

図6 肝障害事例のプロフィール：二次アンケート調査(健康食品分)

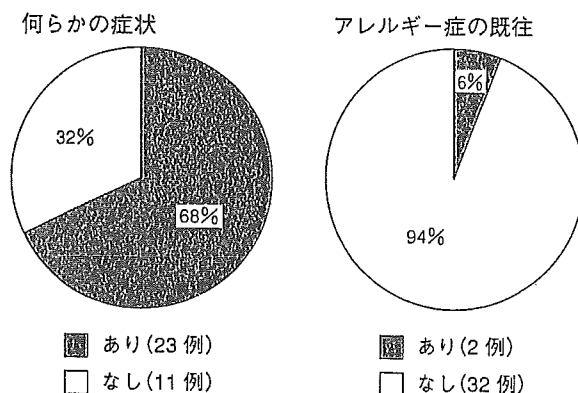


図7 肝障害事例のプロフィール：二次アンケート調査(健康食品分)

肝障害発症事例(以下、無承認無許可医薬品が原因であるものも含む)165例の治療については、69%(114例)の患者において入院治療を要し、外来治療のみ、経過観察のみの事例は、それぞれ11%(18例)、19%(31例)であった。治療として肝移植を必要とした事例は3%(5例)であり、死亡例の報告は4%(6例)であった。肝生検は31%(51例)において施行されていた。

二次調査では、59例の報告が得られ、このうち、「いわゆる健康食品」が原因と考えられるも

のは34例で、無承認無許可医薬品が原因と考えられるものが21例、不明・その他が4例であった(図4)。原因としては、ウコンを含む食品が6例、ウコンと他の健康食品との組み合わせが2例と、ウコンが関係するものが最も多かった。他にアガリクス、紅麹で複数例の報告があった。やはり原因とされる健康食品は多岐に亘り、30品目に及んでいた(図5)。

二次調査で、「いわゆる健康食品」が原因と考えられた34例の平均年齢は55.8歳であり、男性

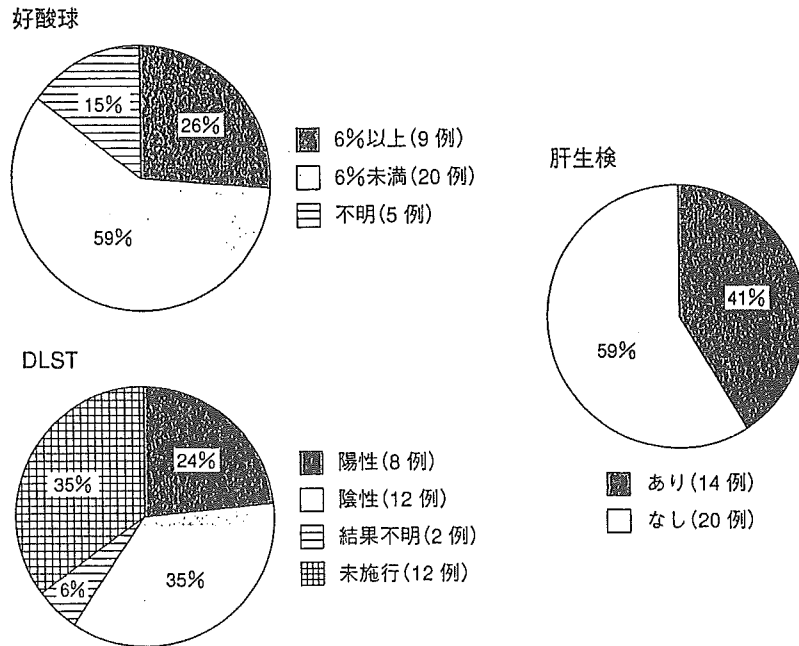


図8 診断のための検査：二次アンケート調査(健康食品分)

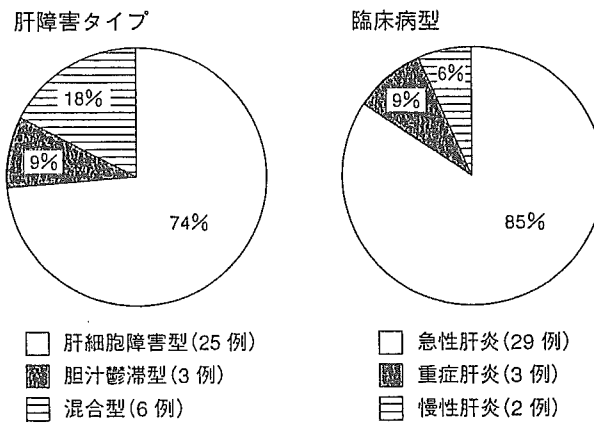


図9 肝障害タイプ・病型：二次アンケート調査(健康食品分)

6例, 女性28例と女性が多かった(以下, すべて「いわゆる健康食品」が原因と考えられた34例についての結果を示す)。68%(23例)の事例で健康食品以外の併用薬が使用されていた。飲酒者は12%(4例)と少なかった(図6)。また, 68%(23例)の事例で発症時, 何らかの症状を有していた。アレルギー症の既往のある事例は6%(2例)のみであった(図7)。好酸球増多は26%(9例)において認められた。DLSTは65%(22例)において

て施行されていたが, 陽性と判定されたのは全体の24%(8例)のみであった。肝生検は41%(14例)において施行されていた(図8)。肝障害のタイプ別では, 肝細胞障害型が74%(25例), 胆汁鬱滞型が9%(3例), 混合型が18%(6例)。臨床病型では, 急性肝炎が85%(29例), 重症肝炎が9%(3例), 慢性肝炎が6%(2例)であった(図9)。全例で原因と考えられる健康食品は中止されていた。治療薬としては, 強力ネオミノファーゲンシ

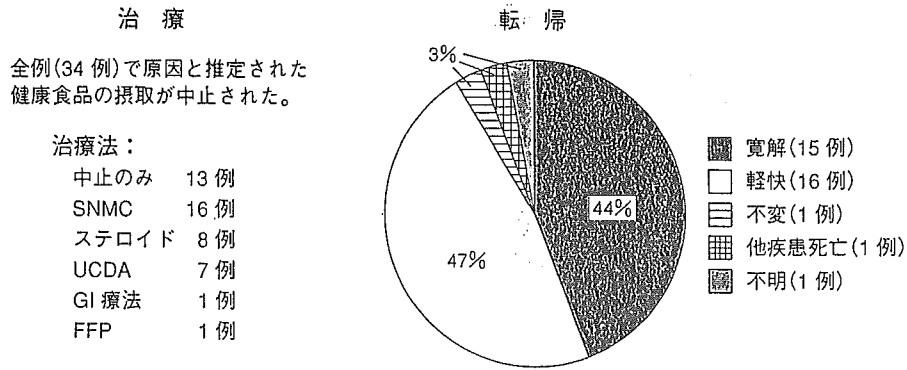


図 10 治療・転帰：二次アンケート調査(健康食品分)

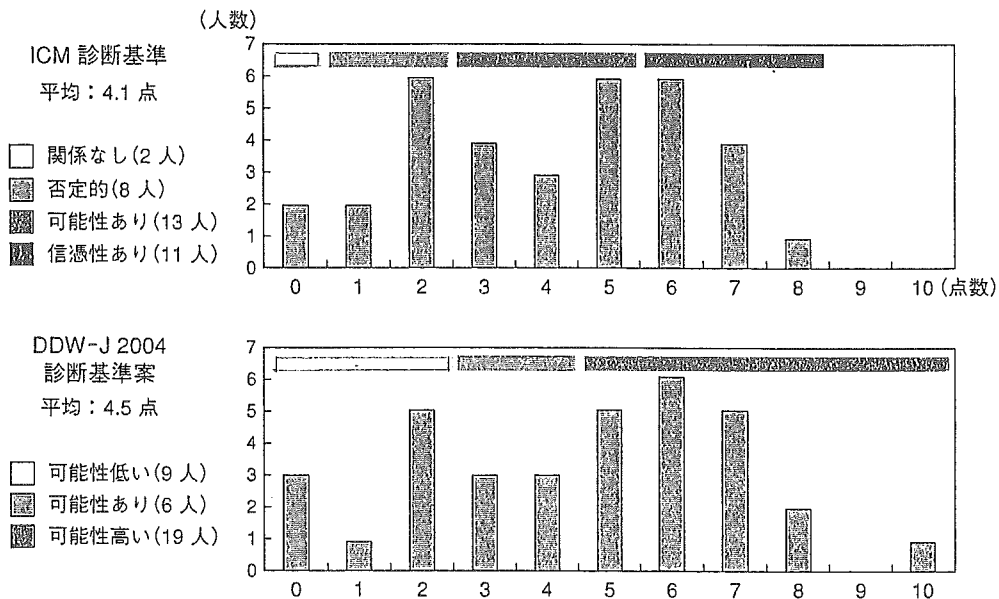


図 11 診断基準によるスコアリング：二次アンケート調査(健康食品分)

一(SNMC)が47%(16例)と最も多く使用され、ステロイド使用例は24%(8例)であった。原因食品の中止のみで経過観察された事例も38%(13例)認めた。肝移植例の報告は認めなかった(図10)。転帰は、寛解44%(15例)、軽快47%(16例)と、肝障害の改善が見られたものが合わせて90%以上を占めていた。不変、不明は各3%(1例)、死亡は3%(1例)であったが原因は他疾患であった(図10)。

一次調査で死亡とされた5例のうち、健康食品が原因と特定可能な事例は1例認めたが、この事

例は二次調査には含まれていなかった。また、一次調査で生体肝移植を施行された5例において、健康食品が原因と推定可能な事例は1例であったが、やはり二次調査には含まれていなかった。

二次調査で健康食品による肝障害と報告された事例に、薬物性肝障害の国際コンセンサス会議における診断基準(ICM基準)¹⁶⁾、DDW-Japan 2004で提案された診断基準案(DDW-J基準案)¹⁷⁾を適用してみると、平均スコアはICM基準で4.1点、DDW-J基準案で4.5点と総じて低く、それぞれで「否定的」と「関係なし」、「可能性低

い」と判定された事例を約3割程度認めた(図11)。

4) 考 察

「いわゆる健康食品」による肝障害に関しての一次調査、二次調査を通じて、健康食品によっても医薬品と同様に肝障害が惹起されることが示された。

今回のアンケート調査では、健康食品による肝障害は、比較的高齢の女性に多いということが明らかになった。また、併用薬が存在する頻度も高く、基礎に何らかの疾患を抱えていることが推測された。年齢、性別の差が発症のリスクに影響するかは明らかではないが、健康の保持に関心を持つ、あるいは健康に何らかの不安を持つこれらの層が健康食品を摂取する割合が高いことを反映しているものと思われる。飲酒歴やアレルギー症の既往についての割合は低く、これらが発症のリスクを予測する因子とすることは難しいと考えられた。肝障害のタイプは肝細胞障害型が多く、臨床病型は急性肝炎型が多かったが、これは他の報告とほぼ一致していた^{13, 15)}。

肝障害事例の転帰は、二次調査においては、寛解、軽快が殆どを占め、肝障害が原因となった死亡例は認めなかった。また、治療においても、多くが原因食品の中止を含めた内科的治療で軽快しており、肝移植を要した例などは認めなかった。但し、二次調査では重症例の拾い上げが充分でなかった可能性があり、これについては今後の追加調査が必要と考えられる。

健康食品による肝障害の診断については、特に定められたものはないため、一般の薬物性肝障害の診断基準を用いることの妥当性を検討した。今回、二次調査回答例についてのICM基準、DDW-J基準案を用いてのスコアは総じて低く、関係なし・否定的(ICM基準)、可能性低い(DDW-J基準案)と判定されるものも多かった。原因としては、医薬品と異なり、服用開始時期・期間などが明確でない場合があること、他の肝障害の原因の除外が完全ではないこと、基礎に肝疾患を持つ人が服用している場合があり、これによ

りスコアが減じられる場合があることなどが挙げられた。健康食品の場合は、医薬品と異なり、処方箋なども存在しないため、服用量、服用形態などについても詳細に聴取する必要があると考えられる。また、診断に際して有用とされるDLSTの施行率は65%であったが、陽性率はそのうちの4割程度と決して高くはなかった。アレルギー性機序のものがそれほど多くなかったためとも考えられるが、DLSTの検査自体の信頼性、特に外注で検査された場合の問題点は以前より指摘されており、この点については今後検討されるべきと思われる。また、保険適用外検査であること、併用薬や複数の健康食品を摂取している場合があることなどが、検査の施行率に影響している可能性も考えられる。

上記は、既存の薬物性肝障害の診断基準を使うことの妥当性を否定するものではない。但し、以上のことを考慮すれば、診断基準および肝生検所見などを参考としながら、肝臓専門医が最終的な判断をすべきであると考えられる。

今回の調査でも、原因と考えられた健康食品は多岐に亘っており、受診まで至らない軽症例を含めれば、健康被害の実数はさらに増加するものと思われるが、これらの拾い上げの方法については、今後の課題になると考えられる。

「いわゆる健康食品」においては、製品の規格が厳密に決められていないことが、原因の究明を困難にしている。すなわち、主成分が同一の健康食品でも、その含有量やその他の含有成分は異なることがあり、主成分の量が肝障害の発生に寄与した可能性、あるいは主成分以外の含有成分が肝障害の原因である可能性については常に考慮が必要と考えられる。

実際、東京都の行った平成15年度第1回健康食品試買調査では80品目中9品目、平成16年度第2回調査では79品目中2品目から、本来医薬品にしか使用できない成分が検出されたこととされている¹⁶⁾。先述の中国製やせ薬も、甲状腺末やニトロソフェンフルラミンが含有されており、これが肝障害の原因となっていた。また、健康食品の

原材料としてさまざまな動植物が使用されることより、環境中からの化学物質による汚染や、製造過程での化学物質の混入の可能性も考えられる。田端らによるアガリクスに含まれるガドニウム含有量に関しての報告は、この1例として挙げられる¹⁹⁾。

また、今回の調査の原因として最も多く挙げられたウコンについては、多種類の製品が流通しており、やはり、肝障害の報告は製品ごとに異なる可能性もあることを考慮する必要がある。殆どは「秋ウコン」と呼ばれるものと考えられるが、同属の植物として「春ウコン」と呼ばれるキョウオウや「紫ウコン」と呼ばれるガジュツがある。これらの中で肝障害発症のリスクが同一であるという保証はなく、それを明らかにできなかった点は今回の調査の問題点と言える。また、ウコン数種の鉄含有量を調べた報告では、製品の中には牛レバーに匹敵する高い数値を示すものもあったとされ²⁰⁾、このような鉄含有量の多いウコン製品を長期間大量に内服すると、鉄過剰になることが予測される。C型慢性肝炎患者においては、肝臓への鉄蓄積により肝障害の増悪が見られることが明らかになっており、ウコンを内服することへの問題点を指摘する報告もある¹⁴⁾。これについても今後検討が必要と考えられる。

以上のように、健康食品においては製品ごとの肝障害の発症頻度の検討なども必要と考えられるが、現状では困難と言わざるを得ない。多くの製品が流通していること、医薬品と異なり、一般への浸透の程度の把握が困難なことも、肝障害、健康被害の実態の把握を困難にしていると考えられる。

薬物性肝障害の原因の究明は、健康食品が原因である場合に限らず重大な医学的問題である。一般に肝毒性が報告されていない薬物による肝障害は、アレルギー性機序によって起こる場合、肝細胞内の薬物代謝酵素の特異性の違いが肝毒性の代謝物の増加の方向に作用する場合に大別される。健康食品による肝障害においても、同様の機序が関与していると考えられるが、それを明らかにす

るためにも、さらに詳細な個々の事例の調査が必要と考えられる。

おわりに

「いわゆる健康食品」によっても、肝障害などの健康被害が起こり得ることが明らかになった。健康食品による健康被害の拡大を防ぐためには、原因の究明を進めると共に、健康食品においても肝障害などが発生する可能性があることを認識し、安易にこれに頼らぬよう、また、疾患の治療・予防に際しては、医師への相談を優先させるよう一般に啓蒙していくことが必要と考えられる。また、医師も健康食品の有効性や安全性については常に留意し、正確な情報を把握し、適切な指導が行えるようにする必要があると考える。下記に厚生労働省などの健康食品の安全性・有効性情報に関するホームページアドレスを記載するので参考にされたい。

厚生労働省(食品安全情報)

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/index.html>

内閣府食品安全委員会 <http://www.fsc.go.jp>

独立行政法人国立健康・栄養研究所

<http://hfnet.nih.go.jp/main.php>

国立医薬品食品衛生研究所(食品に関する情報)

<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/index.html>

国民生活センター <http://www.kokusen.go.jp/>

東京都健康局食品医薬品安全部(いわゆる健康食品ナビ)

<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/anzen/supply/index.html>

追記

この調査研究は、平成15年度厚生労働省科学研究費補助金 厚生労働省特別研究事業「いわゆる健康食品による健康被害事例のリスク分析のための研究」(主任研究者:愛知医科大学消化器内科 各務伸一)、平成16年度厚生労働省科学研究費補助金 食品の安全性高度化事業「いわゆる健康食品の健康影響と健康被害に関する研究」(主任研究者:独立行政法人国立健康・栄養研究所食品機能研究部 斎藤衛郎)の一環として行われたも

のであること付記します。分担研究者、研究協力者、アンケートの多大なるご協力を頂いた施設の先生方に心より御礼申し上げます。一次調査には多数の施設からのご協力を頂きましたが、紙面の都合上、以下に、二次調査にご協力頂いた施設のみを列記させていただきます。

【二次アンケート調査協力施設】

久留米大学病院, 岩手医科大学, 東京通信病院, 大阪大学医学部附属病院, 兵庫医科大学, 大阪労災病院, 倉敷中央病院, 熊本地域医療センター, 赤磐医師会病院, 獨協医科大学病院, 自治医科大学, 日立総合病院, 東京慈恵会医科大学附属青戸病院, 帝京大学, 国際医療福祉大学・山王病院, 新潟大学, 長岡赤十字病院, 富山県立中央病院, 名古屋大学, 中京病院, 岐阜市民病院, 県立岐阜病院, 三重大学, 京都府立医科大学, 大阪市立大学, 大阪鉄道病院, 東大阪市立総合病院, 市立吹田病院, 市立貝塚病院, 岡山大学, 山陰労災病院, 福岡市民病院, 長崎大学, 佐世保共済病院 (以上)

文 献

- 厚生労働省. 食品安全情報. 保健機能食品・健康食品ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/index.html>
- 独立行政法人国立健康・栄養研究所. 「健康食品」に関する制度の概要. <http://hfnet.nih.go.jp/contents/detail.php?no=168>
- 厚生労働省. 健康被害情報・無承認無認可医薬品情報. 中国製ダイエット用健康食品関連情報. <http://www.mhlw.go.jp/kinkyu/diet/index.html>
- 厚生労働省. 中国製ダイエット用健康食品(未承認医薬品)による健康被害事例等. <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2002/07/h0719-3.html>
- Bellec G, Dreano Y, Lozach P, *et al.*: Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2029-2034.
- Morse MA, Lu J, Stoner GD, *et al.*: Metabolism of N-nitrosobenzylmethylamine by human cytochrome P-450enzymes. *J Toxicol Environ Health* 1999; 58: 397-411.
- Foster BC, Vandenhoeck S, Li KY, *et al.*: Effect of several Chinese natural health products of human cytochrome P450 metabolism. *J Pharmaceut Sci* 2002; 5: 185-189.
- 神代龍吉, 日野照子, 古賀郁利子, 他: やせ薬による薬物性急性肝炎. *肝臓* 2003; 44: 113-116.
- 徳永 晋, 安田 宏, 山田雅哉, 他: ステロイドパルス療法が奏効した中国製やせ薬「減肥膠囊」が原因と考えられる重症肝障害の1例. *肝臓* 2003; 44: 85.
- 古賀裕之, 田口 順, 石井邦英, 他: 中国製ダイエット食品による劇症肝炎・亜急性型の1救命例. *肝臓* 2003; 44: 117-122.
- 足立雅之, 石井裕正: 中国製「健康食品」による健康被害. いわゆる痩せ薬問題について臨床方面から. *日中医学* 2003; 17: 16-19.
- 田代眞一: 中国製「健康食品」による健康被害. いわゆる痩せ薬問題について薬学方面から. *日中医学* 2003; 17: 20-22.
- 佐田通夫, 久持顕子, 中沼安二, 鹿毛政義, 各務伸一, 沖田 極: 痩せ薬・健康食品による薬物性肝障害2次全国調査集計結果. *肝臓* 2004; 45: 96-106.
- 石田 聡, 小島裕治, 大山田 純, 他: 健康食品による薬物性肝障害. *肝胆膵* 2004; 48: 747-755.
- 恩地森一, 滝川 一, 村田洋介, 他: 民間薬および健康食品による薬物性肝障害の調査. *肝臓* 2005; 46: 142-148.
- Benichou C: Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an International Consensus Meeting. *J Hepatol* 1990; 11: 272-276.
- 滝川 一, 恩地森一, 高森頼雪, 他: DDW-J 2004 ワークショップ 薬物性肝障害診断基準の提案. *肝臓* 2005; 46: 85-90.
- 東京都健康食品医薬品案全部(いわゆる健康食品ナビ). 東京都の健康食品対策. <http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/anzen/supply/taisaku.html>
- 田端節子, 宮川弘之, 山嶋裕幸子, 他: 健康食品に含まれる化学物質の実態調査. *東京衛研年報* 2002; 53: 101-107.
- 岩田加寿子, 垣内雅彦, 生駒次朗, 他: C型慢性肝炎に対する鉄摂取制限食の効果. *JJPEN* 2001; 23: 165-171.

EFFECTS OF SAW PALMETTO EXTRACT ON MICTURITION REFLEX OF RATS AND ITS AUTONOMIC RECEPTOR BINDING ACTIVITY

TOMOMI OKI, MAYUMI SUZUKI, YASUHIKO NISHIOKA, AKIO YASUDA, KEIZO UMEGAKI
AND SHIZUO YAMADA*

From the Department of Biopharmacy and Center of Excellence Program in the 21st Century, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka (TO, MS, SY), Shizuoka, OTC Product R and D Department, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd. (YN, AY), Tokushima and National Institute of Health and Nutrition (KU), Tokyo, Japan

ABSTRACT

Purpose: We examined the effects of saw palmetto extract (SPE) on the rat micturition reflex and on autonomic receptors in the lower urinary tract.

Materials and Methods: The effect of SPE was examined on cystometrograms of anesthetized rats induced by intravesical infusion of saline or 0.1% acetic acid. SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats received repeat oral administration of SPE and nighttime urodynamic function was determined. The autonomic receptor binding activity of SPE in the rat bladder and prostate was examined by radioligand binding assay.

Results: Intraduodenal administration of SPE (60 mg/kg) in anesthetized rat cystometry caused a significant increase in the micturition interval, micturition volume and bladder capacity during intravesical saline infusion. Also, similar administration of SPE at doses of 12 and 20 mg/kg significantly reversed the shortened micturition interval as well as the decreased micturition volume and bladder capacity due to 0.1% acetic acid infusion in a dose dependent manner. In conscious SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats repeat oral administration of SPE (6 mg/kg daily) constantly increased the micturition interval and concomitantly decreased voiding frequency. SPE inhibited specific binding of [³H]NMS ([N-methyl-³H]scopolamine methyl chloride) (bladder) and [³H]prazosin (prostate) with IC₅₀ values of 46.1 and 183 μg/ml, respectively.

Conclusions: SPE significantly alleviates urodynamic symptoms in hyperactive rat bladders by increasing bladder capacity and subsequently prolonging the micturition interval. Our data may support the clinical efficacy of SPE for the treatment of lower urinary tract symptoms.

KEY WORDS: bladder; urodynamics; Permixon; rats, Sprague-Dawley

Benign prostatic hyperplasia (BPH) and associated lower urinary tract symptoms (LUTS) are common disorders in aging men. The 2 main forms of internationally accepted medical treatment are inhibitors of 5 α -reductase, such as finasteride or α_1 -adrenoceptor antagonists, with the latter being more effective.¹ Nevertheless, plant extracts are widely used for the treatment of BPH and related LUTS. In fact, phytotherapeutic agents, including saw palmetto extract (SPE), are popular in many European countries, where herbal remedies represent up to 80% of all drugs prescribed for these disorders.² Debruyne et al reported that Permixon (Pierre Fabre Médicament, Castres, France), a lipid-sterolic extract of SPE, and α_1 -blocker were equivalent for the medical treatment of LUTS in men with BPH during 12 months.³

Numerous mechanisms of SPE have been proposed, including 5 α -reductase inhibition, and antiandrogenic, antiproliferative, anti-inflammatory and anti-edema effects.⁴ However, most pharmacological effects were observed at relatively high doses of SPE.^{5,6} Thus, none of these mechanisms for SPE has ever convincingly been demonstrated to be therapeutically relevant in vivo.^{7,8} We noted the relatively potent smooth muscle relaxant activity by SPE observed in isolated tissues such as the bladder of guinea pigs and rats.⁹ However, to our knowledge the smooth muscle relaxation of

this extract in the lower urinary tract function has not been previously verified by in vivo pharmacology. Therefore, in this study we clarified the effect of SPE on urodynamic functions in anesthetized rat cystometry, and in conscious and unrestrained SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats. Our data demonstrate that SPE is effective for improving the hyperactive bladder response of rats, suggesting the clinical efficacy of this extract for LUTS in patients with overactive bladder. Also, this extract has been shown to bind to autonomic receptors in the rat lower urinary tract.

MATERIALS AND METHODS

Materials. SPE (Serenoa repens purified extract) was suspended in 0.5% methyl cellulose. [³H]NMS ([N-methyl-³H]scopolamine methyl chloride) (3.03 TBq/mmol) and [³H]prazosin (2.98 TBq/mmol) were purchased from PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, Massachusetts. All other chemicals were purchased from commercial sources.

Animals. Male Sprague-Dawley rats (SLC Co., Ltd., Hamamatsu, Japan) weighing about 250 to 350 gm were used. Also, the male subline of spontaneously hypertensive/National Institutes of Health corpulent rats [SHR/NDmc-cp (cp/cp)] (SLC Co., Ltd.) was also used. They were housed in the laboratory with free access to food and water, and maintained on a 12-hour dark/light cycle in a room with controlled temperature (about 20C to 26C) and humidity (about 30% to 70%).

Cystometry. The procedure of cystometry in anesthetized rats was performed as previously described.¹⁰ Rats were anesthetized by subcutaneous injection of urethane (1.0 gm/

Submitted for publication July 23, 2004.

Supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (2)15591703 from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

* Correspondence: 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan (telephone: +81-54-264-5631; FAX: +81-54-264-5635; e-mail: yamada@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp).

kg) and the duodenum was cannulated for the administration of SPE. The bladder was exposed through a short midline incision. It was cannulated with polyethylene tubing (PE-50, Clay-Adams, Parsippany, New Jersey) that was heat flared at the end, inserted into the bladder dome and ligated. Using a T connector the bladder catheter was connected to a pressure transducer (DX-360, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) and to an infusion pump (STC-521, Terumo Corp., Tokyo, Japan). Saline or 0.1% acetic acid maintained at 37°C at a rate of 4.0 ml per hour was instilled into the bladder of rats and urodynamic parameters were monitored by cystometry recording. Voided urine was cumulatively collected into a urine cup containing water that was placed on a microbalance (HF-200, A and D Co., Ltd., Tokyo, Japan). Analog voltage from the microbalance was received by a PowerLab/8sp (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, New South Wales, Australia) and processed by MacLab8s proprietary client software, version 3.3 (Apple, Sunnyvale, California). After a stable cystometrogram was obtained urodynamic parameters were measured, including maximum micturition pressure, baseline pressure, threshold pressure, micturition interval, mean micturition volume and bladder capacity (infusion rate \times micturition interval). The pretreatment period was considered the 20 minutes of saline or 0.1% acetic acid infusion before SPE administration. The effects of SPE (6 to 60 mg/kg) were analyzed 20 to 40 minutes after intraduodenal administration.

Frequency-volume charts. SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats were administered SPE (6 mg/kg) orally from 3:00 to 5:00 p.m. for 14 days. The frequency-volume chart was continuously monitored from 6:00 p.m. to 6:00 a.m. on the next day. Voided urine was cumulatively collected into a urine cup containing liquid paraffin that was placed on a microbalance. Analog voltage from the microbalance was received by a PowerLab/8sp and processed by MacLabs8s. Voiding frequency and mean voided volume for 12 hours was calculated by proprietary client software. Water intake was measured before and during the oral administration of SPE.

Binding assay of [³H]NMS and [³H]prazosin in rat tissues. Binding assays of muscarinic and α_1 -adrenoceptor receptors were performed using [³H]NMS¹¹ and [³H]prazosin, respectively. Rats were exsanguinated by taking the blood from the descending aorta under temporary anesthesia with diethyl ether and the tissues were then perfused with cold saline from the aorta. The bladder and prostate were then dissected and the tissues were minced with scissors. For the [³H]NMS binding assay the bladder was homogenized using a Polytron homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) in 19 volumes of ice-cold 30 mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5). The homogenate was then centrifuged at 40,000 \times gravity for 20 minutes at 4°C. The resulting pellet was finally resuspended in ice-cold buffer. For the [³H]prazosin binding assay the prostate was homogenized in 30 volumes of ice-cold 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.5). The homogenate was then centrifuged at 40,000 \times gravity for 20 minutes at 4°C. After suspension in cold buffer the pellet was centrifuged further at 40,000 \times gravity for 20 minutes at 4°C and the resulting pellet was finally resuspended in cold buffer.

In the presence of various concentrations (10 to 300 μ g/ml) of SPE rat bladder and prostate homogenates were incubated with [³H]NMS (456 pM) and [³H]prazosin (516 pM) in 30 mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5) and 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.5), respectively. Incubation was done for 60 ([³H]NMS) and 30 ([³H]prazosin) minutes at 25°C. The reaction was terminated by rapid filtration (Cell Harvester, Brandel Co., Gaithersburg, Maryland) through GF/B glass fiber filters (Whatman, Brentford, United Kingdom) and the filters were rinsed 3 times with 3 ml ice-cold buffer. Tissue bound radioactivity was extracted from the filters by placing them overnight by immersion in scintillation fluid and radioactivity was then determined. Specific binding of [³H]NMS and [³H]prazosin

was determined experimentally from the difference between counts in the absence and presence of 1 μ M atropine and 10 μ M phentolamine, respectively.

Data analysis. Cystometry and frequency-volume chart data are expressed as the mean \pm SEM and analyzed by Student's paired t test. The binding activities of SPE to muscarinic and α_1 -adrenoceptors were estimated by IC₅₀ values, which are the concentrations of SPE necessary to displace 50% of the specific binding of [³H]NMS and [³H]prazosin, as determined by log probit analysis. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of single administration on cystometric parameters. Figure 1 shows that reproducible micturition patterns were obtained throughout the cystometry period in anesthetized rats. In saline treated rats the intraduodenal administration of vehicle had little effect on urodynamic parameters (see table, fig. 1, A). These urodynamic parameters in saline infused rats were unaffected by the intraduodenal administration of SPE at the 6 mg/kg dose but the higher 60 mg/kg dose of SPE exerted a significant increase (40.5% to 42.6%) in micturition interval, mean micturition volume and bladder capacity as well as a significant decrease (8.1%) in maximum micturition pressure (see table, fig. 1, B). SPE (6 and 60 mg/kg) had little effect on baseline and threshold bladder pressure.

Following the intravesical infusion of saline containing 0.1% acetic acid in anesthetized rats compared with saline infusion alone the micturition interval (6.22 \pm 0.57 vs 8.64 \pm 0.73 minutes in 10 and 12, respectively) was significantly shortened (28.0%, $p < 0.05$). Mean micturition volume (0.60 \pm 0.05 vs 0.42 \pm 0.04 ml) and bladder capacity (0.57 \pm 0.05 vs 0.42 \pm 0.04 ml) were also significantly decreased (30.0% and 26.3%, respectively, $p < 0.05$).

Following the intraduodenal administration of SPE at doses of 12 and 20 mg/kg compared to results in 0.1% acetic acid treated rats there were significant and dose dependent increases in the micturition interval (15.1% vs 47.7%), mean micturition volume (15.9% vs 65.0%) and bladder capacity (14.0% vs 47.5%) (see table, fig. 1, C). In extract administered rats baseline pressure and maximum micturition pressure were slightly but significantly decreased but the effect was not dose related. Threshold pressure in rats was unaffected by SPE administration.

Effects of repeat administration on urodynamic parameters. The effect of repeat oral administration of SPE on urodynamic parameters in conscious and unrestrained SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats was examined by recording nighttime micturition frequency-volume charts. Following the oral administration of a relatively low dose of SPE (6 mg/kg) in SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats the micturition interval was continuously increased during repeat treatment for 3 to 8 days after the initial transient decrease compared with pretreatment values (46.0 \pm 2.3 minutes in 6, fig. 2, A). Concomitantly voiding frequency in these rats constantly decreased after the initial transient increase following SPE administration (fig. 2, C). On the other hand, the 2 urodynamic parameters during treatment for 9 to 14 days were comparable with pretreatment values. Mean micturition volume tended to constantly increase during oral SPE administration (fig. 2, B). Also, total micturition volume was significantly increased for 9 to 14 days after the start of SPE administration (fig. 2, D). Water intake was little changed by repeat SPE administration (data not shown).

Effects on bladder muscarinic and prostatic α_1 -adrenergic receptors. SPE at concentrations of 10 to 300 μ g/ml competed with [³H]NMS and [³H]prazosin for binding sites in the rat bladder and prostate, respectively, in a concentration dependent manner (fig. 3). SPE IC₅₀ values of [³H]NMS and [³H]prazosin binding were 46.1 \pm 5.6 μ g/ml in 7 preparations

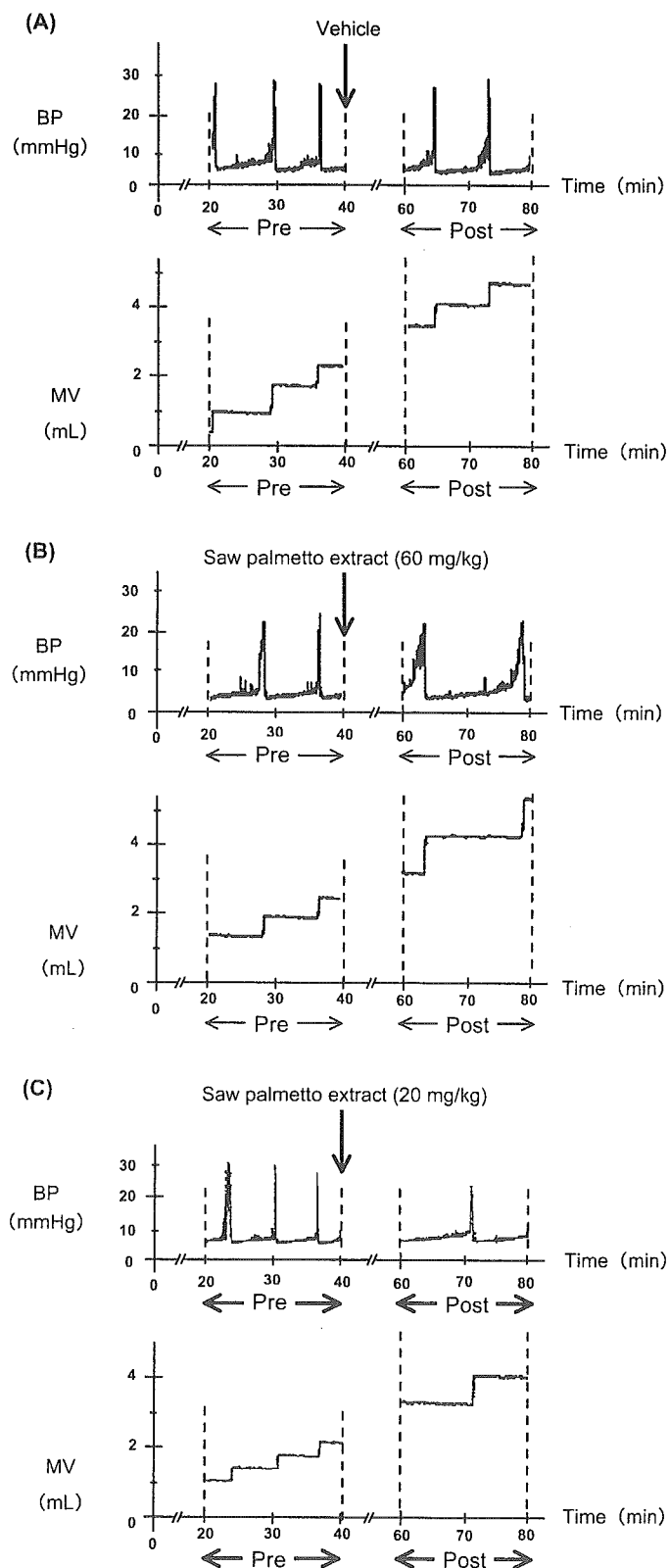


FIG. 1. Effects of intraduodenal administration of 6 to 60 mg/kg SPE on bladder pressure (BP) and micturition volume (MV) on cystometrograms of saline (A and B) and or 0.1% acetic acid (C) infused anesthetized rats. There were spontaneous contractions during bladder filling. Arrow indicates intraduodenal administration of 0.5% methyl cellulose vehicle (A), and 60 mg/kg (B) and 20 mg/kg (C) SPE. Pre, pretreatment. Post, posttreatment.

and $183 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ in 4, respectively. The SPE IC_{50} value of bladder $[^3\text{H}]\text{NMS}$ binding was significantly lower than that of prostatic $[^3\text{H}]\text{prazosin}$ binding ($1/4$, $p < 0.001$).

DISCUSSION

The intraduodenal administration of SPE at the 60 mg/kg dose significantly increased bladder capacity in anesthetized rats, resulting in a prolonged micturition interval and enhanced mean micturition volume. It is well known that hyperreflexia manifested by enhanced voiding frequency is evoked by stimulating sensory afferents with dilute acetic acid solution in the cystometry infusate.^{10,11} Also, in the current study continuous intravesical infusion of 0.1% acetic acid in anesthetized rats produced a hyperactive bladder response, which was characterized by a decrease in bladder capacity and mean micturition volume with a concomitant shortening of the micturition interval. It was evident that such a hyperactive bladder response due to acetic acid infusion was significantly attenuated by relatively low doses (12 and 20 mg/kg) of SPE given intraduodenally in a dose dependent manner. In fact, the values of these urodynamic parameters on rat cystometry after SPE administration at the 20 mg/kg dose were almost identical to control values in saline infused rats without acetic acid.

It should be noted that the intensity of the enhanced micturition interval, mean micturition volume and bladder capacity by SPE at the intraduodenal dose of 20 mg/kg in acetic acid infused rats was almost equivalent to that at the 60 mg/kg dose in saline infused rats (see table). The interpretation of such results is that the hyperactive bladder may be 3-fold more susceptible to SPE than the normal bladder. Thus, it is notable that hyperactive rather than normal bladder appears to be more sensitive to SPE. At any rate the current study may provide the first in vivo functional evidence to suggest that SPE significantly improves bladder instability.

Although the precise mechanism by which SPE attenuates a hyperactive bladder response in acetic acid infused rats remains to be clarified, there are several indications that significantly suppress smooth muscle tone. Previous pharmacological studies have demonstrated the spasmolytic effects of SPE on different isolated smooth muscle organs, such as the ileum, bladder, aorta and uterus in guinea pigs and rats.⁹ These investigators speculated that the inhibitory effects of SPE on agonist or KCl induced smooth muscle contractions are mediated at least in part via the antagonistic effects on α -adrenoceptors, muscarinic cholinergic receptors and calcium channels with the possible involvement of other activities. In fact, Goepel et al noted that SPE displaced α_1 -adrenoceptor radioligands to bind to human prostatic and cloned human α_1 -adrenoceptors in a noncompetitive manner and concomitantly suppressed agonist induced formation of $[^3\text{H}]\text{-inositol phosphate}$.¹² Furthermore, Noronha-Blob et al observed in in vitro and in vivo functional studies that anticholinergic activity rather than spasmolytic or local anesthetic activity of smooth muscle relaxants may have an important role in prevailing therapies for the suppression of bladder hyperactivity.¹³ Also, it is worth noting that a relatively low concentration of SPE competed with bladder $[^3\text{H}]\text{NMS}$ binding sites as well as prostatic $[^3\text{H}]\text{prazosin}$ binding sites in a concentration dependent manner and binding activity was significantly (4 times) greater to muscarinic receptors than to α_1 -adrenoceptors (fig. 3). Thus, it seems likely that SPE increases bladder capacity, possibly via antimuscarinic and/or spasmolytic effects on bladder smooth muscle, resulting in increased micturition volume and a prolonged micturition interval. Nevertheless, it cannot be ruled out that SPE may have some additional peripheral or central neuronal effects because bladder instability may possibly arise not only from a myogenic, but also from a neurogenic mechanism.¹⁴

We further examined the urodynamic effect of repeat oral administration of SPE in conscious and unrestrained SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats. The SHR/NDmc-cp (cp/cp) strain is a strain of spontaneously hypertensive/National Institutes of

Effects of intraduodenal SPE administration (6 to 60 mg/kg) on urodynamic parameters in cystometrograms of saline and 0.1% acetic acid infused anesthetized rats

	Mean Saline \pm SE (mg/kg SPE)		Mean Acetic Acid \pm SE (mg/kg SPE)	
	6	60	12	20
Micturition interval (mins):				
Pretreatment	9.93 \pm 1.07	7.71 \pm 0.90	6.44 \pm 1.10	5.99 \pm 0.47
Posttreatment	9.07 \pm 1.09	10.83 \pm 1.77*	7.41 \pm 1.25*	8.85 \pm 1.07*
Mean micturition vol (ml):				
Pretreatment	0.69 \pm 0.07	0.54 \pm 0.06	0.44 \pm 0.08	0.40 \pm 0.04
Posttreatment	0.66 \pm 0.09	0.77 \pm 0.13*	0.51 \pm 0.08*	0.66 \pm 0.08*
Bladder capacity (ml):				
Pretreatment	0.65 \pm 0.06	0.51 \pm 0.06	0.43 \pm 0.07	0.40 \pm 0.03
Posttreatment	0.60 \pm 0.07	0.72 \pm 0.12*	0.49 \pm 0.08*	0.59 \pm 0.07*
Baseline pressure (mm Hg):				
Pretreatment	3.35 \pm 0.19	3.17 \pm 0.10	3.99 \pm 0.26	3.54 \pm 0.16
Posttreatment	3.20 \pm 0.22	2.93 \pm 0.21	3.69 \pm 0.23	3.37 \pm 0.11*
Threshold pressure (mm Hg):				
Pretreatment	5.02 \pm 0.13	4.74 \pm 0.16	5.05 \pm 0.31	4.44 \pm 0.19
Posttreatment	4.78 \pm 0.13	4.81 \pm 0.15	5.13 \pm 0.27	4.62 \pm 0.25
Max micturition pressure (mm Hg):				
Pretreatment	26.1 \pm 2.2	28.3 \pm 0.8	29.3 \pm 1.7	25.6 \pm 1.4
Posttreatment	23.9 \pm 2.0	26.0 \pm 0.7*	25.7 \pm 2.0†	23.0 \pm 0.5

Values in 5 to 7 rats.

* Significantly different vs pretreatment (Student's paired t test $p < 0.05$).

† Significantly different vs pretreatment (Student's paired t test $p < 0.01$).

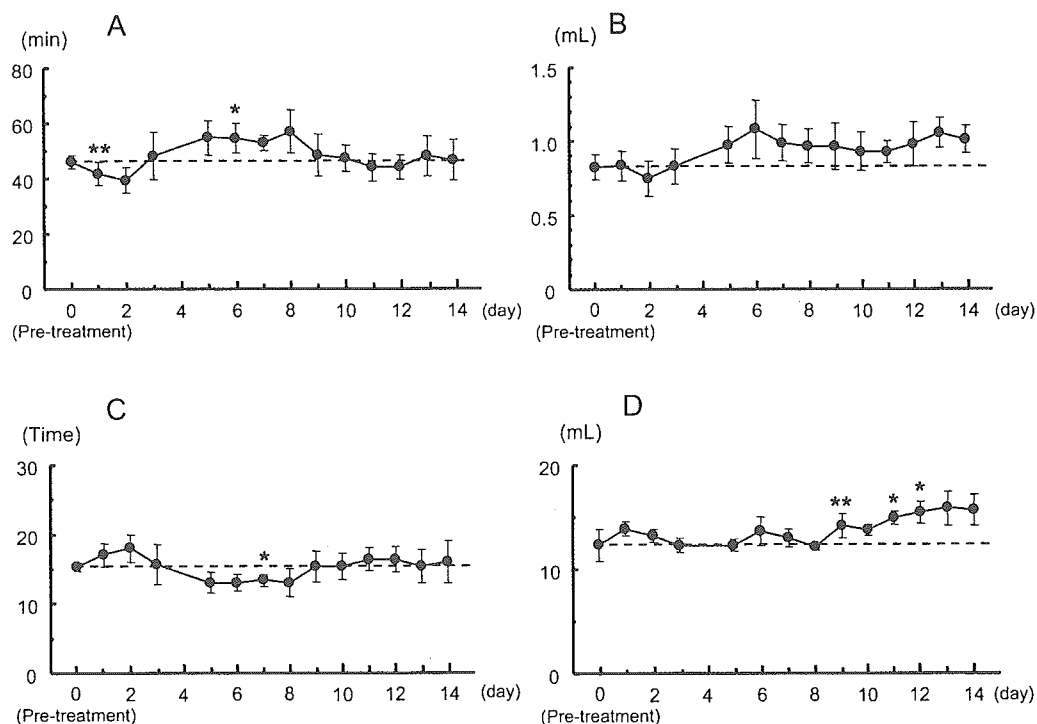


FIG. 2. Effects of repeat SPE oral administration on nighttime urodynamic function from 6:00 p.m. to 6:00 a.m., that is micturition interval (A), mean micturition volume (B), voiding frequency (C) and total micturition volume (D), in conscious and unrestrained SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats that received 6 mg/kg SPE orally daily for 14 days. Point represent mean \pm SE of 3 SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats. Dotted lines indicate pretreatment values. Single asterisk indicates significantly different vs pretreatment (Student's paired t test $p < 0.05$). Double asterisks indicate significantly different vs pretreatment (Student's paired t test $p < 0.01$).

Health corpulent rat as a model of type 2 diabetic nephropathy. SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats showing significant hypertension retain a common genetic background with nondiabetic SHR rats.¹⁵ Adrenergic innervation is generally increased in the SHR strain but SHR bladders are hyperactive relative to Wistar-Kyoto rat bladders.¹⁶ Clemow et al reported that with an increase in adrenergic efferent innervation there is an increase in sensory afferent innervation in SHR bladders.¹⁷ Their data suggest that the increase in sensory afferent nerve density may underlie an enhanced voiding reflex. It was shown that repeat oral administration of SPE (6 mg/kg daily) in conscious SHR/NDmc-cp (cp/cp)

rats for 8 days produced a transient shortening and subsequent sustained prolongation of the micturition interval and concomitantly SPE administration decreased voiding frequency. Thus, it is likely that repeat SPE administration alleviates hyperactivity of the SHR bladder, as observed by a single intraduodenal administration of this extract on anesthetized rat cystometry. However, such urodynamic improvement of SPE in SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats apparently disappeared after longer repeat administration more than 9 days in duration. The clear explanation for this result is lacking but it may be in part attributable to the significant increase in total micturition volume associated with extract administration for

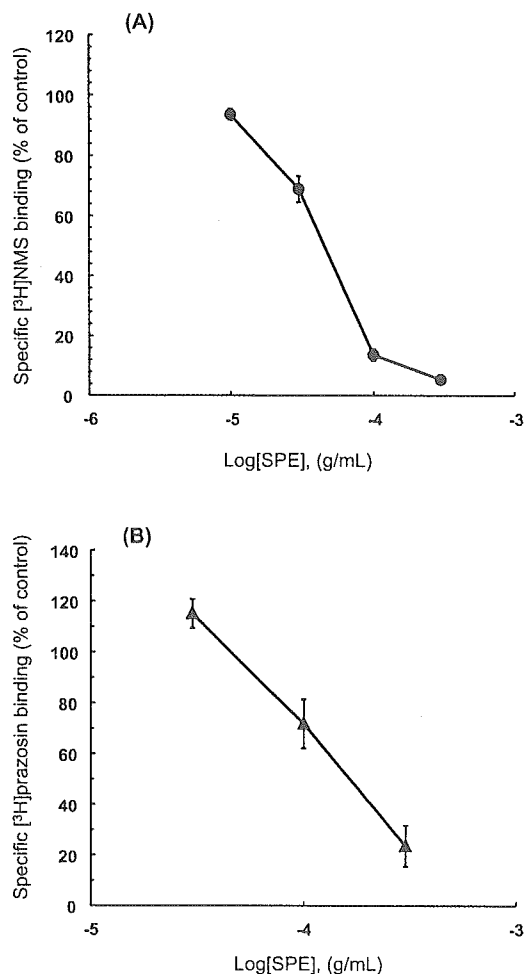


FIG. 3. SPE inhibition of specific binding of [³H]NMS in rat bladder (A) and [³H]prazosin in prostate (B). Specific binding of [³H]NMS (456 pM) and [³H]prazosin (516 pM) in homogenates of rat bladder and prostate, respectively, was measured in absence and presence of 3 or 4 concentrations (10 to 300 μ g/ml) of SPE. Points represent mean \pm SE in 4 ([³H]prazosin) or 7 ([³H]NMS) rats.

more than 9 days. To our knowledge basic pharmacological evidence for the diuretic effect of SPE has not been reported previously but a mild diuretic effect in humans has been described.¹⁸ However, until the pharmacological effects of SPE on lower urinary tract function are definitely known we should continue to interpret variable urodynamic effects of this extract in conscious SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats with caution.

In the majority of men with BPH and LUTS the major treatment goal is the relief of irritative and obstructive symptoms. These symptoms have been shown to be significantly alleviated by phytotherapeutic agents, including SPE.^{3,19} Our data support this clinical usefulness.

CONCLUSIONS

SPE may improve urodynamic symptoms in hyperactive rat bladders by increasing bladder capacity and prolonging the micturition interval. In addition, SPE contains the constituent(s) exerting the binding activities of muscarinic and α_1 -adrenergic receptors in the lower urinary tract. Thus, our data may support the clinical efficacy of SPE for the treatment of LUTS accompanying overactive bladder.

SHR/NDmc-cp (cp/cp) rats were established at Disease Model Cooperative Research Association, Kyoto, Japan. *Serenoa repens* purified extract was provided by Indena Japan

Co., Ltd., Tokyo, Japan. K. Sakakura provided technical assistance.

REFERENCES

- Lepor, H., Williford, W. O., Barry, M. J., Brawer, M. K., Dixon, C. M., Gormley, G. et al: The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group. *New Engl J Med*, **335**: 533, 1996
- Buck, A. C.: Phytotherapy for the prostate. *Br J Urol*, **78**: 325, 1996
- Debruyne, F., Koch, G., Boyle, P., Da Silva, F. C., Gillenwater, J. G., Hamdy, F. C. et al: Comparison of a phytotherapeutic agent (Permixon) with an alpha-blocker (Tamsulosin) in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a 1-year randomized international study. *Eur Urol*, **41**: 497, 2002
- Koch, E.: Extracts from fruits of saw palmetto (*Sabal serrulata*) and roots of stinging nettle (*Urtica dioica*): viable alternatives in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia and associated lower urinary tracts symptoms. *Planta Med*, **67**: 489, 2001
- Sultan, C., Terraza, A., Devillier, C., Carilla, E., Briley, M., Loire, C. et al: Inhibition of androgen metabolism and binding by a liposterolic extract of "*Serenoa repens* B" in human foreskin fibroblasts. *J Steroid Biochem*, **20**: 515, 1984
- Paubert-Braquet, M., Richardson, F. O., Servent-Saez, N., Gordon, W. C., Monge, M. C., Bazan, N. G. et al: Effect of *Serenoa repens* extract (Permixon) on estradiol/testosterone-induced experimental prostate enlargement in the rat. *Pharmacol Res*, **34**: 171, 1996
- Carraro, J. C., Raynaud, J. P., Koch, G., Chisholm, G. D., Di Silverio, F., Teillac, P. et al: Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a randomized international study of 1,098 patients. *Prostate*, **29**: 231, 1996
- Gerber, G. S., Zagaja, G. P., Bales, G. T., Chodak, G. W. and Contreras, B. A.: Saw Palmetto (*Serenoa repens*) in men with lower urinary tract symptoms: effects on urodynamic parameters and voiding symptoms. *Urology*, **51**: 1003, 1998
- Gutierrez, M., Garcia de Boto, M. J., Cantabrana, B. and Hidalgo, A.: Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from *Sabal serrulata* fruit on smooth muscle. *Gen Pharmacol*, **27**: 171, 1996
- Woods, M., Carson, N., Norton, N. W., Sheldon, J. H. and Argentieri, T. M.: Efficacy of the β_3 -adrenergic receptor agonist CL-316243 on experimental bladder hyperreflexia and detrusor instability in the rat. *J Urol*, **166**: 1142, 2001
- Birder, L. A. and de Groat, W.: Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *J Neurosci*, **12**: 4878, 1992
- Goepel, M., Hecker, U., Krege, S., Rubben, H. and Michel, M. C.: Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human α_1 -adrenoceptors in vitro. *Prostate*, **38**: 208, 1999
- Noronha-Blob, L., Lowe, V. C., Peterson, J. S. and Hanson, R. C.: The anticholinergic activity of agents indicated for urinary incontinence is an important property for effective control of bladder dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, **251**: 586, 1989
- Tillig, B. and Constantinou, C. E.: Supraspinal N-methyl-D-aspartate receptor inhibition influences the micturition reflex and function of the upper urinary tract of anesthetized and conscious rats. *Neurourol Urodyn*, **22**: 164, 2003
- Nangaku, M., Miyata, T., Sada, T., Mizuno, M., Inagi, R., Ueda, Y. et al: Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J Am Soc Nephrol*, **14**: 1212, 2003
- Persson, K., Pandita, R. K., Spitsbergen, J. M., Steers, W. D., Tuttle, J. B. and Andersson, K. E.: Spinal and peripheral mechanisms contributing to hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, **275**: R1366, 1998
- Clemow, D. B., McCarty, R., Steers, W. D. and Tuttle, J. B.: Efferent and afferent neuronal hypertrophy associated with micturition pathways in spontaneously hypertensive rats. *Neurourol Urodyn*, **16**: 293, 1997
- Fetrow, C. W. and Avila, J. R.: Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines. Springhouse, Pennsylvania: Springhouse Corp., 1999
- Wilt, T. J., Ishani, A., Stark, G., MacDonald, R., Lau, J. and Mulrow, C.: Saw palmetto extracts for treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *JAMA*, **280**: 1604, 1998

ラットの排尿機能及び下部尿路受容体に対する ノコギリヤシ果実抽出液の薬理作用

静岡県立大学・薬学部・薬剤学教室・COE Program in the 21st Century¹

国立健康・栄養研究所², 大鵬薬品工業(株)ヘルスケア研究所³

鈴木真由美¹ 隠岐 知美¹ 丸山 修治¹
高木由希子¹ 梅垣 敬三² 西岡 安彦³
安田 昭男³ 山田 静雄¹

Pharmacological effects of Saw Palmetto Extract
on urodynamic functions and autonomic receptors in lower urinary tract of rats

Mayumi Suzuki¹, Tomomi Oki¹, Shuji Maruyama¹,
Yukiko Takagi¹, Keizo Umegaki², Yasuhiko Nishioka³,
Akio Yasuda³ and Shizuo Yamada¹

Department of Biopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences & COE Program in the 21st Century,
University of Shizuoka¹, National Institute of Health and Nutrition²
and OTC Product R and D Development, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.³

Abstracts

Saw Palmetto Extract (SPE) is approved as a medicine for benign prostatic hyperplasia (BPH) in some European countries, and is also available as a healthy food product in Japan. Numerous mechanisms of SPE have been proposed, including 5α -reductase inhibition, and antiandrogenic, antiproliferative, antiinflammatory and antiedema effects. However, none of these mechanisms for SPE has ever convincingly been shown to be therapeutically relevant *in vivo*. α -Adrenoceptor antagonists and muscarinic cholinceptor antagonists are commonly used in the treatment of lower urinary tract symptoms in patients with BPH and overactive bladder. Because SPE contains many constituents, it may improve voiding symptoms due to significant antagonism of α -adrenoceptors and muscarinic cholinceptors in the lower urinary tract. The present study was undertaken to clarify pharmacological effects of SPE on urodynamic functions and autonomic receptors in the lower urinary tract.

The intraduodenal administration of SPE in anesthetized rat cystometry significantly reversed the shortened micturition interval as well as the decreased micturition volume and bladder capacity induced by the intravesical injection of 0.1% acetic acid in a dose-dependent manner, and such effect of SPE was dose-dependently observed at relatively lower doses (12 and 20 mg/kg). The improvement of urodynamic parameters was also observed by repeated oral administration of SPE in SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats. SPE (10-1000 μ g/mL) inhibited specific binding of [³H]prazosin, [³H]NMS and (+)-[³H]PN 200-110 in the rat prostate and bladder in non-competitive manner. The binding activity of SPE based on IC₅₀ values of SPE was 2-4 times greater for muscarinic cholinceptors and 1,4-dihydropyridine (DHP) calcium channel antagonist receptors than for α -adrenoceptors. Repeated oral administration of SPE (0.6, 6, 60 mg/kg) in rats exerted significant alteration of Bmax values for prostatic [³H]prazosin binding and also for bladder [³H]NMS binding, suggesting significant autonomic receptor binding activities of SPE in the lower urinary tracts under *in vivo* condition. Furthermore, the SPE administration tended to alleviate the increased density of prostatic α -adrenoceptor binding sites (Bmax) evoked by repeated injection of testosterone in rats.

These data suggest that SPE significantly alleviates lower urinary tract symptoms in patients with BPH or overactive bladder by acting on autonomic receptors in the prostate and bladder.

Key words: Saw Palmetto Extract (SPE), urodynamic parameters, prostatic α -adrenoceptors, bladder muscarinic

要旨：ノコギリヤシ果実抽出液 (Saw palmetto extract: SPE) の排尿機能及び下部尿路受容体に対する作用を調べた。酢酸誘発頻尿ラットシストメトリーにおいて SPE は十二指腸内投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を低下した。この排尿パラメータに対する SPE の薬理作用は病態動物の SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE を反復経口投与することによっても認められた。SPE は前立腺 [^3H]prazosin, 膀胱 [^3H]NMS 及び膀胱 (+)-[^3H]PN 200-110 の特異的結合を濃度依存的に抑制し、この SPE の受容体結合活性は α_1 受容体よりムスカリン性受容体及び 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体に対し 2-4 倍高いこと並びに各受容体に対し非競合的結合様式を示すことが明らかになった。SPE は *in vivo* においても下部尿路の α_1 及びムスカリン性受容体に結合活性を示すことが示唆された。SPE の反復投与はテストステロン誘発肥大前立腺において認めた α_1 受容体数の増加に対し抑制傾向を示した。以上の結果から、SPE は臨床用量において下部尿路受容体への直接作用による前立腺肥大の機能的閉塞の解除や過活動膀胱の抑制などの薬理作用を示すことが示唆された。

キーワード：ノコギリヤシ果実抽出液 (SPE), 排尿パラメータ, 前立腺 α_1 受容体, 膀胱ムスカリン性受容体

緒 言

前立腺肥大症 (BPH) は、前立腺組織の肥大による機械的閉塞や、前立腺平滑筋の α_1 受容体緊張亢進による機能的閉塞により排尿困難や残尿などが認められる疾患であり、その有病率は高く、加齢とともに増加する。BPH は組織学的に60歳の男性では50%以上に、85歳までに約90%に認められ、その1/4に臨床症状が出現する¹⁾。本邦においても、厚生省統計資料によれば、全診療科における BPH の受療患者数は、1990年に25.6万人、98年には60.1万人と報告されており²⁾、高齢化、生活様式の欧米化及び治療薬の開発等による患者啓発の影響と思われる患者数の増加が認められる。

BPH の薬物治療には、一般的に α_1 遮断薬や抗アンドロゲン薬が使用されている²⁾ が、BPH を含めた排尿障害に対して、患者は自己判断で治療手段を選択することも多い。ヤシ科シュロ属のノコギリヤシ果実抽出液 (Saw palmetto extract: SPE)^{3,5)} は、ヨーロッパでは BPH に対する治療薬として用いられ、また本邦でも健康食品として注目されている。SPE の薬理作用としては、 5α -reductase 阻害作用⁶⁾、アンドロゲン受容体遮断作用⁷⁾、抗炎症作用⁸⁾、細胞増殖抑制作用⁹⁾、 α_1 受容体遮断作用¹⁰⁾ が *in vitro* 実験において報告されている。また臨床的に、SPE (320mg/day, Permixon[®]) の6ヶ月の投与により、BPH やそれに伴う頻尿に有効であるとの報告がある¹¹⁾。しかし、SPE の *in vivo* における排尿機能に対する作用や、BPH 及び過活動膀胱などの薬物治療において標的部位となる下部尿路 α_1 受容体及びムスカリン性受容体に対する作用については、殆んど明らかにされていない。本研究では、下部尿路に対する SPE の薬理作用を明らかにする目的で、シストメトリー法を用いた排尿機能に対する作用及び下部尿路受容体に対する作用を検討した。

方 法

I. 供試化合物および試薬

[7-Methoxy- ^3H]prazosin ([^3H]prazosin, 2.979TBq/mmol), [N-methyl- ^3H]scopolamine methyl

chloride ([^3H]NMS, 2.997TBq/mmol), (+)-[5-methyl- ^3H]PN 200-110 ((+)-[^3H]PN 200-110, 3.180TBq/mmol) 及び α , β -methylene ATP [2,8- ^3H]tetrasodium salt ([^3H] α β -MeATP, 580.9GBq/mmol) は PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA) 社より購入した。ノコギリヤシ果実抽出液 (SPE, SABALSELECT[™]) は Indena[®] (Italy) 社より供与された。SPE は0.5%メチルセルロース液に懸濁して用いた。その他の試薬は全て市販の特級規格品を使用した。なお、SPE は、超臨界抽出法により抽出された油状物質で、含有成分を表1に示した¹²⁾。

II. 実験動物

実験動物として、シストメトリー実験には8-9週齢 (体重: 250-350g) の SD 系雄性ラット、SPE2 週間反復投与実験には7週齢 (体重: 250-310g) の SHR/NDmc-cp (cp/cp) 雌性ラット、SPE4 週間反復投与実験には8-11週齢 (体重: 250-430g) の SD 系雄性ラット、テストステロン投与実験では56週齢 (体重: 550-800g) の SD 系雄性ラット (日本エスエルシー株) を使用し、ラット用固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株製) 並びに飲料水を自由に与えて、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ で飼育した。

III. シストメトリーによる膀胱内圧及び尿道排出液量の測定

ウレタン (1.1g/kg, 皮下投与: s.c.) 麻酔下、ラットを仰臥位に固定し腹部正中線に沿って切開後、静脈留置針 (ベニユーラ) を胃より挿入し胃幽門部を縫合糸で縛り固定した (SPE 十二指腸内投与用カテーテル)。次に、下腹部を切開して膀胱を露出させ、膀胱頂部に小切開を加え、膀胱内にポリエチレンチューブ (PE50: 日本ベクトンデイツキンソン株) を挿入した。切開部を結紮し、膀胱内に挿入したチューブの他端を圧トランスデューサー (ディスポーザブル血圧モニタリング用ライフキット DX-360: 日本光電株) に接続した。

ラットをボールマンケージ (アクリル製特注品: 山下技研(有)) に伏臥位に固定した。生理食塩水あるいは0.1%酢酸溶液を満たした専用注射筒 (テルモシリンジ 30mL) を

持続注入器（テルフェュージョンシリンジポンプ STC-521：テルモ株）に装着した。37℃に設定した保温装置（BLOODWATER TM-90：東レ・メディカル株）を介して、膀胱内に生理食塩水あるいは0.1%酢酸溶液を4.0mL/hrで持続注入しながら、圧力アンプ（日本電気三栄製）により膀胱内圧を連続的に測定し、MacLab/8s システム（データ記録、専用ソフト PowerLab/MacLab Chart v3.6s (ADInstrument Pty Ltd.)) でシストメトログラムを記録した。また、排尿量はデジタル天秤（HF-200, エー・アンド・デイ株）に100mm シャーレを設置し、尿道口から排出される液を累積的に採取し、その重量変化を MacLab/8s システムで記録した。膀胱内圧曲線と排尿量変化から、以下のパラメータ：排尿間隔 (min), 一回排尿量 (mL), 膀胱容量 (注入速度×排尿間隔, mL), 静止時膀胱圧 (mmHg), 排尿閾値圧 (mmHg), 最大膀胱収縮圧 (mmHg) を算出した。安定した排尿パターンが得られた後、SPE 投与前後の排尿パラメータを比較した。

IV. 無麻酔下での排尿回数及び排尿量の測定

SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットを代謝ケージ (NALGENE) に入れ、SPE (6mg/kg) を2週間反復経口投与した。そして、SPE 投与前日から反復投与期間中、夜18時から翌朝6時までの夜間12時間における SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの排尿量を累積的に記録した。排尿量は、流動パラフィンを入れた尿量測定用容器をデジタル天秤 (HF-200, エー・アンド・デイ株) の上に設置し、尿を累積的に採取してその重量変化を MacLab/8S システム (データ記録、専用解析ソフト PowerLab/MacLab Chart v3.6s (ADInstruments Pty Ltd.)) で記録した。測定データから排尿間隔 (min), 排尿回数 (回/夜間12時間), 一回排尿量 (mL), 全排尿量 (mL) を求めた。

V. 受容体結合実験における SPE の投与

SPE の反復投与実験では、正常ラットの場合、control 群 (0.5%メチルセルロース経口投与：p.o.), SPE (0.6, 6, 60mg/kg/day, p.o.) 投与群に分け、4週間経口投与した。またテストステロン誘発前立腺肥大モデルラットの場合、sham 群 (ヒマシ油, s.c. と0.5%メチルセルロース, p.o.), control 群 (テストステロン, 3mg/kg/day, s.c. と0.5%メチルセルロース, p.o.), SPE 投与群 (テストステロン, 3mg/kg, s.c. と SPE の6ないし60mg/kg/day, p.o.) に分け、4週間反復経口投与した。

VI. 受容体標品の調製法

ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下行大動脈よりへパリン処理した注射筒で採血し、屠殺した。ただちに生理食塩水で灌流し、膀胱、前立腺、顎下腺及び脾臓を摘出

した。

α 受容体測定では、前立腺 (腹葉部) 及び脾臓に30倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし、冷却下 40,000xg で20分間遠心分離した。沈渣を Tris-HCl buffer で懸濁し、同様の条件にて再度遠心分離後、沈渣を Tris-HCl buffer に懸濁して受容体標品 (3.3-6.7%) とした。

ムスカリン性受容体測定では、膀胱および顎下腺に19倍量の 30mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし、冷却下 40,000xg で20分間遠心分離した。沈渣を Na⁺/HEPES buffer で懸濁して受容体標品 (3.3%) とした。

1,4-Dihydropyridine (DHP) 系 Ca 拮抗薬受容体測定では、膀胱に19倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、冷却下 40,000xg で15分間遠心分離した。沈渣を19倍量の Tris-HCl buffer で懸濁し同様の条件にて再度遠心分離した。沈渣を Tris-HCl buffer で再懸濁して受容体標品 (5%) とした。

P2X 受容体測定では、膀胱に10倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、冷却下 2,000xg で10分間遠心分離し上清を分取した。沈渣を10倍量の Tris-HCl buffer で再度懸濁し同様の条件にて遠心分離後上清を分取した。2回分の上清を合わせ、37℃で20分間インキュベーション後、冷却下 48,000xg で20分間遠心分離し、沈渣を Tris-HCl buffer で懸濁して受容体標品 (5%) とした。

VII. ラジオレセプターアッセイ

α , ムスカリン性, 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬及び P2X の各受容体の測定では、標識リガンドとして、それぞれ [³H] prazosin¹³⁾, [³H]NMS¹⁴⁾, (+)-[³H]PN 200-110¹⁵⁾ 及び [³H] $\alpha\beta$ -MeATP¹⁶⁾ を用いるラジオレセプターアッセイ法に従った。即ち、各臓器の受容体標品を、[³H]prazosin 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で [³H] prazosin (0.03-0.05nM) と 25℃, 30分間, [³H]NMS 結合実験では 30mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5) 中で [³H]NMS (0.06-1.0nM) と 25℃, 60分間, (+)-[³H]PN 200-110 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で (+)-[³H]PN 200-110 (0.025-0.5nM) と 25℃, 60分間, [³H] $\alpha\beta$ -MeATP 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で [³H] $\alpha\beta$ -MeATP (5nM) と 4℃, 60分間インキュベーション後、Receptor Binding Assay 用 Cell Harvester (米国 Brandel 社製) を用いて反応液をガラス繊維濾紙 (Whatman GF/B) 上に急速吸引濾過した。直ちに濾紙を 50mM Na/K phosphate buffer 3mL で3回洗浄した。この濾紙をバイアル瓶に取りトルエンシンチレーター (2,5-diphenyloxazole: 5g, 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazol) benzene: 0.1g, Triton X-100: 333mL, toluene: 666mL) を加えて、室

温中に6時間以上放置後、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。この場合、displacerとして、10 μ M phentolamine (3 H)prazosin), 1 μ M atropine (3 H)NMS), 1 μ M nifedipine ((+)- 3 H)PN 200-110), 3 μ M $\alpha\beta$ -MeATP (3 H) $\alpha\beta$ -MeATP)を用い、displacerの非存在下及び存在下で得られた放射活性をそれぞれ全結合と非特異的結合とし、両者の差を受容体への特異的結合と定義した。測定はすべて duplicate で行った。なお、(+)- 3 H)PN 200-110 を用いた実験は遮光(ナトリウムランプ)下で行った。

VIII. 受容体結合パラメータの算出

各標識リガンドを用いて得られた結合実験の結果の解析は、Bennett ら¹⁷⁾ および Yamada ら¹⁸⁾ の方法に従って行った。各標識リガンドの最大結合部位数 (Bmax), 解離定数 (Kd) は各標識リガンドの種々の濃度における特異的結合を測定し、その Scatchard 解析 (1)式)により算出した。

Scatchard equation :

$$[RL]_e/[L]_T = -1/Kd \cdot [RL]_e + [R]_T/Kd \quad (1)$$

[RL]_e: 平衡状態における標識リガンドと受容体との複合体の濃度 (fmol/mg protein)

[L]_T: 遊離状態の標識リガンドの濃度 (pM)

Kd: 見かけの解離定数 (pM)

[R]_T (Bmax): 最大結合部位数 (fmol/mg protein)

この等式において [RL]_e/[L]_T を Y 軸に、[RL]_e を X 軸にそれぞれプロットすることによって得られる回帰直線の傾斜が -1/Kd, X 軸切片が Bmax に相当する。

タンパク量は Lowry ら¹⁹⁾ の方法に従い、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

IX. In vitro 抑制効力の測定

上述と同様に調製した前立腺、脾臓、膀胱および顎下腺を用いて、10-1000 μ g/mL の SPE 存在下で、前立腺および脾臓への 3 H)prazosin (0.5nM), 膀胱および顎下腺への 3 H)NMS (0.5nM), 膀胱への (+)- 3 H)PN 200-110 (2nM) 及び 3 H) $\alpha\beta$ -MeATP (5nM) の特異的結合を測定し、log probit analysis に従って各標識リガンドの結合を50%抑制する SPE 濃度、即ち IC₅₀ 値を求めた。なお、SPE は、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁後、各標識リガンドの buffer で希釈して用いた。

X. 統計処理

実験値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表示した。有意差検定は、Dunnett's test を用いて行い、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

I. SPE の排尿機能に対する作用

生理食塩水注入ラットのシストメトリーにおいて、SPE (6mg/kg) を十二指腸内投与したところ、排尿間隔、一回排尿量、膀胱容量、静止時膀胱圧、排尿閾値圧及び最大膀胱収縮圧は投与前後で有意な差がなかった。次に、SPE (60mg/kg) 投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量はいずれも約40%有意に増加、最大膀胱収縮圧は有意に(約10%)低下した(図1B, 表2)。

次に、0.1%酢酸溶液をラット膀胱内に注入することにより、排尿間隔 (8.64 \pm 0.73min \rightarrow 6.22 \pm 0.57min), 一回排尿量 (0.60 \pm 0.05mL \rightarrow 0.42 \pm 0.04mL) 及び膀胱容量 (0.57 \pm 0.05mL \rightarrow 0.42 \pm 0.04mL) は正常ラットの場合に比べて有意に (P<0.05) 減少した。この頻尿モデルラットのシストメトリーにおいて、SPE (12mg/kg) を投与したところ、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量はいずれも約15%有意に増加、最大膀胱収縮圧は有意に(12%)低下した。また、SPE (20mg/kg) 投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量は有意に(それぞれ48, 65, 48%)増加、静止時膀胱圧は有意に(5%)低下した(図1C, 表2)。排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量において、SPE の投与量依存性が認められた。なお、0.5%メチルセルロースの十二指腸内投与においては、投与前後で排尿パラメータの有意な変化は認められなかった(図1A)。

次に、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの無麻酔下での夜間(12時間)排尿パラメータに対する SPE の反復投与の影響を検討した。SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE (6mg/kg) を14日間反復経口投与することにより、排尿間隔は SPE 投与前に比べて投与後一時的に減少した後、投与4から8日後にかけて継続的に増加した(図2A)。それに伴い排尿回数は、SPE 投与前に比べ投与後一時的に増加した後、持続的に減少した(図2C)。一方、両パラメータは、SPE 投与9-14日後では投与前

表1 Saw Palmetto Extract (SPE) の組成

Fatty acids	Content (%)	Fatty alcohols and sterols	Content (%)
Total fatty acids	93.5	Fatty alcohols	0.20
Saturated	59.8	Hexacosanol	0.017
Caproic acid	1.5	Octacosanol	0.146
Caprylic acid	2.3	Tetracosanol	0.004
Capric acid	2.5	Triacosanol	0.033
Lauric acid	30.2		
Myristic acid	12.0	Sterols	0.32
Palmitic acid	9.5	Campesterol	0.07
Stearic acid	1.8	Stigmasterol	0.03
Unsaturated	33.7	β -Sitosterol	0.22
Oleic acid	28.5		
Linoleic acid	4.6		
Linolenic acid	0.6		

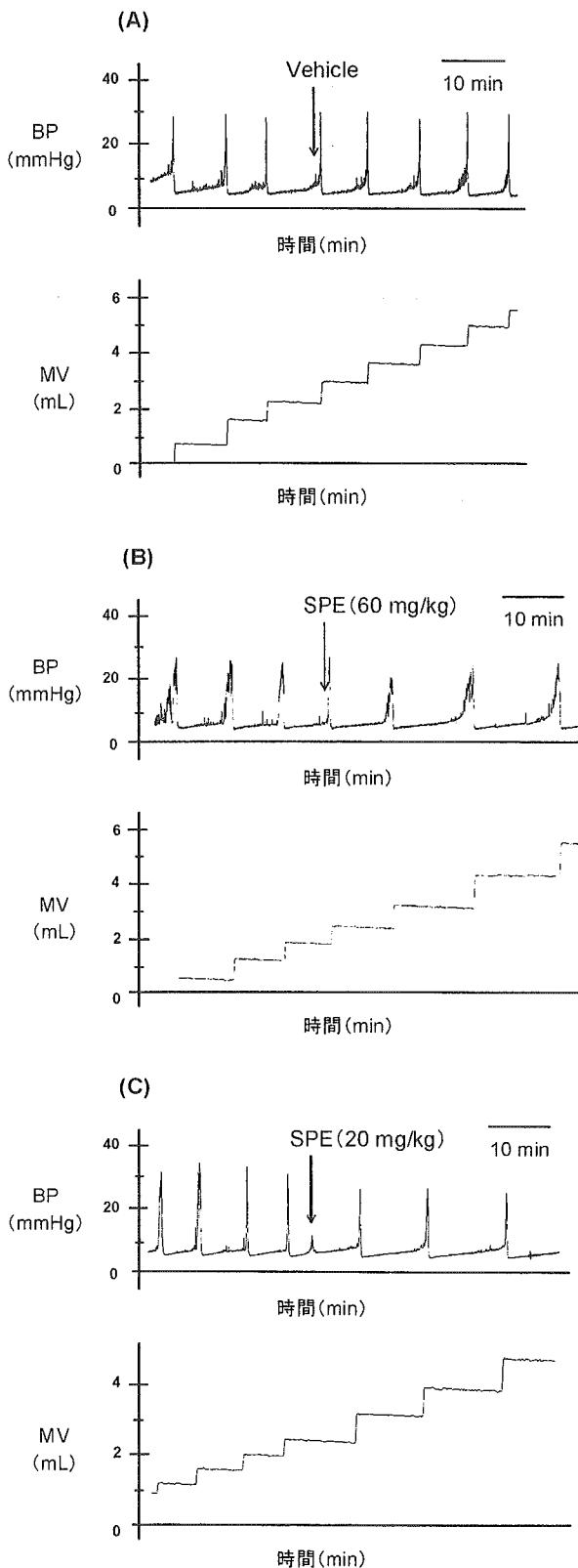


図1 麻酔下ラット (A, B: 生理食塩水注入ラット, C: 0.1% 酢酸溶液注入ラット) シストメトリーにおける SPE 投与時のシストメトログラム

(A), (B) 及び (C) は, それぞれ0.5%メチルセルロース, SPE 60mg/kg, SPE 20mg/kg の十二指腸内投与の影響. BP: Bladder pressure (膀胱内圧), MV: Micturition volume (排尿量).

と差がなかった. 一回排尿量は, SPE 投与期間中増加する傾向 (図 2 B), また, 全排尿量は 9 - 14日後において有意な増加が認められた (図 2 D). 次に, 高用量 (60mg/kg) の SPE を14日間反復経口投与することにより, 排尿間隔は SPE 投与前に比べ投与 1 - 5日後で一時的に減少し, 投与 8 - 11日後で有意に減少した (図 2 A). それに伴い排尿回数は, 投与前に比べ投与後で一時的に増加し, 投与 8 - 14日後では有意な増加が認められた (図 2 C). 特に, 投与 10, 13日後の排尿回数は, 6mg/kg の場合と比べ有意に増加した. 一回排尿量は, SPE 投与期間中増加傾向にあり, 投与11, 13日後においては 6mg/kg の場合と比べ有意に増加した (図 2 B). また, 全排尿量においても SPE 投与開始後から増加傾向にあり, 投与 2-5, 12日後においては 6mg/kg の場合と比べ有意な増加が認められた (図 2 D). SPE の反復投与により, 水分摂取量は投与前と比べほとんど変化が認められなかった.

II. *In vitro* における SPE の各種受容体に対する作用

SPE は 10 - 1000 μ g/mL の濃度において, ラット前立腺及び脾臓への [3 H]prazosin 特異的結合を濃度依存的に抑制し, IC_{50} 値はそれぞれ 169 \pm 24, 188 \pm 47 μ g/mL であった (図 3 A). 同様にラット膀胱及び顎下腺への [3 H]NMS 特異的結合を濃度依存的に抑制し, IC_{50} 値はそれぞれ 40.4 \pm 4.1, 52.3 \pm 4.4 μ g/mL であった (図 3 B). さらに, SPE (30-200 μ g/mL) はラット膀胱への (+)-[3 H]PN 200-110 特異的結合を濃度依存的に抑制した (IC_{50} 値は 97.3 \pm 17.1 μ g/mL) (図 3 C). 一方, SPE はラット膀胱への [3 H] $\alpha\beta$ -MeATP 特異的結合には殆ど影響を与えなかった (図 3 D).

SPE (150 μ g/mL) 存在下の Scatchard 解析により, ラット前立腺及び脾臓の [3 H]prazosin 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (55.45%) 減少した (表 3). また, 前立腺の K_d 値の有意な減少も認められた. SPE (50 μ g/mL) の存在下において, 膀胱及び顎下腺の [3 H]NMS 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (55, 30%) 減少した. また, SPE (100 μ g/mL) の存在下において, 膀胱の (+)-[3 H]PN 200-110 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (67%) 減少した.

III. ラットの各臓器受容体に対する SPE 反復経口投与の影響

ラットに SPE (0.6, 6, 60mg/kg) を 4 週間反復経口投与することにより, [3 H]prazosin 結合の K_d 値は対照値と差がなかったが, B_{max} 値は前立腺において SPE の 6, 60mg/kg 投与によりそれぞれ24, 37%, 脾臓においては 60mg/kg 投与で26%有意に増加した (表 4). [3 H]NMS 結合の K_d 値は, 顎下腺において 0.6mg/kg 投与で対照値と比べ有意な増加が認められた. また, [3 H]NMS 結合の B_{max} 値は, 膀胱において 0.6-60mg/kg 投与により32-

表2 麻酔下ラットシストメトリーにおける SPE (6-60mg/kg) 投与前後の排尿パラメータ

Doses of SPE (mg/kg)	Micturition interval (min)		Mean micturition volume (mL)		Bladder capacity (mL)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
<i>Saline infused anesthetized rats</i>						
6	9.93 ± 1.07	9.07 ± 1.09	0.69 ± 0.07	0.66 ± 0.09	0.65 ± 0.06	0.60 ± 0.07
60	7.71 ± 0.90	10.8 ± 1.77 (140%)*	0.54 ± 0.06	0.77 ± 0.13 (143%)*	0.51 ± 0.06	0.72 ± 0.12 (141%)*
<i>0.1% acetic acid infused anesthetized rats</i>						
12	6.44 ± 1.10	7.41 ± 1.25 (115%)*	0.44 ± 0.08	0.51 ± 0.08 (116%)*	0.43 ± 0.07	0.49 ± 0.08 (114%)*
20	5.99 ± 0.47	8.85 ± 1.07 (148%)*	0.40 ± 0.04	0.66 ± 0.08 (165%)*	0.40 ± 0.03	0.59 ± 0.07 (148%)*

Doses of SPE (mg/kg)	Baseline pressure (mmHg)		Threshold pressure (mmHg)		Maximum micturition pressure (mmHg)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
<i>Saline infused anesthetized rats</i>						
6	3.35 ± 0.19	3.20 ± 0.22	5.02 ± 0.13	4.78 ± 0.13	26.1 ± 2.2	23.9 ± 2.0
60	3.17 ± 0.10	2.93 ± 0.21	4.74 ± 0.16	4.81 ± 0.15	28.3 ± 0.8	26.0 ± 0.7 (91.9%)*
<i>0.1% acetic acid infused anesthetized rats</i>						
12	3.99 ± 0.26	3.69 ± 0.23	5.05 ± 0.31	5.13 ± 0.27	29.3 ± 1.7	25.7 ± 2.0 (87.7%)**
20	3.54 ± 0.16	3.37 ± 0.11 (95.2%)*	4.44 ± 0.19	4.62 ± 0.25	25.6 ± 1.4	23.0 ± 0.5

Mean ± S.E., n=5 (6, 12, 20mg/kg), n=7 (60mg/kg), The values in parentheses represent the percentages when compared with the values (Pre) before SPE administration.

Asterisks show a significant difference from the pre-treatment values using Student's paired t-test, *P<0.05, **P<0.01.

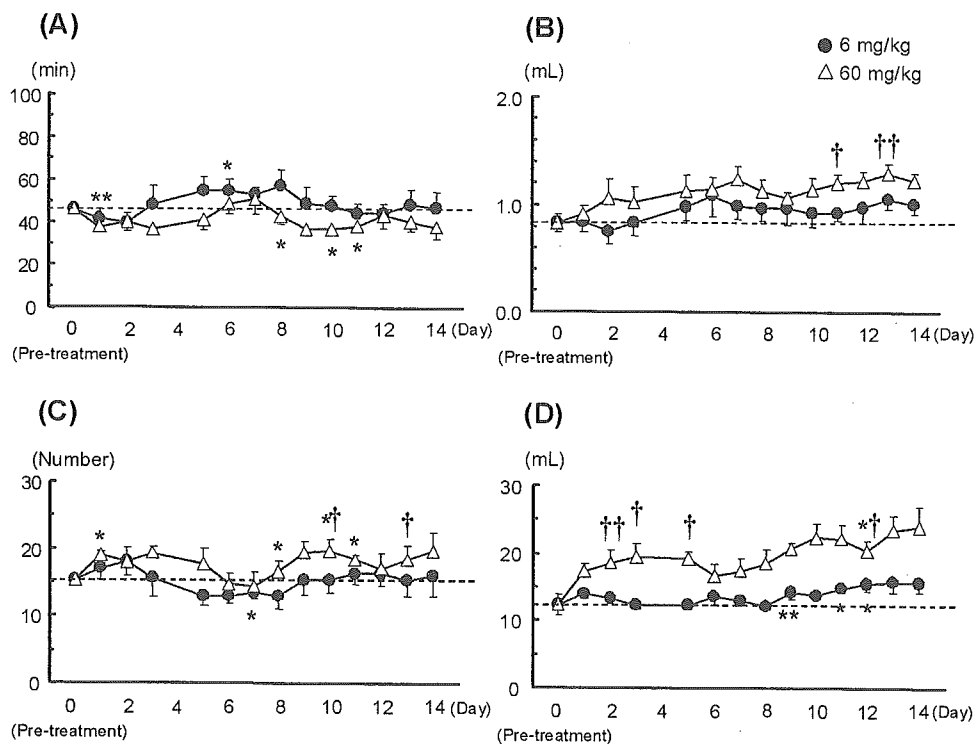


図2 SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの排尿パラメータに対する SPE (6, 60mg/kg) 反復投与の影響

(A) 排尿間隔, (B) 一回排尿量, (C) 排尿回数/夜間12時間, (D) 全排尿量

Mean ± S.E., n=3. Asterisks show significant difference from pre-treatment values (0 day) using Student's paired t-test, *P<0.05, **P<0.01. Symbols show significant difference from each value at the dose of 6 mg/kg using Student's paired t-test, †P<0.05, ††P<0.01.

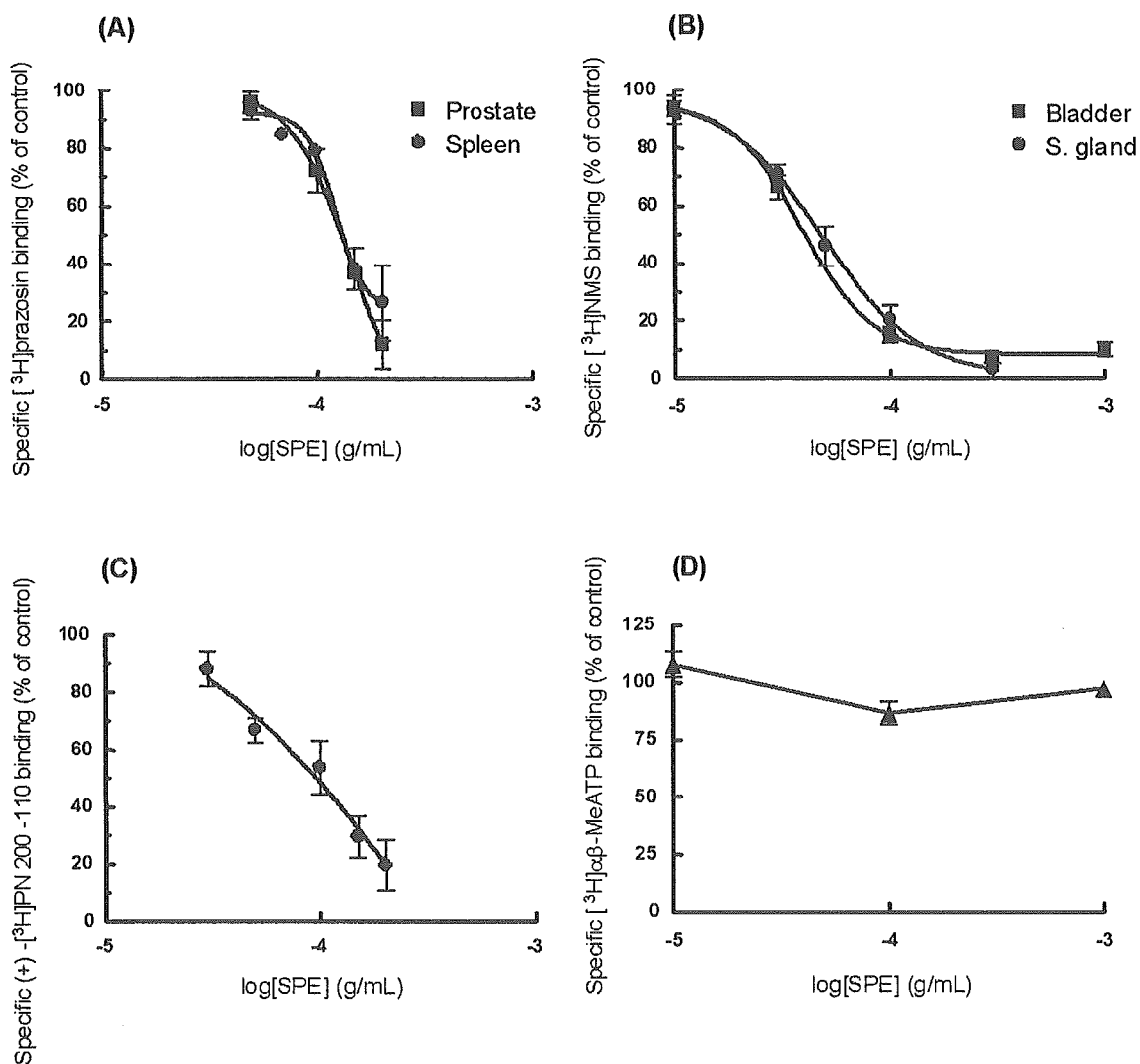


図3 (A) ラット前立腺及び脾臓における $[^3\text{H}]$ prazosin 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=5-8)
 (B) ラット膀胱及び顎下腺における $[^3\text{H}]$ NMS 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=8-9)
 (C) ラット膀胱における (+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=5)
 (D) ラット膀胱における $[^3\text{H}]\alpha\beta$ -MeATP 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=2) (Mean \pm S.E.)

表3 $[^3\text{H}]$ Prazosin, $[^3\text{H}]$ NMS 及び (+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 の特異的結合パラメータに対する SPE の *in vitro* での影響

	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
$[^3\text{H}]$ Prazosin				
	Prostate		Spleen	
Control	80.2 \pm 9.6	17.6 \pm 1.4	58.4 \pm 3.8	39.5 \pm 1.9
SPE (150 μ g/mL)	51.3 \pm 2.1*	7.86 \pm 0.49 (44.7%)**	82.0 \pm 12.5	21.9 \pm 4.0 (55.4%)*
$[^3\text{H}]$ NMS				
	Bladder		Submaxillary gland	
Control	256 \pm 77	192 \pm 27	101 \pm 9	101 \pm 5
SPE (50 μ g/mL)	190 \pm 14	86.1 \pm 11.7 (44.8%)*	149 \pm 26	70.5 \pm 4.6 (69.8%)*
(+) - $[^3\text{H}]$ PN 200-110				
	Bladder			
Control	200 \pm 17	188 \pm 12		
SPE (100 μ g/mL)	151 \pm 40	62.7 \pm 11.8 (33.4%)**		

Mean \pm S.E., n=3 ($[^3\text{H}]$ prazosin, $[^3\text{H}]$ NMS), n=8 ((+)- $[^3\text{H}]$ PN200-110). The values in parentheses represent the percentages when compared with control values in the presence of vehicle (0.5% methylcellulose).

Asterisks show a significant difference from control values, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

表4 ラット前立腺, 脾臓, 膀胱及び顎下腺における $[^3\text{H}]$ prazosin 並びに $[^3\text{H}]$ NMS 特異的結合パラメータに対する SPE 反復経口投与の影響

	Doses of SPE (mg/kg)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
$[^3\text{H}]$ Prazosin			
Prostate	Control	49.7 ± 2.4	26.7 ± 0.5
	0.6	43.1 ± 2.0	30.1 ± 1.6
	6	51.9 ± 4.8	33.0 ± 1.3 (124%)**
	60	54.6 ± 2.8	36.5 ± 1.2 (137%)***
Spleen	Control	26.4 ± 2.8	68.3 ± 4.0
	0.6	28.8 ± 2.2	75.1 ± 3.8
	6	27.5 ± 1.5	65.7 ± 5.1
	60	30.1 ± 1.2	86.1 ± 4.3 (126%)*
$[^3\text{H}]$ NMS			
Bladder	Control	157 ± 10	144 ± 12
	0.6	127 ± 13	84.7 ± 8.1 (58.8%)***
	6	135 ± 11	98.2 ± 3.8 (68.2%)***
	60	137 ± 5	97.5 ± 2.7 (67.7%)***
Submaxillary gland	Control	98.4 ± 3.8	145 ± 3
	0.6	112 ± 3*	149 ± 10
	6	101 ± 2	149 ± 8
	60	105 ± 2	119 ± 2 (82.1%)**

Mean ± S.E., n=6-7. The values in parentheses represent the percentages when compared with control values.

Asterisks show a significant difference from control values, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

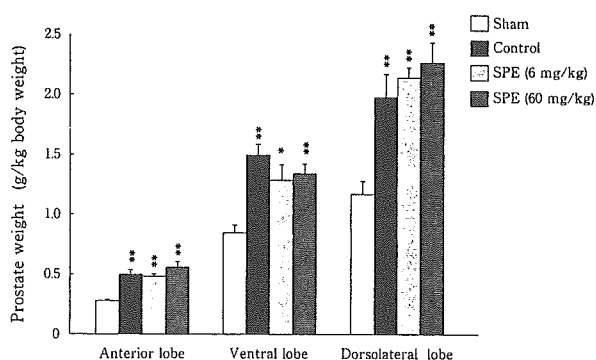


図4 テストステロン処置ラットの前立腺 (前葉, 腹葉, 背側葉) 重量に対する SPE 反復経口投与の影響

Mean ± S.E., n=5.

Asterisks show a significant difference from sham values, *P<0.05, **P<0.01.

41%, 顎下腺においては 60mg/kg 投与で18%有意に減少した。

IV. 前立腺肥大モデルラット前立腺の組織重量並びに受容体に対する SPE 反復投与の影響

ラットにテストステロン (3mg/kg) を4週間皮下投与することにより, 前立腺の前葉, 腹葉及び背側葉の重量は, sham 群に比べそれぞれ79, 77, 69%有意に増加した (図4)。また, 6及び60mg/kg のSPEをテストステロンとともに4週間経口投与した場合, 前立腺各部位の重量は, control (テストステロン単独投与) 群の場合と比べ, 腹葉において減少傾向が認められたものの, いずれの部位で

表5 テストステロン処置ラットの前立腺 $[^3\text{H}]$ prazosin 特異的結合パラメータに対する SPE 反復経口投与の影響

	$[^3\text{H}]$ Prazosin (Prostate)	
	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
Sham	52.6 ± 3.1	14.8 ± 0.7
Control	71.0 ± 11.5	24.0 ± 2.1 (162%)**
SPE (6mg/kg)	58.6 ± 7.9	21.4 ± 2.2 (145%)*
SPE (60mg/kg)	46.7 ± 3.3	20.4 ± 1.2

Mean ± S.E., n=5. The values in parentheses represent the percentages when compared with the sham values.

Asterisks show a significant difference from sham values, *P<0.05, **P<0.01.

も有意差は認められなかった。

テストステロン (3mg/kg) 皮下投与ラット (control) 前立腺における $[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Bmax 値は sham 群に比べ62%有意に増加した (表5)。テストステロンとSPEの両投与群では, $[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Bmax 値はSPE 6mg/kg 投与群で sham 群と比べ45%有意に増加し, 60mg/kg 投与群では38%の増加傾向が認められた。 $[^3\text{H}]$ Prazosin の Kd 値はいずれの群においても sham 群と比べ有意な差は認められなかった。

考 察

SPEの排尿パラメータ及び下部尿路受容体に対する作用を検討した。まず, 麻酔した正常ラットのシストメトリ一実験において, SPEは6mg/kgの十二指腸内投与では排尿パラメータに殆ど影響しなかったが, 60mg/kgにお

いて排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を有意に低下した。また、酢酸の膀胱内注入による頻尿誘発ラットにおいても同様に、SPE は12及び20mg/kgの投与量で、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を投与量に依存して有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を有意に低下した。これより、SPE は麻酔ラットのシストメトリーにおいて頻尿改善作用を示すことが明らかになった。この SPE の作用は正常ラットに比べ酢酸誘発頻尿ラットにおいて低用量で発現したことから、病態特異的である可能性が示唆された。ところで、SPE は高カリウム、ノルエピネフリン及びアセチルコリンによるラット摘出平滑筋組織の収縮を抑制する^{20,21)} ことから、*in vivo* において膀胱平滑筋の弛緩により頻尿改善作用を示すと考えられた。また、SPE の主な含有成分である遊離脂肪酸は、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} などのイオンチャネル透過性や神経伝達などの生理機能に対して影響を及ぼすこと²²⁾ 並びに酢酸誘発頻尿は膀胱知覚神経の活性化に基づく²³⁾ ことから、SPE は下部尿路神経に作用することも推定された。

次に、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットを用いて夜間排尿に対する SPE 反復経口投与の影響を検討した。SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットは、II型糖尿病性腎症モデル動物として開発された自然発症高血圧/NIH 肥満形質ラットである。高血圧を示す SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットは、非糖尿病系 SHR ラットと共通の遺伝的背景を保持している²⁴⁾。SHR においては一般的に交感神経機能亢進が高血圧の発症と維持に関与しているが、SHR の膀胱は対照の Wistar-Kyoto ラット (WKY) に比し過活動となっていることが報告されている^{25,26)}。さらに、Clemow ら²⁷⁾ は、SHR の膀胱における求心性及び遠心性神経密度が WKY の場合に比し有意な増加 (neuronal hypertrophy) を示したことから、これら神経機能の変化による排尿反射の亢進を示唆している。本研究において、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE (6mg/kg) を反復投与することにより、排尿間隔の一過性の短縮後における持続的な延長、並びに排尿回数の有意な減少が観察された。これより、麻酔ラットのシストメトリーにおいて SPE の単回投与で観察された頻尿改善作用は反復経口投与によっても発現することが示された。この SPE の作用が SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットへの9日間以上の投与によって消失した理由については明らかでないが、SPE の頻尿改善作用に何らかの耐性が生じたか、あるいは腎機能や電解質バランスなどに対する全身的な薬理作用が発現したことが推察された。SPE が利尿作用を示すという実験薬理学的報告はないが、ヒトにおいて穏やかな利尿効果を示すことが知られている²⁸⁾。実際に、本研究においても60mg/kgのSPEを反復投与することにより、一回排尿量及び全排尿量が有意に増加したことから、SPEによる利尿作用が示唆された。

次に、排尿障害治療薬の作用部位となる下部尿路自律神

経受容体に対する作用を検討したところ、*in vitro* 実験において、SPE は、ラットの前立腺及び脾臓 α_1 受容体への [³H]prazosin 結合、膀胱及び顎下腺ムスカリン性受容体への [³H]NMS 結合、膀胱 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体への (+)-[³H]PN 200-110 結合をいずれも濃度依存的に抑制した。SPE が α_1 受容体結合活性を有することは既に Goepel ら¹⁰⁾ もヒトクローン発現細胞系を用いて認めているが、本研究結果は α_1 受容体サブタイプの分布密度が異なるラット前立腺 (α_{1A} 受容体が優位) と脾臓 (α_{1B} 受容体が優位) において SPE の α_1 受容体結合活性を明らかにし、さらに両臓器での SPE の結合親和性には差異がないことを示した。また、SPE は、ムスカリン性受容体及び 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体に結合活性を示し、両受容体結合活性は IC_{50} 値の比較より、 α_1 受容体の場合より 2-4 倍高いことが示された。この SPE によるムスカリン性受容体と 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体の結合活性についてはこれまで報告がなく、本研究で初めて得られた知見である。これらの各受容体に対する SPE の作用はラット平滑筋弛緩作用^{20,21)} 及びラット頻尿改善作用 (図1, 表2) の発現に寄与すると考えられた。今後、受容体への結合活性成分の分離同定は興味深い課題である。

SPE の存在下での Scatchard 解析において、SPE は、[³H]prazosin、[³H]NMS 及び (+)-[³H]PN 200-110 結合の K_d 値には前立腺 [³H]prazosin 結合以外は殆んど影響を与えず、 B_{max} 値を有意に減少した。SPE による [³H]prazosin 結合の B_{max} 値の減少は Goepel ら¹⁰⁾ によっても認められている。ラジオレセプターアッセイ実験による受容体結合パラメータの変動と薬物の拮抗様式を詳細に検討した Yamada ら²⁹⁾ の報告から、SPE 存在下での各標識リガンドの B_{max} 値の選択的減少即ち、SPE の非競合的な受容体結合の作用機序として受容体結合後の解離が遅いことが示唆された。また、ラットに SPE を反復経口投与することにより、前立腺と脾臓における [³H]prazosin 結合の B_{max} 値の有意な増加並びに膀胱と顎下腺 [³H]NMS 結合の B_{max} 値の有意な減少が認められたことから、SPE は *in vivo* において各臓器の α_1 受容体及びムスカリン性受容体に結合することが示唆された。両受容体数の変動は、前立腺及び膀胱において他の臓器に比べ低用量 (0.6, 6mg/kg) で発現したことから、SPE は下部尿路受容体に対し選択性を示すことが考えられた。

ラットにテストステロンを4週間皮下投与することにより、前立腺各部位の重量は1.7-1.8倍に増加した。このテストステロン投与ラット前立腺において、[³H]prazosin 結合の B_{max} 値が有意に増加したことから、 α_1 受容体数の増加が示された。これは、去勢により減少した前立腺 α_1 受容体がテストステロンの反復投与により対照値に回復すること³⁰⁾ やヒト肥大前立腺の α_1 受容体数が増加すること¹³⁾ を示した以前の報告と符号する結果である。6ないし60mg/kgのSPEとテストステロンを4週間反復投