

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591808

研究課題名（和文） ラット射精機能評価モデルを用いた合理的な治療薬の探索・創薬研究

研究課題名（英文） Development of the rational pharmacotherapy for ejaculatory disorder using a rat evaluation model

研究代表者

米沢 章彦 (YONEZAWA AKIHIKO)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30167738

研究成果の概要（和文）：本研究は、科学研究費（2007～2009年）の補助を受けて確立した「ラット射精機能評価モデル」を用いた「射精発現の中枢性調節機構の解明とそれに基づく合理的な治療薬の探索・創薬」を課題としている。上記評価モデルを用いた検討から「中枢セロトニン2C受容体およびドパミンD2受容体の同時刺激」が著明な射精促進効果を発現することを明らかにし、射精障害治療における創薬の方向性を決定し得た。更に、「中枢セロトニン2C受容体遮断」による射精遅延効果も明らかにし、障害頻度の高い「早漏」に対する治療薬開発への応用を提示した。

研究成果の概要（英文）：We previously established a rat model for the quantitative evaluation of the ejaculatory function by the support of KAKENHI (19591884). The purpose of this study is the development of the rational pharmacotherapy for ejaculatory disorder by using this model. Obtained results are as follows; 1) Combination of a small dose of the selective dopamine D2 receptor agonists and the selective 5-HT_{2C} receptor agonists potently and selectively facilitates the ejaculatory response through the activation of the central D₂-like and 5-HT_{2C} receptors, respectively. 2) Combination of these receptors agonists acts synergistically to induce ejaculation without affecting micturition reflex and penile erection in rats. 3) Blockade of the central 5-HT_{2C} receptors obviously delays the expression of ejaculation. These results provide useful information as to the pharmacotherapy for patients with ejaculatory disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：アンドロロジー、射精障害、動物評価モデル、創薬、早漏治療薬

1. 研究開始当初の背景

クエン酸シルデナフィルが勃起障害（ED）治療を飛躍的に進歩させ、この障害に苦しむ多くの男性に福音をもたらしたことは周知の通りである。ひとつの薬物創製が治療の進展に大きく寄与した代表的な例である。現在

も国内外で、新規 ED 治療薬の開発ならびに難治性 ED の克服に向けた研究が進行しており、ED の薬物治療は確実に前進している。

一方、本研究課題である「射精障害」については今なお有効な治療方法は確立されておらず、「The 2nd・3rd International Consultation on Sexual Medicine ; 2003年・2009年」にお

いても明確な治療戦略は提示されていない。申請代表者は、「射精障害治療が進展しない最大の理由」が「実験動物、特に小動物を対象とした機能評価法の欠如」にあると考え、平成 19～21 年度に科学研究費の補助を受けて「ラットを用いた簡便かつ確実性の高い射精機能の定量的評価モデル」を確立するに至った。幸いにも現在、この評価モデルは国内外の複数の研究機関において射精機能の解析法として利用されており、評価モデルとしての有用性が示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、科学研究費（平成 19～21 年度）の補助を受けて確立された「ラットを用いた簡便かつ確実性の高い射精機能の定量的評価モデル」を用いて「射精発現の中枢性調節機構の解明とそれに基づく合理的な治療薬の探索・創薬」である。申請代表者は本研究課題に取り組むに際して、性機能領域で近年注目を集めていた神経伝達物質 serotonin (5-HT) ならびに dopamine (DA) (Eur Urol. 48: 408-17: 2005、Neurosci Biobehav Rev. 30: 893-907: 2006) に焦点をあて、それら受容体に対するアゴニストならびにアンタゴニストを用いた幅広いスクリーニングを行い、本研究課題を着想するに至った非常に興味ある知見を得ていた (Pharmacol. Biochem. Behav. 88, 367-374 : 2007、Biomed Res 30, 71-78 : 2009)。一つは、「5-HT 受容体 (5-HT_{2C}) アゴニストと DA 受容体 (D₂) アゴニストの同時併用」が非常に顕著な射精機能促進効果を発現すること、2) 5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストの単独投与が射精遅延効果を発現することである。

そこで本研究では、この二現象に焦点を当て射精の発現機構における中枢 5-HT_{2C} 受容体ならびに D₂ 受容体の役割とその相互作用を解明することにより「合理的な治療薬の探索・創薬」を検討した。

3. 研究の方法

(1) 射精機能の評価

平成 19～21 年度に科学研究費の補助を受けて確立した「ラットを用いた簡便かつ確実性の高い射精機能の定量的評価モデル」を用いた。すなわち、覚醒ラットにおける正確な射精発現の評価を行う場合、性器舐め行動 (genital grooming) による精液の損失が評価の障害になるが、この評価モデルではラット胸部に布製コルセットを装着することでこの行動発現を阻止し、射精機能の定量的評価 (射精発現率と射出精液量の解析) を行った。

(2) 脳室内および脊髄腔内投与

射精発現の中枢性調節機構を解明するため、5-HT 受容体および DA 受容体に選択的な薬物の脳室内および脊髄腔内投与を行った。①脳室内投与は、麻酔下ラットを脳定位固定装置に固定し、頭皮を切開後、頭蓋骨を露出させた。プレグマから尾側に 0.8mm、正中線から外側に 1.5mm の位置にドリルで穴を開け、ステンレス製カニューレを注意深く挿入し、アクリルセメントを用いて頭蓋骨に固定した。薬物は、人工脳脊髄液を用いて溶解し、薬物投与用ガイドカニューレを通して側脳室内に注入した。②脊髄腔内投与は、麻酔下ラットの第 1・第 2 腰椎 (L1-L2) を椎弓切除し、露出した硬膜を注意深く切開し、予め人工脳脊髄液を満たした薬物投与用カテーテルを先端が第 4・第 5 腰椎 (L4-L5) に到達するように挿入し、留置した。薬物は、人工脳脊髄液を用いて溶解し、上記カテーテルを通して脊髄腔内に注入した。なお、①および②とも実験終了時に薬物投与用カニューレおよびカテーテルよりメチレンブルーを注入し、薬物が側脳室内および脊髄腔内に投与されていることを確認した。

(3) 精囊平滑筋に対する作用

各薬物の精囊平滑筋に対する作用を明らかにするため、ラットの摘出標本を用いて検討を行った。麻酔下ラットより両側精囊を摘出し、Tyrode 液に浸した後、注意深く凝固腺を除去した。次に先端から約 5 mm のところを切断し、1 ml 用の注射器を用いて Tyrode 液を注入し、内容物を洗い流した。精囊表面に付着している間膜を取り除いた後、精囊標本は縦方向に 2 分割にし、Tyrode 液を 5 ml で満たした organ bath に 0.35 g の静止張力で懸垂し、60 分間安定させた。Tyrode 液は 32°C に保ち、95% O₂ および 5% CO₂ を通気した。標本の一端は張力による等尺性変化の記録のためポリグラフ (RM-6000, Nihon Kohden, Tokyo) に接続した張力トランスデューサー (TB-612T, Nihon Kohden, Tokyo) に接続した。機械的反応はデジタル変換器 (PowerLab, AD Instruments) にアナログを通してコンピュータに記録した。

(4) 膀胱内圧測定法 (Cystometry; CMG)

各薬物の膀胱機能に対する作用を明らかにするため膀胱内圧測定 (CMG) 法を用いて検討を加えた。麻酔下ラットの膀胱頂部からカテーテル (PE50) を膀胱内へ挿入し、留置した。術後、動物はボールマンケージにて拘束し、麻酔状態から覚醒した後ポンプを用い

て一定のスピードで生理食塩水を膀胱内に灌流した (2.4 ml/h)。膀胱内圧は留置したカテーテルに圧力トランスデューサを接続し、ポリグラフ (AP-601, Nihon Kohden, Tokyo) を介して記録した。機械的反応はデジタル変換器 (PowerLab, AD Instruments) を用いてコンピュータに記録した。

(5) 逆行性射精の評価

薬物による精液の膀胱内への逆流現象を検討した。すなわち、薬物投与による反応を観察した後、吸入麻酔薬でラットを安楽死させ、直ちにラットを背位に固定し、正中切開にて開腹した。膀胱内における精液 (seminal material) の存在を肉眼で確認するとともに、膀胱内より採取した尿中の精子の有無を顕微鏡にて確認し、逆行性射精を評価した。

4. 研究成果

(1) 選択的 5-HT 受容体アゴニストおよび DA 受容体アゴニストの併用による射精機能促進効果について検討した。申請代表者はすでに 5-HT₂ 受容体アゴニストの m-CPP ならびに DA 受容体アゴニストの apomorphine (Apo) の併用投与が射精機能促進効果を発現することを明らかにしていた (*Biomed Res* 30 71-78 : 2009, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 367-374 : 2007)。そこで最初に、両受容体を介した射精機能促進効果の確実性・安定性と射精発現に関与する受容体 subtype を明らかにする目的で、両受容体に選択的なアゴニストを用いた検討を行った。その結果、m-CPP (0.3 mg/kg, i.p.) と「選択的 D₂ 受容体アゴニストである quinelorane の極めて低用量 (0.001 および 0.003 mg/kg, s.c.) の併用」が著明な射精促進効果と射精量の増加作用を引き起こすこと、また D_{2/3} 受容体アゴニストである 7-OH-DPAT (0.01 および 0.03 mg/kg, s.c.) との併用により用量依存的な射精促進効果を発現することを明らかにした。一方、選択的 D₁ 受容体アゴニストである SKF-38393 (0.1 および 1 mg/kg, s.c.) との併用は射精促進効果を発現しなかった。また、選択的 D₄ 受容体アゴニストである PD 168077 (0.03 および 0.3 mg/kg, s.c.) との併用は促進傾向は示したものの、統計学的に有意な射精促進効果は認められなかった。次に、5-HT₂ 受容体 subtype の役割を探る目的で、選択的な 5-HT₂ 受容体アゴニストとの併用による効果を検討した。その結果、Apo (0.1 mg/kg, s.c.) と「選択的 5-HT_{2C} 受容体アゴニストである MK 212 (0.1 および 0.3 mg/kg, i.p.) の併用」により用量依存的かつ著明な射精促進効果と射精量の増加作用が観察された。一方、選択的 5-HT_{2A} 受容体アゴニストである DOI (1

mg/kg, i.p.) ならびに選択的 5-HT_{2B} 受容体アゴニストである BW 723C86 (1 mg/kg, i.p.) との併用では促進効果は認められなかった。

以上の結果より、選択的 5-HT_{2C} 受容体アゴニストと選択的 D₂ 受容体アゴニストの併用が、確実かつ安定した射精機能促進効果を発現することが明らかとなり、「両受容体の同時刺激」に焦点を当てた射精障害治療薬の創薬の方向性を提示した。

(2) 次に、5-HT_{2C} 受容体アゴニストと D₂ 受容体アゴニストの併用による射精機能促進効果の作用点を探る目的で、両受容体アゴニストの脳室内 (i.c.v.) および脊髄腔内 (i.t.) 投与による効果について検討を加えた。その結果、①Apo (1-10 μg/rat) の i.c.v. および i.t. の単独投与は射精促進効果を示さなかったが、全身性投与の m-CPP (0.3 mg/kg, i.p.) と併用すると、Apo (1-10 μg/rat) i.t. 投与は有意な射精促進効果を発現し、また i.c.v. 投与も軽度な促進効果を発現した。一方、② m-CPP (1-10 μg/rat) の i.c.v. および i.t. 単独投与は射精促進効果を示さなかったが、全身性投与の Apo (0.1 mg/kg, s.c.) と併用すると、m-CPP (1-10 μg/rat) i.t. 投与時においてのみ用量依存的かつ著明な射精促進効果が認められた。また、③Apo および m-CPP の全身性投与による併用で得られた著明な射精促進効果は、選択的 5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストである SB 242084 (0.1-1 μg/rat) の i.t. 前処理によって用量依存的かつ有意に減弱した。

以上の結果より、射精機能促進効果における 5-HT 受容体アゴニストの作用は主に脊髄に局在する 5-HT_{2C} 受容体を介して発現する可能性が示唆され、一方、D₂ 受容体アゴニストの作用点に関しては脊髄および脊髄上部に局在する受容体に関与すると考えられ、これら受容体をターゲットにした射精障害治療薬が有効となる可能性を提示した。

(3) 精囊ならびに膀胱機能に対する両受容体アゴニスト併用の影響について検討を加えた。用いた精囊標本では、noradrenaline による濃度依存的な収縮反応を観察した。一方、Apo (1×10^{-7} - 3×10^{-3} M) ならびに m-CPP (1×10^{-7} - 3×10^{-3} M) の単独投与では精囊収縮は全く認められず、著明な射精促進効果を示した Apo と m-CPP の併用投与においても精囊の収縮反応は全く認められなかった。

以上の結果より、Apo と m-CPP 併用投与による著明な射精促進効果は精囊平滑筋に対する両薬物の直接的な作用によるものではないことが示唆された。

次に、膀胱内圧測定法を用いて膀胱機能に対する両受容体アゴニスト併用の影響を検討した。その結果、Apo と m-CPP の併用投与

は溶媒投与群と全く変わらない正常な膀胱内圧曲線を示したことから、Apo と *m*-CPP の併用投与は射精機構に対して特異的な促進作用を発現する可能性を示唆した。

(4) 5-HT_{2C} 受容体アゴニストと D₂ 受容体アゴニストの 5 日間連続併用投与による射精促進効果に及ぼす影響について検討を加えた。その結果、Apo (0.1 mg/kg, s.c.) と *m*-CPP (0.3 mg/kg, i.p.) の併用投与を 5 日間連続しても、射精発現率や射精量に変動は見られず、安定した射精促進効果を発現した。以上の結果より、5-HT_{2C} 受容体アゴニストと D₂ 受容体アゴニストの併用投与による射精促進効果には耐性が発現しないことが明らかとなり、射精障害治療を考える上で極めて重要な特徴と考えられた。

(5) 5-HT_{2C} 受容体アゴニストおよび D₂ 受容体アゴニスト併用投与の射精障害治療への応用を想定し、高齢ラット (90 週齢) の射精機能低下に対する改善効果を検討した。ラットにおける自発的な射精の発現率は加齢とともに減少し、高齢ラット (90 週齢) の発現率は 20% 程度 (若齢ラットではほぼ 100% である) となる。この高齢ラットに Apo (0.1 mg/kg, s.c.) と *m*-CPP (0.3 mg/kg, i.p.) の併用投与を行うとほぼ全例のラットに射精を発現し、若齢 (10 週齢) ラットと差のない程度の射精量が得られた。現在、糖尿病ラットの射精機能低下に対する効果を検討中である。

(6) 申請代表者は、科学研究費の交付を受けた平成 19~21 年度に「ラットを用いた簡便かつ確実性の高い射精機能の定量的評価モデル」を確立するとともに、この評価モデルを用いた 5-HT 関連化合物の幅広いスクリーニングを行った。その中で、「5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストの射精遅延効果」という興味ある知見を見いだしていた。射精障害で最も発現頻度の高いのが「早漏」であるが、現在「早漏」治療に応用されている選択的 5-HT 再取り込み阻害薬 (SSRI) は、薬物間による効果の著しい違いや「うつ病」ではない男性への使用に関する問題点が指摘されている。そこで、「早漏」治療薬の創薬の方向性を決定することを目的に、我々が見いだした 5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストの「射精遅延効果」の特徴ならびに作用機構を明らかにし、「早漏」治療薬の創薬の方向性を導く検討を行った。その結果、選択的 5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストの SB242084 (0.1 および 0.3mg/kg, i.p.) 投与により射精発現は用量依存的に遅延したが、0.1mg/kg 投与群では投与 4 時間後に、また 0.3mg/kg 投与群では投与 6 時間後には対照群と差のない程度までに射精発現率は回復した。また、SB242084

0.3mg/kg 投与群における逆行性射精の有無を検討したが、溶媒投与群と同様に、SB242084 投与群では全例で逆行性射精は観察されず、精液の膀胱内への逆流による二次的な遅延効果の可能性は否定された。次に、5-HT_{2C} 受容体アンタゴニストの射精遅延効果の中枢性機序を探る目的で、SB242084 の脳室内 (i.c.v.) および脊髄腔内 (i.t.) 投与の効果を検討した。その結果、SB242084 の i.c.v. (10 μg/rat) 投与は射精遅延傾向を示したが統計学的に有意な効果ではなかった。一方、i.t. (3-30 μg/rat) 投与では用量依存的かつ有意な射精遅延効果が観察された。以上の結果より、中枢神経系、特に脊髄の 5-HT_{2C} 受容体をターゲットとした早漏治療薬の開発の方向性を決定し得た。

(7) 申請時に、「中枢 5-HT_{2C} 受容体と D₂ 受容体の選択的ノックダウンラットを用いた解析」を課題に加えていたが、実験開始直後に発生した「東日本大震災」の影響により、実験継続を中止せざるを得なかった。今後、改めて検討する予定である。

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 米澤章彦、渡辺千寿子、溝口広一、河谷正仁、木村行雄、櫻田 忍、ラット射精機能評価モデルを用いた副作用解析と治療薬探索、自律神経、査読有、49 巻、2012、74-76
- ② Masaru Yoshizumi, Kazumasa Miyai, Akihiko Yonezawa, Masahito Kawatani. Role of supraspinal and spinal α1-adrenergic receptor subtypes in micturition reflex in conscious rat. *American Journal of Physiology*, 査読有、299(4)、2010、F785-F791

[学会発表] (計 6 件)

- ① 萬谷優、米澤章彦、善積克、渡辺千寿子、溝口広一、木村行雄、河谷正仁、櫻田忍、ラットの spontaneous seminal emission 発現における脊髄 5-HT₂ 受容体サブタイプの役割、日本性機能学会第 21 回学術総会、名古屋、2010 年 8 月
- ② 伊勢慎之介、米澤章彦、渡辺千寿子、溝口広一、渥美久義、木村行雄、河谷正仁、櫻田忍、ラットにおける spontaneous seminal emission とその射精機能評価への応用 - α1 アドレナリン受容体遮断薬の射精障害解析-、第 14 回活性アミンに関するワークショップ、仙台、2010 年 8 月
- ③ Yu Banya, Akihiko Yonezawa, Masaru Yoshizumi, Chizuko Watanabe, Hirokazu

Mizoguchi, Yukio Kimura, Masahito Kawatani, Shinobu Sakurada, Synergistic action of dopamine D2-like and 5-HT_{2C} receptor agonists on ejaculation, but not penile erection in rats. New Perspectives in Neuroscience : Joint Meeting of Young Italian and Japanese Neuroscientists, Naples (Italy), September 2010

- ④米澤章彦、櫻田 忍、木村行雄、射精の生理学-世界の update-、第 23 回日本性機能学会学術総会、東京、2012 年 9 月
- ⑤善積 克、米澤章彦、古川勝雄、木村行雄、河谷正仁、櫻田忍、基礎研究から考える射精障害の治療戦略、第 23 回日本性機能学会東部総会、仙台、2013 年 3 月
- ⑥Akihiko Yonezawa, Masaru Yoshizumi, Katsuo Furukawa, Yukio Kimura, Masahito Kawatani, Shinobu Sakurada. Co-administration of dopamine D2-like and 5-HT_{2C} receptor agonists enhances the ejaculatory response in rats. 14th BIENNIAL MEETING OF THE ASIA PACIFIC SOCIETY FOR SEXUAL MEDICINE, Kanazawa, Japan, June 2013

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/new/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米澤 章彦 (YONEZAWA AKIHIKO)
東北薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：30167738

(2) 研究協力者

萬谷 優 (BANYA YU)
東北薬科大学・薬学研究科・博士課程前期
研究者番号：なし (大学院生)