

## 睾丸の細胞膜系組織特異抗原について

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任 倉田自章教授)

郷 倉 満

(昭和48年7月24日受付)

本論文の要旨は第62回日本病理学会で発表した。

睾丸材料で免疫して実験動物に無精子症に至る睾丸障害をつくった報告は、既にかなり沢山見いだされる<sup>1)~5)</sup>。それらはモルモット、ラット、マウスなどに異種、同種または自己の睾丸あるいは精子を Freund 完全アジュバントとともに注射して、抗体の産生と細精管胚細胞の障害を認めている。しかし、それらの実験はほとんどが睾丸ホモジネートを材料としており、有効抗原の本態に関する情報は得られない。睾丸あるいは精子に異ったいくつかの抗原の分布していることは既に知られているが<sup>10)~9)</sup>、それらの抗原とアレルギー性睾丸炎の関係もまだよくわかっていない。Freund<sup>10)</sup>や Bishop & Carlson<sup>11)</sup>は睾丸から非蛋白質性の無精子症抗原をかなり純粋にとりだし、Brown<sup>12)</sup>はオートクレーブにかけた睾丸材料から5 $\mu$ gの投与でも有効な糖蛋白抗原を抽出しているが、それらの抗原の起源や生物学的意義、例えばヒトの無精子症の成り立ちにおける役割などは調べられていないし、それが睾丸のもつ有効抗原のすべてであるとも考えられない。

そこで、筆者は狭義の組織特異抗原の存在部位である細胞膜系から睾丸特異抗原を抽出して、それが Freund<sup>10)</sup>の "ASPM" や Brown<sup>12)</sup>の "H" 画分とは異った slow acting な無精子症抗原であることを明らかにし、さらに同抗原粒子の subunit を得て、その性質をしらべた。ついで、この抗原あるいは抗原 subunit がヒトの疾患にもつ意義を知る目的で、不妊男性の血清について、その抗体の有無を検索した。

### 実験材料と方法

#### I. 抗原抽出材料

牛・モルモット・ヒトの睾丸を用いた。牛睾丸は金沢市屠場の御好意により成熟雄牛屠殺時に入手し、氷

冷して実験室まで運んだ。モルモットの睾丸は成熟雄のものを屠殺直後にとり出してプールした。ヒト材料は冬期死後12時間以内の病変のない成人睾丸を剖検時入手した。いずれも副睾丸・睾丸輸尿管はとり除き、使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

#### II. 膜抗原LPfr IIの抽出方法

材料を融解させ、睾丸被膜をとり除いてから倉田、岡田<sup>13)~15)</sup>の方法に準じて不溶性リボ蛋白画分(LP)をつくった。即ち、Sol. I (KCl 11.93g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ソーダ59g/l)を溶媒とし、ユニバーサルホモジナイザー (日本精機) でつくったホモジネートをガーゼ1, 2, 4, 8枚を順に通した後、遠心して沈渣を集め、Sol. I でテフロンホモジナイザーに5分以上かけて均質液をつくり、遠心する。沈渣にSol. II (KCl 74.5g/l, モノヨード酢酸186mg/l, クエン酸ソーダ10g/l, HClでpH4.7に補正)を加えて約5分間ホモジナイズし、遠心して沈渣を得る。Sol. IIによる均質化と遠心をさらに6~7回くりかえす。全操作は氷冷下に $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行った。遠心は冷凍遠心器を用い、 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で10,000rpm 30分とした。得られた沈渣を"LP"とする。

LPの湿重量の約5倍量のデオキシコール酸ソーダ(Difco) 0.2%溶液 (以下0.2%DOCと略)を加えてホモジナイズし、さらに1夜冷室で攪伴した後、10,000rpm 30分遠心して上清を得る。沈渣には0.2%DOCを初回とは同量加えて1夜攪伴し、遠心上清をとる。沈渣は同様に0.2%DOCでもう1回抽出する。3回の遠心上清をあつめ、10倍容量の冷アセトンを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ に1夜おき、生じた沈澱を10,000rpm 10分遠心してあつめる。得られた沈澱を少量の蒸留水にとかし、10,000rpm 10分遠心して得る上清を"LPso 1"とする。

セファローズ4B (Pharmacia) のカラム (通常

A Testis-Specific Antigen Locating on Cellular Membranes. Mitsuru Gokura Department of Pathophysiology (Director : Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

1.5×45cm)を用い、蒸留水を溶出液として、冷室でゲル濾過を行う。溶出液3mlづつをフラクションコレクターでとり、吸光度(280m $\mu$ )を測定すると、2つの主ピークの存在が認められる。第1のピーク(pass画分)を“LPfr I<sub>1</sub>”, 第2のピークを“LPfr II<sub>1</sub>”とする。後者が求めるものである。なお、各画分の濃縮には、セロファンチューブにいたれた試料を冷室内の空気流中におく、いわゆる pervaporation によった。

### III. Subunit (P<sub>2</sub>) のつくり方

Shore & Shore<sup>16)</sup>の血清リポ蛋白脱脂法の Day & Levy 変法<sup>17)</sup>を応用してLPfr IIの脱脂を行った。2.5~5 mg (Lowry 法による蛋白量)/ml程度に濃縮したLPfr II 2mlに、エーテル・エタノール(3:2)の2mlを加えて室温で激しく振盪し、1,500rpm 10分遠心した後エーテル層を除く。再度エーテル・エタノール(3:1) 2mlを加えて同様に処理し、遠心後エーテル層を除く。水層には白色沈澱(delipidated LPfr II ; DLP)が生じる。遠心して沈澱をとり、0.05M Tris 緩衝液(pH8.0)を2ml加えてホモジナイズし、 $\beta$ -メルカプトエタノールを0.5Mになるように加え、密閉容器中でマグネチックスターラーにより室温7日またはそれ以上攪拌して、ほとんど透明な溶液を得る。セロファンチューブ(Visking)を用い、4°C以下で蒸留水に対して24時間透析するかあるいは蒸留水を溶出液としてセファデックスG-10のカラム(1.5×45cm)を通し、pass画分をとることによってメルカプトエタノールを除く。つぎにセファデックスG-100のカラム(1.5×45cm)でゲル濾過を行うと、2つの主ピークを認めるが、第1のピーク(pass画分)を“P<sub>1</sub>”, 第2のピークを“P<sub>2</sub>”とよぶ。P<sub>2</sub>が求める subunit 画分である。

他に比較材料として Freund ら<sup>10)</sup>のASPMおよび Brown ら<sup>12)</sup>のH分画をヒト睾丸から抽出した。また、睾丸以外の諸臓器からもLP各標本を抽出した。

抗原量はLPの場合は湿量、各画分の場合は Lowry 法による蛋白量(基準は牛血清アルブミン)であらわすこととした。

### IV. ディスク電気泳動法

7.5%, pH8.9のポリアクリルアミドゲルによる分析用ディスク電気泳動を行った。負荷試料量は1管あたり約25 $\mu$ g(0.1ml)とし、0.5×10cmの管で各管2mAで泳動し、1%アミド黒10B—7%酢酸液で染色、7%酢酸で脱色を行った。

### V. 分子量測定法

Davison の方法<sup>18)</sup>に準じ、LPfr IIはセファローズ

6B, P<sub>2</sub>はセファデックスG-25でゲル濾過を行った。資料に塩酸グアニジン、 $\beta$ -メルカプトエタノール、塩化ナトリウムをそれぞれ6M, 0.1M, 0.05M(pHは7.2に補正)になるように加え、室温2時間放置後、6M塩酸グアニジン・0.1M $\beta$ -メルカプトエタノール・0.05M塩化ナトリウム(pH7.2)の液を溶出液として、2×100cmのカラムでゲル濾過を行った。温度は恒温室で24±1°Cに保った。標準試料としてはビタミンB<sub>12</sub>(1,357), Mann 社製品のチトクロームC(12,400)・ミオグロビン(17,800)・キモトリプシノゲンA(25,000)・アポフェリチン(480,000)などを常用し、カタラーゼ、アルドラーゼなどの結晶標品(Boehringer Mannheim)も用いた。カッコ内に著者の用いた分子量を記載した。なお、void volumeの測定に blue dextran を用いている。

### VI. 赤外吸収スペクトル

試料液(蛋白量3~5mg)をセレン化砒素ガラスの窓板上でフィルム状に乾燥し、赤外分光光度計(日本分光, IR-E)で測定した。試料の脱リピンは窓板とともにクロ、ホルム・メタノール(2:1)中に室温で60分くおことによって行った。

### VII. 免疫方法

抗原量,注射回数,免疫期間は表2に示した。いずれも抗原液に等量の Freund 完全アジュバント(パラフィン油8.5ml, Arlacel A 1.5ml, BCG乾燥死菌10mg)を加えて乳化し、1回1.0mlを健常成熟モルモット(体重510~650g)の肩胛骨下腔域に注射した。頻回免疫の場合は、多くの例は毎週1回づつ3回、以後2週間隔で1~4回免疫を行ったが、全経過を2週間隔で注射した群もある。採血は最終注射後7~9日目に心臓より行い、血清を使用時まで-20°Cに保存し、凍結・融解をくりかえさないように注意した。

### VIII. 免疫学的検査法

寒天内二重拡散法：寒天板の厚さ1.5~2.0mm, 抗原・抗体孔の直径8mm, 孔の間隔4~5mm。抗原は蛋白濃度1~5mg/ml, 抗体は抗血清を稀釈しないで用いた。免疫電気泳動法：Grabar 法<sup>19)</sup>に準じた。

皮内反応：最終免疫注射後1週目のモルモット背部(正中線より2cm)の皮内に抗原30 $\mu$ g(0.1ml)を注射し、一定時間ごとに発赤・硬結を検査した。直径10mm以上の発赤を陽性とした。

タンニン酸処理赤血球凝集反応：Boyden 法<sup>20)</sup>によったが、条件は小西の報告<sup>21)</sup>に従った。

精子凝集反応：被検血清を生理食塩水で5倍にうす

めたもの1滴をスライドガラス上で新鮮ヒト精液1滴とまぜ、室温で鏡検した。

蛍光抗体法： Riggs<sup>22)</sup>に従って標識し、Curtain法<sup>23)</sup>で精製した抗血清グロブリンによる直接法を用いたが、一部には間接法も使用した。組織は $-90^{\circ}\text{C}$ で凍結し、クリオシュタット切片としたが、塗沫標本 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷アセトン固定(3分)も作製した。

血清の移入による被動性感作：体重500~620gのモルモットを用い、直前にミリポアフィルターを通して除菌した被検血清1.5mlを心臓腔内に徐々に注入し、48時間後に剖検して辜丸組織像を検索した。

#### IX. 病理組織学的検査方法

副辜丸・辜丸輸尿管を除いた辜丸を秤量後、他臓器とともに10%ホルマリン固定、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本として観察した。

辜丸障害度は Freund<sup>24)</sup>や Katch & Bishop<sup>33)</sup>がそれぞれ分類している。両者に本質的な差はないが、筆者は一応後者の基準に従い、以下のように区分した。

0：正常

1：成熟精子の形成抑制、細精管腔に脱落細胞の出現

2：細精管腔に脱落した細胞や細胞破壊物の量が増加、第1次精母細胞の空胞変性。

3：第2次精母細胞の全面的消失、第1次精母細胞の脱落。

4：精細胞のほとんど完全な消失、セルトリ細胞の残存。

なお、病変が限局性で、細精管によって差が大きいことがあるから、こゝでは最も強い細精管の病変を以てその辜丸の障害度とした。

### 実験成績

#### I. 膜抗原LPfr IIの性状

LPsolをセファローズ4Bのカラムにかけると図1のような2つの主ピークが認められるが、LPの可溶化に用いるDOCの濃度をあげ、0.5%、1%液などを用いた場合、第1のピーク(LPfr I)の量が多くなるが、第2のピーク(LPfr II)はあまり増加しない。そこで筆者はLPの可溶化に0.2%DOCを用い、抽出を3回くり返して別々にあるいはプールしてアセトン沈澱をとり、カラムにかけてLPfr IIを得ている。LPfr IをさらにDOCかトリプシンで処理すればLPfr IIがかなり得られることは甲状腺の場合知られているが、こゝでは用いていない。LPfr IIは凝集をおこしやすく、強く濃縮するか一度凍結した標本をセファローズ

4Bのカラムに再びかけてみると、LPfr Iの位置にまたピークを生じてくる。

そこで新製したLPfr IIについてディスク電気泳動を行った。図2のようにLPsolは3本のバンドを示し、LPfr IIは単一のバンドを示している。

新鮮なLPfr IIおよびLPfr Iを3%酢酸ウラニウム液でネガチブ染色を行って電子顕微鏡で見ると、前者では長さ約80Å、巾40Å以下の棒状粒子が認められ、後者では前者が集合して長さ約220Å、巾約80Åの粒子をつくっているように見える(図3、4)。

ディスク電気泳動や後述の免疫学的な分析の結果、LPfr IIが一応単一の成分と考えられたので、ゲル濾過法で分子量の測定を行った。棒状粒子の場合、そのままゲル濾過を行ったのでは正しい分子量が得られないから、Davisonの方法<sup>18)</sup>に従い、6M塩酸グアニジンの存在で充分変性させてからゲル濾過を行った結

図1 ヒト辜丸 LPsol のセファローズ4Bゲル濾過。

カラム：1.5×40cm, 溶出液：蒸留水  
溶出速度：3.5ml/hr, 採取液量：3ml/試験管

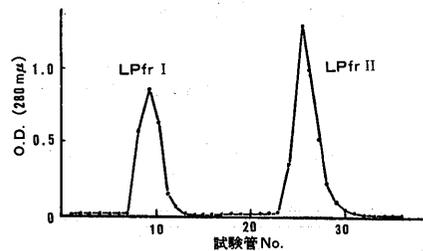
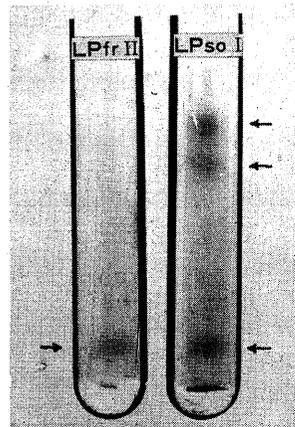


図2 ヒト LPsol と LPfr II の disc 電気泳動



果、ヒトとモルモットのLPfr II についていずれも47,000の値がくり返し得られた(図5)。

ヒトLPfr IIの赤外スペクトルは図6で、牛やモルモットのLPfr IIでも同様なパターンが得られた。それらはスフィンゴ糖脂質のパターンによく類似しており、脱リピンを行うとその特徴が失われた。LPfr IIから抽出したリピンを乾燥フィルムとしてスペクトルをとっても同様なパターンが得られる。抽出リピンに

ついて薄層クロマトグラフィーを行った結果では中性脂肪・コレステロールはなく、リン脂質もほとんど見られず、3~4のニンヒドリン陽性のスフィンゴ糖脂質の存在が認められた。別に乾燥LPfr IIからクロロホルム・メタノール(2:1)で抽出されるリピン量を重量法で測定し、牛LPfr IIでは4.6%、モルモットLPfr IIでは1.3%の値を得た。なお、LPfr IIにDOCの結合がないことをMosbachら<sup>24)</sup>の方法により確めた。

II. Subunit (P<sub>2</sub>)の性状

脱リピンを行ったLPfr II (DLP)の懸濁液を室温で1週間以上攪拌しながら還元したものを透析後、セファデックスG-100のカラムにかけると図7のようなパターンが得られる。還元処理日数が長くなればなるほどP<sub>1</sub>は減少し、P<sub>2</sub>が増加する。反応条件とくに温度によって大きく異なるが、室温15°C附近では2~3週の還元でP<sub>2</sub>のみになる。なお、P<sub>1</sub>をとってさらに還元を行えばP<sub>2</sub>が得られる。DLPをドデシル硫酸ソーダ(SDS)の溶液にとかして還元すれば反応は早く進み、再検率も高くなるが、この場合SDSの不可逆的な結合がおこるから<sup>25)</sup>、ここでは表面活性剤の使用は避けた。P<sub>2</sub>は pervaporation などで濃縮できるが、1/5容量以上に濃縮を行うと目立って重合体を生ずることが再クロマトグラフィーで認められた。新製したヒト・モルモットのP<sub>2</sub>について Davison 法による分子

図3 ヒト LPfr IIの電顕像、酢酸ウランでネガチブ染色。

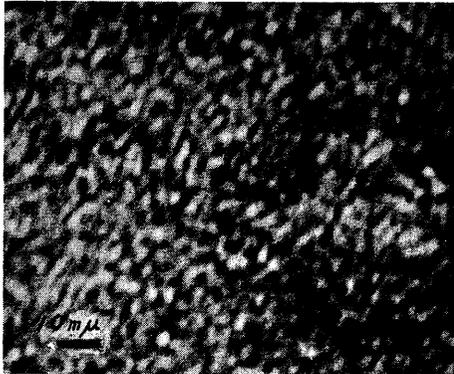


図4 ヒト LPfr Iの電顕像、酢酸ウランでネガチブ染色。



図5 ヒト睾丸 LPfr IIの分子量 (Davison法)

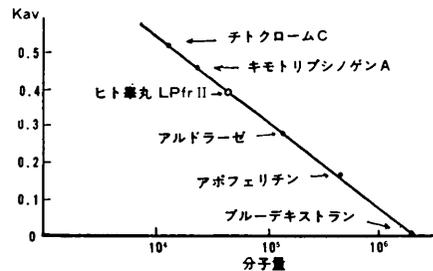
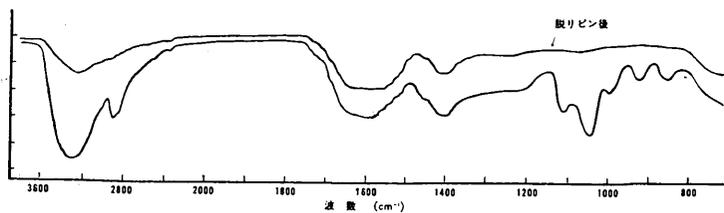


図6 ヒト睾丸 LPfr IIの赤外スペクトル



量測定を行った結果、いずれも約3,800の値が得られた。

Ⅲ. LPfr II の P<sub>2</sub> の免疫学的分析

ヒトまたは牛睾丸のLPfr II はそれぞれの抗睾丸LPfr II (またはLP) モルモット血清との寒天内二重拡散で1本の沈降線を生じ、免疫電気泳動でもα-グロブリンの位置に1本のアークを示した(図8, 9)。しかも組織特異性があり、抗睾丸LPfr II 血清に対し肝・脾・腎・脳・副腎の各LPfr II は沈降線を生じなかった。またLPfr II がASPMやH画分とも一致しないことも確かめられた。なお、異種睾丸LPfr II に対するモルモットの抗血清はモルモット睾丸のLPfr II とも反応して1本の沈降線を示した。

牛睾丸のP<sub>2</sub>は抗牛P<sub>2</sub>モルモット血清とは沈降線をつくらなかったが、抗牛LPfr II モルモット血清とは1本の沈降線を生じた。しかし、その沈降線はLPfr II

図7 牛睾丸 P<sub>2</sub> の溶出パターン

カラム：セファデックス G-100, 1.5×40cm, 溶出液：蒸留水, 溶出速度：5 ml/hr, 採取量：3 ml/試験管

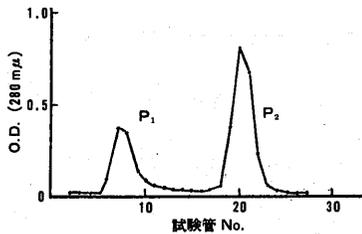
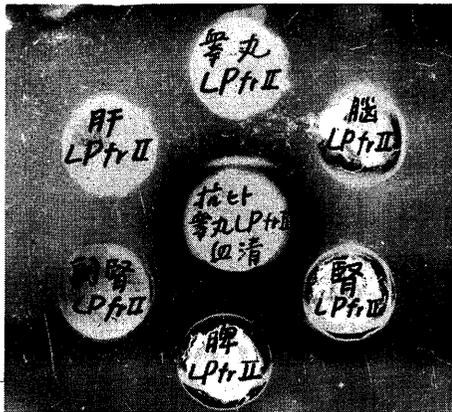


図8 睾丸 LPfr II の臓器特異性。

寒天内二重拡散法, 抗原はヒト各臓器の LPfr II, 抗体は抗ヒト睾丸 LPfr II モルモット血清。



の沈降線に完全一致はしなかった(図10)。そこで抗睾丸LPfr II 血清をP<sub>2</sub>で吸収した結果、LPfr II の沈降線は完全に消失した。

LPfr II やP<sub>2</sub>の細胞内局在を知るために蛍光抗体法を行った(図11, 12)。抗牛睾丸LPfr II 標識血清で牛睾丸・精子を直接法で染めた場合も抗牛睾丸P<sub>2</sub>血清で間接法染色を行った場合も同じような結果が得られた。即ち、精細胞の細胞質がびまん性に染まり、核は陰性である。精子では鞭毛がよく染まり、頸部がやゝ濃く染まる傾向が見られたが、頭部はうすく、アクロソームはとくに染まらない。

Ⅳ. 免疫動物の皮膚反応と血中抗体

ヒトLPfr II で4回5週免疫したモルモット (No. 23, 24, 25) について皮内反応を行った結果、睾丸LPfr II のみが遅延型皮内反応陽性で、24時間後に直径1cm以上の発赤が硬結を伴って現れたが、肝・脳・副腎の各LPfr II による発赤は軽く、いずれも直径1cmに達しなかった。

免疫動物の血清は、既述のような沈降抗体をほとんど全例が示したが、さらにそれらの抗血清の一部についてタンニン酸処理赤血球凝集反応を行い、表1の結果を得た。ヒトまたはモルモット睾丸のLPまたはLPfr II 免疫群はモルモット睾丸LPfr II に対し高単位の抗体を生じているが、ヒトまたは牛の肝LPで免疫した

図9 睾丸 LPfr II の免疫電気泳動。

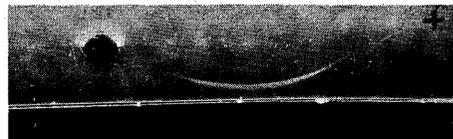


図10 睾丸 P<sub>2</sub> の寒天内沈降反応。



図11 抗牛 LPfr II 標識抗体による牛睾丸  
(塗沫標本)の直接法染色。



図12 抗牛 P<sub>2</sub> 標識抗体による牛精子の間接  
法染色。

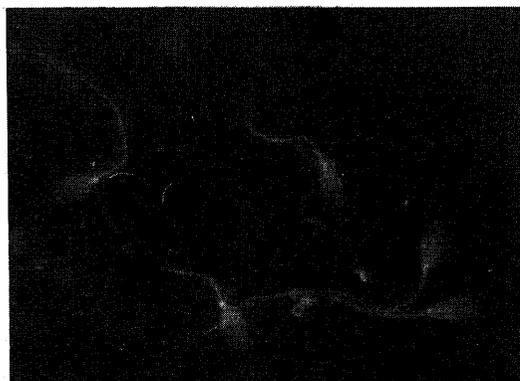
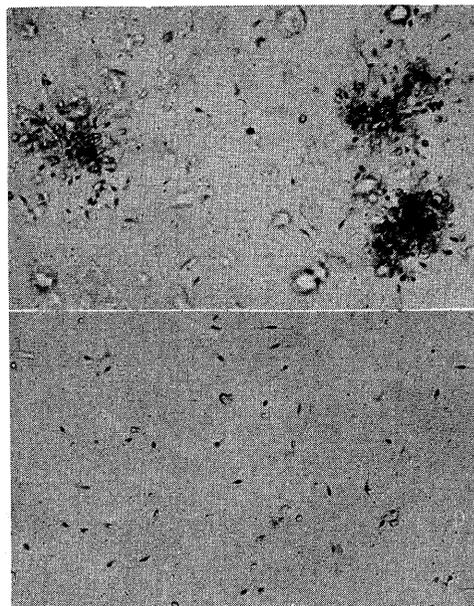


図13 精子凝集反応, 上は抗ヒト睾丸 LPfr  
II モルモット血清添加, 下は対照。



対照群にはそのような抗体は認められない。

新鮮なヒト精液に抗ヒトLPfr II 血清を加えると、精子の凝集が認められた。主に“tail-to-tail”型の凝集像が優勢であった(図13)。

#### V. 免疫動物の病理学的所見

予備実験で、体重500g以下のモルモットは Freund 完全アジュバントのみでかなり強い睾丸萎縮を生じることがわかったので、こゝでは体重510~650gのモルモットのみを使用した。免疫群と対照群の睾丸重量・組織障害度は表2のようである。異種・同種のLP, LPfr II, P<sub>2</sub>の頻回長期免疫で対照群を越える睾丸萎縮が発生している(図14~20)。淋球の浸潤例はなく、間質線維増生も1例(No. 11)に認めただけである。間細胞には著変はない。睾丸以外の臓器は免疫群と対照群の間に有意な差はない。

抗LP, LPfr II, P<sub>2</sub>抗血清を1.5mlづつ心内に注射したモルモットの睾丸はいずれも細精管の一部に障害像が認められ、その変化はアジュバント対照血清注射群

のそれを明らかに越えていた(図21~23)。

#### VI. 不妊男子の血中抗体

本学泌尿器科と舞鶴共済病院坂谷博士の御尽力で入手した不妊男子血清について、ヒト睾丸LPfr II およびP<sub>2</sub>を抗原として寒天内二重拡散法を行った(表3)。前者を抗原とした場合約47%、後者を抗原とした場合約63%の陽性率が得られている。不妊経歴のない健康成人男子10例の血清では両抗原に対して陽性例は1例もなかった。なお、陽性の不妊男子血清はヒトの肝・脾・腎・脳・甲状腺の各LPfr II とは沈降線を生じなかった。

#### 考 察

睾丸から倉田・岡田らの細胞膜系組織特異抗原抽出法によって得た画分(LPfr II)は、disc 電気泳動で単一のバンドを示し、抗原性をを用いた免疫学的分析でも単一とみなされる。その分子量は Davison 法によると約47,000である。この値は岡田ら<sup>26)</sup>が甲状腺LPfr II について得た値(約48,000)に近い。

この抗原の細胞内局在を monospecific な抗体をつかって蛍光抗体法で見ると、精細胞全般の細胞質がびまん性に染まり、甲状腺や唾液腺における同様な染色成績<sup>27)13)</sup>によく一致する。このような所見の意味を岡田らはさらにパーオキソゲ抗体法で電顕的に検討し、LPfr II は細胞膜・ミトコンドリア膜・小胞体膜

表1 免疫モルモット血清のタンニン酸処理赤血球凝集反応\*

血清稀釈 動物番号**	2 <sup>0</sup>	2 <sup>-1</sup>	2 <sup>-2</sup>	2 <sup>-3</sup>	2 <sup>-4</sup>	2 <sup>-5</sup>	2 <sup>-6</sup>	2 <sup>-7</sup>	2 <sup>-8</sup>	2 <sup>-9</sup>	2 <sup>-10</sup>	2 <sup>-11</sup>	2 <sup>-12</sup>	2 <sup>-13</sup>	2 <sup>-14</sup>	2 <sup>-15</sup>	2 <sup>-16</sup>	2 <sup>-17</sup>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* 抗原はモルモット辜丸 LPfr II

\*\* 表2参照. C-1~C-3はヒト肝LP50mg 3回免疫(5週)  
C-4, C-5は牛肝LP50mg 3回免疫(5週)

表2 異種・同種辜丸抗原免疫の効果

動物番号	抗 原	免疫量 <sup>(1)</sup> (mg)	免疫回数	免疫期間 (週)	辜 丸 重 量 <sup>(2)</sup>	組 織 障 害 度
5~8	モルモットLP	100	1	4	3.2, 2.7, 2.6, 2.8	0, 1, 1, 0
9~12	モルモットLP	50	3	5	1.2, 1.2, 0.9, 1.0	3, 3, 4, 3
1, 2	ヒト LP	100	5	8	0.3, 1.5	3, 2
13~15	モルモットLPfr II	0.5	4	5	1.4, 1.3, 1.7	2, 3, 1
16~18	モルモットLPfr I	0.5	4	5	2.2, 2.1, 2.2	0, 1, 1
24, 25	ヒト LPfr II	1.5	4	5	1.3, 0.6	3, 3
28, 29	ウシ LPfr II	1.0	5	10	1.2, 1.2	3, 3
19, 20	モルモット P <sub>2</sub>	0.4	5	7	2.0, 1.3	3, 3
34, 35	ウシ P <sub>2</sub>	0.1	5	9	1.2, 1.7	3, 2
26	アジュバント	-	4	5	1.7	1
36, 37	アジュバント	-	5	9	2.7, 2.9	1, 0
31, 32	アジュバント	-	5	10	2.1, 1.8	1, 2

(1) LPは湿量, それ以外の抗原量は蛋白量(Lowry法)

(2) 両側辜丸重量の和

表3 不妊男子血清の沈降抗体

血 清	抗 原	
	ヒトLPfr II	ヒトP <sub>2</sub>
Azoospermia		
1	+	+
2	-	-
3	+	+
Oligozoospermia		
1	-	-
2	-	-
3	+	+
4	+	+
5	-	-
6	+	+
7	-	+
8	-	+
9	+	+
10	+	+
11	-	+
12	-	-
13	-	-
14	+	+
Klinefelter's syndrome	+	+
Mumps	-	-

・核膜などを含む細胞膜および細胞内膜系に共通して存在する構造蛋白が monomerize したものであると考えている<sup>26)</sup>。構造蛋白の存在については議論があるが、Green ら<sup>28)</sup>、Criddle ら<sup>29)</sup>はその存在を主張し、分子量として22,000の値を示している。他にもさまざまな値が報告されているが<sup>30)~32)</sup>、それは試料の調製法、測定条件による差であろう。この場合、何をマーカーとして分離試料をチェックするかが一つの重要な点となるであろう。

私どもの得たLPfr II にはつねに少量の糖脂質 (sphingoglycolipids) の含まれていることが赤外スペクトルや薄層クロマトグラフィーで認められたが、そのことの意義はまだ明らかでない。LPfr II あるいはP<sub>2</sub>は数%のブドウ糖を加えると直ちに小胞 (vesicle) をつくる性質があるが、このこととDOC処理でも除けない糖脂質があるということには何かの関係があるかしのれない。糖が粒子の立体構造保持上に何等かの意味をもつということもありそうに思われる。

LPfr II のもつ組織特異性は、抗血清を用いた寒天内拡散法やタンニン酸処理赤血球凝集反応でも免疫動

物の皮内反応でも証明されたが、抗原活性は蛋白部分にあることが既に知られている<sup>33)</sup>。しかし特異性と蛋白構造の関係をさらに詳しく知るためには、より低分子の活性 fragment を得ることが望ましい。そこでLPfr II を脱リピン後メルカプトエタノールによる還元を長期間行って subunit 画分を得た。不可逆的な結合を避けるために、収量は犠牲にしてドデシル硫酸ソーダのような表面活性剤を使用せず、また還元後のアルキル化も同じ理由で行わなかった。得られたP<sub>2</sub>は凍結・高度の濃縮・長時間保存などで凝集をおこすから、毎時新製して使用した。新製したP<sub>2</sub>の分子量はDavison 法では約3,800であったから、LPfr II はおそらくP<sub>2</sub>12個から出来ていると考えられる。P<sub>2</sub>も電子顕微鏡でしばしば棒状粒子のように見えることがあったが、この程度の大きさとコントラストでは確実な像は得がたく、得られた写真の光情報処理でも現在までよい結果が得られていない。抗LPfr II 抗体を用い、P<sub>2</sub>の寒天内拡散を行ってみると、LPfr II には完全一致しない1本の沈降線が得られる。抗原性が変わらなくとも分子量が1/12程度に小さければ完全一致像は得難いので、吸収実験を行ってP<sub>2</sub>がLPfr II の抗原性を保持することを確かめた。

無精子症抗原としての活性はモルモットを免疫して確かめたが、LP、LPfr II、P<sub>2</sub>のいずれにしても活性がある。後2者の免疫ではLPに比して変化が多少弱い傾向があったが、収量の関係で投与量のはるかに低くなったのがその原因であろう。アジュバント対照群にも多少の病変が見られたが、抗原投与群の変化がより強いことは明らかであった。AD<sub>6</sub><sup>34)</sup>のような組織障害性のないものをアジュバントに使用すれば、その差は一層明らかとなるであろう。これらの実験で注目されることは睾丸障害の発生にかなりの時日が必要なこと、大量の抗原でも1回投与・1カ月程度では病変がおこらず、少量の抗原でも数回免疫して5週以上たつとかなり変化が見られることである。即ち、これらの抗原はかなり slow acting であると考えられる。

従来、睾丸障害の発生にはリン巴球の関与が重大で、血中抗体の意義は乏しいとする考えが有力で、実際、抗血清による被動性感作で睾丸病変をつくることは成功していない。筆者は抗LP、抗LPfr II、抗P<sub>2</sub>の各血清を他の個体に移入して睾丸障害が限局性ながら起こることを明らかにした。これらの成績と障害睾丸にリン巴球浸潤の欠ける事実とは障害発生における血中抗体の役割を再認識させるであろう。

睾丸障害が自己免疫的に成立し得ることが実験的に

証明されたとしても、ヒトの疾患においてそのような機序が何等かの役割を果しているであろうか。このことはかなり解析の難しい問題であるが、ひとまず不妊男子血清中に抗睾丸細胞膜抗体が出現するか否かをしらべてみた。Azoospermia や Oligozoospermia の患者血清はヒトの睾丸LPfr II を抗原として40%台、P<sub>2</sub>を抗原として60%台の症例が沈降抗体の存在を示した。このことは直ちにこれらの疾患が自己免疫疾患であることの証明にはならないが、しかし疾患の成り立ちには予想以上に免疫機序が関与しているようなことを暗示する。たゞし、そうだととしても実験的睾丸障害の発生に必須な Freund アジュバントの役割を代行する機転がヒトの場合、個体の抗体産生系の先天的あるいは後天的異常であるのか、自己抗原の異種化というような現象であるのか、依然として残される大きな問題となることは確かである。

### 結 論

ヒト・牛・モルモットの睾丸の細胞膜系不溶性リポ蛋白質画分を可溶化し、組織特異性リポ蛋白質画分(LPfr II)を抽出し、それが disc 電気泳動や免疫拡散法で単一であり、分子量は約47,000で、睾丸特異性をもつが、既知抗原ASPMやH画分とは異なるものであることを認めた。

この抗原を Freund 完全アジュバントに混じて、体重約500g以上のモルモットを数回免疫すれば、経過5週間でアジュバント対照群のそれとは有意差のある睾丸萎縮を生じた。

LPfr II を脱リピン後、懸濁液としてβ-メルカプトエタノールで長時間攪拌下に還元し、subunit (P<sub>2</sub>: 分子量約3,800) の画分を得た。同画分も抗原活性をもち、免疫によって睾丸障害をおこした。なお、睾丸障害動物の血清移入によってもモルモット睾丸に障害を作ることができた。

不妊症男子血清19例について、LPfr II を抗原として9例、P<sub>2</sub>を抗原として12例に沈降抗体を証明した。

本研究は本学泌尿器科・中務紀氏により着手され、著者が引きついだものである。記して感謝の意を表したい。また、御指導・御協力下さった恩師倉田自章教授、岡田収司博士、教室各位ならびに研究遂行のお許しを戴き、種々御便宜をお計り下さった砺波厚生病院院長・水木正雄博士に衷心より感謝申上げる。

### 文 献

- 1) Voisin, C., Delaunay, A. & Barber, M. : Ann. Inst. Pasteur, **81**, 48 (1951).
- 2) Freund, J., Lipton, M. M. & Thompson, G. E. : J. Exp. Med., **97**, 711 (1953).
- 3) Katsh, S. & Bishop, D. W. : J. Embryol. Exp. Morph., **6**, 94 (1958).
- 4) Brown, P. C., Glynn, L. E. & Holborow, E. J. : J. Path. Bact., **86**, 505 (1963).
- 5) Hargis, B. J., Malkiel, S. & Berkelhammer, J. : J. Immun., **101**, 374 (1968).
- 6) Henle, W., Henle, G. & Chambers, L. A. : J. Exp. Med., **68**, 335 (1938).
- 7) Katsh, S. & Katsh, G. F. : Fertil. and Steril., **12**, 522 (1961).
- 8) Gunga, K. P., Sheth, A. R. & Shanta, S. R. : J. Reprod. Fert., **23**, 263 (1970).
- 9) Toullet, F., Voisin, G. A. & Nemirovsky, M. : Ann. Inst. Pasteur, **118**, 513 (1970).
- 10) Freund, J. Thompson, G. E. & Lipton, M. M. : J. Exp. Med., **101**, 591 (1955).
- 11) Bishop, D. W. & Carlson, G. L. : Ann. N. Y. Acad. Sci., **124**, 247 (1965).
- 12) Brown, P. C., Holborow, E. J. & Glynn, L. E. : Immunology, **9**, 255 (1965).
- 13) Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y. : Int. Arch. Allergy, **35**, 392 (1969).
- 14) Kurata, Y. : Acta Path. Jap., **18**, 501 (1968).
- 15) 倉田自章・岡田収司：免疫実験操作法（日本免疫学会編）255頁，金沢，1971。
- 16) Shore, V. & Shore, B. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **9**, 455 (1967).
- 17) Day, C. E. & Levy, R. S. : J. Lipid Res., **9**, 789 (1968).
- 18) Davison, P. F. : Science, **161**, 906 (1968).
- 19) Grabar, P. : Ann. N. Y. Acad. Sci., **69**, 591 (1957).
- 20) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., **93**, 107 (1951).
- 21) 小西奎子：臨床免疫，**2**，103 (1970)。
- 22) Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M. & Metcalf, T. G. : Amer. J. Path., **34**, 1081 (1958).
- 23) Curtain, C. C. : J. Histochem. Cytochem., **9**, 484 (1961).
- 24) Mosbach, E. H., Kalinsky, H. J., Halpern, E. & Kennedall, F. E. : Arch. Biochem. and

- Biophys., **51**, 402 (1954).
- 25) Reynolds, J. A. & Tanford, C. : Proc. Natl. Acad. Sci., **66**, 1002 (1970)—J. Biol. Chem., **245**, 5161 (1970).
- 26) Okada, S. : Acta Path. Jap., **23**, 249 (1973).
- 27) Kurata, Y. & Okada, S. : Int. Arch. Allergy, **29**, 495 (1966).
- 28) Green, D. E., Tisdale, H. D., Criddle, R. S. & Chen, P. Y. & Bock, R. M. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **5**, 109 (1961).
- 29) Criddle, R. S., Bock, R. M., Green, D. E. & Tisdale, H. D. : Biochemistry, **1**, 827 (1962).
- 30) Weinbach, E. C. & Garbus, J. : J. Biol. Chem., **240**, 1811 (1965).
- 31) Gent, W. L. G., Gregson, N. A., Gammack, D. B. & Raper, J. H. : Nature, **204**, 553 (1964).
- 32) Got, K. & Polya, J. B. : Enzymologia, **27**, 63 (1964).
- 33) Okada, S., Kurata, Y. & Matsuda, T. : Int. Arch. Allergy, **39**, 6 (1970).
- 34) Tanaka, A. & Kitagawa, M. : Biochim. Biophys. Acta, **98**, 182 (1965).

A b s t r a c t

A testis-specific lipoprotein fraction (LPfrII) which was homogeneous and contained the rodlike particle (M. W.=ca. 48,000) was isolated from cellular insoluble lipoprotein fractions of testes.

Guinea pigs injected with a LPfrII fraction incorporated in Freund complete adjuvant developed circulating antibody, delayed hypersensitivity and testicular lesions.

The subunit fraction ( $P_2$ ; M.W. = ca. 3,700) was obtained by prolonged reduction of delipidated LPfrII suspension and filtration on Sephadex G-100. Guinea pigs injected with a  $P_2$  fraction in Freund complete adjuvant developed a testicular lesion, but no precipitating antibody. Attempts to produce aspermatogenesis by intravenous injection of sera from guinea pigs sensitized with LPfrII or  $P_2$  into normal pigs gave positive results.

The sera of 19 infertile men were studied by gel diffusion in agar; 9 sera of 19 sera showed a precipitation line with LPfrII and 12 sera with  $P_2$  of human testes.

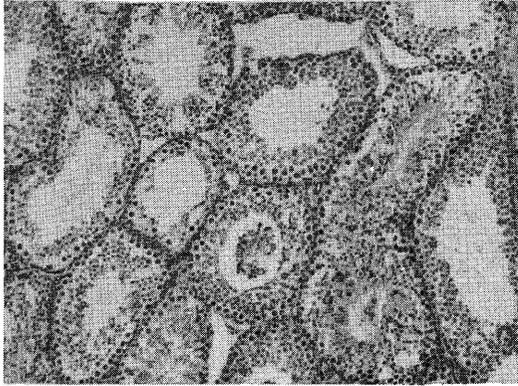


図14 モルモット LP100mg 1回 (4週),  
障害度 1. No.5

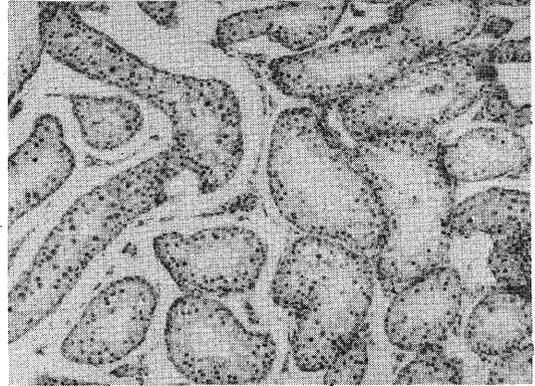


図17 モルモット LPfrII 0.5mg 4回  
(5週), 障害度 2~3, No.14

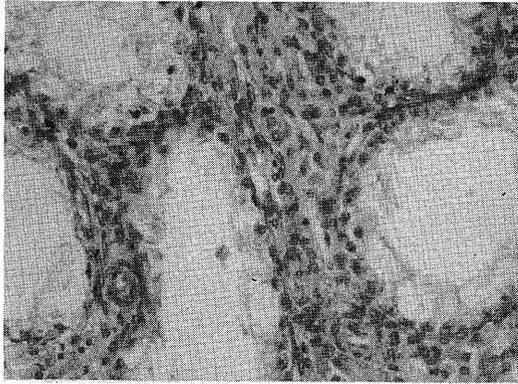


図15 モルモット LP50mg 3回 (5週),  
障害度 4. No.11



図18 牛 LPfrII 1mg 5回 (10週),  
障害度 3. No.29

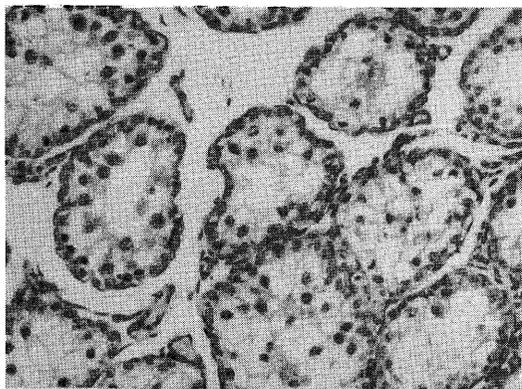


図16 ヒト LP100mg 5回 (8週),  
障害度 3. No.1

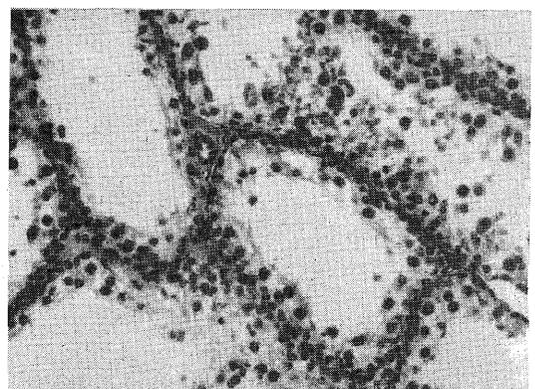


図19 モルモット P<sub>2</sub> 0.4mg 5回 (7週),  
障害度 3. No.19

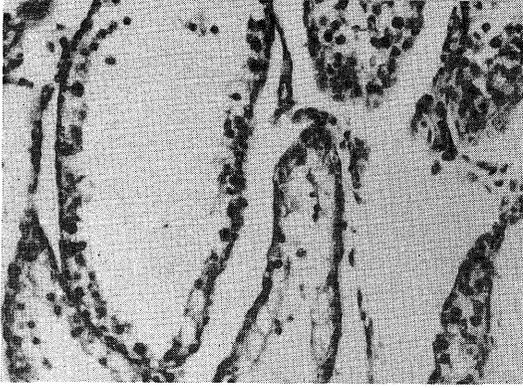


図20 牛  $P_2$  0.1 mg 5回 (9週),  
障害度 3. No.34

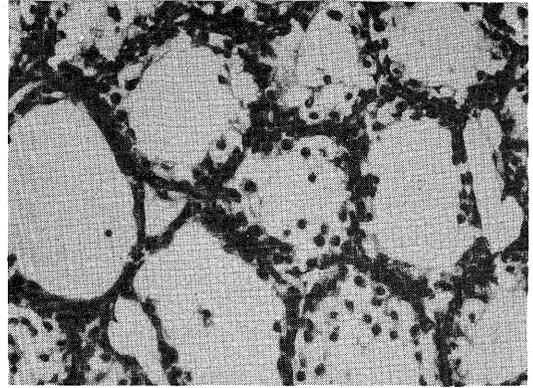


図22 No.34血清移入, 障害度 3.

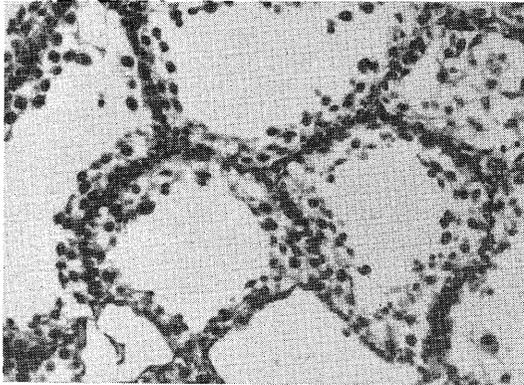


図21 No.29血清移入, 障害度 3.

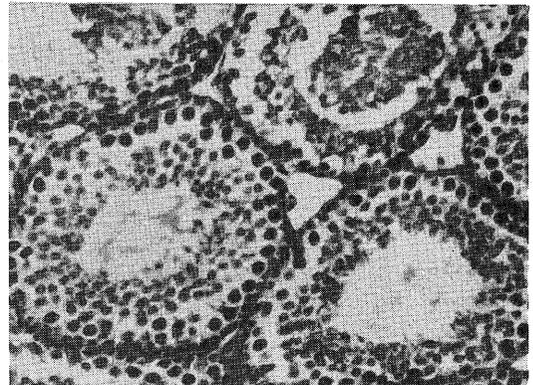


図23 No.36 (アジュバンド対照) 血清移入,  
障害度 1.