

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ペラスチン(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。

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た (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学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

脳梗塞に伴う排尿障害マウスモデルの作製とその応用

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

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

キーワード

日本語 : 脳梗塞、排尿障害、中枢性鎮咳薬

英語 : cerebral infarction, urinary disturbance, centrally acting antitussive

要 約

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が、脳梗塞 24 時間後の無麻酔ラットにおいて生じる過活動膀胱、および排尿困難を改善することを見出した。本研究では、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クロペラスチンの影響について検討した。膀胱瘻を作製した ddY 系および C57BL/6j 系雄性マウスを、1 週間後にボールマンケージで固定し、無麻酔下に膀胱内圧を測定した。測定後、左中大脳動脈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。その結果、ddY マウスにおいて、脳梗塞後に排尿潜時の延長、尿流率の低下、尿道抵抗の増加、および無排尿性収縮の増加が認められた。C57BL/6j マウスにおいても、尿流率の減少および尿道抵抗の増加が認められた。クロペラスチンは、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、無排尿性収縮回数の減少も示した。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、この排尿困難をクロペラスチンが改善することが示唆された。

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 and effects of CP for these urinary disturbances. Single-cystometrograms were stably recorded from conscious male ddY and C57BL/6j mice, a polyethylene catheter (PE-10) chronically was implanted into the bladder, sustained in a Ballman cage at 7 days after bladder catheter implantation. After recordings, the origin of the left middle cerebral artery was occluded by a nylon filament and then single-cystometrograms were re-recorded from conscious mice after 24hr of CI. In ddY mice, CI reduced flow rate (Rf), increased urethral resistance (Ru), extended micturition latency and increased the number of non-voiding contractions, compared to those in control mice. In C57BL/6j mice, CI also reduced Rf and increased Ru. Administration of CP ameliorated both Rf and Ru, and reduced the number of non-voiding contractions. The results suggest that ddY and C57BL/6j mice exhibited difficulty in urination after 24hr of CI, and CP ameliorated this difficulty in urination.

緒 言

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 3,300 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が、慢性期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ことを見出した。また、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。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⁷ 5-HT_{1A} やオピオイド、D₂、 α_2 受容体などと共役している。しかし、クロペラスチンによる改善効果が、この GIRK チャネルの抑制に基づくものか否か明確ではない。そこで、GIRK チャネルの関与について手がかりを得るために、遺伝子改変マウスの利用も視野にいれ、本研究ではマウスにおける脳梗塞後の排尿機能と、これに対するクロペラスチンの影響について検討した。

現在のところ、脳梗塞モデルマウスの排尿機能を検討した報告はない。そこで、本研究においては、一般的に広く用いられている ddY 系と、ノックアウトマウス作製によく使用されている C57BL/6j 系の脳梗塞モデルマウスを作製し、梗塞 24 時間後の排尿機能についてシングルシストメトリー法を用いて詳細な検討を行った。

方 法

1. 膀胱瘻作製

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 (60mg/kg, i.p. Dainippon Pharmaceutical Co., LTD., Japan) 麻酔後、開腹し膀胱を露出させた。Pandita らの方法⁸⁾に従い、先端を加熱し襟を作製したポリエチレンチューブ (Intramedic PE-10, Becton Dickinson & Co., Clay Adams, USA) を膀胱頂部より挿入した。チューブの他端は、皮下を通して背側頸部より外部に出し固定した。

2. 膀胱内圧測定

膀胱瘻作製 7 日後、マウスをジエチルエーテルで麻酔しボールマンケージ 4 型 (KN-326, Natsume Seisakusho Co., LTD., Japan) に固定した。膀胱瘻の露出端を三方活栓とポリエチレンチューブ (Intramedic PE-50, Becton Dickinson & Co., Clay Adams, USA) を介して、1cc の注射筒に接続した。注射筒をインフュージョンポンプにセットし、生理食塩水を 0.017ml/min の速度で膀胱内に注入した。三方活栓の他端は、圧トランスデューサー (DX-360, Nihon Kohden Co., Japan) に接続し、膀胱内圧をアンプ (AP-641G, Nihon Kohden Co., Japan) を介してペンレコーダー (RM-6100, Nihon Kohden Co., Japan) で描記した。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。

3. 脳梗塞作製

膀胱内圧測定後、ペントバルビタールで麻酔し頸部を切開した。左総頸動脈を迷走神経から剥離し、次いで外頸動脈および内頸動脈を単離した。総頸動脈からコーティング (Xantopren, Heraeus Kulzer Co., Japan; 180-210 μ m) を施した 8-0 のナイロン糸 (Ethilon, Ethicon, Johnson & Johnson Co., Japan) を挿入し、左中大脳動脈の起始部を閉塞した。

4. 薬物投与

脳梗塞 24 時間後、再度膀胱内圧測定を行い、記録が安定したところで、0.1ml の生理食塩水に溶解したクロペラスチン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5-20 mg/kg を尾静脈より投与した。

5. TTC 染色

膀胱内圧測定終了後、脳を摘出した。マウス用ブレインスライサー (MB-A1-C, Muromachi Kikai Co., Japan) にて厚さ 1mm の冠状スライスを前額面より 6 枚作製し、1% の TTC (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 溶液に 37°C で 30 分間浸して染色した。染色後、スライスをデジタルカメラで撮影し、Win roof (MITANI co., Japan) にて梗塞体積を算出した。

6. データ解析

1 回の膀胱内圧曲線 (CMG) ごとに計測を行い、これに排尿量と残尿量を加えて以下に示す 8 個のパラメータについて評価した。①排尿潜時; 排尿閾値に到達するまでの時間 (min)、②排尿閾値; 排尿反射を起こす膀胱内圧 (mmHg)、③最大膀胱内圧; 排尿時の最大膀胱内圧 (mmHg)、④膀胱容量; 排尿量と残尿量の和 (ml)、⑤尿流率 (排尿量/排尿時間); 単位時間あたりに排出される尿量 (ml/min)、⑥尿道抵抗 (最大膀胱内圧/尿流率); 尿道括約筋の緊張度 (mmHg \cdot min/ml)、⑦膀胱コンプライアンス (排尿潜時/排尿閾値); 膀胱の

柔軟性の指標 (min/mmHg)、⑧無排尿性収縮回数；1回の排尿反射当りの排尿を伴わない膀胱の収縮回数。各パラメータ値は、実験により実測値または control を 1 とした相対値で示した。成績は全て平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、Student 's の t 検定を用い、危険率 $P < 0.05$ のとき有意差ありとした。

結果

1. ddY マウスにおける脳梗塞 24 時間後の排尿機能の変化

膀胱瘻設置後 7 日目のマウスを用い、シングルシストメトリー法により膀胱内圧の測定を行った。安定して記録された 3 回の膀胱内圧曲線について、8 個のパラメータを算出し、その平均値をもってその個体の Control 値とした。同様に脳梗塞 24 時間後の測定についても、3 回の膀胱内圧曲線ごとに各パラメータを算出し、その平均値を CI 値とした。脳梗塞前および脳梗塞後の代表的な膀胱内圧曲線を図 1 に示す。脳梗塞 24 時間後において、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 (図 2)。

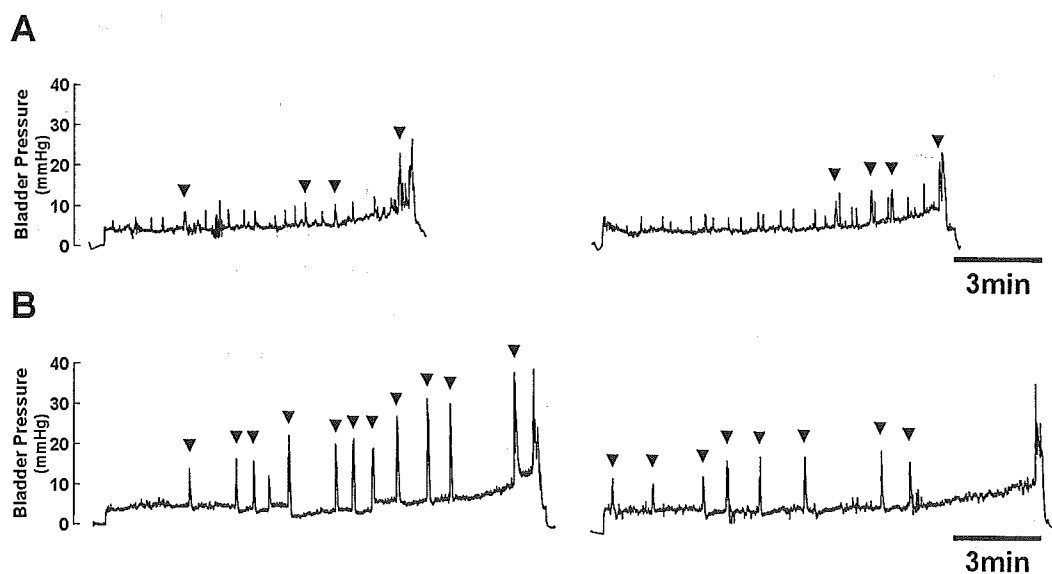


図1 A: ddYマウスにおける脳梗塞前の膀胱内圧曲線. B: 脳梗塞24時間後の膀胱内圧曲線.

▼: 無排尿性収縮, AおよびBの膀胱内圧曲線は同一マウスより得た。

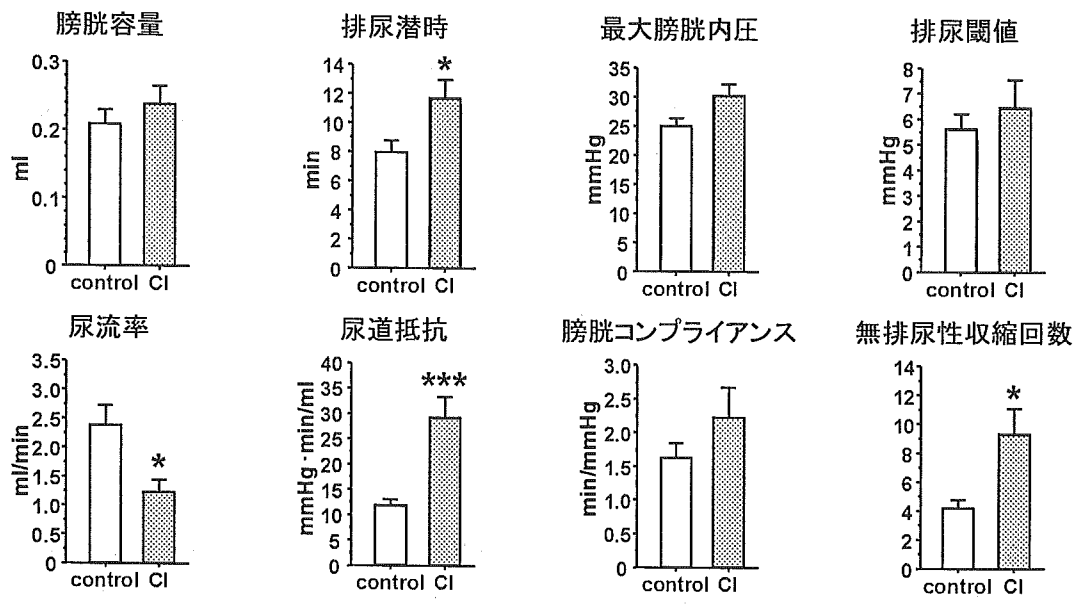


図2 ddYマウスにおける脳梗塞24時間後の排尿機能の変化
 CI: cerebral infarction. control群: 11例、CI群: 9例. * P<0.05, *** P<0.005

2. ddY マウスにおける脳梗塞 24 時間後の排尿障害に対するクロペラスチンの作用

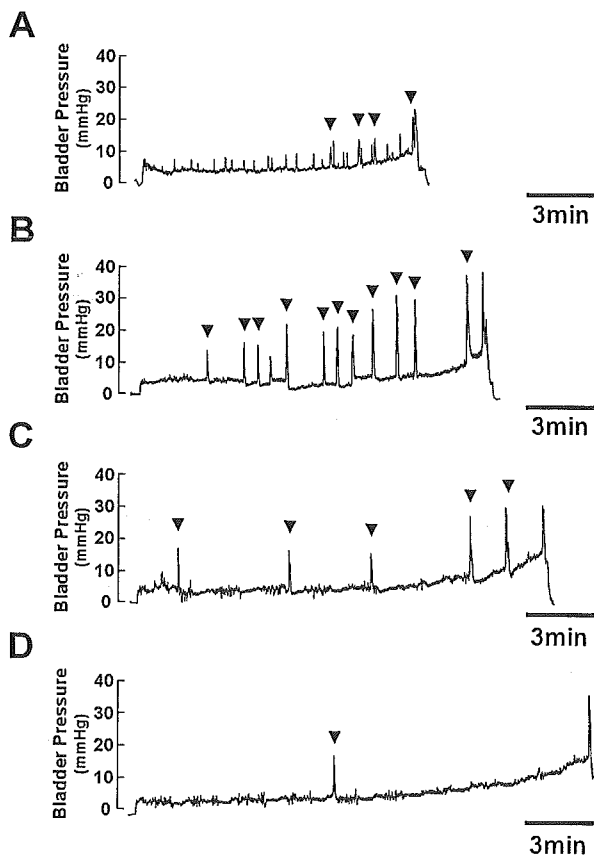


図3 A: ddYマウスにおける脳梗塞前の膀胱内圧曲線。
 B: 脳梗塞24時間後の膀胱内圧曲線。
 C: クロペラスチン(5mg/kg)投与後の膀胱内圧曲線。
 D: クロペラスチン(10mg/kg)投与後の膀胱内圧曲線。
 ▼: 無排尿性収縮,
 A~Dの膀胱内圧曲線は同一マウスより得た。

脳梗塞後の安定した膀胱内圧が記録されたところで、クロペラスチン (5-20 mg/kg, i.v.) を投与した。投与後 60 分間に記録された 2~3 回の膀胱内圧曲線について、各パラメータの平均値を得た。梗塞後の値は、梗塞前の Control 値を 1 としてノーマライズした。代表的な膀胱内圧曲線を図 3 に示す。クロペラスチンは、尿流率および尿道抵抗に対して濃度依存的な改善を示した。また、10・20mg/kg において無排尿性収縮回数の顕著な抑制が見られた (図 4)。

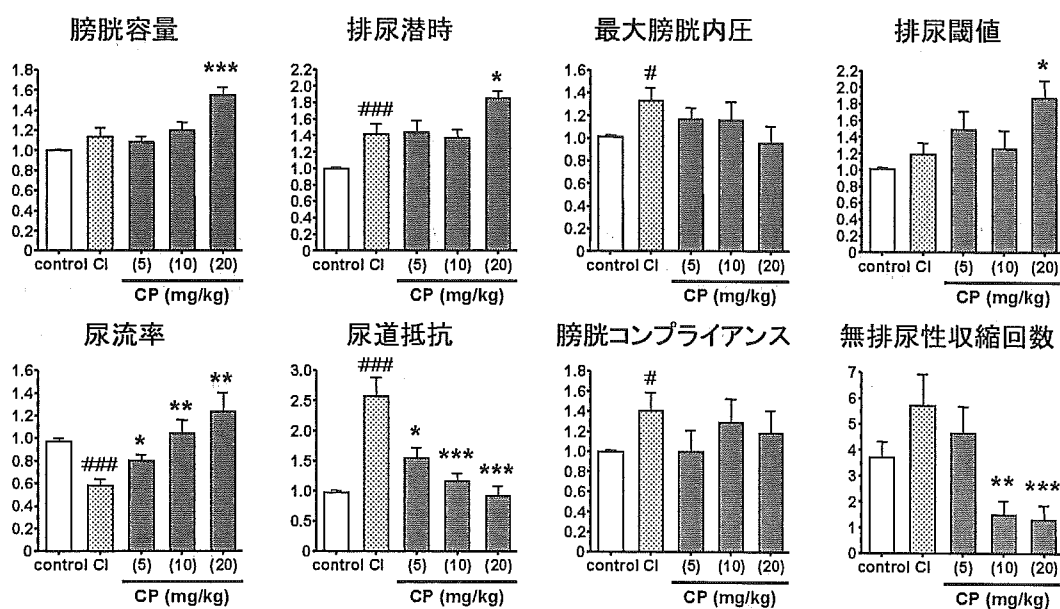


図4 ddYマウスにおける脳梗塞24時間後の排尿障害に対するクロペラスチンの作用
各パラメータはcontrol を1とした相対値で示す。CI: cerebral infarction, CP: cloperastine, 各群の例数は左から、12例、12例、3例、7例、7例。 # P<0.05, ### P<0.005 vs. control. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 vs. CI.

3. ddY および C57BL/6j マウスにおける TTC 染色

ddY および C57BL/6j マウスについて、それぞれ脳梗塞 24 時間後に脳を摘出し、厚さ 1mm の冠状スライス を 6 枚作製した。TTC 染色によって脳梗塞領域の確認を行ったところ、その範囲は側頭・頭頂葉、線条体、基底核、視床下核に及んだ。また、C57BL/6j マウスの方がより梗塞領域が広範囲であり、腹側海馬領域でも梗塞が確認された (図 5)。歩行障害や体の傾斜、前肢の屈曲等も C57BL/6j マウスの方がより強かった。

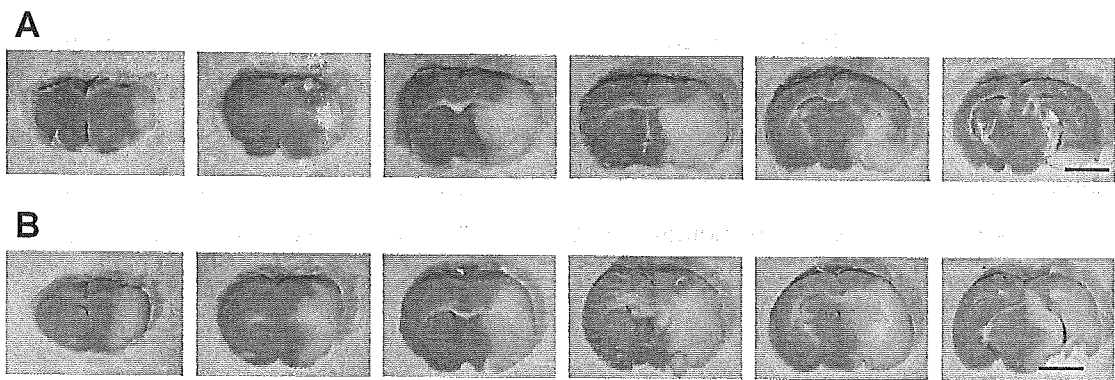


図5 A: ddYマウスにおけるTTC染色. B: C57BL/6j マウスにおけるTTC染色. Bar: 3mm

4. C57BL/6j マウスにおける脳梗塞 24 時間後の排尿障害に対するクロペラスチンの作用

C57BL/6j マウスにおいて、脳梗塞前後の排尿機能変化について検討したところ、ddY マウスと同様に、尿流率の有意な減少、および尿道抵抗の有意な増加が認められた (図 7)。しかし、無排尿性収縮回数の増加はみられなかった (図 6)。また、クロペラスチン (20mg/kg) の作用についても、ddY マウスと同様に尿流率および尿道抵抗の有意な改善が認められた (図 7)。

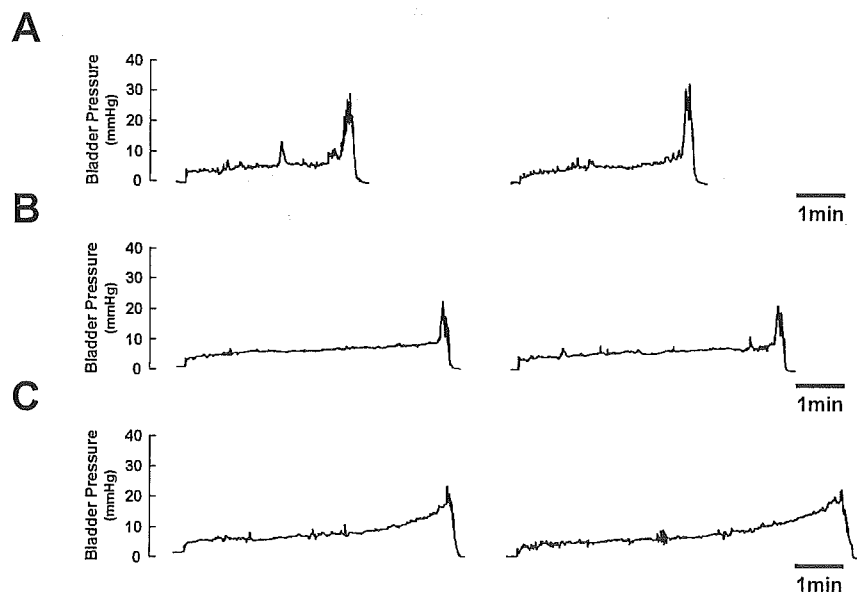


図 6 A: C57BL/6jマウスにおける脳梗塞前の膀胱内圧曲線.
 B: 脳梗塞24時間後の膀胱内圧曲線.
 C: クロペラスチン(20mg/kg) 投与後の膀胱内圧曲線.
 A~Cの膀胱内圧曲線は同一マウスより得た。

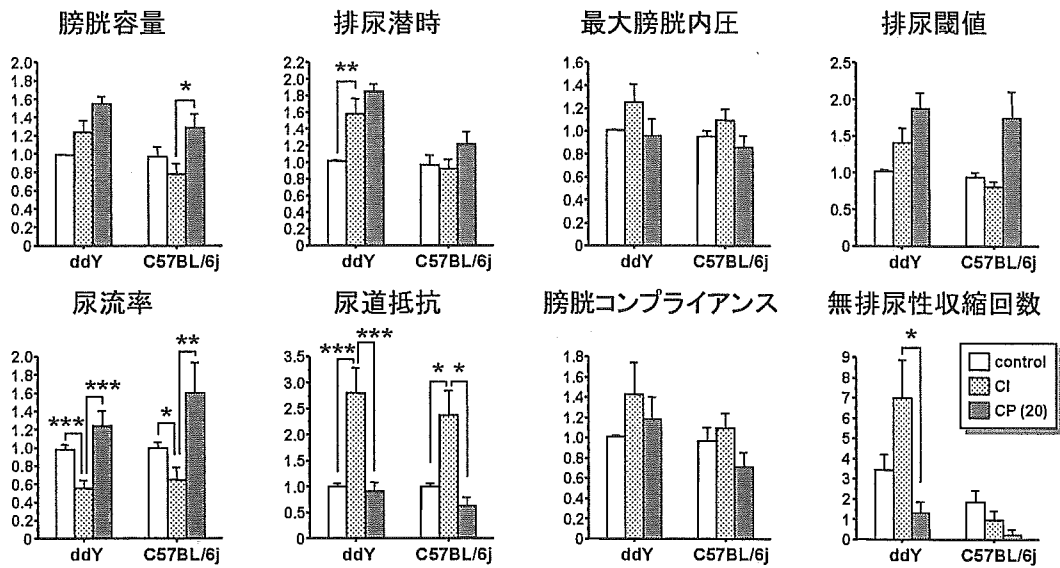


図7 ddYおよびC57BL/6jマウスの各パラメータにおける比較

各パラメータはcontrolを1とした相対値で示す。CI: cerebral infarction, CP: cloperastine, ddY系: 7例, C57BL/6j系(control & CI群: 8例, CP群: 4例), * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005

5. 無処置およびクロペラスチン投与後の脳梗塞容積

ddY および C57BL/6j どちらのマウスにおいても、クロペラスチン投与後による梗塞容積への影響は見られなかった。

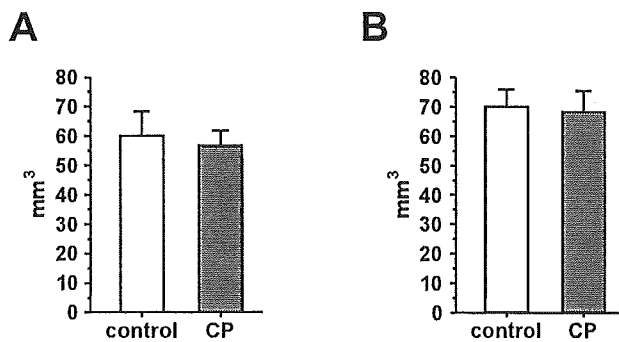


図8 A: ddYマウスの梗塞容積. B: C57BL/6jマウスの梗塞容積.

考 察

ddY マウスにおいて、脳梗塞 24 時間後の排尿機能について検討した結果、梗塞前のコントロールに比べて、排尿潜時の延長、尿流率の減少、尿道抵抗および無排尿性収縮回数の増加が認められた。また、C57BL/6j マウスにおいても、尿流率の減少および尿道抵抗の増

加が ddY マウスと同様に認められた。従って、ddY および C57BL/6j 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た。また、無排尿性収縮回数の増加は ddY マウスにおいてのみ観察され、系統により脳梗塞後の排尿機能変化が異なることがわかった。しかし、これまでの種々の報告や我々の以前の知見のように、ラット脳梗塞モデルで梗塞後に顕著に認められた排尿潜時の短縮および膀胱容量の減少、即ち過活動膀胱様症状は、本研究で用いたマウスモデルにおいて見られなかった。一方で、ddY マウスのみではあるが、脳梗塞後に無排尿性収縮回数が著しく増加していた。これは、下部尿路閉塞モデル^{10, 11)}および脊髄損傷モデル¹²⁾などの過活動膀胱を生じるモデルにおいて、無排尿性収縮を伴うことが報告されており、このことはこのパラメータが、マウスにおける脳梗塞後の過活動膀胱の指標になり得る可能性を示唆している。

TTC 染色の結果、ddY マウスよりも C57BL/6j マウスの方がより梗塞容積が大きかった。C57BL/6j マウスは、DBA/2、MF1 および 129/Sv の他系統のマウスと比較して、脳梗塞に対して脆弱であることが報告されており、これは後交通動脈の片方、ないし両方の欠損によるものであることがわかっている¹³⁻¹⁶⁾。従って、今回認められた梗塞容積の差についても、C57BL/6j マウスの梗塞に対する脆弱性が ddY マウスよりも強いことが示唆された。そして、この梗塞容積の違いが、両系統間における脳梗塞後の排尿機能変化の差につながっていると推測された。しかしながら、TTC 染色では詳細な梗塞部位の確認は困難であるため、この差が梗塞領域の広さから生じているのか、あるいはある特定領域の梗塞により生じているのか明らかでない。

ddY および C57BL/6j の両方のマウスにおいて、脳梗塞後に尿流率の減少および尿道抵抗の増加が見られたが、クロペラスチンはこれらをコントロールレベルまで改善した。我々の脳梗塞モデルラットにおける以前の検討においても、クロペラスチンは同様の改善を示している。従って、クロペラスチンはラットおよびマウスの脳梗塞モデルで生じる排尿困難を改善することが示唆された。また、ddY マウスにおいて生じた無排尿性収縮回数の増加についても顕著に抑制したことから、過活動膀胱を抑制する可能性も示唆された。緒言で述べたように、このクロペラスチンを含む中枢性鎮咳薬は、GIRK チャネル電流を抑制することがわかっている⁵⁾。最近、5-HT およびノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるデュロキセチン、および 5-HT 再取り込み阻害薬の中で、GIRK チャネル抑制作用をもつフルオキセチンが、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¹⁷⁾。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り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¹⁸⁾。さらに、脳梗塞領域の大脳皮質や線条体において、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¹⁹⁾。従って、脳梗塞に伴う過活動膀胱および排尿困難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 チャネルの抑制を介したものである可能性が考えられる。しかし、その作用部位が中枢であるか末梢であるか、さらに中枢であるならどの領域で作用しているのか、どの受容体を介した作用であるのかなど、今後さ

らなる検討が必要である。

本研究から、脳梗塞後の過活動膀胱と排尿困難およびクロペラスチンによるそれらの改善効果メカニズムの解明に、マウスを用いることが有用であることが示された。

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）（H16-長寿-010）の補助を受けて実施された。

文 献

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. Pandita R.K., Fujiwara M., Alm P., Andersson K.E., Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction. *J Urol*, 164, 1385-1389 (2000)
9. Kilic E., Kilic U., Yulug B., Hermann D.M., Reiter R.J., Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add-on treatment to tissue-plasminogen activator. *J Pineal Res*, 36, 171-176 (2004)
10. Schroder A., Tajimi M., Matsumoto H., Schroder C., Brands M., Andersson K.E., Protective effect of an oral endothelin converting enzyme inhibitor on rat detrusor function after outlet obstruction. *J Urol*, 172, 1171-1174 (2004)
11. Lynch J.J., 3rd, Brune M.E., Lubbers N.L., Coghlan M.J., Cox B.F., Polakowski J.S., King L.L., Sullivan J.P., Brioni J.D., K-ATP opener-mediated attenuation of spontaneous bladder contractions in ligature-intact, partial bladder outlet

- obstructed rats. *Life Sci*, 72, 1931-1941 (2003)
12. Gu B., Olejar K.J., Reiter J.P., Thor K.B., Dolber P.C., Inhibition of bladder activity by 5-hydroxytryptamine1 serotonin receptor agonists in cats with chronic spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 310, 1266-1272 (2004)
 13. Fujii M., Hara H., Meng W., Vonsattel J.P., Huang Z., Moskowitz M.A., Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke*, 28, 1805-1810; discussion 1811 (1997)
 14. Kelly S., Mcculloch J., Horsburgh K., Minimal ischaemic neuronal damage and HSP70 expression in MF1 strain mice following bilateral common carotid artery occlusion. *Brain Res*, 914, 185-195 (2001)
 15. Kitagawa K., Matsumoto M., Yang G., Mabuchi T., Yagita Y., Hori M., Yanagihara T., Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 570-579 (1998)
 16. Yang G., Kitagawa K., Matsushita K., Mabuchi T., Yagita Y., Yanagihara T., Matsumoto M., C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 752, 209-218 (1997)
 17. Katofiasc M.A., Nissen J., Audia J.E., Thor K.B., Comparison of the effects of serotonin selective, norepinephrine selective, and dual serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors on lower urinary tract function in cats. *Life Sci*, 71, 1227-1236 (2002)
 18. Pehrson R., Stenman E., Andersson K.E., Effects of tramadol on rat detrusor overactivity induced by experimental cerebral infarction. *Eur Urol*, 44, 495-499 (2003)
 19. Lu X.C., Williams A.J., Yao C., Berti R., Hartings J.A., Whipple R., Vahey M.T., Polavarapu R.G., Woller K.L., Tortella F.C., Dave J.R., Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J Neurosci Res*, 77, 843-857 (2004)

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

黒木伸吾、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

Effects of antidepressant on overactive bladder caused by cerebral infarction in conscious rats

Shingo Kuroki, Gen Yamamoto, Fumio Soeda, Tetsuya Shirasaki and Kazuo Takahama.

Department of Environmental & Molecular Health Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

キーワード

日本語 : 脳梗塞、抗うつ薬、GIRK チャネル

英語 : cerebral infarction, antidepressant, GIRK channel

要 約

最近、本研究室では中枢性鎮咳薬であるクロペラスチンが、脳梗塞モデルラットの排尿障害を改善させることを報告した。ところで、これまで夜尿症の治療に用いられてきたアミトリプチリンなどの薬物は、モノアミンの再取り込みを阻害する抗うつ薬であるが、これらのモノアミンの再取り込み阻害薬も脳梗塞モデルラットの過活動膀胱を改善させることが予想される。そこで本研究では、クロペラスチンが過活動膀胱のどの面で優れているのかを明確にするために、脳梗塞後の排尿機能の異常に対して、5-HTおよびノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害作用の比が同じである三環系の抗うつ薬アミトリプチリン、NA再取り込み阻害作用が強い四環系抗うつ薬マプロチリンがどのような影響を与えるかについて調べ、クロペラスチンの作用との比較検討を行った。その結果、アミトリプチリンは、脳梗塞に伴う排尿障害に対し膀胱容量の減少と排尿潜時の短縮を改善させた。しかし、マプロチリンに改善作用は認められなかった。このことより、5-HTが脳梗塞に伴う排尿障害の改善作用に関与している可能性が考えられた。さらにクロペラスチンとアミトリプチリンの過活動膀胱の改善作用を比較すると、両薬物とも膀胱容量の減少と排尿潜時の短縮は改善させたが、尿道抵抗や尿流率の低下を改善させたのはクロペラスチンのみであった。これらの結果より、比較的選択的な GIRK チャネル抑制作用を持つクロペラスチンは抗うつ薬より過活動膀胱の改善作用が強力であることが示唆される。

Recently, we reported that cloperastine, centrally acting antitussives, significantly improved reduction of bladder capacity and latency of micturition reflex that is overactive bladder caused by cerebral infarction in conscious rats. By the way, amitriptyline, tricyclic antidepressant and therapeutic drug for enuresis, inhibits reuptake serotonin and noradrenaline at the presynaptic terminal. In this study, we comparatively investigated effects of antidepressants and cloperastine on overactive bladder caused by cerebral infarction in conscious rats. Amitriptyline improved reduction of bladder capacity and latency of micturition reflex, but maprotiline, tetracyclic antidepressant, did not improve overactive bladder. This drug inhibits reuptake noradrenaline at the presynaptic terminal. Therefore, serotonin but not noradrenaline may play a part in the improvement of overactive bladder. Moreover, cloperastine blocked an increase in the urethral resistance, in addition to effect of amitriptyline. As the results, it was suggested that cloperastine inhibiting GIRK channel improve reduction of overactive bladder caused by cerebral infarction than antidepressants.

緒 言

高齢化により脳梗塞などの脳血管障害は増加の一途を辿っているが、脳梗塞の後遺症として、代表的な片側半身麻痺と同程度に、高い頻度で排尿障害が起こるといわれている。脳梗塞後の神経因性膀胱として、尿意を催しても排尿できない排尿困難、逆に尿意を生じると直ちに我慢できなくなる尿意切迫、切迫性尿失禁および頻尿となる過活動膀胱がある。これらの症状は、ほとんどの場合、同一患者で起こっており、患者に大きな精神的ダメージを与え、QOLを低下させる。しかし、脳梗塞後の排尿困難を改善する薬物はなく、その開発が急がれている。

これまで、脳梗塞の実験動物モデルについては、種々の報告がなされているが、その多くは臨床上遭遇する脳病変とは異なり、病態モデルとは言いがたい面があった。また、手術侵襲が強く、膀胱機能障害の経時的変化を検討するには適していなかった。近年、頭蓋骨切除を行わずに中大脳動脈動脈起始部を塞栓することによって手術侵襲の少ない脳梗塞モデルが作製された。このモデルは、術後長期の生存が可能で、ほぼ一定した梗塞領域、神経症状が得られ、神経科学領域では脳血管障害の病態モデルとして確立されている。臨床上、最も多い脳疾患は脳血管障害であり、Boriesらは脳梗塞発作症例のCTによる梗塞部位診断を行ったところ、86%が中大脳動脈領域単独であったと述べている。したがって、このモデルを用いて膀胱機能障害を評価することは、ヒト脳血管障害による過活動膀胱の病態解明に有用であると考えられる。

最近、本研究室では脳梗塞モデルラットの排尿障害に対して、非麻薬性鎮咳薬であるデキストロメトルファンやクロペラスチンは、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。さらにクロペラスチンは、尿流率および尿道抵抗についてもコントロールレベルまで回復させ、残尿を生じなかった¹⁾。これらの薬物は既に臨床で用いられているため、過活動膀胱に対する新規シード医薬品になり得る可能性が高い。我々のパッチクランプ法での検討から、デキストロメトルファンやクロペラスチンはG蛋白質共役型内向き整流性K⁺ (GIRK) チャネル電流を抑制することは明らかとなっている。しかし、これら両薬物による排尿機能の改善作用は、このGIRKチャネルの抑制によるものなのか、GIRKチャネルに共役している5-HT_{1A}、D₂、 μ 、 κ 、 δ オピオイド、ムスカリンM₂、GABA_B、 α_2 などの受容体に関係したものなのか、さらにどの受容体が関与しているのかなど詳細については不明である。

ところで、これまで臨床で用いられてきた中枢性の排尿障害治療薬であるアミトリプリンなどの薬物はモノアミンの再取り込みを阻害する抗うつ薬であり、これまでに、セロトニン(5-HT)再取り込み阻害作用を有する非麻薬性鎮痛薬であるトラマドールやセロトニン・ノルアドレナリン取り込み阻害薬(SNRI)であるデュロキセチンは、過活動膀胱を改善させることが報告されている^{2) 3)}。このような知見から、抗うつ薬など、モノアミンの再取り込み阻害薬は、我々が作製した脳梗塞24時間後の過活動膀胱も改善させることが予