活性型 androgen としての血中遊離 testosterone の検討

札幌医科大学泌尿器科学教室

(主任: 熊本悦明教授)

伊藤直樹, 熊本悦明, 赤樫圭吾, 丸田浩
塚本泰司, 梅原次男, 三熊直人, 山口康宏
南部明民, 鈴木伸和

The Assessment of Bioavailable Androgen Levels from the Serum Free Testosterone Level

**Naoki ITOH, Yoshiaki KUMAMOTO, Keigo AKAGASHI,
Hiroshi MARUTA, Taiji TSUKAMOTO, Tsugio UMEHARA,
Naohito MIKUMA, Yasuhiro YAMAGUCHI, Akihito NANBU
and Nobukazu SUZUKI**

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. Y. Kumamoto)

Recently, it has been concluded that measurement of the serum free testosterone level is crucial for evaluating male gonadal function. However, the extent of the decline of serum free testosterone levels with aging and the actual levels in male infertility have not yet been clearly defined. In this study, the clinical significance of serum free testosterone levels was evaluated in a total of 248 subjects, including 120 healthy adult males (54 males aged 20–39, 26 males aged 40–59 and 41 males aged more than 60), 94 infertile males, 28 male hemodialysis patients, and 6 patients with Klinefelter's syndrome.

Since the serum free testosterone levels correlate significantly with serum LH and FSH levels among 120 normal adult males, it appears that free testosterone has a biological action on the organ.

In the subjects aged over 60, serum free testosterone levels were significantly decreased compared with the decrease of serum total testosterone. Thus, biologically active androgen levels decreased with aging. Serum free testosterone levels tended to decrease significantly from 40 years onwards.

In infertile males, serum total testosterone levels were equal to those in normal adult males, but their serum free testosterone levels were significantly lower. This decrease of serum free testosterone may be one of the causes of their hypospermatogenesis.

In male hemodialysis patients, serum total and free testosterone levels were not lower than in normal adult males.

It is considered that the decline of percentage of serum free testosterone levels in aged

males and infertile males was caused by increased serum sex hormone binding globulin (SHBG) levels. Several workers have shown that the production of SHBG is regulated by sex steroid hormones. In this study, however, serum SHBG levels were not correlated with the E₂/T ratio.

We concluded that measurement of the serum free testosterone level is of value in the endocrinological evaluation of male gonadal function.

結 言

男子性腺の内分泌学的な機能評価は、血中総 testosterone 値を中心に従来行われてきた。しかし血中総 testosterone の大部分は albumin および性ホルモン結合蛋白 (Sex hormone binding globulin: 以下 SHBG と略す) と結合して生物学的に非活性であり、実際に生物学的活性を示すのは全体の1-2%を占める遊離 testosterone と考えられている¹⁷⁾。すなわち総 testosterone 値のみでは必ずしも精巣機能を正しく評価しているとはいえず、近年は遊離 testosterone が重視されてきている。すでに加齢に伴う遊離 testosterone の低下傾向が報告されているが⁵⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、その低下が始まる年代や、男子不妊症など精巣機能障害例で血中遊離 testosterone 値を検討した報告はない。

そこでこれらの点に関して血中遊離 testosterone 値を検討し、さらに遊離 testosterone に大きく影響する血中 SHBG 値も一部症例について測定したので報告する。

対 象 と 方 法

検討対象は内分泌学的疾患及び肝機能異常を有しない20-83才の男子計120例 (内訳は20-39才の成人男子53例, 40-59才の中年男子26例, 及び60才以上の高齢男子41例), 未治療男子不妊症94例,

Table 1 Subjects in this study.

		No. of cases
<u>normal adult males</u>		120
	20-29 years	(39)
	30-39 years	(14)
	40-49 years	(13)
	50-59 years	(13)
	60-69 years	(16)
	70-79 years	(22)
	80-83 years	(3)
<u>(disease)</u> (mean of ages)		
<u>male infertile patients</u>		94
subnormal	34±5.0 (22-42 years)	(26)
(sperm count: 20-39x10 ⁶ /ml)		
oligozoospermia	33.1±4.4 (21-46 years)	(44)
(sperm count: <20x10 ⁶ /ml)		
azoospermia	32.7±3.9 (27-40 years)	(24)
Klinefelter's syndrome	31.3±4.3 (27-39 years)	6
hemodialysis males	50.5±11.8 (29-77 years)	28
<u>total</u>		248

Klinefelter 症候群6例, 腎透析症例28例の計248例である (Table.1)。男子不妊症に関しては WHO 基準で精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満が乏精子症と定義されているが²¹⁾, 精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群も subnormal 群として検討対象に加えた。

血中ホルモンは総及び遊離 testosterone, LH, FSH を測定した。総 testosterone は radio-immunoassay (以下 RIA と略す, CIS 社製 kit), 遊離 testosterone も RIA (日本 DPC 社製 kit) にて, LH, FSH はモノクローナル抗体を用いた immunoradiometric assay (以下 IRMA と略す, 第一ラジオアイソトープ社製 kit) にて行った。また testosterone の結合蛋白である血中 SHBG も正常男子と男子不妊症例の一部において IRMA (Diagnostic Products Corporation 社製 kit) にて測定した。

Fig. 1 Changes in serum total testosterone with aging. There was no significant decrease of serum total testosterone levels with aging.

Fig. 2 Changes in serum free testosterone with aging. There was a significant decrease of serum free testosterone levels with aging ($p < 0.001$).

結 果

1. 加齢に伴う血中総 testosterone 値と遊離 testosterone 値の変化

20—83才の120例を対象に年齢と血中総及び遊離 testosterone 値の関係を検討した。

加齢に伴う総 testosterone 値の有意な低下は認められなかったが (Fig.1), 血中遊離 testosterone 値は加齢によって低下し (Fig.2), 相関係数は $r = -0.723$ ($p < 0.001$) であった。すなわち加齢に伴う生物学的活性 androgen の低下が明らかとなった。

次にどの年代から血中総及び遊離 testosterone 値の低下が強くなるかを検討した (Table.2)。血中総 testosterone 値は20才代に比べ60才代で有意に低下する以外, 差は認められないが, 血中遊離 testosterone 値は20才代に比べ40才代以降で有意に低下しており, 活性型 androgen は40才代から低下し始めていることが示された。総 testosterone 中の遊離 testosterone の割合を各年代ごとに Table.3に示したが, 20才代, 30才代に比べ40才代以降では総 testosterone 中に占める遊離 testosterone の割合が有意に低下していた。

Table 2 Mean values of serum total and free testosterone levels in each age group.

age group	total testosterone (ng/ml)	free testosterone (pg/ml)
20-29 years	5.4±1.4	28.6±5.8
30-39 years	4.5±1.1	26.8±3.1
40-49 years	5.3±1.2	21.8±6.0*
50-59 years	4.6±1.5	18.4±8.5*
60-69 years	3.7±1.7*	12.5±6.3*
70-83 years	4.9±1.7	15.2±3.6*

Values expressed as mean ± standard deviation.

Values over 30 years are compared (Student's t test) to corresponding values for 20-29 years. *: $p < 0.01$.

Table 3 The ratio of free T/total T in each age group.

	20-29 years (n=39)	30-39 years (n=14)	40-49 years (n=13)	50-59 years (n=13)	60-69 years (n=16)	70-83 years (n=25)
free T / total T (%)	0.55±0.10	0.64±0.20*	0.42±0.08**	0.41±0.14**	0.39±0.14**	0.33±0.08**

Values expressed as mean ± standard deviation.

Values over 30 years are compared (Student's t test) to the value for 20-29 years. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$.

2. 血中 LH, FSH と総及び遊離 testosterone 値との関係

20—83才の内分泌学的異常を認めない120例において血中総 testosterone 値と LH, FSH との間には, 一定の相関関係は認められなかった。一方血中遊離 testosterone 値と log LH-IRMA, log FSH-IRMA との間には, それぞれ相関係数 $r = -0.629$ ($p < 0.001$), $r = -0.559$ ($p < 0.001$) といずれも有意な負の相関関係が認められた (Fig.3,4)。

3. 疾患別の血中総及び遊離 testosterone 値の検討

次に他の性腺機能不全例及び腎透析症例について検討した。男子不妊症例の年齢構成はほぼ全例が40才以下であるが, 腎透析症例群では各年齢に広く分布していた。これまでの検討から遊離 testosterone は加齢と共に有意に低下することが判明したので, 腎透析症例は40才前後で2群に分けて検討した。

Fig. 3 Relationship between serum free testosterone and serum LH-IRMA (logarithmic value) ($p < 0.001$).

Fig. 4 Relationship between serum free testosterone and serum FSH-IRMA (logarithmic value) ($p < 0.001$).

各疾患別の血中総 testosterone 平均値を Fig.5に示した。血中総 testosterone 値は正常男性群に比し Klinefelter 症候群及び60才以上の高齢者で有意に低下していたが、subnormal 群、乏精子症群及び無精子症群では有意な差は認めなかった。一方腎透析症例群では40才未満群、40才以上群とも有意に高値であった。

次に各疾患別の遊離 testosterone 平均値を Fig.6に示した。Klinefelter 症候群及び60才以上の高齢者群で、遊離 testosterone 値は総 testosterone 値と同様有意に低下していた。さらに総 testosterone 値は正常であった男子不妊症群 (subnormal 群、乏精子症群、無精子症群) での遊離 testosterone 値は正常成人男子に比べ有意に低値であった。腎透析症例では40才以上の群で遊離 testosterone 値は有意に低下していたが、Table.2に示した年代別遊離 testosterone 値と比較する

と40才代の平均遊離 testosterone 値 ($21.8 \pm 6.0 \text{ pg/ml}$) と差はなく, 血清遊離 testosterone の低下の程度は加齢によるものと考えられた。40才未満の群では総 testosterone 値と同様遊離 testosterone 値は正常男性群と差はなかった。

Fig. 5 Serum total testosterone levels in normal males (20–39 years) and patients exhibiting various kinds of testicular dysfunction. Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation and are compared (Student's t-test) to the value for normal males.
*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

Fig. 6 Serum free testosterone levels in normal males (20–39 years) and patients exhibiting various kinds of testicular dysfunction. Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation and are compared (Student's t-test) to the value for normal males.
: $p < 0.01$, *: $p < 0.001$

4. 血中 SHBG 値の検討

Testosterone 結合蛋白である SHBG は, 乏精子症群, 無精子症群, 高齢者群ですべて正常男子に比し有意に上昇していた (Fig.7)。特に高齢者では正常者に比べ SHBG は約3倍の高い値であった。この血中 SHBG の上昇が高齢者, 男子不妊症例での総 testosterone に占める遊離 testosterone の割合の低下の原因であると考えられた。また血中 SHBG 産生については血中の estradiol E_2 , testosterone が強く関与していると考えられていることから¹⁾, 血中 SHBG と E_2/T ratio との関係を検討したが, 血中 SHBG と E_2/T ratio との間に一定の相関関係は認められなかった (Fig.8)。

Fig. 7 Serum SHBG levels in normal males (20–39 years), infertile males and aged males. Values are expressed as the mean $\pm$ standard deviation and are compared (Student's t-test) to the values for normal males. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

Fig. 8 Relationship between the E_2/T ratio and serum SHBG levels. There was no significant correlation between these parameters.

考 察

血中の testosterone は約98%が albumin あるいは SHBG と結合した結合型 testosterone であり, biological な活性を有しているのは残りの約2%の遊離型 testosterone である¹⁷⁾. 今回の我々の検討では年代により異なるが, 遊離 testosterone は総 testosterone の0.3–0.5%と従来の報告に比べ低い結果であった. しかし遊離 testosterone の割合が約2%前後との報告は測定法が透析法であり, 我々が用いた RIA 法による報告値⁴⁾¹⁰⁾ではやはり0.4–0.6%であり, 今回の結果とはほぼ一致していた.

血中遊離 testosterone の測定に関しては Vermeulen ら¹⁶⁾が報告した平衡透析法が従来用いられてきた. しかし現在は前述した RIA による測定が主流となっている. また最近唾液中の testosterone が血中の free testosterone と有意に相関することから⁴⁾¹⁹⁾²⁰⁾, 採血を必要としない方法として小児の測定などに注目されている.

今回遊離型 testosterone が活性 androgen であることを間脳一下垂体系への feedback 機構との関係から調べたところ, 総 testosterone と血中 LH, FSH との間には相関性は認めないが, 遊離 testosterone との間には有意な負の相関性を認め, 遊離 testosterone が間脳一下垂体系に negative feedback factor として働いていることが確かめられた。一方, 遊離 testosterone のみでなく albumin 結合 testosterone も含めた, “Non-SHBG-bound” testosterone が活性を有するとする報告もあり⁸⁾, 将来は遊離 testosterone だけでなく albumin 結合 testosterone の測定, 検討も必要と考えられる。

加齢に伴う血中 androgen level の変化であるが, 総 testosterone の加齢による低下は軽度であった。一方遊離 testosterone を指標とした場合は40才以降で加齢に伴い活性型 androgen が確実に低下しつつあることが示された。加藤⁹⁾, Nankin¹¹⁾, Pirke¹²⁾, Royer¹³⁾らも我々と同様遊離 testosterone は加齢に伴い有意に低下すると報告しているが, 実際にどの年代からどの程度の低下が起こるかは示されていない。この点について今回の検討では40才代が遊離 testosterone 低下の onset と考えられた。またこの40才代より認められた遊離 testosterone の低下傾向は中年以後出現する性欲及び勃起力の低下等のいわゆる男子更年期 “andropause” とどのように関連しているのか興味あるところである。Davidson ら³⁾は加齢に伴う遊離 testosterone の低下は高齢者での性機能低下に少なからず関与しているとも報告しており, さらに検討されるべき問題点であろう。

男子不妊症に関して, 総 testosterone の評価では正常男性群と差は認められないが遊離 testosterone は有意に低下していた。Spermatogenesis 障害の原因は様々であるが, biological androgen の低下が spermatogenesis 障害の原因となっている症例も存在する可能性が示唆された。さらに興味深いことに WHO 基準²¹⁾では正常とされている精子濃度 $20-39 \times 10^6/\text{ml}$ の群でも遊離 testosterone は低下しており, この群中の遊離 testosterone 低下症例に対しても内因性 androgen を高めるような治療を施行することでさらに造精能を賦活できる可能性が考えられた。

最近社会的に quality of life が重視されており, 腎透析症例の性腺機能も注目されている。遊離 testosterone は加齢による影響が強いため今回腎透析症例を40才前後で分けて検討したが, 総 testosterone に関してはいずれも正常以上であった。一方遊離 testosterone は40才以下の群では正常であり, 40才以上の群では正常以下であったがこれは加齢に伴う低下であった。川西ら⁶⁾も遊離 testosterone を反映すると考えられる唾液中 testosterone は低下していないと報告しており, androgen 産生能に関して腎透析症例では総及び遊離 testosterone とも正常であると考えられた。

さて高齢者, 男子不妊症では総 testosterone の低下以上に遊離 testosterone の低下が大きかったわけである。その原因として考えられるのは加齢による血中 SHBG の増加である。SHBG は肝で産生されるが, 性 steroid の調節 (estrogen で産生亢進, androgen で抑制) を受けていると考えられている¹⁾。例えば妊娠中, 肝硬変などで estrogen 上昇により血中の SHBG は上昇する¹⁹⁾。性 steroid の他にも甲状腺ホルモンの影響も受け, 甲状腺機能亢進症での血中 SHBG の上昇も報告されている¹⁹⁾¹⁴⁾。そのため加齢に伴う血中 SHBG 上昇の原因は E_2/T ratio の上昇によるとする報告もある¹⁵⁾。一方男子不妊症では E_2/T ratio の上昇を認める症例が多く存在すると考えられており¹⁸⁾, 男子不妊症での血中 SHBG の上昇もこの性 steroid の影響である可能性が考えられた。しかし今回の検討では E_2/T ratio の上昇に伴う SHBG の上昇は認めなかった。Baker²⁾, 河野ら⁷⁾も血中 SHBG と血中 estradiol, testosterone との間に相関性が認められないと報告し, これら性 steroid hormone の SHBG への影響について否定的立場をとっている。SHBG は biological sex steroid

の量を左右するため重要な問題であり、SHBG に性ホルモンがどの様に関与しているのか、性ホルモン以外にも要因はないのかなどについて、今後さらに検討が必要と考える。

結 語

- 1) 20-83才の内分泌学的に異常の認められない男子120例, 男子不妊症94例, Klinefelter 症候群6例, 腎透析症例28例の計248例について血中遊離 testosterone 値を radioimmunoassay にて測定した。
- 2) 20-83才の内分泌学的に異常の認められない男子120例において血中遊離 testosterone 値は血中 gonadotropin との間に有意な負の相関性を示した。このことは遊離 testosterone が生物学的活性 androgen である一つの根拠であると考えられた。
- 3) 加齢に伴い血中遊離 testosterone 値は40才代以降で有意に低下し始めており, この年代より加齢に伴う活性型 androgen の低下が起こるものと考えられた。
- 4) 男子不妊症例では遊離 testosterone 値の有意な低下が認められ, 男子不妊症例には遊離 testosterone の低下が spermatogenesis 障害の原因の一つとなっている症例も存在することが示唆された。
- 5) 腎透析症例では遊離 testosterone の低下は加齢に伴う低下以上には認められなかった。
- 6) 高齢者, 男子不妊症例での遊離 testosterone の低下は血中 SHBG の有意な上昇によるものであった。また SHBG と E_2/T ratio との相関性は認められず, 従来示唆されてきた SHBG 産生に対する性 steroid の関与は少ないのではないかと推測された。

文 献

- 1) Anderson, D.C.: Sex-hormone-binding globulin. Clin. Endocrinol., 3: 69, 1974.
- 2) Baker, H.W.G., Burger, H.G., deKretser, D.M., Dulmanis, A., Hudson, B., O'Connor, S., Paulsen, C.A., Purcell, N., Rennie, G.C., Seah, C.S., Taft, H.P. and Wang, C.: A study of the endocrine manifestations of hepatic cirrhosis. Q.J. Medicine, 177: 145, 1976.
- 3) Davidson, J.M., Chen, J.J., Crapo, L., Gray, G.D., Greenleaf, W.J. and Catania, J.A.: Hormonal changes and sexual function in aging men. J. Clin. Endocrinol. Metab., 57: 71, 1983.
- 4) Johnson, S.G., Joplin, G.F. and Burrin, J.M.: Direct assay for testosterone in saliva: relationship with a direct serum free testosterone assay. Clinica. Chimica. Acta, 163: 309, 1987.
- 5) 加藤堅一: 下垂体性腺系(男子). 日本内分泌会誌, 53: 1300, 1977.
- 6) 川西章夫, 山本 明, 田中敏博, 沼田 明, 湯浅 誠, 今川章夫: 透析患者の salivary testosterone. 日本透析療法学会雑誌, 20: 834, 1987.
- 7) 河野伸造, 砂川 元, 比嘉裕昭: 血中 testosterone-estradiol binding globulin の加齢, 肥満による変化並びに性差. ホルモンと臨床, 36: 253, 1988.
- 8) Manni, A., Pardridge, W.M., Cefalu, W., Nisula, B.C., Bardin, C.W., Santner, S.J. and Santen, R.J.: Bioavailability of albumin-bound testosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61: 705, 1985.
- 9) 森本勲夫, 和泉元衛, 長瀧重信, 玉井 一: 透析法による free testosterone の測定. 日本内分泌会誌, 60: 872, 1984.
- 10) 森本勲夫, 井上修二, 和泉元衛, 長瀧重信: Free testosterone 測定キット (Coat-A-Count) の検討. ホルモンと臨床, 36: 985, 1988.

- 11) Nankin, H.R. and Calkins, J.H.: Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 1418, 1986. 12) Pirke, K.M. and Doerr, P.: Age related changes in free plasma testosterone, dihydrotestosterone and oestradiol. *Acta Endocrinol.*, 80: 171, 1970. 13) Royer, G.L., Seckman, C.E., Schwartz, J.H., Bennett, K.P. and Hendrix, J.W.: Relationship between age and levels of total, free and bound testosterone in healthy subjects. *Curr. Therp. Res.*, 35: 345, 1984. 14) Ruder, H., Corvol, P., Mahoudeau, J.A., Ross, G.T. and Lipsett, M.B.: Effects of induced hyperthyroidism on steroid metabolism in man. *J. Clin. Endocr.*, 33: 382, 1971. 15) Heber, D.: Aging, 346-356. Ed. by Rajfer, J. *Urologic endocrinology*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1986. 16) Vermeulen, A., Verdonck, L., Straeten, M.V. and Orie, N.: Capacity of the testosterone-binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate. *J. Clin. Endocr.*, 29: 1470, 1969. 17) Vermeulen, A.: Transport and distribution of androgens at different ages. p53-65. Ed. by Martini, L. and Motta M., *Androgens and antiandrogens*, Raven Press, New York, 1977. 18) Vigersky, R.A. and Glass, A.R.: Effect of Δ^1 -Testolactone on the pituitary-testicular axis in oligospermic men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 897, 1981. 19) Vittek, J., L' Hommedieu, D.G., Gordon, G.G., Rappaport, S.C. and Southren, A.L.: Direct radioimmunoassay of salivary testosterone: correlation with free and total serum testosterone. *Life Sciences*, 37: 711, 1985. 20) Wang, C., Plymate, S., Nieschlag, E. and Paulsen, C.A.: Salivary testosterone in men: further evidence of a direct correlation with free serum testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53: 1021, 1981. 21) WHO: Normal values of semen variables. p27, WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

(受付日: '90. 4. 6)

(採択日: '90. 7. 18)