

# 走査電子顕微鏡による淡水プランクトンの研究(I)

富川哲夫

Observations of Fresh water plankters with Scanning Electron Microscope.

Tetsuo Tomikawa

## 1. はじめに

近年走査電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, 以下 SEM と略す) による研究が活発に行われるようになった。最近における水生生物の研究は、赤潮生物に関するものが多く、高山 (1980, 1981) は広島沿岸産と舞鶴湾産の赤潮生物、*Hornellia sp* と、*Gymnodinium* 属について形態学的研究を行い、Watanabe ほか (1980) は静岡県庄内湖における赤潮生物について、また Toriumi (1980) は日本沿岸における赤潮について報告している。

電子顕微鏡は SEM のほかに透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, 以下 TEM と略す) があるが、SEM の利点は試料を検鏡する前に TEM のように超薄切片をつくる必要のないことや、比較的大きな試料 (~1 cm) を取扱うことができるため、形態学的研究には最適であり、また SEM の試料の作製は TEM よりも比較的簡単なことなどがあげられる。このように試料の前処理の簡便さと、試料表面の像を広い範囲にわたってあたかも三次元の像であるかのような鮮明な立体像を映し出すことが可能である。そのため SEM の写真は極めて美しく、微細な部分まで観察することができる。筆者はかねてから SEM をいろいろな生物の観察に利用したいと考えていたが、今回兵庫県立水産試験場のご好意により、同水試の SEM について週1回程度、約5か月間にわたって研修をうけ、淡水動物プランクトンを観察する機会を得たので、今回は試料の作製を中心として簡単に報告する。この研究を行うにあたり、研修の機会を与えていただいた兵庫県立水産試験場長伊丹宏三氏ならびに兵庫県立北須磨高等学校長永野正勝氏および SEM とその他の器機の操作と試料作製についていろいろとご指導をいただいた主任研究員真鍋武彦氏に対し厚く御礼申し上げます。

## 2. 試料の作製

試料は兵庫県三木市近郊にある溜池より採集したヒゲナガケンミジンコ属の *Sinodiantomus valkanovi* と、同県加古川市近郊にある溜池より採集したプランクトンを観察に供した。

SEM で観察するには、試料を所定の方法によって処

理したものでないと観察することができない。最初に試料の脱水が必要であるが、筆者はホルマリン漬けの試料を6~12時間にわたって水洗した後、2%オスmium酸 ( $OsO_4$ ) で3~4時間固定後脱水した。脱水はアセトンシリーズ (25%, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%) で行い、最後は100%アセトンで保存した。脱水のとき、微細な試料では市販の特別製金網籠 (厚さ1cm, 直径1~3cmの円形のもの) を用いてもよいが、筆者はろ紙で小さな袋をつくり (木綿の白糸で縫ったのがよい)、それに試料を入れて脱水保存した。脱水が終了後は試料を臨界点乾燥 (Critical point drying) をしなければならない。

臨界点乾燥の目的は、大きな表面張力による試料の崩壊を防ぎ、試料の表面に歪を生ずることのないように乾燥することである。これには処理液として液化二酸化炭素かドライアイスを使って乾燥する。臨界点乾燥を行う前に、試料の散乱を防ぐため、試料を前述の金網籠に入れるか、またはろ紙で作った袋に入れて中間液である100%酢酸イソアミル置換 (約10分) を行った後、日立製作所製臨界点乾燥器にかけた。この臨界点乾燥を終えるまでには可成時間がかかるので事前にこれを済ませ試料をデシケーターに保存しておいてもよい。

つぎに試料を蒸着 (Coating) しなければならないが、これは試料面に電荷がたまることを防ぎ、試料の導電性を高めるためである。若し電荷が試料面にたまると像が歪む恐れがある。そのために試料面に金属を蒸着すれば、低エネルギーの二次電子の放出量が増加して像のコントラストが増し、また電子ビームによる試料の損傷を軽減できる。理想的には蒸着膜の表面が均等な厚さで導電性物質が試料面を覆わねばならない。最も普通に用いられる蒸着物質は金、パナジウム、カーボン、銀、アルミニウム、クロム、白金などであるが、筆者は金のイオンスパッタ蒸着を施して観察に供した。なお蒸着には日立製作所製真空蒸着装置を用いた。

体内組織の観察には試料の切片をつくって観察しなくてはならない。筆者は *Sinodiantomus valkanovi* (体長1.5~2.0mm) を安全カミソリで横断または縦断して観察してみたが、試料面に凹凸ができて正確な像が得られなかった。そこで100%アセトンで保存していた試料

をパラフィンで包埋し、ミノット式マイクロームでいろいろな厚さで切った結果25  $\mu\text{m}$  程度の厚さが比較的良効な結果が得られた。

この切片をカバーガラスの上に卵白（卵白をろ過し、卵白とグリセリンを1:1としたものに樟脳を少量加えたもの）を塗り、その上に張りつけて乾燥した。その後パラフィンをキシレンで溶かして乾燥した後に中間液の100%酢酸イソアミルで置換（約10分）してから引き揚げて乾燥し、そのカバーガラスを両面テープでスタブに張りつけた後で臨界点乾燥をする。その後の処理は前述の通りである。

#### SEMの構造

現在最も新しいSEMの装置は可成ダイレクトされているものの初心者には複雑である。

SEMは鏡体とディスプレイの二つの部分からできている。鏡体には電子銃のほかに試料ステージ、二次電子検出器や透過電子検出器などがあって試料の上を電子が走査(Scanning)し、それがディスプレイのモニターに影像として現われるしくみになっている。倍率は最高20万倍までが可能である。観察には日立製作所製S430型SEMを使用した。またSEMの映像は写真に撮ることが可能であるが、最も簡単なのはポラロイドフィルムを使用すればよいが、普通の白黒フィルムを使用することもできる。

### 3. 観察結果

#### *Sinodiptomus valkanovi* KIEFER

本種のSEM写真を写真1~6に示した。観察に供したこの種は、主として瀬戸内海を中心とした近畿、四国、中国、九州北部の溜池に生息し、周年を通じて出現する橈脚類プランクトン、ヒゲナガケンミジンコ属の1種である。

本種の生態と外部形態の季節変化については富川によって全貌が明らかにされている。

SEMによる外部形態の微細構造については今回始めて報告したが、写真にも見られるごとく、頭部の構造、胸腹部の接続部分、遊泳肢、雌の生殖孔の構造と胸部背面突起などは従来の光学顕微鏡では到底観察できなかった立体像が撮影できた。

#### *Keratella valga* (EHRENBERG)

##### コシボソカメノコウワムシ

本種のSEM写真は写真7に示した。本種は輪虫類に属し、近畿地方の淡水動物プランクトンとしては主要な種である。この種の背面の亀甲表面には、多くの小突起が規則正しく配列されているのが観察され、その先端部には繊毛状の構造が認められる。本種の背甲前縁の後頭棘は6本で、後棘はほぼ等長の2本が後端両側より出ている。しかし普通は右後棘が幾分長い。また被甲前縁の

中は後端より幾分広い。本種は南方系で本邦では夏季に多く現われる普通種である。

#### *Keratella cochlearis* (GOSSE) カメノコウワムシ

本種のSEM写真は写真8に示した。本種は前種と同様に輪虫類に属し、後端中央部に1本の大きな後棘が特徴である。近畿地方の淡水動物プランクトンの中では最も普通の種で周年にわたって多量に出現する。本種の背甲前縁の後頭棘は6本で、中央の2本は長く腹甲へ少し曲がる。背甲中央部には亀甲の模様があり、後端中央部の後棘は時期によって多少変わる。

#### *Filinia longiseta* (EHRENBERG) ミツウデワムシ

本種のSEM写真は写真9に示した。本種も輪虫類に属し、2本の長い前棘をもち、体長の2~3倍ある。後棘は体の背側中間より生じ、前棘より短い2本の指状突起がでており、その先端に繊毛をもっている。近畿地方では夏季多量に出現する。

#### *Ceratium hirundinella* O. F. MÜLLER

##### イケツノオビムシ

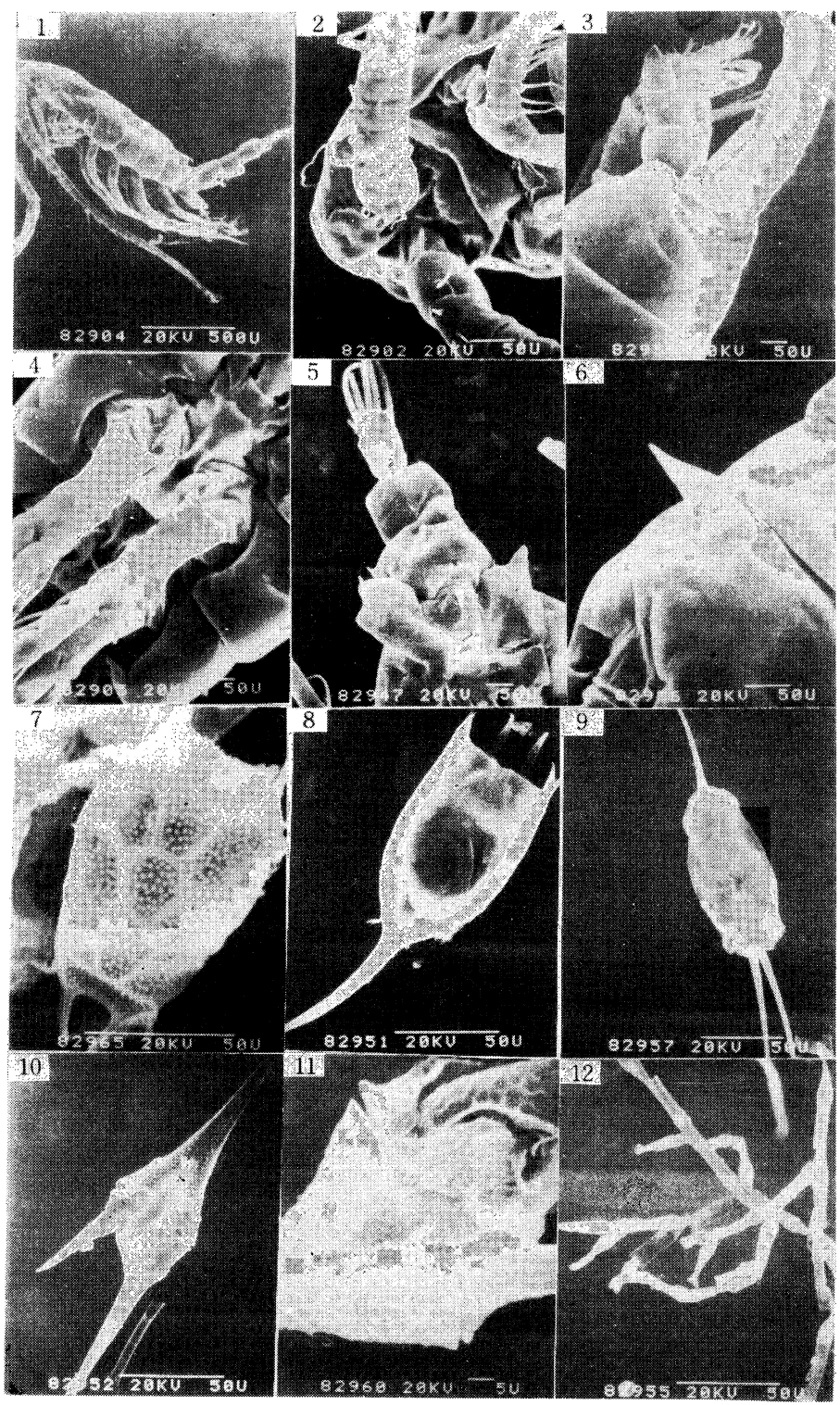
本種のSEM写真は写真10, 11に示した。本種は原生動物に属し、近畿地方の溜池には周年を通じて多量に現われる種である。細胞上部の突起は長く、下部の突起は3本で、そのうちの1本は上部突起の長さの $\frac{1}{2}$ 程度、次の1本は上部突起の $\frac{1}{3}$ 程度である。殻長は220~240  $\mu\text{m}$ 程度で体中央部の殻溝には鞭毛をもち、それを使って移動が行われる。分布は極めて広く、本邦はじめヨーロッパ、アメリカなどの淡水域に最も普通に見られる。

#### *Dinobryon divergens* IMHOF ヒダサヤツナギ

本種のSEM写真を写真12に示した。本種も原生動物に属し群体をつくる。群体は扇状に開き鞘殻は中央部に2~3の凸凹があり、下部は急に細くなる。殻長は35~42  $\mu\text{m}$ 程度で、晩秋から早春にかけて現われ、ときには冬季大発生をすることもある。分布は広く近畿地方の溜池はもとより、全国至るところの淡水域にみられる普通種である。

### 4. 考察

筆者は今回SEMによって淡水動物プランクトンを観察したが、淡水動物プランクトンは微細で、かつ組織が軟かく観察にはそれなりの工夫が必要である。試料作製の上ではヒゲナガケンミジンコ属の*Sinodiptomus valkanovi*は外皮が堅いキチン質で被われているため、脱水、固定、臨界点乾燥、蒸着における試料の損傷は少なく、比較的良効な状態で観察することができた。また原生動物のイケツノオビムシ、ヒダサヤツナギ、輪虫類のカメノコウワムシ、コシボソカメノコウワムシ、ミツウデワムシなども外皮が比較的堅いので外形の損傷は少なく、良効な状態で観察することができた。しかしフクロワムシ、ハネウデワムシ、ドロワムシ、カマガタツボ



写真説明

1.	<i>Sinodiptomus valkanovi</i>	KIEFER	全形, 雄
2.	"	"	頭部, 雌
3.	"	"	胸腹部連接部, 雄
4.	"	"	遊泳肢, 雄
5.	"	"	腹部生殖孔, 雌
6.	"	"	胸部背面突起, 雌
7.	<i>Keratella valga</i>	(EHRENBERG)	コシボソカメノコウワムシ背面
8.	<i>Keratella cochlearis</i>	(GOSSE)	カメノコウワムシ腹面
9.	<i>Filinia longiseta</i>	(EHRENBERG)	ミツウデワムシ腹面
10.	<i>Ceratium hirundinella</i>	O.F.MÜLLER	イケツノオビムシ全形
11.	"	"	" 体中央部
12.	<i>Dinobryon divergens</i>	IMHOF	ヒダサヤツナギ群体

ワムシのような軟い組織のものは外形が変形し、観察は困難であった。このような軟い組織の動物プランクトンの観察には固定法を工夫してみる必要があるように思われる。

今回の SEM による *Sinodiptomus valkanovi* の観察では光学顕微鏡では到底観察することのできない立体像の写真を撮ることができ新知見が得られた。またコシボソカメノコウワムシの亀甲の表面には多くの微細な小突起が規則正しく並んでおり、またこの突起の先端部には絨毛様構造が観察された。SEM による淡水動物プランクトンの研究は、現在のところあまり行われていないが、今後 SEM によって個々のプランクトンの微細構造の解明とあわせて、試料の作製を現在よりもさらに簡便で、しかも短時間でできる方法を研究開発すべきものと考えられる。

5. 要約

筆者は今回走査電子顕微鏡, SEM によって淡水動物プランクトンを観察したが、以下のことが要約される。

SEM による観察には試料を所定の方法によって脱水、固定(2%オスミウム酸)、中間液(100%酢酸イソアミル)、臨界点乾燥、蒸着(Corting)処理したものでないと観察できない。また体内の組織観察には切片をつくって観察する必要がある。観察した動物プランクトン *Sinodiptomus valkanovi* は外皮が堅いキチン質でできているため、外部形態の損傷は少なく、比較的良効な状態で観察することができた。また輪虫類のコシボソカメノコウワムシ、カメノコウワムシ、ミツウデワムシ、原生動物のイケツノオビムシ、ヒダサヤツナギなども比較的良効な結果が得られた。しかしフクロワムシ、ハネウデワムシ、ドロワムシ、カマガタワムシなどは組織が軟いため外形が変形し、正確な観察は困難であった。なお新知見としてコシボソカメノコウワムシの亀甲の表面に

は多くの小突起が規則正しく配列しているのが観察され、さらにその先端部には絨毛様構造が認められた。

引用文献

- (1) Hayat, M.A., (1979). 走査電子顕微鏡入門。鈴木昭男。永谷隆訳。東京丸善, 1-314.
- (2) 東昇, 遠山益, (1979)。電子顕微鏡学実習。東京共立出版, 1-286.
- (3) 高山晴義, (1980)。走査電子顕微鏡による *Chattonella sp.* (*Hornellia sp.*) の観察。日本プランクトン学会報, 29, 37-40.
- (4) 高山晴義, (1981)。走査電子顕微鏡による *Gymnodinium* 属 2 種の観察。日本プランクトン学会報, 29, 121-129.
- (5) 田中敬一, 永谷隆編集, (1982)。図説走査電子顕微鏡, 生物試料作製。東京朝倉書店, 1-282.
- (6) Toriumi, S., (1980)。Prorocentrum species (*Dinophyceae*) causing red tide in Japan coastal waters. 日本プランクトン学会報, 27, 105-112.
- (7) Watanabe, K., A.Hino & R.Hirano, (1980)。Same observation on 1978 red tide blooms in Shonai estuary, Shizuoka prefecture. 日本プランクトン学会報, 27, 87-98.