

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500449

研究課題名（和文） 神経因性膀胱における温度受容体の機能に関する研究

研究課題名（英文） Function of thermosensitive receptor in neurogenic bladder

研究代表者

吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40347109

研究成果の概要：脊髄損傷ラットと正常ラットを用い、寒冷受容体 TRPM8 の作動薬のメントール、熱受容体 TRPV1 の作動薬のカプサイシンと類似構造を持つラズベリーケトンと 42℃の温熱が排尿機能へ与える影響を調べ、メントールが膀胱平滑筋の弛緩作用を持ち、メントールの膀胱内注入が脊髄損傷ラットの膀胱容量を増加させること、ラズベリーケトンと 42℃の温熱が膀胱平滑筋の弛緩作用を持つことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：リハビリテーション医学

科研費の分科・細目：人間医工学 リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：温度受容体 ラット 脊髄損傷 メントール 温熱 神経因性膀胱

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や脳卒中後の神経因性膀胱による尿失禁は、患者のみでなく介護者の 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大変重要な問題である。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。

最近の研究により、脊髄損傷後には脊髄レ

ベルで排尿の神経経路の再構築が起こること、また脊髄損傷後には膀胱収縮に関わるアセチルコリン受容体サブタイプに変化が生じることが報告され、病態下では正常と異なる排尿制御機構が働いていることが明らかにされている。したがって神経因性膀胱に対する、より効果的な治療法の発展のためには、病態下での排尿制御機構について明らかにし、薬物の効果を、病態モデルを用いて明らかにしていくことが極めて重要な意味を持っている。

ところで、外界の温度受容がどのような機序で行なわれるのかはこれまでほとんど明らかでなかったが、近年、温度受容が感覚神

経に発現している TRP チャンネルと呼ばれるイオンチャンネルにより行なわれていることが報告され、これまでに活性化温度閾値の異なる 6 つの TRP チャンネルの存在が明らかにされている。

一方、膀胱機能と温度との密接な関連を示唆する知見は以前からある。その代表例が脊髄損傷後に膀胱内に冷水を注入しそれが排尿反射により排出されるかで排尿反射の回復の指標とする氷水テストである。それ以外にも寒冷環境下では頻尿になるといったことも日常の中で経験されることである。しかしそのような膀胱機能と温度との関連の機序についてはほとんど解明されていない。

また近年、脊髄損傷患者の排尿筋過活動に対して、膀胱からの求心性知覚神経である C 線維を脱感作させるカプサイシンの膀胱内注入が排尿筋過活動を抑制する効果を持つことが報告され臨床応用されているが、このカプサイシンの受容体こそが TRP チャンネルのひとつである TRPV1 であり、膀胱における温度感受性 TRP チャンネルの機能の解明は神経因性膀胱の新たな治療の道を拓く可能性を持っている。

本研究は、脊髄損傷後の神経因性膀胱における温度受容体—温度感受性 TRP チャンネルの機能を明らかにし、神経因性膀胱の新たな治療法の開発に結び付けようとするものである。

2. 研究の目的

本研究は、正常ラットと脊髄損傷ラットを用い、膀胱における温度感受性 TRP チャンネルの機能を調べることで、脊髄損傷後の神経因性膀胱の病態への温度感受性 TRP チャンネルの関与を明らかにすることを目的とする。具体的には今回以下の内容について検討を行う。

(1) 脊髄損傷ラットでシストメトリーを行い、寒冷受容体 TRPM8 の作動薬であるメントールの膀胱内注入による排尿機能の変化を検討するとともに、摘出排尿筋の収縮反応に対するメントールの影響を検討する。

(2) 熱受容体 TRPV1 の作動薬であるカプサイシンと類似した構造を持ち、ラズベリーの代表的な香り成分であるラズベリーケトンの摘出排尿筋収縮への影響を検討する。

(3) 42°C の温熱が摘出排尿筋の収縮反応へ及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

実験には、Sprague-Dawley 系雌ラットを用いた。

(1) 脊髄損傷の作製

イソフルラン吸入麻酔下に第 9 胸髄の椎弓切除を行い、脊髄を露出し、メスで脊髄を切離。切離断端間にスポンゼを充填した後、筋肉及び皮膚を縫合した。術後は 1 日 3~4 回の用手圧迫排尿で尿路管理を行い、脊髄損傷作製後 4~6 週目に実験を行なった。

(2) シストメトリー

イソフルラン吸入麻酔下で下腹部を正中切開し膀胱を露出。膀胱頂部に小切開を加え、ポリエチレンカテーテル(クレイアダムス PE-50)を挿入固定し、カテーテルは皮下トンネルを通して背部から導出。麻酔から覚醒したところで、ラットをボールマニケージに收容し、膀胱カテーテルを圧トランスデューサ (P23XL-1; 日本光電) とマイクロシリンジポンプ (IC3100; アイシス) に接続し、37°C に保温した生理食塩水を 12ml/h の速度で膀胱内へ注入し、排尿反射を誘発させ、日本光電社製 LEG1000 を用い膀胱内圧を測定した。また経尿道的に排出される尿を回収し排尿量を求め、さらに残尿量を測定し、排尿量と残尿量を加算することで膀胱容量を求めた。そして、反応が安定したところで膀胱内へ 1mM、3mM のメントールの注入を行い、諸パラメータの変化を調べた。

(3) 収縮反応の測定

深麻酔下に断頭後、膀胱を摘出し、10×2mm の排尿筋切片を作製。切片を 37°C に保温し 95%O₂+5%CO₂ で通気した Krebs-Ringer 液で満たした organ bath 内に懸垂し、アイソメトリックトランスデューサ (TB-651T ; 日本光電) に接続し、1g の静止張力をかけた状態で平衡化させた後、以下の実験を行ない、日本光電社製 LEG1000 を用い、等尺性張力の変化を調べた。なお①は脊髄損傷ラットからの摘出膀胱を②、③は正常ラットからの摘出膀胱を用いた。

① メントールの作用の検討

カルバコール 10⁻⁵M による収縮反応に対する 0.1~1mM メントールでの 10 分間の前処置による影響を調べた。

② ラズベリーケトンの作用の検討

40mM KCl 収縮に対するラズベリーケトンの累積投与の影響を調べ、さらに adenylyl cyclase inhibitor, SQ22536 3×10⁻⁴M、BK_{Ca} channel inhibitor, charybdotoxin 10⁻⁷M、TRPV1 antagonist, BCTC 10⁻⁶M での前処置によるラズベリーケトンの作用への影響を調べた。またカルバコール 10⁻⁵M による収縮反応に対する 0.3~3mM ラズベリーケトンでの 10 分間の前処置による影響を調べ、さらに

Ca²⁺-Free Krebs (EGTA 10⁻⁵M+Nifedipine 10⁻⁸M 含有) 溶液中でのカルバコールによる収縮反応に対するラズベリーケトンの作用を調べた。

③ 42°Cの温熱の影響の検討

Krebs-Ringer 液の温度を 37°Cから 42°Cに変化させたときの 40mM KCl 収縮とカルバコール 10⁻⁵M による収縮反応の変化を調べ、さらに EGTA 10⁻⁵M 含有の Ca²⁺-Free Krebs 溶液中でのカルバコールによる収縮反応に対する 42°Cの温熱の影響を調べた。

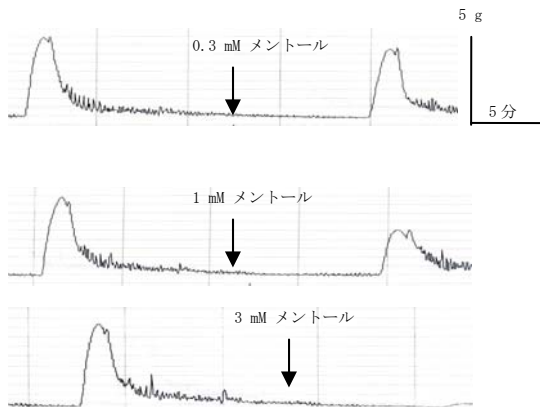
4. 研究成果

(1) 脊髄損傷ラットの排尿機能に対するメントールの影響

① 摘出排尿筋収縮へのメントールの作用

0.1 mM, 0.3 mM, 1 mM のメントールはカルバコールによる収縮反応をそれぞれ 11%、37%、97% 抑制した。(図 1)

図 1. メントールのカルバコール 10⁻⁵M による収縮反応への影響



② メントールの膀胱内注入によるシストメトリーの諸パラメータの変化

1 mM、3 mM のメントールの膀胱内注入により、排尿量の減少、残尿量の増加、膀胱容量の増加を認めた。排尿時膀胱内圧には変化を認めなかった。(表 1、図 2)

また、3 mM のメントールの膀胱内注入を行った 7 例中 4 例で排尿反射の前に無抑制収縮の出現を認め、無抑制収縮の出現する膀胱容量はメントール注入前は 0.65±0.14ml、3 mM メントール注入中は 0.97±0.19ml でメントール注入中は有意に増加していた。

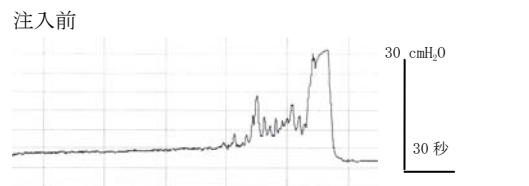
今回の実験において、メントールは膀胱平滑筋の弛緩作用を示し、メントールの膀胱内注入により、膀胱容量の増加と無抑制収縮出現までの容量の増加を認めた。この結果は膀胱内に注入されたメントールが膀胱平滑筋層に達し、膀胱平滑筋を弛緩させたことによ

表 1. メントールの膀胱内注入によるシストメトリーの諸パラメータの変化

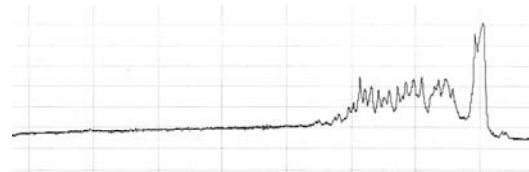
	M.P.	M.V.	R.V.	B.C.
1mM メントール (n=5)				
注入前	40.8±4.2	0.53±0.08	0.49±0.1	1.02±0.12
注入中	45.1±2.4	0.28±0.06*	1.04±0.17*	1.33±0.15*
3mM メントール (n=7)				
注入前	46.8±2.9	0.48±0.04	0.39±0.1	0.87±0.07
注入中	48.3±2.5	0.37±0.05*	0.87±0.12*	1.22±0.08*

M.P. 排尿時膀胱内圧 (cmH₂O) M.V. 排尿量 (ml) R.V. 残尿量 (ml)
B.C. 膀胱容量 (ml) * P<0.05

図 2. 3mM メントールの膀胱内注入時の膀胱内圧の変化



3 mM メントール膀胱内注入中



るものと考えられる。

我々は以前、正常ラットにおいても同様の検討を行っているが、正常ラットでは、メントールは摘出膀胱平滑筋に対しては同様の弛緩作用を示すものの、3 mM メントールの膀胱内注入では、尿路上皮あるいは知覚神経終末の TRPM8 の活性化を介して排尿反射が促進され膀胱容量が減少する、という脊髄損傷ラットとは大きく異なる結果を得ている。この正常ラットと脊髄損傷ラットの作用の違いは、脊髄損傷後の尿路上皮の物質の透過性や排尿反射に関わる膀胱からの求心性知覚神経終末の TRPM8 の発現の違いなどによりもたらされているものと思われるが、薬物の効果を病態下で検討することの重要性を示す重要な知見であると思われる。

また、膀胱内へ薬物の注入療法は、間欠自己導尿で尿路管理を行っている多くの脊髄損傷患者にとっては有用な治療手段である。

今回のメントールの膀胱内注入による膀胱容量の増加作用は、間欠導尿を行っている脊髄損傷患者にとって、尿失禁の減少、導尿

回数の減少につながり、患者のQOL向上に寄与する可能性があり、今後、脊髄損傷患者での臨床試験を実施し、臨床応用に向けた研究を進めていく予定である。

(2) 摘出排尿筋収縮へのラズベリーケトンの作用

0.01 mM~3 mM のラズベリーケトンは濃度依存性に 40mM KCl による収縮を抑制した(図 3)。また SQ22536、charybdotoxin、BCTC はいずれもラズベリーケトンによる KCl 収縮の抑制作用に影響を及ぼさなかった。また 0.3 mM、1 mM、3mM のラズベリーケトンはカルバコールによる収縮反応をそれぞれ 4.5%、11.5%、48.3%抑制した(図 4)。また 3 mM のラズベリーケトンは Ca^{2+} -Free Krebs 溶液中でのカルバコール収縮を 86%抑制した。

図 3. ラズベリーケトン $3 \times 10^{-5}M \sim 3 \times 10^{-3}M$ の累積投与による 40 mM KCl による収縮反応へ影響

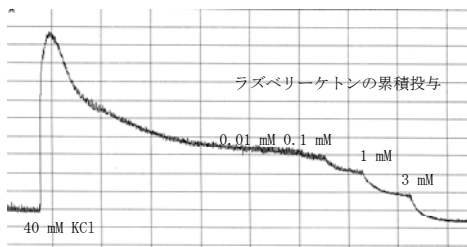
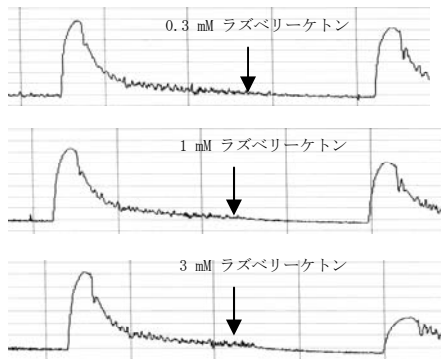


図 4. ラズベリーケトンのカルバコール $10^{-5}M$ による収縮反応への影響



以上のことからラズベリーケトンは KCl による収縮反応に対して弛緩作用を示すが、その作用は cAMP の増加や BK_{Ca} channel の活性化を介するものではないものと考えられた。またラズベリーケトンは TRPV1 の作動薬であるカプサイシンと類似した構造を持つが、TRPV1 の拮抗薬がラズベリーケトンの作用に影響を及ぼさなかったことから、このラズベリーケトンの作用には TRPV1 の活性化は関与していないと考えられた。

さらにラズベリーケトンはカルバコール

による収縮に対しても抑制作用を示し、その抑制作用は Ca^{2+} -Free Krebs 溶液中でも認められたことから、ラズベリーケトンによるカルバコール収縮の抑制には細胞内での Ca^{2+} 動態の抑制が関与しているものと考えられた。

これまで、ラズベリーケトンが平滑筋の収縮反応に及ぼす影響について検討した報告はなく、今回の研究で、ラズベリーケトンが排尿筋収縮に抑制作用を持つという新知見を得ることができた。

今後は、ラズベリーケトンの膀胱内注入による排尿反射への影響や脊髄損傷ラットでの検討をおこなうことで、ラズベリーケトンの膀胱内注入の脊髄損傷後の神経因性膀胱の治療法としての臨床応用の可能性について検討をすすめていく予定である。

(3) $42^{\circ}C$ の温熱が摘出排尿筋の収縮反応へ及ぼす影響

$42^{\circ}C$ の温熱は、1g の静止張力を 9%抑制させるとともに、自発収縮の振幅を 54%減少させた。また、40mM KCl による収縮反応に対しては 18%の抑制作用を示した。さらにカルバコール $10^{-5}M$ による収縮反応を 30%抑制し、細胞外 Ca^{2+} -Free の条件下でのカルバコール収縮に対して 67%の抑制作用を示した。

以上のことから、 $42^{\circ}C$ の温熱はラット摘出排尿筋の KCl 及びカルバコールによる収縮反応に対して著明な抑制作用を持つことが明らかになった。またカルバコールによる収縮反応に対する抑制効果は、細胞外 Ca^{2+} -Free の条件下でも認められたことから、温熱による carbaccol 収縮の抑制には細胞内での Ca^{2+} 動態の抑制が関与しているものと考えられた。

これまで、寒冷刺激が排尿機能に及ぼす影響については、脊髄損傷後の氷水テスト、寒冷刺激による摘出排尿筋の収縮作用、寒冷ストレスによる膀胱過活動の誘発作用などが報告されているが、温熱が排尿機能に及ぼす影響について検討した報告は非常に少なく、本研究で得られた温熱による排尿筋弛緩作用についての報告はこれまでに例をみないものである。

今後は温水の膀胱内注入や体表面からの温熱の適用によるシストメリーの諸パラメータの変化を正常ラットと脊髄損傷ラットで検討していく予定である。もし、温熱による膀胱容量の増加などの効果が確認できれば、脊髄損傷後の神経因性膀胱の治療に温熱が利用できる可能性がある。

また、温熱は薬物治療と比較して体表面から持続的に適用できる、副作用の可能性が少ないといったメリットがあることから、脊髄損傷患者の排尿機能への温熱の影響についての臨床研究も動物実験と並行して実施し

ていきたい。そして、温熱治療を神経因性膀胱の新しい治療法として確立していけたらと考えている。

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2件)

1. Nomoto Y, Yoshida A, Ikeda S, Kamikawa Y, Harada K, Ohwatashi A, Kawahira K
Effect of menthol on detrusor smooth muscle contraction and the micturition reflex in rats.

Urology 72: 701-705 (2008) 査読有

2. Horinouchi K, Ikeda S, Harada K, Ohwatashi A, Kamikawa Y, Yoshida A, Nomoto Y, Kawahira K

Functional recovery and expression of GDNF seen in photochemically induced cerebral infarction.

International Journal of Neuroscience

117: 315-326 (2007) 査読有

[学会発表] (計2件)

1. 下園由理香、吉田 輝、池田 聡、上川百合恵、原田雄大、根路銘周子、大渡昭彦、川平和美

ラット排尿筋収縮に対するラズベリーケトン
の作用

第15回日本排尿機能学会

平成20年9月12日 東京都

2. Yoshida A, Nomoto Y, Ikeda S, Kamikawa Y, Harada K, Ohwatashi A, Kawahira K

Effects of menthol on micturition in rats with spinal cord injury

4th World Congress of the International Society of Physical and Rehabilitation

Seoul, June 11-14, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40347109

(2) 研究分担者

池田 聡 (IKEDA SATOSHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00343369

大渡 昭彦 (OOWATASHI AKIHIKO)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：30295282

川平 和美 (KAWAHIRA KAZUMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：20117493

上川 百合恵 (KAMIKAWA YURIE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70418854

下園 由理香 (SHIMOZONO YURIKA)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員
研究者番号：80418855