

厚生労働科学研究費補助金
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
(H13 - 長寿 - 011)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高濱 和夫

平成15(2003)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	13
1. 排尿反射の中枢内グリシン神経伝達に関する研究 —グリシンおよび関連物質の中脳水道周囲灰白質内投与によるシストメトリー解析	高濱和夫 15
2. ラット橋排尿中枢 Barrington 核ニューロンのグリシン応答性に関する研究	白崎哲哉 19
3. 排尿反射の中枢内神経伝達に関する神経組織化学的研究	田中英明 21
4. N-エチルモルファン合成	樹林千尋 23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29
1. 高濱和夫、岡部裕一、田中明子、副田二三夫、白崎哲哉 グリシンの中脳水道周囲灰白質への投与は排尿反射を促進する —多連微小ピペット法およびシストメトリー法による解析 日本薬理学雑誌（投稿準備中）	31
2. 岡部裕一、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 中脳水道中心灰白質へのグリシンの微量注入は排尿反射を促進させるか？ 日本排尿機能学会誌 13 巻 1 号 110 (2002)	71
3. 高濱和夫 排尿障害治療薬、特に排尿反射強化薬の開発を指向した排尿反射の中枢機序解明 に関する研究 長寿医療委託研究報告集 平成 13 年度 124 (2003)	72
4. 高濱和夫 頻尿・尿失禁治療薬の薬理 薬局 53 巻 8 号 21-28 (2002)	73
5. 高濱和夫	

特集 精密設計が生む画期的新薬の射程 頻尿・尿失禁治療薬 日経メディカル 1月号 48-49 (2003)	82
6. K Yamasaki et al. Glycine responsiveness of neurons in Barrington's nucleus, a micturition center in rat J. Pharmacol. Sci. 91(Suppl. I) 222P (2003)	84
7. T. Shirasaki et al. Glycine-induced Cl ⁻ currents in acutely dissociated rat Barrington's nucleus neurons Neuroscience submitted	85
8. T Shirasaki et al. δ -opioid receptor antagonists inhibit GIRK currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat Br. J. Pharmacol. submitted	118
9. 山崎広大、白崎哲哉、阿部恵介、副田二三夫、高濱和夫 排尿中枢 Barrington's 核における glycine 誘発電流の解析 第 19 回日本薬学会支部大会講演要旨集 47 (2002)	145
10. A. Honda et al. Effects of dextromethorphan (DM) and strychnine (Str) on bladder irritation-induced Fos-like protein (FLP) expression in the brainstem and spinal cord of rats J. Pharmacol. Sci. 91(Suppl. I) 212P (2003)	146
11. 本田 淳、副田二三夫、白崎哲哉、田中英明、高濱和夫 膀胱内侵害刺激による下位脳幹および脊髄における Fos 蛋白の発現に対する デキストロメトルファン作用 日本排尿機能学会誌 13 巻 1 号 111 (2002)	147
12. 副田二三夫、本田 淳、白崎哲哉、田中英明、高濱和夫 膀胱内侵害刺激による Fos タンパク質の脳内発現と排尿障害治療薬の作用機序解明 への応用 日本排尿機能学会誌 (投稿中)	148

1. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（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 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。しかし、排尿反射の中枢メカニズムは不明な点が多い。本研究においては、第1に、排尿中枢のひとつである中脳水道周囲灰白質(PAG)におけるグリシン受容体mRNAの発現を検討し、グリシンをPAGに微量注入して、排尿反射に対する作用を検討した。さらに、PAGからの神経投射を蛍光プローブDilを用いて調べた。第2に、橋排尿中枢としてよく知られているバリントン核のニューロンを急性単離し、そのグリシン応答を明確にするとともに、グリシン応答性ニューロンの形態と核内分布を検討した。第3に、膀胱刺激による排尿反射関連核でのFos蛋白発現に対して、ストリキニーネ(Str)およびデキストロモルファン(DM)が影響するか検討した。さらに、先に確立したモルファン骨格の実用的な新規構築法を用いて、シクロヘキセノンを出発原料とし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) Bregma -6800~-8800 μ mのPAGにおいて、検討した全領域でグリシン受容体 $\alpha 1$ mRNAの発現が認められた。2) Bregma -8300 ~ -8800 μ mの腹内側PAG領域に限局して、グリシンが最大膀胱内圧の上昇、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮、膀胱コンプライアンスの増加、排尿流速の増加、尿道抵抗の低下を惹起した。3) 検討した全てのバリントン核ニューロンにおいて、グリシンはストリキニーネ感受性Cl⁻電流を惹起した。グリシンの最大応答とGABAの最大応答はほぼ同じであり、その比やグリシン応答の大きさはバリントン核内の部位やニューロンの形態、生後の日齢に依存しなかった。4) DMとStrはいずれも視索前野、PAG、バリントン核や青斑核においてFos陽性細胞の数を有意に減少させた。感覚の1次入力部位である脊髄後角や背側交連においては、StrのみがFosの発現を抑制した。5) 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で加熱すると、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(500mg)を得た。

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

研究協力者

副田二三夫・熊本大学薬学部 助手

A. 研究目的

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。しかし、現在中枢性の排尿障害治療薬は存在しない。その理由として、排尿反射の中枢経路やそれに関わる伝達物質の役割などがほとんど不明なことが挙げられる。グリシンは、脳幹・脊髄レベルで最も重要な抑制性神経伝達物質である。我々は、長年従事した咳反射の研究から、グリシンの脳幹への投与が咳反射を強化することを見出した。このことは、グリシン神経系の活性化が、脳幹反射の低下に起因する疾患に対して治療薬開発のターゲットになることを示唆する。そこで、我々はこのグリシンに注目して排尿反射の一端を解明し、中枢

性排尿障害治療薬を開発することを目指している。

これまでに我々は、グリシンおよび関連薬物の全身投与や脳室内注入実験から、グリシン神経系は脳幹レベルで排尿反射に促進的に作用する可能性を示唆してきた。平成 14 年度はその可能性をより明確にするために、以下のことを検討した。第 1 に、排尿中枢のひとつである中脳水道周囲灰白質(PAG)におけるグリシン受容体 mRNA の発現を検討し、さらに 7 連微小ガラスピペットからグリシンを PAG に微量注入して、排尿反射に対する作用を検討した。第 2 に、古くから橋排尿中枢としてよく知られているバリントン核のニューロンを急性単離し、そのグリシン応答を明確にするるとともに、グリシンが橋排尿中枢レベルで排尿反射に関与するか検討する手がかりを得るために、グリシンに応答性ニューロンの形態、バリントン核内の分布ならびに成長に伴う変動を検討した。第 3 に、膀胱の 0.1% 酢酸生理食塩液刺激により PAG やその他の排尿反射関連核において誘発される Fos 蛋白の発現に対して、ストリキニーネ(Str)やグリシン誘発電流抑制作用のある中枢性鎮咳薬デキストロメトルファン(DM)が影響するか検討した。さらに、モルファン骨格を持つ薬物がグリシン受容体を介する排尿障害治療薬となる可能性があることから、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、先に確立したモルファン骨格の実用的な新規構築法を用いて、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) PAG におけるグリシン受容体の発現

8~9週齢の雄性 SD ラットを用いた。Bregma -6800~-8800 μm の領域から、200 μm の連続冠状脳薄切片を作製し、PAG をダイセクションした。さらに PAG を背側と腹側に細分した。AGPC 法により RNA を抽出し、グリシン受容体 $\alpha 1$ サブユニット特異的プライマーを用いて RT-PCR 解析をおこなった。

2) 膀胱収縮の測定

体重 250-300g の SD 系雄性ラットを用いた。ウレタン麻酔下に膀胱頂部より膀胱内にカテーテルを刺入し、カテーテルの他端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た。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、このときの膀胱内圧変化を記録した(シストメログラム, 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留する生理食塩水を除去し、排尿反射終了 30 秒後に、次の CMG 記録を開始した。成績は薬物投与前の各パラメーターの値を 1 として、相対値で求めた。

3) PAG および大槽への微量薬物注入法

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 2) 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 18~24 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 PAG および大槽(小脳下延髄槽)に刺入した。刺入は Paxinos and Watson の脳地図に従い行った。薬物はピコスプリッターを用いて 45nl の容量で微量注入した。

4) 尾側 PAG からの神経投射

8~9週齢の雄性 SD ラットをウレタン麻酔後、脳固定装置に固定した。ラムダ縫合周辺の頭蓋を開け、Bregma -8300 μm に位置する PAG に神経線維トレーサー Dil を注入した。注入は先端径 20 μm のガラスピペットに充填した Dil にピコスプリッターより高圧を短時間かけ行った。Dil の注入から 14 日後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。視床下部から延髄までの脳と、L6/S1 領域の脊髄を摘出し、厚さ 50 μm の冠状薄切片を作製した。鏡検には蛍光顕微鏡を用いた。

○研究2(白崎担当)

5) 急性単離バリントン核ニューロンにおけるグリシン誘発電流の記録

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットを雌雄の別なく使用した。バリントン核を含む厚さ 400

1m の脳薄切片を作成し、酵素処理と機械的処理によりバリントン核ニューロンを単離した。急性単離バリントン核ニューロンにニスタチンまたはグラミシジン穿孔パッチクランプ法を適用して、グリシン電流を記録した。薬液投与は急速交換法(Y-チューブ法)にて行った。

○研究3(田中担当)

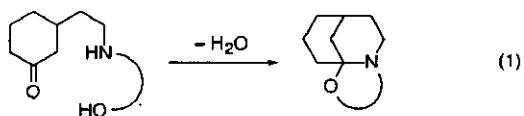
6) Fos の免疫組織化学

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、膀胱頂部より膀胱内にカテーテルを挿入した。動物の状態が安定した後、DM は 10mg/kg、Str は 0.3mg/kg をそれぞれ静脈内に投与した。薬物投与の 15 分後から、0.1% 酢酸生理食塩液を膀胱内に2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、視床下部から延髄までの脳と L6/S1 領域の脊髄を摘出した。厚さ 40 μm の冠状凍結切片を作製し、免疫組織化学的手法により Fos 蛋白の発現を調べた。それぞれの脳領域において、基準部位(視床下部は Bregma -1400 μm 、中脳は Bregma -8300 μm 、橋は Bregma -10040 μm 、延髄は Bregma -13800 μm)とその前後の計 3 枚の脳切片から Fos 陽性細胞数をカウントした。結果は平均値 \pm 標準誤差で表わした。脊髄は L6/S1 を用いて同様にカウントした。

○研究 4(樹林担当)

7) N-エチルモルファン の合成

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



(1)を考慮した。

(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) PAG におけるグリシン受容体の発現

Bregma -6800 ~ -8800 μm の PAG において、検討した全領域でグリシン受容体 $\alpha 1$ mRNA の発現が認められた。また、PAG を背側と腹側に分けて 200 μm ごとに発現を比較検討したところ、吻側部(Bregma -6800 ~ 7600 μm)の腹側に位置する PAG においてグリシン受容体 $\alpha 1$ mRNA の発現レベルが最も多かった。

2) グリシンの大槽内投与によるシストメトリー解析

大槽内にグリシン 9 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ を注入したが、最大膀胱内圧など検討したいずれのパラメーターにおいても、コントロールに対して有意な変動はみられなかった。

3) グリシンおよび関連物質の PAG 内投与によるシストメトリー解析

Bregma -6800 ~ -8800 μm に位置する PAG にグリシンを 3 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入したところ、8 匹の動物で最大膀胱内圧が上昇した。この作用を Bregma からの位置で分類してみると、Bregma -8300 μm では 2 匹、Bregma -8720 μm では 4 匹、Bregma -8800 μm では 2 匹の動物で最大膀胱内圧の上昇が認められた。そのほかに、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮、膀胱コンプライアンスの増加、排尿流速の増加、尿道抵抗の低下が観察された。これら各パラメーターの変化は最大膀胱内圧の上昇と同様に、PAG の中でも尾側(Bregma -8300 ~ -8800 μm)の領域に限局して認められた。Bregma -8300 ~ -8800 μm の PAG にストリキニーネを 0.165 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入し、その 1 分後にグリシンを 3 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入したところ、上記のグリシンの作用のうち最大膀胱内圧、排尿閾値、排尿潜時、膀胱コンプライアンスに対する作用は拮抗された。しかし、排尿流速、尿道抵抗に対する作用には拮抗作用を示さなかった。

4) 尾側の PAG からの神経投射

視索前野、バリントン核、青斑核、脊髄オヌフ核、脊髄副交感神経核、脊髄後角や脊髄背側交連など排尿反射に関与するとされる神経核に投射が認められた。また、それ以外にも中脳や橋における三叉神経中脳路核、橋のオリブ核や台形体核、延髄の最後野、孤束核、網様核、疑核などに投射が認められた。

○研究2(白崎担当)の結果

5) ラット排尿中枢バリントン核ニューロンのグリシン応答性に関する研究

検討した 226 個(79 匹から単離)全てのバリントン核ニューロンにおいて、グリシンは活性化の速い電流を惹起し、その逆転電位は Cl⁻ の平衡電位に一致した。グリシン電流の EC₅₀ および Hill 係数はそれぞれ 3.0x10⁻⁵ M および 1.47 であり、ストリキニーネのグリシン電流に対する IC₅₀ は 2.8x10⁻⁷ M であった。よって、グリシン電流の特性は、脊髄を含む他の領域のニューロンにおけるそれとほぼ同じであることが判明した。

グリシン電流と GABA 電流の最大応答の比はほぼ 1 であった。その比は、バリントン核内の部位(吻側、背尾側、腹尾側)やニューロンの形態(錐体細胞、双極細胞、多極性細胞)に依存しなかった。また、グリシン電流の電流密度もほぼ 150 pA/pF で、部位、ニューロンの形態や日齢に依存しなかった。

6-16 日齢のバリントン核ニューロンにおいて、グリシンは、細胞により内向き電流または外向き電流を惹起した。電流の極性と部位や形態との明確な関連は得られなかった。

○研究3(田中担当)の結果

6) 0.1% 酢酸生理食塩液の膀胱内注入による Fos の発現

PAG やバリントン核など排尿反射に関与するとされる複数の脳部位および脊髄で Fos 陽性細胞が観察された。その他、排尿との関連が知られていない延髄最後野、孤束核および延髄網様核においても Fos の発現が認められた。

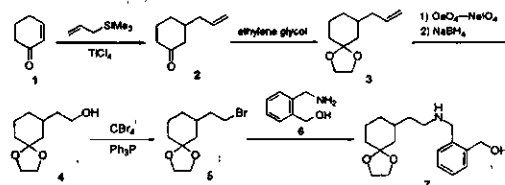
7) DM および Str の静脈内投与に対する Fos 発現の影響

DM と Str はいずれも視索前野、PAG、バリントン核や青斑核において Fos 陽性細胞の数を有意に減少させた。しかし、感覚の 1 次入力部位である脊髄後角や背側交連、さらに延髄最後野においては、Str のみが Fos の発現を抑制した。一方、延髄網様核においては、DM により Fos の発現が増加した。この Fos 発現増加作用は、Str では観察されなかった。

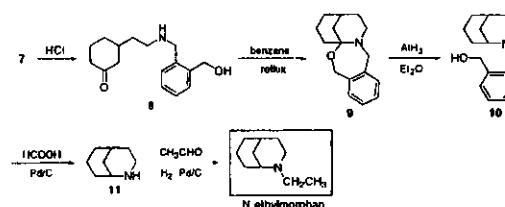
○研究4(樹林担当)の結果

8) N-エチルモルファン合成

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ために、シクロヘキサンから以下の 5 工程でケトアミノアルコールのアセタール保護体 7 を合成した。



アセタール保護体 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. 考 察

我々は、グリシンのプロドラッグを用いた昨年度までの研究において、グリシンは排尿反射に対して促進的な影響を及ぼすことを示唆してきた。この考えは、本年度実施した研究によってさらに強く示唆されることになった。

ある生体内物質を神経伝達物質として同定するためには、以下の基準を満たすことが要求される。1)その物質が機能を発現すべき場所に存在していること(局在)、2)その物質の生成機構が存在していること(生成系)、3)神経刺激時の反応とその物質を適用した時の作用が同じであること(生理作用)、4)神経刺激やその物質適用による反応や作用を修飾する物質があること(薬理作用)、5)その物質の作用を終了させるシステムが存在していること(取込みや代謝系)の五つである。

PAG は排尿反射の古典的な中枢であるバリントン核より上位に位置する排尿反射中枢として、最近その役割が注目されている。PAG はその名の通り中脳水道周囲に位置する神経核であるが、中脳水道が吻側から尾側へ一定の長さを有しているため、PAG も吻側から尾側へ比較的長い核である。この領域にグリシン受容体の mRNA が発現しているか否かは本研究を進める上できわめて重要であるが、意外なことに、これまでその発現の有無について検討されていなかった。そこで、RT-PCR 法を用いて検討した結果、PAG の全領域に亘ってグリシン受容体の $\alpha 1$ サブユニット mRNA が発現していることがわかった。今回は受容体のタンパク質の発現については検討していないので、今後、タンパク質の発現についても確認することが必要であるが、本成績は、微量注入の実験成績とともに、グリシン受容体が排尿反射に関与しているという考え方をさらに支持するものである。

PAG は、上述したように、吻側から尾側へかけて細長く、筒状の核であるが、その中心部に中脳水道が走っているため、背側から腹側までの幅や中心部から外側へかけての幅は最大の箇所でも $1000 \mu\text{m}$ 前後である。従って、この狭い領域に限局して微量の薬液を注入するには、従来のステンレスパイプによる注入法では不可能である。そこで我々は、先端径を $18\text{--}24 \mu\text{m}$ に研磨した7連のガラス微小ピペットを用い、圧注入法により 1 回当たり 15nl の極微量の薬液を注入した。また本法は、同一のピペットから7種の薬液まで注入可能

であるため、生理食塩液注入の対照実験との比較や色素の注入による注入部位の確認などにおいても大きなメリットをもつ。以上の事実は、微量注入実験で得た成績が信頼性が高いことを意味している。

グリシン受容体の mRNA は PAG の全領域に亘って発現していたが、グリシンの微量注入は、PAG の限局された部位においてのみ排尿反射を促進した。しかも、最大膀胱内圧の上昇を指標にした場合、尾側 PAG の中でも bregma から $-8720 \mu\text{m}$ の位置に、作用が発現した注入スポットの高い集積が認められた。本成績は、グリシン微量注入による排尿反射の促進が、アーチファクトによるものでないことを示唆し、PAG の極限られた領域が排尿反射に関与していること可能性を示唆していると言えよう。これらに関連して、PAG は痛覚の中継核としての機能など他の生理的機能にも関与していることが知られている。

ところで、尾側部 PAG へのグルタミン酸の注入も排尿反射を促進することが報告されている。周知のように、グルタミン酸の NMDA 受容体はグリシン結合部位をもち、グリシンの共存下でその受容体の活性は増強される。従って、本研究の成績は、この NMDA 受容体の活性化にグリシンが関与した可能性も示している。しかし、少なくとも、グリシン微量注入による最大膀胱内圧の上昇、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮、膀胱コンプライアンスの増加は、PAG へのストリキニーネの微量注入によりブロックされたので、これらの作用は、ストリキニーネ感受性のグリシン受容体を介して発現している可能性が高いと言える。これに対して、ストリキニーネでブロックされなかった排尿流速の増加および尿道抵抗の低下は、グリシンが PAG の NMDA 受容体のグリシン結合部位に作用して、この受容体を活性化することにより発現した可能性が考えられよう。

酢酸溶液の膀胱内注入による Fos 蛋白質の発現は、排尿反射に関与するとされる脳および脊髄の神経核において認められた。加えて、これまで排尿反射への関与が報告されて

いない神経核にも Fos 蛋白質の発現が認められたが、蓄尿中枢 (D-region) には発現が認められなかった。この発現を指標として、グリシン受容体ブロック作用をもつストリキニーネの作用を検討した結果、PAG、バリントン核に加え、青斑核、脊髄後角、脊髄背側交連および延髄最後野などにおいて、Fos の発現が抑制された。これらの成績は、排尿反射のシグナル伝達にグリシン神経系が関与していることを薬理的に示唆すると言える。

ストリキニーネと同様に排尿反射を抑制するデキストロメトルファン (DM) も排尿反射関連核において Fos 蛋白質の発現を抑制したが、抑制が見られた核はストリキニーネとは同一ではなかった。この成績は、二つの薬物の作用機序が異なっていることを示唆するが、DM がグリシン誘発電流抑制作用に加えて、内向き整流性 K^+ (GIRK) チャンネルに対する抑制作用や NMDA 誘発電流抑制作用をもつことによると考えられる。このことは、排尿反射の中枢内神経伝達機構に、グリシン受容体に加えて、NMDA 受容体や GIRK チャンネルに共役した受容体も関与している可能性も示唆する。

バリントン核は古くから橋排尿中枢として知られる核である。この領域のニューロンのグリシン応答について検討した結果、検討したすべてのニューロンにおいてグリシン応答能が認められ、その応答能は、バリントン核内の部位や神経細胞の形態には依存しなかった。また、GABA とグリシンの最大応答の比も核内の部位や神経細胞の形態に関わらず、その値は 1 であった。グリシン受容体はバリントン核においても機能していることを示唆するこの成績と、古くからバリントン核が排尿反射に関与している事実を併せて考察すると、バリントン核においてもグリシン受容体が排尿反射に関与している可能性は十分考えられ得る。

今後は、*in vitro* において上記各部位におけるグリシン応答能を詳細に検討し、一方 *in vivo* においては、各部位にグリシンを微量注入してシストメトログラムの各パラメーターに対するグリシンの影響を検討することが必要である。これにより、1) どの部位でのグリシンの作

用が排尿反射に最も影響を与えるのか、2) どの部位にグリシンが作用する時に排尿反射の各パラメーターが影響されるのかを明らかにできると考えられる。

加えて、病態モデル動物や高齢動物などにおいて、各部位でのグリシン応答能が如何に変化するかを検討する必要がある。これらの結果を総合してはじめて、グリシンがターゲットとなる排尿障害の病態像が明らかになり、治療薬開発のターゲットを明確にできるものと考えている。病態動物に関しては、現在検討に着手しており、平成 15 年度には何らかの結果が得られるものと期待している。

グリシンをターゲットとした治療薬を考えると、バルビツレートやベンゾジアゼピン系薬物などが $GABA_A$ 受容体応答を増強して薬効を発揮するように、グリシン受容体応答を増強する脂溶性薬物が有力な候補となると考えられる。今後、N エチルモルファンのグリシン受容体応答に対する作用を、サブタイプ特異性の観点も含めて詳細に検討し、かつ、病態動物において期待される治療効果が現れるか検討する必要がある。

排尿障害には蓄尿障害と排尿障害という相反する機能の障害がある。よって、グリシン応答抑制作用がある DM も有力な治療薬の候補となると考えられる。DM は現に中枢性鎮咳薬として臨床使用されている薬物であり、安全性の問題をクリアしている。よって、使用濃度がよほど高くない限り有望であろう。病態動物における作用の検討など今後も引きつづき排尿反射に対する作用の検討を継続する必要がある。

E. 結論

グリシン神経系が脳幹および脊髄の複数の領域において排尿反射に影響する可能性が示唆された。

グリシンは尾側の腹内側 PAG において排尿反射に促進的に作用する。

橋排尿中枢であるバリントン核において、機能的なストリキニーネ感受性グリシン受容体が広く分布し、排尿反射へのグリシンの関与が強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

Shirasaki T, Yamasaki K, Tanaka A, Soeda F and Takahama K. Glycine-induced Cl⁻ currents in acutely dissociated rat Barrington's nucleus neurons. Neuroscience, (submitted)

Shirasaki T, Abe K, Soeda F, Takahama K. δ -Opioid receptor antagonists inhibit GIRK currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat Br J Pharmacol (submitted)

副田二三夫、本田 淳、白崎哲哉、田中英明、高濱和夫. 膀胱侵害刺激による Fos タンパクの脳内発現を指標とした排尿機能評価法の有用性について. 日本排尿機能学会誌(投稿中)

Yamasaki K, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in Barrington's nucleus, a micturition center in rat. Journal of Pharmacological Sciences 91, 222P (2003).

Honda A., Soeda F., Shirasaki T, Tanaka H., Takahama K. Effects of dextromethorphan (DM) and strychnine (Str) on bladder irritation-induced Fos-like protein (FLP) expression in the brainstem and spinal cord of rats Journal of Pharmacological Sciences 91, 212P (2003).

阿部恵介、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫 脳ニューロンにおける GABA_A 受容体活性化電流に対する中枢性鎮咳薬の作用. 日本薬理学雑誌 2003 121:66P

岡部裕一. 排尿反射の中枢内神経伝達に関する研究—中脳水道周囲灰白質におけるグリシン神経系の関与—. 熊本大学大学院博士前期課程学位論文(2003).

Shirasaki T, Abe K, Kuwano K, Soeda F, Ishibashi H, Takahama K. Are GIRK channels one of the main targets for non-narcotic antitussives? Jpn J Pharmacol.

88, 59P(2002)

岡部裕一、丸山格、山本巖、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 2002 119:68P

2) 学会発表

山崎広大、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. ラット排尿中枢 Barrington 核ニューロンのグリシン応答性. 第 76 回日本薬理学会年会(2003)

本田 淳、副田二三夫、白崎哲哉、田中英明、高濱和夫. 膀胱内刺激による脳幹および脊髄における Fos 様蛋白の発現に対するデキストロメトルファンおよびストリキニーネの影響. 第 76 回日本薬理学会年会(2003)

岡部裕一、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. 中脳水道中心灰白質へのグリシンの微量注入は排尿反射を促進させるか?

第 9 回日本排尿機能学会 (2002)

本田 淳、副田二三夫、白崎哲哉、田中英明、高濱和夫. 膀胱内侵害刺激による下位脳幹および脊髄における Fos 蛋白の発現に対するデキストロメトルファンの作用

第 9 回日本排尿機能学会 (2002)

山崎広大、白崎哲哉、阿部恵介、副田二三夫、高濱和夫. 排尿中枢 Barrington's 核における glycine 誘発電流の解析. 第 19 回日本薬学会九州支部会(2002)

3) その他

高濱和夫. 排尿障害治療薬、特に排尿反射強化薬の開発を指向した排尿反射の中枢機序解明に関する研究. 長寿医療委託研究報告集 平成 13 年度 p124 (2003)

高濱和夫. 頻尿・尿失禁治療薬の薬理. 薬局 53 巻 8 号 p21-28 (2002)

高濱和夫. 特集 精密設計が生む画期的新薬の射程 頻尿・尿失禁治療薬. 日経メディカル 1 月号 p48(2003)

Takahama K., Okabe Y., Soeda F., Shirasaki T. Effect of glycine microinjection on the micturition reflex in the periaqueductal gray of rats (in preparation).

Soeda F., Tanaka A., Shirasaki T., Takahama K. A DiI-tracing study of the neural connections of periaqueductal gray; connection in the brainstem and between spinal cord (in preparation).

Soeda F., Honda A., Shirasaki T., Takahama K. Effects of dextromethorphan on Fos protein expression in brain and spinal cord induced by irritant stimulation of the rat bladder (in preparation).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分 担 研 究 報 告

排尿反射の中枢内グリシン神経伝達に関する研究

—グリシンおよび関連物質の中脳水道周囲灰白質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： 我々はこれまでに、グリシン神経系は脳幹レベルで排尿反射に促進的に作用する可能性を示唆してきた。今年度は上記の可能性を直接的に調べるため、昨年度実用化に成功した多連微小ガラスピペットを用いた脳内微量注入法によりグリシンおよびその拮抗薬を排尿中枢である中脳水道周囲灰白質(PAG)に投与し、シストメトリー解析をおこなった。まず本研究では、PAG にグリシン受容体が発現していることをRT-PCR法により明らかにした。そこでグリシン 3 μ g を PAG に投与したところ、PAG の中でも尾側に位置する Bregma-8300~8800 μ m の領域において最大膀胱内圧の上昇、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮などを引き起こし排尿反射に促進的に作用することが示唆された。また、グリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネを前処置すると、グリシンの微量注入による排尿反射の促進作用は拮抗され、ストリキニーネに感受性を示すことがわかった。さらに尾側の PAG からの神経投射を検討したところ、既知の排尿反射関連核のほかに、三叉神経中脳路核、台形体核や最後野などにも投射していることが明らかになった。以上の成績から、グリシンは尾側の PAG において排尿反射を促進させ、その作用には少なくとも、PAG に発現しているストリキニーネ感受性グリシン受容体を介していることが示唆された。

A. 研究目的

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。これまでに我々は、排尿反射におけるグリシン神経系の役割を解明し、臨床応用可能なリ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、シストメトリー法によるグリシンおよびグリシンプロドラッグである α -グリシナミド、グリシン受容体拮抗薬ストリキニーネの全身投与、ならびに脳室内注入実験から、グリシン神経系は脳幹レベルで排尿反射に促進的に作用する可能性を示唆してきた。今年度はその可能性をより明確にするために、排尿中枢のひとつである PAG にグリシンを微量注入し排尿反射に対する影響を調べた。しかし意外なことに、PAG にグリシン受容体が存在しているという明確な報告がなかったため、今回はまず、RT-PCR法を用いて PAG におけるグリシン受容体 mRNA の発現について検討した。さらに、PAG における神経伝達機構を探る目的で、神経線維トレーサー Dil を用いたトレ

ース実験も合わせて検討をおこなった。

B. 研究方法

1. PAG におけるグリシン受容体の発現

8~9週齢の雄性 SD ラット 8 匹から脳を摘出した。PAG は Bregma -6800~8800 μ m の領域から、200 μ m の連続冠状切片を 11 枚作製し、実体顕微鏡下でダイセクションした。ダイセクションした PAG はさらに背側と腹側に分け、それぞれのサンプルは -80°C で保存した。RNA の抽出は AGPC 法にておこない、Takara の RNA PCR Kit、グリシン受容体 α_1 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR をおこなった。また、内部標準として β -actin についても同じように RT-PCR をおこなった。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動をおこない、そのバンドを確認するとともに、電気泳動ゲル撮影システム version 3.5 (Kodac Digital Science EDAS 290 LE) にてデジタル画像を取得した。バンドの解析には Scion Image を用いてその面積を数値化した。ゲル間の補正をするために、マスマーカーでもある Smart Ladder の DNA 量から各バンドの DNA 量を算出し、さら

にその DNA 量を各サンプルの β -actin の DNA 量で割り、補正したものを各サンプルの mRNA レベルとした。

2. PAG および大槽への微量薬物注入法

小動物用脳固定装置にラットの頭蓋を正常位に固定し、腹部を反転させて下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 18~24 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 PAG および大槽(小脳下延髄槽)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を用いて 45nl 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、縦引きブ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。

3. 膀胱収縮の測定

体重 300~350g 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 (0.106ml/min) で生理食塩水を膀胱内に注入した。シングルシストメログラム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 秒後に次のシストメログラムの記録を開始した。記録は膀胱内圧の変化を生体アンプで増幅後レクチコーダにておこなった。解析はコントロールの平均に対し、投与後 30 分以内に最大反応の 20% 以上の反応がみられたものを「効果あり」とした。

4. 尾側の PAG からの神経投射

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、Bregma -8300 μm に位置する PAG に神経線維トレーサー Dil を注入した。注入は先端径が 20 μm のガラスピペットに Dil を充填後、ピコスプ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。Dil の注入から 14 日後、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した。脳は視床下部から延髄までを、脊髄は L6/S1 領域を摘出し、冠状で厚さ 50 μm のビブラトーム切片を作製した。鏡検には蛍光顕微鏡を用いた。

(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. PAG におけるグリシン受容体の発現

今回検討した Bregma -6800~-8800 μm の PAG におけるグリシン受容体 α_1 mRNA の発現は全領域で認められた。また、PAG を背側と腹側に分けて 200 μm ごとの発現についても比較検討したところ、Bregma -6800~7600 μm の物側部で腹側に位置する PAG においてグリシン受容体 α_1 mRNA の発現レベルが最も多かった。

2. グリシンの大槽内投与によるシストメリー解析

大槽内にグリシンを 9 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入したが、最大膀胱内圧、排尿閾値、排尿潜時、膀胱コンプライアンス、排尿流速、尿道抵抗のいずれのパラメーターも有意な変動はみられなかった。

3. グリシンおよび関連物質の中脳水道周囲灰白質内投与によるシストメリー解析

Bregma-6800~-8800 μm に位置する PAG にグリシンを 3 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入したところ、最大膀胱内圧は 8 匹の動物で上昇が認められた。この反応を Bregma からの位置で分類してみると、Bregma-6800~-8000 μm および Bregma-9160 μm では上昇が認められた動物はいなかったが、Bregma-8300 μm では 2 匹、Bregma-8720 μm では 4 匹、Bregma-8800 μm では 2 匹の動物で最大膀胱内圧の上昇が認められた。また排尿閾値は低下 (7 匹)、排尿潜時は短縮 (6 匹)、膀胱コンプライアンスは増加 (7 匹)、排尿流速は増加 (6 匹)、尿道抵抗は低下 (5 匹) したが、各パラメーターの変化は最大膀胱内圧の場合と同様に、PAG の中でも尾側に位置する Bregma-8300~-8800 μm の領域に局限して認められた。また、ストリキニーネを Bregma-8300~-8800 μm の PAG に 0.165 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入し、その 1 分後にグリシンを 3 $\mu\text{g}/45\text{nl}$ 注入したところ、上記のグリシン微量注入による最大膀胱内圧、排尿閾値、排尿潜時、膀胱コンプライアンスの変化に拮抗作用を示した。しかし、排尿流速、尿道抵抗は拮抗作用を示さなかった。

4. 尾側の PAG からの神経投射

視床下部の視索前野、橋のバrinton 核や青斑核、脊髄のオスフ核や副交感神経核、後角や背側交連など排尿反射に関与するとされる神経核に投射が認められ

た。また、それ以外にも中脳や橋における三叉神経中脳路核、橋のオリブ核や台形体核、延髄の最後野、孤束核、網様核、疑核などに投射が認められた。

D. 考 察

まず、今回のグリシン微量注入実験では、PAG よりも尾側に位置する大槽内にグリシンを投与しても排尿反射に影響を示さなかったことから、グリシンの作用点は少なくとも大槽レベルより吻側であり、PAG がその作用点のひとつである可能性を示した。RT-PCR によりグリシン受容体 mRNA の存在が確認された PAG にグリシンを微量注入すると、尾側部の PAG で排尿反射を促進させたことから、グリシンは PAG の限局された部位で作用を示すと考えられる。しかし、グリシン受容体 mRNA の発現レベルは吻側の方が多く、排尿反射の促進部位とは一致していない。この原因は今のところ不明であるが、尾側の PAG にグルタミン酸を注入すると排尿反射が惹起されたとする報告もあることから、尾側の PAG そのものが排尿反射の影響を受けやすい部位である可能性も考えられる。また、今回得られたグリシンによる排尿促進作用は、PAG へのストリキニーネ前処置で拮抗されたため、これらの作用はストリキニーネ感受性のグリシン受容体を介していることが強く示唆された。しかし、排尿流速と尿道抵抗に関してはストリキニーネで拮抗されなかったことから、この二つのパラメーターの変化は、NMDA 受容体上にあるストリキニーネ非感受性のグリシン受容体を介した可能性、もしくは腰仙髄部の抑制性のグリシン作動性介在神経を介した可能性が考えられる。今後は脊髄腔内への投与実験や単一神経放電記録およびイオントフォレシス法などを駆使した詳細な検討をおこない、上記の問題を解明していく予定である。

また、今回正常ラットの PAG におけるグリシン受容体 mRNA の発現を確認したが、これは我々がはじめての報告となる。今後は免疫組織化学やイムノブロット法などを用いて、受容体タンパクが発現していることの確認や、脳梗塞モデル動物や老齢動物などを用いて、排尿反射におけるグリシン受容体の機能的な役割と変化を mRNA、タンパクレベルにおいて詳細に解析する予定である。

本研究では、PAG におけるグリシン神経伝達機構を探る目的で、グリシンの微量注入で排尿反射が促進された尾側の PAG からの神経投射を調べた。その結果、排尿反射に関与するとされる神経核だけでなく、それ以外の核にも投射が認められ、新たな排尿機能関連核

が存在する可能性も考えられた。興味深いことに、中脳や橋における三叉神経中脳路核、橋の台形体核、延髄の最後野では投射の報告すらなく、今回の検討により PAG からの投射が明らかにされた。今後は、これらの脳部位は排尿反射に関与するの否かなどについて検討していく必要があると思われる。また、昨年度の橋背外側被蓋からのトレース実験で、PAG から脊髄へ投射する可能性を示唆する知見を得たが、ラット PAG から脊髄レベルにおける神経投射を検討したものはほとんどなく、我々が示した脊髄 L6/S1 レベルにおける神経連絡の存在を明らかにしたことは意義深いといえる。また Dil は軸索輸送されることを考えると、PAG から脊髄 L6/S1 レベルには直接投射している可能性も示唆しており、排尿反射の神経伝達を解明していくうえで有益な知見になりうると思われる。

E. 結 論

- ① SD 系雄性ラットの PAG において、グリシン受容体 α_1 mRNA の発現が認められた。
- ② PAG の尾側部 (Bregma-8300~8800 μ m) におけるグリシンの微量注入は、最大膀胱内圧の上昇、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮、膀胱コンプライアンスの増加、排尿流速の増加、尿道抵抗の低下を引き起こし排尿反射に促進的であることが示唆された。
- ③ ②で示した作用のうち、最大膀胱内圧、排尿閾値、排尿潜時、膀胱コンプライアンスの変化についてはストリキニーネにより抑制されたため、これらのパラメーターについてはストリキニーネ感受性グリシン受容体を介していると考えられる。
- ④ 尾側の PAG からの神経投射は、排尿反射に関与する脳部位とそれ以外の三叉神経中脳路核、台形体核や最後野で観察された。また、PAG から脊髄の L6/S1 に直接投射する可能性も示唆された。

F. 研究発表

1) 論文発表

- Takahama K., Okabe Y., Soeda F., Shirasaki T., Effect of glycine microinjection on the micturition reflex in the periaqueductal gray of rats (in preparation).
- Soeda F., Tanaka A., Shirasaki T., Takahama K., A Dil-tracing study of the neural connections of periaqueductal gray; connection in the brainstem

and between spinal cord (in preparation).

○高濱和夫、岡部裕一、田中明子、副田二三夫、白崎哲哉., グリシンおよび関連物質の中脳水道周囲灰白質内投与によるシストメトリー解析. 日本薬理学雑誌 (投稿準備中).

2) 学会発表

第9回日本排尿機能学会 (2002)

岡部 裕一、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫、中脳水道中心灰白質へのグリシンの微量注入は排尿反射を促進させるか?

3) その他

○高濱和夫、排尿障害治療薬、特に排尿反射強化薬の開発を指向した排尿反射の中枢機序解明に関する研究. 長寿医療委託研究研究報告集 平成13年度 p124(2003)

○高濱和夫、頻尿・尿失禁治療薬の薬理. 薬局 53巻8号 p21-28 (2002)

○高濱和夫、特集 精密設計が生む画期的新薬の射程 頻尿・尿失禁治療薬. 日経メディカル 1月号 p48 (2003)

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

ラット橋排尿中枢 Barrington 核ニューロンのグリシン応答性に関する研究

分担研究者 白崎 哲哉 熊本大学薬学部助教授

研究要旨： 橋排尿中枢であるバリントン氏核のニューロンを急性単離し、パッチクランプ法により膜電位固定下にグリシン応答能とその特性を検討した。バリントン氏核ニューロンは常法に従い急性単離した。検討した 226 個全てのバリントン氏核ニューロンにおいて、グリシンは Cl^- 電流を惹起し、その電流特性は、脊髄その他の領域のニューロンにおける特性とほぼ同じであった。グリシンは GABA とほぼ同じ最大応答を惹起し、その応答はバリントン氏核内の部位（吻側、背尾側、腹尾側）やニューロンの形態（錐体細胞、双極細胞、多極性細胞）、生後の日齢に依存しなかった。本研究より、バリントン氏核に機能的なストリキニーネ感受性グリシン受容体が広く存在していることが示唆された。

A. 研究目的

グリシンのプロドラッグである α -グリシナミドの腹腔内投与は、膀胱の律動性収縮を惹起し、排尿閾値の低下、排尿潜時の短縮などを惹起する。また、ストリキニーネの静脈内投与は、排尿閾値の低下などを惹起する。よって、グリシンが排尿反射に影響することは明らかであろう。しかし、グリシンとストリキニーネがともに排尿閾値の低下を惹起するように、グリシンの作用は単純ではない。そこで、排尿反射に関わる中枢でのグリシンの作用と作用点を明確にすることを試みた。

バリントン氏核は古くより橋排尿中枢として知られ、腰仙髄部からの直接入力に加え、大脳皮質など脳各部位からも入力を受ける、排尿反射に重要な核である。そのバリントン氏核にグリシン含有線維が存在し、また、バリントン氏核ニューロンにはグリシン受容体 $\alpha 1$ サブユニット mRNA が存在する。よって、本研究ではバリントン氏核ニューロンにおけるグリシン応答を明確にするとともに、グリシンが橋排尿中枢レベルで排尿反射に関与するか検討する手がかりを得るために、グリシンに応答する神経細胞の分布を明らかにした。

B. 研究方法

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットを雌雄の別なく使用した。バリントン氏核を含む厚さ 400 μ m の脳薄切片を作成し、酵素処理と機械的処理によりバリントン氏核ニューロンを単離した。急性単離バリントン氏核ニューロンにニスタチンまたはグラミシジン穿孔パッチクランプ法を適用して、グリシン電流を記録した。薬液投与は急速交換法（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

検討した 226 個（79 匹から単離）全てのバリントン氏核ニューロンにおいて、グリシンは活性化の速い電流を惹起し、その逆転電位は Cl^- の平衡電位に一致した。グリシン電流の EC_{50} および Hill 係数はそれぞれ 3.0×10^{-5} M および 1.47 であり、ストリキニーネのグリシン電流に対する IC_{50} は 2.8×10^{-7} M であった。よって、グリシン電流の特性は、脊髄を含む他の領域のニューロンにおけるそれとほぼ同じであることが判明した。

グリシン電流と GABA 電流の最大応答の比はほぼ 1.1 であった。その比は、バリントン氏核内の部位（吻側、背尾側、腹尾側）やニューロンの形態（錐体細胞、双極細胞、多極性細胞）に依存しなかった。また、グリシン電流の電流密度もほぼ 150 pA/pF で、部位、ニューロンの形態や日齢に依存しなかった。

6-16 日齢のバリントン氏核ニューロンにおいて、グリシンは、細胞により内向き電流または外向き電流を惹起した。電流の極性と部位や形態との明確な関連は得られなかった。

D. 考察

本研究は、排尿関連部位において排尿反射との関連から、神経伝達物質の応答を単一細胞レベルで詳細に検討した最初の研究である。

バリントン氏核内のどのニューロンが排尿反射に関与するかは現在不明である。しかし、本研究結果は、バリントン氏核内のすべての神経細胞がグリシンに反応すること、ならびにバリントン氏核におけるグリシン応答が GABA 応答と同じ作用強度を持ち、その作用が部位や細胞の形態、日齢に依存しないことを示唆する。よって、これまでの生理、薬理、解剖学的知見などとあわせて考えると、どのニューロンが排尿反射に関与するにせよ、グリシンがバリントン氏核ニューロンの興奮性を調節して、排尿反射の制御に関わると考えられる。少なくとも治療薬のターゲットになることは

明白である。よって、今後 in vivo において、バリントン氏核をターゲットにグリシンの排尿反射への影響を検討することは意義があると言える。

グリシン応答性の違いは、唯一 Cl⁻電流の向きにおいて観察された。組織・解剖学的には、生後 2 日齢においてすでに膀胱とバリントン氏核の間に神経連絡が形成されていることが示唆されている。本研究において観察された内向きグリシン電流は、シナプスの成熟を介して排尿反射路の機能的成熟に関与しているかもしれない。

E. 結 論

本研究より、橋排尿中枢であるバリントン氏核に機能的なストリキニーネ感受性グリシン受容体が広く存在していることが示唆された。今後、成熟、老齢および病態動物のバリントン氏核ニューロンにおけるグリシン応答を検討する必要がある。

G. 研究発表

1) 論文発表

Shirasaki T, Yamasaki K, Tanaka A, Soeda F and Takahama K. Glycine-induced Cl⁻ currents in acutely dissociated rat Barrington's nucleus neurons. Neuroscience, (submitted)

Shirasaki T, Abe K, Soeda F, Takahama K. δ -Opioid receptor antagonists inhibit GIRK currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat. Br J Pharmacol (submitted)

Yamasaki K, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in Barrington's nucleus, a micturition center in rat. Journal of Pharmacological Sciences 91, 222P (2003).

阿部恵介、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫 脳ニューロンにおける GABA_B 受容体活性化電流に対する中枢性鎮咳薬の作用. 日本薬理学雑誌 121, 66P (2003)

2) 学会発表

山崎広大、○白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. ラット排尿中枢 Barrington 核ニューロンのグリシン応答性. 第 76 回日本薬理学会年会

○山崎広大、白崎哲哉、阿部恵介、副田二三夫、高濱和夫. 排尿中枢 Barrington's 核における glycine 誘発電流の解析. 第 19 回日本薬学会九州支部会

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

排尿反射の中枢内神経伝達に関する神経組織化学的研究

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： 我々はこれまでに、中脳水道周囲灰白質(PAG)や橋背外側被蓋、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関与する知見を得た。今年度は、我々が排尿反射に対して抑制作用をもつことを明らかにしたデキストロメトルファン(DM)やグリシン受容体拮抗薬ストリキニーネ(Str)の静脈内投与が Fos 蛋白の発現にどのような影響を与えるのかについて調べた。その結果、DM および Str は、視索前野、PAG、バリントン核や青斑核などの排尿反射に関与する神経核において、Fos 陽性細胞の数を有意に減少させることが明らかとなった。また両薬物の作用は、脊髄 L6/S1 において異なっていることも示唆された。以上の成績は、排尿反射にグリシン受容体に関与していることを示唆しており、今後、排尿反射のグリシン神経伝達機構を解明していくうえでの基礎知見になりうると思われる。

A. 研究目的

我々は排尿反射の中枢内神経伝達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。昨年度までに我々は、中脳水道周囲灰白質(PAG)や橋背外側被蓋、脊髄 L6/S1 領域の Onuf 核などの神経核が排尿反射に関与する知見を得た。そこで今年度は、排尿反射のグリシン神経伝達に関する基礎知見を得るために、まず、これまで我々が報告してきたグリシン、NMDA、セロトニン誘発電流を抑制する中枢性鎮咳薬 DM やグリシン受容体拮抗薬である Str が排尿反射を抑制することに着目し、排尿反射関連核における Fos 蛋白の発現に対する各薬物の作用について調べた。

B. 研究方法

免疫組織化学法

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、DM は 10mg/kg、Str は 0.3mg/kg をそれぞれ静脈内に投与した。薬物投与の 15 分後、0.1%酢酸生理食塩液を膀胱内に2時間持続注入した。注入終了後 4%ハラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳は視床下部から延髄までを、脊髄は L6/S1 領域を摘出した。厚さ 40 μ m の冠状凍結切片を作製し、免疫組織化学的手法を用いて Fos の発現を調

べた。Fos 陽性細胞の計測には顕微鏡デジタルカメラ DP70 および二次元画像解析ソフト WinROOF を用いた。Fos 陽性細胞数は、それぞれの脳領域において基準とした部位とその前後、計 3 枚の脳切片から Fos 陽性細胞を計測し、平均値±標準誤差で表わした。視床下部は Bregma-1400 μ m、中脳は Bregma-8300 μ m、橋は Bregma-10040 μ m、延髄は Bregma-13800 μ m を基準とし、脊髄は L6/S1 を用いた。

(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. 0.1%酢酸生理食塩液の膀胱内注入による Fos の発現

排尿反射に関与するとされる複数の脳部位および脊髄で Fos 陽性細胞が観察された。視床下部では視索前野(150.8±31.5)、中脳では PAG(335.3±16.2)、橋ではバリントン核(60.8±11.5)および青斑核(101.3±4.6)であった。脊髄 L6/S1 では後角(18.7±1.4)、背側交連(30.4±5.4)、仙髄副交感神経核(17.4±4.3)で認められた。また、排尿に関与するという知見のない延髄においても Fos の発現が認められ、最後野、孤束核および網様核で観察された。

2. DM および Str の静脈内投与に対する Fos 発現の影響