

Flow cytometry による睪丸内精子形成能の評価判定

第1報：ヒト睪丸組織内 DNA 量分布測定の基礎的検討

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

川 井 修 一

DNA FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF
SPERMATOGENESISPART 1: ANALYSIS OF NUCLEAR DNA IN CELLS FROM
HUMAN TESTICULAR TISSUE

Shuichi KAWAI

*From the Department of Urology, Yamaguchi University, School of Medicine**(Director: Prof. J. Sakatoku)*

The present study was carried out to establish the best method of preparing human testicular tissue for flow cytometric DNA analysis including dispersal, fixation and staining. Human testicular tissue could be dispersed to single cells by incubating in 0.05% collagenase solution at 37°C for 60 minutes. Krishan's method which stains nuclear DNA directly without ethanol fixation and digestion in ribonuclease was not suitable for testicular cells.

After ethanol fixation, testicular cells were treated with ribonuclease and pepsin, then stained with propidium iodide. Nuclear DNA in cells was measured by flow cytometry and a good DNA histogram was obtained. Ribonuclease influenced the DNA histogram little, but pepsin markedly improved it by digesting cell debris and decreasing cell aggregation.

Analysis of the DNA histogram revealed the proportion of haploid, diploid and tetraploid cells accurately and quickly. Flow cytometric DNA analysis could be a useful method of evaluating cell kinetics in spermatogenesis.

Key words: Flow cytometry, Human testis, Spermatogenesis, Preparation method

緒 言

Flow cytometry は、蛍光色素で染色した細胞を1個1個遊離した形で細い水柱の中を流し、細胞がレーザー光線を横切る時に発する蛍光を検出することによって、各細胞内の被染色物質の量を測定する技術である (Fig. 1)。それはすでに、細胞周期解析、染色体解析、免疫学などの研究にさかんに利用されるようになってきている。なかでも DNA 量分布の測定から cell cycle 上における細胞分布を知ることが可能であるため、細胞増殖動態の研究の重要な手段となっている。

睪丸内においても精細胞は、成熟する段階で Fig. 2 のごとく、核 DNA 量が diploid (2C), tetraploid (4C), haploid (1C) と変化するので flow cytometry を用いて DNA 量分布を測定することは、精細胞の成熟度の解明となり、精子形成能の指標となりうると思われる。睪丸組織内の DNA 量分布を正確に測定する上で、Vindelø¹⁾ が異なった組織に対して、それぞれ適した試料作成法を確立する必要があると述べているように、睪丸組織試料作成法の確立は非常に重要である。今日まで、組織内 DNA 量分布を測定するための試料作成法に関しては、Kraemer ら²⁾、Crissman ら³⁻⁵⁾、Krishan⁶⁾、Fried ら⁷⁾、Vindelø¹⁾、

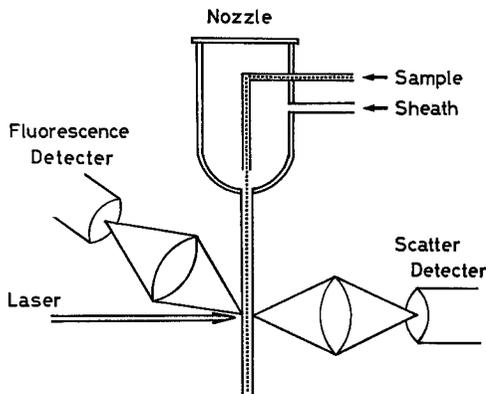


Fig. 1. Principle of flow cytometry

	DNA Content
Spermatogonia	2C
Preleptotene primary spermatocyte	4C
Leptotene primary spermatocyte	2C
Zygotene primary spermatocyte	4C
Pachytene primary spermatocyte	4C
Secondary spermatocyte	2C
Spermatid	1C
Spermatozoa	1C

Fig. 2. The change of DNA content in spermatogenesis

佐藤ら⁹⁾の報告があるが、方法が確立されるまでにはいたっていない。ヒト辜丸組織の DNA 量分布の測定に関してもすでに、Zante ら⁹⁾, Clausen ら¹⁰⁻¹²⁾, Zimmermann ら^{13,14)}, Pfitzer ら¹⁵⁾の報告があるが、報告者によって試料作成法は異なっており、また試料作成法に関して検討をおこなった報告は認められない。今回、われわれはヒト辜丸組織内の DNA 量分布を測定するための至適試料作成法に関して基礎的検討をおこない、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

実験材料として、未治療の前立腺癌患者の治療の目的で除糞した辜丸組織を用いた。この材料を用いて、flow cytometry 用の試料作成法に関する基礎的検討を、細胞遊離法、ribonuclease (RNase) 処理および pepsin 処理効果について、cell aggregation の減少、cell debris の減少、DNA ヒストグラムにおける haploid cell の peak の coefficient of variation (以下 CV 値と略す) を最小にすることを目的として

おこなった。なお辜丸組織は病理組織学上、正常であることを確認した。

1. 細胞遊離法

辜丸組織を鋭利な鋏を用いて、室温で mince し、mince した組織 30 mg を、0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.2% collagenase (Sigma, Type 1-A) in Dulbecco's PBS 中にて、37°C でスターラーを用いて攪拌処理した。処理時間はそれぞれの collagenase 濃度別に、30分間、60分間、120分間でおこなった。処理後、nylon mesh (線維間間隙 48 μ) により濾過し、獲得細胞数を改良型ノイバイエルン算定板で計測した。同時に、細胞浮遊液の塗抹標本を作成、および nylon mesh 上の残渣物を Bouin 液で固定、HE 染色して細胞の遊離状態を検討した。

2. RNase 処理および pepsin 処理の効果

辜丸組織 30 mg を 0.05% collagenase で、37°C 60分間処理して得られた遊離細胞を、70%エタノールで 4°C にて24時間固定した。固定細胞を 200 g で5分間遠沈後、上清をすて、PBS で洗浄した。洗浄した細胞に 0.1% RNase (Sigma, Type III-A) in PBS を加え 37°C で30分間 incubate した。RNase 無処理群として、固定遊離細胞を PBS のみにて 37°C 30分間 incubate した。ついで pepsin 処理効果の検討をおこなうため RNase 処理群および無処理群の細胞を遠沈し、上清をすてた後、HCl を加えて pH 2 に調整した 0.5% pepsin (Sigma, 1 : 2500) を加えて 37°C 15分間 incubate した。Pepsin 無処理群として、pH 2 の HCl を加えて 37°C 15分間 incubate した。

以上の RNase 処理群、無処理群および pepsin 処理群、無処理群の細胞に propidium iodide (以下 PI と略す) 溶液 (0.05 mg/ml in PBS) 4 ml を加え DNA を蛍光染色した後、線維間間隙 32 μ の nylon mesh にて濾過した。各群ごとに 3 × 10⁴ 個の細胞の DNA 量を flow cytometry (Becton-Dickinson 社、

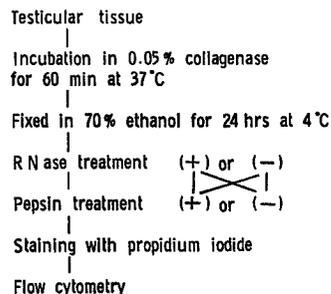


Fig. 3. Method

FACS III) を用いて測定しヒストグラムを得た (Fig. 3). 同時に蛍光染色された各群の細胞を落射型蛍光顕微鏡にて観察し, 細胞の遊離状態と蛍光染色状態の検討をおこなった.

3. Krishan⁶⁾の方法による蛍光染色

エタノールによる固定をおこなわない蛍光染色法として Krishan の方法による染色をおこなった. 辜丸組織を 0.05% collagenase で 37°C 60分間処理して得られた遊離細胞を PBS で洗浄後, 固定をおこなわず 200 g で 5分間遠沈し, PI 溶液 (0.05 mg/ml in 0.1% sodium citrate) にて染色し, flow cytometry で DNA ヒストグラムを得た.

以上それぞれの測定法について, DNA ヒストグラムを得る上で標準サンプルとしてヒト末梢血中リンパ球を用いて 2C の DNA 量が 60 channel になるよう FACS III を調整し, また sperm の DNA 量決定のためのサンプルとしてヒト精液中の sperm を 70% エタノール固定したものを用いた.

結 果

1. 細胞遊離の結果

獲得遊離細胞数の結果は Fig. 4 に示した. 処理時間 30分間の場合, いずれの collagenase 濃度においても, 同濃度の処理時間 60分間, 120分間に比べて有意に細胞数が少なく ($P < 0.05$), 獲得細胞数から見て遊離が不十分であると考えられた. 処理時間 60分間で

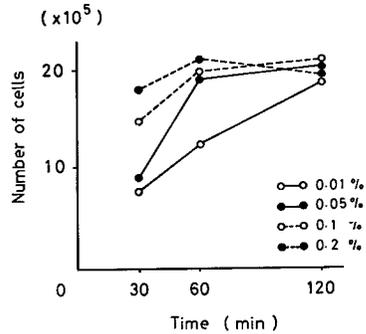


Fig. 4. Time course changes of acquired cells by incubation in 0.01, 0.05, 0.1 and 0.2% collagenase solution

は, 0.01%濃度で他の濃度に比べて有意に獲得細胞数が少なかったが ($P < 0.05$), 0.05, 0.1, 0.2%の各濃度間では有意な差は認められなかった. また処理時間 30分間と比較して細胞数は著明に増加していたが, 120分間とは有意差は認められなかった. Nylon mesh 上の残渣組織を見ても, 処理時間 30分間では各濃度とも intact な精細管が多数認められた. しかし処理時間 60分間の場合, 0.05%以上の濃度で精細管の内容物は認められず, 大部分結合織のみとなっていた. 処理時間 120分間では, 各濃度とも nylon mesh 上に残渣物は認められなかった. 以上の結果より, ヒト辜丸組織はスターラー使用時, 0.05% collagenase 60分間処理にてほぼ完全に組織から細胞を遊離することが可能で

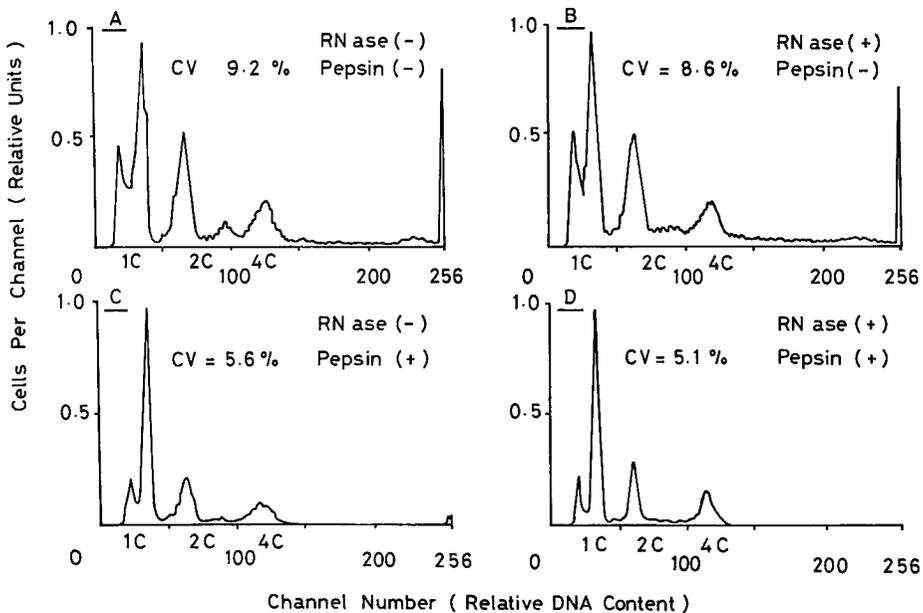


Fig. 5. DNA histogram according to treatment

あると考えられた。

2. RNase 処理および pepsin 処理効果の検討

結果は Fig. 5 (A-D) に示した。各群とも共通して DNA ヒストグラム上, 30, 60, 120 channel 付近に peak が認められ, 2C の DNA 量を 60 channel に設定したことにより, それぞれの peak は 1C, 2C, 4C の細胞を示すと考えられた。

RNase と pepsin とともに無処理群 (A) では, 150 channel 以上すなわち DNA 量 5C 以上に cell aggregation によると考えられる大きな DNA 量をもった物質が多数認められ, また 20 channel 以下にも cell debris と考えられる 1C より小さい DNA 量をもつ物質が多数認められた。1C の peak の CV 値を Vindel⁶⁾の方法にしたがって計算すると $9.2 \pm 1.7\%$ ($n=5$) と他の群に比べて大きくなっており, 1C, 2C, 4C の細胞比率の解析は困難と思われる。蛍光顕微鏡的観察 (Fig. 6) においても cell aggregation および cell debris が多数認められた。

RNase のみ処理群 (B) では, cell aggregation, cell debris の減少は認められず, CV 値においても

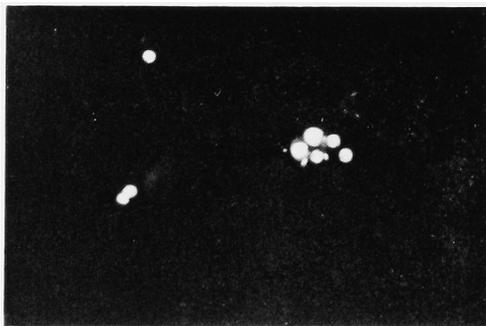


Fig. 6. The appearance of the nuclei without pepsin treatment in the fluorescence microscope ($\times 200$)

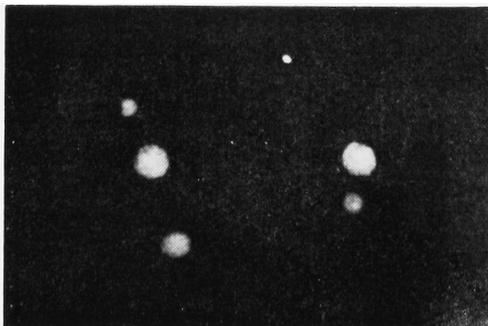


Fig. 7. Appearance of nuclei with pepsin treatment in the fluorescence microscope ($\times 200$)

$8.6 \pm 1.7\%$ ($n=5$) と無処理群と有意な差は認められなかった。蛍光顕微鏡的にも変化は認められなかった。

Pepsin のみ処理群 (C) では, cell aggregation, cell debris が著明に減少し, CV 値も $5.6 \pm 1.2\%$ ($n=5$) と pepsin 無処理群と比較して有意に減少していた ($P < 0.05$)。蛍光顕微鏡的観察 (Fig. 7) でも cell debris は消化され, 細胞は裸核となり単離し, 核の膨化が認められた。しかし sperm は, head の膨化は認められず, 大きさは不変であった。

RNase と pepsin とともに処理した群 (D) では, CV 値が $5.1 \pm 0.6\%$ ($n=5$) ともっとも小さくヒストグラムは 4 つの群の中で最良であった。このように, pepsin 処理によりヒストグラムは著明に改善し, RNase 処理のヒストグラムへの特徴的な影響は認められなかった。

3. Krishan の方法

結果は Fig. 8 に示した。Cell aggregation は認められないが, cell debris が多数認められ, CV 値も $8.7 \pm 2.1\%$ ($n=5$) と大きくなっていった。測定時間は, 細胞遊離を含めても 2 時間以内と短い利点はあるが, 各 peak の境界が不明瞭で各 DNA 量の細胞比率の測定は困難と考えられた。

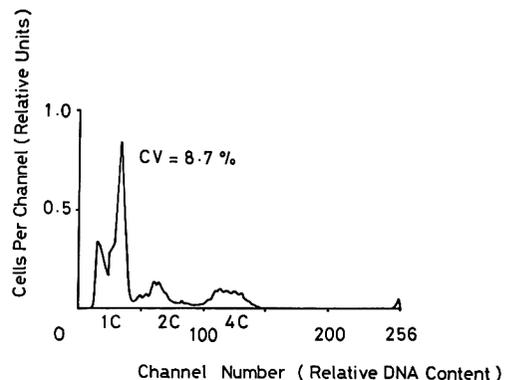


Fig. 8. DNA histogram by Krishan's method

考 察

Flow cytometry が開発されるまでは, 組織内 DNA 量分布の測定には, Feulgen 染色による吸光顕微測光法 (microspectrophotometry) が用いられてきた。しかし, この方法は技術を要するうえに, 測定できる細胞の数が限られており, 統計処理をおこなうに十分な数の細胞を測定するには, 多大の労力が必要であった。Flow cytometry の開発により, これらの欠点が解消され, 短時間に多量の細胞 (100個以上 /

sec)の核 DNA 量が測定できるようになった。このように flow cytometry は、細胞増殖動態の研究においては有効な手段であるが、原理上、完全に細胞が遊離されてなくて、2個あるいは数個の細胞が aggregate した状態では、それを1個の細胞と判断し、本来の細胞の DNA 量と異なる大きな DNA 量として測定する性質がある。そのため、信頼性の高いデータを得るためには、完全な遊離細胞にするなどの試料作成法が非常に重要となってくる。睾丸組織内 DNA 量分布を測定するための試料作成法は、細胞遊離、固定、蛍光染色の3つの段階から成り立っているが、今日まで方法が確立するにいたってなく、また検討をおこなった報告も認められない。以下、今回の実験をもとに各段階について考察をおこなうとともに、得られたヒストグラムの検討をおこなった。

細胞遊離法：細胞遊離法としては、酵素的、化学的、機械的に、あるいは2つの方法を組み合わせておこなわれている。一般に用いられているのは酵素による遊離で、中でも collagenase, trypsin が多くの場合用いられている。睾丸組織は、主として精細管より構成され、精細管内の細胞は、細胞間の結合が、他の実質臓器あるいは固形腫瘍より弱く、比較的容易に遊離細胞とすることが可能であり、溶液中で睾丸組織を mince 後、shaking するだけでもかなりの精細管内細胞を遊離することができる。今回の実験でも、スターラーを使用の下、collagenase を用いる場合、0.05%濃度60分間処理にてほぼ完全に遊離細胞にすることが可能であった。また酵素による細胞遊離では、数個の細胞が融合し多核となることがあるが、collagenase の場合、0.01%から0.2%までいずれの濃度においても多核の細胞はごく少数で、DNA 量分布解析には支障をきたさないと考えられる。Trypsin に関しては今回検討をおこなっていないが、作用が強力であり生きた細胞に影響しないが、死細胞を分解することがあり、死細胞から溶出した DNA が他の細胞の表面に付着し、測定値を不正確にするとの報告がある⁵⁾。EDTA や tetraphenyl boron などの化学物質による遊離や wire mesh による機械的遊離は、細胞膜の研究など酵素を使用できない時に用いられることが多い。

固定：DNA 量測定の場合、蛍光染色前に遊離細胞を固定することが多いが、Krishan⁶⁾のように固定をおこなわず染色するという報告も認められる。しかし、睾丸組織細胞でこの方法を用いた場合、遠沈、固定などの操作が少ないため cell aggregation は少ないが、ヒストグラム上各 peak の境界が不明瞭であり DNA

量分布解析には不適當と考えられる。原因としてこの方法は、hypotonic solution で細胞膜を破壊し染色物質と核 DNA の結合を容易にするものであるが、睾丸組織細胞は一般培養細胞に比べて浸透圧に対して抵抗性があり、細胞膜が十分に破壊されていないのではないかと考えられる。

固定をおこなう場合の固定物質の条件としては、細胞の自己融解をおこさず、細胞内物質を保存し、また蛍光物質と核 DNA の結合を防げないことがあげられる。われわれは70%エタノールを用いたが、上記条件をすべて満たしていると思われる。濃度的にも100%エタノールと比較しても cell aggregation を軽減できるとの報告もある⁵⁾。70%エタノール固定は安定性においても、10日間固定でヒストグラムに著変は認めず、少なくとも10日間は安定と思われる。そのほか、ホルマリン、アセトンなどが固定に使用されるが、ホルマリン固定は、固定された細胞が染色時、エタノールに比べて約50% 蛍光が減少するとの報告があり⁵⁾、エタノール固定の方が、染色には適していると思われる。アセトン固定は、免疫蛍光測定時に用いられ、DNA 量測定には一般に用いられないようである。

蛍光染色：DNA の蛍光染色には、ethidium bromide あるいは PI が用いられる。PI は ethidium bromide の analogue であり、ともに DNA および2重鎖 RNA と定量的に intercalate し 488 nm のレーザーで強い蛍光を発する物質である。そのため、これらの蛍光物質を用いて DNA 量を測定する場合、2重鎖 RNA を除去する目的で RNase による前処置が必要とされている。しかし、睾丸組織細胞では、RNase 処理にてヒストグラム上 CV 値はわずかに減少するが著明な変化は認めなかった。これは Friedら⁷⁾も他の細胞系で述べているように、睾丸組織細胞内に2重鎖 RNA の量が非常に少ないことを示すものと考えられる。

いっぽう、蛍光染色前に pepsin 処理をおこなうことにより、ヒストグラム上 CV 値は小さくなり、cell debris, aggregation は減少し、著明な改善が認められた。これは蛍光顕微鏡の観察でもあきらかなように、細胞質が消化され、核が1個1個遊離し PI と DNA が intercalate しやすくなったことと、cell debris が消化されたためと考えられる。このように蛍光染色前の pepsin 処理は有効と思われる。

ヒストグラムの検討・RNase と pepsin 両者処理された DNA ヒストグラム (Fig. 8D) において、各 peak に含まれる細胞を検討するうえで、蛍光顕微鏡の観察では cell debris が認められないにもかかわらず

らず、1/2 C の DNA 量である 15 channel 付近に小さい peak が認められた。この peak はヒト精液中の sperm を同様の処理、染色して得られた DNA ヒストグラムの peak と一致しており、睪丸組織内の sperm を示すものと考えられる。すなわち、Clausen¹²⁾も述べているように、spermatid から sperm に成熟するにしたがって、核が condensation されたため PI と結合しにくく、本来の DNA 量である 1C より小さく測定されるため、1C の peak より左方にあらわれると思われる。しかし、この sperm の peak は、sperm の核が小さいため、FACS III の測定可能閾値付近にあり、機械のわずかな調整の差により peak の大きさが異なり、睪丸内に sperm が存在するかいなかの確認は可能であるが、sperm の占める細胞比率を正確に測定することは困難であると考えられる。その結果、30 channel 付近の 1C の peak には sperm は含まれず、spermatid を示すと考えられる。その右の 2C の peak には、精細胞として spermatogonia, secondary spermatocyte, その他 Sertoli cell, Leydig cell が含まれ、4C の peak には、primary spermatocyte, spermatogonial G2 cell が含まれている。ヒストグラム上の各 peak の面積を計算することにより、これらの細胞比率の測定が可能である。このように flow cytometry を用いることにより、短時間に、正確に haploid, diploid, tetraploid の割合を知ることが可能であり、睪丸内細胞回転および精細胞の成熟度の解析に役立つ。今後、精子形成能の指標となりうると考えられる。

結 語

ヒト睪丸組織内 DNA 量分布を flow cytometry を用いて測定するための試料作成法の検討をおこない、以下の結果を得た。

1. ヒト睪丸組織は、0.05% collagenase 中で 37°C 60分間処理にて、遊離細胞にすることが可能であった。

2. 遊離細胞の固定をおこなわないで処理する Krishan の方法は、ヒト睪丸組織の試料作成法としては不適當であった。

3. 遊離細胞を 70% エタノール 固定後、RNase, pepsin 処理し、PI で蛍光染色、flow cytometry を用いて DNA 量を測定することにより、良好なヒストグラムが得られた。

4. Pepsin 処理により cell aggregation, cell debris は著明に減少し、ヒストグラムが良好となったが、RNase 処理はヒストグラムに特徴的な変化を示

さなかった。

5. DNA ヒストグラムを解析することにより、睪丸組織内の sperm を除いた haploid, diploid, tetraploid の細胞比率を短時間に、正確に測定できた。

6. 以上より、ヒト睪丸組織を適切な試料作成法を用いて処理し、flow cytometry で DNA 量分布を測定することは、精子形成能の定量的評価となりうる可能性を示唆した。

稿を終えるにあたり、御懇意なる御指導、御校閲を賜った酒徳治三郎教授に深甚なる謝意を表します。また御指導、御助言をいただきました山口大学医学部第 2 病理学教室の高橋学教授に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第 70 回日本泌尿器科学会総会（弘前、1982）および第 27 回日本不妊学会総会（東京、1982）において発表した。

文 献

- 1) Vindeløv LL: Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows Arch B Cell Path* **24**: 227~242, 1977
- 2) Kraemer PM, Deaven LL, Crissman HA and Van Dilla MA: DNA constancy despite variability in chromosome number. *Advan Cell Mol Biol* **2**: 47~108, 1972
- 3) Crissman HA and Steinkamp JA: Rapid simultaneous measurement of DNA, protein and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol* **59**: 766~771, 1973
- 4) Crissman HA and Tobey RA: Cell-cycle analysis in 20 minutes. *Science (Wash DC)* **184**: 1297~1298, 1974
- 5) Crissman HA, Mullaney PF and Steinkamp JA: Methods and applications of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. *Methods in Cell Biology* ed. by Prescott DM, pp 179~246, New York, 1975
- 6) Krishan A: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66**: 188~193, 1975
- 7) Fried J, Perez AG and Clarkson BD: Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. *J Cell Biol* **71**: 172~181, 1976

- 8) 佐藤温重・小沢和子・日景 盛・新井 泉・田端 恒雄 : フローセルサイトフォトメーター. 組織培養 6 : 210~215, 1980
- 9) Zante J, Schaumann J, Göhde W and Hacker U: DNA-Fluorometry of mammalian sperm. Histochemistry 54: 1~7, 1977
- 10) Clausen OPF, Pruvris K and Hansson V: Quantitation of spermatogenesis by flow cytometric DNA measurements. Int J Androl (Suppl 2) 1: 513~522, 1978
- 11) Thorud E, Clausen OPF and Abyholm T: Fine needle aspiration biopsies from human testes evaluated by DNA flow cytometry. Flow Cytometry 4: 175~177, 1980
- 12) Clausen OPF and Abyholm T: Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. Fertil Steril 34: 369~374, 1980
- 13) Zimmermann A and Truss F: The prognostic power of flow-through cytophotometric DNA determinations for testicular disease. Analytical and Quantitative Cytology 2: 247~251, 1980
- 14) Zimmermann A and Truss F: Die DNS-Bestimmung bei der Diagnostik von Hodenerkrankungen. Verh Dtsch Ges Urol 31: 362~363, 1980
- 15) Pfitzer P, Gilbert P, Rölz G and Vyska K: Flow cytometry of human testicular tissue. Cytometry 3: 116~122, 1982

(1984年2月16日受付)