



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血清の Spermicidal action に関する研究 : (I) 物理化学的操作を加えた血清の Spermicidal activity の変化について
Author(s)	松本, 久喜; MATSUMOTO, Kyuki; 森田, 二郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 3(4), 32-39
Issue Date	1960-10-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11709
Type	departmental bulletin paper
File Information	3(4)_p32-39.pdf



血清の Spermicidal action に関する研究

(I) 物理化学的操作を加えた血清の Spermicidal activity の変化について

松 本 久 喜*
森 田 二 郎*

Studies on the spermicidal action of the serum

(I) On the changes of the spermicidal activity in serum by physico-chemical treatments

By

Kyuki MATSUMOTO** and Ziro MORITA**

I 緒 言

METCHINIKOFF¹⁾ が家兎新鮮血清に依つて家兎精子が直ちにその運動性を失う事を知つて以来、精子と血清は免疫学的見地から、又人工授精という実際の要求とから研究が着手され、精液の稀釈液として血清の可否が論ぜられ加熱血清は新鮮血清に比して精子の生存性がよいとされて来た。血清中に初めて精子の運動阻害物質 Spermicidal Substance を化学的に捕えたのは井貫²⁾であるが此の物質の性質並に本態に関する研究で最も一般的に認められているのは CHANG³⁾である。彼の広汎な研究によつて Spermicidal factor が人、牛、家兎、天竺鼠及び白鼠の新鮮血清中に見出され、熱に不安定な高分子物質であり、その性質が補体のそれに酷似していることが解つた。彼の研究の直後、SMITH⁴⁾ は此の事実を確認しその本態が補体でない事を示した。

著者等は精子と血清の相互作用を研究中、此の事実を再認し、当該物質の本態及び作用機序が未だ探究されていないので、更に進んでその物理化学的諸性質に就て研究を行つたので茲に報告する。

尚、牛精液を快く提供して戴いた北海道立家畜人工

授精所及びその運搬の勞を煩わした札幌酪農協家畜人工授精所の方々に厚く感謝の意を表する。

II 実験材料及び方法

(1) 供試動物

採血用として北大農学部付属農場第1畜産部繁養動物中、馬7、驢2、牛5、緬羊5、山羊4、家兎7、精液採取用に家兎6、緬山羊各1、牛3頭を供し、牛精液は北海道立家畜人工授精所繁養種雄牛のもので人工腔法によつて採取されたものである。

(2) 供試材料及び実験法

牛、馬、緬山羊に於ては頸静脈より、家兎に於ては耳静脈より採血し、血液の凝固を待つて血清を分離した。一方精液は CHANG の方法³⁾ に従つて一定数の精子を血清浮游液とし、その運動性を顕微鏡下室温で観察し、一般に血清量は 0.5 ml を標準として用いた。

(3) 記載法

CHANG の示したものを變更して次の方法に依つた。数字は spermicidal substance の活性度を示す。

卅, 3: 反応系に於て注入精子が1/2~1時間以内に全部運動性を失つたもの。即ち spermicidal activity が最も強いもの。

卅, 2: 混和後1時間で全視野の精子中10~30%のもののみが運動性を示したもの。

+, 1: 混和後1時間で40~70%の精子が運動性を

* 北海道大学農学部畜産学研究室

** Laboratory of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

示したものを。

一、0：血清を加えない緩衝液中の精子の運動性と殆んど同様に大部分の精子が活潑な運動性を示したものの。

尚、対照としては 56°C 30 分間加熱した血清を用いたが、特に必要としない限り図表の煩わしさを避けて記入を省略した部分もある。又材料に就て記入のないものは主として血清は馬、精子は家兎のものである。尚本文中の個々の結果は数回以上の実験例に基いたものである。

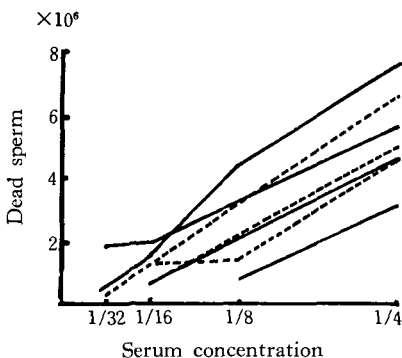
III 実験結果

井貫, CHANG, SMITH 等によつて研究されて来た Spermicidal Substance の諸性質に就て各々追試を行つたが、これら研究者の見解と異なる点及び新知見のみを指摘要約する。

(1) Spermicidal action の量的関係

CHANG³⁾ によれば 0.1 ml の血清は約 120~160 万の精子を殺すので、1 ml では 1200~1600 万の精子が殺されねばならないとしている。之等の血清と精子の量的関係を観察したのが第 1 図である。

Fig. 1 Quantitative determination of the spermicidal substance in serum



此の図は血清の稀釈度と血清によつて運動を止められた不動精子数との関係を表わしたものであるが、両者の関係は直線的であり、血清 1 ml は凡そ 2000~4000 万の精子の運動を止める事になる。此の値は CHANG のものより遙かに大であるが、後述の様に血清中の spermicidal substance は室温に放置する事によつて漸次 activity を減少するので血清の新鮮度、個体差によつて activity の差異の現われるのはむしろ当然と思はれる。

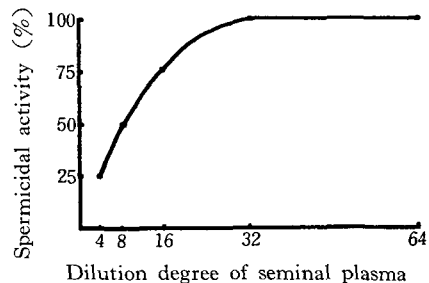
(2) Spermicidal action の時間的關係

精子は血清と混和後、比較的短時間内に運動性を消失する。その過程を時間的に追求すると、一般に 3~4 分間に殆んど運動性を失ひ、5~10 分後には完全に消失する。従つて正常な個体の血清であれば混和後 30 分内には精子の運動性は全く消失した。又、混和後長時間経過したもので一度消失した運動性が再び回復する様な事は観察されなかつた。

(3) Spermicidal action に対する精清の影響

精子と血清の相互作用を観察する場合、精清の存在及び濃度が如何程関係しているかを知る必要がある。第 2 図は遠沈によつて精清を分離し、倍数稀釈した精清液と血清とを等量混合し、その spermicidal activity を調べたものである。

Fig. 2 The spermicidal activity of the serum diluted with seminal plasma



第 2 図に示した如く精清の濃度が稀釈度 32 倍迄 spermicidal activity を抑制する効果を持つて居り、従つて此の抑制作用は 32 倍以上稀釈されると消失する。

(4) 血清濃度と Spermicidal activity

血清濃度と spermicidal activity との関係は比例的關係にあり、此の事は前述した通りである。しかし或る特殊な個体の血清と精子の間には必ずしも比例的關係が成立しない事がある。即ち spermicidal substance の濃度が高い原血清に於て activity が最大と思はれるにも拘らず、斯る個体の血清と精子の間では 0~2 倍稀釈液では activity が弱く、4~8 倍稀釈液で最高の activity を示すものがあつた。此の現象は更に生理的食塩水及び Ringer 液に対して血清を透析しても現れて来た。又、経験的に家兎精清を用いると此の現象に乏しいが、牛精清を用いると可成りの頻度で発現する傾向がある事を知つたが、此の現象の機構に就ては尚不明である。

(5) 精子の凝集性と Spermicidal activity

正常血清による精子の凝集現象は KATO⁵⁾, HENLE et al.⁶⁾, SMITH⁴⁾, 及び MATSUMOTO and MORITA⁷⁾ によつて論じられて来たが精子は血清の新旧如何に関せず凝集を起す。CHANG³⁾ は血清の spermicidal action は或る種の蛋白によつて誘起され、精子を凝集して殺すものである事を主張しているが、筆者等は井貫²⁾の見解と同様で凝集要因とは無関係な物質によつて spermicidal action は起つていると考える。即ち 1) 新鮮血清によつて運動を停止せしめられた精子の中には凝集しているものと然らざるものがある。2) 加熱して当該作用を失つた血清も著しい凝集能を持つ。3) 新鮮血清を精子で吸収し当該作用を消失させた吸収血清に於ても凝集能を持つ。4) 例外的に spermicidal action を全く欠く個体が稀に存在するが、此の個体の新鮮血清には凝集能を著しく有すを。

以上の理由及び実験的事実より精子凝集を誘起する物質と spermicidal substance は異なるものであると認められる。

(6) Spermicidal activity の種間差異

血清の当該作用に動物の種によつて activity の差異を生ずるであろう事は想像に難くない。同様に精子の抵抗力も当然考えられるが、同一条件で各動物の精子を集めるのは困難であるので、血清の spermicidal activity のみを調べた結果、第1表の通りであつた。

Table 1 Species difference of the spermicidal activity

serum	sperms				Total
	Bovine	Rabbit	Ram	Goat	
Cow	5.4	11.2	10.2	7.8	34.6
Horse	5.5	10.8	12.1	9.2	37.6
Ass	9.7	13.3	13.0	13.0	49.0
Sheep	7.6	9.4	14.0	9.2	40.0
Goat	12.8	15.0	14.2	13.8	55.8
Rabbit	13.1	12.3	14.7	15.0	55.1

同表中の数字は5回の試験により得た値によつて activity の強弱を論じたものである。その結果は、馬、驢、緬山羊、家兎血清中、山羊及び家兎血清は他種血清に比して可成り activity が高い事を知つた。又同種の精子と血清との反応は異種の精子と血清との反応に比し、その activity に於て特に顕著な差異は認められなかつた。

(7) Spermicidal activity の個体、性、年齢による差異

血清中に存在する当該物質の activity は性及び年齢に依る差異が無く、更に同種及び自家血清でも spermicidal な作用を示した。

然し個体によつて activity に顕著な差がみられ、供試馬7頭中1頭は完全に activity を欠除していた。更に activity を欠除している個体は、2年間継続した調査では activity が再現する事は無く、調査動物の血清の spermicidal activity の消長は認められなかつた。尚第2表は之等の関係の実験の一部を示すもので、家

Table 2. Individual difference of the spermicidal activity

Rabbit Serum Individual	Rabbit Semen Individual					
	0.22	21	0.20	0.6	55	60
3.08	卅	卅	卅	卅	卅	卅
5	—	+	卅	+	+	+
1.14	+	卅	卅	卅	卅	卅
0.22	卅	卅	卅	卅	卅	卅
0.27	卅	卅	卅	卅	卅	卅
21	卅	卅	卅	卅	卅	卅
5.0	卅	卅	卅	卅	卅	卅
315	卅	卅	卅	卅	卅	卅
1.08	+	+	卅	+	卅	卅
55	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Control (3.08)	—	—	—	—	—	—

兎血清原液中に一定量の家兎精子を浮游させて activity を調べた結果であるが、No. 5 の血清は供試家兎6頭の精子を完全に致死せしめ得ないし No. 1.08 の血清は或る個体 (0.20, 55, 60) の精子に対しては spermicidal に作用するのに対して他の個体 (0.22, 21, 0.6) の精子には弱い activity しか示さなかつた。斯る事実より個体差が精子の抵抗力の差に基くものよりも血清の activity の高低に依る差異の方が大であると思つた。

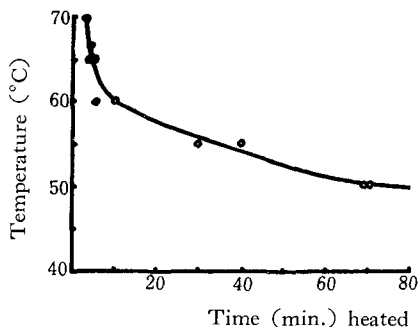
(8) 加熱に依る Spermicidal activity の変化

血清中の spermicidal substance は易熱性であり、60°C 以上の加熱で 10 分以内に activity を失つた。55°C で 30~40 分、50°C で 70 分間の加熱に依り完全に作用を消失した。此の関係を第3図に示した。

尚同図の指点は完全に spermicidal substance が activity を消失した温度とそれに要した時間を示して

いる。

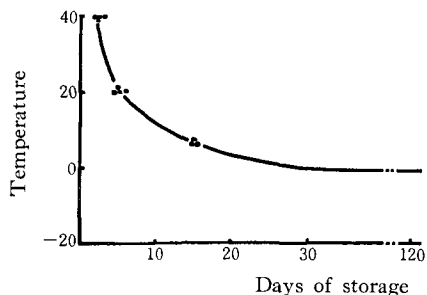
Fig. 3 Time and temperature inactivating the spermicidal substance



(9) 低温による Spermicidal activity の変化

易熱性成分である当該物質は低温に対して著しく安定であり、血清を 5~6°C に貯蔵する事によつて 10 数日、-20°C に凍結せしめると 120 日以上も完全な activity を保持していた。此の関係を第 4 図に示した。

Fig. 4 Stored days and temperature inactivating the spermicidal substance



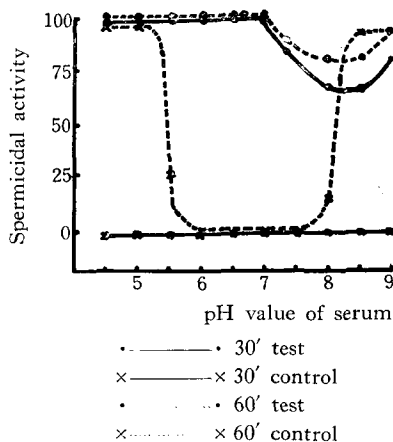
(10) pH による Spermicidal activity の変化

当該物質の pH による作用消失の状態を第 5 図に示した。

pH を 0.2 N, HCl 及び 0.1 N NaOH で変化せしめた場合血清 0.5 ml に対し HCl, NaOH の添加量は 0~0.2 ml でありその血清稀釈度は 0~1.4 倍である。従つて斯る低稀釈度では稀釈による activity の減少はあり得ない。

混和後 30 分にして既にアルカリ側で作用を失つて居り、酸性側で安定であつた。1 時間後に於ける activity もアルカリ側で漸次作用を消失して来たが、非働性血清中の精子 (対照) も pH の影響を受け pH 5.5 以下或は pH 8.0 以上で生存不能となるので pH

Fig. 5 Effect of pH value on the spermicidal substance

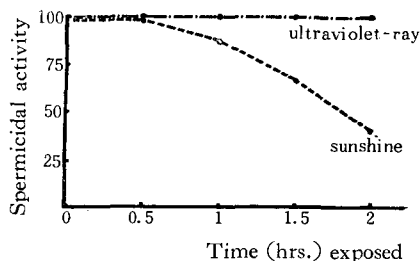


5.5~8.0 の間で activity の変化を論ずる事になるが pH 7.0 以上で部分的に作用を消失したので、当該物質は pH 5.5~7.0 で最も安定で、アルカリ側では不安定になる事を示している。

(11) 太陽光線及び紫外線による activity の変化

光による spermicidal activity の変化を観察した結果は第 6 図である。紫外線は波長 2700~3700Å (平均 3200Å) であつて照射温度は 20°C である。

Fig. 6 Spermicidal activity of serum exposed under the sunshine and ultraviolet-ray



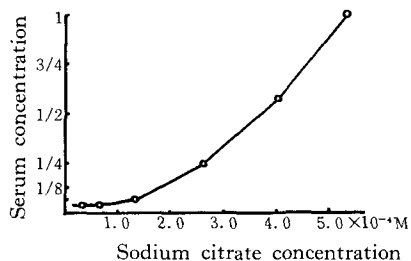
血清中の spermicidal activity は太陽光線照射後 1~2 時間で減少し始めたが太陽光線は光のみならず熱の影響もあるので両者の協同作用によつて作用が消失するものと思われる。又紫外線を照射した場合は生理作用を示すと云われる前記波長では activity に殆んど変化を受けていなかった。

(12) ケエン酸ナトリウムによる Spermicidal activity の変化

血清中の当該物質がケエン酸ナトリウムで破壊され

る事は CHANG³⁾ によつて指摘されている。然しその作用機序は全く不明である。クエン酸ナトリウムの濃度と spermicidal activity との関係を示すと第7図の如くであり、クエン酸ナトリウムの存在によつて

Fig. 7 Destruction of the spermicidal substance by the sodium citrate



activity は低下し、その濃度が高いと完全に当該作用を破壊し、 $5.3 \times 10^{-4} M$ の濃度で当該物質に対する影響は無くなつた。即ち当該作用破壊に要するクエン酸ナトリウムの最少有効濃度は $5.3 \times 10^{-4} M$ であり、これ以上の濃度は当該作用を部分的或は完全に消失せしめる。

(13) Spermicidal substance の水に対する透析性

血清を脱イオン水に対して 24~48 時間透析し、その水溶部及び不溶部について spermicidal test を行つた。此の場合精子は純水中に生存し得ないから得られた水溶部は 0.9% NaCl 液になる様にし、不溶部は 0.9% NaCl 液で溶解した。この様にして得られた水溶部及び不溶部は共に spermicidal activity を完全に消失していた。此の結果を第3表に示した。

Table 3. Effect of dialyzed serum on the spermasozoa

test	against water				against 0.9% NaCl sol.
	soluble	insoluble	soluble + insoluble	soluble + KRP	
ex. 1	—	—	—	—	卍
ex. 2	—	—	—	—	卍
ex. 3	—	—	—	—	卍

更に 0.9% NaCl 液の代りに Krebs-Ringer 液で溶解稀釈しても当該作用を現わさなかつた。又水溶部と不溶部とを混合して Krebs-Ringer 液に溶解しても此の作用は再現しなかつた。然るに 0.9% NaCl 液に対して血清を透析すると activity を現わした。

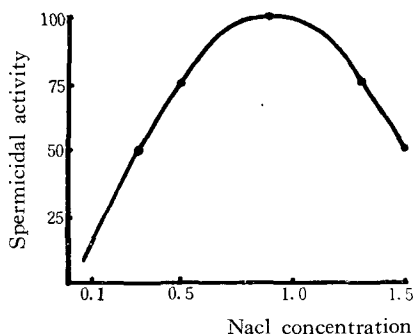
以上の事実は溶液中に NaCl が存在しなければ当該物質は速かに作用を失つて来る事を意味すると認められる。

(14) Spermicidal action と NaCl との関係

spermicidal action の必須イオンとして NaCl の中、 Na^+ 或は Cl^- の何れが必須であるか或は両者共必須であるのかを調査した。即ち血清と等張の 4.33% Na_2SO_4 及び 1.6% $CaCl_2$, $MgCl_2$ を透析外液として血清を透析すると、 Na_2SO_4 に対して透析した血清の非透析部は透析を行わなかつた同一試料の血清と等しい activity を示したのに対して $CaCl_2$, $MgCl_2$ に対して透析した血清は完全に activity を消失していた。以上の事実から spermicidal action を現すのに必要なイオンは Na^+ であろうと考えられる。

次に spermicidal action を現すのに必要な Na の濃度を NaCl として示したのが第8図である。

Fig. 8 Effect of various NaCl solutions on the spermicidal substance



同図に示した様に 1.0~9.0% NaCl (0.39M) を中心として activity は最高であり、0.5% (0.21M), 1.5% (0.65M) で部分的に作用を消失した。又 NaCl の皆無によつて完全に activity を消失した。更に透析終了後、総ての液は 0.9% NaCl 液として置換したが、NaCl の過剰或は不足によつて最大の activity を示し得ず作用を消失している事より、NaCl の過不足に依つて起つた activity の消失は不可逆的である事を示すものと考えられる。

(15) NaCl の濃度と Spermicidal activity 消失速度との関係

血清を硫酸安門で塩析する場合(後述)塩析後生理的食塩水で透析し硫酸安門を除去すると ① 塩析時飽和硫酸溶液を用いるか或は ② 硫酸安門粉末を血清に添加して塩析するかによつて当該作用に著しい差が見

両表に示した様に spermicidal substance は 18.3% (1/3 飽和) 硫酸での沈澱物中のみ存在しその他の fraction には現れなかつた。更に 1/3 飽和での沈澱物は 1/2 飽和での沈澱物によつて賦活され、0.4~0.5 飽和での沈澱物は spermicidal activity を全く欠くにも拘らず 1/3 飽和での沈澱物を加えると 1/3 飽和での沈澱物よりも常に activity が高かつた。此の事から 21~26% での沈澱物中には spermicidal substance の activator 或は activity を現すのに不可欠の高分子物質が存在すると考えられ、此のものは spermicidal substance そのものではあり得ない。

IV 考 察

精子の人工保存液としての血清の役割は古くから研究されて居り、鶏血清のみが有効であると経験的に考えられて来た(石川⁹⁾, GRODZINSKI and MARCHLEWSKI¹⁰⁾)。然し良好な基質として作用すべき血清は精子の運動性に対して阻止的に作用する事は CHANG の提示する迄考えられなかつた。彼は spermicidal substance が trypsin で破壊され非透析物として残存するので一種の蛋白と推定している。

一方同じ生殖細胞である卵子は血清をそのよき medium とする事が近時の研究によつて明かにされている(MARDEN and CHANG¹¹⁾)。血清に対して精子と卵子とでは全く異なつた反応を示す事は興味ある事実である。

血清中には種々の蛋白が存在するが体細胞就中精子に対して toxic に作用する事は興味ある事で種々の作用及び性質は酵素のそれに酷似している。即ち当該物質は易熱性で血中に一定量しか存在せず精子と混和後瞬時にして精子の運動性を停止せしめ、時間的に反応が迅速である。更に同種血清就中自家血清中にも存在しているが個体差が著しい。一般に血清蛋白濃度と spermicidal activity は比例しているが個体によつては必ずしも此の関係は成立せず血清の 4~8 倍稀釈液は血清原液より activity が高い場合もある。従つて定量的意味で spermicidal test を行う場合には予め血清蛋白の activity を測定しておかなければならない。更に特異的な事は人血清は人精子の運動性を停止せしめない事である(CHANG⁹⁾) が他の種の精子には致死的に作用すると云う事であり、人血清を除くと他の動物血清は同種自家を問わず精子の運動を停止せしめる。此の事は血清及び精子の化学的組成が人と動物によつて著しく相違する事を示すものである。

CHANG は COHN の方法¹²⁾に従つて動物血清をエタノールで分割したが何れの fraction にも此の物質を見出す事が出来なかつた。之は spermicidal substance が NaCl の濃度が低下すれば直ちに activity の減少失活を来すと云う性質を知らなかつた為と思われる。著者等は未だエタノール分割を行つていないが塩析法で示した様に spermicidal substance は Globulin 分画中に見出された。然しながらクエン酸ソーダを用いて凝血を阻止した血漿にはクエン酸ソーダが spermicidal substance に対して破壊的に作用するので血漿中からは此の作用が見出し得ない事は前述の通りである。

更に前記研究者等によつて有機溶媒に対する spermicidal substance の態度が調査されているが実験法に疑問の点が多いので今後此の物質の精製と云う面からの検討がより多く為されなければならないものと考ええる。

V 結 論

M. C. CHANG によつて指摘された動物血清中の spermicidal substance に就きその物理化学的操作を加えた場合の activity の変化について研究し、次の様な結果を得た。

- ① 当該物質の活性は種間差異よりも個体差が大である。
- ② 性及び年齢による活性の差異が認められなかつた。
- ③ 一般に当該作用は血清濃度に比例する。
- ④ 血清による精子凝集の有無と血清の spermicidal activity との間には関係が無いものと認められた。
- ⑤ 当該物質は熱に不安定であるが凍結すると活性は長時日間消失しなかつた。
- ⑥ 当該物質はアルカリで著しく不安定であり弱酸性で安定であつた。
- ⑦ 太陽光線を 1~2 時間照射すると漸次活性を失うが、紫外線のみでは 2 時間の照射によつても活性に変化が認められなかつた。
- ⑧ 当該物質は活性を現すに当り Na を必須イオンとするものと考えられた。
- ⑨ NaCl の濃度が 0.9% に於て最も此の物質は安定であり、その濃度の増減により活性を減弱或は消失した。
- ⑩ 0.9% NaCl 液に対して透析すると非透析物とし

て残存する。

- ⑩ 血清を硫酸安門で塩析すると低濃度の硫酸で析出して来た。
- ⑪ 塩析によつて分割した或る fraction は当該物質を賦活する様である。

以上の事実より血清中の spermicidal substance は Na を必須イオンとし、クエン酸ナトリウムで破壊される塩難溶性蛋白と思考される。

参考文献

- 1) METCHNIKOFF, E. (1900) Ann. Inst. Pasteur 14: 1
- 2) 井貫 (1938) 京都府立医大誌 23: 3
- 3) CHANG, M. C. (1947) J. Gen. Physiol. 30: 321
- 4) SMITH, A. U. (1949) Proc. Roy. Soc. B. 136: 46
- 5) KATO, K. (1936) Mem. Fac. Sci. Agr. Taihoku Imp. Univ., formosa, Jap. 19 no. 1
- 6) HENLE et al (1938) J. Exp. Med. 68: 335
- 7) MATSUMOTO, K. and MORITA, Z. (1958) 北大農学部紀要 3: 140
- 8) 平井 (1952) 生物物理化学 1: 87
- 9) 石川 (1930) Rep. Proc. 4th World's Poult. Congr. 90
- 10) GRODZINSKI, Z. and MARCHLEWSKI, J. (1935) Bull. Acad. Sci. Cracovie BII 347
- 11) MARDEN and CHANG (1952) 畜産の研究 13: 127 より引用
- 12) COHN (1946) J. Am. Chem. Soc. 68: 459
- 13) MANN, T. (1954) "The Biochemistry of Semen" Methuen & Co. L. T. D.: London

Résumé

The authors studied on the physico-chemical properties of the spermicidal factor pointed out by CHANG, M. C. in fresh sera of various animals. The results obtained are summarized as follows.

- (1) Difference of the spermicidal activity in

sera was obviously large between individuals rather than between species.

(2) No relationship was seen between the spermicidal activity in sera and the sex or age of the tested animals.

(3) The activity was proportional to the serum concentration.

(4) No relationship was seen between the spermicidal activity of serum and the agglutination of spermatozoa by the serum.

(5) Although the spermicidal substance was unstable, and thermolabile, frozen sera stored for long periods completely maintained their activity.

(6) This substance showed activity in pH range from 5.5 to 7.0 (acid side) but at pH values of 7.0-9.0 (alkaline side) the activity of this factor was partially destroyed within 1 hour.

(7) The activity was gradually lost as a result of exposure to sunshine but there was no loss resulting from exposure of the serum to ultra-violet ray for 2 hours.

(8) Natrium is an essential ion for the action of the spermicidal substance on the spermatozoa.

(9) The spermicidal substance was stable in 0.9% NaCl solution and its activity was rapidly destroyed in high and low concentrations of NaCl solution.

(10) The substance could not be forced to pass through a cellophane membrane by dialyzing the serum against 0.9% NaCl solution, Ringer solution or Krebs-Ringer solution for 24 hours.

(11) When the serum protein was fractionated by means of ammonium sulfate, the protein fraction salted out in low concentration of ammonium sulfate revealed high activity without exception.

(12) The spermicidal substance seemed to be activated by some other substance salted out by ammonium sulfate.

From these findings, the spermicidal substance seems to be a protein that is salted out by low concentration of ammonium sulfate and needs natrium ion for the reaction of this factor and is destroyed by sodium citrate.