Ethylcysteine による精液中 reactive oxygen species の in vivo での抑制効果に関する検討

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 公文裕巳教授)

秋 山 道 之 進

IN VIVO SCAVENGING EFFECT OF ETHYLCYSTEINE
ON REACTIVE OXYGEN SPECIES IN HUMAN SEMEN

Michinoshin Akiyama

Department of Urology, School of Medicine, Okayama University

(Director: Prof. H. Kumon)

(Purpose) The production of reactive oxygen species (ROS) is a normal physiological event in various organs including the testis. Overproduction of ROS, however, can be detrimental to sperm, being associated with male infertility. *In vivo* experiments using vitamin E (Vit. E), one of the major membrane protectants against ROS and lipid peroxidation, have shown its significant potential in treating ROS-associated male infertility. There has been no study that the scavenging drugs reduce the level of ROS in human semen. Previously we reported the *in vitro* scavenging effectiveness of ethylcysteine (EC) against ROS in human semen. The present study was performed in order to determine the effectiveness of the *in vivo* administration of EC as treatment for ROS-associated male infertility.

(Patients and Methods) Ten cases of male infertility, with the exceptions of azoospermia and pyospermia, were chosen. Patients were divided randomly into two groups. Each group received either 600 mg/day of EC (Group A) or Vit. E 600 mg/day (Group B) for 3 months. Then, after a 1-month wash-out period, the patients were switched to another treatment. Conventional semen analysis, computerized motility assessment, measurement of ROS generation and sperm function assessment by triple stain were performed before and after administration of EC and Vit. E. The levels of EC and Vit. E were also assessed in patients' blood serum and seminal plasma before and after administration of EC and Vit. E.

(Results) Sperm density and sperm motility did not improve but sperm function had a significant tendency toward improvement after administration of EC and Vit. E. ROS levels significantly decreased only after administration of EC. After administration of EC and Vit. E, their levels significantly increased in patients' blood serum but were unchanged in patients' seminal plasma.

(Conclusion) Since our study showed that oral administration of EC produced results similar to those of Vit. E, we conclude that EC is an effective treatment agent for ROS-associated male infertility.

Key words: idiopathic male infertility, reactive oxygen species, ethylcysteine

要旨: (目的) 精液中の ROS が過剰に産生されると、男性不妊症の原因になることが示されている。我々は scavenger として直接 ROS 値を低下させる新しい方法として、ethylcysteine (EC) に注目した。その *in vitro* での ROS 値抑制効果に関しては既に報告した。本研究では、その *in vivo* での有効性を検討した。

(方法) 無精子症および膿精液症を除く男性不妊症患者 10 例を対象とし、これらの患者を無作為に 2

群に分けた。EC と Vit. E の cross-over study とした。すなわち A 群には EC 600 mg/日、B 群には Vit. E 600 mg/日を 3 カ月間投与し、1 カ月の休薬期間ののち、投与薬物を入れ替えた。EC および Vit. E の投与前後において精液検査、精子自動解析装置によるパラメーターの測定、ROS 値測定、精子受精能の指標として Triple Stain を施行した。また EC および Vit. E 投与前後で、各々の血漿中および精漿中の薬物濃度も測定した。

(結果) EC 投与後においてのみ、精液中 ROS 値は有意に低下を認めた。精子の受精能は、EC および Vit. E 投与前後でともに有意に改善した。精子濃度および運動率は、EC、Vit. E 投与前後で変化を認めなかった。EC および Vit. E の薬物濃度は、血漿中では投与後に有意な上昇を認めたが、精漿中では不変であった。

(結論) EC は、精液中の ROS 値の上昇を認める男性不妊症患者に対して有用であると考えられた。

キーワード：特発性男性不妊症、活性酸素、エチルシステイン

緒 言

特発性男性不妊症の成因に関する研究は、これまでに種々なされているが、いまだ解明されておらず、このため有効な治療法は見いだせていないのが現状である¹⁾。近年、産婦人科領域にて assisted reproductive technology (以下 ART と略す) が著しく進歩しており、特発性男性不妊症に対する泌尿器科的治療の必要性は低下したかにみえる。しかし、特発性男性不妊症の成因に関する研究を進めることにより、泌尿器科的に治療可能な不妊症の範疇を少しでも拡大し、出来る限り自然妊娠を目指してゆくことが、泌尿器科医の役割として重要であることに変わりはないものと考ええる。最近精子機能障害の原因の一つとして、精液中の活性酸素 reactive oxygen species (以下 ROS と略す) の上昇が注目され、数々の検討が加えられている^{2)~6)}。精液中の ROS は、精子の細胞膜の脂質過酸化反応を惹起し、精子の運動率や受精能の低下をきたし、男性不妊症の原因になることが判ってきた^{4)~6)}。ROS による精子機能障害を抑制する薬物としては、これまでに vitamin E (以下 Vit. E と略す) や glutathione などが報告されているが^{7)~11)}、これらの薬物は内服では精液中の ROS 値を低下させる機能は認められず、antioxidant として作用するものである。そこで我々は、scavenger として直接 ROS 値を低下させる新しい方法として、還元作用を有し、内服の喀痰溶解剤として古くから用いられ安全性の確立している ethylcysteine (以下 EC と略す) に注目した。EC の in vitro での ROS 値抑制効果に関しては既に報告した¹²⁾。そこで今回は、その in vivo での有効性を検討する目的で、以下の臨床研究を計画した。

対象・方法

1. 対象

1996 年 4 月から 1997 年 3 月までに当科の不妊外来

を受診した患者のうち、無精子症を除き、かつ peroxylase test で膿精液症(精液 1 ml 中に peroxylase 陽性の白血球が 1×10^6 以上認められるもの)を除外した患者のうち、精液中の ROS 値が 5×10^4 counts/ 10^7 viable spermatozoa 以上(正常値は 5×10^4 counts/ 10^7 viable spermatozoa 未満¹²⁾)に上昇を認めた特発性男性不妊症患者 10 例を対象とした。対象患者には、今回の使用薬物および方法に関して詳細に説明ののち、全例文書による informed consent を得た。これら 10 例を無作為に 2 群に割り付けた(A 群、B 群)。A 群 5 例の年齢は 24~49 歳、平均 35.6 歳、B 群 5 例の年齢は 30~37 歳、平均 33.0 歳であった。

2. 方法

EC と Vit. E の cross-over study とした。すなわち、A 群にはまず 3 カ月間 EC 600 mg/day を投与し、1 カ月間の wash out 期間の後、3 カ月間 Vit. E 600 mg/day を投与した。これに対して、B 群にはまず 3 カ月間 Vit. E 600 mg/day を投与し、1 カ月間の wash out 期間の後、3 カ月間 EC 600 mg/day を投与した。なお男性不妊症に対して投与中の薬物がある場合は中止し、その際は 1 カ月間の wash out 期間を設けた。

A 群、B 群それぞれにおいて EC および Vit. E 投与前後で、精液検査、精子自動解析装置(Motility Analyzer HTM-IVOS)による各種パラメーターの測定、ROS 値測定、精子受精能の指標として Triple Stain¹³⁾を施行した。また EC および Vit. E 投与前後で、各々の血漿中および精漿中の薬物濃度も測定した。

精液は外来で用手法にて採取し、37℃ で 30 分間静置し液化後、Makler 計算盤上で、200 倍光学顕微鏡を用い、WHO の基準¹⁴⁾に従って各パラメーターを算定した。

精子自動解析装置による各種パラメーターに関しては、今回は頸管粘液および卵膜の貫通性と相関がある

Table 1 Sperm density in semen analysis

(A)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E	
	18.8 ± 13.4	20.1 ± 14.8	18.7 ± 10.3	17.9 ± 15.6	
(B)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E	
	19.5 ± 14.9	20.6 ± 15.3	19.8 ± 10.7	21.3 ± 13.2	
(A + B)		19.2 ± 14.1	20.3 ± 15.1	19.3 ± 10.5	19.5 ± 14.4

(mean ± S.D.) (× 10⁶/ml)

Table 2 Sperm motility in semen analysis

⟨A⟩	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	32.4 ± 26.7	40.9 ± 30.1	36.3 ± 23.9	42.8 ± 34.4
	N.S.		N.S.	
⟨B⟩	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	30.9 ± 23.8	38.8 ± 30.5	33.4 ± 20.1	39.0 ± 25.6
	N.S.		N.S.	
⟨A + B⟩	31.2 ± 25.6	39.1 ± 30.4	34.8 ± 22.0	40.5 ± 31.3
	N.S.		N.S.	

(mean ± S.D.) (%)

といわれている精子直進性の変化を検討した。精子直進性は、始点と終点の2点間直線速度を精子の全移動軌跡速度で除して%で算出した。

ROS 値は luminol に対する chemiluminescence 法として測定した²⁾。まず、精液 800 μ l に 2.4 ml の human tubal fluid¹⁵⁾ (以下 HTF と略す) を加え 300 $\times$ g, 10 分間遠沈し上清を取り除き精漿を除去した。これに 800 μ l の HTF を加えて攪拌後、40 μ l (4 nM) の luminol を加え再度攪拌ののち、サンプルを microtiter plate に入れ、MTP-reader (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Germany) にて chemiluminescent signal を 15 分間測定した。HTF のみのコントロールより得られた signal を差し引いた値を ROS 値とし、精子濃度を一定にした単位 counts/10⁷ viable spermatozoa を用いて表示した。

Triple Stain 法では、まず、精液 500 μ l にヒト血清アルブミン加 HTF 3 ml を加え 300 $\times$ g, 10 分間遠沈し上清を取り除き精漿を除去した。これに 500 μ l のヒト血清アルブミン加 HTF を加えて攪拌後、250 μ l ずつ 2 分割し、一方は先体反応を誘導するために、4 $^{\circ}$ C で 16 時間冷蔵庫内に静置し、他方はコントロールとして室温で 16 時間静置した。続いて 37 $^{\circ}$ C で 3 時間培養のの

ち、2% trypan blue 加 HTF を加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間培養し、HTF 1 ml を加えて 300 $\times$ g, 5 分間遠沈し上清を除去し洗浄した。これに 2.5% glutaraldehyde 溶液を加えて 37 $^{\circ}$ C で 20 分間培養し、HTF 1 ml を加えて 300 $\times$ g, 5 分間遠沈し、上清を除去し再度洗浄した。管底の pellet をスライドガラス上にマウントし、自然乾燥ののち、40 $^{\circ}$ C の 0.8% Bismark brown 液で 5 分間反応させた。最後に 0.8% rose Bengal 液で 30 分間染色した。上昇エタノール系列で脱水し、xylene で透徹、カバーガラスを載せ 1,000 倍油浸レンズで検鏡した。先体の後部が trypan blue で青染するものを死滅精子、Bismark brown で褐色に染まるのを生存精子と判定した。先体が rose Bengal でピンクに染まるのを先体反応誘導前精子、染色されずに透明にぬけるものを先体反応誘導後精子と判定した。先体反応誘導後およびコントロールの各々において精子を 400 個カウントし、生存かつ先体反応誘導後精子の占める割合を百分率で示し、生存・先体反応誘導後精子率とした。また先体反応誘導後の生存・先体反応誘導後精子率からコントロールの生存・先体反応誘導後精子率を引いた値を、生存・先体反応誘導後精子誘導率とした。

血漿中および精漿中の薬物濃度の測定に関してであ

Table 3 Sperm linearity by Motility Analyzer HTM-IVOS

(A)		preEC	postEC		preVit. E	postVit. E	
		32.3 ± 32.3	35.3 ± 35.4		29.8 ± 30.6	33.4 ± 36.1	
		[N.S.]			[N.S.]		
	[N.S.]			[N.S.]			[N.S.]
(B)		preEC	postEC		preVit. E	postVit. E	
		31.5 ± 30.3	32.6 ± 36.6		28.0 ± 36.8	30.7 ± 40.1	
		[N.S.]			[N.S.]		
	[N.S.]			[N.S.]			[N.S.]
<hr/>							
(A + B)		31.9 ± 31.3	33.9 ± 36.0		28.8 ± 33.5	32.1 ± 38.2	
		[N.S.]			[N.S.]		
<hr/>							
(mean ± S.D.) (%)							

Table 4 ROS levels

⟨A⟩	preEC		postEC		preVit. E		postVit. E	
	530.9 ± 608.9		263.8 ± 336.7		581.7 ± 597.5		490.1 ± 560.6	
	└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘	
	[N.S.]		[N.S.]		[N.S.]		[N.S.]	
⟨B⟩	preEC		postEC		preVit. E		postVit. E	
	612.2 ± 1090.5		356.1 ± 493.8		657.9 ± 1031.0		601.4 ± 885.3	
	└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘	
	[N.S.]		[N.S.]		[N.S.]		[N.S.]	
⟨A + B⟩	560.7 ± 855.4		304.8 ± 423.1		613.5 ± 849.0		532.3 ± 772.6	
	└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘		└─┬─┘	
	[p<0.05]		[p<0.05]		[N.S.]		[N.S.]	

(mean ± S.D.) (× 10⁴ counts/10⁷ viable spermatozoa)

るが、Vit. E の薬物濃度の測定の際は、静脈血および精液を 800×g で 10 分間遠沈し、各々の上清を採取した。EC の薬物濃度の測定の際は、静脈血および精液に 5 % sulphosalicylate を加えて、800×g で 10 分間遠沈し、除タンパクののち各々の上清を採取した。これらの検体を用いて高速液体クロマトグラフィー法により、薬物濃度を測定した。血漿中の Vit. E は、μ mol α-tocopherol/mmol cholesterol で表現し、精漿中の Vit. E は μ mol α-tocopherol で表現した。また EC の薬物濃度に関しては、血漿中および精漿中ともに nmol/0.1 ml で表現した。

なお、有意差検定には Wilcoxon signed rank test を用いた。

結 果

1. 精液検査成績

① 精子濃度

精子濃度に関しては、両群ともに EC および Vit. E 投与前後において有意な変化は認められなかった。両群間で精子濃度に有意差は認められず、両群を合わせた 10 例で検討してみたが、やはり有意差は認められなかった (Table 1)。

② 運動率

運動率に関しては、両群ともに EC および Vit. E 投与前後において、有意差は認められなかった。また投与順序による明らかな差は認められず、両薬物投与間の 1 カ月の休薬期間で wash out しえたと思われた。運動率に関しても両群を合わせた 10 例で検討してみたが、EC および Vit. E 投与前後において有意差は認められなかった (Table 2)。

2. 精子直進性

精子直進性に関しては、両群ともに EC および Vit. E 投与前後において有意な変化は認められなかった。両群を合わせた 10 例で検討してみても、EC および Vit. E 投与前後において有意差は認められなかった (Table 3)。

3. ROS 値

ROS 値に関しては、Vit. E 投与前後では不変であった。EC 投与前後では、改善傾向を認めるものの有意差は認められなかった。しかし両群を合わせた 10 例で検討してみたところ、EC 投与後に ROS 値の低下に有意差が認められた (Table 4)。これは各群毎では、症例数が少ないために有意差が出なかったものと思われた。

4. Triple Stain

① 先体反応誘導後の生存・先体反応誘導後精子率

Table 5 Percentage of live, acrosome-reacted sperm after induction of acrosome reaction

(A)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	12.0 ± 10.6	20.3 ± 13.5	16.8 ± 10.3	22.5 ± 15.8
	N.S.		N.S.	
(B)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	14.1 ± 8.5	21.9 ± 13.2	15.4 ± 9.7	20.9 ± 7.7
	N.S.		N.S.	
(A + B)	12.7 ± 9.8	20.9 ± 13.4	15.9 ± 10.1	21.5 ± 12.2
	p<0.05		p<0.05	

(mean ± S.D.) (%)

Table 6 Inducibility of live, acrosome-reacted sperm after induction of acrosome reaction

(A)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	4.7 ± 2.4	7.9 ± 5.6	5.5 ± 4.0	8.7 ± 6.3
	N.S.		N.S.	
(B)	preEC	postEC	preVit. E	postVit. E
	6.3 ± 3.6	10.2 ± 6.8	4.2 ± 2.8	8.1 ± 4.2
	N.S.		N.S.	
(A + B)	5.5 ± 3.1	9.1 ± 6.3	4.8 ± 3.5	8.4 ± 5.3
	p<0.05		p<0.05	

(mean ± S.D.) (%)

先体反応誘導後の生存・先体反応誘導後精子率は、両群ともに EC および Vit. E 投与後、改善傾向を認めるものの有意差は認められなかった。しかし ROS 値同様に両群を合わせた 10 例で検討したところ、EC および Vit. E 投与後ともに有意な改善が認められた (Table 5)。

② 生存・先体反応誘導後精子誘導率

生存・先体反応誘導後精子誘導率も両群ともに EC および Vit. E 投与後、改善傾向を認めるものの有意差は認められなかった。しかし両群を合わせた 10 例で検討したところ、EC および Vit. E 投与後ともに有意な改善が認められた (Table 6)。

5. 薬物濃度

① 血漿中の薬物濃度

血漿中の薬物濃度は、両群ともに EC および Vit. E 投与後、有意な上昇を認めた (Table 7)。

② 精漿中の薬物濃度

精漿中の EC 薬物濃度に関しては、両群とも投与前後ともに測定限界以下で、Vit. E では投与前後におい

て有意な変化は認められなかった (Table 8)。

考 察

精液中の ROS 値の上昇が男性不妊症患者において認められることが示されてより³⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、ROS による精子機能障害に関する研究が進められてきた。Aitken ら¹⁸⁾は、ROS が精子自体でも少量ながら産生され、精子の先体反応を惹起する作用をもつことを示しており、その生理的意義も検討されつつあるが、白血球の存在や過度の oxidative stress で精液中の ROS 値が生理的範囲を越えて上昇すると、精子の細胞膜の脂質過酸化反応を引き起こし、精子の運動率や受精能の低下をきたし、男性不妊症の原因になることが Aitken ら⁴⁾、Alvarez ら¹⁹⁾により明らかにされており、このため特発性男性不妊症患者において、ROS 上昇がその etiology の一つとして注目されている。

ROS 産生の最も上流に superoxide anion が存在し、これが superoxide dismutase により hydrogen peroxide となり、さらに遷移金属とともにフェントン反応によって、非常に毒性の高い hydroxyl radical へと変

Table 7 Levels of EC and Vit. E in blood serum

⟨A⟩	preEC N.D.	postEC 1.62 ± 0.58		preVit. E 3.25 ± 1.47	postVit. E 5.21 ± 1.90
		$p < 0.05$		$p < 0.05$	
			N.S.		N.S.
⟨B⟩	preEC N.D.	postEC 1.73 ± 0.61		preVit. E 4.41 ± 1.53	postVit. E 6.54 ± 2.38
		$p < 0.05$		$p < 0.05$	
⟨A + B⟩	N.D.	1.68 ± 0.60		3.74 ± 1.51	5.73 ± 2.25
		$p < 0.05$		$p < 0.05$	

(mean ± S.D.) (EC : n mol/0.1ml, Vit. E : μ mol α-tocopherol/m mol cholesterol)

Table 8 Levels of EC and Vit. E in seminal plasma

⟨A⟩	preEC N.D.	postEC N.D.		preVit. E 0.43 ± 0.21	postVit. E 0.46 ± 0.35
				$p < 0.05$	
			N.S.		N.S.
⟨B⟩	preEC N.D.	postEC N.D.		preVit. E 0.51 ± 0.39	postVit. E 0.52 ± 0.47
				$p < 0.05$	
⟨A + B⟩	N.D.	N.D.		0.47 ± 0.32	0.48 ± 0.42
				$p < 0.05$	

(mean ± S.D.) (EC : n mol/0.1ml, Vit. E : μ mol α-tocopherol)

化する。これらが何らかの oxidative stress により過剰になるわけであるが、今回我々は、ROS 値測定の chemiluminescent probe として非特異的 reagent である luminol を用いた。McKinney ら²⁰⁾が述べているように、luminol を用いて ROS 値測定をすれば superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical の総量を ROS 値として測定したことになる。superoxide anion に特異的な reagent である lucigenin²⁰⁾を用いて ROS 値を測定する方法もあるが、Aitken ら⁵⁾によれば superoxide anion よりも hydrogen peroxide の方が、精子機能障害に関与していると考えられており、superoxide anion に特異的な reagent である lucigenin を用いて ROS 値測定をするよりも、hydrogen peroxide や更に細胞膜障害性の強い hydroxyl radical を含めた総量を ROS 値として測定する luminol を用いた方が、实际的であると考え、chemiluminescent probe として luminol を用いた。

ROS の scavenger として、生理的には精漿中に superoxide dismutase, glutathione peroxidase/reductase, catalase などが存在するが、男性不妊症患者ではこの scavenger の値が低下していることが最近 Alkan ら²¹⁾により明らかにされた。また、Aitken ら²⁾に

よれば、ART の際に種々の方法でより良い精子の回収を行うが、いずれの場合も遠沈が必要であり、この操作も ROS 値を上昇させることが判っている。このような理由により、男性不妊症患者において、ROS による精子機能障害を抑制する作用を有する薬物の必要性が高まっている。

これまでに ROS による精子機能障害を抑制する作用を有する薬物として、Vit. E や glutathione が報告されている^{7)~11)}。Vit. E は、脂溶性のラジカル捕捉型の antioxidant であり、ROS 値は不変であるが、生体膜の脂質過酸化反応とその拡大を防止することにより、作用する薬物である²²⁾。また glutathione は細胞内の主要な還元物質であり、生理的には scavenger として作用するが、経口投与では精液中の ROS 値は不変である¹⁰⁾。このため精液中の ROS 値を直接的に低下させる scavenger 作用を有する薬物の臨床応用が望ましい。我々は in vitro の検討において、還元作用を有する EC が精液中の ROS 値を時間および濃度依存性に有意に抑制することを既に示した¹²⁾。今回検討した in vivo での EC による精子機能の改善効果は、既に臨床効果の確立されている Vit. E と同程度であり、scavenger 作用を有し、精液中の ROS 値を低下させる薬物と

して臨床的有効性が十分に期待できることが確認された。

EC および Vit. E の体内動態に関しては、血漿中薬物濃度は有意に上昇したが、精漿中薬物濃度は測定限界以下もしくは不変であった。精漿中濃度が不変でありながら、薬物が精液中の精子に作用する機序に関しては、Kessopoulou ら¹¹⁾が推論している。すなわち、血漿中の薬物濃度が上昇すれば、その薬物は血液・精巣関門まで到達し、精細管の基底区域に達することになる。精細管の管腔側区域への輸送はセルトリ細胞を介する必要があるが、セルトリ細胞は造精細胞の増殖分化を助ける支持的な機能を有しており、antioxidant 機能を持つ Vit. E などの薬物は、セルトリ細胞を介して血液・精巣関門を越えて射出前の精細管内の精子に対して十分に作用可能であろうと述べている。ただし、血液・精巣関門を越える薬物の量はごく微量であり、このため精漿中薬物濃度は変化しないものと推論している。EC も scavenger として精子機能を改善させる薬物であり、Vit. E 同様に血液・精巣関門を越えて射出前の精細管内の精子に対して十分に作用可能でありながら、その量がごく微量のため、精漿中薬物濃度は全く上昇しなかったものと考えられる。

今回の検討により、EC の精子機能の改善効果は Vit. E と同等であり、EC は scavenger として精液中 ROS 値を低下させる薬物として臨床的有効性が十分に期待できることが確認された。今後は EC および Vit. E の増量あるいは併用などによって、より有効に ROS による精子機能障害を抑制する方法を検討したいと考える。

結 語

1. EC 投与後において、精液中 ROS 値は有意に低下を認めた。Vit. E 投与前後においては、精液中 ROS 値の変化は認めなかった。

2. 精子の受精能に関しては、EC および Vit. E 投与前後でともに有意に改善した。

3. 精子濃度および運動率に関しては、EC、Vit. E 投与前後で変化を認めなかった。

4. EC および Vit. E の薬物濃度に関しては、血漿中では投与後に有意な上昇を認めたが、精漿中では不変であった。

5. EC は Vit. E と同等の臨床効果を示しており、精液中の ROS 値の上昇を認める男性不妊者患者に対して、EC は有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩

師大森弘之名誉教授ならびに公文裕巳教授に深謝する。また、直接御指導頂いた大枝忠史前講師ならびに永井 敦講師、そして実験に御協力頂いた湯川厚巳技官に深く感謝する。

なお、本論文の要旨は、第 86 回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) O'Donovan, P.A., Vandekerckhove, P., Lilford, R.J. and Hugher, E.: Treatment of male infertility: is it effective? Review and meta-analyses of published randomized controlled trials. *Hum. Reprod.*, **8**, 1209—1222, 1993.
- 2) Aitken, R.J. and Clarkson, J.S.: Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.*, **9**, 367—376, 1988.
- 3) Aitken, R.J.: The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int. J. Androl.*, **12**, 95—97, 1989.
- 4) Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S.: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.*, **40**, 183—197, 1989.
- 5) Aitken, R.J., Buckingham, D. and Harkiss, D.: Use of a xanthin oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **97**, 441—450, 1993.
- 6) Aitken, R.J.: Mechanisms and prevention of lipid peroxidation in human spermatozoa. In: Fenichel, P. and Parinaud, J. (eds), *Human sperm acrosome reaction*. Vol.236, p 339—353, 1995.
- 7) Lenzi, A., Lombardo, F., Gandini, L., Culasso, F. and Dondero, F.: Glutathione therapy for male infertility. *Arch. Androl.*, **29**, 65—68, 1992.
- 8) Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., Lombardo, F. and Dondero, F.: Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum. Reprod.*, **8**, 1657—1662, 1993.
- 9) Griveau, J.F. and Le Lannou, D.L.: Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int. J. Androl.*, **17**, 225—231, 1994.
- 10) Brzezinska-Slebodzinska, E., Slebozinski, A.B., Pietras, B. and Wiczorok, G.: Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol. Tr. El. Res.*, **47**, 69—74, 1995.
- 11) Kessopoulou, E., Russell, J.M., Powers, H.J., Cooke, I.D., Sharma, K.K., Barratt, C.L.R. and Pearson, M. J.: A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to

- treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil. Steril.*, **64**, 825—831, 1995.
- 12) 秋山道之進, 永井 敦, 秋山博伸, 大枝忠史, 大森弘之 : Ethylcysteine による精液中 reactive oxygen species の in vitro での抑制効果について. *日不妊会誌*, **43**, 13—16, 1998.
 - 13) Talbot, P. : A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.*, **215**, 201—208, 1981.
 - 14) World Health Organization : WHO laboratory manual for the examination of human and seminal-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
 - 15) Quinn, P., Kerin, J.F. and Warnes, G.M. : Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil. Steril.*, **44**, 493—498, 1985.
 - 16) Mortimer, D. : Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, **6**, 173—176, 1991.
 - 17) Ochsendorf, F.R., Thiele, J., Fuchs, J., Schutau, H., Freileben, H.J., Buslau, M. and Milbradt, R. : Chemiluminescence in sperm of infertile men. *Andrologia*, **26**, 289—293, 1994.
 - 18) Aitken, J. and Fisher, H. : Reactive oxygen species generation and human spermatozoa : The balance of benefit and risk. *BioEssays*, **16**, 259—267, 1994.
 - 19) Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T. : Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Androl.*, **8**, 338—348, 1987.
 - 20) McKinney, K.A., Lewis, S.E. and Thompson, W. : Reactive oxygen species generation in human sperm : luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Arch. Androl.*, **36**, 119—125, 1996.
 - 21) Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G., Kervancioglu, E., Ozveri, H., Yalcin, S. and Akdas, J. : Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility : Relationship to seminal plasma antioxidants. *J. Urol.*, **157**, 140—143, 1997.
 - 22) Niki, E. : Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **34**, 507—512, 1988.

(1998 年 6 月 19 日受付, 11 月 9 日受理, 特別掲載)