

厚生労働科学研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

脳神経疾患に随伴する過活動膀胱の新規治療薬の開発に関する研究

: 既存薬品に新たに発見された作用を基にして

(H16 - 長寿 - 010)

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高濱 和夫

平成18(2006)年4月

# 目 次

I. 総括研究報告	5
脳神経疾患に随伴する過活動膀胱の新規治療薬の開発に関する研究： 既存薬品に新たに発見された作用を基にして	高濱 和夫 7
II. 分担研究報告	15
1. 脳梗塞ならびに加齢に伴う排尿障害の治療薬開発に関する基礎研究	高濱 和夫 17
2. ラット中脳水道中心灰白質における排尿反射関連ニューロンの電気生理学的・ 薬理学的特性と分布、ならびに <i>in vitro</i> におけるクロペラスチンの薬理学的特性に 関する研究	白崎 哲哉 22
3. 老齢マウスおよびエストロゲン受容体欠損マウスの脳内における GIRK チャネル および 5-HT <sub>1A</sub> 受容体 mRNA レベルの解析	副田 二三夫 27
4. 光学活性 cloperastine の合成	大川原 正 31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37
1. G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats Society for Neuroscience 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner Program No. 218.10 (2005)	39
2. F. Soeda, A. Honda, T. Shirasaki, G. Yamamoto, K. Takahama Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it 日本排尿機能学会誌 17 巻 2 号 (印刷中)	40
3. G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama G-protein-gated inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel and therapeutic drugs for urinary disturbance	

J. Pharmaceu. Soc. Jpn. 125 (Suppl. 2) P20-23 (2005)	48
4. K. Matsumoto, T. Shirasaki, G. Yamamoto, F. Soeda, K. Takahama Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats J. Pharmacol. Sci. 100 (Suppl. I) 251P (2006)	52
5. M. Shiozuka, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K <sup>+</sup> currents J. Pharmacol. Sci. 100 (Suppl. I) 138P (2006)	53
6. K. Hashitani, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K <sup>+</sup> (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons J. Pharmacol. Sci. 100 (Suppl. I) 137P (2006)	54
7. 山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 フリームービング動物の昼夜連続排尿測定システムの開発とその評価 第 58 回日本薬理学会西南部会プログラム/抄録集 P35 (2005)	55
8. 山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 GIRK チャネルは新規排尿障害治療薬の標的になりえるか？ 日本薬学会第 126 年会要旨集 1 P255 (2006)	56
9. 本田宗吉、白崎哲哉、塩塚道崇、副田二三夫、高濱和夫 GIRK 電流抑制作用を有するクロペラスチンの膜電流に対する作用の解析 日本薬学会第 126 年会要旨集 3 P116 (2006)	57
10. 黒木伸吾、山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 無麻酔脳梗塞モデルラットの排尿障害に対する各種抗うつ薬の作用—クロペラスチンの作用との比較— 日本排尿機能学会誌 16 巻 1 号 P151 (2005)	58
11. 松本健吾、白崎哲哉、副田二三夫、山本 巖、高濱和夫 ラット中脳水道中心灰白質(PAG)における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴 日本排尿機能学会誌 16 巻 1 号 P114 (2005)	59
12. 松本健吾 ラット中脳水道中心灰白質(PAG)における排尿反射関連ニューロンの分布と特徴 熊本大学修士論文 (2006)	60
13. 塩塚道崇 脳単一 GIRK チャネル活性化電流に対するクロペラスチンの作用に関する研究 熊本大学修士論文 (2006)	84

14. S. Honda, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama

Inhibition of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons

Pharmacol. Res. (in preparation)

..... 101

# I. 総括研究報告

脳神経疾患に随伴する過活動膀胱の新規治療薬の開発に関する研究：  
既存薬品に新たに発見された作用を基にして

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：我々はこれまでに、既存の非麻薬性中枢性鎮咳薬であり G 蛋白質共役型内向き整流性  $K^+$  (GIRK) チャネル阻害作用が強いクロペラスチンが、脳梗塞後の排尿困難と過活動膀胱とともに顕著に改善することを見出した。本研究では、1) 中枢性鎮咳薬クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害治療薬としての有用性と排尿障害改善作用メカニズムの解明、2) 排尿中枢とされている中脳水道中心灰白質 (PAG) のニューロン活動と排尿反射各パラメーターとの関りの解明、および3) 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録できる新規排尿活動記録システムの開発を目的に研究を実施した。その結果以下に示す成果を得た。

1. 脳梗塞後排尿障害に対する選択的 5-HT 再取り込み阻害薬などの作用の検討から、GIRK チャネル阻害作用をもつクロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用が他の薬物に比べて優れていることがさらに強く示唆された。5-HT 枯渇薬の PCPA および 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストの 8-OH-DPAT の作用の検討から、尿道抵抗上昇に対するクロペラスチンの改善作用に 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関与する可能性が示唆された。さらに、排尿回数が少ない加齢マウスでは成熟マウスに比べ脳内の GIRK1、GIRK2、および GIRK3 チャネル mRNA レベルが有意に高いことも示された。
2. 昨年に引き続き、中脳水道中心灰白質(PAG)において微小電極法により排尿反射関連単一神経活動を *in vivo* で記録し、PAG において6種類の排尿反射関連ニューロンが存在すること、それらのニューロンの詳細な分布および薬物感受性をはじめて明らかにした。大部分のニューロンでは、グルタミン酸やグリシンにより活動電位の発火を変化させても排尿反射は影響されなかった。
3. 昨年開発した「無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録できるシステム」の精度を向上させ、排尿活動の明暗サイクル、加齢に伴う排尿活動の変化、ならびにエストロゲン受容体  $\alpha$  サブタイプ (ER $\alpha$ ) のノックアウトが排尿活動に与える影響を検討した。その結果、排尿回数は暗期（活動期）に多いが、1回排尿量に明暗サイクルはないこと、加齢雄マウスと ER $\alpha$  KO 雄マウスでは対照群と比べて暗期の排尿回数が少ないこと、一方、ER $\alpha$  KO 雌マウスでは野生型に比べ1回排尿量が多く、性差が見られることが示された。
4. クロペラスチンは、GIRK チャネルの細胞内ドメインに作用し、PIP<sub>2</sub>との相互作用を阻害することで GIRK チャネルの開時間を短縮することが示唆された。また、クロペラスチンは膜電位依存性 Na<sup>+</sup>電流、遅延整流性 K<sup>+</sup>電流および A 型 K<sup>+</sup>電流を抑制するが、その作用は弱いことが明らかとなった。さらに、クロペラスチンはラセミ体であるため、より選択的で強力な GIRK チャネルブロッカーと排尿障害治療薬の開発を念頭に、光学活性体である d-体と l-体に分離し、それぞれ 500-700mg を得た。

以上、脳梗塞後排尿障害に対するクロペラスチンの有用性とその障害改善メカニズムの解明をはじめ、排尿反射とその変化・異常のメカニズムの解明と新規排尿障害治療薬開発のための新たな手法の確立など、今後の展開に必要で重要な基礎知見を得ることができた。

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  
大川原正・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

排尿障害はアルツハイマー病や骨粗鬆症とともに、WHO が21世紀に克服すべき三大疾患の一つとして掲げており、その治療法の開発はわが国だけでなく世界レベルで強く望まれている。わが国においても、脳疾患や老化に伴う排尿障害の患者数は数百万人以上に昇ると言われている。排尿障害の問題は、患者本人の QOL や介護者の生活環境の改善

#### A. 研究目的

はもちろんのこと、脳梗塞などの中枢神経疾患のリハビリテーションの効果や病後の回復に大きな影響を与えることが明らかになって、排尿のコントロールがきわめて重要であることが認識され始めている。脳梗塞やアルツハイマー病などの脳神経疾患に基づく排尿障害の中枢内情報伝達機序はおろか、健常時の排尿反射とその調節機序さえ十分開明されていない。このような状況の中で、我々は、驚くべきことに、臨床で広く用いられている中枢性鎮咳薬が、脳梗塞モデル動物における頻尿や排尿困難を薬用量で著明に改善することを見出した【特許出願 特願 2004-059996】。排尿反射は哺乳動物の基礎的な生体反射であるため、中枢性鎮咳薬がヒトの脳梗塞など脳疾患に伴う排尿障害を改善する可能性はきわめて高い。そこで、この薬物の排尿障害改善作用の有用性とそのメカニズムの検討を通して、新規排尿障害治療薬開発のための基礎知見を蓄積し、その開発戦略を構築することを最終目的とした。具体的には、1) 中枢性鎮咳薬クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害治療薬としての有用性と排尿障害改善作用メカニズムの解明、2) 排尿中枢・中脳水道中心灰白質(PAG)のニューロン活動と排尿反射各パラメーターとの関りの解明、および 3) 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録できる新規排尿活動記録システムの開発を目的に研究を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 脳梗塞ラットの排尿障害に対する各種薬物の作用 (高濱担当)

体重 220~280g の SD 系雄性ラットを用い、すでに報告した方法に従い、慢性膀胱瘻を作製した。手術侵襲からの回復を待ち、ボールマンケージに固定後、無麻酔下に正常時のシングルシストメトログラムを記録した。その後、左中大脳動脈閉塞による脳梗塞を作製し、上記と同様にシングルシストメトログラムを記録して、各薬物の作用を調べた。実験終了後、TTC 染色を行い、脳拘束容積を算出した。

### 2. 加齢マウスおよび $ER\alpha$ KO マウスにおける GIRK チャネルおよび $5-HT_{1A}$ 受容体 mRNA レベルの解析 (副田担当)

5 週齢および 54 週齢の ddY 系マウス、ならびに  $ER$

$\alpha$  KO マウスとその野生型マウスを用いた。実体顕微鏡下に上記マウスから脳を摘出し、海馬または PAG を切り出した。これを液体窒素で凍結した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。AGPC 法により RNA を抽出し、GIRK1、2、3 および  $5-HT_{1A}$  受容体に特異的なプライマーと Takara の RNA PCR Kit などを用いて RT-PCR をおこなった。PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、電気泳動ゲル撮影システムにてデジタル撮影したバンドを Scion Image で解析した。

### 3. PAG における排尿反射関連単一神経活動の記録とマイクロイオントフォレシス法による薬物作用の解析 (白崎担当)

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、連続シストメトログラムを記録した。同時に、頭蓋に小穴を開け、3次元マイクロマニピュレーターにより PAG に微小ガラス電極を刺入して、単一ニューロン活動を記録した。記録後、ポンタミンスカイブルーにて記録位置を確認した。

微小ガラス電極と 7 連マイクロマルチバレルを貼り合わせ、各バレルに充填した 1.0M グルタミン酸、0.89M グリシン、0.003M ストリキニーネまたは生理食塩水を活動電位記録中のニューロン周囲に電気泳動的に微量投与した。

### 4. 無麻酔、無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステムの開発 (高濱担当)

読み取り精度 0.001g の電子天秤上に代謝ケージを設置し、アクリル製の風防で装置全体を覆った。代謝ケージと受け皿の間は、尻尾が受け皿に接触してエラーを生じる可能性を防ぐため、5cm の間隔をあけた。マルチインターフェイスを介して、同様の装置 5 台をパソコンに並列接続した。各天秤の計測値は経時的に自動で取得した。

データ取得・処理ソフトは、Microsoft Excel 上で起動するように特別にプログラムした。尿量の変化は、計測値の経時変化の傾きを基に、糞や餌くずの落下と区別した。これにより尿量変化のみを抽出し、排尿を開始した時間、尿重量の変化のキネティクス、1 回排尿量、および単位時間当たりの排尿回数を記録した。

測定は、8~20 時を明期、20~翌日 8 時を暗期とする 24 時間明暗サイクルで行った。

## 5. クロペラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムおよび GIRK チャンネルに対する選択性の解明 (白崎担当)

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットから酵素処理と機械的処理により背側縫線核ニューロンを急性単離した。これに、ニスタチン穿孔パッチクランプ法、ホールセルパッチクランプ法、または outside-out パッチクランプ法を適用し、膜電位固定下に膜電流を記録した。薬液は Y-チューブ法により急速交換した。

## 6. 光学活性クロペラスチンの合成 (大川原担当)

4-chlorobenzhydryl を原料にそのエステル酸キニール塩を合成し、アセトン溶液中で d-体と l-体を分離した後、d-クロペラスチンと l-クロペラスチンを合成した。

### (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. 脳梗塞ラットの排尿障害に対する抗うつ薬の作用 (高濱担当)

選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルボキサミンは、左中大脳動脈の閉塞による排尿潜時、排尿閾値圧、最大膀胱内圧、排尿時間、排尿量、排尿後残尿、膀胱容量、尿流率、尿道抵抗および膀胱コンプライアンスの変化に有意な影響を与えなかった。しかし、GIRK チャンネル抑制作用も併せ持つフルオキサセチンは、排尿潜時の短縮と膀胱容量および膀胱コンプライアンスの低下を有意に改善した。5-HT 枯渴薬である PCPA の処置は、クロペラスチンによる脳梗塞後排尿障害改善作用を消失させた。5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストの 8-OH-DPAT は、尿道抵抗の上昇を有意に改善した。各薬物は、左中大脳動脈閉塞による脳梗塞領域の容積に影響を与えなかった。

### 2. 加齢マウスおよび ER $\alpha$ KO マウスにおける GIRK チャンネルおよび 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA レベルの解析 (副田担当)

成熟マウスに比べ加齢マウスの海馬における GIRK1 mRNA の発現レベルは 1.23 倍 (p=0.007)、GIRK2 は 1.26 倍 (p=0.007)、GIRK3 は 1.40 倍

(p=0.003)、5-HT<sub>1A</sub> 受容体は 1.33 倍 (p=0.005) といずれも有意に高値を示した。

一方、ER $\alpha$  KO マウスの PAG において、GIRK1 mRNA の発現レベルは、野生型に比べ 1.10 倍 (p=0.124)、GIRK2 は 1.17 倍 (p=0.070)、GIRK3 は 1.18 倍 (p=0.169)、5-HT<sub>1A</sub> 受容体は 1.33 倍 (p=0.076) であった。いずれも有意な差は認められなかった。しかし、GIRK2 と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体については増加傾向が見られた。

### 3. PAG における排尿反射関連単一神経活動の記録とマイクロイオントフォレンシス法による薬物作用の解析 (白崎担当)

排尿期に活動電位の発火が増加する Type I、減少する Type II、蓄尿期に排尿反射に先行して発火が増加する Type III および排尿反射と明確な関係が見られない Type IV の 4 種類の神経活動が記録され、約 21 % が排尿反射関連ニューロンであった。Type I、II および III の各ニューロンは約 11:3:1 の割合で確認された。Type I についてはさらに、排尿期に発火が漸増する Type Ia、漸減する Type Ib と持続して発火する Type Ic に細分された。

相互相関解析の結果、Type Ia、Ib および II ニューロンでは、発火の増加が膀胱内圧の上昇より約 1~5 秒先行し、Type III では約 50 秒先行することがわかった。さらに、Type Ic においては、約 3 秒先行する場合と逆に約 3 秒遅れる場合があった。

Type I は Bregma から尾側に 7640~8800 $\mu$ m の領域の外側および腹外側 PAG に、Type II は同領域の外側 PAG および背外側 PAG と四丘体に、Type III は Bregma から尾側に 8720 $\mu$ m 付近の外側 PAG に多く分布した。

Type I、Type II および Type IV ニューロンにおいてグルタミン酸は、発火頻度を増加させた。グリシンは Type I ~ IV のいずれのニューロンに対しても、発火頻度を抑制した。また、Type I、Type II および Type IV ニューロンにおいてストリキニーネは発火頻度を増加させた。これらの変化を起こした大部分のニューロンにおいて、グルタミン酸等による発火の変化は、排尿反射に影響しなかった。

### 4. 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステムの開発 (高濱担当)

ddY 系雄性マウス (23-26g) を用いて暗期 (活

動期)と明期(休眠期)の排尿活動を比較検討したところ、1回排尿量と1回排尿時間に差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数と総排尿量は明期に比べて有意に多かった。

ER $\alpha$  KO 雄マウスでは、野生型雄マウスと比べて1回排尿量に有意な差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数はKOマウスで有意に少なかった。一方雌では、1回排尿量が明期、暗期ともにER $\alpha$  KOマウスで有意に多かった。

C57BL/6j系雄マウスを用い、14週齢と12ヶ月齢の排尿活動を比較したところ、1回排尿量に有意な差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数と排尿量は12ヶ月齢マウスで有意に少なかった。

### 5. クロペラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムおよび GIRK チャンネルに対する選択性の解明 (白崎担当)

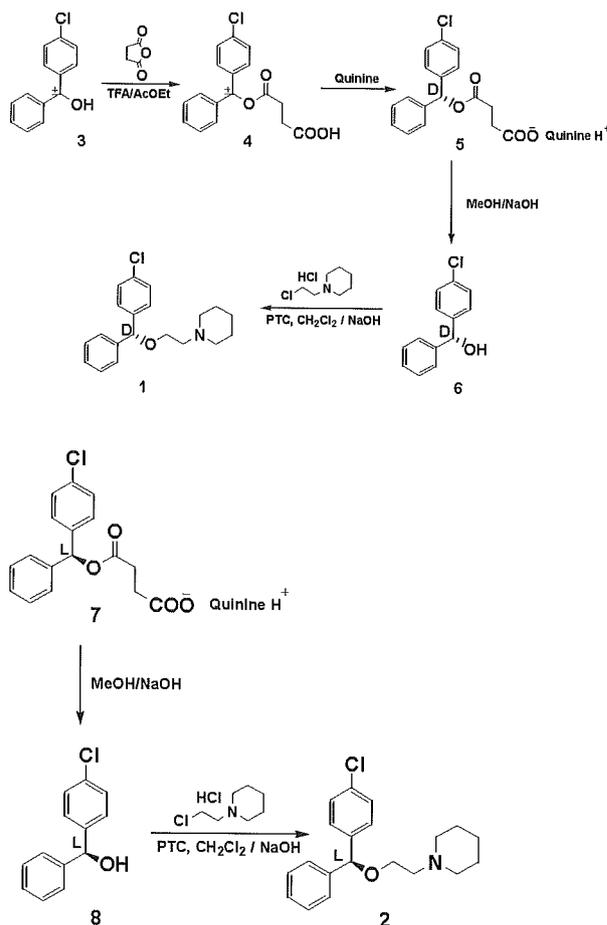
ラット急性単離縫線核ニューロンにおいて、クロペラスチンの5-HT誘発GIRKチャンネル活性化電流抑制作用は、細胞外液のpHに依存し、クロペラスチンのpKaに近いpH 9.0において、最も強い抑制を示した。細胞内から作用させたクロペラスチンもGIRKチャンネル活性化電流を抑制した。さらに、50  $\mu$ M PIP<sub>2</sub>の細胞内投与により、クロペラスチンのGIRKチャンネル活性化電流抑制作用は減弱した。

クロペラスチンを含む中枢性鎮咳薬の分配係数とGIRKチャンネル活性化電流に対するIC<sub>50</sub>は、相関係数0.89で良い負の相関性を示した。

またシングルチャンネル解析から、クロペラスチンは22.7 pSのGIRKチャンネルの平均開時間を短縮させることが分った。また、細胞内側からクロペラスチンを作用させても、GIRKチャンネルの開確率が抑制された。

### 6. 光学活性クロペラスチンの合成 (大川原担当)

ラセミ4-chlorobenzhydrol (3)をエステル酸(4)とし、そのキニーネ塩の一方は析出し、他は溶解することより、(6)と(8)に分割し、*l*-および*d*-cloperastine (1, 2)に導いた。



## D. 考察

### 1). クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害治療薬としての有用性と排尿障害改善作用メカニズムの解明

本研究において、選択的5-HT取り込み阻害薬(SSRI)であるフルボキサミンは、脳梗塞後の排尿障害を改善しなかった。しかし、GIRKチャンネル抑制作用も併せ持つフルオキサセチンは、排尿潜時の短縮と膀胱容量および膀胱コンプライアンスの低下を改善したことから、「GIRKのチャンネル抑制が、脳梗塞に伴う排尿障害の改善に有用である」との我々の仮説が支持された。

ところで、5-HT枯渇作用をもつPCPAは、脳梗塞後排尿障害のクロペラスチンによる改善を阻害した。また、8-OH-DPATが脳梗塞後の尿道抵抗上昇を改善した。よって、少なくとも脳梗塞後の尿道抵抗上昇に対するクロペラスチンの改善作用に5-HTの遊離とそれに続く5-HT<sub>1A</sub>受容体の活性化がかかわる可能性が示唆される。フルボキサミンの用量が脳内5-HTレベルの増加に十分であることは、文献から確認している。よって、フル

ボキサミンの中枢内分布に偏りがある可能性が考えられる。

また、クロペラスチンの作用が PCPA の前処置により完全に阻害されたことは、重要な知見と言える。PCPA は 5-HT のみならずノルアドレナリンなども枯渇させる。よって、クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用に PCPA 感受性の複数の神経伝達物質の遊離が関与する可能性が考えられる。今後、本知見をもとにさらに的を絞った検討が必要であろう。

昨年度の結果ともあわせて考えると、本研究成績は GIRK チャネル阻害作用の強いクロペラスチンが脳梗塞後排尿障害の改善に有用であることを改めて示すものといえる。本年度、d-体とl-体のクロペラスチンを分離・合成することができた。しかし、どちらの光学活性体が排尿障害の改善や GIRK チャネルの抑制により有効であるか検討できなかった。今後、光学活性体の作用を検討することで、排尿異常の改善における GIRK チャネルの役割と、より選択的で強力な GIRK チャネル抑制剤の開発への手がかりが得られると期待される。

また、昨年度に引き続き、GIRK チャネルおよび 5-HT<sub>1A</sub> 受容体 mRNA 発現量と排尿障害との関連も検討した。その結果、排尿回数が減少している加齢マウスにおいて海馬の GIRK チャネル mRNA の発現が増加していることが明らかとなった。この結果は、脳梗塞により PAG で GIRK2 mRNA の発現レベルが有意に増加するとの昨年との結果とも共通する結果と思われる。しかし、排尿反射に海馬がどのようにかわるかは、全く不明であり、今後排尿反射関連核での変動を検討する必要がある。3) にも述べるが ER $\alpha$  KO マウスにおいても排尿回数が減少した。この ER $\alpha$  KO マウスでは、PAG において GIRK2 と 5HT<sub>1A</sub> 受容体の mRNA レベルが増加する傾向を示している。有意差が見られていないことから、さらに例数を追加して検討を重ねる必要がある。

## 2) 排尿中枢・中脳水道中心灰白質 (PAG) のニューロン活動と排尿反射各パラメーターとの関りの解明

本研究により、bregma から尾側に 7040 ~ 9160  $\mu$ m の PAG とその周囲に 6 種類の排尿反射関連ニューロンが存在すること、これらのニューロンの分布、ならびに存在比がはじめて明らかになった。こ

の結果は、古典的橋排尿中枢であるバリントン氏核や橋蓄尿中枢とは全く異なっていた。このことは、PAG が排尿反射の調節に重要な役割を果たしていることを示唆する。

また、我々は先に PAG へのグリシンの微量投与が排尿反射を促進することを見出した。しかし今回のマイクロイオンフォoresis法による検討では、グリシンは排尿反射関連ニューロンを抑制し、ストリキニーネは排尿反射関連ニューロンを強く興奮させた。よって、PAG の排尿反射関連ニューロンにおいて、グリシンが抑制性伝達物質として働いていることが示唆された。先のグリシンによる排尿反射の促進もストリキニーネ感受性であるが、メカニズムについてはさらに検討が必要である。

本研究はまた、大部分の場合、単一の排尿反射関連ニューロンの活動が変化しても排尿反射は影響を受けず、安全性が確保されていることを示唆した。このことは、排尿反射が生命維持にとって重要な反射であることを考えると妥当な結果と言える。今後クロペラスチンの排尿異常改善作用メカニズムの解明には、クロペラスチン、テルチアピンや 8-OH-DPAT などを圧注入法により PAG 内に微量投与し、その作用を検討する必要がある。

本研究は、PAG における排尿反射関連ニューロンの存在とその特性、分布および薬物感受性の詳細をはじめて明らかにし、排尿反射の中核メカニズム解明や中枢性排尿障害治療薬開発の上で貴重な基礎知見を提供したと言える。

## 3) 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録できるシステムの開発

本研究ではまた、昨年度に構築した「無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステム」の精度向上に努め、尿量の少ないマウスでも排尿を精度良く自動計測できるように完成度を高めることができた。本研究から、加齢に伴う排尿活動の変化や、ER $\alpha$  の排尿機能への関わり的一端が明らかにでき、排尿障害の病態解明や排尿障害治療薬の開発に本システムが有用であることを示した。ただし、今回示された結果の意味を明確にするためにはさらなる検討が必要である。

昨年作成に成功した脳梗塞マウスを用いて、脳梗塞が明期および暗期の排尿活動に与える影響

を1週間連続して解析する研究もスタートさせた。目的に適合する梗塞条件などがそろいつつある段階であり、今後脳梗塞に伴う排尿障害が明暗サイクルの中でどのように現れるか、その障害が脳梗塞後どのような時間経過をたどるのか、またこれに対してクロペラスチンがどのように改善するのかなどが解明でき、これまでになかった新たな視点で研究を展開できると期待している。

以上、本研究は中枢神経疾患や加齢に伴う排尿障害の病態解明とそれに対する治療薬の開発における重要な基礎知見を提供するものといえる。

## E. 結論

本研究は、GIRK チャンネル抑制作用をもつクロペラスチンが脳梗塞後排尿障害の治療薬として有用であることを改めて示唆した。また、クロペラスチンの排尿障害改善作用メカニズムに中枢内セロトニン神経と 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関わる可能性が示唆された。GIRK チャンネルノックアウトマウスを用いた検討の準備も進めており、今後メカニズムが解明できると確信している。

また、クロペラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムも PIP<sub>2</sub> による活性化の阻害である可能性が示され、今後、的を絞った作用点の解明ができると期待される。また、本年度合成した光学活性体を用いて、GIRK チャンネルの抑制に必要な化学構造の推定や、これに基づく新規 GIRK チャンネルブロッカーの設計も可能になると期待される。

さらに、排尿反射中枢としての PAG の機能の一端を解明した。無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録できる新規排尿活動記録システムを考案、開発した。このような研究方法によって新たな視点で排尿障害の病態とそれに対する治療薬の開発研究が可能となり、本研究は、今後の研究の発展にとって重要な成果を与えたと言える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Soeda F, Honda A, Shirasaki T, Yamamoto G and Takahama K, Expression of Fos-like protein in

the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it. 日本排尿機能学会誌 17 巻 2 号 (印刷中)

Matsumoto K, Shirasaki T, Yamamoto G, Soeda F, Takahama K. Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 100(Suppl. 1), 251P (2006).

Shiozuka M, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K<sup>+</sup> channel currents. *Journal of Pharmacological Sciences* 100(Suppl. 1), 139P (2006).

Hashitani K, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons. *Journal of Pharmacological Sciences* 100(Suppl. 1), 137P (2006).

Honda S, Shirasaki T, Soeda F and Takahama K. Inhibition of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons, *Pharmacol. Res.* (in preparation)

### 2. 学会発表

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats. 35<sup>th</sup> Annual meeting society for neuroscience.

松本健吾、白崎哲哉、山本 巖、副田二三夫、高濱和夫. 麻酔下におけるラット中脳水道中心灰白質(PAG)の排尿反射関連単一神経活動の特徴と分布. 第79回日本薬理学会年会

塩塚道隆、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. 5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト 8-OH-DPAT 誘発シングル K<sup>+</sup>チャンネル電流に対するクロペラスチンの効果. 第79回日本薬理学会年会

橋谷華世、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫。  
ドネペジル及びクロペラスチンの GIRK チャネル  
活性化電流に対する作用の比較. 第 79 回  
日本薬理学会年会

山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、  
高濱和夫. GIRK チャネルは新規排尿障害治  
療薬の標的になりえるか? 日本薬学会 第  
125 年会

本田宗吉、白崎哲哉、塩塚道隆、副田二三夫、  
高濱和夫. GIRK 電流抑制作用を有するク  
ロペラスチンの膜電流に対する作用の解析.  
日本薬学会 第 125 年会

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. フ  
リームービング動物の昼夜連続排尿測定シ  
ステムの開発とその評価. 第 58 回日本薬理  
学会西南部会

松本健吾、白崎哲哉、山本巖、副田二三夫、  
高濱和夫. ラット中脳水道中心灰白質  
(PAG) における排尿反射関連ニューロン  
の分布と特徴 第 12 回日本排尿機能学会

黒木伸吾、山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、  
高濱和夫. 無麻酔脳梗塞モデルラットの排  
尿障害に対する各種抗うつ薬の作用 第 12  
回日本排尿機能学会

山本巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、  
高濱和夫. GIRK チャネルと排尿障害治療薬  
生体機能と創薬シンポジウム 2005

### 3. その他

松本 健吾. ラット中脳水道中心灰白質  
(PAG) における排尿反射関連ニューロンの  
分布と特徴. 熊本大学修士論文 (2006)

塩塚 道崇. 脳単一 GIRK チャネル活性化電流  
に対するクロペラスチンの作用に関する研究.  
熊本大学修士論文 (2006)

## 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

脳梗塞ならびに加齢に伴う排尿障害の治療薬開発に関する基礎研究

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2項目について研究を実施した。

1. 昨年に続き、クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用にセロトニン (5-HT) やノルアドレナリンが関与するか検討した。選択的 5-HT 再取込阻害薬のフルボキサミンは、脳梗塞後の排尿障害を改善しなかった。しかし、5-HT 再取込阻害作用に加え、G 蛋白質共役型内向き整流性 K<sup>+</sup>(GIRK)チャネル抑制作用をもつフルオキセチンは、排尿潜時の短縮、膀胱容量の低下、最大膀胱内圧の増加を改善し、尿道抵抗の増加も改善する傾向を示した。5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである 8-OH-DPAT は、脳梗塞 24 時間後の尿道抵抗上昇を改善した。また、5-HT 枯渇薬である PCPA の前処置により、クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用が完全に消失した。以上、GIRK チャネル阻害作用が強いクロペラスチンの脳梗塞に伴う排尿障害に対する改善作用が他の薬物に比べて優れていることがさらに強く示唆された。脳梗塞後の尿道抵抗上昇に対するクロペラスチンの改善作用には、5-HT<sub>1A</sub> 受容体が関与する可能性が示唆された。

2. 排尿反射は高次中枢からの影響を受けやすく、これまでの計測法ではストレスの影響が避けられない。また、従来用いられている膀胱内圧測定法は自然な排尿反射を測定しているとは言い難い。このため自然な排尿活動や夜間頻尿に対する薬物の作用の検討も必要である。よって、昨年度、「無麻酔・無拘束下に排尿活動を数日間連続して自動計測できるシステム」を構築した。本年はこのシステムの精度を高めると共に、排尿活動の明暗リズムを明らかにした。さらに、更年期障害に伴う排尿障害を念頭に、このシステムを用いて加齢に伴う排尿活動の変化、ならびにエストロゲン受容体  $\alpha$  サブタイプ (ER $\alpha$ ) のノックアウトが排尿活動に与える影響を検討した。その結果、1 回排尿量に明暗サイクルはないが、暗期（活動期）に排尿回数が多いことが示された。また、加齢雄マウスと ER $\alpha$ KO 雄マウスでは、対照群に比べて暗期の排尿回数が少ないが、1 回排尿量は変わらなかった。一方、ER $\alpha$ KO 雌マウスでは野生型に比べて 1 回排尿量が増加し、性差がある可能性も示唆された。

#### A. 研究目的

我々は、これまでに、中枢性鎮咳薬のクロペラスチンが脳梗塞に伴う過活動膀胱と排尿困難の両方を顕著に改善することを見出した。加えて、クロペラスチンは G 蛋白質共役型の内向き整流性 K<sup>+</sup> (GIRK) チャネル活性化電流を抑制するが、グリシンや NMDA 受容体に対する作用がないことも見出した。これらのことから、脳梗塞後排尿障害に対するクロペラスチンの改善作用に GIRK チャネルの抑制が寄与している可能性が考えられる。この GIRK チャネルは、5-HT<sub>1A</sub>、D<sub>2</sub> ドパミンや GABA<sub>B</sub> 受容体など種々の G<sub>i</sub> 蛋白質共役型受容体と共役する。最近、非麻薬性鎮痛薬で 5-HT 再取り込み阻害作用を有するトラマドールが過活動膀胱を改善するとの報告がなされた。一方、選択的ノルアドレナリ

ン取り込み阻害薬のデュロキセチンは、膀胱内酢酸注入により減少したネコの膀胱容量を増加すると報告されている。鎮咳薬もまた 5-HT レベルを増加させることが報告されている。この 5-HT レベルの増加に GIRK チャネルの抑制が関与する可能性は十分考えられる。このようなことから昨年度は、5-HT およびノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有するアミトリプチンと、マプロチリンの脳梗塞後排尿障害に対する作用を検討した。しかし、5-HT とノルアドレナリンの変動に基づくと考えられる排尿障害改善作用は認められなかった。そこで本研究ではさらに、選択的 5-HT 再取込阻害薬のフルボキサミン、5-HT 再取込阻害作用があり、かつ弱い GIRK チャネル抑制作用をもつフルオキセチン、5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである

8-OH-DPAT、および 5-HT 枯渇薬である PCPA の作用を検討することで、クロペラスチンによる脳梗塞後排尿障害の改善作用に中枢内 5-HT およびノルアドレナリンレベルの変動が関与するか検討した。

また、これまでの排尿反射測定法は、膀胱内にカテーテルを留置し、膀胱内に生理食塩水を注入して測定する。しかし、正常よりも速い速度で膀胱内に生理食塩水を注入するシストメトリー法や、尿道を結紮して当容量性に排尿反射を測定する方法は、決して自然な排尿反射を測定しているとは言えない。そこで第二に、無麻酔・無拘束下で自然に起こる排尿活動を昼夜連続して自動計測するシステムを昨年構築した。本年度は、本システムを用いて排尿活動の明暗サイクルを検討した。また、本年度の検討から、C57BL/6j マウスや脳梗塞マウスなど尿量の少ないマウスでは、排尿反射記録の精度が不十分な場合もあることが判明した。そこで、尿量の少ないマウスや病態時に尿量が減少しても正確に記録できるよう本システムの精度向上を目指した。その上で、排尿反射の加齢に伴う変化および ER $\alpha$  ノックアウトの排尿反射への影響を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 脳梗塞ラットの排尿障害に対する抗うつ薬等の作用

体重 220~280g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。すでに報告した方法に従い、ペントバルビタール (45 mg/kg, i.p.) 麻酔下に、ポリエチレンチューブ (PE-50, Becton Dickinson, USA) を用いて慢性的膀胱瘻を作製した。手術侵襲からの回復をまって、ボールマンケージに固定し無麻酔下に正常時のシングルシストメトログラムを測定した。次いで、Koizumi の方法に準じて左中大脳動脈閉塞による脳梗塞を作製した。この脳梗塞モデルラットを用いて、上記と同様にシングルシストメトログラムを測定し、記録が安定したところで各薬物の作用を調べた。PCPA を除く薬物は生理食塩水に溶解し、頸静脈より静脈内投与した。PCPA は 0.5%メチルセルロース生理食塩水に懸濁させ、脳梗塞の 24 時間前に背部皮下投与した。すべての実験終了後、TTC 染色を行い、脳梗塞領域の容積を算出した。

### 2. 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステムの開発とその応用

読み取り精度 0.001g の電子天秤上にマウス用の代謝ケージを設置し、アクリル製の風防で装置全体を覆った。代謝ケージと受け皿の間は、尻尾が受け皿に接触してエラーを生じる可能性を防ぐため、5cm の間隔をあけた。マルチインターフェイスを介して、同様の装置 5 台をパソコンに並列接続した。各天秤の計測値は経時的に自動で取得した。

データ取得・処理ソフトは、Microsoft Excel 上で起動するように特別にプログラムしたが、記録開始を決定するパラメーターは排尿量の少ない野生型 ER $\alpha$  KO マウス用に最適化し、排尿を開始した時間、尿重量の変化のキネティクス、1 回排尿量、および単位時間当たりの排尿回数を記録した。

測定は、8~20 時を明期、20~翌日 8 時を暗期とする 24 時間明暗サイクルで行った。

## C. 研究結果

### 1. 脳梗塞ラットの排尿障害に対する抗うつ薬等の作用

選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) であるフルボキサミンは、左中大脳動脈の閉塞による排尿潜時、排尿閾値圧、最大膀胱内圧、排尿時間、排尿量、排尿後残尿、膀胱容量、尿流率、尿道抵抗および膀胱コンプライアンスの変化に有意な影響を与えなかった。

5-HT 再取り込み阻害作用と弱い GIRK チャネル抑制作用をもつフルオキセチンは、排尿潜時の短縮と膀胱容量および膀胱コンプライアンスの低下を有意に改善した。また、最大膀胱内圧と尿道抵抗の増加を改善する傾向を示した。

5-HT 枯渇作用を有するパラクロロフェニルアラニン (PCPA) の前投与は、左中大脳動脈の閉塞による排尿反射各パラメーターの変化に影響を与えなかった。しかし、左中大脳動脈閉塞 24 時間経過後に投与したクロペラスチンも、排尿反射の各パラメーターに対し有意な変化を示さなかった。すなわち、脳梗塞後の排尿障害を改善しなかった。

5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストの 8-OH-DPAT は、尿道抵抗の上昇を有意に改善し、排尿潜時の短縮、尿流率と膀胱容量の低下を改善する傾向を示した。しかし、脳梗塞による排尿閾値の低下は、さらに低下させた。

左中大脳動脈の閉塞 24 時間以降に脳冠状

切片を作製し、TTC 染色を行ったところ、側頭・頭頂葉、線条体、基底核、視床下核を含む広範囲な領域が梗塞されていた。各薬物は、脳梗塞領域の容積に影響を与えなかった。

## 2. 無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステムの開発とその応用

ddY 系雄性マウス (23・26g) を用いて暗期 (活動期) と明期 (休眠期) の排尿活動を比較検討したところ、1 回排尿量と 1 回排尿時間に差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数は明期に比べて有意に多く、これに伴い総排尿量も暗期で有意に多かった。4 時間ごとの平均排尿回数および排尿量は 14 時から 20 時の間に最低となり、20 時から翌日の 4 時に最高となることも分った。また、明期、暗期とも雌で 1 回排尿時間が有意に少なく、暗期で雄に比べて雌で一回排尿量が有意に少なかった。

さらに、尿量の少ない野生型 ER $\alpha$  KO マウスを用いて、目視で排尿活動の測定を繰り返し、記録開始トリガーとなるパラメーターの設定値を最適化した。その結果、尿量の少ないマウスでも排尿を糞や餌屑の落下から分離して自動的に計測できるようになった。

このシステムを用いて ER $\alpha$  KO 雄マウスと野生型雄マウスとを比べたところ、1 回排尿量に有意な差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数が KO マウスで有意に少なかった。一方雌では、明期、暗期とも ER $\alpha$  KO マウスで 1 回排尿量が有意に多かった。

C57BL/6j 系雄マウスを用い、14 週齢と 12 ヶ月齢の排尿活動を比較したところ、1 回排尿量に有意な差は見られなかった。しかし、暗期の排尿回数と排尿量は 12 ヶ月齢のマウスで有意に少なかった。

## D. 考察

本研究において、選択的 5-HT 取り込み阻害薬 (SSRI) であるフルボキサミンは、脳梗塞後の排尿障害を改善しなかった。しかし、GIRK チャネル抑制作用も併せ持つフルオキセチンは、排尿潜時の短縮と膀胱容量および膀胱コンプライアンスの低下を改善したことから、「GIRK チャネルの抑制が、脳梗塞に伴う排尿障害の改善に有用である」との我々の仮説が支持された。

ところで、5-HT 枯渇作用をもつ PCPA は、脳梗塞後排尿障害のクロペラスチンによる

改善を阻害した。また、8-OH-DPAT が脳梗塞後の尿道抵抗上昇を改善した。よって、少なくとも脳梗塞後の尿道抵抗上昇に対するクロペラスチンの改善作用に 5-HT の遊離とそれに続く 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化がかかわる可能性が示唆される。ではなぜフルボキサミンは改善作用を示さなかったのであろうか？フルボキサミンの用量が脳内 5-HT レベルの増加に十分であることは、文献から確認している。よって、フルボキサミンの中枢内分布に偏りがある可能性が考えられる。

また、クロペラスチンの作用が PCPA の前処置により完全に阻害されたことは、重要な知見を提供するものと言える。PCPA は 5-HT のみならずノルアドレナリンなども枯渇させる。よって、クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用に PCPA 感受性の複数の神経伝達物質の遊離が関与する可能性が考えられる。今後、本知見をもとにさらに的を絞った検討が必要であろう。

昨年度の結果ともあわせて考えると、本研究成績は GIRK チャネル阻害作用の強いクロペラスチンが脳梗塞後排尿障害の改善に有用であることを改めて示すものといえる。

本研究ではまた、昨年度に構築した「無麻酔・無拘束下で排尿活動を数日間連続して記録するシステム」の精度向上に努め、尿量の少ないマウスでも排尿を精度良く自動計測できるように完成度を高めることができた。本研究から、加齢に伴い活動期の排尿頻度が減少するが、1 回排尿量は変化しないこと、ER $\alpha$  が排尿機能にかかわることなどが示唆され、排尿障害の病態解明や排尿障害治療薬の開発に本システムが有用であることが示された。ただし、今回示された結果の意味を明確にするためにはさらなる検討が必要である。

結果には示していないが、昨年作成に成功した脳梗塞マウスを用いて、脳梗塞が明期および暗期の排尿活動に与える影響を 1 週間連続して解析する研究もスタートさせた。研究目的に適応する梗塞条件などがそろいつつある段階であり、今後脳梗塞に伴う排尿障害が明暗周期の中でどのように現れるか、その障害が脳梗塞後どのような時間経過をたどるのか、またこれに対してクロペラスチンがどのように改善するのかなどが解明でき、これまでになかった新たな視点で研究を展開できると期待している。

以上、本研究は中枢神経疾患や加齢に伴う排尿障害の病態解明とそれに対する治療薬の開発における重要な基礎知見を提供するものといえる。

## E. 結論

本研究の結果、以下の結論を得た。

- 1) GIRK チャネル阻害作用が強いクロペラスチンが脳梗塞後の排尿障害の改善に有用であることが改めて示された。また、クロペラスチンは、5-HT 神経からの 5-HT 遊離とそれに続く 5-HT<sub>1A</sub> 受容体の活性化を介して脳梗塞後の尿道抵抗上昇を改善する可能性が示唆された。
- 2) 無麻酔・無拘束で排尿活動を数日間連続して記録するシステムの改良を行い、尿量の少ないマウスでも排尿を精度よく自動的に記録できるようになった。
- 3) 上記自動記録システムにおいて、排尿活動の明暗サイクルが確認でき、薬物投与のタイミングなど、今後の研究に必要な基礎データが得られた。さらに、加齢や ER $\alpha$  ノックアウトによる排尿活動への影響を活動期と休眠期に分けて評価でき、排尿反射調節に性差がある可能性も示唆されるなど、有用な基礎知見となり、今後の展開が期待できる。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Soeda F, Honda A, Shirasaki T, Yamamoto G and Takahama K, Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it. 日本排尿機能学会誌 17 巻 2 号 (印刷中)

Matsumoto K, Shirasaki T, Yamamoto G, Soeda F, Takahama K. Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 251P (2006).

Shiozuka M, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K<sup>+</sup> channel currents. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 139P (2006).

Hashitani K, Shirasaki T, Soeda F, Takahama K. Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons. Journal of Pharmacological Sciences 100(Suppl. I), 137P (2006).

Honda S, Shirasaki T, Soeda F and Takahama K. Inhibition of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons, Pharmacol. Res. (in preparation)

### 2. 学会発表

Yamamoto G, Kuroki S, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Ameliorating effects of cloperastine on urinary disturbances caused by cerebral infarction in conscious rats. 35<sup>th</sup> Annual meeting society for neuroscience.

松本健吾、白崎哲哉、山本 巖、副田二三夫、高濱和夫. 麻酔下におけるラット中脳水道中心灰白質 (PAG) の排尿反射関連単一神経活動の特徴と分布. 第 79 回日本薬理学会年会

塩塚道隆、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニスト 8-OH-DPAT 誘発シングル K<sup>+</sup>チャネル電流に対するクロペラスチンの効果. 第 79 回日本薬理学会年会

橋谷華世、白崎哲哉、副田二三夫、高濱和夫. ドネペジル及びクロペラスチンの GIRK チャネル活性化電流に対する作用の比較. 第 79 回日本薬理学会年会

山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫. GIRK チャネルは新規排

尿障害治療薬の標的になりえるか？日  
本薬学会 第 125 年会

本田宗吉、白崎哲哉、塩塚道隆、副田二三夫、  
高濱和夫. GIRK 電流抑制作用を有す  
るクロペラスチンの膜電流に対する作  
用の解析. 日本薬学会 第 125 年会

山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和  
夫. フリームービング動物の昼夜連続排  
尿測定システムの開発とその評価. 第  
58 回日本薬理学会西南部会

松本健吾、白崎哲哉、山本 巖、副田二三  
夫、高濱和夫. ラット中脳水道中心灰  
白質 (PAG) における排尿反射関連ニ  
ューロンの分布と特徴 第 12 回日本  
排尿機能学会

黒木伸吾、山本 巖、副田二三夫、白崎哲  
哉、高濱和夫. 無麻酔脳梗塞モデルラッ  
トの排尿障害に対する各種抗うつ薬の  
作用 第 12 回日本排尿機能学会

山本 巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲  
哉、高濱和夫. GIRK チャネルと排尿障  
害治療薬 生体機能と創薬シンポジウ  
ム 2005

### 3. その他

松本健吾. ラット中脳水道中心灰白質  
(PAG) における排尿反射関連ニューロ  
ンの分布と特徴. 熊本大学修士論文  
(2006)

塩塚道崇. 脳単一 GIRK チャネル活性化電  
流に対するクロペラスチンの作用に関する  
研究. 熊本大学修士論文 (2006)

## 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における排尿反射関連ニューロンの電気生理学的・薬理学的特性と分布、ならびに *in vitro* におけるクロペラスチンの薬理学的特性に関する研究

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： 昨年に引き続き、上位排尿反射中枢として近年注目されつつある中脳水道中心灰白質 (PAG) において排尿反射関連単一神経放電を記録し、排尿反射関連ニューロンの分布を *in vivo* で明らかにした。その結果、bregma より -7300 ~ -8800  $\mu\text{m}$  の PAG において、排尿期に活動電位の発火が増加する Type I、減少する Type II、蓄尿期に排尿反射に先行して発火が増加する Type III および排尿反射と明確な関係が見られない Type IV の 4 種類の神経活動が記録された。Type I は、排尿期の発火パターンからさらに 3 種類に細分された。これらのニューロンは、PAG 内で異なる分布を示すことが明らかとなった。また、大部分のニューロンでは、グルタミン酸やグリシンにより活動電位の発火を変化させても排尿反射は影響されなかった。本研究から、PAG における排尿反射関連ニューロンの存在とその特性、分布および薬物感受性の詳細がはじめて明らかとなり、排尿反射の中枢メカニズム解明や中枢性排尿障害治療薬開発の上で貴重な基礎知見を提供した。

第 2 に、脳梗塞後の排尿障害を改善するクロペラスチンの GIRK チャネル活性化電流抑制作用メカニズムを検討した。クロペラスチンの作用は、 $\text{pK}_a$  に近い pH 9.0 において強く、細胞内投与したクロペラスチンも GIRK チャネル活性化電流を抑制した。さらに、細胞内  $\text{PIP}_2$  存在下に、クロペラスチンの GIRK チャネル活性化電流の抑制は減弱した。さらに、outside-out パッチクランプ法により単一 GIRK チャネル電流を記録し、これに対するクロペラスチンの作用を検討した。その結果、クロペラスチンは GIRK チャネルの開時間を短縮させることが明らかとなった。また、細胞内から投与したクロペラスチンは、単一 GIRK チャネル電流を強く抑制した。これらのことから、クロペラスチンが、GIRK チャネルの細胞内ドメインに作用し、 $\text{PIP}_2$  と GIRK チャネルの相互作用を阻害する可能性が示唆された。

第 3 に、クロペラスチンの GIRK チャネル選択性を明らかにするために、膜電位依存性  $\text{Na}^+$  電流、遅延整流性  $\text{K}^+$  電流、A 型  $\text{K}^+$  電流に対する作用を検討した。その結果、これらに対するクロペラスチンの作用は弱いことが明らかとなった。

## A. 研究目的

近年、PAG が上位の排尿中枢として注目されて来つつある。排尿反射が、神経の興奮を介して惹起されることは明白な事実である。にもかかわらず、*in vivo* において排尿反射関連ニューロンの活動を単一ニューロンレベルで検討した報告は少ない。PAG においても、PAG のどこに、どのような特性を持った排尿反射関連ニューロンがあり、排尿反射に伴いそのニューロンの興奮性がどのように変化するのか？ どのような生理活性物質や薬物に感受性を示すのか？ それらのニューロンが排尿反射においていかなる役割を担うのかなど基本的な事項さえほとんどわかっていないに等しい。このようなことから第 1 に、PAG における排尿反射関連ニューロンの生理学的・薬理学的特性を明らかにするために、以下のことを検討

した。1. PAG とその周囲において排尿反射と同期した単一神経放電を微小電極法により記録し、その電気生理学的特性と PAG 内分布を検討した。2. これまでに、単一ニューロンレベルで排尿反射関連ニューロンの活動性と化学物質に対する応答性との関連を検討した報告は皆無である。そこで、微小電極法とマイクロイオントフォレシス法を組み合わせ、*in vivo* の単一ニューロンレベルで PAG とその周囲のニューロンの生理活性物質および薬物に対する感受性を検討した。3. 神経伝達物質またはアンタゴニストの極微量注入による単一ニューロンの発火の変化が排尿反射に与える影響について検討した。

第 2 に、我々はクロペラスチンが脳梗塞後の過活動膀胱と排尿困難の両方を改善することを見出しているが、その改善作用に GIRK チャネルの抑制がか

かわることが示唆されている。そこで、より選択的で作用の強い GIRK チャネルブロッカーの開発を念頭に、クロペラスチンの GIRK 電流抑制作用のメカニズムについて調べた。

クロペラスチンは、グリシン受容体および NMDA 受容体活性化電流に対して作用を持たない。しかし、クロペラスチンが GIRK チャネルに選択的か否かは不明な点が多い。そこで第 3 に、クロペラスチンの GIRK チャネル選択性を明らかにする一環として、脳機能発現に不可欠な膜電位依存性  $\text{Na}^+$  電流、遅延整流性  $\text{K}^+$  電流および A 型  $\text{K}^+$  電流に対する作用を検討した。

## B. 研究方法

### 1. PAG における排尿反射関連単一神経活動の記録

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 四方の小穴を開け、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ブルーを電気泳動してその位置を確認した。

### 2. マイクロイオントフォレシス法

外径 1.2mm の硬質ガラス管を 7 本束ね、縦引きプレーにて 7 連マイクロマルチバレルを作製した。微小ガラス電極のショルダー部分を 45 度に曲げ、7 連マイクロマルチバレルの先端が、ガラス微小電極の先端より 20~30 $\mu\text{m}$  後方となるように 7 連マイクロマルチバレルと張り合わせた。各バレルには、1.0M のグルタミン酸、0.89M のグリシン、0.003M のストリキニーネまたは生理食塩水を充填し、活動電位記録中のニューロン周囲に定電流装置にて電気泳動的に微量投与した。

### 3. 背側縫線核の単離

生後 6-22 日齢の Wistar 系ラットを雌雄の別なく使用した。ペントバルビタールで麻酔後断頭し、背側縫線核を含む厚さ 400 $\mu\text{m}$  の脳薄切片を作成した。脳薄切片を酵素処理後、機械的処理により背側縫線核ニューロンを急性単離した。

### 4. パッチクランプ法

急性単離ニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法、ホールセルパッチクランプ法または outside-out パッチクランプ法を適用し、膜電位固定下にセロトニンまたは 8-OH-DPAT 誘発 GIRK 電流を記録した。薬液は Y-チューブ法により急速交換した。

### (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 における排尿反射関連単一神経活動と興奮性および抑制性アミノ酸感受性

Bregma から尾側に 7040 ~ 9160  $\mu\text{m}$  の PAG において、排尿期に活動電位の発火が増加する Type I (33 例)、減少する Type II (18 例)、蓄尿期に排尿反射に先行して発火が増加する Type III (6 例) および排尿反射と明確な関係が見られない Type IV (213 例) の 4 種類の神経活動が記録された。このことは、この領域で記録されたニューロンの約 21 % が排尿反射関連ニューロンであったことを示す。また、Type I、II および III の各ニューロンは約 11 : 3 : 1 の割合で確認された。Type I についてはさらに、排尿期に発火が漸増する Type Ia (14 例)、漸減する Type Ib (1 例) と持続して発火する Type Ic (18 例) の 3 種類に細分された。

相互相関解析の結果、Type Ia、Ib および II ニューロンでは、発火の増加が膀胱内圧の上昇より約 1~5 秒先行し、Type III では約 50 秒先行することがわかった。さらに、Type Ic においては、約 3 秒先行する場合と逆に約 3 秒遅れる場合があることもわかった。

Type I は Bregma から尾側に 7640~8800  $\mu\text{m}$  の領域の外側および腹外側 PAG に、Type II は同領域の外側 PAG および背外側 PAG と四丘体に、Type III は Bregma から尾側に 8720  $\mu\text{m}$  付近の外側 PAG に多く分布した。

Type I、Type II および Type IV ニューロンにおいてグルタミン酸は、発火頻度を増加させた。グリシンは Type I ~ IV のいずれのニューロンに対しても、発火頻度を抑制した。また、Type I、Type II および Type IV ニューロンにおいてストリキニーネは発火頻度を増加させた。これらの変化を起こした大部分のニューロンにおいて、グルタミン酸等による発火の変化は、排尿反射に影響しなかった。