

身近な動物個体を用いた透明骨格標本の作製

表 潤一*・斉藤千映美**

Preparation of Cleared Skeletal Specimen using Familiar Animal Samples

Junichi OMOTE* and Chiemi SAITO**

要旨：飼育動物および宮城県内に生息する動物を用いて、硬骨と軟骨を二色に染め分ける二重染色法で透明骨格標本を作製し、どのような種が透明骨格標本の作製に適しているか検討を行った。脱脂の工程を含まないで作製する場合、脂肪の少ない種を用いることでより簡便な方法で透明骨格標本を作製できると考えられた。

キーワード：透明骨格標本, 二重染色, 理科教材

1. はじめに

硬骨と軟骨のみを染色しその他の組織を透明にした動物の標本は透明骨格標本と呼ばれている。透明骨格標本は、作製の過程で骨格をばらばらにすることがないため、生存時と同じ位置関係のまま観察が可能であるという特徴を持ち、解剖学や分類学、発生学など様々な分野の研究で活用されてきた。例えば河村・細谷 (1991) は、透明骨格標本を、水産学研究において骨格異常や脊椎骨数の地理的変異に関する知見を得る手段となることを述べている。

近年、透明骨格標本はマスメディアで取り上げられ、一般の人々にも広く知られるようになった。2009年には様々な動物で作製した透明骨格標本の写真を掲載した書籍が出版され、また瓶詰めされた透明骨格標本が市販されている。

2014年現在、中学校の理科の教科書には「動物のなかまと生物の進化」という単元で様々な種で作製された透明骨格標本の写真が掲載されている (塚田ほか 2011)。硬骨と軟骨のみが染色され、他の組織が透明になっているという特性から、生徒の興味関心を引き出すきっかけとして利用されているのであろう。大学の学生実験の教材として活用されている例もある (畑中 2012, 2013)。堀江 (2014) はヘビとネズミの透

明骨格標本を用いることで食物連鎖の関係、モグラとヒミズの透明骨格標本を用いることで生活様式や採食方法による体の構造の違いを学習できると考えている。

一方、標本そのものを学習に活用するだけでなく、標本の作製に教育活動として取り組む事例もある (熊本県立御船高等学校生物部 <http://sh.higo.ed.jp/mifunesh/bukatsudo/biology/tomei/>, 2015年1月26日)。辻 (1995) は、学校の授業に取り入れるには時間が掛かりすぎるため難しいが、クラブ活動や課題研究としてならば教師の援助のもとに作製することが十分に可能であると述べている。

本稿で用いた硬骨と軟骨を染め分ける二重染色法の歴史は古い。Dawson (1926) は動物を透明化した後アリザリンレッド S を用いて硬骨を染色する方法を開発し、その後 Williams (1941) によって軟骨染色にトルイジンブルーを用いる方法が開発された。更にその後、元々トルイジンブルーを用いていた軟骨染色は例えば Ojeda ら (1970) によってアルシアンブルーを用いる方法へと変更された。また、水酸化カリウムで行われていた透明化処理は消化酵素であるトリプシンを用いる方法へと変更された (e.g. Dingerkus et al. 1977)。標本によっては標本の全体もしくは一部が白濁し、透明度を損なうことから河村ら (1991) によ

* 宮城教育大学自然フィールドワーク研究会 YAMOI, ** 宮城教育大学環境教育実践研究センター

てキシレンを用いた脱脂の方法が開発され、より透明度の高い標本の作製が可能となった。硬骨染色に用いられるアリザリンレッド S は、組織内のカルシウムと特異的に結合し難溶性の塩を生成する性質を持つ (Puchtler et al. 1968)。軟骨染色に用いられるアルシアンブルーは生体内に存在するヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの酸性ムコ物質を検出するもので、アルシアンブルー色素が酸性溶媒下で酸性ムコ物質のカルボキシル基や硫酸基と特異的に結合することで青色を呈する (渡辺 2001)。

身近なところで入手可能な試料を利用した透明骨格標本の作製の例としては、干物を利用した透明骨格標本の作製がある (小西ら 2010)。本研究では学校現場や一般市民でも入手しやすいような試料を用いて、どのような種が透明骨格標本の作製に適しているか検討することとした。トリプシンを用いた透明化処理は生物由来の消化酵素を用いることから、溶液を最適温度に保つ必要がある。インキュベーター等の設備を用いて温度の調節を行う必要があり、設備の都合上、学校現場でこの方法を用いるのは難しいかもしれない。また、トリプシンは水酸化カリウムに比べて非常に高価であるため入手しにくい。このため、透明化処理はトリプシンではなく、常温下で透明化処理を行うことができる安価な水酸化カリウムを用いて行うものとした。より簡便に透明骨格標本の作製を行うという観点から、脱脂の工程を省略し、脱脂の処理を行わなくても作製可能な標本の作製法について検討することとした。

2. 標本の資料源と採集方法

- ①タナゴ類・オイカワ：河川に水溶性のエサを入れたモンドリを仕掛け、30分後に回収した。採集された生物のうち、外来生物であるタイリクバラタナゴを活用して標本とした。マタナゴやオイカワは採集の過程で死亡した個体を標本とした。学校現場等においても、児童生徒が近所で飼育していた、もしくは採集してきた魚の死体を標本として活用することも十分考えられる。
- ②ナマズ・ウシガエル：伊豆沼で捕獲され、現地で外来種として駆除されたものを標本として活用した。
- ③ジムグリ：本学周辺において採集されたジムグリの

死体を利用して標本とした。

- ④タツノオトシゴ：クラゲ採集 (出口・伊藤 2005) の際に採集されたタツノオトシゴの死亡個体を標本用として譲り受けた。
- ⑤アジ・ジンドウイカ (通称：ヒイカ)：近隣の食料品店等で市販されているアジとジンドウイカの標本化を行った。アジは全長 10cm 程度、ジンドウイカは 7 cm 程度の標本保存用の瓶として使用しているスクリー管に封入可能な大きさのものを選んだ。
- ⑥ウコッケイ・ウサギ：研究用に飼育されていたものの内、発生段階や出生直後に死亡したものを標本として活用した。

作製に使用した動物の種名と個体数、採集地を表 1 に示す。

表 1. 作製に使用した標本の種名と入手経路

分類	和名 (学名)	数	入手経路
魚類	タイリクバラタナゴ (<i>Rhodeus ocellatus ocellatus</i>)	50	宮城県内の河川で採集
魚類	マタナゴ (<i>Acheilognathus melanogaster</i>)	3	宮城県内の河川で採集
魚類	オイカワ (<i>Opsariichthys platypus</i>)	5	宮城県内の河川で採集
魚類	マアジ (<i>Trachurus japonicus</i>)	20	鮮魚店にて購入
魚類	タツノオトシゴ (<i>Hippocampus coronatus</i>)	2	宮城県野々島で採集
魚類	ナマズ (<i>Silurus asotus</i>)	1	宮城県伊豆沼で採集
両生類	ウシガエル (幼体) (<i>Rana catesbeiana</i>)	5	宮城県伊豆沼で採集
爬虫類	ジムグリ (<i>Elaphe conspicillata</i>)	1	宮城教育大学構内で死体として採集
鳥類	ウコッケイ (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	10	飼育動物
哺乳類	アナウサギ (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	2	飼育動物
軟体動物	ジンドウイカ (<i>Loliolus japonica</i>)	3	鮮魚店にて購入

3. 作製方法

吉岡 (1995) によって試されている水酸化カリウム水溶液を用いて透明化を行う作製方法を一部改変し用いた。標本をキシレンに浸して脱脂を行う作製方法も開発されているが、薬品の扱いや処理が難しくなることやキシレンに浸す期間を誤ると標本を痛めることから、今回は脱脂の工程を省いて行った。複数の種で全ての工程においてほぼ同様の方法で標本の作製を行った (各工程の標本の様子は図1を参照)。(1) 固定…固定液として10%ホルマリンを用いた。鰭等は虫ピンで広げてから小筆で固定液を塗布し、10分程度おいた後、鰭が閉じなくなってから標本全体を固定液に浸した。固定期間は2週間程度であるが、全長10cmを超えるような大きな標本の場合は内部まで固定しきれないことを懸念し、1か月程度固定した。(2) 水洗…固定液のホルマリンの残留を防ぐため、1日程度流水中につけておいた。(3) 前処理…後の透明化処理をスムーズに終わるためにメスとピンセットを用いて標本の表皮を除去した。鱗を持つ種では鱗が染色液によって赤色に染色されてしまうため取り残しがないように注意した。(4) 脱水…次に行う軟骨染色において染色液が浸透しやすくするために20%エタノール、50%エタノール、無水エタノールの順でそれぞれ3日程度脱水した。(5) 軟骨染色…アルシアンブルー染色液で1日染色した。この処理が長すぎると脱灰し、後で硬骨がうまく染色できなくなる恐れがあるため、24時間以上染色液には浸さないようにした。(6) 脱色…無水エタノール、50%エタノール、20%エタノールの順にそれぞれ3日程度浸し、余分なアルシアンブルー染色液を取り除いた。(7) 透明化…2%水酸化カリウム水溶液に浸し透明化を行った。(8) 硬骨染色…アリザリンレッドS染色液に1~2時間程度浸し硬骨染色を行った。(9) 脱色…1%水酸化カリウム水溶液に浸し、余分な染色液を取り除いた。(10) グリセリン置換…水酸化カリウムとグリセリンを①1:1、②1:2、③0:1の体積比で調整し、①、②、③の順に標本を浸した。浸した直後は標本が沈まないため、期間は標本が完全に沈みきるまでとした。③の溶液のみ標本が沈みきってから1週間程度置いた。(11) 封入…グリセリンとチモールの粉末を少量入れ

た保存容器に標本を入れ、密閉した。容器はスクリー管を用いた。

4. 結果

上記の方法で透明骨格標本を作製した結果、全ての種で透明化を進めることができた。しかし、一部の種では組織の白濁や乳白色の構造が確認された。

タイリクバラタナゴ (図2) は内臓を除いて全体が十分に透明化した。硬骨は十分に染色できているが、軟骨染色液で染色された部分は眼と鰓であった (鰓については図3のマタナゴを参照)。

マタナゴ (図3) でもタイリクバラタナゴの場合と同様に内臓を除いて全体が十分に透明になり、硬骨も十分に染色されていた。また、軟骨染色についても同様に染色されたのは眼と鰓であった。溶液を移し替える際に鰓蓋が外れてしまった個体ではその部分から内部の構造を観察すると鰓が青色に染色されていることが分かった。

オイカワ (図4) は硬骨染色や軟骨染色は他の標本と同様な結果が得られたものの、頭部に近い部分が全体的に白濁してしまった。尾鰭に近付くにつれて白濁は薄くなっている。白濁のため背骨が見えにくくなった。

マアジ (図5) は体全体だけでなく内臓まで透明化することができたものの、組織に茶色の色が残った。硬骨染色や軟骨染色はタイリクバラタナゴやマタナゴの標本と同様の結果であった。マアジは鮮魚店で購入し冷凍していたためか固定前の状態で痛みが激しかった。そのためか外縁部に歪みが生じた。

タツノオトシゴ (図6) は全体が十分に透明になった。また、硬骨染色及び軟骨染色も十分にできた。タツノオトシゴ類に特有な外骨格のような体輪の構造が顕著に表れた。

ナマズを用いて作製した透明骨格標本 (図7) は全体が十分に透明化した。歯や頭骨、背骨等は硬骨染色で赤色に染色された。軟骨染色ではタイリクバラタナゴやマタナゴ等と同様に眼や鰓などは青色に染色された。しかし、ナマズにおいてほかの標本と異なる点として体組織全体がごく淡い青色で染色されたまま脱色されなかった。また、鰭はごく付け根に近い部分だけが硬骨染色で染色され、鰭の大部分は軟骨染色で染色

された。

ウシガエルの幼体（図8）は一部メラニン色素様の色が残ったものの透明化した。頭部は硬骨染色で一部分しか染色されず、残りの部分は軟骨染色で青色に染色された。背骨においては頭部に近い部分は硬骨染色で赤色に染色されたものの、尾部に近い部分はいずれの染色でも染色されなかった。

ジムグリ（図9）は下顎が外れてしまったり肋骨が剥き出しになってその一部がずれてしまったりした。軟骨染色では肋骨の先端が青色に染色された。

ウコッケイ（図10）は一部に乳白色の構造が確認されたものの、全体としては十分に透明化できた。頭骨や骨盤、足指は硬骨染色ではなく軟骨染色で染まった部分が多かった。その他の骨についても（例えば大腿骨）両端は軟骨染色で染色され、中央に近い部分は硬骨染色で染色されていた。これは人工孵化で生まれてこなかった雛（中止卵）を試料として用いたため、発生段階にあった雛では骨の形成が途中であったためではないかと考えられる。

ウサギ（図11）は透明化することはできたものの、全長約5cmの乳白色の構造が複数確認された。関節などは軟骨染色で染色されていた

ジンドウイカ（図12）は十分に透明化した。全体が軟骨染色で青色に染色され、硬骨染色ではどの部分も染色されなかった。

5. 考察

(1) 作製方法

透明骨格標本の作製を行っている際に何点か注意すべきことがあった。まず、透明化の段階において標本が十分に透明化された状態で次の工程へと移ると、水酸化カリウムを用いる脱色やグリセリンの浸透の工程でも組織の分解が進むため、組織が劣化して形が崩れたり、作業中に鱗が欠けてしまったりすることがあった。また、透明化処理を4か月近く行った標本は組織がほとんど溶けてしまい、標本が入っている容器を動かすだけで全体が崩壊してしまうほどであった。標本の完成時点で透明化が完了することを見越した上で、透明化の段階で背骨が透けて見えると判断した時点で直ちに次の工程に移るようにした。

硬骨染色では、標本を長時間染色液に浸したままにしておく、染色され過ぎてしまうことが分かった。硬骨染色液に浸していることを忘れて半日浸したままにしていた標本は、硬骨が赤というよりも黒に近い色になってしまい、複数の骨が重なっている頭部の構造が観察しにくくなってしまった。このため、大きな標本でも2時間以上は染色液に浸さないようにした。

脱色の工程でも透明化処理に注意した点と同様に、溶液に浸す期間が長すぎると鱗が欠けてしまったり全体が崩壊してしまったりするので余分な染色液が抜けきった時点で直ちに次の工程に移るようにした。期間としては2日～1週間程度あれば余分な染色液は十分に脱色できた。

(2) 完成した標本の所見

ウシガエルの幼体やウコッケイの中止卵から得た雛の透明骨格標本ではまだ石灰化していないと思われる部分が見られた。卵あるいは発生開始の時期から骨格が発達するまで、段階別に透明骨格標本を作製することで、骨の発達の様子を可視化することができるようになる。

ジムグリ透明骨格標本では透明化処理を長くとりすぎてしまったためか、下顎が外れてしまったり肋骨がずれてしまったりした。今までに作製した透明骨格標本の中では最も大きく、全長は約60cmあった。透明骨格標本にするには大き過ぎたため、透明化処理に時間がかかった。堀江（2014）はシマヘビを用いて透明骨格標本を作製した。こちらは肋骨を覆う組織は溶け切っているものの、肋骨にずれ等の損傷は観察されていない。ヘビの透明骨格標本の作製において、今回作製したもの（図9）のような損傷がないように作製するには透明化処理にかかる時間を十分に吟味するか、より小型のヘビもしくは生まれてすぐのヘビを用いることなどが考えられる。

ジンドウイカはどの部分も硬骨染色で染色されなかった。現生種のイカが属する頭足綱では石灰質の殻（甲）を持つものはオウムガイ科、トグロコウイカ、コウイカ類、アオイガイとされている。ジンドウイカが属するツツイカ類において殻は石灰質のものではなく、有機質の膜になっており、軟甲と呼ばれている（佐々木 2010）。したがって、今回使用したジンド

ウイカはコウイカのような石灰質の殻（甲）を持っていないため、軟骨染色でのみ染色され、硬骨染色では染色されなかったのだと考えられる。コウイカを用いて透明骨格標本の作製を試みれば硬骨染色液で殻が染色されることが示唆される。

(3) 標本の作製に適した種の選定

タイリクバラタナゴやマタナゴ、大きいものではアジやジンドウイカなどの種では、本研究で示した簡易な作製方法でも、十分観察に耐える透明骨格標本ができあがるのが分かった。一方、一部の種の標本では乳白色の脂肪塊と思われる構造や組織の白濁が確認される場合があった。オイカワでは脂肪分が多いためか全ての個体で標本の大部分が白濁してしまった。そのため、体表近くの構造は観察できるものの、内部の構造を観察するには適していない。ウコッケイの孵化直前の雛に見られるような直径2～3mmの乳白色の構造であれば観察にそれほど支障はないと考えられるが、ウサギの子では約5cmの乳白色の構造が複数存在する。今回透明骨格標本を作製した種類のうち、オイカワとウサギでは、脱脂の工程を取り入れるべきであろう。ただし、キシレンは引火性を有する上、有毒な有機溶媒であるため、使用には危険が伴う。キシレンを使用する透明化は慎重に検討するべきである。学校現場で簡便かつ安価な方法を用いて透明骨格標本を作製しようとするならば、タナゴやアジ、ジンドウイカといった比較的に入手しやすく、キシレンによる脱脂が不要な種類を使用して作製することが望ましいと考えられる。

透明化処理は水酸化カリウムなどのアルカリで行う方法と消化酵素であるトリプシンを用いる方法がある。水酸化カリウムは劇物であるため危険を伴うが、水に溶けやすく扱いやすい。トリプシンを用いれば、劇物の使用を少なくすることができるが、前述のように温度にを一定にして酵素活性を保つ必要があり、インキュベーターの設備が無い学校で用いることは不可能である。また、トリプシンは僅かな量でも数万円程度と高価であるため、千円程度で購入できる水酸化カリウムの方が購入しやすい。以上のことから、学校現場で行うことを想定すると透明化処理は水酸化カリウムを使用して行った方が良いと考える。

(4) 理科教材としての検討

本稿では魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類の5つの分類群に加え、軟体動物であるイカでも標本の作製を行った。中学校2年生の理科では前述の5つの分類群の脊椎動物と無脊椎動物の体のつくりについて学習する（文部科学省 2008）。学習指導要領と教科書にはイカの解剖がモデル実験として挙げられている（塚田ほか 2011）。脊椎動物に背骨があること、無脊椎動物に背骨がないことは、今回作製した標本を用いれば実物を見せながら説明することができる。高等学校の生物では生殖と発生という単元で発生について学習する（文部科学省 2009）。ウコッケイの発生段階を追って標本化を行えば、発生過程においてどのように骨格が変化していくのか視覚化され、発生分野の教材として活用できると期待される。長い歴史を持つ透明骨格標本であるが、学校教育における教材としての活用はまだ試されている段階に過ぎず、今後発展する余地は大きいと考えられる。

謝辞

岩手県立一関第二高校の石井美樹子先生には透明骨格標本の作製方法に関してご指導頂いた。本学理科教育講座の出口竜作教授及び同研究室の方々には標本を提供して頂いた。作製作業にあたっては、本学教職大学院の村松隆教授、理科教育講座の猿渡英之教授、宮城教育大学自然フィールドワーク研究会 YAMOI の各位にご協力ご支援を頂いた。写真撮影は本学環境教育実践研究センター協力研究員の橋本勝研究員に協力して頂いた。多くの方々に感謝申し上げる。

参考文献

- 出口竜作・伊藤貴洋 2005, エダアシクラゲの採集とライフサイクルの制御. 宮城教育大学紀要, 40, 107-119.
- Dawson, A. B. 1926. A Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with aliarin red S. *Stain Technology*, 1, 123-124.
- Dingerkus, G. and Uhler, L. D. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology*, 52,

- pp229-232.
- 畑中恒夫 2012, 透明骨格標本の有効利用について. 千葉大学教育学部研究紀要, 60, 447-450.
- 畑中恒夫 2013, 透明骨格標本の樹脂封入法について. 千葉大学教育学部研究紀要, 61, 421-425.
- 堀江紀子 2013, 透明骨格標本の特性を活かした理科教材. 國學院大學人間開発学研究, 5, 99-104.
- 河村功一・細谷和海 1991, 改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製. 養殖研究所研究報告, 20, 11-18.
- 小西雅樹ほか 2010, 干物を利用した透明骨格標本の作製. 近畿大学農学部紀要, 43, 105-110.
- 熊本県立御船高等学校生物部
(<http://sh.higo.ed.jp/mifunesh/bukatsudo/biology/tomei/>)
(アクセス: 2015年1月26日)
- 文部科学省 2008, 中学校学習指導要領解説 理科編.
- 文部科学省 2009, 高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編.
- Ojeda J. L. 1970. Selective skeletal staining in whole chicken embryos; a rapid Alcian blue technique. *Stain technology*, 45, 137-139.
- Puchtler, H., Meloan S. N. and Terry M. S. 1968. On the History and Mechanism of Alizarin and Alizarin Red S Stains for Calcium. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 17, 110-124.
- 佐々木猛智 2010, 貝類学. 東京大学出版会, pp146-150
- 辻彰洋 1995, 二重染色法によって作製した透明骨格標本とその教材の検討. 生物教育, 35, 221-225.
- 塚田捷ほか 2011, 動物のなかまと生物の進化. In: 未来へ広がるサイエンス2, 新興出版社啓林館, 大阪市, pp.36-37.
- 吉岡英二 1995, 魚類の透明骨格標本作成法. 神戸山手女子短期大学紀要, 38, 157-164.
- 渡辺明朗 2001, 色素の化学 (第5回アルシアン青染色). *Medical technology*, 27, 197-199.
- Williams T. W. Jr. 1941. Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. *Stain technology*, 16, 23-25.



図1. 作製過程(写真は同一個体ではない)



図2. タイリクバラタナゴで作製した透明骨格標本



図3. マタナゴで作製した透明骨格標本



図4. オイカワで作製した透明骨格標本



図5. マアジで作製した透明骨格標本



図6. タツノオトシゴで作製した透明骨格標本



図7. ナマズで作製した透明骨格標本



図8. ウシガエル(幼体)で作製した透明骨格標本



図9. ジムグリで作製した透明骨格標本

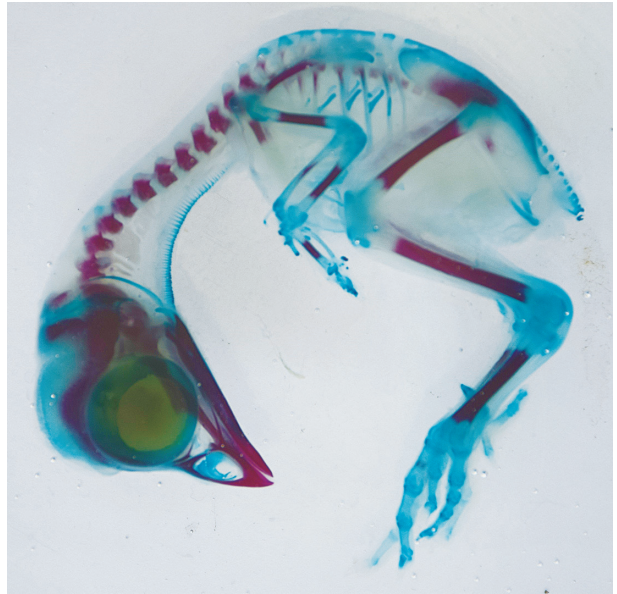


図10. ウコッケイの雛で作製した透明骨格標本



図11. ウサギで作製した透明骨格標本



図12. ヒイカで作製した透明骨格標本