

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18568

研究課題名(和文) 光化学反応を用いた脳梗塞モデル動物の作成と排尿障害発症機序の解明

研究課題名(英文) Change in the central control of the bladder function of rats with focal cerebral infarction induced by photochemically-induced thrombosis

研究代表者

太田 裕也(Ota, Yuya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・臨床研究医

研究者番号：20814255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光化学反応であるphotothrombosisを応用して、排尿中枢である前帯状皮質と大脳皮質前頭葉に脳梗塞を作成し、排尿障害モデルラットを作成した。脳梗塞1日目と7日目までは排尿間隔の短縮を確認した。14日目と28日目では排尿間隔は短縮していなかった。脳梗塞後1日目から28日目までで脳梗塞周囲の虚血領域において活性化ミクログリアと反応性アストロサイトの増加を認めた。グリア細胞が排尿障害の改善に関与した可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で私たちはphotothrombosisを応用して新たな頻尿モデルを作成した。本モデルは、これまで汎用されてきた中大脳動脈閉塞法と比較して脳梗塞体積が小さく、生命維持に関わる脳幹を脳梗塞としないため致死がない。また、全ての個体で前帯状皮質と大脳皮質前頭葉に脳梗塞を作成でき、再現性が高い。本モデルによる頻尿は7日目まで持続し、14日目以降は改善していた。手技が簡便で致死がないこのモデルは新たな脳梗塞による頻尿モデルとして有用であり、中枢での排尿機能制御の解明に発展できると考える。

研究成果の概要(英文)：We established a new rat model of urinary frequency with focal cerebral infarction induced by photochemically-induced thrombosis (photothrombosis). The prefrontal cortex and the anterior cingulate cortex, which are involved in lower urinary tract control, were targeted for focal cerebral infarction, and urinary parameters were measured by cystometrograms. Cystometric analysis indicated that micturition intervals significantly shortened in photothrombosis-treated rats compared with those in the sham operative group on Days 1 and 7 ($P < 0.01$), but prolonged after 14 days, with no difference between the two groups. Immunopathological evaluation showed an accumulation of activated microglia, followed by an increase in reactive astrocytes at the peri-infarct zone after photothrombotic stroke. This novel model combining nonlethality and high reproducibility may be a suitable model of urinary frequency after focal cerebral infarction.

研究分野：排尿障害

キーワード：頻尿モデル 脳梗塞 photothrombosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞は、頻尿、尿失禁などの下部尿路機能障害を高頻度に呈し、患者の QOL を低下させる。下部尿路機能障害に対しては膀胱の受容体をターゲットにした治療が行われているが、治療効果は十分ではなく、新規治療の開発が急務である。現在、脳梗塞による頻尿モデルとして中大脳動脈閉塞法が汎用されているが、難易度と致死率が高い欠点がある。そこでより簡便で再現性が高く致死のないモデル動物が必要と考えた。

(2) 私たちは、photochemical thrombosis (photothrombosis) という簡便で再現性の高い脳梗塞作成方法に着目した。これを応用して標的とする排尿中枢に脳梗塞を作成することで頻尿モデルが作成できると考えた。蓄尿時の膀胱からの求心性信号は橋、中脳を介して膀胱へ排尿反射として投射される。前帯状皮質と大脳皮質前頭葉は、排尿反射を抑制的にコントロールしており、この部位の脳梗塞は頻尿を呈すると考えた。

2. 研究の目的

Photothrombosis を応用して前帯状皮質と大脳皮質前頭葉に脳梗塞を作成し、新たな頻尿モデルの作成と中枢での排尿機能制御の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン

11 週齢の雌 Wistar-ST ラット 90 匹を用いた。そのうち 10 匹のラットを脳梗塞領域と体積の評価用に割り当て、残りの 40 匹ずつを sham 群と photothrombosis 群に割り付けた。神経学的評価、膀胱内圧測定、脳の免疫組織化学染色を、術前および術後 1, 7, 14, 28 日目に行った (n = 8)。

(2) Photothrombosis

イソフルランを吸入麻酔下に頭皮を切開して頭蓋骨を露出させ、bregma を同定した。直径 8 mm の光源 (MSG6-1100S、モリテックス) を bregma から 1 mm 前方の頭蓋骨上で固定した。ローズベンガル (30 mg/kg, 330000-1G; Sigma-Aldrich) を尾静脈注射した 2 分後に 30 分間頭部を照射した (波長 533 nm; 150 mW, MHA-100W-100V, Moritex)。Sham 手術ラットにはローズベンガルの代わりに生理食塩水を投与した。

(3) 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色

TTC 染色は脳梗塞部位を迅速に評価できる。Photothrombosis の 1 日後に TTC 染色を行い、脳梗塞部位の評価を行った。脳を頭蓋骨から取り出し、-20 で 10 分間保存した。C. Watson と G. Paxinos が考案した定位断面図に従って、PFC と ACC の領域を同定した。脳を正中線から 0.4 mm 側方でそれぞれ 2 mm 厚の矢状断に切断し、4% TTC 溶液内で 37 で 30 分間インキュベートした。各スライスの梗塞面積をデジタルスキャナーと Image J ソフトウェア (バージョン 1.52u; National Institutes of Health) を用いて測定した。

(4) 膀胱内圧測定

吸入麻酔下にラットの腹部を切開し、膀胱を露出させた。ポリエチレン製カテーテルチップ (PE-50; 内径 0.5mm、外径 1.0mm) を膀胱頂部に挿入し、手術用顕微鏡下で巾着縫合 (5-0 絹糸) で密封した。縫合後、膀胱に生理食塩水をリークポイントまで満たし、縫合部でのリークが発生していないことを確認した。カテーテルの他端を頸部まで皮下トンネルし、圧力変換器 (MLT844; ADInstruments) に取り付けられたシリンジポンプ (U-802, Univentor) に接続して生理食塩水を注入できるようにした。腹部皮膚を縫合した後、ラットを拘束ケージに入れ、膀胱内圧測定を行った。麻酔から覚醒した 3 時間後に膀胱に生理食塩水を 0.10 mL/min で 120 分間満たし、収縮間隔 (ICI)、基線圧 (BP)、排尿閾値圧 (TP、排尿直前の膀胱圧)、最大膀胱内圧 (MP) を記録して解析した。

(5) 脳虚血領域の評価

NeuN (1:500; mouse monoclonal) を使用し、成熟神経細胞の分布を評価した。成熟神経細胞が消失した領域が梗塞部と断定できる。Iba1 (1:2000; Rabbit polyclonal) および GFAP (1:2,000; mouse monoclonal) をそれぞれ使用して、虚血領域の活性化ミクログリアおよび反応性アストロサイトを評価した。10%ホルマリンで経心的に灌流した後を除脳してパラフィンに包埋した。すべての脳組織を、正中線から 0.4mm 外側で 4 μm 厚の矢状断面に切開した。免疫蛍光染色では、脳切片組織を抗 Iba1 および抗 GFAP とともに 4 で一晩インキュベートし、ヤギ抗ウサギまたはヤギ抗マウス二次抗体 (1:2000; 中山金橋生物工学) と共に 25 で 1 時間インキュベートした。免疫染色および免疫蛍光分析には、BZ-X800 (キーエンス、大阪、日本) を使用してデジタル画像を取得し、BZ-X800 Analyzer で分析した。

NeuN 染色で示される梗塞部の 300 μm 以内を虚血領域とし、免疫蛍光の定量化には、顕微鏡を用いて 40 倍の対物レンズでラット 1 匹あたり 5 枚の顕微鏡画像を無作為に撮影した。Sham 群および PT 群では術前、前頭葉内をランダムに撮影した。BZ-X800 Analyzer を用いて、Iba1 および GFAP 陽性細胞の数を測定した。

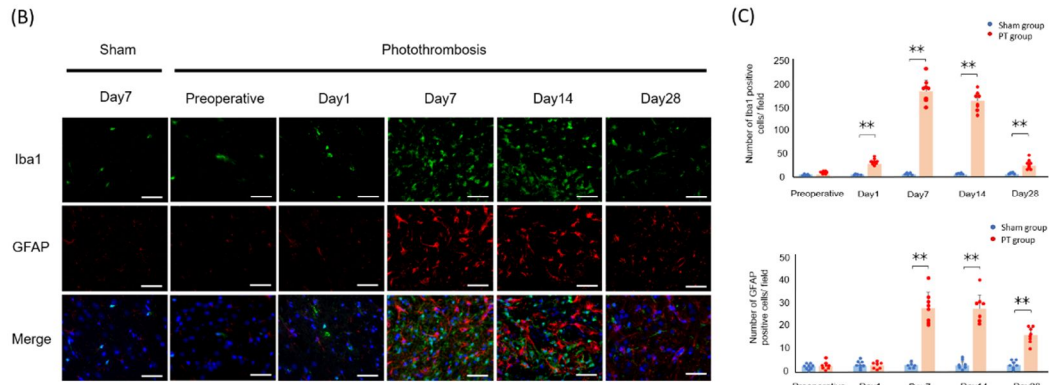
4. 研究成果

(1) 脳梗塞体積

Photothrombosis 後 1 日目の脳矢状断面では、前帯状皮質と大脳皮質前頭葉が脳梗塞病変となっているのが確認された。本研究のすべてのラットは、同様の梗塞部位を有していた。平均梗塞体積は $147.1 \pm 24.1 \text{ mm}^3$ であった。Sham ラットではいずれにも脳梗塞は認められなかった。

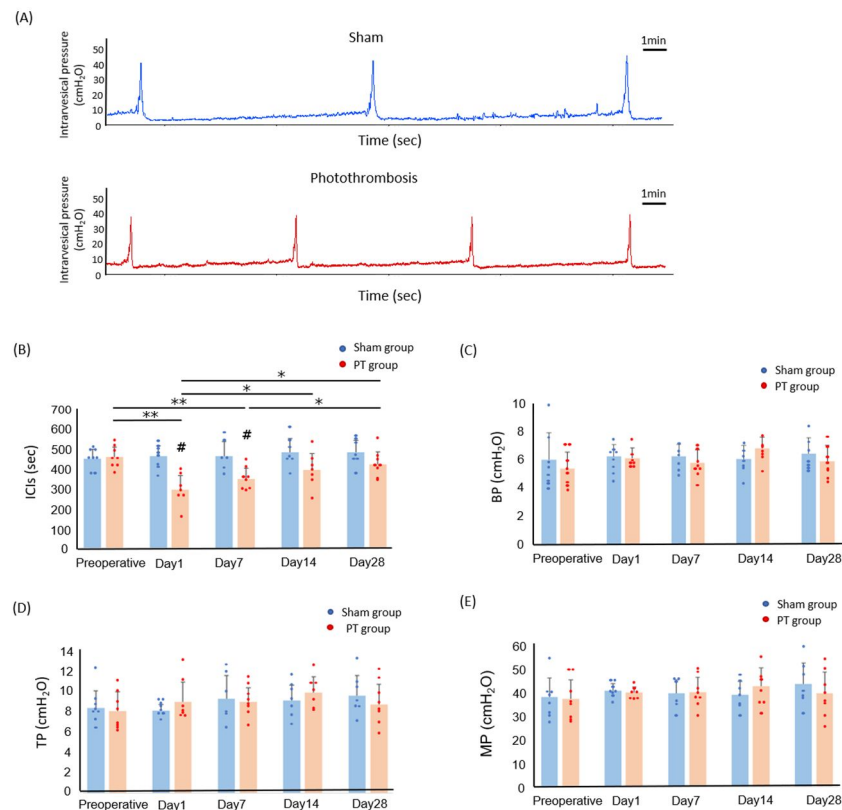
(2) 脳虚血領域の評価

免疫蛍光染色では、脳虚血領域に Iba1 および GFAP 陽性細胞が認められた (Fig.B)。定量では、photothrombosis 群では Iba1 細胞が 1 日目から 28 日目まで、GFAP 細胞が 7 日目から 28 日目まで、sham 群に比べて増加が認められた (Fig.C)。



(3)

各群の代表的な膀胱内圧曲線を図 (A) に示す。膀胱内圧測定の結果、photothrombosis 群の排尿間隔は 1 日目と 7 日目で sham 群より有意に短く ($P < 0.01$)、14 日目以降は 2 群の間に有意差はなかった (B)。基準値圧、閾値圧、最大排尿圧はどのタイミングでも両群間に差はなかった (C-E)。



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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuya Ota, Yasue Kubota, Yuji Hotta, Mami Matsumoto, Nayuka Matsuyama, Taiki Kato, Takashi Hamakawa, Tomoya Kataoka, Kazunori Kimura, Kazunobu Sawamoto, Takahiro Yasui	4. 巻 16
2. 論文標題 Change in the central control of the bladder function of rats with focal cerebral infarction induced by photochemically-induced thrombosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0255200.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田裕也
2. 発表標題 過活動膀胱の基礎研究に向けた光化学反応を用いた脳梗塞モデル動物の作成
3. 学会等名 第27回日本排尿機能学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田裕也
2. 発表標題 過活動膀胱の基礎研究に向けた光化学反応を用いた脳梗塞モデル動物の作成
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田裕也
2. 発表標題 過活動膀胱の基礎研究に向けた光化学反応を用いた脳梗塞モデル動物の作成
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 裕也、窪田 泰江、松山 奈有佳、松本 真実、加藤 大貴、濱川 隆、澤本 和延、安井 孝周
2. 発表標題 光化学反応Photothrombosisを用いた限局性脳梗塞モデルの作成と前帯状皮質による排尿制御機能の解明
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021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

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