

# ポリエチレングリコールを用いたニホンザリガニの 博物館学習用標本の作製

小田桐亮<sup>1)</sup>・川井唯史<sup>2)</sup>・山崎友資<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 〒 044-0006 北海道倶知安町北 6 条東 7 丁目 3 倶知安風土館

<sup>2)</sup> 〒 046-8555 北海道余市町浜中町 238 北海道立総合研究機構

<sup>3)</sup> 〒 048-1341 北海道磯谷郡蘭越町港町 1401 蘭越町貝の館

## Preparation of *Cambaroides japonicus* Using Polyethylene Glycol as an Educational Material in the Museum

Ryo ODAGIRI<sup>1)</sup>, Tadashi KAWAI<sup>2)</sup> and Tomoyasu YAMAZAKI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Kutchan Museum of Natural History, 3 Higashi7, Kita6, Kutchan, Hokkaido, 044-0006 Japan

<sup>2)</sup>Hokkaido Research Organization, Central Fisheries Institute, 238 Hamanaka, Yoichi, Hokkaido, 046-8555 Japan

<sup>3)</sup>Shellfish Museum of Rankoshi, 1401 Minato-machi, Rankoshi, Hokkaido, 048-1341 Japan

**Abstract.** *Cambaroides japonicus* (De Haan, 1841) is endemic native species in Japan and it is listed as alien species in Japanese government, introduced *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) and *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) threatend for the native species. The cooperation of many people is needed to conflict invasive native species, and there is an urgent to improve environmental education and public awareness for citizens. Recently, a specimen preparation method can retain the mobility and coloration of crustacean joints was developed using low molecular weight polyethylene glycol (PEG). This new method can adopt the specimen for education in museum, and *C. japonicus* specimen prepared in PEG 400 solution was useful exhibition and educational material in the museum.

### はじめに

日本国内には、日本固有種であるニホンザリガニ *Cambaroides japonicus*、外来種のウチダザリガニ *Pacifastacus leniusculus* とアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* の 3 属 3 種が分布している (川井, 2007)。そのうち、ニホンザリガニは環境省の希少種に指定され (環境省, 2020)、法的規制が制定された。ウチダザリガニは、ニホンザリガニと生育環境が異なるものの、飼育環境下においてニホンザリガニを活発に捕食するため (Nakata & Goshima, 2006)、国内の在来生態系に著しい被害を与える可能性があることから特定外来種の指定を

受け、飼育や放流等に法的規制が掛かるようになった (環境省, 2021)。アメリカザリガニは、ニホンザリガニが感染すると高い致死率を示す水カビ病の媒介者であることから (Martín-Torrijos *et al.*, 2018)、在来生態系への著しい悪影響を与える外来生物として放流等の法的規制が制定された (環境省, 2022)。

ニホンザリガニの保全活動の主体は一般市民であることが望まれていることから (例えば田中, 2018)、一般市民が国内のザリガニ類 3 種を同定できることについて、重要性が高まる。そのため、博物館標本を通じた種の識別など、生物学分野のうち

分類学における社会教育の普及は緊急の課題である。しかしながら、社会教育の現場において、分類学の教材として使用に耐えうるザリガニ類の標本作製法に関して議論されることはこれまで無かった。

日本産ザリガニ類のうち最も古い博物館標本は、ニホンザリガニの記載標本であるが、当時は保存液がないことから乾燥標本として作製された (De Haan, 1841)。しかし、乾燥標本は体色が失われやすく、外骨格や関節が破損しやすいため、展示や教育現場で使用する標本に向かなかった。その後、エタノールやホルマリン溶液を用いた液浸標本技術が応用された。これらの方法は、破損しにくい点で展示に向くものの、長期間の保存に伴い体色が失われる問題があった (川井, 2007)。近年、海産甲殻類を主とした、低分子ポリエチレングリコール (以下、「PEG」) を用いた体色と関節の可動性を保持した標本作製法が開発され (藤原, 2017)、ザリガニ類への応用も期待される。

本研究では、社会教育や学校教育の現場において使用に耐えられるニホンザリガニの PEG 含浸標本の作製を目的とした。方法は、藤原 (2017) をベースとした方法と、作製時間の短縮を検証するため減圧下で作製する方法 (以下、「真空ポンプ法」) の 2 通りで行った。それぞれの方法で作製した標本の体色と、各部位 (触角、胸脚、腹部、尾扇) の可動性について比較し、ニホンザリガニの標本作製法を検証した。

## 材料と方法

### 試料の採集

2022 年 7 月 28 日、北海道利尻島内で採集したニホンザリガニ 4 個体 (3 個体 RTMCRU234-236 ; 1 個体俱知安風土館にて保管)、2022 年 7 月 15 日および 2022 年 9 月 13 日に北海道鹿部町で採集した 10 個体 (4 個体 RTMCRU238-241 ; 6 個体俱知安風土館にて保管) の生体を用いた (略称 RTM : Rishiri Town Museum)。

試料は、地域個体群の保全を目的に、採集にあたっては 2 ヶ所の生息地域からそれぞれ少数の採集にとどめた。また、同目的のため、詳しい採集場所に

ついては、示さないこととした。

### 麻酔方法

生体はホルマリン等の固定液に直接浸すと、自切等を引き起こすため (駒井, 2003)、藤原 (2017) では、前処理として  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存したものを用いた。本研究では、自切等を防ぐ目的として麻酔薬を用いた。麻酔薬は、クローブオイル (030-03565, FUJIFILM Wako) を用いて最終濃度が 1000ppm になるよう水道水で調製した。試料は生きたまま研究室に持ち帰り、麻酔処理を行った。麻酔処理は、麻酔薬 1L と生きた試料を 2L の密閉容器の中に入れ、約 30 分間浸し、口器や腹肢が完全に動かなくなった時点で完了とした。その後、麻酔処理した試料は、藤原 (2017) をベースとした方法と、真空ポンプ法の 2 通りの方法で PEG 含浸を行った。

### 試料の PEG 含浸方法

#### (1) 藤原法をベースとした処理

標本処理は、おおよそ藤原 (2017) の手順に従った (以下、「藤原法」)。標本の作製には麻酔薬、10% 中和ホルマリン溶液、50%PEG-400 溶液、ゴム板および昆虫針 (志賀昆虫針 5 号) を用いた。10% 中和ホルマリン溶液はホルムアルデヒド液 (16061-70, KANTOKAGAKU) に炭酸カルシウム (58036-17, KANTOKAGAKU) を充分量投入し、水道水で調製した。50%PEG-400 溶液は PEG-400 (161-09065, FUJIFILM Wako) を水道水で 2 倍に希釈して調製した。麻酔した利尻島産 2 個体、鹿部町産 5 個体の計 7 試料は、ゴム板上に取り出し、昆虫針で整形し、10% 中和ホルマリン水溶液が 1L 入った 3L の密閉容器に静置して固定した。固定時間は 48 時間程度で、関節の可動性が確認できるうちに引き上げ、1 ~ 3 日程度流水にさらしてホルマリン溶液を洗い流し、その後、0.8 ~ 1L 程度の 50%PEG-400 溶液が入った 2L の密閉容器内に静置した。含浸完了の目安は、試料静置時、濃度差により発生する溶液の中のモヤが、試料周辺で確認できなくなった時点とした。含浸が完了した試料は流水で 1 分間程度洗い、新聞紙やキッチンタオル等の上に置いて、浸潤液を随時ふ

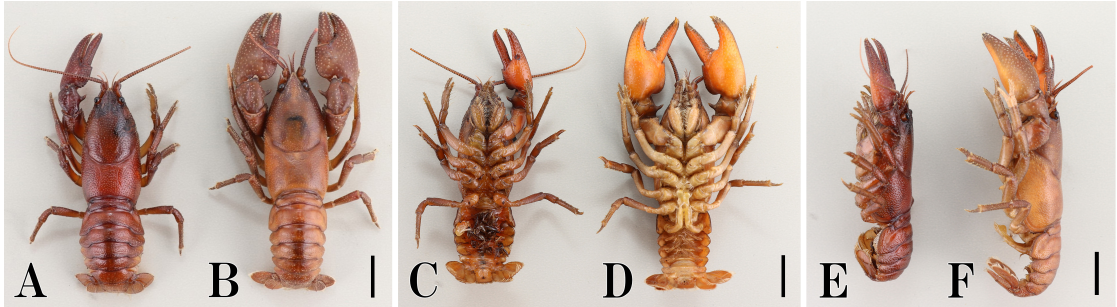


図1. 利尻島産ニホンザリガニのPEG含浸標本。A, C, E: 藤原法で作製したメス個体（含浸時間約340時間；RTMCRU235）、B, D, F: 真空ポンプ法で作製したオス個体（含浸時間290時間；RTMCRU234）。A, B: 背側, C, D: 腹側, E, F: 側面。スケール: 10mm。

き取りながら十分に乾燥させた。

## (2) 真空ポンプ法

藤原(2017)では、試料を50%PEG-400溶液に含浸させる期間を、常温常圧下で2週間としているが、減圧下において、標本作製期間の短縮と効率化を検証するため、真空ポンプを用いた標本の作製も試みた。本方法では、利尻島産2個体、鹿部町産5個体の計7試料に藤原法と同様の処理を施した後、常温下において、真空ポンプ(ULVAC, G-10D)に接続した成形真空デシケーター(RVD-300)内に静置し、 $-0.08\text{MPa}$ で真空引きを行った。含浸完了目安と乾燥方法は(1)の処理と同様とした。

## 結果

藤原法(図1A, C, E)と真空ポンプ法(図1B, D, F)で作製したニホンザリガニのPEG含浸標本について、体色、各部位(触角、胸脚、腹部、尾扇)の可動性の保持を比較した。試料をPEG溶液に静置して含浸が完了するまでに要した時間は、藤原法でのべ340時間ほど、真空ポンプ法でのべ290時間ほどだった。結果、真空ポンプ法では、含浸時間を50時間ほど短縮できた。

## 体色

両方法において、頭胸甲前部は、他の部位に比べやや暗色になり(図1A, B)、外骨格は藤原法で作製した標本の方が、真空ポンプ法よりも全体的にやや赤みが増した(図1)。

## 各部位(触角、胸脚、腹部、尾扇)の可動性の保持

両方法における可動性の保持について、大きな差異は認められなかった。それぞれの部位における詳細は以下の(1)から(4)のとおり。

### (1) 触角

両方法において、触角はある程度の柔軟性を保持していたが、先端ほど脆く、強い衝撃を加えたり、無理な角度で曲げたりすると破損する場合があった(図1)。14個体中、藤原法で1個体、真空ポンプ法で2個体、合計3個体の触角で破損が見られた。

### (2) 胸脚

両方法において、第1胸脚の鉗は開閉が可能で、基節をはじめ、各関節の可動性は保持されていた(図1A-D)。第2~5胸脚も動かすことが可能だったが真空ポンプ法で作製した1個体について計2本の脚が基節部分から脱落した。

### (3) 腹部

両方法において、腹部を折りたたむことが可能だったが(図1E, F)、メスの腹板の縁など、外骨格が比較的薄い部分では、乾燥による反り返りが見られた(例えば図1C)。真空ポンプ法で作製した7個体中2個体で、伸ばした腹部の状態を維持できなかつたり、曲げた腹部が戻ったりする場合があった(図1F)。

### (4) 尾扇

両方法において、いずれの標本でもよく可動・開



図2. 藤原法で作製した北海道産アメリカザリガニのオス個体 (A, C, E) とウチダザリガニのメス個体 (B, D, F) の PEG 含浸標本 (倶知安風土館にて保管)。A, B: 背側, C, D: 腹側, E, F: 側面, スケール: 10mm.

閉した (図 1)。

## 考察

### (1) 藤原法と真空ポンプ法の比較

両方法において、頭胸甲の色彩にややムラが見られた。その要因の1つとして、処理の過程で、頭胸甲内部の組織が収縮したことによるものと考えられる。藤原法で作製した標本は真空ポンプ法で作製した標本に比べ、処理前よりもやや赤みが増した (図 1)。真空ポンプ法では、藤原法に比べ標本作製時間を 50 時間ほど短縮できるメリットがあるものの、関節がやや固くなるデメリットもある (図 1F)。両方法において、作製した標本に差異が認められた理由として、減圧による何らかのストレスがかかったものと考えられる。

### (2) 学習用標本としての標本

乾燥標本は、体色が残りやすいだけでなく、一定サイズ以上の試料を扱う場合、除肉や解体等による損傷を免れず、乾燥や、防腐処理、脚や触角等の付属肢の整形等、作製には時間と手間がかかる (例えば小田原, 1973; 鈴木, 1995)。このことから、ニホンザリガニの乾燥標本は、学習用標本として使用することが難しいと言える。

研究に主眼を置いた液浸標本の作製法は駒井 (2003) が網羅的に紹介している。遺伝子解析を行う場合、無水エタノールを使用すると、遺伝情報をより良い状態で保存できる。形態観察が目的であれば細部や内部の観察が可能な 70%エタノールによる

液浸標本が望ましい (駒井, 2003)。これは、無水エタノールを使うと、脱水により関節の可動性が失われ、観察時に付属肢が破損しやすくなる等、標本が傷みやすいためである。また、ザリガニ類の場合、随伴生物として環形動物 Annelida の一種であるヒルミミズ類 branchiobdellidan (中田ほか, 2014; Ohtaka *et al.*, 2020)、甲殻類 Crustacea の一種であるカイミジンコ類 Ostracoda が付着することがあり (Smith & Kamiya, 2001)、これらが研究対象とされることがある。これらの動物群は無水エタノールで保存すると脱水変形する危険性が高い。ホルマリンは、標本の保存において、エタノールよりも比較的色を残しやすいものの、関節が固く、もろくなるとされる (駒井, 2003)。このことから、液浸標本は研究用標本の作製法として最適であるが、液に浸されているため表面構造等を観察しにくいこと、定期的な管理を必要とすること等から、博物館における学習用標本としての運用には多くの課題がある。

PEG 含浸標本を、乾燥標本 (Kawai & Fitzpatrick, 2004) や、液浸標本 (川井, 2006) と比較すると、褪色や脱色がほとんど起きていなかった (図 1)。PEG 含浸処理後は、1 年経過後も色抜けが起こらないことから (藤原, 2017)、学習用標本として、長期間の使用が可能であるものと考えられる。

本研究によって、ニホンザリガニの PEG 含浸標本は体色が残りやすく、関節の可動性を有し、破損しにくいことがわかった。PEG を用いた標本は、直接手で触れたり、標本の姿勢を変えたりでき、各部位の観察を行いやすいため、社会教育や学校教育



の現場において、使用に耐えられる。ただし、触角や脚が破損する場合があったことから、今後、柔軟性を保つための最適な処理時間を検証する必要がある。また、本研究では、体色について、試料の処理前後での比較を行わなかったが、処理前後と経年変化についても記録する必要がある。

### (3) 教育現場における PEG 含浸標本の活用の可能性

文部科学省 (2017) によれば、学校教育において、博物館等の社会教育施設を積極的に利用することが推奨されている。また、中学校第 1 学年のカリキュラムで新たに「生物の特徴と分類の仕方」が追加され、生物を比較し、分類することが必須となっている。

ニホンザリガニの PEG 含浸標本は、触角や脚の柔軟性等について、課題があるものの、体色や関節の可動性の保持については比較的良好であったことから、ニホンザリガニの保全に関する学習用標本の作製法として十分な可能性を持っている。さらに、本研究で用いた 2 つの標本作製法は、ウチダザリガニとアメリカザリガニにおいても同様の結果が得られていることから、ニホンザリガニのみならず、日本に生息する外来ザリガニ 2 種においても有効である (図 2)。

PEG 含浸標本の活用法の 1 つとして、日本国内に生息するザリガニ類について学習できるトランクキットの作成・貸し出し、野外観察時の比較資料といった、博物館を利用した教育普及活動の構築が可能である。

### (4) クロウブオイルを用いた麻酔の効果について

甲殻類は、ホルマリンやエタノールといった固定・保存溶液に直接浸すと、自切を引き起こして付属肢がばらばらになってしまうため、前処理として水で冷やした水を使うか、冷凍するのが良い方法である (駒井, 2003; 藤原, 2017)。

本研究では、1000ppm のクロウブオイルを麻酔薬としたが、ニホンザリガニの場合、麻酔直後であれば真水に戻すことで復活した。しかし、30 分間浸けた場合は、真水に戻しても、全ての個体において麻酔死が起きた。このことは、本研究で用いた麻

酔薬の濃度が高すぎたと考えられ、濃度については検討の余地が残る。クロウブオイルは、試料を速やかに弛緩させ、標本作製時の整形がしやすい。

ウチダザリガニとアメリカザリガニは、1000ppm のクロウブオイルに 1 時間程度浸けることで、確実に麻酔死させることが可能である (小田桐, 未発表)。特定外来種であるウチダザリガニは、生体での運搬や飼育に許可申請が必要なため (環境省, 2021)、採集した段階で殺す必要がある。採集した本種を標本にする場合、野外で冷凍できる環境を整えることが容易でないことや、低水温に強く、結氷下でも生存できることから (Nakata *et al.*, 2002)、クロウブオイルはザリガニ類を捕殺する際に有効であり、特定外来種を採集地から実験室まで安全に運搬するための手法として有用である。

### 謝辞

利尻島産のニホンザリガニのサンプル採集にあたり、利尻町立博物館の佐藤雅彦氏、富岡森理氏にご協力いただいた。これらの方々には、感謝の意を示します。

本研究の一部は、2022 年度船の科学館ミュージアムサポートプログラム 2 の助成を受けて行った。

### 引用文献

- De Haan, W., 1841. Crustacea (1833–1850). In von Siebold, P. F. (ed.), *Fauna Japonica sive Descriptio Animalium, quae in Itinere per Japoniam, Jussu et Auspiciis Superiorum, Qui Summum in India Batava Imperium Tenent, Suscepto, Annis 1823–1830 Collegit, Notis, Observationibus et Adumbrationibus Illustravit*: 164, pl. 35, fig. 9. Lugduni-Batavorum, Leiden.
- 環境省, 2020. 環境省レッドリスト 2020 : <https://www.env.go.jp/press/107905.html> (2022 年 4 月 29 日閲覧).
- 環境省, 2021. 外来ザリガニ : <https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/attention/gairazarigani.html> (2022 年 4 月 29 日閲覧).
- 環境省, 2022. 一部の規制を適用除外とする特定外来

- 生物の指定等（アカミミガメ・アメリカザリガニ関係）に対する意見の募集（パブリックコメント）について：  
[https://www.env.go.jp/press/press\\_00686.html](https://www.env.go.jp/press/press_00686.html)  
 （2023年1月16日閲覧）。
- 川井唯史，2006. 国内博物館等のザリガニ類標本に基づく情報. *Cancer*, 15: 29-1.
- 川井唯史，2007. ザリガニの博物誌. 東海大学出版会. 秦野. 166 pp.
- Kawai, T. & J. F. Fitzpatrick, Jr., 2004. Redescription of *Cambaroides japonicus* (De Haan, 1841) (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) with allocation of a type locality and month of collection of types. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 117 (1): 23-34.
- 駒井智幸，2003. 甲殻類. 松浦啓一（編），国立科学博物館叢書 - ③ 標本学 自然史標本の収集と管理：39-47. 東海大学出版会. 秦野.
- 藤原慎一，2017. 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. 名古屋大学博物館報告, 32: 27-32.
- Martín-Torrijos, L., T. Kawai, J. Makkonen, J. Jus-sila, H. Kokko & J. Diéguez-Uribeondo, 2018. Crayfish plague in Japan: A real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. *PLOS ONE*, 13 (4): e0195353.
- 文部科学省，2017. 中学校学習指導要領（平成29年告示）解説 理科編：[https://www.mext.go.jp/component/a\\_menu/education/micro\\_detail/\\_icsFiles/afieldfile/2019/03/18/1387018\\_005.pdf](https://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/micro_detail/_icsFiles/afieldfile/2019/03/18/1387018_005.pdf)  
 （2023年1月16日閲覧）。
- Nakata, K., T. Hamano, K. Hayashi & T. Kawai, 2002. Lethal limits of high temperature for two crayfishes, the native species *Cambaroides japonicus* and the alien species *Pacifastacus leniusculus* in Japan. *Fisheries Science*, 68(4): 763-767.
- Nakata, K. & S. Goshima, 2006. Asymmetry in mutual predation between the endangered Japanese native crayfish *Cambaroides japonicus* and the North American invasive crayfish *Pacifastacus leniusculus*: a possible reason for species replacement. *Journal of Crustacean Biology*, 26 (2): 134-140.
- 中田和義・長野優季・大橋慎平・河合俊郎・大高明史，2014. 1872年に北海道阿寒湖で採集されたニホンザリガニ標本と出現したヒルミズ類：八田三郎標本の観察. 日本ベントス学会誌, 69: 90-94.
- 小田原利光，1973. カニの乾燥標本作成 カニの博物館. 緑書房. 東京. 115 pp.
- Ohtaka, A., S. Gelder & S. Peterson, 2020. A catalog and assessment of Prof. Hideji Yamaguchi's slide collection of branchiobdellidans (Annelida: Clitellata) with the identification of syntypes. *Zoosymposia*, 17: 159-187.
- Smith, R. & T. Kamiya, 2001. The First Record of an Entocytherid Ostracod (Crustacea: Cytheroidea) from Japan. *Benthos Research*, 56 (2): 57-61.
- 鈴木一宏，1995. 9 カニの標本を作ってみよう. 村岡健作・小田原利光（監修），カラー図鑑 カニ百科：113-129. 成美堂出版. 東京.
- 田中一典，2018. 北海道における希少種ニホンザリガニの保全に関する地域生態学的研究. 北海道大学博士論文. 214 pp.