精 液 の 生 化 學 的 研 究

(第 3 報) 牡牛の精液, 精子及び精清のアルギニン含量に就て

岩 村 晶, 村井典男, 濱川秀正, 川越郁男

(宮大農學部農業化學教室, 畜産學教室)

昭和 25 年 5 月 17 日 受理

Biochemical Studies of Semen. Part 3. On the Content of Arginine
in Bull Semen, Spermatozoa, and Seminal Fluid.

By Iwao IWAMURA, Norio MURAI, Hidemasa HAMAKAWA and Ikuo KAWAGOE.

(From the Department of Agricultural Chemistry and the Department of Zootechnical Science,
College of Agriculture, Miyazaki University)

緒 言

アルギニンの定量法としては微生物法, 酵素法, 単離法及びクロマトグラフ法等數種が行われているが比色法に付ては從來殆ど記載がない。WEBER⁽¹⁾は始めてアルギニンに對する坂口氏反應⁽²⁾を應用した比色定量法を完成した。近年 THOMAS, INGALLS 及び LUCK⁽³⁾はこれを更に改良して, 蛋白質分解液中のアルギニンを容易に定量できるようにした。坂口氏反應は極めて鋭敏な反應で, 1 cc 中 0.4 γ のアルギニンを検出可能で, 1 回の比色定量に 10~80 γ を正確に測定可能であるが, 發色に際してアルギニンと各試薬との間に複雑な反應機構が存在する。WEBER⁽¹⁾によると 0.05 mg のアルギニンに最高の發色をさせるには 50 モルのアルファーナフトールを要し, THOMAS 他⁽³⁾は 1 モルのアルギニンに對して少くとも 70 モルの次亜臭素酸を必要とすることを報じている。著者の實驗⁽⁴⁾によると純アルギニン溶液では THOMAS 等の觀察に一致したが, 蛋白質分解液に於てはアルギニン 1 モルに對して少くとも 200 モルの次亜臭素酸を用いた方が最高の發色が得られることが判つた。特に精液, 精子及び精清のようなアルギニン含量の全く知られていない生理液の分解物では, アルギニンの適当なモル數を含む試料を作ることが必要で, 更に試料に次亜臭素酸を加えるときの液温, 次亜臭素酸液を加えてから發色に至る過程中尿素液を加えるまでの時間の経過及び發色後比色に至るまでの時間等アルギニン値に影響することが多々あることが判つたので, これ等諸條件を充分検討した後, 次のように定量を行つて好結果を得ることができた。

實 驗 方 法

1. 牡牛の精液, 精子及び精清の收量及び水分含量 第 1 報に示した通り人工陰法により牡牛番號 H2 (本學部畜産學科實驗畜舎に於て飼養中) 及び H3 (宮崎縣富島町, 丸山牧場飼養の Holstein 種牡牛, 年齢 4.0 年) から精液を採取し, Table 1 に示した採取液より試料を採り, 前回と同一の方法によつて遠心沈澱し精子と精清とに分けた。精子及び精清の收量及び水分含量は Table 2 に示す通りである。

Table 1. Amount of Holstein Bull Semen ejaculated by the Artificial Vagina Method.

Semen No. (HS)	9	10	11	12	13	14	15	Average
Bull No. (H)	2	2	2	2	2	3	3	
Date	Dec. 1	Feb. 7	Feb. 22	Mar. 2	Mar. 13	Mar. 19	Mar. 19	
Amount ejaculated, cc.	6.5	7.3	5.5	5.3	5.5	6.5	3.5	5.7

Table 2 の平均値からみると精液 4.0343 g から遠心沈澱法によつて 2.7352 g の精清及び 0.4001 g の精子が得られる。HS 7, 8 及び 10 に於て精清分離量が少い理由は, 射精直後の精子の活動力が旺盛なため精子及び精清の界面が精子の運動によつて濁濁したものと考えられ, 透明な精清區分を採るために精清を下層の精子區分に多量残したことに原因し, HS 9, 12, 13 及び 14 に於ては射精後 3~5 時間経過し, 精子の活動力が衰えたため精子の沈下が著しく, 従つて精清の收量が大きとなつたものである。各區分の水分は精液, 精子及び精清夫々 90.21, 83.45 及び 90.70% であつた。但し精液と精子の水分の差異については尙検討の餘地がある。次に精液中の精子重量については可なりはげしい變動があり, これは Sf/Sp の比率でよく説明される。

Table 2. Weights and Water Contents of Bull Semen, Spermatozoa and Seminal Fluid.

Semen No.	Semen (Sm)	Water of Semen	Spermatozoa (Sp)	Water of Spermatozoa	Seminal fluid obtained	Water of Seminal fluid	Theoretical weight of Seminal fluid, Sm-Sp. (Sf)	Ratio Sf/Sp
HS 1	g. 1.5509	per cent 89.94	g. —	per cent —	g. —	per cent —	g. —	—
7	4.3643	—	0.3207	82.32	1.8433	90.07	4.0436	12.6
8	4.9004	—	0.4384	79.86	2.7202	89.59	4.4620	10.1
9	3.5015	—	0.4524	—	2.4795	—	3.0491	6.8
10	4.2123	—	0.4402	—	2.1857	—	3.7721	8.6
11	2.1105	—	—	—	—	—	—	—
12	3.4137	—	0.1979	—	3.0212	—	3.2158	16.2
13	3.5516	—	0.3737	86.54	3.1779	92.00	3.1779	8.5
14	4.2962	—	0.5774	85.08	3.7188	91.14	3.7188	6.4
15	2.9950	91.68	—	—	—	—	—	—
Average	4.0343	90.21	0.4001	83.45	2.7352	90.70	3.6729	9.9

2. 牡牛精子1個の重量 牡牛精子の1個の重量については既に第2報に於て述べたが今回更に HS 12, 13, 14 について測定算出することができたので追加報告する. その算出は次式によつた.

$$W = \frac{1}{N} \left(\frac{Sp}{Sm} \cdot 10^{-3} \cdot G \right)$$
 但し式中 W は精子1個の重さを g, Sm は供試精液の重量を g, Sp は供試精子の重量を g, N は精液 1 mm³ 中の精子数及び G は精液の比重を表わすことにした. 上式により算出した精子の重量の平均値は第2報の値によく一致し結局兩者の平均値として $8.32 \times 10^{-5} \gamma$ が得られたのである.

Table 3. Specific Gravity, Number of Spermatozoa, and Weight of a Spermatozoon.

Semen No.	Semen (Sm)	Spermatozoa (Sp)	Specific gravity of semen (G)	Number of spermatozoa in 1 mm ³ of semen (N)	Weight of one spermatozoon
HS 7	g. 4.3643	g. 0.3207	1.032	$1,292 \times 10^3$	5.87×10^{-5}
8	4.9004	0.4384	1.032	$1,186 \times 10^3$	7.78×10^{-5}
9	3.5015	0.4524	1.032	$1,157 \times 10^3$	11.52×10^{-5}
12	3.4137	0.1979	1.039	706×10^3	8.49×10^{-5}
13	3.5516	0.3737	1.042	$2,366 \times 10^3$	4.63×10^{-5}
14	4.2962	0.5774	1.038	$1,120 \times 10^3$	11.57×10^{-5}
Average	4.0046	0.3934	1.036	$1,305 \times 10^3$	8.32×10^{-5}

3. 牡牛精子及び精清の加水分解 精子新鮮物 63.6~176.9 mg を直接 10×120 mm の硬質試験管に秤り採り 3 cc の 6 M 鹽酸を加えて (精子は鹽基度が高いから普通の蛋白質分解の場合よりも多量加える) 熔融封管し蒸氣浴で 30 時間加熱分解し分解終了後試験管を切り小濾紙, 小漏斗を用いて濾過し水でよく洗い 15~30 cc に稀釋した. 次に精清は 378.0~745.5 mg を上記の方法で鹽酸分解し最後に水で 30~50 cc に充たし精子及び精清の分解物の兩試料は夫々 0.5~0.75 及び 1.0 cc を比色に用いた.

4. WEBER-THOMAS 氏法の實施

(1) 所要試薬

a 液 :- 95% 酒精で 0.5% アルファーナフトール液を作りこれを水で稀釋して 0.05% の液とし -3~-5° の冷蔵庫に貯藏, 使用期間は1ヶ月.

b 液 :- 次亜臭素酸ソーダ液をつくるには 5% 苛性ソーダ液を冷却しおき, これに 0.64 cc (2g) の臭素を溶かし 100 cc とする. 上記のように冷却しおき使用期間は2ヶ月.

c 液 :- 40%尿素液

d 液 :- 10%苛性ソーダ液

(2) アルギニン標準液

l-アルギニン・モノハイドロクロライド (mp. 216~217° 武田化学薬品會社) を水に溶かし 1 cc に 0.05mg の鹽酸鹽, 或は 0.04135 mg のアルギニンを含むように 100 cc を調製し數滴のトルエンを加えて上記の冷蔵庫に貯藏, 1 ヶ月を使用期間とした。

(3) WEBER-THOMAS 氏反應及び比色方法 全試薬, 標準液, 水等を上記冷蔵庫に冷却しおき 50 cc 三角瓶に夫々標準液 1 cc 及び試料 x cc (1~5 cc) を入れ前者には 4 cc, 後者には 5- x cc (即ち 5 cc 中 0.04 mg 内外のアルギニンを含むようにする) の水を加え檢液を夫々 5 cc とする。次に d 液 1 cc 及び a 液を 1 cc 加え 5 分間時々振盪。次に液温 0~5° に於て 0.2 cc の次亜臭素酸液を滴下して正確に 15 秒間振盪した後 1 cc の c 液を加える。比色は DUBOSCQ 氏比色計を用い標準液の讀度を 20 mm とし, b 液を加えてから 5 分以内に定量を終る。讀度と濃度との關係は本法に於ては特に色度が高い場合は誤差が少く反對に低い場合には正確を期し難いから注意を要する。尙詳細については日本畜産學會誌⁽⁴⁾に報告した。

實 驗 成 績

1. 牡牛精子のアルギニン含量 實驗の結果 Table 4 に示すように各試料共夫々略々近似の數値が得られ

たがその平均値は試料新鮮物中 2.05, 乾燥物中 13.32% となつた。次に呈色は美しい赤色で比色に際しては何等光學的の障害を受けることなく明瞭正確に比色できたことは本比色法の特徴で試料及び標準液の視野は何れも RIDGWAY 氏の Color Standard⁽⁵⁾ の plate I の strawberry pink 又は geranium pink であつた。但し次亜臭素酸のモル數がアルギニンに對して多すぎたり又は次亜臭素酸液を加えるときの溫度が低くない場合は色調は pink よりも plate II の orange 系に移行し褪色も早く測定が不正確となることについては著者が既に報告⁽⁴⁾した通りである。而して比色時の精子新鮮物 1 回の採取量は 1.5~2.9 mg に相當する。

2. 牡牛精清のアルギニン含量

上述と同様にして精清のアルギニン含量を測定し Table 5 にその成績を示した。即ち試料平均 552.7 mg を採り比色時のアルギニンは試料 1 cc 中 40.6 γ を測定し精清新鮮物 100 中 0.33, 同乾燥物中 3.79% アルギニンが含まれることが判つた。

3. 精液の新鮮物について WEBER-

THOMAS 氏法の適用 精液の新鮮物 HS 12 について 1.1882 g に水を

Table 4. Arginine Content of Bull Spermatozoa

Semen No.	Experiment No.	Sample	Arginine by colorimetric reading	Arginine in the fresh substance	Arginine in the dried substance
		mg.	γ	per cent	per cent
HS 10	1	63.6	29.3	2.31	
	2	91.5	41.4	2.28	
	3	108.3	46.7	2.15	
	Average	87.8	39.2	2.25	13.53
HS 12	4	120.0	40.1	2.01	
	5	176.9	58.0	1.97	
	Average	148.5	49.1	1.99	12.02
HS 13	6	86.0	15.8	1.84	
	7	106.6	17.2	1.72	
	Average	96.3	16.5	1.78	13.14
HS 14	8	103.6	35.4	2.13	
	9	104.9	37.4	2.23	
	Average	104.3	36.2	2.18	14.60
Average		(109.2)	(35.3)	2.05	13.32

Table 5. Arginine Content of Bull Seminal Fluid

Semen No.	Experiment No.	Sample	Arginine by colorimetric reading	Arginine in the fresh substance	Arginine in the dried substance
		mg.	γ	per cent	per cent
HS 10	1	378.0	42.8	0.34	
	2	408.7	46.9	0.34	
	3	508.3	53.0	0.31	
	Average	431.7	47.6	0.33	3.55
HS 12	4	583.6	33.9	0.35	
	5	613.7	31.6	0.32	
	6	616.3	34.9	0.34	
	Average	604.5	33.5	0.34	3.66
HS 13	7	685.2	42.1	0.31	
	8	745.5	48.6	0.32	
	Average	604.5	45.9	0.32	4.00
HS 14	9	508.4	29.8	0.29	
	10	631.9	40.7	0.32	
	Average	570.2	35.3	0.31	3.95
Average		(552.7)	(40.6)	0.33	3.79

加えて 50 cc とし等量の 10% 苛性ソーダ液を加えて精子を溶解しこれから試料 2.0, 2.0 及び 1.0 cc 採り第

3の試料には苛性ソーダ液を 0.5 cc 加え、各壺に夫々水を加えて 6 cc とした。次で各試料に次亜臭素酸液を夫々順々に 0.2, 0.3 及び 0.4 cc 添加して比色したところ精液新鮮物 100 g 中のアルギニン含量は夫々 268.4, 257.5 及び 259.2 mg となり、又精液乾燥物中夫々 2.67, 2.56 及び 2.58% のアルギニン値が得られた。今假りに精液乾燥物 100 分中の精子及び精清の重量比を Table 2 から 1 : 10 として Table 4 及び Table 5 からアルギニン量を求めれば、精子乾燥物 9.1 分中には 1.21, 精清 90.9 分中には 3.45, 計 4.66% となり、試料を加水分解しない場合即ち蛋白質分子中のアルギニンに對する WEBER-THOMAS 氏法の適用は同分解物の同値の 57.3% が發色して比色されるに過ぎないことが判明した。

考 察

WEBER⁽¹⁾ によれば坂口氏反應はアルギニンの他グリコシアミン及びメチルグアニジンに陽性であつて恐らくは $\text{NH}=\text{C} \begin{smallmatrix} \text{NHX} \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$ の式に於て X が脂肪酸か或はアルキル基の場合赤色を呈することが考えられる。但しこの反應はクレアチン、クレアチニン、尿素、グリコシアミジン、グアニジン及びジメチルグアニジンには全く陰性である。尤も陽性の前 2 者については精液中に存在が記載されていないから精子及び精清中のアルギニン値については今後検討の餘地がある。然し牡牛精子アルギニンの大部分がプロタミンとして含有され、魚類精子のプロタミンの分析結果⁽⁶⁾から考察して牡牛精子プロタミンの 85% をアルギニンで占めるとすると逆に精子中のプロタミン量が推定できその量は精子乾燥物の 15.7% を占めるものとなろう。

Table 2 のように牡牛精液中には精子 1 g に對して平均 9.9 g の精清を有しているがこの比率には相當の開きがありこの結果は Table 3 の精液 1 mm³ 中の精子數にもほぼ一致している。従つて斯る變異數を考察すると變動の多い精液の化學分析を行つて生物函數的或は少數例の考察を行うことは預る繁雜で科學的な合理性は寧ろ精子と精清とに分離してその兩區分の化學的組成を示す方にあることが痛感される。

次に精清のアルギニン含量は血清アルブミン及びグロブリンの値に近く普通の動物性蛋白質の性質の一部を示したものと見える。

最後に WEBER-THOMAS 氏反應に於てはアミノ酸中ヒスチジン⁽¹⁾、チロシン⁽⁴⁾が單獨に次亜臭素酸試薬を可なり多量消費することであるが、各種アミノ酸混合液⁽³⁾及び蛋白質分解液に於て甚しい實驗誤差を生じないことについては著者がチロシンとアルギニンとの溶液中の分子比によつて決定されるということを認め既に報告した。尙他のアミノ酸がこの反應に如何なる影響をあたえるかは今後検討する。

摘 要

(1) 牡牛の精液、精子及び精清の鹽酸分解物のアルギニンの含量を坂口氏反應を應用した比色定量法で測定した。

(2) 4 回の測定で精子及び精清の水分含量は夫々 83.45 及び 90.70% であつた。精液の比重は平均 1.036 となり精子 1 個の重量は平均 $8.32 \times 10^{-5} \text{ g}$ となつた。

(3) 本定量法は非常に鋭敏で精子新鮮物 1.5~2.9 mg 中のアルギニン 15.8~58.0 γ を測定出來た。

(4) 精子のアルギニンの平均含量は新鮮物中 2.05, 乾燥物中 13.32% である。

(5) 精清のアルギニンは新鮮物中 0.33, 乾燥物中 3.79% であることが確められた。

本報告は昭和 25 年 4 月 9 日、日本農藝化學會大會に於て講演した。

(1) C. J. WEBER : *J. Biol. Chem.*, 86, 217 (1930)

(2) S. SAKAGUCHI : *J. Biochem., Japan*, 5, 25 (1925)

(3) L. E. THOMAS, J. K. INGALLS, and J. M. LUCK : *J. Biol. Chem.*, 129, 263 (1939)

(4) 岩村 岳 : 日本畜産學會報, 21 卷, 2 號, 59 (1950)

(5) R. RIDGWAY : *Color Standards and Color Nomenclature*. 1912.

(6) D. HAMER and D. L. WOODHOUSE : *Nature*, 163, 689 (1949)

Summary

1. Amount of arginine in the hydrochloric acid-hydrolyzates of bull semen, spermatozoa, and seminal fluid was estimated colorimetrically by a method based on the Sakaguchi's reaction.

2. In four experiments water contents of spermatozoa, and seminal fluid were found to be 83.45 and 90.70 per cent, respectively. The weight of one spermatozoön was determined to be $8.32 \times 10^{-5} \text{ g}$.

10⁻⁵γ.

(3) The analytical method was shown to be sensitive to 15.8~58.0 micrograms of arginine in 1.5~2.9 mg. of the fresh samples of spermatozoa.

(4) The average values of arginine in spermatozoa were 2.05 per cent on the fresh basis, and 13.32 per cent on the dry basis.

(5) Arginine was ascertained in the fresh sample of seminal fluid as 0.33 per cent on the wet basis, and 3.79 per cent on the dry basis.

抗 黴 物 質 に 関 す る 研 究

(第 1 報) 絲狀菌の產生する抗黴物質に就て (其の 1)

長 澤 俊 三・川 上 行 藏 (農林省開拓研究所)

昭和 25 年 5 月 22 日 受 理

Studies on the Antifungic Substances. Part 1. On the Fungistatic Substances produced by the Fungi (I)

by T. NAGASAWA and K. KAWAKAMI (Land Development Research Institute, Dept. Agr. and Forest.)

緒 言

培養中に於ける微生物がそれ自身の生長期間を制限する物質を生産すると云うことはかなり以前から知られている。例えば、酵母の酒精, *Rhizopus sp.* の Lactic acid 生産の如くである。この様な物質が微生物群落に於て相互に拮抗的に作用することは、かなり古くから観察されている。これらの物質は或る場合には共棲的に働き或る場合には拮抗的に作用する。この関係は Fungi 間のみでなく、Slime mold と Fungi, Actinomyces と Fungi, Bacteria と Fungi 或は又他の生物群と Fungi の間にも存在することは想像し得るところである。

Fungi 間の関係については 1869 年 RAULIN⁽¹⁾氏が *Asp. niger* についてその報告を行つている。

以來 KÜSTER⁽²⁾, NIKITINSKY⁽³⁾氏等によつて観察並に實驗がなされ報告されている。

この拮抗現象のよつて起る理由については單に產生物質のみに原因するばかりでなく、培地に於ける栄養の消耗, 平衡, 或は濃度の變化, pH の變化等いろいろ原因を挙げることが出来るが、所謂抗生物質として產生される物質の存在は相當重要な因子の一つになると思う。

筆者等は斯くの如き絲狀菌の產生する抗生物質が抗黴的に作用する事實を飲食品の保存中に於ける發黴防止に應用し度いと思つている。この目的の爲に此度は *Rhizopus sp.* (假にこの種を *Rhizopus A* としておく), 及 *Trichoderma lignorum* の產生する抗黴物質について試験し、その性状の一部分を知り得たので報告する。(本稿中 *Rhizopus A* に関しては第 103 回本會東京支部會で報告した)。

實 驗

(I) *Rhizopus A* について 抗黴物質を生ぜしめる爲に次の如き組成の培地を使用した。これは Pfeffer 液を modify したものである。

蔗	糖	50 g	硫酸マグネシウム	2.5 g
硫酸アンモニウム		10 //	蒸 溜 水	1,000 cc
磷酸カリ		5 //		

上記組成を有つ液體培地の反應は pH 5 前後を示し、この培地に *Rhizopus A* を接種し、1 週間 30° の定溫器中で靜置培養を行つた。これによつて得た培養濾液について次の實驗を試みた。即 100°, 10 分間滅菌處理をした後に菌體は除去しその濾液を 200 cc エルレンマイヤー氏フラスコに夫々 10, 20, 30, 40, ……100% の割合で未培養液中に添加(總量を 100 とし、此の際の pH を 4.5~5.0 に調節した)棉栓し 100°, 30 分間滅菌處理後試験絲狀菌の孢子懸濁液をスボイトで以て無菌的に接種し、30° の室溫器に置き菌絲の發育状況を觀察する方法をとつた。試験黴として接種したものは *Rhizopus* 及 *Trichoderma lignorum* であるが、接種した *Rhizopus* は抗黴物質生産に用いたものと同一種の *Rhizopus A* である。