

博士論文

下部尿路閉塞雄性ラットにおける蓄尿障害の病態解析

杉山 梨乃

下部尿路閉塞雄性ラットにおける蓄尿障害の病態解析

東京大学大学院博士課程

医学系研究科外科学専攻泌尿器外科学分野

指導教官 本間 之夫 教授

杉山 梨乃

目次

	頁
要旨	1
序文	2-8
1. 下部尿路機能	2
2. 過活動膀胱	2-3
3. 前立腺肥大症	3-4
4. 下部尿路閉塞モデルラット	5-6
5. TRP チャネルの膀胱での役割	6-8
6. 膀胱における求心性神経活動	8-9
目的	10
方法	11-23
1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討	
	11-16
1-1. 下部尿路閉塞の作成方法	11-12
1-2. 24 時間排尿行動測定	12
1-3. 組織学的検討	12-13
1-4. 膀胱内圧測定	13-15
1-5. 使用薬物	15-16

1-6. 統計解析	16
2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化とその機能的意義の検討	16-19
2-1. リアルタイム PCR	16-18
2-2. 膀胱内圧測定	17
2-3. 使用薬物	19
2-4. 統計解析	19
3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化	20-23
3-1. 膀胱伸展受容一次求心性神経活動測定	20-21
3-2. 解析方法	21-23
3-3. 統計解析	23
結果	24-39
1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討	
.....	24-31
1-1. 24 時間排尿行動測定	24-25
1-2. 組織学的検討	25-26
1-3. 膀胱内圧測定	27-30
1-3-1. Sham 群と BOO 群の比較	27

1-3-2. イミダフェナシン、シロドシンおよび両薬物併用の効果・・・	27-31
2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化とその機能的意義の検討	31-35
2-1. リアルタイム PCR	31-32
2-2. 膀胱内圧測定	32-35
3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化	35-39
考察	40-47
1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討	40-43
2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化とその機能的意義の検討	43-45
3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿機能モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化	46-48
結論	48-49
謝辞	51
参考文献	52-65

要旨

下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害発現の病態解明のため、雄性ラットモデルを用いて排尿行動、膀胱内圧測定、膀胱の Transient Receptor Potential (TRP)チャネルの発現、膀胱求心性神経活動を検討した。モデルラットでは一回排尿量の低下・非排尿性膀胱収縮の増強などの蓄尿障害を認めた。膀胱粘膜では TRPA1 の発現が増大しており、その阻害薬で膀胱容量が増加した。膀胱微小収縮は増強し、膀胱伸展受容求心性神経のうち A δ 線維の活動は膀胱微小収縮に同期して増強した。TRPA1 の発現増加や膀胱微小収縮に伴う膀胱求心路の活性化が下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害の発現に関与することが示唆された。

序文

1. 下部尿路機能

下部尿路は、膀胱およびその排出路(膀胱頸部、尿道、外尿道括約筋)によって構成され、尿を膀胱に貯める“蓄尿”機能と尿を定期的に体外へ排出する“排尿”機能を併せ持つ。これらの機能の大部分は脳幹部の橋排尿中枢以下の自律神経の反射制御によって調節されている[1]。蓄尿時には下部尿路の神経支配は交感神経優位となり、交感神経終末からノルアドレナリン(NA)が放出される。放出された NA は、 β_3 アドレナリン受容体を介して膀胱平滑筋を弛緩するとともに、 α_1 アドレナリン受容体を介して尿道平滑筋を収縮することによって、尿は膀胱内に低圧で貯められて尿禁制を維持する。一方、排尿時には副交感神経が優位となり、その神経終末からアセチルコリン(ACh)と Adenosine triphosphate (ATP) が放出される。AChはムスカリン M3 受容体を、ATP は P2X1 受容体を介してそれぞれ膀胱平滑筋を収縮させ、排尿に至る。何らかの原因により排尿および蓄尿機能が障害される状態を下部尿路機能障害と呼び、排尿機能障害と蓄尿機能障害に大別される。具体的には、過活動膀胱や前立腺肥大症等の疾患が含まれる。

2. 過活動膀胱

過活動膀胱とは、尿意切迫感を必須症状とし、通常、頻尿・夜間頻尿を伴う症状症候群である[2]。日本では 40 歳以上で 12.4 % に過活動膀胱の症状がみられ、その約

半数には切迫性尿失禁を認めることが報告されている[3]。また、過活動膀胱患者において尿流動態検査を行うと、蓄尿期において膀胱の不随意収縮（排尿筋過活動）が検出されることが多く、この病態における背景因子としての関与が示唆されている[2]。

3. 前立腺肥大症

中高齢男性では加齢とともに前立腺が肥大し、尿道を閉塞すること（一般に下部尿路閉塞と呼ぶ）により下部尿路症状を呈し、前立腺肥大症の罹患率が増大することが報告され、この前立腺肥大症は排尿筋過活動を伴うことが多い[4]。下部尿路閉塞に伴い、尿排出が困難となると、膀胱は生理的な蓄尿機能を超えて尿を貯めることになり、その結果、膀胱は過伸展され、膀胱は虚血状態になる。他方、排尿直後には虚血状態が解消され、このような状況下で蓄尿および排尿が行われると、膀胱においては虚血・再灌流が繰り返されることが想定され、この状態が長く継続することにより、膀胱壁内神経や排尿筋には様々な変化が生じることが推測されている(図 1)。特に、膀胱壁内神経は虚血に対し脆弱であり、部分除神経の状態となる。その中でもコリン作動性神経の除神経の結果、膀胱平滑筋細胞は ACh に対し過敏な反応を示すようになる[5]。また、膀胱過伸展により平滑筋層は肥大化し、平滑筋に存在するギャップジャンクションの機能が亢進することにより細胞間の興奮性が高まり、平滑筋細胞が電氣的に同期して収縮しやすくなることも報告され、その結果、排尿筋過活動が生じると考えられている[6-8]。

現在の診療ガイドラインにおいては、前立腺肥大症に伴う下部尿路症状の改善には、 α_1 遮断薬の内服が第一選択となっている[9]。この α_1 遮断薬の作用機序は前立腺および尿道の平滑筋を弛緩させ、排尿症状を改善する直接的な効果が考えられるが[10]、近年ではそれ以外にも直接あるいは間接的な α_1 遮断薬の薬理作用により、蓄尿症状（過活動膀胱症状）を改善することが示唆されている[11-13]。また、 α_1 遮断薬のみで過活動膀胱症状の改善が見られなかった場合、抗コリン薬の併用が有効であるという報告があり、ガイドラインでも推奨されている[14, 15]。

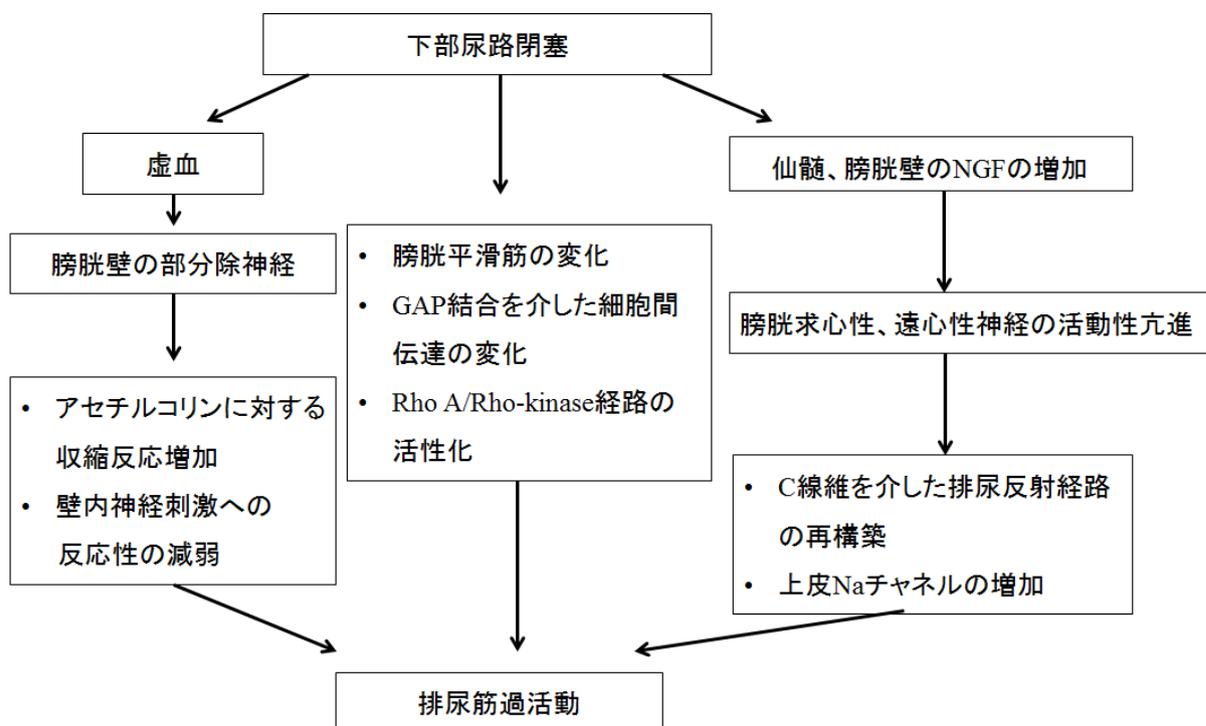


図1 下部尿路閉塞による排尿筋過活動の発生機序[16]

4. 下部尿路閉塞モデルラット

下部尿路閉塞(BOO: Bladder Outlet Obstruction)モデルは臨床的にはヒトの前立腺肥大症を想定して用いられている。尿道部分閉塞を作成することで、排尿筋肥厚[17-19]、膀胱重量の増大、コラーゲンの沈着および副交感神経終末の減少を認める[20]。さらに、ムスカリン受容体サブタイプのうち、膀胱上皮では M_2 受容体と M_3 受容体の発現が増加し、膀胱筋層では M_3 受容体の発現が増加する[21]。他方、 α_1 受容体サブタイプについては、膀胱組織で α_{1D} 受容体の発現が増加することが報告されている[22]。

また、膀胱機能の変化として、一回排尿量の減少・排尿間隔の短縮および非排尿性の膀胱収縮(NVCs: non-voiding contractions)の顕性化が観察される[23-25]。ラットを含めたげっ歯類において観察される NVCs は、ヒトにおいて観察される蓄尿期の排尿筋過活動の指標となると考えられている[26]。BOO ラットを用いた多くの報告では雌性ラットが用いられている。その理由として、雄性ラットは雌性ラットと比べて、尿道が解剖学的に複雑で、閉塞によって前立腺や精囊の導管を通じて尿が逆流するため部分尿道結紮によって十分な下部尿路閉塞を作ることが困難であることが挙げられる[27]。

一方で、臨床的には下部尿路閉塞を呈する代表的な病態は、男性において前立腺肥大に伴う器質的变化によってもたらされることから、上記のようなモデル動物作成の難点を克服した雄性ラットによる下部尿路閉塞モデルも用いられている。雄性下部尿路閉塞ラットの作成方法としては会陰部から尿道を結紮する手法と膀胱頸部を結紮する手法がある[25]。これらのモデルの膀胱機能の変化はいずれも閉塞期間 2-6 週で観

察されており、雌性ラットを用いた結果とほぼ同様に、膀胱重量の増加と膀胱内圧測定における最大排尿圧の上昇、NVCs の出現と膀胱容量の増加が確認されている。一方で、下部尿路閉塞後 6 日の時点を用いたより短期の評価においても、自然排尿行動測定上で排尿回数の増加を認めたとの報告があるが、膀胱内圧測定による詳細な膀胱機能の検討を行った報告はない[28, 29]。

5. TRP チャネルの膀胱での役割

Transient receptor potential (TRP) 遺伝子は 1989 年にシヨウジョウバエの光受容器異常変異株の原因遺伝子として同定された陽イオンチャネルである[30]。TRP チャネルの分子構造は 6 回膜貫通領域を持ち、N 末端、C 末端は細胞内に面しており、全身の臓器に広く発現し[31]、哺乳類では TRPC (canonical), TRPV(vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP(polysistin), TRPML(mucolipin)のサブファミリーから構成されている[32]。これらのチャネルはセンサーとしての機能をもっており、温度、機械刺激、浸透圧、痛み、フェロモン、pH の変化など様々な刺激で活性化される。

ラットおよびヒトの膀胱組織においては、TRPA1, TRPV1, TRPV4 および TRPM8 が尿路上皮、平滑筋、神経などに発現し、種々の刺激に対するセンサーとして、主に膀胱知覚路(求心性神経活動)に促進的に寄与している可能性が示唆されている[33-38]。

病態に伴う TRP チャネルの発現変化を検討した報告では、前立腺肥大症に伴う下部尿路症状を有する男性患者の膀胱組織においては、TRPA1 の発現増大が報告され、

雄性 BOO ラットでは TRPV1, V4 の発現増大が報告されている[35, 39-41]。また免疫染色を用いた検討では、膀胱において TRPM8 陽性神経は、特発性排尿筋過活動あるいは膀胱痛症状を有する患者において有意に増大していることも報告されている[42]。これらのチャネルの膀胱機能への関与についても、基礎的研究からアプローチされている。

TRPA1 チャンネルは、膀胱内に注入した刺激薬が排尿間隔を短縮させ、膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動の活動性を亢進させることが報告され、特に蓄尿時の膀胱求心性神経活動に対する促進的な役割が示唆されている[36, 43]。

TRPV1 欠損マウスを用いた報告では、膀胱伸展に伴う求心性神経のうち、膀胱内圧が 15 mmHg と低値の時に神経活動が増大する“低閾値神経”の神経活動が、野生型マウスと比較し減弱していたことから、TRPV1 が生理的な蓄尿時の膀胱求心性神経の興奮性に促進的な役割を持つことが示唆されている[44]。

TRPV4 は膀胱の尿路上皮細胞に発現しており、膀胱上皮の伸展刺激による ATP 放出に関与することから、蓄尿時のメカノセンサーとして重要な役割を持つことが報告され、チャンネル刺激により膀胱伸展にตอบสนองする求心性神経活動の増大も報告されている[33, 36, 45]。

健常雌性ラット膀胱において、TRPM8 の阻害薬である RQ-00203078 の静脈内投与は膀胱容量および排尿量を増加させ、膀胱伸展受容一次求心性神経活動のうち C 線維の活動を減少させることから、TRPM8 は蓄尿期の膀胱求心性神経活動において促進

的な役割をはたすことが示唆されている[46]。

この他にも近年では、TRPM4, TRPM7, TRPC の膀胱の機能への関与が示唆されている[47-49]。

6. 膀胱における求心性神経活動

下部尿路は、副交感神経の骨盤神経、交感神経の下腹神経、および体性神経の陰部神経という3種類の末梢神経によって神経支配を受けている。膀胱からの知覚伝達は主に骨盤神経を介して、仙髄(S2-S4) 後根神経節へ伝達される[1]。求心性神経線維は、有髄で神経伝達速度が速いA δ 線維と無髄で神経伝達速度の遅いC線維に分類される。ネコの骨盤神経を用いた求心性神経活動測定実験では、A δ 線維が膀胱の収縮および伸展などの機械的刺激に応答する[50]。一方、C線維は膀胱伸展に応答せず、膀胱内の化学的刺激や炎症によって反応する侵害受容器として働くことが知られており、その特性から“silent C線維”と呼ばれてきた経緯がある[51]。しかしながら、ラットにおいてはC線維もA δ 線維と同様に生理的な膀胱伸展に伴い神経活動が亢進することが知られている[52]。

特発性の排尿筋過活動を有する患者の膀胱から採取した排尿筋条片ではコントロールと比較して自発性収縮活動が増強していることが知られている[53]。また別の報告では、過活動膀胱女性患者において、尿意切迫感出現時には膀胱局所で発生する微小運動が確認されており、過活動膀胱の病態に膀胱の局所的な微小収縮（微小運動）

が関与する可能性が示唆されている[54]。この膀胱微小収縮は、健常ラットにおいても観察されることがあり、過去の報告では、 $\beta 3$ 作動薬が膀胱微小収縮の抑制と同時に $A\delta$ 線維の活動性を抑制することが報告されている[52]。これらの結果から、膀胱微小収縮の増強が膀胱求心性神経活動を亢進させ、その結果、過活動膀胱患者において尿意切迫感が誘発されている可能性が考えられるが、病態モデルにおいて、膀胱の微小収縮と求心性神経活動の関連性を詳細に検討した報告はない。

目的

本研究では、ヒトでの前立腺肥大症の病態を想定し、雄性ラットを用いた下部尿路閉塞モデル動物を作成し、その機能評価を行うことでヒト病態との相同性を検討した。加えて、前立腺肥大症に伴う蓄尿症状（過活動膀胱症状）の背景因子の探索を行い、病態機序の解明を目指すことを目的とした。具体的には以下に示す項目について、基礎的検討を行った。

1. 雄性下部尿路閉塞ラットの経時的な排尿行動変化を観察し、蓄尿症状（排尿回数増加と一回排尿量の減少）が最も顕著に認められた時期に、膀胱内圧測定、病理組織学的検討を行い、モデルの妥当性を評価した。さらに α_{1A} 遮断薬、抗コリン薬のそれぞれ単独投与および両薬の併用投与を行い、覚醒下膀胱内圧測定によって、その効果を偽手術群(Sham 群)と比較検討した。
2. 膀胱およびその求心路である L6 後根神経節・脊髄後角における各種 TRP チャネルの発現を mRNA レベルで Sham 群と下部尿路閉塞ラットで比較検討した。Sham 群と比較し、発現が増加していた TRP チャネルの阻害薬を投与して、覚醒下膀胱内圧測定を行い、その効果を検討した。
3. 下部尿路閉塞ラットの膀胱伸展受容一次求心性神経活動を測定し、膀胱微小収縮との関連性について検討した。

方法

本研究計画は、東京大学動物実験委員会の審査承認を得た(承認番号：医-P12-82)。実験には日本エスエルシー社(静岡、日本)より11週齢雄性Wistarラット(体重240-270g)を購入し使用した。ラットは実験に用いるまで12時間明暗条件下で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討

1-1. 下部尿路閉塞の作成方法(図2)

下部尿路閉塞モデルは過去の報告を参考にして作成した[28]。ペントバルビタール(30 mg/kg)腹腔内投与による麻酔下で、下腹部を正中切開し、周囲組織を損傷させないように前立腺を剥離し、膀胱頸部および尿道を露出させた。直径1.2 mmの金属棒を近位尿道に添え、尿道を3-0 ナイロン糸で一括に結紮した。金属棒を取り除き、結紮糸を膀胱頸部から約3 mm遠位の尿道に置き、閉腹し、下部尿路部分閉塞群(BOO: Bladder Outlet Obstruction)群とした。比較対照群として尿道周囲の剥離のみで結紮を行わない偽手術群(Sham群)を作成した。処置後のラットは1匹ずつケージに入れ飼育した。下部尿路閉塞作成により急性腎不全が発生することがあり、飼育中に明らかな衰弱を認めた場合は速やかに安楽死させた。

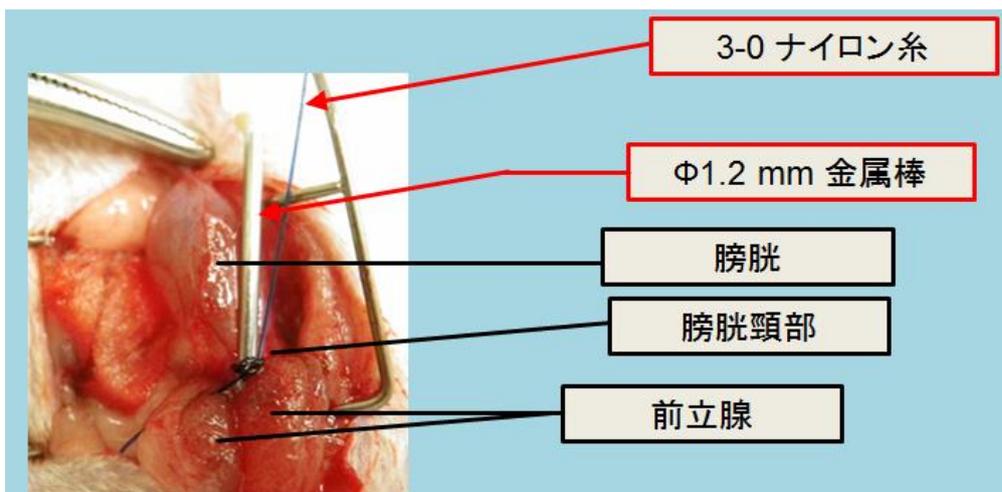


図2 下部尿路閉塞の作成方法

1-2. 24時間排尿行動測定

24時間排尿行動測定は精密代謝ゲージ (MCM-TOA/UF001 三菱化学メディエンス株式会社)を用い、術前24時間と術後4, 8, 16, および32日に行った。環境に馴化させるために、ラットを測定の24時間前に精密代謝ゲージに移し、翌日の午前9時から24時間の排尿回数、一回排尿量、平均尿流率、総排尿量および飲水量をPower lab データ収録システム (AD Instruments 社、Sydney, Australia) を用いて記録し解析に用いた。明暗条件は飼育時と同様に午前9時と午後9時に切り替わり、餌と水は自由に摂取させた。

1-3. 組織学的検討

Sham 群5匹およびBOO 群5匹を使用した。膀胱を摘出し、前壁を縦に切開し発泡スチロールに扇状に展開した状態で、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固

定し、パラフィン包埋した。その後、3 μm に薄切した。排尿筋の肥厚および線維化の評価のために、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)およびマッソン・トリクローム染色を行った。排尿筋の肥厚は無作為に 10 箇所を選び、その厚さを測り、平均値を評価した[55]。線維化はマッソン・トリクローム染色を用いて評価した。高倍率(400 倍)で、排尿筋内から無作為に 4 視野を選び、組織全体と青染部位(線維化)の面積を計測し、その割合を求め、平均を評価した[56]。画像の解析は Image J software(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を使用した[57]。

1-4. 膀胱内圧測定

膀胱内圧測定は、BOO 群の 24 時間排尿行動測定において排尿回数の増加と一回排尿量の減少が最も顕著であった時期を選んで行った。ペントバルビタール (30 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下で、下腹部を正中切開し、膀胱を露出させた。膀胱頂部に小切開を加え、ポリエチレンカテーテル (PE-50, Clay Adams 社, Parsippany, NJ) を膀胱頂部から挿入し、5-0 ナイロン糸でカテーテル挿入部周囲を結紮・閉鎖した。PE-50 カテーテルは膀胱頂部より 5 cm の部位を熱溶解によって閉じ、腹部皮下に留置した後、閉腹した。

膀胱内にカテーテルを留置して 2 日後にイソフルラン吸入麻酔下で左頸静脈を剥離し、薬物投与のための PE-50 カテーテルを留置した。その後、ラットを拘束ゲージ (KN-356, 夏目製作社、東京、日本) に入れ、麻酔から十分に覚醒させるために 90 分間

安置させた。膀胱留置カテーテルは三方活栓を経由し、圧トランスデューサー(DX-100: 日本光電社、東京、日本)とシリンジポンプ(KDS100: 室町機械株式会社、東京、日本)に接続した。圧トランスデューサーは圧力アンプ(AP-600G, AP601G: 日本光電社、東京、日本)に接続し、シリンジポンプを用いて生理食塩水を膀胱内に注入することで膀胱内圧を測定した。生理食塩水は 6 mL/h で注入し、排尿が起きた時点で注入を停止し、膀胱カテーテルから自然滴下による残尿回収を 10 分間行った。この膀胱内圧測定を 3 回繰り返し、最後の測定を基準値とした。基準値の測定後、シロドシン(選択的 α_1 遮断薬、0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) またはイミダフェナシン(抗コリン薬、1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) をそれぞれ単独で静脈内累積投与してその効果を評価した。さらに別の動物を用いて、それぞれの薬物を単独投与した場合には効果を示さない用量で両薬物を併用投与した場合の効果も検討した。測定した膀胱内圧測定パラメーターは以下の通りである。(図 3)

1. 基礎圧：膀胱内圧の測定開始から排尿まで(蓄尿期)の膀胱内圧の最低値
2. 排尿閾値圧：排尿直前の膀胱内圧
3. 最大排尿圧：排尿性膀胱収縮の最大値
4. 一回排尿量：一回排尿での尿重量
5. 残尿量：排尿後、膀胱カテーテルから自然滴下で回収した尿重量
6. 膀胱容量：排尿量と残尿量の和
7. 平均尿流率：排尿量を排尿にかかった時間で割った率

8. 非排尿性膀胱収縮(NVCs: non-voiding contractions): 排尿を伴わない膀胱収縮。

Sham 群と BOO 群の比較には、排尿前 3 分間の振幅 3 cmH₂O 以上の収縮を NVCs と定義して、その数と振幅の平均を解析した。BOO 群における薬物の効果の評価では詳細な影響を観察するために振幅のカットオフ値を 1, 2, 3 cmH₂O 以上に分けて検討した。

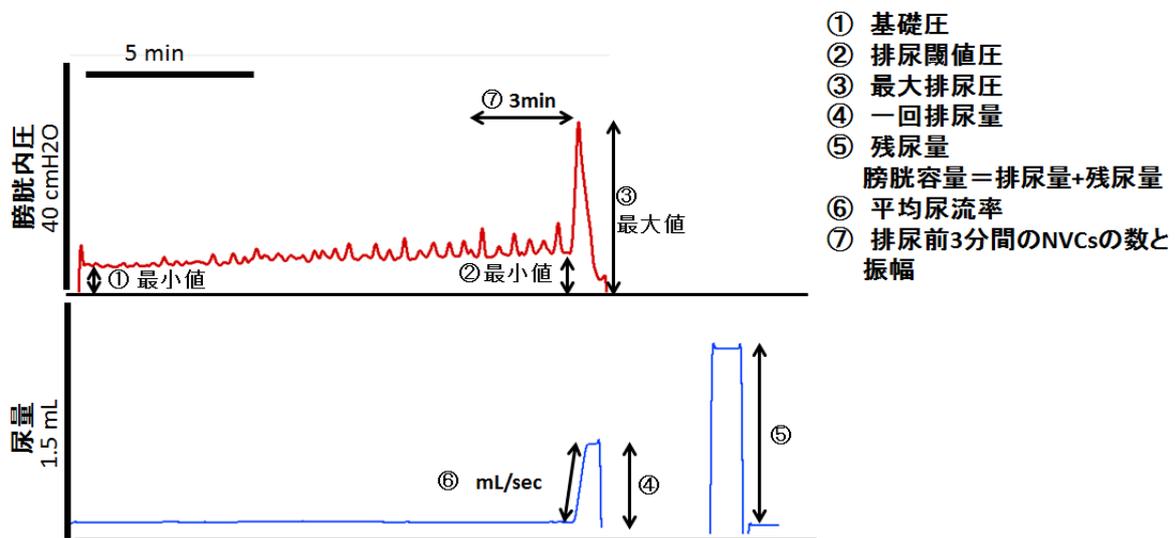


図3 膀胱内圧パラメータの定義

1-5. 使用薬物

選択的 α_{1A} 遮断薬として、キッセイ薬品株式会社(松本、日本) から提供されたシロドシン ((-)-1-(3-hydroxypropyl)-5-[(2R)-2-({2-[2-(2,2,2-trifluoro-ethoxy)phenoxy]ethyl} amino)propyl]-2,3-dihydro-1H-indole-7-carboxamide) を使用した。抗コリン薬としては、杏林製薬株式会社(東京、日本)から提供されたイミダフェナシン

(4-(2-Methyl-1H-imidazol-1-yl)-2,2-diphenylbutanamide)を使用した。シロドシンはハルトマン液(NaCl 0.6, KCl 0.03, CaCl₂ 0.02 および lactic acid 0.3 w/v%) に溶解し、0.1, 1, 10, 100 µg/mL に希釈した。イミダフェナシンは 1 M HCl を含む生理食塩水に溶解し、1 M NaOH で中和し、生理食塩水で 1, 3, 10 µg/mL にそれぞれ希釈した。これらの投与濃度は過去の報告を参考に決定した[58, 59]。

1-6. 統計解析

Sham 群と BOO 群の群間比較には、unpaired Student's t-test あるいは unpaired Welch's t-test(データが非正規分布の場合) を用いた。薬物の併用投与前後の比較には、Paired Student's t-test を用いた。24 時間排尿行動測定および膀胱内圧測定における薬物の単独投与前後の比較には、繰り返しのある一元配置分散分析を用い、その後 Dunnett's test を行った。P<0.05 をもって統計学的に有意と判断した。統計解析には統計解析ソフト JSTAT 6.7 for Windows を使用した。

2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャネルの発現変化と

その機能的意義の検討

2-1. リアルタイム PCR

先に述べたように雄性 Wistar ラットを用いて Sham 群および BOO 群を作成した。Sham 群 6 匹および BOO 群 6 匹を使用し、膀胱およびその求心路である L6 後根神経

節・脊髄後角において、各種 TRP チャンネルの mRNA 発現の変化を検討した。

術後 10 日後にラットをペントバルビタール麻酔薬の腹腔内過量投与により深麻酔し、安楽死させた。下腹部を切開して膀胱を摘出し、膀胱重量を測定した。また、Th10-S2 レベルで椎弓切除を行い、両側 L6 後根神経節とその投射先である脊髄後角を摘出した。膀胱体部は正中で左右 2 つに分け、1 つを膀胱全層標本とし、もう一方は薬匙を使用し、粘膜と排尿筋層に分けた。採取した標本は RNAlater® RNA Stabilization Reagent(Qiagen 社, Valencia, CA, USA)にいれ、-20°Cで保存した。Total RNA は RNeasy® Mini Kit (Qiagen 社)を用いて抽出した。その後 QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen 社)を用いて cDNA を逆転写反応によって合成した。PCR は SYBR® Green PCR Master Mix(Thermo Fisher Scientific 社, CA, USA) および、ABI® 7300 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)を用いて行った。プライマーは過去の報告を参考に決定した[55, 60, 61]。(表 1)

表 1 リアルタイム PCR プライマー

rTRPA1	ATTGCGGCCTGAGTTTT	GCGTACATCCATCATTGTCCT
rTRPV1	GGTGTGCCTGCACCTAGC	CTCTTGGGGTGGGGACTC
rTRPV2	GGGATGGTACCCCTGATGA	TCTCCAAGCAACCCAAT
rTRPV4	CTCTCCTCCCTGGATACGTG	ATCTCATGGCGGTTCTCG
rTRPM2	GAAGGAAAGAGGGGTGTG	CATTGGTGATGGCGTTGTAG
rTRPM4	AGTTGAGTCCCCCTGGACT	AATCCAGTCCCTCCCACTC
rTRPM8	CTCCTGGTCGCCATGTTT	GGAACTCCAGACCTGATCG
rTRPC1	AGCCTCTTGACAAACGAGGA	ACCTGACATCTGTCCGAACC
rTRPC2	TTGCTGGGAGAGTCTCTGGT	CCTCGATCCACACCTCCTTA
rTRPC3	GAGATCTGGAATCGGTGGAA	AAAAGCTGCTGTTGGCAGTT
rTRPC4	GACACGGAGTCCAGAGAGC	GTTGGGCTGAGCAACAAACT
rTRPC5	CCGCAAGGAGGTGGTAGG	TGTGATGTCTGGTGTGAACTC
rTRPC6	TACTGGTGTGCTCCTTGACG	GAGCTTGGTGCCTTCAAATC
rTRPC7	AACGAGACCTTCACAGACTAC	GCATTGAGACCAGATCATTCC
r β -actin	ACGGTCAGGTCATCACTATC	TGCCACAGGATTCCATAACC

2-2. 膀胱内圧測定

術後 8 日後に先に述べたように膀胱頂部より PE-50 カテーテルを留置した。膀胱内にカテーテルを留置して 2 日後（術後 10 日）にイソフルラン吸入麻酔下で左頸静脈を剥離し、薬物投与のための PE-50 カテーテルを留置し、拘束ゲージに入れた。膀胱内圧測定方法は前述のとおりである。

投薬前の基準値の測定後、以下の薬物を投与し、その効果を評価した。

- (1) TRPA1 阻害薬の HC-030031(HC: 0.1, 1, 10 mg/kg)または溶媒を静脈内累積投与
- (2) TRPV1 阻害薬の SB-366791(SB: 0.5 mg/kg)または溶媒を静脈内投与
- (3) HC(500 μ M, 300 μ L) または溶媒を膀胱内投与し、1 時間後に同じ HC または溶媒液を用いて膀胱内圧を 1 回測定

2-3. 使用薬物

HC は Sigma-Aldrich 社(St. Louis, MO, USA)、SB は Tocris Bioscience 社(Ellisville, MO, USA)より購入した。HC はジメチルスルホキシド(80%)と Tween20(20%)に溶解し、100 mg/mL とし、蒸留水で 0.1, 1, 10 mg/mL および 500 μ M にそれぞれ希釈した。SB は 50 mg/kg の濃度でジメチルスルホキシドに溶かし、投与前にジメチルスルホキシド(3.5%)、Cremophor EL (6.5%, ナカライテスク社、京都、日本)、生理食塩水(90%)溶液で 0.5 mg/mL に希釈した。これらの投与濃度は過去の報告を参考に決定した[36, 62, 63]。

2-4. 統計解析

Sham 群と BOO 群の群間比較には unpaired Student's t-test を用いた。SB 静脈内投与および HC 膀胱内投与での膀胱内圧パラメーターの薬物投与前後の比較には、paired Student's t-test を用いた。HC 静脈内累積投与時の膀胱内圧測定の結果の解析には繰り返しのある一元配置分散分析を用い、その後 Dunnett's test を行った。P<0.05 をもって統計学的に有意と判断した。

3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化

3-1. 膀胱伸展受容一次求心性神経活動測定

先に述べたように Sham 群および BOO 群を作成した。Sham 群 10 匹および BOO 群 10 匹を使用し、膀胱伸展受容一次求心性神経活動を測定し膀胱微小収縮との関連性について検討した。

術後 10 日のラットにウレタン (1.2 g/kg) を腹腔内投与し麻酔した。ラットの体温は保温マットを用いて 38°C に維持した。下腹部の左側を切開し、両側の尿管を結紮し、膀胱頂部から膀胱内圧測定のための PE-50 カテーテルを留置した。次に、左側骨盤神経を同定し周囲の組織から剥離し、双極銀電極に乗せて Wacker Silgel (Wacker Chemie 社, Munich, Germany) によって固定した。椎弓切除を行い、両側の L6 後根神経を切断した。ラットの背部皮膚をプール状に展開し、38°C に温めたパラフィンオイルで満たした。左側 L6 後根神経を細く裂き、シールド双極銀電極に乗せ、骨盤神経電気刺激および膀胱内生理食塩水注入によって反応する神経活動を単一ユニットで単離・導出した。これらの活動電位は Spike2 ソフトウェア (CED 社, Cambridge, UK) を用いて記録・解析を行った。伝導速度は刺激電極と記録電極の距離と骨盤神経を電気刺激した際の潜時から計算し、伝導速度が 2.5 m/s 以上の場合を A δ 線維、2.5 m/s 未満の場合を C 線維と同定した[64]。

膀胱内に生理食塩水を持続注入し、30 cmH₂O に到達するまでの膀胱内圧と神経活

動の記録・解析を行った。なお、注入した生理食塩水が尿道から漏れるのを防ぐため、尿道を鉗子を用いて閉鎖した。生理食塩水の注入速度は Sham 群では 6 mL/h、BOO 群では 10 mL/h とした。この注入速度は、両群での 1 回の膀胱内圧測定時間を揃えるために、このモデルの膀胱容量の結果から設定した。骨盤神経電気刺激により反応する求心性神経活動は膀胱内生理食塩水注入前後で確認をした(図 4)

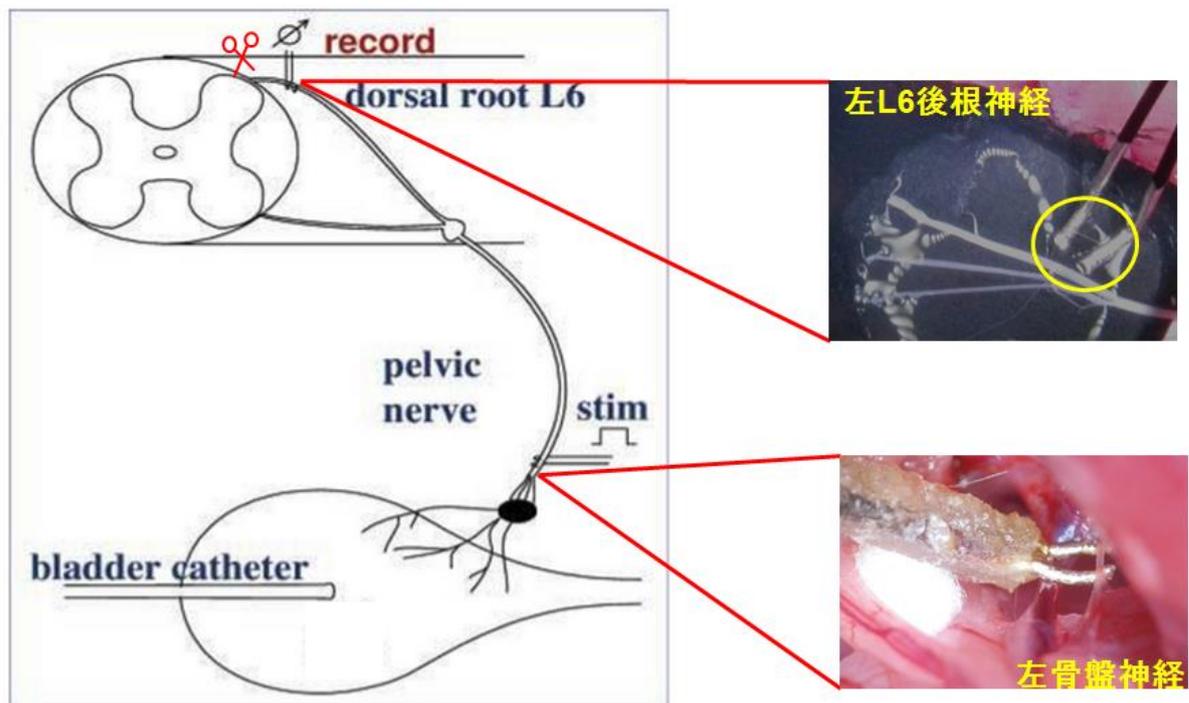


図 4 膀胱伸展受容一次求心性神経活動測定 文献[65]より改変引用

3-2. 解析方法

骨盤神経電気刺激および膀胱伸展刺激に応答する神経の活動電位を Spike2 ソフトウェアによって抽出し、1 秒間隔あたりの神経活動の頻度と、その時の膀胱内圧の平均を算出した。次に、5 cmH₂O 毎に膀胱内圧を区切り、区間ごとの神経活動の平均を解析した(図 5)。

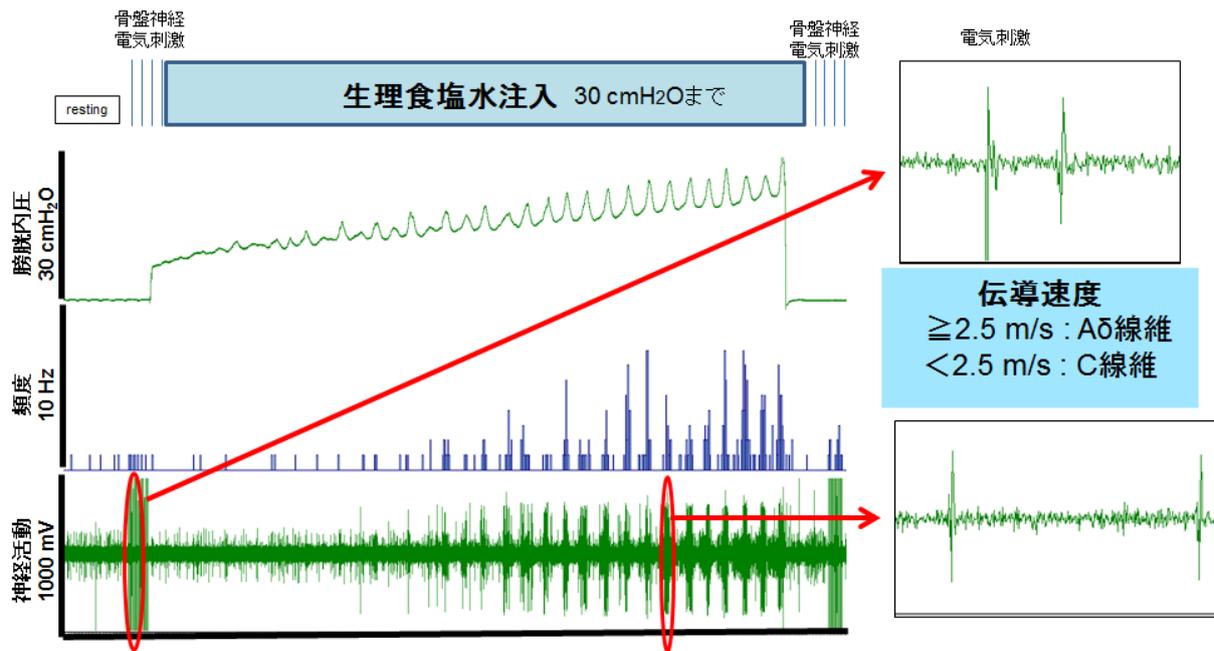


図5 膀胱伸展受容一次求心性神経活動測定、解析方法

膀胱求心性神経活動と膀胱微小収縮の関連性を検討するために、膀胱微小収縮の検出を試みた。膀胱微小収縮は、振幅が2 cmH₂O以上の収縮を有し、かつ、膀胱内圧が0.25 cmH₂O/s以上で上昇し（上昇期）、かつ-0.15 cmH₂O/s以下で下降（下降期）する収縮と定義し、膀胱微小収縮の間を静止期と定義した(図6)。

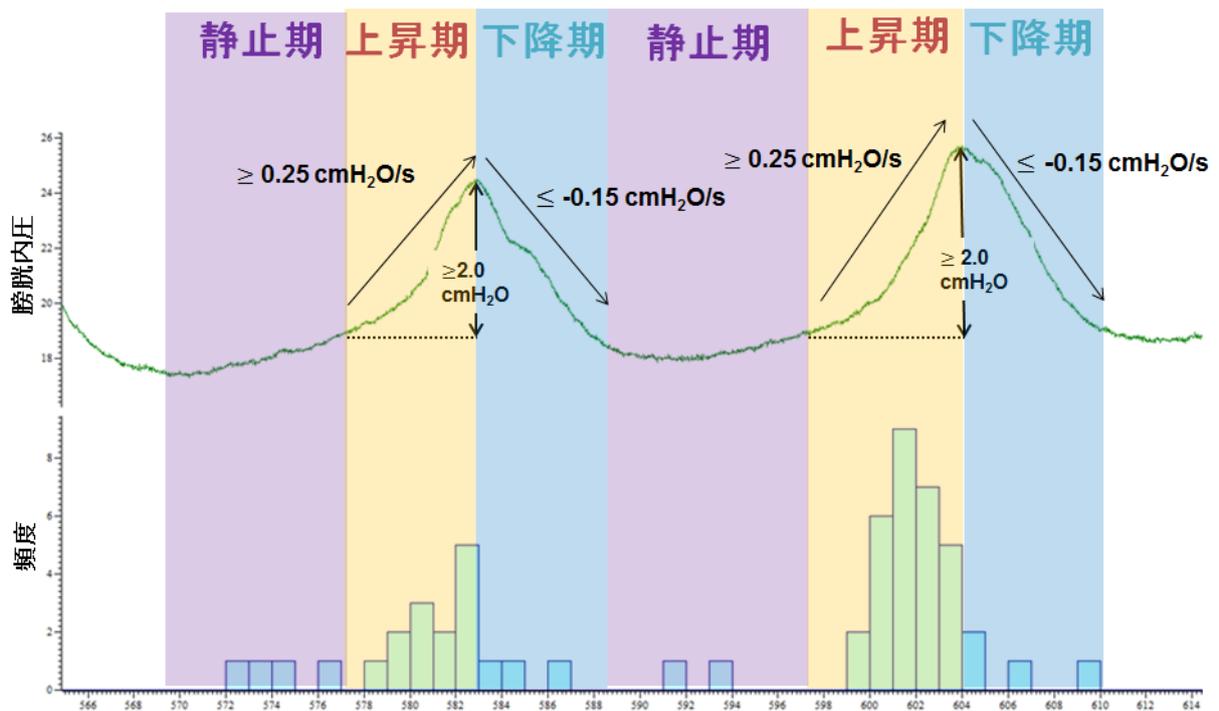


図 6 膀胱微小収縮の定義

3-3. 統計解析

Sham 群と BOO 群の群間比較には unpaired Student's t-test を用いた。膀胱微小収縮における上昇期、下降期、静止期の比較には、繰り返しのある一元配置分散分析を用い、その後 Tukey's test を行った。P<0.05 をもって統計学的に有意と判断した。

結果

1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討

33 匹の Sham 群および 64 匹の BOO 群を作成した。BOO 群では 17 匹のラットが術後 10 日以内に死亡し、14 匹のラットは膀胱重量が 190 mg 以下であり、NVCs の出現を認めなかったため、下部尿路閉塞が不十分であったと判定し、除外した。その結果、Sham 群、BOO 群それぞれ 33 匹を以下の実験に用いた。

1-1. 24 時間排尿行動測定(図 7)

Sham 群(N = 6)と比較して BOO 群(N = 6)では閉塞後 4, 8, 16 日に排尿回数は有意に増加し、一回排尿量および平均尿流率は有意に減少した。閉塞後 32 日では、平均尿流率の減少は維持されたが、排尿回数と一回排尿量の群間差はなくなっていた。また、閉塞後 4 日では総排尿量の減少を認めたが、8 日には回復していた。

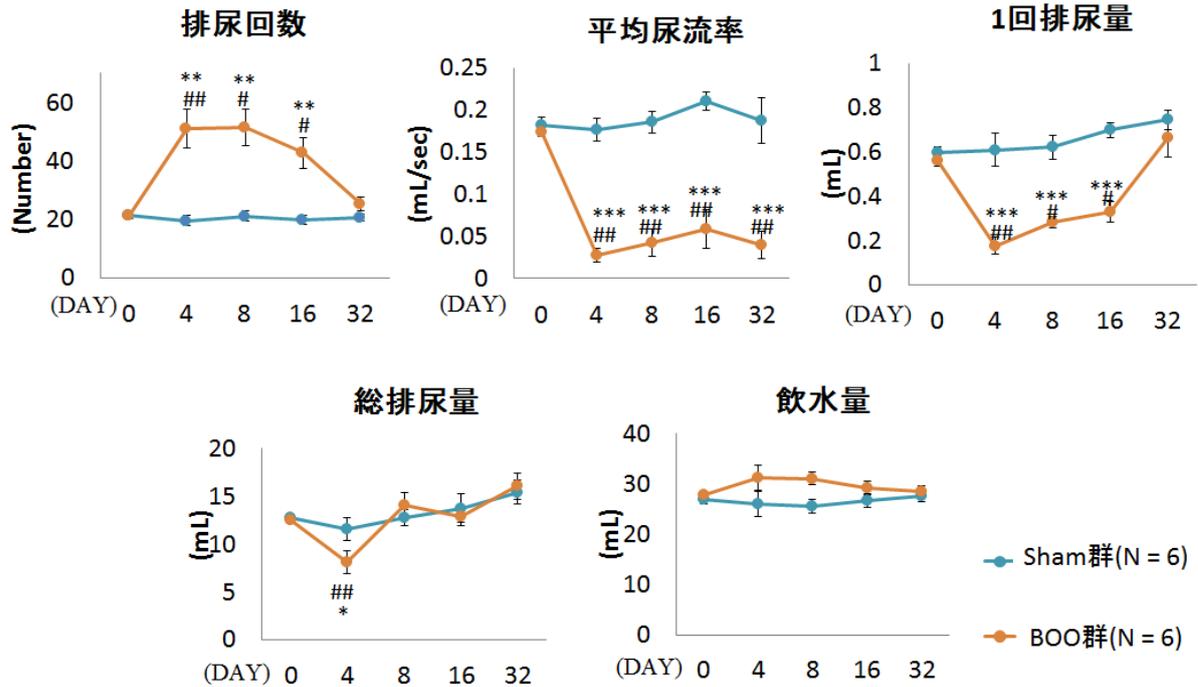


図7 Sham 群および BOO 群の 24 時間排尿行動測定と比較

#P<0.05, ##P<0.01: significant differences from before surgery (repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test)

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test).

1-2. 組織学的検討

膀胱重量の測定は術後 10, 33 日に行い、Sham 群と比較して BOO 群で有意に増加していた (Day 10: 332.82 ± 23.84 mg vs. 113.63 ± 4.30 mg, $P<0.001$, 各群 $N = 27$, Day 33: 422.33 ± 78.98 g vs. 113.17 ± 13.01 g, $P<0.05$, 各群 $N = 6$)。

術後 10 日の Sham 群と比較して BOO 群では排尿筋層が肥厚していた。(図 8-A-E) しかしながら、平滑筋/コラーゲン比は両群間で有意差を認めなかった。(図 8-F)

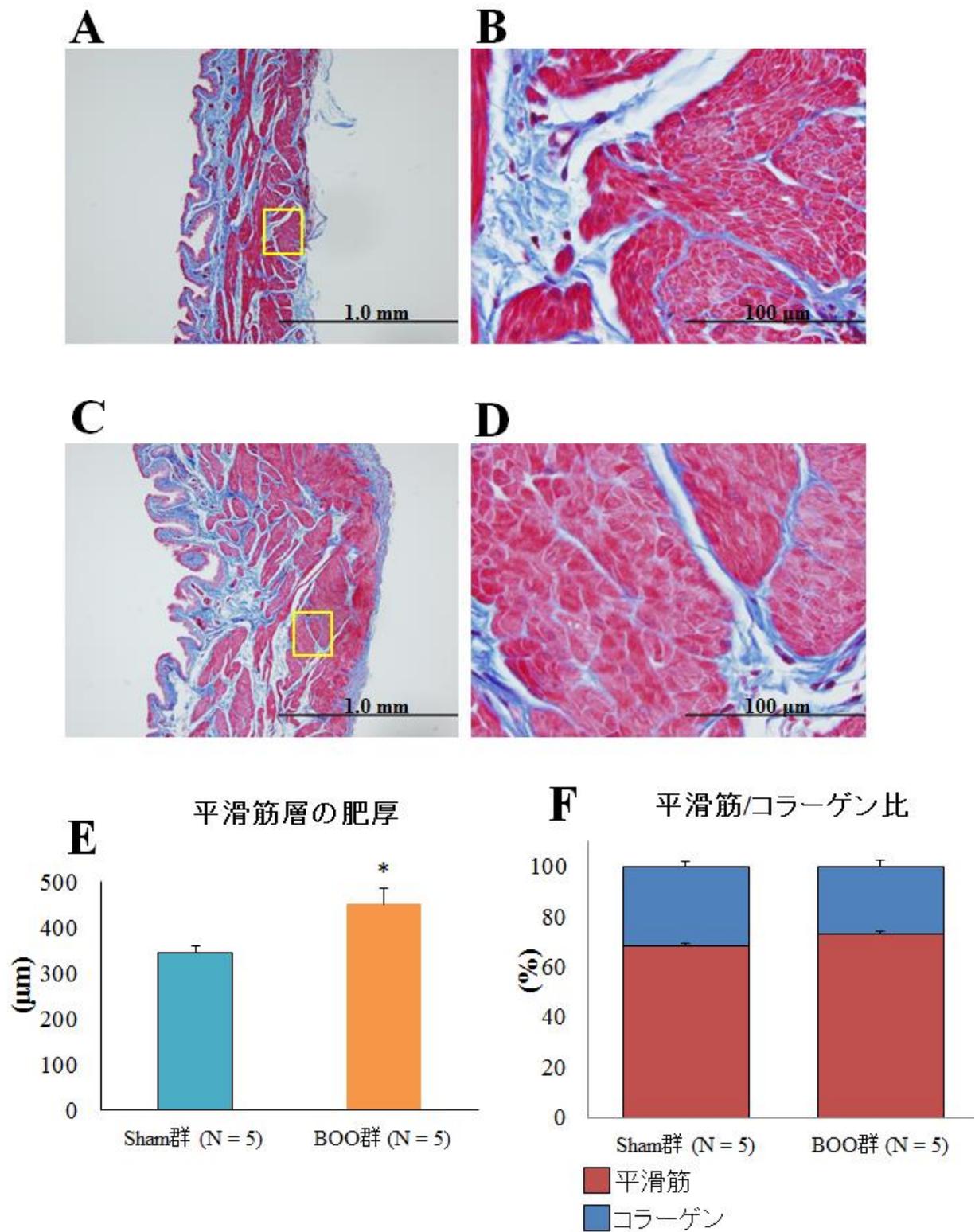


図8 Sham 群(A, B)および BOO 群(C, D)の膀胱組織のマッソン・トリクローム染色の典型例(A, C: 低倍率, B, D: 高倍率)、A および B の黄色枠内はそれぞれ B, D に対応する。両群における膀胱平滑筋層の肥厚(E)、平滑筋/コラーゲン比(F)の比較。

* $P < 0.05$: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test).

1-3. 膀胱内圧測定

1-3-1. Sham 群と BOO 群の比較(表 2)

膀胱内圧測定は排尿行動測定の結果から、総排尿量に変化を与えず、排尿回数が増加と一回排尿量の減少が最も顕著であったのが術後 8-16 日であったことから、術後 10 日に行った。BOO 群では Sham 群と比較して膀胱容量、残尿量、NVCs の振幅および数の有意な増加を認めた (表 2)。

表 2 術後 10 日における Sham 群および BOO 群の膀胱内圧パラメーター比較

	N	基礎圧 (cm H ₂ O)	最大排尿圧 (cm H ₂ O)	排尿閾値圧 (cm H ₂ O)	排尿量 (mL)	残尿量 (mL)	膀胱容量 (mL)	平均尿流率 (mL/s)	NVCs 数	NVCs 振幅 (cm H ₂ O)
Sham	22	4.21 ± 0.42	36.87 ± 1.82	15.67 ± 1.41	0.82 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.91 ± 0.08	0.14 ± 0.008	0.82 ± 0.20	2.17 ± 0.50
BOO	22	4.13 ± 0.24	40.05 ± 2.6	11.56 ± 1.90	0.82 ± 0.12	1.71 ± 0.23***	2.52 ± 0.21***	0.05 ± 0.007***	5.82 ± 0.30***	5.62 ± 0.35***

数値は平均 ± 標準誤差で表示

***P<0.001: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test)

1-3-2. イミダフェナシン、シロドシンおよび両薬物併用の効果(表 3, 4. 図 9, 10)

Sham 群では 10 μg/kg のイミダフェナシン静脈内投与によって残尿量は増加し、平均尿流率が減少した (表 3)。

BOO 群ではシロドシン静脈内投与によって NVCs の数が用量依存的に減少する傾向がみられ、この効果は 100 μg/kg 投与で有意差を認めた(図 9, 10)。しかしながら、いずれのカットオフ値においても NVCs の振幅には有意な変化を認めなかった(図 9)。NVCs のカットオフ値を 1 cmH₂O 以上とした場合、イミダフェナシンの投与は用量依

存的にNVCsの振幅を減少し、3 µg/kg および 10 µg/kg 投与で有意差を認めた(図9, 10)。

また、カットオフ値を2 および 3 cmH₂O 以上とした場合、NVCsの数はイミダフェナシン投与によって用量依存的に減少し、この効果は3 µg/kg および 10 µg/kg 投与で有意であった(表3)。イミダフェナシンの投与は用量依存的に一回排尿量を減少し、残尿量を増加させ、10 µg/kg 投与で一回排尿量への効果は有意であった。

イミダフェナシンおよびシロドシンの単独投与の結果から有意な効果が認められなかった投与量のシロドシン(10 µg/kg)とイミダフェナシン(1 µg/kg)の併用投与を行った。その結果、BOO群においてNVCsの数と振幅において高用量の単独投与と同様の抑制効果を認めた(図9)。他の膀胱内圧パラメーターには有意な効果を認めなかった。

表3 Sham群におけるイミダフェナシン、シロドシンのそれぞれ単独および併用投与による膀胱内圧パラメーターの変化

薬剤	用量 (µg/kg)	N	基礎圧 (cm H ₂ O)	最大排尿圧 (cm H ₂ O)	排尿閾値圧 (cm H ₂ O)	排尿量 (mL)	残尿量 (mL)	膀胱容量 (mL)	平均尿流率 (mL/s)	NVCs 数	NVCs 振幅 (cm H ₂ O)
シロドシン	投薬前		5.69 ± 0.64	42.15 ± 4.13	16.19 ± 2.73	0.63 ± 0.09	0.05 ± 0.02	0.67 ± 0.09	0.14 ± 0.02	0.50 ± 0.29	1.46 ± 0.77
	0.1		4.93 ± 0.48	43.72 ± 3.62	14.56 ± 3.04	0.68 ± 0.13	0.04 ± 0.01	0.71 ± 0.10	0.11 ± 0.05	0	ND
	1.0	7	5.26 ± 0.66	43.55 ± 4.10	13.77 ± 3.02	0.65 ± 0.10	0.03 ± 0.01	0.68 ± 0.25	0.14 ± 0.01	0.50 ± 0.40	1.11 ± 0.82
	10		4.88 ± 0.80	42.07 ± 3.99	13.82 ± 2.09	0.71 ± 0.11	0.04 ± 0.02	0.75 ± 0.11	0.13 ± 0.01	0.36 ± 0.28	1.02 ± 0.72
	100		4.86 ± 0.60	42.48 ± 4.65	15.15 ± 2.72	0.75 ± 0.10	0.03 ± 0.01	0.78 ± 0.10	0.12 ± 0.01	1.00 ± 0.49	2.44 ± 1.02
イミダフェナシン	投薬前		3.37 ± 0.64	33.82 ± 5.14	14.41 ± 1.82	0.93 ± 0.42	0.10 ± 0.03	1.17 ± 0.21	0.16 ± 0.02	1.63 ± 0.32	3.88 ± 0.18
	1.0		3.97 ± 0.97	31.33 ± 4.19	10.40 ± 1.48	0.86 ± 0.36	0.09 ± 0.02	1.00 ± 0.17	0.14 ± 0.02	2.00 ± 0.57	2.63 ± 0.90
	3.0	8	3.35 ± 0.72	34.03 ± 9.28	12.20 ± 3.28	0.95 ± 0.34	0.15 ± 0.07	1.15 ± 0.21	0.14 ± 0.02	1.38 ± 0.50	2.67 ± 0.87
	10		3.63 ± 1.79	27.74 ± 4.31	13.48 ± 6.05	0.81 ± 0.42	0.32 ± 0.20 ^{##}	1.18 ± 0.68	0.12 ± 0.02 [#]	1.00 ± 1.41	1.54 ± 2.17
併用	投薬前		5.74 ± 0.31	33.92 ± 2.17	16.65 ± 1.66	0.93 ± 0.04	0.15 ± 0.05	1.08 ± 0.07	0.14 ± 0.005	0.17 ± 0.15	0.83 ± 0.77
	10 (シロドシン) 1 (イミダフェナシン)	7	5.71 ± 0.55	32.37 ± 1.15	16.70 ± 3.23	0.80 ± 0.09	0.16 ± 0.05	0.96 ± 0.11	0.13 ± 0.01	0	ND

数値は平均 ± 標準誤差で表示

#P <0.05, ##P<0.01: significant differences from before drug administrations (repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test).ND: no data

表4 BOO群におけるイミダフェナシン、シロドシンのそれぞれ単独および併用投与による膀胱内圧パラメーターの変化

薬剤	用量(μg/kg)	N	基礎圧 (cm H ₂ O)	最大排尿圧 (cm H ₂ O)	排尿閾値圧 (cm H ₂ O)	排尿量 (mL)	残尿量 (mL)	膀胱容量 (mL)	平均尿流率 (mL/s)
シロドシン	投与前		4.04±0.50	38.79±3.96	13.65±4.78	0.81±0.22	1.57±0.32	2.38±0.17	0.06±0.02
	0.1		3.44±0.50	37.42±4.88	9.97±2.35	0.81±0.27	1.33±0.32	2.14±0.35	0.06±0.02
	1.0	7	4.22±0.50	38.43±3.83	9.86±1.53	0.87±0.26	1.21±0.23	2.08±0.31	0.06±0.02
	10		4.20±0.51	37.07±3.60	13.39±5.64	0.94±0.28	1.10±0.15	2.04±0.33	0.07±0.02
	100		3.81±0.42	38.48±3.11	14.44±5.67	1.10±0.26	1.14±0.15	2.24±0.3	0.07±0.02
イミダフェナシン	Before		3.97±0.49	40.19±12.94	13.85±4.57	1.02±0.49	1.49±0.41	2.52±0.36	0.06±0.01
	1.0	8	3.74±0.38	40.45±14.29	10.53±5.05	0.77±0.54	1.21±0.31	1.99±0.17	0.06±0.01
	3.0		3.76±0.43	38.24±10.99	11.53±3.89	0.68±0.47	1.85±0.58	2.53±0.46	0.05±0.01
	10		3.43±1.00	37.63±14.02	17.88±9.19	0.54±0.46 [#]	2.19±1.64	2.73±1.4	0.05±0.04
併用	Before		3.33±0.6	41.18±5.89	6.88±1.02	0.57±0.16	2.09±0.54	2.67±0.58	0.04±0.01
	10 (シロドシン) 1 (イミダフェナシン)	7	3.41±0.5	36.52±6.52	6.21±0.98	0.29±0.05	1.40±0.39	1.69±0.35	0.03±0.01

数値は平均 ± 標準誤差で表示

#P<0.05, ##P<0.01: significant differences from before drug administrations (repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test).

ND: no data

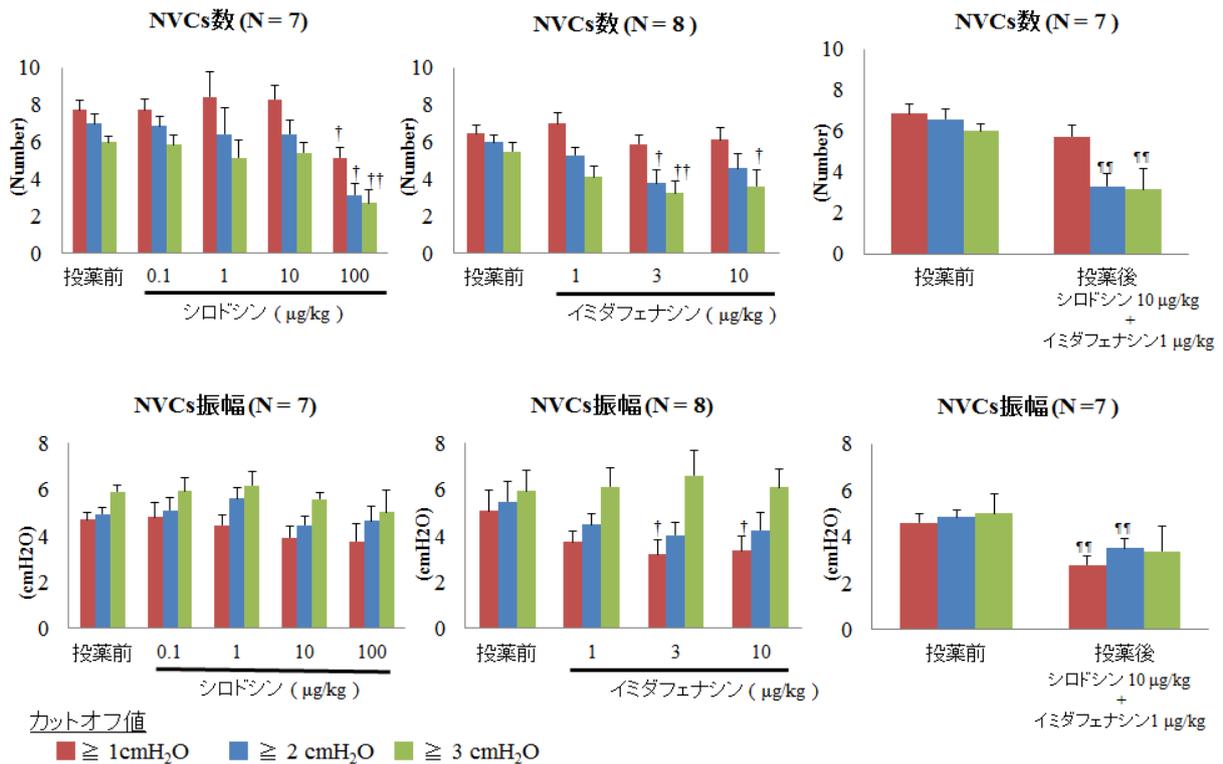


図9 BOO群におけるイミダフェナジン、シロドシンおよび併用投与によるNVCs数(上段)および振幅の平均(下段)の比較。

BOO群においてNVCsの評価にはNVCsの振幅に3つのカットオフ値(1, 2, 3 cmH₂O以上)を設けて比較を行った。

*P<0.05, **P<0.01: significant differences from before drug administrations (repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test).

††P<0.01: significant differences from before drug administrations (paired Student's t-test).

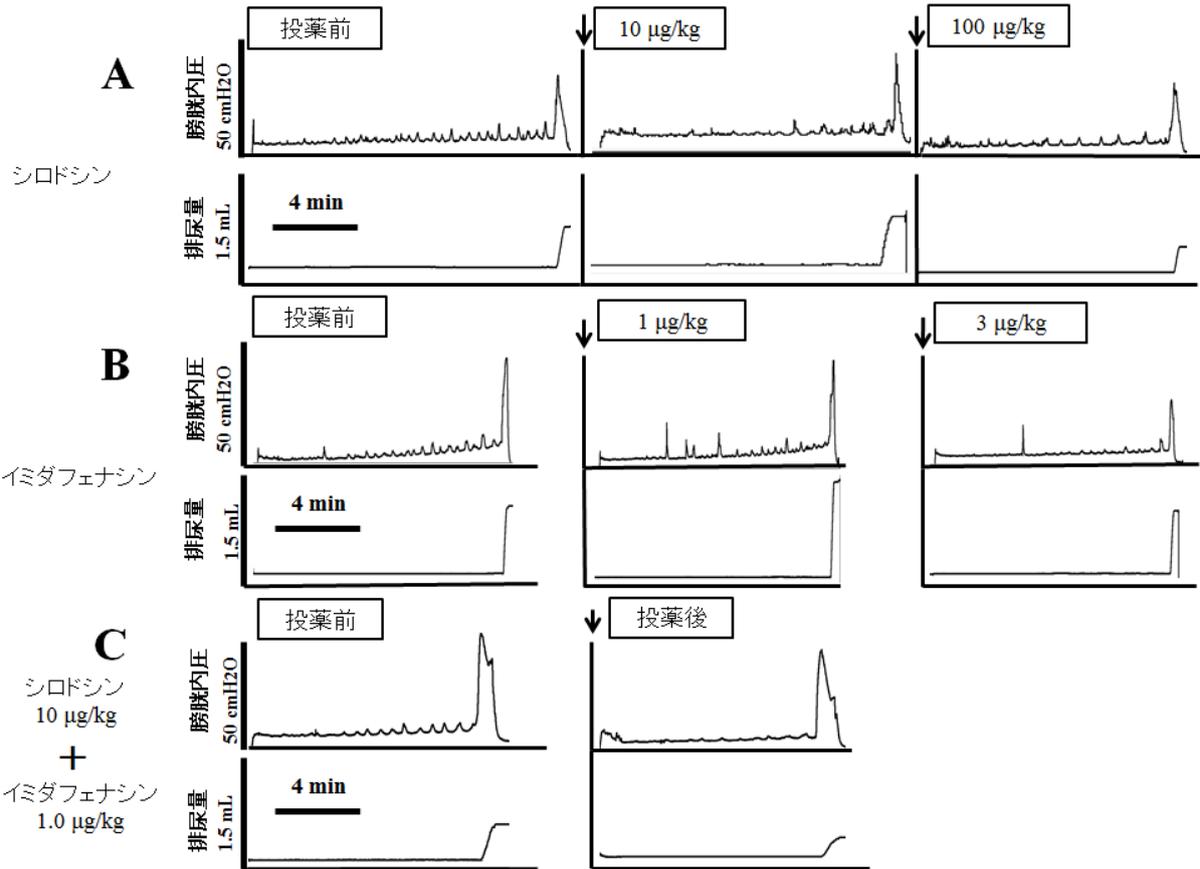


図 10 BOO 群の膀胱内圧および排尿量の典型例。シロドシン(A)、イミダフェナシン (B)、2 剤併用(C)

2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化と

その機能的意義の検討

2-1. リアルタイム PCR(表 5)

Sham 群(N = 6)と比較して、BOO 群(N = 6)の膀胱では、粘膜層で TRPA1、粘膜層・排尿筋層で TRPV1、排尿筋層で TRPV2 チャンネルの発現がそれぞれ増大していた。他方、TRPV4、-M2、-M4、-M8、-C1、-C3、-C6 については 2 群間で有意な発現変化を認められず、TRPC2、-C4、-C5、-C7 は膀胱での発現が検出できなかった。L6 後根神経節およ

び脊髄後角においては、検討した全ての TRP チャンネルに関して有意な発現変化は認められなかった。

表 5 膀胱、L6 後根神経節および脊髄後角における mRNA 発現量の比較

Gene	膀胱全層		粘膜層		排尿筋層		L6 DRG		脊髄後角	
	Fold Change	P value	Fold Change	P value	Fold Change	P value	Fold Change	P value	Fold Change	P value
TRPA1	2.310	0.0098**	5.664	0.0054**	0.357	0.0575	0.819	0.1535	1.080	0.6973
TRPV1	5.808	0.0258*	3.801	0.0434*	4.3235	0.0110*	0.86988	0.4249	0.691	0.4430
TRPV2	4.097	0.0022**	1.552	0.3153	6.635	0.0018**	2.143	0.2083	0.769	0.2484
TRPV4	0.593	0.3898	0.887	0.7138	1.266	0.6785	1.044	0.6756	0.871	0.7305
TRPM2	1.763	0.2910	0.749	0.2170	1.353	0.6582	0.842	0.5139	0.975	0.8817
TRPM4	1.091	0.8753	1.164	0.7264	1.681	0.1845	0.664	0.2577	0.806	0.2214
TRPM8	1.349	0.5792	1.268	0.4913	1.882	0.3516	0.977	0.8799	0.861	0.4148
TRPC1	0.689	0.3093	0.835	0.6200	0.507	0.7505	0.638	0.2752	0.600	0.2752
TRPC2	ND		ND		ND		ND		ND	
TRPC3	0.437	0.1456	0.693	0.3469	0.624	0.3663	0.402	0.1626	0.329	0.1374
TRPC4	ND		ND		ND		0.523	0.1337	0.469	0.1324
TRPC5	ND		ND		ND		0.611	0.3394	0.626	0.3093
TRPC6	0.757	0.4030	0.674	0.3153	0.779	0.6507	0.679	0.3397	0.573	0.2944
TRPC7	ND		ND		ND		0.398	0.3317	0.353	0.1056

Sham 群 (N = 6), BOO 群 (N = 6)

ND: no data (検出限界以下)

*P<0.05, **P<0.01: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test)

2-2. 膀胱内圧測定(表 6, 7. 図 11)

TRPA1 阻害薬 HC の静脈内投与は、Sham 群では、高用量投与(1, 10 mg/kg)で、投薬前および溶媒投与群と比較して排尿閾値圧を用量依存的に有意に上昇させた(図 11, 表 6)。一方、BOO 群では投薬前および溶媒群と比較して、HC は用量依存的に膀胱容量を増大し、排尿閾値圧を上昇させた。これらの効果は最大投与量(10 mg/kg)で有意であった(図 11, 表 7)。

HC の膀胱内投与は、BOO 群において投薬前および溶媒群と比較して一回排尿量と

膀胱容量を有意に増大した。(図 11, 表 7)

TRPV1 阻害薬 SB の静脈内投与は BOO 群の膀胱内圧パラメーターに有意な変化を与えなかった。(表 7)

表 6 Sham 群における HC-030031 静脈内投与による膀胱内圧パラメーターの変化

用量	N	基礎圧 (cm H ₂ O)	排尿閾値圧 (cm H ₂ O)	最大排尿圧 (cm H ₂ O)	排尿量 (ml)	残尿量 (ml)	膀胱容量 (ml)	NVCs 数	NVCs 振幅 (cm H ₂ O)
投与前		2.41 ± 0.254	11.11 ± 2.068	39.99 ± 3.329	0.98 ± 0.130	0.09 ± 0.025	1.07 ± 0.141	0.63 ± 0.324	3.71 ± 0.456(2)
溶媒 1	8	2.26 ± 0.477	11.33 ± 1.727	38.00 ± 3.409	0.98 ± 0.119	0.14 ± 0.043	1.12 ± 0.132	0.88 ± 0.295	4.00 ± 0.430(2)
溶媒 2		2.31 ± 0.455	10.82 ± 1.792	38.58 ± 2.592	0.99 ± 0.164	0.08 ± 0.025	1.07 ± 0.157	0.50 ± 0.189	6.12 ± 1.553(3)
溶媒 3		2.62 ± 0.533	12.45 ± 1.551	37.23 ± 3.517	1.02 ± 0.154	0.12 ± 0.029	1.14 ± 0.143	0.63 ± 0.324	5.76 ± 0.680(2)
投与前		3.92 ± 0.584	11.93 ± 1.558	38.67 ± 4.361	0.88 ± 0.084	0.05 ± 0.018	0.93 ± 0.087	0.38 ± 0.263	5.63 ± 1.087(3)
0.1 mg/kg	8	3.93 ± 0.438	13.56 ± 1.813	36.29 ± 4.052	1.03 ± 0.139	0.08 ± 0.015	1.11 ± 0.140	0.38 ± 0.263	3.30 ± 0.173(5)
1 mg/kg		4.26 ± 0.520	17.33 ± 3.224 [#]	39.38 ± 3.008	0.91 ± 0.093	0.04 ± 0.016	0.95 ± 0.096	1.13 ± 0.66	4.44 ± 0.645(4)
10 mg/kg		4.69 ± 0.634	19.78 ± 2.410 ^{*##}	38.70 ± 3.228	1.10 ± 0.103	0.07 ± 0.039	1.17 ± 0.109	0.50 ± 0.378	4.10 ± 0.318(3)

数値は平均 ± 標準誤差で表示

()内は NVCs を認めた Sham 群の数

* P<0.05: significant difference from the vehicle administration (unpaired Student's t-test)

[#]P<0.05, ^{##}P<0.001: significant differences from the baseline (before administration) (repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test)

表 7 BOO 群における HC-030031 静脈内、膀胱投与および SB 静脈内投与による膀胱内圧パラメーターの変化

薬剤	用量	N	基礎圧 (cm H ₂ O)	排尿閾値圧 (cm H ₂ O)	最大排尿圧 (cm H ₂ O)	排尿量 (ml)	残尿量 (ml)	膀胱容量 (ml)	NVCs 数	NVCs 振幅 (cm H ₂ O)
HC-溶媒 (静脈内投与)	投与前	10	2.13 ± 0.180	10.29 ± 0.813	48.92 ± 5.557	0.67 ± 0.239	0.75 ± 0.187	1.42 ± 0.152	5.80 ± 0.442	6.36 ± 0.702
	溶媒 1		2.26 ± 0.275	10.85 ± 3.565	46.96 ± 3.088	0.66 ± 0.179	0.67 ± 0.189	1.33 ± 0.137	6.10 ± 0.567	5.41 ± 0.345
	溶媒 2		2.26 ± 0.267	10.26 ± 3.198	46.62 ± 2.295	0.69 ± 0.214	0.58 ± 0.157	1.27 ± 0.192	5.50 ± 0.543	5.70 ± 0.660
	溶媒 3		2.57 ± 0.342	10.28 ± 2.790	43.56 ± 3.995	0.55 ± 0.159	0.67 ± 0.212	1.22 ± 0.157	5.00 ± 0.422	5.12 ± 0.454
HC (静脈内投与)	投与前	11	3.11 ± 0.328	8.61 ± 1.251	41.38 ± 3.507	0.49 ± 0.105	0.83 ± 0.183	1.32 ± 0.133	6.91 ± 0.436	6.22 ± 0.574
	0.1 mg/kg		3.53 ± 0.561	7.82 ± 1.014	42.30 ± 3.027	0.60 ± 0.087	0.80 ± 0.226	1.40 ± 0.206	6.45 ± 0.755	6.24 ± 0.669
	1 mg/kg		2.82 ± 0.301	6.98 ± 0.754	42.09 ± 2.79	0.57 ± 0.072	1.10 ± 0.266	1.68 ± 0.215	5.91 ± 0.579	6.64 ± 0.711
HC-溶媒 (膀胱内投与)	投与前	8	2.81 ± 0.415	14.03 ± 2.697*	41.70 ± 3.526	0.75 ± 0.150	1.25 ± 0.299	1.99 ± 0.238*##	5.55 ± 0.824	5.68 ± 0.577
	溶媒		2.97 ± 0.363	9.12 ± 1.518	40.75 ± 3.530	0.78 ± 0.176	0.49 ± 0.114	1.27 ± 0.148	5.63 ± 0.313	5.25 ± 0.958
HC (膀胱内投与)	投与前	8	2.92 ± 0.368	7.68 ± 1.087	40.72 ± 3.936	0.74 ± 0.150	0.36 ± 0.127	1.10 ± 0.140	5.38 ± 0.324	5.46 ± 0.957
	500 μM		2.60 ± 0.623	8.35 ± 1.540	40.85 ± 4.180	0.99 ± 0.228	0.53 ± 0.445	1.52 ± 0.370	6.63 ± 0.885	5.84 ± 0.416
SB-溶媒 (静脈内投与)	投与前	9	2.30 ± 0.344	10.90 ± 1.673	43.64 ± 3.494	1.26 ± 0.229†,*	0.79 ± 0.423	2.04 ± 0.403††,*	7.00 ± 0.707	6.16 ± 0.555
	溶媒		1.86 ± 0.210	4.46 ± 0.555	43.41 ± 4.714	0.67 ± 0.134	0.58 ± 0.097	1.25 ± 0.221	5.75 ± 0.726	6.14 ± 0.595
SB (静脈内投与)	投与前	9	2.51 ± 0.524	4.53 ± 0.840	45.12 ± 5.084	0.45 ± 0.073	0.77 ± 0.130	1.22 ± 0.161	5.57 ± 0.896	6.41 ± 1.064
	0.5 mg/kg		2.60 ± 0.830	6.21 ± 0.833	54.42 ± 4.575	0.85 ± 0.202	0.55 ± 0.214	1.40 ± 0.164	5.13 ± 0.515	5.79 ± 0.423
			1.93 ± 0.595	4.93 ± 1.186	56.17 ± 1.749	0.69 ± 0.180	0.55 ± 0.155	1.24 ± 0.169	4.75 ± 0.840	5.32 ± 0.438

数値は平均 ± 標準誤差で表示

†P<0.05, ††P<0.001: significant differences from baseline (before administration) (paired Student's t-test)

*P<0.05: significant difference from the vehicle administration (unpaired Student's t-test)

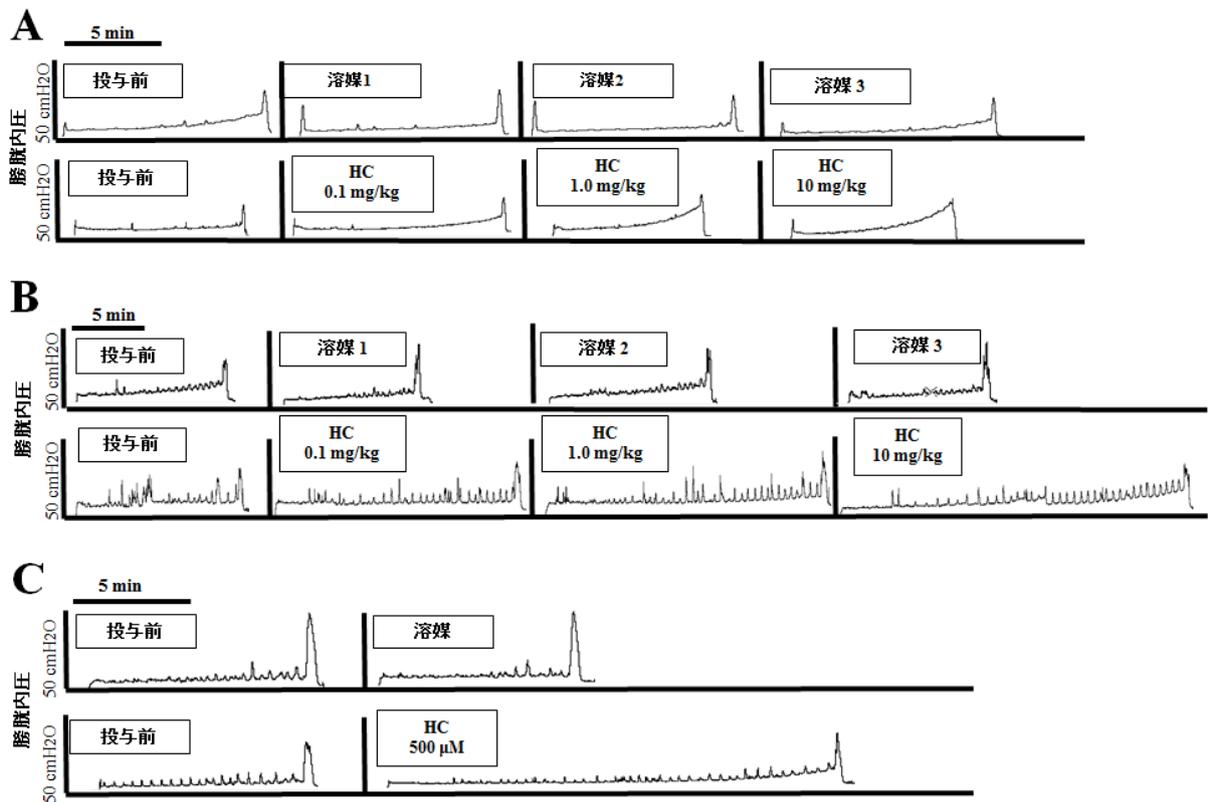


図 11 Sham 群およびBOO 群の HC または溶媒の静脈内投与と膀胱内投与での膀胱内圧の典型例。

- A: Sham 群での HC または溶媒の静脈内累積投与
- B: BOO 群での HC または溶媒の静脈内累積投与
- C: BOO 群での HC または溶媒の膀胱内投与

3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化

BOO 群では Sham 群と比較して膀胱微小収縮の数および振幅は有意に高値を示した (図 12)。L6 後根神経から 44 本の求心性神経線維 (Sham 群 : A δ 線維: n = 10, C 線維: n = 11, BOO 群 : A δ 線維: n = 10, C 線維: n = 13) を単離した。Sham 群と比較して BOO 群では膀胱コンプライアンスは有意に高かったが、A δ および C 線維の平均伝導速度に

は有意差を認めなかった(表 8)。

膀胱伸展に伴う膀胱一次求心性神経の活動性は、Sham 群に比べ BOO 群で、A δ 線維では有意に減弱していたが、C 線維では両群間で有意差を認めなかった(図 13)。膀胱微小収縮での求心性神経活動の平均値を算出した結果、BOO 群では、膀胱微小収縮の内圧上昇期の求心性神経活動が、下降期および静止期での神経活動と比較して高値を示し、この反応性の違いは両線維において観察され、A δ 線維では有意差を認められた。他方、Sham 群ではそのような反応性の違いはなかった。(図 14, 15)

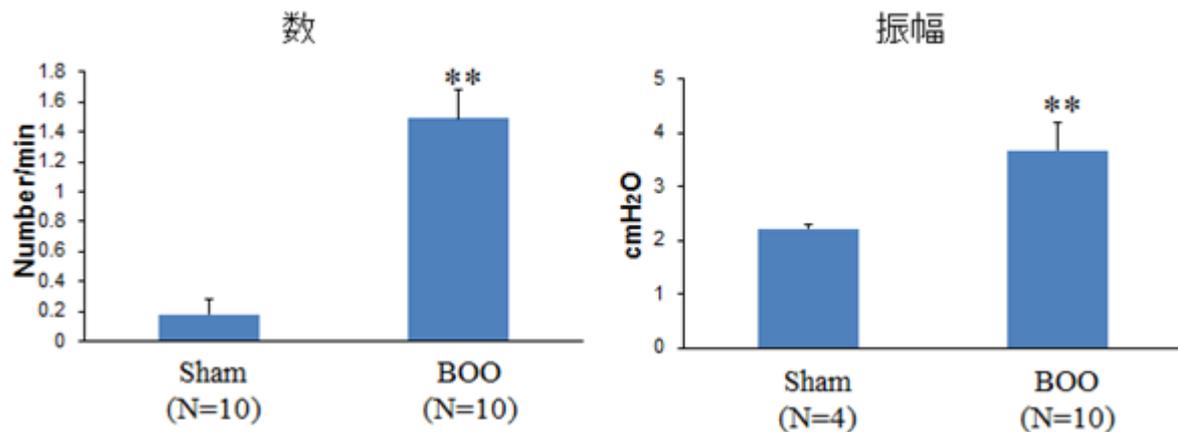


図 12 膀胱微小収縮の数および振幅

**P<0.01: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test).

Sham 群では本研究で用いた定義での膀胱微小収縮を認めた個体が少なかったため、振幅の平均では N = 4 となっている。

表 8 膀胱コンプライアンスと平均伝導速度

	Sham 群(N = 10)		BOO 群(N = 10)	
	A δ 線維(n = 10)	C 線維(n = 11)	A δ 線維(n = 10)	C 線維(n = 13)
伝導速度(m/s)	5.99 \pm 1.59	1.53 \pm 0.11	5.43 \pm 0.79	1.62 \pm 0.10
膀胱コンプライアンス(ml/ Δ cmH ₂ O)	0.0188 \pm 0.0032		0.0381 \pm 0.0032***	

数値は平均 \pm 標準誤差で表示

***P<0.001: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test)

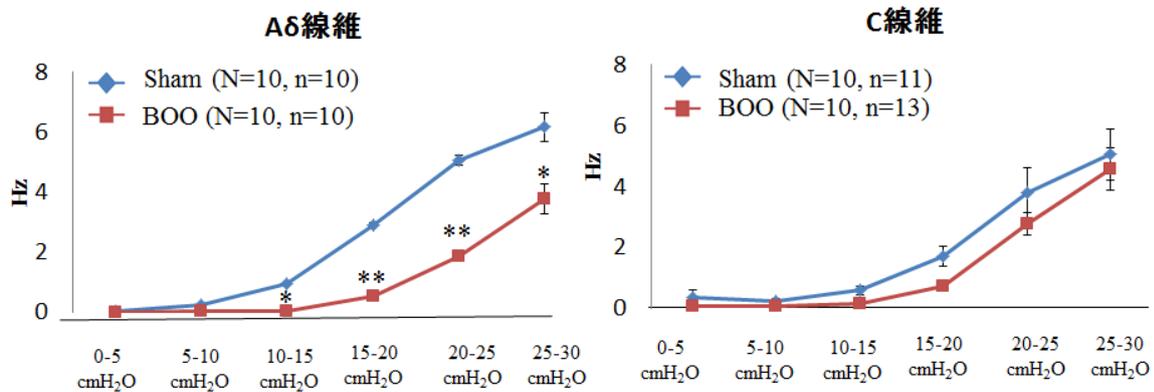


図 13 Sham および BOO 群での膀胱伸展にともなう一次求心性神経活動の変化

*P<0.05, **P<0.01: significant differences from the Sham rats (unpaired Student's t-test)

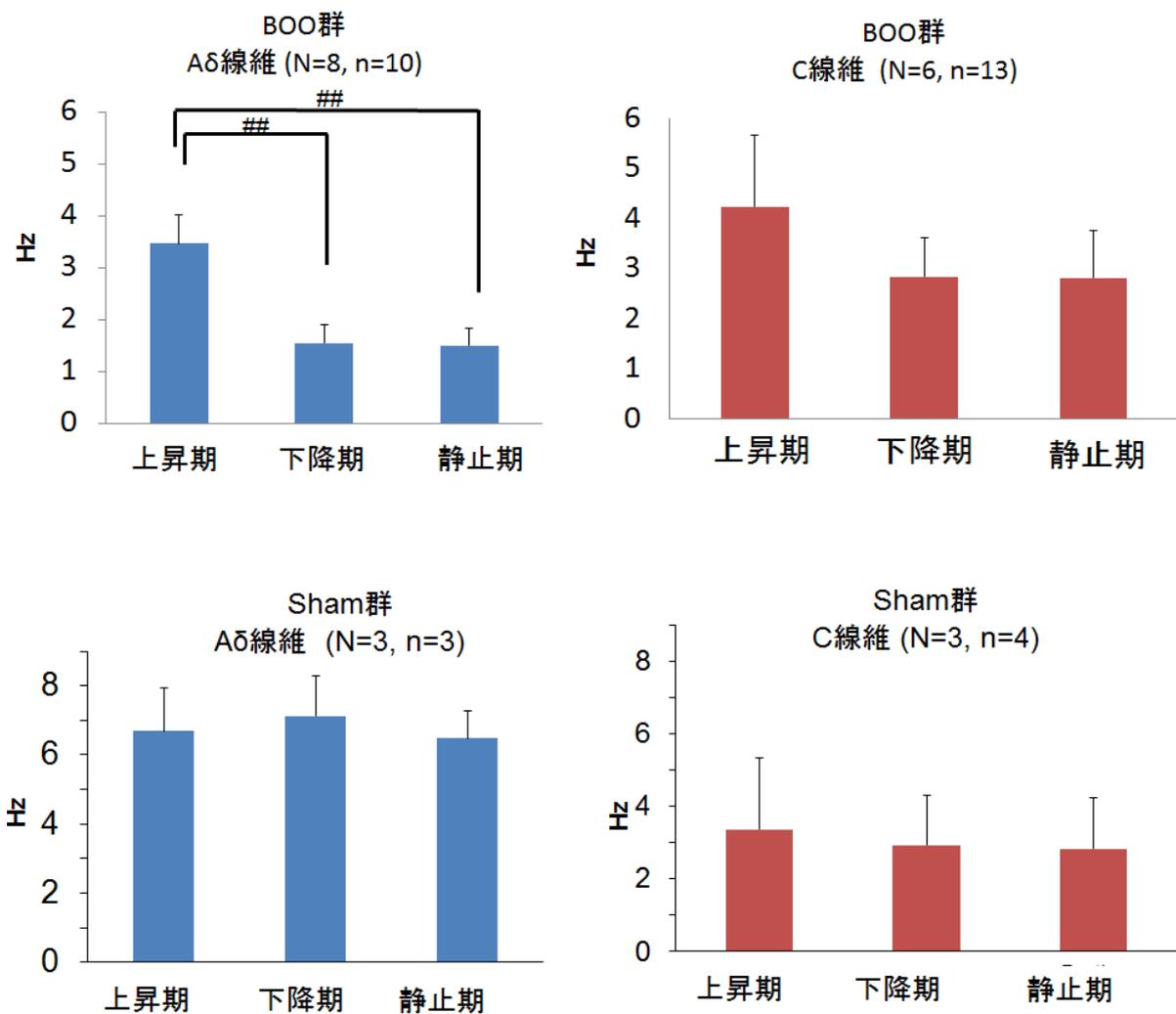


図 14 Sham 群および BOO 群の膀胱微小収縮の上昇期、下降期、静止期の求心性神経活動

$P < 0.01$: significant differences between each phase (repeated measures ANOVA followed by Tukey's test)

Sham 群では本研究で用いた定義での膀胱微小収縮を認めた個体が少なかったため、 $N = 3$ ずつとなっている。

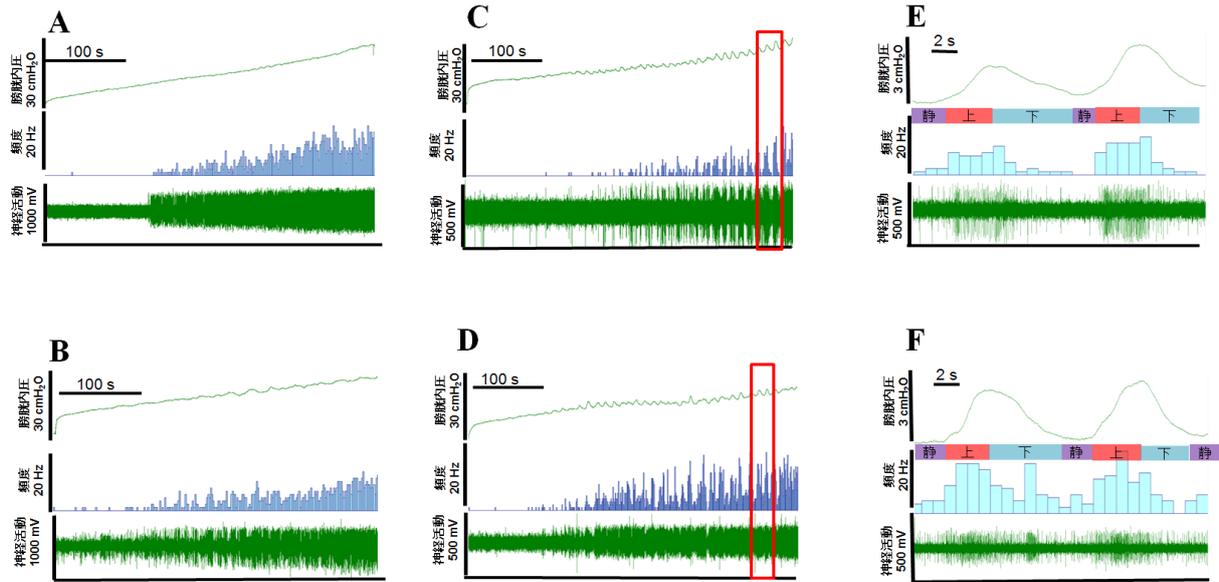


図 15 Sham 群および BOO 群での求心性一次神経活動と膀胱内圧の典型例

A : Sham 群 A δ 線維

B : Sham 群 C 線維

C : BOO 群 A δ 線維

D : BOO 群 C 線維

E : C の赤枠内を拡大して表示

F : D の赤枠内を拡大して表示

考察

1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討

排尿行動測定の結果、本研究で用いた BOO ラットは、平均尿流率および一回排尿量の減少と排尿回数の増加を示した。これらの変化は術後 4, 8 日に最も顕著であり、術後 16 日から回復傾向がみられ、術後 32 日では排尿回数と一回排尿量について両群間で有意差を認めなくなった。また、総排尿量は、BOO 群において術後 4 日に一過性に減少した。これらの結果から、総排尿量に変化を与えず、排尿回数の増加と一回排尿量の減少を顕著に認める術後 10 日に膀胱内圧測定を行った。膀胱内圧測定では、BOO 群は Sham 群と比較して、膀胱容量、残尿量、NVCs の数および振幅の平均が高値を示した。過去に同様の雄性 BOO ラットを用いて術後 8 日後に排尿行動と残尿量を測定した報告においても、BOO ラットでは一回排尿量の減少と残尿量の増大が確認されており、本研究の結果と合致していた[28]。本研究では更に詳細な膀胱機能の検討を行い、術後 10 日という比較的短期においても、ヒトでの病態と近似した下部尿路閉塞による蓄尿症状が誘発されていることが示され、モデル動物としての有用性が確認できた。また、下部尿路閉塞により膀胱重量が増加することが知られているが[25]、本研究の BOO モデルにおいても同様に膀胱重量が増加して、排尿筋層は肥厚していることが確認できた。この点においても、本 BOO モデルの妥当性を支持する結果であった。

本 BOO モデルを用いて、臨床的に前立腺肥大症に伴う下部尿路症状の治療薬とし

て用いられている薬物（ α_1 遮断薬であるシロドシンと抗コリン薬であるイミダフェナシン）が、膀胱機能に与える効果を膀胱内圧測定で評価した。本邦での標準的な投与量としては、シロドシンは 4 mg を 1 日 2 回経口投与、イミダフェナシンは 0.1 mg を 1 日 2 回経口投与とされている。BOO 群では選択的 α_{1A} 遮断薬シロドシンの単独静脈内投与は 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で NVCs の数を抑制した。過去の報告では、本モデルのような機械的閉塞ではなく、テストステロンおよびエストロゲンの投与により誘発される前立腺肥大モデルラットにおいて 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のシロドシン静脈内投与が NVCs の数を減少させたと報告されている[58]。別の報告においても、雌性 BOO ラットへの α_1 遮断薬(タムスロシン、ドキサドシン、ナフトピジル)の動脈内投与は NVCs の数を減少させることが示されている[66]。正確に結びつけることは難しいが、ラットを含めたげっ歯類において観察される NVCs は、ヒトにおいて観察される蓄尿期の排尿筋過活動を反映する可能性が考えられ[26]、臨床研究においては、シロドシンが前立腺肥大に伴う排尿筋過活動に抑制効果を示したという報告があり[67]、本研究におけるシロドシンの NVCs の抑制効果は、これらの臨床知見を支持するかもしれない。

BOO 群では抗コリン薬イミダフェナシンの中間用量(3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)の静脈内投与によって NVCs の数および振幅が減少した。他方、BOO 群へのイミダフェナシンの高用量(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)静脈投与は NVCs に対する抑制効果を認めたが、一回排尿量を減少し、残尿量を増加させる傾向を示した。Sham 群においてもイミダフェナシン高用量投与は残尿量を増加させた。これらの結果は中間用量のイミダフェナシンは排尿機能に影響を与

えずに NVCs を抑制するが、高用量投与では膀胱平滑筋の収縮抑制作用によって排尿効率が低下して残尿量が増加したものと考えられた。またこれらの結果は、BOO ラットにおいて非選択的抗コリン薬トルテロジン投与が、NVCs の数と振幅を減少させたという既報と合致する[68, 69]。また、イミダフェナシンは血液脳関門を通過せず、膀胱のムスカリン受容体に最も特異的に結合することが知られていることから、静脈内投与されたイミダフェナシンの作用部位は、膀胱である可能性が考えられた[70, 71]。

前立腺肥大症に伴う過活動膀胱症状を有する男性患者を対象とした臨床試験では、 α_1 遮断薬単独投与と比較して α_1 遮断薬と抗コリン薬の併用投与が過活動膀胱症状の改善に有用であるとの報告は多い[14, 15, 72-75]。

本研究では雄性 BOO ラットを用い、 α_{1A} 遮断薬シロドシンと抗コリン薬イミダフェナシンの併用投与の相乗効果を膀胱内圧測定により評価した。シロドシンおよびイミダフェナシン単独投与の結果から、膀胱内圧パラメーターに変化を与えなかった低用量のシロドシン (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) とイミダフェナシン (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与した。その結果、併用投与により NVCs に対する相乗的な抑制効果を認めた。このような NVCs に対する相乗的な抑制効果は、シロドシンおよびイミダフェナシンの薬理学的作用点の違いにより引き起こされたと推測されるが、詳細な作用機序については今後の更なる検討が必要である。

一方で、雄性ラットを用いて球部尿道を閉塞したモデルでは、 α_1 遮断薬のドキサドシンと非選択的抗コリン薬の 5-HMT(フェソテロジンの代謝産物)の併用投与は、排尿

閾値圧・最大排尿圧および膀胱自発収縮(本研究における NVCs に相当)を減少させることが報告されている[76]。この併用投与による膀胱自発収縮の抑制効果は、本研究でのシロドシンとイミダフェナシン併用投与の効果と同様であると考えられるが、本研究においてシロドシンとイミダフェナシン併用投与では、排尿閾値圧や最大排尿圧には変化を与えなかった。これらの結果の相違は尿道閉塞の作成部位の差や、使用した薬物の選択性の違いによる可能性が考えられた。しかしながら、 $\alpha 1$ 遮断薬と抗コリン薬の併用投与による NVCs の抑制効果については、過去の報告と本研究の共通点であり、その再現性は高いものと考えられた。

2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化とその機能的意義の検討

ラット、マウスおよびヒトの膀胱組織では TRPA1, -V1, -V2, -V4, -M2, -M4, -M8, -C1-7 の発現が報告されている[34, 38, 47, 48, 77]。本研究では膀胱、L6 後根神経節および脊髄後角において、これらの TRP チャンネルの mRNA 発現を Sham 群と BOO 群で比較した。その結果、BOO 群では Sham 群と比較して膀胱粘膜で TRPA1、膀胱全層で TRPV1、排尿筋層では TRPV2 の発現がそれぞれ増大していた。その他の TRP チャンネルについては有意な発現変化を認めなかった。下部尿路症状を有する男性患者の膀胱組織においては、TRPA1 発現の増大が報告されており[41]、本研究での BOO 群の膀胱粘膜における TRPA1 発現増大の結果と類似していた。また、BOO 群の膀胱での

TRPV1 発現の増大は、雄性 BOO ラットを用いた慢性期(尿道部分閉塞作成後 3 週)の検討において同様の結果が報告されている[40]。さらに、BOO 群では排尿筋層での TRPV2 発現も増大していた。TRPV2 はヒト健常尿路上皮細胞で発現が確認されており[34]、間質性膀胱炎患者の膀胱組織において発現が増加することが報告されている[78]、下部尿路閉塞の病態モデルラットにおいて TRPV2 が発現増大するという知見は、本研究が初めての報告である。一方で、術後慢性期の BOO ラットを用いて評価した過去の報告では、雄性ラットにおいて TRPV4、雌性ラットにおいて TRPM8 の膀胱での発現増大が報告されており[39, 79]、今回の検討と異なる結果であり、TRP チャネルの発現変化が尿道閉塞の期間や雌雄差に影響される可能性が推測された。

TRP チャネルの発現変化の結果を受け、BOO 群の膀胱において発現が増大していた TRPA1 および TRPV1 に着目し、その機能的意義を検討するために、それぞれのチャネルの選択的な拮抗薬を用いて覚醒拘束下膀胱内圧測定を行った。他方、TRPV2 も BOO ラットで発現増大を認めたが、その選択的拮抗薬が市販されていないため、機能的意義に関する薬理的な検討を行うことができなかった。膀胱内圧測定の結果、TRPA1 阻害薬 HC の静脈内投与は BOO 群で膀胱容量を増加させ、Sham 群および BOO 群の両群において排尿閾値圧を上昇させた。加えて、BOO 群における HC 膀胱内への局所投与は、一回排尿量および膀胱容量を増加させた。これらの結果から、TRPA1 チャネルが膀胱伸展受容知覚路に対し促進的に作用し、下部尿路閉塞の病態においては、その促進的寄与が増大する可能性が示唆された。ラット膀胱において TRPA1 と

カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が尿路上皮下組織に共局在することが知られている。[35]また、健常ラット膀胱では TRPA1 が蓄尿期の A δ および C 線維の膀胱求心性神経活動に促進的な役割を果たす可能性が示唆されている[36]。本研究の結果はこれらの過去の報告を支持する結果であり、膀胱伸展受容求心性神経活動の促進に関与する TRPA1 の役割が、下部尿路閉塞によって増強された可能性が示唆された。

TRPV1 は BOO 群の膀胱組織で発現が増大していたが、TRPV1 拮抗薬 SB の静脈内投与は膀胱内圧パラメーターに変化を与えなかった。過去の報告では、SB は腹腔内投与(500 μ g/kg)で TRPV1 刺激薬であるカプサイシンによって誘発される低体温、眼のワイピング行動、膝関節の血管拡張を阻害することから、選択的 TRPV1 阻害薬として知られており[62]、本研究で用いた SB 静脈内投与で使用した用量(500 μ g/kg)は TRPV1 受容体を阻害するのに十分な量であったことが推測される。雌性 BOO ラットにおいては、尿道閉塞作成前にカプサイシン全身投与による TRPV1 の脱感作を行うと、コントロール群と比較して一回排尿量、膀胱容量、排尿閾値圧が増加することが報告されており、病態における TRPV1 の機能的意義が証明されているが[80]、本研究において、BOO 群の膀胱で発現が増大していた TRPV1 の病態生理的意義については今回の検討からは証明できず、更なる検討が必要であると考えた。

3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化

ヒト膀胱を対象としたこれまでの報告では、膀胱局所で発生する微小収縮や微小運動が、知覚の異常亢進と考えられる尿意切迫感の発生に寄与している可能性が報告されていることから[53, 54]、本研究では下部尿路閉塞に伴う膀胱伸展受容一次求心性神経活動の変化およびその膀胱微小収縮との関連性について検討を行った。その結果、Sham 群と比較して BOO 群では 1) 膀胱微小収縮の数、振幅の増加、2) 膀胱伸展受容 A δ 線維の活動性の低下、および 3) A δ 線維の活動性の膀胱微小収縮上昇期に同期した間歇的増強が認められた。

今回の求心性神経活動測定実験では両側の L6 後根神経を予め切断しているため、膀胱伸展に伴って発現する膀胱微小収縮は、基本的に排尿反射の神経反射弓を介さない、筋原性に由来した局所収縮であると考えられる。下部尿路閉塞に伴い平滑筋細胞の GAP 結合が発達し[81]、平滑筋細胞の膜電位特性の変化により平滑筋が電氣的に同期しやすくなることが知られている[7]。健常ラットの摘出膀胱でも膀胱伸展に伴って、膀胱の微小収縮（微小運動）が誘発されるが、下部尿路閉塞では、その度合いは有意に増強されていることが報告されており[82]、今回の BOO 群において観察された膀胱微小収縮増強の知見と合致し、これらは筋原性の要因に由来すると考えた。

膀胱伸展に伴う求心性神経活動の活性化は BOO 群では Sham 群と比較して、A δ および C 線維の両方で減弱する傾向を認め、A δ 線維においては顕著であり有意差を認

めた。末梢神経において有髄神経の髄鞘を形成するシュワン細胞は、虚血により障害されることが示されている[83]。さらに、ウサギの総腓骨神経では、有髄 A 線維は無髄 C 線維と比較して虚血に脆弱であることが報告されている[84]。これらの結果から、下部尿路閉塞に伴う膀胱の虚血により A δ 線維の髄鞘がより選択的に障害を受けた結果、その活動性が低下した可能性を考えた。他方、今回の検討では C 線維の膀胱伸展に対する反応性は下部尿路閉塞によって有意な変化を示さなかったが、C 線維は膀胱伸展に応答する生理的機能以外にも、刺激物質や炎症に応答する非生理的機能において、その意義が証明されていることから、今後、この病態モデルにおいて C 線維の果たす役割を、膀胱の炎症や痛みの誘発を加えて評価検討する必要がある。

下部尿路閉塞の病態において、求心性神経活動と膀胱微小収縮の関連性を検討した結果、BOO 群における A δ 線維の活動性は、膀胱微小収縮に同期して間歇的に増強していた。神経線維の膀胱における分布を考えたとき、A δ 線維は主に平滑筋層に分布し、C 線維は膀胱全層に渡り広く分布していると考えられている。膀胱微小収縮は上述の通り、主に平滑筋層の変化に由来することから、同じく平滑筋層に分布している A δ 線維の活動性が、膀胱微小収縮に同期していた点は合致する。尿意切迫感を有する女性患者では、尿意切迫感出現時に膀胱の局所的な微小収縮（微小運動）が認められており、尿意切迫感の発生機序の一因として、この膀胱局所の収縮（運動）が起因となっている可能性が示唆されている[54]。したがって、本研究で認められた膀胱微小収縮に同期する A δ 線維を介する求心性神経活動の間歇的な増強反応は、下部尿路

閉塞に伴う尿意切迫感の発生機序の一つである可能性が示唆された。今後、臨床的に下部尿路閉塞に伴う過活動膀胱の治療に使用される薬剤を用いた検討が必要である。

結論

1. 雄性下部尿路閉塞ラットの排尿行動変化、膀胱機能および組織学的検討

尿道閉塞後 10 日の比較的短期においても、慢性閉塞モデルと同様に、膀胱重量は増大し、排尿回数と非排尿性膀胱収縮（NVCs）の増加、一回排尿量と平均尿流率の減少、残尿量の増加を認めたことから、本研究で用いたモデルは下部尿路閉塞(BOO)に伴う蓄尿機能障害モデルとして妥当と思われた。この BOO モデルではシロドシンおよびイミダフェナシン単独投与は NVCs を抑制した。また、これらの併用投与の結果から、臨床での α_1 遮断薬と抗コリン薬の併用療法の効果発現機序の一部に、排尿筋過活動への相乗抑制作用がある可能性が示唆された。

2. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける TRP チャンネルの発現変化とその機能的意義の検討

BOO ラットの膀胱では TRPA1, TRPV1, TRPV2 の発現が増大しており、TRPA1 拮抗薬は膀胱容量を増大させたことから、TRPA1 チャンネルは、下部尿路閉塞において膀胱伸展受容知覚路に対して促進的に働くことが示唆された。他方、TRPV1 拮抗薬は BOO 群の膀胱内圧パラメーターに影響を及ぼさなかったことから、下部尿路閉塞の亜急性期における TRPV1 チャンネルの機能的意義は限定的であると考えられた。

3. 下部尿路閉塞に伴う蓄尿障害モデルラットにおける膀胱伸展受容求心性神経活動の変化

BOO ラットでは、膀胱伸展受容 A δ 線維の活動性は低下しており、下部尿路閉塞

による除神経が考えられた。また、この A δ 線維の活動性は、膀胱微小収縮の収縮期に同期して間歇的に増強しており、この膀胱微小収縮に同期した A δ 線維の活動性の亢進は、下部尿路閉塞に伴う尿意切迫感の発生機序の一つである可能性が示唆された。

謝辞

本研究は東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものであり、研究は泌尿器外科学の協力講座であるコンチネンス医学講座で行った。稿を終えるにあたり、本研究に際し終始温かいご指導、御校閲を賜りました、泌尿器外科学 本間之夫教授並びに、コンチネンス医学 井川靖彦特任教授、相澤直樹特任助教に衷心より感謝の意を表します。また、実験手技等を教えていただいた泌尿器外科学およびコンチネンス医学の教室員一同に衷心より感謝の意を表します。本研究においてシロドシンをキッセイ薬品株式会社、イミダフェナシンを杏林製薬株式会社より提供して頂きました。この場を借りて深くお礼申し上げます。

参考文献

1. Fowler CJ, Griffiths D, de Groat WC. The neural control of micturition. *Nature reviews Neuroscience*. 9(6):453-66. 2008.
2. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourology and urodynamics*. 21(2):167-78. 2002.
3. Homma Y, Yamaguchi O, Hayashi K, Neurogenic Bladder Society C. Epidemiologic survey of lower urinary tract symptoms in Japan. *Urology*. 68(3):560-4. 2006.
4. Oelke M, Baard J, Wijkstra H, de la Rosette JJ, Jonas U, Hofner K. Age and bladder outlet obstruction are independently associated with detrusor overactivity in patients with benign prostatic hyperplasia. *European urology*. 54(2):419-26. 2008.
5. Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, Dixon JS, Gilpin SA, Gosling JA. Bladder outflow obstruction--a cause of denervation supersensitivity. *The Journal of urology*. 138(6):1461-6. 1987.
6. Steers WD. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. *Reviews in urology*. 4 Suppl 4:S7-S18. 2002.
7. Seki N, Karim OM, Mostwin JL. The effect of experimental urethral obstruction and its reversal on changes in passive electrical properties of detrusor muscle. *The Journal of*

urology. 148(6):1957-61. 1992.

8. Neuhaus J, Pfeiffer F, Wolburg H, Horn LC, Dorschner W. Alterations in connexin expression in the bladder of patients with urge symptoms. *BJU international*. 96(4):670-6. 2005.

9. 過活動膀胱診療ガイドライン作成委員会 日. 過活動膀胱診療ガイドライン 第2版. Medical R, editor. 2015.

10. Nomiya M, Yamaguchi O. A quantitative analysis of mRNA expression of alpha 1 and beta-adrenoceptor subtypes and their functional roles in human normal and obstructed bladders. *The Journal of urology*. 170(2 Pt 1):649-53. 2003.

11. Goi Y, Tomiyama Y, Nomiya M, Sagawa K, Aikawa K, Yamaguchi O. Effects of silodosin, a selective alpha1A-adrenoceptor antagonist, on bladder blood flow and bladder function in a rat model of atherosclerosis induced chronic bladder ischemia without bladder outlet obstruction. *The Journal of urology*. 190(3):1116-22. 2013.

12. Yanase H, Wang X, Momota Y, Nimura T, Kawatani M. The involvement of urothelial alpha1A adrenergic receptor in controlling the micturition reflex. *Biomedical research*. 29(5):239-44. 2008.

13. Ishihama H, Momota Y, Yanase H, Wang X, de Groat WC, Kawatani M. Activation of alpha1D adrenergic receptors in the rat urothelium facilitates the micturition reflex. *The Journal of urology*. 175(1):358-64. 2006.

14. Takeda M, Nishizawa O, Gotoh M, Yoshida M, Takahashi S, Masumori N. Clinical efficacy and safety of imidafenacin as add-on treatment for persistent overactive bladder symptoms despite alpha-blocker treatment in patients with BPH: the ADDITION study. *Urology*. 82(4):887-93. 2013.
15. Yamaguchi O, Kakizaki H, Homma Y, Takeda M, Nishizawa O, Gotoh M, Yokoyama O, Seki N, Yoshida M. Solifenacin as add-on therapy for overactive bladder symptoms in men treated for lower urinary tract symptoms--ASSIST, randomized controlled study. *Urology*. 78(1):126-33. 2011.
16. Koelbl H, Nitti H, Baessler K, Salvatore S, Sultan A, Yamaguchi O. Pathophysiology of Urinary Incontinence, Faecal Incontinence and Pelvic Organ Prolapse. 4th International Consultation on Incontinence.255-330. 2009.
17. Gosling JA, Kung LS, Dixon JS, Horan P, Whitbeck C, Levin RM. Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. *The Journal of urology*. 163(4):1349-56. 2000.
18. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, Kato K, Wein AJ. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *The Prostate Supplement*. 3:9-26. 1990.
19. Pampinella F, Roelofs M, Castellucci E, Passerini-Glazel G, Pagano F, Sartore S. Time-dependent remodeling of the bladder wall in growing rabbits after partial outlet

obstruction. *The Journal of urology*. 157(2):677-82. 1997.

20. Dixon JS, Gilpin CJ, Gilpin SA, Gosling JA, Brading AF, Speakman MJ. Sequential morphological changes in the pig detrusor in response to chronic partial urethral obstruction. *British journal of urology*. 64(4):385-90. 1989.

21. Kim JC, Yoo JS, Park EY, Hong SH, Seo SI, Hwang TK. Muscarinic and purinergic receptor expression in the urothelium of rats with detrusor overactivity induced by bladder outlet obstruction. *BJU international*. 101(3):371-5. 2008.

22. Hampel C, Dolber PC, Smith MP, Savic SL, Th roff JW, Thor KB, Schwinn DA. Modulation of bladder alpha1-adrenergic receptor subtype expression by bladder outlet obstruction. *The Journal of urology*. 167(3):1513-21. 2002.

23. Malmgren A, Sjogren C, Uvelius B, Mattiasson A, Andersson KE, Andersson PO. Cystometrical evaluation of bladder instability in rats with infravesical outflow obstruction. *The Journal of urology*. 137(6):1291-4. 1987.

24. McMurray G, Casey JH, Naylor AM. Animal models in urological disease and sexual dysfunction. *British journal of pharmacology*. 147 Suppl 2:S62-79. 2006.

25. Melman A, Tar M, Boczko J, Christ G, Leung AC, Zhao W, Russell RG. Evaluation of two techniques of partial urethral obstruction in the male rat model of bladder outlet obstruction. *Urology*. 66(5):1127-33. 2005.

26. Andersson KE, Soler R, Fullhase C. Rodent models for urodynamic investigation.

Neurourology and urodynamics. 30(5):636-46. 2011.

27. Steers WD, De Groat WC. Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *The Journal of urology*. 140(4):864-71. 1988.

28. Hashimoto T, Nagabukuro H, Doi T. Effects of the selective acetylcholinesterase inhibitor TAK-802 on the voiding behavior and bladder mass increase in rats with partial bladder outlet obstruction. *The Journal of urology*. 174(3):1137-41. 2005.

29. Saito M, Longhurst PA, Tammela TL, Wein AJ, Levin RM. Effects of partial outlet obstruction of the rat urinary bladder on micturition characteristics, DNA synthesis and the contractile response to field stimulation and pharmacological agents. *The Journal of urology*. 150(3):1045-51. 1993.

30. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 2(4):1313-23. 1989.

31. Vannier B, Zhu X, Brown D, Birnbaumer L. The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *The Journal of biological chemistry*. 273(15):8675-9. 1998.

32. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annual review of biochemistry*. 76:387-417. 2007.

33. Aizawa N, Wyndaele JJ, Homma Y, Igawa Y. Effects of TRPV4 cation channel

activation on the primary bladder afferent activities of the rat. *Neurourology and urodynamics*.

31(1):148-55. 2012.

34. Caprodossi S, Lucciarini R, Amantini C, Nabissi M, Canesin G, Ballarini P, Di Spilimbergo A, Cardarelli MA, Servi L, Mammanna G, Santoni G. Transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) expression in normal urothelium and in urothelial carcinoma of human bladder: correlation with the pathologic stage. *European urology*. 54(3):612-20. 2008.

35. Du S, Araki I, Yoshiyama M, Nomura T, Takeda M. Transient receptor potential channel A1 involved in sensory transduction of rat urinary bladder through C-fiber pathway. *Urology*. 70(4):826-31. 2007.

36. Minagawa T, Aizawa N, Igawa Y, Wyndaele JJ. The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel in activation of single unit mechanosensitive bladder afferent activities in the rat. *Neurourology and urodynamics*. 33(5):544-9. 2014.

37. Nomoto Y, Yoshida A, Ikeda S, Kamikawa Y, Harada K, Ohwatashi A, Kawahira K. Effect of menthol on detrusor smooth-muscle contraction and the micturition reflex in rats. *Urology*. 72(3):701-5. 2008.

38. Shabir S, Cross W, Kirkwood LA, Pearson JF, Appleby PA, Walker D, Eardley I, Southgate J. Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium. *American journal of physiology Renal physiology*. 305(3):F396-406. 2013.

39. Cho KJ, Park EY, Kim HS, Koh JS, Kim JC. Expression of transient receptor potential vanilloid 4 and effects of ruthenium red on detrusor overactivity associated with bladder outlet obstruction in rats. *World journal of urology*. 32(3):677-82. 2014.
40. Ha US, Park EY, Kim JC. Effect of botulinum toxin on expression of nerve growth factor and transient receptor potential vanilloid 1 in urothelium and detrusor muscle of rats with bladder outlet obstruction-induced detrusor overactivity. *Urology*. 78(3):721 e1- e6. 2011.
41. Du S, Araki I, Kobayashi H, Zakoji H, Sawada N, Takeda M. Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs. *Urology*. 72(2):450-5. 2008.
42. Mukerji G, Yiangou Y, Corcoran SL, Selmer IS, Smith GD, Benham CD, Bountra C, Agarwal SK, Anand P. Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC urology*. 6:6. 2006.
43. Streng T, Axelsson HE, Hedlund P, Andersson DA, Jordt SE, Bevan S, Andersson KE, Hogestatt ED, Zygmunt PM. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive TRPA1 ion channel in rat urinary bladder. *European urology*. 53(2):391-9. 2008.
44. Daly D, Rong W, Chess-Williams R, Chapple C, Grundy D. Bladder afferent sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *The Journal of physiology*. 583(Pt 2):663-74. 2007.

45. Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D, Nilius B. Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *The Journal of clinical investigation*. 117(11):3453-62. 2007.
46. Ito H, Aizawa N, Sugiyama R, Watanabe S, Takahashi N, Tajimi M, Fukuhara H, Homma Y, Kubota Y, Andersson KE, Igawa Y. Functional role of the transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) ion channel in the urinary bladder assessed by conscious cystometry and ex vivo measurements of single-unit mechanosensitive bladder afferent activities in the rat. *BJU international*. 2015.
47. Boudes M, Uvin P, Pinto S, Freichel M, Birnbaumer L, Voets T, De Ridder D, Vennekens R. Crucial role of TRPC1 and TRPC4 in cystitis-induced neuronal sprouting and bladder overactivity. *PloS one*. 8(7):e69550. 2013.
48. Smith AC, Parajuli SP, Hristov KL, Cheng Q, Soder RP, Afeli SA, Earley S, Xin W, Malysz J, Petkov GV. TRPM4 channel: a new player in urinary bladder smooth muscle function in rats. *American journal of physiology Renal physiology*. 304(7):F918-29. 2013.
49. Watanabe M, Suzuki Y, Uchida K, Miyazaki N, Murata K, Matsumoto S, Kakizaki H, Tominaga M. Trpm7 contributes to intercellular junction formation in mouse urothelium. *The Journal of biological chemistry*. 2015.
50. Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M. Myelinated primary afferents of the sacral

spinal cord responding to slow filling and distension of the cat urinary bladder. *The Journal of physiology*. 463:449-60. 1993.

51. Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *The Journal of physiology*. 425:545-62. 1990.

52. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Effects of mirabegron, a novel beta3-adrenoceptor agonist, on primary bladder afferent activity and bladder microcontractions in rats compared with the effects of oxybutynin. *European urology*. 62(6):1165-73. 2012.

53. Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology*. 50(6A Suppl):57-67; discussion 8-73. 1997.

54. Drake MJ, Harvey IJ, Gillespie JI, Van Duyl WA. Localized contractions in the normal human bladder and in urinary urgency. *BJU international*. 95(7):1002-5. 2005.

55. Zhao H, Sprunger LK, Simasko SM. Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 298(2):G212-21. 2010.

56. Sawada N, Nomiya M, Hood B, Koslov D, Zarifpour M, Andersson KE. Protective effect of a beta3-adrenoceptor agonist on bladder function in a rat model of chronic bladder ischemia. *European urology*. 64(4):664-71. 2013.

57. Taylor JA, Zhu Q, Irwin B, Maghaydah Y, Tsimikas J, Pilbeam C, Leng L, Bucala R,

Kuchel GA. Null mutation in macrophage migration inhibitory factor prevents muscle cell loss and fibrosis in partial bladder outlet obstruction. *American journal of physiology Renal physiology*. 291(6):F1343-53. 2006.

58. Tatemichi S, Akiyama K, Kobayashi M, Yamazaki Y, Yokoyama O, Uruno T. A selective alpha1A-adrenoceptor antagonist inhibits detrusor overactivity in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of urology*. 176(3):1236-41. 2006.

59. Yamazaki T, Muraki Y, Anraku T. In vivo bladder selectivity of imidafenacin, a novel antimuscarinic agent, assessed by using an effectiveness index for bladder capacity in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 384(3):319-29. 2011.

60. Takahashi K, Sakamoto K, Kimura J. Hypoxic stress induces transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Journal of pharmacological sciences*. 118(2):186-97. 2012.

61. Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 290(6):L1267-76. 2006.

62. Varga A, Nemeth J, Szabo A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neuroscience letters*. 385(2):137-42. 2005.

63. Andrade EL, Forner S, Bento AF, Leite DF, Dias MA, Leal PC, Koepp J, Calixto JB. TRPA1 receptor modulation attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury. *American journal of physiology Renal physiology*. 300(5):F1223-34. 2011.
64. Sengupta JN, Gebhart GF. Mechanosensitive properties of pelvic nerve afferent fibers innervating the urinary bladder of the rat. *Journal of neurophysiology*. 72(5):2420-30. 1994.
65. Wyndaele JJ. Investigating afferent nerve activity from the lower urinary tract: highlighting some basic research techniques and clinical evaluation methods. *Neurourology and urodynamics*. 29(1):56-62. 2010.
66. Kim JH, Shim JS, Kang SC, Shim KS, Park JY, Moon du G, Lee JG, Bae JH. Effects of Spinal and Peripheral Injection of alpha1A or alpha1D Adrenoceptor Antagonists on Bladder Activity in Rat Models with or without Bladder Outlet Obstruction. *International neurourology journal*. 15(4):199-205. 2011.
67. Matsukawa Y, Gotoh M, Komatsu T, Funahashi Y, Sassa N, Hattori R. Efficacy of silodosin for relieving benign prostatic obstruction: prospective pressure flow study. *The Journal of urology*. 182(6):2831-5. 2009.
68. Gillespie JI, Palea S, Guilloteau V, Guerard M, Lluet P, Korstanje C. Modulation of non-voiding activity by the muscarinergic antagonist tolterodine and the beta(3)-adrenoceptor agonist mirabegron in conscious rats with partial outflow obstruction. *BJU international*.

110(2 Pt 2):E132-42. 2012.

69. Jin LH, Park CS, Shin HY, Yoon SM, Lee T. Dissimilar effects of tolterodine on detrusor overactivity in awake rats with chemical cystitis and partial bladder outlet obstruction. *International neurourology journal*. 15(3):120-6. 2011.

70. Watanabe M, Yamanishi T, Honda M, Sakakibara R, Uchiyama T, Yoshida K. Efficacy of extended-release tolterodine for the treatment of neurogenic detrusor overactivity and/or low-compliance bladder. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 17(11):931-6. 2010.

71. Yamada S, Seki M, Ogoda M, Fukata A, Nakamura M, Ito Y. Selective binding of bladder muscarinic receptors in relation to the pharmacokinetics of a novel antimuscarinic agent, imidafenacin, to treat overactive bladder. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 336(2):365-71. 2011.

72. Kaplan SA, He W, Koltun WD, Cummings J, Schneider T, Fakhoury A. Solifenacin plus tamsulosin combination treatment in men with lower urinary tract symptoms and bladder outlet obstruction: a randomized controlled trial. *European urology*. 63(1):158-65. 2013.

73. Nishizawa O, Yamaguchi O, Takeda M, Yokoyama O, Grp TS. Randomized Controlled Trial to Treat Benign Prostatic Hyperplasia with Overactive Bladder Using an Alpha-blocker Combined with Anticholinergics. *Luts*. 3(1):29-35. 2011.

74. Athanasopoulos A, Gyftopoulos K, Giannitsas K, Fisis J, Perimenis P, Barbaliias G.

Combination treatment with an alpha-blocker plus an anticholinergic for bladder outlet obstruction: a prospective, randomized, controlled study. *The Journal of urology*. 169(6):2253-6. 2003.

75. Yokoyama O, Tsujimura A, Akino H, Segawa N, Tamada S, Oguchi N, Kitagawa Y, Tsuji H, Watanabe A, Inamoto T, Shimizu N, Fujiuchi Y, Katsuoka Y, Azuma H, Matsuda T, Namiki M, Uemura H, Okuyama A, Nonomura N, Fuse H, Nakatani T. Add-on anticholinergic therapy for residual nocturia in patients with lower urinary tract symptoms receiving alpha1-blocker treatment: a multi-centre, prospective, randomised study. *World journal of urology*. 2014.

76. Fullhase C, Soler R, Gratzke C, Brodsky M, Christ GJ, Andersson KE. Urodynamic evaluation of fesoterodine metabolite, doxazosin and their combination in a rat model of partial urethral obstruction. *BJU international*. 106(2):287-93. 2010.

77. Yu W, Hill WG, Apodaca G, Zeidel ML. Expression and distribution of transient receptor potential (TRP) channels in bladder epithelium. *American journal of physiology Renal physiology*. 300(1):F49-59. 2011.

78. Homma Y, Nomiya A, Tagaya M, Oyama T, Takagaki K, Nishimatsu H, Igawa Y. Increased mRNA expression of genes involved in nociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of interstitial cystitis. *The Journal of urology*. 190(5):1925-31. 2013.

79. Jun JH, Kang HJ, Jin MH, Lee HY, Im YJ, Jung HJ, Han SW. Function of the Cold

Receptor (TRPM8) Associated with Voiding Dysfunction in Bladder Outlet Obstruction in Rats. *International neurourology journal*. 16(2):69-76. 2012.

80. Tanaka H, Kakizaki H, Shibata T, Mitsui T, Koyanagi T. Effect of preemptive treatment of capsaicin or resiniferatoxin on the development of pre-micturition contractions after partial urethral obstruction in the rat. *The Journal of urology*. 170(3):1022-6. 2003.

81. Christ GJ, Day NS, Day M, Zhao W, Persson K, Pandita RK, Andersson KE. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 284(5):R1241-8. 2003.

82. Drake MJ, Hedlund P, Harvey IJ, Pandita RK, Andersson KE, Gillespie JI. Partial outlet obstruction enhances modular autonomous activity in the isolated rat bladder. *The Journal of urology*. 170(1):276-9. 2003.

83. Azadzoï KM, Chen BG, Radisavljevic ZM, Siroky MB. Molecular reactions and ultrastructural damage in the chronically ischemic bladder. *The Journal of urology*. 186(5):2115-22. 2011.

84. Dahlin LB, Shyu BC, Danielsen N, Andersson SA. Effects of nerve compression or ischaemia on conduction properties of myelinated and non-myelinated nerve fibres. An experimental study in the rabbit common peroneal nerve. *Acta physiologica Scandinavica*. 136(1):97-105. 1989.

