

人精漿中 Androgen Binding Protein (ABP) の 産生源に関する研究

山形大学産科婦人科学教室 (主任: 広井正彦教授)

小 田 隆 晴

Studies on the Source of Androgen Binding Protein (ABP) in Human Seminal Plasma

Takahare ODA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata
(Director: Prof. Masahiko Hiroi)*

概要 ^3H -DHT を用いた saturation charcoal adsorption 法で種々の精液所見を示す人精漿中の androgen binding protein の binding capacity (SPABP-BC) を測定し、種々の精液所見との相関およびその産生源について検討し、あわせて等電点分離法にて SPABP と精巣上体 ABP、血清 testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) との違いについて検討し次の結果を得た。

1) SPABP-BC と精液中の精子濃度とは有意の相関関係は見出されなかったが、乏精子症重症群 (精子数 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以上, $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満) では高値で、多精子症群 (精子数 $250 \times 10^6/\text{ml}$ 以上) では低値を示した。

2) 精子運動能と SPABP-BC との検討では運動不良群の精漿内の方が良好群よりも SPABP-BC は高値を示したが、有意差のあるものではなかった。

3) 精液量と 1 回射精量あたりの SPABP-BC との間には有意の相関関係が認められた ($p < 0.025$)。

4) 病的な無精子症群および精管結紮後の人工的無精子症群の精漿内にも SPABP-BC はそれぞれ $289.6 \pm 108.6 \times 10^{-12}\text{M}$, $293.2 \pm 84.2 \times 10^{-12}\text{M}$ と存在し正常精液群の $258.6 \pm 29.1 \times 10^{-12}\text{M}$ とほぼ同じであった。

5) 分画射精での精子高濃度を示した第 1 fraction と果糖高濃度を示した第 2 fraction 中での SPABP-BC はほぼ同じであった。

6) SPABP と精漿内蛋白濃度との相関関係は全く認められなかった。

7) Sephadex column を使った等電点分離法では SPABP は $\text{pI} = 7.3$ を示す広いゾーンに活性をもつ蛋白として分離され、精巣上体 ABP や TeBG とは違ったパターンを示した。

以上により精漿中の ABP は従来の Sertoli cell 由来の ABP および血清 TeBG とは異なるもので、その binding capacity は精子濃度、精子運動能との相関は認められず、前立腺あるいは精囊腺に由来するものであると考えられた。

Synopsis Androgen binding protein in human seminal plasma (SPABP) which has a high affinity-low capacity for dihydrotestosterone (DHT) was measured by saturation-charcoal adsorption technique.

No correlation was found between SPABP binding capacity for DHT and sperm count or motility, but there was a significant correlation between SPABP binding capacity per ejaculate and semen volume.

In order to determine the source of this binding protein seminal plasma from vasectomized men was analyzed, split ejaculates were studied from normal volunteers and SPABP was compared from epididymal ABP and from serum testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) by isoelectric analysis. There was no significant difference in SPABP binding capacity in semen from vasectomized ($293.2 \pm 84.2\text{pM}$) and non-vasectomized men with azoospermia ($289.6 \pm 108.6\text{pM}$). Analysis of split ejaculates showed the following: 1) the sperm density was significantly greater in the first fraction; 2) the concentration of fructose was greater in the second fraction; 3) SPABP binding capacity was the same in both fractions. The isoelectric analyses showed that SPABP was distinctly different from epididymal ABP and serum TeBG.

In these data, this DHT-binding protein is not the same as testicular ABP. It appears to originate from

both the prostate and seminal vesicles.

Key words : Accessory glands • Androgen binding protein in seminal plasma (SPABP) • Isoelectric focusing • Sertoli cell • Testosterone-estradiol binding globulin (TeBG)

緒 言

Androgen binding protein (ABP) は精漿中の Sertoli cell で産生される分子量90,000の蛋白質であり³⁾, androgen を輸精管や精巣上体へ運搬あるいは保存し spermatogenesis や sperm maturation あるいは精子運動能の獲得に役立っていると考えられている¹⁰⁾.

人精漿中に dihydrotestosterone (DHT) や testosterone と強い親和性を示す ABP 様物質 (SPABP) が存在し, その binding capacity の定量的測定法とその生化学的性質については, 既報¹⁾にて発表した²⁾が, SPABP が生殖機能あるいは生殖現象においていかなる生物学的意義を有するか, またその産生源がどこにあるかは全く不明である.

本論文は, 精漿中の SPABP の binding capacity (SPABP-BC) と精液所見 (精液量, 精子濃度, 精子運動能) との関係, および精管結紮後の精漿由来成分を持たない精漿や, 分割射精で得られた精漿の SPABP-BC を検討した. また SPABP と極めて類似の affinity や specificity を持つ精巣上体 ABP, 血清 testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) とを等電点分離法にて比較検討した.

研究材料並びに方法

1. 精液の採取

精管結紮術施行後半年以上を経過している人工的無精子症の健康男子 (N=6), 精液検査のため不妊外来を訪れた健康男子 (N=103) より用手的に精液を glass jar に採取し, 液化を待つて一般精液検査後出来るだけ速やかに精漿を分離した. また3名の健康男子 donor より2つの fraction に分割にて精液を採取し精漿を分離した.

2. 精液検査

精子数の計算は37℃で30分おいて液化を待ち精子が均一化したところで hemocytometer を用いて duplicate で行なつた. 精子の運動率は400倍で

表1 Quality of motility

4+	Very rapid PROGRESSIVE motility
3+	Rapid PROGRESSIVE motility (average)
2b+	Sluggish PROGRESSIVE motility
2a+	Rapid NON-PROGRESSIVE motility
1+	Sluggish NON-PROGRESSIVE motility
<1	Occasional spastic motion

10視野を観察しその平均率で計算した. 運動の quality は Bernstein²⁾の 0 から +4 で表現した (表1).

3. 精漿の分離

精漿は既報¹⁾の様に3段階遠心法 (40×G10分間, 140×G10分間, 8,000×G30分間) で分離し, Tris-HCl buffer で2~3倍に希釈し-20℃で凍結保存し, 一週間以内に測定に供した.

4. SPABP-BC の測定

精漿中の ABP の binding capacity は既報¹⁾の様に³H-DHT を用いた saturation-charcoal adsorption 法で測定した.

5. 精漿中の蛋白, 果糖濃度の測定

精漿中の蛋白量は Lowry et al.⁷⁾の方法で, 果糖量は Mann⁸⁾の方法で測定した.

6. 等電点分離法 (isoelectric focusing)

精漿中の³H-DHT 結合蛋白 (SPABP), 精巣上体の cytosol 中の³H-DHT 結合蛋白 (epididymal ABP), および血清中の³H-DHT 結合蛋白 (TeBG) は, あらかじめ Sephadex G25 の mini-column で脱塩したあと, O'Brien et al.⁹⁾の方法に従い, Sephadex G15 column (25×200mm) 中で 10% glycerol を含む pH 4~9 の 1.5% 両性電解質 ampholyte (LKB, Produkter, Sweden) を用いる isoelectric focusing 法で分析した. 溶出液は各々 0.35ml で 100本のフラクションに分画し, 等電点 (isoelectric point, pI) を測定したのち, その 0.3ml をカウント用バイアルにとり aqueous scintillation medium (Amersham Incorporated) を 15ml 加え液体シンチレーションカウンター

表2 Comparison of ^3H -DHT binding sites from
109 men grouped by sperm count

Diagnosis (Sperm Count: $\times 10^6/\text{ml}$)	Number of cases	Sperm count ($\times 10^6/\text{ml}$)	^3H -DHT binding sites (PM)
Polyzoospermia (≥ 250)	5	322.0 ± 21.8	152.0 ± 42.1
Normozoospermia (40—249)	63	99.1 ± 8.9	258.6 ± 29.1
Oligozoospermia I (20—39)	12	31.0 ± 1.5	175.0 ± 26.8
Oligozoospermia II (1—19)	16	9.8 ± 1.5	378.6 ± 91.2
Azoospermia	7	—	289.6 ± 108.6
Vasectomized	6	—	293.2 ± 84.2

The values of sperm count and ^3H -DHT binding sites were given in
mean $\pm$ S.E.M.s.

(Nuclear Chicago, Mark 2) で放射能を測定した。

成 績

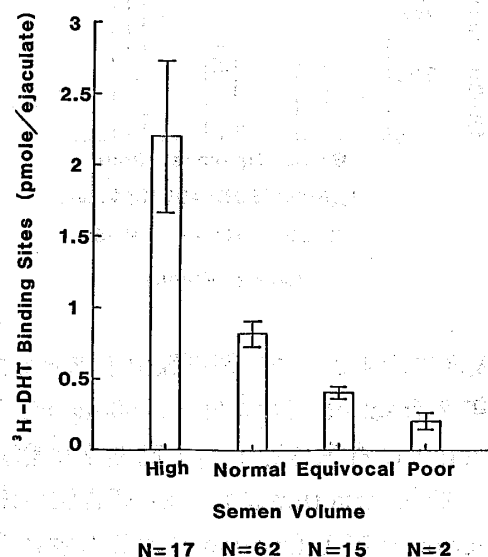
1. 精子濃度と SPABP-BC との相関

精液中の精子濃度により International Committee of Andrology の分類で正常精液群, 多精子症群(精子数 $250 \times 10^6/\text{ml}$ 以上), 乏精子症群 I (精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満), 乏精子症群 II (精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満), 無精子症群および精管結紮後の人工的無精子症群に分けての ^3H -DHT に対する specific binding capacity は表 2 に示す様に乏精子症群 II においては $378.6 \pm 91.2 \times 10^{-12}\text{M}$ と最も高値を, 多精子症群では $152.0 \pm 42.1 \times 10^{-12}\text{M}$ と最も低値を示したが, 各群間において統計学的に有意差は認められなかった。また病的な無精子症群および精管結紮後の人工的無精子症群でもそれぞれ $289.6 \pm 108.6 \times 10^{-12}\text{M}$, $293.2 \pm 84.2 \times 10^{-12}\text{M}$ と正常精液群と同じ程度の SPABP-BC が検出された。

2. 精子運動能および精液量と SPABP-BC との相関

無精子症を除いた96例の精液の精液量, 運動能と SPABP-BC との相関関係を検討した。図 1 に示す様に, 精液量と一回の射精量あたりの精漿中の ^3H -DHT binding site (pmole/ejaculate) には有意の正の相関関係が認められ($p < 0.025$), 正常精液量群(精液量 2 ml 以上 6 ml 未満)の SPABP-BC が $0.811 \pm 0.092\text{pmole/ejaculate}$ であったのに比し精液多量群(精液量 6 ml 以上)で

図1 SPABP binding capacity (pmole/ejaculate)
in relation to semen volume
The values were given in mean $\pm$ S.E.M.'s.



は $2.271 \pm 0.556\text{pmole/ejaculate}$ と有意に高値を示し($p < 0.001$), 精液少量群(精液量 1 ml 未満)では $0.209 \pm 0.066\text{pmole/ejaculate}$ と有意に低値を示した($p < 0.01$).

精子の運動率および運動の quality と精漿中の ABP-BC との比較を図 2, 図 3 に示すが, 運動能の悪い精子を含む精漿の ^3H -DHT binding site が良好な運動能精子をもつそれよりも高値を示したが, いずれにおいても各群における有意差は見出し得なかった。

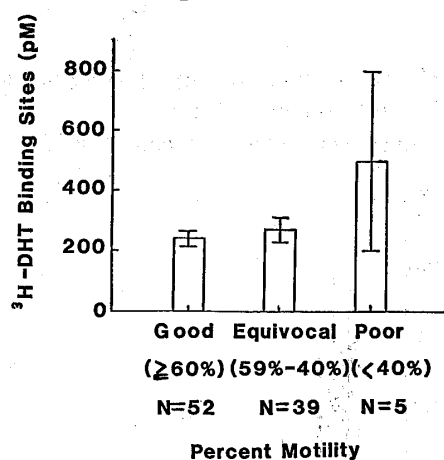
3. 分割射精における SPABP-BC

2つの fraction に分割射精して得た精液量, 精子濃度, 果糖濃度, SPABP-BC について比較した

表3 Combined results from 3 split ejaculates

Parameter	Fraction I (Mean±S.E.M.s)	Fraction II (Mean±S.E.M.s)
Volume (ml)	1.50±0.10	2.37±0.15
Sperm count ($\times 10^6$ /ml)	226.3 ±67.5	51.3 ±19.2
Fructose (mg/ml)	2.49±0.98	4.25±1.60
^3H -DHT Bound (fmole/ml)	201.3 ±48.7	195.0 ±34.0
^3H -DHT Bound (fmole/fraction)	304.3 ±90.6	459.7 ±73.8

図2 SPABP binding capacity in relation to the percent motility of spermatozoa in semen
The values were given in mean±S.E.M.'s.



成績は表3に示す如くで、精囊腺由来成分である果糖は第2 fractionでは $4.25 \pm 1.60 \text{ mg/ml}$ と第1 fractionとは有意差をもつて高濃度に認められ ($p < 0.025$), fractionあたりの SPABP-BC も第2 fractionは第1 fractionに比し有意に高値を示した ($p < 0.005$). しかし1 mlあたりの SPABP の binding site では両群間に有意差は全く認められず第1 fractionでは $201.3 \pm 48.7 \text{ fmole/ml}$, 第2 fractionは $195.0 \pm 34.0 \text{ fmole/ml}$ とほぼ同量であった。

4. 精漿中の蛋白濃度と SPABP-BC との相関
30検体の精漿につきその蛋白濃度と ^3H -DHT binding capacity を検討したが図4に示した様に両群間の相関関係は全く認められなかつた。

5. isoelectric focusing による SPABP, epididymal ABP, TeBG の分析

^3H -DHT に結合した SPABP, epididymal ABP, TeBG を垂直カラムに充填し、直流電圧を加えて isoelectric focusing すると図5に示す様

図3 SPABP binding capacity in relation to the quality of sperm motility
Good: $\geq 2b$, Equivocal: $< +2b$, $> +2a$, Poor: $\leq +2a$
The values were given in mean±S.E.M.'s.

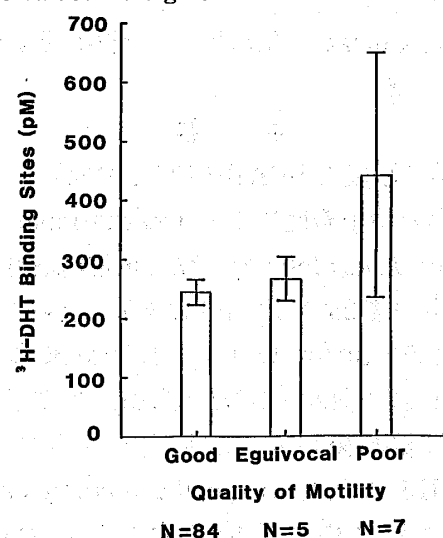


図4 [^3H]-DHT binding sites vs. protein concentration in seminal plasma. (N=30)
By the method of the Spearman rank correlation, there was no apparent correlation between [^3H]-DHT binding capacity and the amount of protein in human seminal plasma.

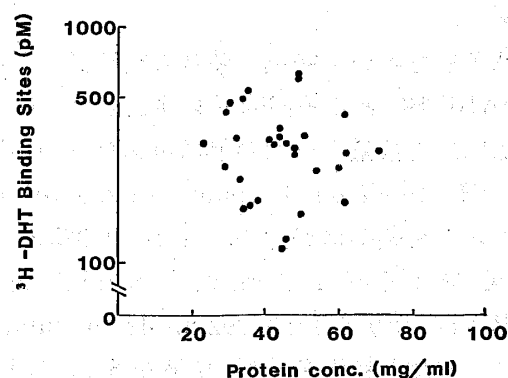


図5 Isoelectric focusing of SPABP over the pH 4—9

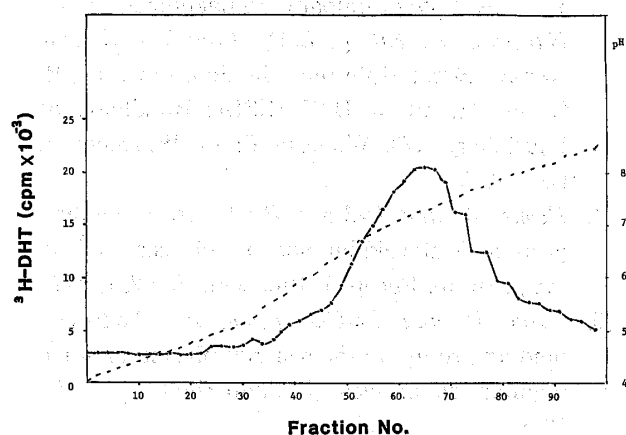


図6 Isoelectric focusing of epididymal ABP over the pH 4—9

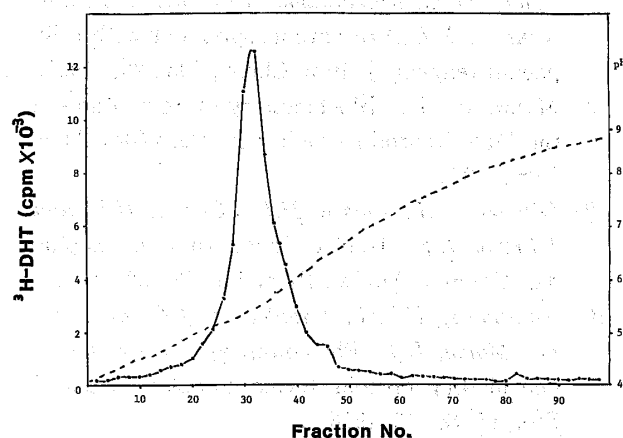
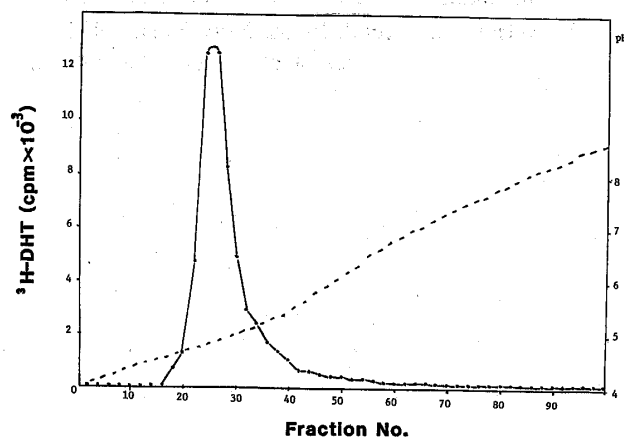


図7 Isoelectric focusing of serum TeBG over the pH 4—9



に SPABP は pI が pH 7.3 にピークをもつ pH 5.5 から pH 8.0 にわたる広いゾーンに分布する蛋白質として分析された。一方 epididymal

ABP や TeBG の濃縮ゾーンは pI がそれぞれ pH 5.6, pH 4.9 に狭いピークをもつ蛋白質として分析された (図 6, 図 7)。

考 案

従来より各種体液中の ABP の存在とその意義が検討されてきているが、精漿中には一部の哺乳類に ABP の存在が確認されており、その役割についての報告も若干みられる⁵⁾が推測の域を出ていないのが実情である。著者は既報¹⁾にて人精漿中にも低結合容量ではあるが DHT に高親和性を示す SPABP が存在することを発表した²⁾が、その SPABP は affinity や steroid specificity において従来の Sertoli cell 由来の ABP や血中 TeBG と極めて類似しているものの³⁾、DHT との結合はそれらに比べてインキュベーションが長時間必要であり、ABP や TeBG 以外のアンドロゲン高親和性蛋白であることが推測された。本論文において示した精管結紮術施行後の精巣由来成分を持たない無精子症の健康男子精漿中にも DHT に高親和性を示す binding capacity が正常精液症群とほぼ同じく存在したこと、また等電点分離法でも epididymal cytosol の ABP や血中 TeBG と SPABP は異なつた isoelectric point を示したことから判断して、SPABP は精巣あるいは精巣上体より産生あるいは分離したものでも、また精漿内に混入した血清 TeBG でもない独自の蛋白質でおそらく前立腺あるいは精嚢腺などの外分泌腺臓器に由来するものと考えられた。その産生源をさらに追求するために、分画射精した精漿中の 2 つの fraction について SPABP-BC を検討したが精子高濃度を示した前立腺由来成分の多い第 1 fraction と果糖高濃度を示した第 2 fraction での DHT binding site はほぼ同じであり、おそらく両外分泌腺より由来しているものと推測された。

本論文中において示した様に、SPABP-BC は精液中の精子濃度や精子運動能とは無関係で、無精子症精漿にも正常精液症精漿と同じ程度が検出されたこと、さらに一回射精量あたりの SPABP-BC はその精液量との間に正の相関関係がみられたこと、また既報¹⁾で述べた様に精子への DHT の

binding は低親和性で非特異性を示したこと等から SPABP は精子細胞からの産生あるいは分離したものでなく精漿成分に付随して産生されたものと考えられた。この点は Jegou et al.⁵⁾が種々の哺乳類の精漿中の ABP を polyacrylamide gel electrophoresis 法で検索し精子濃度が 10^9 cells/ml 以上を示す雄羊、雄山羊、雄牛の精漿中にのみ ABP が見出され、精子濃度との相関を強調し、精巢の Sertoli cell 由来の蛋白質であるとしている報告とは異なる。Jegou et al.⁵⁾の説に従えば、精漿中の ABP 濃度を測定することにより、Sertoli cell の活動性をいとも簡単に把握することが出来るのであるが、前立腺にはレセプター以外のアンドロゲン親和性結合蛋白も最近見出されており⁴⁾¹¹⁾、今後これらと SPABP との類似性を検討し、精漿中の ABP が生殖現象にいかなる役割を有しているか究明されなければならない課題である。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導、御検閲を賜りました恩師広井正彦教授に深甚なる謝意を表するとともに、実験にあたって御協力下さった研究室各位に厚く御礼申し上げます。なお本論文の一部は第26回日本不妊学会総会学術講演会（1981年）および第6回の American Society of Andrology の Annual Meeting（1981年）において発表した。

文 献

1. 小田隆晴：人精液中の Androgen Binding Protein (ABP) の binding capacity 測定法について。日産婦誌，34：1，1982。
2. Bernstein, G.S. : Male factor. In Mischell, D.R.,

- Jr., and Davajan, V. (EDS) : Reproductive Endocrinology, Infertility and Contraception, 351. F.A. Davis Company, Philadelphia, 1979.
3. Hansson, V., Ritzen, E.M., French, F.S. and Naybeh, S.N. : Male reproduction. In Greep, R. O. and Hamilton, D.W. (EDS) : Handbook of Physiology, 173. Waverly Press, Washington, D.C., 1975.
4. Heyns, W. and DeMoor, P. : Prostatic binding protein. A steroid-binding protein secreted by rat prostate. *Europ. J. Biochem.*, 78 : 221, 1977.
5. Jegou, B. and La-Gac Jegou, F. : Androgen binding protein in the seminal plasma of some mammalian species. *J. Endocrinol.*, 77 : 267, 1978.
6. Kato, T. and Horton, R. : Studies of testosterone binding protein. *J. Clin. Endocrinol. Meta.*, 28 : 1160, 1968.
7. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265, 1951.
8. Mann, T. : The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. 239, Wiley, New York, 1964.
9. O'Brien, T.J., Liebke, H.H., Cheun, H.S. and Johnson, L.K. : Isoelectric Focusing in a Sephadex Column. *Analyt. Biochem.*, 72 : 38, 1976.
10. Rommerts, F.F.G., Grootegold, J.A. and van der Molen, H.J. : Physiological role for androgen binding protein-steroid complex in testis? *Steroid*, 28 : 43, 1976.
11. Tymoczko, J.L., Liang, T. and Liao, S. : Androgen receptor interactions in target cells: biochemical evaluation. In O'Malley, B.W. and Birnbaumer, L. (EDS) : Receptors and Hormone Action, 121. Acad. Press, New York, 1978.

(No. 4927 昭56・7・4受付)