

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21500479
 研究課題名（和文）：温度受容体の神経因性膀胱治療への応用に向けた基礎的研究
 研究課題名（英文）：Temperature receptors in treatment of neurogenic bladder
 研究代表者：吉田 輝 (Akira Yoshida)
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：40347109

研究成果の概要（和文）：
 ラットの摘出排尿筋収縮への温熱の影響と排尿反射への温熱とラズベリーケトン膀胱内注入の影響を調べた。温熱は、摘出排尿筋の高濃度 K とカルバコールによる収縮反応を抑制し、静止張力と自発収縮の振幅を低下させた。カルバコール収縮の抑制には細胞内 Ca 動態の抑制が関与していた。また温熱により排尿反射の排尿閾値圧、排尿時膀胱内圧、基礎圧の低下傾向を認め、ラズベリーケトンの膀胱内注入は排尿反射に影響を及ぼさなかった。

研究成果の概要（英文）：
 We investigated the effect of warming on detrusor smooth muscle contraction and the effect of warming and intravesical infusion of raspberry ketone on micturition reflex in rats. Warming inhibited high K and carbachol-induced contractions and reduced resting tension and amplitude of spontaneous contraction. Inhibition of carbachol-induced contraction was due to the inhibition of intracellular calcium mobilization. Warming tended to reduce pressure threshold for inducing micturition, micturition pressure and basal pressure. Intravesical infusion of raspberry ketone had no effect on micturition reflex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

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：温熱 ラズベリーケトン ラット シストメトリー

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頻尿・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。排泄の自立は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。

ところで、外界の温度受容がどのような機序で行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 チャネルと呼ばれるイオンチャネルによって行われていることが報告され、これまでに活性化温度閾値が異なる 6 つの TRP チャネルの存在が明らかにされている。また TRP チャネルは温度刺激のみでなく侵害刺激や機械刺激によっても活性化されることから、痛みの研究の分野で大変注目されている。

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明らかにされているが、このカプサイシンの受容体こそがTRPチャンネルの一つである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への道を拓く可能性を持っている。我々は、これまでに寒冷刺激の受容体であるTRPM8の活性化作用を持つメントールが排尿筋弛緩作用を持つとともに、メントールの膀胱内注入が正常ラットでは排尿反射を促進し膀胱容量を減少させる一方、脊髄損傷ラットでは排尿反射は促進されず排尿筋の弛緩作用により著明な膀胱容量の増加をきたすことを明らかにしてきた。本研究は、これまでの研究を発展させ、膀胱における温度受容体の機能をさらに明らかにし、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、ラットを用い、温度受容体の排尿機能への影響を調べることで、神経因性膀胱の治療への温度受容体の応用の可能性を探ることを目的とする。具体的には、以下の内容について検討を行う。

- (1) 40~42°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。
- (2) 無麻酔除脳ラットを用いたシストメトリーを行い、膀胱内へ温熱を作用させることによる排尿反射への影響を検討する。
- (3) 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膀胱内注入による排尿反射への影響を、覚醒ラットを用いたシストメトリーにより検討する。

3. 研究の方法

すべての実験で、Sprague-Dawley系雌ラットを用いた。

(1) 収縮反応の測定

深麻酔下に断頭後、膀胱を摘出し、10×2 mmの排尿筋切片を作製。切片を36°Cに保温、95% O₂+5% CO₂で通気し、Krebs-Ringer液で満たした10ml-Organ Bath内に懸垂し、

アイソメトリックトランスデューサー

(TB-651; 日本光電)に接続し、1gの静止張力をかけ1時間平衡化させた後、40 mM KClを5分間作用させた。その後、45分間の再平衡化ののち以下の実験をおこない、日本光電社製LEG1000を用いて、等尺性張力の変化を調べた。なお、Organ Bath内の温度はサーミスタ温度プローブ(ITP324-01; 日機装サーモ)でモニターした。

① 40 mM KCl収縮への温熱の影響の検討

40 mM KClを作用させ、その収縮がほぼ定常状態となる26分後から40°Cまたは42°Cの温熱を作用させ、収縮反応への影響を調べた。

② カルバコール収縮への温熱の影響の検討

0.01 mMのカルバコールを25分毎に作用させ、反応が安定したところで40°Cまたは42°Cの温熱を10分前から作用させた時の収縮反応の変化を調べた。さらに、Ca²⁺-Free Krebs-Ringer (EGTA 0.01 mM含有)溶液中でのカルバコール収縮に対する40°Cまたは42°Cの温熱の作用を調べた。

③ 静止張力と自発収縮への温熱の影響の検討

1gの静止張力をかけた状態で42°Cの温熱を作用させた時の静止張力と自発収縮の変化を調べた。

(2) シストメトリー

① 無麻酔除脳ラットを用いた温熱が排尿反射へ及ぼす影響の検討

イソフルラン吸入麻酔下に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(PE-50; クレイアダムス)とサーミスタ温度プローブ(ITP 324-01)を挿入固定し、腹部から導出し、腹部を縫合した。次に頸部に縦切開を加え、両側の総頸動脈を結紮し、さらに気管切開を行い、気管チューブ(PE-240)を挿入固定したのち、頸部を縫合し、ラットを定位脳固定装置に固定した。

次に頭部を縦切開し、頭蓋骨を切除し、大脳を露出。中脳上丘上端レベルで大脳を切離し、除脳を行った。頭蓋腔内の止血の後、綿球とアビテンを頭蓋腔内に充填し、寒天で表面をカバーし、麻酔を停止した。

次に直腸内に温度プローブを挿入し、体温保持装置(BWT-100; バイオリサーチセンター)を用いて直腸温度を36~37°Cに維持した。麻酔停止後2時間後に膀胱カテーテルを圧トランスデューサー(PX23-XL; 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、さらに圧トランスデューサー

とサーミスタ温度プローブを日本光電社製 LEG1000 に接続した後、膀胱内へ 37°C の生理食塩水を 12ml/h の速度で持続注入し排尿反射を誘発させ、膀胱内圧を測定した。そして、反応が安定したところで、膀胱内へ注入する生理食塩水の温度を 41~42°C へ上昇させた際の、排尿時膀胱内圧、排尿閾値圧、基礎圧、排尿間隔の変化を調べた。

② 覚醒ラットを用いたラズベリーケトン膀胱内注入の排尿反射へ及ぼす影響の検討
 イソフルラン吸入麻酔下に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 (PE-50) を挿入固定し、腹部から導出し、腹部を縫合した。次に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ー (PX 23-XL) とマイクロシリンジポンプ (IC3100) に接続し、さらに圧トランスデューサーを日本光電社製 LEG1000 に接続した後、膀胱内へ 37°C の生理食塩水を 12ml/h の速度で持続注入し排尿反射を誘発させ、膀胱内圧を測定した。そして、反応が安定したところで、膀胱内へ 3mM ラズベリーケトン膀胱内注入し、排尿時膀胱内圧、排尿閾値圧、基礎圧、排尿間隔の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 温熱が摘出排尿筋の収縮反応へ及ぼす影響

① 40 mM KCl 収縮への温熱の影響

40°C の温熱は、40 mM KCl による収縮反応を $11.3 \pm 3.7\%$ 抑制、42°C の温熱は、 $15.5 \pm 2.2\%$ 抑制した (図 1)。

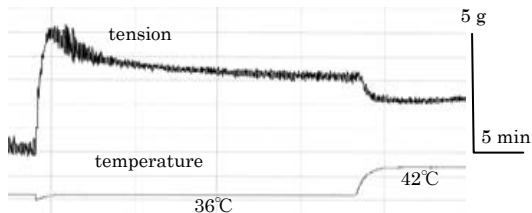


図 1 40 mM KCl 収縮に対する 42°C の温熱の作用の典型例

② カルバコール収縮への温熱の影響

0.01 mM のカルバコールによる収縮反応を、40°C の温熱は $15.6 \pm 2\%$ 抑制、42°C の温熱は $25.6 \pm 2.8\%$ 抑制した (図 2)。さらに Ca^{2+} -Free Krebs-Ringer (EGTA 0.01 mM 含有) 溶液中でのカルバコールによる収縮反応を 40°C の温熱は $46.6 \pm 4.1\%$ 抑制、42°C の温熱は $77 \pm 3.1\%$ 抑制した。

③ 静止張力と自発収縮への温熱の影響

42°C の温熱は、静止張力を $8.6 \pm 2.2\%$ 抑制し、自発収縮の振幅を $53.6 \pm 12.2\%$ 抑制した (図 3)。

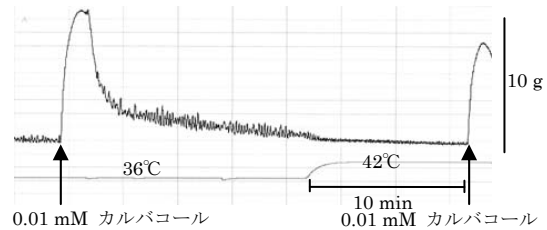


図 2 カルバコール収縮に対する 42°C の温熱の作用の典型例

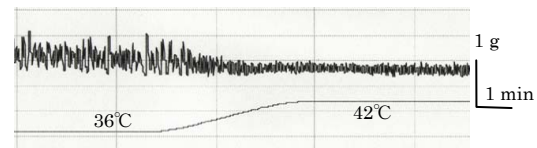


図 3 静止張力と自発収縮に対する 42°C の温熱の影響

以上の結果より、40~42°C の温熱が、KCl 及びカルバコールによる排尿筋の収縮作用を温度依存的に抑制し、その作用には、細胞内の Ca の動態の抑制が関与するものと考えられた。

これまでに、寒冷刺激が摘出排尿筋を収縮させ、それには細胞外からの Ca の流入の促進や Ca-ATPase の抑制などが関与することが報告されているが、温熱の膀胱平滑筋への作用についての報告はなく、今後、温熱による膀胱平滑筋の収縮抑制がどのようなメカニズムで起こるのか、細胞内 Ca の動態に重要な役割を持つ筋小胞体の機能や Rho kinase の活性へ影響を及ぼす可能性があるのかなどについて詳細な検討が必要である。また、今回、温熱が静止張力と自発収縮の抑制作用を持つことが明らかになった。自発収縮は、排尿筋過活動などの病的な状態では増加することが知られ、排尿筋過活動の病態にも関与するものと考えられている。また、自発収縮の発生には尿路上皮が関与するとの報告もあることから、今後、尿路上皮を除去した切片での検討や病態下での摘出排尿筋の自発収縮への影響の検討が必要である。今回明らかとなった温熱の、KCl とカルバコール収縮とともに自発収縮を抑制する作用は、神経因性膀胱でみられる排尿筋過活動の抑制などの治療効果に期待を持たせるものである。そこで、温熱が排尿反射に対してどのような影響を及ぼすかを調べるために次の実験を行った。

(2) 温熱が無麻酔除脳ラットの排尿反射へ及ぼす影響

膀胱内に注入する生理食塩水の温度を 36~37°C から 41~42°C に上昇させると、排尿時膀胱内圧、排尿閾値圧、基礎圧に低下傾向

を認めたが、排尿間隔には変化を認めなかった (表 1)。

	MP	TP	BP	ICI
36~37°C (control)	30.8±5.4	9.2±2.3	2.6±0.1	156.7±32.7
41~42°C	25.7±5.0	6.9±1.6	1.9±0.6	154.4±27.6

MP 排尿時膀胱内圧 (cmH₂O) TP 排尿閾値圧 (cmH₂O)
BP 基礎圧 (cmH₂O) ICI 排尿間隔 (sec)

表 1 温熱によるシストメトリーの諸パラメータの変化

今回の実験から得られた、温熱により排尿時膀胱内圧、排尿閾値圧、基礎圧に低下傾向をきたすという結果は、膀胱内へ適用された 41~42°C の温熱が、排尿筋層まで作用し、排尿筋を弛緩させた可能性が考えられる。一方、排尿間隔には変化をきたさなかったことから、排尿筋収縮力の低下により残尿が増加している可能性、あるいは温熱が尿路上皮や上皮下の知覚終末に発現する温度受容体に作用し排尿反射に促進的に作用している可能性が考えられ、排尿量や残尿量の測定やカップサイシンにより知覚神経の C 線維を脱感作した状態での変化について調べる必要がある。いずれにしても、現時点では、n=4 と例数が少なく統計学的な有意差はついていないことから、さらなるデータの集積が不可欠である。今回、十分なデータの集積ができなかった原因として、無麻酔除脳ラットを用いたシストメトリーの実験系の確立が、予想以上に難航したことがあげられる。

無麻酔除脳ラットを用いたシストメトリーは、麻酔や情動への影響を排除して排尿反射への薬物等の影響を調べるためには、最適な実験系であるが、手術の際の出血のコントロールや術後の痙攣発作の出現などのため、実験の成功率が非常に低かった。現在、実験手技の改良を積み重ねることにより成功率も徐々に上がってきており、今後もこの実験系を用いた実験を継続するとともに、覚醒ラットを用いた検討も並行して行い、正常ラットによる排尿反射に対する温熱の作用を明らかにし、さらに脊髄損傷ラットの排尿反射や排尿筋過活動、排尿筋括約筋協調不全などに対する温熱の影響を調べ、神経因性膀胱の治療への温熱の応用の可能性を探っていきたいと考えている。

(3) ラズベリーケトンが覚醒ラットの排尿反射へ及ぼす影響

膀胱内に 3mM ラズベリーケトンを膀胱内注入した際の排尿反射への影響を調べたが、排尿時膀胱内圧、排尿閾値圧、基礎圧、排尿間隔のいずれにも有意な変化は認めら

れなかった (表 2)。

	MP	TP	BP	ICI
control	37.5±3.4	6.7±1.1	2.3±0.2	224.7±22.6
3 mM ラズベリーケトン	38.6±4.2	7.2±1.3	2.2±0.3	248.6±21.6

MP 排尿時膀胱内圧 (cmH₂O) TP 排尿閾値圧 (cmH₂O)
BP 基礎圧 (cmH₂O) ICI 排尿間隔 (sec)

表 2 3 mM ラズベリーケトンの膀胱内によるシストメトリーの諸パラメータの変化

我々は、以前の実験により 3 mM ラズベリーケトンが、摘出排尿筋の 40 mM KCl 収縮に対しては 79% の抑制、0.01 mM カルバコール収縮に対しては、48.3% の抑制作用を持つことを明らかにしており、もし膀胱内注入したラズベリーケトンが平滑筋層まで作用するならば、排尿時膀胱内圧の低下などの変化をきたすことが予想された。しかし、膀胱内注入されたラズベリーケトンは排尿反射の諸パラメーターへ変化を及ぼさなかった。以上のことから、正常ラットにおいて膀胱内注入されたラズベリーケトンは膀胱平滑筋層までは浸透しないものと考えられた。また、ラズベリーケトンは、熱受容体 TRPV1 の作動薬であるカップサイシンと類似した構造を持ち、カップサイシンの膀胱内注入は、尿路上皮あるいは上皮下の C 線維終末に存在する TRPV1 を活性化し、排尿筋過活動を誘発するが、今回ラズベリーケトンの膀胱内注入では排尿筋過活動は誘発されず、ラズベリーケトンにはカップサイシンのような TRPV1 の強い活性化作用はないものと考えられた。

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 1 件)

① 吉田 輝、排尿障害に関する基礎研究、Japanese Journal of Rehabilitation Medicine、査読無、48 巻、2011、259-262

[学会発表] (計 4 件)

① 吉田 輝、野元佳子、池田 聡、根路銘周子、上川百合恵、原田雄大、川平和美、ラット排尿筋収縮に対する温熱の影響の検討、第 48 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2011 年 11 月 2 日、幕張メッセ (千葉市)

② Akira Yoshida、Yurika Shimozono、Akihiko Ohwatashi、Satoshi Ikeda、Yurie Kamikawa、Kazumi Kawahira、Effect of raspberry ketone on detrusor smooth muscle contraction in rats、Joint Annual Meeting of International Continence

Society & International Urogynecological Association、August 23-27、2010、Toronto、Canada

③ 吉田 輝、排尿障害に関する基礎研究、第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2010 年 5 月 21 日、みなみホール（鹿児島市）

④ 吉田 輝、大渡昭彦、下園由理香、池田聡、上川百合恵、原田雄大、根路銘周子、川平和美、温熱がラット排尿筋収縮へ及ぼす影響の検討、第 16 回日本排尿機能学会、2009 年 9 月 11 日、JAL リゾートシーホークホテル福岡（福岡市）

〔図書〕（計 1 件）

① 井川靖彦、小川隆敏、柿崎秀宏、木元康介、関戸哲利、仙石 淳、田中克幸、田中 博、永松秀樹、浪間孝重、百瀬 均、森田 肇、大濱 眞、木下幸子、幸田 剣、吉田 輝、吉田雅博、松尾清美、リッチヒルメディカル、脊髄損傷における排尿障害の診療ガイドライン、2011、112 ページ

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