P-417 Assay of sperm acrosin activity and its clinical application: contrast of activity in testis, epididymis and analysis of human sperm acrosin and its affecting factors

Dept. of Urology, First Teaching Hospital Of Norman Bethune University of Medical Science.
Zhong-Wen Zhao and Chun-Hua Xiao

We have discovered a new method to detect the activity of human sperm. By this method we have detected 3 different fertile men. The result suggests that acrosin activity is related with the fertility. We collected testis and epididymis specimen from fertile men for assaying sperm density and acrosin activity of sperm in testis, epididymal capus, corpus and cauda. The result showed that there were no obvious difference for the acrosin in epididymal capus, corpus and cauda. We collected more than 300 semen samples of male infertility to assay the acrosin activity and most indices of sperm, ureaplasma urealyticum and antibody for sperm. It showed that the acrosin activity was positively proportional to the motility rate and the viability was inversely proportional to WBC count and the deformity rate. The acrosin activity was significantly related with the ureaplasma urealyticum infection while not related with the sperm antibody.

P-419 精子卵結合の異常症例における補体制御因子

大阪大学¹⁾、大阪府立成人病センター研究所第6部²⁾
北村雅哉¹⁾、山中幹基¹⁾、古賀実¹⁾、辻村晃¹⁾、西村憲二¹⁾、
内田欽也¹⁾、松宮清美¹⁾、瀬谷司²⁾、奥山明彦¹⁾

【目的】所謂不妊カップルのうち約10%が男性要因、女性要因とも通常の検査では異常が認められず、原因不明の不妊症とされている。これらの中に精子卵結合の異常による不妊症があるのでないかと考え、抗CD46抗体を用いてスクリーニングを行った。CD46 (Membrane Cofactor Protein ; MCP)は精子においてはinner acrosomal membraneに発現しており、精子卵結合に重要な役割をしていると考えられている。【対象、方法】当科不妊外来に受診した患者52名のうち、精液所見が正常であり、女性側の要因も否定され、AIHまたはIVFを繰り返し試みるも妊娠に至らない、原因不明の不妊カップル、63組を対象とした。【結果】Acrobeads test は抗CD46抗体を用いて精子の卵との結合能を見るもので、前述の63症例の精子を検査したところ、7例は全く凝集が見られなかった。次にこの7例に対して4つの異なるエピトープをもつモノクローナル抗体を用いてimmuno-blottingを行ったところ、うち2症例はどの抗体とも全く反応せず、1症例は一つの抗体とのみ反応した。なお、これらの異常症例においても白血球上には正常のCD46が認められた。【考察】これらのエピトープの認識部位がCD46の細胞外ドメインの基質結合部位であるところから、精子のCD46の量的、あるいは質的異常はその卵結合能に影響するものと思われる。これらの異常の原因として精子特異的なCD46遺伝子の異常のほか精子特異的なpost-translational modificationの異常も考えられ、他の補体制御因子についての検索もおこなう予定である。

P-418 ラットLeydig cell におけるNitric oxide の産生とその制御

神戸大学¹⁾・三菱神戸²⁾
龍見 昇¹⁾・藤澤正人¹⁾・堅田明浩¹⁾・藤岡 一¹⁾・神崎正徳¹⁾・
奥田喜啓²⁾・岡田 弘¹⁾・荒川創一¹⁾・守殿貞夫¹⁾

【目的】Nitric oxide (NO) はNO synthase (NOS) によりL-arginine から生成されるフリーラジカルであり、様々な臓器で重要な働きをしている。精巣においてもNOがsteroidogenesisを抑制することが報告されており、重要な役割を担っていると考えられる。我々は幼若および成熟ラットLeydig cell 培養系を用い、NOの産生とその制御について検討したので報告する。

【方法】Leydig cell は幼若 (20日齢) および成熟 (8週齢) ラットよりコラゲナーゼ処理にて分離し、無血清培地 (DMEM/F12) にて培養した。①48時間後、本培養系にIL-1β (0.01-100ng/ml)、TNFα (0.01-100ng/ml)、forskolin (0.01-100μM)、またはhCG (0.01-100ng/ml) を添加した。NOはGriess法にて測定し、iNOS mRNA の発現はNorthern blot法にて定量的に評価した。②ABC法を用いて免疫組織学的にiNOSの発現を検討した。③Pachytene spermatocyte (PS) およびround spermatid (RSd) は、12週齢ラットよりコラゲナーゼ処理の後、Elutriationにて採取し、無血清培地 (DMEM/F12) にて16時間培養した。その上清をLeydig cell に添加し、同様にiNOS mRNA の発現量を検討した。

【結果】①Leydig cell の培養液中のNO量は、IL-1βの添加濃度依存性に増加し、NOSの阻害剤であるL-NMMAによって抑制された。TNFα、forskolin、hCGの添加ではNO量に変化は見られなかった。iNOS mRNA の発現は、IL-1βの0.01-10ng/mlの範囲で濃度依存性に増加し、6時間の刺激で最高値に達し、24時間までは持続した。②Rabbit anti-iNOS polyclonal 抗体を用いた免疫染色にて、Leydig cell の細胞質内にiNOS蛋白の発現が認められた。③PS、RSdの培養上清をLeydig cell に添加したもので、双方ともIL-1βで刺激されたLeydig cell 中のiNOS mRNA の発現を抑制した。

【結論】Leydig cell の細胞質内にiNOSが存在しており、NOを産生していることが明らかになった。今後、さらに精巣におけるiNOSおよびNOの機能的役割を検討することにより、精子形成の調節機構解明の糸口になりうるものと考えられた。

P-420 精子特異抗原HSAg-13およびHSAg-33の免疫電顕的検討

宇治徳洲会病院¹⁾・滋賀医科大学²⁾・同解剖学第一³⁾

ブリティッシュコロロンビア大学アンドロロジー研究室⁴⁾
上仁数義¹⁾・徳永義光³⁾・吉貴達寛²⁾

Gregory Lee⁴⁾・友吉唯夫²⁾

精子には、いまだ解析されていない未知の抗原が多数存在しているのではないかと推測される。われわれは、精子に特異性の高いマウス単クローン抗体を作製し、精子形成過程における対応抗原の発現について検討し報告してきた。(日泌総会, 1996)【対象と方法】今回は健康男性から得た新鮮精子を免疫原とするマウス単クローン抗体HS-13(IgG1, 抗原HSAg-13:80kDa, Proc 10th Ann Meeting JSIR, 35-36, 1996)およびHS-33(IgG1, 抗原HSAg-33:72kDa, J Androl. in press)を一次抗体として用いて、SD系成熟ラット (灌流固定) およびヒト精巣 (浸漬固定) をABC法で免疫染色した。免疫染色後1% osmium で固定、脱水、樹脂包埋の後、2% uranyl acetateおよびReynolds` solutionで電子染色を行い透過電子顕微鏡で観察した。【結果】ラットおよびヒトにおいて各々の抗体は減数分裂後の精子細胞および精子に反応しており、他の精巣構成細胞はすべて陰性であった。反応部位は精子細胞および成熟精子のそれぞれの先体部分でHS-13、HS-33ともにintra-acrosomal regionに認められた。【結語】マウス単クローン抗体HS-13、HS-33がそれぞれ認識する抗原HSAg-13、HSAg-33は減数分裂後の精子細胞および精子のintra-acrosomal regionに発現していると考えられた。