運動精子における補中益気湯の直接的効果

大阪大学医学部泌尿器科学教室

山中 幹基 北村 雅哉 岸川 英史 坪庭 直樹
古賀 実 西村 憲二 辻村 晃 高原 史郎
松宮 清美 奥山 明彦

DIRECT EFFECTS OF CHINESE HERBAL MEDICINE “HOCHUEKKITO”
ON SPERM MOVEMENT

Masaki Yamanaka, Masaya Kitamura, Hidefumi Kishikawa, Naoki Tsuboniwa,
Minoru Koga, Kenji Nishimura, Akira Tsujimura, Shirou Takahara,
Kiyomib Matsumiya and Akihiko Okuyama
Department of Urology, Osaka University Medical School
(Director: Prof. Akihiko Okuyama)

(Background and Purpose) Chinese herbal medicine, “Hochuekkito” is widely used for male infertility in Japan. There have been many reports concerning its clinical usefulness but very few reports of in vitro experiments studying the mechanism of its effects. In addition to stimulating germ cells, we analyzed its direct effects on sperm using computer assisted semen analyzer (CASA).

(Materials and Methods) Motile sperm were prepared using swim up technique from semens collected from ten healthy volunteers. Sperm movements (motility, velocity, linearity) were analyzed by CASA after adding either serum containing anti-sperm antibody (ASA) or normal serum with or without Hochuekkito.

(Results) Two hours after adding serum with ASA, the decrease of sperm motility was significantly reduced from 25.1% (92.8%→67.7%) to 12.5% (92.9%→80.6%) by adding Hochuekkito. No significant difference in velocity and linearity was observed between two groups. By adding normal serum, any of three parameters differed significantly with or without Hochuekkito.

(Conclusion) Protective effects of Hochuekkito on sperm was suggested. Although normal sperm with ASA was used in this report, since the sperm of infertile patients are said to be more fragile, this results imply that direct protective effect is one of the mechanism of Hochuekkito for male infertility.

Key words: Hochuekkito, sperm movements, CASA

要旨: (背景と目的) 補中益気湯は男性不妊症に対して広く用いられており, その臨床的有用性についての報告は数多く見られるが, その作用機序の解明につながる in vitro の研究は少ない。我々は同薬が精巢細胞に働き造精機能を促進するのみならず, 直接精子に対する効果があるのではないかと考え, 精液自動分析装置 (CASA) を用いた in vitro の系を開発, 検討した。

(対象と方法) 健常男子10名の精液から swim up 法により運動精子を調整, 抗精子抗体を含む血清による免疫学的負荷をかけた状態, ならびに正常血清をかけた状態で補中益気湯の添加の有無による精子運動性 (運動率, 運動速度, 直進性) の経時的変化を CASA を用いて比較, 検討した。

(結果) 抗精子抗体を含む血清を加えると精子運動率は2時間後, 92.8%から67.7%に低下したが, さらに補中益気湯を加えた群ではその低下が92.9%から80.6%と有意に減少した。運動速度, 直進性に

については補中益気湯の添加の有無による有意な差はなかった。正常血清を加えた場合にはこれら3つのパラメーターについて補中益気湯の有無で両群に有意差はなかった。

(結論) 補中益気湯に精子に対する保護作用があることが示唆された。今回の検討では免疫学的負荷をかけた正常精子を用いたが、男性不妊症患者では障害感受性が高まっている事が知られており、補中益気湯の不妊症に対する作用機序の一部に精子に対する直接的保護作用があることが示唆された。

キーワード：補中益気湯、精子運動能、CASA

緒 言

男性不妊症患者における補中益気湯の臨床的効果については数多くの報告がみられている。しかしそのほとんどが経口投与によるもので、精子に対する直接的効果について検討したものは少ない。

今回、我々は運動精子に抗精子抗体 (anti sperm antibody: ASA) による免疫学的負荷をかけた状態で、補中益気湯エキスを直接加え、精子運動性の経時の変化を精液自動分析装置 (computer-assisted sperm analyzer: CASA) を用いて、その運動の各種パラメーターを測定し、その臨床的意義について検討した。

対象と方法

妊孕能が確認された健康男子10例より用手法にて採取された精液を承諾を得て対象とした。なお全症例において抗精子抗体は陰性であった。

運動精子の調整は星らの layering method¹⁾ に準じて行った。射出直後の精液を試験管に移して30分間室温にて十分に液化した後、磯島が改変した BWB (Bigger, Whitten, Whitten-gham)-BSA 培養液²⁾ 1.5 ml をゆっくりと重層させて37°Cにて90分間静置後、上層の1.0ml を回収した。これにより運動率の高い検体が得られた。

補中益気湯の調整は(株)ツムラより提供された元末を300mg とり、BWB-BSA 培養液30ml に加え十分浸透、溶解させた後、3,000r.p.m で10分間遠心させ上清を0.45 μ のミリポアフィルターにて濾過し、これを補中益気湯エキスとした。

Swim up した精子を含んだ BWB-BSA 液100 μ l と抗精子抗体陽性男子の血清もしくは抗精子抗体を含まない正常血清50 μ l の混合液に上記の補中益気湯エキスを25倍希釈したものを50 μ l 加えた(最終濃度100 μ g/ml)。対照には BWB-BSA 液を50 μ l 加えた。なお抗精子抗体は蛍光抗体間接法 (SRL 社) により精子凝集抗体 IgG を検出した。よく攪拌し、37°C、5%CO₂ で混合開始直後、開始1時間後、開始2時間後に40 μ l を顕微鏡ステージ自動温度制御システム (東海ヒット社製サーモプレート) の上で保温しておいた Makler

counting chamber にのせて精子の運動性を CASA (HAMILTON THORNE RESEARCH HTM-IVOSTM) で測定し、補中益気湯添加の有無の間で比較、検討した。各パラメーターの測定においては、実際に動いている精子数が200個以上が望ましい³⁾とされているので、これに達するまで計測フレーム数を重ねていった。検定には Mann Whitney U-test を用いた。

結 果

CASA においては1981年 Levine らが精子自動分析装置として報告⁴⁾して以来、精子運動能の解析が発展してきたが、その仕組みは位相差顕微鏡の使用により精子の頭部が光り、その光の軌跡を精子運動像としてとらえるとともに、各種パラメーターを自動的に解析するものである。

今回の検討には運動率、運動速度、直進性を用いた。運動率は任意に選んだ精子数のうち実際に運動している精子数の割合であり、運動速度は精子の実際に動いている軌跡の距離を運動時間で除したものである。直進性は HAMILTON-THORNE RESEARCH の定義では精子運動の直進方向の速度を実際の運動速度で除したものに100を乗じたものとされている (Fig. 1)。

抗精子抗体を含まない血清 (normal serum) 中の精子運動率を示す (Fig. 2)。補中益気湯添加群、非添加群とも経時的な低下の度合いはゆるやかで両群間に有意差はなかった。一方抗精子抗体を含む血清 (ASA

Fig. 1 精液自動分析装置 (CASA)

C A S A : Computer assisted sperm analyzer

位相差顕微鏡の使用により精子の頭部が光り、その光の軌跡を精子運動像としてとらえ、コンピューターが各種パラメーターを自動的に解析する。

$$\bullet \text{ 運動率 (\%Motility)} \quad \text{直進性} = \frac{\text{直進方向の速度 (V)}}{\text{実際の運動速度 (v)}} \times 100$$

• 運動速度 (Velocity)

• 直進性 (Linearity)

Fig. 2 抗精子抗体 (ASA) を含まない血清中における運動精子率の経時的変化

Fig. 4 抗精子抗体 (ASA) を含まない血清中における精子運動速度の経時的変化

Fig. 3 抗精子抗体 (ASA) を含む血清中における精子運動率の経時的変化

Fig. 5 抗精子抗体 (ASA) を含む血清中における精子運動速度の経時的変化

serum) 中では、1 時間後までは補中益気湯添加群、非添加群間に運動率の変化の違いはなかったが、2 時間後には非添加群間の運動率の低下の度合いは添加群よりも大きく、2 群間に有意な差があった (Fig. 3)。

精子運動速度は normal serum 中では両群とも差はなく、また経時の変化もほとんどみられなかった (Fig. 4)。ASA serum 中では両群とも 1 時間後までは経時の変化はなかったが、2 時間後ではいずれも若干の低下がみられている (Fig. 5)。これらにおける補中益気湯の添加の有無による有意な差はなかった。

精子運動直進性については normal serum 中 (Fig. 6)、ASA serum 中 (Fig. 7) とともに補中益気湯の添加の有無にかかわらず、1 時間後までに若干の低下がみられている。これらにおいても補中益気湯の添加の有無による有意な差はなかった。

Fig. 6 抗精子抗体 (ASA) を含まない血清中における精子運動直進性の経時的変化

Fig. 7 抗精子抗体 (ASA) を含む血清中における精子運動直進性の経時的変化

考 察

近年における女性側の原因における不妊症の治療は、いわゆる ART (Assisted Reproductive Technology) と呼ばれる生殖技術の発達により大きな進歩をとげている。一方、男性不妊症の多くは特発性の造精機能障害を原因としており、いまだその治療法が確立していないのが現状である。その中で、長期にわたる治療においても、分化・増殖に影響を及ぼさないようにするという点で、比較的副作用が少ないとされている漢方製剤が注目を集めている。中でも補中益気湯による男性不妊症における治療効果については数多くの報告がみられている⁵⁾⁶⁾。しかしながら、その大部分は経口投与による精子濃度が改善したとする in vivo のもので、精子の運動性に対する直接作用、いわゆる in vitro 系を用いた詳細な検討はなかった。

我々は今回の補中益気湯の直接作用の検討において、補中益気湯が精子に対する障害を保護し、運動率の低下を緩和することを示した。田代らは自ら開発した双子管を用いた実験で⁷⁾補中益気湯添加群で精子の運動率は非添加群より長時間保持されていることを示し補中益気湯の精子運動能持続作用を認めている。また同じく田代らは高速クロマトグラフィーを用いて、補中益気湯の経口投与後に血漿中、精漿中のいずれにも補中益気湯の成分が出現していることを示した。このことは経口投与であっても、原理的には精子に直接添加したときと同じ作用が得られることを示している。

一般に漢方製剤は多成分系であるので vivo の状態を正確に反映する vitro の系を考えるのは非常に困難であるが、同じ漢方製剤である小柴胡湯については

通常の一投与量7.5g で、その構成成分の一つである glycyrrhizin が約1.2μg/ml 得られる一方、小柴胡湯 300μg/ml における、この成分の濃度は約1.5μg/ml としており⁸⁾、これに準じて今回の我々の研究においては補中益気湯の濃度を100μg/ml に設定した。

広渡らは⁹⁾運動不良精子において八味地黄丸、補中益気湯、人参湯、牛車腎気丸の各種漢方製剤を加え、我々と同じ CASA を用いて精子運動能の変化をみている。運動率において、いずれも改善傾向を示しているが(有意差は後2種類のみ)、運動速度、直進性に関しては変化がみられなかった。運動率にのみ差が出ている点では我々の測定結果と一致する。同様に補中益気湯が特に精子運動率の改善に有効であったとしている報告がある¹⁰⁾¹¹⁾。

また Amano らは蛍光スペクトルによる解析で補中益気湯と精液の類似性が高く、補中益気湯の添加によりスペクトル強度を上げること¹²⁾、そして蛍光スペクトル強度と精子運動率に正の相関関係が認められること¹³⁾より不妊治療薬として補中益気湯の有効性を示している。

それでは補中益気湯のいかなる成分が精子運動能に関与しているのだろうか。補中益気湯は10種の混合生薬から成っており(表1)、抗ストレス作用、末梢血管拡張作用、蛋白質合成促進作用、脂質代謝改善作用、ステロイド作用、免疫賦活作用があるとされている。吉田らは¹⁴⁾この抗ストレス作用が男性不妊症患者の子供ができないという精神的ストレスから解放し、そこから種々な環境に好影響を与えているとしている。漢方薬の薬理を考える上では、生薬1つ1つの働きと切り離すのではなく、いくつもの成分の相互関係という特徴を無視してはならない¹⁵⁾。そうすればどの成分かと問うこと自体に問題があるかもしれないが、光川らは¹⁶⁾サイコに精子運動性を保持する作用が、またニンジンやソウジュツにその可能性があるとしている報告もある¹⁷⁾。

ここまでの文献的考察においては乏精子症もしくは

表1 補中益気湯の組成(本品7.5g 中)

オウギ	4.0g	タイソウ	2.0g
ソウジュツ	4.0g	チンピ	2.0g
ニンジン	4.0g	カンゾウ	1.5g
トウキ	3.0g	ショウマ	1.0g
サイコ	2.0g	ショウキョウ	0.5g

上記の割合の混合生薬の乾燥エキス5.0g を含有する

運動率の低い精子に対する、補中益気湯の改善効果すなわち負から正への作用におけるものであった。我々の今回の検討では妊孕能が確認されている健常精子をあえて抗精子抗体という負の状態に落として、補中益気湯の保護効果について調べた。我々は本報告と同様の方法で男性不妊症患者の運動精子の膜安定性の低下、あるいは障害感受性の上昇を示してきた¹⁸⁾。つまり男性不妊症患者の精子は一般に脆弱で、今回我々が示した補中益気湯の精子保護効果は男性不妊症に対する同薬の作用機序の可能性を示すものと考えられる。また射出後の精子が頸管内において障害されることを考えると、補中益気湯は男性ばかりでなく女性にも服用する価値があると思われる。田代は¹⁹⁾補中益気湯を服用している女性の頸管粘液を採取し、そこに精子を泳がせたところ、服用していない女性のものと比較して運動能が良かったと報告している。男性の精漿中に補中益気湯の成分が出現するのと同様に女性の頸管粘液中にもその成分が出現しているものと考えられる。天野らは¹⁹⁾我々と同じく健常男子精液に補中益気湯を添加したところ、精子運動率の低下抑制効果を認めているが、精子成分の蛍光スペクトル強度に差がなかったことより、補中益気湯は精子自体よりも精子周囲の環境に作用しているものと推察し、パートナーの服用有用性について示唆している。

我々は今回、抗精子抗体の負荷をかけた状態において、補中益気湯の精子運動率の保護効果が発揮される事を示した。これは男性のみならず女性が補中益気湯を服用することが不妊症の治療の手段となる可能性を示すものと考えられた。

結 語

1. 健常男子の運動精子に抗精子抗体による免疫学的負荷をかけた状態で補中益気湯の精子に対する保護効果を検討したところ、補中益気湯添加群は非添加群と比較して精子運動率の低下が有意に緩和された。

2. 男性不妊症に対する補中益気湯の作用機序として脆弱な患者精子に対する保護効果が考えられた。

3. 女性も補中益気湯を服用する事が不妊カップルの治療につながる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木章, 斉藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精液静置法'layering method'による精液中からの良好精子の分離. 日不妊会誌, 28, 101—105, 1983.
- 2) 磯島晋三: 抗精子抗体検出法. 臨床生殖免疫, 第1

- 版, 47, メジカルビュー社, 東京, 1996.
- 3) Davis, R.O. and Kats, D.F.: Operational Standards for CASA Instruments. J. Androl., 14, 385—394, 1993.
- 4) Levin, R.M., Greenberg, S.H. and Wein, A.J.: Clinical use of the turbidimetric analysis of sperm motility, comparison with visual usual techniques. Fertil. Steril., 35, 332—336, 1981.
- 5) 真鍋文雄, 吉井慎一, 石川博通, 小磯謙吉: 男子不妊症に対するツムラ補中益気湯の効果. 日不妊会誌, 36, 683—689, 1991.
- 6) 柴原浩章, 伊熊健一郎, 塩谷朋弘, 岡田幾久子: 男性不妊症に対する補中益気湯の有効性に関する検討. 産婦の進歩, 45, 76—81, 1993.
- 7) 田代真一, 赤澤好温, 小倉啓司, 福山拓夫, 中川清秀: 補中益気湯の精子安定化作用. 和漢医薬学会誌, 2, 592—593, 1985.
- 8) Yano, H., Mizuguchi, A., Fukuda, K., Haramaki, M., Ogasawara, S., Momosaki, S. and Kojiro, M.: The herbal Medicine Sho-Saiko-to Inhibits Proliferation of Cancer Cell Lines by Inducing Apoptosis and Arrest at the G₀/G₁ Phase. Cancer Research, 54, 448—454, 1994.
- 9) 広渡恒治, 菅沼信彦, 浅田義正, 中村潔史, 近藤育代, 成田 収, 友田 豊: 漢方薬剤の精子運動能に対する直接作用の解析. 産婦人科漢方研究のあゆみ, 9, p25—29, 診断と治療社, 東京, 1992.
- 10) 太田博孝, 福島峰子: 乏精子症に対する補中益気湯・八味地黄丸の効果. 産婦人科漢方研究のあゆみ, 5, p60—67, 診断と治療社, 東京, 1988.
- 11) 李 萍, 高瀬規久也, 向林 学, 高島忠守, 三橋洋治, 星合 昊: 男性不妊における補中益気湯の臨床効果について. 産婦の進歩, 48, 406—410, 1996.
- 12) Amano, T., Kunimi, K. and Ohkawa, M.: Analysis of Fluorescence Spectra from Chinese Herbal Medicine for Male Infertility. Am. J. Chinese Med., 23, 231—221, 1995.
- 13) Amano, T., Kunimi, K. and Ohkawa, M.: Fluorescence spectra from human semen and their relationship with sperm parameters. Arch. Androl., 36, 9—15, 1996.
- 14) 吉田英機, 谷藤 匠, 桜井秀樹, 田代博紹, 小川肇, 今村一男: 乏精子症に対する補中益気湯の臨床的效果について. 泌尿紀要, 32, 297—302, 1986.
- 15) 田代真一: “補中益気湯”基礎. 漢方製剤の知識, 6, p77—80, 薬時新報社, 東京, 1994.
- 16) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫, 折笠精一: 男子不妊症患者に対する補中益気湯の使用経験. 日不妊会誌, 29, 458—465, 1984.
- 17) 田代真一: 補中益気湯の精子運動持続化作用. 漢方医学, 12, 13—18, 1988.

- 18) 山中幹基, 坪庭直樹, 古賀 実, 西村憲二, 辻村晃, 北村雅哉, 高原史郎, 松宮清美, 奥山明彦: 不妊症患者の運動精子における障害感受性の検討. 日不妊会誌, 42, 297—302, 1997.
- 19) 天野俊康, 平田昭夫, 高 栄哲, 並木幹夫: 蛍光ス

ペクトルからみた補中益気湯の精子運動率低下抑制作用について. 日本アンドロロジー学会総会記事, 15, 77—78, 1996.

(1997年8月14日受付, 1998年3月18日受理)