

## 2 流 早 死 産 の 病 理 学 的 研 究

### ② 抗精子抗体の受精卵への影響：in vivo 実験

兵庫医科大学産科婦人科学教室

磯 島 晋 三  
鎌 田 敏 雄  
香 山 浩 二  
宮 本 敬 子

#### 研 究 目 的

原因不明不妊婦人の中には血中に精子不活化因子を保有するものがあることを見出して以来<sup>1)2)</sup>その因子の究明を行った結果、7Sr-G及び19Sr-Mに分離されてくる抗精子抗体であることが判明した。又動物実験で血中抗精子抗体が雌性器管内に移行してくる<sup>3)</sup>及び、不妊婦人でも頸管粘液中に精子不活化抗体が存在することが証明出来たことより、何らかの原因で血中に産生された精子不活化抗体が女性(雌)性器管内を上行してくる精子に障害を与えて、受精が起こらないことが不妊の原因であると想定された。他方我々は、受精後は精子特異抗原は、受精卵の中で如何なる運命をたどるかをみる為に蛍光染色法を用いて実験を行なった結果、興味あることに受精直後より胞胚(blastocyst)に至るまで、その受精卵表面に精子特異抗原が存在していることを想定させる結果を得た。従って、母体に精子特異抗原に対する抗体が生じているが、精子運動及び受精そのものに障害を与えなかった場合(例えば、抗体が非常に弱かったような時)、受精卵が卵管、子宮の中で如何なる影響を受け、又着床及びその後の発育に障害が及ぶかを調べることは重要な研究目的であった。昨年度は、ラット受精卵(L<sub>4</sub>)を家兎で作った抗ラット精子抗体7Sr-Gでinvitroで反応させた後、偽妊娠ラットの子宮内に implant して、その後の結果を調べたところ、対照(正常家兎血清7Sr-Gで受精卵を処理したもの)と比較すると、着床率にほとんど差がないのに、抗精子抗体処理受精卵はほとんど吸収されて、増殖しないことが判明した。従って本年度は in

vitro で受精卵を処理するのではなく、雌ラットをラット精子で、能動的に強力に免疫しておき、精管結紮雄ラットと交配させて偽妊娠状態にしたラットに同系ラット受精卵(L<sub>4</sub>)を子宮内に移植して着床、発育に及ぼす結果を調べてみた。

#### 研 究 方 法

(1) 抗原の調製：成熟 Sprague Dawley (S. D. 系)ラット(体重350g以上)の副睪丸を分離し、精管のVas deferenceより、生食水を注入して精子を集め、生食水にて5回遠沈洗浄する(1300×G, 10分間)。洗浄精子は $1 \times 10^8$ /ml in salineになるように稀釈して、ドライアイス・アルコールを用いて10回、凍結融解を繰返した後、Potter Elevehijem の glass homogenizer にて10回磨砕した。このhomogenate(蛋白量：2.4mg/ml及び4.8mg/ml)を雌ラット免疫用の抗原として用いた。

(2) 免疫法：S. D. 系ラット精子ホモゲナート(蛋白量：2.4mg/ml)/mlに等量のcomplete Freund's adjuvantを混合し、water in oil emulsionとしてから、その1mlを成熟S. D. 系雌ラット(体重250g前後、細胞診により正常性周期を有するもの)の背部皮内に0.2mlづつ、5ヶ所に分割注射した。2週間後S. D. 系ラット精子ホモゲート(蛋白量：4.8mg/ml)1mlに等量のComplete Freund's adjuvantを混合、emulsifyした後、その1mlを同様の方法で第2回目注射を行ない、3週間後より、booster injectionとして、S. D. 系ラット精子ホモゲート(蛋白量4.8mg/ml)浮遊液0.5mlを腹腔内

に4日間隔で3回から4回注射した後、最終注射より、1週間以内に細胞診でproestrusと判定した非免疫ラットと、精管結紮せるS. D.系雄ラットを交配せしめ、偽妊娠状態とした。(表1)

(3) 交配法(偽妊娠ラット): 上記の方法で免疫を行なった雌S. D.系ラットは最終注射後1週間以内に、腔細胞診より、性周期がproestrusのものを選び、6:00P. M.に精管結紮雄ラットをケージ内に入れ、翌朝腔口にVaginal plugが発見された日を交配日( $L'_0$ )とした。対照として抗原注射を受けなかった未処置雌S. D.ラットも同様に精管結紮ラットと交配せしめ偽妊娠状態とした。

(4) 採卵及び受精卵移植法: 上記の方法で免疫及び対照偽妊娠雌S. D.系ラットの交配第5日目( $L'_4$ )を用意しておく、他方未処置成熟雄ラットと未処置proestrus雌ラットとを交配させた後、5日目に開腹し、子宮を切りとり、Hank's balanced salt solutionを用いて、ウェルスライドガラス上に子宮の一方よりflush outする。倒立顕微鏡でウェル中に流れ出た受精卵をさがし、これを移植用ピペットを用いて吸引した後、シリコン加工プラスチックシャーレに移す。次いでこれらの受精卵( $L_4$ )を先に用意した偽妊娠ラットの子宮内に移植した後、閉腹し $L_{15}$ で再開腹して着床卵の有無と成育の度合を観察し、更に $L_{22}$ で開腹して成熟胎児の状態を調べた(表2)。

### 研究結果

表3に示すごとくS. D.系ラット精子で強力に免疫した雌ラット(偽妊娠)に $L_4$ 受精卵を移植した場合、多少とも着床が妨げられたラットは10頭中7頭にみられた。同時に同じラットより採取した受精卵を対照群の子宮内にinplantした場合、ほとんどその100%が着床していることが判明した。又着床受精卵数をとってみると、 $L_{15}$ 観察時点で35ケ中24ケが着床した(68.6%)のに対し、対照群では7頭中6頭が100%の着床を示し、わずかに1頭のみが、5ケ中4ケが着床し、1ケが未着床であった。又移植受精卵29ケ中28ケ(96.6%)が着床していた。

### 考 察

我々が最初受精卵( $L_1 \sim L_4$ )の細胞表面に精子特異抗原が存在することを認めた時は、どうして精子の1細胞中にある抗原分子が受精卵内で増加するのかという点が興味深い問題であると共に説明しにくい問題を多く含んでいた。in vitroの実験で、抗精子抗体7Sr-Gの接触を受けた受精卵は着床はするが、その後の発育停止が起こって、吸収されてしまうような傾向がみられた為に今回のin vivo実験となったわけである。母体内の循環精子抗体が性器管内に移行してくることは、ラットでも婦人でも認められているので、もし精子不動化作用が弱い、又は不動化作用を示さない抗精子抗体が存在しているとするれば、受精は成立するが、その後受精卵が卵管を下降し、子宮内を浮遊している間に障害を受ける可能性は十分あるわけである。又着床前後に何らかの影響を受ける可能性も十分考えられる。最近、精子及び受精卵表面にLDHxが存在することがGoldbergによって証明された為に、我々が呼んでいる精子特異抗原は、あるいはLDHxであるかもしれない。何故ならば、他の臓器に存在するLDHと、その抗原性が異なる為である。又、マウスにおいて見いだされた $T_{1/4}$  locusに支配されるF<sub>1</sub>抗原は精子及び、胎生初期にのみ出現するもので、組織適合抗原H-2に似たものと云われている。従ってラットにおいても同様に、あるlocusに支配される精子及び胎生初期にのみ出現する抗原がないとは云えないので、この点更に究明して行かなくてはならない。今回のin vivo実験では精子で雌ラットをactiveに免疫した場合着床率( $L_{15}$ の時点)の低下があると思われる傾向を示したが、 $L_{22}$ 以後の開腹では対照群にも発育抑制があった為、受精卵のinplantation操作中に、何らかの障害因子が加わったのかもしれない、少なくとも無処置群で完全な成熟胎児を娩出させることが出来るまで、これらの結果は完全とは云えない。又対照として、無処置のみでなく、Freund's adjuvantのみか、又はこれと他臓器抗原で免疫した群を、同時に設定する必要があるが、今回はその結果を示すには間に合わなかった。併し、免疫群でも100%の着床率を得ているものが $\frac{3}{10}$ ある

為, Freund's adjuvantのみではさして影響があるとは思われない。しかし, Freund's adjuvantの処置によっただけでも着床後の発育障害があった可能性があり, この点, 更に究明をつげなければならない。興味あることは実験群の中で15-Aの唯1ケの受精卵のみ成熟(L<sub>25</sub>)していたが, 注目すべきことは小頭, 両上肢短縮, 無両足という奇形が生じていたことである。この場合4ケの受精卵を移植してL<sub>15</sub>で全部 inplantに成功しているが, L<sub>22</sub>以後ではこの奇形一つのみが成育し, 他は吸収されてしまったと云える。

①第68回

日本不妊学会関西支部集談会

抗ラット精子抗体とラット受精卵の  
in vitro incubation実験。

鎌田, 香山, 磯島

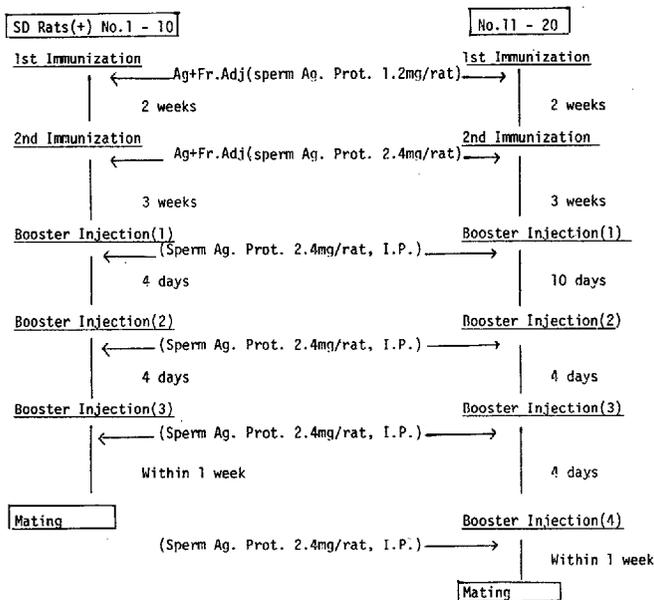
②第20回

日本不妊学会総会

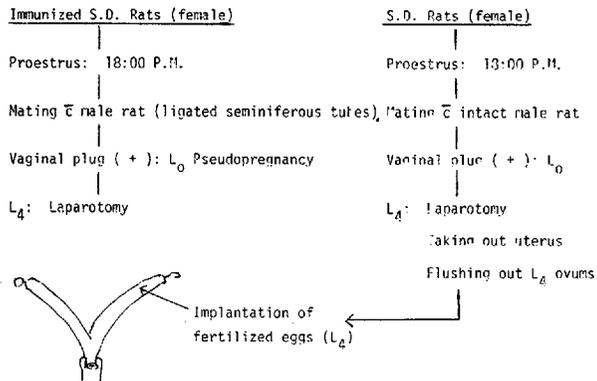
不妊婦人頸管粘液中の精子不動化作用と抗体局所産生について。

鎌田, 香山, 磯島

Active-immunization schedule



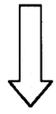
Implantation schedule of fertilized eggs ( $L_4$ ) in the uterus of pseudopregnant ( $L_4$ ) rats.



Results on implantation of fertilized eggs in the uterus of actively immunized SD female rats with spermatozoa

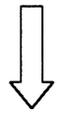
Active Immuniz. Group			No treatment Group			
Rat No.	Successful implantation at $L_{15}$ (No.)	No. of implant. ovum	No. of fertilized eggs obtained	No. of implant. ovum	Successful implantation at $L_{15}$ (No.)	Rat No.
3-A	3 (100%)	← 3	← 5 →	2 →	2 (100%)	9-B
4-A	2 (100%)	← 2	← 4 →	(2)	Died	12-B
2-A	2 (50%)	← 4	← 8 →	4 →	4 (100%)	6-B
10-A	3 (75%)	← 4	← 8 →	4 →	4 (100%)	3-B
16A	1 (25%)	← 4	← 7 →	3 →	3 (100%)	16-B
15-A	4 (100%) #	← 4	← 8 →	4 →	4 (100%)	13-B
11-A	0	← 1	← 2 →	(1)	Died	25-B
13-A	2 (66.6%)	← 3	← 6 →	3 →	3 (100%)	28-B
14-A	5 (71.4%)	← 7	← 7 →	Died		21-B
19-A	2 (66.6%)	← 3	← 7 →	4 →	4 (100%)	11-B
20-A	Died	(4)	← 9 →	5 →	4 (80%)	16-B
Total	24 (68.6%)	← 35		29 →	28 (96.6%)	

# One of four showed typical malformation at  $L_{22}$



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



### 研究目的

原因不明不妊婦人の中には血中に精子不働化因子を保有するものがあることを見出して以来 1)2), その因子の究明を行った結果, 7S -G 及び 19S -M に分画されてくる抗精子抗体であることが判明した。又動物実験で血中抗精子抗体が雌性器管内に移行してくること 3) 及び, 不妊婦人でも頸管粘液中に精子不働化抗体が存在することが証明出来たことより, 何らかの原因で血中に産生された精子不働化抗体が女性(雌)性器管内を上行してくる精子に障害を与えて, 受精が起こらないことが不妊の原因であると想定された。他方我々は, 受精後は精子特異抗原は, 受精卵の申で如何なる運命をたどるかをみる為に蛍光染色法を用いて実験を行なった結果, 興味あることに受精直後より胞胚(blastocyst)に至るまで, その受精卵表面に精子特異抗原が存在していることを想定させる結果を得た。