

蛍光顕微測光法による牛精子DNA量の測定

森 英紀・長松 始・野口忠利・柏原孝夫

顕微測定法は細胞や組織中の微量成分含量を光学的手段を用いて定量する方法であり、組織化学の応用により細胞核DNAの微量測定が可能となった。精子頭部は精子細胞の核が変態したものであり、精子核DNAは核タンパク質と結合してデオキシリボ核タンパクとして存在し、DNA量は体細胞の1/2で比較的安定していることが知られている¹⁾。

顕微測光法による精子DNA量の測定は、Leuchtenbergerら²⁾がフェイルゲン染色により人精子DNA量の測定に用いて以来普及した方法であり、受精能力の低い個体の精子と正常個体の精子との比較、新鮮精子と老化精子との比較、精子の凍結融解処理の影響など精子の受精能力を判定するために応用されている³⁻⁸⁾。しかしこれらの報告は透過測定法による測定のためフェイルゲンDNA量の変異が比較的大きく、精子頭部DNAの不均一な分布による分布誤差⁹⁾が測定に影響を及ぼすものと考えられている。このため最近では、物質の量を蛍光量として測定する蛍光測光法が細胞内微量成分の定量に用いられている¹⁰⁻¹¹⁾。蛍光物質はそれ自身が発光体であり、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ないと考えられている。

本研究は、通常DNA量測定に用いられるフェイルゲン染色による透過測光法と、染色体などの染色に用いられ、核タンパク質と結合することが知られているキナクリン・マスタード染色による蛍光測光法を比較し、DNAの分布誤差の影響が少ないと考えられる蛍光測光法による精子DNA量の測定について検討した。

材料および方法

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牝牛4頭から人工陰法により採取した新鮮精液を用

いた。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当たり精子5000万に希釈し塗抹標本を作製した。スライドは自然乾燥後熱固定(70℃, 30分間)を行い染色に用いた。

フェイルゲン染色 スライドを60℃に温めた1規定塩酸中で正確に8分間加水分解を行った後、冷1規定塩酸で洗浄し、次いで蒸流水にて水洗した。染色はSchiff試薬で2時間行った。染色後亜硫酸水にて各々2分間3回洗浄し、さらに流水下で15分間水洗した。自然乾燥後ビオライトにて封入し測定に用いた。

キナクリン・マスタード染色(以下キナクリン染色と略す) スライドをキナクリン液(0.005%, pH 5.5)にて暗所で20分間染色した。次に流水下で10分間水洗後、マキルベン緩衝液(pH 5.5)にて2回洗浄した。さらに同緩衝液中に12時間保存後封入し測定に用いた。

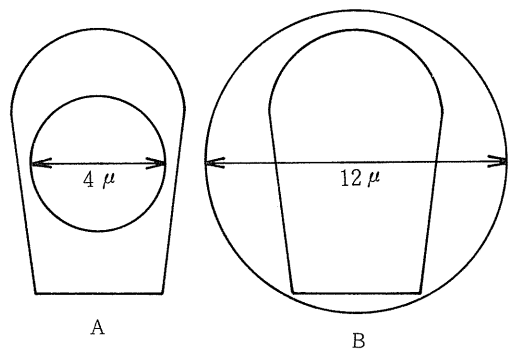


Fig.1. Measuring range of sperm head by microspectrophotometry A: Transmittance microphotometry (diameter 4 μ) B: Fluorescence microphotometry (diameter 12 μ)

測定方法 フェイルゲン染色による透過顕微測光法およびキナクリン染色による蛍光顕微測光法における精子頭部の測定部位は第1図に示した。透過測光法では、まずスライド上の精子のない場所にスポット(直径4μ)を作り530nmの単色光にて透過率が100%を表示するように調整し、次に精子頭部内にスポットを移動させ透過率を計測した。蛍光測光法では、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2法の顕微測光にはオリンパス製マルチ測光顕微鏡装置(MMSP-TK型およびMMSP-RF型)を使用した。拡大は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。

結果および考察

1. 透過測光法による透過率の分布

透過測光法による精子DNA量の測定では、通常吸光度に頭部面積を乗じた値で算出されるが¹²⁾、本実験では測定値の分布を検討することが目的のため、そのまま透過率を用いて分布を調べた。ホルスタイン種牝牛4頭の精液についての測定値は第1表に示し、分布は1%きざみで第2図に示した。平均透過率はA = 71.4 ± 2.27%,

B = 72.2 ± 2.95%, C = 73.4 ± 2.91%, D = 71.4 ± 1.99%で、4例共ほぼ同様な測定値であった。また透過率の幅は最小65%より最大81%で、4例共にほぼ共通であった。しかしヒストグラムのは型は、A, C, Dでは中央値付近に測定値が集まり高い山型となったが、Bでは山が2つに分かれる型となり、一致した結果は得られなかった。フェイルゲン染色によるDNA量の測定では、透過率に差が認められないが、精液により分布の型が異なることが認められた。

広江ら¹²⁾の報告では精子DNA量の測定値は、頭部面積に吸光度を乗じた値で示されており、本実験の結果と比較すると、分散度および分布の幅が大きいことが認められた。本実験では1規定塩酸による加水分解の時間を8分間としたが、広江らは12分間行っている。Salisburyら³⁾は加水分解の時間によってDNA量の測定値に差が生じ、最も高い測定値が得られたのは8~10分間の処理であったと報告している。フェイルゲン染色を用いる場合、染色条件により測定値に差が生じ、異なる結果となる可能性があるものと推察された。また本実験からは精子頭部DNAの分布誤差については明らかにならなかったが、透過測光法を用いる場合は、精子頭部の面積を計測し、透過率との組合わせで分布を調べる必要性が考えられた。

Table1. Transmissivity¹⁾ and fluorescence intensity²⁾ in measurement of DNA content of bovine spermatozoa by microspectrophotometry

Semen	Sperm concentration (10 ⁸ /ml)	Motility of sperm	Transmissivity (%)	Fluorescence intensity (points)
			Mean ± S. D.	Mean ± S. D.
A	14.9	++ 75	71.4 ± 2.27	57.7 ± 6.77
B	9.1	+++ 75	72.2 ± 2.95	61.7 ± 6.07
C	12.9	+++ 80	73.4 ± 2.91	66.2 ± 8.25
D	12.5	++ 70	71.4 ± 1.99	68.8 ± 5.70

1) Feulgen staining

2) Quinacrin mustard staining

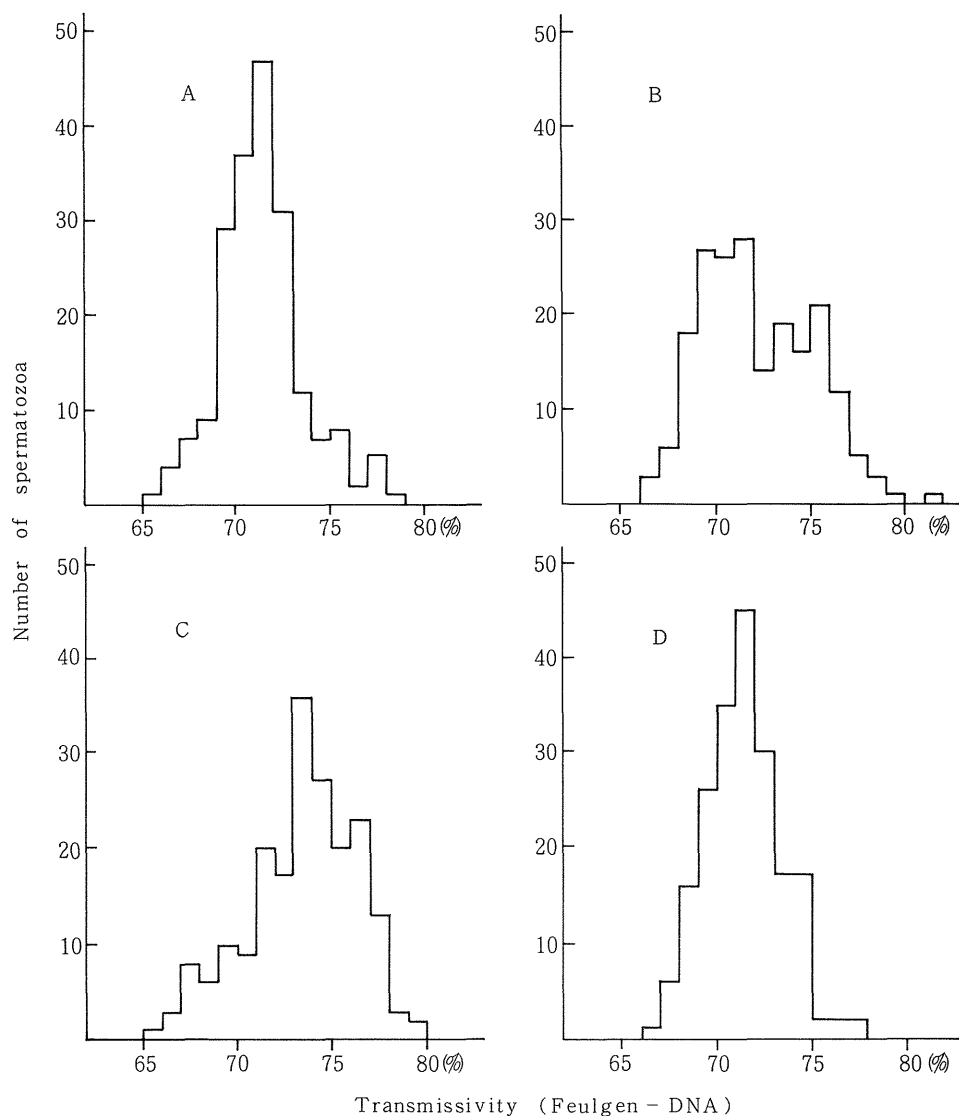


Fig.2. Histograms of transmissivity by transmittance microphotometry in 4 bulls spermatozoa

2. 蛍光測光法による蛍光強度の分布

蛍光測光法による測定値は第1表に、分布は1ポイントきざみで第3図に示した。平均蛍光強度は $A = 57.7 \pm 6.77$, $B = 61.7 \pm 6.07$, $C = 66.2 \pm 8.25$, $D = 68.8 \pm 5.70$ で、4例間でかなりの差のあることが認められた。また蛍光強度の幅は最小44ポイントより

最大88ポイントとなり、4例共に幅広い測定値が得られた。このため Histogram の型も A, B, C では山が数ヶ所認められる分布であった。キナクリン染色による DNA 量の測定では、蛍光強度にバラツキが大きいため、平均値および分布の型に一定の傾向は認められない結果であった。

Fujita¹⁰⁾は肝細胞DNA量を蛍光測光法により測定したが、測定値のバラツキはほとんど認められず、分布も高い山型が得られている。彼らはフェイルゲン染色による蛍光測光法を用いており、DNA量測定のためにはフェイルゲン染色が最も適していると考えられた。本実験ではDNA染色にキナクリン液を用いたが、蛍光色素は一般に結合性が不安定なため、染色後緩衝液に12時間保存し、安定させる方法を行った。しかし本実験の結果からはキナクリンの安定性は認められなかった。また本実験では精子頭部全体を測定するため、精子中片部やバックグラウンドが測定範囲に入り、これらの蛍光が測

定値に影響したものと推察された。

透過測光法と蛍光測光法による測定値を比較すると、平均透過率は4例間でほとんど差が認められないが、平均蛍光強度には大差が認められた。また分布にも大きな相異が認められた。特に最小値から最大値の幅が、フェイルゲン染色では15%前後であるのに対し、キナクリン染色では40ポイント以上の結果であった。本実験に用いた精液には活力および精子数に異常は認められないため、キナクリン染色による方法では、精子DNA量の測定は不完全であると考えられた。

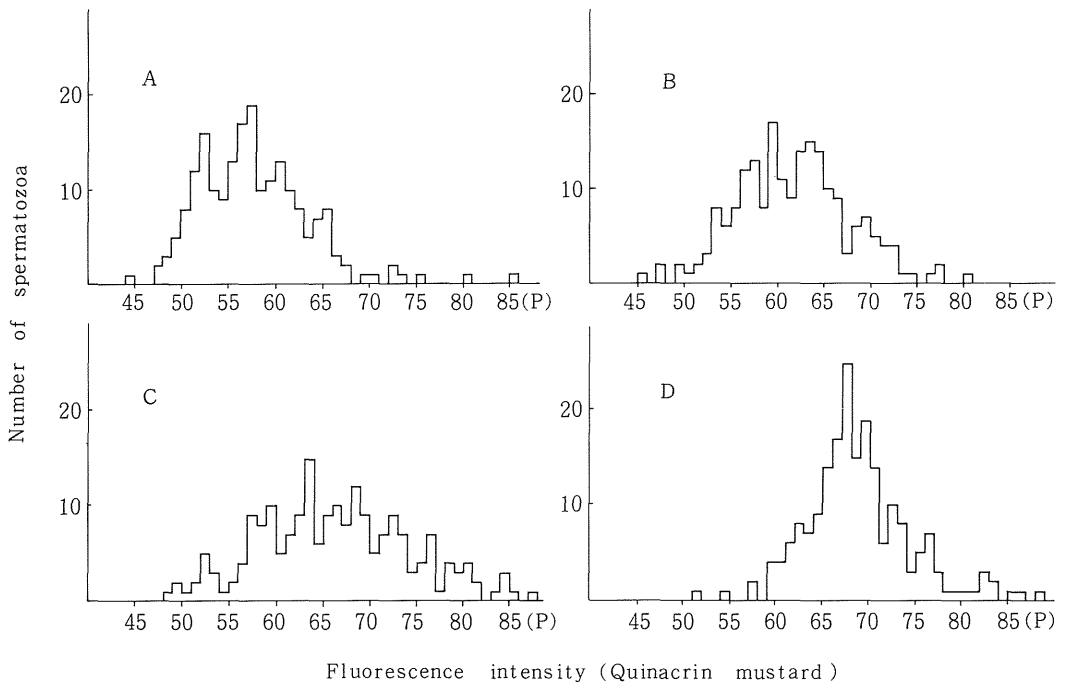


Fig. 3. Histograms of fluorescence intensity by fluorescence microphotometry in 4 bulls spermatozoa (P: points)

3. 蛍光測光法の問題点

顕微測光法を細胞内微量成分の測定に用いる場合、対象となる物質の細胞内分布の均一性が問題となる。このため透過測光法では細胞内数ヶ所を測定して平均値を求め、面積を乗じる方法が用いられているが、必ずしも安定した成績は得られていない。蛍光測光法では細胞全体

を計測できるため、分布の均一性については問題が生じないと考えられたが、本実験からは精子DNA量に一定の成績は得られなかった。

蛍光測光法により定量する場合、DNAや核タンパク質と結合した蛍光色素を安定化させることが必要であると考えられた。FujitaとFukuda¹¹⁾は標本を染色後そ

の蛍光色素に特異的な励起光で照射して、急速に減衰する蛍光成分を消去させ、安定な蛍光色素のみを残す方法について検討している。この方法を用いるとバックグラウンドの蛍光がほとんど消去でき、目的物質のみ利用することも可能で、測定値も安定したものが得られている。

また蛍光測光法では、微量で薄く分散した物質のみ測定可能なため、DNAや核タンパク質などの細胞内成分を定量するためには、その染色がきわめて薄い必要が認められている⁹⁾。本実験ではキナクリン染色後流水下で10分間の水洗を行ったが、結合した蛍光色素が濃過ぎた可能性も考えられた。このため蛍光測光法のための染色条件について検討する必要が考えられた。

さらに精子頭部全体を測定する場合、精子中片部が測定範囲に入るため、精子頭部を分離させる必要があると考えられた。精子頭部の分離には、機械的振とうおよび超音波処理¹³⁻¹⁴⁾などの方法が用いられているので、今後利用できるものと考えられた。

人および牛において受精率の高い個体では精子DNA量が正常で安定しており、受精率の低い個体や不妊個体では変動が大きい傾向が認められている。精子DNA量の測定はこのような精子の受精能力の問題に関して重要な研究であり、また精子の2型性(X精子およびY精子)の研究にも応用できると考えられた。今後は蛍光測光法における種々の染色条件および測定方法について検討し、安定した成績を得ることを目的としたい。

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

キナクリン・マスタード染色を用いた蛍光顕微測光法による牛精子DNA量の分布を、フェイルゲン染色を用いた透過顕微測光法による分布と比較し、蛍光色素を用いたDNA量測定の可能性について検討した。

1. 透過顕微測光法による測定では、4例の平均透過率はほぼ同様であったが、ヒストグラムの型は精液により異なることが認められた。

2. 蛍光顕微測光法による測定では、4例の平均蛍光

強度に差が大きく、ヒストグラムの型にも一定の傾向は認められなかった。透過顕微測光法による分布と比較すると、測定値のバラツキが大きいことが認められた。

3. 蛍光色素を用いた精子DNA量の測定では、染色後、蛍光色素を安定させることが必要であると考えられた。

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) Salisbury, G. W., W. J. Birge, L. De La Torre and J. R. Lodge: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 353 (1961)
- 4) Weir, D. R. and C. Leuchtenberger: *Fertil. and Steril.*, **8**, 373 (1957)
- 5) 花田 章・広江一正・富塚常夫：家畜繁殖誌，**10**，109 (1965)
- 6) 花田 章・広江一正・富塚常夫：同上，**11**，91 (1965)
- 7) Miller, O. C. and A. W. Blackshaw: *Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. and A. I.* (Paris), **2**, 1275 (1968)
- 8) Paufler, S. K. and R. H. Foote: *ibid*, **2**, 1291 (1968)
- 9) 浜島義博・藤田哲也編：組織細胞化学の最新技術，p. 27 (1977) 日本組織細胞化学会
- 10) Fujita, S., T. Ashihara and M. Fukuda: *Histochemistry*, **40**, 155 (1974)
- 11) Fujita, S. and M. Fukuda: *ibid*, **40**, 59 (1974)
- 12) 広江一正・花田 章・富塚常夫：家畜繁殖誌，**10**，33 (1964)
- 13) Mohri, H., T. Mohri and L. Ernster: *Exp. Cell Res.*, **38**, 217 (1965)

14) Quinn, P. J. and I. G. White : J. Reprod. Fert., **15**, 449 (1968)

Measurement of DNA Content in Bovine Spermatozoa by Fluorescence Microphotometry

HIDENORI MORI, HAJIME NAGAMATU, TADATOSHI NOGUCHI and TAKAO KASHIWABARA

The distributions of DNA content in bovine spermatozoa were compared based on two different methods, one was fluorescence microphotometry with quinacrin mustard staining, the other transmittance microphotometry with feulgen staining, and the possibility of determination with fluorochrome was investigated.

1. The averages of transmissivity were almost equal among four samples, but their histograms were shown to be different slightly in the measurement by transmittance microphotometry.
2. The averages of fluorescence intensity were very different among four samples, and there were no similarity among four histograms in the determination by fluorescence microphotometry. Compared with the data of DNA content in the method of feulgen staining, these measured values showed much variance in the method of quinacrin mustard staining.
3. It will be necessary to stabilize fluorochrome after staining in the measurement of DNA content by fluorescence microphotometry.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No.31, 43 ~ 48, 1983)