

ヒト精液中のプロスタグランディン測定法について

山梨医科大学産科婦人科学教室 (主任: 加藤順三教授)

三橋 直樹 安水 洗彦 加藤 順三

A Method for Determination of Prostaglandins
in Human Seminal Fluid

Naoki MITSUHASHI, Takehiko YASUMIZU and Junzo KATO

*Department of Obstetrics and Gynecology, Yamanashi University School of Medicine, Yamanashi
(Director: Prof. Junzo Kato)*

概要 ヒト精液中のプロスタグランディン (PG) は他組織に比し数千倍の濃度で含まれている。しかしながらその正確な定量法は未だ開発されていない。これは精液中の PG の種類が多いため、これらを分離するためにいくつもの分離法を組み合わせる必要があるためである。今回 PGE と 19-OH PGE の 1 測定法を開発した。その要点は以下の如くである。

- 1) 精液は10倍量アセトン中で -20°C で保存する。
- 2) アセトン抽出物をアルカリ処理し、PGE は PGB に、19-OH PGE は 19-OH PGB に転換することによって後の測定を簡易化する。
- 3) PGB とその他の PG の分離には Lipidex column chromatography を用いる。PGB 以外の PG はメチル化後 silicic acid column chromatography で分離する。
- 4) PGB の測定には、メチル化—トリメチルシリル化した後にガスクロマトグラフィーを行う。Internal standard としては、炭素数24個の長鎖脂肪酸 (C_{24}) のメチルエステルを用いる。
- 5) 19-OH PGE の測定は278nm の吸光度測定で行う。19-OH PGE₁ と 19-OH PGE₂ の分離には硝酸銀添加シリカゲルの TLC を行う。
- 6) Silicic acid column chromatography で溶出された 19-OH PGB, PGF, 19-OH PGF の同定を GC-MS で行つた。
- 7) ガスクロのカラムの改良により PGF, 19-OH PGF も測定できる可能性を示唆した。

Synopsis Human seminal fluid has been shown to contain mainly eleven different prostaglandins. Methods for quantitative determination of prostaglandin E and 19-OH prostaglandin E are described.

The methods include extraction with acetone and alkali treatment. After alkali treatment prostaglandin E was transformed to prostaglandin B, and 19-OH prostaglandin E to 19-OH prostaglandin B.

Prostaglandins were separated by using Lipidex column chromatography and silicic acid column chromatography.

Prostaglandin B was quantitated by gas chromatography using C_{24} fatty acid methyl ester as internal standard.

19-OH prostaglandin B was quantitated by measuring ultraviolet photoabsorbance at 278nm.

Key words: Seminal fluid • Prostaglandin

緒 言

プロスタグランディン (PG) 研究の歴史は、1930 年代に Goldblatt⁴⁾ と von Euler³⁾ がヒト精液あるいは精のう腺の抽出物に特異な薬理作用があることを発見したことに始まっている。その後 PG の研究はほとんど進まなかつたが、1960年代になり Sweden の Bergström¹⁾ や Samuelsson⁷⁾ により精液から PGE₁, E₂, F_{1 α} , F_{2 α} 等が次々に分離精製さ

れ、構造決定が行われた。それから周知のごとく PG 研究は爆発的に進むのであるが、不思議なことに精液中の PG を扱った仕事は極めて少ない。1966年に Hamberg et al.⁵⁾ は 19位に水酸基のついた 19-OH PGA および 19-OH PGB が精液中に存在すると報告した。これは 19-hydroxylated PG の最初の報告であるが、その後 Taylor and Kelly により精液中に含まれるのは 19-OH PGE⁸⁾

と19-OH PGF⁹)であることがGC-MSにより証明され、19-OH PGA および19-OH PGB はそれぞれ19-OH PGE から精液の保存中あるいは抽出や分離操作中に生じたものであることがわかってきた。現在ヒト精液中に含まれるとされるPGはPGE₁とPGE₂、それにごく少量のPGE₃、そして19-OH PGE₁、19-OH PGE₂、PGF_{1α}、PGF_{2α}、19-OH PGF_{1α}、19-OH PGF_{2α}、そして最後の19-OH PGFの8位の異性体 iso 19-OH PGF_{1α}、と iso 19-OH PGF_{2α}の11種のPGである。これらのPGを分離し測定することはなかなか困難で、これまで満足できるような測定はなされていない。今回、紫外吸収とガスクロマトグラフィーを用いてPGEと19-OH PGEの測定につき知見を得たので報告する。

方 法

1) 材料

不妊外来で検査を行つた精液で、精子数、運動率などに異常のないものを用いた。精液は採取直後にその1.5mlを15mlのアセトン中に入れ、-20℃で保存した。

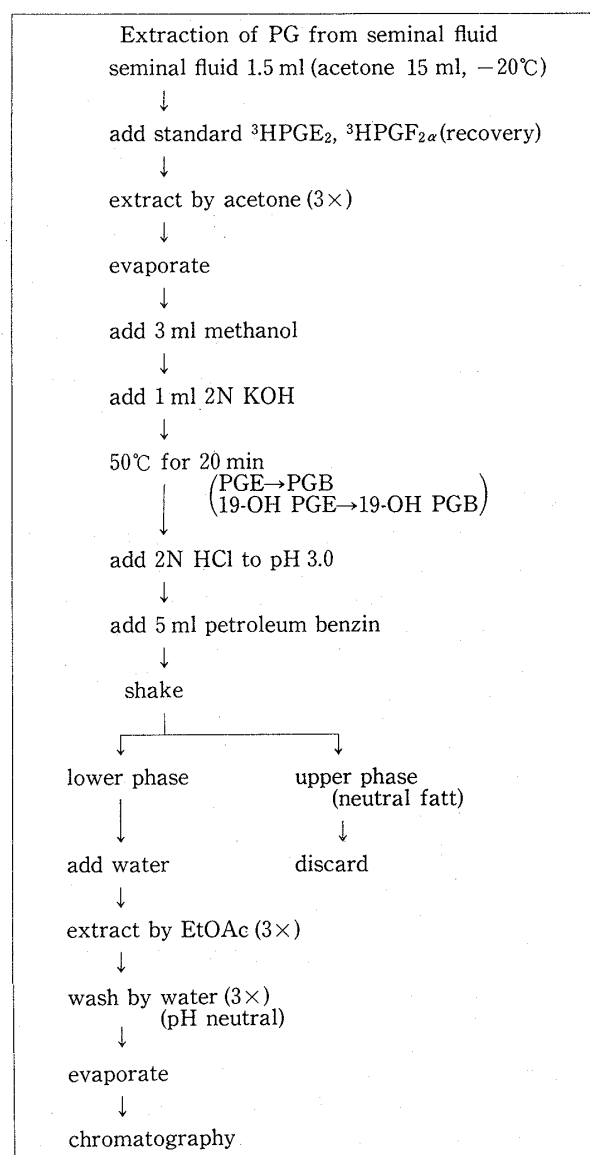
2) アルカリ処理および抽出

精液の入つたアセトン中にスタンダードの³H-PGE₁ および³H-PGF_{2α}を回収率測定用としてそれぞれ約100,000dpm 加え30分間よく混和させた。これを3,000rpm15分間遠心し上清を円形ボトルに移した。沈渣はさらに2回15mlのアセトンを加え十分に攪拌後遠心し、上清を上述の円形ボトルに加え入れた。ボトル中の上清は rotary evaporator で蒸発乾固した。

このアセトン抽出物をメタノール3mlで試験管に移し、2N KOH 1mlを加え50℃、20分間加熱した。その後2N HClでpHを3.0に調整し、共栓つき試験管に移した。これに石油ベンゼン5mlを加え攪拌し、2層に分離した上層の石油ベンゼンを除去し中性脂肪を取り除いた。

石油ベンゼン除去後の下層を分液ロートに移し、水17mlを加え15mlの酢酸エチルで3回抽出を行つた。抽出後の酢酸エチルは、2~3mlの水で数回洗いpHを中性とし以後のクロマトグラフィーに供した。以上のアルカリ処理と抽出の過

図1 PGのアルカリ処理と抽出



程を図1に示した。

3) リピデックスカラムクロマトグラフィー

Packard Lipidex 1000を用いた。カラムは内径1cm、長さ50cmのものを用いた。メタノール中に保存したLipidex 8gをカラムに入れメタノールで数回洗浄した。次のA,B 2種の溶媒を準備した。

A.	水	53ml
	メタノール	47ml
	クロロホルム	4ml
	ブタノール	6ml
B.	メタノール	47ml
	クロロホルム	4ml
	ブタノール	6ml

まずBでカラムを3回洗浄し、次いで void volume の約10倍のAでカラムを洗った後、サンプルをのせた。fraction は、2ml で40本採取した。

4) ケイ酸カラムクロマトグラフィー

Merk の silicic acid ARCC₄ を用いた。内径7 mm, 40cm のカラムを用い、ケイ酸1g を使用した。用いた solvent は、

- ① 酢酸エチル：クロロホルム＝3：7
- ② 酢酸エチル：クロロホルム＝4：6
- ③ 酢酸エチル：クロロホルム＝6：4
- ④ 酢酸エチル
- ⑤ メタノール：クロロホルム＝2：8
- ⑥ メタノール

fraction は3ml で各 solvent の本数は278nm の吸光度あるいは radioactivity を検討して決定した。

5) ガスクロマトグラフィー

Packard becker 420を使用し、detector には FID を用いた。カラムは3%SE 30を充填したガラスカラムを使用した。サンプルのメチル化にはジアゾメタンを用い、トリメチルシリル化には HMDS および TMCSi を用いた。

6) 吸光度測定

吸光度測定には Beckman DB-CG spectrophotometer を使用した。

7) GC-MS

マススペクトロメトリーには LKB-9000を用い、カラムはガスクロマトグラフィーに用いたものと同じものを使用した。

8) TLC

19-OH PGB₁ と19-OH PGB₂ の分離には AgNO₃ 添加シリカゲルの TLC を用いた。使用した Solvent system は、

酢酸エチル	160
メタノール	15
水	100

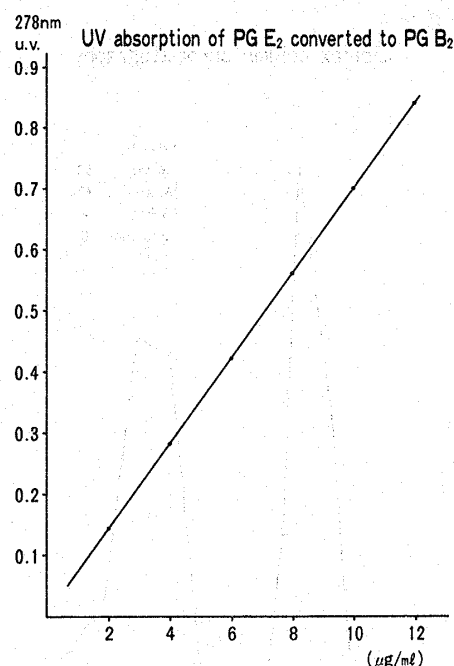
の有機層を用いた。サンプルはメチル化した後に実験に供した。

実験結果

1) PGE₂ の PGB₂ への転換について

Standard の PGE₂ に方法で示したアルカリ処

図2 PGB₂ に転換された PGE₂ の吸光度 (278nm)



理を行い278nmでの吸光度を測定すると、2～12 μg/ml の PGE₂ 濃度では図2に示すような直線性が得られた。これを standard PGB₂ の吸光度と比較し、両者の分子量の比を考慮すると前記のアルカリ処理により PGE₂ は100%PGB₂ に変換されることがわかった。

2) リビデックスカラムクロマトグラフィー

アルカリ処理後酢酸エチルで抽出されたサンプルをリビデックスカラムクロマトグラフィーにかけた結果を図3に示した。I と II の2つのピークが得られた。ピーク II には PGE から転換された PGB が含まれ、ピーク I にはその他の PG が全て含まれている。

3) ガスクロマトグラフィーによる PGB の定量

トリメチルシリル化した PGB₂ の C value (retention time を長鎖脂肪酸の炭素数におきかえた値) は24.6であるため、internal standard として炭素数24の脂肪酸である、Lignoceric acid (C₂₄) のメチルエステルを用いた。ガスクロマトグラフィーによる定量は、次式の F が一定であることを利用して行つた。

$$F = \frac{A_{PGB}/W_{PGB}}{A_{C_{24}}/W_{C_{24}}}$$

Lipidex column chromatography

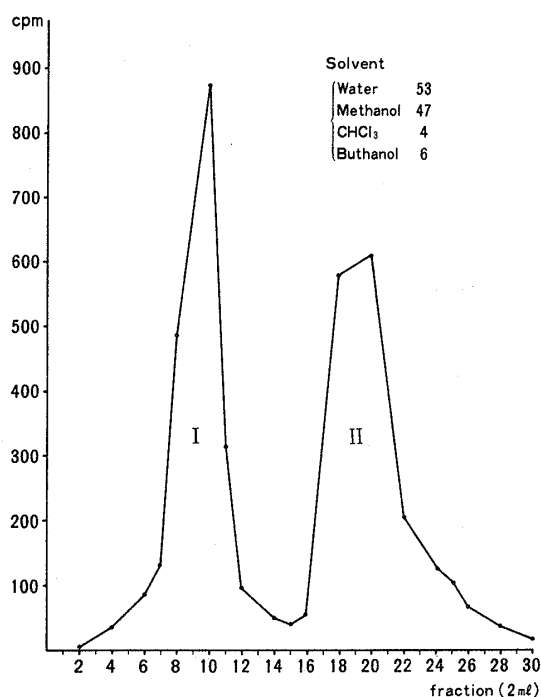


図4 PGB₂とC₂₄のガスクロマトグラフィーのクロマトグラム

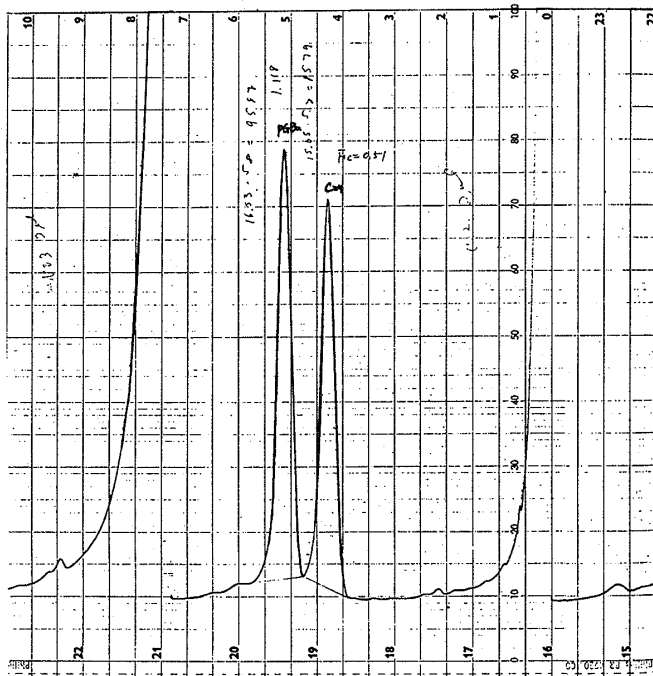
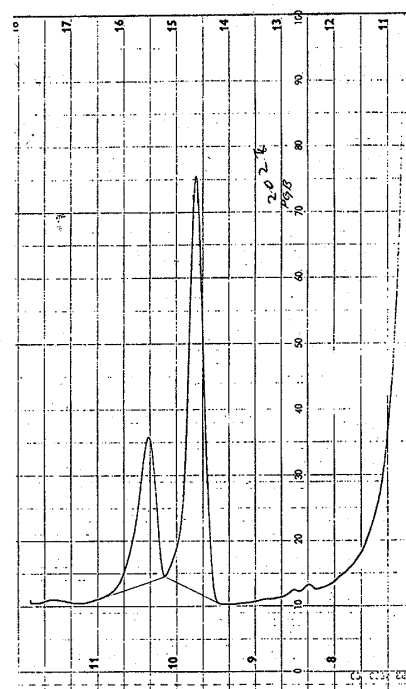


図4に示すようにガスクロ上のPGB₂および

No.	C ₂₄ μg	PGB ₂ μg	F
1	100	45	0.61
2	100	45	0.51
3	100	45	0.58
4	100	49	0.58
5	100	49	0.57
6	100	51	0.58
7	100	51	0.53
8	100	49	0.59
9	25	17.8	0.58
10	30	17.8	0.57
11	30	35.6	0.56
平均			0.569

図5 C₂₄をinternal standardとして加えたsample
のガスクロマトグラム

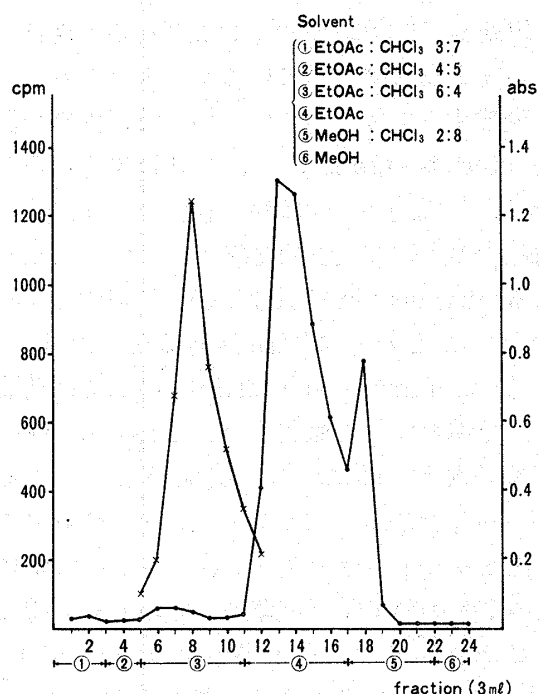


C₂₄の分離は良好でピークが重ならず、しかも極めて近くに2つのピークを作ることから、C₂₄がPGB測定のinternal standardとして都合の良いことがわかる。表1にWPGB₂とWC₂₄を変化させた時のF値を示した。平均は0.569であり、これを用いることとした。図5には精液からのサンプルにC₂₄を加えてガスクロにかけた時のピークを示したが、サンプルでもPGBの良好なピークが得

図6 ケイ酸カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム

×—× absorbance (278nm), ●—● cpm

Silicic acid chromatography



られ、十分定量可能であることがわかる。

4) ケイ酸カラムクロマトグラフィー

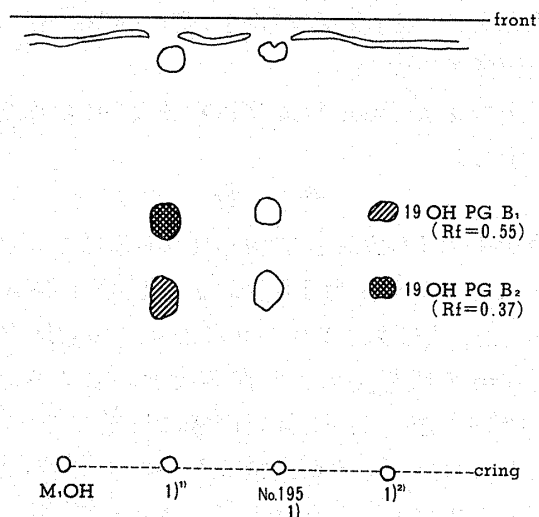
リピデックスカラムクロマトグラフィーで得られたピーク I は、ジアゾメタンでメチル化後、方法に示した solvent によりケイ酸カラムクロマトグラフィーにて分画を行つた。結果は図 6 に示すように、酢酸エチル：クロロホルム＝6：4 の分画に 278nm の吸光度でピークを示す物質（ピーク I-a）が、酢酸エチルの分画に回収率測定で加えた $\text{PGF}_{2\alpha}$ のピークが（ピーク I-b）、さらにメタノール：クロロホルム＝2：8 で溶出される物質（ピーク I-c）が得られた。この 3 つのピークをそれぞれトリメチルシリル化し、GC-MS にかけると、I-a では m/e 510, 508 (M), 495 (M-15), 420 (M-90), 351 (M-159), 323 (M-187) にピークを有するマスフラグメントグラムが得られ、これが 19-OH PGB_1 と 19-OH PGB_2 の混合物であることがわかる。I-b はガスクロ上 2 個のピークに分かれ、その 1 つは m/e 584 (M), 513 (M-71), 494 (M-90), 423 (M-90-71), 404 (M-90 $\times$ 2), 333 (M-90 $\times$

2-71), のピークを示し、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ であることが分かる。I-c ではガスクロで 3 個のピークが得られ、その 1 つは m/e 582 (M-90), 492 (M-90 $\times$ 2), 423 (M-90-159) を示す 19-OH $\text{PGF}_{2\alpha}$ であり、もう 1 つは m/e 584 (M-90), 515 (M-159), 494 (M-90 $\times$ 2), 335 (M-90 $\times$ 2-159) を示す 19-OH $\text{PGF}_{1\alpha}$ であることがわかった。

5) 19-OH PGB の定量

19-OH PGB の定量はケイ酸カラムクロマトグラフィーで得られた I-a のフラクションの 278nm の吸光度を PGB_2 の吸光度にあてはめて求めた。19-OH PGB_1 と PGB_2 の分離には方法の項で示した、 AgNO_3 添加シリカゲルの TLC を用いた。結果は図 7 に示したとおりであり、両者の分離は良好で、発色させない部分はシリカゲルを削り取りメタノールで抽出後再び 278nm の吸光度を測定し 19-OH PGB_1 と 19-OH PGB_2 の比を求めた。

6) 回収率

図7 AgNO_3 添加シリカゲル TLC による 19-OH PGB_1 と 19-OH PGB_2 の分離 (Solvent は本文)表2 TLC により分離した 19-OH PGB_1 と 19-OH PGB_2 の比

No. 1	19-OH PGB_1	40.1%
	19-OH PGB_2	59.9%
No. 2	19-OH PGB_1	51.0%
	19-OH PGB_2	49.0%
No. 3	19-OH PGB_1	46.6%
	19-OH PGB_2	53.4%

表3 ヒト精液中の PGE および 19-OH PGE 含量

(一) は測定できなかったもの

PGE, 19-OH PGE in Seminal Fluid ($\mu\text{g/ml}$)

	PGE	19-OH PGE
1	45	140
2	4	—
3	50.4	181
4	117.3	293
5	42.3	427
6	39	313
7	41.9	360
8	—	242
9	—	400
10	39.8	207
11	29.1	126
12	57.1	183
13	11.2	358
14	44.6	308
15	6.5	248
16	—	255
m	40.6	269.4

PGE の回収率は抽出前に加えた $^3\text{H-PGE}_1$ より計算して求めた。19-OH PGE の回収率はケイ酸カラムクロマトグラフィー後の $\text{PGF}_{2\alpha}$ の回収率を代用した。回収率は前者が75~80%, 後者が64~77%であった。

以上求めた PGE および 19-OH PGE の値を表3に示した。

考 察

精液中の PGE および 19-OH PGE はアルカリ処理によりそれぞれ PGB および 19-OH PGB に変換され、PGB はガスクロにより、19-OH PGB は 278nm の吸光度により測定できることを示した。PGB は 19-OH PGB と同様に吸光計で測定することも可能であるが、精液からのサンプルをリピデックスカラムクロマトグラフィーに通しただけのサンプルには不純物がまだ多く含まれており、吸光度による測定は不可能であった。しかしさらに精製を行えば PGB も吸光度により測定することができるのではないかと考えられる。

回収率は PGE の方は問題ないが、19-OH PGE の方は PGF の回収率を代用しているため、多少の問題点が残された。これは、標識された 19-OH PGE が入手できるようになれば簡単に解決でき

るものである。

PGF および 19-OH PGF については現在検討中である。両者の assay はケイ酸カラムで分離したサンプルをガスクロで $\text{PGF}_{1\alpha}$ および $\text{PGF}_{2\alpha}$, 19-OH $\text{PGF}_{1\alpha}$, 19-OH $\text{PGF}_{2\alpha}$ およびその異性体に分離することを目的としているが、未だこれらを完全に分離するには至っていない。ただ両者の測定には internal standard として炭素数 25 の長鎖脂肪酸 (C_{25}) を用いるのが便利なようである。

精液中の PG の生理的意義については未だ不明である。Bygdeman は男性不妊と精液中の PG 量が少ないことの間に関係があると主張している²⁾。彼は、functional infertility の群では精液中の PG 量が少ないと報告した。しかしながら PG 量と精子数との間には全く関係がないとする報告⁶⁾もあり、結論はでていない。しかし合計すると 1ml あたり mg のオーダーに近いくらい大量に含まれる精液中の PG が生理的に何の働きも持たないとは考えにくく、最も多量に含まれる 19-OH PGE あるいは PGE の作用の検討が期待される。

精液中の PG 測定は PG の測定としては、かなり特殊で、含量が他組織に比べ極端に高いことから RIA によらず機器測定が可能である。しかしガスクロで数種類の PG を全て分離することはなかなか難しく、今後は高速液体クロマトグラフィーを応用することも考えたいと思っている。

文 献

1. Bergström, S. and Sjövall, J.: The isolation of prostaglandin F from sheep prostate glands. *Acta Chem. Scand.*, 14: 1963, 1960.
2. Bygdeman, M., Fredricsson, B., Svanborg, K. and Samuelsson, B.: The relation between fertility and prostaglandin content of seminal fluid in man. *Fertility and Sterility*, 21: 622, 1970.
3. Von Euler, U.S.: Zur kenntnis der pharmakologischen wirkungen nativesekreted und extrakten männlicher accessorischer geschlechtsdrüsen. *Arch. für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.*, 175: 78, 1934.
4. Goldblatt, M.W.: A depressor substance in seminal fluid. *Chem. Ind.*, 5: 1056, 1933.
5. Hamberg, M. and Samuelsson, B.: Prostaglandins in human seminal plasma. *J. Biol. Chem.*, 241: 257, 1966.

1984年 5 月

三橋他

777

6. *Ito, H. and Katayama, T.* : Abstracts of the seventh world congress of fertility and sterility. 9, NV/Drukkerig Hooiberg, The Netherland, 1971.
 7. *Samuelsson, B.* : Isolation of prostaglandins from human seminal plasma. J. Biol. Chem., 238 : 3229, 1963.
 8. *Taylor, P.L. and Kelly, R.W.* : 19-Hydroxylated prostaglandins as the major prostaglandins of human semen. Nature, 250 : 665, 1974.
 9. *Taylor, P.L. and Kelly, R.W.* : The occurrence of 19-hydroxy F prostaglandins in human semen. F.E.B.S. Letters, 57 : 22, 1975.
(No. 5358 昭58・8・10受付)
-