

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007-2008  
 課題番号： 19591830  
 研究課題名 (和文) 中脳水道中心灰白質におけるマイクロダイアリシスを用いた排尿関連神経伝達物質の解析  
 研究課題名 (英文) A neurophysiological study of the rat periaqueductal grey on the micturition reflex  
 研究代表者  
 田中 博 (TANAKA HIROSHI)  
 北海道大学・北海道大学病院・講師  
 研究者番号： 60344470

## 研究成果の概要：

1. 排尿反射調節機構に関わる中脳水道中心灰白質 (PAG) の神経伝達物質の動態を解明するため、無麻酔無拘束ラットを用いて、排尿反射誘発時の PAG の細胞外液中の神経伝達物質の動態を評価する方法を確立した。排尿反射は持続的な生理食塩水の膀胱内注入により誘発し、神経伝達物質に関しては PAG に透析用プローブを挿入し、還流液中のドーパミン、グルタミン酸および GABA の濃度変化を検討した。
2. 排尿反射誘発に伴いラット PAG の細胞外液中ドーパミンおよびグルタミン酸濃度は上昇したが、GABA に関しては逆に低下を示した。次いで D<sub>1</sub> および D<sub>2</sub> 受容体それぞれの作動薬、遮断薬を PAG に投与し、排尿反射の変化と神経伝達物質の変化を検討した。結果、D<sub>1</sub> 受容体遮断薬は排尿反射を亢進し、同時に GABA 濃度の変化を減少から増加へ逆転させた。この時ドーパミンやグルタミン酸変動に対しては影響を及ぼさなかった。D<sub>1</sub> 受容体遮断薬ならびに D<sub>2</sub> 受容体の作動薬、遮断薬はこれらの神経生化学および生理学的パラメータに影響を与えないことが確認された。
3. 今後は、現時点までに解明された正常ラットにおける神経伝達物質の変化から、上位中枢の黒質線条体系のドーパミンの減少に伴う排尿障害の解明のために、病態モデルとして神経毒である 6-OHDA を用いたパーキンソンモデルを用いた検討を予定している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード： 泌尿器科学

## 1. 研究開始当初の背景

蓄尿と排尿の2つの相反する下部尿路の機能を円滑に遂行するためには支配神経による複雑な制御が必須である。基本的な排尿反射は仙髄の副交感神経核とオヌフ核、胸腰髄の交感神経核からなる脊髄中枢と脳幹部橋の排尿中枢からなる脊髄—脳幹—脊髄反射を介して行われるが、さらに上位の中枢がこの基本的な排尿反射を調節している。

中脳水道中心灰白質（periaqueductal grey: PAG）は疼痛の抑制、怖れや不安、性行動の制御、情動行動、心血管系、体温調節などの情報処理に関連し、視床下部、脳幹網様体、縫線核、青班核、脊髄などから入力を受け、これらへの投射路も存在する。排尿に関しても、骨盤神経の刺激により PAG へ興奮性入力が速やかに伝達されることなどが動物実験において証明されている。ヒトにおいても positron emission tomography (PET) や functional MRI などの機能的脳画像検査において蓄尿、排尿時に PAG が賦活化されることが報告されている。これらより PAG は膀胱の知覚情報と他の脳内中枢からの投射を受け排尿反射に関する包括的な調節を行っている可能性がある。

PAG には視床、扁桃核、前頭前野からのグルタミン酸神経が投射されており、ドーパミン、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)、ニューロペプチドなど多くの神経伝達物質の存在が確認されている。PAG の排尿反射調節機構にもこれの神経伝達物質が関連しているものと推測されるが、現在まで詳細な検討はされていない。

黒質—線条体ドーパミン神経の変性により発症するパーキンソン病において排尿筋過活動に伴う尿失禁などの下部尿路機能障害を高率に合併することが知られている。また我々は、パーキンソン病患者の排尿筋過活動に一致して PAG が賦活化されることを PET を用いて明らかにした。したがって PAG に存在するドーパミン作動神経の異常がパーキンソン病をはじめとする中枢性疾患における排尿筋過活動の発生に深く関与していることが推測される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、排尿反射調に伴う PAG の神経伝達物質の動態、特にドーパミン神経による排尿反射の調節機構に注目し、無麻酔無拘束ラットを用いて以下の検討を行った。

- (1) 排尿反射に伴う PAG の神経伝達物質の変動
- (2) ドーパミン作動薬、遮断薬の PAG 内投与による排尿反射と神経伝達物質への影響
- (3) パーキンソン病モデルラットにおける排尿反射の変化と神経伝達物質の変動である。

本研究においては膀胱内圧測定とマイクロダイアリシス法を併用し、排尿反射および PAG の神経伝達物質濃度の変動を同時に評価した。

## 3. 研究の方法

麻酔下（pentobarbital sodium 60mg/kg. i.p.）に定位脳固定装置にラットを固定した。

Paxison and Watson の脳図譜に従い、PAG (0.8mm 外側、bregma から後方 7.8mm、硬膜より深さ 6.8mm) に透析用のガイドカニューレを挿入し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。腹部正中切開にて膀胱を露出しポリエチレンカテーテル (PE-50) を膀胱内に挿入、他端は皮下トンネルを通して頸部から体外へ導出した。これらの実験準備後 4 日目に覚醒下、無拘束状態で以下の実験を行った。

#### (1) マイクロダイアリシス法

微小透析プローブをガイドカニューレを通して PAG に挿入し、人工脳脊髄液を  $2\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流した。人工脳脊髄液内の細胞外液中濃度を測定することで神経伝達物質の濃度を評価した。実験開始後に安定したところで 10 分あるいは 20 分間隔で透析液を採取し、ドーパミン並びにアミノ酸 (グルタミン酸と GABA) 濃度を測定した。ドーパミンは高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) 付き電気化学検出器にて、グルタミン酸および GABA は o-phthaldialdehyde 法による HPLC-蛍光法により測定した。実験終了後にガイドカニューレの先端位置が PAG にあることを確認した個体のデータのみを採用した。

#### (2) 膀胱内圧測定

膀胱へ挿入したカテーテルから生理食塩水を膀胱内へ持続注入し、連続した排尿反射を誘発した。またこの時の膀胱内圧をモニターし、排尿圧 (maximum voiding pressure: MVP) と排尿間隔 (intercontraction interval: ICI) を評価した。排尿反射誘発時以外はカニューレを開放し、膀胱内へ尿が貯留することによる排尿反射の発生を回避した。

#### (3) 実験プロトコールと薬剤投与

膀胱内への生理食塩水注入による排尿反射の誘発を 2 回行い (1<sup>st</sup> infusion 並びに 2<sup>nd</sup>

infusion)、同時に神経伝達物質の濃度測定を行った。ドーパミン作動薬は 2<sup>nd</sup> infusion の前から透析用プローブを介して PAG に灌流した (局所投与)。使用薬剤として D<sub>1</sub> 受容体作動薬 : SFK-38393、D<sub>1</sub> 受容体遮断薬 : SCH-23390、D<sub>2</sub> 受容体作動薬 : quinpirole、D<sub>2</sub> 受容体遮断薬 : remoxipride (全て Sigma) を用いた。

#### (4) 6-OHDA 前処置によるパーキンソンモデルの作成

パーキンソン病モデルラットは麻酔下に 6-OHDA hydrochloride (Sigma)  $8\mu\text{g}$  を片側黒質へ注入し作成した。10 日後に Pole test にて運動障害を確認した個体のみを実験に用いた。また、黒質へ溶媒 (0.1% ascorbic acid) のみを投与した群を偽手術群 (Sham) とした。パーキンソン病モデルラットを用いて、排尿反射の変化と排尿反射に伴う神経伝達物質の変動を検討し、さらに D<sub>1</sub> 受容体作動薬の効果も併せて評価した。実験終了後に脳を摘出し線条体ドーパミン含有量を測定した。

#### (5) 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で示した。神経伝達物質の濃度変動は、排尿反射誘発前の値を基礎値 (baseline 100%) として百分率で示した。薬物投与による変化は 1<sup>st</sup> infusion および 2<sup>nd</sup> infusion 直前の値を 100% とし、それぞれ 60 分間の曲線下面積 (area under the curve: AUC) として評価した。有意差検定は paired T あるいは Dunnet's test を行い、 $p<0.05$  を有意と判定した。

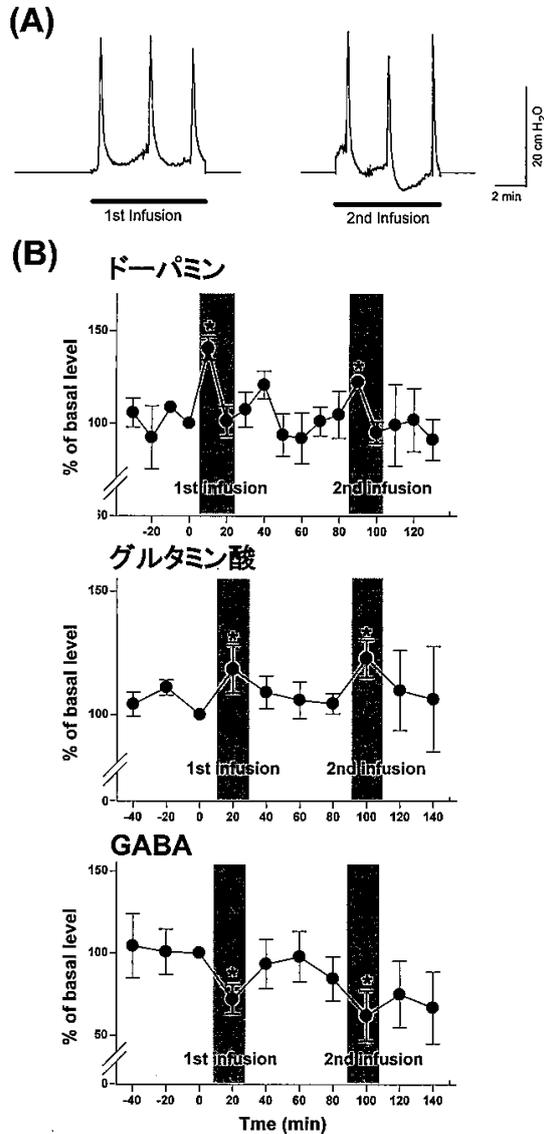
## 4. 研究成果

### (1) 排尿反射に伴う PAG のドーパミン、グルタミン酸、GABA 濃度の変動

生理食塩水の膀胱内注入により排尿反射が誘発された (図 1 A)。PAG のドーパミン

濃度ならびにグルタミン酸濃度は排尿反射に伴い基礎値に比較し有意に増加した。一方、GABA 濃度は排尿反射に伴い有意に減少し、これらの結果に再現性を認めた (n=5) (図 1 B)。

図 1



(2) ドーパミン作動薬、遮断薬の PAG 内投与による排尿反射と神経伝達物質への影響

1<sup>st</sup> infusion と 2<sup>nd</sup> infusion の ICI ならびに MVP を比較し、D<sub>1</sub> 受容体および D<sub>2</sub> 受容体遮断薬、作動薬の排尿反射への影響を検討した (各薬剤 n=6)。D<sub>1</sub> 受容体遮断薬により ICI

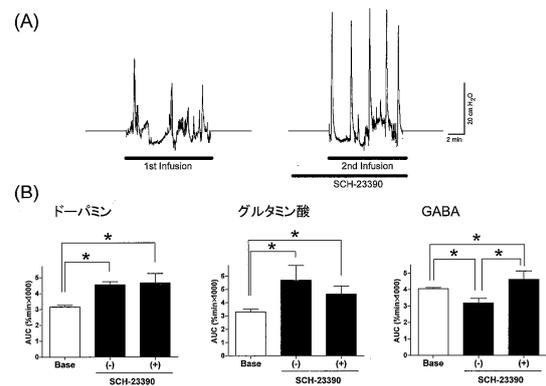
は短縮し、MVP は上昇したが (図 2 A)、他の薬剤においては有意な変化はみられなかった (表 1)。同時に D<sub>1</sub> 受容体遮断薬を投与した際の神経伝達物質の変動を検討した結果、ドーパミンおよびグルタミン酸の排尿反射に伴う濃度変動への影響はみられなかったが、GABA 濃度は排尿反射に伴い増加した (図 2 B)。

表 1

ドーパミン受容体作動薬/遮断薬	N	ICI (min)		MVP (cm H <sub>2</sub> O)	
		1st Infusion	2nd Infusion	1st Infusion	2nd Infusion
SKF-38393 (10 μM)	6	4.7 ± 0.8	4.5 ± 0.5	26.3 ± 2.0	28.1 ± 2.0
SCH-23390 (10 μM)	6	4.8 ± 0.7	3.6 ± 0.6	28.8 ± 3.6	43.1 ± 5.1*
quinpirole (10 μM)	6	3.9 ± 0.9	3.9 ± 1.1	37.8 ± 4.3	38.8 ± 3.1
(100 μM)	3	3.9 ± 0.3	4.0 ± 1.2	35.4 ± 4.0	35.4 ± 3.5
remoxipride (10 μM)	6	4.6 ± 0.6	4.6 ± 0.6	27.7 ± 3.0	25.8 ± 3.6

生理食塩水は流速 0.2 ml/min で膀胱カテーテルを介し 2 回 (1<sup>st</sup> Infusion, 2<sup>nd</sup> Infusion) 20 分間注入。薬物は 2<sup>nd</sup> Infusion の 20 分前から 40 分間、PAG に挿入した透析用プローブを介し局所投与 (灌流)。値は平均値 ± 標準偏差。\*P<0.05 対 1<sup>st</sup> infusion. N は匹数。

図 2

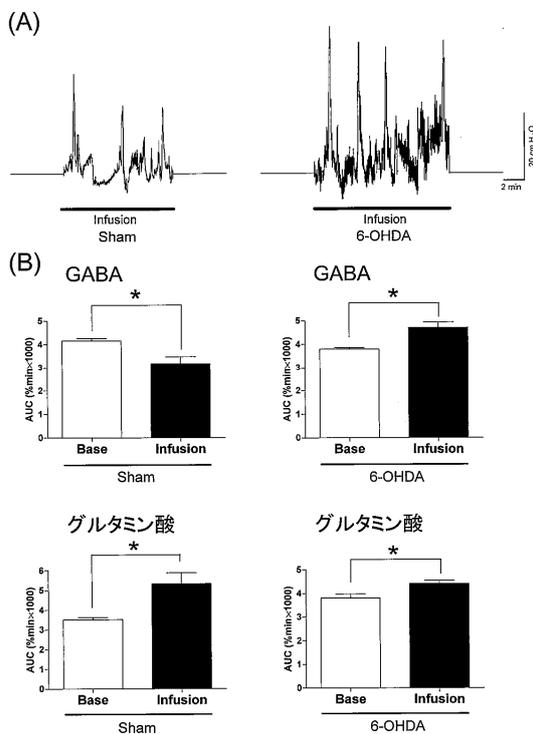


(3) パーキンソン病モデルラットの排尿反射と神経伝達物質の変動

Pole test による行動評価の結果、6-OHDA 前処置ラットは偽手術群と比較し有意な運動機能低下を認めた (ボールの下降時間: 6-OHDA 前処置群 (n=7) 13.9 ± 1.7 秒、偽手術群 (n=11) 8.2 ± 9.0 秒)。また、6-OHDA 前処置群の線条体ドーパミン含有量は有意に減少していた (6-OHDA 前処置群 (n=11) 111.6 ± 57.4 ng/g weight、偽手術群 (n=11) 1604.8 ± 601.7 ng/g weight)。これらの結果から 6-OHDA 前処置によるパーキンソン病

モデルラットの妥当性が証明された。  
**6-OHDA** 前処置ラットの生理食塩水の膀胱内注入により誘発される排尿反射は亢進していた (図 3A)。統計的にも、**6-OHDA** 前処置群は偽手術群と比較し、**ICI** は有意に短縮 (**6-OHDA** 前処置群 (n=7)  $2.5 \pm 0.4$  min、偽手術群 (n=5)  $4.2 \pm 0.3$  min)、**MVP** は有意ではなかったが上昇を認めた (**6-OHDA** 前処置群 (n=7)  $34.6 \pm 2.2$  cmH<sub>2</sub>O、偽手術群 (n=5)  $27.1 \pm 2.3$  cmH<sub>2</sub>O)。

図 3



神経伝達物質の排尿反射に伴う濃度変動はグルタミン酸に関しては偽手術群と変化はなかったが、**GABA** 濃度の変動は **6-OHDA** 前処置群は増加を、偽手術群では減少を示した (図 3B)。**6-OHDA** 前処置ラットの **PAG** へ **D<sub>1</sub>** 受容体作動薬を投与すると亢進していた排尿反射が抑制され (図 3C)、統計的にも **6-OHDA** 前処置群では **ICI** が有意に延長し、**MVP** が有意に低下した。一方、偽手術群では **D<sub>1</sub>** 受容体作動薬による変化を認めなかった (図 3D)。

図 3 (C)

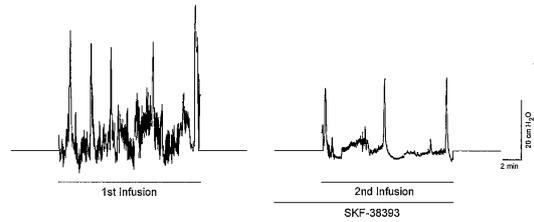
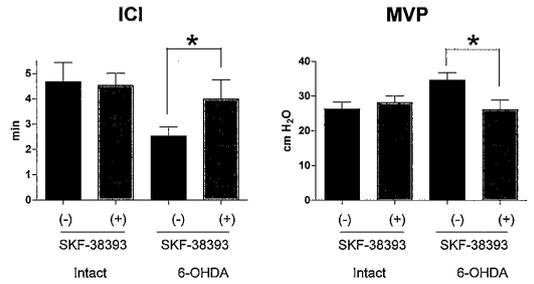


図 3 (D)



以上の結果をまとめると、正常なラットでは排尿反射に伴い **PAG** における細胞外液中のドーパミンおよびグルタミン酸の濃度は増加し、逆に **GABA** 濃度は減少することが判明した。過去の報告において、骨盤神経の電気刺激により **PAG** の神経細胞の興奮が起こること、**PAG** へのグルタミン酸投与により排尿反射が誘発されることから、膀胱の求心性情報はグルタミン酸を伝達物質とする神経により **PAG** へ入力されるか、あるいは **PAG** へ入力するグルタミン酸神経が排尿反射に対し促進性の調節をしていると考えられる。また、**D<sub>1</sub>** 受容体作動薬、**D<sub>2</sub>** 受容体作動薬および遮断薬は排尿反射へ影響しなかったが、**D<sub>1</sub>** 受容体遮断薬の **PAG** 投与により、排尿反射は亢進し、**GABA** 濃度が増加すること、**6-OHDA** 前処置によるパーキンソン病モデルラットにおいても排尿反射は亢進し、**GABA** 濃度は増加すること、パーキンソン病モデルラットでは **D<sub>1</sub>** 受容体作動薬により亢進していた排尿反射が抑制されることなどから、**PAG** へ投射するドーパミン神経は **D<sub>1</sub>** 受容体を介して排尿反射に対して持続的に抑制性調節を行っており、この抑制性調節に **GABA** 神経が何らかの関与をしていること

が推測される。これらの結果からパーキンソン病における排尿筋過活動などの下部尿路機能障害の発生には PAG へ投射するドーパミン D<sub>1</sub> 受容体を介した神経機能の障害が関係しているものと推察される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

橘田 岳也「中脳中心灰白質(PAG)における排尿反射に伴う神経伝達物質調節機構の追求」日本排尿機能学会2007年10月4日福島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 博(TANAKA HIROSHI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：60344470

##### (2) 研究分担者

三井 貴彦(MITSUI TAKAHIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：90421966

橘田 岳也(KITTA TAKEYA)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：40374441

野々村 克也(NONOMURA KATSUYA)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70164720

吉岡 充弘(YOSHIOKA MITSUHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40182729

##### (3) 連携研究者 なし