

原因不明不妊症における精子・リンパ球 混合培養試験とその意義

新潟大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 竹内正七教授)

吉 沢 浩 志

Mixed Culture of Sperm and Lymphocyte in Infertility with Unexplained Cause and its Clinical Implications

Hiroshi YOSHIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University Medical School, Niigata

(Director: Prof. Shoshichi Takeuchi)

概要 原因不明不妊症に免疫的因子の関与するものが存在するか否かを検索する目的で、原因不明不妊症婦人32名、経産婦人16名および未婚婦人47名に精子・リンパ球混合培養試験を行い、以下の結果を得た。

1) 原因不明不妊症婦人、経産婦人および未婚婦人の donor 精子に対する stimulation index (S.I.) は、それぞれ 2.51 ± 1.08 , 2.25 ± 0.79 , 1.96 ± 0.71 であり、未婚婦人の精子に対する反応は他の2群に比較して有意に低かった ($p < 0.01$)。

2) 原因不明不妊症婦人および経産婦人の夫精子に対する S.I. は、それぞれ 2.96 ± 1.43 , 2.44 ± 1.24 であつたが、その間に有意差はなく、また両群の夫精子と donor 精子に対する反応との間にも有意差を認めなかつた。

3) 原因不明不妊症婦人32名のうち14名に妊娠の成立をみた。妊娠非成立の18名と2群に分けて retrospective に、その夫精子および donor 精子に対する S.I. をみると、妊娠成立群では 2.82 ± 1.33 , 2.71 ± 1.25 , 妊娠非成立群では、 3.07 ± 1.50 , 2.35 ± 0.87 であつたが、両群とも夫精子と donor 精子に対する反応の間にも有意差はなく、また両群の夫精子に対する反応の間にも有意差を認めなかつた。

4) 原因不明不妊症婦人、経産婦人および未婚婦人の PHA に対する S.I. は、それぞれ 11.2 ± 4.19 , 9.94 ± 2.38 , 9.23 ± 3.07 であり、原因不明不妊症婦人の反応は未婚婦人に比較して有意に高かつた ($p < 0.05$)。

5) 同時に行つた原因不明不妊症夫婦24組の細胞障害性試験で2例 (8.3%) の陽性例があつたが、2例とも妊娠成立をみた。

以上のことから既婚婦人では、リンパ球はある程度精子に感作された状態にあり、原因不明不妊症婦人では非特異的免疫能が亢進した状態にあることがうかがわれたが、原因不明不妊症婦人が夫精子に強く感作されているために、その妊孕性が障害されていると考えさせられる証拠は得られなかつた。

Synopsis Mixed culture of sperm and lymphocytes were performed in the samples of 32 infertile couples with unexplained cause, 16 couples with proven fertility and 47 virginal women in order to investigate the role of cellular-immunologic factors in infertility.

1) The means of stimulation index (S.I.) and the standard deviation in mixed cultures with donor's sperm were, 2.51 ± 1.08 in infertile, 2.25 ± 0.79 in fertile and 1.96 ± 0.71 in virgin group. The S.I. of the virgin group was significantly lower ($p < 0.01$) than that of the other two groups.

2) The means of S.I. in mixed cultures with husband's sperm were, 2.96 ± 1.43 in infertile and 2.44 ± 1.24 in fertile women. There was no significance in the S.I. of these two groups.

3) It was found during two years' prospective observation that 14 of 32 unexplainedly infertile couples achieved pregnancy. Retrospective analysis disclosed that there was no significant difference between pregnant and non-pregnant groups, when S.I. with husband's sperm were compared. Neither, no difference between S.I. with husband's sperm and donor's sperm was revealed in non-pregnant group.

In conclusion, no evidence was obtained that unexplainedly infertile women, as a group, were suffered from immunologic factors.

Key words: Mixed sperm-lymphocyte culture • Unexplained infertility • Lymphocyte blastogenesis • Cellular-immunologic factors • Sperm antigens

緒言

不妊症研究に免疫学的アプローチが行われて以来、数多くの興味ある知見が報告されている。原因不明不妊症婦人に血清精子抗体が高率に証明されるという報告は多く³⁾⁶⁾、不妊症の原因として免疫的因子の関与する可能性が指摘されている。

しかし、これまでは精子凝集試験や⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾精子不動化試験¹⁾⁴⁾¹²⁾¹³⁾などによる液性因子の面からの研究が主であり、細胞性免疫の面からの研究は数も少なく、またその成績も報告者によつて異なり、一致した見解は得られていない現状にある。

ヒト精子細胞膜には HLA が haploid の形で表現されているという報告⁷⁾⁸⁾があり、精子にも組織適合性抗原が存在することはほぼ確実である。

そこで今回は、原因不明不妊症の免疫学的研究の一方法として、精子・リンパ球混合培養試験を行い、対照群と比較検討し、さらに一定期間観察後の妊娠成立の有無との関係について prospective に解析したので報告する。

なお原因不明不妊症とは、男女両性の総合検査で特に不妊原因が明らかでないものを意味し、機能性不妊と同義なものである。つまり日常ルチンに行っている検査のうち、女性側では、1) 黄体機能不全の有無も含めて基礎体温曲線の正常なもの、2) 内分泌的異常のないもの、3) 子宮卵管造影法で何らの異常も認めないもの、4) 子宮内膜日付診の正常なもの、5) 排卵期の頸管粘液検査が正常(量0.2ml以上、牽糸性10cm以上、シダ状結晶形成良好)なものをすべて満足すること、および男性側では精液検査所見正常(量2.0ml以上、数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率60%以上、奇形率20%以下)である夫婦を、本研究における原因不明不妊症夫婦とした。

研究対象および研究方法

1. 研究対象

昭和51年12月から昭和53年2月までの当科不妊外来受診者のうち、原因不明不妊症と診断され、協力を得られた夫婦32組を対象とし、経産夫婦(1年以上非妊期間のあるもの)16組および未産婦人47名を対照とした。

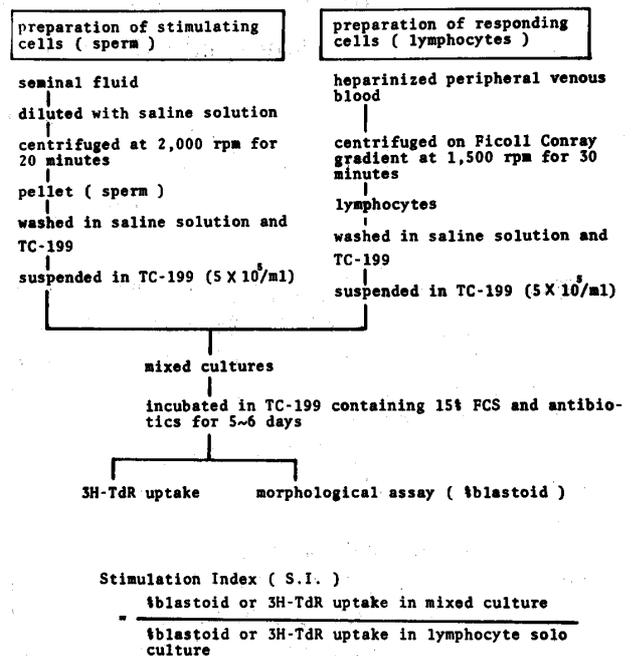
また精液所見の正常な健常男子 donor 11名より精液を採取した。

2. 研究方法

1) 精子・リンパ球混合培養試験

末梢血リンパ球を反応細胞とし、新鮮精子を刺激細胞とし、精子・リンパ球混合培養試験を行った。実験の概略を図1に示した。

図1 Methods



a. 反応細胞

ヘパリン加末梢静脈血より Ficoll-Conray (比重1.078)を利用した比重遠心法にてリンパ球を分離した。分離リンパ球を生食水で1回、TC-199(千葉血清)で2回洗浄し、TC-199中に最終濃度 $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう調整した。

b. 刺激細胞

各群の夫および健常男子 donor より用手法にて採取した新鮮精液1mlを生食水で10倍に稀釈し、十分にピペティングした後2,000rpm, 20分間遠心して得られた精子を、さらに生食水で1回、TC-199で2回洗浄し、TC-199中に最終濃度 $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう調整した。

c. 混合培養

形態学的幼若化率判定法の場合には培養用丸底試験管にリンパ球、精子浮遊液各々1mlを、3H-

TdR uptake による幼若化率判定法の場合には各々0.1mlをマイクロプレート (Falcon 3,040) の well に注入し, 非働化 FCS (DIBCO) を最終濃度15%となるよう添加し, 炭酸ガス培養器 (CO₂ 濃度5%, 37°C) 中で5~6日間静置培養した。なお, culture medium TC-199には抗生物質 (PC 200単位/ml, SM 0.2mg/ml) を添加した。

d. 幼若化率判定法

リンパ球の幼若化反応は形態学的, ないし³H-TdR uptake によつて判定した。

形態学的判定は培養終了前に0.005% コルヒチン0.2ml/mlを添加し, さらに3時間培養し, 0.075M KClによる低張処理, カルノア固定を行い, 塗抹標本を作製し, May-Giemsa 染色を行つた。顕微鏡下でリンパ球500個を数え, 核分裂像ないし核径10μ以上の核を有する細胞を幼若化リンパ球として幼若化率を求めた。

³H-TdR uptake は培養終了前に³H-TdR, 0.6 μCi/well を加え, さらに12時間培養しラベルを行つて, semiautomatic cell harvester (Laboscience社製) にて harvester filter 上に細胞を吸着, 乾燥後, scintillation fluid (トルエン, 1L, PPO 5g, POPOP 0.1g) 8ml を含むカウント用 vial に移し, scintillation counter (Aloka社, LSC 602) にて放射能活性を測定した。

培養はすべて duplicate で行い, その平均値をもつて幼若化率とし, それぞれの混合培養における平均値とリンパ球単独培養における平均値との比をもつて stimulation index (S.I.) とし, 結果の検討を行つた。

stimulation index (S.I.) =

$$\frac{\% \text{ blastoid or } ^3\text{H-TdR uptake (cpm) in mixed culture}}{\% \text{ blastoid or } ^3\text{H-TdR uptake (cpm) in lymphocyte solo culture}}$$

2) 細胞障害性試験

Falcon micro-test plate を用いて micro lymphocyte cytotoxicity test を行つた。

各 well に妻血清1μl および夫リンパ球浮遊液 (1.5~2×10⁶/ml) 1μl を加え, 30分間室温に放置した後, 吸収家兎新鮮血清を補体として5μl 加

え, さらに60分間室温に放置。その後5%エオジン水溶液2μlを加え, 2~5分後にホルマリン (pH7.0) 3μlを加えて, 位相差顕微鏡で判定した。判定の基準は死滅リンパ球比率40%以上を陽性とした。

研究成績

1. 精子・リンパ球混合培養試験

1) 基礎実験

予備実験として, リンパ球と精子との至適混合細胞数比および至適培養日数を検討した (図2, 3)

混合細胞数比はリンパ球数を5×10⁵/mlとし, 精子数0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50×10⁵/mlとして, 培養日数5日間で比較検討した結果, 精子数5×10⁵/ml, すなわち混合比1:1で反応の peak が得られた。

培養日数は1, 3, 4, 5, 6, 7, 8日間培養を行つて比較検討した結果, 5~6日に反応の peak が得られた。

以上のことから, 精子・リンパ球混合培養試験

図2 Mixed cultures of sperm and lymphocytes

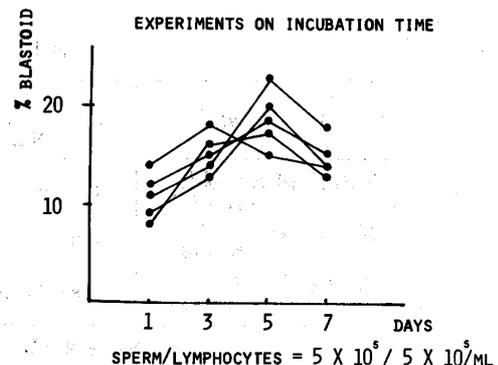
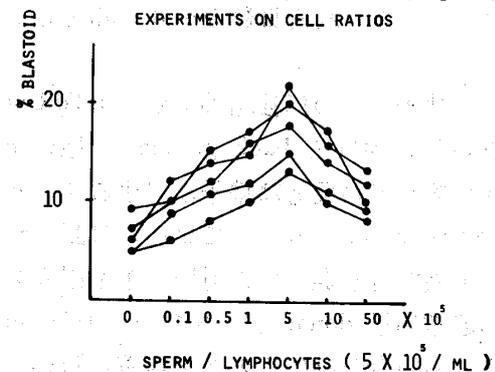
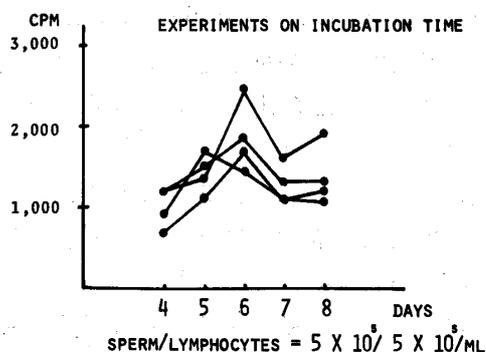
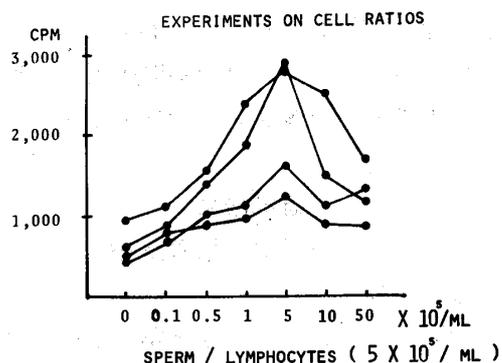


図3 Mixed cultures of sperm and lymphocytes



は混合比1:1, 培養日数5~6日間として行つた。

なお、精子のみの単独培養での³H-TdR uptakeは本実験系におけるback groundと大差なく、この混合培養での反応は精子に対するリンパ球のone way reactionとみなしてよいと判断した。

また実験を行う際には、対照の未婚婦人2~3名と、健常男子donor 2~3名の精子をsetし、それぞれの組み合わせによる混合培養を行い、さらにPHA添加培養も併せて行つた。

2) donor 精子に対する反応

原因不明不妊症婦人(32名)、経産婦人(16名)、未婚婦人(47名)において、donor(11名)精子に対するat randomな組み合わせによる反応は、それぞれS.I.として 2.51 ± 1.08 , 2.25 ± 0.79 , 1.96 ± 0.71 であつた(表1)。

未婚婦人のS.I.は他の2群のS.I.に比較し、有意に低い値であつた($p < 0.01$)。原因不明不妊症婦人のS.I.と経産婦人のS.I.との間に有意差はなかつた。

3) 夫精子に対する反応

原因不明不妊症婦人(32名)および経産婦人(16名)において、その夫精子に対する反応は、それぞれS.I.として、 2.96 ± 1.43 , 2.44 ± 1.24 であつた(表2)。

原因不明不妊症婦人は夫精子に対してやや高い反応を示したが、経産婦人の夫精子に対する反応との間に有意差はなかつた。

また原因不明不妊症婦人および経産婦人の夫精子に対する反応とdonor精子に対する反応(表1)を比較すると、両群とも夫精子に対してやや高い反応を示しているが、有意差はなかつた。

4) 原因不明不妊症婦人におけるその後の妊娠成立の有無とS.I.との関係

昭和54年10月までに、研究対象とした原因不明不妊症夫婦32組のうち14組に妊娠の成立をみた。そこで14名の妊娠成立群と、いまだ妊娠成立をみない18名の妊娠非成立群とに分けて、夫精子およびdonor精子に対する反応をretrospectiveに比較すると、妊娠非成立群では夫精子に対するS.I.は 3.07 ± 1.50 、donor精子に対するS.I.は $2.35 \pm$

表1 Donor 精子に対する反応

対 象	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean \pm S.D.	
原因不明不妊症婦人 (N=32)	1 ~6 (n=98)	2.51 ± 1.08	} N.S. } } P<0.01 } P<0.01
経 産 婦 人 (N=16)	1.3~5 (n=53)	2.25 ± 0.79	
未 婚 婦 人 (N=47)	0.8~5 (n=184)	1.96 ± 0.71	

N: 対象例数 n: 培養の組み合わせ数

N.S.: not significant

表2 夫精子に対する反応

対 象	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean±S.D.	
原因不明不妊症婦人 (N=32)	1.1~7.6 (n=32)	2.96±1.43	} not significant
経産婦人 (N=16)	1.1~4.5 (n=16)	2.44±1.24	

N: 対象例数 n: 培養の組合わせ数

表3 妊娠成立群と非成立群における夫精子に対する反応

対 象	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean±S.D.	
妊娠成立群 (N=14)	1.1~5 (n=14)	2.82±1.33	} not significant
妊娠非成立群 (N=18)	1.3~7.6 (n=18)	3.07±1.50	

N: 対象例数 n: 培養の組合わせ数

表4 妊娠成立群と非成立群における donor 精子に対する反応

対 象	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean±S.D.	
妊娠成立群 (N=14)	1~5.5 (n=45)	2.71±1.25	} not significant
妊娠非成立群 (N=18)	1~4 (n=53)	2.35±0.87	

N: 対象例数 n: 培養の組合わせ数

表5 PHA に対する反応

対 象	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean±S.D.	
原因不明不妊症婦人 (N=32)	3.9~18.3	11.2±4.19	} N.S. } } N.S. } P<0.05
経産婦人 (N=16)	7 ~15	9.94±2.38	
未婚婦人 (N=47)	4.3~16.3	9.23±3.07	

N.S.: not significant

0.87であつたのに対して、妊娠成立群ではそれぞれ2.82±1.33, 2.71±1.25であつた(表3, 4).

妊娠非成立群における夫精子に対する反応は donor 精子に対する反応より高い値を示したが、有意差はなかつた。また、妊娠成立群と妊娠非成立群の夫精子に対する反応の間にも有意差はなかつた。

5) PHA に対する反応

原因不明不妊症婦人(32名)、経産婦人(16名)および未婚婦人(47名)において、そのリンパ球

の PHA に対する反応は、PHA 非添加培養との比としてそれぞれ11.2±4.19, 9.94±2.38, 9.23±3.07であつた(表5)。

原因不明不妊症婦人は未婚婦人に比較して有意に高い反応を示した(p<0.05)が、経産婦人との間では有意差はなかつた。また経産婦人と未婚婦人との間の比較では有意差はなかつた。

6) 健常男子の各種精子に対する反応

精液所見の正常な健常男子10名について、自己精子、他人精子および3~4名の pool した精

表6 健常男子10名における各種精子に対する反応

精 子	Stimulation index		有 意 性
	Range	Mean±S.D.	
自 己 精 子	1.3~2.8 (n=10)	1.84±0.45	} P<0.05 } } N.S. } P<0.05
他 人 精 子	1.4~4 (n=24)	2.37±0.65	
Pooled 精 子	1.3~4.5 (n=10)	2.90±1.02	

n: 培養の組合わせ数

N.S.: not significant

子に対する反応は、それぞれ S.I. として1.84±0.45, 2.37±0.65, 2.90±1.02であつた(表6).

自己精子に対する反応は、他の2種の精子に対する反応より有意に低い反応を示した(p<0.05). 他人精子と pool した精子に対する反応との間には有意差はなかつた.

2. 細胞障害性試験

原因不明不妊症夫婦32組のうち24組に、細胞障害性試験を行つた. その結果、陽性例は2例(8.3%)であつた. その2例の妻および夫の HLA-typing は、1例が妻 A9, BW21, 夫 A2, A11, BW27, 他の1例は妻 A9, B5, 夫A9, BW21, B7であつた. 精子・リンパ球混合培養試験における S.I. は、それぞれ1.1, 3.3であつた(表7).

表7 細胞障害性試験陽性例

症 例	HLA-typing		夫精子に対する S.I.
	妻	夫	
Y. I.	A9, -, BW21, -	A2, A11, BW27, -	1.1
M. A.	A9, -, B5, -	A9, -, B7, BW21	3.3

陽性率 2/24 (8.3%)

考 案

当科不妊外来の臨床統計(昭和49年1月~昭和51年12月)では、日常ルチーンの検査で夫婦ともに異常を指摘し得ない、いわゆる原因不明不妊症夫婦の頻度は17.0%を占めている⁵⁾.

これら原因不明の不妊症の中に免疫的因子の関与するものがあるかも知れないと考え、当教室では不妊症の免疫学的研究が主として精子免疫の観点から精力的に進められてきた.

著者らは細胞性免疫の面からのアプローチを行つているが、従来不妊症分野での細胞性免疫学的

研究は散発的であつた.

たとえばリンパ球混合培養試験(MLC)¹⁶⁾¹⁸⁾, マクロファージ遊走阻止試験(MIT)¹⁵⁾, 白血球遊走阻止試験(LIT)¹⁹⁾, 白血球付着阻止試験(LAI)²⁰⁾ および精子・リンパ球混合培養試験²⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁷⁾²¹⁾などが行われ、不妊症と細胞性免疫反応との関係が論じられているが、まだ一致した見解は得られていない.

しかし、いずれの方法においても妻リンパ球の夫側抗原(リンパ球あるいは精子)に対する反応を検索していることになるが、精子を用いる場合、その処理方法がそれぞれ異なつているため、成績の評価は慎重に行わなければならない.

精子にもリンパ球をはじめとした、あらゆる有核細胞に存在する組織適合性抗原が存在しており、HLAがhaploidの形で表現されていることや、HLA-D抗原の存在することが報告されている. また精子特異抗原の存在も指摘されている.

精子に存在する抗原の詳細な分析については、なお検討すべき多くの問題が残されているが、抗原が存在するとすることには異論はないと考えられる.

今回の研究では、刺激細胞として新鮮洗浄精子を、反応細胞として妻リンパ球を用いて、原因不明不妊症夫婦において精子・リンパ球混合培養試験を行い、リンパ球の幼若化率を測定することによつて妻側の夫精子に対する反応を検討した.

精子・リンパ球混合培養試験における3H-TdR uptakeは、リンパ球混合培養試験におけるそれに比較して低く、新鮮洗浄精子のリンパ球刺激能はあまり強くなく、精子表面に表現される抗原は量的または質的に弱いものと推測される.

原因不明不妊症婦人における夫精子に対する反応は、donor 精子に対する反応よりやや高い反応を示したが、有意差はなく、経産婦人においても同じ傾向であった。

また原因不明不妊症と診断された32組の夫婦のうち、約2年間の経過観察期間中、14組に妊娠の成立をみたが、残り18組の妊娠非成立群における夫精子と donor 精子に対する反応を比較しても、やはり全体として同じ傾向を示すものの有意差は認められなかった。

細胞障害性試験において陽性を示した2例は、ともに妊娠の成立をみており、教室の須藤らの行っている精子凝集試験、精子不動化試験の結果と照らしてみても、精子・リンパ球混合培養試験の S.I. との間に相関関係を認めなかった。

以上のことから、原因不明不妊症婦人が夫精子に強く感作されているために、その妊孕性が障害されていると考えさせられる証拠は得られなかった。

未婚婦人の donor 精子に対する反応は、既婚婦人である他の2群の donor 精子に対する反応より有意に低く、これは既婚婦人では精子に存在する抗原に、リンパ球がある程度感作された状態にあることを示唆するものと考えられる。

原因不明不妊症婦人における夫精子に対する反応を不妊期間の長さとの関係でみると、不妊期間2年まででは、その S.I. は 2.11 ± 0.75 ($N=6$)、3~4年では 3.35 ± 1.77 ($N=16$)、5~8年では 2.79 ± 0.81 ($N=8$)、9年以上では 3.1 ($N=2$) であり、不妊期間が長くなるにつれて精子に対する反応が高くなる傾向がうかがわれたが、これらの間に有意差はなかった。

non-specific な mitogen である PHA に対する反応は、原因不明不妊症婦人において高く、とくに未婚婦人との間に有意差を認めた。このことは原因不明不妊症婦人では非特異的免疫能が亢進した状態にあることを示唆しているが、その意義は現時点では不明である。

また健常男子10名における自己精子、他人精子および pool した精子に対する反応では、自己精

子に対する反応が他の2種の精子に対する反応より有意に低い。このことは精子には精子特異抗原以外の、たとえば組織適合性抗原などが存在していることを示唆するものと考えられる。

さらに自己の精子に対しても未婚婦人と同程度の反応を示したことから、精子には精子としての特異抗原が存在していることも示唆していると考えられる。

今回の研究では、原因不明不妊症夫婦間のリンパ球混合培養試験を併せて行っていないため、リンパ球の精子に対する反応が組織適合性の違いをそのまま表現しているか否かについては不明である。

この稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました竹内正七教授に心よりお礼申し上げます。また、直接御指導をいただきました金沢浩二講師に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第23回日本不妊学会総会(1978年、東京)にて発表した。

文 献

1. 磯島晋三：妊孕現象に関する免疫学的研究。第23回日産婦学会総会宿題報告，1971。
2. 繁田 実，香山浩二，磯島晋三：細胞性精子免疫に関する研究。血中精子不動化抗体保有不妊婦人における mixed sperm-lymphocyte reaction。日産婦誌，31：755，1979。
3. 須藤寛人，森田和雄，吉沢浩志，高橋 威，竹内正七：原因不明不妊症患者における血清精子抗体の検索。日産婦誌，30：685，1978。
4. 須藤寛人，森田和雄，吉沢浩志，竹内正七：当科で行う精子抗体の検索手技について。日産婦新潟地方部会誌，10：63，1977。
5. 須藤寛人，森田和雄，吉沢浩志，高橋 威，竹内正七：当科不妊外来患者の臨床統計。日産婦新潟地方部会誌，11：5，1977。
6. 竹内正七，高橋 威：受精と免疫。代謝，13：1593，1976。
7. Arnaiz-Villena, A. and Festenstein, H.: HLA genotyping by using spermatozoa: Evidence for haploid gene expression. Lancet, October, 2: 707, 1976.
8. Fellous, M. and Dausset, J.: Probable haploid expression on HL-A antigens on human spermatozoon. Nature, 225: 191, 1970.
9. Franklin, R.R. and Dukes, C.D.: Antispermatozoal antibody and unexplained infertility. Am. J. Obstet. Gynecol., 89: 6, 1964.

10. *Friberg, J.*: A simple and sensitive micro-method for demonstration of spermagglutinating activity in serum from infertile men and women. *Acta. Obstet. Gynec. Scand. Suppl.*, 36: 21, 1974.
11. *Husted, S., Thestrup-Pederson, K. and Hjort, T.*: Lymphocyte-transformation test with spermatozoal antigens in men from infertile couples. II. Clinical studies. *Int. J. Fertil.*, 21: 57, 1976.
12. *Isojima, S., Li, T.S. and Ashitaka, Y.*: Immunologic analysis of sperm immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101: 677, 1968.
13. *Isojima, S., Tsuchiya, 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. *Masson, D., Wesener, G., Krebs, D. and Lehmann, F.*: Blastoid transformation of lymphocytes in response to spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 21: 171, 1976.
15. *Mettler, L. and Schirwani, D.*: Macrophage migration inhibitory factor in female sterility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 121: 117, 1975.
16. *Meyer, H.G., Laurser, B., Lundsgaard, A. and Heron, I.*: Mixed lymphocyte culture responses in infertile couples. *Int. J. Fertil.*, 22: 110, 1977.
17. *Mumford, D.M., Barsales, P.B., Ball, K.D. and Gordon, H.L.*: Microlymphocyte transformation studies with seminal antigen. 1. Technique and patterns of responsiveness to autologous and allogeneic semen from normal and infertile male subjects. *J. Urol.*, 105: 858, 1971.
18. *Ohama, K. and Kadotani, T.*: Lymphocyte reaction in mixed wife-husband leukocyte cultures in relation to infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109: 477, 1971.
19. *Tait, B., Barrie, J.V., Johnston, I. and Morris, P.J.*: Cellular immunity to lymphocyte antigens in human infertility. *Fertil. Steril.*, 27: 389, 1976.
20. *Timothy, K.R., Aloys, G.T.-O., Dorsman, B.G., Hall, R. and Lewins E.*: Immunological influence on human fertility. 271, Academic press, 1977.
21. *Tyler, A., Tyler, E.T. and Denny, P.C.*: Concepts and experiments in immunoreproduction. *Fertil. Steril.*, 18: 159, 1967.

(No. 4719 昭55・6・6 受付)