

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)

総合研究報告書

主任研究者 高濱 和夫

平成18(2006)年4月

目 次

I . 総合研究報告	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 . 研究成果の刊行に関する一覧表	15
III . 研究成果の刊行物・別刷	21
1 . T. Shirasaki, K. Yamasaki, M. Shiozuka, K. Hashitani, F. Soeda, K. Takahama Inhibition of GIRK channels-activated currents by centrally acting non-narcotic antitussives Society for Neuroscience 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner Program No. 851.10 (2004)	23
2 . G. Yamamoto, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama Preparation and application of the mice model for studying urinary disturbances after cerebral infarction J. Pharmacol. Sci. 97 (Suppl. I) 250P (2005)	24
3 . M. Shiozuka, T. Shirasaki, K. Hashitani, F. Soeda, K. Takahama Single channel analyses of the inhibition of 5-HT-induced currents by cloperastine J. Pharmacol. Sci. 97 (Suppl. I) 213P (2005)	25
4 . 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排尿障害に対するデキストロメトルファンおよび クロペラスチンの改善作用 日本排尿機能学会誌 15 巻 1 号 P116 (2004)	26
5 . 山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫 GIRK チャネルは新薬開発のための標的分子になり得るかー 新規排尿障害治療薬開発の可能性 日本薬理学雑誌 125 巻 2 号 P109 (2005)	27
6 . 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)	28
7 . 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)	29
8 . G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel and therapeutic drugs for urinary disturbance J. Pharmaceu. Soc. Jpn. 125 (Suppl. 2) P20-23 (2005)	37
9 . 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)	41
1 0 . M. Shiozuka, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K ⁺ currents J. Pharmacol. Sci. 100 (Suppl. I) 138P (2006)	42
1 1 . 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 ⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons J. Pharmacol. Sci. 100 (Suppl. I) 137P (2006)	43
1 2 . 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)	44
1 3 . 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)	45
1 4 . 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ベ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)	46
1 5 . 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 —クロベ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)	47
1 6 . 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)	48
1 7 . 山本 巖、副田二三夫、白崎哲哉、高濱和夫	

脳梗塞に伴う排尿障害マウスモデルの作製とその応用 日本排尿機能学会誌 (投稿準備中)	49
18. 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過活動膀胱に対する抗うつ薬の影響 日本排尿機能学会誌 (投稿準備中)	62
19. 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)	77
20. 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)	101
21. T. Shirasaki, K. Abe, F. Soeda, K. Takahama Inhibition of the GABA _B receptor-mediated inwardly rectifying K ⁺ current by centrally acting antitussives in rat dorsal raphe neurons Br. J. Pharmacol. (in preparation)	118
22. S. Honda, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama Inhibition of Na ⁺ and K ⁺ currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons Pharmacol. Res. (in preparation)	151

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総合研究報告書

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、既存の非麻薬性中枢性鎮咳薬で 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、脳梗塞モデル動物における過活動膀胱と排尿困難の両方を鎮咳有効量で顕著に改善することを見出した。そこで本研究では、このクロペラスチンの作用メカニズム解明を通して新規排尿障害治療薬を開発することを目指した。具体的には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、2)排尿中枢とされている中脳水道中心灰白質 (PAG) の単一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. 脳内 5-HT およびノルアドレナリン量を増加させる各種抗うつ薬や関連薬物の脳梗塞後排尿障害に対する作用の検討から GIRK チャネル阻害作用をもつクロペラスチンの効果が他の薬物に比べて優れていることが強く示された。また、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 5-HT 神経と 5-HT_{1A} 受容体の活性化が関与する可能性が示唆された。
2. 脳梗塞 24 時間後の PAG において、GIRK2 mRNA レベルが有意に増加し、5-HT_{1A} 受容体 mRNA レベルも増加傾向を示した。これは、脳神経疾患モデルの排尿反射関連核において、GIRK チャネル mRNA レベルが変動することを示したはじめての報告であり、クロペラスチンの脳梗塞後排尿障害改善作用に GIRK チャネルの抑制が関与している可能性を示唆する。また、排尿回数が少なくなる加齢マウスでは成熟マウスに比べて脳内の GIRK1、GIRK2、および GIRK3 チャネル mRNA レベルが有意に高かった。
3. 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。しかし、グリシンによる活動電位発火の抑制と排尿反射の抑制が同時に起こるニューロンもあることがわかった。
4. 「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」の開発に成功し、これを用いて排尿活動の明暗サイクル、加齢に伴う排尿活動の変化、およびエストロゲン受容体 α サブタイプ (ER α) 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 α 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 α KO 雌マウスでは野生型と比べて 1 回排尿量が多く、性差があることが示された。
5. クロペラスチンは、5-HT_{1A} 受容体のみならず GABA_B 受容体と共役する GIRK チャネルも抑制することがわかった。また、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、PIP₂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も示唆された。さらに、クロペラスチンは、膜電位依存性 Na⁺ 電流、遅延整流性 K⁺ 電流および A 型 K⁺ 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。
6. クロペラスチンはラセミ体であるため、光学活性体である d 体と l 体を分離し、それぞれ 500-700mg 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

A. 研究目的

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顕著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)の単一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・無拘束下で数日間連続して排尿活動を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、ボールマニケージに固定後、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、脳梗塞容積を算出した。

2. 脳梗塞に伴う排尿障害のマウスモデルの作成と薬物の評価 (高濱担当)

ddY 系 (28-33g) および C57BL/6j 系 (18-24g) 雄性マウスを用いた。ペントバルビタール麻酔下に、ポリエチレンチューブ (PE-10, Becton Dickinson, USA) を用いて、ラットの場合と同様に慢性の膀胱瘻を作成した。このマウスを用いて、正常時および脳梗塞後にシングルシストメトログラムを記録し、クロペラスチンの作用も調べた。

3. 脳梗塞モデルラット、加齢マウスおよび $ER\alpha$ KO マウスの $GIRK$ チャネルおよび $5-HT_{1A}$ 受容体 mRNA レベルの解析 (副田担当)

脳梗塞モデルラットは 1. と同様に作成し、左中大脳動脈塞栓の 24 時間後に脳を摘出した。加齢による変動の検討には 5 週齢および 54 週齢の ddY 系マウスを、 $ER\alpha$ ノックアウトの影響の検討には $ER\alpha$ KO マウスとその野生型マウスを用いた。いずれの場合も脳を摘出後、実体顕微鏡下に PAG または海馬を切り出し、液体窒素で凍結した後、 -80°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。

4. 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oresis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。

ガラス微小電極と 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。

5. 無麻酔・無拘束下で数日間連続して排尿を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 チャネル抑制メカニズムおよび GIRK チャ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-chlorobenzhydrol を原料にそのエステル酸キニーネ塩を合成し、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)

クロペラスチンは、GIRK チャネル抑制作用が強く、グリシン受容体や NMDA 受容体には作用しない。よって、クロペラスチンの脳梗塞に伴う排尿異常の改善作用メカニズムに GIRK チャネルの抑制が寄与している可能性が考えられる。GIRK チャネルの抑制は、脳内 5-HT 量を増加させると考えられる。一方、5-HT やノルアドレナリンの取り込み阻害薬が過活動膀胱を改善することや、膀胱容量を増加することなどが報告されている。そこで、5-HT およびノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有し、夜尿症の治療にも使用されている抗うつ薬アミトリプチンと、アミトリプチンに比べ抗コリン作用の弱いマプロチリンの脳梗塞後排尿障害に対する作用を調べた。

アミトリプチンは脳梗塞に伴う排尿潜時の短縮と膀胱容量の低下を改善したが、最大膀胱内圧を低下させ、尿道抵抗を上昇させた。これにより、尿流率も低下し、残尿が見られた。よって排尿困難を悪化させることがわかった。一方、マプロチリンは、脳梗塞による排尿潜時、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。

選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルボキサミンも、調べた全てのパラメーターに対し、有意な影響を与えなかった。しかし、選択的 5-HT 再取り込み阻害作用と弱い 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有意に改善した。5-HT 枯渇薬である 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_{1A} 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. 脳梗塞に伴う排尿障害のマウスモデルの作成と薬物の評価 (高濱担当)

脳梗塞に伴う排尿障害の病態とこれに対する治療薬の開発に遺伝子改変動物の利用が有用である。そこで、マウスを用いた脳梗塞後排尿障害の評価系の確立を目指した。

ddY マウスにおいては、正常時に比べて脳梗塞 24 時間後に排尿潜時の有意な延長、尿流率の有意な減少、尿道抵抗および無排尿性収縮回数の有意な増加が認められた。クロベラスチンは、5 mg/kg から尿流率および尿道抵抗を有意に改善し、10-20mg/kg においては、無排尿性収縮回数の顕著な抑制が見られた。梗塞容積には影響しなかった。

C57BL/6j マウスにおいても、脳梗塞による尿流率の有意な減少と尿道抵抗の有意な増加が認められた。しかし、無排尿性収縮回数は増加しなかった。また、クロベラスチン 20mg/kg は尿流率および尿道抵抗を有意に改善した。梗塞容積には影響しなかった。

3. 脳梗塞モデルラットの排尿反射関連核における 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)

脳梗塞ラットの PAG において、GIRK2 mRNA の発現レベルが正常の 1.25 倍と有意に増加した ($p=0.021$)。GIRK1 および 3 の mRNA レベルに有意な変動は認められなかった。

また、脳梗塞ラットの PAG において、5-HT_{1A} 受容体 mRNA の発現レベルが、正常ラットの 1.08 倍と増加傾向を示した ($p=0.056$)。

4. 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)

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 μ 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 μ 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。しかし、1 例ではあるが、Type Ia ニューロンにおいてグリシンが活動電位の発火を抑制するとともに排尿反射も抑制した。

5. 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) を用いて尿量を 24 時間計測し、総排尿量、排尿回数、および 1 回排尿量を測定した。同様の測定を 3 回行った結果、24 時間当たりの平均総尿量は 2.685 \pm 0.162 ml、平均排尿回数は 11.2 \pm 0.74 回、平均 1 回排尿量は 0.239 \pm 0.006 ml であった。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 α 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 α 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。

6. 加齢マウスおよび ER α 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)

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_{1A} 受容体は 1.33 倍 ($p=0.005$)とい

いずれも有意に高値を示した。

一方、ER α 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 $_{1A}$ 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 $_{1A}$ 受容体については増加傾向が見られた。

7. 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 μ M PIP $_2$ 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。

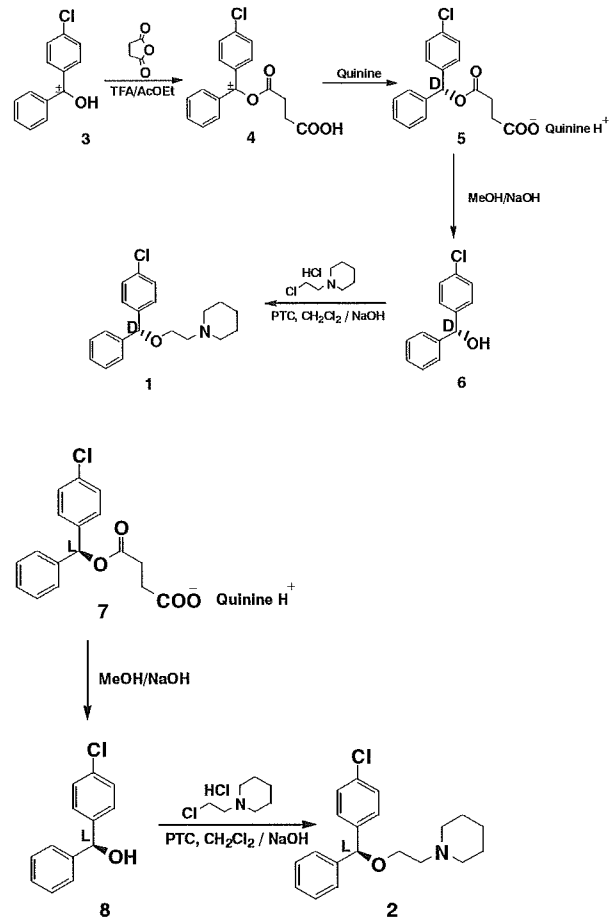
クロペラスチンを含む中枢性鎮咳薬の分配係数と GIRK チャンネル活性化電流に対する IC $_{50}$ は、相関係数 0.89 で良い負の相関性を示した。

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。

さらに、クロペラスチンと非麻薬性中枢性鎮咳薬のデキストロメトルファンは、5-HT $_{1A}$ 受容体活性化 GIRK 電流と同様の様式で、GABA $_B$ 受容体アゴニストのバクロフェンが誘発する GIRK 電流を抑制した。

8. 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

アミトリプチリンの 5-HT とノルアドレナリン再取り込み阻害の比は 1:1 である。膀胱容量低下の改善にこれらが関与した可能性は考えられる。しかし、アミトリプチリンには抗コリン作用もあり、このために膀胱容量が増加した可能性も考えられる。また、排尿困難の悪化は抗コリン作用によるものと考えられた。一方、ノルアドレナリンの取り込み阻害作用が強いマプロチニンと選択的 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。これに対し、GIRK チャン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。また本研究は、脳梗塞にともなって PAG の GIRK2 チャンネル mRNA の発現が増加することをはじめて明らかにした。さらに、脳梗塞により大脳皮質や線条体の GIRK3 チャンネル mRNA の発現が増加するとの報告もあ

る。したがって、脳梗塞に伴う排尿異常とそのクロベラスチンによる改善の少なくとも一部に GIRK チャネルが関与する可能性が考えられる。これらの結果は、「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」との我々の仮説を支持する。

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ベラスチンによる改善を阻害し、8-OH-DPAT は脳梗塞後の尿道抵抗上昇を改善した。よって、少なくともクロベラスチンによる脳梗塞後尿道抵抗上昇の改善に 5-HT の遊離とそれに続く 5-HT_{1A} 受容体の活性化がかかわる可能性が示唆された。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、クロベラスチンの作用が 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、クロベ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。

本研究において、ラセミ体のクロベラスチンを d-体と l-体に分離できたが、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。

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 μm 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トフォレシス法による検討では、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。しかしながら、1 例であっても、Type Ia ニューロンにおいてグリシンが活動電位の発火を抑制するとともに排尿反射も抑制したことは、注目する必要がある。排尿リズム全体を司るニューロンが PAG の特定部位に存在する可能性を示唆するからである。一方、薬物の作用点の解明の点からは、マイクロイオントフォレシス法よりも圧注入法が適していると考えられた。今後クロベラスチン、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新規排尿活動記録システムの開発

本研究ではまた、「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」を開発した。本システムにより、尿量の少ないマウスでも排尿を精度良く自動計測することができた。本研究から、加齢に伴う排尿活動の変化や、ER α 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。

また、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。目的に適應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に伴う排尿障害の治療薬として有用であることを示唆した。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_{1A} 受容体が関わる可能性も示唆された。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 PIP₂ 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⁺ 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⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons. *Journal of Pharmacological Sciences* 100(Suppl. 1), 137P (2006).

Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T, Takahama K. Preparation and application of the mice model for studying urinary disturbances after cerebral infarction. *Journal of Pharmacological Sciences* 97(Suppl. 1), 250P (2005).

Shiozuka M, Shirasaki T, Hashitani K, Soeda F, Takahama K. Single channel analysis of the inhibition of 5-HT-induced GIRK current by cloperastine. *Journal of Pharmacological Sciences* 97(Suppl. 1), 213P (2005).

Shirasaki T, Abe K, Soeda F and Takahama K. Inhibition of the GABA_B receptor-mediated inwardly rectifying K⁺ current by centrally acting antitussives in rat dorsal raphe neurons. *Br. J. Pharmacol.* (in preparation)

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

山本 巖、副田 二三夫、白崎 哲哉、高濱 和夫. 脳梗塞に伴う排尿障害マウスモデルの

作製とその応用. 日本排尿機能学会誌 (投稿準備中)

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過活動膀胱に対する抗うつ薬の影響. 日本排尿機能学会誌 (投稿準備中)

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. 35th 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_{1A}受容体アゴニスト8-OH-DPAT誘発シングルK⁺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チャン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チャン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チャンネルと排尿障害治療薬生体機能と創薬シンポジウム2005

T. Shirasaki, K. Yamasaki, M. Shiozuka, K. Hashitani, F. Soeda, and K. Takahama. Inhibition of GIRK channels-activated currents by centrally acting non-narcotic antitussives. 34th Annual meeting society for neuroscience.

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排尿障害に対するデキストロトルファンおよびクロペラスチンの改善作用. 第11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. 脳梗塞に伴う排尿障害マウスモデルの作成とその応用. 第78回日本薬理学会年会

塩塚道崇, 白崎哲哉, 橋谷華世, 副田二三夫, 高濱和夫. クロペラスチンによるセロトニン誘発電流抑制のシングルチャンネル解析. 第78回日本薬理学会年会

3. その他

山本 巖, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫. GIRKチャンネルは新薬開発のための標的分子になり得るかー新規排尿障害治療薬開発の可能性. 日薬理誌 125, 109 (2005)

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チャン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. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Shirasaki, K. Yamasaki, M. Shiozuka, K. Hashitani F. Soeda, K. Takahama	Inhibition of GIRK channels-activated currents by centrally acting non-narcotic antitussives	Society for Neuroscience 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner		Program No. 851.10	2004
G. Yamamoto, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama	Preparation and application of the mice model for studying urinary disturbances after cerebral infarction	J. Pharmacol. Sci.	97(Suppl.I)	250P	2005
M. Shiozuka, T. Shirasaki, K. Hashitani F. Soeda, K. Takahama	Single channel analyses of the inhibition of 5-HT-induced currents by cloperastine	J. Pharmacol. Sci.	97(Suppl.I)	213P	2005
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排尿障害に対するデキストロメトルファンおよびクロペラスチンの改善作用	日本排尿機能学会誌	15 巻 1 号	116	2004
山本 巖、 副田二三夫、 白崎哲哉、 高濱和夫	GIRK チャネルは新薬開発のための標的分子になり得るか—新規排尿障害治療薬開発の可能性	日本薬理学雑誌	125 巻 2 号	109	2005
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
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	2006
G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama	G-protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channel and therapeutic drugs for urinary disturbance	Journal of the Pharmaceutical Society of Japan	125(Suppl. 2)	20-23	2005
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	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	251P	2006

M. Shiozuka, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama	Effects of cloperastine on the 8-OH-DPAT-induced single K ⁺ currents	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	138P	2006
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 ⁺ (GIRK) channel-activated currents in rat dorsal raphe neurons	Journal of Pharmacological Sciences	100(Suppl. I)	137P	2006
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7°フォーラム/抄録集		35	2005
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		255	2006
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		116	2006
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	151	2005
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	114	2005
山本 巖、 副田二三夫、 白崎哲哉、 高濱和夫	脳梗塞に伴う排尿障害マウスモデルの作製とその応用	日本排尿機能学会誌			投稿準備中
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過活動膀胱に対する抗うつ薬の影響	日本排尿機能学会誌			投稿準備中
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

T. Shirasaki, K. Abe, F. Soeda, K. Takahama	Inhibition of the GABA _B receptor-mediated inwardly rectifying K ⁺ current by centrally acting antitussives in rat dorsal raphe neurons	Br. J. Pharmacol.			in preparation
S. Honda, T. Shirasaki, F. Soeda, K. Takahama	Inhibition of Na ⁺ and K ⁺ currents by cloperastine in rat acutely dissociated dorsal raphe neurons	Pharmacol. Res.			in preparation

III. 研究成果の刊行物・別刷

Abstract View

INHIBITION OF GIRK CHANNELS-ACTIVATED CURRENTS BY CENTRALLY ACTING NON-NARCOTIC ANTITUSSIVES

T. Shirasaki*; K. Yamasaki; M. Shiozuka; K. Hashitani; F. Soeda; K. Takahama

Dept. Environ. & Molec. Hlth. Sci., Grad. Sch. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan

G-protein coupled inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels widely distribute in the living body and contribute to many physiological functions including brain functions. We have recently found that centrally acting antitussives inhibited GIRK channel currents (I_{GIRK}) activated by 5-HT_{1A} and adrenergic α_2 receptors, although their chemical structures are diverse.

Furthermore, introduction of a piperidino group into the chemical structure potentiated I_{GIRK} inhibition as well as antitussive activities. These findings seem to be of interest, because only a few GIRK channel blockers have been known. In this study, we investigated mechanisms of I_{GIRK} inhibition by centrally acting antitussives. Method Conventional and perforated whole-cell patch-clamp techniques were applied to dorsal raphe neurons acutely dissociated from rats. Results At the first time, inhibitory action of centrally acting antitussives on 5-HT-induced I_{GIRK} ($I_{5\text{-HT}}$) was confirmed to be non-competitive and voltage-independent. The inhibition was potent at the pH around pKa. Relative $I_{5\text{-HT}}$ in the presence of 8.6×10^{-7} M cloperastine (CLP; pKa=8.87) were 0.67 ± 0.08 , 0.49 ± 0.06 and 0.36 ± 0.10 at pH 6.0, 7.3 and 9.0, respectively, when $I_{5\text{-HT}}$ in the absence of CLP is taken as 1. Those in the presence of 7.0×10^{-6} M diphenhydramine (DPH; pKa=8.76), which is the mother compound of CLP and has not a piperidino group, were 0.75 ± 0.05 , 0.50 ± 0.06 and 0.31 ± 0.06 , at respective pH described above. The inhibition by CLP and DPH of I_{GIRK} activated by 5-HT in the presence of intracellular GTP γ S was reduced by addition of 5×10^{-5} M PIP₂ to the internal solution. The percent inhibitions by CLP and DPH were 99.0 ± 14.3 and 72.7 ± 1.1 % in the control solution without PIP₂ and 47.2 ± 5.2 and 37.7 ± 1.5 % in the solution with PIP₂. The results suggest that CLP and DPH might inhibit GIRK channel function via interaction with hydrophobic site of the channel.

Citation: T. Shirasaki, K. Yamasaki, M. Shiozuka, K. Hashitani, F. Soeda, K. Takahama.

INHIBITION OF GIRK CHANNELS-ACTIVATED CURRENTS BY CENTRALLY ACTING NON-NARCOTIC ANTITUSSIVES Program No. 851.10. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner*. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

2004 Copyright by the Society for Neuroscience all rights reserved. Permission to republish any abstract or part of any abstract in any form must be obtained in writing from the SfN office prior to publication

Program No.851.10. *2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner*.
Washington, DC: Society for Neuroscience, 2004. Online.

P-30002 Preparation and application of the mice model for studying urinary disturbances after cerebral infarction

Gen Yamamoto, Fumio Soeda, Tetsuya Shirasaki and Kazuo Takahama

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

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). In this study, we planned to establish the conscious mice model for studying the urinary disturbances at 24hr after CI. Male ddY mice (29-30g) were used under anesthesia with pentobarbital sodium (60 mg/kg, i.p.). A polyethylene catheter (PE-10) was chronically implanted into the bladder. Single-cystometrograms were stably recorded from conscious mice sustained in a Ballman cage at 7 days after bladder catheter implantation. A nylon filament No.5-0 (Nescosuture) was heat-blunted to make a rounded tip, 210-240 μm in diameter. The filament was inserted into the left internal carotid artery and advanced a distance of 9mm from the carotid bifurcation toward the origin of the left middle cerebral artery. CI significantly reduced flow rate (Rf) and increased urethral resistance (Ru), compared to those in control mice. Administration of CP (10 mg/kg, i.v.) ameliorated both Rf and Ru. The results suggest that this model may be beneficial to study the urinary disturbances caused by CI.