

Glucuron 酸の試験管内組織, 體液 Glucuronide 加水分解酵素に及ぼす影響

On the Influences of the Glucuronic Acid on Glucuronidase in
Tissues in Vitro and Body Fluids

横濱醫科大學産科婦人科學教室(主任 森山豊教授)

小 池 忠 次 Tadatugu Koike

第1章 緒 言

Fishman¹⁾²⁾³⁾ は1940年以降, Glucuronide 加水分解酵素(以下 β -G) が, 生体内で各種のGlucuronide 抱合體を合成する作用あることを提唱し, Steroidhormone 殊に Estrogenの抱合代謝に β -G が有力に作用するといふ, 英國學派の Kerr 及びその協同者⁴⁾⁵⁾⁶⁾ は癌組織にその活性が高い點などから, 細胞増殖, 核分裂の事象に β -G の生物學的意味を求めている. 又その水解性に重點を置いて, 水溶性 lipide glucuronides 殊に Steroid 性狀のもの \rightarrow aglycon への轉換をはかる生理的的使命ありとする意見もある⁷⁾⁸⁾. Fishman等⁹⁾はGlucuron 酸代謝の研究で, その分子内エステル結晶體であるラクトンを経口投與した人血清 β -G の減少を發表し, 著者¹⁰⁾¹¹⁾ は Glucuron 酸(グロンサン中外) 溶液の皮下注射による妊娠悪阻及び中毒症の治療中に, 上昇せる血清 β -G が著明に減少することを認めた. Brayer et al¹²⁾ は前立腺癌患者の血清及び尿 β -Gが Glucuron酸(以下G酸)のラクトン投與によつて著明に減少することを報告した. 著者¹³⁾ のマウスによる實驗では, Estrogen 負荷成熟雌性マウスの子宮 β -G は, G酸投與により一過性に急激に減少する.

これらの實驗は in vivo において β -G がGlucuronideの分解及び合成に關與する機轉に影響をうけることを暗示するものであるが, in vitro の酵素活性とG酸の關係について行つた實驗はない.

著者は, 妊娠及び産褥時血清, 新鮮胎盤, 絨毛, 脱落膜組織で, β -G 活性に對するG酸の試験管内作用に關する實驗を行う事のような結果をえたので, こゝにその大様を報告する.

第2章 實 験

第1節 β -G 活性に對するG酸と保溫時間の關係

この實驗は血清及び組織の β -G に對するG酸の作用と, 生體の生理的體溫に等しい β -Gの至適溫度に保溫した時間的因子との關係を究明しようと試みた.

第1項 G酸の血清 β -Gに及ぼす作用と保溫時間

試験管内のG酸の血清 β -Gに及ぼす影響を, 一定時間檢體にG酸添加したものを保溫したものについて行つた.

(1) 實驗方法

實驗材料は β -G活性の高い妊娠後期及び分娩後婦人血液を用いた. すなわち滅菌試験管に豫めG酸10%溶液(pH 5.6) 0.5 cc とこれと比較する目的で, 蒸留水, 醋酸緩衝液(pH 5.6)を夫々入れ,

第1表 各物質混合液20時間保溫後の血清 β -Glucuronidase

患者 番號	血清 β -Glucuronidase 單位/100cc				備 考
	對 照	蒸留水	pH 5.6 醋酸緩 衝 液	10% G 酸溶液	
I	540	546	540	283	妊娠9ヵ月 肺結核
II	761	648	676	412	分娩後5日
III	695	695	690	313	妊娠6ヵ月
IV	548	540	548	300	分娩後4日
V	280	280	280	180	分娩後4日
平均	559	541	546	297	

血液5ccに $1/10$ 量の蒸留水, 醋酸緩衝液(pH 5.6)及び10%G酸(pH 5.6)を夫々混和, 20時間38°Cに保溫後の血清について β -G 活性を測定した.

よく混和し、直に 38°C に保温した。保温時間は 20 時間とした。保温後各血清をとって Fishman et al¹⁴⁾の方法で β -G を測定した。

(2) 実験成績

20時間 38°C で試験管内血液で G 酸が果した血清 β -G への影響は、第 1 表にみるように、著明な酵素の活性抑制作用を示した。保温した対照の血清 β -G は平均 559 単位であり、G 酸 50mg を加えた場合の血清 β -G は平均 297 単位で 53% に減少した。比較すべき蒸留水、醋酸緩衝液を加えた血液より分離した血清 β -G は対照の実験値と有意の差をみない。

第 2 項 G 酸の組織 β -G に及ぼす影響と保温時間 (脱落膜及び絨毛組織)

脱落膜は妊娠初期 8 ~ 12 週で最高の活性を示すといわれる。著者はこの脱落膜及び絨毛組織 β -G 活性に及ぼす G 酸の影響を検討した。

(1) 実験方法

妊娠初期の人工中絶で内容除去によつて得た脱落膜及び絨毛組織を正確に 1 g を滅菌的な操作でとり、そのまま破碎した。滅菌蒸留水 20 倍で稀釋し、25cc 容量の栓付き煮沸試験管に封じて充分振盪し、55 分間 2000 廻轉で遠心分離した。その 1 cc を 6 本の試験管にとり、その各々に 0.1cc の 10% G 酸溶液 (G 酸 10mg 含有) を加えた。又対照として他の 6 本の試験管にとつた抽出液に 0.1 cc の蒸留水を加えた。かくして組織の 22 倍抽出液を 0, 1, 2, 3, 4, 24 時間 38°C に保温したものについて、逐時的に β -G 活性を Fishman et al の方法で測定した。

(2) 実験成績

脱落膜及び絨毛組織では、明かに前者のほうの活性が高い。その各々に對する対照及び G 酸添加の各保温時間に對應する実験値は第 2 表に一括して示してある。各群において推計學的検討を二元配置法で行うと、保温時間による実験値には有意の差はなく、G 酸及び対照の値では 0.01 以下の危険率で有意義の差が認められた。すなわち G 酸は、組織抽出液では保温時間に關係せずに β -G 活性を著明に抑制した。

第 2 表 組織 β -Glucuronidase に及ぼす G 酸の影響

組	織	組織 β -Glucuronidase (単位/Gm)						備 考
		保 温 時 間						
		0	1	2	3	4	24	
I	対照	1082	1008	961	881	872	1107	妊娠 10W 脱落膜
	G 酸*	960	714	714	739	672	611	
II	対照	800	807	800	800	782	800	妊娠 7W 脱落膜
	G 酸	680	700	685	685	650	700	
III	対照	462	462	462		462	470	妊娠 9W 絨毛組織
	G 酸	365	365	370		365	376	
IV	対照	420	420	420	420	406	420	妊娠 8W 絨毛組織
	G 酸	251	230	230	240	217	230	

* G 酸 10% 溶液 (pH 5.5)

検討 { 時間的要因 $< F_{5}^{5}(0.05)$, $3/4$
處置的要因 $> F_{5}^{1}(0.01)$

第 3 項 小括及び考按

妊婦及び産褥婦人血液、妊娠子宮内容組織抽出液に G 酸を添加すると、保温時間に關係なく、これらの β -G を著明に抑制することが認められた。この抑制作用は生體温度及び酵素至適温度は必ずしも必要ではなかつた。

第 2 節 β -G 活性に對する G 酸濃度の及ぼす影響

前節において G 酸の β -G 活性抑制の定性的實驗が行われたが、添加した G 酸の濃度の量的な關係と β -G 活性の抑制についての實驗を行なおうとするものである。

第 1 項 G 酸濃度による脱落膜組織 β -G に對する活性抑制

組織抽出液に添加する G 酸が、その溶液内 G 酸濃度によつて β -G に及ぼす活性の減弱度に差異があるか否かを測定した。

(1) 実験方法

G 酸濃度は 10% 溶液の倍數稀釋によつて、5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% を作製した。その 0.5cc を脱落膜組織の 20 倍抽出液 1.0cc に加え、各試験管 1.5cc は 30 倍組織抽出液中に各量の G 酸を含有するごとくにした。対照として 0.5cc の蒸留水を加えた 30 倍抽出液を作り、これらを 38°C 2 時間保温後その β -G 活性を測定した。

(2) 実験成績

第 3 表のごとく G 酸濃度により、その 50mg G

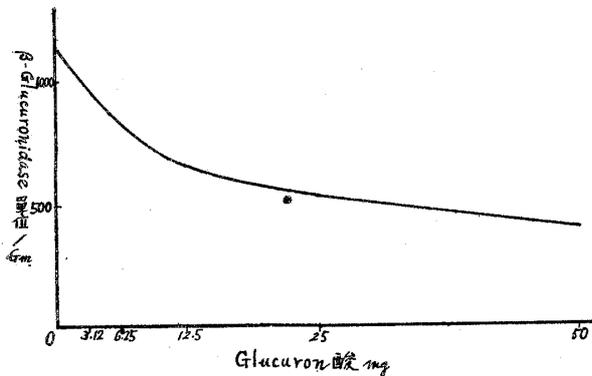
第3表 脱落膜抽出液に各量のG酸添加
2時間保温後の組織β-G

* a b	脱落膜組織β-Glucuronidase 單位/Gm						妊娠週數
	50mg	25	12.5	6.25	3.12	0	
I	324	530	680	820	988	1082	7 W
II	400	622	742	902	1116	1237	9
III	360	476	584	664	884	1105	10

a 添加G酸量(mg) b 被檢組織
* 組織は30倍稀釋

酸の存在の下で組織抽出液の2時間保温後のβ-G活性は、G酸を含有しない対照の値の約30%となり、以下低濃度となるに従つて活性が増加してゆく。0.625%のG酸溶液(3.12mg G酸含有)を加えた場合は、対照値と殆ど顯著な差をみない。この濃度と活性度減弱の對比曲線は第1圖のごとくになる。

第1圖 子宮脱落膜組織β-G活性と
添加G酸濃度の關係



第2項 胎盤組織β-G活性に対するG酸濃度の抑制作用と他の酸性溶液の比較

(1) 實驗方法

妊娠10カ月の正常新鮮胎盤1gの20倍抽出液を作り、前記の方法で遠心、上澄1ccを滅菌試験管にとつた。添加酸性溶液として、pH 5.6のG酸及び醋酸、硫酸とその倍數稀釋液を作つた。これを各抽出液に0.5cc添加し、0時間及び2時間保温後のβ-G活性値を比較した。

(2) 實驗成績

胎盤7個についての平均した數値は第4表に示

第4表 添加酸性溶液と保温時間に対する
組織β-G活性の關係

添加物 a b	組織β-Glucuronidase 單位/Gm					
	0			2		
G 酸	1*	1/2	1/4	1	1/2	1/4
硫 酸	346	530	637	320	530	637
醋 酸	988	1004	1000	890	980	944
蒸 溜 水	980	1000	1000	1000	1004	
	1000	1000	1000	1000	1000	1000

a 保温時間 b 添加物稀釋 * pH 5.6
實驗値は7の胎盤(10カ月)の平均値を示す

第5表 10%G酸稀釋液 pH G酸 pH 試驗

稀 釋	%	pH
原 液	10	5.65, 5.60
1/2	5	5.65
1/4	2.5	5.6
1/8	1.25	5.5
1/16	0.625	5.45

(註) アンチモン電極 pH計使用による
稀釋は蒸溜水を用う。pH測定時 20°C

してある。G酸以外の酸性溶液の添加では保温時間に有意差はなく、又その各々とのG酸各濃度との間には明かな差が認められる。又G酸添加群では、保温時間の影響はなく、そのG酸濃度によつて相反的な顯著な差が認められた。Van't Hoffの理論による稀釋によるpHの關係は、G酸の10%溶液(pH 5.6)の溜水稀釋液についての嚴正なpH検査(第5表)によつて確められた。

第3項 小括及び考按

脱落膜及び組織のβ-G活性に対するG酸の抑制作用は、そのG酸濃度と量的な關係をもつことが明かにされた。G酸10%溶液pH 5.6の倍數稀釋液を添加するに従つて、すなわちG酸の量的減少に従つて酵素活性は遞増する關係が認められる。これには酸性度は關與せずG酸の質的並びに量的な因子が關係する。

これらの作用は酵素非活性化とは異なり、酵素

それ自體への化學的反應によるものか、又はもつと他の原因によるものかは不明である。至適水素指數及び至適溫度という酵素條件ではなくて、G酸と Glucuronidase という特異的な關係に立つた化學變化と考えられる。

第3章 考 按

β -G の多價アルコール(2價及び3價)による活性抑制は既に知られている¹⁵⁾。しかしG酸が *in vitro*において、たかまつた酵素活性を抑制した機序と、*in vitro*における今回の活性阻害作用とが同一の性状であることを斷言することはできないし、その本體は不明である。この作用は酵素活性の條件である至適水素指數や溫度に關連がなく、濃度の量的關係で酵素作用を抑制することなどから、G酸の作用が、一般的な酵素阻害の法則に従っているのかも知れない。

β -G のこの實驗でみられた活性は妊婦又は産褥血清や妊娠子宮内容組織でたかまつた状態であり、この場合の活性は、Estrogenを初めとする種々 Steroid の Glucuronide を基質とした水解や、又は恐らく合成という可逆性の平衡に觸媒的作用に及ぼしていると解せられる。

酵素の物質に對する作用の機構は、先ず物質がアポ酵素の上に固定され、次に Coenzyme によつて化學變化をうける。この物質と化學的相似性の物質は、酵素によつて變化を蒙ることなくアポ酵素の上に固定され、その酵素作用を阻害する。酵素と阻害物質との關係は現在次第に解明されつつあり、これによる特異性が構造の上で決定されている。例えば、燐酸鹽や砒酸鹽は Phosphatase を阻害し、Protease は Phenylhydrazine によつて阻害をうける¹⁶⁾。Takadiase の β -Glucosidase はブドウ糖 phenol β -D-Glucosid, Glucon 酸、及びそのラクトンにより、 β -Galactosidase は Galacton 酸, Phenol- β -Galactoside 及びそのラクトンにより阻害される¹⁷⁾¹⁸⁾。これらの阻害作用は、その物質と基質が酵素結合に「競争的」となることに基くとされ、反應は基質と阻害物のそれぞれの濃度に従つて變化する¹⁹⁾。

體液及び組織抽出液には、單離した Aglycon

(主としてこの場合水不溶性 Steroid) は存在していないものと思われる。従つてこゝでは Glucuronide 合成作用は考えられない。水溶性 Glucuronide の加水分解が一方的に進行する状態の、酵素觸媒による活性化と化學反應の平衡が、G酸の過剰な添加によつて破綻を來たすのではなからうか。少くとも *in vivo* ではこの生物學的作用が考えられる。

妊婦血清 β -G は大部分妊娠子宮或いは副腎皮質など異常生理によるものであることを著者は強調して來た。妊娠10カ月の胎盤 β -G が妊娠初期の絨毛組織よりも高活性を示し、脱落膜組織のそれに匹敵する事實は、妊娠後半期に著明に増大する血清 β -G によつて表徴されることを示している。又妊娠中の排泄體各種 Steroid は胎盤に由來するといわれ²⁰⁾²¹⁾、一方副腎皮質もその代償性腺としての意義が考えられている。妊婦尿 Estrogen では Estriol はもとより、從來主として硫酸エステルを作るとされていた Estrone²²⁾も、近時大部分 Glucuron 酸抱合するといわれ²³⁾²⁴⁾²⁵⁾、Pregnanediol もすべてG酸結合をしている²⁶⁾²⁷⁾ ことから、 β -G が胎盤性の Steroid hormone 代謝と緊密な關連があることが暗示される。

人血清の β -G が妊娠中毒症で著しく増加することは知られている²⁸⁾。この原因を Fishman は Estrogen の代謝異常にあるとし、Estrogen と浮腫について追求している²⁹⁾³⁰⁾。又森山³¹⁾³²⁾及び瀬谷³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾ は妊娠中毒症血清に ACTH の著明な増加を報告し、この場合副腎皮質の賦活が行われ得る。吉利等³⁵⁾は Cortison による浮腫、細胞内外液相の變動を報告しており、中毒症における諸症状との關連が血中 ACTH 増加の間に暗示される。Cohen³³⁾は妊婦尿の formaldehydogenic Steroid の G酸抱合體の増加から、これを副腎皮質に源泉を求めて血清 β -G との關係を追求している。

このような機構は尿中 C-19, C-17 の Steroid glucuronide の酵素(β -G) 加水分解によつて明るみに出されて來たが³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾、17-Ketosteroids や Corticoids は妊婦尿ではG酸結合物と Sulfate の比率が著しく増加する²⁶⁾。

かゝる Steroid 代謝亢進の結果、上昇すると思われる血清 β -G 活性は、晩期妊娠中毒症や妊娠悪阻治療に G 酸 200mg 皮下注射すると、治療効果と共に短時間内に半減することが認められた。

今回の実験は *in vitro* においても Glucuronide 加水分解酵素に對して、G 酸が特異的な阻害作用を及ぼしたことを示した。

第4章 結 論

in vitro において體液、組織 β -G は G 酸によつて活性が抑制された。この作用は生體及び酵素至適溫度に關係がなく、特異的であり、又 G 酸濃度に比例して β -G 活性の阻害が高まることを示した。これは又 G 酸溶液の酸性度と關連がなく、質的並びに量的に G 酸の β -G に及ぼす影響は特異的であつた。

終りに恩師森山豊教授の御懇篤なる御指導を感謝する。又、下垂體副腎皮質の研究から教室の瀨谷學士の助言と教示をえたことに謝する。

グルクロン酸の提供を頂いた中外製薬會社學術課、酵素に關する基質を提供された名古屋産業科學研究所手嶋氏に、その御厚意を感謝する。

文 獻

- 1) *Fishman, W.H.*: J. Biol. Chem., 152: 487, 1944.
- 2) *Fishman, W.H.*: J. Biol. Chem., 136: 229, 1940.
- 3) *Fishman, W.H.*: J. Biol. Chem., 131: 225, 1940.
- 4) *Kerr, L.M.H., Levy, G.A., & Campbell, J.G.*: Nature., 160: 572, 1948.
- 5) *Kerr, L.M.H., Levy, G.A., & Campbell, J.G.*: Biochem. J., 44: 487, 1949.
- 6) *Kerr, L.M.H., Levy, G.A., & Campbell, J.G.*: Biochem. J., 46: 462, 1950.
- 7) *Arz, N.E., & Osman, E.M.*: The Biochemistry of Glucuronic acid, 1950.
- 8) *Meyer, K., Linker, A., & Rapport, M.M.*: J. Biol. Chem., 192: 297, 1951.
- 9) *Fishman, W.H., Smith, M., Thompson,*

- D.B., Bonners, C.D., Kadson, S.C. & Hamburger, F.*: J. Clin. Investigat., 30: 685, 1951.— 10) 小池: 産婦の世界, 5: 23, 1953.— 11) 小池: 第12回日本産婦人科學會神奈川地方部會, 昭28. 1月31日.— 12) *Brayer, F.T. & Trunell, J.B.*: J. Clin. Endocrinol., 12., 917, 1952.— 13) 小池: 横濱醫大産婦人科教室研究會, 昭27. 12月22日.— 14) *Fishman, W.H., Springer, B. & Brunetti, R.*: J. Biol. Chem., 173: 449, 1948.— 15) *Masamune, H.*: J. Biochem. Japan, 19: 353, 1934.— 16) 坂口, 朝井: 「酵素」, 第2版, p. 5, 昭27.— 17) 江崎: J. Biochem., 32: 31, 1940.— 18) 堀越: J. Biochem., 35: 39, 1942, 赤堀, 田宮「酵素學の進歩」第3集 p. 183, 1953.より引用.— 19) *Stolkowski, J.*: Les Diastases, 山科, 吉田譯「酵素」p. 44, 1952.— 20) *Jones, B.W. & Weil, P.G.*: J.A. M.A., 111: 519, 1938.— 21) *Dorfman, R.I.*: Surg. Gynecol., 73: 1545, 1941.— 22) *Eutenandt, A. & Hofstetter*: Z. Physiol. Chem., 259: 222, 1939.— 23) *Cohen, S.L.*: J. Biol. Chem., 184: 417, 1950.— 24) *Cohen, S.L. & Marrian, G.F.*: Biochem. J. 30: 57, 1936.— 25) *Oueson, I.B. & Cohen, S.L.*: Endocrinology., 51: 173, 1952.— 26) *Cohen, S.L.*: J. Biol. Chem., 192: 147, 1951.— 27) *Cohen, S.L., & Goldfine, M.M.*: J. Clin. Endocrinol., 12: 960, 1952.— 28) *Odell, L.D. & Mc Donald, D.F.*: Am. J. Obst. & Gynec., 56: 74, 1948.— 29) *Ogston, A.G., Philpot, J.S.L., Zukerman, S.*: Endocrinology., 1: 231, 1939.— 30) *Sprunt, D.H.M., Dearman, S., Rapa, J.*: J. Exper. Med., 67: 159, 1938.— 31) 森山, 瀨谷: 日産婦誌, 4: 32, 昭27.— 32) 森山, 瀨谷, 鈴木: 醫事新報, No. 1456, 93, 昭27.— 33) 瀨谷: 「晩期妊娠中毒症と ACTH の臨床的並に實驗的研究」(印刷中).— 34) 瀨谷: 「下垂體向副腎皮質ホルモンの新檢定法」(未發表).— 35) 吉利, 北村: 「内分泌のつどい」, 第2集. 195, 昭27.— 36) *Talbot, N.B., Ryan, J. & Wolf, J. K.*: J. Biol. Chem., 148: 593, 1943.— 37) *Mason, H.L. & Kepler, E.J.*: J. Biol. Chem., 191: 235, 1945.— 38) *Buchler, H.J., Katzman, P.A., Doisy, P.P. & Doisy, E.A.*: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 72: 297, 1949.

(No. 105 昭28・3・18受付)