

ラット精索静脈瘤モデルにおける水素水の造精機能に及ぼす影響

川崎医科大学附属病院泌尿器科

杉山星哲*・原 綾英・高崎宏端

清水真次朗・月森翔平・藤井智浩

宮地禎幸・永井 敦

抄録：

【目的】水素には酸化ストレスで生じたフリーラジカルを選択的に還元し、細胞死を抑制する抗酸化作用があると言われている。男性不妊症患者の約 30% に認められる精索静脈瘤は酸化ストレスにより造精機能が低下すると考えられている。今回、ラットの精索静脈瘤モデルにおける精巣の酸化ストレスを評価し、水素水の造精機能に及ぼす影響について検討した。

【対象と方法】8 週齢、Sprague-Dawley ラットを用いて精索静脈瘤モデルを作成した。水素水投与群 (n=5) と非投与群 (n=5) に分け、術後 12 週目に検討を行った。精巣上体尾部から精子を回収し、精子運動解析装置で精子所見を検討した。また、精巣内の免疫組織学的、生化学的变化を検討した。

【結果】精子所見は水素水投与群で精子濃度： $151 \pm 11.9 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率： $81.6 \pm 1.5\%$ 、非投与群で精子濃度： $65 \pm 3.2 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率： $54.8 \pm 7.7\%$ で、いずれも 2 群間で統計学的有意差を認めた ($P < 0.05$)。ELISA 法では水素水投与群で精巣組織内 8-OHdG の有意な低下を認めた ($P < 0.05$)。8-OHdG の免疫染色では水素水非投与群の精祖細胞にて発現の亢進を認めた。

【結論】精索静脈瘤の造精機能障害の原因の 1 つとされる酸化ストレスは水素水の投与により改善された。水素水は精索静脈瘤による男性不妊症において新しい保存的治療法となる可能性がある。

(西日泌尿. 80 : 517-521, 2018)

キーワード：精索静脈瘤，男性不妊症，水素水，酸化ストレス

緒 言

酸素の一部は代謝過程で活性酸素群 (ROS: Reactive Oxygen Species) を生成する。これらの ROS は生命維持に必要な役割を担っているが、過剰に産生されると酸化ストレスとなる。酸化ストレスの上昇は生体への酸化損傷能力を増加させ、癌や糖尿病、高血圧といった生活習慣病をはじめ、様々な疾病や老化亢進につながると考えられている¹⁾。水素は酸化ストレスで生じた毒性の高いフリーラジカルを選択的に還元し、細胞死を抑制する抗酸化剤として機能すると言われている²⁾。男性不妊症患者の約 30% に認められる精索静脈瘤は酸化ストレスが関与する造精機能障害であると考えられており³⁾、実

際に酸化ストレスの指標である 8-OHdG の精巣内での発現と精索静脈瘤の grade には相関があるとの報告がある⁴⁾。今回、ラットの精索静脈瘤モデルに対して、精巣における酸化ストレスを評価し、水素水投与による造精機能へ及ぼす影響について検討した。

対 象 と 方 法

実験動物：8 週齢、Sprague-Dawley ラットに対して、セボフルラン (導入 5%，維持 3%，Pfizer Incorporated, Tokyo, Japan) を用いて吸入麻酔下に腹部正中切開を加えて腹腔内にアプローチを行った。まず初めに、顕微鏡下に左内精静脈から総腸骨静脈に流入する性腺静脈の結紮を行った。続いて、左腎静脈を左内精静脈合流部より下大静脈側で左腎静脈径が約 0.8 mm となるように部分結紮を行い、精索静脈瘤モデルを作成した⁵⁾。水素水投与群 (n=5) と非投与群 (n=5) に分け、術後 12 週目に

* 〒 701-0192 倉敷市松島 577

TEL 086-462-1111, FAX 086-463-4747

E-mail : s.kin@med.kawasaki-m.ac.jp

組織学的, 生化学的変化について検討を行った。また, sham model として, 腹部正中切開のみ加えたラット (n = 3) も実験に供した。本研究は川崎医科大学実験動物委員会の承認を受け (No. 17-054), 川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

水素水: H₂ SERVER 水素水冷温水サーバー (ドクターズチョイス[®]) で作られた水素水を専用アルミボトルに入れてゲージで投与を行った。

精子検査: 精巣上体尾部から精子を回収し, 精子運動解析装置 (SMAS): DITECT[®] を用いて精子所見を解析した。

組織学的解析: 摘出組織をホルマリン固定し, エタノールにより脱水処理を加えた後, パラフィン包埋を行った。5 μm でパラフィン切片を作成し, 脱パラフィン後にヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色を行い, 光学顕微鏡 (Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて組織学的解析を行った。

8-OHdG の発現解析: 摘出組織に Cell Lysis Buffer[®] (ホスファターゼ阻害薬・プロテアーゼ阻害薬含有, Cell Signaling Technology, CA, USA), PMSF (1 mM, Cell Signaling Technology, CA, USA) を加え, ホモジナイザーによる破碎を行った。遠心分離 (15,000 × g, 5 分間, 5°C) を行った後, 組織片を除去した。精巣における 8-OHdG の発現を 8-OHdG ELISA Kit (NIKKEN SEIL Co. Ltd., JaICA, Japan) を用いて検討した。測定機器は Varioskan Flash[®] (Thermo Fisher Scientific, Weltham, MA, USA) を用いて, 測定波長を 540 nm に設定し, 吸光度を測定することで定量検査を行った。

酸化ストレスに対する免疫組織学的解析: パラフィン包埋組織を 5 μm 厚で薄切し, 脱パラフィン後に BLOXALL[™] (Vector Laboratories, CA, USA) を用いてブロッキング処理 (室温, 10 分間) を行った。1 次抗体は, anti-rabbit 8-OHdG antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を用い, 2.5% normal horse serum (Vector Laboratories, CA, USA) で 100 倍希釈して使用した。(4°C, overnight)。2 次抗体として免疫染色試薬 ImmPRESS[™]-Alkaline Phosphatase (AP) Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit[®] (Vector Laboratories, CA, USA) を用いた。免疫染色基質として, ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase (AP) Substrate[®] (Vector Laboratories, CA, USA) を用いた。対比染色として 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, CA, USA) を用いて核染色を行い, VectaMount Permanent Mounting Medium[®] (Vector Laboratories, CA, USA) により封入を行った後, 蛍光顕

微鏡 (Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて免疫組織学的検討を行った。

統計学的解析: 精子検査 (精子濃度, 運動率), 定量検査の結果は平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.) で記した。群間の比較には Welch's test を用いた。P < 0.05 を有意差ありとした。統計解析は Microsoft Excel 2016 edition を使用した。

結 果

精子所見 (Fig. 1): 術後 12 週目において, 水素水投与群で精子濃度: $151 \pm 11.9 \times 10^6$ /ml, 運動率: $81.6 \pm 1.5\%$, 非投与群で精子濃度: $65 \pm 3.2 \times 10^6$ /ml, 運動率: $54.8 \pm 7.7\%$ で, いずれも 2 群間で統計学的有意差を認めた (P < 0.05)。なお, sham model 群における術後 12 週目の精子所見は, 精子濃度: $236 \pm 2.0 \times 10^6$ /ml, 運動率: $97.9 \pm 1.6\%$ であった。

組織学的解析 (Fig. 2): HE 染色では, sham model 群の正常な精細管構造と比較して, 両群ともに細胞間隙の拡大と一部, 精細管構造の破壊を認めた。

8-OHdG の発現解析 (Fig. 3a): 酸化ストレスの代表マーカーである 8-OHdG の精巣内発現について ELISA 法を用いて検討した。8-OHdG 定量検査において, 水素水非投与群: 74 ± 3.7 ng/ml に対して水素水投与群: 41 ± 0.2 ng/ml と水素水投与群で有意な濃度の低下を認めた (P < 0.05)。

炎症性変化に対する免疫組織学的解析 (Fig. 3b): 8-OHdG の免疫染色を行った。免疫染色では水素水非投与群において精祖細胞で 8-OHdG の発現が充進していた。

考 察

酸化ストレスとは, 酸素の一部から代謝過程で生成される ROS が過剰になり, 酸化損傷能力が生体へ影響を及ぼした状態のことを言う。ROS の中でも最も反応性が高いと言われているヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) は生体分子を容易に修飾して高い細胞毒性を発揮すると言われている。 $\cdot\text{OH}$ は生体内の酸素から作られた過酸化水素が鉄や銅イオンと反応することで生成され, これをフェトン反応 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$) と呼ぶ²⁾。

水素分子は, 生体内で容易に拡散してフェトン反応や放射線照射により生じた $\cdot\text{OH}$ を還元し, 細胞死を抑制すると言われている²⁾。Ohsawa ら⁶⁾ は動脈硬化症モデルのアポリポ蛋白 E 欠損マウスに水素水を経口投与した結果, 大動脈でのアテローム形成が抑制され, 4-ヒド

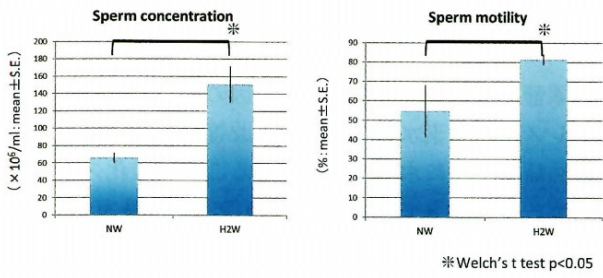


Fig. 1 Sperm concentration and motility in the H₂ water administration group were statistically improved compared to the H₂ water non-administration group. (NW : normal water, H2W : hydrogen water)

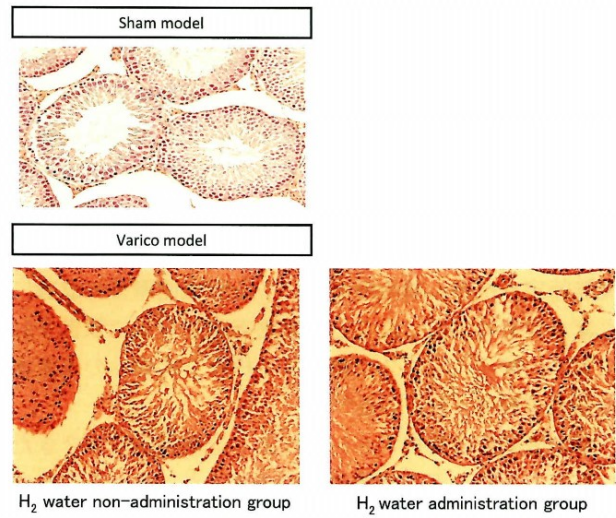


Fig. 2 Histological analysis showed that testicular structure was maintained in sham model group. On the other hand, destruction of seminiferous structure was observed in both the H₂ water administration group and the H₂ water non-administration group.

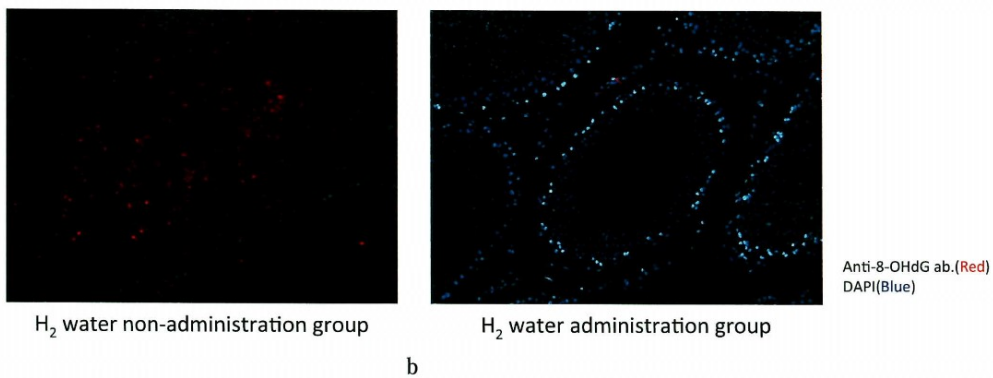
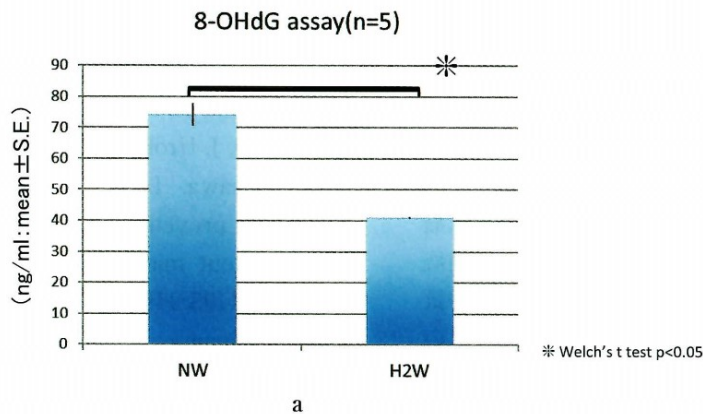


Fig. 3a A significant decrease in 8-OHdG, which is marker of oxidative stress, was observed in the left testis of the H₂ water administration group.
 b Immunostaining of 8-OHdG was abundantly expressed in the H₂ water non-administration group.

ロキシ-2-ノネナールを指標とした酸化ストレスが減少したことを報告している。また、Kajiyamaら⁷⁾は、脳の視床下部領域に蓄積した酸化ストレスが発症原因とされている糖尿病患者に水素水を投与することで脂質代謝と糖代謝に好影響をもたらし、インスリン抵抗性関連疾患の予防と治療に有益であることをヒトにおける臨床研究で報告している。他にも、パーキンソン病などの脳神経機能障害や抗がん剤治療などによる腎機能障害の改善に水素水が有効であったことが動物実験レベルで報告されており、酸化ストレスに起因する様々な疾患への水素水の効果が期待されている⁸⁾⁹⁾。

精索静脈瘤は酸化ストレスにより造精機能低下をきたし男性不妊症に至る疾患の1つである³⁾。ラットにおける精索静脈瘤モデルは完成されており⁵⁾、今回このモデルを使用して検討を行った。水素水投与により、明らかに精子所見の改善が認められ、動物実験ではあるが、水素水の有用性が証明された。一方、HE染色による組織学的解析では、水素水投与群、非投与群ともに、精細管構造の一部が破壊されており、精索静脈瘤における精巢組織への直接的影響は避けられないことも考えられた。しかし、水素水を投与することで精子所見が保たれていること、および精祖細胞における8-OHdGの発現が抑制されていたことにより、精細管構造は乱れても、精細胞自体に対する保護作用が水素水にはあり、精子形成障害の進行を軽減できるのではないかと推測される。

現在、造精機能低下を伴うhigh gradeの精索静脈瘤の標準的な治療方法は手術である。手術治療により精液所見が改善し、妊娠率、出産率が上昇したとする報告は多く存在し¹⁰⁾¹¹⁾、我々も以前に同様の報告を行っている¹²⁾。しかし、外科的侵襲を好まない患者や保存的治療を先に望む患者には、より有効な保存的治療法の充実が望まれるところである。また、手術を施行しても精液所見の改善を認めない症例も存在することは事実であり、現状ではどのような症例群で手術による改善効果が認められるか判明していない。今回、我々の行った動物実験で精索静脈瘤モデルラットに水素水を投与することで酸化ストレスが軽減され、精子所見が改善することが判明した。このことより水素水投与が精索静脈瘤による男性不妊症に対する新たな保存的治療法の1つとなる可能性が示唆された。一方、水素水投与にもかかわらず精液所見の改善がない患者群では、直接的に精索静脈瘤を根治し、より強力に酸化ストレスを改善すると考えられる外科的治療の適応となると考えられ、手術適応のより精緻な判断が可能になることが予想される。

結 語

精索静脈瘤の造精機能障害の原因の1つとされる酸化ストレスは、水素水の投与により改善された。ラット精索静脈瘤モデルに水素水を投与することで酸化ストレスマーカーである8-OHdGの精巢組織内濃度低下を認め、精子所見の改善も確認された。水素水は精索静脈瘤による男性不妊症患者において新しい保存的治療法となる可能性がある。

文 献

- 1) 酒居一雄・他：酸化ストレスマーカー 8-OHdG. 生物試料分析 32: 297-300, 2009.
- 2) 大澤郁朗：水素分子の生理作用と水素水による疾患防御. 日老医誌 49: 680-688, 2012.
- 3) Agarwal, A. et al.: Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. American Journal of Reproductive Immunology. 59: 2-11, 2008.
- 4) Ishikawa, T. et al.: Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele. BJU. 100: 863-866, 2007.
- 5) Najari, B. B. et al.: Microsurgical rat varicocele model. J. Urol. 191: 548-553, 2014.
- 6) Ohsawa, I. et al.: Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377: 1195-1198, 2008.
- 7) Kajiyama, M. et al.: Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. Nutr. Res. 28: 137-143, 2008.
- 8) Fu, Y. et al.: Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. Neurosci. Lett. 453: 81-85, 2009.
- 9) Nakashima-Kamimura, N.: Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. Cancer Chemother. Pharmacol. 64: 753-761, 2009.
- 10) Altintas, R. et al.: The effect of varicocelectomy on the relationship of oxidative stress in peripheral and internal spermatic vein with semen para-

- eters. *Andrology*. 4: 442-446, 2016.
- 11) Smit, M, et al.: Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J. Urol.* 183: 270-274, 2010.
- 12) 原 綾英・他: 男性不妊症における精索静脈瘤の現況 当院での手術法と治療成績を踏まえて: 西日本泌尿器科 77: 195-201, 2015.

THE EFFECT OF HYDROGEN WATER ON SPERMATOGENIC FUNCTION IN A RAT VARICOCELE MODEL

SEITETSU SUGIYAMA, RYOEI HARA, HIROYASU TAKASAKI,
SHINJIRO SHIMIZU, SYOHEI TSUKIMORI, TOMOHIRO FUJII,
YOSHIYUKI MIYAJI AND ATSUSHI NAGAI

Department of Urology, Kawasaki Medical School Hospital, Kurashiki, Japan

Abstract :

[Purpose] Hydrogen is said to selectively reduce the free radicals that are produced by oxidative stress, and to have an antioxidant function that inhibits cell death. Varicocele, seen in about 30% of male infertility patients, is thought to reduce spermatogenic function as a result of oxidative stress. We administered hydrogen water to a rat varicocele model, evaluated the oxidative stress in testicular tissue, and investigated the effect on spermatogenic function.

[Subjects and methods] A varicocele model was created using 8-week-old Sprague-Dawley rats. The rats were divided into a hydrogen water administration group (n=5) and non-administration group (n=5), and were investigated during the 12th week after surgery. Sperm was collected from the cauda epididymis, and the concentration and motility of the sperm were investigated using a sperm motility analyzer. Immunohistological and biochemical changes in the testes were also investigated.

[Results] The results showed a sperm concentration of $151 \pm 11.9 \times 10^6/\text{ml}$ and a motility of $81.6 \pm 1.5\%$ in the hydrogen water administration group, and a sperm concentration of $65 \pm 3.2 \times 10^6/\text{ml}$ and a motility of $54.8 \pm 7.7\%$ in the hydrogen water non-administration group. Statistically significant differences in both sperm concentration and motility were seen between the two groups ($P < 0.05$). With ELISA, a significant decrease in 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) was seen in the hydrogen water administration group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Oxidative stress, which is thought to be a cause of impaired spermatogenic function in subjects with varicocele, was mitigated by the administration of hydrogen water. Hydrogen water may be a new conservative treatment for male infertility patients with varicocele.

(Nishinon J. Urol. 80 : 517-521, 2018)

key words : varicocele, male infertility, hydrogen water, oxidative stress
