

メイオベントスの研究法

Methods in Meiobenthos Study

福島 朋彦¹

メイオベントスとは大きさを基準にしたベントスカテゴリーの一つである。このサイズはメイオフauナと呼ばれる動物群を包括するのに最も適するように、通常1mm以下、0.03~0.04mm以上のふり画分が設定されている。メイオベントス群集は下記の22動物門にわたるメイオフauナの他にマクロファウナの小さなものも含むために、動物門にして22+ α が存在する。

このように多くの対象生物をもつメイオベントスの研究にはそれぞれに適した多くの研究法があり、それらは何を対象とするか、何の目的に使うか等によって選択を受けなければならない。

そこで今回、各分野の研究者から聞いたそれぞれの研究法の一部を紹介する。

1.メイオフauナを含む22動物門 (資料4)

メイオフauナは以下の22動物門が確認されている。この中にはメイオフauナしか含まない動物門もあるが(ex. 胴甲動物門, 腹毛動物門, 動物動物門等), 多くの動物門はメイオフauナ以外のものも含んでいる。例えば, メイオフauナのHarpacticoidaは節足動物門に属するが, 節足動物門に属するタカアシガニはメイオフauナではない。

有孔虫門, 繊毛虫門, 扁形動物門, 顎口動物門, 紐形動物門, 線形動物門, 腹毛動物門, 輪形動物門, 胴甲動物門, 鰓曳動物門, 動物動物門, 環形動物門, 緩歩動物門, 節足動物門, 外肛動物門, 内肛動物門, 腕足動物門, 棘皮動物門, 脊索動物門, 星口動物門, 刺胞動物門, 軟体動物門

* 有孔虫類と繊毛虫類は原生動物門として一括している場合もある。

2.採集方法 (資料3)

採集の方法は研究のテーマによって異なってくるので、ここでは詳しく述べないで注意点だけ記す。

メイオベントスは一般に m^2 あたりに数百万個体が存在すると言われるので、個体数密度等を調べるには口径5cmぐらいのコアで採集すれば十分である。あまり欲張って採集したところで分析時に見苦しい程の分割を強いられるのが関の山である。また、多くの場合メイオベントスは表層数cmに集中的に分布するので(図1), 単位面積あたりの生物量を調べるには表層と直上水を取り逃すと著しく過小評価になってしまう。

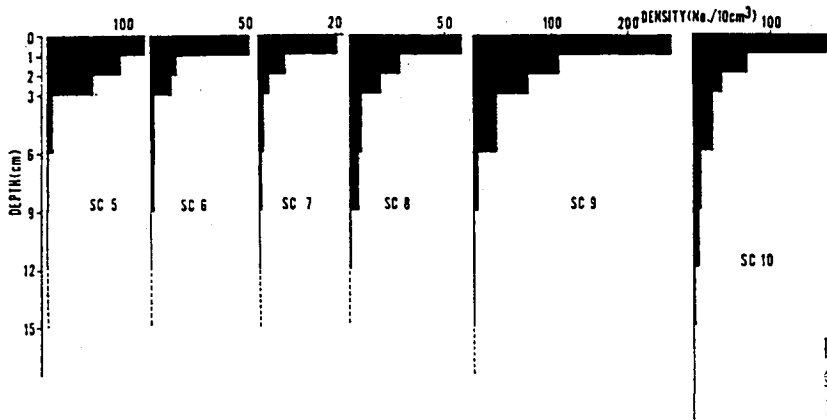


図1 メイオベントスの体積物内の鉛直分布 (Shirayama and Horikoshi, 1982より引用)

3. 固定法及び保存法 (資料1, 5, 7, 8, 9, 10)

標本をよい状態で観察するためには適切な固定液を選び、採集後できるだけ速く固定するのが原則である。また長期間にわたってよい状態を保つためには適切な保存液に移し変える等の処理も必要となってくる。これらのことはメイオベントスに限ったことではないが、メイオフアウナには体が軟らかく、変形しやすいものが多いため、特別に注意を払わなければならない。

a. ホルマリン

最も一般的で手軽な固定液かつ保存液で、生物数の計数や高次のタクサで分類するには便利であるが、深海有孔虫等の殻の薄い生物や、多毛類のような剛毛を分類の形質にする生物を詳細に分析するには適しているとは言えない。固定時の濃度は状況や対象生物によってある程度幅をもたせてもよいが、普通は10%ぐらいにしている。保存液として用いるときは固定液のままでも良いが、やや低濃度にして涼所に保管または冷蔵しておくとともに良い。また、ホルマリンは炭酸カルシウムを溶かすことがあるのでボラックス(125g/l)を用い中和しなければならない。ヘキサミンも中和剤として広く使用されているが、ある種の生物を傷めてしまうことがあるので避けた方がよい。

*1: 実際、ホルマリンの濃度は研究者によって見解を異にする。例えばDr. Thistleは25% (V/V)で固定している。彼は“濃度が高すぎる”という私の問いに対して、①すばやく固定できること。②棲管の中にある生物の固定にも有効等と答えた。

Dr. David Thistle: University of Florida State の教授 Harpacticoidaの研究者

b. アルコール

ホルマリンと並んで手軽な固定液かつ保存液だが、ホルマリンと比べて効果が弱いので70~80%の濃度を必要とする。また、蒸発しやすいので密閉容器に入れないと標本が乾燥してしまう。

アルコールによる保存はHarpacticoidaや多毛類にはホルマリンより適しているが、NematodaやSoft forminiferaを研究対象とする場合は脱水してしま

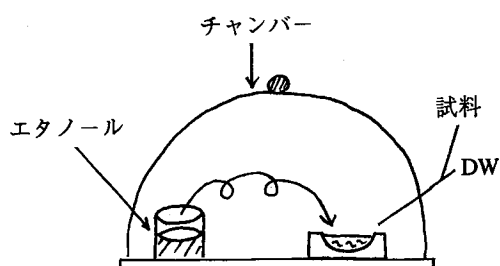


図2 アルコール置換法

うので使わない方がよい。もし用いるとしても下記のように時間をかけて置換する必要がある。

c. エチレングリコール (20%)

アルコール保存では縮んでしまうような生物の保存にはよい。また、蒸発してもグリセリンとして残るので乾燥の心配もなく、ローズベンガルの赤が退色し、きれいな標本が得られる。

d. 中性ホルマリン+グルタルアルデヒド2%

4℃保存。電子顕微鏡用の試料はこの方法がよい。

4. 染色

メイオベントスは小さいため、堆積物の中に埋もれてしまうと検鏡下でも無生物と区別しにくかったり、探したりするのに苦労する。

特に生物群組成等を調べる時、優占種ならば1個体ぐらい見落としても大した影響はないが、希少種の場合は見落としは致命的だ。そのためローズベンガルで染色すると生物と無生物を区別しやすく便利である。ローズベンガルは研究室に持ち帰ってから試料に滴下してもよいが、固定液に混ぜて現場で染色してもよい。後者の場合、固定液の入れ忘れが防げる。染まり具合は個人の好みだが、薄いで見落としが多くなり、濃いと同定が困難になる。また、ローズベンガルは蛋白質を染めるので、マクロベントスの体の一部がちぎれていても染まってしまう。ミズヒキゴカイの鰓やスピオのバルブ等を個体数として計数しないように注意を要す。

5. 麻酔 (資料1, 6)

メイオベントスの良い標本を得るには縮まったり、殻を閉ざしてしまったりさせないようにすることが肝心である。そこで固定に先だって、麻酔にかけて体を弛緩させるなどの工夫も必要になってくる。以下に麻酔法を示す。

a. 安息香エチル酸

安息香エチル酸は水に不溶性なので、エチルアルコールで3~4倍に薄めて使用すると良い。シャーレに2~3滴で効果を発揮する。

b. 塩化マグネシウム

7.5gの $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を100mlの純水に溶かす。これを堆積物ごとほぼ等量に混ぜると約10分後に効果が出る。

c. エタノール

試料にエタノールを5~10%の濃度になるように入れると3~4分後に効果が出る。

d. 淡水

生きた試料を短時間(10~15秒)、淡水に浸すと麻酔の効果がある。しかし、慎重に行わないと試料をかえって傷めてしまう危険性もある。

6. マウンティング (資料1, 2, 9)

メイオベントスの門別の計数ぐらいなら、実体顕微鏡を用いたり、光学顕微鏡による低倍率の観察で十分だが、科、属または種までの同定やタイプ分けなどには光学顕微鏡による高倍率の観察が必要となってくるのでプレパラートを作成しなければならない。メイオフアウナのマウンティングといっても基本的には一般的方法と大差はない。しかし、線虫、クマムシをはじめとする軟らかい体構造を持つ生物はいきなり封入剤(グリセリン)に入れると浸透圧の関係で脱水してしまい観察困難になることがあるので、徐々にグリセリンに馴染ませる工夫が必要である。以下にその手順を示す。

a. マウントしたいサンプルを分離する

実体顕微鏡下で観察しながら対象生物を拾い、溶液1 or 2 (図5, 参照) の入ったシャーレに移し、さらに同じ溶液の入ったシャーレに移し直す。この作業は堆積物から対象生物を拾う際、ゴミまで拾ってしまうことがあるので、目的のシャーレに移すまでにStepを踏んでいるが、その心配がなければ直接、目的のシャーレに移しても構わない。

*小さなメイオベントスを傷つけないでピンセットでつまみ上げるのは至難の業である。Irwan loopを用いれば表面張力のおかげで金魚すくいのようにすくうことができる(図3)。

*ブロックシャーレもしくはソーティングシャーレは中央がくぼんでおり、水分が蒸発してもサンプルが中央部分に集まり、再び拾い上げるとき便利である。時計皿でも構わないが、不安定なので扱いにくいのではないだろうか(図4)。

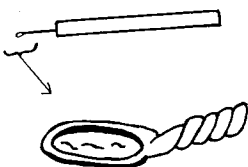


図3 Irwan loop

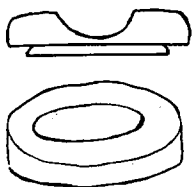


図4 ブロックシャーレ

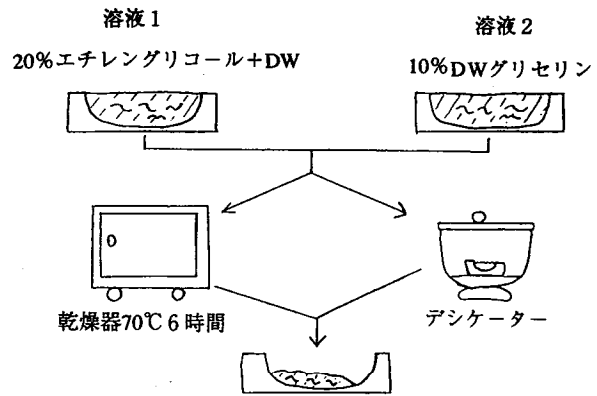


図5 グリセリン濃縮法

b. グリセリンに馴染ませる

aで分離したサンプルはデシケーターや乾燥器に入れるなどして、水分を蒸発させて徐々にグリセリンに馴染ませる。

c. サンプルをプレパラートに封入する

プレパラートを作成するには、準備するスライドが異なるため、両面観察にするか片面観察にするかを決めなければならない。

片面観察用プレパラート:

一般的なプレパラートで、普通のスライドガラスとカバーガラスがあれば良いので手軽であるが、観察は表面からのみ行うことになるので、線虫類等の同定には次に述べる両面観察用プレパラートの方が良い。

両面観察用プレパラート:

このプレパラートを作成するにはH-SスライドもしくはCobbスライドを用意し、さらにその大きさに合ったスライドガラスも必要となるが、前述したとおり表面からも裏面からも観察できるので詳細な観察にはぜひお奨めする。

以下、H-Sスライドを用いた両面観察用プレパラートの作成方法について述べる。

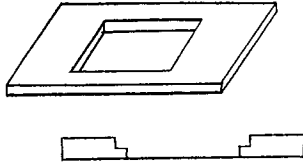
(準備品)

H-Sスライド; Dr. Higin'sとDr. Shirayamaが考案した両面観察用スライド、関東理化から販売されているが小口購入しにくい。両面観察用スライドには他にもCobbスライドがあるが、組立て式なのでH-Sスライドの方が使用しやすい。

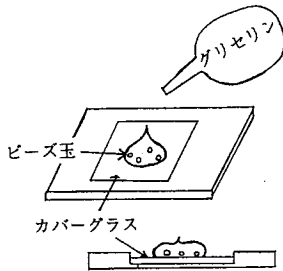
カバーガラス; 2種必要。一方は22×24mm、他方はそれより小さければ構わない。

ガラスビーズ玉; 試料がつぶれないようにする充填材。径は対象生物の大きさによって選ぶ。0.105~0.125, 0.350~0.500mmなどの規格がある。

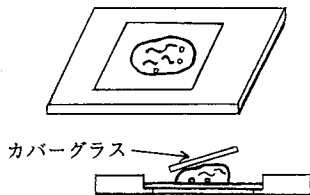
H-Sスライド



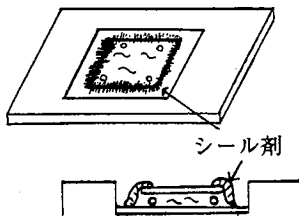
H-Sスライドを用いるときはあらかじめ下面のカバーガラスを固定する。これはきちんと固定できればどんな接着剤でもよい。



固定したカバーガラスの上にビーズ玉を適量置き、その上にグリセリンを一滴たらす。



グリセリンに馴染ませたサンプル (図5 参照) をIwan loopを用いて拾いあげて、カバーガラス上のグリセリンの中に入れる。



スライドガラスをのせてある程度グリセリンをのばしたら、周囲をシール剤でシールする。

図6 マウンティング手順

グリセリン, バルサム, チモール, パラフィン (融点54°C), キシレン。

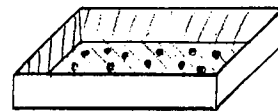
(調製)

封入剤; グリセリンを用いる。但し、グリセリンはカビが生えることがあるので、チモールを数粒いれておくと良い。

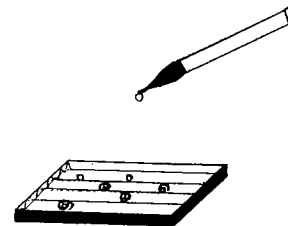
シール剤; バルサム: パラフィン=1:1

またはバルサムをキシレンで適量溶かしたもの。前者は温めながら使用するのに対し、後者はそのまま使用できる。シール剤としてマニキュアなども用いられることがあるが、油浸レンズで検鏡する場合は溶けてしまうので避けたほうが良い。

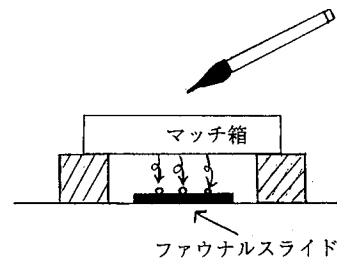
サンプルを堆積物ごと乾燥させておく



マッチ箱の中を黒く塗ったものに穴をあけておく。(1mm~0.063mm)



少し湿らせた筆で、軽く触れるだけで試料は付着する。筆はできるだけ細いものを用いる。穴の上から筆を軽く叩けば、ファウナルスライドの上に落ちる。(有孔虫スライド; 岩本コウハンにて購入可)



ファウナルスライドにはトラガカントゴムを塗っておく。(木工用ボンドを薄く溶かしたもので代用可)

図7 乾燥標本作成手順

7. 乾燥標本 (資料6,11)

メيوفォウナの中には有孔虫や貝形動物のように堅い殻で被われ、ローズベンガルを用いてもうまく染色されない生物がいる。このような生物はむしろ乾燥させた方が外殻の白さがきわだって、周囲の堆積物と区別しやすくなる。しかも、これらの生物は外殻だけでも科、属ぐらいなら同定は可能であることから種レベルの同定が必要のない時は乾燥標本を作成すると便利である。以下にその方法を示す。

一旦乾燥してしまった標本を液漬標本のような状態で観察したい場合にはトリポリ燐酸ナトリウムの1%水溶液に数分から数十分浸しておくといよい。但し、長時間浸しておくとな軟らかくなりすぎてしまうので注意すること。

8. 謝辞

本手引き書を作成するにあたって、東京大学海洋研究所 助教授 白山義久博士、東京大学総合研究資料館 助手 塚越哲博士には有意義なご助言、ご指導を頂いた。また、フロリダ州立大学教授 David Thistle博士、同 Susan Boa女史、ハワイ州立大学 Fred Dobbs博士には貴重な資料を提供して頂いた。ここに厚く御礼申し上げる。

9. 資料

1. Higgins, R. P. and H. Thiel, 1988. Introduction to the study of meiofauna. Smithsonian Press., 488pp.
2. 鬼頭 研二, 1984. 海産自由生活線虫類の食性型と群集解析. 日本ベントス研究会誌, 26:pp. 23-30.
3. Shirayama, Y. and M. Horikoshi, 1982. Vertical distribution of smaller macrobenthos and larger meiobenthos in the sediment profile in the deep-sea system of Suruga Bay (Central Japan). J. Oceanogr. Soc. Japan, 38, 273-280.
4. 白山義久, 1992. 海産メيوفォウナ学. 岡山大学附属牛窓臨海実習所公開臨海実習テキスト. pp. 109.
5. 白山義久, 1992. 第6回深海生物学シンポジウム(1991年7月)に出席して. 日本ベントス学会誌, 43:pp. 67-68.
6. 塚越 哲, 1992. 液浸オストラコーダ標本のための小物あれこれ. Jasso Newsletter 6: pp. 3 - 5.
7. Boa, S., 1992. 私信
8. Dobbs, F., 1991. 私信
9. 白山義久, 1992. 私信
10. Thistle, D., 1992. 私信
11. 塚越 哲, 1992. 私信