

不妊症患者における精漿中 LDH-C4 アイソザイム活性の 臨床的有用性の検討

獨協医科大学泌尿器科学教室（主任：吉田謙一郎教授）

辻井 俊彦，釜井 隆男，森口 英男，細谷 吉克

本田 幹彦，山西 友典，吉田謙一郎

獨協医科大学越谷病院泌尿器科学教室（主任：安田耕作教授）

北 原 聡 史

南部地域病院泌尿器科（部長：立花裕一）

立 花 裕 一

SEMINAL LACTATE DEHYDROGENASE C4 (LDH-C4) ISOZYME ACTIVITY IN INFERTILE MEN

Toshihiko TSUJII, Takao KAMAI, Hideo MORIGUCHI, Yoshikatsu HOSOYA,
Mikio HONDA, Tomonori YAMANISHI and Ken-Ichiro YOSHIDA

From the Department of Urology, Dokkyo University School of Medicine

Satoshi KITAHARA

From the Department of Urology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

Yuichi TACHIBANA

From Nanbu Chiiki Hospital

Lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) is the specific isozyme of LDH produced by germ cells. We measured LDH-C4 activity in seminal plasma from infertile men with oligozoospermia or azoospermia using gel electrophoresis. Total LDH activity in seminal plasma from infertile patients (n=99) was $2,487 \pm 1,384$ IU/l (mean $\pm$ SD). LDH-C4 isozyme activity was detected in 63 out of 75 seminal plasma samples from infertile patients with a mean of 383 ± 356 IU/l ($13.8 \pm 8.6\%$ of total LDH). Sperm count was positively correlated with LDH-C4 ($r=0.298$; $P<0.05$), but not with any other LDH isozymes or with total LDH. Seminal LDH-C4 was significantly lower in patients with varicoceles (253 ± 223 IU/l) than without varicoceles (474 ± 262 IU/l). Six azoospermia patients were treated with hCG and hMG. Three out of four patients whose seminal plasma revealed LDH-C4 activity responded to the treatment, whereas none of the other two patients without seminal LDH-C4 activity did. These results indicate the clinical usefulness of seminal LDH-C4 as a potential marker for seminal epithelium activity in the diagnosis and treatment of male infertility.

(Acta Urol. Jpn. 48: 193-197, 2002)

Key words: Seminal plasma, LDH-C4, Male infertility

緒 言

乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) は NAD を補酵素として乳酸を可逆的にピルビン酸に変換する酸化還元酵素である。血清 LDH はゲル電気泳動法により LDH1～5 の5つのアイソザイムに分離され、これらはいずれも2種類のサブユニットA, B から成る4量体である。血清 LDH アイソザイムは種々の疾患で特異的に変化し、診断や治療に有用であることはよく知られている。

Blanco ら¹⁾は思春期以後のヒト精巣組織や射精液

中に LDH3 と LDH4 の間に泳動する特異なアイソザイムの存在を認め、LDHx と命名した。LDHx アイソザイムはCサブユニットの4量体であることから LDH-C4 と呼ばれている。LDH-C4 は精子形成の開始と共に精巣組織に特異的に発現がみられ²⁾、また LDH-C4 に対する能動免疫の誘導によって妊孕性が抑制される³⁾ことから、精子形成と深い関連を持つことが推測される。

今回われわれは市販のゲル電気泳動による LDH アイソザイム測定キットを用いて不妊症患者の精漿中 LDH-C4 の定量を試みた。

対象と方法

(1) 精液の採取と精漿の分離

当科不妊症外来を受診し、無精子症もしくは乏精子症（精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満）と診断された男性患者99名（年齢21～55歳，中央値36歳）から得られた精漿を検体とした。即ち最低3日間の禁欲後マスターベーションにより精液を採取させ，室温で30分以上放置して十分に液化した後，よく混和して精液量を測定し，一部は精子濃度の測定および検鏡に供し，残りを3,000回転，10分間遠心分離して精漿を得た。精漿はLDH測定まで -20°C にて凍結保存した。また健常者10名（男性8名，女性2名）より得た血清をゲル電気泳動の際のコントロールとした。

(2) 精漿中総LDHの測定

NADH存在下にピルビン酸を基質としてLDHにより乳酸を生成させ，この反応におけるNADHの減少速度を吸光度の変化から測定し，LDH活性を算出した。LDHモノテスト（ペーリンガー・マンハイム山之内KK）を用い，試験液（0.62 mM ピルビン酸，0.19 mM NADH，51.7 mM リン酸緩衝液， $\text{pH}=7.5$ ）1.0 ml と精漿 $20 \mu\text{l}$ を混和し， 37°C で60秒間反応させ波長 340 nm における吸光度の変化をDU530スペクトロフォトメーター（ベックマン）で測定した。

(3) LDHアイソザイムの測定

試料中のLDHアイソザイムをゲル電気泳動法により分離した後，NADと乳酸を加えてNADHとピルビン酸を生成させ，NADHによる呈色反応を利用して各アイソザイムの泳動バンドを発色させ，活性比率を算定した。LDHアイソザイムテストワコー（和光純薬工業KK）を用い，付属の解説書にしたがって測定をおこなった。即ち寒天ゲルプレート（0.8%アガロース，バルビタール緩衝液）を泳動用緩衝液（0.04 M バルビタール緩衝液 $\text{pH} 8.5$ ）に浸し，試料 $10 \mu\text{l}$ を負荷し，30 mA にて60分間電気泳動した。電気泳動終了後，寒天ゲルプレートの表面に染色液（0.1 M 乳酸リチウム， NAD^+ 2.1 mM，ニトロテトラゾリウムブルー 0.42 mM，フェナジンメトサルフェート 0.084 mM，0.1 M トリス緩衝液 $\text{pH} 8.35$ ）7 ml を加え， 37°C 60分間反応させた後，寒天ゲルプレートを水洗した。各バンドの発色はPDIイメージスキャナー（東洋紡）にて画像として取り込み，quality one ソフトウェアで解析した。

(4) データ解析と統計処理

LDHはIU/lで表した。数値は平均±標準偏差で示した。2群間の有意差の検定はMann-Whitney U検定で行い， $P < 0.05$ を有意な差とした。2群間の相関はSpearmanの順位相関係数にて表した。

結果

健常者10名の血清中の総LDHは $99.5 \pm 5.6 \text{ IU/l}$ であった。不妊症患者99名の精漿中の総LDHは $2,487 \pm 1,384 \text{ IU/l}$ と健常者血清の総LDHの約25倍の値を示した。血清LDHは上記条件のゲル電気泳動法によって5つのアイソザイム（LDH1～5）に明瞭に分離された（Fig. 1A）。一方，精漿を試料とした場合LDH-C4はLDH4とバンドが重なり分離が困難であった（Fig. 1B）。そこで精漿中のLDH-C4分離に最適な電気泳動条件を検討した。泳動時間を30，60，90分に，ゲルプレートおよび泳動用緩衝液の pH を8.0，8.5，9.0に，試料負荷量を2，4，6 μl に変化させた。その結果，泳動時間90分， $\text{pH} 8.5$ ，試料負荷量2 μl で最も良好な分離が得られた（Fig. 1C）。この条件を用いて不妊症患者75名の精漿中のLDHアイソザイム活性を測定した。

健常者血清および不妊症患者精漿中の各LDHアイソザイムの比率をFig. 2に示す。精漿では血清に比べLDH1が有意に低くLDH4およびLDH5が有意に高い比率を示した。またLDH-C4は血清では検出されず，精漿では75名中63名に検出された。精漿LDH-C4の平均値は $383 \pm 356 \text{ IU/l}$ で，総LDHの $13.8 \pm 8.6\%$ を占めた。

次に精漿中LDHと精子濃度の相関を検討した。LDH-C4と精子濃度の間に有意な正の相関を認めた（Fig. 3）。総LDHおよび他のLDHアイソザイムと精子濃度の間に相関は認めなかった。また，LDH-C4と運動精子数との間には有意な相関は認めなかった。

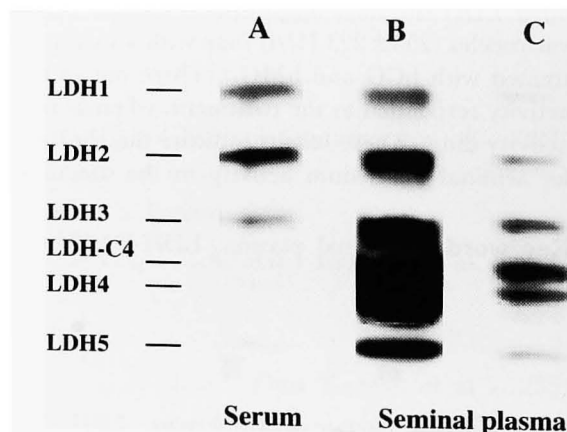


Fig. 1. Gel electrophoretic patterns of LDH in human serum (A) or seminal plasma (B, C). LDH-C4 isozyme was detected only in seminal plasma. Separation between LDH4 and LDH-C4 was remarkably improved in C under electrophoretic condition optimized for seminal plasma compared to gel electrophoretic pattern in B under the condition similar to A (see text for details).

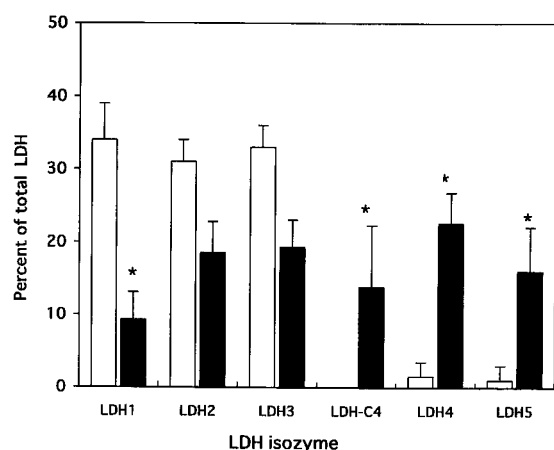


Fig. 2. Distribution of each LDH isozyme activity in serum from healthy subjects (open columns) and in seminal plasma from infertile patients with oligozo- or azoo-spermia (closed columns). Data are expressed as mean $\pm$ SD. Asterisks indicate statistically significant differences between serum and seminal plasma at $P < 0.001$.

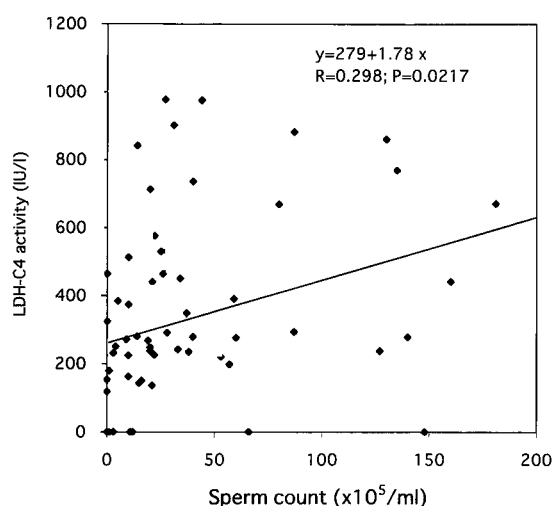


Fig. 3. Correlation between sperm count and LDH-C4 activity in seminal plasma from infertile patients with oligozo-spermia or azoospermia.

た (相関係数 $r = 0.198$, $P = 0.126$).

3 回以上の反復測定を行った 11 例について, LDH-C4 の測定日による変動を検討した. Fig. 4 に示すように 11 例中 5 例で測定日によって比較的大きな LDH-C4 活性の変動が認められた.

精索静脈瘤の有無が確認されている 45 例を静脈瘤あり 22 例と静脈瘤なしの 23 例の 2 群に分けて, LDH-C4 を比較した. Table 1 のごとく, LDH-C4 は静脈瘤あり群において静脈瘤なし群より有意に ($P < 0.05$) 低い値を示した. 精子濃度と総 LDH は両群間で差がなかった.

無精子症は 7 例に認め, 1 例は hypogonadotropic

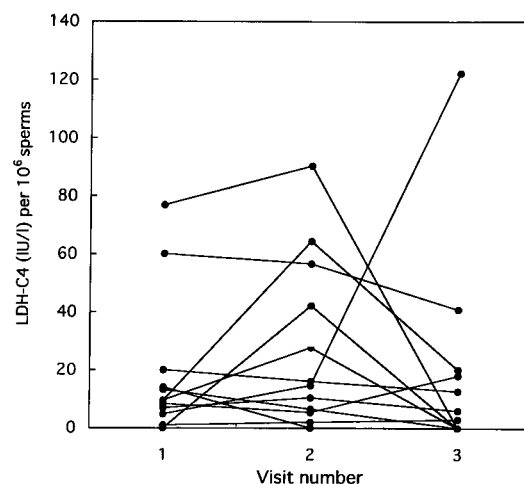


Fig. 4. LDH-C4 activity in seminal plasma from eleven patients at three different visits.

Table 1. LDH-C4 and sperm count in infertile patients

	Varicocele (+)	Varicocele (-)
No. pts	22	23
LDH-C4 (IU/l)	252 $\pm$ 223*	410 $\pm$ 275
Total LDH (IU/l)	2,487 $\pm$ 1,430	2,750 $\pm$ 1,091
Sperm count ($\times 10^6$ /ml)	3.74 $\pm$ 4.90	3.18 $\pm$ 3.84

Data are expressed as mean $\pm$ SD. * significant difference vs varicocele (-) at $P < 0.01$.

hypogonadism (HH), 他の 6 例は idiopathic azoospermia であった. HH 1 例を含む 4 例で精漿中に LDH-C4 を検出した. 7 例中 6 例で hCG+hMG による induction therapy が行われ, LDH-C4 検出例では 4 例中 3 例に精液中に精子の出現を認め, うち 1 例は normozoospermia となり挙児を得た. LDH-C4 が検出されなかった 2 例はいずれも精液所見の改善を認めなかった. Table 2 に 7 例の臨床所見をまとめた.

考 察

不妊症患者 75 名の精漿 LDH アイソザイムは血清と比べて LDH1 が低く, LDH4, 5 が高い比率を示した. また LDH-C4 は血清では検出されず, 精漿でのみ検出された. 1) 精管結紮後の精液中では LDH-C4 活性が消失すること^{4,5)}, 2) 精子を洗浄して精子浮遊液を作成したのち精子を破壊すると浮遊液中には LDH-C4 のみが検出されること^{1,6)}, 3) 齧歯類では LDH-C4 タンパクおよび LDH-C サブユニット mRNA は第一次精母細胞以降の生殖細胞でのみ発現が証明され, 精粗細胞や Sertoli 細胞には発現がみられないこと^{7,8)}から, 精漿中の LDH-C4 は精母細胞, 精子細胞, 精子から逸脱したものであると考えられる. 一方, LDH-C4 以外の LDH アイソザイムは前

Table 2. Clinical findings and response to treatment in patients with azoospermia

Pt. No.-Age	Varix	Testis		LDH-C4 (IU/l)	hCG/hMG	Response
		Vol (ml)	Biopsy			
<i>Hypogonadotropic hypogonadism</i>						
1-30	no	7	not done	118.3	yes	increased testicular volume, sperm+
<i>Idiopathic azoospermia</i>						
2-28	no	42	hypospermatogenesis	324.9	yes	sperm+
3-25	no	50	hypospermatogenesis	153.8	yes	normospermia, pregnancy, live birth
4-35	no	22	maturation arrest	464.3	yes	poor
5-32	no	35	hypospermatogenesis	0	yes	poor
6-30	no	22	hypospermatogenesis	0	yes	poor
7-39	no	36	not done	0	no	---

立腺上皮細胞から前立腺液中に逸脱したものが大部分を占めるとされる。実際精管結紮前後の精漿中の LDH アイソザイム分画を比較すると LDH-C4 以外の LDH アイソザイムの分画比率はほぼ同様であったことが報告されている⁵⁾

精漿中 LDH-C4 は精子濃度と正の相関を示したが、ばらつきがあり個人差を認めた。両者の相関はこれまでも検討されている^{5,9-12)} 相関係数0.6~0.74と高い相関も報告されている^{5,11,12)}が、これらはいずれも健常者あるいは normozoospermia 症例が対象の多くを占めており、比較的均質な集団での結果と考えられる。精漿中 LDH-C4 活性は精子、精子細胞、精母細胞の数、細胞内での酵素産生や代謝活性、細胞の障害の程度、精液中での酵素の希釈、分解など多くの因子によって変化することが想定される。無精子症や乏精子症患者ではこれらの因子がさまざまに関与しており、今回のばらつきの原因となったのであろう。不妊症患者では精漿 LDH-C4 は精子濃度にかわるものではなく、上述の多くの因子を反映した指標としてとらえるべきである。Eliasson ら¹³⁾は精子 10⁸個あたりの LDH-C4 (LDH-C4/sperm ratio) が不妊症患者では健常者より高いこと、精子濃度と逆相関することを報告し、この値が精細管上皮の機能をあらわす良い指標であるとしている。

反復測定した11例中5例で LDH-C4 の比較的大きな日差を認めた。この変動が精細管上皮機能の実際の変動をあらわしているのか、精液中での希釈分解など別の原因によるのかは今回の結果からは明らかではない。Orlando ら¹⁴⁾は健常者の精子数、精漿中 LDH-C4, transferrin の1年以上の期間における変動を検討し、精子数と LDH-C4 は transferrin より大きな変動を示したことを報告している。生殖細胞は Sertoli 細胞より血流や温度などの細胞環境の変化の影響を受けやすく、LDH-C4 の日差はそれを反映していることが推測される。

精索静脈瘤は男子不妊症の原因の1つとして重要である。精索静脈瘤患者の精細管には形態学的に

Sertoli 細胞の細胞質の空胞形成や精子細胞の成熟異常などの障害がみられるのみならず¹⁵⁾、glycogen や脂質含量などの生化学的な変化がみられ、細胞代謝にも障害が起きていることが推測される¹⁶⁾ 今回の検討では精索静脈瘤のある患者の精漿中 LDH-C4 は精索静脈瘤のない患者と比較して有意に低い値を示した。精索静脈瘤患者の精漿では Sertoli 細胞機能の指標とされる transferrin 濃度が低下しており、精索静脈瘤の外科的治療後、精子濃度の増加と平行して上昇することが報告されている^{17,18)} 精索静脈瘤患者における LDH-C4 の低値は生殖細胞の障害を反映していると考えられ、高位結紮術後の精子運動率や精子数などの精液所見の改善と共に LDH-C4 がどのように変化するか検討する必要がある。

今回無精子症7例のうち4例の精漿中に LDH-C4 が検出された。精漿中に LDH-C4 が検出されれば閉塞性無精子症が否定される。また少なくとも第一次精母細胞以降まで分化増殖した生殖細胞が存在することを示しており^{7,8)}、Sertoli cell only syndrome や spermatogonium arrest は否定できる¹⁹⁾が、今回の対象にはこの両者は含まれておらず、実際にこれらの精子形成障害で LDH-C4 が検出されないのかどうかは確認できなかった。7例中6例に hCG と hMG による induction therapy を行い、LDH-C4 が検出された4例中3例に精液所見の改善を認め1例では挙児を得た。LDH-C4 が検出されなかった2例には反応がみられなかった。Gavella ら²⁰⁾は高度の乏精子症患者に testosterone rebound therapy を行い、治療前の精漿中 LDH-C4 活性の高い患者では治療への反応が良好であったと報告している。これらの結果は LDH-C4 が無精子症、乏精子症患者の潜在的な精子形成能の評価や治療効果の予測に有用であることを示唆する。

これらの所見を総合すると、精漿 LDH-C4 は不妊症患者の精漿の精子形成能と密接な関係を持っており、男子不妊症の診断、治療において従来の seminogram を補う有用な指標となりうると考えられる。

文 献

- 1) Blanco A and Zinkham WH: Lactate dehydrogenases in human testes. *Science* **139**: 601-602, 1963
- 2) Goldberg E and Hawtrey C: The ontogeny of sperm specific lactate dehydrogenase in mice. *J Exp Zool* **164**: 309-316, 1967
- 3) Blanco E: Effect of immunization with LDH-X on fertility. *Acta Endocrinol (Suppl)* **194**: 202-222, 1974
- 4) Moon KH and Bunge RG: Lactate dehydrogenase isozymes patterns in pre- and postvasectomy seminal plasma. *Invest Urol* **6**: 223-226, 1968
- 5) 内島 豊: ヒト射精液中の乳酸脱水素酵素とそのアイソザイム. *日泌尿会誌* **72**: 643-661, 1981
- 6) Clausen J and Ovlisen B: Lactate dehydrogenase isoenzymes of human semen. *Biochem J* **97**: 513-517, 1965
- 7) Hintz M and Goldberg E: Immunohistochemical localization of LDH-X during spermatogenesis in mouse testis. *Dev Biol* **57**: 375-384, 1977
- 8) Fujimoto H, Erickson RP and Tone S: Changes in polyadenylation of lactate dehydrogenase-X mRNA during spermatogenesis in mice. *Mol Reprod Dev* **1**: 27-34, 1988
- 9) Rotbol L, Hemmingsen L and Schmidt V: Protein pattern and LDH isozymes in human seminal plasma with reference to fertility. *Clin Chim Acta* **25**: 147-152, 1969
- 10) Gerez de Burgos NM, Burgos C, Coronel CE, et al.: Correlation of lactate dehydrogenase isoenzyme C4 activity with the count and motility of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* **55**: 107-111, 1979
- 11) Gavella M, Cvitkovic P and Skrabalo Z: Seminal plasma isoenzyme LDH X in infertile men. *Andrologia* **14**: 104-109, 1982
- 12) Velasco JAN, Albacete MP, Zapata IT, et al.: Lactic dehydrogenase-C4 activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil Steril* **60**: 331-335, 1993
- 13) Eliasson R and Virji N: LDH-C4 in human seminal plasma and its relationship to testicular function. II. clinical aspects. *Int J Androl* **8**: 201-214, 1985
- 14) Orlando C, Casano R, Caldini AL, et al.: Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *J Androl* **9**: 220-223, 1988
- 15) Nistal M and Paniagua R: Vascular disorders of the testis. In "Testicular and epididymal pathology", pp. 201-226, Thieme-Stratton Inc., New York, 1984
- 16) Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, et al.: Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* **22**: 149-159, 1989
- 17) Yoshida K-I, Nakame Y and Uchijima Y: Seminal plasma transferrin concentration in normozoospermic fertile men and oligozoospermic men with varicocele. *Int J Fertil* **33**: 432-436, 1988
- 18) Kosar A, Sarica K and Ozdiler E: Effect of varicolectomy on seminal plasma transferrin values: a comparative clinical trial. *Andrologia* **32**: 19-22, 2000
- 19) Verma PK, Singh JN and Quadros M: LDH-x in azoospermia: a new diagnostic alternative to vasography and testicular biopsy. *Indian J Med Sci* **47**: 204-207, 1993
- 20) Gavella M, Cvitkovic P, Papic Z, et al.: Seminal plasma LDH-X in testosterone rebound therapy. *Arch Androl* **19**: 65-69, 1987

(Received on August 6, 2001)

(Accepted on October 6, 2001)