

〔不妊・不育症対策〕 抗精子抗体検出法の実際

兵庫医科大学教授
産婦人科教授
香山 浩二

はじめに

抗精子抗体は不妊女性だけでなく自己抗体として男性にも検出され、不妊の原因となってくる。女性の場合は、一般に血中抗体が測定され、不妊との関係が論じられているが、男性の場合には血中抗体よりも射出精子に結合した抗精子抗体の存在が問題となる。

すでに本研修コーナー（42巻11号）で抗精子抗体検査法として、主に血中抗体の検出に用いられている精子不動化試験について述べたので、本稿では射出精子に結合した抗精子抗体の検出法について述べる。

精子結合抗体の検出法

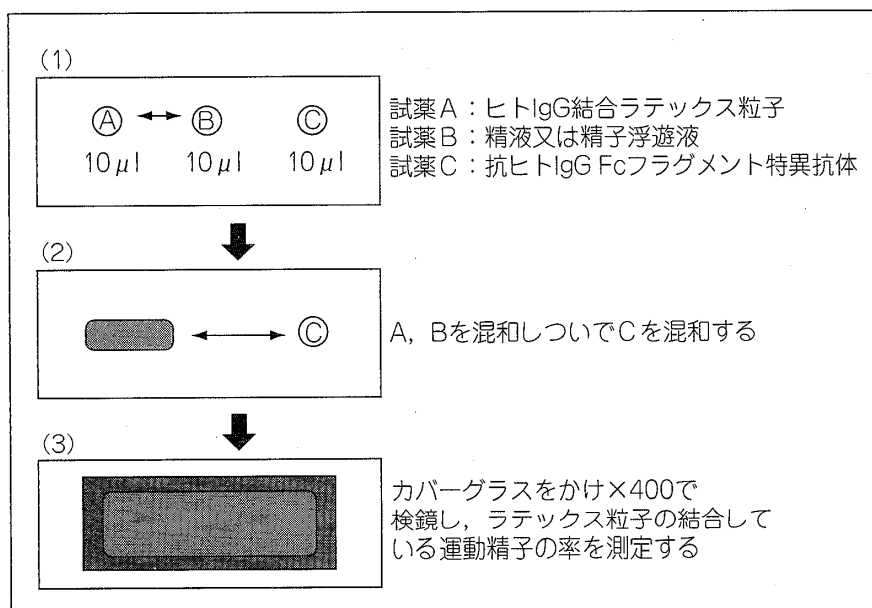
精子に結合した抗体の検出法として表1に示すような方法が報告されているが、臨床的に不妊検査として用いられているものは主にIBテストとMarテストの二つである。IBテストの原理は抗ヒト免疫グロブリン（Ig）抗体又は抗IgG、抗IgA、抗IgM抗体を標識したポリアクリルアミド粒子（イムノビーズ）を指標として運動精子表面に結合した抗精子抗体を検出する方法である。運動精子浮遊液とイムノビーズ浮遊液を試験管又はスライドグラス上で反応させ、顕微鏡下でビーズの結合した運動精子の数とビーズの付着部位を調べる。直接法では射出精子に結合した抗体を、間接法では前もって検体と精子を反応させることによって検体中の抗精子抗体を検出することができる。

Marテストの原法では抗Rh（D）抗体で感作したRh（D）陽性血球を指標として、これに精子浮遊液と抗ヒトIgG抗体を加えて反応させ、血球の結合した運動精子の数と血球の付着部位を調べる。最近では血球の代わりにIgG感作ラテックスも用いられている。

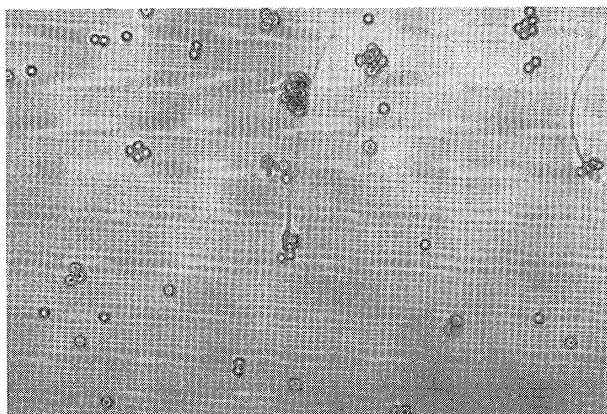
以下実際に測定キットとして臨床に用いられているSperm Mar IgG TestとSperm Mar IgA Testによる抗精子抗体の検出法について述べる。両測定キットはFerti Pro N. V. (Nevelestraat 18, 9880 Aalter-Lotenhulle, Belgium Fax+32 51 68 65 21) より入手可能である。

（表1）精子結合抗体の検出法

1. Immunobead (IB) テスト
2. Mixed antiglobulin reaction (Mar) テスト
3. Radiolabeled antiglobulin (RA) 法
4. Fluorescent-activated cell sorter (FACS) 法
5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法
6. 免疫蛍光抗体法



(図 1) Sperm Mar IgG Test



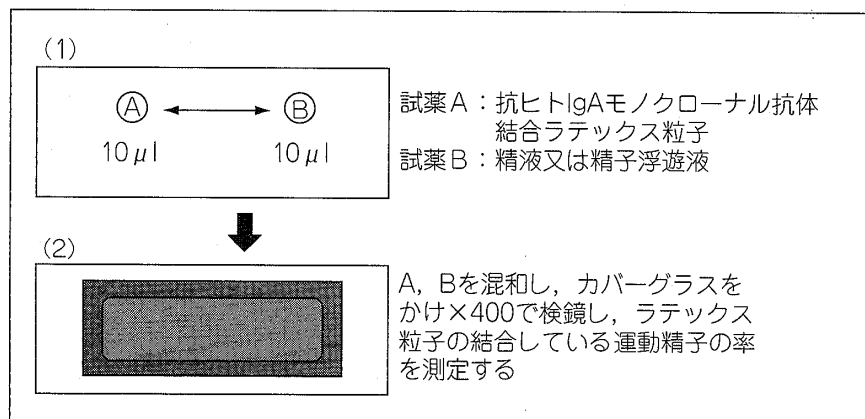
(写真 1)

Sperm Mar IgG Test

操作手順：図 1 に示すように、直接法では試薬 A と C を室温に戻してよく混和した後、各々 10 μ l をスライドガラス上に滴下し、採取後十分液化した精液又は精子浮遊液 (40 $\times$ 10⁶/ml) B の 10 μ l を滴下する (1)。まず、A, B をよく混和し、次いで C を混合する (2)。カバーガラスをかけ 2～3 分後に、顕微鏡 (400 倍) 下で検鏡する (3)。100 個の運動精子を数えて、ラテックス粒子の結合している精子数を算定する。全く粒子の結合がみられない場合は、乾燥を防いで 10 分間反応させた後に再度同様にラテックス粒子の結合した精子数を算定する。

間接法では 56℃、30 分の加熱処理で非働化した被検血清を段階希釈 (1/16 倍) し、これに 20 $\times$ 10⁶/ml に調整したドナー精子浮遊液 (精漿を洗滌除去) を等量混合し 37℃、60 分間反応させる。これを精子浮遊液 B として直接法の場合と同様に反応させラテックス粒子の結合した精子数を算定する。

判定基準：ラテックス結合運動精子が 40% 以上を抗精子抗体陽性と判定する。10～39



(図2) Sperm Mar IgA Test

%の場合は疑陽性として, 再検査や他の検査法を用いて抗体の確認をすることが望ましい。

Sperm Mar IgG Test では, 抗ヒト IgG Fc フラグメント特異抗体 (試薬 C) によりヒト IgG 結合ラテックス粒子 (試薬 A) 自身も凝集を起こすが, このラテックス粒子の凝集により試薬 A, B が正常に機能していることの確認にもなる。抗精子抗体陽性不妊男性の射出精子を用いて本試験を行った結果を写真1に示すが, 頭部にラテックス粒子が付着した精子並びにラテックス粒子自身の凝集像も観察することができる。この不妊男性は精子頭部の精子抗原に対して IgG 抗体を産生していることを示している。

Sperm Mar IgA Test

操作手順: 図2に示すように, 直接法では試薬 A と精液又は精子浮遊液 ($40 \times 10^6/\text{ml}$) B の各 $10 \mu\text{l}$ をスライドグラス上に滴下し (1), よく混和した後カバーガラスをかけ3分後に顕微鏡 (400倍) 下で検鏡する (2)。IgG の場合と同様に100個の運動精子を数えて, ラテックス粒子の結合している精子数を算定する。全く粒子の結合がみられない場合は, 乾燥を防いでさらに10分間反応させた後に再度ラテックス精子結合運動精子の割合を測定する。間接法では 56°C , 30分の加熱処理で非働化した被検体 (精漿又は頸管粘液) を $1/4$ 倍に希釈し, これに $20 \times 10^6/\text{ml}$ に調整したドナー精子浮遊液を等量混合し, 37°C 60分間反応させる。その後, 遠心 ($400g$, 10分) により反応精子を先滌した後, 精子濃度を $40 \times 10^6/\text{ml}$ に調整したものを精子浮遊液 B として直接法の場合と同様に反応させ, ラテックス粒子の結合した精子数を算定する。

判定基準: IgG の場合と同様にラテックス結合運動精子が40%以上を抗精子抗体陽性, 10~39%を疑陽性と判定するが, IgG 抗体に比べて IgA 抗体の方が不妊症との因果関係が, より強いと考えられている。頸管粘液の場合にはラテックス結合運動精子の割合が40%以下であっても10%以上であれば不妊の原因になる可能性が指摘されている。

精子結合抗精子抗体の意義

男性の場合は, 本来精子抗原は血液—精巣関門によって循環系 (免疫系) から隔絶されており, 思春期になって初めて出現してくる精子抗原に対しては十分な免疫学的寛容が誘導されていない。したがって何らかの原因でこの血液—精巣関門に破綻が生じると, 自己の精子抗原に対する免疫応答が誘導され, 抗精子抗体が産生されてくるものと考えられている。この場合に全身的な免疫応答においては主に IgG 抗体が産生され, 精巣内におけ

る局所的な免疫応答では主に分泌型 IgA 抗体が産生される。射出精子結合抗体には IgG と IgA が検出されるが、IgA の検出される症例にはほとんど IgG 抗体も検出される。分泌型 IgA は IgA の二量体として分泌され、精子凝集作用が強く、射出精液中の精子に凝集がみられる。IgG, IgA 結合精子は共に頸管粘液の中で精子の通過性が強く抑制されることが報告されている。さらに、80%以上の運動精子に IgG 又は IgA 抗体の結合がみられるような不妊男性では受精段階での障害も強く、通常の体外受精では受精に至らず、顕微授精 (ICSI) が必要となることが多い。