Split ejaculates の免疫電気泳動

—— 男子生殖器疾患の診断への応用について ——

西 村 泰 司

Division of Urology,
Baylor College of Medicine

David F. Mobley,

C. Eugene Carlton, Jr.

IMMUNOELECTROPHORESIS OF THE SPLIT EJACULATES: CLINICAL APPLICATION FOR THE DIAGNOSIS OF MALE REPRODUCTIVE ORGAN DISEASES

Taiji Nishimura*, David F. Mobley and C. Eugene Carlton, Jr.

Division of Urology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, U.S.A.

As a preliminary investigation for the clinical application of immunoelectrophoresis (IE) of ejaculate in the diagnosis of male reproductive organ diseases, variations of immunoelectrophoretic pattern in normals due to the difference of antigenicity between split ejaculates was demonstrated with rabbit antisera. Fresh samples and antisera against them gave larger numbers of more intense precipitin lines than in stored samples. The precipitin lines developed by acid phosphatase was most remarkable between the first portion of ejaculate (F1) and the anti-F1, whereas the line caused by the protein from the seminal vesicle was most prominent between the remainder of the ejaculate following F1 (F2) and anti-F2. Although IE of the split ejaculates from 17 patients with the diagnosis of chronic prostatitis was performed, some abnormality was observed only in one case.

緒 言

ヒト精液および前立腺液の抗原性につき、免疫電気泳動法を用いて行つた研究の報告は過去にいくつかみられるが¹⁾、泳動パターンや抗原数は著者により異り、抗原の同定も完全にはなされていない。

Shulman ら²⁾は免疫電気泳動法により、human seminal plasma (HSP) 中に約12の抗原を認め、また Hekman ら³⁾は、血清成分による沈降線を除いた HSP のみに特異的な抗原は9つであると報告している。

一方前立腺炎や副睪丸炎などの男子生殖器疾患における HSP の免疫電気泳動についていくつかの報告⁴⁾⁻⁶⁾があるが、いずれの報告も異常な沈降線についての詳しい説明はなされていない。当然のことながら沈降線の異常を決定するにあたっては、沈降線の同定および正常における沈降線パターンの variation を知っておくことが不可欠である。

ところで精液の構成成分は1回の射精において継時的に各部分間で質的および量的に異なることが知られている。すなわち ejaculate のはじめの部分は主に前立腺由来であるのに対し、残りの部分は主に精囊腺由来とされている。

また精液採取後、冷凍保存する際は、精液全体よりも各部分ごとに分けて保存するほうがより安定であるとの報告⁷⁾がある。

以上のことから前立腺疾患の場合は精液全体よりも ejaculate のはじめの部分 (F1) の免疫電気泳動のほうが適切ではないかとの推測のもとに、著者らは正常人からの HSP および Split ejaculates の免疫電気泳動を行い、抗原性、泳動パターンの variation を検討したのち、慢性前立腺炎患者からの split ejaculates の免疫電気泳動を行い正常人と比較検討したので報告する。

* Research fellow from Department of Urology (Chairman: Prof. Hiroshi Kawai), Nippon Medical School, Tokyo, Japan

実験方法および研究対象

HSP および split ejaculates に対するウサギ抗血清は、正常人からの試料を用いて作製した。

HSP の場合は、プールした精液を1,500g にて15分間遠心しその上清を -20°C にて保存した。抗 HSP の作製は著者の経験⁷⁾にもとづき、1 ml の HSP を等量の Freund's Complete Adjuvant (FCA) と混合しウサギの foot pad に2週間おきに3回注射し、最終注射後7日目に同量の HSP のみを booster として静注しさらに1週間後心臓穿刺にて採血する方法を用いた。

一方 split ejaculates は、はじめの約0.5ml (F1) と F1 につづく残りの部分 (F2) の2つに分けて採取した。Liquefaction 後 ejaculates を 40000g にて30分間遠心⁸⁾したのちただちに免疫に使用した。抗 F1 または抗 F2 の作製は0.4ml の F1 または F2 を等量の生食水および0.8ml の FCA と混合しウサギに注射することにより行つた。免疫のスケジュールは抗 HSP 作製の場合と同様である。

免疫電気泳動は泳動用 plate として25mm×75mm のガラス板上に、濃度1.2%、厚さ1.5mm の agar layer を作製し、直径1mm の抗原用 well、長さ6.5cm の抗体用 trough を設け、well と trough 間の距離は4.1mm とした。原液のままの抗原3 μl を Tris-barbital 緩衝液 ($\mu=0.06$, pH 8.8) を用いて、1 mA/cm にて1.5時間泳動した。

泳動後100 μl の抗体を trough に注入し、24時間室温にて moist chamber 中に保存し水洗、乾燥後 amido black にて染色し写真にて記録した。

酸フォスファターゼの同定は、 α -naphthyl-phosphate 1 mg, diazo fast red TR 1 mg を含む10ml のクエン酸緩衝液 (0.09M, pH 4.8) 中に15分間浸す方法を用いた。

アルブミン, IgG および lactoferrin に対する抗血清は Behling Diagnostics (Somerville, N.J., U.S.A.) より購入した。

抗体のヒト血清による吸収は、等量のヒト血清を抗体に加えた後室温に1時間保ち、24時間 4°C で保存し、10,000g にて1時間遠心する方法を用いた。

正常人と比較検討した患者は、Ben Taub General Hospital (Houston, Texas)の泌尿器科外来にて慢性前立腺炎と診断された16歳より51歳までの平均年齢30.3歳の17名である。

実験結果

第1図は正常人における HSP および split ejaculates

第1図 上から順に

スライド1: 抗 HSP に対する HSP の免疫電気泳動

スライド2: 抗 HSP に対する F1 (上段) および F2 (下段) の免疫電気泳動

スライド3: 抗 F1 に対する F1 (上段) および F2 (下段) の免疫電気泳動

スライド4: 抗 F2 に対する F1 (上段) および F2 (下段) の免疫電気泳動

間の免疫電気泳動パターン variation を示したものであり、第2図はその模式図である。

プールし冷凍保存された HSP と抗 HSP 間の免疫電気泳動 (第1図, スライド1) で強い沈降線として認められる6, 8, 10に比し、他のスライド3および4では強い沈降線として認められる3, 4は比較的弱く、沈降線6, 8, 10が保存に対して比較的安定な抗原によることを示唆している。沈降線3は抗アルブミンによりアルブミン、沈降線4は酸フォスファターゼ染色により酸フォスファターゼ、また沈降線6は抗 lactoferrin により lactoferrin と同定された。

第2図 F 1 と抗 F 1 間または、F 2 と抗 F 2 間で観察された全沈降線の模式図

第3図 慢性前立腺炎の一症例において認められた沈降線10の微弱化（下段）上段は正常人

沈降線8は Hekman ら³⁾ の論文にある精囊腺由来の蛋白質による沈降線6に相当すると考えられるが、このことは、この沈降線が主に精囊腺由来とされているF 2 と抗 F 2 間（第1図，スライド4，下段）で最も強く、主に前立腺由来とされているF 1 と抗 F 1 間（第1図，スライド3，上段）で殆んど認められないこと、また前立腺液の免疫電気泳動では、たとえ抗 F 2 を使用しても、この沈降線が認められないことから裏づけられる。

一方前立腺由来とされている酸フォスファターゼによる沈降線はF 1 と抗 F 1 間で最も強く、F 2 と抗 F 2 間では比較的弱く認められた。

以上F 1 とF 2 のそれぞれの homologous な抗体に対する免疫電気泳動では、特に沈降線4，8において明らかな差を示しているが、これら沈降線パターンの違いは、抗 HSP を用いた際は、それ程著明でなく（第1図，スライド2，上段および下段）、抗 F 1 および抗 F 2 が互に特異的であることを示している。

次に、F 1 と抗 F 1 間、またはF 2 と抗 F 2 間では、

HSP と抗 HSP 間で殆んど認められなかつた minor components による沈降線1，2，11，12，13，14が認められ、このうち沈降線11は抗 IgG により IgG と同定された。

以上の抗体をヒト血清で吸収すると、沈降線6，8，10に関しては殆んど変化が認められなかつたが、その他の沈降線は多少なりとも微弱化の傾向がみられた。

最後に慢性前立腺炎と診断された17名の患者から採取した split ejaculates の免疫電気泳動を行い正常人の泳動パターンと慎重に比較検討したが、1例に沈降線10の微弱化がみられた以外は異常なパターンは認められなかつた。

また足の浮腫および腹水など炎症部位の体液の免疫電気泳動において、アルブミンの移動度が正常に比し速いとの報告⁹⁾があるので、患者および正常人のアルブミンの移動度を比較検討したが、両者間に差異は認められなかつた。

考 按

免疫電気泳動を臨床に応用するにあたっては、泳動パ

ターンの variation を生じせしめる諸因子, すなわち試料の新鮮度, 泳動に用いる抗原および抗体の量, 抗体価などを含めた泳動条件を一定にすることが不可欠であるが, 著者らの実験において, 上記の因子による variation の他に, HSP および split ejaculates の抗原性の差に起因する以下の variation が認められた。

すなわち前立腺由来の酸フォスファターゼによる沈降線は F 1 と抗 F 1 間で最も強く, F 2 と抗 F 2 間では比較的弱く認められた。一方精囊腺由来の蛋白による沈降線 8 は F 2 と抗 F 2 間で著明であり, F 1 抗 F 1 間では殆んど認められなかつた。この実験結果は射精に際し前立腺, 精囊腺の順に分泌が惹起されるという Lundquist¹⁰⁾ の報告と一致すると同時に, Hekman ら⁹⁾ が前立腺および精囊腺の臓器抽出物を用いて行つた沈降線の同定をより生理学的方法で裏づけることができたと考ええる。

次に HSP と抗 HSP の免疫電気泳動でアルブミンと酸フォスファターゼによる沈降線が薄いこと, ならびに F 1 と抗 F 1 間および F 2 と抗 F 2 間でより多くの沈降線が観察されるなどの variation が認められたが, これら HSP と split ejaculates 間の差異は, Shulman ら⁶⁾ のいう精液を split ejaculation 法により分けて採取保し保存の際にみられる試料の安定性によることが示唆される。

いづれにせよ前立腺疾患の場合は, 主に前立腺由来とされる F 1 の検索が適切と考えられるし, 用いる抗体も, 抗 HSP より抗 F 1 の方が免疫電気泳動における F 1 の反応を増幅して観察できる点でこのまじいと思われる。

最後にこれら抗 F 1 および抗 F 2 は split ejaculates の種々の研究において, 前立腺や精囊腺由来の構成成分の割合を総合的に把握できるという点で有用であると考ええる。

結 論

男子生殖器疾患の診断における精液の免疫電気泳動の利用価値を検討すべく, 正常における泳動パターンの variation を検索した。

その結果冷凍保存した HSP, 新鮮な split ejaculates である F 1 および F 2 の抗原性の差による variation が以下の如く認められた。

- 1) HSP と抗 HSP 間ではアルブミンと酸フォスファターゼによる沈降線が比較的弱く認められた。
- 2) 酸フォスファターゼによる沈降線は主に前立腺由来とされている F 1 と抗 F 1 間で最も強く, 精囊腺由来の蛋白による沈降線は主に精囊腺由来とされている F 2 と抗 F 2 間で最も強く認められた。
- 3) HSP と抗 HSP 間より F 1 と抗 F 1 間および, F 2 と抗 F 2 間においてより多くの沈降線が認められた。

慢性前立腺炎と診断された 17 名の患者より採取した split ejaculates の免疫電気泳動を行つた結果, 1 名において沈降線 10 の微弱化が認められた以外に著しい変化は認められなかつた。

文 献

- 1) Shulman, S.: In Immunology and Reproduction, Edwards, R.G., p. 111, International Publications, New York, 1968.
- 2) Shulman, S. and Bronson, P.: J. Reprod. Fert., **18**, 481, 1969.
- 3) Hekman, A. and Rümke, P.: Fertil. Steril., **20**, 1969.
- 4) Searcy, R.L. and Craig, R.G.: Clin. Res., **9**, 241, 1961.
- 5) Blenk, H., Hofstetter, A., Bowering, R., Butler, R., Hartmann, M. and Marx, F.J.: Münch. med. Wsch., **116**, 35, 1974.
- 6) Shulman, S. and Bronson, P.: Fertil. Steril., **19**, 549, 1968.
- 7) Nishimura, T., Kogo, T., Yokomuro, K., Kimura, Y., Kajita, A. and Shukuya, R.: FEBS Letters, **36**, 1, 1973.
- 8) Jecht, E.W. and Poon, C.H.: Fertil. Steril., **26**, 1, 1975.
- 9) Bogdanikowa, B. and Grabowski, R.: Clin. Chim. Acta, **36**, 351, 1972.
- 10) Lundquist, F.: Acta Physiol. Scand., **19** (Suppl. 66), 1949.

(1977年1月17日受付, 特別掲載)