

Mo (ppb)	79.78 ± 34.96	58.95 ± 20.56	71.74 ± 18.95	74.94 ± 39.52	b
Se (ppb)	565.76 ± 155.53	515.57 ± 151.52	617.39 ± 217.19	527.01 ± 80.79	b
I (ppb)	444.91 ± 459.47	407.26 ± 230.92	553.21 ± 596.80	1194.30 ± 1709.43	a
Li (ppb)	19.01 ± 15.48	8.98 ± 5.14	11.88 ± 5.49*	6.80 ± 3.55	b
V (ppb)	31.52 ± 19.82	24.75 ± 15.66	30.84 ± 10.28*	20.59 ± 11.34	b
Co (ppb)	28.36 ± 30.36	11.68 ± 5.78	15.60 ± 15.99	11.44 ± 6.57	a
Ge (ppb)	57.85 ± 8.08*	46.95 ± 2.49	58.97 ± 6.48	59.80 ± 7.96	b
Na (ppm)	100.17 ± 126.60	36.11 ± 24.81	49.82 ± 57.38	130.98 ± 260.51	a
K (ppm)	45.44 ± 19.99	27.84 ± 12.00	33.01 ± 16.93*	37.22 ± 35.00	c

Values are the means±standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P <0.05)

Analyze method: a, square root transformation and t-test; b, t-test; c, t`-test.

Table 4-2 Minerals content in the hair of patients and control

	serious patient n=8	mild patient n=16	control n=26	test
Be (ppb)	3.71 ± 4.21	10.51 ± 12.392*	3.32 ± 2.86	a
Al (ppm)	14.11 ± 6.62	18.12 ± 9.29	13.77 ± 9.07	b
Ni (ppb)	368.71 ± 366.48	579.42 ± 748.37	266.87 ± 380.77	a
As (ppb)	379.41 ± 248.85	558.94 ± 326.86*	344.62 ± 242.76	b
Cd (ppb)	76.58 ± 30.56	100.69 ± 83.25*	52.47 ± 39.56	b
Sn (ppb)	83.16 ± 50.02	246.74 ± 494.23	116.44 ± 171.83	a
Hg (ppm)	1.27 ± 0.41	1.58 ± 0.63	1.65 ± 0.94	b
Pb (ppm)	1.37 ± 0.39	2.15 ± 1.39	1.31 ± 1.16	b
Mg (ppm)	24.91 ± 21.43	10.55 ± 8.97	16.71 ± 14.09	a
P (ppm)	213.74 ± 29.08	198.19 ± 33.51	201.36 ± 34.80	a
Ca (ppm)	102.01 ± 77.27	63.19 ± 62.42	92.74 ± 63.39	b
Cr (ppb)	57.45 ± 45.55	80.78 ± 59.45	63.53 ± 56.02	b
Mn (ppm)	3.37 ± 4.3	2.35 ± 1.8	1.54 ± 1.87	a
Fe (ppm)	13.36 ± 4.26	18.58 ± 6.61*	13.74 ± 6.19	b
Cu (ppm)	8.62 ± 4.01	8.91 ± 1.89	8.31 ± 2.06	b
Zn (ppm)	152.47 ± 23.12	123.53 ± 44.12	134.95 ± 26.15	b
Mo (ppb)	71.3 ± 38.02	76.99 ± 19.58	68.79 ± 33.94	b
Se (ppb)	562.13 ± 120.81	612.75 ± 220.7	522.61 ± 110.51	b
I (ppb)	305.08 ± 243.94	625.38 ± 625.52	854.34 ± 1349.3	a
Li (ppb)	14.64 ± 14.5	14.95 ± 9.57*	7.67 ± 4.29	b
V (ppb)	29.13 ± 19.12	32.16 ± 11.68	22.19 ± 13.03	b
Co (ppb)	10.28 ± 4.78	24.53 ± 25.83*	11.54 ± 6.16	a
Ge (ppb)	57.72 ± 3.92	58.89 ± 8.26	54.86 ± 8.99	b
Na (ppm)	88.12 ± 139.77	62.14 ± 64.02	94.43 ± 207.73	a
K (ppm)	35.79 ± 20.86	39.38 ± 18.46	33.47 ± 28.12	b

Values are the means ± standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P < 0.05). Analysis method: a, square root transformation and Dunnett's multiple comparison; b, Dunnett's multiple comparison.

Table 5 Hormone status of female

	patient N=14			control N=15		
	normal	high	low menopause	normal	high	low menopause
	Menstrual phase			Menstrual phase		
LH	5	7	1	1	6	1
FSH	5	7	1	1	6	1
E2	5	7	1	1	7	6

Table 6 LH, FSH and E2 level after menopause of female

	patient n=7		control n=6	
LH (mIU/ml)	41.54 ± 15.42	26.01 ± 19.3		
FSH (mIU/ml)	80.24 ± 18.46	46.24 ± 36.77		
Estradiol (E2) (pg/ml)	11.81 ± 1.65	42.4 ± 43.47		
Age	56.29 ± 7.18	54.67 ± 6.89		
BMI	20.69 ± 1.99	22.23 ± 2.56		

Values are the means±standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P <0.05, T-test)

Table 7 **Hormone level of male**

	patient n=10	control n=10
LH (mIU/ml)	6.43 ± 2.81	7.85 ± 2.85
FSH (mIU/ml)	6.32 ± 1.93	8.53 ± 3.48
Testosterone(ng/ml)	6.59 ± 1.3*	5.25 ± 1.27
Age	44.80 ± 11.76	54.9 ± 10.6
BMI	20.71 ± 2.21	20.97 ± 1.99

Values are the means±standard deviations for each group. Asterisk indicate that the value was significantly different from the control (*P <0.05, T-test)

Table 8 元患者の残存自覚症状

	重症者(9)		軽症者(20)	
	n	%	n	%
記憶力減退	9	100	11	55
頭痛	4	44	8	40
眩暈	3	33	8	40
耳鳴	3	33	14	70
心悸亢進	3	33	5	25
胸内苦悶	2	22	5	25
聴力低下	2	22	6	30
倦怠	4	44	7	35
反応遅い	5	56	8	40
筋肉痛	3	33	8	40
四肢の痺れ感	3	33	5	25

Table 9 Data of five children

	F1	F2	F3	M1	M2
age	7	10	13	14	15
height(cm)	115	135	149	163	162
body					
weight(kg)	20	25	43	77	42
status	serious	mild	mild	mild	mild
Hb (g/dL)	9	10.5	8	8.5	12.5
RBC ($10^{12}/L$)	3.2	3.7	2.8	3	4.4
WBC ($10^9/L$)	6.5	4.2	4	3.9	4
N (%)	81	60	70	50	70
TBIL ($\mu\text{mol/L}$)	5.8	8	5.5	14.4	8
DBIL ($\mu\text{mol/L}$)	1.8	1.9	1.4	3.4	1.5
AST (IU/L)	27	22.3	29	23.1	24.6
ALT (IU/L)	19.5	14.3	36.3	19.3	26.1
TSH (uIU/ml)	2.69	4.2	2.04	2.06	2.95
Free					
T4(ng/dl)	1.25	1.25	1.26	1.05	1.15
LH (mIU/ml)	0.1	0.19	2.62	1.89	1.77
FSH (mIU/ml)	2.49	1.99	3.9	5.01	3.98
E2(pg/ml)	13.9	17.1	33.3		
		no	menstrual		
	no menstruation	menstruation	phase		
Testosterone				1.31	1.27
(ng/ml)					
Sn(ppb)	434.04	241.75	62.36	126.67	46.75
Be(ppb)	1.71	6.5	0.57	29.07	0.031
Al(ppm)	18.13	34.66	12.01	24.74	10.68
Ni(ppb)	360.57	253.06	472.8	929.98	101.68
As(ppb)	627.68	308.94	229.28	355.77	351.95
Cd(ppb)	73.89	80	36.96	1260.04	23.74
Hg(ppm)	2.38	1.11	1.26	1.17	1.3
Pb(ppm)	4.63	2	1.53	2.55	0.44
Mg(ppm)	4.72	4.25	9.74	13.49	9.55
P(ppm)	153.29	146.62	139.3	197.44	173.59
Ca(ppm)	42.27	27.54	35.91	85.53	30.25

Cr (ppb)	98.28	87.66	46.66	87.87	62.25
Mn (ppm)	0.46	2.52	0.47	9.79	0.22
Fe (ppm)	25.55	35.6	12.31	21.06	11.37
Cu (ppm)	9.43	8.18	10.02	12.62	7.18
Zn (ppm)	60.04	75.44	137.59	114.26	122.41
Mo (ppb)	67.82	104.52	78.7	109.51	57.14
Se (ppb)	845.46	540.8	337.71	538.96	668
I (ppb)	462.3	1288.27	180.16	2768.46	292.81
Li (ppb)	24.97	21.91	10.01	11.91	12.22
V (ppb)	41.41	71.73	18.75	43.05	18.36
Co (ppb)	11.11	24.16	8.01	115.65	5.56
Ge (ppb)	55.1	59.11	56.97	50.01	52.29
Na (ppm)	73.58	24.34	20.88	48.65	9.39
K (ppm)	45.91	24.37	10.29	28.98	9.16

残る症状	風邪を引きや すい、学習力低下	頭痛、記 憶力低下	頭痛、眩暈、足の痺れ
------	--------------------	--------------	------------

II-5. その他バイオマーカーに関する検討

那須民江、上島通浩、柴田英治、日比初紀、山野優子、
高木健次、市原 学、五藤雅博、内藤久雄、岡村 愛、
李チュルホ、上山 純、鈴木隆佳、斎藤 勲、Kim, Heon

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用
検出のための新たなバイオマーカーの開発
— 職域集団における生殖機能評価の指標に関する検討 —

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座
日比 初紀 みなと医療生活協同組合協立総合病院泌尿器科
山野 優子 昭和大学医学部衛生学教室
高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
市原 学 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

主任研究者

那須 民江 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

研究協力者

五藤 雅博 五藤労働衛生コンサルタント事務所
内藤 久雄 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
岡村 愛 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
李チュルホ 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
鈴木 隆佳 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻
斎藤 勲 東海コープ事業連合商品安全検査センター
Kim, Heon Department of Preventive Medicine, College of Medicine,
Chungbuk National University, Korea

研究要旨

平成 14-16 年度の 3 年間にわたり、職域集団を中心に生殖・次世代影響の有無の調査とともにバイオマーカー候補の検討を行ってきた。対照者群との間に有意差のみられたマーカーはごく一部であったが、これらについては曝露とマーカー候補の変動との関連の強さ、用量反応関係、関連の一貫性を確認する検証していくことが必要である。職域での曝露量が一般集団に近い水準まで下がりつつある現状をふまえると、生殖次世代影響の予防には、一般集団でも適用可能な高感度な曝露マーカー測定によるリスク管理が現実的であろう。

A. 研究目的

本研究では、化学物質への曝露を職業的に受ける職域で生殖・次世代影響の評価を行ってきた。職域におけるヒト集団を対象とした研究では、動物実験モデルに比べ曝露量が微少で、曝露以外の交絡要因が入るといった特徴に加え、調査研究を被験者となる方々の健康の保護、保持増進という視点と無関係に行うことはあり得ない。一方、臨床ではよく使われるバイオマーカーであっても、職域の年齢層が医療機関を受診する年齢層と異なる場合があるなど臨床と職域の集団は同等とみなせないことが少なくなく、医療機関で用いられる「正常値（標準値）」をそのまま職域の「正常値」としてよいとは限らない。こうした点を考慮し、本研究では、職域で曝露量を確実に把握し、交絡要因をできるだけ調整して曝露量の異なる集団間でバイオマーカーおよびその候補を比較することに重

点を置いた。以下に、検討した結果をまとめる。

B. 研究方法

本研究課題のうち、殺虫剤に曝露する職域で調査した結果を抜粋した。バイオマーカー候補を、曝露マーカー、影響マーカー、感受性マーカーに分けて整理した。同一の職域は同じ記号で示した。

C. 研究結果

結果を表に示した。曝露マーカーに関しては、職域 A-1 の調査において有機リン系殺虫剤へのマーカーである赤血球コリンエステラーゼ活性に、また、職域 B-1 の調査において尿中臭化物イオンの曝露群と対照群との差が有意であった。

影響マーカーについては、職域 A-1 において精液指標のうち緩徐な直進運動精子率および非直進運動精子率について有意差が見られ、職域 B-

1 では自覚症状有訴数に有意差があった。精巣容積は A-1 で対照職域に比較し小さい傾向がみられたが ($p=0.06$)、同じ職域の中に対照群をおいた A-2 では差がみられなかった。なお、表には示していないが、精子運動についてはジクロロボスを投与したラットで精子自動解析装置を用いて精子運動の詳細な指標についても解析した。しかし、顕微鏡下に目視で観察した運動精子率以上に群間の有意差を鋭敏に反映する指標はなかった。また、性ホルモンのうち、黄体形成ホルモンと卵胞刺激ホルモンについては、年齢に有意に回帰した (図)。

感受性マーカーについては、オキシソ型有機リン殺虫剤の分解酵素であるパラオキシナーゼ 1 (PON1) の多型を A-1 で検討した。現時点までの解析では酸化ストレス上昇との関連ははっきりしていない。

D. 考察

職域集団を対象とした調査研究では、特殊な場合を除き、比較を行った群間で「生殖次世代影響のあることが明らかな集団で既知のバイオマーカーというポジティブコントロールをおき、新しいバイオマーカー候補の有効性を比較検討する」というアプローチは通常はなりたない。すなわち、対象とする集団で影響の有無を知る探索的なアプローチをとらざるをえないため、すべての指標

で有意差がなかった場合には、バイオマーカー候補が既存のマーカーに比べ高感度でないのか、あるいは単に対象集団で影響が生じていないのかどちらかで、新たなマーカー候補の有効性が十分に検証されたかについてはよく吟味する必要がある。

A-1 の職域では緩徐な直進運動精子率および非直進運動精子率に有意差があったが、化学物質への曝露以外の交絡要因が原因である可能性が現時点では残っている。しかし、運動精子率全体としては有意差がなかったため、起こりうる影響を感度良く検出できるマーカーという点では、WHO 基準にしたがった詳細な精子運動性の解析は有効であると考えられる。また、B の職域では曝露群と対照群との間で有意差のある生殖次世代影響を検出しなかったが、標的臓器となることが既に知られている神経系をふくむ健康評価を並行して行ったところ、B-1 では自覚症状の訴えに差が見られた。B-2 の調査ではこの結果は再現されなかったが、少なくとも職域においては生殖影響のみにとらわれず、既知の毒性影響の有無についても評価することが健康管理という視点からは重要であることが示された。

E. 結論

本解析の範囲では、一般集団に比較し高い曝露を受けている職域集団

において、調査した範囲での曝露量では顕性の生殖次世代影響を見いださなかった。しかし、研究の一部では対照群との有意な差が検出されている項目があり、これが不顕性の影響であるか交絡要因によるものか、今後明らかにする必要がある。曝露とバイオマーカー候補の変動との関連の強さ、用量反応関係、関連の一貫性を確認することが必要である。

職場の労働衛生の向上を反映して職域での曝露量が一般集団に近い水準まで下がりつつある現状をふまえ

ると、生殖次世代影響の予防には、高感度な、すなわち職域だけでなく一般集団でも適用可能な曝露マーカー測定によるリスク管理が現実的であろう。食品中からの残留農薬の経口摂取や室内空気環境からの経気道暴露により多種類の混合曝露を受ける農薬類については特に、職域に加え一般集団も含むより大規模な生物学的曝露モニタリングが望ましいと考えられる。

表 バイオマーカー候補の測定結果 (平均±標準偏差. 群間で有意差($p<0.05$)のあるものは枠内を灰色で示した.)

	職域 A-1 ^a	A-1 対照 職域	職域 A-2 ^b 曝露	職域 A-2 ^b 非曝露	職域 A-3 曝露	職域 A-3 非曝露	職域 B-1 曝露	職域 B-1 非曝露	職域 B-2 曝露	職域 B-2 非曝露	泌尿器科 外来患者
n	15	16	28	6	78	20	22	12	8	30 (8°)	46
年齢	33.8±7.6	34.3±7.8	37.1±10.9	49.7±17.6	37.1 ±11.2	38.5 ±11.5	44.9 ±10.1	45.7 ±15.1	49.1 ±7.4	44.8 ±15.6°	40.2 ±12.7

曝露マーカー

総 DAP ^{de} (μg/l)	38.6±6.3	20.3±2.6	21.3±4.9	16.7±5.5	15.1±4.7	8.5±5.2	ND	ND	ND	ND	ND
E-CHE ^f (unit)	1.5±0.2 ^b	1.7±0.2 ^b	1.8±0.2 ^b	1.8±0.2 ^b	3.1 ±0.4 ⁱ	3.2 ±0.3 ⁱ	ND	ND	ND	ND	ND
P-CHE ^e (unit)	5.8±0.7 ^b	6.2±0.6 ^b	5.6±0.8 ^b	5.3±0.6 ^b	378.5 ±64.2 ^j	358.8 ±84.7 ^j	ND	ND	ND	ND	ND
尿中 Br (μg/mgCre)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.6 ±5.3	8.1 ±5.6	9.7 ±4.4	8.2 ±3.8	ND

影響マーカー

黄体形成ホル モン (mIU/ml)	3.2±1.1	2.9±1.5	3.5±1.7	5.9±3.7	ND	ND	5.1 ±2.1	3.5 ±1.9	5.6 ±2.5	5.6 ±4.0	ND
卵胞刺激ホル モン (mIU/ml)	6.2±3.2	4.9±2.8	5.7±3.9	10.6±12.7	ND	ND	6.5 ±3.9	6.9 ±4.3	6.7 ±3.0	11.8 ±13.8	ND
テストステロ ン (ng/dl)	500±133	445±139	505±149	476±156	ND	ND	570 ±195	504 ±195	5.3 ±1.6*	5.5 ±1.7*	ND

精巢容積 (左) (ml)	18.4 ±4.3	21.1 ±3.8	17.3±3.9	16.7±4.8	ND	ND	17.8 ±5.4	16.8 ±4.5	ND	ND	16.3±4.7
尿クレアチン ^a (mg/dl)	1.6±2.6	2.4±4.0	0.4±0.6	2.3±4.3	ND	ND	3.4 ±4.6	1.5 ±3.4	ND	ND	ND
前立腺体積 (ml)	ND	ND	14.4±4.1	14.9±3.2	ND	ND	14.7 ±6.2	15.6 ±1.9	ND	ND	ND
PSA ¹ (ng/ml)	ND	ND	1.2±1.2	0.75±0.26	ND	ND	1.2 ±0.9	1.0 ±0.4	0.8 ±0.5	0.9 ±0.3	ND
精子濃度	72.2 ±33.6	94.0 ±59.6	ND	ND	ND	ND	78.0 ±46.1 (n=6)	ND	122, 10 (n=2)	76 (n=1)	ND
精子運動性 (%)	15.6 ±7.1 ^a	8.8 ±2.8 ^a	ND	ND	ND	ND	50.9 ±13.9 ^a	ND	28 ^a , 64 ^a	49 ^a	
自覚症状 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.3 ±3.5	1.1 ±1.0	1.1 ±1.5	1.5 ±1.7	ND
神経伝導速度	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	有意差無し		ND

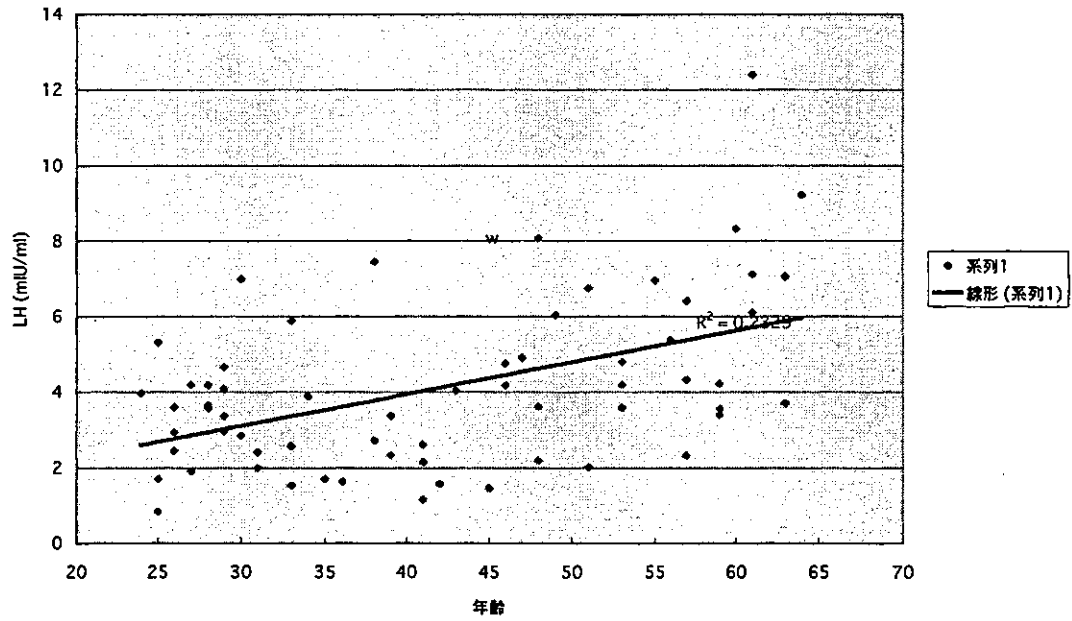
感受性マーカー

PON1 ^p	さらに検討が必要	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
-------------------	----------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

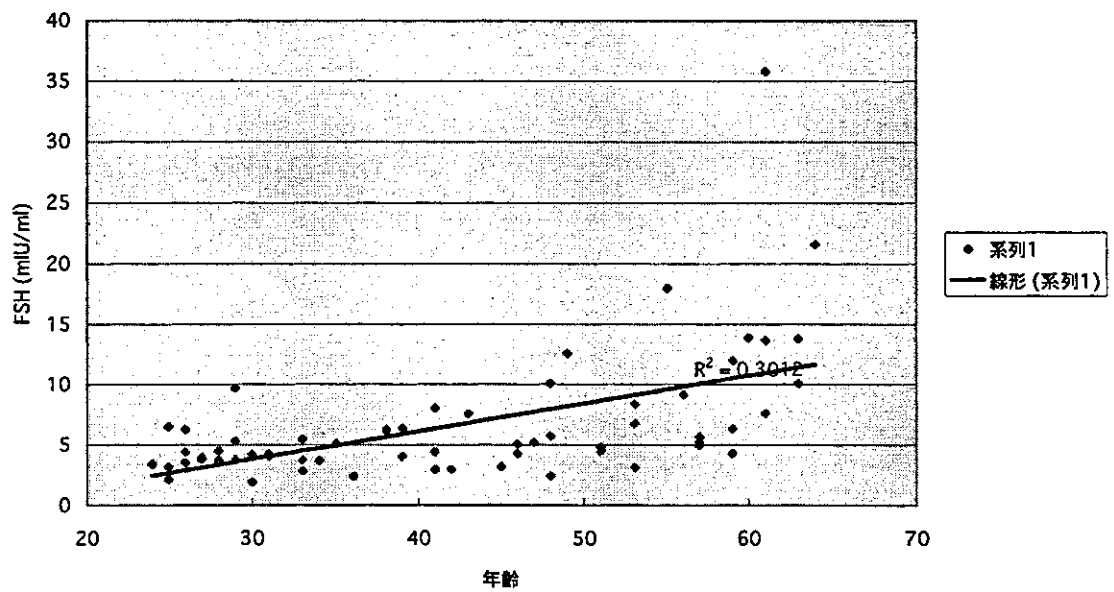
ND, 検討せず^a 繁忙期^b 閑散期^c 男性^d DAP, ジアルキルリン酸^e 幾何平均±幾何標準偏差^f E-ChE, 赤血球コリンエステラーゼ^g P-ChE, 血漿コリンエステラーゼ^h Routh 法ⁱ チオコリンエステラル DTNB 法^j Rate assay (血清、P-ヒドロキシベンゾイルコリン基質)^k ng/ml^l PSA, 前立腺特異抗原^m 緩徐な直進運動精子率ⁿ 高速直進運動精子率^o 訴えのあった項目数^p PON1, パラオキソナーゼ¹



年齢と黄体形成ホルモン



年齢と卵胞刺激ホルモン



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と
内分泌かく乱作用検出のための新たなバイオマーカーの開発

ー 男性生殖毒性バイオマーカーとしての
クレアチンキナーゼの有効性の検討 ー

研究協力者

王 海蘭 日本学術振興会外国人特別研究員（H16.4-8）・
日本食品衛生協会リサーチ・レジデント（H16.9-H17.3）

分担研究者

市原 学 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

主任研究者

那須 民江 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

研究要旨

クレアチンキナーゼ(CK)はアデノシン 3 リン酸(ATP)の γ 位のリン酸がクレアチンに転移する反応を触媒する酵素である。サブユニットには M 型(筋型)と B 型(脳型)の 2 種があり、二量体であるため、アイソザイム 3 種(MM, MB, BB)が電気泳動的に分離される。CK は神経毒性のバイオマーカーとしてよく使用されているが、今回の研究では生殖器影響のバイオマーカーとしての CK の利用可能性を検討した。Western Blot 方法では、CK を多量に含む組織のサンプルについては定量できるが、CK 量が少ない精巣上体から分離した精子サンプルの定量は難しい。酵素免疫法は Western Blot 法より感度が高く、精子中の CK-B、および精巣、精巣上体中の CK-B、CK-M が定量出来ることが明らかになった。その後、人間の精子の塗抹標本で免疫染色を行った。市販の抗体ではうまく染まらなかったが、発達障害研究所神経制御学部で精製した CK-B 抗体により精子の頭部を染めることができた。今回は定性的な評価にとどまっているが、CK-B の着色度で未成熟精子の割合を求め、男性生殖毒性の評価指標として使うことが出来るかもしれない。

A. 研究の目的

クレアチンキナーゼ (CK) はアデノシン 3 リン酸 (ATP) の γ 位のリン酸がクレアチンに転移する反応を触媒する酵素である。サブユニットには M 型 (筋型) と B 型 (脳型) の 2 種があり、二量体であるため、アイソザイム 3 種 (MM, MB, BB) が電気泳動的に分離される。生理的意義は、筋収縮などエネルギーの大量消費時、ホスホクレアチンを消費して ATP を供給することであろう。

化学物質の神経毒性を調べる時、CK はバイオマーカーとしてよく使用されている。私達が行った以前の研究では、1-ブロモプロパン (1-BP) 曝露によりラットの中樞神経組織中 (大脳、小脳、脳幹、脊髄) CK の活性と量が減少したことを明らかにしたが、この中では、1-BP がラットの生殖器に影響を及ぼすことも明らかになっている。今回の研究では生殖器影響のバイオマーカーとしての CK の利用可能性を検討した。

B. CK 量測定方法の検討

9 匹の Wistar 系雄ラットを断頭して精巣、精巣上体、精囊と前立腺を切り出し、重量を測定した。右精巣上体を使って、精子の運動率と精子数を測定した。残りの右精巣上体頭部、尾部の組織を冷たい NaH_2PO_4

Buffer (10 mM, pH 5.5) 15 ml に入れ細切し、氷上に 15 分置いた後上清を取った。この上清を 3000 rpm, 10 分間遠心し、ペレットを NaH_2PO_4 Buffer (10 mM, pH 5.5) で 1 回洗い、pH 6.8 NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 Buffer でもう 1 回洗い、最後のペレットは 0.5 ml pH 6.8 NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 Buffer 中で再懸濁し、 -80°C で保存した。

A: Western Blot 法による CK アイソザイム量の測定

精巣上体頭部、尾部、精巣、精囊と前立腺の膜を取り、各組織に 5 倍の NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 Buffer (pH 6.8) を加え、精子懸濁液に同じ量の 0.1% SDS を加え、ホモジナイズした。ホモジナイズ液を $800 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を SDS-PAGE (12.5% Acrylamides separating gel) で電気泳動し、ニトロセルロースに移し、市販の CK-B, CK-M, uMt-CK (ubiquitous mitochondrial creatine kinase) と sMt-CK (sarcomeric mitochondrial creatine kinase) 抗体を使って、免疫染色した。

結果は Figs 1~6 で示した。CK-B, CK-M, uMt-CK と sMt-CK 抗体、精巣上体頭部の精子原液 20 μl ではバンドは見つからなかった。CK-B と uMt-CK 抗体、精巣上体頭部の精子原液 30 μl でもバンドは出来なかった。

B: 酵素免疫法 (EIA, enzyme immunoassay) による CK アイソザイム量の測定

測定方法:

a). 測定組織の前処理

冷凍組織を凍ってる状態で潰して (液体窒素で器具を冷やした状態)、組織粉を凍結したままでチューブに分装し、使用部分だけ処理した。残った粉は-80℃で保存した。

凍結組織粉に、4℃の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA を含む) を組織重量の 5 倍 volume 量で加え、超音波破碎装置を用いて、氷浴しながらホモジナイズし、超遠心用チューブに入れ、45000 rpm (125000 ×g), 4℃, 20 分間遠心し、上清を採取した。

b). 蛋白濃度測定: Bio-Rad Protein Assay

c). EIA 測定

1. 第一反応:

標準抗原: CK-B (rat), CK-M (rat)

2. 第二反応

3. 翌日: 反応生成物である 4-MU を蛍光光度計 (起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm) で測定する (unit: ng/10 μl)。コンピューターによって、定量計算を行う。

この CK の測定系は愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所の加藤兼房先生達により開発され、今回神経制御学部の伊東秀記先生の協力で測定した。その結果、精巣上体から分

離した精子の CK-B の量は測定できたが、CK-M はほとんど検出されなかった。

以上の検討結果をまとめると、Western Blot 方法では、CK を多量に含む組織のサンプルについては定量できるが、CK 量が少ない精巣上体から分離した精子サンプルの定量は難しい。酵素免疫法は Western Blot 法より感度が高く、精子中の CK-B、および精巣、精巣上体中の CK-B, CK-M が定量出来ることが明らかになった。

C. CK-B による人間精子の塗抹

標本の免疫染色

CK-B は精子の頭部に存在し、精子の成熟と共に段々減少する。動物では未成熟精子の頭部には CK-B が濃く染められると報告されている (Theowallimann 1986; Gabor Huszar 1994)。私達は人間の精子の塗抹標本で、市販の CK-B 抗体と愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所神経制御学部で精製した CK-B 抗体を用いて免疫染色を行った。市販の抗体ではうまく染まらなかったが、発達障害研究所神経制御学部精製 CK-B 抗体により精子の頭部を染めることができた (Fig. 7)。今回は定性的な評価にとどまっているが、CK-B の着色度で未成熟精子の割合を求め、男性生殖毒性の評価指標として使うことが出来るかもしれない。

文献

1. Kato, K., Nakajima, T., Ishiguro, Y. and Matsutani, T. (1982). Sensitive enzyme immunoassay for S-100 protein:determination in human cerebrospinal fluid. *Biomed. Res* 3, 24-28.
2. Kato, K., Suzuki, F., Shimizu, A., Shinohara, H. and Semba, R. (1986). Highly sensitive immunoassay for rat brain-type creatine kinase: determination in isolated Purkinje cells. *J Neurochem* 46, 1783-8.
3. Kato, K., Suzuki, F. and Umeda, Y. (1981). Highly sensitive immunoassays for three forms of rat brain enolase. *J. Neurochem* 36, 793-797.
4. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. (1994) Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril*. 1994 Jan;61(1):136-42
5. Wallimann T, Moser H, Zurbriggen B, Wegmann G, Eppenberger HM. (1986) Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa *J Muscle Res Cell Motil*. 1986 Feb;7(1):25-34

Fig. 1 SDS-PAGE, CK-B(N-20)染色

12.5%Acrylamides separating gel

Sample:

1. Sperms From Epididymides caput 30 μ l
2. Sperms From Epididymides cauda 30 μ l
3. Epididymides caput 5 μ l
4. Epididymides cadua 5 μ l
5. Testes 5 μ l
6. Seminal vesicle 5 μ l
7. Prostate 5 μ l
8. Sperms From Epididymides caput 20 μ l
9. Sperms From Epididymides cauda 20 μ l
10. Epididymides caput 5 μ l
11. Epididymides cadua 5 μ l
12. Seminal vesicle 5 μ l

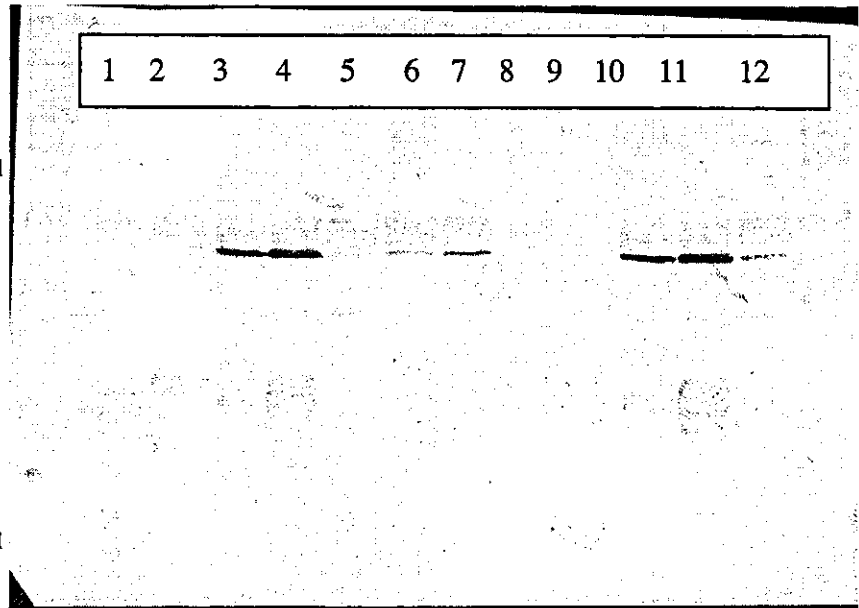


Fig. 2 SDS-PAGE, CK-B(N-20)染色

12.5%Acrylamides separating gel

Sample:

1. Testes 5 μ l
2. Seminal vesicle 5 μ l
3. Prostate 5 μ l
4. Epididymides caput 5 μ l
5. Epididymides cadua 5 μ l
6. Sperms From Epididymides caput 20 μ l
7. Sperms From Epididymides cauda 20 μ l
8. Testes 5 μ l
9. Seminal vesicle 5 μ l
10. Prostate 5 μ l
11. Epididymides caput 5 μ l
12. Epididymides cadua 5 μ l

