— Technical Note —

Detection of Fluorescent Body in the Spermatozoa and Somatic Cells of the Common Vole, *Microtus arvalis pallas*

Nobuharu INOUE, Midori MORI, Takako GOTO, Takehiko NISHIKAWA,
Shiichi NISHIDA*, and Yoshio OKI

Nippon Veterinary and Animal Science University, Musashino-shi, Tokyo 180

(Accepted for publication May 24, 1991)

Summary. Spermatozoa, and male and female somatic cells were stained with fluorochrome quinacrine mustard and the incidence of fluorescent bodies (F-body) was compared among these cells in the common voles. Fluorescent bodies were observed in 24.3% of the spermatozoa, 20% of the bone marrow cells and 17.7% of the lymphocytes in the male animals, respectively. However, such bodies were not observed in the female animals. F-bodies decreased to approximately one half in the somatic cells, when they were fixed with Carnoy's solution. Such bodies were observed mostly at the anterior part of the head of spermatozoa.

KEY WORDS: F-BODY, FIELD VOLE, SPERMATOZOA, SOMATIC CELLS.

Jpn J Anim Reprod 37, 291–294, 1991

ハタネズミ (*Microtus arvalis pallas*) の精子および体細胞における F-body の検出

井上 信治・森 みどり・後藤 貴子・西川 武彦・西田 司一*・大木 与志雄

日本獣医畜産大学 〒180 東京都武蔵野市境南町

Zech (1969) は, quinacrine を用いて, ヒト細胞の分裂中期の像で, Y 染色体の長腕の先端部に特殊蛍光物質の存在を認めた (F-body). このものは, ヒトにおいては, 静止期の細胞でもスポットとして染め出されることが知られている (Caspersson *et al.*, 1970). F-body はヒトおよび少数の霊長類のみに存在するものといわれてきたが, Bhattacharya (1970) は, protease 消化によってウシ, ウマの精子で認めた (B-body, Bright-body の略). その後 F-body は, 他の多くの哺乳動物においても, 存在が認められた (Ogawa *et al.*, 1987, 1988; Oikawa, 1987; Igarashi *et al.*, 1989) が, 野生哺乳動物では報告がないようである. 野生哺乳動物として, 人工飼育中のハタネズミを用い, 精子, 骨髓細胞, 白血球 (主として

リンパ球, 以下リンパ球) において F-body の検出を試みた. 染色体そのものの証明はまだ成功していないが, 間接的証明として, 雌雄の体細胞について F-body の検出差を求めた.

材料と方法

精子: ハタネズミを頸椎脱臼法により屠殺し, 精巢上体尾部を摘出した後, pH6.8 の Dulbecco PBS を少量入れたシャーレ内に移し, 液中で, 注射針で尾部を穿刺し, 圧迫して, 穿刺孔から圧出された精子塊を得た. これを 5~15 分間 37℃ で保持した後, 精子の浮遊白濁液を採取した. これに Dulbecco PBS を採取液の 2 倍量加えて 200×g 10~15 分間の遠心分離で 2 回洗浄し, 沈澱部の直上に遊走した精子を染色に供した.

骨髓細胞: 上記のハタネズミの大腿骨を採出し, 生理的

* Former address: Fac. of Agric., Univ. of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

食塩水で灌流し、得られた骨髓細胞を用いた。骨髓細胞を $1,000\sim 2,000\times g$ で5～8分間遠心分離後、常法により 7.5×10^{-3} M-KCl 低張処理した後、2分し一方は無固定、他方は Carnoy (除クロロホルム) 固定して細胞浮遊液を作製した。これらを冷却 50% methanol に浸漬したスライドガラス上に滴下し、風乾標本を作製した(1～2日間乾燥)。

リンパ球：採血したものをスライドガラス上に塗抹し、そのまま一昼夜乾燥させ標本を作製した。

染色方法(精子)：Ogawa ら (1987c) の方法に準じた。精子浮遊液 0.1 ml に対し、等量の dispase (合同酒精製) 2,000 PU/ml 液を混じて、37℃ 10～15分間蛋白質消化処理を行った。次いで 10% glutaraldehyde 溶液で固定し、quinacrine mustard (以下 Q-M) 2.5×10^{-5} % 水溶液を添加、60分間室温で振盪した。なお、Q-M 液を添加した後、アルミ箔で遮光した。暗室内で染色処理された精子浮遊液をスライドガラス中央部に1滴落し、カバーガラスで覆い、軽く圧してから、カバーガラスの周囲を市販のマニキュアエナメルで封じた。この精子を蛍光顕微鏡下で観察し、各試料について200個の精子を数え、頭部に F-body を有するものの率を算出した。

染色方法(骨髓細胞およびリンパ球)：乾燥標本の染色は、遮光した染色瓶を用い、 2.5×10^{-5} % Q-M 液で約10秒間染色した後、蒸留水で水洗、Macilvaine 緩衝液 (pH4.1) に30分間浸漬後、カバーガラスを被せ、その周囲をマニキュアエナメルで封じて、蛍光顕微鏡で観察し、F-body を有する細胞の率を算出した。

試料の検査には、落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス光学) が用いられた。励起フィルターは390～490 nm、補助吸収フィルターは530 nm の波長のもの、光源は超高圧水銀灯である。試料の多くは1,000倍で観察された。

結果と考察

ハタネズミの精子、骨髓細胞およびリンパ球における F-body の出現率を Table 1 に示す。

酵素処理をしない精子においても、Q-M 液に浸漬して、暗室内に一昼夜放置すれば F-body は検出可能となる。しかし、染色に時間を要し、標本面がやや汚染されることが判った。F-body の検出度も酵素処理のものに比し劣るため、酵素処理を行った実験数値を結果として採用し、Table 2 に示した。

体細胞においては、酵素処理により細胞の破壊、変形を来し明確な細胞の識別がつかないものがあつた。また、酵素処理を行わなくても十分に鮮明な F-body の検

Table 1. Detection rate of F-body

	Unfixed cells	Fixed cells
Spermatozoa*	24.3%	
Bone marrow cells	20.0%	11.3%
Lymphocytes	17.7%	6.4%

* Digested with enzyme dispase.

Table 2. Distribution of F-body in the head of spermatozoa

anterior part	71.4%
near boundary line	28.6%
posterior part	0%

出が可能のため、酵素処理をしないものがより適当であると思われた。精子および雄の体細胞における F-body は Figs. 1, 2A に示す。

Ogawa ら (1987) によれば、精子においてはウシ、ブタ、イヌ、ウサギ、ラット、マウスいずれも酵素処理を施せば約1.5～2倍近い F-body の出現率を示した。上述のことから、動物の種類および細胞の種類によって、酵素処理の必要性や、それを行う場合には濃度の変更を考えねばならない。ハタネズミの精子においては、酵素処理は前処理として有効であるといえる。

ヒト精子においては、Q-M 染色で頭部前半部はやや淡く、後半部はやや濃く染まり、明らかな境界線がみられる。境界線は頭部の長軸に対してほぼ直角に位置する。Barlow と Vosa (1970) によれば、ヒト精子頭部の F-body の60%はこの境界線付近にあり、残りは前、後部にほぼ等しく分布する。ハタネズミ精子頭部では、前後部の染色差はヒトのものほど明らかなではないが、同様の境界線がみられ、この線は長軸に対し傾斜している。F-body の分布は Table 2 に示すように、主として頭部前部に存在していて、後半部にはほとんどみられなかった。

骨髓細胞染色の際の Q-M 濃度は、予備実験では 5×10^{-3} % としたが、この濃度では、細胞全体が濃染し、F-body の識別が困難であつた。実験では、Ogawa ら (1987) の方法に従って、Q-M の濃度を 2.5×10^{-5} % に薄めて使用したところ、F-body の出現率は高められた。また、Q-M 染色後の緩衝液 (pH4.1) 浸漬時間は、30から60分と時間を変えても結果に大きな変化はみられなかった。

リンパ球においても、骨髓細胞と同様の方法で F-

Fig. 2. Male (A) and female (B) bone marrow cells. A: male cell that has F-body (arrow, $\times 1,000$) and female cells that have no F-body ($\times 1,000$).

body が認められた (Fig. 2A). なお、同時に染色した雌の体細胞 (骨髓細胞, リンパ球) では F-body は認められなかった (Fig. 2B)

F-body は理論的には、精子においては50%, 雄の骨髓細胞, リンパ球においては100%の出現率が期待されるはずであるが, 本実験の結果はそれよりも低かった. その原因についてはいろいろ考えられるが, いずれも決定的証拠はない. 例えば, Q-M 染色においては, 鏡検中, 時間の経過につれて蛍光が失われ, 暗所に保存すれば再び蛍光を発する事実がある. 体細胞では固定すれば, F-body の検出率が低下する (Table 1). さらに Ishiwatari ら (1988) によれば, 新鮮射出精子よりも凍結保存精子の F-body の出現率は低い. Kano ら (1990) は精子の生存率の低下とともに, F-body の検出率は低下したと報じた. このような F-body 検出率の原因として細胞の凍結, 固定, 死亡などにより細胞構造に変化が起り,

色素の浸透性, 色素との親和性などに変化をきたす可能性がある. このようにして F-body の検出率と理論値との間に差を生じたものとも推察される. また, F-body 検出のための技術の未熟さによる原因などもあげられるかもしれない. ヒト精子で F-body 検出率が50%であるとの報告は, 著者らの知る限りでは, Barlow と Vosa (1970) のみで, 他はすべて50%以下のものである. また, 精子頭部における F-body の分布状態はヒト (Barlow and Vosa, 1970) とハタネズミの場合とは異なるようであるが, 理由は不明である.

Sidhu ら (1987a, b) によれば, ショウジョウバエ (*Drosophila*, ♂, XY) とメイガ科の一種 (*Gallaria mellonella* ♀, ZW) の体細胞においては F-body が陽性であるという.

従来からの多くの報告と今回の研究で得られた結果などを総合して考察すると, F-body は雄特異性の蛍光性

物質というより、むしろ性染色体がヘテロである場合において、全動物細胞に存在する可能性が考えられる。

文 献

- Barlow P, Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 226: 961-962.
- Bhattacharya BC (1976) Pre-determination of sex in animal reproduction. *Proc 8th Int Cong Anim Reprod Artf Insem* 4: 876-878.
- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Lindsten J, Hulten M (1970) Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome regions in human interphase nuclei. *Exp Cell Res* 61: 472-474.
- Igarashi Y, Takeshima T, Tauchi K, Tanaka K, Ogawa S (1989) Identifying the fluorescent body (F-body) with quinacrine mustard staining of canine. *Exp Anim* 38: 263-267.
- Ishiwatari M, Ohtani S, Tanaka K, Nagashima H, Matsumoto T, Suzuki T, Ishida T, Nishida T, Nishida S, Kano Y, Ogawa S (1988) On the character of F-body in spermatozoa heads. *Proc 74th Anim Reprod* p 19 (in Japanese).
- Kano Y, Ishiwatari M, Ohtani S, Ogawa S (1990) The relationship between the incidence rate of F-body having spermatozoa and the survival rate of spermatozoa. *Bull Fac Agric Meiji Univ* 77: 1-8 (in Japanese).
- Ogawa S, Yamakawa H, Yamai J, Nishida S, Takeshima T, Matsumoto T, Yamauchi M, Nagashima H, Kano Y (1987a) Detection of fluorescent body in spermatozoa of bull, boar, dog, rabbit, rat and mouse. *Jpn J Reprod* 33: 140-145 (in Japanese).
- Ogawa S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kano Y, Takeshima T, Tauchi Y, Nagashima H (1988b) Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species. *Theriogenology* 29: 1083-1089.
- Ogawa S, Ohtani S, Kano Y (1987c) Detection of fluorescent bodies in the sperms of various mammals and application of the F-body test to the separation of X- and Y-sperms in boars. Symposium on Biotechnology in Animal breeding (Proceeding). German-Japanese Association for Animal Production: 83-98.
- Oikawa H (1987) Fluorescence-positive body in the spermatozoa of domestic cat (*Felis catus*). *Jpn J Vet Sci* 49: 942-944.
- Sidhu NS, Jashi JD, Bhusan S (1987a) A new fluorescent stain and identification of Y-bearing spermatozoa in mammals and Y-chromosome in somatic cells of animals. *Indian J Hered* 18: 19-24.
- Sidhu NS, Bhusan S, Jashi JD (1987b) Polymorphism in spermatozoal attributes vis-A-vis haploid effects in gametes. *Ibid* 19: 23-31.
- Zech L (1969) Investigation of metaphase chromosomes with DNA binding fluorochromes. *Exp Cell Res* 58: 463 (abstr).

要 約

蛍光色素 quinacrine mustard を用いて、ハタネズミの精子および雄、雌の体細胞（骨髓細胞、リンパ球）を染色し、F-body の出現率を比較した。精子においては、24.3%、雄の骨髓細胞においては20%、リンパ球では17.7%の割合でF-body が認められたが、雌の体細胞ではいずれも陰性であった。体細胞においては、固定（Carnoy）することによって、F-body の出現率は、無固定材料にくらべて半減あるいはそれ以下に減少した。精子における F-body の出現位置は、精子頭部の前半部で最も多かった。