

# 二重染色法によるグリーンアノール透明骨格標本作製

## Double Stainig Technique for Making a Transparent Green Anor Specimen7

グリアノグループ

川浦もえみ, 土屋夏美, 中尾友紀

指導教員: 今村伸一郎

ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物機能形態学研究室

キーワード: グリーンアノール, 透明標本, アルシアンブルー, ホルマリン固定

### 1. 目的

透明骨格二重染色標本を作製するにあたり、アルシアンブルーの染色がうまくいかない事例が知られている。今回、インターネット上の情報で、ホルマリン固定時間がアルシアンブルーの染まり具合に影響している可能性があるという記事があったため、ホルマリン固定時間及びアルシアンブルー濃度による染色の違いが出るか、グリーンアノール標本を用いて検討した。

### 2. 研究方法

- 1) グリーンアノール 54 体を大きさにより分類し、3g の個体を中型とし、それ以上の個体を大型、それ以下の個体を小型とした。
- 2) 表 1 のようにホルマリン固定時間とアルシアンブルー濃度の組み合わせにより、グループ分けをした。

表 1: ホルマリン固定時間とアルシアンブルー濃度の組み合わせ

		アルシアンブルー濃度		
		1%	10%	30%
ホルマリン固定時間	3日間	ホル3dアル1	ホル3dアル10	ホル3dアル30
	1週間	ホル1wアル1	ホル1wアル10	ホル1wアル30
	2週間	ホル2wアル1	ホル2wアル10	ホル2wアル30

- 3) 表 1 のホルマリン固定後、1 日水洗してホルマリンを抜き、次に水分を抜くためにエタノール 50 → 70 → 100% に置換した。100% エタノールに置換

後、酢酸を加えた酸性アルシアンブルー溶液(濃度は表 2 に表す) に 1 晩浸漬した。翌日、中和処理として四ホウ酸ナトリウム飽和液に置換し、酢酸臭が抜けるまで 3 回液交換した。

- 4) 1% 水酸化カリウム (KOH) 溶液により透明化を開始した。1% KOH 液が茶色になったら、新しい溶液と交換した。

- 5) 前後肢の骨格が透視できる状態になったのち、アリザリンレッド約 30 mg を 0.5% KOH 液 1000ml に加えた溶液にグリーンアノールを入れ、約 20 時間染色した。

- 6) 表 2 に示すように各グループ、溶液交換を行った。ホル 1w アル 30 とホル 2w アル 30 は、反応が進まず、さらに 1.5% KOH 溶液に 5 日浸漬した。

表 2: 各グループの KOH 濃度及び液交換回数、作用時間

	KOH 溶液濃度	液交換(回)	時間(日)	KOH 溶液濃度上げ	時間(日)
ホル3dアル1	0.5%	3回	14日	—	—
ホル1wアル1	0.5%	4回	17日	—	—
ホル2wアル1	0.5%	4回	17日	—	—
ホル3dアル10	0.5%	3回	14日	—	—
ホル1wアル10	1%	4回	21日	—	—
ホル2wアル10	1%	5回	21日	1.5%	5日
ホル3dアル30	0.50%	4回	18日	1%	3日
ホル1wアル30	0.50%	4回	18日	1%	3日
ホル2wアル30	0.50%	4回	18日	1%	3日

- 7) 頭部、腰部の骨格透視ができれば、グリセリンへの置換を開始し、最終的に 1% チモール(防腐剤) 加 100% グリセリンに封入した。

以上の手順は参考文献 (1) を参考として、反応を観察しながらアレンジした。

### 3. 結果

1) アルシアンブルー1%の場合、ホル 3d アル 1、ホル 1w アル 1、ホル 2w アル 1 (表 1) すべてのグループで、関節に青は認められなかった。

2) アルシアンブルー10%の場合、ホル 3d アル 10 では関節に青は認められず、ホル 1w アル 10 は中型と大型 2 体で関節に青を確認、ホル 2w アル 10 は小型の 2 体で関節の青が認められた。

3) アルシアンブルー30%の場合、ホル 3d アル 30 の小型 1 体の関節に青を認めた。それ以外では皮膚まで青く染色され、関節の青は確認できず、過染色と判断した。大きさの比較では、ホル 1w アル 30 の小型 2 体の関節に青を認めた。ホル 2w アル 30 の小型 2 体 (図 1、2)、中型 1 体の関節に青を認めた。

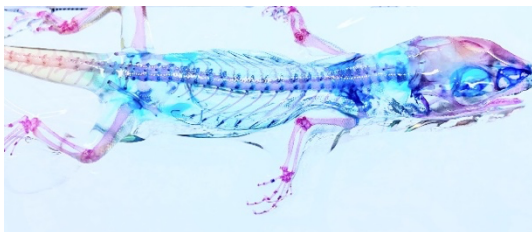


図 1: ホル 2w アル 30 の小型個体の全体像

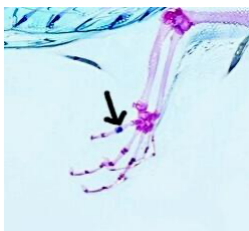


図 2: 染色が認められた指の関節拡大図

4) 椎間板は多くの個体で青く染色された。アルシアンブルー1%ではホルマリン固定時間による染色の差は見られず、アルシアンブルー10%以上からはホルマリン固定時間 3 日のみ、他と比べ、青の染色が弱かった。

### 4. 考察

関節部を染色するアルシアンブルーは、体の大きな個体ほど染色されにくくなっていた。これは成熟した個体ほど幼体に比べ、関節部の軟骨基質成分の減少により、アルシアンブルーが反応する酸性ムコ物質のカルボキシル基や硫酸基が減少していたことが原因と考えられる (2、3)。また、種

族間の軟骨成分の違いにより、適した染色濃度ではなかったことも考えられる (4)。椎間板は、アルシアンブルーが 10%前後かつ、ホルマリン固定時間が 1 週間以上だと染色がよくなる可能性が、今回の結果から考えられた。

今後は部位による酸性ムコ物質のカルボキシル基や硫酸物質の含有量の測定を行い、検討する必要があると考えられた。水道水での容器の濯ぎによるイオンの混入、キムタオルの繊維の混入など不純物を完全に除去した実験での検討も必要あると考える。ホルマリン固定時間を 1 週間と 2 週間の間、また 2 週間以上の測定を行った追加実験も必要あるかもしれない。

### 5. 結論

今回の研究から、ホルマリン固定時間によるアルシアンブルーの染色の違いは、1 週間と 2 週間で染色が認められる個体が多かった。またアルシアンブルーの濃度は 10%から染色が認められたが、30%では過染色がとなり、関節の染まりを区別できなくなった。アルシアンブルー1%ではホルマリン固定時間に関係なく、染色が弱かった。

### 6. 謝辞

ヤマザキ動物看護大学 内田明彦教授より、グリーンアノール標本を提供していただきました。心より感謝いたします。

### 7. 参考文献

- (1) 松本敏秀 (2015) : 透明骨格標本の作製. 仙台市科学館研究報告, 第 25 号, p. 18-20.
- (2) 瀧澤敬美 (2018) : 日本医科大学解剖学秘蔵の標本. イヌ胃腺アルシアンブルー・PAS 染色. 日医大医会誌, 14 (4), p. 144.
- (3) 村田健児 (2011) : ラット足関節軟骨の加齢と運動の影響. 理学療法-臨床・研究・教育, 18 : 61-66, p. 61.
- (4) 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. 養殖研究報告, 20 号, p. 11-18.