



ネオンテトラの青色保存標本作製法の考案

福島県立安積黎明高等学校

3年 山田 晃石

はじめに

カラシン目カラシン科に属する一部の種には、ネオンテトラ (*Paracheirodon innesi*) やカージナルテトラ (*Paracheirodon axelrodi*) など体表全体または体表の一部分に鮮やかな青色を呈する種がある。青色を呈する種は色素細胞の虹色素胞をもつ (Lythgoe, J, N. & Shand, J.)。虹色素胞の内部には主にグアニンからなる板状の結晶 (光反射小板) の重なりが存在し、屈折率の高いプリン結晶の重層で生じる反射光の薄膜干渉現象によって鮮やかな青色が発色される (梅鉢, 2000; 大島・杉本, 2001)。海水魚であるスズメダイ科にも青色を呈する種があり、それらも光反射小板が並行的に移動することで間隔が増減し体色変化の主要な役割を担っている。(大島・杉本, 2001)。現在のところ、光反射小板の間隔が変化する機構は明らかになっていないが体色変化に対してはカリウムイオンの影響がみられるとの報告がある。(大島・杉本, 2001)。

実際に生鮮標本作製する場合、青色を発色する魚類の生存時の通常状態の色彩を標本中に記録することは極めて困難である。標本に生存時の色彩の情報を残すことは大変有益であるが、青色の色彩を持つスズメダイ科魚類を用いた先行研究では、標本処理をする際一度黒色がかかった個体を生存時の通常状態の色彩に戻す方法が発見された (岩坪・本村, 2014)。しかし、青色系スズメダイと同じ発色機構を持つネオンテトラに関しては青色を保ったまま標本作製する方法は考案されていない。そこで、本研究ではネオンテトラを用いた青色の色彩を保存した標本作製法を考案した。

材料

本研究では、淡水魚販売店で購入したネオンテトラ (*Paracheirodon innesi*) を用いた。

仮説

通常の標本作製方法(すべての処理で蒸留水を用いる方法)の通りにネオンテトラを処理すると体色が黒ずんでしまう。この原因は体表表面にある虹色素胞内の微小構造が標本処理の際に変化するためと考えられる。

そこでまず、本研究では色素胞に作用し体色変化に影響を与えるアドレナリンやアセチルコリンを用いれば生存時の体色を再現できる可能性があるのではないかと考えた。

海水魚のルリスズメダイを用いた先行研究(岩坪・本村, 2014)では展鰭に海水で作ったホルマリンを用い、固定と保存には真水で作ったホルマリンを用いることでルリスズメダイの青色を保存することに成功していた。これは魚と処理溶液との浸透圧の違いをうまく利用したものである。このことから、標本処理の際に蒸留水や海水、淡水魚体液組成のリンガー液を用いることで体色保存に適切な塩分濃度が存在するのではないかと考えた。

さらに、先行研究で報告されている虹色素胞の微細構造はカリウムイオンの刺激で構造の間隔が変化する(大島, 1990)という点に着目し、リンガー液の塩化ナトリウムを塩化カリウムに置き換えることで体色が保存できるのではないかと考えた。

方法

- ① 生きた状態のネオンテトラを標本にするための前処理溶液の入った試験管に入れ、その状態で試験管ごと氷水につけ、45分間0°Cで処理する。
- ② 37%ホルムアルデヒドが9%になるように様々な展鰭溶液を調製する。
- ③ 調製した9%展鰭溶液を用いてスライドガラスに乗せたネオンテトラを3°Cの低温で展鰭する。
- ④ それぞれの展鰭溶液中で鰭が固定されたことを確認する。
- ⑤ 37%ホルムアルデヒドを3%になるように様々な固定溶液を調製する。
- ⑥ 固定溶液に浸し、青色色彩の保存状況を観察する。固定、保存は恒温機を用いて3°Cの冷暗条件で行った。
- ⑦ 展鰭直後と保存10日後の色素胞と虹色素胞の様子を顕微鏡で比較する。

実験 1

前処理溶液が保存に与える影響と保存溶液としてホルマリンが適切か、グリセリンが適切であるかの検討を計 12 試験区で展鱗処理無しで行った。

試験区	前処理溶液	固定溶液	保存溶液
1-1	蒸留水	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-2	人工海水	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-3	リンガー液	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-4	アドレナリン溶液+蒸留水	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-5	アドレナリン溶液+人工海水	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-6	アドレナリン溶液+リンガー液	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
1-7	蒸留水	3%水ホルマリン	原液グリセリン
1-8	人工海水	3%水ホルマリン	原液グリセリン
1-9	リンガー液	3%水ホルマリン	原液グリセリン
1-10	アドレナリン溶液+蒸留水	3%水ホルマリン	原液グリセリン
1-11	アドレナリン溶液+人工海水	3%水ホルマリン	原液グリセリン
1-12	アドレナリン溶液+リンガー液	3%水ホルマリン	原液グリセリン

(表 1)

*リンガー液は 7.5g NaCl 0.2g KCl 0.2g CaCl₂ 0.2g NaHCO₃ を純水 1 l に溶かしたものである。

*アドレナリンを用いた溶液は 3 種類あり、アドレナリン 1 mg を蒸留水 50ml または人工海水 50ml またはリンガー液 50ml で溶かしたものである。

実験 1 の結果

日数経過の観察をしたネオンテトラの体表の色彩保存状態を

- ① + + + トリプルプラス (生存時と遜色ない色彩状態)
- ② + + ダブルプラス (体表の一部のみに青色が残っている状態)
- ③ + シングルプラス (青色ではないが体表に銀白色の反射がある状態)
- ④ - シングルマイナス (体表の銀白色が一部にしか見られない状態)
- ⑤ - - ダブルマイナス (目が白濁し銀白色が見られない状態)
- ⑥ - - - トリプルマイナス (体表に光沢がなくなり、黒くなった状態)

で評価した (表 2)。

試験区	前処理溶液	1 日目	5 日目	10 日後
1-1	蒸留水	- -	- - - -	- - - -
1-2	人工海水	- -	- -	- - - -
1-3	リンガー液	-	- -	- -
1-4	アドレナリ溶液+蒸留水	- -	- - - -	- - - -
1-5	アドレナリン溶液+人工海水	- -	- -	- - - -
1-6	アドレナリン溶液+リンガー液	-	- -	- - - -
1-7	蒸留水	- -	- - - -	- - - -
1-8	人工海水	- -	- -	- - - -
1-9	リンガー液	-	- - - -	- - - -
1-10	アドレナリン溶液+蒸留水	- -	- - - -	- - - -
1-11	アドレナリン溶液+人工海水	- -	- -	- - - -
1-12	アドレナリン溶液+リンガー液	-	- - - -	- - - -

(表 2)

表 2 の結果より、実験 1 の計 12 試験区の中では 1-3、1-6 での色彩状態が短期間であるが良好であった。さらに、1-1 区、1-2 区、1-4 区、1-5 区で用いた蒸留水と海水はリンガー液で前処理したものより色彩状態が良くなかった。このことから、前処理に蒸留水と海水を用いた場合には青色保存標本の作製に適切でないとわかった。また、1-7 区、1-8 区、1-9 区、1-10 区、1-11 区、1-12 区では色彩状態が悪く、グリセリンの影響により体形も歪んでしまった。よって、保存にはグリセリンよりもホルマリンが適切であるとわかった。

この結果から、実験 2 では前処理溶液にはリンガー液を用い、保存液としてホルマリンを用いることとした。

実験 2

実験 1 の結果をもとに前処理溶液にリンガー液を用いたものとリンガー液組成中の NaCl を 7.5 g の KCl に置き換えた溶液で比較をした。また、展鱗、固定保存溶液でリンガー液を用いたものと、蒸留水を用いたものでどちらが適切であるかの検討を行った。

試験区	前処理溶液	展鱗溶液	固定溶液	保存溶液
2-1	リンガー液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-2	アドレナリン溶液+リンガー液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-3	アセチルコリン溶液+リンガー液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-4	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-5	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アドレナリン溶液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-6	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アセチルコリン溶液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
2-7	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%水ホルマリン	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
2-8	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アドレナリン溶液	9%水ホルマリン	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン
2-9	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アセチルコリン溶液	9%水ホルマリン	3%水ホルマリン	3%水ホルマリン

(表 3)

- * リンガー液は 7.5g NaCl 0.2g KCl 0.2g CaCl₂ 0.2g NaHCO₃ を純水 1 L に溶かしたものである。
- * アドレナリンを用いた溶液はアドレナリン 1 mg を前処理溶液 50mℓまたはリンガー液 50mℓで溶かしたものである。
- * アセチルコリンを用いた溶液はアセチルコリン 1 mg を前処理溶液 39mℓまたはリンガー液 39mℓで溶かしたものである。
- * 展鱗溶液の 9%リンガー液+ホルマリンは 37%ホルマリンをリンガー液で 9%の濃度になるように薄めたものである。
- * 固定、保存溶液の 3%リンガー液+ホルマリンは 37%ホルマリンをリンガー液で 3%になるように薄めたものである。
- * 2-4 区~2-9 区の前処理溶液はリンガー液の NaCl を置き換えて、7.5 g の KCl を加えたものである。

実験 2 の結果

日数経過の観察をしたネオンテトラの体表の色彩保存状態を

- ① + + + トリプルプラス (生存時と遜色ない色彩状態)
- ② + + ダブルプラス (体表の一部のみに青色が残っている状態)
- ③ + シングルプラス (青色ではないが体表に銀白色の反射がある状態)
- ④ - シングルマイナス (体表の銀白色が一部にしか見られない状態)
- ⑤ - - ダブルマイナス (目が白濁し銀白色が見られない状態)
- ⑥ - - - トリプルマイナス (体表に光沢がなくなり、黒くなった状態)

で評価した (表 4)。

試験区	前処理溶液	展鰭直後	1 日目	5 日目	10 日目
2-1	リンガー液	+ +	+	- - -	- - -
2-2	アドレナリン+リンガー液	+ +	+ +	- -	- - -
2-3	アセチルコリン+リンガー液	+ +	+	- -	- - -
2-4	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	+ +	-	- - -
2-5	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アドレナリン溶液	+ + +	+ +	-	- - -
2-6	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アセチルコリン溶液	+ + +	+ +	-	- - -
2-7	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	-	- -	- - -
2-8	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アドレナリン溶液	+ +	-	- -	- - -
2-9	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂ + アセチルコリン溶液	+ +	-	- -	- - -

(表 4)

表 4 より計 9 試験区の中で最も長く青色色彩を保存できたのは、2-4 区の前処理溶液の条件を用いたものであった。

また、2-4 区と 2-7 区を比較してみると固定、保存溶液にリンガー液を用いたものと蒸留水で調製したホルマリンでは、リンガー液を用いたもののほうが青色を長く保存できることがわかる。

さらに、2-2 区と 2-5 区の比較からはアドレナリンは黒色素胞には作用するが青色の発色に関しては作用しないことがわかった。また、2-3 区と 2-6 区の比較からアセチルコリンも青色の発色に関しては作用しないことがわかった。

この結果に基づき、次の実験 3 では前処理溶液にはリンガー液の NaCl を置き換え、様々な質量の KCl を加えたものを用い、固定、保存にも同じ前処理溶液で調製したホルマリンを用いることとした。

また比較としてリンガー液を前処理に用いるものと、標準法での作製も改めて行うこととした。

実験 3

表 5 において実験 1、実験 2 の結果をもとに 3-1 区および 3-2 区を対照区とし、リンガー液の NaCl を除き、様々な質量の KCl を加えたものを用いてどの溶液が最適であるかの検討をした。

試験区	前処理溶液	展鱈溶液	固定溶液	保存溶液
3-1	リンガー液	9%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン	3%リンガー液 ホルマリン
3-2	蒸留水	9%ホルマリン	3%ホルマリン	3%水ホルマリ ン
3-3	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-4	1.9g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-5	3.8g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-6	9.7g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-7	11.3g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-8	13.1g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-9	15.0g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン
3-10	30.0g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	9%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン	3%処理溶液 +ホルマリン

(表 5)

*使用した薬品の質量は 10 当たりの質量である。

*展鱈溶液の 9%処理溶液+ホルマリンは 37%ホルマリンを各区における前処理溶液でホルマリンが 9%の濃度になるように薄めたものである。

*固定、保存溶液の 3%処理溶液 +ホルマリンは 37%ホルマリンを各区における前処理溶液でホルマリンが 3%の濃度になるように薄めたものである。

*3-3 区~3-10 区の前処理溶液はリンガー液から NaCl を取り除き、様々な質量の KCl を加えたものであり、処理溶液の KCl の質量のみを変化させている。

実験 3 の結果

経過観察をしたネオンテトラの体表の色彩保存状態を

- ① + + + トリプルプラス (生存時と遜色ない色彩状態)
- ② + + ダブルプラス (体表の一部のみに青色が残っている状態)
- ③ + シングルプラス (青色ではないが体表に銀白色の反射がある状態)
- ④ - シングルマイナス (体表の銀白色が一部にしか見られない状態)
- ⑤ - - ダブルマイナス (目が白濁し銀白色が見られない状態)
- ⑥ - - - トリプルマイナス (体表に光沢がなくなり、黒くなった状態)

で評価した (表 6)。

試験区	前処理溶液	展鰭直後	1 日目	5 日目	10 日目
3-1	リンガー液	+ + +	+ +	- - -	- - -
3-2	蒸留水	+ + +	+ +	- - -	- - -
3-3	7.5g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	+ +	+ +	+
3-4	1.9g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+	-	- - -	- - -
3-5	3.8g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	-	- - -	- - -
3-6	9.7g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	+ + +	+ +	+ +
3-7	11.3g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
3-8	13.1g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ + +	+ + +	+ +	+ +
3-9	15.0g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ +	+ +	- - -	- - -
3-10	30.0g KCl 0.2g NaHCO ₃ 0.2g CaCl ₂	+ +	+ +	- - -	- - -

(表 6)

試験区中で最も良い状態の標本は 3-7 試験区の条件であった。

標準法を用いる 3-2 区の結果からは、ネオンテトラの場合標本処理に蒸留水を用いる過程を経ることで著しく体色は黒化する (写真 8) ことがわかった。また、3-10 区からは塩化カリウムを過剰に用いたもので体色が白化してしまう (写真 6) ことがわかった。

今回の結果から得られた最適な条件は KCl 11.3g NaHCO₃ 0.2g CaCl₂ 0.2g を純水 10 に溶かした溶液を前処理溶液に用い、展鰭にはこの溶液でホルマリンを 9% に調製したものを、固定、保存にはこの溶液でホルマリンを 3% に調製したものをを用いることであることがわかった。

固定直後

2日目

3日目

4日目

5日目

10日目



(写真1) 3-3 試験区 青色の呈色期間が5日程度である



(写真2) 3-5 試験区 青色の保存状態は良くない



(写真3) 3-6 試験区 はっきり呈色し10日後も一部であるが青色が残った



(写真4) 3-8 試験区 全体の呈色は悪いが、目の横にだけ10日後も青色が残った



(写真5) 3-9 試験区 青色は保存されなかった



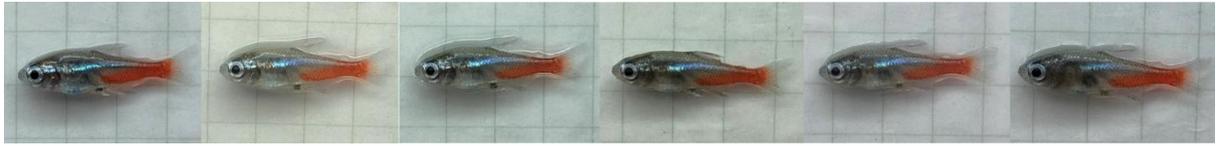
(写真6) 3-10 試験区 体表は白く変色し、呈色は悪い



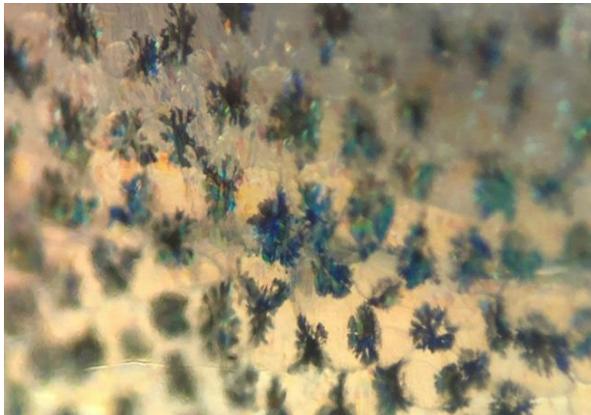
(写真7) 3-1 試験区(対照区) 青色の保存状態は良くない



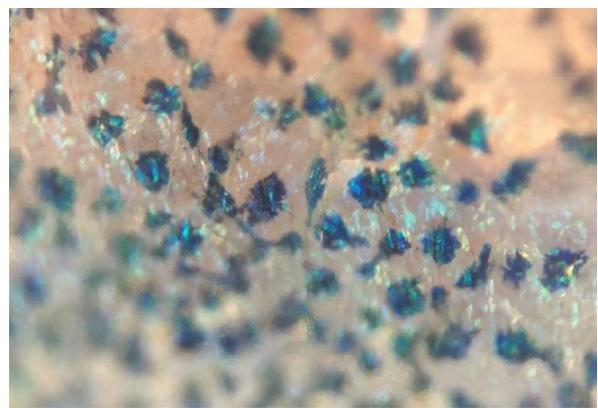
(写真 8) 3-2 試験区(対照区) 標準法による対照実験



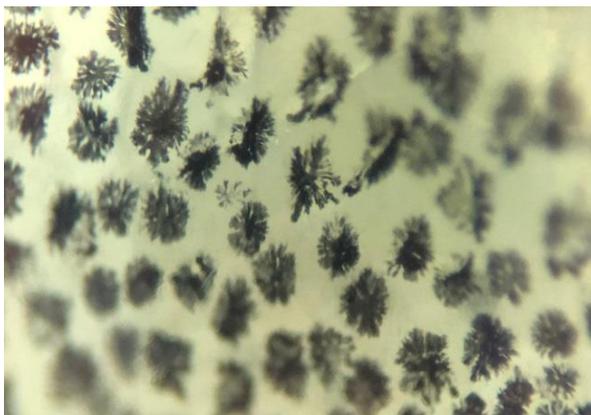
(写真 9) 3-7 試験区 今回の条件の中で最良で 10 日後も生存時の体色に近い



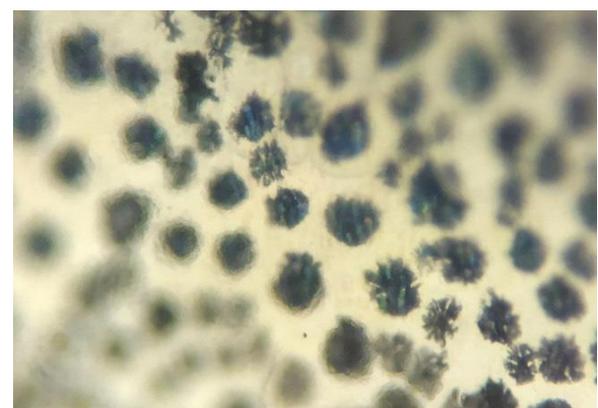
(写真 10) 3-2 試験区(拡大)
展鰭直後は虹色素胞の青い反射が見られる。



(写真 11) 3-7 試験区(拡大)
3-2 と比較してすでに青い反射に違いが見られる。



(写真 12) 3-2 試験区(拡大)
虹色素胞の青い反射は消失している。



(写真 13) 3-7 試験区(拡大)
虹色素胞の青い反射が 10 日後まで保存されている。

考察

実験結果から標本処理に蒸留水を用いる標準法の場合、処理後直ちに青色部分が退色し、体表が黒く変色した(写真 8)。これは、淡水魚の体内浸透圧と蒸留水との間には浸透圧の差が存在するためではないかと考えられる。

海水とリンガー液を使用した標本作製法では、処理溶液に浸漬してすぐには色の変化が起こらなかったが、固定や保存のために人工海水で薄めたホルマリンとリンガー液で薄めたホルマリンでは顕著な差があった。これは、生存時には細胞内での浸透圧調節がなされていたが、死亡すると浸透圧調節がされないため青色の発色をする細胞内の光反射小板の幅が変化し色彩状態に影響がでたものと考えられる。

また、体色変化に影響を与えられると考えたアセチルコリンやアドレナリンを用いた標本作製法では、生存時にアドレナリンを使用すると体色は黒くなったが、青色部分では大きく色は変化しなかった。また、アセチルコリンを用いた場合には体色にほとんど影響は見られなかった。このことから、ネオンテトラの青色部分は、アドレナリンやアセチルコリンの影響を黒色素胞と異なり、ほとんど受けていないことが考えられる。

リンガー液の塩化ナトリウムを塩化カリウムに置き換えた溶液を用いた標本作製法では、青色の呈色の改善が見られ、その中でも最も青色が良い状態で保存されたのは塩化カリウム 11.3g 塩化カルシウム 0.2g 炭酸水素ナトリウム 0.2g を水 10に溶かしたものであった。また、この値よりも少ないと標本化した時に青色は保存されず、体色は黒ずんでしまった。しかし、この値より多い場合にも青色は消え、体色は白くなった。このことから、塩化カリウム 11.3g 塩化カルシウム 0.2g 炭酸水素ナトリウム 0.2g を 10に溶かしたものが青色保存標本作製するのに最適であると考えられる。

今後の展望

今回の実験から溶液中の塩化カリウムの濃度で標本の青色保存状態が変わることがわかった。しかし、虹色素胞内の微小構造の変化の様子までは観察することができなかった。そのため、微細構造の様子を電子顕微鏡で観察できないかと考えている。

また、今回の実験では塩化カリウムの濃度を 1.9g , 3.8g, 7.5g, 9.7g, 11.3g, 13.1g, 15.0g, 30.0g で実験した結果で最もよく青色が保存されたのが 11.3g であったが、さらに精度を高めるため今後は 0.5g 単位での実験を行っていきたい。

さらに、同じ青色発色構造をもつグッピーやカージナルテトラ、ベタなどでも応用できるかも調べたい。そして、日本在来の淡水魚で青色の婚姻色を発色するヤリタナゴやオイカワ、カネヒラなどでもその繁殖期特有の青色も保存できるか調べたい。

謝辞

一般社団法人鹿児島水圏生物博物館の岩坪洸樹様にはこの実験方法の助言をいただいた。福島県立安積黎明高校の佐藤富浩先生には助言とこの論文の校閲、添削をしていただいた。以上の方々に深く感謝の意を表す。

文献

岩坪洗樹 2014 タクサ 日本動物分類学会誌 青色系スズメダイ科魚類の標本青色還元法と色彩保存標本作製法 37:21-27

藍沢正弘 2009 標本用麻酔薬, 本村浩之(編). 魚類標本の作製と管理マニュアル, p 8 鹿児島大学総合研究博物館, 鹿児島

大島範子・杉本雅純 2001 魚類における色素細胞と体色変化. 松本二郎・溝口昌子(編), 色素細胞機能と発生分化の分子機構から色素性疾患への対応を探る, pp. 161-176, 慶応義塾大学出版会, 東京

大島範子 1990 魚類の運動性虹色素胞 Vol. 7, No. 2 pp55-60

伊賀哲郎 1993 魚類の白色素胞と運動性虹色素胞の運動制御 Vol. 10, No. 2 pp72-80

吉岡伸也 2012 魚類を中心とする色可変な構造色の研究 科学研究費助成事業(科学研究費補助金)研究成果報告書