

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K10782

研究課題名（和文）マイクロダイアリシス法を用いた神経因性膀胱の病態に関わる脳内機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the brain mechanisms involved in the pathophysiology of neurogenic bladder using the microdialysis method

研究代表者

吉田 輝（Yoshida, Akira）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：40347109

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：光感受性色素ローズベンガルを用いた脳梗塞ラットと正常ラットで小動物用排尿機能検査装置を用いて自由行動下での排尿活動を比較した。脳梗塞後の過活動膀胱モデルの確立を目的としていたが、自由行動下でのその病態の再現は困難であった。一方、小動物用排尿機能検査装置を用いた自由行動下での排尿活動と傍中脳水道灰白質でのセロトニンとドーパミンの動態をマイクロダイアリシス法で同時に評価できる新たな実験系を確立し、排尿活動と同期するセロトニンの律動的な変化を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小動物用排尿機能検査装置を用いた自由行動下での排尿活動と傍中脳水道灰白質でのセロトニンとドーパミンの動態をマイクロダイアリシス法で同時に評価できる実験系を確立することができた。この実験系を用いることで、これまで行われてこなかった生理的条件下での長時間の排尿活動と脳内の神経伝達物質の動態の関連の検討が可能となり、排尿に関わる脳内の神経機構の解明や神経因性膀胱の病態の解明、新たな治療薬の開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Using the photosensitizing dye rose bengal, we compared urination activities in stroke-induced rats and normal rats with a small animal urinary function testing device under free-moving conditions. Although our aim was to establish an overactive bladder model post-stroke, replicating this pathology under free-moving conditions was challenging. However, we developed a new experimental system that simultaneously evaluated urination activity and serotonin and dopamine dynamics in the periaqueductal gray matter using the microdialysis method. This system revealed rhythmic serotonin changes synchronized with urination activity.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：マイクロダイアリシス 神経因性膀胱 脳梗塞 ラット

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中や脊髄損傷などによる神経因性膀胱に伴う頻尿、尿失禁は、患者および家族の 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。排尿機能の研究では、近年、尿路上皮が機械的刺激に対するセンサー機能や神経伝達物質の分泌機能を有することが注目され、新たな治療のターゲットとして活発な研究が行われ、多くの新しい知見が見出されているが、脳における排尿制御機構の詳細についてはいまだ不明な点が多い。近年のヒトの機能的脳画像による検討から傍中脳水道灰白質や視床、前部帯状回、島皮質、前頭前野皮質など排尿制御に関わる重要な領域が明らかにされ、過活動性膀胱やパーキンソン病の患者では健常者と異なる賦活パターンを示すことが報告されている。そこには様々な神経伝達物質の変化が基盤にあると考えられるが、ヒトで直接脳内の神経伝達物質の動態を調べることは不可能である。最近、ラットを用いた機能的脳画像の検討でもヒトと同様な領域が排尿制御にかかわることが明らかにされており¹、その領域における神経伝達物質の動態を明らかにすることにより、ヒトにおける排尿機能の脳内機構や神経因性膀胱の病態の解明、さらには、より病態に基づいた治療法の開発につながる貴重な情報が得られると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、正常ラットと脳梗塞モデルラットを用い、排尿制御に関わる大脳の領域である前部帯状回や前頭前野皮質、傍中脳水道灰白質などにおける、排尿反射や排尿行動に伴うセロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、アセチルコリンなどの神経伝達物質の動的変化を、マイクロダイアリシス法を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 正常ラットでの 48 時間の排尿活動のパターンの解析

10~12 週齢の Sprague-Dawley 系雌ラット (体重 312 ± 5.2 g) を用いた。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した。

(2) 脳梗塞モデルラットの排尿活動の解析

以下の実験では、10~12 週齢の Wistar 系雄ラット (体重 309.4 ± 14.1 g) を用いた。ここで Wistar 系雄ラットを用いた理由は、後のマイクロダイアリシス実験で特定の脳部位へのカニューレ挿入の際に基準となる Paxinos&Watson の脳図譜が、体重 300g の Wistar 系雄ラットを用いて作成されていることによる。イソフルラン吸入麻酔下でラットを脳定位固定装置で固定し、頭皮を剥離した状態で光源装置より誘導された波長 560 nm の緑色光線を照射しながら尾静脈より光感受性色素のローズベンガルを 20 mg/kg 静注した。照射部位は、同様の脳梗塞モデルで過活動膀胱モデルを確立した Ota ら²の先行研究を参考に、Bregma より前方 2 mm を中心とした直径 10mm の範囲とし、照射時間は 20 分で行った。

脳梗塞作製 3 日後にラットを小動物用排尿機能検査装置のケージ内に入れ、48 時間にわたり排尿パターンおよび排尿量を観察した。観察はラットが自由に餌と水を摂取可能な状況で行った。また、正常の Wistar 系ラットでも同様の観察を行い、脳梗塞モデルラットと正常ラットでのデータの比較を行った。なおデータの比較には、実験開始後 24~48 時間のデータを用いた。

(3) 前頭前野皮質 (Prefrontal Cortex: PFC) と傍中脳水道灰白質 (Periaqueductal Gray: PAG) のセロトニンとドーパミンの動態のマイクロダイアリシス法による測定

イソフルランの吸入麻酔下でラットを脳定位固定装置で固定し、ガイドカニューレを挿入後 2 個のアンカービスと歯科用セメントで固定した。ガイドカニューレの挿入位置は、Bregma を基準に PFC は (anterior 3.2 mm, lateral 3.2 mm, ventral 3.5 mm)、PAG は (anterior 7.8 mm, lateral 2 mm, ventral 1.6 mm) とした。なおガイドカニューレの挿入位置は Kitta ら³、Chiba ら⁴の先行研究を参考にした。術後 3 日目に、イソフルラン吸入麻酔下で測定用プローブに変更し、微量生体試料分析システム (HETC-500、エイコム社製) に接続し細胞外液を回収。ドーパミン・セロトニン高感度分析用カラムを用いて 5 分間隔で 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、24 時間、ドーパミン・セロトニンの測定を行った。

(4) 排尿活動と関連した PAG におけるセロトニンとドーパミンの動態のマイクロダイアリシス法による検討

前述の方法で PAG にガイドカニューレを挿入。術後 3 日目に、イソフルランの吸入麻酔下で測定用プローブに変更したのち、微量生体試料分析システムに接続し、ラットを小動物用排尿機能

検査装置のケージ内に入れ、24 時間にわたり排尿パターンおよび排尿量を観察すると同時に 5 分間隔でドーパミン・セロトニンの測定を行った。実験のシステムの全景を図 1 に示す。

実験は鹿児島大学動物実験指針に従い、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得て行った。(承認番号：第 MD21047 号)

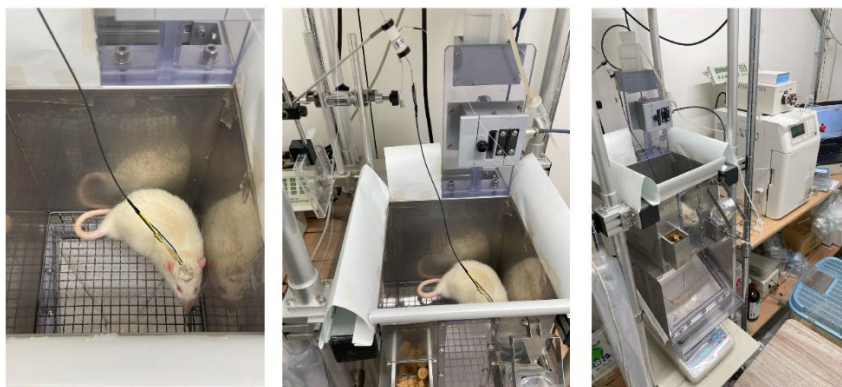


図 1 実験のシステムの全景

4. 研究成果

(1) 正常ラットの 48 時間の排尿パターン

正常ラットの 48 時間の排尿の諸パラメータを表 1 に示す。

	排尿回数 (回)	排尿間隔 (分)	1 回排尿量 (μ l)	総排尿量 (μ l)
暗時間帯 (0~12 時間)	11 \pm 5	51.9 \pm 6.0	779.3 \pm 89.0	8202 \pm 3318
明時間帯 (12~24 時間)	8 \pm 3	99.9 \pm 17.6*	820.3 \pm 86.3	6562 \pm 637
暗時間帯 (24~36 時間)	14 \pm 1	54.3 \pm 8.0	769.3 \pm 50.0	14182 \pm 601
明時間帯 (36~48 時間)	9 \pm 1	75.1 \pm 8.3	1017.7 \pm 113.3	8542 \pm 448

* $P < 0.05$ vs 暗時間帯 (0~12 時間), 暗時間帯 (24~36 時間) (Turkey-Kramer 法) 平均 \pm 標準誤差

表 1 暗時間帯と暗時間帯の排尿のパラメータの比較

明時間帯 (12~24 時間) は暗時間帯 (0~12 時) 暗時間帯 (36~48 時間) と比較して有意に排尿間隔が長かった。排尿回数は暗時間帯が多い傾向を認めた。

(2) 脳梗塞ラットと脳梗塞ラットの排尿パターンの比較

脳梗塞ラットと正常ラットの排尿の諸パラメータを表 2 に示す。

	排尿回数 (回)	排尿間隔 (分)	1 回排尿量 (μ l)	総排尿量 (μ l)
脳梗塞ラット				
暗時間帯	12 \pm 3	57.0 \pm 4.9*	672.6 \pm 52.1	8239 \pm 1280
明時間帯	6 \pm 4	101.9 \pm 13.7**	886.9 \pm 93.6	4649 \pm 1867
正常ラット				
暗時間帯	15 \pm 2 [#]	54.3 \pm 8.0	769.3 \pm 50.0	14182 \pm 601
明時間帯	9 \pm 1	75.1 \pm 8.3***	1017.7 \pm 113.3	8542 \pm 448

$P < 0.05$ vs 脳梗塞ラットの明時間帯, 正常ラット明時間帯 * $P < 0.05$ vs 脳梗塞ラット明時間帯, 正常ラット明時間帯

** $P < 0.05$ vs 正常ラット暗時間帯 *** $P < 0.05$ vs 正常ラット暗時間帯 (Turkey-Kramer 法)

表 2 脳梗塞ラットと正常ラット排尿のパラメータの比較

脳梗塞ラット、正常ラットともに暗時間帯が明時間帯よりも排尿回数が多く排尿間隔が短い日内変動を示したが、脳梗塞ラットと正常ラット間での排尿パターンには明らかな差は認めなかった。Ota らは、同様の感受性色素のローズベンガルを用いた脳塞栓モデルで脳梗塞作製後 1 日目、7 日目、14 日目にシストメトリーを実施し、脳梗塞ラットでは 1 日目、7 日目で正常ラットと比較し有意に排尿間隔が短縮しており、脳梗塞後の過活動膀胱の病態モデルとしての有用性であると報告している²。今回の実験では、同様の脳梗塞モデルで、自由行動下での排尿間隔の短縮、排尿回数の増加といった過活動性膀胱の病態モデルを確立が確立できることを期待していたが、期待していた結果を得ることはできなかった。Ota らは脳梗塞作製後 1 日目が正常ラットよりも最も排尿間隔が短縮していたことを報告しているが、自由行動下では脳梗塞作製 1~2 日は、脳梗塞作製後のダメージから飲水、摂餌量が低下し、体動も減少し排尿活動も減少する

ことから、生理食塩水を膀胱内に注入し排尿反射を誘発させるシストメトリーとは条件が大きく異なっており、自由行動下では過活動性膀胱の病態モデルとしての有用性を明らかにすることができなかったものと思われる。従って、自由行動下での脳梗塞後の過活動膀胱モデルを確立するには、シストメトリーでの実験とは異なる脳梗塞作製の条件設定、脳梗塞後の管理、評価タイミングの検討が必要と思われる。

(3) PFC と PAG のセロトニンとドーパミンの動態

PFC と PAG におけるドーパミンとセロトニンの典型的なクロマトグラムを図 3 と図 4 に示す。セロトニンは、PFC と PAG の両部位で検出され、PFC でその量が多かった。またドーパミンは PFC でわずかに検出されたが、PAG ではほとんど検出されなかった。

図 5 に PFC における暗時間帯のドーパミンとセロトニンの経時的な変化を示す。セロトニンは暗時間帯の早期にその量が漸増し深夜帯をピークになだらかに減少してくるパターンを示し、暗時間帯の総体的な活動量の増加との関連が示唆された。一方ドーパミンは経過を通じてごく微量しか検出されなかった。

次に図 6 に PAG におけるドーパミンとセロトニンの経時的な変化を示す。セロトニンは暗時間帯において律動的な変化を示し、暗時間帯における何らかの活動の変化との関連を示唆するものと考えられた。測定数時間後からセロトニンがほとんど検出されなくなっているが、これはプローブに何らかのトラブルが発生した影響によるものと考えられた。一方ドーパミンは経過を通じてほとんど検出されなかった。

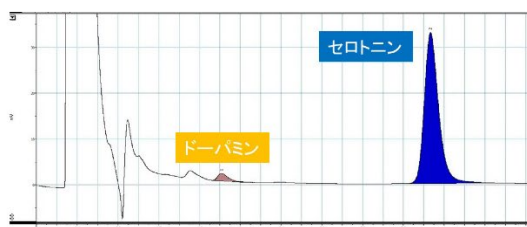


図 3 PFC におけるクロマトグラム

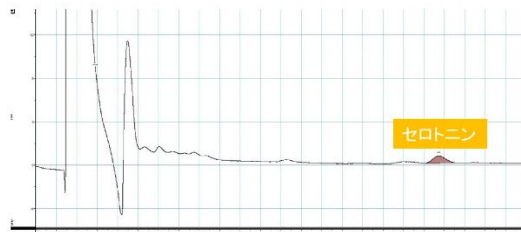


図 4 PAG におけるクロマトグラム

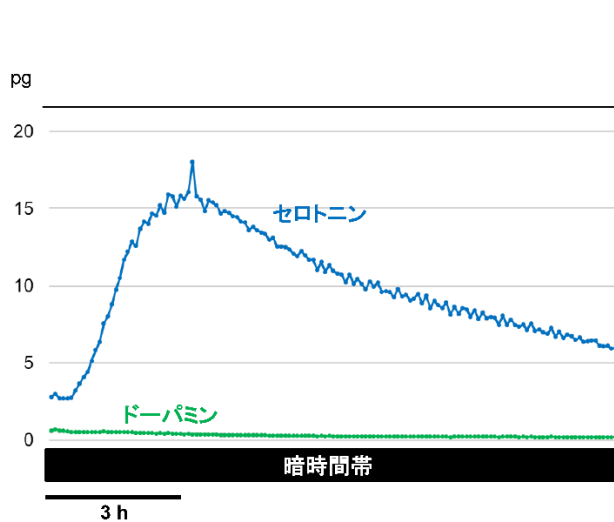


図 5 PFC のドーパミン、セロトニンの変化

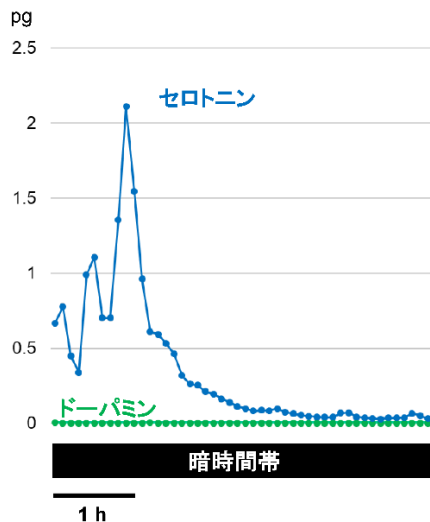


図 6 PAG のドーパミン、セロトニンの変化

(4) 排尿活動と PAG におけるセロトニンの動態

図 7 に PAG におけるセロトニンの経時的な変化と排尿の関係を示す。ドーパミンは経過を通じて検出されなかったためグラフには提示していない。セロトニンは律動的に変化し、排尿行動と同期するような変化が観察され、排尿活動と何らかの関係があることが示唆された。しかし、排尿と同期しないセロトニンの変化も認めており排尿との関連を明らかにするにはさらなるデータの蓄積が必要である。また、PAG は排尿のみでなく、情動行動や疼痛制御など様々な機能に関連する部位であることから、排尿以外の行動変化がないかをモニターすることが重要と考えられる。今回は、実験システムの確立と安定したデータを得るまでに時間を要し、十分な例数での評価を行うことができず、PAG 以外の排尿に関連する重要な部位である PFC での排尿行動とマイクロダイリシス法の実験まで進めることができなかった。しかし、これまで、シストメトリー

一で誘発される排尿反射とマイクロダイリシス法での脳内のモノアミンの変化との関連を検討した報告はあるが^{3,4}、自由行動下での排尿活動とマイクロダイリシス法でのモノアミンの変化を長時間にわたって検討を行った報告はなく、これまでにない新しい実験系を確立できたことの意義は大きい。今後、PAGのみでなく、PFCや前部帯状回でのデータを蓄積することで、排尿活動におけるセロトニンとドーパミンの関与を詳細に明らかにしていきたい。また、今回はセロトニンとドーパミンのみの検討であったが、分析カラムを換えることで、アセチルコリンやノルエピネフリンの測定も可能であり、より多くの神経伝達物質との関連を明らかにする研究への発展も期待できる。また長時間の観察が可能であることから、暗時間帯と明時間帯での排尿パターンの変化への脳内の神経伝達物質の関与も明らかにできるかもしれない。今回、脳梗塞後の過活動膀胱モデルを確立することはできなかったが、今後パーキンソン病の病態モデルなどを用いた検討を行うことで、神経因性膀胱の病態の解明や新たな治療薬の開発につながる知見が得られることが期待される。

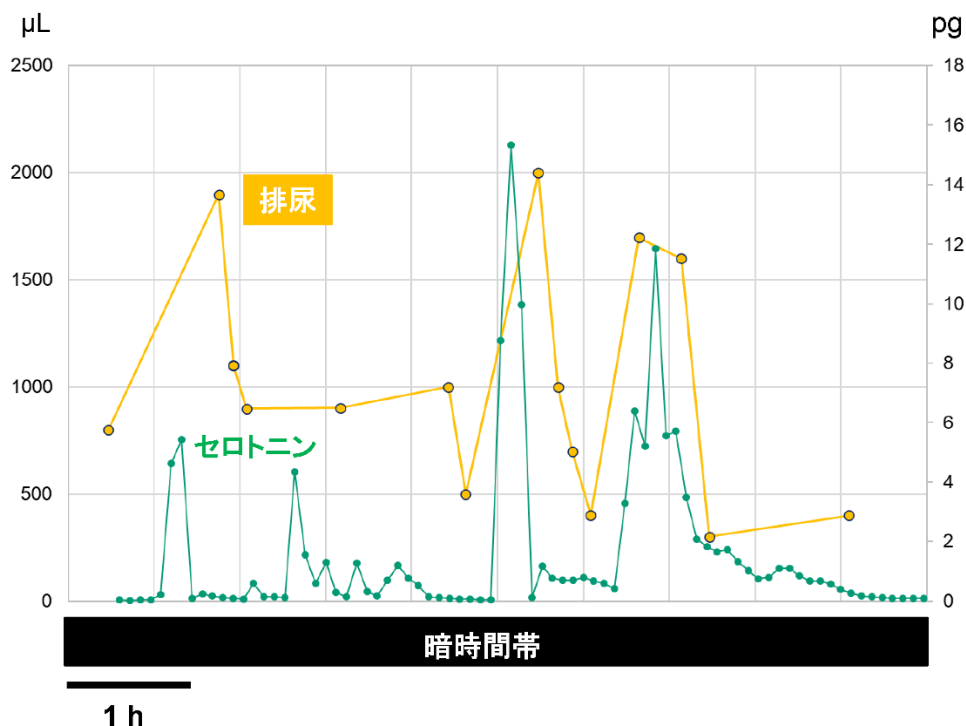


図 7 PAG におけるセロトニンの経時的変化と排尿の関係

引用文献

- 1 Tai C, Wang, J, et al. Brain switch for reflex micturition control detected by FMRI in rats. *J Neurophysiol.* 2009; 102: 2719-2730.
- 2 Ota Y, Kubota Y, et al. Change in the central control of the bladder function of rats with focal cerebral infarction induced by photochemically-induced thrombosis. *PLoS One.* 2021; 16: e0255200.
- 3 Kitta T, Matsumoto M, et al. GABAergic mechanism mediated via D receptors in the rat periaqueductal gray participates in the micturition reflex: an in vivo microdialysis study. *Eur J Neurosci.* 2008; 27: 3216-3225.
- 4 Chiba H, Mitsui T, et al. The role of serotonergic mechanism in the rat prefrontal cortex for controlling the micturition reflex: An in vivo microdialysis study. *Neurourol Urodyn.* 2016; 35: 902-907.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 輝
2. 発表標題 リハビリテーション医療における排尿障害
3. 学会等名 第7回日本リハビリテーション医学会秋期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	大渡 昭彦 (Ohwatashi Akihiko) (30295282)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	下堂 園 恵 (Shimodozono Megumi) (30325782)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	原田 雄大 (Harada Katsuhiko) (30755228)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------