



Title	モノクローナル抗体を用いた精子不動化抗体対応抗原の性状分析
Author(s)	亀田, 絹
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37692">https://hdl.handle.net/11094/37692</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	かめ だ きぬ 亀 田 編
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 9 8 8 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 3 年 9 月 12 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	モノクローナル抗体を用いた精子不動化抗体対応抗原の性状分析
論文審査委員	(主査) 教授 三村 務 (副査) 教授 近藤 雅臣 教授 真弓 忠範 教授 三浦 喜温

## 論 文 内 容 の 要 旨

男性側女性側のいずれにも特に不妊原因を見いだせない、いわゆる原因不明不妊の女性の血中に十数%の頻度で補体依存性にヒト精子不動化（S I）作用を示す抗体が検出されることが知られており、不妊原因のひとつと考えられている。S I抗体による不妊発症機序は、主に子宮頸管粘液中に分泌されたS I抗体が精子の運動を阻止し、精子の性管内通過を障害することによるが、受精や着床レベルへの影響も報告されている。しかし、患者により、また、一人の患者においてもS I抗体の活性や認識する抗原に多様性があるため、その作用機序や対応抗原の生化学的性質を分析することは必ずしも容易ではない。また、S I抗体の産生機序も未だ充分解明されていない。そこで、著者は、S I抗体が認識する精子抗原を解明する目的で、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法によりS I抗体陽性不妊患者の末梢血リンパ球から血中S I抗体のひとつをヒト型S I - MA b（H 6 - 3 C 4）として確立した。さらに、ヒト精子または精漿等で免疫したマウスおよびラット脾細胞由来のS I - MA b（2 C 6, 2 B 6, 2 E 5, 1 A 11, Y TH - 3, 1 C 4）合計7種類のS I - MA bを用いて、それらの対応抗原の性状を分析し比較検討した。

これら7種のS I - MA bは、補体存在下にヒト精子に対してS I作用を示したが、補体非存在下にヒト精子と反応させた場合、すべての精子を凝集させる強い精子凝集（S A）作用を示すMA b（H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5）と弱いS A作用を示すMA b（1 A 11, 1 C 4）、S A作用を示さないMA b（Y TH - 3）に分かれた。不妊患者血清にもS A作用を示すものと示さないものがあり、S I作用とS A作用の強さは必ずしも一致しないことが知られている。従って、これらのS I - MA bは、患者血中S I抗体の多様性の一端を反映していることが明かになった。また、MA b H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5 の S I作用は乳汁で吸収されず、MA b 1 A 11, Y T

H - 3, 1 C 4 の S I 作用は乳汁でも完全に吸収されたことから、前 4 者は精漿特異抗原を、後 3 者は乳汁との共通抗原を認識していることが明かになった。

ビオチン化 S I - M A b とラベルしていない各 M A b の競合的 E L I S A 結合阻止実験を行った結果から、4 種の M A b (H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5) がそれぞれ精子膜上の同一とは限らないが互いに近接する抗原エピトープを認識していること、また、M A b により抗原に対するアフィニティは異なることを明らかにした。精子膜抽出液を S D S - P A G E にかけ Western blot 分析を行った結果、この 4 種の M A b (H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5) はいずれも、15-2 5kDa にかけて 7 本前後のバンドからなる polymorphic な分子を認識していることが明かになった。非還元条件下で行っても同様の染色性が得られた。しかし、M a b 1 A 11, Y T H - 3, 1 C 4 の場合、前 4 者 M A b に対する結合阻止は認められず、また、blot したメンブレン上に対応抗原を検出することはできなかった。そこで、より分析し易くより精子精漿に対し特異性の高い 4 種の S I - M A b (H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5) を用いて、その対応抗原の性状についてさらに検討を加えた。

対応抗原の産生部位を調べるために、ホルマリン固定後パラフィン包埋した男性各生殖組織の薄切標本を A B C 法により免疫組織化学的に染色した結果、精巣の精細管内精子に染色を認めず、精巣上体管の上皮細胞の微絨毛に強い染色を認めた。一部の精囊腺上皮細胞表面にも染色を認めたが、前立腺は染まらなかった。また、精管結紮後の精液は精子や精巣上体からの分泌液を含まず、おもに精囊腺と前立腺分泌液から成るが、正常精液や無精子症患者の精液に比べて M A b の抗体吸収活性が著しく低下したことから、これら 4 種の M A b の対応抗原は、精巣精子に存在せず、精巣上体における精子成熟過程の間に上皮細胞から分泌され、精子膜上に新たに付加された精子付着抗原であると考えられた。

S I - M A b の抗原認識に関与しているのが糖鎖、ペプチド鎖のいずれかを検討するため、精子を過ヨウ素酸で化学的に糖鎖を破壊しその影響を抗体吸収実験にて検討した。精子を 10 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウムにて 10 分間処理することにより、精子に対するレクチンの結合性は低下し、精子による抗体吸収活性も低下を示した。また、各種酵素処理による 15-25 k D a 抗原に及ぼす影響を Western blot 分析にて検討した。15-25 k D a 抗原は trypsin, V 8 protease, thermolysin による蛋白質分解酵素処理に対して非感受性で、未処理の場合とその免疫染色に差は認められなかったが、papain で処理した場合は 15-25 k D a の染色性は消失した。また、糖蛋白質中の N - glycoside 結合型糖鎖を切断する酵素である N - glycanase の処理により、M A b による染色性は消失した。これらのことから、M A b による抗原認識に糖鎖が関与していることが示唆された。また、15-25 k D a 抗原分子は N - glycoside 結合型糖鎖をもつ糖蛋白質であることが示唆された。

以上、S I 抗体陽性患者の末梢血リンパ球を用いた細胞融合により、血中 S I 抗体のひとつを M A b として取り出すことに成功した。このヒト型 M A b は、強い S I 作用、S A 作用を有し、精漿特異的精子付着抗原を認識していることを明らかにした。マウス型の M A b 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5 も同じ性質を持ち、これら 4 種の M A b は、それぞれ抗原に対するアフィニティは異なるが、精巣上

体に由来する15-25 kDa の不均一な分子からなる同一抗原を認識していることが明らかにした。

本研究により、SI - MA b の多様性ならびに SI - MA b が糖鎖構造を認識することを明らかにし、さらに、SI 抗体によって認識される精子膜抗原のひとつを明らかにできたことは、不妊患者における SI 抗体の産生機序・不妊発症機序を解き明かす上で非常に意義深いものと考える。

### 論文審査の結果の要旨

不妊原因の一つと考えられているヒト精子不動化抗体（SI 抗体）は活性や認識抗原に多様性がみられるため、その作用機作や対応抗原の解明は容易ではない。

本研究は精子不動化抗体が認識する精子抗原を解明する目的で細胞融合法により作成した不妊患者リンパ球由来のヒト型精子不動化モノクローナル抗体（H 6 - 3 C 4）ならびにヒト精子または精漿で免疫したマウスおよびラット脾細胞由来の7種の精子不動化モノクローナル抗体（SI - MA b）〔2 C 6, 2 B 6, 2 E 5, 1 A 11, YTH - 3, IC 4〕を用いて、その対応抗原の性状をしらべ以下の知見を得た。

- (1) このうち、4種のMA b H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5 は、強いSI ならびに精子凝集（SA）作用を示し、精漿特異的精子付着抗原を認識した。MA b 1 A 1 1, 1 C 4, YTH - 3 は、SI 作用を有するがそのSA作用はないか弱く、乳汁と交差反応性を示した。従って、この7種のSI - MA b は患者血中のSI 抗体の活性ならびに認識する抗原の多様性を反映していることが示唆された。
- (2) ピオチン化MA b を用いた ELISA inhibition assay ならびに精子膜抽出液の Western blot 分析から、ヒト型MA b の他に3種のMA b が共通して15 kDa から25 kDa にかけて7本前後のバンドから成る polymorphic な分子を対応抗原としていることを認めた。
- (3) このMA b 4種（H 6 - 3 C 4, 2 C 6, 2 B 6, 2 E 5）の対応抗原は、免疫組織化学的検討ならびに抗体吸収実験から、精巣精子には存在せず、精巣上体管上皮細胞に由来し、射精精子において精子膜表面全体に局在することを明らかにした。さらに、各種化学的処理・酵素処理による影響を調べた結果から、対応抗原はN-glycoside結合型糖鎖をもつ糖タンパク質であり、その糖鎖が抗体による抗原の認識に関与していることを明らかにした。

以上より本研究はヒトの不妊原因の解明とその治療に大きく貢献するものであり学位に値するものと考える。