男性不妊症における精漿中遊離アミノ酸の研究

昭和大学医学部泌尿器科学教室 吉 田 英 機
(主任: 赤坂裕教授)STUDIES OF FREE AMINO ACIDS IN NORMAL AND
STERILE HUMAN SEMEN

Hideki Yoshida

Department of Urology, School of Medicine, Showa University

(Director: Prof. H. Akasaka)

Twenty-eight free amino acids in human semen, which were stood at room temperature (20–25°C) for 3 hours after ejaculation, were analysed both qualitatively and quantitatively in an automatic amino acid analyzer (JLC-5AH). In order to clearly separate Asparagine and Glutamine, lithium citrate buffer's method was used for the analysis of acidic and neutral amino acids.

The ninety-five samples were divided to following 4 groups, 1. fertile, 2. subfertile, 3. infertile and 4. azoospermic groups. Group 1, 2 and 3 were classified according to the sperm counts and sperm motility.

Low contents of almost all amino acids seemed to be demonstrated in the subfertile, infertile and azoospermic groups, comparing with the fertile group. The contents of amino acids between the fertile group and the other 3 groups were significantly different ($p < 0.01-0.05$), particularly in the contents of Lysine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine, Valine and Phenylalanine. But Asparagine and Glutamine showed almost the same amounts of amino acids in all groups. In addition, Citrulline showed a high content in the azoospermic group than in the non-azoospermic groups.

Seven samples were studied for successive changes in free amino acid contents. The total contents of amino acids in 2 healthy cases increased rapidly within 3 hours after ejaculation and moderately thereafter. In contrast, amino acid contents in 3 cases with sterility increased after 3 hours. In one case with azoospermia, a very rapid increase of amino acid contents was observed during initial a few hours, but no increase was observed after 3 hours. In a vasectomized case, although amino acid contents were quantitatively low, the increasing rate was very steep and constant.

Thus, amino acid contents in normal human semen should increase rapidly in initial a few hours after ejaculation, suggesting that spermatozoa may be protected by these amino acids during penetration through the female genital tract. The low content of free amino acids obtained in initial a few hours after ejaculation in cases with oligozoospermia may play a role in the cause of infertility.

緒 言

ヒト精液の生化学的研究は近年盛んに行なわれるようになった。しかしアミノ酸の研究は少なく1941年 Tyrosine の結晶化に成功した Wagner-Jauregg⁶¹⁾ の発表に始まるが、その後数人の研究者により主にペーパークロマトグラフィーによる同定が行なわれ、現在までに約20数種の遊離アミノ酸が確認されている。しかし個々のアミノ酸の定量については Quatrini⁴¹⁾, Keutel and Gabsch²⁸⁾, および Krampitz³⁰⁾ らによつて述べられているにすぎず、従つてその定量値と男性不妊症との検討について

はほとんど行なわれていない。本邦においては、田中⁴⁸⁾ および久住⁴⁹⁾ がニンヒドリン陽性物質総量から男性不妊症との関係を比較したのみで、個々の遊離アミノ酸の濃度から検討した論文は現在のところないようである。

また、ヒト精液中の遊離アミノ酸濃度は、時間の経過とともに急速に増加することが Christensen et al.⁸⁾, Jacobsson²⁸⁾ および Lundquist^{33), 34)} らにより立証され、個々のアミノ酸濃度の経時的変動は Quatrini⁴¹⁾ が健康者について観察し、不妊症患者精液については、本邦において、Tanimura⁴⁹⁾ が Arginine の変化を観察している

が、その他のアミノ酸について検討した論文は見当たらない。

1972年、著者および協同研究者⁶⁰⁾は、アミノ酸自動分析機を使用し、健康者および不妊を訴えた患者で正常濃度の精子を保有する症例の両者を比べ、精漿中遊離アミノ酸の種類および濃度に全く有意差のなかったことを発表した。

今回著者は、塩基性アミノ酸の分析にはクエン酸ナトリウム緩衝液を、中酸性アミノ酸の分析にはクエン酸リチウム緩衝液を用いることにより、新たに遊離アミノ酸の同定と定量を行ない、男性不妊症患者の精漿遊離アミノ酸の濃度およびその経時的変化について比較し検討したので報告する。

方 法

精液採取は5日以上禁欲後、用手法により滅菌広口容器に取らせ、一様に液化した後、精液量、精子濃度、運動率、活性率および奇型率の精液一般検査を行ない、その後全精液として滅菌有栓試験管に保存し、室温(20~25℃)に静置した。

1. 精子濃度の算定

精子濃度は、白血球算定用メランジュールとトーマの血球計算盤を用い、0.5%フォルマリン生食液で稀釈して3回算定し、その平均値をとった。また無精子症の検体は生標本にて全く精子の見られないものとした。

2. 精子運動率の算定

精子運動率は、生食液にて10~20倍に稀釈し、精子の極端に少ない場合は原液のままとして、精子200個以上を数え、運動精子数の百分率により表現した。前進はしないが動いている精子はすべて運動精子として算定した。

3. 精子活性率の算定

精子活性率は、Williams and Pollak⁶²⁾の方法により、0.5%エオジン生食液に10~20倍に稀釈した精液を混和して200個以上を数え、エオジン不染精子数の百分率により算定した。

4. 遊離アミノ酸の分析

1) 分析資料の調整

分析資料の調整は、Stein and Moore⁴⁶⁾の方法に準じ、全精液を3000 r.p.m. 10分間遠沈し、その上清0.5~1.0mlに5倍量の1%ピクリン酸溶液を加え、さらに3000 r.p.m., 10分間遠沈して除蛋白を行ない、その上清の一定量を、あらかじめ1N-HClと蒸留水にて調整しておいたDOWEX 2×8 Cl⁻ resin (100~200メッ

シュ)を入れたカラム(2×3cm)に注入し、0.02N-HClを5mlずつ4回流し、流出液と洗液を40℃の温浴中にて約0.5mlに濃縮した。さらに稀釈用緩衝液にて5mlに定容し、自動分析まで-27℃に凍結保存した。

2) 分析方法

分析には日本電子製のJLC-5AH型全自動アミノ酸分析機を使用し、その分析条件をTable 1.に示した。分析用緩衝液は、クエン酸ナトリウム緩衝液はSpackman et. al⁴⁵⁾の方法に、クエン酸リチウム緩衝液はBenson, JR. et al.⁴⁾の方法にそれぞれ準じて作製した。

アミノ酸の同定は、各種のアミノ酸を一定濃度に混和した標準溶液を同時分析することにより行ない、その定量は面積算定法であるH.W法および吸光度法を用いた¹⁸⁾。

Table 1. Analytical conditions Apparatus: JLC-5AH

	Line-1	Line-2
Resin	LC-R-1	LC-R-2
Column Size	0.8×30cm	0.8×70cm
Sample Volume	0.8 ml	0.8 ml
Buffer		
1 st buffer	pH5.28(0.35N)	pH3.18(0.15N)
2nd buffer		pH3.28(0.20N)
3rd buffer		pH4.25(0.30N)
Temperature		
1 st temp.	60℃, 190 min.	35℃, 140 min.
2nd temp.		60℃, 240 min.
Flow Rate	1.22 ml/min.	0.83 ml/min.

推定アミノ酸濃度(ニンヒドリン陽性物質総量)は、L-Leucineの検量線により測定し、自動分析直前の資料の稀釈の指標とした。

3) 経時的変化の観察

精子運動率、精子活性率および遊離アミノ酸濃度の経時的な変化をみるための検体はすべて滅菌器具を使用し、全精液として同様に室温に静置し、射精後1時間、3時間、5時間、8時間および10時間(無精子症の1例はさらに13時間まで)の一定時間における検体についての分析を行なった。

症 例

対象とした症例は、当教室不妊外来を訪れた患者70症例、95検体であり、大部分は未治療の症例を対象としたが、以前に治療をうけたことのある患者については、過去一年以上何ら治療を受けていない症例とした。また明

らかな器質的疾患および尿路、副性器感染を有する症例は除外した。

症例の年齢構成は25才から45才、平均約33才で、不妊期間は10カ月から8年7カ月、平均約2年9カ月である。

経時的な変化の観察に使用した症例は、精管結紮術前の健康者2例 (Health-1, 2) と、不妊を訴えた症例中の正常精子保有者1例 (Normozoospermia), 乏精子症2例 (Oligozoospermia-1, 2), 無精子症1例 (Azoospermia) および健康者の1例で精管結紮術後1カ月目の1症例 (Post-vasectomy) の計7検体を用いた。禁欲期間は、健康者の2例は3日間、精管結紮術後の1例は4日間で、他の症例はすべて5日以上である。乏精子症および無精子症の症例は精囊腺撮影では異常像は認められなかったが、睾丸生検による組織像は、乏精子症の2例では造精機能障害像はほとんど見られなかったが、無精子症の症例では強い造精機能低下像を示していた。

結 果

1. 遊離アミノ酸の同定

射精後3時間、室温静置後の精漿中遊離アミノ酸としては、Lysine (Lys), Histidine (His), Arginine (Arg), Cysteic acid (CySO_3H), Phosphoserine (P. Ser), Taurine (Tau), Aspartic acid (Asp), Hydroxyproline (Hyp), Threonine (Thr), Serine (Ser), Asparagine (Asn), Glutamic acid (Glu), Glutamine (Gln), Sarcosine (Sar), α -Amino adipic acid (Aad), Proline (Pro), Glycine (Gly), Citrulline (Cit), Alanine (Ala), α -Amino-n-butyric acid (Abu), Cystine (Cyt), Valine (Val), Methionine (Met), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Tyrosine (Tyr), Phenylalanine (Phe) および β -Alanine (β -Ala) の28種であったが Tryptophane は検出できなかった。

これらの遊離アミノ酸について、正常者、乏精子症および無精子症の間に、アミノ酸の種類による差は全くなかった。

2. 遊離アミノ酸の濃度

1) 精液所見と遊離アミノ酸の濃度

a) 微量の遊離アミノ酸について

同定し得た28種の遊離アミノ酸のなかで、Hydroxyproline, Sarcosine, α -Amino adipic acid, α -Amino-n-butyric acid および β -Alanine の5種は微量であり、定量できた検体数も少ないため全体の症例をNon-azoospermia 群と Azoospermia 群の2群に分けて Table 2. にそ

Table 2. Several Amino Acids in Small Amount

	Non-azoo.		Azoo.	
	cases	mean	cases	mean
Hyp.	2 (2)	9.3	(1)	trace
Sar.	7 (23)	21.2	1 (1)	27.6
Aad.	3 (19)	4.2	(3)	trace
Abu.	5 (11)	2.7	2 (4)	1.1
Cyt.	10 (18)	4.5	3 (6)	2.2
β -Ala.	4 (15)	5.2	(3)	trace

mg/dl

の平均値を示したが、Azoospermia 群では Non-azoospermia 群と比べて低値を示す傾向が見られたが著明な差ではなかった。なお、Table 2. の () 内に同定しえた検体数を示した。

b) 精子濃度による分類でのアミノ酸濃度の比較

精子濃度の正常値は諸家により一定はしていないが、大体 $60 \sim 40 \times 10^6/\text{cc}$ を正常下限とする研究者が多いため、著者は一応 $50 \times 10^6/\text{cc}$ 以上を正常と考え、また妊娠可能な最低基準は清水⁴³⁾および志田⁴²⁾の $20 \times 10^6/\text{cc}$ に基き、無精子症群を除いた76検体について、精子濃度から以下の3群に分類して比較した。

I 群: $50 \times 10^6/\text{cc}$ 以上

II 群: $50 \sim 20 \times 10^6/\text{cc}$

III 群: $20 \times 10^6/\text{cc}$ 以下

各群におけるアミノ酸濃度の比較を Table 3. に示したが、定量し得たアミノ酸のみの総量を、総アミノ酸量 (Total) として表わし、ニンヒドリン陽性物質総量 (Ninhyd-total) とは区別した。

ニンヒドリン陽性物質総量および総アミノ酸量ともに、I 群と比し II 群・III 群では低い値をとる傾向を示したが、I 群と II 群との間には統計学的な有意差は認められなかった。しかし I 群と III 群との間にはともに $P < 0.01$ において有意差を認めた。

個々のアミノ酸の比較においても、I 群に比し II 群・III 群ではほとんどのアミノ酸が低値をとる傾向を示し、I 群と比較して II 群・III 群の両者に有意差を認めたものは Lysine と Aspartic acid の2種で、特に Aspartic acid は II 群と III 群の比較でも $P < 0.01$ において有意差を認めた。また I 群と III 群との間にも有意差を認めたものは、Histidine ($p < 0.01$), Arginine ($p < 0.01$), Glutamic acid ($p < 0.01$), Glycine ($p < 0.05$), Alanine ($p < 0.01$) および Valine ($p < 0.01$) の6種であった。

Table 3. Relationship between Sperm Count and Free Amino Acid Contents

	over 50×10^6		50— 20×10^6		under 20×10^6	
Cases	25		18		33	
Volume	3.0cc		3.0cc		3.1cc	
Sperm counts	99.6×10^6		29.7×10^6		5.9×10^6	
Motility	71.8%		54.0%		47.9%	
Activity	86.9%		70.9%		68.8%	
	mean	s.d	mean	s.d	mean	s.d
Ninhyd-total	1704.8	634.0	1404.5	476.2	1177.5	441.6
Lys.	73.8	21.6	60.7	20.9	51.5	17.1
His.	54.3	14.4	46.5	14.3	40.4	10.6
Arg.	62.8	15.2	54.6	16.1	49.1	16.3
CySO ₃ H	3.4	1.8	3.0	1.9	2.8	2.0
P. Ser.	1.9	0.8	2.3	1.5	1.9	1.3
Tau.	4.9	2.6	5.6	3.4	5.3	3.8
Asp.	19.4	6.7	15.1	6.3	9.9	4.0
Thr.	35.4	12.6	33.7	7.9	33.0	9.6
Ser.	105.6	38.2	98.3	25.3	97.4	25.5
Asn.	26.2	9.7	26.7	7.3	24.9	8.0
Glu.	73.6	22.4	60.6	20.2	48.9	17.9
Gln.	46.0	20.5	39.7	12.0	39.7	11.5
Pro.	5.0	3.1	4.3	2.1	3.4	2.1
Gly.	31.5	11.0	27.8	8.5	24.6	8.6
Cit.	8.5	5.4	7.5	3.3	8.2	3.7
Ala.	11.8	4.4	9.7	3.3	8.4	3.9
Val.	38.8	11.6	33.6	10.1	31.7	9.8
Met.	5.1	3.1	3.5	2.8	3.2	2.9
Ile.	33.8	9.7	31.4	8.7	29.6	7.3
Leu.	45.8	14.8	40.9	11.9	38.5	9.4
Tyr.	65.7	20.7	63.5	18.1	59.6	14.4
Phe.	16.4	5.1	15.5	5.0	14.5	4.5
Total	779.2	192.9	682.2	171.4	627.0	156.8

mg/dl

c) 精子運動率による分類でのアミノ酸濃度の比較

精子運動率について、清水⁴³⁾は正常者平均62%，妊娠可能な最低基準は35%であると述べ、志田ら⁴²⁾は40%以上を妊娠可能としていることから、精子運動率により76検体を以下の3群に分類し比較した。

- I 群：60%以上
- II 群：60～40%
- III 群：40%以下

Table 4. Relationship between Sperm Motility and Free Amino Acid Contents

	over 60%		60%—40%		under 40%	
Cases	38		22		16	
Volume	2.9cc		3.2cc		3.1cc	
Sperm counts	64.3×10^6		22.2×10^6		14.2×10^6	
Motility	75.4%		50.0%		23.1%	
Activity	87.7%		70.1%		53.3%	
	mean	s.d	mean	s.d	mean	s.d
Ninhyd-total	1603.5	611.6	1020.5	519.6	1391.2	455.0
Lys.	71.5	20.3	48.7	22.7	53.9	11.7
His.	52.3	12.2	39.8	17.5	42.2	8.7
Arg.	59.9	12.3	48.7	17.9	53.0	9.5
CySO ₃ H	3.8	1.6	2.1	1.8	2.7	1.5
P. Ser.	1.8	0.6	1.6	1.2	3.0	1.5
Tau.	5.7	3.5	4.7	2.5	5.0	3.1
Asp.	17.4	7.0	10.5	5.3	12.3	4.2
Thr.	38.0	11.5	29.1	7.8	32.5	5.2
Ser.	112.2	32.3	86.3	23.5	95.3	15.9
Asn.	28.4	8.7	23.2	8.3	24.4	5.2
Glu.	69.9	23.0	45.1	17.7	56.7	13.0
Gln.	45.7	17.8	38.4	10.9	37.4	11.2
Pro.	4.8	2.6	3.0	1.9	4.5	2.5
Gly.	32.0	9.0	22.8	7.5	25.2	5.8
Cit.	8.1	4.5	6.9	3.7	7.5	4.3
Ala.	11.3	4.5	7.5	3.2	9.6	2.9
Val.	37.7	11.3	27.1	7.5	37.3	8.8
Met.	4.3	3.2	3.5	2.8	3.1	2.5
Ile.	34.4	9.1	25.8	11.0	30.3	5.7
Leu.	46.9	13.3	34.7	10.0	37.4	6.9
Tyr.	68.2	19.0	55.5	14.1	60.0	12.3
Phe.	17.2	4.7	13.6	4.6	13.6	3.5
Total	778.7	175.5	580.0	168.2	643.8	98.4

mg/dl

これら3群におけるアミノ酸濃度の比較を Table 4. に示したが、ニンヒドリン陽性物質総量、総アミノ酸量および個々のアミノ酸についても、I 群に比し II 群・III 群では低値をとる傾向を示したが、II 群と III 群の比較ではむしろ III 群の方がやや高い値を示した。しかしいずれの場合でも有意の差は示さなかった。個々のアミノ酸の比較では、I 群に比し II 群・III 群で有意の差を示したものは Lysine ($p < 0.01$) と Histidine ($p < 0.05$) の2種

で、I 群に比し II 群にのみ有意の差を示したのは Arginine ($p < 0.05$) のみであった。

d) 精子活性率による分類でのアミノ酸濃度の比較

精子活性率による分類は、清水⁽⁴³⁾の基準に従い、以下の3群にわけて比較検討した。

I 群：80%以上

II 群：80~60%

III 群：60%以下

Table 5. Relationship between Sperm Activity and Free Amino Acid Contents

	over 80%		80%—60%		under 60%	
Cases	36		24		16	
Volume	3.0cc		3.2cc		3.0cc	
Sperm counts	62.7×10^6		26.3×10^6		20.8×10^6	
Motility	74.9%		51.4%		26.3%	
Activity	90.3%		70.3%		49.0%	
	mean	s.d	mean	s.d	mean	s.d
Ninhyd-total	1568.9	605.0	1180.9	521.5	1371.0	406.1
Lys.	67.6	19.8	57.0	26.0	51.9	13.5
His.	50.8	14.0	43.2	15.6	41.2	8.7
Arg.	59.1	12.6	50.7	17.5	54.6	13.1
CySO ₃ H	3.5	1.8	3.0	2.0	1.9	1.6
P. Ser.	1.4	0.4	1.9	1.1	2.9	1.6
Tau.	5.8	3.8	5.5	2.3	3.9	2.1
Asp.	15.9	8.0	13.4	6.6	11.3	5.1
Thr.	35.4	11.9	32.7	9.6	32.7	4.8
Ser.	105.8	34.0	92.4	26.2	100.4	16.4
Asn.	26.0	9.1	26.4	8.1	24.5	5.8
Glu.	65.6	24.2	55.1	22.3	54.2	15.9
Gln.	45.7	17.1	37.0	12.7	40.1	11.2
Pro.	4.7	2.7	3.4	2.4	3.5	2.1
Gly.	30.1	9.9	26.3	8.7	25.5	6.0
Cit.	7.8	4.1	8.2	3.9	7.5	3.2
Ala.	10.3	5.0	9.7	4.0	8.9	2.5
Val.	35.9	11.5	31.7	10.6	35.4	9.6
Met.	4.3	3.3	4.0	3.5	3.0	2.5
Ile.	32.6	9.8	29.7	8.1	31.2	6.2
Leu.	44.2	14.1	38.9	11.7	38.9	7.9
Tyr.	65.2	19.8	59.4	15.7	61.4	14.0
Phe.	16.3	5.3	15.1	4.7	13.3	3.5
Total	748.5	190.0	639.5	186.5	645.4	126.1

mg/dl

この分類によるアミノ酸濃度の比較を Table 5. に示した。この場合には活性率の低い群ほどアミノ酸濃度が低い値をとる傾向が見られたが、ニンヒドリン陽性物質総量および総アミノ酸量は、ともに有意の差は認められなかった。個々のアミノ酸についても、I 群に比し II 群・III 群で有意差をもつて低い値を示したものはなく、I 群と III 群の比較で Lysine と Histidine がともに $p < 0.05$ の有意差をもつて低値をとることを認めたのみであった。

e) 妊孕性の程度による分類でのアミノ酸濃度の比較

妊孕性という点から精子濃度と精子運動率の2者を加味して76検体を3群に分類し、さらに無精子症の19検体を含めた以下の4群についてそのアミノ酸濃度を比較検討した。

I 群：Fertile (Fert.)

精子濃度 $50 \times 10^6/\text{cc}$ 以上で、運動率40%以上のものの

II 群：Subfertile (Subfert.)

精子濃度 $50 \sim 20 \times 10^6/\text{cc}$ で、運動率40%以上のものの、および精子濃度 $50 \times 10^6/\text{cc}$ 以上で、運動率40%以下のもの

III 群：Infertile (Infert.)

精子濃度 $20 \times 10^6/\text{cc}$ 以下のもの、および精子濃度 $50 \sim 20 \times 10^6/\text{cc}$ で、運動率40%以下のもの

IV 群：Azoospermia (Azo.)

以上の4群におけるアミノ酸濃度の比較を Table 6. に示したが、ニンヒドリン陽性物質総量および総アミノ酸量ともに I 群と比較して他の各群では著しく低い値をとることが見られ、いずれも $p < 0.01 \sim 0.05$ において有意差を認めた。このうちの総アミノ酸量のみ、各群における分布を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 Distribution Chart of Amino Acid-Total

Table 6. Relationship between Clinical Classifications and Free Amino Acid Contents

	Fertile		Subfertile		Infertile		Azoospermia	
Cases	20		19		37		19	
Volume	3.0cc		3.1cc		3.0cc		3.3cc	
Sperm counts	105.2×10 ⁶		41.8×10 ⁶		8.7×10 ⁶			
Motility	78.9%		58.7%		45.3%			
Activity	86.1%		75.6%		64.9%			
	mean	s.d	mean	s.d	mean	s.d	mean	s.d
Ninhyd-total	1838.1	601.7	1257.6	426.6	1246.0	481.7	1307.3	633.2
Lys.	78.1	20.7	61.7	15.8	51.3	16.5	54.4	21.2
His.	56.1	10.8	48.3	17.3	40.1	9.1	41.1	11.3
Arg.	64.1	12.6	55.6	18.8	50.7	11.5	50.6	17.5
CySO ₃ H	3.8	1.6	2.6	1.9	2.7	2.1	3.4	1.7
P. Ser.	2.2	0.9	1.8	1.4	2.2	1.4	0.7	0.1
Tau.	5.5	2.6	5.0	2.9	5.3	3.8	4.6	1.3
Asp.	20.9	6.4	15.1	6.0	10.3	4.1	8.4	3.8
Thr.	39.5	13.0	32.1	8.8	32.8	9.1	30.5	10.8
Ser.	118.1	38.2	92.5	25.7	97.5	25.1	103.1	35.5
Asn.	29.6	9.8	25.6	8.2	24.6	7.5	24.3	8.5
Glu.	78.0	22.0	60.0	19.8	49.9	17.7	48.9	19.6
Gln.	51.5	21.5	36.1	11.0	40.6	13.0	41.1	15.8
Pro.	5.6	2.9	3.5	2.3	3.4	2.1	2.6	1.2
Gly.	34.3	7.7	27.8	7.6	24.5	8.6	24.8	8.3
Cit.	9.1	5.6	7.0	3.5	8.1	3.4	10.2	1.8
Ala.	12.6	4.4	9.7	3.3	8.4	3.7	8.4	3.3
Val.	41.2	10.9	31.4	8.6	32.5	10.3	29.9	9.8
Met.	5.4	3.3	3.8	2.7	3.1	2.6	3.1	1.7
Ile.	35.6	9.4	30.5	8.9	29.6	7.3	30.0	9.0
Leu.	48.5	14.6	40.6	11.7	37.9	10.4	39.1	11.4
Tyr.	68.7	20.8	61.5	17.8	59.8	14.5	60.2	16.4
Phe.	17.3	5.0	15.6	4.6	14.2	4.5	13.9	3.9
Total	823.1	176.1	673.4	175.8	628.1	154.6	609.3	180.6

mg/dl

個々のアミノ酸についても妊孕性の低い群ほど低い値をとる傾向を強く示し、I群に比し他の各群において有意の低い値を示したものは、Lysine ($p<0.01\sim0.05$), Aspartic acid ($p<0.01$), Glutamic acid ($p<0.01$), Glycine ($p<0.01\sim0.05$), Alanine ($p<0.01\sim0.05$), Valine ($p<0.01\sim0.05$) および Phenylalanine ($p<0.01\sim0.05$) の7種で、なかでも Aspartic acid は Fig. 2 に示したように特に著しく低い値をとることが認めら

れ、特にⅡ群と比べてもⅢ群・Ⅳ群においては $p<0.01$ の有意差をもつて低い値を示した。なお Lysine および Glutamic acid の各群における分布をそれぞれ Fig. 3 と Fig. 4 に示した。一方 Citrulline は Azoospermia 群に高い値を示したが、定量し得た検体数がさほど多くないため、他の群を一括して Non-azoospermia 群とし、Azoospermia 群と Non-azoospermia 群の2群に分けこの両者について比較したところ、Fig. 5 に示したよう

Fig. 2 Distribution Chart of Aspartic Acid

Fig. 3 Distribution Chrt of Lysine

Fig. 4 Distribution Chart of Glutamic Acid

に Non-azoospermia 群では35検体で平均濃度は、 8.1 ± 3.2 mg/dlの値を示し、Azoospermia 群10検体の平均濃度 10.2 ± 1.8 mg/dlと比べ $p < 0.05$ の有意差をもつて Azoospermia 群に高いという結果を得た。

以上のように、無精子症群における Citrulline の高値以外は妊孕性の低下とともに各群それぞれ遊離アミノ酸濃度も著明に低い値をとることが見られたが、Aspartic

Fig. 5 Distribution Chart of Citrulline

acid と Glutamic acid の低値に比べ Asparagine および Glutamine の濃度にはほとんど差は認められなかった。

2) 遊離アミノ酸濃度の経時的変動

精液を全精液のまま室温に静置し、その場合の精漿中遊離アミノ酸の濃度の経時の変化を7症例の精液を用いて検討し、その分析結果を Table 7.~Table 13. に示した。アミノ酸総量としてはニヒドリン陽性物質総量は用いず、アンモニアの定量値を別に記し総アミノ酸量として表現し、個々のアミノ酸については、いずれの測定時においても定量し得た16種について検討した。さらにアミノ酸濃度の増加率をみるために、1時間値を1.0とした時の各時間の増加比率を()内に示し、その主な変化グラフはそれぞれの Figure の右側に示した。

a) 総アミノ酸量

精子運動率および活性率の変化は Table 7.~Table 11. に示したように3時間以後に急激に低下するが、一方総アミノ酸量は一般に3時間以後も急速に増加し、8時間後をピークとしてそれ以後の増加は緩徐となる傾向が見られた。

各症例別に経時的な変化をみると、Fig. 6 の左のグラフに示したように、精管結紮術後の症例で低い値を示す以外は著明な差は認められなかったが、その増加率をみると Fig. 6 の右のグラフに示したように、健康者では2例とも射精後3時間までは急激な増加を示し、それ以後の増加は緩徐となるのに比し、無精子症を除く不妊症例では正常精子保有者を含め、3時間までは増加が

緩徐で、3時間以後に急激な増加を示す傾向が見られた。一方無精子症の1例は1時間から3時間までは急激に増加し、その定量値も他の症例とほとんど差はないが、3時間以後の増加は他の症例に比し極めて緩徐であつた。しかし1例の精管結紮術後の検体では、定量値は他に比し低いが各時間において一様な増加を示していた。

b) 遊離アンモニア

遊離アンモニア濃度の变化は、Fig. 7 に示したが、健康者の1例以外は精子の存在する症例ではほぼ同じように増加するが、無精子症および精管結紮術後の症例では3時間以後の増加はほとんど見られなかつた。

c) Lysine, Histidine および Arginine

Lysine および Histidine は各症例ともほとんど同じ

Table 7. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Health-1

Sperm counts: $81 \times 10^6/cc$, Volume: 3.8cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
Motility	68%	62%	25%	8%	2%
Activity	77%	75%	41%	17%	8%
NH ₃	2.3 (1.0)	3.8 (1.7)	4.4 (1.9)	7.6 (3.3)	8.1 (3.5)
Lys.	14.2 (1.0)	36.8 (2.6)	40.7 (2.9)	85.0 (6.0)	83.6 (5.9)
His.	11.3 (1.0)	22.2 (1.7)	22.2 (1.7)	41.6 (3.7)	42.0 (3.7)
Arg.	13.8 (1.0)	25.0 (1.8)	24.6 (1.8)	38.3 (2.8)	38.7 (2.8)
Asp.	2.4 (1.0)	5.7 (2.4)	8.3 (3.5)	10.4 (4.3)	22.3 (9.3)
Thr.	14.1 (1.0)	17.8 (1.3)	20.0 (1.4)	26.3 (1.9)	31.0 (2.2)
Ser.	38.6 (1.0)	53.9 (1.4)	56.9 (1.5)	66.1 (1.7)	58.8 (1.5)
Asn.	4.8 (1.0)	14.9 (3.1)	16.3 (3.4)	17.0 (3.5)	18.6 (3.9)
Glu.	10.2 (1.0)	28.2 (2.8)	46.2 (4.5)	53.2 (5.2)	50.4 (4.9)
Gln.	8.3 (1.0)	25.6 (3.1)	30.1 (3.6)	24.3 (2.9)	27.6 (3.3)
Gly.	9.0 (1.0)	25.3 (2.8)	23.7 (2.6)	47.8 (5.3)	52.3 (5.8)
Ala.	1.1 (1.0)	3.2 (2.9)	3.8 (3.5)	9.9 (9.0)	11.6 (10.6)
Val.	5.6 (1.0)	18.4 (3.3)	19.0 (3.4)	34.5 (6.2)	33.3 (6.0)
Ile.	6.4 (1.0)	19.0 (3.0)	15.8 (2.5)	32.6 (5.1)	33.3 (5.2)
Leu.	7.5 (1.0)	24.4 (3.3)	23.9 (3.2)	43.4 (5.8)	44.0 (5.9)
Tyr.	14.7 (1.0)	38.7 (2.6)	39.5 (2.7)	68.7 (4.7)	66.6 (4.5)
Phe.	2.8 (1.0)	7.5 (2.7)	8.5 (3.0)	15.1 (5.4)	15.3 (5.5)
Total	164.8 (1.0)	366.6 (2.2)	399.5 (2.4)	614.6 (3.7)	629.4 (4.2)

mg/dl

Table 8. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Health-2

Sperm counts: $62 \times 10^6/cc$, Volume: 4.1cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
Motility	81%	68%	31%	12%	5%
Activity	97%	90%	68%	21%	13%
NH ₃	9.0 (1.0)	12.3 (1.4)	16.7 (1.9)	17.5 (1.9)	22.5 (2.5)
Lys.	21.2 (1.0)	70.6 (3.3)	112.2 (5.3)	183.1 (8.6)	158.1 (7.5)
His.	16.7 (1.0)	37.6 (2.3)	48.6 (2.9)	73.6 (4.4)	69.6 (4.2)
Arg.	22.3 (1.0)	44.7 (2.0)	55.4 (2.5)	69.1 (3.1)	70.4 (3.2)

Asp.	3.2 (1.0)	7.9 (2.5)	11.6 (3.6)	15.3 (4.8)	13.1 (4.1)
Thr.	22.6 (1.0)	25.8 (1.1)	27.4 (1.2)	23.4 (1.0)	15.1 (0.7)
Ser.	47.1 (1.0)	77.3 (1.6)	95.6 (2.0)	80.3 (1.7)	53.1 (1.1)
Asn.	9.3 (1.0)	20.1 (2.2)	27.6 (3.0)	30.7 (3.3)	18.8 (2.0)
Glu.	13.1 (1.0)	38.4 (2.9)	60.8 (4.6)	63.3 (4.8)	48.3 (3.7)
Gln.	9.8 (1.0)	38.4 (3.9)	29.5 (3.0)	30.3 (3.1)	16.3 (1.7)
Gly.	10.1 (1.0)	40.6 (4.0)	42.4 (4.2)	50.3 (5.0)	49.5 (4.9)
Ala.	1.3 (1.0)	5.9 (4.5)	7.1 (5.5)	11.6 (8.9)	12.7 (9.8)
Val.	7.3 (1.0)	45.5 (6.2)	33.2 (4.6)	43.2 (5.9)	37.7 (5.2)
Ile.	8.0 (1.0)	18.0 (2.3)	22.4 (2.8)	38.2 (4.8)	33.9 (4.2)
Leu.	7.7 (1.0)	21.0 (2.7)	26.7 (3.5)	48.0 (6.2)	47.1 (6.1)
Tyr.	15.3 (1.0)	27.4 (1.8)	40.4 (2.6)	58.1 (3.8)	53.2 (3.5)
Phe.	3.1 (1.0)	7.5 (2.4)	10.3 (3.3)	15.8 (5.1)	13.1 (4.2)
Total	218.1 (1.0)	526.7 (2.4)	640.9 (2.9)	834.3 (3.8)	710.0 (3.3)

mg/dl

Table 9. Changes in Free Amino acid Contents with the Course of Time in Normozoospermia
Sperm counts: $80 \times 10^6/\text{cc}$, Volume: 4.0cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
Motility	63%	51%	26%	6%	2%
Activity	79%	68%	43%	11%	5%
NH ₃	8.0 (1.0)	8.7 (1.1)	14.2 (1.8)	25.3 (3.2)	14.1 (1.8)
Lys.	35.9 (1.0)	43.9 (1.2)	73.1 (2.0)	110.0 (3.1)	144.6 (4.0)
His.	15.7 (1.0)	19.8 (1.3)	33.2 (2.1)	64.6 (4.1)	74.8 (4.8)
Arg.	26.5 (1.0)	25.6 (1.0)	48.3 (1.8)	69.5 (2.6)	67.0 (2.5)
Asp.	4.9 (1.0)	8.7 (1.8)	14.8 (3.0)	23.3 (4.8)	29.4 (6.0)
Thr.	13.2 (1.0)	17.2 (1.3)	26.3 (2.0)	34.2 (2.6)	29.3 (2.2)
Ser.	36.8 (1.0)	50.2 (1.4)	70.6 (1.9)	79.1 (2.2)	75.7 (2.1)
Asn.	8.7 (1.0)	15.2 (1.8)	22.9 (2.6)	22.8 (2.6)	17.5 (2.0)
Glu.	22.2 (1.0)	41.4 (1.9)	68.4 (3.1)	77.9 (3.5)	77.2 (3.5)
Gln.	16.1 (1.0)	22.6 (1.4)	37.5 (2.3)	39.3 (2.4)	31.9 (2.0)
Gly.	12.1 (1.0)	23.9 (2.0)	51.3 (4.2)	54.8 (4.5)	75.2 (6.2)
Ala.	3.1 (1.0)	4.7 (1.5)	10.1 (3.3)	15.4 (5.0)	19.0 (6.1)
Val.	16.9 (1.0)	21.2 (1.3)	45.8 (2.7)	56.4 (3.3)	56.1 (3.3)
Ile.	16.1 (1.0)	18.2 (1.1)	37.7 (2.3)	41.1 (2.6)	49.7 (3.1)
Leu.	19.6 (1.0)	24.0 (1.2)	49.8 (2.5)	53.0 (2.7)	66.0 (3.4)
Tyr.	34.6 (1.0)	35.3 (1.0)	61.7 (1.8)	68.8 (2.0)	82.5 (2.4)
Phe.	6.0 (1.0)	8.2 (1.4)	14.3 (2.4)	19.5 (3.3)	25.5 (4.3)
Total	288.4 (1.0)	380.1 (1.3)	665.8 (2.3)	829.7 (2.9)	921.4 (3.2)

mg/dl

Table 10. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Oligozoospermia-1
Sperm counts: $28 \times 10^6/\text{cc}$, Volume: 4.6cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
Motility	40%	31%	18%	6%	0%
Activity	68%	66%	25%	10%	5%
NH ₃	14.5 (1.0)	12.0 (0.8)	25.1 (1.7)	34.2 (2.4)	16.3 (1.1)
Lys.	39.8 (1.0)	68.2 (1.7)	149.0 (3.7)	215.0 (5.4)	156.0 (3.9)
His.	22.7 (1.0)	32.7 (1.4)	52.9 (2.3)	76.8 (3.4)	66.3 (2.9)
Arg.	24.3 (1.0)	47.6 (2.0)	70.9 (2.9)	97.8 (4.0)	61.2 (2.5)
Asp.	2.7 (1.0)	8.3 (3.1)	14.9 (5.5)	26.1 (9.7)	27.7 (10.3)
Thr.	16.3 (1.0)	23.0 (1.4)	26.5 (1.6)	36.9 (2.3)	34.0 (2.1)
Ser.	58.1 (1.0)	62.7 (1.1)	88.5 (1.5)	129.1 (2.2)	119.4 (2.1)
Asn.	9.8 (1.0)	16.8 (1.7)	27.3 (2.8)	35.2 (3.6)	32.3 (3.3)
Glu.	18.8 (1.0)	32.8 (2.6)	59.5 (3.2)	99.8 (5.3)	95.6 (5.1)
Gln.	12.6 (1.0)	32.5 (2.6)	41.5 (3.3)	46.2 (3.7)	41.5 (3.3)
Gly.	14.5 (1.0)	13.9 (1.0)	49.9 (3.4)	64.5 (4.5)	58.7 (4.1)
Ala.	1.9 (1.0)	3.9 (2.1)	7.6 (4.0)	16.3 (8.6)	15.1 (8.0)
Val.	14.0 (1.0)	27.8 (2.0)	47.4 (3.4)	56.0 (4.0)	45.9 (3.3)
Ile.	17.4 (1.0)	18.6 (1.1)	31.8 (1.8)	37.2 (2.1)	37.9 (2.2)
Leu.	19.9 (1.0)	25.5 (1.3)	51.8 (2.6)	62.5 (3.1)	50.7 (2.6)
Tyr.	31.5 (1.0)	38.2 (1.2)	69.1 (2.2)	72.7 (2.3)	69.2 (2.2)
Phe.	3.4 (1.0)	5.9 (1.7)	13.5 (4.0)	20.3 (6.0)	20.3 (6.0)
Total	307.7 (1.0)	458.4 (1.5)	802.1 (2.6)	1092.4 (3.6)	929.8 (3.0)

mg/dl

Table 11. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Oligozoospermia-2
Sperm counts: $15 \times 10^6/\text{cc}$, Volume: 4.8cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
Motility	62%	44%	13%	5%	0%
Activity	71%	73%	41%	13%	2%
NH ₃	4.4 (1.0)	4.7 (1.1)	14.7 (3.3)	25.7 (5.8)	16.9 (3.8)
Lys.	12.2 (1.0)	29.6 (2.4)	100.0 (8.2)	223.3 (18.3)	151.5 (12.4)
His.	10.1 (1.0)	18.1 (1.8)	51.6 (5.1)	100.5 (10.0)	66.9 (6.6)
Arg.	18.5 (1.0)	26.8 (1.5)	70.8 (3.8)	116.8 (6.3)	77.9 (4.2)
Asp.	2.9 (1.0)	5.2 (1.8)	21.0 (7.2)	30.2 (10.4)	44.1 (15.2)
Thr.	8.1 (1.0)	14.2 (1.8)	33.8 (4.2)	35.0 (4.3)	38.0 (5.1)
Ser.	25.0 (1.0)	46.2 (1.9)	104.9 (4.2)	113.0 (4.5)	127.5 (5.1)
Asn.	2.4 (1.0)	10.0 (4.2)	19.7 (8.2)	22.9 (9.5)	37.4 (15.6)
Glu.	14.6 (1.0)	24.0 (1.6)	82.7 (5.7)	97.9 (6.7)	92.9 (6.4)
Gln.	4.6 (1.0)	17.0 (3.7)	36.6 (8.0)	34.8 (7.6)	38.0 (8.3)
Gly.	6.6 (1.0)	14.7 (2.2)	45.5 (6.9)	89.5 (13.6)	57.9 (8.8)

Ala.	1.3 (1.0)	4.2 (3.2)	7.0 (5.4)	21.1 (16.2)	13.2 (10.2)
Val.	8.3 (1.0)	18.9 (2.3)	46.8 (5.6)	53.3 (6.4)	35.5 (4.3)
Ile.	9.5 (1.0)	17.7 (1.9)	21.3 (2.2)	33.0 (3.5)	28.3 (3.0)
Leu.	10.2 (1.0)	19.5 (1.9)	39.6 (3.9)	43.2 (4.2)	36.7 (3.6)
Tyr.	20.3 (1.0)	35.1 (1.7)	84.5 (4.2)	87.7 (4.3)	50.6 (2.5)
Phe.	3.5 (1.0)	6.3 (1.8)	21.0 (6.0)	22.0 (6.3)	15.8 (4.5)
Total	158.1 (1.0)	307.5 (1.9)	786.8 (5.0)	1124.2 (7.1)	912.2 (5.8)

mg/dl

Table 12. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Azoospermia
Volume: 9.0cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h	13h
NH ₃	4.3 (1.0)	8.1 (1.9)	9.0 (2.1)	8.2 (1.9)	10.5 (2.4)	7.6 (1.8)
Lys.	23.0 (1.0)	53.1 (2.2)	68.9 (2.9)	61.8 (2.6)	81.5 (3.4)	70.3 (2.9)
His.	23.9 (1.0)	41.0 (1.3)	48.3 (1.5)	45.0 (1.4)	54.9 (1.7)	49.8 (1.6)
Arg.	31.5 (1.0)	56.8 (1.8)	59.9 (1.9)	59.0 (1.9)	63.3 (2.0)	48.9 (1.6)
Asp.	4.7 (1.0)	8.2 (1.7)	13.7 (2.9)	22.8 (4.9)	34.4 (7.3)	44.3 (9.4)
Thr.	18.6 (1.0)	24.9 (1.3)	36.3 (2.0)	59.3 (3.2)	62.8 (3.4)	78.4 (4.2)
Ser.	51.8 (1.0)	106.9 (2.1)	126.4 (2.4)	152.2 (2.9)	142.2 (2.7)	167.0 (3.2)
Asn.	8.5 (1.0)	21.4 (2.5)	25.8 (3.0)	26.3 (3.1)	24.3 (2.9)	34.8 (4.1)
Glu.	38.2 (1.0)	50.2 (1.3)	110.6 (2.9)	121.8 (3.2)	131.8 (3.5)	173.8 (4.6)
Gln.	22.5 (1.0)	43.5 (1.9)	54.6 (2.4)	58.9 (2.6)	58.9 (2.6)	71.8 (3.2)
Gly.	11.0 (1.0)	23.1 (2.1)	27.0 (2.5)	24.7 (2.2)	33.9 (3.1)	32.9 (3.0)
Ala.	3.0 (1.0)	8.7 (2.9)	9.6 (3.2)	9.0 (3.0)	13.6 (4.5)	14.8 (4.9)
Val.	23.0 (1.0)	43.6 (1.9)	37.8 (1.6)	37.5 (1.6)	42.6 (1.9)	37.2 (1.6)
Ile.	25.1 (1.0)	36.2 (1.4)	32.6 (1.3)	30.3 (1.2)	34.6 (1.4)	34.1 (1.4)
Leu.	27.5 (1.0)	44.1 (1.6)	43.5 (1.6)	39.8 (1.4)	47.4 (1.7)	45.7 (1.7)
Tyr.	58.0 (1.0)	70.2 (1.2)	65.1 (1.1)	58.4 (1.0)	65.0 (1.1)	57.7 (1.0)
Phe.	8.6 (1.0)	12.7 (1.5)	13.8 (1.6)	23.7 (2.8)	18.0 (2.1)	14.6 (1.7)
Total	378.9 (1.0)	644.6 (1.7)	773.9 (2.0)	830.5 (2.2)	909.2 (2.4)	976.1 (2.6)

mg/dl

Table 13. Changes in Free Amino Acid Contents with the Course of Time in Post-vasectomy
Volume: 5.0cc

Time	1h	3h	5h	8h	10h
NH ₃	2.1 (1.0)	2.7 (1.3)	2.0 (1.0)	1.6 (0.8)	1.8 (0.9)
Lys.	7.3 (1.0)	13.0 (1.8)	45.7 (6.3)	72.2 (9.9)	63.5 (8.7)
His.	4.5 (1.0)	8.7 (1.9)	20.9 (4.6)	27.9 (6.2)	25.8 (5.7)
Arg.	6.2 (1.0)	7.6 (1.2)	27.3 (4.4)	28.3 (4.6)	26.3 (4.2)

Asp.	1.0 (1.0)	2.3 (2.3)	4.9 (4.9)	13.4 (13.4)	9.2 (9.2)
Thr.	3.5 (1.0)	8.3 (2.4)	11.8 (3.4)	25.6 (7.3)	22.4 (6.4)
Ser.	11.1 (1.0)	24.4 (2.2)	45.7 (4.1)	63.7 (5.7)	62.3 (5.6)
Asn.	1.7 (1.0)	5.5 (3.2)	9.0 (5.3)	17.7 (10.4)	16.3 (9.6)
Glu.	5.8 (1.0)	11.4 (2.0)	26.4 (4.6)	91.4 (15.8)	124.7 (21.5)
Gln.	2.2 (1.0)	12.4 (5.6)	19.4 (8.8)	25.7 (11.7)	21.7 (9.9)
Gly.	3.7 (1.0)	8.3 (2.2)	12.9 (3.5)	19.6 (5.3)	19.9 (5.4)
Ala.	0.5 (1.0)	0.9 (1.8)	2.9 (5.8)	3.8 (7.6)	4.5 (9.0)
Val.	4.7 (1.0)	8.8 (1.9)	11.1 (2.4)	14.3 (3.0)	14.0 (3.0)
Ile.	4.3 (1.0)	6.1 (1.4)	13.5 (3.1)	15.1 (3.5)	35.2 (8.2)
Leu.	4.5 (1.0)	7.2 (1.6)	16.4 (3.6)	20.0 (4.4)	38.9 (8.6)
Tyr.	8.9 (1.0)	13.9 (1.6)	24.8 (2.8)	32.3 (3.6)	46.8 (5.3)
Phe.	1.8 (1.0)	3.5 (1.9)	9.1 (5.1)	9.8 (5.4)	12.6 (7.0)
Total	71.7 (1.0)	142.3 (2.0)	301.8 (4.2)	480.8 (6.7)	544.1 (7.6)

mg/dl

Fig. 6 Time Course of Amino Acid-Total

Fig. 7 Time Course of Ammonia

Fig. 8 Time Course of Aspartic Acid

ようなパターンで増加するが、Arginineは無精子症精液では射精後3時間で60mg/dlの値を示すが、3時間以後の増加はほとんど見られなかった。

d) Aspartic acid

Aspartic acidはFig. 8に示したように、健康者の2例は3時間以後の増加がやや緩徐となるのに比し、不妊を訴えた症例では無精子症を含め3時間以後の増加は急激であつた。

e) Asparagine

一方Asparagineの濃度の変化は、Fig. 9の左のグラフに示すように、各症例であまり著明な差はないが、1時間以後の増加率ではFig. 9の右のグラフに示したように乏精子症の1例と精管結紮術後の症例では極めて高い増加率を示し、Aspartic acidの変化パターンとは多少異なつていた。

f) Threonine および Serine

Threonine および Serineは、Fig. 10 および Fig. 11に示したように、健康者の2例と、不妊を訴えた症例中

Fig. 9 Time Course of Asparagine

Fig. 10 Time Course of Threonine

正常精子保有者、および乏精子症でも精子濃度の比較的良好な症例では、3時間以後の増加は極めて緩徐であるのに比べ、乏精子症で精子濃度の低い1例と、精管結紮術後の症例では、3時間以後も極めて高い増加率を示し、また無精子症の症例では他のアミノ酸の変動と異なり3時間以後も増加を続ける傾向が見られた。

g) Glutamic acid および Glutamine

Glutamic acid は Fig. 12 に示したように、精管結紮術後の症例で5時間以後にも急激な増加を示した他は、ほとんど差はなく、一方 Glutamine は Fig. 13 に示したように Asparagine のパターンとはほぼ同様なパターンを示した。

Fig. 11 Time Course of Serine

h) Glycine, Alanine, Valine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine および Phenylalanine

Alanine および Pnenylalanine は各症例ほとんど同様のパターンで増加するが, Glycine, Valine, Isoleucine, Leucine および Tyrosine は無精子症の症例では Arginine

の場合と同様に, 各測定時における濃度は高いが3時間以後の増加はほとんど見られなかつた. 他の症例ではほぼ同様の増加パターンを示すが, Isoleucine のみは Fig. 14に示したように, 著明な差ではないが, 1時間以後の増加率で健康者の2例と比べ, 不妊を訴えた症例ではそ

Fig. 12 Time Course of Glutamic Acid

Fig. 13 Time Course of Glutamine

Fig. 14 Time Course of Isoleucine

の増加率がやや低い傾向を示していた。

考 按

- 1. ヒト精液中の遊離アミノ酸の同定
ヒト精液中の遊離アミノ酸の同定は、Jacobsson²⁶⁾, Lundquist³⁵⁾, Quatrini⁴¹⁾, Adam and Korting²⁾, Smith⁴⁴⁾,

Keutel and Gabsch²⁸⁾, Kubicek et al³¹⁾, Keller and Pataki²⁷⁾, および本邦においても石橋²⁵⁾, 西浦³⁹⁾らはペーパークロマトグラフィーにより、さらにKramitz³⁰⁾はアミノ酸自動分析機により、田中⁴⁸⁾は高圧濾紙電気泳動法を用いて、10数種から20数種の遊離アミノ酸を確認し

た。これらに今回著者の新しく同定し得た Phosphoserine, Asparagine, Sarcosine, α -amino adipic acid および Citrulline の 5 種を加えると現在までにヒト精液中の遊離アミノ酸の種類は30種となる。

2. 遊離アミノ酸の濃度

1) 精液所見と遊離アミノ酸の濃度

男性不妊症患者精液中の遊離アミノ酸濃度について、Adam and Kortling²⁾によると37°C, 1～3時間放置後の分析の結果、精子濃度による分類でアミノ酸の種類には全く差はなかつたと述べている。Keutel and Gabsch²⁸⁾はペーパークロマトグラフィーを用い、精子濃度から、fertil, subfertil, bedingt infertil および Azoospermie の4群に分け、各群における個々のアミノ酸濃度の比較を行ない、妊孕性の低下している群ほど全体にやや低い値を示すが、特に Taurine は fertil 群では19.8mg/dlであるのに比べ、Azoospermie 群では2.78mg/dlと著明な低値を示したと述べている。また Krampitz³⁰⁾もアミノ酸自動分析機による分析から、正常精子保有者と比べ、無精子症および副性器障害を有する患者精液では個々のアミノ酸が著明な低値を示すことを認めている。本邦においては、田中⁴⁸⁾はニンヒドリン陽性物質総量から比較し、4例づつであるが正常精子保有者と乏精子症とではほとんど差はないが、無精子症では低値を示す傾向を認め、一方久住¹⁹⁾は、正常精子保有者、乏精子症および無精子症精液中の遊離ニンヒドリン陽性物質総量の比較では全く有意差を認めなかつたと述べている。

著者は今回、精子濃度、精子運動率および精子活性率により別々に分類して検討した結果、ニンヒドリン陽性物質総量、総アミノ酸量および個々の遊離アミノ酸濃度は、精子濃度の低い群ほど低値を示したが、精子運動率および精子活性率による比較ではあまり著明な差は認められなかつた。一方精子濃度と精子運動率から妊孕性の程度により無精子症を含めた4群の比較では、妊孕力の低下している群および無精子症群において、妊孕力では正常と思われる群と比べ、ニンヒドリン陽性物質総量、総アミノ酸量および個々のアミノ酸のなかで Lysine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine, Valine および Phenylalanine が有意差をもつて低い値を示すことを認め、なかでも特に Aspartic acid は著明な差を認めた。しかし Citrulline は、Non-azoospermia 群と Azoospermia 群との比較で、逆に Non-azoospermia 群と比べて Azoospermia 群において有意差をもつて高い値を示すことを認めたが、Citrulline に関しては定量し

得た検体数がさほど多くないため、今後さらに検討を加える必要があると思われる。

また睪丸の造精機能とアミノ酸の関係に関する研究は主に Arginine について行なわれており、Holt et al.²⁹⁾は、Arginine を除外した食餌を与えることにより、動物同様ヒトにおいても精子濃度の著明な減少を来し、再び Arginine を投与することにより精子濃度がもとにもどることを観察した。また巻野³⁶⁾は、ラッテを用いて Arginine 欠乏により8週後に睪丸の精子形成に著しい障害を来し、この障害は Ornithine 添加により防がれることを証明した。さらに Tanimura⁴⁹⁾は、ヒト精液における Arginine の研究で、精子濃度の低い群では bound-Arginine の低下が見られ、一方精子運動率の低い群では free-Arginine が低値を示すことから、Arginine は精子形成のみでなく、精子の運動にも大きく関与しているのではないかと述べ、乏精子症患者に Arginine を投与することにより精液所見の著明な改善を認めたが、一方 Aspartic acid を投与すると逆に精子濃度と運動率の著明な低下を認めたことから、オルニチンサイクルにおける Arginine 代謝のなかで、Aspartic acid は何らかの阻害的な作用をするのではなからうかと述べている。著者の研究でも、精子濃度および精子運動率の低い群で Arginine が低値を示すことを認めたが、Aspartic acid は、Tanimura の推定とは逆に、射精後3時間における濃度の比較では妊孕性の高い群において著しい高値を示した。しかし Aspartic acid の経時的な変化から見ると、精子運動率も良好な健康者精液では3時間までは急激に増加するが、3時間以後の増加は不妊を訴えた症例と比べむしろ緩徐となり、一方精子の運動率および活性率は3時間以後は急激に低下することから、3時間以後の Aspartic acid の増加は Tanimura の述べているようにむしろ阻害的な要素となっているのではなからうかとも思われる。

2) 遊離アミノ酸濃度の経時的変動

時間の経過とともにヒト精液において、遊離アミノ酸濃度の急激に増加することは良く知られており、Christensen et al.⁸⁾は、遊離の α -amino nitrogen が射精直後の15.8mg/dlから、25°C, 12時間で103.6mg/dlにまで増加することを認め、Jacobsson²⁶⁾も同様に非蛋白窒素量の増加することを認めている。Lundquist²³⁾³⁴⁾は分割射精精液から、この非蛋白窒素の増加は精液中の蛋白分解酵素の作用によるものであり、この酵素は前立腺液に含まれる Fibrinase であり、その基質は精囊腺に由来す

る Fibrine であろうと述べている。本邦においても、石橋²⁵⁾および西浦³⁹⁾は、ペーパークロマトグラフィーにより、時間の経過とともに遊離アミノ酸の種類と呈色濃度の著しい増加を認めている。個々の遊離アミノ酸濃度の経時的な変化についての研究は、Quatrini⁴¹⁾が、健康者10例の精漿を用いて8種の遊離アミノ酸濃度の変化について検討し、Serine, Threonine, Glycine および Alanine はほぼ一様に急激に増加するが、Aspartic acid, Glutamic acid, Valine および Leucine はあまり増加しなかつたと述べている。また、不妊を訴えた患者精液については、本邦における Tanimura⁴⁹⁾の Arginine に関する研究のみで、他のアミノ酸濃度の変化については現在まで全く検討されていない。Tanimura は、無精子症の2例を含め7例の精子濃度の異なる症例について、Arginine 濃度の経時的な変化を検討したが、特別な差異は認めなかつたと述べている。

著者は今回、総アミノ酸量と16種の遊離アミノ酸濃度の経時的な変化について検討し、射精後1時間でこれらすべての遊離アミノ酸が出現し、その後の時間における新しいアミノ酸の出現は見られず、一般に射精後8時間でその濃度は最高になる傾向を示した。また総アミノ酸量、Aspartic acid および Glutamic acid において見られたように、健康者では射精後3時間までは急激な増加を示すがそれ以後の増加は緩徐となり、特に Threonine, Serine, Asparagine および Glutamine は3時間以後ほとんど増加しないのに比べ、不妊を訴えた症例では3時間までの増加はむしろ緩徐で、3時間以後に急激な増加を示す傾向が見られた。無精子症の1例では、射精後1時間から3時間で急激に増加してピークとなり、それ以後はほとんど増加しないが、Threonine と Serine のみは健康者の場合とは逆に3時間以後にも比較的高い増加が見られた。一方、精管結紮術後の症例では、全体的に濃度は低いがすべてのアミノ酸が一様に増加し、同一症例の精管結紮術前の精液における変化とは明らかな差異を示した。以上のことから、精液中の遊離アミノ酸濃度の経時的な変化は、健康者と比べて不妊を訴えた症例および精管結紮術後の症例では、総アミノ酸量および個々のアミノ酸のなかでも何種類かのものに多少差異があるものと考えられる結果を得た。

3. 精液中の遊離アミノ酸の存在意義

精液中のこれらの遊離アミノ酸の存在意義について、Tyler et al.^{56), 57), 58)}は、海水で稀釈されたウニの精子は各種のアミノ酸、特に Glycine を添加することによ

りその活動力を保持する時間が著明に延長することを認め、これらのアミノ酸は海水中の有害な重金属と複塩を形成し、それにより精子環境の保護に役立っていることを実験的に証明した。また Giese and Wells¹⁶⁾は0.05 mole 濃度の Glycine はウニの精子を可視光線による害から保護する役割をしていると述べ、Metz and Donovan³⁸⁾は、ヒトの精子について、種々の α -アミノ酸およびペプチドは受精に必要な精子の凝集を促す補助物質として作用することを認めている。本邦においても高橋⁴⁷⁾は、Glycine, Histidine および Proline はヒト精子の運動時間の延長に効果的に作用すると述べている。しかし一方、Tosic and Walton^{50)~55)}は、牛の精液に卵黄を加えると最初は精子の酸素消費量の増加が見られ、その後急速に精子の呼吸と運動の低下を来すが、カタラーゼやペルオキシダーゼを添加すると呼吸と運動の低下が防止されることから、アミノ酸代謝による遊離アンモニアおよび過酸化水素の発生が精子に対して有害な作用をしていると述べ、さらに L-Tryptophane, L-Phenylalanine および L-Tyrosine の分解や脱アミノ反応により少量ではあるが過酸化水素が発生し、0.075 mole H_2O_2 /ml の低濃度でも精子の呼吸および運動を強く阻害したと述べている。

精子によるアミノ酸代謝の問題について、Flipse et al.^{3), 9)~15)}は ^{14}C -Glycine が牛の精子により代謝されることを認め、Bhargava^{5), 6)}は、 ^{14}C -Valine を使用し、牛および水牛の精子において少量ではあるが取り込まれ、その取り込みは精子の尖体部分に起こることから、これらのアミノ酸は RNA の合成に利用されているのではないかと述べ、Abraham and Bhargava¹⁾も、水牛および山羊同様、ヒト精子においても、 ^{14}C -Valine は尖体部分の蛋白とわずかではあるが結合することを認め、ヒト精子においてもアミノ酸の利用はわずかではあるが行なわれていると述べている。しかし、飯田ら²²⁾は、豚精子の呼吸および運動性に及ぼす各種のアミノ酸の影響について検討し、L-Phenylalanine は呼吸を促進するが、L-Leucine および DL-Isoleucine は呼吸を阻害し、また L-Proline は運動性に好影響を与えるが、L-Phenylalanine, DL-Tryptophane および L-Histidine は豚同様、牛の精子の運動性も著しく阻害したと述べ、さらに、洗浄浮遊精子のアミノ酸に対する酵素活性は比較的低いものであり、エネルギーの面からみるとアミノ酸代謝は糖代謝におけるほど大きな役割は果していないと述べている。また最近になり、Busby et al.⁷⁾は、 ^{14}C でラベ

ルした20種のアミノ酸を用いて、家兎精子における取り込みについて検討したが、時間の経過とともにその取り込みは増加し、30分後の比較では、Tryptophane が最も多く、[次いで、Cysteine, Tyrosine の順であるが、自然界における蛋白質の構成アミノ酸として最も普通に見られる Glycine, Alanine および Aspartic acid の取り込みは極めて少なかったと述べ、またさらに、蛋白合成阻害剤を使用してその取り込みに対する影響について検討したがほとんど影響のなかったことから、これらのアミノ酸は Bhargava らが述べているような精子の尖体ないしはミトコンドリアにおける蛋白合成に利用されているのではなく、単なる物理的な移行にすぎないのではないかと述べている。

以上のように、アミノ酸の存在意義についての研究は少なく、特にヒト精液についてはほとんど解明されていない。また、女性(雌性)側については、本田²¹⁾によれば、家兎の卵管分泌液中の遊離アミノ酸は20種あり、これらのアミノ酸濃度は排卵期には20%の増加を示し、アミノ酸の種類も増加することを認めている。

今回の著者の研究で、精子の存在する精液では遊離アンモニアの増加が見られるが、無精子症および精管結紮術後の症例の精液では時間の経過とともに遊離アンモニアの増加が見られなかったことから、精子により何らかの代謝が行なわれていると思われる。また、精液所見の良好なものほど射精後3時間における遊離アミノ酸の濃度は高く、経時的なアミノ酸濃度の変動の検討で、健康者精液では射精後3時間までに急速に増加する傾向が見られ、一方、不妊を訴えた症例では3時間までの増加が緩徐である傾向を示したことから、ヒト精液は女性体内における通過経路中、短時間に遊離アミノ酸濃度の急激な増加を必要とするのではないかと思われ、さらには射精後3時間における遊離アミノ酸濃度の低いことが、不妊症患者でも特に乏精子症患者の精子が受精しにくい原因の一つとなつていのではないだろうかと思われる。

結 論

ヒト精液中の遊離アミノ酸の分析に関する研究は少ない。著者は自動分析機を用いて、95検体の不妊症患者の精漿中アミノ酸の分析を行ない、先人の業績に以下のことを加え得た。

1. 遊離アミノ酸の同定について

射精後3時間室温に放置後、精漿中のアミノ酸の分析を行ない28種の遊離アミノ酸を同定し得たが、現在までに精漿中のアミノ酸として知られていたもの以外に新し

く見出されたものは、Phosphoserine, Asparagine, Sarcosine, α -amino adipic acid および Citrulline の5種である。また精液所見から種々の群に分類して検討したが、これらの遊離アミノ酸の種類には各群とも全く差異は認められなかった。

2. 遊離アミノ酸の濃度について

1) 精液所見と遊離アミノ酸濃度

同定し得た遊離アミノ酸の定量を行ない、男性不妊症と遊離アミノ酸の量的変化がどのように関係するかを検討し以下の結果を得た。

a) 精子濃度の低い群においては、精子濃度の高い群と比べ、総アミノ酸量および個々のほとんどのアミノ酸濃度が低値を示す傾向が見られ、なかでも特に Lysine および Aspartic acid は有意差をもつて著明な低値を示した。

b) 精子運動率および活性率による分類での比較においても、率の低い群では高い群に比べ各アミノ酸は全体に低い値を示す傾向が見られたが、精子濃度による分類の場合ほど著明な差ではなかった。

c) 精子濃度と運動率から妊孕性の程度を3群に分類し、さらに無精子症群を含めた4群について比較検討したところ、妊孕性の低下とともにほとんどすべてのアミノ酸濃度が低値を示す傾向がうまく見られ、なかでも特に、Lysine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine, Valine および Phenylalanine において著明な有意差を認めたが、Citrulline の濃度は無精子症群に高く、精子を有する群との間に負の相関を認めた。しかし今回、特に検討を加えた Asparagine と Glutamine については、いずれもほとんど差異は認められなかった。

2) 遊離アミノ酸濃度の経時的変動について

経時的な遊離アミノ酸濃度の変化については、健康者精液では総アミノ酸量は射精後3時間までに急速に増加する傾向を示すのに比べ、不妊を訴えた症例では3時間までの増加はむしろ緩徐で、3時間以後に急激な増加を示す傾向が見られた。個々のアミノ酸濃度の変動についても、健康者の精液における変動と比べ、無精子症例を含めた不妊症患者の精液および精管結紮術後の症例の精液における変動では多少とも差異があると思われる結果を得た。

尚、本論文の要旨の一部は第16回日本不妊学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、御校閲をいただいた赤坂裕教授ならびに御指導をいただいた今村一男助教授に厚く御礼申

上げます。また、アミノ酸分析に多大な御助力をいただいた本大学中央化学研究所長、佐藤永雄教授に心から謝意を表します。

文 献

- 1) Abraham, K.A. and Bhargava, P.M.: *Biochem. J.*, **86**, 308, 1963.
- 2) Adam, W. and Korting, G.W.: *Dtsch. Med. Wschr.*, **80**, 249, 1955.
- 3) Anderson, W.R. and Flipse, R.J.: *J. Dairy Sci.*, **48**, 805, 1965.
- 4) Benson, J.V. Jr., Gordon, M.J. and Patterson, J.A.: *Anal. Biochem.*, **18**, 228, 1967.
- 5) Bhargava, P.M.: *Nature*, **179**, 1120, 1957.
- 6) Bhargava, P.M., Bishop, M.W.H. and Work, T.S.: *Biochem. J.*, **73**, 247, 1959.
- 7) Busby, W.F. Jr., Hele, P. and Chang, M.C.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **330**, 246, 1974.
- 8) Christensen, H.N., Decker, D.G., Lynch, E.L., Mackenzie, T.M. and Power, J.H.: *J. Clin. Invest.*, **26**, 853, 1947.
- 9) Dietz, R.W. and Flipse, R.J.: *J. Dairy Sci.*, **48**, 806, 1965.
- 10) Dietz, R.W. and Flipse, R.J.: *J. Dairy Sci.*, **49**, 85, 1966.
- 11) Flipse, R.J.: *Science*, **124**, 228, 1956.
- 12) Flipse, R.J. and Almquist, J.O.: *J. Dairy Sci.*, **41**, 1787, 1958.
- 13) Flipse, R.J. and Anderson, W.R.: *J. Dairy Sci.*, **42**, 637, 1959.
- 14) Flipse, R.J.: *J. Dairy Sci.*, **43**, 773, 1960.
- 15) Flipse, R.J.: *J. Dairy Sci.*, **43**, 777, 1960.
- 16) Giese, A. and Wells, P.H.: *Science*, **115**, 239, 1952.
- 17) Hamilton, P.B. and Van Slyke, D.D.: *J. Biol. Chem.*, **150**, 231, 1943.
- 18) 波多野博行: アミノ酸自動分析法. 化学同人, 1964.
- 19) 久住治男, 宮崎公臣, 中務 紀: 日不妊会誌, **14**, 45, 1969.
- 20) Holt, L.E. Jr., Albanese, A.A., Schettles, L.B., Kajda, C. and Wangerin, D.M.: *Fed. Proc.*, **1**, 116, 1942.
- 21) 本田 岳: 日不妊会誌, **17**, 123, 1972.
- 22) 飯田 勲, 河合恒彦: 静大農報, **7**, 21, 1957.
- 23) 石神襄次, 谷村実一: 日不妊会誌, **10**, 219, 1965.
- 24) 石神襄次, 谷村実一, 上田巖夫, 長谷川注: 日泌尿会誌, **57**, 1010, 1966.
- 25) 石橋丸応: 外科の領域, **2**, 347, 1954.
- 26) Jacobsson, L.: *Acta. Physiol. Scand.*, **20**, 88, 1950.
- 27) Keller, Von M. and Pataki, G.: *Helvetica Chimica Acta*, **XLVI**, 1687, 1963.
- 28) Keutel, H.J. and Gabsch, H.CH.: *Urol. Int.*, **6**, 206, 1958.
- 29) 近藤常郎: 日泌尿会誌, **63**, 756, 1972.
- 30) Krampitz, G.: *Nature*, **194**, 684, 1962.
- 31) Kubicek, R., Lindner, E. and Santavy, F.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 1345, 1959.
- 32) Lorenz, F.W. and Tyler, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **78**, 57, 1951.
- 33) Lundquist, F.: *Acta. Physiol. Scand.*, **19**, 66, 1949.
- 34) Lundquist, F.: *Fed. Proc.*, **9**, 198, 1950.
- 35) Lundquist, F.: *Acta. Physiol. Scand.*, **25**, 178, 1952.
- 36) 巻野治男: 大阪大学医誌, **6**, 233, 1954.
- 37) Mann, T.: 精液の生化学, 三共出版, 1958.
- 38) Metz, C.B. and Donovan, J.E.: *Science*, **112**, 755, 1950.
- 39) 西浦延彦: 岐阜医紀要, **8**, 906, 1960.
- 40) Peters, J.H., Berridge, B.J. Jr., Cummings, J.G. and Lin, S.C.: *Anal. Biochem.*, **23**, 459, 1968.
- 41) Quatrini, U.: *Arch. Fisiol. (Firenze)*, **55**, 375, 1955.
- 42) 志田圭三, 浦野悦郎: 男子不妊症の臨床, 金原出版, 東京, 1967.
- 43) 清水博宣: 日不妊会誌, **2**, 29, 1957.
- 44) Smith, I.: *Chromatographic and Electrophoretic Techn.*, Interscience Publ. Inc. New York, **1**, 120, 1962.
- 45) Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S.: *Anal. Chem.*, **30**, 1190, 1958.
- 46) Stein, W.H. and Moore, S.: *J. Biol. Chem.*, **211**, 893, 1954.
- 47) 高橋美行: 日不妊会誌, **5**, 264, 1960.
- 48) 田中広見: 泌尿紀要, **11**, 592, 1965.
- 49) Tanimura, J.: *Bulletin of Osaka Medical School*, **13**, 76, 1967.
- 50) Totic, J. and Walton, A.: *Nature*, **156**, 507, 1945.
- 51) Totic, J. and Walton, A.: *Nature*, **158**, 485, 1946.
- 52) Totic, J. and Walton, A.: *J. Agr. Sci.*, **37**, 69, 1946.
- 53) Totic, J.: *Nature*, **159**, 544, 1947.
- 54) Totic, J. and Walton, A.: *Biochem. J.*, **47**, 199, 1950.
- 55) Totic, J.: *Symp. Biochem. Soc.*, **7**, 22, 1951.
- 56) Tyler, A. and Atkinson, E.: *Science*, **112**, 783, 1950.
- 57) Tyler, A. and Rothschild, L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76**, 52, 1951.
- 58) Tyler, A. and Tanabe, T.Y.: *Proc. Soc.*

Exp. Biol. Med., **81**, 367, 1952.

59) 吉田重雄：蛋白質・核酸・酵素, **12**, 1164, 1967.

60) 吉田英機, 近藤常郎, 今村一男, 甲斐祥生, 佐藤永雄, 飯島 武：日泌尿会誌, **63**, 878, 1972.

61) Wagner-Jauregg, Th.: *Hoppe-Seyler's Z.*

Physiol. Chem., **269**, 56, 1941.

62) Williams, W. and Pollak, J.: *Fertil. & Steril.*, **1**, 178, 1950.

(1974年6月4日受付, 特別掲載)