

〔泌尿紀要11巻5号〕
昭和40年5月

ヒト精液酸性ホスファターゼに関する研究

I ウサギに注射されたヒト精液酸性ホスファターゼの運命

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

I FATE OF HUMAN SEMINAL ACID PHOSPHATASE INJECTED INTO RABBIT

Yoshiaki TAKAO

From the Department of Urology, Kobe Medical Collage

(Director : Prof. Minoru Jogetu)

A preparation of the acid phosphatase partially purified from human semen was injected intravenously into the rabbit and the influence of the injected enzyme upon the body was investigated.

It was observed that the enzymatic activity in blood was restored to the normal level after increasing temporarily, and that acid phosphatase level elevated in liver.

It could not be proved that the human seminal acid phosphatase penetrated positively into any tissue when the enzyme was incubated with slices of the liver, kidney and heart. It was recognized, however, that a substance existing in rabbit serum was responsible for strong inhibition of the enzyme activity. It may indicate that the rapid disappearance of this enzyme in blood is due mainly to the inhibition of the enzyme.

I 緒 言

磷酸エステルを分解して無機磷酸を遊離せしめる作用を有する酵素をホスファターゼと言う (以下「ホ」と略記する) 本酵素は1907年鈴木等¹⁾により米及び麦の糠中にその存在を証明せられたのに始まり動物の各種臓器²⁾及び植物体、或いはカビ、酵母等³⁾に汎く存在することが知られている。

血清中に存在する「ホ」は専らモノエステラーゼに属するものであるが、そのうち至適 pH がアルカリ側にあるものをアルカリ性「ホ」、至適 pH が酸性側にあるものを酸性「ホ」と呼んでいる。

血清アルカリ性「ホ」については早くよりその存在が重要視され、年令の差異 (主として骨の成長、化骨に起因する増加)、食物摂取、妊

娠及び授乳に基づく生理的変動も検索され、臨床的には各種の骨疾患⁴⁾、胆道疾患⁵⁾⁶⁾の鑑別診断にも利用されている。これに比べると血清酸性「ホ」はその存在の知られるのも遅く、臨床的にその重要性を認められたのは遙かにおくれた。

動物組織における酸性「ホ」の存在は1924年、Demuth⁷⁾により人尿中で発見され、1934年 Davies⁸⁾により犬の肝臓及び脾臓においてその存在が認められた。1935年 Kutsher-Walberg⁹⁾が成人男子の尿中にかなり多量の酸性「ホ」が存在することを知りこれが前立腺に由来し、特に最も高活性を示すものは前立腺組織のミトコンドリア分画にあることを確かめて、始めて前立腺と酸性「ホ」との関係が明らかになった。Gutman-Gutman¹⁰⁾は前立腺組織の酸性ホの年

令的差異を検べ思春期に至り急にこれが増加することを知った。更にあかげざる (Rhesus Monkey) を用いた動物実験により本酵素の生産が男性ホルモンの支配を受けることを確認した¹¹⁾ 又 Moore 等¹²⁾はアドレナリンの存在によりネズミの前立腺分泌細胞が刺激されることを証明しており、今日では前立腺の酸性「ホ」の増加は生化学的な第二性徴と見做れている。ここに注目すべきことは前立腺癌と血清酸性「ホ」との関係であつて、Kutsher-Walbergの前記の発見に次いで Gutman-Sproul-Gutman¹³⁾が1936年に前立腺癌の骨転移病巣の組織に酸性「ホ」の増加している事実を認めた。更に1938年 Gutman-Gutman¹⁴⁾は播種性転移を有する前立腺癌患者の大多数に血清中の酸性「ホ」の増加を認めその生化学的性状からこれが前立腺の酸性「ホ」と同一のものであると判定した。

Huggins (1939~40)^{15), 16)}は犬の実験によつて得たヒントから、人の前立腺癌に対して、女性ホルモンを投与したり或は去勢術を施行して顕著な成果を得、同時に増加していた血清酸性「ホ」値の降下するのを見出した^{17), 18)}。

1948年 T. Fischmann¹⁹⁾は前立腺肥大症及び癌の前立腺組織中の酸性「ホ」の濃度は正常の前立腺のそれと同程度であると報告している。このことは前立腺癌組織そのものに酸性「ホ」がリンパ或は血行中に直接流入して血清中酸性「ホ」含有量を高めることを示すと思われる。したがつて癌が前立腺内に局限している場合には血清中の酸性「ホ」値は病的上昇を示さないがもし病的上昇があればこれは前立腺癌の転移がすでにどこかに発生していると考えられる。しからば血清の酸性「ホ」活性がどの程度まで忠実に前立腺癌の転移を示しているかという点が問題となる。この点に関しては臨床的に非常に興味がありかつ重要な点で従来内外の多数の報告^{20), 21), 22), 23)}があり、Fishman²⁴⁾等は血清中前立腺「ホ」の測定法を考案している。

1951年 Nesbit & Baum²⁵⁾の行つた統計的

観察によると血清の酸性「ホ」値上昇を示さない前立腺癌が約20%あり、転移を証明された前立腺癌で病的上昇値を示したものは65.5%、転移がX線等で証明されないのに値が上昇しているもの20.5%となつている。これらの成績から血清中の酸性「ホ」の病的上昇は一般に前立腺癌転移の存在を示すものと考えられているが正常値内でも必ずしも前立腺癌の転移を否定するわけにはいかない。このことについて Ozar 等²⁶⁾は測定における人為的誤差、例えば溶血、レントゲン治療等の影響を指摘している。

又 Bonner 等²⁷⁾は前立腺マッサージ或は治療的に用いたテストステロンが一過性に血清中酸性「ホ」活性を上昇せしめこれが誤差の原因となり得るとしている。

とにかく前立腺癌に於いては前立腺中に存在する強力な酸性「ホ」が血中に放出されるのは事実であり、しかもこのような高酸性「ホ」血症が生体に及ぼす影響については未だ実験が乏しいようである。そこで私は実験の高酸性「ホ」血症を惹起せしめるために人精液より本酵素を部分的に純化し、これをウサギ耳静脈に注射して本酵素の生体に及ぼす影響を検討し興味ある知見を得たので茲に報告する。

II 実験材料

実験動物：体重 2.5kg 前後の白色雄ウサギを用いた。

酵素基質：イーストマンコダック製のB-グリセリン酸ナトリウム塩 60 μ mole/ml の濃度でpHを5.0に補正した基質溶液を調製した。

酵素液：泌尿器科外来で採取したヒト精液を原材料として次のような方法で純化した。即ちヒト精液 1.0ml に0.2M酢酸緩衝液 (pH 5.0) 4.0ml を加え、0°C で1時間放置後、10,000r.p.m. 10分間遠沈し、その上澄を流水に対して24時間、更に0°C で蒸留水に対して48時間透析する。次いで10,000 r.p.m. 10分間遠沈後、その上澄を酵素液とした。この純化精液は氷室に保存すれば約1カ月間は活性に殆んど変動を示さなかつた。

本酵素液の比活性は第1表の如く、もとの精液の約5倍に上昇している。酵素活性測定は酵素液をそれぞれ0.02%卵白アルブミン液で釈希して行つた。

第1表 純化精液酸性「ホ」の比活性

酵素液	蛋白量(A) ⁺ (mg/ml)	酵素活性(B) [*] (μ mole P/ml 分)	比活性 (B/A)
稀釈精液	12.80	638.5	49.9
純化精液	1.56	385.0	246.8

⁺ 蛋白質定量法は Davidson 等²⁸⁾の法による。

^{*} 第Ⅲ節記載の反応条件で1分間に遊離されるリン酸の μ mole の量を酵素原法 1.0ml 当りに換算したもの即ち μ mole P/ml 酵素液/分である。

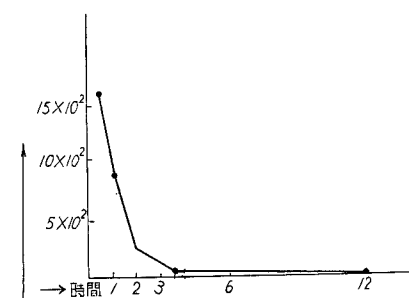
Ⅲ 実験方法

酸性「ホ」活性の測定は次のようにして行つた。

試験管に0.2M酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2.0ml, 水又は添加物 1.0ml 及び酵素液 1.0ml 入れて予め 37°C に温める。基質溶液 1.0ml を添加, 37°C 15分間反応せしめた後, 20%三塩素酢酸 1.0ml を加えて反応を止める。15分の後濾過して濾液 1.0ml について無機リン酸を Fiske-Subbarow²⁹⁾ 法により定量する。毎回基質を除いたものについて盲験を行う事を常とした。反応時間は一般に15分を原則としたが, 組織抽出液のように酵素活性の低いものを用いた場合には最高24時間とした。後者の場合には反応液にトルエン各2滴を加えて腐敗を防止した。

Ⅳ 実験結果

(1) ウサギに注射された酸性「ホ」の血液中の消長
純化酸性「ホ」溶液 5.0ml に10%食塩水 0.5ml を加えて血清と等張とし, これをウサギ耳静脈に注射した。次いで血液 1.0ml を逐次的に反対側耳静脈より採取し, 水 9.0ml を加えて遠沈する。その上澄について酸性「ホ」活性を測定した。酵素活性が弱い場合には15分と仮定した反応時間を24時間に延長した。血液 1.0ml 中24時間内に遊離する無機リン量 (μ mole)



第1図 ウサギに注射された酸性「ホ」の血液中の消長

を算出して図に示せば第1図に示す通りである。第1図に示す値は数回の実験の代表的なものであるが, 血中酸性「ホ」は一過性に上昇するが直ちに下降し4時間目にはほぼ正常に戻る。

(2) 注射された酸性「ホ」のウサギ組織中の分布

前項について静注後血中より急速に消失する酸性「ホ」の運命を追跡する目的で次の如き実験を行つた。

実験(1)と同様ウサギ耳静脈に酸性「ホ」液を注射して1時間30分後空気栓塞によりウサギを死亡せしめ, 直ちに各臓器を剔出し臓器 1.0gm に冷生理的食塩水 4.0cc を加えてホモジナイズする。次いで10,000 r.p.m. 10分間遠沈後, 上澄を酵素液として使用した。酸性「ホ」活性測定条件並びに活性の表現方法は実験(1)と同様である。

第2表 酸性「ホ」静注後に見るウサギ各種組織酸性「ホ」活性の変動
(μ mole P/gm 湿性重量組織/24時間)

組織名	酸性「ホ」活性量			B-A
	生理的食塩水注射群(A)	失活酵素液*注射群	酵素液注射群(B)	
肝	278.2	344.4	976.3	798.1
腎	388.1	338.0	472.5	74.4
脾	544.1	515.7	606.5	92.1
心	71.1	78.5	146.1	75.0
肺	214.8	206.9	295.8	81.0
血液	0	0	562.2	562.2

(表中数字は各5例の平均値である。)

* 「ホ」酵素液を 70°C 30分間加熱して失活させたもの

第2表に示す如く, 各組織中肝及び血液に於いて酸性「ホ」活性は特に著明に上昇し, その他の組織では上昇は著明でない。又肝と血液の上昇値の差は正常肝の酸性「ホ」活性の個体差から考えて必ずしも有意差とは考え難く, 更に適確な成績を以てするのでなければ今直ちに肝の酸性「ホ」吸収を推定する根拠となし難い。

(3) 酸性「ホ」に対するウサギ各種組織切片の作用
前項の実験で静注した酸性「ホ」の組織親和性に関しては決定的な証拠は得られなかつたから, 更に *in vitro* に於て組織切片と酸性「ホ」の親和性について観察を試みる事にした。

酸性「ホ」酵素液を水で約50倍に稀釈し, 活性を約 100 μ mole/ml/15分とする。この稀釈酵素液 2.0ml

に1.8%食塩水 2.0ml を加えて等張とし、これに組織切片 500mg を加え、37°C で1時間反応せしめた後、組織切片をガラス鈎にて除く。反応液はその 1.0ml に生理的食塩水 4.0ml を加え、10,000r.p.m. 10分遠沈後、その上澄 1.0ml を酵素液とした。

一方前記組織切片は冷生理的食塩水中で2回洗滌した後、生理的食塩水 2.0ml と共にホモジエナイトしてそのホモジエネートを酵素液とした。

反応液中の酸性「ホ」活性は第3表に表示する通りである。盲験として酸性「ホ」を含まないで組織切片のみを反応せしめたが、液には「ホ」活性は認められなかった。

第3表 酸性「ホ」活性に対する組織切片の影響
($\mu\text{mole P/ml}$ 前処理液/15分)

組 織 名	酸性「ホ」活性
無 添 加	9.05
肝	22.62
腎	16.12
心	21.06

(表中数字は4例の平均である)

本表に見られる如く、「ホ」活性は肝、腎又は心の切片の存在する時、明らかに増強する傾向が認められ、酸性「ホ」が組織切片に吸収されて失われるとの推定は否定せなければならない。

表中に見る組織切片の示す「ホ」活性増強作用が組織切片より遊離した蛋白質等の単なる酵素保護作用によるものか或は又特殊な因子によるものかこの成績だけでは判定出来ない。

次に組織切片の酸性「ホ」活性を第4表に示す。

対照実験として、酸性「ホ」酵素液を加えないで反応せしめた組織切片の酸性「ホ」活性を測定したものを本表に附記する。

本表に見られる如く、酸性「ホ」液と反応せしめた組織切片には若干の酸性「ホ」活性の上昇が認められ腎においてやや強い酸性「ホ」活性が認められ、従つ

第4表 組織切片の酸性「ホ」活性
($\mu\text{mole P/g}$ 組織/2時間)

前処理 組織名	酸性「ホ」液 無 添 加 (A)	酸性「ホ」液 添 加 (B)	B-A	%
肝	22.36	28.21	5.85	26.1
腎	29.24	38.53	9.29	31.9

(表中数字は3例実験の平均値である)

て肝のみが酸性「ホ」を取り込むような結果は得られなかった。

(4) 酸性「ホ」に対するウサギ血清の影響

上記の実験の結果からは静注した酸性「ホ」が特殊の組織に取り込まれる事を確証することは出来なかつた。次に静注した酸性「ホ」がウサギ血清中より消失する原因として考えられる可能性はウサギ血液中に酸性「ホ」の破壊を来す因子の存否如何である。之を検するため次の如き実験を行つた。

酸性「ホ」と血清との前処理は前項(3)とはほぼ同様の条件で行つた。まず、酸性「ホ」酵素液を水で約100倍に稀釈しその活性を $25\mu\text{mole P/ml/15分}$ とする。一方ウサギ血清を生理的食塩水を用いて2倍に稀釈する。試験管には稀釈酸性「ホ」酵素液 20ml, 稀釈ウサギ血清 1.0ml 及び1.8%食塩水 2.0ml を加えて、37°C 1時間で反応せしめる。前処理終了後反応液は稀釈することなくその 1.0ml を酵素液とした。

実験結果は第5表に示す如く精液酸性「ホ」はウサギ血清と共に前処理を施すとき、活性が著しく減少することを知つた。

第5表 酸性「ホ」に対するウサギ血清の影響
($\mu\text{mole P/ml}$ 前処理液/15分)

前 処 理	血性無添加	血 清 添 加
酵 素 活 性	9.05	3.10
阻 害 率 %	—	-65.7

(表中数字は4例実験の平均値である)

V 考 按

私は、はじめ人工的高酸性「ホ」血症を起させる目的でヒト精液酸性「ホ」をウサギの耳静脈に注射した。結果、予想に反し血液中酸性「ホ」活性は一過性上昇を示すのみで、短時間内に下降して正常値に復した。本実験の結果に基きこの血中酸性「ホ」の急速な消失の原因として次の2点が考えられる。

その第1は注射された酸性「ホ」が肝に集中することである。およそ正常ウサギの肝酸性「ホ」活性値は可成の個体差を示す事は周知の事に属す。之に加えて本実験では別々の個体を用いたものであるから酸性「ホ」を注射したウサギ及びそうでないウサギの肝酸性「ホ」活性の差を適確につかむことは難しい。従つて両者の間の差を以て直ちに肝細胞の積極的な酸性

「ホ」の取り込みと断定を下す事は早計である
と考える。

肝切片を用いた *in vitro* の実験に於ては、
この考えは否定され、むしろ肝より酸性「ホ」
活性を上昇せしめる物質の遊出を思わせる知
見を得ている。本物質の特性に関する論議は今
暫くおくとして、本物質のために肝に酸性「ホ」
が集中するような結果が得られたとも考えられ
る。

第2に考慮される因子として血清中に酸性
「ホ」を失活せしめる物質の存在である。この
実験結果は極めて明白なものであるからこの現
象は一つの間違のない事実としてよいと思われ
る。

しかし本実験ではヒトの酵素とウサギの血清
とを反応せしめたものであつて、種属の相異に
よる異種蛋白質相互の免疫化学変化を無視する
ことは出来ない。其の点は今後の研究に待たね
ばならない。

結 語

1) ヒト精液酸性ホスファターゼをウサギ静
脈内に注射した所本酵素活性は一過性に上昇し
た後、直ちに正常値に復する。

2) ヒト精液酸性ホスファターゼを注射した
ウサギの肝酸性ホスファターゼ活性は上昇す
る。

3) ヒト精液酸性ホスファターゼと反応せし
めた肝、腎、心等の組織切片では酸性ホスファ
ターゼを積極的に取り込むとの証拠は得られな
かつた。

4) ウサギ血清中にはヒト精液酸性ホスファ
ターゼの活性を強く抑制せしめる物質が存在す
る。

文 献

- 1) Suzuki, U., Yoshimura, Y. and Takaishi, M. : Tokyo Imp. Univ. Bull., 7 : 503, 1907.
- 2) Kay, H. D. : Physiol. Rev., 12 : 384, 1932.
- 3) Rimington, C. and Kay, H. D. : Biochem. J., 20 : 777, 1926.
- 4) Kay, H. D. : J. Biol. Chem., 89 : 235,

- 1931.
- 5) Robert, E. : Brit. J. Exp. Med., 11 : 90, 1930.
- 6) Robert, E. : Brit. Med. J., 1 : 734, 1933.
- 7) Demuth, F. : Biochem. Ztschr., 159 : 415, 1925.
- 8) Davies, D. R. : Biochem. J., 28 : 529, 1934.
- 9) Kutscher, W. and Wolbergs, H. : Ztschr. f. Physiol. Chem., 236 : 237, 1935.
- 10) Gutman, A. B. and Gutman, E. B. : Proc. Soc. Exper. Biol & Med., 39 : 529, 1938.
- 11) Gutman, A. B. and Gutman, E. B. : Proc. Soc. Exper. Biol & Med., 41 : 277, 1939.
- 12) Moore, C. R., Price, D. and Gallagher, T. F. : Am. J. Anat., 45 : 71, 1930.
- 13) Gutman, E. B., Sproul, E. E. and Gutman, A. B. : Am. J. Cancer., 28 : 485, 1936.
- 14) Gutman, A. B. and Gutman, E. B. : J. Clin. Investigation, 17 : 473, 1938.
- 15) Huggins, C. and Stevens, R. E. : J. Urol., 43 : 705, 1940.
- 16) Huggins, C. and Clark, P. J. : J. Exper. Med., 72 : 747, 1940.
- 17) Huggins, C. and Hodges, C. V. : Cancer Research, 1 : 293, 1941.
- 18) Huggins, C., Stevens, R. E. and Hodges, C. V. : Arch. Surg., 43 : 209, 1941.
- 19) Fischmann, T. : J. Urol., 59 : 1194, 1948.
- 20) Robinson, J. N., Gutman, E. B. and Gutman, A. B. : J. Urol., 42 : 602, 1939.
- 21) Woodard, H. Q. and Dean, A. L. : J. Urol., 60 : 158, 1947.
- 22) Hock, E. and Tessier, R. N. : J. Urol., 62 : 488, 1949.
- 23) 黒田一秀 : 日泌尿会誌., 44, 1, 102, 1953.
- 24) Fishman, W. H. and Lerner, F. : J. Biol. Chem., 200 : 89, 1953.
- 25) Nesbit, R. M. and Baum, W. C. : J. A. M. A., 145 : 1321, 1951.
- 26) Ozar, M. B., Isaac, C. A. and Valk, W. L. : J. Urol., 74 : 150, 1955.
- 27) Bonner, C. D., Homburger, F. and Fish-

man. W. H.: Surg. Gynec. & Obst., 99 :
179, 1954.

29) Fiske, C. H. and Subbarow, Y.: J. Biol.
Chem., 66 : 375, 1925.

28) Davidson, H. M. and Fishman, W. H. :
J. Biol. Chem., 234 : 526, 1959.

(1965年3月3日特別掲載受付)

新発売

出血時間を著しく短縮する！

■ 新止血促進剤

ダイシニン

技術提携 スイス・オム ラボラトリー



〈特長〉

- ダイシニンは(1)毛細血管の強化および収縮作用(2)血小板の増加および機能の亢進作用など 生理的な止血作用により出血時間を著しく短縮する
- ダイシニンは 他の多くの止血剤と異なり血液の凝固性をたかめることがないので安全に投与ができる

〈適応症〉

止血剤として次の各科領域において使用する
内科：外科：耳鼻咽喉科：産婦人科：泌尿器科：歯科

〈包装〉 250mg 2ml 5管・30管

文献
試供品



鳥居薬品
東京・日本橋局区内

すでにご使用いただいております合成止血剤ナフチオニンの作用機序は ダイシニンとは全く異なります 両者の併用は一層の止血効果が期待されます