

ミシシippアカミミガメの幼態(通称ミドリガメ)の透明骨格二重染色標本

今村伸一郎

192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2 ヤマザキ学園大学動物看護学部動物看護学科

Double stained transparent specimen of Red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*).

By Shin-ichiro IMAMURA

Yamazaki Gakuen University, 4-7-1 Minamiosawa, Hatioji-city, Tokyo 192-0364, Japan

本学の動物形態学研究室では、学生の卒業研究テーマとして、骨格標本作製を1つのテーマとしている。通常、ある程度の大きさの標本であれば、全身骨格を取り出してそれを磨き、再度組み立てる作業を基本作業として骨格標本作製を行なっているが、体長10cmに満たないは虫類、両生類、魚類、ほ乳類胎仔などに関しては、全身骨格の組み立てはとても困難である。そこで、これらの標本の骨格構造を観察するツールとして、昔から紹介されていた魚類における透明骨格二重染色標本作製手法を応用し、全身の透明骨格標本作製も行なっている。

魚類の透明骨格二重染色標本作製法については、いろいろな改良法などが報告されており(河村・細谷, 1991; 吉岡, 1995), またニワトリ(Bellairs and Osmond, 2005)やカエル(Tokita and Iwai, 2010), ラット(畑中, 2012)の同標本についても、発生や異常骨格の観察などのために標本作製法がかなり詳しく紹介されている。しかしながら亀については、その条件設定に触れた報告が見当たらない。一部、甲羅長3~4 cm程度の亀の幼態の透明骨格標本写真が、サイエンス系雑誌の特集や、コレクションの写真集などに紹介されていることがあるが、その標本作製法は残念ながら紹介されていない。もっとも、亀を使用した骨格構造観察研究を行なっている研究者がどれほどいるかと言ったら、多分ほとんどいないのが現状だと思われる。そんなわけで、亀の幼態について、その透明骨格二重染色標本がうまく作製できるのかまったくわからない状態ではあったが、昨年度(2016年度)、学生がトライしてみたいと言った一言から、本研究室にて試行してみる事となった。

方法論の基本は、染色試薬として軟骨染色用にalcian blue(アルシアン ブルー)、硬骨染色用にalizarin red(アリザリン レッド)を使用し、全身の透明化にはKOH(水酸化カリウム)を使用するといった至極一般的な方法を応用した。特にKOHの使用については、その濃度と加温程度、作用時間といったところで、よく観察しながら反応を進行させた。

以下の作製法は、当研究室において、現時点までで一番状態の良い標本が作製できた作業工程として示す。なお反応はすべて室温(5, 6月)で行ない、希釈水は蒸留水(ミリポア水)を用いた。

- ① 10%ホルマリン(3.7%ホルムアルデヒド)溶液に1週間ほど浸漬し、固定処理(図1)。
- ② 流水で1晩水洗。ここで、以降の反応液が体内にもよく入り込むようにということで、四肢の付け根の皮膚に切り込みを入れた。
- ③ 50%エタノールに浸漬し、1晩静置。
- ④ 99.5%エタノールに移し、数日浸漬。



図1. 10%ホルマリン固定

- ⑤ 99.5%エタノール:酢酸:alcian blue 8GX=70:30:1溶液(作り置きせず, その都度調整)に1晩浸漬. Alcian blueは酸性条件でよく染色されるとされる. 今回の標本では, 結果としてほとんど青色染色は認められなかった.
- ⑥ 四ホウ酸ナトリウム飽和液にて中和処理. 酢酸臭がなくなってくるまで, 2~3日, 適宜溶液を交換しながら処理する.
- ⑦ 2%KOH溶液に10日間ほど浸漬. 溶液は適宜交換する. 数日で表皮が次第に剥けてくる(図2). 1週間から10日ほどで, 甲羅を含め全身の表皮が一皮剥けるので(図3), ピンセットなどを用い, ていねいに全身剥離する. ここまで早目に反応を進行させれば, 様子をみながら40℃加温してもよい. 全身の表皮が剥離できると, 四肢に少し透明感が出てくる.
- ⑧ alizarin red 耳かき1杯分 / 1% KOH 100mlに1晩浸漬.
- ⑨ 1%KOH溶液へ置換し, 透明化処理を3週間ほど行なう. 溶液は適宜交換する. 反応処理1週間ほどで四肢, 甲羅共にやや透明感が出てくる. 甲羅と同一化した肋骨が少し赤く透けてみえてくる(図4). 進行を早めたい場合, KOHの濃度を2%にしたり加温することができるが, あまり無理をすると, 甲羅が透明になる前に四肢の骨がバラバラになってしまったり, 逆に透明化処理をあまりゆっくり進めると, 標本が収縮してしまうことがあるので注意したい. 反応処理がさらに進行して2週間ほどで腹甲の模様が薄くなっていく(図5). この模様が消える頃を目処として次のステップに進む.



図2. Alcian blue染色後, 2%KOH処理3日目. 体表面が白くなり, 薄皮が剥けてくる.



図3. 2%KOH処理8日目. 甲羅も含め, 全身一皮剥ける.



図4. Alizarin red染色後, 1%KOHで透明化処理7日目. 四肢, 甲羅ともやや透明感がでてきて, 四肢は骨格が透けてみえてくる.

- ⑩ 1%KOH:グリセリン=3:1溶液へ置換. 10日間ほどかけ, 透明化が進行してくるのを待つ. KOHの割合を減じると, タンパク溶解が抑制されるが, 水からグリセリンへの置換により透明化はさらに進む. 長いと2週間以上かかることもあるが, よく観察しながら状態を把握する. 甲羅を通して中がぼやっとみえてきたら(図6), 次のステップに進む.
- ⑪ 1%KOH:グリセリン=1:1溶液へ置換. 透明化をさらに進める. 体内溶液とグリセリンの割合を増した高浸透圧溶液が入れ替わって完全に沈むのを待ち, 様子を見ながら次のステップに進む.
- ⑫ 1%KOH:グリセリン=1:3溶液へ置換. 標本が完全に沈むのを待ち, 様子を見ながら次のステップに進む.
- ⑬ 100%グリセリンへ置換. 数日静置して完全に沈ませる.
- ⑭ 防腐剤としてチモール飽和液を1ml/グリセリン100mlの割合で加えた溶液に封入して完成(図7).



図5. 1%KOH処理16日目. 腹甲の様子がみえなくなってくる. また甲羅の透明感は一段と進む.

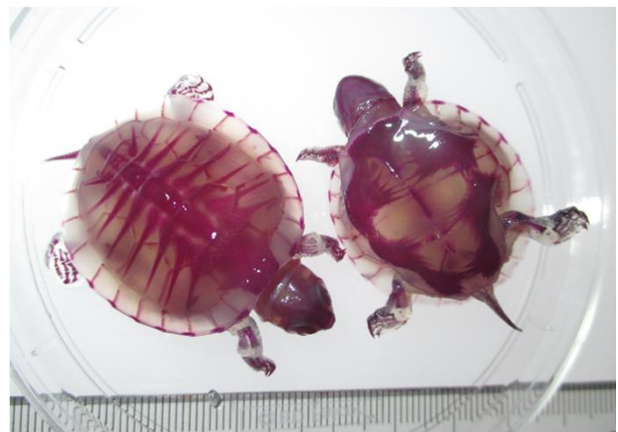


図6. 1%KOH:グリセリン=3:1溶液に移行して9日目. 甲羅の中がだいぶ透けてみえてくる. 内臓にまだ少し色が残っている.



図7-1. 100%グリセリン封入. (標本ビンへ)グリセリン置換により, より透明化がはっきりしてくる. 甲羅を通して, 腰帯(骨盤帯)がはっきりとみえる. また脊椎の構造がはっきりと観察できる.

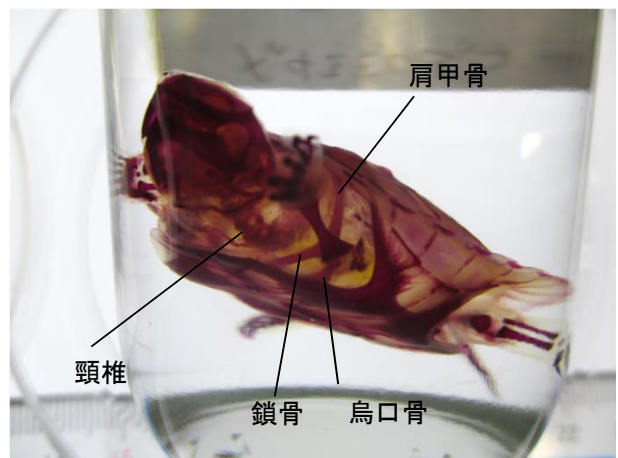


図7-2. 頸椎の湾曲状況や前肢の付け根の状況, 胸帯(肩甲骨, 鎖骨, 烏口骨)の存在が確認できる.

昨年度、初めて試みた亀の透明骨格標本作りでは、一応それなりの透明標本ができあがったが、甲羅の透明度を優先させると四肢の骨が分解してしまったり、頸椎がはずれて頭部がとれてしまったり、また、四肢の状態を優先させると甲羅の透明化がいまいちだったり、条件設定が難しかった。

これを踏まえて今年度(2017年度)は試薬の反応条件を優しくし、反面、反応時間を少々長く設定してみたところ、ほぼ満足のいく透明度を得ることに成功した。研究面で本方法を応用するなら、もう少し時間の短縮できる条件を探りたいところではあるが、まずは甲羅長3~4cmほどの幼態亀であれば、十分にその透明骨格標本作製することが可能であることがわかり、また、全身状態を良好な状態で透明標本化できることがわかった。

謝辞

今回の標本作製に供したミシシippアカミガメの幼態は、神戸市立須磨海浜水族園よりご提供頂きました。貴重な標本のご提供に対し、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 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. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture 20: 11-18.
- 吉岡英二. 1995. 魚類の透明骨格標本作製法. 神戸山手女子短期大学紀要 38: 157-164.
- Bellairs, R. and M. Osmond. 2005. The Atlas of Chick Development. Elsevier, USA. p.406-409.
- Tokita, M. and N. Iwai. 2010. Development of the pseudothumb in frogs. Biol. Lett. 6: 517-520.
- 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.