

ニワトリ胚を用いたアポトーシス観察

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 教授 和田（わだ） 直之（なおゆき）

1. 実験のねらい

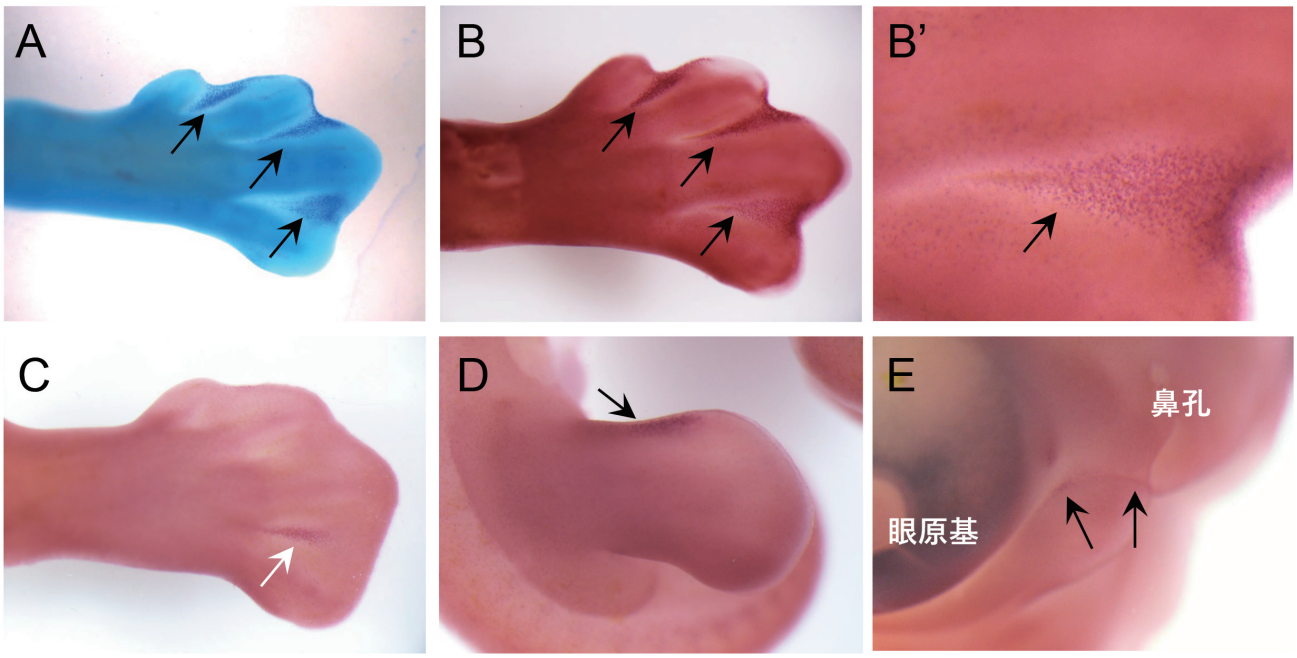
高校生物教科書の動物発生の章に、発生の過程では「プログラムされた細胞死（＝アポトーシス）」が起こり、それによって動物の形ができるという解説がある。その現象の例として引用されるのが「ニワトリの指間アポトーシス」であり、一部の教科書には、将来削られる指間部を青く染色した写真も掲載されている。これは、ナイルブルーという色素で肢芽を染色したもので、染色によりアポトーシス領域に多いとされる食作用活性のある細胞が色素の粒を取り込むため、結果的にアポトーシス領域が濃く染まったように見える**【図 A】**。ナイルブルー染色によるアポトーシス領域の検出実験は古くから行われていて、ネットでは「市販のナイルブルー粉末を水やリン酸バッファーに溶解して用いる」と書かれている。しかし、実際にはナイルブルーは難溶で、温めたり攪拌時間を長くするなどしても溶けにくく、教科書の追試は実は容易ではない。以下に紹介するのは、ナイルブルーの代わりにニュートラルレッド（neutral red, 以下 NR）という色素を用いてアポトーシス領域を染色する方法である。

2. 準備

用いるニワトリ有精卵の入手や孵卵、機器類（孵卵器、実体顕微鏡と照明装置）、器具類（操作用ピンセット）などは、以前の科学フォーラム（文献）に記載したので、そちらを参照してほしい。以下、今回の実験の留意点を記載する。(1)孵卵時間：いわゆる指間アポトーシスが観察できるのは大体 7.3 日胚（7 日と 8 時間ほど孵卵）以降、8 日胚の間である。ただし同じ時間孵卵しても発生の進行は卵により微妙にばらつくので、同時に 5〜10 個くらいは孵卵した方が良い。(2)生理食塩水：蒸留水 1 L に対し NaCl を 9 g、グルコースを 1 g 溶解する（胚を 1-2 時間ほど維持するので、グルコースを加えた方が良い）。(3)操作用シャーレ：ガラス製またはプラスチック製で、直径 35 mm、60 mm、100 mm のものがそれぞれ 2 枚程度あるとよい。35 mm は色素染色用なので、使い捨てのもので構わない（シャーレに代わる小型容器でも可）。(4)NR 溶液：薬品業者から NR 粉末（FUJI、#140-00932、25 g）、または NR 溶液原液（MERCK、#N2889、0.33%、20 mL または 100 mL）を入手する。まず、粉末の場合は、蒸留水に 0.02% 溶液となるように溶解し（スターラーで概ね一晩撹拌する）、これを 2×生理食塩水（NaCl 濃度を 2 倍にしたもの）で 1/2 に希釈する（終濃度 0.01% になる）。溶液原液の場合は、通常の生理食塩水で終濃度 0.01%になるように希釈する。(5)薬匙：胚をすくってシャーレ間を移動させる際にあると便利。耳かきサイズよりも少し大きめ（1 cm 程）のものを、柄に対して 30 度ほど曲げておく。(6)その他：先の細いピンセット 2 本、使い捨て手袋、3-5 mL 用スポイト、など（いずれも必要に応じて準備）。

3. 実際の操作と観察

(1)胚の取りだし：60 mm シャーレに生理食塩水を入れ、ここに胚を取り出す。7〜8 日胚になると胚が卵下方に沈んで取り出しにくい場合もあり、この場合はまず 100 mm シャーレに卵内容物を全て出した上で、ピンセットで胚だけを 60 mm シャーレの生理食塩水内に移す。実体顕微鏡下で胚（特に手足）に傷をつけないように羊膜（胚を覆う透明な膜）を剥ぐ。羊膜に包まれたままだと胚が染色されない。頭部でのアポトーシス観察を行わない場合は、首の部分から頭部を切り離したほうが、以降の操作がしやすい。
(2)NR 染色：35 mm シャーレに 0.01%NR 溶液を 2/3〜3/4 の深さまで入れ、ここに取り出した胚を入れる。四肢を染色するため、胚がうつ伏せになるようにピンセットで向きを整え、この状態で 30〜40 分程放置する。胚が横を向く場合は、25 分くらいで胚の向きを変え、反対側を染色する（染色時間は少し延ばす）。
(3)観察：別の 35〜60 mm シャーレに生理食塩水を入れ、ここに NR 染色した胚を移して、余分な NR 溶液をすすぐ。生理食塩水を 1-2 回交換したうえで、そのまま実体顕微鏡観察に用いる。ステージプレートを白い面にするか、ステージ上に白い紙を敷き、この上にシャーレを置いて観察する。観察は倍率を高め



【図】 ニワトリ胚でのアポトーシス検出
A：ナイルブルー染色によって検出した 7.5 日胚後肢のアポトーシス領域（矢印）。B：ニュートラルレッド染色によって検出した 7.5 日胚後肢のアポトーシス領域（矢印）。B’：B の一番下の矢印で示した部分の拡大図。赤茶の粒が観察できる。C：B と同じ日に取り出した、別の個体の染色結果。赤粒は矢印で示した部分だけに限定され、発生がやや遅れていたと考えられる。D：5 日胚後肢芽のアポトーシス領域。この段階では、先端でのアポトーシスはまだ始まっていない。一方で、前端部でアポトーシスが起こっており（矢印）、指形成以外にもアポトーシスが関わることを示している。E：5 日胚顔面でのアポトーシス。眼原基と鼻孔の間に赤粒が観察され（矢印）、顔面形成時にもアポトーシスが関与することがわかる。

（20–30 倍、あるいはそれ以上）にして行う。胚全体がぼんやりと赤色に染まっているが、これとは別に、指間部（特に後肢）に明瞭な赤い粒が観察できるはずである【図 B、B’】。先述の通り、この粒は NR を取り込んだ食作用の高い細胞（群）であり、粒が多いほどその部位で食作用≒アポトーシスが活発に起こっていることを示している。四肢は体から切り離した方が観察しやすく、前肢（翼）なら生え際のあたりから、後肢（足）なら大腿部のあたりからピンセットで切断し、腹側（この段階で平らな方）を下にする。

4. 指導のポイント

実際の作業工程は平易であり、30 分強できれいにアポトーシス領域を観察できるので、ニワトリ卵の入手や孵卵が可能であれば試してもらいたい。待ち時間を考えると、授業の開始時に染色を始め、終了前に観察という流れもあるかと思う。実体顕微鏡を使わなくても、拡大倍率の高い虫メガネやルーペ、最近ならデジタル拡大鏡でも一応の観察は可能である。

同じ孵卵時間でも発生の進行速度に個体差があるため、複数個体の肢を比較すると赤粒の数（量）や観察される範囲に違いが観察されることがある。赤粒が観察されない場合は、発生段階が若い（孵卵時間が短い）か、逆に発生段階が進みすぎている（孵卵時間が長い）可能性が考えられる（例：【図 B と C】）。また、同じ肢芽でも背腹でアポトーシスの進行度合いが微妙に違うので、同じ個体の左右の肢を切りだして背面と腹面での粒の分布を比較して、アポトーシスがどのように進行しているのかを推論しても面白いと思う。さらに、より若い胚で同様の NR 染色を行うと、肢芽の別の部位が染色されたり【図 D】、肢芽以外でも顔面や頸部、後肢から尾部にかけて染色を確認することができる（例として【図 E】）。教科書では、指間アポトーシスだけが強調されるが、実際に染色してみると発生の様々な段階で、かつ体の様々な部位でアポトーシスが起こっていることを学べると思う。

参考文献

和田直之、科学フォーラム、39(5)、56–57、2022 年 10 月号