

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11026

研究課題名(和文)性機能と心血管機能に着目した『低インスリンダイエット』による突然死の原因解明

研究課題名(英文)The influence of low-carbohydrate diet on erectile function in rats

研究代表者

加藤 順子 (Kato, Junko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号：70761401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：『低インスリンダイエット』で減量に成功した人も多いが、その危険性も報告されている。本研究では、『低インスリンダイエット』が男性性機能へ及ぼす影響を検討した。

本研究では炭水化物制限食(low carbohydrate diet; LCD)を飼料として与えるLCD群と通常食を与える通常食群の2群を作成した。等尺性張力測定により経壁電気刺激による弛緩反応を測定したところ、LCD群で有意な反応の低下が観察され、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)およびS1P1のmRNA発現量がLCD群で有意な低下が観察された。神経細胞を傷害した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、極端に炭水化物を制限することで神経系を介した勃起障害の発症が示唆された。本研究では、一部の成分を除き、炭水化物をたんぱく質に置換するという極端な条件であったため、今後は炭水化物の摂取量を段階的に変えて検討を行う必要がある。また、炭水化物制限食によって勃起機能が低下した後に、通常の飼料に戻すと勃起機能が回復するかどうかにも検討する必要がある。しかし、極端な食生活が将来の性機能にも影響を及ぼす可能性があり、注意が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although the number of obese people are on the rise due to the Westernization of dietary habits worldwide, many people are also known to follow diet plans. Out of all the diet booms in recent years, low-carbohydrate diet (LCD) has been the most prevalent. We investigated the influence of low-carbohydrate diet on erectile function using animal model. We divided 12-week-old male Wistar-ST rats into control and LCD groups. After 4 weeks, we measured erectile function of rats. This study suggests that extreme carbohydrate restriction reduces erectile function. In addition, when the relaxation reaction due to transwall electrical stimulation was measured by isometric tension measurement, a significant decrease in the response was observed in the LCD group. In addition, when the expression fluctuation of neural nitric oxide synthase (nNOS) in the corpus cavernosum was examined using real-time PCR, a significant decrease was observed in the LCD group.

研究分野：医療薬学

キーワード：性機能 勃起障害 炭水化物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化による肥満者の増加が進む一方で、ダイエットも流行している。近年のダイエットブームの中、炭水化物制限食による『低インスリンダイエット』が流行している。この『低インスリンダイエット』は Robert Atkins 博士が提唱したもので、血糖値の上がりにくい食品を食べ、インスリンの過剰な分泌を抑えることでダイエットが可能というものである。この方法で減量に成功した人も多いが、その危険性も報告されている。スウェーデンで 4 万人以上の女性を対象に行われた研究では、炭水化物制限食を摂取していたグループで心血管疾患の発症リスクを高め、突然死を引き起こす可能性が示唆されている (Lagiou P, *et al. BMJ*, 2012)。

一方、男性性機能は血管性因子、神経性因子、および内分泌性因子が重要な役割を果たすことが知られている。勃起時には性的刺激が加わり、一酸化窒素 (nitric oxide; NO) 作動性神経および内皮細胞の NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) により NO が合成、放出される。陰茎海綿体内では cGMP/PKG (cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G) 経路が活性化されることで陰茎海綿体平滑筋が弛緩し、海綿体動脈からの血液流入量が増大する。これにより陰茎海綿体が膨張し、海綿体白膜を進展させ、貫通静脈を閉塞させることで血液流出量を減少させ、陰茎海綿体内の内圧を上昇させることで勃起を引き起こし持続させる。

勃起不全 (ED; erectile dysfunction) とは性行為のために十分な勃起状態に達することができないあるいは維持することができないことと定義されている。この ED と心血管疾患は密接な関係にあることが知られている。虚血性心疾患の患者の 75% が ED も罹患していることや、心血管イベントに対する ED の相対リスクを調べたメタアナリシスにおいて ED を有する者は、そうでない者にと比較して心血管イベントの補正相対リスクは 1.47 と有意であったこと (Mulhall J, *et al. J Sex Med.* 2009) が報告されており、ED は心血管疾患の重要なマーカーになりうると考えられている (ED 診療ガイドライン [第 3 版] 2018)。これらのことより、『低インスリンダイエット』に代表される極端な食生活により心血管疾患の発症リスクを高めるとの報告から、将来の不妊症の大きな原因となる性機能に対する影響も危惧される。

### 2. 研究の目的

『低インスリンダイエット』をはじめとした極端な食生活が男性性機能および血管内皮機能にどのように作用するのかを薬理的、分子生物学的および生化学的に多面的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 使用動物

12 週齢の雄性 Wistar/ST ラットを用いた。このラットは 24 時間いつでも自由に餌と水は摂取可能とし、12 時間ごとの明暗サイクル下で温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。本研究は、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

#### 3-2. 実験プロトコール

12 週齢の Wistar/ST ラットを用いて Control 群、LCD (Low Carbohydrate Diet) 群の 2 群を作成した。Control 群 (n = 12) では通常食として標準的なラットの飼料である CE-2 での飼育を行った。LCD 群 (n = 12) では炭水化物制限食として CE-2 の炭水化物成分を同カロリーになるようにたんぱく質のミルクカゼインで置換した飼料での飼育を行った。2 週間ごとに心拍数と血圧を測定 (n = 8) し、4 週間の観察期間終了後、勃起機能評価 (n = 4) または陰茎海綿体収縮弛緩反応評価 (n = 4 - 10) を行なった。勃起機能は陰茎海綿体内圧測定 (intra cavernous pressure 測定 ; ICP 測定) により評価した。勃起機能の評価後、ラットの陰茎を切除し生理食塩水の中に移した。切除した陰茎の周りの薄膜を実体顕微鏡下で取り除き、亀頭部分は切除した。陰茎背静脈と尿道海綿体を取り除き、陰茎海綿体のみを遺伝子学的検討に用いた。また収縮弛緩反応評価の際には、まず過麻酔によって安楽死させた後、下腹大静脈から血液を採取し、次に陰茎海綿体を単離し、等尺性張力測定により陰茎海綿体平滑筋の収縮弛緩反応を評価した。

#### 3-3. 心拍数・血圧測定

飼育開始日、2 週間後、観察期間終了週の計 3 回、ラットの心拍数と収縮期血圧を覚醒下にて測定した。測定には tail-cuff 方式のラット・マウス非観血式自動血圧測定装置 (Softron BP-98-A-L 型) を用いた。ラットを付属の保温器 (Softron THC-31) 内で 37℃ に維持し、15 分以上安定させた後、心拍数と収縮期血圧を測定した。1 個体につき 5 回測定し、最高値および最低値を省いた 3 回の値を評価に用いた。

#### 3-4. 陰茎海綿体内圧測定による勃起機能評価

勃起機能の評価は海綿体神経の電気刺激下での ICP の変動を測定することで行った。ラットにガス麻酔システム (Small Animals Apparatus NS-1, 矢沢科学) でイソフルラン (Pfizer)

吸入による麻酔をかけた。吸入麻酔はイソフルラン濃度を 4%で導入し、1.5%で維持した。維持麻酔をかけた状態で解剖板に仰向けに寝かせ、ビニールテープを用いて四肢を固定した。70%エタノールで腹側を消毒後、下顎から胸骨にかけて正中切開し、左頸動脈を同定、単離した。単離した左頸動脈の心臓側を動脈クレンメでクランプし、中枢側を糸で二重結紮した。クランプ部と結紮部位の間の動脈を 0.5 mm 程切開し、PE-50 チューブ (Imamura Co. Ltd) を挿管した。チューブは圧トランスデューサーに繋ぎ動脈血圧 (arterial pressure; AP) を測定した。次に下腹部を正中線に沿って陰茎上部から 5-6 cm 正中切開した。陰囊の裏側に位置する陰茎脚を同定しやすくするために、精巣を陰囊から腹腔内に押し上げ、切開した下腹部から引き出した。左陰茎脚を露出させた後、PE-50 チューブに接続した 23G 注射針 (TERUMO) の針を穿刺し、陰茎脚を貫通させないように注意しながらアロンアルファで固定した。PE-50 チューブは圧トランスデューサーに繋ぎ、ICP を測定した。チューブ内はいずれも 50 U/ml のヘパリン生理食塩水で満たした。測定には Power-lab 2/26 (ADINSTRUMENTS) を用いた。前立腺の側面に位置する海綿体神経を同定し、併走している血管や神経を傷付けないように注意しながら、ツル首型精密ピンセットですくい上げて単離した。単離した海綿体神経を双極型鉤電極 (ユニークメディカル) を用いて 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動を測定した。刺激は Electronic Stimulator (NIHON KOHDEN) と Isolator SS-202J (NIHON KOHDEN) を用いて 5 V、1-16 Hz、pulse width 5 msec の条件で行った。AP、ICP は LabChart7 (ADINSTRUMENTS) を用いて記録、解析を行った。ICP 値は AP にも左右されるため、刺激で生じた最大 ICP 値をそのときの平均動脈血圧 (MAP; mean arterial pressure) 値で除した ICP/MAP にて評価した。

### 3-5. 血液生化学検査

吸入麻酔薬イソフルラン (Pfizer) を高濃度で過麻酔の処置をして安楽死させた直後、ラットの右下静脈を露出させ、18G×1 1/2"注射針 (TERUMO) を用いて採血した。採取した血液をベノジェクト II 真空採血管 (TERUMO) に入れ、1200 g で 10 分間遠心分離し、得られた血清を測定まで -80 °C で保存した。血清中の一般生化学検査項目の測定をオリエンタル酵母バイオに依頼した。また、testosterone に関しては、Testosterone (serum) ELISA キット (APO ALPL0 Diagnostics) を用いて測定した。

### 3-6. 等尺性張力測定による陰茎海綿体平滑筋の収縮弛緩反応評価

摘出した陰茎から陰茎背静脈と尿道海綿体を取り除き、白膜を剥離し陰茎海綿体のみを用いた。Organ bath に Krebs 液 (119 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 11 mM glucose) を 10 ml 注入し、陰茎海綿体の一端をセルフィンで、他端を圧トランスデューサー (ミネベアミツミ, 長野, 日本) の先端に固定した。同時に、organ bath 内の Krebs 液を一定温度に保つために、恒温槽で 37 °C に温めた水を organ bath の外側に灌流させた。Organ bath 内には 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気させた。陰茎海綿体標本に 0.6 g の基礎張力を負荷した後、張力が定常状態に達するまで 1 時間以上安定化させた。80 mM K<sup>+</sup> Krebs 溶液を用いて収縮力を確認した後、noradrenaline (NA) を累積投与 (10<sup>-10</sup>-10<sup>-4</sup> mol/L) し、収縮力を測定した。各濃度における NA に対する収縮力は 80 mM K<sup>+</sup> Krebs 溶液に対する収縮力の比で評価した。また、NA 10<sup>-5</sup> mol/L による前収縮の後に ACh や sodium nitroprusside (SNP) の累積投与 (10<sup>-10</sup>-10<sup>-4</sup> mol/L)、または阻害剤 (suramine 10<sup>-5</sup> mol/L、atropine 10<sup>-5</sup> mol/L、propranolol 10<sup>-5</sup> mol/L) 滴下後の経壁電気刺激 (EFS; electrical field stimulation) を行うことによって弛緩力を測定した。ACh では内皮を介した NO 放出による弛緩、SNP では NO ドナーを直接投与することによる弛緩、EFS では NO 作動性神経を介した NO 放出による弛緩が評価できる。弛緩陰茎海綿体の張力は圧トランスデューサーを介して、Power lab 4/26 (ADIstruments) データ収録システムで収録し Labchart8 (ADIstruments) で解析した。

### 3-7. 遺伝子学的検討

#### 3-7-1. total RNA 抽出

摘出したラット陰茎海綿体から TriPure Isolation Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて添付プロトコールに従い total RNA を抽出した。得られた total RNA に対して逆転写反応を行った。

#### 3-7-2. cDNA 合成

得られた total RNA 1 µg から、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (TaKaRa Bio) を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応の条件は 42 °C で 20 分間、続けて 99 °C で 5 分間行った。得られた cDNA に MiliQ 水を加えて 5 倍希釈し、-20 °C で保存した。

#### 3-7-3. real-time PCR

KAPA SYBR (KAPA Biosystems) を用いて、CFX96 real-Time System (BIO RAD) により real-time PCR を行った。反応は 95 °C 3 min の後、95 °C 3 sec、60 °C 30 sec (40 cycles) の条件で行った。解析は Ct 法を用いて -actin との比で比較した。

### 3-8. 統計解析

結果は全て平均値 ± 標準誤差で表しており、2 群間の検定は、Welch ' s t-test を用い、有意

水準を5%以内として評価した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 体重変化と摂餌量

飼育開始時に対する体重変化の割合を評価したところ、LCD 群では Control 群と比較して2週目 ( $p < 0.01$ ) と3週目 ( $p < 0.05$ ) に有意に減少した ( $p < 0.05$ )。一方、1週目に対する体重変化の割合を評価したところ、Control 群とLCD群の間に有意な変化はみられなかった。また、LCD 群では Control 群と比較して摂餌量が有意に減少した (1, 2, 4週目;  $p < 0.01$ , 3週目  $p < 0.05$ )。

##### 4-2. 心拍数と収縮期血圧

LCD 群では Control 群と比較して心拍数が4週目において低下したが ( $p < 0.05$ )、その他の期間では変化はみられなかった ( $p > 0.05$ )。一方、収縮期血圧に関しては、いずれの期間においても Control 群と LCD 群の間に有意な差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。

##### 4-3. 血清生化学パラメータ

各群の血清中の生化学パラメータを Table 1 に示した。LCD 群において Control 群と比較して Cl、ALB、AST、T-CHO、BUN、ALT が上昇し ( $p < 0.05$ )、Cr が低下した ( $p < 0.01$ )。その他の項目に関しては、変化は見られなかった。

Table.1 生化学パラメータ

	Control	LCD
Na (mEq/L)	141.3 ± 0.68	143.1 ± 0.70
K (mEq/L)	4.63 ± 0.15	4.53 ± 0.11
Cl (mEq/L)	102 ± 0.57	104 ± 0.44 *
Ca (mg/dL)	10.04 ± 0.12	9.9 ± 0.12
IP (mg/dL)	7.09 ± 0.35	6.27 ± 0.11
GLU (mg/dL)	248.4 ± 19.9	241.6 ± 11.4
AMY (IU/L)	1300 ± 56.0	1262 ± 89.4
TP (g/dL)	5.03 ± 0.12	5.20 ± 0.10
ALB (g/dL)	3.60 ± 0.08	3.80 ± 0.04 *
BUN (mg/dL)	19.5 ± 0.92	36.1 ± 1.71 **
Cr (mg/dL)	0.38 ± 0.02	0.26 ± 0.01 **
AST (IU/L)	86.0 ± 8.18	117.0 ± 7.00 *
ALT (IU/L)	40.9 ± 1.20	58.0 ± 2.32 **
LDH (IU/L)	492.4 ± 188.8	587.7 ± 125.4
T-CHO (mg/dL)	64.3 ± 2.63	78.6 ± 4.65 *
TG (mg/dL)	24.9 ± 4.44	46.1 ± 8.89
T-BIL (mg/dL)	0.037 ± 0.004	0.037 ± 0.004
Testosterone (mg/dL)	3.98 ± 0.65	3.91 ± 0.56

##### 4-4. 勃起機能評価

各群の刺激頻度別の ICP 測定結果を図1に示した。どちらの群においても刺激頻度が増えるにつれて、ICP/MAP が上昇した。特に16 Hz の電気刺激で LCD 群では Control 群と比較して ICP/MAP が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

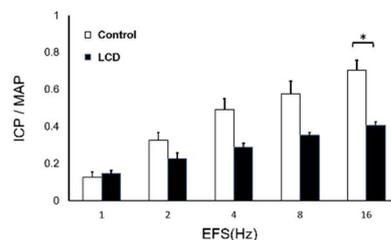


図1. ICP 測定結果

##### 4-5. 陰茎海綿体平滑筋の収縮弛緩反応評価

陰茎海綿体平滑筋の収縮弛緩反応を等尺性張力測定により評価した。NA による収縮反応、ACh による弛緩反応、SNP による弛緩反応、阻害剤滴下後の EFS による弛緩反応の結果を図2に示した。NA による収縮反応に関しては Control 群と LCD 群の間に有意な差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。また、ACh による弛緩反応に関しても Control 群と LCD 群の間に有意な差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。一方、SNP による弛緩反応に関しては LCD 群では Control 群と比較して有意に低下した ( $p < 0.05$ )。また、EFS による弛緩反応に関しても LCD 群では Control 群と比較して有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

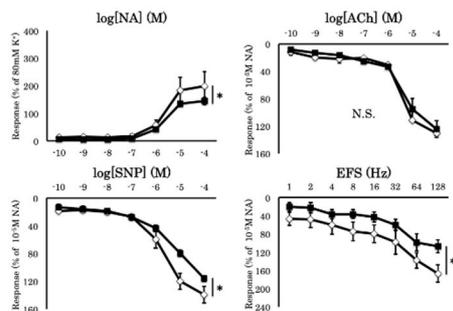


図2. 張力測定結果

##### 4-6. 陰茎海綿体における mRNA 発現量

陰茎海綿体における mRNA 発現量を real-time PCR によって測定した結果を図3に示した。eNOS、S1P2、S1P3、SPP に関しては Control 群と LCD 群の間に有意な差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。

一方、nNOS と S1P1 は LCD 群では Control 群と比較して有意に減少した ( $p < 0.05$ )。

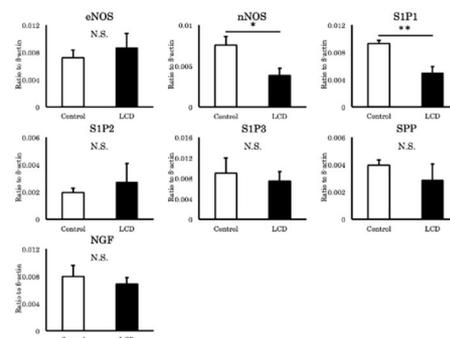


図3. PCR 測定結果

#### 4-7. 考察

本研究より、極端に炭水化物を制限することで勃起機能が低下することが示唆された。また、等尺性張力測定により経壁電気刺激による弛緩反応を測定したところ、LCD 群で有意な反応の低下が観察された。また、リアルタイム PCR 法を用いて、陰茎海綿体における神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の発現変動を検討したところ、LCD 群で有意な低下が観察された。また、LCD 群において S1P1 の mRNA 発現量が減少していたことより、極端な炭水化物制限により S1P1 が減少し Akt の活性化が抑制され、神経細胞を傷害した可能性が示唆された。これらの結果より、『低インスリンダイエット』により、神経系を介した勃起障害の発症が示唆される。

本研究では、一部の成分を除き、炭水化物をたんぱく質に置換するという極端な条件であったため、今後は炭水化物の摂取量を段階的に変えて検討を行う必要がある。また、炭水化物制限食によって勃起機能が低下した後に、通常の飼料に戻すと勃起機能が回復するかどうかも検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 和哲  (Kimura Kazunori)  (00423848)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	片岡 智哉  (Kataoka Tomoya)  (20737928)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師   (23903)	
研究分担者	川出 義浩  (Kawade Yoshihiro)  (20738439)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	
研究分担者	前田 康博  (Maeda Yasuhiro)  (60275146)	藤田医科大学・共同利用研究設備サポートセンター・准教授   (33916)	
研究分担者	堀田 祐志  (Hotta Yuji)  (90637563)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・講師   (23903)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	日高 隼也  (Hidaka Junya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------