

男性不妊と亜鉛に関する基礎的研究

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 守殿貞夫教授)

岡 伸 俊・松 本 修・守 殿 貞 夫

EXPERIMENTAL STUDIES OF MALE INFERTILITY AND ZINC

Nobutoshi OKA, Osamu MATSUMOTO and Sadao KAMIDONO

*From the Department of Urology, School of Medicine, Kobe University
(Director: Prof. S. Kamidono)*

The physiological role of zinc in sperm motility was studied. There was a positive correlation between the sperm motility and the low molecular weight binding zinc (ultrafiltrable zinc) concentration. The low molecular weight binding zinc was purified by gel filtration and identified as zinc citrate by gas chromatography/mass spectrometry. The addition of zinc citrate to the fresh semen of the patients with asthenozoospermia stimulated sperm motility. These results suggest that zinc has a significant role in human sperm motility.

Key words: Male infertility, Zinc Low molecular weight binding zinc, Zinc citrate, Sperm motility

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。

亜鉛と雄性生殖系については、Bertrand と Vladoesco¹⁾ が1921年にヒト精漿中に高濃度の亜鉛が存在することを報告したのが最初であり、1953年にはMawson と Fisher²⁾ は、精漿中亜鉛が前立腺に由来することを明らかにした。その後、諸家の研究により、ヒト臓器中では前立腺の亜鉛濃度が最も高いことが明らかにされ、体液では正常のヒト精漿は血清の100倍、前立腺液では同様に300倍もの亜鉛を含有していることが明らかにされた^{2,4-7)}。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⁸⁻¹⁰⁾、精子細胞膜の安定化^{11,12)}、精子アクロシン活性の抑制¹³⁾、奇形精子 (coiled tail など) との関連¹⁴⁾、抗菌作用¹⁵⁾などについて検討されている。また、精子中亜鉛の生理学的意義についても精子運動能¹⁶⁻¹⁸⁾や酸化的リン酸化に必要な zinc-lipoprotein complexes の蓄積との関連¹⁹⁾および精子細胞膜の安定化作用²⁰⁾などについての研究がみられる。

これらの成績のうち、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^{8,21)}、逆に抑制的に作用するとの報告¹⁰⁾もあり、いまだ統一された見解がないのが現状である。また、精

漿中亜鉛を蛋白結合型と非結合型に分けて、特に後者の意義を検討した報告は少なく²²⁾、その臨床的役割は解明されていない。

そこで、精漿中亜鉛の臨床的意義を明らかにするべく、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、限外濾過性亜鉛と精子運動能との間に正の相関関係があることを初めて明らかにした。さらに、ゲル濾過法にて低分子物質結合亜鉛を精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび gas chromatography/mass spectrometry により本物質がクエン酸亜鉛であることを証明した。さらに、精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を添加することにより精子運動能が改善されたので以下これらの成績について報告する。

対象と方法

1. 対象

対象は、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。

2. 精液検査

精液は3~5日の禁欲後、用手法により滅菌シャーレに直接全量を採取させた。30分間室温にて放置し、

精液が十分に液化した後に精子濃度、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) にて測定した²³⁾。精子奇形率は精液塗抹の Papanicolaou 染色標本を作成し, Macleoid の分類に従って算定した²⁴⁾。精子アクロシン活性は BAEE/ADH (benzoyl arginine ethyl ester/ alcohol/dehydrogenase) 法にて測定した²⁵⁾。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検査された²⁶⁾。精漿中亜鉛およびマグネシウム濃度を原子吸光法にて測定した。精漿は精液検査後の精液を 2,000 g×30分間に遠心分離し, 精漿中亜鉛およびマグネシウムを測定するまで -20°C で保存した。精漿中亜鉛およびマグネシウムは, 精漿を蒸留水にて200倍に希釈し, 原子吸光度計 (Perkin-Elmer 403) にて測定された。亜鉛の測定条件は lump current 10 mA, resonance line 213.9 nm, slit 0.1 mm とした。cv 値は1.8%であり, 亜鉛添加回収試験では97.8%の回収率であった。

3. 限外濾過性亜鉛の測定

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測定した。限外濾過性亜鉛の分離には, 検体が少量でも測定可能で, かつ精漿の希釈が起こらず, pH, イオン濃度ともに変化を与えず, 短時間に分離することができる遠心型タンパク結合試験器 <Micropartition system, MPS-3 (Amicon, USA)> を使用した。

精漿 0.5 ml を MPS-3 試験器に注入し, 2,000 g×30分間遠心分離した後, 得られた濾液を蒸留水で200倍に希釈し, 原子吸光法にて亜鉛濃度を測定した。MPS-3 試験器に使用されている YMT メンブレンの分画分子量は30,000であり, YMT メンブレンの亜鉛吸着率は3.2% (n=9) であった。

4. ゲル濾過法による亜鉛結合物質の分析

Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) を用いたゲル濾過法により, 亜鉛結合物質を分析した。

通常の Sephadex はデキストランの架橋によって構成されている軟性ゲルで, 親水性置換基はヒドロキシル基である。しかし, これら Sephadex 分子ふるい用の充填剤には残留カルボキシル基も少量含まれているため陽イオン性化合物, たとえば金属イオンなどがカラムに良く吸着される。このようなカルボキシル基による妨害を除くため, 今回はカルボキシル基を水素化ホウ素ナトリウムでヒドロキシル基に還元した Sephadex を用いた²⁷⁾。

ゲルは 5.5×300 mm のガラスカラムを充填され, ゲルの平衡化および溶出液として 0.05 M Tris HCl, pH 7.4 を用い, カラムは室温に保った。それぞれのカラムの充填状態および排除体積 V_0 は Blue Dextrane 2,000 (Pharmacia Fine Chemicals) を用いて調べた。充填されたベッドの総体積はカラムのサイズから計算された。分子量マーカーとして, キモトリプシノーゲン A (分子量 25,000, Pharmacia Fine Chemicals), アンギオテンシン II アナログ DD-3489 (分子量 1,109, 第一製薬) および NAD (nicotinamide/adenine dinucleotide) (分子量 663, Sigma, USA) を用いた。流速は 0.3 ml/min. とした。ゲル濾過された溶出液中の蛋白質量は 280 nm の吸光度で検索し, 亜鉛は原子吸光法, グエン酸は酵素法で測定された。

試料は正常男性より得た精漿およびその限外濾過性亜鉛を用いた。ところで, 精漿を含め体液中の低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛^{22,27,28)}、ピコリン酸亜鉛²⁹⁾、塩化亜鉛¹⁵⁾などとして存在すると報告されており, 統一された見解はみられていない。そこで, 対照はクエン酸亜鉛 (分子量606, 関東化学), 塩化亜鉛 (分子量136, 和光純薬) およびピコリン酸亜鉛<ピコリン酸 (分子量123, 和光純薬) と塩化亜鉛により合成した>の3者を用いた。

5. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) による亜鉛結合低分子物質の分析

試料は, ゲル濾過にて分離された低分子物質結合亜鉛分画を凍結乾燥したもので, 対照は前項の実験成績からクエン酸亜鉛とした。これらサンプルをガラススクルーバイアルにとり, 5%塩酸メタノール (半井化学) 1 ml を加えた後に 100°C, 30分間加圧加熱し, 亜鉛結合物質をメチルエステル誘導体とした。

GC/MS 分析装置は, JMS-DX300 (日本電子製) にデータ解析用コンピュータとして JMA-5000 をオンラインし, カラムは 30 m×0.53 mm (film thickness) Fused Silica Mega Bore Column DB-1 (J&W Scientific Ins.) を用い, キャリアガス He (流速 30 ml/min), カラム温度 150~220°C (昇温 8°C/min.) のプログラム昇温を行い, エンリッチャー温度は 280°C に設定した。質量分析部の条件は, EI モードで加速電圧 3 KV, イオン化室温度 250°C, イオン化電流 300 μ A, イオン化電圧 70 eV, 分解能500の条件で質量数100~500を3秒サイクルでスキャンした。

6. 亜鉛の精子運動能に対する効果

1) 洗浄射出精子浮遊液の作製

妊孕性を有する正常男性より得た精液を Mann に

よる sperm-Ringer solution, pH 7.0 (140 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 1.4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.6 mM NaHCO_3 を含む 0.1 M リン酸緩衝液) にて 2 回洗浄し, 精子濃度が $20 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ となるように精子浮遊液を調整した。生理的食塩水にクエン酸亜鉛を溶解し, 最終亜鉛濃度が 0.02 mM, 0.2 mM および 2 mM となるようにクエン酸亜鉛溶液を調整した。次に, 精子浮遊液 0.2 ml とクエン酸溶液 0.2 ml を混合し, 最終精子濃度 $10 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$, 最終亜鉛濃度 0 mM, 0.01 mM, 0.1 mM および 1 mM となるように調整した。なお, クエン酸亜鉛溶液は pH 7.0 となるように調整した。

2) 精管精巢上体精子浮遊液の作製

精管精巢上体精子は前立腺癌患者 3 例の精巣除去術にさいして摘出した精管精巢上体 6 検体から採取した。方法は精管断端より逆行性に 22 G アンギオカットを挿入し, 精巢上体体部に切開を加え注射器を用いて生理的食塩水で wash out した。この溶液を 250 g \times 30 分間遠心分離した後, sperm-Ringer solution, pH 7.0 で 2 度洗浄し, 精子濃度 $10 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ となるように精子浮遊液を調整した。次に, 精子浮遊液 0.2 ml とクエン酸亜鉛溶液 0.2 ml を混合し, 最終精子濃度 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$, 最終亜鉛濃度 0 mM および 1 mM となるように調整した。

3) 精子浮遊液の精子運動能の測定

精子浮遊液 (25°C) に各種濃度の亜鉛溶液を添加し, 経時的に精子運動率および平均運動速度を BPP system を用いて測定した。亜鉛添加直後の運動率および平均運動速度を 100 とし, 運動能の経時的変化はそれらに対する比率で表わした。

4) クエン酸亜鉛と男性不妊患者精子

当科不妊外来に通院している患者のうち精子濃度 $20 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$, 精子運動率 $20 \sim 40\%$ の精子無力症患者精液 7 検体を対象とし, 2 mM の亜鉛濃度に調整したクエン酸亜鉛溶液 (pH 7.0) を添加し, 精子運動

率および平均運動速度の変化を経時的に検討した。対照群には 3 mM に調整したクエン酸溶液 (pH 7.0) を添加した。なお, 対象とした精子無力症患者の精漿中亜鉛濃度は平均値 $103 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

結 果

1. 精漿中亜鉛濃度と精子パラメータ

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, 精子奇形率および SPA に有意差がみられた。しかし, 精漿中亜鉛濃度およびマグネシウム濃度には有意差は認められなかった (Table 1)。

そこで今回の全対象の精漿中亜鉛濃度の平均値 $141 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($40 \sim 446$) (Fig. 1) 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, 前者の精漿中マグネシウム濃度が有意 ($p < 0.01$) に高かった (Table 2)。

精漿中の亜鉛濃度とマグネシウム濃度との間に正の相関関係を認め, 相関係数 $r = 0.81$ ($p < 0.01$), 回帰直線は $\text{Mg} = 0.74 \text{ Zn} + 28.8$ であった (Fig. 2)。

2. 限外濾過性亜鉛濃度と精子パラメータ

限外濾過性亜鉛を測定した 30 検体の平均値は $73 \mu\text{g}$

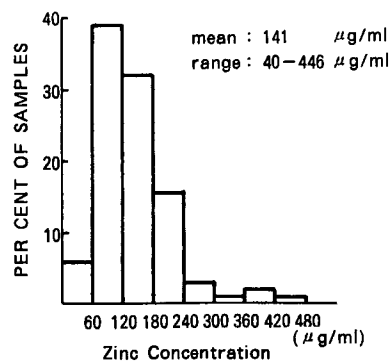


Fig. 1. Zinc concentration of seminal plasma in 108 specimens

Table 1. Semen characteristics

	Fertile Men (n=41)	Infertile Men (n=67)	P-value
Density ($\times 10^6/\text{ml}$)	89.7 ± 6.5	45.9 ± 4.0	$P < 0.01$
Motility Rate (%)	57.3 ± 1.7	32.0 ± 2.3	$P < 0.01$
Mean Velocity ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	30.6 ± 1.0	24.9 ± 0.9	$P < 0.05$
Abnormal Sperm (%)	26.2 ± 1.5	40.0 ± 2.4	$P < 0.05$
SPA (%)	54 ± 4	24 ± 6	$P < 0.05$
Acrosin Activity ($\text{mU} \times 10^4$ sperm)	3.8 ± 0.5	2.9 ± 0.4	N.S.
Zinc ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	134 ± 8	161 ± 12	N.S.
Magnesium (Mg/ml)	115 ± 7	131 ± 10	N.S.

mean \pm S.E.

Table 2. Semen characteristics by seminal zinc concentration

	Seminal Zinc		P-value
	≤140 μg/ml (n=80)	>140 μg/ml (n=48)	
Density (×10 ⁶ /ml)	63.1±5.4	74.4±8.3	N.S.
Motility Rate (%)	43.9±2.9	47.1±2.7	N.S.
Mean Velocity (μm/sec)	27.9±1.1	29.4±1.0	N.S.
Abnormal Sperm (%)	30.0±2.2	32.6±2.3	N.S.
SPA (%)	64.0±7.0	52.3±6.6	N.S.
Acrosin Activity (mU×10 ⁷ sperm)	3.7±0.5	3.0±0.5	N.S.
Mg (μg/ml)	97.3±5.2	181.4±9.5	P<0.01

mean±S.E.

Table 3. Semen characteristics by seminal ultrafiltrable zinc concentration

	Ultrafiltrable Zinc		P-value
	≤73 μg/ml (n=15)	>73 μg/ml (n=15)	
Density (×10 ⁶ /ml)	57.1±7.4	47.7±11.0	N.S.
Motility Rate (%)	44.4±5.9	40.2±4.4	N.S.
Mean Velocity (μm/sec)	25.2±1.8	30.5±1.0	P<0.05
Abnormal Sperm (%)	23.3±2.1	33.6±4.8	N.S.
SPA (%)	65.2±11.8	62.7±13.9	N.S.
Acrosin Activity (mU×10 ⁷ sperm)	1.7±0.3	3.6±0.9	N.S.

mean±S.E.

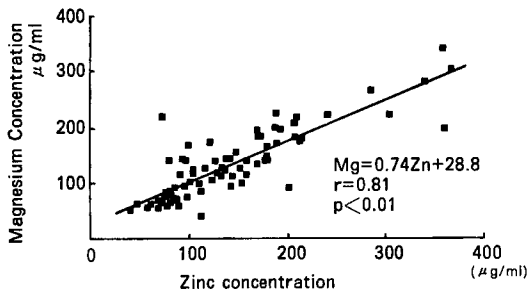


Fig. 2. Correlation between zinc and magnesium concentration in seminal plasma.

/ml (21~120) であった (Fig. 3)。精漿中限外濾過性亜鉛濃度が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 ($p<0.05$) に高かった (Table 3)。精漿中亜鉛濃度と平均運動速度との間には正の相関関係を認め、相関係数 $r=0.434$ ($p<0.05$)、回帰直線は $Y=0.09X+21.0$ であった (Fig. 4)。

3. ゲル濾過法による低分子物質結合亜鉛の分析 (Fig. 5)

分子量の大きく異なった物質の分離に有用な Sephadex G-25 を用いた精漿のゲル濾過クロマトグラム (Fig. 5-a) をみると、精漿は 280 nm の吸光度

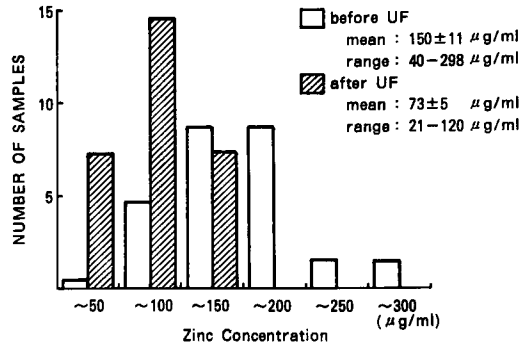


Fig. 3. Zinc concentration before and after ultrafiltration in 30 specimens of seminal plasma.

で3つのピークを示している。精漿中亜鉛濃度は $Ve/Vo=1.15$ と $Ve/Vo=1.64$ 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た。

精漿の限外濾過液のゲルクロマトグラム (Fig. 5-b) は精漿と同様に 280 nm の吸光度で3つのピークを示したが、最初のピークが痕跡程度であり、分子量 30,000以上の高分子物質が除去されたためと考えられた。

対象とした亜鉛化合物は、クエン酸亜鉛 $Ve/Vo=$

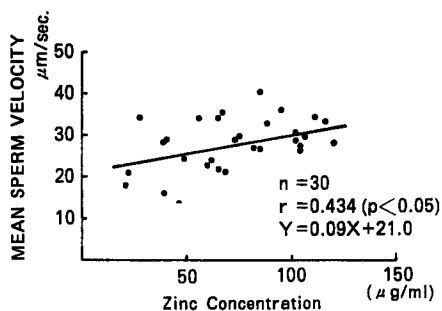


Fig. 4. Correlation between mean sperm velocity and ultrafiltrable zinc concentration

1.64, ビリコン酸亜鉛 $V_e/V_o=1.94$, 塩化亜鉛 $V_e/V_o=3.27$ にピークを示し, 精液中低分子物質結合亜鉛とクエン酸亜鉛のピークが $V_e/V_o=1.64$ で一致し

た.

このことから, 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.

4. Gas chromatography/mass spectrometry によるクエン酸の同定

Fig. 6 はゲル濾過にて分離された低分子物質結合亜鉛およびクエン酸亜鉛のメチルエステル誘導体を GC/MS にて分析した total ion chromatogram (TIC), マスクロマトグラム (MC, Fig. 6-a) およびマススペクトル (MS, Fig. 6-b, c) が示されている. 試料と標品を GC/MS の同条件で分析し, GC における保持時間の一致および MS における開裂様式が合致するかどうかを検討した.

なお, 本実験ではクエン酸亜鉛を 5% 塩酸メタノール中で加熱高圧分解し, 亜鉛は塩化物とし, 同時にクエン酸をトリメチルエステル化を行い分析された. な

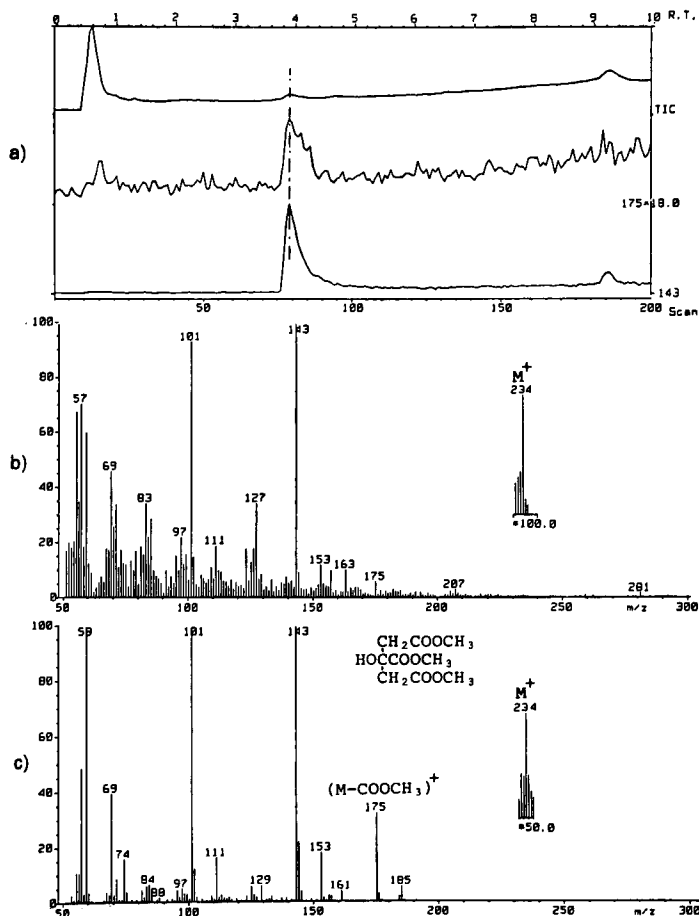


Fig. 5. Elution patterns of seminal samples (a); ultrafiltrated seminal samples (b) and standard samples (c)

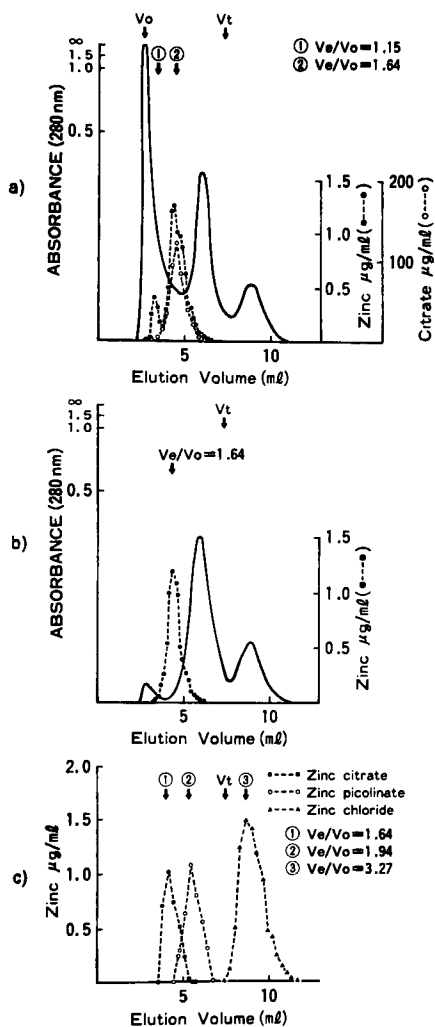


Fig. 6. Thermochromatograms of total ion and fragment ions of seminal sample (a), mass spectra of seminal sample (b) and standard zinc citrate (c)

お、試料は凍結乾燥後同手法でメチルエステル化を計った。

試料と標品の GC/MS 分析は、GC で両者の保持時間が一致し、MS で M^+ として m/z 234 をはじめ、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 に観測され、開裂様式も合致した。

ゲル濾過クロマトグラフィーおよび GC/MS の両者の結果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精子運動能の変化

1) 洗浄射出精子 (Fig. 7)

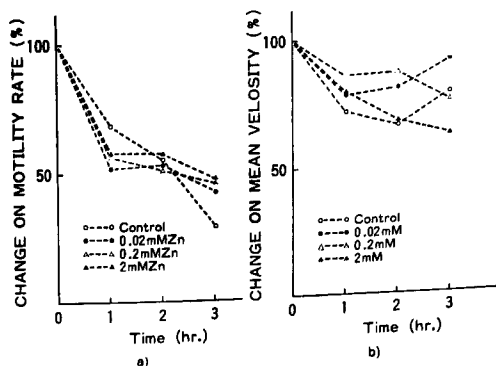


Fig. 7. Change of motility rate (a) and mean velocity (b) on washed ejaculated spermatozoa.

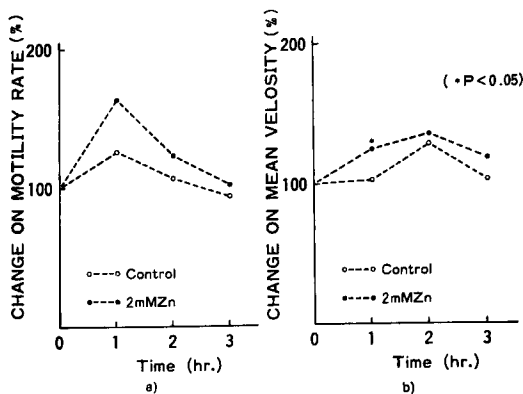


Fig. 8. Change of motility rate (a) and mean velocity (b) on spermatozoa with asthenozoospermia.

対象とした正常者の精子運動率はコントロール群に比し、亜鉛添加群で早期に運動率の低下傾向を認めるものの、その後比較的良好に保たれたが、推計学的有意差はなかった。各濃度の亜鉛添加群間にも著明な差はなかった。精子平均運動速度についても各群間に有意差はなかった。

2) 精管精巢上体精子

精管精巢上体精子については、精巢摘出から精管精巢上体精子浮遊液作製までに約1時間要したためか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なかった。亜鉛の添加によっても精管精巢上体精子の精子運動能に変化はなかった。

3) 精子無力症患者射出精子 (Fig. 8)

精子無力症患者精液に亜鉛を添加し、精子運動能の変化を経時的に測定した。亜鉛添加群ではコントロール群に比し、早期に運動率の上昇を認め、その後も運

て有意 ($p < 0.05$) に増加し、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の変化とを検討したところ、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。

統計的解析はデータの性質に応じて Mann-Whitney U 検定, Student-t 検定, 最小二乗法を用い、有意水準は 5% を採用した。

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。

この亜鉛は 1869 年, Raulin により *Aspergillus niger* の必須栄養素であることが初めて示され²⁾, 1934 年には Tood らがラットの食餌に亜鉛が必須であることを指摘した²⁾ これらの栄養学的な研究とあいまって、生細胞中における亜鉛代謝および機能に関する研究が進められ、1939 年には Keilin と Mann³⁾ は亜鉛がヒト炭酸脱水素酵素の構成成分であることを示した。その後、多くの亜鉛を含む金属酵素が次々と発見され、代謝における亜鉛の重要性が注目されるに至った。1961 年, Prasada³¹⁾ はイランやエジプトの若い男性にみられる第二次性徴の抑制に伴う性機能不全は亜鉛の欠乏によるものとし、ヒトにおける亜鉛の栄養学的重要性を見だし、ヒトにおける亜鉛の必須性がさらに確立された。

男性生殖機能と亜鉛については、1921 年に Bertrand と Vladesco¹⁾ がヒト精液中および前立腺に高濃度の亜鉛が含まれていることを報告し、亜鉛の生殖における重要な役割が示唆された。

その後、精漿中亜鉛は前立腺に由来することが明らかにされた。Mackenzie ら⁵⁾ はヒト前立腺液の亜鉛含量を研究し、前立腺液は乾燥重量で他の体液よりも多くの亜鉛を含んでいることを報告した。Lindholmer と Eliasson³²⁾ は分割射精精液の前立腺分画すなわち前半の 1/3 分画の平均亜鉛濃度は 294 $\mu\text{g/ml}$ であるのに対し、後半の 2/3 分画の精漿液分画では 44 $\mu\text{g/ml}$ であったと述べている。さらに、Eliasson³³⁾ は精漿中亜鉛濃度と精漿中酸性フォスファターゼ活性との間に正の相関があり、ヒトでは血清に比べて精漿では 100 倍、前立腺液では 300 倍もの亜鉛を含有していることを報告している。

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。精漿中亜鉛濃度の低下は、精漿液による希釈ある

いは前立腺の分泌機能低下によって生じると考えられており、Caldamone ら³⁴⁾ は精漿中亜鉛濃度は、前立腺分泌機能と相関し、前立腺炎の存在下ではその濃度は低下しているとし、Eliasson ら³⁵⁾ は慢性前立腺炎・精囊炎を有する患者の大部分で精漿中亜鉛濃度と精漿中酸性フォスファターゼ活性値が著明に低下していることを報告した。

精漿中亜鉛濃度の平均値は、Mann⁴⁾ は 140 $\mu\text{g/ml}$, Eliasson ら³³⁾ は 133 $\mu\text{g/ml}$, 石川ら³⁶⁾ は 156 $\mu\text{g/ml}$ とし、著者らも 141 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ同様であり、精漿中亜鉛濃度分布も Eliasson ら³³⁾ の成績と同様の分布を示した。

精子濃度、精子運動率あるいは精子奇形率の異常を示す患者では亜鉛濃度が低下しているとの報告がある。すなわち、Eliasson ら³⁷⁾ は精漿中亜鉛濃度が 50 $\mu\text{g/ml}$ 以下の検体の 75% に、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の検体の 40% に運動率の低下ならびに高い精子奇形率を認めたとしている。真田ら³⁸⁾ は精漿中総亜鉛量の増加とともに総精子数が増加する傾向を認め、前立腺固有の分泌能と精子形成能は相関関係にあるとしている。志田ら³⁹⁾ は精液中亜鉛濃度は精子濃度とは関係がなかったが、精子運動率と相関することを報告した。Homomni⁴⁰⁾ は精液所見が不良になるにつれ精漿中亜鉛濃度が低下する傾向にあるとしている。しかし、一方では、これら精子パラメータと亜鉛濃度との間にはなんらの関係も認めなかったという報告も少なくない^{41, 42)}

これら精子パラメータ、特に精子運動率と精漿中亜鉛濃度についての報告例の運動率算定法は肉眼的観察によるものであり、客観的な評価法で検討された報告はない。われわれは、当科で開発した客観的な検査法であるマイクロコンピュータを利用した自動精液検査装置 (Bilevel Picture Processing System) を用いて、精子運動率および平均運動速度を測定し、それらの成績と精漿中亜鉛濃度との関連、ならびに精子濃度、ババニコロー染色による奇形率、アクロシン活性および精子侵入率との関連を検討した。しかし、いずれのパラメータとも精漿中亜鉛濃度との間には相関関係は認めなかった。精漿中亜鉛濃度とマグネシウムとの間には、Eliasson ら⁴³⁾ および真田ら³⁸⁾ の結果と同様に強い正の相関関係を認めたと、マグネシウムは亜鉛と同様に前立腺および精漿中に高濃度にみられ、また、精漿中マグネシウムは前立腺由来とされていることから当然の結果とも考えられる。Arver と Eliasson⁴⁴⁾ は精漿中亜鉛の 60% が透析性亜鉛であるとしている。Arver²²⁾ はゲルクロマトグラフィーにより精

動率は良好に保たれる傾向にあったが、推計学的有意差はなかった。精子平均運動速度の変化については亜鉛添加群ではコントロール群に比し、1時間目において漿中亜鉛結合物質を検索し、運動性不良な精液では分子量80,000以上の高分子物質と結合した亜鉛の割合が高いとしている。著者らはこの成績から高分子物質結合亜鉛が精子運動を抑制的に、低分子物質結合亜鉛は精子運動性を促進的に作用すると考え、まず精漿の生理的条件を変えることなく低分子物質結合亜鉛を分離することができる限外濾過法を用いて、限外濾過性亜鉛について検討した。限外濾過性亜鉛濃度の平均値が73 µg/mlであり、検体を73 µg/ml以上と73 µg/ml未満の2群に分け、各種精子パラメータを比較検討したところ、精子濃度、運動率、奇形率、アクロシン活性および精子侵入率において両群間に有意差はなく、平均運動速度においてのみ両群間に有意差を認めた。限外濾過性亜鉛濃度と平均運動速度との間に正の相関関係を認めた。限外濾過液をゲル濾過法により分離し、亜鉛を分析したところ高分子物質結合亜鉛は除去されており、低分子物質結合亜鉛のみ存在した。これらの結果から、限外濾過性亜鉛すなわち、低分子結合亜鉛は精子運動能に関係していることが示唆され、限外濾過性亜鉛濃度は精子運動能に関する marker として有用と思われた。

亜鉛結合物質について、前述したように Arver²²⁾ はゲルクロマトグラフィーにより精漿中亜鉛結合物質を検索し、亜鉛は分子量80,000以上の高分子物質、分子量3,000以下の低分子物質あるいはその中間の物質と結合しているが、分割射精精液の前立腺分画では低分子物質とのみ結合していると報告した。さらに、Kavanagh⁴⁵⁾ はいずれも同定されていないが前立腺組織での亜鉛は高分子、中間物質および低分子物質とほぼ均等に結合していると報告した。前立腺炎症例では精漿中亜鉛の低下および精子運動能の低下を認めることや限外濾過性亜鉛濃度と精子運動能との間に相関を認めるというわれわれの成績から、前立腺の機能および精子と精漿中亜鉛との関連を理解する上で、前立腺から分泌される亜鉛結合物質、すなわち亜鉛結合低分子物質を同定することはきわめて有意義なことと考えられる。亜鉛結合低分子物質について Reed⁴⁶⁾ は前立腺肥大組織を用いて、それをヒスチジンに富む亜鉛結合ペプチドであるとしたが、Fair¹⁵⁾ は前立腺液中の低分子物質亜鉛は塩化亜鉛であるとした。Boursnell²⁸⁾ はそれはクエン酸亜鉛と仮定し、Lonnerdal²⁷⁾ は人乳から低分子物質結合亜鉛を分離し、その溶出パターンがクエン酸亜鉛のそれと一致

することからこの低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛であるとしている²⁶⁾。Arver²²⁾ は低分子物質結合亜鉛の scanning spectrometry により、低分子物質結合亜鉛とクエン酸亜鉛がともに210 nmで最大吸収を示し、一致したことから、それはクエン酸亜鉛であると推測した。今回、gas chromatography/mass spectrometry によりゲル濾過法で分画分取した低分子物質結合亜鉛とクエン酸亜鉛の純品をGC/MSの同一条件で分析し、GCにおける保持時間の一致およびMSにおける開裂様式が合致したことから、低分子物質結合亜鉛がクエン酸亜鉛であることがわれわれによりはじめて同定された。

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、精管精巣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。Saito⁹⁾ はヒト射出精子は精管精巣上体精子よりも高い運動性を示し、亜鉛含量の少ない精管精巣上体精子に亜鉛を0.02 mM程度添加すると、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。精管精巣上体精子については、採取標本内に前進運動性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運動性精子を得られなかった。このことに関して、Lindlömer¹⁰⁾ はヒト精管精巣上体精子は精子鞭毛運動は認めるが精子前進運動性は欠如していると、精管精巣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運動性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巣上体精子浮遊液では、完全に精漿因子を除去し、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を含んで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。これらのことから、ヒト精管精巣上体精子および洗浄射出精子においては、精子浮遊液にクエン酸亜鉛を添加しただけでは精子運動の開始あるいは運動性を促進することはできず、精漿中の他の諸因子の考慮が必要と考えられた。

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作用を裏付けるものと考えた。

以上の同定の成績や精子運動能に関する機能的特質の結果より、精漿中の低分子物質結合亜鉛はクエン酸亜鉛であり、これは精子の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。

結 語

精漿中亜鉛の生理的意義を明らかにするため、基礎的実験を行い次のような結果を得た。

1. 精子パラメータと精漿中亜鉛濃度と、とくに生理的活性型とされる精漿中蛋白非結合亜鉛（限外濾過性亜鉛）との関連を検討し、蛋白非結合亜鉛と精子運動能との間に正の相関関係があることが明らかとなった。

2. 蛋白非結合亜鉛とし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 によって本物質はクエン酸亜鉛であることが証明された。

3. 精子無力症患者精液にクエン酸亜鉛を添加することにより、精子運動能が改善された。

稿を終えるにあたり、アンドロロジー全般にわたって広くご指導を賜りました恩師石神襄次名誉教授に深く感謝の意を表します。

また、亜鉛と精子機能について御助言をいただきました斎藤宗吾博士、亜鉛の測定および低分子物質結合亜鉛の分析などに御懇意なる御助言をいただきました本学公衆衛生学教室住野公昭教授、三尾隆弥助手をはじめご協力いただいた当教室の諸先生方に感謝いたします。

本論文の要旨は第31回日本不妊学会学術講演会（東京）および第12回国際不妊学会（シンガポール）において発表した。

文 献

- Bertrand G and Vladesco R: Intervention probable due zinc dans les phenomenes de fecondation chez les animaux vertebres. *CR Acad Sci D* 173: 176~179, 1921
- Underwood EJ: Trace elements in human and animal nutrition. 3rd edition Academic Press. New York, 1971
- Mawson CA and Fisher C: Zinc and carbonic anhydrase in human semen. *Biochem J* 55: 696~699, 1953
- Mann T and Lutwak-Mann C: Male reproductive function and semen. Springer-Verlag, Berlin, 1981
- Mackenzie AR, Hall T and Whitmore WF Jr.: Zinc content of expressed human prostatic fluid. *Nature* 193: 72~73, 1962
- Lindholmer C and Eliasson R: The effects of albumin, magnesium and zinc on human sperm survival in different fractions of sperm ejaculates. *Fertil Steril* 25: 424~428, 1974
- Lindholmer C and Glavman H: Zinc and magnesium in human male reproductive tract. *Andrologia* 4: 213~222, 1972
- Janic J, Zeitz PD and Whitmore WF Jr: Seminal fluid and spermatozoon zinc level and relationship to human spermatozoon motility. *Fertil Steril* 22: 573~580, 1971
- Saito S, Bush IM and Whitmore WF Jr: The effects of certain metals and chelating agents on rat and dog epididymal spermatozoon motility. *Fertil Steril* 18: 517~529, 1967
- Lindholmer C: Importance of seminal plasma for human sperm motility. *Biol Reprod*. 10: 533~542, 1974
- Kvist U: Sperm nuclear chromatin decondensation ability *Acta Physiol Scand Suppl* 486: 1~24, 1980
- Bedford JM, Bent MJ and Calvin HI: Variation in the structural character and stability of nuclear chromatin in morphologically normal spermatozoa. *J Reprod Fert* 33: 19~29, 1973
- Steven FS, Griffin MM and Chantler EN: Inhibition of human and bovine sperm acrosin by divalent metal ions. Possible role of zinc as a regulator of acrosin activity. *Int J Androl* 5: 401~412, 1982
- Lindholmer C: Toxicity of zinc ions to human spermatozoa and influence of albumin. *Andrologia* 6: 7~16, 1974
- Fair WR, Couch J and Wenher N: Prostatic antibacterial factor: Identity and significance. *Urology* 7: 169~177, 1976
- Lindholmer C and Eliasson R: In vitro release and uptake of zinc and magnesium by human spermatozoa. *Int J Fertil* 19: 56~62, 1974
- Huacuja L, Sosa A, Delgado NM and Rosado A: A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sci* 13: 1383~1394, 1973
- Clvin HL, Hwag FHF and Wohlrab H: Localization zinc in a dense fiber connecting piece fraction of rat sperm tail analogues chemically to hair keratin. *Biol Reprod* 13: 228~239, 1975
- Rosado A, Huacuja L, Delgado NM, Merchant H and Pancardo RM: Elemental composition of subcellular structures of hu-

- man spermatozoa. A study by energy dispersive analysis of X-ray. *Life Sci* **20**: 647~656, 1977
- 20) Chavapil M: New aspects in the biological role of zinc. A stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci* **13**: 1041~1049, 1973
- 21) Skandhan KP, Ckandhan S and Mehta YB: Seminal electrolytes in normal and infertile subjects. *H. Zinc. Experimentia* **34**: 1476~1477, 1978
- 22) Arver S: Studies on zinc and calcium in human seminal plasma. *Acta Physiol Scand Suppl* **507**: 1~23, 1982
- 23) Hazama M, Okada H, Matsumoto O, Ka-midono S and Ishigami J: Automatic analysis of sperm characteristics by means of a microcomputer system. *Studies in Fertility and Sterility*. MTP Press Limited, Lancaster, 1985
- 24) Macleod J: Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int J Fertil* **9**: 281~295, 1964
- 25) 岡田 弘・岡本恭行・江藤 弘・岡 伸俊・浜口毅樹・羽間 稔・松本 修・守殿貞夫・石神囊次: Fertile male および不妊患者の acrosin 活性に関する研究—preliminary report—. *西日泌尿* **46**: 1017~1021, 1984
- 26) 浜口毅樹・松本 修・守殿貞夫: 男性不妊における精子授精能に関する研究—透明帯除去ハムスター精子侵入試験とヒト精子授精能— *泌尿紀要* **32**: 1867~1878, 1986
- 27) Lonnerdal B, Stanisiowski AG and Hurley LS: Isolation of a low molecular weight zinc binding ligand from human milk. *J Inorg Biochem* **12**: 71~78, 1980
- 28) Bournsnell JC, Briggs PA, Lavon U and Butler EJ: The association of zinc with some components of boar vesicular secretion and seminal plasma. Gel filtration and dialysis studies. *J Reprod Fertil* **34**: 57~71, 1971
- 29) Evans GW and Johnson PE: Characterization and quantitation of zinc-binding ligand in human milk. *Pediatr Res* **14**: 876~880, 1980
- 30) Keilin D and Mann T: Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J* **34**: 1163~1176, 1940
- 31) Prasada AS, Halsted JA and Nadimi M: Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Amer J Med* **31**: 532~546, 1961
- 32) Lindholmer C and Eliasson R: Zinc and magnesium in human spermatozoa. *Int J Fertil* **17**: 153~160, 1972
- 33) Eliasson R and Lindholmer C: Zinc in seminal plasma. *Andrologia* **3**: 147~153, 1971
- 34) Caldamone AA, Valvo JR and Cockett ATK: Evaluation of the infertile or subfertile male. *Urologic Clinic of North America* **8**: 17~39, 1981
- 35) Eliasson R, Molin L and Rajka G: Involvement of the prostate and seminal vesicles in urethritis with special reference to semen analyses. *Andrologia* **2**: 1 79, 1970
- 36) 石川博通・小磯謙吉・友政 宏・吉井慎一・武島仁・梅山友一: 男性不妊症患者における精液中微量金属に関する研究. *日泌会誌* **77**: 1159~1163, 1986
- 37) Eliasson R, Lindholmer C and Leander G: Zinc and magnesium in human seminal plasma. *Int Urol Nephrol* **2**: 309~312, 1970
- 38) 真田俊吾・吉田 修: 男性不妊症における精漿中亜鉛濃度および総亜鉛量—とくに前立腺分泌能との関連について—. *泌尿紀要* **31**: 1971~1987, 1985
- 39) 志田圭三・島崎 淳・古谷信雄・田谷元佑: 男性不妊症の精液内科学成分の研究. *日不妊会誌* **16**: 217~223, 1971
- 40) Homonni ZT, Matzkin H, Fainman N, Paz G and Kraicer PF: The cation of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. *Fertil Steril* **29**: 539~542, 1978
- 41) Mawson Ca and Fisher MI: Zinc in aspermic human semen. *Nature* **177**: 190, 1956
- 42) Abyholm T, Kofstad J, Molne K and Stray-Pedersen S: Seminal plasma fructose, zinc, magnesium and acid phosphatase in case of male infertility. *Int J Androl* **4**: 75~81, 1981
- 43) Eliasson R and Lindholmer C: Magnesium in seminal plasma. *Invest Urol* **9**: 286~289, 1972
- 44) Arver S and Eliasson R: Zinc and zinc ligands in human seminal plasma. II. Contribution by ligands of different origin to the zinc binding properties of seminal plasma. *Acta Physiol Scand* **115**: 217~224, 1982
- 45) Kavanagh JP: Zinc binding properties of human prostatic tissue, prostatic secretion and seminal plasma. *J Reprod Fert* **68**: 359~363, 1983
- 46) Reed MJ and Stitch SR: The uptake of testosterone and zinc *in vitro* by the human being hypertrophic prostate. *J Endocrinol* **58**: 405~419, 1973
- 47) 毛利秀雄: 精子の運動性. 哺乳動物の精子. 飯田勲編, p. 258~292, 学窓社, 東京, 1972
(1987年8月19日迅速掲載受付)