



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1435号
学位記番号	第296号
氏名	塩田 有史
授与年月日	平成 26年 3月 25日
学位論文の題名	食品成分 L-Citrulline が男性性機能に及ぼす影響の薬理学的研究
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 木村 和哲, 山村 寿男, 中村 克徳

名古屋市立大学学位論文

食品成分 L-Citrulline が男性性機能に及ぼす影響の薬理学的研究

平成 25 年度 (2014 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医療機能薬学専攻

病院薬剤学分野

塩田 有史

1. 本論文は、2014年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査	湯浅	博昭	教授
副査	山村	寿男	准教授
副査	中村	克徳	准教授
副査	木村	和哲	教授

2. 本論文は、学術雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

- 1) Arufumi Shiota, Yuji Hotta, Tomoya Kataoka, Masahiro Morita, Yasuhiro Maeda, and Kazunori Kimura
Oral L-citrulline supplementation improves erectile function in rats with acute arteriogenic erectile dysfunction.
J Sex Med. 2013 Oct; (10) 10: 2423–2429

- 2) Yuji Hotta, Arufumi Shiota, Tomoya Kataoka, Marina Motonari, Yasuhiro Maeda, Masahiro Morita, and Kazunori Kimura
Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats.
Int J Urol. 2013 Dec 23. doi: 10.1111/iju.12362.

3. 本論文の基礎となる研究は、木村和哲教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

略語	2
序論	3
本論	
第一章 内分泌性勃起機能障害に対する L-Citrulline 経口投与の効果	
第一節 背景	6
第二節 実験材料及び方法	7
第三節 結果	14
第四節 考察	18
第五節 小括	21
第二章 動脈性勃起機能障害に対する L-Citrulline 経口投与の効果	
第一節 背景	23
第二節 実験材料及び方法	24
第三節 結果	28
第四節 考察	31
第五節 小括	34
総括	35
引用文献	36
謝辞	42

略語

Cast	castration
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
ED	erectile dysfunction
GTP	guanosine triphosphate
ICP	intracavernous pressure
L-Arg	L-arginine
L-Cit	L-citrulline
MAP	mean arterial pressure
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PDE-5	phosphodiesterase-5
SM	smooth muscle

序論

L-Citrulline (L-Cit) は、スイカの果汁から単離され、学名 *Citrullus vulgaris* より命名された遊離アミノ酸である。L-Cit は、スイカの他、キュウリ、メロンなどの食品に多く含まれ、熟したスイカ中の L-Cit 含有量は 1.8 mg / g である [1]。また、L-Cit は、経口摂取で生体内に吸収されることが報告されており [2]、医薬品や健康補助食品として海外では広く利用されている。フランスにおいては、一般用医薬品として疲労回復を目的に使用されており、その摂取量は、L-Cit として 1.7 g / day とされている。2007 年には本邦において食品成分としての使用が認められた。

L-Cit は、生体内でアルギニノコハク酸を経由して L-arginine (L-Arg) に変換された後、nitric oxide synthase (NOS) により nitric oxide (NO) と L-Cit を生成する (図 1)。L-Cit は、ラットの胸部大動脈において NO を介した血管拡張作用 [3]、ヒトにおいて血中 NO 濃度を有意に上昇させることによる動脈硬化抑制作用 [4]、マウス由来腹腔マクロファージにおいて NO 産生の促進による寄生虫感染抑制作用を示した [5]。このように、L-Cit の摂取は、血中 NO 濃度を上昇させることで、様々な生理機能を有することが報告されている。また、NO は男性性機能である勃起においても重要な役割を果たすため、L-Cit 投与による NO 産生増加が、勃起機能に影響を与えられらる。

勃起は、性的刺激が伝わると NO 作動性神経から NO が放出され、陰茎海綿体平滑筋が弛緩することで陰茎内への流入血液量が増加し、海綿体内圧 (intracavernous pressure; ICP) が上昇して開始される。その後、上昇した内圧により流出血液量が制限され勃起が完成する。陰茎海綿体平滑筋の弛緩反応の調節には、NO / cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 系が重要な役割を担っている。NO は、グアニル酸シクラーゼを活性化し、guanosine triphosphate (GTP) から cGMP への反応を促進することで細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、陰茎海綿体平滑筋を弛緩させる。何らかの要因で十分な陰茎海綿体平滑筋の弛緩が得られない場合、勃起機能障害 (erectile dysfunction; ED) となる。ED は、器質性、心因性の 2 種類に分類され、器質性 ED は内分泌性、血管性、神経性に細分される。cGMP は phosphodiesterase-5 (PDE-5) によって分解されるため、ED の治療には、PDE-5 阻害薬 (ex. シルденаフィール、バルデナフィール、タダラフィール) が使用される。PDE-5 阻害薬は、一定の臨床効果が得られているが、効果不十分な症例が約 30 % 存在しており [6]、特に内分泌性 ED、動脈性 ED においては PDE-5 阻害薬無効症例が多い。この一因として、NO の供給不足が考えられている。NO の供給が不足していると、PDE-5 阻害薬により cGMP の分解を抑制しても、勃起機能の改善にはつながらないと考えられる。L-Arg または L-Cit を経口摂取し NO 供給を増加させることで、ED を改善できる可能性を考

えた。

L-Arg と L-Cit 経口摂取では吸収過程に違いがあることが知られている。L-Arg の経口摂取は、腸管からの吸収時に腸内細菌によって代謝される [7]。また、肝初回通過により大部分が代謝され、血中 L-Arg 濃度は大きくは上昇しない。一方、L-Cit を経口摂取した場合、これらの代謝を避けて血中に吸収されるため、速やかに腎臓で L-Arg に代謝され、L-Arg を経口摂取した場合と比較し、効率的に血中 L-Arg 濃度を上昇させることがヒトをはじめ哺乳類において示されている [8-11]。L-Cit 経口摂取による L-Arg の効率的な生成は、NO 産生を増加させ、ED 治療に有効であると考えられる。

本研究では、PDE-5 阻害薬無効症例が多い内分泌性 ED、及び動脈性 ED に着目した。第一章で内分泌性 ED について、第 2 章では動脈性 ED について、各々モデルラットを作製し、L-Cit 経口投与による勃起機能の改善効果とその作用機序について検討した。

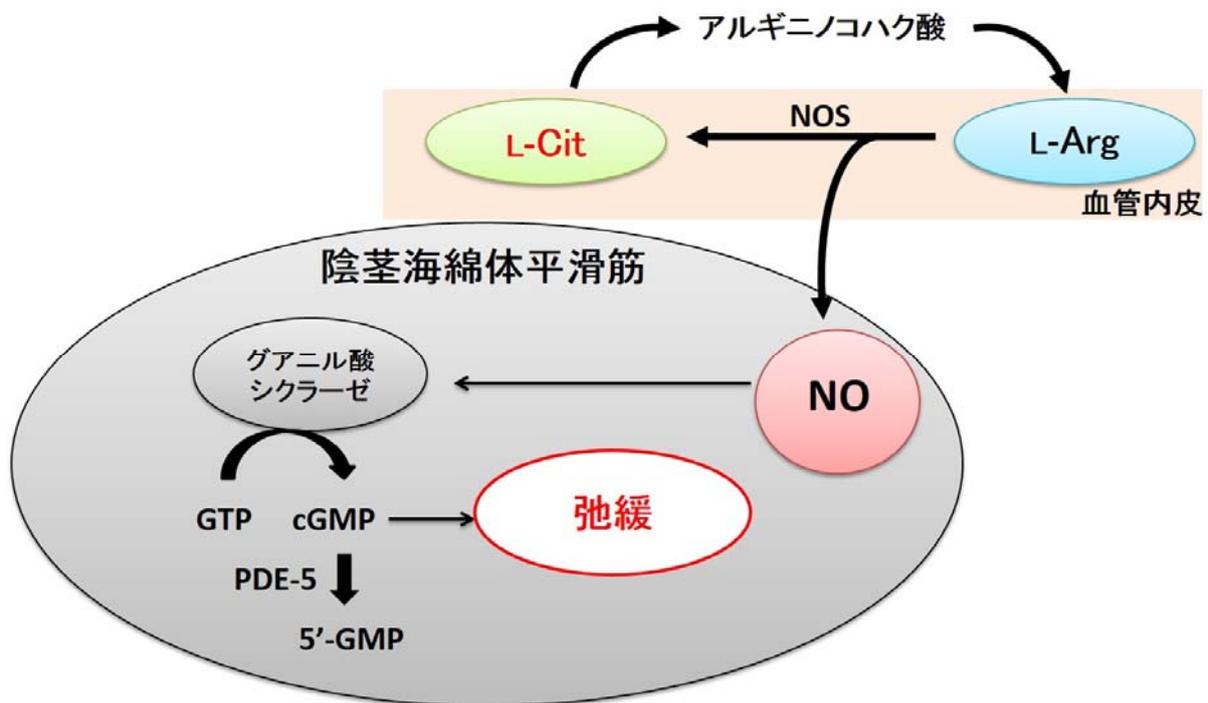


図 1 勃起における NO/cGMP 系と L-Cit, L-Arg の NO サイクル

第一章

内分泌性勃起機能障害に対する L-Citrulline 経口投与の効果

第一節 背景

ED 治療において PDE-5 阻害薬は、多くの場合勃起機能の改善効果が期待できる。しかし、一部の ED においては PDE-5 阻害薬無効例が存在する。加齢や糖尿病などにより引き起こされる内分泌性 ED では PDE-5 阻害薬の有効率は約 50% と高くない [12]。加齢に伴って血中テストステロン濃度が減少し [13]、内分泌性 ED を発症する場合がある [14]。低テストステロンが原因の ED 患者は ED 患者の中で約 10% 存在する [15]。ラットを用いた検討では、去勢により血中テストステロン濃度が低下すると PDE-5 のタンパクレベルでの発現も減少するため、PDE-5 阻害薬の反応性が低下することが示されている [16]。

低テストステロンを伴う内分泌性 ED においては、PDE-5 阻害薬が無効な場合、テストステロン補充療法が選択される。しかし、テストステロン補充療法にも効果が不十分な症例が存在している。最も一般的なテストステロン補充療法である筋肉注射を用いた場合の有効率は 51.3% とされる [17]。また、テストステロンは勃起機能に対する作用の他に、造血作用や脂質代謝作用も有しており、補充療法においては多血症、心筋梗塞などの副作用が報告されている [18]。したがって、内分泌性 ED においては PDE-5 阻害薬やテストステロン補充療法に代わる新たな治療法が望まれている。

内分泌性 ED の動物モデル作成方法の一つとして去勢手術が報告されている [19]。ラットに去勢手術を行うことで、血中テストステロン濃度を低下させると、海綿体構造が変化し、勃起機能が低下するが、テストステロンの補充により勃起機能は回復する。また、去勢ラットを用いた研究では、陰茎海綿体中の NOS の活性が消失はしないものの低下傾向であることが報告されており [20, 21]、このため、内分泌性 ED では、NO の供給不足が勃起機能の低下につながっている可能性が示唆されている。よって、内分泌性 ED 治療において PDE-5 阻害薬を投与しても、NO の供給が不足しているため、PDE-5 阻害薬無効例が発生していると考えられる。L-Cit には直接的な代謝酵素への影響や NOS を活性化する報告はないが、NO 産生の基質となる L-Arg を増加させることで NO を補充し、去勢により低下した勃起機能を改善できると考えた。

去勢ラットを作製し、低テストステロンにより生じる内分泌性 ED のモデルとした。この内分泌性 ED モデルラットに NO 産生の増加が期待できる L-Cit 経口投与の勃起機能に対する効果を調べ、内分泌性 ED において L-Cit 経口投与が新たな治療法となり得るかを検討した。

第二節 実験材料及び方法

(1) 対象

15 週齢, 雄性, Wistar-ST 系ラット (SLC Japan, Inc.) を用いた。自由飲水かつ餌も自由に摂取でき, 温度, 湿度, 12 時間毎の明暗コントロール下での飼育を行った。実験に使用する前に 1 週間の予備飼育を行った。

(2) 実験プロトコール

内分泌性 ED は, 低テストステロンに伴う ED と定義されており, 動物モデルとして去勢手術 (Castration; Cast) を行ったラットのモデルが報告されている [22]。この報告に基づいて内分泌性 ED モデルラットを作製した。去勢手術を行った群 (Cast 群), sham 手術を行った群 (Control 群), 去勢手術後 4 週間 2% L-Cit 水の自由飲水を行った群 (Cast + L-Cit 群) の 3 群で勃起機能を比較検討した。20 g の L-Cit 粉末 (Kyowa Hakko Bio) を精製水に常温で溶解して 1000 mL とし, 2% L-Cit 水を作製した。L-Cit の投与量は, ラットにおいて 4 週間反復投与試験を行って副作用が認められなかった最大量として 2000 mg / kg / day とした [23]。各群 1 週毎に血中テストステロン濃度, 4 週間の飼育後に勃起機能, 血中 L-Cit, L-Arg, NOx 濃度測定, 及び陰茎海綿体の組織学的検討を行った (図 2)。

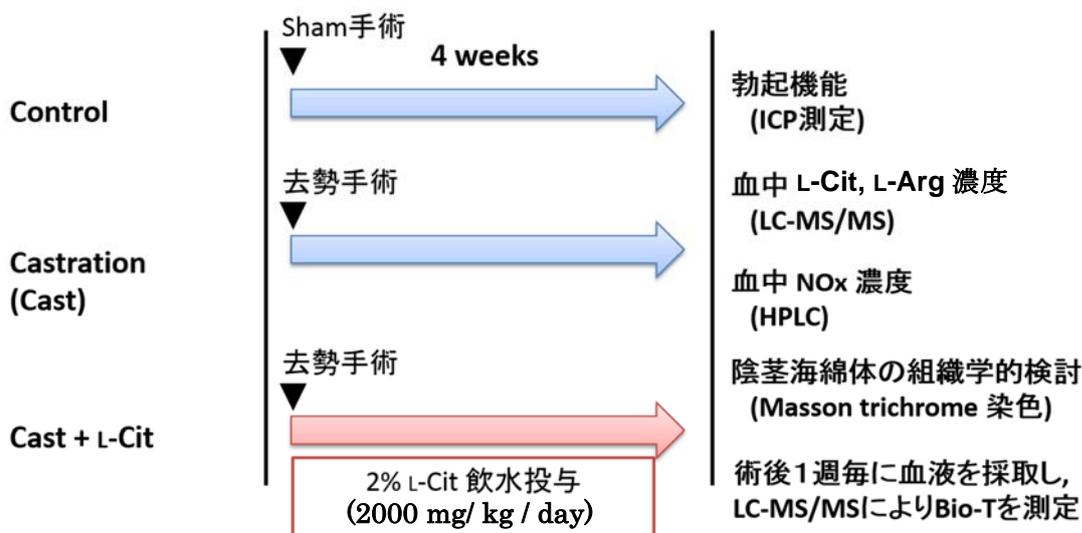


図 2 内分泌性 ED モデルの実験プロトコール

(3) 去勢手術

ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg) を腹腔内に投与し、麻酔をかけた。麻酔後、解剖板にビニールテープを用いて、四肢を固定した。その後、ラットの腹部を約 1 cm 正中切開し、両側精巣を露出、摘出して、Cast 群とした。両側精巣を摘出後、ラットの腹部を糸によって縫い合わせることで閉腹した。Control 群は、ラットの腹部を切開し、精巣を摘出しない sham 手術を行った。

(4) 勃起機能の評価

勃起機能の評価は、図 3 に示すように、海綿体神経の刺激下において ICP 及び動脈血圧を、各々陰茎脚及び頸動脈より測定することで行った。はじめに、ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg) の腹腔内投与により麻酔をかけた。次に、解剖板の上に、四肢及び頭部をビニールテープによって固定した。下顎から胸部にかけて切開し、片側の頸動脈を露出し、胸部側をクレンメによりクランプした後、下顎側を糸により二重結紮した。クランプと結紮部位間の頸動脈を切開し、PE-50 チューブ (BECTON DICKINSON) を挿入した。挿入後、二重結紮し、チューブが外れることを防止した後、クランプをはずした。チューブは power-lab (ADI) と接続し、全身血圧をモニターした。腹部を正中切開し、陰囊から精巣を押し出した後、下腹部を切開し、陰茎脚を露出した。23 G 針の針先 2 cm をラジオペンチにより切り出し、この針先を接続した PE-50 チューブを陰茎脚に挿入し、瞬間接着剤で固定した。チューブは、power-lab と接続して、陰茎脚から海綿体内圧である ICP の変動を測定した。チューブはいずれも 50 U / mL ヘパリン液で満たした。次に、前立腺側面にある左右の海綿体神経を左右両側とも同定した。片側の海綿体神経を双極形鉤電極 (ユニークメディカル) を用いて海綿体神経をひっかけた。Electronic Stimulator (NIHON KOHDEN) と Isolator SS-202J (NIHON KOHDEN) を用いて 1 分間の電気刺激 (10 V, 20 Hz, pulse width 5 msec) を行った。電気刺激は左右交互に行い、その中で一番高い値を採用した。

ICP の測定結果は、Chart5 (ADI) を用いて解析を行った。測定結果は、図 4 の様に示される。赤色の線が全身血圧を示し、青色の線は ICP を示している。黒い太線は電気刺激の区間を表している。ICP の最高値を平均動脈血圧 (mean arterial pressure; MAP) で割った ICP / MAP を算出し、勃起機能の指標として用いた。

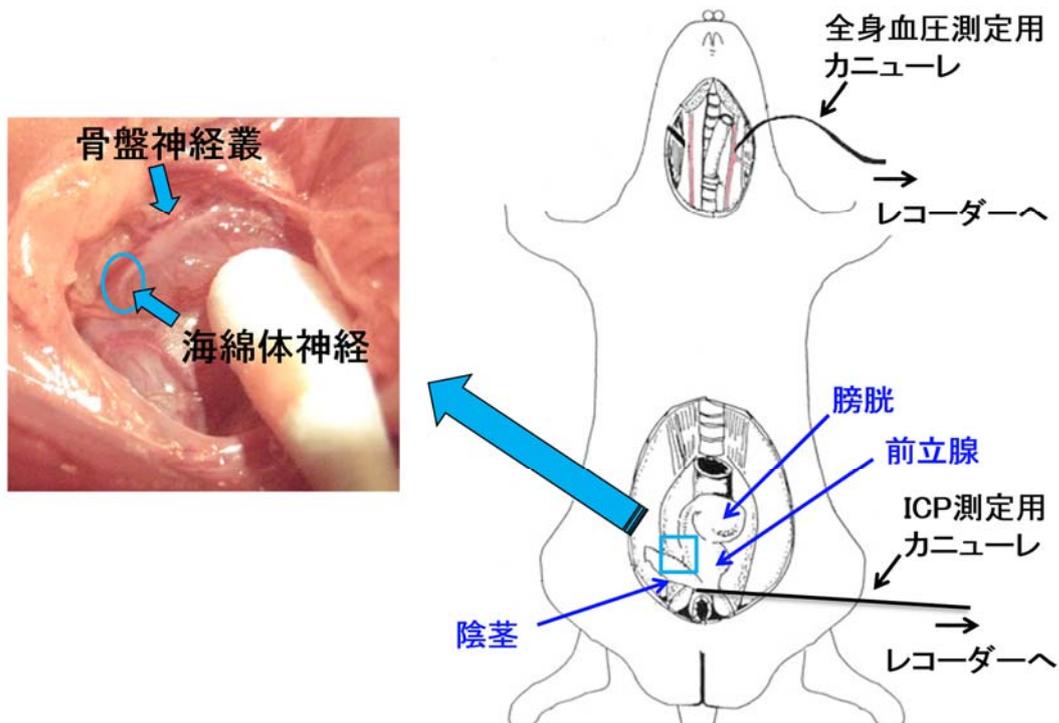


図3 ICP測定による勃起機能の評価

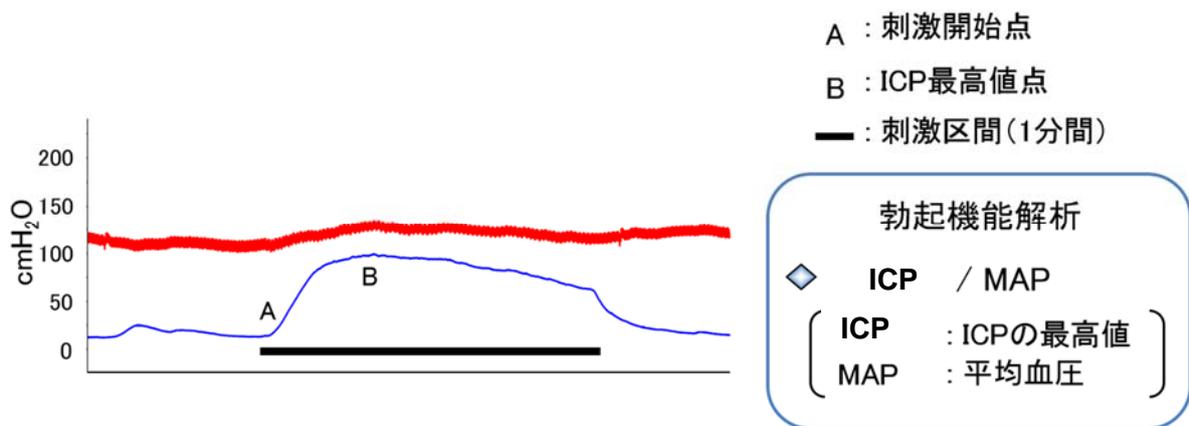


図4 ICP測定結果の解析方法

(5) 採血と組織の摘出及び処理

勃起機能の評価終了後、大静脈より 10 mL 注射筒と 18G の注射針を用いて採血を行った。採血した血液は、採血管の中に室温で 2 時間静置後、800 g, 20 分遠心分離し、上清を血清として得、-80°C で保存した。採血を行った後、ペントバルビタールナトリウムの過麻酔にて安楽死させた。その後、陰茎を陰茎脚の部位より切除した。切除した陰茎は、亀頭側、陰茎脚側の 2 つに分け-80°C で保存した。本研究では、亀頭側の陰茎を組織学的検討に使用した。

(6) 血中 L-Cit, L-Arg, テストステロン濃度測定

(6)-1 血中 L-Cit, L-Arg 濃度測定

検量線溶液の調製

L-Cit, L-Arg を下記濃度 (μM) となるよう milli Q に溶解した。

L-Cit : 71.1, 142.1, 284.1, 355.2, 568.2, 710.3, 1136.3, 1420.5

L-Arg: 71.5, 142.9, 285.8, 357.2, 571.5, 714.3, 1142.9, 1428.6

試料の調製

ラットの血清サンプルおよび検量線溶液 100 μL に L-Cit, L-Arg の内部標準物質として 50 μg の $^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4\text{-L-Arg}$ を添加し、0.025% trifluoroacetic acid (TFA) in acetonitril (ACN) 600 μL を加え vortex 後、氷上で 15 分間静置した。Methanol 500 μL を加え vortex 後、3000 g で 10 分間遠心分離し、上清 1000 μL を分取した。得られた上清を窒素気流下、40 °C で乾固し、0.025% TFA in ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}:\text{MeOH}=1 : 2 : 2$) 100 μL で溶解し、測定用サンプルとした。測定には 5 μL を ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Acquity UPLC[®]-MS/MS; Waters Corporation) に注入した。

UPLC[®]-MS/MS の条件

液クロ装置 : ACQUITY UPLC[®] (Waters Corporation)

カラム : Acquity UPLC BEH HILIC 1.7 μm column (2.1 \times 100 mm; Waters)

移動相 : A: 0.08% ion pair reagent (IPCC-MS; GL-science) in H_2O

B: 1.0% formic acid in ACN

Gradient	time	A :B
	0 - 1 min	2:98
	1 - 3 min	2 > 25 : 98 > 75
	3 - 6 min	25:75
	6 - 8 min	50:50

8 -10 min 2:98

流速 : 0.3 mL / min

質量分析装置 : Quattro Premier XE (Waters Corporation)

イオン化法 : electrospray ionization (ESI) positive

分析モード : multiple reaction monitoring (MRM)

測定イオン : L-Arg

m/z 174.8 → 69.7

(cone voltage 25 V, collision energy 15 eV)

L-Cit

m/z 176.0 → 159.00

(cone voltage 25 V, collision energy 10 eV)

$^{13}\text{C}_6, ^{15}\text{N}_4$ -L-Arg

m/z 148.8 → 74.8

(cone voltage 25 V, collision energy 15 eV)

(6)-2 血中テストステロン濃度測定

性ホルモンを含まない血清 (ゼロ血清) の調製

ラットの血清約 20 mL に活性炭 500 mg を添加し、氷冷下で 60 分間攪拌した。4 °C, 1600 g で 20 分間冷却遠心分離を行い、上清を得た。あらかじめ methanol 6 mL と milliQ 6 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ (InterSep C₁₈, GL Sciences) にこの上清をロードし、最初に溶出する部分の 8 mL を捨て、次いで溶出した部分およびその後 milliQ 8 mL で溶出した画分を捕集し、ゼロ血清として -80 °C に保存した。

検量線用溶液の調製

テストステロンを ethanol に溶解し、1 mg / mL の標準液とした。テストステロン標準液をゼロ血清で順次希釈して 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.06 ng / mL となるように調製した。

試料の処理

ラットの血清サンプルおよび検量線溶液に内部標準物質として 5 ng の dexamethasone を添加し、5% concanavalin A 溶液を 50 μL 加えて混和し、室温で 1 時間静置し、性ホルモン結合グロブリンを除去した。その後、4 °C, 3000 g で 10 分間遠心分離し、上清を分取した。上清から各性ホルモンおよび内部標準物質を 4 mL の *t*-butyl methyl ether で抽出し、40 °C で窒素乾固した。残留物を 50 μL の tetrahydrofuran (THF) で再溶解し、reagent mixture (50 mg of 2-methyl-6-

nitrobenzoic anhydride, 10 mg of 4-dimethylaminopyridine and 30 mg of picolinic acid in 1 mL of THF) 100 μ L および triethylamine 10 μ L を加えて混和し、室温で 1 時間静置し、誘導体化反応を行った。反応後、5% NaHCO₃ 500 μ L を加え、あらかじめ methanol 1 mL および milliQ 1 mL でコンディショニングした固相抽出カートリッジ (Oasis HLB, 30 mg, Waters Corporation) にロードした。5% NaHCO₃ 1 mL, milliQ 1 mL, 5% HCl 1 mL 及び milliQ 1 mL で洗浄し、ACN-H₂O (80 : 20) 1 mL で抽出した。抽出物を 40 °C で窒素乾固し、CH₃CN-H₂O (40 : 60) 100 μ L で溶解した。10 μ L を UPLC-MS/MS で分析した。

UPLC[®]-MS/MS の条件

液クロ装置 : ACQUITY UPLC[®] (Waters Corporation)

カラム : Inertasil ODS-3 (2.1 x 50 mm; GL Sciences)

移動相 : 0.1 % water / ACN (40 : 60, v / v)

流速 : 0.2 mL / min

質量分析装置 : Quattro Premier XE (Waters Corporation)

イオン化法 : ESI positive

モード : MRM

測定イオン : testosterone derivative

m/z 394.3 \rightarrow 124.1

(cone voltage 35 V, collision energy 15 eV)

dexamethasone derivative

m/z 498.4 \rightarrow 123.8

(cone voltage 70 V, collision energy 45 eV)

(7) 血中 NO_x 測定

血清中の NO_x 濃度の測定を行った。エッペンチューブに血清 (150 μ L) 及び等量の methanol を添加し、ボルテックスした後、10 分間氷上で放置した。4,000 g, 4 °C, 15 分間遠心分離し、上清を分取し、-80 °C で保存した。分析前にフィルター濾過後、NO_x analyzer (high-performance liquid chromatography; ENO-20, Eicom) を用いて測定した。測定する血清サンプルが外気に触れる時間が長い場合や、エッペンチューブやチューブの往復を繰り返した場合、外因の窒素酸化物が測定値に影響を与える可能性があるため、最小限の操作で行った。また、血清サンプルは氷上で作業を行った。

(8) 陰茎海綿体の組織学的検討

陰茎を4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、10%スクロース液、20%スクロース液、30%スクロース液の順に各々12時間以上4°C下で置換した。その後、陰茎から亀頭部分を取り除き、包埋用O.C.T. compound溶液を用いて包埋し、液体窒素を用いて急速凍結して-80°Cで保存した。-80°Cで保存しておいた凍結組織から凍結マイクローム (LEICA CM1850) を用いて、厚さ10 μLの凍結切片を作製した。作製した切片は1晩乾燥させ、Masson trichrome染色を表1に沿って行った。陰茎の横断面の写真を顕微鏡 (ECLIPSE Ti-U; Nikon) で撮影し、Photoshop elements 9 (Adobe) を用いて解析した。写真の画像で、左右の片側の陰茎海綿体の全範囲で赤色のピクセルを平滑筋 (smooth muscle: SM)、青色のピクセルを膠原繊維 (collagen) として、SMとcollagenのピクセル数の比 (SM/collagen) を算出した。

表1 Masson trichrome 染色プロトコール

PBS	5分×3
10%トリクロロ酢酸・10%重クロムカリウム等量混合液	30分
流水	1分
ワイゲルト鉄ヘマトキシレン	2分
流水	5分
1%オレンジG液	1分
1%酢酸水	2分
ポンソー酸フクシン・アゾフロキシリン液	5分
1%酢酸水	5分
2.5%リンタングステン酸・2.5%リンモリブデン酸等量混合液	30分
アニリン青	5分
水	1分
95% ethanol	2分×2
100% ethanol	2分×2
脱水用キシレン	2分×2
透徹用キシレン	2分×2

エンテランニューで封入

(9) 統計解析

結果は、すべて平均値±標準誤差で表してあり、3群間の検定は、ANOVAで解析を行い、Bonferroni補正法を用いた多重t-testを用いた。

第三節 結果

1) 血中テストステロン濃度

血中テストステロン濃度において Control 群では, 手術前は 2.01 ± 0.05 ng / mL (n=3), 手術後 1 週目 2.64 ± 0.28 ng / mL (n=3), 2 週目 2.16 ± 0.10 ng/mL (n=3), 3 週目 2.11 ± 0.04 ng / mL (n=3), 4 週目 2.05 ± 0.01 ng / mL (n=3)と観察期間中変動はみられなかった。一方, Cast 群及び Cast+ L-Cit 群は, 手術前は各々 2.69 ± 0.52 ng / mL (n=3), 2.60 ± 0.25 ng / mL (n=3)で, 手術後 1 週目より両者とも検出限界である 0.05 ng / mL 以下となり, 血中テストステロン濃度が大幅に減少していた (図 5)。

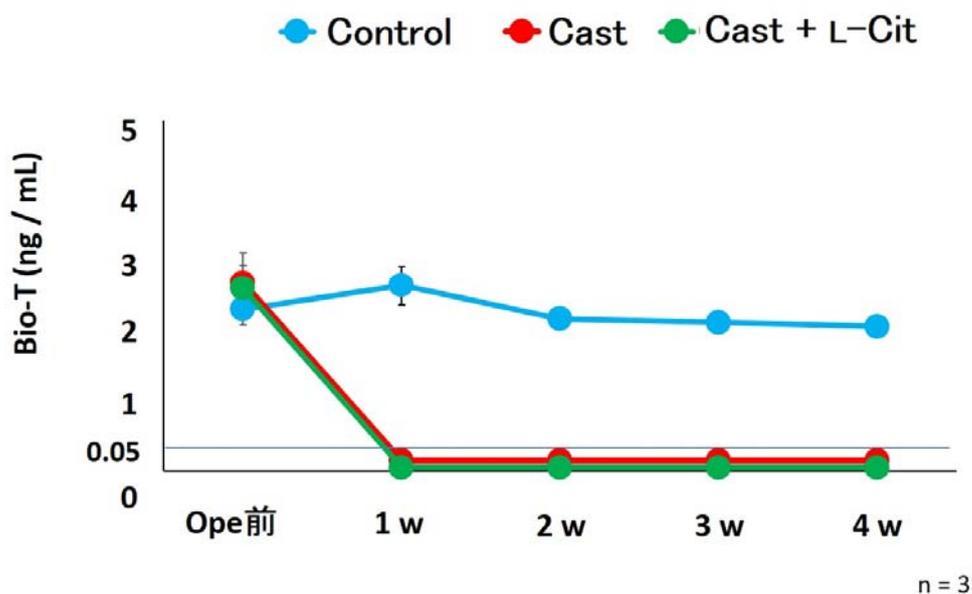


図 5 血中テストステロン濃度の推移

去勢手術前, 及び去勢手術後 4 週目まで 1 週毎に血中テストステロン濃度を LC-MS/MS により測定した。青線がコントロール群, 赤線が Cast 群, 緑線が Cast + L- Cit 群を表している。Cast 群, Cast + L- Cit 群では, 血中テストステロン濃度は手術後 1 週目より検出限界以下であった。n = 3。

2) 勃起機能 (ICP/MAP)

ICP/MAP は Cast 群では, 0.41 ± 0.02 (n=6) と Control 群の 0.72 ± 0.04 (n=7) と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。一方, Cast+ L-Cit 群では, 0.56 ± 0.03 (n=5) Cast 群と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$) (図 6)。

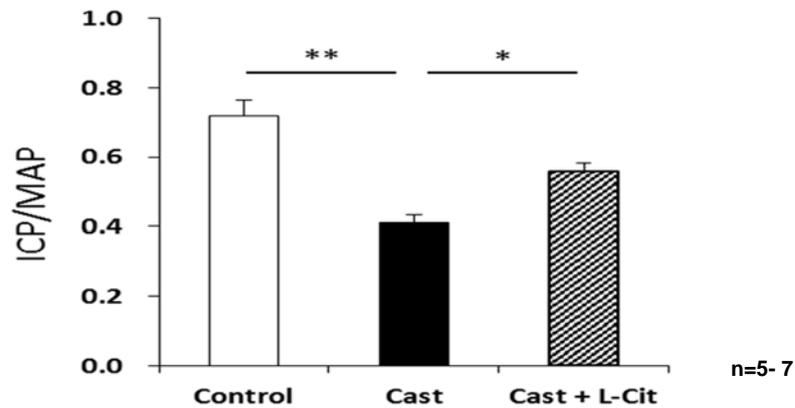


図 6 内分泌性 ED モデルにおける ICP/MAP 測定結果

ICP の測定を行い, MAP との比率により ICP/MAP を算出し比較した。Cast 群では Control 群と比較して ICP/MAP が有意に低下したが, Cast+ L-Cit 群ではこの低下が有意に改善した。n = 5- 7, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

3) 血中 L-Cit, L-Arg 濃度

血中 L-Cit 濃度は, Cast + L-Cit 群では $1037.1 \pm 89.5 \mu\text{M}$ (n=5) と Cast 群の $65.5 \pm 6.2 \mu\text{M}$ (n=5) と比較して有意に上昇した ($p < 0.01$)。Control 群の血中 L-Cit 濃度は $46.3 \pm 2.8 \mu\text{M}$ (n=6) だった。また, 血中 L-Arg 濃度は Cast + L-Cit 群において $364.7 \pm 40.7 \mu\text{M}$ (n=5) と Cast 群の $77.9 \pm 16.7 \mu\text{M}$ (n=5) と比較して有意に上昇した ($p < 0.01$)。Control 群の L-Arg 濃度は $91.4 \pm 9.6 \mu\text{M}$ (n=6) だった (図 7)。

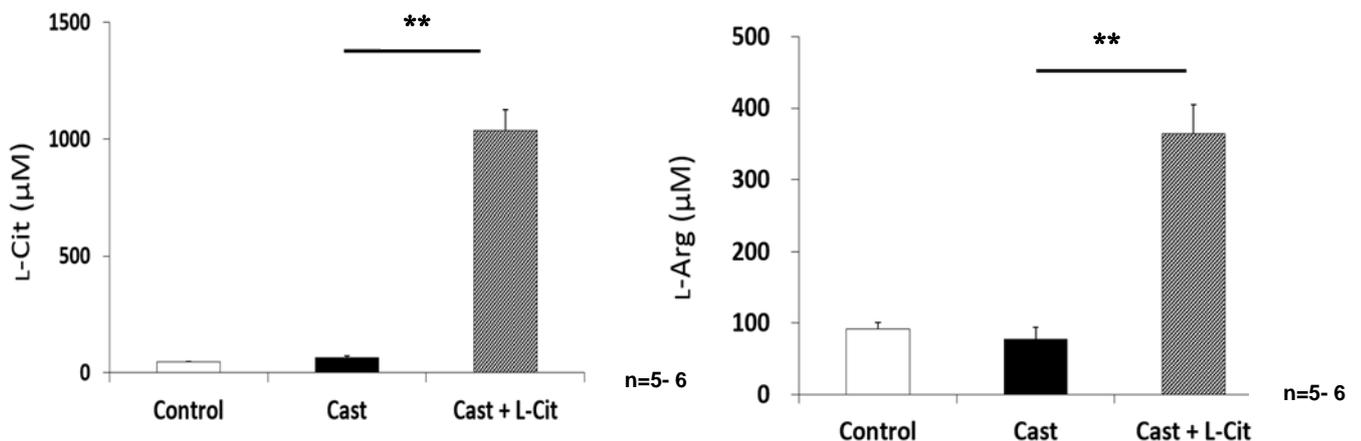


図 7 血中 L- Cit 濃度及び血中 L- Arg 濃度の測定結果

去勢手術後 4 週後の血中 L- Cit 及び L- Arg 濃度を LC-MS/MS により測定した。Cast+ L-Cit 群で血中 L- Cit 及び L- Arg 濃度が有意に上昇した。n = 5- 6, ** $p < 0.01$ 。

4) 血中 NOx 濃度

ICP/MAP 測定後, 血中 NOx を測定したところ, Cast 群では $14.1 \pm 2.5 \mu\text{M}$ (n=6) と Control 群の $20.1 \pm 2.5 \mu\text{M}$ (n=6) と比較して有意差はないものの減少傾向だった。Cast + L-Cit 群では $18.3 \pm 4.1 \mu\text{M}$ (n=5) と平均値は Cast 群と比較して高値だった (図 8)。

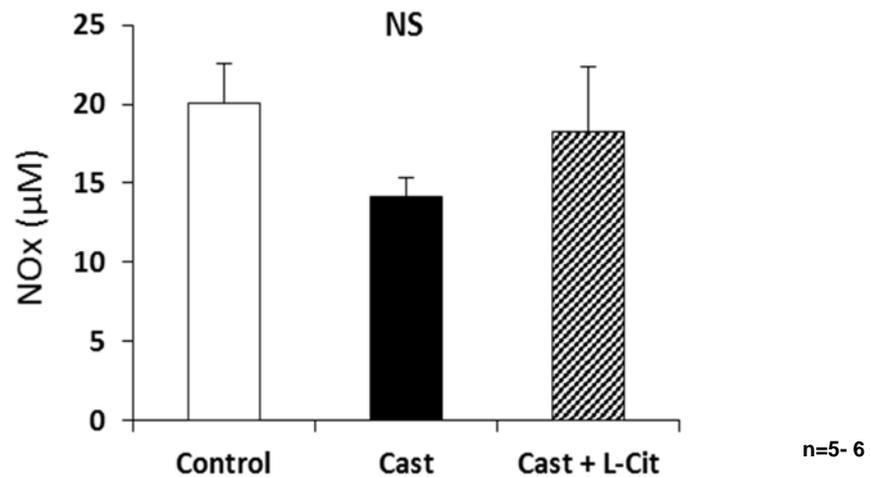


図 8 内分泌性 ED モデルにおける 血中 NOx 濃度測定結果
去勢手術後 4 週後の血中 NOx 濃度を HPLC により測定した。
Control 群と比較して Cast 群では減少傾向を示した。n = 5- 6,
NS = not significant。

5) 陰茎海綿体の組織学的検討

Masson trichrome 染色により，平滑筋が赤く，膠原繊維が青く染まった。そして，SM/Collagen 比を数値化し，棒グラフに示した。Cast 群では $5.3 \pm 1.0\%$ ($n=3$) と Control 群の $11.1 \pm 0.2\%$ ($n=3$) と比較して有意に SM/Collagen 比が減少した ($p < 0.05$)。Cast + Cit 群では $10.9 \pm 1.8\%$ ($n=3$) と Cast 群と比較して有意に SM/Collagen 比が増加していた ($p < 0.05$) (図 9)。

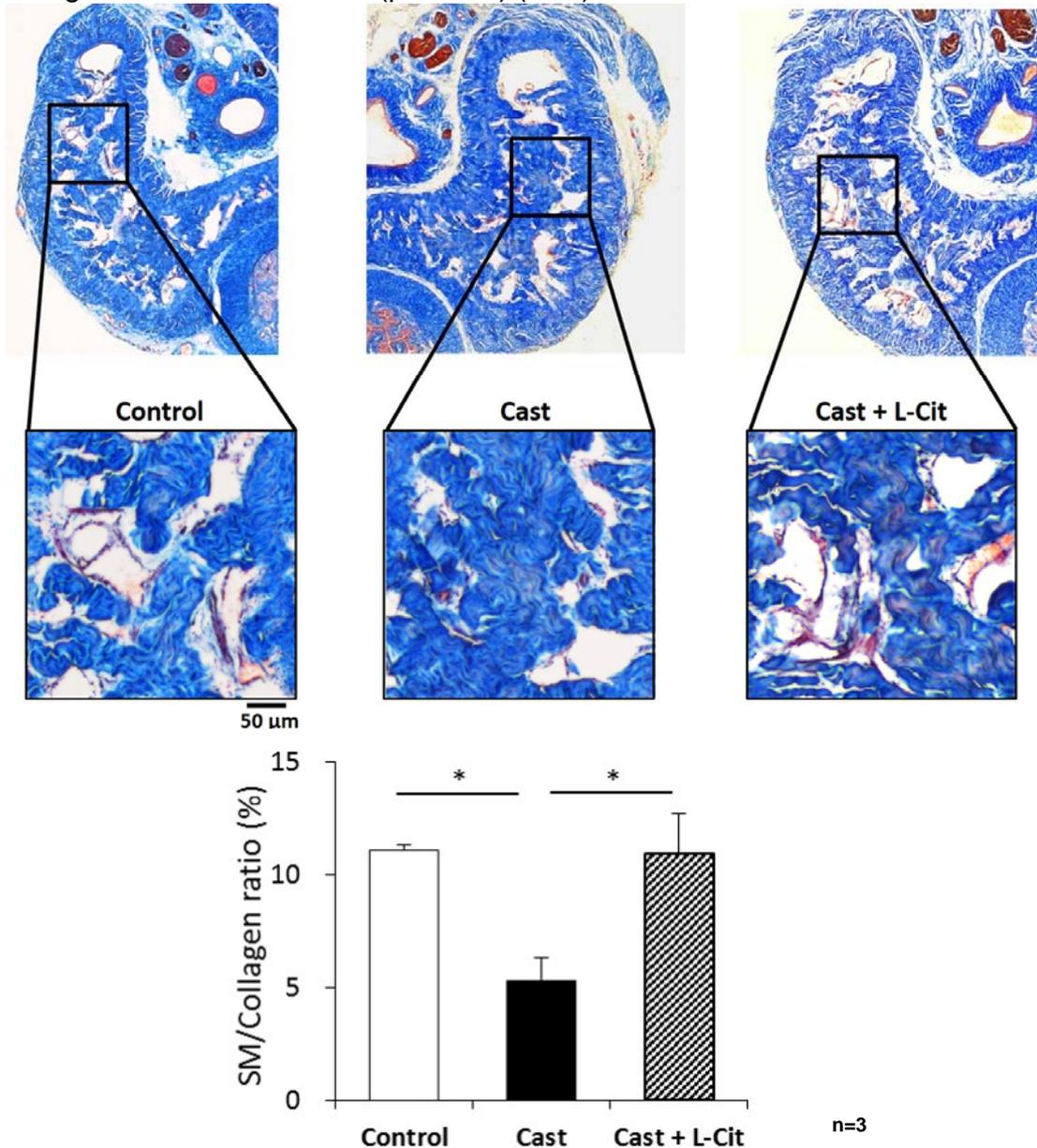


図 9 内分泌性 ED モデルにおける陰茎海綿体の組織学的検討

各群の陰茎海綿体組織を Masson trichrome 染色により組織学的検討を行った。Control 群と比較して Cast 群における SM/Collagen 比が有意に減少した。そして，Cast + Cit 群ではこの SM/Collagen 比の減少が有意に改善した。 $n = 3$, $*p < 0.05$ 。

第四節 考察

本研究では、去勢により内分泌性 ED モデルを作製し、L-Cit 経口投与の勃起機能への効果を検討した。去勢ラットにおいて、去勢手術の 4 週間後、勃起機能は低下したが、L-Cit 経口投与によって勃起機能の有意な改善が認められた。L-Cit 経口投与は低テストステロンによる内分泌性 ED を改善したといえる。

本去勢モデルにおいて、去勢後 1 週目以降血中テストステロン濃度が検出限界以下となり、低テストステロンの状態が維持されていたと考えられる。同様の測定方法で、疾患モデルではないラットの血中テストステロン濃度が 2 ng / mL 前後と今回の結果と類似した報告があり[24]、今回の血中テストステロン濃度の測定方法は妥当であると考えられる。この低テストステロン状態において、陰茎海綿体の平滑筋/膠原繊維の比率が低下した。平滑筋/膠原繊維の比率の減少により、勃起に必要な平滑筋の弛緩が十分に行えなくなり、勃起機能の低下につながったと考えられる。

また、血中テストステロン濃度の減少に加え、血中 NOx 濃度の低下傾向がみられた。過去に去勢モデルでは NOS の活性が低下し、NO 産生が低下しているとの報告があるため [20, 21]、今回のモデルにおいても、NOS の活性低下に伴う NO 産生の低下が考えられた。このため、勃起時の平滑筋の弛緩に必要な NO の産生量が不十分な状態となり勃起機能が低下したと考えられる (図 10)。

L-Cit 経口投与を行うことで、血中 L-Arg 濃度が上昇することが示された。そして、この血中 L-Arg 濃度の上昇に加え、血中 NOx 濃度が上昇傾向を示した。NOx は血中 NO 濃度を正確に反映していないかもしれないが、一つの可能性として、L-Cit 経口投与は NO 産生を増加させた可能性が考えられる。勃起時の平滑筋の弛緩に必要な NO が L-Cit 経口投与により十分に供給されることで勃起機能が改善したといえる。加えて、L-Cit の持続的な投与により、継続的な NO 産生の増加によって、陰茎海綿体への血流改善が生じ、平滑筋/膠原繊維の比率の減少を軽減した可能性がある。このことも勃起機能の改善につながったのではないかと考えられた (図 11)。

去勢は、前立腺、膀胱において酸化ストレスを誘導することが知られている [25-27]。また、I 型糖尿病モデルラットを用いた研究で、酸化ストレスが増加し、陰茎海綿体の膠原繊維が増加することで ED を発症することが報告されている [28]。一方、L-Cit が *in vitro*, *in vivo* において抗酸化作用を示した報告が存在する [29, 30]。このことから、去勢後の酸化ストレスによる陰茎海綿体の平滑筋/膠原繊維の比率の減少を L-Cit の抗酸化作用によって軽減した可能性が考えられた。L-Cit の陰茎海綿体に対する抗酸化作用も、勃起機能の改善に寄与した可能性が考えられる。

勃起は、ホルモンバランス、血管系及び神経系と様々な要素が影響する。テストステロンが中枢及び末梢の神経系において勃起機能の維持に関わるとの報告もある

[31]。しかし、今回の検討では、神経組織の解析は行っておらず、今後、骨盤神経叢における nNOS の発現量など、L-Cit 経口投与の神経系における解析が今後の検討課題と考えられる。

今回の L-Cit 経口投与は、ラットの安全性試験における最大量で投与した。ヒトにおいて単盲検試験ではあるが L-Cit 経口摂取により ED を改善した報告があり[32]、この報告における L-Cit 投与量は 1.5 g / body / day と今回の投与量と比較して少なかった。ただし、この報告では改善効果がみられなかった例も存在し、ED のモデルも特定されていない。今後、内分泌性 ED に対して適切な投与量の検討が必要と考えられる。

また、今回 Control 群に L-Cit を投与した群は作製していない。その理由として、Control 群の ICP は、収縮期圧で限定されており、海綿体の機能がより改善してもそれ以上上昇することはないと考えているからである。

以上より、内分泌性 ED の治療に対して L-Cit 経口投与は新たな治療法として有効である可能性が示唆された。今後、今回よりも少ない L-Cit 投与量における内分泌性 ED への効果、またヒトにおける内分泌性 ED の PDE5 阻害薬無効例に対する効果を検討したい。

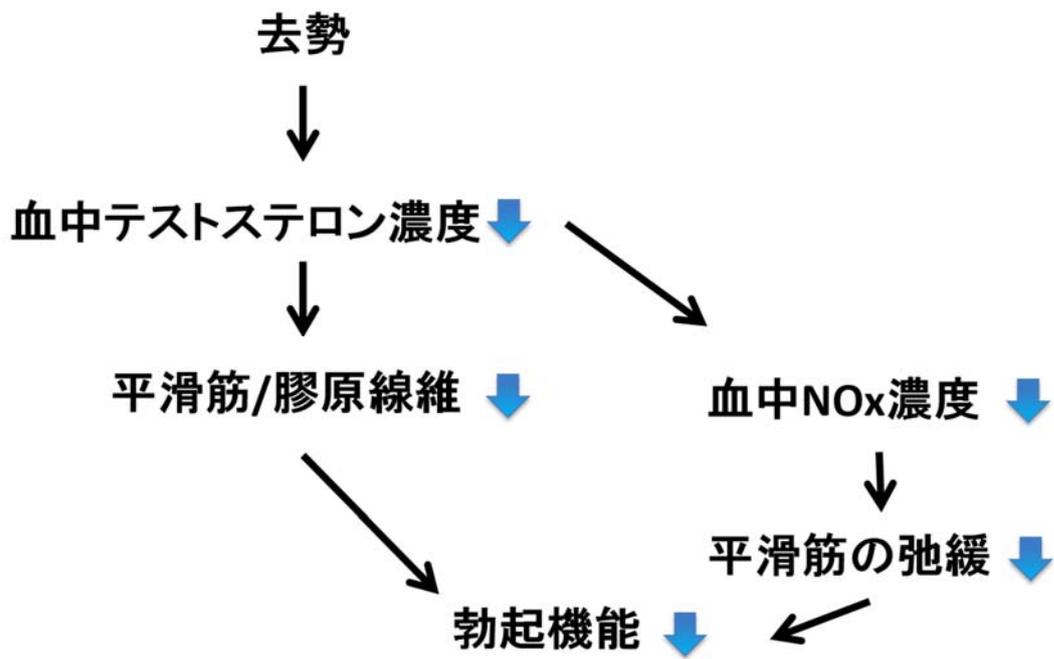


図 10 内分泌性 ED モデルの勃起機能に対する影響



図 11 内分泌性 ED に対する L-Cit 経口投与の効果

第五節 小括

1. L-Cit の経口投与によって、内分泌性 ED のモデルラットにおける勃起機能が改善されることが示された。
2. L-Cit の経口投与によって、血中 L-Arg 濃度が有意に上昇した。
3. L-Cit の経口投与による勃起機能の改善効果は、陰茎海綿体の平滑筋/膠原繊維の比率の改善が伴うことが示唆された。

第二章

動脈性勃起機能障害に対する L-Citrulline 経口投与の効果

第一節 背景

動脈性 ED は、動脈硬化や外傷により海綿体動脈や内陰部動脈などが障害を受け、陰茎海綿体に流入する血液量が不十分となり生じる。近年では、根治的前立腺摘出手術やスノーボード、バイク事故などの外傷による血管の侵襲が原因となった動脈性 ED が増加しており問題となっている。実際、根治的な前立腺全摘手術を受けた場合では、その後約 30%の患者が血管原性の ED を有するという報告がある [33]

現在の動脈性 ED に対する治療法の第一選択として PDE-5 阻害薬の投与が行われる [6]。しかし、この治療成績は必ずしも十分ではなく無効例が存在している。第二選択として陰茎動脈の血行再建術やプロスタグランジン E1 の海綿体注射が行われる。しかし、これらの治療法は侵襲性が高く、患者の身体的及び精神的な苦痛も問題となっている。このため、外傷性の動脈性 ED においては、新たな治療法が望まれている。

外傷による動脈性 ED の動物モデルとして、両側内腸骨動脈の結紮したラットのモデルが使用されている [34- 36]。このモデルでは、海綿体神経の刺激により測定された勃起機能が低下することが示されている。また、陰茎海綿体組織の繊維化により海綿体構造が崩壊することも知られている。ただし、このモデルにおける NO 産生の変動については明らかにされていない。アテローム性動脈硬化症のウサギの動脈性 ED モデルにおいては、陰茎海綿体内の NOS の発現量低下に伴う勃起機能の低下が報告されている [37]。また、虚血により NO 産生が低下することが報告されているため [38]、動脈硬化症による動脈性 ED では、NO 産生の低下が ED 発症の一因となっている可能性がある。一方、外傷による動脈性 ED においても陰茎虚血が生じており、NO 産生が低下していると予想される。NO 産生が低下すると、cGMP の合成量が減少するため、cGMP の分解を抑制する PDE-5 阻害薬の効果は低くなると考えられる。そこで、L-Cit 経口投与によって、NO 産生を増加させることで、動脈性 ED を改善できるのではないかと考えた。

本研究では、内腸骨動脈の両側結紮による外傷性の動脈性 ED モデルを使用し、NO 産生の増加が期待できる L-Cit 経口投与が勃起機能へ与える効果を調べ、動脈性 ED に対して新たな治療法となり得るかを検討した。

第二節 実験材料及び方法

(1) 対象

8 週齢, 雄性, Wistar-ST 系ラット (SLC Japan, Inc.) を用いた。自由飲水で餌も自由に摂取でき, 温度, 湿度, 12 時間毎の明暗コントロール下での飼育を行った。実験に使用する前に 1 週間の予備飼育を行った。

(2) 実験プロトコール

動脈性 ED において, 両側内腸骨動脈を結紮することで手術や交通外傷による ED のモデルとなるモデルラットが報告されており [34- 36], この報告に基づいて動脈性 ED モデルラットを作製した。両側内腸骨動脈結紮手術を行った群 (Ligation 群), sham 手術を行った群 (Control 群), 両側内腸骨動脈結紮手術後 1 週経過後から 3 週間 2% L-Cit 水の自由飲水を行った群 (Ligation+ L-Cit 群) の 3 群を設定し, 勃起機能を比較検討した。L-Cit の投与量は, 2000 mg / kg / day とした。各群 4 週間の飼育後に勃起機能, 陰茎海綿体組織の eNOS の mRNA 発現量の検討, NOx 濃度測定, 及び陰茎海綿体の組織学的検討を行った (図 12)。

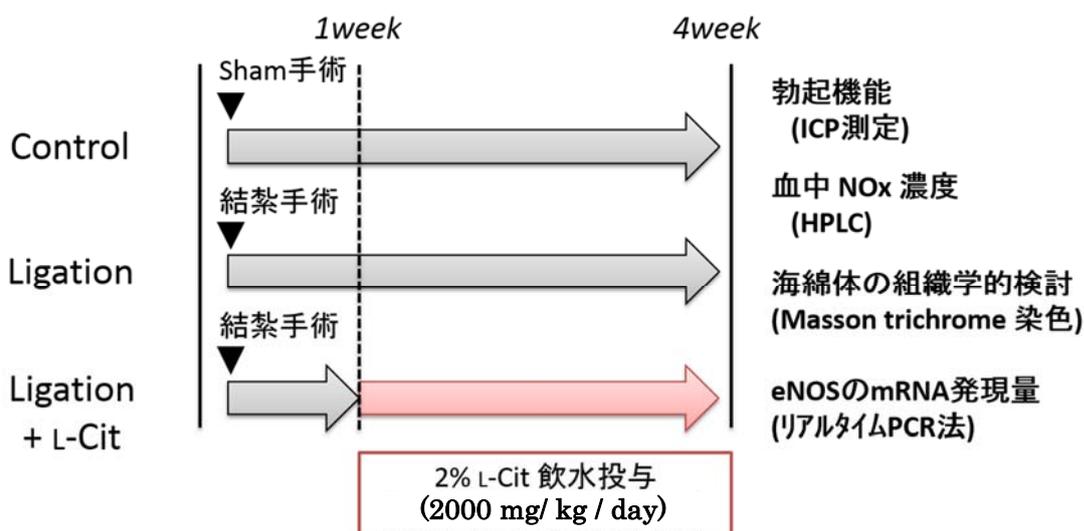


図 12 動脈性 ED モデルの実験プロトコール

(3) 両側内腸骨動脈結紮手術

ペントバルビタールナトリウム (50 mg / kg) 麻酔を腹腔内投与により行った。麻酔後、解剖板に、ビニールテープを用いて四肢を固定した。固定後、下腹部を正中切開して開腹した。開腹後、膀胱を体内から外側へ押し上げた。この際、膀胱が乾かないように生理食塩液で湿らせたキムワイプを用いて膀胱を支えるように固定した。そして、実体顕微鏡 (Olympus SZ[®]) 下で大動脈から 2 本に分岐している総腸骨動脈をまず片側同定した。次に同定した総腸骨動脈から枝分かれする内腸骨動脈を確認し、周りの血管や神経を傷つけないようにして単離した。単離した内腸骨動脈を糸により二重に結紮した。次に、もう片側の総腸骨動脈を同定した。同定されたもう片側の総腸骨動脈から枝分かれする内腸骨動脈を確認し、こちらも周りの血管や神経を傷つけないようにして単離し、糸により二重に結紮した。左右両側の内腸骨動脈結紮後、糸により縫い合わせることで閉腹した (図 13)。

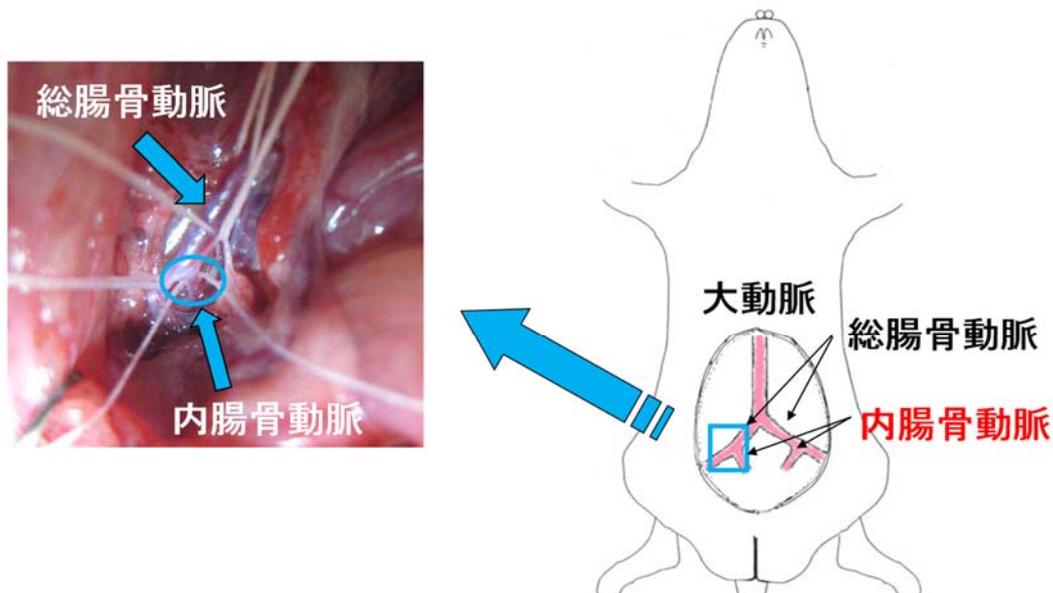


図 13 内腸骨動脈結紮による動脈性 ED モデルラットの作製

(4) 勃起機能の評価

第一章に準ずる。

(5) 採血と組織の摘出及び処理

第一章に準じて行い、亀頭側の陰茎は組織学的検討に使用した。また、陰茎脚側の陰茎は、陰茎背動脈と尿道海綿体を取り除くことで陰茎海綿体のみとして、eNOS の mRNA 発現量の検討に用いた。

(6) 全身血圧の測定

ラットを覚醒下にて、ラット-マウス非侵襲的自動血圧測定機 (BP-98A-L, Softron) を用いて、全身血圧を測定した。測定時の温度は、Warmer (THC-31, Softron) を使用することで 37°C を保った状態で平均血圧を測定した。1 個体毎に 3 回測定し、その平均値を比較した。

(7) eNOS の mRNA 発現量の検討

陰茎海綿体組織より、ISOGEN の添付プロトコールに沿って total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を得た。逆転写反応は、ReverTra Ace- α -[®] を用いて、Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) を用いて、42°C 20 分間、99°C 5 分間の条件で行った。

得られた cDNA を使用して Real-time PCR 法により定量を行った。PCR 反応は次の通りの組成 (表 2) 及び、primer (表 3) で、ABI Prism7300 (Applied Biosystems) を用いて 50°C 2 分間、95°C 15 秒間、60°C 1 分間 (40 サイクル) の反応条件で行った。 β -actin との比をとり解析を行った。

表 2 Real-time PCR 反応の組成

cDNA	2 μ L
Primer (5 μ M)	2 μ L
POWR SYBR PCR MASTER MIX	10 μ L
DW	6 μ L
Total	20 μ L

表 3 Real-time PCR に使用した primer

mRNA		Sequence	GenBank Accession No.
eNOS	Sense	5'- CCGGCGCTACGAAGAATG -3'	NM 021838
	Antisense	5'- CAGTGCCACGGATGGAAATT -3'	
β -actin	Sense	5'- TGTGTGGATTGGTGGCTCTATC -3'	NM 031144
	Antisense	5'- CATCGTACTCCTGCTTGCTGATC -3'	

(8) 血中 NOx 濃度測定
第一章に準ずる。

(9) 陰茎海綿体の組織学的検討
第一章に準ずる。

(10) 統計解析
第一章に準ずる。

第三節 結果

1) 体重, 飲水量, 精巣重量, 血中テストステロン濃度, 及び全身血圧

各群間で, 体重, 飲水量, 精巣重量, 血中テストステロン濃度, 及び全身血圧に有意な変動は認められなかった (n=4- 6) (表 4)。

表 4 体重, 飲水量, 精巣重量, 血中テストステロン濃度, 及び全身血圧

	Control	Ligation	Citrulline
Body weight (g)	382.3 ± 8.2	387.9 ± 3.9	371.9 ± 7.9
Drinking water/day (mL)	41.9 ± 2.6	44.4 ± 3.4	42.0 ± 4.9
Weight of testis (g)	1.50 ± 0.03	1.54 ± 0.02	1.50 ± 0.04
Bio-T (ng/mL)	0.65 ± 0.07	0.76 ± 0.10	0.54 ± 0.04
Mean arterial blood pressure (mmHg)	99.1 ± 1.3	86.4 ± 2.9	95.7 ± 6.0

2) 勃起機能 (ICP/MAP)

ICP/MAP は Ligation 群では, 0.15 ± 0.01 (n=4) と Control 群の 0.51 ± 0.05 (n=4) と比較して有意に減少した ($p < 0.05$)。一方, Ligation + L-Cit 群では, 0.47 ± 0.04 (n=4) と Ligation 群と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$) (図 14)。

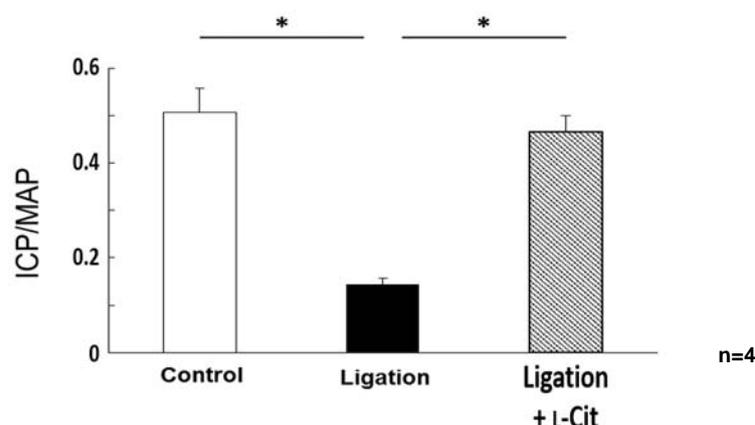


図 14 動脈性 ED モデルにおける ICP/MAP 測定結果

ICP の測定を行い, MAP との比率をとり ICP/MAP を算出し比較した。Ligation 群では Control 群と比較して ICP/MAP が有意に低下したが, Ligation + L-Cit 群ではこの低下が有意に改善された。n = 4, *p < 0.05

3) eNOS の mRNA 発現量

陰茎海綿体組織における eNOS の mRNA 発現量は, Ligation 群 (n=2) では, Control 群 (n=2) との比は 0.67 と有意な差はないものの低下傾向を示した。Ligation+ L-Cit 群では, 0.94 ± 0.18 (n=3) だった (図 15)。

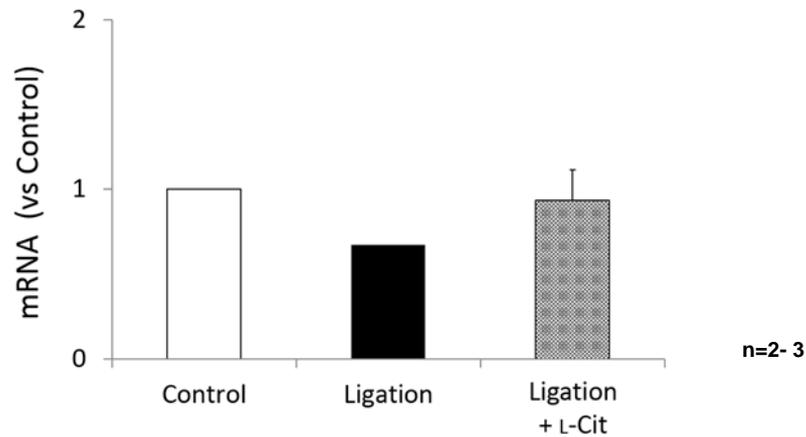


図 15 動脈性 ED モデルにおける eNOS の mRNA 発現量

リアルタイム PCR 法により, 陰茎海綿体組織の mRNA 発現量を検討した。Ligation 群では Control 群と比較して減少傾向を示した。n = 2- 3。

4) 血中 NOx 濃度

血中 NOx 濃度は Ligation 群では, $20.5 \pm 1.1 \mu\text{M}$ (n=4) と Control 群の $28.9 \pm 2.4 \mu\text{M}$ (n=4) と比較して有意に減少した ($p < 0.05$)。一方, Ligation + L-Cit 群では, $32.0 \pm 1.4 \mu\text{M}$ (n=4) と Ligation 群と比較して有意に上昇した ($p < 0.05$) (図 16)。

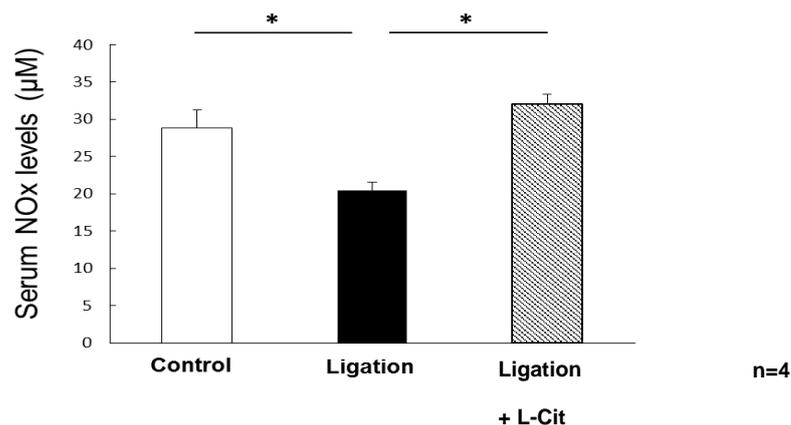


図 16 動脈性 ED モデルにおける 血中 NOx 濃度測定結果

結紮手術後 4 週間後の血中 NOx 濃度を HPLC により測定した。Control 群と比較して Ligation 群では有意に減少し, Ligation + L-Cit 群ではこの減少が有意に改善した。n = 4, * $p < 0.05$ 。

5) 陰茎海綿体の組織学的検討

Masson trichrome 染色により、平滑筋が赤く、膠原繊維が青く染まった。そして、SM/Collagen 比を数値化し、棒グラフに示した。Ligation 群では $6.2 \pm 1.0\%$ ($n=3$) と Control 群の $13.8 \pm 0.7\%$ ($n=3$) と比較して有意に SM/Collagen 比が減少した ($p < 0.05$)。Ligation + Cit 群では $14.2 \pm 0.5\%$ ($n=3$) と Ligation 群と比較して有意に SM/Collagen 比が増加した ($p < 0.05$) (図 17)。

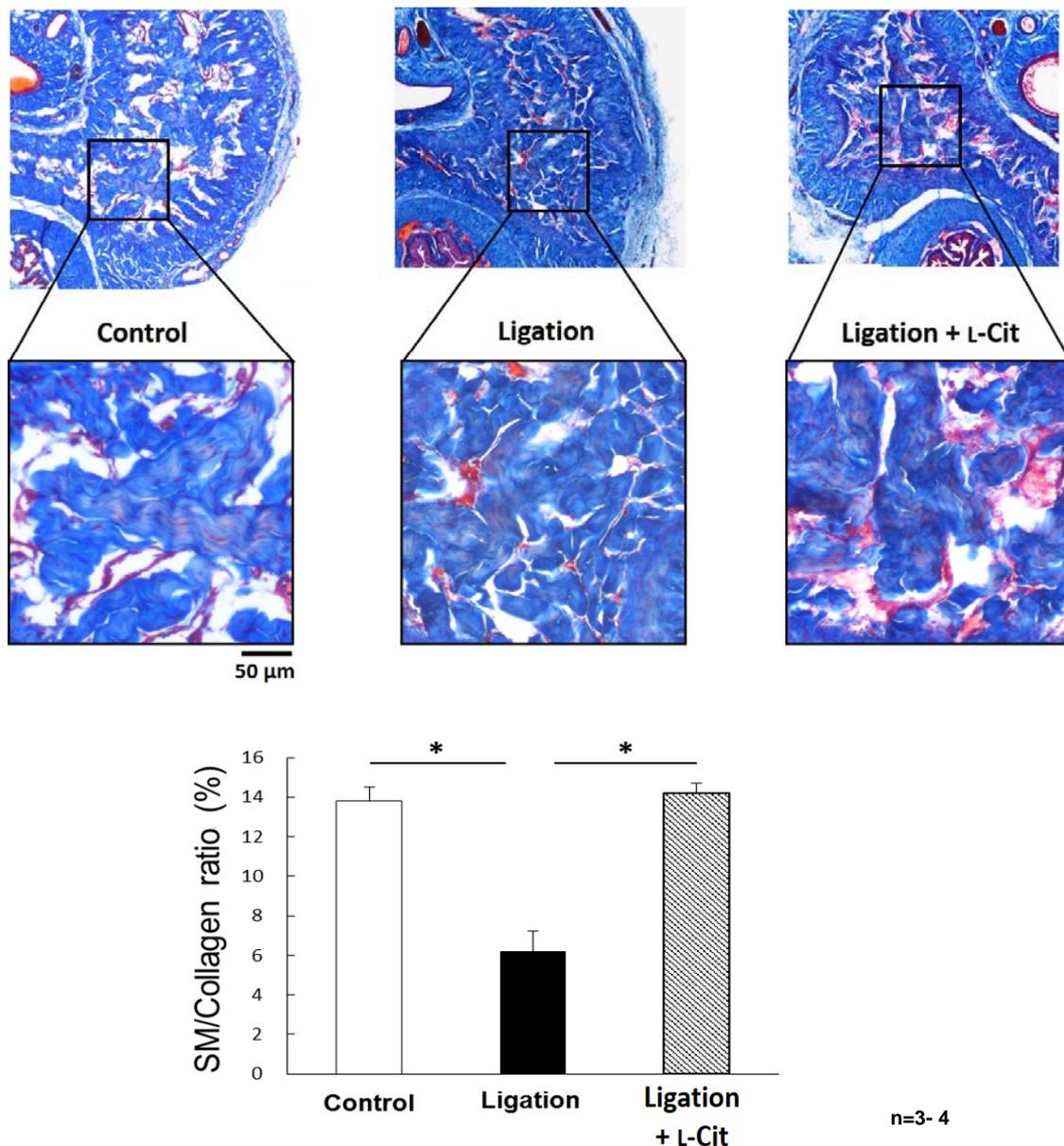


図 17 動脈性 ED モデルにおける陰茎海綿体の組織学的検討

各群の陰茎海綿体組織を Masson trichrome 染色により組織学的検討を行った。Control 群と比較して Ligation 群における SM/Collagen 比が有意に減少した。そして、Ligation + L-Cit 群ではこの SM/Collagen 比の減少が有意に改善した。n = 3- 4, *P < 0.05。

第四節 考察

本研究では、両側の内腸骨動脈を結紮することにより動脈性 ED モデルを作製し、L-Cit 経口投与の勃起機能への効果を検討した。その結果、内腸骨動脈結紮により勃起機能は低下したが、L-Cit 経口投与によって有意に改善した。

今回の動脈性 ED モデルでは、内腸骨動脈を結紮するという外傷性かつ限局性の動脈性 ED を反映したモデルである [34]。ICP 測定の結果から内腸骨動脈結紮を行っても勃起機能が完全に消失していなかった。勃起機能が完全に消失しないことは、過去の報告においても同じ結果であった [36]。また、外見上壊死も生じていなかった。これは、結紮部位より下部の完全虚血とはなっていないことを意味している。

内腸骨動脈結紮を行った結果、血中 NOx レベルが有意な差をもって減少していた。このことから、本動脈性 ED モデルにおいては、勃起に必要な NO が不足することで ED を発症している可能性が示唆された。そこで、血管内皮の NOS である eNOS に着目して、陰茎海綿体内の mRNA 発現量を調べた結果、内腸骨動脈結紮により、eNOS の mRNA 発現量は低下傾向を示した。タンパクの発現量や活性を調べる必要はあるものの、NO 産生の低下は eNOS の発現量低下が関わっているかもしれない。動脈性 ED において PDE-5 阻害薬の無効症例が存在する理由は、NO 産生自体が不足しているためと考えられる。このため、PDE-5 阻害薬により cGMP の分解を阻害しても、海綿体平滑筋が十分に弛緩しないと考えられる。一方、L-Cit 経口投与は NO 産生を有意に改善し、平滑筋を十分に弛緩させ、勃起機能の改善に寄与したと考えられる。

また、NO には、脳梗塞モデルラットや、局所の虚血モデルマウスによって血管新生作用を示唆する報告がある [39, 40]。L-Cit 経口投与によって NO 産生が増加したことで側副血行路が発達し、陰茎の虚血状態が改善した可能性が考えられる。陰茎への血流が改善することで、勃起に必要な血液流入量が増加し、勃起機能改善の一因になったと考えられる (図 18,19)。

内腸骨動脈結紮により平滑筋/膠原繊維の比率が減少した。低酸素、低栄養により陰茎海綿体平滑筋の構造変化が引き起こされることが報告されているため [41]、今回の内腸骨動脈結紮において、陰茎海綿体組織が低酸素、低栄養の状態になったと考えられる。平滑筋/膠原繊維の比率減少が、L-Cit 経口投与で改善したことは、前述した側副血行路の発達にしたことによる陰茎海綿体周囲の血行動態が改善したことが要因ではないかと考えられる。一方、第一章でも述べた様に L-Cit には抗酸化作用も報告されている [29, 30]。この報告の中で、陰茎海綿体の虚血は、酸化ストレスにより陰茎組織へ障害を生じることが示されているため、本動脈性 ED モデルにおいても虚血により生じたと考えられる陰茎組織の平滑筋/膠原繊維の比率減少を L-Cit 経口投

与が抗酸化作用によっても軽減させたのではないかと考えられる。

L-Cit 経口投与による副作用を懸念して、体重、飲水量、精巣重量、血中テストステロン濃度、全身血圧を調べた。体重、飲水量には、変動がみられず、L-Cit 経口投与はこれらに影響していないと考えられる。また、精巣重量や血中テストステロン濃度に各群有意な差はなく、このモデルでは性腺機能へ影響を与えないことが示唆された。全身血圧も変動はみられず、今回の L-Cit 投与では全身血圧の低下といった副作用は生じていないと考えられる。

以上より、動脈性 ED の治療に対して L-Cit 経口投与が有効であることが示唆された。動脈性 ED 患者における、PDE-5 阻害薬が無効な場合でも、L-Cit の経口摂取はある程度の効果が期待できる。そして今後、動脈性 ED において、今回よりも少ない L-Cit 投与量における検討や PDE-5 阻害薬との併用効果を検討したい。

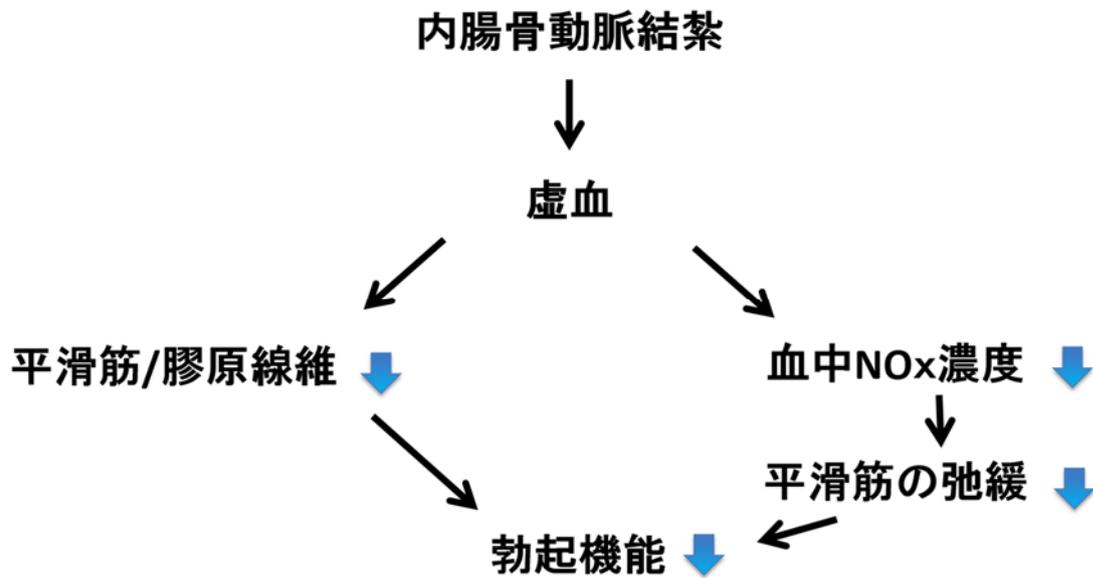


図 18 動脈性 ED モデルの勃起機能に対する影響

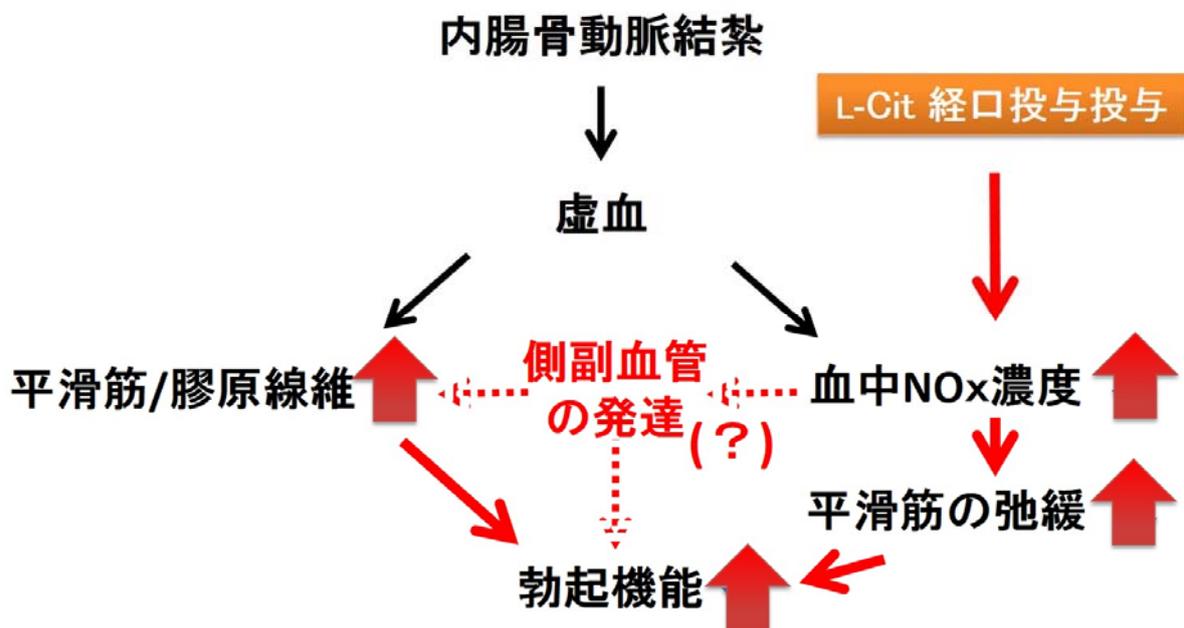


図 19 動脈性 ED に対する L-Cit 経口投与の効果

第五節 小括

1. L-Cit の経口投与によって、動脈性 ED モデルラットにおける勃起機能が改善されることが示された。
2. L-Cit の経口投与による勃起機能の改善効果は、NO 産生の増加及び陰茎海綿体の平滑筋/膠原繊維の比率の改善が伴っていた。

総括

ED の治療には PDE-5 阻害薬が使用されるが、無効症例が存在し、この原因が上流の NO が不足していることが考えられた。L-Cit 経口投与によって、不足した NO を補い、勃起機能を改善できる可能性を予想して研究を行った。NO 産生を増加させる方法として、NO 産生の原料となる L-Arg の血中濃度を効率的に上昇させる L-Cit 経口投与について検討した。第一章では内分泌性 ED について、第二章では動脈性 ED について、各々の ED モデルラットにおける勃起機能が L-Cit 経口投与によって改善されることを明らかにした。実際に、L-Cit 経口投与により血中 L-Arg 濃度は有意に上昇していた。L-Cit 経口投与による勃起機能の改善効果は、NO 産生の増加及び陰茎海綿体の平滑筋/膠原繊維の比率の改善が伴うことが示唆された。また、L-Cit 経口投与は、全身血圧の低下といった副作用は認められず、動脈性 ED 及び内分泌性 ED において、安全かつ簡便な ED 治療法として期待される。今後、L-Cit と PDE-5 阻害薬の併用効果の検討や、ヒトでの PDE-5 阻害薬無効症例に対する臨床試験を行いたいと考える。

引用文献

1. T Rimando AM, Perkins-Veazie PM
Determination of citrulline in watermelon rind.
J Chromatogr A. 2005 Jun 17;1078(1-2):196-200.
2. Edmonds MS, Lowry KR, Baker DH.
Urea cycle metabolism: effects of supplemental ornithine or citrulline on performance, tissue amino acid concentrations and enzymatic activity in young pigs fed arginine-deficient diets.
J Anim Sci. 1987 Sep;65(3):706-16.
3. Raghavan SA, Dikshit M.
L-citrulline mediated relaxation in the control and lipopolysaccharide-treated rat aortic rings.
Eur J Pharmacol. 2001 Nov 9;431(1):61-9.
4. Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K.
Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men.
Int J Cardiol. 2012 Mar 8;155(2):257-61.
5. Norris KA, Schrimpf JE, Flynn JL, Morris SM Jr.
Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*.
Infect Immun. 1995 Jul;63(7):2793-6.
6. 日本精機脳学会 ED 診療ガイドライン 2012 版作成委員会 編
ED 診療ガイドライン 2012 年版
7. Smith EA, Macfarlane GT.
Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria.
Anaerobe. 1997 Oct;3(5):327-37.
8. Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L.

Almost all about citrulline in mammals.

Amino Acids. 2005 Nov;29(3):177-205. Epub 2005 Aug 8.

9. Mandel H, Levy N, Izkovitch S, Korman SH.
Elevated plasma citrulline and arginine due to consumption of *Citrullus vulgaris* (watermelon).
J Inherit Metab Dis. 2005;28(4):467-72.
10. Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH.
Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism.
Br J Clin Pharmacol. 2008 Jan;65(1):51-9.
11. Wijnands KA, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA, Poeze M.
Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia.
PLoS One. 2012;7(5):e37439.
12. Price DE, Gingell JC, Gepi-Attee S, Wareham K, Yates P, Boolell M.
Sildenafil: study of a novel oral treatment for erectile dysfunction in diabetic men.
Diabet Med. 1998 Oct;15(10):821-5.
13. Purifoy FE, Koopmans LH, Mayes DM.
Age differences in serum androgen levels in normal adult males.
Hum Biol. 1981 Dec;53(4):499-511.
14. Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT; EMAS Group.
Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men.
N Engl J Med. 2010 Jul 8;363(2):123-35.
15. 日本泌尿器科学会 / 日本 Men's Health 医学会 編集
LOH 症候群 加齢男性性腺低下症候群 診療の手引き
16. Zhang XH, Morelli A, Luconi M, Vignozzi L, Filippi S, Marini M, Vannelli GB,

Mancina R, Forti G, Maggi M.

Testosterone regulates PDE5 expression and in vivo responsiveness to tadalafil in rat corpus cavernosum.

Eur Urol. 2005 Mar;47(3):409-16

17. Jain P, Rademaker AW, McVary KT.

Testosterone supplementation for erectile dysfunction: results of a meta-analysis.

J Urol. 2000 Aug;164(2):371-5.

18. Vigen R, O'Donnell CI, Barón AE, Grunwald GK, Maddox TM, Bradley SM, Barqawi A, Woning G, Wierman ME, Plomondon ME, Rumsfeld JS, Ho PM. Association of testosterone therapy with mortality, myocardial infarction, and stroke in men with low testosterone levels.

JAMA. 2013 Nov 6;310(17):1829-36.

19. Reilly CM, Stopper VS, Mills TM.

Androgens modulate the alpha-adrenergic responsiveness of vascular smooth muscle in the corpus cavernosum.

J Androl. 1997 Jan-Feb;18(1):26-31.

20. Lugg JA, Rajfer J, González-Cadavid NF.

Dihydrotestosterone is the active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat.

Endocrinology. 1995 Apr;136(4):1495-501.

21. Chamness SL, Ricker DD, Crone JK, Dembeck CL, Maguire MP, Burnett AL, Chang TS.

The effect of androgen on nitric oxide synthase in the male reproductive tract of the rat.

Fertil Steril. 1995 May;63(5):1101-7.

22. Zhang MG, Wu W, Zhang CM, Wang XJ, Gao PJ, Lu YL, Shen ZJ.

Effects of oral finasteride on erectile function in a rat model.

J Sex Med. 2012 May;9(5):1328-36.

23. シトルリン反復投与安全性試験

協和発酵バイオ(株) 社内資料

24. Kataoka T, Hotta Y, Maeda Y, Kimura K.
Assessment of Androgen Replacement Therapy for Erectile Function in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus by Examining Nitric Oxide-Related and Inflammatory Factors.
J Sex Med. 2014 Jan 28. doi: 10.1111/jsm.12447.
25. Fartes G, Lorenzetti F, Salvador LB, Ortiz V, Dambros M.
Antioxidant supplementation decreases the cell death rate in the prostatic stromal tissue of long-term castrated rats.
Int Braz J Urol. 2012 May-Jun;38(3):419-25.
26. Ludwig L, Seraphim D, Lorenzetti F, Bertolla RP, Ortiz V, Dambros M.
Inhibitory activity of α -tocopherol on apoptosis in the rat bladder wall subjected to androgen deprivation.
Neurourol Urodyn. 2011 Jan;30(1):194-8.
27. Kracochansky M, Reis LO, Lorenzetti F, Ortiz V, Dambros M.
Impact of castration with or without alpha-tocopherol supplementation on the urethral sphincter of rats.
Int Braz J Urol. 2012 Mar-Apr;38(2):277-83.
28. Suresh S, Prakash S.
Effect of *Mucuna pruriens* (Linn.) on oxidative stress-induced structural alteration of corpus cavernosum in streptozotocin-induced diabetic rat.
J Sex Med. 2011 Jul;8(7):1943-56.
29. Akashi K, Miyake C, Yokota A.
Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger.
FEBS Lett. 2001 Nov 23;508(3):438-42.
30. Hayashi T, Juliet PA, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Iguchi A, Ignarro LJ.
L-Citrulline and L-arginine supplementation retards the progression of high-cholesterol-diet-induced atherosclerosis in rabbits.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 20;102(38):13681-6.
31. Suzuki N, Sato Y, Hisasue S, Kato R, Suzuki K, Tsukamoto T.

Effect of testosterone on intracavernous pressure elicited with electrical stimulation of the medial preoptic area and cavernous nerve in male rats.
J Androl. 2007 Mar-Apr;28(2):218-22.

32. Cormio L, De Siati M, Lorusso F, Selvaggio O, Mirabella L, Sanguedolce F, Carrieri G.
Oral L-citrulline supplementation improves erection hardness in men with mild erectile dysfunction.
Urology. 2011 Jan;77(1):119-22.
33. Rogers RS, Graziottin TM, Lin CS, Kan YW, Lue TF.
Intracavernosal vascular endothelial growth factor (VEGF) injection and adeno-associated virus-mediated VEGF gene therapy prevent and reverse venogenic erectile dysfunction in rats.
Int J Impot Res. 2003 Feb;15(1):26-37.
34. El-Sakka A, Yen TS, Lin CS, Lue TF.
Traumatic arteriogenic erectile dysfunction: a rat model.
Int J Impot Res. 2001 Jun;13(3):162-71.
35. Lee MC, El-Sakka AI, Graziottin TM, Ho HC, Lin CS, Lue TF.
The effect of vascular endothelial growth factor on a rat model of traumatic arteriogenic erectile dysfunction.
J Urol. 2002 Feb;167(2 Pt 1):761-7.
36. Hotta Y, Ohno R, Kataoka T, Mikumo M, Takahata Y, Ohno M, Maeda Y, Kimura K.
Effects of chronic vardenafil treatment persist after end of treatment in rats with acute arteriogenic erectile dysfunction.
J Sex Med. 2012 Jul;9(7):1782-8.
37. Azadzo KM, Master TA, Siroky MB.
Effect of chronic ischemia on constitutive and inducible nitric oxide synthase expression in erectile tissue.
J Androl. 2004 May-Jun;25(3):382-8.
38. Ito Y, Ohkubo T, Asano Y, Hattori K, Shimazu T, Yamazato M, Nagoya H, Kato Y, Araki N.
Nitric oxide production during cerebral ischemia and reperfusion in eNOS- and

nNOS-knockout mice.

Curr Neurovasc Res. 2010 Feb;7(1):23-31.

39. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, Chopp M.

Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat.

Circ Res. 2003 Feb 21;92(3):308-13.

40. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R.

Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia.

FASEB J. 2001 Nov;15(13):2530-2.

41. Tal R, Mueller A, Mulhall JP.

The correlation between intracavernosal pressure and cavernosal blood oxygenation.

J Sex Med. 2009 Oct;6(10):2722-7.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心な御指導、御教授を頂いた名古屋市立大学大学院薬学研究科の木村和哲教授に心より感謝の意を表します。そして、本論文をご精読頂き、熱心なご指導を頂きました本論文審査主査の湯浅博昭教授、副査の山村寿男准教授、中村克徳准教授に深謝いたします。また、様々な場面で、御指導、御教授を頂きました、前田康博講師に深く感謝申し上げます。本研究を通して、研究の進め方やまとめ方、さらに基本的な実験手技にいたるまで、昼夜を問わず熱心に御指導頂いた堀田祐志助教に心より感謝申し上げます。NO_xの測定を行って頂いた協和発酵バイオ(株)の森田匡彦研究員に深く感謝申し上げます。動物のお世話をして頂いた動物舎の皆様にも深く感謝申し上げます。4年間の研究生活において、様々なアドバイスや実験を手伝ってくださった片岡智哉さん、本成真理奈さんをはじめ病院薬剤学の皆様に深く感謝いたします。この他、現在所属している職場である名古屋市立大学病院薬剤部の皆様など、ここにすべてのお名前を挙げることはできませんが、気にかけてくださった多くの方々に心より感謝いたします。最後に、折に触れ励まし、見守り続けてくれた家族と友人に深く感謝いたします。