

干物を利用した魚類透明骨格標本の作製

小西 雅樹*・朝井 俊亘**・武内 啓明**・細谷 和海**

*近畿大学農学部環境管理学科

**近畿大学農学研究科環境管理学専攻

Technique for making a transparent fish skeletal specimen by using dried food fishes

Masaki KONISHI*, Toshinobu ASAI**, Hiroaki TAKEUCHI**
and Kazumi HOSOYA**

**Department of Environmental Management, Faculty of Agriculture, Kinki University,
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

***Program in Environmental Management, Graduate School of Agriculture, Kinki University,
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

Synopsis

Possible application of a modified double staining technique to make a transparent skeletal specimen by using dried food fishes is proposed. The steps of the present technique, modified from those of previous techniques based on museum or fresh specimens, are as follows: (1) Soaking of dried fishes for almost a day in water to remove salt before fixation; (2) fixation of specimens in relatively thick formalin; and (3) digestion of muscle with a low-concentration KOH solution. This new technique results in dried fishes more transparent, compared with the results of the conventional techniques.

Keywords: processed marine products, double staining technique, transparentization, material for scientific education

1. はじめに

筋タンパク質を透明化し硬骨を赤に軟骨を青に染め分ける二重染色法は、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、および発生学などさまざまな分野で活用されている。二重染色法は、水産学研究においても、種苗の健苗性判定¹⁾や魚類資源の系統解析方法としてすでに確立されている。さらに本法による骨格異常に関する知見も得られている²⁾。二重染色法は、Williams³⁾によって1941年に開発され、その後、軟骨染色はtoluidine blueではなくalcian blueを用いる方法に^{4,5)}、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^{6,7)}。また、透明化処理時に問題となる体

表面黒色素や眼球色素の残留は過酸化水素水への浸漬や紫外線照射を行なうことによって漂白されることが分かっている^{3,8)}。その後も各処理において数多くの改良がなされて^{9,15)}、河村・細谷¹⁶⁾は、透明化の段階において筋タンパク質の消化を妨害する脂肪分の効果的な除去手段としてキシレンによる脱脂方法を開発した。これにより、比較的多くの脂肪分をもつ脊椎動物をより透明化できるようになった。しかし、これらの方法は、鮮魚もしくは固定標本から作成することを主目的としている。

近年、食品表示制度や産地偽装問題が話題となっている水産加工物に二重染色法を用いた例はない。干物や佃煮などの水産加工物は、魚体に変形や変色が生じるため外部形態で種を同定するこ

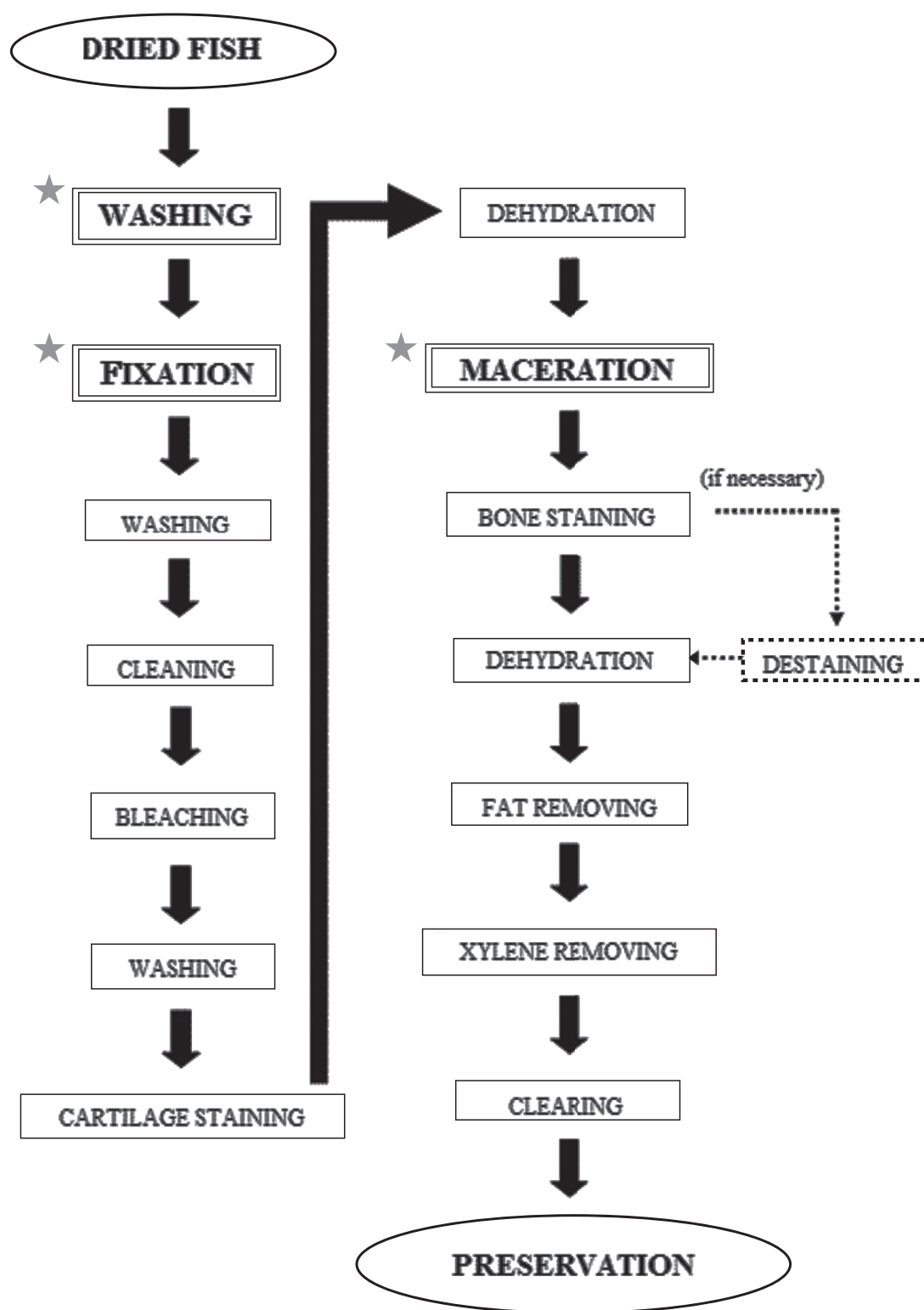


Fig. 1. Flow chart of steps in the modified double-staining technique for making a transparent specimen by using dried fishes. Asterisk indicates a newly modified steps.

とが困難である。そこで、本研究では水産加工物の干物に焦点をあて、脂肪分を効果的に除去できる改良二重染色法¹⁶⁾を改良し、干物からの透明骨格標本作製への応用の可能性を検証した。同時

に、干物から作成した透明骨格標本の水産学分野および理科教材への応用の可能性についても検討した。



Fig. 2. Figures of *Glyptocephalus stelleri* before and after the modified double-staining. (A) a specimen before fixation, (B) cleared and double stained according to the manner of the revised method. Scale = 50 mm.

2. 材料と方法

供試魚 奈良県内スーパーで購入したヒレグロ *Glyptocephalus stelleri* (産地不明、 $n=12$ 、167 ~ 182 mm SL)、シシヤモ *Spirinchus lanceolatus* (北海道産、 $n=4$ 、81 ~ 92 mm SL)、カラフトシシヤモ *Mallotus villosus* (産地不明、 $n=5$ 、138 mm ~ 161 mm SL) の干物、および比較対照としてアユ *Plecoglossus altivelis* (滋賀県琵琶湖産、 $n=8$ 、103 ~ 122 mm SL) の鮮魚を用いた。

薬品 フォルマリン (無調整)、alcian blue 8GX (粉末)、alizarin red S (粉末)、氷酢酸、グリセリン、泡水クロラール (結晶状)、エタノール、水酸化カリウム、過酸化水素水、キシレン、およびチモールには、すべて試薬特級 (和光純薬) を用いた。

方法 本報では干物から透明骨格標本を作製するため、河村・細谷¹⁶⁾の二重染色法を改良した (Fig. 1)。主な改良は次の3点である。1. 塩抜きのために水戻しをすること、2. 固定時のフォルマ

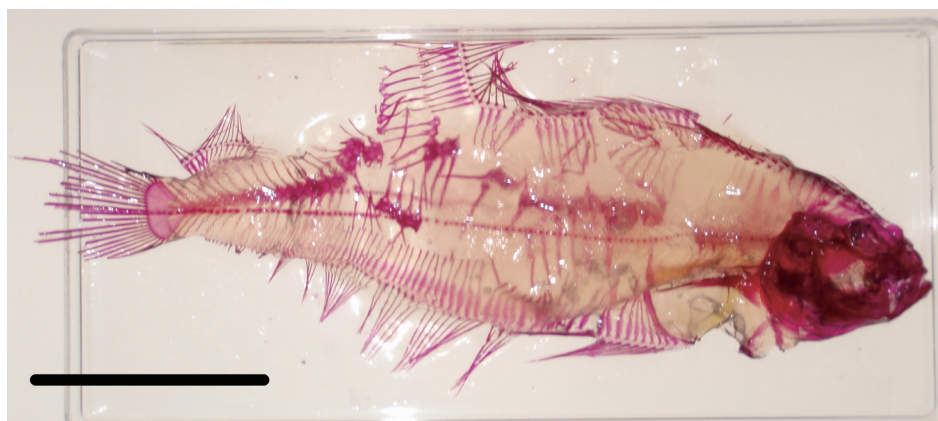


Fig. 3. An unsuccessful case in *Glyptocephalus stelleri*. After being cleared and double-stained according to the treatment with 4% KOH solution, broken vertebrae are shown; cartilages are not stained in blue. Scale = 50 mm

リン濃度を高くすること、3. 透明化処理時の水酸化カリウム水溶液濃度を低くすることである。

改良点 1 (水戻し) 干物はそのままの状態では、塩分、醤油、およびみりんなどの調味料を含むため、ホルマリンで固定する前に流水中に1日放置して塩抜きした。

改良点 2 (固定) 従来の方法では鮮魚を 10 ~ 20% フォルマリンで固定するが、干物は固定された鮮魚標本より、透明化する際に表皮および筋肉が崩壊しやすいため (Fig. 3)、濃度を 30% に上げたホルマリンで約 1 ヶ月固定した。

改良点 3 (透明化) 透明化の方法としては、トリプシンを用いる方法^{6,7)}と、水酸化カリウムを用いる方法^{3,5,16)}があるが、本報では安価かつ容易に透明化が行なえる水酸化カリウム水溶液を用いた。河村・細谷¹⁶⁾は、水酸化カリウム水溶液の濃度を 4% としているが、干物では表皮が破裂しやすいため (Fig. 3)、2% 以下とした。

3. 結果

3 点の改良を加えた本法で透明骨格標本作製した結果、従来の方法では崩壊しやすかった干物の形を崩さずに透明化することができた (Fig. 2)。それぞれの改良点に対する結果は以下のとおりである。

改良点 1 (水戻し) 水戻しを行なったことにより、調味料による影響を軽減できたと思われる。

改良点 2 (固定) 低濃度のホルマリンで固定した場合と比べて、表皮および筋肉の崩壊が少なく、魚体の形を維持したまま透明化することができた。比較実験として干物を 10% フォルマリンで固定した標本で透明骨格標本作製を行なったが、透明化処理中に表皮と筋肉の崩壊が生じ、骨格系の観察が困難な状態になった (Fig. 3)。

改良点 3 (透明化) 今回は 1%、2%、4% の 3 種類の濃度の KOH を用いて透明化処理を行なった。4% KOH は、河村・細谷¹⁶⁾で述べられている透明化完了の基準である「中軸骨格が透けて見える」に至る前に表皮が裂け始め、最終的には標本が崩壊した (Fig. 3)。一方、1% および 2% では、濃度が低いため、従来の方法より透明化に時間がかかったものの、表皮や筋肉の崩壊が少なく、形を崩さずに透明化処理を行うことができた。な

お、インキュベーターを用いて溶液の温度を 50℃ 程度に上げることによって反応速度を高めることが可能であった。

4. 考察

本研究で確立した干物からの透明骨格標本作成法で作成した透明骨格標本は、透明化には成功しているものの、材料に褐変が認められた。主な原因として考えられるのがアミノカルボニル反応である。また、軟骨染色も鮮魚標本にくらべて染まりにくいなどの課題が残った (Fig. 3)。以下に、アミノカルボニル反応および軟骨染色の 2 課題について考察を述べるとともに、本研究の水産分野への利用および理科教材への応用の可能性について考察する。

アミノカルボニル反応 干物はアミノカルボニル反応 (メイラード反応) によって褐色化しており、完成した透明骨格標本にも多少の褐変が認められた。そのため、今後はこの褐変現象にどう対処するかが大きな課題となる。アミノカルボニル反応の促進因子としては温度、水分活性、pH、空気、酵素および金属イオンが挙げられ¹⁷⁾、これらに配慮し透明骨格標本作製することが重要である。具体的な対策案として、以下の 4 案が考えられる。

対策案 1 フォルマリン固定中の標本を冷暗所で保管し、褐変を抑制する。

対策案 2 アミノカルボニル反応は中性からアルカリ側で進行するため、蒸留水で完全に塩抜きと調味料抜きを行なう。水道水では塩素などの化学物質や、微量の金属イオンが含まれる可能性がある。

対策案 3 透明化処理をできる限り低濃度の水酸化カリウムで行なう。

対策案 4 アミノカルボニル反応によって生じる褐色物質 (メラノイジン) を漂白するために過酸化水素水で漂白する。

軟骨染色 我々が開発した干物からの透明骨格標本作成法において、軟骨の染まりにくい傾向が見られた。同じ染色液で同時に漬けた鮮魚固定標本であるコアユでは問題なく染まったため、染色液の作成には問題はなかったと思われる。干物は加工段階で塩や調味料、および太陽光による影響を受けているため、それらの要因が軟骨染色時

の alcian blue による化学反応を阻害している可能性がある。したがって、これらの要因について今後、詳しく調べて行く必要がある。

水産分野への利用 干物の透明骨格標本を用い内部形態から種を同定することにより、食品表示制度や産地偽装問題解決への貢献が期待できる。さらに、シシャモのように、地域特産種の干物とカラフトシシャモなどの外国から輸入される類似した干物を明確に区別して地域ブランドを確立することにより、地域の水産経済の振興にも寄与できると考えられる。

理科教材への応用 透明骨格標本の教材性については今まで数多くの研究がなされてきた^{14, 15, 18, 19)}。そのことから分かるように、透明骨格標本を理科教材として応用できる可能性がある。普段から食している干物で透明骨格標本を作製することにより、生徒が骨格系の観察に興味を持ちやすい。また、干物はスーパーなどで簡易に購入できることから、材料を用意する労力が少ない。そのため、干物から作成した透明骨格標本の理科教材としての教材性は従来のものより高いといえる。

要約

干物から透明骨格標本を作製するため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. 塩抜きのために水戻しをすること、2. 固定時のホルマリン濃度を高くすること、3. 透明化処理時の水酸化カリウム水溶液濃度を低くすることの3点である。この方法は、干物をきれいに透明化できる点で従来の方法よりも優れている。

謝辞

本研究を行なうにあたり、近畿大学農学部水産学科水産利用学研究室の塚正泰之教授に助言をいただいた。ここに記して感謝の意を表する。なお、本研究は近畿大学農学部「里山修復プロジェクト」の教育プログラムの一環として実施され、研究の一部は日本学術振興会科学研究費（萌芽研究、20657019）の予算で行なわれた。

引用文献

- 1) Dedi, J., Takeuchi, T., Hosoya, K., Watanabe, T., and Seikai, T. (1998) Effect of Vitamin A Levels in *Artemia Nauplii* on the Caudal Skeleton Formation of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 64, 344-345.
- 2) Hosoya, K. and Kawamura, K. (1998) Skeletal Formation and Abnormalities in the Caudal Complex of the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & schlegel). Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci., 12, 97-110.
- 3) Williams, T. W. (1941) Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult and embryonic bone and cartilage. Stain Technol., 16, 23-25.
- 4) Ojeda, J. L., Barbosa, E. and Bosque, P. G. (1970) Selective skeletal staining in whole chicken embryos: a rapid alcian blue technique. Stain Technol., 45, 137-139.
- 5) Simons, E. V. and Van Horn, J. R. (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.
- 6) Dingerkus, G. and Uhler, L. D. (1977) Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technol., 52, 229-232.
- 7) Kelly, W. L. and Bryden, M. M. (1983) A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparation of mammalian fetuses and small vertebrates. Stain Technol., 58, 131-135.
- 8) Freihoffer, W. C., Compagno, L. J. V. 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, 587-588.
- 9) Burdi, A. R. (1965) Toluidine blue-alizarin red S staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. Stain Technol., 40, 45-49.

- 10) Wassersug, R. J. (1976) A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technol.*, 51, 131-134.
- 11) 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.
- 12) 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, (Moser, H. G., Richards, W. J., Cohen, D. M., Fahay, M. P., Kendall, jr. A. W., and Richardson, S. L. eds., Allen press, USA.
- 13) Park, E. H. and Kim, D. S. (1984) A Procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. *Stain Technol.*, 59, 269-272.
- 14) 澄川冬彦・藤田 清 (1984) 魚類の分化と適応 - 透明骨格標本の教材化 (1). *遺伝*, 38, 67-69. 裳華房, 東京.
- 15) 澄川冬彦・藤田 清 (1984) 魚類の分化と適応 - 透明骨格標本の教材化 (2). *遺伝*, 38, 94-101. 裳華房, 東京.
- 16) 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*, 20, 11-18.
- 17) 福澤美喜男 (2005) 褐変. 菅原龍幸・福澤美喜男 (編). *食品学 I*, 第2版, 165-169, 建帛社, 東京.
- 18) 黒澤雅仁 (1989) 軟骨・硬骨二重染色透明標本の教材化に関する予察的研究. *共立女子第二中学高等学校研究論集*, 12, 37-48.
- 19) 辻彰洋 (1995) 二重染色法によって作成した透明骨格標本とその教材性の検討. *生物教育*, 35, 221-225.