ヒト細胞における蛍光小体の研究

東京医科歯科大学泌尿器科教室 酒 井 邦 彦
(主任: 落合京一郎教授)

INVESTIGATION OF FLUORESCENT BODY IN THE HUMAN CELLS

Kunihiko Sakai

Department of Urology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

(Director; Prof. K. Ochiai)

Recently evidence, that Y chromosome with strong fluorescence can be distinctly distinguished from another chromosome on the metaphase plates of cultured human blood stained with quinacrine mustard dihydrochloride or quinacrine dihydrochloride (fluorescing dye-stuffs) and also a fluorescent spot in the similarly prepared interphase nuclei of various human cells can be observed through the fluorescence microscope, has been published and confirmed. The fluorescent spot in the interphase nucleus is thought to indicate the existence of Y chromosome and is called "fluorescent body", and its clinical usefulness is suggested

The author investigated the fluorescent body in nuclei of somatic cells (mainly hair-root cells), lymphocytes of systemic blood and in spermatozoon with the fluorescence microscopic method.

1) Distinct fluorescence was recognized at the distal portion of Y chromosome long arms on the metaphase plate of cultured human lymphocytes stained with quinacrine.

2) In nuclei of hair-root cells as well as lymphocytes in the systemic blood obtained from normal male, a round or oval bright fluorescent body in diameter from $0.2\ \mu$ to $0.3\ \mu$ was regularly observed and the average incidence of the fluorescent body was more than 40 percent of the cells examined. The incidence did not show the correlation to the age. In contrast to these findings, the fluorescent body usually could not be recognized in the nuclei of the somatic cells from women. If present at all, the incidence was in less than 3-4 percent.

It was reasonably concluded that the examination of the fluorescent body in the interphase nuclei of human somatic cells offered a very useful clinical method for determination of cytogenetic sex, and that combined examination of Barr body at the same time gave more accurate information for this purpose.

3) Spermatozoon with single fluorescent body which showed similar appearance in the interphase nuclei of somatic cells were observed in 40-45 percent. The incidence showed no correlation to sperm count or sperm motility of the sperms from the normospermics and oligospermics. In eight specimens, which were obtained from four normospermics and four oligospermics, spermatozoon with two fluorescent bodies were recognized. The average incidence was 1.8 percent. But double fluorescent body was observed more often in morphologically anomalous spermatozoon than in normal structured ones.

4) The incidence of fluorescent body in human somatic cells from patients with simple hypospadias, cryptorchidism, male infertilities and male hermaphroditism was on the same level as that of normal male, whereas female hermaphrodites showed the same level of incidence of fluorescent body as that of the normal female.

5) In true hermaphroditism, the incidences of fluorescent body and Barr body were almost in accordance with their karyotype, but showed lower level than that of normal men and women. In true hermaphrodites with mosaicism and mixed gonadal dysgenetic patients, the incidences of both bodies were generally low and sometimes the cytologic sex could not be determined from the examination of these nuclear bodies. The results would suggest that the patient might be true hermaphroditism or

mixed gonadal dysgenesis.

6) The incidence of fluorescent body in patients with Klinefelter's syndrome (all cases, 47, XXY, positive Barr body) was as high as that of normal men. It might be thought that the high incidence of fluorescent body corresponding with that of normal male with positive Barr body was a characteristic cytological feature in Klinefelter's syndrome.

まえがき

体細胞核に認められる sex chromatin (あるいは drum-stick) による, いわゆる細胞学的性別 (cytologic sex) の判定はすでに routine の検索法として臨床的にも広く利用されている⁸⁾. 一方最近に至り植物 (ダイズなど) や動物 (ハムスターなど) の細胞をアクリジン色素による蛍光染色法で研究していた学者らによつて, 染色体の部分部分がいくつもの帯状に蛍光染色されることが発見された²⁾³⁾. これにひきつづき, さらにヒトのリンパ球培養による分裂中期の染色体を蛍光染色すると, Y染色体だけがとくに強い蛍光を発して他の染色体と容易に区別できるという極めて興味ある成績が発表された⁷⁾²²⁾. この研究は直ちに Pearson ら¹³⁾によつて追試確認され, とくに強い蛍光を発するのはY染色体の長腕の遠端の半分であることが確かめられた. これはさらに Caspersson ら⁶⁾によつても追試確認されている. しかも口腔粘膜剥離細胞の interphase の細胞核でもはつきりと強い蛍光を発する小体の存在することも報告された. これらの研究成績から, この小体は蛍光小体 (fluorescent body), 略して F 小体 (F body) などと呼ばれ, さらにその後の検索によつて F 小体の存否は Y 染色体の存否, いいかえると体細胞における Barr 小体 (sex chromatin) と同様に細胞学的性別判定に応用できることが明らかにされるに至つた.

著者は蛍光色素である quinacrine dihydrochloride および quinarine mustard dihydrochloride 染色法によつて, 正常男女および各種の性器系異常における体細胞あるいは精子などについてこの F 小体を検索した. その結果この検査法が Barr 小体と同じく, 細胞学的性別の判定に極めて有用な方法であることを確認したほか, 若干の興味ある所見も検索しえた.

検索材料と検索方法

検索の対象は, 対照としてほぼ各年令層にわたる性別のはつきりした正常男女55例 (男31例, 女24例), それに男子不妊症, 性染色体異常, 性器奇形あるいは半陰陽の99例, 計 154例である.

(1) 後述するように細胞核の F 小体はいろいろな細胞, たとえば口腔粘膜剥離細胞, 毛根細胞, 血液あるい

は精液中の精子などで検索できる. これらからの標本は以下のような方法で作製した.

(a) 粘膜剥離細胞および血液標本

Barr 小体の検索性標本作製と同じようにスライドグラスに塗抹後, 室温で乾燥しメタノールで固定して染色する.

(b) 毛根細胞標本

Schmid¹⁸⁾, Meredith¹¹⁾ および Sperling¹⁹⁾ の方法に準拠して作製した. すなわち, 側頭部から2~3本の毛髪をひき抜き, 毛根部を残して剪除しこれを直ちに2~3滴の60%酢酸溶液を滴下したホール・グラスに浸す. ほぼ5分間で毛根外層の細胞の殆んど全部は酢酸溶液中に遊離してくるが, なるべく多数の遊離細胞を得るためピペットでごく静かに4~5回溶液の出し入れを行なう. 次にピペットに吸引した溶液を脱脂肪したスライドグラス上に滴下塗抹し, これを室温で空気乾燥させる. この操作によつて1枚の標本でおよそ300個の剥離細胞を観察することができる.

(c) 精子標本

ほぼ Barlow & Vosa¹⁾ に準拠したが, 実際にはいろいろと検討を加えた結果, 以下のような操作で標本作製した. 新鮮な射精液が均質に液化するのを待ち, その1ml に約10ml の生理食塩水を加えて3,000回転で3分間遠沈して上清をすて, 再び生理食塩水を追加して同じように遠沈を行なう. その上清をすてた後に Carnoi 液3~4ml を加える. この液を駒込ピペットで静かに出し入れして精子を均等に浮遊させ, その2~3滴をピペットでスライドグラス上に落し速かに火炎乾燥させる.

(2) 染色法と検索法

細胞核の F 小体の染色には acridine 色素に属する quinacrine mustard dihydrochloride (以下 QM と略記する) および quinacrine dihydrochloride (以下 Q と略記する) が応用されている (図1参照). この二種の色素は後述するようにどちらも F 小体の検索性色素として応用できるが, Q は QM にくらべてその蛍光度とか染色安定度が劣ることは多くの学者がこれを承認している. 著者も研究の初期には QM の入手が極めて困難であつたため, 専らより入手しやすい Q により検索を行なつた. そ

図 1

の後QMの入手が比較的容易になったので最近では主としてQMによつて検索している。このQとQMを比較した著者の成績でも、上述のように両者に優劣のあることは確認した。一般的にいえばQMの方がF小体の検出率がやや高いといえる。しかし、どちらも heterochromatin 部分を染色するという性質は同じであり、したがつて検索に習熟してくればQによる染色標本でも臨床的には十分に応用しうることを認めている。

標本の染色は次のようにして行なう。0.5%のQ溶液では6～7分間、0.005%のQM溶液では20分間標本を染色し、脱イオン水で水洗し余分の色素を十分に洗い落とし、直ちにpH 5.4の McIlvaine's buffer をのせカバーガラスをかけて封入する。

F小体の検索には Zeiss の蛍光顕微鏡、光源としては HBO 200の水銀灯、BG 12の励起フィルターおよび 530 nm の barrier filter を使用し油浸にて鏡検した。ただし、国産の Nikon 蛍光顕微鏡も現在著者が使用している型式は Zeiss のそれと全く同等の性能をもっていることを確認している。とくに Nikon 型は水銀灯の交換に好都合である。

QもQMもF小体の検索には十分応用できるが、明らかに後者の方が褪色時間が長く安定している。たゞQの場合にはなるべく早く鏡検を完了するよう心がければよく、少くとも20～30分なら十分観察に耐えうることができる。したがつてこのような注意の下に観察に慣れてくれば、QあるいはQMどちらの染色標本によるF小体検索成績でも、検出率に多少の差はあるが確実さにおいてほとんど差はないことを確認している(図2, 3)。

なお、上述したどの種類の標本もQまたはQM染色でF小体が明瞭に染色されるが、F小体の検索には標本によつて適・不適がある。すなわち、剝離細胞についてみると口腔粘膜細胞は十分に口をすすがせても細菌の混在を除去することは難しく、しかもこの細菌も強く蛍光染色され識別を困難にすることが多いという欠点があり、F小体の検索用としては不適で、この点では毛根細胞による標本が適している。したがつて、著者は剝離細胞に

図2 毛根細胞核のF小体出現率(正常)

図3 リンパ球のF小体出現率(正常)

についてのF小体検索は専ら毛根細胞によつた(写真1)。血液塗抹標本では Barr 小体 (drumstick) と同様に多形核白血球でも検索可能ではあるが紛わしいことが少なく、この点では核質も比較的均等なリンパ球の方が適しており、著者は専らリンパ球について検索した(写真

2, 3).

検索成績

口腔粘膜細胞標本 (buccal smear) でも F 小体の検索は可能であるが、上述したように混在する細菌群も強く蛍光を発するため鑑別に煩わしいところが少なくなく、F 小体の検索にはあまり適していない。ここでは専ら毛根細胞についての検索成績について記述する。

(1) 正常男・女子

年齢は1才から72才まで（大部分は20～40才代）、臨床的にも性別に疑点のない男女合計55例について検索した。

(a) 毛根細胞核における小体

第2章の(b)で述べた方法で作製した標本によると、毛根細胞核には細長い形、楕円形およびほぼ円形の3種類が認められる。F小体はいずれもほぼ同じではあるが、一般的にいうと楕円形細胞核がF小体検索には適している。1枚の標本には少くとも100～300個以上の剝離細胞が存在しているが、原則としては100個の細胞を観察してF小体の出現率を算出し、必要に応じては同時に作製した別の標本についても検索し200個についての出現率をも算出した。毛根細胞核におけるF小体はbuccal smear 標本と本質的に異なることなく大きさ0.2～0.3 μ 、核質内に存在する場合は円形に、Barr小体と同じく核質の内側に接して存在する場合はやや細長く桿状に近い形を示していることが多い(写真1)。しかし、いずれもその他の部分にくらべて強い蛍光を発しており、その識別は極めて容易である。

男子の毛根細胞核におけるF小体の出現率は14～84%とかなりの巾がある。このうち30%以下のものは検索初期のもので、ごく少数例にすぎず、検索例の大部分は40%から75%の間の出現率を示した。これに対し女子の細胞核ではその過半数が全くF小体の出現を示していない。しかし少数例では数%の出現率（最高は10%）であり、これら全体を平均すると女子における毛根細胞核のF小体の出現率は2.9%となる(図2をも参照)。ただ数%という陽性率を示したもので、その大部分において著者がF小体と判定したものは蛍光輝度や大きさなどの点で男子におけるF小体とくらべると必ずしも典型的な形状とはいえない印象が強かった。したがって、これが男子細胞核に出現するF小体と全く同じものかどうかは判定しがたいが、いずれにしろF小体の出現率は男女の間では明らかにちがっているといえることができる(後述のリンパ球検索成績をも参照)。また、年齢による出現

率の差は認められない。

(b) 血液塗抹標本におけるF小体

血液塗抹標本においては多形核白血球にもF小体が出現している。しかし後述のようにこの白血球では核にくびれや突起があり、さらに核質にも多少濃淡の差があり蛍光部分の識別に困難を感じるものが少なくない(写真2, a, b)。したがってF小体の検索に多形核白血球を利用することは可能であるが、核質が均等な単核球(リンパ球)の方がはるかに明瞭に識別できる。著者は専らリンパ球についてF小体の出現率を検索した。リンパ球におけるF小体の形状ははつきり周囲と区別できる強い蛍光を示す大きさ0.2～0.3 μ 程度の円形の小体として認められる。大いには核内に遊離して存在するが、ときには核膜内側に接して存在するものもある(写真3a, b)。

リンパ球におけるF小体の出現率は男子では20～84%であつた(図3)。このうち最低の20%とか30%以下のものは恐らく標本の不出来あるいは蛍光顕微鏡の水銀灯出力の弱化为原因ではないかと考えられるもので、それ以外ではほとんど大部分が30～70%という数字のところに集中している。これに対し、女子の場合にはF小体の出現率は0～3%と低く平均値は0.8%であり過半数では全くF小体は存在していない。すなわち、リンパ球で観察した場合、F小体の出現率は毛根細胞のそれと同様に男女で明かに差がある。また年齢による出現率の差は認められない(図3)。

このように、毛根細胞あるいはリンパ球におけるF小体の出現率には確かなはつきりした男女差があるといえることができる。ただ標本作製上の不手際とか蛍光顕微鏡の水銀灯の性能などの原因によることもあつて、極端に出現率の低いごく少数例は別として男子の場合にも20～30%と出現率が比較的に低いものも存在する。また同じように、女子でもほとんどその全部は細胞核にF小体の出現をみておらないが、少数例では2～3%から数%という出現率を示すものもある。これは後述する半陰陽例ではしばしばみられる。同じような現象はBarr小体の場合にも観察されている。しかし、いま男女別でリンパ球と毛根細胞におけるF小体の出現率をそれぞれ縦横の座標軸上にとつてみると、図4のような関係を示している。すなわち、仮りに男子の場合どちらかの出現率が低かつたとしても、同一人については常に一方の出現率は高く、これに対し女子の場合にも仮りにどちらかがやや高い出現率を示しても他方は低率という関係をもつてい

写真1：毛根細胞におけるF小体（油浸×800）

写真2a：多形核白血球のF小体（油浸×800）

写真2b：多形核白血球のF小体核膜の内側に接して存在（油浸×800）

写真3a：リンパ球のF小体核質内にある（油浸×1000）

写真3b：リンパ球のF小体核膜の内側に接して存在（油浸×800）

写真4：精子におけるF小体（油浸×1000）

写真5：2個のF小体をもつ精子形態は異常を呈する。（油浸×1000）

写真6：ヒト・リンパ球の培養細胞（QM染色，油浸×1000）染色体の最も左側にあるのがY染色体で，その長腕の遠端の約半分が強い蛍光を発している（外村教授による）。

る。したがって，この座標軸にプロットすれば，男女の間でF小体の出現率にはつきりした差のあることが判かる。Barr小体の検索と同様によい標本，よい顕微鏡，よい眼ということがF小体検索の場合もその基本条件であることはいうまでもないが，F小体による細胞学的性別の判定に際し，確実を期するためには同一人のリンパ球と毛根細胞についての成績を総合して判断するのがよいといえる。

（c）精子におけるF小体

材料は正常精子数（4,000万/ml以上）のもの26例と乏精子数（4,000万/ml以下）のもの21例で，これらにつき既述の方法（第2章のc参照）によつて精子におけるF小体を検索した。なお，これら射精液については精子数のほか運動性，形態の異常なども併せて検索した。精子染色標本で観察できる精子数は正常か高度の乏精子

症かで異なるが，正常なものでは1枚の標本で優に300個の精子数を検索でき，高度のものを除く中等度の乏精子数の標本でもほぼ100～200個は常に観察することができる。F小体の出現率は原則として100個の精子について算定した。

精子をQあるいはQMで染色すると，一般に頭部の前半部は淡く後半部はそれより濃く黄色調に染まる。F小体は極めて強い蛍光を発する直径0.2～0.3μmの円形微小体として現われ，周囲とははつきり区別することができる。頭部におけるその存在部位は必ずしも一定していないが，大部分では頭部の中間でAchromosomeとの境界近くに位置していることが多い（写真4）。

正常および乏精子症の精子におけるF小体の出現率は2例（5%および10%）を除き，それ以外のものではほとんど全部30～40%の間に集中しており，最高は49%であった（図5）。あるいは5%および10%という低出現率

図4 リンパ球および毛根細胞におけるF小体出現率男女差（正常）

図5 精子のF小体出現率と精子数

図6 精子のF小体出現率と運動性

%, 平均 1.8%という数字を示した。まれには形態正常の精子にも2個のF小体をもつものがあるが、全般的にみると2個のF小体をもつ精子は大形でやや変形したいわゆる形態異常精子の方に多くみられる傾向が強い(写真5)。

(d) 乏精子症, 単純性尿道下裂, 停留睪丸, 半陰陽および性染色体異常症におけるF小体。

(i) 乏精子症

精子数が2,000万/ml未満のものを乏精子症とした。(c)にも述べたように, 精子におけるF小体の出現率は正常および乏精子数において差異はなかつた(図5を参照)。ここでは比較的高度の乏精子症($20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下)のものについて毛根細胞およびリンパ球のF小体出現率を検索した。その平均値はそれぞれ52.3%および31.1%を示しており, これらは正常男子のそれと同様で

表1 乏精子症*における体細胞のF小体

症 例	年 令	F 小 体 (%)	
		毛根細胞	リンパ球
1	31	43	50
2	29	53	29
3	39	75	38
4	35	25	39
5	31	54	32
6	37	/	26
7	37	53	26
8	44	63	9
平 均		52.3	31.1

* 精子数: $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のもの

のものは標本作製あるいは鏡検上の不備によるものかも知れない。したがって一般的には精子のうちその40%前後はF小体をもつものであるということが出来る。またこの出現率は精子数および運動性との間に相関関係を示していない(図5, 6)。

とくに注目すべき所見は, すべての精子についてではないが検索した47例のうち8例の精液(正常4例, 乏精子症4例)において精子のなかに, 2個のF小体をもつものが存在するということである。この2個のF小体は大きさも蛍光度もほとんど同じではあるが, 2個は近接していても融合していることはない(写真5)。その出現頻度は2個のF小体をもつ精子の精液において1~3

あつた（表1）.

ii) 単純性尿道下裂

Barr小体陰性の単純性尿道下裂6例についての毛根細胞あるいはリンパ球におけるF小体の出現率の平均値はいずれも66.2%および49.8%を示しており、これらは正常男子のそれと同様であつた（表2）.

iii) 停留睪丸

Barr小体陰性で他に奇形を伴わない停留睪丸6例についての毛根細胞あるいはリンパ球におけるF小体の出現率の平均値は62.6%および60.2%を示しており、これらは正常男子のそれと同様であつた（表2）.

表2 単純性尿道下裂および停留睪丸における体細胞のF小体

症 例	年 令	F 小体 (%)	
		毛根細胞	リンパ球
尿 道 下 裂			
1	6	50	49
2	4	／	50
3	6	51	34
4	2	75	62
5	3	82	58
6	4	75	46
	平 均	66.2	49.8
停 留 睪 丸			
1	28	61	56
2	22	55	65
3	20	35	／
4	5	88	50
5	4	75	46
6	10	／	84*
	平 均	62.6	60.2

* : QM染色

iv) 男性半陰陽.

Barr小体は陰性で臨床的に男性半陰陽の確診がつけられた6例についての毛根細胞あるいはリンパ球におけるF小体は52.0%および49.3%の出現率で、正常男子のそれと同様であつた. このうち染色体分析を行なつたものは1例で46XYであつた（表3）.

v) 女性半陰陽

先天性副腎過形成症2例と非進行性女性半陰陽2例についての毛根細胞およびリンパ球におけるF小体の出現率はそれぞれ2.0%および0.4%であり、後者の1例で

表3 男性半陰陽*における体細胞のF小体

症 例	年 令	F小体 (%)	
		毛根細胞	リンパ球
1	5	61	61
2▲	20	34	41
3	3	/	61
4	6	/	60
5	10	46	47
6	29	67	26
	平 均	52.0	49.3

※ : Barr小体は全例とも陰性

▲ : kayotype が46, XYと確認されたもの.

表4 女性半陰陽における体細胞のF小体

症 例	年 令	F 小体 (%)		Barr 小体
		毛根細胞	リンパ球	
先天性副腎過形成				
1	7 日	0	1	+
2	4	0	2	+
非進行性女性半陰陽				
3	5	5	0	+
4	4	3	0	+

毛根細胞が5%とやや高率を示したがそのリンパ球の出現率は0であつた(表4).つまり、女性半陰陽におけるF小体の出現率は正常女子のそれと同様であるといえる.

vi) 真性半陰陽

6例における検索成績は表5に示した如くである. これらのうち2例は46, XY(性腺はいずれもO+T), 2例は46, XX(性腺はいずれもOT+OT), 2例は46, XX/46, XY(性腺は1例はO+OT, 他の1例はO+T)のモザイク型のkaryotypeである. 46, XYではBarr小体はどちらの症例も2%を示しており、これに対し毛根細胞あるいはリンパ球のF小体は26%および24~48%であつた. これはほぼそのkaryotypeとも一致しており、その細胞学的性別に関しては男子と考えてよいといえる. ただしF小体の出現率は低い傾向を認める. 46, XXの2例のうち1例はBarr小体が17%でこのかぎりでは陽性と判定されるし、毛根細胞およびリンパ球のF小体は0.5%および1%を示した. 他の1例もBarr小体は12%とこれも陽性と判定してよいと考えられ、こ

表5 真性半陰陽における体細胞のF小体

症 例	年 令	性 腺	F 小 体		Barr 小体 (粘膜細胞)	性染色体構成
			毛根細胞	リンパ球		
1	10	O+T	26/100	23/100	2/100	46, XY
2	10	OT+OT	3/100	12/300	12/100	46, XX
3	31	O+T	—	24/100	2/100	46, XY
4	19	O+OT	15/100	19/100	9/100	46, XX/46, XY
5	7	OT+OT	1/200	2/200	17/100	46, XX
6	28	O+T	20/200	10/200	14/200	46, XX/46, XY

れに対し毛根細胞およびリンパ球のF小体は1%および4%であった。これらを46, XX という染色体組合せと併せて考えると、その細胞学的性別はいずれも Barr 小体出現から一応は女性と判定してよいが、女性としてはその出現率はかなり低いといえる。46, XX/46, XY のモザイクを示した2例 (O+OT, O+T) のうち、1例は Barr 小体が9%と高率であるとともに毛根細胞およびリンパ球のF小体出現率も15%および19%と高く、また他の1例も Barr 小体は7%、毛根細胞およびリンパ球のF小体は10%および5%を示した。すなわち、モザイク型のこの2例の真性半陰陽では、Barr小体は正常女子のそれより低いが陽性と判定できないことはなく、一方F小体も正常男子のそれよりはかなり低いが女子としてはかなり高率を示しているという興味ある関係が認められる。

vii) 混合型性腺異発生症

この3例の karyotypeは2例が45, X/46, XY, 1例が45, X/46, Xy/46, XY のモザイクを示している (表6)。前者のうちの1例では、Barr 小体が1%であるのに

表6 混合型性腺異発生症における体細胞のF小体

症例	年令	F小体 (%)		Barr 小体 (%)	性染色体構成
		毛根 細胞	リン パ球		
1	19	40	43	1	45, X/46, XY (1:2)
2	30日	5	14	0	45, X/46, XY (2:1)
3	1.8	7	1	1	45,X/46,Xy/46XY (10:28:13)

対し毛根細胞およびリンパ球のF小体は40%および43%というかなり高い出現率を示しており、このかぎりではその細胞学的性別はむしろ男といえる。ところが同じ karyotype を示す他の1例は Barr 小体が陰性、毛根細胞およびリンパ球のF小体はそれぞれ5%と14%という出

現率で細胞学的性別は男と判定できないこともないが男としてはかなり低率である。これはあるいは性染色体組合せの細胞群の割合のちがいによるのかも知れない。残りの1例は Barr 小体が1%、毛根細胞およびリンパ球のF小体はそれぞれ7%と1%といずれも低値を示しており、この成績からはその細胞学的性別の判定は非常にむずかしいということになる。あるいはF小体出現率の低値は46Xy という細胞群が比較的多いことによるのかも知れない。いずれにしろ、性染色体組合せがモザイクを示す真性半陰陽の場合とかなり似ており、とくに混合型性腺異発生症では Barr 小体およびF小体のどちらかの出現率だけからその細胞学的性別を判定することはさらにむずかしくなっている。これらの所見は、Barr 小体 (あるいは drum-stick) だけでなく同時にF小体をも検索して細胞学的性別を総合的に判定することが、半陰陽とくに男性 (女性) 半陰陽か真性半陰陽 (あるいは混合型性腺異発生症) かを診断する上で極めて有用な手がかりを与えてくれるものであることを示している。

viii) Klinefelter 症候群

本症候群の3例はいずれも karyotype が47, XXY での Barr 小体 (あるいは drum-stick) は陽性、毛根細胞およびリンパ球のF小体出現率は平均それぞれに65%および47%である (表7)。すなわち、Barr 小体が陽性なのは本症候群の特徴として当然であるが、F小体もその出現率は高く、どちらも正常女子あるいは正常男子のそれと同じである。これは本症候群がその karyotype と一致してY染色体をもっていることを示すものであるが、F小体および Barr 小体が正常男女のどちらにも相当する値を示している。この点は真性半陰陽および混合型性腺異発生症の場合と同じように細胞学的性別の判定はほとんど不可能ではあるが、どちらも高率で判定不可能というパターンは、47, XXY の Klinefelter 症候群

表7 Klinefelter 症候群における体細胞のF小体

症例	年齢	F小体 (%)		Barr 小体	性染色体構成
		毛根細胞	リンパ球		
1	27	81	77	+	47, XXY
2	17	39	20	+	47, XXY
3	17	76	44	+	47, XXY

の診断上, 同じく重要な所見とみることができる.

(3) 染色体におけるF小体

上述したようにいろいろなヒト細胞核においてQあるいはQMなどのアクリジン色素染色で強い蛍光を発するF小体が, Y染色体の一部分に相当するということはすでに確かめられた事実である. 著者はこれを直接に確認するため, 本大学医学部染色体異常研究施設の外村教授に依頼して, ヒト・リンパ球培養細胞の分裂中期の染色体についてQM染色による検索を行なつた. その所見は写真6の如くで, 明らかにY染色体の長腕の一部(遠端部)がはつきりとほかの部分あるいはほかの染色体と識別できるほど強く蛍光染色されている.

総括と考案

緒言にも述べたように, F小体 (fluorescent body) の発見はアクリジン系の蛍光色素, とくに quina-crine mustard dihydrochloride (QM), quina-crine dihydrochloride (Q) あるいは propyl quina-crine mustard dihydrochloride (PQM) などによる染色法を用いての植物および動物細胞構造の研究に端を発したものである. これら一連の研究が発展して, さらにヒト細胞のY染色体の長腕の遠端半分のみがこれら蛍光色素によつてほかの部分とはつきり識別できるほど強い蛍光を呈することが確かめられたが, そればかりでなく分裂休止期のヒト細胞核内にも同じく強い蛍光を発する小体として識別できることが明らかにされ, 臨床的にもその応用が注目されるに至つたものである.

著者も当大学染色体異常研究施設の外村教授らの好意で, ヒト・リンパ球の培養による分裂中期のY染色体長腕の一部がこれら蛍光色素によつて明瞭に染色されるという成績を確認することができた(写真6を参照).そこで著者はさらに, ヒトの細胞(表皮, リンパ球あるいは精子)についてQあるいはQMによる染色法でF小体の検索を行なつた. その成績は第3章に記述した如くであるが, ここにはこれら成績を総括するとともに若干の考案

を加えてみたい.

これら蛍光色素によつて, なぜある染色体の一部分だけが蛍光顕微鏡ではつきり識別できるほど強く染色されるかについては, 現在次のように解釈されている. はじめ Caspersson ら²⁾³⁾は QM がアルキル化作用群をもち, これが染色体の guanine の N-7の原子に結合することから, guanine の多い DNA の部分, さらに一般的には DNA の多い染色体部分に結合するためと考えた. しかし, その後の研究からこの解釈は正当ではなく, QMで染色される部位は heterochromatin で構成されているためという説が有力になつている⁵⁾. heterochromatin とは性染色体ではじめて発見されたものである. これは heterochromosome とよばれ, 細胞分裂の終りにも濃縮したままで残り染色体を失われないという性状をもっている¹⁰⁾. ところが, その後の研究で常染色体にも分裂の間に濃縮されたまま残る部分のあることが判明した. このような部分はすべて heterochromatinとよばれ, そうでない染色体部分は euchromatinと称せられて両者が区別されるに至つている. なぜ2つの異なる chromatin が存在するかはまだいろいろと議論のあるところだが, 恐らく heterochromatin とは染色体の各節の作用を発動させる機能をもつ部分であり, いいかえれば heterochromatin そのものは遺伝学的には機能をもっていないと解される. あるいは, heterochromatin の細胞学的定義によれば, これは interphase の核における濃縮され DNA を多量に含む部分ということにもなる. ある種のアクリジン色素で染色された染色体を蛍光顕微鏡でみるとその部分部分が幾条にも蛍光を発した帯状を呈するが, この蛍光帯は heterochromatin の部分に相当すると考えられている. とくに Q, QM などこの作用が強いのはイオン結合 (ionic bonding) と intercalation によつて DNA に結合しやすい性状をもち, なかでもQMはそのもつアルキル化作用群によつて一層DNAとの結びつきが強いのではないかと考えられている. しかし, QやQMのDNA結合力は動物の種類によつてちがつているらしい. たとえば, 著者も確認したように, QやQMによつてY染色体やヒト精子の約半数ではF小体のはつきり染色されるのに, ウシ精子ではこの現象が見られないという¹⁾. また, マラリア治療剤の me-caprine はダイズやハムスターの染色体を均等に染色するが, ヒトの染色体では帯状に染色されているというちがいのあることも確かめられている¹⁴⁾. 以上のいろいろな研究成績から考案すると, ヒトのY染色体およびinter-

Phase の細胞核内にみられる Q や QM で強く染色される部分、すなわち F 小体とよばれるものはこれら蛍光色素にとくにいわゆる親和性をもつ heterochromatin の部分と見ることができよう。

Caspersson ら²³⁾も指摘しているように、この F 小体の染色には QM の方が Q より強い蛍光を発し、安定性も大きく褪色がおそいとされており、このことは著者も確認している。これは恐らく QM がアルキル化作用群をもっているためかとも考えられるが、著者の実験によれば Q も F 小体の検索には十分役立つことを確認している。したがって、できるなら QM の方がよいが、Q でも臨床的には十分応用できるものといえる。

以上のようなことから、著者は正常男女、性器異常（男子不妊症、尿道下裂、停留睾丸、各型の半陰陽、性染色体異常症）などにおいて主として毛根細胞、血液リンパ球など休止期細胞および精子につき、Q あるいは QM 染色による F 小体の出現を蛍光顕微鏡によつて検索した。血液についてリンパ球を対象としたのは、既述のように多形核白血球よりは、はつきりかつ容易に F 小体の存在を判定できるからである^{9) 15) 16)}。

正常男女における F 小体

男子の場合、その毛根細胞およびリンパ球の核には、Q または QM で強く染色される直径約 0.2~0.3 μ の円形の F 小体が約 30~70% に存在する。しかし、女子の場合には全く存在しないか、F 小体と推定されるものが認められてもその出現率はせいぜい 3% かそれ以下である（図 2, 3, 4）。この所見は男女の体細胞核の F 小体の出現がはつきりちがつていることを示すものである。いいえと、ヒト体細胞核における F 小体の検査は Barr 小体 (sex chromatin) 検査と同様、とくにこれとの併用によつて細胞学的性別 (cytological sex) の判定に極めて有用な臨床的検査法である。ただ、なぜ男子にもつと高率に出現しないか、逆に女子でもなぜ稀れではあるが時には 4~5% の出現を示すのか、この点は sex chromatin 検査成績の実態とよく似ている⁹⁾。これにはいろいろの原因や解釈が考えられるが、これらの検査法はどちらも性別の判定というヒトの一生をも左右するほどの重大な決定の基準ともいえるものである。したがって、その判定には少しでも疑念を残さないようにすることが最も肝要である。これにはよい標本、よい顕微鏡、よい観察者ということが最大の条件となる。ただ図 4 に示したように座標図式で毛根細胞とリンパ球の出現率をプロットすると、F 小体出現率は男女の間ではつきり区別さ

れることが判明している。したがって、正確を期するためには同一人につき毛根細胞（その他の細胞でもよい）とリンパ球の F 小体を検査してこれを総合的に判断するのがよいと考えられる。なお、妊娠初期の頸管粘膜²⁰⁾、あるいは羊水中細胞¹⁷⁾の F 小体検査による性別判定の可能性も想定されており、将来はこの方面でも有力な検査法となるであろう。

精子における F 小体

精子には X 精子と Y 精子の 2 種類が存在することはすでに周知のとおりである。したがって、F 小体が Y 染色体を示すものであるとすれば、精子を Q あるいは QM で染色すれば F 小体をもつ精子を区別することができるはずであり、実際にも精子のうちには F 小体をもつものが 40~50% の割合いで存在することが証明されている^{13) 14)}。著者も正常および不妊を主訴とする乏精子症の射精液中の精子について F 小体の出現率を検索した。その結果、40% 前後の精子は 1 個の F 小体をもっていることを認め、さらにこの出現率は精子数あるいは精子の運動性などとの間に相関関係を示していないことをも確かめた（写真 4 および図 5, 6）。この成績は Pearson ら¹⁴⁾、Barlow ら¹⁾、Summer ら²¹⁾のそれと同様であつた。しかし既述のように Y 染色体の長腕の一部が強く蛍光染色されるからといって F 小体をもつ精子が Y 精子、これを欠くものが X 精子だということは、この蛍光染色法によるかぎり、それは間接的な証明であることはいうまでもない。これに対し Summer ら²¹⁾は、F 小体をもつ Y 精子と想定されるものとこれをもたない X 精子と想定されるものにつき Feulgen 染色による DNA 含有量の測定を行なつて比較検索した。この検索から、F 小体陽性の精子と陰性の精子との間の DNA の量的差異は 23X と 23Y の haploid 間で理論的に算出した量的差異と等しいことを確かめている。つまり、F 小体陽性の精子は Y 染色体をもつ精子と考えてよいことになる。なお、著者の 40% 前後が F 陽性精子という出現率は Pearson ら¹⁴⁾などのそれよりやや低率ではあるが、Diasio & Glass⁶⁾のそれにほぼ同じ数値である。これは恐らく QM の使用とか検査法の習熟度を高めることで理論的に想定される 50% 前後の出現率が得られるかも知れないが、少なくとも著者の成績からも射精液中の精子の約半分は Y 精子であると考えてよいといえる。

このように Y 精子は通常 1 個の F 小体をもっているわけであるが、著者の検索によるとそのうちの 8 例（正常 4 例、乏精子症 4 例）においては 2 個の F 小体をもつ精

子の存在することを認めている。その出現率は1—3% (平均 1.8%) であった Pearson & Barlow¹⁴⁾ は3例の正常男子の精子細胞 (Spermatid) の 1.4% が2個のF小体をもつ精子であることを、また Summer²¹⁾ らもほぼ精子の1.26% が2個のF小体をもっていることを報告している。著者の47例についての精子におけるF小体検索で、8例にのみ平均 1.8% に2個のF小体をもつ精子のあることを認めたのはなぜか、はつきり断定はできないが、各例とも 100—200の精子を検索しているからで、同一精液につきもつと多数の精子を検索すれば、さらに高率に発見されるかも知れない。これに対し、Diasio & Glass⁶⁾ は XYY の1例でその精子の5% が2個のF小体をもっているのを認めたが、それ以外では 5,700個の精子を検索して2個のF小体をもつものは1個も発見できなかったという。この点もさらに今後の検討が必要であろう。しかし、一見正常と考えられる男子の精子中にも2個のF小体をもつものが平均 1.8% も存在することがあるという事実は注目に価する。それにもかかわらず、XYY という性染色体組合せ異常の発生は 0.1% 以下と算定されている。これは恐らく、2個のF小体をもつY精子は1個しかない正常のY精子より授精能力が低いということも推定される²¹⁾。これに関して著者は2個のF小体をもつY精子はその形態に異常を示しているものの方にはるかに多いという成績を得ており (写真5)、これも2個のF小体をもつ精子が実際には授精しにくいことの証左と考えることもできる。

性器系異常

単純性尿道下裂および停留睪丸では、体細胞におけるF小体の出現率はそれぞれ毛根細胞で66.2%と62.6%、リンパ球で49.8%と60.2%であり、これは正常男子のそれらと全く同様であった。また男性半陰陽の診断が確定したもので、体細胞のF小体は正常男子および単純性尿道下裂とはほぼ同じ出現率を示し、F小体に関するかぎり異常は認められていない。これに対し、先天性副腎過形成症または非進行性男性化症を含む女性半陰陽ではいずれも体細胞のF小体の出現率は正常女子の場合と同様で、少数の例外 (3—5%) をのぞきその大部分では出現率が0であった。

しかし、真性半陰陽および混合型性腺異発生症ではF小体の出現および Barr 小体の出現の率とか割合などは極めて複雑になつてくる。たとえば、真性半陰陽のうち46, XY の2例 (性腺: O+T) ではF小体は26%および24—28%であり Barr 小体は2%であった。karyo-

type が46, XX の2例 (性腺: OT+OT) の真性半陰陽では Barr 小体が12%および17%で明らかに陽性、ところが毛根細胞でのF小体は3%および0.5%、リンパ球では4%および1%の出現率を示していた。46, XY の症例では Barr 小体およびF小体の出現率はおよそその karyotype をそのまま示しており、その細胞学的性別は一応男性と判定されるが、F小体の出現率は正常男子のそれよりはかなり低率である。これと対応するように、46, XX ではその細胞学的性別は karyotype とほぼ相応し女性型に近いが、Barr 小体は陽性とは判定できるが、その出現率は12%および17%と正常女子の報告よりはやはり低い傾向を示している。つまり、Barr 小体あるいはF小体の出現率は大体においてそれぞれの karyotype を反映してはいるが、異性半陰陽あるいは女性半陰陽の場合とはかなりちががつており、これらの出現率ははつきりと細胞学的性別を示すものとしては一般に低い傾向を示している。このような所見と性腺分化の異常との関係は今後検索例の増加によつて明らかになると考えられるが、少なくともモザイク型でない真性半陰陽の Barr 小体とF小体の出現率とかその割合はいは男性半陰陽のそれとはかなりちがうパターンを示しているといえる。したがつて Barr 小体と併施したF小体の検索は真性半陰陽の鑑別診断に新しい一つの手段を提供するものといえる。このような Barr 小体とF小体の出現率とかその割合の特異的なパターンは46, XX/46, XY のモザイク型の真性半陰陽の2例 (性腺: O+OT と O+T) ではさらにはつきりしている。すなわち、その1例は Barr 小体9%で陽性と判定されるにもかかわらずF小体も15—19%というかなり高い出現率を示している。もう1例は Barr 小体が7%で陽性であるとともに、F小体もかなり低い10%および5%と女性としてはやや高い出現率である。この2例の場合における細胞学的性別判定は当然困難になつてくるが、逆にみれば Barr 小体のみならずF小体の両方を総合した成績からの判定が困難のような半陰陽はむしろ真性半陰陽の可能性が大きいことを示唆する所見とも考えることができる (表5)。

同様のことは karyotype がモザイクを示す混合型性腺異発生症¹²⁾についてもいえるし、そのパターンは一そう複雑で Barr 小体およびF小体による細胞学的判定はさらに困難になつてくる。すなわち、2例の45, X/46, XY および1例の45, X/46, Xy/46, XY における Barr 小体およびF小体の出現率はどちらもその割合いからいつて細胞学的性別判定が一そう難かしいという

所見を呈している(表6)。したがって、これらの所見も Barr 小体およびF小体による性別判定の困難さがモザイク型の半陰陽を示唆するという事を裏づけている。

著者の検索した Klinefelter 症候群の3例は karyotype がいずれも47, XXY であるが、これらでは Barr 小体は女性系に近い高率で明らかに陽性であり、同時にF小体も男性のそれと判定してよい高率を示している。これも Barr 小体およびF小体からの性別判定は困難ではあるが、ただ真性半陰陽あるいは混合型性腺異発生症のパターンとは著しく趣きを異にしており、細胞学的にはそのどちらだけでも男とも女とも判定できるほど両者が高率である。

結 論

正常男女、種々の性器系異常症などのヒト細胞(毛根細胞、リンパ球、精子)について quinacrine dihydrochloride(Q)あるいは quinacrine mustard dihydrochloride (QM) 染色と蛍光顕微鏡により、Y染色体を示すとされる蛍光小体(fluorescent body: F小体)の検索を行なった。

(1) リンパ球培養による分裂中期の染色体について検索した結果、Y染色体の長腕部(遠端の半分)のみが、QあるいはQMによつて強い蛍光を発する。

(2) 正常男子の毛根細胞およびリンパ球においても、明らかにその核内に1個の直径約0.2~0.3 μ の円形あるいは長楕円形の強い蛍光を発する小体(F小体)が平均30~40%以上に認められる。これに対し正常女子の場合は時に2~3%のF小体を認めるが大部分では全く存在しない。したがって、体細胞核におけるF小体の検索は、Barr 小体(sex chromatin)検査と同じく、あるいは両者の併施は細胞学的性別の判定に極めて有用な検査法である。正確を期するためには毛根細胞とリンパ球の両者についてF小体を検査し総合的に判断するのがよい。

(3) 射精液中の全精子数のうち30~40%(大部分は40%前後)にY精子と想定される1個のF小体をもつ精子が存在する。この出現率は正常および乏精子症における精子数あるいは精子運動率との間に相関関係を示していない。8例(正常4例、乏精子症4例)において平均1.8%に2個のF小体をもつ精子の存在することを認めた。しかし、2個のF小体をもつ精子はむしろ正常精子よりは形態異常を示す精子の方に多く認められる。

(4) 男子不妊症、単純性尿道下裂、停留辜丸、男性半陰陽では体細胞のF小体出現率は正常男子のそれと同

じであり、逆に女性半陰陽の場合は正常女子と同じ出現率を示した。

(5) 真性半陰陽ではその karyotype にある程度まで対応して Barr 小体またはF小体の出現率が高いが、正常の男女にくらべるといずれも低率である。モザイク型の真性半陰陽あるいは混合型性腺異発生症においては、Barr 小体あるいはF小体の出現率は、不定の傾向が強くどちらも全体として低率であり、細胞学的性別の判定が困難である。したがって、Barr小体(sex chromatin)およびF小体の検索成績で性別判定が困難のような場合は、むしろ真性半陰陽とかモザイク型の混合型性腺異発生症などを疑わせる有力な所見ともいえる。

(6) Klinefelter 症候群(いずれも47, XXY)でのF小体は正常男子のそれと同様で高率を示し、また Barr 小体(sex chromatin)も陽性であった。細胞学的性別判定が困難な点は真性半陰陽や混合型性腺異発生症と同様であるが、本症候群は常にF小体の出現率が高いという異なるパターンを示している。

本研究に関して恩師落合京一郎教授より絶大な御指導と御校閲を賜わつた。また本学附属遺伝病研究施設染色体異常研究部の外村晶教授、山田博士から絶大な御指導と御援助を賜つたほか当教室の駒瀬講師、大島講師、根岸講師、佐々木嬢ならびに教室員諸氏の御助力をいただいた。ここに深く感謝の意を表する。

本論文の一部は1971年9月16日第336回日本泌尿器科学会東京地方会、同年10月15日第16回日本不妊学会総会、同年10月31日第36回日本泌尿器科学会東部連合地方会において発表した。

文 献

- 1) Barlow, P. and Vosa, C.G.: Nature, **226**, 961, 1970.
- 2) Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, U. and Zech, L.: Exptl. Cell Res., **49**, 219, 1968.
- 3) Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U. and Simonsson, E.: Exptl. Cell Res., **58**, 128, 1969.
- 4) Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U. and Simonson, E.: Exptl. Cell Res., **58**, 141, 1969.
- 5) Caspersson, T., Zech, L. and Johansson, C.: Exptl. Cell Res., **62**, 490, 1971.
- 6) Diasio, R.B. and Glass, R.H.: Lancet, **ii**, 1318, 1970.
- 7) George, K.P.: Nature, **226**, 80, 1970.

- 8) 金井三郎：日泌尿会誌, 49, 187, 1958.
- 9) Lamborot-Manzur, M., Tishler, P.V. and Atkins, L.: *Lancet*, **i**, 974, 1971.
- 10) Mittwoch, V.: *Sex Chromosomes*, London, 1967.
- 11) Meredith, R.: *Chromosoma*, **26**, 254, 1969.
- 12) 落合京一郎：半陰陽，現代産婦人科学大系，Ⅱ，中山書店，1971.
- 13) Pearson, P.L., Bobrow, M. and Vosa, C.G.: *Nature*, **226**, 78, 1970.
- 14) Pearson, P.L. and Barlow, M.: *J. Reprod. Fert.*, **22**, 107, 1970.
- 15) Polani, P.E. and Mutton, D.E.: *Brit. Med. J.*, **i**, 138, 1971.
- 16) Ricci, N., Castoldi, G.L., Dallopiccola, B. and Baserga, A.: *Brit. Med. J.*, **i**, 347, 1931.
- 17) Rook, A. Hsu, L.Y., Gertner, M. and Hirschhorn, K.: *Nature*, **230**, 53, 1971.
- 18) Schmidt, W.: *Cytogenetics*, **6**, 342, 1967.
- 19) Sperling, K.: *Lancet*, **i**, 753, 1971.
- 20) Schettles, L.B.: *Nature*, **230**, 52, 1971.
- 21) Summer, A.T., Robinson, J.A. and Evans, H.J.: *Nature New Biology*, **229**, 231, 1971.
- 22) Zech, L.: *Exptl. Cell Res.*, **58**, 463, 1969.

(1972年2月14日受付)