

結 論

神経活動マーカーである Fos タンパクは、膀胱内に 0.1%酢酸溶液を持続注入すると、排尿反射に関与するといわれる橋のバリントン核、青斑核に発現が認められた。さらに排尿反射に対して抑制作用を示す DM により、その発現は有意に抑制された。このことから、Fos タンパクの脳内発現を指標として、排尿機能やそれに対する薬物の作用を評価することは可能であることが示唆された。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）により実施された。

参考文献

- 1) Barrington, F.J.F.: The relation of the hind-brain to micturition. *Brain*, 44:22-53, 1921
- 2) Barrington, F.J.F.: The effect of lesions of the hind-and mid-brain on micturition in cat. *Q.J.Exp.physiol.*, 15:81-102, 1925
- 3) Osumi, Y., Oishi, R., Fujiwara, H. and Takaori, S.: Hyperdipsia induced by bilateral destruction of the locus coeruleus in rats. *Brain Research*, 86:419-427, 1975
- 4) Satoh, K., Shimizu, N., Toyama, M. and Maeda, T.: Localization of the micturition reflex center at the dorsolateral tegmentum of the rat. *Neurosci. lett.*, 8:27-33, 1978
- 5) Holstege, G., Griffiths, D., de Wall, H. and Dalm, E.: Anatomical and physiological observations on supraspinal control of bladder and urethral sphincter muscles in the cat. *J Comp Neurol*, 250:449-461, 1986
- 6) Christian, G., Armand, L.B. and Laurent G.: Differential brainstem Fos-like immunoreactivity after laryngeal-induced coughing and its reduction by codeine. *J. Neurosci.*, 17(23):9340-9352, 1997
- 7) Takahama, K., Fukusima H., Isohama, Y., Kai H. and Miyata, T.: Inhibition of glycine currents by dextromethorphan in neurons dissociated from the guinea-pig nucleus tractus solitarii. *Br.J.pharmacol.*, 120:690-694, 1997
- 8) Fukusima, H., Takahama, K., Isohama, Y., Kai H. and Miyata, T.: Antitussives block N-methyl-D-aspartate (NMDA)- and glycine-induced currents in isolated nucleus tractus solitarii (NTS) neurons of guinea-pigs. *Jpn.J.Pharmacol.*, 67:313, 1995

- 9) Netaer,R., Pflimlin,P. and Trube,G.: Dextromethorphan blocks N-methyl-blocks N-methyl-D-aspartate-induced currents and voltage-operated inward currents in cultured cortical neurons. *Eur.J.pharmacol.*,238:209-216, 1993
- 10) Ishibashi,H., Kuwano,K. and Takahama,K.: Inhibition of the 5-HT(1A) receptor-mediated inwardly rectifying K(+) current by dextromethorphan in rat dorsal raphe neurons.: *Neuropharmacology*,39 (12):2302-2308, 2000
- 11) Maruyama,I., Okabe,Y., Shirasaki,T., Ishibashi,H. and Takahama,K.: Are glycine receptors involved in micturition reflex? : *Jpn. J. Pharmacol.*,85(Suppl.D):240P, 2001
- 12) Birder, LA. and DE Groat, WC.: Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat.: *J. Neurosci.*, 12(12): 4878-4889, 1992
- 13) Rizvi, TA., Murphy, AZ., Ennis, M., Aston-Jones, G. and Shipley, MT.: Fos expression in rat pontine tegmental neurons following activation of the medial preoptic area.: *Brain Res.*, 789:256-262, 1998

GIRKチャネルと排尿障害治療薬

山本巖、黒木伸吾、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫
(熊本大学大学院 薬学研究部 環境分子保健学)

G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel and therapeutic drugs
for urinary disturbance

Gen Yamamoto, Shingo Kuroki, Fumio Soeda, Tetsuya Shirasaki, Kazuo Takahama
(Dept. Environ. & Molec. Health Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ.)

Stroke frequently results in incontinence by reducing suprapontine micturition control. We have recently found that cloperastine (CP), a centrally acting antitussive, ameliorated overactive bladder and difficulty in urination in conscious rats after 24hr of cerebral infarction (CI). We have also found that centrally acting antitussives containing CP inhibit G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) current activated by 5-HT. In this study, we designed to establish the conscious mice model for studying the urinary disturbances at 24hr after CI, and we comparatively investigated effects of several types of antidepressants on urinary disturbances caused by CI in conscious rats. As antidepressants, amitriptyline (AMI), maprotiline (MP) and fluvoxamine (FLV) were used. A polyethylene catheter was chronically implanted into the bladder. Single-cystometrograms were stably recorded from conscious mice or rats sustained in a Ballman cage at 7 days after bladder catheter implantation. Then, CI was induced by occlusion of the left middle cerebral artery using a monofilament nylon thread. At 24hr after CI, effects of CP, AMI, MP and FLV on urinary disturbances caused by CI were determined. CI significantly reduced flow rate (Rf) and increased urethral resistance (Ru), compared to those in control mice. Administration of CP ameliorated both Rf and Ru in mice with CI. In CI model of rats, AMI ameliorated reduction in bladder capacity and micturition latency caused by CI, but further increased Ru. However, MP and FLV had little effect on these parameters. The results suggest that this mice model may be beneficial to study the urinary disturbances caused by CI, and that CP might be a seed of new drugs for treatment of urinary disturbances after CI.

Key words: cerebral infarction, urinary disturbance, centrally acting antitussive, GIRK channel

はじめに

WHO は、21 世紀に克服すべき 3 大疾患として、痴呆症、骨粗鬆症と共に排尿障害をあげている。わが国だけでも患者数が 2,000 万人を超えること、臨床的に優れた治療薬が未開発であること、排尿のコントロールが脳梗塞疾患などの予後のリハビリの成果を左右すること、患者およびその介護者の QOL に影響すること、などがその理由として考えられる。

高齢化により脳梗塞などの脳血管障害が増加しているが、その後遺症として過活動膀胱および排尿困難のどちらか一方、ある

いは両方が高頻度に発症している。その発症機序の一部に、NMDA、GABA、ドパミンなどの受容体の関与が示唆されている^{1,4)}。しかし、これらの受容体の活性に影響を与える薬物は、脳梗塞を伴う排尿障害に対して今のところ有効ではない。最近我々は、非麻薬性中枢性鎮咳薬であるクロペラスチン (CP) が、脳梗塞に伴う排尿障害を改善する作用を見出した。また、CP を含む中枢性鎮咳薬が、G タンパク質共役型内向き整流性 K⁺ (GIRK) チャネル電流を抑制するという知見も得ている⁵⁾。この GIRK チャネルは、種々の伝達物質受容体と共役

してシナプス後膜での抑制作用を仲介していることが知られている。また、排尿・蓄尿反射に関わる神経核や領域に広く分布しており⁶⁾、排尿反射への関与が認められている5-HT_{1A}やオピオイド、D₂、 α_2 受容体などと共役している⁷⁾。

本研究では、脳梗塞後の排尿障害にGIRKチャネルが関与しているか否か、また、CPの排尿障害改善作用がGIRKチャネルに対する作用を介したものであるのか否かを追及する一環として、以下の研究を実施した。第一に、脳梗塞モデルマウスを作製し、梗塞24時間後の排尿機能とこれに対するCPの影響について検討した。ところで、GIRKチャネル抑制作用をもつ薬物は、脳内の5-HTやノルアドレナリン(NA)のレベルを増加させることが報告されている⁸⁾。5-HTやNAの再取り込み阻害作用を有する三環系抗うつ薬のアミトリプチリン(AMI)は、臨床において夜尿症の治療薬としても使用されている。さらに、このAMIおよびNA再取り込み阻害作用が強い抗うつ薬マプロチリン(MAP)は、GIRK電流抑制作用を有している⁹⁾。そこで、第二に、この両者と、GIRK電流抑制作用をもたない選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるフルボキサミン(FLV)¹⁰⁾の三種類の抗うつ薬について、脳梗塞モデルラットにおける排尿障害に対する影響を検討した。

実験方法

膀胱瘻を作製したddY系およびC57BL/6j系雄性マウス(それぞれ28.6~29.3g, 20.2~21g)、あるいはSD系雄性ラット(250~280g)を、1週間後にボールマンケージで固定し、無麻酔下に生理食塩水を膀胱内に一定速度で注入することに

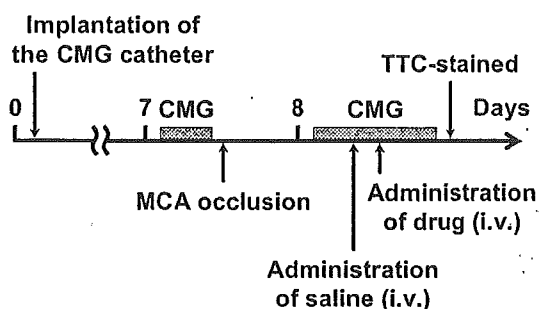


Fig. 1. Protocol for present experiments. CMG: cystometrogram, MCA: middle cerebral artery. TTC: 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

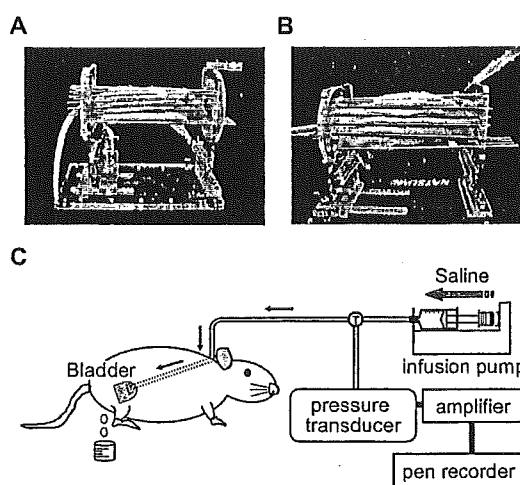


Fig. 2. Method of cystometrograms. Restraining of rat (A) or mouse (B) in the Bollman cage. C: Schematic diagram of CMG recording in conscious rats or mice. Cystometry was performed with a physiological saline warmed at 37°C. Saline was infused into the bladder at a rate of 0.126 ml/min (rats) or 0.017 ml/min (mice).

より、膀胱内圧を測定した(Fig.2)。生理食塩水の注入は、1回の排尿ごとに停止し、膀胱内の残尿を除去した。測定後、左中大脳動脈の起始部を閉塞して脳梗塞を起こし、24時間後の膀胱内圧を測定した。1回の膀胱内圧曲線ごとに計測を行い、これに排尿量と残尿量を加えて8個のパラメータについて評価した。得られた結果は、薬物投与

前の値に対する投与後の%で表し、この値を生理食塩水投与群の値と統計学的に比較した。P<0.05 の場合、有意差ありとした。薬物は頸静脈より投与した。

結果

マウスでの作用 ddY 系マウスにおいて、脳梗塞後に排尿潜時の延長 (155.59 ± 12.87%, P<0.05)、尿流率の低下 (55.33 ± 10.84%, P<0.05)、尿道抵抗の増加 (277.65 ± 51.24%, P<0.005)、および無排尿性収縮の増加 (208.93 ± 29.88%, P<0.05)が認められた。C57BL/6j 系マウスにおいても、尿流率の減少 (65.53 ± 14.58%, P<0.05)および尿道抵抗の増加 (235.07 ± 42.92%, P<0.05)が認められた。CP (10-20mg/kg)は、脳梗塞 24 時間後の排尿機能変化のうち、尿流率および尿道抵抗をコントロールレベルまで改善し、無排尿性収縮回数も減少させ

た (Fig. 3)。

ラットでの作用 脳梗塞モデルラットにおける排尿障害に対して、AMI (10mg/kg)は、脳梗塞に伴う膀胱容量の減少 (35.61 ± 2.95% → 69.30 ± 10.13%, P<0.05)および排尿潜時の短縮 (37.84 ± 3.20% → 85.81 ± 10.94%, P<0.05)を有意に改善したが、CP とは異なり、尿道抵抗をさらに増加させ (240.77 ± 38.04% → 422.83 ± 178.64%)、排尿後に残尿が認められた。一方、MAP (10mg/kg)および FLV (10mg/kg)は、梗塞後の排尿障害に対してほとんど作用を示さなかった。

考察

以上の結果から、ddY 系および C57BL/6j 系マウスは、脳梗塞 24 時間後に排尿困難を呈することが示され、この排尿困難を CP が改善することが示唆された。CP は、また無排尿性収縮も抑制した。この無排尿性収縮が過活動膀胱の状態を示すのか否かについては今後さらに検討する必要がある。

ラットでの検討において、抗コリン作用をもち、かつ 5-HT および NA の取り込み阻害作用と GIRK 活性化電流抑制作用をもつ AMI は、脳梗塞ラットの過活動膀胱を改善したが、排尿困難は改善しなかった。また、NA 取り込み阻害作用をもつ MAP や選択的 5-HT 取り込み阻害作用をもつ FLV も排尿障害を改善しなかった。上記の成績は、脳梗塞に伴う排尿障害の中で、少なくとも排尿困難は 5-HT や NA の取り込み阻害作用をもつ薬物では改善が見られないことを示している。AMI が過活動膀胱を抑制したのは、この薬物の抗コリン作用による可能性が考えられる。

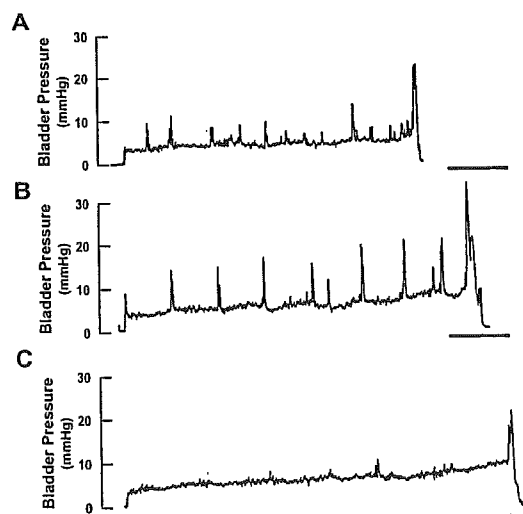


Fig. 3. Effects of cloperastine (CP) on CMGs recorded at 24 hrs after MCA occlusion in a conscious mouse. **A:** A typical CMG recorded before a cerebral infarction. **B:** A typical CMG at 24 hrs after left MCA occlusion. **C:** A typical CMG after CP (10mg/kg) administration under MCA occlusion. All recordings were recorded from the same mouse. Bar: 2min.

AMI および MAP は GIRK 電流抑制作用を持ちながら、CP と異なり排尿困難に対して作用が認められなかった。これは AMI や MAP の GIRK 活性化電流に対する IC₅₀ 値が、CP の約 100 倍と、非常に弱かったためと考えられる。いずれにしても、より強い GIRK チャンネル抑制作用を有する CP が、脳梗塞に伴う過活動膀胱や排尿困難に対して有効であることが示唆された。これらの CP の作用が GIRK チャンネルを介した作用であるか否かについては、GIRK チャンネルのトランスジェニックマウス等を用いてさらに検討が必要である。

REFERENCES

1. Yokoyama O., Ishiura Y., Komatsu K., Mita E., Nakamura Y., Kunimi K., Morikawa K., Namiki M., Effects of MK-801 on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol*, 159, 571-576 (1998)
2. Yokoyama O., Yoshiyama M., Namiki M., De Groat W.C., Glutamatergic and dopaminergic contributions to rat bladder hyperactivity after cerebral artery occlusion. *Am J Physiol*, 276, R935-942 (1999)
3. Yokoyama O., Yoshiyama M., Namiki M., De Groat W.C., Changes in dopaminergic and glutamatergic excitatory mechanisms of micturition reflex after middle cerebral artery occlusion in conscious rats. *Exp Neurol*, 173, 129-135 (2002)
4. Kanie S., Yokoyama O., Komatsu K., Kodama K., Yotsuyanagi S., Niikura S., Nagasaka Y., Miyamoto K.I., Namiki M., GABAergic contribution to rat bladder hyperactivity after middle cerebral artery occlusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279, R1230-1238 (2000)
5. Ishibashi H., Kuwano K., Takahama K., Inhibition of the 5-HT(1A) receptor-mediated inwardly rectifying K(+) current by dextromethorphan in rat dorsal raphe neurones. *Neuropharmacology*, 39, 2302-2308 (2000)
6. Chen S.C., Ehrhard P., Goldowitz D., Smeyne R.J., Developmental expression of the GIRK family of inward rectifying potassium channels: implications for abnormalities in the weaver mutant mouse. *Brain Res*, 778, 251-264 (1997)
7. De Groat W.C., Yoshimura N., Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 691-721 (2001)
8. Kamei J., Mori T., Igarashi H., Kasuya Y., Serotonin release in nucleus of the solitary tract and its modulation by antitussive drugs. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 76, 371-374 (1992)
9. Kobayashi T., Washiyama K., Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1841-1851 (2004)
10. Kobayashi T., Washiyama K., Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). *Br J Pharmacol*, 138, 1119-1128 (2003)

P3K-48 Characterization of micturition-related single neuron activities and their distribution in periaqueductal gray matter (PAG) in anesthetized rats

Kengo Matsumoto, Tetsuya Shirasaki, Gen Yamamoto, Fumio Soeda, Kazuo Takahama
Dept. Environ. & Molec. Health Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., Kumamoto 862-0973, Japan

PAG has recently been concerned as the upper micturition center. In this study we explored micturition reflex-relating neurons in PAG, recording single cystometrogram and unit activity of neurons simultaneously, and investigated their distribution in PAG, and the chemical sensitivities of these neurons. **Method** Male S.D rats (250-300 g) were used under anesthesia. Glass microelectrodes were used for unit recording. Chemicals were applied by microiontophoresis. **Result** Based on relationship of firing rate with micturition reflex, PAG neurons were classified into three types. Out of 247 neurons recorded, 34 (Type I) increased and 27 (Type II) decreased in firing rate during micturition phase. The firing of the remaining 186 (Type III) was not related to micturition reflex. Type I neurons were further divided into three subtypes. Type I and II neurons were mostly found in ventrolateral and lateral parts of the caudal PAG (from -7300 to -8800 μ m of Bregma). Glycine decreased the firing in these neurons, whereas glutamate and strychnine increased. The results present physiological evidence that the PAG plays functional role in micturition reflex.

PIK-12 Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K⁺ channel currents

Michitaka Shiozuka, Tetsuya Shirasaki, Fumio Soeda,
Kazuo Takahama
*Dept. Environ. & Molec. Health Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci.,
Kumamoto Univ., Kumamoto 862-0973, Japan*

We have recently found that centrally acting antitussives inhibited the currents irreversibly activated by 5-HT in the presence of intracellular GTP γ S, suggesting that inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels. In this study, we further studied effect of cloperastine (CP) on single GIRK channel currents activated by 8-OH-DPAT, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, in comparison with that of tertiapin, a selective GIRK channel blocker. [Method] Dorsal raphe neurons were acutely dissociated from 7- to 18-day-old Wistar rats. [Result] The histograms of open and closed states of 8-OH-DPAT (3×10^{-9} M) - activated single GIRK channels were fitted with two and three exponential functions, respectively. CP (10^{-6} M) decreased the open probability of channels activated by 8-OH-DPAT with affecting both the open and closed components. Tertiapin had similar effects, but no effect on the closed component. Spiperone, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, and Ba²⁺, a K⁺ channel blocker, also decreased the open probability of the channel. In addition, these two affected the closed components. The results suggest that CP might inhibit single GIRK channel activities in a different manner from those of other substances studied.

PTK-08 Comparison of the inhibitory effects of donepezil and cloperastine on the G-protein coupled inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons

Kayo Hashitani, Tetsuya Shirasaki, Fumio Soeda, Kazuo Takahama

Dept. Environ. & Mol. Health Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., Kumamoto 862-0973, Japan

We recently found that donepezil (DZ, a therapeutic drug for Alzheimer's disease), like cloperastine (CP, a centrally acting anti-tussives), inhibited the GIRK channels-activated currents. Since these drugs belong to the completely different categories of medicine, we compared the inhibitory effects of them on 5-HT-induced GIRK channel-activated currents (I_{5-HT}) in this study. [Methods] Dorsal raphe neurons were acutely dissociated from 8 to 14-day-old Wistar rats. The currents were recorded with the patch clamp technique. [Results] DZ inhibited the currents with IC_{50} of 1×10^{-5} M in a concentration-dependent and non-competitive manners. DZ had no effect on the reversal potential for I_{5-HT} . DZ also inhibited the currents irreversibly activated by 5-HT in the presence of intracellular GTP- γ S. The effects of DZ depended on the extracellular pH, with the maximal effects at the pH 9.0, which is close to its pKa. A similar pH effect was found for CP. Inter-cellular PIP_2 (50μ M) reduced the effect by 10^{-6} M CP. These results suggest that both DZ and CP may affect the GIRK channels at the intracellular or intra-membrane site.

5

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

○山本 巖、副田 二三夫、白崎 哲哉、高濱 和夫
(熊本大学大学院 医学薬学研究部 環境分子保健学)

【目的】平成15年度の日本排尿機能学会の疫学調査によると、夜間頻尿だけでもわが国の患者数は、4,500万人にもものぼると推定されている。本来、排尿は昼間（活動期）に起こり、また、麻酔の影響を受けやすい。そこで、本研究においては、代謝ケージに電子天秤を一体化させ、これにコンピューターを導入することにより、無麻酔、無拘束下で、マウスおよびラットの排尿反射を昼夜連続で数日間にわたって記録できるシステムの開発を試みた。

【方法】無処置の ddY 系雄性マウス (30-38g) 5 匹を 1 グループとして 4 グループを実験に用いた。8 時点灯 20 時消灯の明暗サイクルにて、24 時間連続で排尿反射を測定した。読み取り限度 0.001g の電子天秤 (PB303-S, Mettler Toledo K.K., Japan) を尿量測定に用いた。5 台の天秤から得たそれぞれの計測値は、マルチインターフェイス (RS422A, RS232C, ラインテック) を介して同時にパソコンに出力させた。得られたデータは、尿だけでなく糞および餌くずを含んでいるため、基礎検討の上、単位時間当たりの重量の変化が 0.02g/sec 以上の場合、尿とみなすソフトウェアを独自に開発した。

【結果】4 グループの結果を集計すると、測定時間 24 時間の総尿量は 1.868 ± 0.138 ml、排尿回数 5.7 ± 0.519 回、1 回排尿量 0.328 ± 0.014 ml であった。また、それぞれのパラメータにおいて、明時間と暗時間の間で有意な差が見られた (総尿量：明時間 0.538 ± 0.090 ml、暗時間 1.330 ± 0.104 ml、 $P < 0.001$ 。排尿回数：明時間 1.9 ± 0.324 、暗時間 3.8 ± 0.304 、 $P < 0.001$ 。1 回排尿量：明時間 0.286 ± 0.024 ml、暗時間 0.356 ± 0.018 ml、 $P < 0.05$)。このように、今回開発した排尿測定システムは、従来の代謝ケージにおける測定では評価が困難であった、測定時間内の排尿回数、総排尿量、1 回排尿量、および 1 回の排尿時間の計測を可能とした。本システムは、正常動物だけでなく各種病態モデル動物の排尿機能の研究やこれらに対する各種薬物の評価や解析など、様々な研究への応用が期待できる。

GS1-6

GIRK チャンネルは新規排尿障害治療薬の標的になりえるか？

Is GIRK channel a target for developing a novel therapeutic drug of urinary disturbance ?

○ 山本巖, 黒木伸吾, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫(熊本大院薬)

WHO は、21 世紀に克服すべき3 大疾患として、痴呆症、骨粗鬆症と共に排尿障害を掲げている。これは、わが国だけでも患者数が2,000 万人を超えること、排尿のコントロールが脳梗塞疾患などの予後のリハビリの成果を左右すること、患者およびその介護者のQOL に影響すること、などがその理由として考えられる。最近、我々は、G タンパク質共役型内向き整流性K イオン(GIRK)チャンネル活性化電流を抑制する中枢性鎮咳薬クロベラスチン(CP)が、脳梗塞モデル動物に随伴する排尿障害を改善するという興味深い知見を得た。このGIRK チャンネルは、排尿・蓄尿反射に関わる神経核や脳領域にも広く分布している。また、排尿反射への関与が認められている5-HT_{1A} や α_2 ノルアドレナリン(NA)受容体などと共役している。しかし、GIRK チャンネルと排尿機能との関連については、現在のところ報告されていない。そこで、我々は、脳梗塞後の排尿障害にGIRK チャンネルが関与しているか否か、また、CP の排尿障害改善作用がGIRK チャンネルに対する作用を介したものであるのか否かを追及する一環として、以下の研究を実施した。第一に、5-HT やNA の再取り込み阻害作用を有する抗うつ薬が、脳梗塞後のラット排尿機能に与える影響についてCP と比較検討した。第二に、脳梗塞モデルマウスを作製し、その排尿機能について検討を行った。本シンポジウムでは、CP による脳梗塞後に生じる排尿障害の改善作用をもとに、GIRK チャンネルが新規排尿障害治療薬の標的となる可能性について考えてみたい。

日本薬学会第 126 年会 要旨集 1 P.255

P28[S]am-603

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

○本田宗吉, 白崎哲哉, 塩塚道崇, 副田二三夫, 高濱和夫(熊本大院医薬)

【目的】我々は最近、中枢性鎮咳薬が5-HT_{1A}、 α_2 アドレナリン、GABA_Bなどの受容体と共役したGタンパク質共役型内向き整流性K⁺(GIRK)チャンネルを抑制することを見出した。その中で最も強い抑制作用を示したクロペラスチン(CP)は、脳梗塞後の排尿障害やメタンフェタミン投与後の多動を改善した。このことからCPがいかなる薬理学的プロファイルを有しているのか興味深い。CPはGlycineおよびNMDA受容体には作用しない。しかし、その他のチャンネルに対する作用は不明である。そこで本研究では、脳機能の維持に重要なNa⁺電流(I_{Na})、A電流(I_A)および遅延整流性K⁺電流(I_{KD})に対する作用を検討した。

【方法】標本は8~16日齢のWistar系ラットより急性単離した縫線核ニューロンを用いた。膜電流の記録はニスタチン穿孔パッチクランプ法で行い、薬物はYチューブ法により急速投与した。

【結果および考察】CPはI_{Na}、I_AおよびI_{KD}を濃度依存的に抑制した。I_{Na}に対するIC₅₀値は18.6 μ Mであった。I_Aに対しては、peak(IC₅₀=260 μ M)よりもsteady成分(IC₅₀=24.5 μ M)に対して抑制作用が強かった。同様にI_{KD}についてもpeak(IC₅₀=96.8 μ M)よりsteady成分(IC₅₀=52.0 μ M)に対してより強い抑制が見られた。しかし、GIRKチャンネルに対する抑制作用(IC₅₀=0.86 μ M)と比べると、最も抑制の強かったI_{Na}に対してさえ約20倍高い濃度を要した。

CPは、これまで報告された、GIRKチャンネル活性化電流に対して抑制作用をもつ物質の中で、非ペプチド系物質としては、この作用が最も強い物質の一つで、選択性も高いことが示唆された。

P-10-3

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—

熊本大院・医学薬学研究部・環境分子保健学

○黒木 伸吾、山本 巖、副田二三夫、白崎 哲哉、
高濱 和夫

【目的】我々は、中大脳動脈(MCA)の閉塞 24 時間後における、GIRK チャンネル抑制作用をもつ中枢性鎮咳薬クロペラスチン (CP) の投与は、MCA 閉塞に伴う過活動膀胱や排尿困難を改善することを見出した。GIRK チャンネルは、5-HT_{1A} や α_2 ノルアドレナリン(NA)受容体などと共役しており、GIRK チャンネルの抑制は、脳内の5-HTやNAのレベルを増加させることが考えられる。一方、5-HT や NA の再取り込み阻害作用を有する三環系抗うつ薬のアミトリプチリン(AMI)は、臨床において夜尿症の治療薬としても使用されている。本研究では、5-HT および NA 再取り込み阻害作用をもつ、AMI を含む各種抗うつ薬の、無麻酔 MCA 閉塞ラットにおける排尿障害に対する作用を比較検討した。【方法】体重 250~280g の S.D 系雄性ラットを用いた。排尿反射はボールマンケージを用い、無麻酔下でシングルシストメトリー法により測定した。薬物は MCA 閉塞 24 時間後に静脈内に投与し、膀胱容量、排尿潜時、排尿閾値、膀胱コンプライアンス、最大膀胱内圧、尿流率、および尿道抵抗に対する作用を調べた。【結果】AMI(10mg/kg)は、脳梗塞に伴う膀胱容量の減少および排尿潜時の短縮を有意に改善したが、CP とは異なり、尿道抵抗をさらに増加させ、排尿後に残尿が認められた。一方、NA 再取り込み阻害作用が強いマプロチリン(MAP)(10mg/kg)および選択的セロトニン再取り込み阻害薬のフルボキサミン(FLV)(10mg/kg)は、梗塞後の排尿障害を改善しなかった。【考察】AMI は、脳梗塞後の過活動膀胱を改善したが、排尿困難は改善せず、また、MAP や FLV も排尿障害を改善しなかった。以上より、強い GIRK チャンネル抑制作用を有する CP が、脳梗塞に伴う過活動膀胱や排尿困難に対して有効であることがさらに強く示唆された。

MP-3-5

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・大学院・医学薬学研究部・環境分子保健学

○松本 健吾、白崎 哲哉、副田二三夫、山本 巖、
高濱 和夫

【目的】 PAG は腰仙髄部から直接ニューロンの投射を受け、被投射ニューロンは橋排尿中枢のバリントン核に投射している。PAG へのグルタミン酸注入は、バリントン核を介して排尿反射を促進する。さらに、PET などの画像診断法を用いたヒトの研究において、排尿反射に伴い PAG が活性化することが報告されている。これらのことから、PAG は近年上位排尿中枢として注目されている。そこで本研究においては、排尿反射と同期した単一神経放電を微小電極法により PAG から記録し、その分布と特性を電気生理学的に明らかにすることを試みた。【実験方法】体重 250-300g の SD 系雄性ラットを用い、ウレタン麻酔下にシストメト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 (bregma から尾側に 7.3 mm、側方に 5.0 mm) を開け、PAG に微小ガラス電極 (5~15M Ω) を刺入して、単一神経活動を記録した。薬物は電極に貼り合わせた 7 連微小ピペットから微小電気泳動法により微量投与した。【結果】検討した bregma から -7300~-8800 μ m の PAG 領域において、排尿期に活動電位の発火が増加する Type I (24 例)、蓄尿期に増加する Type II (14 例)、および排尿反射と無関係に発火する Type III (63 例) の 3 種類の活動が記録された。Type I はさらにその発火パターンから 3 種類に分類された。Type I は bregma から -7300~-8720 μ m の領域の外側および腹外側 PAG に、また Type II は bregma から -7800~-8720 μ m の領域の外側 PAG に多く分布した。これらのうち 11 例においてグルタミン酸が発火を増加させ (Type I : 2、Type II : 1、Type III : 8)、18 例においてグリシンが興奮を抑制した (Type I : 6、Type II : 2、Type III : 10)。また 5 例では、ストリキニーネが発火を増加させた (Type I : 1、Type II : 0、Type III : 4)。【考察】尾側 PAG (bregma から -7300~-8720 μ m) に排尿反射関連ニューロンが少なくとも二種類存在し、それぞれのニューロンの局在は若干異なっていることが示唆された。また、これらの部位は腰仙髄の第 V 層からのニューロンが直接投射する部位とほぼ一致した。今後、これらのニューロンの薬理的性質について検討する必要がある。

日本排尿機能学会誌 第 16 巻第 1 号 (2005) P114

要旨

WHO は 21 世紀において克服すべき 3 大疾患として痴呆症、骨粗鬆症と共に排尿障害を挙げている。未だに優れた治療薬がないこれらの疾患が、今後、特に先進諸国において、増加の一途を辿ると予想されるためである。脳血管障害やパーキンソン病など中枢神経疾患に起因する排尿障害も増加すると考えられ、中枢性排尿障害治療薬の開発が望まれる。しかし、排尿反射の中枢メカニズムさえ十分に解明されておらず、その開発は遅れている。

PAG は腰仙髄部から直接ニューロンの投射を受け、その被投射ニューロンは古典的橋排尿中枢であるパーリントン核に投射している。さらに、PAG へのグルタミン酸注入は、パーリントン核を介して排尿反射を促進する。画像診断法によるヒトでの研究においても、蓄尿に伴って PAG の神経活動が増加する。これらのことから、PAG は近年上位の排尿中枢として注目されている。しかし、排尿反射ニューロンの特性などその詳細は不明である。そこで本研究においては、排尿反射と同期した単一神経放電を微小電極法により PAG から記録し、その電気生理学的・薬理学的特性と各ニューロンの PAG 内分布を明らかにすることを試みた。以下に結果を示す。

- 1) Bregma から尾側に 7300~8800 μm の PAG 領域において、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 種類の単一神経活動が記録された。Type I はさらにその発火パターンから 3 種類に分類された。
- 2) Type I は Bregma から尾側に 7640~8800 μm の領域の外側および腹外側 PAG に、また Type II は同領域の外側 PAG および背外側 PAG と四丘体に多く分布した。
- 3) これらのうち 37 例においてはグルタミン酸が発火を増加させ、57 例においてはグリシンが興奮を抑制した。また 16 例では、ストリキニーネが発火を増加させた。
- 4) PAG およびその周辺領域への薬物投与による発火頻度の変化はほとんどの場合、排尿反射に影響を与えなかった。しかし、グリシンの極微量注入により神経放電が抑制されると共に排尿反射が抑制された例が 1 例確認された。

以上の成績から、PAG には発火パターンの異なる排尿反射関連ニューロンが少なくとも 5 種類存在し、それぞれ異なる分布を示すことが明らかとなった。また、グルタミン酸とグリシンが排尿反射の神経伝達物質として働いている可能性が示唆された。本研究は PAG において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を詳細に調べた最初の報告であり、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極めて貴重な基礎知見を提供するものと言える。

第 1 章 緒 論

WHO は 21 世紀において克服すべき 3 大疾患として、アルツハイマー病、骨粗鬆症と共に排尿障害を挙げている。未だに優れた治療薬がないこれら三つの疾患が、今後特に先進諸国において増加の一途を辿ることが予想されるためである。わが国でも平成 15 年度に日本排尿機能学会が実施した疫学的研究¹⁾において、日中 8 回以上の排尿を生じる昼間頻尿の人は 3300 万人にも達し、尿意を催した時に我慢できずに失禁してしまう切迫性尿失禁が 570 万人、咳やくしゃみ等により失禁する腹圧性尿失禁が 540 万人に達すると推定されている。高齢化や生活スタイルの変化などにより、末梢性の排尿障害に加え、脳梗塞などの脳血管障害、痴呆症やパーキンソン病などの中枢性疾患に随伴する排尿障害も増加している。排尿障害は大別して蓄尿時障害と排出時障害に大別されるが、脳梗塞などの場合は、程度の差こそあれ同一患者で過活動膀胱 (蓄尿時障害) と排尿困難 (排出時障害) の両方が、片麻痺と同程度に高頻度で発症するといわれている。少子高齢化の時代を迎え、患者本人の尊厳や QOL の低下はもとより、介護福祉とその費用の点でも問題は深刻化している²⁾。

下部尿路は中枢および末梢神経の支配下にあり、これらの神経による膀胱と尿道の協調的なコントロールにより蓄尿と排尿のリズムが制御されている。現在臨床において使用されている排尿障害治療薬や開発中の治療薬は、その殆どが膀胱平滑筋、尿道括約筋や末梢神経など末梢組織に作用点を持つ。しかし、仮に受容体選択性の高い末梢性排尿障害治療薬が開発されたとしても、脳梗塞に伴う排尿障害のように過活動膀胱と排尿困難が同一患者に起きる場合には、末梢性治療薬では対応が困難である。このようなことを考慮すると、少なくとも中枢疾患に基づく排尿障害に対しては中枢性に作用する排尿障害治療薬が必要とされるであろう。中枢性排尿障害治療薬の開発が躊躇されている原因の一つは、未だに排尿反射の中枢内情報伝達機構が十分解明されておらず、予期せぬ副作用が発現する可能性が心配されるからである。このことは取りも直さず、医学的見地からのみならず、薬学的見地からも、排尿反射の中枢メカニズム解明を急ぐ必要があることを意味する。

Fig.1 に、これまでの解剖学的、組織学的、電気生理学的および画像診断学的検討から考えられている排尿反射関連核と関連核間の神経連絡の概略をまとめて示す。赤で示す領域は特に排尿反射に重要と考えられている。このように示すと排尿反射についていろいろなことがわかっているように思われるかもしれないが、ほとんどは関連が指摘されているに過ぎず、ここに示す線維連絡も多くは解剖学的に線維連絡があることを示すのみで、必ずしも排尿反射との関連が明らかでない。この中で、排尿反射経路としてほぼ確定して良いと思えるものは、太線で示す部分である。膀胱および尿道括約筋からの知覚神経は、主として仙髄の後角と背側交連核 (DCM) に入力する。以前は、ここから古典的橋排尿中枢であるパーリントン核に投射すると考えられていたが、最近、主として PAG に投射することが示された⁹⁾。パーリントン核の電気的、化学的刺激は仙髄副交感神経核 (SPN) を興奮させて膀胱を収縮し、逆に内尿道括約筋を弛緩させると共に、腰髄側核 (IML) の交感神経節前ニューロンを抑制して内尿道括約筋の弛緩と膀胱頸部の収縮を起し⁴⁾、また DCM の興奮を介してオヌフ核を抑制して外尿道括約筋を弛緩させることで排尿反射を惹起する⁴⁾。一方、PAG の電気的、化学的刺激も排尿反射を惹起し、Ca²⁺ チャネルブロッカーである Co²⁺ のパーリントン核への注入によりその反射が抑制される⁶⁾。組織学的にも脊髄に投射するパーリントン核ニューロンに PAG ニューロンが直接投射することが報告された⁶⁾。当研究室の研究でも、PAG 内へのグリシンの微量注入が排尿反射を促進することが示されている⁷⁾。このような報告は、PAG が排尿反射調節の要として機能するのではないかと考えを抱かせる。

また、PAG は痛覚、血圧、呼吸、情動、不安、性行動なども関連が深い領域⁸⁻¹¹⁾であり、排尿行為がこのような生理機能により影響されることは、日常的に経験することである。このようなことから、PAG が排尿反射調節において重要な役割を担うと考えられる。

ところで、排尿反射が神経の興奮を介して惹き起こされることは明白な事実であろう。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く¹²⁻²²⁾、PAG における検討も基本的にはなされていない。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本研究では、PAG および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を明らかにするとともに排尿反射関連ニューロンの PAG 内分布を明らかにすることを試みた (第3章)。また、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、第4章において、微小電極法とマイクロイオントフォoresis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。また、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。本論文は、上記の実験項目について得られた成績を記載し、最後に総括と結論 (第5章) を加えてまとめたものである。

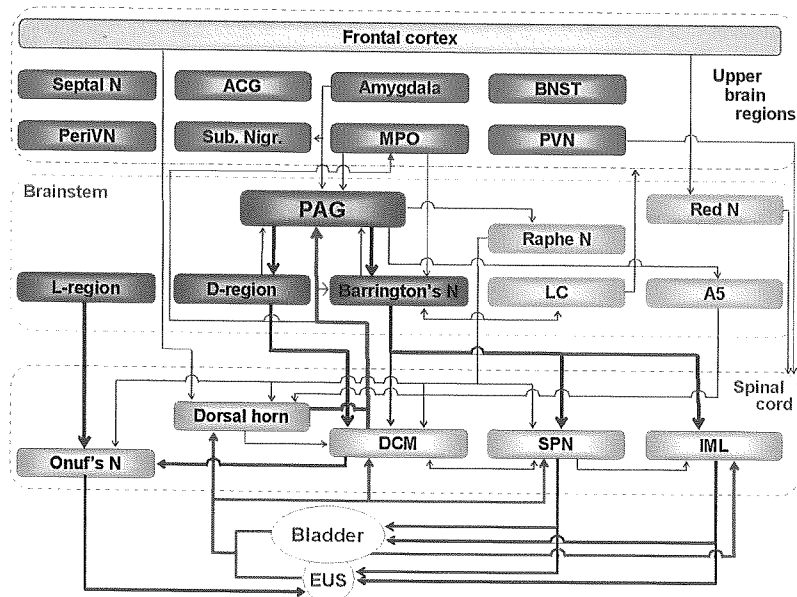


Fig. 1 Nucleuses and brain regions possibly contributing micturition reflex and their neuronal connectivity.

Red lines indicate afferent inputs and blue ones indicate efferent outputs. Considerable micturition pathways were shown by thick lines. Septal N : Septal nucleus, ACG : Anterior cingulate cortex, BNST : Bed nucleus of the stria terminalis, PeriVN : Periventricular nucleus of the hypothalamus, Sub.Nigr. : Substantia nigra pars reticulata, MPO : Medial preoptic area of hypothalamus, PVN : Paraventricular nucleus of the hypothalamus, PAG : Periaqueductal gray matter, Red N : red nucleus, Raphe N : Raphe nucleus, Barrington's N : Barrington's nucleus, LC : Locus coeruleus, A5 : A5 noradrenergic area, DCM : Dorsal commissura, SPN : Sacral parasympathetic nucleus, IML : Intermediolateral cell column, Onuf's N : Onuf's nucleus, EUS : External urethral sphincter.

第2章 実験方法

1. 実験動物

体重 250-280g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを九動(株)より購入し、熊本大学薬学部実験動物施設にて、室温 22±2°C の環境下で飼育した。飼育中は固形飼料 (CE・2) および飲料水 (水道水) を自由に摂取させた。動物は日本薬理学会および熊本大学の実験動物取り扱い規則に従って実験に供した。

2. 試薬

ウレタン (urethane)、グリシン、ストリキニーネは SIGMA より購入した。L(+)-グルタミン酸ナトリウム一水和物とポンタミンスカイブルー (Pontamine Sky Blue 6BX) はそれぞれ、和光純薬工業(株)と Avocado Research Chemicals より購入した。

3. 微小ガラス電極

外径 1.5 mm、長さ 90mm の芯入ガラス管 (GD-1.5、成茂科学機械研究所、東京) を微小電極作製器 (PE-2、成茂科学機械研究所、東京) に垂直に固定し、加熱しながら自然落下させることで先端の外径が 1 μm 以下の微小ガラス電極を作製した。さらに、マイクログラインダー (EG-400、成茂科学機械研究所、東京) に微小ガラス電極を 40 度に固定し、先端外径が約 1 μm になるように研磨した。Fig.3A に示すように、微小ガラスピペットの肩 (shoulder) の部分をガスバーナーの微小炎で加熱して約 40° 曲げ、

ポントミンスカイブルー-6BXを2%の濃度で溶かした0.5 M 酢酸ナトリウム溶液を電極内に充填した。直流抵抗が4~6MΩのものを実験に用いた。

4. マイクロイオントフォレシス用7連ガラスピペット

大村らの方法^{23, 24)}に準じて作製した。まず、外径1.2 mm、長さ90 mmの芯入ガラス管(G.D.1.2、成茂科学器械研究所、東京)を中心にし、その周囲に外径1.2 mm、長さ30 mmの芯入ガラス管(G.D.1.2、成茂科学器械研究所、東京)を6本、Fig.2Aのようにエナメルステンレス線(E・2C、成茂科学器械研究所、東京)で固定した。これを電極作製器(PE・2、成茂科学器械研究所、東京)に垂直に固定し、熱を加えながらFig.2Bのように約120°よじった後、加熱しながら(ヒーターの電流値14.2A)重力と磁力(マグネット3.5目盛)の力でガラス管を引きちぎってFig.2Cのような7連ガラスピペットを作製した。さらにこのピペットの先端の外径が約2 μmになるようにピペット先端をマイクログラインダー(EG・400、成茂科学器械研究所、東京)にて研磨した。このときの固定角度は40度とした。テーパー(taper)が7~8 mmで、各ピペットに2Mの酢酸ナトリウムを充填したときの直流抵抗は50~90MΩであった。ピペットへの薬液の充填は、注射筒に取り付けたカテラン針1/5を介して行った。充填した薬液は毛細管現象により数時間でピペット先端まで移行した。薬液ピペット各管の間での電気的な相互干渉が、薬物効果に影響を及ぼすことが考えられるので、一つの7連薬液ピペットのある管に薬物Aを、隣の管に薬物Bを充填したとすると、他の7連薬液ピペットでは薬物Aを充填した管の隣の管には薬物B以外の薬物を充填し、少なくとも4種の薬液ピペットを用いて実験を行った。

5. 記録電極と薬液ピペットの接着

実体顕微鏡下、Fig.3Bに示すように記録電極の先端を薬液ピペット先端より20~30 μm突き出した状態でアロンアルファ(東亜合成、東京)により貼り合わせ、十分乾燥させた後Fig.3Aのように歯科用ワックス(ニューステッキワックス、大成歯科工業、大阪)で固定した。接着が不完全な場合、保存中または実験中に先端が離れることがあったが、前者の場合は使用直前に顕微鏡下で観察することにより、後者の場合は非特異的興奮物質L(+)-グルタミン酸ナトリウムに対する神経発火が欠如することにより発見できた。

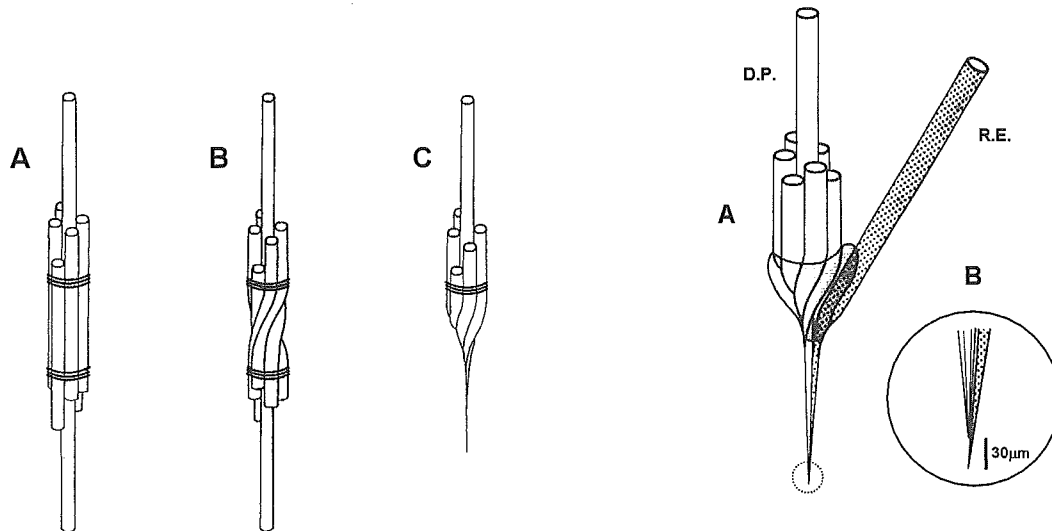


Fig. 2 Steps manufacturing the seven-barrel micropipette assembly.

A: Outer 6 glass pipes are fixed to the inner core glass pipe. B: In a small frame of the glass burner, the assembly is twisted through 120°. C: Final style of the seven-barrel micropipette assembly after heating and pulling.

Fig. 3 Diagrammatic illustration of the recording electrode (R.E.) attached to the seven-barrel drug containing pipette (D.P.)

A: Recording electrode (R.E.) curved about 30° at the shoulder, attached to seven-barrel drug containing micropipettes (D.P.) with water resistant adhesive at the tip and taper, with dental wax at shoulder.

B: Microscopic view of the tips
The recording electrode projects about 30 μm beyond the openings of attached seven-barrel drug containing pipette.

The diameters of the recording electrode and seven-barrel drug containing pipette are both smaller than 2 μm.

膀胱内圧測定のための手術（後述）を施したラットを脳定位固定装置（高橋延雄商店、東京）に固定した後、後頭部の毛を刈り、頭蓋を露出させた。Bregma から後方に 7.3 mm、側方に 5.3 mm のところに歯科用ドリル（LABO NO 7、吉田製作所、東京）で約 4 mm 四方の孔を開けた。実体顕微鏡下に観察しながら、硬膜を注意深く除き、大脳皮質を露出させた。拍動に伴う脳組織の動きを緩和させる目的で、少量の脳脊髄液を小脳下延髄槽から放出させた。微小ガラス電極を貼り合わせた 7 連微小ピペットを水平面に対して 40 度傾けた 3 次元電動マイクロマニピュレーター（PF5-1、成茂科学器械研究所、東京）に固定し、実体顕微鏡下に観察しながら、ガラス電極の先端を大脳皮質表面に接触させた。この点を深さ 0（H：0）とした。記録電極は 1 パルス当たり 1 μ m 移動するパルスモーターにより、Paxinos and Watson の脳地図に従って、Bregma から尾側に 7300~8800 μ m の中脳水道中心灰白質およびその周辺領域に刺入させた。不関電極は約 1 cm 四方の銅板とし、頭部の手術縁に置いた。また、皮質表面の乾燥と呼吸や振動による脳表面の動揺を防ぐために、電極刺入直後に 2% の寒天で皮質表面を覆った。

単一神経活動を記録するための装置の配置ならびに接続を Fig.4 に示す。記録電極先端と不関電極の間で捉えられた電位を微小電極増幅器（M-707A、WPI、Sarasota、Florida、USA）と生体用アンプ（AB-601G、日本光電、東京）で増幅した。このとき、活動電位に比べて遅い電位変化（低周波成分）は、雑音として 0.5 msec の low cut filter（AB-601G、日本光電、東京）により除去した。フィルターの出力を PowerLab/4sp（AD Instruments、Lexington Drive Bella Vista NSW、Australia）でアナログ/デジタル変換し、Chart 5.1.1 for Windows（以下 Chart、AD Instruments、Lexington Drive Bella Vista NSW、Australia）を用いて、パーソナルコンピュータに記録した。同時に、単一神経活動は生体用アンプ（AB-601G、日本光電、東京）を介した後、ブラウン管オシロスコープ（V-225、HITACHI、東京）でモニターすると共に、オーディオモニターにより聴覚的にモニターした。

7. 7 連微小ピペットからの薬物投与

実験に用いた 7 連微小ピペットの先端径は約 2 μ m であり、自然に漏れ出す可能性が考えられる。そこで、各化学物質の帯電荷とは逆向きに 5 nA のバッキングカレントを通電し、ピペット先端から薬液が自然に放出するのを防いだ。

ピペット先端からのエレクトロフォoresisによる化学物質の遊離量は、定電流装置で流した電流の大きさに比例する。このことは放射性物質や蛍光物質を使った多くの実験で証明されている^{25,30}。従って、薬物の投与量は、定電流装置から流した電流の大きさ（nA）でほぼ表すことができる。

薬液ピペットは 30M Ω 以上の非常に高い電気抵抗を持ち、その抵抗は通電に際してピペット内の超微粒子、血液、組織片などのために絶えず変化する。そこで、薬物を投与するための電流源として定電流装置（SEZ-1100、日本光電、東京）を用いた。

本実験に用いた薬物、薬物の濃度および pH を Table.1 に示す。L(+)-グルタミン酸ナトリウムおよびストリキニーネは蒸留水製造装置（GS-200、東洋濾紙、東京）および超純水製造装置（LV408、東レ、東京）を用いて精製した超純水に溶解した。その他の薬物は、上記超純水で調節した 154 mM NaCl 溶液に溶解した。

L(+)-グルタミン酸ナトリウムは負の電流（20 nA）、その他の薬物は正の電流（20 nA）でそれぞれ 10 秒間投与した。

8. 単一神経活動記録部位の同定

実験終了後、電気刺激装置（SEN-7203、日本光電、東京）を用いて、記録電極内が負となるように、100V、500 msec の電圧パルスを 1 Hz で 45 分間通電し、ボンタミンスカイブルーを電極刺入部位に注入した。その後、脳を取り出し、凍結切片作製器（No.5024、エルマ光学器械製作所、東京）にて厚さ 50 μ m の冠状脳切片を作製した。脳切片作製後ただちに実体顕微鏡（SZ40、オリンパス、東京）下でボンタミンスカイブルーの染色位置を確認した。また、同時に、デジタルカメラ（C-5060、オリンパス、東京）にて画像として記録した。

9. 膀胱内圧測定

ラットをウレタン(1.0~1.2g/kg, i.p.)で麻酔し、仰臥位に固定した。恥骨より約 2cm 上方の下腹部を正中切開して膀胱を露出させ、先端に 23G の注射針を付けたポリエチレンチューブ（PE50、BECTON DICKINSON、Franklin Lakes、NJ、USA）を膀胱

頂部に約 2.5mm 刺入し、アロンアルファ（東亜合成、東京）で固定した。

膀胱内圧を記録するための装置の配置ならびに接続を Fig.4 に示す。ポリエチレンチューブの他端は三方活栓に接続し、これにポリエチレンチューブ (PE-50、BECTON DICKINSON、Franklin Lakes、NJ、USA) を介して 5 cc の注射筒を接続し、0.128ml/min の速度で膀胱に 37°C の生理食塩水を注入した。生理食塩水の注入にはインフュージョンポンプ (Model A、日本光電、東京) を用いた。三方活栓のもう一端は、膀胱内圧測定のための圧トランスデューサー (DX-360、日本光電、東京) に接続し、その信号を血圧測定用アンプ (AP-641G、日本光電、東京) で増幅した。この信号を PowerLab/4sp (AD Instruments、Lexington Drive Bella Vista NSW、Australia) でアナログ/デジタル変換して、パーソナルコンピュータ (Intel ペンティアム IV 3.06GHz、WindowsXP) に記録すると共に、ペンレコーダー (R-02A、理化電機、東京) 上に記録した。麻酔深度を一定に保つため、呼吸数をモニターすると共に、直腸体温をモニターした。また、必要に応じてヒーティングパッド (Self regulating heating pad、FST、North Vancouver、Canada) により体温を 37.0±1.0°C に保った。

Table.1 Concentration and pH of drug solutions.

Drug	Concentration (mM)	pH	Current
L-Glutamate Na	1000	8.0	—
Glycine	890	6.5	+
Strychnine nitrate	5	6.5	+
NaCl	154	7.0	+

10. データ解析

10.1. データ解析および統計処理

膀胱内圧と単一神経活動は Chart 5.1.1 for Windows (以下 Chart、AD Instruments、Lexington Drive Bella Vista NSW、Australia) を用いて解析した。単一神経活動を定量化するために単一神経の活動を一秒あたりの活動電位数、すなわち発火頻度 (spikes/second) として表し、Fig.5 に示す排尿反射の各パラメーターと比較した。得られたデータは Excel2000 (Microsoft、Redmond、WA、USA) または Origin 5 (Microcal、Northampton、MA、USA) を用いて統計解析した。結果は平均値±標準誤差として表した。独立 2 群間 t 検定により危険率 P < 0.05 のとき、2 群の差が有意であるとみなした。

10.2. 相互相関分析

Excel 用アドイン解析ツール Ver1.2 (共和計測、東京) により膀胱内圧と発火頻度の相互相関分析を行い、詳細な相関関係を調べた。相互相関関数は、2 つの信号のうち、一方の波形を時間 τ だけ遅延させたときのずらし量 τ の関数で、次式のように定義される。

$$R_{xy}(\tau) = \lim_{T \rightarrow 0} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t)y(t+\tau)dt$$

今回の実験では、膀胱内圧を基準に発火頻度を τ 時間だけずらして、相互相関を検討した。相互相関関数は 2 信号間の類似度や時間遅れの測定に利用される。もし、2 信号が完全に異なっているならば、 τ に関わらず相互相関関数は 0 に近づく。2 つの信号が、ある系の入力、出力に対応するものであるときに、その系の持つ時間遅れの推定や、外部雑音に埋もれた信号の存在が検出できる。