

魚類の透明骨格標本作成法

吉 岡 英 二

An Improved Procedure for Clearing and Staining Fish Bone Specimens

Synopsis Two representative methods, clearing with 'Trypsin' and with 'KOH', for fish bone specimen were attempted. The 'Trypsin' method is preferred at fully equipped laboratories. Some improvements over the 'Trypsin' method are proposed. And, the specimens after the procedure are shown in the figures.

1. はじめに

脊椎動物を研究するにあたって、その骨の形態および位置関係は分類上きわめて重要な鍵となる。とりわけ、現生の脊椎動物〈約40,000種〉の中の半数ほど〈約18,000種〉(Forey, 1980; 内田, 1974)を占める硬骨魚綱の、環境への適応や系統・進化の過程を知る手がかりとして、その骨格の詳細を観察し記述することは、比較解剖学の分野における最も重要な研究手段であろう。

魚類でも特に小型のものや稚魚の骨格の観察には、Schulze (1897) によって鶏卵を用いて最初に手掛けられた「標本を透明化し硬骨だけを染色する方法」をもとに、より大形の脊椎動物にも応用できるように改変した方法が有効な手段として用いられている。それによって作られた標本は、見た目がきれいで、長期の保存が可能であり、操作も簡便であることなどから、実習課題としても適当なものとして紹介されている(澄川・藤田, 1984a, 1984b; 都築, 1992)。また、一般的な生物学の教程において示すべき教示用標本としても、フォルマリンなどで固定したままの標本(慎重に固定されたものでも、色彩は失われ形も損なわれていることが多い)よりも多くの情報を提供するものであることが期待できる。ここでは、魚類の透明骨格標本を作成するにあたって、これまでの一般的な処方を検討し、教示用標本の目的に応じた改変を行ったので、その処方を報告し標本写真を掲載する。

まず、標本作成法に限らず一般的な実験手順として望まれることとして、①より簡便な操作によること(特別な器具や薬品などを必要としないこと)、②より短時間にできあがること、③実験条件のわずかな違いが仕上がりに大きく影響しないこと、④なるべく安全な試薬だけで手順が完了すること、そして⑤必要な試薬・器具などが安価であること、などが挙げられる。また、きれいな透明骨格標本を作るにあたって特に心得るべき点として、⑥表皮および組織が本来持っている有色成分を十分に取り除くか脱色すること、⑦骨格だけを染め、骨格以外の組織に染料を沈着・残存させな

いこと、⑧無色になった組織の屈折率を、透徹に用いる溶媒（グリセリン）の屈折率にできる限り近づけること（無色と透明とは異なったものであることを心得た上で操作すること）、⑨骨格およびその接続を損なうほど激しい化学的処置を施さないこと、⑩長期の保存にも、色彩・形態とも損なわれないこと、などが挙げられる。多くの標本作成法（特に組織や細胞の観察を行う場合）の中には、一度か二度失敗した上で初めてそのコツが飲み込めるといったものが多く、それらが印刷された実験手順には記載されていないことがしばしばある。ここでは、そのようなことがなるべくないように、作成手順の背景にある原理を通じて、それぞれの処置がなぜ必要か、またその失敗がどのような結果になるかも加えて述べ、実際の操作の便に供したい。以上の点を踏まえて、まず従来の一般的な処方に沿って実際に標本を作成し、その結果を検討する。

2. 従来の一般的な処方

透明骨格標本を作成する方法としてこれまで多くの方法が考案されてきたが、原理的には以下に挙げた(1)と(2)の二つの方法に分けることができる。いずれの方法も、硬骨を染色する染料としては、アルカリ溶液中でカルシウムに特異的に結合して発色する‘アリザリンレッドS’を用いているが、組織を透明化する方法として(1)は強アルカリ（通常 KOH 水溶液）を用い、(2)ではタンパク分解酵素を用いている。また、(2)では軟骨を対比的に染色するため‘アルシャンブルー’による染色を施すのが一般的である。いずれの方法も、透明化した標本は組織と屈折率がほぼ等しい純グリセリン中で保存し観察する。

(1) アルカリで透明化する方法

原理としては、水酸化カリウム水溶液（Jensh and Brent (1966) の処方以降、通例 4% の濃度で処理されている）で魚体の肉質部を溶かし、骨格の硬骨だけをアリザリンレッドSで染色して、100%グリセリン中で透明化し保存する方法である。Jensh and Brent (1966)、澄川・藤田 (1984b)、都築 (1992) などに示された処方によると、下の①から⑦までの液を準備し、標本をその中に順次移し替えていくだけの簡単な操作によってできる。

前処理：ホルマリンなどにより固定した後、2～3日水洗し固定液を除去する。

- | | |
|-----------------------------|--------------------|
| ① 4% KOH 水溶液 | (標本の脊椎骨が透けて見えるまで) |
| ② 4% KOH 水溶液：染色原液* (16：3) | 2日 (脊椎骨が赤く染まるまで) |
| ③ 4% KOH 水溶液 | 1日 (不必要な染色液が抜けるまで) |
| ④ 4% KOH 水溶液：グリセリン (3：1) | 2～3日 (容器の底に沈むまで) |
| ⑤ 4% KOH 水溶液：グリセリン (1：1) | 2～3日 (容器の底に沈むまで) |
| ⑥ 4% KOH 水溶液：グリセリン (1：3) | 2～3日 (容器の底に沈むまで) |
| ⑦ 純グリセリン＋チモール粉末 (防腐剤) = 保存液 | |

* 1% 抱水クロラール60 ml + 純グリセリン10 ml + 氷酢酸 5 ml + アリザリンレッド S
50 mg

実際にこの処方によって標本を作った結果、この方法の欠点として以下の点が挙げられる。澄川・藤田 (1984b), 都築 (1992) では、1液に長期間入れ過ぎると骨格がばらばらに分解してしまうと述べられているが、ホルマリンで固定し70%アルコールで固定した尾叉長35 mmのキンギョを1液に7日間入れても、そのような兆候はまったくなかった。しかし、処方する液がいずれも4% KOH水溶液という比較的高濃度のアルカリ水溶液を含むので、取り扱いにかなりの注意を要する。また、筋肉組織中の色素（おそらく‘ちあい’の部分などに含まれるミオグロビン様タンパクなど）の色が完全には抜けず、筋肉層がやや不透明のまま残される。この色は1液の処理時間を14日に延ばしても同じ程度に残っており、この方法により完全に透明にすることは困難なように思われる。染色後の③から⑦までKOH水溶液から純グリセリンへと徐々に濃度を替えて移し、色素を抜くようになっているが、この過程で筋肉などに含まれるアリザリンレッドSを完全に取り除くには各々4~5日以上要し、かなり長い日数がかかる。また、骨などにもそのまま強アルカリが残ることになり、それが長期的に標本に与える化学的な影響も気がかりである。

この方法は、簡便で用意する薬品も一般的なものであるので、多くの文献で紹介されているが、その手技についての改変はあまり行われていない。これは、おそらくこの方法の完成度が一定水準に達しており、同じ原理での改良の余地はあまり残されていないためではないかと考えられる。

(2) タンパク質分解酵素で透明化する方法

原理としては、軟骨をアルシャンブルーで染め、タンパク質の分解酵素であるトリプシンで肉質部を分解・透明化した後、硬骨をアリザリンレッドSで染色して、100%グリセリン中で透明化し保存する方法である。その一般的処方は、Dingerkus and Uhler (1977), 近江 (1986), 澄川・藤田 (1984b) などに示されており、以下のようなものである。

前処理：ホルマリンなどにより固定した後、2~3日水洗し固定液を除去する。

- | | |
|---------------|--------------------------|
| ① 軟骨染色液* | 1~2日 (尾部骨格の末端部の染色を目安にする) |
| ② 95%エタノール水溶液 | 4~6時間以上 (途中1回交換) |
| ③ 75%エタノール水溶液 | 2~3時間 |
| ④ 40%エタノール水溶液 | 2~3時間 |
| ⑤ 15%エタノール水溶液 | 2~3時間 |
| ⑥ 純水 | 1日 |
| ⑦ トリプシン処理液** | 小型の標本で2~3日 (大形の標本では数日) |
| ⑧ 硬骨染色液*** | 1日 |
| ⑨ 0.5% KOH水溶液 | 1~2日 |

⑩ 0.5% KOH 水溶液：グリセリン（3：1） 1～2日

⑪ 0.5% KOH 水溶液：グリセリン（1：1） 1～2日

⑫ 0.5% KOH 水溶液：グリセリン（1：3） 1～2日

⑬ 純グリセリン＋チモール粉末（防腐剤）＝保存液

* 95%エタノール80 ml＋氷酢酸20 ml＋アルシヤンプルー8G X10 mg

** ホウ酸ナトリウム飽和水溶液30 ml＋純水70 ml＋トリプシン（DIFCO 1：250）1 mg

*** 0.5% KOH 水溶液100 ml＋アリザリンレッド S 20 mg

この処方により実際に標本を作成した結果、(1)の方法よりはるかに透明な標本が完成したが、以下のような教示用標本としては望ましくない点があった。トリプシン処理によって、KOH 処理よりも組織を透明化することはできるが、同時に組織が軟弱になり、以降の処理の過程で標本が損なわれることがしばしばあった。また、KOH 処理では失われなかった鰭条の間を支える鰭膜が完全に失われ、鰭全体の安定した形態は保持されにくい。これらは Howe (1993a)、澄川・藤田 (1984a) などに示された標本写真にも見られる特徴で、トリプシン処理では避け難い欠点ではないかと考えられる。また、強酸性の軟骨染色液はリン酸カルシウムを溶かして、鰭条の先端部などは軟弱になりアリザリンレッドで染色されにくくなっている。加えて、骨全体の染色性もかなり損なわれている。さらに、尾叉長35 mm 程度のキンギョで標本を作成した結果、同じ程度の大きさの標本でも(1)の方法では見られなかった2～3 mm 程度の乳白色の球形の構造が腹腔内に見られた。これは、おそらく処理の過程で溶出しなかった腹腔内の脂肪分が集まったものと思われ、標本全体の透明性を損なうものであった。

3. 教示用標本に際しての改変

以上の(1)、(2)の方法を比較すると、(1)の方が処置に要する操作が簡便であり、標本が処理終了まで適度な硬さを持つので終始取り扱いやすいという利点がある。(1)では(2)の標本のように軟骨を対比的に示すことはできないが、それほど専門性の高くない講義・演習内容では軟骨まで提示する必要のないものがほとんどであろうから、処方の手軽さから考えれば(1)の方法を採用するのが適当であろうと考えられるかもしれない。しかし(2)の方法では、軟骨組織が染色できるばかりではなく、(1)の方法によるよりはるかに透明で美しい標本を作ることができる。また、(2)の方法による標本は、比較的大きなもの (>50 mm) でも透明感の高い標本が作れること、同じ程度の大きさの標本の場合(1)の方法による標本よりも細部が鮮明に観察できることなど、教育効果の上からも高く評価できる点が多い。(2)では組織が著しく軟弱になり取り扱いに注意を要するという欠点があるものの、実際に(1)・(2)の双方の処理を試みて総合的に判断すると、標本作成に充分な設備のもとで相応の労力を費やすことができる教育施設等で作成すべき標本としては(2)の方法を採用すべきであろうと考える。しかし、上に示した(2)の方法で若干の改良すべき点が見られたので、その理由を含めて以下に

改変した全体の処方を示す。

(1) 改変の主な点

Taylor and Van Dyke (1985) は上に述べた処方の欠点を挙げて、いくつかの改変を提案している。まず、固定液が酸性になると、骨の成分であるリン酸カルシウムが溶出し骨の染色性を損なうので、固定には中性フォルマリンを用いることを推奨している。また、固定後水洗すると軟骨の成分であるコンドロイチン硫酸が溶出するので、固定後直ちに100%エチル・アルコールに入れて脱水することを勧めている。以上の点に加えて、不透明な脂肪分の残留を防ぐ操作と、リン酸カルシウムの溶出を最小限にとどめるためのいくつかの注意点を加えて、(2)の処方をもとに以下の a. ~ f. に挙げた処方の改変を提案したい。

- a. 固定には中性フォルマリンを用いる。プアン液などの酸性の固定液は用いない。また、固定液を酸性にするような操作・処置を避けるように心がける。
- b. 固定後の水洗は行わない。通常の標本の処理法としては、フォルマリンを抜くために一定時間の水洗を行うことが通例とされているが、ここでの標本作成に際しては、フォルマリンの残留がその後の標本の仕上がりに大きく影響することはないと考えられる。そのため、標本から軟骨成分の流出を極力避けるために、水洗の操作を行わず、直ちに保存液(70%エタノール)に投入し脱水・脱脂の操作へ進む。
- c. アルコールによる脱水の過程で、筋肉組織や結合組織の硬化や収縮は避け難いが、それらの組織はその後透明化するので、硬化や収縮を恐れずに脱水用のアルコール(100%)に投入する。
- d. 脱水後キシレンに投入して脱脂の作業をおこなう。多くの処方では、脂肪分の少ない標本ではこの作業は省略可能とされているが、標本の大小・脂肪分の多寡によらず必ず脱脂の操作を行う。この処理によって、以降の薬品の浸透もよくなるものと思われる。
- e. アルシアンブルーによる軟骨染色は高濃度の酢酸の存在下で行われる。しかし、その処理の際に強い酸性液のため硬骨の成分であるリン酸カルシウムが溶出してしまう。このジレンマを少しでも解消するため、アルシアンブルー染色液から水分を極力少なくする。(染料の基剤に100%エタノールと氷酢酸だけを用いる。)また、染色はできる限り低温下で行い、温度依存的と考えられる骨成分の溶出を抑制する。
- f. 硬骨染色の後水洗を行い、透明化した組織から不必要な KOH を除去する。この操作によってアルカリによる組織の損傷を防ぐことができるが、過剰に行くと骨から染料が抜けてしまう場合があるので注意を要する。また、純グリセリンへの移行に際しても KOH 水溶液を用いず、単純なグリセリン水溶液を用いる。

(2) 改変した処方

前処理：10%中性ホルマリン*で固定 2～10日（充分固定されるまで）
 ：70%エタノールに保存

- ① 100%エタノール — I 2～3時間
- ② 100%エタノール — II 1日
- ③ キシレン — I 2～3時間
- ④ キシレン — II 1日
- ⑤ 100%エタノール — III 2～3時間
- ⑥ アルシアンブルー染色液** 1～2日（尾部骨格の末端部の染色を目安にする）

骨の成分の溶出を最小限にするため冷蔵庫中で保管する。

- ⑦ 70%エタノール 2時間（不必要な染色液が抜けるまで）
- ⑧ 水洗 2～3時間
- ⑨ トリプシン処理 数日～数週

トリプシン処理液***に標本を浸し、2～3日毎あるいは液が青くなったときに適宜処理液を交換する。骨・軟骨がきれいに見えるようになり、組織から青い色が抜けるまで続ける。半分から7割程度の組織が透明になった段階で、次の操作に移る。

- ⑩ 水洗 1時間
- ⑪ アリザリンレッド染色液**** 1～2日（硬骨が完全に染色されるまで）
- ⑫ 水洗 2～3時間（過剰にすると骨から染料が抜ける）
- ⑬ 50%グリセリン 1～2日
- ⑭ 75%グリセリン 1～2日
- ⑮ 純グリセリン 1～2日
- ⑯ 純グリセリン+チモール粉末（防腐剤）=保存液

* フォルマリンの主成分であるホルムアルデヒドは、空気中の酸素によって酸化され蟻酸となる。生成した蟻酸を除去するため、市販ホルマリンに炭酸カルシウムを主成分とする石灰・大理石（石灰石）・珊瑚砂などを投入する。炭酸カルシウムは酸性下で溶解し、蟻酸はそのカルシウムイオンと結合して蟻酸カルシウムとなって沈澱するのでホルマリンは中性化する。その上清を固定液の原液（中性ホルマリン）として用いる。

** 100%エタノール80 ml+氷酢酸20 ml+アルシアン・ブルー-8G X10 mg

*** ホウ酸ナトリウム飽和水溶液30 ml+純水70 ml+トリプシン（DIFCO 1:250）約1 mg

**** 0.5% KOH 水溶液100 ml+アリザリン・レッド S 約20 mg

4. おわりに

2.-(1)で挙げた‘アルカリで透明化する方法’に従って作成した標本を図1-A.に、上記の改変した処方に従って作成した標本を図1-B.に示す。いずれの標本も、生きてまま中性ホルマリンで固定し、水洗せずに70%エタノールで保存したキンギョの標本を用いた。本報で改変した方法では脂肪の球も現れず、きわめて透明性の高い標本が作成できた。しかし、鰭膜は完全に失われているので、鰭全体の形を安定に維持するのは難しい。図1-C.に、本学3号館の中庭で採集した死亡直後と思われるメジロの標本を示す。内臓と羽毛・表皮は前処理の段階で取り除き、その後本報で改変した方法に沿って処理を行った。今後ここで述べた方法によって、脊椎動物の各系統群（魚類から哺乳類まで）の骨の比較形態を示す標本を、順次整備していきたい。

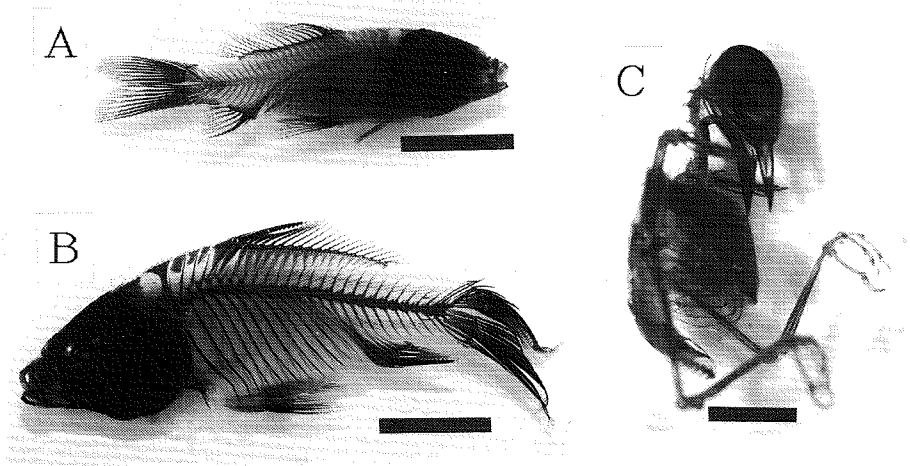


図1 A. アルカリで透明化したキンギョの骨格標本。(scale bar=5 mm)
B. トリプシンで透明化したキンギョの骨格標本。(scale bar=10 mm)
C. トリプシンで透明化したメジロの骨格標本。操作の途中で、尾椎の先端のいくつかの骨が失われている。(scale bar=10 mm)

参 考 文 献

- Dingerkus, G. and L. D. Uhler (1977) "Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage." *Stain Technology*, 52(4) : 229-232.
- Forey, P. L. (1980) "Birds, mammals and other cratiates" p.190-262. in "The Complete Encyclopedia of the Animal World." ed. by D. M. Burn (Octopus Books, London) pp. 400.
- Howe, J. C. (1993a) "Original descriptions." *Freshwat. and Mar. Aquarium Mag.*, 16(11) : 66.
- Howe, J. C. (1993b) "Original descriptions." *Freshwat. and Mar. Aquarium Mag.*, 16(12) : 142.

魚類の透明骨格標本作成法

- Jensh, R. P. and R. L. Brent (1966) "Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S staining of fatal rat bone." *Stain Technology*, 41: 179-183.
- 近江 卓 (1986) "標本作成" p. 416-421. in "決定版生物大図鑑魚類" 阿部宗明編 (世界文化社・東京) pp. 432.
- Schulze, O. (1897) "Über Herstellung und Konservierung durchsichtiger Embryonen zum Studium der Skelettbildung." *Anat. Anz.*, 13: 3-5.
- 澄川冬彦・藤田 清 (1984a) "魚類の透明骨格標本" 遺伝, 38(9): 口絵 (ii-iii).
- 澄川冬彦・藤田 清 (1984b) "魚類の分化と適応—透明骨格標本の教材化(1)—." 遺伝, 38(9): 67-69.
- 澄川冬彦・藤田 清 (1984c) "魚類の分化と適応—透明骨格標本の教材化(2)—." 遺伝, 38(10): 94-101.
- Taylor, W. R. (1967) "An enzyme method of clearing and staining small vertebrates." *Proceedings of the United States National Museum*, 122(3596): 1-17.
- Taylor, W. R. and G. C. Van Dyke (1985) "Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study." *Cybium*, 9(2): 107-119.
- 都築 功 (1992) "脊椎動物の骨格を比較する—生物 I A のための実験・観察シリーズ(4)—" 遺伝, 46(4): 87-92.
- 内田 亨 (1974) "増補 動物系統分類の基礎" (図鑑の北隆館・東京) pp. 334.
- Wassersug, R. J. (1976) "A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates." *Stain Technology*, 51: 131-134.