

想される。そこで本研究では、我々が新たな作用を見いだした非麻薬性鎮咳薬は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、以下の検討を行った。まず、臨床では夜尿症の治療薬として使用され、5-HT およびノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害作用が 1 対 1 である三環系の抗うつ薬 Amitriptyline について、第二に、5-HT およびノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害作用が 1 対 20 と、Amitriptyline に比べノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害作用が強い四環系抗うつ薬 Meprobamate について、脳梗塞 24 時間後における排尿機能に対する影響について調べた。

## 方 法

### I. 試薬

amitriptyline hydrochloride、maprotiline hydrochloride 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）より購入した体重 220~280g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを、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。飼育中は固形試料（CE-2）および飲料水（水道水）を自由に摂取させた。

### III. 膀胱瘻作製

ラットをペントバルビタール（45mg/kg,i.p.）で麻酔後、仰臥位に固定した。下腹部を正中切開して膀胱を露出させ、あらかじめ加熱処理し、先端に襟を作製した直径 0.965mm のポリエチレンチューブ（PE-50, Becton Dickinson）を膀胱内に挿入した。ポリエチレンチューブの他端は、腹部から皮膚を介して頸背部に露出させ、チューブの周囲をアロンアルファで固定し、尿の逆流及び空気の流入を防ぐためステンレス線で栓をした。また、腹部の皮膚切開部は縫合糸（ハシモト）で縫合した。麻酔から覚醒後、薬学部実験動物施設にて一週間飼育し、膀胱機能が回復した後、実験に供した。飼育期間中は感染予防のため、硫酸ストレプトマイシン(100mg/kg)を 1 日 1 回筋肉内に投与した。

### IV. シングルシストメトリー

無麻酔ラットにおけるシストメトログラム (CMG) は、Yaksh らの方法に準じて行った。まず、ラットをジエチルエーテルで麻酔後、ボールマンケージⅢ型（夏目製作所）に固定した。先に設置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を介して注射筒に接続した。注射筒をインフュージョンポンプ（Model A, Nihon Kohden）にセットし、これより 37°C に保温した生理食塩水を、0.125ml/min の速度で膀胱内に注入した。三方活栓の他端は、CMG 測定のためにポリエチレンチューブを介して圧トランスデューサー（DX-360, Nihon Kohden）に接続した。圧トランスデューサーの電気信号は生体アンプ（RMP-6004M, Nihon Kohden）で増幅させ、ペンレコーダー（SS-250F, SECONIC）で CMG として描記した。なお、尿道抵抗の上昇に伴い膀胱内に残留した生理食塩水が与える影響を防ぐため、CMG を記録するごとに膀胱内の生理食塩水を抜去した。

### V. 左中大脳動脈塞栓ラットの作製

ラットをペントバルビタール（45mg/kg, i.p.）で麻酔後、まず、頸静脈カニューレ設置のための手術を行った。頸部を正中切開後、左頸静脈を露出させ単離した。血管にわずかな

切り込みを入れ、心臓側へ外径 0.61mm のポリエチレンチューブ (PE-10, Becton Dickinson) を挿入し、直径 0.074mm のナイロン糸で結紮した。次に、Koizumi の方法に準じて左中大脳動脈塞栓による脳梗塞を作製した。まず、左総頸動脈を左内頸動脈と左外頸動脈の分岐部まで迷走神経から慎重に剥離した。左外頸動脈をミシン糸で結紮後、左総頸動脈を同様に結紮した。さらに、塞栓糸挿入後の結紮・固定のために、左内頸動脈起始部に糸をかけた後で、左総頸動脈を結紮部より中枢側で切開した。切開部より塞栓糸 (3-0 ナイロンモノフィラメント, アズウェル) を左内頸動脈内に分岐部から約 17mm 挿入させ、左内頸動脈起始部を結紮した。以上の操作により、塞栓の先端は左中大脳動脈起始部を超えて、左前大脳動脈内に約 1~2mm 入り、塞栓の体部で左中大脳動脈起始部を閉塞した。なお、今回使用した塞栓糸は、血管壁の穿通防止および血液遮断を目的として、加熱により先端を鈍化させた。塞栓糸挿入後、正中切開した頸部の皮膚を縫合し、ラットが麻酔から覚醒したのち、熊本大学薬学部実験動物施設で飼育した。

## VI. 脳梗塞層の確認

CMG 測定終了後、ラットをジエチルエーテルで麻酔し、断頭器 (サーモニクス) により断頭した。断頭後すばやく脳を摘出し、ブレインスライサー (MUROMACHI)、剃刀 (フェザー) を用いて前額面より 2mm の間隔で 6 枚のスライスを作製した。吻側の 1 枚を除いてただちに、各脳切片を 37°C で 30 分間 1% TTC 溶液に浸し、脳の非梗塞部位を染色した。染色後の脳切片をデジタルカメラで撮影し、梗塞体積の算出に用いた。梗塞体積は脳浮腫による影響を考慮し、Golanov らの方法に準じて計算した。画像解析ソフト Win roof, ver 5.0 (MITANI CORPORATION) にて、A: 左半球 (梗塞部位を含む)、B: 右半球 (梗塞部位を含まない)、C: 梗塞部位の面積、を計測し、以下の式にて補正した梗塞体積を算出した。

$$\text{脳梗塞体積 (mm}^3\text{)} = 2 \times \sum_{i=1}^5 (C_i \times (B_i/A_i))$$

ここで i は脳切片の番号を示す。

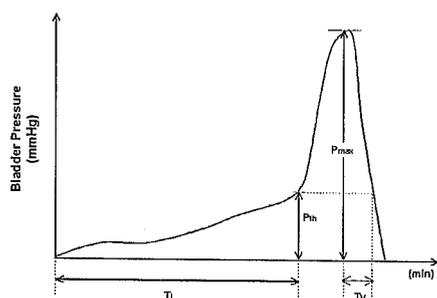
## VII. 薬物投与方法

アミトリプチリンは生理食塩水に溶解し、静脈内投与した。マプロチリンは生理食塩水を加えた後、氷酢酸を微量加えて溶解し、静脈内投与した。1 回の投与容量は 0.1~0.12ml とし、チューブ内の薬液は 0.1ml の生理食塩水で完全に押し流した。

## VIII. データ解析

シングルシストメトリー法で得られた各 CMG について、Fig.1 に示すパラメーターを解析した。各パラメーター値は、実験により実測値または相対値で示したが、相対値で示した場合は成績の項に明記した。プールした成績は全て平均±標準誤差で示した。有意差の

検定は、Student's の t 検定を用いた。危険率  $P < 0.05$  のとき「有意差あり」とした。



TL	Micturition Latency (排尿遅延) 膀胱総圧に到達するまでの時間 (min)
Pth	Threshold Pressure (排尿閾値圧) 排尿反射を起こす膀胱内圧 (mmHg)
Pmax	Maximum Pressure (最大膀胱内圧) 排尿時の最大膀胱内圧 (mmHg)
Tv	Voiding Time (排尿時間) 尿の排出開始から停止までの時間 (min)
Vv	Voided Volume (排尿量) 尿道を通して排出された全尿量 (ml)
PVR	Post Void Residual (排尿後残尿) 排尿終了時に膀胱内に残っている尿量 (ml)
BC (Vv + PVR)	Bladder Capacity (膀胱容量) 排尿量と残尿量の和 (ml)
rr (Vv/Tv)	Flow Rate (原流量) 単位時間あたりに排出される尿量 (ml/min)
RU (Pmax/rr)	Urethral Resistance (尿道抵抗) 尿道括約筋の緊張度 (mmHg·min/ml)
CP (TL/Pth)	Bladder Compliance (膀胱コンプライアンス) 膀胱の柔軟性の指標 (min/mmHg)

Fig.1 Cystometric parameters for micturition reflex

## 結 果

### I. 脳梗塞モデルラットの過活動膀胱に対するアミトリプチリンの影響

膀胱瘻設置後 7 日目のラットをボールマニケージに固定し、無麻酔下でシングルシストメトリー法により CMG の測定を行った。記録開始後、安定した記録が 3~4 回得られたときに各パラメーターを算出し、その平均値を Control 値とした。各パラメーターの算出法は実験方法に記した。Control 測定後 MCA を閉塞し、その 24 時間後にシングル CMG の測定を開始した。記録開始後、安定した CMG が記録されたところで、ビークルとして生理食塩水を静脈内投与した。2~3 回の CMG を測定した後、10mg/kg のアミトリプチリンを投与し、投与後 1 時間以内で一番反応が顕著にみられた 1 つの CMG について、各パラメーター値を測定した。

代表的な CMG の変化を Fig.1 に、MCA 閉塞前後の各パラメーターの値を Table.1 に示す。MCA 閉塞後の各パラメーター値は、Control 値を 1 としてノーマライズした。アミトリプチリン投与の前後で比較すると、膀胱容量、排尿潜時および膀胱コンプライアンスが有意に増加し、最大膀胱内圧が有意に減少した(Fig.2)。

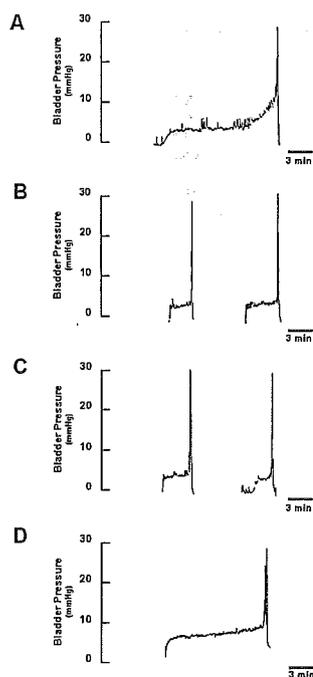


Fig.1 Effects of AMI(10mg/kg, i.v.) on CMGs recorded at 24hrs after MCA occlusion in a conscious rat.

A: A typical CMG recorded before a cerebral infarction. B: Typical CMGs at 24hrs after left MCA occlusion. C: Typical CMGs at 6 and 13 min after saline administration under MCA occlusion. D: Typical CMG at 14 min after AMI administration under MCA occlusion. All recordings were recorded from the same rat.

Table.1 Cystometric parameters recorded before (CI) and after amitriptyline administration (AMI) in MCA occluded conscious rats.

Parameter	CI	AMI
BC	0.295±0.023	0.693±0.101*
Vv	0.295±0.023	0.464±0.184
TL	0.314±0.029	0.858±0.109 <sup>b</sup>
P <sub>max</sub>	1.017±0.068	0.720±0.057**
P <sub>th</sub>	0.595±0.099	0.729±0.135
rr	0.434±0.049	0.296±0.111
RU	2.794±0.379	4.228±1.786
CP	0.772±0.174	1.219±0.097 <sup>c</sup>
n	10	4

\*p<0.05 \*\*p<0.01

BC:Bladder capacity, Vv:Voided Volume,TL:Micturition latency,P<sub>max</sub>:Maximum pressure,P<sub>th</sub>:Threshold pressure,rr:Flow rate,Ru:Urethral resistance, Cp:Bladder compliance,n:number of data

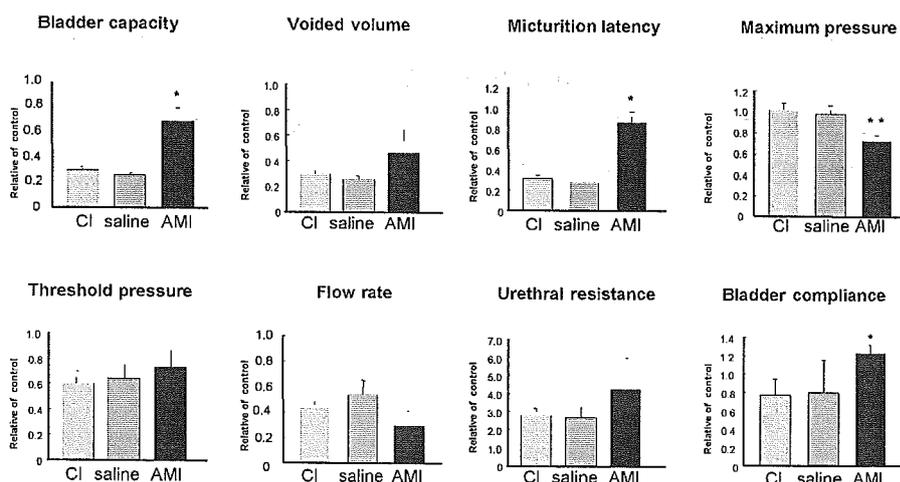


Fig.2 Effects of amitriptyline(AMI,10mg/kg)on cystometric parameters after MCA occlusion for 24 hrs in conscious rats.

Each parameter was normalized to the control recorded before MCA occlusion.Results were expressed as mean ±SEM(CI:n=10,saline:n=10,AMI:n=4)

## II. 脳梗塞モデルラットの過活動膀胱に対するマプロチリンの影響

I. と同様にして Control 測定後 MCA を閉塞し、その 24 時間後にシングル CMG の測定を開始した。記録開始後、安定した CMG が記録されたところで、生理食塩水を投与した。2~3 回の CMG を測定した後、10mg/kg のマプロチリンを投与した。投与後 1 時間以内で反応が見られた 3 つの CMG について各パラメーター値を測定し、それを平均してマプロチリン投与後の値とした。なお、試薬を溶解するために、生理食塩水には氷酢酸を微量加えた。

代表的な CMG の変化を Fig.3 に、MCA 閉塞前後の各パラメーターの値を Table.2 に示

す。MCA 閉塞後の各パラメーター値は、Control 値を 1 としてノーマライズした。マプロチリン投与の前後で比較すると、各パラメーターについて有意な変化はみられなかった (Fig.4)。

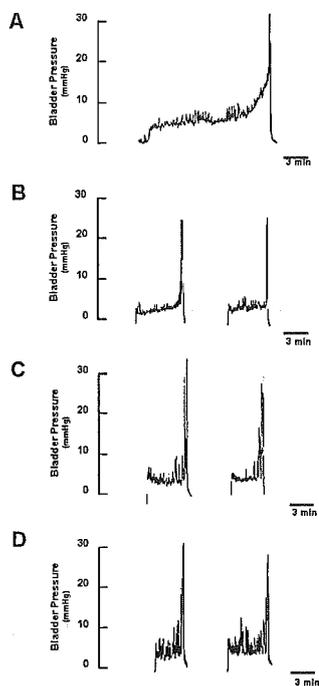


Fig.3 Effects of MAP(10mg/kg,i.v.) on CMGs recorded at 24hrs after MCA occlusion in a conscious rat.

A:A typical CMG recorded before a cerebral infarction. B:TypicalCMGs at 24hrs after left MCA occlusion. C:Typical CMGs at 5 and 11 min after saline administration under MCA occlusion. D:Typical CMGs at 23 and 31 min after MAP administration under MCA occlusion.All recordings were recorded from the same rat.

Table.2 Cystometric parameters recorded before (CI) and after maprotiline administration (MAP) in MCA-occluded conscious rats.

Parameter	CI	MAP
BC	0.295±0.024	0.278±0.026
TL	0.315±0.029	0.276±0.043
P <sub>max</sub>	1.017±0.068	1.012±0.158
P <sub>th</sub>	0.595±0.099	0.745±0.094
rr	0.434±0.049	0.669±0.253
RU	2.794±0.379	2.536±1.006
C <sub>p</sub>	0.772±0.174	0.440±0.082
n	10	4

BC:Bladder capacity, TL:Micturition latency,P<sub>max</sub>:Maximum pressure,P<sub>th</sub>:Threshold pressure, rr:Flow rateRU:Urethral resistance, C<sub>p</sub>:Bladder compliance,n:number of data

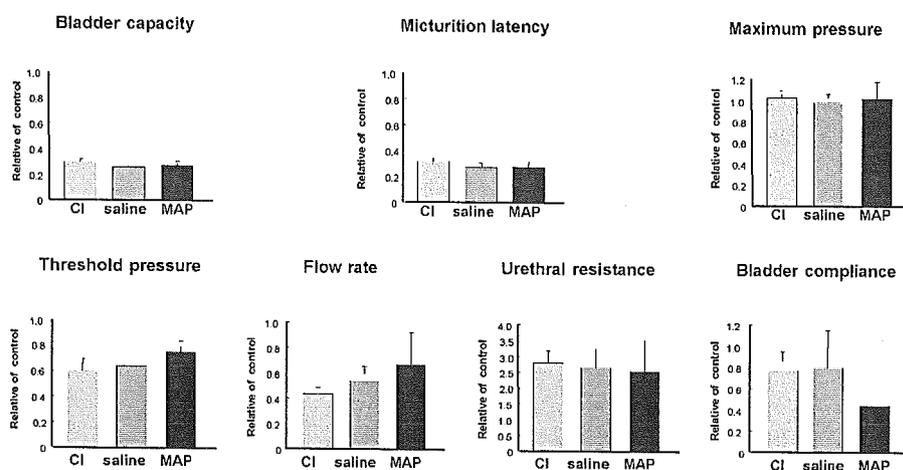


Fig.4 Effects of maprotiline(MAP,10mg/kg)on cystometric parameters after MCA occlusion for 24 hrs in conscious rats.

Each parameter was normalized to the control recorded before MCA occlusion.Results were expressed as mean  $\pm$  SEM(CI:n=10,saline:n=10,MAP:n=4).

#### IV. 脳梗塞層の確認

TTC 染色により MCA 閉塞による脳梗塞層を確認したが、脳梗塞の範囲は側頭葉、頭頂葉、線条体、基底核、視床下核に及び、さらに内頸動脈分岐や中大脳動脈領域全般にわたる広範なものであった。脳梗塞の体積はそれぞれ、薬物を投与していないもの (control)  $213.07 \pm 98.25 \text{mm}^3$ 、アミトリプチリンを投与したもの  $221.66 \pm 71.65 \text{mm}^3$ 、マプロチリンを投与したもの  $301.66 \pm 25.49 \text{mm}^3$  であった。統計学的解析の結果、薬物投与による脳梗塞層への影響は認められなかった。

## 考 察

アミトリプチリンは投与直後に一過性に膀胱容量の増加、排尿潜時の延長および最大膀胱内圧の減少を引き起こした。一過性に反応が起こった原因の一つとして、アミトリプチリンの体内動態が考えられる。アミトリプチリンは、特に静脈内投与でクリアランスが大きな薬物であるとの報告があり<sup>4)</sup>、投与後すぐに代謝されたため、作用が一過性になったのかもしれない。また、残尿を除去できない場合もあり、排尿潜時などに対する残尿の影響があったことも考えられる。次に、最大膀胱内圧の有意な減少と残尿を生じたことに関しては、アミトリプチリンが、5-HT および NA 再取り込み阻害作用に加え、抗コリン作用も有することが考えられる。アミトリプチリンの抗コリン作用は、同じ 3 環系抗うつ薬であるイミプラミンやデシプラミン、およびクロミプラミンに比べて一番強力である。副交感神経の興奮は膀胱収縮と同時に尿道を直接弛緩することが知られている。よって、抗コリン作用により、膀胱平滑筋の収縮が減弱し、かつ尿道が収縮するためこのような作用が生じたのではないかと考えられる。また、蓄尿期に起きる収縮（無排尿性収縮）の抑制作用もみられたが、これは上に述べた抗コリン作用と抗ヒスタミンによる鎮静作用である可能性が考えられる。これについては、コリンエステラーゼ阻害薬を用いた検討により、明らかにできるものと考えている。

一方、マプロチリンは、脳梗塞 24 時間後の排尿機能に対して作用を示さなかった。Fig.5 に示すように、アミトリプチリンの 5-HT、NA 再取り込み阻害の比が 1 対 1 であるのに対し、マプロチリンは、ノルアドレナリン再取り込み阻害作用が優位である。また、抗コリン作用もアミトリプチリンに比べ、その IC<sub>50</sub> 値は 15 倍ほど高い。よって、ノルアドレナリン単独では、排尿機能に影響を与えなかったのではないかと推測される。この結果は、ノルアドレナリン選択的再取り込み阻害作用を有する thionisoxetine が、酢酸注入によって膀胱炎症を起こしたネコの膀胱容量や尿道括約筋に影響を与えなかったという報告により支持される<sup>2)</sup>。

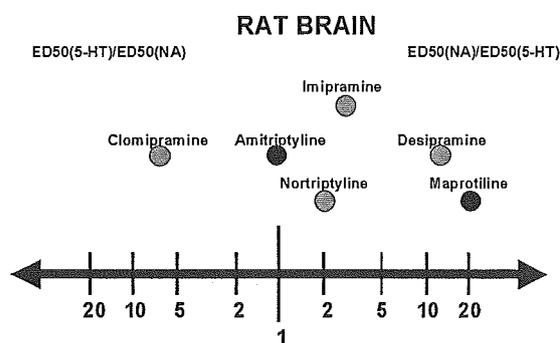


Fig.5 The ratio of inhibition of 5-HT reuptake to that of NA reuptake in antidepressants.

本研究室の以前の知見から、クロペラスチンはセロトニン誘発 GIRK 電流を抑制し、そ

の IC<sub>50</sub> 値が 8.6×10<sup>-7</sup> (M) であることが分かっている。また、アミトリプチリンおよびマプロチリンも GIRK 電流を抑制するという報告があるが、その IC<sub>50</sub> 値は共に 100 倍程度クロペラスチンよりも高い<sup>5)</sup>。この結果は、in vitro の結果であるため単純に比較はできないが、in vivo の実験でもクロペラスチンの方が GIRK チャネルを強く抑制している可能性が示唆される。

今後、クロペラスチンの作用が GIRK チャネルの抑制によるものなのか、あるいは共役した受容体によるものなのかを検討するためには、抗コリン作用のない SNRI を用いる必要があると考えられる。緒論でも述べたように、SNRI であるデュロキセチンは、酢酸注入によって膀胱炎症をおこしたネコの膀胱容量を増加させるという報告がある<sup>2)</sup>。SNRI 投与後の排尿機能について検討するとともに、SNRI に GIRK チャネル抑制作用があるかどうかを電気生理学的に検討することが必要であると考えられる。また、本研究は、5-HT と NA 再取り込み阻害の比が 1 対 1 であるアミトリプチリンと、NA の選択的再取り込み阻害作用のあるマプロチリンのみの検討であった。今後は、5-HT 受容体単独の作用を明確にするためには、SSRI であるフルオキセチンやフルボキサミンについての検討が必要である。フルオキセチンは、フルボキサミンと異なり GIRK チャネル抑制作用を持つという報告があるため<sup>6)</sup>、両者の作用を比較することにより、排尿機能に対する GIRK チャネルの関与についてより明らかにすることができると考えられる。

これまでの結果により、アミトリプチリンは排尿機能に影響を与え、マプロチリンは影響を与えなかったということが分かった。アミトリプチリンとクロペラスチンの作用を比較したものが、Table.3 である。

Table.3 Comparison of the effects of cloperastine with amitriptyline on micturition.

Parameter	Cloperastine(5mg/kg)			Amitriptyline(10mg/kg)	
	CI	CP		CI	AMI
BC	0.284±0.057	0.605±0.075*	↑	0.295±0.023	0.693±0.101* ↑
TL	0.279±0.056	0.606±0.077*	↑	0.314±0.029	0.858±0.109* ↑
rr	0.384±0.139	0.882±0.038*	↑	0.434±0.049	0.296±0.111 →
Ru	2.894±0.613	0.976±0.087*	↑	2.794±0.379	4.228±1.786 →
n	3	3		10	4

\* p<0.05

↑ :Change for the better → :No change

BC: Bladder capacity, TL: Micturition latency, rr:Flow rate, Ru:Urethral resistance  
n:number of data

両薬物とも膀胱容量と排尿潜時は改善させたが、クロペラスチンが尿道抵抗や尿流率を改善したのに対し、アミトリプチリンは改善しなかった。これは、より選択的な GIRK チャネル抑制作用を持つクロペラスチンが、過活動膀胱だけでなく排尿困難までも改善する優れた薬物であるということを示している。以上のことから、脳梗塞に伴う排尿障害に対する改善作用に、GIRK チャネルの抑制が関与しているのではないかと推測される。GIRK チャネルと脳梗塞後の排尿障害との関係性を明確にしていくことは、新規治療薬開発の指標

となる可能性を秘めており、今後さらなる発展が期待される。

## 結 論

5-HT と NA 再取り込み阻害の比が 1 対 1 である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、NA の選択的再取り込み阻害作用のあるマプロチリンは、脳梗塞に伴う排尿障害に対して影響しなかった。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る。また、非麻薬性鎮咳薬クロペラスチンの作用とアミトリプチリンの作用を比較すると、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。以上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。

## 参考文献

1. Yamamoto G, Soeda F, Shirasaki T and Takahama K, Ameliorating effects of dextromethorphan (DM) and cloperastine (CP) on overactive bladder (OAB) caused by cerebral infarction (CI) in conscious rats. *J Pharmacol Sci*, 94(Suppl. I), 113P. (2004)
2. Pehrson R., Stenman E., Andersson KE., Effects of Tramadol on Rat Detrusor Overactivity Induced by Experimental Cerebral Infarction. *Eur Urol*, 44, 495-499. (2003)
3. Katofiasc MA., Nissen J., Audia JE., Thor KB., 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*, 2; 71, 1227-1236. (2002)
4. Rutkowska A., Piekoszewski W., Brandys J., Chronopharmacokinetics of amitriptyline in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 20, 117-124. (1999)
5. Kobayashi T., Washiyama K., Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1841-1851. (2004)
6. Kobayashi T., Washiyama K., Ikeda K., Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac). *Br J Pharmacol*, 138, 1119-1128. (2003)

## 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  $\mu\text{m}$  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 (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  $\mu\text{m}$  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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。

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く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連合核 (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<sup>3)</sup>。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こし<sup>4)</sup>、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<sup>4)</sup>。一方、PAG の電気的、化学的刺激も排尿反射を惹起し、Ca<sup>2+</sup> チャネルブロッカーである Co<sup>2+</sup> 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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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<sup>7)</sup>。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の考えを抱かせる。

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<sup>8-11)</sup>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<sup>12-22)</sup>、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。

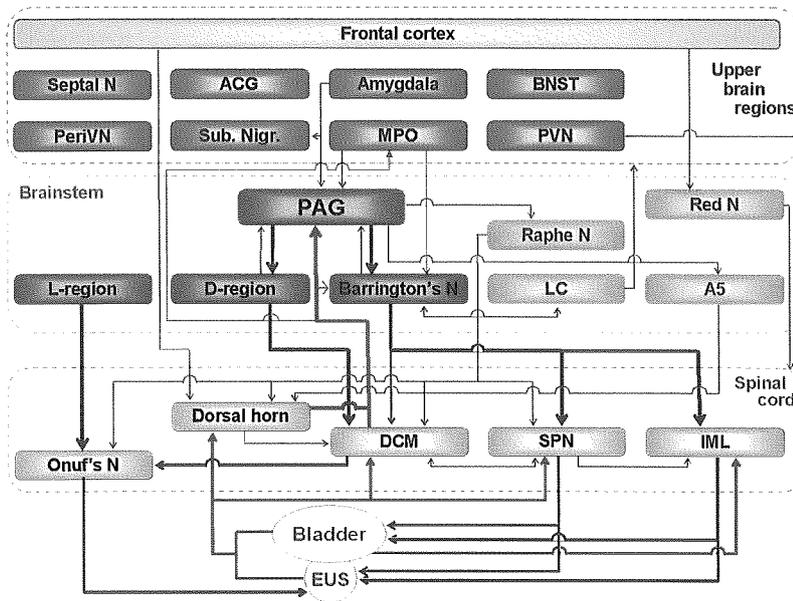


Fig. 1 Nucleuses and brain regions possibly contributing micturition reflex and their neuronal connectivity.

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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  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  $1 \mu\text{m}$  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  $1 \mu\text{m}$  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<sup>23, 24)</sup>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 (ニューステッキーワックス、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。

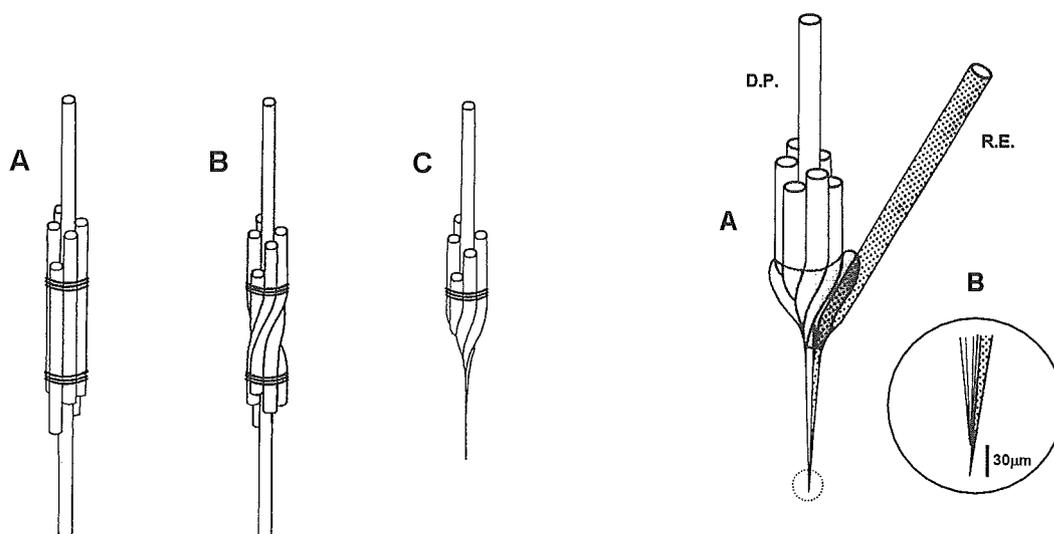


Fig. 2 Steps manufacturing the seven-barrel micropipette assembly.

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.

## 6. 単一神経活動の記録

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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ーに記録した。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  $\mu\text{m}$  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<sup>25-30</sup>。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  $\Omega$  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、ポ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  $\mu\text{m}$  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）下でポ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ー (Intel ペンティアム IV3.06GHz、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。

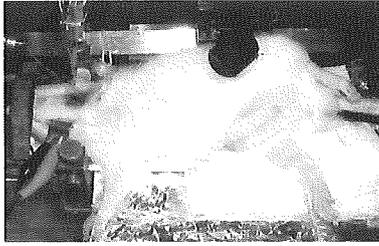
### 10.2. 相互相関分析

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  $\tau$  だけ遅延させたときのずれし量  $\tau$  の関数で、次式のように定義される。

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

今回の実験では、膀胱内圧を基準に発火頻度を  $\tau$  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、 $\tau$  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。

A



B

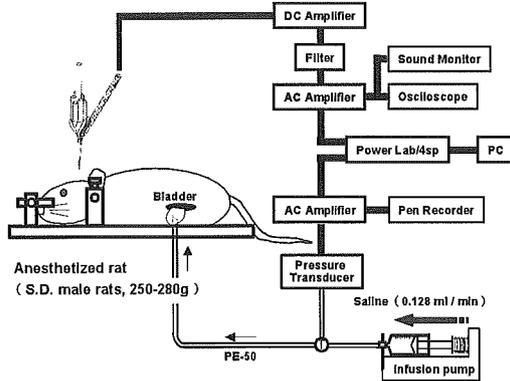
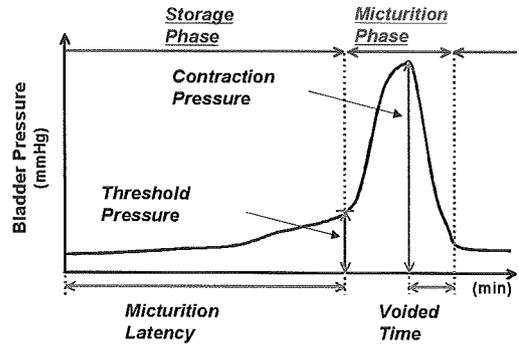


Fig. 4 Simultaneous recording of cystometrogram and single unit activity of brain neurons.

A: Fixation of rat in a stereotaxic puncture apparatus for unit recording. B: Schematic diagram for recording of unit activities and bladder pressure in anesthetized rats. Saline warmed at 37°C was infused into the bladder at a rate of 0.128 ml/min.



Parameters	
Micturition Latency	Latency until the pressure reach threshold for micturition after the beginning of saline injection
Contraction Pressure	Maximum bladder pressure during micturition
Threshold Pressure	Bladder pressure immediately prior to micturition
Micturition phase	The phase until the bladder pressure returns to basal level after it has reached to the threshold
Storage Phase	The phase until the bladder pressure reaches to the threshold after micturition has terminated

Fig. 5 Cystometric parameters for micturition reflex.

### 第3章 排尿反射関連ニューロンの特性および分布に関する研究

#### 第1節 本章の目的

第1章でも述べたように、PAG はこれまでの研究<sup>31-43)</sup>により上位排尿中枢として最近注目されているが、その領域における排尿反射関連ニューロンの詳細な分布や化学物質に対する感受性は不明である。そこで本章では、まず、排尿反射と関連したニューロンがPAGに存在しているのか、存在するとしたらどのような電気生理学的特性を示すのか？またこれらはどこに分布しているのかを調べるために、排尿反射と単一神経活動を同時に記録し、その関係を詳細に検討した。

#### 第2節 実験成績

##### 第1項 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探索

###### 1) PAGにおける単一ニューロン発火と排尿反射

膀胱内圧の変化を指標に排尿反射に関連するニューロンの発火を記録することを試みた。その結果、Bregma から尾側に 7300~8800 $\mu$ m の PAG 領域において 261 例の安定した発火が記録された。Fig.5 に示すように排尿反射を蓄尿期と排尿期に分けると、排尿期に発火が増加するニューロン (Fig.6) が 33 例、排尿期に発火が減少するニューロン (Fig.7) が 18 例、排尿反射に先行して蓄尿期に発火が増加するニューロン (Fig.8) が 6 例であった。また、排尿反射と明確な関係が見られなかったニューロン (Fig.9) が 213 例あった。ここでは、それぞれのニューロンを Type I、Type II、Type III、Type IV とした。

発火パターンをさらに詳しくみると、Type I は、排尿期に発火頻度が漸減するもの (Type Ia)、漸増するもの (Type Ib) と、持続的に発火するもの (Type Ic) の 3 種類に細分類された (Fig. 10)。

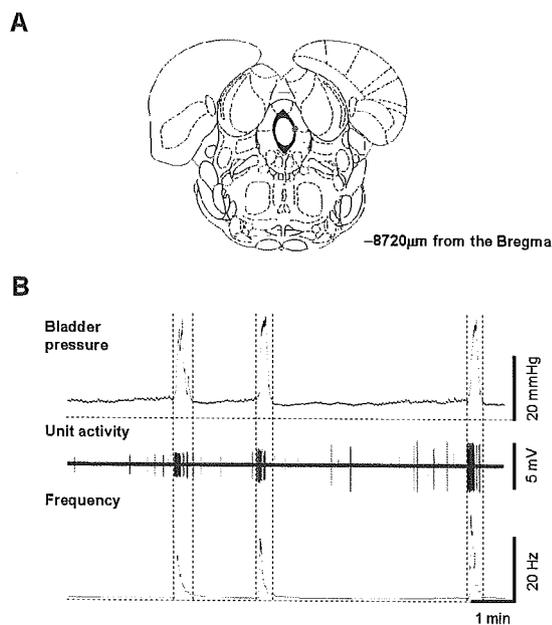


Fig. 6 Typical recording of Type I neuron.

A: The red dot shows recording site of single unit activity of Type I neuron.

B: Presentative recording in Type I neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

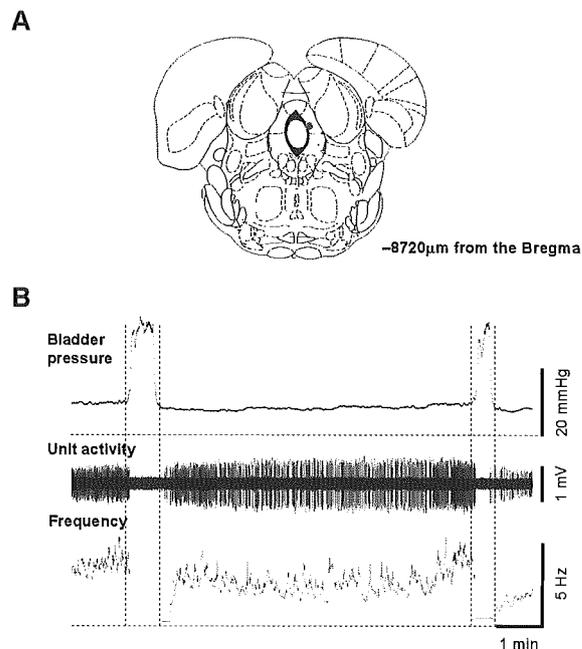


Fig. 7 Typical recording of Type II neuron.

A: The blue dot shows recording site of single unit activity of Type II neuron.

B: Presentative recording in Type II neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

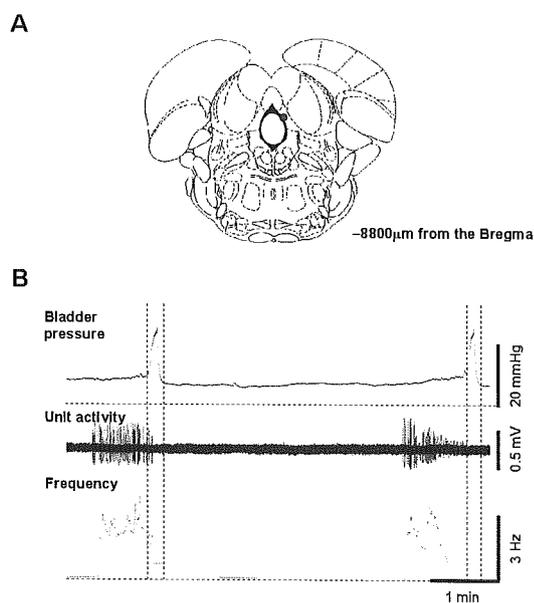


Fig. 8 Typical recording of Type III neuron.

A: The pink dot shows recording site of single unit activity of Type III neuron.

B: Presentative recording in Type III neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

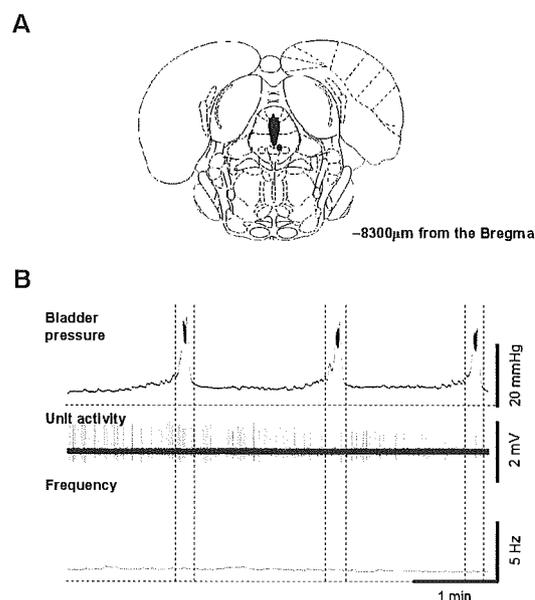


Fig. 9 Typical recording of Type IV neuron.

A: The black dot shows recording site of single unit activity of Type IV neuron.

B: Presentative recording in Type IV neuron of bladder pressure, unit activity of action potential and its frequency in Hz.

## 2) 膀胱内圧と発火頻度の相互相関分析

膀胱内圧と発火頻度との相関性を詳しく調べるために、膀胱内圧を基準に発火頻度を $\tau$ 時間だけずらして相互相関を検討した。最大相関係数およびそのときのずらし量 $\tau$ を求めた(Fig.11~16)ところ、Type Ia、Ib、Ic、IIIでは高い正の相関( $r=0.682\pm 0.067$ )、Type IIでは高い負の相関( $r=-0.730\pm 0.052$ )が見られた。さらに、Type Iaでは $\tau=-3.07\pm 0.78$ (秒)であり、膀胱内圧を平均-3秒シフトさせた位相で最大相関係数が得られることが示された。つまり、発火頻度の上昇が平均3秒、膀胱内圧の上昇に先立つ