

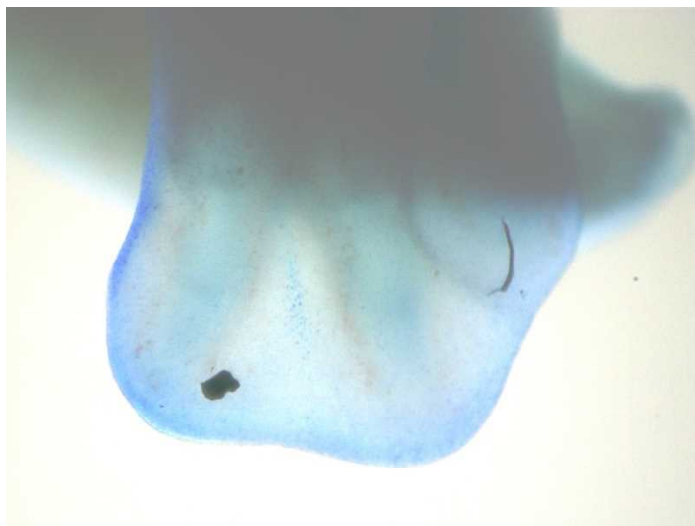
肢芽の発生観察とナイルブルー染色によるアポトーシスの観察

兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

今回、兵庫県立氷上高等学校から、質のよい有精卵を販売していただくことができ、観察に十分な数の胚を準備できたことから、ニワトリ胚を用いて肢芽の発生の観察を行うことにしました。

鳥類やほ乳類の肢の発生過程では、指と指の水かき状の細胞群がアポトーシス（プログラムされた細胞死）を起こして除去されることによって、指ができていくことが知られています。

ウズラ胚やニワトリ胚では6日目から8日目にかけて、前肢・後肢ともに、大きく外見が変わってきます。今回の授業では、5日目・7日目・9日目の胚を観察しました。特に7日目胚では指の形が現れてくるため、7日目胚にはあらかじめナイルブルー染色を行い、アポトーシスが起きている部位の観察も行いました。



↑ニワトリ7日目胚後肢 ナイルブルー染色

なお、ナイルブルーによる染色方法は、名古屋大学理学部生命理学科の黒岩厚教授に助言をいただいて、2011・2012年に理研 CDB で実施した「高校生のための発生生物学実習講座」ならびに、2012年理研 CDB「高校生物教員のための発生生物学リカレント講座」で実施された実習内容を、高等学校の授業で取り組めるようにアレンジして行ったものです。

授業実践報告

実施日・対象： 2014年12月12日（金）1限 2－5 18名 いずれも理系生物選択者
3限 2－6 17名

- ① 7日目胚は当日朝に必要な数をまとめてナイルブルーで染色し、染色後はポリチューブに入れた生理食塩水(7.2g/L NaCl)に移しておく。
- ② 9日目胚もあらかじめ卵から取り出して、生理食塩水を入れたチューブに入れておく。
- ③ 7日目・9日目の胚をチューブごと配布し、シャーレにあけて、双眼実体顕微鏡下で肢芽の観察する。ピンセットを使って、肢芽は見やすいように角度を調節する。
※発生の進んだ胚については、その姿を見ること自体が生徒の感情を揺さぶる場合もあることを十分に配慮し、あらかじめ卵から取り出して不透明なポリチューブに入れて配布した。
観察は、実体顕微鏡下での肢芽のみにしてもかまわないことを前もって伝え、生徒それぞれの感じ方によって、可能な範囲での観察ができるように、班員で協力することを求めた。
- ④ 5日胚については、別の実験台に卵から出したもの、羊膜に入ったままのもの、羊膜から出したもの、などを、実体顕微鏡で観察できるようにし、各自観察に来るようにした。

今回は、初期胚の観察のために卵を購入してから、やや日数を置いて順次孵卵を開始したため、発生の再開に時間がかかり、孵卵日数に比べて、発生の進みが遅れ気味だったり、ばらつきが生じたりしていました。そのため、7日目胚のアポトーシスが枝芽の水かき部分にしっかりと観察しにくい胚もありました。しかし、どの胚も枝芽の縁の部分が顆粒状にしっかりと染まっており、5日目、9日目の胚とも比較観察したので、形作りにアポトーシスが重要な役割をしていることは観察を通して理解できたのではないかと思います。

カドヘリンのはたらきの実験と同時間内に行ったため、やや、慌ただしい観察になりました。アポトーシスの解説と併せて、この観察を行うと、一コマ分の授業になるとと思います。

ナイルブルー染色について

アポトーシスを起こした細胞はアポトーシス小体と呼ばれる小さな袋状になって、マクロファージなどの食細胞に貪食（どんしょく）されます。

ナイルブルーで染色すると、マクロファージの食胞内に青く染まったアポトーシス小体がたまっていきます。また、マクロファージはナイルブルーも取り込んでいるので、貪食されたアポトーシス小体は食胞内でも染まっていきます。一方、周囲の生きた細胞は、色素が細胞に入っても排出できるため、あまり染まりません。その結果、アポトーシス小体を貪食しているマクロファージが青い顆粒状に見えて、アポトーシスが起きている場所を観察することができます。

染色の方法

① 0.1%のナイルブルー水溶液を37℃に温めた生理食塩水で希釈する。希釈は直前に行う。

※シグマのナイルブルーAを使用。

ナイルブルーはメーカーやロットによっては水に溶けにくく、0.1%まで溶けないときもあるので、染色のようすを見て何倍に希釈するか、と、染色時間を決める。

② 胚を殻から取り出して羊膜を取り除き、温めた生理食塩水で洗う。

③ 50mL チューブなどに染色液と胚を入れ、37℃のインキュベーターで10～20分間、時々振りながら染色する。

生徒の感想より

- ・最初は目が大きく、見ていてなんだか怖いと思っていましたが、見ているうちに可愛く思えてきました。5日目胚からだんだんと細かな部分ができて、はねの形になっていっている過程がよく分かりました。後肢の染色部分から、教科書で見たプログラム細胞死というものを、実際に見ることができて、理解できました。
- ・5日目胚がとてめにかわいかった。結構何回も見ても見てもぐらい気に入りました。あと、ナイルブルーでしっかり染まっていたのが見られて、よかったです。動物の命を使って実験できていることを感謝します。
- ・7日目胚の青色に染まっているところは、9日目胚ではほとんどが失われていて、プログラムされた細胞死であることが分かった。
- ・3日違いで、アポトーシスがこんなにも進んで、ニワトリらしい肢ができていて、改めて細胞単位で行われていることから見たら、大スケールなことなんだと思いました。
- ・アポトーシスによってだんだんと手の形ができていく様子が、5日目胚、7日目胚、9日目胚と、見ることでよく理解できてよかったです。