Hyaluronidase の 研 究 (第 1 報)

總 説

東京大學醫學部泌尿器科教室
(主任 市川篤二教授)

副手 齋 藤 豊 一

STUDY ON HYALURONIDASE (I. REPORT) PRELIMINARY REPORT AND REVIEW OF LITERATURE

Toyokazu Saito

From the Urology Department, Medical Faculty, University of Tokyo.

(Director: Prof. T. Ichikawa)

1928年, Duran-Reynalsは家兎, モルモット, 白鼠等の睪丸エキスを痘瘡ウイルスとを混じて, 家兎の皮内に注射すると, 炎症が著しく擴大され皮膚のその部分に睪丸エキスを前以て浸潤しておけば, その炎症は更に増大される事を發見した. 然し, その炎症面より分離したウイルスは再び同様な實驗に用いた場合に, 感染性の増大は見ないのである. 即ち, 睪丸エキスの作用はウイルスに影響を及ぼすことによつて, かゝる結果を生ずるのではなく, 皮膚に影響を及ぼすのであることが判る. 更に彼は睪丸以外に, 腎, 肝, 脾, 皮膚, 腦, 胎盤等のエキスを, 或種の細菌, 蛇毒, 等にも含まれることを見たが, その効果は睪丸が最大であり, 血液や副腎皮質, 網膜, 筋肉, 卵巢等には全く含まれない事を追試した. 一方ウイルスのみならず, デフテリア毒素, 破傷風トキシンを用いても同様な事實が證明せられた. 之を彼は Spreading-Factor (Sp-Fと略記)と命名したのである.

彼とは全く別に Mc Cleanは殆んど同様の知見を發表した. 睪丸エキスを皮内に注射すると水疱を形成せずに周囲に擴散し, 色素と混じた場合にその擴散速度と面積は對照に比し著しく大きい事を發見し, 之に Diffusing-Factor と命名したのである.

之等の研究とは全く別に Meyer 及び Palmerは硝子體中に Hyaluron 酸(H酸と略記)を發見し, R型肺炎菌の自家分解液, 脾臓エキスを, 之を

水解する酵素を發見, Hyaluronidase (Hdase と略記)と命名した.

1939年 Chain 及び Duthie は睪丸エキスをムチン分解酵素のある事を見, Sp-F と Hdaseは同一のものであると推論し, 之は多くの人によつて確認された. 睪丸エキスを皮下組織の基質をなす H 酸に作用し, その粘度を減少させることにより, 擴散性を發揮すると解釋せられている.

現在迄の所, Sp-Fという名の下に, 動物組織中に存在して, 且つ皮下組織の細胞透過性を増加せしめる特性を有する物質が總稱されている. その意味づけは in vivoにおける酵素作用よりも, 組織中への擴散能力で決定せられている. かゝる解釋における Sp-F は大小の差こそあれ, 殆んど大部分の哺乳動物の組織中に含まれ, 腫瘍組織中にも存在する事が判明している. 特に哺乳動物の睪丸, 或種の有毒分泌液に特に高度であり, 一方, 鳥類, 兩棲類, 爬蟲類等の睪丸には少量しか證明されず, 植物組織中には發見されていない. 細菌については, 肺炎菌, ガス壊疽菌, 或種の連鎖球菌, 葡萄球菌等には存在するが, 結核菌, 腦脊髄膜炎菌, チフス菌, 赤痢菌, 破傷風菌, 脾臓疽菌, 濾過性病原體等には證明せられない.

Sp-Fについては現在迄の所, 次の2種に分類せられている. 第1のものは生體に於て擴散能力を發揮し, 然も, 試験管内に於て H 酸の粘度を減少させ得るもので, 睪丸エキスを, 精液, 脾, 或る眼

第 1 表

組織(擴散能力なしと主張する人もいる), 感染性細菌の或種, 有毒分泌液等である。但し, この場合に擴散能力と酵素作用は必ずしも平行しない。畢丸エキスでも製法により一方が強く表われることもあり, 葡萄狀球菌は擴散力は大で, 酵素力が小さく, *Cl. welchii* は逆である。

第2のものは擴散能力を生體に於て示すけれども, 試験管内實驗に於てはH酸に對する作用を示さぬもので, 第1のもの以外の組織, 及び或種の

細菌, アスコルビン酸(之には異説がある)が之に屬している。

大體に於て前者を Hdase と呼び, 後者を Sp-F と呼んでいるようである。従つて Hdase には Sp-F が含まれ, Sp-F は Hdase の一部であると考えられる。

Hyaluron 酸について。

1934年 Carl-Meyer 及び Palmerは眼硝子體中の粘液物質中の多糖類をH酸と命名し, 1936年之はアセチルグリコサミンとグルクロン酸との等モル比結合體であることを明らかにした。翌年 Kendall はA型の連球菌の中に發見し, Madinav-eitia は乳酸菌の培養液中に發見した。結合組織, 間葉組織中には何處にも存在し, 然も細胞間の接合物質として極めて重要な役割を演じている。特に臍帶, 硝子體, 關節液等に多量に證明され, 鶏冠, 或種の肉腫中にも見出され得る。

溶液中の粒子の長さが $4700\text{\AA}$ から $10,000\text{\AA}$ であることから, それを構成している二糖類を $10\text{\AA}$ として, 分子量は $200,000\sim 500,000$ であるといわれている。

吸濕性が大で, 低濃度の溶液でも極めて粘稠であるが, 鹽を加えると粘度が低下し, 又温度が高くなつても低下する。

その臍帶よりの製法を表示すると次の如くである。(第1表)

Hyaluronidase について

Hdaseは極めて水に溶け易く, 氷醋酸, 苛性加里溶液にも低温に於ては可溶である。強酸には温めると溶解し, その際鹽酸には黄色, 硫酸では桃色を呈する。大體の有機溶媒には不溶であるが, アルコールには或程度溶解し, 水溶液に醋酸鉛, アセトン, エーテルを加えると沈澱する。又 Xantho-protein 反應, Millon 反應, Biuret反應, Diazo 反應等の蛋白反應に陽性である。

pH に對する安定性は可成大である。無菌溶液中では pH 4.6 乃至 9.0 の間で, 37°C , 12時間後も安定である。同一條件で pH 4.0 では30%, pH 3.0 では90%の減少となり, pH 9.6 になると30%

の減少を示している。無菌状態でないと附着する細菌の種類により安定性の變化は不定である。

各 pH により活性度を検査すると、畢丸よりの Hdase は pH 5 で最大の活性度を示し、Cl. welchii のものは pH 7 であり、母體によつて異なる。更に同じ pH にあつても、溶媒の鹽の濃度によつて異なり、稀薄緩衝液では酸性に於て濃厚緩衝液より大であり、アルカリ性に於ては逆に小となる。

温度による影響は、至適温度は 41°C といわれているが、 $20^{\circ}\sim 37^{\circ}\text{C}$ が測定には便利である。乾燥状態のものは室温、數年にわたつて安定であり、加熱にもたえる。水溶液を放置したり、加熱したりすれば活性度の落ちることは諸家の等しく認める所であるが、その程度は報告者により異つてゐる。

Madinaveitia によれば 37°C 、24時間では變化なく、 60°C 5分間では 99% 不活性化されるといひ、Quibell 等によると 5°C 、24時間で 15% の低下があるという。

振動によつて安定性を著明に失われる。乾燥状態に於ては影響はうけないが、溶液に於て著明で然も稀薄のもの程大である。各種溶媒の内では蒸溜水を溶媒とした時が最も影響を受けやすく、温度の上昇と比例する。 25°C では 3 時間の振動により 100% 活性度を失う。

トルオール、Merthiolate、Phenyl mercuric Nitrate、Acridine によつては何等の影響を受けず、クロロフォルム、ヨード、硫黄、砒素、チアン等によつて不活性化される。Pepsin、Trypsin によつても影響されるが、Corboxy polypeptidase の影響はなく、Berkefeld を通過するが、蛋白を通さぬ半透過性膜を通ることは出来ない。レントゲン線、紫外線も無影響であり、pH 6.2~6.9 の間で、電流を通すると陽極の方へ移る。

現在行われている畢丸よりの製法を示す。

(第2表)

Hyaluronidase の定量法

Hdase の定量法には次の如き方法がある。

1) Mucin Clot Prevention Test.

H 酸に血清蛋白を混ざると、醋酸の存在下では特殊の

第 2 表

(牛畢丸 磨碎)

凝塊を作るという Seastone, Meyer 及び Palmer の原理を應用したものである。即ち、各種濃度の Hdase 溶液中に一定量の H 酸を滴加し、醋酸酸性下で凝塊の出来ない最大稀釋液中の Hdase 量を 1 単位とする。

2) Turbidimetric Method (濁濁度試験法)。

H 酸を完全に水解する時には濁濁は残らないが、Hdase がその量以下の時は濁濁が残る。Photoelectric Colorimeter を用いて、濁濁度を讀み、Hdase を作用させない時の讀みと比較して、単位を決定する。

3) 加水分解物を測定する方法

H 酸が分解されて生じた還元物質 N-Acetylglucosamine, 又は Glucuron 酸を定量する方法である。之は方法が繁雜であるばかりでなく、之等のものは他の物質の作用によつても遊離するから、余りよい方法とはいえない。

4) 粘度計を用うる方法

H 酸が分解されると粘度が減少する。この粘度が半減するに要する時間は H 酸の濃度には無關係で Hdase の量にのみ比例することを利用したものである。

私もこの方法を用いて定量したので、この方法について述べる。

粘度計は Ostwald 式の小型のものでよい。その手技については Chain 及び Duthie, Haas, Werthessen 等の方法を参考とした。

1) 第3表の I の A, B 兩液を別々の試験管に作つておいて、30° C 10分間作用させ、粘度計中に移し、落下時間を測定し t_1 秒とする。

第 3 表

	I	II	III
[A]			
0.2 M. Borate Buffer pH 6.7(cc)	0.25	0.25	0.25
水(cc)	0.5	0.5	0.25
Hyaluronidase 溶液 (cc)			0.25
[B]			
0.5 M. Phosphate Buffer pH 7.0 (cc)	0.5	0.5	0.5
8.5%食鹽水 (cc)	0.25	0.25	0.25
Hyaluron 酸溶液 (cc)	1.0		
水 (cc)		1.0	1.0

2) 同様に II を行い t_2 を求める。

3) 次に III の A, B兩液を2本の試験管に作つておいて 30° C 10分間作用させた後に、粘度計に移し、兩液を混合してから時間 T とそれに對する落下時間 T' を求める。T が多くなると、即ち、兩液を混合して時間が経つと Hdase が作用するから t が短くなるわけである。

始めの T に對する t が求められたら再び液を吸入して、落下させ同様に第2回目 T に對する t を求め、之を反覆する。

かくして、 $\eta = (t/t_2 - 1)$ が $(t_1/t_2 - 1)$ の $1/2$ に達した時の $T + 1/2t$ (Reaction time) を R_0 (半減時) とする。 $1/R_0 \times 10^4 = K$ を Hdase の活性度とするのである。

Mc Clean は $R_0 = 1200$ のものを 1.V.R.U. (Viscosity Reducing Unit) とした。従つて検査に供した Hdase 稀釋度 (D) が判れば、 $(D \times 1200) / R$ として V.R.U. として表わすことも出来る。

今 0.5mg/cc について實驗した結果を表示すると第4表の如くなる。各濃度について粘度と Reactin time との函數として表わしたのが第1圖である。

第 4 表

Hyaluronidase 0.5mg/cc

T	t 及び t_1	t_2	$T + 1/2t$	η
0	69.8	30.8		1.28
16	55.2		43.6	0.79
86	48.4		110.2	0.57
153	45.8		175.9	0.48
216	42.4		237.2	0.38
413	39.4		432.7	0.28

$R_0 \dots \dots 80$

第 1 圖

精液中の Hyaluronidase について

哺乳動物の成熟卵は多數の卵丘細胞におゝわれている。この卵丘細胞相互の間及び卵との間には粘稠で濃厚なゲル様物質が充されている。受精が行われる爲には、その前にこの卵丘細胞が一部でも除去せられることが必要となり、かくして精子が卵の中に侵入し得ることになる。このゲル様物質が多糖類の一種であるH酸であり、精子はこれを分解する Hdaseを有し、この酵素作用により卵の内部に侵入し得るのである。

1930 年、Pincus, 山根氏は雌家兔を用いて、排卵をおこさせ、成熟未受精卵を取出し、in vitro にて、精液或いは精子のエキスと混合すると、數分にして卵丘細胞の消失することを發見した。

1942 年 Mc Clean 及び Rowlands は睪丸の Hdaseを排卵直後の哺乳動物の卵に作用させると、卵丘細胞は除去せられて卵が露出されて來るが、卵細胞そのものには何等の影響を及ぼさないことを發見した、然も、Hdaseの濃度が減少するに従い、細胞の除去に時間を要し、或濃度以下では卵の露出が不完全であることを認めた。彼等は受精には Hdase の或濃度が必要であり、精液中に卵胞細胞の除去を行うに不十分な酵素濃度しか有さない爲の不妊症の存在することを始めて示唆したのである。其後、Fekete及び Duran-Reynals, Leonard 及び Kurzrok は夫々家兔と二十日鼠とにおいて

この卵胞細胞除去作用 (Dispersing effect) を確認している。

1944 年 Rowlands は家兎に於て受精には不成功であると考えられる少い精子数を有する精液に Hdase を加え、人工受精を試み、5 回の實驗中 4 回に成功することが出来た。そしてその時の精子数は受精に必要であると考えられる最小濃度の $\frac{1}{4}$ で充分であるとのべている。

1946 年 Swyer は家兎に於て交尾させるか又は腔内に Hdase を注入すると 12 時間後迄は卵管中に酵素の存在することを證明し、注入後 5 時間にして卵の露出していることを發見した。然るに、蒸留水を注入した對照例では Hdase もなく、又卵も卵丘細胞に圍繞されたまゝであつた。

更に、Kurzrok, Leonard 及び Conrad は精液と牛の睪丸の Hdase とを混じて人工受精を行い、或いは正常の性交の前に頸管部に Hdase を充填することにより受精に成功したと報告している。

精液中の Hdase を系統的に検討しているのは Joel 及び Eichenberger; Kurzrok, Leonard 及び Conrad; Werthessen, Bergman 及び Greenberg; Michelson, Haman 及び Koets; Swyer; 更に Bergenstal 及び Scott の研究がある。

Joel 及び Eichenberger は精子数の増加と Hdase との關係を調べ、精子のない精液には Hdase は存在せず。精子缺乏症の人の精液中には低濃度しか證明されなかつたと述べ、大體に於て精子数と Hdase 濃度とは正比例的關係をとるが、必ずしも正確な正比例的關係ではないと結論した。Kurzrok, Leonard 及び Conrad は 1cc 中に 0~4 億の精子数を有する患者 90 人の精液を調べた。その結果、彼等は 1cc 中 1 億迄の間は Hdase は精子数に正比例して上昇するが、1 億以上では比例的上昇は必ずしも見られないと述べている。

細菌の Hyaluronidase について

Duran-Reynals は睪丸エキス中の擴散因子を發見して以來、諸種物質中の擴散因子を検討した。1933 年化膿巢から葡萄狀球菌を培養し、この菌體の自家融解液を墨汁と混じて皮内に注射すると著

明に擴散作用のあることを見た。更に彼は同様のことを連鎖狀球菌についても發見した。次で Goodner Meyer 及び Palmer は肺炎菌に、Mc Clean は *Cl. welchii* 及び瓦斯壞疽菌に同様の作用を見出し、或種の細菌は Hdase を有することが判つた。

Duran-Reynals は寒天培養による葡萄狀球菌の水エキスは菌體を除いても Hdase 作用のあることを見、Haas も同様のことを、指摘している。又ブイオンで培養した液の上清を取り、色素と混じて皮内に注射すると、その色素の擴大する範圍は培養液そのものの注射によつて惹起される炎症の範圍とよく一致することを認め、又 Majorie はブイオン培養液を遠沈して上清を出来るだけ取り去り、残渣、即ち菌體をトルオールで浸出して検査した所 Hdase を證明することは出来なかつた。即ち、葡萄狀球菌の Hdase は菌體外にあることが判る。又彼は 4 株の菌に Hdase について調べた結果、2 株は Hdase を產生し、他の 2 株は產生しないことを報告した。

かゝる細菌の Hdase はその細菌感染の際の侵襲性に密接な關係があるとされている。Hdase を產生する菌による炎症に際しては、少くともその初期には Hdase が炎症の擴大に重要な役割を果すのであろうということは想像に難くない。Hdase によつて組織の透過性の増大した部分には、更に菌及び炎症性産物が侵襲してゆくことになるわけで、炎症の擴大に拍車をかけるわけである。

特に炎症の早期の浮腫と、この中に多數の菌の證明せられるという事實はこの知見を裏付けるものであろう。

Duran-Reynals は葡萄狀球菌の侵襲力 Hdase と活性度の間には平行的な關係があることよりして、菌型の分類をこの方面からも出来るという。又 Mc Clean は *Cl. welchii* の場合と同様に、Hdase 產生は極めて早いから、これらの菌の感染の際には早期診斷にも利用せられるのではないかという。

連鎖狀球菌ではこの間の關係はもつと複雑である。Russel 及び Sherwood は 69 株の連鎖菌につ

いてその毒力, Hdase 活性擴散力, Lancefield の菌型との關係を検討したが, 全く無關係であつた. 又或株では培養液の炎症の擴り方と, 上清に色素を混じた時の擴散度とを比較すると必ずしも一致しない. Hdase 活性度と皮内の擴散作用とは平行せず, 一方しか證明されないものもある. 連鎖菌の被膜に H 酸が存在するという報告 (Kendall, Seastone) もあり, H 酸と Hdase と兩方を產生する菌もあるといい (Pike), 被膜が Hdase に關係があると想像されるのみで決定的な説は未だないようである.

Mc Clean は *Cl welchii* を用いて, ペプトン培地内に葡萄糖と H 酸とを加えて培養した時の差を見ると, 葡萄糖の時は Hdase 産生量は 5 倍になり, H 酸を加えた時は 9 倍になる事を發見した. この事實は他の菌についても追試され, 菌の Hdase 産生量は H 酸を加えることにより増加する. 之は組織内での細菌の態度と考え合わせると興味のあることで, 組織内の H 酸を分解して菌は侵襲するが, その H 酸が菌の Hdase 産生力を促進させて, この Hdase が新しく H 酸を分解してゆくことが考えられる.

私は數種の菌について Hdase 活性度を検査した. ブイヨンの 24 時間培養液について, 孵卵器から菌を取出して, 直ちに遠心分離し, 上清を検査に供した. 活性度の低下は時間と共に著しく, 非

常に破壊されやすいことを示している. 結果は第 5 表の如くでグラム陰性桿菌には全く證明されず, 葡萄狀菌連鎖菌の或者には證明され或者にはされなかつた.

第 5 表

		R ₀	K
Staph. aureus	寺島	75	133.3
" "	Heatley	185	54.1
" "	1	/	0
" albus		/	0
Streptococ. hemoly	1	165	60.6
" "	2	850	11.7
" "	3	/	0
Esch. coli	1	/	0
" "	2	/	0
" "	3	/	0
Aerobact. aerog		/	0
Pseudom. aerug		/	0
Mycobact. tbc		/	0

ブイヨン培地, 上清

Tbc は中村氏ムチン培地

$$K = \frac{1}{R_0} \times 10^4$$

結 論

Hyaluron 酸及び Hyaluronidase に關する現在迄の知見の推移と兩者の製法, 特性, 定量法等についてのべた.

文獻は次篇の末尾にまとめて記載する.

御指導, 御校閲を頂いた恩師市川教授に深甚なる感謝を捧げ, 實驗材料を提供せられた帝國臓器及び持田製藥の二社に謝意を表する.