

男子不妊症精巣肥満細胞の組織化学的検討

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 三宅弘治教授)

長 井 辰 哉

A HISTOCHEMICAL STUDY OF TESTICULAR MAST CELLS
FROM PATIENTS WITH MALE INFERTILITY

Tatsuya Nagai

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

The proteoglycan of the mast cells from human testes was analyzed using histochemical techniques. Testicular biopsies were obtained from 50 with idiopathic male infertility, 13 with obstructive azoospermia, 6 with varicocele and 14 normal men. To identify the proteoglycan, nitrous acid treatment and chondroitinase ABC digestion were carried out in addition to specific staining procedures using Alcian Blue pH 1.0 and high iron diamine. In all clinical groups, the mast cells which contained heparin were predominant. However, in the idiopathic male infertility group, the mast cells which contained chondroitin sulfate increased significantly. This type of mast cells were rarely seen in normal testicular tissue, whereas in the testes of patients with idiopathic male infertility, 20 percent or more mast cells contained chondroitin sulfate. This observation demonstrates that a change in mast cell subclass occurs in the testes of the patients with idiopathic male infertility and implies that the mast cells play an important role in the etiology of this disorder.

(Acta Urol. Jpn. 37: 349-355, 1991)

Key words: Male infertility, Testicular mast cell heterogeneity, Proteoglycans, Nitrous acid deaminative cleavage, Chondroitinase ABC digestion

緒 言

男子不妊症患者の精巣における肥満細胞の増加は1981年欄らにより初めて報告された¹⁾。肥満細胞は生理活性アミン、プロテオグリカン、protease、プロスタグランジン、血小板活性化因子等多くの物質を合成放出ないし貯溜することより、その増加は肥満細胞の急速な脱顆粒によるとされるI型アレルギー以外にも種々の病態と密接な関係を持っていると考えられる。

一方これまで単一性と考えられていた肥満細胞に結合組織型、粘膜型の2種類が存在することが明らかになり²⁾、種々の炎症性、アレルギー性疾患、あるいは線維化病巣などにおける肥満細胞亜型の果す役割の相違が注目されて来ている。

今回われわれは肥満細胞亜型のマーカーである顆粒のプロテオグリカンを組織化学的手法を用いて検討し、ヒト精巣における肥満細胞の多様性と精巣病変との関係において若干の知見を得たので報告する。

対 象

名古屋大学医学部泌尿器科不妊外来を受診し精巣生

検を施行した69例の男子不妊症患者を対象とした。患者の内訳は特発性男子不妊症50例(複数回の精液検査で精子濃度2,000万/ml以下)、精索静脈瘤6例、閉塞性無精子症13例である。精索静脈瘤の診断は視触診およびサーモグラフィーにより、閉塞性無精子症の診断は精管造影あるいは手術的になされた。正常対照としては精管結紮時に採取した正常男性14例の精巣組織を用いた。

方 法

原則として Charny の方法に準じて精巣生検を施行した³⁾。また一部の閉塞性無精子症の患者では手術時に精巣組織を採取した。生検組織は直ちに Carnoy 液にて室温下に3時間固定、エタノール系列にて脱水、キシレンにて置換後、パラフィン包埋し、各パラフィンブロックより厚さ2 μ mの連続切片を作製した。各切片はスライドガラスに貼付し、キシレンにて脱パラフィンし、エタノール系列で水和し、一般染色としてヘマトキシリンエオジン染色を、またプロテオグリカン検出法として、アルシアンブルー pH 1.0 染色⁴⁾、または高鉄ジアミン染色⁵⁾を施した。さらにブ

ロテオグリカン分子種検索のため亜硝酸分解法⁶⁾と chondroitinase ABC 消化法⁷⁾とを上記二種のプロテオグリカン検出法に併用した。

1. 亜硝酸分解法

切片を 0.24 M 亜硝酸 1.8 M 酢酸溶液に室温にて 100 分間浸漬後洗浄し、上記のプロテオグリカン検出法を施した。対照として 1.8 M 酢酸溶液に同温度同時間浸漬した切片、ならびに無処置の切片を用いた。

2. chondroitinase ABC 消化法

亜硝酸分解法によりあらかじめヘパリンを除去した切片に対し同法を施行した。切片は chondroitinase ABC 溶液 [1 ml 中に、2U の chondroitinase ABC (生化学工業), 15 μ mol の酢酸ナトリウム, 50 μ g の牛血清アルブミン, 5 μ mol のエチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 5 μ mol の N-エチルマレイミド, 2.5 μ mol のフェニルメタンスルフォニルフルオリド, 0.18 μ mol のペプスタチンを含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 溶液] 中に 37°C にて 90 分間浸漬後洗浄し上記プロテオグリカン検出法を施した。対照として上記酵素溶液から chondroitinase ABC のみを除外した溶液に同温度同時間浸漬した切片、ならびに無処置の切片を用いた。

各標本は 400 倍にて顕微鏡検し、ヘマトキシリンエオジン染色標本により Mean Johnsen score の算定⁸⁾、精細管および周囲の線維化度、Leydig 細胞の増加の有無を観察し、またアルシアンブルー pH 1.0

染色、ないし高铁ジアミン染色標本により全視野において染色された肥満細胞数、および精細管断面数を算定した。観察した全視野の肥満細胞数を精細管断面数で除したものを肥満細胞指数とした (肥満細胞数/精細管断面数)。また亜硝酸分解後も染色性を失わない肥満細胞数と亜硝酸分解対照切片中での全肥満細胞数との比を算出しこれを亜硝酸分解耐性肥満細胞比とした (亜硝酸分解耐性肥満細胞数/全肥満細胞数)。

統計学的検討

統計学的有意差の検討には Mann-Whitney の U 検定および Kruskal-Wallis の検定を用いた。

結 果

1. 正常精巣の標本ではプロテオグリカン検出法により精巣間質に少数の肥満細胞が散見された (Fig. 1A)。一方亜硝酸分解法を施行した切片ではほとんどすべての肥満細胞顆粒の染色性が失われ、またきわめて少数の肥満細胞のみが弱い染色性を示した (Fig. 1B)。亜硝酸分解後の切片に chondroitinase ABC 消化法を行うと、これらわずかの肥満細胞もその染色性を全く失った。

2. 特発性男子不妊症の精巣標本ではプロテオグリカン検出法により精巣間質、および肥厚した精細管壁内に多数の肥満細胞が認められた (Fig. 2A)。亜硝酸分解法処理後の切片では一部の肥満細胞顆粒はその染色性を失うものの、同処理後も強い染色性を維持する

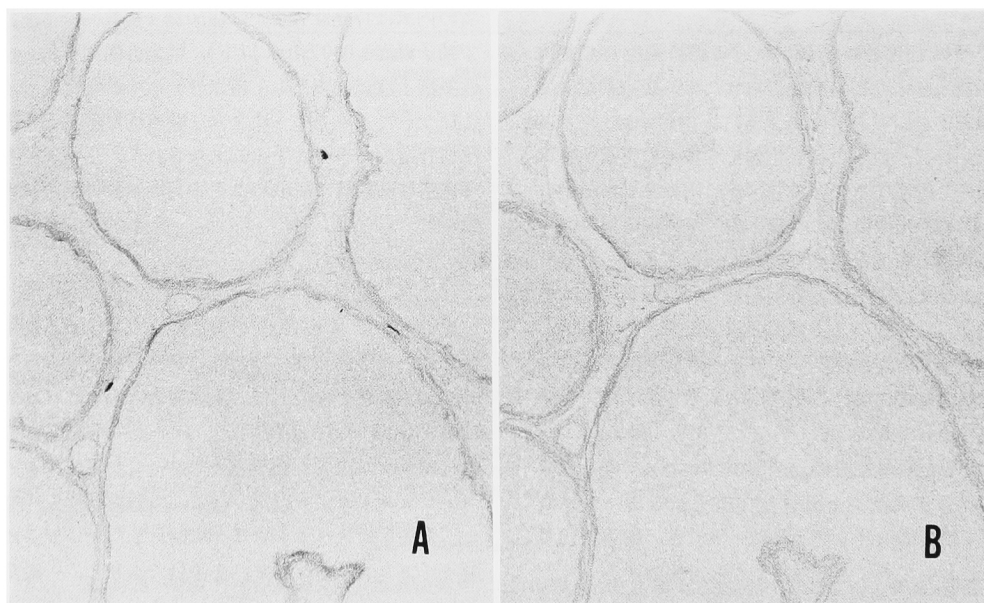


Fig. 1. Testis from a fertile male. A) Stained with alcian blue pH 1.0 ($\times 200$). A few mast cells are distributed in the interstitium. B) Treated with nitrous acid and stained with alcian blue pH 1.0 ($\times 200$). All mast cells lose their alcianophilia.

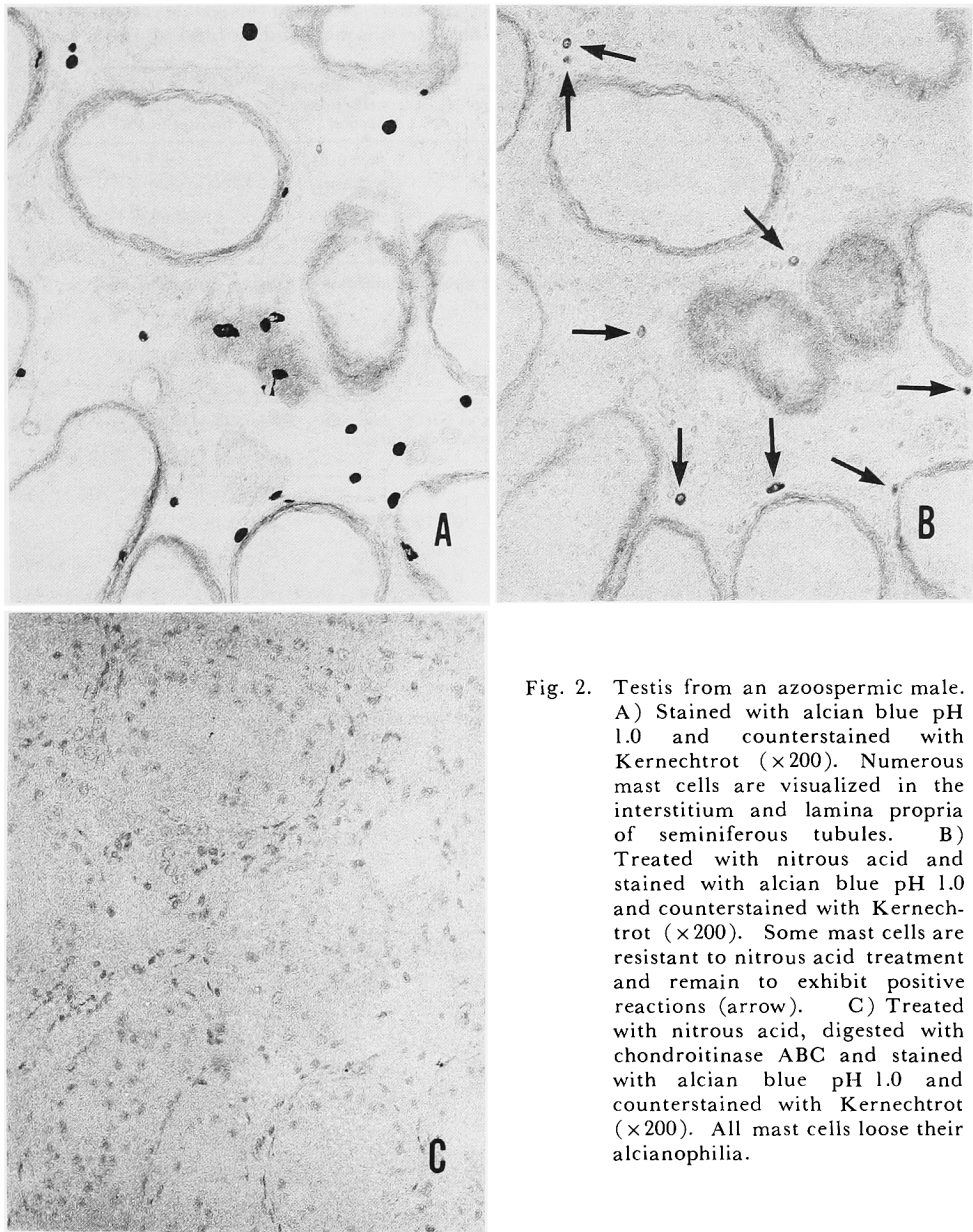


Fig. 2. Testis from an azoospermic male. A) Stained with alcian blue pH 1.0 and counterstained with Kernechtrot ($\times 200$). Numerous mast cells are visualized in the interstitium and lamina propria of seminiferous tubules. B) Treated with nitrous acid and stained with alcian blue pH 1.0 and counterstained with Kernechtrot ($\times 200$). Some mast cells are resistant to nitrous acid treatment and remain to exhibit positive reactions (arrow). C) Treated with nitrous acid, digested with chondroitinase ABC and stained with alcian blue pH 1.0 and counterstained with Kernechtrot ($\times 200$). All mast cells lose their alcianophilia.

肥満細胞が多数認められた (Fig. 2B). これら亜硝酸分解法処理後の切片に chondroitinase ABC 消化法を施すとこれらの亜硝酸分解耐性肥満細胞も、すべてその染色性を失った (Fig. 2C).

Table 1 に正常ならびに疾患群別の肥満細胞指数、亜硝酸分解耐性肥満細胞指数 (=コンドロイチン硫酸含有肥満細胞指数), および全肥満細胞に対する亜硝酸分解耐性肥満細胞比 (=コンドロイチン硫酸含有肥満細胞比) を示す。正常対照群に比べ, 特発性男子不妊症群では, 肥満細胞指数, 亜硝酸分解耐性 (=コン

ドロイチン硫酸含有) 肥満細胞指数およびその細胞比の有意な増加を認めた。しかし精索静脈瘤群, 閉塞性無精子症群ではこれらの指数および比は正常群と有意な差を認めなかった。

Table 2 は三種の精巣障害の程度の指標と肥満細胞指数, 亜硝酸分解耐性 (=コンドロイチン硫酸含有) 肥満細胞指数, および全肥満細胞に対する亜硝酸分解耐性 (=コンドロイチン硫酸含有) 肥満細胞比とを比較したものである。Mean Johnsen score, Leydig 細胞の増加度, 精細管およびその周囲の線維化の

Table 1. Number and ratio of nitrous acid deaminative cleavage (NADC) resistant mast cells and total number of mast cells in infertile men and normal controls

Diagnosis (No.)	No. of mast cell/tubular section	No. of NADC resistant mast cells/tubular section	Ratio of NADC resistant mast cells (%)
Idiopathic male infertility (n=50)	1.66±0.18*	0.35±0.05*	21.9±2.9*
Obstructive azoospermia (n=13)	1.00±0.22	0.12±0.04	11.7±2.3
Varicocele (n=6)	0.85±0.35	0.10±0.05	11.8±5.3
Normal control (n=14)	0.85±0.23	0.04±0.01	4.7±1.1

Values are expressed as mean ± S.E. There were significant differences between the control and the patients with idiopathic male infertility (*p<0.01).

Table 2. Mast cells and pathological findings

Pathological findings (No.)	No. of mast cell/tubular section	No. of NADC resistant mast cells/tubular section	Ratio of NADC resistant mast cells (%)
MJS*			
<2 (n=5)	1.01±0.37	0.43±0.27	38.7±18.3
2~3 (n=20)	2.13±0.17	0.48±0.07	26.2±4.3
3~6 (n=5)	2.81±1.25*	0.55±0.29*	17.9±9.7
6~8 (n=23)	1.07±0.17	0.14±0.03	14.1±2.4
8< (n=30)	0.89±0.11	0.08±0.02	8.4±1.3
Increase of Leydig cell			
Severe (n=6)	1.35±0.32	0.37±0.23	30.2±16.0
Moderate (n=19)	2.03±0.36*	0.46±0.09*	24.9±4.4
Mild (n=21)	1.60±0.24	0.24±0.06	16.0±2.8
Normal (n=37)	0.88±0.09	0.11±0.03	10.6±0.2
Fibrosis			
Severe (n=7)	1.87±0.37	0.31±0.17	14.1±6.7
Moderate (n=22)	2.06±0.33*	0.45±0.09*	27.1±5.3
Mild (n=21)	1.29±0.19	0.25±0.07	18.7±3.6
Normal (n=33)	0.84±0.09	0.08±0.02	9.0±1.3

* MJS : means mean Johnsen score. Values are expressed as mean ± S.E. There were significant differences among the groups (*p<0.05).

程度のすべてにおいてこれらの指標が悪化すればするほど肥満細胞指数、亜硝酸分解耐性(=コンドロイチン硫酸含有)肥満細胞指数、および全肥満細胞に対する亜硝酸分解耐性(=コンドロイチン硫酸含有)肥満細胞比は増加する傾向が認められた。

考 察

肥満細胞の多様性は1966年の Enerback によるラット腸管の肥満細胞密度が固定法により異なるとの報告から知られるようになった⁹⁾。その後多くの報告により人を含む多くの動物種において肥満細胞の多様性という概念が確立されてきた²⁾。最もよく研究されているラットにおいては肥満細胞は大きく2つの亜型に分類されている。その1つは結合組織型肥満細胞(典型的肥満細胞)であり、皮膚、粘膜下組織等に分布し通常のホルマリン固定によりその染色性がよく保たれる細胞である。この型の細胞の顆粒はプロテオグリカン

としてヘパリンプロテオグリカンを含み、またヒスタミン含有量も多く、サフラニンによって染色される。他のグループは粘膜型肥満細胞(非典型的肥満細胞)であり、腸管粘膜等に局在し、ホルマリン固定によって染色性を失う細胞である。その顆粒はプロテオグリカンとしてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを含み、ヒスタミン含有量は比較的少なく、サフラニンによって異調染色を示さない²⁾。また肥満細胞のこれら両型は含有する protease も異なり、また薬理学的特性も結合組織型細胞は poliamine に反応して顆粒放出を起こし、cromoglycate, theophyllin 等により顆粒放出が抑えられるのに対し、粘膜型細胞はこれらの薬物に対して反応しないなどまったく異なっている¹⁰⁾。また粘膜型肥満細胞は胸腺欠如動物では欠如し、その増殖分化はTリンパ球依存性と考えられており、腸管寄生虫症において増殖しその排除に関与すると考えられているのに対し、結合組織型細胞の増殖分化はTリ

ンパ球非依存性でありまた寄生虫疾患においても増殖しないなど、免疫反応におけるその果す役割の相違が明らかになっている。この両肥満細胞型の分化を制御する因子としてはTリンパ球により合成分泌されるインターロイキン3、およびインターロイキン4等の免疫学的因子や局所の線維芽細胞との相互作用等の局所因子の二者が報告されている¹⁰⁾。

ヒト肥満細胞の多様性については固定に対する性質の相違、含有する protease の相違、プロテオグリカンの分子種の相違などが報告されており、ヒトにおける肥満細胞の多様性の概念は確立しているものと解される。また AIDS ないしその他の免疫不全症においても腸管粘膜の肥満細胞は減少することが知られており、ヒト肥満細胞の一部はラットなどにおける粘膜型肥満細胞と同様、Tリンパ球依存性であることも知られている¹¹⁾。

肥満細胞は一般的には1型アレルギーに関与するほか、組織の線維化や若干の免疫学的役割も有すると考えられている。これらの役割と肥満細胞各亜型との関係についてはまだ不明であるが、既に慢性炎症性肺疾患¹²⁾、アレルギー性鼻炎^{13,14)}、慢性関節リウマチ¹⁵⁾、囊胞腺維症¹⁶⁾等ではホルマリン感受性あるいは含有すプロテオグリカン、プロテアーゼの種類などが正常と異なる亜型の分布が見られることが報告されており、このことは、これら疾患における肥満細胞の質的変化の意義を注目させるものである。

一方特発性男子不妊症精巣における肥満細胞の増加は欄らにより1981年に報告されたが、その果す生理的ないし病理的役割についてはまだ未解決である。彼らの報告によれば特発性男子不妊症の精巣では肥満細胞は単にその組織内分布密度が高いだけではなくその電子顕微鏡的な形態や顆粒構造にも変化が認められるという¹⁾。このような所見は特発性男子不妊症の精巣において肥満細胞が造精障害の機序に何等かの積極的な役割を有している可能性を示唆するものとして注目される。その後精巣における肥満細胞についてはいくつかの報告があるが疾病におけるその質的ないし機能的変化あるいは増数の機構について検討は見られない。他方 Schill らの報告によれば男子不妊症において肥満細胞ブロッカーの投与は妊娠性の向上をもたらすとされ肥満細胞が特発性男子不妊症の病態生理において何等かの重要な役割を果している可能性が高いものと考えられる¹⁷⁾。

今回のわれわれの研究では従来のヒト肥満細胞の多様性に関する報告に基き、肥満細胞亜型のマーカーの一つである細胞顆粒中のプロテオグリカンを組織化学

的手法によって分析し、精巣肥満細胞の多様性を解明するとともに、特発性男子不妊症精巣における肥満細胞の質的ならびに量的変化を明らかにしたものである。

今回われわれは肥満細胞顆粒のプロテオグリカン同定のために亜硝酸分解法、chondroitinase ABC 消化法を、硫酸糖質検出法（アルシアンブルー pH 1.0 法、高鉄ジアミン法）に併用した。亜硝酸分解法は硫酸酸性複合糖質の N-硫酸のみを特異的に分解する化学修飾法である。肥満細胞顆粒中のヘパリン鎖は D-グルコサミンの6種の誘導体と2種のウロン酸およびその硫酸化物とがグリコシド結合により重合したものである¹⁸⁾。亜硝酸は pH 2.5 以下において、この分子内の N-スルフォグルコサミンを脱アミノ分解して 2,5 アンヒドロマンノースに転換するとともにそのグリコシド結合を開裂しヘパリン鎖を破壊する。亜硝酸処理は N-スルフォグルコサミンを欠く他のプロテオグリカンには全く影響を与えないことが知られている¹⁹⁾。今回われわれは平林らが報告した方法により亜硝酸分解法を組織化学的ヘパリン同定法として用いた⁶⁾。他方 chondroitinase ABC 消化法によりその酵素基質であるコンドロイチン硫酸異性体（ch-sABCDE）が分解される。本酵素の基質特異性は高く他のプロテオグリカンに対する作用はほとんどない²⁰⁾。今回われわれの使用した組織化学的染色法、化学修飾法ならびに酵素消化法によって得られた結果によれば、正常ならびに三種の疾患のヒト精巣組織にはその顆粒中に、亜硝酸処理により分解されるヘパリンを含む肥満細胞、ならびに亜硝酸分解耐性で chondroitinase ABC 消化法によりその染色性を失う、コンドロイチン硫酸異性体を含む同細胞の二種の亜型が存在し、特に特発性男子不妊症精巣組織では後者の分布密度が高いことが判明した。

精巣肥満細胞の定量化法としては欄らが用いたような標本の単位面積当たりの肥満細胞数を計測する方法が一般化している¹⁾。しかし特発性男子不妊症精巣においてはしばしば精細管の萎縮と間質の増生が認められ肥満細胞が存在する間質と精細管の占める面積の比が変化し、肥満細胞増生を過大評価する危険性が生ずる。そこでわれわれは同じく精巣間質に分布する Leydig 細胞の定量化にしばしば用いられる、精細管断面数と細胞数との比を用いる方法を採用し²¹⁾、肥満細胞数の過大評価を防ぐことを試みた。なおこの方法は橋本らによりすでに精巣肥満細胞の定量化に用いられたものである²²⁾。

今回のわれわれの検索によれば正常ヒト精巣には 0.85 個/精細管断面の肥満細胞が存在しそのほとんど

は通常結合組織中に含まれる肥満細胞と同様、細胞顆粒プロテオグリカンとしてヘパリンプロテオグリカンのみを含んでいたが、ごく少数の細胞ではヘパリンに加え僅量のコンドロイチン硫酸がその顆粒に認められた。一方特発性男子不妊症精巣には1.66個/精細管断面の肥満細胞が存在し、その20%以上はコンドロイチン硫酸を含む肥満細胞であり、最も顕著な症例では70%を超える肥満細胞がコンドロイチン硫酸含有顆粒を有しており、本疾患においては明らかに肥満細胞の形質転換が起きていた。精索静脈瘤群、閉塞精無精子症群においては正常群に比べコンドロイチン硫酸含有肥満細胞がやや多い傾向が認められたが正常群との間に有意な差は認められなかった。特発性男子不妊症群と他の二疾患群とは組織学的な精巣障害の程度に差が有るので断定はできないが、精巣肥満細胞の形質転換は特発性男子不妊症の精巣にのみ認められる特異的な現象であるものと解される。

精巣障害の病理学的指標である Mean Johnsen score, 精細管および周囲の線維化度, Leydig 細胞の増加の有無と精巣肥満細胞の質的量的変化との相関の検討ではこれらの指標が悪化すればするほど肥満細胞指数, コンドロイチン硫酸含有肥満細胞指数 (= 亜硝酸分解耐性肥満細胞指数), コンドロイチン硫酸含有肥満細胞比 (= 亜硝酸分解耐性肥満細胞比) は増加する傾向が認められ、観察された肥満細胞の形質転換には精巣組織障害と密接な関連性が有るものと考えられる。またこれらの精巣組織障害が比較的軽度の段階からすでに肥満細胞の増加があり、その形質転換が認められることは注目に値する所見と言えよう。

肥満細胞のこのような形質転換が認められる原因としては既述の二つの因子、局所環境因子と免疫学的因子が関与しているものと考えられる¹⁰⁾。男子不妊症精巣には今回われわれが病理学的指標としたような一連の組織学的異常が知られており、これら微小環境因子の異常によって肥満細胞の正常と異なる分化ないし型質転換が誘導されている可能性は十分考えられる。また特発性男子不妊症精巣に正常では認められないTリンパ球が出現するとの報告があり²³⁾、Tリンパ球により肥満細胞の分化が誘導されている可能性も考えられる。今後肥満細胞と精巣組織中の他の細胞(Tリンパ球、線維芽細胞等)との相互作用についての検討が必要と思われる。

結 語

1. ヒト精巣肥満細胞顆粒プロテオグリカン分子種の組織化学的検索を行った。

2. 正常精巣の肥満細胞顆粒はプロテオグリカンとして主としてヘパリンプロテオグリカンのみを含む。

3. 特発性男子不妊症精巣においてはヘパリンに加えコンドロイチン硫酸を含む肥満細胞の顕著な増加が認められる。

4. コンドロイチン硫酸を含む肥満細胞の増加は精巣不妊症病変の進行と密接な関連性を示すものと解される。

稿を終るにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った。恩師三宅弘治教授に感謝いたします。また、直接御指導を頂いた名古屋市立大学医学部第2解剖学教室山田和順教授、平林義章助手に心からの謝意を表します。

本論文の要旨は、第9回日本アンドロロジー学会学術大会(1990年東京)において発表した。

文 献

- 1) Maseki Y, Miyake K, Mitsuya H, et al.: Mastocytosis occurring in the testes from patients with idiopathic male infertility. *Fertil Steril* **36**: 814-817, 1981
- 2) Enerback L: Mast cell heterogeneity. The evolution of the concept of a specific mucosal mast cell. In: *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*. Edited by Befus AD, Bienenstock J and Denburg JA., pp. 1-26, Raven Press, New York, 1986
- 3) Charny CW: Testicular biopsy. Its value in male sterility. *JAMA* **115**: 1429-1433, 1940
- 4) Lev R and Spicer SS: Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* **12**: 309, 1964
- 5) Spicer SS: Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* **13**: 211-234, 1965
- 6) Hirabayashi Y, Shimizu S and Yamada K: A nitrous acid procedure as a selective histochemical means of eliminating the N-sulphates of glycoconjugates. *Histochem J* **21**: 687-692, 1989
- 7) Yamada K, Fujita Y and Shimizu S: The effect of digestion with keratanase (*Pseudomonas* sp.) on certain histochemical reactions for glycosaminoglycans in cartilaginous and corneal tissues. *Histochem J* **14**: 897-910, 1982
- 8) Johnsen SG: Testicular biopsy score count: a method for registration of spermatogenesis in human testis. Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* **1**: 2-25, 1970
- 9) Enerback L: Mast cells in rat gastrointes-

- tinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* **66**: 289-302, 1966
- 10) Irani AA and Schwartz LB: Mast cell heterogeneity: clinical and experimental. *Allergy* **19**: 143-155, 1989
 - 11) Irani AA, Craig SS, DeBlois G, et al.: Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* **138**: 4381-4386, 1987
 - 12) Van Overveld FJ, Houben LAMJ, Terpstra GK, et al.: Patients with chronic bronchitis differ in their mast cell subtypes as compared with normal subjects. *Agents Actions* **26**: 60-62, 1989
 - 13) Okuda M and Ohtsuka H: Heterogeneity of the human nasal mast cell. In: *Immunobiology, Histophysiology, Tumor Immunology in Otorhinolaryngology: Proceedings of Second International Academic Conference Immunobiology in Otolaryngology and Laryngology Utrecht (The Netherlands)*, August 26-29. Edited by Veldman JE, Huizing EH, Lim DJ, et al., pp. 317-323, Kugler Publications, Berkley, 1987
 - 14) Pipkorn U, Karlsson G and Enerback L: Phenotypic expression of proteoglycan in mast cells of human nasal mucosa. *Histochem J* **20**: 519-525, 1988
 - 15) Irani AA, Golzar N, Blois G, et al.: Distribution of mast cell subsets in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovia. *Arthritis Rheum* **30**: 66, 1987
 - 16) Irani AA, Spock A and Schwartz LB: Reverse distribution of human mast cell subsets in cystic fibrosis. *Pediatr Res* **23**: 565, 1988
 - 17) Schill WB, Schneider J and Ring J: The use of Ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenospermia. *Andrologia* **18**: 570-573, 1986
 - 18) Shively JE and Conrad HE: Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin. *Biochemistry* **15**: 3932-3942, 1976
 - 19) Shively JE and Conrad HE: Stoichiometry of the nitrous acid deaminative cleavage of model amino sugar glycosides and glycosaminoglycuronans. *Biochemistry* **9**: 33-43, 1970
 - 20) 山形達也：コンドロイチン硫酸構造の多様性とコンドロイチン硫酸分解酵素。蛋白質，核酸，酵素 **14**: 1152-1171, 1969
 - 21) Weiss DB, Rodriguez-Rigau L, Smith KD, et al.: Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies of oligospermic men with varicocele. *Fertil Steril* **30**: 305-311, 1978
 - 22) Hashimoto J, Nagai T, Takaba H, et al.: Increased mast cells in the limiting membrane of seminiferous tubules in the testes of patients with idiopathic infertility. *Urol Int* **48**: 129-132, 1988
 - 23) El-Demiry M, Elton R, Hargreave TB et al.: Immunocompetent cells in human testis in health and disease. *Fertil Steril* **48**: 470-479, 1987

(Received on November 20, 1990)

(Accepted on January 11, 1991)

(迅速掲載)