

## 副 辜 丸 に 関 す る 研 究

## 第II報：家兎副辜丸組織中カルニチン濃度について

東邦大学医学部泌尿器科学教室（主任：安藤 弘教授）

中 山 孝 一

## STUDIES ON EPIDIDYMIS

## II: CARNITINE LEVELS IN RABBIT EPIDIDYMAL TISSUE

Koichi NAKAYAMA

From the Department of Urology, Toho University School of Medicine, Tokyo

(Director: Prof. K. Ando)

Carnitine is known to be indispensable to  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids and it occurs in seminal fluid, spermatozoa, and epididymis tissue. In the present study, epididymal tissue levels of carnitine were measured based on the assumption that such measurement would provide an insight into epididymal secretory function.

**Materials and Methods:** Male rabbits each weighing about 3 kg were used. Experimental acute epididymitis was induced by inoculating into the vas deferens 0.1 ml of *Ps. aeruginosa* A14, inoculum size adjusted to  $10^6$  cells/ml, and the animals were examined 4 days after surgery. For the vasectomy group, only the vas deferens was ligated, and animals in this group were studied at 1 week and 1, 2 and 3 months after surgery. Epididymal tissue levels of carnitine were determined by the enzymatic method of Maebashi et al.

**Results:** The mean tissue level of carnitine in the control group (12 rabbits) was  $350.7 \pm 136.5 \mu\text{g/g}$  wet wt for the epididymal caput,  $573.5 \pm 282.1 \mu\text{g/g}$  wet wt for the corpus,  $1,378.9 \pm 663.0 \mu\text{g/g}$  wet wt for the proximal cauda,  $1,134.9 \pm 475.3 \mu\text{g/g}$  wet wt for the distal cauda,  $723.5 \pm 459.2 \mu\text{g/g}$  wet wt for the vas deferens, and  $199.4 \pm 232.9 \mu\text{g/g}$  wet wt for the testicle. In the acute epididymitis group (6 rabbits), on the other hand, epididymal tissue levels of carnitine were remarkably lower than that in the control ( $t < 0.001$ ), with the mean tissue level of carnitine in these diseased animals being  $159.0 \pm 119.1 \mu\text{g/g}$  wet wt for the corpus,  $76.1 \pm 48.8 \mu\text{g/g}$  wet wt for the proximal cauda, and  $60.0 \pm 46.9 \mu\text{g/g}$  wet wt for the distal cauda. Even in the vas deferens it was significantly lowered to  $140.8 \pm 127.3 \mu\text{g/g}$  wet wt ( $t < 0.01$ ). In the vasectomy group (3 rabbits), the tissue levels of carnitine in the epididymal caput, corpus and cauda showed a tendency toward elevation at 1 week and 1 month after surgery. At 2 and 3 months, the epididymal tissue levels of carnitine in this group were generally lowered, but the difference in level compared to that of the control was not statistically significant.

**Key words:** Carnitine, Epididymis, Epididymitis, Vasectomy

## は じ め に

副辜丸の機能的役割は、精子の転送、濃縮、成熟および貯蔵などの作用が挙げられる。このうち精子の成

熟には、副辜丸管上皮よりの分泌物が深く関与しているものと思われる。

カルニチンは、長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化に不可欠なものであるが、Marquis と Fritz<sup>1)</sup>が rat の epididymal

fluid 中に高濃度に存在することを報告して以来、精子の成熟との関連などについても研究されるようになった。そしてカルニチンが、副睪丸管上皮より分泌されていると考えられているので、副睪丸組織中のカルニチン濃度を測定すれば副睪丸の機能を知ることができると考えられる。

如上の研究史を背景として、今回著者は、雄家兎を用い、精管結紮群、急性副睪丸炎群を実験的に作製し、これらの副睪丸組織中のカルニチン濃度を測定することにより、病的状態にある副睪丸の分泌機能を探索しようと企図し実験をおこなった。その結果、興味ある成績が得られたのでここに報告する。

### 実験材料および実験方法

3 kg 前後の雄家兎を用い、実験的急性副睪丸炎群と精管結紮群を作製した。使用した動物数は、コントロール群12羽、急性副睪丸炎実験群6羽、精管結紮群では1週、1カ月、2カ月、3カ月の4群に分け各群3羽である。

急性副睪丸炎の作製法については、すでに前報<sup>2)</sup>で詳細に報告したが、今回の実験では、*P aeruginosa* A14 を  $10^8$  cells/ml に調整した菌液0.1 ml を精管に注入し、急性副睪丸炎を惹起させ、術後4日目に屠殺し実験に供した。

いっぽう、精管結紮群の作製は、急性副睪丸炎作製実験と同様に、静脈麻酔下で鼠径部に約1 cm の皮膚切開を加え、精管のみを露出して結紮切断した。この際血管を損傷しないよう細心の注意をほらった。術後1週、1カ月、2カ月、3カ月後に再び、静脈麻酔下に睪丸と副睪丸を露出し、脱血後睪丸と副睪丸および精管を剝離して、Fig. 1 に示すごとく副睪丸を caput, corpus, proximal cauda および distal cauda に4分割し、組織重量を測定した後、カルニチン濃度測定をおこなった。

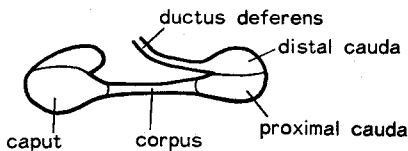


Fig. 1. Diagram of rabbit epididymis

カルニチン濃度の測定法は、前橋ら<sup>3)</sup>の酵素法に従った (Fig. 2, 3)。組織に20% KOH を加え、80°C の温水浴下に30分間加水分解させた後、1.5倍量の10% ケイフッ化水素酸を加え振盪し、さらに炭酸カルシ

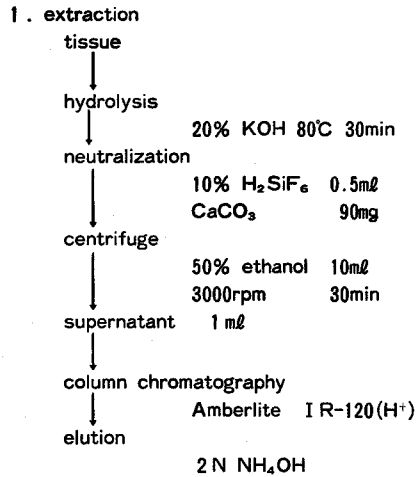


Fig. 2. Carnitine assay method in rabbit epididymal tissue

### 2. enzymatic assay

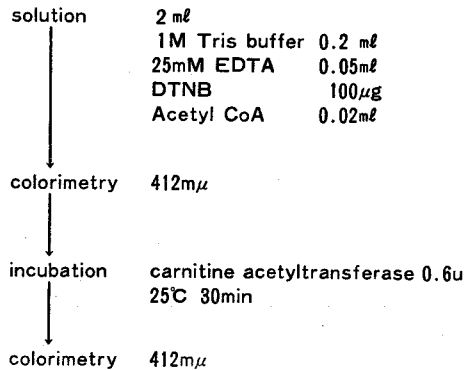


Fig. 3. Carnitine assay method in rabbit epididymal tissue

ウムを加え pH 5.4 に調整する。その後50%エタノール10 ml を加え、3,000 rpm 30分間遠心沈澱する。上清1 ml を amberlite IR-120(H<sup>+</sup>) column chromatography にかけて十分に水洗したのち、2Nアンモニア溶液で溶出する。これを乾固し、蒸留水10 ml に溶解させたものを組織抽出液とした。カルニチンの定量は、組織抽出液2 ml に1 M Tris 緩衝液、25 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、5, 5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)、acetyl-CoA を加えて、412 m $\mu$  で比色した後、carnitine acetyltransferase 0.6単位を加え、25°Cで30分間振盪し、再度412 m $\mu$  で比色した後、前値との吸光度差を求め組織中カルニチン濃度を算出した。

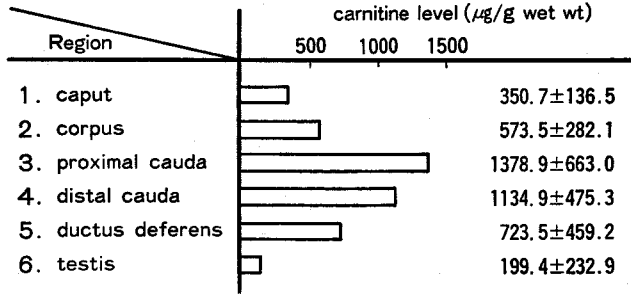


Fig. 4. Carnitine levels in epididymal tissue of normal rabbits

実験成績

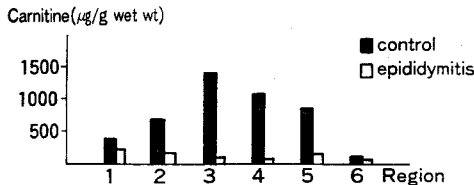
1) コントロール群の辜丸, 副辜丸および精管組織内のカルニチン濃度 (Fig. 4)

proximal cauda が最高濃度値 (1378.9±663.0 µg/g wet wt) を示した. ついで distal cauda, ductus deferens, corpus, caput の順に低くなり, testis は最低値 (199.4±232.9 µg/g wet wt) を示した. 全副辜丸組織内カルニチン濃度に対する proximal cauda と distal cauda の占める割合はそれぞれ40.1%, 33%で尾部が全体の73%を含有していた.

2) 急性副辜丸炎群の辜丸, 副辜丸および精管組織内のカルニチン濃度 (Fig. 5)

副辜丸炎時におけるカルニチン濃度の分布はコントロール群と異なり, caput が最高値の 221.9±209.3 µg/g wet wt を示し, corpus と ductus deferens がこれにつき caput の 72~64%で, proximal

Region	Carnitine levels (µg/g wet wt)
1. caput	221.9 ± 209.3
2. corpus	159.0 ± 119.1 *
3. proximal cauda	76.1 ± 48.8 *
4. distal cauda	60.0 ± 46.9 *
5. ductus deferens	140.8 ± 127.3 **
6. testis	63.8 ± 40.0



\*: Significantly different from control, T<0.001

\*\*: Significantly different from control, T<0.01

Fig. 5. Carnitine levels in rabbit epididymal tissue of epididymitis

cauda, distal cauda および testis は caput のほぼ 1/3 前後の値を呈した. これらの値は Fig. 5 の下図に示すようにコントロール群に比し, corpus, proximal cauda および distal cauda において有意なカルニチン濃度低下を示し (t<0.001), また ductus deferens も減少を示した (t<0.01).

同様に caput, testis ではコントロール群より減少を示したが, 両者には有意差は認められなかった.

3) 精管結紮群の辜丸, 副辜丸および精管組織内カルニチン濃度 (Fig. 6)

i) 精管結紮1週後でのカルニチン濃度は, caput, corpus, proximal cauda でややコントロール群より高値を示し, distal cauda ではやや低値を示めしたが, ductus deferens と testis では等値を示した. しかし, いずれもコントロール群値との間に有意差はなかった.

ii) 精管結紮1カ月後のカルニチン濃度は, 結紮1週後の各部の濃度より一段と上昇し, かつ各部位ともこの実験群の最高値を示しているが, testis においては低値を示した. しかし, これらの数値はコントロール群, 1週後のいずれとも有意差がなかった.

iii) 精管結紮2カ月後のカルニチン濃度は, 結紮1カ月後の値よりいずれの部においても減少傾向を示したが, コントロール群値との対比では, corpus と ductus deferens 以外は低い値を示した. testis ではコントロール群とほぼ同等であった.

iv) 精管結紮3カ月後のカルニチン濃度は, caput, corpus, proximal cauda, testis においては, 2カ月後より低くかつコントロール群よりも低い値を示したが, distal cauda においてはコントロール群とほぼ等値を示し, ductus deferens においてはコントロール群より高かつ1カ月後の値とほぼ等しい高い値を示した.

以上の結果を通覧すると, 副辜丸の caput, corpus, cauda のカルニチン濃度は精管結紮後1週から1カ

Region	Period			
	1 week	1 month	2 month	3 month
caput	390.5±156.0	406.7±100.6	324.3±243.7	213.4± 97.3
corpus	614.8±243.8	896.5±691.9	741.4±747.4	441.7±526.1
proximal cauda	1410.2± 38.8	1630.2±680.0	1179.3±920.9	940.2±508.9
distal cauda	1116.5± 98.6	1358.1±418.2	823.4±647.8	1098.3±717.7
ductus deferens	729.0± 70.9	1277.1±672.9	1145.0±827.6	1305.1±969.8
testis	180.8± 9.5	126.1± 17.8	181.4± 74.6	68.4± 44.5

(μg/g wet wt)

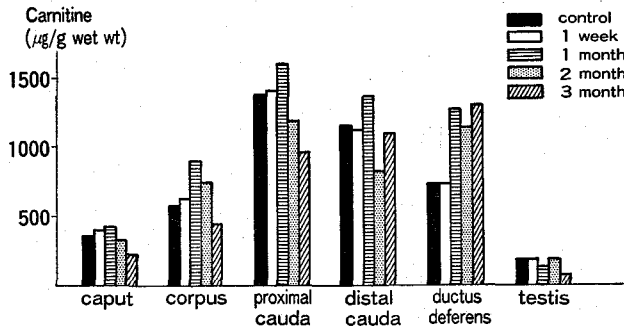


Fig. 6. Carnitine levels in rabbit epididymal tissue after vasectomy

月後まではコントロール群に比し、増加傾向にあり、この時期を最高値として2カ月、3カ月と経過するに従い、次第に減少傾向を認めたが、統計学的にはいずれの部位においてもコントロール群、1週後、1カ月後、2カ月後、3カ月後の値との間に有意差を認めなかった。

考 察

Fitz<sup>4,5)</sup> は、カルニチンが活性化された脂肪酸と結合して acylcarnitine となり、脂肪酸を酸化の場であるミトコンドリアの中へ運び入れる作用のあることを示し、脂肪代謝においてカルニチンは不可欠なものであることをあきらかにした。

カルニチンの合成について、Broquist<sup>6)</sup>は、*Neurospora crassa* を用い、Fig. 7 に示すような lysine からの合成経路を確立し、Frenkel と Carter<sup>7)</sup> は、trimethyllysine (TML) 代謝について [<sup>3</sup>H-methyl]-TML を rat に静注し、組織中の radioactivity について検討した結果、腎臓にもっとも多く集積することと、腎臓を摘出した時には肝臓での radioactivity も減少することをあきらかにし、腎臓が肝臓でのカルニチン合成の intermediate の役割を果し、trimethyllysine を butyrobetaine に変換するものと考えた。しかし Rebouche<sup>8)</sup> は、ヒトにおいては肝臓ばかりでなく、腎臓でも r-butyrobetaine の生合成がおこな

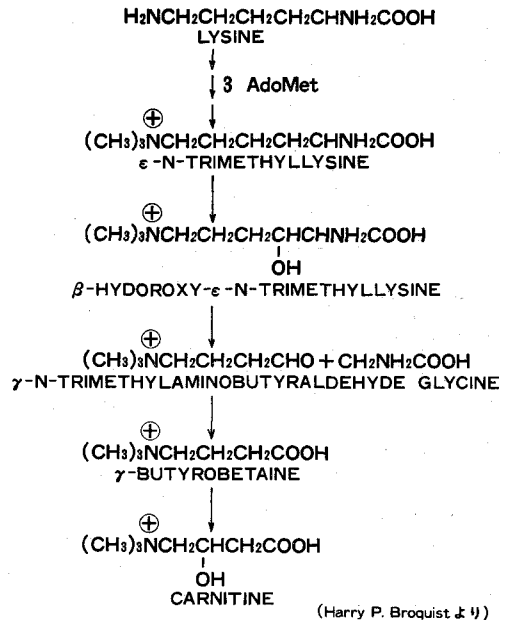


Fig. 7. Pathway of carnitine biosynthesis in *Neurospora crassa*

われていると報告している。

副睾丸組織内のカルニチンに関しては、1965年 Marquis と Fritz<sup>1)</sup> が rat について研究したことが始まりである。彼の報告によると caput epididymis

には  $10.8 \mu \text{ moles/g dry wt}$ , caudal epididymis には  $83.5 \mu \text{ moles/g dry wt}$  と。尾部に多く存在することをあきらかにした。Casillas と Chaipayungpan<sup>9)</sup> は rabbit で proximal cauda に  $2,320 \pm 404 \text{ n mol/g wet wt}$ , distal cauda に  $1,669 \pm 196 \text{ n mol/g wet wt}$  そして corpus で  $667 \sim 760 \text{ n mol/g wet wt}$  と proximal cauda でもっとも多くカルニチンが含有されていると報告している。今回の著者の実験結果からコントロール群では、他の報告者と同様副睾丸尾部にカルニチンが高濃度に認められ、睾丸にも少量ながら含有することがあきらかとなった。

Brooks ら<sup>10)</sup>や Bøhmer ら<sup>11,12)</sup>は、 $[^3\text{H}]$  カルニチンや butyrobetaine の静注によりこれらが副睾丸に濃密に集積することを報告し、Casillas と Erickson<sup>13)</sup>は、副睾丸で trimethylaminobutylate からカルニチンは合成されないことを示し、Hinton ら<sup>14)</sup>は睾丸より副睾丸に送入される液中のカルニチン濃度は微量であることと micropuncture で得られた管腔のカルニチン濃度はあきらかに caput で増加しはじめる事実などより、副睾丸カルニチンの唯一の源泉は血液からのカルニチンの集積であるように思われている。

しかし、血中から副睾丸管腔へカルニチンが集積するメカニズムについてはいまだあきらかにされていない。しかし、動物で、castration した副睾丸にはカルニチンが集積しないことなどより、転送の過程は androgen dependent であることがあきらかにされている<sup>10-12)</sup>。

以上よりカルニチンは副睾丸における分泌能を示す1つの物質であり、副睾丸組織中のカルニチン濃度を測定すれば病的状態にある副睾丸機能をうかがい知る手段となると考え、実験的に急性副睾丸炎と精管結紮を家兎に作製し、それらの組織中カルニチン濃度を測定した。

その結果、急性副睾丸炎群では、corpus, proximal cauda および distal cauda では著明にカルニチン濃度は減少している事実をあきらかにした ( $t < 0.001$ ) が、caput では有意差を認めなかった。この理由は既報の急性副睾丸炎の組織学的所見で示したように、副睾丸管腔の拡大や副睾丸管上皮の扁平化、脱落や間質の炎症などの変化が惹起されるためと、その変化は caput より cauda において強いことより説明できる。

いっぽう精管結紮群では、1週、および1カ月後では caput, corpus および cauda ではコントロール群に比し組織内カルニチン濃度は増加の傾向を示したが統計学的有意差は認められなかった。

このような精管結紮時の経時的変化は、精管結紮後には当然精子や分泌物の通過障害が起こり、やがてそれらは崩壊、吸収されるので精管や副睾丸の機能は一過性に促進され、時日の経過とともに次第にその機能は低下してゆくためと思われる。

## 結 語

家兎副睾丸、精管および睾丸の組織中カルニチン濃度を前橋らの酵素法で測定し、実験的に急性副睾丸炎を作製した時と、精管結紮を施行した時のカルニチン濃度についても検討した。

### 1) コントロール群のカルニチン濃度

proximal cauda が最高濃度値 ( $1378.9 \pm 663.0 \mu \text{g/g wet wt}$ ) を示し、ついで distal cauda, ductus deferens, corpus, caput の順に低くなり、testis で  $199.4 \pm 232.9 \mu \text{g/g wet wt}$  と最低値を示した。

副睾丸尾部カルニチン濃度は副睾丸組織全体の73%を含有していた。

### 2) 急性副睾丸炎群のカルニチン濃度

caput が最高値の  $221.9 \pm 209.3 \mu \text{g/g wet wt}$  を示し、proximal cauda, distal cauda および testis は caput のほぼ 1/3 前後の値を示した。コントロール群に比し、corpus, proximal cauda および distal cauda は有意な濃度低下を示した ( $t < 0.001$ )、また ductus deferens も減少を示した ( $t < 0.01$ )。

### 3) 精管結紮群のカルニチン濃度

精管結紮1週と1カ月後の組織内濃度はコントロール群に比し、caput, corpus および cauda で増加傾向を示し、2カ月と3カ月後の濃度は、全般的に減少傾向を示したが、統計学的有意差を認めなかった。

以上の結果より、副睾丸組織中のカルニチン濃度を測定することにより副睾丸の機能を推測することが可能であることがわかった。

本論文の要旨は、第69回日本泌尿器科学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師安藤 弘教授に感謝の意を捧げるとともに直接御指導いただいた白井将文助教授に感謝致します。またカルニチン測定を御指導いただいた東北大学第2内科前橋 賢博士に深謝し、あわせて御協力をいただいた教室の諸先生方に感謝致します。

## 文 献

- 1) Marquis NR and Fritz IB: Effects of testosterone on the distribution of carnitine, acetylcarnitine, and carnitine acetyltransferase in tissues of the reproductive system of

- the male rat. *J Biol Chem* **240** : 2197~2200, 1965
- 2) 中山孝一: 副辜丸に関する研究 第1報 実験的急性副辜丸炎の作製に関する研究. *泌尿紀要* **29** : 659~667, 1983
  - 3) 前橋 賢・今村 彰・佐藤満生・鈴木由里: 組織中カルニチン濃度の測定. *脂質生化学研究* **22** : 391~393, 1981
  - 4) Fritz IB: Carnitine and its role in fatty acid metabolism, *Advances in lipid research*, Paoletti, R. and Kritchevsky, D., Vol 1, 285~334, Academic Press, New York, 1963
  - 5) Fritz IB: The metabolic consequences of the effects of carnitine on long-chain fatty acid oxidation, *Cellular compartmentalization and control of fatty acid metabolism*, Gran, F. C., 39~63, Academic Press, New York, 1968
  - 6) Broquist HP: Carnitine biosynthesis in *Neurospora crassa*, *Carnitine biosynthesis, metabolism, and functions*, Frenkel, R. A., and McGarry, J. D., 7~17, Academic Press, New York, 1980
  - 7) Frenkel RA and Carter AE: Synthesis of carnitine precursors in rat kidney, *Carnitine biosynthesis, metabolism, and functions*, Frenkel, R. A., and McGarry, J. D., 19~33, Academic Press, New York, 1980
  - 8) Rebouche CJ: Comparative aspects of carnitine biosynthesis in microorganisms and mammals with attention to carnitine biosynthesis in man, *Carnitine biosynthesis, metabolism, and functions*, Frenkel, R. A. and McGarry, J. D., 57~72, Academic Press, New York, 1980
  - 9) Casillas ER and Chaipayungpan S: The distribution of carnitine and acetylcarnitine in the rabbit epididymis and the carnitine content of rabbit spermatozoa during maturation. *J Reprod Fert* **56** : 439~444, 1979
  - 10) Brooks DE: Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa, *Carnitine biosynthesis, metabolism, and functions*, Frenkel, R. A., and McGarry, J. D., 219~235, Academic Press, New York, 1980
  - 11) Bøhmer T and Hansson V: Androgen-dependent accumulation of carnitine by rat epididymis after injection [ $^3\text{H}$ ] butyrobetaine in vivo, *Mol Cell Endocrinol* **3** : 103~115, 1975
  - 12) Bøhmer T: Accumulation of carnitine in rat epididymis after injection of [ $^3\text{H}$ ] butyrobetaine in vivo: quantitative aspects, and the effects of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol* **11** : 213~223, 1978
  - 13) Casillas ER and Erickson BJ: Studies on carnitine synthesis in the rat epididymis. *J Reprod Fert* **44** : 287~291, 1975
  - 14) Hinton BT, Snoswell AM and Setchell BP: The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. *J Reprod Fert* **56** : 105~111, 1979

(1983年3月25日迅速掲載受付)