



Title	Lipopolysaccharide誘発間質性膀胱炎モデルラットに対する低出力体外衝撃波治療の有効性
Author(s)	日下部, 直久
Description	配架番号 : 2826
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15892号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15892
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92054
Type	doctoral thesis
File Information	KUSAKABE_Naohisa.pdf



学位論文

Lipopolysaccharide誘発間質性膀胱炎モデルラットに
対する低出力体外衝撃波治療の有効性
(Effects of low-intensity extracorporeal shock wave
therapy on lipopolysaccharide-induced cystitis
in a rat model of interstitial cystitis)

2024 年 3 月

北海道大学

日下部 直久

学位論文

Lipopolysaccharide誘発間質性膀胱炎モデルラットに
対する低出力体外衝撃波治療の有効性
(Effects of low-intensity extracorporeal shock wave
therapy on lipopolysaccharide-induced cystitis
in a rat model of interstitial cystitis)

2024 年 3 月

北海道大学

日下部 直久

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
【第一章】	
緒言	9 頁
予備実験	10 頁
材料と方法	12 頁
結果	16 頁
考察	20 頁
【第二章】	
緒言	22 頁
予備実験	23 頁
材料と方法	26 頁
結果	29 頁
考察	36 頁
結論	38 頁
謝辞	39 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表予定である。

Naohisa Kusakabe, Tadanobu Chuyo Kamijo, Naoki Wada, Hiroki Chiba, Nobuo Shinohara, Minoru Miyazato.

Effects of low-intensity extracorporeal shock wave therapy on lipopolysaccharide cystitis in a rat model of interstitial cystitis/bladder pain syndrome

投稿先：International Urology and Nephrology

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 日下部直久、上條中庸、宮里実、千葉博基、橘田岳也、篠原信雄

Lipopolysaccharide 誘発膀胱炎モデルラットに対する低出力体外衝撃波の治療効果

若手研究者クローズアップ企画<非腫瘍>

第110回日本泌尿器科学会総会

2023年4月22日-24日、神戸

2. 日下部直久、上條中庸、宮里実

Lipopolysaccharide 誘発膀胱炎モデルラットに対する低出力体外衝撃波治療の有効性の検討

シンポジウム「Cutting edge in Young neurourologists」

第30回日本排尿機能学会

2023年9月7日-9日、千葉

要旨

【背景と目的】

間質性膀胱炎（IC: Interstitial cystitis）は膀胱壁の慢性炎症を引き起こす原因不明の難治性疾患である。膀胱周囲の疼痛や頻尿が特徴的な症状で、患者の生活に大きく影響を及ぼす。膀胱粘膜に特徴的なハンナー病変を有し、重症例では本邦では難病に指定されている。現状ではストレス緩和、内服治療、ジメチルスルホキシドの膀胱注入療法、膀胱水圧拡張術などが行われているが、いずれも根治性はなく効果の持続期間も長くないため、より有効な治療方法が必要とされている。本研究で検討する低出力体外衝撃波治療（LiESWT: low-intensity extracorporeal shock wave therapy）は、本邦では足底腱膜炎に対してのみ保険適用となっているが、狭心症や勃起不全など他の疾患に対しても有効であることが報告されている。さらに有害事象がほとんどないことも特徴として挙げられる。基礎研究の分野でも抗炎症作用や血管新生作用など様々な効果が報告されている。以上より、LiESWT は原因不明の IC に対しても有効な治療となり得ると予想された。リポポリサッカライド（LPS: lipopolysaccharide）を腹腔内や膀胱内に注入して膀胱炎を誘発した動物モデルが、下腹部痛や頻尿を起こし組織学的にも IC と同様に膀胱への炎症細胞の浸潤や線維化の増加を示すことから、IC の動物モデルの 1 つとして使用されている。本研究では LPS で膀胱炎を誘発した間質性膀胱炎モデルラットに対し LiESWT を行い、疼痛や膀胱機能の改善効果やメカニズムを検討した。本研究では最初に腹腔内に LPS を注入したラットで実験を行い、次に膀胱内に LPS を注入したラットで実験を行った。

【材料と方法】

（第一章 LPS 腹腔内投与）Sprague-Dawley (SD) ラットを sham 群、膀胱炎群（LPS 群、LPS10 mg/kg を腹腔内に投与）、膀胱炎誘発後の day3 に LiESWT を行った群（LiESWT 群）の 3 群に分類した。LiESWT は膀胱に向かって下腹部に照射した（0.12 mJ/mm²、300 shot、2 Hz）。day6 に疼痛評価（von Frey テスト）と 24 時間排尿記録を行い、day7 に urethane 麻酔下で膀胱内圧測定（CMG: cystometrogram）を行った後に膀胱を摘出して組織評価を行った。

（第二章 LPS 膀胱内投与）SD ラットを control 群、膀胱炎群（LPS 群、LPS1mg を 2 日連続で膀胱内注射）、膀胱炎誘発後の day3 と day4 に LiESWT を行った群（LiESWT 群）の 3 群に分類した。LiESWT は膀胱に向かって下腹部に照射した（0.12mJ/mm²、各回 300shot、2Hz）。day6 に疼痛評価（von Frey テスト）と 24 時間排尿記録を行い、day7 に urethane 麻酔下で膀胱内圧測定（CMG）を行った後に膀胱を摘出して組織評価を行った。さらに免疫組織学的検討として、膀胱の神経を評価するために S-100 染色も行った。

【結果】

(第一章 LPS 腹腔内投与) LPS 群では下腹部の疼痛閾値が sham 群よりも有意に低かった。しかし LiESWT 群では疼痛閾値の回復を認めなかった。排尿機能としては 24 時間排尿記録と CMG 共に 3 群間で有意な違いを認めなかった。組織学的には LPS 群で膀胱粘膜の軽度の肥厚を認めたが、それ以外に違いを認めなかった。

(第二章 LPS 膀胱内投与) LPS 群では下腹部の疼痛閾値が control 群よりも有意に低かった。排尿機能としては、LPS 群で 24 時間排尿記録の平均 1 回排尿量が有意に増加し、CMG では膀胱収縮時の振幅が有意に低下しており、LPS 群が低活動膀胱様の状態となった。免疫組織化学的検査では、LPS 群では粘膜下層の炎症性変化、線維化面積の有意な増加を認め、筋層の S-100 染色陽性領域の有意な減少が認められた。LiESWT 群では、下腹部の疼痛閾値が LPS 群と比較して有意に高く、CMG では膀胱の収縮力が有意に上昇した。免疫組織化学的には、LPS 群と比較して膀胱の炎症や線維化は改善し、S-100 染色陽性領域は増加していた。

【考察】

(第一章 LPS 腹腔内投与) LPS を腹腔内に投与した膀胱炎モデルでは、下腹部の疼痛閾値の低下が確認されたが、膀胱機能に変化は見られなかった。組織学的に膀胱粘膜の軽度肥厚を認めたが炎症細胞浸潤などの痛みの原因となるような変化を認めなかったため、疼痛の原因が膀胱由来とは考えづらかった。むしろ腹腔内に LPS の影響が生じ、その結果として疼痛が生じた可能性がある。LiESWT 群と LPS 群の比較では、下腹部の疼痛や膀胱機能に変化は認められなかった。本研究の主目的は LiESWT の効果を検討することであり、LPS を腹腔内に投与したモデルは膀胱由来の疼痛や膀胱機能の変化を認めなかったことから、モデルとしては使用できないと判断した。

(第二章 LPS 膀胱内投与) LPS を膀胱内に投与した膀胱炎モデルでは既報と同様に膀胱周囲の疼痛閾値の低下を認め、IC 患者に特徴的な下腹部痛と似た症状を呈していた。組織学的にも炎症細胞浸潤の増加や線維化面積の増加を認め、炎症が原因で疼痛が生じたと予想された。その一方で膀胱機能としては膀胱収縮力の低下や排尿間隔の延長、平均 1 回排尿量の増加を認め、低活動膀胱様の状態となり既報と異なる結果も認めた。この変化の原因として神経が影響していると予想し、膀胱に対して S-100 抗体を使用して免疫染色を行うと、LPS 群で S-100 染色陽性範囲が有意に減少しており、神経の損傷が疑われた。本モデルは膀胱の神経が強く傷害を受けたことにより、低活動膀胱様の状態になったと予想された。このモデルに対して LiESWT で治療を行うと、膀胱周囲の疼痛閾値が有意に改善し、膀胱機能も control 群と同等まで回復していた。組織学的には膀胱への炎症細胞浸潤が低下し線維化範囲が改善しており、既報と同様に

LiESWTにより膀胱の炎症が改善したと考えられた。膀胱周囲の疼痛の改善も、炎症の改善により生じたと予想された。膀胱機能の回復については、低活動膀胱動物モデルに対して LiESWT を行うと、排尿筋の回復や血流を増加させて膀胱収縮力が増強することが報告されている。本実験ではそれに加えて S-100 染色陽性範囲が増加したことから、神経の回復により膀胱機能が改善したと予想された。既報では LiESWT により神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS: neuronal nitric oxide synthase) や脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) が増加することが報告されており、本研究における神経の回復も nNOS や BDNF が関係している可能性が示唆された。

【結論】

LiESWT は炎症の改善や神経を回復させることにより、LPS 誘発膀胱炎モデルラットの膀胱周囲の疼痛や膀胱機能が改善させる可能性が考えられた。本研究により、LiESWT が IC に対する新たな治療方法となり得る可能性が示唆された。

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ANOVA: analysis of variance

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

CMG: cystometogram

CTR: control

DAB: diaminobenzidine

DMSO: dimethyl sulfoxide

ESWT: extracorporeal shock wave therapy

HE: Hematoxylin & Eosin

IC: interstitial cystitis

LiESWT: low-intensity extracorporeal shock wave therapy

nNOS: neuronal nitric oxide synthase

QOL: quality of Life

SD: Sprague-Dawley

緒言

間質性膀胱炎 (IC: interstitial cystitis) は、膀胱壁に慢性炎症を起こす原因不明の難治性の疾患である。主症状は下腹部や骨盤内の持続的な痛みで、頻尿や尿意切迫感を伴うことも特徴としており (Akiyama et al., 2020)、患者の quality of life (QOL) に大きな影響を及ぼす (Nickel et al., 2010)。この疾患は男性よりも女性に多く、米国では成人女性の 2.7~6.5% が IC に罹患しており (Berry et al., 2011)、本邦では一般成人のうちの 1.0% が毎日膀胱痛を経験すると報告されている (Homma et al., 2020)。IC の特徴として膀胱粘膜にハンナー病変と呼ばれる異常な毛細血管構造を有し、IC の一部重症例は本邦では難病に指定されている (日本間質性膀胱炎研究会, 2019)。

古くから一般的に行われてきた治療方法として膀胱水圧拡張術があるが、奏功率は約 50% に留まり、数ヶ月しか効果は持続しない (Homma et al., 2020)。最近では 2021 年に本邦でジメチルスルホキシド (DMSO: dimethyl sulfoxide) の膀胱内注入療法が保険適応となり、この治療の有効率は 50~80% と比較的高いが (Perez-Marrero et al., 1988)、再発することも多い。IC に対するより有効な治療方法の確立が必要とされている。

体外衝撃波治療 (ESWT: extracorporeal shock wave therapy) は 1980 年代に初めて腎結石の治療に用いられ (Chaussy et al., 1982)、現在も尿路結石の標準的な治療として使われている (Türk et al., 2016; 麦谷, 2012)。消化器科においても胆石の治療に ESWT が使用されている (星野, 1991)。本研究で使用する低出力体外衝撃波治療 (LiESWT: low-intensity extracorporeal shock wave therapy) はその 1/10 程度の出力の治療で、現在臨床では整形外科治療 (L. Chen et al., 2020; Gerdesmeyer et al., 2003)、狭心症 (Kikuchi et al., 2010; Li and Liu, 2018)、勃起不全治療 (Kalyvianakis et al., 2022; Kitrey et al., 2016) などで有効性が示されており、有害事象もほとんどない。本邦では足底腱膜炎に対する治療として保険適用となっている。基礎研究分野では抗炎症作用 (Ciampa et al., 2005; Mariotto et al., 2009)、血管新生作用 (Kuo et al., 2007; Nishida et al., 2004)、神経回復作用 (Mense and Hoheisel, 2013; Ohtori et al., 2001)、幹細胞の活性化作用 (Lin et al., 2017) などの様々な効果が報告されている。泌尿器科疾患モデルに対しても有効性が報告されている。前立腺炎モデルラットにおいて、LiESWT は陰嚢や骨盤の疼痛感受性を低減させて、組織学的には前立腺の白血球の浸潤を抑制したことが示されている (Song et al., 2021; Wang et al., 2019)。糖尿病性膀胱機能障害モデルラットや放射線性膀胱炎モデルラットに対しては、LiESWT を行うことで膀胱の収縮力を改善することが報告されている (Y.-T. Chen et al., 2020; Wang et al., 2018)。以上のように LiESWT は抗炎症作用、血管新生作用、神経再生作用などが示されており、原因が未だ解明されていない

IC に対しても有効な治療となり得ると仮説を立てた。

IC の動物モデルはいくつか報告されているが(Liu et al., 2007; Matos et al., 2017; Song et al., 2017)、まだ標準的なモデルは確立されていない。本研究で採用したリポポリサッカライド (LPS: lipopolysaccharide) はグラム陰性菌の外膜の主要成分であり、人体の免疫反応を誘発することが知られている(Park and Lee, 2013; Whitfield and Trent, 2014)。これを腹腔内や膀胱内に注入して膀胱炎を誘発した動物モデルは IC の病態を模倣することが報告されており、IC モデルとして研究に用いられてきた(Kamei et al., 2018; Olsson et al., 1998; Yoshizumi et al., 2021)。このモデルは頻尿や 1 回排尿量の減少などの排尿状態の変化を示し、病理組織学的にも IC 患者と同様に、膀胱への炎症細胞の浸潤と線維化の増加が認められた(Kim et al., 2017; Ryu et al., 2019; Song et al., 2017; Yoshizumi et al., 2021)。以上より、LPS 誘発膀胱炎モデルは、IC に対する新たな治療方法の研究の評価に有用であると考えられた。

上記を踏まえ、本研究では LPS 誘発膀胱炎モデルラットに対する LiESWT の治療効果およびメカニズムを検討した。排尿・疼痛行動、膀胱機能、組織学的変化を調べた。本研究では第一章で腹腔内に LPS を注入したラットに対する LiESWT の効果を、第二章で膀胱内に LPS を注入したラットに対する LiESWT の効果を検討した。

第一章

LPS腹腔内注入により膀胱炎を誘発したラットに対する LiESWTの効果の検討

緒言

LPS を腹腔内に注入したラットやマウスが、頻尿となり膀胱の炎症物質が増加することが報告されており、間質性膀胱炎モデルとして使用されている(Song et al., 2017; Tambaro et al., 2014)。第一章ではラットの腹腔内に LPS を注入して膀胱炎を誘発したモデルに対して LiESWT を行い、その効果を検討した。

予備実験

最初に投与する LPS の量を決定するための予備実験を行った。ラットの腹腔内に 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg の 3 種類の量の LPS を投与して、1 週間後に膀胱内圧測定 (CMG: Cystometogram) を行った。その波形を図 1 に示す。

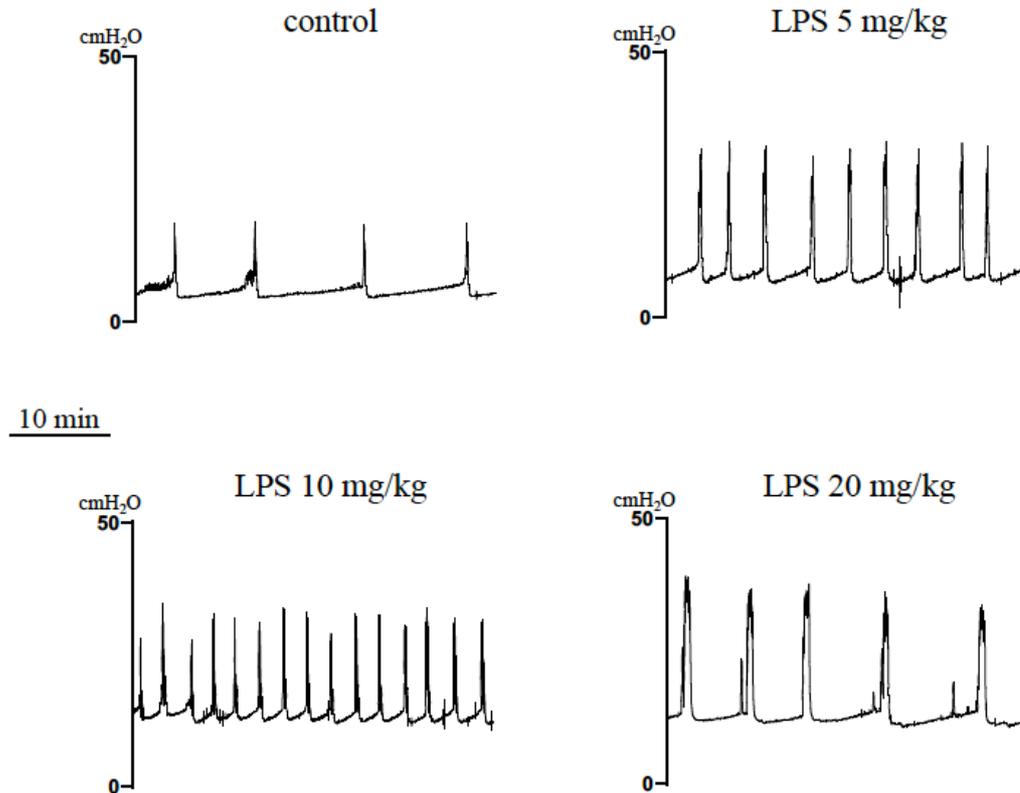


図 1. LPS 腹腔内投与後 1 週間後の CMG の波形

LPS を腹腔内に投与したラットは全て control と比較して頻尿となった。10 mg/kg を投与したラットが最も頻尿となった。

LPS を腹腔内に投与したラットは control と比較して頻尿となった。10 mg/kg を投与したラットは他のラットと比較して著しく頻尿となっていたが、その一方で 20mg/kg を投与したラットは頻尿の変化が乏しくなっていた。20mg/kg を注入したラットは腹腔内全体に炎症が波及して骨盤神経にも影響を与え、排尿に対して抑制的に働いたために頻尿変化が乏しくなった可能性が考えられた。あるいは LPS の腹腔内投与では心臓や脳や肝臓や大腸など様々な臓器に影響を及ぼすことが報告されており (Bargi et al., 2017; Beheshti et al., 2021; Khoshkhoy et

al., 2021; Li et al., 2023)、20mg/kg を投与したラットでは膀胱以外の臓器にも強く影響し、膀胱局所の変化が乏しくなった可能性も考えられた。本実験では LPS 10mg/kg を腹腔内に投与してモデルを作成することにした。

次に LPS を腹腔内に投与したラットに対する LiESWT の影響を調べる予備実験を行った。LPS10 mg/kg を腹腔内に投与したラットに対し、投与3日目に LiESWT を行い、7日目に CMG を行った。LiESWT は既報を参考にして出力 0.12 mJ/mm^2 、2 Hz の頻度で、1回の治療で合計 300 shot を膀胱に当てた(Lin et al., 2021; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2014)。結果を図2に示す。

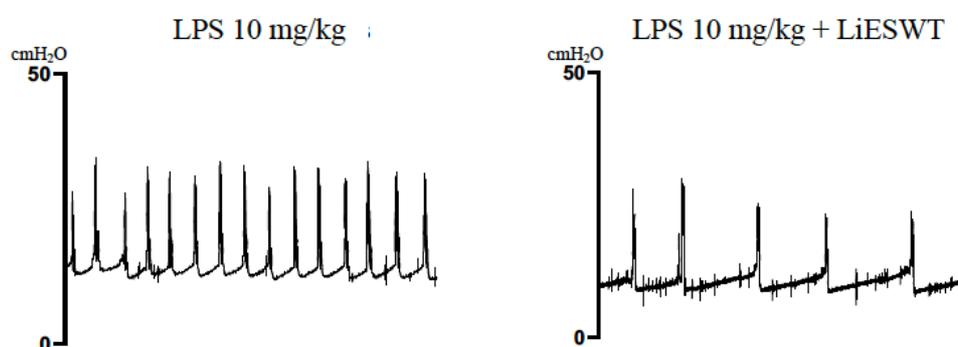


図2. LPS 10 mg/kg 投与後3日目に LiESWT を行ったラットの CMG の波形
LiESWT を行ったラットは未治療のラットと比較して、頻尿が改善していた。

LPS 10 mg/kg 投与後3日目に LiESWT を行ったラットでは、無治療のラットと比較して頻尿が緩和されることが確認された。

上記の結果より、本実験は LPS10 mg/kg を腹腔内に投与したラットに対する LiESWT の効果を検討することにした。

材料と方法

1. 対象

9週齢の雌性 Sprague-Dawley (SD) ラット (九道株式会社、日本) を使用した。全てのラットは購入後に 12 時間の人工明暗サイクルのもとで飼育され、餌と水は自由に摂取できた。

2. 研究倫理

本研究は、ARRIVE ガイドラインに準拠し、琉球大学動物実験委員会の承諾を得た上で行われた (承認番号 A2020019)。飼育及び実験に関しては、琉球大学動物実験規則に準拠した。

3. 実験プロトコール

本研究はラットを、生理食塩水を腹腔内に投与した sham 群、LPS を腹腔内に注入して膀胱炎を誘発した群 (LPS 群)、膀胱炎を誘発した後に LiESWT を行った群 (LiESWT 群) の 3 群に無作為に分類した。疼痛の評価として von Frey テストを、膀胱機能の評価として 24 時間排尿記録と連続膀胱内圧測定を行い、膀胱内圧測定後に膀胱を摘出して組織学的評価を行った。実験プロトコールの詳細を図 3 に示す。

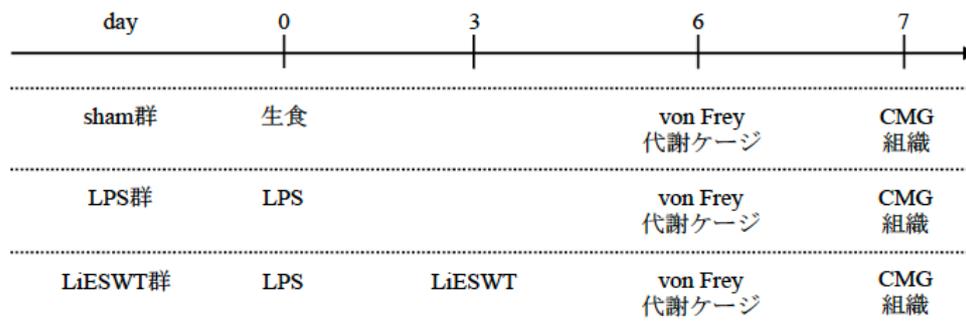


図 3. 実験プロトコール

生食: 生理食塩水を腹腔内に投与

LPS: LPS を腹腔内に投与

組織: 膀胱の組織学的評価

4. 膀胱炎の誘発

本実験では膀胱炎の誘発のために LPS を腹腔に投与した。ラットを isoflurane 吸

入麻酔で十分に鎮静し、LPS10 mg/kg を腹腔内に注入した。sham 群でも同様に鎮静し、同量の生理食塩水を注入した。注入後は再び元のケージに戻した。

5. LiESWT の方法

LiESWT は、臨床でヒトの勃起不全に対する治療に使用されている ED-1000 (Medispec, Yehud, Israel) を使用した。衝撃波を発生させるプローブは、ラットの膀胱に焦点が合うように特別に設計されたものを使用した。

ラットを isoflurane 吸入麻酔下で仰臥位をとり、下腹部の毛を剃った。ラットの膀胱が治療域に入るように下腹部に超音波用ゲルパッドを敷き、その上からプローブを当てて LiESWT を行った。予備実験と同様に、衝撃波の出力は $0.12\text{mJ}/\text{mm}^2$ とし、2Hz の頻度で、1 回の治療で合計 300 shot を膀胱に向かって当てた。(図 4 参照)

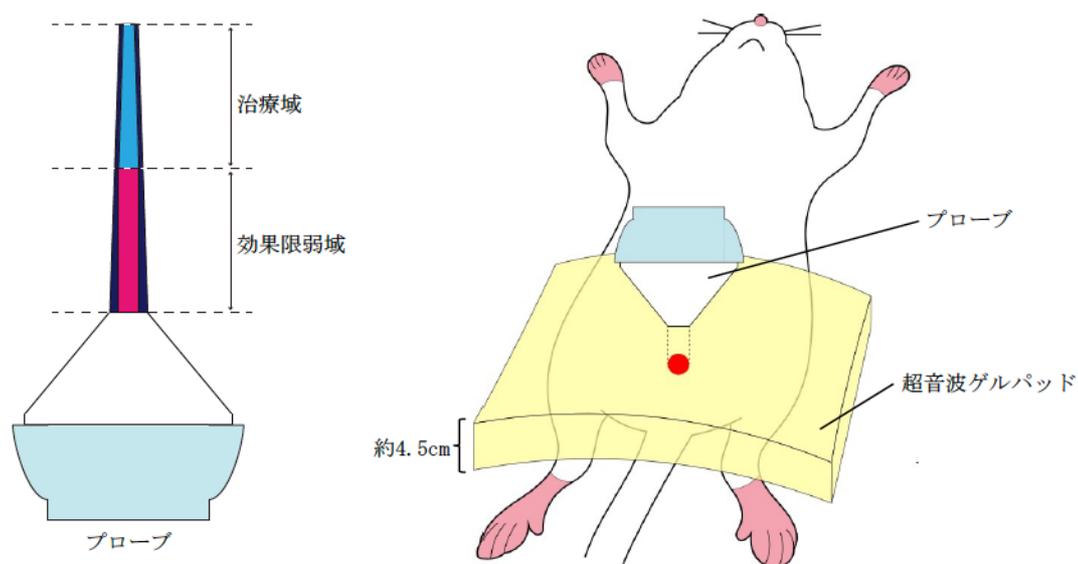


図 4. LiESWT の方法

ラットを isoflurane 吸入麻酔で十分に鎮静し、仰臥位にした。ラットの膀胱が治療域に入るように腹部に超音波ゲルパッドを被せ、その上にプローブを設置して衝撃波を当てた。

6. 疼痛閾値の測定

本実験では疼痛閾値の測定方法として von Frey テストを用いた。ラットを環境に慣れさせるために、テストで使用する床が金網でできた cage の中に移動させ

て1時間経過した後に、von Frey モノフィラメント (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) でラットを刺激してその反応を観察した。刺激部位は膀胱周囲の疼痛を評価するための下腹部と、比較対象として後足底も刺激した。刺激に対してラットが①飛び上がる、②刺激から急に逃げる、③刺激部位を舐める、のうち最低1つの行動が見られた時に痛み反応陽性と判断した。up-down 法を用いてラットを20回刺激し、陽性反応と陰性反応のパターンから $[\log_{10}(\text{force (g)} \times 10^4)]$ を計算し、その平均値を閾値として算出した(Bradman et al., 2015)。

7. 24時間排尿記録

覚醒状態での24時間の排尿回数と平均1回排尿量を測定するために、ラットを代謝ケージ (Metabolica™, Sugiyama-gen Co. Ltd., Tokyo, Japan) に入れて24時間飼育した。尿量はPowerLab (ADInstruments Pty. Ltd., New South Wales, Australia) を用いて連続的に測定した。平均1回排尿量は24時間の総排尿量(g)を排尿回数で徐して算出した。なお代謝ケージ内で飼育中、ラットは自由に水と餌を摂取できる状態だった。

8. CMG

測定前に薬剤投与と膀胱内圧測定のカテーテルを留置するために、isoflurane 吸入麻酔下でラットに処置を行った。頸部右側を切開して右頸静脈を露出させ、薬剤投与用のカテーテルとしてポリエチレン製カテーテル(BD Intramedic™ Polyethylene Tubing PE-10, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を同血管内に留置した。次に下腹部正中を縦に切開して膀胱と尿管を露出させ、ラット自身の尿が膀胱内に流入しないように両尿管を結紮した。膀胱頂部を一部切開して、膀胱内圧測定用カテーテルとしてカフ付きポリエチレン製カテーテル(BD Intramedic™ Polyethylene Tubing PE-50, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を留置した。腹部を縫合糸で閉じて処置を終了した。

処置終了後に isoflurane 吸入麻酔を止め、urethane 麻酔下で CMG を行った。urethane は合計 1 g/kg を腹腔内に 1/3、皮下に 2/3 投与し、1時間半経過後に測定を行った。膀胱内圧測定用カテーテルに三方活栓を介して生理食塩水注入用のシリンジと圧力測定器を接続し、膀胱内圧を記録した。測定中、膀胱内には生理食塩水 0.05ml/分の速度で注入し、データの記録には PowerLab を使用した。安定した膀胱収縮がみられるようになった後に、膀胱収縮間隔、収縮閾値、基線圧、膀胱収縮時の振幅、無抑制収縮の数を30分以上測定し、最後の収縮後にカテーテルを解放して残尿量を測定した。無抑制収縮は、蓄尿期に基線圧から 7 cmH₂O 以上の膀胱収縮と定義した。CMG 後に組織評価のために膀胱を摘出した。CMG の波形と評価項目の詳細を図5に示す。

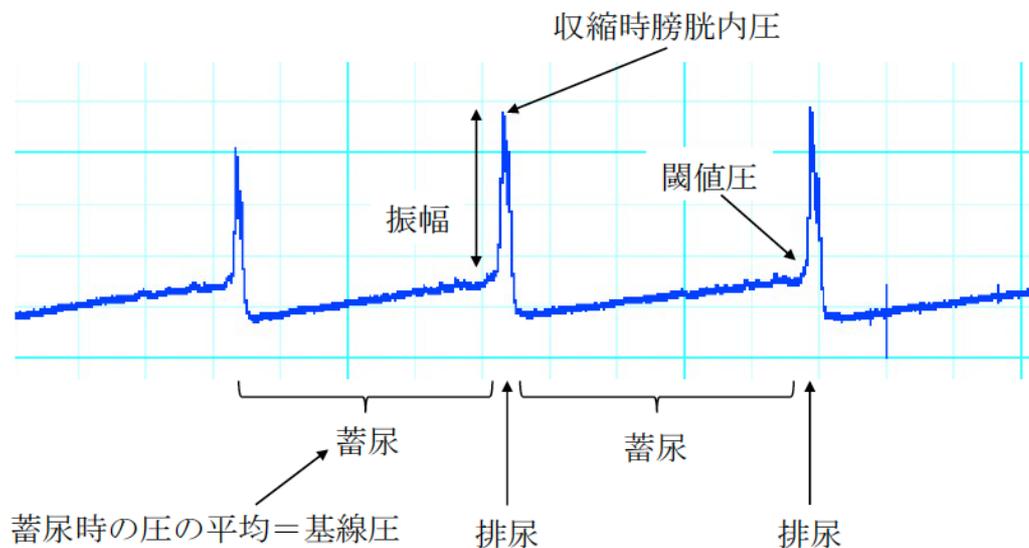


図 5. CMG の波形と評価項目

基線圧: 蓄尿時の膀胱内圧の平均。

振幅: 収縮時膀胱内圧と基線圧との差

閾値圧: 膀胱収縮直前の膀胱内圧

無抑制収縮: 蓄尿期の 7 cmH₂O 以上の圧上昇

9. 組織学的検討

摘出した各膀胱を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後にミクロトームで 4 μ m 厚の切片に切り出した。組織学的検討のために Hematoxylin & Eosin (HE) 染色を行った。HE 染色は染色キット (HAE-1-1FU, ScyTek Laboratories Inc., UT, USA)を用いて染色した。

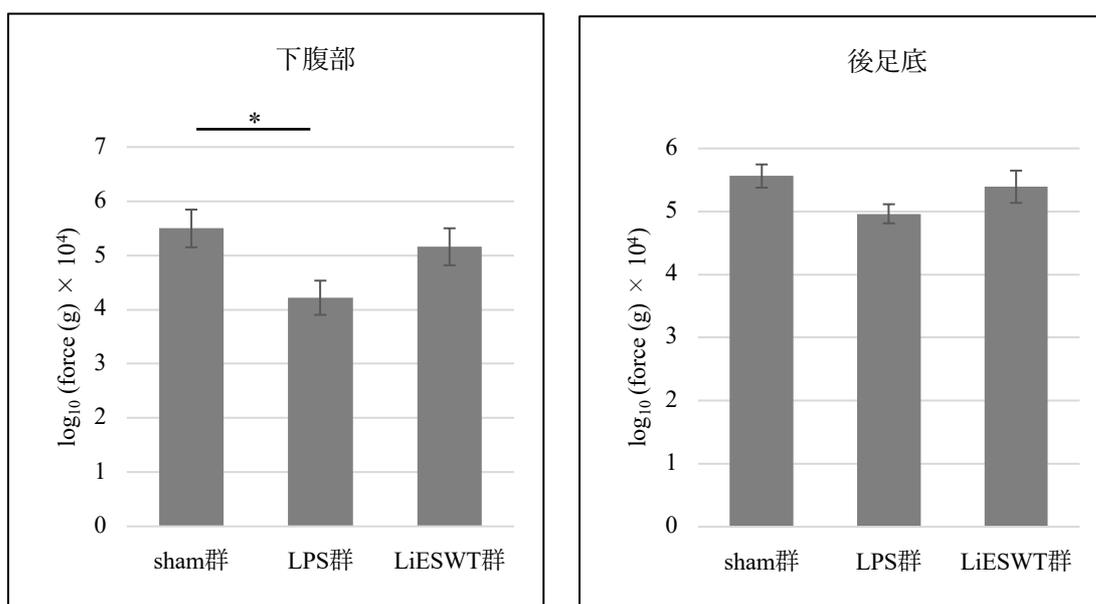
10. 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。3 群の比較は one-way analysis of variance (ANOVA)を、事後解析は Tukey-Kramer 検定を用いた。p-value < 0.05 を有意差ありとした。

結果

1. 疼痛に対する過敏性の評価

day6 に下腹部と後足底の疼痛刺激を与え、その閾値を比較した (sham 群 n=9、LPS 群 n=6、LiESWT 群 n=8)。後足底の疼痛刺激に対する閾値は 3 群間で有意な差を認めなかった。一方で下腹部においては LPS 群が sham 群と比較して有意な閾値の低下を認めた。しかし LiESWT 群は他の 2 群と比較して有意な差を認めなかった。結果を図 6 に示す。



*p<0.05

図 6. day6 における疼痛閾値

LPS 群は sham 群と比較し下腹部の疼痛閾値が低下したが、LiESWT を行っても違いを認めなかった。後足底では 3 群に違いを認めなかった。

2. 24時間排尿記録

day6 から day7 に代謝ケージの中で飼育し、24時間排尿記録を比較した (sham群 n=4、LPS群 n=4、LiESWT群 n=3)。24時間排尿回数と平均1回排尿量は共に3群間で有意差はなかった。結果を図7に示す。

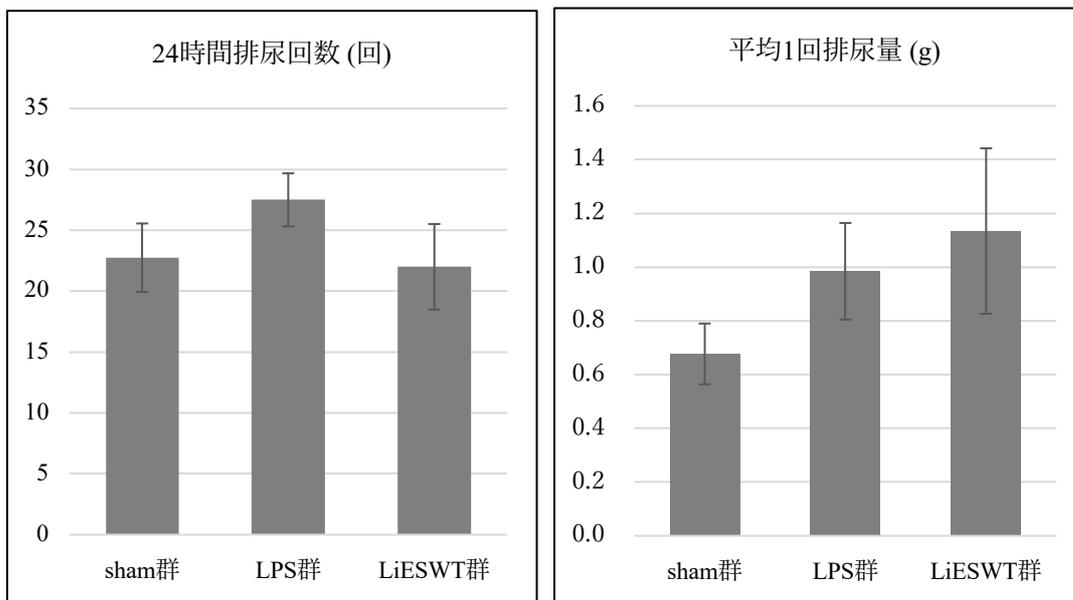


図7. 排尿回数と平均1回排尿量

24時間排尿回数と平均1回排尿量は共に3群で有意差を認めなかった。

3. 膀胱内圧測定 (CMG)

day7 に麻酔下で CMG を行い、比較を行った (sham 群 n=6、LPS 群 n=6、LiESWT 群 n=8)。各項目で 3 群に有意差を認めなかった。予備実験と同様に LPS 群で排尿間隔が短くなり、LiESWT 群で回復する傾向はあったが、有意差はなかった。結果を表 1 に示す。

表 1. CMG データの比較

	sham群	LPS群	LiESWT群
基線圧 (cmH ₂ O)	7.42 ± 0.42	6.45 ± 0.93	8.20 ± 0.76
振幅 (cmH ₂ O)	19.64 ± 2.20	18.72 ± 1.10	19.25 ± 1.42
閾値 (cmH ₂ O)	11.37 ± 0.70	9.82 ± 1.00	11.62 ± 0.72
排尿間隔 (秒)	495.00 ± 91.57	361.55 ± 61.93	520.00 ± 92.72
無抑制収縮 (回)	0.33 ± 0.21	0.33 ± 0.21	0.75 ± 0.49
残尿量 (ml)	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.17 ± 0.11

データは平均値 ± 標準誤差で示した。

4. 組織学的解析

CMG 後に膀胱を摘出し、HE 染色を行った (sham 群 n=6、LPS 群 n=6、LiESWT 群 n=8)。LPS 群は尿路上皮が肥厚していたが、その他 3 群に違いを認めなかった。組織写真を図 8 に示す。

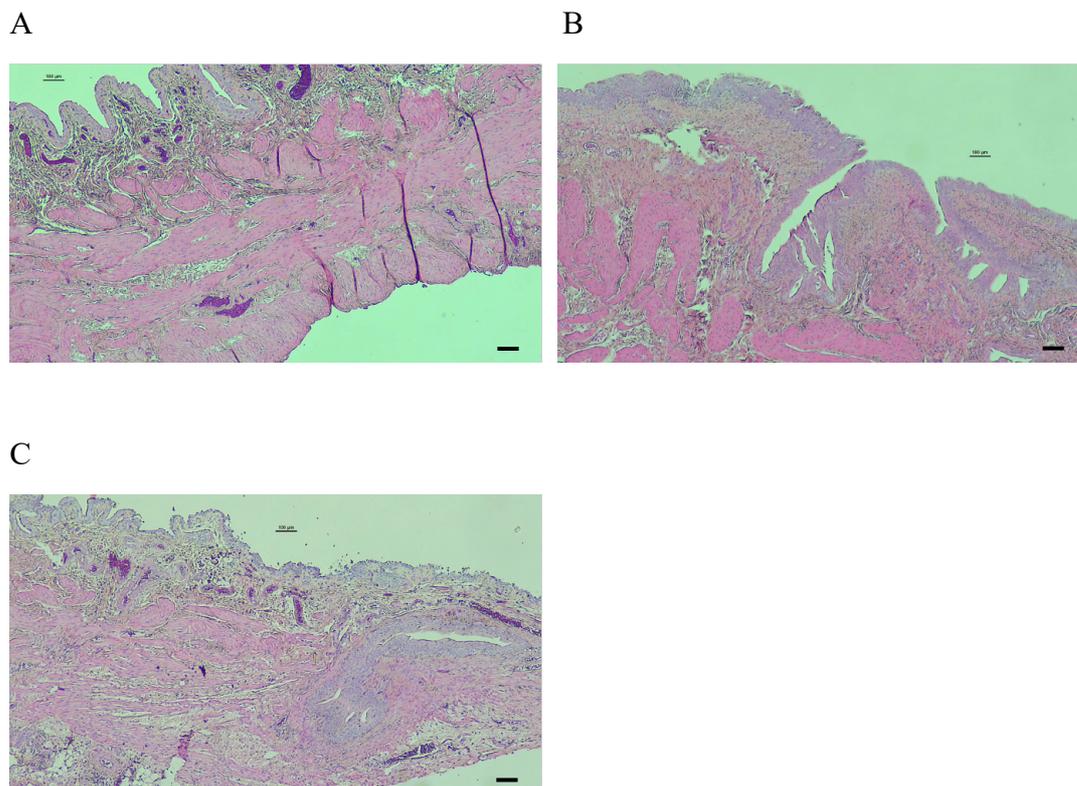


図 8. HE 染色

LPS 群で軽度の粘膜肥厚を認めた。しかしその他に特記すべき違いは認めなかった。

A. sham 群 B. LPS 群 C. LiESWT 群

全てのスケールバーは 100 μ m を表す

考察

本実験では LPS を腹腔内に投与して、膀胱炎モデルを作成した。このモデルは sham 群と比較して下腹部の疼痛が強く生じていたが、膀胱機能は 24 時間排尿記録と CMG とで変化を認めなかった。組織学的には LPS 群の粘膜に肥厚を認めたが、既報(Song et al., 2017)で報告されている膀胱の炎症性変化は認めなかった。

LPS 群で下腹部の疼痛が強く生じていたが、組織学的には膀胱の炎症性変化などを認めなかったことから、膀胱に起因して下腹部痛が生じたと結論づけるのは困難であった。むしろ腹腔内に LPS を投与したことにより、膀胱ではなく腹腔内に LPS の影響が生じたことで、その一症状として下腹部の疼痛が生じた可能性がある。それを確かめるためには下腹部以外の腹部の疼痛の検討や、腹膜や腸などの膀胱以外の組織学的な検討を行うべきだったかもしれない。LPS 群が sham 群と比較して膀胱機能の違いを認めなかったことも、本モデルが膀胱炎を起こしたとは言い難かった。

LiESWT 群は LPS 群と比較して下腹部の疼痛の改善を認めず、膀胱機能や組織学的にも変化を認めなかった。本実験で用いた LiESWT はプローブの形状を膀胱に焦点を合わせるように作られているため、膀胱のみに治療を行っても変化を生じなかったと予想される。

本研究は、IC に対する LiESWT の効果を検討することが主目的であるため、本実験で使われた LPS 誘発膀胱炎モデルはその効果を検討するには適当でないと判断した。LPS を膀胱内に注入した膀胱炎モデルも間質性膀胱炎に似た病態を呈することが報告されている(Ryu et al., 2019; Yoshizumi et al., 2021)。したがって次に LPS を膀胱内に注入した膀胱炎モデルを作成し、LiESWT の効果を再度検討することにした。実験内容を第二章にまとめた。

第二章

LPS膀胱内注入により膀胱炎を誘発したラットに対する LiESWTの効果の検討

緒言

LPS を膀胱内に注入したラットやマウスが、頻尿や膀胱周囲の疼痛過敏を来し、病理組織学的には膀胱への炎症細胞の浸潤や繊維化の増加を認め、IC と似た病態を呈することが報告されている (Ryu et al., 2019; Yoshizumi et al., 2021)。第二章では LPS を膀胱内に注入して膀胱炎を誘発したラットに対する LiESWT の効果を検討した。

予備実験

膀胱内に LPS を投与するスケジュールを決定するための予備実験を行った。LPS の投与量は 1 mg/body を 1 時間膀胱内に貯留することにした。

最初にラットの膀胱内に LPS を 1 回投与して 1 週間後に CMG を行った。しかし control と比較して波形に大きな変化がなく規則的な収縮を認め、投与回数が不十分と予想された。次に LPS を 2 日連続で膀胱内に投与して 1 週間後に CMG を行った。control と比較して頻尿で不規則な収縮を認めたため、膀胱機能に変化が生じていると予想された。波形を図 9 に示す。

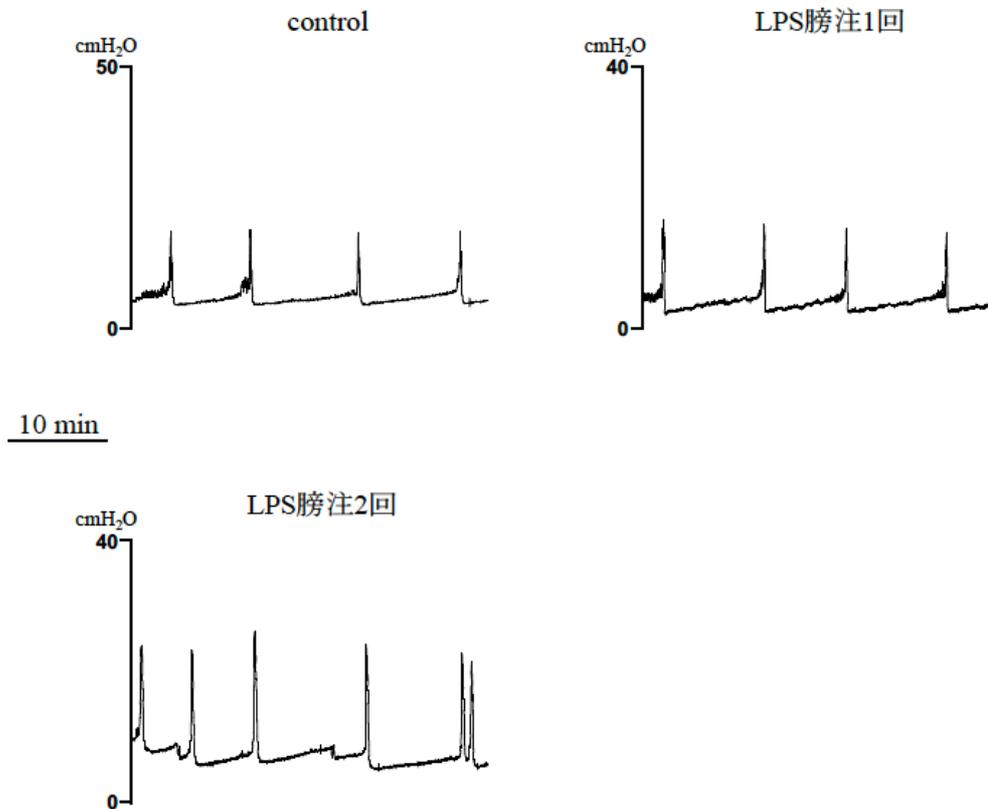


図 9. LPS 膀胱後の CMG の波形

LPS を 1 回のみ膀胱注したラットは規則的な膀胱収縮を認め、control と比較して明らかな違いはなかった。LPS を 2 回膀胱注したラットでは不規則な膀胱収縮を認めた。

上記の結果より LPS を 2 日連続で膀胱内に投与して、膀胱炎モデルを作成することにした。

次に膀胱炎モデルラットに対して LiESWT を行い、CMG の波形に変化がみられるかを確認した。LiESWT は第一章と同様に出力は $0.12\text{mJ}/\text{mm}^2$ 、 2Hz の頻度で、1 回の治療で合計 300 shot を膀胱に当てた。

最初に 1 回目の LPS 膀胱注を行ってから 3 日後に LiESWT を行い、7 日後に CMG を行った。しかし膀胱収縮は安定せず無治療のラットと比較して大きな違いはなく、1 回の治療では改善が乏しいと判断した。次に 1 回目の LPS 膀胱注を行ってから 3 日後と 4 日後に LiESWT を行って、7 日後に CMG を行った。LiESWT を 2 回行ったラットでは、control と同様に安定した収縮がみられるようになった。結果を図 10 に示す。

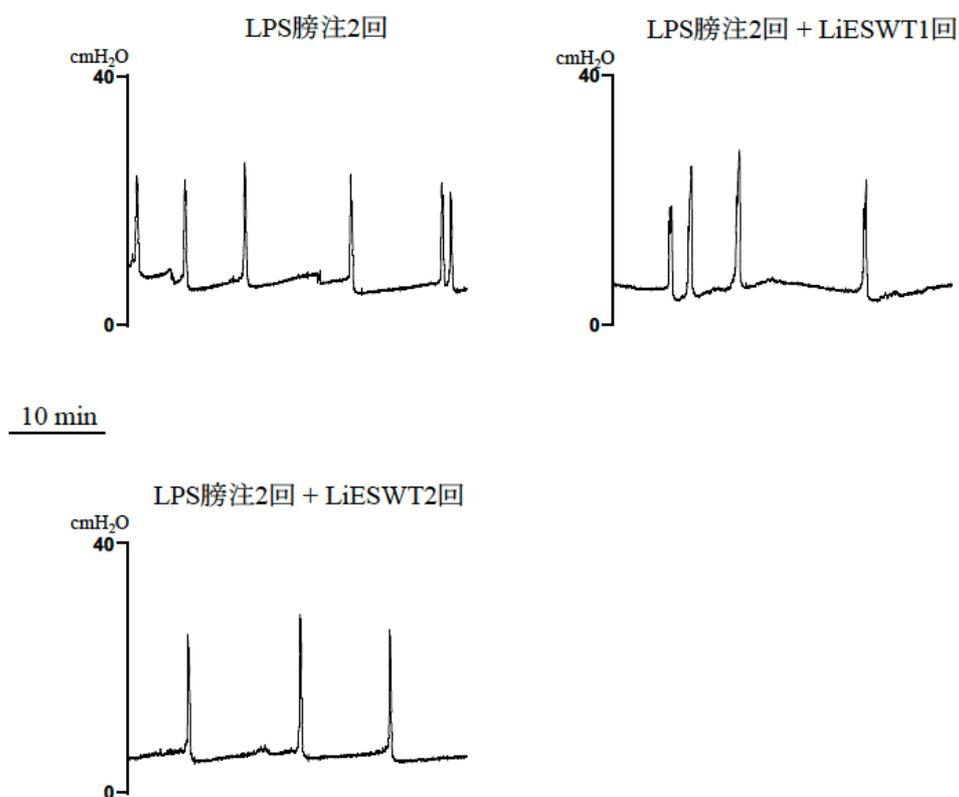


図 10. LPS 膀胱注後に LiESWT を行った後の CMG 波形

LiESWT を 1 回のみ行ったラットでは膀胱収縮が安定せず、無治療のラットと比較して明らかな改善を認めなかった。2 回 LiESWT を行ったラットでは、規則正しい収縮がみられるようになった。

上記の結果より、本実験では LPS 1 mg/body を 2 日連続で膀胱内に注入して膀胱炎モデルを作成し、LiESWT を 2 日間連続で行得ことで、LiESWT の効果を評価することにした。

材料と方法

1. 対象

9週齢の雌性SDラット（九道株式会社、日本）を使用した。全てのラットは購入後に12時間の人工明暗サイクルのもとで飼育され、餌と水は自由に摂取できた。

2. 研究倫理

本研究は、ARRIVEガイドラインに準拠し、琉球大学動物実験委員会の承諾を得た上で行われた（承認番号A2021068）。飼育及び実験に関しては、琉球大学動物実験規則に準拠した。

3. 実験プロトコール

本研究はラットを、control群、LPSを膀胱内に注入して膀胱炎を誘発した群（LPS群）、膀胱炎を誘発した後にLiESWTで治療を行った群（LiESWT群）の3群に無作為に分類した。第一章と同様に疼痛の評価としてvon Freyテストを、膀胱機能の評価として24時間排尿記録と連続膀胱内圧測定を行い、膀胱内圧測定後に膀胱を摘出して組織学的評価を行った。実験プロトコールの詳細を図11に示す。

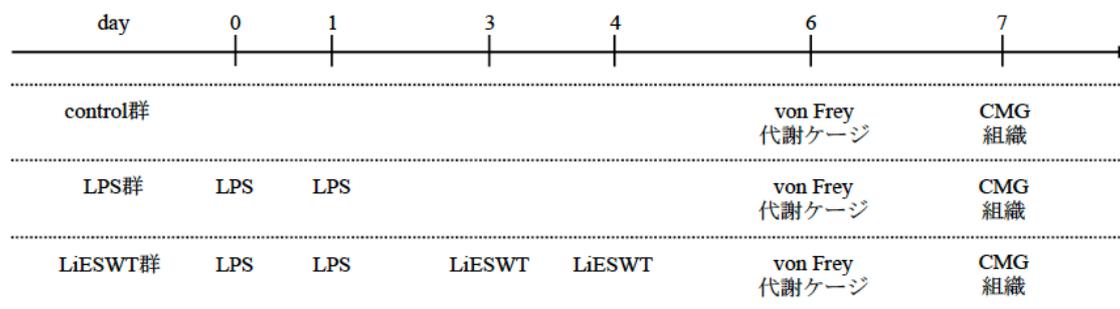


図11. 実験プロトコール

LPS: LPSを膀胱内に投与

組織: 膀胱の組織学的評価

4. 膀胱炎の誘発

本実験では膀胱炎の誘発のためにLPSを膀胱内に注入・貯留した。ラットの腹腔内にketamine hydrochloride (90mg/kg)とxylazine hydrochloride (10mg/kg)を

注入して十分に鎮静後、尿道から膀胱内にポリエチレン性カテーテル(BD Intramedic™ Polyethylene Tubing PE-50, Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)を挿入して、LPS(1mg/body, Escherichia coli O55:B5, Sigma-Aldrich Co., LLC, MO, USA)を膀胱内に注入した。LPS を膀胱内に 1 時間貯留させた後に、カテーテルを解放して LPS を膀胱外に出した。この操作を 2 日連続で行い、膀胱炎を誘発した。control 群に対しては処置を行わなかった。

5. LiESWT の方法

第一章と同様に ED-1000 (Medispec, Yehud, Israel) 用い、プローブもラットの膀胱に焦点が合うように特別に設計されたものを使用した。

衝撃波の出力は $0.12\text{mJ}/\text{mm}^2$ とし、2Hz の頻度で、1 回の治療で合計 300 shot を膀胱に向かって当てた。(図 2 参照)

6. 疼痛閾値の測定

疼痛閾値の測定は第一章と同様の方法で von Frey テストを使用した。

7. 24 時間排尿記録

覚醒状態での 24 時間の排尿回数と平均 1 回排尿量を計算するために、von Frey テスト後にラットを代謝ケージ (Metabolica™, Sugiyama-gen Co. Ltd., Tokyo, Japan) に入れて 24 時間飼育した。第一章と同様に行った。

8. CMG

第一章と同様に行った。

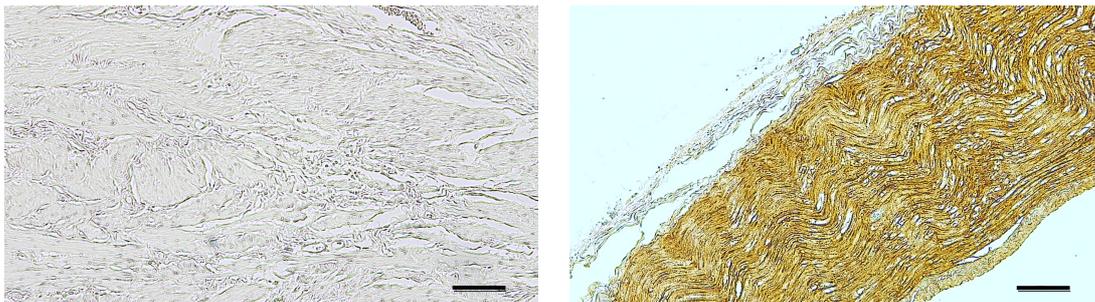
9. 組織学的検討

摘出した各膀胱を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋後にミクロトームで $4\mu\text{m}$ 厚の切片に切り出した。組織学的検討のために HE 染色、Masson's trichrome 染色を行った。

HE 染色 (HAE-1-1FU, ScyTek Laboratories Inc., UT, USA) と Masson's trichrome 染色 (TRM-1-1FU, ScyTek Laboratories Inc. Lcc, UT, USA) はそれぞれの染色キットを用いて染色した。Masson's trichrome 染色では膀胱筋層の線維化範囲を評価するために、無作為に選択した 3 つの高倍率 (対物 20 倍) の視野を抽出し、FIJI ImageJ ソフトウェア (ver. ImageJ 1.53q, Java 1.8.0_322 [64 bit], <https://imagej.net/Fiji/Download>) を用いて各視野の線維化面積の割合 (%) を算出した。

10. 免疫組織学的検討

本実験では膀胱の末梢神経の評価のために S-100 染色を行った。脱パラフィンした切片を 3% H_2O_2 で 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し、次に 2.5% 正常ウマ血清に室温で 2 時間浸透させてブロッキングを行った。その後切片を S-100 ウサギ一次抗体 (1:2000, GTX48819, GeneTex, Irvine, CA, USA) に 4°C で一晩浸透させた。翌日、切片を二次抗体 (ウマ抗ウサギ抗体) に 30 分間浸透し、最後に反応部位を diaminobenzidine (DAB) で染色した。陽性 control として、上記と同じ工程でラットの坐骨神経が染色されることを確認した。陰性 control として、一次抗体を用いないでラットの膀胱を染色し、膀胱が全く染色されないことを確認した (図 12 参照)。膀胱の末梢神経を定量化するために、対物 10 倍で無作為に選んだ 3 視野を抽出し、FIJI ImageJ ソフトウェアを用いて各視野の染色陽性範囲を計算した。



A) 陰性 control (膀胱)

B) 陽性 control (坐骨神経)

図 12. S-100 染色の陰性 control と陽性 control

A) 一次抗体を使用せずに染色し、膀胱が全く染色されないことを確認した。

B) 坐骨神経が同工程で染色されることを確認した。

全てのスケールバーは 100 μm を表す

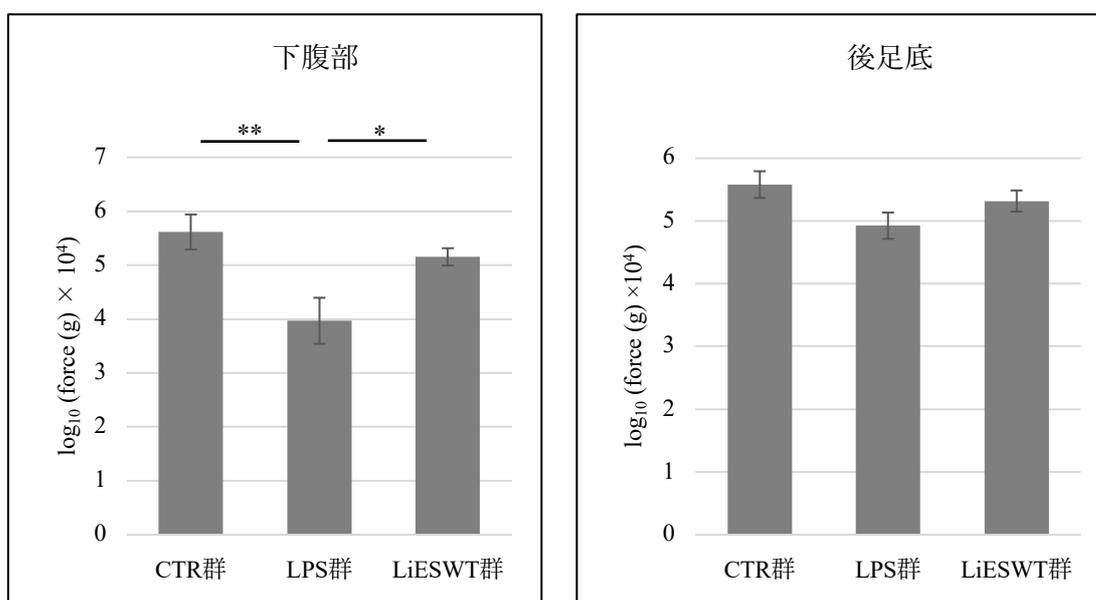
11. 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。3 群の比較は one-way ANOVA を、事後解析は Tukey-Kramer 検定を用いた。p-value < 0.05 を有意差ありとした。

結果

1. 疼痛閾値の比較

day6 に下腹部と後足底に対して von Frey テストを行い、疼痛閾値を測定した (control 群 n=8、LPS 群 n=8、LiESWT 群 n=8)。LPS 群では、下腹部の疼痛閾値が control 群と比較して有意に低かった。一方、LiESWT 群の疼痛閾値は LPS 群よりも有意に高く、control 群と同等まで回復していた。後足底の疼痛閾値は 3 群間で差を認めなかった。結果を図 13 に示す。



*p < 0.05, **p < 0.01

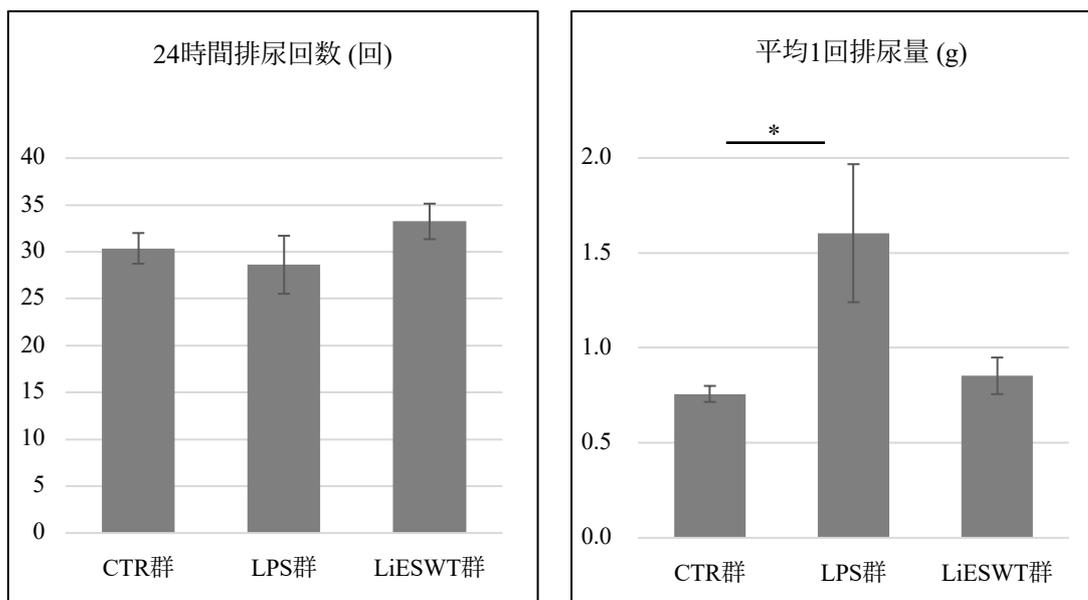
図 13. 疼痛閾値

下腹部では LPS 群の閾値が control 群と比較して有意に低かった。その一方で LiESWT 群では閾値が LPS 群と比較して有意に高く、control 群と同等まで回復していた。後足底では 3 群で差を認めなかった。

CTR 群: control 群

2. 24 時間排尿記録

day6 から day7 に代謝ケージの中で飼育し、24 時間排尿記録を比較した (control 群 n=8、LPS 群 n=8、LiESWT 群 n=8)。24 時間排尿回数は 3 群間で有意差はなかった。平均 1 回排尿量は、LPS 群が control 群と比較して有意に多かった。LiESWT 群は LPS 群と比較して有意差はなかった。結果を図 14 に示す。



*p < 0.05

図 14. 排尿回数と平均 1 回排尿量

平均 1 回排尿量は LPS 群が control 群と比較して有意に増加した。LiESWT では LPS 群と比較すると有意差はなかった。24 時間排尿回数は 3 群間で有意差を認めなかった。

CTR 群: control 群

3. CMG

day7 に麻酔下で CMG を行い、比較を行った (control 群 n=8、LPS 群 n=8、LiESWT 群 n=8)。LPS 群では膀胱収縮時の振幅が control 群と比較して有意に低かった。さらに LPS 群の排尿間隔が control 群と比較して延長する傾向があったが (668.57±97.48 秒 vs. 435.53±44.05 秒; p=0.0851)、統計学的に有意ではなかった。LiESWT 群では、収縮時の振幅は LPS 群より有意に高く、control 群と同等に回復した。残尿量は 3 群間で有意差はなかったが、LPS 群で 1 匹が尿閉となった。表 2 に結果を示す。

代表的な波形を図 15 に示す。control 群では比較的安定した膀胱収縮を認めたが (A)、LPS 群では蓄尿期の無抑制収縮 (B) や排尿間隔の延長を伴う振幅の低下 (C) した波形を認めた。LiESWT 群では LPS 群で認めた変化が消失し、control 群と同様の安定した収縮を認めた (D)。

表 2. CMG データの比較

	control群	LPS群	LiESWT群
基線圧 (cmH ₂ O)	5.27 ± 0.54	7.83 ± 1.11	5.17 ± 0.57
振幅 (cmH ₂ O)	19.51 ± 0.82	13.95 ± 2.09*	19.23 ± 1.21†
閾値 (cmH ₂ O)	8.54 ± 0.58	10.84 ± 1.60	8.76 ± 1.11
排尿間隔 (秒)	435.53 ± 44.05	668.57 ± 97.48	475.17 ± 71.41
無抑制収縮 (回)	0.00 ± 0.00	1.29 ± 0.75	1.13 ± 0.79
残尿量 (ml)	0.11 ± 0.04	0.68 ± 0.52	0.12 ± 0.06

データは平均値 ± 標準誤差で示した。

*p < 0.05 vs. control 群, †p < 0.05 vs. LPS 群

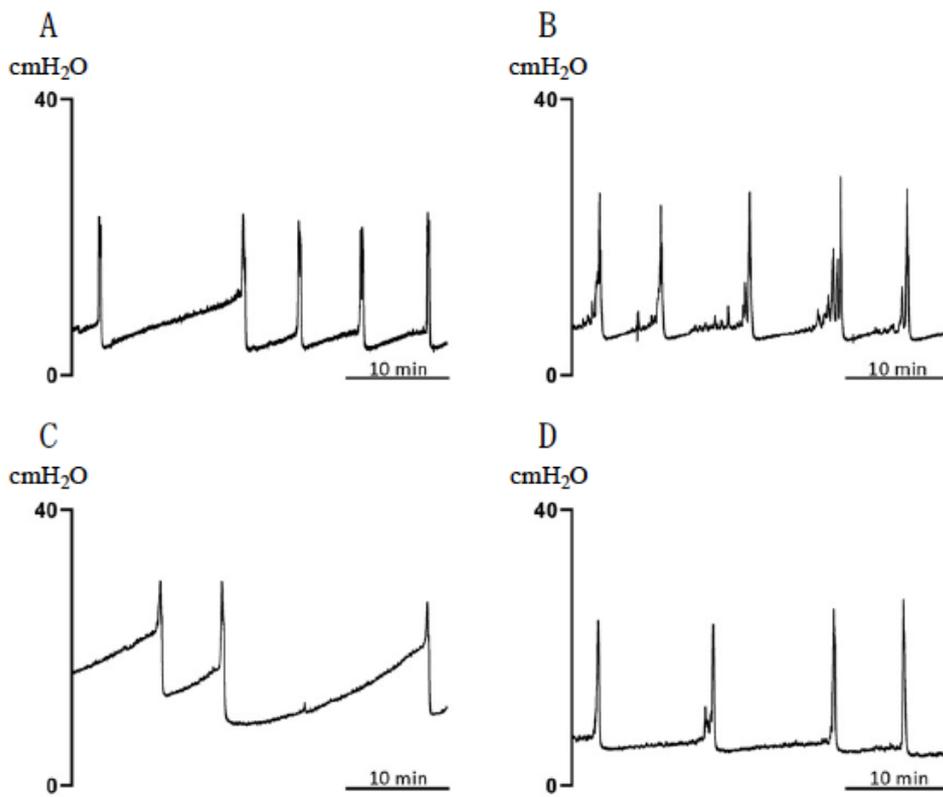


図 15. 代表的な波形

A: control 群 B,C: LPS 群 D: LiESWT 群

LPS 群では無抑制収縮や排尿間隔の延長を伴う振幅の低下を認めた。LiESWT 群では LPS 群で認めた変化が改善し、control 群と同様の安定した収縮を認めた。

4. 組織学的解析

CMG 後に膀胱を摘出し、染色を行った (control 群 n=8、LPS 群 n=8、LiESWT 群 n=8)。HE 染色では、LPS 群は粘膜下組織の炎症細胞の増加を認めた。LiESWT 群では炎症性変化は改善した。図 16 に結果を示す。

Masson's trichrome 染色では、LPS 群は control 群と比較して筋層の線維化範囲が有意に増加していた。LiESWT 群は LPS 群と比較して筋層の線維化範囲が有意に低下していた。図 17 に結果を示す。

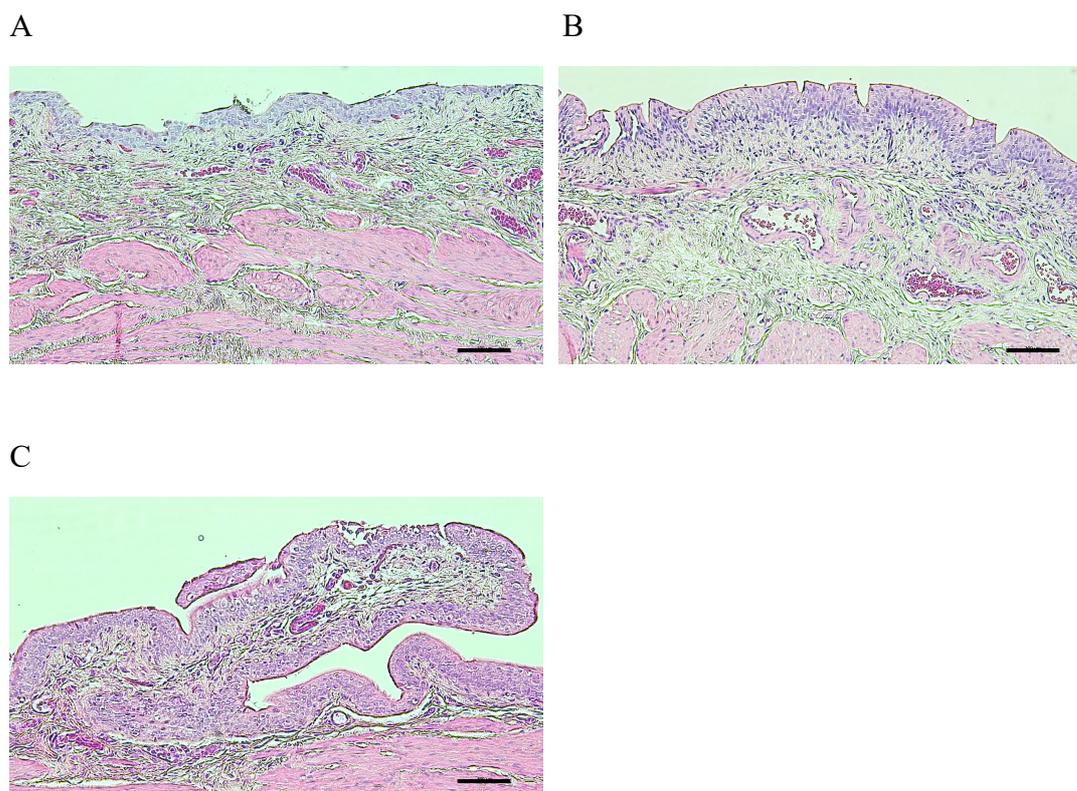
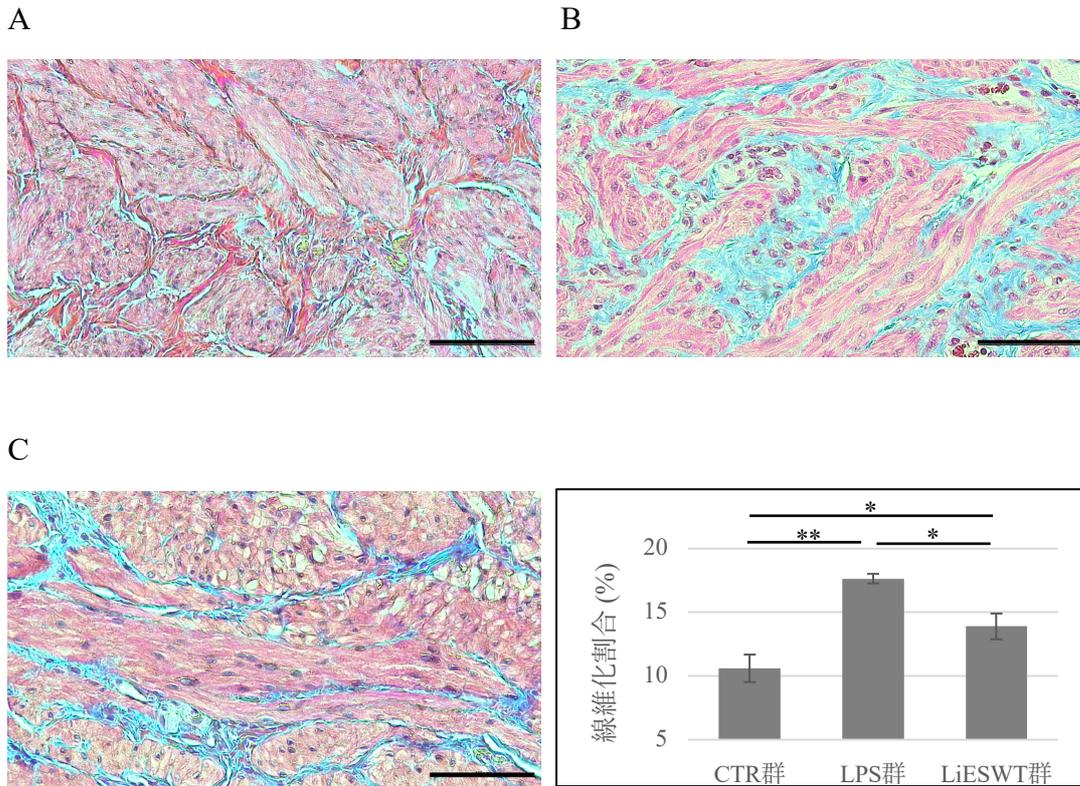


図 16. HE 染色

LPS 群は control 群と比較して粘膜下組織の炎症細胞の増加を認めた。LiESWT 群では LPS 群と比較して炎症細胞浸潤が低下していた。

A. control 群 B. LPS 群 C. LiESWT 群

全てのスケールバーは 100μm を表す



*p<0.05, **p<0.01

図 17. Masson's trichrome 染色

LPS 群は control 群と比較して筋層の線維化範囲が有意に増加した。LiESWT 群では LPS 群と比較して線維化範囲が有意に低下していた。

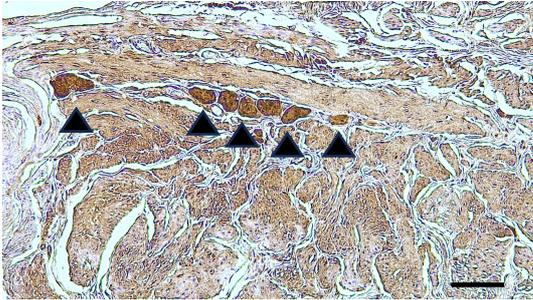
A. control 群 B. LPS 群 C. LiESWT 群

全てのスケールバーは 100 μ m を表す

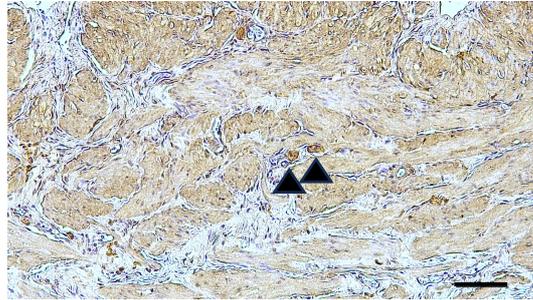
5. 免疫組織学的解析

膀胱の神経を評価するために、CMG 後の膀胱に S-100 染色を行った。LPS 群は control 群と比較して筋層の染色陽性範囲が低下しており、統計学的にも有意な低下を認めた。LiESWT 群では神経の回復を認め、統計学的にも LPS 群と比較して染色範囲の有意な増加を認めた。図 18 に結果を示す。

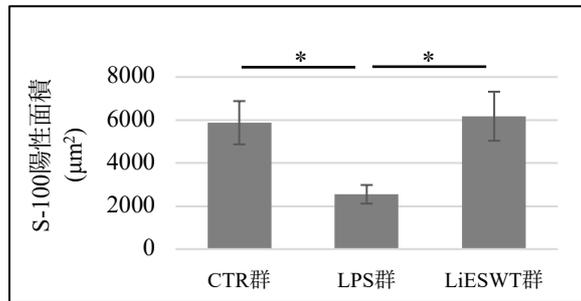
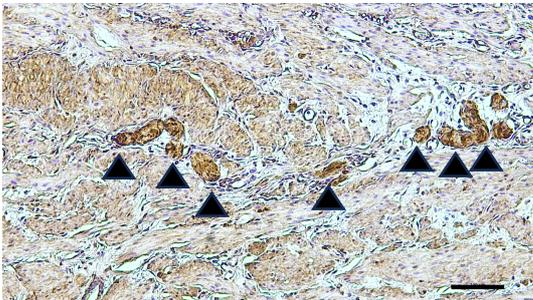
A



B



C



*p<0.05

図 18. S-100 染色

LPS 群は control 群と比較して S-100 染色陽性面積が有意に低下した。LiESWT 群では LPS 群と比較して S-100 染色陽性面積が有意に増加していた。

A. control 群 B. LPS 群 C. LiESWT 群

▲: S-100 染色陽性

全てのスケールバーは 100μm を表す

考察

本実験では最初に LPS を膀胱内に 2 日連続で注入して IC モデルを作成した。このモデルは既報の LPS 誘発膀胱炎モデルと同様に膀胱周囲の疼痛閾値の低下があり、間質性膀胱炎患者に特徴的な下腹部や骨盤の疼痛と似た症状を認めた (Ryu et al., 2019; Yoshizumi et al., 2021)。組織学的には膀胱壁への炎症細胞浸潤や線維化の増加を認め、炎症が原因で疼痛の悪化が生じたと考えられた。その一方で 24 時間排尿記録と CMG では平均 1 回排尿量の増加と排尿間隔の延長を認めた。さらに膀胱の収縮力も低下し 1/8 匹は尿閉となっており、膀胱機能としては低活動膀胱様の状態であった。既報の同モデルでは排尿間隔が短縮し、1 回排尿量が低下しており、本実験のモデルとは異なる結果だった。本モデルは膀胱の神経に原因があると予想し、検討を行った。

免疫組織学的に神経のマーカーとして使用される S-100 染色で膀胱を染色すると、膀胱筋層で LPS 群の S-100 染色陽性範囲が control 群と比較して有意に小さくなっていた。この結果は A δ 線維のような正常な膀胱の感覚・出力を担う神経が強く傷害されたことを示唆しており、本モデルは神経が強く傷害されたことで膀胱収縮力の低下や排尿間隔の延長を来したと予想された。

IC 患者の特徴的な症状は膀胱周囲の疼痛と頻尿であるが、本実験のモデルは膀胱周囲の疼痛は強い一方で膀胱機能としては低活動膀胱様であり、IC の症状と一部合致しない点がある。しかし膀胱周囲の疼痛と膀胱機能障害を併せ持っており、組織学的にも膀胱壁への炎症細胞浸潤の増加や線維化を伴っており、ヒトの IC と似た組織学的な特徴 (Kim et al., 2017; Logadottir et al., 2014) を認めたことから、LiESWT の効果を検討するには適当なモデルであると判断した。

本実験では予備実験を参考にして、LiESWT 群に対して day3 と day4 に LiESWT を行い、day6 の von Frey テストでは膀胱周囲の疼痛閾値が LPS 群と比べて有意に改善していた。以前の研究では、カプサイシン誘発前立腺炎モデルや坐骨神経損傷モデルに対して LiESWT を行うことで、炎症物質を低下させて疼痛を改善することが報告されている (Wang et al., 2019; Yang et al., 2019)。本実験でも LiESWT 群が LPS 群と比較して、HE 染色で膀胱への炎症細胞浸潤が改善し、Masson's trichrome 染色では膀胱壁の線維化が改善していたことから、LiESWT により炎症を低下させて疼痛が改善されたと予想された。

LPS 群では膀胱収縮力の低下や平均 1 回排尿量の増加を認め低活動膀胱様の状態を呈したが、LiESWT 群では LPS 群と比較して膀胱収縮力が上昇し 1 回排尿量も低下し、いずれも control 群と同等に回復した。以前の研究で低活動膀胱モデルに対して LiESWT を行うことで、排尿筋の回復や血流の増加を認め、膀胱収縮力が増強したことが報告されている (Chuang et al., 2018; Lee et al., 2021)。さ

らに本実験では LiESWT 群において膀胱壁の S-100 染色陽性範囲が有意に上昇しており、LiESWT が正常な排尿に関係する A δ 線維を回復させることにより、膀胱収縮が改善したと予想された。過去には糖尿病性膀胱機能不全モデルラットや糖尿病性勃起不全モデルラットに対して LiESWT を行うことで、尿道平滑筋や陰茎の神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS: neuronal nitric oxide synthase) を増加させることが報告されている (Lee et al., 2021; Qiu et al., 2013)。他にも海綿体神経を損傷した勃起不全モデルラットに対して LiESWT を行うことで、脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) を増加させることが報告されている (Wang et al., 2017)。神経再生において nNOS と BDNF の関係が推定されることを考慮すると (Cui et al., 2011; McGregor and English, 2018; Sharma et al., 1998)、本実験における膀胱の S-100 陽性領域の増加は、nNOS と BDNF 合成の影響を受けている可能性があると考えられた。

本研究の限界を以下に示す。

1. 本研究では day3 と day4 にラットに対して LiESWT を行っているが、この時点での疼痛、排尿および組織学的な評価を行っておらず、LiESWT を行った時点では膀胱炎が確立しているかは不明である。したがって、本研究は LiESWT の治療効果というより膀胱炎の進行を予防する効果を示している可能性がある。
2. 本研究では雌性ラットのみを使用しており、雄性ラットに対する LiESWT の効果は検討していない。しかし臨床において IC は男性より女性に多いため、IC に対する LiESWT の効果を調べる研究としては意義があると考えられる。
3. 本研究で使用したモデルは、IC に特徴的な頻尿ではなく、むしろ膀胱収縮力の低下や排尿間隔の延長がみられており、一部間質性膀胱炎と違う症状である。
4. 本研究では LiESWT の出力や shot 数を変えた実験を行っていないため、最適な出力と shot 数ではなかった可能性がある。
5. 本研究では LPS で膀胱炎を誘発していないラットへの LiESWT の影響を検討していない。今後は LiESWT の有害事象を評価するために、正常なラットに使用してその影響を検討する必要がある。

これらの限界はあるが、本研究結果が今後の IC に対する LiESWT の効果を研究する上で意義があると考えられる。

結論

① 本研究から得られた新知見

- ・ LiESWT は間質性膀胱炎モデルの膀胱の炎症と線維化を改善した。
- ・ LiESWT は間質性膀胱炎モデルの膀胱の神経を回復させた。
- ・ LPS 誘発間質性膀胱炎モデルラットの膀胱周囲の疼痛と排尿機能を改善した。

② 新知見の意義

- ・ LiESWT は間質性膀胱炎に対する治療方法の一つとなり得る。
- ・ 既に実臨床で使用されていて副作用もほとんどない機器を用いて実験を行っているため、今後間質性膀胱炎患者に対しても使用しやすい。

③ 今後の展望・課題

本研究では LiESWT 後、比較的早い時期の効果を確認することができた。しかし間質性膀胱炎は慢性疾患であることから、LiESWT の長期的な効果を検討する必要がある。

LiESWT の出力や shot 数を変更して実験を行い、より効果がある方法を検討する。

謝辞

本研究に際して、多くのご支援とご指導を頂きました琉球大学医学部システム生理学講座 宮里実教授、琉球大学医学部腫瘍病理学講座 和田直樹教授、北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教室 篠原信雄教授に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、日々の御指導を多岐にわたりいただきました琉球大学医学部システム生理学講座 上條中庸助教授に深く感謝申し上げます。

最後に本研究にあたり御協力頂きました研究者の皆様、研究室スタッフの皆様方に深く感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Akiyama, Y., Luo, Y., Hanno, P.M., Maeda, D., and Homma, Y. (2020). Interstitial cystitis/bladder pain syndrome: The evolving landscape, animal models and future perspectives. *Int. J. Urol.* 27, 491–503.

Bargi, R., Asgharzadeh, F., Beheshti, F., Hosseini, M., Sadeghnia, H.R., and Khazaei, M. (2017). The effects of thymoquinone on hippocampal cytokine level, brain oxidative stress status and memory deficits induced by lipopolysaccharide in rats. *Cytokine* 96, 173–184.

Beheshti, F., Hosseini, M., Taheri Sarvtin, M., Kamali, A., and Anaeigoudari, A. (2021). Protective effect of aminoguanidine against lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity and liver dysfunction in rat. *Drug Chem. Toxicol.* 44, 215–221.

Berry, S.H., Elliott, M.N., Suttorp, M., Bogart, L.M., Stoto, M.A., Eggers, P., Nyberg, L., and Clemens, J.Q. (2011). Prevalence of symptoms of bladder pain syndrome/interstitial cystitis among adult females in the United States. *J. Urol.* 186, 540–544.

Bradman, M.J.G., Ferrini, F., Salio, C., and Merighi, A. (2015). Practical mechanical threshold estimation in rodents using von Frey hairs/Semmes-Weinstein monofilaments: Towards a rational method. *J. Neurosci. Methods* 255, 92–103.

Chaussy, C., Schmiedt, E., Jocham, D., Brendel, W., Forssmann, B., and Walther, V. (1982). First clinical experience with extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves. *J. Urol.* 127, 417–420.

Chen, L., Ye, L., Liu, H., Yang, P., and Yang, B. (2020). Extracorporeal Shock Wave Therapy for the Treatment of Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res. Int.* 2020, 1907821.

Chen, Y.T., Yang, C.C., Sung, P.H., Lin, K.C., Chiang, J.Y., Huang, C.R., Huang, K.H., Chuang, F.C., Chu, Y.C., Huang, E.Y., et al. (2020). Long-term effect of extracorporeal shock wave therapy on attenuating radiation-induced chronic cystitis in rat. *Am. J. Transl. Res.* 12, 999–1015.

Chuang, Y.C., Tyagi, P., Wang, H.J., Huang, C.C., Lin, C.C., and Chancellor, M.B. (2018). Urodynamic and molecular characteristics of detrusor underactivity in a rat cryoinjury model and effects of low energy shock wave therapy. *Neurourol. Urodyn.* 37, 708–715.

Ciampa, A.R., de Prati, A.C., Amelio, E., Cavalieri, E., Persichini, T., Colasanti, M., Musci, G., Marlinghaus, E., Suzuki, H., and Mariotto, S. (2005). Nitric oxide mediates anti-inflammatory action of extracorporeal shock waves. *FEBS Lett.* 579, 6839–6845.

Cui, Z., Lv, Q., Yan, M., Cheng, C., Guo, Z., Yang, J., Chen, M., Xia, Y., Zhang, L., and Shen, A. (2011). Elevated expression of CAPON and neuronal nitric oxide synthase in the sciatic nerve of rats following constriction injury. *Vet. J.* 187, 374–380.

Gerdesmeyer, L., Wagenpfeil, S., Haake, M., Maier, M., Loew, M., Wörtler, K., Lampe, R., Seil, R., Handle, G., Gassel, S., et al. (2003). Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2573–2580.

Homma, Y., Akiyama, Y., Tomoe, H., Furuta, A., Ueda, T., Maeda, D., Lin, A.T., Kuo, H.C., Lee, M.H., Oh, S.J., et al. (2020). Clinical guidelines for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int. J. Urol.* 27, 578–589.

Kalyvianakis, D., Mykoniatis, I., Pyrgidis, N., Kapoteli, P., Zilotis, F., Fournaraki, A., and Hatzichristou, D. (2022). The Effect of Low-Intensity Shock Wave Therapy on Moderate Erectile Dysfunction: A Double-Blind, Randomized, Sham-Controlled Clinical Trial. *J. Urol.* 208, 388–395.

Kamei, J., Aizawa, N., Nakagawa, T., Kaneko, S., Kume, H., Homma, Y., and Igawa, Y. (2018). Attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory bladder hypersensitivity in mice deficient of transient receptor potential ankilin1. *Sci. Rep.* 8, 15622.

Khoshkhouy, F., Farshbaf, A., Mahmoudabady, M., and Gholamnezhad, Z. (2021). Effects of moderate exercise on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in rat's cardiac tissue. *Cytokine* 138, 155409.

Kikuchi, Y., Ito, K., Ito, Y., Shiroto, T., Tsuburaya, R., Aizawa, K., Hao, K., Fukumoto, Y., Takahashi, J., Takeda, M., et al. (2010). Double-blind and placebo-controlled study of

the effectiveness and safety of extracorporeal cardiac shock wave therapy for severe angina pectoris. *Circ. J.* 74, 589–591.

Kim, A., Han, J.Y., Ryu, C.M., Yu, H.Y., Lee, S., Kim, Y., Jeong, S.U., Cho, Y.M., Shin, D.M., and Choo, M.S. (2017). Histopathological characteristics of interstitial cystitis/bladder pain syndrome without Hunner lesion. *Histopathology* 71, 415–424.

Kitrey, N.D., Gruenwald, I., Appel, B., Shechter, A., Massarwa, O., and Vardi, Y. (2016). Penile Low Intensity Shock Wave Treatment is Able to Shift PDE5i Nonresponders to Responders: A Double-Blind, Sham Controlled Study. *J. Urol.* 195, 1550–1555.

Kuo, Y.R., Wu, W.S., Hsieh, Y.L., Wang, F.S., Wang, C.T., Chiang, Y.C., and Wang, C.J. (2007). Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *J. Surg. Res.* 143, 385–392.

Lee, Y.C., Hsieh, T.J., Tang, F.H., Jhan, J.H., Lin, K.L., Juan, Y.S., Wang, H.S., and Long, C.Y. (2021). Therapeutic effect of Low intensity Extracorporeal Shock Wave Therapy (Li-ESWT) on diabetic bladder dysfunction in a rat model. *Int. J. Med. Sci.* 18, 1423–1431.

Li, H., and Liu, M.L. (2018). Cardiac shock wave therapy: an alternative non-invasive therapy for refractory angina. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 5402–5410.

Li, Y., Guo, Y., Aoqi, L., Ma, C., Xiong, Z., Yuan, D., Zhang, C., Zhang, J., and Dun, Y. (2023). Changes of Colon in Rats with Different Ages in Response to Lipopolysaccharide. *Curr. Med. Chem.* 30, 4492–4503.

Lin, G., Reed-Maldonado, A.B., Wang, B., Lee, Y.C., Zhou, J., Lu, Z., Wang, G., Banie, L., and Lue, T.F. (2017). In Situ Activation of Penile Progenitor Cells With Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy. *J. Sex. Med.* 14, 493–501.

Lin, K.L., Lu, J.H., Chueh, K.S., Juan, T.J., Wu, B.N., Chuang, S.M., Lee, Y.C., Shen, M.C., Long, C.Y., and Juan, Y.S. (2021). Low-Intensity Extracorporeal Shock Wave Therapy Promotes Bladder Regeneration and Improves Overactive Bladder Induced by Ovarian Hormone Deficiency from Rat Animal Model to Human Clinical Trial. *Int. J.*

Mol. Sci. 22.

Liu, W., Evanoff, D.P., Chen, X., and Luo, Y. (2007). Urinary bladder epithelium antigen induces CD8⁺ T cell tolerance, activation, and autoimmune response. *J. Immunol.* 178, 539–546.

Logadottir, Y., Delbro, D., Lindholm, C., Fall, M., and Peeker, R. (2014). Inflammation characteristics in bladder pain syndrome ESSIC type 3C/classic interstitial cystitis. *Int. J. Urol.* 21 Suppl 1, 75–78.

Mariotto, S., de Prati, A.C., Cavaliere, E., Amelio, E., Marlinghaus, E., and Suzuki, H. (2009). Extracorporeal shock wave therapy in inflammatory diseases: molecular mechanism that triggers anti-inflammatory action. *Curr. Med. Chem.* 16, 2366–2372.

Matos, R., Serrão, P., Rodriguez, L., Birder, L.A., Cruz, F., and Charrua, A. (2017). The water avoidance stress induces bladder pain due to a prolonged alpha1A adrenoceptor stimulation. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 390, 839–844.

McGregor, C.E., and English, A.W. (2018). The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 522.

Mense, S., and Hoheisel, U. (2013). Shock wave treatment improves nerve regeneration in the rat. *Muscle Nerve* 47, 702–710.

Nickel, J.C., Tripp, D.A., Pontari, M., Moldwin, R., Mayer, R., Carr, L.K., Doggweiler, R., Yang, C.C., Mishra, N., and Nordling, J. (2010). Psychosocial phenotyping in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome: a case control study. *J. Urol.* 183, 167–172.

Nishida, T., Shimokawa, H., Oi, K., Tatewaki, H., Uwatoku, T., Abe, K., Matsumoto, Y., Kajihara, N., Eto, M., Matsuda, T., et al. (2004). Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation* 110, 3055–3061.

Ohtori, S., Inoue, G., Mannoji, C., Saisu, T., Takahashi, K., Mitsunashi, S., Wada, Y.,

Takahashi, K., Yamagata, M., and Moriya, H. (2001). Shock wave application to rat skin induces degeneration and reinnervation of sensory nerve fibres. *Neurosci. Lett.* 315, 57–60.

Olsson, L.E., Wheeler, M.A., Sessa, W.C., and Weiss, R.M. (1998). Bladder Instillation and Intraperitoneal Injection of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide Up-regulate Cytokines and iNOS in Rat Urinary Bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 1203–1208.

Park, B.S., and Lee, J.O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* 45, e66.

Perez-Marrero, R., Emerson, L.E., and Feltis, J.T. (1988). A controlled study of dimethyl sulfoxide in interstitial cystitis. *J. Urol.* 140, 36–39.

Qiu, X., Lin, G., Xin, Z., Ferretti, L., Zhang, H., Lue, T.F., and Lin, C.S. (2013). Effects of low-energy shockwave therapy on the erectile function and tissue of a diabetic rat model. *J. Sex. Med.* 10, 738–746.

Ryu, C.M., Shin, J.H., Yu, H.Y., Ju, H., Kim, S., Lim, J., Heo, J., Lee, S., Shin, D.M., and Choo, M.S. (2019). N-acetylcysteine prevents bladder tissue fibrosis in a lipopolysaccharide-induced cystitis rat model. *Sci. Rep.* 9, 8134.

Sharma, H.S., Nyberg, F., Westman, J., Alm, P., Gordh, T., and Lindholm, D. (1998). Brain derived neurotrophic factor and insulin like growth factor-1 attenuate upregulation of nitric oxide synthase and cell injury following trauma to the spinal cord. An immunohistochemical study in the rat. *Amino Acids* 14, 121–129.

Song, P.H., Chun, S.Y., Chung, J.W., Kim, Y.Y., Lee, H.J., Lee, J.N., Ha, Y.S., Yoo, E.S., Kwon, T.G., Kim, J., et al. (2017). Comparison of 5 different rat models to establish a standard animal model for research into interstitial cystitis. *Int. Neurourol. J.* 21, 163–170.

Song, Z., Jin, C., Bian, Z., and Liang, C. (2021). Extracorporeal shock wave therapy decreases the number of total and degranulated mast cells and alleviates pelvic pain in a rat model of prostatitis. *Mol. Cell. Biochem.* 476, 1905–1913.

Tambaro, S., Casu, M.A., Mastinu, A., and Lazzari, P. (2014). Evaluation of selective cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor agonists in a mouse model of lipopolysaccharide-induced interstitial cystitis. *Eur. J. Pharmacol.* 729, 67–74.

Türk, C., Petřík, A., Sarica, K., Seitz, C., Skolarikos, A., Straub, M., and Knoll, T. (2016). EAU Guidelines on Interventional Treatment for Urolithiasis. *Eur. Urol.* 69, 475–482.

Wang, B., Ning, H., Reed-Maldonado, A.B., Zhou, J., Ruan, Y., Zhou, T., Wang, H.S., Oh, B.S., Banie, L., Lin, G., et al. (2017). Low-Intensity Extracorporeal Shock Wave Therapy Enhances Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression through PERK/ATF4 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Wang, H.J., Tyagi, P., Chen, Y.M., Chancellor, M.B., and Chuang, Y.C. (2019). Low Energy Shock Wave Therapy Inhibits Inflammatory Molecules and Suppresses Prostatic Pain and Hypersensitivity in a Capsaicin Induced Prostatitis Model in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Wang, H.J., Tyagi, P., Lin, T.K., Huang, C.C., Lee, W.C., Chancellor, M.B., and Chuang, Y.C. (2022). Low energy shock wave therapy attenuates mitochondrial dysfunction and improves bladder function in HCl induced cystitis in rats. *Biomed. J.* 45, 482–490.

Wang, H.S., Oh, B.S., Wang, B., Ruan, Y., Zhou, J., Banie, L., Lee, Y.C., Tamaddon, A., Zhou, T., Wang, G., et al. (2018). Low-intensity extracorporeal shockwave therapy ameliorates diabetic underactive bladder in streptozotocin-induced diabetic rats. *BJU Int.* 122, 490–500.

Whitfield, C., and Trent, M.S. (2014). Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 99–128.

Yang, C.H., Yip, H.K., Chen, H.F., Yin, T.C., Chiang, J.Y., Sung, P.H., Lin, K.C., Tsou, Y.H., Chen, Y.L., Li, Y.C., et al. (2019). Long-term Therapeutic Effects of Extracorporeal Shock Wave-Assisted Melatonin Therapy on Mononeuropathic Pain in Rats. *Neurochem. Res.* 44, 796–810.

Yoshizumi, M., Watanabe, C., and Mizoguchi, H. (2021). Gabapentin reduces painful bladder hypersensitivity in rats with lipopolysaccharide-induced chronic cystitis.

Pharmacol. Res. Perspect. 9, e00697.

Zhang, X., Yan, X., Wang, C., Tang, T., and Chai, Y. (2014). The dose-effect relationship in extracorporeal shock wave therapy: the optimal parameter for extracorporeal shock wave therapy. *J. Surg. Res.* 186, 484–492.

日本間質性膀胱炎研究会, 日本泌尿器科学会 (2019) 間質性膀胱炎・膀胱痛症候群診療ガイドライン (RichiHill Medical: 東京)

星野光典 (1991) 体外衝撃波胆石破碎療法 -胆石性状よりみた基礎的、臨床的検討-. *日本臨床外科学会雑誌* 52, 521-529

麦谷荘一 (2012) 尿路結石診療ガイドライン：診断・治療の Update. *泌尿器科紀要* 58, 703-706