

精漿中 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) の研究

埼玉医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岡田耕市教授)

内	島	豊
吉	田	健
平	賀	聖 悟

STUDIES ON γ -GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE
(γ -GTP) IN SEMINAL PLASMA

Yutaka UCHIJIMA, Ken YOSHIDA and Seigo HIRAGA

*From the Department of Urology, Saitama Medical School**(Director: Prof. K. Okada)*

The significance of γ -GTP (γ -glutamyl transpeptidase) in seminal plasma was examined by measuring the γ -GTP activity in ejaculate, seminal plasma, prostatic secretion, testis, epididymis, vas deferens, prostate and sperm. The γ -GTP activity was measured spectrophotometrically (405 nm) using L- γ -glutamyl-p-nitroanilide as a substrate. One unit of enzyme activity was defined as the amount liberating 1 μ mol of p-nitroaniline per min.

The mean γ -GTP activity was $9,094 \pm 4,351$ mU/ml in ejaculate and $7,487 \pm 4,286$ mU/ml in seminal plasma of 76 men visiting the infertility clinic. There is a positive correlation between γ -GTP activity in ejaculate and in seminal plasma. The γ -GTP activity was $15,044 \pm 6,422$ mU/ml in prostatic secretion and twice as high as the activity in seminal plasma.

There was no significant correlation between γ -GTP activity in seminal plasma and volume of ejaculate, sperm density or sperm motility.

The γ -GTP activity in testicular tissues was 72 ± 25 mU/mg protein except for two cases in which its activity was not detected (3 years old; retentio testis, 71 years old; prostatic carcinoma, was administered with hormonal medicine). The γ -GTP activity in prostatic tissues was 133 ± 68 mU/mg protein. The relationship between the γ -GTP activity in testicular tissues and Johnsen's mean score count.

Judging from the present results together with the previous reports of Rosalki et al (1977) and Simon et al (1978) the prostate seemed to be the major source of γ -GTP in human semen.

Key words: γ -GTP, Seminal plasma

緒 言

γ -glutamyl transpeptidase (E.C.2.3.2.2, 以下 γ -GTP と略す) は N 末端に γ -カルボシル基が結合した peptides を加水分解するとともに, γ -glutamyl 基を他のアミノ酸に転移させる酵素であり, ヒトにお

いても腎臓, 肝臓や脾臓など, 種々の臓器に分布していることが報告^{1,2)}されているが, 精路系での γ -GTP に関する報告は少ない. われわれは精漿中の γ -GTP 活性を測定し, 若干の興味ある結果を得たので報告する.

研究対象ならびに研究方法

(1) 研究対象

不妊を主訴として埼玉医科大学泌尿器科外来を受診した76症例を対象とした。

(a) 射精液および精漿

精液採取は最低4日間の禁欲後、用手採取させ、充分液化した射精液について射精量、精子数、精子運動率を測定した。また射精液を3,000回転、20分間、4℃で遠心沈澱し、その上清を試料とした。

(b) 精子浮遊液

(a)の操作で得られた精子に1mlの生理食塩水を加えて攪拌後、3,000回転、20分間、4℃で遠心沈澱し、その上清を精子洗浄液として酵素活性を測定し、さらに沈澱に1mlの生理食塩水を加えた。同じ操作を5回施行し、最終的に0.3% Triton X-100を1ml加えて精子浮遊液とし、Triton X-100と30分間反応させた後、10,000×G、60分間、4℃で遠心沈澱し、その上清を試料とした。なお、各射精液中には前立腺炎を疑わせる所見は認められなかった。

(c) 前立腺液および精路組織

前立腺マッサージにより採取した液を試料とした。各前立腺液には前立腺炎を疑わせる所見は認められなかった。次に精巣、副精巣、精管および前立腺組織の γ -GTPについて検討した。精巣、副精巣および精管組織は未治療の前立腺癌症例8例、既治療（酢酸クロルマジノン 150 mg/日、18カ月）の前立腺癌症例1例、陰嚢水腫症例1例、両側停留睪丸症例1例および不妊症例1例の計12例について除手術あるいは精巣の生検時に得たものを用いた。前立腺組織は前立腺肥大症2例について、恥骨上式前立腺摘除術を施行後に得られたものを用いた。各組織は摘除後、ただちに必要量を秤量し、細切後、0.25 M しゅ糖 1 ml を加え、

テフロンホモジナイザーにてホモジナイズし、そのホモジネートを10,000×Gで60分間、4℃で遠心沈澱後、その沈澱に0.3% Triton X-100を1ml加えてよく攪拌し、30分間反応させた後、再び同じ条件で遠心沈澱し、その上清を試料とした。

(2) 研究方法

(a) γ -GTP 活性測定

γ -GTP 活性はベーリンガー・マンハイム社製モノテスト・ γ -GT キットを使用して測定した。基質液(L- γ -glutamyl-p-nitroanilide, glycyl-glycine) 1 ml と試料 50 μ l をよく混和させ、遊離してくる p-nitroaniline による黄色の増加を37℃で、波長 405 nm で測定し、オリンパス社製 Quickrate で γ -GTP 活性を計算した (Fig. 1)。 γ -GTP の 1 Unit は1分間あたり 1 μ M の p-nitroaniline を産生させる酵素量である。機械の特性から γ -GTP 活性が 8 mU/ml 以下の場合はその活性は N.D. (not detected) とした。

(b) 精巣組織の一部は摘除後、ただちにブアン固定し、H-E 染色後、Johnsen の mean score count を計算した。

(c) 蛋白定量

蛋白定量は Lowry ら²⁾の方法で測定し、検量線は牛アルブミンを用いて作成した。

成 績

(1) 安定性に関する検索

精漿中 γ -GTP 活性は室温で7日目まで、4℃および-20℃で12日目まで測定したが、3者の間に活性値の有意の差は認めなかった。また活性値の有意の低下も認められなかった (Fig. 2)。

(2) 射精液と精漿中 γ -GTP 活性

射精中 γ -GTP 活性は $9,094 \pm 4,351$ mU/ml ($n =$

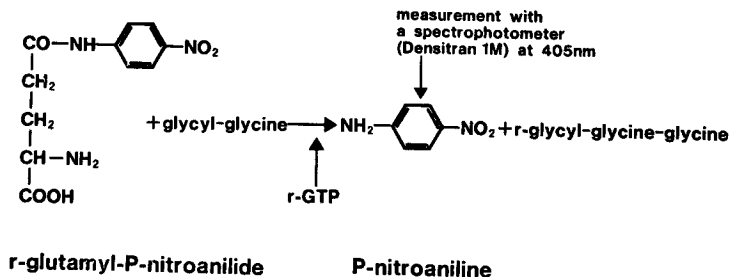


Fig. 1. γ -GTP activity was measured by the colorimetric method of Orłowski using γ -glutamyl-p-nitroanilide as substrate. One unit of γ -GTP activity will liberate one millimicromole of p-nitroaniline per min. at 37°C.

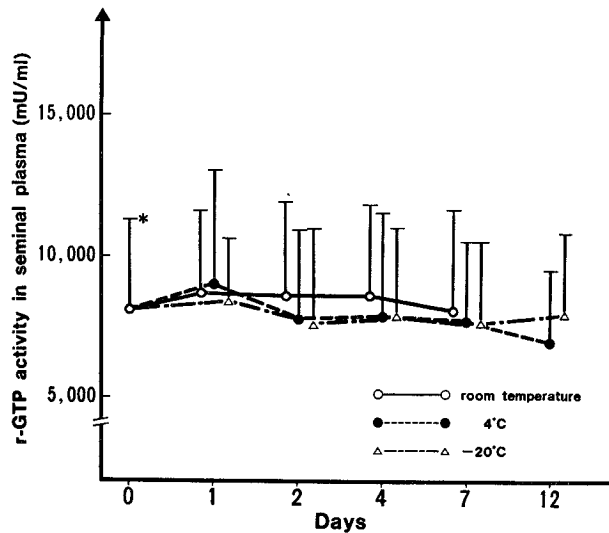


Fig. 2. Changes in γ -GTP activity in seminal plasma each for conservative difference. The seminal plasma was kept at room temperature, 4°C or frozen at -20°C until analysis. *Mean $\pm$ S.D.

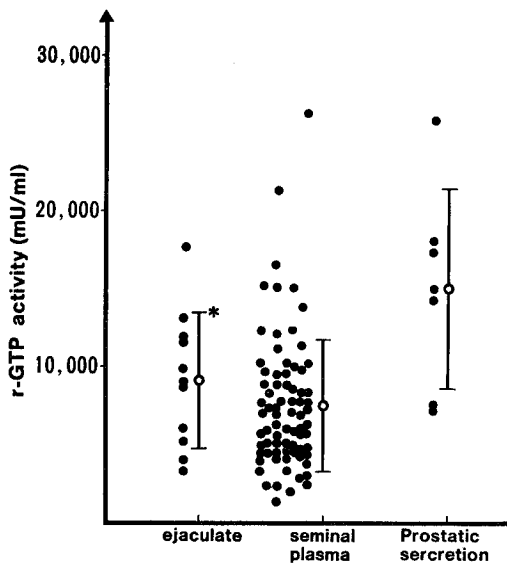


Fig. 3. The γ -GTP activity in ejaculate ($n=11$), seminal plasma ($n=77$) and prostatic secretion ($n=7$). *Mean $\pm$ S.D.

11), 精漿中 γ -GTP 活性は $7,487 \pm 4,286$ mU/ml ($n=77$) であり、両者の間に有意の差は認められなかった (Fig. 3). また射精液と精漿中の γ -GTP 活性は極めて高い相関 ($r=0.986$, $p<0.001$) を示し、射精液の代わりに精漿中の γ -GTP 活性を測定しても、射精液の活性を充分推定しうると考えられた (Fig.

4).

(3) 前立腺液中の γ -GTP 活性

前立腺マッサージ液中の γ -GTP 活性は $15,044 \pm 6,420$ mU/ml ($n=7$) と非常に高値で、射精液中 γ -GTP 活性あるいは精漿中の γ -GTP に対して各々有意 ($p<0.001$) に高値であった (Fig. 3).

(4) 射精液量と精漿中 γ -GTP 活性

射精液量と精漿中 γ -GTP 活性の間には有意の相関は認められなかった ($r=-0.203$, $n=72$) もの、射精液量の増加とともに精漿中 γ -GTP 活性は逆に減少する傾向を示した (Fig. 5).

(5) 精子濃度と精漿中 γ -GTP 活性

精子濃度と精漿中 γ -GTP 活性の間には有意の相関は認められなかった ($r=0.107$, $n=76$). 精子濃度によって症例を区分し、各群の γ -GTP 活性を検索すると、精子濃度が 40×10^6 /ml 以上の群 ($n=18$) で $8,932 \pm 6,156$ mU/ml, 40×10^6 /ml $\sim 20 \times 10^6$ /ml の群 ($n=25$) で $7,477 \pm 3,839$ mU/ml, 20×10^6 /ml $\sim 10 \times 10^6$ /ml の群 ($n=14$) で $7,256 \pm 2,792$ mU/ml, 10×10^6 /ml 以下の群 ($n=13$) で $6,847 \pm 3,519$ mU/ml, 無精子症の群 ($n=6$) で $6,139 \pm 3,055$ mU/ml であり、各群の γ -GTP 活性の平均値は精子濃度の低下とともに減少する傾向が認められたが、各群の間には有意の差は認められなかった (Fig. 6).

(6) 精子運動率と精漿中 γ -GTP 活性

精子運動率と精漿中 γ -GTP 活性の間には有意の相関は認められなかった ($r=0.185$, $n=59$). 精子運動

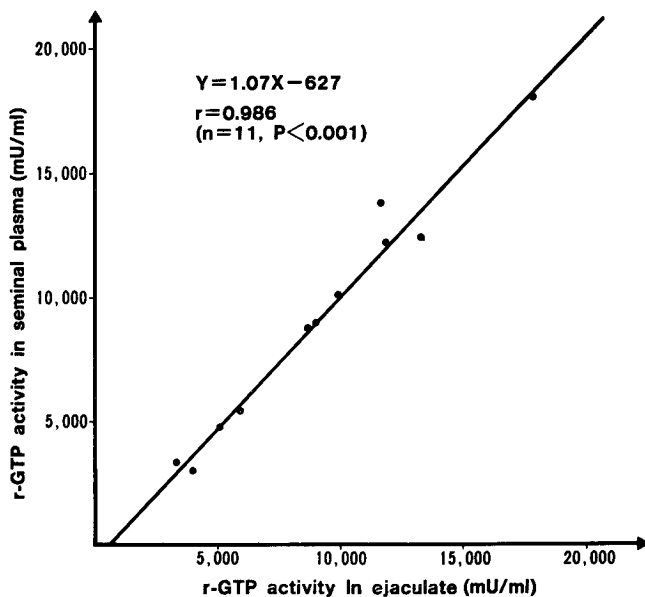


Fig. 4. The γ -GTP activity in ejaculate and seminal plasma. There exists a positive correlation between γ -GTP activity in ejaculate and in seminal plasma. The correlation coefficient was 0.986 ($p < 0.001$).

率によって各群を区別し、各群の γ -GTP 活性を検索すると、精子運動率が60%以上の群 ($n=12$) で $7,157 \pm 3,278$ mU/ml, 60~40%の群 ($n=26$) で $9,417 \pm 5,701$ mU/ml, 40%以下の群 ($n=15$) で $6,155 \pm 2,398$ mU/ml, 0%の群 ($n=4$) で $5,409 \pm 1,805$ mU/ml であり、各群の間には有意の差は認められなかった (Fig. 7).

(7) 精巣および副性器組織中 γ -GTP 活性

精巣組織中 γ -GTP 活性は12例中両側停留率丸症例と酢酸クロルマジノンの投与を受けていた症例の計2症例においてその活性は N.D. であり、残り10症例においては 90 ± 65 mU/mg protein であった。副精巣頭部組織中 γ -GTP 活性は 72 ± 25 mU/mg protein ($n=4$) であり、副精巣尾部組織中 γ -GTP 活性は1例において N.D. であり、残りの2例は各々 16 mU/mg protein および 15 mU/mg protein であった。精管組織中 γ -GTP 活性は3例全例とも N.D. であった。前立腺組織中 γ -GTP 活性は 133 ± 68 mU/mg protein ($n=3$) であった (Fig. 8).

(8) 精子浮遊液中 γ -GTP 活性

精子の洗浄とともに洗浄液中 γ -GTP 活性は低下し、5回目の洗浄液中 γ -GTP 活性は N.D. となった。最終的な精子浮遊液中 γ -GTP 活性は 45 ± 16 mU/mg protein ($n=3$) であった (Table 1).

(9) 精巣組織中の γ -GTP 活性と精子形成能

精巣組織中 γ -GTP 活性と Johnsen の mean score count との間には有意の相関は認められなかった ($r = 0.516$, $n=7$).

考 察

精漿中 γ -GTP 活性の安定性について Krishnaswamy ら⁴⁾ は -20°C の条件下で2~3週間は活性の低下を認めず、 37°C で3時間加温すると活性が40%減少すると報告している。本実験においても -20°C および 4°C の条件下では12日目までは活性の有意の低下を認めず、室温下でも7日目まで検討したが、活性の有意の低下は認められなかった。ただ、室温下では検体によっては4~5日目頃より黄緑色に変色し、細菌感染が疑われたので、検体を保存する条件としては 4°C あるいは -20°C で保存することが適当と考えられる。

精漿中 γ -GTP 活性の由来部位については種々の報告があり、Kirshnaswamy ら⁴⁾ はラット精囊および副精巣組織中の γ -GTP 活性が高値であることから、ヒト精漿中 γ -GTP 活性の大部分は副精巣組織から由来するとし、一方、Rosalki ら (1973)⁶⁾ は電気泳動像上、精漿中 γ -GTP 活性と精子中 γ -GTP アイソザイムの泳動像が類似している点からヒト精漿中 γ -GTP 活性は精子由来であると報告している。本実験から前立腺液中の γ -GTP 活性が精漿中 γ -GTP 活性

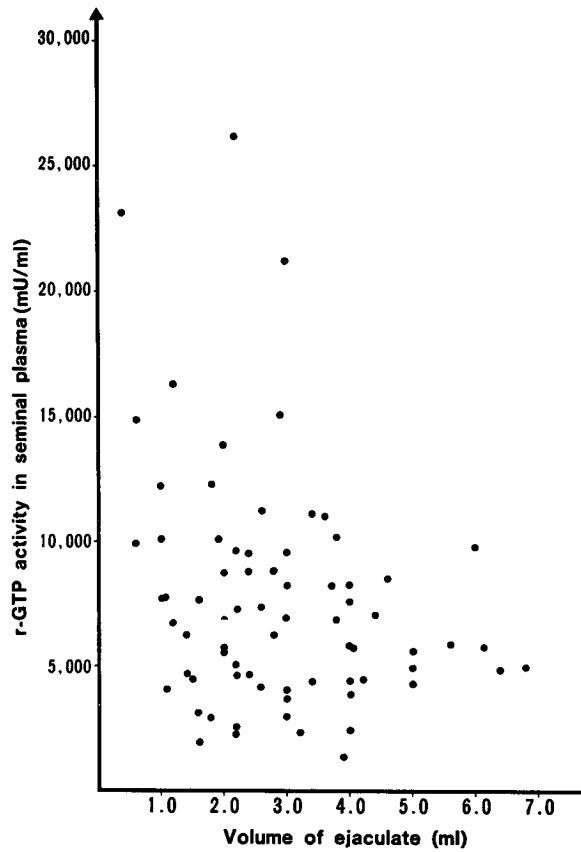


Fig. 5. Correlation between volume of ejaculate and γ -GTP activity in seminal plasma.

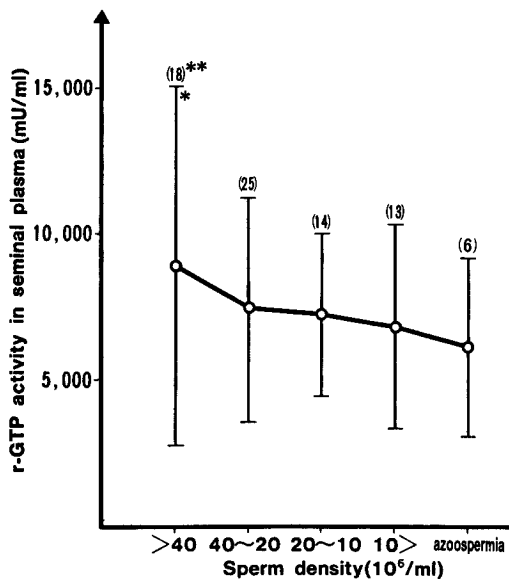


Fig. 6. Correlation between sperm density and γ -GTP activity in seminal plasma.
*Mean $\pm$ S.D. **Number of patient

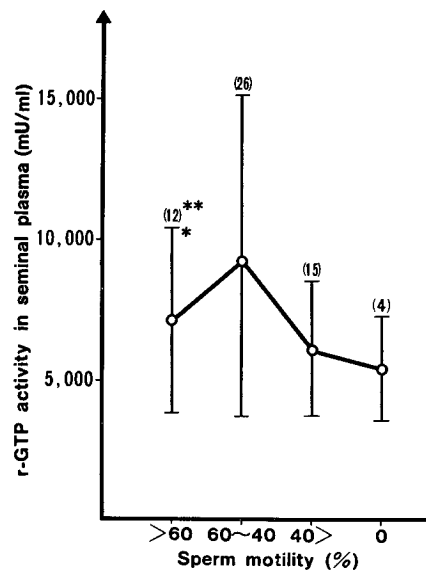
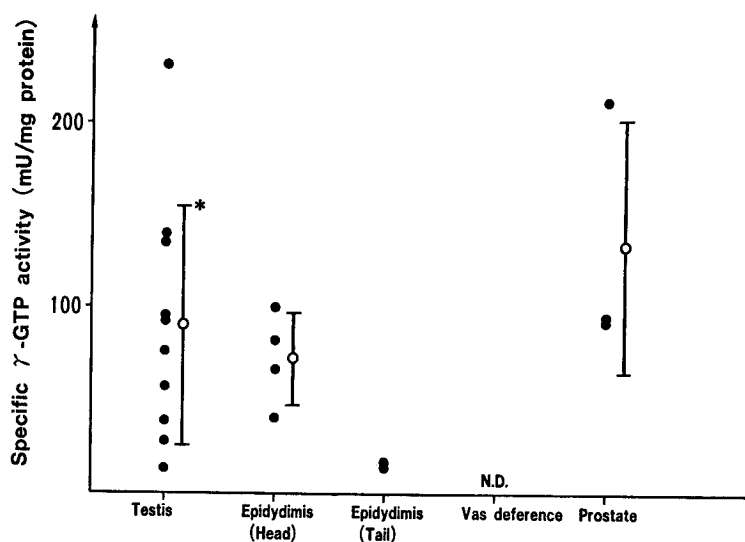


Fig. 7. Correlation between sperm motility and γ -GTP activity in seminal plasma.
*Mean $\pm$ S.D. **Number of patient

Table 1. The γ -GTP activity in washings and sperm suspension.

No	Ejaculate*	Washing (1st)	Washing (2nd)	Washing (3rd)	Washing (4th)	Washing (5th)	Sperm** suspension
1	5,921	2,366	665	130	26	12	55
2	11,758	2,773	355	58	16	8	53
3	8,934	2,361	295	64	19	11	26

* mU/ml ** mU/mg protein

Fig. 8. The specific γ -CTP activity in reproductive tissues. *Mean $\pm$ S.D.

より約2倍高い活性を示し、しかも精路の中では前立腺組織が γ -GTP活性の平均値では最も高い活性を示したこと、さらに Gonzalez Buitrago ら⁶⁾は excretory および secretory の無精子症例の間に γ -GTP活性の有意の差を認めなかったと報告していること、Rosalki ら (1977)⁷⁾も精管結紮術後の精漿中 γ -GTP活性と正常射精液所見を示す症例の精漿中 γ -GTP活性の間にやはり有意の差を認めなかったと報告しており、精漿中 γ -GTPの大部分は前立腺由来と推定される⁸⁾。また本実験では精囊組織中 γ -GTP活性については検索していないが、Verhoeven ら⁹⁾は分画射精の検討で精漿中 γ -GTP活性と果糖濃度が相関しないことより、その活性の大部分は精囊ではなく前立腺より由来すると報告している。

射精液中の各パラメーターと精漿中 γ -GTP活性との関係について Aafjes ら¹⁰⁾は不妊症例104例について精子濃度と精漿中 γ -GTP活性の間に有意の相関($r=0.258$, $p<0.05$)を認めたと報告し、特に精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の症例において高い相関($r=$

0.440, $p<0.01$)を認めているが、本実験からは精漿中 γ -GTP活性と射精液量、精子濃度および精子運動率の間には有意の相関は認められず、Rosalki ら⁷⁾も精漿中 γ -GTP活性と精子濃度、精子運動率および精子奇形率との間に有意の相関は認めなかったと報告している。実際、精漿中 γ -GTPの大部分が前立腺由来と考えるなら単に活性を測定するだけでは精巢あるいは精子の異常を推定することは困難で、本実験からも明らかなように精巢組織あるいは精子中にも γ -GTP活性を認めるので、それらの異常の有無を検索するには γ -GTPのアイソザイムについての検討も今後必要になると考えられる^{11,12)}。

精漿中および精路組織中の γ -GTP活性の生理的意義については現在のところ不明であるが、Kruger ら¹³⁾は Vitamin A 欠乏食の投与を受けたホルツマンラットにおいて spermatogenesis の障害が認められるにもかかわらず、 γ -GTP活性が15日齢以後急速に増加し、20日齢までに最高の活性を示すことより γ -GTP活性は Sertoli 細胞の機能の指標となりうる

ことを指摘し、Sherins ら¹⁴⁾もヒトにおいて γ -GTP 活性が Sertoli 細胞のマーカーとして臨床的に有用であると報告している。しかし、本実験では精巣組織中 γ -GTP 活性と Johnsen の mean score count との間には有意の相関が認められず、精巣組織中 γ -GTP 活性が Sertoli 細胞のマーカーとして有用かどうかは今後の検討課題と考えられる。

結 語

(1) 男子不妊症例76例について射精液中および精漿中 γ -GTP 活性を測定するとともに、前立腺マッサージにより得た前立腺液中の γ -GTP 活性も測定し、前立腺液中 γ -GTP 活性は精漿中 γ -GTP 活性より約2倍も高い活性を示し、射精液中 γ -GTP 活性の大部分が前立腺由来であることが示唆された。

(2) 精漿中 γ -GTP 活性は射精液量、精子濃度および精子運動率との間には各々有意の相関は認められなかった。

(3) 精巣組織中 γ -GTP 活性と Johnsen の mean score count との間には有意の相関は認められなかった。

稿を終るにあたり、ご協力頂いた東京医科歯科大学泌尿器科学教室根岸壮治先生ならびに東四雄先生に深謝致します。なお本論文の要旨は第4回アンドロロジー大会において発表した。

文 献

- 1) 西沢芳男・松村 光・藤岡正雄：尿中 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) の測定法の検討。医学の歩み 108 : 227~229, 1979
- 2) 堺 隆弘： γ -GTP 測定 of 臨床的意義。代謝 30 : 634~638, 1972
- 3) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the foline phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265~275, 1951
- 4) Krisnaswamy PR, Tate SS and Meister A : γ -glutamyl transpeptidase of human seminal fluid. Life Sci 20 : 681~686, 1977
- 5) Rosalki SB and Rowe JA: Gamma-glutamyl-transpeptidase activity of human seminal

fluid. Lancet 1: 323~324, 1973

- 6) Gonzalez Buitrago JM and Garcia Diez LC : Enzyme levels in semen of men with different types of azoospermia. Andrologia 14: 77~80, 1982
- 7) Rosalki SB and Rowe JA : Seminal plasma γ -glutamyl transferase activity and fertility. Life Sci 20: 1521~1524, 1977
- 8) Simon R, Delbruck A, Schirren C and Mitzkat HJ : Enzyme activity of γ -glutamyl-transpeptidase in human sperm of normo-, oligo-, terato- and azoospermia. Int J Androl (Suppl) 1: 130, 1978
- 9) Verhoevev G and Steeno O : Evidence for then prostatic origin of gamma-glutamyl transpeptidase activity in human semen. Andrologia 11: 163~167, 1979
- 10) Aafjes JH, Wolffensperger-Van Oort HJ and Schenck PE GAMMA-glutamyl transpeptidase and β -glucuronidase in human ejaculate. Relation with abnormal liquefaction. Andrologia 15: 661~665, 1983
- 11) Hlebarova M, Ruscova SV, Kremensky I, Tsvetkov D and Kamenov V: Enzymes and cytomorphological sperm alterations in some diseases of the male reproductive system. Int Urol Nephrol 12: 361~365, 1980
- 12) Tate SS and Meister A Subunit structure and isozymic forms of γ -glutamyl transpeptidase. Proc Natl Acad Sci USA 73: 2599~2603, 1976
- 13) Krueger PM, Hodgen GD and Sherins RJ: New evidence for the role of the Sertoli cell and spermatogonia in feedback control of FSH secretion in male rats. Endocrinol 95: 955~962, 1974
- 14) Sherins RJ and Hodgen GD : Testicular gamma glutamyl-transpeptidase: an index of Sertoli cell function in man. J Reprod Fert 48: 191, 1976

(1985年7月11日受付)