

改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製

河村 功一・細谷 和海

(1991年 8月21日受理)

A Modified Double Staining Technique for Making a Transparent Fish-Skeletal Specimen

Kouichi Kawamura* and Kazumi Hosoya*

A modified double staining technique for making a transparent fish-skeletal specimen was reviewed. The steps in the present technique, differing from those in the previous techniques, are as follows: 1) maceration by potassium hydrate instead of trypsin, 2) acceleration of transparency by removing the fat with xylene. This technique is characterized by low cost, convenience and quickness in operation, compared with other techniques. A few important points in using this technique were also commented.

Key words: alcian blue, alizarin red, double staining technique, xylene

二重染色法は硬組織である硬骨、軟骨をそれぞれ赤、青に染め分け他の組織を透明化させる染色法である。この方法を用いれば外部から骨格系を直接観察することが可能となり、骨格解剖が容易である。現在では魚類を中心とする小型の脊椎動物を対象に、機能解剖学、系統分類学、発生学などさまざまな分野において利用されている。水産学研究においても、種苗の健苗性の判定や魚類資源の系群解析の方法としてすでに確立しており、骨格異常や脊椎骨数の地理的変異に関する知見が得られている。二重染色法は、最初 Williams (1941) によって開発され、その後、軟骨染色は toluidine blue ではなく alcian blue を用いる方法に (Ojeda *et al.*, 1970; Simons and Van Horn, 1971)、透明化処理は水酸化カリウムではなくトリプシンを用いる方法へと変更された (Dingerkus and Uhler, 1977; Kelly and Bryden, 1983)。またその他各処理に対しても数多くの改良がなされてきている (Burdi, 1965; Wassersug, 1976; Dunn, 1983; Potthoff, 1985; Park and Kim, 1986; 澄川・藤田, 1988)。しかし、これらの方法は、作業が煩雑であったり、高価な酵素を多量に必要とするなど必ずしも一般化されているわけではない。さらに、標本の漂白・脱色素、残留脂肪の除去法、稚仔魚染色法等、改良すべき課題も多く残されている。透明標本作製の際の要点は、1. 最良の透明標本作製するためにはどのように固定すればよいか、2. 筋肉組織を完全に透明にできるか、3. 軟骨と硬骨をきれいに染め分けられるかの3点にあると思われる。今回、我々はこれらの3点をほぼ完全に満たすと思われる透明標本の作製法を開発したのでその方法について紹介する。

* 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan)

方 法

器具および薬品 1. フォルマリン (無調整), 2. alcian blue 8GH または alcian blue 8GX (粉末状), 3. alizarin red S (粉末状), 4. 氷酢酸, 5. グリセリン, 6. 泡水クロラール (結晶状), 7. エタノール, 8. 水酸化カリウム, 9. 過酸化水素水 (紫外線を用いる場合には不要), 10. キシレン, 11. チモール, 12. サンプルパック (Fig. 1), 13. シーラー (Fig. 3), 14. メス, 15. ガラス製腰高シャーレ, 16. 各種スチロール製角型ケース (Fig. 4), 17. 麻製の布ないしはダイモテープ (標本のラベルに用いる)

染色液 1. alcian blue 染色液 (Dingerkus and Uhler, 1977)

100 cc 作る場合には, alcian blue 20 mg, 99%エタノール 80 cc, 氷酢酸 20 ccを混ぜ合わせる。

この染色液ではエタノールと酢酸の混合比が重要なので, 作製した染色液は必ずふたつきの瓶に入れる。また時間がたつにつれ酢酸とエタノールがエステルを形成しやすくなり (特に夏), エステル特有の臭いが認められるようになったら作り替えること。

2. alizarin red 染色原液 (Hollister, 1934)

(a) 氷酢酸に alizarin red の粉末を飽和させたもの, (b) グリセリン, (c) 泡水クロラルの 1% 溶液を 1:2:12 の体積比で混合する。この原液は黄色であるが水酸化カリウム溶液に入れると紫色に発色する。今日, 二重染色法の硬骨染色にはほとんどの方法で alizarin red の粉末を直接水酸化カリウム溶液に溶かす方法が用いられている (たとえば澄川・藤田, 1985)。この方法は硬骨の染ま



Fig. 1. 'Sample pack', a histological envelope to house a small-sized specimen.

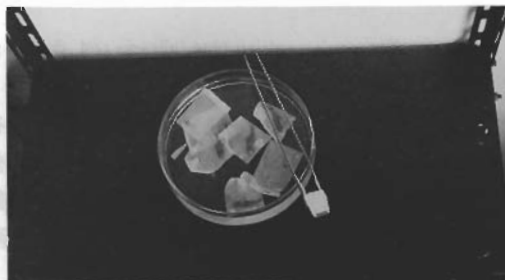


Fig. 2. Young fish specimens practically sample-packed.



Fig. 3. 'Sealer', a sealing equipment.

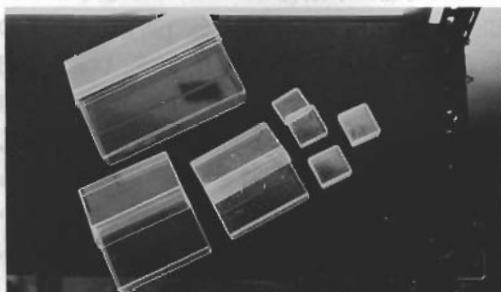


Fig. 4. Several kinds of rectangular styrol cases to preserve a cleared specimen.

りの色が悪く脱色しやすいのに対し、本方法では硬骨の染まりはよく脱色しない。

透明標本の作り方 改良二重染色法による透明標本作製の手順を Fig. 5 に示す。

(1) 登録…個体の識別を必要とする場合には標本にラベルをつける。ラベルは、水酸化カリウムに侵されない麻製のものないしはダイモテープを用いるのがよい。ラベルをつける際は糸は下顎の中央部ないしは尾柄上部に骨に傷つけないように通す。テキストによっては、鰓口部に通すよう指

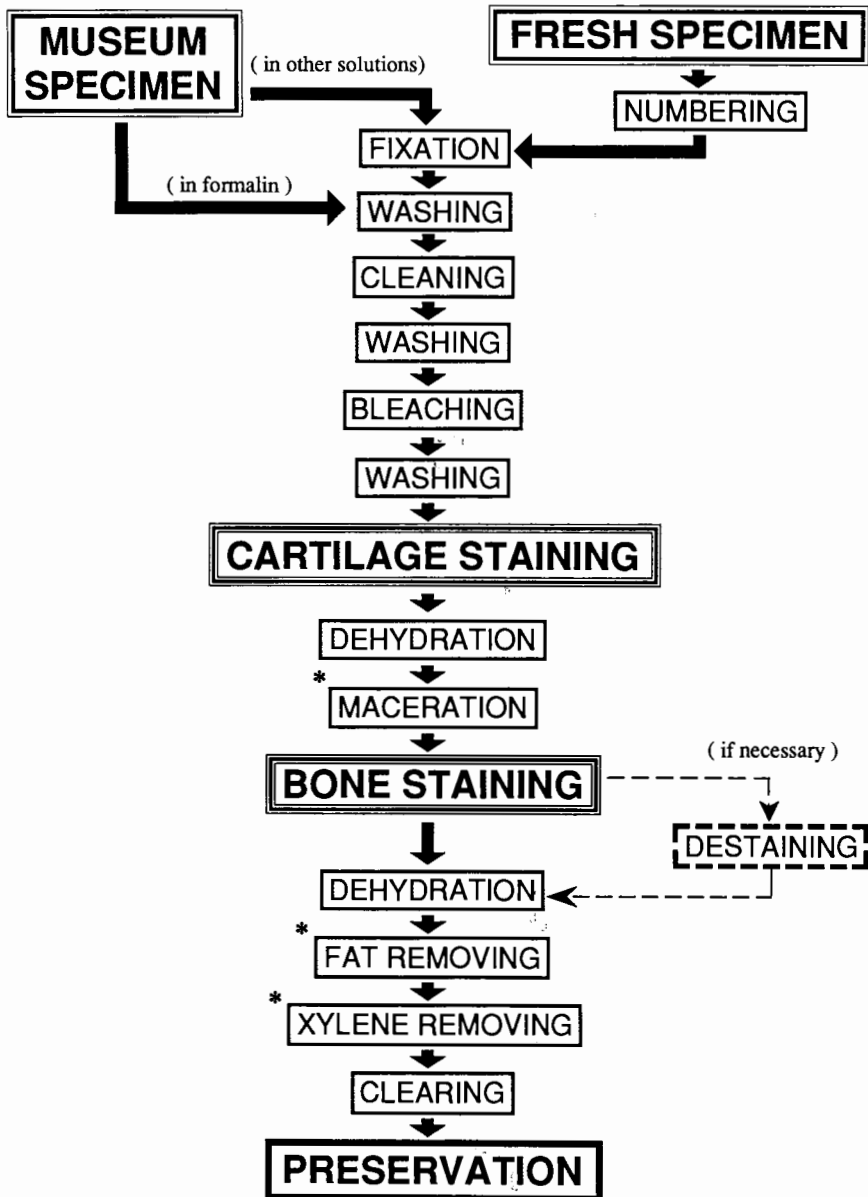


Fig. 5. Flow chart of steps in the modified double-staining technique. Asterisk indicates a newly modified step.

示してある場合もあるが、この方法は鰓弓を傷めるので用いない。稚仔魚の場合には、直接ラベルを付けることができないのでサンプルパック（㈱栄研器材製組織切片収納袋）に入れるとよい（Fig. 1, 2）。この製品の特徴としては、1. 標本を傷めない、2. ラベルを付けることが可、3. 透明標本作製で用いるすべての薬品に侵されない、4. 大量収納可の4点があげられる。パックはシーラーで熱を加えることによって封じることができる（Fig. 3）。

(2) 固定…標本は必ず無調整ホルマリンで1週間以上固定。濃度は、稚仔魚が3%、アユ成魚10%、スズキ成魚20%。エタノール、イソプロピルアルコール、フェノキシエタノール等で固定した標本の場合ホルマリンで再固定。生鮮個体は alizarin red で染まりが悪く筋肉を透明化できない。無固定ないしはアルコール類でのみ固定した場合は透明化の過程で標本が崩れることがある。中性ホルマリンを用いると軟骨が染まらなくなることがあり（特に稚仔魚）、無調整のものを用いたほうがよい。

(3) 水洗…ホルマリンを完全に抜くため流水中に2日間つけておく。

(4) 前処理（稚仔魚は省略）…全長10cmを超える標本では、透明化時の筋肉溶解を最小限に押さえるため、メスで鱗、内臓等ではできるだけ取り除き、筋肉中に切れ込みを入れておくことが望ましい。この際、肉間骨を傷つけないこと。

(5) 水洗…取り残した鱗、内臓等を流水できれいに洗い落とす。

(6) 漂白…過酸化水素水でメラニンなどの色素を漂白。濃度は、稚仔魚が1%、アユ成魚3%、スズキ成魚5%程度で、浸漬時間は小型のもので2時間、10cmを越えるもので半日ぐらいを目安とし、長すぎないようにする。入れ過ぎると硬骨が酸化され後で染まらなくなる。この処理が終了した時点では、メラニンは透明にはならず茶褐色の状態にあるが、これは水酸化カリウムによる透明化の際に完全に抜けるので心配ない。なお、漂白の方法としてはこの他に紫外線を照射する方法もある（Williams, 1943; Freihoffer *et al.*, 1977）。

(7) 水洗…過酸化水素を完全に抜くため流水に1日つけておく。水洗後、鰓腔内に酸素の泡が残っていないことを確認する。この過程で酸素を取り除いておかないと気泡が最後まで標本中に残ることがある。

(8) 軟骨染色…alcian blue 染色液に標本を移す。浸漬時間は、稚仔魚が2～3時間、アユ成魚で約1日。適正な染色時間は、下尾骨の後縁部ないしは不對鰭の遠位担鰭骨の外縁がうっすら青く染まるのを目安にするとよい。この処理は、必要以上に行わない。標本のサイズと浸漬時間の記録を取っておくと後で便利。過剰な浸漬は脱灰を引き起こし硬骨を青紫色に濃染する。

(9) 脱水…標本を50%エタノール溶液に移し、脱水することによって alcian blue 染色液の反応を止める（2日間）。その後、稚仔魚は、別の50%エタノール溶液に、全長5cmを越える個体では100%エタノールに2時間ぐらい入れる。エタノールから酢酸の刺激臭が感じられるようになったら交換。

(10) 透明化…水酸化カリウム溶液に移し透明化を行う。溶液の濃度としては稚仔魚が2%、5cmを越える個体では4%の水酸化カリウムに入れる。処理工程の終りは、1. 中軸骨格が透けて見える、2. 鰓が光って見えるを目安にするとよい。完全に透明になるまで入れておいてはいけない。大型魚を扱う場合や冬季はかなり時間がかかるので、インキュベーターを用いて温度を上げてやると処理を速めることができる（Kelly and Bryden, 1983）。古い標本では溶液が黒く濁る場合があるがこのときはそのつど交換。

(11) 硬骨染色…2%水酸化カリウム溶液に濃紫色になるまで alizarin red 染色原液を加え染色液

とする。標本浸漬時間は、約2時間。水酸化カリウム溶液を作る時は蒸留水を用い、作製した染色液は必ずふたつきの容器に入れ埃が入らないようにする。これは、alizarin red がカルシウム化合物よりも埃中の金属イオンに吸着されやすいことによる（小川，1988）。

⑫ 脱色（過染色の場合）…1%水酸化カリウム溶液につけ脱色を行う。ただし、少々の染まり過ぎは次の脱水処理の工程で脱色されるので必要ない。

⑬ 脱水…標本を50%エタノール溶液に移し、脱水することによって alizarin red 染色液の反応を止める（2日間）。その後、稚仔魚は、別の50%エタノール溶液に、全長5cmを越える個体では100%エタノールに約2時間浸漬。

⑭ 脱脂（稚仔魚は省略）…標本を100%キシレン溶液に移し脱脂。浸漬時間は標本の大きさに応じて30分～2時間。2時間以上浸漬すると、過剰な脱脂作用により標本を傷めることがある。alizarin red の染色度はキシレンの脱脂効果により強調される。

⑮ キシレン抜き…70%エタノールに移しキシレンを脱液する（1日）。この処理は必ず行う。この過程を省略すると標本中に残ったキシレンがスチロール容器を溶かすことがある。

⑯ 浸透…アルコールとグリセリンを2:1, 1:1, 1:2の体積比で混ぜたものをそれぞれ用意し、標本を1日ごとに順に次の溶液へと移していき、最後に100%グリセリン溶液に入れる。アルコールとグリセリンは混ざりにくいのであらかじめよく攪拌しておく。

⑰ 保存…標本を100%グリセリンに入れ保存。グリセリンは長期間放置すると腐敗することがあるので防腐剤として、チモールをいれておくとよい。処方は、チモールをグリセリン100ccに対し25mg加える。チモールは解けにくいのであらかじめ乳鉢で結晶を砕いておくとよい。保存用の容器としては、スチロールないしはプラスチック製のふたつきケースを用いると便利（Fig. 4）。

論 議

上記の方法で作製した骨格透明標本が Fig. 6（エツ *Coilia nasus nasus*）と Fig. 7（ホワイトスタージョン *Acipenser transmontanus*）である。従来の方法にくらべて標本の透明度がより高く、メラニンを始めとする色素が完全に脱色されている。透明化の促進はキシレンの脱脂作用によるものであり、脱色効果は過酸化水素と水酸化カリウムによるものである。透明標本作製の歴史において最初透明化には水酸化カリウムが用いられた。しかし、Dingerkus and Uhler (1977) が水酸化カリウムのかわりにトリプシンを用いて以来、今日ではトリプシンが一般的に用いられている。Dingerkus and Uhler は、トリプシンが水酸化カリウムより優れている点として完成した透明標本の弾力性の高さを挙げている。今回、我々があえてトリプシンではなく水酸化カリウムを用いたのは次の理由による。1. トリプシンでは色素の脱色、特にメラニンの完全な脱色は不可能である。2. トリプシンは、酵素であるため buffer の pH 調整を行わなければならない（作り置きが効かない（夏だと1週間以内））。3. トリプシンは、高価で長期間保存すると活性を失うのに対し、水酸化カリウムは安値で長期保存が可能。Dingerkus and Uhler が問題とした標本の弾力性についてもこれは、水酸化カリウムの濃度を下げてゆっくり透明化を行えば克服できる。逆に水酸化カリウムは無機化合物であるため温度と濃度を上げることによって著しく反応速度を上げることもでき、透明化処理に時間のかかる大型魚の場合には最適と考えられる。トリプシンは酵素であることより濃度調節によって反応速度をあげることには限界があり、また40°C以上では失活することからトリプシンでは水酸化カリウムと同程度の反応速度を得ることはできない。

二重染色法でもっとも重要な点は、標本の固定と軟骨染色にある。標本の固定は標本が腐敗しない必要最低濃度のホルマリンで行い、保存期間が長期に渡る場合には定期的に新しいホルマリンと交換したほうがよい結果が得られる。ホルマリンは時間がたつにつれ蟻酸に変わる。これは硬骨の主成分であるリン酸カルシウムを溶解するので、古いホルマリンで長時間固定したものは硬骨が染まらないことがある。稚仔魚は特に脱灰しやすいので透明標本にする時は採集してからなるべく早く処理を行ったほうがよい。硬骨には、軟骨起源の軟骨性硬骨、結合組織起源の膜骨、および外胚葉性起源の皮骨の3種類が存在する (Patterson, 1977)。軟骨染色で重要な点は alcian blue で必要以上に染色を行わないことである。軟骨染色を過剰に行くと軟骨性硬骨、膜骨、皮骨のいずれも青く染まってしまい後で赤く染まらなくなる。これは硬骨組織中のカルシウムイオンが染色液中の酢酸によって遊離するからである。過去の報文の中には明らかに膜骨であるものを軟骨性硬骨と記載したものがあるが、これは明らかに alcian blue の過剰染色の結果によるものである。したがって、各硬骨要素の同定ならびに骨化が起こる体長サイズの決定に当たっては、軟骨染色液の脱灰作用に充分注意を払うべきである。硬骨染色を確実にやりたいのであれば、軟骨染色を省略し alizarin red だけで硬骨を染色してもよい。

我々はこの二重染色法を用いて魚類以外の小型脊椎動物についてもいくつか試験的に骨格透明標本作製した。その結果、ヤツメウナギを除きほとんどのものでよい結果を得た。alcian blue が軟骨に染まる原理は、alcian blue が軟骨に特異的に含まれる酸性ムコ多糖類の1種であるコンドロイチン硫酸の硫酸基とイオン結合することによる (Halstead, 1984; 羽山, 1988)。軟骨をもつヤツメウナギで軟骨が alcian blue で染まらない理由は不明である。もしヤツメウナギの軟骨の成分が他の脊椎動物の成分と異なるならば、脊椎動物の歴史の中で無顎類から有顎類への進化と平行して、軟骨にも変化が起こった可能性も考えられる。

要 約

魚類の透明骨格標本作製法である二重染色法を改良した。この方法が従来の方法と大きく異なる点は、1. トリプシンではなく水酸化カリウムを用いて組織の透明化を行う、2. キシレンを用いることによって標本の透明度を高めることができるの2点である。この方法は、安価で容易にかつ早くきれいに透明標本作製できる点で従来の方法より優れている。また、染色を行う際の2、3の重要な点についても言及した。

文 献

- Burdi, A. R. 1965. Toluidine blue-alizarin red S staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. *Stain Technol.*, **40** (2): 45-49.
- Dingerkus, G. and L. W. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol.*, **52** (4): 229-232.
- Dunn, J. R. 1983. The utility of developmental osteology in taxonomic and systematics studies of teleost larvae: A review. NOAA Technical Rep. NMFS Circ., **450**: 1-19.
- Freihoffer, W. C., L. J. V. Compagno and W. Rogers. 1977. Additional notes on the use of the Sihler technique of staining nerves of small, whole specimens of fishes and other vertebrates. *Copeia*, **1977** (4): 587-588.
- Halstead, L. B. 1984. 硬組織の起源と進化—分子レベルから骨格系までの形態機能—。後藤仁敏, 小寺春人訳。モダンサイエンスシリーズ。共立出版, 東京。

- 羽山正義 1988. アルシアン青染色 pp. 104-107. 染色法のすべて, 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊, 医歯薬出版株式会社, 東京.
- Hollister, G. 1934. Clearing and dyeing fish for bone study. *Zoologica*, **10** (4): 89-101.
- Kelly, W. L. and M. M. Bryden. 1983. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. *Stain Technol.*, **58** (3): 131-135.
- 小川浩実 1988. ダールのカルシウム染色 (アリザリンレッド S 法) pp. 96-97. 染色法のすべて, 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊, 医歯薬出版株式会社, 東京.
- Ojeda, J. L., E. Barbosa and P. G. Bosque. 1970. Selective skeletal staining in whole chicken embryos: a rapid alcian blue technique. *Stain Technol.*, **45**: 137-139.
- Park, E. H. and D. S. Kim. 1984. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissue transparent. *Stain Technol.*, **59** (5): 269-272.
- Patterson, C. 1977. Cartilage bones, dermal bones and membrane bones, or the exoskeleton versus the endoskeleton. pp. 77-121, In "Problems in vertebrate evolution", ed. by S. M. Andrews, R. S. Miles and A. D. Walker, Academic Press, London.
- Potthoff, T. 1983. Clearing and Staining Techniques. pp. 35-37, In "Ontogeny and systematics of fishes" (American Society of Ichthyologists and herpetologists Special Publication Number 1), ed. by H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall, Jr. and S. L. Richardson, Allen Press, U.S.A.
- Simons, E. V. and J. R. Van Horn. 1971. A new procedure for whole-mount alcian blue staining of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphol., Neerl.-Scana.* **8**: 281-292.
- 澄川冬彦・藤川 清 1984. 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. 裳華房, 東京.
- 澄川冬彦・藤川 清 1984. 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. 裳華房, 東京.
- Taylor, W. T. 1967. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. *Proceedings of the United States National Museum*, **22**: 1-17.
- Wassersug, R. J. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technol.*, **51** (2): 131-134.
- Williams, T. W. 1941. Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult and embryonic bone and cartilage. *Stain Technol.*, **16**: 23-25.
- Williams, T. W. 1943. A technique for the gross differential staining of peripheral nerves in cleared vertebrate tissue. *Anat. Rec.*, **86**: 189-194.