分散性で **3 nm** 以下の幅の細いフィブリルを得られる有望な植物材料として、ナツミカン中果皮およびこれに類似する各種柑橘類中果皮を特定した。

なお、本章で研究対象として採り上げたスギ針葉組織由来 **WARP**、ミドリハナヤサイ茎髓組織由来 **WARP**、カカオポッド由来 **WARP** およびナツミカン中果皮組織由来 **WARP** の4例について、各 **WARP** 湿潤物を我々は試食した。その結果、いずれもほぼ無味無臭であったが、スギ針葉組織由来 **WARP** については、明らかに舌触りに難があり、現実に食品として経済的開発を果たすためには、そのテクスチャの改善が必須と考えられる。

第VI章 総括と結論

過去長く地球上で多様な進化を遂げて来た高等植物は、細胞壁の主成分であるセルロースフィブリルの形状も多種多様に発展させて来たと考えられる。シャジク藻綱以上の進化段階にある高等植物において、天然セルロースの存在基本単位は 3.5 nm 幅のマイクロフィブリルすなわち「エレメンタリーフィブリル」であるというのが従来の通説であった。しかしながら、本研究の結果、高等植物の非木化組織については、幅 0.6 nm~2.5 nm 程度の細さのセルロースフィブリルが、細長い糸状あるいは短小な楔形等の複数以上の姿形で、植物種と組織種の広範囲にわたって存在する可能性が高いことが分かった。

現在の学説上、3.5 nm 幅のフィブリルは、ロゼットと呼ばれる酵素複合体に対応する分子鎖 30~40 本からなると考えられている（図 6.1 参照。）が、上記のような本研究の結果は、分子鎖 10 本かそれ以下の数からなるセルロースフィブリルが、高等植物界において、植物種ならびに組織種を問わず広く存在することを実証した。また、植物種・組織種によるフィブリルの形や太さの多様性は、セルロースの合成と高次構造形成の機構が、従来考えられていたよりも多様であることを強く示唆する。ロゼットの実体が 6 量体のタンパク質であるとしても、常にそれらのすべてのサブユニット・すべての酵素が、活発に活動するとは限らないのかもしれない。

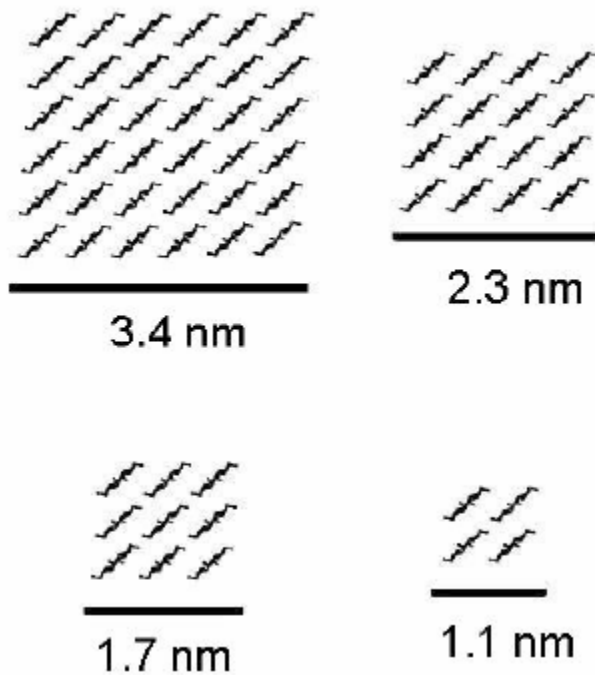


図 6.1 セルロースフィブリルの横断面構造と幅の関係

また、木材セルロースについては、その分析に当たり、試料の乾燥履歴が実験結果に影響することが分かった。従来の研究では、生の樹木からセルロースを単離する過程のどこかで乾燥を経ている場合がほとんどである。しかし、本研究においては、真の「未乾燥」(never-dried) 組織からのセルロースは、乾燥を経たものからのものとは異なる（より細い）可能性が高いことが分かった。

巖ら（1988）は、広葉樹と針葉樹の新生二次木部組織中のリグニンの組織化学的研究を行い、5月中の新葉展開の後にはほぼ一次壁のみからなる1~7細胞の層が形成され、次いで、6月以降に二次壁が形成され、その後リグニンが堆積することを明らかにしている。そこで、本研究では、あくまでも生きた樹木を研究対象とし、リグニン沈着以前の木材セルロースの実存形態を手始めとして、成熟木部組織に含まれるセルロースフィブリルの実態の解析にも取り組んだ。その結果、たとえ成熟木部組織においても、乾燥履歴を経していない場合、2.0 nm~3.0 nm 程度の比較的幅の細いフィブリルを含有する可能性が高いことを見出した。この可能性は、本研究の第4章で主たる研究対象としたウダイカンバのような特定の樹種のみに限られるものではない。

今後、多種多様な植物組織中におけるセルロースフィブリルの自然な存在形態を、より解明するために、当該組織の化学・生化学分析や超薄切法・凍結切断等による詳細な検討が必要であることは明白である。たとえば、第3章および第4章の実験中、AFM観察によって少なからず検出した短小な楔形の物体などは、現段階では化学的に正体不明と言わざるを得ない段階に留まった。それらが、真にセルロースフィブリルであるか否か、メチル化分析や、これより、より優れた技法により立証を加えて行くことが急務である。これらから、多種多様なセルロースの合成と細胞壁の形成機構について、より有効な知見が得られると期待される。

他方、果肉や花弁等の柔組織からは、木材組織由来とは明らかに異なる、約3(w/w)%水懸濁液がゲル様を呈するような、比較的分散性が高いことを特徴とするセルロースフィブリルを分離出来る可能性がある。このようなセルロースフィブリルは、相当の保湿効果や増粘機能が期待出来るため、高品質の化粧品や食品増粘剤への応用が考えられ、ある程度の経済価値が認められる。

しかしながら、その材料が、さらに付加価値の高い食用果実や野菜となる場合、そこからセルロースフィブリルを分離して、あらためて何らかの用途に用いる方法は、コスト的に太刀打ち出来ない。そこで、従来有効利用されていない農林業廃棄物の中から、高分散性のセルロースフィブリルを分離出来る可能性があつて、当該資源の収集と加工が容易であり、ある程度以上の調製収率が見込める植物材料を探索した。その結果、そうした植物資源として、柑橘類の中果皮が、相当適する可能性が高いことが判明した。

もっとも、それを現実にどのように加工して、どのような製品を作っていくのか、その具体的な応用可能性の開発はまた、今後の課題である。

【完】

参考文献

- Azuma J (2003) Cellulosic hydrocolloid system present in seed of plants. *Trends. Glycosci. Glycotechnol.* 15: 1-14
- Baker AA, Helbert W, Sugiyama J, Miles MJ (1997) High resolution atomic force microscopy of native Valonia cellulose I microcrystals. *J. Struct. Biol.* 119: 129-138
- Chanzy H, Imada K, Mollard A, Vuong R, Barnoud F (1979) Crystallographic aspects of sub-elementary cellulose fibrils occurring in the wall of rose cells cultured in vitro. *Protoplasma* 100: 303-316
- Davies LM, Harris PJ (2003) Atomic force microscopy of microfibrils in primary cell walls. *Planta* 217: 283-289
- Ding SY, Himmel ME (2006) The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *J. Agric. Food Chem.* 54: 597-606
- Franke WW, Ermen B (1969) Negative staining of plant slime cellulose: an examination of the elementary fibril concept. *Naturforschung* 24b: 918-922
- Frey-Wyssling A (1963a) Ultrastructure and biogenesis of native cellulose. *Fortschritte der chemie organischer naturstoffe* 27: 1-30
- Frey-Wyssling A, Muhlethaler K (1963b) Die Elementarfibrillen der Cellulose. *Makromol. Chem.* 62: 25-30
- Garvey CJ, Parker IH, Simon GP (2005) On the Interpretation of X-Ray Diffraction Powder Patterns in Terms of the Nanostructure of Cellulose I Fibres. *Macromol. Chem. Phys.* 206: 1568-1575
- Ha MA, Apperley DC, Evans BW, Huxham IM, Jardine WG, Vietor RJ, Reis D, Vian B, Jarvis MC (1998) Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. *The Plant Journal* 16: 183-190
- Itoh T, Kimura S, Brown RM Jr (2004) Theoretical considerations of immunogold labeling of cellulose synthesizing terminal complexes. *Cellulose* 11: 385-394
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder CR, Brown RM Jr (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant, *Vigna angularis*. *Plant Cell* 11: 2075-2085
- Rondeau-Mouro C, Bouchet B, Pontoire B, Roberta P, Mazoyer J, Buleon A (2003) Structural features and potential texturising properties of lemon and maize cellulose microfibrils. *Carbohydrate Polymers* 53: 241-252
- Saxena IM, Brown RM, Jr. (2005) Cellulose Biosynthesis: Current Views and Evolving Concepts. *Annals of Botany* 96: 9-21
- Schneider B, Hearth W (1986) Distribution of plasma membrane rosettes and kinetics of cellulose formation in xylem development of higher plants. *Protoplasma* 131: 142-152
- Sugiyama J et al. (1982) Lattice images from ultrathin sections of cellulose microfibrils in the cell-wall of *Valonia-macrophysa kutz.* *Planta* 166: 161-168
- Smith BG, Harris PJ, Melton LD, Newman RH (1998) Crystalline cellulose in hydrated primary cell walls of three monocotyledons and one dicotyledon. *Plant Cell Physiol.* 39(7): 711-720
- Thimm JC, Burrit DJ, Ducker WA, Melton LD (2000) Celery parenchyma cell walls examined by atomic force microscopy. *Planta* 212: 25-32
- 奥田一雄(1999) 藻類のセルロース合成、電子顕微鏡 34 : p.81-86.
- 巖 泰振 (1988) リグニン化学構造の不均質性に関する研究、東京大学大学院農学系研究科林産学専攻博士論文、p.29-32, 44-48, 92-94
- 木村 聡、中島啓介 セルロース生合成研究の最近の進歩 *Cellulose Commun.* Vol. 15 (3) 109-113 (2008)
- 小山 進 (1966) 下中邦彦編「世界大百科事典4」平凡社 (1966) p.136

- 島地 謙、須藤彰司、原田 浩 共著 (1976)「木材の組織」森北出版
- 船田 良(2003) 福島和彦ほか編「木質の形成」海青社(2003) p33
- 船田 良(2008) 樹木形成層活動の制御機構、木材学会誌、Vol. 54, No. 1, p. 1-10

謝辞：

本研究は、生物素材科学研究室の空閑重則教授（当時）と木材化学研究室の松本雄二教授の指導の下、両研究室の厚いご支援ご協力を得て、平成18年早春より、まる5年以上の歳月を掛けて行いました。

第3章および第5章の実験においては、東京都立薬用植物園より、貴重なカカオの熟果1個のご提供を戴き、興味深い実験データを得ることが出来ました。第4章の実験においては、本専攻附属の秩父演習林ならびに田無試験地において、長年保護あるいは養成されて来た重宝な樹木研究資源の中から、多数回のサンプリングを実施し、本研究の相当程度の水準到達に必要な実験データの確保が実現出来ました。

ここに、本研究を遂行するに際し、ご指導・ご協力・ご後援を下された関係各位の方々に対し、あらためて深く感謝申し上げます。

報文目録

1. “AFM observation of ultrathin microfibrils in fruit tissues”

Hiroshi Niimura, Tomoya Yokoyama, Satoshi Kimura, Yuji Matsumoto, Shigenori Kuga Cellulose (2010) 17:13–18

2. <依頼寄稿> 「果実のセルロース」 空閑 重則、松本雄二、新村 博

Cellulose Communcations 17, 116-120 (2010)