國學院大學学術情報リポジトリ

理科室における生物標本としての透明骨格標本作製の可能性

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-02-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堀江, 紀子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.57529/00001248

理科室における生物標本としての透明骨格標本作製の可能性

堀江　紀子

Possibility of making the transparent skeletal specimens for biological specimens in science laboratory

Horie　Noriko

キーワード：理科室、理科教育、理科教材、透明骨格標本

１．はじめに

理科の学習指導を行うにあたり生物分野の観察では、標本を使うことがある。実際に生きている生物を観察することも大切であるが、植物分野では顕微鏡でプレパラート標本を観察したり、生きている葉や花などを児童・生徒と共に採集し自分たちで乾燥標本を作製したりすることもある。動物分野では骨格標本や液浸標本から、筋肉の様子や関節の仕組みなどを観察することができる。標本には生体からは得られない情報を得ることができるという利点がある。したがって学校近辺に生息する生物を標本にして活用できれば、貴重な教材となる可能性が高い。

この数年の間に、これまで理科室の標本として目にすることのなかった透明骨格標本の知名度が、出版物やインターネットを通して急速に高まった。一般的にも、観賞用として雑誌やテレビ番組に登場することもあり、研究者以外にも認知され、インテリアや芸術作品として作られ販売されていることもある。また神秘的な雰囲気を漂わせる写真集（冨田 2009）や、図鑑（宝島社 2009）が出版されたり、自然史系博物館での企画展示のポスターに登場したり（神奈川県立生命の星・地球博物館）と注目されている。

透明骨格標本は魚類や小動物の繊細な骨格系を、生きているときのままの骨組みで立体的に観察することができ、研究用標本としての学術的な有効性が認められている（河村、細谷 1991）。その作製法はインターネットで検索すれば見つけることができる。例えば自然史博物館などが公開しているWebサイトが参考になる（国立科学博物館）。

学校現場の理科教員が、学校近辺に生息する生物の透明骨格標本を理科室で自作することは容易なのか。本稿では理科室で行う作製方法について述べ、理科室で教材活用できる生物標本としての透明骨格標本の有用性と、日常業務や授業を持つ教員による理科室での作製の可能性について考察する。

２．透明骨格標本とは

透明骨格標本とは骨格を観察するために、骨格を取り出すことなく、試料の筋肉や軟組織を透

明化し、硬骨を赤、軟骨を青の二色の色素で染め分ける手法で作製した標本である。硬骨のみを染色する手法もある。Dingerkus and Uhler（1977）による軟骨・硬骨の二重染色法をベースに、主に魚類研究者の間で少しずつ改良が加えられてきた（澄川、藤田 1984a; 1984b）。染色骨格透明標本、透明標本などとも呼ばれる。筋肉の主要成分であるタンパク質を分解し、骨を染色した後、グリセリンを徐々に浸潤させ、最終的に100％グリセリンで封入している。標本はガラス容器の中に浮かび、透明な筋肉組織の中に赤と青で鮮やかに染色された骨格を、生きているときのままの立体的な配置で観察することができる。魚や鳥などの小動物や幼獣などの未成熟な動物の骨格を見る場合に、骨同士を組み上げて作られる交連骨格標本を作製することは非常に難しく不可能である場合も多い。そのような試料でも透明骨格標本にすれば、赤く染色された硬骨と青く染色された軟骨が連なる様子を詳細に観察することができる。爬虫類や両生類の学術標本としても有効性が評価されている（須田 2005）。

３．透明骨格標本作製手順

前述したように研究者により少しずつ改良が加えられてきた作製方法だが、試料を透明にする段階であるタンパク質の分解方法はおおよそ3通りに分けることができる。タンパク質分解酵素を使用する場合と、塩基性溶液を使う場合、両方を併用する場合、である（図１）。

３－１．作業全体の流れ

以下に透明骨格標本作製の手順とおよその必要日数を示す。使用した薬品、作製にかかった日数は表１にまとめた。標本作製に使用した試料は表１のように、学校近辺で手に入るような雑多な種類の生物を使った。近くの田んぼや川、校内で採集したもの、スーパーで購入したものなどである。時間管理については、精緻な標本作りには厳密な時間管理が必要との考え方もあるが、今回は“素晴らしく完成度の高い”標本や芸術作品ではなく、“観察に耐えうる”程度の標本作製を目的としている。理科教員が学校現場で日常業務や授業をこなしながら、その合間を利用してどの程度作製が可能なのか考察するため、あえて日単位での時間管理とした。

[試料の固定]
水洗し10％ホルマリンで固定
　↓３～10日以上（試料の大きさによる）
[試料の洗浄、脱水]
50％エタノール、100％エタノールの順に1日ずつ替え、試料の水分をエタノールに置換
　↓３日程度（この間に皮剥ぎ、内臓の除去）
[軟骨の染色]
氷酢酸：エタノール＝3：7にアルシアンブルー8GXを１％程度加える

↓１日

＜試料の透明化＞

・タンパク質分解酵素を使用する方法

・塩基性溶液を使用する方法

・両方を併用する方法

↓

[硬骨の染色]

0.5％水酸化カリウム（KOH）水溶液

＋　アリザリンレッドS適量

↓１日

[透明化の促進]

0.5％～KOH水溶液

↓１日～

[グリセリンへの置換]

0.5％KOH水溶液：グリセリン＝3：1から

徐々にグリセリンの割合を増やし、

最終的に100％グリセリンに置換する

↓３日～

[封入]

100％グリセリン　＋　チモール1～2粒

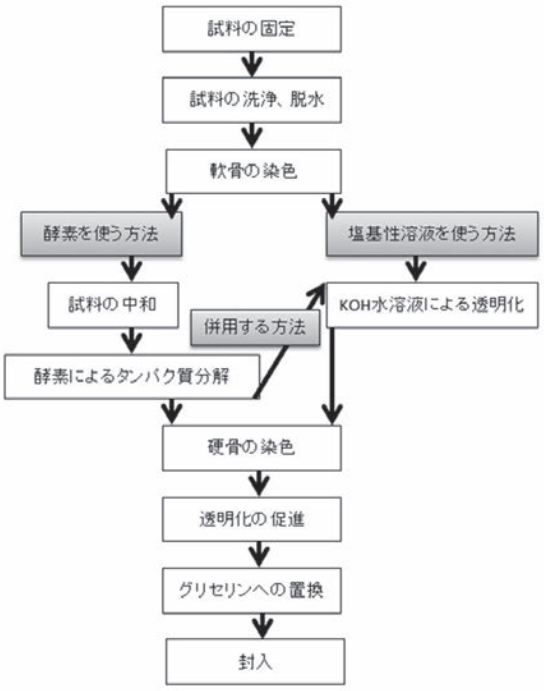

図１．透明骨格標本作製手順

［試料の固定］で使うホルマリンはホルムアルデヒド35～38％水溶液であり、これを10％溶液にして使用する。ホルマリンは腐敗の進行を止める。ホルマリンによる固定を行うと試料は固くなり、扱いやすくなる。メダカのような小さく脆弱な試料は固定後に皮剥ぎ・内臓除去をした方が、試料の崩壊を防ぐことができる。

【ホルマリン利用上の注意】試料の固定時に利用するホルムアルデヒドは毒物及び劇物取締法により医薬用外劇物に指定されており、発がん性が指摘されている。また建材からの空気中放出によるシックハウス症候群の原因物質としても知られる。理科室でのホルマリン使用は児童・生徒のいない時間帯に行い、使用者もマスクと手袋、安全メガネを着用の上（写真１）、作業中～後の換気を十分に行い、ドラフトがあればドラフト内で作業を行うべ

写真１．作業時の装備

きである。ホルマリンは鍵のかかる薬品庫で保管されなければならない。人体へのホルマリン暴露を少しでも軽減するため、試料の皮剥ぎや内臓除去は固定後すぐではなく、［試料の洗浄・脱水］の後に行うと良い。

［軟骨の染色］［硬骨の染色］については次節以降で詳述する。

［透明化の促進］は、試料の状態によりKOH水溶液の濃度を調節して進めていく。

［封入］では、グリセリンとともに防腐剤としてチモールを１～２粒加える。

３－２．タンパク質分解酵素を使う方法

図１［軟骨の染色］後、＜試料の透明化＞においてタンパク質分解酵素を使う場合の手順は以下のとおりである。

［軟骨の染色］
　↓
［試料の中和］
四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液
　↓１日
［酵素によるタンパク質分解］
四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液：水＝3：7にトリプシンを1%加える
　↓１～４日
［硬骨の染色］以後３－１と同じ

タンパク質分解酵素トリプシンは消化酵素の一つである。これを使用する利点は、標本の透明化を短時間で促進することができる点と、その透明度が高く、仕上がりがきわめて良い点にある。表１は透明骨格標本作製にかかった日数を表しており、試料別に［軟骨の染色］後から［グリセリンへの置換］前までの、透明化までの日数を比較している。試料の大きさにもよるが、およそ1日～4日程度で透明化は進む。

トリプシンを使用する際に最も注意が必要なのが、溶液の温度管理とｐＨ管理である。トリプシンは40℃前後で活性化するため、恒温庫で温度を保つようにする。発泡スチロール容器とヒーターで簡易恒温庫を自作してもよいし、比較的低温で温度を保てる実験用ホットプレートなどでも代用できる。トリプシンの最適ｐＨは８～９である。酵素による透明化の前段階では酢酸を使った軟骨の染色を行っているため、溶液は酸性になっている。このままではいかに温度管理を徹底してもトリプシンは活性化せず、透明化は進まない。四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液による中和を１日行った後もｐＨ５～６の場合があるので、溶液のｐＨ管理を小まめに行いながら進める必要がある。溶液のｐＨ管理のためにｐＨ計があると便利である。

しかしトリプシンの利用には難点がいくつかある。価格が高く、25ｇで12,000円程度と高価で

あること、加えて冷蔵保存しなければならないことである。冷蔵便で届けられた後、冷蔵庫で保存する必要があるが、食品と共に保管することは大変危険であり、絶対に避けなければならない。

３－３．塩基性溶液を使う方法

図１［軟骨の染色］後、＜試料の透明化＞において塩基性溶液を使う場合の手順を述べる。

［軟骨の染色］
　↓
［KOH水溶液による透明化］
　↓６日～
［硬骨の染色］以後３－１と同じ

［軟骨の染色］後、酵素を使わない場合は、塩基性の水酸化カリウム（KOH）水溶液による透明化を行う。KOH水溶液による透明化を進める場合、試料の大きさによってその濃度を調整する。70mm程度の小魚のような小さな試料は3%、100mmを超える大きさであれば5～7%で様子を見ながら進める。

ここで用いるKOH水溶液は強アルカリ性であり、タンパク質に対し強い腐食性がある。水と反応する際の湯気を吸わないように注意する。皮膚についた場合はすぐに水で洗い流す。KOHは毒物及び劇物取締法で劇物に指定されているので、ホルマリン同様、鍵のかかる薬品庫で保管しなければならない。

３－４．タンパク質分解酵素とKOH水溶液の両方を使う方法

図１［軟骨の染色］後、＜試料の透明化＞においてタンパク質分解酵素による透明化ののち、微妙な透明化の促進が必要な場合にはKOH水溶液を用いる。また、トリプシンによって試料が柔らかくなりすぎた場合には、酵素による透明化を中断し、KOH水溶液に切り替える。これらの場合のKOH水溶液の濃度は試料の状態を見ながら0.5～5%程度の範囲で調整する。

以上、試料の透明化の方法を3通り示したが、小魚やエビなど小さな試料は、酵素を使っても使わなくても透明化までの日数はほぼ変わらなかった。マアジのような肉厚で中型の魚は、KOH水溶液だけでは透明化するまでかなり時間がかかった。軟骨の染色後、酵素とKOH水溶液を併用してタンパク質の分解を行い、硬骨の染色後の透明化促進の工程でもKOH水溶液の濃度を調節して透明化を進めるのが、標本作製の成功のコツである。

表 1. 試料別骨格透明標本作製日数

試料名			トウキョウダルマガエル	シジュウカラ	スジエビ	セミの抜け殻	マアジ	ヤモリ	ギンブナヨシノボリ	ワカサギ	メダカ	セミの抜け殻	小魚	メダカ	ヤモリ	マアジ	マアジ
作業		使用薬品	酵素を使う							酵素もKOH溶液も使う			酵素を使わない				
①	固定	10%ホルマリン溶液	8	7	1	3	9	120	15	13	4	2	26	124	120	9	9
②	皮剥ぎ・内臓除去																
③	脱水	50%エタノール	1	1	2	3	4	2	2	1	2	1	2	2	2	4	4
④	脱水	100%エタノール	1	1	5	2	5	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5
⑤	軟骨染色	(氷酢酸3:エタノール7) +アルシアンブルー８GX	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
⑥	中和	四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液	3	1	1	1	7	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-
⑦A	タンパク質分解	(四ホウ酸ナトリウム飽和水溶液3:水7)+トリプシン	1	4	3	3	失敗	4	4	3	2	2	-	-	-	-	-
⑦B	タンパク質分解	水酸化カリウム水溶液（濃度は試料の状態による）	-	-	-	-		-	-	1	1	7	1%に6	3%に5	5%に4	5%に16	7%に16
⑧	硬骨染色	0.5%水酸化カリウム水溶液+アリザリンレッドS	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
⑨	透明化の促進	0.5%～5%水酸化カリウム水溶液	12	2	1	1		1	1	1	1	1	1	1	失敗	13	13
透明化までの日数（⑥～⑨）			17	8	6	6	−	7	7	7	6	12	8	7	−	30	30
⑩	水分の置換	0.5%水酸化カリウム水溶液3：グリセリン1	3	3	1	1		2	2	6	2	1	2	2		2	2
⑪	水分の置換	0.5%水酸化カリウム水溶液1：グリセリン1	2	10	1	1		2	2	9	2	1	2	2		2	2
⑫	水分の置換	0.5%水酸化カリウム水溶液1：グリセリン3	3	3	3	1		3	3	1	3	1	3	3		2	2
⑬	水分の置換	100%グリセリン	2	25	10	3		30	30	10	30	3	30	30		20	20
⑭	封入・防腐	100%グリセリン+チモール															
標本としての出来具合（◎○△×）			◎	◎	△	○	×	◎	○	◎	○	○	○	○	×	○	◎

判断基準＝◎筋肉部が極めて透明で濁りがない　○筋肉部が透明　△筋肉部が半透明　×筋肉部が白く不透明

４．標本の有用性

標本としての有用性を写真によって検証する。一見して、筋肉を介し赤く染まった硬骨同士のつながりや、青く染まった軟骨（丸印）の存在を観察することができる。

写真２はトウキョウダルマガエルである。透明骨格標本にした全身写真からは、哺乳類とは違った骨格を見ることができる。指骨の写真からは、手のひらから末節骨まで長さ10mm程度の骨の様子がしっかりと染色され関節の様子を観察することができる。細かな骨で形成されている頭骨からは独特の大きな口や歯、頭骨に占める眼窩の割合の大きさ、鼻部分の軟骨（丸印）が分かり、側面から見るとカエルには肋骨がないことも確認できる。下半身では背骨と腰の骨と大腿骨のつながり具合や、距骨と踵骨が孔のあいたような形を作っている状態を立体的に見て取ることができる。

【写真２．トウキョウダルマガエル】

写真 2-1　ホルマリン固定

写真 2-2　透明骨格標本全身

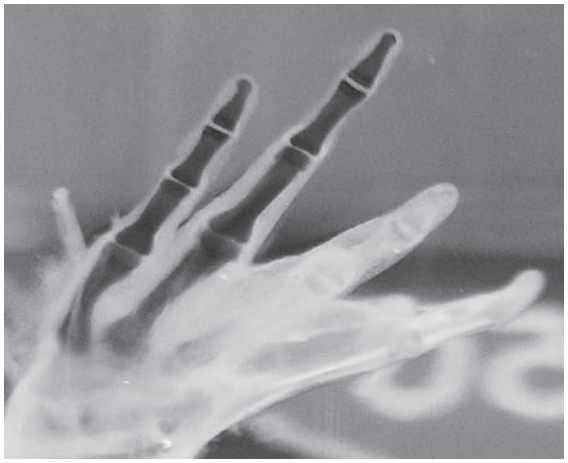

写真 2-3　前肢指骨

写真 2-4　頭骨

写真 2-5　側面から見た全身

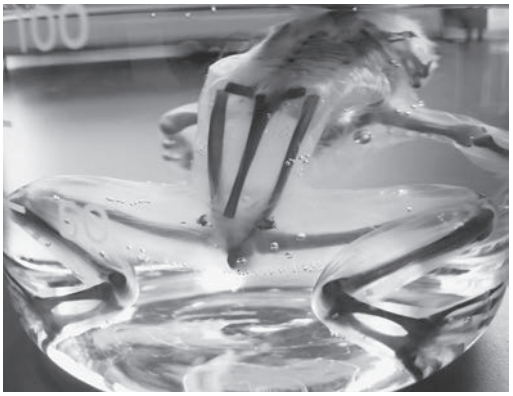

写真 2-6　仙骨、腸骨、尾骨と下肢の様子

写真３はシジュウカラである。衝突死とみられ左側頭部が陥没していた。骨格透明標本にすると、羽のないつるんとした状態となり、観察者がヒナと勘違いするケースがある。透明骨格標本からは、胸骨の竜骨突起や癒着した背骨と骨盤（複合仙骨）の形、筋肉の上に肩甲骨が乗った様子、上腕骨とのつながり、尾端骨までの連続性がわかる。

【写真３. シジュウカラ】

写真 3-1　透明骨格標本全身

写真 3-2　背部から見た様子

写真４はワカサギである。魚の骨は肉を外したり煮たりするとバラバラになってしまい、特に頭部は細かい骨が多く、組み立てて復元するのはかなり困難である。写真4-1からは頭骨の様子や青で染まった強膜骨（矢印）が分かり、透明骨格標本が魚の骨を観察するのに非常に適していることがわかる。写真4-2からは椎骨の形と尻鰭の軟条が観察でき、その付け根は青く染まっている（丸印）ことから軟骨であることが分かる。写真4-3は尾鰭を支える尾骨（丸印）を詳細に観察することができる。

【写真４. ワカサギ】

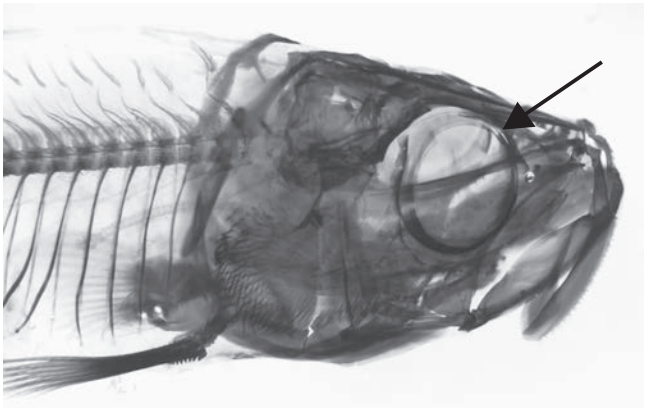

写真 4-1　頭骨

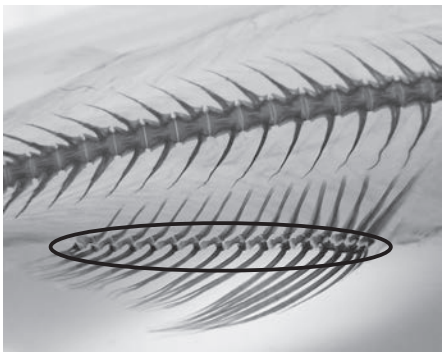

写真 4-2　尻鰭

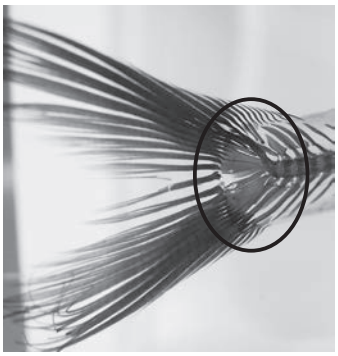

写真 4-3　尾鰭

５．理科室での標本作製

試料の収集は普段から行い、死骸が手に入ったら採集に関する情報を記録し、試料の大きさの計測・写真撮影を行ってからホルマリン溶液に漬けておき、試料が固定した後、完成までの日数をある程度逆算し、都合のよい時期に次の工程を始めればよい。

表１のように１つの試料を骨格透明標本に仕上げるまで､ホルマリンでの固定日数をのぞいて､メダカのような小魚程度であれば10日ほど、肉厚のアジや小鳥、カエルなどは短くても１か月以上かかる。

工程の中で最も注意が必要なのは、タンパク質分解酵素を使った場合の透明化の時間管理である。長すぎると崩れてしまうことがある。ワカサギのように油分が多く身がもろい試料は途中で崩れてしまったり、アジのように身が厚い試料は透明化に時間がかかり腐敗したりすることがある。染色にも注意が必要で、硬骨、軟骨とも１日を超えると染まりすぎるので気を付けなければならない。

標本完成までの時間はわりと長くかかるが、一連の工程の中ではある程度放置しても問題のない過程が多い。教員が授業や休日などとの兼ね合いで調整しながら作業することができる。毎日規則正しく世話をしなければならないという作業ではない上、数日おきに行う溶液交換などの１回の作業時間は10分程度である。このように骨格透明標本づくりは時間的余裕をもって作業にあたることができ、日常業務を持ちながらの作業や授業の合間を見ながらの標本作製は十分に可能である。

骨格透明標本を作製する場合、薬品の計量に必要な天秤やガラス器具、薬品保管庫などの器材が使える理科室という環境は、作業効率が大変よく、利点を活かして作業が進められると言えるだろう。

６．おわりに

透明骨格標本の、教材活用できる理科室での生物標本としての有用性と、日常業務を持つ教員による理科室での作製の可能性について、実際の作業工程に基づいて考察してきた。

学校近辺に生息している魚類や小鳥、カエル、ヤモリなどの小動物は、交連骨格標本を作製するには繊細すぎて、根気と細かな骨の知識が必要となる。このような動物の骨格を観察するための標本として、骨を組み立てる必要がなく、生きている状態と同じ筋肉組織の中にあるままの骨組みを観察することができる透明骨格標本は、非常に適していると言え、身近な生物の標本として教材化することができるだろう。

作製法については多くの工程が必要ではあるが､次の工程に追われるような作業ではないため、時間的余裕をもって作業に取り組むことができる。薬品の取り扱いに気を付ければ、特殊な技術を要することもない｡加えて理科室という環境は作業効率が大変良く､標本作りには最適である。

以上のように、透明骨格標本は理科室における教材用生物標本として有用であり、理科教員による作製も可能であることがわかった。今後は、骨格標本の新しい形である透明骨格標本の、理科教材としての活用法を見出していきたい。

標本作製にあたって薬品の処理方法や器材について國學院大學人間開発学部加藤季夫先生にご教示いただいた。同学部原英喜先生、髙山真琴先生には試料の提供をいただいた。ここに御礼申し上げます。

参考文献・Webサイト

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

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.　養殖研報.120, 11－18

澄川冬彦、藤田清. 1984a. 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

澄川冬彦、藤田清. 1984b. 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

須田透. 2005. 両生・爬虫類染色骨格透明標本の有効性.　群馬県立自然史博物館研究報告. 9, 121－125
冨田伊織. 2009. 新世界透明標本. 小学館
驚異！透明標本. 2009. 宝島社（別冊宝島1663）
神奈川県立生命の星・地球博物館企画展「博物館の標本工房」開催期間2012.12.15～2013.02.24
国立科学博物館魚類研究室「UODAS」Webサイト内　“標本作成方法”（参照 2012-12-18）
http://research.kahaku.go.jp/zoology/uodas/collection/how_to_make/index.html

（ほりえ　のりこ・國學院大學人間開発学部資料室助手）