

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高濱 和夫

平成16(2004)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. 排尿反射関連核における神経活動性の検討および脳梗塞の排尿反射に対する 影響とその改善に関する研究	高濱 和夫 13
2. ラット中脳水道中心灰白質 (PAG) ニューロンのグリシン応答性および 「ピペリジノ基説」と GIRK チャネル抑制作用の関連に関する研究	白崎 哲哉 17
3. 脳梗塞モデルラットの排尿反射関連核におけるグリシン受容体および <i>c-fos</i> mRNA レベルの解析	副田 二三夫 20
4. ピペリジノ基説関連化合物の合成	大川原 正 22
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、山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉 脳梗塞モデルラットの過活動膀胱に対する中枢性鎮咳薬の改善作用 日本薬理学雑誌 (投稿準備中)	31
2. G. Yamamoto, F Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama Ameliorating effects of dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP) on overactive bladder (OAB) caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats J. Pharmacol. Sci. 94(Suppl. I) 113P (2004)	84
3. 本田 淳、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 膀胱内侵害刺激による中枢内 Fos 蛋白の発現に対する牛車腎気丸の影響 日本排尿機能学会誌 13 巻 1 号 P113 (2003)	85
4. 高濱和夫 過活動膀胱の治療の現状と今後の展望 —解明されてきた漢方薬：牛車腎気丸の作用—	

Mcbio 21 卷 1 号 P128-133 (2004)	86
5. T. Shirasaki, K. Abe, F. Soeda, K. Takahama δ -Opioid receptor antagonists inhibit GIRK channel currents acutely dissociated brainstem neurons of rat Brain Res. 1006 P190-197 (2004)	92
6. M Shiozuka, T. Shirasaki, K. Yamasaki, F. Soeda, K. Takahama Glycine responsiveness of neurons in periaqueductal gray (PAG), a micturition center in rat J. Pharmacol. Sci. 94(Suppl. 1) 228P (2004)	100
7. 山崎広大、塩塚道崇、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫 Barrington's 核および腹外側中脳水道中心灰白質における glycine 応答ニューロンの分布とその性質についての電気生理学的解析 日本排尿機能学会誌 14 卷 1 号 P188 (2003)	101
8. 山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫 中枢性鎮咳薬の piperidino 基説は GIRK チャネル抑制作用によって説明できる？ 日本薬理学雑誌 123 卷 3 号 68P (2004)	102
9. T. Shirasaki, M. Shiozuka, K. Yamasaki, F. Soeda, K. Takahama Glycine responsiveness of neurons in rat periaqueductal gray Neurosci. (submitted)	103

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 熊本大学大学院 医学薬学研究部教授

研究要旨：過去 2 年間にわたり、我々は脳幹部でグリシンが排尿反射に促進的に作用することを示してきた。本年度はグリシンの作用部位と排尿反射経路との関連をより明らかにすることを試みるとともに、正常動物で得られた知見をもとに、脳梗塞後の過活動膀胱にグリシン受容体に関与するのではないかと考え、中大脳動脈(MCA)閉塞モデルラットで、その可能性を検討した。その結果以下に示す結果が得られた。

1) 連続シストメトリー法により排尿反射を記録しながら、微小ガラス電極法にて細胞外で PAG の単一ニューロン活動を記録した。その結果、PAG およびその周囲から排尿期に活動電位の発火が増加するニューロン(Type I)と逆に減少するニューロン(Type II)の大別して2種類のニューロン活動が記録された。これらは bregma より-8000~-8300 μm の部位に多く見出され、Type I の分布は、グリシン感受性部位と近いことが判明した。また、グリシン感受性部位の局在性は、単にグリシン感受性ニューロンの分布の局在だけでは説明できないことも明らかとなった。2) Fos 蛋白質の発現を指標にした牛車腎気丸の作用部位の検討からは、牛車腎気丸が脊髄 L6/S1 領域と Barrington's 核で選択的に Fos 陽性細胞数を減少させることがわかり、デキストロメトルファンやストリキニーネが広範な排尿関連部位で Fos 陽性細胞数を減少させるのは対照的であった。3) MCA 閉塞モデル動物では、膀胱容量の減少、排尿潜時の短縮、排尿閾値の低下、尿道抵抗の上昇と尿流率の減少が惹起された。これらの影響は MCA 閉塞の 24 時間後でも持続していた。ストリキニーネはこれらの症状に影響を与えなかった。しかし、MCA 閉塞の 24 時間後に投与した鎮咳薬デキストロメトルファンは、過活動膀胱様症状を有意に改善した。この改善作用に GIRK チャネルの抑制が関与する可能性が考えられた。これに関連して4) 鎮咳薬の鎮咳活性に関する「ピペリジノ基説」が GIRK チャネル抑制作用にも適用できることがわかった。これより、GIRK チャネルをより特異的に抑制し、脳梗塞後の過活動膀胱をより強く改善する新規薬物の開発の上で、貴重な指針を得た。

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・熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授
副田二三夫・熊本大学大学院医学薬学研究部 助手
大川原正 熊本大学大学院医学薬学研究部 助教授

A. 研究目的

我々はこれまでに正常動物において、薬理的、免疫組織学的、分子生物学および電気生理学的方法により、脳幹部のグリシンとグリシン受容体が排尿反射に促進的に作用する可能性を示してきた。本年度は、その有力な作用点の一つが尾側の腹外側 PAG にあるのではないかと考えをさらに明確にすることを試みた。最近 PAG が排尿反射の中核として働く可能性に関心がもたれているが、その PAG においては排尿反射関連神経活動が未だ記録されておらず、どの部位が排尿反射に係るかは全く不明であった。そこで第 1 にこの点を明確にするために、連続シストメトリー法

の実施下に微小電極法により排尿反射関連神経活動を記録することを試みた。

また、PAG におけるグリシン応答性ニューロンの分布やその形態、グリシン応答の特性やグリシン応答の大きさなどは全くわかっていない。そこで第 2 に、尾側の腹外側 PAG に限局してみられたグリシン微量注入による排尿反射促進作用（昨年度報告）が、グリシン感受性ニューロンの分布やその応答性の違いによるものか否かを明らかにすることを試みた。このため、急性単離ニューロンを用いて、グリシン応答性とグリシン誘発電流の特性を詳細に検討した。

最近、抗コリン剤でコントロールが不十分な過活動膀胱を抑制するとして漢方製剤牛車腎気丸が注目されている。その機序として、ダイノルフィン遊離促進が考えられている。しかし、中枢性に作用を持つか否かは明確でない。そこで、第 3 に、Fos 蛋白質発現に対する牛車腎気丸の作用を検討し、中枢性に作用を持つか、ストリキニー

ネの作用と違いがあるかを明らかにすることで、牛車腎気丸の作用メカニズム解明に寄与すると共に、ストリキニーネの作用の特徴を明確にすることを試みた。

ところで、臨床においては脳梗塞後に過活動膀胱が起きることが良く知られている。これまでの正常動物における知見からは、脳幹部のグリシンが排尿反射に促進的であることが示された。このことから、脳梗塞後の過活動膀胱にグリシンとグリシン受容体が関与するのではないかと考えた。残念なことに、脳梗塞による過活動膀胱の詳細な評価系がなかったことから第4に、MCA閉塞動物を作成し、シングルシストメトリー法によりその排尿反射への影響を詳細に検討した。その上で、その評価系を用いて、ストリキニーネとデキストロメトルファンを作用を検討した。さらに、MCAの閉塞により、グリシン受容体 α_1 サブユニット mRNA および *c-fos* mRNA の発現レベルが変動するか検討した。

MCA閉塞ラットでの検討において、脳梗塞後の過活動膀胱にグリシン受容体ではなく GIRK チャネルが関与する可能性が考えられた。我々は、調べた全ての中枢性鎮咳薬が GIRK チャネル電流を抑制することを見出している。また、鎮咳活性については、加瀬らが「ピペリジノ基説」を提唱している。そのことから、第5に GIRK チャネルに選択性の高い化合物を探索するための基礎知見を得る目的で、鎮咳薬の鎮咳活性に関する「ピペリジノ基説」が GIRK チャネルの抑制に適用できないか検討した。

B. 研究方法

1. PAG における排尿反射関連神経活動の記録 (高濱担当)

体重 250-300g の SD 系雄性ラットを用い、ウレタン麻酔下に膀胱カテーテルを設置して、連続シストメトリー法により膀胱内圧を記録した。同時に、3次元マイクロマニピュレーターにより PAG とその周囲の領域に微小ガラス電極を刺入し、単一ニューロン活動を細胞外記録した。電極は、Paxinos と Watson の脳地図に従って刺入し、記録後、電極からポンタミンスカイプルーを電気泳動してその位置を確認した。

2. PAGニューロンのグリシン応答性およびグリシン誘

発電流の特性の解析 (白崎担当)

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットを雌雄の別なく使用した。bregma より -7500~-9100 μm の PAG 領域を含む厚さ 400 μm の脳薄切片を作成し、酵素処理と機械的処理により腹外側 PAG および背内側 PAG ニューロンを単離した。急性単離したニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、膜電位固定下にグリシン誘発電流を記録した。薬液投与は急速交換法 (Y-チューブ法) により行なった。

3. Fos 蛋白質の発現を指標にした牛車腎気丸の中枢内作用部位の検討 (高濱担当)

1.08%の牛車腎気丸を混入した固形飼料 (CE-2) を 4 週齢の SD 系雄性ラットに 4 週間与えて飼育し、8 週齢で実験に供した。ウレタン麻酔後、膀胱カテーテルを設置し、0.1%酢酸生理食塩液を膀胱内に 2 時間持続注入した。注入後 4%パラホルムアルデヒドでラットを灌流固定し、視床下部から延髄までの脳と、L6/S1 の腰仙髄の冠状凍結切片 (厚さ 40 μm) を作製した。免疫組織化学的に Fos 蛋白質を染色し、そのスライスを顕微鏡デジタルカメラで撮影した。その画像を元に、二次元画像解析ソフト WinROOF により Fos 蛋白質陽性神経細胞数を計測した。それには、L6/S1 の切片と、以下に示す基準部位およびその前後の計 3 枚の脳切片を用いた。基準部位: 視床下部、Bregma -1400 μm ; 中脳、Bregma -8300 μm ; 橋、Bregma -10040 μm ; 延髄、Bregma -13800 μm 。

4. MCA 閉塞ラットの作成 (高濱担当)

体重 250-300g の SD 系雄性ラットの頸部を切開し、内頸動脈と外頸動脈の分岐部から内頸動脈と Willis 輪を経て左中大脳動脈の分岐部までナイロン糸を挿入して MCA を閉塞した。

5. MCA 閉塞ラットにおける排尿反射の測定 (高濱担当)

体重 250-300g の SD 系雄性ラットにまず膀胱瘻を設置し、1 週間の回復期をおいた後、無麻酔下にシングルシストメトリー法で膀胱内圧を測定した。安定した記録が数回取れた後、MCA を閉塞し、その 0.5-1 時間後または 24 時間後に再度無麻酔下に膀胱内圧を測定した。記録が安定した後、生理食塩水を静脈内投与し、その影響を確認した。その後、ストリキニーネ (0.3mg/kg) またはデキストロメトルファン (10 または 20mg/kg) を静脈内投与し、膀胱内圧に対する影響を検討した。実験終了後、TTC 染色によ

り脳梗塞領域の容積を測定した。

6. MCA 閉塞ラットにおけるグリシン受容体および *c-fos* mRNA レベルの測定 (副田担当)

体重 250-280g の正常および MCA 閉塞 24 時間後のラットから脳を摘出し、実体顕微鏡下で PAG および LDT 領域をダイセクションした。PAG は bregma から -7000 μm の位置を境界として吻側部と尾側部に分けた。ダイセクションした PAG および LDT は左右に分け -80°C で保存した。AGPC 法により RNA 抽出をおこない、グリシン受容体 α_1 サブユニットおよび *c-fos* に特異的なプライマーと Takara の RNA PCR Kit を用いて RT-PCR をおこなった。ゲル間の補正を行うために、電気泳動で流した Smart Ladder の DNA 量とそのバンドの面積から各バンドの DNA 量を算出した。その DNA 量を β -actin の DNA 量で割って補正し、その値を各サンプルのグリシン受容体または *c-fos* mRNA のレベルとした。

7. ピペリジノ基説関連化合物の合成 (大川原担当)

ピコペリダミンと AH-1 は N-(pyridine-2-yl)-methylaniline、より 2 工程で、イソチアンブテンは methyl methacrylate より 3 工程で、Piperijine, 1-(*o*-methoxy-*a*-methylphenethyl) HCl は 2-allylphenol より 3 工程で合成を試みた。

8. ピペリジノ基説関連化合物の GIRK 電流に対する作用 (白崎担当)

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットの背側縫線核より酵素処理と機械的処理によりニューロンを急性単離した。この単離ニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用して、セロトニン誘発 GIRK 電流を記録した。ピペリジノ基説関連化合物を 30 秒間前処置後、セロトニン 10^{-7} M と同時投与して各化合物の作用を検討した。薬液投与は急速交換法 (Y-チューブ法) により行なった。

(倫理面への配慮)

熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得、「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「熊本大学動物実験指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. PAG における排尿反射関連神経活動の記録

(高濱担当)

PAG とその周囲において、排尿反射と同期して神経活動が増加するもの (Type I、7 個)、逆に減少するもの (Type II、5 個) および排尿反射に関係なく発火するもの (49 個) の 3 種類のニューロン活動が記録された。Type I のうち 6 個は、bregma より -8000 ~ -8300 μm の腹外側 PAG または背側縫線核より記録された。また、Type II のうち 3 個は bregma より -8000 ~ -8300 μm の外側 PAG または外側 PAG と背外側 PAG の境界領域より記録され、他の 2 個は bregma より -7640 μm の外側 PAG と背外側 PAG の境界領域および下丘から記録された。

2. PAG ニューロンのグリシン応答性およびグリシン誘発電流の特性の解析 (白崎担当)

bregma より -8300 μm の位置を基準に前後 800 μm を任意に中間部と尾側部とした。中間部と尾側部の腹外側 PAG および尾側背内側 PAG において、検討した全てのニューロンがグリシン誘発電流を惹起した。腹外側 PAG ニューロンのグリシン誘発電流の特性は、脊髄や Barrington's 核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った。

中間部と尾側部の腹外側 PAG ニューロンにおいて、グリシンと GABA の最大電流比 ($I_{\text{Gly}}/I_{\text{GABA}}$) はほぼ 1~2 で、中間部と尾側部で違いは見られなかった。またその比は、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。

一方、尾側の背内側 PAG では、 $I_{\text{Gly}}/I_{\text{GABA}}$ が細胞により異なり (錐体細胞と多極性細胞で 0.5-1、双極性細胞で 2.5 以上)、グリシン応答性が細胞の形態に依存する可能性が示された。

3. Fos 蛋白質の発現を指標にした牛車腎気丸の中核内作用部位の検討 (高濱担当)

牛車腎気丸を慢性投与したラットにおいて、2 時間の酢酸溶液膀胱内持続注入による排尿回数がコントロールラットに比べて有意に減少し (28 ± 3.4 回 \rightarrow 16 ± 0.8 回)、排尿間隔が延長した。これらの動物で Fos 蛋白質の発現を検討したところ、Barrington's 核と L6/S1 の後角、背側交連、副交感神経核の 4 部位において、Fos 陽性細胞数の有意な減少が観察された。視床下部視索前野、PAG、青斑核などそのほかの排尿反射関連核では変化が認められなかった。

4. MCA 閉塞ラットにおける排尿反射の測定 (高濱担当)

MCA 閉塞の 1 時間後には膀胱容量の減少、排尿

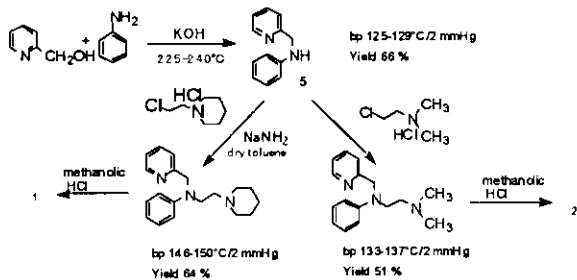
潜時の短縮、排尿閾値および膀胱コンプライアンスの低下、尿道抵抗の上昇、尿流率の減少が惹起された。これらから、過活動膀胱様と排尿困難様症状を同時に示すものと考えられた。これらの影響は閉塞 24 時間後にも持続していた。ストリキニーネは MCA 閉塞直後と 24 時間後のいずれにおいても、上記症状に影響を与えなかった。しかし、MCA 閉塞 24 時間後において、鎮咳薬のデキストロトルファンが過活動膀胱様症状を改善した。

5. MCA 閉塞ラットにおけるグリシン受容体および *c-fos* mRNA レベルの測定 (副田担当)

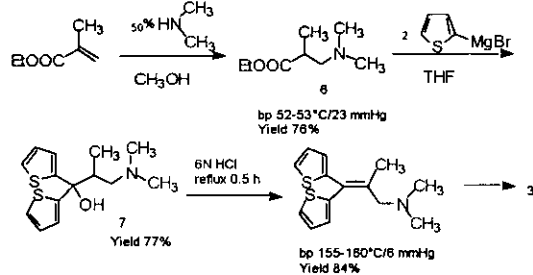
MCA 閉塞ラットにおいて、PAG および LDT におけるグリシン受容体 α_1 mRNA レベルは、調べた全ての部位で正常動物とほぼ同じであった。また、*c-fos* mRNA レベルも同様に正常動物とほぼ同じであった。

6. ピペリジノ基説関連化合物の合成 (大川原担当)

α -pyridylmethanol と aniline から、化合物 5 を得、ついで sodium amide 存在下、N-chloro-ethylpiperidine および、N-chloro-ethyl dimethylamine で処理し、遊離のピペコリダミン (目的化合物 1) と AH-1 (目的化合物 2) を得た。

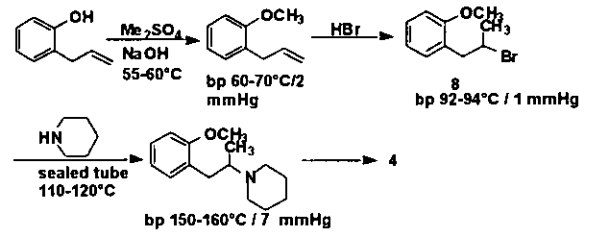


ethyl methacrylate に dimethylamine を Michael 付加して、化合物 6 を得、ついで Grignard 反応を行い、化合物 7 に導き、脱水・減圧蒸留して、イソチアンブテン塩酸塩 (目的化合物 3) とした。



2-allylphenol を 0-メチル化ついで HBr 付加し、封管中で piperidino 化し、Piperijine,

1-(o-methoxy- α -methylphenethyl) HCl (目的化合物 4 塩酸塩) とした。



7. ピペリジノ基説関連化合物の GIRK 電流に対する作用 (白崎担当)

ピペリジノ基を構造内に持たない母化合物イソチアンブテン (大川原の化合物 3)、AH-1 (大川原の化合物 2) およびメキシフェナミンに比べ、アミノ基としてピペリジノ基が導入されたチペピジン、ピコペリダミン (大川原の化合物 1) および Piperijine, 1-(o-methoxy- α -methylphenethyl) HCl (大川原の化合物 4) は低濃度でセロトニン誘発 GIRK 電流を抑制した。

D. 考察

昨年度までの検討から我々はグリシンが脳幹部、特に尾側の腹外側 PAG で排尿反射に促進的に作用する可能性を示してきた。本年度は、この部位で初めて排尿関連ニューロン活動を記録し、この部位が排尿反射に関連する部位であることを示した。この位置は CoCl_2 の注入により排尿反射が抑制されると報告されていた領域とよく一致した。しかし、まだ例数が少なく正確なことは言えないが、排尿を促進するグリシン感受性部位が bregma -8300 ~ -8800 に多かったのに対し、排尿反射関連ニューロン活動が記録された部位は -8000 ~ -8300 に集まっており完全には一致していなかった。グリシンにより排尿が促進された腹外側 PAG では、Type I ニューロン活動が記録され、Type II の活動は記録されなかった。今後 Type I ニューロン活動にグリシンやストリキニーネがどのように作用するか、そのとき排尿反射が如何に影響されるか検討する必要がある。

また、本研究は *in vivo* でみられた局在性のグリシン感受性部位は、単にグリシン感受性ニューロンの分布だけでは説明できないことを示している。おそらく、グリシン含有ニューロンを含む排尿関連の局所回路が bregma -8000 から -8800 の領域に存在するものと思われる。Type I ニューロンと Type II ニューロンがどのような神経回路で結ばれているか、それぞ

れがどのような伝達物質を含有するニューロンであるかも明らかにする必要がある。さらに、この領域でのグリシン含有ニューロンの分布やその線維の分布を免疫組織化学的に明らかにする必要がある。

Fos 蛋白質を指標とした検討からは、牛車腎気丸が中枢内の極限られた領域に作用していることが示された。この結果は、昨年度報告したストリキニーネの広範な作用部位とは明らかに異なっていた。このことから、Fos 蛋白質の発現を指標にした評価が有用であり、ストリキニーネの広範な部位における Fos 蛋白質発現抑制作用はアーチファクトによるものではないことが示唆される。換言すると、グリシンは PAG や Barrington's 核を始め多くの排尿反射関連核で排尿反射に影響していると考えられた。

このように、正常ラットにおける検討からは、グリシンが排尿反射に関与し、その異常は排尿反射異常につながると考えられた。しかし、ストリキニーネは MCA 閉塞後に観察された過活動膀胱様症状のパラメーター変化に全く影響を与えなかった。また、PAG および LDT 領域におけるグリシン受容体 mRNA の発現レベルも変化しなかった。これらのことから、少なくとも今回のモデル動物ではグリシン受容体は排尿反射異常に関与しないと考えられた。

一方興味深いことに、閉塞 24 時間以降に投与したデキストロメトルファンが過活動膀胱様症状を改善した。これまで脳梗塞後 24 時間経過した時点で投与した薬物が、脳梗塞の後遺症を改善した例は殆ど知られていない。このことから、今回の知見は極めて有用と思われる。しかも、デキストロメトルファンは現に鎮咳薬として臨床使用されている医薬品である。今後、脳梗塞後の過活動膀胱の治療薬としての発展が期待される。

デキストロメトルファンは、グリシン受容体拮抗作用のほか、NMDA 受容体拮抗作用と GIRK チャネル抑制作用があることを我々は明らかにしている。しかし、NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 は、脳梗塞 24 時間後の過活動膀胱を抑制しないとの報告がある。このことから、今回観察された作用は GIRK チャネルの抑制によるものではないかと思われた。これに関連し、側鎖としてピペリジノ基を導入することで、GIRK チャネルの抑制が増強されることを見出した。この知見は、今後 GIRK チャネルにより特異性が高く、脳梗塞後の過活動膀胱により有効な新規薬物を探索する上での貴重な指針となると思われる。

また一方で、過活動膀胱を抑制する牛車腎気丸が Barrington's 核の Fos 蛋白質発現を特異的に抑制したことから、デキストロメトルファンと共通の作用がないか興味を持たれる。今後、牛車腎気丸の抽出物が GIRK チャネルを抑制するかなどさらに検討が必要であろう。

E. 結論

本研究より、*in vivo* で示されたグリシン感受性部位が排尿反射関連部位とほぼ一致することが明らかとなった。しかし、*in vivo* におけるグリシン感受性部位は、単にグリシン感受性ニューロンの分布だけでは説明できないことも明らかとなった。

一方 MCA 閉塞モデルラットによる検討では、MCA 閉塞による過活動膀胱様症状と排尿困難様症状に、グリシン受容体は関与しないことが示唆された。しかし、MCA 閉塞 24 時間以降に投与したデキストロメトルファンが、過活動膀胱様症状を改善すること、ならびに、ピペリジノ基説が GIRK チャネル抑制作用にも適用できる可能性が高いことが示された。これらの知見は、今後、脳梗塞に起因する過活動膀胱の治療薬開発の上で貴重な指針になると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirasaki T, Abe K, Soeda F and Takahama K. δ -opioid receptor antagonists inhibit GIRK channel currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat. *Brain Res*, 1006 P190-197 (2004)

Shirasaki T, Shiozuka M, Yamasaki K, Soeda F and Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in rat periaqueductal gray. *Neurosci*, (submitted)

Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K. Ameliorating effects of dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP) on overactive bladder (OAB) caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. *J Pharmacol Sci*, 94(Suppl. 1),113P (2004).

Shiozuka M, Shirasaki T, Yamasaki K, Soeda F, Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in periaqueductal gray (PAG), a micturition center in rat. J Pharmacol Sci, 94(Suppl. 1), 228P (2004).

山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャネル抑制作用によって説明できる? 日本薬理学雑誌 123 巻 3 号 68P

2. 学会発表

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中枢内 Fos 蛋白の発現に対する牛車腎気丸の影響. 第 10 回日本排尿機能学会 (2003)

山崎広大、白崎哲哉、阿部恵介、副田二三夫、高濱和夫. Barrington's 核および腹外側中脳水道中心灰白質における glycine 応答ニューロンの分布とその性質についての電気生理学的解析. 第 10 回日本排尿機能学会

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫、無麻酔脳梗塞ラットにおける過活動膀胱に対するデキストロメトルファンとクロペラスチンの改善効果. 第 77 回日本薬理学会年会

塩塚道隆、白崎哲哉、山崎広大、副田二三夫、高濱和夫. ラット排尿中枢 PAG ニューロンのグリシン応答性. 第 77 回日本薬理学会年会

山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャネル抑制作用によって説明できる? 第 56 回日本薬理学会西南部会

3. その他

高濱和夫、過活動膀胱治療の現状と今後の展望
— 解明されてきた漢方薬: 牛車腎気丸の作用 —
— Mebio vol. 21(1) P128-133 (2004)

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

II. 分 担 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）
分担研究報告書

排尿反射関連核における神経活動性の検討
および脳梗塞の排尿反射に対する影響とその改善に関する研究

分担研究者 高濱 和夫 熊本大学大学院 医学薬学研究部教授

研究要旨：本年度は以下の3項目について検討した。

1) 昨年度我々は、プレグマより-8300 ~ -8800 μm の腹外側 PAG にグリシンを微量注入すると排尿反射が促進することを報告した。しかし、PAG のどの領域が排尿反射に係るかは不明な点が多い。そこで PAG 領域において排尿関連ニューロン活動の記録を試みた。そのために、連続シストメリー法により排尿反射を記録しながら、微小ガラス電極を PAG に刺入し、細胞外で単一ニューロン活動を記録した。その結果、PAG およびその周囲から排尿期に活動電位の発火が増えるニューロン (Type I)、減少するニューロン (Type II) と排尿反射に関係なく発火するニューロンの3種類のニューロン活動が記録された。Type I および II のニューロン活動はプレグマより-8000 ~ -8300 μm の部位に多く見出された。

2) 過活動膀胱などの排尿障害治療薬として用いられる漢方製剤牛車腎気丸の作用について、Fos 蛋白質の発現を指標に中枢作用の有無の確認と、その作用部位の同定を試みた。その結果、牛車腎気丸は脊髄 L6/S1 領域とバリントン核で選択的に Fos 陽性細胞数を減少させた。この結果は、昨年報告したデキストロメトルファンやストリキニーネの作用とは異なり、バリントン核の興奮を比較的選択的に抑制する可能性を示唆する。

3) 中大脳動脈 (MCA) 閉塞による脳梗塞モデル動物を作成し、排尿反射への影響をシングルシストメリー法で詳細に検討した。その結果、膀胱容量の減少に加え、排尿潜時の短縮、排尿閾値の低下、尿道抵抗の上昇と尿流率の減少が惹起された。これらの影響は MCA 閉塞の 24 時間後でも持続していた。ストリキニーネはこれらの症状に影響を与えなかった。しかし、MCA 閉塞の 24 時間後に投与した鎮咳薬デキストロメトルファン (DM) は、過活動膀胱様症状を有意に改善した。この改善作用に GIRK チャネルの抑制が関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでに正常動物において、薬理的、免疫組織学的、分子生物学的および電気生理学的方法により、脳幹部のグリシンとグリシン受容体が排尿反射に促進的に作用する可能性を示してきた。その中で、尾側の腹外側 PAG が有力な作用点の一つではないかと考えた。PAG は古典的橋排尿中枢である Barrington's 核の上位にあり、腰仙髄部より直接投射を受ける。昨年度示したプレグマより-8300 ~ -8800 μm の領域は腰仙髄の第1層から投射を受ける部位でもある。また、プレグマより-8300 μm の付近に CoCl_2 を注入すると排尿反射が抑制されると報告されている。しかし、PAG のどの部位のどのようなニューロンが排尿反射に係るかは全く不明である。これらのことからまず、PAG において排尿反射に関連する神経活動を単一ニューロンレベルで記録し、その特徴と PAG 内での分布を明らかにすることを試みた。

第2に、Fos 蛋白質の発現を指標に漢方製剤牛車腎気丸の作用を検討した。牛車腎気丸は、抗コリン剤が効きにくい頻尿症状を改善するとして最近興味をもたれている。その機序として、脊髄レベルでのダイノルフィンの遊離促進が考えられている。このため、ストリキニーネとは異なる機序で中枢作用を示す可能性が考えられる。しかし、中枢性に作用するか否かは明確ではない。そこで、その作用をストリキニーネやデキストロメトルファンと比較することで、牛車腎気丸の作用メカニズム解明に寄与すると共に、Fos 蛋白質の発現を指標とした評価系の有用性を示し、かつグリシン神経系の作用の特徴をより明確にできないか検討した。

第3に、病態モデルとして MCA 閉塞動物を作成し、その排尿反射への影響を詳細に検討すると共に、グリシン神経系の関与を調べるためにストリキニーネおよびデキストロメトルファンの作

用を検討した。

B. 研究方法

1. PAG における排尿反射関連神経活動の記録

体重 250-300g の SD 系雄性ラットを用い、ウレタン麻酔下に膀胱カテーテルを設置して、連続シストメリー法により膀胱内圧を記録した。同時に、頭蓋に 4mm 四方の穴を開け、3 次元マイクロマニピュレーターにより PAG とその周囲の領域に微小ガラス電極を刺入し、単一ニューロン活動を細胞外記録した。電極は、Paxinos と Watson の脳地図に従って刺入し、記録後、電極からポンタミンスカイプルーを電気泳動してその位置を確認した。

2. Fos 蛋白質の発現を指標にした牛車腎気丸の中 枢内作用部位の検討

1.08% の牛車腎気丸を混入した固形飼料 (CE-2) を 4 週齢の SD 系雄性ラットに 4 週間与えて飼育し、8 週齢で実験に供した。ウレタン麻酔後、膀胱カテーテルを設置し、0.1% 酢酸生理食塩液を膀胱内に 2 時間持続注入した。注入後 4% パラホルムアルデヒドでラットを灌流固定し、視床下部から延髄までの脳と、L6/S1 の腰仙髄の冠状凍結切片 (厚さ 40 μ m) を作製した。免疫組織化学的に Fos 蛋白質を染色し、そのスライスを顕微鏡デジタルカメラで撮影した。その画像を元に、二次元画像解析ソフト WinROOF により Fos 蛋白質陽性神経細胞数を計測した。それには、L6/S1 の切片と、以下に示す基準部位およびその前後の計 3 枚の脳切片を用いた。基準部位: 視床下部、Bregma -1400 μ m; 中脳、Bregma -8300 μ m; 橋、Bregma -10040 μ m; 延髄、Bregma -13800 μ m。

3. MCA 閉塞ラットの作成

体重 250-300g の SD 系雄性ラットの頸部を切開し、内頸動脈と外頸動脈の分岐部から内頸動脈と Willis 輪を経て MCA の分岐部までナイロン糸を挿入して MCA を閉塞した。

4. MCA 閉塞ラットにおける排尿反射の測定

体重 250-300g の SD 系雄性ラットにまず膀胱瘻を設置し、1 週間の回復期をおいた後、無麻酔下にシングルシストメリー法で膀胱内圧を測定した。安定した記録が数回取れた後、左中大脳動脈を閉塞し、その 0.5-1 時間後または 24 時間後に再度無麻酔下に膀胱内圧を測定した。記録が安定した後、生理食塩水を静脈内投与し、その影響を確認した。その後、ストリキニーネ (0.3mg/kg) またはデキストロメトルファ

ン (10 または 20mg/kg) を静脈内投与し、膀胱内圧に対する影響を検討した。実験終了後、TTC 染色により脳梗塞領域の容積を測定した。

(倫理面への配慮)

熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得、「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「熊本大学動物実験指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. PAG とその周囲から大別して 3 種類のニューロン活動が 61 個記録された。そのうち 49 個では排尿反射とニューロン活動に関連が見られなかった。しかし、7 個のニューロンでは膀胱内圧が上昇する排尿期に発火が増加し (Type I)、残りの 5 個のニューロンでは排尿期に発火が減少した (Type II)。記録された 7 個の Type I ニューロン活動のうち 6 個は、ブレグマより -8000 ~ -8300 μ m の腹外側 PAG または背側縫線核より記録された。また、5 個の Type II ニューロン活動のうち 3 個はブレグマより -8000 ~ -8300 μ m の外側 PAG または外側 PAG と背外側 PAG の境界領域より記録され、他の 2 個はブレグマより -7640 μ m の外側 PAG と背外側 PAG の境界領域および下丘から記録された。

2. 牛車腎気丸を慢性投与したラットにおいて、2 時間の酢酸溶液膀胱内持続注入による排尿回数がコントロールラットに比べて有意に減少し (28 \pm 3.4 回 \rightarrow 16 \pm 0.8 回)、排尿間隔が延長した。これらの動物で Fos 蛋白質の発現を検討したところ、Barrington's 核と L6/S1 の後角、背側交連、副交感神経核の 4 部位において、Fos 陽性細胞数の有意な減少が観察された。視床下部視索前野、PAG、青斑核などそのほかの排尿反射関連核では変化が認められなかった。

3. MCA 閉塞の 1 時間後には膀胱容量の減少に加え、排尿潜時の短縮、排尿閾値および膀胱コンプライアンスの低下が惹起された。これらは、過活動膀胱様の変化と考えられる。また、同時に尿道抵抗が上昇し、尿流率が減少した。これらは排尿困難を示すものと考えられる。最大膀胱内圧は影響されなかった。上記の影響は閉塞 24 時間後にも持続していた。ストリキニーネは MCA 閉塞直後と 24 時間後のいずれにおいても、上記の症状に影響を与えなかった。しかし、MCA 閉塞 24 時間後において、鎮咳薬

のデキストロメトルファンは過活動膀胱様症状を改善した。ストリキニーネ、デキストロメトルファン共に、脳梗塞領域の容積には影響を与えなかった。

D. 考察

本研究から、初めて PAG における排尿関連ニューロン活動が記録された。まだ例数が少なく正確なことは言えないが、本研究結果からは、排尿反射に関連するニューロンがプレグマより 8000~8300 μm の中脳水道の周囲に集まっている可能性が考えられる。また、Type I ニューロンと Type II ニューロンはそれぞれ腹側と背側に分かれて存在する可能性が考えられた。蓄尿期の発火頻度が Type I ニューロンで平均 1.5 Hz であったのに対し、Type II ニューロンでは 11.4 Hz と高かった。このような違いは明らかとなったが、Type I ニューロンと Type II ニューロンのその他の特性の違いは現在のところ不明である。今後、マイクロイオントフォレシス法や微量圧注入法と組み合わせて、両ニューロンの特性の違いを明らかにするとともに、これらのニューロンがどのような投射を受け、どこに投射するかを明らかにする必要がある。

また、牛車腎気丸の作用は、脊髄の 3 部位と Barrington's 核に局限していた。脊髄後角での抑制は知覚神経の入力の遮断による可能性も考えられるが、PAG で抑制が見られないことから、その可能性は低いと考えられる。交連核と副交感神経核は Barrington's 核より直接興奮性の投射を受ける部位である。このことを考慮すると、牛車腎気丸は Barrington's 核に極めて特異的に作用した可能性が考えられた。その理由は不明である。本知見は、1) Fos 蛋白質の発現を指標とした作用点の評価が有用であること、2) ストリキニーネやデキストロメトルファンの作用とは明らかに異なり、牛車腎気丸にグリシン受容体抑制作用はないであろうこと、さらに 3) ストリキニーネとデキストロメトルファンの作用点およびグリシン受容体が関与する排尿反射部位が広く存在することを示唆する。

牛車腎気丸が抗コリン薬でコントロール不十分な頻尿を良く改善するとの臨床知見とあわせて考えると、今回の知見は Barrington's 核の興奮抑制が過活動膀胱の改善のうえで重要であることを示すと考えられる。

MCA の閉塞は、最大膀胱内圧以外の 6 パラメー

ターに影響を与え、過活動膀胱と排尿困難を同時に呈することが、今回はじめて明らかになった。当初の予想に反して、ストリキニーネはこれらの変化に全く影響を与えなかった。しかし、閉塞 24 時間以降に投与したデキストロメトルファンが過活動膀胱様症状を改善した。これまで脳梗塞 24 時間経過した時点で投与した薬物が、脳梗塞の後遺症を改善した例は殆ど知られていない。このことから、今回の知見は極めて有用と思われる。しかも、デキストロメトルファンは現に鎮咳薬として臨床使用されている医薬品である。今後、脳梗塞後の過活動膀胱の治療薬としての発展が期待される。ただし、20mg/kg では、尿道抵抗の上昇と尿流率の減少および残尿が観察された。このことから、臨床応用に当たってはその用量に注意する必要があると思われる。

デキストロメトルファンは、グリシン受容体拮抗作用のほか、NMDA 受容体拮抗作用と GIRK チャネル抑制作用があることを我々は明らかにしている。しかし、NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 は、脳梗塞 24 時間後の過活動膀胱を抑制しないとの報告がある。このことから、今回観察された作用は GIRK チャネルの抑制によるものではないかと思われた。今後、さらに検討する必要がある。

また、本研究の知見は過活動膀胱を抑制する牛車腎気丸が MCA 閉塞ラットにおける過活動膀胱様症状を改善するかや、牛車腎気丸抽出物が GIRK チャネルを抑制するかなど興味ある疑問も残した。これらの疑問を解決することで、デキストロメトルファンが示した改善作用の作用点が明確になると期待される。さらに継続して検討することが必要であろう。

E. 結論

本研究より、プレグマより 8000~8300 μm の中脳水道周囲に排尿関連ニューロンが分布すること、Fos 蛋白質を指標とした評価が有用であること、MCA 閉塞により、過活動膀胱様症状と排尿困難様症状を同時に呈すること、さらに MCA 閉塞 24 時間以降に投与したデキストロメトルファンが、過活動膀胱様症状を改善させることがあきらかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirasaki T, Abe K, Soeda F and Takahama K. δ -opioid receptor antagonists inhibit GIRK channel currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat. Brain Res, 1006 P190-197 (2004)

Shirasaki T, Shiozuka M, Yamasaki K, Soeda F and Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in rat periaqueductal gray. Neurosci, (submitted)

Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, Ameliorating effects of dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP) on overactive bladder (OAB) caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. J Pharmacol Sci, 94(Suppl. 1),113P (2004).

Shiozuka M, Shirasaki T, Yamasaki K, Soeda F, Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in periaqueductal gray (PAG), a micturition center in rat. J Pharmacol Sci, 94(Suppl. 1), 228P (2004).

山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャンネル抑制作用によって説明できる？日本薬理学雑誌 123 巻 3 号 68P

2. 学会発表

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中枢内 Fos 蛋白の発現に対する牛車腎気丸の影響. 第 10 回日本排尿機能学会 (2003)

山崎広大、白崎哲哉、阿部恵介、副田二三夫、高濱和夫. Barrington's 核および腹外側中脳水道中心灰白質における glycine 応答ニューロンの分布とその性質についての電気生理学的解析. 第 10 回日本排尿機能学会

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫、無麻酔脳梗塞ラットにおける過活動膀胱に対するデキストロメトルファンとクロペラスチンの改善効果. 第 77 回日本薬理学会年会

塩塚道隆、白崎哲哉、山崎広大、副田二三夫、高濱和夫. ラット排尿中枢 PAG ニューロンのグリシン応答性. 第 77 回日本薬理学会年会

山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャンネル抑制作用によって説明できる？第 56 回日本薬理学会西南部会

3. その他

高濱和夫、過活動膀胱治療の現状と今後の展望 — 解明されてきた漢方薬: 牛車腎気丸の作用 — Mebio vol. 21(1) P128-133 (2004)

H. 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

ラット中脳水道中心灰白質（PAG）ニューロンのグリシン応答性
および「ピペリジノ基説」と GIRK チャネル抑制作用の関連に関する研究

分担研究者 白崎 哲哉 熊本大学大学院 医学薬学研究部 助教授

研究要旨：昨年度我々は bregma より-8300 ~ -8800 μm の腹外側 PAG にグリシンを微量注入すると排尿反射が促進することを報告した。そこで、本年度はこの作用部位特異性がグリシン感受性ニューロンの分布の局在によるものか、またその応答はいわゆるグリシン受容体を介するものかを明らかにする目的で PAG ニューロンにおけるグリシン応答性をパッチクランプ法により検討した。PAG は吻尾側に長い領域であるが、bregma より-8300 μm の位置を基準に前後 800 μm をそれぞれ中間部と尾側部として、その腹外側 PAG と尾側部については背内側 PAG の計 3 領域について調べた。検討した 61 個全てのニューロンでグリシン誘発電流が観察された。尾側および中間部の腹外側 PAG においては、ニューロンの形態（錐体細胞、双極細胞、多極性細胞）によらずグリシンと GABA の誘発電流の比 (I_{Gly}/I_{GABA}) はほぼ 1~2 であった。この部位におけるグリシン誘発電流の特性は、脊髄や Barrington's 核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。以上本研究より、bregma より-8300 μm の前後の腹外側 PAG 領域と尾側の背内側 PAG には機能的ストリキニーネ感受性グリシン受容体が広く存在し、グリシン感受性ニューロンの分布だけでは、in vivo で観察された部位特異的なグリシンの作用が説明できないことが判明した。第 2 に、中大脳動脈閉塞動物における検討から、鎮咳薬デキストロメトルファンによる GIRK チャネルの抑制が脳梗塞による過活動膀胱を抑制する可能性が示された。そこで、より低濃度で GIRK チャネルを抑制する化合物を求めて、中枢性鎮咳薬の鎮咳活性に関する「ピペリジノ基説」をもとに、大川原により合成された化合物と関連化合物について GIRK チャネル電流に対する作用を検討した。その結果、アミノ基としてピペリジノ基が導入された化合物で、GIRK 電流抑制作用が強いことが示された。本結果は、新規排尿障害治療薬開発の上で有用な指標となると考えられ、今後の進展が期待される。

A. 研究目的

PAG は古典的橋排尿中枢である Barrington's 核の上位にあり、腰仙髄部より直接投射を受ける。このため、近年排尿中枢としての機能が注目されている。昨年我々は bregma より -8300 ~ -8800 μm の腹外側 PAG にグリシンを微量注入すると排尿反射が促進することを報告した。この部位への CoCl_2 の投与が排尿反射を抑制することも報告されており、この部位は排尿反射に重要な部位と考えられる。この部位は腰仙髄の第 1 層から投射を受けている。しかし、解剖学的に明らかにされている腰仙髄部から PAG への投射は単純ではなく、また脊髄以外の脳部位からも多く入力を受けている。Substance P の分布や GAD 陽性ニューロンの分布が PAG 内で一様でないことも明らかにされている。しかし、PAG におけるグリシン応答性ニューロンの分布やその形態、グリシン応答の特性やグリシン応答の大きさなどは全くわかっていない。

そこで、本年度は PAG ニューロンにおけるグリシン応答とグリシン感受性ニューロンの形態および分布を明らかにし、グリシン感受性ニューロンの分布と in vivo におけるグリシン作用部位とに相関があるか検討した。

また、中大脳動脈閉塞動物における検討から、鎮咳薬デキストロメトルファンによる GIRK チャネルの抑制が脳梗塞による過活動膀胱を抑制する可能性が示された（高濱分担報告参照）。我々はこれまでに、検討した全ての中枢性鎮咳薬が GIRK チャネル電流を抑制することを見出している。一方、加瀬らは中枢性鎮咳薬の鎮咳活性に関して、「ピペリジノ基説」を提唱している（大川原分担報告参照）。これらを総合すると、ピペリジノ基説が GIRK チャネルの抑制にも適用でき、新規排尿障害治療薬開発の有力な手がかりとなる可能性があると考えられた。そこで第 2 に、大川原により合成された化合物とそのほかの関連化合物について、ピペリジノ基の導入が GIRK チャネル電流の抑制を増強するか、また、これまでより

強く GIRK チャンネル電流を抑制する化合物がないかを検討した。

B. 研究方法

1. 生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットを雌雄の別なく使用した。bregma より -7500~-9100 μm の PAG 領域を含む厚さ 400 μm の脳薄切片を作成し、酵素処理と機械的処理により腹外側 PAG および背内側 PAG ニューロンを単離した。急性単離したニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、膜電位固定下にグリシン誘発電流を記録した。薬液投与は急速交換法 (Y-チューブ法) により行なった。

2. 1.と同様に背側縫線核よりニューロンを急性単離した。この単離ニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用して、セロトニン誘発 GIRK チャンネル電流を記録した。ピペリジノ基関連化合物を 30 秒間前処置後、セロトニン 10^{-7} M と同時投与して各種化合物の作用を検討した。薬液投与は急速交換法 (Y-チューブ法) により行なった。

(倫理面への配慮)

熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得、「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「熊本大学動物実験指針」に従って実施した。

C. 研究結果

1. bregma より -8300 μm の位置を基準に前後 800 μm を任意に中間部と尾側部とした。中間部と尾側部の腹外側 PAG において検討した 52 個全てのニューロンが活性化の速いグリシン誘発電流を惹起した。また、尾側背内側 PAG でも任意に検討した 9 個全てのニューロンで活性化の速いグリシン誘発電流が観察された。中間部と尾側の腹外側 PAG ニューロンでグリシン誘発電流の詳細を検討したところ、逆転電位は Cl^- の平衡電位にほぼ一致し、 EC_{50} および Hill 係数はそれぞれ 2.0×10^{-5} M および 2.06 であった。また、ストリキニーネのグリシン誘発電流に対する IC_{50} は 2.0×10^{-7} M であった。よって、グリシン電流の特性は、脊髄や Barrington's 核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。

中間部と尾側の腹外側 PAG ニューロンにおいて、グリシンと GABA の最大応答の比 ($I_{\text{Gly}}/I_{\text{GABA}}$) はほぼ 1~2 であった。その比は、中間部と尾側で変わらず、

また、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。一方、尾側の背内側 PAG では、 $I_{\text{Gly}}/I_{\text{GABA}}$ が細胞により異なり (錐体細胞と多極性細胞で 0.5-1、双極性細胞で 2.5 以上)、グリシン応答性が細胞の形態に依存する可能性が示された。

2. ピペリジノ基を構造内に持たない母化合物イソチアンブテン (大川原の化合物 3)、AH-1 (大川原の化合物 2) およびメキシフェナミンに比べ、ピペリジノ基がアミノ基として導入されたチベピジン、ピコペリダミン (大川原の化合物 1) および Piperijine, 1-(*o*-methoxy- α -methylphenethyl) HCl (大川原の化合物 4) は低濃度でセロトニン誘発 GIRK 電流を抑制した。ピペリジノ基導入化合物の IC_{50} 値は、 6.9×10^{-6} M ~ 5.2×10^{-5} M であった。

D. 考察

本研究から、まず中間部および尾側の腹外側 PAG と尾側の背内側 PAG には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する可能性が示唆された。腹外側 PAG におけるグリシン誘発電流の EC_{50} 、Hill 係数およびストリキニーネによる IC_{50} は、いずれもこれまで脊髄その他のニューロンで報告されている値とよく一致した。また、電流-電圧関係より、グリシン誘発電流が Cl^- 電流であることが示された。腹側および背側 PAG にグリシン受容体 α_1 サブユニット mRNA が広く存在することを副田らは RT-PCR 法により確認している。これらのことから、PAG におけるグリシン応答は、ストリキニーネ感受性のいわゆるグリシン受容体を介することが明らかとなった。

グリシン感受性に関しては、まず調べた全てのニューロンがグリシンに応答し、中間部および尾側の腹外側 PAG においては、神経細胞の形態によらず $I_{\text{Gly}}/I_{\text{GABA}}$ が 1 以上であったことから、bregma より -8300 μm の位置を境にグリシン応答性が異なる可能性は否定される。これらの部位においてグリシンは GABA と同程度に重要な役割を担っていると考えられる。In vivo で観察されたグリシンの部位特異的な作用は、おそらく尾側 PAG にありグリシン神経を含む局所回路により発現するのではないかと考えられる。今後より詳細な検討が望まれる。

また、ピペリジノ基導入化合物による検討から、アミノ基としてピペリジノ基を導入することで GIRK チャ

ネル電流の抑制作用が増強されることが明らかとなった。チペピジンの場合は抑制作用の増強が小さかった。このことから、ピペリジノ基の導入に際して、その窒素を介して母核と結合させることが有用であると思われた。本結果は、脳梗塞に起因する排尿障害治療薬の開発の上で重要な基礎知見になると思われる。残念ながら今回の検討では、これまでに調べた中で最も低濃度で GIRK チャネルを抑制するクロペラスチンより低濃度で GIRK チャネル電流を抑制する化合物は見出せなかった。今後、GIRK チャネル上の中枢性鎮咳薬結合部位を明らかにし、今回の知見とあわせてより効果の高い化合物を創造することが望まれる。

E. 結論

本研究より、中間部および尾側の腹外側 PAG にグリシン感受性ニューロンが広く存在する可能性が示唆された。よって、*in vivo* における部位特異的なグリシンの作用は、単純にグリシン感受性ニューロンの分布だけでは説明できないと考えられる。

また、ピペリジノ基説は中枢性排尿障害治療薬開発の上でも有用な手がかりになると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shirasaki T, Abe K, Soeda F and Takahama K. δ -opioid receptor antagonists inhibit GIRK channel currents in acutely dissociated brainstem neurons of rat. *Brain Res*, 1006 P190-197 (2004)

Shirasaki T, Shiozuka M, Yamasaki K, Soeda F and Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in rat periaqueductal gray. *Neurosci*, (submitted)

Shiozuka M, Shirasaki T, Yamasaki K, Soeda F, Takahama K. Glycine responsiveness of neurons in periaqueductal gray (PAG), a micturition center in rat. *Journal of Pharmacological Sciences* 94(Suppl. 1), 228P (2004).

山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャネル抑制作用によって説明できる? *日本薬理学雑誌* 123 巻 3 号 68P

2. 学会発表

塩塚道隆○白崎哲哉、山崎広大、副田二三夫、高濱和夫. ラット排尿中枢 PAG ニューロンのグリシン応答性. 第 77 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. Barrington's 核および腹外側中脳水道中心灰白質における glycine 応答ニューロンの分布とその性質についての電気生理学的解析. 第 10 回日本排尿機能学会

○山崎広大、白崎哲哉、大川原正、大塚雅巳、副田二三夫、高濱和夫. 中枢性鎮咳薬の Piperidino 基説は GIRK チャネル抑制作用によって説明できる? 第 56 回日本薬理学会西南部会

3. その他

なし

H. 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

脳梗塞モデルラットの排尿反射関連核におけるグリシン受容体
および *c-fos* mRNA レベルの解析

分担研究者 副田 二三夫 熊本大学大学院医学薬学研究部 助手

研究要旨： 我々はこれまでに、正常ラットの橋排尿中枢（バリントン核）を含む橋背外側被蓋野（LDT）や中脳水道中心灰白質（PAG）においてグリシン受容体 α_1 サブユニット mRNA の発現を確認してきた。本年度は、中大脳動脈（MCA）閉塞による脳梗塞モデルラットにおいて、排尿反射関連核のグリシン受容体 mRNA 発現レベルを検討し、脳梗塞に伴う排尿反射異常（過活動膀胱と排尿困難：高濱分担報告参照）にグリシン受容体の発現レベルが関与するか検討した。また、排尿反射関連核の神経活動性に対する脳梗塞の影響を、神経活動のマーカーである *c-fos* mRNA の発現レベルを指標に検討した。その結果、MCA 閉塞 24 時間後の脳梗塞ラットにおける PAG および LDT 領域のグリシン受容体と *c-fos* の mRNA 発現レベルは、正常動物の場合とほぼ同じであることがわかった。このことから、MCA の閉塞は少なくとも 24 時間後の時点において、排尿反射関連核におけるグリシン受容体の発現レベルに影響を与えず、神経活動性も正常レベルと大きくは変化していない可能性が示唆された。MCA 閉塞 24 時間後に観察される排尿反射異常にグリシン受容体の発現レベル変動は関与していないと考えられた。

A. 研究目的

これまで我々は、1) 尾側の腹外側 PAG にグリシンを微量注入すると排尿反射が促進され、その作用がストリキニーネで抑制されること、2) 膀胱内への酢酸溶液注入により排尿反射関連核で誘発される Fos タンパク質の発現が、グリシン受容体拮抗薬ストリキニーネで抑制されることなどから、グリシン受容体が排尿反射に関与することを示唆してきた。本年度は、中枢性排尿障害の病態モデルとして MCA 閉塞ラットを作成し、その排尿反射関連核におけるグリシン受容体の発現レベルを解析することで、グリシン受容体の発現レベルの変動が脳梗塞による排尿障害に関与するの否かについて検討した。また、脳梗塞動物の排尿関連部位における神経活動性の変化を知る目的で、*c-fos* mRNA レベルについても併せて調べた。

B. 研究方法

動物は SD 系雄性ラットを九動（株）より購入し、以下の実験に用いた。
脳梗塞ラットは左中大脳動脈を閉塞してから 24 時間経過したものをを用いた。

半定量的 RT-PCR 法

体重 250-280g の正常および脳梗塞ラットから脳を摘出し、実体顕微鏡下で PAG および LDT 領域をダイセクションした。PAG は bregma から -7000 μ m の位置を境界として吻側部と尾側部に分けた。ダイセクションした PAG および LDT は左右に分け -80°C で保存した。AGPC 法により RNA 抽出をおこない、グリシン受容体 α_1 サブユニットおよび *c-fos* に特異的なプライマー、Takara の RNA PCR Kit などを用いて RT-PCR をおこなった。内部標準として β -actin mRNA を測定した。PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、そのバンドを電気泳動ゲル撮影システム（Kodac Digital Science EDAS 290 LE）にてデジタル撮影した。この画像を Scion Image で解析し、各バンドの面積を数値化した。ゲル間の補正のために、流した Smart Ladder の DNA 量とそのバンドの面積から各バンドの DNA 量を算出した。さらに各バンドの DNA 量をそのサンプルの β -actin DNA 量で割り、その補正値を各サンプルのグリシン受容体または *c-fos* mRNA のレベルとした。

(倫理面への配慮)

「動物実験に関する日本薬理学会指針」および「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。

C. 研究結果

1. グリシン受容体 α_1 mRNA の発現レベル

MCA を閉塞した左側において、吻側部 PAG、尾側部 PAG および LDT 領域のグリシン受容体 α_1 mRNA 発現レベルは、正常ラットにおける発現レベルのそれぞれ 1.11 倍、1.27 倍および 1.00 倍であった。

右側におけるグリシン受容体 α_1 mRNA の発現レベルは、吻側部 PAG および尾側部 PAG において、正常ラットにおける発現レベルのそれぞれ 0.97 倍、0.92 倍であった。

2. *c-fos* mRNA の発現レベル

MCA 閉塞ラットにおいて、左吻側 PAG、左尾側 PAG および左 LDT 領域における *c-fos* mRNA の発現レベルは、正常ラットのそれぞれ 1.01 倍、1.14 倍、1.07 倍であった。

右側の吻側 PAG および尾側 PAG において、*c-fos* mRNA の発現レベルは、正常動物のそれぞれ 0.86 倍、0.95 倍であった。

D. 考察

今回用いた脳梗塞モデルラットは術後 24 時間経過しており、梗塞層は完成しているものと考えられる。既報によると、MCA 閉塞の 1 時間後に LDT の *c-fos* mRNA の発現レベルはピークに達し、3 時間後には急激に低下して、その後 MCA 閉塞の 24 時間後までほぼ一定したレベルであったと報告されている。これと同様の成績が、今回用いた脳梗塞モデルラットの LDT でも得られた。さらに本研究では、PAG を吻側と尾側に分け、さらにそれぞれを左右に分けて詳細に検討した。その結果は、LDT の場合と同様であった。このことより、排尿反射関連核の神経活動性は、MCA の閉塞直後に増加するものの、少なくとも 24 時間後の時点においては大きな影響を受けないことが示唆された。

このような動物を用いてグリシン受容体 α_1 mRNA レベルを測定したが、排尿反射関連核におけるその発現レベルは、MCA 閉塞の 24 時間後において変化しなかった。このことから脳梗塞の亜急性期に見られる

排尿反射異常はグリシン受容体量の変動によるものではないと考えられた。

E. 結論

MCA 閉塞 24 時間後において、排尿反射関連核の神経活動性はほぼ正常レベルと考えられ、グリシン受容体 mRNA の発現レベルは変化していないことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, Ameliorating effects of dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP) on overactive bladder (OAB) caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. J Pharmacol Sci, 94(Suppl. 1),113P (2004).

2. 学会発表

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫: 無麻酔脳梗塞ラットにおける過活動膀胱に対するデキストロメトルファンとクロベラスチンの改善効果. 第 77 回日本薬理学会年会

3. その他

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし