

細胞を染色したい

I はじめに

Calcein-AM、Fluorescein diacetate (FDA) や CFSE 等の fluorescein を基本骨格に持つ蛍光色素は、fluorescein 骨格のフェノール性水酸基がアセトキシメチル基やアセチル基で保護されることにより脂溶性が増加し、細胞膜を容易に透過することができる。これらの色素は、エステル保護基のため本来の蛍光が抑えられているが、細胞内に浸透すると、細胞内のエステラーゼにより容易に加水分解を受け、fluorescein 本来の緑色の蛍光を示すようになる。また、加水分解を受けて、脂溶性が減少することにより細胞内からの溶出が抑えられ、結果的に細胞を蛍光染色することになる。このことを利用して、これらの fluorescein 系の色素類は、生細胞を染色する色素として利用することができる¹⁻⁸⁾。

一方、Propidium iodide (PI)、Ethidium bromide (EB)、Acridine Orange (AO) や DAPI など正電価を持つ蛍光性色素は、核酸の染色試薬として知られている。PI、EB、DAPI は一般的に生細胞の場合は細胞膜を透過しないが、死細胞の場合、細胞膜が変化するため透過するようになる。細胞膜を透過したこれらの蛍光色素は、核酸に結合することにより赤色 (PI、EB) や青色 (DAPI) の蛍光を発するようになる。これを利用して死細胞染色用の蛍光色素として使用されている⁹⁻¹⁶⁾。

また、これら生細胞染色色素、及び死細胞染色色素を同時に用いることにより、系内の生死細胞を二重染色する(染め分ける)ことが可能であり、蛍光顕微鏡下での蛍光観察や、フローサイトメトリー、あるいはプレートリーダーで測定することにより、生死細胞数を計測することも可能である¹⁷⁻²⁰⁾。

多細胞生物の生命は、個体を構成する種々の細胞群の増殖と分化によってのみ維持されているのではなく、特定の時期に特定の細胞が死滅することによって巧妙に維持されている。この細胞死はアポトーシス (apoptosis) という概念として 1972 年に Kerr により提唱された。アポトーシスは単なる細胞の崩壊現象ではなく、個体の生命を維持するために遺伝子に組み込まれた能動的な細胞死のことであり、その発現、作用機序、関連物質等に関する研究が盛んに行われている²¹⁾。

アポトーシスの検出には、特異的に断片化した DNA (クロマチン DNA のヌクレオソーム単位の断片化) を検出するゲル電気泳動法、TUNEL 法に代表される DNA 末端 *in situ* end-labelling 法、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法) などがあるが、細胞死の現象がアポトーシスであるか否かを判断する上で、細胞の形態学的観察が最も重要な判断基準であり、位相差顕微鏡下での観察、色素を用い細胞染色後、光学顕微鏡下での観察などが必要である。

個々の細胞の形態学的観察として一般的に用いられている分染法は、アポトーシス、ネクローシスの区別なく、細胞死の検出法として古くから最も用いられているものである。現在でも広く使用されているのが青色の Trypan Blue であり、その他赤色の Erythrosin B なども利用されてきた。電気泳動ゲルの核酸検出に用いられている EB を始めとして、PI、AO、DAPI、Fluorescein diacetate (FDA)、Calcein-AM などの蛍光性の色素も用いられてきている。しかし色素によって染色性に差があり、用いる色素の種類により死細胞の割合が異なり、多くの因子により染色性が影響を受ける等の難点もあるが、同一の系では再現性が高く、細胞死一般を簡便に判定する方法として広く用いられている。また、フローサイトメトリーに応用することにより、個々の細胞の生死を判定する方法も最近多用されている。

ここでは細胞の染色例を説明する。

II 細胞での染色例

1. 生細胞および死細胞の染色例

下記の試薬を用いて、HeLa 細胞を染色する例を示す。

(1) 試薬溶液の調製

下記のストック溶液を調製する。

製品名	溶液濃度	染色対象
・ Calcein-AM	0.5 mg/ml DMSO solution	生細胞
・ BCECF-AM	1 mmol/l DMSO solution	生細胞
・ CFSE	1 mg/ml DMSO solution	生細胞
・ CytoRed	1 mmol/l DMSO solution	生細胞
・ FDA	0.5 mg/ml DMSO solution	生細胞
・ PI	1 mg/ml H ₂ O solution	死細胞
・ EB	1 mg/ml H ₂ O solution	死細胞
・ DAPI	1 mg/ml H ₂ O solution	死細胞
・ AO	1 mg/ml H ₂ O solution	生・死細胞
・ Hoechst33258	1 mg/ml H ₂ O solution	生・死細胞
・ Hoechst33342	1 mg/ml H ₂ O solution	生・死細胞

※溶液調製後の保存は劣化を抑えるため -20°C にて保存する。

(2) 器具

- ・ スライドガラス
- ・ カバーガラス 18 mm × 18 mm
- ・ シャーレ (φ35 mm 程度)
- ・ ピンセット

(3) 操作

- 1) ストック溶液 10 μl を 5.0 ml の PBS(-) に溶解し、添加用色素液を調製する。
※ DMSO に溶解したストック溶液は水溶液中で分解するので、添加用色素液は用時調製し使用する。長時間放置すると染色できなくなる。
- 2) HeLa 細胞をトリプシン-EDTA などで処理し、細胞の懸濁液を準備する。
- 3) 細胞懸濁液を遠心分離する (1000 rpm, 3 分間)。
- 4) 上清を除き、PBS(-) を添加する (この時、細胞数が 10⁵ ~ 10⁶ cells/ml になるように調製する)。
- 5) ピペティングなどで十分分散させる。
※ 培養液中の血清などはバックグラウンドを上昇させる恐れがあるので、2)~4) の操作を繰り返し行い、十分に洗浄する。
- 6) 1.5 ml マイクロチューブに 4) で得た細胞懸濁液 30 μl 添加する。
- 7) さらに添加用色素液 15 μl 添加する。
- 8) マイクロチューブに蓋をして、37°C で 15 ~ 30 分間インキュベートする。
- 9) スライドガラス上に 8) の溶液 10 μl を乗せ、上からカバーガラスを重ね、染色した細胞溶液を挟みこむ。
- 10) このスライドガラスを蛍光顕微鏡に置き、色素に応じた励起光源を用いて励起し、観察する。
図 1 a) ~ i) に各色素の蛍光写真を示す。なお、死細胞染色色素では、HeLa 細胞を死滅させる操作は行わず、細胞溶液の調製段階で死滅した細胞を染色して観察している。

2. ミトコンドリアの染色については、「ミトコンドリアを染色したい」の項を参照下さい

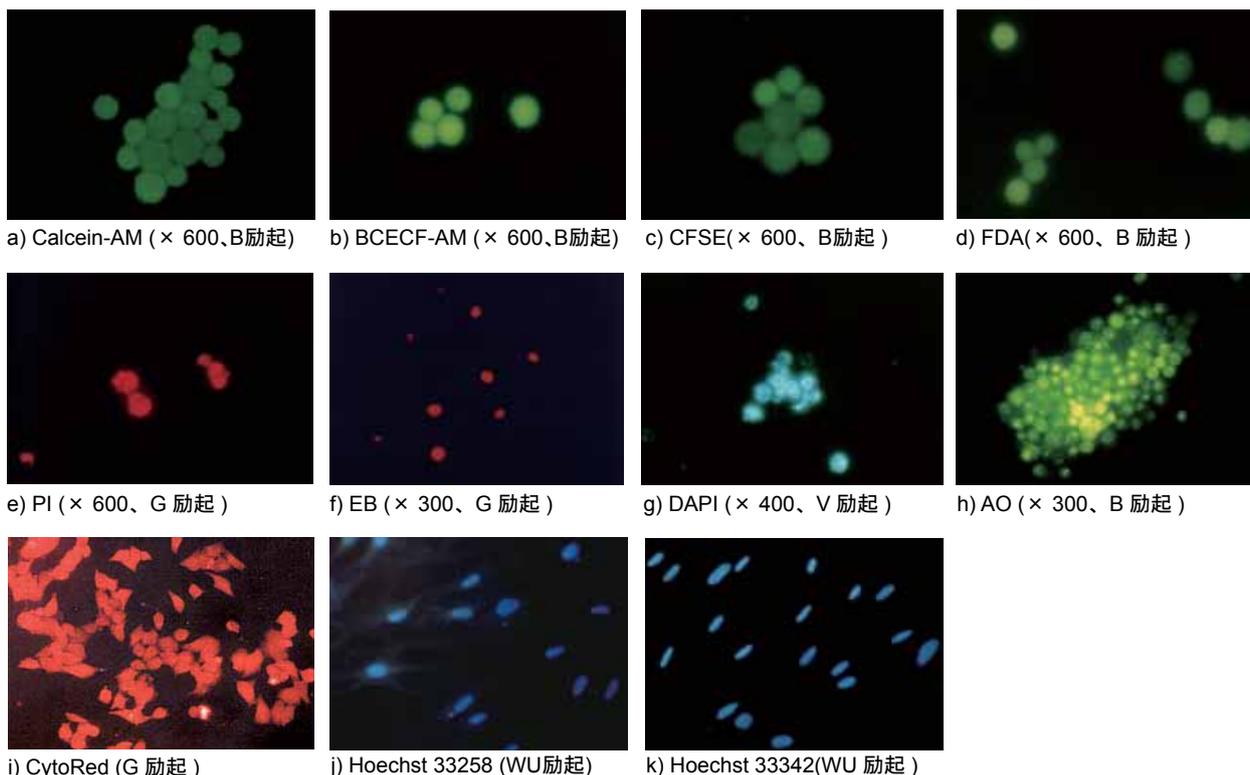


図1 染色色素による細胞の染色例 a)～i) : HeLa 細胞、j), k) : 正常ヒト胎児由来細胞

3. 固定化後の核染色例

Hoechst 33258 (Code: H341), Hoechst 33342 (Code: H342) を用いた細胞の染色例を示す。

(1) 試薬溶液の調製

下記のストック溶液を調製する。

- ・ Hoechst 33258 1 mg/ml H₂O solution
- ・ Hoechst 33342 1 mg/ml H₂O solution
- ・ 細胞固定液 : 1%グルタルアルデヒド /PBS(-)
- ・ 培養液 : PBS(-)

(2) 操作

- 1) 約 1×10^6 個の細胞を含む細胞培養液を 400 x g、5 分遠心し、上澄みを捨てる。
- 2) 細胞固定液 100 μ l を加え、ピペッティング等により混和する。
- 3) 30 分間室温で静置する。
- 4) 400 x g、5 分間遠心し、上澄みを捨てる。さらに、PBS(-) を 1ml 加え、混和した後、400 x g、5 分遠心し、上澄みを捨てる。
※この操作でグルタルアルデヒドをよく洗浄除去する。退色の原因となる。
- 5) PBS(-) を 20 μ l 加え、混和後、蛍光色素液 4 μ l 加え混合する。
- 6) スライドガラス上に 5) の細胞液を 1 滴置き、カバーガラスをのせ、端を押さえる。
- 7) 蛍光顕微鏡下で観察する。

図 1 j), k) に正常ヒト胎児由来細胞を染色した蛍光写真の例を示す。

参考文献

- 1) L. S. De Clerck, C. H. Bridts, A. M. Mertens, M. M. Moens, W. J. Stevens, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 172, 115.
- 2) G. Radcliff, R. Waite, J. LeFevre, M. D. Poulik, D. M. Callewaert, *J. Immunol. Methods*, **1991**, 139, 281.
- 3) S. A. Weston, C. R. Parish, *Cytometry*, **1992**, 13, 739.
- 4) E. Proserpi, *Histochem. J.*, **1990**, 22, 227.
- 5) S. A. Weston, C. R. Parish, *J. Immunol. Methods*, **1990**, 133, 87.
- 6) K. McGinnes, G. Chapman, R. Marks, R. Penny, *J. Immunol. Methods*, **1986**, 86, 7.
- 7) J. M. Rolland, K. Dimitropoulos, A. Bishop, G. R. Hocking, R. C. Nairn, *J. Immunol. Methods*, **1985**, 76, 1.
- 8) S. J. Murphy, D. J. Watt, G. E. Jones, *J. Cell Sci.*, **1992**, 102, 789.
- 9) C. P. Wan, R. V. Sigh, B. H. S. Lau, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 173, 265.
- 10) I. Vollenweider, P. Groscurth, *J. Immunol. Methods*, **1992**, 149, 133.
- 11) C. M. Davies, *Lett. Appl. Microbiol.*, **1991**, 13, 58.
- 12) I. P. Beletsky, S. R. Umansky, *J. Immunol. Methods*, **1990**, 134, 201.
- 13) Z. Darzynkiewicz, *Methods Cell Biol.*, **1990**, 33, 285.
- 14) Z. Darzynkiewicz, *Methods Cell Biol.*, **1994**, 41, 401.
- 15) W. Schnedl A. - V. Mikelsaar, M. Breitenbach, O. Dann, *Hum. Genet.*, **1977**, 36, 167.
- 16) J. Kania, T. G. Fanning, *Eur. J. Biochem.*, **1976**, 67, 367.
- 17) E. S. Kaneshiro, M. A. Wyder, Y. - P. Wu, M. T. Cushion, *J. Microbiol. Methods*, **1993**, 17, 1.
- 18) N. G. Papadopoulos, G. V. Z. Dedoussis, G. Spanakos, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, M. Papamichail, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 177, 101.
- 19) K. H. Jones, J. A. Senft, *J. Histochem. Cytochem.*, **1985**, 33, 77.
- 20) W. M. J. Vuist, F. V. Buitenen, M. A. de Rie, A. Hekman, P. Ru-emke, C. J. M. Melief, *Cancer Res.*, **1989**, 49, 3783.
- 21) 「最新アポトーシス実験法」辻本賀英、刀祢重信、山田武 編、羊土社、**1995**.
- 22) 「フローサイトメトリー入門」、河本圭司、赤木清 編、医学書院、**1994**.

細胞
増殖 / 毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

III 組織のアミロイド検出例

アミロイドーシスはアミロイド (β シート線維構造を持つタンパク質) が臓器や組織細胞の外に沈着して、これらの臓器や組織の働きを阻害する病気である。弊社で販売している BSB は、全身性アミロイドーシスの沈着アミロイドを鋭敏に染色することが知られている¹⁾。in vivo の系においても全身性アミロイドーシスの1つである二次性アミロイドーシスを誘起したトランスジェニックマウスに BSB を静注すると、沈着アミロイド部分に BSB が集積していることが確認されている²⁾。他にも、限局性アミロイドーシスの1種であるアルツハイマー病の研究において、Skovronsky らはアミロイド前駆体タンパク質 (APP) を発現するトランスジェニックマウス Tg2576 に BSB を静注し、18 時間後の脳組織の老人斑 (SP) に色素が集積していることを確認したと報告している³⁾。アミロイドを選択的に染色していることをアルツハイマー病、FAP および AL アミロイドーシスの病理組織の染色結果からも確認できている。樋口らは最近、アルツハイマー病モデルマウスを用いた in vivo の系で、静脈注射した FSB が投与数時間後に脳内に移行し、マウスの脳組織のアミロイド斑部分に FSB が集積していることを確認した。さらにはそのアミロイド部分を ¹⁹F-MRI で高感度に検出している⁴⁾。

FSB solution (Code: F308) 若しくは BSB solution (Code: B525) を用いた染色例

1. 使用例

サンプルの固定法：エタノール固定もしくはホルマリン固定

(1) 操作方法

* 本製品は 1% FSB (若しくは BSB) の DMSO 溶液である (1 mg [FSB or BSB] in 100 μ l DMSO)。
本製品 1 本から、0.01% 濃度の染色液が 10 ml、0.0001% の染色液が 1000 ml 調製できる

(2) FSB (若しくは BSB) 染色液の調製

製品に 50% エタノールを加えて希釈し、0.01 ~ 0.0001% の濃度にする。

(3) 染色

切片を FSB (若しくは BSB) 染色液に 30 分間浸す。
切片を飽和炭酸リチウム水溶液に浸した後、50% エタノールにて軽く洗う。

(4) 観察

UV 光 (V 励起) にて観察する。

・ 蛍光特性

FSB: λ_{ex} =390 nm, λ_{em} =511 nm

BSB: λ_{ex} =432 nm, λ_{em} =532 nm

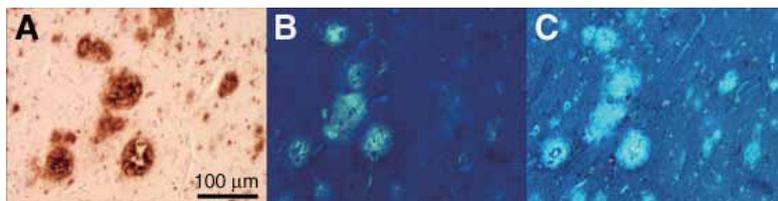


図2 アルツハイマー病患者の脳の染色例

(A) は A β に対する抗体による染色で褐色に染まった部分がアミロイドである。(B) は thioflavin S により、(C) は BSB により蛍光染色したもので、白く光っている部分がアミロイドである。
BSB による染色の方が薄い老人斑や神経原線維変化の様子を明確に観察することができる。(BSB 濃度 : 0.01%)
(画像提供 : 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学 古和久朋先生)

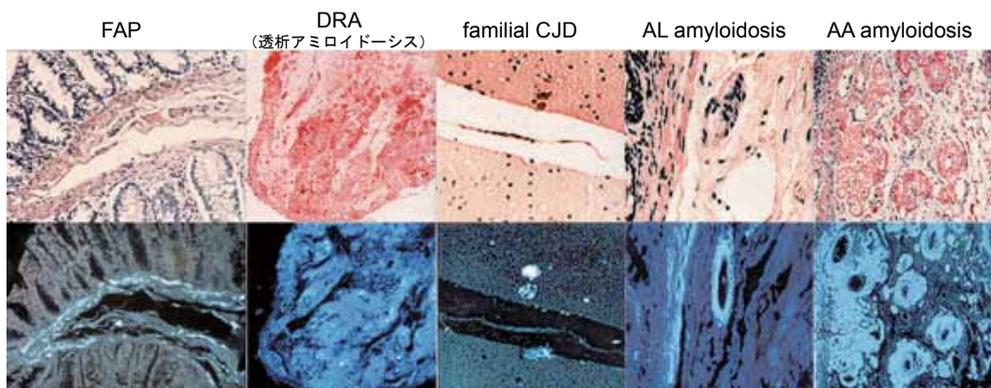


図3 各種アミロイドーシス患者の組織の染色例

上段は Congo Red により染色したもので赤褐色に染まった部分がアミロイドである。
下段は BSB で染色したもので、白く光っている部分がアミロイドである。
(画像提供 : 熊本大学医学部臨床検査医学 安東由喜雄先生)

参考文献

- 1) 安東 由喜雄, *Dojin News*, **2002**, 104, 1.
- 2) Y. Ando, et al., *Lab. Invest.*, **2003**, 83, 1751.
- 3) D. M. Skovronsky, et al., *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **2000**, 97, 7609.
- 4) M. Higuchi, et al., *Nature Neurosci.*, **2005**, 8(4), 527.