

# 透明骨格標本作製

動物班

## 《実施日》

2012/10/30～2012/11/23

## 《要旨》

本実験では生物を目に見える形で保存することにより、生体の構造理解を深める。又、作成の際に利用する薬品の使用法やその原理を理解することも目的とした。

実験方法は軟骨と硬骨をそれぞれ染色する、「二重染色法」を行った。概要は

- (1) 標本のホルマリン固定、及びエタノールでの脱水。
- (2) フタロシアニンで軟骨の染色後に水酸化カリウム水溶液に浸して組織の透明化。
- (3) アリザリンレッド S による硬骨の染色とグリセリン置換での保存。

である。

今回の実験では組織の透明化と硬骨の染色には成功したが、軟骨の染色には失敗した。軟骨染色における染色液の濃度、染色時間の調整という課題が残った。又、標本の学術的な価値を高めるためにも今後、更に実験の技術向上を図っていく必要がある。

## 《諸言》

昆虫と同じく動物を標本の形で保存するのは難しい。体長が大きい、腐敗しやすいなど様々な理由がある。比較的小型の爬虫類などはホルマリンやエタノールに浸して保存する液浸標本のスタイルをとる事が多い。大型の爬虫類、哺乳類に対しては博物館で見受けられるような骨格を人の手で構成し直すような形をとる。

ここでは、今年度行った骨格標本作成の中の1つ、二重染色法による透明骨格標本について触れる。

透明骨格標本は文字通り、標本の組織を薬品に長時間浸すことで分解・透明化して、骨格が観察できるようにするものである。二重染色は硬骨を赤に、軟骨を青に染色してより観察を容易にする。透明骨格標本は主に小型の生物、中でも魚類に対して行われることが多い。

長所は通常の骨格標本の作製の際に起こる、骨の欠落や破損がないこと、骨格の内部構造が原型のまま立体的に観察できる事、染色により容易に硬骨、軟骨を見分けられる、などがあげられる。

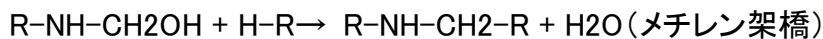
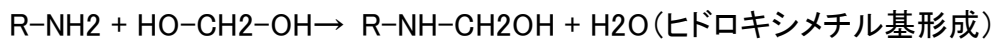
短所は製作に時間がかかる、酵素液や染色剤などの薬品が高価であることだろう。実験者が何を標本にしたいかによって最適な作製方法を選択する必要がある。

### <原理>

#### ・ホルマリン（ホルムアルデヒド CH<sub>2</sub>O）

透明化をする前に初めに組織を固定して腐敗を防ぐ必要がある。そこに使用されるのがホルマリンである。ホルマリンはアミノ酸のアミノ基と反応し、ヒドロキシメチル基の形成、アルギニンやアスパラギンをメチレン架橋する。

### 反応式



#### ・水酸化カリウム（KOH）

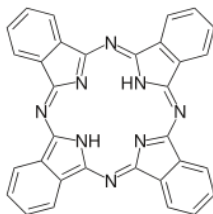
組織のタンパク質分解のために用いられる。ここでは主に筋組織や皮膚組織が分解される。本来はタンパク質分解酵素であるトリプシンを使用するが、非常に高価なため、水酸化カリウムで代用した。他にも代用品として1%に調整したナトリウムメトキシドを使うことができる。水酸化カリウムよりもやや高価だが、それを上回る速さで透明化できる。

水酸化カリウムは強塩基性を有するのでタンパク質を変性、分解する。長時間浸すことでトリプシンと同等の効果を得られる。タンパク質が分解された結果、ホルマリンによって架橋された一部のタンパク質だけが残り、光を透過して透明に見える。

#### ・フタロシアニン（C<sub>32</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>）

本実験で軟骨染色に使用した。青に染色される。通常はフタロシアニンを修飾したより染色性の高いアルシャンブルーを使うがトリプシンと同様の理由で今回はフタロシアニンを使用した。

フタロシアニンは耐光性が高く、インクなどの塗料の顔料として使われることが多い。

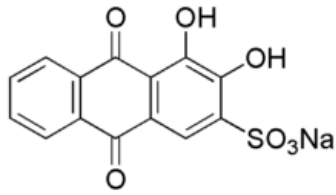


(Wikipedia より引用)

構造は「copper phthalocyanine 構造」といい、ヘモグロбинのような酸化還元反応を有するシクロムによく似ている。

金属原子が上図の中心部分に入り込み、水素結合、配位結合することで錯体を形成し、安定化、緑又は青に呈色する。軟骨中の硫酸コンドロイチンと結合して発色する。

- ・アリザリンレッド S (1,2-ジヒドロキシアンドラキノン C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>)



(Wikipedia より引用)

硬骨の染色に用いる。金属イオンと結合し赤色に呈色される。硬骨中のカルシウム又は、リン酸カルシウムと結合し沈着するので赤く見える。金属イオンと容易に反応してしまうので、標本が赤く染色されているところが必ずしも硬骨というわけではない。

#### 《標本》

- ・金魚 (稚魚) *Carassius auratus auratus*
- ・ハツカネズミ *Mus musculus*
- ・ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis*
- ・スッポン *Pelodiscus sinensis*
- ・ウキガエル *Occidozyga lima*

#### 《試薬》

- ・エタノール (99.5%) 和光純薬株式会社 以下同上
- ・10%ホルマリン
- ・酢酸 (99.7%)
- ・フタロシアニン
- ・水酸化カリウム
- ・蒸留水
- ・アリザリンレッド S
- ・グリセリン (90%以上)
- ・チモール
- ・抱水クロール

#### 《方法》

##### <組織の固定>

1. 標本を水洗いし、粘液を洗い流した後、10%ホルマリンに5日間浸した。(ホルマリンは有毒なので実験者は必ずマスクと手袋を着用し、手早く作業を行う。又、実験室内をよく喚起すること。)

<軟骨染色と脱色>

2. 水を交換しながら1日間、水につけておいた。標本の表皮、内臓を除去し、軟骨染色液に1日浸した。染色後に95%エタノールに3時間、50%エタノールに半日浸した後、最後に水に数時間さらした。

軟骨染色液

95%エタノール	162ml
酢酸	50ml
フタロシアニン	25mg

---

<組織の透明化>

3. 水酸化カリウムを3%水酸化カリウム水溶液に調整し、30℃に設定したインキュベーターに入れ、1週間反応させた。

<硬骨染色>

4. 2%に調整した水酸化カリウム水溶液に対して硬骨染色液を青紫になるまで加え標本を浸し、1日置いておいた。（\*染色液調整の際、水道水を使うと重金属と反応してしまい染色性が悪くなるので、必ず蒸留水を使う。）

硬骨染色液

1%抱水クロール水溶液	120ml
グリセリン	20ml
酢酸	10ml
アリザリンレッドS	100mg

---

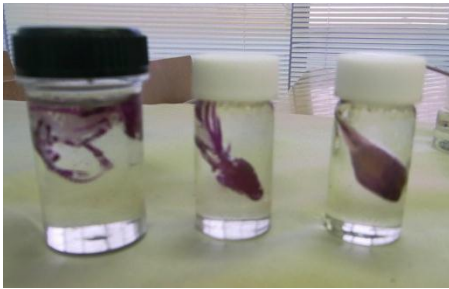
<グリセリン置換と保存>

5. 硬骨が染色されていることを確認したら、0.5%に調整した水酸化カリウム水溶液とグリセリンを用意し、水酸化カリウム水溶液：グリセリンを3：1の割合で混合してそこに標本を2日間浸した。

6. グリセリンの比率を上げて1:1の混合液を作り、そこに標本を2日間浸した。

7. 水酸化カリウム水溶液:グリセリンの比率を1:3にした混合液に2日間浸した後、最後は純粋なグリセリンにいれ、チモールを加えて保存した。(チモールはグリセリン100mlに対して25mg加えた。)

#### 《結果》



上の写真は左からウキガエルとスッポンである。硬骨の部分が赤く染色され、その周りには透明化された皮膚、筋組織が観察できる。ウキガエルはヒトの大腿骨にあたる部分に太く筋組織が観察されることから、下肢が他の生物に比べて発達していることがわかる。これは骨盤にたいして大腿骨の可変範囲が大きいことから同様のことがわかる。カメやスッポンなどの甲羅を持つ生物は外骨格とよく間違えられるが、甲羅が透明化されて内部が半透明になっていることから内骨格だと分かる。スッポンは甲羅に覆われているため、水酸化カリウム水溶液が内部まで浸透せず、茶色く濁ってしまった。又、同様の理由で内臓の除去ができなかったため、写真中央左側に内臓が残っているのが観察できる。



上の3つの写真は左からハツカネズミ、金魚、ミドリフグである。ハツカネズミは厚い皮下脂肪に覆われているため、実験手順2で軟骨染色前に脂肪を取り除く必要があった。完全に除去できなかった部分が結果として白く残ってしまった。反応液が浸透しにくく、一番透明化に時間がかかった。

金魚は透明化後、組織の液化が進み、原型を留めるのが困難だった。又、骨格そのものが柔らかいので保存する際に折れ曲がってしまい、見栄えは悪い。

ミドリフグは体全体が白く濁ってしまい透明骨格標本として失敗に終わった。しかし、表皮に点在する棘が赤く染色されていることから、棘はカルシウムを含み、骨と類似した組成であるという発見があった。

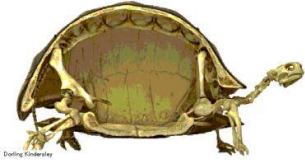
全体の結果として、標本の腐敗防止及び組織の固定化、硬骨の染色には全標本が成功したが、関節部分などの軟骨が青に呈色されていることが確認できなかったため、軟骨染色はどの標本も失敗した。透明化の出来は五分五分といったところである。

#### 《考察》

ここでは標本の中でも興味深い結果だったスッポンとミドリフグについて初めに触れる。スッポンは結果でも述べたように内骨格の生物である。甲羅の直下に背骨が通っているのが写真でも分かる。その背骨から肋骨のようなものが左右に8対伸びている。



(<http://matome.naver.jp> より引用) 左図のようにこの骨格系はカメ目に広く共通し、甲羅の強度を増すためのものと思われる。リクガメを例に甲羅の断面図を見ると、下図のように中は空洞になっている。通常、甲羅は角質層と皮骨から成るが、



(<http://www.geocities.co.jp>より引用) それだけでは外部からの圧力や衝撃に耐えることはできない。身を守るためにも硬骨部を増やし、種の保存を計ってきたのだらう。

実際の標本を裏側から観察すると、腹部全体が骨に覆われて内部をみることはできない。このことから同じ事が推測される。

続いてミドリフグの透明化が失敗した原因だが、体内に多量の脂肪が含まれていたためだと思われる。水酸化カリウムはタンパク質の立体構造を切断するが、脂肪の切断はできない。ハツカネズミでも同様のことがいえるが、哺乳類の脂肪は飽和脂肪酸なのに対して魚類は不飽和脂肪酸である。全体が不透明になってしまったのは不飽和脂肪酸により試薬の浸透が妨げられたためだろう。又、金魚やウキガエルの標本は眼球まで透明化されたが、ミドリフグは元のままだった。これはフグのもつ特異な形質が原因である。普通、硬骨魚は瞼を持たない。しかし、フグは硬骨魚にも関わらず油瞼と呼ばれる瞼を持っている。それがなぜかは明らかではないが、瞼が油膜で覆われていることが透明化できなかった要因であろう。

結果からも分かるとおり、今回の実験では軟骨染色は失敗してしまった。ほとんどの場合、軟骨染色はアルシャンブルーを使うのだが、より安価にするためにフタロシアニオンを使用した。軟骨染色液を作る際に、アルシャンブルーを使用した場合の分量とほとんど変えずに調整してしまったのが主な失敗原因だろう。又、フタロシアニオンは思いのほか、溶解度が低く、タッパーの下に沈殿してしまっていた。フタロシアニオンの溶解度をあげるためにも、最適な酢酸とエタノールの混合割合を模索していかなくてはならない。

他に考えられることは染色時間が短かった、染色後の脱色時間が長く、色素が抜けてしまったことがあげられる。

染色直後はわずかに青く呈色されているのが確認できたため、原因はおそらく後者の方だろう。本来なら脱色作業は95%、50%、20%エタノールに各2~3時間ずつ浸けて行うが、今回は都合により50%エタノールに半日間も浸してしまっていたため、色素が抜けてしまったのだらう。

水酸化カリウム水溶液による透明化は温度を30°Cに保った場合、3日~7日間反応させるのが最適である。7日間以上反応させると組織の分解が進行しすぎて、保存の際に形が崩れてしまう。最悪の場合、組織がすべて分解されてしまい、骨格のみが残ってしまう可能性がある。新たな可能性としては、透明化の反応は3日程度に抑えておき、硬骨染色の脱色作業およびグリセリン置換の期間・段階を増やして仕上げる方法がある。

この2つの作業では0.5%の水酸化カリウム水溶液を使うので、ここで更に透明化を進める。組織分解が行われすぎず、保存の過程もより丁寧になるので手間はかかるが、学術的な標本としての価値は高まるだろう。

標本の保存は最終的にグリセリンに浸す形をとったが、樹脂標本のようにポリエステル樹脂でコーティングしてしまうのも1つの方法である。

#### 《終わりに》

本年度の動物班の活動は、生明祭展示でも分かるとおりに、標本作成が活発であった。主に骨格標本・乾燥標本・液浸標本・樹脂標本・透明骨格標本の5つの手法である。昨年度は骨格標本のみだったので、この活動の活発化は喜ばしいことであると思う。

次年度へ展望として

- (1) 学術的なレベルの標本が作製できるような技術向上。
- (2) 実験方法の独自性の模索。
- (3) 遠征や合宿などのフィールドワークを通して採取した生物を標本として保存し、まとめる。
- (4) 各標本作成方法の長所、短所を理解し最適な方法を用いて作成し、結果を比較検討して学園祭などで発表する。

以上の4つの目標を達成していきたいと思う。

#### 《参考》

- ・新世界 『透明骨格標本』

<http://www.shinsekai-th.com/photo.php>

- ・東京海洋大学 水酸資料館

[http://www.s.kaiyodai.ac.jp/museum/public\\_html/mainpage.html](http://www.s.kaiyodai.ac.jp/museum/public_html/mainpage.html)

- ・二重染色透明骨格標本作製方法

[http://research.kahaku.go.jp/zoology/uodas/collection/how\\_to\\_make/sensyoku/2.html](http://research.kahaku.go.jp/zoology/uodas/collection/how_to_make/sensyoku/2.html)

- ・図解 アリエナイ理科ノ実験室 薬理凶室 監修

- ・組織の固定方法について

[http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~hassei/sagata/lab\\_only/protocols/fix.html](http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~hassei/sagata/lab_only/protocols/fix.html)