

蛇床子エキスの雄性マウス性行動 およびその血中テストステロン値に及ぼす効果

水野 一郎

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

The effects of *Cnidii Monnieri Fructus* on sexual behavior and blood testosterone level in male mice

Ichiro MIZUNO

Department of Urology, School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received March 25, 1996. Accepted July 3, 1996.)

Abstract

The pharmacological effects of "Jashoshi, *Cnidii Monnieri Fructus*, *Selium monnieri*" which is claimed to be effective for male sexual dysfunction were investigated, and the following results were obtained. *Cnidii Monnieri Fructus*, *Selium monnieri* orally administered to normal mice and those with experimental bilateral cryptorchidism (1) increased the frequency of mounts and shortened the latency time to the first mount, overall enhancing sexual behaviors, (2) tended to raise the blood testosterone level, (3) raised the trypsin-like protease activity in the submaxillary gland, one of the androgen target organs, with electrophoretic analysis demonstrating exactly the same zymographic changes with *Cnidii Monnieri Fructus*, *Selium monnieri* as those with testosterone propionate, and (4) produced more mRNA of the epidermal growth factor (EGF) in the submaxillary gland as is the case with testosterone propionate administration. Meanwhile, none of those changes were found in castrated mice given the extract. Furthermore, no variations of the blood LH or FSH levels were found with the extract administration in any mice of the groups. Thus these findings demonstrate that *Cnidii Monnieri Fructus*, *Selium monnieri* has an activity of accelerating mouse sexual behaviors and an effect of raising the blood testosterone level, with the latter possibly contributing to development of the former. Moreover, the absence of LH and FSH variations highly suggests that the beneficial effect of *Cnidii Monnieri Fructus*, *Selium monnieri* on testosterone might be produced by its direct action on the testis.

Key words Jashoshi, mouse, sexual behavior, submaxillary gland, trypsin-like protease, epidermal growth factor, testosterone.

Abbreviations EGF, epidermal growth factor ; Jashoshi (*Selium monnieri*), 蛇床子.

緒 言

男性性機能障害に対し、和漢生薬あるいは和漢生薬から構成された漢方薬が功を奏する場合があります^{1,2)}。性欲、勃起、射精などの男性性機能に作用する、漢方医学におい

て温腎補陽薬として用いられているものに対する興味が高まってきている。しかし現在のところ、外来で一般的に使用されている八味地黄丸あるいは補中益気湯などの漢方薬については、その効果が一定しないこともあり広く治療薬として普及するには至っていない。

今回着目した蛇床子という和漢生薬は、温腎補陽薬の

ひとつとして、性機能障害の代表的な症状である勃起不全の治療薬として古くより成書に記載されている³⁾が、現代の臨床家には使用されていないものである。しかし近年、三輪⁴⁾によって蛇床子には男性ホルモン様作用があるという報告がなされており、男性性機能はアンドロゲン依存性が強いものである⁵⁾ことから、この作用がもし存在するとすれば、これが性機能の回復に役立つ可能性がある。そこでマウスを用いて、蛇床子の男性ホルモン様作用の有無を検討し、その作用の雄性性機能との関連性を追及することを目的とした。すなわち、雄マウス性行動への影響を検討することはもちろん、特に本研究では、薬物の微小な血中アンドロゲン上昇作用について検討する際、その作用が血中ホルモンレベルの変化としては捕えにくく、血中テストステロンの微小な変化に鋭敏に反応する、顎下腺のトリプシン様プロテアーゼの測定によって始めて確認できたとする報告^{6,7)}があるので、血中ホルモンレベルの測定に加え、マウス顎下腺における、プロテアーゼ活性および表皮成長因子(EGF)産生についても検討した。

材料と方法

1. 実験動物および処置法

A. 実験動物

実験には、雌雄とも購入時5週齢のICR系マウスを用い、これを1ケージ3匹ずつ雌雄別々に配置した。恒温恒湿(23±2°C, 55±10%)、明暗サイクル12時間毎(点灯午前7時)の動物室にて、実験時以外は市販されている固型飼料ならびに水道水を自由に摂取させて飼育した。

B. 処置法

マウスは以下の3群に分け処置を行った。なお麻酔は、pentobarbital sodiumを60 mg/kgで腹腔内投与することによって行った。

(1) 去勢群

陰囊縫線の部位に切開を入れ、精巣動静脈を切断することにより精巣および精巣上体を一括して摘出し、これを去勢群とした。

(2) 停留精巣群

鼠径部から陰囊にかけて縦切開を入れ、鼠径管を通して精巣を押し上げた後、精巣導帯を切断した。この後、精巣を腹腔内に留置し鼠径管を結紮することにより、精巣を停留させた。これを両側に行い停留精巣群とした。

(3) 対照群

sham operationとして下腹部正中切開および閉腹のみを行い、対照群とした。

さらにこれら3群にそれぞれ、蛇床子エキス投与群、testosterone propionate (TP) 投与群、および対照として蒸留水(distilled water (DW)) 投与群(すべてn=9)を設けた。

2. 薬物処置法および動物飼育

投与薬物である蛇床子(Jashoshi), Cnidii Monnieri Fructus, *Selium monnieri* は、日本粉末薬品株式会社より購入した30%エタノール抽出エキスを蒸留水にて懸濁し10%(w/v)の濃度とし、これを、0.5 g/kgで経口投与した。TPは、帝国臓器製薬株式会社のエンルモン[®]注10を胡麻油にて3 mg/mlの濃度に希釈し、これを15 mg/kgで腹腔内投与⁶⁾した。対照のDWは5 ml/kgで経口投与した。なお、蛇床子エキスの投与量は、予備実験の結果により得られた最適投与量とした。

5週齢の雄マウスに去勢術、両側停留精巣作製術、およびsham operationを施行し、4週間の予備飼育を経て薬物の投与を始めた。投与期間は2週間であり、蛇床子およびDWは連日、TPは去勢群においては2日に1回、停留精巣群および対照群においては7日に1回投与した。投与期間終了日に性行動の観察を行い、その翌日、断頭により採血し、また、顎下腺、前立腺および精囊の摘出を行った。

3. 実験方法

A. 性行動の観察

雄マウスの性行動には、sniffing, licking, mounting, intromission, thrusting, ejaculationなどがあるが、特にmountingは、性行動のactivityを表す指標として最も一般的に用いられている⁸⁾ものである。これにつき、30分間におけるその発現率および回数、初回mountingまでの潜時(mount潜時)を測定した。

観察は午後6時から午前0時にかけて行った。新たに準備した飼育ケージに1匹の雄マウスを入れ、これを5分間adaptationさせたところで同週齢の雌マウスを1匹同ケージに導入し、観察を始めた。10分間の観察でmountingが認められない場合は2匹目の雌マウスに交換、さらに次の10分でも認められなければ3匹目の雌マウスと交換して観察を行った。なお、雌マウスは観察日の昼間にsmear checkを行い、その腔垢像が有核上皮細胞がほとんどを占める発情前期と判定した個体のみを用いた。

B. 顎下腺トリプシン様プロテアーゼ活性の測定

摘出した顎下腺に蒸留水を加え、10%(w/v)の摩擦液を作製した。これを20,000×gで30分間2回遠心分離し、得られた上清を顎下腺組織抽出液とした。活性測定はTaieら⁹⁾の方法に基づき、基質としてp-ニトロアニリンの誘導体であるN- α -benzoyl-DL-arginine-p-

nitroanilide (BAPNA) を用いた。検量線標品は、10 mM の p-ニトロアニリンを 5% 過塩素酸で 100 μ M ~ 10 μ M に希釈し 1 ml としたものをを用いた。酵素活性は、1 分間に p-ニトロアニリン 1 μ mol の反応を触媒する酵素量を 1 unit (U) とし、蛋白量 (mg) あたりの U 数で表した。なお蛋白量は、Lowry 法¹⁰⁾に従い、牛血清アルブミンを標準物質として検量線を作成し算出した。

C. 電気泳動法による顎下腺トリプシン様プロテアーゼ活性の解析

(1) 電気泳動法

Ogita ら¹¹⁾により考案された垂直式微量電気泳動法に従った。

顎下腺組織抽出液と試料調製用希釈溶液〔125mM トリス塩酸 (pH 6.8), 40% グリセリン, 0.0005% プロムフェノールブルー〕とを等量混和し、これを 8,500 \times g で 1 分間遠心分離、得られた上清を電気泳動用試料とした。これを 3 μ l 取り、8% ポリアクリルアミド分離ゲルおよび 4% ポリアクリルアミド濃縮ゲルを用いて、ゲル幅 1 cm あたり 1 mA の電流が流れるよう調整し電気泳動を行った。

(2) ザイモグラムの検出

プロテアーゼ活性の測定と同様、基質として BAPNA を用いる Isobe ら¹²⁾の方法に基づき、トリプシン様プロテアーゼ活性を有する酵素類のザイモグラムを得た。

D. 顎下腺における EGFmRNA の分析法

(1) RNA 抽出法

totalRNA は、Chomczynski ら¹³⁾の一段階抽出法にて調製した。得られた RNA は 75% エタノールで洗浄後、Diethyl Pyrocarbonate 処理した 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液を加えて、RNA 最終濃度 10 μ g/ μ l に調製した。

(2) Probe の調整

Probe は American type culture collection より購入したプラスミド、pmEGF-26F12¹⁴⁾より調整した。これを制限酵素 Pst I で消化した後、1.2% の低融点アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、0.4 kb および 0.6 kb の DNA 断片を切り出した。これらを NaI 法¹⁵⁾に基づいた GENE CLEAN II KIT™ (BIO101 Inc.) を用いて精製し最終濃度 10 ng/ μ l に調整、これを peroxidase で酵素ラベルし Probe として用いた。

(3) Northern blot hybridization

各レーン 20 μ g の totalRNA を、ホルムアルデヒドを加えた変性条件下 1% アガロースゲルにて電気泳動後、ナイロン膜 (Hybond™-N+, Amersham) にトランスファーし、これを 0.05N の NaOH 処理により固定した。このナイロン膜を、上記 Probe と 42°C で一晩ハイブリ

ダイゼーションを行った。その後ナイロン膜を尿素、SDS を含む 0.5 \times SSC で洗浄し、enhanced chemiluminescence 法¹⁶⁾にて発色反応を行った後、X 線フィルムに 2 時間感光した。

E. 血清中総テストステロン、黄体化ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH) の測定

総テストステロンの測定は DPC 社のトータルテストステロンキットを、LH、FSH の測定は Amersham 社の下垂体ホルモンアッセイシステムシリーズをそれぞれ用いて、ラジオイムノアッセイ法により行った。

F. 前立腺および精囊の重量測定

前立腺および精囊は一括して摘出しその重量を測定し、結果はマウス体重 100 g あたりの重量で表現した。

G. 蛇床子エキス中のコレステロールの測定

(1) 定性反応

Liebermann-Burchard 反応に従い、蛇床子エキス中不飽和ステロールの呈色反応¹⁷⁾を行った。すなわち、まず蛇床子エキスを蒸留水にて溶解し 0.5% (w/v) の濃度としたもの 1 ml に、クロロホルム 2 ml を加えて振盪抽出した。このクロロホルム抽出液に無水酢酸 1 ml および濃硫酸 50 μ l を加えて、その色調の変化を観察した。

(2) 定量試験

Zurkowski 法¹⁸⁾に従い、蛇床子エキス中のコレステロールの定量を行った。呈色試薬としては、0.2M スルホサリチル酸 35 ml、無水酢酸 65 ml、濃硫酸 10 ml の混合比のものを用いた。0.1% (w/v) コレステロール標準液、0.5% (w/v) 蛇床子エキス液、ブランク用蒸留水それぞれ 50 μ l に呈色試薬を 2.5 ml ずつ加えて 15 分間放置後、620 nm において吸光度を測定した。

4. 統計学的処理

統計解析はデータの性質に応じて、Fisher の直接確率計算法 (mount 行動の発現率)、Mann-Whitney の U 検定 (mount 回数)、対応のない t 検定 (その他の項目) を用い、結果は平均 \pm 標準偏差で表現した。危険率 5% 未満を有意差水準とし、10% 未満、10% 以上をそれぞれ傾向あり、not significant (N.S.) として有意差検定を行った。

結 果

1. 蛇床子エキス投与量の決定

蛇床子エキスの投与量は、予備実験における顎下腺トリプシン様プロテアーゼ活性の測定結果より決定した。蛇床子エキスを 2 週間連日投与した、11 週齢の正常雄マウスのプロテアーゼ活性は、対照群 0.037 \pm 0.0071 U/mg protein に対し、蛇床子エキス 0.1, 0.5, 1.0 g/kg 投与群

それぞれ、 0.025 ± 0.012 , 0.051 ± 0.012 , 0.034 ± 0.0084 U/mg protein (すべて $n=5$) であり、 0.5 g/kg を最適投与量とした。

2. 性行動

A. mount 行動の発現率 (Table I)

停留精巣にすることによっても、mount 行動の発現率は対照群と比較して変化は生じなかった。しかしながら、去勢により対照群と比較して有意に減少し、また TP 投与により増加傾向を示した。しかし蛇床子エキス投与による変化は認められなかった。停留精巣および対照群においては、投与物の相違によるその発現率の変化は認められなかった。

Table I The effects of testosterone propionate and Jashoshi extract on incidence of mounting in sexual behavior.

Group	Incidence of mounting (number/9)		
	Distilled water	Testosterone propionate	Jashoshi extract
Castration	2 **	6 *	1
Cryptorchidism	8	8	9
Control	7	8	8

Each figure shows the number of male mice that mount female mice.

** $p < 0.05$: Compared with control group, distilled water.

* $p < 0.1$: Compared with castration group, distilled water.

B. mount 回数 (Fig. 1)

停留精巣にすることにより mount 回数は、対照群と比較して有意に減少した ($12.1 \pm 8.4 \rightarrow 5.3 \pm 4.3$ 回)。停留精巣群では、TP および蛇床子エキス投与により mount 回数は有意に増加し (13.4 ± 8.2 および 12.7 ± 9.0 回)、対照群においてもそれは、TP 投与により有意に増加し (24.1 ± 12.1 回)、また蛇床子エキスの投与によっても増加傾向を示した (21.3 ± 11.3 回)。去勢群については Fig. 1 に示すごとくであった。

C. mount 潜時 (Fig. 2)

mount 回数と同様、停留精巣にすることにより mount 潜時は、対照群と比較して有意に延長した ($12.83 \pm 7.95 \rightarrow 20.85 \pm 6.04$ 分)。停留精巣群では、TP および蛇床子エキス投与により mount 潜時は有意に短縮し (13.76 ± 5.21 および 14.18 ± 4.79 分) 対照群においてもそれは、TP 投与により有意に短縮し (5.75 ± 3.47 分)、また蛇床子エキスの投与によっても短縮傾向を示した (7.28 ± 3.57 分)。去勢群については Fig. 2 に示すごとくであった。

3. 顎下腺トリプシン様プロテアーゼ活性 (Fig. 3)

プロテアーゼ活性は去勢することにより大きく低下した (0.0046 ± 0.0023 U/mg protein) が、これは TP 投与

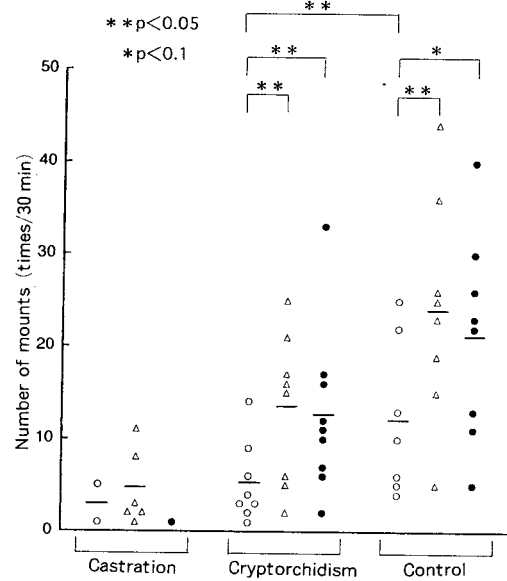


Fig. 1 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on number of mounts per 30 minutes in sexual behavior.

○, △ and ● show distilled water as control, TP and JE administration respectively.

Horizontal bar represents mean.

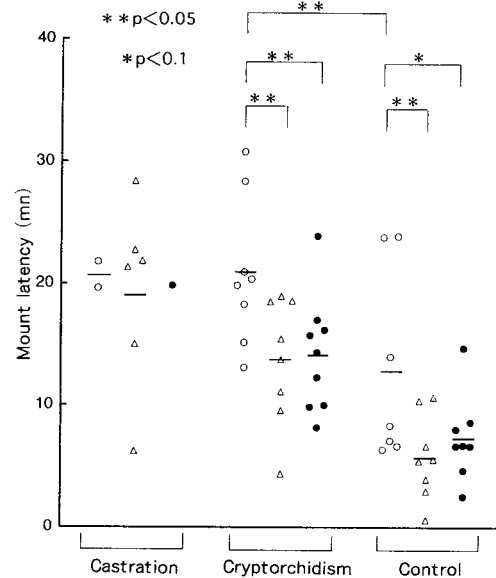


Fig. 2 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on mount latency (time from introduction of the first female until the first mount) in sexual behavior.

○, △ and ● show distilled water as control, TP and JE administration respectively.

Horizontal bar represents mean.

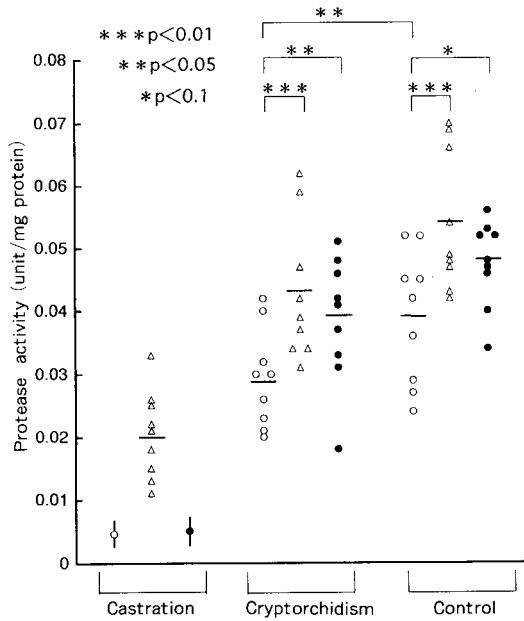


Fig. 3 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract on protease activity in submaxillary gland.

○, △ and ● show distilled water as control, TP and JE administration respectively. Horizontal bar represents mean, and vertical, S.D.

により大きく上昇した (0.0200 ± 0.0070 U/mg portein). しかし蛇床子エキス投与による変化は認められなかった。 (0.0051 ± 0.0022 U/mg protein)。また、停留精巢にすることにより活性は、対照群と比較して有意に低下した ($0.0390 \pm 0.0110 \rightarrow 0.0290 \pm 0.0080$ U/mg protein) が、TP および蛇床子エキスの投与により有意に上昇した (0.0430 ± 0.0110 および 0.0390 ± 0.0100 U/mg protein)。対照群においてもほぼ同様の結果が得られた。すなわち、活性は TP 投与により有意に上昇し (0.0540 ± 0.0110 U/mg protein), 蛇床子エキスを投与しても上昇傾向が認められた (0.0480 ± 0.0069 U/mg protein)。

4. 電気泳動法による顎下腺トリプシン様プロテアーゼ活性の解析 (Fig. 4)

顎下腺プロテアーゼ活性は、少なくとも 5 本の活性泳動帯として分離検出され、これら活性泳動帯を移動度の速いものから順に A, B, C, D, E と命名した。去勢することにより、A および C の活性泳動帯のみがわずかに検出されるだけとなり、これは蛇床子エキスを投与しても同様であった。しかし TP の投与により C~E の活性泳動帯の活性、特に C のそれは上昇し、停留精巢および対照群のザイモグラムに類似してきた。また去勢群においては、A の活性泳動帯の活性は停留精巢および対照群

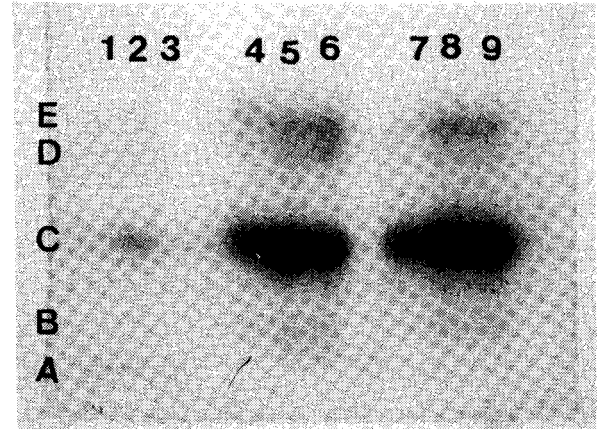


Fig. 4 Zymograms of protease in mouse submaxillary gland.

A to E show the bands of protease isozymes. Lane 1 to 3, 4 to 6 and 7 to 9 represent castrated, cryptorchid and control mice respectively. In each group, the left, the middle and the right show distilled water as control, testosterone propionate and Jashoshi extract administration respectively.

と比較してより強い傾向が見られた。停留精巢および対照群においては、蛇床子投与によるザイモグラムの変化は TP 投与によるそれと全く同様であった。

5. 顎下腺における EGFmRNA の分析 (Fig. 5)

Northern blot analysis により EGFmRNA 量の変化を調べた。去勢することにより EGF 遺伝子の発現はほとんど認められなくなったが、TP 投与により 4.7 kb の部位に EGFmRNA の band が出現した。しかし蛇床子エキスを投与してもその band は出現せず、EGF 産生へ

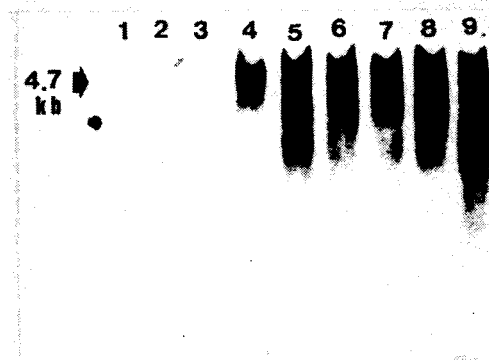


Fig. 5 Northern blot analysis of epidermal growth factor mRNA in mouse submaxillary gland.

Lane 1 to 3, 4 to 6 and 7 to 9 represent castrated, cryptorchid and control mice respectively. In each group, the left, the middle and the right show distilled water as control, testosterone propionate and Jashoshi extract administration respectively.

の影響は認められなかった。一方、停留精巢および対照群においては、TP および蛇床子エキス投与により EGF mRNA の band の signal は増強され、EGF 遺伝子の活性化による EGF 産生の増加が示唆された。

6. 血清中総テストステロン, LH, FSH

A. 血清中総テストステロン (Fig. 6)

テストステロン値は去勢することにより大きく低下した (0.18 ± 0.14 ng/ml) が、これは TP 投与により大きく上昇した (1.72 ± 0.60 ng/ml)。しかし蛇床子エキス投与による変化は認められなかった (0.16 ± 0.13 ng/ml)。また、停留精巢にすることによりテストステロン値は、対照群と比較して低下傾向を示した ($3.70 \pm 2.02 \rightarrow 2.18 \pm 1.56$ ng/ml) が、TP 投与により有意に上昇し (4.73 ± 2.30 ng/ml)、蛇床子エキスを投与しても上昇傾向が認められた (3.95 ± 2.51 ng/ml)。対照群においてもほぼ同様の結果が得られた。すなわち、テストステロン値は TP 投与により有意に上昇し (6.53 ± 2.87 ng/ml)、蛇床子エキスを投与しても、統計学的には差は認められなかったがその平均値は上昇した (5.57 ± 2.79 ng/ml)。

B. 血清中 LH (Fig. 7)

去勢マウスの LH は、対照マウスのそれと比較して有意に上昇したが、停留精巢にすることによる変化は認め

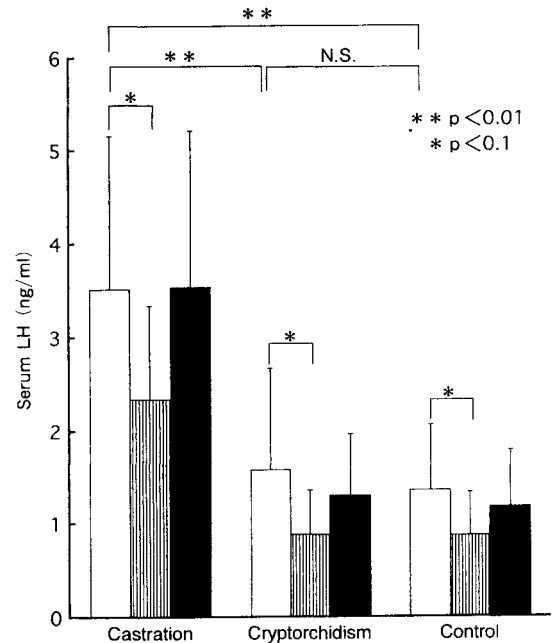


Fig. 7 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on serum LH level.

In each group, the left, the middle and the right show distilled water as control, TP and JE administration respectively. Results are expressed as mean \pm S.D., n=9

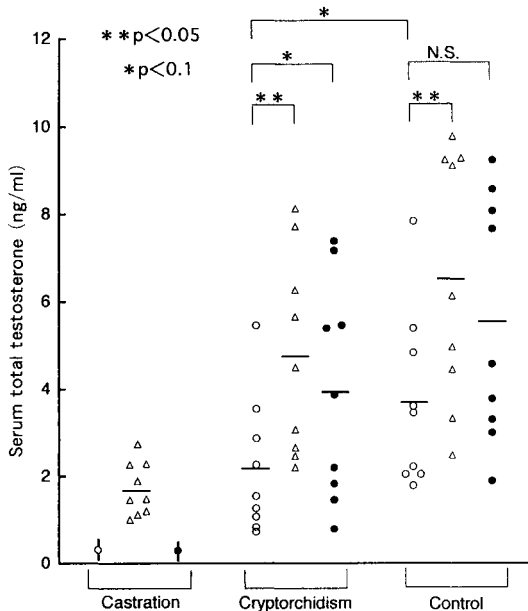


Fig. 6 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on serum total testosterone concentration.

○, △ and ● show distilled water as control, TP and JE administration respectively. Horizontal bar represents mean, and vertical, S.D.

られなかった。また、去勢群、停留精巢群、対照群いずれにおいても、LH は TP 投与により低下傾向を示したが、蛇床子エキス投与による変化は認められなかった。

C. 血清中 FSH (Fig. 8)

去勢および停留精巢マウスの FSH は、対照マウスのそれと比較して有意に上昇した。しかし去勢による上昇は、停留精巢にすることによる上昇より有意に大きいものであった。また、去勢群、停留精巢群、対照群いずれにおいても、FSH は TP により低下傾向を示したが、蛇床子エキス投与による変化は認められなかった。

7. 前立腺および精嚢の重量 (Fig. 9)

前立腺および精嚢の重量は、去勢することにより大きく減少したが、停留精巢にすることによる変化はその平均値の低下のみにとどまり、対照群と比較して統計学的には差は認められなかった。また、去勢群、停留精巢群、対照群いずれにおいても、前立腺および精嚢の重量は TP 投与により有意に増加したが、蛇床子エキス投与による変化は認められなかった。

8. 蛇床子エキス中のコレステロール

定性反応では、蛇床子エキスのクロロホルム抽出液に色調の変化は認められなかった。また定量試験においても、620 nm における吸光度はコレステロール標準液

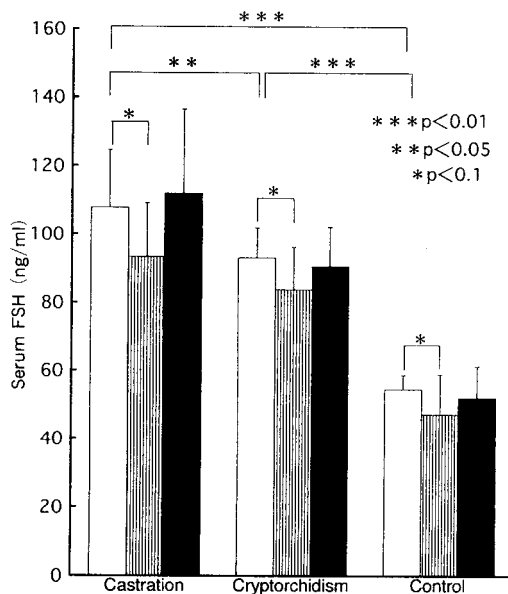


Fig. 8 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on serum FSH level. In each group, the left, the middle and the right show distilled water as control, TP and JE administration respectively. Results are expressed as mean \pm S.D., n=9

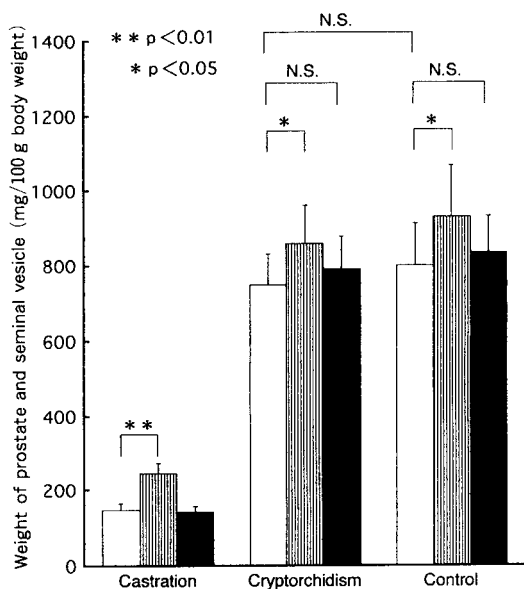


Fig. 9 The effects of testosterone propionate (TP) and Jashoshi extract (JE) on weight of prostate and seminal vesicle (mg/100g body weight). In each group, the left, the middle and the right show distilled water as control, TP and JE administration respectively. Results are expressed as mean \pm S.D., n=9

0.185, 蛇床子エキス溶液 0.059, ブランク用蒸留水 0.061であった。すなわち以上の結果より, 蛇床子エキスにはコレステロール, スチグマステロールなどの不飽和ステロールは混在していないと考えられた。

考 察

蛇床子とはセリ科蛇床の成熟果実を乾燥したものであるが, 古い記述の一つに, その効能として“陰痿薬トシテ又婦人陰腫薬ニ用ユ”とあり, “陽事ノ起ラザルニ蛇床子・五味子・兎絲子・等分末シテ蜜丸梧子ノ大サニシテ毎服三十九酒ニテ下スコト日ニ三服ス”という表現もみられる³⁾ように, その性機能改善作用については古くから注目されてきたようである。

また, 動物を用いた蛇床子の薬理効果に関する研究もすでにいくつか報告されており, Chian¹⁹⁾は, 正常雌マウスに蛇床子を投与するとその子宮および卵巣の重量が増加し, さらに去勢雌マウスに対してもその子宮重量を増加させるとしている。また三輪⁴⁾は, 正常および去勢雄マウスに蛇床子を投与すると, その前立腺および精囊の重量が増加するとしている。しかしながらこれらの研究では, 投与薬物である蛇床子は皮下注射により投与されており, また, その薬理効果の検定としては臓器の重量変化が観察されているに過ぎない。そこで今回の実験では, 和漢生薬あるいは漢方薬は本来経口的に服用されるものであることを考慮し, 投与薬物である蛇床子エキスは経口投与とし, また, 薬理効果の検定にも血中ホルモンレベルの測定のみでなく, 顎下腺のプロテアーゼ活性およびEGF産生を検討し, 微小なアンドロゲンレベルの変化の検索を試みた。

雄マウス性行動の最も典型的なパターンは, mountingおよびintromissionの反復の後にejaculationに至り, 数分の性的不応期を経て再び雌マウスへmountする。そしてこの過程を繰り返す, というものであるが, mountingについては, 一定時間における回数が多いほど, また, その潜時が短いほど, 性的activityは高いと考えられる。今回の検討では, 実験的両側停留精巣マウスでは, 対照マウスと比較してそのmountingの発現率には差がなかったが, mount回数は統計学的に有意に減少し, mount潜時は有意に延長した。またこの停留精巣マウスでは, 血中テストステロンの低下傾向も認められた。すなわち, 実験的両側停留精巣マウスは, 従来言われているごとく造精機能障害モデル^{20, 21)}としてだけでなく, 性機能障害モデルとしても用いることが可能であることがまず確認できた。

この停留精巣マウスを用いて蛇床子エキスの効果を検

討したところ、精巣を停留させることにより低下した性行動が本エキスの投与により改善されることが示された。この改善のメカニズムに関しては、対照マウスでも同じ様な性行動の亢進が見られたのに対し、去勢したマウスでは見られなかったという点から、精巣を介してのものである可能性が示唆された。

一方、血中テストステロンは、停留精巣作成により低下傾向を示したにとどまったのに対し、プロテアーゼ活性には有意の低下が見られた。さらにこれに蛇床子エキスを投与すると、血中テストステロンの上昇傾向およびプロテアーゼ活性の有意の上昇が認められた。すなわち、血中テストステロンの変化に比較して、大きな変化がプロテアーゼ活性などに認められ、Huangら^{6,7)}のいうように、これらの活性が血中アンドロゲンのわずかな変化を増幅して捕えられる可能性が考えられた。今回蛇床子エキス投与により認められた弱い血中テストステロンの変化は、統計学的には有意なものではなかったが、本エキス投与によるプロテアーゼサイモグラムの変化がTP投与の場合のそれと全く同様なこと、また、TP投与における場合と同様、EGF遺伝子の活性化によるEGF産生の増加が示唆されたことから、蛇床子エキス投与による血中テストステロンレベルの変化は確かにおきるものと思われる。また、その変化は血中LH、FSHなどの上昇を伴わないものであり、本エキスの効果は、下垂体を介さず精巣に直接働いて発揮されているものと推測された。さらに、アンドロゲンを投与した場合には下垂体抑制が認められるが、蛇床子エキスの投与では生じていない。

マウス顎下腺はアンドロゲンや甲状腺ホルモンの標的臓器として知られており、²²⁻²⁶⁾この臓器の雌雄間には形態学的にも生化学的にも著しい性差が認められる。すなわち、形態学的には雄マウス顎下腺ではgranular convoluted tubule (GCT)が発達しており、これが顎下腺の50%を占める。また生化学的に性差の認められるEGFや神経成長因子nerve growth factor (NGF)などの成長因子やプロテアーゼは、いずれもこのGCT細胞分泌顆粒中に存在することが組織学的に確認されている。GCT細胞の分化増殖にはアンドロゲンや甲状腺ホルモンが関与しており、すなわち胎児期から出生後しばらくは顎下腺にGCT細胞は確認されないが、甲状腺ホルモンが分泌され始めるとGCT細胞の分化増殖が観察されるようになる。さらに雄マウスにおいては、第二次性徴に伴い精巣からテストステロンが分泌されGCT細胞の増殖が再び活発になると、この細胞で生合成される、EGF、NGFおよびプロテアーゼの顎下腺での濃度が著しく上昇する。顎下腺の持つ性差の理由や、これらの蛋

白質が他の組織に比べ高濃度に含有されている理由はいまだ明らかではないが、この臓器は以上の理由から薬物のホルモン様作用を研究するうえで非常に有用と考えられている。

蛇床子エキス投与により見られる軽度の血中テストステロンの変化のみにより有意な性機能の改善がおきているものかどうかについては明らかでない。顎下腺と同様にテストステロンの標的臓器であり、また性中枢でもある視床下部の内側視索前野²⁷⁻²⁹⁾が、今回顎下腺で見られたように血中の微小なアンドロゲンの動きに大きく反応することが、有意な性行動の改善として表現された可能性がまず考えられる。また、蛇床子エキスが精巣のテストステロン分泌を促進するという作用とは別に、他の何らかの精巣に関連した因子が本エキスによって賦活され、これが性機能の改善につながったという可能性もあろう。蛇床子エキスが多種類の成分を含む和漢生薬であるということを考えると、その作用がアンドロゲン作用につきるとすることはむしろ考えにくく、本研究からは、蛇床子エキスの性行動を亢進させる作用のメカニズムのあくまでもひとつとして血中のテストステロン上昇作用があるとすべきであろう。

また、今回得られた結果で興味深いのは、蛇床子エキス投与により見られたmount回数、mount潜時、プロテアーゼ活性および血中テストステロンの上昇が、いずれも停留精巣群において対照群より顕著であったことである。マウスに両側停留精巣を作成することにより見られる血中テストステロンの軽度の低下は、Mendis-Handagamaら³⁰⁾により、個々のLeydig細胞あたりのテストステロン基礎分泌能およびヒト絨毛性ゴナドトロピンhuman chorionic gonadotropin (hCG)刺激によるテストステロン産生能の低下に起因すると報告されている。もしこれが本実験における停留精巣マウスにも同様にあってはまるとするならば、一般に和漢生薬あるいは漢方薬に関していわれている、生体の正常な生理機構のバランスが崩れているほど、より大きな薬理効果が得られるという説をそのよい説明と出来るかも知れない。今後、停留精巣を作成してから実験までの期間をいろいろ変化させることで、もし精巣のテストステロン分泌能へのダメージの程度を変えられるものならば、これを検証する手掛かりと出来るかも知れない。さらに、蛇床子の作用メカニズムを検討するにあたっては、田代³¹⁾のいう様に、和漢生薬の効果が発揮されるにあたり、その成分がそのまま吸収されて作用しているのか、あるいは生体内でなんらかの代謝を受けてから作用しているのかという点を検討することも重要と思われる。*in vitro*での培養Leydig細胞に、蛇床子エキスそのものあるいは蛇床子エキスを

投与した後のマウス血清を添加して、その反応性の違いを検討するなどの方法も考えられるところであろう。

最後に、マウスで得られた性行動に関する実験結果を、そのままヒトにあてはめることには慎重でなくてはならない。マウスなどの実験動物においては性行動におよぼすアンドロゲンの影響が非常に大きいのに対し、ヒトではヒトであるがゆえに持つ、不安、期待、あせり、あるいは人間関係などの心理的な要素が、時には、アンドロゲンにも増して大きく性行動にかかわっているからである。はたして、先人に強壯作用ありとして用いられていた蛇床子に、そこまでも含めた作用があるかどうかは今のところ不明である。しかし、今回性行動に関する賦活効果および血中テストステロン上昇作用が確認できたことは、蛇床子が、それらの作用を含めた今後のさらなる検討に充分値するものであることを示すものと考えられる。

結 論

従来より造精機能障害モデルとして用いられてきた両側停留精巣マウスは、性機能障害モデルとしても用いることができることが明らかとなった。蛇床子エキスには雄マウスの性行動を亢進させる作用及び血中のテストステロン値に対する上昇作用があることが判明し、後者が前者の発現メカニズムのひとつである可能性が示された。また、LH、FSHに変動が認められなかったことから、そのテストステロンに対する効果は蛇床子エキスが精巣に直接作用して発揮される可能性が高いものと推測された。さらに、本エキスを投与しても下垂体抑制は生じなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師片山喬教授に心から深く感謝致します。また、終始直接の御指導および御鞭撻を賜りました本学の荻田善一名誉教授、ならびに実験に多大な御協力を頂きました株式会社ニッポンジーン研究開発部門の綿引正則氏に深く感謝致します。なお、本論文の要旨は第82回日本泌尿器科学会総会(1994年4月、福岡)ならびに第12回和漢医薬学会大会(1995年8月、東京)において報告した。また、本研究の一部は平成6年度文部省科学研究費補助金一般研究(c)課題番号06671578によった。

References

- 1) Terasawa, K.: Shorei kara manabu wakanshinryogaku. Igaku syoin, Tokyo, pp.83-85, 1990.
- 寺澤捷年: 症例から学ぶ和漢診療学. 医学書院, 東京, pp.83-85, 1990.
- 2) Nishizawa, Y.: Impotensu kanja ni taisuru hachimijiogan no koka. *Hinyokika kyo* 29, 547-558, 1983.
- 西澤芳男: インポテンス患者に対する八味地黄丸の効果, 泌尿器科紀要 29, 547-558, 1983.
- 3) Koizumi, E.: Wakan'yaku kou (Kohen). Asakaya shoten, Tokyo, pp.489-492, 1922.
- 小泉栄次郎: 和漢薬考(後編). 朝香屋書店, 東京, pp.489-492, 1922.
- 4) Miwa, T.: Kan'yaku gokai kaiba jashoshi oyobi in'yokaku no dansaihorumonsayo ni tsuite. *Gifuakadagaku kyo* 8, 1705-1724, 1960.
- 三輪卓: 漢薬蛤蚧, 海馬, 蛇床子及び淫羊藿の男性ホルモン作用について. 岐阜医科大学紀要 8, 1705-1724, 1960.
- 5) Sato, Y.: Androgen to seikodo; Saikin no chiken kara. *Igaku no ayumi* 175, 548-549, 1995.
- 佐藤嘉一: アンドロゲンと性行動; 最近の知見から. 医学のあゆみ 175, 548-549, 1995.
- 6) Huang, A. and Ogita, Z.: Androgen-dependent effect of Rehmanniae Radix on trypsin-like protease of the mouse submaxillary gland. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 5, 191-199, 1988.
- 7) Huang, A. and Ogita, Z.: The effect of Gomi-gan on trypsin-like protease of the mouse submaxillary gland. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 6, 58-63, 1989.
- 8) Sato, Y., Kumamoto, Y., Suzuki, N.: Shinri-teki sutoresu fuka ratto no seikodo no kenkyu; Dai ippo Sutoresu fuka ni yoru seikodo henka no kento. *Nihon hinyokika gakkai zasshi* 83, 205-211, 1992.
- 佐藤嘉一, 熊本悦明, 鈴木伸和: 心理的ストレス負荷ラットの性行動の研究; 第1報 ストレス負荷による性行動変化の検討. 日本泌尿器科学会雑誌 83, 205-211, 1992.
- 9) Taie, H. T. and Ogita, Z.: Mausu gakkasen aruginin' aminopepuchitazekassei no hisyokuteiryohou. *Rinsyo kagaku* 14, 405-410, 1985.
- Taie, H. T., 荻田善一: マウス顎下腺アルギニンアミノペプチターゼ活性の比色定量法. 臨床化学 14, 405-410, 1985.
- 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 11) Ogita, Z. and Markert, C. L.: A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 99, 233-241, 1979.
- 12) Isobe, M. and Ogita, Z.: Electrophoretic analysis of pancreatic proteases and zymogen-activating factors in the mouse. *J. Exp. Zool.* 230, 347-354, 1984.
- 13) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 14) Gray, A., Dull, T. J. and Ullrich, A.: Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* 303, 722-725, 1983.
- 15) Vogelstein, B. and Gillespie, D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 615-619, 1979.
- 16) Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G., Carter, T. J. M., Groucutt, C. and Kricka, L. J.: Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature* 305, 158-159, 1983.
- 17) Fukuzawa, K.: Koresuteroru no teisyoku hanno (Liebermann-Burchard hanno). *Igakuryoiki ni okeru seikagakuji ssyu shishin*, (Fjita, K., Kansyu). Hirokawa shoten, Tokyo, pp. 64-65, 1979.

1) Terasawa, K.: Shorei kara manabu wakanshinryogaku. Igaku

- 深沢勝彦：コレステロールの呈色反応（Liebermann-Burchard 反応）。医学領域における生化学実習指針，（藤田啓介監修）。廣川書店，東京，pp. 64-65, 1979.
- 18) Zurkowski, P. : A rapid method for cholesterol determination with a single reagent. *Clin. Chem.* **10**, 451-453, 1964.
- 19) Chian, T. : An experimental study on four Chinese drugs used as aphrodisiacs IV ; On the sexual cycle of normal and castrated mice injected with an extract of *Selinum Monnieri* L. *Gifu-kadaigaku kiyo* **7**, 729-735, 1959.
- 20) Nishimune, Y., Aizawa, S. and Komatsu, T.: Testicular germ cell differentiation *in vivo*. *Fertil. Steril.* **29**, 95-102, 1978.
- 21) Nishimune, Y., Haneji, T. and Aizawa, S.: Testicular DNA synthesis *in vivo* ; Changes in DNA synthetic activity following artificial cryptorchidism and its surgical reversal. *Fertil. Steril.* **35**, 359-362, 1981.
- 22) Barka, T. : Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 836-859, 1980.
- 23) Murphy, R. A., Watson, A. Y., Metz, J. and Forssmann, W. G. : The submandibular gland ; An exocrine organ for growth factors. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 890-902, 1980.
- 24) Takuma, T. and Kumegawa, M. : Independent inductions of trypsin-like esteroproteases by 5α -Dihydrotestosterone and triiodothyronine in mouse submandibular gland. *J. Biochem.* **90**, 1371-1375, 1981.
- 25) Hosoi, K., Kida, T. and Ueha, T. : Induction of various androgen-dependent esteroproteases (trypsin-like and chymotrypsin-like enzymes) by tri-iodo-L-thyronine in the submandibular glands of female mice and mice with testicular feminization. *J. biochem.* **89**, 1793-1798, 1981.
- 26) Wilson, C. M., Myhre, M. J., Reynolds, R. C. and Wilson, J. D. : Regulation of mouse submaxillary gland renin by thyroxine. *Endocrinology* **110**, 982-989, 1982.
- 27) Fisher, A. E. : Maternal and sexual behavior induced by intracranial chemical stimulation. *Science* **124**, 228-229, 1956.
- 28) Brackett, N. L., Iuvone, P. M. and Edwards, D. A. : Midbrain lesions, dopamine and male sexual behavior. *Behav. Brain Res.* **20**, 231-240, 1986.
- 29) Horio, T., Shimura, T., Hanada, M. and Shimokochi, M. : Multiple unit activities recorded from the medial preoptic area during copulatory behavior in freely moving male rats. *Neurosci. Res.* **3**, 311-320, 1986.
- 30) Mendis-Handagama, S. M. L. C., Kerr, J. B. and de Kretser, D. M. : Experimental cryptorchidism in the adult mouse ; II A hormonal study. *J. Androl.* **11**, 548-554, 1990.
- 31) Tashiro, S.: *Kampoyaku wa naze kikuka ; Gendai yakurigaku karano kaimei. Progress in Medicine* **14**, 1774-1791, 1994.
田代真一：漢方薬はなぜ効くか；現代薬理学からの解明。 *Progress in Medicine* **14**, 1774-1791, 1994.