HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	排尿反射におけるラット前頭前野の役割 ： セロトニンを介した排尿反射制御機構について
Author(s)	千葉, 博基
Description	配架番号：2219
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12115号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12115
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61650
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Chiba.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

排尿反射におけるラット前頭前野の役割
–セロトニンを介した排尿反射制御機構について–

(The role of serotonergic mechanism in the rat prefrontal cortex
for controlling the micturition reflex)

2016 年 3 月

北海道大学

千葉　博基

学　位　論　文

排尿反射におけるラット前頭前野の役割
–セロトニンを介した排尿反射制御機構について–

（The role of serotonergic mechanism in the rat prefrontal cortex for controlling the micturition reflex）

2016 年 3 月

北海道大学

千葉　博基

目次

発表論文目録及び学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・3

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

第１章
　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7
　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・8
　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12

第２章
　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14
　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・15
　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26

第３章
　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30
　実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
　結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34
　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

総括及び結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・43

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の通り Accept 済みである。

Hiroki Chiba, Takahiko Mitsui, Takeya Kitta, Yu Ohmura, Kimihiko Moriya, Yukiko Kanno, Mitsuhiro Yoshioka, Nobuo Shinohara
The Role of Serotonergic Mechanism in the Rat Prefrontal Cortex for Controlling the Micturition Reflex: An In Vivo Microdialysis Study.

投稿先：Neurourology and Urodynamics　（WEB 上では公開済、発表巻未定）

本研究の一部は以下の学会に発表した

千葉　博基、三井　貴彦、橘田　岳也、大村　優、菅野　由岐子、守屋　仁彦、吉岡　充弘、篠原　信雄
排尿反射に対する前頭前野における c-Fos 発現の検討
第 102 回日本泌尿器科学会総会
2014 年 4 月　神戸

千葉　博基、三井　貴彦、橘田　岳也、大村　優、菅野　由岐子、守屋　仁彦、吉岡　充弘、篠原　信雄
排尿反射における前頭前野の役割に関する研究
第 21 回排尿機能学会
2014 年 9 月、岡山

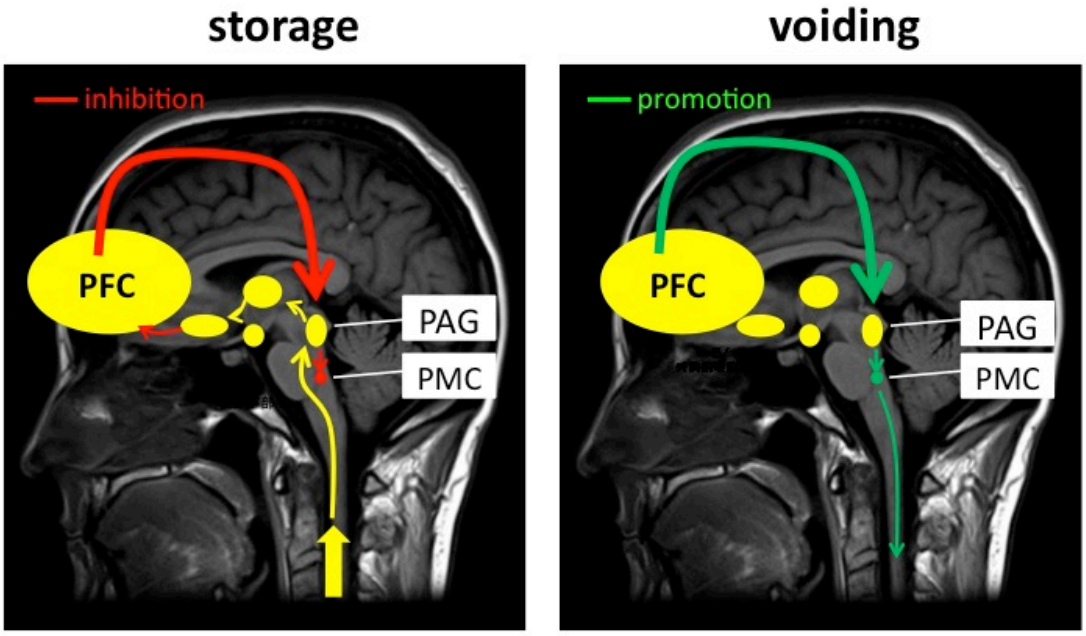
千葉　博基、三井　貴彦、橘田　岳也、大村　優、菅野　由岐子、守屋　仁彦、吉岡　充弘、篠原　信雄
排尿反射における前頭前野の役割：セロトニンを介した排尿反射抑制機構について
第 103 回日本泌尿器科学会総会
2015 年 4 月　金沢

千葉　博基、三井　貴彦、橘田　岳也、大村　優、菅野　由岐子、守屋　仁彦、
吉岡　充弘、篠原　信雄
ラット前頭前野において 5-HT は 5-HT_{2A} 及び 5-HT_7 受容体を介して排尿反射を制御している
第 22 回排尿機能学会
2015 年 9 月、札幌

Hiroki Chiba, Takahiko Mitsui, Takeya Kitta, Yu Ohmura, Kimihiko Moriya, Yukiko Kanno, Mitsuhiro Yoshioka, Nobuo Shinohara
The role of serotonergic mechanism in the rat prefrontal cortex for controlling the micturition reflex.
45th Annual Meeting of International Continence Society
October 6-10, 2015. Montreal, Canada.
Best basic science abstract 受賞

緒言

ヒトにおいて膀胱、尿道を含めた下部尿路は、脳や脊髄などの中枢神経系によりコントロールされ、蓄尿及び排尿で構成される排尿反射は周期的にスムーズに行なわれている。その中枢神経系に障害が起きると、いわゆる神経因性膀胱となり切迫感や頻尿などの蓄尿障害や排尿困難、尿閉などの排尿障害を来たす。このような排尿反射に関わる中枢神経の役割、特に脳に関しては未だ不明な点が多いが、ヒトにおける臨床研究では、SPECT、PET、functional MRI (f-MRI)などの機能的脳画像（functional brain imaging）を用いた研究が 1990 年代後半より行われており、蓄尿期及び排尿期における脳内の賦活化部位の同定がなされてきている[1,2,3,4]。それらの報告を元に、脳と排尿反射の関係についてひとつのワーキングモデルが提唱された[5]（図）。膀胱からの知覚は脊髄を上行し中脳水道周囲灰白質（PAG: periaqueductal grey）に到達する。PAG は以前より排尿中枢を担う重要な部位として認識されているが、このワーキングモデルでは、PAG の上位に前頭前野（PFC: prefrontal cortex）が位置し、PAG を制御しているとしている。PFC は学習、記憶、計画、認知、意思決定などの高次脳機能を司る部位として重要な役割を果たしているが[6,7]、その機能の中に排尿制御が含まれていると考える。すなわち、尿意があっても排尿に適切な時間や場所まで我慢し、排尿開始の意思決定をする中枢が PFC である。これまで PFC と排尿反射に関する研究は基礎実験を含めてほとんど報告がなく、その詳細は不明な点が多い。そのメカニズムを解明することは、排尿反射制御における中枢神経系の働きの全体像を理解する上で重要である。本研究では神経薬理学的な手法を用いてラット PFC における排尿反射制御の役割について研究した。まず第 1 章では排尿に関わる PFC の部位について c-Fos を用いて特定することを試み、第 2 章では脳内微小潅流法（マイクロダイアリシス法）を用いて排尿反射時の PFC における神経伝達物質の測定を行った。さらに第 3 章では、その結果を受けてセロトニン受容体の働きに着目しマイクロインジェクション法によるセロトニン受容体拮抗薬の PFC への局所投与を行い、排尿反射の制御に与える影響を調べた。



Fowler et al. 2010 より改変

略語集

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ACSF : artificial cerebrospinal fluid

CMG: cystometrography

DA: Dopamine

fMRI: functional magnetic resonance imaging

GABA: γ-aminobutyric acid

Glu: Glutamate

HPLC : high performance liquid chromatography

ICI: intercontraction interval

IL: infralimbic cortex

MVP: maximal voiding pressure

OAB: overactive bladder

PAG: periaqueductal grey

PET: positron emission tomography

PFC : prefrontal cortex

PL: prelimbic cortex

PMC: pontine micturition center

SPECT: single photon computerized tomography

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitors

5-HT: 5-hydroxytriptamine, Serotonin

8-OH-DPAT: (±)-8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin

第 1 章

排尿反射に対する前頭前野における c-Fos 発現の検討

緒言

研究の始めとして排尿反射の制御に関わる前頭前野（PFC）の詳細な部位について検討するため、排尿反射に対する PFC における c-Fos の発現を調べることとした。c-Fos は細胞核内の最初期発現遺伝子のひとつである c-fos からコードされるタンパク質であり、様々な外的刺激により急速にかつ一過性に神経活動依存的に誘導される。神経活動の指標として用いられ、神経刺激からその発現がピークに達するまで約 2 時間程度という特徴を持つ。麻酔下ラットにおいて膀胱内に生理食塩水を持続的に注入することで排尿反射を起こさせ、PFC における神経活動を c-Fos を用いて評価し、排尿反射に関わる部位の特定を試みた。

実験方法

1．実験動物

雌性Sprague-Dawley rats（体重222-285g）を使用した。明暗期のサイクルは12時間毎とし、全てのラットは自由に飲食可の状態とした。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）」に準拠した。

2．実験方法

ウレタン（1.2g / kg）の腹腔内投与により麻酔した。以下の要領で膀胱瘻を作成した。麻酔後速やかに下腹部正中切開を置き、膀胱を露出し18G針で膀胱頂部に穴を開けポリエチレンカテーテル（PE50, Clay-Adams, Parsippany, NJ）を挿入、膀胱の刺入部周囲は6-0絹糸で全周性に縫合しカテーテル脇からのリークがないようにした。カテーテルは、シリンジポンプ（STC-523 , Terumo, Tokyo, Japan）に接続し、生理食塩水（以下生食）を0.2ml/minの速度で2時間持続注入した。注入終了後、速やかに開胸し心臓を露出、左心室から灌流用のカテーテルを挿入し生食、及び10%緩衝ホルマリンで灌流固定した。固定後、開頭し脳を取り出し以下の方法で免疫染色を施行した。実験は以下の4群に分けて比較検討した。①処置なし群、②麻酔のみ群、③麻酔+膀胱瘻挿入群、④麻酔+膀胱瘻+生食注入群（補足：①はウレタン麻酔後即灌流固定、②はウレタン麻酔後2時間後に灌流固定、③は膀胱瘻作成2時間後に灌流固定、④は膀胱瘻から生食を2時間持続注入した後に灌流固定）　各群n=6とした。

3．免疫組織染色（c-Fos）

灌流固定したラット脳を10%緩衝ホルマリンに一晩後固定し、その後30%スクロース液で数日置換した。脳はOCT compound (Sakura Finetechnical Co., Japan)で包埋し、-80℃で凍結保存した。Paxinos and Watsonのラット脳アトラス[8]（1997）を参考に、クライオスタットで切片を30μmの厚さで作成した。PFCの位置はbregmaより前方+2.5, +2.8, +3.0のスライスをそれぞれ作成し免疫染色に使用した。免疫染色は以下の要領で行った。脳切片を30% H_2O_2を10倍希釈した溶液と5% MeOHで振盪後、0.1% PBSで洗浄、その後blockingを経て一次抗体であるPC38T (Ab-5), (calbiochem, 1:5000, USA)を一晩室温で振盪し反応させた。翌日、二次抗体で反応させた後、0.1% PBSで洗浄しDAB染色を施行した。c-Fos陽性細胞数は、光学顕微鏡で自動カウントし、1 mm^2あたりの細胞数でカウントし各群を比較した。ラットPFCをCg (cingulate

cortex), PL (prelimbic cortex), IL (infralimbic cortex)の3領域に分けて計測した（図1-1）。

4．統計学的解析

データは平均値±標準誤差で示した。解析は多群間比較に一元配置分散分析を用い、その後の検定ではBonferroni法を用いた。P value < 0.05を有意差ありとした。

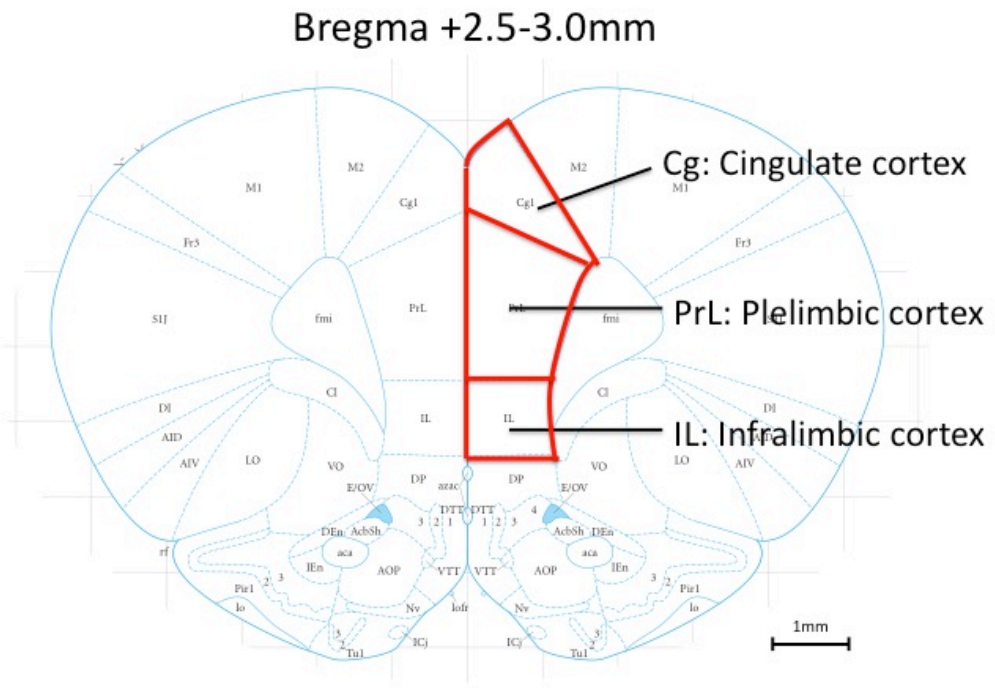


図 1-1　Paxinos and Watson のラット脳アトラスに従って PFC を 3 つの領域に分類

結果

各群におけるc-Fos陽性細胞数を図1-2に示す。全体的にみると、①処置なし群は他の3群と比較し陽性細胞数が最も少ない結果となった。部位別にみると、Cg領域よりもPL領域とIL領域で陽性細胞数の増加が有意に多かった。特に変化の見られたPL領域、IL領域について、各群間で比較検討を行った（図1-3、1-4）。PL領域、IL領域ともに①処置なし群と比べ、②麻酔のみ群、及び③麻酔+膀胱瘻群が有意にc-Fos陽性細胞が多く発現していた。また、④生食注入群においてはどの群とも差は見られなかった。

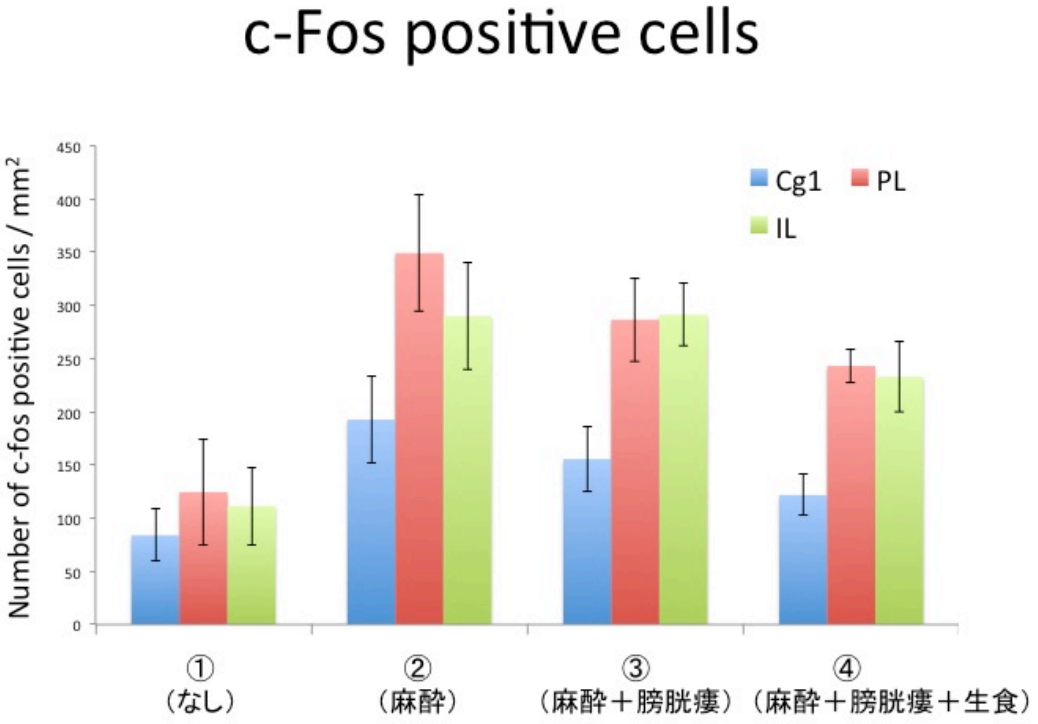


図1-2：PFC全体におけるc-Fos陽性細胞数

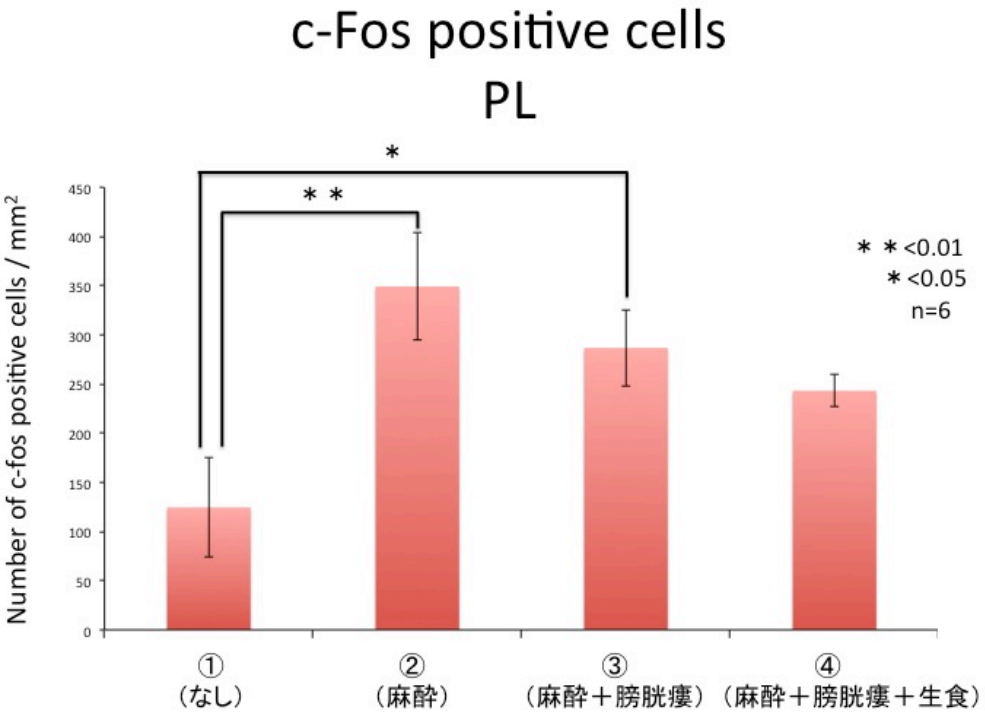


図1-3：c-Fos陽性細胞数　PL領域における比較

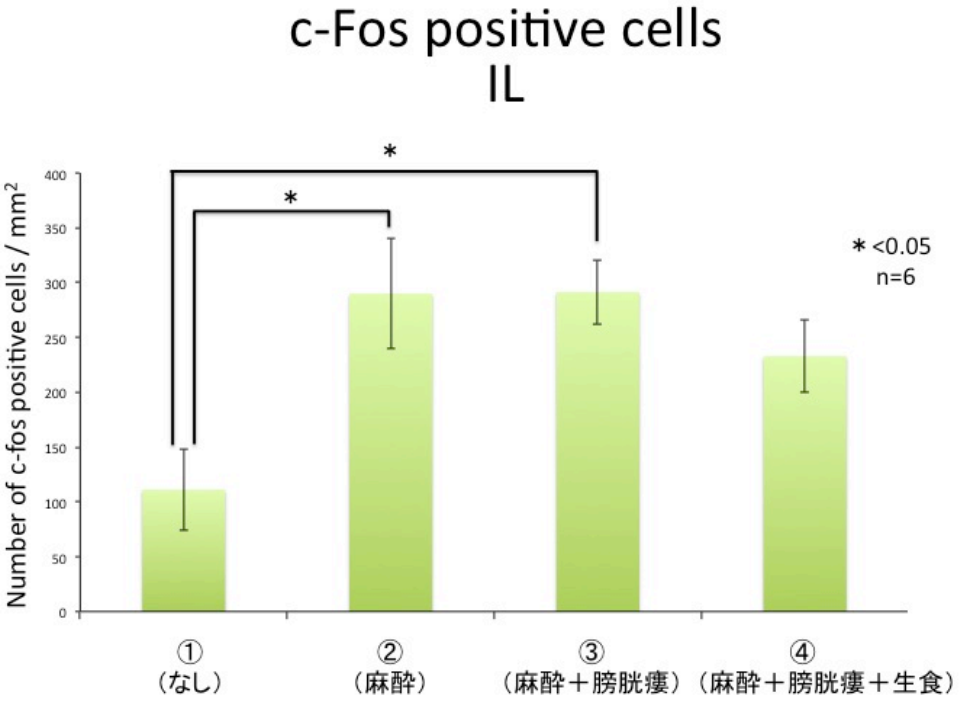


図1-4：c-Fos陽性細胞数　IL領域における比較

考察

本実験の目的は、膀胱に生食を注入することにより排尿反射を起こさせ、PFCにおける神経学的反応を見ることであった。Cg、PL、ILの3領域において、処置なし群で最もc-Fos陽性細胞数が少ないことは共通した結果であった。当初の予想では、生食注入群のみで有意な変化が現れるものと考えていたが、実際には麻酔のみ群と麻酔+膀胱瘻群で有意に陽性細胞数が多い結果となった。これらの結果から、麻酔処置のみでもPFCにおいてc-Fosは発現することが判明した。緒言にも示したように、c-Fosは細胞核内の最初期発現遺伝子のひとつであるc-fosからコードされるタンパク質であり、様々な外的刺激により神経活動依存的に誘導される。そして、その発現は外的刺激から2時間程度でピークを迎える。本実験では麻酔なし群を除いた3群で最初にウレタンの腹腔内麻酔処置を施しており、麻酔処置そのもの（ラットの把持、腹腔内注射）がラットに対して何らかのストレスを与え、その結果PFCでのc-Fos発現につながったものと考えた。3群間で差がなかったことからも、麻酔の影響が最も大きいと考察するに至った。なお、麻酔薬であるウレタンそのものは脳のc-Fosの発現の増減に影響しないとの報告があり[9]、本実験では考慮しなくてもよいと考える。この結果は、c-Fos発現のメカニズムをしっかり理解していれば実験デザインを考える過程で気づくことができた可能性があり、それがこの実験での反省点である。

以上の結果より、本実験では排尿に特異的な反応を認めることは出来なかった。しかし、外的刺激に対してCg領域よりもPL、IL領域が何らかの反応を示すことが判明した。また、有意な差は認めなかったものの、PL、IL領域ともに生食注入群では麻酔群や麻酔+膀胱瘻群と比較し陽性細胞数が少ない傾向を示した。排尿反射を起こさせることにより、PFC内で麻酔への刺激以外の反応が起きた可能性が示唆された。

第 2 章

ラット前頭前野における排尿反射時の神経伝達物質の測定

–マイクロダイアリシス法を用いた解析–

緒言

膀胱と尿道からなる下部尿路は、尿をためる蓄尿機能と尿を排出する排尿機能の相反する機構を持つ。蓄尿期には、交感神経の興奮により膀胱が弛緩し、さらに体性神経の興奮によって尿道が収縮する。逆に排尿期には副交感神経の興奮により膀胱の収縮と尿道の弛緩が起きる。それら下部尿路の神経系を、上位中枢である脳がコントロールしている[10]。中枢神経系または末梢神経において、神経伝達物質は情報を介在する重要な物質であり、排尿反射の制御に至っても同様である。排尿反射に関する基礎研究においては、これまで様々な動物で神経伝達物質に関する研究が行われてきた[10]。主な神経伝達物質としては、グルタミン酸、セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン、アセチルコリン、グリシン、γ-アミノ酢酸（GABA）などが挙げられる。
本実験の目的は、ラット PFC において排尿反射時にどの神経伝達物質がどのような動きをしているかを定量的に測定することである。その手段として、脳内微小潅流法（マイクロダイアリシス法）を用いた。マイクロダイアリシス法は神経薬理学の分野で広く行われている方法である。利点としては麻酔下ではなく覚醒下でより生理的に近い状態で脳内の神経伝達物質を回収できる点にある。組織損傷が比較的少なく、長時間の採取にも適しており、また同じサンプルから数種類の伝達物質を単離、同定可能である。覚醒下のラットの排尿における PFC での神経伝達物質の動きを捉えるとともにその働きを解明すべく、マイクロダイアリシス法を用いて以下の実験を行った。

実験方法

1．実験動物

雌性Sprague-Dawley rats（体重222-285g）を使用した。明暗期のサイクルは12時間毎とし、全てのラットは自由に飲食可の状態とした。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）」に準拠した。

2．手術方法

ラットにpentobarbital (40mg/kg body weight, i.p)にて麻酔後、stereotaxic frameに頭部を固定し、Paxinos and Watsonのアトラス[8]に従い、片側PFC（bregmaより前方3.2mm、側方0.7mm、硬膜より深さ1.6mm）にマイクロダイアリシス用のガイドカニューラを埋め込み、歯科用セメントで固定した（図2-1）。ガイドカニューラは左右交互に挿入した。頭部術後、stereotaxic frameから外し、仰臥位にした上で下腹部正中切開を置き、膀胱を露出した。膀胱頂部に18G針で穴を開け、ポリエチレンカテーテル（PE-50, Clay-Adams, Parsippany, NJ）を挿入した。カテーテルの先は皮下を頚部まで通し、先端を閉じた上で皮下に埋没し皮膚を4-0ナイロン糸で縫合した。術後、ラットは個別にケージに入れ、7日間の回復期間をおいた。

3．実験方法

手術7日後に、マイクロダイアリシス法及び膀胱内圧測定を同時に施行した。
以下の実験は全て覚醒下、非拘束下で行った。

マイクロダイアリシス法

予めPFCに埋め込んでおいたガイドカニューラからダイアリシスプローブ（membrane length 2.0mm, A-I-4-02, Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japan）を挿入し、固定した。プローブはチューブでマイクロシリンジポンプ（Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japan）と接続し、人工脳脊髄液 (ACSF：artificial cerebrospinal fluid、KCl 2.7, NaCl 140, CaCl2 1.2, MgCl2 1.0, NaH2PO4 0.3, and Na2HPO4 1.7mM）を2μl/ min（実験1, 2）、または1μl/min（実験3）の速度で灌流し、PFCにおける神経伝達物質を含んだサンプルを回収した。回収する間隔は20分毎とし、回収後速やかにHPLC(high performance liquid chromatography)で神経伝達物質を定量測定した。測定する物質は、セロトニン（serotonin, 5-HT）、ドーパミン（dopamine, DA）、グルタミン酸（glutamate, Glu）の3種とした。5-HT及びDAの測定については、電気化学検出器

（ECD-300, Eicom, Kyoto, Japan）を用いた。移動相の組成は2.1mM sodium 1-decansulfonate, 0.1mM EDTA-2Na／0.1M phosphate buffer（pH 5.4に補正）, methanol (2%)とした。カラムはPP-ODSⅡ（Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japan）を用いた。Gluの測定には蛍光分光分析器（FLD-370, emission 445nm, extraction 340nm, Kyoto, Japan）を使用した。サンプルは予めmercaptoethanolを含んだ o-phthaldialdehydeに5分間反応させ、測定した。カラムはSA-5ODS(Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japan)を用いた。移動相の組成は0.1mM EDTA-2Na／0.1M phosphate buffer（pH 6.0に補正）, methanol (30%)とした。

実験終了後にラットをpentobarbitalで深く麻酔をかけ、脳を取り出し10%緩衝ホルマリン液に浸した。固定後、-80℃で凍結しクライオスタットを用いて60μmの厚さで切片を作成し、トルイジンブルーで染色しプローブの位置を確認した。正しい位置に埋め込まれていたラットのみを検討の対象とした（図2-2）。

膀胱内圧測定（cystometrography, CMG）

マイクロダイアリシスと同時に膀胱内圧測定（以下CMG）を行った。プローベをPFCに挿入した後に、ラット背側皮下に予め埋め込んでおいたカテ先端を取り出し、カテーテルに接続し生食注入用のシリンジポンプ (STC-523, Terumo, Tokyo, Japan) に接続した。生食は0.2ml/minの速度で膀胱内に注入し、圧測定はAcq Knowledge 3.7.1 software (Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA)を用いて解析した。

薬剤

以下の薬剤を既報[11]に基づいた濃度で使用した。

Citalopram hydrobromide, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI): 1μM

(±)-8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin (8-OHDPAT), 5-HT_{1A} agonist: 300μM

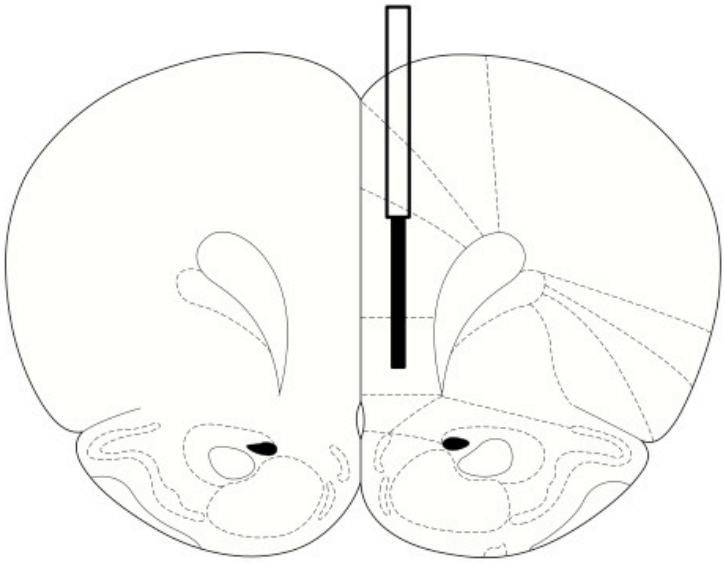


図 2-1　PFC（+3.2mm from bregma）冠状断。白いバーはガイドカニューレ、黒いバーは挿入されたマイクロダイアリシスプローブを表す。

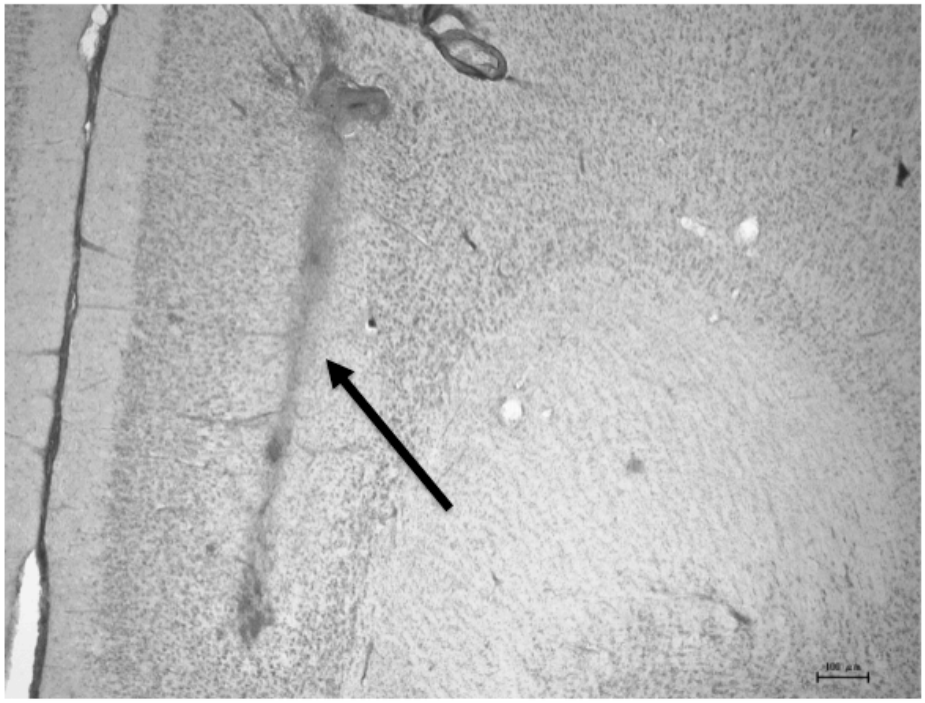
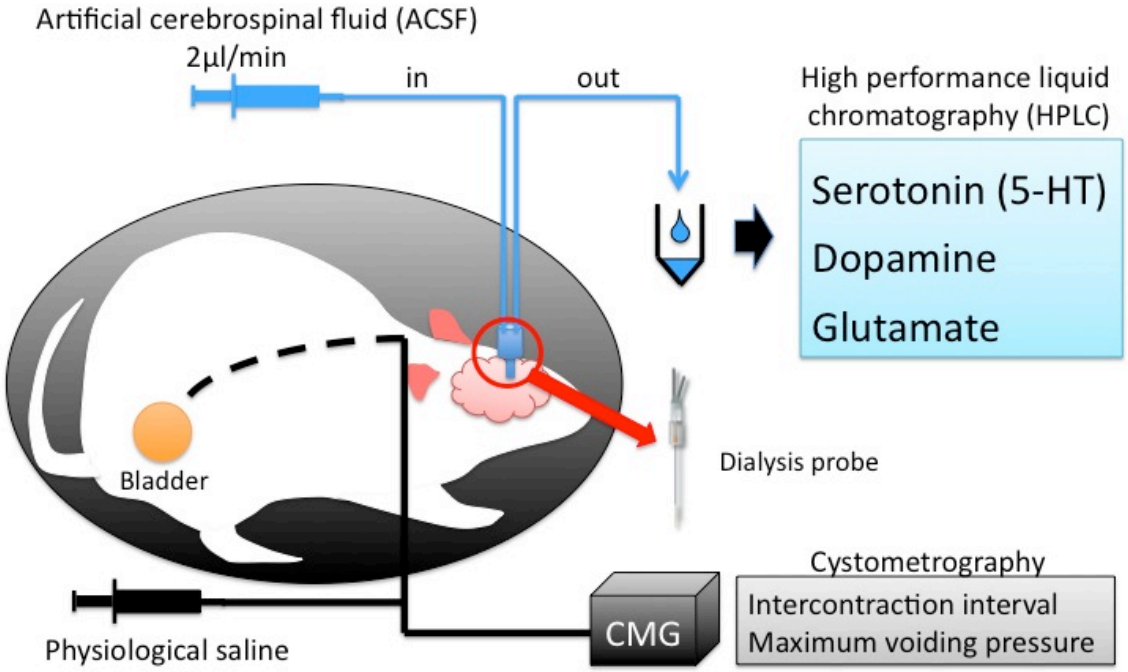


図 2-2　トルイジンブルー染色後の PFC の切片。矢印はプローブ挿入痕を表す。



マイクロダイアリシス法　実験方法のシェーマ

ラット PFC にダイアリシス用プローブを埋め込み、人工脳脊髄液（ACSF）にて持続灌流しサンプルを回収し HPLC へ。同時に膀胱内へカテーテルを通じて生理食塩水を注入し排尿反射を起こさせ、膀胱内圧測定を施行。

結果

実験 1：排尿反射時における PFC の 5-HT, DA, Glu の測定

方法

まず排尿反射時の PFC における神経伝達物質の動きを測定するために、実験 1 を行った。脳から回収したサンプルは 20 分毎に回収し、5-HT, DA, Glu を HPLC にて測定した。安定した基礎値を 60 分間測定した後に、膀胱内に生食を 0.2ml/min の速度で 60 分間持続注入し、排尿反射を数回起こさせた（図 2-3）。その間、排尿間隔（intercontraction interval, ICI）と最大排尿時膀胱内圧(maximum voiding pressure, MVP)を測定した。それ以外は膀胱内は空の状態とした。生食を注入せず膀胱を空のままとした排尿なし群を比較対象とした。

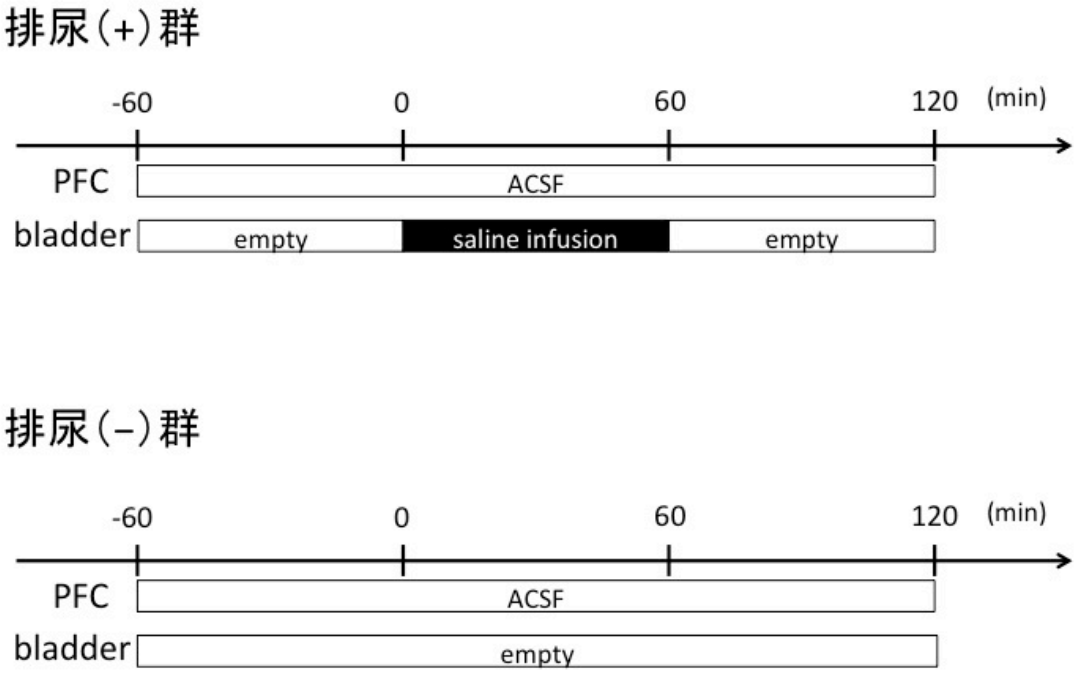


図 2-3　排尿有り群では、60 分間の排尿反射を起こさせた。排尿なし群では膀胱は空のままとした。

結果

排尿反射時の PFC における神経伝達物質の細胞外濃度の変化を図 2-4 に示す。60 分間の生食注入において、数回の排尿反射が見られた。5-HT, DA, Glu のうち、5-HT のみが排尿反射時に有意に濃度上昇（基礎値から 125.8%±13.2%の上昇）が見られた。膀胱内への生食の注入を中止すると、5-HT 濃度は基準値まで低下した。DA, Glu については有意な変化は見られなかった。

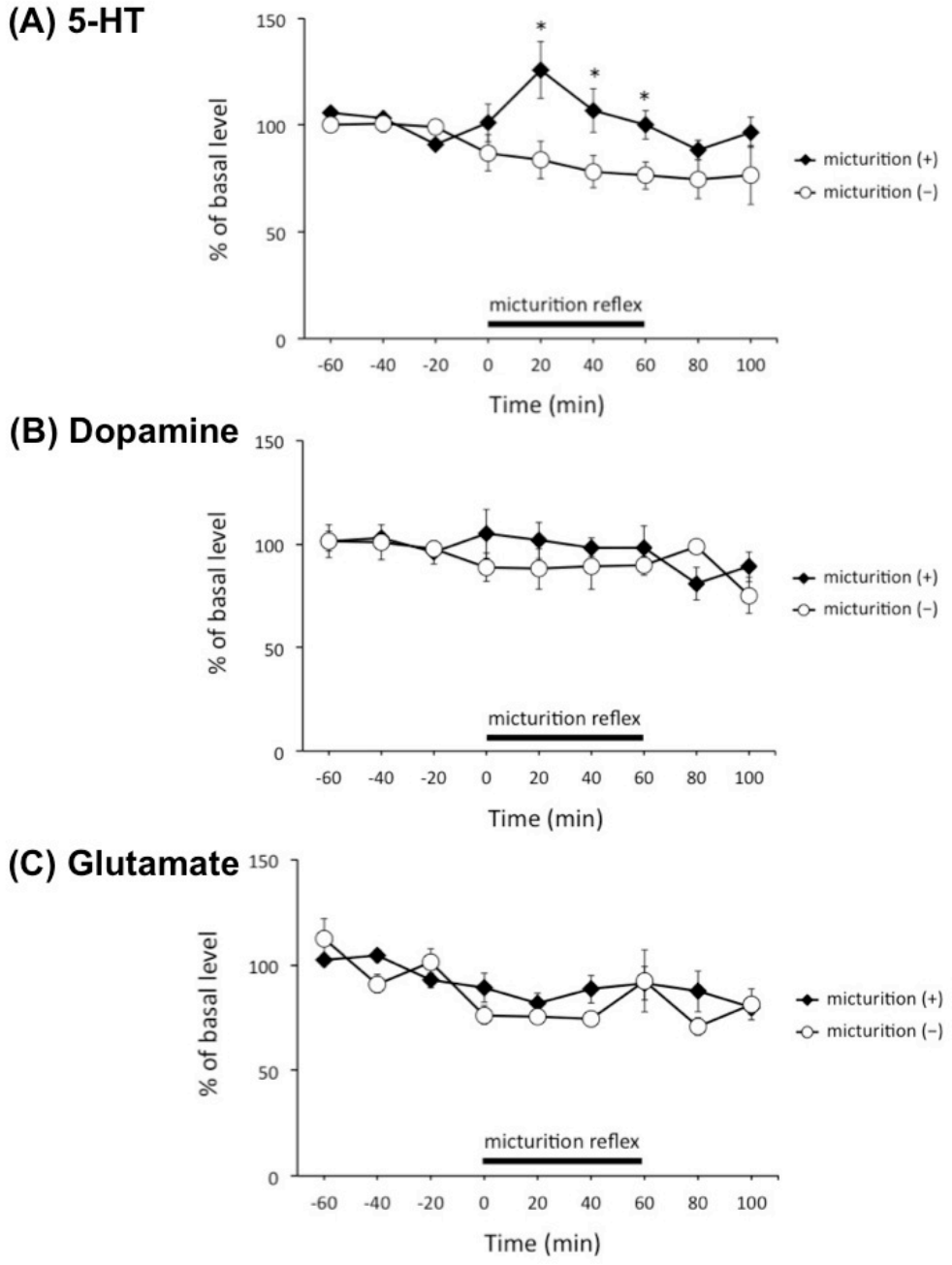


図 2-4　排尿反射時における PFC での各神経伝達物質の動きを示す。5-HT のみ排尿反射時に有意に濃度が上昇した。* P<0.05 vs. micturition(-) group, n=6-7

実験 2：SSRI の PFC 局所投与における排尿パラメーターの変化

実験 1 において、排尿反射時に PFC での 5-HT 上昇が起こることが判明したが、実際に排尿反射と 5-HT の上昇の間に因果関係があるかを調べるため、以下の実験を行った。

方法

5-HT 濃度の基礎値を測定した後に、SSRI(selective serotonin reuptake inhibitor)である citalopram（1μM in ACSF）を PFC にダイアライシスプローブを通じて 120 分間局所灌流した。灌流開始 60 分後に膀胱内に生食を 60 分間持続注入し、排尿反射を起こさせ、排尿パラメーターを測定した（図 2-5）。

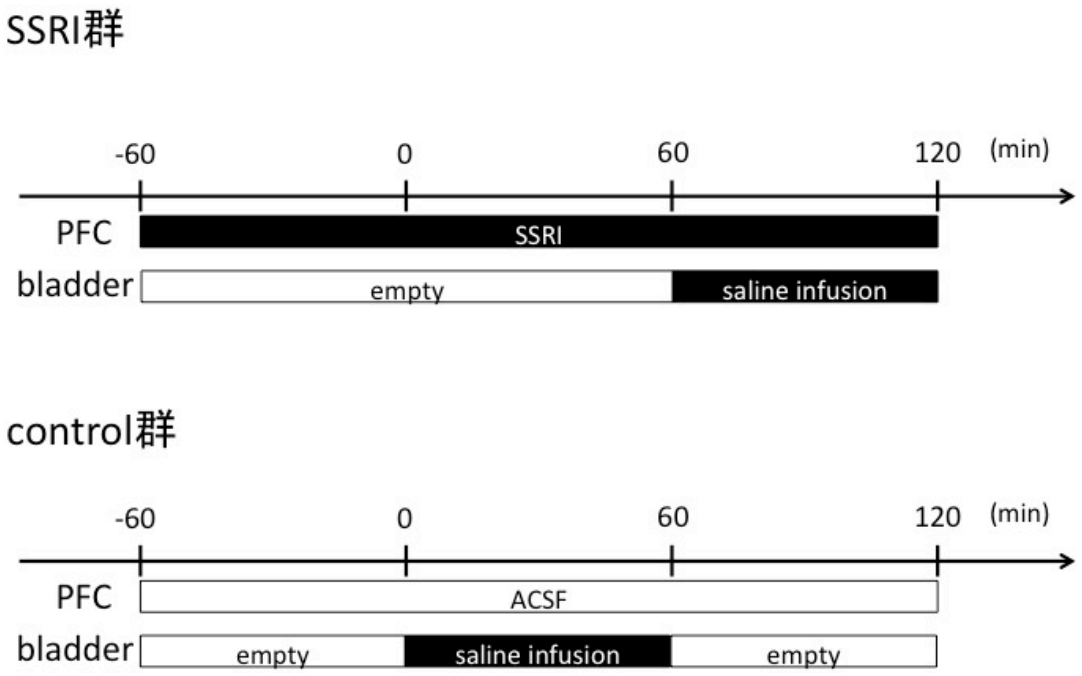


図 2-5　PFC に SSRI（citalopram, 1μM）を局所灌流し、排尿反射を起こした

結果

citalopram の局所投与 1 時間で PFC の 5-HT 濃度は基準値の 623±90.3%まで上昇し、その後も高値が持続した（図 2-6-A）。なおデータは示していないが、SSRI 投与にて PFC の DA, Glu の濃度には変化は見られなかった。一方、SSRI 投与下における排尿パラメーターに関しては、control 群と比べ有意に排尿間隔の延長（7.10±0.81→9.88±0.81min）が見られた（図 2-6-B）。排尿時最大膀胱内圧に関しては有意な変化を認めなかった。

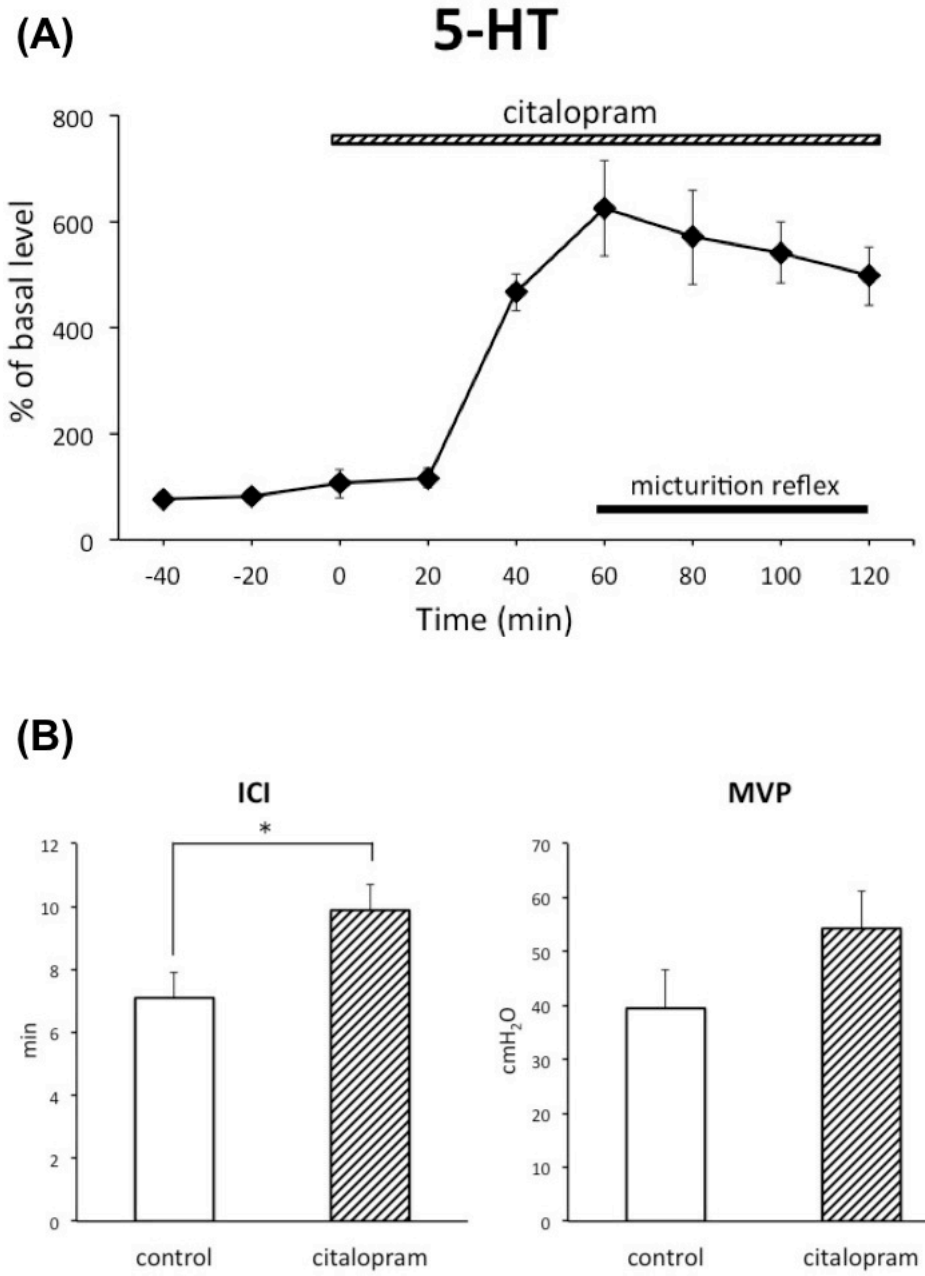


図 2-6-A　citalopram（1μM）局所投与における PFC の 5-HT の変化

図 2-6-B　citalopram 投与群にて ICI（排尿間隔）の有意な延長が見られた

* P<0.05 vs. micturition(-) group, n=6-7

実験 3：5-HT1A agonist の PFC 局所投与における排尿パラメーターの変化

PFC における 5-HT 濃度の減少が排尿間隔の短縮を招くことを確認するため、以下の実験を行った。

方法

5-HT 濃度の基礎値をとった後に、SSRI(selective serotonin reuptake inhibitor)である citalopram（1μM）を PFC にダイアライシスプローブを通じて 120 分間局所灌流した後に、8-OH-DPAT (300μM)を加えて灌流した（図 2-7）。citalopram 及び 8-OH-DPAT の濃度は既報[11]を参考にした。膀胱には生食を持続的に 0.2ml/min で注入し、排尿を観察した。排尿パラメーターは、ACSF 投与時、citaroplam 投与時、8-OH-DPAT 投与時の 3 点で測定した。

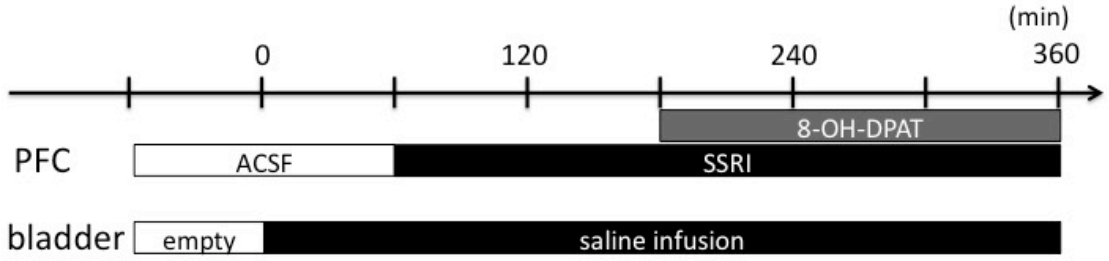


図 2-7　citalopram（1μM）を局所灌流後、8-OH-DPAT（300μM）を追加で灌流

結果

PFC における 5-HT 濃度は、実験 2 と同様に citaroplam 投与後に上昇し、その後 8-OH-DPAT の投与とともに徐々に減少に転じた（640.3±77.8%→363.2±60%）（図 2-8-A）。3 点で評価した排尿パラメーターは、citaroplam 投与により排尿間隔が有意に延長し、また 8-OH-DPAT の投与により排尿間隔は有意に短縮した（図 2-8-B）。

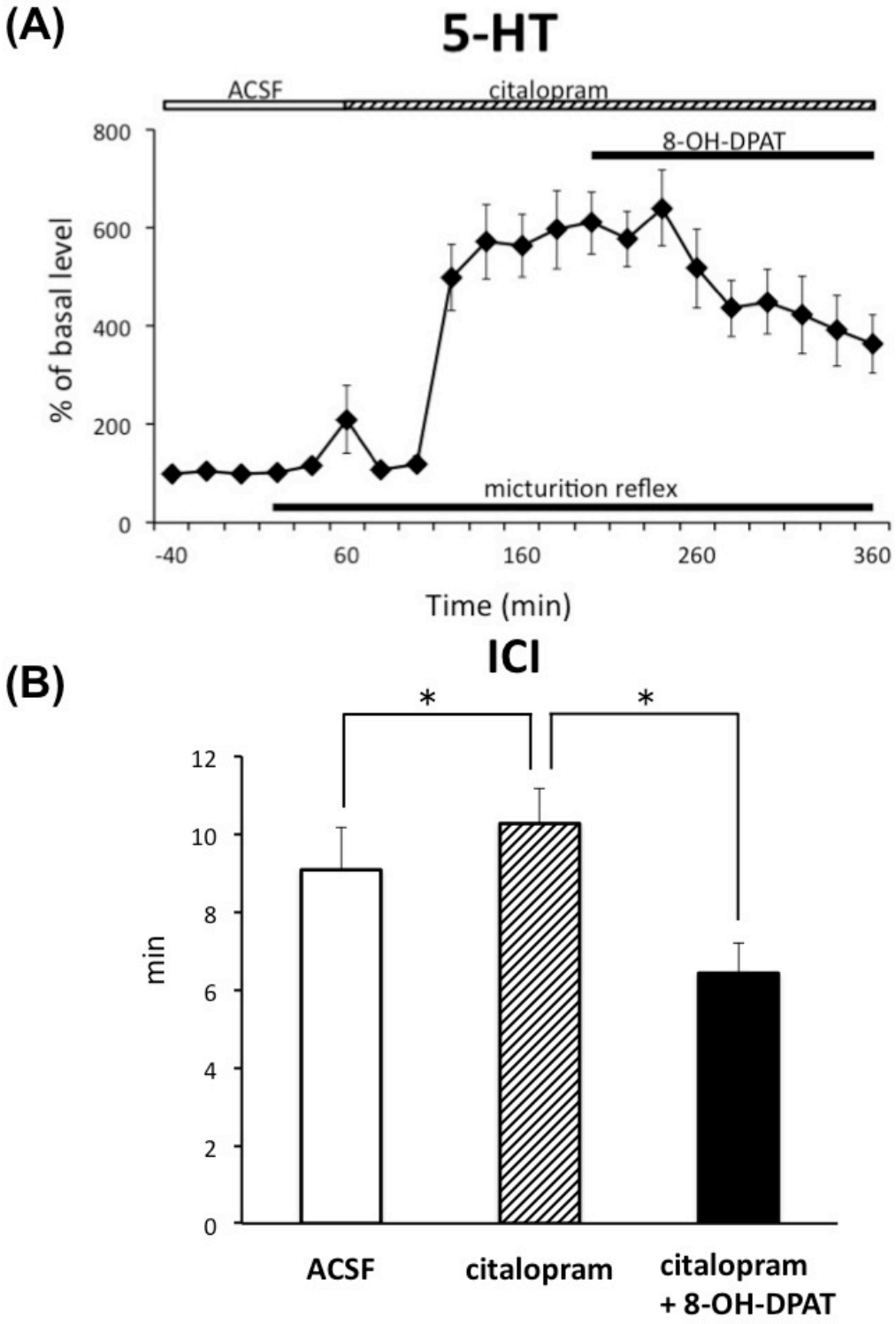


図 2-8-A　citaroplam, 8-OH-DPAT の PFC 局所による 5-HT 濃度の変化

図 2-8-B　排尿パラメーターの変化。ICI（排尿間隔）は citaroplam 投与により排尿間隔が有意に延長し、また 8-OH-DPAT の投与により排尿間隔は有意に短縮した。

* $P<0.05$, n=6

考察

マイクロダイアリシス法を使用した排尿反射時における PFC の神経伝達物質の測定は、本研究が初めての報告である。実験では排尿反射時に PFC の 5-HT 濃度が有意に上昇したが、DA 及び Glu には変化は見られなかった。SSRI の PFC 局所投与による 5-HT の上昇は、排尿時間の延長、つまり排尿反射の抑制をもたらした。逆に 5-HT_{1A} agonist の投与では 5-HT の濃度は減少し、排尿間隔の短縮、つまり排尿反射の亢進をもたらした。排尿圧に関しては変化は見られなかった。以上の結果より、PFC において 5-HT は、排尿反射の抑制に働いていると考えられる。

緒言にも述べたように、ヒトの排尿と脳の関係に関しては、機能的脳画像が有用であり 1996 年に福山ら[12]が初めて SPECT による報告を行って以来多くの研究がなされてきた。モダリティにはいくつかあるが、現在の主流は f-MRI(functional MRI)である。2010 年に、Fowler らはこれまでの機能的脳画像研究を元に、ひとつのワーキングモデルを提唱した[5]。そのモデルによると、排尿制御に中心的な役割を果たしているのは中脳水道周囲灰白質（periaqueductal grey, PAG）とされている。PAG は膀胱からの尿意などの求心路の情報を受けて上位中枢に受け渡し、さらに橋排尿中枢を制御することにより蓄尿、排尿を統制している。PAG は前帯状回や視床下部など他の様々な脳部位とつながりをもっており、特に PFC と直接的、あるいは間接的な強いコネクションをもつことが知られている[13,14]。PFC は PAG より上位に位置し、排尿においては適切なタイミングまで排尿を抑制する働きがあるとされている。これまでの機能的脳画像の報告では、PFC は蓄尿期及び排尿期で賦活化することが確認されている[1,3,15-18]。Michels らは、f-MRI を用いた研究において、排尿の initiation（開始）に PFC が賦活化していることを報告している[19]。また、過活動膀胱（overactive bladder, OAB）の患者の脳では、f-MRI において PFC の賦活化が抑制されているという報告もある[18,20,21]。このように、PFC は特に排尿抑制に重要な役割を担っていることがわかる。

ラットや人間を含む動物の PFC の働きそのものに関しては、過去の行動研究により、実行機能（executive function）の中心的役割を担っているとされている[6,7]。実行機能とは、記憶や学習、プランニング、柔軟性や適応性、抑制、意思決定などであるが、ラットにおいてもその働きは報告されている。特に、腹側内側前頭前野は衝動性のコントロール、すなわち「抑制性の制御」に関して重要な役割を果たしているとされており[22,23,24]、その機構が排尿反射の制御にも関わっている可能性がある。また、排尿開始を判断する「意思決定」という実行機能も、排尿制御において重要な役割を果たしていると考える。本研究においても、実際にダイアリシスプローブを挿入した

部位は、第一章の c-Fos 実験でも示したように、PL、IL 領域を含む内側前頭前野である。

一方、神経伝達物質と排尿という点でみると 5-HT を含めた多くの神経伝達物質について研究がなされてきた[10,25,26,27]。特に中枢神経系においては、グルタミン酸は排尿反射に対して興奮性の作用を持ち、GABA やグリシンやエンケファリンは抑制性の作用を持つことが判明している。興味深いことに、モノアミン（5-HT、DA、ノルアドレナリン）に関しては、動物種や神経系の違いにより興奮性もしくは抑制性の作用を示すことが知られている。これまでの排尿と中枢神経系の基礎研究では、主に脊髄以下がターゲットのものが主体であり、脳に関しては行われていても脳室内投与が大半であった。橘田ら[28]が同じくマイクロダイアリシス法を用いて PAG における DA, Glu, GABA の働きを報告しているが、排尿反射と脳のある特定の部位の働きに関する薬理学的検討はほとんどないのが現状である。本研究では、その PAG の上位に位置し、PAG を制御していると考えられる PFC に焦点を当て研究を行った。結果として PFC における 5-HT が排尿反射に抑制的な役割を持つことが判明した。

5-HT（5-ヒドロキシトリプタミン）は、ドーパミンやノルアドレナリンなどのモノアミン神経伝達物質の一つである。セロトニン（serotonin）の名称の由来は、血清（serum）から単離された血管を緊張（tone）させる物質に由来している。5-HT は体内に存在する内の 90%以上は腸管由来であり、中枢神経系には 2%の割合で存在する。中枢神経系の 5-HT は脳幹の縫線核で合成され、脳内及び脊髄に広範囲に投射している。特に PFC への 5-HT 神経は背側縫線核から上行性に投射していることが分かっている[29]。基本的な生理機能としては、末梢では心血管系、呼吸、内分泌系、消化管系、侵害受容、そして排尿や生殖器と幅広い作用を有している。中枢ではモノアミン仮説とも言われるように、うつ病などの気分障害にも関わっているとされている。これまで PFC における 5-HT と executive function（実行機能）の関係は報告されており、短期記憶や注意、認知機能、衝動性の抑制などがその機能として考えられている[30]。本実験から、PFC における 5-HT は、排尿制御に関しての実行機能も有している可能性が考えられる。緒言で述べた脳と排尿に関するワーキングモデルやこれまでの機能的脳画像研究と本実験結果を合わせて考えると、PFC は 5-HT を介して PAG を直接的あるいは間接的に制御し、結果として排尿反射を抑制する方向に働くのではないかという仮説が成り立つ（図 2-9）。

本実験の limitation としては、①citalopram や 8-OH-DPAT が呼吸や循環など自律神経系に与える影響を評価していない点や、②PAG におけるダイアリシスを行っておらず、PFC と PAG の相関関係を直接証明出来なかった点が挙げられる。また、③としてマイクロダイアリシス法の欠点として時間分解能に乏しい点がある。本来は蓄尿時と排尿時に分けてサンプルを回収することが理想であるが、本実験ではそこまで

は実現できず、「排尿反射」としてまとめて検討せざるを得なかった。①に関しては、少なくとも観察し得た限りにおいては歩行や睡眠、排便などに関しては薬剤投与中も異常な行動は見られなかった。また 5-HT 受容体の関与に関しては、本実験では確認していない。第 3 章で述べることとする。

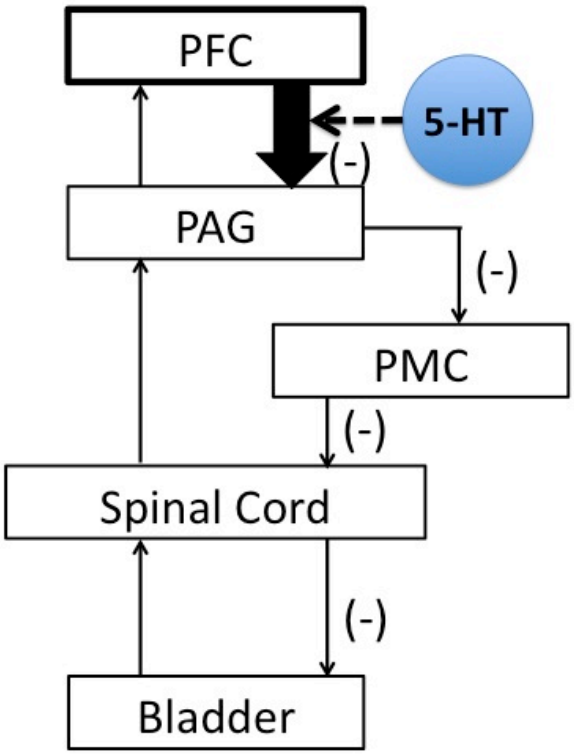


図 2-9　本実験結果による PFC の排尿制御に関する仮説。PFC は 5-HT を介して PAG を抑制することにより、PMC 以下の排尿反射の抑制に働く。

第 3 章

ラット前頭前野における排尿反射制御に関わる
セロトニン受容体についての考察
−マイクロインジェクション法を用いた解析−

緒言

第 2 章において、マイクロダイアリシス法を用いて PFC におけるセロトニンが排尿反射の抑制に関与している可能性を示した。その仕組みをより詳細に検討するため、セロトニン受容体に着目し本実験を行った。セロトニン受容体は 5-HT1～7 の 7 つに分類され、それぞれのサブタイプを合わせると計 14 種類にも及ぶ。中枢神経系におけるその役割や生理学的特性は数多くの研究により徐々に判明してきている。排尿反射の制御に関わる受容体が特定できれば、将来的に脳のセロトニン受容体をターゲットとした排尿改善薬の創薬につながるものと考える。

本実験では、マイクロインジェクション法を用いた。マイクロインジェクション法は、インジェクションカニューレを直接目的の脳部位に刺し、ある薬剤を局所投与することでその薬理学的、生理学的作用をみる手法である。セロトニンが排尿反射に抑制性の働きをもつことが判明したが、いずれかのセロトニン受容体拮抗薬（アンタゴニスト）を投与することによりその作用が拮抗され排尿反射の亢進、すなわち頻尿が起こるのではないかという仮説を立てた。本実験で使用したアンタゴニストは、5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_3, 5-HT_4, 5-HT_7 の 6 つである。PFC におけるセロトニン受容体の局在が証明されているもののうち、特に PFC に豊富に存在し、実行機能との関わりが深いとされているのが 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT_3 である [30]。また、予備実験においてラットの排便に中枢神経の 5-HT_4, 5-HT_7 が関与していることが判明しており、検討に加えた。また、マイクロインジェクション法の特性として脳内の細かい部位を打ち分けて検討することができるため、PFC の中でもさらに PL と IL に分けて検討することとした。

実験方法

1．実験動物

雌性 Sprague-Dawley rats（体重 236-308g）を使用した。明暗期のサイクルは 12 時間毎とし、全てのラットは自由に飲食可の状態とした。飼育および実験に関しては、北海道大学医学研究科「動物実験に関する指針（Guide for the Care and use of Laboratory Animals）」に準拠した。

2．手術方法

ラットにpentobarbital (40mg/kg body weight, i.p)にて麻酔後、stereotaxic frameに頭部を固定し、Paxinos and Watsonのアトラス[8]に従い、両側PFC（bregmaより前方3.0-3.2mm、側方0.7mm、硬膜より深さ2.0mm）にマイクロインジェクション用のガイドカニューラ（ステンレス製、直径0.6mm, 長さ9mm、手製）を埋め込み、歯科用セメントで固定し詰まりを防止する目的でダミーカニューラ（ステンレス製、直径0.3mm、手製）を通しておいた[24, 31]。頭部術後、stereotaxic frameから外し、仰臥位にした上で下腹部正中切開を置き、膀胱を露出した。膀胱頂部に18G針で穴を開け、ポリエチレンカテーテル（PE-50, Clay-Adams, Parsippany, NJ）を挿入した。カテーテルの先は皮下を頚部まで通し、先端を閉じた上で皮下に埋没し皮膚を縫合した。術後、ラットは個別にケージに入れ、7日間の回復期間をおいた。

3. 実験方法

手術7日後に、マイクロインジェクション法及び膀胱内圧測定を同時に施行した。
以下の実験は全て覚醒下、非拘束下で行った。

マイクロインジェクション法

ラット背側皮下に予め埋め込んでおいたカテ先端を取り出し、生食注入用カテーテルに接続し膀胱内圧測定を施行した。生食は 0.2ml/min の早さで注入し、60 分間測定した。その後 PFC に埋め込まれたガイドカニューラよりインジェクションカニューラ（直径 0.3mm）を挿入した。カニューラの長さは PL が目標の場合 9.8mm, IL が目標の場合 11mm とした。それぞれカニューラ先端からの深さは 0.8mm, 2.0mm となる（図 3-1）。カニューラ挿入後、マイクロシリンジポンプを使用し、生食で溶解した薬剤（0.5μl）を 0.5μl/min で PFC に局所投与した。投与終了後 1 分間待機し、カニューラを抜去した。薬剤投与終了 5 分後に再度膀胱内に同じ速度で生食を注入し、

膀胱内圧測定を 60 分間施行した。マイクロインジェクション前後での排尿間隔、及び排尿時膀胱内圧の変化につき検討した（図 3-2）。

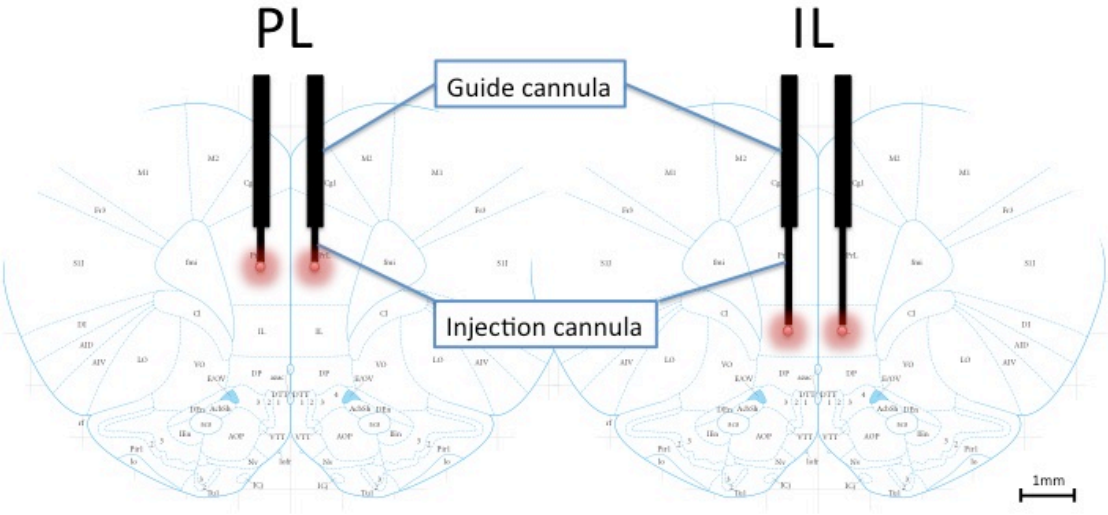


図 3-1　PFC におけるマイクロインジェクション用ガイドカニューラ及びインジェクションカニューラの埋め込み位置。目標位置によりインジェクションカニューラの長さを変えた。

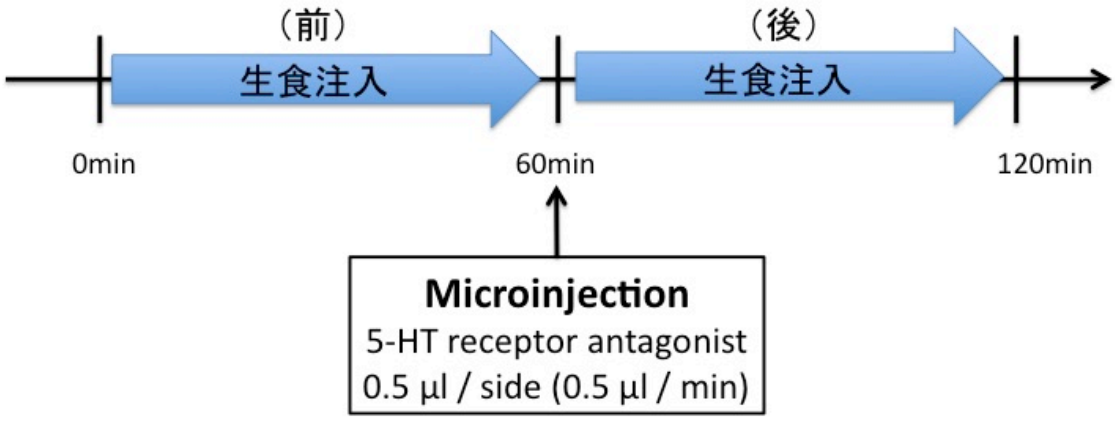


図 3-2　実験のタイムコースを示す。セロトニン受容体アンタゴニストのマイクロインジェクション前後において、膀胱内圧測定を施行し排尿間隔、排尿時最大膀胱内圧を比較した。

薬剤

既報[32-37]を参考にし、以下の濃度で用いた。いずれの薬剤も 0.5μl / side の量で両側 PFC 同時に 0.5μl / min の速度で投与した。

5-HT_{1A} antagonist: WAY100635 (600 ng/μl, 300ng/side)

参考：Hui et al. 2014[32]　ラット PFC、抗不安効果、240ng/side

5-HT_{2A} antagonist: MDL11939 (600 ng/μl, 300ng/side)

参考：Carli et al. 2006[34]　ラット PFC、抑制機能、300ng/side

5-HT_{2C} antagonist: SB242804 (600 ng/μl, 300ng/side)

参考：Bekinschtein et al. 2013[33]　ラット PFC、認知記憶、300ng/side

5-HT_3 antagonist: Ondansetron (2000 ng/μl, 1000ng/side)

参考：Ohmura, data not shown, ラット腹側海馬、排便、1000ng/side

5-HT_4 antagonist: GR113808 (1000 ng/μl, 500ng/side)

参考：Ohmura, data not shown, ラット腹側海馬、排便、500ng/side

5-HT_7 antagonist: SB266970 (2000ng/μl, 1000ng/side)

参考：Ohmura, data not shown, ラット腹側海馬、排便、2000ng/side

4．統計学的解析

排尿間隔、及び排尿時最大膀胱内圧は、薬剤投与前後で比較した。投与前を 1 として投与後の値を比で表した。データは平均値±標準誤差で示した。解析は 2 群間比較に paired t-test を用い、P value < 0.05 を有意差ありとした。

結果

実験に先立ち、Vehicle として生理食塩水の PFC への局所投与を行い排尿間隔、排尿時膀胱内圧に変化がないことを確認した（図 3-3, 3-4）。

図 3-5 に示すように、PL への 5-HT_{2A} antagonist である MDL11939（300 ng/μl /side）投与で有意に排尿間隔が延長した（n=6, $p<0.05$）。また、5-HT_7 antagonist である SB266970 (1000ng/side)投与で排尿間隔は有意に短縮した（n=4, $p<0.05$）。両者とも排尿時最大膀胱内圧は有意な変化を認めなかった（図 3-7）。対して IL への投与においては排尿間隔、排尿時最大膀胱内圧ともにどの antagonist も投与前後で有意な変化は観察できなかった（図 3-6, 3-8）。

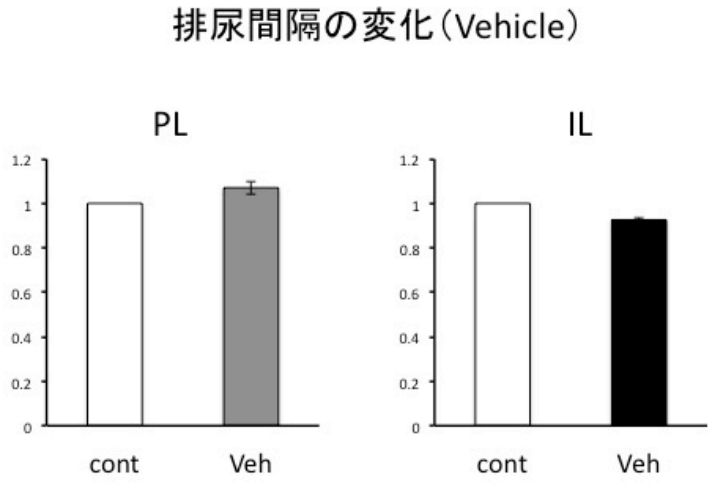


図 3-3　Vehicle（生理食塩水）局所投与前後の排尿間隔の比較。PL, IL ともに有意な変化は認めなかった。局所投与前を 1 として投与後の変化を示している。n=4

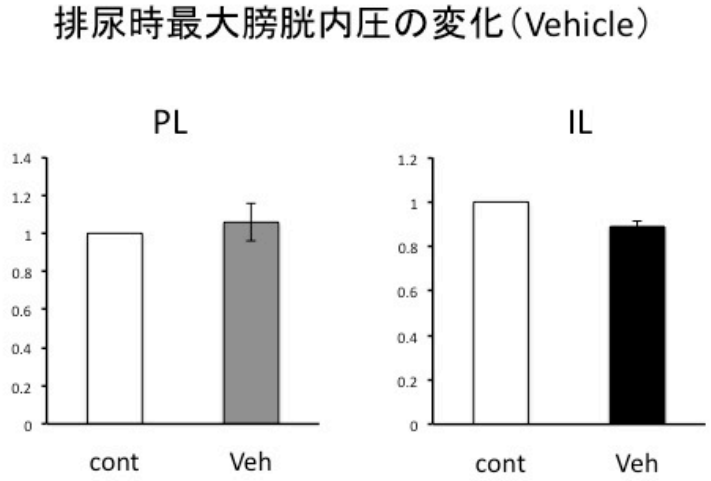


図 3-4　Vehicle（生食）投与前後の排尿時最大膀胱内圧の比較。PL, IL ともに有意な変化なし。n=4

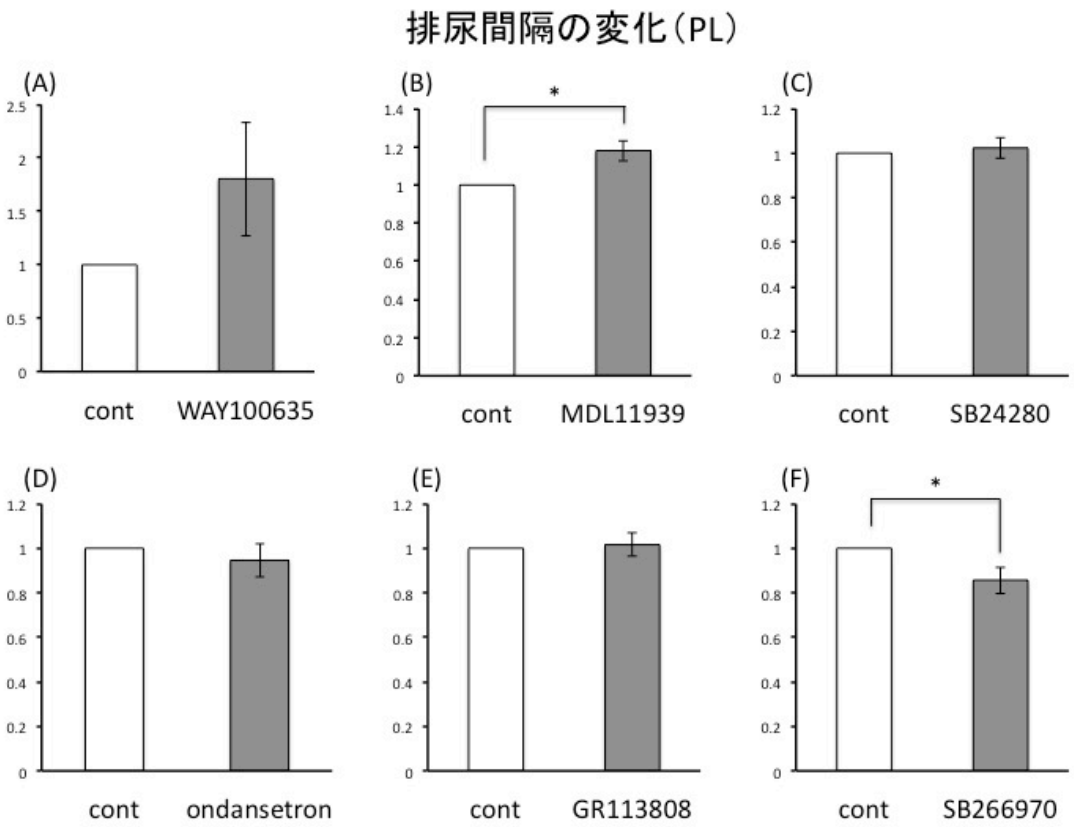


図 3-5　PL 領域における排尿間隔の変化

(B) MDL11939（300 ng/μl /side）投与で有意に排尿間隔が延長した（n=6, $p<0.05$）

(F) SB266970 (1000ng/side)投与で排尿間隔は有意に短縮した（n=9, $p<0.05$）。

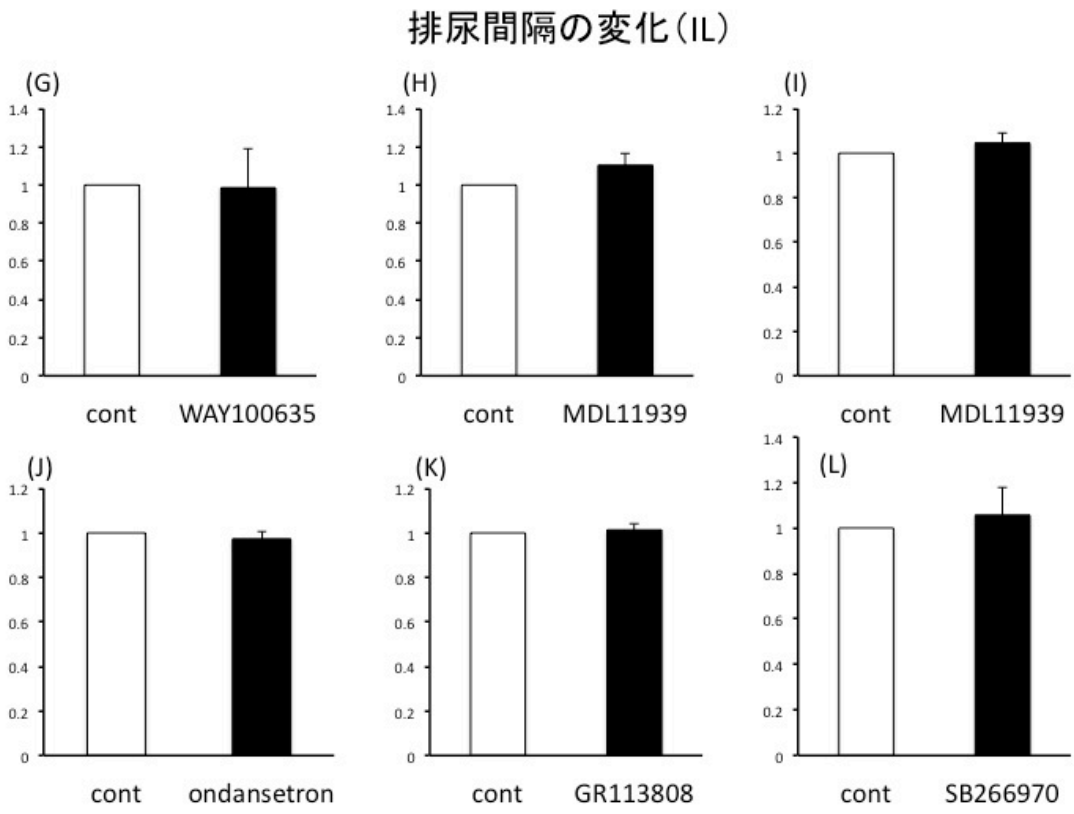


図 3-6　IL 領域における排尿間隔の変化
どの薬剤においても排尿間隔の有意な変化は見られなかった。(n=4-6)

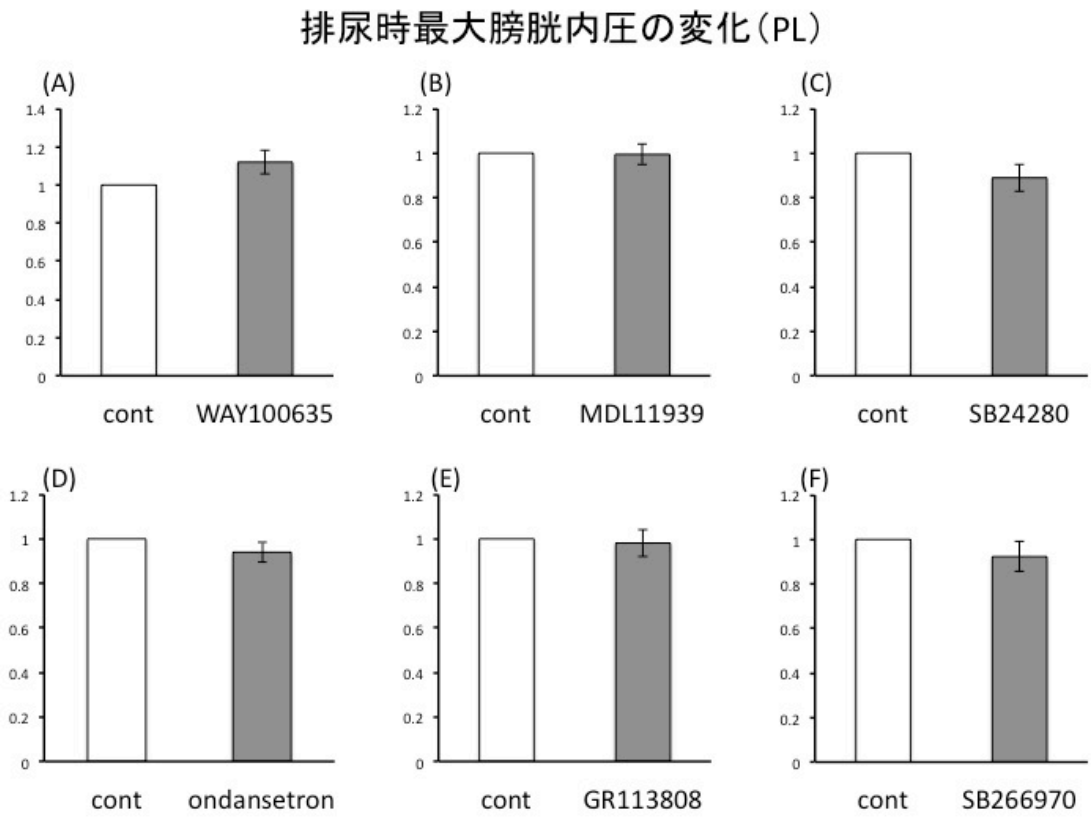


図 3-7　PL 領域における排尿時最大膀胱内圧の変化
どの薬剤においても排尿間隔の有意な変化は見られなかった。(n=4-6)

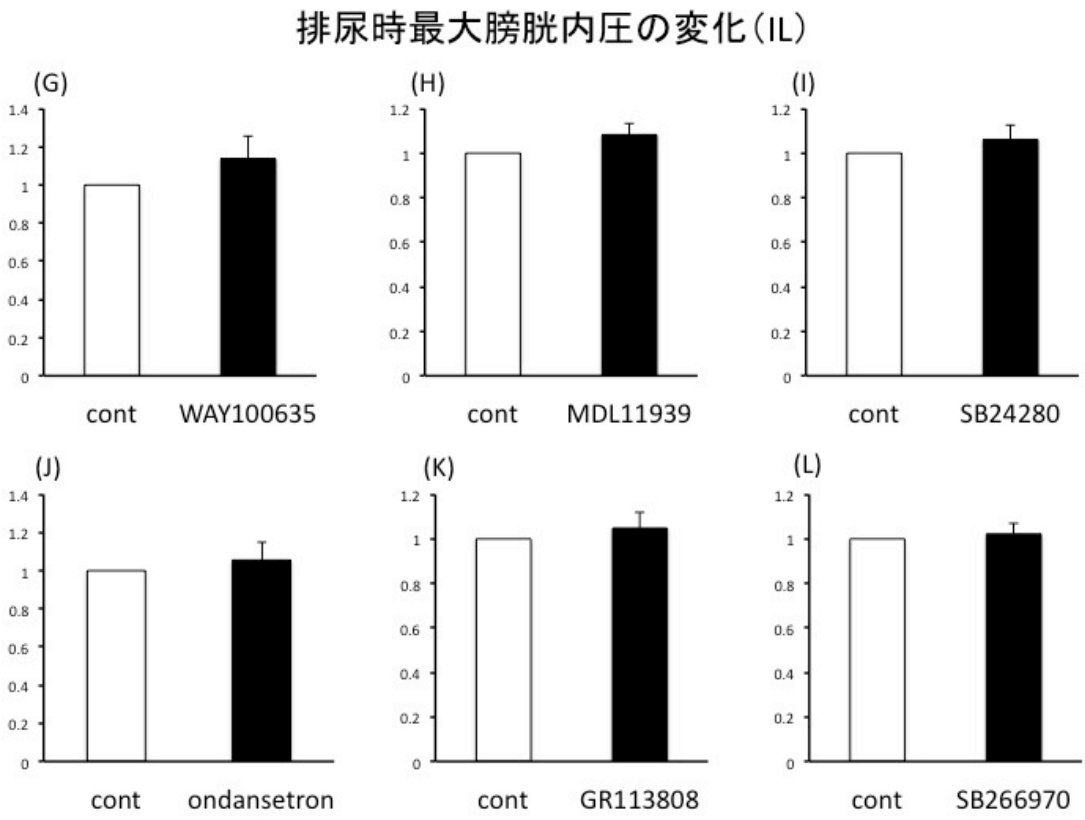


図 3-8　IL 領域における排尿時最大膀胱内圧の変化
どの薬剤においても排尿間隔の有意な変化は見られなかった。(n=4-6)

考察

本実験ではラット PFC（PL）への 5-HT_{2A} antagonist 局所投与により排尿間隔の延長が、5-HT_7 antagonist の投与で排尿間隔の短縮が見られた。すなわち、5-HT_{2A} antagonist により排尿反射が抑制され、5-HT_7 antagonist により亢進されたことになる。以上より、通常の排尿反射の制御においては 5-HT_{2A} は排尿反射亢進の働きを、5-HT_7 は排尿反射抑制の働きを有することが推察される（図 3-9）。第二章で PFC におけるセロトニンは排尿反射に抑制的な作用を持つことを示したが、本実験の結果より受容体によって作用に違いがある可能性が示唆された。

セロトニン受容体は大きく 7 つのクラスに分類され、サブタイプを含めると 14 種類存在し多彩な受容体ファミリーを形成している。細胞内情報伝達系も異なっており、代謝型（G タンパク質共役型）として Gs 共役型（5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7）、Gi/o 共役型（5-HT_1, 5-HT_5）、Gq 共役型（5-HT_2）があり、イオンチャネル型として 5-HT_3 がある。それぞれの受容体の構造や細胞内伝達様式により多様な薬理学的特性を持っている。セロトニンの生理的及び薬理学的作用は中枢から末梢まで全身に及び、それぞれの受容体が持つ働きも異なっている。循環器系では、5-HT_4 が心房細動などの不整脈の発生[38]や心室のリモデリングに関わっており[39]、呼吸器系では 5-HT_{2B} が肺動脈性肺高血圧症の発生に関与しているという報告がある[40]。体内セロトニンの 90%以上は消化管の腸クロム細胞から産生され、5-HT_3 の作用により消化管の蠕動運動が亢進される。5-HT_3 の選択的阻害剤は、過敏性腸症候群（IBS）の治療薬として用いられている[41]。また痛みなどの侵害受容にも作用しており、5-$HT_{1A, 2A, 3, 4}$ がその調節に関与している[42]。

一方、セロトニン受容体と排尿に関する研究も多数行われてきた[43]。ラットを用いた検討が主体ではあるが、いくつか報告がなされている。5-HT_{1A} agonist（8-OH-DPAT）の全身投与、脊髄腔内投与、脳室内投与にて排尿反射が亢進し[44, 45]、逆に 5-HT_{1A} antagonist（WAY-100635）の投与にて排尿反射が抑制された[46]。以上より 5-HT_{1A} は排尿反射に促進的に働くと言える。セロトニンの尿道括約筋に対する作用をみた研究では、5-HT_{2A} は排尿に促進的に作用し、5-HT_{2C} は逆に抑制的に作用すると報告されている[47]。5-HT_3 も同様に排尿反射に抑制的に働く[48]。5-HT_7 に関しては、5-HT_{1A} と同様、排尿に促進的に作用するとされている[49, 50]。このように、排尿反射という一つの事象に対するセロトニンの作用は受容体によって大きく異なる。また、5-HT_{1A} のように同じセロトニン受容体でも動物種の違いによって作用が全くの反対となることもあり[51]、その働きの全てをクリアカットに説明することは困難である。脳、特に PFC という部位においては類似の実験は過去に報告はない。その中で本実験から得られた結果は PFC におけるセロトニン受容体の働きについて新たな知見を

加えるものと考える。同じ PFC という部位において作用が異なる 2 つの受容体が存在するという結果は一見矛盾しているようだが、上記に示したような外尿道括約筋における 5-HT_{2A} と 5-HT_{2C} の関係に類似している [47]。どちらの方向に作用するかは、受容体同士のパワーバランスによって決まるのかもしれない。PFC が主に排尿反射に対し抑制系に働いているとすると、通常は 5-HT_7 の作用が有意であり排尿を許可する意思決定がなされたときに 5-HT_{2A} が一時的に有意になるという仮説が成り立つ。

本実験にもいくつかの limitation がある。各受容体の濃度は、過去の報告を参考に生理的作用の出る濃度を推定して施行したが、更に濃度を振った実験は行っておらず排尿反射が濃度依存性に変化するかは不明である。また、脳内にはセロトニン以外の多くの神経伝達物質が存在している。脳内のセロトニンは受容体を介してグルタミン酸や GABA を modulate しているとされており [30]、直接的ではないにしろセロトニン以外の神経伝達物質が排尿反射の制御に複雑に絡んでいる可能性はある。

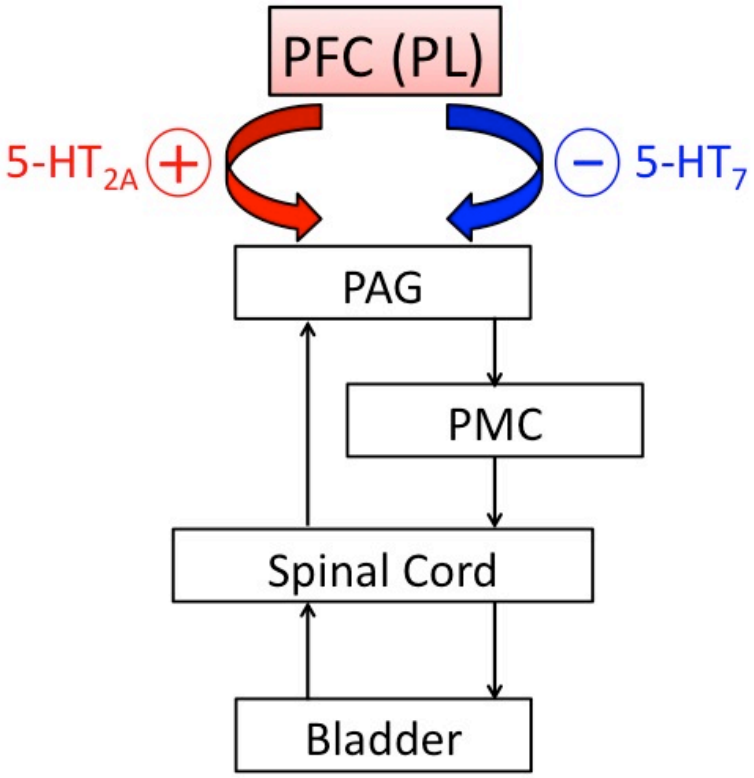


図 3-9　PFC におけるセロトニン受容体による排尿反射制御の仮説。5-HT_{2A} は排尿反射を促進し、5-HT_7 は抑制的に作用する。

総括

第 1 章

1. c-Fos を用いた検討では、PFC において排尿特異的な反応は確認できなかった。
2. しかし、外的刺激に対して PFC の PL 及び IL 領域が関与していることが判明した。

第 2 章

1. マイクロダイアリシス法にて、排尿反射中に PFC でのセロトニン濃度が上昇した。
2. SSRI を用いて PFC でのセロトニン濃度を上昇させると、排尿間隔の延長が起こった。
3. 5-HT_{1A} agonist を用いてセロトニン濃度を減少させると、排尿間隔の短縮が起こった。

第 3 章

1. マイクロインジェクション法にて、PFC に 5-HT_{2A} antagonist を投与すると排尿間隔の延長が起こった。
2. 5-HT_7 antagonist の投与により排尿間隔の短縮が起こった。

結論

本研究は、マイクロダイアリシス法及びマイクロインジェクション法を用いて脳と排尿機能の関連を調べたものである。結果として PFC におけるセロトニンが排尿反射の抑制に深く関わっていることが明らかになった。これまでのヒトにおける機能的脳画像研究でも、排尿反射における PFC の役割は主に抑制機能とされており、本結果はそれを裏付ける一つのデータとなり得る。またセロトニン受容体の関与においては、同じ PFC 内で 5-HT_{2A} と 5-HT_7 が排尿反射促進と抑制という相反する機能を有することが判明した。この事実は蓄尿から排尿への切り替え、すなわちスイッチングの機序解明に寄与する可能性がある。実臨床への応用という点においては、PFC に直接作用する排尿改善薬の開発につながる可能性がある。

今後の研究課題としては、PFC と脳内他部位の相互関係や他の神経伝達物質との関連を研究することにより、中枢における排尿反射制御のより一層の解明につながるものと考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さった北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野野々村克也前教授、篠原信雄教授、北海道大学大学院医学研究科薬理学講座神経薬理学分野吉岡光弘教授に深く感謝いたします。また、実験の遂行にあたり、実験方針や方法、論文作成の御指導をいただきました北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野三井貴彦助教（現山梨大学泌尿器科講師）、橘田岳也講師、北海道大学大学院医学研究科薬理学講座神経薬理学分野大村優助教に感謝申し上げます。

最後に、研究を進める上で両教室の方々には多くの協力をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

1. Blok, B. A PET study on brain control of micturition in humans. *Brain* **120**, 111-121 (1997).
2. Matsuura, S. et al. Human brain region response to distention or cold stimulation of the bladder: a positron emission tomography study. *J Urol* **168**, 2035-9 (2002).
3. Kavia, R.B., Dasgupta, R. & Fowler, C.J. Functional imaging and the central control of the bladder. *J Comp Neurol* **493**, 27-32 (2005).
4. Kuhtz-Buschbeck, J.P. et al. Control of bladder sensations: an fMRI study of brain activity and effective connectivity. *Neuroimage* **47**, 18-27 (2009).
5. Fowler, C.J. & Griffiths, D.J. A decade of functional brain imaging applied to bladder control. *Neurourol Urodyn* **29**, 49-55 (2010).
6. Kesner, R.P. & Churchwell, J.C. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem* **96**, 417-31 (2011).
7. Funahashi, S. & Andreau, J.M. Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *J Physiol Paris* **107**, 471-82 (2013).
8. Paxinos, G. & Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 3nd Edn. (Academic Press, San Diego., 1997).
9. Wang, K. et al. [Effects of ketamine and urethane on stimulation-induced c-fos expression in neurons of cat visual cortex]. *Dongwuxue Yanjiu* **34**, 582-8 (2013).
10. Yoshimura, N. & de Groat, W.C. Neural control of the lower urinary tract. *Int J Urol* **4**, 111-25 (1997).
11. Matsuzaki, H. et al. Early postnatal stress affects 5-HT1A receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur J Pharmacol* **615**, 76-82 (2009).
12. Fukuyama, H. et al. Neural control of micturition in man examined with single photon emission computed tomography using 99mTc-HMPAO. *NeuroReport* **7**, 3009-3012 (1996).
13. Vertes, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* **51**, 32-58 (2004).
14. Holstege, G. Micturition and the soul. *J Comp Neurol* **493**, 15-20 (2005).
15. Nour, S. Cerebral activation during micturition in normal men. *Brain* **123**, 781-789 (2000).

16. Athwal, B.S. Brain responses to changes in bladder volume and urge to void in healthy men. *Brain* **124**, 369-377 (2001).
17. Griffiths, D. & Tadic, S.D. Bladder control, urgency, and urge incontinence: evidence from functional brain imaging. *Neurourol Urodyn* **27**, 466-74 (2008).
18. Dasgupta, R., Critchley, H.D., Dolan, R.J. & Fowler, C.J. Changes in brain activity following sacral neuromodulation for urinary retention. *J Urol* **174**, 2268-72 (2005).
19. Michels, L. et al. Supraspinal Control of Urine Storage and Micturition in Men-An fMRI Study. *Cereb Cortex* (2014).
20. Griffiths, D., Derbyshire, S., Stenger, A. & Resnick, N. Brain control of normal and overactive bladder. *J Urol* **174**, 1862-7 (2005).
21. Tadic, S.D., Griffiths, D., Schaefer, W., Cheng, C.I. & Resnick, N.M. Brain activity measured by functional magnetic resonance imaging is related to patient reported urgency urinary incontinence severity. *J Urol* **183**, 221-8 (2010).
22. Passetti, F., Chudasama, Y. & Robbins, T.W. The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cereb Cortex* **12**, 1254-68 (2002).
23. Gill, T.M., Castaneda, P.J. & Janak, P.H. Dissociable roles of the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens core in goal-directed actions for differential reward magnitude. *Cereb Cortex* **20**, 2884-99 (2010).
24. Tsutsui-Kimura, I. et al. Milnacipran enhances the control of impulsive action by activating D(1)-like receptors in the infralimbic cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **225**, 495-504 (2013).
25. de Groat, W.C. & Yoshimura, N. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 691-721 (2001).
26. Yoshimura, N. et al. Neural mechanisms underlying lower urinary tract dysfunction. *Korean J Urol* **55**, 81-90 (2014).
27. de Groat, W.C., Griffiths, D. & Yoshimura, N. Neural control of the lower urinary tract. *Compr Physiol* **5**, 327-96 (2015).
28. Kitta, T. et al. GABAergic mechanism mediated via D receptors in the rat periaqueductal gray participates in the micturition reflex: an in vivo microdialysis study. *Eur J Neurosci* **27**, 3216-25 (2008).
29. Jacobs, B.L. & Azmitia, E.C. Structure and function of the brain serotonin

system. *Physiol Rev* **72**, 165-229 (1992).

30. Puig, M.V. & Gulledge, A.T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Mol Neurobiol* **44**, 449-64 (2011).
31. Tsutsui-Kimura, I. et al. Nicotine provokes impulsive-like action by stimulating alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in the infralimbic, but not in the prelimbic cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **209**, 351-9 (2010).
32. Hui, Y.P. et al. Anxiolytic effects of prelimbic 5-HT receptor activation in the hemiparkinsonian rat. *Behav Brain Res* (2014).
33. Bekinschtein, P., Renner, M.C., Gonzalez, M.C. & Weisstaub, N. Role of medial prefrontal cortex serotonin 2A receptors in the control of retrieval of recognition memory in rats. *J Neurosci* **33**, 15716-25 (2013).
34. Carli, M., Baviera, M., Invernizzi, R.W. & Balducci, C. Dissociable contribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* **31**, 757-67 (2006).
35. Ohno, Y., Imaki, J., Mae, Y., Takahashi, T. & Tatara, A. Serotonergic modulation of extrapyramidal motor disorders in mice and rats: role of striatal 5-HT3 and 5-HT6 receptors. *Neuropharmacology* **60**, 201-8 (2011).
36. Xu, W.J., Zhao, Y., Huo, F.Q., Du, J.Q. & Tang, J.S. Involvement of ventrolateral orbital cortex 5-HT 1-7 receptors in 5-HT induced depression of spared nerve injury allodynia. *Neuroscience* **238**, 252-7 (2013).
37. Li, S.F., Zhang, Y.Y., Li, Y.Y., Wen, S. & Xiao, Z. Antihyperalgesic effect of 5-HT7 receptor activation on the midbrain periaqueductal gray in a rat model of neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav* **127**, 49-55 (2014).
38. Langer, C. et al. Atrial fibrillation in carcinoid heart disease: The role of serotonin. A review of the literature. *Clin Res Cardiol* **96**, 114-8 (2007).
39. Brattelid, T. et al. Functional serotonin 5-HT4 receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT4 mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**, 157-66 (2004).
40. Esteve, J.M., Launay, J.M., Kellermann, O. & Maroteaux, L. Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell Biochem Biophys* **47**, 33-44 (2007).
41. Spiller, R.C. Targeting the 5-HT(3) receptor in the treatment of irritable

bowel syndrome. *Curr Opin Pharmacol* **11**, 68-74 (2011).

42. Klomp, A. et al. Test-retest reliability of task-related pharmacological MRI with a single-dose oral citalopram challenge. *Neuroimage* **75**, 108-16 (2013).
43. Ramage, A.G. The role of central 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) receptors in the control of micturition. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 2**, S120-31 (2006).
44. Ishizuka, O. et al. Role of supraspinal serotonin receptors for micturition in normal conscious rats. *Neurourol Urodyn* **21**, 225-30 (2002).
45. Testa, R. et al. Effect of several 5-hydroxytryptamine(1A) receptor ligands on the micturition reflex in rats: comparison with WAY 100635. *J Pharmacol Exp Ther* **290**, 1258-69 (1999).
46. Kakizaki, H., Yoshiyama, M., Koyanagi, T. & De Groat, W.C. Effects of WAY100635, a selective 5-HT1A-receptor antagonist on the micturition-reflex pathway in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1407-13 (2001).
47. Mbaki, Y., Gardiner, J., McMurray, G. & Ramage, A.G. 5-HT 2A receptor activation of the external urethral sphincter and 5-HT 2C receptor inhibition of micturition: a study based on pharmacokinetics in the anaesthetized female rat. *Eur J Pharmacol* **682**, 142-52 (2012).
48. Espey, M.J., Du, H.J. & Downie, J.W. Serotonergic modulation of spinal ascending activity and sacral reflex activity evoked by pelvic nerve stimulation in cats. *Brain Res* **798**, 101-8 (1998).
49. Read, K.E., Sanger, G.J. & Ramage, A.G. Evidence for the involvement of central 5-HT7 receptors in the micturition reflex in anaesthetized female rats. *Br J Pharmacol* **140**, 53-60 (2003).
50. Gang, W. et al. The effect of the 5-HT7 serotonin receptor agonist, LP44, on micturition in rats with chronic spinal cord injury. *Neurourol Urodyn* **33**, 1165-70 (2014).
51. Tai, C., Miscik, C.L., Ungerer, T.D., Roppolo, J.R. & de Groat, W.C. Suppression of bladder reflex activity in chronic spinal cord injured cats by activation of serotonin 5-HT1A receptors. *Exp Neurol* **199**, 427-37 (2006).