厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

脳内グリシン受容体を標的にした
頻尿改善薬としての排尿反射強化薬の開発に関する研究

平成１３年度　総括・分担研究報告書

主任研究者　高濱　和夫

平成１４（２００２）年４月

目　次

Ⅰ．総括研究報告 ………… 3
脳内グリシン受容体を標的にした頻尿改善薬としての
排尿反射強化薬の開発に関する研究　高濱和夫 ………… 5

Ⅱ．分担研究報告 ………… 11
1．グリシンおよび関連物質の排尿反射に対する作用
ー末梢および脳内投与によるシストメトリー解析　高濱和夫 ………… 13

2．グリシン受容体におけるデキストロメトルファンの
作用部位に関する卵母細胞翻訳系での解析　白崎哲哉 ………… 16

3．排尿反射の中枢内神経回路に関する神経組織化学的、
神経化学的研究　田中英明 ………… 19

4．N-エチルモルファンの合成　樹林千尋 ………… 21

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表 ………… 23

Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷 ………… 27
1．I. Maruyama et al.
Are glycine receptors involved in micturition reflex?
Jpn. J. Pharmacol. 85 (Suppl. I) 240P (2001) ………… 29

2．高濱和夫、白崎哲哉
排尿反射と 5-HT1A およびグリシン受容体
日本薬理学雑誌　118 巻　73 (2001) ………… 30

3．岡部裕一
排尿反射の中枢機序に関する薬理学的研究
第４回ブレインサイエンス要旨集　P11 (2001) ………… 31

4．岡部裕一、丸山　格、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫
排尿反射の中枢内神経伝達機序に関する研究ーグリシンおよび
関連物質の排尿反射に対する作用ー
日本薬理学雑誌　119 巻３号、68P (2002) ………… 32

5．高濱和夫、丸山　格、岡部裕一、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉
グリシン受容体ブロック作用をもつデキストロメトルファンの
排尿反射に対する作用ーシストメトリー法による解析
日本薬理学雑誌（投稿中） ………… 33

Ⅰ．総括研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

脳内グリシン受容体を標的にした頻尿改善薬としての排尿反射強化薬の開発に関する研究

主任研究者　高　濱　和　夫　　熊本大学 薬学部 教授

研究要旨　アルツハイマー病や脳血管障害にしばしば随伴する尿失禁や頻尿などを含めた排尿障害の患者は f がだあふぁふぁ、数百万の数に上る。しかし、未だに優れた排尿障害治療薬は開発されていない。本研究においては、**第１に**、脳幹グリシン受容体が排尿反射に如何に関与しているのか、について、グリシンプロドラッグおよび関連薬物の排尿反射に対する作用を全身動物を用いて検討した。**第２に**、グリシン受容体ブロック作用をもつ鎮咳薬デキストロメトルファン（DM）のグリシン受容体上での作用部位を卵母細胞翻訳系を用いて検討した。**第３に**、排尿反射の中枢内経路について、c-Fos の検出、DiI によるトレース実験などにより検討した。また、平成１４年度以降の実験供するために、グリシン受容体活性化作用を持つ N-エチルモルファンを合成した。その結果、以下の結果を得た。１）グリシンのプロドラッグの Z-グリシナミドは麻酔ラットにおいて、排尿潜時、排尿流速、排尿閾値の減少を伴い膀胱の律動性収縮を起こした。２）鎮咳薬 DM は、麻酔ラットで１～１０mg/kg 膀胱の律動性収縮を用量依存的に抑制した。また、DM の作用をシストメトリー法で解析した結果、排尿潜時の延長と膀胱容量の増大が観察された。３）グリシンの中脳水道吻側部第Ⅳ脳室内への注入は、不安定膀胱様の応答を示しながら膀胱収縮反射の促進を起こした。また、独自に開発した多連微小ガラスピペットを用いる微小圧注入法でグリシンを中脳水道吻側部第Ⅳ脳室内へ微量注入すると、排尿潜時の短縮と排尿閾値の低下が観察された。４）ツメガエル卵母細胞での実験から、DM はグリシン受容体上において、ストリキニーネとは異なりる部位に作用することが示唆された。５）DiI を用いたトレース実験と酢酸による膀胱内壁刺激に続く c-fos 蛋白質（Fos）の発現実験から、排尿反射中枢の一つである背外側被蓋部(LDT)から中脳中心灰白質（PAG）や脊髄の Onuf 核へ直接下降する経路が存在することが示唆された。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名
白崎哲哉・熊本大学薬学部　　助教授
田中英明・熊本大学医学部　　教　授
樹林千尋・東京薬科大学薬学部　教　授

A．研究目的

アルツハイマー病や脳血管障害にしばしば随伴する尿失禁や頻尿などを含めた排尿障害の患者は、数百万の数に上る。本障害は、本人のみならず家族や介護者にも不快感をもたらし、その治療薬の開発は老年性痴呆などの治療薬の開発とともに、長寿社会の重要な課題である。排尿障害治療薬の開発の障害になっているのは、排尿反射の中枢内神経伝達機序が十分解明されていない点にある。申請者は１０数年に亘って排尿反射と同じ脳幹反射である咳反射の研究に従事し、これに端を発して、ごく最近、グリシンの複数のプロドラッグが動物の排尿反射を強力に促進、増強するという予備知見を見い出した。高齢者の夜間頻尿や尿失禁には、膀胱平滑筋や外尿道括約筋を支配する中枢神経機能の異常が関与する。そこで、平成１３年度においては、我々が見いだした予備知見を基に、**第１に**、脳幹グリシン受容体が排尿反射に如何に関与しているのか、について、グリシンプロドラッグや脳幹作用薬でグリシン受容体ブロック作用をもつ鎮咳薬など関連物質の排尿反射に対する作用を全身動物を用いて詳細に検討した。**第２に**、排尿反射に強力な影

響を与えグリシン受容体ブロック作用をもつ鎮咳薬デキストロメトルファン（DM）のグリシン受容体上での作用部位と様式を分子レベルで解明する糸口を得るために、アフリカツメガエルの卵母細胞翻訳系を用いて検討した。**第3に**、排尿反射の中枢内経路を詳細に追究する基礎知見を得るために、膀胱壁刺激による情報の伝達部位をc-Fos 発現の検出を組織化学的に追究し、かつ、排尿反射中枢 DiI によるトレース実験により検討した。さらに、平成１４年度以降の実験供するために、グリシン受容体活性化作用を持つ N-エチルモルファンを合成した。

B. 研究方法

○研究１（高濱担当）

１）膀胱収縮の測定

体重 250-300ｇの SD 系雄性ラットを用いた。ウレタン麻酔下に開腹し、膀胱頂部よりカテーテルを挿入した。本カテーテルをインフュージョンポンプおよび圧トランスデューサーに接続し、インフュージョンポンプより一定速度（0.106 ml/min）で生理食塩水を膀胱内に注入した。このときの膀胱内圧変化を生体アンプで増幅後レクチコーダーに記録した（シストメトログラム、CMG）。シングル CMG の記録にあたっては、1 回の排尿反射が終了した直後に膀胱内から残尿を除去し、排尿反射終了から 30 秒後に次の CMG の記録を開始した。連続 CMG およびシングル CMG のいずれの場合も、成績は薬物投与前の各パラメーターの値を１として、それに対する比率を求め、その比率の平均値±標準誤差として表わした。

２）脳内微量薬物注入法

体重 250-300ｇの SD 系雄性ラットをウレタン麻酔下に用いた。小動物用脳固定装置にラットの頭蓋を正常位に固定し、腹部を反転させて上記の測定準備を行った後、歯科用ドリルで頭蓋に小孔を開け、先端径 5-15 μｍの７連微小ガラスピペットあるいは 30 ゲージのステンレスパイプをパルスモーター式マイクロマニプレータを用いて第四脳室に刺入した。微小ガラスピペットおよびステンレスパイプの刺入は Paxinos and Watson の脳地図に従い行なった。薬物は、微小ガラスピペットに接続された圧注入装置（ピコスピリツアー）あるいはマイクロシリンジを用いて、前者の場合は数１０nl の容量で、後者の場合は数 μl の容量で微量注入した。微小ガラスピペットは、外径 1mmの芯入りガラス管を７本束ね、縦引きプラーにて作成した後、電極研磨装置にてピペット先端を上記の径に研磨して成形した。

○研究２（白崎担当）

アフリカツメガエルの卵母細胞に野生型 α1 サブユニット、α１（Y161F）変異体、α１（F159Y/Y161F）変異体、α１（S267I）変異体または野生型 α２サブユニットｃRNA を 1～2 mg/mL で 10～20 ｎL 注入し、20℃で 12～48 時間培養した。培養後、2 本の微小電極を卵母細胞に刺入し、２電極膜電位固定法によりグリシン電流を記録した。薬液投与は外液急速交換法（Y-チューブ法）にて行った。

○研究３（田中担当）

１）神経線維の連絡の検討

８～９週齢の雄性 SD ラットをウレタン麻酔後、脳固定装置により固定した。ラムダ縫合周辺の頭蓋を開け、LDT 領域に神経線維トレーサー DiI を注入した。注入は先端径が 20μｍ のガラスピペットに DiI を充填後、ピコスピリッツァーによる高い空気圧（40psi, 50ms）を用いておこなった。その後縫合し、実験動物施設にて飼育した。以上の操作は無菌的におこない、実験動物施設での飼育中は抗菌薬硫酸ストレプトマイシンを筋肉内注射した。DiI の注入から 2、10、30 日後と 3 種類の動物を作製し、それぞれ 4％パラホルムアルデヒドで潅流固定した。脳は中脳から延髄までを、脊髄は L6/S1 領域を摘出し、厚さ 100

μm のビブラトーム切片を作製、鏡検には蛍光顕微鏡を用いた。

2）Fos 発現の検討

8～9 週齢の雄性 SD ラットをウレタン麻酔後、背位に固定し膀胱内にカテーテル(PE-10)を挿入した。動物の状態が安定したのを確認した後、0.1%酢酸を 3 時間持続注入した。注入終了後 4%パラホルムアルデヒドで潅流固定し、脳は中脳から延髄までを、脊髄は L6/S1 領域を摘出した。厚さ 50μm のミクロトーム切片を作製し、免疫組織化学的手法を用いて Fos の発現を調べた。

（倫理面への配慮）

上記のすべての実験は、「動物実験に関する日本薬理学会指針」に従い実施されており倫理的に問題はない。

C. 研究結果

○研究 1（高濱担当）の結果

1）DM およびストリキニーネの排尿反射に対する作用

DM は膀胱の律動性収縮を 1 ～10 mg/kg, i.v.で用量依存的に消失させ、10 mg/kg でのその消失時間は、37.5+4.1 分であった。シストメトリー法において DM10 mg/kg およびストリキニーネ 0.3mg/kg は排尿流速、膀胱内圧、尿道抵抗、排尿閾値、排尿潜時および膀胱コンプライアンスのパラメーターの中で、ともに排尿流速を減少させ、尿道抵抗を上昇させた。

1 回の膀胱収縮が起こった後に、残尿を除去しシングル・シストメトリー法で検討した結果、排尿潜時の延長 (5.08±0.80 分 → 8.09±1.05 分)、つまり膀胱容量の増大（0.54±0.08 ml → 0.86±0.11 ml）が DM 投与直後から観察され、その効果は投与後 30 分から 1 時間以上持続した。この持続時間は、排尿閾値、膀胱内圧、排尿流速および尿道抵抗への影響の持続時間とほぼ同様であった。膀胱コンプライアンスは影響を受けなった（0.53±0.07 → 0.47±0.05)。その他のパラメータについては連続 CMG の場合と同様であった。

2）DM の作用機序

セロトニン合成阻害薬の PCPA の前処理は、排尿反射の各パラメーターに対する DM の作用の持続時間を短縮させ、作用強度を減弱させた。また、DM の排尿反射抑制作用は 5-HT1A 受容体のアゴニストの 8-OH-DPAT により、有意に回復した。8-OH-DPAT の単独投与は、排尿反射時の膀胱内圧の上昇を強く抑制した。

3）Z-グリシナミドおよびグリシンの排尿反射に対する作用

グリシンのプロドラッグの Z-グリシナミドの腹腔内投与は、膀胱の律動性収縮を起こした。グリシン 100μg の中脳水道吻側側への注入は、排尿潜時の著しい短縮と膀胱コンプライアンスの減少をもたらし、薬尿反射に至るまでの過活動膀胱様の律動性収縮を起こした。シストメトリー法で検討した結果、、Z-グリシナミドは対照群を 1 とした場合、排尿潜時（0.51±0.07)、排尿流速（0.48±0.11)、排尿閾値（0.36±0.10）は減少させ、尿道抵抗（2.62±0.54）とコンプライアンス（1.98±0.47）は上昇させた。最大膀胱内圧 (1.21±0.11）は変化しなかった。

○研究 2（白崎担当）の結果

4）グリシン受容体上での DM の作用部位に関する研究

グリシン電流の EC_{50} 値は α1 で 6.0×10^{-5}M、α2 で 7.6×10^{-5}M であり、用量 - 反応関係は α サブユニットのサブタイプに依存しなかった。一方、両サブタイプにおいて EC_{50} 値の濃度のグリシンを用いて、競合的拮抗薬であるストリキニーネの IC_{50} 値を求めると α1 で 2.4×10^{-8}M、α2 で 9.9×10^{-8}M であり、α1 の方が感受性が高かった。これに対して、これまでにストリキニーネ同様に競合拮抗作用があること

が示唆されていた DM では、その IC_{50} 値は α_1 で 3.0×10^{-5}M、$\alpha 2$ で 7.9×10^{-6}M であり、ストリキニーネとは逆のサブタイプ特異性を示した。DM の構造類似体であるコデインも $\alpha 2$ に高感受性を示した。カフェインでは $\alpha 1$ に若干感受性が高い傾向が見られてが、明らかなサブタイプ特異性は見られなかった。

グリシン結合サイトでありグリシンおよび β アラニンの感受性を増加させる 159 番目と 161 番目のアミノ酸の変異体 $\alpha 1$ (Y161F) および $\alpha 1$ (F159Y/Y161F) を用いてストリキニーネと DM の抑制作用を検討したところ、ストリキニーネの IC_{50} 値は $\alpha 1$ (F159Y/Y161F) 変異体において有意に減少し、高感受性を示した。しかし、DM のそれは野生型とほぼ同じであった。さらに、アルコールによるグリシン受容体機能の制御に深く関与する267番目のセリンをイソロイシンに置換した $\alpha 1$ (S267I) 変異体においても DM のグリシン電流抑制作用は野生型とほぼ同じであった。

○研究3（田中担当）の結果

5）神経線維の連絡の検討

DiI を LDT に注入したところ、主に中脳中心灰白質 (PAG)、延髄孤束核、疑核、脊髄 L6/S1 領域（前根の Onuf 核など）において蛍光像が確認された。また DiI 注入から 2、10、30 日後の動物を作製したが、各脳領域の蛍光の強さは経日的に違いがみられた。まず PAG 領域では 2 日後で最も強い蛍光を発しており、10 日後ではやや弱くなり、30 日後では確認されなかった。同じ傾向は延髄孤束核、疑核においても認められた。これらとは逆に L6/S1 領域の Onuf 核では 30 日後で最も強い蛍光を発しており、10 日後、2 日後と次第に弱くなっていった。

6）Fos 発現の検討

中脳では PAG と中位縫線核（median raphe nucleus)、橋網様核口部（pontine reticular nucleus, oral part）で比較的強い発現が認められた。橋ではバリントン核などの LDT に認められたが中脳に比べ若干弱い発現であった。また、延髄も同様に若干弱い発現を示した。脊髄の L6/S1 領域では灰白質全体にその発現が強く認められ、Onuf 核にも強い発現が確認された。

○研究4（樹林担当）の結果

7）N-エチルモルファンの合成

シクロヘキセノンより 7 工程で得られたケトアミノアルコールをベンゼン中加熱すると 4 環性 N,O-アセタールが生成した。次いで水素化アルミニウムによる還元的開環、N-置換基の還元的除去、N-エチル化を経て N-エチルモルファンが得られた。

D. 考　察

Gly 神経系の排尿反射への関与は単純ではなく、脳幹部では、部位により排尿反射の潜時や閾値に関わる機構を介して排尿反射に促進的または抑制的に寄与し、脊髄では外尿道括約筋支配ニューロンの抑制を介して尿道抵抗を調節し、排尿反射に抑制的に寄与する可能性が考えられた。

グリシン受容体ブロック作用をもつ DM は、排尿反射を強く抑制した。最近、仙随の抑制性のグリシン神経が外尿道括約筋支配の陰部神経を支配していることが報告された。従って、静脈内に投与した DM の作用の一部は、仙随のグリシン受容体の抑制を介して発現したことが示唆される。

不安定膀胱は、頻尿や尿失禁の主因の一つと考えられているが、そのメカニズムは不明である。本成績はグリシンが脳幹部において不安定膀胱の発現に関与している可能性を示しており、今後、詳細な研究が必要である。

本年度確立した新規微量圧注入法により、今後より詳細な解明が期待される。

また、DM は尿道抵抗の上昇に加え、持続的に膀胱容量を増大した。よって、投与量を厳密に設定することで、尿失禁や蓄尿障害に有効である可能性が考えられた。DM は鎮咳薬として長年臨床使用されていることから毒性試験等はすでにクリアしており、新規蓄尿障害治療薬としての開発が有望視される。

5-HT 神経系は仙随の副交感神経節前ニューロンを抑制し、排尿反射を抑制することが知られている。本研究の成績は、5-HT 受容体サブタイプの中で、5-HT1A 受容体が排尿反射の調節に関与していることを示唆する。

これまでの検討から、DM はグリシン結合サイトまたはその極近傍に結合する可能性が高いと考えられていた。しかし、本研究において DM の作用は調べたいずれの変異体でも野生型と変わらなかった。一方でストリキニーネは $\alpha 1$ (F159Y/Y161F) 変異体において高感受性を示した。よって、DM の結合サイトはグリシン、ストリキニーネ、アルコールの各結合サイトとは異なることが示唆される。DM は $\alpha 2$ サブタイプに感受性が高かったことから、今後グリシン結合部位近傍もしくはそのコンホメーションに影響しうる領域で、$\alpha 1$ と $\alpha 2$ で相同性が低い領域にターゲットを絞る必要がある。また、$\alpha 2$ サブタイプは胎生期から生後早い段階までの期間に中枢神経系の広い部位に分布するが、生後は $\alpha 1$ 受容体に置き換えられる。排尿障害治療薬開発を念頭に考えると $\alpha 2$ よりも $\alpha 1$ に選択性のある薬物の探索が必要かもしれない。両サブタイプの発現時期と排尿機能への影響との関連は今後検討すべき課題であろう。

LDT における神経連絡の検討より、LDT は PAG、延髄孤束核、疑核、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核と神経連絡があることが示唆された。また 2、10、30 日と経日的に神経連絡のパターンを比較することで、DiI は PAG から脊髄の方へ軸索輸送した可能性が考えられ、PAG から Onuf 核への神経連絡の存在が示唆された。さらに過去の知見で疑核から脊髄 L6/S1 領域へ投射するという報告もあり、今回の検討でも同様のことがおこった可能性がある。今後は、PAG における神経連絡の検討など、詳細な解析が必要である。

Fos 発現の検討では、PAG、中縫線核、橋網様核口部などの中脳、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関わっていることが示唆された。今回用いた刺激方法は 0.1％酢酸を膀胱内に注入しており、化学的な膀胱侵害刺激という側面から排尿反射に関連する神経核の同定をおこなった。しかし今後詳細に排尿機能との関連を明らかにしていくためには、その他の化学的刺激物質での検討や物理的、電気的刺激による検討、さらに病態動物や加齢動物での検討、夜尿症の治療に用いられる中枢性排尿治療薬イミプラミンの影響など、さまざまな条件下で Fos の発現を検討していく必要がある。また、それと並行して脳・脊髄内における転写因子 *c-fos* の *in situ* hybridization もおこないメッセンジャー RNA レベルでの詳細な解析も必要と思われる。

E. 結　論

Gly 神経系は脳幹および脊髄の二つのレベルにおいて排尿反射に促進的にも抑制的にも寄与している。

DM は新規蓄尿障害治療薬としての開発が有望視される。

DM のグリシン電流抑制作用にはサブタイプ特異性があり、$\alpha 1$ より $\alpha 2$ に感受性が高いこと、DM の結合サイトはグリシンおよびストリキニーネ結合部位とは異なることが明らかとなった。

ラットにおいて PAG、中縫線核、橋網様核口部、LDT、延髄孤束核、疑核、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関わっていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G．研究発表

1）論文発表

○高濱和夫、白崎哲哉：　排尿反射と5-HT1Aおよびグリシン受容体、日本薬理学雑誌、118、73（2001）

○高濱和夫、丸山　格、岡部裕一、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉：　日本薬理学雑誌（投稿中）

○高濱和夫、丸山　格、岡部裕一、副田二三夫、白崎哲哉：　グリシン受容体ブロック作用をもつデキストロメトルファンの排尿反射に対する作用－シストメトリー法による解析、日本薬理学雑誌（投稿中）

2）学会発表

○I. Maruyama, Y. Okabe, T. Shirasaki, H. Ishibashi, K. Takahama. Are glycine receptors involved in micturition reflex? Jpn. J. Pharamacol. 85 (Suppl.I), 240P (2001)

○岡部裕一、：　排尿反射の中枢機序に関する薬理学的研究、第４回ブレインサイエンス研究会要旨集 11P（2001）

○岡部裕一、丸山　格、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫：　排尿反射の中枢内神経伝達機序に関する研究－グリシンおよび関連物質の排尿反射に対する作用－、日本薬理学雑誌、119、68P（2002）

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

グリシンおよび関連物質の排尿反射に対する作用一末梢および脳内投与によるシストメトリー解析

分担研究者　高濱　和夫　熊本大学薬学部教授

研究要旨：　排尿反射の中枢機序に関しては不明な点が多い。本研究では、脳幹および脊髄の重要な抑制性神経伝達物質であるグリシンとその受容体にフォーカスして排尿反射への関与と機序を明確にすることを試みた。動物は体重 250-300 g の雄性 S.D.ラットをウレタン麻酔下に用いた。ストリキニーネ、グリシンおよびグリシンプロドラッグであるｚ－グリシナミドの全身投与、ならびに本研究において新規に開発した脳内微量注入実験から、グリシン神経系は脳幹および脊髄の二つのレベルで排尿反射に関与し、前者は排尿促進的に、後者は尿道抵抗の調節に関与すると考えられた。グリシン拮抗作用のあるデキストロメトルファンはシングルシストメトリーより尿道抵抗の上昇および膀胱容量の増大を惹起し、尿失禁や蓄尿障害に有効である可能性が示唆された。また、NMDA 受容体は排尿閾値の調節に、5-HT_{1A} 受容体は最大膀胱内圧、尿道抵抗および排尿流速の調節に関与することが示唆された。

A. 研究目的

現在臨床で使用されている排尿障害治療薬はα1 ブロッカーや抗コリン薬など末梢に作用点をもつ薬物である。しかし、排尿障害の病態は複雑であり、脳卒中やアルツハイマー病、痴呆症など中枢神経系の障害による神経因性排尿障害が多く存在することを考慮すると、中枢神経系に作用点を持つ新規排尿障害治療薬の開発が望まれている。グリシン神経系は排尿中枢が存在すると言われている脳幹および脊髄の主要な抑制性神経伝達物質であるにもかかわらず、排尿反射における役割はほとんど検討されていない。そこで、排尿反射におけるグリシン神経系の役割を解明し、臨床応用可能なシード化合物を探索する基盤を形成することを目的として、シストメトリー法およびシングルシストメトリー法によるグリシンおよび関連物質の排尿反射に対する効果の詳細な検討を行い、並行して新規脳内微量注入法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 膀胱収縮の測定：　体重 250-300 g の SD 系雄性ラットを用いた。ウレタン麻酔下に開腹し、膀胱頂部よりカテーテルを挿入した。本カテーテルをインフュージョンポンプおよび圧トランスデューサーに接続し、インフュージョンポンプより一定速度（0.106 ml/min）で生理食塩水を膀胱内に注入した。このときの膀胱内圧変化を生体アンプで増幅後レクチコーダーに記録した（シストメトログラム）。

   シングル CMG の記録にあたっては、1 回の排尿反射が終了した直後に膀胱内から残尿を除去し、排尿反射終了から 30 秒後に次の CMG の記録を開始した。連続 CMG およびシングル CMG のいずれの場合も、成績は薬物投与前の各パラメーターの値を 1 として、それに対する比率を求め、その比率の平均値±標準誤差として表わした。

   律動性収縮の記録にあたっては、尿道を結紮し、律動的膀胱収縮が起きるまで生理食塩水を膀胱に注入した後、等容積条件下に実験を行った。

2. 脳内微量薬物注入法：小動物用脳固定装置にラットの頭蓋を正常位に固定し、腹部を反転させて上記の測定準備を行った後、歯科用ドリルで頭蓋に小孔を開け、先端径 5-15 μm の 7 連微小ガラスピペットをパルスモーター式マイクロマニプレータを用いて第四脳室に刺入した。微小ガラスピペットの刺入は Paxinos and Watson の脳地図に従い行なった。薬物は、微小ガラスピペットに接続された圧注入装置（ピコスピリツアー）を用いて数１０nl の容量で微量注入した。微小ガラスピペットは、

外径1mmの芯入りガラス管を7本束ね、縦引きプラーにて作成した後、電極研磨装置にてピペット先端を上記の径に研磨して成形した。

（倫理面への配慮）

「動物実験に関する日本薬理学会指針」に従い実施した。

C. 研究結果

1. 律動性収縮：デキストロメトルファンは1, 3, 5および10 mg/kg, i.v. で用量依存的に律動性収縮を消失させ、10 mg/kgでのその消失時間は37.5±4.1min であった。グリシンプロドラッグであるZ-グリシナミドは50mg/kgから100mg/kgの濃度範囲において律動性収縮を濃度依存的に増加し、膀胱内圧を減少した。
2. シストメトリー：デキストロメトルファンを静脈内投与すると、排尿潜時の延長(6.8±3.9)、排尿閾値の上昇(2.4±0.03)、最大膀胱内圧の増加(1.2±0.03)、排尿流速の顕著な減少(0.16±0.08)、尿道抵抗の急速な増加(8.6±2.3)および排尿間隔の延長が観察された。排尿閾値、膀胱内圧、排尿流速および尿道抵抗への影響は30分から1時間以上持続した。膀胱コンプライアンスは最初の10分は減少(0.27±0.02)し、その後延長した(1.7±0.93)。グリシン拮抗薬、ストリキニーネの作用は、各パラメーターのうち排尿流速の減少（0.58±0.11）、尿道抵抗の増加(2.05±0.22)がデキストロメトルファンのそれと類似した。排尿閾値（0.81±0.06）、排尿潜時（0.74±0.08）および最大膀胱内圧（1.00±0.14）に著明な影響を与えなかった。この他、MK-801、PCPA, 8-OH-DPAT 等を用いた薬理実験から排尿閾値と膀胱内圧にはそれぞれNMDA及び$5\text{-}HT_{1A}$受容体が関与する可能性が示唆された。

   Z-グリシナミドは対照群を1とした場合、排尿潜時(0.51±0.07)、排尿流速(0.48±0.11)、排尿閾値（0.36±0.10）は減少させ、尿道抵抗（2.62±0.54）とコンプライアンス（1.98±0.47）は上昇させた。最大膀胱内圧（1.21±0.11）は変化しなかった。
3. シングルシストメトリー：連続したシストメトリーでは、デキストロメトルファンにより排尿潜時がまず延長後、つづいて短縮し、コンプライアンスは増加後低下した。しかし、デキストロメトルファンは尿道抵抗の上昇もきたし、排尿できずに膀胱内に残尿が生じるため排尿潜時の短縮およびコンプライアンスの低下が観察された可能性が考えられた。そこで、シングルシングルシストメトリーにより再評価した結果、排尿潜時の延長（5.08±0.80分 → 8.09±1.05分）、つまり膀胱容量の増大（0.54±0.08 ml → 0.86±0.11 ml）が投与直後から観察され、30分から1時間以上持続した。この結果、膀胱コンプライアンスは影響されないことが明らかとなった(0.53±0.07 → 0.47±0.05)。その他のパラメーターについては連続シストメトリーと同様であった。
4. 脳室内投与：30Gステンレス管を用いてグリシンを中脳水道へ50-100μg投与すると、1/10の確率で不安定膀胱様の応答を示しながら膀胱収縮反射の促進が観察された。さらに200-300μgに濃度をあげると膀胱反射は逆に抑制された。

   30Gステンレス管の刺入は脳組織にダメージを与える。そこで、損傷を最小限に留め、かつ注入部位を限局させるために、多連ガラス微小ピペットに圧注入装置を併用した新規微量注入法を考案し実用化することを試みた。微小ピペット先端の研磨角度および先端径の決定、投与量と圧の相関性など基本事項について検討を加えた結果、実験に使用できることがわかった。本法により現在までのところ、グリシン50μgを100 nlの容量で中脳水道および中脳水道周囲灰白質へ微量注入した場合、排尿閾値が有意に低下し、排尿潜時は短縮される傾向を示した。また、コンプライアンスは低下した。

D. 考　察

ストリキニーネの作用とz-グリシナミドの作用に類似点がみられ、さらに脳室内に投与したグリシンにより排尿潜時の延長と短縮という相反する結果が得られるなどグリシン神経系の排尿反射への関与は単純ではないことが示唆された。おそらくグリシンは脳幹部の排尿中枢において、排尿反射の潜時や閾値に関わる機構を介して排

尿促進に寄与し、脊随レベルで外尿道括約筋支配ニューロンに作用して尿道抵抗の調節に関与していると考えられる。デキストロメトルファンとPCPA および 8-OH-DPAT を用いた実験から 5-HT_{1A} 受容体は最大膀胱内圧、尿道抵抗および排尿流速の調節に関与していると考えら、さらにMK-801 とデキストロメトルファンの作用の検討から NMDA 受容体は排尿閾値の調節に関与すると考えられた。 $5\,\text{HT}_{1A}$ 受容体に関しては L6-S1 脊髄のそれが排尿反射に関与するとの報告があるが、詳細は今後の検討が必要であろう。また、デキストロメトルファンは尿道抵抗を上昇させ、膀胱容量を増大させること、ならびにそれらの作用が持続的であったことから、投与量の設定を細かく行うことで、尿失禁や蓄尿障害に有効である可能性が考えられた。本薬物は現在臨床使用されている医薬品であることから、新規蓄尿障害治療薬としての開発が有望視される。

E. 結　論

① グリシン神経系は脳幹レベルで排尿促進的に、脊髄レベルでは尿道抵抗の調節に関与している可能性が示唆された。

② NMDA 受容体は排尿閾値の調節に関与することが明確となった。

③ 5-HT_{1A} 受容体は最大膀胱内圧、尿道抵抗および排尿流速の調節に関与することが示唆された。

④ デキストロメトルファンは尿道抵抗の上昇および膀胱容量の増大を惹起し、尿失禁や蓄尿障害に有効である可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

○高濱和夫、白崎哲哉., 排尿反射と 5-HT_{1A} およびグリシン受容体. 日本薬理学雑誌　**118**, 73 (2001) .

○Maruyama I., Okabe Y., Shirasaki T., Ishibashi H., Takahama K., Are glycine receptors involved in micturition reflex? Jpn. J. Pharmacol. 85, 240p (2001).

2. 学会発表

第 4 回ブレインサイエンス研究会

岡部裕一　排尿反射の中枢機序に関する薬理学的研究

第 54 回日本薬理学会西南部会

岡部裕一、丸山　格、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫、排尿反射の中枢内神経伝達機序に関する研究―グリシンおよび関連物質の排尿反射に対する作用―

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

グリシン受容体におけるデキストロメトルファンの作用部位に関する卵母細胞翻訳系での解析

分担研究者　白﨑　哲哉　熊本大学薬学部助教授

研究要旨：　グリシン受容体α１およびα２サブユニットの野生型および変異体を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用い、デキストロメトルファン（DM）およびストリキニーネ感受性のサブタイプ特異性およびDM結合部位の探索を試みた。本研究より、ストリキニーネとDMはそれぞれα１とα２に感受性が高く、サブタイプ特異性があることが判明した。また、α１(Y161F)、α１(F159Y/Y161F)およびα１(S267I)変異体においてDMのグリシン電流抑制作用は野生型と変わらず、ストリキニーネはα１(F159Y/Y161F)において高感受性を示した。よって、DMの結合サイトはグリシン、ストリキニーネ、アルコールの各結合部位とは異なることが示唆された。成長過程におけるα１、α２サブタイプの発現時期と排尿機能への影響との関連は今後検討すべき課題である。

A. 研究目的

グリシン応答抑制作用のあるデキストロメトルファン（DM）を静脈内投与し、シストメトリー法にて記録すると、尿道抵抗の上昇など排尿反射への明らかな影響が観察される。しかし、グリシン受容体にもサブタイプが存在し、DMがどのサブタイプに作用するのかなどグリシン受容体への作用メカニズムの詳細は不明な点が多い。そこで本研究では、アフリカツメガエルの卵母細胞にグリシン受容体α１またはα２サブユニットの野生型または変異体を発現させ、膜電位固定下にDMのグリシン電流に対する作用を調べることで、グリシン受容体上のDM結合部位やサブタイプ特異性など、グリシン応答拮抗作用メカニズムを明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

アフリカツメガエルの卵母細胞に野生型α１サブユニット、α１(Y161F)変異体、α１(F159Y/Y161F)変異体、α１(S267I)変異体または野生型α２サブユニットcRNAを1～2 mg/mLで10～20nL注入し、20℃で12～48時間培養した。培養後、2本の微小電極を卵母細胞に刺入し、2電極膜電位固定法によりグリシン電流を記録した。薬液投与は外液急速交換法（Y-チューブ法）にて行った。

（倫理面への配慮）

「動物実験に関する日本薬理学会指針」に従い実施した。

C. 研究結果

グリシン電流のEC_{50}値はα１で6.0×10^{-5}M、α２で7.6×10^{-5}Mであり、用量-反応関係はαサブユニットのサブタイプに依存しなかった。一方、両サブタイプにおいてEC_{50}値の濃度のグリシンを用いて、競合的拮抗薬であるストリキニーネのIC_{50}値を求めるとα１で2.4×10^{-8}M、α２で9.9×10^{-8}Mであり、α１の方が感受性が高かった。これに対して、これまでにストリキニーネ同様に競合拮抗作用があることが示唆されていたDMでは、そのIC_{50}値はα_1で3.0×10^{-5}M、α２で7.9×10^{-6}Mであり、ストリキニーネとは逆のサブタイプ特異性を示した。DMの構造類似体であるコデインもα２に高感受性を示した。カフェインではα１に若干感受性が高い傾向が見られてが、明らかなサブタイプ特異性は見られなかった。

グリシン結合サイトでありグリシンおよびβアラニンの感受性を増加させる159番目と161番目のアミノ酸の変異体α１(Y161F)お

よびα1(F159Y/Y161F)を用いてストリキニーネとDM の抑制作用を検討したところ、ストリキニーネの IC_{50} 値はα1(F159Y/Y161F)変異体において有意に減少し、高感受性を示した。しかし、DM のそれは野生型とほぼ同じであった。さらに、アルコールによるグリシン受容体機能の制御に深く関与する267番目のセリンをイソロイシンに置換したα1(S267I)変異体においてもDM のグリシン電流抑制作用は野生型とほぼ同じであった。

D. 考察

これまでの検討から、DM はグリシン結合サイトまたはその極近傍に結合する可能性が高いと考えられていた。しかし、本研究においてDMの作用は調べたいずれの変異体でも野生型と変わらなかった。一方でストリキニーネはα1(F159Y/Y161F)変異体において高感受性を示した。よって、DM の結合サイトはグリシン、ストリキニーネ、アルコールの各結合サイトとは異なることが示唆される。DM はα2サブタイプに感受性が高かったことから、今後グリシン結合部位近傍もしくはそのコンホメーションに影響しうる領域で、α1 とα2 で相同性が低い領域にターゲットを絞る必要がある。また、α2サブタイプは胎生期から生後早い段階までの期間に中枢神経系の広い部位に分布するが、生後はα1受容体に置き換えられる。排尿障害治療薬開発を念頭に考えるとα2よりもα1に選択性のある薬物の探索が必要かもしれない。両サブタイプの発現時期と排尿機能への影響との関連は今後検討すべき課題であろう。

E. 結 論

DM のグリシン電流抑制作用にはサブタイプ特異性があり、α1よりα2に感受性が高いこと、DM の結合サイトはグリシンおよびストリキニーネ結合部位とは異なることが明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

排尿反射の中枢内神経回路に関する神経組織化学的、神経化学的研究

分担研究者　田中　英明　熊本大学大学院医学研究科教授

研究要旨：我々は排尿反射の中枢性機序を解明するにあたり、まず排尿反射に関わる諸核を同定し、諸核の神経連絡とその機能的関連を明らかにするために、排尿中枢が存在するといわれている橋の背外側被蓋部(LDT)における神経連絡についての検討を試み、さらに末梢神経刺激によりそのレベルが変動するc-fos蛋白(Fos)をマーカーとして、膀胱内刺激時における脳・脊髄(仙髄)内のFos発現について調べた。その結果、中脳中心灰白質(PAG)、中縫線核、橋網様核口部、LDT、延髄孤束核、疑核、脊髄L6/S1領域のOnuf核などの神経核が排尿反射に関わっていることを示唆する知見を得た。

A. 研究目的

我々は排尿反射の中枢性機序を解明するにあたり、まず排尿反射に関わる諸核を同定し、諸核の神経連絡とその機能的関連を明らかにする必要があると考えた。過去にいくつかの神経連絡に関する知見はあるが、その機能的関連までを明らかにしたものは皆無といってよい。

そこで我々がこれまで研究に用いてきた8～9週齢の雄性SDラットにおいて、まず排尿中枢が存在するといわれている橋の背外側被蓋部(LDT)における神経連絡についての検討を試みた。さらに末梢神経刺激によりそのレベルが変動するc-fos蛋白(Fos)をマーカーとして、膀胱内刺激時における脳・脊髄(仙髄)内のFos発現についても調べた。

B. 研究方法

1. 神経連絡の検討

8～9週齢の雄性SDラットをウレタン麻酔後、脳固定装置により固定した。ラムダ縫合周辺の頭蓋を開け、LDT領域に神経線維トレーサーDiIを注入した。注入は先端径が20μmのガラスピペットにDiIを充填後、ピコスピリッツァーによる高い空気圧(40psi, 50ms)を用いておこなった。その後縫合し、実験動物施設にて飼育した。以上の操作は無菌的におこない、実験動物施設での飼育中は抗菌薬硫酸ストレプトマイシンを筋肉内注射した。DiIの注入から2、10、30日後と3種類の動物を作製し、それぞれ4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。脳は中脳から延髄までを、脊髄はL6/S1領域を摘出し、厚さ100μmのビブラトーム切片を作製、鏡検には蛍光顕微鏡を用いた。

2. Fos発現の検討

8～9週齢の雄性SDラットをウレタン麻酔後、背位に固定し膀胱内にカテーテル(PE-10)を挿入した。動物の状態が安定したのを確認した後、0.1%酢酸を3時間持続注入した。注入終了後4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳は中脳から延髄までを、脊髄はL6/S1領域を摘出した。厚さ50μmのミクロトーム切片を作製し、免疫組織化学的手法を用いてFosの発現を調べた。

(倫理面への配慮)

「動物実験に関する日本薬理学会指針」に従い実施した。

C. 研究結果

1. 神経連絡の検討

DiIをLDTに注入したところ、主に中脳中心灰白質(PAG)、延髄孤束核、疑核、脊髄L6/S1領域(前根のOnuf核など)において蛍

光像が確認された。また DiI 注入から 2、10、30 日後の動物を作製したが、各脳領域の蛍光の強さは経日的に違いがみられた。まず PAG 領域では 2 日後で最も強い蛍光を発しており、10 日後ではやや弱くなり、30 日後では確認されなかった。同じ傾向は延髄孤束核、疑核においても認められた。これらとは逆に L6/S1 領域の Onuf 核では 30 日後で最も強い蛍光を発しており、10 日後、2 日後と次第に弱くなっていった。

2. Fos 発現の検討

中脳では PAG と中縫線核(median raphe nucleus)、橋網様核口部(pontine reticular nucleus, oral part)で比較的強い発現が認められた。橋ではバリントン核などの LDT に認められたが中脳に比べ若干弱い発現であった。また、延髄も同様に若干弱い発現を示した。脊髄の L6/S1 領域では灰白質全体にその発現が強く認められ、Onuf 核にも強い発現が確認された。

D. 考察

LDT における神経連絡の検討より、LDT は PAG、延髄孤束核、疑核、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核と神経連絡があることが示唆された。また 2、10、30 日と経日的に神経連絡のパターンを比較することで、DiI は PAG から脊髄の方へ軸索輸送した可能性が考えられ、PAG から Onuf 核への神経連絡の存在が示唆された。さらに過去の知見で疑核から脊髄 L6/S1 領域へ投射するという報告もあり、今回の検討でも同様のことがおこった可能性がある。今後は、PAG における神経連絡の検討など、詳細な解析が必要である。

Fos 発現の検討では、PAG、中縫線核、橋網様核口部などの中脳、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関わっていることが示唆された。今回用いた刺激方法は 0.1%酢酸を膀胱内に注入しており、化学的な膀胱侵害刺激という側面から排尿反射に関連する神経核の同定をおこなった。しかし今後詳細に排尿機能との関連を明らかにしていくためには、その他の化学的刺激物質での検討や物理的、電気的刺激による検討、さらに病態動物や加齢動物での検討、夜尿症の治療に用いられる中枢性排尿治療薬イミプラミンの影響など、さまざまな条件下で Fos の発現を検討していく必要がある。また、それと並行して脳・脊髄内における転写因子 *c-fos* の *in situ* hybridization もおこないメッセンジャー RNA レベルでの詳細な解析も必要と思われる。

E. 結論

8～9週齢の雄性 SD ラットにおいて PAG、中縫線核、橋網様核口部、LDT、延髄孤束核、疑核、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関わっていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

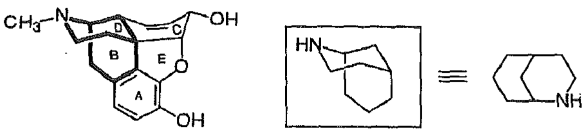
N-エチルモルファンの合成

分担研究者　樹林　千尋　東京薬科大学薬学部教授

研究要旨：シクロヘキセノンより 7 工程で得られたケトアミノアルコールをベンゼン中加熱すると 4 環性 N,O-アセタールが生成した。次いで水素化アルミニウムによる還元的開環、N-置換基の還元的除去、N-エチル化を経て N-エチルモルファンが得られた。

A. 研究目的

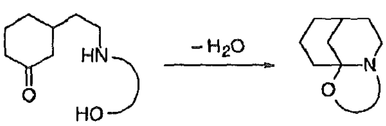
モルヒネの B/D 環に相当するモルファン骨格に対しては、従来実用的な合成法が報告されていなかった。本研究は、安価に市販されているシクロヘキセノンを出発原料として、モルファン骨格の実用的な新規構築法を開発し、さらにモルファン誘導体である N-エチルモルファンを合成することを目的とする。



Morphine　　Morphan

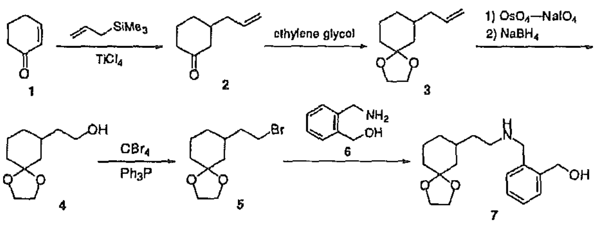
B. 研究方法

N-エチルモルファンを合成するための基本手段として、ケトアミノアルコールの脱水縮合によりモルファン骨格を一挙に構築する方法(式1)を考慮した。



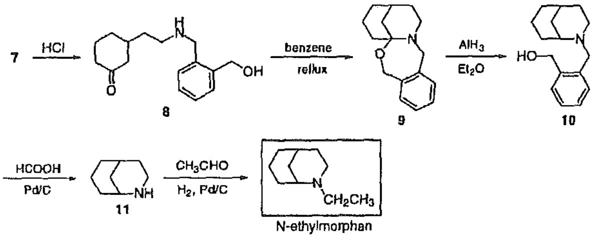
(1)

上記基本方針に基づき、ケトアミノアルコールのアセタール保護体 **7** を下記の経路により合成した。すなわち市販のシクロヘキセノン **1** より 4 工程を経てアルコール **4** とし、次いでブロム化を経て[2-(アミノメチル)フェニル]メタノール(**6**) と反応させ目的物 **7** を得た。



C. 研究結果

7 のアセタール基を除去して得られたケトアミノアルコール **8** の分子内脱水環化を行うと、モルファン骨格 **9** が生成した。次いで **9** の還元的 C-O 結合開裂及び N-置換基の除去により得られたモルファン **11** の N-エチル化を行うことにより、目的とする N-エチルモルファンの合成が達成された。



D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

E. 知的所有権の出願・登録状況
なし

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
I. Maruyama, Y. Okabe, T. Shirasaki, H. Ishibashi, K. Takahama	Are glycine receptors involved in micturition reflex?	Jpn. J. Pharmacol.	85 (Suppl.I)	240P	2001
高濱和夫、白崎哲哉	排尿反射と 5-HT_{1A} およびグリシン受容体	日本薬理学雑誌	118巻	73	2001
岡部裕一	排尿反射の中枢機序に関する薬理学的研究	第4回ブレインサイエンス要旨集		11P	2001
岡部裕一、丸山　格、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫	排尿反射の中枢内神経伝達機序に関する研究－グリシンおよび関連物質の排尿反射に対する作用－	日本薬理学雑誌	119巻3業	68P	2002
高濱和夫、丸山　格、岡部裕一、山本　巌、副田二三夫、白崎哲哉	グリシン受容体ブロック作用をもつデキストロメトルファンの排尿反射に対する作用－シストメトリー法による解析	日本薬理学雑誌			投稿中