

審査の結果の要旨

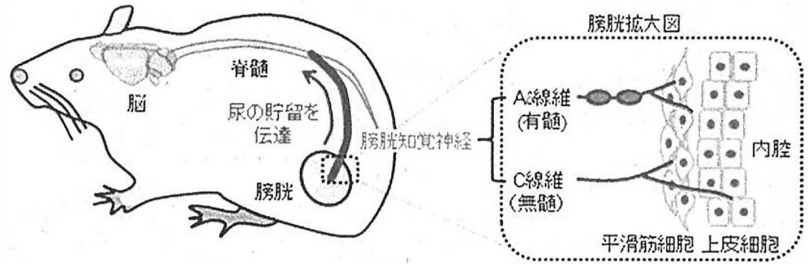
論文題目 泌尿器疾患ラットモデルにおける膀胱知覚神経活動の解析

氏名 佐々木 奈穂子 (旧姓 久我 奈穂子)

佐々木奈穂子 (旧姓 久我奈穂子) は、成体ラットにおける膀胱知覚神経の電気生理学的計測法を確立し、本法を泌尿器疾患の病態ラットモデルに適用して、病態生理メカニズムを解析した。

膀胱知覚神経は、膀胱における尿の貯留を感知して、膀胱から中枢へ情報を伝達することで、排尿機構に重要な役割を担う(図1)。代表的な泌尿器疾患に挙げられる過活動膀胱や間質性膀胱炎の症状は、膀胱知覚神経が膀胱の異常を感知し、その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のが主因と考えられている。膀胱知覚神経はA δ 線維とC線維に分類される。一般的には、A δ 線維が膀胱にお

図1



膀胱知覚神経の分類

膀胱知覚神経	一般的機能的役割	伝導速度	TTX感受性
A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

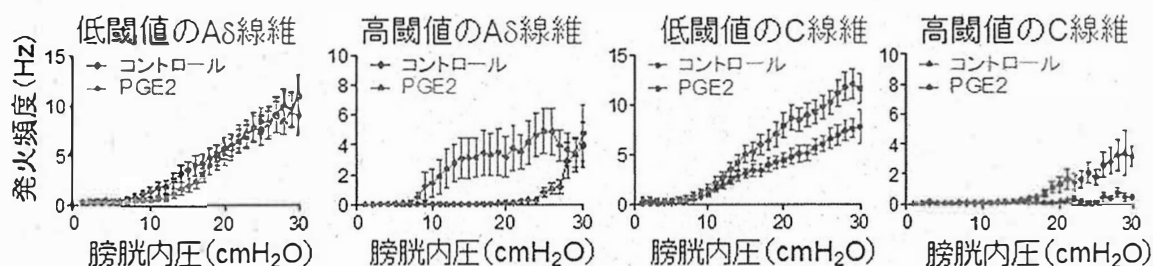
ける尿の貯留を感知する正常な機能を担うのに対し、C線維は過活動膀胱や間質性膀胱炎のような病態時に特異的に活性化して、症状の惹起に関与すると考えられてきた。しかし、A δ 線維とC線維の生理活動を詳細に記述した研究は、測定技術の難易度の高さ故に極めて少ない。更に、病態時にA δ 線維とC線維がいかに異常な活動を生じるかも不明であった。そこで、本論文では、成体ラットにおける膀胱知覚神経の電気生理学的計測法を確立し、本法を過活動膀胱ラットモデル、間質性膀胱炎ラットモデルに適用して、病態生理メカニズムを解析した。

まず、麻酔下のラットにおいて、*in vivo*細胞外記録法にて膀胱知覚神経の活動を記録する系を確立した。更に、A δ 線維とC線維の活動を分類する指標も新たに確立した。従来はA δ 線維とC線維の伝導速度の違いを利用した分類がなされてきたが、伝導速度の算出には骨盤神経を電気刺激する必要があり、実験手法を煩雑にしていた。本研究では、低用量(0.3 μ M)のテトロドトキシンを記録電極直下の神経に直接処置することで、A δ 線維とC線維の活動をより簡便に分類することを可能とした。

次に、本法を過活動膀胱ラットモデルに適用した。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、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。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 (PG E2) が広く知られている。過活動膀胱の患者や動物モデルの膀胱では PG E2 量の増加が認められる。更に、ヒトまたはげっ歯類の膀胱内に PG E2 を処置すると、膀胱平滑筋の過活動と膀胱知覚神経の発火頻度の増加が認められるとともに、過活動膀胱様の症状が観察される。そのため、PG E2 を膀胱に注入した動物モデルは、過活動膀胱

モデルとして汎用されている。これまで過活動膀胱における膀胱知覚神経の活動は、A δ 線維で変化せず、C線維が特異的に活性化し、症状を惹起するとの考えが一般的であった。しかし近年、過活動膀胱においてA δ 線維も過剰な活動を示すとの報告がなされている。このように議論が分かれる要因として、膀胱知覚神経の生理的特性が多様であることが挙げられる。しかし、個々のA δ 線維とC線維の活動に着目して、どのようなタイプの膀胱知覚神経が発火パターンを変化させるのかは完全には明らかでない。そこでPGE2で誘発した過活動膀胱ラットモデルから、単一のA δ 線維とC線維のユニット活動を解析した(図2)。まず、コントロールでの膀胱内圧上昇

図2



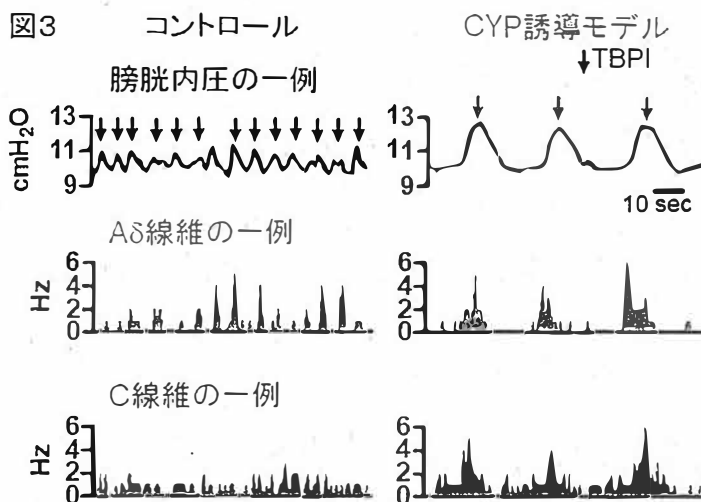
PGE2処置に対して反応した知覚神経の割合

A δ 線維		C線維	
低閾値	高閾値	低閾値	高閾値
7% (1/15)	100% (23/23)	48% (13/27)	100% (6/6)

に伴ったA δ 線維、C線維の各ユニット活動を解析し、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、膀胱内圧閾値が15 cmH₂O以下、以上のユニットを、それぞれ低閾値ユニット、高閾値ユニットと定義した。次に、過活動膀胱モデルとしてPGE2溶液を膀胱に注入すると、コントロールに比較して膀胱内圧の上昇が急速になった。膀胱内圧に対する各ユニットの発火頻度を、コントロールとPGE2処置下で比較した。A δ 線維の低閾値ユニットでは、ほぼ全てのユニットでPGE2による有意な発火パターンの変化は認められなかった。一方、高閾値ユニットでは全てのユニットで膀胱内圧閾値の低下と発火頻度の増加が認められた。C線維の低閾値ユニットでは、48.1%のユニットで発火頻度の増加が認められたが、膀胱内圧閾値に変化は認められなかった。高閾値ユニットではA δ 線維と同様、全てのユニットで膀胱内圧閾値の低下と発火頻度の増加が認められた。従来、A δ 線維はPGE2に反応せず、C線維のみ活性化して、過活動膀胱の症状に寄与すると考えられてきた。本研究の結果は、PGE2に対する膀胱知覚神経の反応性が一様でなく、膀胱知覚神経の種類や膀胱内圧閾値など、個々の神経で異なることを示している。また、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の症状には、C線維のみならず、A δ 線維も寄与しうることが本研究から示唆された。

さらに、間質性膀胱炎ラットモデルで同様の検討を行った。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。これらの症状は膀胱知覚神経のうちC線維に起因すると考えられてきたが、間質性膀胱炎モデルの成体動物から単一神経レベルでの膀胱知覚神経の活動を捉えた報告はなく、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振幅の小さな自発的振動を生じる(transient bladder pressure increase; TBPI)。TBPI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。間質性膀胱炎の患者や動物モデル

においては TBPI の振幅が増大し、患者では TBPI のピーク時に疼痛が付随した尿意切迫感が生じることから、TBPI に伴う膀胱知覚神経の過剰なシグナルが、これらの症状を惹起する一つのメカニズムであると提唱されている。TBPI と膀胱知覚神経の活動に関連があることは先行研究で報告されているが、特に病態モデルにおける単一神経レベルでの膀胱知覚神経の活動は明らかでなかった。間質性膀胱炎モデルとしては、免疫抑制剤のシクロフォスファミド (CYP) を用いて膀胱の炎症を誘導するモデルを採用した。膀胱の浮腫や上皮細胞の損傷、炎症性因子の増加といった解剖学的、生化学的所見の一致、頻尿、疼痛行動という間質性膀胱炎様の症状が確認できる、最も汎用のモデルである。本研究では、CYP 誘導モデルの TBPI と膀胱知覚神経の活動を解析した (図 3)。CYP 誘導モデルでは、コントロール動物に比較して、TBPI の振幅、持続時間が有意に増加した。この TBPI の変化に対する A δ 線維、C 線維のユニット活動の変化を解析したところ、A δ 線維ではコントロールでも 76%のユニットが TBPI に関連した活動を示すが、CYP 誘導モデルでは関連したユニットの割合が 90%に増加した。C 線維では、コントロールでは 10%のユニットしか関連した活動を示さないが、CYP 誘導モデルではこの割合が顕著に増加し 94%で相関が認められた。この CYP 誘導モデルでの変化に対し、第二章で用いた PGE2 誘導過活動膀胱モデルでも同様の解析を行った。過活動膀胱の患者や動物モデルでも、間質性膀胱炎と同様、TBPI の振幅が大きくなる変化が生じる。TBPI のピーク時に、患者で尿意切迫感が生じるのも間質性膀胱炎と同様であるが、間質性膀胱炎とは違って疼痛症状は付随しない。この症状の違いが膀胱知覚神経のどのような活動に起因するかを検討するべく、PGE2 誘導モデルでも解析した。PGE2 誘導モデルでは、コントロールに比較して TBPI の振幅は増加するが、持続時間に変化は認められなかった。この TBPI に対し、A δ 線維ユニットではコントロール、PGE2 誘導モデルともに、TBPI に関連した活動が認められ、関連したユニットの割合は PGE2 によって 78%から 89%に増加した。一方、C 線維ユニットではコントロール、PGE2 誘導モデルともに、TBPI に関連した活動は認められなかった。以上から、CYP 誘導モデルは A δ 線維、C 線維ともに TBPI に高い反応性を示すのに対し、PGE2 誘導モデルは、C 線維ではなく A δ 線維のみが TBPI に関連した活動を示すことが、本研究から明らかになった。この結果から、間質性膀胱炎と過活動膀胱に共通する症状の尿意切迫感は A δ 線維の活動が TBPI に対して相関が強くなることに起因し、一方で、間質性膀胱炎に特異的な症状である疼痛は主に C 線維の活動が TBPI に相関するようになることに起因することが推測される。



以上、本論文では、成体ラットから膀胱知覚神経活動を記録する系を確立し、過活動膀胱モデルおよび間質性膀胱炎モデルにおいて、膀胱の病的な変化に応じて、A δ 線維、C 線維が多様な活動パターンの変化を示すことを明らかにした。本研究は、A δ 線維、C 線維という解剖学的な分類に加え、生理特性も含めたより詳細な分類から、病態に関与する神経のポピュレーションを特定したという点において、更なる新規創薬ターゲットの探索に繋がることが期待される。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。