

# 牛精子DNA量の蛍光測定におけるPost-irradiationの効果

森 英紀・臼井真澄・柏原孝夫

精子DNAは雄動物における遺伝情報の伝達物質として受精現象に直接関与する成分と考えられており、受精能力の正常な精子と異常な精子の判別の必要性が認められている<sup>1)</sup>。しかし通常の顕微鏡下での形態学的検査から判定することは困難である。

顕微測光法による精子DNA量の測定は、Leuchtenbergerら<sup>2), 3)</sup>が人精子DNA量の測定に用いて以来、精液性状との関係、受精能力との関係などに応用されている<sup>4-9)</sup>。これらの報告では精子の状態によりDNA量の減少や増加が認められているが、フォルゲン染色を用いた透過測光法のため、フォルゲンDNA量の変異が比較的大きいことが指摘されている。このため顕微測光法による細胞内微量成分の定量には、目的とする物質の量を蛍光量として測定する蛍光測光法が用いられている<sup>10-14)</sup>。蛍光測光法では測定する物質が細胞内で不均一な分布をしていても蛍光量に差が生じないため、測定時の分布誤差も少ないと考えられている<sup>15)</sup>。しかし細胞核DNA量の蛍光測定にはアクリジン系色素や塩基性フクシンが用いられているが、一般に蛍光の減衰が早いいため、測定条件により同一標本内でも蛍光量に変異が認められている。このためFujita and Fukuda<sup>13)</sup>は、測定時の蛍光を安定させる方法としてpost-irradiationについて検討している。post-irradiationは染色後その蛍光色素に特異的な励起光で照射し、急速に減衰する蛍光成分を除き、安定なものだけを残す方法として注目されている<sup>15)</sup>。

本研究は前報<sup>16)</sup>に続きアクリジン系色素の一つであるキナクリン・マスタードをDNA染色に用い、蛍光測光法による牛精子DNA量の測定を行う場合のpost-irradiationの効果について検討した。

## 材料及び方法

供試精液 茨城県畜産試験場にけい養中のホルスタイン種牡牛4頭から人工陰法により採取した新鮮精液を用いた。これらは全て顕微鏡検査により正常精液と判定されたものである。採取後等量の卵黄クエン酸ソーダ液にて希釈し、約10℃に保存して持ち帰った。活力および精子数を検査後、生理食塩液にて1ml当り精子5000万に希釈し、塗抹標本を作製した。精子標本は自然乾燥後熱固定(70℃, 30分間)を行い染色に用いた。

キナクリン・マスタード(以下Q・Mと略す)染色 DNA量測定においては通常フォルゲン染色(塩基性フクシン)が用いられるが、本研究ではアクリジン系色素のQ・M(SIGMA製)を用いた。精子標本をQ・M液(0.005%, pH 5.5)にて暗所で20分間染色した。次に流水下(水道水)で10分間水洗後マキルベン緩衝液中に12時間保存(4℃)しておき、測定1時間前に上記緩衝液にて封入し実験に用いた。上記の染色は山田の方法<sup>17)</sup>に従って行った。

蛍光の安定性調査 Q・M染色を用いた場合の蛍光の減衰を測定するため以下の方法を行った。まずスライド上の精子に頭部全体が入る大きさのスポット(直径12μ)を作り、蛍光強度が50ポイント付近を表示するように感度計を調整し、蛍光測定を開始した。次に励起光照射を続けたまま1分毎に5分間、10分間、15分間、20分間の4通りについて蛍光強度を計測した。さらに照射後の蛍光強度の変化を測定するため、再度感度計を50ポイント付近を表示するように調整し、1分毎に10分間蛍光強度を計測した。照射時間別の測定精子数は10個である。また励起光照射直後および照射後5分間隔で25分後まで写真撮影を行い、顕微鏡像について観察した。

post-irradiation (以下PIと略す)の方法 牛精子DNA量の測定時に行うPI処理の時間は、Q・Mの安定性調査より15分間とした。照射方法はスライド上の精子が数十個入る場所を任意に選び励起光を照射した。この場合照射域は直径約400 $\mu$ の円形であった。

DNA量の測定方法 PI処理を行った精子および無処理の精子(同一スライド上)について蛍光強度の測定を行った。方法は蛍光の安定性調査と同様に、頭部全体

が入る大きさのスポット(直径12 $\mu$ )を作り、蛍光強度が50ポイント付近を表示するように感度計を調整し、次に他の精子頭部にスポットを移動させ蛍光強度を計測した。

上記の蛍光測定にはオリンパス製マルチ測光顕微鏡装置(MMSP-RF型)を使用した。拡大は全て400倍で鏡検し、1材料につき200個の精子核について測定した。

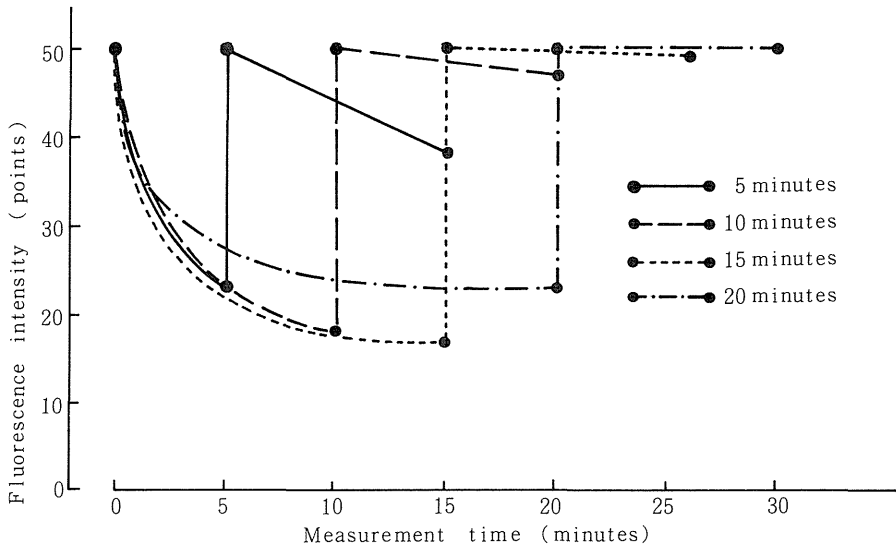


Fig. 1 Attenuation of fluorescence intensity on fluorescence microphotometry with quinacrin mustard staining. These fading curves were treated for 5 minutes irradiation (—●—), 10 minutes (—●—), 15 minutes (—●—) and 20 minutes (—●—).

### 結果および考察

#### 1. Q・M染色における蛍光強度の安定性

Q・M染色を用いた蛍光測光法による牛精子DNA量測定時のPIの至適時間を検討するため、Q・M染色後の蛍光強度の経時変化について調べた。照射時間別の蛍光強度の推移は第1図に示し、顕微鏡像は第2図に示した。5分照射区では平均50ポイントから23ポイントまで急激に減衰しており、再調整後も10分間に平均50ポイントから38ポイントまで減衰した。10分照射区では平均50ポイントから18ポイントまで減衰したが、7分以降は緩やかな減衰であった。再調整後は平均50ポイ

ントから47ポイントまで減衰した。15分照射区では平均50ポイントから17ポイントまで減衰したが、10分以降はほとんど減衰は認められなかった。再調整後は平均50ポイントから49ポイントまでと僅かの減衰であった。20分照射区では平均50ポイントから23ポイントまで減衰したが、15分照射区と同様に10分以降はほとんど減衰は認められなかった。再調整後は50ポイントを維持し、蛍光の減衰はないことが認められた。Q・M染色による精子頭部の蛍光は10分照射までは減衰の途中であるが、15分以上の照射では残った蛍光がほぼ安定なものだけであると考えられた。

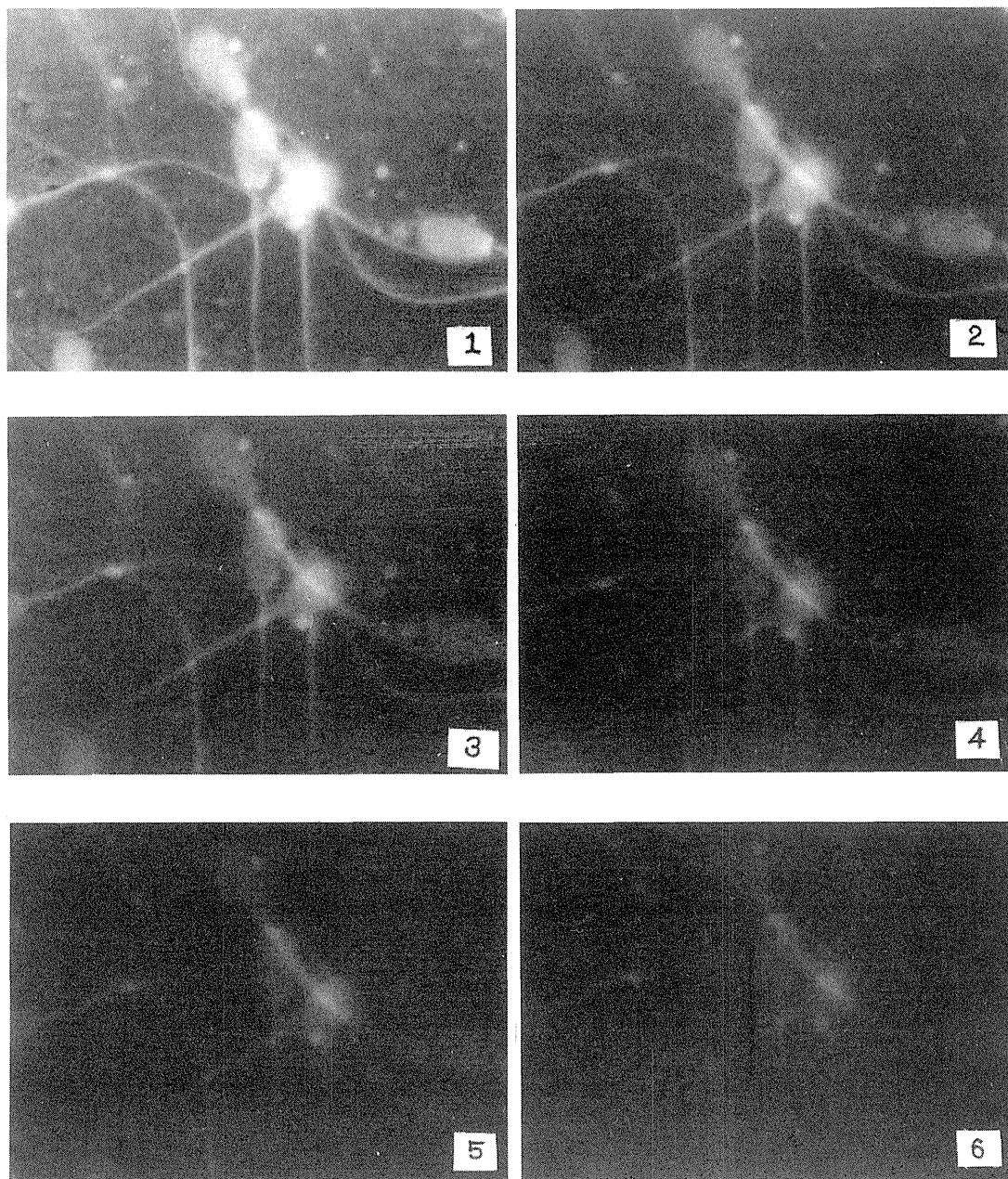


Fig. 2 Photographs showing attenuation of fluorescence intensity. ( $\times 400$ )

Bovine spermatozoa following irradiation (1), after 5 minutes irradiation (2), 10 minutes (3), 15 minutes (4), 20 minutes (5) and 25 minutes (6).

顕微鏡像により蛍光の減衰を観察すると、励起光照射直後ではバックの蛍光が観察され、全体的に明るいことが認められた。5分照射後ではバックの蛍光はまだ残存していたが、全体的に蛍光が減少したことが認められた。10分照射後ではバックの蛍光もほとんど消失し精子のみが観察された。15分照射後ではバックの蛍光も消失し精子のみが観察されたが、精子自体の蛍光もだいぶ減少することが認められた。20分および25分照射後では15分照射後とほぼ同様の像が観察された。Q・M染色による精子頭部の蛍光測定においては、10分間以内の照射ではバックの蛍光が測定値に影響を及ぼす可能性があることが認められ、15分間以上の照射後測定することが必要であると考えられた。

再調整前後の感度計の平均表示電圧は、5分照射区では772V-848V、10分照射区では778V-882V、15分照射区では784V-899V、20分照射区では750V-830Vであり、PI処理時間を15分間とした場合、平均115Vの電圧差を調整することが認められた。

Fujitaら<sup>10),13)</sup>はフェイルゲン染色による肝細胞DNA量の蛍光定量時におけるPIの処理時間について検討している。FujitaらによるPIの方法は本実験とは異なり特別な装置を使用しているが、無処理の測定値は20.98±1.86、10時間照射後は19.65±0.86でありバラツキが大幅に減少することが認められている。本実験においてもPI処理は目的とする物質の蛍光量は減少

するが、安定化後は照射を続けてもほとんど蛍光量が減衰しないことおよびバックグラウンドの蛍光がほぼ消失することが効果として確認された。しかしQ・M染色を用いた場合のPI処理の方法が、他のDNA染色による蛍光測定に応用できる可能性については、検討の必要があると考えられた。

## 2. 蛍光測定による蛍光強度の分布

Q・M染色を用いた蛍光測定法による蛍光強度の分布を、PI処理を行った精子と無処理の精子について比較した。4例の蛍光強度の分布は第3図に示した。分布は2ポイントきざみで左側に無処理(A, B, C, D)を、右側にPI処理を行った場合(A', B', C', D')を示してある。また材料精液の性状および平均測定値は第1表に示した通りである。平均蛍光強度は無処理の場合、A=58.8±6.72, B=60.23±10.21, C=52.8±5.34, D=50.2±6.28であった。4例共蛍光強度にバラツキが大きく、測定値も40ポイントから80ポイントまで幅広く分布していた。ヒストグラムの型も山が数ヶ所認められる分布であり、4例間で一定の傾向は認められなかった。PI処理を行った場合では、A'=55.3±4.97, B'=46.8±3.75, C'=44.7±4.03, D'=43.0±6.07であった。D'を除き3例で測定値は40ポイントから70ポイントまでの分布となり、蛍光強度のバラツキが小さくなったことが認められた。ヒストグラムの型もD'を除き山が一ヶ所だけの分布となり、三例間でほぼ一致した分

Table. 1 Fluorescence intensity of bovine spermatozoa DNA on fluorescence microphotometry by quinacrin mustard staining

Semen	Sperm concentration (10 <sup>8</sup> /ml)	Motility of Sperm	Fluorescence intensity (points)	
			non post-irradiation	post-irradiation <sup>※</sup>
			Mean ± S.D.	Mean ± S.D.
A	14.8	### 60	58.8 ± 6.72	55.3 ± 4.97
B	8.0	## 65	60.2 ± 10.21	46.8 ± 3.75
C	5.8	## 60	52.8 ± 5.34	44.7 ± 4.03
D	9.5	### 80	50.2 ± 6.28	43.0 ± 6.07

※ Treated for 15 minutes.

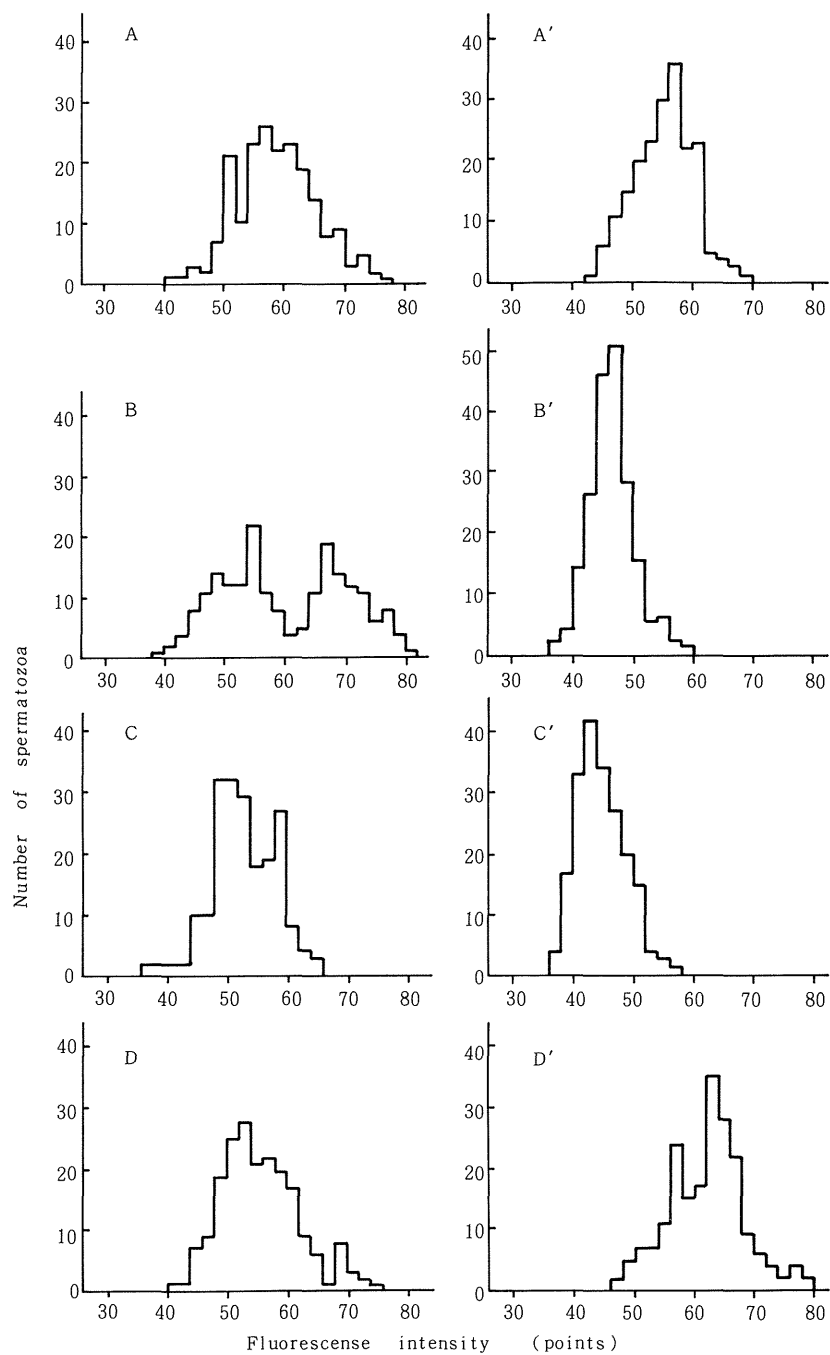


Fig. 3 Distribution of fluorescence intensity in 4 bulls spermatozoa by fluorescence microphotometry with post-irradiation (A', B', C', D') and non (A, B, C, D).

布が認められた。無処理の場合に比較し、測定値のバラツキが小さくなり、測定誤差の少ない成績であることが認められた。しかし前報<sup>16)</sup>におけるフェイルゲン染色による分布と比較すると、測定値の幅についてはバラツキの大きい結果であった。

Fujitaらの肝細胞DNA量の報告<sup>10),13)</sup>では、測定値の幅およびヒストグラムの型のいずれにおいても本実験を上回る安定した成績が得られている。彼らはフェイルゲン染色による蛍光測光法にPI処理を用いており、DNA定量のためには、フェイルゲン染色が最も優れた方法であると考えられた。Q・M染色による精子DNA量測定の場合、PI処理の効果は認められたが、測定値の正確性については不完全であったと推察された。

また精子DNA量を精液間で比較する場合、対照とする細胞核を全スライド上に塗抹し、精子測定と同時に蛍光強度を計測する必要が認められた。本実験では、4例間の平均蛍光強度に差が認められたが、測定電圧の違いによるものか、あるいは精液の違いによるものかについては、対照とするものがないために結論は出せなかった。Salisburyら<sup>4)</sup>は、ラット肝細胞を対照に用いて精子DNA量を測定して、スライド間の比較を行っている。また直良と内海<sup>18)</sup>は、リンパ球を対照とする方法がDNA量の恒常性の点で優れた材料であると報告している。今後は対照とする細胞核についても検討の必要性が認められた。

### 3. 蛍光測光法の問題点

蛍光測光法により牛精子DNA量を測定する場合、測定値に影響を及ぼす要因に蛍光の不安定性があげられる<sup>16)</sup>。このため本実験ではPI処理を行い、無処理に比較すれば測定値のバラツキは減少したが、安定した成績は得られなかった。測定値のバラツキの原因としては、まず染色条件が考えられた。Q・M染色では目的とするDNAの他に別の精子成分を染色した可能性がある。精子頭部においては、DNAは核タンパク質と結合して、DNA核タンパクとして存在することが知られているため、核タンパク質も同時に染色していることが考えられた。またDNA定量のためには、Q・M染色による結合色素

が薄い必要があるが、本実験で用いた濃度および時間では、結合した蛍光色素が濃過ぎたことも考えられた。

Fujita<sup>12)</sup>のフェイルゲン染色による方法では、通常のDNA染色の条件より、schiff試薬との反応時間を短かくして染色した方が良好な結果であったと報告している。さらに測定条件の問題としては、精子頭部の他に精子中片部が測定範囲に入ることがあげられる。Q・M染色の場合、中片部も染色されるので、測定値に影響を及ぼすものと考えられた。以上より今後はフェイルゲン染色を用いた蛍光測光法により、牛精子DNA量の測定について検討する必要が認められた。

本研究を遂行するに当たり、精液を御提供下された茨城県畜産試験場改良部の皆様に感謝致します。

## 要 約

- 1) キナクリン・マスタード染色を用いた蛍光測光法による牛精子DNA量測定時のpost-irradiationの効果について検討した。
- 2) キナクリン・マスタード染色を用いた場合のpost-irradiationの有効時間は、蛍光が安定となる15分間であることが認められた。
- 3) post-irradiationを用いた蛍光測定の場合、無処理と比較して測定値のバラツキが小さいことが認められた。
- 4) 4例の蛍光強度の分布は、無処理の場合一定の傾向は認められなかったが、post-irradiationを用いた場合3例でほぼ一致した山型の分布が認められた。

## 文 献

- 1) 飯田 勲編：哺乳動物の精子，p. 225 (1972) 学窓社
- 2) Leuchtenberger, C., F. Schrader, D. R. Weir and D. P. Gentile : Chromosoma, **6**, 61 (1953)
- 3) Leuchtenberger, C., R. Leuchtenberger, L. Murmanis and D. R. Weir : ibid, **8**, 73 (1956)

- 
- 4) Salisbury, G. W., W. J. Birge, L. De La Torre and J. R. Lodge : J. Biophys. Biochem. Cytol., **10**, 353 (1961)
- 5) Salisbury, G. W., J. R. Lodge and F. N. Baker : J. Dairy Sci., **47**, 165 (1964)
- 6) 花田 章・広江一正・富塚常夫 : 家畜繁殖誌, **10**, 109 (1965)
- 7) 花田 章・広江一正・富塚常夫 : 同上, **11**, 91 (1965)
- 8) Miller, O. C. and A. W. Blackshaw : Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I. (Paris), **2**, 1275 (1968)
- 9) Paufler, S. K. and R. H. Foote : *ibid*, **2**, 1291 (1968)
- 10) Fujita, S., S. Yoshida and M. Fukuda : Acta Histochem. Cytochem., **4**, 126 (1971)
- 11) Fujita, S., M. Fukuda, T. Kitamura and S. Yoshida : *ibid*, **5**, 146 (1972)
- 12) Fujita, S. : Histochemie., **36**, 193 (1973)
- 13) Fujita, S. and M. Fukuda : Histochemistry, **40**, 59 (1974)
- 14) Fujita, S., T. Ashihara and M. Fukuda : *ibid*, **40**, 155 (1974)
- 15) 浜島義博・藤田哲也編 : 組織細胞化学の最近技術, p. 27 (1977) 日本組織細胞化学会
- 16) 森 英紀・長松 始・野口忠利・柏原孝夫 : 茨大農学術報告, **31**, 43 (1983)
- 17) 山田清美 : Medical Technology, **5**, 1195 (1977)
- 18) 直良 博・内海耕造 : 第2回顕微分光測光法講習会講演 (1964)

## Effect of Post-irradiation on Fluorescence Microphotometry of Bovine Spermatozoa DNA

HIDENORI MORI, MASUMI USUI and TAKAO KASHIWABARA

1) Effect of post-irradiation on fluorescence microphotometry of DNA content in bovine spermatozoa was studied with quinacrin mustard staining.

2) The available time of post-irradiation with quinacrin mustard staining were about fifteen minutes for which the fluorescence after irradiation was stabilized.

3) Compared with the data of DNA content without the treatment of post-irradiation, the measured values with one showed less variance in three samples.

4) There were no similarity among four samples in the distributions of fluorescence intensity without the post-irradiation, but the histograms of fluorescence intensity with one were almost similar types among three samples.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.32, 15 ~ 21, 1984)