



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1439号
学位記番号	第300号
氏名	片岡 智哉
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	勃起障害に対する Androgen 補充療法の有効性の研究
論文審査担当者	主査： 藤井 聡 副査： 木村 和哲，林 秀敏，今泉 祐治

名古屋市立大学学位論文

勃起障害に対する

Androgen 補充療法の有効性の研究

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

片岡 智哉

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	藤井	聡	教授
副査	今泉	祐治	教授
副査	林	秀敏	教授
副査	木村	和哲	教授

2. 本論文は、学術雑誌に収載された次の報文を基礎とするものである。

- 1) Tomoya Kataoka, Yuji Hotta, Masae Ohno, Yasuhiro Maeda, Kazunori Kimura

Limited Effect of Testosterone Treatment for Erectile Dysfunction Caused by High Estrogen Levels in Rats

*International Journal of Impotence Research* 25, 201-205 (2013).

- 2) Tomoya Kataoka, Yuji Hotta, Yasuhiro Maeda, Kazunori Kimura

Assessment of Androgen Replacement Therapy on Erectile Function in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus by Examining Nitric Oxide-related and Inflammatory Factors

*The Journal of Sexual Medicine*, 11(4):920-929 (2014).

- 3) Tomoya Kataoka, Yuji Hotta, Yasuhiro Maeda, Kazunori Kimura

Testosterone Deficiency Causes Endothelial Dysfunction via Elevation of Asymmetric Dimethylarginine and Oxidative Stress in Castrated Rats

*The Journal of Sexual Medicine*, 14(12):1540-1548 (2017).

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	1
序章	3
第一章 過剰な <b>Estrogen</b> レベルによる <b>Androgen</b> 低下に伴う勃起障害に対する ART の検討	
I 背景	7
II 実験材料および方法	8
III 実験結果	14
IV 考察	19
第二章 2 型糖尿病を伴うモデルラットにおける <b>Androgen</b> 低下時の勃起障害に対す る ART の効果	
I 背景	23
II 実験材料および方法	24
III 実験結果	30
IV 考察	38
第三章 去勢ラットにおける <b>Androgen</b> 低下時の勃起機能に対する ART の効果	
I 背景	41
II 実験材料および方法	42
III 実験結果	46
IV 考察	51
総括	52
引用文献	55
謝辞	61

## 略語

ACN:	acetonitrile
ACh:	acetylcholine
ADMA:	asymmetric dimethylarginine
AP:	arterial pressure
ART:	androgen replacement therapy
bio-T:	bioavailable testosterone
BMI:	body mass index
Cast:	castration
cDNA:	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP:	cyclic guanosine monophosphate
DHEA:	dehydroepiandrosterone
DHT:	dihydrotestosterone
DNA:	deoxyribonucleic acid
dNTP:	deoxynucleotide triphosphate
ED:	erectile dysfunction
eNOS:	endothelial nitric oxide synthase
ES:	estrogen
ESI:	electrospray ionization
GAPDH:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GnRH:	gonadotropin-releasing hormone
HbA1c:	hemoglobin A1c
ICP:	intracavernous pressure
IL-6:	interleukin 6
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
LC-MS/MS:	liquid chromatography–tandem mass spectrometry
LETO:	Long-Evans Tokushima Otsuka
LH:	luteinizing hormone
LOH:	late-onset hypogonadism
MAP:	mean arterial pressure
MMAS:	Massachusetts male aging study
MRM:	multiple reaction monitoring
NA:	noradrenaline
NADPH:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF- $\kappa$ B:	nuclear factor-kappa B
NO:	nitric oxide
NOS:	nitric oxide synthase
OLETF:	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PE:	polyethylene
PKG:	protein kinase G
PSA:	prostate-specific antigen
QOL:	quality of life
RNA:	ribonucleic acid
RNase:	ribonuclease
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction
SM:	smooth muscle
SNP:	sodium nitroprusside
Sirt1:	sirtuin 1
TG:	triglyceride
THF:	tetrahydrofuran
TNF- $\alpha$ :	tumor necrosis factor alpha
UPLC-MS/MS:	ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
VE:	vitamin E

## 序章

男性ホルモン (androgen) は様々な臓器に作用し、恒常性の維持に深く関わっている<sup>1-2)</sup>。Androgen には testosterone、dihydrotestosterone (DHT)、androstenedione などがあり、中でも testosterone が病態生理に重要な役割を果たしている<sup>3)</sup>。Testosterone は視床下部より放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) が刺激となり、下垂体前葉から黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) が放出され、精巣の leydig 細胞より産生される。testosterone は、脂肪組織に多く含まれる aromatase により estradiol や estrone などの女性ホルモン (estrogen) に代謝される。Estrogen 値が増加すると視床下部に作用し、ネガティブフィードバック機構により testosterone 産生が減少する。また、脂肪組織から放出される TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインは GnRH の作用を減弱させるため、testosterone の産生量が減少する<sup>3)</sup>。さらに、脂肪組織より放出される leptin は精巣中に受容体が多く存在し、leptin が過剰になると testosterone の産生量を減少する<sup>4)</sup>。また、加齢に伴い leydig 細胞数が減少すると、testosterone 値が低下する。一方、副腎性 androgen の dehydroepiandrosterone (DHEA) は testosterone へと代謝されるが、DHEA も加齢によって産生量が低下する<sup>5)</sup>。このように testosterone 低下に伴う種々の疾患を testosterone 欠乏症、もしくは androgen 欠乏症という。特に加齢に伴う androgen 低下による種々の症状をあらわす病態を加齢男性性腺機能低下 (late-onset hypogonadism; LOH) 症候群とよぶ。LOH 症候群の病態は多様で、性欲低下や勃起機能障害 (erectile dysfunction; ED) などの性機能症状だけでなく、睡眠障害、記憶力低下、集中力低下、落胆、抑うつ、苛立ち、不安、疲労感などの精神心理症状や、骨、関節、筋肉関連症状、発汗、ほてりなどの多彩な身体症状を呈する<sup>5)</sup>。

Androgen が男性性機能にとって重要であることは古くから知られており、testosterone の低下によって引き起こされる ED を一般に内分泌性 ED という<sup>1, 6)</sup>。International Society of Impotence Research が 1999 年に発表した ED の分類では内分泌性 ED は器質性 ED の一種である。器質性 ED には他に、動脈性 ED と静脈性 ED を含めた血管性 ED、神経性 ED および解剖性 ED がある。器質性 ED とは別に心因性 ED があり、ED は大きく分けてこれら 2 つに分類されている<sup>1)</sup>。近年は国際的な高齢化によって性機能障害をはじめとする男性更年期の問題に対する認識が高まり、内分泌性 ED の治療が注目されるようになった。1994 年に北米で行われた大規模疫学調査マサチューセッツ男性加齢研究 (Massachusetts Male Aging Study; MMAS) では、40~70 歳の男性 1290 人を対象に、患者本人による ED の重症度分類が行われ、52% の人が何らかの ED を有し、10% の人は、完全 ED を有している事がわかった<sup>7)</sup>。2010 年に発表された欧州での大規模臨床研究では、40~79 歳の男性 3369 人を対象に androgen と

LOH 症候群の各症状との関係を検討した結果、androgen 低下と勃起機能低下の間に有意な相関が見られることが示された<sup>8)</sup>。本邦では、1998 年に MMAS と同形式質問票を用いて疫学調査が行われた。その結果 30～79 歳の男性における ED 患者数は中等度、完全 ED あわせて約 1,130 万人と推定された<sup>9)</sup>。

ED 治療の第一選択は PDE-5 阻害薬である<sup>6)</sup>。しかし、高齢者や糖尿病患者では多くの場合 androgen 値が低く内分泌性 ED を発症しており、PDE-5 阻害薬の無効例が約 4 割と他の疾患に比べて多い<sup>3)</sup>。PDE-5 阻害薬の無効例にはプロスタグランジン E1 の海綿体注射やプロステーシス挿入手術が行われ、高い効果を得られているが、侵襲性の高さや高額な医療費が問題となっている。そのため、androgen 値が低下している場合には、androgen 補充療法 (androgen replacement therapy; ART) が施行される場合がある。しかし、Jain らのメタアナライシス研究によると、ART 有効性は 57.0%だったと報告されており、投与方法を工夫して、より効果的な ART の確立が必要とされている<sup>10)</sup>。そこで本研究では LOH 症候群をはじめ性ホルモンに関連した内分泌性 ED の治療に応用できるよう、種々の内分泌性 ED モデルラットを用い、勃起機能に対する ART の有効性を検討し、その作用メカニズムの解明を試みた。





## 第一章

過剰な Estrogen レベルによる

Androgen 低下に伴う勃起障害に対する ART の検討

## I. 背景

勃起は複雑なメカニズムにより制御されている<sup>11)</sup>。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。非勃起時には noradrenaline (NA) のような収縮物質によって海綿体平滑筋の収縮反応が制御されている。これまでの研究では海綿体平滑筋の弛緩反応に注目した報告がなされてきた。しかし近年、海綿体平滑筋の弛緩だけでなく収縮とのバランスも重要であると考えられるようになってきた。収縮系のひとつとして RhoA/Rho-kinase 経路あげられる。糖尿病やメタボリックシンドロームといった ED を引き起こすとされる疾患では、RhoA/Rho-kinase 経路が過剰に活性化されているとの報告がある<sup>12-14)</sup>。さらに中高年男性でも RhoA/Rho-kinase 経路が過剰に活性化されている<sup>15)</sup>。また、Rho-kinase 阻害剤の Y-27632 が老齢ラットの勃起機能を改善させたとの報告もある<sup>16)</sup>。

一方、他のホルモンによる ED のリスクファクターのひとつとして高 estrogen レベルが示唆されている<sup>17-24)</sup>。例えば Srilatha らは中高年男性において estrogen レベルが高いと性欲が低下していることを報告している<sup>19-20)</sup>。また、Baser らは estrogen レベルと男性の加齢による機能との負の相関を報告している<sup>17)</sup>。

Estrogen レベルと ED に関する基礎研究では、Goyal らが高 estrogen レベルによりラットの陰茎の正常な成長を阻害することや陰茎中の testosterone レベルを低下させることを示している<sup>21)</sup>。また、Adaikan らは estrogen 投与によりラットに ED を発症させることや、ウサギを用いて陰茎海綿体平滑筋の収縮性の亢進、および弛緩反応の低下を引き起こすことを報告している<sup>23-24)</sup>。これらの報告では高 estrogen レベルによる ED 発症を示しているが、同時に testosterone レベルの低下も示している。これまで高 estrogen レベルによって引き起こされた androgen 欠乏症に対して ART を施行した報告はなく、その効果は不明である。

本研究では estrogen が勃起機能に及ぼす影響を検討し、さらに高 estrogen レベルにより引き起こされた ED に対して ART が有効であるかラットを用いて検討した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 使用動物

13 週齢の雄性 Wistar-ST ラット (Japan SLC Inc, Hamamatsu Japan) を用いた。動物は、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 時間ごとの明暗サイクルで温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。

### 2. 実験プロトコール

#### ・ estrogen 投与による ED モデルラットの確立と ART

本研究では内分泌性 ED の病態を検討するため、2 週間の観察期間を設け、勃起機能の評価を行った。図 1 に示したように、13 週齢雄性 Wistar-ST ラットに対して estrogen として estradiol ( $3 \mu\text{g/kg/day}$ ) を 2 週間皮下投与した (ES 群)。一方、ES 群に対して androgen として testosterone ( $3 \text{ mg/kg/day}$ ) を 2 週間皮下投与し ART を行った (ES + ART 群)。対照群には溶媒のみを皮下投与した (Control 群)。なお、estradiol および testosterone は 1% Tween® 生理食塩水に溶解し、注射溶液として用いた。

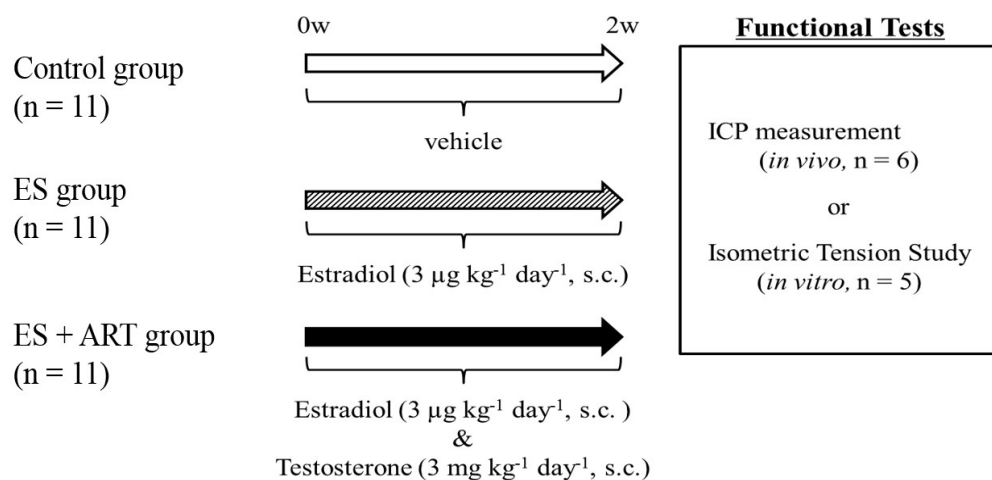


図 1. 内分泌性 ED の病態の検討の実験プロトコール

### 3. 血液サンプルおよび組織摘出

血中の性ホルモン濃度分析用に観察期間終了後、下大静脈より血液を採取し、血液が凝固した後 4 °C、800 g で 20 分間遠心分離を行い、血清を得た。得られた血清は分析まで -80 °C で保存した。また、組織学的分析用に ICP 測定終了後、陰茎を摘出し、4%ホルマリン溶液に一晩静置し固定した。固定後 10%、20%、30%スクロース溶液に順次 10 時間以上静置しスクロース置換を行った。その後、組織を O.C.T. compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo Japan) を用いて包埋し、液体窒素を用いて凍結した。サンプルは分析まで -80 °C で保存した。

### 4. 血中性ホルモン濃度測定

#### 4-1) 性ホルモンを含まない血清（ゼロ血清）の調整

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 milli Q 6 mL で調製した DISPOSIL C<sub>18</sub> (GL Sciences, Tokyo Japan) にこの上清を吸着させ、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 milli Q 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。

#### 4-2) 検量線用溶液の調製

各性ホルモン testosterone, estrone, estradiol を ethanol に溶解し、1 mg/mL の標準液とした。Testosterone 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。また、estrone 標準液および estradiol 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 pg/mL となるように調製した。

#### 4-3) 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 を加えて混和し、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、bioavailable testosterone (bio-T) の測定を行った。反応後、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 µL および triethylamine 10 µL を加えて混和し、室温で 1 時間静置し、誘導体化の反応を行った。反応後、5% NaHCO<sub>3</sub> 500 µL を加え、あらかじめ methanol 1 mL および milli Q 1 mL でコンディショニングした Oasis HLB cartridge (30 mg, C<sub>18</sub>; Waters Corporation, MA USA) に移し、固相に吸着させた。5% NaHCO<sub>3</sub> 1 mL、milli Q 1 mL、5% HCl 1 mL、milli Q 1 mL で wash し、CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (80 :

20) 1mL で抽出した。抽出物を 40℃で窒素乾固し、CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (40 : 60) 100 μL で溶解し、測定用サンプルとしてバイアルにつめた。測定には 10 μL を liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) に注入した。

#### 4-4) LC-MS/MS の条件

HPLC : 2777c Sample manager (Waters Corporation)

Binary HPLC Pump 1525μ (Waters Corporation)

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

移動相 : 0.1 % acetic acid water / acetonitrile (40 : 60, v/v)

流速 : 0.2 mL/min

MS/MS : Quattro Premier XE (Waters Corporation)

イオン化法 : electrospray ionization (ESI) positive

モード : multiple reaction monitoring (MRM)

測定イオン :

testosterone derivative

$m/z$  394.30 → 124.09 (cone voltage 35 V, collision energy 15 eV)

estrone derivative

$m/z$  376.24 → 77.9 (cone voltage 7 V, collision energy 41 eV)

estradiol derivative

$m/z$  483.14 → 78.14 (cone voltage 70 V, collision energy 45 eV)

dexamethasone derivative

$m/z$  498.35 → 123.8 (cone voltage 70 V, collision energy 45 eV)

## 5. 陰茎海綿体内圧 (intracavernous pressure; ICP) 測定による勃起機能の評価

図 2 に ICP 測定の模式図を示した。Pentobarbital sodium (45 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔をかけた。手術台に仰向けに四肢を固定し、下顎から胸骨にかけてハサミで正中切開した。精密ハサミや精密ピンセット、綿棒を用いて筋肉を分け、左総頸動脈を露出させた。先曲り精密ピンセットを用いて膜に覆われている左総頸動脈に糸をかけた。糸で左総頸動脈を持ち上げながら精密ハサミを用いて膜を除去した。左総頸動脈の心臓側をブルドッククレンメでクランプした。左総頸動脈の頭部側を糸で結紮した。クランプ部と結紮部の間の血管を精密ハサミで 1/3 ほど切開し、切開部上部の血管を精密ピンセットでつまみ上げ、血管内に左総頸動脈カニューレを挿入し、二重結紮により固定を行い、動脈圧を測定した。動脈圧の測定には 50 U/L heparin で満たした polyethylene (PE)-50 チューブをカニューレとして用い、圧トランスデューサー (PowerLab 2/26, ADInstruments, CO USA) に接続して動脈圧をモニターした。

次いで、下腹部を陰茎上部から肋骨の下部まで正中切開した。陰のうを押し、精巣を上部へ押し上げた。陰のうを切開し、左側陰茎脚を露出させ、23 G 注射針付きカニューレを陰茎脚から挿入し、アロンアルファハイスピード EX で固定し、ICP を測定した。ICP の測定には 50 U/L heparin で満たした PE-50 チューブの先端に 23G 注射針を接続したものをカニューレとして用い、圧トランスデューサーに接続して ICP をモニターした。

前立腺付近に存在する海綿体神経を 10 V, 20 Hz, Duration 5 msec の条件にセットした Electronic Stimulator (Nihon Kohden Co, Tokyo Japan) で双極形鉤電極 (Unique Medical Co, Osaka Japan) を用いて 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動をモニターした (図 3)。

動脈圧と ICP は Chart & Scope (ADInstruments) を用いて記録、解析した。測定された ICP の最大値を動脈圧の平均血圧 (mean arterial pressure; MAP) で割った ICP/MAP を評価の指標とした。

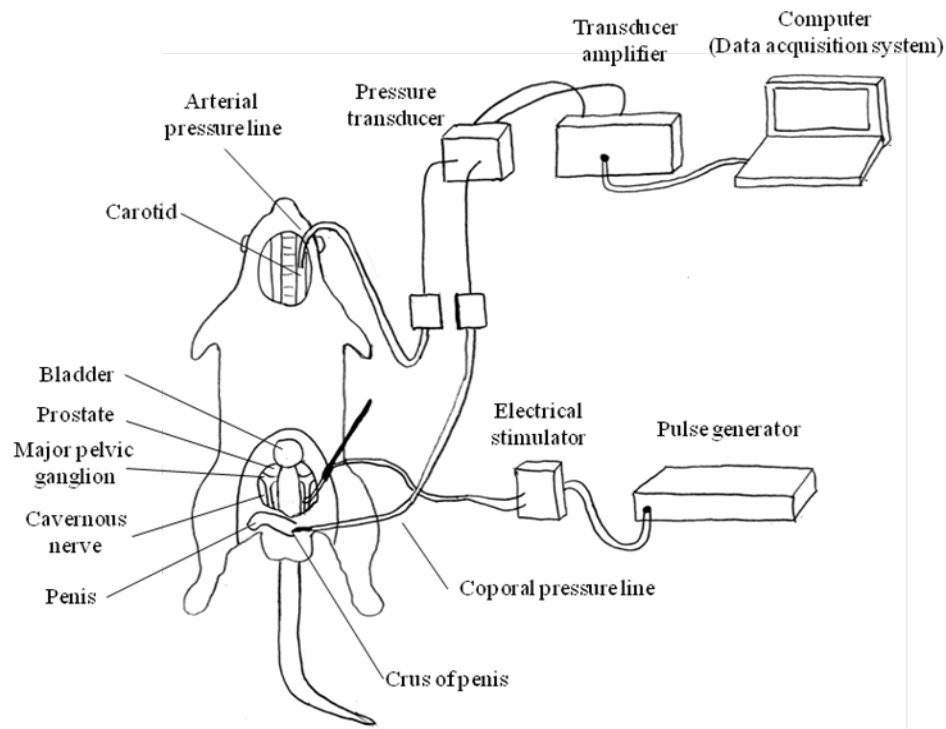


図 2. 陰茎海綿体内圧 (Intracavernous pressure: ICP) 測定における装置の模式図

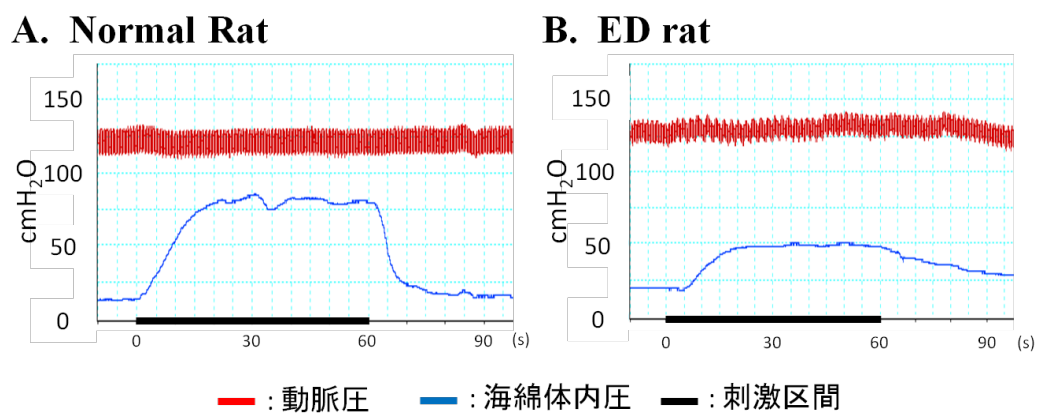


図 3. ICP 測定における各種パラメータの変動

A. では Normal rat、B. では estrogen 投与により ED を発症したラットの海綿体神経電気刺激時の動脈圧 (AP) と海綿体内圧 (ICP) のチャートを示している。



## 6. Isometric Tension Study による張力測定

Pentobarbital sodium を腹腔内投与し、過麻酔により安楽死させたラットから陰茎を摘出し、4°Cに冷やした Krebs 溶液(mM: NaCl 119, KCl 4.6, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 15, D-glucose 11 and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2)中で白膜を取り除き、長さ約 1 cm の陰茎海綿体のみの標本を作製した。陰茎海綿体標本を 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub> で通気した 37°C の Krebs 溶液で満たしたマグヌス管に固定した。陰茎海綿体標本の一端をセルフインで固定し、他端をトランスデューサー (PowerLab 2/25, ADInstruments) の先端に糸で接続して固定し、張力変動をモニターした。陰茎海綿体標本に 500 mg の基礎張力を負荷し、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 high potassium solution (mM: NaCl 36.7, KCl 80, CaCl<sub>2</sub> 2.2, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucose 14 and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2) を用いて収縮力を確認した後、NA (DL-Norepinephrine hydrochloride; Sigma Aldrich, MO USA) を 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-4</sup> M の範囲で累積投与し、海綿体平滑筋の収縮力を測定した。また、10<sup>-5</sup> M NA で前収縮させた標本に sodium nitroprusside (SNP: sodium nitroferricyanide(III) dehydrate; Sigma Aldrich) および、Rho-kinase 阻害剤である Y-27632 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka Japan)を 10<sup>-10</sup> – 10<sup>-4</sup> M の範囲で累積投与し、その弛緩力を測定した。NA による収縮力の測定には、80mM high potassium solution の収縮力に対する割合を、SNP および Y-27632 による弛緩力の測定には、10<sup>-5</sup> M NA で収縮させた張力に対する割合を用いて解析した。

## 7. 統計処理

測定結果はすべて平均値 ± 標準誤差で表記した。統計解析には Bonferroni-type multiple *t*-test を用い、危険率 5%未満を有意と判定した。

### III. 実験結果

#### 1. 血中性ホルモン濃度

表 1 に各種性ホルモンを投与したラットの血中性ホルモン濃度を示した。estradiol 投与により、有意に bio-T 濃度が低下し、estrogen 濃度が上昇した( $P < 0.05$ )。一方、ART により有意に bio-T 濃度が上昇した( $P < 0.01$ )。

表 1. ラットの血中性ホルモン濃度

	Control	ES	ES + ART
bio-T (ng/mL)	$1.20 \pm 0.13$	$0.90 \pm 0.12^*$	$2.58 \pm 0.31^{**\S\S}$
Estrogen (pg/mL)	$102.5 \pm 8.7$	$332.3 \pm 17.4^{**}$	$401.5 \pm 51.6^{**}$

データは平均値±標準誤差で表した(n = 6)。

Estrogen 濃度は estrone 濃度と estradiol 濃度を合計したものを示した。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Control 群と比較した値を示した。

§§ $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された ES 群と比較した値を示した。

## 2. ICP 測定結果

図4に上段には ICP 測定時の海綿体神経電気刺激下における ICP と AP の生チャートの一例を示し、下段には解析した ICP/MAP の結果を示した。ES 群 ( $0.43 \pm 0.03$ ) および、ES + ART 群 ( $0.43 \pm 0.02$ ) において、Control 群 ( $0.70 \pm 0.04$ ) と比べて有意に ICP/MAP が低下した ( $P < 0.01$ )。また、ES 群と ES + ART 群の間には有意差はみられなかった ( $P > 0.05$ )。

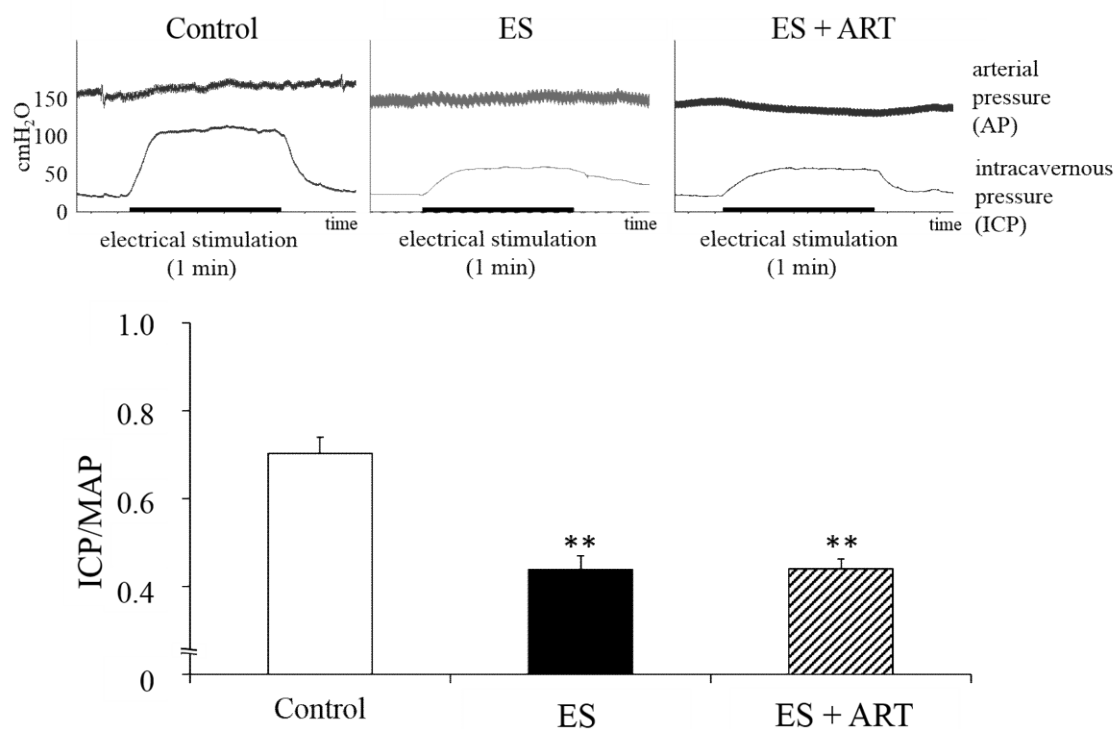


図4. estrogen 投与群における ICP 測定結果

海綿体神経を電気刺激し (10 V, 5 ms, 20 Hz, 1 min)、勃起を誘導した。勃起機能は ICP/MAP を用いて評価した。

データは平均値±標準誤差で表した (n = 6)。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Control 群と比較した値を示している。

### 3. Isometric Tension Study による張力測定

#### 3-1) SNP に対する弛緩反応測定

図 5 に NA で予め収縮させた陰茎海綿体の SNP に対する弛緩反応を示した。いずれのラットの組織においても NO 供与体である SNP 濃度の上昇に伴い弛緩反応も増大した(Control 群:  $E_{\max} = 16.8 \pm 10.3\%$ , ES 群:  $E_{\max} = 55.2 \pm 6.8\%$ , ES + ART 群:  $E_{\max} = 61.1 \pm 1.5\%$ )。ES 群および ES + ART 群において Control 群に対して有意に弛緩反応が低下していた ( $P < 0.01$ )。また、ES 群と ES + ART 群の間には有意差はみられなかった ( $P > 0.05$ )。

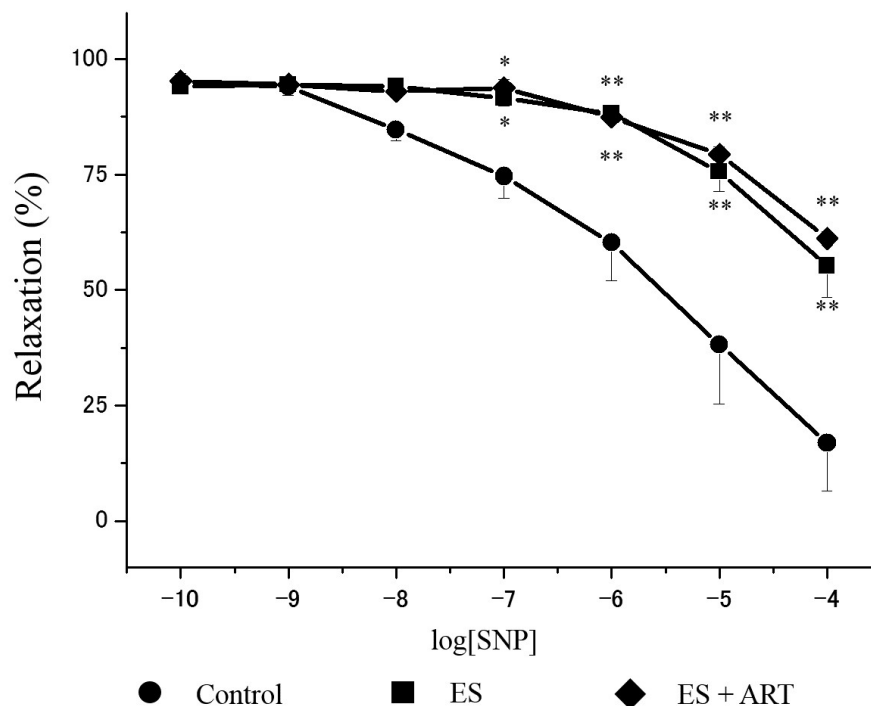


図 5. Isometric Tension Study によるラット陰茎海綿体の SNP への反応性の違い

SNP に対するラット陰茎海綿体の弛緩性の違いを示した。ラット陰茎海綿体は  $10^{-5}\text{M}$  NA で予め収縮させ、その収縮力を 100% として弛緩反応を算出した。

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (%) で表した ( $n = 5$ )。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Control 群と比較した値を示している。

### 3-2) NA に対する弛緩反応測定

図 6 に陰茎海綿体の NA に対する収縮反応を示した。いずれのラットの組織においても NA 濃度の上昇に伴い収縮力の増大がみられた。 $10^{-5}$  M および  $10^{-4}$  M において ES 群および ES + ART 群で有意に収縮反応が増大した (Control 群:  $E_{\max} = 167.9 \pm 14.4\%$ , ES 群:  $E_{\max} = 202.3 \pm 18.8\%$ , ES + ART 群:  $E_{\max} = 251.2 \pm 13.3\%$ ;  $P < 0.05$ )。また、ES 群と ES + ART 群の間には有意差はみられなかった( $P > 0.05$ )。

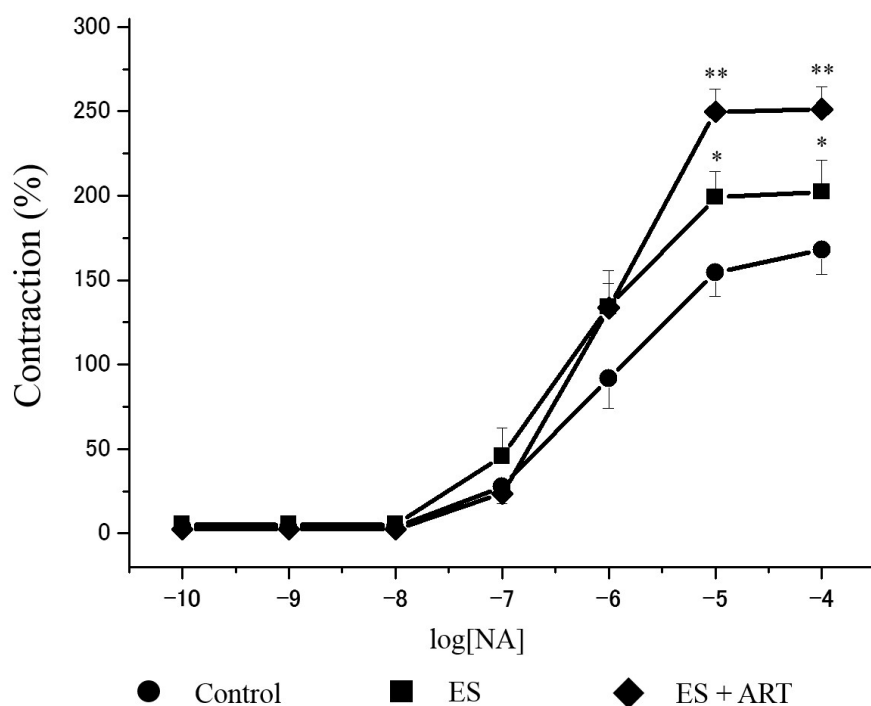


図 6. Isometric Tension Study によるラット陰茎海綿体の NA への反応性の違い

NA に対するラット陰茎海綿体の収縮性の違いを示した。収縮力は 80 mM KCl 溶液に対する収縮力を 100% として表した。

データは平均値  $\pm$  標準誤差 (%) で表した ( $n = 5$ )。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Control 群と比較した値を示している。

### 3-3) Rho-kinase 阻害剤に対する弛緩反応測定

図 7 に NA で予め収縮させた陰茎海綿体の Y-27632 に対する弛緩反応を示した。いずれのラットの組織においても Rho-kinase 阻害剤である Y-27632 濃度の上昇に伴い弛緩反応も増大した (Control 群:  $IC_{50} = 1.22 \times 10^{-6}$  M, ES 群:  $IC_{50} = 2.26 \times 10^{-7}$  M, ES + ART 群:  $IC_{50} = 1.25 \times 10^{-7}$  M)。 $10^{-6}$  M および  $10^{-5}$  M において ES 群および ES + ART 群では Control 群に対して有意に弛緩反応が上昇しており ( $P < 0.01$ )、Y-27632 に対する感受性が亢進していた。

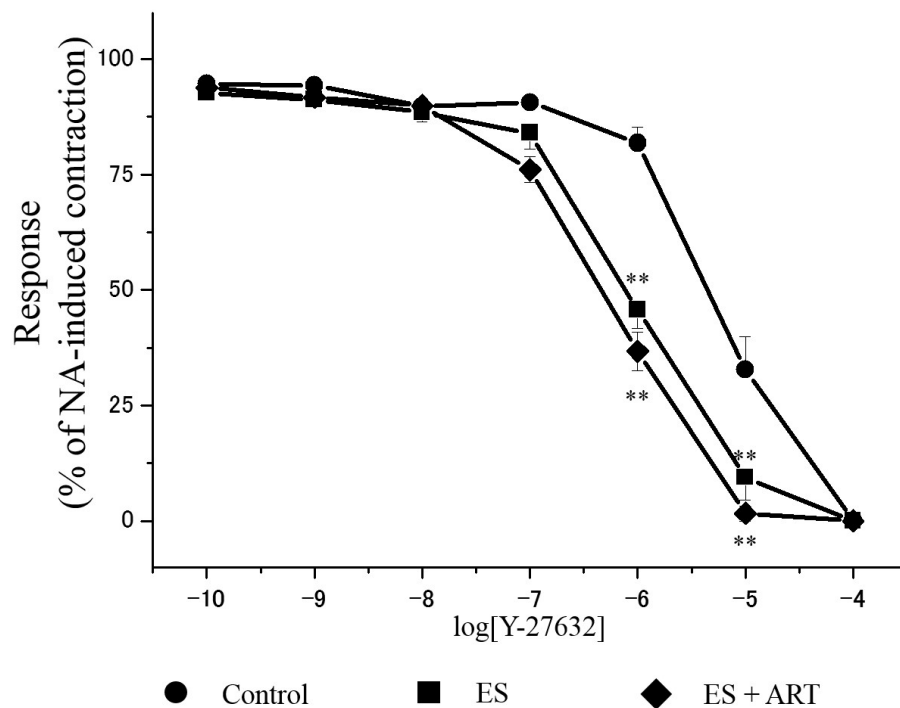


図 7. Isometric Tension Study によるラット陰茎海綿体の SNP への反応性の違い

Y-27632 に対するラット陰茎海綿体の弛緩性の違いを示した。ラット陰茎海綿体は  $10^{-5}$  M NA で予め収縮させ、その収縮力を 100% として弛緩反応を算出した。

データは平均値 ± 標準誤差 (%) で表した ( $n = 5$ )。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Control 群と比較した値を示している。

## IV. 考察

本研究により、高 *estrogen* レベルにより *testosterone* の低下を伴う ED を発症したが、ART によっては ED の改善効果が得られないことが示された。Adaikan らの報告と同様に、*estrogen* を投与したラットにおいて ICP/MAP が低下しており、勃起機能が低下していることが分かった。一方、*estrogen* 投与により低下した *testosterone* レベルを ART により治療を行ったが、ICP/MAP は改善せず、勃起機能は改善しなかった。

今回、*estrogen* を 3  $\mu\text{g/kg/day}$  の用量で投与し、*estrogen* レベルの有意な上昇および、*testosterone* レベルの有意な低下をもたらした。この *estrogen* 投与に用いた用量は、卵巣摘出手術を行ったメスラットに対するホルモン補充療法の用量を用いた。ヒトの *estrogen* の一種である estradiol の基準値は、男性では 12~49 pg/mL に対し、女性の卵胞・黄体期では 19~255 pg/mL と、男性と女性で *estrogen* レベルは同程度もしくは数倍程度であり、今回用いた *estrogen* の用量は androgen の低下および ED をもたらしたが、本研究において死亡例などはみられず、過剰量投与による重大な副作用をもたらすものではないと考えられる。

ART に用いた *testosterone* の用量は 3 mg/kg/day を用いた。本実験に対する前実験において、去勢を行ったラットに対して 2 週間 ART を行ったところ、bio-T 値が正常に回復し、ICP/MAP も有意に改善し、勃起機能の改善が見られたため、本実験においても ART には *testosterone* 3 mg/kg/day を用いた。一方、ART の安全性を評価するため、無処置のラットに対し ICP 測定の前日に *testosterone* 3 mg/kg/day を投与しても、ICP/MAP の低下はみられず、ART 自体が勃起機能に悪影響をもたらすものではないことを確認した。

本研究の結果、高 *estrogen* 下ではたとえ ART により androgen レベルが改善したとしても、ラットの勃起機能は改善しないことが示された。この原因を調べるため、Isometric Tension Study を行い、海綿体平滑筋の機能を評価した。

勃起は性的刺激が海綿体神経を伝わり、NO が放出されることで海綿体平滑筋が弛緩して起こる<sup>11)</sup>。SNP による弛緩反応の結果、*estrogen* を投与した群および、ART を行った群において弛緩反応が減少していたため（図 5）、これが原因となって ED が引き起こされたのではないかと考えられる。一方、NA による収縮反応の結果、これらの群では収縮反応が増大していた（図 6）。これらのことから、高 *estrogen* 状態では、性ホルモンのバランスが変化し、平滑筋の収縮と弛緩のバランスが崩れてしまったのではないかと推測される。収縮反応が過剰に起こるメカニズムとして RhoA/Rho-kinase 経路に着目したところ、高 *estrogen* 状態の群では ART を行っても RhoA/Rho-kinase 阻害剤である Y-27632 に対する感受性が亢進したままだった（図 7）。この現象は以前に高 *estrogen* 状態により ED を発症したウサギを用いた検討でも観察

されており<sup>23)</sup>、androgen レベルに関係なく高 estrogen 状態時に RhoA/Rho-kinase 経路の亢進が生じることが示唆された。またこの RhoA/Rho-kinase 阻害剤に対する感受性の亢進は、糖尿病ラットや老齢ラットを用いた実験でも報告されており<sup>13)</sup>、性ホルモンバランスの変化したラットで見られた平滑筋の収縮反応が過剰に起こる原因のひとつではないかと考えられる。また、陰茎海綿体以外の組織ではあるが、estrogen が RhoA/Rho-kinase 経路を介して輸精管の平滑筋の収縮反応を増大させるとの報告があり<sup>25)</sup>、陰茎海綿体内でも同様のメカニズムがはたらいっていると考えられる。

体脂肪が増加すると estrogen 値が高くなると言われている<sup>2-3)</sup>。Estrogen は aromatase によって testosterone から産生される。Aromatase は体脂肪に多く含まれ、そのため、体脂肪の多い人では aromatase の活性が高くなり、estrogen 値が高くなると考えられている。中高年男性において estrogen 値が高いのは、加齢によって筋肉量が低下し、基礎代謝量が低下することで体脂肪が蓄積しやすいためと考えられている。これらのことから、体脂肪を増やさないことで estrogen 値を上げないことができ、ED の予防になると考えられる。さらに、estrogen は testosterone から代謝されるため、過剰量の testosterone を投与すると estrogen レベルが上がり、ED をもたらすことになるかもしれないと危惧されている<sup>26)</sup>。

以上の結果より、性ホルモンと勃起機能には密接な関連性があり、高 estrogen レベルにより内分泌性 ED が発症することがわかった。さらに estrogen レベルが高い場合には ART の効果がみられなかった。そのため、バランスのとれた性ホルモンの濃度を維持することが生活の質 (quality of life: QOL) を向上させることにつながると考えられる。性ホルモンは勃起機能だけでなく、全身へ作用するものであるため、他の部位にも障害が起こっているかもしれない。男性にとって estrogen レベルの測定はほとんど行われてはいない。ART のように性ホルモンに関する治療を行う際には、estrogen レベルにも注意することが、効果的な内分泌性 ED の治療につながると考えられる。





## 第二章

### 2 型糖尿病を伴うモデルラットにおける

### Androgen 低下時の勃起障害に対する ART の効果

## I. 背景

肥満は国民の健康にかかわる重要な問題であり、肥満指数 (body mass index; BMI) が 25 以上の場合、心血管疾患や糖尿病の発症のリスクを増加させる<sup>27)</sup>。厚生労働省の平成 20 年国民健康・栄養調査結果によると、肥満者 (BMI  $\geq$  25) の割合は、男性 28.6%、女性 20.6%であり、男性では、40 歳代 (35.9%) が最も多く、次いで 50 歳代 (32.4%) の順である<sup>28)</sup>。糖尿病患者は現在も増加の一途をたどり、平成 24 年の厚生労働省の統計によると 950 万人に上ることが示され、男性の 27.3%が糖尿病かその予備群であることが示された<sup>27)</sup>。また、国際糖尿病連合の『糖尿病アトラス第 6 版』によると、2013 年現在で世界の糖尿病有病者数は 3 億 8200 万人に上ることが示された<sup>29)</sup>。

近年、肥満や 2 型糖尿病と androgen 欠乏症などの性腺機能低下症との関連性を示す報告がなされている<sup>2-3, 5)</sup>。これは内臓脂肪より産生される tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) や leptin などにより性腺刺激ホルモンの産生が低下することが原因と考えられている。さらに Fukui らは、androgen が低下すると基礎代謝量が低下し、内臓脂肪の増加や血糖値の上昇が引き起こされることを報告しており、androgen 欠乏症では肥満や 2 型糖尿病のリスクも高めるため、悪循環を生じることを警告している<sup>30)</sup>。

『ED 診療ガイドライン[2012 年版]』によると、糖尿病患者での ED 有病率は健常者と比べ 2~4 倍高いとの報告があり、糖尿病は ED の重大なリスクファクターのひとつと考えられている。また、糖尿病を有する ED 患者に対する PDE-5 阻害薬の有効率は非糖尿病 ED 患者よりも低い。高血糖状態で発生する酸化ストレスにより、内皮細胞が障害を受け、海綿体平滑筋の弛緩が正常に行えなくなっていることが一因とされている。そのため、低衝撃波を陰茎海綿体に与え、内皮細胞を回復させることや、幹細胞を陰茎海綿体に注入することなど様々な試みがなされているが、簡便で有効な治療法の確立が望まれている。

近年では、肥満者や 2 型糖尿病患者では androgen が低下している症例もあり、PDE-5 阻害薬の無効例には ART が施行されることがある<sup>2-3)</sup>。しかし、これまで詳細にメカニズムを検討した基礎研究の報告はなく、ART の効果を解明することが必要とされている。本研究では過食により 2 型糖尿病を発症する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用い、2 型糖尿病を伴うモデルラットにおける androgen 低下時の勃起障害に対する ART の効果を検討した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 使用動物

OLETF ラットおよびそのコントロールである LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットは4週齢時に搬入し、名古屋市立大学動物実験施設において1週間馴化した後、5週齢より実験に用いた。なお、LETO ラット 6 匹、OLETF ラット 12 匹を大塚製薬徳島研究所より提供を受け、LETO ラット 10 匹、OLETF ラット 18 匹を Japan SLC Inc. より購入した。動物は、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 時間ごとの明暗サイクルで温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。

### 2. 実験プロトコール

図 8 に示したように、本研究では LETO 群 (n = 16)、OLETF 群 (n = 17)、そして OLETF + ART 群 (n = 14) の 3 群を作成した。OLETF + ART 群では、OLETF ラットに対して androgen として testosterone (3 mg/kg/day) を 20 週齢より 5 週間皮下投与し ART を行った。LETO 群および OLETF 群には溶媒のみを皮下投与した。なお、testosterone は 0.01% benzyl alcohol (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加した sesame oil (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に溶解し、注射溶液として用いた。

各群とも 5 週齢の時点より毎週体重を測定し、5 週ごとに尾静脈より血液を採取し、メディセーフミニ (Terumo, Tokyo, Japan) を用いて血糖値の測定を行った。5 週間の ART の後、各種勃起機能の測定を行った。

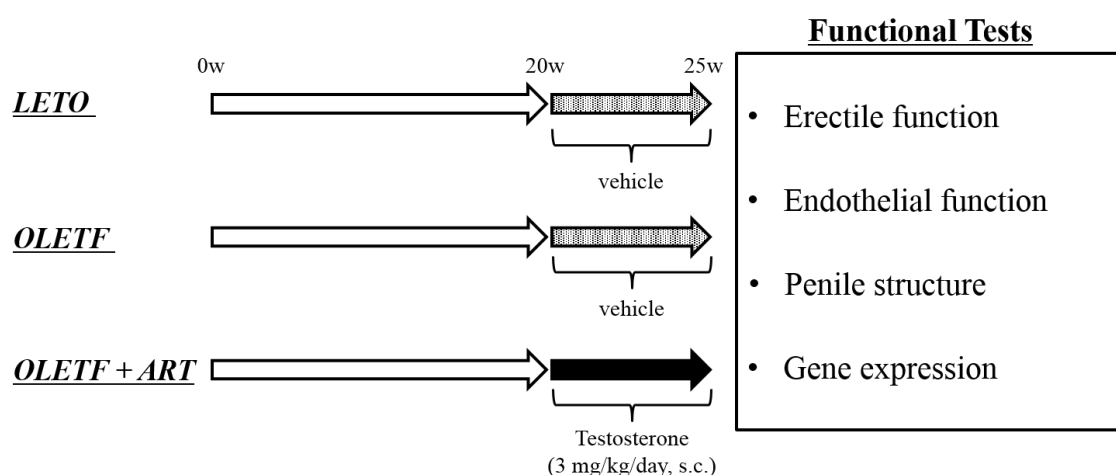


図 8. 2 型糖尿病モデルに対する ART の検討の実験プロトコール

### 3. 血液サンプルおよび組織摘出

方法は第 1 章に準ずる。

### 4. 血中性ホルモン濃度測定

方法は第 1 章に準ずる。

### 5. 勃起機能の評価

方法は第 1 章に準ずる。

### 6. Isometric Tension Study による張力測定

方法は第 1 章に準じて実験を行い、SNP に加え、acetylcholine ([ACh] Wako Pure Chemical Industries) を  $10^{-10} - 10^{-4}$  M の範囲で累積投与し、その弛緩力を測定した。

## 7. Masson's trichrome 染色法による組織学的検討

凍結ミクロトーム (LEICA CM1850, Leica Microsystems Japan, Tokyo Japan) を用いて凍結組織を 7  $\mu\text{m}$  の厚さで凍結切片を作製し、一晚乾燥させた。スライドガラスは MAS コート付きスライドガラス (Matsunami Glass Ind, Osaka Japan) を使用した。表 2 に示すプロトコルを用いて Masson's trichrome 染色を行った。染色・封入後、顕微鏡用デジタルカメラ (Nikon ECLIPSE Ti, Nikon, Tokyo Japan) を用いて標本の写真を撮影し、Adobe Photoshop CS4 extended software (Adobe System Incorporated, CA USA) を用いて解析した。Masson's trichrome 染色法では平滑筋 (smooth muscle; SM) は赤色に染まり、コラーゲン線維は青色に染まるので、解析には、1 個体あたり陰茎海綿体の異なる 6 か所の像を切り取り、それぞれ SM とコラーゲン線維の面積比を算出した。

表 2. Masson's trichrome 染色法のプロトコル

①PBS	5 min $\times$ 3
②10% trichrol acetate and 10% potassium dichromate solution	30 min
③water	1 min
④1% hematoxylin hydrate and 2% ferric chloride solution	10 min
⑤water	5 min
⑥1% orange G solution	1 min
⑦1% acetic acid solution	5 min
⑧1% ponceau xyloidine and 2.5% azophloxine solution	5 min
⑨1% acetic acid solution	5 min
⑩12 tungsto (VI) phosphoric acid and 2.5% 12 molybdo (VI) phosphoric acid solution	30 min
⑪aniline blue	5 min
⑫water	1 min
⑬95% ethanol	2 min $\times$ 2
⑭100% ethanol	2 min $\times$ 2
⑮xylene for dehydration	2 min $\times$ 2
⑯xylene for penetration	2 min $\times$ 2
⑰inclusion with Entellan® new	

## 8. 血中 asymmetric dimethylarginine (ADMA) 濃度測定

### 8-1) 検量線溶液の調整

ADMA (Wako Pure Chemical Industries) を 4% 牛血清アルブミン PBS 溶液に溶解し、400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ng/mL になるように調整した。

### 8-2) 試料の調整

ラットの血清サンプルおよび検量線溶液 100  $\mu$ L に内部標準物質として 2.5 ng の D<sub>6</sub>-ADMA を添加し、0.025% TFA in ACN 600  $\mu$ L を加え VOLTEX 後、氷上で 15 分間静置した。Methanol 500  $\mu$ L を加え VOLTEX 後、3000 g で 10 分間遠心分離し、上清 1000  $\mu$ L を分取した。得られた上清を 40 °C で窒素乾固し、0.025% TFA in (H<sub>2</sub>O:ACN:MeOH=1 : 2 : 2) 100  $\mu$ L で溶解し、測定用サンプルとしてバイアルにつめた。測定には 5  $\mu$ L を ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Acquity UPLC<sup>®</sup>-MS/MS; Waters) に注入した。

### 8-3) UPLC<sup>®</sup>-MS/MS の条件

UPLC<sup>®</sup> : ACQUITY UPLC<sup>®</sup> (Waters Corporation)

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

移動相 : A: 0.08% ion pair reagent (IPCC-MS; GL-science) in H<sub>2</sub>O

B: 1.0% formic acid in ACN

0 - 1 min	2:98
3 - 4 min	25:75
4 - 6 min	25:75
6 - 8 min	50:50
8 - 10 min	2:98

流速 : 0.3 mL/min

MS/MS : Quattro Premier XE (Waters Corporation)

イオン化法 : electrospray ionization (ESI) positive

モード : multiple reaction monitoring (MRM)

測定イオン : ADMA

$m/z$  202.86  $\rightarrow$  45.8 (cone voltage 25 V, collision energy 20 eV)

D<sub>6</sub>-ADMA

$m/z$  208.86  $\rightarrow$  51.8 (cone voltage 25 V, collision energy 20 eV)

## 9. 遺伝子学的検討

### 9-1) Total RNA 抽出

摘出した陰茎海綿体から ISOGEN 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 を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度を測定した。260 nm の吸光度を 280 nm の吸光度で除した値が 1.8 以上のサンプルについて逆転写反応を行った。

### 9-2) cDNA 合成

得られた total RNA 1 µg から、ReverTra Ace-α<sup>®</sup>を用いて表 3 の組成で 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は 42 °C 20 分間、99 °C 5 分間の条件で行った。合成した cDNA は milli Q で 5 倍に希釈し-20°Cで保存した。

表 3. 逆転写反応の組成

materials	volume	
RNase free water	12.4	X µL
5×RT Buffer	4	µL
dNTP mixture (10 mM)	2	µL
RNase Inhibitor (10 U/µL)	0.3	µL
Oligo(dT) <sub>20</sub> (10 pmol/µL)	1	µL
Total RNA (1 µg)	X	µL
ReverTra Ace <sup>®</sup> (10 U/µL)	0.3	µL
Total Volume	20	µL



### 9-3) polymerase chain reaction (PCR)解析

PCR 解析に用いた primer およびサイクル数は表 4 の通りである。primer はあらかじめ、sense primer と antisense primer が 5  $\mu$ M になるよう調整した。表 4 の組成にて 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)で PCR を行った。反応は 1 サイクル 95°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 30 sec の条件で行い、前後の反応は 95°C 10 min、72°C 2 min の条件で行った。

PCR 産物は 1.0  $\mu$ g/mL ethidium bromide を添加した 2%アガロースゲルにマウントし、電気泳動後、FAS-III (Toyobo)を用いて撮影した。解析には Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて、得られたバンドの密度を計測した。

表 4. RT-PCR 解析に用いた primer の塩基配列

target mRNA		Sequence	Cycles
eNOS	forward	5'-CAGGCTGCCTGTGAAACTTT-3'	34
	reverse	5'-TTGCTGCTCTGTAGGTTCTC-3'	
iNOS	forward	5'-TTCACGACACCCTTCACCACAA-3'	34
	reverse	5'-CCATCCTCCTGCCCCACTTCCTC-3'	
Sirt1	forward	5'-TGTTTCCTGTGGGATACCTGA-3'	38
	reverse	5'-TGAAGAATGGTCTTGGGTCTTT-3'	
IL-6	forward	5'-TGTGCAATGGCAATTCTGAT-3'	28
	reverse	5'-GGAACTCCAGAAGACCAGAGC-3'	
TNF- $\alpha$	forward	5'-TACTGAACTTCGGGGTGATCG-3'	32
	reverse	5'-CCTTGTCCCTTGAAGAGAACC-3'	
GAPDH	forward	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	32
	reverse	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'	

## 10. 統計処理

方法は第 1 章に準ずる。

### Ⅲ. 実験結果

#### 1. 生化学パラメータ

表 5 に治療期間終了時におけるラットの生化学パラメータを示し、5 週齢の時点より毎週の体重測定の結果、および 5 週ごとの血糖値測定の結果を図 9-10 に示した。OLETF 群では LETO 群に比べ体重、血糖値、HbA1c、および総コレステロールが有意に上昇し、陰茎重量、精巣重量、および bio-T 値が有意に低下した( $P < 0.05$ )。ART によつては、体重や血糖値には変化はもたらさなかったが ( $P > 0.05$ )、陰茎重量、HbA1c と総コレステロールは LETO 群と同程度になり、bio-T 濃度が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

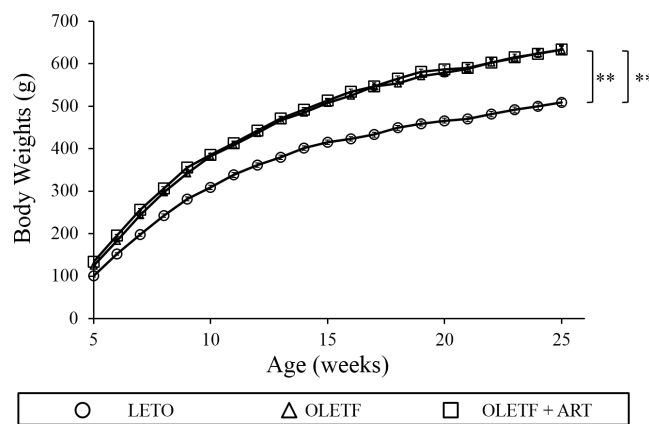


図 9. ラットの体重の推移

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 14 - 17$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

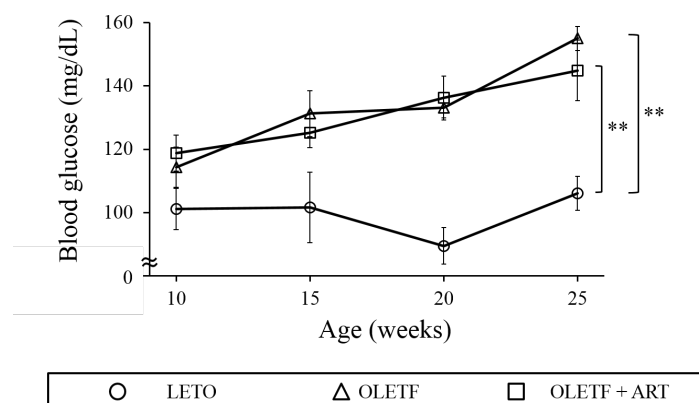


図 10. ラットの血糖値の推移

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 14 - 17$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

表 5. ラットの各種パラメータ

	LETO	OETF	OETF + ART
Body weight (g)	508.9 ± 7.1	632.5 ± 8.2**	634.1 ± 9.4**
Penis weight (g)	1.13 ± 0.06	0.84 ± 0.06*	1.00 ± 0.04
Testes weight (g)	4.26 ± 0.05	3.25 ± 0.21**	2.48 ± 0.04** <sup>§§</sup>
bio-T (ng/mL)	1.98 ± 0.07	0.96 ± 0.14**	2.10 ± 0.06 <sup>§§</sup>
Estrogen (pg/mL)	217.4 ± 10.0	206.6 ± 9.4	203.8 ± 14.9
Blood glucose (mg/dL)	106.1 ± 3.6	155.0 ± 12.9**	144.9 ± 7.9**
HbA1c (%)	4.20 ± 0.05	4.70 ± 0.22*	4.30 ± 0.09
Total cholesterol (mg/dL)	92.2 ± 1.2	105.9 ± 5.0**	94.0 ± 5.6
TG (mg/dL)	10.6 ± 5.0	95.6 ± 42.5	28.7 ± 8.5

Estrogen 濃度は Estrone 濃度と Estradiol 濃度を合計したものを示した。

データは平均値±標準誤差で表した (n = 14 - 17)。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された LETO 群と比較した値を示している。<sup>§ §</sup> $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された OETF 群と比較した値を示している。

## 2. ICP 測定結果

図 11 に上段には ICP 測定時の海綿体神経電気刺激下における ICP と AP の生チャートの一例を示し、下段には解析した ICP/MAP の結果を示した。OLETF 群 ( $0.48 \pm 0.03$ ) において、LETO 群 ( $0.78 \pm 0.04$ ) と比べて有意に ICP/MAP が低下した ( $P < 0.01$ )。また、OLETF + ART 群 ( $0.75 \pm 0.05$ ) では OLETF 群と比べ、ICP/MAP が有意に上昇した ( $P < 0.01$ )。

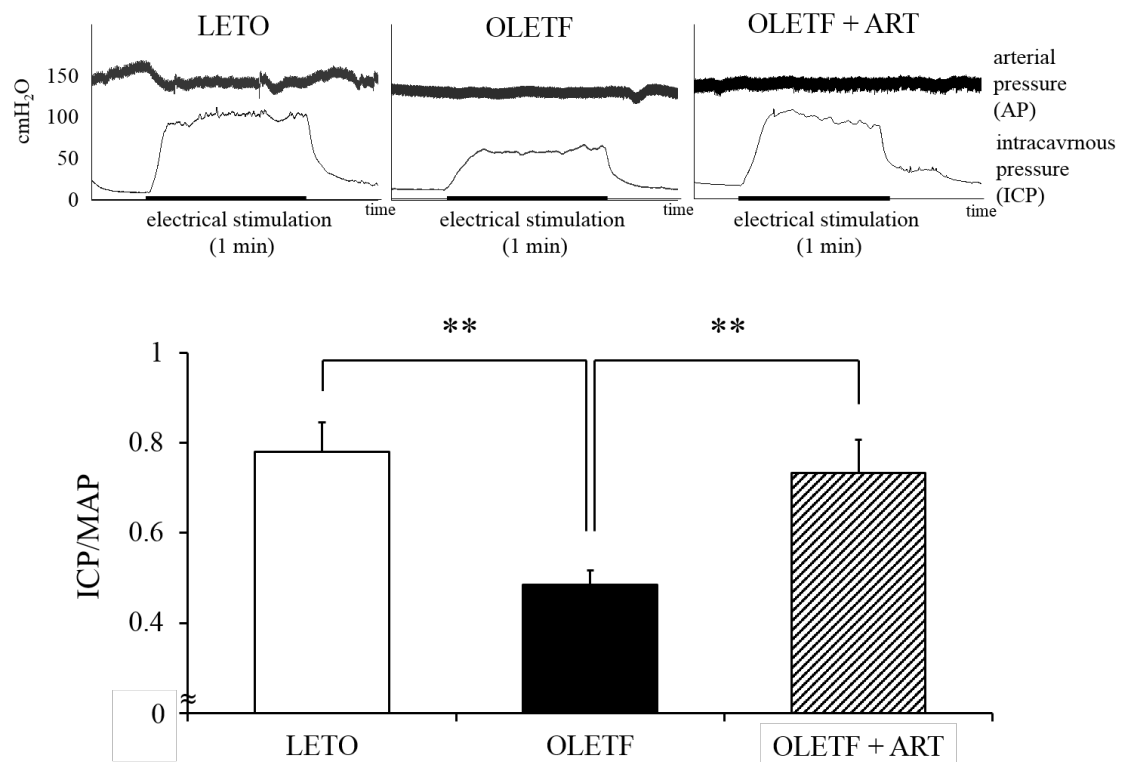


図 11. ICP 測定結果

上段は各群の ICP 測定の代表的なチャートを表しており、下段は ICP/MAP を解析したグラフを表している。

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 13 - 15$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

### 3. Isometric Tension Study による陰茎海綿体機能測定

#### 3-1) SNP に対する弛緩反応測定

各群における陰茎海綿体の SNP に対する弛緩反応結果を図 12 に示した。OLETF 群では LETO 群および OLETF + ART 群に比べ、 $10^{-4}$  M においてのみ SNP に対する反応性が低下していたが ( $P < 0.01$ )、その他の濃度では有意差はみられなかった ( $P > 0.05$ )。

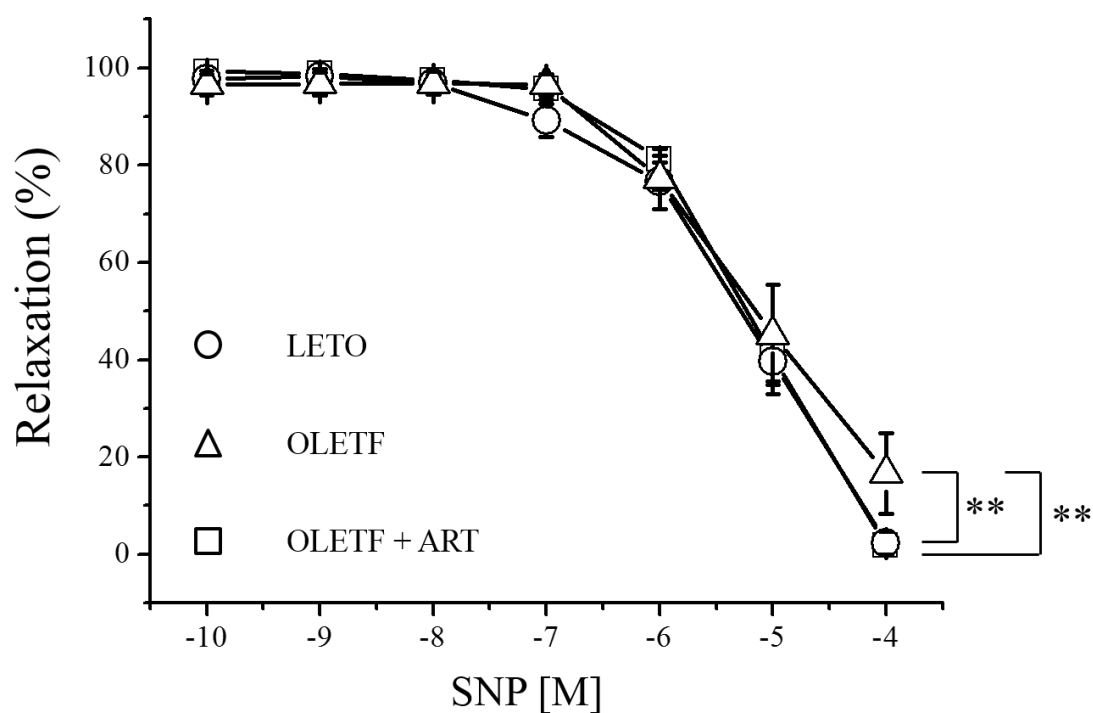


図 12. Isometric Tension Study による SNP に対する弛緩反応

データは平均値±標準誤差で表した (n = 11 - 13)。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

### 3-2) ACh に対する弛緩反応測定

各群における陰茎海綿体の ACh に対する弛緩反応の結果を図 13 に示した。OLETF 群では LETO 群に比べ、ACh に対する弛緩反応が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、OLETF + ART 群では OLETF 群に比べ、ACh に対する弛緩反応が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

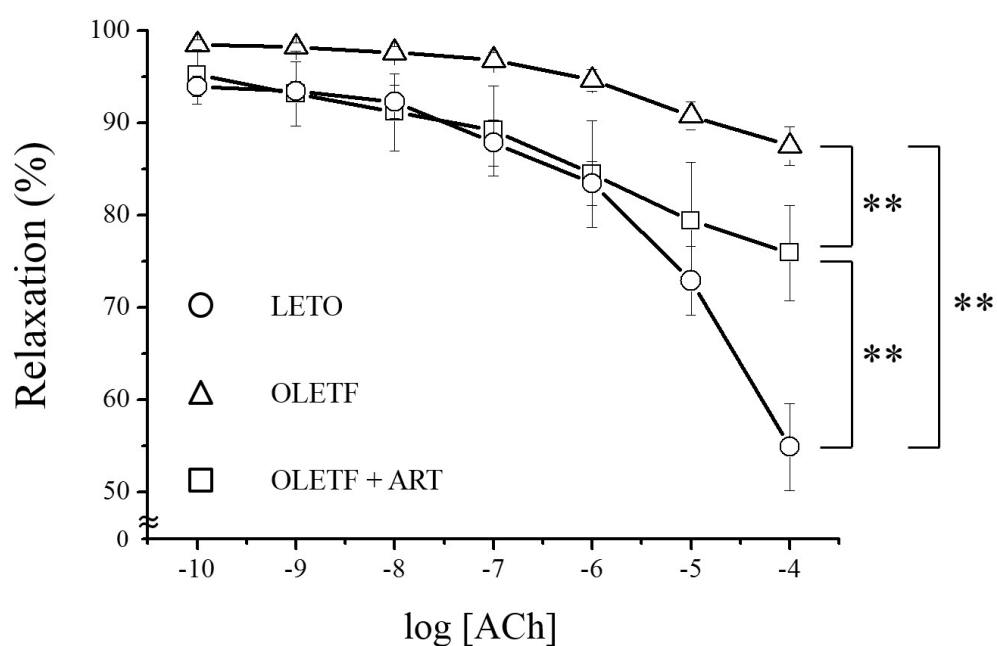


図 13. Isometric Tension Study による ACh に対する弛緩反応

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 11 - 13$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

#### 4. Masson's trichrome 染色による組織学的検討

Masson's trichrome 染色により組織学的に検討した結果を図 14 に示した。OLETF 群では LETO 群に比べ、SM/collagen 比が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、OLETF + ART 群では OLETF 群に比べ、SM/collagen 比が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

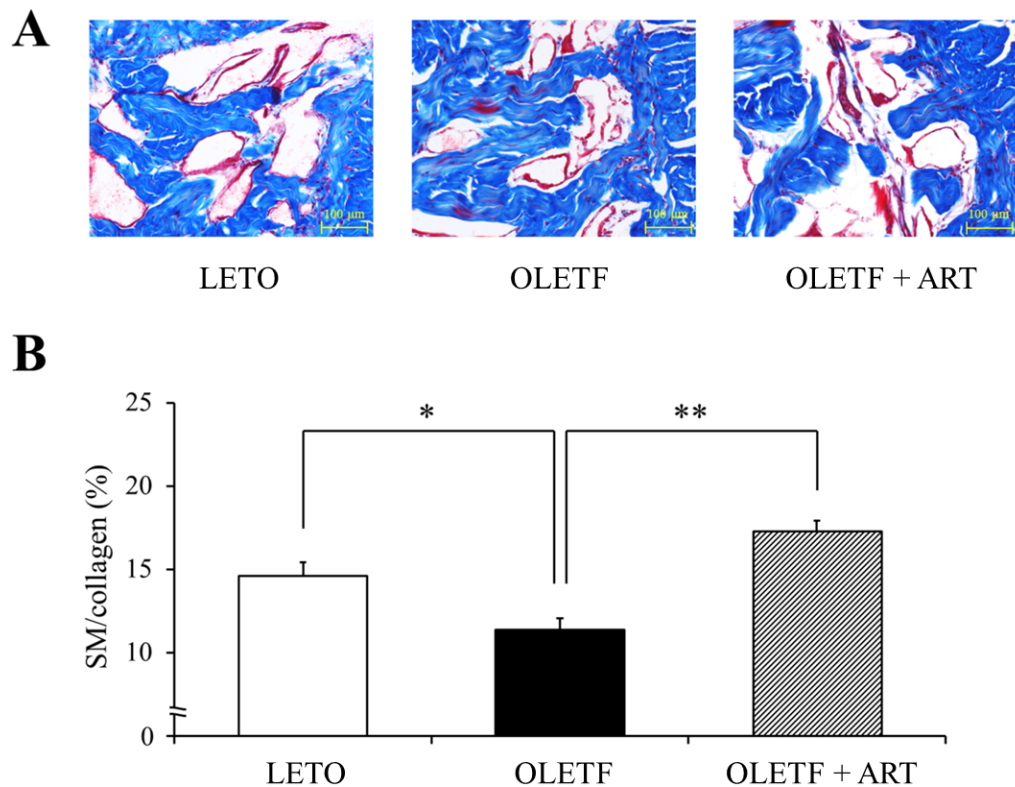


図 14. Masson's trichrome 染色による陰茎海綿体の組織画像および SM/collagen 解析結果

上段は各群の代表的な組織画像を表しており、下段は SM/collagen を解析したグラフを表している。

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 3$ )。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

## 5. RT-PCR 法による遺伝子学的検討

RT-PCR 法を用いた eNOS, Sirt 1, iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$  の各種 mRNA 発現変動の結果を図 15 に示した。OLETF 群では LETO 群に比べ、eNOS の発現が低下傾向にあり ( $P < 0.10$ )、Sirt 1 の発現が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、OLETF + ART 群では OLETF 群に比べ、eNOS および Sirt 1 の発現が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。また、OLETF 群では LETO 群に比べ、iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$  の発現が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。一方、OLETF + ART 群では OLETF 群に比べ、iNOS, IL-6, TNF- $\alpha$  の発現が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。

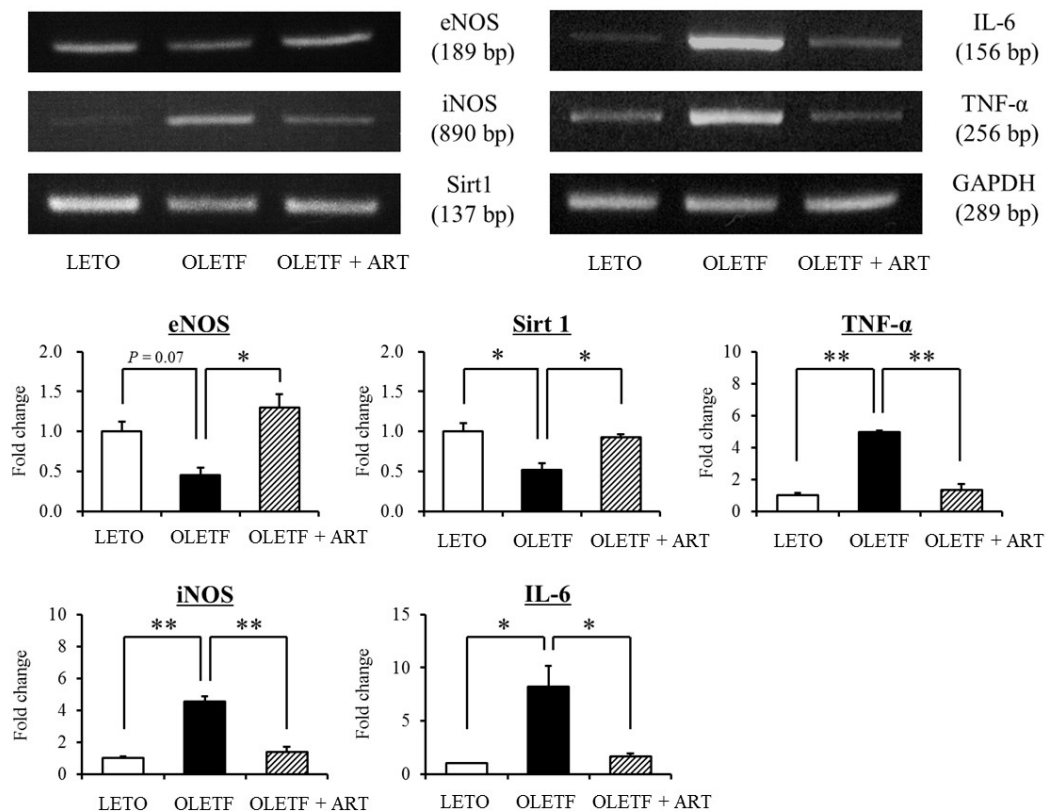


図 15. RT-PCR 法による mRNA 発現画像および解析結果

上段は各群の代表的な電気泳動の画像を表しており、下段は解析したグラフを表している。解析には各 mRNA の密度を GAPDH の密度で割った値を LETO 群を 1 として表した。

データは平均値±標準誤差で表した (n = 3)。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。



## 6. ADMA 測定結果

血清中 ADMA 濃度の測定結果を図 16 に示した。OLETF 群では LETO 群に比べ、有意に高く、OLETF + ART 群では OLETF 群に比べ有意に低かった ( $P < 0.05$ )。

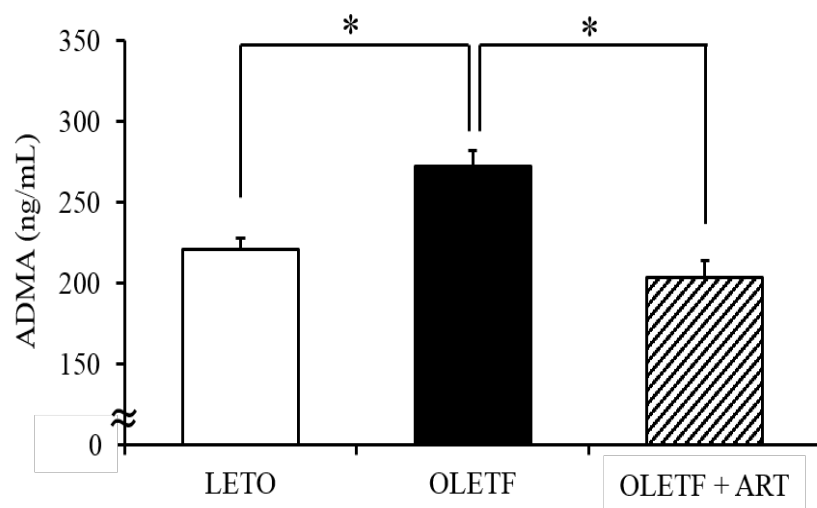


図 16. UPLC-MS/MS による ADMA 測定結果

データは平均値±標準誤差で表した (n = 7 - 10)。

\* $P < 0.05$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

## IV. 考察

本研究では2型糖尿病モデル動物として OLETF ラットを用いた。これまでの報告によると、OLETF ラットでは10週齢以降から androgen レベルの低下が観察され、20週齢以降では初期の脂質異常症や糖代謝能異常が見られる<sup>31-33)</sup>。本研究においては、初期の2型糖尿病に対する ART の効果を NO 関連物質や炎症物質に着目し、薬理学的手法を用いて検討した。

本研究において、ART は OLETF ラットの体重に変化をもたらさなかったが、HbA1c や脂質レベルを改善し、ART による血糖値や脂質異常に対する効果も示唆された。これまで、肥満ラットに対して ART が施行された例は Davis らによる報告がある<sup>34)</sup>。Davis らは Zucker ラットに対して ART を行ったところ、体重、血中インスリンレベル、コレステロールレベルの改善が見られたことを報告している。Davis らの報告では体重の減少が見られているが、ART による androgen レベルが正常ラットに比べ、10倍以上になっており、過剰投与が原因と考えられる。そのため、本研究における体重測定の結果とは異なっているものと考えられる。

高血糖や高コレステロール血症は酸化ストレスを発生させ、陰茎海綿体を含め血管に炎症を起こすことが報告されている<sup>35-36)</sup>。一方、ART は血中の脂質異常の改善効果や脂質過酸化の抑制作用が示唆されている<sup>37)</sup>。本研究でも OLETF ラットの陰茎海綿体において iNOS や IL-6、TNF- $\alpha$  の mRNA 発現が増加しており、ART によって抑制が見られた。Ota らは血管の細胞を用いた実験で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により生じた炎症を testosterone が抑制することを示した<sup>38-39)</sup>。彼らの実験では testosterone が eNOS や Sirt1 産生を増加させる Sirt1/eNOS 経路の活性化により、酸化ストレスによる炎症反応を抑制することを報告している。本研究においても Sirt1 と eNOS の発現を ART が増加させ、OLETF ラットの陰茎海綿体内での炎症反応を抑制したと考えられる。しかし本研究では mRNA レベルでの検討であり、タンパクレベルでの検討や NOS の活性の検討など、さらなる検討が必要である。

本研究において、Masson's trichrome 染色を用いた組織学的な検討により、OLETF ラットでは SM/collagen 比が低下していることを示した。一方、ART により SM/collagen 比の改善が見られた。組織障害による SM の減少や collagen の増加は ED と深く関連することが示唆されており、ED を発症するモデルとして知られる去勢による低 testosterone や1型糖尿病モデル動物において SM/collagen 比の低下がみられることが報告されている<sup>40-43)</sup>。さらに、陰茎海綿体において IL-6 や TNF- $\alpha$  は SM を傷害する<sup>44)</sup>。一方、Sirt1 は炎症性サイトカインの発生を抑制し、組織の障害を抑制することが知られている<sup>45)</sup>。本研究において ART が陰茎海綿体中の炎症を抑制し、SM/collagen 比を改善させたものと考えられる。

OETF ラットにおいて血清中の ADMA 濃度が上昇し、ART により ADMA 濃度が改善した。ADMA は様々な疾患により増加することが知られており、近年では ADMA と ED の関連性も示唆されている<sup>46-48)</sup>。ADMA は内因性の NOS 阻害物質であり、組織中の NO バイオアベイラビリティを低下させ、血管内皮機能障害を引き起こす<sup>49)</sup>。本研究においても ART が ADMA 濃度を低下させ、ED の改善に作用したと考えられる。

さらに陰茎海綿体の内皮機能を評価するため、Isometric tension study を用い、ACh に対する反応性を検討した。OETF ラットでは ACh に対する反応性が低下しており、血管内皮機能が低下していることが示された。しかし、この血管内皮機能障害は ART により改善し、ADMA 濃度の結果と同様の結果を示した。一方、SNP に対する反応性を検討したところ、OETF ラットで  $10^{-4}$  M において反応性の低下がみられたが、低濃度の SNP では変化せず、SM の機能に変化はみられなかった。2 型糖尿病により引き起こされた組織の炎症により、eNOS の低下や ADMA の上昇が血管内皮機能障害をもたらしたものと考えられる。しかし、ART はこれらの血管内皮機能障害を改善し、2 型糖尿病モデルラットの ED の改善に寄与したものと考えられる。

以上の結果より、ART は HbA1c や総コレステロール値は改善し、炎症物質の産生も抑制した。また、ART では eNOS や Sirt 1 の発現も改善しており、eNOS/Sirt 1 経路の活性化による組織炎症の抑制ももたらされたと考えられる。これらの androgen による作用により、組織構造の改善や血管内皮機能の改善がもたらされ、OETF ラットの勃起機能が改善したものと考えられる。

## 第三章

### 去勢ラットにおける

### Androgen 低下時の勃起機能に対する ART の効果

## I. 背景

Androgen は陰茎の発達や精子形成など、男性性機能にとって必要不可欠である<sup>2-3)</sup>。そのため、androgen の低下は勃起機能に大きな影響をもたらし、内分泌性 ED と呼ばれる。Androgen 低下と勃起機能の関係はこれまで去勢ラットを用いて eNOS の低下による NO 産生の減少や海綿体組織中の線維化など、いくつかの経路の障害によって ED を引き起こすことが報告されてきた<sup>50-51)</sup>。しかし、内分泌性 ED の発症メカニズムはまだ完全には解明されていない。

Androgen の低下は男性性機能だけではなく、血管機能を低下させることが報告されている<sup>52)</sup>。近年では、高脂肪食を与えたウサギの動脈硬化やプラークのサイズを ART が抑制することが報告されている<sup>53-54)</sup>。この androgen の作用には IL-6 や NF- $\kappa$ B などの炎症性サイトカインの抑制によるものと考えられている。興味深いことに、Khasnavis らはマウスを去勢すると脳の血管において iNOS が発生し、パーキンソン病様の症状を示すことを報告した<sup>55)</sup>。現在のところ、androgen の低下と組織炎症発生のメカニズムは解明されていないが、内分泌性 ED 発症にも大きく関与している可能性がある。

OLETEF ラットを用いた研究において ART の抗炎症作用が示唆された。しかし、OLETEF ラットでは androgen 低下だけでなく糖尿病や脂質異常など、その病態が複雑である。そこで本研究では、去勢ラットを用いて androgen 低下に焦点を当て、ART による抗炎症作用に着目した検討を行った。

## II. 実験材料および方法

### 1. 使用動物

11 週齢の雄性 Wistar/ST ラット (Japan SLC Inc) を用いた。動物は、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 時間ごとの明暗サイクルで温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。

### 2. 実験プロトコール

#### 2-1) モデル動物の作製

Pentobarbital sodium (40 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔をかけた。手術台に仰向けに四肢を固定し、下腹部を正中線に沿って約 2 cm 切開した。陰嚢を圧迫し下腹部に精巣を移動させ、切開部分からピンセットを用いて精巣を露出した。精巣血管と輸精管をクランプし、精巣側を熱した金属を用いて切断して精巣を摘出した。組織を元に戻し、縫合糸にて縫合することで外科的に去勢を行った **castration** ラットを作製した。コントロールとして、開腹後、精巣を露出して元の位置に戻し、縫合糸にて縫合した **Sham** 手術を施したラットを用いた。

#### 2-2) 去勢ラットに対する ART

本研究では 4 週間の観察期間を設け、勃起機能の評価を行った。11 週齢のラットに対し Sham 手術を行った Sham 群、去勢手術を行った Cast 群、去勢手術後 ART を行った Cast + ART 群の 3 群を作成した。Cast + ART 群では去勢手術翌日から **androgen** として **testosterone** (3 mg/kg/day) を 4 週間皮下投与し、ART を行った。Sham 群および、Cast 群には溶媒のみを皮下投与した。なお、注射溶液は第 2 章に準じた。

#### 2-3) 去勢ラットに対するビタミン E の投与

本研究ではさらに去勢手術後 **vitamin E** を投与した Cast + VE 群を作成した。Cast + VE 群は去勢手術翌日から 4 週間、2 % **vitamin E** を配合した飼料を与え、**vitamin E** の投与を行った。なお、Cast + VE 群は血液生化学検査および ICP 測定のみ行い、機能評価を行った。

### 3. 血液サンプルおよび組織摘出

方法は第 1 章に準ずる。

#### **4. 血液性化学検査**

##### **4-1) 血中性ホルモン濃度測定**

方法は第 1 章に準ずる。

##### **4-2) 血中パラメータの測定**

血中 glycoalbumin, total-cholesterol, triglyceride 濃度は、株式会社モノリス(Monolis Inc. Tokyo Japan)に測定を依頼した。

#### **5. 勃起機能の評価**

方法は第 1 章に準じた方法で行った。なお本研究では、海綿体神経の電気刺激条件を 5 V、5 ms の条件下で 1, 2, 4, 8, 16 Hz と刺激周波数を変化させ 1 分間ずつの電気刺激を行った。

#### **6. Isometric Tension Study による張力測定**

方法は第 2 章に準ずる。

#### **7. Masson's trichrome 染色による組織学的検討**

方法は第 2 章に準ずる。

#### **8. 遺伝子学的検討**

##### **8-1) Total RNA 抽出**

方法は第 2 章に準ずる。

##### **8-2) cDNA 合成**

方法は第 2 章に準ずる。

### 8-3) real-time PCR

real-time PCR 解析には表 6 の primer を用いた。各 primer は、sense primer と antisense primer が 5  $\mu$ M となるよう調整した。表 7 に示す組成にて ABI Prism7300 (Applied Biosystems)を用いて real-time PCR を行った。反応条件は 50°C 2 min、95°C 10 min、95°C 15 sec、60°C 1 min (40 cycle)で行った。解析には $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて GAPDH との比で比較した。

**表 6. real time PCR 解析に用いた primer の塩基配列**

target mRNA		Sequence
NADPH oxidase-1	forward	5'-GGCATCCCTTTACTCTGACCT-3'
	reverse	5'-TGCTGCTCGAATATGAATGG-3'
NADPH oxidase-4	forward	5'-CTGTCCTGAACCTCAACTGCAG-3'
	reverse	5'-TGTGATCCGCGAAGGTAAGC-3'
iNOS	forward	5'-TTCACGACACCCTTCACCACAA-3'
	reverse	5'-CCATCCTCCTGCCCCACTTCCTC-3'
IL-6	forward	5'- CAAGAGACTTCCAGCCAGTTGC -3'
	reverse	5'- TGTGTGGGTGGTATCCTCTGTG -3'
NF- $\kappa$ B	forward	5'- AGAGAAGCACAGATACTACTAAG -3'
	reverse	5'- CAGCCTCATAGAAGCCATCC -3'
GAPDH	forward	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
	reverse	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'

**表 7. real time PCR の組成**

cDNA	2 $\mu$ L
primer (5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
POWER SYBR <sup>®</sup> PCR MASTER MIX	10 $\mu$ L
milli Q	6 $\mu$ L
Total volume	20 $\mu$ L



## 9. 統計処理

測定結果はすべて平均値 ± 標準誤差で表記した。統計解析には Tukey-Kramer's *t*-test を用い、危険率 5%未満を有意と判定した。

### Ⅲ. 実験結果

#### 1. 生化学検査結果

生化学検査結果を表 8 に示した。Cast 群および Cast + VE 群では Sham 群に比べ、bio-T 濃度が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、Cast + ART 群では Cast 群に比べ、bio-T 濃度が有意に増加した ( $P < 0.05$ )。

表 8. ラットの各種パラメータ

	Sham			Cast			Cast + ART			Cast + VE		
Body weight (g)	408.0	±	4.4	390.3	±	5.3	391.0	±	5.6	407	±	4.5
bio-T (ng/mL)	2.23	±	0.53	0.20	±	0.04**	2.12	±	0.33 <sup>§§</sup>	0.17	±	0.03**
Glycoalbumin (%)	4.7	±	0.2	4.6	±	0.3	5.3	±	0.1	4.8	±	0.1
Total cholesterol (mg/dL)	61.0	±	5.0	76.8	±	7.7	57.8	±	2.4	77.5	±	3.8
TG (mg/dL)	4.5	±	1.2	6.3	±	3.3	13.0	±	0.4	6.0	±	0.4

データは平均値±標準誤差で表した (n = 4 - 8)。

\*\* $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Sham 群と比較した値を示している。<sup>§§</sup> $P < 0.01$  は Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された Cast 群と比較した値を示している。

## 2. ICP 測定結果

ICP 測定結果を図 17 に示した。Cast 群では Sham 群に比べ、ICP/MAP が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、Cast + ART 群では Cast 群に比べ、ICP/MAP が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。また、Cast + VE 群では Cast 群に比べ、ICP/MAP が上昇傾向にあったが ( $P = 0.08$ )、Sham 群と比べ ICP/MAP は低下傾向にあった ( $P = 0.09$ )。

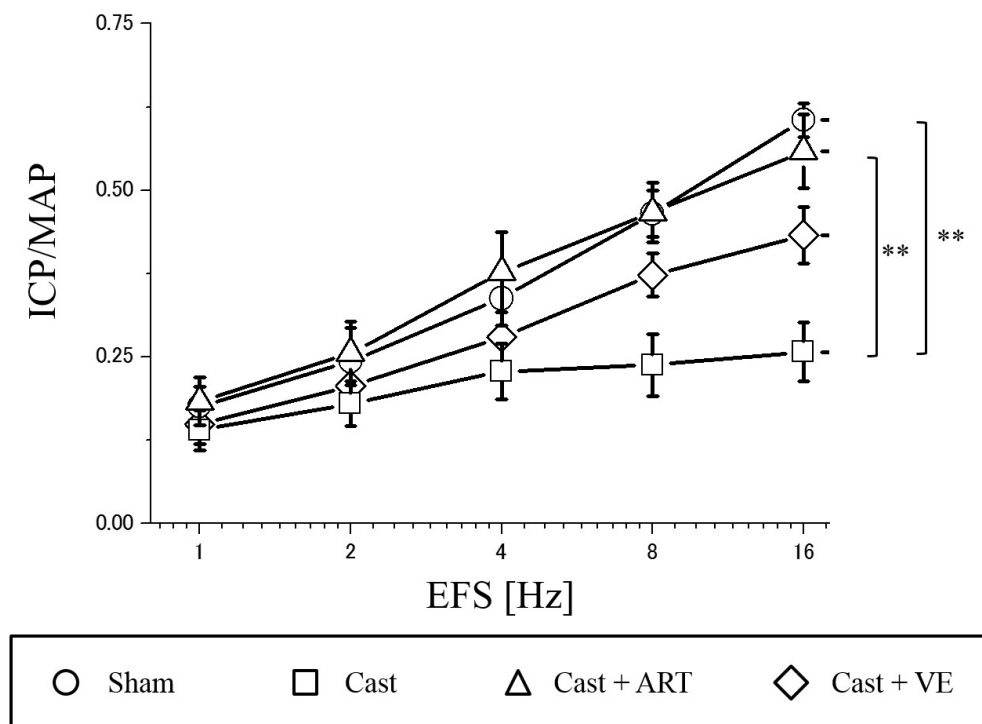


図 17. ICP 測定結果

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 4 - 8$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

### 3. Isometric Tension Study による ACh に対する弛緩反応測定

ACh に対する弛緩反応の結果を図 18 に示した。Cast 群では Sham 群に比べ、ACh に対する弛緩反応が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、Cast + ART 群では Cast 群に比べ、ACh に対する弛緩反応が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

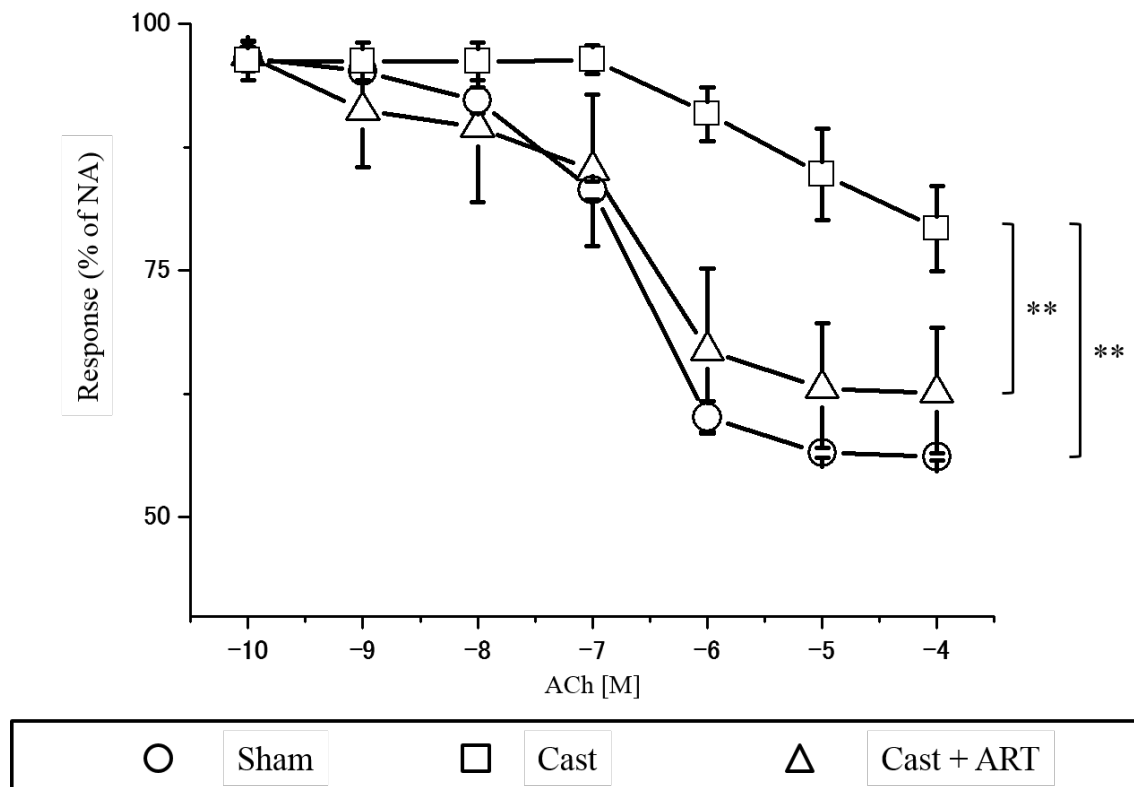


図 18. Isometric tension study による ACh に対する弛緩反応

データは平均値±標準誤差で表した (n = 8)。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

#### 4. Masson's trichrome 染色による組織学的検討

Masson's trichrome 染色により組織学的に検討した結果を図 19 に示した。Cast 群では Sham 群に比べ、SM/collagen 比が有意に低下した ( $P < 0.05$ )。一方、Cast + ART 群では Cast 群に比べ、SM/collagen 比が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。

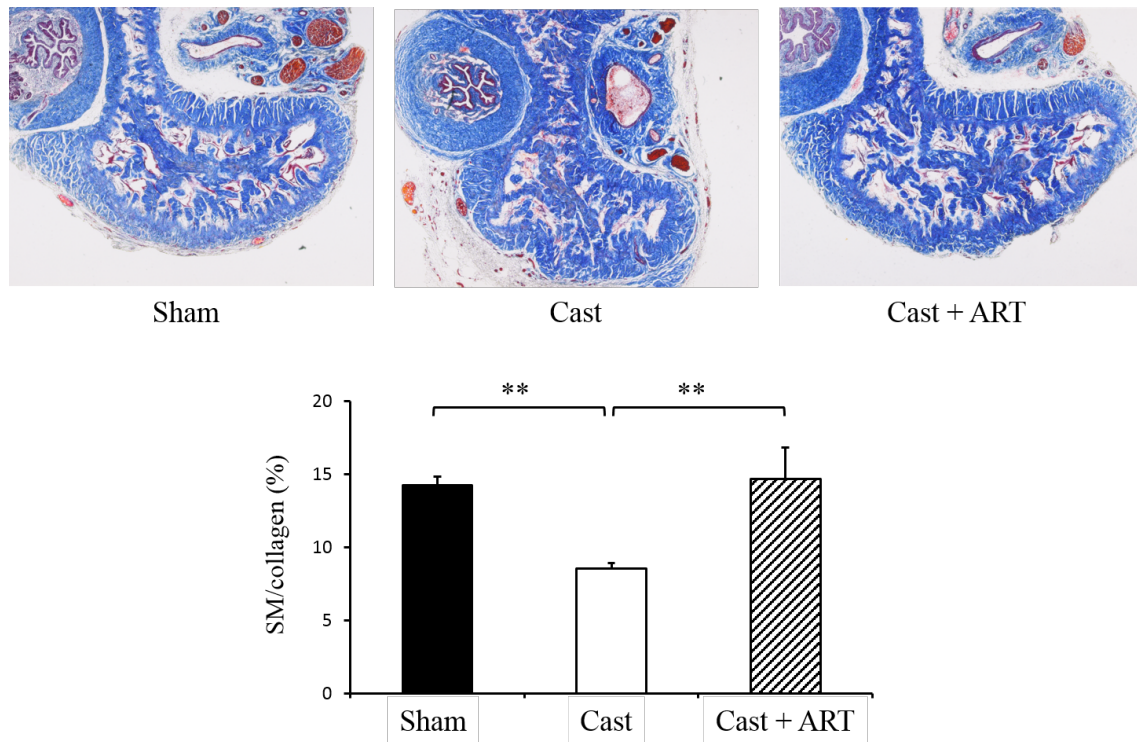


図 19. Masson's trichrome 染色による陰茎海綿体の組織画像および SM/collagen 解析結果

上段は各群の代表的な組織画像を表しており、下段は SM/collagen を解析したグラフを表している。

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 3$ )。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

## 5. real-time PCR 法による遺伝子学的検討

Real-time PCR 法を用い、NADPH oxidase-1, NADPH-4, iNOS, IL-6, NF- $\kappa$ B の各種 mRNA 発現変動の結果を図 20 に示した。Cast 群では Sham 群に比べ、NADPH oxidase-1 および NADPH oxidase-4 の発現が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。一方、Cast + ART 群では Cast 群に比べ、NADPH oxidase-1 および NADPH oxidase-4 の発現が低下傾向にあった ( $P < 0.10$ )。また、Cast 群では Sham 群に比べ、IL-6 の発現が有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。さらに、Cast 群では Sham 群に比べ、NF- $\kappa$ B の発現が上昇傾向にあり、Cast + ART 群では低下傾向にあった ( $P < 0.10$ )。

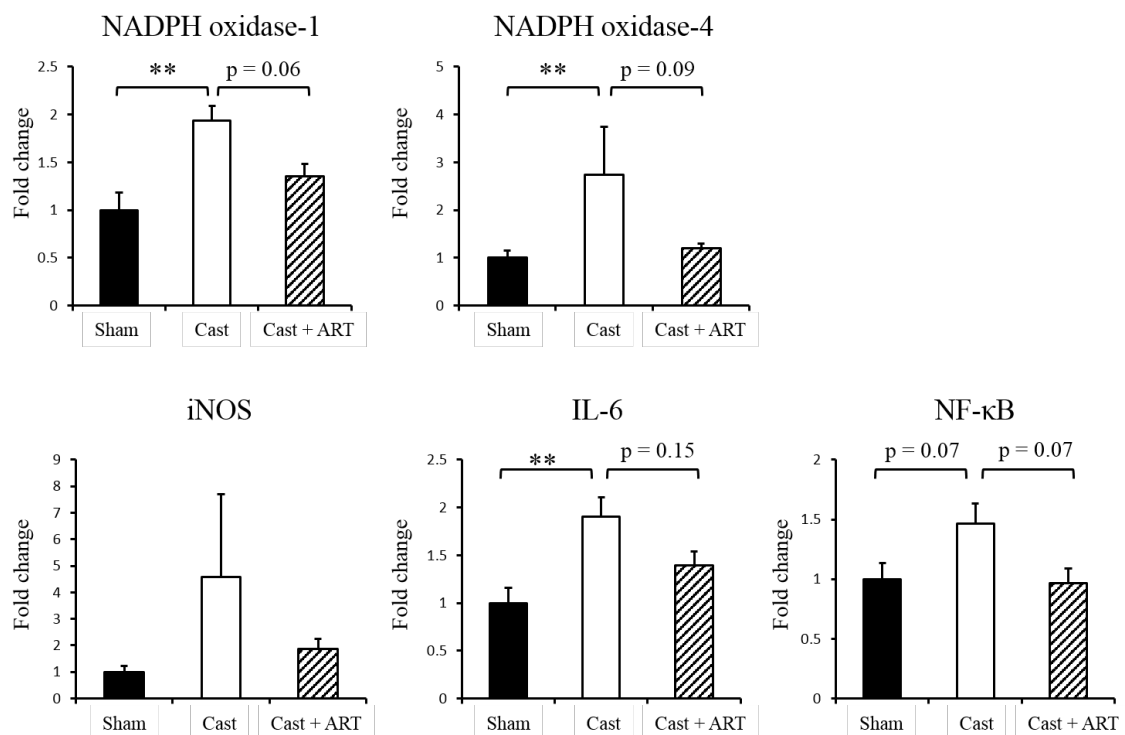


図 20. real time PCR による mRNA 発現解析

データは平均値±標準誤差で表した ( $n = 8$ )。

\*\* $P < 0.01$  Bonferroni-type multiple  $t$ -test により検定された各群と比較した値を示している。

## IV. 考察

これまでの報告と同様に本研究においても、去勢ラットでは **androgen** の低下に伴い、ICP/MAP の低下がみられ、勃起機能の低下が観察された。一方、ART により去勢ラットの ICP/MAP が上昇し、勃起機能の回復が得られた。去勢ラットでは内皮機能の低下や SM/collagen 比の低下がみられ、ART によりこれらの機能回復が得られた。

酸化ストレスのマーカーである nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase の mRNA 発現を real time PCR 法により検討したところ、去勢ラットで有意な上昇がみられ、IL-6 や NF- $\kappa$ B のような炎症性サイトカインの発現増加も観察された。これらはいずれも ART により発現が抑制されていた。つまり、**androgen** の低下ということ自体が陰茎海綿体において酸化ストレスの発生および組織の炎症を引き起こす可能性が示唆された。Khasnavis らの報告では、マウスを去勢すると脳の血管において iNOS や炎症性サイトカインの発現が上昇することが示されている<sup>55)</sup>。Androgen が血管の炎症性サイトカイン発生を抑制する報告はヒトの細胞を用いた研究でも示されており<sup>56)</sup>、**androgen** が血管の炎症を制御する何らかの作用を有することは十分に考えられる。現在のところ、**androgen** の低下による NADPH oxidase 増加のメカニズムは解明されていないが、今後は NADPH oxidase の阻害剤や炎症性サイトカインの阻害剤を用いた検討により、これらの経路の解明を試みたい。

本研究ではさらに、去勢ラットに対して抗酸化作用を示す vitamin E を与えることで、**androgen** 低下により発生する酸化ストレスが勃起機能に与える影響を検討した。vitamin E を与えた去勢ラットでは ICP/MAP が上昇傾向にあり、勃起機能の改善効果が見られた。このことから、**androgen** 低下による ED 発症のメカニズムには酸化ストレスによる組織炎症という経路が重要な役割を果たすことが示唆された。しかし、vitamin E による勃起機能の改善効果は ART に比べて低下傾向にあり、その効果は去勢ラットの勃起機能を完全に回復させるものではなかった。Androgen には eNOS の活性による NO バイオアベイラビリティーの増加などのはたらきが報告されており<sup>2-3)</sup>、ART には単なる抗酸化作用だけではない別の経路による効果があるものと考えられる。

以上の結果より、去勢により **androgen** が低下しただけでも酸化ストレスが発生し、組織の炎症をもたらすことが示唆され、ART によって抗炎症作用が見られ、勃起機能が回復した。一方、vitamin E 投与により勃起機能の改善傾向が示されたが、ART ほどの回復はみられなかった。Androgen は勃起機能維持に対して必要なものであり、その一つの経路として炎症に関わるメカニズムが重要な役割を果たしていることが示唆された。そのため、内分泌性 ED に対しては適切に ART を施行すべきである。

## 総括

医療の進歩に伴い中高年男性の QOL に注目が集まり、本邦でも 2007 年に『加齢男性性腺機能低下症候群（LOH 症候群）診療の手引き』が出版され、男性性機能と androgen との関連性にも注目されるようになってきたが、未だ解明されていない点も多いのが現状である。そこで本研究では LOH 症候群をはじめ性ホルモンに関連した内分泌性 ED 治療に応用できるように、種々の内分泌性 ED モデルラットを用い、ART の効果の検討を行った。

第 1 章にて、過剰な estrogen レベルは androgen の低下および ED を発症することを示した。高 estrogen 状態では、ART を施行しても ED は改善しなかった。これは陰茎海綿体内において高 estrogen 状態では、Rho-kinase 経路が亢進し平滑筋の弛緩反応が阻害されることが示唆された。第 2 章では 2 型糖尿病モデルである OLETF ラットを用い、androgen 欠乏症が引き起こされ ED を発症することを示した。OLETF ラットでは ART を施行すると、組織炎症を抑制し、陰茎海綿体の内皮機能障害および組織構造を改善し、勃起機能が改善することを示した。また第 3 章では去勢ラットを用い、androgen が低下すると酸化ストレスを産生し、陰茎海綿体内に炎症が生じ、勃起機能を低下させることを示唆した。

LOH 症候群診療の手引きによると、表 9 に示すように ART の投与経路は注射、経口、皮下植込み、経皮膚、経歯肉があるが、本邦では筋肉注射もしくは男性ホルモン軟膏を用いた経皮膚による方法が行われている。しかし、表 10 に示すようにそれぞれの長所・短所が存在する。また、Jain らによるメタアナライシス研究によると、筋肉注射では有効率が 51.3%であったのに対し、経皮吸収パッチでは 80.9%と有意に高い効果があり、投与経路によっても ART の有効性に違いがあることを報告している<sup>10)</sup>。経皮吸収パッチや経皮吸収軟膏は 1 日に 1~2 回投与を行うのに対し、筋肉注射は 2~4 週間に一度投与が行われる。Amano らは、経皮吸収軟膏を用いて ART を行った場合には血中 androgen レベルの上昇が穏やかで、androgen の日内変動と似た推移を示すが、筋肉注射で ART を行った場合には急激に血中 androgen レベルが上昇し、正常値を大きく上回ることもあり、予想外の副作用が現れることもあると注意を促している<sup>26)</sup>。また Rogol らは testosterone gel は安定した androgen レベルを得ることができ、若い年齢の性腺機能低下症候群患者にも安全に使用することができることを報告している<sup>57)</sup>。

ART を行うにあたり、前立腺疾患との関連には注意が必要であり、前立腺癌では絶対的禁忌、前立腺肥大症では相対的禁忌とされている。そのため ART 施行前には、前立腺癌のマーカーである prostate-specific antigen (PSA) の検査が必須項目である<sup>5)</sup>。前立腺疾患患者に対する ART は、日本では禁忌とされている。ART によって新たに



前立腺癌が発生するかどうかは不明な点も多いが、欧米で行われた研究では、6～36 カ月間 ART を 461 例に行ったところ、5 例（1.1%）が前立腺癌を発症したが、この発症率は一般的な罹患率と同じであり、ART によって前立腺癌の発症リスクが高まるものではないことが示された<sup>58)</sup>。また、前立腺癌患者では androgen 欠乏症を発症している場合が多いことが知られており、Morgentaler らは前立腺癌患者に対して ART を行ったところ、PSA レベルが低下し、良好な結果を得られたことも報告している<sup>59)</sup>。さらに Vignozzi らは androgen レベルが低いほうが前立腺に炎症が生じ、前立腺肥大症を発症することを示している<sup>60)</sup>。しかし、Amano らの指摘のように正常レベルを超える androgen は前立腺疾患以外にも予想外の副作用をもたらす危険性もあり<sup>26)</sup>、ART は慎重に行われなければならない。

本研究の結果から、2 型糖尿病に起因する androgen 欠乏症の場合や去勢による単純な androgen 欠乏症による勃起障害に対して ART は勃起機能を改善することが示されたが、高 estrogen 状態を伴う androgen 欠乏症の場合には ART が奏功しなかった。そのため、ART を施行する際には、現在の ART 施行前の検査では考慮されていない因子にも注意することで、ART の有効性改善や副作用回避にもつながると考えられる。

表 9. 国内外で使用されている男性ホルモン剤<sup>5)</sup>

投与経路	一般名	商品名	投与量
注射	プロピオン酸テストステロン	エナルモン*	25~50 mg/1~3 day
	エナント酸テストステロン	エナルモンデポー*	125~250 mg/2 wks
	mixed testosterone esters	Sustanon 250	250 mg/3 wks
経口	フルオキシメステロン	ハロテストチン	2~5 mg daily
	メチルテストステロン	エナルモン*	20~50 mg daily
	testosterone undecanoate	Andriol	120~200 mg daily
		Andriol Testocap	
	mesterolone	Proviron	25~75 mg daily
皮下植込み	Testosterone implants		1200 mg/6 mos
経皮膚	男性ホルモン軟膏	グローミン軟膏*	6 mg daily
	testosterone patches	Androderm	6 mg daily
		Testoderm	10~15 mg daily
	testosterone gel	AndroGel	5~10 g (1%) daily
		Testim	
経歯肉	testosterone buccal system	Striant	2 T/daily

\*日本で販売している男性ホルモン剤（2006 年 12 月現在）

表 10. 投与経路別の男性ホルモン剤の長所・短所<sup>5)</sup>

投与経路	長所	短所
経口薬	投与法・投与量設定が容易、 中断可能	肝機能障害、 毎日服用、 高 DHT 値
注射薬（非デポー剤）	投与量設定が容易、 中断可能	痛み、 1~3 日毎の注射
注射薬（デポー剤）	2~3 週に 1 度の注射	痛み、 テストステロン値の大きな変動、 投与量設定の困難さ、 中断不能
皮下植込み薬	安定したテストステロン値、 6 カ月毎投与	小切開、 中断不能
経皮薬、バツカル薬	投与法・投与量設定が容易、 生理的テストステロン値、 中断可能	局所刺激、 毎日投与

## 引用文献

1. Lizza EF, Rosen RC. Definition and classification of erectile dysfunction: report of the Nomenclature Committee of the International Society of Impotence Research. *Int J Impot Res* 1999;11:141-3.
2. Buvat J, Maggi M, Guay A, Torres LO. Testosterone deficiency in men: systematic review and standard operating procedures for diagnosis and treatment. *J Sex Med* 2013;10:245-284.
3. Buvat J, Maggi M, Gooren L, Guay AT, Kaufman J, Morgentaler A, Schulman C, Tan HM, Torres LO, Yassin A, Zitzmann M. Endocrine aspects of male sexual dysfunctions. *J Sex Med* 2010;7:1627-1656.
4. Isidori AM, Strollo F, More M, Caprio M, Aversa A, Moretti C, Frajese G, Riondino G, Fabbri A. Leptin and aging: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different body weights. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000;85:1954-1962.
5. 加齢男性性腺機能低下症候群-LOH 症候群- 診療の手引き. (じほう) 2007
6. ED 診療ガイドライン [2012 年版]. (リッチヒルメディカル) 2012
7. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol* 1994;151:54-61.
8. 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. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med* 2010 8;363:123-135.
9. Marui E. Epidemiology of erectile dysfunction and risk factors. *Igaku-no-ayumi* 2002;201:397-400.
10. Jain P, Rademaker AW, McVary KT. Testosterone supplementation for erectile dysfunction: results of a meta-analysis. *J Urol* 2000;164:371-375.
11. Andersson KE, Wagner G. Physiology of Penile Erection. *Physiological Rev* 1995;75:191-236.
12. Wingard C, Fulton D, Husain S. Altered penile vascular reactivity and erection in the Zucker obese-diabetic rat. *J Sex Med* 2007;4:348-63.
13. Morelli A, Chavalmane AK, Filippi S, Fibbi B, Silvestrini E, Sarchielli E, Zhang XH, Vignozzi L, Vannelli GB, Forti G, and Maggi M. Atorvastatin ameliorates

- sildenafil-induced penile erections in experimental diabetes by inhibiting diabetes-induced RhoA/Rho-kinase signaling hyperactivation. *J Sex Med* 2009;6:91–106.
14. Wingard CJ, Moukdar F, Prasad RY, Cathey BL, and Wilkinson L. Reversal of voltage-dependent erectile responses in the Zucker obese-diabetic rat by rosuvastatin-altered RhoA/Rho-kinase signaling. *J Sex Med* 2009;6:269–78.
  15. Rajasekaran H, White S, Baquir A, Wilkes N. Rho-kinase inhibition improves erectile function in aging male Brown-Norway rats. *J Androl* 2005;26:182–8.
  16. Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction. *FASEB J* 2006;20:536-8.
  17. Basar MM, Aydin G, Mert HC, Keles I, Caglayan O, Orkun S et al. Relationship between serum sex steroids and aging male symptoms score and international index of erectile function. *Urology* 2005; 66: 597-601.
  18. Greco EA, Pili M, Bruzziches R, Corona G, Spera G, Aversa A. Testosterone:estradiol ratio changes associated with long-term tadalafil administration: A pilot study. *J Sex Med* 2006; 3: 716-22.
  19. Srilatha B, Adaikan PG, Chong YS. Relevance of oestradiol-testosterone balance in erectile dysfunction patients' prognosis. *Singapore Med J* 2007; 48: 114-8.
  20. Srilatha B, Adaikan PG. Endocrine milieu and erectile dysfunction: is oestradiol-testosterone imbalance, a risk factor in the elderly? *Asian J Androl* 2011; 13: 569-73.
  21. Goyal HO, Braden TD, Williams CS, Williams JW. Estrogen-induced developmental disorders of the rat penis involve both estrogen receptor (ESR)- and androgen receptor (AR)-mediated pathways. *Biol Reprod* 2009; 81: 507-16.
  22. Simon L, Avery L, Braden TD, Williams CS, Okumu LA, Williams JW et al. Exposure of neonatal rats to anti-androgens induces penile mal-developments and infertility comparable to those induced by oestrogens. *Int J Androl* 2012; 35: 364-76.
  23. Adaikan PG, Srilatha B. Oestrogen-mediated hormonal imbalance precipitates erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2003; 15: 38-43.
  24. Srilatha B, Adaikan PG. Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: do ER-alpha and ER-beta in the cavernosum play a role? *Urology*. 2004; 63: 382-6.
  25. Fibbi B, Filippi S, Morelli A, Vignozzi L, Silvestrini E, Chavalmane A, De Vita G, Marini M, Gacci M, Manieri C, Vannelli GB, Maggi M. Estrogens regulate humans and rabbit epididymal contractility through the RhoA/Rho-kinase pathway. *J Sex Med*

- 2009;6:2173-86.
26. Amano T, Imao T, Takemae K, Iwamoto T, Yamakawa K, Baba K, Nakanome M, Sugimori H, Tanaka T, Yoshida K, Katabami T, Tanaka M. Profile of serum testosterone levels after application of testosterone ointment (glowmin) and its clinical efficacy in late-onset hypogonadism patients. *J Sex Med* 2008;5:1727-1736.
  27. 平成 20 年国民健康・栄養調査結果
  28. 平成 24 年厚生労働省統計
  29. 糖尿病アトラス第 6 版(国際糖尿病連合) 2013
  30. Fukui M, Tanaka M, Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N. Association between serum bioavailable testosterone concentration and the ratio of glycated albumin to glycated hemoglobin in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:397-401.
  31. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992;41:1422-1428.
  32. Mizukawa M, Ohmori K, Obayashi A, Ishihara Y, Yoshida J, Noma T, Yukiiri K, Kosaka H, Kohno M. Effects of combined olmesartan and pravastatin on glucose intolerance and cardiovascular remodeling in a metabolic-syndrome model. *Hypertens Res* 2009;32:617-624.
  33. Moran TH, Bi S. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1211-1218.
  34. Davis DD, Ruiz AL, Yanes LL, Iliescu R, Yuan K, Moulana M, Racusen LC, Reckelhoff JF. Testosterone supplementation in male obese Zucker rats reduces body weight and improves insulin sensitivity but increases blood pressure. *Hypertension* 2012;59:726-731.
  35. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117-3132
  36. Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med* 2012;52:46-58.
  37. Høst C, Gormsen LC, Christensen B, Jessen N, Hougaard DM, Christiansen JS, Pedersen SB, Jensen MD, Nielsen S, Gravholt CH. Independent effects of testosterone on lipid oxidation and VLDL-TG production: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Diabetes* 2013;62:1409-1416.

38. Ota H, Akishita M, Akiyoshi T, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Testosterone deficiency accelerates neuronal and vascular aging of SAMP8 mice: protective role of eNOS and SIRT1. *PLoS One* 2012;7:e29598.
39. Yu J, Akishita M, Eto M, Ogawa S, Son BK, Kato S, Ouchi Y, Okabe T. Androgen receptor-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells: role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *Endocrinology* 2010;151:1822-1828.
40. Traish AM, Munarriz R, O'Connell L, Choi S, Kim SW, Kim NN, Huang YH, Goldstein I. Effects of medical or surgical castration on erectile function in an animal model. *J Androl* 2003;24:381-387.
41. Fukuhara S, Tsujimura A, Okuda H, Yamamoto K, Takao T, Miyagawa Y, Nonomura N, Okuyama A. Vardenafil and resveratrol synergistically enhance the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in corpus cavernosal smooth muscle cells and its therapeutic potential for erectile dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rat: preliminary findings. *J Sex Med* 2011;8:1061-1071.
42. Kovanecz I, Ferrini MG, Vernet D, Nolzco G, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Pioglitazone prevents corporal veno-occlusive dysfunction in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *BJU Int* 2006;98:116-124.
43. Albersen M, Lin G, Fandel TM, Zhang H, Qiu X, Lin CS, Lue TF. Functional, metabolic, and morphologic characteristics of a novel rat model of type 2 diabetes-associated erectile dysfunction. *Urology* 2011;78:476.e1-8.
44. Li A, Xiong J, Chen Z. IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS is associated with decreased colonic contraction in rats with multiple organ dysfunction syndrome. *J Surg Res* 2012;178:e51-57.
45. Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:431-435.
46. Beltowski J, Kedra A. A symmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep.* 2006;58:159-178.
47. Ioakeimidis N, Vlachopoulos C, Rokkas K, Aggelis A, Terentes-Printzios D, Samentzas A, Alexopoulos N, Stefanadis C. Relationship of asymmetric dimethylarginine with penile doppler ultrasound parameters in men with vasculogenic erectile dysfunction. *Eur Urol* 2011;59:948-955.

48. Paroni R, Barassi A, Ciociola F, Dozio E, Finati E, Fermo I, Ghilardi F, Colpi GM, Corsi MM, Melzi d'Eril GV. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction. *Int J Androl* 2012;35:660-667.
49. Park K, Lee DG, Kim SW, Paick JS. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rat penile tissue: reduced enzyme activity is responsible for erectile dysfunction in a rat model of atherosclerosis. *Int J Impot Res* 2009;21:228-234.
50. Mills TM, Stopper VS, Wiedmeier VT. Effect of castration and androgen replacement on the hemodynamics of penile erection in the rat. *Biol Reprod* 1994;51:234-8.
51. Davila H, Rajfer J, Gonzales-Cadavid N. Corporal veno-occlusive dysfunction in aging rats: evaluation by cavernosometry and cavernosography. *Urology* 2004;64:1261-6.
52. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FC. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Eur J Endocrinology* 2008;159:507–14.
53. Bruck B, Brehme U, Gugel N, Hanke S, Finking G, Lutz C, Benda N, Schmahl FW, Haasis R, Hanke H. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2192-2199.
54. Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1999;84:813-819.
55. Khasnavis S, Ghosh A, Roy A, Pahan K. Castration Induces Parkinson Disease Pathologies in Young Male Mice via Inducible Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem* 2013;288:20843-20855.
56. Hatakeyama H, Nishizawa M, Nakagawa A, Nakano S, Kigoshi T, Uchida K. Testosterone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 2002;530:129-132.
57. Rogol AD, Swerdloff RS, Reiter EO, Ross JL, Zumbrunnen TL, Pratt GA, Brennan JJ, Benesh J, Kan-Dobrosky N, Miller MG. A multicenter, open-label, observational study of testosterone gel (1%) in the treatment of adolescent boys with klinefelter syndrome or anorchia. *J Adolesc Health* 2014;54:20-25.
58. Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med* 2004;350:482-92.

59. Morgentaler A, Lipshultz LI, Bennett R, Sweeney M, Avila D Jr, Khera M. Testosterone therapy in men with untreated prostate cancer. *J Urol* 2011;185:1256-1260.
60. Vignozzi L, Cellai I, Santi R, Lombardelli L, Morelli A, Comeglio P, Filippi S, Logiodice F, Carini M, Nesi G, Gacci M, Piccinni MP, Adorini L, Maggi M. Antiinflammatory effect of androgen receptor activation in human benign prostatic hyperplasia cells. *J Endocrinol* 2012;214:31-43.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官として終始御懇なる御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科 木村和哲先生に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、幾多の御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野 前田康博先生、大野雅恵先生、堀田祐志先生に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、様々な御協力を賜りました動物飼育施設の皆様に感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、幾多の御助言、御協力を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野の教室員の皆様に深謝の意を表します。

最後になりましたが、本学において研究を行えるように全ての面で支えてくれた家族に感謝するとともに、厚く御礼を申し上げます。