

ヒト精液中のNAG活性についての研究

—その基礎的検討—

埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科（主任：斉藤 博教授）

吉 田 謙 一 郎
中 目 康 彦
高 橋 卓
斉 藤 博

東京医科歯科大学泌尿器科学教室（主任：大島博幸教授）

木 原 和 徳

STUDY OF N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE (NAG)
ACTIVITY IN THE HUMAN SEMENKenichiro YOSHIDA, Yasuhiko NAKAME,
Taku TAKAHASHI and Hiroshi SAITO*From the Department of Urology, Medical Center of Saitama Medical School.**(Director: Prof. H. Saitoh)*

Kazunori KIHARA

*From the Department of Urology, Tokyo Medical and Dental University**(Director: Prof. H. Oshima)*

NAG activity in the human semen was measured using NAG kit. Plasma NAG activity in the semen was more than 500 times higher than that of urine, while in sperm, NAG activity was low. In a frozen condition, NAG activity in semen plasma did not change for more than five weeks. NAG activity in semen plasma of male infertility associated with oligozoospermia was $1,918 \pm 829$ (M \pm S.D.) mU/ml. Among the reproductive tissue, high NAG activities were observed in epididymis and prostate.

Our present study suggests that NAG in semen plasma must possess some active roles related to sperm maturation and/or sperm motility or both.

Key words: NAG, Semen, Reproductive tissue

N-acetyl, β -D-glucosaminidase (以下 NAG と略す) は、ムコ蛋白の代謝関連酵素であり、その活性は血中および尿中で検出される。従来その測定法は蛍光光度法¹⁾を用いたもので、操作の煩雑さのため、あまり臨床的には用いられなかった。しかし近年 NAG に対する基質が合成され、この合成基質を用いた簡便化された測定操作²⁾により、各種疾患において広く NAG 活性が測定されている^{3,4)}。

われわれはヒト精液中のこの活性に注目し、今回、

NAG 活性の精液中での分布、また精路および副性器における本酵素の活性分布などの基礎的検討を行なうとともに、男子不妊症例について、精漿中での本酵素活性を求めたので報告する。

試料の調整

精液は男子不妊症例より得た。精液量、精子濃度、運動率を測定後、検体をスピッツグラスに移し、2,500 rpm にて 10 分間遠沈し、精子と精漿を分離せしめた。

分離した精漿は活性測定時に生食にて26倍希釈し、活性測定に供した。また精液中での本酵素の活性分布を観るため、精子についても NAG 活性を測定した。まず遠沈にて得られた精子を生食にて数回洗浄、遠沈を繰り返し、洗浄精子を作成した。ついで、これをポリトロンにて homogenize し、この homogenate に TritonX-100 を最終濃度0.5%、最終容量 10 cc になるように加え1時間室温にて攪拌した。更にこの溶液を 800G にて20分間遠沈し、その上清である cell-free homogenate を得、これを精子における NAG の酵素源とし、活性測定を行なった。

ついで NAG 活性が精路および副性器のどの組織で高値を示すかを検討するため、睾丸、副睾丸、精管、精囊腺、前立腺、各組織の homogenate を作成し、この homogenate につき、NAG 活性を測定した。睾丸、副睾丸、精管については、腹部停留睾丸で除勢した26歳の症例を用いた。また精囊腺、前立腺については膀胱腫瘍にて膀胱全摘術を行なった57歳の症例を用いた。いずれの組織も摘除後、但ちに生食にて水洗し、良く生食を拭き取った後秤量し、 -20°C にて凍結保存した。これらの組織は NAG 活性測定時に解凍し、細切後、ポリトロンにて homogenize した。これを前記の如く 800 G にて20分間遠沈し、その上清である cell-free homogenate を組織の NAG 酵素源として用いた。

測定法

精液および組織中における NAG 活性の測定は尿中 NAG 活性の測定に準じ行なった^{5,6)}。簡単に述べると、活性測定用の試薬として、“NAGテスト、シオノギ”を用いた。すなわち基質として M-cresolsulfonylphthalate-D-glucosaminide (以下 MCP-NAG と略す)を用い、一定量の精漿、もしくは組織の cell-free homogenate を酵素源とし、 37°C にて一定時間酵素反応をおこさしめ、NAG 活性により基質 MCP-NAG より生成される MCP を 580 nm にて吸光度を測定し、1分間に $1\mu\text{mole}$ の MCP を生成する NAG 活性を 1u とする表現法に従い、活性値を求めた。なおブランク値は酵素源を加えた直後の値、すなわち反応前値をとり、反応後の活性よりブランク値を差し引いたものをもって活性値とした。酵素活性の表現は mU/ml もしくは mU/mg tissue で表した。

結果

—精漿および精子における NAG 活性について—
乏精子症を伴う男子不妊症の3症例について、精漿

と精子洗浄液および洗浄精子における NAG 活性を測定した。Fig.1 には、これらの単位容積における活性に容量を剰じた総活性を示す。Fig.1 でみられる如く個々の症例の精漿における NAG 活性は、4,272, 6,760, 15,964 mU と極めて高い値を示すが、第1回の洗浄液では、その活性はそれぞれ 301, 451, 550 mU と低下し、精漿の値の10%以下となる。

洗浄液中の NAG 活性は、洗浄回数が増えるほど低下し、第3回目の洗浄液では、4, 7, 14 mU と精漿の0.1%程度にまで、その値の低下がみられた。これに対して Triton 処理の洗浄精子では、それぞれ 11, 30, 25mU と第3回の洗浄液より高い値を示した。以上のことは、精液中の NAG 活性の大部分は精漿由来であることを示していると同時に、精子にも NAG 活性が存在していることを示したものと云える。

—精漿中における酵素 NAG の安定性について—
同一検体につき -20°C にて凍結保存した精漿を1週おきに解凍し、NAG 活性の酵素源として用いた後、再凍結し保存するという操作を5週間にわたり行ない、

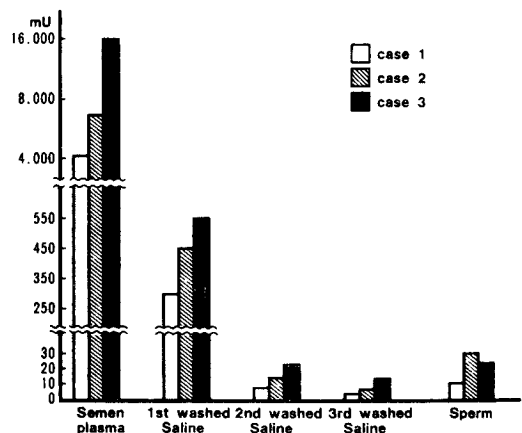


Fig. 1. Total NAG activities in semen plasma, washed saline and sperm.

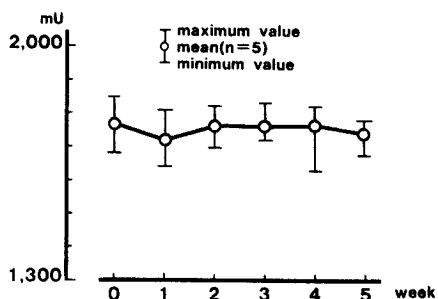


Fig. 2. Stability of NAG in semen plasma

これらの操作による精漿中の酵素 NAG に対する影響を、NAG 活性の面から検討した。Fig. 2 に上記実験法による NAG 活性の変化を示す。図で見られる如く精漿中の NAG 活性は5週にわたり、ほとんど変化を示さなかった。以上のことは、酵素 NAG は精漿中にある安定であり、凍結解凍処理を頻回に行なっても、その活性は変化しないと解釈された。

—精路および副性器における NAG の活性分布について—

Table 1 に症例 I とした26歳の腹部停留睾丸患者の除睾丸について、睾丸、副睾丸、精管の各組織における NAG 活性を測定し、この活性を組織重量あたりで表現した (Table 1)。本症例の睾丸組織は光顕上 Sertoli 細胞のみであり、germ cell は全くみられなかった。このことは精路における NAG の活性分布を検索するうえで、精子の混入を考慮せずに済むことを意味しており、各組織における活性がそのまま、その組織の NAG 活性と解釈される。なお本症例の副睾丸は停留睾丸例で良くみられるように、副睾丸の形態的異常を合併しており、解剖学的に頭部、体部、尾部に分けられなかった。このため副睾丸を2分し睾丸側2分の1を頭部とし、それより精管側を尾部とし扱った。睾丸、副睾丸、精管における NAG 活性は周囲組織のそれより高い値を示した。特に副睾丸頭部で高いことが特徴的であり、ついで副睾丸尾部、睾丸、精管の順であった。Table 1 に症例 II とした57歳の膀胱全摘例より得られた精囊腺と前立腺における NAG 活性を比較すると、前立腺で高いことが特徴的である。症例が異なるため、症例 I の各組織における活性と、そのまま比較することはできないものの、NAG 活性は精囊腺においても高く、症例 I の副睾丸頭部に匹敵する値を示した。

Table 1. NAG activity in reproductive tissue.

Case	Reproductive tissue	NAG activity (mU/mg tissue)	
I	Testis	0.48	
	Epididymis	head	0.89
		tail	0.56
	Vas	0.29	
	Peripheral tissue	0.16	
II	Serminal vesicle	0.80	
	Prostate	2.15	

—乏精子症例における精漿中の NAG 活性について—

Table 2 に24から43歳までの、乏精子症を伴う男子不妊症につき、その精液量、精子濃度、運動率および NAG 活性を示した。

NAG活性は753から4,126mU/ml までの値を示し、その平均は $1,918 \pm 829$ (M \pm S.D.) であった。

精子濃度とNAG活性の相関、および運動率とNAG活性の相関について検討した。前者は $y = -1.6x + 2,12$ ($r = -0.15$, $n = 21$)、後者は $y = -4x + 2,078$ ($r = -0.08$, $n = 21$) と両者とも負の相関傾向を示したが、有意ではなかった。

考 察

NAG は一般的に腎の lysosomal enzyme として知られており、腎不全や各種薬剤の腎障害時に、尿中に酵素の逸脱がおり、その尿中活性が増加する²⁾。

この他、血中においても肝硬変や肝炎では、その活性増加がみられるとされている²⁾。しかしながら、これら血中および尿中の NAG 活性は高くても 30 mU/ml 程度である。

今回、われわれの測定した精漿中の NAG 活性は753 から 4,126 mU/ml、その平均は 1,918 mU/ml と、血中、尿中の NAG 活性に比べ、極めて高い値を示した。ヒト精漿中の NAG 活性について他の報告例をみると、7,288 μ g phenol liberated./ ml/hr. at 37°C との報告がみられている⁸⁾。本活性を phenol の分子量から、 μ mole に換算し、Uで表わすと、1,104 mU/

Table 2. NAG activity in plasma of oligozoospermic Patients

No.	Age	Volume (cc)	Sperm concentration ($\times 10^6$)	Motility (%)	NAG (mU/ml)
1	34	1.8	18.8	40	2246
2	43	1.8	1.9	30	2610
3	36	1.7	17.2	10	1278
4	39	3.9	4.5	30	1686
5	37	3.7	8.9	60	3156
6	31	2.5	16.4	50	1793
7	29	1.5	5.3	40	1721
8	36	4.2	11.6	30	1507
9	32	4.1	2.2	30	2104
10	24	2.2	19.2	50	1166
11	37	2.7	18.4	50	1091
12	25	5.4	19.2	60	753
13	33	5.3	11.6	60	1120
14	32	1.9	24.0	50	1772
15	43	3.0	2.5	60	1521
16	28	2.0	19.2	40	3320
17	31	3.0	12.8	30	4126
18	41	5.0	7.2	20	1512
19	37	3.5	25.6	30	1622
20	41	2.8	0.4	5	1684
21	35	3.0	3.2	50	2485

ml となり、われわれの測定値と同様の値となる。

以上の測定値からも解る如く、精漿中の NAG 活性は、やはり高いと言えよう。このように精漿中の高い NAG 活性を説明するのに、尿中の活性の如く、臓器障害による酵素の逸脱説で説明することは不可能である。本酵素の精漿中での役割については不明であるが、NAG はムコ蛋白を基質とすること、かつヒト精漿中には高濃度にムコ蛋白が存在していることが、NAG の精漿中での役割を考えるうえで、一つの材料となるものと思われる。ムコ蛋白が水解されると N-acetylglucosamine が生成され、ついで hexosamine が生成される。

この hexosamine はヒト精漿中に高濃度にみられる⁹⁾。以上を考えれば NAG は N-acetylglucosamine や hexosamine の生成をつかさどっているといえよう。

さて NAG 活性の精路および副性器における組織分布は、前述の如く副睾丸と前立腺で高値を呈した。副睾丸分泌液における NAG 活性については、種々の哺乳類で検討¹⁰⁾されている。副睾丸分泌液においては NAG 活性は一般的に高い値を示すが、種差があり guinea pig ではやや低く、monkey, boar では高い。更に副睾丸における NAG 活性の局在について、Findlay ら¹¹⁾は pig 副睾丸を 12 に細分し、個々の区分につき、その活性を組織重量あたりで表わし、頭部で高い活性値が得られたと報告している。この点われわれの症例においても同様の傾向がみられた。Bamberg ら¹²⁾は、副睾丸における NAG 活性について、精子の成熟との関係を述べている。NAG により生成される N-acetylglucosamine は、ABP (androgen binding protein) の主成分であり¹³⁾、この ABP は副睾丸に高く、精子の成熟をつかさどっていることを考えると、NAG は ABP とともに精子成熟の役割を果たしているとも考えられる。本活性は前立腺でも高い値を示した。ヒトの精漿中の糖質としての主成分はフルクトースであるが、有袋類においてはフルクトースは精漿中でほとんど検出されず、N-acetylglucosamine が主成分である¹⁴⁾。このことは、かかる種においては N-acetylglucosamine が、精子の運動エネルギー源として作用していると考えられる。ヒト精漿中の NAG 活性は単に hexosamine を生成するものなのか、もしくは間接的に精子のエネルギー源として作用しているかについては、今後検討する必要がある。いずれにせよ精漿中の NAG 活性は尿中のそれとは異なり、ムコ蛋白の代謝をつかさどる積極的な機能を果たしている酵素と考えられる。

精子における NAG 活性の測定については、本酵素が膜酵素であることより、Triton 処理を行ない、膜から酵素を遊離せしめ、測定した。その結果、精子においても有意に NAG 活性が検出されたが、その値は精漿に比し、極めて低値であった。Khar ら¹⁵⁾は Bull の精子について、Hyamine 2,389 と Triton X-100 にて可溶化し、純化した NAG につき、その酵素学的特性を検討しているが、ヒトにおいては純化できるほど、高い NAG 活性は得られなかった、これは Triton の濃度もしくは Triton との反応時間に問題があり、NAG を充分可溶化できなかった可能性も考えられる。

結 語

- 1) ヒト精漿中の NAG 活性について測定した。精漿では極めて高い NAG 活性が得られた。これに対し、精子の NAG 活性は存在したものの、低値であった。本酵素は凍結保存により、長期間その安定がみられた。
- 2) 精路および副性器における本活性は、副睾丸頭部および前立腺で高い値を示した。
- 3) 男子不妊症例においては、その活性は、 $1,918 \pm 829$ (M \pm S.D.) mU/ml であった。

文 献

- 1) Leabach DH and Walker PG: Studies on glucosaminidase, The fluorimetric assay of N-acetyl- β -glucosaminidase. *Biochem J* 78: 151~156, 1961
- 2) 佐野紀代子・宇野恵美子: 尿中 NAG 活性測定の基礎的検討および腎機能検査との関連性. *臨床病理 別冊* 56: 111~121, 1983
- 3) 矢沢直行・石沢修二・友安 治・平沢正人・高木康・千 住紀・五味邦英: 血清及び臓器における NAG 活性とそのアイソザイム. *臨床病理 XXX Ⅲ総会号*, 233, 1985
- 4) 梁田葉子・佐藤龍次・今野 述・山田 齊・小沢優園・後藤英道・片桐 敬・新谷博一: 急性心筋梗塞における血中 NAG (第一報) *臨床病理 XXX Ⅲ総会号* 233, 1985
- 5) 寺田広子・原口ゆみ子・鈴木勝治・吉田謙一郎: 自動分析装置による尿中 NAG 活性測定の試み, *臨床検査 投稿中*
- 6) 吉田謙一郎・高橋 卓・中目康彦・斉藤 博・堀内 晋・金親史尚・根岸荘治: CDDP 投与に伴なう尿中 NAG 活性の急性変動についての検討. *泌尿紀要* 32: 369~373, 1986

- 7) 江上照夫・池田須枝子・古谷信滋・小橋隆一郎・伊藤武雄：血清 NAG 活性及び Isoenzyme と疾患との関係について，第31回，日本臨床病理学会。XXXⅢ 189, 1984
- 8) Conchie J and Mann T: Glycosidases in mammalian sperm and seminal plasma. *Nature* **179**: 119~1191, 1957
- 9) Mann T and Rottenberg DA: The carbohydrate of human semen. *J Endocrinol* **34**: 257~264, 1966
- 10) Mann T and Lutwak-Mann C: *Male Reproductive Function and Semen*. 151, Springer-Verlag, Berlin Heiderberg, New York, 1981
- 11) Findlay J and Levvy GA: Purification of β -N-Acetylglucosaminidase from the pig epididymis. *Biochem J* **77**: 170~175, 1960
- 12) Bamberg E, Skolelek R and Winnisch R: Distribution of β -N-Acetylhexosaminidase in the genital tract of the cockerel. *IRCS Med Sci* **3**: 178, 1975
- 13) Hansson V, Rizen EM, French FS and Nayfeh SN: Androgen transport and receptor mechanisms in the testis and epididymis. In: Hamilton DW, Greep RO eds. 173, sect 7, vol 5. *Handbook of phycyology*. American Physiological Society, Washington DC, 1974
- 14) Rodger JC: Comparative aspects of the accessory sex glands and seminal biochemistry of mammals. *Comp Biochem Physiol* **55B**:1~8, 1976
- 15) Khar A and Anand SR: Studies of the glycosidases of semens purification and properties of β -Acetylglucosaminidase from bull sperm. *Biochim Biophys Acta* **483**: 141~151, 1977

(1986年2月6日受付)