Detection of Fluorescent Body in Spermatozoa of Bull, Boar, Dog, Rabbit, Rat and Mouse

Shyoso OGAWA, Hirohito YAMAKAWA, Junko YAMANOI, Shiichi NISHIDA*,
Tutomu TAKESHIMA**, Tetsufou MATUMOTO***, Yoshinori TAUCHI**,
Hiroshi NAGASHIMA****, Yasuhiko KANOU

Dept. of Animal Reproduction, Meiji University, 1-1-1 Higashimita Tama Kawasaki 214,

***Imamichi Institute for Animal Reproduction, ***Tokyo Metropolitan Livestock
Experiment, ****Research Center Nisshin Flour Milling Co. Ltd.*

(Accepted for publication June 24, 1987)

Summary. An attempt was made to identify the fluorescent body (F-body), with Quina-crine mustard (Q-M) staining, in the spermatozoa from 7 mammalian species (human, bull, boar, dog, rabbit, rat and mouse). Washed sperm suspension in PBS was either stained with Q-M solution for 40 min or 24 hr, or treated with Protease and then stained with Q-M for 40 or 100 min. The final concentration of Q-M in sperm suspension was 0.025 mg/ml. The microscopic examination, using a reflected fluorescence microscope (B-exciter filter; 390~490 nm, Optical suppression filter; ≥ 510 nm), revealed that the same F-body as that in human sperms was present in all of these species. After 24 hr staining, F-body was found in 28.5, 28.4, 36.2, 3.0, 9.7 and 9.3% of sperms of bull, boar, rabbit, dog, rat and mouse, respectively. Enzyme treated specimens showed higher incidences (43.8, 44.0, 47.6 and 41.0% for bull, boar, rabbit and dog, respectively, and 20.4 and 20.7% for mouse and rat, and 32.5% for human) of the F-body than those in the specimens stained 24 hr without enzymatic digestion. These findings led to the conclusion that the F-body is present in common with spermatozoa of many mammalian species including man and gorila.

The successful detection of F-bodies in the sperms from various mammalian species is attributed to; (1) the long-term submersion of specimens in the Q-M solution for staining and (2) the treatment of the membrane by protein digestion which yielded more favorable condition for staining in many animal species. **KEY WORDS;** F-BODY, SPERMS.

Jpn J Anim Reprod 33, 140-145, 1987

牛・豚・犬・家兎・ラットおよびマウス精子における 蛍光小体 (F-body) の検出

尾川 昭三・山川 宏人・山井 淳子・西田 司一*・竹島 勉**
松本 徹郎***・田内 正賢**・長嶋比呂志****・加納 康彦

明治大学農学部 214 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1・*元東京大学農学部

動物繁殖研究所・*東京都畜産試験場・****日清製粉(株)中央研究所

Zech (1969) はキナクリンマスタード (Q-M) 染色されたヒトの細胞には、分裂中期の像でY染色体長腕部

の末端に強く蛍光を発する小体のあるのを認めた。Pearson *et al.*, (1970) はヒトの男性の細胞の Q-M 染色では interphase の核に蛍光小体 (Fluorescent Body; F-body) が高頻度に観察されたと報告した。Barlow and

* Former Address; Dept. Veterinary Med., The University of Tokyo

Vosa (1970) は Y 染色体に認められる F-body は精子にも出現することを報告した。彼らは、この F-body を有する精子は Y 染色体精子であり、これを欠く精子を X 染色体精子であると推論した。現在では、この推論は妥当と考えられていて、ヒトの Y 染色体精子の識別には F-body が指標として用いられるようになった。Pearson *et al.* (1971) は Q-M 染色による F-body の出現は全哺乳動物細胞の Y 染色体に共通しているかどうかを 24 種の動物のリンパ細胞についてしらべた。その結果、F-body はヒトとゴリラの細胞にのみ認められた。果して、この様な Y 染色体を示す F-body はヒトや一部の霊長類に特有なものであろうか。

一方、Bhattacharya (1976) はウシおよびウマの精子にタンパク分解酵素で消化処置してから Q-M 染色を施した結果、ヒトの精子頭部にみられると全く同様な螢光小体が両者の動物の約 1/2 の細胞に認められたと報じた。彼はこの精子を Y 染色体精子と結論している。以来 10 年以上を経過したが、その間、この Bhattacharya の知見を支持する研究報告は全く見当たらない。依然として、F-body はヒトの Y 染色体精子に（一部の霊長類を含む）特有なものであるとの考え方が支配的である。我々は、この F-body はヒトのみならず、家畜、小実験動物の Y 染色体精子に共通すること示す知見を得たので報告する。

材料と方法

用いた精子はヒト、ウシ（ホルスタイン種）、ブタ（デュロック種）、イヌ（ビーグル犬種）、家兎（ニュージーランドホワイト種）、ラット（ウイスター系）、マウス（ICK 系）のものである。ヒト、ウシ、ブタ、イヌおよび家兎の射精精液（家兎およびヒト精液は液化後）を 80～100×g、5 分間遠心分離して沈渣部を棄て、残る上層部分を採取した。これにダルベッコの PBS (pH 6.8) を 2 倍量加えて遠心分離 (200～250×g、10～15 分間) した。沈渣精子部分について 3 倍量の PBS を加えて遠心分離 (200～250×g、10～15 分間) する精子洗浄操作を 3 回反復した。得られた洗浄精子部分を 5 分間静置し、上方に浮遊してくる精子部分を染色に供した。一方、ラットおよびマウスでは頸椎脱臼法により殺し、精巣上体尾部を摘出し、この分離尾部を 1/2 皮下注射針にて穿刺した後、尾部の圧迫により穿刺孔より圧出された精子塊を得た。これを 0.4 ml の HER 液 (Ogawa *et al.* 1971) に移して 5～10 分間 37°C で保持した後、精子が浮遊して HER 液が白濁したものを微細ピペットで採取した。これに PBS (pH 6.8) を 2 倍量ずつ加えて 3 回

遠心分離 (200×g、10 および 15 分間、そして 200×g、15 分間) で洗浄し、最終回遠心分離の沈渣部の真上に浮遊走して来た精子部分を採取して染色に供した。これらの分画に含まれる精子の数は必ずしも多くないが、夾雑物が少なく、以後の Q-M 染色に適していた。

これらの洗浄精子浮遊液には Fig. 1 に示すような、a) および b) の 2 種の Q-M 染色が施された。用いた Q-M 染色液は Q-M 0.05 mg/ml 濃度の PBS である。なお、予備実験であるが、この濃度より低くても高くても F-body の検出には不適當であった。

a) 上記の洗浄された精子の浮遊液は各 0.1 ml を小試験管（径 10 mm、長さ 50 mm）に移し、これに Q-M 液 0.1 ml を加えて室温で 40 分間あるいは一昼夜保持した。

b) 精子浮遊液 0.1 ml に対し等量のデイズパーゼ (2000 P.U./ml, Bacillus polymixa の培養液より抽出、製品化されたプロテアーゼ合同酒精、東京) 液を混じて 37°C で 10～15 分間保持してタンパク消化処置した。次いで Q-M 液を 0.2 ml 加えた。これを室温で振盪しながら 40 分あるいは 100 分間保持した。

a) および b) の両者共に Q-M 液を添加した後、直ちに試験管外側をアルミ箔で被覆して、鏡検するまでの間、外部の光線から遮断された。

試料の検査には落射型螢光顕微鏡 (BHS-RFK: オリンパス光学) が用いられた。B 励起フィルターは 390～490 nm、補助吸収フィルターは 515 nm 以上の波長のものが、光源は超高圧水銀灯 (USH-200 Mb) が、そして対物レンズは S plan 40× が用いられた。

染色処置された精子浮遊液はスライドガラス (Pre-cleaned 76×26 mm Matsunami Ltd.) 中央部に 1 滴 (約 0.002 ml) を落として、その上方からカバーガラスで被い、精子が移動しないようになるまでカバーガラスを圧してからカバーガラスの周囲を市販のネイルエナメルで封じた。この精子を螢光顕微鏡で観察し、各試料について 200 個の精子を数え、その頭部に F-body を有するものの率 (%) が算出された。

結果と考察

本研究に用いた Q-M 染色によりヒト精子頭部に認められる F-body と全く同じ螢光小体が用いた 7 種の哺乳動物精子に認められた (Fig. 1)。ただし酵素処理をしないで Q-M 0.025 mg/ml 液の染色 40 分の処理のものでは、この 7 種の動物精子には F-body は認められなかった。一方、酵素処理をしなくても一昼夜そのまま染色液

Fig. 1. Processing of quinacrine mustard staining for F-body detection in mammalian spermatozoa.

中に保持しておいた精子では、F-body の存在が用いた全動物種において認められた。その出現率は Table 1 に示す如く、ウシ、ブタおよび家兎の精子では各28, 30および 38% に達した。

しかし、イヌ、ラットおよびマウス精子では極めて低く、2~9% であった。一方、デイスパーゼで消化処理後の精子では、Q-M 液40分間の染色により、前述の酵素無処理で一昼液染色されたものよりも高い F-body 検出率が得られた。平均出現率はウシ 43%, ブタ 46%, 家兎 48%, そしてヒト 27% であった。すなわちこの酵素処理は F-body の検出のための前処理として有効であった。然し、酵素処理後、100分の染色を施したものでは、40分の染色に比し F-body の検出率には、著しい増加は認められなかった。

Rohde *et al.* (1972) はヒト精子を3%トリプシン液で30分間消化処置すると Q-M 染色による F-body 出現率が消化処置しないものに比して約2倍に増加したことを報告した。また Bhattacharya (1976) はウシ、ウマの精子をパパイアのプロテアーゼで消化処置してから Q-

M 染色すると F-body が認められると報告した。彼は この消化処置が Q-M の精子頭部内への透過に都合のよい状態をもたらすと考えた。我々がこの研究で得た結果もこれら Rohde *et al.* (1972) および Bhattacharya (1976) の両報告と一致している。動物種によって Q-M の精子頭部内への透過性に違いがある可能性が考えられる。24時間の染色の結果は、家兎、ブタおよびウシの精子では他の動物種のものに比し Q-M の透過性あるいは Q-M と染色体の蛍光小体部位との結合性がより良好である可能性を示唆している。さらに蛋白分解酵素による消化処理効果は、Q-M の透過に都合の良い状態を作るばかりでなく、蛋白消化によって精子表層に附着している粒子など(遠心分離によって除去されなかったもの)が除去され、頭部蛋白消化によって膜層が薄くなることから更に F-body 像が精子表層を透して検出され易くしていることも推定される。周知の如くウシ、ブタ、イヌおよび家兎精子頭部の形状はオタマジャクシ状で厚さが極めて薄い。それに比してマウスおよびラット精子頭部には特殊な厚膜構造がみられる。この構造が F-body の明

Fig. 2. Micrographs of spermatozoa showing fluorescent-body (arrowed). a: Bull, b: Boar, c: Rabbit (ca. $\times 1500$) d: Rat, e: Mouse, f: Human (ca. $\times 1200$)

瞭な検出に障壁となっている可能性がある。前述したように、一昼夜の染色においても消化処置による蛍光染色においてもこれらの動物における F-body 検出率は非常に低いものであったが、これは上記のような頭部形態によるものかも知れない。なお、この他に Y 染色体の蛍光小体出現部位における Q-M との結合性について種による違いがある可能性を考慮する必要があるだろう。

何故これまで F-body の存在が種々の哺乳動物精子について検出されていなかったのであろうか。ヒトの細胞や精子で行われたと全く同じ Q-M, Q-HCl 蛍光染色法をそのまま他の動物の精子の染色に適用していたのではないだろうか。例えば染色液の濃度、染色時間、更に染色物質の細胞内への透過性を助ける工夫などに考慮が払われて来たのかが問題であろう。

本研究では種々の哺乳動物で精子の F-body が検出されたが、これは、(1)染色液に封入されたまま試料が鏡検

に供されたことと、(2) Q-M 液の中でも長時間染色処置されたこと、ならびに(3)動物種により精子頭部のタンパク消化処理が染色に好条件をもたらしたこと、などの点が F-body 検出可能となった原因と推定される。

これらの結果は Bhattacharya (1976) がウシ、ウマ精子に F-body を発見したという唯一の報告に確証を与えるものである。そして精子 F-body はヒトや一部の霊長類細胞の Y 染色体に特有のものであるとの考え方に反証を与えるものである。我々は、Y 染色体精子の F-body は多くの哺乳動物に共通して存在するものと推論する。

精液中の全 Y 精子の F-body が検出された場合の率は 50% になるはずである。Barlow and Vosa (1970) によればヒトにおける F-body の出現率が常に 50% 以下であるのは F-body の短時間の褪色によると説明した。一方、Shirai and Matsuda (1972) は正常のヒトの F-body を有する精子の検出率が F-body を有さない精子

Table 1. Incidence of F-body detected in the spermatozoa of various mammalian species

species	No. of Animals	Rate of appearance of F-body (% , mean±SE)			
		Staining without enzymatic digestion		Staining after enzymatic (disperse) digestion (10 min)	
		Quinacrine Mustard Staining			
		40 min	24 h	40 min	100 min
		%	%	%	%
Mouse	8	0	9.25±1.01	20.25±1.41	20.38±1.16
Rat	3	0	9.67±2.19	18.33±1.33	20.67±1.76
Rabbit	5	0	36.20±1.83	47.60±4.34	45.00±3.69
Dog	3	0	3.03±1.53	38.00±4.51	41.01±4.93
Boar	5	0	28.40±1.94	44.00±1.73	43.60±1.29
Bull	4	0	28.50±2.87	42.25±2.87	43.74±2.29
Human	4	0	3.25±1.18	27.50±1.71	32.54±1.94

に比し常に低いことの原因として、正常人においても常に数 % の形成不全、すなわち Q-M によって染色されない異常な核を有する精子が存在するためと推論した。この実験で F-body 出現率の高い値の得られた動物、家兔、ウシ、ブタ精子でも F-body の平均出現率は 50% より数%低い値であった (Table 1)。精液の洗浄回数の増加に伴い微細な夾雑物や精子表面に附着している夾雑物を取り払われた標本では、F-body の出現率が増加する事実 (未発表資料) から、上記 4 種の動物精子で F-body 出現率が 50% に満たない理由の 1 つとして技術的な失宜によることが推察される。

従来より家畜において、X 染色体精子と Y 染色体精子を分離しようとする試みが枚挙にいとまのない程の数多くの人々によってなされてきた。しかし、分離処理されて得られた精子が X 染色体精子か Y 染色体精子かを識別し得る簡単で信頼し得る方法は確立されていない。本実験で得られた知見は家畜や小実験動物の Y 染色体精子の同定をヒト Y 染色体精子におけると同様に行い得る可能性を示唆している。この F-body 検出法を更に信頼性の高いものにするべく、研究を続ける必要がある。そのようにして得られたこの F-body の検出方法は家畜や小実験動物における X 染色体精子と Y 染色体精子の分離による選択的性の動物生産に関する研究に利用されるのみならず、その実用化にはずみをつけ、その進歩に貢献するものと考えられる。

References

- Barlow P, Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226: 961-992.
- Bhattacharya BC (1976) Pre-determination of sex in animal reproduction. *Proc 8th Intn Cong Anim Reprod Art Insem* 4: 876-878.
- Dulbecco R, Vogt M (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 99: 167-182.
- Ogawa S, Satoh K, Hashimoto H (1971) *In vitro* culture of rabbit ova from the single cell to the blastocyst stage. *Nature* 233: 422-424.
- Person PL, Bobrow M (1970) Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male. *J Reprod Fert* 22: 177-179.
- Person PL, Bobrow M, Vosa CG, Barlow PW (1971) Quinacrine Fluorescence in mammalian chromosomes. *Nature* 231: 326-329.
- Rohde W, Porstmann T, Zillmann R, Dörner G (1972) Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Y-Chromosomes in unbehandelten und trypsinbehandelten menschlichen Spermien. *Acta Biol Med Germ* 28: 189-192.
- Shirai M, Matsuda S (1972) Fluorescent bodies in the spermatozoa of patients with sterility. *Jap J Fert & Ster* 18: 239-242, 243-245 (in Japanese).
- Zech L (1969) Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. *Exp Cell Res* 58: 463 (Abst).

要 約

我々はキナクリンマスタード(Q-M)を用いて7種類の哺乳動物(ヒト, ウシ, ブタ, イヌ, 家兎, ラット, マウス)から得た精子に蛍光染色を施し, F-bodyの検出を試みた。これらの動物から得た精子をよく洗浄し, (a)その精子浮遊液 0.1 ml を等量の Q-M 液と混合し, 40分間あるいは一昼夜室温に放置した。および, (b)デイスパーゼ液 (2000 P.U./ml) 0.1 ml を加え, 37°C で10~15分間保持した後に 0.2 ml Q-M 液を添加し, 40分あるいは100分間室温に放置した。染色液中の Q-M 最終濃度は 0.025 mg/ml であった。精子浮遊染色液をスライドガラスに載せ, カバークラスで覆って蛍光顕微鏡下で観察した (B-励起フィルター; 390~490 nm, 補助吸収フィルター; ≥ 515 nm)。一昼夜の染色後の観察で, ヒト精子に出現したものと同一 F-body が6種類の動物の精子に観察され, ウシ, ブタ, 家兎ではそれぞれ 28.5%, 28.4%, 36.2%, イヌ, ラット, マウスではそれぞれ 3.0%, 9.7%, 9.3% であった。一方, 酵素処理を施した標本は, 酵素処理せずに一昼夜染色した標本よりも F-body の出現率は高く, ウシ, ブタ, 家兎, イヌではそれぞれ 43.8%, 44.0%, 47.6%, 41.0%, マウスとラットではそれぞれ 20.4%, 20.7%, ヒトでは 32.5% であった。以上の如く, 様々な哺乳動物種から得た精子に F-body が発見できた理由に, (1)標本の Q-M 染色を長時間行ったこと, (2)酵素による細胞膜のタンパク質消化が, 染色に好条件をもたらしたことが挙げられる。