

グリセリン浸透法による小さな生物標本の作製について —マダニと寄生虫卵の永久標本作製を目指して—

1. はじめに

生物標本には、乾燥標本や液浸標本、樹脂包埋標本など様々な種類があり、使用する目的に応じた作製方法の検討がされてきた。作製方法は手法と生物サンプルの相性を考慮して選択する必要があり、作製方法によっては脱色や変色、変形や脆化など、大切なサンプルの材料の価値を下げてしまう問題点が生じてしまう¹⁾²⁾。標本の作製において、生物ごとにある特徴を保つことが極めて重要である。グリセリン浸透法は生きている時とほぼ変わらない状態を長期間維持するための優れた標本作製の手法であり、魚や昆虫等を対象に行われている¹⁾。

当研究室では、マダニ及び寄生虫卵を実験の題材とすることが多い。これらは希少材料であるため長期間保存可能な標本作製法が求められていた。そこで、永久標本作製を目標として、これらの生物を対象としてグリセリン浸透法を応用して標本を作製し、実体顕微鏡または光学顕微鏡による観察の有用性を評価したので紹介する。

2. マダニ編

(1) 材料 (図1)

- ・エタノール (99.5%) 及びグリセリン (100%)
- ・脱脂綿と綿棒
- ・精密ピンセット
- ・プラスチック容器
- ・冷凍保管したマダニ

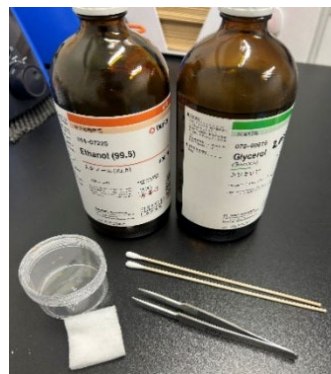


図1 試薬と器具(マダニ編)

(2) 工程

① 脱水

試料 (マダニ) の脱水を目的としてエタノール (99.5%) に浸した。また、標本のポーズをあらかじめ決めて固定するため、発泡スチロール等を土台とし、精密ピンセットを使用してマダニを虫ピン数本で固定した (図2)。試料の大きさによって脱水に要する日数は異なるがマダニの場合、振盪機にエタノールが入った容器を設置し、計2日間、脱水処理を行った。

この脱水工程により、次工程のグリセリン浸透に必要な時間が短縮され、また保存性も向上する。マダニについては脱水工程前後で色や模様の変化は認められなかったが、対象生物によっては生体の外観が脱水処理により変わってしまう場合もあるため省略することも可能である。

② 浸透

試料 (マダニ) の体液をグリセリンに置換

するため、グリセリン溶液（浸透液）中に試料を入れた容器を振盪機に設置し、60 rpm で 3 日間浸透処理を行った。この工程では試料の体液により浸透液が薄まるため、浸透液は 1 日置きに交換した（図 3）。

なお、使用済みのグリセリン溶液は、濃度回復のために、揮発性の差を利用して晴天時に開封して約 1 日放置すると再利用が可能である。試料の大きさや数量によって液の交換回数は変わるため、その都度条件が異なることに留意する。また、脱水が不十分であったり脱水を省略した場合は、浸透液濃度の低下のため固定不良となるため特に注意が必要である。

③ 表面の洗浄と乾燥

グリセリン浸透が完了したらエタノール（99.5%）で数十秒から 1 分程度洗い、表面の余分な浸透液を取り除いた。その後、綿棒や吸水紙で洗浄液を除き、脱脂綿等の上で乾燥させた。

表面がべたつく場合は再度洗浄し、浸透液をしっかりと取り除くことが重要である。

④ 保管（標本の乾燥）

標本保管には防水性の高い素材でできた容器等を用いた。今回、標本の保護のため脱脂綿をプラスチック容器の底に敷いた。マダニの成虫は 3-10 mm と小型であり、虫ピンを用いた固定が難しいが、マダニ脚にあるかぎ爪構造により、脱脂綿に標本を固定することができた（図 4）。

⑤ 実体顕微鏡での観察

固定前のマダニと比較して色や構造の変化はほとんどなく、生体と同様の形態観察が可能であった。また、作製後 2 年が経過した標本に劣化等は認められないが、引き続き標本の状態を観察し、保管期間や標本に起こる変化を経過観察し、固定法の有効性について評価をしたいと考えている（図 4、5）。



図 2 虫ピンで固定したマダニ



図 3 グリセリンへ浸漬



図 4 マダニ標本



図 5 マダニ標本の一部

3. 寄生虫卵編

(1) 材料(図 6)

- ・グリセリン (10-100%)
- ・マリノール試薬
- ・パンチ穴シール (厚さ:0.05 mm、外径:15 mm、ポリエステル製)
- ・丸型カバーガラス (厚さ:0.13-0.17 mm、外径:15 mm)
- ・正方形カバーガラス (サイズ:18×18 mm)
- ・スライドガラス
- ・10%ホルマリンまたは 70%エタノールで固定済みの寄生虫卵 (虫卵: 縮小条虫、鞭虫、日本海裂頭条虫、肝吸虫、回虫)

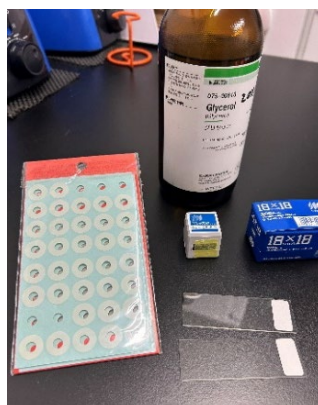


図 6 試薬と器具(寄生虫卵編)

(2) 工程

① 浸透

10%ホルマリンまたは 70%エタノールで固定済みの寄生虫卵を 1.5mL チューブに分注し、遠心機にかけることで寄生虫卵を回収した。10%グリセリン溶液→30%グリセリン溶液→50%グリセリン溶液→70%グリセリン溶液→100%グリセリン溶液に一日置きに移し替え、試料(寄生虫卵)内の固定液をグリセリンへ置換した。

② 封入

スライドガラスにパンチ穴シールを貼り、穴部分に寄生虫卵を含む 100%グリセリン溶液を 10-15 μ L 添加し、丸型カバーガラスをのせた(図 7, 8)。さらに、マリノール試薬を丸型カバーガラス上に適量滴下し、18×18 mm カバーガラス(正方形)による封入をした(図 9)。

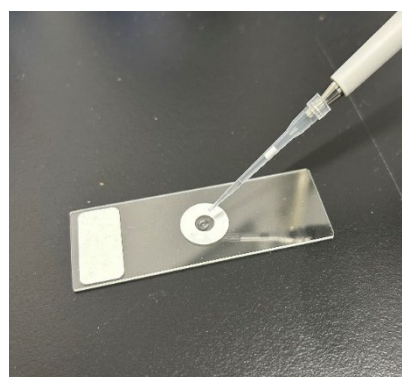


図 7 スライドガラスへの溶液滴下



図 8 丸型カバーガラスによる封入

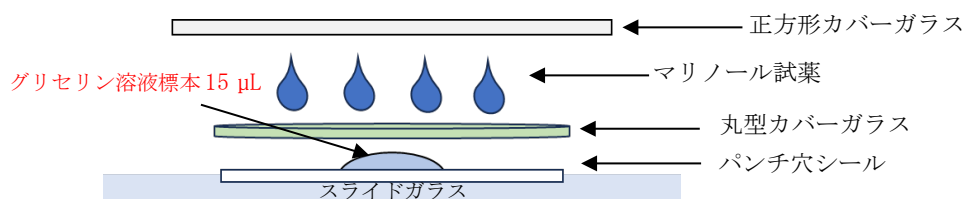


図 9 プレパレート作製のイメージ図

③ 光学顕微鏡での観察

寄生虫卵の観察を行ったところ、100 倍、200 倍のような低倍率では、通常のプレパラートと比較して観察像に差はあまり感じられず、顕微鏡観察に使用可能な標本であった。一方で、400 倍では、二枚のカバーガラスを使用している影響で、細部の観察が困難であった。また、エマルジョンオイルを使用した 1,000 倍での観察は不可能であった。

寄生虫卵の観察は、観察の都度プレパラートを作製することが一般的であるが、今回作製したプレパラートは、作製から 1 年経過しても遜色なく観察が可能であり、貴重なサンプルの節約、また観察までの時間短縮という観点から役立つプレパラート作製法であると考え。

4. まとめ

今回、マダニ及び寄生虫卵を対象に、グリセリン浸透法による標本作製を行い、その有効性について結果を紹介した。いずれも個体サイズ

が小さいため、短時間かつ安価で標本の作製が可能であり、変色や脱色、変形等は認められなかった。400-1000 倍といった高倍率での観察には不向きではあるが、低倍率による顕微鏡観察では、通常の方法で作製されたプレパラートと遜色ない観察像が得られ、グリセリン浸透法の有用性を確認できた。引き続き標本状態について観察を継続し、グリセリン浸透標本がどの程度長期間の保存が可能であるのか、また、模様や色彩などの形態が維持できるのかについては経過観察が必要である。

5. 参考文献

- 1) 小野榮子：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, 39-41 (2005)
- 2) 廣田大輔, 中島経夫：魚類標本におけるグリセリン浸透法の検討. Naturealistae, 18, 47-52 (2014)

(文責:生物学部 医動物研究室)

愛知衛研技術情報 第49巻第1号 令和7年(2025)年 12月 1日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のウェブサイト【 <https://www.pref.aichi.jp/eiseiken/> 】

総務課：	052-910-5618	生物学部	052-910-5654
企画情報部		ウイルス研究室：	052-910-5674
健康科学情報室：	052-910-5619	細菌研究室：	052-910-5669
		医動物研究室：	052-910-5654
		衛生化学部	052-910-5638
		医薬食品研究室：	052-910-5639
		生活科学研究室：	052-910-5643

代表電話： 052-910-5618

代表 FAX： 052-913-3641
