



STEMCELL Technologies 社

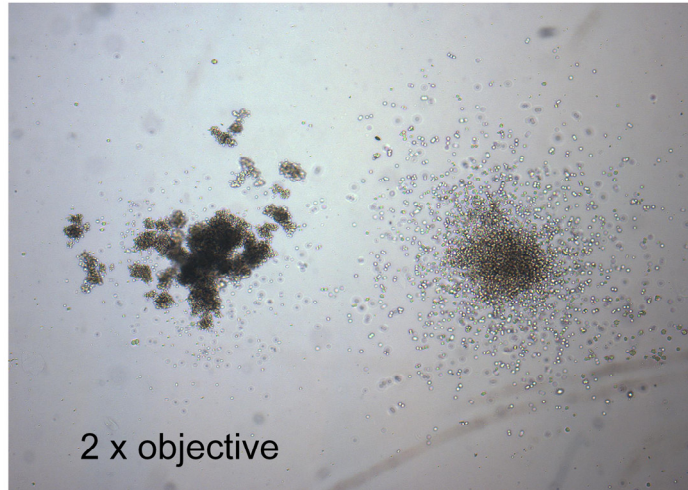
---

# Mouse MethoCult

マウス造血コロニー形成細胞アッセイの為のコロニー解説集

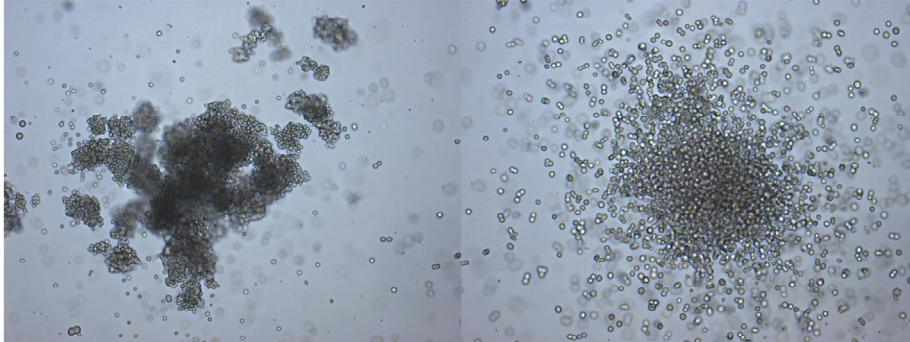


## MOUSE MYELOID IN M3434 CFU-GM: 2 colonies



異なる細胞で構成される2種類のコロニーがあります。これら2つは、メチルセルロース培地で培養したmyeloid progenitor cellで、10日以上分裂、分化した大変大きなコロニーです。これは、顕微鏡の2 X 対物レンズからの像です。

## MOUSE MYELOID IN M3434 CFU-GM



CFU-G

4 x objective

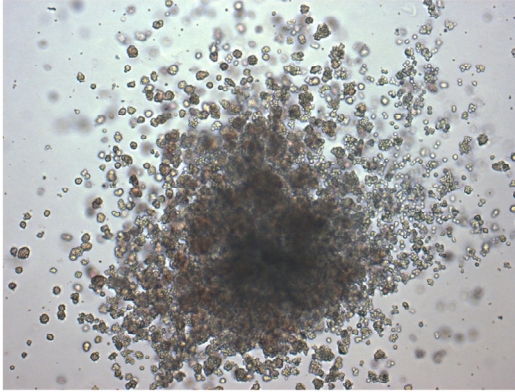
CFU-M

スライド1と同じ2つのコロニーを4 X 対物レンズで観察した像です。各コロニー中の細胞が均質である事を確認できます。これらは、両方ともmyeloidコロニーです。myeloidコロニーを構成する細胞は、透明で、明確な膜を持ち、焦点を上下すると輝いて見えます。左側のコロニーは、右のコロニーよりもやや小さい細胞で、構成されています。左側のコロニー中の細胞は、右のコロニー中の細胞より密集しています。左のコロニーは、成熟した顆粒球(CFU-G)で構成され、密に詰まったクラスターとして成長する傾向がありますが、右のコロニーでは細胞は、大きく、成熟したマクロファージになります(CFU-M)。CFU-Mコロニーの細胞は、広がったように見えることがよくあります。

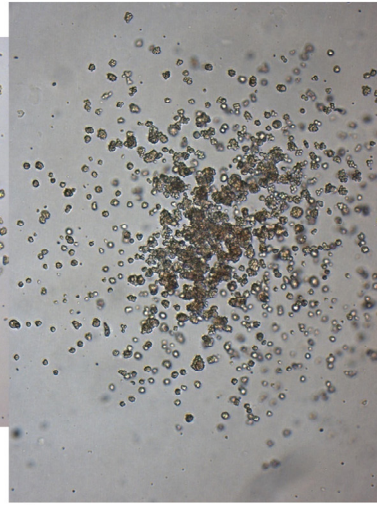


## MOUSE ERYTHROID IN 3434

4 x objective



Large Immature BFU-E

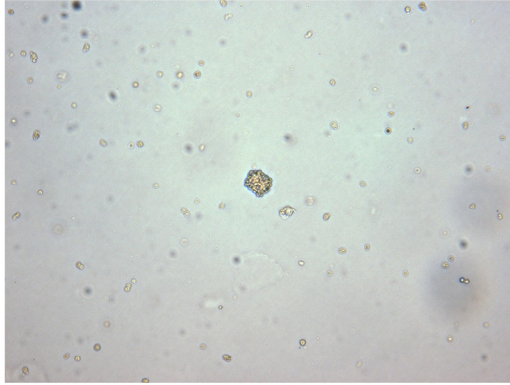


Smaller mature BFU-E

4 x objective

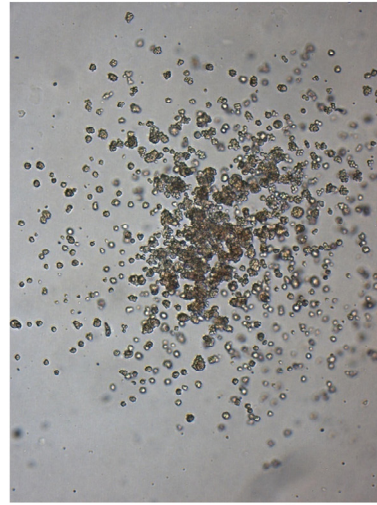
このコロニー中の細胞は前のスライドの細胞と大変異なっています。これらの写真は、4 X 対物レンズで撮ったもので、個々の細胞を見ると不規則な形であり、シングルセルではありません。それらの小さい細胞からなるクラスターは袋に包まれたように見えます。それぞれの細胞は、10 X 対物レンズを使っても個々の細胞を識別することはできません。また、それらはmyeloid cellと異なり、焦点を上下しても識別可能な膜はなく、輝きもありません。これらは、erythroid cellです。Erythroid cellは、赤血球系の分化経路を経て分化し、ヘモグロビンも発現します。顕微鏡下で、このヘモグロビン発現は、赤色のコロニーとして観察されます。左のコロニーと右のコロニーではコロニーの大きさが違います。左のコロニーは、分裂および分化の為のより大きなポテンシャルを有した早期前駆細胞由来であるため、大きいコロニーとなっています。右側のコロニーは、分裂および分化するポテンシャルが小さい後期のerythroid progenitor由来であり、一般的に小さなコロニーとなります。

## MOUSE CFU-E IN M3334 VS BFU-E IN M3434



CFU-E in M3334 20X Objective

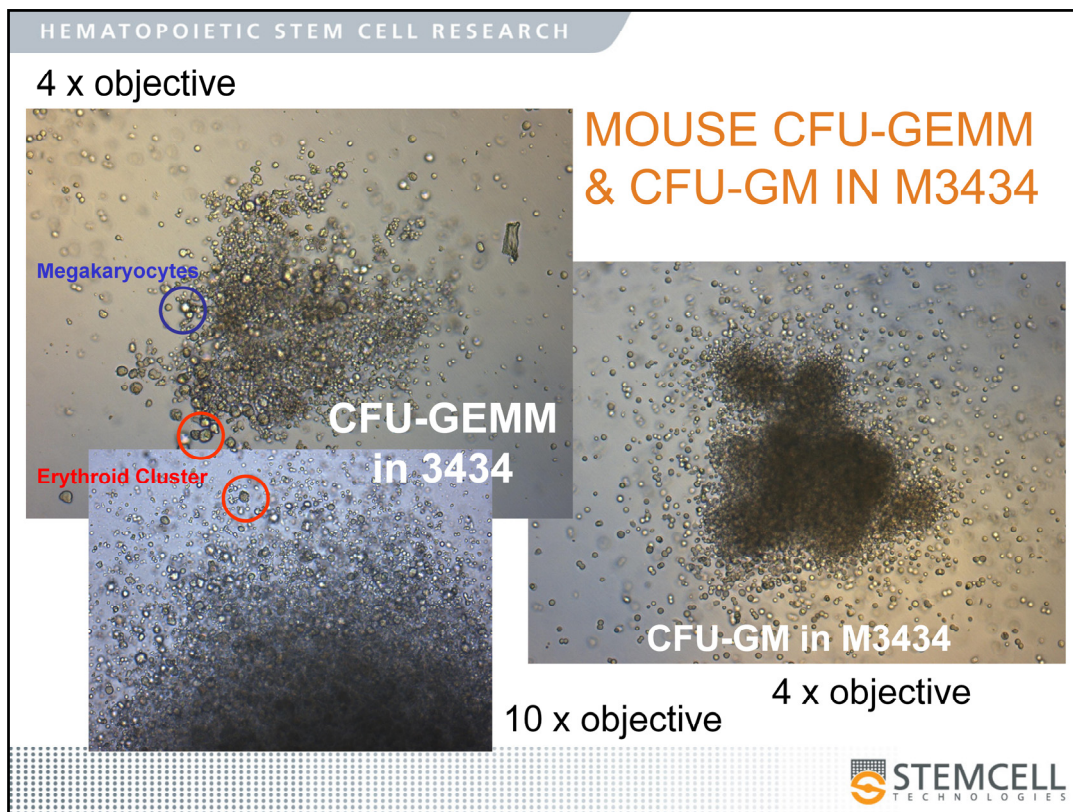
After 48 hours



BFU-E in M3434 4 X Objective

After 10 days

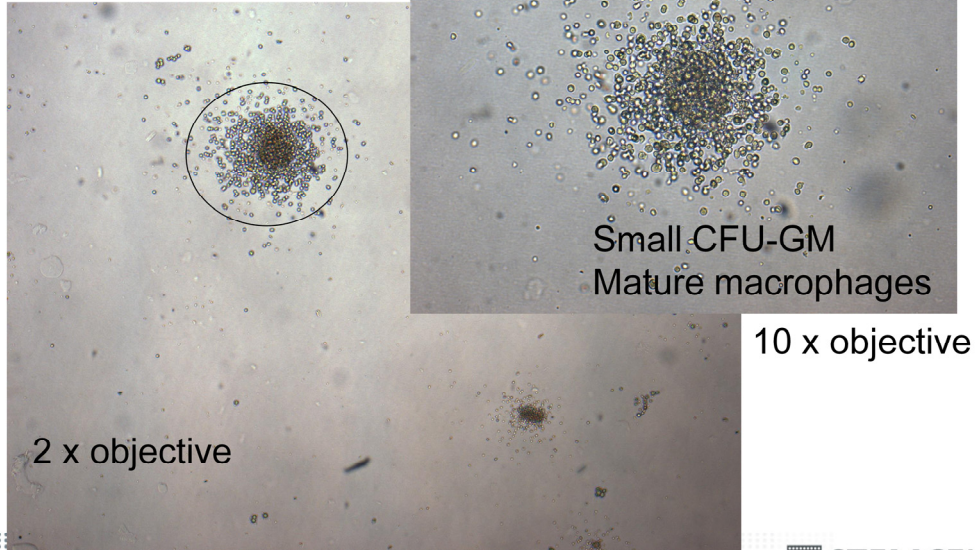
成熟マウスerythroidコロニーの検出の為には、特異的な培地組成であるM3334がご利用いただけます。これらの成熟erythroid progenitorはCFU-Eと呼ばれます。スライドでは、増殖する為のポテンシャルが限定された後期のerythroid progenitor由来であるマウスCFU-Eコロニーを示します。このコロニーは、少なくとも8細胞が融合し、袋に包まれたように見えるたった一つのクラスターで構成されるコロニーです。これらのクラスターを見る際に焦点を上下すると、ビー玉の輝くピンクの袋のように見えます。右のコロニーの場合、BFU-Eは、多くのこのようなCFU-Eに見えるクラスターから構成されます。クラスターは、形態学的に赤血球であり、クラスター数は、コロニーをつくらることができる細胞の未分化性を定義します。特定の培地M3334を使いマウスCFU-Eを算定する為には最適な培養時間は、わずか48時間です。48時間後、袋がこじ開けられたようになくなり、それらの内容物(個々の細胞)は、区別するのが難しくなり、塵のように見え始めます。



スライドの左上の写真は、4 X 対物レンズを使って見える大変不均一なコロニーを示しています。このコロニーは、myeloidおよびerythroid発生の為の最適なサイトラインを含む完全培地で10日間成長させました。これに対し、右のコロニーは均一に見えます。右のコロニーを近くでよく見ると、それは、myeloid cellだけで構成されています(myeloid cellsは小さいGranulocytesと大きいmacrophageの2サイズあります)。また、左のコロニーは、多くの異なる細胞サイズの複雑なミックスになっています。左のコロニーは、実際に多くの異なる細胞サイズおよび種を含むことから、CFU- GEMMと同定され、いくつかの非常に大きい石鹼の気泡に見える細胞も含んでいます。これらの細胞は、巨核球です。CFU- GEMMコロニーは全ての細胞種(顆粒球、マクロファージ、赤血球、巨核球)を含みます。このコロニーは、培地中で増殖・分化がさかんで多くのポテンシャルがあり、すべての細胞に分化する可能性がある前駆細胞に由来したということです。マウスCFU-GEMM (特に骨髄由来) の別の性質としては、典型的なerythroidのクラスターを見つけることができるものの、コロニーに占める割合が大きくないということがあります。ほとんどのコロニーはmyeloidから構成されます。下のパネルは、CFU-GEMMを拡大した像です。一般的にGEMMは高い増殖能や分化能を伴った最も未分化な前駆細胞であるため、プレート上で最も大きなコロニーとして観察されます。さまざまな細胞サイズを見ることができ、erythroidのクラスターと同様に、大きな泡のような細胞も観察できます。

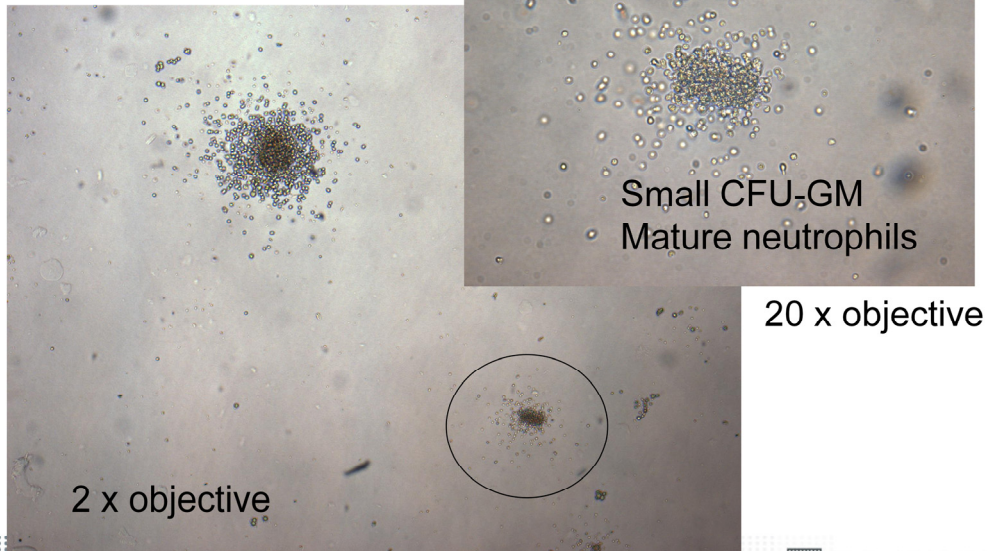


## 2 COLONIES IN M3434 DAY 8



CFU-GMコロニーですが先ほどより小さなコロニーとして観察されています。対物2Xで観察したCFU-GM progenitor後期の例であり、2つのコロニーのうち、上のコロニーを丸で囲んであります。丸で囲んだコロニーはCFU-GMで、ほとんどがマクロファージから構成されており、10×で観察した場合に識別可能です。

## 2 COLONIES IN M3434 DAY 8

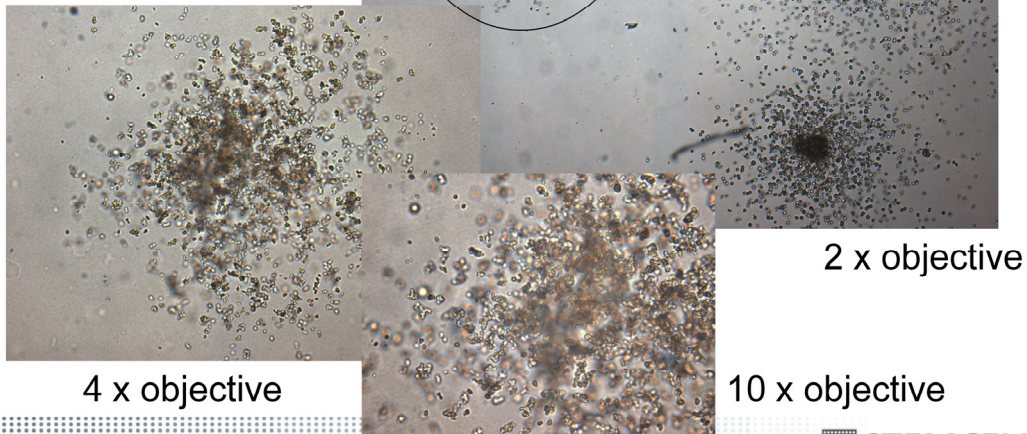


 **STEMCELL**  
TECHNOLOGIES

前のスライドと同じ画像ですが、右下にある小さい方のコロニーを丸で囲っています。このコロニーもCFU-GMではありますが、より小さな細胞 (granulocyte) から構成されます。コロニーと判定するには十分な数の細胞を含むクラスターです。コロニーと判定する基準は、少なくとも40個の細胞から構成されている必要があります。このコロニーも細胞数を数えると、少なくとも40個の細胞が数えられることでしょう。細胞が小さいことからErythroidのコロニーと混同するかもしれませんが、細胞は融合していませんし、カプセルに包まれたようにも見えません。また、ヘモグロビン産生 (細胞が赤またはピンク色を呈す) が観察されない、という特徴が見られます。このコロニーを形成する細胞は茶色を呈しているように見えますが、これは細胞に含まれる顆粒によって、茶色く見える好中球です。コロニーを確定するために、倍率を上げてコロニー内の細胞の形態をよく観察することが大切です。

### 3 COLONIES IN M3434 DAY 8

BFU-E  
Grotty, stringy



2 x objective

4 x objective

10 x objective

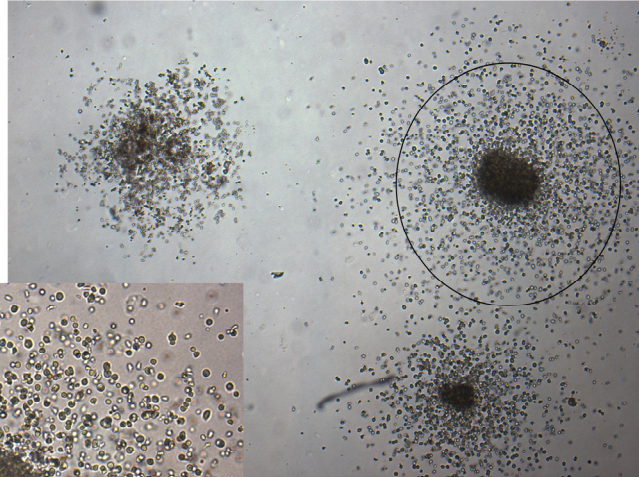
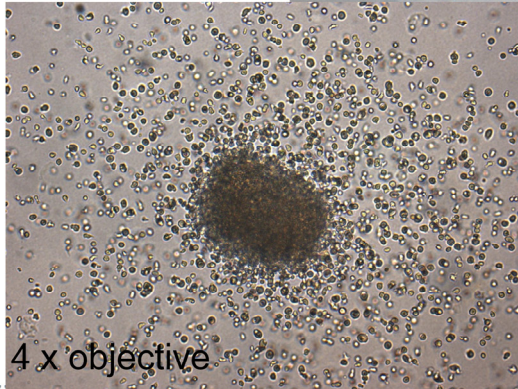


上のパネル (対物2×)では3個のコロニーが観察されます。うち1個のコロニーを丸で囲っています。このコロニーを、対物4×、10×に上げて観察しますと、明らかにmyeloidではないコロニーが見られます。それらは透明でなく、周囲が光っている丸い細胞ではありません。むしろ小さな細胞が固まって、かつ赤っぽく見えます。このコロニーは「ビー玉が詰まった袋」の形状ではありませんが、erythroidです。すべてのerythroidが「ビー玉が詰まった袋」状になっているとは限らず、線維状であったり、「みずぼらしい」形になったりします。その原因として、erythroidが成熟する時に低湿度にさらされたことが挙げられます。Erythroid細胞は「水と脂肪分が入った袋」状になっていますが、インキュベーター内や部屋の湿度が低くなると写真のような線維状になってしまいます。細胞をより高倍率で観察すれば、erythroidの形態がより分かりやすく見えることでしょう。Erythroid progenitorのコロニー形態は、myeloidコロニーと比べて異なっています—myeloidコロニーは大抵左右対称ですが、erythroidコロニーはまばらに観察され、かつ決まった形がありません。



### 3 COLONIES IN M3434 DAY 8

CFU-GM

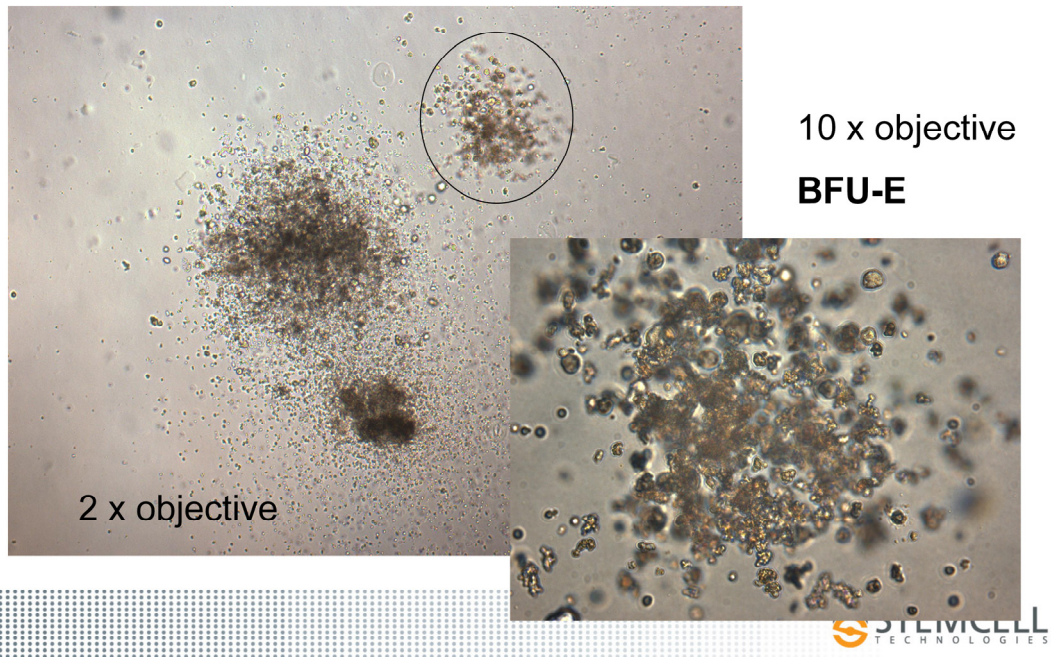


2 x objective

4 x objective

対物2×の写真ですが、大きなmyeloidコロニーが観察できます。同じコロニーを対物4×で観察しますと、明らかにmyeloidであることが確認できます—細胞が大きく、前のスライドと比較してコロニーの形態が左右対称です。「光の輪が密集した塊を囲んでいる」様な、myeloidに典型的な形をしています。

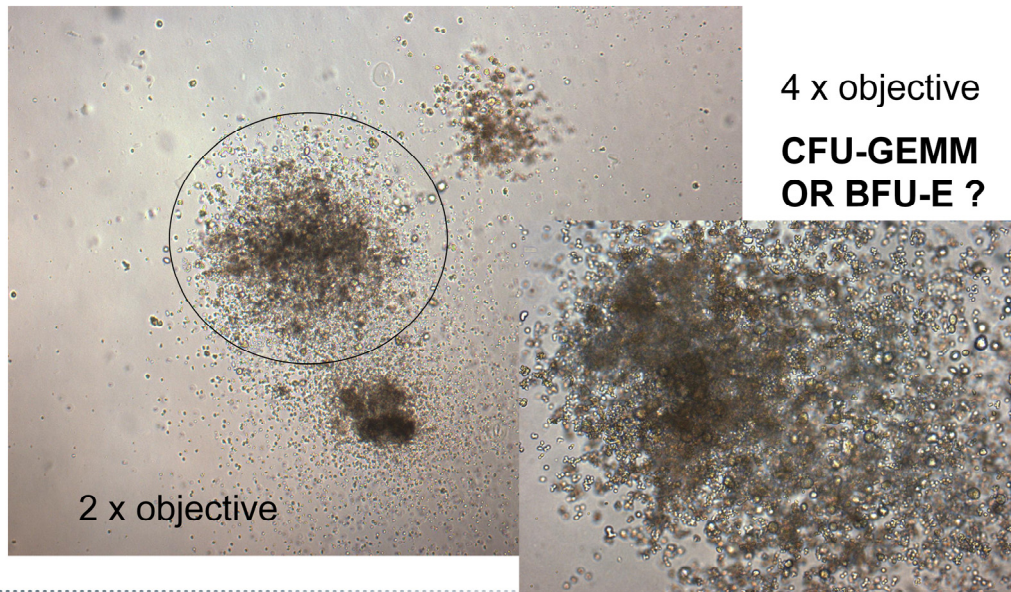
### 3 COLONIES IN M3434 DAY 8



3個のコロニーが観察されます。右上にある丸で囲まれたコロニーに注目しましょう。これはerythroidコロニーです。このコロニーは小さくて、progenitorの後期であることが分かります。このコロニーを対物10×で観察しますと、細胞は赤色を帯び、細胞ひとつひとつが区別しにくいことが分かります。



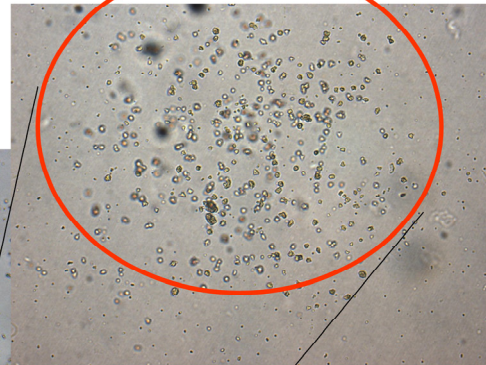
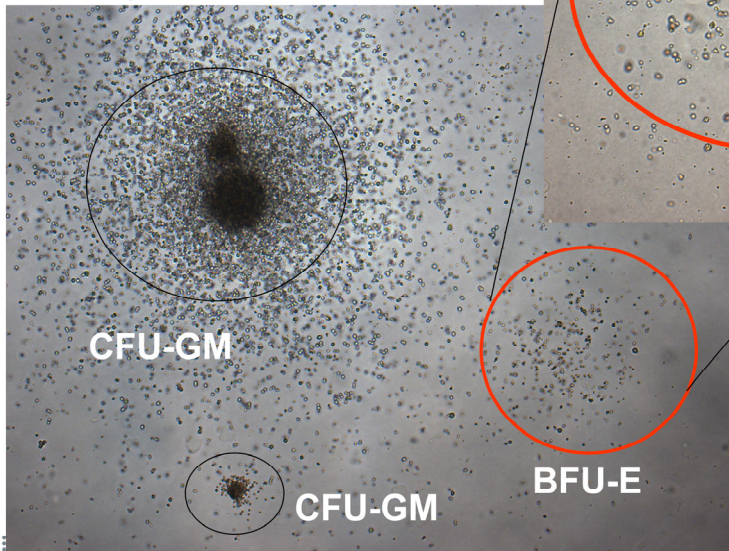
## 3 COLONIES IN M3434 DAY 8



前のスライドと同じものですが真中にあるコロニーが丸く囲まれています。下部にある丸で囲まれていないコロニーはCFU-GMです。丸く囲まれているコロニーを高倍率で見ると、ほとんどの細胞がErythroidの形態で、他にMacrophageかmegakaryocytesであろう透明で大きな細胞が多々見られます。しばしば(得にmiceでは) erythroidコロニーの周辺でコンタミしたようなmyeloid細胞を見かけることがあります。もしコロニーのほとんどがerythroid細胞だとすると、そのコロニーはerythroidのprogenitorであり、CFU-GEMMコロニーの場合は、erythroid clusterを含みますがほとんどがmyeloidになります。したがってこのコロニーはCFU-GEMMではありません。また、myeloid細胞がmegakaryocyteであるとするとMix Mk/BFU-E Progenitorコロニーの可能性も考えられます。文献でも示唆されているように、megakaryocytesとerythroid細胞に共通なProgenitorがあり、これらは未熟なのでこのコロニーのように大きいコロニーになると予測されます。今回これらの細胞を培養した培地はMethocult M3434でerythroidとmyeloidのprogenitorに最適な組成条件であり、megakaryocytesはあまり観察されません。Megakaryocytesが生育するためには、無血清で異なるサイトカンを追加した培地条件にする必要があります。StemCell technologiesではMegakaryocytesの生育のために最適化された血清を含まないコラーゲンベースの培地を用意しています。コラーゲンベースのシステムでは、脱水、固定、染色を行うことによりCFU-Mkコロニーを形成する細胞の識別が可能です。

## BM M3434 DAY 8

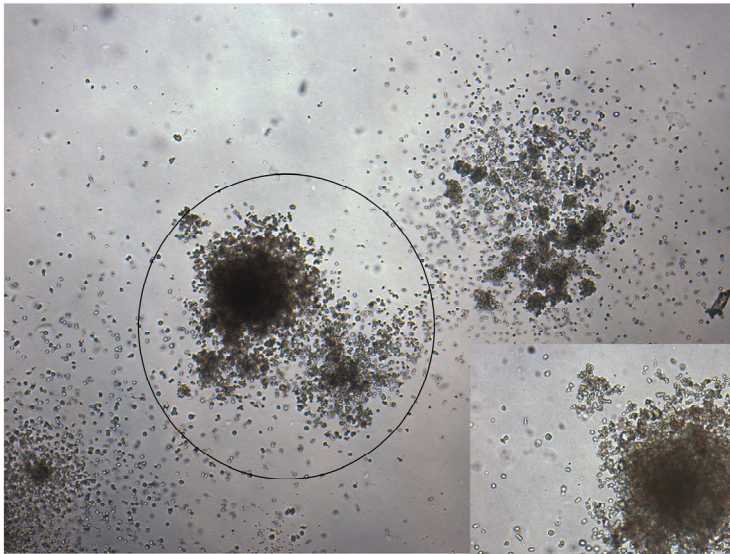
2 x objective

Mature BFUE  
10 x objective

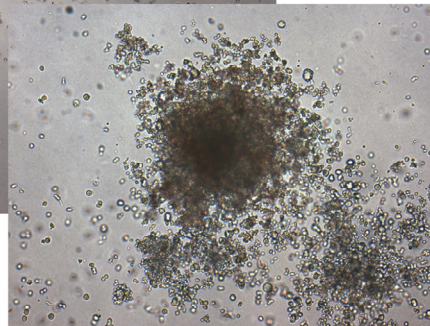
The logo for STEMCELL TECHNOLOGIES, featuring a stylized 'S' icon and the company name.

このスライドはerythroidとmyeloid細胞両方の成長に最適な培地中で多く観察されるerythroidコロニーの例です。大きいコロニーはmyeloid CFU-GMで下部に見える細胞のクラスターは後期のerythroid progenitorであり、分化や増殖の可能性はかぎられています。これを10X objectiveで見ると、erythroidのクラスターが見られてそれらの細胞数が40以上であればそれをerythroidコロニーとします。(それぞれのクラスターを8細胞とすると4~5個のクラスターがあれば十分です)早い時点での細胞のカウンティング(9日目)がBFU-Eのコロニーを見る際にはよいでしょう。カウンティングの時期を逃してしまうと大きいmyeloidコロニーによって隠れてしまうことがあります。

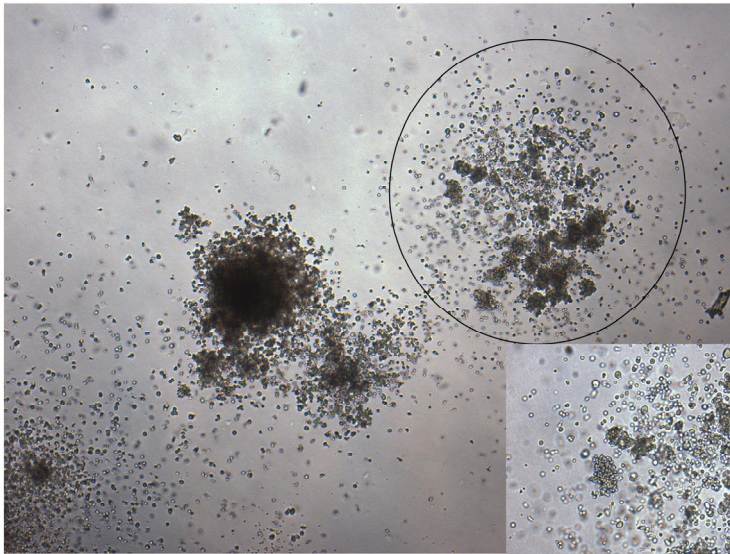


BM M3434  
DAY 84 x objective  
BFU-E

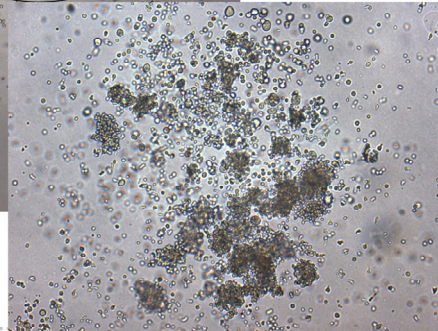
2 x objective



マウスの培養でとても珍しいコンパクトで密集した赤いBFU-Eが見られます。通常のマウスの培養でBFU-Eコロニーは見た目が低密度なのですが、ディッシュ中に1つか2つは大きく密なものがあります。高倍率でみるとerythroidの特徴がみられ、個々の細胞を区別することはできず、赤く見えます。

BM M3434  
DAY 84 x objective  
CFU-GM

2 x objective

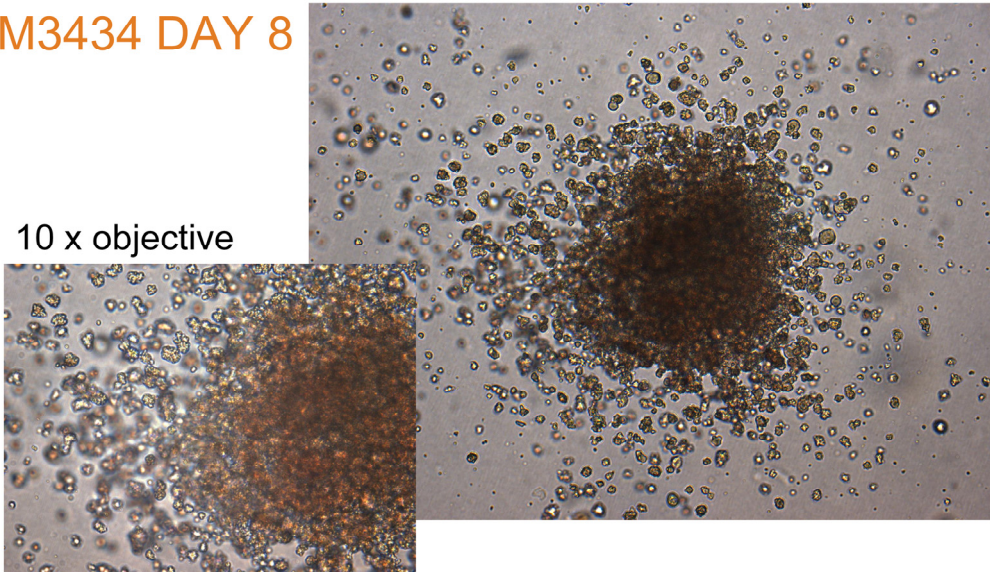
STEMCELL  
TECHNOLOGIES

このスライドのもう片方のコロニーはmyeloidです。4Xで見た時、クラスターがありますがコロニーは個々の細胞がはっきり区別できます。細胞はerythroidの形態ではありません(細胞は融合しておらず、ビー玉の入った袋のような見た目ではありません)。細胞の茶色は細胞内の顆粒によるものです。

**SPLEEN BFU-E  
M3434 DAY 8**

4 x objective

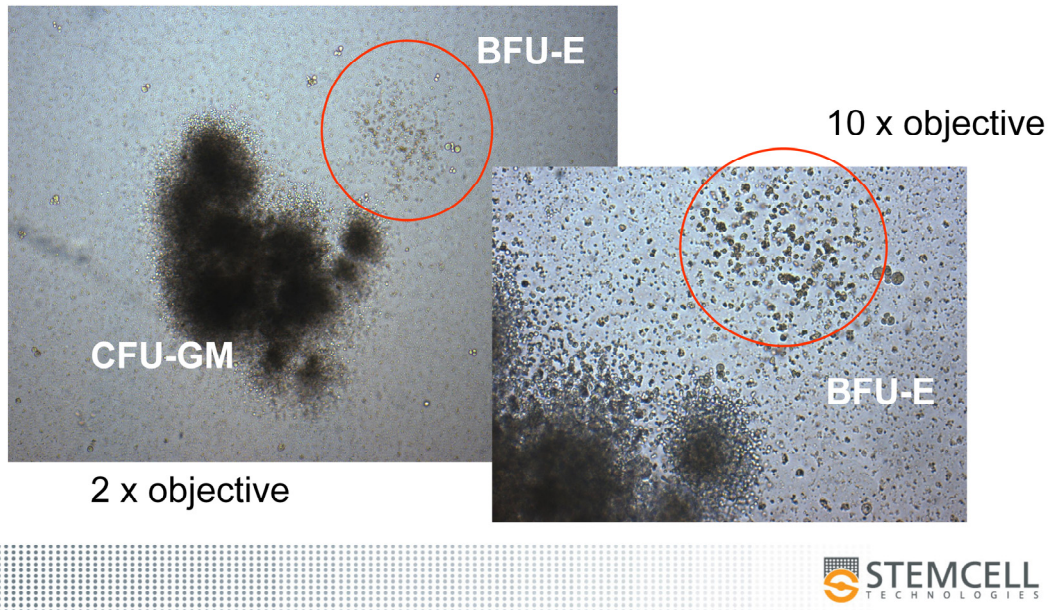
10 x objective



BMIはCFCが見つかる唯一の場所ではありません。このスライドでは脾臓によく見つかる未熟なBFU-Eを示しています。脾臓で見つかるCFCの頻度はBM細胞よりも少ないのですが、脾臓ではerythroid progenitorが多く見られ、myeloid progenitorの出現率は低くなります。この写真ではとてもはっきりしたerythroidの形態を見ることができ、小さい細胞が融合したビー玉の入った袋のような形態が確認できます。クラスターの中の細胞は赤く、コロニーの密に詰まった中心からこのコロニーは初期のprogenitorであると言えます。

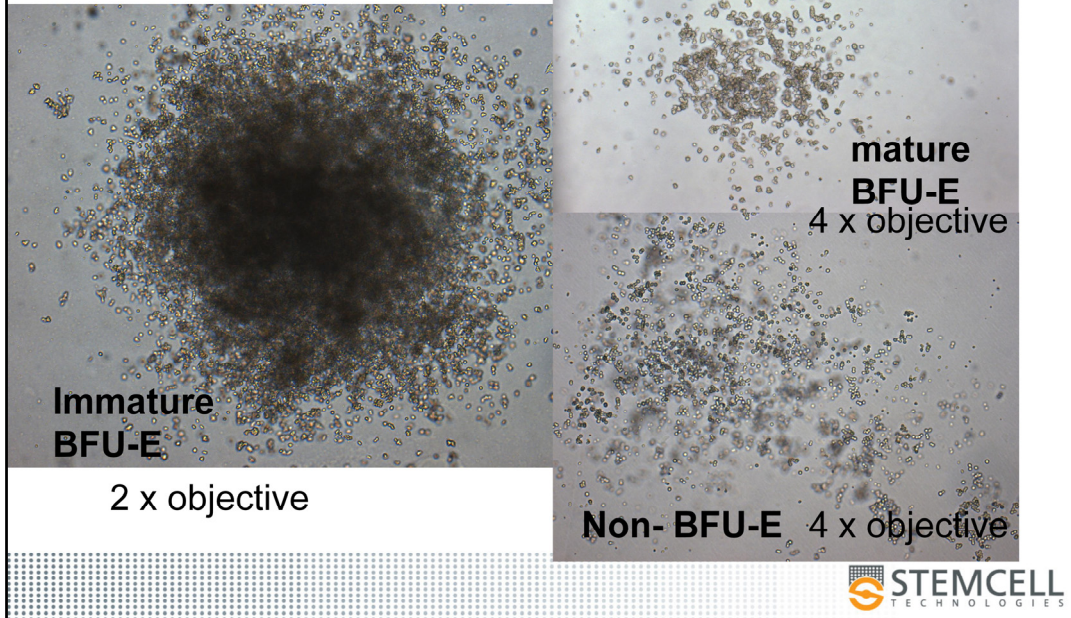


## MATURE BFU-E AND CFU-GM M3434 FROM MOUSE PB



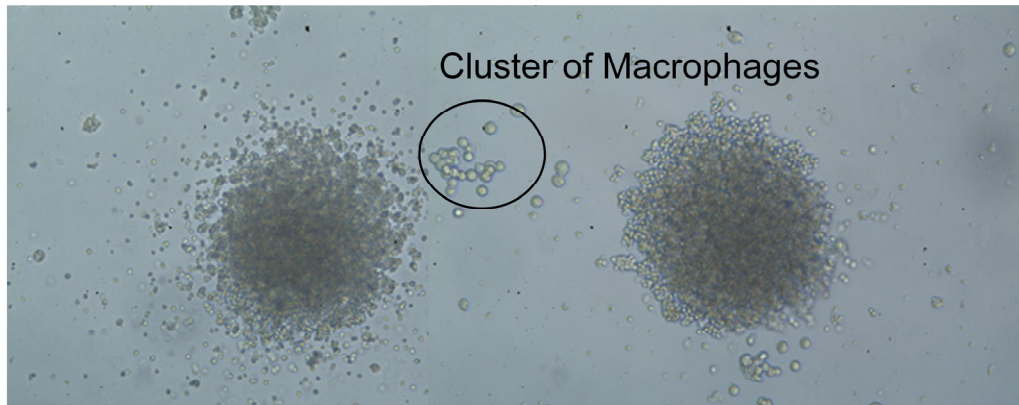
RBCを破壊したマウスのPBをプレーティングすることによってもCFCを観察することができます。大きく未熟なCFU-GMが見え、その右に少数のerythroidクラスターで構成される後期のBFUEが見えます。バックグラウンドにある斑点のようなものはRBCを溶血した残骸で、PBを使った培養に典型的なものです。

## MOUSE ERYTHROID IN M3436



erythroid progenitor由来のコロニーです。培地はerythroid progenitor生育のために特別にデザインされた組成のものを使用しています。M3436を使用した場合、60-80のコロニーを1 dishに得るためには、M3434と比較してより多くのBM細胞をプレートする必要があります。この培地は、myeloid progenitorは生育せず、erythroid progenitorの増殖が促進されるようにデザインされています。初期のerythroid progenitorの成長が促進され、増殖、分化およびヘモグロビン発現が促進されます。M3436中においては未成熟のBFUEは、ここで見られるように対物2xで大きく赤く観察されます。成熟した小さなBFUEも右側のスライド上の対物4xで典型的なerythroid形態が観察されています。Myeloidに見える細胞由来のコロニーも下のパネルにおいて4xで観察されていますが、これらは通常10%以下です。本培地においてerythroidとして確認できないコロニーについてはnon-BFUEとしてスコアリングします。

## PRE-B PROGENITORS IN M3630

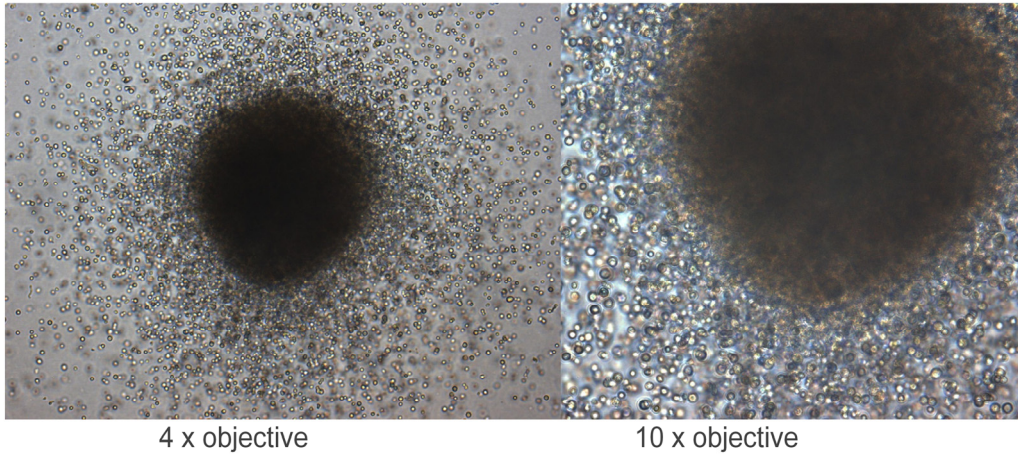


4 x objective

Lymphoid cellとくにB cell progenitorの培養のために最適化されたメソカルト組成におけるマウスprogenitorです。この組成はmyeloidサイトカインを含んでおらず、IL-7だけを含みます。得られるコロニーはとても小さな細胞から構成されており、それらはミエロイド細胞の外観に特徴的なように透明であり、個々の細胞を見分けられるはっきりした膜を有しています。Pre-B progenitor由来のコロニーは2つの一般的なフェノタイプがあります。それらは右に見られるように密接した球状をしているか、コロニーの端側の細胞がコロニーから飛び散ったように見られるコロニーのどちらかです。両方ともpre-Bコロニーであり、これらのコロニーを構成する細胞は小さく、コロニーは均一です。中央にはいくつかの大きめの細胞を見ることができます。それらはprogenitor由来のコロニーとするには不十分ですが、実際にはこれらのクラスターはマクロファージであり、成熟細胞として小さなグループでクラスターを形成します。マクロファージはしばしばマウスCFCのクラスターにコンタミします。それらはコロニーとしてカウントする必要はありませんが、多量のサイトカインを自ら産生するため、血清を含む培地中でしばしば生存します。



## Mouse 3434 Day 9 BM CFU-GM

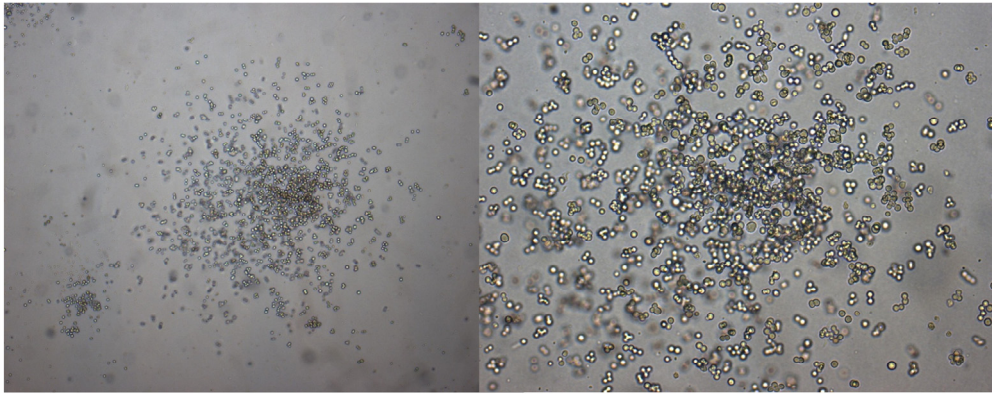


4 x objective

10 x objective

CFU-GMコロニーです。成熟した透明なミエロイド細胞で構成されています。膜がくつきりとしており外観が光って見えます。コロニーの中央は密集していますが、焦点を上下させることによりシングルセルを確認することができます。

## Mouse 3434 Day 9 BM CFU-GM

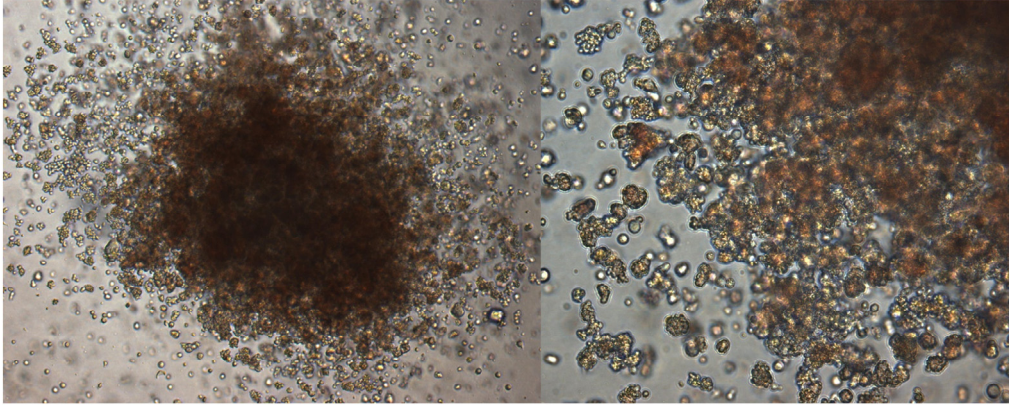


4 x objective

10 x objective

CFU-GMコロニーです。周囲に広がった大きな透明の細胞で構成されています。このコロニーを形成した前駆細胞は後期のprogenitorであり、ポテンシャルは限られています。そのため増殖する能力が低く、結果として小さなコロニーとなりますが、細胞数は40個以上あります。

## Mouse 3434 Day 9 BM BFU-E



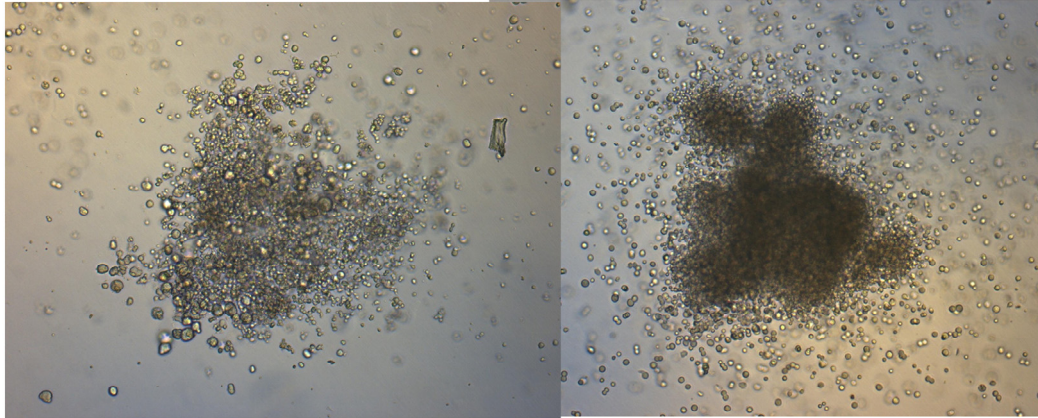
4 x objective

20 x objective

大きなBFU-Eコロニーです。かなり未成熟なprogenitor由来であり、erythroidに特徴的な形態をしています。細胞はとても小さく、融合しており、シングルセルを識別することが困難です。ヘモグロビンの出現により赤色になっています。



## Mouse 3434 Day 10 BM CFU-GEMM (left) and CFU-GM (right)

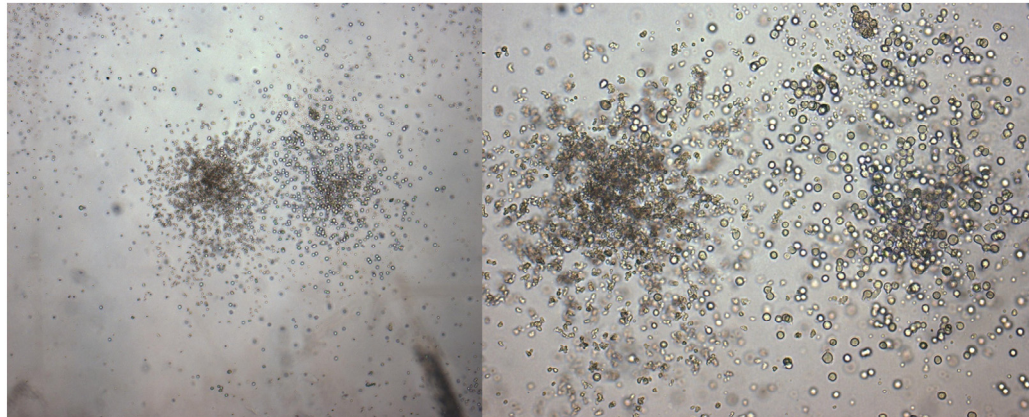


4 x objective

4 x objective

左側がCFU-GEMMコロニーで右側がCFU-GMコロニーです。これらのコロニーは同じような形状をしていますが、コロニー内の細胞が異なります。CFU-GMコロニー内の細胞は典型的なmyeloid細胞であり2サイズの同種な透明細胞からなります。左側のCFU-GEMMコロニーは異種細胞で構成されており、2サイズ以上の透明な細胞、いくつかの大きなsoapy bubbles、少数のerythroidクラスターを見ることができます。

## Mouse 3434 Day 11 BM BFU-E (left) plus CFU-GM (right)

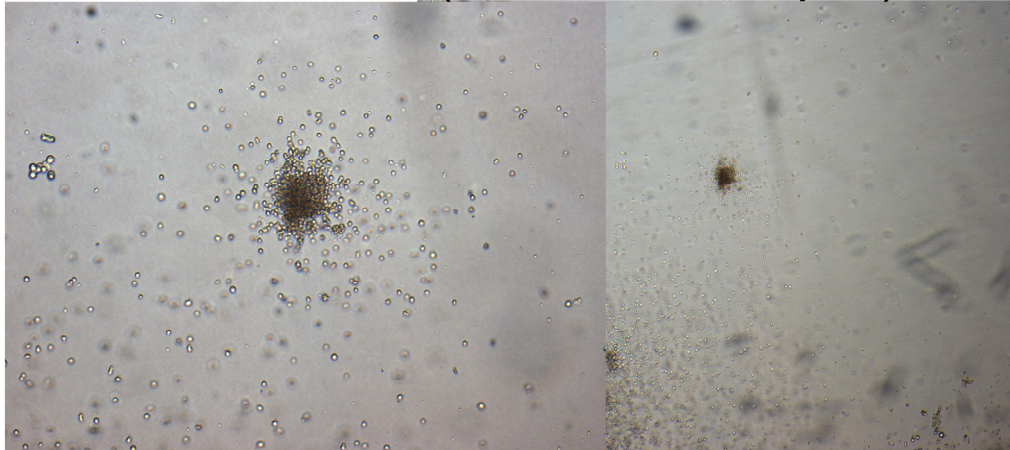


4 x objective

10 x objective

左側にはerythroidコロニー、右側にはmyeloidコロニーが観察されます。これらのサイズは小さくて似ており、後期のprogenitor由来です。しかし、コロニー内の細胞は異なっており、CFU-GMコロニー内にはとても大きな透明の細胞が見られます。小さくて融合した赤みがかかった細胞はBFU-Eで観察されます。

## Mouse 3434 Day 11 BM CFU-GM (Mature Neutrophil)

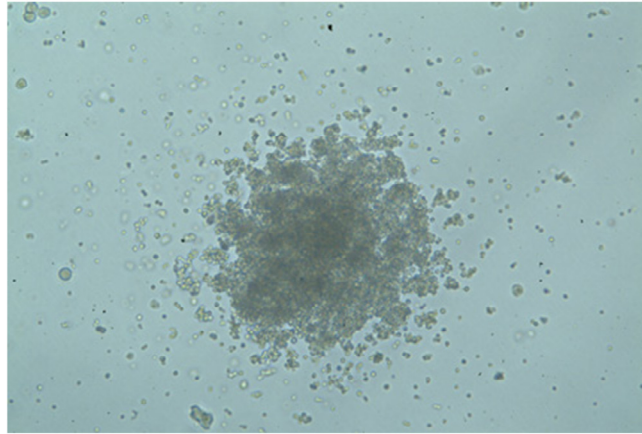


10 x objective

4 x objective

これは、小さな成熟CFU-GMコロニーです。細胞は成熟した好中球であり、成熟細胞内の顆粒により茶色がかった色をしています。

## Mouse 3630 Day 7 BM CFU-Pre-B

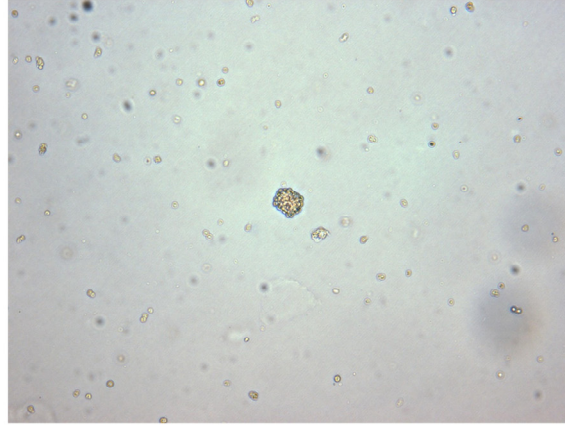


- 10 X objective

M3630培地は特殊なサイトカイン組成によりpre-Bコロニーだけを観察することが可能です。このコロニーは、とても小さな透明の細胞から構成されており、対称的で40以上の細胞を含んでいます。



## Mouse 3334 48 hours BM CFU-E

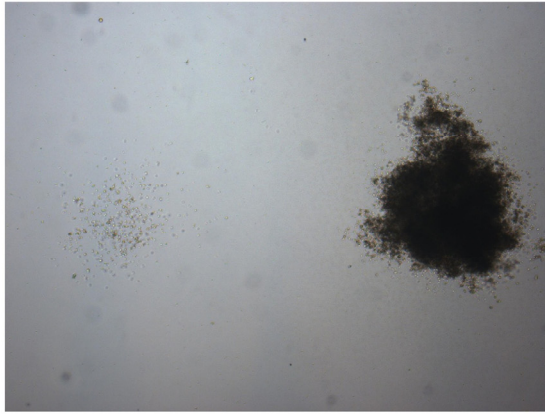


20 X objective

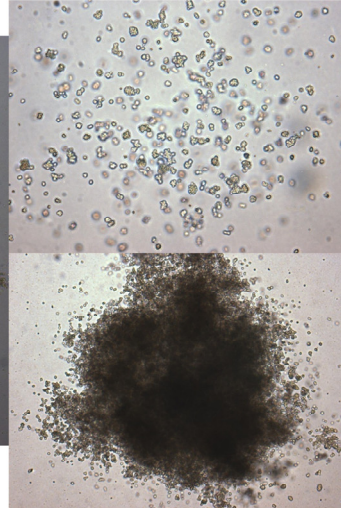
M3334培地は特殊なサイトカイン組成により48時間後にはCFU-Eコロニーだけを観察することが可能です。erythroid細胞に特徴づけられる一つの小さな細胞クラスターです。シングルセルを見ることは非常に困難で、細胞同士が融合しているように見えます。また、輝いている袋に包まれているように見えます。



## Mouse 3436 Day 12 BFU-E (mature on left, immature on right)



4 x objective



10 x objective

左側のコロニーは成熟したBFU-Eで右が未成熟のBFU-Eです。M3436培地では観察されるコロニーはほとんどがerythroidコロニーです。後期のprogenitorの形状はより典型的なerythroidであり、融合した小さな細胞です。未成熟のprogenitorは大きく赤色をしています。





VERITAS

日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14  
住友東新橋ビル3号館5階  
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076  
E-mail: veritas@veritastk.co.jp  
<http://www.veritastk.co.jp/>

RSTH-3029  
(1003000)V