

Dissection of *Drosophila* CNSs

ITO Kei 1989 May; revised 1995 June

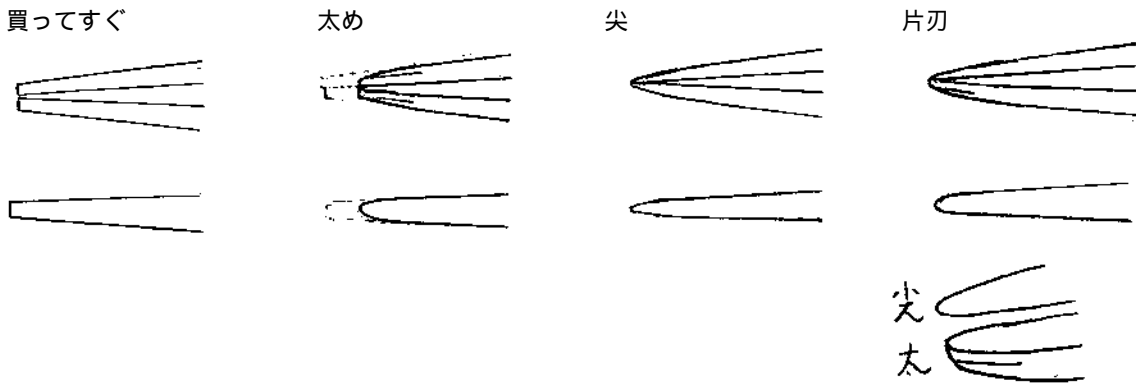
必要な道具（よい道具でるんるんディセクション！）

1 ピンセット

INOX のNo.5ピンセットの先を研ぐ（1本数千円、少し高いが、Taxal という材質のが丈夫でよい）。

・まず耐水ペーパー（黒い紙やすり）の 1000 番で形を作る。できれば4本作るとよい。

- | | | |
|-----|--------------------------|-----------------|
| I | 比較的太め × 1本 | 幼虫や蛹を傷つけずに持つため |
| II | よく尖らせたもの × 2本 | ディセクション用 |
| III | 片方の先は平たく刃にし、片方は若干太め × 1本 | 中の蛹を傷つけずに殻を剥くため |

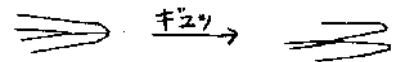


- ・紙やすりを掌に広げ、その上で研ぐと肉の弾力で紙がしななってきれいに丸く研げる。
- ・両方の先の長さをきれいにそろえる。特に側面は、先を閉じたとき面一（めんいつ、段や凹みがなく、きれいな平面の状態）になるようにする。そのために、研ぐときは先をそろえて研ぐ。
- ・先の内側は研がないこと。ごく軽くバリ（整形時に出来る金くずの出っ張り）を取るだけにする。それ以上研ぐと、強く力を入れるとき先端が開いてしまい、物がつかめなくなる！

- ・形が出来たら 2000 番以上のごく細かい紙やすりで、きれいに磨く。

紙やすりの目の細かさは 番という番号で表わす。番号の大きい程細かい。

アーカンサスストーンで研いでも良い。



2 微小メス

木綿針を研いで先をメス状にする。

- ・針を用意する（20 番の太さ）。

丈夫さ、粘りの関係で日本製は不可。英国 Milward Needles の # A102 9 の No.20 が良いそうな、、、。

国内で売っているかどうか知らない。

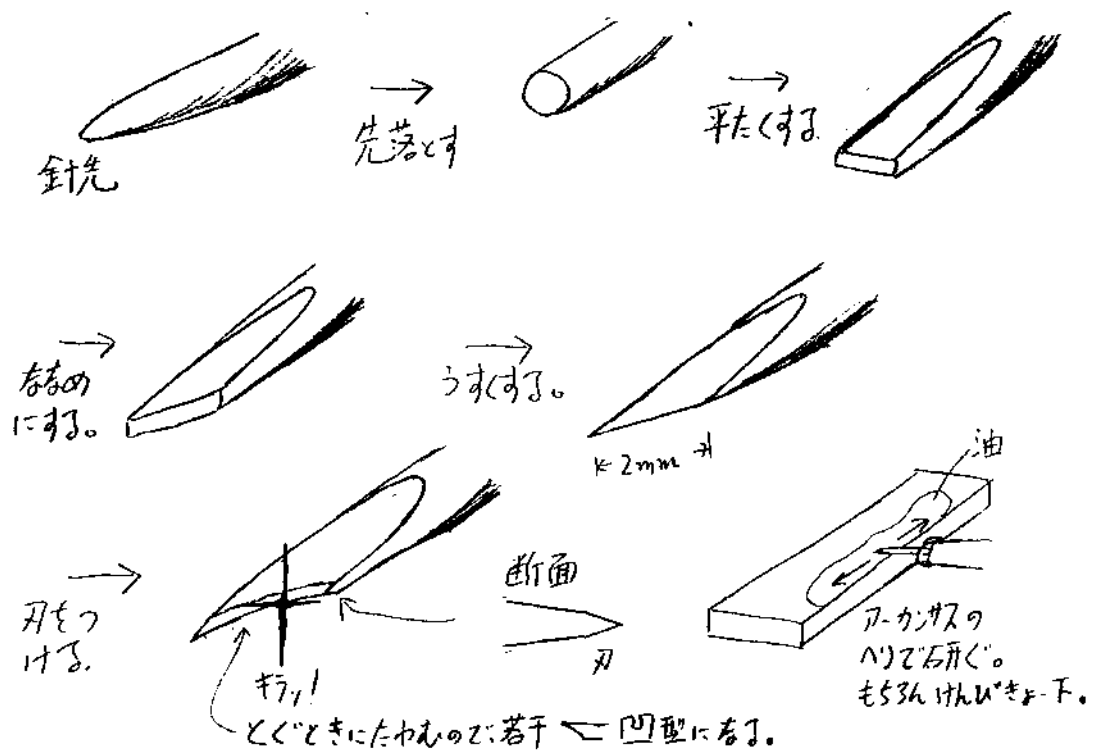
- ・アーカンサスストーンを用意する。

烏口の先を研ぐのに使う米国アーカンサス産の最上級の油砥石。乳白色で半透明の物ほど上質。製図道具屋で売っている。小1ケ 2000 円くらい、大1ケ 5000 円くらい。研ぐときは精密機械油をつけて研ぐ。

- ・針をホルダー（柄付き針、ピンバイスホルダー等）に付ける。
- ・実体顕微鏡下で、アーカンサスストーン上で針の先を研ぐ。まずホルダーを立てて持って研ぎ、先端を斜めに落とす。次にホルダーを寝かせて持ち、先の両側を薄くする。
- ・さらに薄くして、刃の部分尖らせる（刃の長さは1ミリくらい）。
- ・刃の形が出来たら、刃の全長にわたって少し角度をつけて研ぎ、刃を付ける。

要は包丁や小刀の研ぎ方と同じ。うんと小さいだけです。

非常に薄いので、ちょっと力を入れすぎるとすぐ折れてしまう。修行が必要。



好みによって、刃の形は凹型（反り刃）で凸型（丸刃）でもよい。凸型の方が切れは悪いが丈夫である。

3 シリコンラバー入りシャーレー

ディセクションのさい刃が痛まないよう台にする。

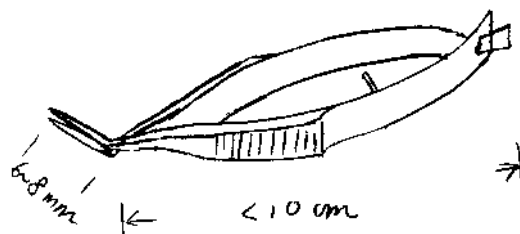
- ・ダウ・コーニングのシルポット 184W/C を用意する。
- ・重合剤をいれ、よく混ぜてからガラス、プラスチックのシャーレーに流し込む。すぐ固まって出来上り。
- ・そのままだと透明。活性炭を混ぜてから固めると黒いのが出来る。

4 手回し遠心機

- ・エペンドルフ中で抗体反応などをする際、小さい標本はなかなか底に沈まず、液交換の際に面倒くさい。といって DNA 用遠心機で振り回すとつぶれてしまう。そういうときはタカラの粗品スタンドやセラムチューブに 40センチ程度のひもをつけ、粘土の重りをつけて、そこにエペンドルフチューブをたて、ひもの端を持って投げ縄の要領で振り回すとすぐに標本が底に沈む。だまされたと思ってやってみよう。 (チビタンでもよいのだが、、、)

5 虹彩用剪刀

- ・首を落とすのに便利。先が真っ直ぐでなく、柄に対して角度の付いている方がよい。
- ・小さいほどよい。1本 3~5万円。



6 実体顕微鏡

- ・予算に余裕があれば、ライカ・ウィルド社の WILD M28 が一番価格に比べて性能が良い。M10 はさらによいがかなり高価。

7 ファイバー照明

ファイバー照明は熱線がでず、明るく、照明角度が自由に変えられるので便利。シャーレー側面から照らすと効果的。

蛹本体を傷つけずに殻から取り出す方法

ショウジョウバエ等双翅目の蛹は、3令幼虫のクチクラが蛹化時に脱皮せず、囲蛹殻 puparium になる。蛹のクチクラはその下に形成される。

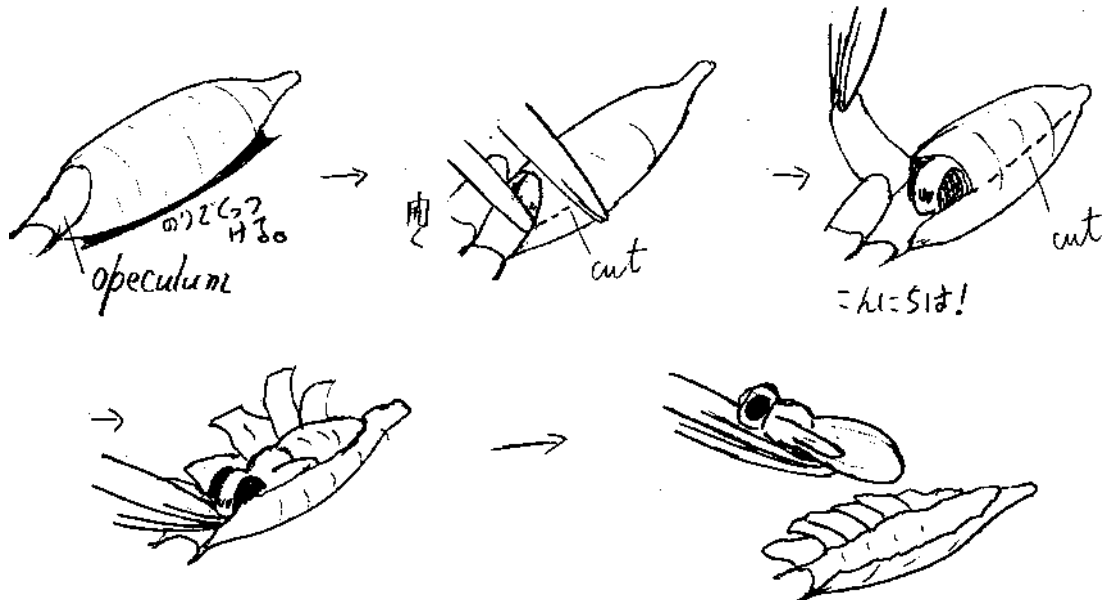
3令幼虫のクチクラが硬化して囲蛹殻に変化するのを pupariation (又は puparium formation)、そのあと囲蛹殻の内側に蛹クチクラが出来るのを pupation という。蛹のステージはふつつ pupariation を起点とする。pupation はその 10h ~ 15h 後である。

さらに羽化まぎわに蛹クチクラの下に成虫クチクラが形成され、羽化脱皮を行なう。羽化は 95h ~ 105h 後である。

pupation 後の蛹は、以下のようにすると傷つけずに囲蛹殻から取り出すことが出来る。

- 1 陶器台 (ハエの仕分けに使うもの) 等の上に黒いビニールテープを貼る。黒くするのは蛹を見やすくするためである。
- 2 殻を剥きたい蛹を、背中を上にしてビニールテープ上に置き、瞬間接着剤で固定する。
- 3 糊が乾いたら、片刃ピンセットを持つ。
- 4 囲蛹殻頭部のふた opeculum を、ピンセットではがす。頭が出て来る。
- 5 ピンセットの刃の方を蛹と囲蛹殻の隙間に差し入れ、囲蛹殻を切り開く。囲蛹殻は側面中央部が薄くなっているのので、ここを切ると楽である。
- 6 頭上側面と翅の原基のところは囲蛹殻に押しつけられたようになっているので、ちょっとしくじるとすぐ傷つけてしまうので気をつける。
- 7 囲蛹殻は横方向にはすぐ裂けるので、側面を少し切ったらそこを持って反対側面の方に持ち上げると、囲蛹殻が剥けて蛹が少しづつ出て来る。
このさいピンセットを 180 度持ちかえて、太い方を蛹に向けておくと、不用意に傷つけることがない。(このために、ピンセットの片方の先だけ尖らせている。)
- 8 尻まで出てきたら、閉じたピンセットの先に乗せるようにして蛹を取り出す。蛹は濡れているのでピンセットにくっついて来る。

間違っても蛹そのものをつまもうなどと思わないこと。非常につぶれやすい。



CNS の取り出しかた

脳 + 胸部神経節 (CNS) の取り出しかたは、ステージによって異なる。PBS を入れたシャーレーあるいは肉池の中で行なう。切断した体の後部や脳を取り出した後の頭部は、すみやかに PBS 中から取り出し、キムワイブなどにくっつけて捨てる。でないと PBS がゴミだらけになる。

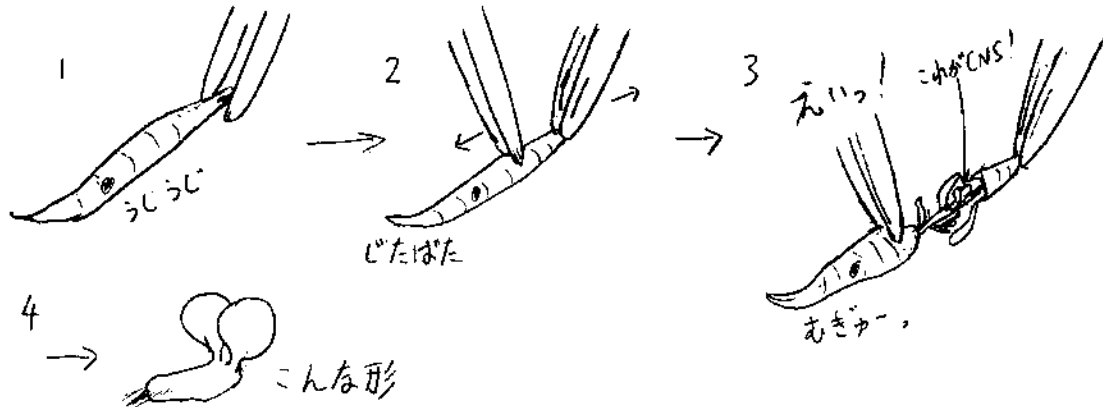
取り出した CNS は、チップの先を切って太くしたピペットマン (200ul) に PBS ごと吸って運ぶと、傷つきにくい。いちいち切るのがめんどうなら、細胞培養に売られている先太の「セル・セーバー・チップ」を使うと良い。

I 幼虫

唾腺の取り出しかたと基本的に同じである。

- 1 頭を太ピンセットでつまむ。
- 2 胴体の前から1/4くらいの所を尖ピンセットでつまみ、エイッと引っ張る。
- 3 皮がちぎれて食道～前胃、脳、唾腺などが出て来る。
- 4 脳の形をした物を見つけ、他の物をのぞく。

原基などは小さく、また他の組織もくっついていないので、ピンセットのみで容易にきれいに出来る。

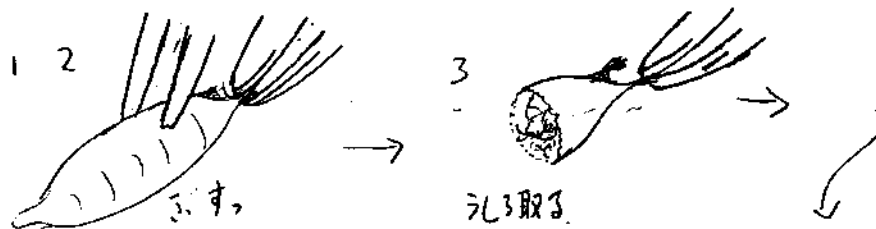


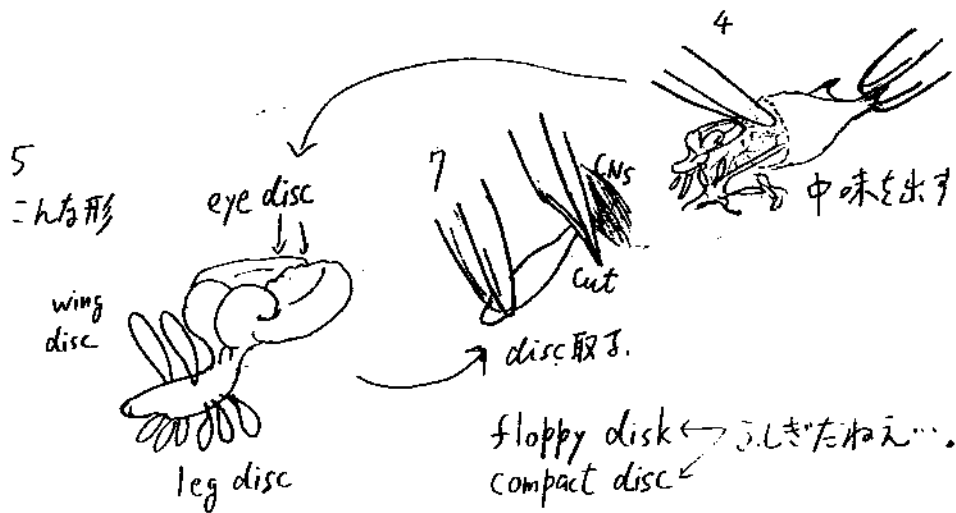
II pupation 前の蛹 (0h ~ 12h)

この時期はクチクラは一層しかない。幼虫に比べ、脂肪体が顆粒状になっていて解体時に出て来るので、少しやりにくい。また表皮が硬化していて弾力性がない。

CNS にくっついていて成虫原基が大きくなっているため、取り除くのに苦労する。

- 1 PBS 中で、蛹の頭部を太ピンセットで押える。
(尖りピンセットで押さえると、力を入れると頭の所で蛹がちぎれてしまい、あとが面倒。)
- 2 尖りピンセットを前から1/4くらいの位置の側面or背中にさす。
- 3 尖りピンセットを動かして、さした位置から後方を切断する。
- 4 残った前方1/4のクチクラの内側にピンセットをいれ、中身を順序よく取り出す。脳は比較的前の方(クチクラの奥の方)にあることが多い。
- 5 脳を見つけたら、食道、気管などをピンセットで取り除く。
- 6 太いピンセットを捨て、微小メスに持ちかえる。
- 7 脳半球の外側から前方に eye disk、胸部神経節から左右に leg disk, wing disk が出ている。これらを尖ピンセットでつまみ、CNS との境界部を微小メスで切断する。
(逆に CNS の方を持って原基を取り除こうとすると、必ず傷を付けてしまう。)



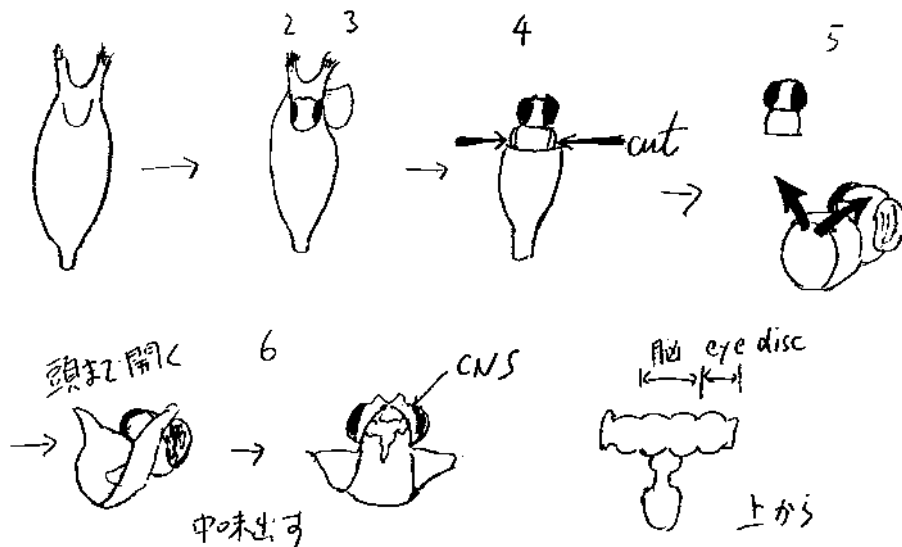


III pupation後の蛹 (12h ~ 40-50h)

この時期は囲蛹殻の下に蛹クチクラが出来ているが、まだ首は完全にくびれていない。leg disc, wing disc は外転して足、翅となり、胸部神経節とは細い神経でつながっているだけなので、CNS を取り除くときに自然に分離される。一方 eye disc は脳の前方から外側側方に移動し、脳と一体化する。

- 1 両手に尖ピンセットを持つ。
- 2 蛹の後部を押さえ、もう一方のピンセットで囲蛹殻頭部のふた opeculum を開く。
- 3 蛹との隙間にピンセットをいれ、胸のあたりまでクチクラをのぞく。
- 4 虹彩用剪刀を持ち、胸の中央で直角に体を切断する。ピンセットでむりやりちぎってもよい。
- 5 再び両手に尖りピンセットを持ち、切断部の背中中央から前を頭まで左右に開く。
- 6 ピンセットで頭の先端をシャーレーの底に押しつけて、後ろの方へしごくようにすると、断面から頭の中身が出てくる。(細い網袋に入ったミカンを底からしごいて取り出す要領。) 食道、脂肪体などを慎重にのぞくと、CNS が出て来る。
- 7 脳と胸部神経節の間が非常に細くなっているので、ちぎれないよう気をつける。
- 8 微小メスを持ち、ピンセットで付着物や原基を押さえ、CNS との境界をメスで切断する。
- 9 eye disc は脳と一体化しているが、境界は軽くくっついていて神経自体は細くなっているため、メスを差入れれば切断することが出来る。

30h 前後の CNS 表面はなぜか非常に付着性が強く、脂肪体やゴミなどがひっついてなかなかとれない。根気よく、

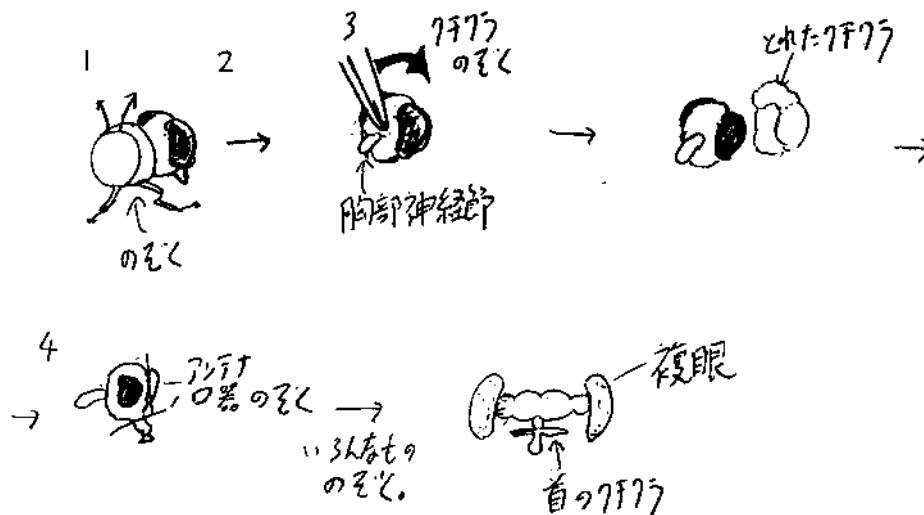


IV pupation後の蛹 ~成虫 (40-50h~)

この時期は頭部が完全に胸から独立し、首は非常に細くなっている。そのため脳と胸部神経節をつなげて取り出すのはたいへん難しい。また複眼が完成し、頭部の表皮とくっつくので、脳が頭部に固定され、簡単には取れなくなる。

CNS 全体を取り出すとき

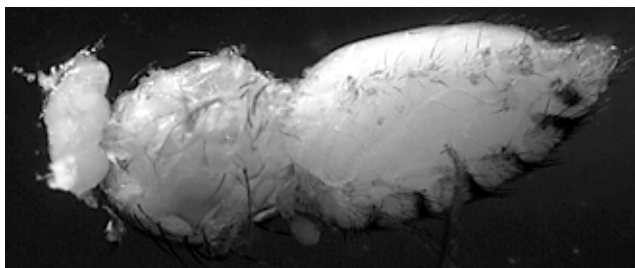
- 1 囲蛹殻をのぞき、羽や脚をピンセットでちぎり取る。
- 2 胴体を裏返し、胸の部分の下側（脚の付け根の部分）を左右に開き、その直下にある胸部神経節を露出させる。
- 3 頭後部上方（うなじ?）の所にピンセットをいれ、カツラを取るようにしてクチクラをはがす。うまくやれば頭部全体の蛹クチクラがコロッと取れる。
- 4 口器をのぞく。頭の表皮を左右に開き、脂肪体などを取り出すと、複眼の左右に付いた脳が見えて来る。
- 5 附着物を微小メスでのぞく。
- 6 首の部分はエリマキとかがけ状に表皮が残る。胸部神経節を一体で取りたいなら、これは残っても諦めた方がよい。エリマキをきれいにのぞこうとすると、たいてい胸部神経節がちぎれてしまう。ただしエリマキが大きすぎると、脳のエリマキに接した部分がうまく染まらなくなってしまう。



脳だけを染めたいとき

取り出した脳は小さくて、染色中になくしてしまうことが多い。脳だけを染めたいときは、首から下をそのままにしておいて標本の「柄」として利用し、染色終了後に切り放すと良い。

- 1 取り出した囲蛹殻をのぞき、羽や脚をピンセットでちぎり取る。
- 3 頭後部上方（うなじ?）の所にピンセットをいれ、カツラを取るようにしてクチクラをはがす。うまくやれば頭部全体の蛹クチクラがコロッと取れる。
- 4 口器をのぞく。頭の表皮を左右に開き、脂肪体などを取り出すと、複眼の左右に付いた脳が見えて来る。
- 5 頭部表皮を完全に取り去る。脳は首の部分で胴体につながっている。ちぎらないよう注意する。



頭の表皮をむいた標本、この状態で染色する。