



Title	排尿反射路の調節機構に関する研究 : 代謝型グルタミン酸受容体による調節機構と下部尿路閉塞ラット排尿反射求心路の可塑性変化
Author(s)	田中, 博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第6357号
Issue Date	2005-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6357
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/28083
Type	doctoral thesis
File Information	TANAKA_2005.pdf



学 位 論 文

排尿反射路の調節機構に関する研究

—代謝型グルタミン酸受容体による調節機構と

下部尿路閉塞ラット排尿反射求心路の可塑性変化—

北 海 道 大 学

田 中 博

この学位論文は北海道大学大学院医学研究科 外科治療学講座 腎泌尿器外科学分野・小柳知彦名誉教授もとで1998年から2003年にかけて行った研究内容をもとに記述したものである。

本学位論文の主体となった論文は以下の3つである。

- 1) Tanaka H, Kakizaki H, Shibata T, Mitsui T, Koyanagi T (2003): Effects of a selective metabotropic glutamate receptor agonist on the micturition reflex pathway in urethane-anesthetized rats. *Neurourol. Urodyn.* 22: 611-616.
- 2) Tanaka H, Kakizaki H, Shibata T, Mitsui T, Koyanagi T (2003): Effect of preemptive treatment of capsaicin or resiniferatoxin on the development of pre-micturition contractions after partial urethral obstruction in the rat. *J. Urol.* 170: 1022-1026.
- 3) Tanaka H, Kakizaki H, Shibata T, Ameda K, Koyanagi T (2003): Effects of chronic blockade of N-Methyl-D-Aspartate receptors by MK-801 on neuroplasticity of the micturition reflex pathway after partial urethral obstruction in the rat. *J. Urol.* 170: 1427-1431.

目 次

要旨・・・(1)

緒言・・・(5)

研究 I：ウレタン麻酔ラットにおける代謝型グルタミン酸

受容体の排尿反射路に対する調節機構・・・(8)

研究 II：下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の発生メカニズムに

関する研究

(1) ラット下部尿路閉塞モデルの確立・・・(19)

(2) 下部尿路閉塞ラットの過活動膀胱発生における膀胱求心性 C-fiber の機能的亢進の関与についての検討・・・(24)

(3) 下部尿路閉塞ラットにおける NMDA 型グルタミン酸受容体の慢性阻害効果の検討・・・(36)

全体の考察・・・(46)

結論・・・(49)

謝辞・・・(50)

引用文献・・・(51)

要旨

膀胱と尿道から構成される下部尿路は蓄尿と排尿の相反する機能を円滑に行うべく、末梢と中枢の神経路を介した複雑な制御を受けている。蓄尿反射は主に脊髄レベルの反射によって制御され、交感神経（下腹神経）と体性神経（陰部神経）の興奮によりそれぞれ膀胱の弛緩、尿道の収縮が起こる。一方、排尿反射は膀胱の伸展刺激が中枢に伝達され、脳幹部橋排尿中枢の興奮が起こり、副交感神経（骨盤神経）の興奮を介する膀胱の収縮と体性神経の抑制を介する尿道の弛緩を起こすと考えられている。

これら下部尿路支配神経の調節機構を明らかにすることは、下部尿路機能障害の新たな治療の開発につながる可能性がある。前立腺肥大症に代表される下部尿路閉塞性疾患では、尿意切迫感や頻尿などを主症状とする過活動膀胱がしばしば合併し、この過活動膀胱の発生機序として、排尿反射路の機能的変化が関与することが想定されている。排尿神経機能の解明と下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の発生機序の解明を目的として、以下の2つの研究を行った。

研究1：ウレタン麻酔ラットにおける代謝型グルタミン酸受容体を介した排尿調節機構

骨盤神経を介する膀胱伸展刺激の求心性神経伝達と橋排尿中枢より副交感神経核への遠心性神経伝達の両者において、腰仙髄に存在するイオンチャンネル型グルタミン酸受容体が主要な役割を果たしていることが知られているが、代

謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) が排尿反射にどのように関与するかは不明であった。そこで選択的 mGluR 作動薬である *trans*-(±)1-amino1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (*trans*-ACPD)を腰仙髄レベルのクモ膜下に投与し、その効果を検討した。

膀胱伸展により誘発される膀胱の律動性収縮は、*trans*-ACPD 3-10 μ g のクモ膜下投与により完全に抑制され、その抑制時間は容量依存性に延長した。また、膀胱の収縮に一致して起こる尿道内圧の低下と排尿促進効果を有する外尿道括約筋の高頻度な収縮-弛緩運動は *trans*-ACPD (10 μ g) 投与により消失した。さらに、橋排尿中枢の電気刺激による膀胱の収縮圧も *trans*-ACPD (10 μ g) 投与により著明に低下した。以上の結果より代謝型グルタミン酸受容体は排尿反射に対し抑制性調節を行っているものと考えられた。また、その作用点は少なくとも橋排尿中枢から腰仙髄への遠心路にあることが示唆された。

研究 II：下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の発生メカニズムに関する研究

(1) ラット下部尿路閉塞モデルの確立

近位部尿道の周囲にポリエチレンチューブを巻き尿道の部分的閉塞を作製、6週後に膀胱内圧測定を行った。この処置により急性尿閉による死亡例もなく、また均一な下部尿路閉塞が作製可能であった。

閉塞ラットでは偽手術ラットと比較し、膀胱容量の増加と排尿圧の上昇がみられた。閉塞ラットでは、ヒトの排尿筋過活動に相当すると考えられる排尿を伴わない排尿筋収縮 (pre-micturition contraction) の出現が認められた。膀胱重量の有意な増加も認められた。

これらの結果から、本研究で使用した尿道部分閉塞ラットが下部尿路閉塞に伴う特徴的な組織学的、機能的変化を有していることが確認された。

(2) 下部尿路閉塞ラットでの過活動膀胱発生における膀胱求心性

C-fiber の機能的亢進に関する検討

下部尿路閉塞に合併する過活動膀胱の発生に膀胱求心性 C-fiber の機能的亢進が関与しているとの報告がある。本研究では capsaicin (CAPS) あるいは resiniferatoxin (RTX) の前治療により C-fiber を脱感作したラットを用いて下部尿路閉塞を作製し、自然排尿行動の観察と覚醒下膀胱内圧測定を行い、コントロールと比較検討した。

その結果、CAPS 群あるいは RTX 群とコントロール群との間に自然排尿行動において明らかな違いはみられなかった。覚醒下膀胱内圧測定では、コントロールと比較し、CAPS 群では膀胱容量、排尿量、排尿閾値圧の有意な増加を認め、RTX 群においても統計的有意差はないものの同様の傾向であった。両群ともコントロールと比較し、最大排尿圧、排尿効率に差を認めず、また pre-micturition contraction の頻度と振幅にも差がみられなかった。

(3) 下部尿路閉塞ラットにおける NMDA 型グルタミン酸受容体の慢性

阻害効果の検討

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一型である NMDA 型受容体は、強い侵害刺激後に生じる末梢神経から脊髄への入力亢進、いわゆる中枢性感作の形成と維持に関与することが報告されている。本研究では閉塞ラットと偽手術ラットそれぞれに NMDA 型受容体拮抗剤である MK-801 または生食を反復投与し、各群の覚醒下膀胱内圧測定の結果を比較検討した。

NMDA 型受容体を慢性阻害するため、MK-801 1.0mg/kg を週 1 回筋注した。その結果、閉塞ラットでは MK-801 投与により膀胱容量、排尿量の有意な増加を認めたが、閉塞のない偽手術ラットにはこの作用を認めなかった。また、MK-801 は閉塞、非閉塞ラットの最大排尿圧、排尿効率には影響せず、閉塞ラットに認められる pre-micturition contraction も MK-801 投与により変化を認めなかった。

結語

以上の結果より、ラットの排尿反射路においては、腰仙髄レベルに存在する代謝型グルタミン酸受容体を介した抑制性調節機構が存在することが明らかとなった。膀胱求心性 C-fiber は下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の発生には関与しないことが示唆されたが、生理的な排尿反射と無関係と考えられていた膀胱求心性 C-fiber が下部尿路閉塞状態下では膀胱の圧や容量変化の情報伝達に関与していることが明らかになった。さらに、下部尿路閉塞後の排尿反射求心路の可塑的变化に NMDA 型受容体が関与していることが明らかとなった。これらの結果から、下部尿路閉塞などの病的状態では排尿反射を制御する機構に変化が起こり、これが過活動膀胱などの病的状態を引き起こすことが示唆された。

今後の研究により排尿反射路の調節機構をより詳細に解明していくことは、下部尿路疾患の新たな治療方法を探る上で重要な糸口をもたらすものと考えられる。

緒言

膀胱及び尿道より構成される下部尿路は蓄尿と排尿の相反する機能を行う臓器であり、消化器など他の自律神経の調節を受ける器官とは異なり、意識下のコントロールがよく発達している。このような特性を維持するために下部尿路は末梢及び中枢よりなる神経回路の複雑な支配を受けている。排尿反射路を形成する末梢神経は骨盤神経を介する副交感神経、下腹神経を介する交感神経、陰部神経を介する体性神経よりなる。また、これらの神経は、それぞれ一次求心性線維を含んでいるが、排尿反射に最も重要なものは骨盤神経を経由する知覚情報である。骨盤神経に含まれる求心性線維は有髄の A δ -fiber と無髄の C-fiber からなるが、尿の貯留や膀胱内の圧力に関する情報は A δ -fiber から脊髄後角に存在するニューロンにシナプスし、その後脊髄内を上行して脳幹部橋排尿中枢に伝達される。この入力が増加すると橋排尿中枢の興奮が起き、そこからの下行線維が副交感神経の興奮と交感神経、体性神経の抑制を起し、排尿にいたる。この末梢神経—脊髄—橋—脊髄—末梢神経よりなる基本的排尿反射路は脳皮質などの上位中枢からの抑制性または促進性の調節を受け、さらにその神経回路の求心路及び遠心路のシナプス伝達の各段階において抑制性または促進性の複雑な制御を受けている。

過活動膀胱は尿意切迫感、頻尿、尿失禁などの症状をもたらす、患者の生活の質（QOL）を損ない、社会生活に対しても深刻な影響を与える。最近の大規模な疫学調査の結果、本邦をはじめ先進諸国において中高年の 12–16%に過活動膀胱の症状がみられることが判明し大いに関心が持たれている（Milson et al.,

2001; Stewart et al., 2003; 本間ら 2003)。過活動膀胱における頻尿・尿失禁が発生するメカニズムとして、膀胱求心路の機能的亢進を重視する意見と、不随意の排尿筋収縮がはじめに起こり、これにより尿意切迫感や尿失禁などが引き起こされるとする意見があるが、その詳細は不明である。

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、基本的排尿反射路においても重要な役割を果たしていることが報告されている。しかしながら過去の報告はイオンチャンネル型受容体 (ionotropic glutamate receptor: iGluR) に関するものであり、代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor: mGluR) の働きは不明である。mGluR は様々な神経伝達物質を介したシナプス伝達を、シナプス前性あるいは後性に促進性あるいは抑制性に調節することが知られているが、とりわけ重要なのは iGluR を介した興奮性伝達の抑制である (Anywl,1999; Cartmell and Schoepp, 2000)。これらのことから排尿反射路において mGluR が何らかの調節的作用を有していることが推測される。

先に述べた過活動膀胱のモデルとしてラットに下部尿路閉塞を作製した実験では、推測される過活動膀胱の発生メカニズムの一つに排尿反射路の可塑的变化がある。特に膀胱から脊髄への求心路、とりわけ骨盤神経に含まれる求心性線維の中の C-fiber の機能的亢進が関与していることを示す報告がある (Steers and de Groat, 1988; Steers et al., 1991; Chai et al., 1998)。NMDA 型受容体はシナプス伝達の可塑的变化である海馬の長期増強の発現に深く関わっていることが知られているが、その他に内臓器への侵害刺激後に起こる脊髄後角求心性ニューロンの興奮性の増強である中枢性感作においても重要な働きをしている

ことが知られている (Munglani et al., 1999; Coutinho et al., 2001)。

これらの背景をもとに、以下の研究を行った。

研究 I : ウレタン麻酔ラットにおける代謝型グルタミン酸受容体を介した排尿
調節機構

研究 II : 下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の発生メカニズムに関する研究

(1) ラット下部尿路閉塞モデルの確立

(2) 下部尿路閉塞ラットでの過活動膀胱発生における膀胱求心性

C-fiber の機能的亢進の関与についての検討

(3) 下部尿路閉塞ラットにおける **NMDA** 型グルタミン酸受容体の慢性

阻害効果の検討

上記の研究結果について、以下に順を追って詳述する。

研究1：ウレタン麻酔ラットにおける代謝型グルタミン酸受容体を介した排尿調節機構

背景と目的

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質であり、その受容体はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) と代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の2つに大別される。さらに iGluR には、アゴニスト選択性により N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体、 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 型受容体、kainate 型受容体の3種類のサブタイプが存在する。一方、G 蛋白と共役する mGluR には現在まで mGluR1 から mGluR8 までの8種類のサブタイプが存在することが知られ、これらは受容体を構成するアミノ酸配列の相同性、シグナル伝達機構の違い、またアゴニスト選択性により group I、II、III の3つのサブグループに分類される。mGluR1 と mGluR5 よりなる group I mGluR はホスホイノシチドの代謝回転を亢進し、group II mGluR (mGluR2 及び mGluR3) と group III mGluR (mGluR4、6-8) は cAMP の産生を抑制する (Pin and Duvoisin, 1995)。

mGluR は Ca^{2+} や K^{+} チャンネルを介してシナプス前性あるいはシナプス後性に iGluR を含む様々なシナプス伝達の制御を行っている (Anywl, 1999)。薬理的検討の結果、mGluR を介した脊髄反射の遠心路に対する抑制効果 (Bond and Lodge, 1995) や促進効果 (Cao et al., 1995) の存在が明らかにされ、また、一次求心性神経から脊髄後角細胞へのシナプスに存在する mGluR が、脊髄への求心性入力に対する制御を行っていることも報告されている (Rueshewehy

and Spandkühler, 2000)。

基本的排尿反射路においてグルタミン酸受容体が重要な働きを担っていることが報告されている。すなわち、ウレタン麻酔下のラットでは、NMDA 型受容体または AMPA 型受容体拮抗剤の全身または腰仙髄クモ膜下投与により、膀胱伸展による反射性の膀胱収縮および外尿道括約筋の活動が抑制されること

(Maggi et al., 1990; Yoshiyama et al., 1993a, 1995)、橋排尿中枢の電気刺激による膀胱の収縮反応を抑制することが報告されている (Matsumoto et al., 1995a,b)。また、膀胱に対する侵害性あるいは非侵害性刺激の脊髄上行性伝達においても腰仙髄に存在する NMDA 型受容体、AMPA 型受容体が主要な役割を果たしていることが報告されている (Kakizaki et al., 1996,1998)。しかし、従来の研究は iGluR に関するものであり、mGluR の排尿反射路における作用は不明である。よって本研究では、mGluR の選択的作働薬である *trans*-(±)1-aminocyclopentanedicarboxylic acid (*trans*-ACPD)を用いて、ラットの排尿反射路に対する mGluR の役割を検討した。

対象と方法

実験には 19 例のメスラット (180-277g) と 3 例のオスラット (252-398g) を使用した。ウレタン筋注 (1.2 g/kg) による麻酔後に、薬剤投与経路として腰仙髄クモ膜下あるいは内頸静脈にカテーテルを挿入した。第 1 頸椎と第 2 頸椎間のクモ膜の切開孔より PE-10 (Clay-Adams, USA) を挿入し、尾側に向けて第 6 腰髄・第 1 仙髄レベルまで進め、腰仙髄クモ膜下投与 (i.t.) 経路とした。

(Yaksh and Rudy, 1976)。カテーテルは内腔量が 10 μ l になるように長さを

16cm とし、内腔を生食で満たしたものをを用いた。薬剤投与前には i.t.による容量効果がないことを、生食 10 μ l 注入し確認した。薬剤は溶液量が 10 μ l に調整したものを十分な時間をかけて注入、さらに生食 10 μ l によりカテーテル内をフラッシュした。実験終了後には椎弓を切除し、カテーテルの位置が適正であることを確認した。静脈投与 (i.v.) は内頸静脈へ挿入した PE-50 (Clay-Adams, USA) から行った。

等容量性反射性膀胱収縮実験では両側尿管の膀胱側を結紮、腎側に PE-10 を挿入し、尿が体外へ排出されるようにした。また、遠位部尿道を結紮し膀胱内容量を一定とした。膀胱頂部の小切開孔よりカテーテル (PE-60: Clay-Adams, USA) を挿入固定した。このカテーテルに三方活栓を介してシリンジポンプ (STC-523, Terumo, Japan) と圧トランスデューサー (P-23XL, Viggo Spectramed, USA) を連結し、それぞれ膀胱内への生食注入と膀胱内圧測定に使用した。反射性の膀胱収縮が出現するまで生食を 0.1ml/min のスピードで注入し、その後は膀胱内容量を一定とし律動性膀胱収縮圧を測定した。

橋排尿中枢電気刺激実験では、尿管及び遠位部尿道を同様に処置し、等容量性膀胱収縮圧のモニターを可能とした上で、膀胱内容量を膀胱の伸展による反射性収縮が出現する閾値以下で一定とした。脳定位固定装置にラットを固定、開頭後に橋排尿中枢を電気刺激し、膀胱収縮圧の変化を検討した。刺激電極 (J-3002, M.T Giken Co., Japan) は橋背側の内側域に挿入し、挿入部位を 0.25—0.50mm 刻みで移動し、最大の膀胱収縮圧が得られた部位にて固定した。電気刺激は持続時間 0.3msec、10-40V、50 ヘルツで一回の刺激時間は 4 秒間の条件で行った。

外尿道括約筋筋電図・尿道内圧測定実験にはオスラットを使用した。先に述べたように両側尿管を遮断し、膀胱頂部のそれぞれ別の小孔から、膀胱内圧測定用カテーテル (PE-60) と尿道内圧測定用のダブルルーメンカテーテル (PE-150 と PE-50 を使用して作製) を挿入した。ダブルルーメンカテーテルは先端を円錐状に形成し、これを内尿道口が閉鎖される位置で固定した。この処置により膀胱と尿道との間を結紮あるいは切断することなく両者の内腔が分離され、膀胱内圧及び尿道内圧を別々に測定することが可能となる (Kakizaki et al., 1997)。膀胱内容を反射性の律動性膀胱収縮が持続する容量で一定とし、尿道内へはダブルルーメンカテーテルより生食を 0.075ml/min で注入しつつ尿道内圧を測定した。併せて、外尿道括約筋に針電極(13R21, Dantec, Denmark)を刺入し、外尿道括約筋筋電図を記録した (Counterpoint, Mk2, Dantec, Denmark)。

薬剤はウレタン (ethyl carbamate, Sigma Chemical, USA)、*trans*-ACPD (Research and Biochemical, Inc., USA) を使用した。*trans*-ACPD は実験直前に生食に溶解し (1.0mg/ml)、pH を 7.2-7.4 に調節したものを使用した。結果は平均±標準偏差で表示し、統計的解析は ANOVA 及び post hoc Sheff *F* test により行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

結果

1) 膀胱伸展による反射性の律動性膀胱収縮への影響

等容量性反射性膀胱収縮実験では、最初に膀胱伸展による反射性の膀胱収縮が律動的に安定した状態で継続することを 10-15 分間確認したが、薬剤投

与前の平均膀胱収縮圧は $55.5 \pm 1.5 \text{ cmH}_2\text{O}$ であった。 *trans*-ACPD を 1、5、10 mg/kg と累加的に i.v. したが、律動性膀胱収縮は変化しなかった (n=3)。 *trans*-ACPD $1 \mu\text{g}$ を i.t. した 5 例中 3 例では変化を認めなかったが、3、5、10 μg を i.t. した各 4 例のラットでは全例で、投与後まもなく律動性の膀胱収縮が完全に抑制された (図 I-1 A)。投与後一定時間で律動性膀胱収縮は再出現したが、回復までの時間は投与量依存性に延長した。回復後の律動性収縮の頻度と収縮圧は薬剤投与前と同様であった (表 I-1 B)。

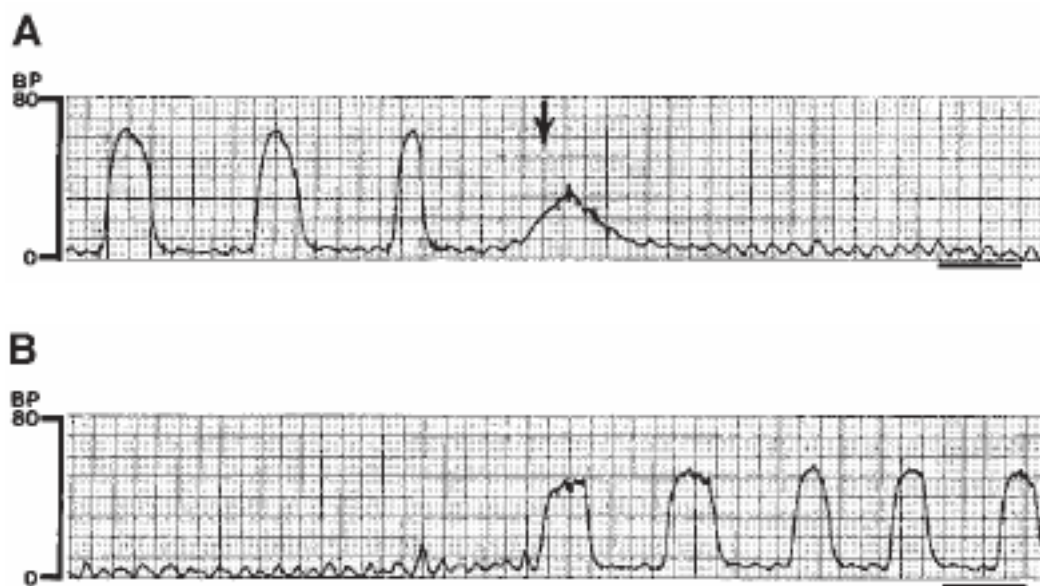


図 I-1 膀胱伸展による反射性膀胱収縮に対する *trans*-ACPD i.t. の効果

A: *trans*-ACPD $10 \mu\text{g}$ i.t. により律動性の膀胱収縮は完全に抑制される。

B: この抑制効果は約 40 分間持続し、その後は速やかに回復。回復後の収縮圧と収縮頻度は投与前と変化がない。

矢印は *trans*-ACPD の投与、水平バーは 1 分、垂直軸は膀胱収縮圧 (cmH_2O)

表 I-1 膀胱伸展による反射性律動性膀胱収縮への *trans*-ACPD の用量別効果

<i>trans</i> -ACPD の投与量 (i.t.) (n: 投与例数)	平均律動性膀胱収縮圧 (cmH ₂ O)	i.t.後の抑制時間 (分)
3 μ g (n=4)	56.2 \pm 2.8	11.4 \pm 2.5 ^a
5 μ g (n=4)	55.3 \pm 2.1	13.2 \pm 1.3 ^b
10 μ g (n=4)	55.0 \pm 1.5	36.2 \pm 2.4

^a p < 0.05 v.s. 10 μ g ^b p < 0.05 v.s. 10 μ g

2) 橋排尿中枢電気刺激による膀胱収縮への影響

橋排尿中枢電気刺激実験では電極の位置を変えつつ電気刺激したが、Bregma を基準とし尾側に 8.5–9.4 mm、外側に 0.5–1.0 mm、深さは 5.4–7.5 mm の位置で最大の膀胱収縮圧が得られた (n=4)。薬剤投与前及び投与後に各 4 回、3 分毎に電気刺激を行ったが、薬剤投与前の膀胱収縮圧を 100% とすると、*trans*-ACPD 10 μ g i.t. 後には膀胱収縮圧は 12.6 \pm 2.3% に抑制された。この抑制作用は投与後速やかに現れ、約 40 分間持続し、その後徐々に回復した (図 I-2)。

3) 外尿道括約筋の活動性に与える影響

外尿道括約筋筋電図・尿道内圧測定では膀胱の律動性収縮に一致し、尿道内圧は緩やかに低下、また外尿道括約筋の *bursting activity* と、これに同期した尿道内圧の高頻度振動を認めた (図 I-3A)。*trans*-ACPD 10 μ g i.t. により膀胱の律動性収縮は消失し、外尿道括約筋の *bursting activity* と尿道

内圧の高頻度振動も消失した (図 I-3 B)。

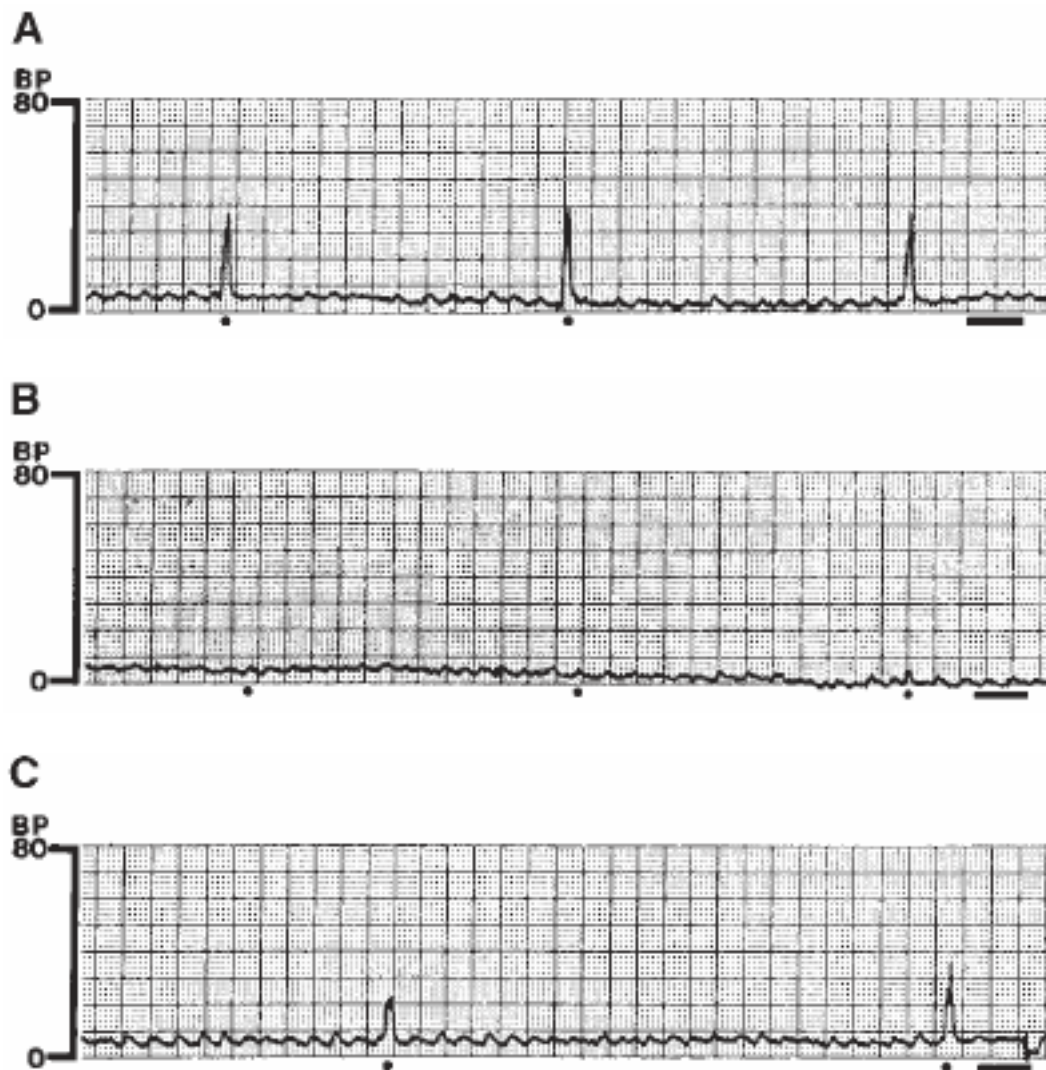


図 I-2 橋排尿中枢電気刺激による膀胱収縮への *trans*-ACPD の効果
A: 生食 $10 \mu\text{l}$ の i.t. 後も橋排尿中枢への電気刺激により、一定した圧の膀胱収縮が得られる。
B: *trans*-ACPD ($10 \mu\text{g}$) の i.t. により膀胱の収縮は完全に消失する。
C: 投与 35 分後より電気刺激による収縮が回復し、徐々に前値に復す。
●は電気刺激、水平バーは 30 秒、垂直軸は膀胱収縮圧 (cmH_2O)

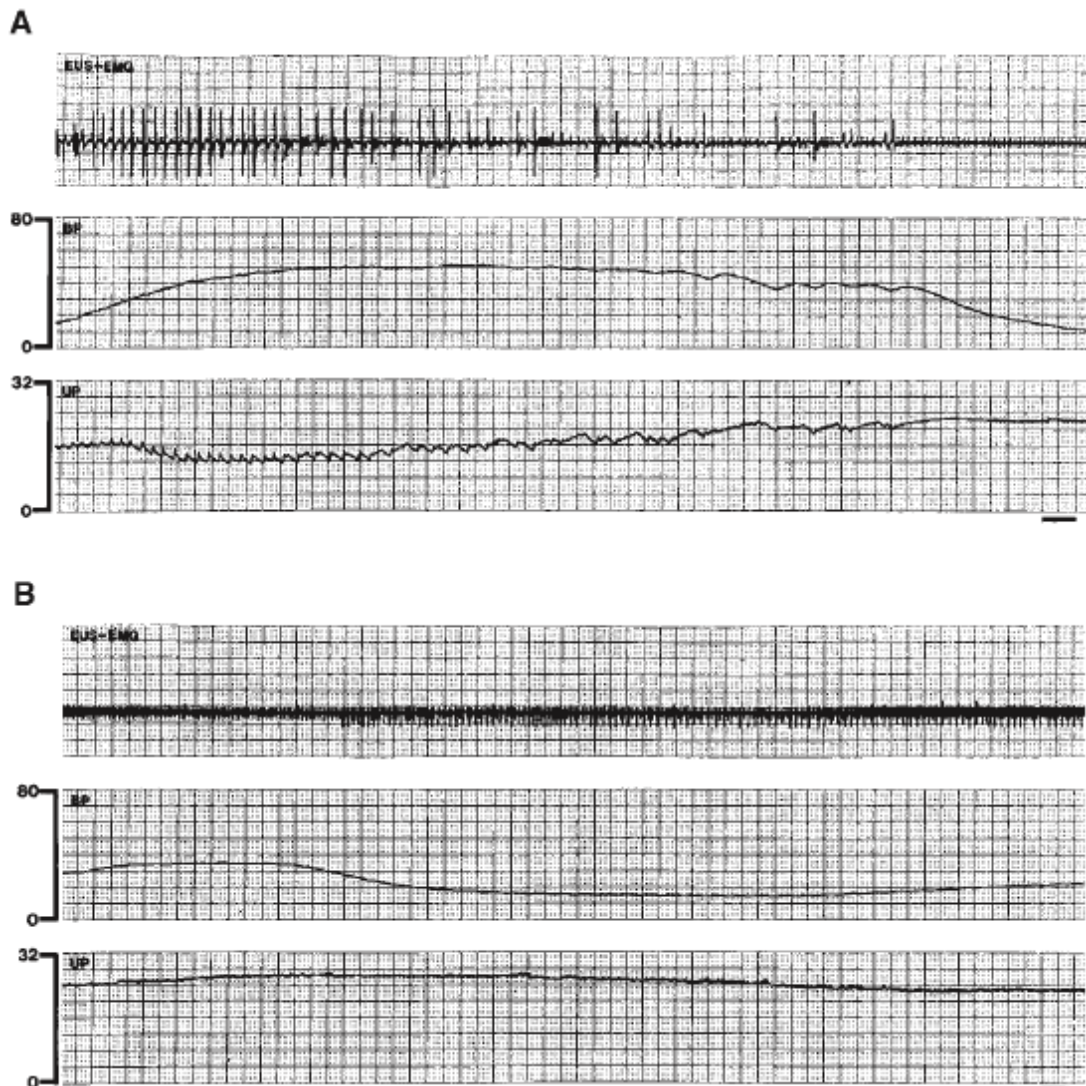


図 I - 3 等容量性反射性膀胱収縮時の外尿道括約筋筋電図 (EUS-EMG)、尿道内圧 (UP; cmH₂O)、膀胱内圧 (BP; cmH₂O) の同時測定
 A: 膀胱収縮による膀胱内圧の上昇に一致し、外尿道括約筋筋電図にて外尿道括約筋の *bursting activity* と、尿道内圧の高頻度振幅を認める。
 B: *trans*-ACPD (10 μg) の i.t.により外尿道括約筋の *bursting activity* と尿道内圧の高頻度変化が消失する。 (水平バーは 10 秒)

考察

本実験の結果から、選択的 mGluR 作動薬である *trans*-ACPD のクモ膜下への投与は腰仙髄に存在する mGluR を介し、基本的排尿反射路に対し抑制性に

作用することが示された。橋排尿中枢の電気刺激により誘発される膀胱収縮も *trans*-ACPD により抑制されたことから、この薬理的効果は少なくとも橋排尿中枢から腰仙髄の副交感神経核へ投射する遠心性伝達を抑制した結果と考えられる。また膀胱収縮に伴う外尿道括約筋の活動も抑制されたことから、陰部神経核(オヌフ核)への遠心路に対しても抑制性作用を有すると考えられた。

trans-ACPD はサブグループ非選択的 mGluR 作動薬であるが、アフリカツメガエル卵母細胞に遺伝子導入により発現させた mGluR を用いた実験の結果、作用強度は group II に対するものが最も強く、次いで group I、group III の順であった (Pin and Duvoisin, 1995)。本実験では高用量の *trans*-ACPD を静脈内投与したが、排尿反射に対し明らかな作用を示さなかった。したがって、この薬剤が脳血液関門を通過しないこと、また排尿反射に関連する末梢神経系には作用しないことが示唆された。

ラット海馬のシナプス内 mGluR の局在に関する報告では、group II あるいは group III mGluR は主にシナプス前に、group I mGluR はシナプス後に存在するとされているが (Shigemoto et al., 1997)、group I 及び group II mGluR がシナプス前、後の両方に存在するとの報告もある (Petrulia et al., 1996; Doherty and Dingledine, 1998)。脊髄内の mGluR の局在に関する免疫組織化学的研究では、group I に属する mGluR5 が副交感神経核および交感神経核に存在し、mGluR1 が横隔膜及び外尿道括約筋を支配する脊髄前角運動ニューロンに存在することが報告されている (Alvarez et al., 2000)。また group II mGluR に対する抗体を用いた免疫組織染色では、脊髄後角に強い染色性が、脊髄側角及び前角には中等度から軽度の染色性が認められている (Tang and Sim, 1999)。

In situ hybridization 法による検討では group III mGluR の mRNA の発現を脊髄前角及び後角に認めている (Boxall et al., 1998)。

多くの神経伝達物質のシナプス間隙への放出が mGluR により制御されているが、中枢神経系に普遍的に認められ、かつ最も顕著な mGluR の生理的作用はグルタミン酸受容体による興奮性シナプス伝達への抑制性調節であり、この作用は典型的にはシナプス前 mGluR によるものと考えられている (Cartmell and Schopp, 2000)。脊髄内のシナプス伝達に関しては group I mGluR による脊髄後角への求心性伝達に対する抑制作用 (Chen et al., 2000)、一次求心性神経の刺激による脊髄後角神経細胞への興奮性伝達に対するシナプス前 group II あるいは group III mGluR の抑制作用などの報告がある (Gerber, 2000)。

これらの事実を踏まえると、今回の実験により示された腰仙髄クモ膜下への *trans*-ACPD 投与による脊髄一橋一脊髄からなる基本的排尿反射路に対する抑制作用は、シナプス前に存在する mGluR の活性化によるものと考えられる。先に述べたように、基本的排尿反射路における求心性伝達と遠心性伝達の両方において脊髄内グルタミン酸受容体が重要な働きをしているが、*trans*-ACPD のクモ膜下投与による効果は、腰仙髄に存在する mGluR が少なくとも遠心性神経伝達に対して抑制的に作用することを示したものと考えられる。しかしながら、膀胱の一次求心性神経から脊髄後角への求心性伝達に対する *trans*-ACPD の効果については今回の実験では明らかではなく、今後の課題である。

生理的レベルの微量の濃度のグルタミン酸によりグルタミン酸受容体を介したシナプス伝達が抑制されることから (Zorumski et al., 1996)、グルタミン酸のシナプス間隙への放出そのものが、グルタミン酸受容体による興奮性シナプ

ス伝達に対し自己調節を行っていることが推測されている。排尿反射路における mGluR の生理的作用は排尿反射に関係する脊髄神経の過度の興奮を防止することであると考えられ、この調節機構の異常が排尿筋過活動などの膀胱機能異常の原因となっている可能性も考慮される。今後臨床的に使用可能な mGluR 作動薬が開発されれば、排尿反射の調節機構の異常に起因する疾患に有用であると考えられる。

研究 II：下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の発生メカニズム

に関する研究

(1) ラット下部尿路閉塞モデルの確立

背景と目的

Mattiasson らの報告以来 (Mattiasson and Uvelius., 1982)、ラットの尿道部分閉塞モデルに関する多くの研究が行われてきた。ラットの閉塞膀胱にみられる特徴として、膀胱重量の増加や組織学的な膀胱筋層の肥大があり (Uvelius et al., 1984)、機能的には膀胱内圧測定にて膀胱容量の増加、排尿圧の上昇、排尿を伴わない排尿筋の収縮である *pre-micturition contraction* の出現を認め (Malmgren et al., 1987; Igawa et al., 1994)、その他に自然排尿行動の観察から単位時間あたりの排尿回数が増加することが報告されている (Chai et al., 1999)。これらの組織学的あるいは機能的特徴はヒトの前立腺肥大症など、下部尿路閉塞疾患に見られる特徴と類似しているため、その病態を研究する上で有用なモデルとして研究が行われてきた。

ラットを用いた下部尿路閉塞モデルの多くは、尿道外周に回した糸を結紮して尿道の部分閉塞を作製する報告が大部分である。このような方法の欠点として、結紮糸の種類や結紮時の張力により尿道の部分閉塞の程度が一定しない可能性があり、また急性に尿道の閉塞が作製されるため術後尿閉により死亡するラットが存在するなど、緩徐に進行するヒトの前立腺肥大症などとは異なる側面がある (Lluel et al., 1998)。

そこで今回はより臨床に近い病態を再現し、また実験の有用性を高めるため、

閉塞の程度が軽度でかつ個体間のバラツキの少ない下部尿路閉塞モデルを作製する新たな方法を開発した。

対象と方法

実験にはメスのウイスターラット用い、ketamine hydrochloride 100mg/kg (Sankyo Co., Japan) 筋注による麻酔後に下部尿路閉塞作製のため以下の処置を行った。下腹部の正中切開にて膀胱頸部から尿道を露出し、近位部尿道を周囲の血管を損傷しないように腔壁より剥離した。尿道部分閉塞の作製には内径 1.40mm のポリエチレンチューブ PE-200 (Clay-Adams, USA) を使用し、長さ 2mm に調節した PE-200 の一カ所に切開を入れ、輪を開く様に両端を保持して尿道に被せた。その後 PE-200 は自らの復元力により環状に戻り、尿道全周が取り囲まれるが、この時点では尿道と PE-200 の間には十分な余裕が存在した。偽手術では尿道を剥離し、PE-200 を尿道周囲へ巻き付けた後にこれを摘出した。術後は尿路感染を予防するために ampicillin 150mg/kg (Sigma Chemical Co., USA) を毎週筋注した。

この処置により尿道が適度に狭窄し、実験に有用な下部尿路閉塞モデルが得られるかどうかを確認するため、下部尿路閉塞ラット (bladder outlet obstruction: BO) 群の膀胱重量と膀胱内圧測定の結果を偽手術 (Sham) 群と比較した。

膀胱内圧測定は閉塞作製 6 週後に行った。Ketamine hydrochloride (100mg/kg) 筋注による麻酔後に下腹部正中切開により膀胱を露出し、膀胱頂部においた小切開孔より PE-60 を挿入固定した。反対側は皮下トンネルを通して頸部背面より体外に出し、端を熱溶解により閉鎖した。同時に残尿による連

続膀胱内圧測定への影響を除くため尿道周囲に巻き付けたPE-200 を摘出した。2日後にラットを拘束ゲージ (KN-326, 夏目製作社) にラットを入れて、覚醒下膀胱内圧測定を行った。頸部背面より導出したPE-60 に三方活栓を介して圧トランスデューサー (P-23XL, Viggo Spectramed, USA) とシリンジポンプ (STC-523, テルモ社) を連結した。一回の膀胱内圧測定に要する時間がほぼ同一になるように、閉塞ラットは 0.2ml/minで、偽手術ラットは 0.05ml/minでシリンジポンプから生食を膀胱内に注入し、膀胱容量 (排尿量+残尿量)、排尿量、残尿量 (排尿終了後に吸引し測定)、排尿効率 (排尿量/膀胱容量 × 100)、排尿閾値圧 (排尿開始時膀胱内圧)、排尿圧 (排尿中の最大膀胱内圧)、排尿前2分間におけるpre-micturition contractionの頻度と最大振幅を測定した。尚、pre-micturition contractionは 4cmH₂O以上の振幅のものとした。各ラットとも3回の排尿サイクルをWR7700 (Graphtec社) に記録し、膀胱内圧チャートより得られたパラメータを解析した。2群間の比較はnon-paired T testあるいはMann-Whitney testにより行い、p<0.05を有意差ありとした。

結果

1) 下部尿路閉塞による膀胱重量の変化

膀胱重量の測定は下部尿路閉塞後6週目に行い、BO群、Sham群とも各5例で比較した。なお、カテーテル挿入等の処置を行うことによる影響を除くため、これらのラットは膀胱重量の測定のみを行った。膀胱重量はBO群 228 ± 18 mg、Sham群 52 ± 3 mgで、有意にBO群の膀胱重量は増加していた (p<0.001)。また、術後の急性尿閉による死亡は認めなかった。

2) 覚醒下膀胱内圧測定

閉塞ラットの覚醒下膀胱内圧測定では、排尿を伴わない排尿筋収縮である pre-micturition contraction を認めた (図 II-1-1)。BO 群 9 例と Sham 群 7 例の比較では、膀胱容量、排尿量、排尿閾値圧、排尿圧は有意に BO 群が高いが、排尿効率に差はなかった。また、pre-micturition contraction の頻度に差はないが、振幅は有意に BO 群の方が高かった (表 II-1-1)。

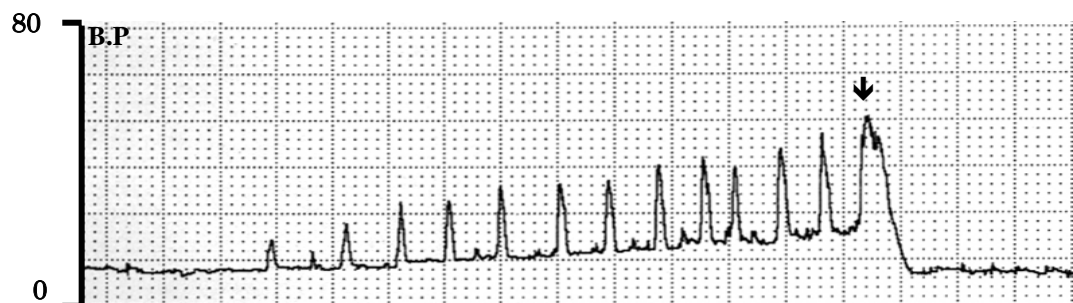


図 II-1-1 下部尿路閉塞ラットの覚醒下膀胱内圧測定
 排尿 (矢印) 前に次第に振幅が増強する pre-micturition contraction を認める。
 水平バーは 1 分、垂直軸は膀胱内圧 (BP; cmH₂O)

表 II-1-1 下部尿路閉塞ラットと非閉塞ラットの膀胱内圧パラメータ

	閉塞ラット	非閉塞ラット	p 値
例数	9	7	
平均膀胱容量 (ml)	1.73 ± 0.16	0.64 ± 0.05	<0.01
平均排尿量 (ml)	1.56 ± 0.17	0.59 ± 0.06	<0.01
平均排尿閾値圧 (cmH ₂ O)	18.7 ± 11.8	11.3 ± 0.7	<0.05
平均排尿効率 (%)	87.8 ± 1.7	88.4 ± 2.2	
平均排尿圧 (cmH ₂ O)	56.4 ± 3.0	35.4 ± 2.3	<0.01
Pre-micturition contraction			
平均回数 (回数 / 分)	4.3 ± 0.2	3.4 ± 0.9	
平均振幅 (cmH ₂ O)	9.8 ± 0.8	3.4 ± 0.8	<0.01

考案

BO 群では主に排尿筋の肥厚によると考えられる膀胱重量の増加、膀胱容量の増大と排尿圧の上昇、振幅の大きい **pre-micturition contraction** の出現を認めた。これらの結果は過去の尿道部分閉塞ラットの報告と合致するものであり (Igawa et al., 1994)、下部尿路閉塞ラットに特徴的な組織学的、機能的変化を有していることが確認された。しかしながら、過去の下部尿路閉塞ラットの検討では、閉塞作製初期から高度の尿道閉塞となるため膀胱が過伸展し、25%程度のラットは急性尿閉により死亡することが知られている。また著明な膀胱重量の増加と膀胱容量の増大が報告されている (Malmgren et al., 1987; Lluet et al., 1998; O'Connor et al., 1997)。今回行った方法では手術時には尿道周囲に巻き付けた PE-200 と尿道との間には間隙があり、明らかな閉塞は存在しなかったが、手術から6週間後の時点では PE-200 の周囲に線維性組織が増殖し、これが PE-200 と尿道との間隙を埋めて尿道を閉塞することが確認された。したがって、今回の方法による下部尿路閉塞は徐々に進行したものであり、また過去の報告との比較から下部尿路閉塞の程度は軽度であることが判明した。以上より、本検討で使用した下部尿路閉塞方法は臨床における前立腺肥大症の病態により近いものを再現していると考えられた。

(2) 下部尿路閉塞ラットでの過活動膀胱発生における膀胱求心性 C-fiber の機能的亢進に関する検討

背景と目的

下部尿路閉塞性疾患では排尿困難や残尿感などの排尿症状に加えて、尿意切迫感や頻尿、切迫性尿失禁など蓄尿症状を同時に呈することが多く、また排尿症状よりも蓄尿症状の方が QOL に与える影響が大きいことが知られている (Peters et al., 1997)。排尿筋過活動とはウロダイナミクス検査にて証明される蓄尿中の排尿筋不随意収縮と定義されているが (Abrams et al., 2002)、この排尿筋過活動は代表的な下部尿路閉塞性疾患である前立腺肥大症の患者にみられる尿意切迫感や切迫性尿失禁など蓄尿症状の主たる原因とされてきた。前立腺肥大症患者に高頻度に認められる排尿筋過活動には複数の要因が関与している (Machino et al., 2002)。

ラットにおいても実験的に尿道の部分閉塞を作製すると、pre-micturition contraction と単位時間の排尿回数の増加を特徴とする過活動排尿を認める (Malmgren et al., 1987; Igawa et al., 1994 ; Chai et al., 1999)。この pre-micturition contraction は蓄尿中に出現する排尿を伴わない排尿筋の自発的収縮であり、ヒトの排尿筋過活動に相当すると考えられている (Igawa et al., 1994)。これらの下部尿路閉塞ラットに認める膀胱機能異常には、排尿反射路の機能的変化が関与していることが示唆されている (Steers and de Groat, 1988; Steers et al., 1991a, b)。膀胱の求心性神経線維のひとつである C-fiber の機能的亢進状態を評価するために施行される冷水注入試験 (Ice-water test, Fall et

al., 1990) では、下部尿路閉塞を有する患者は非閉塞患者と比較し有意に陽性率が高いことが報告されている (Chai, et al., 1998)。これらの事実から下部尿路閉塞に伴ってみられるヒトの排尿筋過活動、ラットの **pre-micturition contraction** の発生メカニズムとして、排尿反射の求心路、特に **C-fiber** を介した求心性神経伝達の機能的亢進の関与が考えられる。

骨盤神経に含まれる膀胱の求心性神経線維は比較的伝導速度の速い有髄性 **A δ -fiber** と伝導速度の遅い無髄性 **C-fiber** から構成されるが、これら両者の膀胱の知覚感受性が異なっていると報告されている。ラットでは **A δ -fiber** の大部分と **C-fiber** の約半数は膀胱の伸展により生じる興奮性伝達に関与しているが、その感受性に関しては大きく異なり、**C-fiber** の多くは興奮の圧閾値が高く、膀胱内圧が高い状況にのみ反応し、反応の強さも **A δ -fiber** と比較し微弱である (Dmitrieva and McMahon, 1996)。一方この膀胱求心性 **C-fiber** の感受性は、ある種の病的状態では変化することも知られ、膀胱に炎症が起こると、機械的刺激に無反応であった膀胱求心性 **C-fiber** の一部分は機械的刺激に反応性を示すようになる (Häbler et al., 1990)。

Capsaicin は細径の知覚神経線維である **C-fiber** に対し高い選択性を有する薬剤である。高用量の **capsaicin** を投与すると、初期の神経細胞の興奮に続き、長期間継続する可逆的な神経活動の抑制である脱感作と言われる現象を起こす (Holzer, 1991)。また、**resiniferatoxin** は **capsaicin** と同様の構造を持ち、その作用強度は **capsaicin** よりも強力な薬剤である (Szallasi, 1999)。排尿反射路あるいは膀胱の侵害刺激に関係する **capsaicin** 感受性膀胱求心性線維の働きを調べる目的で、**capsaicin** あるいは **resiniferatoxin** は有用な薬剤として実

験に使用されている (Craft et al., 1995)。

本研究の目的はラットの下部尿路閉塞モデルを作製し、下部尿路閉塞に付随する過活動排尿や pre-micturition contraction などの膀胱機能異常の発生に capsaicin 感受性神経が関与しているかどうかを検討することである。capsaicin あるいは resiniferatoxin により膀胱求心性線維の C-fiber を脱感作した後に、部分尿道閉塞を作製し、6 週間後に膀胱機能を検討した。

対象と方法

実験には体重 124g から 175g のメスのウイスターラットを使用した。先に述べたように、ketamine hydrochloride による麻酔下に尿道周囲へ PE-200 を巻き付けることにより下部尿路閉塞 (BO) を作製した。術後 5 週目まで尿路感染予防に ampicillin 150mg/kg を毎週筋注したが、術後尿閉による死亡は認めなかった。下部尿路閉塞に伴う膀胱機能の変化を調べるために本研究では自然排尿行動の観察と覚醒下膀胱内圧測定を 6 週間に行った。

下部尿路閉塞の作製に先立って capsaicin あるいは resiniferatoxin により C-fiber の脱感作を誘導した。両薬剤ともエタノール 10%、Tween-80 10%、生食 80% の溶液に溶解し、capsaicin 100mg/kg は 50mg/kg ずつ 2 日間に分けて 4 日前に、resiniferatoxin は 0.3mg/kg を下部尿路閉塞作製の前日に皮下投与した (Szallasi et al., 1995)。

自然排尿行動の観察は以下の方法に従い、下部尿路閉塞前と閉塞後 6 週目に行った。代謝ゲージ (Cat. No 650-0350, Nalgen, USA) の下にビーカーを置き、その重量の変化を重量計 (BW42011, 島津製作所) に連結したコンピュータに

60 秒毎に記録した。最低 0.1g 以上の重量増加を排尿と判断し、排尿量は尿 1g を 1ml と換算して算出した。観察は午前 6 時と午後 6 時に明暗が切り替わる、静寂な隔離した部屋で行った。環境の変化に順応するよう前日に測定室内の代謝ゲージにラットを入れ、翌日の午後 3 時から 5 時の間に測定用代謝ゲージにラットを移した。測定は午後 9 時から午前 3 時までの暗期 6 時間と午前 9 時から午後 3 時までの明期 6 時間行い、その間の排尿回数と一回排尿量を評価した。測定中、ラットは自由に摂食、飲水が可能であるようにした。下部尿路閉塞を作製したラットを無治療群 (BO/-)、capsaicin による前治療群 (BO/CAP)、resiniferatoxin による前治療群 (BO/RTX)、の 3 群に分けて、各群間の自然排尿行動を比較検討した。また、各群の下部尿路閉塞前後の自然排尿行動の変化も検討した。

覚醒下膀胱内圧測定は自然排尿行動の観察後に行った。先に述べた方法と同様、ketamine hydrochloride による麻酔下に膀胱内圧測定と膀胱内への注入目的にカテーテルを挿入し、同時に尿道周囲に巻き付けた PE-200 を摘出し、2 日後に測定を行った。各ラットとも 3 回の排尿サイクルを測定し、その平均値を解析に用いた。

今回の実験は下部尿路閉塞作成後 capsaicin あるいは resiniferatoxin による脱感作が長期間継続することが必要なため、C-fiber を介する化学侵害刺激として capsaicin 溶液を角膜表面と膀胱内へ投与し、脱感作の継続の有無を確認した。角膜の求心性 C-fiber の脱感作は eye wipe test により確認した。覚醒下ラットに 100 µg./ml. の capsaicin 溶液を点眼し、点眼後 2 分間の眼を拭く運動の回数を評価した。さらに膀胱求心性 C-fiber の脱感作については、生食注入による覚

醒下膀胱内圧に引き続き、膀胱内に 100 μ M の capsaicin 溶液を注入して評価した。capsaicin 溶液注入により生食注入時の膀胱容量と比較してどれだけ減少するかを検討し、生食注入時を 100%として相対値にて表現した。

測定値は平均±標準偏差により表した。統計的検討として3群間の検討は one-way ANOVA により行い、さらに群間の比較を post hoc Scheffe's F -test により行った。また、必要に応じて、Student's paired t-test、Mann-Whitney test、Kruskal-Wallis test により検討した。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

今回の実験に使用した薬剤は ketamine hydrochloride (Sankyo Co. Japan)、ampicilin、capsaicin、resiniferatoxin (Sigma Chemical Co., USA)である。

結果

1) 下部尿路閉塞ラットの自然排尿行動

自然排尿行動の観察は下部尿路閉塞作製前と閉塞後6週目に、尿道周囲に巻き付けた PE-200 を装着したままの状態で行った。観察したラット数は BO/CAP 7例、BO/RTX 7例、BO/-10例である。各群における閉塞前後の比較では暗期、明期の一回排尿量と排尿回数に一部を除き有意差を認めなかった。全ての群において一回排尿量は暗期、明期とも閉塞後に減少したが(図II-2-1)、有意な減少は BO/RTX 群の暗期にのみ認めた(閉塞前 0.40 ± 0.06 v.s. 閉塞後 0.18 ± 0.02 ml、 $p < 0.05$ 、図II-2-1A)。一方、閉塞後の排尿回数は各群により異なった結果であった(図II-2-2)。暗期の排尿回数は BO/CAP 群と BO/RTX 群では増加したが、BO/-ではほぼ変化しなかった(図II-2-2A)。また明期の排尿回数は BO/RTX 群と BO/-群では増加したが、BO/CAP 群では

逆に減少した (図 II - 2 - 2 B)。3 群間の比較では閉塞前の一回排尿量と排尿回数は、明期、暗期の何れにおいても、有意差を認めず、また閉塞後も明期、暗期とも、一回排尿量と排尿回数に 3 群間の有意な差を認めなかった。

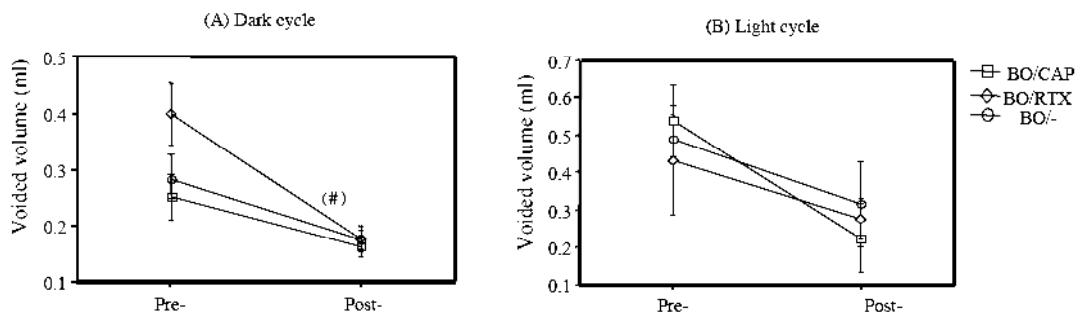


図 II - 2 - 1 下部尿路閉塞前 (Pre-) と閉塞後 (Post-) の平均一回排尿量 (ml)

A: 暗期 (Dark cycle) B: 明期 (Light cycle)

(#): BO/RTX 群は暗期の平均一回排尿量が閉塞後に有意に減少 ($p < 0.05$)。

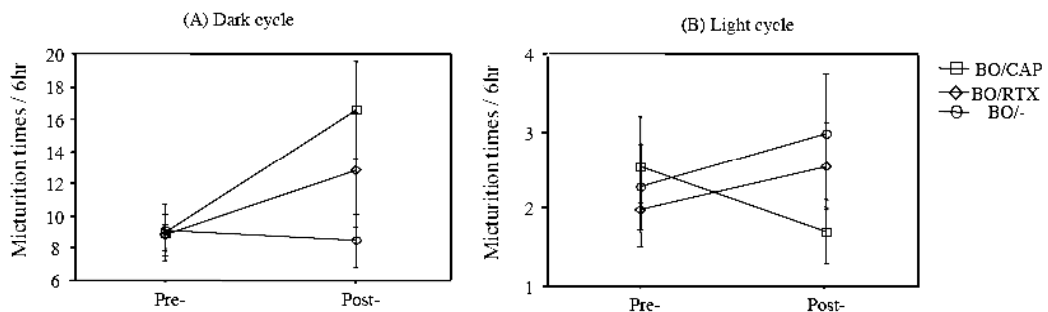


図 II - 2 - 2 下部尿路閉塞前後の平均排尿回数 (回数/6 時間)

A: 暗期 (Dark cycle) B: 明期 (Light cycle)

2) 下部尿路閉塞ラットの覚醒下膀胱内圧測定

覚醒下膀胱内圧測定は BO/- 群 6 例、BO/CAP 群 7 例、BO/RTX 群 7 例で施行し、全ての群において再現性のある結果が得られた。BO/- ラットでは膀胱容

量が増すにつれて増強する pre-micturition contraction を認めた (図 II-2-3 A)。BO/CAP あるいは BO/RTX ラットにおいても同様に pre-micturition contraction を認めた (図 II-2-4 A、図 II-2-5 A)。各群における覚醒下膀胱内圧測定の結果を表に示す (表 II-2-1)。BO/CAP 群の膀胱容量 ($p<0.01$)、排尿量 ($p<0.01$)、排尿閾値圧 ($p<0.01$) は BO/-群と比較し有意に増加していた。BO/RTX 群も BO/-群と比較し膀胱容量、排尿量、排尿閾値圧は増加していたが、統計的有意差は認めなかった。それに対し、残尿量、排尿効率、排尿圧に関しては 3 群に差を認めなかった。それぞれの群の pre-micturition contraction の出現頻度は BO/CAP と BO/RTX は 100%であり、BO/-群の 83%と差はなく、また排尿前 2 分間の pre-micturition contraction の頻度と振幅に関しても 3 群に差を認めなかった。

3) 脱感作の継続性

脱感作の継続性を評価するために行った eye wipe test の結果、capsaicin 溶液の点眼に対してラットが 2 分間の間に眼を拭く回数は BO/-群が 17 ± 1 回であり、BO/CAP 群 (3 ± 1 回、 $p<0.0001$) あるいは BO/RTX 群 (1 ± 1 回、 $p<0.0001$) との間に有意な差を認めた (図 II-2-6 A)。膀胱求心性 C-fiber の脱感作を評価するために行った capsaicin 溶液の膀胱内への注入の結果、BO/-ラットでは著明な膀胱容量の減少を認めたが (図 II-2-3 B)、BO/CAP ラット (図 II-2-4 B)、BO/RTX ラット (図 II-2-5 B) では膀胱容量の変化は僅かであった。BO/-群は capsaicin 溶液注入により膀胱容量は $45\pm 9\%$ に減少したが ($n=4$)、BO/CAP 群は $92\pm 7\%$ ($n=7$, $p<0.001$)、BO/RTX 群は $85\pm 3\%$ ($n=7$,

p<0.001) と生食注入時の膀胱容量と比べごくわずかな差を認めるのみであった (図 II-2-6 B)。

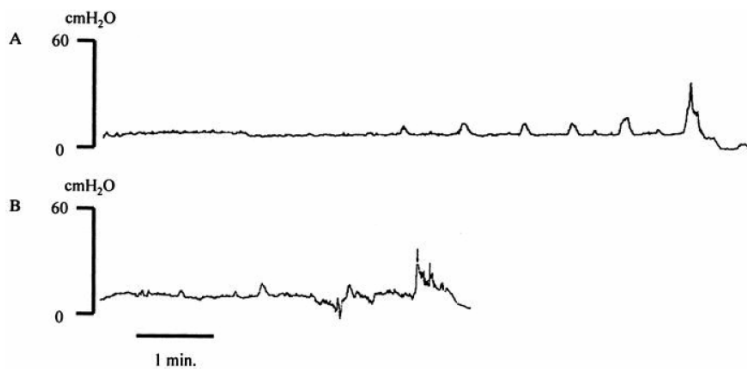


図 II-2-3 BO-ラットの膀胱内圧測定 A:生食、B: capsaicin 溶液注入

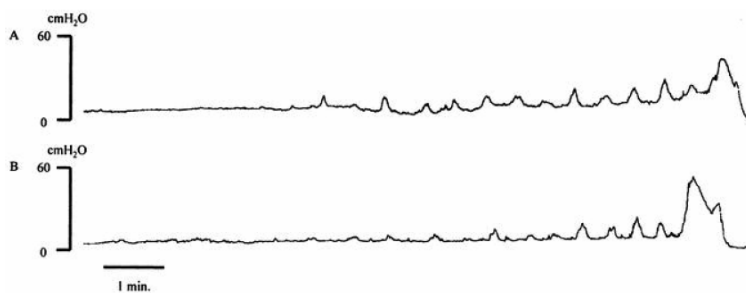


図 II-2-4 BO/CAP ラットの膀胱内圧測定 A:生食、B: capsaicin 溶液注入



図 II-2-5 BO/RTX ラットの膀胱内圧測定 A:生食、B: capsaicin 溶液注入

表 II-2-1 BO/-、BO/CAP、BO/RTX 群の膀胱内圧パラメータ

	BO/-	BO/CAP	BO/RTX
例数	6	7	7
膀胱容量(ml)	1.18±0.07	2.16 ±0.23*	1.64±0.22
排尿量(ml)	1.03±0.08	1.89 ±0.22*	1.43±0.21
排尿閾値圧(cmH ₂ O)	10.8±1.1	21.5 ±2.4*	12.8±2.0
残尿量(ml)	0.12±0.04	0.26±0.06	0.21±0.07
排尿効率(%)	89.4±3.1	87.8±2.3	87.5±3.4
排尿圧(cmH ₂ O)	38.4±3.2	45.0±4.9	31.8±2.5
Pre-micturition contraction			
陽性率(%)	83%	100%	100%
回数(回数/分)	4.4±1.1	4.4±1.3	3.9±0.4
振幅(cmH ₂ O)	11.9±3.9	15.7±1.3	12.1±2.5

* v.s. BO/- p<0.01

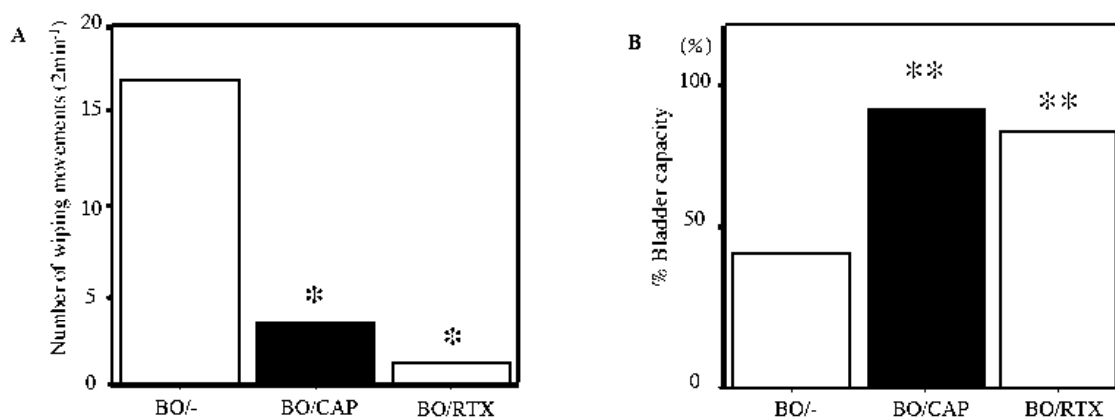


図 II-2-6 角膜 (A) と膀胱 (B) への capsaicin 溶液による化学侵害刺激に対する反応 * : p<0.0001 v.s. BO/- ** : p<0.001 v.s. BO/-

考察

capsaicin あるいは resiniferatoxin 全身投与による capsaicin 感受性求心性神経の

脱感作は投与6週間後も継続していたにもかかわらず、尿道の部分閉塞に伴う pre-micturition contraction の発生は予防されなかった。しかし、覚醒下膀胱内圧測定の結果、capsaicin による前治療を受けたラットでは膀胱容量、排尿量、排尿閾値圧の有意な増加を認めた。一方、自然排尿行動の観察からは、無治療の閉塞ラットと capsaicin あるいは resiniferatoxin による前治療を受けたラットとも排尿行動に違いは認められなかった。これらの事実から、capsaicin 感受性膀胱求心性神経は pre-micturition contraction の発生には必須ではないが、閉塞ラットの排尿反射求心路の機能的変化に部分的ではあるが関与しているものと考えられた。

capsaicin あるいは resiniferatoxin 投与により強い影響を受ける膀胱求心路の C-fiber が正常な排尿反射において果たしている役割は十分に解明されていない。ラットでは A δ -fiber の大部分と C-fiber の約半数は膀胱の伸展により興奮性シグナルを伝達するが、平均的な C-fiber は A δ -fiber と比較しより高い内圧あるいは張力にのみ反応し、またその反応自体も微弱であるとされ (Dmitrieva et al., 1996)、C-fiber は侵害刺激に関する情報を伝達することが主な役割であると考えられてきた (Cheng et al., 1993)。しかし、最近の研究ではラットの骨盤神経内の膀胱求心性線維に関して、その伝導速度と刺激感受性との間に明らかな関係は認められず、骨盤神経内の半数以上の C-fiber は機械的刺激に反応し、また膀胱内圧や膀胱容量に対する興奮発生の閾値も A δ -fiber の

それと差がないことが報告されている (Shea et al., 2000)。

今回の実験では下部尿路閉塞ラットにおいて **capsaicin** の全身投与により膀胱容量、排尿量、排尿閾値圧は増加したが、排尿圧、残尿量、排尿効率には影響しなかった。また、**resiniferatoxin** も統計的に有意差には至らなかったが、**capsaicin** と類似の効果を示した。この結果は、下部尿路非閉塞ラットの排尿反射に対する **capsaicin** の効果として過去に報告された膀胱容量の増加と一致するものである (Shaker et al., 1998)。最近の報告とも併せて考えると、**capsaicin** 感受性の膀胱求心性神経は膀胱の容量や内圧に関する情報を伝達し、**A δ -fiber**、**C-fiber** とも下部尿路の閉塞の有無に関わらず、排尿反射路の一部を構成しているものと考えられる。

過去に報告された下部尿路閉塞ラットの実験では、閉塞を作製するために使用した糸あるいはリングを装着したままの状態でも4から6週間後に覚醒下膀胱内圧測定が施行されており、高い排尿圧と多量の残尿が認められている (Malmgren et al., 1987; O'Connor et al., 1997)。すなわち下部尿路閉塞ラットでは慢性尿閉により膀胱が過伸展した状態であることが推測される。今回行った自然排尿行動の観察の結果、下部尿路閉塞に伴う排尿回数の有意な増加は認められなかった。下部尿路閉塞ラットにおいて排尿回数の増加は必ずしも認められているわけではなく (Malmgren et al., 1988)、ラット個体間の違いが大きいことが結果に影響したとも考えられる。覚醒下膀胱内圧測定では連続した排尿サイクルを観察したが、残尿が測定結果に影響することを懸念し、今回の検討では尿道の部分的閉塞を解除した2日目に覚醒下膀胱内圧測定を行った (Malmgren et al., 1990; Lluet et al., 1998)。自然排尿行動時に得られた排尿

量と、覚醒下膀胱内圧測定で得られた排尿量の違いは、主に閉塞解除後の排尿効率の改善によると考えられる。

今回の実験においても過去の報告と同様、下部尿路閉塞ラットに高率に **pre-micturition contraction** を認めたが、その発生メカニズムに関して神経原性と筋原性の2つの理論が有力である。今回の実験では **capsaicin** あるいは **resiniferatoxin** の前治療により **capsaicin** 感受性膀胱求心性神経の脱感作は持続していたが、**pre-micturition contraction** の発生は予防されなかった。この結果は下部尿路閉塞ラットにおいて、**pre-micturition contraction** の発生に **capsaicin** 感受性膀胱求心性神経は本質的には関係していないことを示している。脊髄損傷などの神経疾患に伴う排尿筋過活動の治療として **capsaicin** あるいは **resiniferatoxin** 溶液の膀胱内注入療法が行われ、臨床的有効性も証明されている (De Ridder et al., 1997; Cruz et al., 1997)。我々の知る限り下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の治療に、これら **vanilloid** 薬を用いたとの報告はないが、今回の結果から、下部尿路閉塞患者の排尿筋過活動に対する **vanilloid** 薬による治療は無効である可能性が高いと推測される。しかしながら本研究は下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の発生メカニズムに関して、十分に検討を尽くしたのではなく、今後下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の病態生理を明らかにするための研究が必要である。

(3) 下部尿路閉塞ラットにおける NMDA 型グルタミン酸受容体の慢性阻害効果の検討

背景と目的。

下部尿路閉塞の実験モデルである尿道部分閉塞ラットは、膀胱筋層の肥大やヒトの排尿筋過活動に類似する pre-micturition contraction の顕性化、排尿回数増加など臨床における前立腺肥大症と同様の特徴を示す。このような下部尿路閉塞に伴う膀胱の機能的異常の発生機序は未だ不明であるが、排尿反射経路の可塑的变化 (neuroplasticity) との関連を示唆する報告がある。すなわち下部尿路閉塞により肥大した筋層から Nerve growth factor (NGF) が過剰産生され、その結果、閉塞ラットの後根神経節内の膀胱求心性神経の細胞体が肥大し、さらに膀胱求心性線維の脊髄投射域が拡大すること、また上位中枢を介さない脊髄反射路を介した膀胱収縮が閉塞ラットでは高率に出現することが報告されている (Steers and de Groat, 1988; Steers et al., 1991 a, b; Steers et al., 1996)。

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一種である NMDA 型受容体は排尿神経路において重要な働きしていることが知られている。ウレタン麻酔下のラットを用いた実験では、NMDA 型受容体拮抗剤である MK-801 の投与により排尿反射が抑制されること (Yoshiyama et al., 1993a, b)、脊髄への MK-801 投与

により排尿反射路の遠心性及び求心性伝達が抑制されること (Matsumoto et al., 1995a; Kakizaki et al., 1998)、さらに下部尿路に侵害あるいは非侵害刺激を加えた場合の脊髄への求心性神経伝達は NMDA 型受容体拮抗剤により抑制されることが報告されている (Birder and de Groat, 1992; Kakizaki et al., 1996, 1998)。しかし、NMDA 型受容体の排尿反射への作用は必ずしも単純なものではなく、覚醒ラットを用いた実験では MK-801 により排尿閾値が低下し排尿反射が促進されるとの報告がある (Vera and Nadelhaft, 1991; Yoshiyama et al., 1994)。一方、様々な侵害刺激や外傷後に起こる痛覚過敏現象には、NMDA 型受容体を介した求心性神経路の可塑的变化が関与していることが知られている (Attal and Bouhassira, 1999)。

今回の実験の目的は下部尿路閉塞に伴う膀胱機能の変化に NMDA 型受容体を介した排尿反射路の **neuroplasticity** が関与しているかどうかを検討することである。NMDA 型受容体の慢性阻害により下部尿路閉塞ラットの膀胱機能がどのように変化するかを検討するため、下部尿路閉塞を作製する直前から 5 週間後まで、NMDA 型受容体の非競合的拮抗剤である MK-801 を反復投与し、6 週間後に覚醒下膀胱内圧測定を行った。さらに閉塞ラットの排尿反射における NMDA 型受容体の急性阻害効果も併せて検討した。

対象と方法

実験には体重 156g – 199g のメスのウイスターラットを使用した。先に述べたように、尿道周囲に PE-200 を巻き付けることにより下部尿路閉塞 (BO) を作製した。術後は尿路感染を予防するために ampicillin 150mg/kg を毎週筋注

した。偽手術 (Sham) 群では、BO 群と同様の処置を行った後に尿道周囲に巻き付けた PE-200 を摘出した。

NMDA 型受容体を慢性的に阻害する目的で、MK-801 1.0mg/kg を下部尿路閉塞作製の直前から、5 週間まで毎週一回筋注した (BO/MK)。同様のスケジュールで MK-801 の vehicle である生食 0.2ml を筋注し、対照とした (BO/V)。Sham 群においても MK-801 投与 (Sham/MK) と生食投与 (Sham/V) の 2 群を作製した。MK-801 の影響として、投与後約 12 時間続く軽度の鎮静状態を認めたが、反復投与による死亡例はなかった。しかし、MK-801 反復投与を受けたラットの実験期間中の体重増加は不良であり、体重増加量は BO/MK 群 $20.0 \pm 2.6\text{g}$ 、BO/V 群 $38.8 \pm 4.9\text{g}$ と有意差を認めた ($p < 0.05$)。Sham 群も同様に MK-801 反復投与により体重増加は不良であったが、統計的有意差はみられなかった (Sham/MK v.s Sham/V: $18.8 \pm 2.3\text{g}$ v.s $31.9 \pm 2.4\text{g}$, $p < 0.1$)。覚醒下膀胱内圧測定は MK-801 投与による直接的影響を排除するため最終投与後 5 日から 7 日目に行った。

覚醒下膀胱内圧の測定は、先に述べた方法と同様に、下部尿路閉塞作製 6 週間後に行った。ketamine hydrochloride による麻酔下に膀胱頂部からカテーテルを挿入し、BO 群では同時に尿道周囲に巻き付けた PE-200 を摘出し、2 日後に測定を行った。各ラットとも 3 回の排尿サイクルを観察し、得られたパラメータの平均値を解析に用いた。膀胱内圧測定後、pentobarbital 60mg/kg 腹腔内投与による深麻酔にて屠殺し、膀胱を摘出してその重量を測定した。

実験は BO/MK 群 9 例、BO/V 9 例、Sham/MK 群 9 例、Sham/V 群 7 例の 4 群で行った。また MK-801 投与による下部尿路閉塞ラットの排尿反射への急性

効果を検討するため、上記の群とは別の BO ラット 6 例に、膀胱頂部から膀胱内圧測定用のカテーテル (PE-60) を、経静脈的薬剤投与 (i.v.) のためのカテーテル (PE-50) を大腿静脈から挿入した。薬剤投与前の膀胱内圧を測定後、累加的に MK-801 を 0.01–1.0mg/kg i.v.した。各用量の MK-801 投与 15 分後に膀胱内圧測定を行い、2 から 3 回の排尿サイクルを観察した。得られたパラメータは薬剤投与前のコントロールに対する相対値として%表示した。各測定結果は平均値 ± 標準偏差で表した。統計的処理は one-way ANOVA を用い、有意差を認めた時には post hoc Sheffe *F* test により各群間の比較を行った。また、2 群間の比較には unpaired t test を行った。全ての統計的処理において $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

使用した薬剤は ketamine hydrochloride (Sankyou Co., Japan)、ampicillin (Sigma Chemical Co., USA)、MK-801 (dizocipiline: Sigma Chemical Co., USA) であり、MK-801 は生食に溶解した。

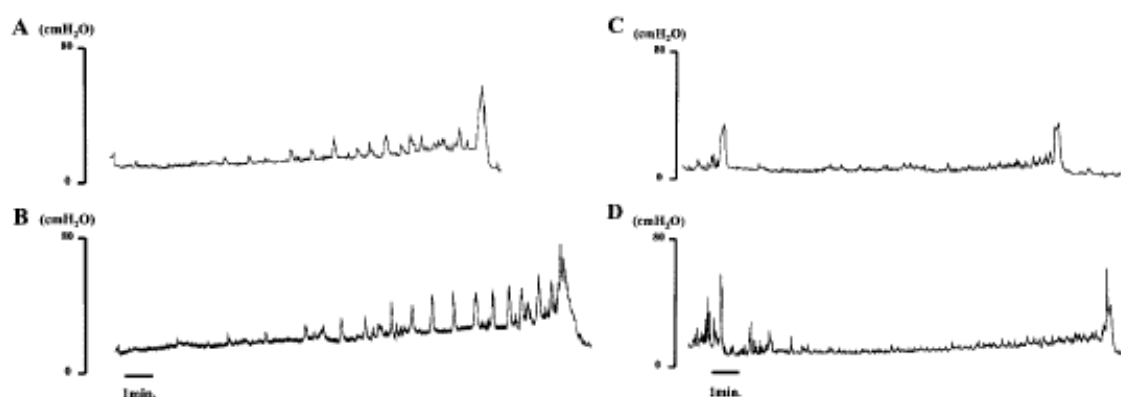
結果

1) 下部尿路閉塞と MK-801 反復投与による膀胱重量への影響

閉塞作製 6 週間後の膀胱重量は BO 群 362 ± 23 mg、Sham 群 154 ± 6.4 mg と下部尿路閉塞により有意に増加していた ($p < 0.0001$)。BO/MK 群 (389 ± 35 g) と BO/V 群 (339 ± 24 g)、Sham/MK 群 (162 ± 9 g) と Sham/V 群 (144 ± 8) の比較では、それぞれ有意な差はなく、MK-801 反復投与による膀胱重量への影響は下部尿路閉塞の有無に関わらず認めなかった。

2) MK-801 反復投与による膀胱機能への効果

4群すべてにおいて、再現性のある覚醒下膀胱内圧測定が可能であった。各群の膀胱内圧測定のチャートを示す（図Ⅱ-3-1 A~D）。膀胱内圧測定においてBO/Vラットは蓄尿中にpre-micturition contractionを認めた（図Ⅱ-3-1 A）。BO/MKラットは膀胱容量の増大を認めたが、pre-micturition contractionはBO/Vラットと同様であった（図Ⅱ-3-1 B）。ShamラットはSham/V、Sham/MKとも蓄尿中の膀胱内圧の変動を認めたが、BOラットと比較しその振幅は明らかに小さかった（図Ⅱ-3-1 C、D）。



図Ⅱ-3-1 左列は閉塞ラット（A: 生食投与、B: MK-801投与）の右列は非閉塞ラット（C: 生食投与、D: MK-801投与）の覚醒下膀胱内圧測定

表に各群の膀胱内圧測定より得られたパラメータを示す（表Ⅱ-3-1）。BO/MK群とBO/V群との比較から、MK-801の反復投与により膀胱容量（BO/MK v.s. BO/V: 2.29 ± 0.12 v.s. 1.73 ± 0.16 ml, $p < 0.01$ ）、排尿量が有意に増加したが（ 2.00 ± 0.10 v.s. 1.56 ± 0.22 ml, $p < 0.05$ ）、排尿閾値圧（ 19.6 ± 9.2 v.s. 18.7 ± 11.8 cmH₂O）、排尿圧（ 55.8 ± 2.3 v.s. 56.4 ± 3.0 cmH₂O）、排尿効率（ 87.5 ± 1.6 v.s. $87.8 \pm 1.7\%$ ）に有意差はみられなかった。一方、Sham/V群とSham/MK群との比較では、膀胱容量（Sham/MK v.s. Sham/V: 0.73 ± 0.31 v.s. 0.64 ± 0.05 ml）、

排尿量 (0.62±0.06 v.s. 0.59±0.06ml) に有意差を認めなかった。BO/MK群とBO/V群において排尿前2分間のpre-micturition contractionの頻度および振幅に有意差を認めなかった (表II-3-1)。

表II-3-1 BO/MK、BO/V、Sham/MK、Sham/V 群の膀胱内圧パラメータ

	BO/MK	BO/V	Sham/MK	Sham/V
例数	9	9	9	7
膀胱容量(ml)	2.29±0.12	1.73 ±0.16**	0.73±0.31	0.64±0.05
排尿量(ml)	2.00±0.10	1.56 ±0.22*	0.62±0.06	0.59±0.06
排尿閾値圧(cmH ₂ O)	19.6±9.2	18.7±11.8	9.7±0.8	11.3±0.7
排尿効率(%)	87.5±1.6	87.8±1.7	83.1±2.8	88.4±2.2
排尿圧(cmH ₂ O)	55.8±2.3	56.4±3.0	37.5±1.9	35.4±2.3
Pre-micturition contraction				
回数(回数/分)	3.9±0.3	4.3±0.2	2.0±0.6	3.2±0.9
振幅(cmH ₂ O)	13.0±1.2	9.8±0.8	3.0±0.6	3.4±0.8

* v.s. BO/MK p<0.05 **v.s. BO/MK p<0.01

3) 閉塞ラットの排尿反射に対するMK-801の急性効果

閉塞ラットにMK-801を累加的に0.01-1.0mg i.v.した結果、覚醒下膀胱内圧測定にて膀胱容量と排尿圧は用量依存性に減少した(図II-3-2,3)。高用量のMK-801投与により頻回の膀胱内圧の変動を認めたが(図II-3-2)、同時にラットの体動も増加したため、この圧変動がpre-micturition contractionの増強か体動による影響か判別困難であった。

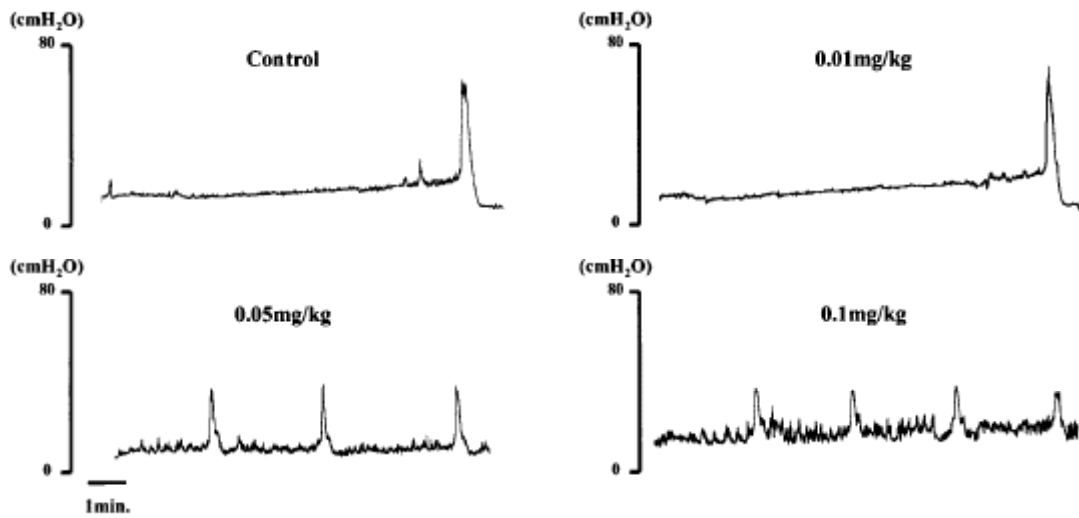


図 II-3-2 閉塞ラットに対する MK-801 の急性効果: MK-801 により排尿反射は促進される。

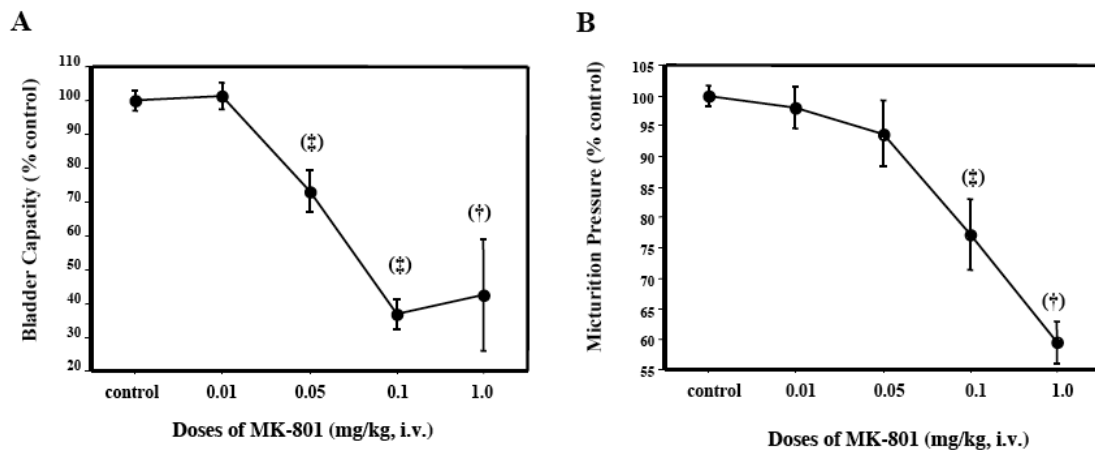


図 II-3-3 閉塞ラットに対する MK-801 i.v.の急性効果

A:平均膀胱容量 B:平均排尿圧 (†) v.s. control $p < 0.05$ (‡) v.s. control $p < 0.01$

考案

過去に報告された下部尿路閉塞ラットの試験では、閉塞を作製するために使用した糸あるいはリングを装着したままの状態でも4から6週間後に、覚醒下膀胱内圧測定を行った試験では、高い排尿圧と多量の残尿が認められている (Malmgren et al., 1987; O'Connor et al., 1997)。このように、下部尿路閉塞

ラットでは慢性尿閉により膀胱が過伸展した状態であることが推測される。閉塞解除後の下部尿路機能の経時的観察では5日から6日目には閉塞により増大した膀胱容量が正常に戻るが、残尿の減少はより早く、閉塞の解除後1日から2日目にはほぼ消失することが報告されている (Malmgren et al., 1990)。今回行った閉塞解除後2日目の膀胱内圧測定の結果も、閉塞ラットの排尿効率は非閉塞ラットと同様に約90%と良好であった。一方、閉塞ラットでは膀胱容量、排尿圧は有意に増加しており、また pre-micturition contraction の振幅も非閉塞ラットに比較し有意に増大していた。したがって、閉塞解除後2日目に行った覚醒膀胱内圧測定では閉塞自体は解除されているが、膀胱機能異常は十分残存しており、下部尿路閉塞が膀胱機能に与える影響を検討する上で問題はないものと考えられた。

膀胱への侵害刺激として非生理的圧力により繰り返し膀胱を拡張すると、初期には膀胱知覚の感作が起こり、繰り返す刺激により内臓運動反射が増強すること、一度感作されるとその後は生理的範囲の圧力による膀胱の拡張によっても内臓運動反射が誘発されることが報告されている (Castroman and Ness, 2001)。下部尿路閉塞ラットでは膀胱の慢性的過伸展が侵害刺激として作用し、これがトリガーとなって膀胱の機能的あるいは形態的变化を引き起こす可能性が推測される。下部尿路閉塞ラットの膀胱にトレーサーを注入して追跡した実験では、末梢神経と中枢神経の両者において膀胱の求心性神経の形態的变化を認めている (Steers et al., 1991)。今回の実験ではMK-801の反復投与は非閉塞ラットには作用せず、閉塞ラットにおいてのみ膀胱容量を有意に増大させた。また排尿圧や排尿効率という排尿の遠心性神経伝達を反映する部分に

は影響を与えなかった。これらのことから、下部尿路閉塞により発生する排尿求心路の機能的変化には NMDA 型受容体が関与していることが示唆された。

最近の研究から、内臓の知覚過敏が生じるときに、末梢知覚神経から脊髄、さらに脊髄の上位中枢に至る様々な段階の神経系に存在する NMDA 型受容体が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。McRoberts らはラットの大腸や膀胱の一次求心性神経の細胞体と末梢側の神経終末に NMDA 型受容体が存在すること、大腸への機械的侵害刺激によるラットの内臓運動反射が NMDA 型受容体拮抗剤により容量依存性に減弱することを報告している (McRoberts et al., 2001)。末梢神経の急性及び慢性障害モデルにみられる知覚過敏の形成と維持において、中枢性感作と呼ばれる脊髄後角神経細胞の長期間の興奮性増強が重要であり、この現象に NMDA 型受容体が深く関与していることが知られている (Hudspith et al, 1999; Mungalni et al., 1999)。大腸への化学的刺激により誘発される内臓知覚過敏の形成においても、脊髄の NMDA 型受容体が関与している (Coutinho et al., 1996, 2001)。これらの事実から、前立腺肥大症に伴う頻尿や尿意切迫感などの蓄尿症状の発生や原因不明の膀胱部痛と頻尿が主症状である間質性膀胱炎などの下部尿路疾患の病態に、排尿求心路に存在する NMDA 型受容体が膀胱知覚亢進の形成をはじめとする多彩な面に関与していることが推測される。

今回の実験の結果、MK-801 による慢性的治療は下部尿路閉塞ラットに対し有意な膀胱容量と排尿量の増大効果を示したにも関わらず、排尿筋過活動の発生には影響しなかった。日中及び夜間の頻尿は前立腺肥大症の患者に高率にみられる症状である。これらの蓄尿症状は排尿筋過活動に関連があると考えられ

ていたが、最近の報告では、排尿筋過活動の有無と一回排尿量の減少、日中、夜間の頻尿などの蓄尿症状との間に明らかな関連性がないとの報告もある (Van Venrooij et al., 2002)。今回の実験結果も、下部尿路閉塞ラットの排尿筋過活動と膀胱知覚の亢進とは全く独立した現象であることを示唆している。

一方、非閉塞ラットにおける効果 (Vera and Nadelhaft, 1991) と同様に、下部尿路閉塞ラットにおいても MK-801 を経静脈的に投与した場合、膀胱容量と排尿圧は用量依存性に減少した。覚醒下ラットにおいては、NMDA 型受容体は下部尿路閉塞の有無に関わらず排尿反射に対して抑制的に作用することが判明した。

本研究の結果から、下部尿路閉塞により NMDA 型受容体を介した膀胱求心路の可塑的变化が起こること、一方 NMDA 型受容体の慢性的阻害が排尿筋過活動の発生に影響しなかったことから、下部尿路閉塞後に膀胱求心路の機能的変化が起こる機序と排尿筋過活動が出現する機序とは異なったものであると考えられる。

全体の考察

mGluRの選択的作動薬である *trans*-ACPD をラットの腰仙髄クモ膜下へ投与した結果、膀胱の伸展刺激により誘発される反射性膀胱収縮と橋排尿中枢の電気刺激により誘発される膀胱収縮が抑制された。また反射性膀胱収縮に伴う外尿道括約筋の活動も抑制された。これらの事実よりラットの排尿反射路において、腰仙髄に存在する代謝型グルタミン酸受容体を介した抑制性調節機構が存在することが判明した。*trans*-ACPD の薬理作用として、橋排尿中枢から腰仙髄副交感神経核への遠心性伝達に対する抑制作用の他に、オヌフ核への遠心性伝達に対する抑制と膀胱一次求心性神経から脊髄後核への求心性伝達に対する抑制作用の存在も考えられた。mGluR は中枢神経系に普遍的に存在するが、部位により存在する代謝型グルタミン酸受容体のサブタイプが異なる。またその働きはシナプス伝達の微妙な制御であり、シナプス伝達自体を完全に抑制することではない (Cartnell and Shoepf, 2000)。よってサブタイプ選択性の高い新たな薬剤の開発は、特定の疾患あるいは症状に対し、有効性と安全性の高い治

療薬をもたらすものと期待されている。基礎的研究の結果、脳血管障害、神経変性疾患、てんかんなどの神経疾患、あるいは疼痛や高血圧などに対する有用性が期待され、臨床応用が考えられている (Conn and Pin, 1997)。過活動膀胱は高い罹患率と患者の QOL への影響から大きな注目を集めているが、その原因は明らかではなく、排尿反射求心路あるいは遠心路の活動性亢進の関与が推測されている。過活動膀胱の治療として一般的には抗コリン剤が使用されるが、無効例や副作用が問題になる例が少なからず存在し、新たな治療薬、特に排尿反射求心路への抑制作用を持つ薬剤の開発が待たれる。今回の結果から mGluR が基本的排尿反射路において抑制性調節を行っていることが示され、mGluR 作動薬が過活動膀胱の治療薬となる可能性が示唆された。今後の課題として、副交感神経核とオヌフ核への遠心性伝達、膀胱一次求心性神経から脊髄後角細胞への求心性伝達のそれぞれにおいて関与する mGluR のサブタイプを特定することが必要であり、この結果を基に過活動膀胱など特定の下部尿路機能異常の治療薬剤に必要なサブタイプ選択性が明らかになると考えられる。

下部尿路閉塞に伴う膀胱機能異常に関する研究では、capsaicin あるいは resiniferatoxin による前治療後のラットに尿道の部分閉塞を作製した結果、膀胱求心性 C-fiber の脱感作は長期間継続したが、下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の発生には影響しなかった。一方、capsaicin による前治療により閉塞ラットの膀胱容量、排尿閾値圧の有意な増加が認められ、resiniferatoxin による前治療も類似の効果を示した。NMDA 型受容体の慢性的阻害効果の検討では MK-801 反復投与により閉塞ラットの膀胱容量と排尿量の有意な増加を認めたが、非閉塞ラットではこれらの変化は認められなかった。一方、NMDA 型受容

体の慢性的阻害は閉塞ラットに認める排尿筋過活動の発生には影響しなかった。これらの結果から、生理的な排尿反射と無関係と考えられていた capsaicin 感受性膀胱求心性 C-fiber が、下部尿路閉塞状態下では膀胱の圧や容量変化の情報伝達に関与していること、下部尿路閉塞により NMDA 型受容体を介した膀胱求心路の可塑的变化が起こることが明らかになった。下部尿路閉塞により膀胱平滑筋から神経栄養因子が過剰産生されるが (Steers et al., 1991b, 1996)、神経栄養因子は NMDA 型受容体依存性の中枢性感作の形成に関与することが知られている (Groth and Aanonsen, 2002)。また capsaicin により神経栄養因子の軸索輸送が抑制されることを考えると (Szallasi and Blumberg, 1999)、capsaicin あるいは resiniferatoxin による前治療の効果、NMDA 型受容体の慢性的阻害の効果とも、神経栄養因子による膀胱求心性神経の中枢性感作の形成を阻害した結果と考えられる。一方、膀胱求心性 C-fiber の脱感作あるいは NMDA 型受容体の慢性的阻害は排尿筋過活動の発生に影響しなかったことから、下部尿路閉塞後に排尿反射求心路の機能的変化が起こる機序と排尿筋過活動が出現する機序とは異なったものであると考えられた。

下部尿路閉塞などの病的状態では排尿反射を制御する機構に変化が起こり、これが過活動膀胱などの病的状態を引き起こすことが示唆された。今後の研究により排尿反射路の調節機構をより詳細に解明していくことは、下部尿路疾患の新たな治療方法を探る上で重要な糸口をもたらすものと考えられる。

結論

1. 腰仙髄に存在する代謝型グルタミン酸受容体は基本的排尿反射に対し抑制性に作用する。この作用は少なくとも橋排尿中枢から腰仙髄の副交感神経節前神経核への遠心性伝達を抑制した結果である。
2. 下部尿路閉塞に伴う排尿筋過活動の発生と過活動排尿の形成には **capsaicin** 感受性膀胱求心性線維の機能的亢進は関与していない。しかし排尿反射の求心性伝達において **capsaicin** 感受性膀胱求心性線維は膀胱内容量や圧情報の伝達を一部担っている。
3. 下部尿路閉塞に伴う膀胱機能の異常には **NMDA** 型グルタミン酸受容体を介した排尿反射求心路の可塑的变化が関与している。

謝辞

本学位論文を執筆する機会を与えて下さり、親切なご指導を賜った小柳知彦名誉教授と野々村克也教授には心より深謝申し上げます。また、研究の出発点を与え、研究中から論文執筆に至るまで適切な助言を下さった柿崎助教授には深謝致します。さらに一連の研究に協力して頂いた腎泌尿器科外科学教室の皆様、実験の補助をして下さった実験助手の方々に深謝申し上げます。

引用文献

Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P., Ulmsten, U., van Kerrebroeck, P., Victor, A. and Wein, A. (2002): The standardisation of terminology of lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol. Urodyn.*, 21: 167-178.

Alvarez, F. J., Villalba, R.M., Carr, P.C., Grandes, P. and Somohano, P.M. (2000): Differential distribution of metabotropic glutamate receptors 1a,1b, and 5 in the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 422:464-487.

Anywl, R. (1999): Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Rev.*, 29:83-120.

Attal, N. and Bouhassira, D. (1999): Mechanisms of pain in peripheral neuropathy. *Act. Neurol. Scand.*, 173: 12-24.

Bond, A. and Lodge, D. (1995): Pharmacology of metabotropic glutamate receptor-mediated enhancement of responses to excitatory and inhibitory amino acids on rat spinal neurones in vivo. *Neuropharmacology*, 34:1015-1024.

Boxall, S., Berthele, A., Laurie, D.J., Sommer B., Zieglgansberger, W. Urban, L. and Tolle, T.R. (1998): Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3 messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation. *Neurosci.*, 82 (2):591-602.

Birder, L.A., and de Groat, W.C. (1992): The effect of glutamate antagonists on c-fos expression induced in spinal neurons by irritation of lower urinary tract. *Brain Res.*, 580: 115-120.

Cao, C.Q., Evans, R.H., Headley, P.M. and Udvarhelyi, P.M. (1995): A comparison of the effects of selective metabotropic glutamate receptor agonists on synaptically evoked whole cell currents of rat spinal ventral horn neurones in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 115 (8):1469-1474.

Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000): Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.*, 75:889-907.

Castroman, P. and Ness, T.J. (2001): Vigor of visceromotor responses to urinary bladder distension in rats increases with repeated trials and stimulus intensity. *Neurosci. Lett.*, 306: 97-100.

Chai, T., Gray, M. and Steers, W. (1998): The incidence of a positive ice-water test in bladder outlet obstructed patients: evidence for bladder neural plasticity. *J. Urol.*, 160: 34-38.

Chai, T., Gemalmaz, K., Anderson, K-E., Tuttle, J.B. and Steers, W.D. (1999): Persistently increased voiding frequency despite relief of bladder outlet obstruction. *J. Urol.*, 161: 1689-1693.

Chen, J., Heinke, B. and Sandkuler, J. (2000): Activation of group I metabotropic glutamate receptors induces long-term depression at sensory synapses in superficial spinal dorsal horn. *Neuropharmacol.*, 39: 2231-2243.

Cheng, C-L., Ma, C-P. and de Groat, W.C. (1993) Effects of capsaicin on micturition and associated reflexes in rats. *J. Am. Physiol.*, 265: R132-R138.

Conn, P.J. and Pin, J-P, (1997): Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37: 205-237.

Coutinho, S.V., Urban, M.O. and Gebhart, G.F. (1996): Intracolonic zymosan produces visceral hyperalgesia in the rat that is mediated by spinal NMDA and non-NMDA receptors. *Brain Res.*, 1996: 7-15.

Coutinho, S.V., Urban, M.O. and Gebhart, G.F. (2001): The role of CNS receptors and nitric oxide in visceral hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 319-325.

Craft, R.M., Cohen, S.M. and Porreca, P. (1995): Long-lasting desensitization of bladder afferents following intravesical resiniferatoxin and capsaicin in the rat. *Pain*, 61: 317-323.

Cruz, F., Guimaraes, M., Silvia, C. and Reis, M. (1997): Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet*, 350: 640-641.

De Ridder, D., Chandramani, V., Dasgupta, P., van Poppel, H., Baert, L. and Fowler, C.J. (1997): Intravesical capsaicin as a treatment for refractory detrusor hyperreflexia: a dual center study with long-term followup. *J. Urol.*, 158: 2087-2092.

Dmitrieva, N. and McMahon, S.B. (1996): Sensitization of visceral afferents by nerve growth factor in the rat. *Pain*, 66: 87-97.

Doherty, J. and Dingledine, R. (1998): Differential regulation of synaptic inputs to dentate hilar border interneurons by metabotropic glutamate receptors. *J. Neurophysiol.*, 79:2903-2910.

Fall, M., Lindsorm, S. and Mazieres, L. A (1990): Bladder to bladder cooling

reflex in the cat. *J. Physiol. Lond.*, 427: 281-300.

Gerber, G. Zhong, D.-H. and Randic, M. (2000): Group II and III metabotropic glutamate receptors agonists depressed synaptic transmission in the rat spinal cord dorsal horn. *Neurosci.*, 100(2):393-406.

Groth, R. and Aanonsen, L. (2002): Spinal-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice, while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain*, 100(1-2): 171-181.

Häbler, J., Jänig, W. and Koltzenburg, M. (1990): Activation of unmyelinated afferent fibers by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder of the cat. *J. Physiol. Lond.*, 425: 545-562.

Holzer, P. (1991): Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, 43: 143.

本間 之夫、柿崎秀宏、後藤百万、竹井実根雄、山西友典、林 邦彦 (2003): 排尿に関する疫学的研究. *日本排尿機能学会誌* 14: 1-12.

Hudspith, M.J., Harisson, S., Smith, G., Bountra, C., Elliot, P.J., Birch, P.J., Hunt, S.P. and Munglani, R. (1999): Effects of post-injury NMDA antagonist treatment on long-term Fos expression and hyperalgesia in a model of chronic neuropathic pain. *Brain Res.*, 822: 220-227

Igawa, Y., Mattiasson, A. and Andersson, K.E. (1994) : Micturition and premicturition contractions in unanesthetized rats with bladder outlet obstruction. *J. Urol.*, 151: 244-249.

Kakizaki, H., Yoshiyama, M., and de Groat W.C. (1996): Role of NMDA and AMPA glutamatergic transmission in spinal c-fos expression after urinary tract irritation. *Am. J. Physiol.*, 270: R990-R996.

Kakizaki H., Fraser M.O. and de Groat W.C. (1997): Reflex pathways controlling urethral striated and smooth muscle function in the male rat. *Am. J. Physiol.*, 272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.41): R1647-R1656.

Kakizaki, H., Yoshiyama, M., Roppolo, J.R., Booth, A.M., and de Groat, W.C. (1998): Role of spinal glutamatergic transmission in the ascending limb of the micturition reflex pathway in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285: 22-27.

Lluel, P., Duquenne, C. and Martin, D.(1998): Experimental bladder instability following bladder outlet obstruction in the female rat. *J. Urol.*, 160: 2253-2357.

Machino, R., Kakizaki, H., Ameda, K., Shibata, T., Tanaka, H., Matsuura, S. and Tomohiko Koyanagi. (2002): Detrusor instability with equivocal obstruction: A predictor of unfavorable symptomatic outcomes after transurethral prostatectomy. *Neurourol. Urodyn.*, 21: 444-449.

Maggi, C.A., Giuliani S., Giachetti,A. and Meli, A. (1990): The effect of MK-801 on the micturition reflex in anesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 181:105-109.

Malmgren, A., Sjögren, C., Uvelius, A., Matiasson, A., Anderson, K.-E. and Anderson, P.O. (1987): Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction. *J. Urol.*, 137: 1291-1294.

Malmgren, A. (1988): Bladder instability and abnormal micturition pattern

in rats with infravesical outflow obstruction. *Neurourol. Urodyn.*, 6: 371-380.

Malmgren, A., Uvelius, B., Andersson, K.-E. and Andersson, P.O.(1990): On the reversibility of functional bladder changes induced by infravesical outflow obstruction in the rat. *J. Urol.*, 143: 1026-1031.

Mattiasson, A. and Uvelius, B. (1982): Changes in contractile properties in hypertrophic rat urinary bladder. *J. Urol.*, 128: 1340-1342.

Matsumoto, G., Hisamitsu, T., and de Groat, W.C. (1995a): Role of glutamate and NMDA receptors in the descending limb of the spinobulbospinal micturition reflex pathway of the rat. *Neurosci. Lett.*, 183: 58-61.

Matsumoto, G., Hisamitsu, T., and de Groat, W.C. (1995b): Non-NMDA glutamatergic excitatory transmission in the descending limb of the spinobulbospinal micturition reflex pathway of the rat. *Brain Res.*, 639: 246-250.

McRoberts, J.A., Coutinho, S.V., Marvizon, J.C.G., Grady, E.F., Tognetto, M., Sengupta, J.N., Ennes, H.S., Chaban, V.V., Amadesi, S., Creminon, C., Lanthorn, T., Geppetti, P., Bunnett, N.W. and Mayer, A.E. (2001): Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology*, 120: 1737-1748.

Milsom, I., Abrams, P., Cardozo, L., Roberts, R.G., Thüroff, J. and Wein, A.J.

(2001) : How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *Br. J. Urol. Int.*, 87: 760-766.

Monaghan, D.T., Bridges, R.J. and Cotman, C.W. (1989): The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in

the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29:365-402.

Munglani, R. Hudspith, M.J. Fleming, B., Harrison, S., Smith, G., Bountra, C., Elliot, P.J., Birch, P.J. and Hunt, S.P. (1999): Effect of pre-emptive NMDA antagonist treatment on long-term Fos expression and hyperalgesia in a model of chronic neuropathic pain. *Brain Res.*, 822: 210-219.

O'Connor, L.T.Jr., Vaughan, E.D. Jr. and Felsen, D. (1997): In vivo cystometric evaluation of progressive bladder outlet obstruction in rats. *J. Urol.*, 158: 631-635.

Petralia, R.S., Wang, X-Y., Niedzielski, A.S. and Wenthold, R.J. (1996): The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localization. *Neurosci.*, 71: 949-976.

Peters, T.J., Donovan, J.L., Kay, H.E., Abrams, P., DE LA Rosette, J.J.M.C.H., Porru, D., Thüroff, J.W. and the international continence society "Benign Prostatic Hyperplasia" study group. (1997): The international continence society "Benign Prostatic Hyperplasia" study : The bothersomeness of urinary symptoms. *J. Urol.*, 157: 885-889.

Pin, J. P., and Duvoisin, R. (1995): The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol.*, 43:1-26.

Rusheweyh, R., and Spandkühler, J. (2000): Differential actions of mono-versus polysynaptic A δ -fiber-evoked field potentials in superficial spinal dorsal horn in vitro. *Pain*, 88:97-108.

Shea, V.K. Cai, R., Crepps, B., Mason, J.L. and Perl, E.R. (2000): Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the rat's urinary bladder. *J.*

Neurophysiol., 84: 1924-1932.

Shaker, H., Mai, L.T., Kalfopoulos, M., Hassouna, M., Dion, S. and Elhilali, M. (1998): Hyperreflexia of the urinary bladder: possible role of the efferent function of the capsaicin sensitive primary afferents. J.Urol.,160: 2232-2239.

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H. Takada, M., Flor, P.J.,Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. and Mizuno, N. (1997): Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. J. Neurosci., 17:7503-7522.

Steers, W.D. and de Graot, W.C. (1988): Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. J. Urol., 140: 864-871.

Steers, W.D., Ciambotti, J., Etzel, B., Erdman, S. and de Groat, W.C. (1991a): Alterations in afferent pathways from the urinary bladder of the rat response to partial urethral obstruction. J. Comp. Neurol., 310: 401.

Steers, W.D., Kolbeck, S., Creedon, D. and Tuttle, J.B. (1991b): Nerve growth factor in the urinary bladder of the adult regulates neuronal form and function. J. Clin. Invest., 88: 1709-1715.

Steers, W.D., Creedon, D.J. and Tuttle, J.B. (1996): Immunity to nerve growth factor prevents afferent plasticity following urinary bladder hyperrophy. J. Urol., 155: 379-385.

Stewart, W.F., van Royen, J.B., Cundiff, G.W., Abrams, P., Herog, A.R., Corey, R., Hunt, T.L. and Wein, A. (2003): Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. W. J. Urol., 20: 327-336.

Szallasi, A., Nilsson, S., Szallasi, T.F., Blumberg, P., Hökfelt, T. and Lundberg, J.M. (1995): Vanilloid (capsaicin) receptor in the rat: distribution in the brain, regional difference in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Res.*, 703: 175-183.

Szallasi, A. and Blumberg, P.M. (1999): Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 51: 159-211.

Tang, F.R. and Sim, M.K. (1999): Pre- and/or post-synaptic metabotropic glutamate receptor 1 α (mGluR1 α) and 2/3 (mGluR2/3) in the rat spinal cord. *Neurosci. Res.*, 34: 73-78.

Uvelius, B. and Mattiasson, A. (1984): Smooth muscle cell hypertrophy and hyperplasia in the rat detrusor after short-time infravesical outflow obstruction. *J. Urol.*, 131: 173-176.

Van Venrooij, G.E.P.M., Eckhardt, M.D., Gisolf, K.W. and Boon, T.A.(2002): Data from frequency-volume charts versus filling cystometric estimated capacities and prevalence of instability in men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Neurourol. Urodyn.*, 21: 106-111.

Vera, P. and Naldelhaft, I. (1991): MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist, produces facilitation of the micturition reflex in awake, freely moving rats. *Neurosci. Lett.*, 134: 135-138.

Yaksh, T.H. and Rudy, T.A. (1976): Chronic catheterization of spinal subarachnoid space. *Physiol. Behav.*, 17: 1031-1036.

Yoshiyama, M., Roppolo, J.R., and de Groat, W.C. (1993a): Effects of

LY274614, a competitive NMDA receptor antagonist, on the micturition reflex in the urethane anesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 77-86.

Yoshiyama, M., Roppolo, J.R., and de Groat, W.C., (1993b): Effects of MK-801 on the micturition reflex in the rat – possible sites of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265: 844-850.

Yoshiyama, M., Roppolo, J.R., and de Groat, W.C. (1994): Alteration by urethane of glutamatergic control of micturition. *Eur. J. Pharmacol.*, 264: 417-425.

Yoshiyama, M., Roppolo, J.R., and de Groat, W.C. (1995): Effects of GYKI52466 and CNQX, AMPA/kinate receptor antagonists, on the micturition reflex in the rat. *Brain Res.*, 691: 185-194.

Zorumski, C. F., Mennerick, S. and Que, J. (1996): Modulation of excitatory synaptic transmission by low concentrations glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol. Lond.*, 494: 465-477.