

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08664

研究課題名(和文)膀胱痛は漿膜側間質の変性によりおこるか

研究課題名(英文)ATP could cause visceral pain released from inflammation cells at the serosal side of urinary bladder in partial bladder outlet obstruction rat model

研究代表者

河谷 正仁 (KAWATANI, MASAHIITO)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00177700

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)：尿道狭窄モデル(pB00)作製により膀胱は肥厚し2週間後に重量が3倍になった。作成3日後にはNFが低下し、粘膜下層及び漿膜筋層間に線維芽細胞の増殖がおき2週間後まで継続した。摘出膀胱の粘膜側または漿膜側からATPを測定した。6pMのATPがpB00の粘膜側から測定され、漿膜側では粘膜側より多く圧依存的な結果となった。膀胱から粘膜上皮細胞除去後、対象群では圧刺激によるATP量の変化はなかったが、pB00では圧依存的にATPが増加した。pB00モデルで膀胱内神経線維が減少しても間質からのATPによって平滑筋の収縮と漿膜側にある知覚神経終末が刺激され過活動膀胱症状をおこすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Size of the rat urinary bladder enlarge after partial bladder outlet obstruction (pB00). Nerve fibers were diminished from the mucosa and submucosa and remained serosa area. Fibroblast and blood cells were observed at submucosa and area between smooth muscle and serosa membrane. ATP was measured from mucosal side or serosal side Ussing chamber. 2 weeks after pB00 operation, 3-6pM ATP was detected from mucosal side which 2-4 times higher at serosal side. ATP increase when the pressure increased. Following removal of the mucosa, ATP was not increase at control animal, however, increased pressure dependently at pB00. Pelvic nerve afferent activity after removal of mucosa was detected 30cmH₂O in control animal. In pB00, activity was first detected at 10cmH₂O and its frequency increase with pressure. In conclusion, ATP from connective tissue could activate smooth muscle and nerve terminals around the serosal contribute visceral pain.

研究分野：自律神経科学 疼痛学 生理学 排尿生理

キーワード：膀胱痛 過活動膀胱 ATP 尿道狭窄モデル

1. 研究開始当初の背景

尿道狭窄モデルで尿の排出障害がおきると、膀胱の粘膜細胞と粘膜下組織が肥厚するが、膀胱の漿膜側(外側)にも同じような変化(浮腫・細胞浸潤・間質細胞の増殖)がおきるかについて不明であった。この変化により膀胱支配神経、特に求心性神経の存在を低下させ、膀胱粘膜直下まで伸ばしていた神経終末が病態後は存在しなくなり、粘膜から出て求心性神経や平滑筋を刺激する化学物質の影響による病態生理の説明はできないと予想された。本研究は、病態モデルの特徴である無排尿性膀胱収縮および膀胱痛・膀胱知覚過敏が筋層及び漿膜側間質から出る物質により発生するのではないかという疑問がおきた。

2. 研究の目的

膀胱の伸展は粘膜上皮細胞から ATP が放出し骨盤神経の知覚神経終末にある P2X 受容体を刺激したり、活性化された TRPV1 チャネル、ASIC チャネルが ATP の放出を促進し、排尿反射の亢進(過活動)や痛みを作ると考えてきた。モデルの膀胱はその重量は3倍で、肥厚している。モデル動物の知覚神経が粘膜下に到達する前に、漿膜を通過する際に、ATP が肥厚した漿膜下組織から放出され、神経を刺激することを検討する。また、蓄尿に伴って肥厚した漿膜下の間質細胞から化学物質が放出され、知覚神経活動を活性化させ痛みがおこることを証明する。

3. 研究の方法

尿道狭窄モデルでの形態変化と信号物質の変化

ラットをセボフルレン麻酔し恥骨を切開して尿道を直視下で剥離し、ステンレス棒(1mm)を添えて絹糸(4.0)で結束し、棒を引き抜き、狭窄を形成する。シャムオペ群は麻酔後、尿道の剥離のみをする。術後3, 7, 14, 28日の膀胱重量測定したのち、組織切片を免疫染色し検討す

る。

尿道狭窄モデルの膀胱内持続灌流による膀胱内圧測定

尿道狭窄モデルラットを再度ガス麻酔し、膀胱にポリエチレンチューブ(PE50)を挿入し、ここから生理食塩水を2.4ml/hで持続灌流しながら、同時に膀胱内圧を圧トランスデューサーで測定する。データはパワーラボを用いてコンピュータに記録して、排尿間隔、最大排尿圧、排尿閾値圧についてシャム群とモデル群で系時的变化を含めて検討する。

ウツグチェンバーによる筋層 漿膜からの ATP の測定

小型ウツグチェンバーに摘出した膀胱をセットし、漿膜側から粘膜側にむかって水圧をかけ、粘膜側を灌流液2mlのチェンバーから200ulを採取し、ATP量を測定する。ATP測定はルシフェリン-ルシフェラーゼを用いて測定する。また、粘膜側からの水圧刺激も行い、漿膜側からのATP量も記録する。シャム群とモデル群で水圧刺激を行い、結果を比較検討する。伸展によって出された漿膜側ATP量を検討する。同様の検討を膀胱粘膜を剥離して行い漿膜側間質からの影響の特徴を明確にする。

骨盤神経放電記録

In vitro の膀胱 骨盤神経標本を用いて骨盤神経からシングルユニットで放電を記録する。全層膀胱標本ないし粘膜剥離標本の漿膜側でない方から水圧刺激をし、放電頻度の観察記録をする。

4. 研究成果

尿道狭窄モデル(pBOO)作製により膀胱は肥厚し2週間後に重量が3-5倍になった。作成3日後には神経線維マーカーの低下が起こり、組織染色では神経線維は漿膜とその近くの間質のみに存在し筋層ならびに粘膜下層には認められなくなっていた。また粘膜下層及

び漿膜筋層間に線維芽細胞の増殖がおき2週間後まで継続した。対象群とpBOO作成後2週間後、膀胱をウツグチェンバーを用いて粘膜側または漿膜側からATPを測定した。3-6pMのATPがpBOOの粘膜側から測定され、漿膜側では粘膜側より多く圧依存的な結果となった。pBOOと対象群とでは増加率に差は認められなかった。膀胱から粘膜上皮細胞除去後、対象群では圧刺激によるATP量の変化はなかったが、pBOOでは圧依的にATPが増加した。粘膜剥離膀胱の骨盤神経からの神経放電医記録では、粘膜側(筋層がある状態)から圧刺激すると、対照群では30cmH₂Oの水圧刺激で放電が記録されたが、pBOOモデルでは10cmH₂Oの水圧刺激から放電が記録され、圧依的に放電頻度の増大が認められた。

したがってpBOOで膀胱内神経線維が減少しても間質からのATPによって平滑筋の収縮や漿膜側にある知覚神経終末刺激され、無排尿性膀胱収縮や膀胱知覚過敏・膀胱痛といった過活動膀胱症状をおこすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

- 1) 河谷正仁, 河谷昌泰(2018) 排尿反射から見た脊髄の機能的回路. *Clinical Neuroscience* 36, 41-48. 査読無
- 2) Kawatani, M., Akimoto, N., Yamada, A., Furue, H., Kawatani, M. (2017) Noradrenergic effects in rat sacral autonomic nucleus using in vitro slice patch-clamp recording. *Biomedical Res* 38, 359-369. 査読有

DOI: <https://doi.org/10.2220/biomedres.38.359>

- 3) Shiina, M., Hayashida, K., Ishikawa, K., Kawatani, M. (2016) ATP release from bladder urothelium and serosa in a rat model of partial bladder outlet

obstruction. *Biomedical Res* 37, 299-304. 査読有

DOI: <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.299>

- 4) 宮井和政, 河谷正仁 (2017) セロトニン受容体による排尿機能制御. *腎臓内科・泌尿器科* 6, 159-164. 査読無

- 5) Matsumoto-Miyai, K., Yamada, E., Shinzawa, E., Koyama, Y., Shimada, S., Yoshizumi, M., Kawatani, M. (2016)

Serotonergic regulation of distention-induced ATP release from the urothelium. *Am J Renal Physiol* 310, F646-F655. 査読有

DOI 10.1152

- 6) Matsumoto-Miyai, K., Yoshizumi, M., Kawatani, M. (2015) Regulatory effects of 5-Hydroxytryptamine receptors of voiding function. *Advances in Therapy* 32, Supple 1, S3-S15 査読有

DOI 10.1007/s12325-015-0240-2

[学会発表](計2件)

- 1) 秋元 望, 箱崎敦志, 河谷正仁, 井元二, 古江秀昌 (2015) 下部尿路から脊髄入力する痛覚伝達機構の in vivo 解析. *Pain* 第37日本疼痛学会, 7月, 熊本 Res 30, 85
- 2) 善積克, 河谷正仁 (2015) 抑制効果とグリシン受容体 3サブユニット覚醒下ラットにおけるグリシン髄腔内投与による排尿機能の関与. 第22回日本排尿機能学会, 9月, 札幌

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

6. 研究組織

(1)研究代表者

河谷正仁（Kawatani Masahito）

秋田大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号：00177700

(2)研究分担者

伊藤登茂子（Ito Tomoko）

秋田大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号：50241675

林田健一郎（Hayashida Kenichiro）

秋田大学大学院医学系研究科 准教授

研究者番号：40769634