

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462510

研究課題名(和文) 下部尿路閉塞における膀胱微小循環の変化と交感神経 1 遮断薬の効果

研究課題名(英文) Change of bladder microcirculation in bladder outlet obstruction and effect of alpha-1 adrenoceptor blockers

研究代表者

後藤 百万 (Gotoh, Momokazu)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10186900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱虚血再灌流モデルラット、及び下部尿路閉塞モデルラットを用い、ペンシル型CCD生体顕微鏡により膀胱虚血再灌流における膀胱壁微小循環の変化を解析した。下部尿路閉塞における膀胱蓄尿障害は、膀胱過伸展による虚血再灌流障害による膀胱血流障害に起因することを示した。また、膀胱微小循環の障害が交感神経 1 遮断薬の前投与により 1A受容体を介して抑制されることを示した。これらの結果から、下部尿路閉塞に基づく蓄尿障害の新規治療として、膀胱微小循環、特に交感神経 1A受容体をターゲットとした薬剤開発が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bladder microcirculation in the condition of ischemia-reperfusion was analyzed using a pencil lens CCD microscopy system, in bladder ischemia-reperfusion model rats and bladder outlet obstruction model rats. It was demonstrated that the etiology of bladder storage dysfunction would be blood flow impairment due to microcirculation damage caused by bladder over distension. These microcirculation damage was suppressed through alpha-1A adrenoceptor subtype by pretreatment with alpha-1 blockers. The present results suggested that development of new medicine to improvement of bladder microcirculation targeting on alpha-1A adrenoceptor subtype would be of use for treatment of storage dysfunction due to bladder outlet obstruction.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：膀胱虚血再灌流障害 下部尿路閉塞 交感神経アルファ1受容体 交感神経アルファ1遮断薬 アルファ受容体サブタイプ 膀胱微小循環

1. 研究開始当初の背景

下部尿路機能障害の原因として膀胱血流障害が注目されるようになり、様々な下部尿路機能障害の病態と膀胱血流障害との関連が示唆されている。前立腺肥大症などの下部尿路閉塞においては、尿排出障害のみならず、過活動膀胱による蓄尿障害が高頻度にみられ、患者の QOL 阻害要因となっている。下部尿路閉塞において過活動膀胱が発生する機序については十分に検討されていないが、下部尿路閉塞によって起こる膀胱過伸展は膀胱壁の血流障害を起こす可能性がある。そこで、我々は下部尿路閉塞における膀胱過伸展が膀胱血流障害を引き起こし、蓄尿障害の発生に関与するとの仮説に基づいて今回の研究を行った。

2. 研究の目的

下部尿路閉塞によって引き起こされる膀胱機能障害の病因を膀胱微小循環の面から解析するとともに、新しい薬剤開発のターゲットを膀胱微小循環の側面から検討する。

3. 研究の方法

膀胱微小循環の評価は、膀胱外壁に接触させたペンシル型 CCD 生体顕微鏡により、膀胱粘膜と膀胱筋層別、膀胱部位別、動脈・静脈・毛細血管別に血流を動的可視化して評価するとともに、血流を数値化 (ml/min/100gm) して評価した (図 1)。

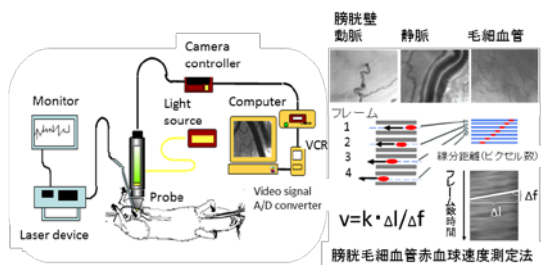


図 1 ペンシル型 CCD 生体顕微鏡による膀胱血流測定

(1) 膀胱過伸展による虚血再灌流モデルラットの作成と虚血再灌流モデルラットの膀胱微小循環に対する $\alpha 1$ 遮断薬タムスロシンの効果

SD 系雌性ラット 12 週を用い、イソフルレン麻酔下に、外尿道口からカテーテル (PE-50) を挿入し、膀胱内へ 0.05ml/分の速度で生理食塩水を計 2ml まで注入し、膀胱を過伸展の状態にした。腹壁を切開し、ペンシル型 CCD 生体顕微鏡を用いて膀胱外壁から経時的に毛細血管の血流速度を測定した。膀胱を生理食塩水 2mL で伸展し 120 分保持 (虚血)、その後膀胱内を空虚 (再灌流) にし、膀胱毛細血管の血流を 120 分後まで経時的に測定した。

皮下浸透圧ポンプによるタムスロシン (0.1mg/kg/day)、生理食塩水の投与を行い、1 週間後に膀胱過伸展による虚血再灌流モデルラットを作成し、膀胱過伸展 (2mL) (120 分保持) 及び過伸展解除 (膀胱空虚化) での膀胱毛細血管の血流の変化をペンシル型 CCD 生体顕微鏡を用いて過伸展および解除後 120 分まで計測した。

(2) 膀胱過伸展による膀胱粘膜毛細血管破綻に対するタムスロシンの効果

皮下浸透圧ポンプによるタムスロシン (0.1mg/kg/day)、生理食塩水の投与を行い、1 週間後に膀胱過伸展による虚血再灌流モデルラットを作成し、膀胱空虚後膀胱内に生理食塩水を注入し膀胱を過伸展状態とした。膀胱過伸展状態 (2.0 ml) を 2 時間維持、膀胱を空虚にして膀胱過伸展状態を解除し、膀胱毛細血管の形態的变化をペンシル型 CCD 生体顕微鏡で観察し、特に毛細血管の破綻と血管外赤血球漏出について検討を行い、タムスロシン投与群とコントロール群を比較した。

(3) 下部尿路閉塞モデルラットの膀胱微小循環と各種 $\alpha 1$ 遮断薬の効果

SD 系雌性ラットを用いて下部尿路閉塞モデルラットを作成した。下部尿路閉塞モデルラット作成と同時に、タムスロシン (0.1mg/kg/day)、ナフトピジル (30mg/kg/day)、シロドシン (4mg/kg/day)、および生理食塩水の皮下浸透圧ポンプによる投与を行い、2 週

間後、膀胱毛細血管の血流を測定した。シャム手術群 vs タムスロシン vs コントロール、シャム手術群 vs ナフトピジル vs コントロール、シャム手術群 vs シロドシン vs コントロールについて比較した。なお、使用した3種類の $\alpha 1$ 遮断薬は $\alpha 1$ サブタイプに対する親和性が異なり、タムスロシンの $\alpha 1$ サブタイプ親和性は $\alpha 1A > \alpha 1D >> \alpha 1B$ 、ナフトピジルは $\alpha 1D > \alpha 1A >> \alpha 1B$ 、シロドシンは $\alpha 1A >> \alpha 1D$ 、 $\alpha 1B$ である。

(4) 下部尿路閉塞モデルラットにおける膀胱機能変化とナフトピジルの効果

下部尿路閉塞モデルラットに、ナフトピジル(30mg/kg/day)および生理食塩水の皮下浸透圧ポンプによる投与を行い2週間後に膀胱内圧測定を行い、ナフトピジル群、コントロール群、およびシャム手術群を比較した。

(5) 下部尿路閉塞ラットにおける膀胱組織変化とナフトピジルの効果

下部尿路閉塞モデルラットを作成しナフトピジル(30mg/kg/day)、および生理食塩水の皮下浸透圧ポンプで投与し2週間後にHE染色による膀胱の組織学的変化を両群で比較した。

(6) 下部尿路閉塞ラットにおける膀胱組織内酸化ストレスマーカー8-OHdGの変化とナフトピジルの効果

ナフトピジル(30mg/kg/day)、生理食塩水皮下浸透圧ポンプによる投与2週間後に組織内8-hydroxy-2'-deoxyguanosineを測定した。

(7) 尿逆流による前立腺炎モデルにおける膀胱機能変化、前立腺血流の変化とタムスロシンの効果

雄性SDラット12週齢を用い、イソフルレン麻酔下に下腹部正中切開し、24G針にて膀胱頂部より尿500 μ Lを採取、尿あるいは生理食塩水500 μ Lを外尿道口より注入した。シロドシン2mg/kg/dayあるいは生理食塩水

を皮下浸透圧ポンプで投与し1週間後に膀胱内圧測定、およびペンシル型CCD生体顕微鏡を用いて前立腺微小循環血流測定を行った。

4. 研究成果

(1) 虚血再灌流モデルラット作成と膀胱微小循環に対するタムスロシンの効果

膀胱過伸展に伴い膀胱毛細血管血流は徐々に減少し、最終的には血流がほぼ0となり虚血状態が惹起された。再灌流により膀胱毛細血管血流は徐々に増加するものの、再灌流後120分後も膀胱過伸展以前までのレベルには回復せず、すなわち虚血再灌流障害が発生することが示唆された(図2)。他方、タムスロシンを前投与すると、血流再開後の毛細血管血流は膀胱過伸展以前のレベルまで改善し(図2)、タムスロシンは虚血再灌流障害による膀胱微小循環障害を抑制することが示唆された。

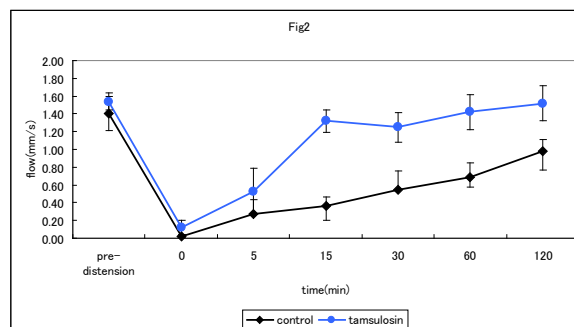


図2 膀胱虚血再灌流による膀胱毛細血管血流障害とタムスロシンの微小循環障害抑制作用

(2) 膀胱過伸展による膀胱粘膜毛細血管破綻に対するタムスロシンの効果

膀胱過伸展により、膀胱毛細血管の破綻による出血が観察された(図3)。

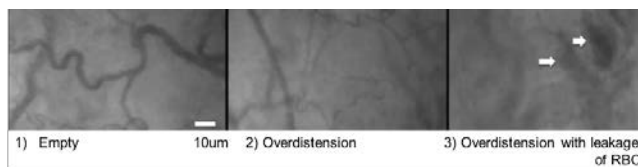


図3 膀胱虚血再灌流障害モデルラットにおける毛細血管からの出血

他方、タムスロシン前投与群とコントロールを比較すると、タムスロシン前投与群で赤血球漏出が有意に低率で(図4)、タムスロシンは膀胱過伸展による膀胱毛細血管の機械的障害(破綻)にも抑制的効果を示した。

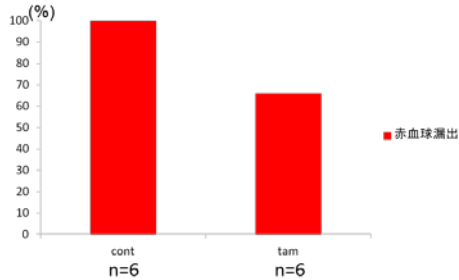


図4 タムスロシン前投与とコントロールの膀胱過伸展に伴う毛細血管からの赤血球漏出発生頻度の比較

(3) 下部尿路閉塞モデルラットの膀胱微小循環と各種 $\alpha 1$ 遮断薬の効果

下部尿路閉塞モデルラットでは、シャム群に比較して膀胱毛細血管血流が有意に低下した。他方、タムスロシン(図5)、ナフトピジル(図6)、シロドシン(図7)、いずれの $\alpha 1$ 遮断薬による前処置によってもコントロール(生理食塩水投与)に比べて下部尿路閉塞による血流低下が抑制された。すなわち、 $\alpha 1$ 遮断薬は下部尿路閉塞による膀胱微小循環障害を抑制することが示唆された。

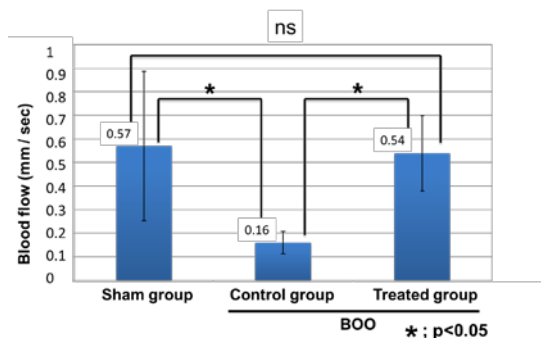


図5 下部尿路閉塞(BOO)による膀胱毛細血管の血流低下とタムスロシン前投与による血流障害抑制効果

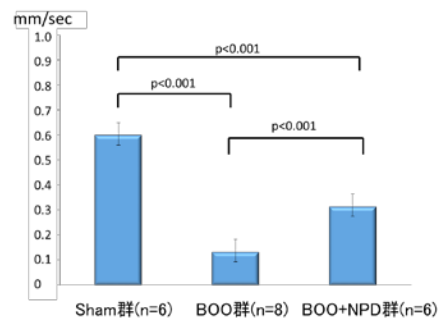


図6 下部尿路閉塞による膀胱毛細血管の血流低下とナフトピジル(NPD)前投与による血流障害抑制効果

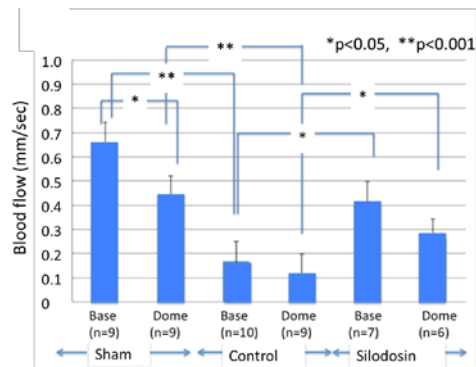


図7 下部尿路閉塞による膀胱毛細血管の血流低下とシロドシン前投与による血流障害抑制効果(Base:膀胱底部, Dome:膀胱頂部)

(4) 下部尿路閉塞モデルラットにおける膀胱機能変化とナフトピジルの効果

膀胱内圧測定では、下部尿路閉塞では膀胱収縮間隔を短縮したが、ナフトピジル前投与によりこれらの変化が抑制された(図8)

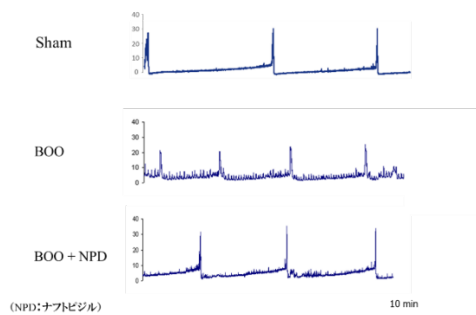


図8 シャム群、下部尿路閉塞(BOO)群、ナフトピジル前投与を行ったBOO群における膀胱内圧所見

(5) 下部尿路閉塞ラットにおける膀胱組織変化とナフトピジルの効果

下部尿路閉塞モデルラットの膀胱壁は肥厚し粘膜下に炎症細胞浸潤が見られるが、ナフトピジルを前投与した下部尿路閉塞モデルラットでは、膀胱壁肥厚と炎症細胞浸潤が減弱していた（図9）。

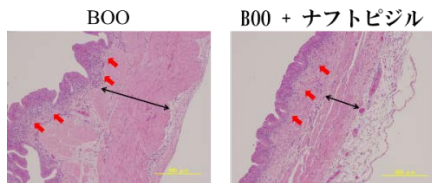


図9 BOO（下部尿路閉塞）とナフトピジル前投与したBOOラット膀胱組織のHE染色

（6）下部尿路閉塞ラットにおける膀胱組織内酸化ストレスマーカー8-OHdGの変化とナフトピジルの効果

下部尿路閉塞モデルラットの膀胱組織では酸化ストレスマーカー8-OHdGが増加していたが、ナフトピジルを前投与した下部尿路閉塞モデルラットの膀胱組織では8-OHdGが減少した（図10）。

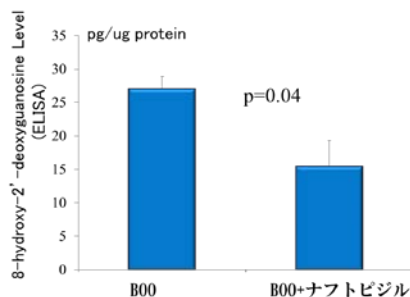


図10 下部尿路閉塞とナフトピジル前投与したBOOラット膀胱組織の酸化ストレスマーカー8-OHdG量

（7）尿逆流による前立腺炎モデルにおける膀胱機能変化、前立腺血流の変化とタムロシンの効果

尿逆流前立腺炎モデルでは、前立腺間質に炎症が認められた（図11）。

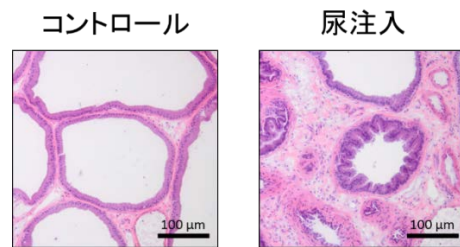


図11 尿道からの尿逆流による前立腺組織の変化（HE染色）

尿逆流前立腺炎モデルラットの膀胱内圧測定では、膀胱収縮間隔の短縮、すなわち過活動膀胱が惹起されたがシロドシン前投与により過活動膀胱は抑制された（図12）。

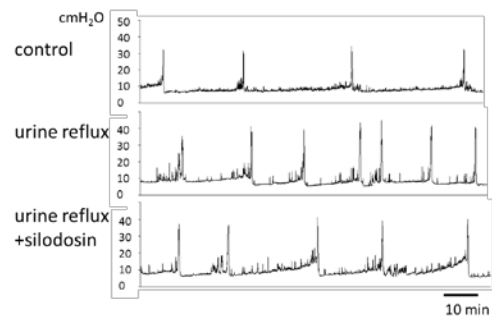


図12 尿逆流前立腺炎モデルの膀胱内圧測定所見とシロドシン前投与の影響

また前立腺微小循環のペンシル型 CCD 生体顕微鏡による評価では、前立腺炎モデルでは血流が減少するものの、シロドシン前投与により血流減弱が抑制された（図13）。

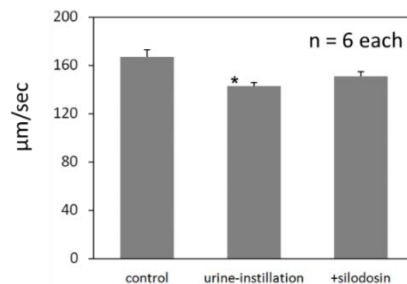


図13 前立腺炎モデルラットでの前立腺微小循環測定とシロドシン前投与の影響

本研究課題における一連の実験により、膀胱過伸展により膀胱虚血再灌障害が発生し、微小循環障害による膀胱血流障害が過活動膀胱などの蓄尿障害の発生に関与することが示唆された。下部尿路閉塞では、膀胱過伸展に

伴う虚血再灌流障害により膀胱微小循環が障害され、酸化ストレスにより排尿筋過活動が惹起されることが示唆された。さらに、交感神経 $\alpha 1$ 遮断薬は膀胱微小血管に作用して虚血再灌流による膀胱微小循環障害を抑制することが示された。異なる $\alpha 1$ サブタイプ親和性を有する $\alpha 1$ 遮断薬の使用により、膀胱毛細血管に対するこれらの薬剤の作用は $\alpha 1A$ 受容体が優位であることが示唆された。これらの結果から、今後下部尿路閉塞に基づく蓄尿障害の新規治療として、膀胱微小循環、特に交感神経 $\alpha 1$ 受容体をターゲットとした薬剤開発が有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Majima T, Yamamoto T, Funahashi Y, Takai S, Matsukawa Y, Gotoh M. Effect of naftopidil on bladder microcirculation in a rat model of bladder outlet obstruction. LUTS, 査読あり、2015 epub on ahead. DOI: 10.1111/luts.12119

(2) Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo K, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M. Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in rat model of bladder outlet obstruction using pencil lens charge-coupled device microscopy system. Urology, 査読あり、2013, 81:155-9, doi: 10.1016/j.urology

〔学会発表〕(計3件)

(1) Funahashi Y, Yoshida M, Yamamoto T, Matsukawa Y, Majima T, Gotoh M. The effect of silodosin on the prostatic microcirculation in a prostatitis model induced by urine reflux. 45th International Continence Society, 2015年10月7日、モントリオール(カナダ)

(2) Mizuno H, Funahashi Y, Matsukawa Y, Yamamoto T, Gotoh M, Muramatsu T, Soeda Y, Okamoto N, Kimura K, Aota Y. The imaging of leakage of red blood cells from submucosal capillary after bladder overdistension effect of

$\alpha 1$ blocker for hematuria after acute urinary retention. 45th International Continence Society, 2015年10月7日、モントリオール(カナダ)

(3) 水野秀紀、副田雄也、木村恭祐、岡本典子、青田泰博、山本徳則、後藤百万。急性尿閉後の血尿-膀胱過伸展・過伸展解除後(膀胱虚血再灌流障害)における膀胱毛細血管楔家球漏出の可視化。第27回日本老年泌尿器科学会、2014年6月13日、ホテル日航金沢(石川県、金沢市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 百万 (Momokazu, Gotoh)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10186900

(2)研究分担者

舟橋 康人 (Yasuhito, Funahashi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70534824