

ヒト精液中の NAG 活性についての研究

—精漿中ならびに精路組織における γ -GTP 活性との関係
および精漿中ムコ蛋白濃度との関係について—

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・高橋 卓・中目 康彦・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

N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASE (NAG) ACTIVITY IN
THE HUMAN SEMEN: ITS RELATIONSHIP TO γ -GLUTAMYL
TRANSEPTIDASE (γ -GTP) ACTIVITY IN SEMINAL PLASMA
AND IN THE REPRODUCTIVE TISSUES, AND RELATIONSHIP
BETWEEN SEMINAL MUCOPROTEIN CONCENTRATION
AND SEMINAL NAG, AND γ -GTP ACTIVITIES

Kenichiro YOSHIDA, Taku TAKAHASHI, Yasuhiko NAKAME and Hiroshi SAITO

*From the Department of Urology, Saitama 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)*

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) activities in seminal plasma obtained from male infertile patients and these activities in reproductive tissues obtained from cryptorchids and patients with bladder tumors were studied. Seminal mucoprotein concentration was also measured. The mean NAG and γ -GTP activity in seminal plasma was $2,092 \pm 794$ mU/ml and $10,942 \pm 4,179$ mIU/ml, respectively. The mean seminal mucoprotein concentration was 28.0 ± 5.7 mg/ml. In seminal plasma, a significant correlation was obtained between NAG and γ -GTP ($p < 0.001$), and between γ -GTP and mucoprotein concentration ($p < 0.05$). However, there was no correlation between NAG and mucoprotein concentration. In the reproductive tissue high γ -GTP activity was observed in the testicular tissue and in the external gland of the prostate. The activity in the epididymis was higher in the tail than in the head. High NAG activity was observed in the epididymal head and in the internal gland of the prostate. In the testicular tissue, NAG activity was low.

These findings showed that in the seminal plasma NAG and γ -GTP activities were closely related but in the reproductive tissue, these activities located in different areas.

Key words: NAG and γ -GTP activities, Mucoprotein concentration, Seminal plasma, Reproductive tissues

緒 言

N-Acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 活性は合

成基質を用いる簡便化された方法により、近年各種疾患において、その血中、尿中活性が測定され、その値の臨床的意義が検討されている。われわれは精液中の

本酵素活性に注目し、その基礎的検討として、その活性値、保存安定性、精路組織における活性分布等を先に報告し¹⁾、その生物学的意義についても触れた。今回精液中で高い活性を示す γ -GTP について、男子不妊症より採取した精液、および除睾術や膀胱全摘術の際に得られた睾丸、精路組織における活性を NAG 活性とともに測定し、精漿および精路組織における両酵素活性の関連について検討したので報告する。なお NAG の基質であるムコ酵素について、精漿内濃度を測定したので、これについても触れたい。

検 索 対 象

検索対象とした症例は埼玉医科大学総合医療センター泌尿器科、および東京医科歯科大学泌尿器科を受診した男子不妊症のうち、無精子症を除く66例（年齢19歳から45歳、平均34歳）、腹部停留睾丸のため除睾術を施行した26歳例、膀胱腫瘍のため膀胱全摘術を施行した57歳例と74歳例の計69例である。

精液中の NAG、 γ -GTP の活性測定については、3日以上禁欲期間をおいて用手法にて採取された射精液を用いた。睾丸、副睾丸、精管の各組織については26歳の除睾例より得、精囊腺、前立腺の組織については57歳および74歳の膀胱全摘例より得た。

検 体 の 調 整

精液については充分液化した後、これをスピッツグラスに移し、2,500 rpm にて10分間遠心し、精子や白血球を沈殿せしめた後、上清である精漿を得、これを NAG および γ -GTP 活性の酵素源とするとともに、ムコ蛋白濃度の測定に用いた。

精子における NAG、 γ -GTP 活性を検討するため、2症例について精液より遠心分離した精子を生食 5 ml にて2回洗滌し、各洗滌液における NAG、 γ -GTP 活性を測るとともに、洗滌精子を0.5%の Triton X-100 で一晚放置した後、再遠心し、その上清について NAG、 γ -GTP 活性を測定した。

精路組織については、摘除後直ちに生食にてよく水洗後、秤量し、 -20°C にて凍結保存した。その後活性測定時に組織を細切し、ポリトロンにて homogenate を作成した。ついでこれを 800 g にて20分間遠心し、その上清でも cell-free homogenate を得、これを組織における NAG および γ -GTP 活性の酵素源とした。

NAG、 γ -GTP 活性およびムコ蛋白濃度の測定法について

精漿、Triton 処理精子、および組織の cell-free

homogenate における NAG、 γ -GTP 活性の測定は、尿中および血中のこれらの活性測定法に準じて行なった。なお精漿中のこれらの活性は極めて高いため、生食にて26倍に希釈した後、活性測定を行なった。NAG 活性の測定法については先に報告¹⁾しており、ここでは省略する。

γ -GTP 活性については Tris buffer にて pH 8.2 に調整した 100 mM の glycyl-glycine と 10 mM の MgCl_2 を含む 2 ml の溶液に、上記のごとく26倍に希釈した精漿 20 μl を加え、 37°C にて8分間 incubation した後、これを基質として Tris buffer に溶解せしめた 5 mM の L-r-glutamyl-p-nitroanilide を 0.5 ml 加え、 37°C にて1分間反応させた。活性測定は上記の反応にて遊離した nitroanilide を 410 nm の吸光度にて測定し、表わした。なお γ -GTP 1 IU とは 37°C にて L-r-glutamyl-p-nitroanilide より1分間に 1 μmol の anilide を遊離せしむ活性をいう。

精漿中のムコ蛋白濃度の測定については、U-MPキットを用い、尿中のムコ蛋白測定法²⁾に準じて行なった。すなわち前述のごとく26倍に希釈した精漿 0.5 ml をとり、3%スルホサルチル酸液 1.5 ml を加え混和後20分放置し、ついでこれを 3,000 rpm にて20分遠心し、その上清 0.5 ml に Coomassie-Brilliant Blue G-250 液 3.0 ml を加えよく混和後、更に15分放置、その後 590 nm にて吸光度を測定した。検量線は一定濃度の α_1 -acid glycoprotein を含む標準液 0.5 ml を用い作製し、この検量線より精漿中のムコ蛋白濃度を測定した。

NAG、 γ -GTP 活性およびムコ蛋白濃度の表現について

精漿中の酵素活性については ml あたりで表現した。睾丸および精路組織における酵素活性については、酵素源として用いた cell-free homogenate の蛋白量を Lowry 法³⁾にて測定し、mg protein あたりで表現した。またムコ蛋白濃度については ml あたりで表わした。

結 果

Table 1 に2症例における精漿中、精子洗滌液中、および洗滌精子を0.5% Triton X-100 にて処理した溶液中における NAG、 γ -GTP 活性を示す。症例1は精索静脈瘤をともなわない症例で、精子濃度 $56 \times 10^6/\text{ml}$ 、精液量 3.4 ml、運動率50%と、その精液所見は比較的良好であった。これに対し症例2は精索静脈瘤を合併しており、その精子濃度は $26 \times 10^6/\text{ml}$ 、精

Table 1. NAG, γ -GTP activities and NAG/ γ -GTP in seminal plasma, washed saline and Triton-reacted sperm.

	Case 1			Case 2		
	NAG	γ -GTP	NAG/ γ -GTP	NAG	γ -GTP	NAG/ γ -GTP
semen plasma	2,520	16,382	0.15	1,869	8,501	0.22
washed saline						
1st	101	629	0.16	72	351	0.21
2nd	5.1	37	0.14	2.4	15	0.16
sperm	5.7	41	0.14	5.2	141	0.04

The activity of NAG and γ -GTP was expressed as mIU/ml and mIU/ml, respectively.

Sperm was reacted with 5 ml of 0.5% Triton X-100 for overnight.

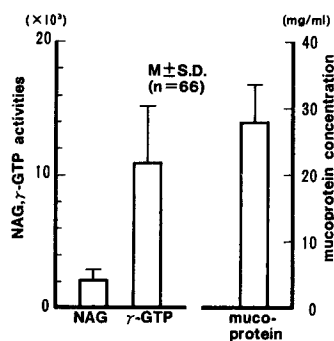


Fig. 1. NAG and γ -GTP activities, and mucoprotein concentration in the seminal plasma of infertile men.

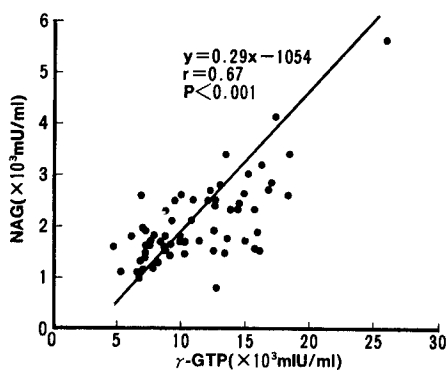


Fig. 2. Relation between NAG and γ -GTP activity.

液量 1.3 ml, 運動率30%と, 乏精子症と運動率の低下を示した。両症例とも NAG, γ -GTP 活性は精漿中で高い値を示し, 精子洗滌液中では, これらの活性は激減する。このことは精液中における NAG, γ -GTP 活性の由来は精子でなく精漿であることを意味する。しかし症例2で明らかごとく, 第2回目の精子洗滌液中における NAG, γ -GTP 活性に比し, 同量の0.5

% Triton X-100 で処理した精子溶液中での両酵素活性が高値を示したことは, 精子においてもこれらの活性は有意に存在していることを示している。また本症例は精漿中, 精子洗滌液中における NAG/ γ -GTP は0.16~0.22かあるのに対し, Triton 処理精子では γ -GTP 活性が増加したため, その比率は0.04と明らかな違いを示した。これに対し症例1における NAG/ γ -GTP は精漿中, 精子洗滌液中, Triton 処理精子において0.14~0.16と, はば一定した値が得られた。

Fig. 1 に男子不妊症66例の精漿中の NAG, γ -GTP 活性およびムコ蛋白濃度の平均値を示す。NAG 活性は 753 mIU/ml から 5,572 mIU/ml までで, 平均 $2,092 \pm 794$ mIU/ml ($M \pm SD$) であった。 γ -GTP 活性は NAG 活性より4~5倍ほど高く, 4,683 mIU/ml から 26,319 mIU/ml までで, その平均は $10,941 \pm 4,179$ mIU/ml ($M \pm SD$) であった。またムコ蛋白濃度についてみると, 16.5 mg/ml から 43.3 mg/ml までで, その平均は 28.0 ± 5.7 mg/ml ($M \pm SD$) であった。

ついで66症例における NAG 活性と γ -GTP 活性との相関を Fig. 2 に示す。両者は $Y = 0.25X - 1,054$, $r = 0.67$, ($p < 0.001$) ときわめて高い相関を示した。ムコ蛋白濃度と NAG 活性についてみると, Fig. 3 に示すごとく $Y = 25X + 1,359$, $r = 0.17$ ($p > 0.05$) と有意の相関はみられなかった。しかしムコ蛋白濃度と γ -GTP 活性は $Y = 182X + 6,117$, $r = 0.26$, ($p < 0.05$) と危険率の高いものの有意の相関を示した (Fig. 4)。

Table 2 に睾丸, 精路組織および精路周囲組織における NAG, γ -GTP 活性を示す。表でみられるごとく, 両酵素活性は睾丸および精路組織において, 精路周囲組織より明らかに高値を示す。症例3は先に述べたごとく¹⁾ 腹部停留睾丸にて, その精細管組織は Sertoli 細胞のみであり, 副睾丸も isthmus がはっ

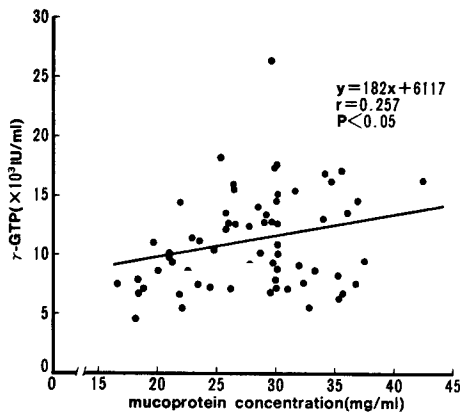


Fig. 3. Relation between mucoprotein concentration and γ -GTP activity.

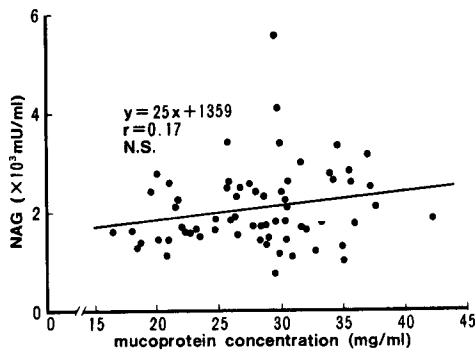


Fig. 4. Relation between mucoprotein concentration and NAG activity.

Table 2. Distribution of NAG and γ -GTP activities in the reproductive tissues.

Case	Reproductive tissue	NAG _g	γ -GTP	NAG/ γ -GTP
3	Testis	8.6	75.9	0.11
	Epididymis head	20.0	17.2	1.16
	tail	13.2	25.5	0.52
	Vas	6.2	6.3	1.00
4	Seminal vesicle	12.1	5.5	2.20
5	Seminal vesicle	11.6	9.0	1.29
	Prostate internal G	39.9	19.5	2.05
	external G	29.1	50.2	0.38
	Peripheral tissue	4.2	2.3	1.83

Each activity was expressed per mg protein.

Case 3: 26yrs cryptorchidism. Case 4: 74yrs bladder tumor. Case 5: 57yrs bladder tumor.

The activity of peripheral tissue was mean value of three cases.

きりせず、このため辜丸側1/2を頭部とし、精管側1/2を尾部としたが、精路組織におけるこれらの酵素活性についてみると、 γ -GTP 活性は辜丸できわだって高く、ついで副辜丸尾部、副辜丸頭部、精管の順で高い値を示した。また NAG 活性は副辜丸頭部で他より

比較的高値を示し、ついで副辜丸尾部、辜丸、精管の順で高い値を示した。精囊腺と前立腺組織では症例4、5で示されるごとく、 γ -GTP 活性は前立腺外腺で高く、NAG は前立腺内腺で高い値を示した。これに対し精囊腺では NAG、 γ -GTP 活性とも、前立腺組織に比し低値を示した。ついで精路組織における NAG/ γ -GTP についてみると、その比率は精囊腺、前立腺内腺で高く、副辜丸頭部や精管では両酵素活性はほぼ同値を示した。これに対し副辜丸尾部や前立腺外腺では0.5前後と低い比率を示した。

考 察

ヒト精液中には生物学的活性をもつ物質が多種認められる。これらの物質は精子に対し積極的な作用を有していると想定され、おそらくは精子の成熟作用、精子への運動 energy の供給、殺菌作用、免疫抑制作用など⁴⁾をつかさどり、受精と密接な関係を有しているものと考えられる。精漿中で高い活性を示す種々の酵素活性も精子に対し直接的、間接的に受精という命題に対し、positive に作用しているものと考えられる。われわれは先に精漿中や前立腺組織で高い活性を示す NAG について、その値を測定するとともに、その生物学的意義についても言及したが、今回 γ -GTP 活性も同時に測定し検討を加えた。

γ -GTP は γ -glutamyl 基で結合しているグルタミン酸を切り離すと同時に、 γ -glutamyl 基をアミノ酸やペプチドへ転移する酵素である。本酵素活性がヒト精液中で高い活性を示すことは Rosalki⁵⁾を始めとし、Verhoeven⁶⁾や Beer⁷⁾により報告されている他、本邦においても最近、公平ら⁸⁾や内島ら⁹⁾によりその報告がみられている。その活性値を公平らは $12,509 \pm 7,120$ mIU/ml ($M \pm SD$)と報告しており、内島らは $7,487 \pm 4,286$ mIU/ml ($M \pm SD$)と報告している。今回われわれの測定した66症例の平均値は $10,941 \pm 4,179$ mIU/ml ($M \pm SD$)と、両者の報告のほぼ中間値を示した。

内島らは、精液中の本活性が精漿由来であることを報告しているが、われわれも精漿除去後の精子洗滌液では γ -GTP 活性が激減することから、その由来は精漿であると考えている。しかし Triton 処理精子では γ -GTP 活性が精子洗滌液より増加することから、精子にも γ -GTP 活性は存在するものと思われる。以上より γ -GTP の精液内分布は先に報告したごとく NAG のそれと類似したものといえる。ところで Triton 処理精子における NAG と γ -GTP の溶出が症例により異なることは興味深い。すなわち症

例1, 2において, Triton 処理精子の NAG 活性はほぼ同値を示すのに対し, 同一の Triton 処理を行ないながら, 総精子数の少ない症例(症例2)で高い γ -GTP 活性が得られたわけで, これは症例により Triton に対し精子の反応の違いを示している。この現象が症例2の合併する精索静脈瘤と関連しているのか, あるいは症例2が正常であり, Triton 処理精子で γ -GTP 活性が上昇しなかった症例1にむしろ異常があるのか, 今後検討を必要としよう。

Sertoli 細胞は睪丸における精細胞の発育, 分化について, その支持細胞としての動きのみならず, lactate, mitogen の供給¹⁰⁾, また androgen binding protein (ABP) の産生¹¹⁾ などを担う重要な働きを演じている。前述したごとく γ -GTP 活性が Sertoli tubules を示した睪丸組織で極めて高い値を示したことは, 本酵素活性がヒト Sertoli 細胞でも高いことを意味している。Sherins ら¹²⁾は種々の step における精子形成障害の症例で, γ -GTP 活性を測定し, γ -GTP 活性は Sertoli 細胞の成熟度と関係していることを報告しているが, おそらくは Sertoli 細胞は上記のごとく多機能を果たすうえで, 高い γ -GTP 活性を必要とするものと思われる。これに対し睪丸組織中の NAG 活性は γ -GTP 活性の11%にしかすぎず, NAG は ABP の主成分である N-acetylglucosamine の生成に関与するものの, Sertoli 細胞の主たる酵素活性ではなく, したがって Sertoli 細胞機能の marker enzyme としては適していないといえる。これに対し副睪丸頭部組織での NAG 活性は, 睪丸組織のおよそ3倍の値を示し, γ -GTP 活性より高い値を示した。このことは副睪丸頭部組織における NAG は Sertoli 細胞における NAG 機能より, より active な作用を演じていると考えるのが妥当であろう。その作用は先に報告した¹⁾ ごとく, 精子の成熟と関連したものと思われる。

精囊腺および前立腺組織における NAG, γ -GTP 活性をみると, 両活性とも前立腺組織で高い値を示した。 γ -GTP 活性が睪丸組織を除けば, 前立腺外腺組織で最も高い値を示したことは, 精漿中の γ -GTP 活性の由来は前立腺であるという公平および内島らの報告を支持するものである。組織内活性はその組織よりの分泌液中の活性を必ずしも代替するものではないものの, γ -GTP 活性のみならず NAG 活性も前立腺組織で高く, また精漿中の NAG 活性は γ -GTP 活性とよく相関することは, 精漿中の NAG の多くは γ -GTP と同様に前立腺由来であることを示唆しているものといえよう。NAG および γ -GTP 活性は前

立腺内腺と外腺とでは, その比率が逆転したが, これは元来尿道粘膜下腺である内腺と, 元来の前立腺組織である外腺とでは, その機能が異なるための違いと解釈される。しかし内腺と外腺で NAG/ γ -GTP の違いの意味するところは, 今のところ不明である。

今回 NAG の基質となる精漿中の μ コ蛋白濃度について測定した。 μ コ蛋白とは hexosamine が4%以上を占める糖蛋白で, このなかにはヒアルロン酸やコンドロイチンが含まれる。血清における μ コ蛋白濃度はおよそ 10 mg/dl であるが, 前述したごとく精漿におけるそれは 28 mg/ml と, 血清のおよそ300倍近くを示した。このことは精漿中の μ コ蛋白は血液からの漏出ではなく, 精路組織のいずれかより active に分泌されていることを示唆している。精漿中の μ コ蛋白濃度と γ -GTP 活性が低いながらも有意に相関したことは, その由来臓器は前立腺とも解釈できるが, この点については μ コ蛋白の生物学的意義を含め, 今後さらに検討する必要がある。

結 語

1. 無精子症を除く男子不妊症66例について, 精漿中の NAG, γ -GTP 活性, および μ コ蛋白濃度について測定した。NAG 活性は $2,092 \pm 794$ mU/ml, γ -GTP 活性は $10,941 \pm 4,179$ mIU/ml μ コ蛋白濃度は 28.0 ± 5.7 mg/ml であった。

2. 精漿中の NAG 活性と γ -GTP 活性はきわめて高い相関を示したが, μ コ蛋白濃度と γ -GTP 活性とは低い相関を示し, μ コ蛋白濃度と NAG 活性とは, あまり良い相関を示さなかった。

3. 精路組織についてみると γ -GTP 活性はその精細管が Sertoli 細胞のみを示した睪丸組織できわめて高く, また前立腺外腺組織でも高い値を示した。副睪丸においては尾部において高い値を示したが, 頭部ではやや低値であった。NAG 活性についてみると副睪丸頭部, 前立腺内腺で高い値を示したが, γ -GTP 活性と異なり睪丸組織では低値であった。精囊腺や精管においては両酵素活性とも低値であった。

本論文の要旨は第5回アンドロロジー学会にて報告した。

文 献

- 1) 吉田謙一郎・木原和徳・中目康彦・高橋 卓・斉藤 博: ヒト精液中の NAG 活性についての研究—その基礎的検討—. 泌尿紀要 33: 391~395, 1987
- 2) 佐野紀代子・金森きよ子・中尾 真・中嶋克行・小平 司: 尿中スルホサリチル酸可溶性 μ コ蛋白の簡便な定量法. 臨床病理 31: 741~744, 1983

- 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) 島崎 淳・片山 喬・相川英男・柳 重行：精液の生化学，性Ⅰ．代謝，萩田善一・松本圭史・鈴木秋悦・館 鄰 編16巻，4月臨時増刊号，pp. 119~128，中山書店，1979
- 5) Rosalki SB and Rowe JA : Gamma-glutamyl transpeptidase activity of human seminal fluid. *Lancet* **1**: 323~324, 1973
- 6) Verhoeven G and Steeno O : Evidence for the prostatic origin of gamma-glutamyl-transpeptidase activity in human semen. *Andrologia* **11**: 163~167, 1979
- 7) Beer R, Weisselberg M, Soffe Y and Lewin LM: Human seminal fluid gamma-glutamyl-transpeptidase: A prostatic marker enzyme. *Int J Androl* **1**: 405~410, 1978
- 8) 公平昭男・岩崎 皓・岩本晃明・今野 稔：精液中の γ -GTP 活性とその由来臓器. *日泌尿会誌* **77**: 428~431, 1986
- 9) 内島 豊・吉田 健・平賀聖悟：精漿中 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) の研究. *泌尿紀要* **32**: 553~559, 1986
- 10) Mita M, Price JM and Hall PF : Stimulation by follicle-stimulating hormone synthesis of lactate by Sertoli cell from rat. *Endocrinology* **110**: 1535~1541, 1982
- 11) Lee JA, Yoshida KI, Hosaka M, Stratico D, Hsue AF, Winter SJ, Oshima H and Troen P: Studies of the human testis. Androgen-binding protein and function of Leydig cells and tubules in aged men with prostatic carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **50**: 1105~1110, 1980
- 12) Sherins RJ and Hodgen GD : Testicular gamma glutamyl-transpeptidase : An index of Sertoli cell function in man. *J Reprod Fert* **48**: 191~193, 1976

(1986年6月9日受付)