

光学顕微鏡による微細な体表構造の撮影方法

林 成多

〒 691-0076 島根県出雲市園町 1664-2

ホシザキグリーン財団

Imaging method for minute structures of beetle larva using a light microscope

Masakazu HAYASHI

はじめに

筆者は、日本産ヒメドロムシ科の幼虫を解明するため、飼育やDNAバーコーディングを用いて成虫との対応関係を調べている（例えば、Hayashi and Sota, 2010）。本土産の種については、属や種レベルでの同定が可能となりつつあるが、形態の詳しい記載や近縁種間の比較など、検討すべき課題はたくさん残っている。ヒメドロムシ科の幼虫の体表には、多種多様な剛毛や鱗があり、その形状を記載していく必要がある。従来、この微細な構造の撮影には走査型電子顕微鏡（SEM）が用いられている。しかし、筆者のように気軽にSEMが利用できない方も多と思われる。そこで、光学顕微鏡を用いた撮影方法（Hayashi, 2009）について紹介する。本手法が利用できる条件は限られているが、ヒメドロムシ科の幼虫以外にも応用できるはずである。

方法の原理

光学顕微鏡での観察や撮影でもっとも問題になるのは焦点深度の狭さである。そのため、通常観察では被写体を薄片にしたり、カバーガラス下で被写体を平面的に押し広げたりするなどの処置が必要になる。そこで、筆者は被写体を立体的な状態のまま画像を得るため、焦点合成法を用いることにした。被写界深度の浅いデジタル画像について、ピントを変えながら撮影し、数枚から数十枚の画像をパソコンのソフトを用いて合成して、すべての画像のピントが合っているように見える合成方法である（例えば、Wikipediaの“Focus stacking”参照）。

撮影できる被写体は、通常、光を透過する物体に限られる。これは光学顕微鏡が透過光条件下で観察・撮影することを条件にしているからである（ただし、落射できる光源があれば、不透明でも撮影は可能である）。

この方法の大きな利点は、標本を液浸状態で撮影するため、乾燥による変形・縮小が起こらない

ことがあげられる。一方、合成された画像はSEMとは異なり、透過条件で撮影された被写体の合成画像になる。従って、合成する写真の選び方によっては、外骨格の中や裏側の画像も合成されることになる。この点は注意が必要である。

撮影と画像処理の実際

1. 被写体の準備

(1) ゴミ取り

微細な構造を撮影することが目的であるため、ゴミ（塵などの付着物）は可能な限り除去したい。筆者は、70%エタノール漬けの標本については、液浸瓶のまま超音波洗浄機に入れ、5-10分間の処理を行っている。液浸瓶の中に微細な浮遊物が漂っていれば、ゴミが取れている証拠である。ヒメドロムシ科の幼虫の場合、あまり長い時間超音波洗浄を行うと、口器（大顎や下唇板）が吹き飛んでしまうので、注意が必要である。なお、99%エタノール漬け標本は70%漬けよりも脆くなっているため、お湯などで軟化してから処理した方がよい。

越冬後の幼虫は、かなり汚れているため、処理が難しい。できれば、採集した時点であまり汚れていない幼虫を観察用に用いるのが賢明である。なお、ヒラタドロムシ幼虫（珪藻などがこびりついていることが多い）の汚れを取るのに乳酸が良いとのことである（緒方氏、私信）。筆者はまだ実際にやってみたことがないが、試してみる価値はあると思われる。

(2) 脱色・半透明化

次に必要なのが脱色と半透明化の処理である（図1）。ヒメドロムシ科の幼虫の場合、体色が薄い茶色の種は処理がしやすいが、黒い種については時間がかかる。筆者は3%程度の水酸化ナトリウム水溶液や低濃度の過酸化水素水（オキシドール）を適宜、加熱（40-50℃）し、様子をみながら判断している。

外骨格が透けてきたら、そのまま撮影できるの



図1. 脱色し、内蔵や筋肉を取り除いた状態のアヤスジミゾドロムシの幼虫（焦点合成写真）。透過条件のため、縁は暗くなる。

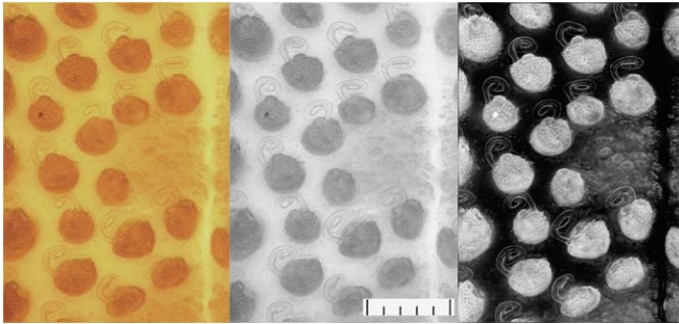


図2. ハバビドロムシの前胸背面の顆粒と剛毛。合成画像（左）、グレースケールに変換（中央）および、コントラストを調整した反転画像（右）。スケールは0.05mm（目盛りは0.01mm）。剛毛が螺旋状の突起になっている。

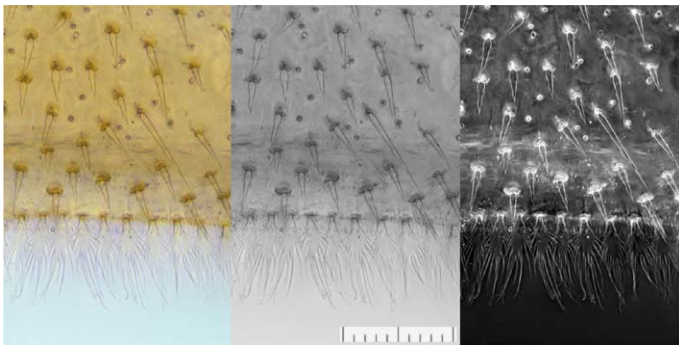


図3. アヤスジミゾドロムシ腹部腹板の剛毛。合成画像（左）、グレースケールに変換（中央）および、コントラストを調整した反転画像（右）。スケールは0.1mm（目盛りは0.01mm）。表面には刺がある剛毛、後縁には長い突起を持った鱗状の剛毛が並ぶ。

であるが、体内の筋肉や内蔵、消化管内の内容物が影のように写ることがある。筆者は腹節を外して、ピンセットでかき出したりしている。さらに筋肉などが残っているようであれば、水酸化カリウム水溶液で再度、処理している。

上記の過程で注意しなくてはいけないのは、毛や鱗が抜けたり、折れたりしては意味がないということである。また、軟化が進みすぎると、外骨格そのものが変形してしまう恐れがある。

2. 撮影

被写体をホール付きのスライドガラスに置き、カバーガラスをかけ、水酸化カリウム水溶液に浸したままの状態です。まず検鏡をする。ゴミや気泡の有無、透明化の程度を確認し、目的とする剛毛や鱗などの構造が見えれば、撮影を開始する。

深度焦点合成をするには、ピントを少しずつずらして撮影する。注意しなくてはいけないのは、上からでも下からでも構わないが、どちらか一方に動かしながら撮影しなくてはならない。撮影前に、ピントをどこからどこまで動かすか確認しておいた方がよい。また、撮影範囲は広めに設定し、後で必要な範囲の写真を作成する（多すぎる写真は合成の処理に時間がかかり、また、不要な画像も合成されることになる）。スケールは後で必ず必要になるので、適宜、わかるようにしておく。特に倍率を変えながらの撮影をする時は注意が必要である。

3. 焦点合成やその他の画像処理

撮影したデジタル画像をパソコンの画面で確認し、必要な部位や範囲が撮影されているかどうか

確認する。焦点合成のソフトはいろいろあり、フリーのソフトも存在する（フリーソフトである CombineZM の使い方は、丸山宗利博士のウェブサイト（に詳しい）、筆者は Adobe Photoshop の機能（画像のスタック）を使って合成している。

焦点合成された写真はそのままでも良いが、カラーであることと、コントラストが低いことにより、印刷物に使うには物足りない。そこで、筆者はグレースケール（白黒画像）に変換後、反転処理とコントラストの調整をしている（図 2, 3）。Photoshop にはアンシャープマスキングの機能があり、剛毛の輪郭を強調することができる。画像処理が、どこまで許されるのかは難しい問題ではあるが、印刷時に紙上で判読できる状態の画像を準備することは、必要であると筆者は考えている。

4. 撮影後の標本

撮影後の標本は水酸化カリウム水溶液に漬けたままにしておくことはできないので、プレパラートにするか、乾燥させるか、70%エタノールに保存する。乾燥標本の場合、後で低真空 SEM（金蒸着をする必要がない）を用いて観察することも可能だろう。

最後に

得られた合成画像は、SEM の画像に比べれば、分解能も低く、画像も不鮮明である。しかし、光学顕微鏡とデジタルカメラ、画像処理ソフトがあ

れば、それなりの画像を得ることができる。また、微小甲虫の雄交尾器内袋の撮影などにも応用できるので、ぜひ試していただきたい。

謝辞

乳酸によるヒラタドロムシ幼虫の汚れ除去方法について教えて下さった故・緒方健氏にお礼申し上げる。緒方氏には生前、ヒメドロムシ科について示唆に富んだご教示をいただいた。また、日本産ヒメドロムシ科の幼虫の解明は緒方氏が先行して進めておられるとお聞きしていたが、氏が亡くなられたことにより、公表される機会も失われてしまった。この小文を緒方氏に捧げ、ご冥福をお祈りしたい。

引用文献

- Hayashi, M., 2009. Description of larva of *Dryopomorphus yaku* Yoshitomi et Sato with distributional and ecological notes on the Japanese members of the genus *Dryopomorphus* Hinton (Coleoptera: Elmidae). *Entomological Review of Japan*, 64(1): 41–50.
- Hayashi, M. and T. Sota, 2010. Identification of elmidae larvae (Coleoptera: Elmidae) from Sanin District of Honshu, Japan, based on mitochondrial DNA sequences. *Entomological Science*, 13: 417–424.
- 丸山宗利研究室: CombineZM (ZP) の使い方 (2010.6.20 更新). <https://sites.google.com/site/myrmekophilos/czm> (2013.1.19 閲覧)

(2013 年 1 月 24 日受領, 2013 年 2 月 16 日受理)

【短報】 *Praolia* 属カミキリムシの野外での採集記録

Praolia 属のカミキリムシは、材を持ちかえて羽化させた標本が多いが、筆者はいくつかの成虫を野外で採集しているのを報告しておく。標本はいずれも筆者が保管している。

1. ヒゲナガヒメルリカミキリ *Praolia citrinipes citrinipes* Bates

1♀, 山梨県鳴沢村富士林道, 6. IX. 1975.

広葉樹の梢のスイーピングで採集している。9月の野外採集記録は珍しいものと考えますが、同じ日にキベリカタビロハナカミキリを採集しており、9月上旬までカミキリが残っていたのは、この年の特徴であったのかもしれない。

2. イシガキイトヒゲカミキリ *Praolia citrinipes ishigakiana* (N. Ohbayashi)

1♂, 沖縄県石垣島於茂登岳, 30. V. 2006.

於茂登岳の山頂に近いタブノキの梢付近のスイーピングで採集している。

3. キイロイトヒゲカミキリ *Praolia mizutani* Niisato

鹿児島県奄美大島住用村湯湾: 1♂, 4. VII. 1998; 1♀, 5. VII. 1998; 1♂, 6. VII. 1998.

湯湾の町はずれにあった土場のまわりのアワブキのスイーピングで採集している。

(大木 裕 225-0015 横浜市青葉区荏田北 2-17-13)