

抗体による精子不動化作用に於ける補体活性経路について

兵庫医科大学産科婦人科学教室

坂出回生病院産婦人科*

鎌田 敏雄* 窪田 耕三 伊熊健一郎
香山 浩二 磯島 晋三

Study on Pathway of Complement Activation for the Sperm Immobilization Test

Toshio KAMATA*, Kozo KUBOTA, Kenichiro IKUMA, Koji KOYAMA and Shinzo ISOJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo Medical College, Nishinomiya

**Department of Obstetrics and Gynecology, Kaisei Hospital, Sakaide*

概要 一般に補体の活性化は2つの経路によつて起こる事が知られており、1つは classical pathway であり、主として IgG, IgM が抗原と結合することによつて活性化され、これに9つの補体成分 C1~C9 及び Ca^{++} , Mg^{++} が関与するもので、他の1つは、alternate pathway と呼ばれ、抗原に種々の抗体が結合するか、又は多糖類, Lipopolysaccharide によつて活性化され、C1, C4, C2 及び Ca^{++} の関与なしに C3 から C9 までを活性化するものである。著者らの行つている精子不動化試験においても補体は必要不可欠なものであり、補体としてモルモット血清を使用しているが、その際の補体活性経路については不明であつた。そこで著者らは精子不動化試験における補体活性経路について C4 欠損 (C4D) モルモット血清及び EGTA- Mg^{++} を用いて検討した結果、次の成績を得た

(1) EGTA- Mg^{++} を用いて精子不動化試験の反応系中の Ca^{++} をキレートすると補体の活性化が阻止され、精子不動化作用が発現しなかつた。このことはモルモット補体による羊赤血球の溶血を EGTA- Mg^{++} 溶液が阻止したものと同一の態度であつた。

(2) C4欠損 (C4D) モルモット血清を補体として用いた場合には精子不動化作用が発現しなかつたが、C4欠損 (C4D) モルモット血清にモルモット C4成分溶液を等量に加えたものを補体として用いた場合、精子不動化作用が発現した。以上の事より、精子不動化試験における補体の活性化には C4 及び Ca^{++} が不可欠であり、この事より精子不動化試験における補体活性経路は classical pathway であり、alternate pathway は関与しない事がわかつた。

Synopsis It is well known that the complement is activated through the classical or alternate pathway. In our sperm immobilization test by which the complement dependent sperm immobilizing antibody could be detected, the pathway of complement activation was remained unknown. Thus the pathway which is working for the activation of complement in the sperm immobilization test was studied by using C4 deficient (C4D) guinea pig serum and EGTA- Mg^{++} . The results were as follows:

1) When Ca^{++} in the reaction system of the sperm immobilization test was chelated with EGTA- Mg^{++} solution, the complement activation was inhibited and the sperm immobilization did not occur. The same phenomenon occurred in the complement dependent hemolysis of sheep red blood cells by EGTA- Mg^{++} .

2) When C4 deficient guinea pig serum was used as complement source, the sperm immobilization did not occur. When the serum was complemented with guinea pig's C4 component, the sperm immobilizing activity was resumed.

From these results, it was concluded that the complement in the sperm immobilization test was activated through the classical pathway, and not through the alternate pathway, because C4 and Ca^{++} were necessary in the reaction.

Key words: Sperm immobilizing antibody•Classical pathway of complement•Alternate pathway of complement•EGTA- Mg^{++} •C4 defect guinea pig serum

緒 言

精子免疫に関する研究が進むにつれ、臨床的にも抗精子抗体が原因と考えられる女性不妊婦人の存在する事が明らかになってきた。不妊婦人の血中抗精子抗体の検出法にも精子不動化試験¹²⁾、精子凝集試験^{7) 8) 18)}、精子毒性試験¹⁰⁾等があるが、著者らの発表した精子不動化試験によつて検出される精子不動化抗体は原因不明不妊婦人に特異的に見い出されるところから、不妊症と最も密接な関係があると報告されている^{1) 3) 13) 14)}。この精子不動化抗体は IgG, IgM 分画中に存在し、またその作用発現には補体が必要不可欠なものである。精子不動化試験において使用する補体源としてはモルモット血清が最適であり、反応感度を良くする為には 200C/H₅₀/ml 以上の補体価を有するモルモット血清を用いるべきであることは既に報告したが¹⁷⁾、精子不動化抗体の作用発現に必要な補体活性経路については、いまだ検討がなされていない。補体活性経路には、classical pathway と alternate pathway の2つの経路があり、従来より IgG, IgM は classical pathway 系と関係があり、alternate pathway 系とは関連性がないと考えられていたが、近年の研究の進歩により各種免疫グロブリンも alternate pathway 系に関与することが明らかになってきた^{5) 11) 19) 20) 23) 25)}。本論文中において著者らは Ca⁺⁺ のキレート剤である EGTA、及び C4 欠損モルモット補体を用いて精子不動化抗体の作用発現に必要な補体活性経路の検討を行つたので報告する。

実験材料及び方法

I. 精子不動化抗体保有不妊婦人血清

高力価精子不動化抗体保有不妊婦人血清を 56°C, 30分間非働化した後、-20°Cに保存したものを実験に用いた。又 C4 欠損モルモット血清及び C4 成分添加モルモット血清を用いての補体活性経路の検討を行なう際には精子不動化抗体保有血清より Sober et al.²⁶⁾ の方法に準じて IgG 分画を分離抽出した後、buffer 成分による精子への影響を除く為生食水にて充分透析して実験に供した。

II. 運動精子浮遊液の調整

5日間以上禁欲後の精液検査で正常所見（精液量 2.5ml 以上、精子数 40×10^6 /ml 以上、運動率 70%以上、奇形率 15%以下）を呈し、かつ精液中に精子凝集のみられない健康男子を精子提供者として選んだ。滅菌シャーレに用手法で採取した精液を室温で20分間放置した後、3倍量の洗浄液（10%非働化正常人血清含有生理的食塩水）を加えて混合した後、1,350g 5分間遠沈し、上清を除去した後、沈渣に約 2ml の洗浄液を加えて静かに10分間放置し、上清中に遊泳してきた運動活発な精子のみを分離し、これを 40×10^6 /ml の濃度の精子浮遊液に調整して実験に用いた。精子不動化抗体保有不妊婦人より採取した IgG 分画と C4 欠損モルモット血清、C4 添加モルモット血清を補体として用いて、補体活性経路を調べる実験においては、精子浮遊液中に含まれる非働化人血清中補体成分の影響を考慮して、5%牛血清アルブミン含有生理的食塩水を精子洗浄並びに稀釈液として用いた。

III. C4欠損 (C4D) モルモット血清及び C4 補体成分

C4欠損 (C4D) モルモット血清は C4 欠損モルモットの心穿刺により採血後、血清を分離し、小試験管に分注した後、直ちに -80°Cに保存したもので、使用に臨んで小試験管の1本ずつを融解して用いた。C4 モルモット補体成分は Cordis 社 (Florida) のものを用いた。

IV. EGTA-Mg⁺⁺ 溶液

EGTA 38g, MgCl₂·6H₂O 20.3g, NaOH 7g を脱イオン水にて 100ml とし、これを NaOH 溶液にて pH 5.0とし、これを 1M EGTA-Mg⁺⁺ 溶液とした。実験に際してはこれを生理的食塩水にて稀釈し、各モル濃度の EGTA-Mg⁺⁺ 溶液を用いて補体活性経路の検討を行つた。

V. 精子不動化試験

(1) 定性的精子不動化試験

著者ら^{1) 3) 12) 13)}がすでに発表した方法に従って行つた。すなわち、非働化被検血清 0.25ml と精子浮遊液 0.025ml を小試験管内に混入し、更に

補体としてモルモット血清 0.05ml を加えて、32°C, 60分間 incubate し、顕微鏡下(200倍)で精子運動率を算定する。対照としてあらかじめ精子不動化作用のない事を確認した非働化未婚女性血清を用い、その精子運動率(C%)を非検血清の精子運動率(T%)で割つたものを精子不動化値(SIV)とし、これが2.0以上の場合、すなわち被検血清による精子運動率が対照血清の運動率に比べて50%以下に低下した場合を陽性と判定した。

(2) 定量的精子不動化試験

著者ら³⁾¹⁶⁾がすでに発表した方法に準じた。すなわち被検血清を非働化未婚女性血清(予め精子不動化抗体を含みぬ事を確認したもの)で倍数稀釈し、各稀釈血清を用いて前述の精子不動化試験に準じて精子運動率(T%)を算定する。対照未婚女性血清の精子運動率(C%)から被検稀釈血清の精子運動率(T%)を差し引いたものを対照血清の運動率(C%)で割つた値に100を乗じたもの、すなわち $(C-T)/C \times 100$ を精子不動化率とし、この値を縦軸にとり、血清稀釈倍数を横軸にとつて、各稀釈倍数における精子不動化率をプロットしてゆくとS字状曲線が得られる。このS字状曲線の直線部分が50%精子不動化率と交叉する点の血清稀釈倍率を求め、これを精子不動化抗体の定量値、即ち50%精子不動化値 SI_{50} (50% sperm immobilization titer) と呼ぶ事にした。即ち、この値が大きい程、精子不動化作用が強い事を示している。

VI. 補体価測定

Mayer²¹⁾の方法に従つて50%溶血単位を求め、これを補体力価($C'H_{50}$)とした。

VII. 羊赤血球溶血反応に及ぼす EGTA-Mg⁺⁺ 濃度の検討

Mayerの方法に準じて行つた。即ち、EGTA-Mg⁺⁺ 溶液0.5ml, モルモット血清0.5ml, 感作羊赤血球 (5×10^8 /ml) 1ml を混合し、ペロナール緩衝液で7.5ml とし、対照としてEGTA-Mg⁺⁺ 溶液のかわりに生理的食塩水を加えたものを用いて両者の溶血を比較し、EGTA-Mg⁺⁺ の濃度により、対照と比較して羊赤血球の溶血がいかに低下するかを検討した。

VIII. EGTA-Mg⁺⁺ による補体活性経路の検討

表1に示す方法によつて1M EGTA-Mg⁺⁺ 溶液を生理的食塩水にて適当に稀釈してゆき、各稀釈濃度のEGTA-Mg⁺⁺ 溶液と正常新鮮モルモット血清を等量に混合したものを補体として、高力価精子不動化抗体保有患者血清を用いて定性的精子不動化試験(SIV)及び、定量的精子不動化試験(SI_{50})を行い、EGTA-Mg⁺⁺ の濃度による精子不動化抗体価SIV、及び SI_{50} の変化を検討した。

IX. C4欠損(C4D)モルモット血清及びモルモットC4補体成分を用いた補体活性経路の検討

精子不動化抗体保有不妊婦人血清よりIgG分画を遊離し、蛋白濃度70mg/mlに調整したものを被検液とした。実験に際しては表3に示す如く、被検液0.25mlと5%牛血清アルブミン含有生理的食塩水洗浄精子浮遊液(40×10^6 /ml)0.025mlを混合し、これに補体として生理的食塩水にて適当に稀釈した正常新鮮モルモット血清、C4

表1 Procedure for sperm immobilization test in use of EGTA

Sterile woman's serum with sperm immobilizing antibody	0.25 ml	} incubation 32°C, 60 min → sperm motility (T%)
Sperm suspension (40×10^6 /ml)	0.025 ml	
Complement (guinea pig serum)	0.025 ml	
EGTA	0.025 ml	
Control serum (Unmarried woman's serum)	0.25 ml	} incubation 32°C, 60 min → sperm motility (C%)
Sperm suspension (40×10^6 /ml)	0.025 ml	
Complement (guinea pig serum)	0.025 ml	
EGTA	0.025 ml	

表2 Procedure for sperm immobilization test in use of C4D G.P. serum, diluted G.P. serum and C4

7S- γ G of sterile woman's serum containing sperm immobilizing antibody	0.25 ml	$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\}$ incubation 32°C, 60 min. $\rightarrow$ sperm motility
Sperm suspension ($40 \times 10^6/\text{ml}$)	0.025 ml	
Complement (diluted G.P. serum :		
C4D G.P. serum + C4 : inact. G.P. serum :	0.05 ml	
C4D G.P. serum : C4)		
C4D : C4 deficient guinea pig serum		
C4 : Guinea pig C4 component		
G.P. : Guinea pig		

表3 Results of sperm immobilization test in use of various concentrations of EGTA

Concentration of EGTA	Sperm motility	
	Control serum	Sterile woman's serum
0.01 M	68%	60%
0.005 M	60	60
0.004 M	60	56
0.003 M	68	0
0.002 M	64	0

M : mol

EGTA : Ethyleneglycoltetraacetic acid

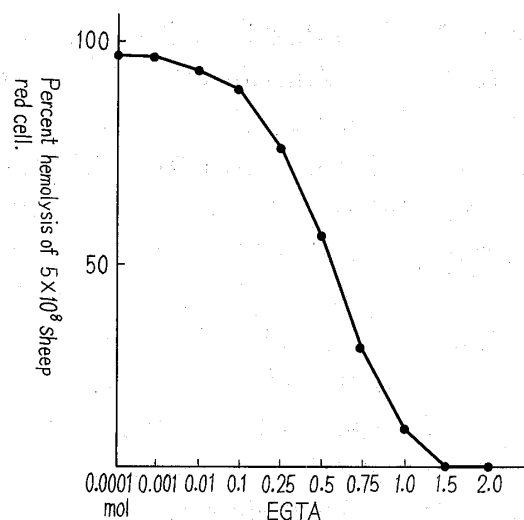
欠損モルモット血清,あるいはC4欠損モルモット血清にモルモットC4溶液(1バイアルに蒸留水5mlを加えたもの)を等量に加えたものを各々0.05mlずつ加えて精子不動化試験を行い,用いた補体成分の違いにより被検液中の不動化値がどのように変化するかを検討した.対照実験として非働化モルモット血清またはモルモットC4溶液のみを補体源とした精子不動化試験も同時に行つた.補体源として用いたC4欠損モルモット血清,C4欠損モルモット血清とモルモットC4溶液を等量に混合したもの,モルモットC4溶液,生理的食塩水にて適当に稀釈した正常新鮮モルモット血清,非働化モルモット血清の各々についてMayerの方法に従つて補体力価($C'H_{50}$)を測定した.

実験成績

I. 羊赤血球溶血反応におけるEGTA-Mg⁺⁺の影響

classical pathwayによる補体の活性化にはCa⁺⁺は不可欠であるが,alternate pathwayによ

図1 Percent hemolysis of sheep red cell in use of various concentrations of EGTA



る補体の活性化にはCa⁺⁺を必要としない.そこでEGTAが主にCa⁺⁺のみをキレートし,Mg⁺⁺にはあまり影響を与えない事を利用して,classical pathwayを経るといわれるモルモット補体の羊赤血球溶血作用をEGTA-Mg⁺⁺が実際に阻止し得るかどうかを検討した.図1に示す如くEGTA-Mg⁺⁺のモルモット濃度が増加するに従つて羊赤血球の溶血率は低下し,1.5M以上では完全に溶血が阻止された.この事実は溶血反応に際してclassical pathwayによる補体活性系がEGTA-Mg⁺⁺添加により完全に阻止される事を示している.次いでこのEGTA-Mg⁺⁺添加実験法を用いて精子不動化作用の発現にclassical pathwayが関与しているか否かの検討を行つた.

II. EGTA-Mg⁺⁺の精子不動化試験における影響

図2 Comparative results of quantitative sperm immobilization test in use of various concentrations of EGTA and complement. (I.I. serum)

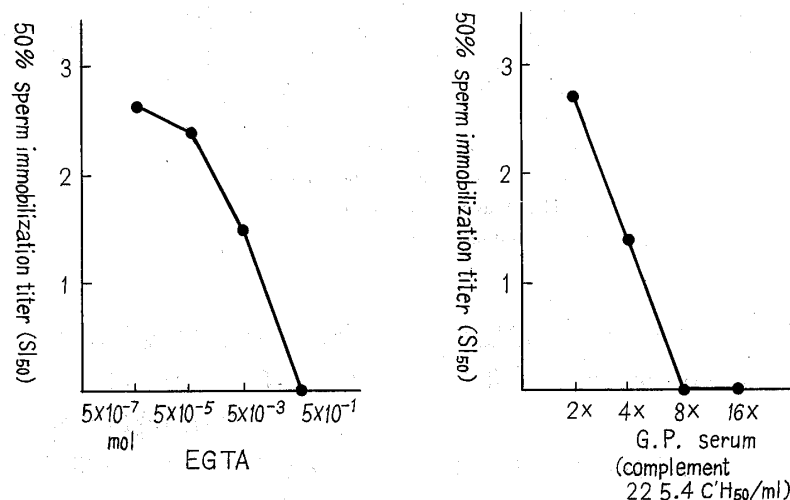
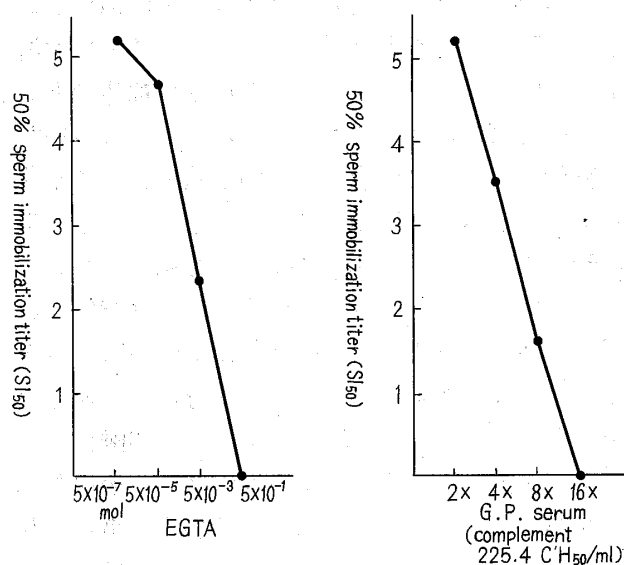


表1に示した方法に従って反応系に種々の濃度のEGTAを加え、高力価精子不動化抗体保有患者血清による精子不動化作用への影響を検討した。結果は表3に示す如く、用いたEGTA-Mg⁺⁺のモル濃度が0.003M以下の場合、対照血清の運動率は全く変化しないのに比べて被検血清中の精子運動率は全て0%を示し、精子不動化作用は充分発揮されていたが、0.004M以上になると被検血清の精子運動率と対照血清の精子運動率はほぼ同じ値を示し、精子不動化作用は完全に阻止された。この事は、反応系に0.004M以上のEGTA-Mg⁺⁺を加える事によつて精子不動化作用に必要な補体活性が阻止されたため、精子不動化抗体による精子不動化作用も発現されなかつたものと考えられる。次にEGTA-Mg⁺⁺の補体活性化阻止作用を定量的に検討するため、定量的精子不動化試験の反応系に種々の濃度のEGTA-Mg⁺⁺を加えた場合、50%精子不動化値(SI₅₀)がどのように変化するかを調べてみた。また別な実験系としてEGTA-Mg⁺⁺添加によつて補体活性化阻止を起す代りに、反応系に加える補体量を変化させて、SI₅₀がどのように変化するかをEGTA-Mg⁺⁺添加によるSI₅₀の変化と比較検討してみた。2名の高力価精子不動化抗体保有患者血清(I.I.及びT.T.血清)を用いた場合、反応系に加え

図3 Comparative results of quantitative sperm immobilization test in use of various concentrations of EGTA and complement (T.T. serum)



たEGTA-Mg⁺⁺濃度及び補体量と50%精子不動化値(SI₅₀)の関係を検討した結果を図2, 3で示した。補体として用いた新鮮モルモット血清(225.4 C'H₅₀/ml)は生理的食塩水で倍数希釈したものである。図2, 3に示す如く2名の高力価精子不動化抗体保有患者血清は共に反応系に加えたEGTA-Mg⁺⁺のモル濃度が増す毎に、又反応系に加えたモルモット血清の希釈倍数が増す毎に

表4 Analysis of complement activity for sperm immobilization

	Diluted G.P. serum	C4D G.P. serum +C4	Inactivated G.P. serum	C4D	C4
Sperm motility	34%	28%	72%	70%	70%
C'H ₅₀ /ml	51.3	41.0	<1.0	<1.0	<1.0

C4D : C4 deficient guinea pig serum

C4 : Guinea pig C4 component

C'H₅₀: Mayer's 50% hemolytic titers

G.P. : Guinea pig

SI₅₀ は低下し、その変化は EGTA-Mg⁺⁺ 濃度並びに補体濃度に対して dose responsive な変化を示した。

Ⅲ. C4欠損 (C4D) モルモット血清及びモルモット C4 補体成分使用による精子不動化作用における補体活性経路の検討

表4に示す如く、稀釈正常モルモット血清を用いた場合、対照である非働化モルモット血清を用いた場合 (72%) に比して精子運動率は34%と低下し、明らかに不動化が起っているが C4D 血清あるいはモルモット C4 のみを単独で補体源として用いた場合の精子運動率は、対照として用いた非働化モルモット血清とはほぼ同じ値である精子運動率70%を示し、不動化は殆んど起っていない事がわかる。ところが C4D に C4 を添加したものを補体源として用いると、精子運動率は28%に低下し、精子不動化作用が回復した事は明らかである。又これらの実験において、同時に羊赤血球の溶血作用を C'H₅₀ で調べてみると、非働化モルモット血清、C4D 及び C4 のみでは全く溶血を示さなかつたのに、C4D に C4 を添加する事によりその溶血作用は正常モルモット血清における如く復元され、その傾向は精子不動化作用と平行関係を示した。

考 察

血中抗精子抗体の中でも不妊症発生と最も密接な関係を示す精子不動化抗体に関する研究は臨床面では原因不明不妊症の原因究明に手がかりを与えるのみでなく、将来精子免疫による避妊を究極の目的とした基礎的研究としても主要な研究課題となつている。著者らは精子不動化抗体の作用発

現には不可欠な補体に関する一連の実験を行い、既に、精子不動化試験における補体源としてはモルモット血清が最適であり、かつ、50%溶血単位で表現した場合に 200C'H₅₀/ml 以上の補体価を有するモルモット血清を用いることが反応感度を良くするための必要条件であることを報告してきた¹⁷⁾。新鮮モルモット血清を補体用血清として用いる場合の大きな障害因子として、ヒト精子に対しての毒性 (精子不動化作用) を示す血清が高頻度に存在する為、使用前にヒト精子に対する毒性試験を行う必要のあること、並びにこの毒性物質の検討についても既に報告した²⁾。今回、著者らは精子不動化試験に必要な補体の活性経路について検討した結果について報告した。補体活性経路には抗原抗体複合物、プラスミン等の作用で C1 が活性化され、以下、順次 C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 の反応が起る classical pathway と Pillemer et al.²⁴⁾によつて報告され、近年、著しい発展を遂げている alternate pathway の2つの経路がある。alternate pathway はコブラ毒²²⁾、Lipopolysaccharide⁹⁾、免疫プログリン²³⁾等によつて活性化され、C1, C4, C2 の関与なしに C3~C9 までの補体成分を活性化する経路である。classical pathway における補体活性化には、9つの補体成分すべてと Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ が必要不可欠であり、alternate pathway は C1, C2, C4 は不必要で、かつ Mg⁺⁺ のみで Ca⁺⁺ は必要ではないと報告されている²⁵⁾。又、従来より、classical pathway によつて補体が活性化されると考えられている羊赤血球の溶血反応においては C4 欠損モルモット血清を補体として用いた場合及び EGTA

の存在下において溶血が阻害されると報告されている⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾。又 EGTA は主に Ca^{++} のみをキレートし、 Mg^{++} にはあまり影響を与えないといわれている⁴⁾。以上の諸家の報告よりみて明らかな事は C4 欠損モルモット血清を用いた場合には classical pathway の補体活性化は起らず、alternate pathway による補体活性化のみ可能であり、又同様に正常新鮮モルモット血清中に EGTA が存在する場合にも classical pathway における補体活性化は阻害されるが、alternate pathway による補体活性化は可能と考えられる。

本論文において著者らは精子不動化抗体による補体活性経路を C4 欠損モルモット血清及び EGTA を用いて検討した。定量的精子不動化試験においては反応系に存在する EGTA の濃度が増加するに従って精子不動化抗体の定量値 (SI_{50}) が低下し、患者 I.I. serum, T.T. serum は共に 5×10^{-1} モル濃度において全く精子不動化作用が阻止された。この実験結果は、精子不動化作用の作用発現には Ca^{++} が必要であり、 Mg^{++} のみの存在下では精子不動化作用は発現しない事を示している。他方、C4 欠損モルモット血清を補体として用いて検討した結果は表 4 に示す如くであり、C4 欠損モルモット血清を補体として用いた場合には精子不動化作用が発現せず、C4 欠損モルモット血清にモルモット C4 を加えて初めて精子不動化作用が再び発現して来る事が判明した。以上の事より精子不動化抗体による補体の活性化には C4 補体成分及び Ca^{++} が必要不可欠であり、この事は精子不動化抗体による補体活性経路は classical pathway であり、alternate pathway は関与していないと考えられる。しかし、これは血中精子不動化抗体に関してであり、生殖器管内に存在する精子不動化因子における補体活性経路については今後の検討が必要である。

本研究に用いた C4 欠損モルモット血清を提供していただき、又いろいろ御指導をいただいた大阪大学医学部細菌学教室井上公蔵助教授に深謝すると共に、本研究について助言をいただいた大阪府立成人病センター細菌血清部稲井真弥部長に厚く感謝の意を表します。

文 献

1. 磯島晋三：妊孕現象に関する免疫学的研究。第23回日産婦総会宿題報告，1971。
2. 鎌田敏雄：ヒト精子不動化に關与する補体の性状及び作用機序について。四国医学雑誌，33：408，1977。
3. 香山浩二，磯島晋三：不妊婦人に存在する精子不動化抗体とその検出法。ホルモンと臨床，24：617，1976。
4. Bryant, R.E. and Tenkins, D.E. Jr.: Calcium requirements for complement dependent hemolytic reactions. J. Immunol., 101: 664, 1968.
5. Ehrnst, A.: Separate pathways of C activation by measles virus cytotoxic antibodies; Subclass analysis and capacity of F(ab) molecules to activate C via the alternative pathway. J. Immunol., 121: 1206, 1978.
6. Fine, D.P., Marney, S.R. Jr., Colley, D.G., Sergeant, J.S. and Des Prez, R.M.: C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. J. Immunol., 109: 807, 1972.
7. Franklin, R.R. and Dukes, C.D.: Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. Am. J. Obstet. Gynecol., 89: 6, 1964.
8. Friberg, J.: A simple and sensitive micro-method for demonstration of sperm agglutinating activity in serum from infertile men and women. Acta Obstet. Gynecol. Scand., Suppl., 36: 21, 1974.
9. Gewurz, H., Shin, H.S. and Mergenhagen, S.E.: Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide; Consumption of each of the six terminal complement components. J. Exp. Med., 128: 1049, 1968.
10. Hamerlynck, J. and Rümke, P.: A test for the detection of cytotoxic antibodies to spermatozoa in men. J. Reprod. Fert., 17: 191, 1968.
11. Hicks, J.T., Klutch, M.J., Aibrecht, P. and Frank, M.M.: Analysis of complement-dependent antibody mediated lysis of target cells acutely infected with measles. J. Immunol., 117: 208, 1976.
12. Isojima, S., Li, T.S. and Ashitaka, Y.: Immunological analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained infertility. Am. J. Obstet. Gynecol., 101: 677, 1968.
13. Isojima, S., Tsuchiya, K., Koyama, K., Tanaka, C., Naka, O. and Adachi, H.: Further studies on sperm immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women. Am. J. Obstet. Gynecol., 112: 199, 1972.

14. *Isojima, S., Tsuchiya, K. and Koyama, K.*: Antibodies against spermatozoa found in woman and corresponding antigens in human semen. *Immunology in Obstetrics and Gynecology, Excerpta Medica, Padua*, 55, 1973.
15. *Isojima, S., Koyama, K. and Tsuchiya, K.*: The effect on fertility in women of circulating antibody against human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 21 Suppl.: 125, 1974.
16. *Isojima, S. and Koyama, K.*: Quantitative estimation of sperm immobilizing antibody in the sera of women with infertility of unknown cause, 1st International Congress on Human Reproduction, Rio de Janeiro, Brazil, 1974.
17. *Kamata, T., Ikuma, K., Koyama, K. and Isojima, S.*: Standardization of complement in the sperm immobilization test, IXth World Congress of Fertility and Sterility, Miami, U.S.A., 1977.
18. *Kibrick, S., Belding, D.L. and Merrill, B.*: Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 3: 430, 1952.
19. *May, J.E. and Frank, M.M.*: Hemolysis of sheep erythrocytes in guinea pig serum deficient in the forth component of complement; I. Antibody and serum requirements. *J. Immunol.*, 111: 1661, 1973.
20. *May, J.E. and Frank, M.M.*: Hemolysis of sheep erythrocytes in guinea pig serum deficient in the forth component of complement: II. Evidence for involvement of C1 and components of the alternate complement pathway. *J. Immunol.*, 111: 1668, 1973.
21. *Mayer, M.M.*: Complement and complement fixation; In *experimental immunochemistry* (Kabat, E.V. and Mayer, M.M. editor), 2nd edition, C.C. Thomas, Springfield, 133, 1961.
22. *Müller-Eberhard, H.J. and Fjellström, K.E.*: Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. *J. Immunol.*, 107: 1666, 1971.
23. *Osler, A.G., Oliveira, B., Shin, H.S. and Sandberg, A.L.*: The fixation of guinea pig complement by r_1 and r_2 immunoglobulins. *J. Immunol.*, 102: 269, 1969.
24. *Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Wardlaw, A.C.*: The properdin system and immunity; Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120: 279, 1954.
25. *Sandberg, A.L. and Osler, A.G.*: Dual pathways of complement interaction with guinea pig immunoglobulins. *J. Immunol.*, 107: 1268, 1971.
26. *Sober, H.A. and Peterson, E.A.*: Protein chromatography on ion exchange cellulose. *Fed. Proc.*, 17: 1116, 1958.

(No. 4511 昭54・3・6 受付)