

ちりめんじゃこを用いた透明骨格標本の作製

朝井 俊巨*・細谷 和海*,**

*近畿大学大学院農学研究科環境管理学専攻

**近畿大学農学部環境管理学科

Application of dried larval fishes to skeletal specimens by using cleared and counterstained method

Toshinobu ASAI* and Kazumi HOSOYA*,**

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

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

Synopsis

The cleared and counterstained method for dried larval fishes to make skeletal specimens was proposed. The previous method was improved by use of new technique. The points of foci in this method, are as follows: 1) desalting and soaking in water and fixation at once, 2) digesting myoprotein for a long time at a certain temperature under diluted KOH solution conditions and giving ethanol treatment while transparent, 3) increasing Glycerin-ethanol displacement series while glycerin penetration. In these ways, high-quality transparent skeletal specimens were provided, and thereby, the species of larval or juvenile fishes can be identified on the basis of fine structures of skeletal characters. Also, this enables observations of crustacean or molluscan larvae and zooplankton caught by boat seine fishery of drawers type, by counterstaining.

Keywords: 二重染色, シラス, 生物多様性, 理科教材, 甲殻類・軟体類

1. はじめに

近年, 二重染色を施した透明骨格標本が一般でも注目されている^{1), 2)}. 従来, 透明骨格標本は, 魚類を中心とした小型脊椎動物を対象に機能解剖学³⁾, 系統分類学⁴⁾, 発生学⁵⁾ などさまざまな専門分野で活用されてきた. 本手法を用いた研究はすでに水産分野でも確立しており, 種苗の健苗性判定⁶⁾ や骨異常検診⁷⁾, さらに魚類資源の系統解析法⁸⁾ として実用化されている. しかし, これらの報告例は主に鮮魚もしくは液浸固定標本から作製されたものに限られ, 干物など水産加工品を用いた例は, 小西ほか(2010)⁹⁾ に見られるのみであり, 本手法の応用例は少ない. また, 分類学分野でも種同定には外部形態の整った成魚が主

に使われ, 判別が困難な仔稚魚やその干物などはあまり利用されてこなかった.

日本古来の伝統食品であるシラスの干物“ちりめんじゃこ”は, 魚の種類や組成にかかわらず全国的に食されてきた. シラスには主要魚種のみならず, 他魚種仔稚魚も頻繁に混獲される^{10), 11)}. 成魚においては, その姿かたちや魚種名を把握できるものは多い. しかし, これほど一般家庭の食卓に馴染み深い食べ物にもかかわらず, 仔稚魚である“ちりめんじゃこ”の中身を詳しく理解する者は少ない. また, 混獲される魚種には, 資源学的に重要な魚種が含まれる可能性もある. このように初期減耗の激しい魚類において生鮮・干物を問わず仔稚魚の動態を把握することは, 生物多様性を保全するうえで非常に重要であり, 骨格系から

仔稚魚の同定を行なうことには大きな意義がある。

そこで本報では、近年、教育現場で教材として注目され¹²⁾、水産加工品の1つである“ちりめんじゃこ”を用いて二重染色を施した透明骨格標本作製し、完成した標本からその分類学的特徴を明らかにする。また、作製過程における必要な改良点を明示し、最適な透明標本作製法を提案する。さらには、教育現場ならびに水産分野へ応用できるか検討する。

2. 材料および試薬調整法

供試魚 シラスの干物（ちりめんじゃこ）適当量（Fig. 1）。本研究では、和歌山県加太沖で操業する二艘曳きシラスパッチ網漁で漁獲されたシラスを用いた。

器具および薬品 1. ホルマリン（無調整）、2. アルシアン青 alcian blue 8GX（粉末状）、3. アリザリン赤 alizarin red S（粉末状）、4. 氷酢酸（pH: 約 0.9）、5. グリセリン、6. 抱水クロラール（結晶状）、7. 99% エタノール、8. 水酸化カリウム（顆粒状）、9. 過酸化水素（紫外線を用いる場合には不要）、10. キシレン、11. チモール、12. ホットプレート、13. 取手つき金ザル、14. キッチンペーパー、15. ガラス製腰高シャーレ、16. 蓋つき小型タッパー。なお、試薬はすべて特級（和光純薬）を用いた。

3. 透明骨格標本作製法の改良点

本報では“ちりめんじゃこ”を用いたため、従来の方法にさらなる改良を加えた。また、著者らは透明骨格標本作製にあたり、魚種やサイズ、各浸漬薬液の濃度や浸漬時間のデータを記録表に残している（Appendix. 1）。これにより次回以降の作製は容易となり、失敗した場合でも反省点を割り出しやすい。本研究における主な改良点を以下に記した（Fig. 2）。

(1) 固定：標本を十分量の 15% 無調整ホルマリンで約 1 週間固定した後、ホルマリン溶液を交換、さらに 1 週間固定する。液中に磯の香りが残留する場合は、ホルマリン溶液をさらに交換し、

もう 1 週間固定する。

この操作において、魚体の透明化で問題になる塩分⁹⁾の除去が可能である。また、標本を湿潤状態にすることで、干物特有の「曲がり」や「縮れ」を多少なりとも矯正できる。小西ほか（2010）⁹⁾では、固定作業の前段階として流水中で塩抜きを行っている。しかし、干物は乾燥によりすでに表皮や筋組織が傷んでいるため、水戻しによる「ふやけ」は透明化の際に崩壊を助長する要因となる。また、軟骨の主成分であるコンドロイチン硫酸は温度依存的に水溶性を示すため、硬骨が未形成の時期には、水との接触を極力避ける必要がある。

(2) 透明化および脱水：質量パーセント濃度で 0.5～1% 水酸化カリウム水溶液に移し、透明化処理を行なう。なお本工程は、反応の急激な変化を抑え、安定した結果を得るため、ホットプレート上で温度を一定（28℃）に保つ。干物の場合には筋タンパク質の消化が難しいため、未消化部分は気にせず、若干不完全な状態で硬骨染色・脱脂の工程に移る。硬骨染色が施された標本を脱水・脱脂した後、再び透明化を行なう。

本工程では、魚体腹部や背部の破裂がよく見られる。これは筋タンパク質消化の際に、溶液中の水分を魚体が吸収し膨張することと、水酸化カリウムによる表皮強度の低下が主な要因と考えられる。脱水による水分除去で魚体の破裂を回避できる。このとき原理は不明だが、アルコール処理により表皮膜の強度が若干上昇するようである。

(3) 透徹：グリセリンとエタノールを体積比 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 で混合したものをそれぞれ用意し、標本を 1 日ごとに漬け換えていく。最後に 100% グリセリンに漬け、標本がグリセリン溶液の液面よりも下に沈むのを確認する。

4. ちりめんじゃこ透明骨格標本作製の実際

本法により作製された“ちりめんじゃこ”の透明骨格標本は、既報^{9),12)}より標本の完成度、作製成功率ともに高かった。これは新たに提案した固定法、筋タンパク質消化法（透明化）、透徹法（グリセリン浸漬）によるところが大きい。

“ちりめんじゃこ”の透明骨格標本作成における重要な点は、標本の固定と魚体を効率よく透明化することにある。

そこで、固定は「ふやけ」防止のため水戻しを行わず、塩抜きを兼ねて、高濃度ホルマリン溶液に直接浸漬したことで、コンドロイチン硫酸の溶出を回避できた。これにより表皮破裂が起きにくい透明骨格標本が作製された (Fig. 3)。

筋タンパク質の消化では、魚体の発育段階（前期仔魚～稚魚）にあわせ、低濃度の水酸化カリウム水溶液（0.5～1%）に一定温度（28℃）で浸漬した結果、魚体を崩すことなく透明化が行なえた。また、エタノール処理を施すことにより表皮膜が強化され、脱水を繰り返すことで魚体の膨張・破裂も防ぐことができた。

透徹では、グリセリンとエタノール濃度の変換系列を従来^{9),12)}の倍程度に増やした結果、グリセリンの魚体への浸透・置換が進み、魚体中の残存有色有機物が効率よく除去された。また、魚体の軟化により、骨格の観察も多少容易になった。

なお、完成した透明標本群には、魚類以外に軟体類や甲殻類の幼生、動物プランクトンなども観察された (Fig. 4)。

5. 考 察

本研究で提示した方法により、“ちりめんじゃこ”の効率的な透明化は成功した。しかし、“ちりめんじゃこ”は塩ゆでしたのち天日干しするため、魚体の損傷や筋肉の収縮が激しく、中軸骨格の骨折や頸部断裂個体が多く観察された。また、筋タンパク質が消化される前に表皮が溶解するなど、魚体の脆弱性も目立った。さらに、加工の影響が大きい筋肉部は消化されにくく、白濁したまま魚体が崩壊するなど、透明化には多大な困難が伴った。これらは筋タンパク質の消化時間を減らし、グリセリン・エタノール混合液による透徹時間や回数、濃度の変換系列を増やすことで効率よく透明化を行なえる。また、一回あたりの作製標本数を減らすと、重複個体の自重による押しつぶしや標本間摩擦が防げ、魚体の損壊も回避しやすい。

しかし、標本を漬け換えるタイミングや標本の扱いなど、何度か透明骨格標本の作成を経験しないと難しく、小さな干物標本の透明骨格標本化に

は、さらなる改良の余地が残されている。

理科教育への応用 近年、中学・高等学校では、ちりめんじゃこを材料として、色彩が特異な軟体類や甲殻類幼生を探し出す、形態が異なる魚種を分別させるなど、さまざまな実験が行なわれている。二重染色を施した透明骨格標本は、応用性の高さから多くの分野で活用されており、その原理・使用法などから理科教材として用いることはきわめて魅力的である。

本実験において魚類以外で観察されたものにタコの幼生、カニのゾエア幼生やメガロバ幼生、エビのミシス幼生、動物プランクトンのワレカラなどが含まれていた。これらを用いて骨格系から個体、生物相、地域の生態系まで生物学的な側面を広く学ぶことができる (Fig. 4)。

また、“ちりめんじゃこ”といった身近な食物を標本とすることで、生徒が実験観察に興味を示しやすい。加えて、身近な材料魚を用いることは、中学・高等学校教員が本実験を導入する際にも抵抗感を与えない。そのため、“ちりめんじゃこ”を用いた透明骨格標本の作製実験は、理科教材として大いに期待される。

水産分野への応用 本実験で用いた“ちりめんじゃこ”は天日干しにより形態が著しく変形しており、外部形態からは明確な同定が困難であった。一方、透明骨格標本の特徴として、上顎は角骨後端まで伸長し下顎を上部から覆う、下顎先端が前方へ突出するが頭部は若干の丸みを帯びる、顎部後端、つまり上顎と下顎の関節部は眼窩部前方まで伸長する、鰓条骨は7本、肛門は体の中央より後位であることなどが挙げられた。また、鰭に関しては、背鰭が後頭部後方を起点に、腹鰭が肛門部後方を起点にしてそれぞれ尾鰭基部まで伸長し、尾鰭条が他の鰭条より先に形成されていた。中軸骨格は総脊椎骨数が44～46であった。沖山 (1988)¹⁴⁾と比較検討した結果、カタクチイワシに一致した。これにより、形態の変形した干物からでも同定が可能であることが明らかになった。本手法は初期減耗の激しい仔稚魚の動態を把握し、水産資源を保全するための情報収集に寄与できると考えられる。

6. 要 約

“ちりめんじゃこ”を材料として、二重染色を施した透明骨格標本作製した。その過程における必要な改良点を提示するとともに、教育学・水産学分野への応用の可能性を検討した。本報により、仔稚魚乾燥標本からの透明骨格標本作製の成功実例が示された。本法における改良点は、1. 塩抜き・水戻し・固定を同時に行なった、2. 一定温度の低濃度薬液で長時間筋タンパク質消化を行ない、エタノール処理を施した、3. 透徹時にグリセリンとエタノール濃度の変換系列を増やしたことである。これにより完成度の高い透明骨格標本ができ、仔稚魚の骨格から魚種を推定することが可能になった。また、シラス網漁に混獲される軟体類・甲殻類幼生も染色により容易に観察が可能となった。本実験により教材として応用できる展望が開けた。

7. 謝 辞

本研究を行なうにあたり、和歌山県中善商店には“ちりめんじゃこ”を提供していただいた。ここに記して感謝の意を表する。

8. 引用文献

- 1) 富田伊織. 2009. [新世界] 透明標本, 小学館, 東京. 72pp.
- 2) 蓮見清一. 2009. 驚異! 透明標本いきもの図鑑. 別冊宝島 1663号, 宝島社, 東京. 111pp.
- 3) 藪本美孝・上野輝彌. 1984. メダカ *Oryzias latipes* の骨学的研究. 北九州自然史博物館研究報告, 5: 143-161.
- 4) Parenti, L. R. 2008. A phylogenetic analysis and taxonomic revision of ricefishes, *Oryzias* and relatives (Beloniformes, Adrianichthyidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 154: 494-610.
- 5) Matsuoka, M. 1987. Development of skeletal tissues and skeletal muscles in the Red sea bream. Bulletin of Seikai Region of Fisheries Research Laboratory, 65: 1-114.
- 6) Sawada, Y., M. Hattori, R. Suzuki, H. Miyatake, M. Kurata, T. Okada and H. Kumai. 2001. Skeletal anomalies in cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*, with shortened upper jaw. SUISANZOSHOKU, 49: 451-460.
- 7) Hosoya, K. and K. Kawamura. 1998. Skeletal formation and abnormalities in the caudal complex of the Japanese Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). Bulletin of National Research Institute of Fisheries Science, 12: 97-110.
- 8) Balart, E. F. 1985. Development of median and paired fin skeleton of *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). Japanese Journal of Ichthyology, 31: 398-410.
- 9) 小西雅樹・朝井俊亘・武内啓明・細谷和海. 2010. 干物を利用した魚類透明骨格標本の作製. 近畿大学農学部紀要, 43: 105-110.
- 10) 堀木信男. 1983. 紀伊水道においてパッチ網で漁獲される幼稚魚の漁業生物学的考察. 水産増殖, 31: 146-155.
- 11) 中田尚宏. 1986. シラス魚群中に見られる混獲魚について. 神奈川県水産試験場研究報告, 7: 29-33.
- 12) 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. 養殖研究所研究報告, 20: 11-18.
- 13) 日下部敬之. 2009. チリメンモンスターをさがせ!. 偕成社, 東京. 64pp.
- 14) 沖山宗雄. 1988. イカナゴ科 Ammodytidae. pp. 597-599. 日本産稚魚図鑑. 東海大学出版会, 東京.



Fig. 1. Materials of dried larval fishes used in this study.

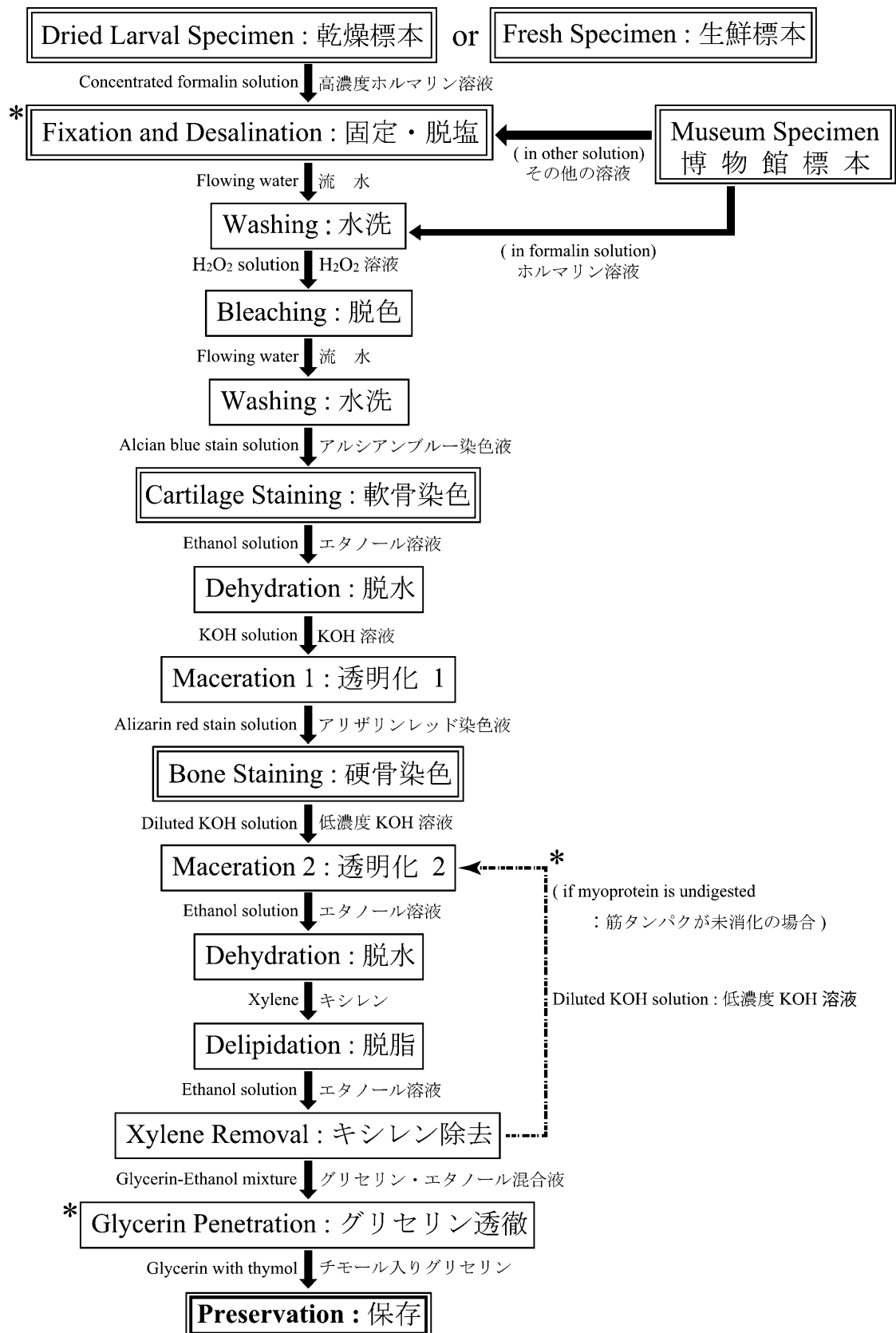


Fig. 2. Flow chart of procedure in the cleared and counterstained method for dried larval fishes to make skeletal specimens. * indicates a newly modified processes.

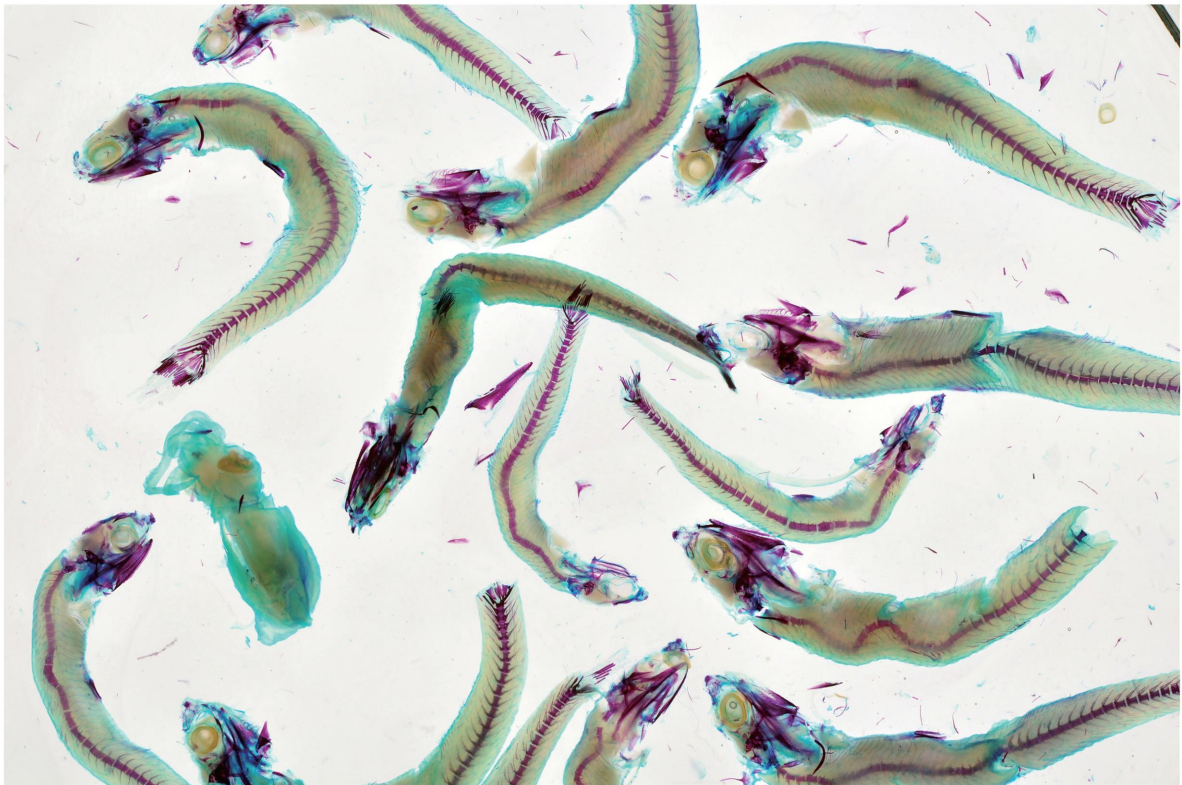


Fig. 3. Samples of dried larval fishes used in this study after cleared and counterstained.

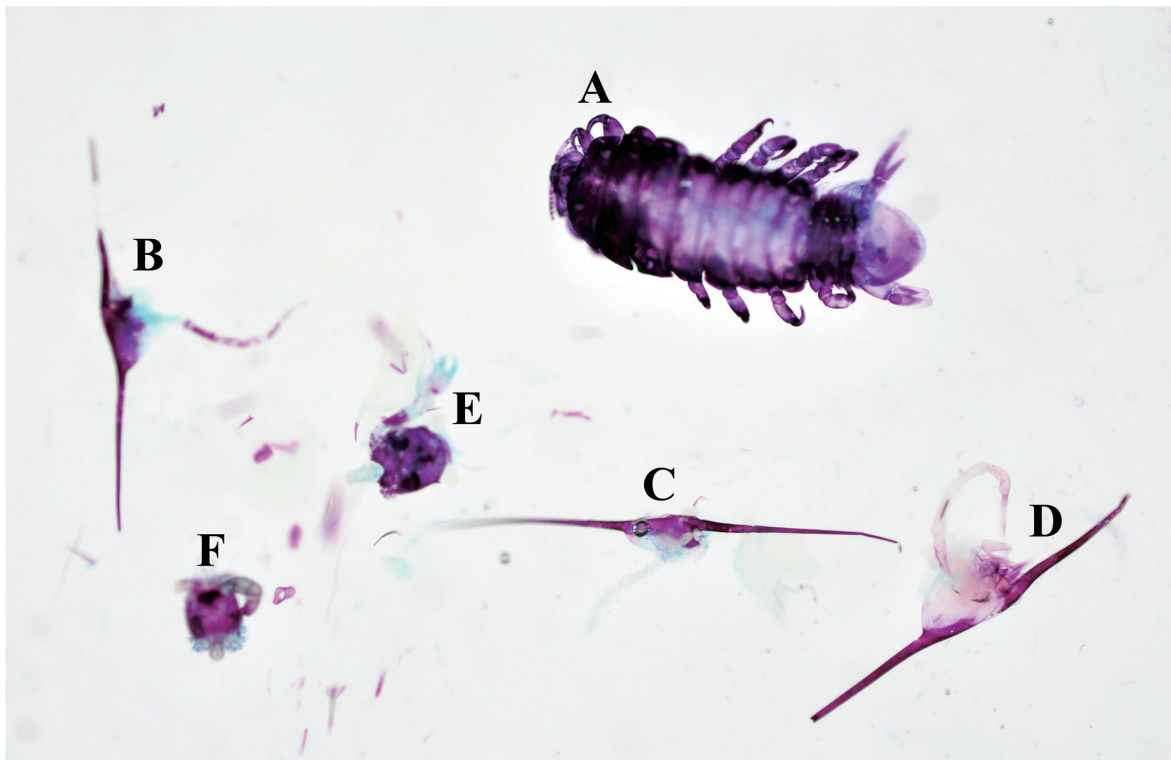


Fig. 4. Contaminated crustacean larva and zooplankton which caught by boat seine fishery of drawers type.
A: Isopoda; B, C, D: Zoea larvae; E, F: Megalopa larvae

Appendix 1. The recording paper for experiment of cleared and counterstained method to make skeletal specimens.

通し番号

日付:

作業工程	時間の目安	各浸漬時間	
固定 (%ホルマリン)	—	/	~
再固定 (%ホルマリン)	—	/	~
水洗 (ホルマリン抜き)	日	/	~
前処理 (鱗・内臓取り, メス入れ)	—	/	~
水洗 (鱗・内臓洗い)	—	/	~
漂白 (%過酸化水素水)	時間	/	~
水洗 (過酸化水素抜き)	1日	/	~
軟骨染色	時間	/	~
脱水 (%エタノール)	2日	/	~
脱水:2回目 (%エタノール)	約2時間	/	~
透明化 (%KOH溶液)	—	/	~
硬骨染色 (%KOH溶液)	2時間強	/	~
透明化:2回目 (%KOH溶液)	—	/	~
脱水 (%エタノール)	2日	/	~
脱水:2回目 (%エタノール)	約2時間	/	~
脱脂 (キシレン)	分	/	~
キシレン抜き (70% エタノール)	1日	/	~
透明化: 回目 (%KOH溶液)	—	/	~
脱水 (%エタノール)	2日	/	~
脱水:2回目 (%エタノール)	約2時間	/	~
脱脂 (キシレン)	分	/	~
キシレン抜き (70% エタノール)	1日	/	~
浸透 (エタノール:グリセリン=3:1)	1日	/	~
浸透 (エタノール:グリセリン=2:1)	1日	/	~
浸透 (エタノール:グリセリン=1:1)	1日	/	~
浸透 (エタノール:グリセリン=1:2)	1日	/	~
浸透 (エタノール:グリセリン=1:3)	1日	/	~
保存 (チモール入グリセリン)	—	/	

備考