



Title	血清の Spermicidal action に関する研究 : (II) 当該物質の物理化学的性質について
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), 40-46
Issue Date	1960-10-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11710">https://hdl.handle.net/2115/11710</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3(4)_p40-46.pdf



# 血清の Spermicidal action に関する研究

## (II) 当該物質の物理化学的性質について

松 本 久 喜\*  
森 田 二 郎\*

### Studies on the spermicidal action of the serum

#### (II) On the physico-chemical properties of the spermicidal substance

By

Kyuki MATSUMOTO\*\* and Ziro MORITA\*\*

### I 緒 言

第 I 報に於ては血清中の spermicidal substance の基本的性質、物理化学的操作を加えた場合の血清 spermicidal activity の変化に就て論じたが第 II 報に於ては当該物質の電気泳動及び超速心による研究、spermicidal substance と補体との関係及び spermicidal action を受けた精子の性状に就ての実験及び観察結果を報告する。

### II 実験材料及び方法

供試動物、供試材料、実験法及び記載法は第 I 報のものと同じである。尚精子の運動性を次の様に示した。

- 卍：大部分が最活発な運動をするもの
- 卄：大部分が活発な運動をするもの
- ＋：微弱な運動をするもの
- －：全く運動性を欠くもの

又、実験結果は特に本文中に明示しない限り個々の実験を数例以上に基いて洞察したものである。

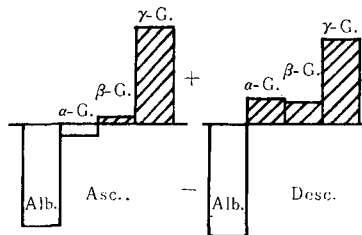
### III 実験結果

#### (1) 正常血清蛋白及び Spermicidal substance の電気泳動

血清硫酸塩析の結果、血清中の spermicidal activity

は硫酸濃度 21% の沈澱で最高を示した(前報)。この fraction を粗製 spermicidal substance と定め電気泳動的 pattern を決定した。即ち spermicide の位置を決定するために正常血清(A)を泳動測定し、之に更に spermicide (21% 硫酸沈澱透析物)を加えたもの(B)を測定し(両者の蛋白濃度は略々同一とした)両者の相対面積差(B-A)を算定した。第 1 図は此の関係を図示したもので、16 試料の泳動に基いたものである。尚、負符号は成分の減少、正符号は増加を意味

Fig. 1 Electrophoretic components of the spermicidal substance

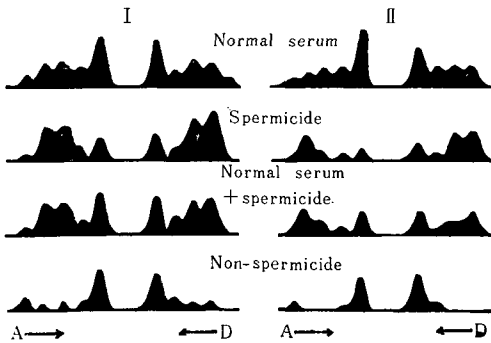


するものである。此の結果から ① Albumin は spermicidal action に関与していない(必ず負の値をとる)。② α 及び β-Globulin は殆ど関与していないものと考えられ ③ γ-Globulin の大部分が当該作用の主役を演ずる(必ず正の値を示した)と思われた。以上の様に正常血清中の spermicide は電気泳動的に大部分の γ Globulin 僅少の α-, β-Globulin より成つて居り、Albumin は此の作用に関与していないものと認められた。尚各 fraction の増減の様子を第 2 図

\* 北海道大学農学部畜産学研究室

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

Fig. 2 Electrophoretic patterns of the serum protein



に示した。

(2) Spermicidal activity を欠除した血清の電気泳動

spermicidal test を多数の動物に就て行つた場合、低い頻度で spermicidal action を全く欠除している個体が存在した。即ち馬 27 頭の血清を調査した処 2 頭の血清が当該作用を全く欠除していた。此の血清は牛、家兎の数個体の精子と反応せず精子は充分な運動を保持した。之等の血清蛋白の電気泳動分析値を求めたのが第 1 表である。

abnormal serum 1 に於ては Albumin の減少と  $\gamma$ -Globulin の増加が著明であり (総蛋白量は 8.4%)

Table 1 Electrophoretic analysis of abnormal serum proteins

		Ascend					Descend				
		Alb.	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	Total	Alb.	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	Total
Normal serum	1	42.9	17.9	21.4	17.9	100	39.3	10.7	25.0	25.0	100
	2	34.2	11.5	18.0	26.2	100	49.2	13.6	16.9	20.3	100
Abnormal serum	1	35.9	15.4	15.4	33.3	100	34.2	13.2	18.4	34.2	100
	2	26.1	19.6	23.9	32.4	100	31.8	22.7	25.0	20.5	100

此の血液の性状を検査した処、赤血球数及び沈降速度は略々正常値に近いにも拘らず白血球数 1 万箇に対して 1 箇の割合で Siderocyten が検出され伝染性貧血と診断された。

一方 abnormal serum 2 に於ては Albumin の僅かの減少と  $\alpha$ -Globulin の高値が特徴的であつたが  $\gamma$ -Globulin 値は電気泳動の上昇及び下降値が著しく異つていた。此の馬の Siderocyten の検出は未だ行つていない。

以上の如く spermicidal test からみた血清の abnormality を 2 例に就いて観察したが異常個体の頭数が少なくて他の性状との類似関係を論ずる事ができなかった。

(3) 超遠心機による血清蛋白の分離

渡辺、川出、及び宇井<sup>1)</sup>が血清蛋白について超遠心機に依る濃縮度を観察しているのに之に従つて血清を分離した。超遠心機にかけ濃縮された血清蛋白は拡散するので特に留意し採取に當つて第 3 図の如き分離法を試みた。

血清は 40,000 及び 50,000 r.p.m. 各 1 時間宛 2 例 12 試料に就き上記法により分離し各 fraction について spermicidal activity を観察した結果が第 4 図である。

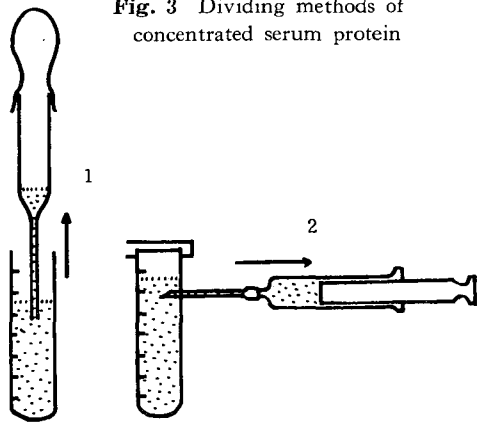
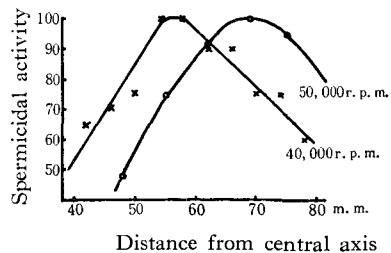


Fig. 3 Dividing methods of concentrated serum protein

Fig. 4 Changes in the highest activity with the centrifugal force



即ち 40,000 r.p.m. 1時間の超遠心により activity の最高は回転中心より 53 mm を中心として鈍峰を作った。又 50,000 r.p.m. 1時間の遠心により activity の最高を示した peak は回転中心より 68 mm の点に移動した。即ち回転数を 40,000 より 50,000 r.p.m. に増加させる事により 15 mm の最高活性部の移動が認められた。

(4) Spermicidal substance の超遠心分析

小沢及び高波<sup>2)</sup>は血清蛋白に就て塩析蛋白の超遠心分析を行っているので之を参考とし硫安 14~21% で沈澱する fraction を更に 0.9% NaCl 液で透析したものを spermicide とし、その対照として略々同蛋白濃度の血清を用いた。尚使用した超遠心機は Spinco (Model E) であり、沈降速度は Svedverg の式に従つて補正計算を行い、 $S_{20}^{\circ}$  値で示した。その結果は第2表である。

Table 2 The sedimentation pattern of the serum proteins

name of peak	Sa	Sb	Sc
mean r.p.m.		60.000	
mean temp.		9.0°C	
$S_{20}^{\circ}$ { normal serum	16	6	4
spermicide	14.5	5.5	3.5

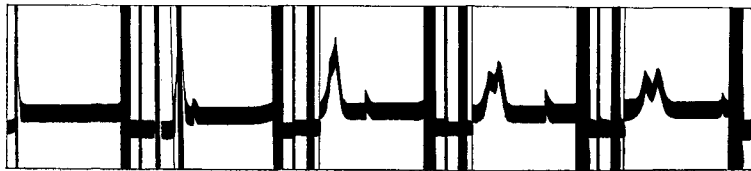
通常正常馬血清には3つの界面形成が見られるが便宜上之を最初に現れるものから順に Sa, Sb, Sc としてその各々の沈降定数を求めるとそれぞれ (18~9S) 16S, 6S, 4S の3つの値が得られ之は他の研究者の値と略々一致した。次に硫安で塩析後透析して得た spermicide は第2表に示した様に 14.5S, 5.5S, 3.5S の3つの値が得られ之等はそれぞれ正常血清の3つの値に対比すべきものと思われた。之等の値について相対面積を比較すると主として Sb (S=5.5) fraction が Spermicidal action の主役を演ずるものと考えられた (第3表)。

Table 3 Comparison in area of the sediments

name of peak	Sa	Sb	Sc	total
normal serum (1)	4.3	53.9	41.7	100
Spermicide (2)	4.2	76.6	18.7	100
difference between (2) and (1)	+0.4	+22.7	-23.0	0

因みに正常血清及び spermicide の超遠心分析図を第5図に示した。

Fig. 5 The sedimentation patterns photographed 16 min. interval (1) Normal serum



(2) Spermicidal substance



(5) 補体と Spermicidal substance との関係

CHANG<sup>3)</sup>等によつて spermicidal substance が血清中の補体に酷似している諸点に就き指摘されている。然し之等の実験方法につき疑問とする処が多いので別の面から之を検討した。

① 水に対する透析性

補体は水に対して透析すると  $c'_1$  と  $c'_2$  が分離するため補体作用を消失するが両者を混合すると補体作用は再現する。而るに第I報第2表に示した如く血清を水に対して透析した場合如何なる処置を施しても活性

の再現が見られなかつたので補体と spermicidal substance の相同性には充分疑いを持つ事ができる。

② 硫酸による塩析性

硫酸濃度 2M で沈澱する fraction は主として  $c'_1 + c'_3$  でありその上澄は主として  $c'_2 + c'_4$  であると云われている<sup>4)</sup>。従つて硫酸 2M で沈澱した fraction は完全な補体作用を示さない筈である。而るに著者等の得た硫酸各濃度による沈澱と spermicidal activity との関係は前報の様にその最大活性は 1.6M で、その上澄には activity が現れなかつた。此の事は 1.6M の上澄即ち補体成分の  $c'_2$  及び  $c'_4$  を必要としない事を意味している。

③ 補体の spermicidal activity

血清を非働化すると spermicidal activity が消失するので易熱性殺精子成分と考え、非働化血清を抗体として補体の関与の成否を観察した結果、他動物に比し補体含量の遙かに高いモルモット血清は通常の動物血清の如く 16 倍稀釈液迄しか activity を示さなかつた。従つて強力な補体作用を有するモルモット 50 倍稀釈血清(補体)は activity を有しなかつた。更に非働化血清(抗体)を等量補体に混合しても activity は再現しなかつた。

④ 吸収血清の spermicidal activity

正常血清に運動性を有する精子を混合し全く spermicidal action を示さなくなる迄吸収させた血清を吸収血清とし、前項の様に補体と抗体とを作り之等の存在と activity の再現の有無を観察した。その結果、吸収血清に補体を加えても activity は再現しなかつた。又吸収血清に抗体を加えても再現せず更に吸収血清に補体及び抗体を等量混合しても activity の再現は認められなかつた。

以上 4 項にわたる実験的事実は spermicidal substance が補体にあらざる事を示すものであると考えられる。

(6) Spermicidal action を受けた精子の性状

新鮮血清を精子に混合すると瞬時にして精子固有の活発な運動性を消失する。然し運動の停止は必ずしも精子の死を意味するものでは無いので、spermicidal action を受けた精子の性状に就て検討した。

① spermicidal action の不可逆性

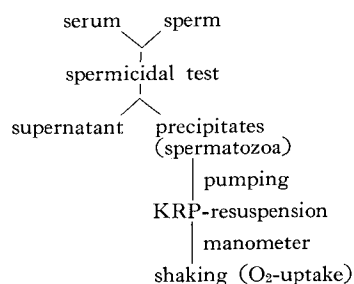
精子を新鮮血清、非働性血清、Krebs-Ringer 磷酸緩衝液(以下 KRP と略す)に混合し 1 時間後遠沈して各々 KRP に再浮遊させ精子の運動性を調べたのが第 4 表である。

Table 4 Effect of various treatments on the motility of spermatozoa

	K.R.P.	inactivated serum	normal serum
before treatment	+++	+++	+++
after treatment	+++	+++	—
KRP-resuspension	+++	+++	—

尚之等の処理過程を第 6 図に示した。

Fig. 6 Treating Process



第 4 表に示した様に正常血清で処理した精子は血清除去し KRP に再浮遊してもその運動性は再現しなかつたので spermicidal action は不可逆的な反応であると考えられる。

② 精子の Methylene-blue 還元能

Methylene-blue reduction test (MRT) は精子の脱酸素素活性を示すものとして脱色に要する時間によつて酵素活性を測定するものである。Beck & Salisbury の方法<sup>5)</sup>に従つて 112°F で好氣的に MRT を行つた結果を第 5 表に示した。

Table 5 Methylene-blue raduction test

test	treatment with			sperm density
	K.R.P.	inactivated serum	normal serum	
1	38 min.	12.5	—	$1.88 \times 10^8$
2	35	9	—	$1.50 \times 10^8$
motility	++~+++	+++	—	

同表中の数字は完全に脱色が終了するに要した時間(分)を示している。第 6 図に示した処理を行つて得た精子に就き条件を等しくして測定すると運動性を持つた非働性血清処理精子が最も速く 9~12 分、次いで KRP で処理した精子は 35~38 分を要した。運動性を欠除した新鮮血清処理精子は 1 時間以上を経過する

も脱色能が全然認められなかつた。即ち新鮮血清処理によつて精子の脱水素酸素活性が消失したと考えられる。尚通常脱色時間と精子生存率との関係は牛精液で 8.5~13.8 分で 60.9%, 40.92 分で 31.6% と云われている。

### ③ 細胞膜透過性

細胞膜は一般に生存中、分子を通過せしめるが分子の集団を通過せしめない。此の理論に基いて精子の染色性による生死鑑別法が確立されている。第 6 表に示した結果は LASLEY の方法<sup>9)</sup>で Eosin-phosphate Buffer solution を用いて染色したもので数字は Eosin に染まつた精子の全体に対する割合を示している。

Table 6 Live-dead staining of treated spermatozoa

test	treatment with		
	KRP	inactivated serum	normal serum
1	50%	20	90
2	40	40	90
motility before staining	卍	卍	—

尚精子の処理法は第 6 図に示した通りである。同表に示した様に運動性を持たない加熱処理した精子及び新鮮血清で処理した精子は大部分 Eosin を吸収して居り不染のものは僅少数である。KRP で処理されたものは活発な運動性を有するにも拘らず 40~50% の精子が染色された。更に非働性血清で処理した精子は運動性も大であり 20~40% のものしか染色されなかつた。

以上の如く新鮮血清で処理した精子は運動性を有せず而も大部分 Eosin 粒子は細胞内に摂取された。

### ④ Spermicidal action を受ける精子の酸素消費量

KRP, 非働性血清及び新鮮血清で各々処理した場合の精子の酸素消費量を第 7 表に示した。

Table 7 Effect of treatments on the respiration of sperm.

test	treatment with		
	K.R.P.	inactivated serum	normal serum
1	100	119	143
2	100	128	103
3	100	137	90
4	100	183	152
motility	卍	卍	—

通常家兎精子で  $ZO_2$  は 11, 牛精子で 21 位とされている<sup>7)</sup>が第 6 図の処理を行うと内在呼吸は約半分位に減少した。同表に示した様に KRP で処理し更に KRP に再浮游したものを標準として酸素消費量を百分率で示すと、非働性血清で処理したものは運動性も大であり酸素消費量も大で 20~30% 増加した。之に対して新鮮血清で処理した精子は全く運動性を欠くにも拘らず KRP で処理したものよりも酸素消費量は大であるか或は殆ど等しい値を示した。

尚その他の性状の一つとして形態変化の有無が問題となるが、少くとも光学顕微鏡下で観察した限り正常な精子の形態と比較して spermicidal action を受けた精子の形態には変化が認められなかつた。然し詳細は電子顕微鏡による研究に待たねばならない。

## IV 考 察

古来多くの研究者によつて所謂殺精子物質或は精子運動抑制物質として研究の対象とされて来たのはシアン化物, アジ化物, 弗化物, SH 基と結合する化合物, キノン類, 表面活性剤, 有機金属化合物等であり之等は総て低分子物質で且正常生体内にありそうもない物質である。しかし著者等の問題として取り上げた spermicidal substance は高分子物質就中、塩難溶性蛋白で或る種の Globulin と考えられる。且正常動物血清の一分成分であり細菌等の汚染による二次的なものではない。

近時血清蛋白の研究が著しく進歩し詳細にわたり論ぜられるに至つて居り特に COHN 一派のエタノールによる血清成分の分画法が確立し血清中の各種蛋白が化学的に捕捉されつつあるが、之等の蛋白中免疫物質として易熱性成分である補体と spermicidal substance との相同性が論ぜられたが否定的結果に終つている。

正常血清蛋白中生物活性をもつものとして多くの Vitamine 及び Hormone があるが此の中、精子に著明な影響を与える物質として現在認められているものに Thyro-Globulin がある<sup>8)</sup>が此の物質は精子の運動性を高める役割を有し、それは呼吸促進剤としての作用を有するためと考えられている。

血清の正常 pH 範囲内で活性を示す物質としてクエン酸で抑制される酸素 Desoxyribonuclease を spermicidal substance の役割に仮定し、血清中此の酸素の activity が特に高いと云われるネコ血清<sup>9)</sup>の spermicidal action を調べたがその activity は馬の血清のそれよりも低い事を知つた。

一方精子運動機構に関する研究は近時緒についたばかりであり詳細は不明であるが、MANN<sup>10)</sup> LARDY, 吉川等<sup>11)12)</sup>によつて代表される研究者達によつて精子の代謝と運動との関係が生化学的に解明されつつある。代謝機構の解明に果した阻害剤の役割は大きいので生理的物質としての血清中の spermicidal substance の本態並びにその作用機序の研究は精子の代謝機序及び本物質の生理的意義の解明と相俟つて大きい意味を持たねばならないものと考ええる。

正常血清蛋白が或る種の細菌及び Trypanosoma を in vivo 或は in vitro に殺す作用のある事が最近明かにされて居り<sup>13)14)</sup> その化学的本態は  $\alpha_2$ -Glycoprotein 及び  $\alpha_1$ -Lipoprotein であろうと云われているが未だ明かでない。即ち易熱性殺菌系に於て正常血清中に存在する正常殺菌素が免疫殺菌素として捉えられる抗体と果して同一であるか否か或はその化学的本態、性質に就ても不明の点が多い。

又、牛乳中の或る種の蛋白が或る種の細菌を殺す作用を有する事が最近明かにされつつあり<sup>15)16)</sup> その本態は易熱性の Globulin に属すると云われているが之等の蛋白たる本態が spermicidal substance と同一物であるか否かは全然不明である。

著者等は今 spermicidal action を受けた精子の性状に就て二三の項目にわたつて検討したのであるが今後精子の代謝面から此の課題を取扱つて行きたいと考えている。

## V 結 論

前報に引続いて血清中の spermicidal substance について物理化学的性質及び精子の性状に就て研究した結果は次の如くである。

① 電気泳動的に spermicidal substance は主として  $\gamma$ -Globulin 及び僅少量の  $\alpha$ -及び  $\beta$ -Globulin より成つて居り Albumin は此の作用に殆ど関与していなかった。

② 血清を超遠心濃縮すると回転速度に応じて最大活性を有する fraction が移動した。

③ 超遠心分析により S=5.5 の fraction が spermicidal action の主役を演ずるものと考えられた。

④ spermicidal substance は補体とは異なる性質を有していた。

⑤ spermicidal action を受けた精子は不可逆的に運動性を消失して居り Methylene blue の脱色能を欠き、Eosin で染色されたが酸素の消費能を有するもの

のようであつた。

今後精子の代謝と運動との関係について充分なる検討を必要とするものである。

## 参考文献

- 1) 渡辺, 川出, 宇井 (1954) 超遠心機とそれによる蛋白質及び Virus の研究, 日本學術振興会 149
- 2) 小沢, 高波 (1955) 家畜衛生試験場研究報告 30: 223
- 3) CHANG, M.C. (1947) J. Gen. Physiol. 30: 321
- 4) PILLEMER and ECKER (1941) J. Exp. Med., 74: 297
- 5) BECK and SALISBURY (1943) J. Dairy Sci. 26: 483
- 6) LASLEY et al. (1942) Anat. Rec. 82: 167
- 7) LARDY and PHILLIPS (1943) Amer. J. Physiol. 138: 741
- 8) MAQSOOD (1952) Biol. Rev. 27: 281
- 9) KURNICK, N. B. (1952) Arch. Biochem. Biophys. 35
- 10) MANN, T. (1954) "The Biochemistry of Semen" Methuen & Co. L. T. D.: London
- 11) 高橋, 石渡 (1956) 生化学 28: 209, 213, 437
- 12) 石渡 (1957) ibid, 29: 188
- 13) PILLEMER, L. et al. (1955) Science 122: 545
- 14) 小西 (1953) 京都府立医大誌 53: 947
- 15) 有馬 他 (1958) 日畜会報 29: 236
- 16) 佐々木, 栗飯原 (1958) ibid 29: (別号) 42

## Résumé

Physico-chemical properties of the spermicidal substance in fresh sera and the characteristics of the sperm affected by the spermicidal substance were studied.

(1) By means of TISELIUS-electrophoretic apparatus, it was found that  $\gamma$ - and  $\beta$ -globulin fractions were mainly responsible for spermicidal activity, but the albumin fraction did not effect it.

(2) By the ultra-centrifugical separation of the serum protein, high activity fraction was removed in consequence of the centrifugal force.

(3) In the ultra-centrifugical analysis, a fraction (s=5.5) was shown to play a leading

part in this spermicidal action.

(4) Chemical and biological characteristics of the complement were not similar to those of the spermicidal substance.

(5) The sperms affected by the spermicidal substance lost their motility irreversibly and lost methyleneblue reduction-ability; they were

stained by eosin pigment but showed a considerable respiratory activity.

The mechanism of the action of this spermicidal substance on the spermatozoa has to be studied in relation to the metabolic patterns of spermatozoa.