

令和元年6月24日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01374

研究課題名(和文) 脊髄損傷による神経因性膀胱における温度受容体の機能の解明

研究課題名(英文) Function of thermosensitive receptor in neurogenic bladder due to spinal cord injury

研究代表者

吉田 輝 (Yoshida, Akira)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：40347109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の高濃度Kと γ -メチレンATPによる収縮反応に対する寒冷受容体TRPM8の作動薬のメントールの影響を調べ、メントールが正常ラットと脊髄損傷ラットで同程度に高濃度Kと γ -メチレンATPによる収縮反応を抑制することを明らかにした。さらに、小動物用排尿機能測定装置を用い48時間にわたり排尿量および飲水量の測定を行い、明時間帯より暗時間帯に排尿回数、排尿量、飲水量が明らかに多い排尿パターンが存在することを明らかにし、本システムが病態モデルを用いた自然な排尿行動の評価に有用である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、メントールが正常ラットと脊髄損傷ラットで同程度に摘出排尿筋の高濃度Kと γ -メチレンATPによる収縮反応を抑制することを明らかにし、メントールの排尿筋弛緩作用を排尿筋過活動の治療に応用できる可能性を示した。また、小動物用排尿機能測定装置が自然な排尿および飲水の評価に有用であることを示し、本手法を等尺性収縮実験やシストメトリーなどの実験手技と組み合わせることで、神経因性膀胱の病態の解明や治療法の開発に向けた有用な知見が得られる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of menthol on detrusor smooth muscle contractions induced by high K and γ -methylene ATP in normal and spinal cord injured rats. Menthol inhibited high K and γ -methylene ATP-induced contractions equally in normal and spinal cord injured rats. We evaluated voluntary voiding behavior and water intake in metabolic cage experiments. Micturition frequency, micturition volume and water intake were markedly higher in dark period than in light period. Metabolic cage experiments system used in this study is useful to evaluate micturition in neurogenic bladder model.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：温度受容体 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳卒中後の神経因性膀胱による頻尿・尿失禁は、患者及び家族の QOL に重大な影響を及ぼす。また、排泄の自立が在宅復帰の鍵となることも多く、神経因性膀胱はリハビリテーション医療の現場において極めて重要な問題である。神経因性膀胱の薬物治療には抗コリン薬が中心に使用されているが、十分な効果が得られないことも少なくなく、また副作用や臓器選択性の面で問題が残されており、より選択性が高く効果的な治療法の開発が望まれている。

最近の研究により、脊髄損傷後には脊髄レベルで排尿の神経経路の再構築が起こること、また脊髄損傷後には膀胱収縮に関わるムスカリン受容体サブタイプに変化が生じることが報告され、病態下では正常と異なる排尿制御機構が働いていることが明らかにされている (de Groat WC et al. Exp Neurol 2011)。したがって、神経因性膀胱に対する、より効果的な治療法の発展のためには、病態下での排尿制御機構について明らかにし、治療の効果を、病態モデルを用いて明らかにしていくことが極めて重要な意味を持っている。

ところで、外界の温度受容のメカニズムは長らく不明であったが、1997年に、感覚神経に発現している TRP チャンネルと呼ばれるイオンチャンネルが温度受容に関わっていることが報告されて以来、これまでに活性化温度閾値の異なる多くの TRP チャンネルの存在が明らかにされている。また、TRP チャンネルは温度のみでなく侵害刺激や機械刺激によっても活性化されることから、痛み研究の分野で特に注目され、鎮痛薬としての臨床応用に向けた研究が進んでいる (Moran MM et al. Nat Rev Drug Discov 2011)。

一方、脊髄損傷患者の排尿筋過活動に対して、膀胱からの求心性知覚神経である C 線維を脱感作させるカプサイシンの膀胱内注入が排尿筋過活動を抑制する効果を持つことが報告され臨床応用されているが、このカプサイシンの受容体こそが TRP チャンネルのひとつである TRPV1 であり、膀胱における温度感受性 TRP チャンネルの機能の解明は神経因性膀胱の新たな治療の道を拓く可能性を持っている。

我々は、早くからこの TRP チャンネルの排尿機能への関与に着目し、これまでに寒冷刺激の受容体である TRPM8 の活性化作用を持つメントールの排尿機能への影響を調べ、メントールがカルバコールによる摘出排尿筋収縮の抑制作用を持つとともに、メントールの膀胱内注入が、正常ラットでは排尿反射を促進し膀胱容量を減少させる一方、脊髄損傷ラットでは排尿反射は促進されず排尿筋の弛緩作用により著明な膀胱容量の増加をきたすことを明らかにしてきた。本研究は、これまで行なってきたメントールによる排尿機能への影響の検討をさらに推進するとともにそれ以外の温度受容体へ研究対象をひろげ、脊髄損傷後の神経因性膀胱における温度受容体 温度感受性 TRP チャンネル の機能を明らかにし、神経因性膀胱の新たな治療法の開発に結び付けようとするものである。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の高濃度 K と、 α -メチレン ATP による収縮反応に対する寒冷受容体 TRPM8 の作動薬であるメントールの影響を調べることによって正常な状態と病的な状態での膀胱収縮に対するメントールの作用を明らかにすること、小動物用排尿機能検査装置を用いた排尿機能の観察を行い、本システムを、病態モデルを用いた温度受容体の神経因性膀胱の病態への関与の検討や温度受容体作動薬や阻害薬の排尿機能への影響の検討に用いていくための基盤を確立することである。

3. 研究の方法

すべての実験で、Sprague-Dawley 系雌ラットを用いた。

(1) 脊髄損傷の作製

脊髄損傷は、イソフルラン吸入麻酔下に第 9 胸椎の椎弓切除を行い、脊髄を露出し、メスで脊髄を切離。切離断端間にスポンゼルを充填した後、筋肉及び皮膚を縫合した。術後は 1 日 3 ~ 4 回の用手圧迫排尿で尿路管理を行い、脊髄損傷作製後 4 ~ 6 週目に以下の実験を行なった。

(2) 収縮反応の測定

深麻酔下に断頭後、膀胱を摘出し、10×2 mm の排尿筋切片を作製。切片を 37℃ に保温し 95% O₂+5% CO₂ で通気した Krebs-Ringer 液で満たした organ bath 内に懸垂し、アイソメトリックトランスデューサ (TB-651T ; 日本光電) に接続し、1g の静止張力をかけた状態で平衡化させた後以下の実験を行ない、日本光電社製 LEG1000 を用い、等尺性張力の変化を調べた。実験には、正常ラットと脊髄損傷ラットからの摘出排尿筋切片を用いた。

正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の高濃度 K による収縮反応に対するメントールの影響の検討

40 mM KCl を作用させ、その収縮が定常状態となる 20 分後から 0.001 ~ 1 mM のメントールとその溶媒である 0.001 ~ 1% のエタノールを累積投与し、収縮反応への影響を調べた。

正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の α -メチレン ATP による収縮反応に対するメントールの影響の検討

， -メチレン ATP 0.01 mM を 25 分間毎に作用させ、安定した収縮反応が観察されるようになったところで 0.1 mM、0.3 mM、1 mM のメントールとその溶媒である 0.1%、0.3%、1% のエタノールを 11 分間作用させた後の、 ， -メチレン ATP による収縮反応への影響を調べた。

(3) 正常ラットにおける小動物用排尿機能検査装置を用いた排尿機能の検討

ラットを小動物用排尿機能検査装置 (MCM/TOA-UF001) のケージ内に入れ、7:00~19:00 までの 12 時間を明時間、19:00~7:00 までの 12 時間を暗時間に設定した防音室内で、室温 24℃、湿度 40~60% の条件下で 48 時間にわたり排尿パターンおよび排尿量を観察するとともに、ドリンクセンサーを用い、飲水パターンを観察した。観察はラットが自由に餌と飲水が可能な状況で行った。(実験システムの概要を図 1 に示す。) また一部のラットでは 24 時間後に室温を 20℃ または 28℃ の変化させた際の影響についても観察を行った。

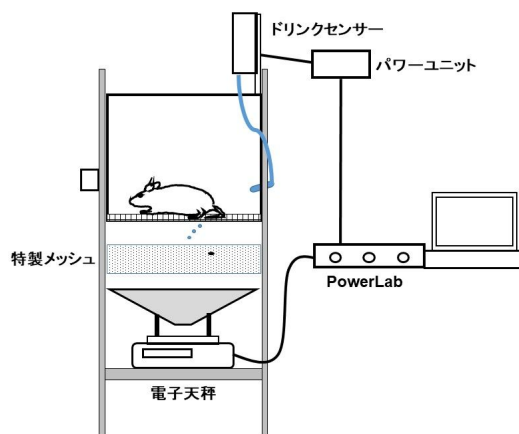


図 1 小動物用排尿機能検査装置を用いた実験のシステムの概要

4. 研究成果

(1) 正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の高濃度 K と ， -メチレン ATP による収縮反応に対するメントールの影響

脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の 40 mM KCl による収縮反応に対するメントールの影響の典型例を図 2 に示す。

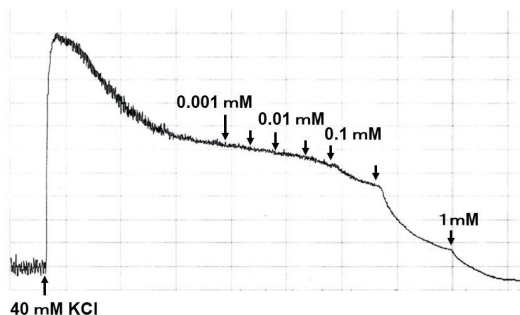


図 2 脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の 40 mM KCl による収縮反応に対するメントールの影響

正常ラットにおいては、0.03~1 mM のメントールは濃度依存性に 40 mM KCl による収縮反応を抑制した(図 3A)。また、0.1~1 mM のメントールの溶媒である 0.1~1% のエタノールにも軽度の収縮抑制作用を認めた(図 3B)。さらに脊髄損傷ラットにおいても 0.03~1 mM のメントールは濃度依存性に 40 mM KCl による収縮反応を抑制した(図 3C)。また、0.1~1 mM のメントールの溶媒である 0.1~1 m~1% のエタノールにも軽度の収縮抑制作用を認めた(図 3D)。正常ラットと脊髄損傷ラットの間には、メントールの 40 mM KCl による収縮反応の抑制の程度に有意な差は認めなかった。

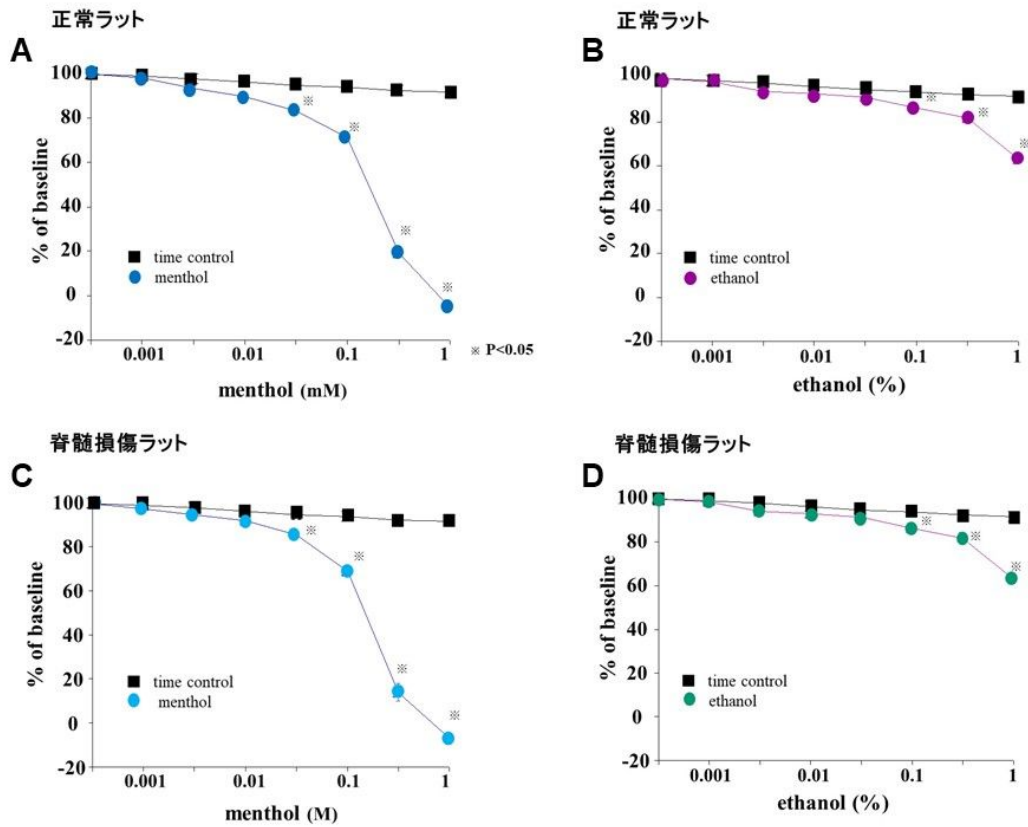


図3 正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の40mM KClによる収縮反応に対するメントールとその溶媒の影響

次に、 α, β -メチレン ATP による収縮反応に対するメントールの影響を調べた。脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の α, β -メチレン ATP 0.01 mM による収縮反応に対するメントールの影響の典型例を図 4A に示す。

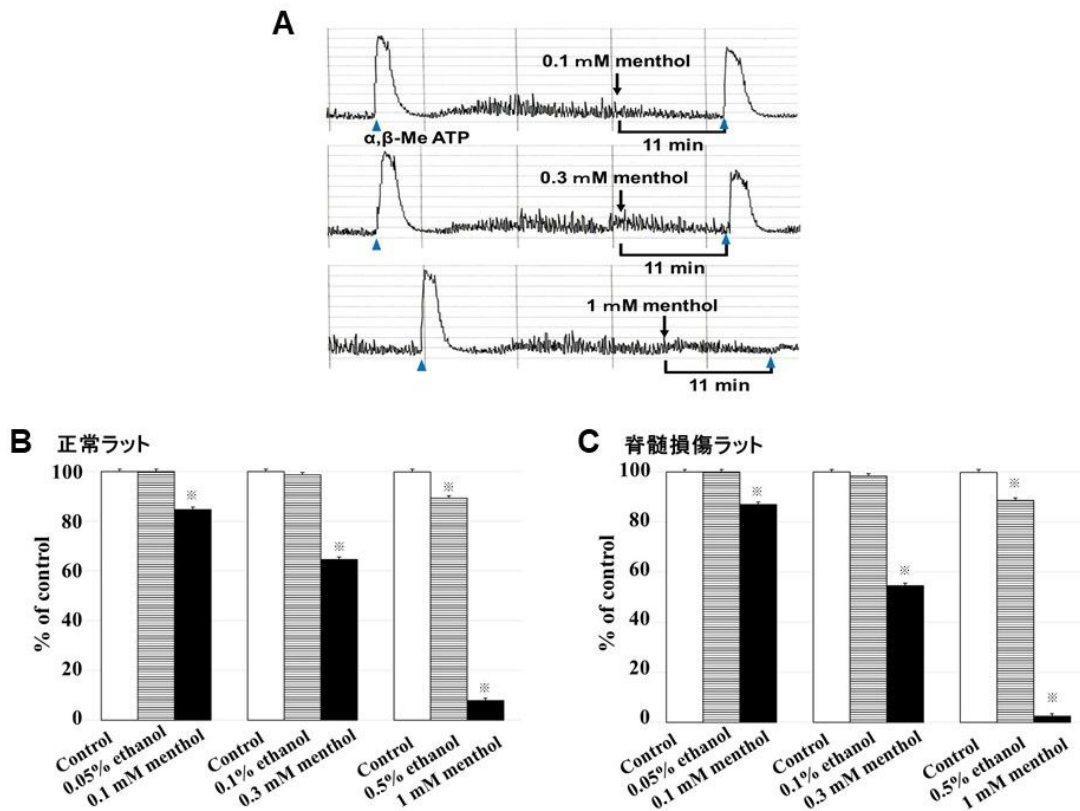


図4 正常ラットと脊髄損傷ラットの摘出排尿筋の α, β -メチレン ATP による収縮反応に対するメントールとその溶媒の影響

正常ラットにおいては、 γ -メチレン ATP 0.01 mM による収縮反応に対して、0.1mM、0.3 mM、1 mM のメントールがそれぞれ 15.4%、35.4%、92.2%の抑制作用を示した (図 4B)。また、脊髄損傷ラットにおいては、 γ -メチレン ATP 0.01 mM による収縮反応に対して、0.1mM、0.3 mM、1 mM のメントールがそれぞれ 13.1%、45.4%、97.6%の抑制作用を示した (図 4C)。正常ラットと脊髄損傷ラットの間には、メントールの γ -メチレン ATP による収縮反応の抑制の程度に有意な差は認めなかった。

我々は、これまでのカルバコールによる収縮反応にメントールが抑制作用を持つことを報告してきたが、今回の実験により、アセチルコリンと同様に膀胱収縮に関わる重要な神経伝達物質であり、病的な状態での膀胱平滑筋収縮においてより重要な役割を担うとされる ATP による膀胱収縮反応や高濃度 K による膀胱収縮反応にもメントールが抑制作用を示すことが明らかになり、またその作用は正常な状態と病的な状態において同程度に認められることが明らかになった。

(2) 正常ラットにおける小動物用排尿機能検査装置を用いた排尿機能の観察

小動物用排尿機能検査装置を用い 48 時間にわたり覚醒、非拘束下での排尿と飲水のパターンを観察した (図 5)。

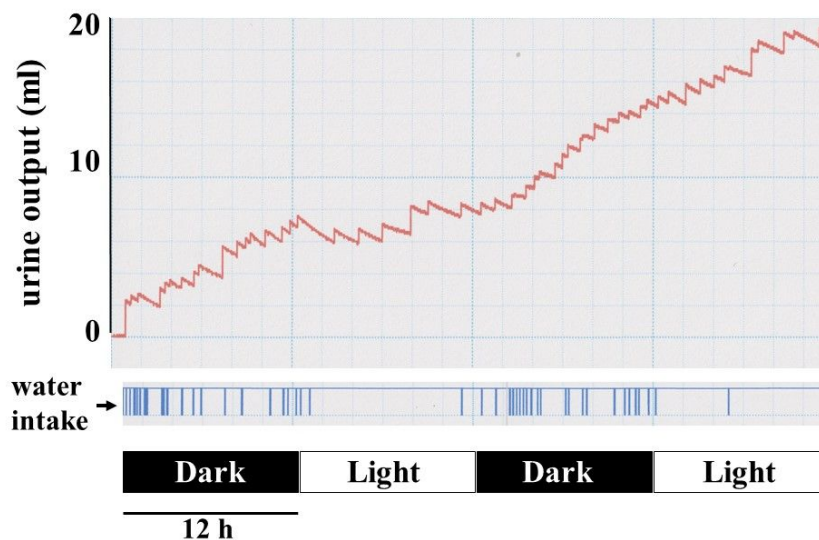


図 5 正常ラットの排尿と飲水のパターン

1 日目の 1 日排尿量は、 16.4 ± 4.7 ml (平均値 \pm 標準偏差) であった。また、2 日目の 1 日排尿量は 15.1 ± 6.6 ml であり、1 日目と 2 日目で有意な差は認めなかった。排尿のパターンに関しては、暗時間における尿回数は 1 日目が平均 11.8 回/12 時間、2 日目が平均 14 回/12 時間、明時間帯における尿回数は 1 日目が平均 7.6 回/12 時間、2 日目が平均 8.5 回/12 時間で暗時間帯は明時間帯に比較して有意に尿回数が多かった。また 1 回排尿量に関しては、1 日目の暗時間帯が 0.86 ± 0.44 ml (平均値 \pm 標準偏差)、2 日目の暗時間帯が 0.73 ± 0.18 ml、1 日目の明時間帯が 0.84 ± 0.35 ml、2 日目の明時間帯が 0.97 ± 0.43 ml であり、1 日目と 2 日目、暗時間帯と明時間帯の間に有意な差は認めなかった。また、飲水のパターンにも暗時間帯と明時間帯の間に明らかな差が存在し、暗時間帯の飲水回数が平均 18.5 回/12 時間であるのに対し、明時間帯の平均は 2.6 回/12 時間で、明時間帯における飲水行動が非常に少ないことが明らかになった。また、一部のラットで 24 時間 24 の室温下での観察を行った後、あとの 24 時間の室温を 20 あるいは 28 に変化させ観察を行ったが、排尿や飲水のパターンには特に変化は認められなかった。

これまで代謝ケージを用いて排尿パターンを観察する実験は行われてきたが、ケージへの尿の付着により正確な尿量の測定が困難であること、糞便を分離できないことが問題であった。今回使用した小動物用排尿機能検査装置では、特製のメッシュを使用することで、尿の付着を防ぎ糞便を分離することで正確な尿量が測定可能であり、排尿行動の観察に非常に有用なシステムであると考えられた。ただ、特殊メッシュにより糞便は完全に分離できたが、餌の細かい粉末がメッシュを通過してしまうという問題があることが分かった。今回は、解析の段階で 0.3mg 以下の重量変化は餌の粉末による影響と考え解析から除外したが、今後は細かい粉末が発生しない餌を使用するなどの工夫を行うことで、測定の精度を上げる工夫が必要である。

排尿機能の実験手技としては、シストメトリーが、排尿時の膀胱内圧に加え、排尿量、残尿量などの排尿に関する詳細なデータを解析できる重要な実験手技であるが、膀胱内に生理的ではない速い速度で生理食塩水を注入することで誘発された排尿反射を観察していること、また膀胱

膀胱作製などの侵襲を加える必要があることから、シスメトリーに加え、自然な状況下での排尿行動の観察を行うことが、より総合的な排尿障害の病態の解明や治療効果の評価に重要であると考えられる。今回使用した小動物用排尿機能検査装置を用いることで48時間にわたり排尿や飲水に関するデータを正確に測定できることが明らかになったことから、今後は病態モデルを用いた研究を進めていく必要がある。脊髄損傷モデルに関しては、我々がこれまで使用してきた脊髄の完全損傷モデルでは、損傷部以下の麻痺部分がケージと擦れることによる褥瘡の発生が必発と考えられるため、今後は不全損傷モデルを確立することで、脊髄損傷ラットで本システムを用いた実験が可能になると思われる。また、脳梗塞ラットやパーキンソン病モデルラットでは、本システムを用いた実験が薬物治療の効果判定などに有用と考えられる。現在、TRPチャンネル関連の阻害薬が多く開発され、温度受容体TRPチャンネルの効果をより詳細に検討できる環境が整ってきている。今後は、これまでに我々が確立してきた等尺性収縮実験やシスメトリーの実験手法に加え、今回の小動物用排尿機能検査装置を用いた実験を行なうことで様々な病態モデルにおける排尿障害の病態への温度受容体の関与と、その受容体作動薬や阻害薬の治療への応用の可能性を多面的に評価することで、神経因性膀胱の新たな治療法の開発を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

1. 原田雄大、大渡昭彦、上川百合恵、吉田輝、下堂蘭 恵
霊長類脳梗塞モデルによる長期観察および慢性期リハビリテーション医療の研究
第55回日本リハビリテーション医学会学術集会、平成30年6月28日-7月1日、福岡市

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大渡 昭彦

ローマ字氏名：Ohwatashi Akihiko

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30295282

研究分担者氏名：上川 百合恵

ローマ字氏名：Kamikawa Yurie

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：附属病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：70418854

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。