



男性不妊と亜鉛に関する基礎的研究

岡, 伸俊

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-10-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0698

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000698>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	岡 ^{おか} 伸 ^{のぶ} 俊 ^{とし} (岡山県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第558号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和62年10月15日
学位論文題目	男性不妊と亜鉛に関する基礎的研究

審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫
	教授 住 野 公 昭 教授 岩 井 誠 三

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

近年、亜鉛は特に生体の必須元素としての役割が注目されるようになり、各臓器や組織と亜鉛に関する臨床的研究が増加しつつある。

精漿中亜鉛の生理学的意義についても数多くの研究がみられるが、亜鉛と精子運動能については、亜鉛が精子運動性に促進的に作用するとするもの、また抑制的に作用するとの報告があり、いまだ統一された見解のないのが現状である。そこで、精漿中亜鉛と精子運動能を中心とする精子パラメータとの関連、特に生理的活性型とされる蛋白非結合亜鉛としての限外濾過性亜鉛と精子パラメータとの関連を検討した。さらに、ゲル濾過法にて低分子物質結合亜鉛を精製し、ゲルクロマトグラフィーおよび Gas Chromatography/Mass Spectrometry によりそれがクエン酸亜鉛であることを同定した。また、精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を添加し、精子運動能の変化を検討した。

対象と方法

原則として配偶者が妊娠中あるいは児を得てから1年以内の妊孕性を有する正常男性41名および神戸大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来を受診した不妊期間が1年以上で、配偶者に産婦人科的異常を認めない男性不妊患者67名である。精子パラメータとして精子濃度、精子運動率および平均運動速度を当科にて開発したマイクロコンピュータを用いた自動精液検査装置 (Bilevel Picture Processing system, BPP system)、精子奇形率は精液塗抹の Papanicolaou 染色標本、精子アクロシン活性は BAEE/ADH 法、精子侵入試験 (sperm penetration assay; SPA) は透

明帯除去ハムスター卵を用いて算定・測定された。精漿中亜鉛およびマグネシウム濃度は原子吸光法にて測定された。蛋白非結合亜鉛として、限外濾過法により精漿30検体の限外濾過性亜鉛を分離、亜鉛濃度を測定し、精子パラメータと精漿中亜鉛濃度および限外濾過性亜鉛との関連を検討した。次に、水素化ホウ素ナトリウムで処理した Sephadex G-25を用いたゲル濾過法により、試料として精漿および限外濾過液、対照としてクエン酸亜鉛、ピコリン酸亜鉛および塩化亜鉛を分析した。それぞれの溶出液について蛋白質量および亜鉛濃度が測定された。ゲル濾過法により精製された低分子物質結合亜鉛および対照としてクエン酸亜鉛を5%塩酸トリメチルアルコールにてメチルエステル誘導体とし、Gas Chromatogram/Mass Spectrometry (GC/MS)にて分析した。さらに、亜鉛の精子運動能に対する効果を検討するため、洗浄精子浮遊液、精管精巢上体精子浮遊液および精子無力症患者精液に対し、各種濃度のクエン酸亜鉛溶液を添加し、精子運動能の変化を経時的に BPP system を用いて測定した。

結 果

1) 対象とした正常男性と男性不妊患者群との間には精子濃度、運動率、平均運動速度、奇形率およびSPAに有意差 ($P < 0.05$) がみられたが、精漿中亜鉛およびマグネシウム濃度には有意差は認めなかった。2) 今回の全対象を精漿中亜鉛濃度の平均値 $141 \mu\text{g/ml}$ より高濃度と低濃度の2群に分け、それらの各種精子パラメータを比較検討した。その結果、精漿中亜鉛濃度とマグネシウム濃度との間のみ正の相関 ($r = 0.81$, $P < 0.01$) を認めた。3) 限外濾過性亜鉛を測定した30検体の平均値は $73 \mu\text{g/ml}$ であり平均値よりも高濃度と低濃度の2群に分け、各種精子パラメータを対比すると、平均運動速度が前者において有意 ($P < 0.05$) に高く、精漿中亜鉛濃度と平均運動速度との間に正の相関 ($r = 0.434$, $P < 0.05$) を認めた。4) Sephadex G-25を用いた精漿のゲルクロマトグラムの溶出パターンでは、亜鉛濃度は $V_e/V_o = 1.15$ と $V_e/V_o = 1.64$ の2峰性のピークを示し、高分子物質結合亜鉛と低分子物質結合亜鉛の存在が示唆され、対照とした亜鉛化合物の溶出パターンと対比すると、低分子物質結合亜鉛は $V_e/V_o = 1.64$ でクエン酸亜鉛のピークと一致した。このことから、精漿中低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛であることが強く示唆された。ゲル濾過に精製された低分子物質結合亜鉛とクエン酸亜鉛のメチルエステル誘導体はGCで保持時間が一致し、MSで M^+ として $m/z 234$ はじめ、クエン酸トリメチルエステルに特徴的とされている $(M - \text{COOH}_3)^+$ のフラグメントイオンが $m/z 175$ に観察され、開裂様式も合致したことから、亜鉛結合低分子物質はクエン酸と同定された。5) クエン酸亜鉛添加による洗浄射出精子に対する精子運動能の変化は亜鉛添加群とコントロール群との間に有意差はなかった。精管精巢上体精子は全例において精子鞭毛の微弱な振幅を認めるのみで、前進性運動精子を得ることはできず、亜鉛の添加によっても変化はなかった。精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を 2 mM 添加したところ、亜鉛添加群ではコントロール群に比し、1時間目において平均運動速度が有意 ($P < 0.05$) の増加し、その後も良好に保たれていた。なお、症例ごとに亜鉛添加前の精漿中亜鉛濃度と精子運動能との変化を検討したところ、精漿中亜鉛濃度が低い検体ほど添加したクエン酸亜鉛によく反応する傾向がみられた。

考 察

生体における亜鉛の機能は主に触媒作用であり、各種酵素の活性に重要な役割を果たしていると考えられている。男性不妊における亜鉛の臨床的意義としては、精漿中亜鉛濃度が前立腺分泌機能の一つの指標とされている、また、精漿中亜鉛と精子機能については、精子運動能との関連、精子細胞膜の安定化、精子アクロシン活性の抑制などについて検討されているが、とくに精子運動能に関しては、統一された見解がないのが現状である。われわれは、精漿中亜鉛に関する一連の基礎的研究を行い、2, 3, の興味ある知見を得た。

精漿中亜鉛濃度と精子パラメータとの関連は古くより検討され、とくに亜鉛が精子運動性に促進的作用するとするもの、逆に抑制的に作用するとする報告もある。しかし、これらの報告は精子運動能を肉眼的観察により評価していることから施設間による成績にばらつきがあり、客観性に乏しいこと、また多くは蛋白結合・非結合型亜鉛の違いについて検討されていないことなどが原因と思われる。そこで、われわれは、当科にて開発された BPP system にて精子運動能（精子運動率、平均運動速度）を客観的に評価することにより、生理的活性型とされる蛋白非結合亜鉛（限外濾過性亜鉛）と平均運動速度との間に正の相関関係があることを初めて明らかにし、限外濾過性亜鉛濃度は精子運動能に関する marker になり得ることを明らかにした。このことから、蛋白非結合亜鉛を同定することが重要であると考えた。Bournsnell らや Arver は精漿中低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛であるとしているが、これはゲルクロマトグラムや Scanning spectrometry によりクエン酸亜鉛と一致することから推測されたものである。われわれは、低分子物質結合亜鉛をゲル濾過法にて精製し、試料および対照としてクエン酸亜鉛をメチルエステル誘導体として GC/MS にて分析し、クエン酸亜鉛であることを初めて同定した。

精子運動能における亜鉛の生理学的意義を検討するために洗浄射出精子、精管精巢上体精子および精子無力症患者に対するクエン酸亜鉛の効果を BPP system を用いて客観的に評価した。Saito らはイヌ射出精子は精管精巢上体精子よりも高い運動性を示すことから、亜鉛含量の少ない精管精巢上体精子に亜鉛を0.02mM 程度添加し、その運動性が高められたと報告している。しかし、ヒト射出洗浄精子について検討したわれわれの結果では、亜鉛添加により精子運動能に変化はみられなかった。精管精巢上体精子については、採取標本内に前進性運動を有する精子がみられず、また、亜鉛の添加によっても前進性運動精子を得られなかった。このことに関して、Lindholmer はヒト精管精巢上体精子は鞭毛運動は認めるが前進性運動は欠如しているとし、精管精巢上体精子浮遊液に少量の精漿あるいはアルブミンを添加することにより精子は直ちに前進性運動を獲得したと報告している。精液の希釈のし過ぎは、精子の生存性に対するのみならず、その運動性にも悪影響を及ぼすとされ、本実験における洗浄射出精子および精管精巢上体精子浮遊液では、完全に精漿因子が除去され、希釈に対する保護効果を有するとされているアルブミンが含まれていないため精子生存性および運動性に悪影響をもたらした結果、運動性が得られなかった可能性が推察された。そこで、精子無力症患者の射出精液に直接クエン酸亜鉛溶液を、対照としてクエン酸溶液を添加した。亜鉛添加群において運動能が促進されたことから、亜鉛と他の精

漿因子の相互作用により運動能が促進されたものと考えている。さらに、対象とした精子無力症患者の精漿中亜鉛濃度は平均値が $103\mu\text{g/ml}$ と低く、個々の症例では精漿中亜鉛濃度が低値を示す症例でクエン酸亜鉛添加に対する反応が良かったことは、クエン酸亜鉛の精子運動能に対する促進的作用を裏付けるものと考えた。

以上、本研究における同定の成績や精子運動能に関する機能的特質の結果から、精漿中低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛であり、これは精子機能とくに運動能に関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

近年、亜鉛の生体の必須元素としての役割が注目されており、各臓器や組織と亜鉛に関する研究が増加している。

亜鉛と雄性生殖系については、1921年にヒト精漿中に高濃度の亜鉛が存在することが報告されたに始まり、それら亜鉛は前立腺に由来することが明らかにされた。この精漿中亜鉛の生理学的意義については精子運動能との関連、精子細胞膜の安定化、精子アクロシン活性の抑制、奇形精子との関連、抗菌作用などについて検討されている。精子中亜鉛の生理学的意義についても精子運動能や酸化的リン酸化に必要な zinc-lipoprotein complexes の蓄積との関連および精子細胞膜の安定化作用などの関係について研究されている。しかし、亜鉛と精子運動能については、亜鉛が精子運動に促進的に作用するとするもの、逆に抑制的とする報告もあり、いまだ一定の見解のないのが現状である。また、精漿中亜鉛を生理的非活性型の蛋白結合型と活性型の非結合型に分けて、活性型である後者の意義が検討されたことは少なく、その臨床的役割は解明されていない。そこで、申請者は生理的活性型とされる蛋白非結合亜鉛としての限外濾過性亜鉛と精子パラメータとの関連、および蛋白非結合亜鉛の同定を試み、さらに精子無力症患者精子と亜鉛の関係についても検討を加えた。

実験方法。正常男性41名および不妊期間が1年以上で、配偶者に産婦人科的異常を認めない男性不妊67名と対象とした。精液検査は自動精液検査装置 Bilevel picture processing system (BPP system) を用い、精子濃度、精子運動率および平均運動速度などを測定した。精子奇形率はパパニコロ染色標本を Macleoid の分類に従って算定した。精子アクロシン活性は BAEE/ADH 法にて、精子侵入試験は透明帯除去ハムスター卵を用いて検査された。精漿中亜鉛およびマグネシウム濃度は原子吸光法にて測定された。遠心型タンパク結合試験器を用い限外濾過性亜鉛すなわち蛋白非結合亜鉛を分離し、その亜鉛濃度を測定した。また、SephadexG-25を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより、クエン酸亜鉛、塩化亜鉛およびピコリン酸亜鉛を対照とし、限外濾過性亜鉛の結合物質を、さらに Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) により亜鉛結合低分子物質を分析した。洗浄精子浮遊液、精管精巢上体精子浮遊液および精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を添加し、BPP system により精子運動能を経時的に測定した。

結果。精漿中限外濾過亜鉛（すなわち低分子物質結合亜鉛）濃度と平均精子運動速度との間に正の相関関係を認めた。精漿のゲル濾過クロマトグラムの溶出パターンでは高分子物質結合亜鉛と低分子物質結合亜鉛の存在が示唆され、生理的活性型である低分子物質結合亜鉛のピークはクエン酸亜鉛のそれと一致したことから、それはクエン酸亜鉛であることを想定した。さらにゲル濾過法にて精製された低分子物質結合亜鉛とクエン酸亜鉛のメチルエステル誘導体は GC で保持時間が一致し、MS で開裂様式が合致したことなどからこの亜鉛結合低分子物質はクエン酸と同一と定された。精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を添加したところ、対照群に比し 1 時間目において平均運動速度が有意に増加し、その後も良好に保たれ、また精漿中亜鉛濃度が低い症例ほどクエン酸亜鉛によく反応する傾向がみられた。

以上の結果から、申請者は限外濾過性亜鉛すなわち低分子物質結合亜鉛は精子運動能に関連し、そのマーカーとして有用であることを指摘した。また、この低分子物質結合亜鉛を精製し、亜鉛結合低分子物質がクエン酸であることを初めて同一と定した。さらにクエン酸亜鉛により精子無力症患者精子の運動能が改善されることを示した。

本研究は男性不妊と亜鉛との関係について、その臨床的意義を基礎的に研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった精漿中低分子物質結合亜鉛について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。