

## インスパイア・ハイスクール事業

### 「ナイルブルー染色によるウズラ 7日胚肢芽におけるアポトーシスの観察」

鳥類やほ乳類の肢の発生過程では、指と指の間の水かき状の細胞群がアポトーシス（プログラムされた積極的な細胞死）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。このとき、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（どんじょく）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。このように、ナイルブルー生体染色はアポトーシスを起こした細胞が存在する場所を間接的に検出する方法と言えます。

インスパイア事業の一環として、ウズラ胚を用いたアポトーシス観察を行うことにしました。染色方法については、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きました。また、理化学研究所CDB広報・国際化室の南波直樹先生、兵庫県立大学理学部の餅井真准教授も、実際に染色を行って見て、助言をいただきました。

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。特に7日目胚では指の形が現れてくるため、観察には7日目胚を用いました。



7日目胚 後肢



7日目胚 前肢

#### 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。（ナイルブルーが水に溶けにくいいため、染色のようすを見て何倍に希釈するかを決める）
- 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 スクリューびんに染色液と胚を入れ、37℃のインキュベーターで15～20分間、時々振りながら染色する。

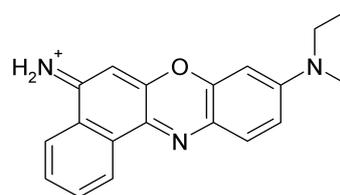
成長した胚を用いることから、当面は教師が操作を行い、画像または染色した実物を生徒に提示する形で利用します。また、今年度はS P P講座の実習内容に入れていきます。

今後は、理系3年生など、積極的主体的に実習の意義を理解できる段階での、希望者を対象とした生徒実習といった実践を考えています。

## 詳しい実験方法について

2011年12月26日・27日実施のSPP支援 理研CDBー須磨東講座のテキストより抜粋

ナイルブルー



準備：孵卵7日目ウズラ卵

生理食塩水(7.2g/L NaCl 水溶液) 50mL チューブ入り

0.002% Nile Blue A (SIGMA N5632)

ナイルブルーは1%の水溶液を用意し、使用直前に生理食塩水で100～500倍に希釈する。1%水溶液を作る際は、加熱しながら十分に攪拌して溶解させる。極力溶かした上で、0.45 μmのフィルターを通しておく。

希釈後30分程度放置すると色素が急激に沈殿してくるので、希釈は染色直前に行う。

ピンセット(2本)、スプーン(プラスチック)、ハサミ、シャーレ(大・中)

## 実験操作

生体染色なので、胚は使用直前に採取し、全ての行程はできるだけ37℃を保ち、迅速に行う。

1. 卵をシャーレ(大)にあけ、胚を採取する。
2. 実体顕微鏡で確認しながら、羊膜をきれいに取り除き、シャーレ(中)に入れて37℃に温めておいた生理食塩水で洗う。
3. 使用直前に、37℃に温めておいた生理食塩水が入った50mLチューブを孵卵器から取り出し、マイクロピペッターを用いて1.5mLチューブに入っているナイルブルー原液を100 μL入れて、転倒混和する。
4. 胚をスプーンですくって、ナイルブルー液に浸す。
5. 20分程度37℃で静置する(途中で数回攪拌する)。
6. 胚を取り出し、生理食塩水の中に入れ、実体顕微鏡で前肢・後肢を観察、スケッチする。観察しにくい場合は後肢を切断して向きを変える。
7. 染色が不十分であれば、染色液を交換し、さらに染色を続ける。

### (参考事項)

この実験では、まず、ナイルブルーの溶液を作るところが実は一番の関門です。シグマなどの高価なものを使えばよいのですが、高等学校現場ではそういうわけにもいかず、できるだけ価格の低いものを探して購入することになると思います。すると、非常に溶けにくいものにあたる場合があります。少量のエタノールで先に溶いたり、加熱しながらスターラーを回し続けても、溶け残りがかかり出ます。さらに、理研などではそれを0.45 μmフィルターで濾過できますが、学校ではろ紙で漉します。すると、溶液中に色素の微粒子がいっぱい、という状況になります。結局、あきらめてそのまま染色に持って行ってしまいます。胚の体表に細かい色素の粒子がいっぱい付着して、なかなかとれないのですが、スクリーびんの生理食塩水の中で胚を振り回して、できるだけ洗い落とすようにしています。

染色液は生理食塩水で希釈後時間と共にどんどん染まらなくなります。

染色液さえうまくできていれば、操作は簡単です。ただ、胚がフレッシュであること、操作中は37℃に保つことが条件です。