

細胞をただ「見る」時代から、 観察後さらに「活用」する時代へ

～マウス初期胚発生の長時間多次元イメージングが証明するCSUシリーズの低退色・低光毒性～

共焦点スキャナユニットCSUシリーズ

はじめに

受精・初期胚発生過程では、様々な現象が時空間的に制御され、かつそれらの多くが「個体発生」という最終目標に向かって原因と結果という関係で結ばれています。その作用機序を解析する上で、細胞の固定や破壊を必要とする従来の実験手法では限界がありました。この問題を解決するには、一連の過程を経時的に観察でき、かつ観察後も引き続き個体まで発生させることが必要です。そこで、個体発生にダメージを与えない初期胚長時間多次元ライブセルイメージング技術の確立を目指しました。

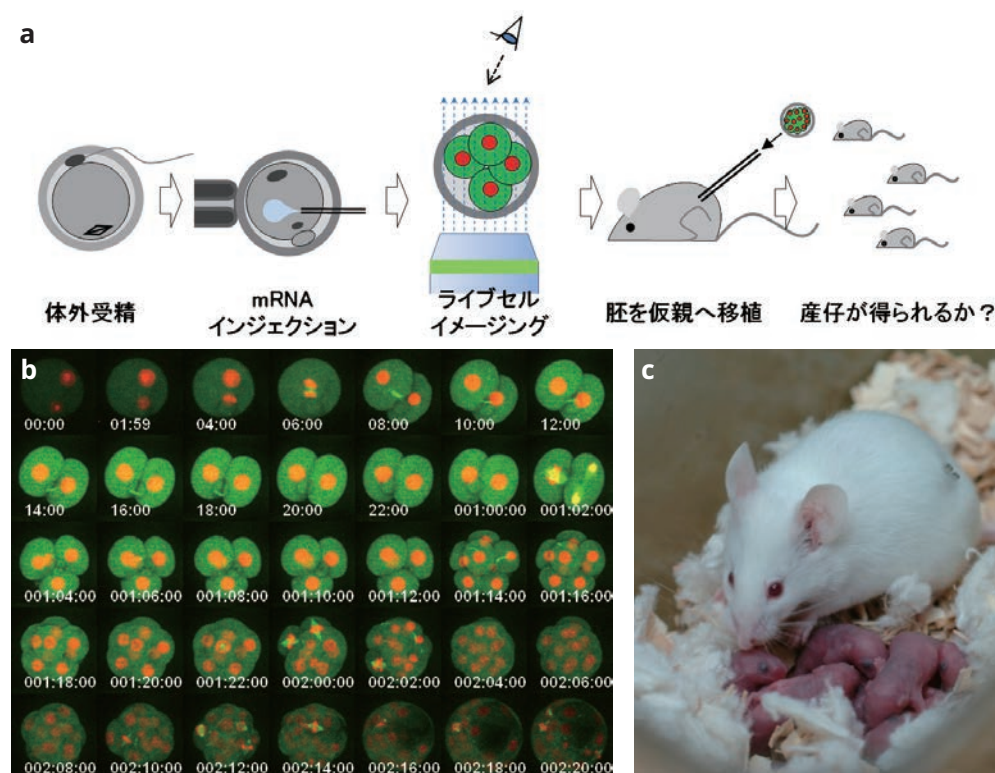


図1 初期胚長時間多次元ライブセルイメージング技術は胚の個体発生に影響しない

a 実験の流れ

b ムービーの代表的な例

ここでは紡錘体を緑に (EGFP- α -tubulin) 核を赤に (H2B-mRFP1) にラベルしてある写真はZ軸方向に51枚ある画像を最大輝度合成によって1枚の画像に変換したもの
7.5分おきに撮影したものから2時間間隔で抜粋して示しました

c 約6万枚近くの蛍光画像を取得した胚を移植して生まれた仔とその仮親

データご提供：理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 若山照彦研究室 研究員 山縣一夫先生

参考文献：Yamagata, K., Suetsugu, R. and Wakayama, T. Long-term, Six-dimensional Live-cell Imaging for the Mouse Preimplantation Embryo That Does Not Affect Full-term Development. J. Reprod. Dev. In press 2009; 55: 328-331
顕微鏡活用なほど Q&A 羊土社 宮戸 健二、岡部 勝 編集

実験手順

マウス受精卵にEGFP- α -tubulinおよびHistone H2B-mRFP1のmRNAをマイクロインジェクションし、3時間インキュベーションした後にCSU10を付加した顕微鏡システム(図2)にセットしました。着床前初期胚発生過程について約70時間に及ぶ長時間の3次元イメージング(詳細な撮影条件は表参照)の後、胚盤胞期胚を仮親の子宮に移植しました(図1a)。

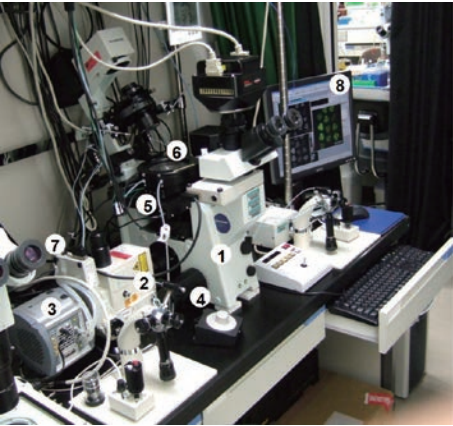


図2 本実験で用いた初期胚多次元イメージング用顕微鏡システム
倒立顕微鏡にCSU10およびEM-CCDカメラをアドオンしてあります
自動XYステージ、Z軸モータの制御により、多点かつ立体観察が可能です
ステージ上のCO₂インキュベータで培養しながら観察します

No.	Devices	Manufacturer	Model
1	Inverted fluorescence microscope	Olympus	IX-71
2	Nipkow disk confocal unit	Yokogawa	CSU10
3	EM-CCD camera	Andor	iXon DV887-BV
4	Z motor	Ludl	Mac5000
5	XY auto stage	Sigma Koki	XY30100T
6	CO ₂ incubator	Tokai hit	MI-IBC
7	Filter wheel	Ludl	Mac5000
8	Software	Molecular Devices	MetaMorph

CSU システムでの撮影条件	
総時間	70 時間(約 3 日間)
撮影間隔	7.5 分
Z 軸撮影枚数	51 枚 (2 μ m 間隔)
観察チャンネル数	3 (可視光、EGFP、mRFP1)
観察ポジション数	6 か所 (計 72 個の胚)
光強度 (レンズ先端からの出力)	488nm (0.281mW)
	561nm (0.225mW)

結果と考察

受精直後から胚盤胞期までの長時間イメージングに成功しました(図1b)。イメージング後の胚(計6万枚近くの蛍光画像を取得)を移植した結果、正常に産仔が得られました(図1c)。得られた産仔は健康に育ち、生殖能力を有していました。以上から、本初期胚イメージング技術は個体発生にダメージを与えないことが明らかとなりました。

まとめ

CSUを用いることで、細胞に対して極めて低毒性の長時間多次元イメージング技術を確認することができました。これは、サンプルに当たる励起光が極端に弱いというCSUの特徴によるものと考えられます。この技術革新により、ライブセルイメージングにより細胞をただ「見る」だけだった時代から、イメージング後にさらにその細胞を別の解析法に「活用する」時代に移ったのではないのでしょうか。今後はイメージングをもとに遡及的・予後予測的に細胞現象の原因と結果を関連付ける研究がさかんになると考えられます。

横河電機株式会社

〒 180-8750 東京都武蔵野市中町 2-9-32
E-mail : CSU@CSV.yokogawa.co.jp
URL : <https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/spinning-disk-confocal/>



記載内容は、お断りなく変更することがありますのでご了承ください。
本文中に使用されている会社名、団体名、商品名およびロゴ等は、各社または各団体の登録商標または商標です。
All Rights Reserved. Copyright © 2009, Yokogawa Electric Corporation.

[Ed:04d]