地球規模や都市環境における異常な気温上昇は収まる気配がなく，将来的に地衣類の多様性の喪失が起こることも懸念される．その際に観察記録が残されていれば，将来的な分析や対策の基礎データにもなり得る．また，個別の事例では判断が難しいが，同時期に多数地点で起こっていることが確認できると全体として何が起こっているのかを調べることもできることがあり，これは市民科学の利点でもある．今後も各所での記録および情報の共有によって，環境問題のより早い識別につながる活動へと展開することを期待したい．

引用文献

Hawksworth, D. L. 1982. Secondary fungi in lichen symbioses: parasites, saprophytes and parasymbionts. J. Hattori Bot. Lab. 52: 357–366.

Thatje, S. 2021. Saving corals from bleaching. Environ. Sci. Technol. 55: 9634–9636.

近 芳明．2015．ウメノキゴケの裂片はどこが成長するか．ライケン 18: 44–46.

濱田信夫・宮脇博巳．1998．大気汚染の生物指標としての地衣類．日本生態学会誌 48: 49–60.

地衣類同定における呈色反応の判定への取り組み

久保 浄 [1,*]

New Approaches to the Determination of Color Spot Test for Lichen Identification

Kiyoshi KUBO

地衣類に含まれる化学成分を同定する方法に呈色反応がある．試薬を地衣体に付けて色の変化を肉眼あるいは実体顕微鏡下で観察するのが一般的である．しかし，実際にやってみると様々な問題を経験した．まず，色の変化の判定は感覚に頼った主観的なものにならざるを得ない．色の変化が微妙であったり，地衣体にもともと含まれる色素のために判定が難しい場合もある．試液の量が多すぎて誤った判定をしたり，髄層に含まれる成分を判定するために皮層を削る作業がうまくいかずに標本の一部を不必要に破壊してしまうということもあった．そこで，できるだけ容易で客観的な判定を目指していくつかの方法を試した．また，誤った判定の原因についても検討したので報告する．

なお，筆者が「色弱」であることも今回の検討のきっかけとなったことを述べておく．黄色人種の男性の約 5%, 白人男性の約 8%, 黒人男性の約 3% は遺伝による「色弱」であるとされる（血液 AB 型の人より多い）．さらに，「正常」な色覚とされる人の感覚にも個人差があり，「正常」と「異常」の境界線を明確に決めることはできないとも考えられている．また，「色弱」は多数派と感覚が異なる少数派であるというだけで, 必ずしも「弱い」・「劣っている」わけではないという考えから,「色弱」・「色覚異常」などの言葉は使うべきでないという意見もある．色覚の多様性，色覚バリアフリー等についての詳しい解説には，例えば，生物・医学系の研究者によるウェブページ (https://www.nig.ac.jp/color/barrierfree/barrierfree.html) などがある．

[1] つくば市　[*]E-mail: kk.6164905111@gmail.com

1. 色の客観的な判定

呈色反応によって化学成分を正確に同定するには光の波長分布の変化を測定すべきであるが，地衣類の呈色反応については, 図鑑(吉村 1974) や専門の文献でも，その判定方法が「色の名前」によって記述されている．「色の名称」は人がそれをどう感じるかを言葉で表現しようとしたもので，客観的に定義するのは難しく，判定は各自の感覚や経験に頼った主観的なものにならざるを得ない．さらに，筆者もその一人である「色弱」の者は色の名前と感覚とを対応させることが困難な場合が多い．色覚に関する「バリアフリー」という観点からも，数値化による客観的な判定方法が必要である．

科学的に色の変化を判定するには，分光器等を用いて波長スペクトルを測定するのが正確な方法であろう．しかし，地衣類の呈色反応は手軽にできることも重要で，分光器などを用いることは多くの場合に現実的でない．そこで，簡単にできて客観的な判定が可能な方法として,「呈色反応の様子を動画データで取り込んでから RGB（Red, Green, Blue の強度）の数値で判定す

る」という方法を試した．呈色反応では，短時間で変色してすぐに褪めてしまうような反応もあり，静止画を撮るよりも動画を撮影する方が良いと考えた．また，取り込んだ動画データから時間的な色の変化を数値で表すことも試みた．

1.1.「色」の数値化

動画撮影用カメラとして,WiFi デジタル顕微鏡（Mx61, SKYBASIC）を Windows パソコンに接続して使用した．また，色を数値として表示するために「色々の色」(https://www.hikarun.com/w/) というソフトを使用した．パソコンの画面上のカーソル付近の RGB 値が表示される．例として，ウメノキゴケ *Parmotrema tinctorum* の C 反応（花王「キッチンハイター」3倍希釈液を使用）を試した．腹面の皮層を剃刀で削って髄層をむき出しにしてから試薬をつけた．この動画を表示させて，試薬を付ける前と直後での RGB 値を「色々の色」で測定している様子を Fig. 1 に示す. Fig. 2 には RGB 値の変化のグラフを示す. R(赤) のみが増加して G(緑) と B(青) が減少し，吉村 (1974) にあるように「C+ 赤」と判定できそうである．ただし，完全な赤ではなく, G が B よりも相対的に強いことを重視すれば橙色とも言える．

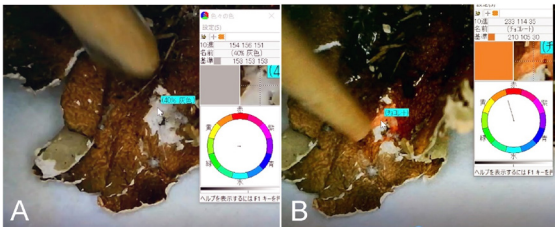

Fig. 1. ウメノキゴケの C 反応の動画から，試薬を付ける前(A) と付けた直後(B) での RGB 値測定の様子.

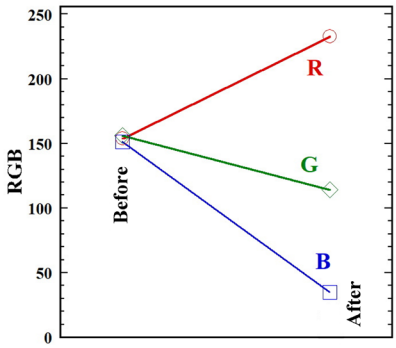

Fig. 2. ウメノキゴケの C 反応で，試薬を付ける前と付けた直後の RGB 値.

1.2. 時間変化

色の時間変化を数値データにすることも試みた．ここでは，ナミガタウメノキゴケ *Parmotrema austrosinense* の C 反応について報告する．

まず, 1.1 節と同様に動画を撮影した後，動画編集ソフトにより見たい場所だけを切り取った動画にし, 多数（この例では 325 枚）の静止画として保存する(Figs. 3, 4).

次に, ImageJ（https://imagej.nih.gov/ij/）というソフトを使い，これらの静止画ごとに画面全体の RBG 値の平均を計算して数値データとし，これをグラフとした (Fig. 5). 試薬を付けた直後に R が増加し G と B が減少して赤色となる（「C+ 赤」, 吉村 (1974) と一致）が, その後 10~20 秒程度でこの変化が弱まっていくのがわかる．また, B よりも G の減少が小さいので純粋な赤

Fig. 3. 動画編集により見たい部分のみにトリミングする.

Fig. 4. ナミガタウメノキゴケの C 反応で保存した静止画の例（試薬塗布前，直後，10 秒程後．325 枚中の 3 枚）.

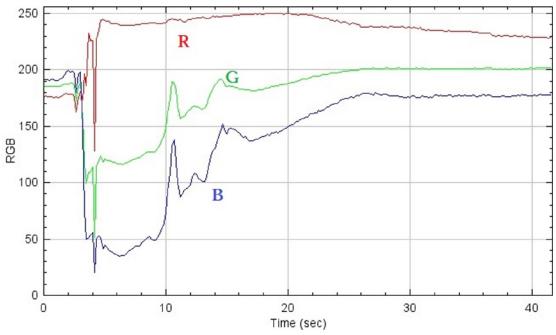

Fig. 5. ナミガタウメノキゴケの C 反応における RGB 値の時間変化.

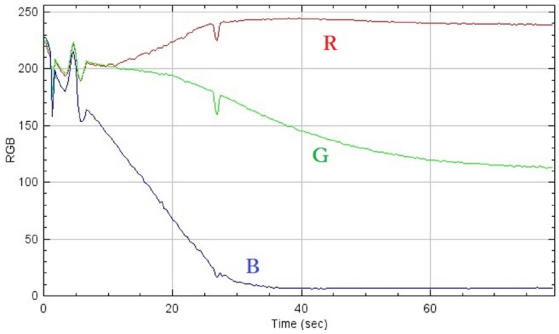

Fig. 6. マツゲゴケの K 反応における RGB 値の時間変化.

色でなく橙色であるとも言える．なお，グラフが途中でガタガタしているのは，試薬を付けすぎて液面での光の反射の様子が変化したためと考えられる．

同様の方法で, マツゲゴケの K 反応（和協産業「パイプ洗浄剤ピーピースカット」主成分 NaOH + KOH を使用）の RGB の時間変化をグラフにしたものを Fig. 6 に示す．試薬を付けた後 20 秒ほどかけて B が大きく減少し G がやや減少，R はやや増加する．さらに，G は R と B がほぼ一定となった後もゆっくりと減少し続けることがわかる．吉村 (1974) では「K+ 黄色 , のち血赤色」となっており，はじめの変化は「黄色」，その後の変化は「のち血赤色」に対応していると解釈できる．ただし，純粋な黄色ではなく橙色とも言える．

1.3. 色の客観的な判定の考察

試した例では変化が解り易く，撮影した動画の RGB の数値から呈色反応の判定ができそうである．しかし，変化が微妙な場合も含めて客観的な判定を行うには，各地衣成分に対して RGB 数値による判定基準を設定しておく必要がある．

本来,「色」による化学成分の正確な判定のためには，透過または反射・吸収スペクトルを分光器で測定する必要がある. RGB 値から元の光の波長分布を決めることは一般的にはできないからである．しかし，見るべき化学成分が予めわかっていれば，撮影した動画からある程度正確な判定をすることは可能と考えられる．一旦分光器を用いて化学成分の反射スペクトルを測定してデータにしておけば，後は分光器を用いなくても光源の波長分布・カメラのセンサーの感度の波長依存性・撮影ソフトの仕様がわかっていれば，その化学成分に対する RGB 値の変化が予測できるはずである．

2.「C+ 黄色」という誤認

地衣類の呈色反応をあれこれ試している中で，マツゲゴケ *Parmotrema clavuliferum* と思われる地衣類の髄層の呈色反応で「C+ 黄色」に見えることがあった．腹面の黒い皮層を剃刀で削り取ったところに C 液（市販の殺菌消毒剤「ピューラックス」，オーヤラックス：主成分は次亜塩素酸ナトリウム）を付ける瞬間 (Fig. 7A) と 1 分ほど経過したとき (Fig. 7B) の様子を示す．また, 1 節で述べた方法でこの変化を RGB 値で表したグラフを Fig. 8 に示す．無色の髄層部分が 1 分後には明らかに黄色あるいは橙色に変わっている．しかし，図鑑など（吉村 1974，柏谷ほか 2020) によるとマツゲゴケは「C–」で，色の変化はないはずである．よく見ると黄色くなったのは髄層をむき出しにした領域の周辺に近い部分であり中心部分は白いままのようにも見えることから，腹面の皮層の成分が C 液と反応して色が変化した可能性が疑われた．

このことを確かめるため，マツゲゴケの皮層を削ったものを白い濾紙の上にのせて殺菌消毒剤をかけた様子

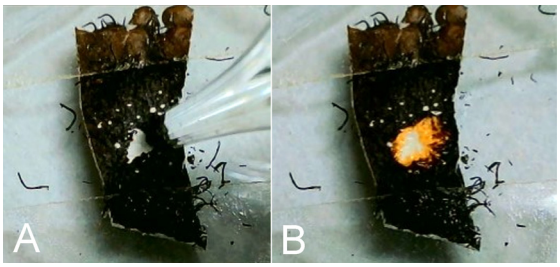

Fig. 7. マツゲゴケ腹面の皮層を削り C 液を付けた．A. 付ける瞬間 , B. 約 60 秒後.

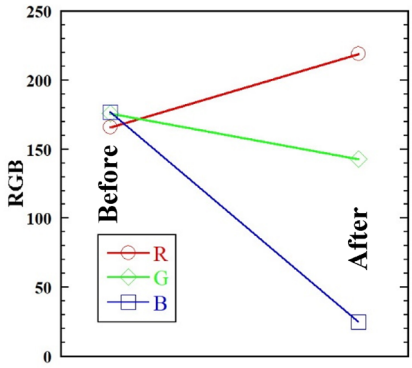

Fig. 8. マツゲゴケ腹面の皮層を削り C 液を付けた．液を付けた部分の RGB 値.

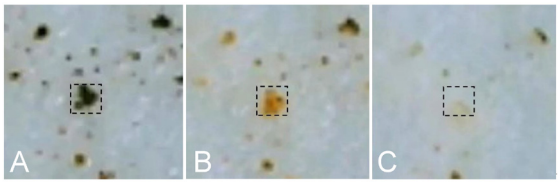

Fig. 9. マツゲゴケ腹面の皮層を濾紙にのせてC液をかけた様子. 動画撮影したものから静止画を保存した. 左から, 液をかけた直後 (A), 30 秒後 (B), 4 分後 (C). 黒い点線の枠内の RGB 値の平均を計算した.

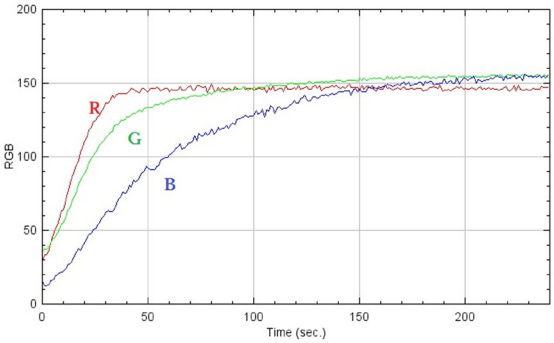

Fig. 10. Fig. 9 に示した長方形の領域の RGB 値の平均の時間変化.

を動画撮影した. その様子を Fig. 9 に示す. 左から C 液をかけた直後, 30 秒後, 4 分後の様子である. また, 点線で示した枠内の領域の RGB 値の平均の時間変化を Fig. 10 に示す (1 節で述べた方法による). 腹面の皮層に含まれる黒い色素は次亜塩素酸ナトリウムによって脱色される (最終的に R, G, B 全てが同程度に増加する) がその途中の過程では黄色くなっている (B の増加速度が遅く R, G が強い) と解釈できる. このことから, Figs. 7, 8 に示した例では, C 液が皮層の色素と反応したが完全に脱色されるほど大量には液が付いていないために黄色い色が残ったものと考えられる.

結論として, 試薬は髄層にのみ付くようにしなければならないことが確かめられた.

3. 地衣成分をアセトンで抽出する方法

ある程度広い領域にわたって皮層を削って髄層をむき出しにしないと髄層にのみ試薬を付けることが難しいことが多い. 広い領域にわたって皮層を削って髄層を出すことも標本の状態によっては簡単ではなく, 下手にやると標本を不必要に破壊する結果となる. そこで, 地

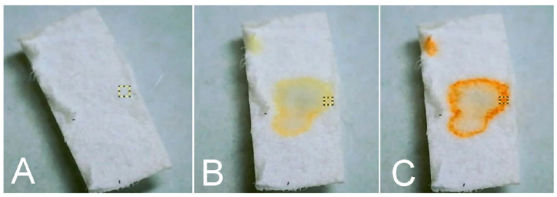

Fig. 11. マツゲゴケ抽出液を浸みこませた濾紙にK液を付ける動画から, 付ける前 (A), 10秒後 (B), 50秒後 (C) を静止画として保存し, RBG を平均する領域を選んだところ.

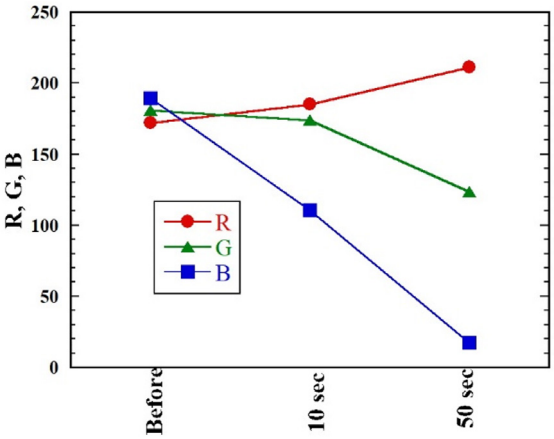

Fig. 12. マツゲゴケ抽出液を浸みこませた濾紙にK液を付ける前 , 10 秒後 , 50 秒後での選択した領域の R, G, B の平均値.

衣成分をアセトンで抽出して濾紙に浸みこませたのち濾紙に試薬を付けて色の変化を見る, という方法 (Orange *et al.* 2010) を試した.

まず, マツゲゴケの地衣体の小片にアセトンをかけ, 濾紙に浸みこませ, この濾紙をいくつかに切り分けた. 黒い色素はアセトンには溶けないようで, この時点では濾紙は無色のままである. 切り分けた濾紙の一つにK液 (和協産業「パイプ洗浄剤ピーピースカット」で代用) を付けたところを 1 節の方法と同様に動画撮影した. 動画から, 3つの時点の画像を Fig. 11 のように静止画として保存した. ImageJ を使用して, 其々について調べたい領域を長方形で切り取り(Fig. 11 の小さい長方形), その中の RGB 値の平均を算出した. ここでは, 50 秒後に赤っぽくなっている領域を選んだ. Fig. 12 に 3 つの時点での R, G, B の平均値を示す. 10 秒後には B が減

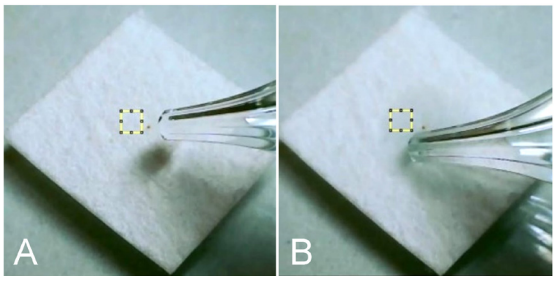

Fig. 13.　マツゲゴケ抽出液を浸みこませた濾紙に C 液を付ける動画から，付ける前 (A), 直後 (B) を静止画として保存し，RBG を平均する領域を選んだところ．

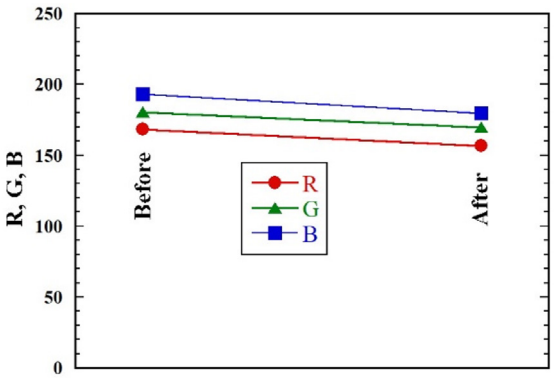

Fig. 14. マツゲゴケ抽出液を浸みこませた濾紙に C 液を付ける前 , 直後での選択した領域の R, G, B の平均値．

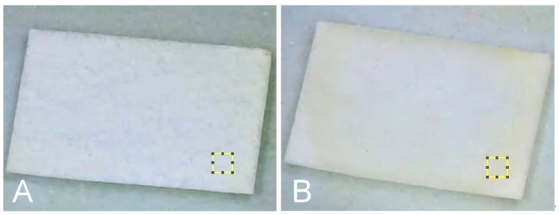

Fig. 15. ウメノキゴケ抽出液を浸みこませた濾紙に K 液を付ける動画から液を付ける前 (A), 90 秒後 (B) を静止画として保存し，RBG を平均する領域を選んだところ．

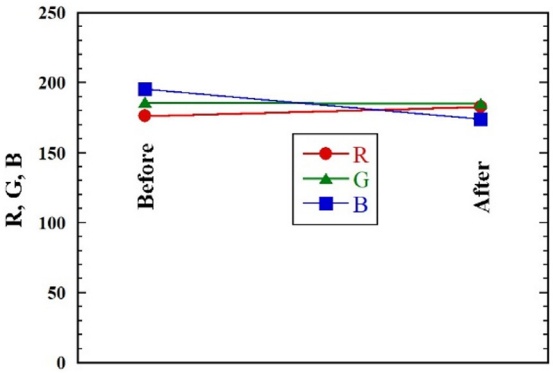

Fig. 16. ウメノキゴケ抽出液を浸みこませた濾紙に K 液を付ける前と 90 秒後での選択した領域の R, G, B の平均値．

少し（黄色），50 秒後には G も減少して（橙色～赤）となり，「K+ 黄 → 赤」（吉村 1974）と一致する．

マツゲゴケ抽出液を浸みこませた濾紙に C 液を付ける前と直後について，同様の結果を Figs. 13, 14 に示す．R, G, B ともに僅かに減少しているが相対的な変化の差はほとんどない（僅かに暗くなったが色の変化はない）．

さらに，ウメノキゴケと思われる地衣類にアセトン抽出液を浸みこませた濾紙の K, 及び C 反応についても同様の実験を行った．結果を Figs. 15, 16, 17, 18 に示す．K 液の反応では変化は大きくないが，Fig. 16 から，R , G があまり変化せず B が減少しているので，「皮層 K+ 黄」（吉村 1974）と矛盾しないと考えられる．変化が小さいのは，地衣成分が皮層のみに含まれるために抽出量が少ないためと推察される．

C 液の反応は Fig. 18 から，R の強度がほとんど変化しないのに対して G と B の強度がほぼ同じだけ大きく減少しており，「髄層 C+ 赤」（吉村 1974）と一致する．

この方法ではアセトンに溶けるものはすべて出てくるので，髄層の成分のみを調べることはできない．また，アセトンに溶けない成分は調べられない．しかし，地衣体に直接つける方法に比べて，以下の利点があるだろう．

- 必要な地衣体は比較的少量で，皮層を削り易い平らな場所を探す必要がない．
- 試薬を付けすぎるという失敗の可能性が小さい．
- 濾紙を細かく切り分けておくことにより何度も試すことができる．
- 濾紙を標本と共に保存することにより，呈色反応の「証拠」を残すことができる．
- スライドガラスの上のような安定した場所でできるので，動画撮影やその後の解析による数値化が容易になる．

野外での判定や，髄層の成分のみを調べたい場合を除き，この方法は優れている点が多いように思われる．

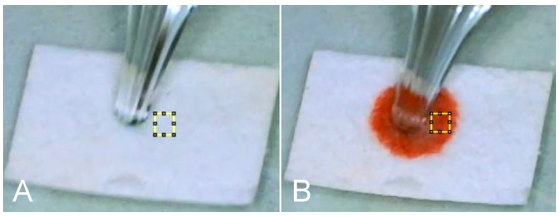

Fig. 17. ウメノキゴケ抽出液を濾紙に浸みこませたものにC液を付ける動画から液を付ける前(a), 直後(b)を静止画として保存し, RBGを平均する領域を選んだところ.

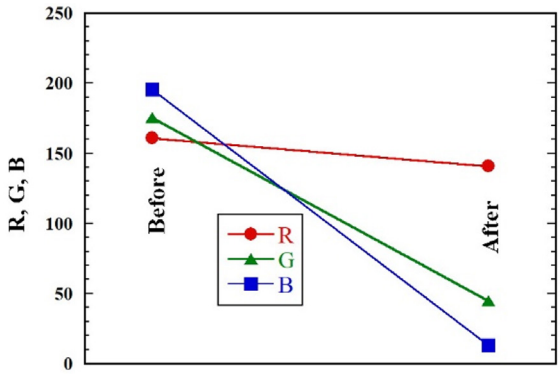

Fig. 18. ウメノキゴケ抽出液を浸みこませた濾紙にC液を付ける前, 直後での選択した領域のR, G, Bの平均値.

4. 試薬の添加剤の影響

2節で述べたように, マツゲゴケの呈色反応で「C+黄色」と誤認された原因は, 腹面の黒い色素が次亜塩素酸ナトリウムで半ば漂白されたためと思われるが, Orange *et al.* (2010) らも指摘しているように, 市販の漂白・消毒剤には次亜塩素酸ナトリウム以外の添加剤が含まれているものがあることも気になった. 実際によく使われている「キッチンハイター」(花王) には添加剤として界面活性剤 (アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム) と水酸化ナトリウム (アルカリ剤) が表示されている. 濃度が小さければ問題ないと思われるが, 水酸化ナトリウムはC液とは異なる呈色反応を示す可能性がある. 花王の「お客様相談」に問い合わせたが製品中の成分濃度は公開していないとのことで, この点ははっきりしない. 同じような製品で「ピューラックス」(オーヤラックス) という家庭用の殺菌消毒剤では次亜塩素酸ナトリウム以外の成分が表示されていない (表示がないから入っていないという保証はないが, 2節と3節の

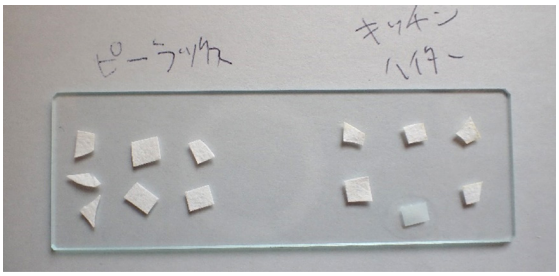

Fig. 19. マツゲゴケの地衣成分を浸みこませた濾紙に「キッチンハイター」(右の6枚) と「ピューラックス」(左の7枚) を付けた後の様子.

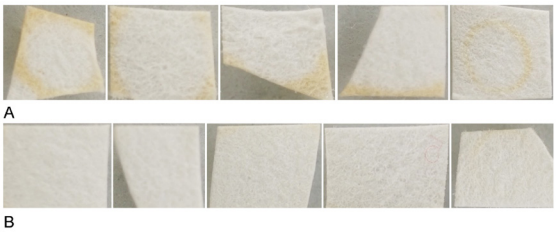

Fig. 20. マツゲゴケの地衣成分を浸みこませた濾紙へのC液の代用品による反応. A. キッチンハイター. B. ピューラックス.

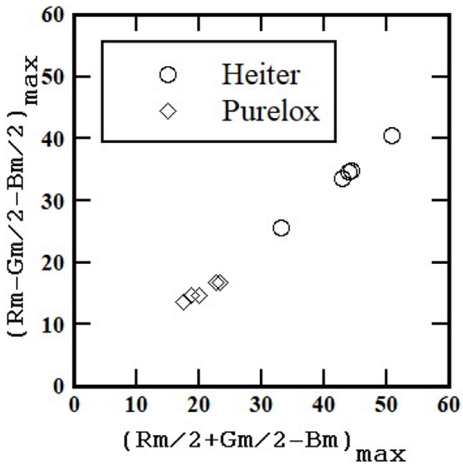

Fig. 21. マツゲゴケの地衣成分を浸みこませた濾紙に「キッチンハイター (Heiter)」を付けた5枚の写真の解析結果 (○) と「ピューラックス (Purelox)」を付けた5枚の写真の解析結果 (◇). 横軸は「黄色度」, 縦軸は「赤色度」の各写真での最大値.

実験ではC液として「ピューラックス」を使用している.）

そこで,「キッチンハイター」と「ピューラックス」とで呈色反応に違いがあるかどうか，マツゲゴケを使って試した．マツゲゴケは「K+ 黄 → 赤」（柏谷ほか 2020）で，水酸化ナトリウムに対してもK液（水酸化カリウム水溶液）と似たような呈色反応を示すのではないかと考えた．

まず，マツゲゴケの地衣体の小片にアセトンをかけて地衣成分を抽出して濾紙に浸みこませた．これを乾燥させた後, 小さく切り分けたものに「キッチンハイター」と「ピューラックス」を2倍程度に薄めたものを付けて観察した．

Fig. 19 に液を付けた後の全ての濾紙の写真を示す．また，各濾紙を拡大撮影してトリミングしたものを Fig. 20A（キッチンハイター）と Fig. 20B（ピューラックス）に示す．だだし, Fig. 20A では液が紙の外にはみ出すほど付けすぎたものを, Fig. 20B では歪な形のものを除いている．撮影時の光源はアイリスオーヤマ LED デスクライト 502 タイプ LDL-52K-W, カメラは OLYMPUS Tough TG-6 を使用した．その結果，C液の代用品であるキッチンハイターとピューラックスによるC反応では，キッチンハイターの方が黄色がかった色になっている部分が目立っていた (Fig. 20).

これらの差を数値化することを試みた．Fig. 20A と Fig. 20B の 10 枚のそれぞれの写真を縦 20 横 20 の 400 の小ブロックに分けて，各ブロックに含まれるピクセルの RGB の値の平均を ImageJ を使用して計算し（それぞれの平均値を Rm, Gm, Bm とする），以下のように「黄色度」と「赤色度」を定義した．

黄色度 = Rm/2+Gm/2-Bm

赤色度 = Rm-Gm/2-Bm/2

それぞれの写真の 400 の小ブロック中での最大の「黄色度」と「赤色度」を Fig. 21 に示す.

「黄色度」と「赤色度」の最大値はほぼ比例しており，色の濃さが異なるだけで色調はほぼ同じ（黄色～橙色）と考えられる．ただし,「キッチンハイター」の結果は「ピューラックス」に比べて明らかに大きな色の濃さを示している．この違いは製品に含まれる添加剤の違い（あるいは添加剤の濃度の違い）によるものと推察される．

Figs. 11, 12 の K 反応と比べれば,「キッチンハイター」の場合でも色の変化は小さく，添加剤が呈色反応の判定に深刻な影響を与えることはないかもしれない．しかし，変化が微妙な場合には試薬の純度について注意が必要だと思われる．

本稿の執筆に当たって，大村嘉人先生（国立科学博物館）と竹下俊治先生（広島大学）に有意義なアドバイスと御指導をいただいたことを感謝します.

引用文献

Orange, A., James, P.W. and White, F. J. 2010. Microchemical Method for the Identification of Lichens. British Lichen Society.

柏谷博之・大村嘉人・文光喜．2020．里山の地衣類ハンドブック．文一総合出版.

吉村庸．1974．原色地衣植物図鑑．保育社.

欧州ハーバリウムで守り伝えられる地衣類標本

宮澤研人 [1,*]

Legacy of Lichen Specimens Preserved and Passed on in European Herbaria

Kento MIYAZAWA

2023年4月24日から5月19日までの26日間, フィンランド，スウェーデン，スイス，オーストリアの4か国を巡り，6つのハーバリウムを訪問しました．ハーバリウムとは植物標本の意味もありますが，ここではそれらが所蔵されている「植物標本施設」のことを指しています．日本から遠く離れたヨーロッパのハーバリウムに行った理由の一つは，学名の基準であるタイプ標本を検討するためでした．現在，私は生葉上地衣類の分類学的研究に取り組んでいますが，タイプ標本の検討は種概念の確認など最終的な分類学的判断をする上で極めて重要なのです．もう一つの理由は，大学のカリキュラムの一環としてインターンシップを行うためでした．日頃，国立科学博物館でハーバリウムワークを行っている一方，外部のハーバリウムにはほとんど訪問したことがな

[1] 筑波大学理工情報生命学術院
[*]E-mail: miyazawa.kento.ss@alumni.tsukuba.ac.jp