

# 生殖細胞の抗原性に関する研究

徳島大学医学部産科婦人科学教室

森 崇英・野田 保人  
奈賀 脩・松下 光彦  
鎌田 正晴・木下 恒夫  
山野 修司・苛原 稔  
長谷部 宏

## 1. 研究目的.

近年、卵細胞透明帯の特異抗原性、並びにこれに対する抗体の受精阻止作用が、動物実験で明らかにされてきている。私どもの教室のこれまでの検討成績を要約すると、大量のブタ卵細胞から透明帯物質を精製し、これに対する特異抗体を作製して、ヒト透明帯の抗原構成を分析したところ、透明帯特異抗原と透明帯関連抗原に大別され、特異抗原にはヒト、ブタ共通抗原とヒトに固有の抗原のあることが判明している。この事実にもとづいて、ブタ透明帯を標的とした間接蛍光抗体法により、ある種の不妊患者血清中に抗透明帯自己抗体の存在することが示唆された。

しかし、不妊の病因的意義を確立するためには、この抗体の受精阻止作用を、*in vitro* のヒト受精系を用いて立証する必要がある。昨年度の本班研究において、このテストに必要なヒト受精系を確立することができたので、本年度はまず受身赤血球凝集反応を用いた抗体価の半定量法の開発、次にヒト透明帯を用いた精子貫入試験によって抗体の受精に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 2. 研究方法

この図は、感作赤血球の作成方法を示す(図1)。まず、赤血球とグルタルアルデハイドを室温で3時間培養し、赤血球を37℃で15分間タンニン酸処理し、ブタ透明帯抗原を感作し、1%赤血球浮遊液として凝集反応に用いた。赤血球としてはウシ赤血球が最も適しており抗原量としては10 $\mu$ g/mlが適当である。次にヒト透明帯精子貫入試験の手順を示す(図2)。卵については、子宮頸癌などの開腹術時に得た卵巣あるいは卵胞液から卵を授取し、パラフィンオイルで封入した培養液(T6)0.3ml中に入れ、37℃、5% CO<sub>2</sub> in air の条件下に48時間培養を行ない第1極体の出現した卵のみをストック卵として、同時期の卵で検討した。卵は0.5M 硫

酸アンモニウム、1M 塩化マグネシウム、0.1%デキストランを含む塩溶液中に保存した。柳町らの報告では、この状態で3ヶ月間は透明帯の性質が変わることなく精子の貫入が認められているが、私どもは保存期間を2ヶ月以内とした。貫入試験の方法は次のように行なった。ストック卵はPBS中に over night 浸し、培養液で5回洗浄後、血清7.5%を含んだ培養液で炭酸ガス培養器内にて、37℃30分間反応させた。一方精子は、同一健康男子より得た精液を30分間液化させ培養液で2回洗浄後、精子ペレットに培養液を重ねる、いわゆる swim up 法により運動性の活発な精子のみを集め、あわせて90分間前培養を行なった。卵1個に対して0.5~1.0 $\times 10^6$  の精子を加え炭酸ガス培養器にて37℃6時間反応させ透明帯付着精子数および貫入精子として、囲卵腔と卵形質内の精子数を数えた。

## 3. 研究結果

受身感作赤血球凝集反応(PHAR)にて、当科外来で治療中の不妊症患者88例とコントロール90例につき検討した(表1)。不妊症患者ではPHAR陽性率が8.0%でコントロールに比べ有意に高い。次にPHARで2倍希釈陰性であった血清をコントロールとして、PHARで8倍希釈以上に陽性と認められた6例の患者血清を卵に作用させ、精子の貫入阻止率をみたところ95%以上の阻止率を示したのが2例、70%以上が2例、50%以上が1例、全く阻止しなかった血清が1例だった。(表2)。高度阻止率の2例はヒト透明帯を標的とした蛍抗体法で陽性反応を示したが、他の4例は陰性だった。

以上、ヒト血中に検出される抗透明帯自己抗体は異種抗血清に比べて極めて低力価ではあるが確かに精子の貫入を阻止し得ることが*in vitro* の実験系で明らかになった。

☒1

Coating onto the red blood cell surface  
with porcine zona pellucida

5% RBC in saline  
 2.5% glutaraldehyde  
 ↓  
 incubation for 3 h. at room temperature with mixing  
 ↓  
 5% RBC in saline  
 0.01% tannic acid in saline  
 ↓  
 incubation for 15 min. at 37°C with shaking every 5 min.  
 ↓  
 5% RBC in saline  
 adequate concentration of porcine zona pellucida  
 ↓  
 incubation for 2 h. at room temperature with mixing  
 ↓  
 1% RBC solution in normal saline containing with 1% BSA

☒2

SPERM PENETRATION TEST

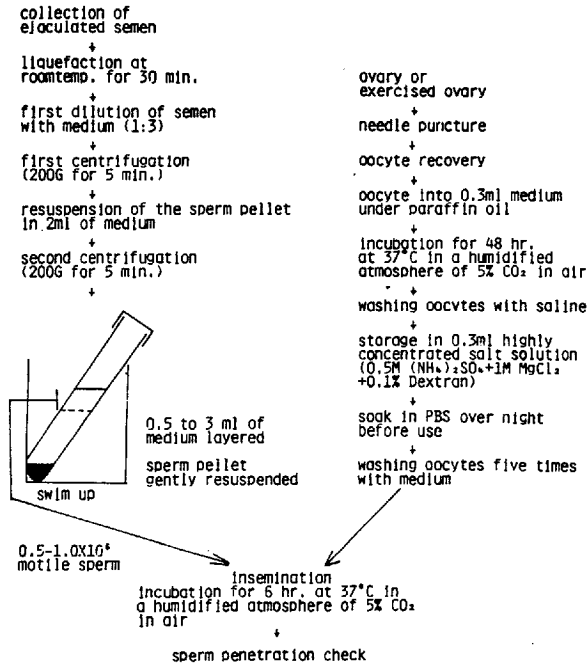


表1

Incidence of Anti-Zona Activities of Sera from Infertile Patients as Tested by Passive Hemagglutination Reaction

Clinical diagnosis	No. of Sera tested	Titer			No. of positive reactions	% Positive reactions
		≤1:4	1:8	1:16		
<b>Infertile women</b>						
Anovulation	35	32	1	2	3	8.6
Tubal obstruction	9	9	0	0	0	0
Uterine abnormality	7	7	0	0	0	0
Sperm abnormality	14	13	1	0	1	7.1
Unexplained	23	20	3	0	3	13.0
Total	88	81	5	2	7	8.0
<b>Control subjects</b>						
Non-pregnant women	59	58	1	0	1	1.7
Pregnant women	18	18	0	0	0	0
Normal men	13	13	0	0	0	0
Total	90	89	1	0	1	1.1

表2

BLOCK OF SPERM PENETRAITON THROUGH HUMAN ZONA PELLUCIDA BY SERA OBTAINED FROM INFERTILE WOMEN

	Titer of anti-zona activities by		Sperm attachment to Z.P.	Sperm penetration through Z.P.	% Inhibition
	PHAR	IIFT			
Control	negative	not done	17	47	
<b>Patients</b>					
S.N. (unex)	1:8	1:16	8	2	95.7%
T.T. (unex)	1:8	1:4	5	0	100 %
S.K. (anovulation)	1:16	1:8	39	very many	0 %
T.K. (amenorrhea)	1:8	1:8	2	23	51.1%
S.H. (unex)	1:8	1:2	2	10	78.7%
E.M. (unex)	1:8	1:2	12	13	72.3%

PHAR : Passive Hemagglutination Test  
 IIFT : Indirect Immunofluorescence Test  
 Z.P. : Zona Pellucida  
 unex : unexplained infertility



## 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



### 1. 研究目的

近年,卵細胞透明帯の特異抗原性,並びにこれに対する抗体の受精阻止作用が,動物実験で明らかにされてきている。私どもの教室のこれまでの検討成績を要約すると,大量のブタ卵細胞から透明帯物質を精製し,これに対する特異抗体を作製して,ヒト透明帯の抗原構成を分析したところ,透明帯特異抗原と透明帯関連抗原に大別され,特異抗原にはヒト,ブタ共通抗原とヒトに固有の抗原のあることが判明している。この事実にもとづいて,ブタ透明帯を標的とした間接蛍光抗体法により,ある種の不妊患者血清中に抗透明帯自己抗体の存在することが示唆された。

しかし,不妊の病因的意義を確立するためには,この抗体の受精阻止作用を, *in vitro* のヒト受精系を用いて立証する必要がある。昨年度の本班研究において,このテストに必要なヒト受精系を確立することができたので,本年度はまず受身赤血球凝集反応を用いた抗体価の半定量法の開発,次にヒト透明帯を用いた精子貫入試験によって抗体の受精に及ぼす影響を検討することを目的とした。