ヒト精漿の超遠心沈殿分画中に存在する interleukin 2 受容体抑制物質

里 見 定 信*・辻 芳 之
李 勇 鎬・中 川 晶 子
井 上 幾 雄・片 山 喬*・磯 島 晋 三

Jpn. J. Clin. Immun., 9(4) : 288~297, 1986.

Interleukin 2 receptor inhibiting substance in the sedimented fraction of ultracentrifugation in human seminal plasma

Sadanobu Satomi*, Yoshiyuki Tsuji, Yuko Lee, Shoko Nakagawa,
Ikuro Inoue, Takashi Katayama* and Shinzo Isojima

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College

**Department of Urology, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

【Summary】

The inhibition of interleukin 2 (IL-2) response by seminal plasma (SP) was investigated using recombinant interleukin 2 (rIL-2) and IL-2 dependent cell line (NKC-3). Remarkable inhibition of ^3H -thymidine uptake was observed, when SP was added to the NKC-3 line culturing in IL-2 containing medium. Such inhibitory effect could not be found by addition of SP to IL-2 independent cell line such as NS-1 or YAC-1. The inhibitory effect of SP could only be observed when SP was added at the initiation of culture, but it was not observed when SP was added 6 hours before harvest. Gel filtration using Sephacryl-300 revealed that the most intensive inhibition of IL-2 response existed over M.W. 740,000 with broad distribution. Immunosuppressive factor (ISF) of SP was demonstrated to be an ultracentrifugable macromolecule, because it was sedimented by ultracentrifugation at 105,000 G for 2 hours. SP and rIL-2 were mixed and then ultracentrifuged at 105,000 G for 2 hours. The result demonstrated that IL-2 activity was completely retained in supernatant. NKC-3 cells culturing in the presence of SP for 2 hours restored IL-2 response by the washing to remove SP. The binding of ^{125}I -rIL-2 to NKC-3 cells was inhibited by SP. Flow cytometry using monoclonal antibodies (3C7, 7D4) against IL-2 receptors indicated that the binding of the monoclonal antibodies to IL-2 receptor decreased by addition of SP to NKC-3 cells. These results indicated that ISF of SP did not bind directly with nor neutralize IL-2 but prevented IL-2 from binding to IL-2 receptors.

Key words : human seminal plasma,
immunosuppressive factor,
ultracentrifugation,
IL-2 dependent cell line (NKC-3)

【概 要】

recombinant interleukin 2 (rIL-2) と IL-2 依存性の cell line (NKC-3) の系を用いて精漿中の免疫抑制物質の作用機序について検討した。精漿の添加により NKC-3 cell の IL-2 response が阻害され ^3H -thymidine の取り込みの著明な低下がみられた。しかしながら IL-2 非依存性の cell line である NS-1 や YAC-1 に精漿を加えても、この抑制はみられなかった。また、harvest 6 時間前の精漿の添加では抑制効果がみられなかった。この精漿中の IL-2 抑制物質はゲル濾過にて分子量 74 万以上の巨大分子であり、また 105,000 G、2 時間の超遠心を行うと沈殿側に抑制活性が移動することがわかった。精漿と IL-2 を混合後、超遠心により沈殿側に抑制物質が移動すると上清にはほぼ 100 % IL-2 活性が回収され、精漿中の免疫抑制物質は IL-2 に直接効果を及ぼさないことが示唆された。精漿存在下の NKC-3 cell は洗浄により精漿を除くと IL-2 の response を回復した。 ^{125}I -rIL-2 の NKC-3 cell への結合は、精漿濃度依存性に抑制された。さらに IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体 (3C7, 7D4) を用いた flow cytometry において、精漿により IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体の結合の低下がみられた。以上により、精漿は細胞側の IL-2 receptor site に作用して IL-2 の効果を抑制することが示唆された。

I. 緒 言

1975 年, Stites と Erickson¹⁾ が精漿に免疫抑制効果があることを見出して以来, mitogen response²⁾, MLR³⁾, NK 活性⁴⁾ などによりその事実が追認されてきた。しかるにどのような機序によりこの免疫抑制効果が発現するかについては十分解明されていない。最近 immune response に数々の lymphokine が重要な役割を果たしていることが知られてきており、また遺伝子組み替え技術により単一の lymphokine を大量に作成し実験に供することも可能になってきた。そこでわれわれはこの研究において、非常に複雑な多種の要素がかかわっている免疫応答現象のなかから IL-2 の関与する部分だけを選び、精漿がこの lymphokine の系にどのように影響するかを検討した。ちなみに従来報告されている精漿の免疫抑制現象は T 細胞依存性免疫応答を特異的に阻害する報告が多くみられる。IL-2 はこのような T 細胞性免疫応答の中心となるべき lymphokine であり、この部分での阻害は T 細胞性免疫応答の阻害につながるものである。

II. 方 法

1. IL-2

遺伝子組み替え技術により得られた recombinant IL-2 (TGP-3,33200 U/ml) を武田薬品工業中央研究所より提供を受け -80°C にて保存。

2. cell line

東北大学歯学部熊谷教授より提供を受けた IL-2 依存型の mouse NK cell line (NKC-3)⁵⁾ を rIL-2 1 U/ml, 100 μg streptomycin sulfate/ml (meiji), 100 U penicillin G potassium (meiji)/ml, 2 mM L-glutamine, 10 % FBS (MA Bioproducts) を加えた RPMI 1640 培地 (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo) で、6 穴 multishield (No. 152795, Nunclon) にて継代培養した。

3. 精漿の調整

ボランティアの正常男性より集めた精液を 30 分室温で液化し、 4°C で 1,000 G 15 分, 6,800 G 30 分の遠心にて精子を取り除いた⁶⁾。その後精漿を 0.05 M PBS (PH 7.2) にて 4°C で 24 時間透析し、Folin Phenol 法⁷⁾ にて蛋白量を測定し PBS にて 18 mg/ml に調整し (これを原液とする) 使用するまで -20°C に保存した。

4. NKC-3 cell culture

1 U/ml rIL-2 を含む RPMI 1640 培地で継代培養していた NKC-3 cell を、血清および IL-2 無添加の RPMI 1640 で 3 回洗い IL-2 を除いた後 $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、各 well 100 μl ずつ 96 穴平底 microculture plate (Corning; No. 25860) に添加した。さらに 1 U/ml rIL-2 を 100 μl ずつ各 well に添加し、 37°C 42 時間 5 % CO_2 incubator にて培養した。その後 methyl ^3H thymidine (Amersham Lab. TRK 120) を 0.25 μCi

well 添加し、6 時間後 harvester (Skatron) にて glassfiber filter paper に harvest した。十分乾燥後、シンチレーションバイアルに試料を入れ、トルエンシンチレーターとして 3 g/l 2,5-diphenyloxazole (PPO), 100 mg/l 1,4-bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOP) を含むトルエンを 2 ml ずつ各バイアルに添加し、liquid scintillation counter (Packard) にて測定した。この系において、精漿を 20 μ l/well 上記 NKC-3 cell culture 中に加え、thymidine の取り込みの変化により精漿の IL-2 抑制効果を検討した。

5. IL-2 非依存性 cell line における抑制効果

IL-2 非依存性 cell line である NS-1, YAC-1 を用い RPMI 1640 で 3 回洗浄後、 1×10^5 /ml に調整し 100 μ l ずつ各 well に添加し、さらに 10 % FBS 加 RPMI 1640 100 μ l、各濃度に希釈した精漿 20 μ l を各 well に添加し 48 時間培養して ^3H -thymidine の取り込みをみた。

6. 精漿の透析の有無と精漿の添加時間の変化による抑制効果

精漿を 2 群に分け、一方は透析を行わず、一方は PBS にて 4°C で 24 時間透析を行った。両群とも同じ濃度に希釈した精漿を NKC-3 cell culture start 時と harvest 6 時間前に添加し抑制効果をみた。

7. 精漿存在下での NKC-3 cell の viability の変化

精漿の cytotoxic 効果は、rIL-2 存在下で培養している NKC-3 cell に精漿を 10% 加え、各時間で精漿非添加群の NKC-3 cell を対照としてトリバンプルー色素排除法⁸⁾により算定した。

8. 精漿の gel filtration

凍結乾燥により濃縮した精漿 (1.5 ml, 蛋白量 200 mg) を、0.05 M PBS (PH7.2) で平衡化した Sephacryl-300 column (5 $\times$ 77 cm) でゲル濾過した。溶出は 0.05 M PBS で行い、各 fraction 5 ml ずつ集め吸光度を測定し、その後各 fraction を凍結乾燥した。その各 fraction を 500 μ l の 0.05 M PBS で resuspend し、それを NKC-3 cell culture の系に添加することにより抑制効果の存在する fraction を検討した。

9. 精漿の超遠心分離

精漿を 4°C にて、6,800 G, 27,000 G, 60,000 G, および 105,000 G, 2 時間の条件で Beckman model L ultracentrifuge により超遠心を行い、上清部分、沈殿部分

を NKC-3 cell culture の系に添加し、IL-2 抑制活性がどの分画にあるかをみた。

10. rIL-2 と精漿の混合液より超遠心による IL-2 活性の回収

精漿 1.5 ml と各濃度に調整された rIL-2 1.5 ml を混合し、37°C にて 1 時間放置した。これを 105,000 G にて 2 時間超遠心を行い上清を採取した。これを 3 回洗うことにより完全に IL-2 を除いた NKC-3 cell (5×10^4 /well) に添加し、上清部分の IL-2 活性を、この NKC-3 cell の ^3H -thymidine の取り込みにより検討した。

11. NKC-3 cell を精漿で前処置し、洗浄後の抑制効果

3 回洗い IL-2 を除いた NKC-3 cell に前処置として (I) 精漿だけ (II) 精漿と IL-2、の 2 群を添加した。さらに各群について前処置を 30 分と 2 時間行うものの 2 群にわけた。前処置後 3 回 RPMI 1640 で洗い、その後各群について IL-2 だけの添加群と IL-2 と精漿の添加群に分けさらに 48 時間培養し抑制効果をみた。(III) 群は前処置を行わず positive control とした。

12. 精漿による ^{125}I -rIL-2 の NKC-3 cell への結合抑制

3×10^6 /ml に調整した NKC-3 cell 1 ml, iodogen を用い ^{125}I でラベルした ^{125}I -rIL-2 0.1 ml (200,000 cpm) と各濃度に希釈した精漿 1 ml を polypropylene tube (No. 2063, Falcon) に加え、37°C で 2 時間反応させた。この NKC-3 cell を 0.05 M PBS で 3 回洗浄後 autogamma scintillation spectrometer (5360, packard) で ^{125}I 放射性活性を測定した。

13. IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体を用いた flow cytometry

3 回洗い 10 % FBS 加 RPMI 1640 で 1×10^6 /ml に調整した NKC-3 cell 1 ml, 精漿 0.8 ml と一次抗体として NIH の Dr. Malek より提供を受けた IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体 (3C7, 7D4)⁹⁾ 0.3 ml を polypropylene tube (No. 2063, Falcon) に加え 37°C, 1 時間 incubate した。PBS で 2 回洗い二次抗体として 200 倍に希釈した FITC anti rat IgG (Miles) を各 tube 0.4 ml ずつ加え、37°C, 30 分反応させた。その後 PBS で 3 回洗い EPICS により解析した。positive control には精漿を加えずに 10% FBS 加 RPMI 1640 0.8ml を加えた。negative control には、一次抗体を加えない

ものを用いた。

III. 結 果

1. IL-2 依存性および非依存性 cell line における抑制効果

IL-2 依存性の NKC-3 cell では、精漿原液で 85% の抑制がみられ精漿濃度依存性の抑制効果がみられた。これに対し IL-2 非依存性の cell line である NS-1 や YAC-1 では、ほとんど抑制効果がみられなかった (図 1)。

2. 精漿の透析の有無と精漿の添加時間の変化による抑制効果

culture 開始時に精漿を加えた方は、透析の有無にかかわらず同様の抑制効果を示した (図 2 の実線)。これに対し harvest 6 時間前に精漿を加えた方では、透析を行った場合は各希釈率でほとんど抑制がかかっていないのに対し、透析を行っていないときは culture 開始時に精漿を加えたものと同様の抑制効果の変動を示した (図 2 の点線)。

3. 精漿存在下での NKC-3 cell の viability の変化

IL-2 を加えた方では、精漿の有無にかかわらず各時

間でほぼ 90% 以上の cell viability を示した。IL-2 を加えない方では時間の経過とともに IL-2 添加に比

図 1 Inhibiting effect of seminal plasma to IL-2 dependent and IL-2 independent cell line
IL-2 dependent NKC-3 cell (●—●)
IL-2 independent NS-1 (▲·····▲) and
YAC-1 (×---×)

図 2 The effect of adding seminal plasma after dialysis and before dialysis to NKC-3 cell culture with rIL-2 at different times

(a) seminal plasma before dialysis

(b) seminal plasma after dialysis

Seminal plasma was added at the initiation of culture (●—●) and 6 hours before harvest (▲·····▲)

表 1 Analysis of cytotoxicity of seminal plasma. The viability of NKC-3 cells at each time was recorded by the trypan blue dye exclusion method.

time course	0 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.	36 hr.	48 hr.
IL-2 (-)	94.3±1.09	86.3±2.95	71.0±6.71	50.0±6.78	29.5±3.84	15.5±3.57
IL-2 (-) S.P. (+)	96.0±3.16	82.3±3.56	74.0±8.25	51.5±7.26	25.3±5.12	9.5±2.60
IL-2 (+)	95.5±0.87	91.3±2.39	92.0±1.41	93.8±2.28	97.0±0.71	95.5±2.18
IL-2 (+) S.P. (+)	94.8±3.11	91.0±4.36	90.5±2.96	89.3±3.83	91.0±4.12	92.8±0.83

percent of viability (mean±S.D.)

し、明らかに cell viability は低下し、24 時間ではほぼ 50% の cell viability であった。しかしながら精漿の添加の有無にかかわらず cell viability に有意の差は認められず、精漿の cytotoxic な効果はみられなかった¹⁰⁾ (表 1)。

4. 精漿の gel filtration

fraction は 5 つのピークに分かれ、幅広い抑制活性を示した。もっとも抑制活性の強い分画での推定分子量は 74 万以上であるが、低分子量のところにも抑制がみられた (図 3)。

5. 精漿の超遠心分画

精漿の超遠心分画では 6,800 G 上清に抑制効果が 91% 維持されるが、回転数を上げるにつれ沈殿側での抑制効果が強くなり、105,000 G では上清中にほとんど抑制効果がみられなくなり沈殿側に 86% の抑制効果がみられた。なお control として 10% FBS 加 RPMI 1640 を精漿と同様に超遠心を行ったが、上清にも沈殿にも抑制効果を認めなかった (図 4)。

6. rIL-2 と精漿の混合液より超遠心による IL-2 活性の回収

rIL-2 と精漿を混合したものは、そのまま NKC-3 cell に添加すると精漿により IL-2 活性が阻害されるため、NKC-3 cell は増殖することができないが、図 5 に示すように混合液を 105,000 G、2 時間超遠心後の上清部分は、NKC-3 cell の ³H-thymidine の取り込みは rIL-2 2 単独添加と同様に濃度依存性の増加を示し、ほぼ 100% の IL-2 活性が回収されていることが明らかとなった。

7. NKC-3 cell を精漿で前処置し、洗浄後の抑制効果

精漿存在下で培養した NKC-3 cell を 3 回洗浄後、精漿を除いた状態で培養すると IL-2 response が回復し

た。これは前処置で IL-2 を加えていない (I) 群でも加えている (II) 群でも同様の傾向を示した (図 6)。

8. 精漿による ¹²⁵I-rIL-2 の NKC-3 cell への結合抑制

¹²⁵I-rIL-2 の NKC-3 cell への結合は、8 倍希釈まで精漿濃度依存性に抑制された (図 7)。

9. IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体を用いた flow cytometry

IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体による EPICS 解析では、精漿により 3C7, 7D4 の両方で蛍光強度の減弱がみられたが、IL-2 receptor の framework を認識するといわれている 7D4 に比べ、IL-2 の binding site の epitope を認識するといわれている 3C7 の方より蛍光強度が減弱していた (図 8)。

IV. 考 案

生殖細胞は個体にとり免疫原となりうるということが報告されている。とくに精子および精漿中には男性側および女性側に対し精子不活化抗体を生ぜしめるような抗原の存在があり (磯島ら¹¹⁾) そのような抗原での感作が不妊を生ぜしめることが報告されている。精漿中の免疫抑制物質はそのような抗原感作を防ぐ役割をしており生体にとって有益な働きをしていると思われる。しかしながら生体にとって不利益な面に関与する場合もある。男性および女性泌尿生殖路は免疫抑制物質が広く存在し、immunologically privileged site¹²⁾ とも言われている。この部位では細菌や癌細胞が免疫抑制物質によって液性および細胞性免疫といった生体防御機構から逃れ、このことが男性における前立腺炎あるいは前立腺癌、女性における子宮癌を引き起こす一要因に成りうるかもしれないと考えられている¹²⁾。また最近 AIDS の発現に関し、精漿中の免疫抑制物質が何らかの役割を果たすことが注目を集めている¹³⁾。今回われわれが NKC-3 cell と IL-2 を用いた *in vitro* の実験から示唆された知見はつぎの

図 3 Fractionation of human seminal plasma by gel filtration

(a) Seminal plasma was layered on a column (5×77 cm) of Sephacryl-300 at 4 °C with the use of 0.05 M PBS as the eluting buffer.

UV-absorbing materials were monitored at 280 nm. The void volume is indicated at Vo. The positions of ferritin (440,000 MW), aldolase (158,000 MW), albumin (67,000 MW), chymotrypsinogen A (25,000 MW) and ribonuclease A (13,700 MW) in the elute fractions were indicated.

(b) The fractions were assayed for ability to inhibit ³H-thymidine uptake of NKC-3 cell.

3 点に要約できる。1) 精漿は IL-2 の活性を阻害することにより T 細胞性免疫応答系を抑制する。2) その免疫抑制物質は 105,000 G, 2 時間の超遠心により沈殿する macromolecule である¹⁴⁾。3) 精漿の IL-2 活性抑制の作用機序として, IL-2 そのものを中和したり, IL-2 に結合したりすることにより阻害効果を発現するのでは

なく, 精漿の免疫抑制物質が IL-2 の IL-2 receptor site での働きを何らかの形で阻害することを示した。IL-2 依存性の NKC-3 cell では精漿による抑制がみられるが IL-2 非依存性の YAC-1 や NS-1 では抑制がみられないことより精漿が IL-2 活性を阻害していることがわかる。また透析した精漿では harvest 6 時間前に精漿を

図 4 Fractionation of IL-2 inhibiting substance in seminal plasma by ultracentrifugation.

- 図 5 Attempt of IL-2 absorption with seminal plasma
(Separation IL-2 from seminal plasma by ultracentrifugation)
Seminal plasma and IL-2 were mixed and ultracentrifuged at 105,000 G for 2 hours. Supernatant of ultracentrifugation (●—●) was added to NKC-3 cell culture.
As a control, each concentration of IL-2 (▲.....▲) was added to NKC-3 cell culture.

	Pretreatment	culture condition	% inhibition	
			50	100(%)
I	S.P. 2hr. 30min.	IL-2		
	S.P. 2hr. 30min.	IL-2+S.P.		
II	S.P.+IL-2 2hr. 30min.	IL-2		
	S.P.+IL-2 2hr. 30min.	IL-2+S.P.		
III	no treatment	IL-2+S.P.		

図 6 The effect of preaddition of seminal plasma

- (I) NKC-3 cells preincubated with seminal plasma
 (II) NKC-3 cells preincubated with seminal plasma + IL-2
 (III) NKC-3 cells not preincubated

図 7 The binding of ^{125}I -rIL-2 to NKC-3 cells in the presence of seminal plasma

加えても抑制がかからないことより、いったん IL-2 で活性化された NKC-3 cell に精漿を加えても抑制がかからないことがわかる。このことからこの抑制には、IL-2 が介在していることがわかる。なお透析していない精漿において harvest 6 時間前に精漿を加えても抑制

がみられるのは、精漿中には cytotoxic な低分子物質が存在するかあるいは thymidine などのような ^3H -thymidine uptake assay に競合阻害するような物質が含まれているとも考えられる。精漿中の免疫抑制物質の分子量については、現在まで諸家の報告があり、高分子量であるとする Lord ら (200,000 以上³⁾、Prakash ら (100,000 以上¹⁰⁾ と低分子量であるとする Pitout (3,000¹⁵⁾、Davis (14,000¹⁶⁾ の 2 群に大別することができる。われわれも Sephacryl-300 を用いてゲル濾過を行ったところ分子量 74 万以上のところにもっとも強い抑制活性があり、幅広い抑制がみられたことより、超遠心で沈殿側に抑制活性がくるといことも考え合わせ、超遠心可能な macromolecule と考えている。しかしながら正確な分子量については、より低分子量のところにも抑制活性が存在していることからはっきりせず、少なくともその性状より精漿中の免疫抑制物質は単一ではないと思われる³⁾。精漿中の免疫抑制物質の作用機序については、はっきり解明されていない。われわれの IL-2 を用いた系で作用機序を考えた場合、(1) 免疫抑制物質が IL-2 を直接障害する、(2) NKC-3 cell 上の IL-2 receptor site で IL-2 の結合を阻害する、(3) NKC-3 cell 内での DNA 合成を阻害するの 3 つに大別される。

IL-2 と精漿の混合液を超遠心し、上清にはほぼ 100% IL-2 活性を回収できたことから精漿中の免疫抑制物質は IL-2 を中和したり IL-2 に結合したりして阻害効果を発現することは否定される。また精漿存在下で培養し

図 8 Flow cytometry using monoclonal antibodies against IL-2 receptor
 As the positive control (P.C.), 0.8 ml of RPMI 1640 supplemented with 10 % FBS
 instead of seminal plasma was added to NKC-3 cells.
 As the negative control (N.C.), the first antibody was not added to NKC-3 cells.

た NKC-3 cell を十分洗うことにより IL-2 活性が回復することから、この抑制効果は reversible なものであり、NKC-3 cell 内での DNA 合成を直接抑制しているとは考えにくく、間接的に receptor site での阻害を考えさせる¹⁷⁾。また ^{125}I -rIL-2 の NKC-3 cell への結合が精漿濃度依存性に抑制されたことは receptor site での IL-2 と免疫抑制物質の competition を示唆する。さらに IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体(3C7, 7D4)を用いた flow cytometry において、精漿により IL-2 receptor に対する monoclonal 抗体の結合の低下がみられたことは、直接的に精漿中の免疫抑制物質が IL-2 receptor に変化を及ぼしている可能性を示唆する。ちなみに 3C7 と 7D4 の相違についてみると 3C7 は IL-2 receptor 上の IL-2 を結合させる部分を認識している monoclonal 抗体であり、この 3C7 抗体の結合の方が、IL-2 receptor の framework に向いているという 7D4 の結合よりも強く精漿で抑制されたことは興味深い⁹⁾。最近 IL-2 inhibitor の報告が多くみられるようになり、癌患者の腹水中¹⁸⁾、正常マウス脾細胞の培養

上清中¹⁹⁾あるいはマラリアに感染したマウス血清中²⁰⁾に IL-2 inhibitor の存在が確かめられている。その作用機序として、IL-2 receptor site での阻害を示す報告もみられるようである。また生体内には免疫機構に干渉する物質が多種あり、それが関与する領域は移植免疫学、腫瘍免疫学、生殖免疫学など広い範囲にわたっている。われわれが精漿の免疫抑制現象について得た知見は今後癌や母児間免疫において lymphokine とその receptor についても検討を進めなければならないことを示すものである。

V. 結 語

IL-2 依存性の cell line (NKC-3) と rIL-2 の系を用いて、精漿中の免疫抑制物質が超遠心可能な巨大分子であること、その作用機序として精漿中の免疫抑制物質が IL-2 receptor site で IL-2 の結合を阻害することにより抑制効果を発現することを証明した。

文 献

- 1) Stites, D.P., Erickson, R.P. : Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte. *Nature*, 253 : 727~729, 1975.
- 2) Franken, D.R., Slabber, C.F. : Reproductive immunology 1. The effect of different protein concentrations of seminal plasma on *in vitro* lymphocyte cultures. *Andrologia*, 13 : 504~507, 1981.
- 3) Lord, E.M., Sensabaugh, G.F., Stites, D.P. : Immunosuppressive activity of human seminal plasma 1. Inhibition of *in vitro* lymphocyte activation. *J. Immunol.*, 118 : 1704~1711, 1977.
- 4) James, K., Szymaniec, S. : Human seminal plasma is a potent inhibitor of natural killer cell activity *in vitro*. *J. Reprod. Immunol.*, 8 : 61~70, 1985.
- 5) Suzuki, R., Handa, K., Itoh, K. : Natural killer cells as a responder to interleukin 2. *J. Immunol.*, 130 : 981~987, 1983.
- 6) Jecht, E.W., Poon, C.H. : Preparation of sperm-free seminal plasma from human semen, *Fertil. Steril.*, 26 : 1~5, 1975.
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 113 : 265~275, 1951.
- 8) Mishell, B.B., Shiigi, S.M. : Determination of viability by trypan blue exclusion. *Selected methods in cellular immunology*. Edited by Henry, C., Mishell, R.I., W.H. Freeman and company, San Francisco, 1980, pp. 16~17.
- 9) Ortega-R., G., Robb, R.J., Shevach, E.M., Malek, T.R. : The murine IL-2 receptor 1. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.*, 133 : 1970~1975, 1984.
- 10) Prakash, C., Coutinho, A., Moller, G. : Inhibition of *in vitro* immune responses by a fraction from seminal plasma. *Scand. J. Immunol.*, 5 : 77~85, 1976.
- 11) Isojima, S., Koyama, K., Tsuchiya, K. : The effect on fertility in women of circulating antibodies against human spermatozoa. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 21 : 125~150, 1974.
- 12) Anderson, D.J., Tarter, T.H. : Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components *in vivo* and *in vitro*. *J. Immunol.*, 128 : 535~539, 1982.
- 13) James, K., Hargreave, T.B. : Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol. Today*, 5 : 357~363, 1984.
- 14) Marcus, Z.H., Hess, E. V., Freisheim, J.H. : *In vitro* studies in reproductive immunology 4. Mechanisms of immune response control in human male genital tract. *Int. J. Fertil.*, 28 : 189~198, 1983.
- 15) Pitout, M.J., Jordaan, J.H. : Partial purification of an antimitogenic factor from human semen. *Int. J. Biochem.*, 7 : 149~151, 1976.
- 16) Davis, C.P. : Inhibition of PHA-induced lymphocyte transformation by human semen. Abstract from seventeenth interim congress of the south african society of obstetricians and gynecologists, Pretoria. : 45, 1974.
- 17) Majumdar, S., Bapna, B.C., Mapa, M.K., Gupta, A.N., Devi, P.K., Subrahmanyam, D. : Effect of seminal plasma and its fractions on *in vitro* blastogenic response to mitogen. *Int. J. Fertil.*, 27 : 224~228, 1982.
- 18) 浜田史祥・淵本定儀・板野 聡・他6名 : 免疫抑制物質 (ISS) の LAK 細胞に及ぼす影響の検討. 日本免疫学会総会記録, 15 : 67, 1985.
- 19) Honda, M., Chan, C., Shevach, E.M. : Characterization and partial purification of a specific interleukin 2 inhibitor. *J. Immunol.*, 135 : 1834~1839, 1985.
- 20) Lelchuk, R., Playfair, J. H.L. : Serum IL-2 inhibitor in mice 1. Increase during infection. *Immunol.*, 56 : 113~118, 1985.