

## 関節の可動性を保持した甲殻類の ポリエチレングリコール含浸標本の作製

### Preparing PEG-impregnated crustacean specimens that retain the joint flexibilities

藤原 慎一 (FUJIWARA, Shin-ichi)

名古屋大学博物館 〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町  
The Nagoya University Museum, Furocho, Chikusa-ku, Nagoya, 464-8601 Japan

#### Abstract

How we store or use the specimens in the museum collections strongly depends on the preparation methods. The drying and formalin/alcohol immersion have been the two major methods to prepare crustacean (Arthropoda) specimens. However, the former restricts the flexibility of the joints due to the desiccation of the soft tissues; and the latter causes the discoloration, remains both in periodic exchange of the solution, and require closed vessel to keep the specimen that wastes the space in the collection room. Here I propose a new preparation method for crustacean specimens to solve the above-mentioned problems. The specimen was prepared in the following steps: (1) fixation in 10% formalin solution; (2) impregnation into 50% 400-polyethylene glycol solution; and (3) desiccation. The specimen prepared in this new method retained the mobility of the joint. This method also has an advantage in saving the space in the collection room compared with the formalin/alcohol fixed specimens. The colors of the specimens were not faded for more than one year after the preparation. The preservation of crustacean specimens using 400-polyethylene glycol solution is expected to be one of the useful methods for the museum collections.

#### 要 旨

生物標本はその作製法によって研究への利用法や管理方法が大きく制限される。甲殻類の標本は従来、乾燥標本や液浸標本が主要な標本作成法となってきた。しかし、前者は組織が乾燥することで各関節を動かすことができなくなる点、後者は色素の分解が起こる点や固定液の管理が面倒な点がそれぞれ標本管理や利用における問題点として挙げられる。本報告ではこれらの問題を解消するべく、新たな標本作成法として、低分子ポリエチレングリコール (PEG) 含浸標本の作製法を提唱する。甲殻類の冷凍標本を一度10%ホルマリン溶液で固定した後、低分子PEGで含浸し、その後乾燥させた。この方法で作成した甲殻類標本は、関節膜や腱の柔軟性が失われないため、関節の可動性が保持された。また、密封容器に入れる必要がないため、収蔵スペースの節約においては液浸標本に勝り、乾燥標本と同等であるといえる。なお、標本作成後一年間が経過したが、PEG含浸処理後の色抜けは起こっていない。本手法は今後の甲殻類の保存方法のひとつとして有効活用していくことが期待される。

#### イントロダクション

動物標本を製作する場合、博物館標本は利用目的に応じた適切な保存方法が求められる。博物館の甲殻類標本は、主に乾燥標本(鈴木, 1971, 1973)やエタノールやホルマリン溶液での液浸標本、樹脂包埋標本として保存されてきた。乾燥標本は甲殻類標本の体色は良く残るものの、関節膜の柔軟性が失わ

れ、関節の可動性が保持されない。乾燥標本は水またはお湯で戻すことで可動性を取り戻すことができる（鈴木，1973；丸山，2014）が、観察する度に水で戻し、再度収蔵する前に乾燥させるのは手間がかかる。また、液浸標本は関節の可動性はある程度保持されるものの、時間と共に体色も抜け落ちる。さらに液浸標本は、保存溶液の液垂れに気を付けなければいけないため、観察に関しては乾燥標本のような手軽さはない。他にも、密閉容器による収蔵スペースの圧迫や、揮発性が高いため、定期的に保存溶液を交換する必要性、液体であるために重量がかさむこと、熱容量が大きいため、空調管理を徹底しないと結露が生じ、カビの発生源となることなど、維持管理にもコストがかかる。また、ホルマリンは白血病をはじめとするガンの原因となる有害な薬物として特定されており、資料管理者の健康管理面で万全な方法とはいえない。さらに、ホルマリンは酸化によってギ酸を生じるため、長期保存する場合は生体鉱物である炭酸カルシウムを溶解してしまう。エタノールは引火性が高く、消防法によって危険物に指定されており、保管できる量に制約があることや、酒税法によって酒税が上乗せされて販売されるため、薬価が高額になることや、免税購入の手続きや管理が煩雑になることが問題として挙げられる。樹脂包埋標本は体色の保存の点で優れているが、関節を動かすことは不可能である。

しかし、近年の甲殻類標本は、分類学的研究への利用だけではなく、機能形態学的研究への利用が盛んになっている（Fujiwara and Kawai, 2016）。特に、附属肢の機能形態学的研究では、関節の可動性が保持されている“動かせる標本”であることが重要である。また、多くの“動かせる標本”を手軽に観察できることが望ましい。こうした近年の甲殻類における機能形態学的研究の発展を受け、安価でかつ密閉容器が必要のない“動かせる”甲殻類標本の製作方法を模索していくことが重要だ。

生物の軟組織の形態を保存する方法として、近年、ポリエチレングリコール（PEG）による含浸法（Linder, 1992; Blumenstein, 2005）やプラスチック（Hagens, 2012）技術、グリセリン浸透法（小野，2004）などが発達してきた。特にPEGによる含浸標本は、比較的安価に作成できる点で、大量の博物館標本を作製する場面で有効である。PEGは水に可溶であり、分子量が小さいものは常温で液体として存在し、分子量が大きいものは固体として存在する（Ma et al., 1990；長崎，2012）。Blumenstein (2005)で紹介されているPEG含浸標本の製作方法は、まず遺体標本をホルマリンで固定した後、低分子のPEG溶液（PEG-600）から徐々に高分子のPEG溶液を順に含浸させ、最終的に加温したPEG-4000溶液を含浸させたのち、溶液から取りだして常温に置くことにより、組織に含浸させたPEG-4000を固化させて作るというものである。

本手法では、軟組織に含まれる水分が常温で固化する高分子のPEGに置き換わるため、PEG-4000で含浸させた甲殻類標本では関節の可動性が保持されない。そこで、本報告では、常温で液体の低分子のPEG（Ma et al., 1990; PEG-400; 和光純薬工業株式会社HP, 2014）で含浸させた甲殻類標本の製作を試み、関節の可動性や保存スペースの節約について議論する。

## 手 法

甲殻類の低分子PEG溶液含浸標本の作製手順を以下に記す。試料は甲殻類を $-20^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存した標本を用いる（図1）。資料は著者が藤前干潟や石垣島で採取したものや、津田漁港で水揚げされたものである。本報告で用いた標本のサイズは最大のもので620 g（ヤシガニ *Birgus latro*）である。

10%等張ホルマリン溶液と、50%PEG-400溶液（比重1.13；融点 $4-8^{\circ}\text{C}$ ）を準備する。このとき、10%ホルマリン溶液と50%PEG-400溶液は、標本に対して十分に多い量になるようにする。PEG-400は比較的安価に入手できる。

甲殻類標本はまず10%等張ホルマリン溶液で固定した。ホルマリン溶液での固定時間が長すぎると関節の可動性が徐々に失われていくため、試料のサイズに応じて、関節の可動性が残っているうちに固



図1. 甲殻類の冷凍標本. 上段左) アシハラガニ (*Helice tridens*), 上段右) シオマネキ (*Uca arcuata*), 下段) ノコギリガザミ (*Scylla serrata*) の左右の鋏脚. スケールバーは5 cm.



図2. 甲殻類のPEG-400含浸標本. 上段左) アシハラガニ (*Helice tridens*), 上段右) シオマネキ (*Uca arcuata*), 下段) ノコギリガザミ (*Scylla serrata*) の左右の鋏脚. スケールバーは5 cm.

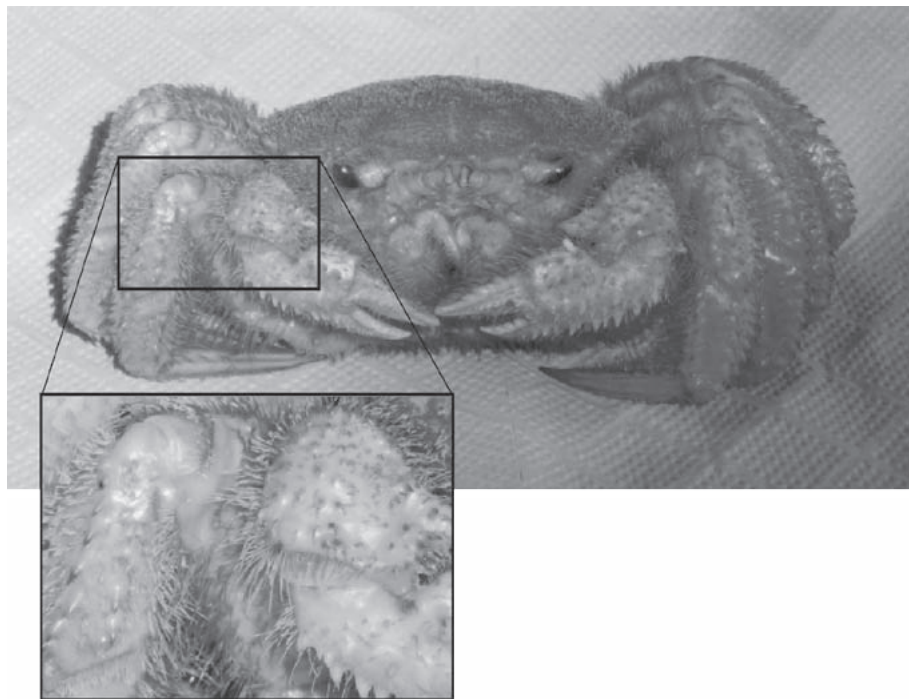


図3. ケガニ (*Erimacrus isenbeckii*) のPEG-400含浸標本. 殻に生える毛も、柔軟性を維持して残されている.

定液から引き揚げた(駒井, 2003). その後, 50% PEG-400溶液で2週間含浸させた. その後, 標本をPEG-400溶液から取り出し, 新聞紙等の上に標本を置いてPEG-400溶液の液だれを除去しつつ, 十分に風乾させた(図2).

甲殻類標本の甲羅や毛, 関節膜, 内突起, 筋, 卵について, PEG-400含浸標本と乾燥標本で形状を比較し, PEG-400含浸標本における関節の可動性も確認した. また, その後の経時変化を観察し, 甲殻類標本のPEG-400含浸法が博物館標本として半永久的に保存できる方法かを考察した.

## 結 果

軟組織の形状保存—乾燥標本では、関節膜や内突起は目立って収縮し、冷凍標本が持っていた形状を保持しない。しかしPEG-400含浸標本では、PEG-400が毛や関節膜、内突起によく浸透し、少なくとも肉視できる範囲では、冷凍保存標本と比べて目立った収縮は見られなかった（図2, 3）。カニ類のPEG-400含浸標本の場合、体部では目立って収縮する部位はなかった。しかし、貝殻に隠れるタイプのヤドカリ類のPEG-400含浸標本の場合、腹部のように外骨格が比較的薄い部位については、収縮が生じた。また、肉視できる範囲で、卵も収縮を起こした。甲殻類の甲羅については、どこまでPEG-400が含浸したかは判断できなかった。しかし、少なくとも甲羅の表面にはPEG-400が覆っていることが確認できた。筋肉はホルマリン固定の段階で柔軟性を失っており、PEG-400含浸後は若干の収縮が認められた。

関節の可動性—PEG-400含浸標本は乾燥標本とは異なり、附属肢の関節の可動性が保たれていた。特に、小型の甲殻類標本では、関節の高い柔軟性と可動性が保持されていた。特に、関節膜にPEG-400が十分に含浸した関節では標本製作後に関節角度を調整することが比較的容易であった（図4）。しかし、関節膜にPEG-400が十分浸透していない関節の場合、乾燥標本と同様に、標本製作後に関節を動かすと、関節膜が破損してした。このように、PEG-400の含浸が不十分な標本は、含浸中に溶液に標本が浮いてしまうものに多くみられた。一方で、大型の甲殻類標本の附属肢の関節では、関節膜の柔軟性と関節の可動性は保持されていたものの、関節を動かす際の抵抗は大きく、標本作成後に標本の姿勢を調整することは困難であった。このような関節の可動性は、標本製作後1年間経過した後でも保持されていた。また、触角やキチン質の毛のように細長い部位は、乾燥標本では折れてしまう場合があるが、PEG-400含浸標本ではすぐに折れてしまうことはなかった（図3）。

ホルマリン固定前の乾燥や、ホルマリン溶液での固定時間が長すぎたことで、関節の可動性が失われてしまった標本は、PEG-400含浸後に関節の可動性が回復することはなかった。また、腐敗が少し進行して関節膜のアポトーシスが進んだ標本では、関節を柔軟に動かすことは可能だったものの、関節の姿勢を維持させることは難しかった。

標本の保存—甲殻類は、ホルマリン固定やアルコール固定の最中に色が少し抜けてしまう。しかし、PEG-400含浸処理後の標本は、標本製作後1年が経過したのもでも、殻の体色が残された。ただし、乾燥標本のような乾いた質感ではなく、PEG-400が表面をコーティングすることによる潤いを残した質感を保っている（図2-4）。

標本は密閉容器や特殊な保存溶液は必要としなかった。標本は密閉せずに暗所で保管していたが、カビの発生は確認されなかった。乾燥した甲殻類独特の臭いは、標本から消えることはなかった。しかし、防虫剤を置かない状況においても、少なくとも1年間、カツオブシムシ等による標本の食害は受けなかった。甲殻類の軟組織に含浸したPEG-400は、溶液から取りだして十分に風乾させた後であれば、体内から染み出してくることはなかった。



図4. ノコギリガザミ (*Scylla serrata*) の右鉗のPEG-400含浸標本の関節角度を変えて撮影した写真。各関節が高い可動性を保持していることがわかる。

## 考 察

動物の関節の仕組みや動きを観察する際に、関節の可動性が保持されている標本は非常に有効な研究教育の材料となるが、以下の点において、PEG-400による含浸法は、特に甲殻類の標本製作で非常に有効な手法である。

(1) 標本製作の簡便性—標本はホルマリン溶液とPEG-400溶液に順に漬けるだけで製作できる。標本製作期間は、固定と含浸、風乾を含めて合計1ヶ月程度で、比較的大型(< 620 g)の標本でも製作できる。

(2) 安価な標本製作費—PEG-400は水溶性で毒性もなく(和光純薬工業株式会社, 2014)、比較的安価に入手が可能である。また、一度標本製作に使用したPEG-400溶液でも、その後繰り返し標本製作に利用することができる。ただし、長期にわたってPEGを含浸に使用した場合、含浸液のPHの低下がみられ(増沢ほか, 1995)、溶液中でのPEGの分解につながる危険性が指摘されている(Bitz et al., 1993)ので、注意が必要である。

(3) 保管の簡便性—標本は密閉容器や保存溶液は必要とせず、ケースに裸のまま置いておくだけで保管ができる。ただし、カビや虫の食害をどれだけ防げるかについては検証が不十分である。また、分子量の低いPEGは吸湿性が高いため、湿気の高いところに置くと吸湿して滴を生じ、標本の外に浸出する事例が報告されている(増澤・宮岸, 2003)。従って、標本を保存する際は、防虫剤を置いて、防虫と除湿を行った方が安全だと思われる。

PEG-400は、常温では粘性の高い液体として存在し、揮発しないため、甲殻類の関節膜や筋肉等の軟組織に含まれる水分と置換させることで、標本の潤いを保つことができると考えられる。また、関節膜の潤いが保たれることで、PEG-400含浸標本は関節の可動性が保持されると考えられる。ただし、筋肉はホルマリン固定の段階で柔軟性が失われてしまう。そのため、筋量が多い関節においては、外皮である殻と内突起を結ぶ筋肉が固まるのが強く影響し、関節を動かそうとする際に抵抗が強くなるものと考察される。

PEG-400含浸法は、PEG-400を軟組織の中に十分に含浸させることが重要である。標本の比重が軽い場合は、含浸中に標本が溶液上に浮かびあがってしまい、含浸が十分に進行しないことが懸念される。PEG-400に含浸させる工程では、標本が溶液に浮いてこないよう、金属製のカゴに入れてカゴごとPEG-400溶液に沈めるなり、容器の底に標本を固定する等の工夫が求められる。また、ヤドカリ類の腹部や卵のように、殻が薄い部位については、PEG-400溶液の浸透圧が体内の浸透圧よりも高かったため、軟組織が収縮してしまったと考えられる。殻が薄い資料でのPEG-400含浸法について、形状を保持したまま標本作製することを今後の課題としたい。

PEG-400含浸法は、甲殻類だけではなく、その他の分類群についても関節の可動性を保持した標本を製作する際の有効な手法として活用できる可能性がある。グリセリン浸透標本(小野, 2004)は軟組織を保存するための有効な手法であるが、小野(2004)では、甲殻類のグリセリン浸透標本における関節の可動性についての言及はなかった。しかし、グリセリンも常温中において液体で存在するため、グリセリン浸透標本でも、PEG-400含浸標本と同様、関節の可動性を保持した甲殻類標本が作製できるかもしれない。今後、昆虫や棘皮動物、脊椎動物の軟骨の標本製作でもPEG-400含浸法が利用できるか、検討していきたい。

## 結 論

常温で固化する高分子のPEGによる含浸法はこれまでも標本製作の現場で使われてきたが、本報告では、敢えて常温で液体であるPEG-400で含浸させた甲殻類標本の製作を試みた。本方法で製作すると、

関節の可動性を保持した標本ができるため、甲殻類の筋骨格系の研究や教育において非常に有効に利用できただけではなく、比較的安価かつ安価に製作でき、保管も容易である。今後、博物館の甲殻類標本の有効な製作手段として活躍していくことが期待される。

## 謝 辞

本報告を執筆するにあたり、PEGによる含浸法について多大なる助言をいただいた相川稔氏（神奈川県立生命の星地球博物館）、標本の採集に協力をいただいた名和真治氏（津田漁業組合）、河合巧幾氏（元・名古屋大学環境学研究科）、大路樹生教授、西田佐知子准教授（名古屋大学博物館）に深く御礼申し上げます。本報告の標本製作は、平成28年度の名古屋大学博物館館長裁量経費にて実施した。最後に、本原稿を査読し、有益な助言を多数いただいた佐藤武宏学芸員（神奈川県立生命の星・地球博物館）と編集委員会に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Bitz, M., Dean, L., Grattan, D. W., McCawley, J. C., McMillen, L. (1993) A study of the thermal breakdown of polyethylene glycol. *Proceedings of the 5th ICOM Group of Wet Organic Archaeological Materials Conference*, 167–197.
- Blumenstein, C. (2005) Vom engerling bis Mittelsäuger: PEG-anwendungen in der zoologischen präparation. *Der Präparator*, **51**, 38–53.
- Fujiwara, S-I. and Kawai, H. (2016) Crabs grab strongly depending on mechanical advantages of pinching and disarticulation of chela. *Journal of Morphology*, published online as early view.
- von Hagens, G. (2012) Anatomical safari. In Whalley, A. (ed.) *Body Worlds: The Anatomy of Animals*, 4–20. Arts and Sciences, Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- 駒井智幸 (2003) 甲殻類. 松浦啓一 (編) *標本学—自然史標本の収集と管理*, 39–47. 東海大学出版会.
- Linder, E. (1992) Excavating an ancient merchantman. *Biblical Archaeology Review*, **18**, 24–35.
- Ma, T. Y., Hollander, D., Krugliak, P., Katz, K. (1990) PEG 400, a hydrophilic molecular probe for measuring intestinal permeability. *Gastroenterology*, **98**, 39–46.
- 丸山宗利 (2014) 小型甲虫の台紙貼り標本とラベルの基本的な作り方と注意点. *九州大学総合研究博物館研究報告*, **12**, 21–32.
- 増澤文武・宮岸重好 (2003) 室内保管したポリエチレングリコール含浸出土木材の30年経年変化. *考古学と自然科学*, **47**, 13–33.
- 増澤文武・北野信彦・菅井裕子・井上美知子・植田直見 (1995) PEG含浸槽内のPEG水溶液の劣化. *保存科学研究集会*, **95**, 24–25.
- 長崎幸夫 (2012) 生体適合性ポリエチレングリコール表面の構築. *高分子*, **61**, 1–6.
- 小野榮子 (2004) グリセリン浸透法による生物標本の作成. *第36回東レ理科教育賞受賞作品集*, 東レ科学振興会, 39–41.
- 鈴木一宏 (1971) かにの乾燥標本の製作法. *甲殻類の研究*, **4, 5**, 242–248.
- 鈴木一宏 (1973) カニの感想標本製作. 小田原利光 (編) *蟹の博物館*, 28–65. 緑書房.
- 和光純薬工業株式会社 (2014) 製品詳細情報—ポリエチレングリコール400. <http://www.siyaku.com/uh/Shs.do?dspCode=W01W0116-0906>.