Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 38, No. 11, pp. 2089—2090, 1986（昭61, 11月）

速　報

Fluorescein Diacetate—Propidium Iodide 複合螢光染色による絨毛細胞の生死の判別法

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内　正七教授）
本間　滋　茅原　保　安達　茂実
内山三枝子　金沢　浩二　竹内　正七

A New Method for Evaluation of Viability of Trophoblast by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate—Propidium Iodide

Shigeru HONMA, Tamotsu CHIHARA, Shigemi ADACHI,
Mieko UCHIYAMA, Koji KANAZAWA and Shoshichi TAKEUCHI
Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Niigata University, Niigata
(Director : Prof. Shoshichi Takeuchi)

Key words: Viability・Trophoblast・Fluorescein diacetate・Propidium iodide

緒　言

細胞の生死判別法として，トリパンブルーやニグロシンなどの色素を用いた方法が，リンパ球などの浮遊系細胞やトリプシンなどによる酵素処理で分散した培養細胞に対して行われてきた．しかし，組織片について，その構成細胞の生死を判定する方法は未だ確立されていない．今回，Fluorescein diacetate（FDA）と Propidium iodide（PI）を用いた Jones et al.[1]の方法を，培養絨毛癌細胞に対して検討し，従来からのトリパンブルー色素排除法と比較したところ，両者間に良好な相関が観察された．そこで，さらにこの方法を絨毛組織片に対して応用したところ，その表層に存在する trophoblast の生死を判定する上で有用と判断される結果が得られたので，その概要を報告する．

研究方法

1．研究材料

a．GCH-1（絨毛癌細胞株）−0.25%トリプシンにて分散し Dulbecco's phosphate buffered saline（DPBS）にて洗浄した細胞浮遊液〔生細胞〕と，10%ホルマリンにて10分間処理し DPBS にて洗浄した細胞浮遊液〔死細胞〕．

b．妊娠初期中絶絨毛—人工妊娠中絶後，直ちに DPBS にて洗浄した絨毛（妊娠 7 ～10週，15例）〔生絨毛〕と10%ホルマリンにて10分間処理し DPBS にて洗浄した絨毛〔死絨毛〕．

2．染色液

FDA-PI 染色液は DPBS 100ml に対して FDA（Sigma）0.5mg, PI（Behring Diagnostics）6mg 溶解し作製した．トリパンブルー液は0.16%トリパンブルー/CMF-PBS 液を用いた．

3．染色操作

細胞浮遊液は 3 分間 FDA-PI 液に入れてからスライドグラスに滴下し直ちに観察した．絨毛組織は 5 分間 FDA-PI 液に入れてから OCT-compound（Miles Scientific）に包埋後，液体窒素にて急速凍結し，cryostat にて厚さ5μm の切片を作製した．トリパンブルー染色はトリパンブルー液に約30秒入れ，直ちに観察した．

4．観察

螢光顕微鏡（オリンパス model BHF）水銀ランプ，450～490nm の bandpass の bluefilter, 510nm の chromatic beam splitter と long pass 520nm barrier filter を使用し，細胞浮遊液は倍率200倍

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

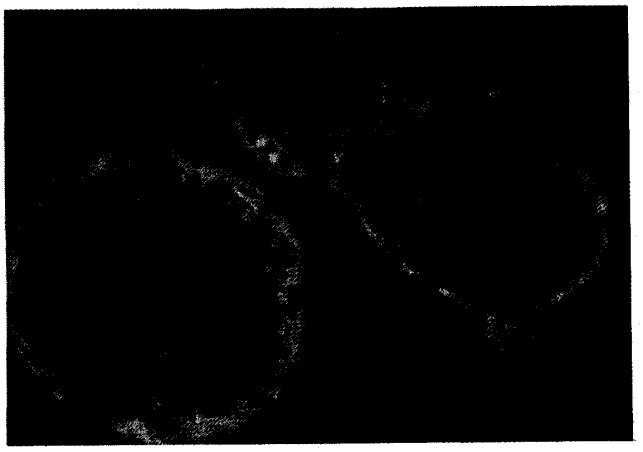

写真1　人工中絶にて得られた新鮮絨毛

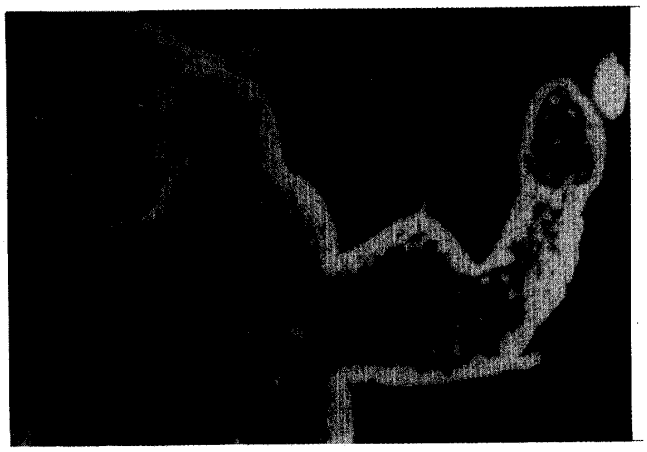

写真2　ホルマリン処理による死絨毛

で，絨毛組織は100倍で観察した．トリパンブルー色素排除法の観察は光学顕微鏡にて行つた．

5．判定法

緑色の螢光を発する細胞は生細胞，赤色の螢光を発する細胞は死細胞と判定した．細胞浮遊液の場合は，細胞を200個数え，そのうちの生細胞の数を百分率で表現した．絨毛組織の場合は，10視野について絨毛の表層の長さを測定しそのうち生絨毛細胞の存在する絨毛表層の長さを百分率で表現した．

研究成績

GCH-1については，FDA-PI 複合螢光染色法で93.7±1.6%，トリパンブルー色素排除法でviability 92.8±2.4%（N＝5）と判定され，そのホルマリン処理後ではいずれの方法でもviability 0％と判定された．

一方，中絶絨毛組織片15例の trophoblast（写真1）については，FDA-PI 複合染色法で viability 82±13%と判定され，そのホルマリン処理後（写真2）では viability 0％と判定された．

考　案

従来，trophoblast の viability を評価する方法として，培養上清中の HCG, HPL などの測定が行われてきたが，この方法では個々の trophoblast の生死を判定することは不可能であつた．またトリパンブルー，ニグロシンなどの色素を用いた方法は，浮遊細胞の生死を判定することは可能であるが，組織片に応用することが困難であつた．

FDA は intact cell membrane のみを通過し，intracellular esterase により加水分解を受けて螢光色素を産生するため，細胞質が明るい緑色の螢光を発し，一方，PI は injured cell membrane のみを通過し，細胞核内において DNA 及び RNA と螢光複合体を形成するため，細胞核が赤色の螢光を発するという性質が知られている．

そこで我々は FDA-PI 複合螢光染色を，絨毛表層に存在するという解剖学的特性を有する trophoblast の生死の判定に応用できるか否か検討した．Jones et al.[1]が浮遊細胞に対して行つた原法は反応時間が3分であるが，絨毛組織は浮遊細胞より色素の浸透に時間を要すると推測し反応時間を5分とし，PI 濃度も原法より5倍高濃度にして良好な結果が得られた．

我々は現在，trophoblast の免疫組織学的研究の一環として，この方法に基づいて，正常妊娠，流産，及び胞状奇胎における trophoblast の viability を検討中である．FDA-PI 複合螢光染色は，今後多方面に広く応用されて良い方法であると期待される．

文　献

1. *Jones, K.H. and Senft, J.A.*: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with Fluorescein diacetate-Propidium iodide. J. Histochem. Cytochem., 33 : 77, 1985.

（No. 6021　昭61・8・5受付）

NII-Electronic Library Service