

X線分析顕微鏡を用いた 甲虫のオオアゴに蓄積する金属元素の測定

堀越晟仁^a, 宮澤拓実^b, 松下直矢^c, 向 雅生^{d*}, 横山政昭^e

Measurement of Metal Elements Accumulating in the Mandibles of the Beetles (*coleoptera*) Using an X-ray Analytical Microscope

Seiji HORIKOSHI^a, Takumi MIYAZAWA^b, Naoya MATSUSHITA^c,
Masao MUKOU^{d*} and Masaaki YOKOYAMA^e

^a Nakano H.S. Attached to Meiji Univ.

3-3-4 Higashi-nakano, Nakanoku, Tokyo 164-0003, Japan

^b Syukutoku Sugamo Senior High School.

2-22-16 Nishi-sugamo, Toshimaku, Tokyo 170-0001, Japan

^c Tokyo Metropolitan Koyamadai H.S.

3-3-32 Koyama, Shinagawaku, Tokyo 142-0062, Japan

^d Tokyo Metropolitan Fuji J.H.S.

5-21-1 Yayoicho, Nakanoku, Tokyo 164-0013, Japan

^e HORIBA TECHNO SERVICE Co., Ltd Analytical Technology Center

2-6 Kanda-Awajicho, Chiyodaku, Tokyo 101-0063, Japan

(Received 31 December 2018, Revised 24 February 2019, Accepted 25 February 2019)

It is reported there are some species of terrestrial arthropods that clearly have Zn accumulation inside their mandibles (fang) while others do not. In some insects (*insecta*) that belong to the arthropods, there are some species that clearly have an accumulation of Zn inside their mandibles while others do not.

21 species in two suborders of beetles (*coleoptera*) and in insects (*insecta*) were measured for accumulation of metal elements inside their mandibles by using an X-ray analytical microscope. As a result, distinct accumulation of Mn was discovered in beetles' (*coleoptera*) mandibles, but no species were found which had obvious accumulation of Zn instead. Until the present day, the definite accumulation of Mn expected for beetles (*coleoptera*) has not been confirmed. Using the jewel beetle (*Chrysochroa fulgidissima*) as a test subject, Mn was detected in adult mandibles.

[Key words] X-ray analytical microscope, Beetles(*coleoptera*), Mandibles, Mapping analysis, Accumulation of metal elements, Mn

a 明治大学付属中野高等学校 東京都中野区東中野 3-3-4 〒164-0003

b 淑徳巣鴨高等学校 東京都豊島区西巣鴨 2-22-16 〒170-0001

c 東京都立小山台高等学校 東京都品川区小山 3-3-32 〒142-0062

d 東京都立富士高等学校附属中学校 東京都中野区弥生町 5-21-1 〒164-0013 *連絡著者: masaomukoh04@yahoo.co.jp

e 株式会社テクノサービス 東京都千代田区神田淡路町 2-6 〒101-0063

陸上に生息する節足動物のオオアゴ(牙)の先端部には、Znの蓄積が見られる種と見られない種が確認されている。その中の昆虫綱(六脚亜門)でも、オオアゴの先端部においてZnの蓄積が見られる種と見られない種が確認されている。そこで、本研究では昆虫綱の甲虫目に着目し、2亜目21種についてX線分析顕微鏡でオオアゴの先端部における金属元素の分布を調べた。その結果、甲虫目では、他の昆虫綱の生物と異なり、Znの蓄積は見られず、その代わりにオオアゴ先端部にMnが顕著に蓄積する種が存在することを見出した。なお、現在のところ甲虫目以外でのこのようなMnの蓄積は確認されていない。

[キーワード] X線分析顕微鏡, 甲虫, オオアゴ, マッピング分析, 金属元素の蓄積, Mn

1. はじめに

X線顕微鏡は微小領域の元素分布を観測する手法として有効である。これまで様々な生物試料における金属分布が測定され、生物の機能が元素分布の観点から議論されている。例えば、電子線励起エネルギー分散型蛍光X線分光法(SEM-EDS)によるクモの牙の観察では、様々な金属元素(Zn, Mn等)の存在が報告されている¹⁾。最近では、集光したX線ビームを用いたX線励起のX線分析顕微鏡が用いられるようになり、節足動物のオオアゴにおける元素の内部分布まで測定する研究が行われている。

昆虫などの陸上に生息する節足動物の口器は、進化の過程でバッタのように食物を摂取する際に左右一対のオオアゴ(牙)を用いる「噛み口」と、それが退化したチョウやセミのようなパイプ状、針状の口器で植物の蜜などを吸う「吸入口」、ハエのように花の蜜や果物などをなめる「舐め口」に分岐した。また、口器は、上唇、大顎(オオアゴ)、小顎、下唇などから構成されており、昆虫のオオアゴやクモの牙の主成分はクチクラ(キチン質やタンパク質)であることが知られている²⁾。

昆虫綱(六脚亜目)の甲虫目は、オサムシ亜目(食肉亜目)、カブトムシ亜目(多食亜目)、ナガヒラタムシ亜目(始原亜目)、ツブミズムシ亜目

(粘食亜目)の4亜目に分類される。甲虫は、多様性に富み、世界で116科(約37万種)からなり、昆虫綱の3分の1を占める昆虫綱最大の目である。日本国内では、そのうち約8000種が、全ての地域(北海道から沖縄まで)に生息している。そこで、本研究では昆虫綱(六脚亜目)の甲虫目に着目し、2亜目21種の甲虫のオオアゴ先端部における金属元素の分布、特にMnとZnの分布に注目してX線顕微鏡で観察した。

2. 実験

2.1 測定試料

測定試料は、前処理としてCell Window (PET: polyethylene terephthalate)膜で固定したオサムシ亜目3種3検体とカブトムシ亜目18種38検体を用いた。測定試料の採集は、2008年8月～2018年12月の期間で、1都5県(東京都、神奈川県、千葉県、茨城県、長野県、福岡県)で行った。なお、測定期間2013年4月～2018年12月である。また、41検体全てにおいて、全体領域(100 μm^{ϕ})とオオアゴ部分(10 μm^{ϕ})の元素マッピング測定を行った。元素マッピング測定後に、必要に応じてポイント分析を行った。同様に、甲虫目以外の節足動物との比較のため、千葉県船橋市で採取されたハエトリグモの脱皮殻も測定に供した。

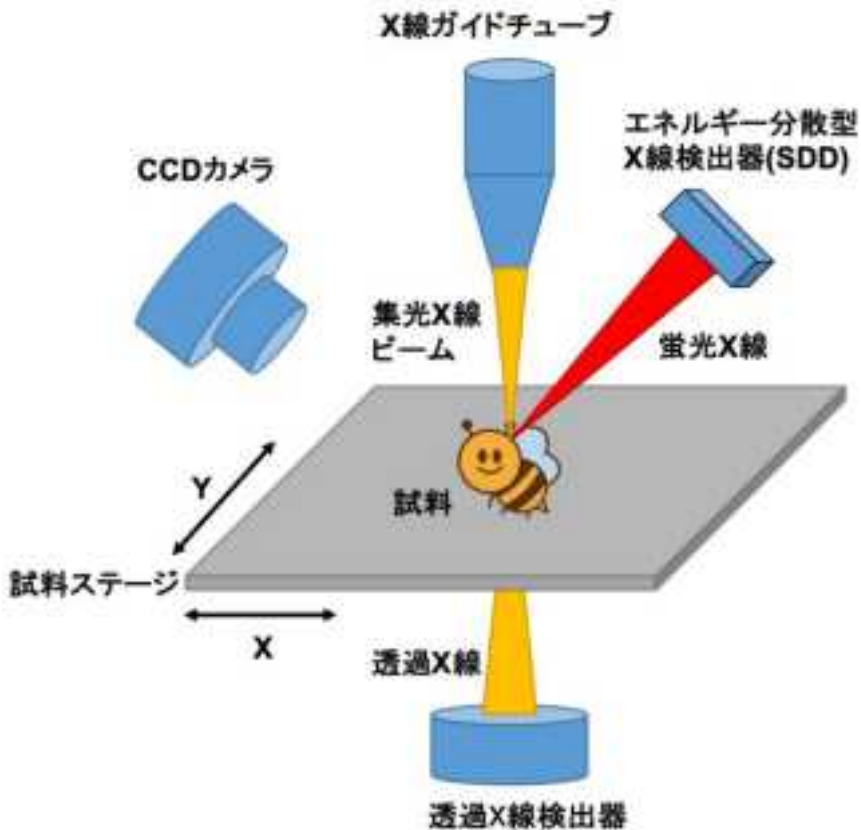


Fig.1 Optical arrangement of the X-ray analytical microscope, XGT-5200.

2.2 測定条件

測定には、X線分析顕微鏡 (XGT-5200, 堀場製作所) を用いた。Fig.1 の光学配置に示すように、X線をガイドチューブで集光し、試料に照射された微小部から放出される蛍光X線をシリコンドリフト検出器 (SDD) で検出する。蛍光X線を分光検出しながら試料を固定したXYステージを走査することにより、元素マッピング像を得た。今回の測定では、集光X線ビーム径を $10\ \mu\text{m}^\phi$ または $100\ \mu\text{m}^\phi$ に設定し、試料微小部の測定では前者を、試料全体の測定では後者を用いた。光学像はCCDカメラで撮影した。試料室は大気環境を保ったまま測定できるため、試料交換が簡便で、様々な種類の試料を非

破壊で、前処理なしに数多く測定できる³⁾。測定条件は次のとおりである。照射X線パワー；50 KV, 1 mA, ポイント分析の測定時間；100 s, 元素マッピング分析； $2.048\ \text{mm} \times 2.048\ \text{mm} \sim 51.2\ \text{mm} \times 51.2\ \text{mm}$, 4000 s, 12 ~ 13 回積算, 試料と検出器間の距離；約 1 mm, 環境；大気圧下, 室温。

3. 結果

オオアゴ先端部に Mn の顕著な蓄積が確認された種の一例として、ヤマトタマムシ (*Chrysochroa fulgidissima*) のマッピング像を Fig.2 に示す。光学像 (a), Ca 分布図 (b), Mn 分布図 (c) およびオオアゴ部の拡大図 (d) から、

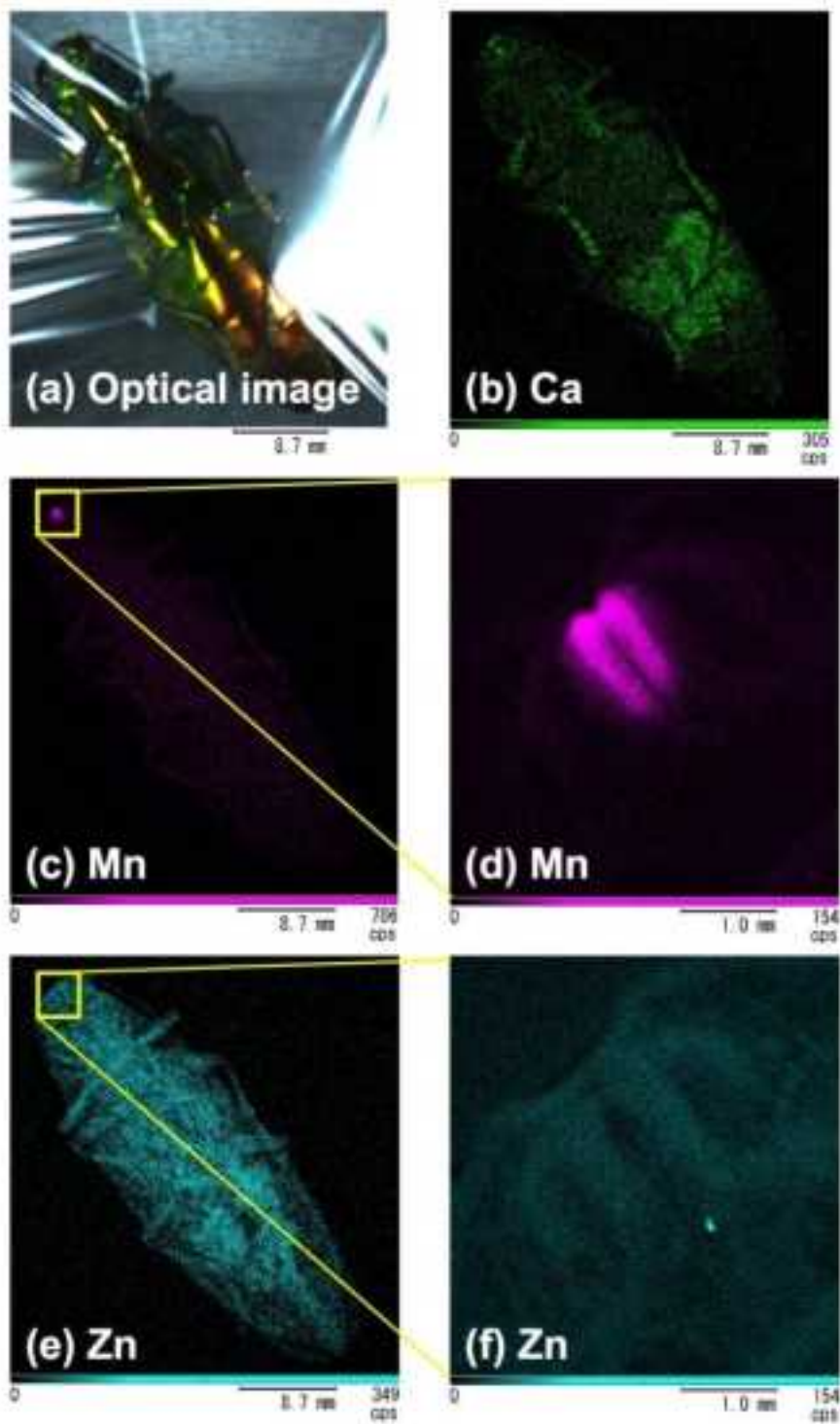


Fig.2 Optical image of *Chrysochroa fulgidissima* (a) and X-ray mapping images of Ca (b), Mn (c, d), and Zn (e, f).

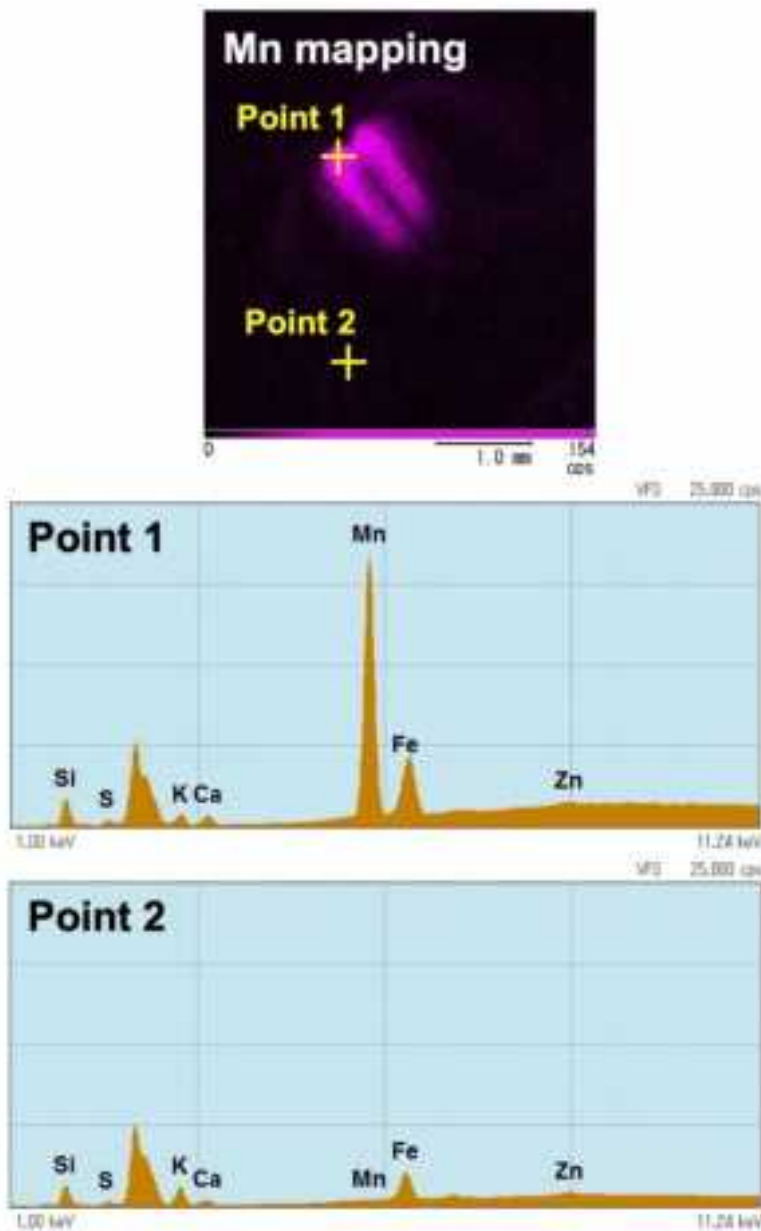


Fig.3 Upper panel shows the X-ray mapping image of Mn in mandible of *Chrysochroa fulgidissima*. Lower panels show X-ray fluorescence spectra measured at the point 1 and 2.

オオアゴ部分に Mn の蓄積が確認された。しかし、Zn 分布図 (e) およびオオアゴ部の拡大図 (f) から、他の節足動物で見られるオオアゴ先端部の Zn の蓄積は見られなかった。同様に Ca 分布

図 (b) から、オオアゴ先端部の Ca の蓄積は見られなかった。これらのマッピング測定結果が甲殻(クチクラ)の密度差などによる散乱 X 線の強度変化によるものでないことを検証するた

め、X線スペクトルを測定した。オオアゴの先端部 (point 1) と周辺部 (point 2) における蛍光X線スペクトルを Fig.3 に示す。オオアゴ先端部の方が周辺部に比べて Mn K 線の強度が高く、オオアゴ先端部に Mn が蓄積されることを確認できた。また、Zn K 線の強度は散乱 X 線の範囲にとどまり、両部位における Zn の蓄積は確認されなかった。

同様に Mn の蓄積が観測された例として、ゴマダラカミキリ (*Anoplophora malasiaca*) のマッピング像を Fig.4 に示す。光学像 (a), Ca 分布図 (b), Mn 分布図 (c) およびオオアゴ部の拡大図 (d) から、オオアゴ部に Mn が蓄積していることが確認された。しかし、Zn の分布図 (e) およびオオアゴ部の拡大図 (f) から、他の節足動物で見られるようなオオアゴ先端部の Zn の蓄積は見られなかった。同様に Ca 分布図 (b) から、オオアゴ先端部の Ca の蓄積は見られなかった。

一方、甲虫目でもオサムシ亜目のオサムシ

科ではオオアゴ部分に Mn の蓄積は確認されなかった。その一例として、ヒョウタンゴミムシ (*Scarites aterrimus*) のマッピング像を Fig.5 に示す。光学像 (a), Ca 分布図 (b), Mn 分布図 (c) およびオオアゴ部の拡大図 (d), Zn 分布図 (e) およびオオアゴ部の拡大図 (f) から、オオアゴ部に Mn と Zn の蓄積は確認されなかった。同様に Ca 分布図 (b) から、オオアゴ先端部の Ca の蓄積は見られなかった。

このようなマッピング測定をオサムシ亜目 3 種 3 検体とカブトムシ亜目 18 種 38 検体の計 41 検体について^{4,6)}、行った結果を整理して Table 1 に示す。オオアゴ先端部に Mn の蓄積が確認された種は、カブトムシ目のコガネムシ科、カミキリムシ科、タマムシ科、コメツキムシ科、ゴミムシダマシ科、テントウムシ科であった。これに対し、Mn の蓄積が確認されなかった種は、オサムシ亜目のオサムシ科、カブトムシ亜目のクワガタムシ科であった。なお、甲虫目のほとんどの種で Zn の蓄積は確認されなかった。

Table 1 Beetle species and the Mn detection of the mandibles.

目	亜目	科	種	Mn の蓄積	
甲虫目	オサムシ亜目 (食肉亜目)	オサムシ科	ゴミムシ	なし	
			ヒョウタンゴミムシ	なし	
	カブトムシ亜目 (多食亜目)	クワガタムシ科	ノコギリクワガタ♂♀	なし	
			コクワガタ♂♀	なし	
			コガネムシ科	コガネムシ	あり
			コフキコガネ	あり	
			カミキリムシ科	キボシカミキリ	あり
			ゴマダラカミキリ	あり	
			タマムシ科	ヤマトタマムシ	あり
			コメツキムシ科	コメツキムシ	あり
ゴミムシダマシ科	ゴミムシダマシ	あり			
テントウムシ科	ナナホシテントウ	あり			
	ナミテントウ	あり			
	ニジュウヤボシテントウ	あり			

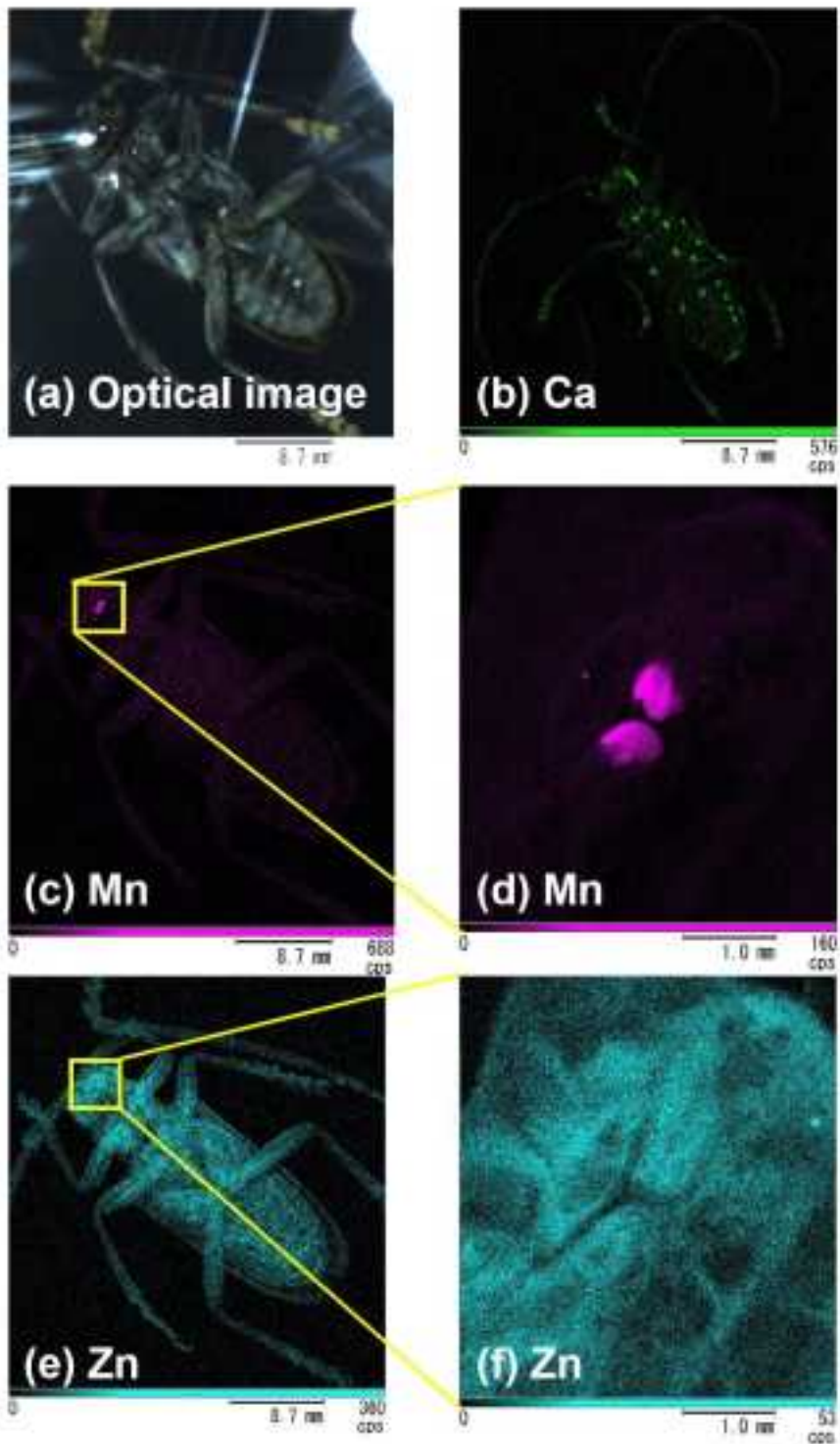


Fig.4 Optical image of *Anoplophora malasiaca* (a) and X-ray mapping images of Ca (b), Mn (c, d), and Zn (e, f).

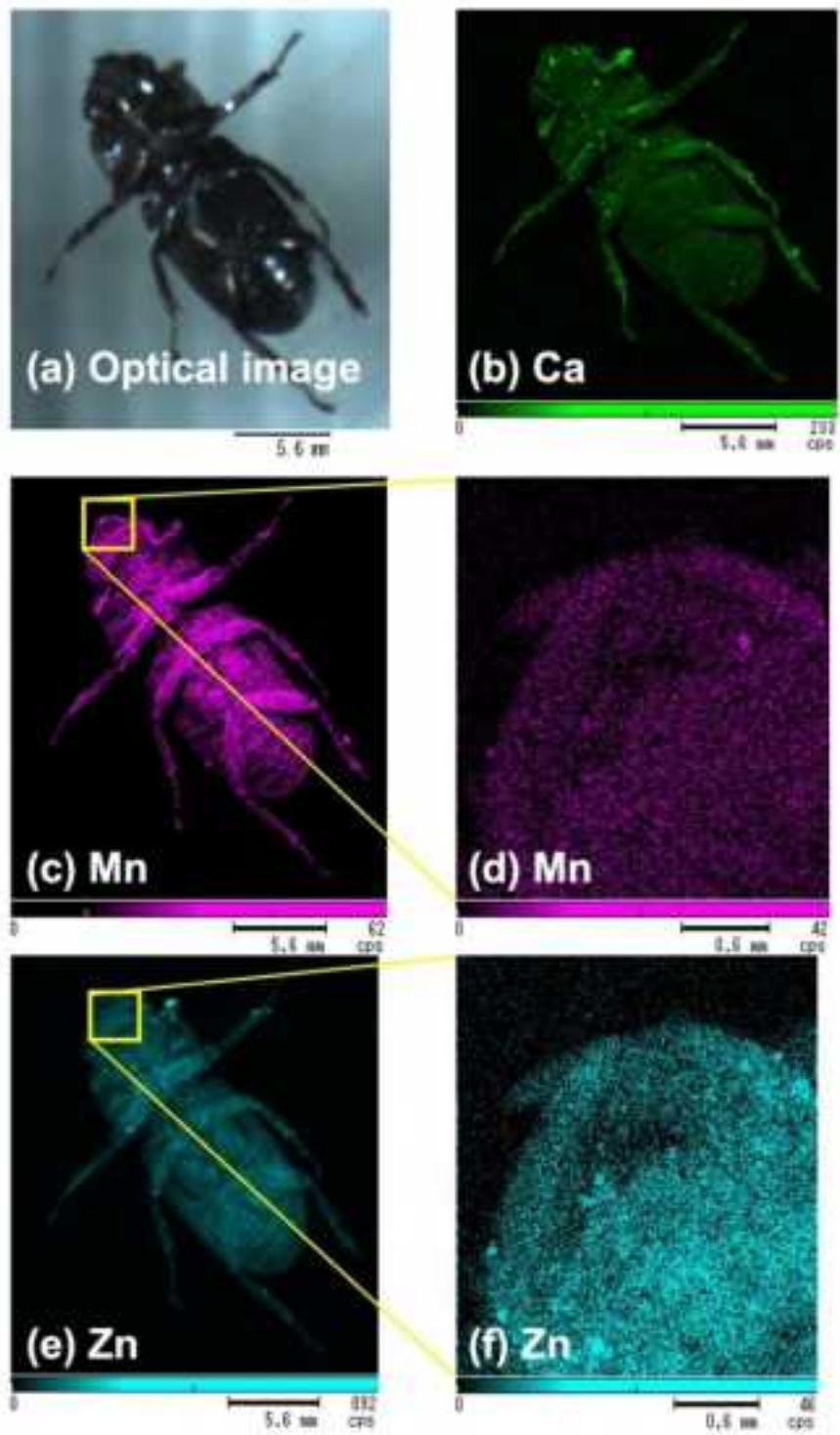


Fig.5 Optical image of *Scarites aterrimus* (a) and X-ray mapping images of Ca (b), Mn (c, d), and Zn (e, f).

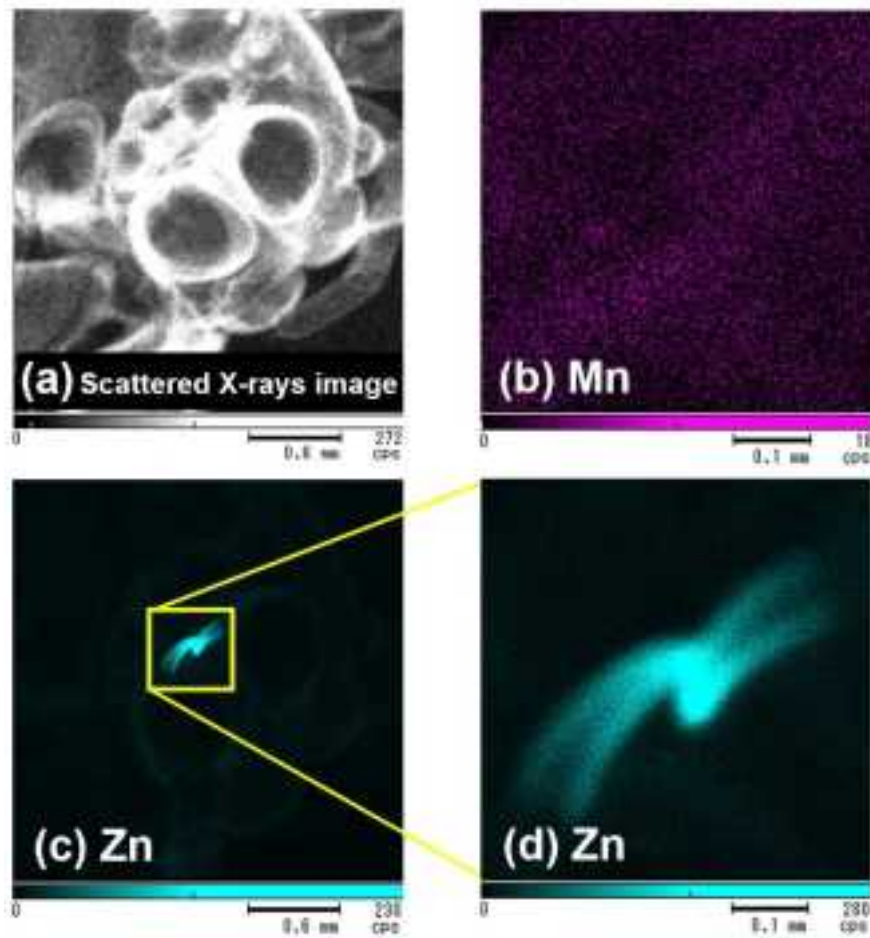


Fig.6 Scattered X-ray image of *Chrysochroa fulgidissima* (a) and X-ray mapping images of Mn (b), Zn (c, d).

さらに、甲虫目以外の節足動物との比較のため、ハエトリグモ (*Salticidae*) の脱皮殻のマッピング像を Fig.6 に示す。散乱 X 線像 (a)、Mn 分布図 (b)、Zn 分布図 (c) および牙の拡大図 (d) から、牙の先端部に Zn の蓄積が確認された。しかし、Mn 分布図 (b) から、甲虫目で見られるオオアゴ先端部の Mn の蓄積は見られなかった。また、ハエトリグモ (*Salticidae*) の脱皮殻

の牙の先端部 (point 1) と周辺部 (point 2) における蛍光 X 線スペクトルを Fig.7 に示す。牙先端部の方が周辺部に比べて Zn K 線の強度が高く、牙先端部に Zn が蓄積されることを確認できた。また、Mn K 線の強度は散乱 X 線の範囲にとどまり、両部位における Mn の蓄積は確認されなかった。

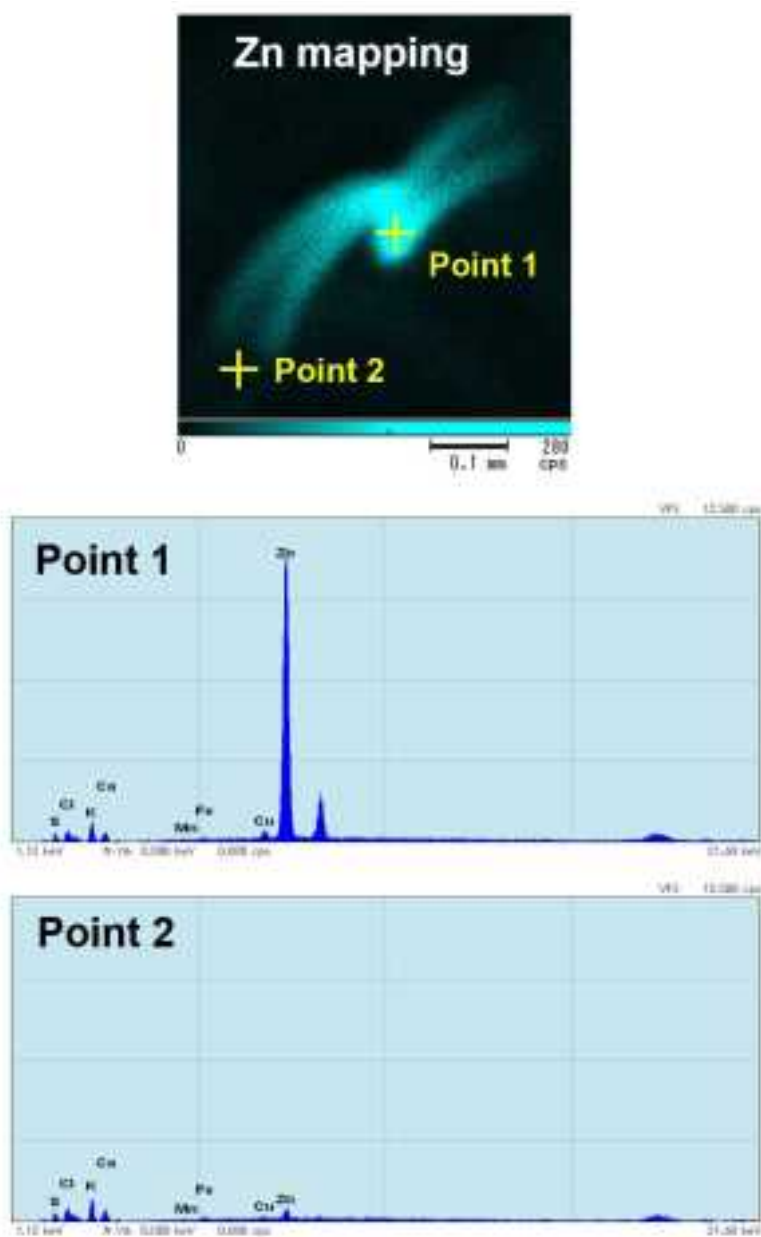


Fig.7 Upper panel shows the X-ray mapping image of Zn in mandible of *Chrysochroa fulgidissima*. Lower panels show X-ray fluorescence spectra measured at the point 1 and 2.

4. 考 察

これまでのX線分析顕微鏡観察では、Table 2に示すように陸上に生息する一部の節足動物

のオオアゴ(牙)の先端部には、Znの蓄積が見られる種と見られない種の存在が確認されている⁷⁻¹⁰⁾。このうち、クモ網(鋏角亜門)では、ハエトリグモ(*Salticidae*)とジョロウグモ(*Nephila*

Table 2 Arthropod species and the Zn detection of the mandibles⁷⁻¹⁰⁾.

門	亜門	綱	目	種など	Znの蓄積	
節足動物門	六脚亜門	昆虫綱	甲虫目	カブトムシ, オサムシ	なし	
			鱗翅目	チョウ, ガ	幼虫	あり
					成虫	なし
			ハチ目	アリ科	女王アリ, 働きアリ(成虫)	あり
					オスアリ	なし
					ハチ科(働きバチ)	なし
			半翅目	セミ, カメムシ	なし	
	直翅目	バッタ科 コオロギ科	なし あり			
	トンボ目	均翅亜目	あり			
		不均翅亜目	なし			
鋏角亜門	クモ綱	クモ目	ジョロウグモ, ハエトリグモ	あり		
多足亜門	ムカデ綱		トビズムカデ	あり		
	ヤスデ綱		ヤケヤスデ	なし		

clavata)において、牙の先端部にZnの蓄積が見られる。昆虫綱(六脚亜門)は、陸上の節足動物の中でいろいろな形態に分化しており、オオアゴの先端部において、Znの蓄積が見られる種と見られない種が確認されている。

しかし、今回の測定では、甲虫目のオオアゴにおいて陸上に生息する節足動物に見られるオオアゴ(牙)先端部のZnの顕著な蓄積がほとんど見られず、代わりにオオアゴ先端部にMnを顕著に蓄積している種としていない種が存在する。また、Caは多くの動物で体を支える組織(骨や殻など)の主要物質である。そこで、Fig.2とFig.4では、Caの分布の様子と、MnやZnと比較のため、Ca分布図(b)を用いた。その結果、CaではMnの分布のような蓄積は確認されなかった。

今回の測定では、X線励起法を用いているため、電子線励起法での測定と違い、オオアゴの内部の元素分布まで測定している。よって、測定されたMnの蓄積は、オオアゴ先端部の甲殻

に含有されている金属元素を示し、オオアゴの表面に付着したものと考えるに、仮に餌や体液などが付着した場合、Fig.2(e, f)に示したZnの分布のように点として検出されることがある¹¹⁾。

今回の実験で確認したように、オオアゴ先端部にMnが蓄積されるものと蓄積されない種がある理由として、アゴの強度との関連性を考えた。甲虫のオオアゴが獲物(エサ)をはさんだり、固いものをかじったりする用途から、圧力のかかるオオアゴ先端部の強度をあげるためではないかと考えた。先行文献¹⁾では、クモにおいてZnとClが含まれる牙やCaが含まれる牙は、これらの金属元素が含まれない牙よりも硬度が増すと報告されている。また、昆虫の甲殻(クチクラ)は、ZnもしくはMnを10%加えることで、硬化するという報告もある¹²⁻¹⁴⁾。この報告を踏まえ、オオアゴ先端部にMnを蓄積しているカブトムシ亜目(多食亜目)のカミキリムシ科は固い樹木を食すのに対し、オサムシ亜目(食

肉亜目)は死肉などの比較的柔らかいものを食すためオオアゴ先端部にMnを蓄積していないのではないかと考えられる。また、オオアゴ先端部にMnの蓄積が見られなかったカブトムシ亜目(多食亜目)のクワガタムシ科では、樹液を食すためオオアゴの先端部を硬くする必要がない可能性がある。なお、測定の結果、同じく樹液を食すコガネムシ科の方がカミキリムシ科よりも、オオアゴ先端部におけるMnの蓄積量が少ないことが示唆された。ただし、タマムシ科やテントウムシ科では、植物の葉やアブラムシなどの比較的柔らかいものを食すがMnの蓄積が見られるなど、Mnの分布はアゴの強度との相関だけでは説明しきれない。

次に節足動物の進化との関連性を考えた。オオアゴ先端部におけるMnの蓄積の有無は、カブトムシ亜目(多食亜目)とオサムシ亜目(食肉亜目)に分岐した時点ですでに決まっていた可能性が考えられる。しかし、カブトムシ亜目(多食亜目)でもクワガタムシ科は、オオアゴにMnの蓄積が見られない。これは、他のカブトムシ亜目の種と比較してオオアゴが非常に大きいためMnの蓄積が分散されたためではないかと推測できる。

さらに、陸上に生息する節足動物全体に視野を広げると、進化の過程で甲虫目に分岐した時点で、オオアゴ先端部に金属元素の蓄積を必要とする種においてZnの代わりにMnを活用した可能性も考えられる。ハエトリグモ(*Salticidae*)の脱皮殻のマッピング像(Fig.6)と比較すると、Zn分布図(c)および牙の拡大図(d)から、牙の先端部にZnが蓄積している位置が甲虫のオオアゴにおけるMnの蓄積した位置(Fig.2(c)(d), Fig.4(c)(d))と一致しているように見える。また、ヤマトタマムシ(*Chrysochroa*

fulgidissima)のオオアゴ部分の蛍光X線スペクトル(Fig.3)とハエトリグモ(*Salticidae*)の脱皮殻の牙部分の蛍光X線スペクトル(Fig.7)を比較すると、ヤマトタマムシではZnの代わりにMnに置き換わっているように見える。また、ヤマトタマムシのX線スペクトル(Fig.3)において、FeのX線スペクトルも増加しているが、測定したヤマトタマムシは脚からも高濃度のFeが検出され、Feのオオアゴへの付着も考えられる。

甲虫目の一部だけのオオアゴ先端部分にMnが蓄積する理由を明らかにするには、さらなる測定を重ね、節足動物の生態および進化の観点から総合的に解析する必要がある。

5. まとめ

オサムシ亜目3種3検体とカブトムシ亜目18種38検体の計41検体について、特にオオアゴ先端部におけるMnに着目してX線顕微鏡観察を行った。その結果、カブトムシ亜目には、ほとんどの種でMnの顕著な蓄積が確認された。このようなMnの蓄積は、現在のところ甲虫目以外では確認されていない。一方、オサムシ亜目では、Mnの蓄積は確認されなかった。また、甲虫目においては、陸上節足動物の一部に見られたZnの蓄積はほとんどの種で確認されなかった。

今回は、カブトムシ亜目とオサムシ亜目のいくつかの種で、成虫を測定した。今後は、今回測定していない種(ナガヒラタムシ亜目、ツブミズムシ亜目、カブトムシ亜目、オサムシ亜目)および幼虫や蛹の測定を行う。また、餌となる植物由来または土壌由来かを確認するため、甲虫の採取地域の比較と植物や土壌のX線分析顕微鏡による測定も行う。さらに、海に生息する

節足動物を含め、進化の過程のどの時点で、オオアゴ先端部に金属元素を蓄積し、その金属元素がどのように変化していくかを検証することが課題である。

謝 辞

本研究の論文作成に当たり、ご助言をいただきました東北大学石田秀輝名誉教授に、この場を借りて御礼申し上げます。また、サンプル採集に当たりヤマトタマムシやキボシカミキリなど重要な種の捕獲に貢献した東京自由保育園の向麟太郎くんをはじめ、ご協力いただいた多くの方に感謝致します。

参考文献

- 1) Y. Politi, M. Priewaaser, E. Pippel, P. Zaslansky, J. Hartmann, S. Siegel, C. Li, F. G. Barth, P. Fratzl: *Adv. Funct. Mater.*, **22**, 2519-2528 (2002).
- 2) J. F. V. Vincent: Compos. Part A: *Appl. Sci. Manuf.*, **33**, 1311-1315 (2002).
- 3) 駒谷慎太郎: X線分析顕微鏡, “蛍光X線分析の実際”, 第2版, 中井 泉編, pp.142-150 (2016), (朝倉書店).
- 4) 上野俊一, 黒沢良彦, 佐藤正孝: “原色日本甲虫図鑑(II)”, (1985), (保育社).
- 5) 黒沢良彦, 久松定成, 佐々治寛之: “原色日本甲虫図鑑(III)”, (1985), (保育社).
- 6) 林 匡夫, 森本 桂, 木元新作: “原色日本甲虫図鑑(IV)”, (1985), (保育社).
- 7) W. B. Rabitsch: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **32**, 172-177 (1996).
- 8) T. Yoshimura, N. kagemori, S. Kawai, K. sera, S. Futatsugawa: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, B*, **189**, 450-453 (2002).
- 9) W. Ohmura, Y. Suzuki, H. Imaseki, T. Ishikawa, H. Iso, T. Yoshimura, Y. Takemetsu: *International Journal of PIXE*, **17** (3)(4), 113-118 (2007).
- 10) 中村ちひろ, 中野ひとみ, 横山政昭, 駒谷慎太郎: X線分析の進歩, **48**, 365-374 (2017).
- 11) 中村ちひろ, 中野ひとみ, 横山政昭, 駒谷慎太郎: X線分析の進歩, **49**, 249-256 (2018).
- 12) J. E. Hillerton, J. F. V. Vincent: The specific location of zinc in insect mandibles., *J. Exp Biol*, **101**, 333-336 (1982).
- 13) J. E. Hillerton, B. Robertson, J. F. V. Vincent: The presence of zinc or manganese as the predominant metal in the mandibles of adult stored product beetles., *J. Stored Prod Res*, **20**, 133-137 (1984).
- 14) D. Quicke, P. Wyeth, J. Fawke, H. Basibuyuk, J. F. V. Vincent: Manganese and zinc in the ovipositors and mandibles of hymenopterous insects., *Zool J. Linn Soc*, **124**, 387-396 (1999).