

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：33708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11060

研究課題名(和文) 衛星細胞による膀胱知覚神経の調節

研究課題名(英文) The condition change by neural regulation modified by glia cells.

研究代表者

松吉 ひろ子 (Matsuyoshi, Hiroko)

岐阜医療科学大学・保健科学部・准教授

研究者番号：10448772

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)：急性・慢性膀胱炎モデルラット膀胱から取得したラマンスペクトルを解析することにより、膀胱壁を構成する蛋白質(構造蛋白質が有力)の変性または組成変化が病態に大きく影響している可能性があるという結果を得た。研究に用いたラマン分光法による測定技術では、前処理なく非侵襲的に生体を測定することが可能であり、衛星細胞の神経細胞修飾等により起こる生体変化を簡単な操作で検出できる技術として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今研究では、急性・慢性膀胱炎モデルラット膀胱からラマンスペクトルを検出することが可能であり、ラマン分光法の使用により、免疫組織学的実験では明らかにできない構造変化の原因を推測することが出来ることを明らかにした。加えて、今回使用したラマンプローブはヒトの膀胱鏡との併用が可能な大きさである。故に、ラマン分光法の応用により、間質性膀胱炎や膀胱癌の非侵襲的な診断技術を確立できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The spectra changes between the BPS/IC model and control animals were detected and the spectral alteration was affected by the effect of property change of urothelium; structure proteins. The Raman technique used this sturdy can be applied the living animal analysis without pretreatment noninvasively. Hence, the Raman technique has a possibility as a detection system of animal condition change by neural regulation modified by glia cells.

研究分野：末梢神経科学

キーワード：膀胱炎 ラマン分光学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蓄尿・尿排泄を担う下部尿路機能は、末梢神経系では下腹神経、陰部神経、骨盤神経により調節されており、特に、膀胱の状態を伝達するには骨盤神経の求心性知覚神経が重要な役割を果たしている。一方、神経膠細胞は、従来言われている構造支持だけでなく、膜電位形成に関わるカリウム動態を変化させることにより神経活動に影響を及ぼすことが分かってきた。故に、膀胱知覚神経とその周囲を取り囲んで存在する末梢神経膠細胞である衛星細胞のカリウム濃度調節に関与するカリウムチャネルの発現、活性を明らかにすることは、蓄尿・尿排泄機序を解明し、新たな排尿障害治療標的の発見に繋がる。

### 2. 研究の目的

チャンネル阻害剤や物理刺激等を動物に与えて測定した膀胱内圧測定の結果より導き出した膀胱知覚神経細胞と衛星細胞との調節機構が、実際の生体でどのように機能するのかを検証し、新たな治療標的として有効な分子を同定する。さらに、細胞内のすべての物質活性変化後の状態をとらえる技術であるラマンスペクトル測定を応用し、その治療効果を判定する技術を確立する。

### 3. 研究の方法

実験は、10~14週齢の雌性ウイスターラットを用いて行った。

#### 1 急性、慢性膀胱炎(間質性膀胱炎)モデルラット作成

イソフルラン吸入麻酔下のウイスターラット尿道に挿入した PE-50 カテーテルより 0.4 M 塩酸 0.2 mL を膀胱に注入し、90 秒後に溶液を排出させ、カテーテルを抜去し処置を終え、1 週間通常飼育することによって急性膀胱炎モデルを作成した。慢性膀胱炎(BPS/IC)モデルは、この操作を 4 回繰り返すことにより作成した。塩酸の代わりに生理食塩水を用いてそれぞれ同様の操作を行ったものを対照群(sham)とした。なお、動物は、組織採取・ラマン測定時(最終投与後 1 週間)に 14 週齢になるよう調節した。

#### 2 免疫組織化学実験

モデル動物を 4%パラホルムアルデヒドで還流固定または摘出したラット膀胱を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、包埋凍結した。その後、マイクロトームにて 5 または 10  $\mu\text{m}$  の厚さの切片を作製し、染色に用いた。免疫染色は抗体を反応させた後、ビオチン修飾二次抗体を反応させ、ビオチン・アビジン反応で信号を増幅し(ABC elite kit)、DAB 反応で検出した。

#### 3 パッチクランプ用膀胱知覚神経細胞・膠細胞培養

膀胱支配神経を可視化するための逆行性神経標識物質、Hydroxystilbamidine (Fluoro Gold) を膀胱壁に注入したラットの後根神経節を採取し、トリプシン、コラーゲン分解酵素、DNA 分解酵素処理して細胞を単離し、さらに、30%パーコールによる密度遠心分離により神経と衛星細胞を分離し、それぞれを馬血清、牛胎児血清、グルタミン酸塩などを含む培養液中で初代培養した。

#### 4 膀胱ラマンスペクトル測定

塩酸または生理食塩水最終投与後 1 週間のモデルラット膀胱を、イソフルラン吸入麻酔下の動物より摘出し、膀胱質量を測定したのち、膀胱を切開展開して上皮面からラマンプローブによるラマン分光測定を行った。直径 500  $\mu\text{m}$  のサファイアボールレンズ(Edmund optics, パーリントン)と、直径 420  $\mu\text{m}$  の中空ファイバー(導光技術合同会社, 仙台)で構成された中空ファイバーラマンプローブ(Ball lens mounted Hollow fiber Raman Probe: BHRP)を用いて測定を行った(図 1)。励起光源には波長 785 nm のダイオードレーザー(TOPTICA Photonics AG, ミュンヘン)を使用し、強度はサンプル位置にて 50 mW、露光時間 90 秒(30 秒 3 回積算)の条件で測定した。ラマン散乱光の検出には単色ラマン分光器(F4.2, focal length 320 mm, 750 nm blazed 6001/mm grating)(株式会社フォトンデザイン, 東京)と CCD 検出器(DU420-BRDD)(Andor Technology Ltd, ベルファースト)を用いた(図 2)。取得したデータに対して The Unscrambler を用いて PCA、PCA-LDA を行った。

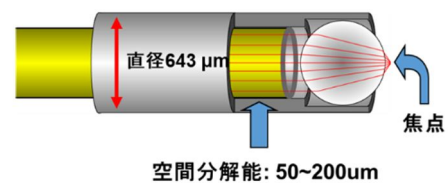


図1 中空系ファイバーラマンプローブ

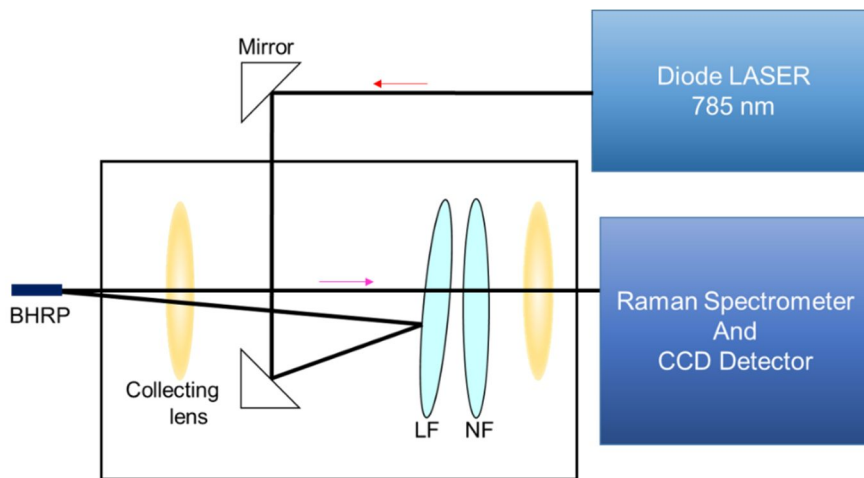


図2 ラマン測定装置

#### 4. 研究成果

##### 1 急性、慢性膀胱炎（間質性膀胱炎）モデルラット

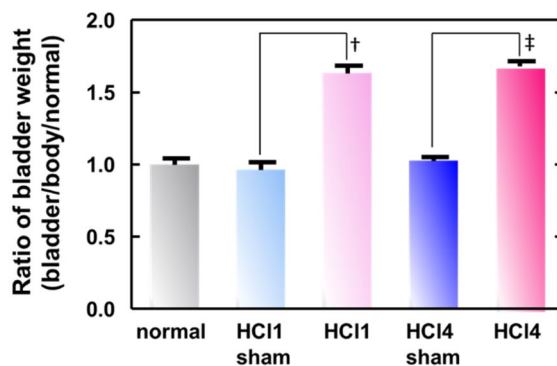


図3 膀胱障害モデルラット膀胱質量

対照群に比べ投与群で膀胱質量が増加し、対照群と正常ラットの間には膀胱質量差はなかった。また、投与回数による膀胱質量差はなかった。

塩酸膀胱内投与により塩酸の膀胱内注入により膀胱炎が誘発され、膀胱重量の増加（図3）・膀胱上皮の増生を認めた（図4）。今実験では、塩酸の頻回投与でも、シクロフォスファミド投与により起きるような重度の膀胱炎（重度血尿による尿閉を発症）症状は見られず、この方法は内視鏡では異常をみとめないが排尿障害症状を持つ病態に近いモデル作成に適していると考えられる。

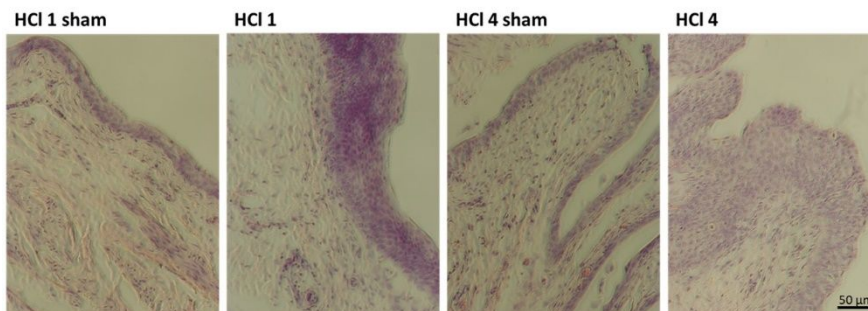


図4 膀胱の組織学的変化(HE染色)

塩酸の膀胱内投与により膀胱上皮の増生が認められた。

##### 2 免疫組織化学

コラーゲンの発現は障害モデル、対照群ともに粘膜固有層、平滑筋層に発現が認められ病態による差は認められなかった。コラーゲンについても、明確な差異は認められなかった。

##### 3 パッチクランプ測定

ラマン分光法とパッチクランプの同時測定系の確立を目指しているが、現在のところ、膀胱支

配神経標識には標識が必要であり、前処理のない方法での実験を模索している。また、培養に関しても、神経と膠細胞の分散が難しく、パッチクランプ実験系の確立が難しかった。

#### 4 モデル動物膀胱のラマンスペクトル測定

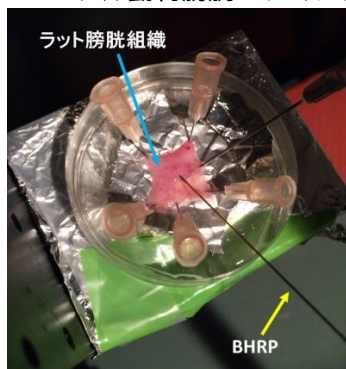


図5 ラット膀胱ラマンスペクトル測定

各対照群の摘出膀胱の粘膜側から、1本のファイバーで励起光照射とラマン散乱光検出が可能な微小ラマンプローブを用いてラマンスペクトルを測定し、各群の平均スペクトルを取得した(図5)。

得られた平均スペクトルを比較すると、800 - 1000  $\text{cm}^{-1}$ 、1010 - 1110  $\text{cm}^{-1}$ 、1220 - 1350  $\text{cm}^{-1}$  領域(アミド)で急性・慢性対照群とそれぞれの投与群との差が顕著であり、さらに、急性対照群 ~ 慢性対照群 ~ 急性炎症群 ~ 慢性炎症群へと段階的に変化する傾向があることを示した(図6)。加えて、そのスペクトル変化は

構造タンパク質(コラーゲン)の影響を示唆するものであった。得られたスペクトルから主成分分析法を応用して変量間の類似度(第一主成分のローディングプロット)を抽出し、スペクトルから予想された蛋白質、コラーゲンの純物質ラマンスペクトルと比較すると、コラーゲンの減少がスペクトルの変化に影響する可能性があることが明らかになった。これは、各組織のヘマトキシリン・エオジン染色により示された膀胱上皮の炎症による増殖と相関のある結果であり、抗コラーゲン抗体による免疫染色では、コラーゲンの発現様式に差はなかったことを合わせて考えると、ラマンスペクトル測定の感度が高いことを示す結果であると考えられる。ファイバースペクトルを用いた本手法による対照群と炎症モデルの判別分析の感度、特異度は、それぞれ、HCl 1で94.4%、91.7%、HCl 4では88.0%、91.7%と高い確率であった。

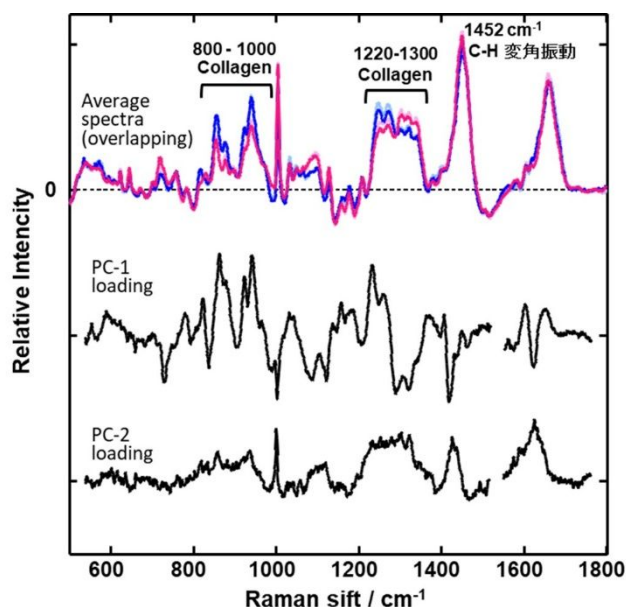


図6 膀胱炎モデルラット膀胱の平均ラマンスペクトル

淡青:急性炎症対照群 濃青:急性炎症群  
淡桃:慢性炎症対照群 濃桃:慢性炎症群

以上より、今実験で使用した微小プローブを内視鏡と組み合わせて生体に使用すれば、前処理なく、非侵襲的に生体膀胱を測定することが可能であり、診断・治療への応用が期待できる結果と言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松吉ひろ子、竹谷皓規、佐藤英俊	4. 巻 47
2. 論文標題 ラマン分光を応用した膀胱病態評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 レーザー研究	6. 最初と最後の頁 107-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Matsuyoshi H, Takama S, Tanioka T, Sato H
2. 発表標題 Raman for detection of the pathological change of the bladder
3. 学会等名 SPEC 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuyoshi Hiroko, Taketani Akinori, Iwasaki Yuki, Yoshimura Naoki, Sato Hidetoshi
2. 発表標題 Raman study to explore a new discriminate method of bladder condition
3. 学会等名 ICS2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松吉ひろ子、高間柊平、佐藤英俊
2. 発表標題 ラマン分光を応用した膀胱病態評価・分析技術の開発
3. 学会等名 第15回医用分光学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroko Matsuyoshi, Kosuke Hashimoto, Naoya Ogawa, Akinori Taketani, Naoki Yoshimura, Hidetoshi Sato
2. 発表標題 Raman study for detecting the change of property of DRG neurons innervating the urinary bladder
3. 学会等名 Spec 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Hiroko Matsuyoshi, Akinori Taketani, Yuki Iwasaki, Naoki Yoshimura, Hidetoshi Sato
2. 発表標題 Raman study for development of a new discriminate method of bladder conditions of Bladder pain syndrome/Interstitial cystitis (BPC/IC) model rat
3. 学会等名 Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	吉村 直樹  (Yoshimura Naoki)		
連携研究者	佐藤 英俊  (Sato Hidetoshi)  (10300873)	関西学院大学・理工学部・教授   (34504)	