＜平成 27 年度助成＞

“低インスリンダイエット”による下部尿路機能障害発症機序の解明

片岡　智哉[1)]・堀田　祐志[2)]・前田　康博[2)]・木村　和哲[1)、2)]
（[1)] 名古屋市立大学大学院 医学研究科臨床薬剤学
[2)] 名古屋市立大学大学院 薬学研究科病院薬剤学）

Ⅰ．背景

食生活の欧米化による肥満者の増加が進む一方で、ダイエットも流行している。近年のダイエットブームの中、炭水化物制限食による“低インスリンダイエット”が流行している。この“低インスリンダイエット”はRobert Atkins博士が提唱したもので、血糖値の上がりにくい食品を食べ、インスリンの過剰な分泌を抑えることでダイエットが可能になるというものである。この“低インスリンダイエット”はメタボリックシンドロームの予防など体重減少には一定の成果を上げている。しかし恐ろしいことに、スウェーデンで 4 万人以上の女性を対象に行われた研究では、炭水化物制限食を摂取していたグループで心血管疾患の発症リスクを高めたことが報告されている。

我々は性ホルモン変化に伴う排尿機能障害発症メカニズムの検討など、様々な排尿機能障害発症メカニズムの解明を行ってきた。“低インスリンダイエット”による健康被害の報告も存在し、下部尿路機能に及ぼす影響についても検討が必要である。そこで本研究では、“低インスリンダイエット”が下部尿路機能に及ぼす影響をラットを用いて薬理学的に検討し、下部尿路機能障害の発症メカニズムを解明することを目的とした。

Ⅱ . 実験材料および方法

Ⅱ-1．実験プロトコール

12 週齢、雄性、Wistar ST ラットを用いた。ラットに日本クレア株式会社より購入した通常食（CLEA Rodent Diet CE-2）を給餌するコントロール群を作成した。一方、炭水化物制限食（LCD）として、CLEA Rodent Diet CE-2 の糖質（スクロースおよびコーンスターチ）をタンパク質（ミルクカゼイン）で置換した飼料を給餌する LCD 群を作成した。なお、食餌重量あたりの総エネルギー量が同じ飼料（タンパク質エネルギー比率 76.7%、脂質エネルギー比率 21.6%、糖質エネルギー比率 1.7%）になるよう配合し、各飼料を粉末給餌器用カバーを装着した粉末給餌器を用いて給餌した。動物は、温度および湿度がコントロールされた部屋で、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 時間毎の明暗サイクルで飼育した。

本研究では LCD 投与開始後、4 週間の観察期間を設け、ラットの下部尿路機能を評価した。

Ⅱ-2．膀胱内圧曲線（シストメトログラム；CMG）による膀胱機能測定

実験の概要を **Fig.1** に示す。麻酔の導入を 3.0％イソフルラン、維持を 1.0-1.5％イソフルランによる吸入麻酔で行い、麻酔下で下腹部を約 2 cm 切開し、膀胱を露出して頭頂部より側溝をあけた PE-50 チューブを挿管。5-0 糸にて二重結紮し、膀胱瘻を作成した。チューブは下腹部より皮下を通し、首の後ろから体外へ出した。チューブは圧トランスデューサーに接続し、さらに膀胱への生理食塩水注入のためシリンジポンプへと接続した。膀胱内圧測定は、麻酔の影響を避けるため覚醒下にて固定器内で行った。生理食塩水（室温）の膀胱内注入速度は 0.08 ml/min とした。圧トランスデューサーの信号を PowerLab 4/26 で記録し、得られた

膀胱内圧曲線から、ソフトウェア Chart5 を用いて排尿間隔 (Voiding interval)、排尿時最大膀胱内圧 (Peak voiding pressure)、ベースライン圧 (Baseline pressure：排尿後から次の排尿までの膀胱内圧の最小値）を算出した。

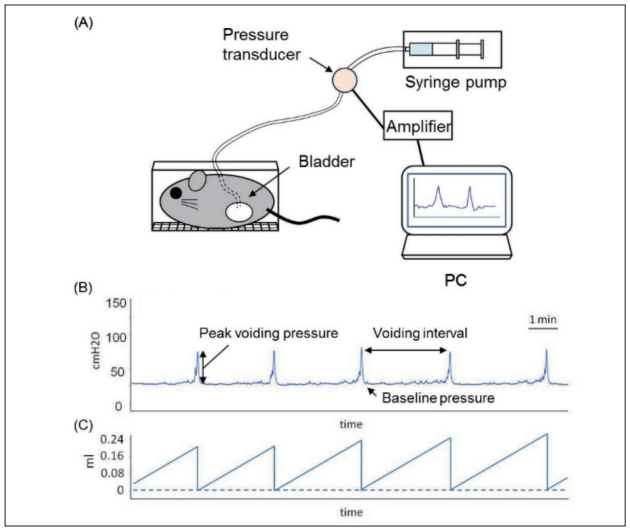

Fig.1 (A) The measurement of intravesical pressure.
(B) Representative cystometrogram. (C) Injection volume of saline

Ⅱ-3．Isometric Tension Study による張力測定

ラットより摘出した膀胱を 4℃に冷やした Krebs 溶液 (mM: NaCl 119, KCl 4.6, $CaCl_2$ 1.5, $MgCl_2$ 1.2, $NaHCO_3$ 15, D-glucose 11 and NaH_2PO_4 1.2) 中で、膀胱体部を約 1 cm × 0.2 cm の大きさにプレパレーションし、標本を作製した。膀胱標本を 95% O_2 ― 5% CO_2 で通気した 37℃の Krebs 溶液で満たしたマグヌス管に固定した。膀胱標本の一端をセルフィンで固定し、他端をトランスデューサーの先端に糸で接続して固定し、薬物による収縮反応と electrical field stimulation (EFS) による収縮反応の張力変動をモニターした。膀胱標本に 600 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。薬物による収縮反応として carbachol を 10^{-10}–10^{-4} M の範囲で累積投与し、膀胱の収縮力を測定した。また、EFS による収縮反応は、刺激電極を用い、160V, duration 5 msec, 周波数 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 Hz のパルス波で 5 秒間ずつ刺激した。収縮力の測定には、各膀胱標本重量に対する張力の割合で解析した。

Ⅱ-4．マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析

ラットの大静脈より採取した血清を用いて、マイクロアレイ法によりマイクロ RNA の発現変動を網羅的に解析した。また、摘出した膀胱を用いて、マイクロアレイ法により遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。解析は Agilent 社製の解析システムを用い、株式会社マクロジェン・ジャパンに抽出・解析を依頼した。

Ⅱ-5．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 Welch’s *t*-test もしくは Student’s *t*-test を適宜用い、危険率 5％未満を有意と判定した。なお、本研究では F 検定を行い、張力測定の結果が Welch’s *t*-test であることが必要と判断されたため、他のすべての結果も Welch’s *t*-test で統計処理を行った。

Ⅲ．結果

Ⅲ-1．各種パラメータ測定結果

体重測定結果を **Fig.2** に示す。開始後、1 週目の時点で LCD 群（332.4 ± 4.9 g）では Control 群（360.7 ± 5.7 g）に比べて有意に体重が低下した（$p < 0.01$）。また、LCD 群では 2 週目以降体重が増加したが、4 週目の時点（390.2 ± 3.6 g）において Control 群

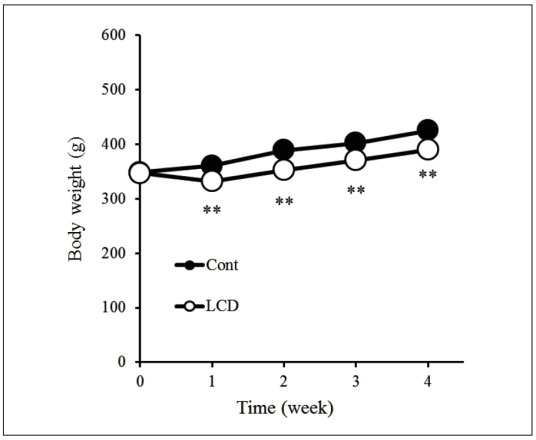

Fig.2 The measurement of body weight. n = 16. **$p < 0.01$.

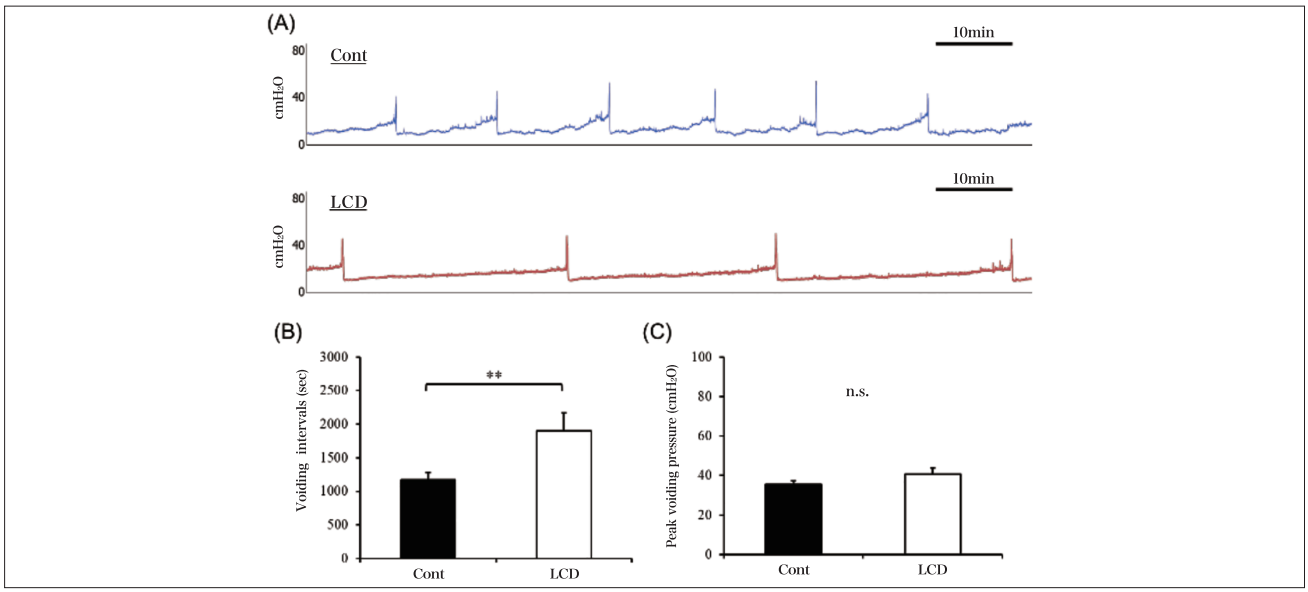

Fig.3 (A) Representative tracings of cystometrograms in Control and LCD groups. Infusion rate of saline; 0.08 ml/min. (B) Analysis of voiding interval (B) Peak voiding pressure. n = 8. $^{**}p < 0.01$. *n.s.* = not significant.

（425.3 ± 5.3 g）に比べて有意に体重が低かった（$p < 0.01$）。

4 週目の時点において、ラットの膀胱重量（Control 群 : 0.16 ± 0.03 g, LCD 群 : 0.17 ± 0.01 g）には有意差は見られなかった（$p > 0.05$）。一方、血糖値（Control 群 : 103.8 ± 3.1 mg/dL, LCD 群 : 120.0 ± 7.3 mg/dL）にも有意差は見られなかったが（$p > 0.05$）、ケトン値は LCD 群が Control 群に比べて有意に低かった（Control 群 : 1.38 ± 0.2 mmol/L, LCD 群 : 0.88 ± 0.03 mmol/L; $p < 0.05$）。

Ⅲ-2．膀胱内圧曲線（シストメトログラム；CMG）による膀胱機能測定結果

膀胱内圧曲線のチャートと解析結果を **Fig.3** に示す。LCD 群の排尿間隔（1899.6 ± 269.2 秒）は Control 群（1172.9 ± 109.7 秒）に比べて有意に延長した（$p < 0.01$）。一方、排尿時最大膀胱内圧およびベースライン圧には変化は見られなかった（$p > 0.05$）。

Ⅲ-3．Isometric Tension Study による張力測定結果

膀胱の張力測定結果を **Fig.4** に示す。カルバコールを累積投与すると濃度依存的に収縮力が増大した。LCD 群では Control 群に比べてカルバコール刺激に対する収縮力が有意に低下した。一方、EFS において刺激時の周波数を増加させると、周波数依存的に収縮力が増大した。LCD 群は Control 群に比べて EFS に対する収縮力が有意に低下した。

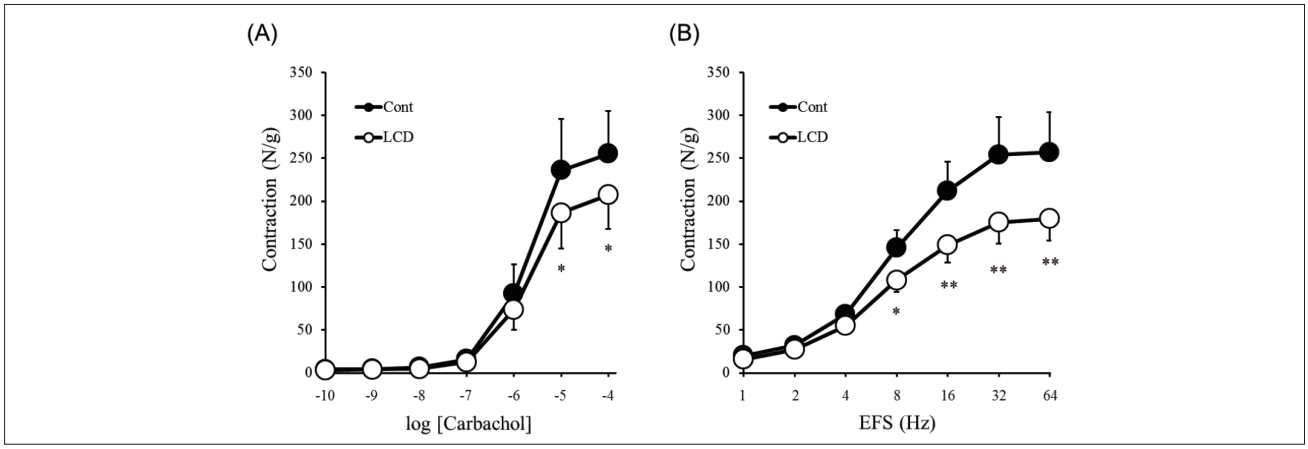

Fig.4 (A) Carbachol-induced contraction curve in rat bladder.
(B) Electrical field stimulation (EFS)-induced contraction curve in rat bladder. .n = 8. $^{**}p < 0.01$. $^{*}p < 0.05$

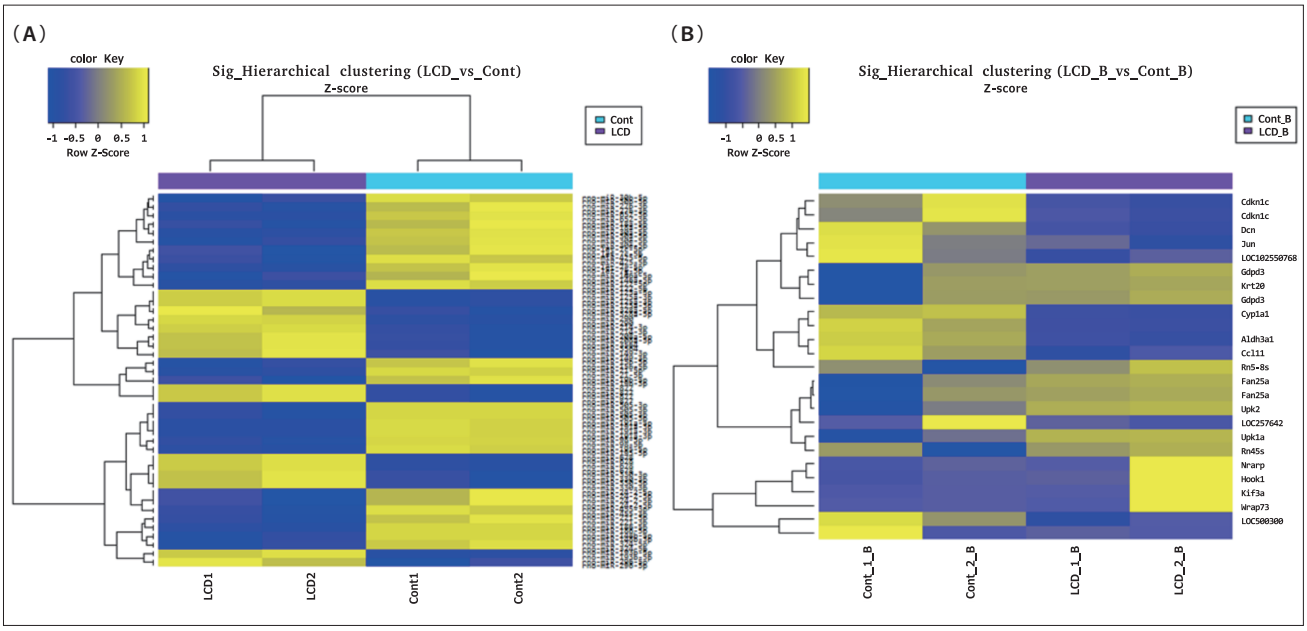

Fig.5 (A) Cluster image of serum micro RNA expression using microarray analysis. (B) Cluster image of bladder gene expression using microarray analysis.

Ⅲ-4．マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析による血清中マイクロ RNA のクラスター解析結果を **Fig.5** に示す。Control 群に比べて LCD 群で 1.5 倍以上の発現量の変化が見られた因子は 43 種類存在し、miR-125a など 15 種類のマイクロ RNA の発現量が増加しており、miR-221 など 33 種類のマイクロ RNA の発現量が低下していた。一方、膀胱組織を用いたマイクロアレイ解析では Cdkn1c など 6 種類の因子において LCD 群で低下傾向がみられた。

Ⅳ．考察

炭水化物制限食で 4 週間飼育した LCD 群のラットにおいて、CMG 測定の結果、排尿間隔の延長が観察された。さらに Isometric Tension Study による張力測定の結果、排尿筋収縮力の低下が観察された。これらの結果により、“低インスリンダイエット”が低活動膀胱を引き起こす可能性が示唆された。

下部尿路機能障害のうち、低活動膀胱は尿漏れや排尿困難などを引き起こし、尿路感染症や腎障害などの二次障害も引き起こす可能性があり、患者の QOL を大きく低下させる。さらに、低活動膀胱に対する治療法は現在のところ存在せず、予防が重要である。

低活動膀胱の危険因子の一つとして、膀胱における炎症がある。本研究において発現の増加が観察された miR-125a は NF-κB の制御因子として知られており、miR-125a の増加により組織に炎症を引き起こす可能性が考えられる。一方、miR-221 は血管新生に関与する因子として知られており、miR-221 の減少は膀胱血流量の低下を引き起こし、低活動膀胱の要因の一つと考えられる。しかし、本研究での膀胱における網羅的遺伝子解析の結果からは解明は困難であった。今後も引き続き“低インスリンダイエット”による低活動膀胱の発症メカニズムを明らかにしていきたい。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位に深謝致します。また、共同研究者の木村和哲教授、前田康博講師、堀田祐志助教にも感謝致します。

Influence of a low carbohydrate diet (LCD) on lower urinary function in rats

Kataoka T[1)], Hotta Y[2)], Maeda Y[2)], Kimura K[1), 2)]

1) Department of Clinical Pharmaceutics, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University

2) Department of Hospital Pharmacy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

It has been reported that an excessive diet can cause health damage. In this study, we investigated the influence of a low carbohydrate diet (LCD) on lower urinary function in rats using pharmacological and molecular biology techniques.

We divided 12-week-old male Wistar-ST rats into control and LCD groups. After 4 weeks, voiding function and detrusor muscle contraction were evaluated. Cystometrography (CMG) was performed to assess the voiding interval and intravesical pressure. Detrusor muscle contraction was measured via isometric tension using bladder tissue. Contraction was induced by carbachol and electrical field stimulation (EFS). A micro-array analysis was used to examine variations in the expressions of microRNAs in the serum and gene expressions in the bladder tissue.

The body weight of rats in the LCD group was significantly decreased from one week after LCD administration to 4 weeks. Based on the CMG (80 μ L/min) results, LCD significantly prolonged the voiding interval (LCD group: 1899.6 $\pm$ 269.2 sec., control group: 1172.9 $\pm$ 109.7 sec.). Intravesical pressure did not differ significantly between the groups. On the other hand, LCD rats showed a significantly weaker detrusor muscle contractile force in response to carbachol. Similarly, LCD rats showed a weaker contractile force against EFS. Regarding microRNAs, LCD increased 15 factors and decreased 33 factors.

An excessive diet might cause an underactive bladder by decreasing the response of the muscarinic receptors and urinary bladder smooth muscle contractility.