

ヒト精液酸性ホスファターゼに関する研究

II ヒト血清中に存在する精液酸性ホスファ
ターゼの阻害物質について神戸医科大学泌尿器科教室 (主任 上月 実教授)
大学院学生 高 尾 良 昭

STUDY ON ACID PHOSPHATASE IN HUMAN SEMEN

II PRESENCE OF INHIBITOR OF SEMINAL ACID PHOSPHATASE
IN HUMAN SERUM

Yoshiaki TAKAO

From the Department of Urology, Kobe Medical Collage
(Director : Prof. Minoru Jogetu)

A substance in rabbit serum which inhibited the acid phosphatase activity present in human semen was reported in the first paper. In order to study an influence of the human serum upon the homogenous acid phosphatase in semen, an attempt of this experiment was made.

Subsequent result showed that human serum had a strong inhibition for the acid phosphatase in human semen, and this substance was dialysable and heat-stable and its action was not lost even by calcination. It was recognized that this substance belonged to cation from its adsorption on ion exchange column, and that Cu^+ produced by Cu^{++} and the reductive substance in serum displayed the inhibition of the enzymatic activity.

I 緒 言

私は第 I 篇に於いてウサギ血清中にヒト精液酸性ホスファターゼ (以下「ホ」と略記する) 活性を抑制する物質の存在を報告した。この異種属間の動物で得た結果を以つて直ちに同種属動物間に於ける関係を類推するのは早計の誹を免れない。茲に本問題を解決すべくヒト血清「ホ」との相関関係の観察を試みた。

II 実験材料

ヒト血清は前立腺疾患を除外した本学泌尿器科入院患者の血清を資料に供した。精液の採取及び精液の酸性「ホ」の純化、及び基質溶液の調製等は第 I 報の方法に従つたため再録を省く。

III 実験方法

1) ヒト精液「ホ」とヒト血清との前処理方法

第 I 編 実験結果, 第 4 項に記載する処に従つた。

2) ホスファターゼ力価測定の方法

第 I 編記載と全く同じ条件で反応せしめ、反応液中の無機リン酸を Fiske-Sabbarow 法¹⁾ に従つて定量した。本反応液中の無機リン酸の総量即ち、前記前処理液 1.0 ml がこの測定条件で遊離する無機リン酸の総量を算出した。

IV 実験結果

(1) ヒト精液「ホ」に対するヒト血清の影響

第 1 表に示す如く男女血清の別を問わずヒト血清中にも明かに酸性「ホ」阻害物質が存在する事実と前報とその傾向を一つにする。血清中の阻害程度の上では性別による区別は認め難い。

(2) 前処理時間と酸性「ホ」活性抑制効果

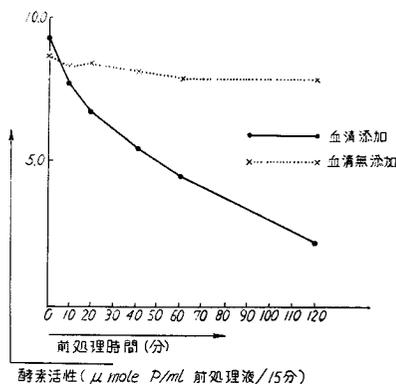
酸性「ホ」と血清での処理時間との関係を知るべく実験を行つた。その結果は第 1 図に示す如く酸性「ホ」

第1表 男女血清の酸性「ホ」阻害効果

前処理	血清無添加	男子血清添加	女子血清添加
酵素活性	10.64	4.06	4.45
阻害率%	—	-61.8	-58.2

活性は60分の処理で50%以下に減少した。従つて阻害物質の存否の確認はこの前処理時間で充分と考えられたので以下の実験は全て前処理時間を60分と定めた。

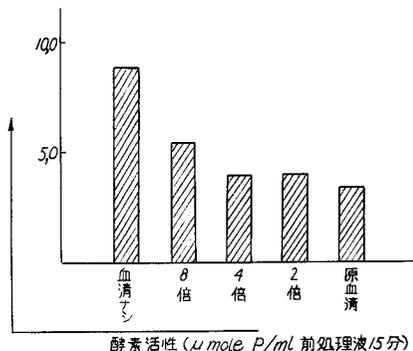
第1図 前処理時間と酸性「ホ」活性抑制効果



(3) 前処理時の血清の稀釈倍数と酸性「ホ」活性抑制効果

「ホ」の前処理に際して用いるヒト血清を0.9%食塩水を用いて種々の倍数に稀釈し、その抑制効果を検討した。

第2図



第2図の如く8倍稀釈血清の添加で抑制効果が明かに認められ、4倍稀釈血清ではすでにほぼ原血清の示す最高の抑制効果を呈した。

(4) ヒト血清の新旧と「ホ」活性抑制効果

以上の諸実験の結果は何れも血清の「ホ」活性抑制効果を認め得るが、血清の稀釈度の如何により効果に

若干強弱の差が認められる。

偶々、血清採取後、冷蔵庫内に1両日放置した血清に強い「ホ」活性抑制効果のあることに気が付き、血清の新旧の程度と抑制効果との関係を追求した。

第2表 陳旧血清の酸性「ホ」阻害効果

前処置	血清無添加	新鮮血清添加	陳旧血清添加
酵素活性	8.96	4.48	1.77
阻害率%	—	-50.0	-80.2

本表中新鮮血清とは、血餅より分離した血清を指し、採血後実験開始までに約30分を経過している。陳旧血清とは、前記の新鮮血清を別の小試験管に移し、冷蔵庫内に24時間保存後実験に供したものであり、その間血餅との接触はない。尚陳旧血清添加の実験例は、新鮮血清の実験の翌日行われたのは当然である。

血清を加えずに酵素液を処理する対照実験の値は、両日とも全く同一の値を示したので表から省略した。

第2表に見る阻害率から考えて、酸性「ホ」阻害物質が血清を放置することにより、血清中の活性強化、或は新生、乃至は増量を思わせるものである。

(5) 透析血清の酸性「ホ」抑制効果

血清中の酸性「ホ」抑制物質の本態を追求するため、本物質の透析性を検討した。即ち血清をビスキンのセロファンチューブに容れ、透析の前半は流水に対し、後半は氷室内で蒸留水に対し、透析を行った。血清のみを透析時間と同時間冷蔵庫内に放置したものについて阻害効果を検討し対照値とした。

尚毎回血清を除いて酵素を処理する盲験を行った。盲験値は実験期間を通じ、常に同一の値を示したので、以下第1日目(即ち新鮮血清についての実験を行った日)の値のみを記することにした。

第3表 透析血清の酸性「ホ」抑制効果

前処理	血清無添加	新鮮血清添加	透析血清添加		陳旧血清添加	
			24時間	72時間	24時間	72時間
酵素活性	7.20	3.74	4.51	5.49	2.41	0.82
阻害率%	—	-48.1	-37.4	-23.8	-66.5	-88.6

実験の結果を第3表にて通覧するに陳旧血清にあつては、血清の抑制効果は放置時間の延長と共に強化されているが、透析血清例では「ホ」抑制効果は透析時間と共に減弱されている。

以上より今問題視している本物質は透析性を有する

ものである。

(6) 酸性「ホ」抑制物質の耐熱性について

加熱除蛋白血清及び灰化血清の2種を調製した。前者は、0.9%食塩水により2倍に稀釈し、それを沸騰水浴中で5分間加熱後、10,000 r.p.m. 10分間遠沈した。

一方血清 1.0ml をルツボ内で蒸発乾涸、灰化して水 2.0ml を加注浸出の上遠沈、その上澄を灰化血清浸出液とした。

第4表 加熱除蛋白血清並びに灰化血清浸出液の酸性「ホ」抑制効果

前処理	血清無添加	新鮮血清添加	加熱血清添加	灰化血清添加
酵素活性	6.97	3.87	2.51	1.93
阻害率%	—	-44.5	-64.0	-72.3

前処理：2倍稀釈血清又はそれに相当する浸出液各1.0ml を添加。

第4表に見られる如く、血清酸性「ホ」阻害効果は加熱、或は灰化何れによつても消失せず却つて僅か乍ら増強の傾向さえ認められた。

又加熱除蛋白血清稀釈度を変えてみた。

結果は第5表の如くである。4倍稀釈即ちもとの血清に換算すると約8倍稀釈液 1.0ml の添加ですでに著明な抑制効果が認められた。

第5表 加熱除蛋白血清の稀釈倍数と「ホ」活性抑制効果

前処理	血清無添加	加熱除蛋白血清添加			
		原血清	2倍	4倍	8倍
酵素活性	8.61	2.10	2.10	2.48	5.34

(7) 血清中酸性「ホ」阻害物質のイオン交換樹脂による分析

前項までの成績から精液酸性「ホ」活性に対する阻害作用は血清中の無機物質に因るものと推定される。無機物質のイオンの種類を決定するために次の実験を試みた。

まず前項の方法に準じて、血清の2倍稀釈除蛋白液を作成、これを2.0ml を採り、それぞれアンバーライト IR-120 (H型)、又はアンバーライト IR-4B (OH型) の0.7×20.0cm のカラムを通し、更に各管に水 25.0ml ずつを加注する。この通過液についてそれぞれプロムチモールブルー紙に対しほぼ pH 7.0

を示すことを再確認した。

盲験として、上記両イオン交換樹脂に蒸溜水のみを加注、前記同様に処理したものについて「ホ」阻害効果を調べた。

第6表 イオン交換処理を行った加熱除蛋白血清の「ホ」抑制効果

前処理	血清無添加		加熱血清添加		I R-120処理		I R-4B処理	
	血清無添加	血清無添加	血清無添加	血清無添加	血清無添加	血清無添加	血清無添加	血清無添加
酵素活性	8.39	3.55	8.07	8.03	9.03	2.58		
阻害率%	—	-57.7	-3.8	-4.3	+7.6	-69.2		

本表に見られる如く、「ホ」抑制効果は IR-120 で処理した加熱血清では殆んど完全に消失し、IR-4B 処理血清では、未処理の加熱血清よりもやや増強する。従つて「ホ」抑制効果を呈する物質は血清中のカチオン中に存在する事が推定出来る。

(8) 血清中に存在するカチオンの酸性「ホ」に対する影響

以上の実験に次いで成書²⁾より血清又は血漿中に存在する各種カチオンの種類及び濃度を求め、酸性「ホ」に対する態度を検討すべく、カチオン及びその濃度として次の通り選んだ。

Ca⁺⁺ 10.0mg/dl, Mg⁺⁺ 2.0mg/dl,
K⁺ 16.0mg/dl, Cu⁺⁺ 0.12mg/dl,
Fe⁺⁺ 0.13mg/dl, Mn⁺⁺ 0.004mg/dl,
Zn⁺⁺ 0.30mg/dl

これらのカチオンの塩化物又は硫酸塩を用いた。又これまでの実験では「ホ」の前処理に際し常に2倍稀釈血清を1.0ml 用いたので、上記の濃度の2分の1の濃度の溶液 1.0ml を血清に代えた。

その結果これらカチオン単独では酸性「ホ」に対してほとんど認むべき影響を与えず、Cu⁺⁺ のみが僅か

第7表 血清カチオンの酸性「ホ」阻害効果

前処理	無添加	KCl	MgSO ₄	CaCl ₂
酵素活性	7.26	7.34	7.18	7.12
阻害率%	—	+1.1	-1.1	-1.9

前処理	ZnSO ₄	CuSO ₄	MnSO ₄	FeCl ₃
酵素活性	7.26	6.56	7.30	7.26
阻害率%	0.0	-9.6	+0.5	0.0

ながら阻害作用（阻害率-9.6%）を示したにすぎない。

たまたま本学生化学教室で山下⁹⁾は、精液酸性「ホ」が二価の銅イオン及び果糖の共存の下に強い阻害を受け、又一価の銅イオンにも同様の強い阻害効果があることを実験した。

これらの実験事実を併せ考えるとき、先に第4項で得た血清の氷室内放置による酸性「ホ」阻害効果の増強は、一部血清の二価銅イオンが血清中還元性物質により還元されて、一価銅イオンとなつて酸性「ホ」に対して阻害効果を示すと推定し得る。

血清中の還元性物質に数えられる果糖(7.5mg/dl)、及びアスコルビン酸(1.0mg/dl)と二価銅イオンの酸性「ホ」阻害効果を検討した。

第8表 銅イオン及び還元物質の酸性「ホ」阻害効果

前処理	添加物なし	完全*	§-果糖	§-アスコルビン酸	§-CuSO ₄	§+CuCl
酵素活性	6.1	3.06	5.54	5.41	5.80	4.38
阻害率%	—	-49.8	-9.2	-11.3	-5.0	-28.2

* 全液量 100ml 中果糖 4mg, アスコルビン酸 0.5mg, 硫酸銅 0.24mg を含む溶液 1ml を 2倍稀釈血清に代えて添加。

§ 完全液より各果糖, アスコルビン酸, CuSO₄を除いたもの。

第8表に見られる如く二価銅イオン, 果糖及びアスコルビン酸三者が共存するとき酸性「ホ」は明らかに阻害を受け, 三者のうちいずれかを除いた時には阻害効果は殆んど消失した。

更に添加物として血清濃度の2分の1の一価銅を加えた場合にも明らかな阻害効果が認められた。

V 考 按

動物体内に酵素蛋白を注射してその運命を追求する実験は未だ少い。Fleisher 及び Wakin⁴⁾は犬にトランスアミナーゼ或は乳酸脱水素酵素を注射し, 血中よりの消失, 或はリンパ液への移行等を観察している。又八木等⁵⁾は I¹³¹で標識したキモトリプシンを調製し, これをウサギに注射してその尿中への排泄を観察している。更に若林等⁶⁾はネズミに注射したネズミ包皮腺β-グルクロニダーゼの運命を追求し, それがネズミ包皮腺に撰択的に集中して行くことを発見した。

私の行つた本実験はヒト精液「ホ」の動物体

内運命を追求したものであつて, 本酵素をウサギに注射した所それが肝に集中して行くような結果を得た。ただしこの肝集中の問題は別々の個体を用いて実験する関係で実験条件が必ずしも正確とは言ひ難く, むしろ今後の検討に待つべき問題のように考えられる。

本実験で確実に証明し得たことはウサギ及びヒト血清に精液酸性「ホ」を阻害する物質が存在する事実である。

精液酸性「ホ」の阻害物質としては, Kutscher⁷⁾はアルコール, ウレタン, 或はエチルエーテルのような麻醉性物質をあげ, 又 Reiner⁸⁾は弗化物の阻害について研究を行つている。更に Abul-Fadl 及び King⁹⁾は L(+) 酒石酸に強い阻害作用のあることを発見し, その機構については Kilsheimer 及び Axelrod¹⁰⁾が, 更にその臨床的応用については Fisheman 及び Lerner¹¹⁾がそれぞれ研究を行つている。更に P-マーキュリベンゾエートの如き SH 試薬¹²⁾や, 三価鉄及び二価銅¹³⁾及びカルシウム¹⁴⁾, マグネシウム¹⁵⁾等にも阻害効果が報告されている。

私の本論文で示された阻害物質はこの何れにも該当せず, 一価銅の示す阻害効果がこれに近かつた。血清中の還元性物質の為に血清銅(二価又は一価)が全て一価に還元され, これが阻害効果を示すのであろう。ここに新鮮血清よりも陳旧血清の方が阻害効果が強く現われる事実はこの推定を支持するものと考えられる。

前立腺癌ことにその転移巢の有無の診断に対する補助的手段として血清中の酸性「ホ」の活性値を測定することが行われているが¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾, 血清が高「ホ」血症を自己防衛する手段としてそれに対する阻害物質を予め存していることは誠に興味深く, 従つて上述の測定が診断的価値を有するか否かについて自ら限度があると断定せざるを得ない。又本診断に用いる血清が新鮮でなければならぬとする Ozar¹⁹⁾等の主張は本実験結果をもつて裏付けを得たことになると考えられる。

結 語

1) ヒト血清はヒト精液酸性ホスファターゼの活性を強く阻害する物質を備えている。

2) 本物質は透析性及び耐熱性を有し、灰化によつても其阻害作用を失わない。

3) 本物質はイオン交換樹脂に対する吸着性から見るとカチオンに属する。

4) 血清中の Cu^{++} 及び還元性物質によつて生ずる Cu^+ は精液酸性「ホ」阻害効果を示す

稿を終るに臨み終始御指導、御校閲を賜つた恩師上月教授、本学生化学教室馬淵秀夫教授に深甚なる謝意を表す。併せて終始御懇篤なる御教示、御鞭撻を戴いた本学生化学教室白井助教授に衷心より感謝します

尚本論文の要旨は第51回日本泌尿器科学会総会、第13回日本泌尿器科学会中部連合地方会に於て口演した。

文 献

- 1) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: J. Biol. Chem., **66** : 375, 1925.
- 2) Biochemist's Handbook, Richard Chay & Co. Suffaek 1961.
- 3) 山下澄夫：日本不妊学会誌発表予定。
- 4) Fleisher, G. A. and Wakin, K. G. : J. Lab. & Clin. Med., **61** : 76, 1963.
- 5) 八木 国夫・加藤昌平：生化学., **35** : 563, 1963.
- 6) 若林 正雄・二宮英則：生化学., **35** : 586, 1963.
- 7) Kutsher, W. and Pany, J. : Ztshr. f.

- Physiol. Chem., **255** : 169, 1938.
- 8) Reiner, J. M., Tsuboi, K. K. & Hudson, B. B.: Arch. Biochem. & Biophysic., **56**: 165, 1955.
- 9) Abul-Fadl, M. A. M. and King, E. J. Biochem. J., **45** : 51, 1949.
- 10) Kilsheimer, G. S. & Axelrod, B. : J. Biol. Chem., **227** : 879, 1957.
- 11) Fishman, W. H. & Lerner, F. : J. Biol. Chem., **200** : 89, 1953.
- 12) Tsuboi, K. K. & Hudson, P. B. : Arch. Biochem. & Biophysic, **55** : 191, 1954.
- 13) Schmidt, G. : The Enzymes. Vol. 5. 44, Academic Press, 1961.
- 14) Tagnon, H. J. & Steens-Lievens, A. : Cancer, **13** : 509, 1960.
- 15) Ohlmeyer, P. : Naturwissenschaften, : **33**: 508, 1942.
- 16) Glenn, J. F. and Spanel, D. L.: J. Urol., **82** : 240, 1959.
- 17) Kurtz, C. W. and Valk, W. L.: J. Urol., **83** : 74, 1960.
- 18) Peterson, C. G. : J. Urol., **85** : 1011, 1961.
- 19) Ozar, M. B., Isaac, C. A. and Valk, W. L. : J. Urol., **74** : 150, 1955.

(1965年3月3日特別掲載受付)