

哺乳類代替動物として アフリカツメガエルを用いた分裂細胞の検出実験

梶原 裕二

Detecting cell division using frogs, *Xenopus laevis*,
as an alternative to using mammals

Yuji KAJIWARA

Accepted June 26, 2018

抄録：動物の体づくりや維持では、細胞分裂と DNA の複製は重要な出来事である。哺乳類では、血液細胞、小腸上皮細胞、精細胞、毛嚢などの組織では活発な細胞分裂が生じている。細胞分裂を観察する方法として、チミジンの相同体である BrdU で標識し、抗体で検出する手法が用いられる。哺乳類マウスは一般的であるが、動物愛護管理法の観点から代替動物を用いたい。そこで、マウスの代替としてアフリカツメガエルが利用できるかを検討した。変態中のカエル幼生の後肢芽で間充織に多数の陽性細胞が存在し、本手法が両生類でも適用できた。子ガエルの小腸や精巣の分裂細胞はマウスと存在場所が異なっていた。著者らが開発した簡易凍結徒手切片法と抗 BrdU 抗体による分裂細胞の検出手法が、扱いやすいカエルで実施できることが示された。動物の組織の観察に加え細胞分裂も調べることで、生徒が学校の理科室で課題研究を実施する際、より広いテーマが設定できる。

検索語：分裂細胞, BrdU, カエル, 哺乳類代替実験, 簡易凍結徒手切片法

Abstract: Both cell proliferation and DNA replication are important phenomena during the formation and maintenance of animal bodies. In mammalian bodies, several tissues, such as the blood cells, absorptive epithelium cells of small intestine, spermatid cells, and hair follicles, have continuous active cell division. In the present experiment, bromodeoxyuridine (BrdU) was used to label newly synthesized DNA to detect cell division in mice. Furthermore, the same method could be applied to detect cell division in amphibians like frogs, *Xenopus laevis*, using them as alternatives to mammals. Post limb-bud in frog larva, during the period of metamorphosis, several positive cells were found stained with anti-BrdU antibodies. This indicates that experimental procedure involving BrdU was successful on frogs as well as mice. There were some differences in cell division in the small intestine and the testis of mice and frogs. Thus, the present experiment was effective in understanding the cell division and DNA replication in animal bodies in the high school biology class.

Key words: cell division, BrdU, frog, alternative animals, frozen-method

1. はじめに

多細胞動物の体は、それぞれの機能に分化した多数の細胞で構成されている。例えば、私たちヒトの体は約 200 種類に分化した多数の細胞でできている^{8) 10) 11)}。中枢神経のように一旦出来ると生涯にわたって細胞が維持される場合もあるが（側脳室の脳室下帯・嗅球や海馬歯状回の神経細胞は例外的に分裂）、成体になっても活発に細胞分裂を続ける細胞もあり、赤血球の寿命と骨髄における新生はよく知られている⁸⁾。他には、皮膚細胞、小腸上皮細胞、精原細胞、毛根細胞、色素細胞などがあり、成体でも活発に細胞分裂を続ける細胞には幹細胞が存在している⁸⁾。このように細胞の分裂は、多細胞動物の体づくりばかりでなく、成体の維持にも深く関わる。

分裂細胞の検出には、DNA の材料であるヌクレオチドに目印をつけ、DNA 合成期（S 期）の細胞で合成される複製 DNA に取り込ませる。その後、組織標本を作成し、目印をもつ細胞を検出する手法が行われる。従来から、放射性 3H- チミジン、チミジンの相同体であるブロモデオキシウリジン（Bromo-deoxy-Uridine; BrdU）などが一般的に用いられる⁷⁾。チミジンを使用することで、チミジンの代わりにウラシルを塩基としてもつ RNA と区別することができる。

高校の生物基礎や生物の教科書では、細胞の増殖、DNA の複製は生物の基本的な特徴として記載される^{10) 11)}。細胞分裂の単位では、細胞周期の中で、分裂期と間期の存在、間期には G1 期、S 期、G2 期があり、S 期で DNA が複製されることが模式図などで示される。また、DNA の複製の単位では、母細胞の DNA を鋳型として、相補的な DNA 鎖がヌクレオチドから複製されることが模式図で示される^{10) 11)}。しかし、これら生物に基本的で重要な現象であるが、実験を通して理解する教材はほとんどない。

分裂細胞の検出実験には、実験動物としてマウスなど哺乳類が一般的に用いられる。著者らはこれまで、高額な器材を必要とせず、短時間で動物組織の構造を観察できる簡易凍結徒手切片法を開発してきた^{2) 3) 4) 5)}。この方法により、これまで敬遠されてきた動物組織の観察が格段に容易になり、多様な動物の様々な組織の観察が可能となった。例えば、簡単に入手できるフナやカエルなど魚類や両生類を用いることで、マウスに限定されずに、個体と器官の観察、組織や細胞の観察という一連の段階的な実験が可能となった^{4) 5)}。特にカエルの組織の観察はマウスに劣らない組織の観察が可能であり、近年、動物愛護管理法の改正と遵守の視点から羊膜類に属するマウスを用いた実験が難しくなってきた状況では、實際上、有効な代替方法となる。そこで、簡易凍結徒手切片法を用いて、多細胞動物において細胞が増殖することを捉える実験、細胞分裂時にヌクレオチドから DNA が実際に複製されることを捉える実験として、哺乳類マウスの代替として、両生類カエルを用いた実験が可能かどうかを検討した。マウス以外、多様な動物で分裂細胞の検出が可能となれば、高等学校でも広く実施できる実験となる。

2. 材料と方法

(1) 実験動物

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は島津理科機器から成体入手し、産卵・発生させた、後肢が成長した変態中の幼生 (st.54)、生後 6 月の子ガエルを用いた。マウス (*Mus musculus*, Slc:ICR 系統)

は雄・8週令（清水実験材料から入手）を用いた。マウスを用いた実験は京都教育大学における動物実験の実施に関する規定に沿って H24 年に実施した。

5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU; SIGMA-ALDRICH 社) を用いて分裂細胞を標識した。アフリカツメガエルでは、BrdU を純水に 10mg/ml の濃度で溶解し、子ガエルには 0.1ml (1mg/カエル)、幼生（体重 0.42g）には 0.03ml (0.3mg/幼生) 腹腔内投与した。また、さらに子ガエル（体重 2.0g）と幼生の飼育水に 0.5mg/ml の濃度で BrdU を溶解し、48 時間飼育し、経口投与した（48 時間 BrdU 標識）。マウス（体重 25g）は、BrdU 溶液（10mg/ml）を 0.5ml (5mg/マウス) 腹腔内投与し、さらに飲料水に BrdU を 0.5mg/ml の濃度で溶解し 24 時間、経口投与した（24 時間 BrdU 標識）。

BrdU 標識の終了時、子ガエルとマウスは過剰のジエチルエーテルで麻酔死させた。カエル幼生は飼育水を 25% エタノールとし麻酔死させた。解剖後、子ガエルの腸、精巣を、カエル幼生の後肢を取り出し 10% ホルマリンで固定した。マウスの小腸、精巣を取り出しブアン氏固定液で固定した。

(2) 簡易凍結徒手切片法による組織切片の作成

動物の組織切片の作成は梶原と八十田²⁾、梶原と山崎³⁾の方法を用いた。以下、手法を概略する。中央に穴を開け、20%エタノールで置換・保存したブロッコリー髓を試料の保持体とした。支持体の中央の穴に、凍結包埋剤（OCT コンパウンド、サクラファインテックジャパン）を入れ、試料を挿入した。ブロッコリー保持体と内部の凍結包埋剤をドライアイスで挟み数分放置・固化させた。あるいは、低温貯蔵庫（-80℃）で冷却したアルミ板をドライアイスの代替として用いて固化させた。凍結・固化した保持体と試料を安全カミソリの刃（フェザー製・ハイステンレス）を用いて、徒手法により標本作製した。ブロッコリー髓・凍結包埋剤とともに薄切された切片をシャーレに入れた生理食塩水に浮かべ、凍結包埋剤を溶解した。切片をピンセットでスライドグラス上に取り、以下の通り、抗 BrdU 抗体による免疫染色で核内の BrdU を検出した。対比染色として、マイヤー氏ヘマトキシリン溶液で核を染色した後、50% グリセリン - 生理食塩水で封入、カバーガラスをかけた。カバーガラスの周囲をマニキュアで密封し、長期保存が可能な標本とした。組織標本は光学顕微鏡（ECLIPSE-E200; ニコン）で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ（DS カメラ・DSL-2; ニコン）で写真撮影を行った。

(3) BrdU 検出法

BrdU の検出は BrdU 染色キットを用いた（BrdU *In-Situ* Detection Kit; BD-Bioscience 社）。

スライドグラスに載った組織薄片の水をドライヤーで乾燥させ、スライドグラスに密着させた。染色液が拡散しないように、薄片の周囲に油性マジックで約 1cm の円を描いた。緩衝液（キット溶液 A）を滴下し 2 分間馴染ませた。緩衝液を除去し、1% トリプシン液を滴下、3 分間（32℃）タンパク質分解処理して、核内の DNA を露出させた。緩衝液で 3 分間、3 回洗浄した。この抗体は 1 本鎖の BrdU に反応するため、試料を乾熱滅菌器内で 10 分間（89℃）熱処理し、1 本鎖 DNA に解離した。室温に放置冷却した後、生理食塩水で 3 分間 3 回洗浄した。ビオチン化 BrdU 抗体を滴下し、湿室内で湿度を保ちながら 90 分間反応させた。生理食塩水で 2 分間 3 回洗浄した。ストレプト・アビジン-HRP（ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ酵素）を滴下し、湿室内で 30 分間反応させた。生理食塩水で 2 分間 3 回洗浄した。DAB（ジアミノベンチデン）クロモゲン基質溶液を滴下し、5 分間発色させた。生理食塩水で 2 分間 3 回洗浄し、反応を停止した。

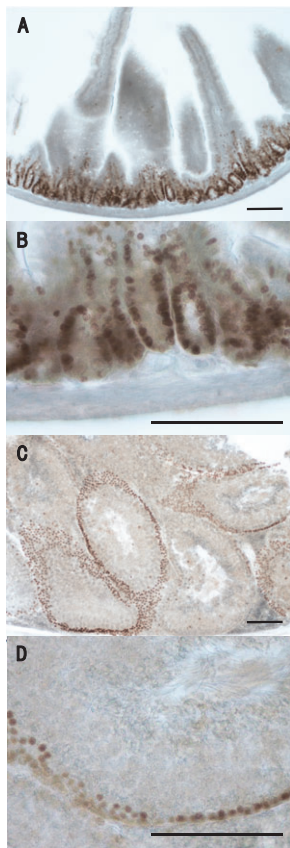


図 1

マウス成体の小腸と精巣の分裂細胞。小腸柔毛の低倍率 (A) と高倍率 (B) の組織像を示す。柔毛は整然と配列した小腸上皮細胞とその下部の粘膜固有層とからなる。褐色に核が染まった陽性細胞が柔毛基部とクリプト（陰穿）の小腸上皮細胞層に存在する。クリプト底部には陽性細胞が見られず、パネート細胞と思われる。この組織像から、クリプト内部にある分裂細胞が 24 時間の間、活発に分裂して柔毛先端部へ細胞を供給していることがわかる。精巣の低倍率 (C) と高倍率 (D) の組織像を示す。精細管の周囲に、褐色の陽性細胞が存在し、精原細胞が活発に分裂している様子がわかる。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 。

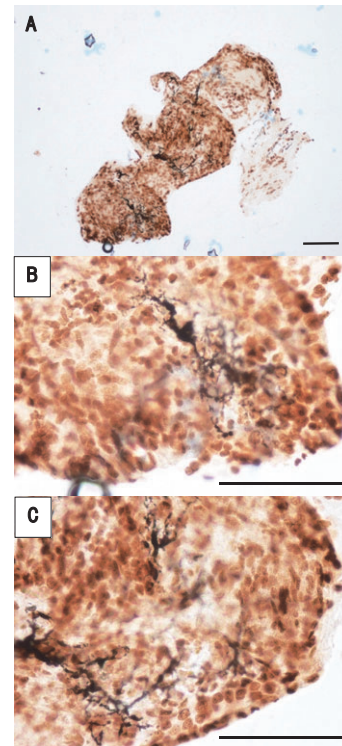


図 2

アフリカツメガエル幼生の発達中の後肢分裂細胞。後肢の低倍率 (A) と高倍率 (B, C) の組織像を示す。後肢で形成されている指原基 (図 2 A) の 3 本を示す。図から明らかなように、後肢の指原基内は褐色の陽性細胞で満たされており、活発に分裂する間充細胞と判断できる。それらの染色状況もマウスの小腸や精巣の陽性細胞 (図 1) と変わりはない。また、不定形の黒い細胞はメラニン顆粒をもつ黒色素胞である。スケールバーは $100\mu\text{m}$ 。

3. 結果と考察

(1) マウスの小腸・精巣内の分裂細胞

マウス小腸の BrdU 標識細胞の組織像を示す (図 1A, B)。組織像から、小腸柔毛の下部に多くの陽性細胞が存在する。特に、小腸柔毛底にあるクリプト（陰穿）から連なった上皮細胞が見られる。クリプト最奥部には陽性細胞が存在しない領域があり、腸管の免疫を担当するパネート細胞の領域と思われる⁸⁾。パネート細胞より上側には、陽性細胞が多数観察でき、小腸上皮幹細胞由来の分裂細胞群の存在が確認できる。この領域から常に新しい上皮細胞が作られ、柔毛先端部へ押し出されるように、小腸上皮細胞は常に置き換わりが行われている。この組織像は従来から見られる小腸の分裂像と

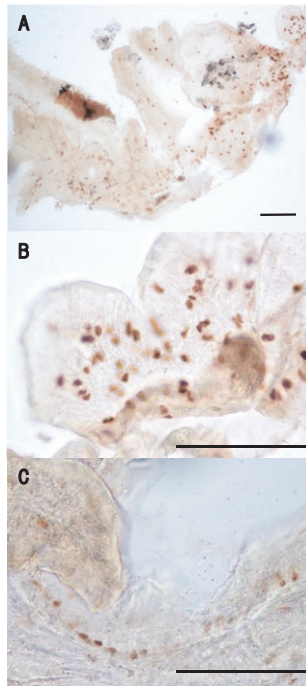


図 3

アフリカツメガエル子ガエルの小腸の分裂細胞。小腸の低倍率 (A) と高倍率 (B, C) の組織像を示す。カエルの場合、陽性細胞が小腸内に広範囲に散在し、マウスの小腸では分裂細胞 (図 1) がクリプトに局在するのに対して分布が大きく異なる。小腸上皮幹細胞が哺乳類のクリプトのように局在せず、散在することが原因と考えられる。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ 。

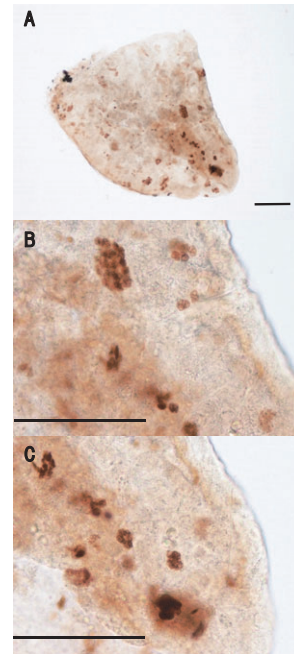


図 4

アフリカツメガエル子ガエルの精巣の分裂細胞。精巣の低倍率 (A) と高倍率 (B) の組織像を示す。カエルの精巣では、陽性細胞が約 16 個、あるいは数個とクラスター状 (塊状) に散在している。マウスの精巣では分裂細胞が精細管の周辺に局在するのに対して分布が大きく異なる。無尾両生類の精巣で、精細管の中に存在する同調分裂を行う生殖細胞シスト (袋) と考えられる。スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ 。

一致する⁸⁾。

マウス精巣の BrdU 標識細胞の組織像を示す (図 1C, D)。組織像から、精細管の周囲に多数の陽性細胞が存在する。この陽性細胞は精原細胞・精母細胞で、セルトリ細胞により調整されながら幹細胞として盛んに細胞分裂をすることが知られている⁸⁾。また、陽性細胞が見られない精細管も存在し、BrdU を投与した時期が分裂期になかった精細管と思われる。

この分裂細胞を標識する BrdU を用いた実験方法と簡易凍結徒手切片法により、高等学校においても、小腸や精巣に見られる分裂活性が高い細胞の存在、幹細胞の存在を実際に観察する実験が可能である。抗 BrdU 抗体による陽性細胞の検出操作自体は 3 時間弱なので、生物クラブや少人数の課題研究などで十分に実施できよう。また、染色キット自体は高価であるが、適切に希釈した溶液 (キットあたり千枚以上の標本が染色可能) を大学などの機関から頒布すれば可能である。この実験系により、生物基礎や生物において^{10) 11)}、生物の重要な概念である DNA の複製を実際の動物の体の中で生じている現象として理解することができる。

(2) アフリカツメガエル幼生後肢の分裂細胞

アフリカツメガエル幼生の変態期 (st.54)、発達中の後肢の組織像を示す (図 2)。この時期の後肢

は既に指原基が形成され始めており、図2ではそれらのうち3本の指原基を示す。図から明らかなように、後肢の指原基内は褐色を呈した細胞で満たされており、それらの染色状況もマウスの小腸や精巣の陽性細胞（図1）と変わりはない。さらに、発達中の後肢には進行帯と呼ばれる間充織の増殖により肢芽の成長が起こるので⁸⁾、この場所に多くの抗 BrdU 抗体陽性細胞が存在することは、増殖細胞を検出したと判断できる。従って、主にマウスで用いられてきたこの実験方法が、哺乳類以外の両生類のカエルでも適用できることを示す。

(3) アフリカツメガエル子ガエルの小腸・精巣の分裂細胞

アフリカツメガエル子ガエルの小腸（図3）と精巣（図4）の分裂細胞の組織像を示す。カエルの場合、腸の分裂細胞はマウスの小腸（図1）のように小腸底部のクリプトに限定されずに、広範囲に散在する（図3）。哺乳類の小腸では、出生前後に成体型の幹細胞が存在するクリプトを形成する。アフリカツメガエルでは、変態期に幼生型の腸から成体型の幹細胞をもつ腸上皮が再構築されるが、哺乳類のようなクリプトは見られない¹⁾。おそらく、腸上皮の幹細胞が哺乳類のクリプトのように局在しないことが、カエルの分裂細胞が散在する理由と考えられる。いずれにせよ、哺乳類の柔毛は腸の消化・吸収において重要な構造であるため、両生類の襞状の腸における分裂細胞の分布の違いも合わせて考えると興味深い。

アフリカツメガエル子ガエル精巣内の分裂細胞（図4）は、マウスの精巣内の分裂細胞（図1）と様子が大きく異なる。マウスでは精細管の周りに分裂細胞が並ぶが、カエルでは、クラスター状（塊状）の分裂細胞が精巣内に散在している。多いもので約16個、あるいは4個、数個と少数の分裂細胞が分散している。無尾両生類の精巣は精細管と呼ばれる構造からなるが、哺乳類のような精細管でなく、袋状でそれに続く精巣内輸出管を一つの単位とし、精細管の中に同調分裂をする生殖細胞とセルトリ細胞からなるシスト（袋）が存在する。シスト毎に分化段階が異なる⁶⁾。図4で見られるクラスター状の分裂細胞は、シスト内の同調分裂した生殖細胞と思われる。有性生殖を行う多細胞動物において、配偶子形成、生殖細胞の分化とそれに続く受精、発生過程は、多細胞動物の本質を理解できる一連の現象である。この視点から見ると、生殖細胞の増殖を実際に動物の体で確認する実験は重要であろう。

(4) 今後の展開

細胞分裂とそれに伴う DNA の複製は生物にとって基本となる重要な現象である。中学校や高等学校では、細胞分裂は分裂各期と染色体の観察に主眼が置かれる¹¹⁾。しかし、動物や植物などの多細胞生物において、体づくりや維持に細胞分裂がどのように関わるかは見過ごされがちである。また、DNA の複製において、細胞周期の S 期にヌクレオチドから新生 DNA が実際に生じることを細胞、組織レベルで実際に確認する実験はほとんどない。本報告では、簡易凍結徒手切片法を用いることで、動物の体内で生じる細胞分裂、ヌクレオチドから複製された DNA を実際に高等学校で観察できることを示した。さらに、抗 BrdU 抗体を使った実験手法は哺乳類マウスで用いられてきたが、両生類カエルにも適用できることが示された。本手法が従来用いられてきたマウス以外で適用できたことは重要で、今回は両生類を材料にしたが、さらに、魚類やミミズなど無脊椎動物、植物でも利用できると考えられる。

生物にとって細胞分裂と DNA 複製が重要な現象である反面、これらの現象が外界の要因によって

阻害される影響も大きい。この視点から、放射線の生物影響を学ぶ教材の開発も重要であり、放射線に対する科学リテラシーの充実が望まれる。本報告で示した両生類,あるいはさらに扱いやすい魚類,安価なミミズなどを実験材料として、放射線の影響を調べる教材開発も可能であろう。加えて、放射線の性質を調べたり、遮蔽効果を見たり、あるいは放射線影響からの回復過程を見るなど様々な探求課題が設定できよう。

これまで様々な植物や動物の組織や細胞を観察する実験例を示してきたが、本報告では細胞分裂という生物にとって重要な現象も観察対象とする手法を示した。これら一連の観察対象の拡大や実験手法の改良は、生徒が調べる活動の機会を広げ、課題設定を容易にすることで、次期学習指導要領で設置される「理数探求基礎」「理数探求」の充実に資する⁹⁾と考える。

本論文の図はカラーがより明瞭なため、京都教育大学HP/附属図書館/クエリの森/学内定期刊行物、京都教育大学紀要 No.133 (2018) を参照されたい。

本研究は、科学研究費補助金(課題番号 16K00960)の援助を受けて実施した。

引用文献

- 1) 岡 敦子 (2015)「消化器系の進化と発生のメカニズム」.『日医大会誌』**11** 巻 (3 号): pp. 155-160.
- 2) 梶原裕二・八十田茂希 (2011)「凍結包埋剤を用いた簡便な徒手切片法による動物組織とニワトリ胚の観察」.『生物教育』**52**: pp. 112-120.
- 3) 梶原裕二・山崎康平 (2012)「簡易凍結徒手切片法を用いた身近な魚類と両生類の解剖・組織実習」.『京都教育大学紀要』**121**: pp. 43-51.
- 4) 梶原裕二 (2016)「簡易凍結徒手切片法を用いた組織観察による多様な動物の構造と系統を学ぶ実験」.『京都教育大学紀要』**129**: pp. 1-13.
- 5) 梶原裕二 (2017)「簡易凍結徒手切片法により生物の体を調べる」.『生物の科学遺伝』**71** 巻 (5 号): pp. 466-471.
- 6) 片桐千明編 (1998) 両生類の発生生物学 2 章精子形成, pp.23-45, 北海道大学出版.
- 7) 金 承業, 朝長正徳 (1989) 神経組織培養法第 31 章増殖能の判定法 31.1. トリチウム標識サイミジンの取り込みとオートラジオグラフィ 31.2. プロモディオキシユリジン抗体による増殖能判定法, pp.241-245, 藤田企画出版.
- 8) 武田洋幸, 田村宏治監訳 (2012) ウォルパート発生生物学, pp.383-430, 432-439, メディカル・サイエンス・インターナショナル.
- 9) 文部科学省 (2016) 幼稚園, 小学校, 中学校, 高等学校及び特別支援学校の学習指導要領等の改善及び必要な方策等について (答申)【概要】.
http://www.mext.go.jp/component/b_menu/shingi/toushin/_icsFiles/afieldfile/2016/12/27/1380902_1.pdf
- 10) 吉里勝利ら編 (2012) 高等学校生物基礎 (平成 24 年度用) pp.76-87, 88-93. 第一学習社.
- 11) 吉里勝利ら編 (2014) 高等学校生物 (平成 26 年度用) pp.110-115. 第一学習社.

