

機関番号：21061

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591884

研究課題名 (和文) 閉塞が徐々に完成する新しい BPH モデルによる閉塞膀胱の病態とそのメカニズムの解明

研究課題名 (英文) New Model of BPH with Slowly Advancing Obstruction to Investigate Pathophysiology and Mechanism of Obstructed Bladder

研究代表者

山口 脩 (YAMAGUCHI OSAMU)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60006814

研究成果の概要 (和文)：前立腺肥大症で見られる下部尿路閉塞の様に、前立腺増殖に伴って尿道閉塞が徐々に進行するビーグル犬モデルを試作した。この新規閉塞モデルは、排尿回数の増加、膀胱収縮圧の上昇および軽度の残尿増加など、前立腺肥大症患者によく似た尿流動態を示した。新規モデルの膀胱では、平滑筋増殖因子の発現は線維成分増殖因子よりも強く、アポトーシス陽性細胞の出現が抑えられていた。したがって、前立腺肥大症の閉塞膀胱では、平滑筋成分の肥大・増殖を主体とした代償性変化によって収縮力を保っていることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In the present study, using beagle dogs, we created a new animal model of benign prostatic obstruction, in which prostate would occlude the bladder outlet as prostate grows. This model showed urinary frequency, an increase in detrusor pressure during voiding and a mild degree of residual volume, which resembles a micturition behavior of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). In the obstructed bladder of this new model, the expression of smooth muscle growth factor (HB-EGF) was higher than that of fibrous growth factor such as TGF- β 1 while smooth muscle cell apoptosis was suppressed. These results suggest that compensatory muscle hypertrophy or hyperplasia may serve to sustain the ability of detrusor to contract.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺肥大症、尿流動態検査、閉塞モデル、増殖因子

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症における膀胱出口部の閉塞は、膀胱に形態的および機能的変化をもたらす、排尿筋過活動や排尿筋収縮障害を発症させることが知られている。これらの病態については多くの基礎研究が行なわれ、最近はその分子メカニズムも明らかにされつつある。しかし、このような閉塞膀胱病態に関する知見は尿道を部分閉塞した動物モデルから得られたものであり、尿道閉塞形成の過程が臨床例とは著しく異なる点に大きな問題がある。

前立腺肥大症患者では、前立腺増殖に伴いおおよそ10年間の時間単位でゆっくりと閉塞が形成されて行く。一方、これまでの動物モデルでは、尿道部分結紮と言う手術操作を加えた時点から急に尿道閉塞が形成されることになる(即時閉塞)。したがって、閉塞によって膀胱にかかる負荷も急に増大することになり、その後の膀胱機能の変化や病態は臨床で見られる閉塞膀胱とは著しく異なるものと考えられる。実際、兎やラットの閉塞膀胱モデルでは閉塞作成後短期間で(6週—8週)多くが非代償期に移行するのに対し、前立腺肥大症患者の膀胱機能は例え閉塞を伴っていても代償期に留まっている場合が多い。このような背景を考慮すると、もし臨床例と同じように閉塞が徐々に出来上がっていく動物モデルがあるならば、閉塞膀胱の病態研究は飛躍的に発展することが期待できる。

2. 研究の目的

最近、我々は、ビーグル犬の前立腺をメッシュで包みテストステロンを投与することにより、前立腺が増殖するに伴い尿道を閉塞していく新しいモデルの作製に成功した。この動物モデルでは、閉塞が数カ月かけて徐々に完成されるので、閉塞形成のプロセスが臨床に類似していると言える。

本研究は、この新しい閉塞モデル(新規閉塞モデル)を用いて、前立腺肥大症患者によく見られる排尿筋過活動、排尿筋収縮障害および残尿などの病態が発症するかについて検証する。また、従来の即時閉塞モデルと比較することにより、本モデルにおける病態の程度や発症時期の特徴を検討する。さらに、臨床像に近い本モデルを利用し、薬理学的特性、組織学的所見、HB-EGF、TGF- β 1、およびアポトーシスなどの発現を即時閉塞モデルと比較し、閉塞膀胱の病態メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 新規閉塞モデルの作製と病態評価

① ビーグル犬閉塞モデルの作製

雄ビーグル成犬をペントバルビタールで

麻酔し、下腹部正中切開で膀胱を露出、膀胱内圧測定用および生食注入用の2本のカテーテルを膀胱に挿入留置した。次いで、前立腺全体をナイロンメッシュで包み込んだ。閉腹した後に、テストステロン2mg/day およびエストラジオール0.02mg/day となるようにヒマシ油で溶解し、連日12週間皮下投与を行った。このようにして、前立腺増殖に伴い尿道閉塞が徐々に進行していくモデル(新規閉塞モデル)を作製した。テストステロンとエストラジオール混合液(ホルモン製剤)が膀胱機能へ影響を及ぼさないことを確認するため、前立腺をメッシュで包まずにホルモン製剤のみを投与したSham群を作製した。また、溶媒であるヒマシ油のみを投与したものをコントロール群とした。さらに、従来の即時閉塞モデルとして、膀胱頸部を部分結紮した群を作製し、今回の新規モデルと比較した。実験に使用したビーグル犬は、コントロール群、Sham群、即時閉塞群および新規閉塞群それぞれ5匹ずつで、合計20匹とした。予備実験からはSham群とコントロール群の間で膀胱機能の差がまったく認められなかったため、以下の実験ではコントロール群、新規閉塞群および即時閉塞群の3群で比較を行った。

② 尿流動態検査による病態評価

新規閉塞犬、即時閉塞犬およびコントロール犬について、術前と術後4週および12週目に覚醒下でテレメトリーによる尿流動態検査(ウロダイナミクス検査)を施行し、排尿回数、一回排尿量、排尿筋収縮圧、残尿量などを測定した。これらウロダイナミクス・パラメーターの経時的変化は、術前値からの変動率(%)によって評価した。

(2) 閉塞膀胱の病態メカニズムに関する検討

閉塞手術施行後4週目と12週目で、コントロール群、新規閉塞群および即時閉塞群から膀胱を摘出し、以下の検討を加えた。

① 形態学的・組織化学的検討

摘出膀胱の一部を凍結あるいはホルマリン固定し、筋成分と線維成分の比率の計測、コリンエステラーゼ染色による除神経の同定などを行った。

② 薬理的検討

カルバコール(Cch)のようなムスカリン受容体刺激薬に対する収縮反応、壁内神経電気刺激に対する収縮反応をそれぞれ解析し、コリン作動性神経に関わる除神経の薬理的エビデンスを評価した。

③ 分子生物学的検討

定量的RT-PCR法によって、閉塞膀胱におけるHB-EGFおよびTGF- β 1のmRNA発現量を測定した。また、チューネル法によるアポトーシス陽性細胞の染色も行い、閉塞後の膀胱平滑筋の増殖とアポトーシスのバランス

を経時的（4週と12種運目）に追跡した。

4. 研究成果

(1) 尿流動態から見た膀胱機能の変化

テレメトリーによって覚醒時のビーグル犬から膀胱内圧と一回排尿量の安定した同時記録を得ることが出来た（図1）。この同時記録に基づいて決定された正常ビーグル犬の尿流動態パラメーターの平均値は、排尿回数 1.72 回/H、一回排尿 99.6ml、排尿時の収縮圧（排尿筋収縮圧）52.6mmHg、残尿率 0% であった。

従来の即時閉塞モデルでは、閉塞手術施行後4週目で排尿筋収縮圧は約1.5倍に上昇するが、膀胱容量（一回排尿量）が72%に減少するため排尿回数は1.4倍多くなった。残尿も発生し、残尿率は膀胱容量の約34.5%まで増加した（表1）。第12週目になると、排尿回数はさらに増加し術前の2倍となった。残尿量はさらに増え残尿率は約90%になると共に、排尿筋収縮圧は40.2%まで減少した（表1）。これらの所見から、即時閉塞モデルでは術後12週目に膀胱機能は既に非代償期に移行していることが明らかとなった。

一方、閉塞が徐々に進行する新規閉塞モデルでは、術後4週経過しても、排尿回数、一回排尿量、排尿筋収縮圧および残尿率は術前の値と殆ど同じであった（表2）。術後12週目になって、排尿回数は約1.3倍に排尿筋収縮圧は1.4倍にそれぞれ増加したが、残尿率は約38%であった（表2）。これらは外来を訪れる前立腺肥大症患者の尿流動態パラメーターの値とほぼ同じであり、膀胱機能は十分保たれ代償期に留まっている。したがって、新規閉塞モデルは第12週目に臨床例によく似た尿流動態を示すことが明らかとなった。

(2) 薬理的所見

閉塞手術後4週目と12週目に即時閉塞群および新規閉塞群から膀胱を摘出し、オルガンバス内でカルバコール（Cch）と経壁電気刺激（経壁神経電気刺激）に対する収縮反応を検討した。

即時閉塞群では、4週目から排尿筋切片のCchに対する収縮反応が増大したが、経壁電気刺激による収縮反応は減少した。12週目になるとCchでも経壁電気刺激でも収縮反応は低下した。一方、新規閉塞群においては、Cchに対する収縮反応が4週目の膀胱では変化を示さなかった。しかし、12週目になると、10(-7M)以上のCchに対する反応は有意に上昇した。また、経壁電気刺激による収縮反応も4週目ではコントロールと比較して変わりがなかったが、12週目になって有意の減少を示した。

(3) 膀胱重量の変化（表3）

即時閉塞群の膀胱重量は、4週目で平均

21.4gとなりコントロールの約2倍の増加を示した。12週目で平均26.8gとなり、その増加は頭打ちになった。新規閉塞群においては、4週目でコントロールとほぼ同じで、12週目になって約2.6倍の有意の増加を示した。

(4) 線維成分と筋成分の比率（図2）

コントロール膀胱における線維成分と筋成分の比は約0.6位になった。即時閉塞群での線維成分の増加は著しく、4週で0.85に12週目で1.6まで増加した。一方、新規閉塞群では、4週目でコントロールとほぼ同じ値で、12週目になっても0.8位に留まった。すなわち、新規閉塞モデルの膀胱では、線維成分よりも筋成分の増生が主体となる、いわゆる代償性平滑筋肥大の像が観察された。

(5) HB-EGF mRNA と TGF- β 1mRNA の発現（図3, 4）

従来の即時閉塞モデルの膀胱では、平滑筋の増殖因子であるHB-EGF mRNAの発現および線維成分の増殖に関連するTGF- β 1mRNAの発現が4週目でも12週目でも増加した。しかし、新規モデルの膀胱では、TGF- β 1mRNAの発現よりもHB-EGF mRNAの発現の方がどの週でも高かった。このことは、新規閉塞モデルにおいて、閉塞に対する膀胱のバイオリジカルな反応は、平滑筋の肥大と増生を中心としたものであることを示唆している。

(6) アポトーシス陽性細胞の発現（図5）

アポトーシス陽性細胞は、コントロール膀胱でも一定の視野中で全平滑筋細胞数の7から8.2%に認められた。このアポトーシス陽性細胞は即時閉塞群で著しく多く、4週でも12週でも30%以上の値を示した。しかし、新規閉塞群では4週目でコントロールとほぼ同じで、12週目でも僅か12%であった。したがって、新規閉塞モデルの膀胱では、平滑筋増生が優位となりアポトーシスはかなり抑制された状態にあることが判明した

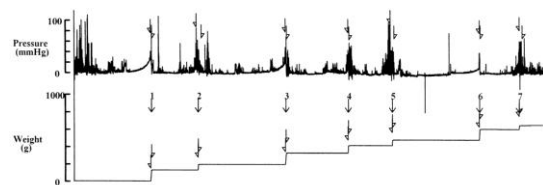


図1. テレメトリーによる膀胱内圧(上段)と1回排尿量(下段)の同時記録

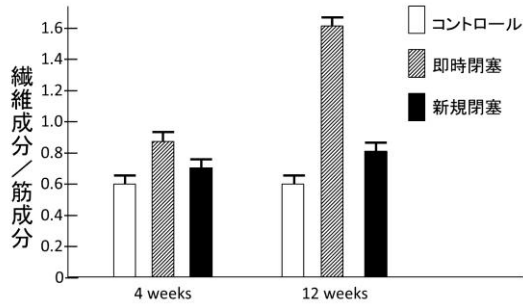


図2. 纖維成分と筋成分の比

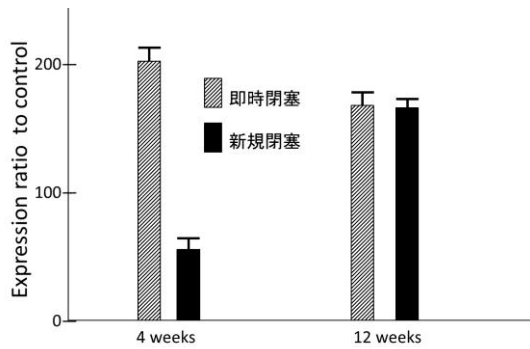


図3. HB-EGF mRNAの発現

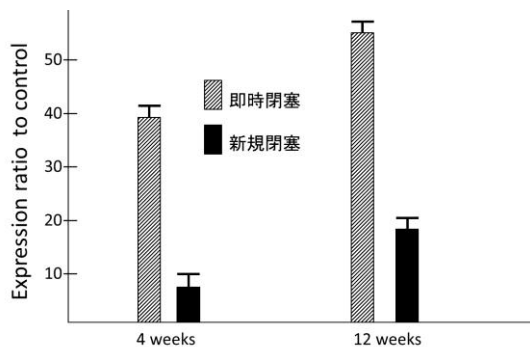


図4. TGF-β1 mRNAの発現

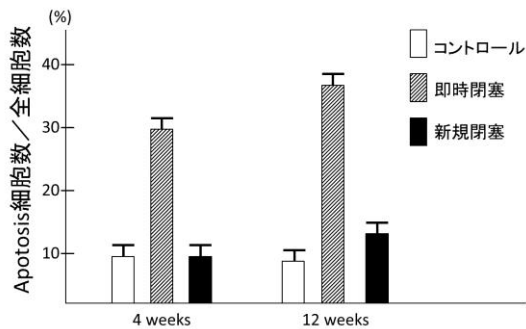


図5. アポトーシス指標の変化

	排尿回数(%)	1回排尿量(%)	排尿筋収縮圧(%)	残尿率(%)
第4週	142.5±10.6*	72±12.8*	151.5±2.9**	34.5±9.2
第12週	20.9±30.2*	12.5±3.2**	40.2±10.9*	90.3±8.5

表1. 即時閉塞モデルにおける尿流動態パラメーターの経時的変化。閉塞モデル術前の値(ベースライン)を100%とし、第4週と第12週目での変化を示す。残尿率は膀胱容量に対する残尿量の割合(%)で示してある。
n=25, p>0.05, **p<0.01

	排尿回数(%)	1回排尿量(%)	排尿筋収縮圧(%)	残尿率(%)
第4週	102±10.8	98±6.8	108±9.6	5.2±0.8
第12週	135±19.8*	75±9.8*	142±10.6**	38±5.2

表2. 新規閉塞モデルにおける尿流動態パラメーターの経時的変化。閉塞手術前の値(ベースライン)からの変化率(%)を示す。残尿率は膀胱容量に対する残尿量の占める割合で示してある。
n=5, *p>0.05, **p<0.01

膀胱重量(g)

	4 weeks	12 weeks
コントロール群	9.3±1.0	9.8±2.1
即時群	21.4±8.1	26.8±8.1
新規群	10.8±2.6	26.3±9.4

表3. 膀胱重量の変化

5. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 脩 (YAMAGUCHI OSAMU)
 福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号：6 0 0 0 6 8 1 4

(2) 研究分担者

宍戸 啓一 (SHISHIDO KEIICHI)
 福島県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：3 0 2 8 5 0 3 5

相川 健 (AIKAWA KEN)

(平成20年度)
 福島県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：8 0 2 9 5 4 1 9

榎田信博 (KUSHIDA NOBUHIRO)
(平成 20 年度)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 3 0 3 8 1 3 9 6

(3) 連携研究者

相川 健 (AIKAWA KEN)
(平成 21 年度～平成 22 年度)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 8 0 2 9 5 4 1 9

榎田信博 (KUSHIDA NOBUHIRO)
(平成 21 年度～平成 22 年度)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 3 0 3 8 1 3 9 6

白岩 学 (SHIRAIWA MANABU)
(平成 21 年度)
福島県立医科大学・医学部・病院助手
研究者番号 : 4 0 5 5 4 1 6 8

(4) 研究協力者

南里 真人 (NANRI MASATO)
(平成 20 年度～平成 21 年度)
大鵬薬品工業株式会社・育薬研究所