

技術報告

両生・爬虫類染色骨格透明標本の有効性

須田 透

群馬県立自然史博物館：〒370-2345 群馬県富岡市上黒岩1674-1

キーワード：染色骨格透明標本，両生・爬虫類，骨格

Effectiveness of cleared and stained skeletal specimens of Amphibians and Reptiles

SUDA Toru

Gunma Museum of Natural History :1674-1,Kamikuroiwa, Tomioka, Gunma, 370-2345, Japan

**Abstract** : There are many kinds of specimens in the Gunma Museum of Natural History. Specimens states ; stuffed, Freeze-dried, embedded in acrylic resin, skeleton, immersed etc.. We have made freeze-dried specimens of Amphibians and Reptiles since this Museum opened. But we have never made skeleton specimens because their bones are very smaller than mammals and birds. There for it is difficult to put together a frame. I report another method that we can use to observe skeleton structure easily and the effectiveness of cleared and stained skeletal specimens of Amphibians and Reptiles.

**Key Words** : cleared and stained skeletal specimens, Amphibians and Reptiles, skeleton structure

はじめに

群馬県立自然史博物館に収蔵されている両生・爬虫類の標本には剥製，凍結乾燥標本，アクリル樹脂封入標本，骨格標本，液浸標本などがある。当博物館では，開館準備段階より凍結乾燥標本の作製を積極的に行ってきた。また，凍結乾燥標本の作製方法およびデータは研究報告第4号にも報告されている（小久保・月田，2001）。しかし，現在まで交連骨格標本の作製は行われていなかった。

これは，一般的に両生・爬虫類の骨が哺乳類や鳥類に比べ小さく，爬虫類に代表されるヘビのように類似した脊椎骨や肋骨が200～400になるためである。博物館の交連骨格標本としては，それぞれの骨が正確につながりなければ標本としての価値はない。また，カエル幼生（オタマジャクシ）から成体までの骨格標本があれば，成長に伴う骨形成を観察できるが，成長段階の低い幼体では骨化の進行も遅く，関節が不明確で非常に小さいため交連骨格標本作製することはできない。

そこで以前より脂肪分の少ない小型魚類で行われていた方法（Dingerkus G and Uhler LD,1977）を応用し，両生・爬虫類の全身骨格標本および部分骨格標本作製することにした。アリザリンレッドSによる硬骨染色およびトルイジ

ンブルーによる軟骨染色した後に筋肉部分を透明化し，骨格の観察ができる標本作製した。これを以下では染色骨格透明標本と呼ぶ（透明骨格標本とよばれる場合もある）。この方法が有効であれば，骨や関節の形成過程を研究する資料として非常に役に立つものと考えられる。代表的な両生・爬虫類資料6点を4通りの方法で透明化し，調査・研究に活用可能な標本が得られたので，ここに報告する。

資料（試料）

全身骨格標本

両生類

- 成体 - ウシガエル *Rana catesbeiana*
- 成体 - アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*
- 幼生 - ウシガエル *Rana catesbeiana*

爬虫類

- シマヘビ *Elaphe quadrivirgata*
- アオダイショウ *Elaphe climacophora*
- ニホンカナヘビ *Takydromus tachydromoides*

部分骨格標本

- 前肢（右） - ウシガエル *Rana catesbeiana*
- 後肢（右） - ウシガエル *Rana catesbeiana*



図1 ウシガエル *Rana catesbeiana*

## 方 法

染色骨格透明標本は、筋肉部分のタンパク質を分解し、それぞれの骨を取り出すことなく骨格を観察できる標本である。骨格を解体せず、生きていた状態を保持した状態で標本とするため、骨の付き方・部位も正確である。また、軟骨および硬骨を染色することで観察が容易になるという利点もある。タンパク質の分解方法はいくつか存在し、魚類以外の資料について、どの方法が容易で標本の作製に適切かは示されていない。そこで比較的入手が容易で一般的な実験室でも実験可能な方法を考えた。タンパク質の分解方法では4つの薬剤を用い、交連骨格標本作製が困難と考えられる両生・爬虫類について染色骨格透明標本を作製した。

表1 使用した試薬

試薬名	使用目的
エチルアルコール	固定
ホルムアルデヒド	固定
水酸化カリウム	タンパク質分解
トリプシン	タンパク質分解
四ホウ酸ナトリウム十水和物	タンパク質分解
衣類用洗濯洗剤	タンパク質分解
入れ歯用洗剤	タンパク質分解
トリエジンプルー	軟骨染色
酢酸	軟骨染色
アリザリンレッドS	硬骨染色
グリセリン	保存

## 1 解剖

ここでの解剖は、内臓等の観察を目的とする一般的な解剖実験とは違うので、まず最初に背部より剥皮を行った(図2)。これは普通行われる解剖手順とは異なる方法であるが、表皮の完全除去の点からは有効な方法であった。一般的に行われる腹部からの開腹では、内臓除去を行った後の表皮完全除去が困難になり、剥皮にかかる力で資料を傷つけてしまう可能性があると考えたからである。内臓および眼球の除去は剥皮後行った。また、小型で筋肉組織の発達していないカエル幼生(オタマジャクシ)のような場合には、固定後剥皮し、内臓除去を行う方が資料を傷めずに処理することができた。



図2 背部より剥皮

## 2 固定

資料の固定には大きくホルマリン固定(図3)とアルコール固定の2通りの方法がある。今回の標本作製ではどちらの方法で固定を行ったとしても、その後の処理に影響はなかった。ただし、ホルマリンで固定した場合には一度ホルマリンを完全除去し、染色前にエチルアルコールで完全置換を行った。



図3 ウシガエル幼生 Tadpole of *Rana catesbeiana*

### 3 軟骨染色

まず、資料を100%エチルアルコールで完全置換した。軟骨染色液はエタノール100mlに氷酢酸20mlとトルイジンブルーを少量入れ攪拌したのを使用し、全体が青く染色した時点で処理を終了した。また、余分な染色液および酢酸を除去するため、水で完全置換した後、次の処理に移った。軟骨染色液としてトルイジンブルーの代わりにアルシャンブルーを用いても同様に染色が行えた。

### 4 透明化

タンパク質の分解方法はいくつか考えられるが、博物館で容易に入手でき、かつ簡単な方法でなければ標本作製には適さない。そこで以下の4つの薬剤を用いタンパク質の分解を試みた。

- 4-1 衣類用洗濯洗剤
- 4-2 入れ歯用洗浄剤
- 4-3 塩基性溶液
- 4-4 タンパク質分解酵素

#### 4-1 衣類用洗濯洗剤による方法

市販の衣類用洗濯洗剤には、ヒトの体から分泌された皮脂や不溶性のタンパク質・油汚れ等を分解するため、界面活性剤だけでなくプロテアーゼ（プロテイナーゼやペプチダーゼ）やセルラーゼなどの分解酵素を含むものがたくさんある。そこでタンパク質分解酵素およびその他薬剤を含む洗剤5gを200mlの水に溶かし、恒温器（35～40℃）で最長3日間処理した。処理後は完全に反応を停止するため水で完全置換した。

#### 4-2 入れ歯用洗浄剤による方法

市販の入れ歯用洗浄剤には、食べ物のカスや雑菌を分解除去する目的で衣類用洗濯洗剤には含まれていない成分を含むものが多い。そこでタンパク質分解酵素およびその他薬剤を含む洗浄剤1片を200mlの水に溶かし、恒温器（35～40℃）で最長3日間処理した。処理後は完全に反応を停止するため水で完全置換した。

#### 4-3 塩基性溶液による方法

塩基性溶液がタンパク質を溶かす働きがあることは有名である。そこで5%水酸化カリウム水溶液を用い、タンパク質を分解する方法を考えた。酵素反応は最適温度が存在するが、無機反応は温度の影響をあまり受けないので、室温で処理を行った。処理は資料の様子を見ながら、半透明になった時点で終了とした。処理後は完全に反応を停止するため水で完全置換した。

#### 4-4 タンパク質分解酵素による方法

タンパク質分解酵素には我々哺乳類の生体内で合成されるものがある。よく知られるものとして、ペプシンやトリ

プシンが挙げられる。酵素反応には最適温度・最適pHがあり、反応条件に注意が必要である（八谷ほか、1994）。今回は比較的取り扱いが容易なトリプシンを用い処理を行うことにした。四ホウ酸ナトリウム水溶液に少量のトリプシンを溶かし、恒温器（35～40℃）で7日間処理した（図4）。処理後は完全に反応を停止するため水で完全置換した。



図4 恒温処理

#### 4-5 タンパク質分解酵素と塩基性溶液の併用処理

上記4-4の処理後、水酸化カリウム水溶液で処理を行った（図5）。トリプシン処理だけでは完全に透明にならなかったが、この工程を加えることでさらに透明化が進んだ。ただし、長時間処理すると骨格がバラバラになってしまうので、資料の様子を見ながら短時間で終了し、水酸化カリウムを完全に取り除くため水で完全置換した。



図5 透明化

### 5 硬骨染色

水で完全置換した資料を硬骨染色液で処理した。硬骨染色液は0.1%水酸化カリウム水溶液にアリザリンレッドSを少量入れ攪拌したのを使用した。処理は硬骨が赤紫色に染色された時点で終了とした。処理後、余分な染色液を除去するため0.1%水酸化カリウム水溶液に入れ硬骨以外の染色が抜けた時点で水と完全置換した。

## 6 保存

全ての処理を終えた資料はエチルアルコールで完全置換した。置換後、アルコールを半分除去し、同量のグリセリンを加えた。1日後、再度液体を半分除去し、同量のグリセリンを加えていく操作を繰り返し、最終的にグリセリンで完全置換した。完全置換が行なわれていれば防腐剤を加える必要はないと考えられる。

## 結果および考察

### 7 透明化について

#### 7-1 衣類用洗濯洗剤

処理時間に関係なく、タンパク質部分は白濁した状態であった。処理を中止した資料は、タンパク質部分が糊状になり骨格の観察が不可能なうえ、時間が経つと骨格が不完全ながら解体してしまった(図6)。染色骨格透明標本の作製における衣類用洗濯洗剤の使用は適さないと考えられる。

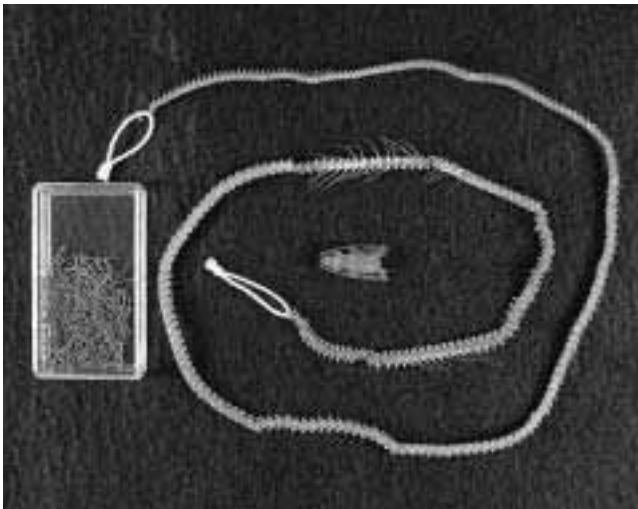


図6 アオダイショウ *Elaphe climacophora*

#### 7-2 入れ歯用洗浄剤

衣類用洗濯洗剤と同様、処理時間に関係なくタンパク質部分は白濁した状態のままであった。ただし、反応段階は衣類用洗濯洗剤の時より低く、骨格の完全解体にはいれないが、部分的欠落が生じた。入れ歯用洗浄剤も染色骨格透明標本の作製には適さないと考えられる。

#### 7-3 塩基性溶液

予備実験として10%水酸化カリウム水溶液で小魚を透明化した場合、完全解体してしまった。そこで5%水酸化カリウム水溶液を使用してタンパク質の分解を行ったが、処理時間が非常に難しいことがわかった。透明化という観点では酵素入り洗浄剤より透明度は良いが、解体してしまう可能性が高い。

#### 7-4 タンパク質分解酵素溶液

トリプシンの反応は穏やかで、7日間以上処理を続けても骨格が解体することはなかった。小型の資料であればタンパク質分解酵素のみの使用で観察可能な資料が得られた。しかし、大型の資料では白濁してしまう部分が残りに、別の方法を考える必要が生じた。

#### 7-5 タンパク質分解酵素と塩基性溶液の併用

トリプシン処理後で白濁部分の残る資料をさらに水酸化カリウム水溶液で処理すると、全ての資料において透明化することができた。大型のウシガエル(体長180mm)を用いた部分骨格標本でも内側広筋や大内転筋や小内直筋などに若干白濁が残ったが、大腿骨や腓骨、上腕骨の観察も行った。

## 8 染色骨格透明標本の有効性

### 8-1 カエル

体長100mm程度までのカエルであれば中足骨や指骨、手根骨も観察することができた(図7)。白濁して観察できない部分もなく、染色骨格透明標本に適した資料と考えられる。ただし、180mm以上の大型ウシガエルでは筋肉組織が非常に厚く、脚部だけで200mm以上になる。そのため大腿骨等を観察するには処理時間を長くする必要があった。観察しにくい部位については解剖後、部分的筋肉除去を行えば、透明化の処理が容易になると考えられる。



図7 アズマヒキガエル

*Bufo japonicus formosus* (phalanx, metacarpus)

### 8-2 カエル幼生（オタマジャクシ）

今回、作製に用いた資料は変態途中の幼生であったが、その脚にも骨の形成が確認できた（図8）。1mm以下の骨を正確につなぐことは交連骨格標本では不可能と考えられることから、カエル幼生における染色骨格透明標本は極めて有効と考えられる。成長段階毎に標本化を行えば後肢の形成過程を観察できるものと考えられる。

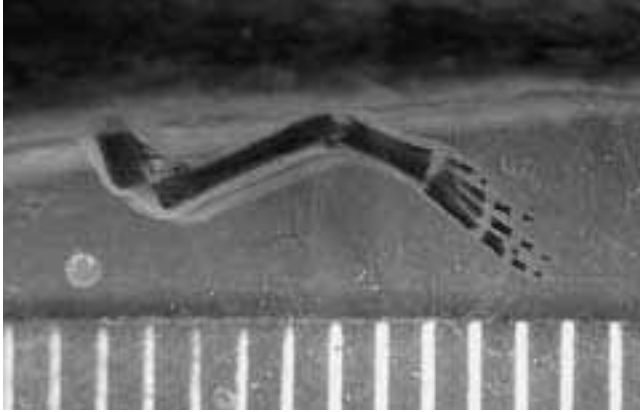


図8 ウシガエル幼生 *Rana catesbeiana* (tadpole)

### 8-3 ヘビ

筋肉組織も薄くほぼ透明化した。しかし、体壁には脱色できない部分もあり、できるだけ取り除いておく必要があると考えられた。カエル幼生と同様、幼蛇頭部の微細構造（図9）も200を越える脊椎骨や肋骨も正確に観察することができることから、ヘビにおける染色骨格透明標本も非常に有効であると考えられる。



図9 シマヘビ *Elaphe quadrivirgata*

### 8-4 ニホンカナヘビ

ニホンカナヘビ（図10）などの指骨も非常に小さく交連骨格標本作製することは非常に困難と考えられる。しかし、染色骨格透明標本では、それぞれの骨を解体する必要

がないため他の資料と同様処理することができた。ただし、尾部についてはトカゲ特有の自切があるため、非常に切断しやすかった。そのため、尾部の剥皮は不可能で現時点では標本には適さないと考えられる。



図10 ニホンカナヘビ *Takydromus tachydromoides*

## おわりに

今回の結果から染色骨格透明標本の作製では、トリプシンまたは水酸化カリウムの単独使用より、両者の併用が有効であるという結論に達した。交連骨格標本の作製が困難と考えられる小さな個体では非常に有効な手段であり、骨や関節の形成過程を研究する資料として非常に役に立つと考えられる。今後は、この方法による資料をもとに、カエル幼生の脚骨格の形成過程を研究していきたいと考えている。

## 引用文献

Dingerkus G and Uhler LD (1977): Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology*, 52: 229-232

八谷 昇・大泰司紀之(1994): 骨格標本作製法. 北海道大学図書刊行会: 4-95

小久保博志・月田典寿(2000): 博物館における凍結乾燥標本の製作. 群馬県立自然史博物館研究報告, 4: 103-108

# 群馬県立自然史博物館研究報告 投稿規定 (2005年3月修正)

## A 投稿内容

### 1 「群馬県立自然史博物館研究報告」の内容

本誌には、自然史およびそれに関連する分野の総説、原著論文、短報、資料、技術報告、雑報等その他編集委員会が適当と認めたものを掲載する。外部投稿者は群馬県または当館所蔵の標本と関連する内容に限る。

### 2 投稿の手続き

原稿はA4版縦使い、横書きとする。印字は、和文の場合1行40文字×30行とし、行間、余白を十分とること。句読点、は、を使用する。英文の場合は、ダブルスペースで30行とする。各ページの右上に著者名を入れること。投稿者は、投稿規定に従って作成した原稿1部とコピー2部に投稿原稿送付票を付してすべてを編集委員会に提出すること。

### 3 原稿言語

原則として、和文または英文。

### 4 原稿の受理

編集委員会は、受け取った投稿原稿の受付年月日を記録し、原稿を保管する。ただし、投稿原稿が投稿規定に明らかに反している場合には、受付前に理由を付して、原稿を著者に返却する。

### 5 原稿作成

投稿原稿は、すべてパソコンを用いて作成し、MS-DOSフォーマットしたメディアにテキストファイルで保存のうえ、原稿ごとに査読修正変納時に添付・提出する。ただし、使用できるメディアは3.5インチフロッピーディスク、3.5インチMOディスク、CD-R、CD-RWとする。

### 6 原稿の構成

和文の場合は、原稿の第1枚目に、表題、著者名、所属、要旨(総説と原著論文は必ず入れる)、キーワード(5語程度で1行に収まる範囲)を書くこととする。本文構成は原則として、はじめに、資料(試料)、方法、結果(記載)、考察、謝辞、引用文献、英文表題、英文著者名、英文所属、英文要旨(300語以内)とする。英文の場合は、前記の和文の構成に準じ、和文要旨をつける。大項目(はじめに、資料(試料)、方法、結果(記載)、考察、謝辞、引用文献)には番号をつけず、行の中央にそろえ、ゴシック体を使用する。大項目を整理する上で必要な中・小項目についても番号を設定せず、ゴシック体左揃えとする。なお、記載や検索のために項目の整理が必要な場合 1 > 1-1 > a > a-1 の順位で記号を付与することができる。

### 7 図表

図表は本文とは別紙とし、挿入箇所を本文原稿の欄外に記入する。原図はそのまま製版が可能なものとする。資料に関する図や実物写真にはスケールを入れる。各図表の右上に、著者名を入れる。印刷後の図表及び写真は、モノクロを原則とする。カラー製版をとまなう図もしくは図版の掲載を希望する場合には投稿原稿提出時に編集委員に申し出る。編集委員はその可否を検討し、決定する。また、図表にとまなう電子ファイルがある場合、これを添付してもよい。

図表とその表題は1言語で作成し、見出しは例にならって作成する。また図版以外の写真と図は分けない。本文中に引用する図表の表記は図表の表題に準じる。

(例): 図1 表1 図版1 Fig.1 Table 1 Plate 1

### 8 著者名の表記

原稿著者の表記は下記の例にならい、共著の場合著者の右肩に所属を示す番号を入れる。

(例): 阪東太郎<sup>1</sup>・谷川岳史<sup>2</sup>・板倉 潤<sup>1</sup> BANDO Taro<sup>1</sup>, TANIGAWA Takeshi<sup>2</sup>, and ITAKURA Jun<sup>1</sup>

### 9 引用文献

引用文献は、文章末に一括して、下記の例にならい、著者のアルファベット順に並べる。同著者では年号順に並べ、同年代の場合には年号の後に a, b をつけて区別する。文献名の略称は各分野の慣習に従う。

(例)

米倉浩司・大橋広好(2002): ヒマラヤとその周辺地域のイブキトラノオ属(タデ科)の分類学的検討(2). 植物研究雑誌, 77:61-81.

Sarah S. D. and Mc. Connaughay K.D.M.(2002): Interpreting phenotypic plasticity: the importance of ontogeny, Plant

Species Biology, **17**:119-131.

Shizenshi Taru(2000): Birds of Momizidaira-Park, Tomioka, Gunma Prefecture. Bulletin of Gunma Museum of Natural History, **4**:51-59.

角川日本地名大辞典編集委員会(1988): 角川日本地名大辞典 10 群馬県 . 角川書店, 東京, 1474pp .

Jefferson, G. J. and Grice, P.V(1998): The conservation of lowland wet grassland in England. In:Joyce, C.B. and Wade, P. M. eds., European wet grasslands, John Wiley and Sons Ltd., Chichester, U.K., p.31-48 .

中村太士(2000): 水辺林の更新動態, 水辺域管理, pp.41-63, 砂防学会編, 古今書院, 東京 .

また,本文中における引用文献の表記は例の通りとする .

例:(富岡・藤岡,2002),(太田ほか,2001),(Shibukawa and Numata,2002)

## B 原稿の審査と採否

### 1 原稿の審査

編集委員会は,受け付け時及び査読修正返納時に原稿を審査し,掲載の可否を定める .

### 2 原稿の査読

編集委員会は,受け付けた総説,原著論文,及び短報を外部査読にかける . 査読の結果,著者に修正を求めることがある . 修正を求められた原稿は2週間以内に編集委員会に返送することとする .

### 3 原稿の採否

編集委員会は,掲載適当と認めた原稿について,文書を送付する . また,掲載不適当と認めた原稿について,その理由を明らかにした文書を付して著者に,原稿を返却する .

## C 校正

### 1 初校

校正は,初校のみ著者校正とし,再校正以後は編集委員会が行う .

### 2 初校返送期限

初校は,1週間以内に編集委員会に返送することとする .

## D 別刷り

### 1 寄贈別刷り

別刷りは,一編につき各100部(表紙なし)を著者へ寄贈する . 著者が連名の場合には,筆頭著者に寄贈することとする .

### 2 別刷りの増刷り

100部以上の別刷りを希望する場合,投稿時に50部単位で申し込むこととし,著者の実費負担とする .

## E 群馬県立自然史博物館研究報告の内容

### 1 総説(Review)

自然史分野の論文や学説などを総括,解説,あるいは考察したもの .

### 2 原著論文(Original Article)

オリジナルな研究論文で,未発表のもの .

### 3 短報(Short Article)

短い論文,または新事実などの簡単な報告 .

### 4 資料(Data)

考察を加えない,生のデータ等 .

### 5 技術報告(Technical Report)

新しい技術の報告 .

### 6 雑報(Miscellaneous)

調査,研修,学会参加等の報告,資料目録 .

### 7 その他編集委員会が必要と認めたもの

投稿原稿送付票	
原稿種別（該当するものを で囲む） 総説・原著論文・短報・資料・技術報告・雑報	
著者名（ふりがな）	
表題	
簡略表題（20字以内）	
英文著者名	
英文表題	
原稿枚数 本文： 枚 / 付表： 枚 / 付図： 枚 / 写真： 枚 図の説明： 枚 / 英文抄録： 枚	
別刷希望枚数（無料進呈の100部を除く） 合計 部 （費用は著者負担で，50部単位で申し込む）	
連絡先・校正刷送付先（所属） 〒 - TEL:( ) - FAX:( ) - E-mail:	
自宅住所（連絡先と同じ場合は記入の必要無し） 〒 - TEL:( ) - FAX:( ) - E-mail:	
* 原稿受付日： 年 月 日	* 原稿受理日： 年 月 日
* 査読者 氏名（ふりがな）： 所属住所：〒 - TEL:( ) - FAX:( ) - E-mail:	

註：\*印は，編集委員会で記入する