

### III 標本作成法

#### 1. 標本試料採集

- (1) 生態記録のために、生息水深や群体の大きさ等のデータを記録するとともに水中写真撮影を行った後、標本として試料を採集する。
- (2) 採集に当たっては、小さな群体の場合は固着面も含めて全体を採集する。
- (3) 大きな群体の場合は、後の同定作業に必要な冠部から固着面を含む柄部までを、パイを切り分ける要領で群体を縦切りにして採集する (図 13)。

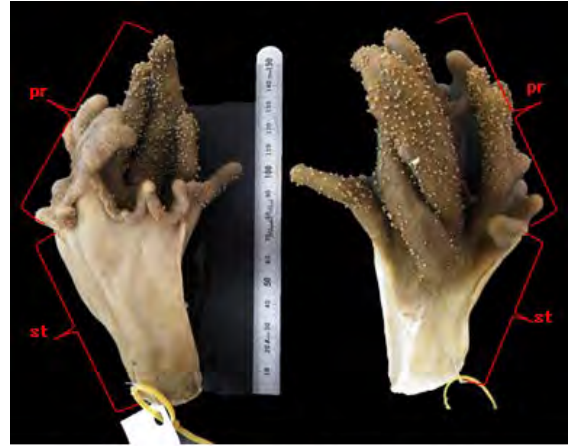


図13. 群体の一部を縦切りにして採集した標本. pr: 冠部; st: 柄部.

#### 2. DNA 標本作成

- (1) 採集した試料から 0.5~1 cm 角の組織片をできるだけ速やかに切り取り、純エタノール中に浸漬し、冷蔵庫等の冷暗所に保管する (図 14)。
- (2) その後 1 週間前後で、保存液全体を交換した後、DNA 分析を行うまでの期間は冷蔵庫等の冷暗所に保管する。



図14. A: DNA標本切り出し用具; B: DNA標本一時保管状態.

#### 3. 液浸標本作成

- (1) 採集した試料は、採集時の衝撃および輸送によるストレス等のために緊縮していることが多いので、それらの緊張を解き、群体およびポリプが伸長した状態を再現するために、可能であれば試料を水槽内で一晩放置する (図 15A, B)。
- (2) その後、試料ができるだけ伸張した状態で 20% 前後のホルマリンにできるだけ速やかに浸漬し、そのまま 8~12 時間放置する (ソフトコーラルは麻酔が効きにくい場合が多いので、高濃度のホルマリンに急激に浸漬することにより、群体やポリプが縮むことなく固定することができる) (図 15C)。



図15. 試料の一時保管と固定. A: 流水水槽に浸け試料の緊張を解く; B: 試料はできるだけ水中に浮かす; C: 20%ホルマリンバケツに資料を浸漬する.

なお、ウミキノコ属

やカタトサカ属等の大型で共肉内に中膠が充満している試料については、固定に 12 時間以上の時間をかけるほうが望ましい。また、麻酔をかける場合は、試料を海水と等張の塩化マグネシウム水溶液中に浸漬するか、または水槽にメントールを滴下して、麻酔が効果を現すまで数時間から 1 昼夜放置する。メントールは海水に溶けにくいので、エタノールに溶かしてから使う方法も有効である。

- (3) 試料の固定を終えたら、ホルマリン液から試料を取り出し、水道水による水洗を行ってホルマリンを抜く (図 16A)。水洗は流水で行うか、あるいは水道水を何度か入

れ替えて、延べ 8-24 時間程度の時間をかける。試料が大型の場合は、水洗時間を長くする。(固定に使用したホルマリンは、必要に応じて濃度を調整することにより、何度も使い回しが可能)。

- (4) フォルマリンが十分抜けたことを確認後、80%エタノール中で常温保存する。ソフトコーラルの分類では骨片の形や大きさ等が重要な形態形質とされているが、骨片はホルマリンの酸により溶解されるので、標本の保存にはエタノールが使われる(図 16B)。また、ソフトコーラルは群体内に多量の水分を含むために、80%エタノールに浸漬することにより、エタノールの濃度は 70%前後に維持できる。



図16. A: 通直流水を掛けながらホルマリンを抜く; B: 試料を80%エタノールに浸漬する。

- (5) 試料から色素等が溶出するために、1~数か月後に保存液を新しい 75%エタノールに置き換えることにより、長期保存標本が完成する。なお、古いエタノールは、その後も第一次保存液として数回の使い回しが可能である。
- (6) 上記(4)または(5)の何れかの過程で、標本にラベルを付ける(図 17A)。ラベルに記載する内容は、下記のとおりである。なお、(ii)の種名(学名)に係る情報は、分類学の発達に伴い将来変更を受ける可能性があるが、(i)の産地名等の情報は標本に固有の情報であって、将来変更を受ける可能性がないばかりでなく、作成時点でしか与えることのできない情報であるので、出来るだけ詳細に記載する。筆記用具は、耐アルコール性のロットリングインクを用いることがあるが、2B~4Bの鉛筆が軽便でかつ耐用性が高い。

(i) 標本の採集情報

- 標本の産地名  
(地名または海域名や緯度経度)
- 水深
- 採集年月日
- 採集者名
- 採集方法
- 保存液の種類
- 特記事項

(ii) 標本の分類学上の情報

- 種名
- 和名
- 科名
- 目名
- 綱名
- 門名等



図17. A: 標本ラベル; B: 完成したエタノール標本。



#### 4. 骨片の SEM 用標本作成

##### (1) 骨片取出し部位の決定

- ① 属により多少異なるが、触手、花頭、花柄、冠部共肉皮部と内部、柄部共肉皮部と内部の各部に、それぞれ形や大きさの異なる特徴的な骨片の埋在していることが多いので、それら各部の骨片の存在を実体顕微鏡で確認しながら、骨片を取り出す部位を決定する。
- ② 属によっては、皮部や内部がそれぞれ2層に分かれていたり、ポリプの構造が複雑化している場合があるので、このような点についても、実体顕微鏡で確認を行う。

##### (2) 骨片を含む組織の取出し

- ① 実体顕微鏡下で骨片取り出し部位を確認しながら、切除する箇所に適した大きさと形状のメス等を使って試料から小片（長さともにも1~2mm程度、大きな骨片の含まれている場合は、それらの骨片が数個含まれている大きさ）を切り出す。
- ② 目視で確認をして、骨片の量が多くかつ共肉組織が少ない場合は、小片をスライドグラス上に置き、次いで

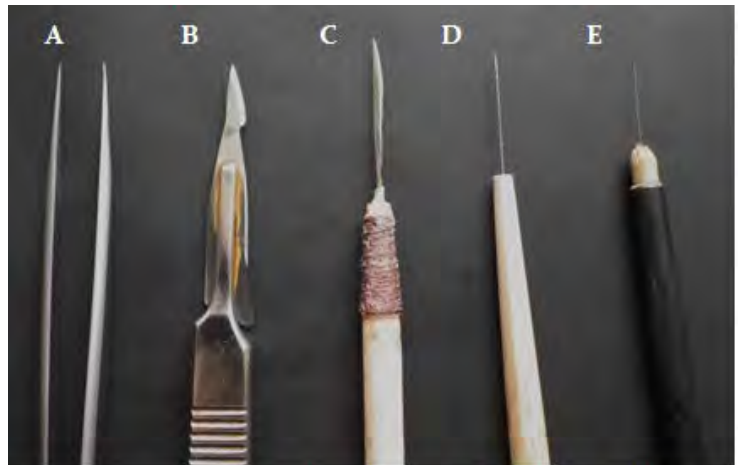


図18. 小片切り出し用具. A: 精密ピンセット; B: 普刃メス; C: 自家製極小メス(縫い針を加工して使用); D: 自家製柄付針(虫ピン使用); E: 自家製柄付針(面相筆の毛を1本使用). (すべてYD)

台所用塩素系漂白剤またはアンチホルミンを

数滴落とした後、数分間放置して骨片以外の有機物が溶解するのを待つ (図 19)。



図19. 精密ピンセットと自家製極細メスを使って小片を切り出す。



図20. 次亜塩素酸ナトリウム10%溶液を滴下して、骨片以外の組織を溶かす。

- ③ 中膠が大量に含まれている共肉の小片等の場合は、先端を尖らせた極細の柄付針や精密ピンセットの先端等で小片を慎重に動かして、溶解を促進させる (図 21A)。有機物が完全に溶解したら吸水紙 (キムタオルの小片から作成した「こより」が、繊維くず等が混入しなくて扱いやすい) で台所用塩素系漂白剤を吸い取る (図 21B)。なお、この「こより」は、あまり細すぎないように作成し、その後先端を少しちぎって再び巻き直すと吸水性が高く、かつちぎることによってできた数本の繊維が骨片に引っかかって扱いやすい。

- ④ 次いで、ビーカー等に入れた蒸留水を精密ピンセットの先で少量挟み取り、試料に数滴落として、骨片に付いた台所用塩素系漂白剤の残液や汚れを慎重に洗い出した後、吸水紙で吸い取る。

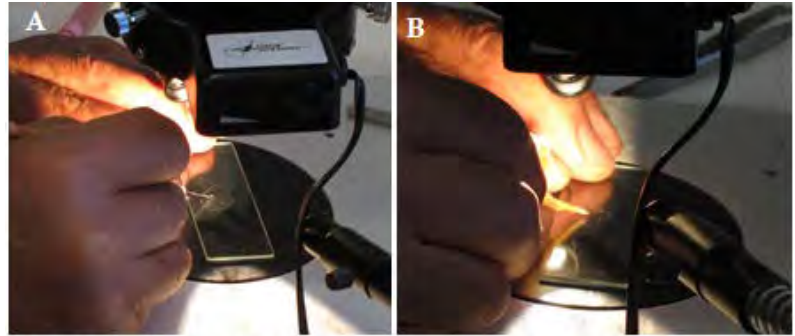


図21. A: 実体顕微鏡下で、組織をほぐす; B: 「こより」で次亜塩素酸ナトリウム溶液を吸い取る。

- ⑤ この作業を数回繰り返して、スライドガラス上で骨片を十分に洗浄する。

### (3) SEM 標本作成

- ① 先ほどの工程で作成したスライドガラス上の骨片の集まりに、蒸留水を1、2滴落とすと共に、すぐ近くにも1滴落として小さな水溜りを作る（精密ピンセットで水を滴下するとミスが少ない）（図22）。

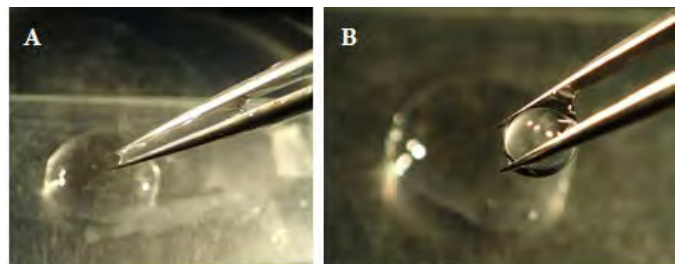


図22. A: 精密ピンセットで蒸留水をほさむ; B: ピンセットを広げると水滴が落下する。

- ② 実体顕微鏡透過照明下で観察しながら、SEM 標本として適当な骨片を10~20個程度選び、面相筆の毛を1本取り付けた筆を用いて選別した骨片を隣の水溜りの中に引き込む。骨片の大きさによっては、筆の代わりに柄付針や精密ピンセットを用いる。（この時、元の水ができるだけ混ざらないように注意する）。
- ③ 次に、水溜り中の骨片を筆で一つずつ外側に引き出す。この場合も、骨片の大きさによっては筆の代わりに柄付針や精密ピンセットを用いる（最終洗浄工程）。

- ④ 次に、1円硬貨大のアルミ板にSEM用導電両面テープを表裏1周するように貼り付けて、SEM用ステージを作成する。その後、両面テープの上端と下端に、繊維くずの出ない耐水紙等で作成した幅3mm長さ15mm程度のラベルを横方向に貼付してデータをロットリングペンで記入する（中央の四角い部分が骨片を貼り付けるスペースになる）（図23A）。



図23. A: SEM用ステージ作成。1円硬貨大のアルミ板にSEM用両面テープを貼り、さらに上部と下部に耐水紙の帯を貼る（アルミ板や耐水紙等に油脂が付かないようゴム手袋を着用して行う; B: SEM標本作成用プラスチックシート、実体顕微鏡下で骨片の載っているスライドガラスとSEM用ステージを同時に移動するためのシートで、高さ調節のためのスライドガラスの上に骨片の載っているスライドガラスを載せる。

- ⑤ その後、あらかじめ作成しておいたSEM 標本作成用プラスチックシート上に（図23B）、このSEM用ステージ板を貼り付ける（この後の工程でアルミ板をプラスチックシートごと自由に動かすことができるようにするため、なお、シート上のスライドガラスは、実体顕微鏡下でピント調節を容易に行うための高さ調節用）。

⑥ ③で引き出した骨片がほぼ乾燥したのを確認後、骨片の載ったスライドガラスを先ほどのSEM標本作成用シートのスライドガラス上に置く。

⑦次に、スライドガラス上の骨片を透過照明で観察すると共に、SEMステージ上面を落射照明で観察するため、実体顕微鏡の透過照明と落射照明の双方を点灯して骨片を観察しながら、筆の先に③の水溜りの水を少量付けて骨片を一つずつ吊り出し、SEMステージの両面テープ上に貼り付ける(図24)。なお、カタトサカ属のように、長さ1mmを超すような大型骨片の場合は、精密ピンセットで骨片を慎重につまみ、両面テープ上に貼り付ける。貼り付け時も、実体顕微鏡で骨片の向きや傾きを確認しながら行う。この時、骨片の載っているスライドガラスと、SEMステージをSEM標本作成用シートに載せておくことにより、顕微鏡の下で両者を素早く入れ替えることが可能になる。また、骨片の向きや傾きを調整しながら貼り付けることができる。

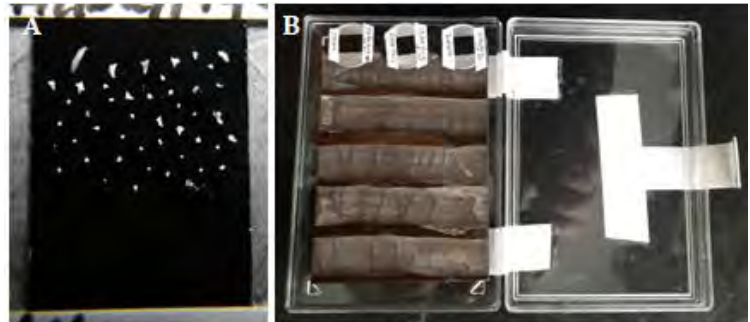


図24. A: 両面テープ上に並べた骨片; B: 完成したSEMステージをSEMステージ下面にも貼り付けた両面テープを利用して、一時保管ケースに貼り付ける。

⑧完成したSEM標本を蓋付きの一時保管ケースに保管する。

## 5. 骨片の永久プレパラート標本作成

- ① 4の工程でスライドガラス上に残った骨片を、筆または柄付針を使って、カバーガラスの大きさに合わせて、骨片同士が重ならないように均一に広げる。なお、残っている骨片が少ない場合は、先ほどの工程を繰り返して、組織片から骨片を取り出す。
- ② 骨片が完全に乾いていることを確認後、封入剤をかけて、カバーガラスをかぶせる。なお、骨片の乾燥が遅い場合は、スライドガラス上の骨片をエタノール原液で洗い、乾燥を促進する。
- ③ 完成したスライドガラスにデータを記入する。
- ④ 完成したプレパラートをケースに保管する。