

P-20078 Single channel analyses of the inhibition of 5-HT-induced currents by cloperastine

Michitaka Shiozuka, Tetsuya Shirasaki, Kayo Hashitani, Fumio Soeda and 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 (CAATs) inhibited the inwardly rectifying K^+ currents activated by 5-HT_{1A}, GABA_B and α_2 adrenergic receptors. CAATs also inhibited the currents irreversibly activated by 5-HT in the presence of intracellular GTP γ S, suggesting the inhibition of GIRK channels. However, mechanism of the inhibition is not known. Among antitussives studied, cloperastine (CP) is the most potent. Therefore, we investigated the effect of CP on single channel currents activated by 5-HT_{1A} receptor agonists. **Method** Dorsal raphe neurons were acutely dissociated from 7- to 18-day-old Wistar rats. Outside-out mode of patch clamp was employed for the experiment. **Result** 5-HT at 10^{-8} M and 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} receptor agonist, at 10^{-7} M both increased the number of opening of channels having conductances of 19-28 and 32-37 pS. Spiperone, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, decreased the action induced by 8-OH-DPAT. CP at 10^{-5} M had no effect on single channel conductances and mean open time but decreased the number of opening of channels activated by 5-HT or 8-OH-DPAT. CP did not induce flickering during channel open. The results suggest that CP might affect the open probability of GIRK channels activated by 5-HT_{1A} receptor.

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

熊本大院・薬学研究部・環境分子保健学

○山本 巖, 副田二三夫, 白崎 哲哉,
高濱 和夫

【目的】脳梗塞後、過活動膀胱や排尿困難が高頻度で起こり、QOL を著しく低下させる。しかし、脳梗塞等の脳神経疾患に随伴する排尿障害に対する優れた中枢性治療薬は未だに開発されていない。我々は、これまでに中枢性鎮咳薬であるデキストロメトルファン(DM)とクロペラスチン(CP)がウレタン麻酔下ラットにおいて排尿頻度を減少させ、排尿閾値を上昇させるという知見を得ている。本研究においては、無麻酔ラットにおいて中大脳動脈閉塞による脳梗塞後に生じる過活動膀胱および排尿困難に対する両薬物の作用を検討した。【方法】体重 250~280g の S.D 系雄性ラットを用いた。まず麻酔下で、膀胱内圧測定のための慢性カテーテルを設置した。排尿反射の測定は、動物をボールマンケージに固定して無麻酔下でシングルシストメトリー法によって行った。脳梗塞は、左中大脳動脈をナイロン糸により塞栓することで作製した。脳梗塞 24 時間後の排尿障害に対する DM および CP の作用を膀胱容量、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の 7 つのパラメーターについて評価した。薬物は静脈内に投与した。【結果】膀胱容量は、梗塞前 2.791 ± 0.117 ml、梗塞後 0.829 ± 0.079 ml で、梗塞後に著しく減少した。また、排尿潜時、排尿閾値、尿流率および膀胱コンプライアンスも有意に減少した。一方、尿道抵抗は梗塞前の値を 100%とした時、梗塞後は $289.09 \pm 52.29\%$ と有意に増加した。これに対して、NMDA 電流、グリシン誘発電流および G タンパク質共役型内向き整流性 K^+ (GIRK) チャネル活性化電流抑制作用をもつ DM(20mg/kg)は、脳梗塞に伴う膀胱容量および排尿潜時の変化を有意に改善し、過活動膀胱に対して効果を示したが、尿道抵抗をさらに増加させ、排尿後に残尿が認められた。DM と比べて、選択的に GIRK チャネル活性化電流を強く抑制するクロペラスチン(5mg/kg)は、DM よりも強力に膀胱容量と排尿潜時の変化を改善し、かつ尿道抵抗と膀胱コンプライアンスもコントロールレベルまで回復させ、残尿も認められなかった。【考察】CP は、DM と異なり、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可能性が考えられる。この作用のメカニズムさらに脳梗塞に伴う排尿障害のメカニズムの一部に、GIRK チャネルが関わっているという作業仮説は、本研究の進展のために有益と考えられる。

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—新規排尿障害治療薬開発の可能性

21世紀は始まったばかりである。この世紀がどのような世紀になるのか予測が困難な中で、WHOは21世紀に人類が克服すべき3大疾患の一つに排尿障害を掲げた。他は、痴呆症と骨粗鬆症である。わが国だけでも3,300万人を超える患者数、臨床的に満足いく優れた治療薬が未開発、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、患者だけでなく健常者のQOLへの影響、などがその理由として考えられよう。

排尿・蓄尿反射は、尿を膀胱内に蓄積しておく蓄尿反射とこれを膀胱から排出する排尿反射からなる自律反射である。この反射系を構成するのは、下位脳幹と腰仙髄に存在する反射中枢、求心性および遠心性の神経、平滑筋からなる膀胱と尿道および尿道括約筋などである。また、この反射は上位中枢の支配下にある。この系の障害や異常が、蓄尿・排尿について様々な病的症状をもたらす。例えば、頻尿を主症状とする過活動膀胱や排尿困難などの神経因性膀胱は、脳梗塞を始めとする脳神経疾患にもしばしば随伴する。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 (J Urol. 1998;159:571-576; Am J Physiol. 1999;276:R935-R942; NeuroUrol Urodyn. 1992;11:535-545; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279:R1230-R1238)。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に伴う排尿障害に対して今のところ有効ではない。このような中で、我々は、非麻薬性の中枢性鎮咳薬クロペラスチンが、慢性期の脳梗塞モデルラットの過活動膀胱や排尿困難を改善するという興味深い知見を得た。我々は、このクロペラスチン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)チャンネルの活性化電流を抑制するという知見を得ている (Neuropharmacology. 2000;39:2302-2308)。

GIRKチャンネルは4つのサブユニット(GIRK1~4)がクローニングされており、脳では主にGIRK1とGIRK2が、心臓ではGIRK1とGIRK4がヘテロメリックチャンネルとして四量体を形成している (Biochem Biophys Res Commun. 1995;208:1166-1173; J Biol Chem. 1995;270: 28660-28667; J Neurosci. 1996;16: 7137-7150)。またこのチャンネルは、5-HT_{1A} やオピオイド、D₂, α₂ 受容体などの多くの受容体とGタンパク質を介して共役している。これらの受容体の活性化

により、Gタンパク質のβγサブユニットが遊離、チャンネルが開口し、細胞外にカリウムイオンが流出する。このことにより細胞は過分極状態となり、細胞の活動性が安定化される。このように、GIRKチャンネルは、種々の伝達物質によるシナプス後膜での抑制作用を仲介し、神経活動の抑制的調節において重要な役割を果たすことが知られている。

このGIRKチャンネルは、排尿・蓄尿反射に関わる神経核や領域に広く分布している。これらの核や領域の中で、縫線核のセロトニン含有神経は、腰仙髄レベルの後角、自律神経ならびにオヌフ核に下行性の線維を送っており、交感神経および体性神経の興奮を介して蓄尿反射を亢進する。縫線核ニューロンの活動は5-HT_{1A} 受容体により負のフィードバック制御を受けている。5-HT_{1A} 受容体はGIRKチャンネルに共役しており、GIRKチャンネルの抑制は、この縫線核ニューロンを興奮させ、セロトニン放出を促進すると考えられる。最近、5-HTおよびノルアドレナリン再取込み阻害薬であるデュロキセチンが、膀胱内酢酸注入によって減少したネコの膀胱容量を増加させることが報告された (Life Sci. 2002;71:1227-1236)。また、非麻薬性鎮痛薬で、5-HTおよびノルアドレナリン再取込み阻害作用をもつトラマドールは、脳梗塞3日後にラットの過活動膀胱を抑制した (Eur Urol. 2003;44:495-499)。さらに、5-HT再取込み阻害薬の中で、GIRKチャンネル抑制作用をもつフルオキセチンは膀胱容量を増加させるという報告がある (Life Sci. 2003;71:1227-1236)。

従って、脳梗塞に伴う過活動膀胱に対するクロペラスチンの改善作用は、少なくとも一部GIRKチャンネルの抑制を介した5-HT遊離の増加による可能性が考えられる。GIRKチャンネルが頻尿や排尿困難の治療薬の標的分子となり得る可能性について、脳梗塞領域の大脳皮質や線条体でのGIRK3のmRNAの発現が増加するというマイクロアレイ解析による報告もある (J Neurosci Res. 2004;77:843-857)。

このGIRKチャンネルは、これまで循環器系作用薬を中心にして医薬品の心臓に対する副作用の観点から注目されてきた。しかし、GIRKチャンネルは、新たな排尿障害治療薬の開発のための標的分子となり得る可能性を秘めており、薬理学的研究の進展が望まれる。

熊本大・院・医学薬学研究部・環境分子保健
山本 巖, 副田二三夫, 白崎哲哉, 高濱和夫
Gen Yamamoto, Fumio Soeda, Tetsuya Shirasaki, Kazuo Takahama
e-mail: takahama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

キーワード: GIRKチャンネル, 排尿障害, 脳梗塞

Program Number: 218.10

Day / time: Sunday, Nov. 13, 9:00 AM – 10:00 AM

Presentation Type: Poster

Presentation Location: Washington Convention Center – Hall A–C, Board # UU16

AMELIORATING EFFECTS OF CLOPERASTINE ON URINARY DISTURBANCES CAUSED BY CEREBRAL INFARCTION IN CONSCIOUS RATS

G. Yamamoto*; S. Kuroki; F. Soeda; T. Shirasaki; K. Takahama

Environmental & Molecular Hlth Sci, Graduate School of Pharmaceutical Sci, Kumamoto, Japan

Stroke frequently results in incontinence by reducing suprapontine micturition control. Intraluminal occlusion of the middle cerebral artery (MCA), which produces overactive bladder and dysuria, has been introduced as a useful model of stroke-induced urinary disturbances. We have previously reported that dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP), centrally acting antitussives, reduced the frequency of micturition reflex and increased the threshold pressure of the reflex in anesthetized rats. Antidepressants have been employed for the treatment of enuresis or nocturia in clinics.

In this study, we comparatively investigated effects of DM, CP and two types of antidepressants on urinary disturbances caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. As antidepressants, amitriptyline (AMI), a reuptake inhibitor of noradrenaline and serotonin, and maprotiline (MP), a selective noradrenaline reuptake inhibitor, were used.

[Method] First of all, single cystometrogram was performed in conscious male S.D. rats (250–280g) restrained using the Ballman cage. Then, CI was induced by occlusion of the left MCA using a monofilament nylon thread. At 24hr after CI, effect of each drug on urinary disturbances was estimated for seven parameters: bladder capacity (BC), maximum pressure (P_{max}), threshold pressure (P_{th}), micturition latency (TL), flow rate (R_f), urethral resistance (R_u) and bladder compliance (C_b).

[Result] CI significantly reduced BC, P_{th} , TL, R_f and C_b , and increased R_u . After CI, intravenous dosing of saline and MP (10mg/kg, i.v.) had little effect on these parameters. But, DM (10 or 20mg/kg, i.v.), CP (5mg/kg, i.v.) and AMI (10mg/kg, i.v.) significantly increased BC and TL. Interestingly, CP, unlike DM and AMI, blocked a decrease in R_f and an increase in R_u caused by CI. Only AMI decreased P_{max} and had residual urine after micturition reflex. These results suggest that CP might become a seed of new drugs for treatment of urgency associated with OAB and dysuria.

Citation:

G. Yamamoto, S. Kuroki, F. Soeda, T. Shirasaki, K. Takahama. AMELIORATING EFFECTS OF CLOPERASTINE ON URINARY DISTURBANCES CAUSED BY CEREBRAL INFARCTION IN CONSCIOUS RATS

Program No. 218.10. 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner.
Washington, DC: Society for Neuroscience, 2005. Online.

膀胱侵害刺激による Fos タンパクの脳内排尿反射関連核における
発現とそれに対するデキストロメトルファンへの作用

副田二三夫、本田 淳、白崎哲哉、山本 巖、高濱和夫

熊本大学大学院 医学薬学研究部 環境分子保健学分野

連絡先： 〒862-0973 熊本市大江本町 5-1
熊本大学大学院 医学薬学研究部 環境分子保健学分野
高 濱 和 夫
TEL/FAX 096-371-4334
takahama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Expression of Fos-like protein in the micturition center caused by bladder irritation and effect of dextromethorphan on it

Fumio Soeda, Atsushi Honda, Tetsuya Shirasaki, Gen Yamamoto,
Kazuo Takahama

Department of Environmental and Molecular Health Sciences,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto Univ., Kumamoto 862-0973, Japan

キーワード

日本語：Fos タンパク, 膀胱侵害刺激, デキストロメトルファン

英語：Fos-like protein, bladder irritation, dextromethorphan

要 約

神経活動マーカーである Fos タンパクの脳内発現を指標として、排尿機能やこれに対する薬物の作用が評価できるか否かについて検討した。SD 系ラットをウレタン麻酔下に用いた。膀胱内に 0.1%酢酸溶液を持続注入することにより律動性の膀胱収縮を惹起させると、排尿反射に関与するといわれる橋のバリントン核と青斑核に Fos タンパクの強い発現が認められた。この発現は排尿反射抑制作用をもつデキストロメトルファン (DM) の静脈内投与により有意に抑制された。これらの成績から、0.1%酢酸溶液の膀胱内持続注入による Fos タンパクの脳内発現は、排尿機能やこれに対する薬物の作用を評価するための一つの指標になり得ることが示唆される。

In this study, we investigated whether or not expression in the brain of Fos-like protein caused by bladder irritation is useful to estimate micturition function. Male rats (SD strain, 250–300g) were used under anesthesia with urethane (1.2g/kg, i.p.), following bladder irritation by injection of 0.1% acetic acid solution into the bladder, Fos-like protein positive cells were found in the barrington's nucleus and locus coeruleus. The number of Fos-like protein positive cells in the both nucleus was significantly decreased by dextromethorphan that has an inhibitory effect on micturition reflex in rats.

These results suggest that the expression of Fos-like protein caused by the bladder irritation may be useful to study central mechanisms of micturition reflex and to evaluate effect of drugs affecting the reflex.

緒 言

排尿反射に関する研究は、古典的な Barrington（排尿反射の発見）の研究^{1),2)}以来、橋の背外側被蓋に排尿中枢が存在すること、青斑核や中脳水道中心灰白質などもその機能を持つこと^{3),4)}、橋の背外側被蓋から脊髄のオヌフ核への投射が存在すること⁵⁾などが明らかにされている。しかし、排尿反射に関する中枢内神経伝達機構については、なお、多くの検討課題が残されている。このような中で、1997年に Gestreau らは咳反射に関与する脳幹の神経核を同定するために、上喉頭神経を電気刺激して咳を誘発させたネコの脳幹において、神経活動マーカーである Fos タンパクの発現を検討したところ、孤束核や後疑核など呼吸に関連した延髄の特異的な部位に Fos タンパクの発現が認められることを報告した。さらにその発現は麻薬性鎮咳薬コデインにより抑制されたと報告している⁶⁾。この Gestreau らの咳反射弓に関する研究手法は、同じく脳幹に反射中枢をもつ排尿反射の中枢内神経伝達の解明にも応用できるのではないかと考えた。

ところで、我々はこれまでに中枢性の非麻薬性鎮咳薬、デキストロメトルファン (DM) が麻酔下ラットにおいて、排尿流速、尿道抵抗、排尿閾値、収縮時間および排尿潜時といった排尿反射のパラメーターに影響を与え、排尿反射に対して抑制的に作用するということを報告した¹¹⁾。

そこで、本研究において、排尿反射の中枢内神経伝達を解明する糸口を得るために、今回は排尿反射を抑制する DM を用い、まず膀胱内侵害刺激により排尿反射関連核であるバリントン核や青斑核に Fos タンパクが発現するのか否かについて検討し、この発現に対する DM の作用を調べた。

方 法

I. 試薬

Fos タンパクの 1 次抗体は Santa Cruz 社、臭化水素酸デキストロメトルファン (DM) は SIGMA 社より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級規格品を用いた。

II. 実験動物

九動 (株) より購入した 250~300g の SD 系雄性ラットを、熊本大学薬学部実験動物施設にて 1 週間ハンドリングをおこない実験に用いた。

III. 膀胱内圧の測定および薬物の投与

ラットをウレタン麻酔 (1.2 g/kg, i.p.) 後、膀胱頂部から膀胱内部に刺入したカテーテル (PE50 のポリエチレンチューブの先端に 23G の注射針を付けたもの) を圧トランスデューサーに接続した。酢酸の 0.1% 生理食塩液 (0.1% 酢酸溶液) をシリンジポンプ (Razel Scientific Instruments, INC.) により、0.106 ml/min の注入速度で膀胱内に 2 時間持続注入した。DM は酢酸溶液の注入前 15 分に 10 mg/kg を静脈内投与した。コントロール群には同じ用量の生理食塩液を DM と同じスケジュールで投与した。

IV. 免疫組織染色法による Fos タンパクの発現

0.1% 酢酸溶液の膀胱内注入終了後、4% パラホルムアルデヒドによる灌流固定をおこない脳の摘出をおこなった。標本はクリオスタット (CM3050, LEICA) を用いて、厚さ 40 μ m の冠状凍結切片を作製した。免疫組織染色は、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法 (ABC 法) によりおこない、Fos タンパクの発現を調べた。

V. データ解析

Fos タンパクが発現している細胞 (Fos タンパク陽性細胞) は正立型顕微鏡にて観察した。画像の取得には顕微鏡デジタル画像解析システム (DP70, OLYMPUS) を用いておこなった。また、Fos タンパク陽性細胞の計測には二次元画像解析ソフト WinROOF (ver5.01 三谷商事) を用いて、橋レベルである Bregma-10040 μ m の部位とその前後、計 3 枚の脳切片から Fos タンパク陽性細胞数を計測し、データは平均値 \pm 標準誤差で表わした。なお、統計処理は unpaired t-test にておこない、 $p < 0.05$ のとき有意とみなした。

本研究は熊本大学大学院医学薬学研究部の動物実験倫理委員会により承認され、日本薬理学会の「実験動物のケアと使用に関するガイドライン」に基づいて実施された。

結 果

橋排尿中枢における0.1%酢酸溶液の膀胱内注入によるFosタンパクの発現およびDMの影響

図1に示すように、Fosタンパク陽性細胞は排尿反射に関与するといわれる青斑核とバリントン核で観察された。その数は青斑核で 101.3 ± 4.6 個、バリントン核で 60.8 ± 11.5 個であった。中枢性鎮咳薬DMの静脈内投与により、Fosタンパク陽性細胞の数は青斑核では 52.8 ± 6.7 個、バリントン核では 26 ± 6.4 個となり、いずれの神経核においても有意に減少した。

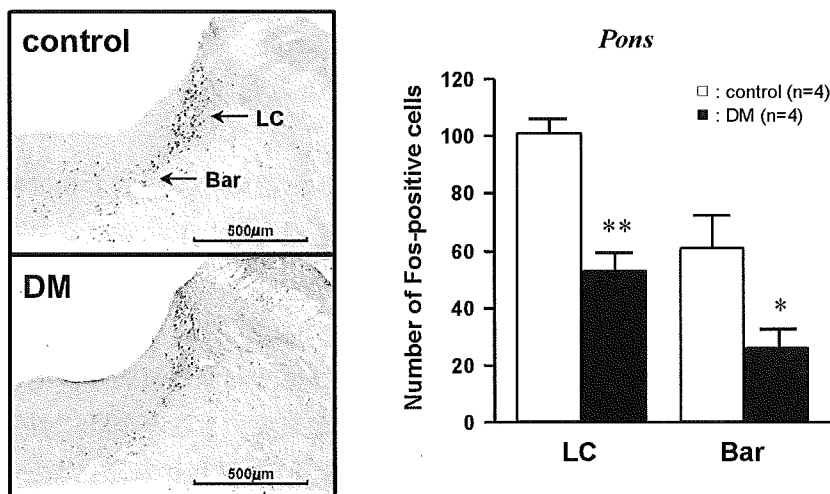


図1. 橋における膀胱内酢酸溶液注入によるFosタンパクの発現に対するDMの影響
橋 (Bregma -10040µm) におけるFosタンパクの発現は、DM (10mg/kg) の静脈内投与により青斑核およびバリントン核において有意に減少した。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. LC: 青斑核, Bar: バリントン核

考 察

我々は排尿反射の中枢内神経伝達を解明するにあたり、まず排尿反射に関わる諸核を同定し、諸核の神経連絡とその機能的関連を明らかにする必要があると考えた。過去にいくつかの神経連絡に関する知見はあるが、その機能的な関連性までを明らかにしたものは少ない。排尿反射に関わる Fos タンパクの発現実験のほとんどは、脊髓レベルでおこなわれており、脊髓 L6 レベルの脊髓後角、背側交連、仙髄副交感神経核において Fos タンパクの発現が認められている¹²⁾。今回結果には示していないが、我々の予備実験でも脊髓レベルでは同じ結果が得られた。

本研究においては、橋レベルにおける Fos タンパクの発現は青斑核およびバリントン核で見られ、さらに排尿反射に対して抑制的に作用する DM の静脈内投与により、これら二つの神経核における Fos タンパクの発現は有意に抑制された。青斑核およびバリントン核は排尿反射に関与する脳部位であることから、今回観察された Fos タンパク陽性細胞は排尿に関連している可能性が高いと思われる。

また、これらの発現が排尿反射を抑制する用量の DM の静脈内投与により抑制されたことから、膀胱侵害刺激による 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有用であることが示唆された。

本研究では、膀胱の侵害刺激により青斑核とバリントン核で Fos タンパクが発現することを見出したが、Rizvi らは、排尿反射に関与するといわれる内側視索前野の電気刺激や化学刺激により、青斑核やバリントン核で Fos タンパクが発現することを既に報告している¹³⁾。既報も雄性の SD ラット (250-350g) を用いているが、いずれの刺激においても、Fos 陽性細胞数はバリントン核に比べ青斑核で 3 倍多いという結果であった。本研究では、バリントン核に比べ青斑核で 1.7 倍多いという結果であり、既報よりもバリントン核の発現レベルが高いことがわかる。この違いについての原因は不明であるが、既報は特定の排尿反射関連核の刺激であり排尿反射を測定していないのに対し、本研究は酢酸溶液の膀胱内注入によりラットの膀胱を収縮、弛緩させ排尿反射を引き起こしている。この違いがバリントン核の発現レベルに影響を与えている可能性も考えられる。

また、本研究で見いだされた DM の効果が末梢なのか中枢なのかは、現在のところ不明である。しかし、DM は中枢性鎮咳薬であること、さらに今回用いた DM の濃度は鎮咳効果を発現する濃度であることから、DM が中枢に作用していることは十分考えられる。今後は、DM を脳内に投与し、Fos タンパク発現に対する効果を検証する必要があると思われる。

ところで、橋レベルでは青斑核、バリントン核以外に排尿機能に関連する中枢部位として蓄尿中枢が知られている。しかし、今回の検討では橋レベルにおいて上記の二つの核以外における Fos タンパクの発現は認められなかった。このことは、我々が確認した Fos タンパク陽性細胞は排尿相と蓄尿相からなる排尿機能のうち排尿相に関連したニューロンである可能性を示唆する。しかし、詳細についてはさらなる検討が必要である。

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, LB. 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-blocks 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.I):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

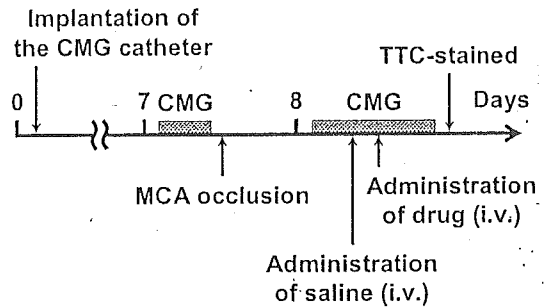


Fig. 1. Protocol for present experiments. CMG: cystometrogram, MCA: middle cerebral artery. TTC: 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

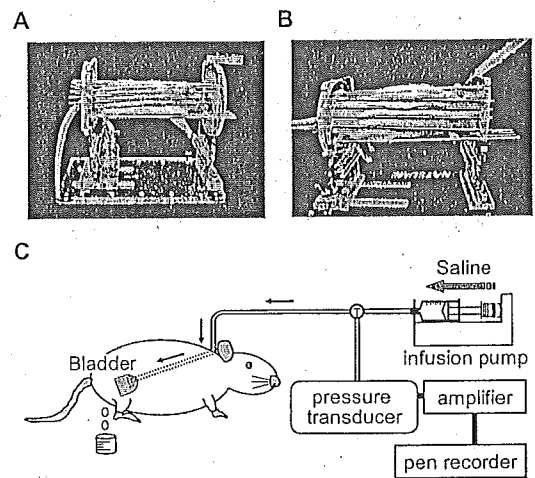


Fig. 2. Method of cystometrogram. Restraining of rat (A) or mouse (B) in the Bollman cage. C: Schematic diagram of CMG recording in conscious rats or mice. Cystometry was performed with a physiological saline warmed at 37°C. Saline was infused into the bladder at a rate of 0.126 ml/min (rats) or 0.017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

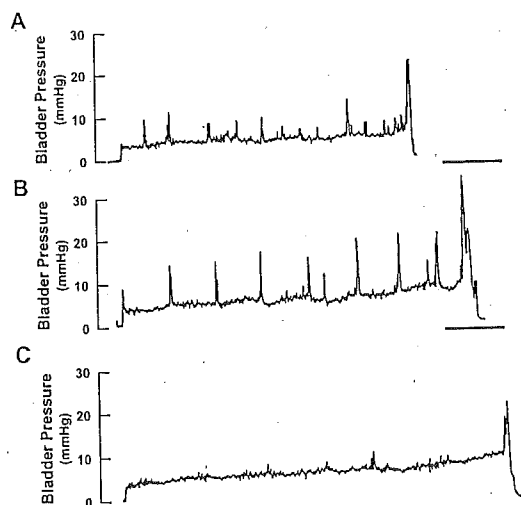


Fig. 3. Effects of cloperastine (CP) on CMGs recorded at 24 hrs after MCA occlusion in a conscious mouse. A: A typical CMG recorded before a cerebral infarction. B: A typical CMG at 24 hrs after left MCA occlusion. C: A typical CMG after CP (10mg/kg) administration under MCA occlusion. All recordings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

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。

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.

PK-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.

PIK-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. Intercellular 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。