石灰岩のコノドント検出を容易にするアリザリンレッド S 染色法の開発

Alizarin Red S staining method for the effective detection of conodont elements in limestone

鈴木和博* ** 三村耕一*

Kazuhiro Suzuki* ** and Koichi Mimura*

2011年9月13日受付.

2011年11月30日受理.

* 名古屋大学大学院環境学研究科地球環境科学専攻
Department of Earth and Environmental Sciences, Graduate
School of Environmental Studies, Nagoya University,
Nagoya 464-8602, Japan

** 愛知県立明和高等学校
Aichi Prefectural Meiwa High School, Nagoya 461-0011,
Japan

Corresponding author; K. Suzuki
kaze@nagoya-u.jp

Abstract: Conodont elements in limestone are generally collected from acid-insoluble residues by using heavy solutions (e.g., bromoform). To avoid the use of harmful heavy solutions, we have developed a new method of identifying conodont elements in limestone. Acid-insoluble residues were obtained by treating limestone samples with 10% acetic acid solution. The collected residues were then soaked in a 10% acetic acid solution containing 0.1 wt.% Alizarin Red S for 5 days. Apatite (conodont elements, pellet pieces, abiotic apatite minerals, etc.) in the residues was stained a color between orange and light red, enabling it to be easily distinguished from other minerals. This method enables conodont elements to be collected from limestone samples effectively and safely.

Keywords: Alizarin Red S, conodont elements, apatite, limestone, staining method

はじめに

コノドントは、古生代カンブリア紀から中生代三畳紀の世界中の海成層に産出する微化石である。コノドントは主成分がアパタイト(主に $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$)で、変質作用に対して抵抗性があり、種の生存期間が短いことから、有力な示準化石の一つとなっている。石灰岩中のコノドントは酢酸処理することで溶け残るため、その酢酸不溶残さから採集される。そのため、他の石灰質の示準化石と比べ、多量の石灰岩を酢酸処理することで化石の存在度が極端に低い試料からも採集し易いという利点がある。しかしながら、わが国の中生界三畳系石灰岩体にはコノドントでさえも検出されにくい岩体があり、それらについては堆積年代の詳細な特定が困難であっ

た。

三畳系石灰岩体からコノドントが検出されにくい場合、その原因の一端は、石灰岩に含まれる酢酸不溶残さの多様性にある。酢酸不溶残さに存在するケイ酸塩の不定形小片はコノドントと色・形状・大きさが似ており、コノドント検出に非常に長い時間がかかる。そのため、コノドントの主成分であるアパタイトの密度($3.05\text{--}3.2\text{ g/cm}^3$)が大きいことを利用して、検出のための検鏡に先立ち、残さをプロモホルム(CHBr_3 , 密度: 2.9 g/cm^3)などで重液分離することが通例である。確かに、重液分離後、重い画分のみを検鏡すれば、密度が小さい残さは容易に排除され、コノドント検出までの時間が短縮される。しかし、プロモホルムなどの蒸気が人体に及ぼす健康被害を避けるために、その使用には高価で精巧なドラフトチェンバーが必要不可欠となる。さらに、石灰岩中のパイライトなどの重鉱物はプロモホルムによっても重い画分から分離することはできない。

本研究の目的は、示準化石が見出しにくい石灰岩試料から少量のコノドント片をプロモホルムの使用なしに、効率よく検出する方法を開発し、石灰岩体の堆積年代特定に資することである。筆者らは石灰岩の酢酸不溶残さをアリザリンレッド S (Alizarin Red S; $\text{C}_{14}\text{H}_7\text{NaO}_7\text{S}$) 処理することで、コノドントが橙色–薄赤色に変色して同定作業が容易になり、重液を使用せずとも効率的なコノドント検出が可能であることを確認したのでここに報告する。

アリザリンレッド S 染色

アリザリン(Fig. 1(a))はセイヨウアカネ(*Rubia tinctorum*)の根から採集される赤色の色素に含まれる化合物で、媒染染料の一種である。わが国在来種のアカネとともに、古来、染色に用いられた。現在では、アントラセンから人工的に合成されている。アリザリン分子のヒドロキシル基($-\text{OH}$)に隣接した水素をスルホ基($-\text{SO}_3\text{H}$)で置換した化合物の Na 塩がアリザリンレッド S (Fig. 1(b))である。アリザリンレッド S は水溶性で多くの金属イオンとキレートをつくり(Myers, 1968)、その金属イオンを媒染剤として、赤色(Al イオンとのキレート)、暗紫色(Fe イオン)、橙色(Ca イオン)に着色する。また、アリザリンレッド S の溶液は酸塩基指示薬としても使用され、 $\text{pH} = 5.5\text{--}6.8$ で黄色から紫色に、 $\text{pH} = 10.1\text{--}12.1$ で紫色から赤紫色に変色する。

アリザリンレッド S は生体染色も可能で、生物体内の組織に沈着した Ca イオンの検出や、透明骨格標本作成における硬骨染色に利用される。硬骨にはアパタイトの結晶が沈着しているため、この Ca とアリザリンレッド S とが結合し染色される。また、Fu and Somasundaran (1986) はカルサ

Fig. 1. Structural formulae of (a) Alizarin and (b) Alizarin Red S.

イトとアパタイトの選択的吸着と選択浮選効果を比較し、アリザリン・レッド S がカルサイトよりもアパタイト表面によく吸着することを報告した。さらに、藤貫ほか(1968)は琉球石灰岩の試料採集時に野外でアリザリンレッド S の染色実験を行い、試料の構成鉱物について同定が可能であることを報告している。それによると、0.2% 冷塩酸のもと、アリザリンレッド S で染色されるのはアラゴナイトとカルサイトと高マグネシウムカルサイトで、無水石膏、石膏、ドロマイト、マグネサイトなどは染色されない。これは、アラゴナイト、カルサイト、高マグネシウムカルサイトは希塩酸と直ちに反応し、溶け出た Ca イオンが媒染剤となって染色されるからである。無水石膏、石膏、ドロマイト、マグネサイトは希塩酸とは反応しにくいので、短時間であれば染色されない。以上のような特性を生かし、炭酸塩岩を薄片にして、ドロマイトを判別する手法として使われている(Tucker, 1988)。

コノドント片のアリザリンレッド S 染色法

石灰岩中のコノドントを抽出するには、まず、10% 酢酸を用いて、時間をかけて石灰岩を処理する。これによって、石灰岩中のカルサイト、アラゴナイトなど炭酸塩の大部分が溶解される。残さを多量の水で洗い、溶出された Ca イオンを除去した後、アリザリンレッド S 溶液に残さを浸して染色する。アパタイトは Ca を含むため、アリザリンレッド S によって穏やかに染色される。一方、アリザリンレッド S はほとんどのケイ酸塩や重鉱物を染色しない。これらのことから石灰岩の酢酸不溶残さにおいてアリザリンレッド S 染色される物質は多くはなく、残さ中のコノドント片を含むア

パタイトを効果的に選別できる。

コノドント片の染色、検鏡、同定は、次の手順で行なう。

- 1) 10 L (リットル) ポリバケツに収められる 20 cm 角程度の石灰岩片を採集し、十分に水洗して、付着した有機物、土壌などの汚れを落とす。石灰岩片はコノドントの損傷を避けるため細粒に粉碎しない。
- 2) 10 L ポリバケツに収めた石灰岩片に試料全体が浸る量の 10% 酢酸を注ぎ、1 週間溶解させる。
- 3) 1 週間後、残さを十分な量の水道水で洗浄し、残さを回収する。コノドント片は数 100 μm から 1 mm 程度の大きさで、密度は 3 g/cm^3 以上あるから、長時間沈積しない浮遊物中には残留していないものと考え、浮遊物は流し去る。
- 4) ふるいを使って、径 2 mm 以下の残さを 1 L ビーカーに回収する。1 kg 程度の石灰岩から回収される残さは、総計 100 g に満たないことが多い。
- 5) アリザリンレッド S 粉末 1 g を 10% 酢酸溶液 1 L (pH = 2.4) に溶解し (0.1%)、上記回収された残さに 200 mL 注ぐ。アリザリンレッド S は強酸では染色能力を十分発揮できず、アパタイトも溶けてしまうため 10% 酢酸がアリザリンレッド S 溶液の溶媒として好適である (この時の溶液の色は黄色)。残さとアリザリンレッド S 溶液の入ったビーカーを 5 日間静置し、染色固定する。
- 6) 残さを多量の水で洗浄して、シャーレに分取し、乾燥機で 110 $^{\circ}\text{C}$ 、数時間乾燥する。
- 7) 双眼実体顕微鏡で、残さをまず 25 倍、続いて 45 倍と倍率を高くして検鏡する。
- 8) コノドントと思われる小片の画像を、上方・下方・側方の 3 方向からデジタルカメラで撮影する。特徴を記載しつつスケッチを描く。種特定が可能なコノドント片は金蒸着して走査型電子顕微鏡 (SEM) で撮影、高倍率の画像を得る。

結果と考察

1. 残さ構成物質の種類と染色

前項の手順で 10% 酢酸不溶残さをアリザリンレッド S 染色し、双眼実体顕微鏡で検鏡した。採集した石灰岩体に応じて、石灰岩試料の酢酸不溶残さ構成物質の構成比は変化するが、構成物質の種類は限られる。酢酸不溶残さとして次のような物質がある。

- a) 石英片 (Fig. 2a) : 石英片は粒状、塊状など形状はさまざまであるがアリザリンレッド S に全く染色されない。透明の石英片は無色、不透明のものは白色に見える。
- b) 岩石片 (Fig. 2b) : 岩石片は石灰岩堆積時に巻き込まれた周囲の岩石起源ケイ酸塩と考えられる。長石片はコノドント片と誤りやすいが、アリザリンレッド S によって染色されないことから容易に区別できる。泥質石灰岩の場合、灰色から黒色の岩石片がコノドント検出にとって、大いに障害となる。一般的にはこれらの岩石片はアリザリンレッド S によって染色されないが、風化を受けたものは染色されることがあり、含有する元

Fig. 2. Selected minerals in an acid insoluble residue of Triassic limestone of the Chichibu Belt collected from Tahara City, Aichi Prefecture, central Japan. (a) Quartz pieces, (b) rock fragments, (c) pyrite crystals, and (d) apatite pieces stained orange with Alizarin Red S solution.

素に応じて色調はさまざまである。しかし、Fig. 2bに示される岩石片の色はアパタイトのCaによる橙色–薄赤色とは容易に区別できる。

c) パイライト(黄鉄鉱) (Fig. 2c)：パイライトの形状は立方体または立方体が一部くずれた形状で、黄金色または褐色である。アリザリンレッドSによって染色されない。ただし、これが風化することによって生成した褐鉄鉱は黄色から褐色を呈し、アリザリンレッドSによって染色された色と混同することがある。

d) アパタイト片 (Fig. 2d)：残さ中のアパタイト片はすべてコノドント片とは限らない。生物起源のアパタイト片としては、排泄物を起源としたペレットが挙げられ、コノドントの形状と類似しているため、コノドントと見誤ることがある。また、造岩鉱物中の非生物的に生成したアパタイトにもコノドントと似ているものがある。これらは当然のことながらアリザリンレッドSで橙色–薄赤色に染色される。形状でコノドントと区別する必要がある。

酢酸不溶残さの大部分は上記のうちのどれかである可能性が高い。アリザリンレッドSで染色されるものはアパタイト片か一部の岩石片で、多くの石灰岩試料について平均すると、染色される小片数の割合は全体の5~10%程度である。

2. 染色時間と検出時間の検討

本研究では、コノドント検出に最適な染色時間も検討し

た。2–3日間染色後の検鏡では、アパタイトにも目立った染色がなく、残さ全体について染色がほとんどなかった。一方、7–10日間染色では残さ全体が橙色–赤紫色に濃く染色して、コノドント検出はかえって困難となった。これらの実験からアリザリンレッドSの染色期間は5日間が最も適当と判断できる。

コノドント片がAlイオンを含む鮮やかな赤色、Feイオンを含む暗紫色に染色されることはないため、橙色–薄赤色に染色したアパタイトのみを速やかに認定することができる。ペレットや非生物起源のアパタイトを形状により除外して、コノドントの特徴的な部位を有している小片を探し出した。これでコノドント検出に要する時間はこれまでの手法に比して明らかに短縮された。Fig. 3(a),(b)にはアリザリンレッドS染色法によって検出したコノドント片の実体顕微鏡画像を掲げた。橙色–薄赤色に染色された小片は他の残さと容易に区別でき、重液分離しない手法では検出困難だった層準からコノドントを見出すことができた。

3. 染色したコノドント片の脱色

堆積したコノドントがたどった熱履歴が、検出されたコノドント片の色調(CAI; Conodont Color Alteration Index)からわかる(Epstein et al., 1977)。アリザリンレッドS染色したコノドント片の色は橙色–薄赤色に変化しているため、染色された状態ではCAI値を厳密に読みとることは困難である。しかし、アリザリンレッドSはアパタイト表面

Fig. 3. Conodont elements stained with Alizarin Red S solution.

でのみ反応している (Meyers, 1968) から、薄い強酸溶液 (筆者らは 0.2 M 塩酸溶液使用) にコノドント片を短時間浸すことで簡単に脱色し、CAI 値を読みとることができる。

CAI 値の決定は種を判定できないような不完全個体であっても可能である。確かな熱履歴情報が必要な場合、コノドント片が検出された層準から、アリザリンレッド S 染色していない別の不完全個体を含めたコノドント片を見つけることも考えたい。種を判別できるコノドント片の検出に至るまでに、その何十倍という不完全個体が見出されることが常である。

ま と め

石灰岩の 10% 酢酸不溶残さ中のアパタイトはアリザリンレッド S 粉末 1 g を 10% 酢酸溶液 1 L に溶解した溶液によって橙色–薄赤色に染色されるが、それ以外の構成物の大部分は染色しなかった。アパタイトにはコノドント以外に生物起源の不定形アパタイト (ベレットなど) と非生物起源のアパタイトなどがあるが、これらはアリザリンレッド S によって変色するため、その形状によってコノドントと区別する必要がある。

アリザリンレッド S 染色法を用いるとアパタイト片を効率よく認定でき、コノドントの検出に要する時間が短縮した。さらに、吸入による健康被害が明らかなプロモホルムなどの重液の使用も要らない。これによって、重液分離に必須なドラフトチェンバーを設備していないことで、コノドント探索を断念していたアマチュア研究者、初等・中等教育現場の学生・職員にまでコノドント研究の場が広がることが期待される。また、この手法は文部科学省が推進する SSH (スー

パーサイエンスハイスクール) 事業でも実施可能であり、地質学を目指す若い人材発掘の一助になるであろう。

筆者らのコノドント検出の最終目的は、示準化石が見出されない石灰岩体の、コノドントによる堆積年代確定である。これまで検出が困難であった石灰岩体からこの染色法を用いてコノドントの検出が相次ぎ、未解明な部分が多いわが国石灰岩体の堆積の全容が明らかになることを期待したい。

謝 辞

名古屋大学大学院環境学研究科の田中 剛名誉教授、山本鋼志教授、井龍康文教授には石灰岩の化学、アリザリンレッド S の化学について、徳島大学の石田啓祐教授にはコノドントの古生物学について多くの有益なご助言をいただいた。査読者の九州大学、狩野彰宏教授、および匿名査読者には的確なご指摘、ご助言をいただき、本稿は著しく改善された。記して感謝の意を表します。

文 献

- Epstein, A. G., Epstein, J. B. and Harris, L. D., 1977, Conodont color alteration: an index to organic metamorphism. *U. S. Geol. Surv. Prof. Pap.*, **995**, 1–27.
- Fu, E. and Somasundaran, P., 1986, Alizarin Red S as a flotation modifying agent in calcite-apatite systems. *Intern. Jour. Miner. Process.*, **18**, 287–296.
- 藤貫 正・渡部美南子・富樫幸雄 (Fujinuki, T., Watanabe, M. and Togashi, Y.), 1968, 炭酸塩鉱物の染色法. 地質ニュース (*Chishitsu News*), **171**, 35–39.
- Meyers, H. M., 1968, Alizarin and tetracycline binding by bone mineral. *Amer. Jour. Phys. Anthropol.*, **29**, 179–182.
- Tucker, M., 1988, *Techniques in Sedimentology*. Blackwell Science Ltd., Oxford, 99 p.