

博士論文

泌尿器疾患ラットモデルにおける
膀胱知覚神経活動の解析

佐々木 奈穂子

(旧姓 久我 奈穂子)

本研究では、まず成体ラットにおける膀胱知覚神経の電気生理計測法を確立した(第一章)。さらに、本法を過活動膀胱ラットモデル(第二章)、および間質性膀胱炎ラットモデル(第三章)に適用し、病態生理メカニズムを解析した。

なお、本論文は、以下の論文をもとに作成した。

1. Kuga N, Tanioka A, Hagihara K, Kawai T. Modulation of afferent nerve activity by prostaglandin E2 upon urinary bladder distension in rats. *Exp Physiol*. 2016, 101(5), 577-587.
2. Kuga N, Tanioka A, Hagihara K, Kawai T. Fiber type-specific afferent nerve activity induced by transient contractions of rat bladder smooth muscle in pathological states. *PLoS One*. 2017, 12(12), e0189941.

目次

第一章 成体ラットを用いた膀胱知覚神経における電気生理学的計測法の確立

【背景】.....	4
【方法】.....	6
【結果と考察】.....	11
【参考文献】.....	15

第二章 過活動膀胱ラットモデルにおける膀胱知覚神経活動の解析

【背景】.....	18
【方法】.....	20
【結果と考察】.....	22
【参考文献】.....	37

第三章 間質性膀胱炎ラットモデルにおける膀胱知覚神経活動の解析

【背景】.....	46
【方法】.....	48
【結果と考察】.....	49
【参考文献】.....	65

総括.....	72
---------	----

謝辞.....	73
---------	----

第一章

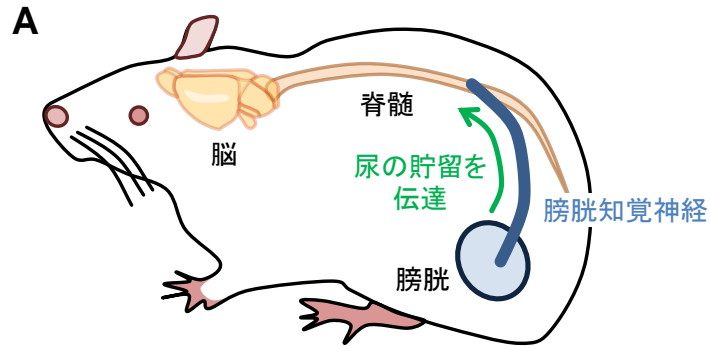
成体ラットを用いた膀胱知覚神経における 電気生理学的計測法の確立

【背景】

膀胱知覚神経は、膀胱における尿の貯留を感知し、膀胱から中枢へと情報を伝達することで、排尿機構に重要な役割を担う(図 1A)。代表的な泌尿器疾患として挙げられる過活動膀胱や間質性膀胱炎は、尿意切迫感、頻尿、切迫性尿失禁を共通の主訴とし、これに加えて間質性膀胱炎では疼痛症状を伴うが、これらの症状は膀胱知覚神経が膀胱の異常を感知し、その神経活動が増大することで中枢に過剰な神経シグナルが伝わるのが主因と考えられている(Kanai & Andersson, 2010, Yoshimura et al., 2014)。

膀胱知覚神経は A δ 線維と C 線維に分類される(図 1B)。一般的には、A δ 線維が正常時における膀胱への尿の貯留を感知するのに対して、C 線維は過活動膀胱や間質性膀胱炎のような病態時に特異的に活性化し、症状の惹起に関与すると考えられてきた(Fowler, 2002)。しかし、A δ 、C 線維の生理活動を詳細に記述した研究は、測定技術の難易度の高さ故に極めて少ない。特に病態時において、A δ 線維と C 線維がいかに異常な活動を生じるかも不明である。

そこで本研究では、まず成体ラットにおける膀胱知覚神経線維の電気生理計測法を確立し(第一章)、本法を過活動膀胱ラットモデル(第二章)、および間質性膀胱炎ラットモデル(第三章)に適用して、その病態生理メカニズムを解析した。



B 膀胱知覚神経の分類

膀胱知覚神経	一般的な機能的役割	伝導速度	TTX感受性
A δ 線維	正常時の尿の貯留を伝達	>2.5 m/s	感受性
C線維	病態時の膀胱の異常を伝達	<2.5 m/s	非感受性

図 1 膀胱知覚神経の役割と分類

A 膀胱知覚神経は、膀胱における尿の貯留を感知し、その情報を中枢に伝達する。

B 膀胱知覚神経の分類。A δ 、C 線維の分類においては、従来は伝導速度に基づいた分類がなされて

きたが、本研究ではテトロドトキシン (TTX) 感受性に基づいた分類法を確立した。

【方法】

使用動物

Sprague–Dawley 雌性ラット(8–11 週齢、体重 260–320 g、Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan)を使用した。ラットは、自由摂水・摂食、12 時間毎の明暗制御、および温度(23 度)・湿度を制御した条件下で飼育した。全ての実験は、杏林製薬株式会社わたらせ創薬センターの動物実験ガイドラインと倫理規定に従い、動物実験委員会の承認の下で実施した(承認番号:2014-25)。

In vivo 細胞外記録法を用いた単一膀胱知覚神経の活動測定

ラットは、生理食塩水で溶解した 20% (w/v)ウレタン溶液を皮下投与(1.5 g/kg)して麻酔した。麻酔の深度は下肢と眼瞼反射の消失によって確認した。呼吸を維持するため、気管にはカニューレを挿管した。実験中、ラットの体温はヒートパッドを用いて 37.5 度に維持した。まず、ラットを仰臥位にして左下腹部を切開し、骨盤神経節周囲を露出して神経節近傍の骨盤神経を周辺組織から剥離した。この骨盤神経に刺激用銀線双極電極を設置し、シリコン系シーリング剤(Kwik-Cast™, World Precision Instruments Ltd., Sarasota, FL)で封入した。次に、膀胱頂部を切開し、ダブルルーメンカテーテルを挿入した。内側カテーテルは、生理食塩水を注入するシリンジポンプ(Aladdin Pump; World Precision Instruments Ltd.)に接続した。外側カテーテルは、膀胱内圧測定用の圧カトランスデューサー(DX-100; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)に接続した。ラットの下腹部を縫合した後に、伏臥位にして背部を切開し(図 2A 左)、腰椎の椎弓を切除した。露出した脊髄から硬膜を除去し、表面をパラフィン油で覆った。L6・S1 後根神経

を両側ともに脊髄に入り込む手前で切除した後に、左側 L6 後根神経を割いて、ある程度の発火活動が取得可能になるまで神経束を分離した。この分離した神経束を記録用銀線双極電極に設置して、細胞外電位信号を記録した(図 2A 右、図 2B)。刺激装置 (SEN-3301; Nihon Kohden) を用いて骨盤神経の電気刺激(パルス幅 0.4 msec)を行い、複数ユニットの発火信号が得られた場合は、最大 3 つのユニットの発火信号となるまで、さらに神経束を分離した(図 2C 下)。細胞外電位信号は、増幅器 (CP511 AC amplifier; Grass Instruments, Quincy, MA, USA) を用いて 100,000 倍に増幅し、30-3000 Hz のバンドパスフィルターに通した後に、ノイズ除去装置 (Hum Bug 50/60 Hz Noise Eliminator; Quest Scientific, North Vancouver, BC, Canada) を用いて電気干渉ノイズを除去した。膀胱内圧と神経活動は、PowerLab データ取得システム (PowerLab 8/30; AD Instruments, Castle Hill, NSW, Australia) を用いて、サンプリング周波数 20 kHz で記録した。記録終了時には、0.3 μ M TTX 溶液を吸収させた吸水スポンジ片を記録電極直下の神経束に設置し(図 2B)、神経活動を 5 分間記録した。最後に、過剰量のペントバルビタールによってラットを安楽死させた。

データからの発火信号の分離

L6 後根神経を分離せずに、電極を設置して集合線維の活動を記録すると、多数の神経線維(ユニット)の発火信号が重なったデータが得られる(図 2C 上)。この条件では、各線維の発火信号を分離して解析することができない。そこで本研究では、単一神経レベルでの活動を解析するべく、3 本以下のユニットの発火信号のみ含まれるデータが得られるまで、集合線維を少数線維に手作業で分離した(図

2C 下)。各ユニットは、記録電極との距離に応じて、固有のパラメータを持つ発火波形を示す。少数線維のユニット活動が混在した生データから、発火波形に基づいて、スパイクソーティングアルゴリズムの Wave_clus (Quian Quiroga et al., 2004) を用いて自動的にソーティングを行い、各ユニットの発火信号を単離した(図 2D)。

各ユニットにおける伝導速度の計算

各ユニットの伝導速度は、刺激電極と記録電極間の距離を、伝導時間で除して算出した。解析には、後述の膀胱伸展刺激への反応が得られたユニットのみを用いた。

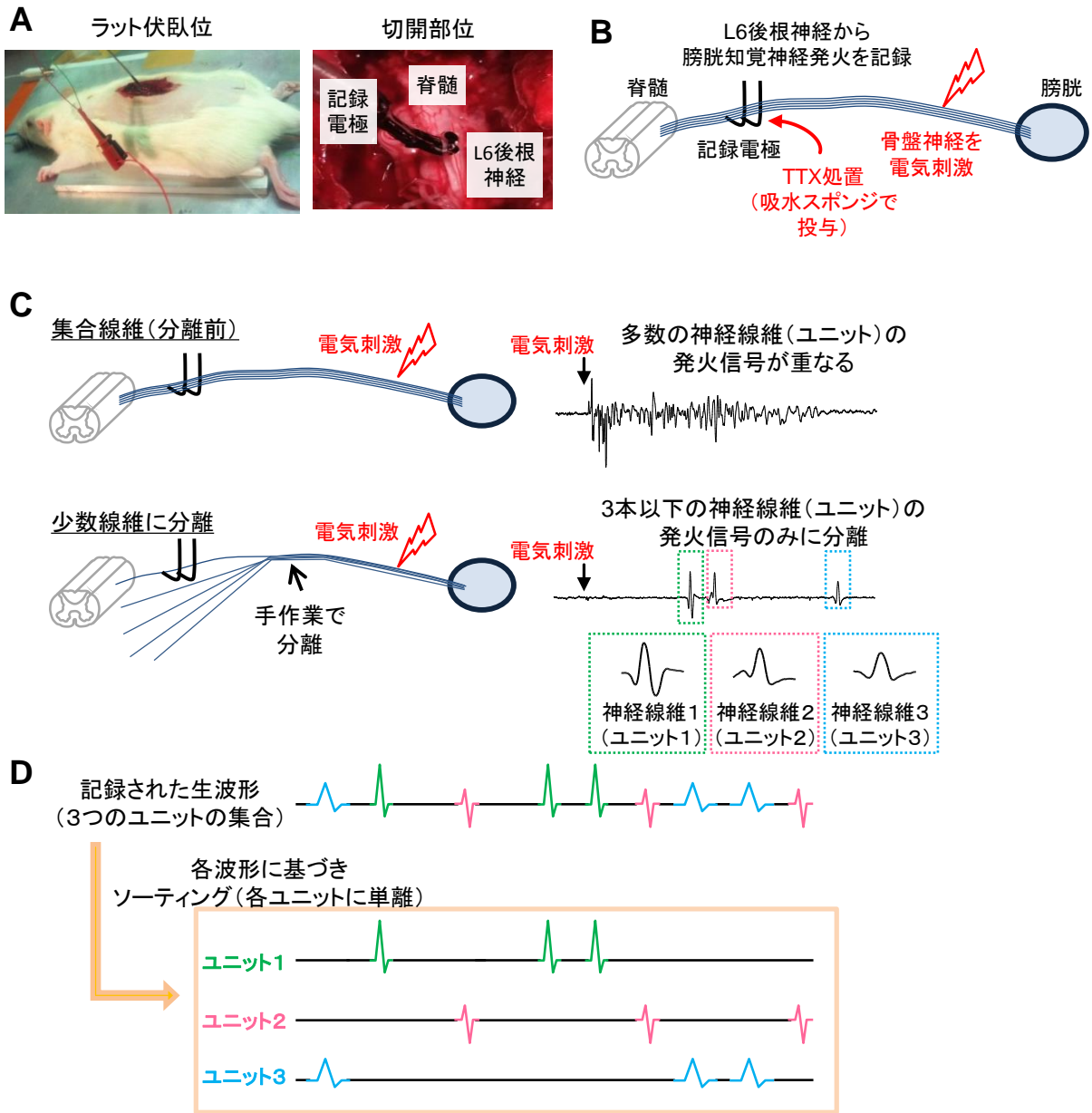


図 2 実験と解析の概要図

A ラットの L6 後根神経より膀胱知覚神経活動を記録した。

B 骨盤神経の電気刺激に反応する膀胱知覚神経からユニット活動を記録した。テトロドトキシン (TTX) は 0.3 μM 溶液を吸水スポンジに吸収させ、記録電極直下の神経束に設置することで処置した。

C (上)L6後根神経に電極を設置して集合線維の活動を記録すると、多数の神経線維(ユニット)の

発火信号が重なってしまうため、各線維の発火信号を分離できない。(下)本研究では、単一神経レベルでの活動を解析するために、3 本以下の神経線維(ユニット)の発火信号のみが含まれるように、集合線維を少数の線維に手作業で分離した。右図の例では、電気刺激に応答して、3 つの異なるユニットが発火を生じていることを示す。それぞれの発火の波形の拡大図から、それぞれのユニットが特有の波形を呈することがわかる。

D 図 2C 下のような条件下で得られた記録データからの発火信号の抽出例。ここでは 3 つのユニットから生じる発火信号を 3 つの異なる色(緑、赤、青)で表示している。(上)3 つのユニットからの波形が混ざった記録データ。(下)各ユニットに特有の発火波形に基づいて自動的にソーティングを行い、各ユニットの発火信号を分離した。

こうした波形分離を行った後、各ユニットについて電気刺激による発火応答の伝導速度や半値幅、TTX 感受性を評価し、A δ 線維、C 線維に分類した(図 3)。

【結果と考察】

膀胱知覚神経の活動測定とテトロドトキシンを用いた膀胱知覚神経(A δ ・C線維)の分類〈結果〉

ラットの L6 後根神経から *in vivo* 細胞外記録法を用いて、膀胱知覚神経活動を記録した(図 2)。L6 後根神経を単一活動電位が記録可能なレベルに細く分離した神経束から、骨盤神経を電気刺激した際の活動を記録すると(図 3A)、A δ 線維と C 線維が混在した集合ユニット活動が得られた。本研究ではまず、この A δ 線維と C 線維が混在したユニット活動から、両者を分類する方法の確立を試みた。A δ 線維と C 線維の分類においては、Na⁺チャンネル遮断薬に対してそれぞれ感受性・非感受性であることを利用し、低用量のテトロドトキシン(TTX)処置によって分類可能であることが、単離した膀胱知覚神経の細胞体(Yoshimura et al., 1996)、または L6 後根が付随した脊髄スライス標本(Yoshimura & Jessell, 1990; Pinto et al., 2008)を用いた先行研究から報告されている。この *in vitro* での分類手法が、本実験の *in vivo* 標本においても適応できるか検討した。0.3 μ M TTX を記録電極直下に処置すると、骨盤神経刺激に対して短時間で反応するユニット活動が選択的に消失した(図 3A)。これまで *in vivo* 標本では、有髄神経である A δ 線維と、無髄神経である C 線維の伝導速度の差を利用した分類が経験則的になされてきた(Vera & Nadelhaft, 1990; Sengupta & Gebhart, 1994)。伝導速度が 2.5 m/sec 以上のユニットを A δ 線維、2.5 m/sec 以下のユニットを C 線維とするこのクライテリアと一致して、TTX 処置により、伝導速度 2.5 m/sec 以上のユニット活動が選択的に消失した。記録した単一ユニット活動から伝導速度の分布を解析すると、伝導速度 2.5 m/sec 以上のユニットのうち、94.4% (34/36) が TTX 処置によって活動が消失した TTX 感受性のユニットであった。一方、伝導速度 2.5 m/sec 以下のユニットでは、94.8% (37/39) が TTX

処置においても活動の消失が認められない TTX 非感受性のユニットであった(図 3B)。以上の結果は、A δ 、C 線維の TTX に対する感受性の違いを利用した本分類法が、伝導速度を用いた既存の分類法と 5% 以内の誤差で合致することを示唆している。本分類法の更なるバリデーションのため、各ユニットの発火の波形における半値幅についても解析した(図 3C)。伝導速度 2.5 m/sec 以上、以下のユニットとして定義される A δ 、C 線維の発火の波形における半値幅の分布を解析すると、C 線維の半値幅は A δ 線維よりも顕著に長く、0.4 msec を閾値とする二相性の分布を示した(図 3D)。TTX 感受性、非感受性ユニットの発火の波形における半値幅の分布においても、TTX 非感受性ユニットの半値幅が TTX 感受性ユニットより顕著に長く、図 3D と同様の分布を示した(図 3E)。以上の結果から、TTX への感受性の違いを利用して、A δ 線維と C 線維が分類可能であることが示唆された。

膀胱知覚神経の活動測定とテトロドトキシンを用いた膀胱知覚神経(A δ ・C 線維)の分類〈考察〉

成体ラットから膀胱知覚神経活動を記録する本実験手法は、より生理的条件下で膀胱活動に関連した膀胱知覚神経の生理活動が捉えられ、かつ神経活動のポピュレーション解析ができる点でも、有用な実験系である。しかし、その測定技術の難易度故に、これまでに膀胱知覚神経活動を詳細に記述した報告は極めて少ない。本研究で確立した TTX への感受性を利用した A δ 線維と C 線維の分類法は、伝導速度に基づく従来の分類法と同等の精度を示し、かつ膀胱知覚神経活動のポピュレーション解析を目的とした本実験手法のスループット性向上に繋がると考えられる。TTX への A δ 、C 線維の感受性の違いは、C 線維に主に発現するナトリウムチャネルのサブタイプである Nav1.8 や Nav1.9 (black et al.,

2003)など、A δ 線維と C 線維におけるイオンチャネルの発現パターンの違いに起因すると考えられる。

このイオンチャネルの発現パターンの違いは、A δ 線維より C 線維で活動電位幅が顕著に大きい要因でもあると推測できる (Fang et al., 2002; Djouhri et al., 2003)。図 3D は、発火の波形の半値幅が A δ 線維と C 線維を分類する指標となり得ることを示している。これは、TTX 非感受性ユニットが TTX 感受性ユニットよりも発火の波形の半値幅が広いことを示した図 3E の結果からも支持される。以降の解析では、TTX 感受性または発火の波形の半値幅が 0.4 msec 以下のユニットを A δ 線維、TTX 非感受性または活動電位の半値幅が 0.4 msec 以上のユニットを C 線維と見なすこととした。

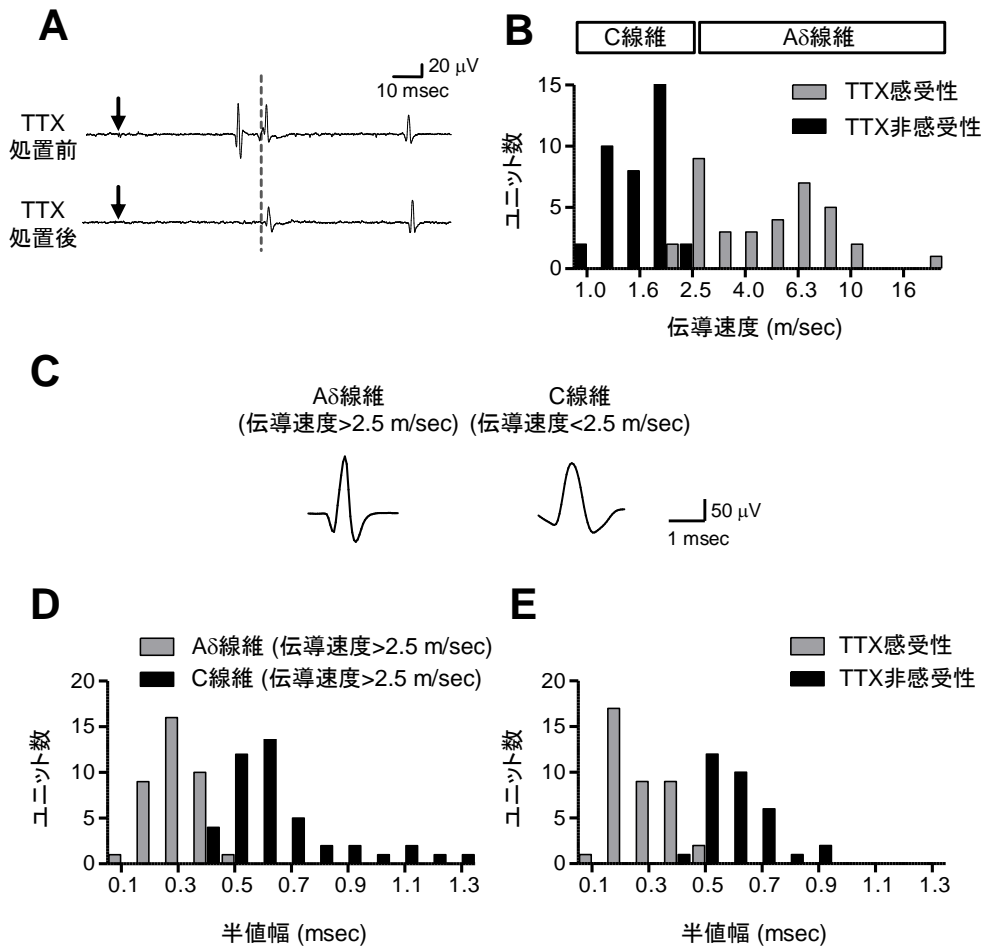


図3 膀胱知覚神経の分類

A 骨盤神経を電気刺激し、L6 後根神経から細く分離した神経束より記録した細胞外電位信号の代表トレース。図中の点線が伝導速度 2.5 m/sec の電気パルスが記録部位に到達する時間に相当する。

TTX 処置により、伝導速度 2.5 m/sec 以上のユニット活動が選択的に消失した。

B TTX 感受性ユニット(灰、 $n = 36$)、非感受性ユニット(黒、 $n = 39$)における、伝導速度の分布。

C A δ 線維と C 線維の発火の波形の拡大トレース。

D A δ 線維(灰、 $n = 37$)と C 線維(黒、 $n = 44$)における、発火の波形の半値幅の分布。

E TTX 感受性ユニット(灰、 $n = 38$)、非感受性ユニット(黒、 $n = 32$)での発火の波形の半値幅の分布。

【参考文献】

1. Black JA, Cummins TR, Yoshimura N, de Groat WC & Waxman SG (2003). Tetrodotoxin-resistant sodium channels Na(v)1.8/SNS and Na(v)1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats. *Brain Res.* **963**, 132-138.
2. Djouhri L, Fang X, Okuse K, Wood JN, Berry CM & Lawson S (2003). The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol* **550**, 739-752.
3. Fang X, Djouhri L, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG & Lawson SN (2002). The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Nav1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* **22**, 7425-7433.
4. Fowler CJ (2002). Bladder afferents and their role in the overactive bladder. *Urology* **59**, 37-42.
5. Kanai A & Andersson KE (2010). Bladder afferent signaling: recent findings. *J Urol* **183**, 1288-1295.
6. Pinto V, Derkach VA & Safronov BV (2008). Role of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in A δ - and C-fiber conduction and synaptic transmission. *J Neurophysiol* **99**, 617-628.
7. Sengupta JN & Gebhart GF (1994). Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *J Neurophysiol* **72**, 2420-2430.
8. Vera PL & Nadelhaft I (1990). Conduction velocity distribution of afferent fibers innervating the rat urinary bladder. *Brain Res* **520**, 83-89.
9. Yoshimura M & Jessell T (1990). Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol* **430**, 315-335.

10. Yoshimura N, Oguchi T, Yokoyama H, Funahashi Y, Yoshikawa S, Sugino Y, Kawamorita N, Kashyap MP, Chancellor MB, Tyagi P & Ogawa T(2014). Bladder afferent hyperexcitability in bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int J Urol* **21**,18-25.

11. Yoshimura N, White G, Weight FF & de Groat WC (1996). Different types of Na⁺ and K⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurones innervating the urinary bladder. *J Physiol* **494**, 1–16.

第二章

過活動膀胱ラットモデルにおける 膀胱知覚神経活動の解析

【背景】

過活動膀胱は、尿意切迫感、頻尿、切迫性尿失禁を主訴とする疾患である。これらの症状は、膀胱知覚神経が膀胱の異常を感知し、その神経活動頻度が増大することで、中枢に過剰な神経シグナルが伝わることによって生じると考えられている (Kanai & Andersson, 2010)。

過活動膀胱症状を惹起する主要因子としては、プロスタグランジン E2 (PGE2) が広く知られている。過活動膀胱患者 (Kim et al., 2005, 2006) や動物モデル (Masunaga et al., 2006) の膀胱では、PGE2 量の増加が認められる。加えて、ヒト (Schüssler, 1990) またはげっ歯類 (Ishizuka et al., 1995) の膀胱内に PGE2 を処置すると、膀胱平滑筋の過活動が惹起されるとともに、過活動膀胱様症状が観察される。更には、この膀胱内への PGE2 処置によって膀胱知覚神経が発火頻度の増加を示すことも、げっ歯類において報告されている (Ritter et al., 2009; Aizawa et al., 2010)。

膀胱知覚神経は、A δ 線維が正常時の膀胱への尿の貯留を感知するのに対し、C 線維は過活動膀胱のような病態時に特異的に活性化し、症状の惹起に関与すると考えられてきた (Fowler, 2002)。この説に一致して、膀胱に侵害刺激を与えても A δ 線維の活動には変化は認められないとするげっ歯類での報告がある (De Wachter & Wyndaele, 2003; Aizawa et al., 2010, 2011)。しかしながら、A δ 線維が膀胱の過活動状態に反応して過剰な活動を示すとの報告も複数なされている (Dmitrieva & McMahon, 1996; Iijima et al., 2009)。このように議論が分かれる要因として、個々の膀胱知覚神経線維の生理学的特性が多様であることが挙げられる。実際、膀胱の伸展刺激に対して膀胱知覚神経が反応する膀胱内圧の閾値は、各神経線維によって多様である (Sengupta & Gebhart, 1994; Shea et al., 2000; Rong et al.,

2002)。しかし、個々の A δ 、C 線維に着目して、どのようなタイプの膀胱知覚神経が、膀胱での PGE2 量の上昇に対して発火パターンを変化させるのかを記述した報告はない。そのため、第一章で確立した膀胱知覚神経の活動測定法を、PGE2 で誘発した過活動膀胱ラットモデルに適用し、膀胱伸展刺激を与えた際の単一膀胱知覚神経における発火活動を測定することによって、膀胱知覚神経の種類や膀胱内圧閾値により PGE2 に起因した発火パターンの変化が異なることを明らかにした。

【方法】

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経の活動測定

In vivo 細胞外記録法は、第一章と同様に実施した。ここでは、膀胱伸展刺激と、膀胱内圧・膀胱知覚神経活動の同時記録法の実験手順のみを記述する。膀胱伸展刺激は、膀胱内圧が 30 cmH₂O に到達するまで徐々に上昇させる方法、10 cmH₂O で維持する方法の 2 種類を実施した。30 cmH₂O まで膀胱内圧を上昇させる場合は、生理食塩水を膀胱内に 6 ml/h で注入し、膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した。30 cmH₂O に到達後、注入した生理食塩水はダブルルーメンカテーテルの外側カテーテルより排出した。この測定を 10 分間隔で 3 回繰り返した後、PGE₂ 溶液(100 μM)に置換して、同様に 3 回繰り返した。膀胱内圧と膀胱知覚神経活動の解析には、生理食塩水・PGE₂ 溶液を注入した各 3 回目の記録を用いた。膀胱内圧を 10 cmH₂O で維持する膀胱伸展刺激を与える際には、ダブルルーメンカテーテルの外側カテーテルと圧カトランスデューサーの間に三方活栓を設置し、残りのコネクタにチューブを接続して高さ 10 cm の台に繋ぐことで、膀胱内圧を 10 cmH₂O に維持した。生理食塩水を 2 ml/h で注入して 30 分間膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した後、PGE₂ 溶液(100 μM)に置換して、更に 30 分間記録を行った。膀胱内圧と膀胱知覚神経活動の解析には生理食塩水、PGE₂ 溶液注入時ともに、30 分間の記録のうち最後の 5 分間を用いた。

データ解析と統計処理

膀胱知覚神経活動の解析においては、集合ユニット活動をスパイクソーティングアルゴリズムの

Wave_clus (Quian Quiroga et al., 2004)を用いて、単一ユニット活動に分離した。各ユニットは TTX に対する反応性に基づき、A δ 線維と C 線維に分類した。膀胱伸展刺激への反応が得られたユニットのみを採用し、ビンサイズを 1 秒として膀胱内圧とそれに対応するユニットの発火頻度を算出した。膀胱内圧の周期的変動に伴ったユニット活動の解析においては、まず膀胱内圧トレースから極大値と極小値を検出し、各極大値と右隣の極小値の差分を、膀胱内圧の周期的変動における振幅として算出した。この振幅が 0.3 cmH₂O 以下の場合にはノイズとして解析から除外した。周期的変動の持続時間は、極小値間の時間として算出した。周期的変動に伴うユニットの平均発火頻度は、各周期的変動の極大値前後 1 秒間における最大発火頻度の平均値として算出した。また、ベースラインの膀胱内圧におけるユニットの平均発火頻度は、膀胱内圧の極小値前後 1 秒間における発火頻度の平均値として算出した。統計学的有意性の検定には paired *t*-test または Wilcoxon test を用い、用いた検定については図の説明文中に記載した。有意水準は 5% 未満として検定した。数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。

【結果と考察】

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経の発火パターン〈結果〉

まず膀胱知覚神経が膀胱伸展刺激に対してどのように反応するかを検討するべく、膀胱に生理食塩水を注入して、膀胱内圧が 30 cmH₂O に到達するまで膀胱伸展刺激を与えた際の(図 4A)、膀胱内圧と膀胱知覚神経の集合ユニット活動を同時記録した(図 4B)。集合ユニット活動はオフラインでのスパイクソーティングにより、単一ユニット活動に分離した。膀胱内圧が上昇するに従って、A δ 、C 線維ともに各ユニットの発火頻度も増加した。各ユニットが反応する膀胱内圧の最小値を膀胱内圧閾値として定義すると、A δ 、C 線維ユニットともに、膀胱内圧閾値は 15 cmH₂O を境に二相性分布を示した(図 4C、D、各左図)。膀胱内圧閾値が 15 cmH₂O 以下、以上のユニットをそれぞれ低閾値、高閾値ユニットと定義して、膀胱内圧と A δ 、C 線維の各低閾値、高閾値ユニットの発火頻度の関係を図 4C、D の右図に示した。記録した全 71 ユニット中、各ユニットが占める割合は、A δ 線維の低閾値ユニットが 21% (15/71 ユニット)、高閾値ユニットが 32% (23/71 ユニット)、C 線維の低閾値ユニットが 38% (27/71 ユニット)、高閾値ユニットが 8% (6/71 ユニット)であった。

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経の発火パターン〈考察〉

膀胱知覚神経は、膀胱内圧に対するその発火頻度の関係から、発火閾値となる膀胱内圧(膀胱内圧閾値)に基づいた生理学的分類が可能である。本研究のポピュレーション解析においても、前報と同様(Sengupta & Gebhart, 1994; Shea et al., 2000; Rong et al., 2002)、膀胱知覚神経の膀胱内圧閾値は 15

cmH₂O を境とした二相性分布を示した(図 4C、D)。正常ラットにおける排尿の膀胱内圧閾値が 10-20 cmH₂O であることから(Ishiura et al., 2001; Pandita et al., 2003; Yoshimura et al., 2006)、15 cmH₂O 以下の膀胱内圧閾値をもつ低閾値ユニットは正常時における膀胱への尿の貯留を感知し、一方、15 cmH₂O 以上の膀胱内圧閾値をもつ高閾値ユニットは病態時における強い機械刺激に対して活性化し、膀胱から中枢へ異常なシグナルを伝達していると考えられる。これまで A δ 、C 線維はそれぞれ低閾値、高閾値線維に相当するとの説が一般的であった(Bahns et al., 1987; Häbler et al., 1990; Dmitrieva & McMahon, 1996; Morrison, 1997)。しかし、複数の先行研究でこの説が異なるとも報告されている(Sengupta & Gebhart, 1994; Shea et al., 2000)。本研究においても、多数(81.8%)の C 線維が 6-12 cmH₂O を膀胱内圧閾値とする低閾値ユニットであった(図 4D)。本研究の結果は、一部の C 線維が正常な膀胱伸展に反応して活性化することを示唆している。

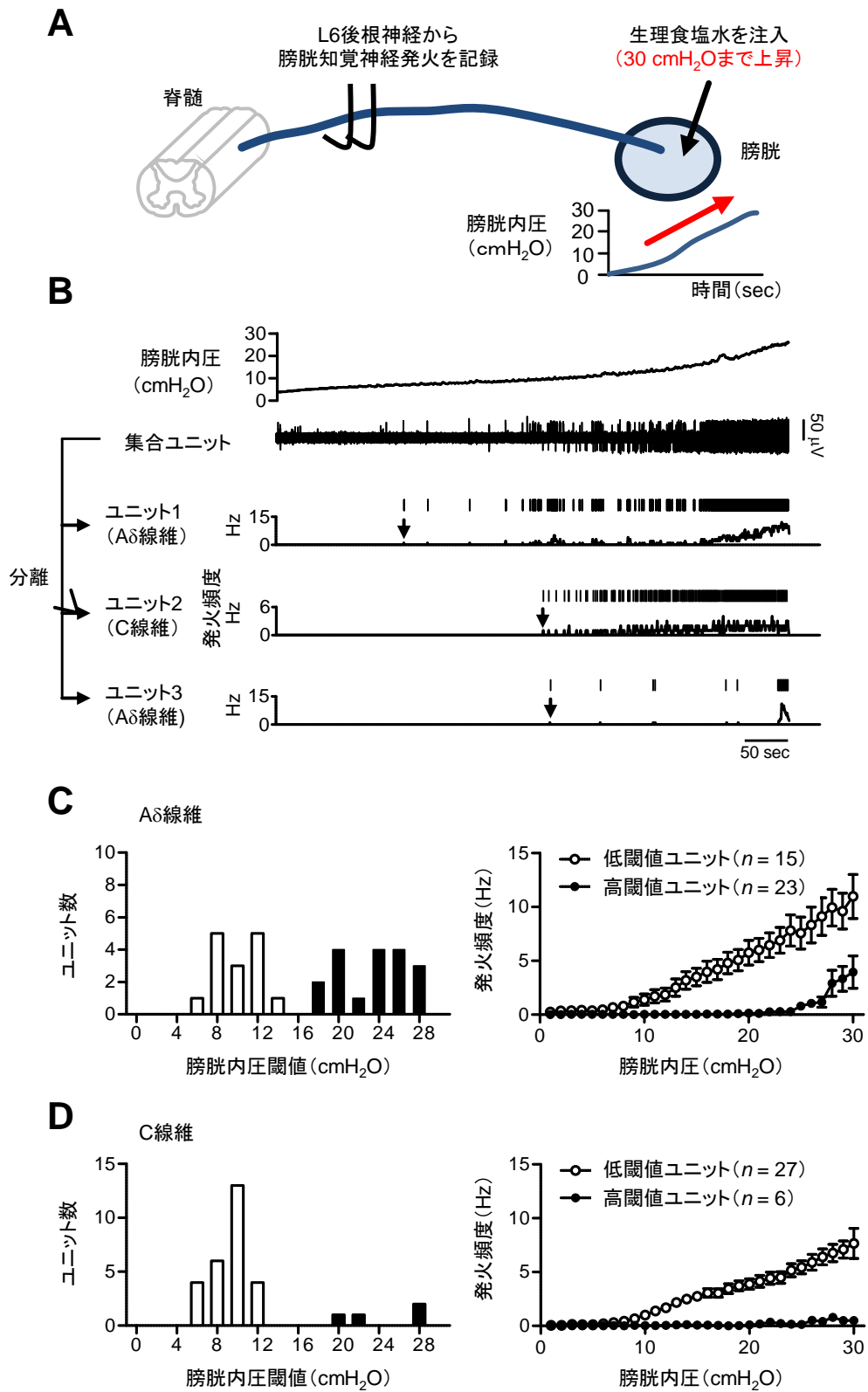


図 4 膀胱伸展刺激に対する A δ 線維と C 線維の発火パターン特性

A 実験概要図。膀胱に生理食塩水を注入し、膀胱内圧を30 cmH₂Oまで上昇させた際の、膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した。

B 膀胱内圧と膀胱知覚神経の集合ユニット活動を同時記録した代表トレース。スパイクソーティングによって、この集合ユニット活動は2つのA δ 線維と1つのC線維を含む、3つのユニットに分離できた。各ユニットにおける活動の発火タイミングを上段に示し、これに対応する発火頻度を下段に示した。また、各ユニットでの発火閾値となる膀胱内圧(膀胱内圧閾値)を矢印で示した。

C-D A δ 線維(C)、C線維(D)ユニットそれぞれの膀胱内圧閾値の分布を左図に示した。15 cmH₂O以下、以上の膀胱内圧閾値をもつユニットを、それぞれ低閾値ユニット(白丸)、高閾値ユニット(黒丸)と定義した。右図では、A δ 線維(C)とC線維(D)における低閾値ユニット、高閾値ユニットの膀胱内圧に対する平均発火頻度を示した。

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経活動へのPGE2の作用〈結果〉

次に、PGE2に起因して膀胱知覚神経の発火パターンがどのように変化するかを検討した。PGE2溶液を膀胱内に処置すると(図5A)、膀胱内圧上昇が急速になり(図5B)、膀胱内圧が10 cmH₂Oに達するまでに要した膀胱への溶液注入量が有意に減少した($P < 0.05$, Student's *t*-test, 図5C)。この膀胱内圧変化の影響を排除するため、膀胱知覚神経の発火パターンの解析では、時間やそれと比例する膀胱への溶液注入量ではなく、膀胱内圧に対する各ユニットの発火頻度の変化をPGE2処置前後で比較した(図5D-G)。PGE2処置によって発火頻度は全体的には増加するが、その変化は膀胱知覚神経の種類により異なることが本研究から明らかとなった。膀胱内圧閾値が15 cmH₂O以下の低閾値ユニットのうち、C線維では48.1% (13/27ユニット)がPGE2により発火頻度が増加した(図5E)。一方、A δ 線維では、ほぼ全てのユニットでPGE2による有意な変化は認められなかった(図5D)。なお、これらのPGE2に反応した低閾値ユニットでは、膀胱内圧に対する発火頻度は増加したものの、膀胱内圧閾値に変化は認められなかった(図5D、E)。また、膀胱内圧閾値が15 cmH₂O以上の高閾値ユニットでは、A δ 、C線維に関わらず全てのユニットで、膀胱内圧閾値の低下と、膀胱内圧に対する発火頻度の増加が認められた(図5F、G)。

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経活動へのPGE2の作用〈考察〉

過活動膀胱では、患者(Schurch et al., 2000; Silva et al., 2002)や動物モデル(Atiemo et al., 2005; Khera et al., 2005; Yokoyama et al., 2005, 2010)の膀胱に、ボツリヌストキシンやレシニフェラトキシン等

の神経毒を処置すると、膀胱知覚神経活動の抑制により、過活動膀胱症状の改善が認められることから、膀胱知覚神経が病態に関与することが示唆されている。本研究では、過活動膀胱ラットモデルとして、PGE2誘導モデルを採用した。100 μ MのPGE2を膀胱内に処置した覚醒下のラットでは、過活動膀胱様症状(排尿回数の増加、排尿間隔と膀胱容量の減少、蓄尿・排尿時における膀胱内圧の上昇)が認められる(Lee et al., 2008; Granato et al., 2015)。ヒトにおいても、PGE2の膀胱内処置により、膀胱容量の減少と排尿圧の増加が生じ、尿意切迫感や頻尿といった過活動膀胱様症状が惹起される(Schussler, 1990)。本研究では、同一の膀胱内圧で比較した際の膀胱知覚神経ユニットの発火頻度が、PGE2処置によって増加することを示した(図5C-F)。この結果は前報に一致して(Ritter et al., 2009; Aizawa et al., 2010)、PGE2が膀胱平滑筋の過活動を惹起して膀胱内圧が変動することにより(図5B)、膀胱知覚神経の発火頻度を間接的に増加させるだけでなく、膀胱知覚神経に直接的に作用することを示唆している。これまで、C線維は病態時に特異的に活性化するとの説が一般的であった(de Groat & Yoshimura, 2009)。この説に一致して、本研究でもPGE2処置によって半数以上(58%)のC線維ユニットの発火頻度が増加し、特に15 cmH_2O 以上の高い膀胱内圧を発火閾値とするC線維の全てのユニットで、発火頻度の増加に加え、膀胱内圧閾値の低下が認められた。一方、42%のC線維ユニットがPGE2に非感受性であったことは、C線維の反応パターンが一様ではなく、個々の線維によって異なることを示している。さらに本研究では、一部のA δ 線維ユニットがPGE2によって強く活性化されることを明らかにし、C線維のみならずA δ 線維にもPGE2が作用することを示した。先行研究においては、膀胱の過活動状態に対し、A δ 線維が活性化すると報告がある一方(Dmitrieva & McMahon, 1996; Iijima et al., 2009)、活性化は認

められないとの報告もなされている (De Wachter & Wyndaele, 2003; Aizawa et al., 2011)。本研究と同様にPGE2を膀胱内処置した先行研究でも、A δ 線維の活動パターンが変化しないことを報告している (Aizawa et al., 2010)。これら先行研究との矛盾は、個々の膀胱知覚神経が異なる生理学的性質を持ち、多様な活動パターンを示すことに起因するものと考えられる。本研究では、A δ 線維のうち、膀胱内圧閾値が高閾値のユニットがPGE2に強い感受性を示し、低閾値のユニットでは変化は認められなかった。これは、正常時には活動を生じないA δ 線維が病態時に特異的に活性化することを示唆している。先行研究では、膀胱内圧閾値に基づいた分類をせず、全てのA δ 線維の活動を一律に平均化してしまったために、A δ 線維の活性化を見落とす結果になったと考えられる。このPGE2に対するA δ 線維の感受性は、PGE2により惹起される尿意切迫感や頻尿といった過活動膀胱症状に、C線維のみならずA δ 線維も寄与しうることを示唆している。Gタンパク質共役型のプロスタグランジン受容体であるPGE2受容体には、EP1-4の4種類のサブタイプが存在し、膀胱に投射するL6後根神経の細胞体でEP1 (Wada et al., 2013)、EP3 (Su et al., 2008) の発現が報告されている。また、膀胱知覚神経活動に対するEP3拮抗薬の作用解析において、伝導速度が遅く、かつ発火閾値となる膀胱内圧が高い (高閾値のC線維に相当すると推測される) 線維の活動が主に抑制されるとの報告もあることから (Su et al. 2008)、PGE2受容体の発現は線維の種類や膀胱内圧閾値によって異なることも推測される。今後の研究から、PGE2による膀胱知覚神経活動の調節メカニズムが、より詳細に明らかになることが期待される。

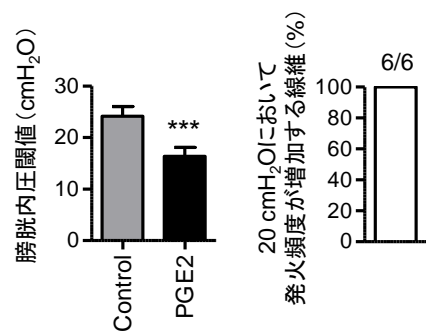
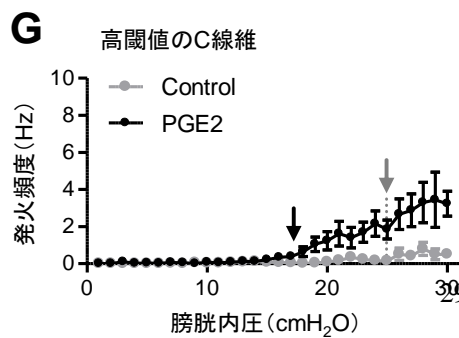
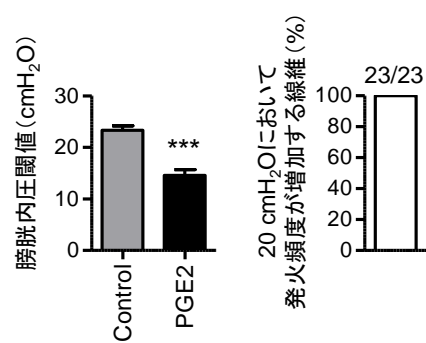
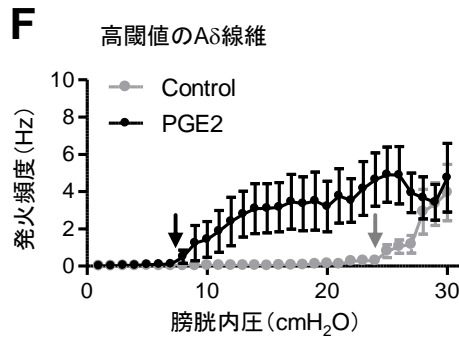
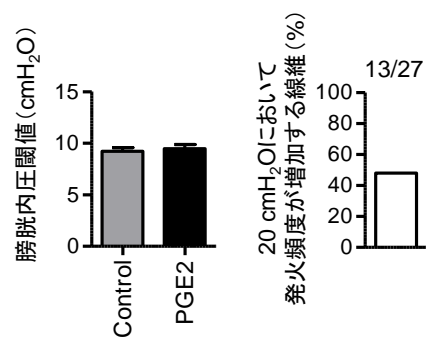
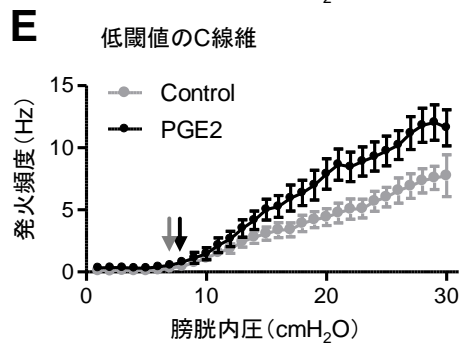
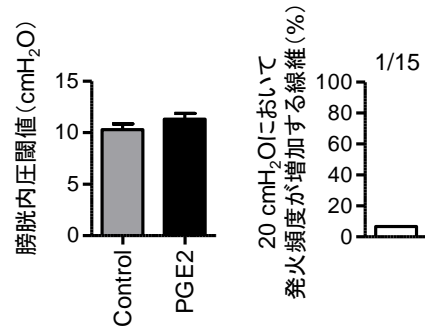
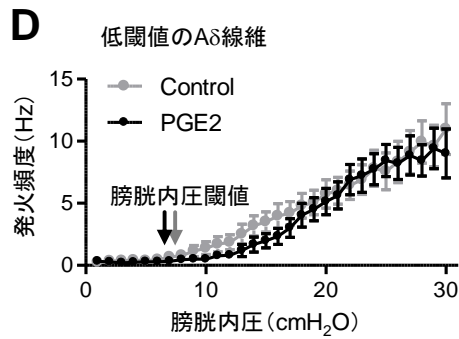
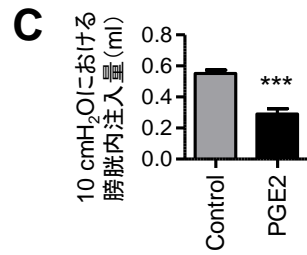
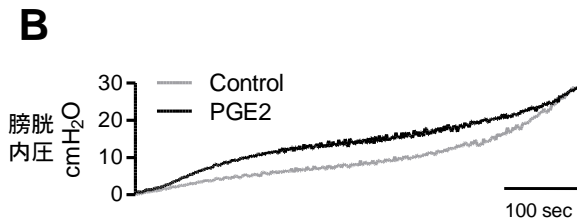
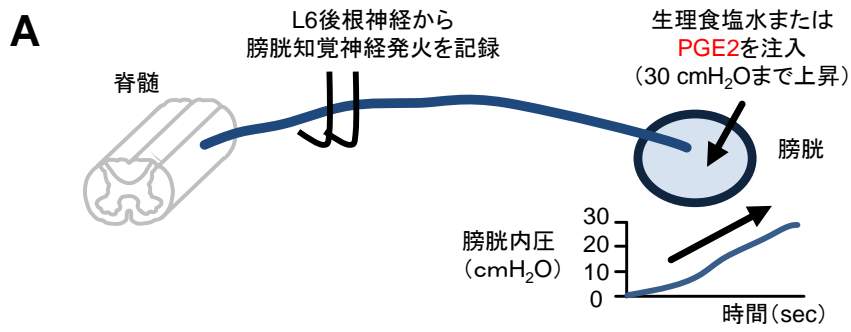


図5 膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経活動へのPGE2の作用

A 実験概要図。膀胱に生理食塩水またはPGE2溶液を注入し、膀胱内圧を30 cmH₂Oまで上昇させた際の、膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した。

B 30 cmH₂Oまで上昇させた膀胱内圧の代表トレース。生理食塩水を膀胱内へ注入した後(灰)、PGE2溶液(100 μM)に置換した(黒)。

C 膀胱内圧が10 cmH₂Oに達するまでに膀胱内に注入した生理食塩水(灰)とPGE2溶液(黒)の溶液量(*** $P < 0.001$, paired t -test, $n = 11$)。

D-G 低閾値のAδ線維(D)とC線維(E)、高閾値のAδ線維(F)とC線維(G)ユニットにおいて、PGE2非存在下(灰)、存在下(黒)での膀胱伸展刺激に対する平均発火頻度(左)と膀胱内圧閾値の平均値(中央)、PGE2処置によって膀胱内圧20 cmH₂Oでの発火頻度の増加が認められた線維の割合(右)(*** $P < 0.001$, paired t -test)。

A δ 線維は膀胱内圧の小さな周期的変動に 관련된活動を示す(結果)

膀胱伸展により惹起される膀胱内圧変化には、上述の大きな変化に加え、 ~ 2 cmH₂O の振幅、且つ ~ 10 秒程度の時間で周期的に繰り返す小さな変動が見られる (transient bladder pressure increase; TBPI)。これは、膀胱平滑筋の自発収縮活動を反映していることが示唆されている (Drake et al., 2003)。

この TBPI が膀胱知覚神経活動とどのように関連するかを検討した。膀胱へ注入する生理食塩水の量を調節して膀胱内圧を 10 cmH₂O に維持すると(図 6A)、膀胱内圧は 1.13 ± 0.12 cmH₂O の振幅、 5.26 ± 0.22 秒の時間間隔で周期的な変動を示した(図 6B、左上)。この TBPI に伴う膀胱知覚神経活動を測定した(図 6B、左下)。各 TBPI のピーク時間を 0 秒として平均化した膀胱内圧と、対応する各膀胱知覚神経の平均発火頻度を算出した(図 6B、右)。平均化した TBPI のピーク前後 1 秒間に有意な発火頻度の増加(ベースラインの膀胱内圧での膀胱知覚神経の平均発火頻度 + 1.96 標準偏差以上、5% 有意に相当)を示した膀胱知覚神経ユニットを、TBPI に 관련된活動を示したユニットとして定義した。A δ 線維ユニットでは 72.7% が TBPI に 관련된活動を示した一方、C 線維ユニットでは 15.4% のみに留まった(図 6B)。この結果は A δ 線維が C 線維よりも TBPI に対して反応性が高い線維であることを示唆している。

ここでの A δ 、C 線維ユニットは、膀胱内圧を 10 cmH₂O に維持した際に得られた神経活動であるため、膀胱内圧閾値が低閾値のユニットと考えられる。次に PGE2 の TBPI と、対応する膀胱知覚神経活動への作用を検討した。PGE2 処置により TBPI の振幅は有意に増加した(図 7A)。PGE2 処置前にも活動が確認されたユニット、処置後にもみ活動が出現したユニットが存在し、これらはそれぞれ膀胱内圧閾値が低閾値のユニット、高閾値のユニットと推測された(図 7B-E)。A δ 線維においては低閾値、高閾値ユ

ニットともに、TBPI に関連した発火頻度の増加が認められた(図 7B、D)。一方で、C 線維は低閾値、高閾値いずれのユニットにおいても、PGE2 処置前と同様、TBPI に関連した活動は認められなかった(図 7C、E)。

A δ 線維は膀胱内圧の小さな周期的変動に関連した活動を示す(考察)

過活動膀胱では、TBPIに振幅が大きくなる変化が生じ、この病的なTBPIに伴う膀胱から中枢への周期的かつ過剰な膀胱知覚神経シグナルの伝達が、尿意切迫感の一つのメカニズムであると示唆されている(Gillespie, 2004)。本研究では、A δ 線維がPGE2非処置のコントロール下でTBPIに関連した活動を示し、更に、PGE2処置下での過剰なTBPIに対しより強く関連した活動を示すこと、一方、C線維ではコントロール、PGE2処置下ともにTBPIに関連した活動は認められないことを明らかにした。この結果は、薬理的なTBPIの抑制で、より選択的にA δ 線維の活動が消失するという先行研究に一致する(Aizawa et al., 2012, 2015)。TBPIに対するA δ 、C線維の反応性の違いについては、後述の第三章で考察する。本研究の結果は、過活動膀胱患者の尿意切迫感がC線維の異常な活性化によって生じるとする、これまでの一般的な説に疑問を呈するものであり、過活動膀胱での異常な膀胱活動に対するA δ 線維の高い反応性が尿意切迫感のメカニズムである可能性を示唆している。

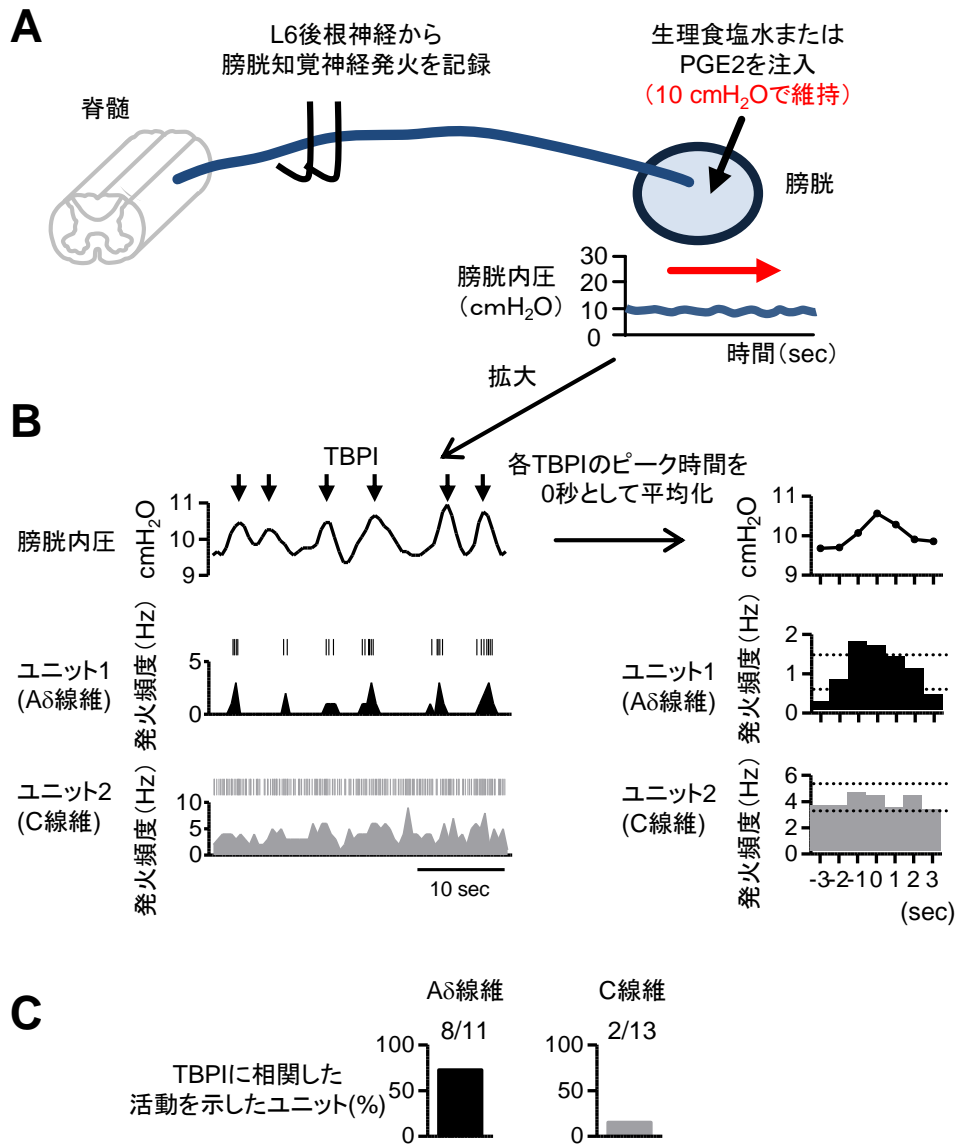


図6 A δ 線維は膀胱内圧の周期的変動に 관련된 活動を示す

A 実験概要図。膀胱に生理食塩水 (図6) またはPGE2溶液 (図7) を注入し、膀胱内圧を10 cmH₂Oに維持

した際の膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した。

B 左段、PGE2非処置下での膀胱内圧の代表トレース (上段) と、対応するユニット1 (A δ 線維, 中段) と

ユニット2 (C線維, 下段) の発火頻度のトレース。右段、膀胱内圧のトレース中にみられる小さな周期的

変動 (transient bladder pressure increase; TBPI, 矢印) の各ピーク時間を0秒として整列し平均化した、

膀胱内圧(上段)と、対応するユニット1(中段)とユニット2(下段)の発火頻度。各ユニットのヒストグラム
中で、下の点線はベースラインの膀胱内圧におけるユニットの平均発火頻度、上の点線はベースライン
の膀胱内圧におけるユニットの平均発火頻度+1.96標準偏差の発火頻度に相当する。ユニット1が
TBPIに 관련된 活動を示したのに対して、ユニット2ではTBPIのピークに従った発火頻度の増加は認め
られなかった。

C A δ 、C線維それぞれの、TBPIに 관련된 活動を示したユニットの割合(%)。

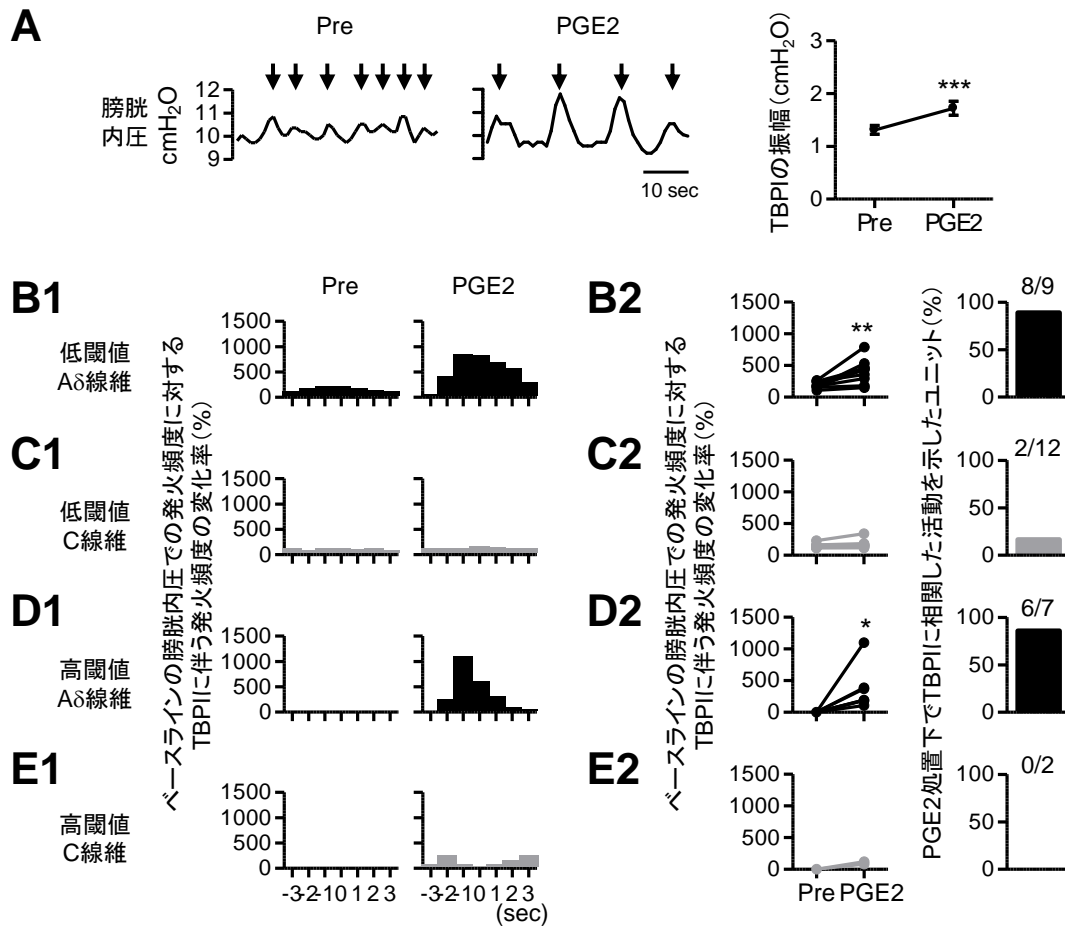


図7 膀胱内圧の周期的変動に伴う膀胱知覚神経活動に対するPGE2の作用

A 左段、PGE2処置前(Pre)、処置後(PGE2)での膀胱内圧の代表トレース。図中の矢印はTBPIを示す。

右段、TBPIの振幅(*** $P < 0.001$, paired t -test, $n = 10$)

B-E PGE2処置下での、TBPIに伴う膀胱知覚神経の発火頻度の変化を解析した。B、膀胱内圧閾値が

低閾値のA δ 線維ユニットにおいて、(B1) PGE2処置前(Pre)、処置後(PGE2)でTBPIに伴う発火頻度を

各々のベースラインの膀胱内圧における発火頻度で正規化した変化率の代表例。(B2左)各ユニットに

おけるTBPIに伴った発火頻度のPGE2処置による変化率(** $P < 0.01$, paired t -test)。(B2右)PGE2処置

下で、TBPIに相関した活動を示すユニットの割合。C-E、膀胱内圧閾値が低閾値のC線維(C)、高閾値

のA δ 線維(D; * $P < 0.05$, Wilcoxon test)、高閾値のC線維(E)ユニットで、B同様の解析を行った。膀胱内圧閾値に関係なく、A δ 線維ユニットはPGE2処置によりTBPIにより強く相関した活動を示し、C線維ユニットはPGE2処置下においてもTBPIに相関した活動は認められなかった。

【参考文献】

1. Aizawa N, Homma Y & Igawa Y (2012). Effects of mirabegron, a novel β_3 -adrenoceptor agonist, on primary bladder afferent activity and bladder microcontractions in rats compared with the effects of oxybutynin. *Eur Urol* **62**, 1165-1173.
2. Aizawa N, Homma Y & Igawa Y (2015). Effects of L-arginine, mirabegron, and oxybutynin on the primary bladder afferent nerve activities synchronized with reflexic, rhythmic bladder contractions in the rat. *Neurourol Urodyn* **34**, 368-374.
3. Aizawa N, Igawa Y, Andersson KE, Iijima K, Nishizawa O & Wyndaele JJ (2011). Effects of intravesical instillation of ATP on rat bladder primary afferent activity and its relationship with capsaicin-sensitivity. *Neurourol Urodyn* **30**, 163-168.
4. Aizawa N, Igawa Y, Nishizawa O & Wyndaele JJ (2010). Effects of CL316,243, a β_3 -adrenoceptor agonist, and intravesical prostaglandin E2 on the primary bladder afferent activity of the rat. *Neurourol Urodyn* **29**, 771-776.
5. Atiemo H, Wynes J, Chuo J, Nipkow L, Sklar GN & Chai TC (2005). Effect of botulinum toxin on

detrusor overactivity induced by intravesical adenosine triphosphate and capsaicin in a rat model. *Urology* **65**, 622–626.

6. Bahns E, Halsband U & Jänig W (1987). Responses of sacral visceral afferents from the lower urinary tract, colon and anus to mechanical stimulation. *Pflugers Arch* **410**, 296–303.

7. de Groat WC & Yoshimura N (2009). Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol* **194**, 91–138.

8. De Wachter S & Wyndaele JJ (2003). Intravesical oxybutynin: a local anesthetic effect on bladder C afferents. *J Urol* **169**, 1892–1895.

9. Dmitrieva N & McMahon SB (1996). Sensitisation of visceral afferents by nerve growth factor in the adult rat. *Pain* **66**, 87–97.

10. Drake MJ, Harvey IJ & Gillespie JI (2003). Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder. *Exp Physiol* **88**, 19–30.

12. Fowler CJ (2002). Bladder afferents and their role in the overactive bladder. *Urology* **59**, 37–42.

13. Gillespie JI (2004). The autonomous bladder: a view of the origin of bladder overactivity and sensory urge. *BJU Int* **93**, 478–483.

14. Granato C, Korstanje C, Guilloteau V, Rouget C, Palea S & Gillespie JI (2015). Prostaglandin E2 excitatory effects on rat urinary bladder: a comparison between the β -adrenoceptors modulation of non-voiding activity in vivo and micro-contractile activity in vitro. *NaunynSchmiedeberg's Arch Pharmacol* **388**, 727–735.

15. Häbler HJ, Jänig W & Koltzenburg M (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* **425**, 545–562.

16. Iijima K, Igawa Y, Wyndaele JJ & De Wachter S (2009). Mechanosensitive primary bladder afferent activity in rats with and without spinal cord transection. *J Urol* **182**, 2504–2510.

17. Ishiura Y, Yoshiyama M, Yokoyama O, Namiki M & de Groat WC (2001). Central muscarinic mechanisms regulating voiding in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 933–939.

18. Ishizuka O, Mattiasson A & Andersson KE (1995). Prostaglandin E2-induced bladder hyperactivity in normal, conscious rats: involvement of tachykinins? *J Urol* **153**, 2034-2038.
19. Kanai A & Andersson KE (2010). Bladder afferent signaling: recent findings. *J Urol* **183**, 1288–1295.
20. Khera M, Somogyi GT, Salas NA, Kiss S, Boone TB & Smith CP (2005). In vivo effects of botulinum toxin A on visceral sensory function in chronic spinal cord-injured rats. *Urology* **66**, 208-212.
21. Kim JC, Park EY, Hong SH, Seo SI, Park YH & Hwang TK (2005). Changes of urinary nerve growth factor and prostaglandins in male patients with overactive bladder symptom. *Int J Urol* **12**, 875–880.
22. Kim JC, Park EY, Seo SI, Park YH & Hwang TK (2006). Nerve growth factor and prostaglandins in the urine of female patients with overactive bladder. *J Urol* **175**, 1773–1776.
23. Lee T, Andersson KE, Streng T & Hedlund P (2008). Simultaneous registration of intraabdominal and intravesical pressures during cystometry in conscious rats – effects of bladder outlet obstruction and intravesical PGE2. *Neurol Urodyn* **27**, 88–95.

24. Masunaga K, Yoshida M, Inadome A, Iwashita H, Miyamae K & Ueda S (2006). Prostaglandin E2 release from isolated bladder strips in rats with spinal cord injury. *Int J Urol* **13**, 271–276.
25. Morrison JF (1997). The physiological mechanisms involved in bladder emptying. *Scand J Urol Nephrol Suppl* **184**, 15–18.
26. Pandita RK, Pehrson R, Christoph T, Friderichs E & Anderson KE (2003). Actions of tramadol on micturition in awake, freely moving rats. *Br J Pharmacol* **139**, 741–748.
27. Quian Quiroga R, Nadasdy Z & Ben-Shaul Y (2004). Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Comput* **16**, 1661–1687.
28. Ritter AM, Martin WJ & Thorneloe KS (2009). The voltage-gated sodium channel Nav1.9 is required for inflammation-based urinary bladder dysfunction. *Neurosci Lett* **452**, 28–32.
29. Rong W, Spyer KM & Burnstock G (2002). Activation and sensitisation of low and high threshold afferent fibres mediated by P2X receptors in the mouse urinary bladder. *J Physiol* **541**, 591–600.

30. Schurch B, Stöhrer M, Kramer G, Schmid DM, Gaul G & Hauri D (2000). Botulinum-A toxin for treating detrusor hyperreflexia in spinal cord injured patients: a new alternative to anticholinergic drugs? Preliminary results. *J Urol* **164**, 692-697.
31. Schüssler B (1990). Comparison of the mode of action of prostaglandin E2 (PGE2) and sulprostone, a PGE2-derivative, on the lower urinary tract in healthy women. A urodynamic study. *Urol Res* **18**, 349-352.
32. Sengupta JN & Gebhart GF (1994). Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *J Neurophysiol* **72**, 2420-2430.
33. Shea VK, Cai R, Crepps B, Mason JL & Perl ER (2000). Sensory fibers of the pelvic nerve innervating the rat's urinary bladder. *J Neurophysiol* **84**, 1924-1933.
34. Silva C, Ribeiro MJ & Cruz F (2002). The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input. *J Urol* **168**, 575-579.

35. Su X, Lashinger ES, Leon LA, Hoffman BE, Hieble JP, Gardner SD, Fries HE, Edwards RM, Li J & Laping NJ (2008). An excitatory role for peripheral EP3 receptors in bladder afferent function. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F585–F594.
36. Wada N, Matsumoto S, Kita M, Watanabe M, Hashizume K & Kakizaki H (2013). Effect of intrathecal administration of E-series prostaglandin 1 receptor antagonist in a cyclophosphamide-induced cystitis rat model. *Int J Urol* **20**, 235-240.
37. Yokoyama O, Ito H, Aoki Y, Oyama N, Miwa Y & Akino H (2010). Selective α 1A-blocker improves bladder storage function in rats via suppression of C-fiber afferent activity. *World J Urol* **28**, 609-614.
38. Yokoyama O, Yusup A, Miwa Y, Oyama N, Aoki Y & Akino H (2005). Effects of tolterodine on an overactive bladder depends on suppression of C-fiber bladder afferent activity in rats. *J Urol* **174**, 2032-2036.
39. Yoshimura N, Bennett NE, Hayashi Y, Ogawa T, Nishizawa O, Chancellor MB, de Groat WC & Seki S (2006). Bladder overactivity and hyperexcitability of bladder afferent neurons after intrathecal delivery

of nerve growth factor in rats. *J Neurosci* **26**, 10847–10855.

40. Zagorodnyuk VP, Gibbins IL, Costa M, Brookes SJ & Gregory SJ (2007). Properties of the major classes of mechanoreceptors in the guinea pig bladder. *J Physiol* **585**, 147–163.

第三章

間質性膀胱炎ラットモデルにおける 膀胱知覚神経活動解析

【背景】

間質性膀胱炎は、尿意切迫感、頻尿、疼痛を主訴とする疾患である (Driscoll et al., 2001)。尿意切迫感や頻尿は過活動膀胱にも共通する症状であるが、疼痛症状は間質性膀胱炎に特異的な症状である (Abrams et al., 2005)。この疼痛症状は、膀胱知覚神経のうち C 線維に起因することが示唆されている (Dickson et al., 2006; Mukerji et al., 2006)。しかし、間質性膀胱炎動物モデルにおいて C 線維活動の変化を直接的に捉えた報告はなく、特に、膀胱内圧変化との関連は不明であった。

膀胱内圧は生理学的特性として小さな周期的変動を生じる (transient bladder pressure increase; TBPI、第二章)。これは膀胱平滑筋の自発収縮活動を反映していることが示唆されている (Drake et al., 2003)。この TBPI は、間質性膀胱炎や過活動膀胱症状を示す患者 (Drake et al., 2005; Van Os-Bossagh et al., 2001) や、動物モデル (Chopra et al., 2005; Okinami et al., 2014; Granato et al., 2015) において、異常な変化を示すことが報告されている。シクロフォスファミド (CYP) 誘導間質性膀胱炎モデル (Chopra et al., 2005; Okinami et al., 2014) や PGE2 誘導過活動膀胱モデル (Granato et al., 2015) では、本章の図 8 のように、TBPI の振幅が病的に増大する。

膀胱知覚神経は、この病的な TBPI に反映される膀胱平滑筋の異常な収縮活動を感じ、中枢へと過剰な神経シグナルを伝達する。これが、尿意切迫感 (Gillespie et al., 2004) のような症状を惹起する、一つのメカニズムと考えられている (de Groat & Yoshimura, 2009)。先行研究においては、病態時の TBPI と膀胱知覚神経活動に関連があることは報告されてきたものの (Iijima et al., 2009; McCarthy et al., 2009; Zvara et al., 2010; Yu & de Groat, 2010, 2013)、詳細な生理学的特性は明らかでなかった。

第二章では、PGE2 誘導過活動膀胱モデルにおいて、C 線維ではなく A δ 線維が TBPI に対して高い反応性を示すことを明らかにした。本章では、CYP 誘導間質性膀胱炎モデルにおける TBPI と膀胱知覚神経の活動パターンの関連を解析し、PGE2 誘導過活動膀胱モデルと比較した。CYP 誘導モデルは、PGE2 誘導モデルと異なり、膀胱の炎症が生じるために (Malley & Vizzard, 2002; Auge et al., 2013)、排尿回数の増加や膀胱容量の減少といった過活動膀胱様症状に加え (Ozawa et al., 1999)、疼痛様行動を呈する (Lanteri-Minet et al., 1995; Boucher et al., 2000)。本研究から、これら 2 つのモデルで TBPI の病的変化が異なり、TBPI に対する膀胱知覚神経の活動パターンも両モデルで異なること、特に C 線維が CYP 誘導モデル選択的に TBPI への反応性を示すことを明らかにした。

【方法】

シクロフォスファミド(CYP)誘導間質性膀胱炎モデル

CYP(Shionogi Pharma, Osaka, Japan)は生理食塩水に溶解して(10 mg/ml)、膀胱知覚神経活動の測定実施 24 時間前に腹腔内投与(100 mg/kg)し、モデルを作製した。コントロール動物には、等量の生理食塩水を投与した。

膀胱伸展刺激に対する膀胱知覚神経の活動測定

第一章、第二章に記載の方法と同様に実施した。

データ解析・統計処理

各膀胱知覚神経ユニットは発火の波形の半値幅に基づき、A δ 線維と C 線維に分類した。膀胱内圧の周期的変動とそれに伴うユニット活動の解析方法は第二章と同様であるが、第三章では周期的変動に伴うユニットの平均発火頻度(各周期的変動の極大値前後 3 秒間における最大発火頻度の平均値)を、ベースラインの膀胱内圧でのユニットの平均発火頻度(膀胱内圧の極小値前後 1 秒間における発火頻度の平均値)で除した比率を算出し、この比率が 1.5 以上のユニットを、膀胱内圧の周期的変動に 관련된活動を示すユニットとして定義した。統計学的有意性の検定には Student's *t*-test、paired *t*-test、或いは Mann_Whitney U test を用い、用いた検定は図の説明文中に記載した。有意水準は 5%未満とした。数値は平均値±標準誤差で示した。

【結果と考察】

膀胱内圧の小さな周期的変動はCYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで異なる〈結果〉

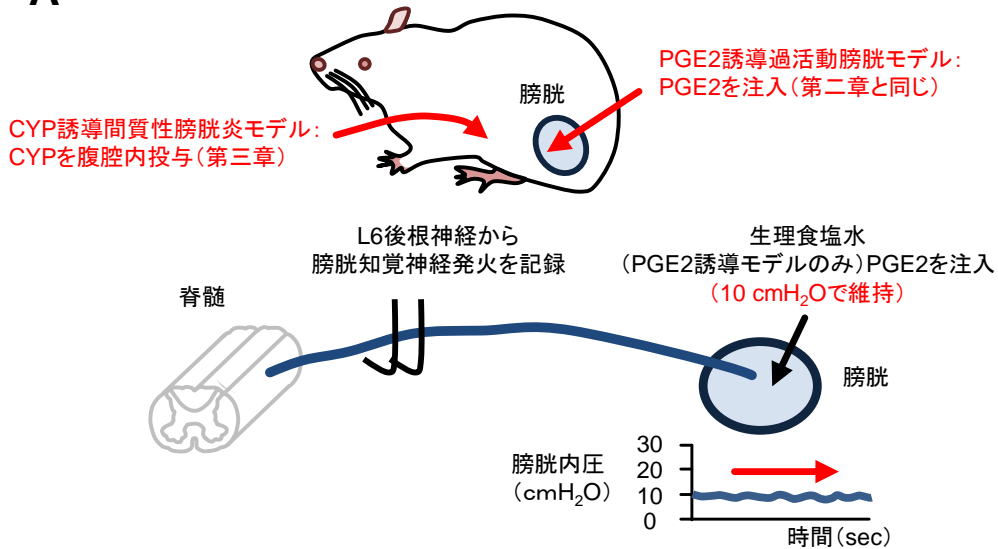
膀胱内圧を10 cmH₂Oに維持した際の(図8A)、正常ラットにおける膀胱内圧の小さな周期的変動(transient bladder pressure increase; TBPI)(図8B、D、左、control)が、CYP誘導モデル(図8B、右)とPGE2誘導モデル(図8D、右)でどのように変化するかを解析した。CYP誘導モデルでは、コントロール動物と比較して、TBPIの振幅、持続時間が有意に増加した(振幅:control, 1.0 ± 0.10 cmH₂O; CYP, 1.9 ± 0.088 cmH₂O, Student's *t*-test, $P < 0.001$; 持続時間:control, 7.6 ± 0.36 sec; CYP, 19.0 ± 1.7 sec, Student's *t*-test, $P < 0.001$)。一方で、TBPIの頻度は有意に減少した(control, 8.3 ± 0.34 /min; CYP, 3.5 ± 0.40 /min, Student's *t*-test, $P < 0.001$)(図8C)。PGE2誘導モデルでは、TBPIの振幅においては有意な増加が認められた(振幅:control, 1.1 ± 0.12 cmH₂O; PGE2, 1.6 ± 0.12 cmH₂O, paired *t*-test, $P < 0.01$)。一方で、TBPIの持続期間と頻度には変化は認められなかった(持続時間:control, 7.4 ± 0.44 sec; PGE2, 7.1 ± 0.29 sec, 頻度:control, 8.5 ± 0.42 /min; PGE2, 8.6 ± 0.34 /min, paired *t*-test)(図8D)。

膀胱内圧の小さな周期的変動はCYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで異なる〈考察〉

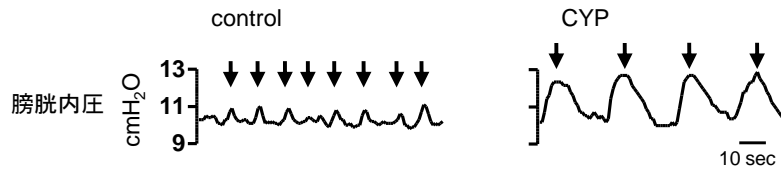
CYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで異なるTBPIが惹起された要因として、CYP誘導モデルでは、膀胱での炎症性因子の産生に加えて(Auge et al., 2013; Malley et al., 2013)、膀胱上皮のバリア機能の崩壊により、尿中に含まれる刺激物に膀胱平滑筋が反応して(Auge et al., 2013)、過剰な膀胱活動が惹起されたと考えられる。一方、PGE2誘導モデルでは、PGE2の膀胱平滑筋に対する直接的な作用や

(Parajuli et al., 2014)、膀胱上皮からのアセチルコリンやATP産生を介した間接的な作用によって
(Kanai et al., 2007; Nile et al., 2007; Akino et al., 2008; Wang et al., 2008)、膀胱平滑筋の収縮は促進
されるものの、膀胱上皮のバリア機能は崩壊しない。これらの生化学的、解剖学的メカニズムの違いが、
これら2つの動物モデルで異なるTBPIが惹起された要因であると推測される。

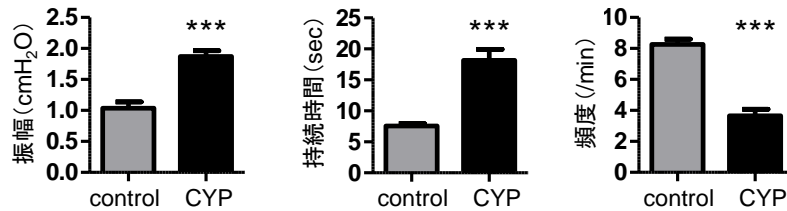
A



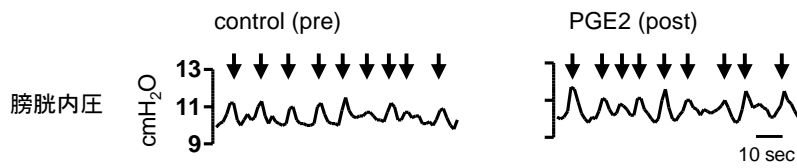
B CYP誘導モデル



C



D PGE2誘導モデル



E

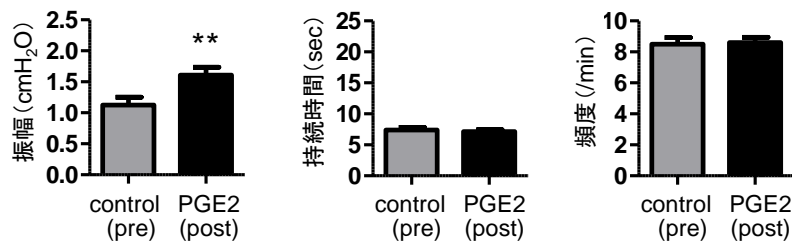


図8 CYP誘導モデルとPGE2誘導モデルにおける膀胱内圧の周期的変動の比較

- A** 実験概要図。CYP誘導間質性膀胱炎モデルは、CYPを試験24時間前に腹腔内投与して誘導した。
- PGE2誘導過活動膀胱モデルは、第二章と同様、膀胱への注入液を生理食塩水からPGE2溶液に置換して誘導した。膀胱に生理食塩水(PGE2誘導モデルではPGE2溶液)を注入して膀胱内圧を10 cmH₂Oに維持した際の、膀胱内圧と膀胱知覚神経活動を同時記録した。
- B** コントロール動物(左)とCYP誘導モデル(右)における、膀胱内圧の代表トレース。各トレース中での膀胱内圧の周期的変動(TBPI)を、矢印で示した。
- C** コントロール動物とCYP誘導モデルにおける、TBPIの振幅、持続時間、頻度の比較(control, N = 20 rats; CYP, N = 10 rats; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, Student's t -test)。
- D-E** B、Cと同様、PGE2処置前後での膀胱内圧の代表トレース(D)と、TBPIの振幅、持続時間、頻度の比較(E, N = 15 rats; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, paired t -test)。

TBPIに相関した活動を示す膀胱知覚神経の集団はCYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで異なる(結果)

まずコントロール動物において(図9A、左)、第二章と同様、A δ 線維(図9B、灰)とC線維(図9C、灰)の各ユニットのTBPIに伴う平均発火頻度と、ベースラインの膀胱内圧における平均発火頻度を算出した(図9B、C、左上、灰)。本章では、このTBPIに伴う発火頻度をベースラインの膀胱内圧における発火頻度で除した比率(以下、TBPIに伴う発火頻度比率と表記)を定量した(図9B、C、右上、灰)。この比率は、各膀胱知覚神経ユニットがTBPIにどの程度相関した活動を示すかの指標となる。ベースラインの膀胱内圧における発火頻度の平均値 ± 1.96 標準偏差(5%有意に相当)からベースラインの膀胱内圧における発火頻度の平均値を除した比率が 1.4 ± 0.052 であったことから、TBPIに伴う発火頻度比率が1.5以上のユニットを、TBPIに相関した活動を示すユニットと定義した(図9B、C、右上、図中の点線がTBPIに伴う発火頻度比率1.5に相当)。コントロール動物では、A δ 線維のうち75.9%のユニットがTBPIに相関した活動を示したのに対して(図9B、右下、灰)、C線維では10.3%のユニットのみが相関した活動を示し(図9C、右下、灰)、A δ 線維がC線維よりもTBPIに対して反応性が高い線維であることが示唆され、第二章に一致した結果となった。

次に、CYP誘導モデル(図9B、C、黒)とPGE2誘導モデル(図10B、C、黒)においても同様の解析を実施し、CYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで認められたTBPIの変化に対して、膀胱知覚神経の活動パターンがそれぞれどのように変化するか検討した。CYP誘導モデルにおいては、A δ 線維、C線維ユニットともに、TBPIに強く相関した活動が観察された(図9A、右)。A δ 線維では、コントロール動物でも

75.9%のユニットがTBPIに相関した活動を示していたが、CYP誘導モデルにおいては、この相関するユニットの割合が90.0%まで増加し(図9B、右下)、TBPIに伴う発火頻度比率も有意に増加した(図9B、左下)。C線維においては、コントロール動物では10.3%のユニットしか相関した活動を示さなかったのに対して、CYP誘導モデルでは94.1%のユニットが相関した活動を示し(図9C、右下)、TBPIに伴う発火頻度比率も有意に増加した(図9C、左下)。以上の結果から、CYP誘導モデルではA δ 線維、C線維ともにTBPIに強く相関した活動を示し、コントロール動物と比較した際の活動パターンの変化は、C線維でより顕著であった。PGE2誘導モデルにおいては、第二章に一致して、A δ 線維では、TBPIに相関した活動を示したユニットの割合がPGE2処置前後で77.8%から88.9%に増加し(図10B、右下)、TBPIに伴う発火頻度比率も有意に増加した(図10B、左下)一方、C線維においては、PGE2処置下でもTBPIに相関した活動を示したユニットの割合(図10C、右下)、TBPIに伴う発火頻度比率(図10C、左下)に変化は認められなかった。

(補足) A δ 線維とC線維の活動パターンは病的なTBPIに対して異なる時間的關係を示す

病態モデルでのTBPIの変化と、膀胱知覚神経の活動パターンの変化がどのように関連するか詳細に解析するため、CYP誘導モデル、PGE2誘導モデルにおけるTBPIの振幅と持続期間に対して、A δ 線維、C線維ユニットのTBPIに伴う発火頻度比率をそれぞれ図示すると、TBPIの振幅、持続期間に顕著な増加が認められたCYP誘導モデルでは(図9A、B)、A δ 線維、C線維ユニットともに、TBPIに伴う発火頻度比率がTBPIの振幅と持続期間に対して有意な相関を示した(図11A、A δ 線維、振幅： $r = 0.41$, $P =$

0.0014; 持続時間: $r = 0.49, P < 0.001$; C線維、振幅: $r = 0.58, P < 0.001$; 持続時間: $r = 0.72, P < 0.001$)。一方、TBPIの持続期間は変化せず、振幅のみ有意に増加したPGE2誘導モデルでは(図9C、D)、A δ 線維ユニットにおいて、PGE2処置前後でのTBPIに伴う発火頻度比率が振幅とは相関するが、持続時間との相関は認められなかった(図11B、振幅: $r = 0.50, P = 0.0020$; 持続時間: $r = 0.095, P = 0.58$)。C線維ユニットでは、TBPIに伴う発火頻度比率の増加が認められなかったため、TBPIの振幅、持続時間との相関も認められなかった。

加えて、これら病態モデルでのTBPIと膀胱知覚神経活動の時間的関係を解析した。TBPIのピーク時間を0秒として、TBPIに伴った膀胱知覚神経活動が最大発火頻度に到達した時間との差分を算出し、反応時間と定義した(図12A)。コントロール動物においては、A δ 線維ユニットの平均反応時間は0よりも有意に低い値であった(図12B、 $P < 0.001$)。これは、A δ 線維がTBPIのピークに先行して最大発火頻度に到達することを意味する。一方、C線維ユニットの平均反応時間は0と同等であった(図12B、 $P = 0.18$)。以上の結果は、TBPIに対してA δ 線維がC線維よりも早いタイミングで反応することを示している。この時間的關係は、CYP誘導モデルやPGE2誘導モデルにおいても保持される(図12B、A δ 線維:CYP、 $P < 0.001$; PGE2、 $P < 0.001$; C線維:CYP、 $P = 0.069$; PGE2、 $P = 0.82$)。なお、CYP誘導モデルにおけるA δ 線維ユニットの反応時間(-2.4 ± 0.21 sec)は、コントロール動物(-1.0 ± 0.10 sec)やPGE2誘導モデル(-0.92 ± 0.08 sec)の反応時間に比較して有意に小さな値であった。これは、CYP誘導モデルにおけるTBPIの持続時間が、コントロール動物やPGE2誘導モデルに比較して有意に長いことに起因するものと推測される(図8)。

TBPIに 관련된 활동을示す 膀胱知覚神經の集團はCYP誘導モデルとPGE2誘導モデルで異なる(考察)

A δ 線維とC線維のTBPIへの反応性の違いは、線維固有の発火特性に起因する可能性が考えられる。膀胱知覚神經は(1)外部刺激が与えられている間、活動が維持される持続的発火と、(2)外部刺激の開始に反応して、一時的に活動が発生する一過性発火の、2つの異なる発火様式をもつ(de Groat & Yoshimura, 2009)。A δ 線維は、コントロール動物においてTBPIに 관련된持続的な発火を示し、この活動はCYP誘導モデルで更に増強された(図9B)。一方でC線維は、正常状態では一過性の発火様式を示すのに対し(de Groat & Yoshimura, 2009)、CYP誘導モデルでは一過性発火から持続的発火へ発火様式を変化させることが報告されている(Yoshimura & de Groat, 1999)。これが、コントロール動物ではTBPIに 관련된活動を示さなかったC線維が、CYP誘導モデルでTBPIへの反応性を獲得した要因であると考えられる(図9C)。なお、PGE2誘導モデルでは、C線維での発火様式の変化は生じなかったと推測される(図10C)。これらの異なる発火様式は、A δ 線維とC線維におけるイオンチャネルの発現パターンや活性化レベルの違いに起因すると考えられる(de Groat & Yoshimura, 2009)。また、図11の相關結果からは、A δ 線維とC線維におけるTBPIへの反応性の違いを説明しうる、もう一つのメカニズムが考えられる。TBPIの振幅は増加するが持続時間は変化しないPGE2誘導モデルでは、TBPIにA δ 線維が反応する一方、C線維は反応を示さない(図11B)。TBPIの振幅も持続時間も増大するCYP誘導モデルでは、TBPIに対して、A δ 線維と同様にC線維の活動もTBPIの振幅や持続時間に相關を示す(図11A)。さらに、図12では各TBPIに対してA δ 線維がC線維に先行して発火することを示している。上記に記述し

た線維固有の発火様式とも併せて考えると、これらの結果は、A δ 線維が膀胱内圧のわずかな変化に対して、より高い感受性で反応することを示している。これらのA δ 線維とC線維の生理学的特性の違いは、transient receptor potential (TRP) channelsのような機械感受性チャネルの発現パターンの違い(Boudes et al., 2013)や、膀胱への投射パターンの違い(Gabella & Davis, 1998)に起因する可能性が考えられる。特に、A δ 線維は膀胱の主に平滑筋層に選択的に投射し、一方、C線維は上皮層、粘膜下層、平滑筋層の全ての層に広く投射する。このA δ 線維の投射パターンが、膀胱平滑筋の活動に起因するより小さく、より速い膀胱内圧変化を、A δ 線維が効果的に検出するメカニズムであると考えられる。

本研究の結果から、病態時における膀胱知覚神経の活動パターンの変化と、泌尿器症状との関連が推察できる。PGE2誘導過活動膀胱モデルは、排尿回数の増加、排尿間隔と膀胱容量の減少といった、過活動膀胱様症状を示す(Lee et al., 2008; Granato et al., 2015)。一方で、CYP誘導モデルは、膀胱の炎症により(Malley & Vizzard, 2002; Auge et al., 2013)、過活動膀胱様症状に加え(Ozawa et al., 1999)、疼痛様行動を呈する(Lanteri-Minet et al., 1995; Boucher et al., 2000)、間質性膀胱炎モデルの一つである。本研究では、PGE2誘導モデルでC線維ではなくA δ 線維がTBPIに高い反応性を示すのに対して、CYP誘導モデルではA δ 線維、C線維ともにTBPIに相関した活動を示すことを明らかにした。PGE2モデルでTBPIに対するC線維の活性化が認められなかったことは、過活動膀胱の症状に疼痛が付随しないことを説明する。間質性膀胱炎と過活動膀胱に共通する症状である尿意切迫感は、A δ 線維の活性化レベルの上昇に起因すること、間質性膀胱炎に特異的な症状である疼痛は主にC線維の活性化により生じることが、本研究の結果より推測される。

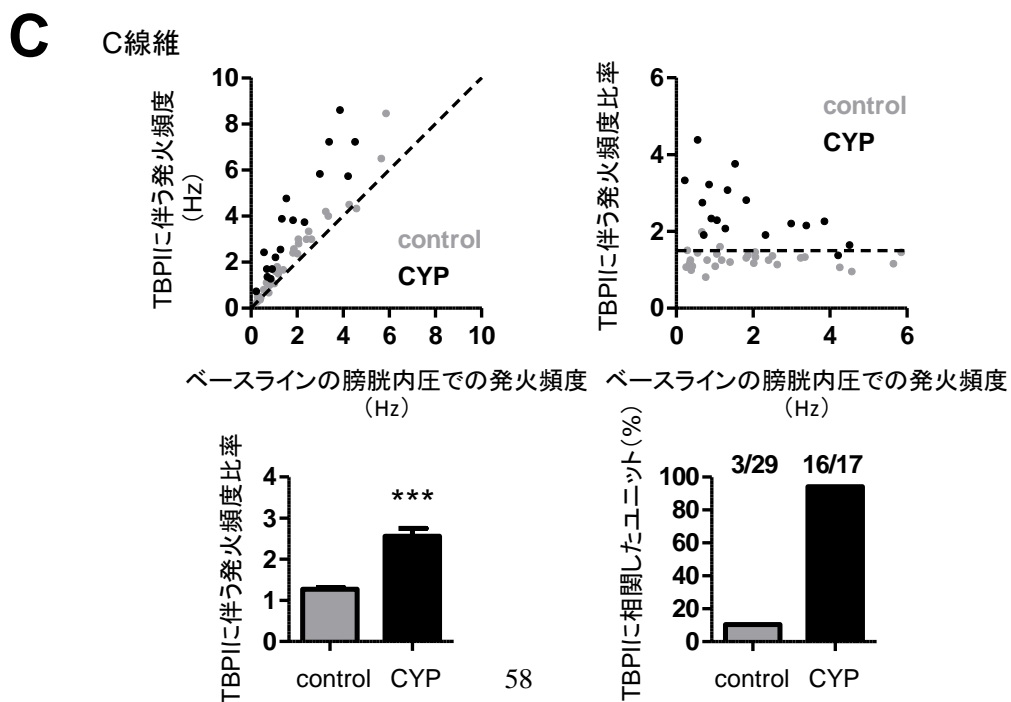
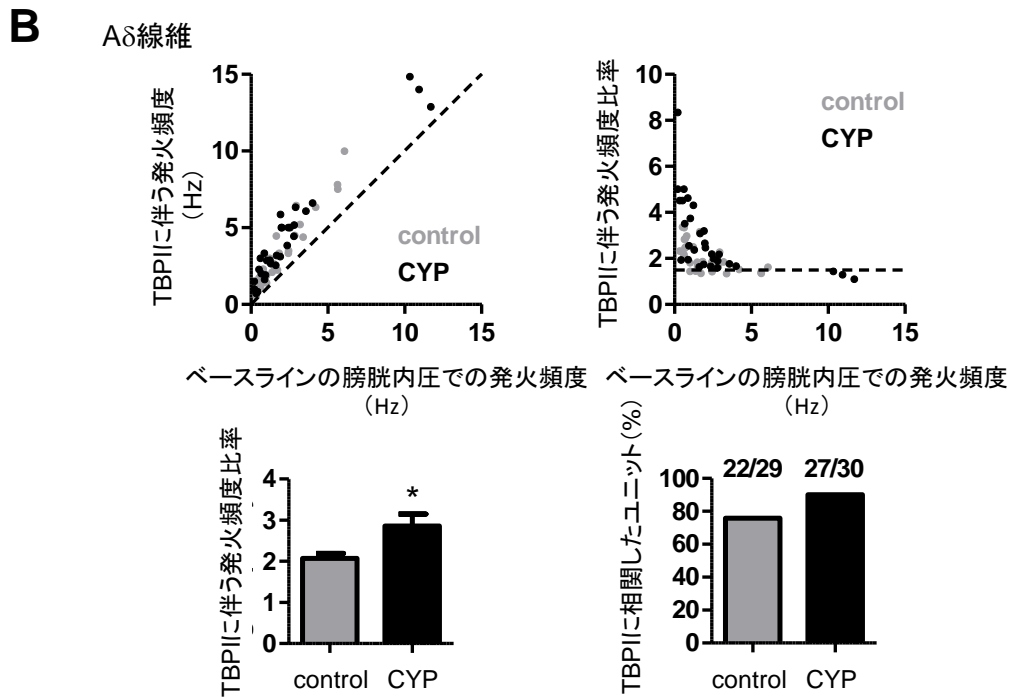
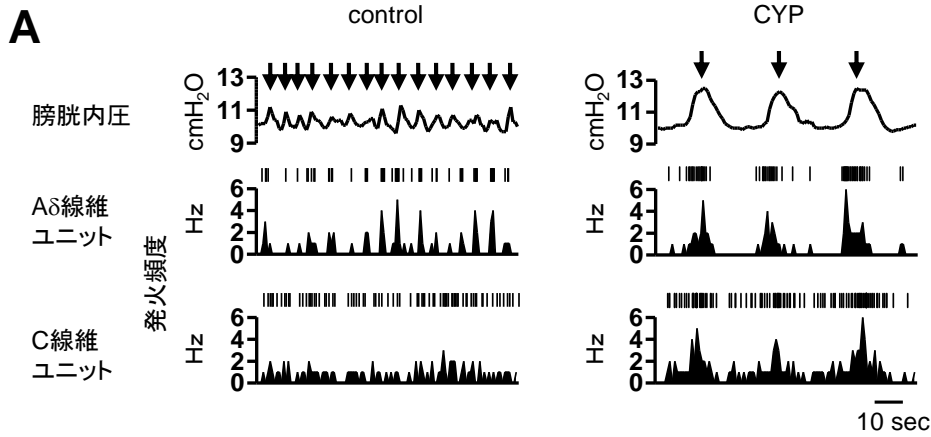


図9 コントロール動物とCYP誘導モデルにおける、TBPIに伴うA δ 線維とC線維の活動パターン

A コントロール動物(左)とCYP誘導モデル(右)における、膀胱内圧を10 cmH₂Oに維持した際のTBPI(上段)、対応するA δ 線維(中段)とC線維(下段)ユニットの発火頻度の代表トレース。膀胱内圧のトレース中の矢印は、TBPIを示す。

B コントロール動物とCYP誘導モデルの各A δ 線維ユニットで、ベースラインの膀胱内圧の時間に対応する平均発火頻度(X軸)と、TBPIのピーク時間に対応する平均発火頻度(Y軸)をそれぞれ算出した(上段、左)。各点が1つのユニットを表す(コントロール動物が灰、CYP誘導モデルが黒に対応)。図中の点線は傾き1の線であり、この線上の点は、TBPIに伴う発火頻度とベースラインの膀胱内圧における発火頻度が同じユニットであることを表す。次に、ベースラインの膀胱内圧での発火頻度(X軸)に対し、TBPIに伴う発火頻度からベースラインの膀胱内圧での発火頻度を除した比率(TBPIに伴う発火頻度比率、Y軸)を図示した(上段、右)。TBPIに伴う発火頻度比率が1.5以上のユニットを、TBPIに相関した活動を示したユニットとして定義した。図中の点線が1.5に相当する。下段には、コントロール動物とCYP誘導モデルのA δ 線維ユニットにおける、TBPIに伴う発火頻度比率(左、* $P < 0.05$, Mann-Whitney U test; control, n = 29 fibers from 17 rats; CYP, n = 30 fibers from 9 rats)と、TBPIに相関した活動を示したユニットの割合(右)を示した。

C コントロール動物とCYP誘導モデルの各C線維ユニットにおいて、Bと同様の解析を行った(** $P < 0.001$, control, n = 29 fibers from 15 rats; CYP, n = 17 fibers from 8 rats)。

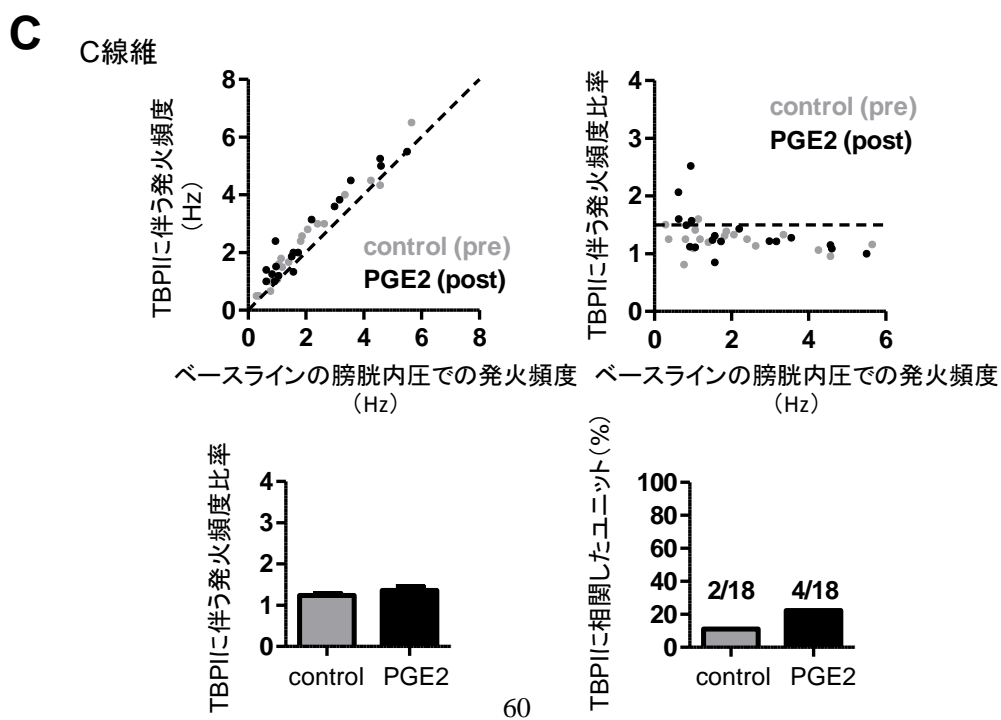
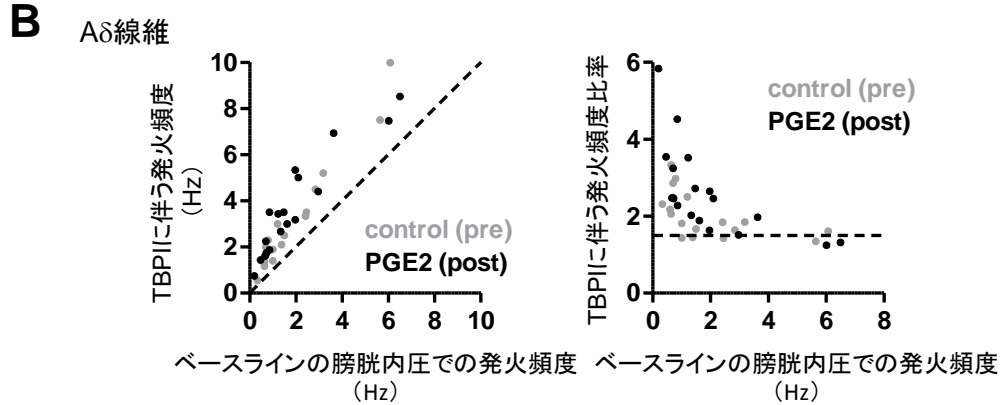
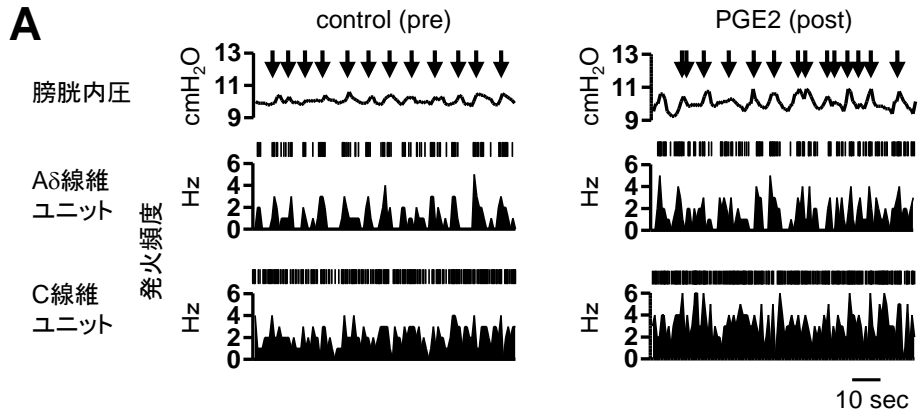
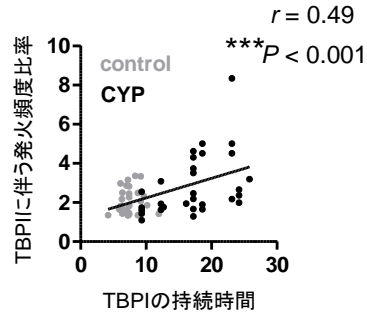
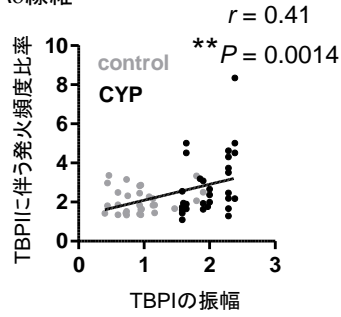


図10 PGE2誘導モデルにおけるTBPIに伴うA δ 線維とC線維の活動パターン

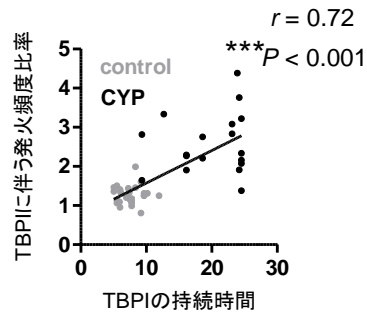
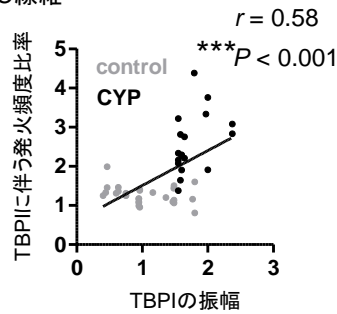
A-C PGE2処置前(control(pre))と、処置後(PGE2(post))において、図9と同様の解析を行った(* $P < 0.05$, paired t -test ; A δ fibers, $n = 18$ fibers from 12 rats; C fibers, $n = 18$ fibers from 10 rats)。

A CYP誘導モデル

A δ 線維

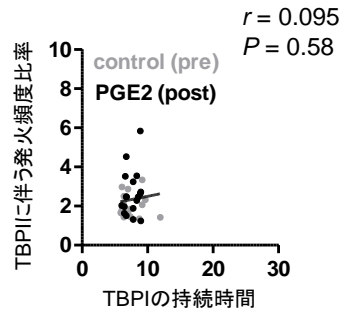
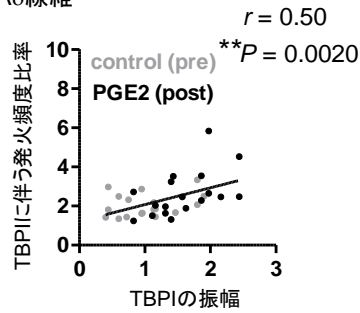


C線維

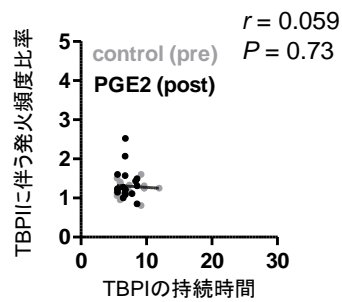
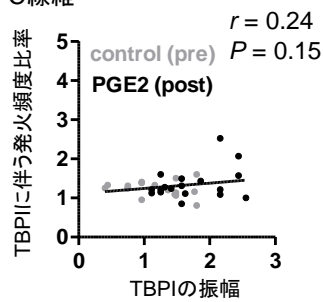


B PGE2誘導モデル

A δ 線維



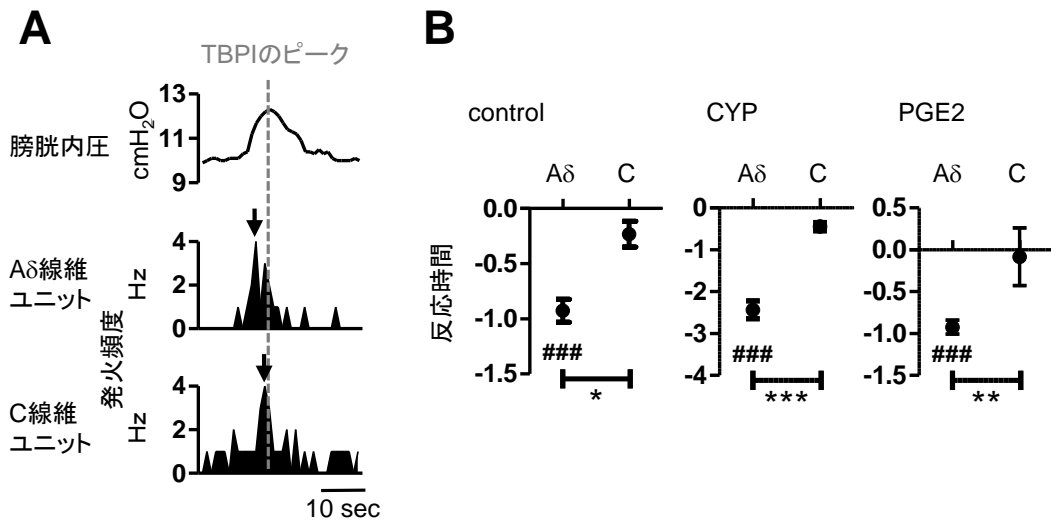
C線維



(補足)図11 CYP誘導モデルとPGE2誘導モデルにおけるTBPIと膀胱知覚神経活動の関係

A コントロール動物(灰)とCYP誘導モデル(黒)において、TBPIの振幅(左)と持続時間(右)に対する、A δ 線維(上)、C線維(下)ユニットのTBPIに伴う発火頻度比率を図示した。図中の線は回帰直線を表す。

B PGE2処置前(control (pre)、灰)と、処置後(PGE2(post)、黒)において、Aと同様の解析を行った。



(補足)図12 TBPIと膀胱知覚神経活動の時間的關係

A 各TBPIのピークで整列し平均化した膀胱内圧(上)と、対応するA δ 線維(中)、C線維(下)ユニットの発火頻度の代表例。図中の矢印は、A δ 線維またはC線維ユニットの最大発火頻度に対応する時間を示す。この時間と、TBPIのピーク時間(点線)との差分を、反応時間と定義した。

B コントロール動物、CYP誘導モデル、PGE2誘導モデルにおける、A δ 線維とC線維ユニットの平均反応時間。#は、A δ 線維またはC線維ユニットの反応時間と、0秒との比較における有意性を示す(paired *t*-test, $^{###}P < 0.001$)。*は、A δ 線維とC線維ユニットの反応時間の比較における有意性を示す(Student's *t*-test, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, control A δ fibers, $n = 22$ fibers from 15 rats; control C fibers, $n = 3$ fibers from 3 rats; CYP A δ fibers, $n = 27$ fibers from 9 rats; CYP C fibers $n = 16$ fibers from 8 rats; PGE2 A δ fibers, $n = 16$ fibers from 10 rats; PGE2 C fibers, $n = 4$ fibers from 3 rats)。

【参考文献】

1. Abrams P, Hanno P & Wein A (2005). Overactive bladder and painful bladder syndrome: there need not be confusion. *Neurourol Urodyn* **24**, 149–150.
2. Akino H, Chapple CR, McKay N, Cross RL, Murakami S, Yokoyama O, Chess-Williams R & Sellers DJ (2008). Spontaneous contractions of the pig urinary bladder: the effect of ATP-sensitive potassium channels and the role of the mucosa. *BJU Int* **102**, 1168–1174.
3. Auge C, Chene G, Dubourdeau M, Desoubzdanne D, Corman B, Palea S, Lluel P, Vergnolle N & Coelho AM (2013). Relevance of the cyclophosphamide-induced cystitis model for pharmacological studies targeting inflammation and pain of the bladder. *Eur J Pharmacol* **707**, 32–40.
4. Boudes M, Uvin P, Pinto S, Freichel M, Birnbaumer L, Voets T, De Ridder D & Vennekens R (2013). Crucial role of TRPC1 and TRPC4 in cystitis-induced neuronal sprouting and bladder overactivity. *PLoS One* **8**, e69550.
5. Boucher M, Meen M, Codron JP, Coudore F, Kemeny JL & Eschalier A (2000). Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model

of visceral pain. *J Urol* **164**, 203–208.

6. Chopra B, Barrick SR, Meyers S, Beckel JM, Zeidel ML, Ford AP, de Groat WC & Birder LA (2005).

Expression and function of bradykinin B1 and B2 receptors in normal and inflamed rat urinary bladder urothelium. *J Physiol* **562**, 859–871.

7. de Groat WC & Yoshimura N (2009). Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol* **194**, 91–138.

8. Dickson A, Avelino A, Cruz F & Ribeiro-da-Silva A (2006). Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* **141**, 1633–1647.

9. Drake MJ, Harvey IJ & Gillespie JI (2003). Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder. *Exp Physiol* **88**, 19–30.

10. Drake MJ, Harvey IJ & Gillespie JI & Van Duyl WA (2005). Localized contractions in the normal human bladder and in urinary urgency. *BJU Int* **95**, 1002–1005.

11. Driscoll A & Teichman JM (2001). How do patients with interstitial cystitis present? *J Urol* **166**, 2118–2120.
12. Gabella G & Davis C (1998). Distribution of afferent axons in the bladder of rats. *J Neurocytol* **27**, 141–155.
13. Gillespie JI (2004). The autonomous bladder: a view of the origin of bladder overactivity and sensory urge. *BJU Int* **93**, 478–483.
14. Granato C, Korstanje C, Guilloteau V, Rouget C, Palea S & Gillespie JI (2015). Prostaglandin E2 excitatory effects on rat urinary bladder: a comparison between the β -adrenoceptors modulation of non-voiding activity in vivo and micro-contraction activity in vitro. *NaunynSchmiedeberg's Arch Pharmacol* **388**, 727–735.
15. Iijima K, Igawa Y, Wyndaele JJ & De Wachter S (2009). Mechanosensitive primary bladder afferent activity in rats with and without spinal cord transection. *J Urol* **182**, 2504–2510.
16. Kanai A, Roppolo J, Ikeda Y, Zabbarova I, Tai C, Birder L, Griffiths D, de Groat W & Fry C (2007).

Origin of spontaneous activity in neonatal and adult rat bladders and its enhancement by stretch and muscarinic agonists. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, 1065–1072.

17. Lanteri-Minet M, Bon K, de Pommery J, Michiels JF & Menetrey D (1995). Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats: model elaboration and spinal structures involved as revealed by the expression of c-Fos and Krox-24 proteins. *Exp Brain Res* **105**, 220–232.

18. Lee T, Andersson KE, Streng T, Hedlund P (2008). Simultaneous registration of intraabdominal and intravesical pressures during cystometry in conscious rats – effects of bladder outlet obstruction and intravesical PGE2. *Neurourol Urodyn* **27**, 88–95.

19. Malley SE & Vizzard MA (2002). Changes in urinary bladder cytokine mRNA and protein after cyclophosphamide-induced cystitis. *Physiol Genomics* **9**, 5-13.

20. McCarthy CJ, Zabbarova IV, Brumovsky PR, Roppolo JR, Gebhart GF & Kanai AJ (2009). Spontaneous contractions evoke afferent nerve firing in mouse bladders with detrusor overactivity. *J Urol* **181**, 1459–1466.

21. Mukerji G, Yiangou Y, Agarwal SK & Anand P (2006). Transient receptor potential vanilloid receptor subtype 1 in painful bladder syndrome and its correlation with pain. *J Urol* **176**, 797–801.
22. Nile CJ & Gillespie JI (2012). Interactions between cholinergic and prostaglandin signaling elements in the urothelium: role for muscarinic type 2 receptors. *Urology* **79**, 240 e17–23.
23. Okinami T, Imamura M, Nishikawa N, Negoro H, Sugino Y, Yoshimura K, Kanematsu A, Hashitani H & Ogawa O (2014). Altered detrusor gap junction communications induce storage symptoms in bladder inflammation: a mouse cyclophosphamide-induced model of cystitis. *PLoS One* **9**, e104216.
24. Ozawa H, Chancellor MB, Jung SY, Yokoyama T, Fraser MO, Yu Y, de Groat WC & Yoshimura N (1999). Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol* **162**, 2211–2216.
25. Parajuli SP, Provence A & Petkov GV (2014). Prostaglandin E2 excitatory effects on guinea pig urinary bladder smooth muscle: a novel regulatory mechanism mediated by large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Eur J Pharmacol* **738**, 179–185.

26. Van Os-Bossagh P, Kosterman LM, Hop WC, Westerhof BE, de Bakker JV, Drogendijk AC & Van Duyl WA (2001). Micromotions of bladder wall in chronic pelvic pain (CPP): a pilot study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* **12**, 89–96.
27. Wang X, Momota Y, Yanase H, Narumiya S, Maruyama T & Kawatani M (2008). Urothelium EP1 receptor facilitates the micturition reflex in mice. *Biomed Res* **29**, 105–111.
28. Yoshimura N & de Groat WC (1999). Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. *J Neurosci* **19**, 4644–4653.
29. Yu Y & de Groat WC (2010). Effects of stimulation of muscarinic receptors on bladder afferent nerves in the in vitro bladder-pelvic afferent nerve preparation of the rat. *Brain Res* **1361**, 43–53.
30. Yu Y & de Groat WC (2013). Nitric oxide modulates bladder afferent nerve activity in the in vitro urinary bladder-pelvic nerve preparation from rats with cyclophosphamide induced cystitis. *Brain Res* **1490**, 83–94.
31. Zvara P, Wright AJ, Roach K, Ursiny M, Shapiro B, Dagrosa LM, Nelson MT & Heppner TJ (2010).

A non-anesthetized mouse model for recording sensory urinary bladder activity. *Front Neurol* **1**, 127.

【総括】

本研究では、成体ラットにおける膀胱知覚神経の活動測定法を確立し、本法を過活動膀胱モデル、および間質性膀胱炎モデルに適用し、その病態生理メカニズムを解析した。膀胱知覚神経は、正常時において個々の神経線維で異なる生理学的性質を持ち、多様な活動パターンを示す。病態時においても、膀胱知覚神経線維の種類によって特異的な調節がなされることで、泌尿器疾患の多様な症状に寄与することが示唆された。今回解明した病態生理メカニズムは、新規創薬ターゲット探索への貢献が期待される。

【謝辞】

本論文を作成するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷 裕二 教授、ならびに、杏林製薬株式会社わたらせ創薬センター 村上 浩二 副センター長に、謹んで感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ご協力を賜りました、杏林製薬株式会社創薬本部 萩原 幸一郎 副本部長、杏林製薬株式会社わたらせ創薬センター 谷岡 麻生 課長、杏林製薬株式会社わたらせ創薬センター 河合 智之 副主任研究員、ならびに、杏林製薬株式会社わたらせ創薬センターの皆様、心より感謝いたします。