

(A5 Size)

FUJIFILM

Wako

Code No. 295-77301 (1 キット (ヒメダカ 4 匹用))

透明骨格標本作製キット

【はじめに】

金沢医科大学医学部解剖学八田稔久教授により、生体試料をそのまま形状を保持しながら、短期間で簡便に透明化する新しい方法が開発されました。本キットは、その新しい透明化技術を利用したメダカの骨格標本作製キットです。

ホルムアルデヒドによってタンパク質分子間に架橋を形成させると同時にアルカリ溶液でそのタンパク質のペプチド結合を加水分解して、標本を形状が残ったまま適度な隙間ができた状態にします。そこにアリザリンレッド（色素）を添加して、硬骨内に含まれるリン酸カルシウムに結合させ硬骨を赤く染色します。最後に水分をグリセリンで置換することによって透明度を飛躍的に向上させ、メダカの透明骨格標本を完成させます。

【特 長】

- 従来 1 週間以上の時間を要していた透明骨格標本が 3 日で作製できます。
- 必要なすべての試薬をセット化しています。
- 振とう機を使わず反応を進めることができます。
- 透明度が高く鮮やかに染色されたヒメダカの骨格標本ができます。

【キット内容】 ヒメダカ 4 匹用

(1) 固定液(A)	50 mL × 1 本
(2) 固定液(B)	50 mL × 1 本
(3) 染色剤溶解液	100 mL × 2 本
(4) 染色剤	50 mg × 1 本
(5) 脱色液(A)	120 mL × 1 本
(6) 脱色液(B)	120 mL × 1 本
(7) 置換液	100 mL × 1 本
(8) 保存液	100 mL × 1 本
(9) 保存用ガラスビン	5 mL 容 × 4 本

【保存条件】

冷蔵 (2～10℃)

【キット以外に必要なもの】

(装 置)

1. 局所排気装置（ドラフトチャンバーなど）
2. 実体顕微鏡
3. 37℃恒温器（恒温水槽ではなく恒温乾燥機型）

(器具、消耗品など)

1. ピンセット（メダカ 1 匹に対し 2 本）
2. メスシリンダー（※1）
3. 100 mLビーカー（メダカ 1 匹に対し 2 個）、200 mLビーカー（メダカ 1 匹に対し 1 個）（※1）
4. シャーレなどの小皿（メダカ 1 匹に対し 2 個）
5. 50 mL～100 mL フタ付広口ポリ容器（メダカ 1 匹に対し 1 個）（※2）
6. ラップ、輪ゴム
7. 保護具（ラテックス手袋、保護メガネやゴーグル、マスクなど）

※1 ガラス製器具はアルカリに弱いので継続的に使用すると白く劣化してきます。一時的な使用ではガラス製器具でも問題はありません。気になる場合はアルカリ耐性のプラスチック製器具をおすすめします。

※2 固定用に使用します。ポリプロピレン製またはポリエチレン製を使用してください。複数のメダカをまとめて固定する場合は、適当な大きさのポリ容器 1 個でも構いません。

【使用上の注意】

- 本キットはパラホルムアルデヒドを使用します。シックハウス症候群などホルムアルデヒドに過敏な症状を示す体質の方は使用を避けてください。
- パラホルムアルデヒドを含む固定液(A)や、固定液(A)と固定液(B)で調製した「固定液」のフタを開けて オープン作業をする際は、手袋などの保護具を着用した上、必ずドラフトチャンバー等の局所排気装置内で操作してください。
- 本キットには強アルカリ性を示す試薬もありますので、ホルムアルデヒドを含まない試薬を取り扱う際も メガネや手袋などの保護具を着用してください。
万が一、試薬が直接肌に触れた場合は水道水で洗い流してください。また、目に入った場合は、こすらず直ちに流水で15分以上洗い流し、医師の手当てを受けてください。

【操作方法】

使用する試薬は、当日、冷蔵庫から出し室温にして使用してください。

(準 備)

- 1 日目 ● 固定液(B)を固定液(A)のボトルに全量添加して転倒混和して十分に混ぜ、「固定液」とします **ドラフト内作業**。
 - 翌日のためにあらかじめ37℃恒温器の電源を入れておきます。
- 2 日目 ● 2 本ある染色剤溶解液のうち 1 本に染色剤を全量投入し、ボトルをよく振って十分に溶解させ、「染色液」とします。ボトルに回転子を入れてマグネチックスターラーを使い、攪拌溶解しても構いません。
 - 脱色液(B)を脱色液(A)のボトルに全量添加し転倒混和して十分に混ぜ、「脱色液」とします。

注意・ポイント

調製後の固定液、染色液、脱色液は冷蔵で保管し、1～2週間ほどで使い切ってください。メダカ1匹あたり固定液と染色液は25 mL、脱色液は60 mL必要になります。メダカの数に合わせて調製することも可能ですので、その場合は必要な液量を測り取り(A)液と(B)液を等量ずつ混ぜて固定液や脱色液を調製してください。

染色液は、染色剤を約12.5 mg/25 mLの濃度で染色剤溶解液に溶かし必要量を調製してください。染色剤の溶け残りは染色ムラとなってしまうので十分に攪拌して溶かしてください。

(操 作)

1日目<仮死化措置・固定> 操作：5～10分、固定：終夜

(1) メダカ1匹を水槽からすくい取り、5～10分ほど氷水の中に浸して仮死状態にします。

注意・ポイント

水温は出来るだけ低い方がいいので、氷をたくさん入れた氷水にしてください。仮死状態になるまでにメダカの背骨が曲がらないよう気をつけてください。メダカ標本が曲がるか否かはステップ(1)～(2)の段階でほぼ決まります。個体にもよりますので確実な方法はありませんが、姿勢があまり曲がらないよう矯正しながら氷水に浸してください。



(2) 50 mL～100 mL容フタ付広口ポリ容器に固定液25 mLを入れ、そこへ仮死状態になったメダカ1匹を入れ、フタを締めます **ドラフト内作業**。フタをしっかりと締めた後、容器を動かして液を揺らし馴染ませます。

注意・ポイント

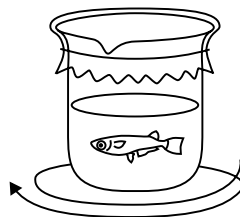
メダカ標本の曲がりになるべく避けるためには、固定液に浸した後すぐに30秒～1分ほど液を揺らしてメダカを動かすと効果的です。

一度にメダカ4匹を固定する場合は、調製した固定液(100 mL)のボトルに直接メダカを入れてください。その際は、まず1匹を固定液に入れ、液がこぼれないように軽く30秒～1分ほど液を揺らしメダカを動かしてから、次のメダカを入れるようにしてください。

(3) 室温で終夜、静置し固定します。

2日目＜脱ホルムアルデヒド＞ 30分

- (4) 100 mLビーカーに染色剤溶解液25 mLを入れ、そこに固定液から取り出したメダカ1匹を移し替え、ビーカーの上部をラップで覆い輪ゴムでとめてフタをします **ドラフト内作業**。ビーカーを動かして液を揺らし馴染ませます。大きく円を描くように数回揺らしてください。



- (5) 37℃恒温器に30分間静置します（途中15分経過したときに液を揺らしてメダカを動かしてください）。

＜ウロコとり（1回目）＞ 5～15分

- (6) メダカを取り出して小皿に移し、ビーカー中の使用済み染色剤溶解液をメダカの上に少し（メダカ全体にかかる程度）かけます。
- (7) 小皿上のメダカを実体顕微鏡（黒色ステージ）下に置いて、鱗（ウロコ）を可能な限り剥がし取ります。鱗を剥がしたメダカはビーカー中の使用済み染色剤溶解液に戻して軽く液を揺らして剥がれた鱗をすすぎ落としてください。

注意・ポイント

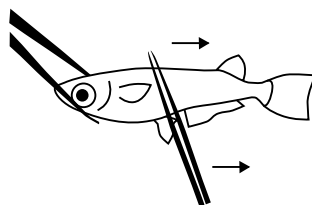
ピンセットを2本使ってください。1つのピンセットで体を挟みできるだけ動かないようにし、もう1つのピンセットで鱗を剥がします。鱗は固定液に浸漬したことにより脆くなっていますので、ピンセット先の側面を使い撫でるだけで比較的容易に剥がれ落ちてきます。ピンセットの先端で突き刺さないよう注意してください。

最初に、頭の方を押さえて胸鰭（ヒレ）から尾鰭にかけての体の両面を鱗の向きに繰り返して撫でてぬめりと共に鱗を大まかに落とした後、頭の向きを変えてあご下や頬、頭頂部分を撫でて頭部の鱗を落とすとよいでしょう。次に、尾鰭や胸鰭、背鰭など各鰭の付け根および腹部など細かいところまでやさしく撫でて全身の鱗を剥がしてください。

鱗が多数かたまって残っていると、その部分が脱色されず染色ムラになりますのでかたまりでは残さないようにしてください。ただし、無理に剥がしすぎると誤って鰭を折ったり体を傷つけたりします。鱗を剥がしとる作業は後半にもありますので無理な操作は避けてください。

ピンセットの先端は使わない！ 突き刺さない！

動かないよう
軽く挟んで押さえる



細いピンセット先の側面をメダカにあてて、撫でるように平行に動かす

<染 色> 30分～1時間

- (8) 100 mLビーカーに染色液25 mLを入れ、そこに鱗を剥がしたメダカ1匹を移し替え、ビーカーの上部をラップで覆い輪ゴムでとめてフタをします。ビーカーを動かして液を揺らし馴染ませます。
- (9) 37℃恒温器に30分～1時間静置して染色します（途中15分おきに液を揺らしてメダカを動かしてください）。溶液の温度が下がらないよう素早く行ってください。
37℃に保温できる振とう機がある場合は、メダカと溶液を適当な大きさのフタ付きプラボトルへ入れてゆっくり揺らしてください（ステップ(11)や(14)も同様に）。

<脱 色> 3時間

- (10) 200 mLビーカーに脱色液60 mLを入れ、そこに染色したメダカ1匹を移し替え、ビーカーの上部をラップで覆い輪ゴムでとめてフタをします。ビーカーを動かして液を揺らし馴染ませます。
- (11) 37℃恒温器に3時間静置して脱色します（途中30分おきに液を揺らしメダカを動かしてください）。

<ウロコとり（2回目）・観察・脱色の続き> 操作・観察：5～15分、脱色：終夜

- (12) 小皿にメダカを移し、ビーカー中の脱色液をメダカの上に少しかけ、実体顕微鏡（白色ステージ）下に置いて、まだ残っている鱗を剥がし取ります。

注意・ポイント

鱗も染色されますので、この段階で残っている鱗が見つけやすくなります。鰭や体などを傷つけないようにピンセットで撫でるようにして丁寧に剥がし取ってください。剥がしとった鱗の中には年輪が鮮明に染色されたものがありますので 鱗の観察 もおすすめです。



観察ポイント

鱗（ウロコ）

- (13) 鱗を剥がしたメダカはビーカー中の脱色液に戻し、ビーカーを動かして液を軽く揺らし、剥がれた鱗を振るい落としてください。
- (14) ビーカーの上部をラップで覆い輪ゴムでとめてフタをし、37℃恒温器に静置して、終夜で脱色を続けます。

3日目<観察・ウロコとり（3回目）> 5～15分

- (15) 脱色を終えたメダカを小皿に移し、ビーカー中の使用済み脱色液をメダカの上に少しかけ、実体顕微鏡（白色ステージ）下で 背骨を観察 します。



観察ポイント

背骨

注意・ポイント

メダカの透明度はグリセリン置換した後、飛躍的に上がって骨格が最も鮮明になりますので、保存液に浸した後のほうが骨の観察には適していますが（ステップ（22））、グリセリン置換すると背骨に大きな液泡が形成されますので、背骨はこのステップで一度観察することをおすすめしています。

また、鰭や体中に白い脂質様の塊がまとわりついている場合がありますが、保存液に置換したあと見えなくなっていくます。この段階では、観察の邪魔にならないように実体顕微鏡のステージは必ず白にしてください。

- (16) 観察を終えたら、綺麗な標本作製するために、鱗を丁寧にできるだけ剥がし取ります。鱗を剥がしたメダカはビーカー中の使用済み脱色液に戻して軽く液を揺らして剥がれた鱗をすすぎ落としてください。

注意・ポイント

実体顕微鏡の倍率を大きくすると見つけやすくなります。ピンセットで撫でて体などを傷つけないように丁寧に剥がし取ってください。

<グリセリン置換1> 1時間

- (17) 100 mLビーカーに置換液25 mLを入れ、そこにメダカを移し替え、ビーカーの上部をラップで覆い輪ゴムでとめてフタをします。ビーカーを動かして液を揺らし馴染ませます。
- (18) 室温で1時間静置してグリセリン置換を行います（途中15分おきに液を揺らしてメダカを動かしてください）。この工程から徐々に透明度が上がっていくのが観察できます。
- (19) その間に保存液およそ5 mLを保存用ガラスビンに入れておきます。

注意・ポイント

保存液は粘性が高いため、器具を使わず保存液の容器から直接、保存用ガラスビンに注いでください。ガラスビンの肩口～ねじ口に届くあたりの高さでおよそ5 mLです。

<グリセリン置換 2> 1時間

(20) 100 mLビーカーに保存液およそ20mLを入れ、そこにメダカを移し替え、ピンセットでメダカを動かして馴染ませます。

(21) 室温で1時間以上静置してグリセリン置換を行います（時々ピンセットでメダカを動かして下さい）。

<観察・保存>（5～15分）

(22) ガラスシャーレなど小皿にグリセリン置換したメダカを移し、乾燥しないようにビーカー中の保存液をメダカの上に少しかけ、実体顕微鏡（白色ステージ）下で 頭蓋骨や肋骨、背骨、各部位の鱗などを観察 します。



観察ポイント **全ての骨（頭蓋骨、肋骨、背骨、鱗（ヒレ）など）**

注意・ポイント

保存液に浸すと頭頂部が陥没することがあります。また、腹部などからだの一部が若干縮んだり凹んだりします。保存している間に半年程度かけて元に戻っていきます。

(23) 観察を終えたメダカを保存液の入ったガラスビンに移し保存します。

注意・ポイント

グリセリン置換によってできた背骨や腹部の液胞や気泡は保存していると徐々に小さくなり、半年程度で消えていきます。

【廃棄上の注意】

廃棄物は、自治体や国の法規制を遵守して適切に処理してください。

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

1801KA1

【フローチャート】

■ 操作はドラフト内 □ ウロコとり・観察

