The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of SLPI in the human reproductive organs (seminal plasma and uterine cervical mucus) : its protective role in sperm mobilization
Author(s)	森山, 明宏
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43006
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 72 】

氏　　名	森山明宏（もりやま あきひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15013　号
学位授与年月日	平成11年12月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Identification of SLPI in the human reproductive organs (seminal plasma and uterine cervical mucus) : its protective role in sperm mobilization (精漿及び子宮頚管粘液における Secretory leukocyte protease inhibitor〔SLPI〕の発現とその機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 濵岡 利之　教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

【目的】 Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) はヒト耳下腺分泌液より単離された分子量11.7 kd の蛋白で、エラスターゼなどの蛋白分解酵素プロテアーゼの強力な阻害物質であることが知られている。その発現部位や作用部位は耳下腺だけでなく、生体内で広く分布しており、その生理作用及び炎症などの病態におけるその働きが解明されつつある。精漿中にはエラスターゼや様々なサイトカインが存在し、精巣、前立腺等の感染症と男性不妊との関連性についての検討がなされており、特に膿精子症では精漿中エラスターゼ濃度の上昇が精子運動能に悪影響を及ぼすことが確認されている。このエラスターゼの阻害物質である SLPI の生殖領域における役割については未だ解明されていない。本研究では生殖器官における SLPI 蛋白の局在とその機能、産生機序を解析することを目的として、以下の項目について検討した。精子の産生、輸送に影響を及ぼす精漿、子宮頚管粘液中の SLPI 蛋白を各性周期で定量し、精子運動率、精子数と比較をおこなった。さらに精子運動能に及ぼすエラスターゼ及び SLPI の相互作用を in vitro で検討した。

【方法】 1．不妊外来患者の配偶者46名（うち膿精子症合併19名）、及び対象群として妊孕性の確認された健常男性 8 名の精液を採取し、精液検査の後、精漿を分離した。精漿中の SLPI 蛋白を Western blot 法にて確認した。ついで SLPI 及びエラスターゼ濃度を ELISA を用いて測定し、精液所見との関連について解析した。さらに精子運動能に対する SLPI とエラスターゼの影響について検討するため、swim up 法によって回収した正常精子を 1×10^5/ml の濃度で 4 時間培養し SLPI とエラスターゼの添加の有無による運動率の変化を精子自動分析装置 CASA (Hamilton-Thorn Research, MA, USA) を用いて分析した。2．対象は十分な同意の下、正常月経周期を有する婦人11名の子宮頚管粘液を経日的に採取し、頚管粘液中の SLPI 蛋白の存在を Western blot 法を用いて確認した。さらに頚管粘液中の SLPI 及びエラスターゼ濃度を ELISA を用いて測定した。子宮頚管における SLPI の局在を検討する目的で正常月経周期を有する婦人のそれぞれ卵胞期、排卵期、黄体期の摘出子宮より患者同意の下、子宮頚部組織を採取した。SLPI 蛋白の発現を Western blot 法で確認、局在に関しては SLPI ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色にて確認した。さらに SLPImRNA の発現は特異的プライマーを用いて RT-PCR 法にて検討した。

【成績】 1．(1)精漿中のSLPI濃度は膿精子症群において3990±400 ng/mlと膿精子症を伴わない群の4310±500 ng/ml、健常男性の4650±640 ng/mlに比べ有意に低値を示すことが確認された。(2)精漿中のSLPI濃度とエラスターゼ濃度との間に負の相関が認められた（相関係数：−0.36）。(3)精液所見と精漿中のSLPI濃度との解析では、精子運動率と精漿中のSLPI濃度との間に正の相関が認められた（相関係数：0.51）。(4) SLPIとエラスターゼ添加による精子運動能に及ぼす検討では、精子培養4時間後にコントロール群の74%であるのに対しエラスターゼ0.5 μg/ml単独添加では精子運動率は47%と抑制された。しかしSLPI 10、100、1000 ng/ml添加によって、55、60、71%とSLPI濃度依存的に精子運動能の改善を認めた。2．(1)子宮頚部組織におけるSLPI蛋白は卵胞期及び黄体期に比べて排卵期に強く発現することがWestern blot法において確認された。(2)子宮頚管粘液中のSLPI濃度は排卵期において平均811±256 ng/mlと卵胞期の242±188 ng/ml、黄体期の195±197 ng/mlに比べて有意に高値を示し、いずれの症例においても排卵期に高値を示した。一方エラスターゼ濃度は排卵期において卵胞期と比較して有意な増加を認めた。さらにSLPI/エラスターゼ比は排卵期において最も高値を示すことが確認された。(3)子宮頚部組織における免疫組織染色では、SLPI蛋白は子宮頚管腺から分泌されることが確認された。またSLPImRNAの発現はいずれの周期においても認められた。

【総括】 精漿及び子宮頚管粘液中にエラスターゼ阻害物質であるSLPI蛋白の存在が確認された。精液所見との関連では膿精子症合併の際、精漿中SLPI濃度は有意に低値を示し、SLPI濃度と精子運動率との間に正の相関が認められた。さらに精子運動能に対するSLPIの添加実験より、エラスターゼによる精子運動能障害をSLPIが防御する働きが示された。従って膿精子症において妊孕能の低下の一因としてSLPIの減少による精子運動能低下が示唆された。一方頚管粘液中のSLPI/エラスターゼ比は排卵期においていずれの症例においても最も高値を示したことから、排卵期における頚管内での精子運動能の保持にSLPIが重要な蛋白であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は子宮頚管におけるSLPI蛋白の月経周期における変化を解析し、さらにエラスターゼ阻害物質であるSLPI蛋白の精子への機能を明らかにし、SLPIのヒト生殖機能に及ぼす影響を解明することを目的としている。最初に、精子の生存、輸送に影響を及ぼす精漿及び受精に至る過程の第一関門である子宮頚管粘液中にエラスターゼ阻害物質であるSLPI蛋白の存在を明らかにした。次に精子運動能に対するSLPI及びエラスターゼの添加より、エラスターゼによる精子運動能障害をSLPIが防御することを本研究で初めて証明した。さらに重要なことに、疾患との関連としてSLPIの精漿中濃度は精子運動率と正の相関を示すだけでなく、膿精子症患者の精漿中ではSLPIは正常者に比べて有意に低値であることを明らかにしている。この事実は膿精子症における妊孕能の低下の一因としてSLPIの減少による精子運動能低下の可能性を示唆している。また子宮頚管粘液中のSLPI蛋白は子宮頚管腺より分泌されることを解明し、頚管粘液中のSLPI濃度は排卵期に有意に高値を示したことから、排卵期における頚管内での精子運動能の保持にSLPIが重要な蛋白であり、かつ合目的であることを証明した。本研究は不妊症の原因究明だけでなく、治療法の確立の一助となることが期待され、学位の授与に値すると考えられる。