慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ヒト精漿および精子内のクレアチンキナーゼアイソザイムについての検討
Sub Title	
Author	宮地, 系典(Miyaji, Keisuke) 村井, 勝(Murai, Masaru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.3 (2005. 9) ,p.T207- T215
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050901-0207

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・82(3)：T207～T215，2005

学位論文

ヒト精漿および精子内のクレアチンキナーゼアイソザイムについての検討

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室
（指導：村井　勝教授）
宮地系典（みやじけいすけ）

（平成16年2月17日受付）

Key Words：male infertility, human sperm, seminal plasma, creatine kinase isozyme

不妊夫婦の数は増加傾向にあり，最近ではおよそ15%のカプッルが不妊であるとの報告がある[1]．また社会全体に目を向けると約20年前より人工構成の少子高齢化が進み，社会問題にまで発展してきた．このような出生率の低下を防ぐために種々の方策がとられているが，その中で不妊治療の充実化を図ることも極めて重要になってきた．不妊治療の中で女性の治療，生殖補助技術に関しては近年急速な進歩がみられるのに対して，不妊原因の約50%占める男性不妊では有効な治療法が少ないのが現状である．精子機能の一つである，精子運動は卵への侵入，受精に不可欠であり，精子運動率が50%以下の精子無力症は男性不妊に大きな割合を占め，その原因究明が必要である．

クレアチンリン酸塩は高エネルギーリン酸塩として貯蔵され，アデノシン3リン酸（ATP）を補給するためのエネルギー緩衝剤として利用される．筋肉内ではクレアチンリン酸シャトルがミトコンドリアから筋原線維へ高エネルギーリン酸を輸送し，かつ高エネルギーリン酸のレベルを一定に保つために緩衝剤になっていると考えられている[2]．Tombesらは精子細胞内でも筋肉細胞で提唱されているクレアチンリン酸シャトルによってATPが輸送されていることを示唆している．すなわちATPの高エネルギーリン酸結合はミトコンドリアのクレアチンキナーゼ（CK）によりクレアチンに転移されると同時にアデノシン2リン酸（ADP）が生じ，このADPは酸化的リン酸化によってATPに変換される．いっぽう，クレアチンリン酸は精子尾部鞭毛の軸糸のダイニン-ATPaseによって分解され，再びADPになる[3]．申請者は精子運動機構および精子無力症へのクレアチンリン酸シャトルの関与を解明する一端として，精子尾部におけるATP濃度維持に主要な役割を果たすCKに着目した．CKアイソザイムには，CK-MM, CK-BB, CK-MB, CK-MiMiの4種類があり，精漿中には精子中と比較して大量のCK-BBが存在するといわれている[4,7]．従来，体外受精における受精率とヒト精子内アイソザイムの関連についての報告がなされているが，アイソザイムパターンに関しては諸家によって報告が異なる．本研究では最初に，精子内にはなく精漿に多量に含まれる酸性フォスファターゼ（ACP）活性を指標として，精子検体に精漿，精液内他細胞が混在しないような精子精製法を検討した．さらにその方法を使って，精子および精漿内のCKアイゾザイムの同定とその活性測定を行った．

材料と方法

東京歯科大学市川総合病院泌尿器科および産婦人科における不妊外来患者112名の精液を用いた．精液の提供には患者本人に十分なインフォームドコンセントを行い，同意を得て使用した．精液は患者自身による用手法にて採取され，精液検査施行後の余剰精液を実験に供した．精液検査は液状化後，WHOのガイドラインに沿って施行した[8]．精子濃度はMakler Counting Chamber (SEFI-MEDICAL INSTRUMENTS, New York, USA) で計測し，精子運動率は37℃でcomputer assisted motility analyzer（C-men；Compix, PA, USA）を使用し計測した．精子奇形率はKruger's strict criteria[9]に沿って評価した．

1．精子精製法の検討

(1)Haszar らの精子精製法[10]，(2)Claus らの精子精製法[11]，(3)キャピラール撹拌密度勾配法[12-14]，(4)swim up 法[15]，(5)キャピラール撹拌密度勾配法および修正 swim up 法を合わせた精製法，をそれぞれ施行し，精子を精製した．

(1) Huszar らの生理的食塩水による精子精製法[10]

精液を 15 倍量の 0.03 M イミダゾール加 0.15 M 塩化ナトリウム溶液（pH 7.0）で希釈し，2000×g，4℃で 10 分間遠心分離後上清を除去した．残った精子検体は 0.03 M イミダゾール，10%グリセリン，5 mM Dithiothreitol（Sigma Chemical Co, St. Lous, MO），0.1% Triton X-100 を加えた 0.15 M 塩化ナトリウム溶液（pH 7.0）同量に再懸濁し，20 秒撹拌後，4℃，5000×g で 10 分間遠心分離し，上清を検体とした（n = 5）．

(2) Claus らの生理的食塩水による精子精製法[11]

精液 200 μl に 0.05 M Tris 緩衝化 0.1 M 塩化ナトリウム溶液（pH 8.0；洗浄液）10 ml を加えて 2000×g，4℃で 10 分間遠心分離し上清を除去した．沈殿を再度洗浄液 10 ml に混和し，2000×g，4℃で 10 分間遠心分離し，上清を除去した．沈殿を 1 % Triton X-100 加洗浄液（抽出液）に混和して 5 分間撹拌し，5000×g，10 分間遠心分離し，上清を Eppendorf tube に移した（精子抽出液 1）．沈殿は 100 μl の抽出液に混和し 5 分間撹拌後 5000×g，10 分間遠心分離し，上清を最初の精子抽出液 1 に加えたものを検体とした（n = 5）．

(3) キャピラール撹拌密度勾配法[12-14]（図 1）

精液全量に等量の 4.0 mg/ml アルブミン加 20 mMHepes 緩衝化ハンクス液（ハンクス液）を加えて 40 μm ナイロンメッシュフィルターで濾過した（以下濾過精液）．20 mg/ml アルブミン加等張化 80%パーコール液（pH 7.4）5 ml に濾過精液を 2 ml 層積し，キャピラールを挿入した後に精液とパーコール層を L 型撹拌棒で数度撹拌することにより連続密度勾配を作成し，4℃，1000×g で 30 分間遠心分離した．精子は管底に濃

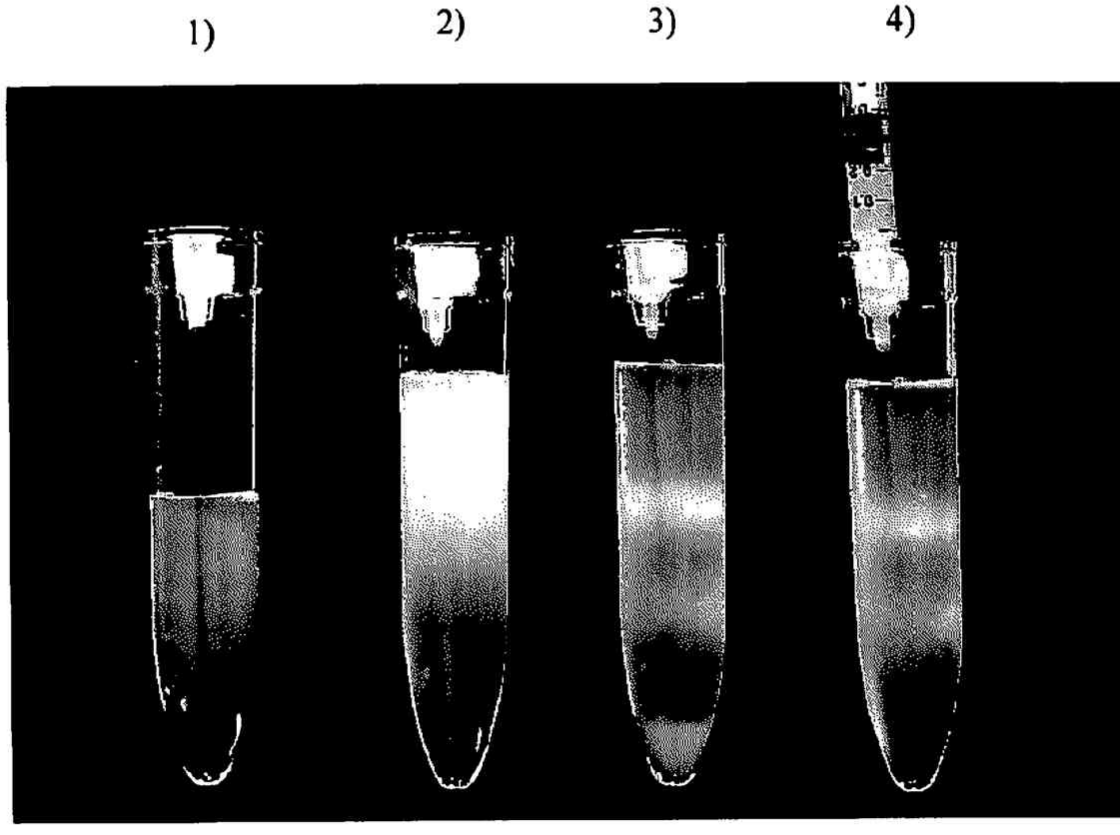

図 1　キャピラール撹拌密度勾配法

写真は，1）20 mg/ml アルブミン加等張化 80%パーコール液（pH 7.4）5 ml にキャピラールを挿入しているところを示す．2）40 μm ナイロンメッシュフィルターで濾過した精液 2 ml を層積し，L 字撹拌棒で数回撹拌，連続密度勾配を作成した．3）4℃，1000×g で 30 分遠心分離，管底に成熟精子が沈殿しているのを示す．4）管底の精子を吸引，回収している．

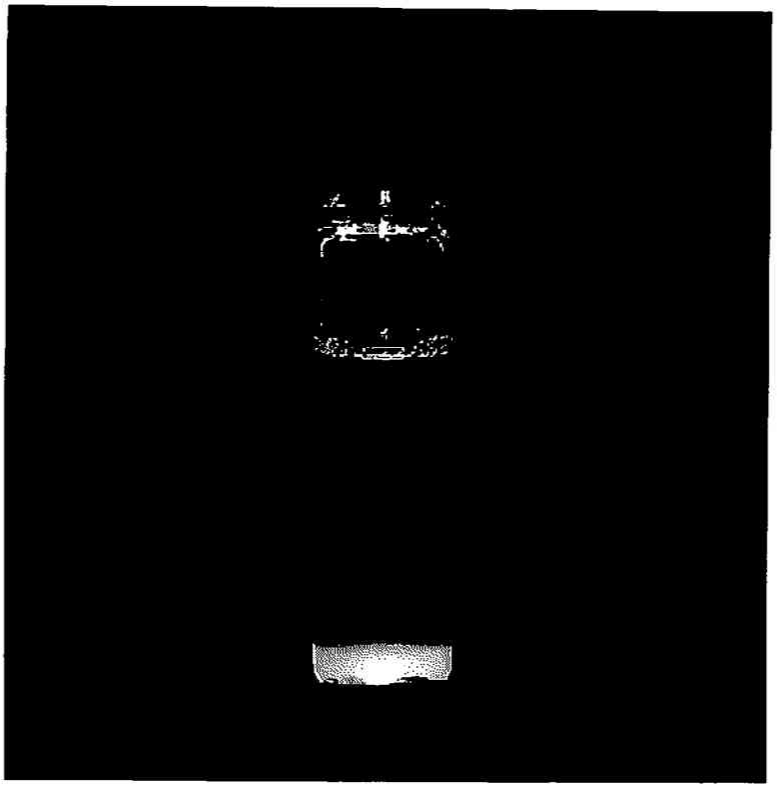

図2　Swim up法
写真は，Swim up法において1％アルブミン加ハンクス液10 mlの管底に精液を層積した状態を示している．修正swim up法の場合は40％パーコール液を管底に層積し，その下に精液を層積した．

縮され，キャピラールから吸引して0.5 mlに再懸濁して検体とした（n = 5）．

(4) swim up法[15]（図2）

1％アルブミン加ハンクス液10 mlの入ったガラス管底にゆっくりと精液を層積した．2時間後に上層部のハンクス液8 mlを吸引し，クッション法[16]で再濃縮後精子を回収して検体とした（n = 5）．

(5) キャピラール撹拌密度勾配法および修正swim up法を合わせた精子精製法

1％アルブミン加ハンクス液3 mlの入ったガラス管底にまず40％パーコールを0.3 mlゆっくりと注入し，その下層に前述のキャピラール撹拌密度勾配法によって得られた精子混濁液をゆっくりと層積した．2時間後に上層部のハンクス液2 mlを吸引し，クッション法で再濃縮後精子を回収して検体とした（精製精子，n = 5）．

2．各種精製法での精漿残存率の測定および精子精製法の決定

前述の5つの方法で得られた精子懸濁液中のACP活性を測定し，それによって精漿残存率を求め，精子を最も純粋に精製できる方法を決定し，その方法を以下の検討に用いた．ACP活性はAcid Phospha-K II-test（Wako, Osaka, Japan）を使用した．測定は37℃で，波長500 nmの分光光度計1100 spectrophotometer（HITACHI, Tokyo, Japan）を使用した．活性はKing-Armstrong単位（以下K-A U/ml）で表した．各精子精製法による精子懸濁液中の精漿残存率は，精漿残存率（%）＝精子懸濁液中ACP活性値×100/原精漿ACP活性値として求めた．

3．精製精子からのCKの抽出

採取したの精製精子に0.1％および1％のTriton X-100加0.15 M塩化ナトリウム液を加えて総量を1 mlとした．撹拌1分間後，液体窒素による凍結融解を2回，7分間の超音波処理後，鏡検上90％以上の精子の頭部と尾部が分離していることを確認した．2000×g，4℃で10分間遠心分離を行い，上清（精子抽出液）を採取し実験に供した．

4．精漿の精製法

液状化した精液1 mlを取り，4℃，2000×g，10分間遠心分離して上清を採取し，0.4 μmメンブランフィルターで残存する精液内異物を濾過して実験に供した．

5．CK活性の計測

精子抽出液（n = 31）および精漿抽出液（n = 37）についてCK活性をIatro set CK-S（Iatron Co. Tokyo, Japan）で測定した．測定には37℃，波長560 nmの分光光度計1100 spectrophotometer（HITACHI, Tokyo, Japan）を使用した．活性値はIU/lで表した．得られた結果は，平均±SDとして表した．

6．イオン交換クロマトグラフィーによる精子，精漿のCKアイソザイムの測定

0.02%Tris（hydroxymethyl）aminomethane（以下Tris）緩衝液 pH 8.0にDE23セルロース（DE23；Whatman Ltd., England）を混和してガラス製円柱筒に滴下し，DEAEセルロースカラム（1.5×10 cm）を作製した．34検体の精子，精漿それぞれの検体1 mlを0.02%Tris緩衝液10 mlに混和し，カラムに滴下して吸着させた．0 M～0.6 M塩化ナトリウムを加えた0.02%Tris緩衝液20 mlを徐々に濃度が上昇するようにカラム内に滴下した．溶出液を1 mlずつ試験管に取り，それぞれのCK活性を計測し，クロマトグラムを作成しCKアイソザイムを求めた．

7．セルロースアセテートメンブラン電気泳動によるCKアイソザイムの測定

32検体の精子および精漿のそれぞれについてセルロースアセテートメンブラン電気泳動を行った．泳動後のセルロースメンブレンはIatro set CK-S（Iatron Co. Tokyo, Japan）を用いて活性染色を行い，発色するまで37℃で保温した．発色後の電気泳動像はdensitometryを行い，標準血清（CK-MM；99 IU/l, Iatro set CK-S, Iatron Co. Tokyo, Japan）の泳動パターンとの比較を行い，CKアイソザイムを測定した．

結　果

1．各種精子精製法における精漿残存率の比較

(1)Huszarらの精子精製法，(2)Clausらの精子精製法，(3)キャピラール撹拌密度勾配法，(4)swim up法，(5)キャピラール撹拌密度勾配法および修正swim up法を合わせた精子精製法について，それぞれの精子懸濁液中の残存ACP活性値を測定した．精漿のACP活性値は3.2±1.6×10^5 K-A U/mlであり，各精製法で調製した精子懸濁液中のACP活性値はそれぞれ(1)29.0±0.7×10^4 K-A U/ml，(2)1.9±0.2×10^4 K-A U/ml，(3)1.3±0.3×10^4 K-A U/ml，(4)3.2±0.2×10^4 K-A U/ml，(5)4.3±2.1 K-A U/mlであった．この結果，精漿残存率はそれぞれ(1)91.0±4.6%，(2)5.8±1.0%，(3)3.9±1.7%，(4)9.9±1.2%，(5)1.4±1.3×10^{-3}%であり，キャピラール撹拌

a　　b

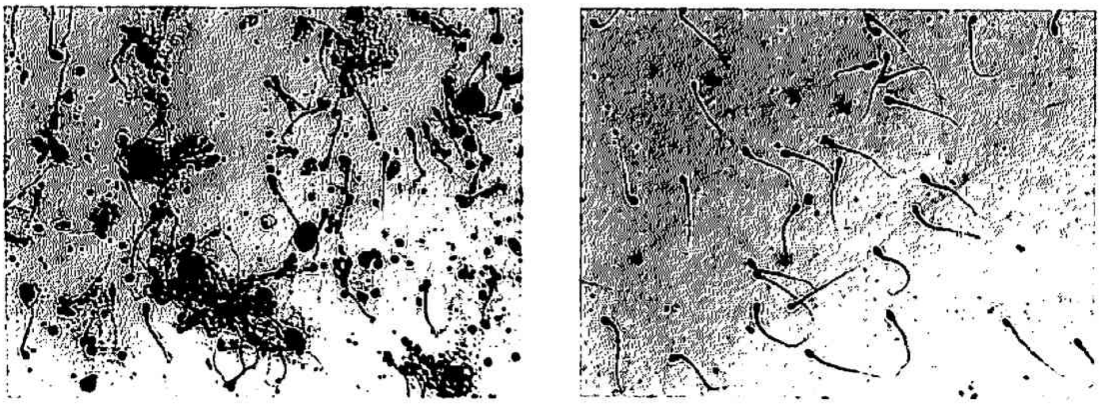

図3　精製後の精液像の比較（Diff-Quik染色×400）
aはClausとHuszarらの方法で得た精子像であり，精子と他細胞が混在している．bはキャピラール撹拌密度勾配法で得られた精子に修正Swim up法を行って得た精子像であり，精子のみが観察される．

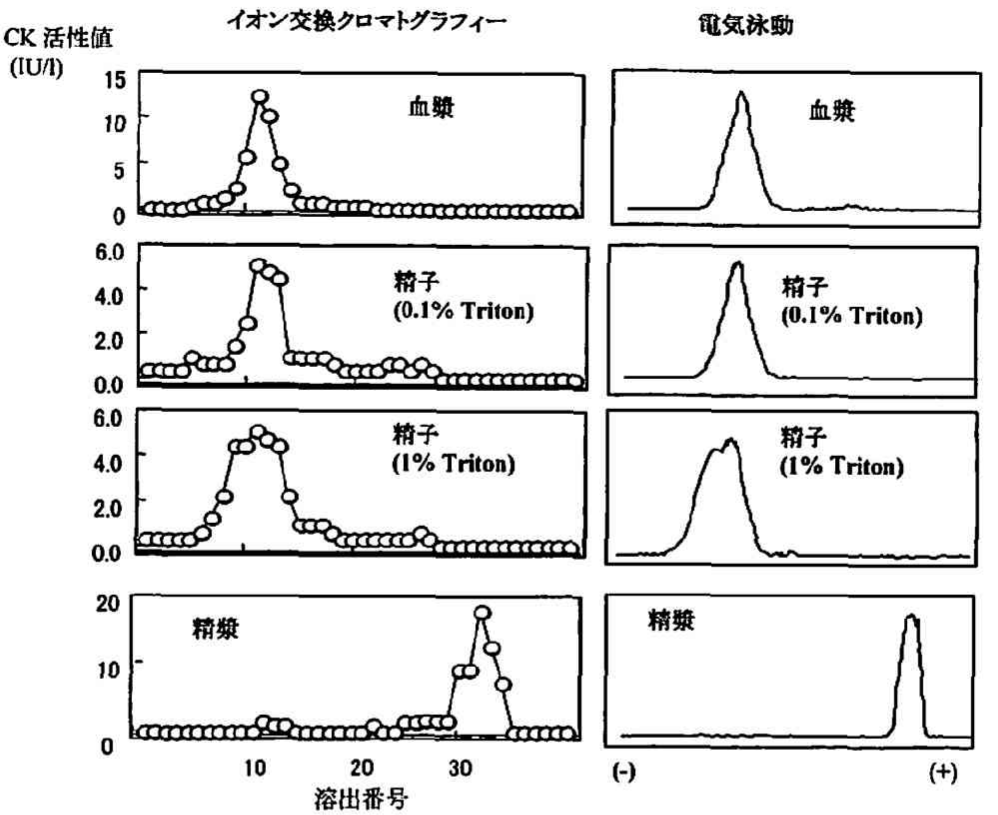

図4　ヒト血漿，精漿，精製精子における CK アイソザイムの比較
図左側はイオン交換クロマトグラフィーにおける CK 活性の溶出態度を，図右側は活性染色による CK 電気泳動像を示している．精子内には CK-MM，MiMi と微量の -MB が認められ，精漿内には CK-BB が認められた．
(Miyaji K et al：Arch Androl 46：127-134, 2001 の Figure 1 を許可を得て転載)

密度勾配法と修正 swim up 法を組み合わせた方法の精漿残存率が最も低値であった．

2．各種精子精製法における精子像の比較（図3）

Huszar らの精子精製法および Claus らの精子精製法は単なる希釈遠心分離法であり，精液内の細胞は沈澱に回収され，3-a 図に示すように精子のみならず白血球や尿路上皮細胞などの他細胞や異物が観察された．いっぽうキャピラール撹拌密度勾配法および swim up 法では，3-b 図に示すように精子のみが観察された．以上の結果より，精漿をほぼ完全に除去できるとともに精子のみを選択的に採取することができる精子精製法として，キャピラール撹拌密度勾配法および修正 swim up 法を合わせた精子精製法を採用した．

3．イオン交換クロマトグラフィーによる精子および精漿の CK アイソザイム測定（図4）

精子および精漿 34 検体についてのクロマトグラムを標準血清の CK アイソザイムパターン（CK-MM）と比較検討した．精子では，抽出の際に使用した界面活性剤（Triton X-100）濃度が 0.1%の場合には，標準血清と同様に溶出番号 11 でピークが認められ，CK-MM であると考えられた．いっぽう，Triton X-100 の濃度を 1 %とした場合には，溶出番号 9 ～11 に二双性のピークが認められ，CK-MM および CK-MiMi であると考えられた．精漿では溶出番号 33 にピークを認め，CK-BB であると考えられた．

4．セルロースアセテートメンブラン電気泳動による精子，精漿の CK アイソザイム測定

精子および精漿 32 検体の泳動パターンを標準血清の

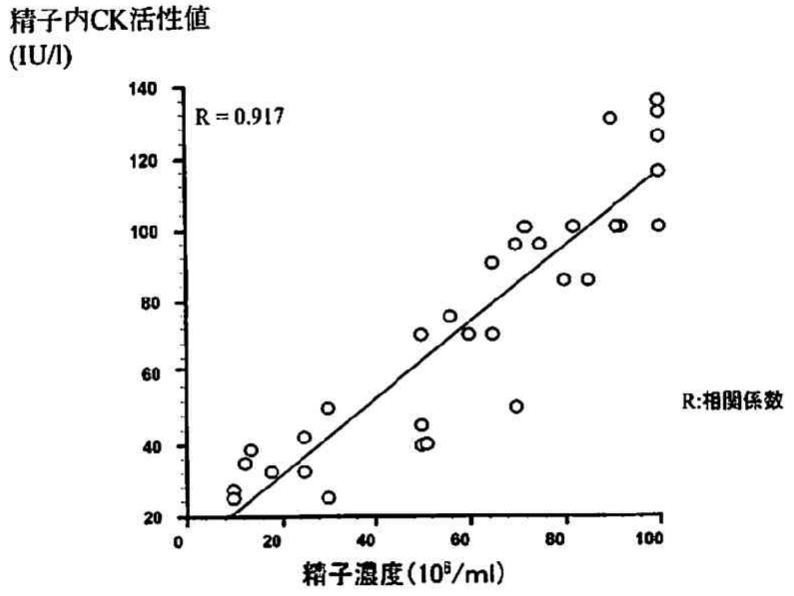

図5　精子内 CK 活性値と精子濃度との相関
精子内 CK 活性値と精製精子濃度の間には相関関係が認められた．運動精子中の CK 活性はほぼ一定であると思われる．
(Miyaji K et al：Arch Androl 46：127-134, 2001 の Figure 2 を許可を得て転載)

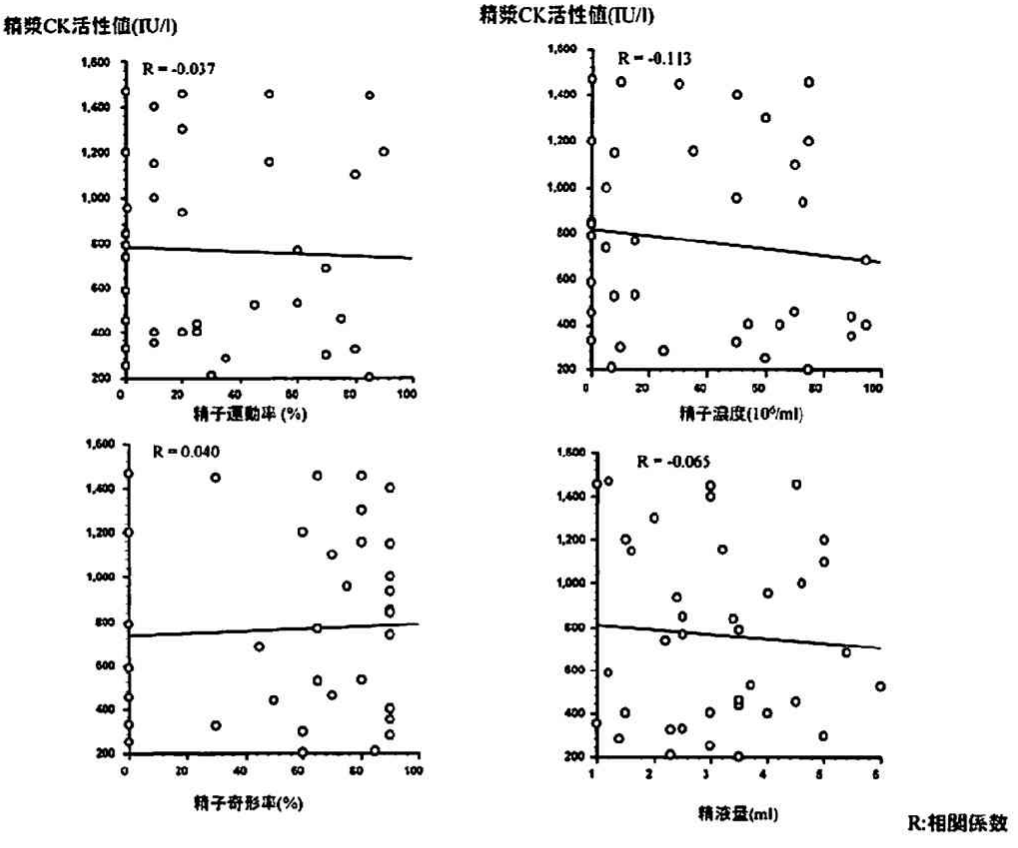

図6　精漿の CK 活性値と精液所見（精液量，精子濃度，精子運動率，奇形率）との相関
精漿の CK 活性と精液所見との間には相関関係が認められなかった．
(Miyaji K et al：Arch Androl 46：127-134, 2001 の Figure 3 を許可を得て転載)

CK アイソザイムパターン（CK-MM）と比較検討した．精子抽出の際，Triton X-100 濃度が 0.1%の場合には精子の CK アイソザイムは 32 例中，30 例で CK-MM だけであったが，2 例では CK-MB がごくわずかに認められた．いっぽう，Triton X-100 の濃度を 1 %にした場合には CK-MM と CK-MiMi が等量認められた．精漿中の CK アイソザイムは CK-BB のみであった(図4)．

5．精子および精漿の CK 活性

精子内 CK 活性は $2.0\pm0.7\times10^{-6}$ IU/10^6 sperm であった．精漿 CK 活性は $6.6\pm3.6\times10^2$ IU/l であった．精製精子濃度と精子内 CK 活性には相関関係が認められ，運動精子内の CK 活性はほぼ一定であると思われた（図5）．原精液の所見（精子濃度，運動率，奇形率，全精子数，全運動精子数，精液量）と精漿 CK 活性値との相関関係はなかった（図6）．

考　察

現在までの知見では精子内に存在する CK アイソザイムについて統一された見解が得られていないのが現状である．そのため本研究では最初に，精子精製法の検討を行った．これまでに報告のあった，Huszar らの方法，Claus らの方法およびキャピラール撹拌密度勾配法，修正 swim up 法，それらの併用法によって精子を精製し，精漿のみに存在する ACP を指標として精子懸濁液中の精漿残存率を算定して精子精製法を検討した．その結果，精漿をほとんど含まない精子精製法はキャピラール撹拌密度勾配法と修正 swim up 法の併用であることが判明した．キャピラール撹拌密度勾配法は，精子が成熟の過程で形態が変化し，その時期によって細胞密度が異なることを利用したものである．すなわち未成熟な精子は細胞小滴が存在するために細胞密度は低いが，成熟精子ではそれが消失しているため密度は上昇する．また死滅した精子では細胞膜の透過性が変わり，細胞外液が細胞内に浸透するために密度は低下する．そこで濃度を調整したパーコール液を添加することによって運動精子と，精漿および非運動精子（または死滅精子）とを分離することができる．また修正 swim up 法は精子自身の運動性を利用したものであり，これら2法を併用することにより精漿をほとんど含まない運動精子を選択的に採取することが可能となった[17]．CK には CK-MM, CK-MB, CK-BB, CK-MiMi と呼ばれている，大きく分けて 4 種類のアイソザイムが存在する．CK-MM は主に筋肉，CK-MB は心筋に特異的で，CK-BB は脳，腎，膀胱にあり，CK-MM, -MB, -BB は細胞質上清に存在するが，CK-MiMi はミトコンドリア内膜内に存在する[19-21]．また精漿内には CK-BB が大量に存在し，前立腺由来または精嚢由来といわれている[4-7]．Asseo らは，乏精子症の精漿中 CK 活性は健常者より低いと報告している[18]が，本研究では精液所見と精漿中 CK 活性値との関連は見られなかった．Claus らはヒト精子内には CK-BB と CK-MiMi が存在すると報告しており[11]，いっぽう，Huszar らは精子内には CK-BB と CK-MM が存在し，精子内の CK-MM/CK-BB 比が 10%以上の場合，体外受精における受精率が良好であり[10]，精液所見と精子内 CK 活性値は反比例し[22]，CK 活性値によって乏精子患者の人工受精率を予見できる[23]と報告している．これに対して本研究では精子内に CK-BB は認めず，大部分が CK-MM で，微量の CK-MB が認められ，精製条件によって CK-MiMi が併存するという結果であった．このような成績の違いは精子精製法の相違によるものと考えられる．精漿中には CK-BB が大量に存在することが知られており，Claus や Huszar の方法で得られた成績は，精漿の除去が不完全なため，CK-BB を精子内のものとして計測したと考えられる．以上より，申請者の精子精製法を用いて初めて，精子内の CK アイソザイムを測定することが可能となり，大部分が CK-MM であることが確認されたといえる．

CK-MiMi に関しては，精子中片にミトコンドリアが豊富であることが知られており，CK-MM が細胞質に存在するのに対して，CK-MiMi はミトコンドリア内に存在するため，精子の処理法の違いによって成績が異なったものと思われた．すなわち，CK を抽出する際に用いる Triton X-100 の濃度を Claus と同様に 1 %にするとミトコンドリア内の CK-MiMi も抽出されるが，0.1 %ではそれが起こらず検出されなかったものと考えられる．

精漿内には，大量の ACP および CK-BB が存在しており，両者ともリン酸代謝に関与する．精漿にはクレアチン，クレアチンリン酸が存在し，Lee ら[24]はこれらの精子内取り込みが細胞内クレアチン濃度維持，ひいては精子運動に関与すると報告し，精漿 CK-BB は精漿内クレアチン濃度維持および精子細胞表面における ATP 再生産に寄与するとしているが，精漿 CK-BB の精子に対する生理的意義は不明な点が多い．ACP についても生理的意義は不明である．

Na-K ATPase の alpha4 アイソフォームは細胞内の H^+ を調節して[25]精子運動に関与し，乏精子症においてはその酵素活性が低下している[26]と報告されている．ヒ

ト精子においてCa-ATPaseの阻害剤は用量依存的精子運動を低下させることが報告されているが[27]，Ca^{2+}の精子運動に対する作用は動物種により異なり，ヒツジ，マウス，モルモットではCa^{2+}はほとんど影響を与えない．ウシ，イヌ，チンパンジーではCa^{2+}は精子運動を阻害し，ハムスター，ラットでは精子運動を活性化する．その作用は阻害的であったり，促進的であったり種によってさまざまである[28]．

本研究では，精子内CKアイソザイムは大部分がCK-MMであったが，CK-MMは骨格筋において，ATPの産生と輸送を担っており，ミオシンフィラメントに関与するM-bandの構成蛋白といわれている[29]．また，精子鞭毛の軸糸はチューブリン，ダイニンで構成され，9本のダブレット微小管（周辺微小管）と2本の中心微小管（中心小管を）骨格とするいわゆる9＋2構造で，ダイニンが中心となり，2次元，3次元の周期的な屈曲運動を行う[2]．Kamimuraらは0.5 mM ATP存在下で約300 Hzの鞭毛振幅を観察し，その振幅数はATP濃度依存的に変化したと報告しており[30]，CK-MMは尾部におけるATPの局所再生を通して精子運動維持に寄与していると考えられる．

以上より，これらの結果は今後，精子内のCK濃度やアイソザイムパターンを調整することによる精子無力症に対する治療法や精子運動についての研究の一助となると考えた．また精子精製法については，精液中の細菌，ウィルス等の異物除去に応用できるようさらなる改良の検討が必要であると考える．

総　括

本研究はヒト精子を精漿より高度に分離することにより，精子内と精漿内のCKのアイソザイムおよびCK活性値を明らかにした．

1．精漿に多量に含まれるACP活性を指標として，ヒト精子検体に精漿が混在しないような精子精製法を検討し，キャピラール撹拌密度勾配法と修正swim up法を組み合わせた方法が有用であるという結果を得た．本研究で確立したヒト精子精製法は，非運動精子，他細胞の排除とともに精漿をほぼ完全に除去し，運動精子を選択的に分画することができた．

2．この精製法で精子と精漿を分離して，DEAEセルロースカラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー，セルロースアセテートメンブラン電気泳動法を用いてヒト精子内，精漿内のCKアイソザイムおよび活性値を計測したところ，精子内のCKアイソザイムは，CK-MMと微量のCK-MBであり，抽出条件によってCK-MiMiが併存し，CK-BBは検出されなかった．精漿のCKアイソザイムはCK-BBであった．

3．精子のCK活性値は，$2.0 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ IU/10^6 spermで，精漿のCK活性値は$6.6 \pm 3.6 \times 10^2$ IU/lであった．

4．これらの結果は今後，精子無力症の研究の一助となると考えられた．また精子精製法については，精液中の細菌，ウィルス等の異物除去に応用できるようさらなる改良の検討が必要であると考える．

本稿を終えるにあたり，御指導，御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室　村井勝教授に深甚なる謝意を表します．また，貴重な御助言，御協力をいただきました東京歯科大学市川総合病院泌尿器科，産婦人科各位に厚く御礼を申し上げます．

本研究の一部は，第42回　日本不妊学会総会（1997年11月東京），Third Asian and Oceanic Congress Of Andrology（2000年5月幕張）において発表した．

文　献

1) Howards SS：Treatment of male infertility. New Eng J Med 332(5)：312-317, 1995
2) 鈴木範男，森沢正昭，星元紀：精子のエネルギー代謝．精子学（毛利秀雄監修），東京大学出版会，146-147，1994
3) Tombes RM, Shapiro BM：Metabolite Channeling：A Phosphorylcreatine Shuttle to Mediate High Energy Phosphate Transport between sperm Mitochondion and Tail. Cell 41：325-334, 1985
4) Kavanagh JP, Darby C：Creatine kinase and ATP in human seminal fluid and prostatic fluid. J Reprod Fert 68：51-56, 1983
5) Wallimann T, and Hemmer W：Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. Mol Cell Biochem 133-134：193-220, 1994
6) Wallimann T, Moser H, Zurbriggen B, Wegmann G, Eppenberger HM：Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. J Muscle Res Cell Motil 7：25-34, 1986
7) Soufir JC：Creatine kinase in human seminal plasma：activity, origin and isoenzymes. Clin Chem 25：1183-1184, 1979
8) World Health Organization：Laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus interaction. 3 rd ed. New York, Cambridge University Press, 1993
9) Kruger TF, Menkveld R, Thomas C.Lombard CJ, Franken DR：Sperm morphology：assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. Fertil Steril 63：135-141, 1995

10) Huszar G, Vigue L, Morshedi M : Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men. Fertil Steril 57 : 882-888, 1992
11) Claus R, Hermann MB, Trevor G, Brigit K, Eberhard N : Creatine kinase activity in human spermatozoa and seminal plasma lacks predictive value for male fertility in in vitro fertilization. Fertil Steril 69 : 727-734, 1998
12) Kaneko S, Oshio S, Kobanawa K, Kobayashi T, Mohri H, Iizuka R : Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an inner-column. Biol Reprod 35 : 1059-1063, 1986
13) Kaneko S, Sato H, Kobanawa K, Ohsio S, Kobayashi T, Iizuka R : Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. Arch Andol 19 : 75-84, 1987
14) Lee K : Studies on human sperm cryopreservation using the dry ice pellet method ; its application to artificial insemination with husbands semen (AIH). J. Keio Med. Soc. 66 : 845-856, 1989
15) Andolz P, Bielsa MA, Genesca A, Benet J, Egozcue J : Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. Hum Peprod Feb 2 : 99-101, 1987
16) 兼子　智，久慈直昭，小田高久，小林俊文，吉村泰典，野澤志郎：ヒト精子凍結保存と不妊症への応用．低温医学，22：147-152，1996
17) Miyaji K, Kaneko K, Ishikawa H, Aoyagi T, Hayakawa K, Hata M, Oohashi M, Izawa A, Murai M : Creatine kinase isoforms in the seminal plasma and the purified human sperm. Arch Andol 46 : 127-134, 2001
18) Asseo PP, Panidis DK, Papadimas JS, Ikkos DG : Creatine kinase in seminal plasma of infertile men : Activity and isoenzymes. Int J Androl 4 : 431-439, 1981
19) Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M : High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. Biochem Biophys Res Commun 16 : 516-521, 1964
20) Smeitink J, Wevers R, Hulshof J, Lith T, Sengers R, Treijbels F, Korenke C, Wallimann T : A method for quantitative measurement of mitochondrial creatine kinase in human skeletal muscle. Ann Clin Biochem 29 : 196-201, 1992
21) Kottke M, Adams V, Wallimann T, Nalam VK, Brdizka D : Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. Biochim Biophys Acta 1061 : 215-225, 1991
22) Huszar G, Corrales M, Vigue L : Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normozoospermic and oligozoospermic men. Gamete Res 19 : 67-75, 1988
23) Huszar G, Vigue L, Corrales M : Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. J Androl 11 : 40-46, 1990
24) Lee J, Fillers W, Iyengar M : Phosphocreatine an intracellar high-energy compound, is found in the extracellular fluid of the seminal vesicles in mice and rats. Proc. Nati. Acad. Sci. 85 : 7265-7269, 1988
25) Woo L, James F, Lingrel B : Roles of the Na, K-ATPase alpha 4 isoform and the Na^+/H^+ exchanger in sperm motility. Mol Repro Dev 62 : 348-356, 2002
26) Kocak N, Aktan G, Aykac G : The role of Na, K-ATPase in human sperm motility. Int J Androl 25 : 180-185, 2002
27) Williams K, Ford W : Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. Int J Androl 26 : 366-371, 2003
28) 森沢正昭，森沢幸子，星　元紀：精子運動の調節．精子学（毛利秀雄監修）．東京大学出版会，104-120，1994
29) Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K : Functional coupling of creatine kinases in muscles : Species and tissue specificity. Mol Cell Biochem 184 : 231-247, 1998
30) Kamimura S, Kamiya R : High-frequency nanometre-scale vibration in 'quiescent' flagellar axonemes. Nature 340 : 476-478, 1989