

精漿中 Diamine Oxidase (DAO) 活性の研究

埼玉医科大学総合センター泌尿器科 (主任: 齊藤 博教授)
内島 豊, 吉田謙一郎, 小林 信幸, 齊藤 博

STUDIES ON DIAMINE OXIDASE (DAO) ACTIVITY IN SEMINAL PLASMA

Yutaka UCHIJIMA, Ken-Ichiro YOSHIDA, Nobuyuki KOBAYASHI
and Hiroshi SAITOH

From the Department of Urology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School

Diamine oxidase (DAO: EC 1.4.3.6) activity was measured for seminal plasma of patients complaining of infertility to investigate whether measurement of DAO activity in seminal plasma is a significant laboratory examination or not for evaluation of male infertility.

(1) DAO activity showed a slight decrease with increasing sperm density, but there was no significant correlation between DAO activity and sperm density. (2) DAO activity was higher in samples with sperm motility below 20%. There was a significant negative correlation between DAO activity and sperm motility. (3) DAO activity was higher in samples with motile sperm count below $10 \times 10^6/ml$.

In conclusion, the simple spectrophotometric assays for DAO could form the base of a routine examination of male infertility.

(Acta Urol. Jpn. 35: 829-833, 1989)

Key words: Diamine oxidase, Seminal plasma, Infertility, Sperm motility

緒 言

男子不妊症に対する評価の中で精液量, 精子濃度ならびに精子運動性は特に重要なパラメーターである。しかし精子運動性を評価する方法として従来観客的な方法がなく, 種々の試みがされてきた。最近 CELL SOFT™ により精子運動性を半自動的に測定することが可能となったが¹⁾, 装置が高価のため多くの施設では利用することが困難であり, できるだけ簡便に, しかも客観的な評価に耐える測定法の導入が待たれている。

Diamine oxidase (以下 DAO と略す) は diamines を酸化する酵素で²⁾, 腎臓, 腸管および胎盤に分布し, 精路では精漿, 前立腺に多く存在することが報告されている (Fig. 1)。James ら³⁾ は精子運動率が低くなるにつれて DAO 活性が高くなる傾向にあると報告し, DAO 活性の測定が妊孕性の指標となる可能性を指摘している。

本実験では精漿中の DAO 活性を測定し, 精液の各種パラメーターと比較することにより DAO 活性

の測定の意義について検討した。

対象および方法

埼玉医科大学泌尿器科不妊外来を受診した 292 症例から提供された精液を 20 分間静置後, 精液量, 精子濃度および精子運動率を測定し, その後 3,000 回転 20 分間遠心沈澱し, その上清を酵素試料とした。

DAO 活性の測定: DAO 活性の測定原理は Table 1 に示したように (0.2 M phosphate buffer; pH 7.4, 5.7 mM 2-oxoglutarate, 0.19 mM NADH, 8 mM putrescine, 15 U/ml GLDH), GLDH [L-glutamate; NAD (P) oxidoreductase] が DAO によって発生したアンモニアを利用して, 2-oxoglutarate (本実験では putrescine) を glutamate に変換するとき酸化される NADH の減少を吸光度 340 nm で測定して行った⁴⁾。

試料の調整: 精漿の中には DAO の基質が多く含まれているために, それを取り除くため酵素活性の測定前に Sephadex G-50 カラム (2.5×40 cm) でゲル濾過を施行し, void volume の分画について

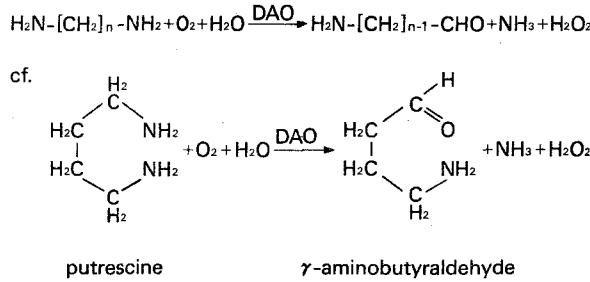


Fig. 1. Action of diamine oxidase for substrates

Table 1. Principles of measurement for diamine oxidase activity.

$[NH_3 + 2\text{-oxoglutarate} + NADH + H^+ \xrightarrow{GIDH^*} \text{glutamate} + NAD^+ + H_2O]$	
Phosphate buffer	1.65-2.55 ml
GIDH solution	0.05 ml
2-oxoglutarate solution	0.10 ml
NADH solution	0.10 ml
Sample	0.1-1.0 ml
(Mix and allow to stand for 10 min)	
Substrate solution	0.1 ml

* L-Glutamate : NAD(P) oxidoreductase

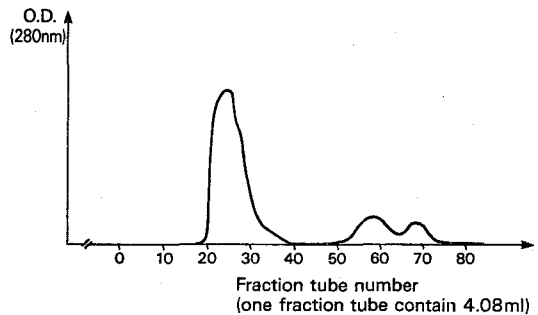


Fig. 2. Elution pattern of Sephadex G-50 column chromatography

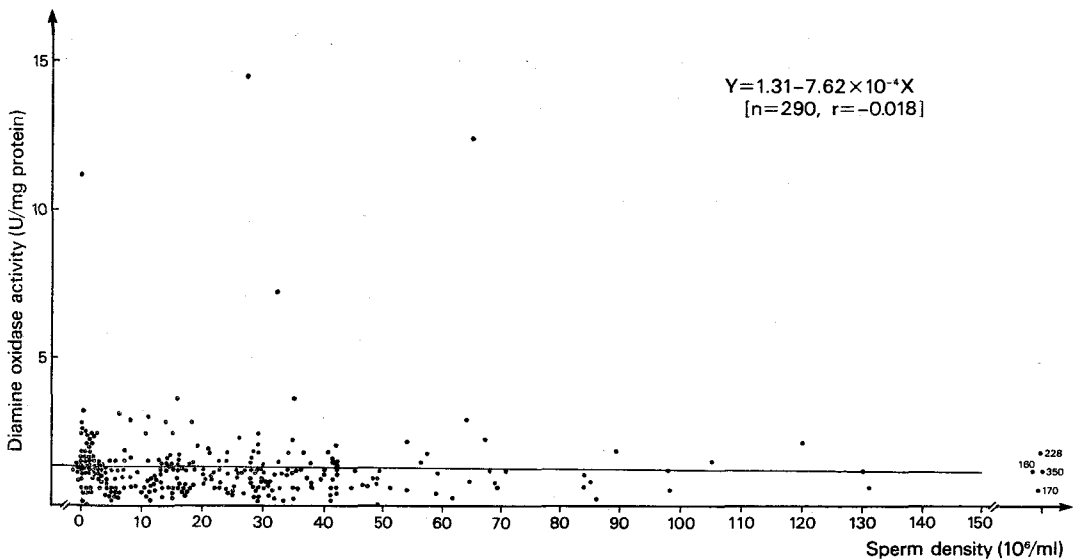


Fig. 3. Diamine oxidase activity in seminal plasma is plotted for sperm density.

DAO 活性を測定した (Fig. 2).

蛋白定量は Lowry ら⁹⁾の方法に準じて施行した.

結 果

精子濃度と DAO 活性の間には相関係数が $r = -0.018$, 回帰直線 $Y = 1.31 - 7.62 \times 10^{-4} X$ の関係

を認めたが, 統計的に有意の相関は認められなかった (Fig. 3).

精子濃度を無精子症から $10 \times 10^6/ml$ 毎に最高 $50 \times 10^6/ml$ 以上の群までの 7 群に分類したが, 各群間に有意の DAO 活性の相違は認められなかった (Table 2).

精子運動率と DAO 活性の間には相関係数が $r = -0.267$, 回帰直線 $Y = 1.75 - 0.0143X$ の関係を認め, 危険率 $p = 0.001$ で有意の相関を認めた (Fig. 4).

精子運動率を 0% から 20% 毎に最高 60% 以上の群までの 5 群に分類して各群間の DAO 活性を検討すると, 運動率が 60% 以上の群の DAO 活性は 0.94 ± 0.53 U/mg protein であり, 運動率が低い群になるにつれて DAO 活性は上昇し, 0% の群では DAO 活性は 2.30 ± 0.59 U/mg protein と危険率 $p = 0.01$ で 60% 以上の群の DAO 活性よりも有意の高い値を示

Table 2. Diamine oxidase activity in seminal plasma for samples of different sperm density

Sperm density (10 ⁶ /ml)	Diamine oxidase activity (U/mg protein)
50 ≤ (n=31)*	1.48 ± 2.12
40 ≤ <50 (n=25)	0.97 ± 0.52
30 ≤ <40 (n=33)	1.24 ± 1.27
20 ≤ <30 (n=49)	1.35 ± 1.99
10 ≤ <20 (n=57)	1.16 ± 0.76
0 < <10 (n=84)	1.27 ± 0.73
0 (n=11)	2.10 ± 3.03

* Parenthesis shows sample number

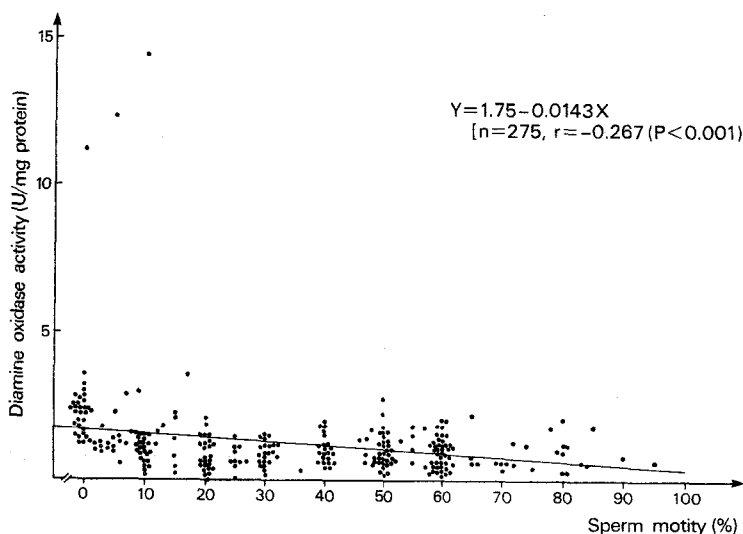


Fig. 4. Diamine oxidase activity in seminal plasma is plotted for sperm motility.

した. また運動率が 0% の群は 40-60% および 20-40% の群の DAO 活性よりも各々有意に高い DAO 活性を示し, 20% 以下の群の DAO 活性も 60% 以上と 20-40% の群の DAO 活性よりも各々有意に高い DAO 活性を示した (Table 3).

運動精子数 (精子濃度 × 精子運動率) と DAO 活性の間には相関係数が $r = -0.099$, 回帰直線 $Y = 1.34 - 6.49 \times 10^{-3} X$ の関係を認めたが統計的に有意の相関は認められなかった (Fig. 5). 運動精子数を 0 から 10×10^6 /ml 毎に最高 50×10^6 /ml の群までの 7 群に分類し, 各群間の DAO 活性を検討すると, 運動精子数が 0 の群の DAO 活性は 2.30 ± 0.59 U/mg protein で他の群よりいづれも有意に高い DAO 活性を示した. 運動精子数が 10×10^6 /ml 以下の群の DAO 活性は運動精子数が $30-40 \times 10^6$ /ml と $10-20 \times 10^6$ /ml の群より有意に高い DAO 活性を示した (Table 4).

Table 3. Diamine oxidase activity in seminal plasma for samples of different sperm motility

Sperm motility (%)	Diamine oxidase activity (U/mg protein)
60 ≤ (n=67)*	0.94 ± 0.53
40 ≤ <60 (n=67)	1.06 ± 0.53
20 ≤ <40 (n=58)	0.97 ± 0.96
0 < <20 (n=56)	1.68 ± 2.38
0 (n=27)	2.30 ± 0.59

* Parenthesis shows sample number

** $P < 0.01$

*** $P < 0.05$

考 察

Crabbe は精液中 DAO 活性は精子運動率が 20% 以下の群では高い活性値を示し⁷⁾, Hölttä ら⁸⁾も精子運動率が 70% 以上の群では DAO 活性が 165 nM/min/ml であるのに対して, 50% 以下の群では 302 nM/min/ml と有意に高い値を示したと報告し, 自験

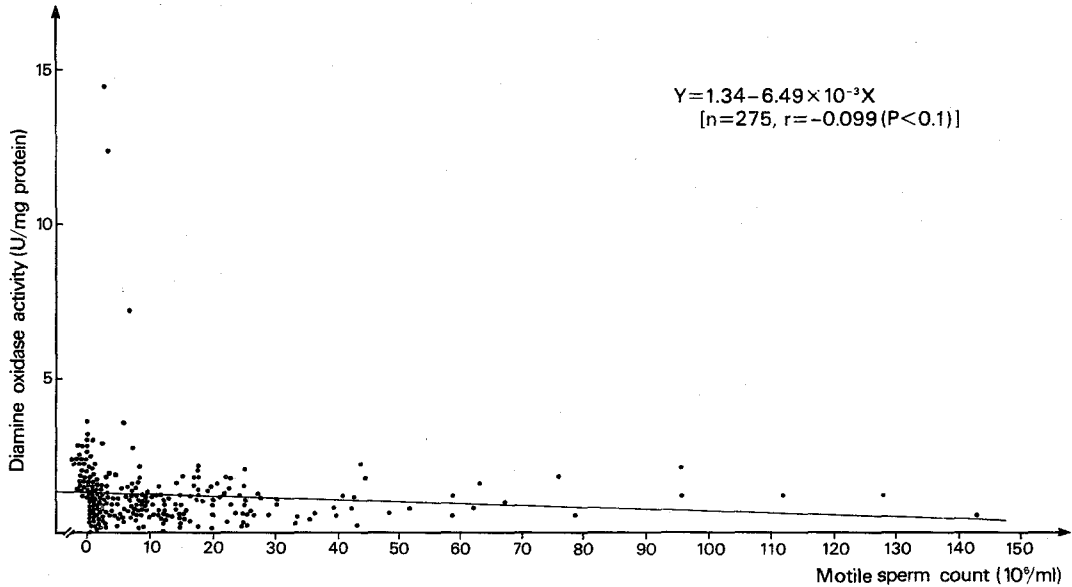


Fig. 5. Diamine oxidase activity in seminal plasma is plotted for motile sperm count.

例でも精子運動率が20%以下の群や運動精子数が $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群では他の群より精漿中 DAO 活性が高い値を示し、精漿中 DAO 活性と精子運動性との間に何らかの関係が存在することが示唆された。

精路に認められる DAO は他の臓器からの DAO と非常に類似しており、分子量が182,000であることが報告されている³⁾。DAO は diamines に対して高い親和性を示し、精漿中に存在する polyamines を酸化する可能性が指摘されている。Hölttä ら³⁾は基質として、putrescine, spermidine および spermine を使用し、発生した過酸化水素量の検討から spermidine および spermine は各々 putrescine の94%, 64%の過酸化水素発生量を示し、さらに spermine は putrescine に対して競合的に作用すると報告している。また精漿中の polyamine 濃度は putrescine, spermidine および spermine で各々約 0.2mM, 0.1 mM および 3 mM であり⁸⁾、じゅうぶん精漿中の DAO は in vivo でも polyamines を酸化することが可能であると考えられる。

事実、精漿中 DAO 活性が高くなるにつれて putrescine 濃度は低値になり⁸⁾、Fair ら⁹⁾も運動性の良い精子を認める精液の方が有意に高い spermine 濃度を示すと報告し、これらの polyamine が DAO により、より多く代謝されている可能性を窺わせる。

酸化された polyamine 代謝物の精子への作用については明かではないが、一つには DAO により発生する可能性のある活性酸素による細胞膜の障害であ

Table 4. Diamine oxidase activity in seminal plasma for samples of different motile sperm count.

Motile sperm count (10 ⁶ /ml)	Diamine oxidase activity (U/mg protein)
50 ≤ (n=13)*	1.12 ± 0.49
40 ≤ <50 (n=7)	1.15 ± 0.68
30 ≤ <40 (n=7)	0.63 ± 0.26
20 ≤ <30 (n=25)	1.00 ± 0.52
10 ≤ <20 (n=49)	0.93 ± 0.53
0 < <10 (n=147)	1.27 ± 1.63
0 (n=27)	2.30 ± 0.59

* Parenthesis shows sample number

** P < 0.01

*** P < 0.05

り、もう一つには酸化された polyamine 代謝物の作用である。前者は活性酸素により精子膜の過酸化が運動性を障害すると考えられ、過酸化に対する生体の防御機構である superoxide dismutase (SOD) 活性が精子運動率と有意の相関を示すことから活性酸素に運動性の障害作用があることが指摘されている¹⁰⁾。後者は spermine 酸化物の N, N'-bis, 1,4-diaminobutane の iminoaldehyde が精子における果糖および乳酸の取り込みを強く抑制するということであり¹¹⁾、さらにこの代謝物が精子膜に強く結合する事実が指摘されており¹²⁾、精子エネルギー代謝に polyamine 酸化物が影響を与えるために精子の運動性が障害を受ける可能性も考えられる。

結 語

本実験から精漿中の DAO 活性の測定は男子不妊症症例の妊孕能の評価判定に有用である検査法になる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 淡路英雄, 井上正人, 小林善宗, 本田育子, 古橋進一, 佐々木史, 出口しのぶ, 松井素子, 藤井明和: 精液自動分析装置 Computer assisted semen analyzer による精液検査. 日本アンドロロジー学会第6回学術大会プログラム・講演抄録集, p76-77, 1987
- 2) Zeller E: Über den enzymatischen Abbau von Histamine und Diamin. *Hekv Chem Acta* **21**: 880-890, 1938
- 3) Hölttä E, Pulkkinen P, Elfving K and Jänne J: Oxidation of polyamines by diamine oxidase from human seminal plasma. *Biochem. J.* **145**: 373-378, 1975
- 4) James, M and Crabbe, C: Enzyme assay for sperm motility. *Lancet* **6**: 1295, 1975
- 5) Kusche, J, Trotha, U, Muhlenberger, G and Lorenz, W: The clinical-chemical application of the NADH test for d-etermination of diamine oxidase activity in human pregnancy. *Agents Actions* **4/3**: 18-1889, 1974
- 6) Lowry OH, Rosenbrough. NJ, Farr, AL and Lindall, RJ: Protein measurement with the phenol reagents. *J Biol Chem* **193**: 295-275, 1981
- 7) Crabbe, MJC: The development of a qualitative assay for male infertility from a study of enzyme in humen semen. *J Re-prod Fertil* **51**: 73-76, 1977
- 8) Jänne, J, Hölttä, E, Harranen, P and Elfving, K: Polyamenes and polyamine-metabolizing enzyme activities in human semen. *Clin Chim Acta* **48**: 303-401, 1973
- 9) Fair, WR, Clark RB and Wehner, N: A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. *Fertil Steril* **23**: 38-42, 1972
- 10) 宮崎豊彦: 活性酸素の精子運動に及ぼす影響—ヒト精子・精漿中の過酸化脂質と superoxide dismutase—*日不妊会誌* **33**: 105-113, 1988
- 11) Pulkkinen, P, Sinervirta R and Jänne, J: Mechanism of action of oxidized polyamine on the metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **51**: 399-404, 1977
- 12) Pulkkinen, P, Kanerva, S, Elfving, K and Jänne, J: Association of spermine and diamine oxidase activity with humen spermatozoa. *J Reprod Fertil* **43**: 49-55, 1975

(1988年6月8日受付)