

275 FITC-Concanavalin A (ConA) 蛍光法による先体内膜露出ヒト精子の評価

東京歯大市川病院

兼子 智、郡山 智、吉田丈児、赤星晃一、
松林秀彦、冬城高久、田中宏明、石見大輔、
泉 康史、小田高久

【目的】ヒト精子先体反応を迅速に評価するためにFITC (fluorescein isothiocyanate) -ConAによる先体内膜の組織染色が汎用されているが、ConAは単に細胞表面のマノース (Man)、グルコース含有糖鎖を認識しているにすぎない。我々はConAをリガンドとするcell affinity chromatography (CAC) 法において、ConAは原形質膜に比して先体内膜に相対的に強い親和性を有することを報告した。本研究ではFITC-ConAにより先体内膜を特異的に染色するため、Manによるcutoff条件を検討した。【方法】CAC法により先体反応精子 (AR+) を調製し、Ca²⁺非存在下の攪拌密度勾配法により先体未反応精子 (AR-) を調製した。先体内膜露出率は修正 triple stain法により観察した。精子標品を溶液A (1.0mM CaCl₂、MnCl₂含有20mM Pipes生食、pH6.6) で2回洗浄して残存する単糖、糖蛋白質等を除去した後、0~5.0mg/ml Man存在下に0.01mg/ml FITC-ConA添加溶液Aと等量混合して30分間反応させ、さらに溶液Aで洗浄した。AR+精子の先体部のみに蛍光を認めるMan濃度を検索した。【成績】調製したAR+、AR-精子の先体内膜露出率は各々87%、5%であった。検討を行ったMan濃度のうち0及び0.005mg/mlではAR+、AR-標品とも精子全体に蛍光像を認め、0.05mg/mlではAR+精子の先体部とAR+、AR-精子の赤道部、中片部に蛍光が残存した。0.5mg/mlではAR+精子の先体部のみに蛍光を認め、5.0mg/mlではAR+精子先体部の蛍光も減弱した。【結論】以上の結果は先体内膜にConAに対する強親和性糖鎖群が存在することを示唆しており、その特異的染色には0.5mg/ml Manによるcutoffが有用であることが明らかとなった。

276 精子妊孕能良好例および不良例における精漿中carnitine濃度の検討

長崎大

布施正樹、石丸忠之、山辺 徹

【目的】精漿中のある因子の量的および質的違いが精子妊孕能の差となっていることが考えられる。精漿中free carnitineは遊離脂肪酸と結合し、精子ミトコンドリア内にエネルギー源としての脂肪酸を供給し、acylcarnitineになると考えられる。そこで、total, free carnitineおよびacylcarnitineの精漿中濃度が精子妊孕能に関連するかどうかについて検討した。【方法】不妊のため受診した夫婦31組の夫に、sperm survival test(SST)を行い、同時に精液の一部を液化後(37℃,30分間)、遠心し精漿を回収した。Total carnitine, free carnitineおよびacylcarnitine濃度とSST結果を比較した。SST結果はgrade I(36時間陽性)5例、grade II(24時間陽性)5例、grade III(12時間陽性)12例およびgrade IV(6時間陽性)9例に分類された。なお、SST結果36時間陽性例は精子妊孕能良好、36時間陰性例は不良と判定した。【成績】①Total carnitine濃度はSST結果との間に有意差はなかった。②精子妊孕能良好例(grade I)のacylcarnitine濃度は不良例(grade II, IIIおよびIV)よりも高値であった(P=0.0125)。精子妊孕能良好例のfree carnitine濃度は不良例よりも低かった(P=0.0258)。③Acylcarnitine/total carnitine(A/T)比はgrade I(0.43~0.61)がもっとも高く、ついでII(0.32~0.37), III(0.15~0.29)およびIV(0.13~0.25)の順であった。なおgradeIIIおよびIVの間には有意差はなかった。【結論】精漿中A/T比は精子妊孕能不良例ほど低かった。すなわち、精子妊孕能不良例ではfree carnitineからacylcarnitineへの変換が低いことから、ミトコンドリアの機能あるいは脂肪酸酸化の異常がうかがわれた。