

精液中免疫抑制物質の研究

埼玉医科大学泌尿器科学教室（主任：岡田耕市教授）

内 島 豊
高 橋 美 和 子
保 母 光 俊

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科学教室（主任：斎藤 博教授）

吉 田 謙 一 郎
斎 藤 博STUDIES OF IMMUNOSUPPRESSIVE SUBSTANCES
IN HUMAN SEMINAL PLASMAYutaka UCHIJIMA, Miwako TAKAHASHI
and Mitsutoshi HOBO*From the Department of Urology, Saitama Medical School*
(Director: Prof. K. Okada)

Kenichiro YOSHIDA and Hiroshi SAITO

From the Department of Urology, Medical Center of Saitama Medical School
(Director: Prof. H. Saito)

Endogenous opioids, which have been shown to exhibit pharmacological and physiological activity on the immune system, have recently been reported to inhibit rosette formation between human T lymphocytes and sheep red blood cells. Because those opioids were found at a higher concentration in seminal plasma than in plasma, we studied whether seminal plasma could influence E rosette formation in 23 patients who complained of infertility.

Seminal plasma significantly inhibited E rosette formation. With the dilution of seminal plasma, the percentage of E rosette formation increased. The incubation mixture of naloxone prevented the inhibition of E rosette formation produced by seminal plasma. The percentage of E rosette formation was significantly inhibited in azoospermia and oligozoospermia than in normozoospermia.

In conclusion, these results suggest that opioids exert a suppressive effect on E rosette formation and may play a role in human spermatogenesis.

Key words: Seminal plasma, β -endorphin, E-rosette formation

緒 言

男子不妊症において、精液検査所見が正常であるにも拘わらず、妊娠が成立しない症例が多数存在し、治療も困難なことが多い。従来からヒトにおいて、精子凝集抗体や精子不動化抗体の存在が報告されている

が^{1,2)}、近年ウサギにおいて、その直腸内へ精液を注入することにより、免疫能に乱れが生じることが報告され³⁾、男子不妊症の原因として精液内に存在する物質が自己あるいは配偶者の免疫機構の異常をきたすことが考えられる。

今回、われわれは男子不妊症の原因として精液内に

存在する免疫抑制物質による免疫機構の異常の有無を明らかにする事を目的として研究を行ない、興味ある結果を得たのでここに報告する。

対象および方法

埼玉医科大学泌尿器科外来を不妊を主訴として受診した23症例を対象とした。4日間の禁欲後、採取した精液を3,000回転20分間遠心沈澱し、得られた精漿を試料とした。またヘパリン採血した患者血液をリン酸緩衝液(PBS)で2倍に稀釈後、Ficoll液上に静かに重層し、1,500回転30分間遠心沈澱後にリンパ球層を試験管に採取した。これに5mlのPBSを加えてじゅうぶん混和し、1,000回転～1,500回転5分間遠心沈澱した。この操作を3回繰り返す、最終的に1ml当たりリンパ球数が $1 \times 10^6/\text{ml}$ 個になるように調節した。ウシ胎児血清(FCS)は 56°C 、60分間反応させて、非動化して使用した。ヒツジ赤血球はPBSで稀釈し、1%浮遊液とした。稀釈した精漿、リンパ球、FCSおよびヒツジ赤血球を各々0.1mlずつ混和後、 56°C 、60分間あるいは 0°C 、17時間の条件下で反応させ、形成されるEロゼットの比率を各症例について比較検討した。

次に最終濃度が $4 \times 10^{-6}\text{M}$ になるように調節したnaloxone溶液0.05mlと精漿0.05mlを混和し、さらにリンパ球、FCSおよびヒツジ赤血球を各0.1mlずつ加え、 0°C 、17時間で反応させ、形成されるEロゼットの比率を検討した。コントロールはnaloxoneのかわりにPBSを使用した。

Eロゼット形成の判定はリンパ球の表面にヒツジ赤血球が3個以上付着している場合を陽性とした⁴⁾

結 果

37°C 、60分間の反応条件ではEロゼットの形成率は46%で、 0°C 、17時間の反応条件ではEロゼットの形成率は $72.5 \pm 4.9\%$ であり反応条件としては 0°C 、17時間の方がEロゼットの形成率は良好であった(Fig. 1)。

精漿を稀釈し、それによるEロゼットの形成率の変化を検討すると、精漿原液で $49.8 \pm 23.0\%$ 、2倍稀釈で $75.5 \pm 32.0\%$ 、4倍稀釈で $80.3 \pm 29.9\%$ および8倍稀釈で $92.3 \pm 29.1\%$ と稀釈率が上昇するにつれて、Eロゼットの形成率は増加する傾向を示し、精漿原液の場合には2倍、4倍および8倍稀釈の場合より各々 $P < 0.005$ で統計的に有意に低いEロゼットの形成率を示したが、他の稀釈率の間では統計的に有意の差は認められなかった(Fig. 2)。

Opioidsの拮抗剤であるnaloxoneのEロゼット

形成に対する影響について検討した。naloxone未使用群では、Eロゼット形成率では $54.7 \pm 25.8\%$ 、naloxone使用群では $80.7 \pm 7.8\%$ とnaloxone使用群の方が高いEロゼットの形成率を示したが、統計的に有意の差は認められなかった(Fig. 3)。

23症例を精子濃度から無精子症群($n=2$)、 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の乏精子症群($n=19$)および $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群($n=2$)の3群に分類し、各群のEロゼットの形成率について検討した。精漿原液で検討した場合、Eロゼットの形成率は無精子症群で $50.5 \pm 3.5\%$ 、乏精子症群で $47.1 \pm 23.8\%$ でいずれも $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群に対して各々 $P < 0.01$ で統計的に有意に低いEロゼットの形成率を示した。また他の稀釈率で検討した場合3群の間では統計的に有意の差は認めら

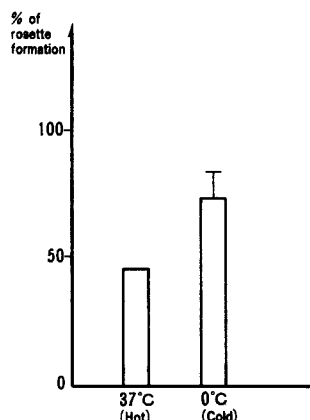


Fig. 1. Effects of 60-min incubation at 37°C and 17-hour incubation at 0°C for E rosette formation.

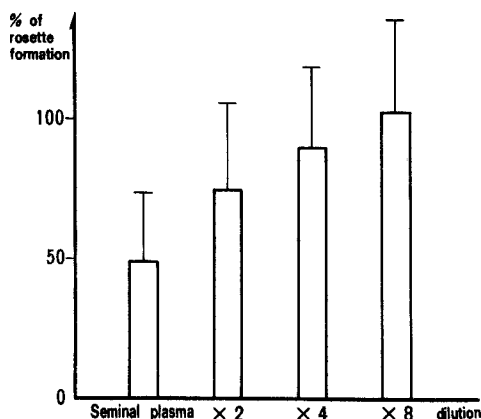


Fig. 2. Percentage of E rosette formation in seminal plasma and its dilute solutions ($\times 2$, $\times 4$, $\times 8$ dilution).

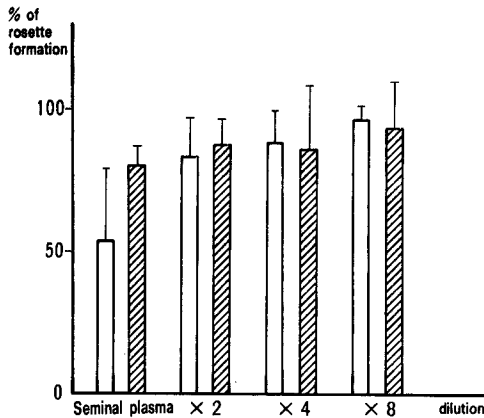


Fig. 3. Effects of E rosette formation in seminal plasma alone or in the presence of naloxone.

□ without naloxone
▨ with naloxone

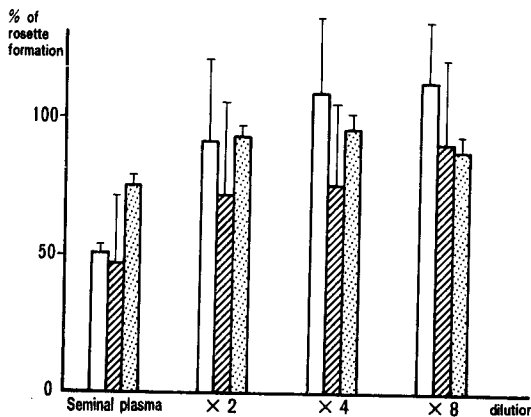


Fig. 4. Percentage of E rosette formation at different sperm densities.

□ azoospermia (n=2)
▨ $20 \times 10^6/\text{ml}$ (n=19) >
▤ $20 \times 10^6/\text{ml}$ (n=2) <

れなかった (Fig. 4).

考 察

ある物質のリンパ球への影響を検索する場合、ヒツジ赤血球膜上の糖タンパク (E 物質) とリンパ球上の E リセプターとの間で形成される E ロゼットの有無を検討する事は有効な手段であり、特に E リセプターがリンパ球の中でも B 細胞や、マク細胞には存在せず、T 細胞に特異的に存在するので T 細胞の機能を調べるのに有効な手段となる⁴⁾。

反応条件として本実験では 37°C , 60 分間ではなく、 0°C , 17 時間で施行したが、この条件では active な

T リンパ球ではなく resting の状態にある T リンパ球の機能を調べることになる⁵⁾。

精液がリンパ球に対して抑制的に作用することは Stites ら⁶⁾ (1975) が報告しており、この作用が精液に含まれる物質によることが示唆されている⁷⁾。Fabrizi ら⁸⁾も精液 (精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率 40% 以上、奇形率 50% 以下) がロゼットの形成を抑制し、この抑制が 10^{-6}M の naloxone の投与により回復し、しかも精液の β -endorphin 濃度が血中濃度の約 7 倍高値であることより、リンパ球のロゼット形成の障害に対して β -endorphin を含めた opioids が重要な作用を有していると報告している。本実験でも精液、特に精漿原液について E ロゼットの形成が強く抑制され、統計的に有意の差は認められなかったが、naloxone の使用により E ロゼットの形成が回復した結果からも精液中の opioids が E ロゼット形成を抑制することが考えられた。この抑制効果は 10^{-11}M の濃度でも発現することが報告されている⁹⁾。

β -endorphin は ACTH と共通の先駆物質である proopiomelanocortin (POMC) から形成され、精路を含めて脳、胎盤、消化管および脾臓などに分布しており¹⁰⁾、 β -endorphin の活性が Leydig 細胞に認められ¹¹⁾、POMC も下垂体以外で精巢の Leydig 細胞でも形成されることから¹²⁾、精路においては Leydig 細胞が β -endorphin 産生の重要な部位と考えられる。精巢には β -endorphin 以外の opioids として N-acetyl endorphin や γ -endorphin がラットにおいて精子形成細胞に存在することが報告されており、これらの opioids が精子形成に重要な作用を行なっていると考えられる^{13,14)}。Delitala ら¹⁵⁾は naloxone の投与により血中 LH 値が上昇した結果から内因性の opioids が視床下部一下垂体一性腺系を抑制している作用を有すると報告し、Gerendai ら¹⁶⁾は 5 日令のラットの精巢に naloxone あるいは nalmefene を注入し、精巢重量、ABP 濃度および testosterone 濃度の測定結果から opioids が Sertoli 細胞と Leydig 細胞の両者に対して調節作用を持つ可能性を指摘している。本実験においても無精子症や乏精子症の精液の方が強い E ロゼット形成の抑制を示したことから、精液中の opioids 濃度を測定はしていないが、これらの症例では Leydig 細胞の機能異常により過剰に産成された opioids により、精子形成の障害が生じている可能性も考えられる。現在精液中の opioids の精路での生理的意義については不明であるが、最近 AIDS との関係で opioids が注目されている。特に AIDS 患者が麻薬中毒や同性愛の人に多く発症す

ること¹⁷⁾ら、精液中に含まれている opioids が AIDS 発症の誘因の一つとなっている可能性も考えられる。

今後、精液が自己のリンパ球だけでなく配偶者のリンパ球に対してどのような作用を示すか検討し、精液中の opioids の生理的意義を明らかにする予定である。

結 語

男子不妊症23例についてその精液が自己のTリンパ球に対してどのような作用を示すかをEロゼット形成を利用して検討し、以下の結果を得た。

1) 精液を稀釈するにつれて、そのEロゼットの形成率は増加し、精漿原液の場合のEロゼットの形成は他の稀釈した精漿が示すEロゼットの形成率より有意に低い形成率を示した。

2) Opioids の拮抗剤である naloxone の投与によりEロゼットの形成率は回復する傾向を示したが、統計的に有意の差は認められなかった。

3) 無精子症群や乏精子症群のEロゼットの形成率は精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群のEロゼットの形成率より有意に低いEロゼットの形成率を示した。

稿を終えるにあたり、終始ご助言をいただいた本学小児科教室の渋谷温講師に厚く感謝致します。また本論文の要旨の一部は第31回日本不妊学会学術総会で発表した。

本実験の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号 61771190)によった。

文 献

- 1) 繁田 実・香山浩二・磯島晋三：細胞性精子免疫に関する研究。血中精子不動態抗体保有婦人における mixed sperm-lymphocyte reaction. 日産婦誌 31: 755~756, 1979
- 2) 松本 修：男性不妊における抗精子抗体に関する臨床的研究。泌尿紀要 27: 477~492, 1981
- 3) Richards JM, Bedford JM and Witkin SS: Rectal insemination modifies immune responses in rabbits. Science 224: 390~392, 1984
- 4) 橋 武彦：リンパ球サブポピュレーションおよびサブセットの検査法、ロゼット形成試験 (E, EA, EAC). Medical Technology 121: 763~770, 1982
- 5) Oh S-K, Farrar WL and Ruscetti FW: Modulation of E-receptor expression on activated T-lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol 38: 55~67, 1986
- 6) Stites DP and Frickson RP: Suppressive effect of seminal plasma on lymphocyte activation. Nature 253: 727~729, 1975
- 7) Lord EM, Sensabaugh GF and Stites DP: Immunosuppressive activity of human seminal plasma. I. Inhibition of in vitro lymphocyte activation. J Immunol 118: 1704~1711, 1977
- 8) Fabbri A, Genssi L, Perricone R, Sanctis GD, Moretti C, Carolis CD, Fontana L, Ishidori A and Fraloli F: Human semen inhibits T rosette formation through an opiate mediated mechanism. J Clin Endocrinol Metab 60: 807~809, 1985
- 9) Carolis CD, Sanctis GD, Perricone R, Moretti C, Fabbri A, Gnessi L, Fraioli F and Fontana L: Evidence for an inhibitory role of β -endorphin and opioids on human total T rosette formation. Experientia 40: 738~739, 1984
- 10) Tsong SD, Phillips D, Halmi N, Liotta AS, Margioris A, Bardin CW and Krieger DT: ACTH and β -endorphin related peptides are presented in multiple sites in the reproductive tract on the male rat. Endocrinology 110: 2204~2206, 1982
- 11) Shaha C, Liotta AS, Krieger DT and Bardin CB: The ontogeny of immunoreactive β -endorphin in fetal, neonatal, and pubertal testes from mouse and hamster. Endocrinology 114: 1584~1591, 1984
- 12) Margioris AN, Liotta AS, Vaudry H and Bardin CW: Characterization of immunoreactive proopimelanocortin-related peptides in rat testes. Endocrinology 113: 663~671, 1983
- 13) Cheng MC, Clements JA, Smith AI, Lolait SJ and Funder JW: N-acetyl endorphin in rat spermatogonia and primary spermatocytes. J Clin Invest 75: 832~835, 1985
- 14) Lebouille JL, Burbach JPH, Kloet RD and Rommerts FFG: γ -endorphin-generating endopeptidase distribution in body tissues and cellular localization [in rat testis. En-

- ocrinology **118**: 372~376, 1986
- 15) Delitala G, Giusti M, Mazzocchi G, Granziera L, Tarditi W and Giordano G: J Clin Endocrinol Metab **57**: 1277~1281, 1983
 - 16) Gerendai I, Shaha C, Gunsalus GL and Bardin W: The effects of opioids receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. Endocrinology **118**: 2039~2044, 1986
 - 17) Shearer GM and Rabson AS: Semen and AIDS. Nature **308**: 230, 1984

(1986年11月21日迅速掲載受付)