

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 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890012

研究課題名（和文）ラット下部尿路閉塞モデルに対する抗血小板剤の膀胱血流
および膀胱機能保護効果研究課題名（英文）The anti platelet agents treatment improves bladder function after
outlet obstruction in rat

研究代表者

松本 成史 (MATSUMOTO SEIJI)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10288912

研究成果の概要（和文）：

下部尿路閉塞（BOO）による膀胱機能障害は、膀胱血流障害が一因である。抗血小板剤である PDE3 阻害剤（PDE3i）が、BOO による膀胱機能障害に有効か検討した。方法は 12 週齢雌 SD ラットに BOO モデルを作成し、PDE3i を low/high dose 群に分けて混餌にて投与した。4 週間後、膀胱を摘出し、膀胱重量を測定後、経壁電気刺激および薬物刺激（Carbachol、KCl）による等尺性張力収縮実験を検討した。結果は、BOO で膀胱重量は有意に増加し、膀胱収縮能は有意に低下した。PDE3i 投与により dose dependent に膀胱収縮能は改善した。PDE3i の抗血小板作用や血管拡張作用が、BOO による膀胱機能低下を抑制、改善することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

[Aim] To investigate whether bladder dysfunction after bladder outlet obstruction (BOO) could be altered by treatment with a phosphodiesterase 3 inhibitor (PDE3i). PDE3i, the antiplatelet agents, has been used to improve perfusion of the heart and brain.

[Materials and methods] In all, 12-week-old female Sprague-Dawley rats were divided into five equal groups; group 1 and 2, sham operated rats (each 3 rats); group 3-5, BOO rats (each 6 rats), and group 1 and 3 rats given vehicle; group 2 and 51, rats given high dose PDE3i; group 4 rats given low dose PDE3i, respectively. PDE3i was given within diet from the day of surgery. At 4-weeks BOO, the bladder was excised and dissected into four longitudinal strips for isometric organ-bath assay. Contractile responses of bladder strips to electrical field stimulation (EFS), carbachol and KCl was determined for each group.

[Results] BOO induced a significant increase in bladder weight in group 3-5 compared with group 1 and 2. Bladder weights of PDE3i groups were not significantly different from vehicle groups. The contractile forces in response to EFS, carbachol and KCl in group 3 were about 20-40% of those in group 1. In BOO groups, the contractile forces in PDE3i treatment dose-dependency increase the BOO-induced reduction of contractile force in the bladder strips.

[Conclusion] PDE3i has a small but significant protective effect on the contractile dysfunction induced by 4-weeks BOO in rats, although the increase in bladder mass was not altered. PDE3i could be a useful protection against contractile dysfunction of the obstructed bladder.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	560,000	168,000	728,000
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：泌尿器科学

科研費の分科・細目：泌尿器科

キーワード：下部尿路閉塞、膀胱機能、抗血小板作用、PDE3 阻害剤、膀胱血流

1. 研究開始当初の背景

前立腺肥大症；Benign prostate hyperplasia (BPH) は中高年男性の非常に一般的な病気で、60 歳以上の男性の罹患率は 50%以上とされている。BPH による前立腺腫大や下部尿路閉塞；bladder outlet obstruction (BOO)にて、さまざまな下部尿路症状；lower urinary tract symptoms (LUTS) が引き起こされることが知られており、最近ではこれらを BPH/LUTS (male LUTS) という包括概念で診断し、さまざまな観点からの治療方法が検討されている[1,2]。

われわれはこれら BPH/LUTS の発生機序として加齢や動脈硬化、BOO 等の変化による膀胱血流低下、引き続き生じる膀胱虚血・再還流障害；Ischemia-Reperfusion (I-R) が膀胱機能を低下させることなどの膀胱機能の変化を、動物実験として BOO モデル、I-R モデル等を用いてその病態の変化や種々の薬物の効果等を報告し[3-16]、下部尿路の血流動態、特に膀胱血流の変化が膀胱機能に多大なる影響を与えることを証明してきた。

近年、BPH/LUTS がメタボリック症候群や勃起不全；Erectile Dysfunction (ED) との病態に強い関連性があることが報告され[17-18]、また ED 治療薬であるホスホジエステラーゼ；Phosphodiesterase (PDE) 5 阻害剤が BPH を有する ED 患者で LUTS を改善するとことが多くの研究[22-25]から証明され、FDA が PDE5 阻害剤を BPH/LUTS 治療剤として認定した。これらの報告と今までのわれわれの結果から推測すると、BPH/LUTS の一因が膀胱血流低下による NO/cGMP pathway の障害であると仮定すれば、PDE5 阻害剤が NO/cGMP pathway を改善、賦活化させることにより、BPH/LUTS を改善する可能性が考えられ、実験的に PDE5 阻害剤が膀胱機能にどのような影響を与えているかをわれわれは報告した[10,26]。また、PDE ファミリーはその酵素活性のバランスによってその濃度を調節し、シグナル伝達に重要な役割を担っていることが知られており、その他の PDE 阻害剤も、BPH/LUTS の膀胱機能障害に寄与する可能性を秘めていると考えられる。特に、BOO モデルや I-R モデル等の膀胱血流の変化に基づく膀胱機能障害においては、PDE 阻害剤 (PDE ファミリー) は膀胱血流を増加させ、膀胱機能障害を保護する可能性があると思

測される。

PDE ファミリーの中でも、特に PDE3 阻害剤は、血小板、心筋、血管平滑筋などに存在し、細胞内 c-GMP または c-AMP レベルを調節し、循環器系の制御に関与しており、心筋症、肺高血圧症および関連する病態の処置に有用であり、血小板凝集抑制作用および脂肪分解亢進作用を有する[27]。これは全身の動脈硬化等の血管病変や血流の変化による影響を改善することを意味すると考え、膀胱血流にも寄与する可能性があると思われる。また膀胱平滑筋に直接関与する可能性も考えられる。実際、BOO モデルを用いた実験で、PDE3 阻害剤の対照比較薬として用いられるアスピリンが膀胱機能に寄与したと言う論文が存在する[27]。この効果は、アスピリンも PDE3 阻害剤も抗血小板作用を有しており、BOO による膀胱血流低下を改善することによって膀胱機能障害を改善している可能性が考えられる。

PDE3 阻害剤 BOO による膀胱機能低下を改善する効果が存在することを証明出来れば、臨床現場において脳梗塞や心筋梗塞等の治療・予防に広く用いられている PDE3 阻害剤が、膀胱機能にも効果があることが示されることになり、その治療効果だけでなく、膀胱機能低下の予防効果にも寄与する可能性が示されることになる。また、PDE3 阻害剤が膀胱機能を改善する能力を持つとすれば、BPH/LUTS に作用する機序として PDE5 阻害剤やその他の薬物と同様、膀胱機能障害に膀胱血流が大きく関与していることの学術的裏づけにもなる。このような観点に立った研究は、現在までに報告されておらず、PDE3 阻害剤をはじめ抗血小板作用を有する薬剤の新しい効能として膀胱機能改善剤としての可能性を追求することとなり得る。

(参考文献)

1. **World J Urol.** 2002;19:436-2.
2. **Eur Urol.** 2001;39 Suppl 3:31-6.
3. **Int. J Urol.** 2012;19:20-5.
4. **J Urol.** 2011;186:2470-7.
5. **LUTS.** 2010;2:71-5.
6. **Phytotherapy Research.** 2010;24:301-3.
7. **Urology.** 2010;75:235-40.
8. **Aktuel Urol.** 2010;41:S46-9.
9. **BJU Int.** 2009;103:1436-9.

10. **BJU Int.** 2009;103:987-90.
11. **Urology.** 2005;66:892-6.
12. **Urology.** 2004;64:608-10.
13. **Adv Exp Med Biol.** 2003;539(Pt A):293-6.
14. **Urology.** 2003;62:1129-33.
15. **Int J Urol.** 10339-45,2003.
16. **J Urol.** 168: 2677-81,2002.
17. **BJU Int.** 2006;97 Suppl 2:34-8.
18. **BJU Int.** 2006;97 Suppl 2:23-8.
19. **Eur Urol.** 200547:838-45.
20. **Eur Urol.** 2003;44:637-49.
21. **Eur Urol.** 2005;47:824-37.
22. **Eur Urol.** 2011;60:809-25.
23. **Neurourol Urodyn.** 2011;30:292-301.
24. **Eur Urol.** 2011;60:1105-13.
25. **Eur Urol.** 2012;61:994-1003.
26. **Int Urol Nephrol.** 2010;42:53-6.
27. Goodman, Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. , 9th Edition, pp.832, McGraw-Hill,1996.
28. **Urology.** 2001;58:608-13.

2. 研究の目的

近年、前立腺肥大症の病態には、BOOによる変化、特に膀胱血流低下や膀胱血流再還流障害などの膀胱血流障害が大きく関与することが分かってきた。前立腺肥大症の動物モデルとされる BOO モデルを使用して、抗血小板作用や血管拡張作用を有し、臨床現場で広く使用されている抗血小板剤である PDE3 阻害剤が、BOO による膀胱機能低下の予防効果にも寄与すれば、本来の治療効果に相加・相乗効果が見出されることになる。これらの病態解明のため、ラットを用いて、BOO による膀胱機能障害に対して PDE3 阻害剤投与により、膀胱機能がどの程度改善するかを検討することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

・使用動物：12 週齢 Sprague-Dawley 雌ラット

・麻酔およびモデルの作成方法：ペントバルビタール (25mg/kg) を腹腔内投与し、開腹下にて下腹部正中切開をおき、膀胱・尿道を露出し、尿道に 19G 針をあてて、2-0 silk にて尿道周囲を結紮し、針を抜去し、閉創するという BOO モデル[7-11]を作成。

・実験方法：BOO 作成後、PDE3 阻害剤として cilostazol (大塚薬品、東京) を low dose (0.003% 飼料)、high dose (0.01% 飼料) に分け (*)、混餌状態で投与した。

①sham : normal diet (sham / normal)、②sham : high dose cilostazol diet (sham / high)、③

BOO : normal diet (BOO / normal)、④BOO : low dose cilostazol diet (BOO / low)、⑤BOO : high dose cilostazol diet (BOO / high) (①・②は各 4 匹、③～⑤は各 6 匹) の 5 群に分けて検討した。

4 週間後にペントバルビタール麻酔下に、体重測定後、膀胱を摘出し、膀胱重量を測定した。その後、等尺性張力収縮実験用に膀胱を小切片に切開・分割し、残りの膀胱を病理組織検討用にホルマリン処理した。

・等尺性張力収縮実験：Tyrodes 液 (124.9 mM. NaCl, 2.5 mM. KCl, 23.8 mM. NaHCO₃, 0.5 mM. MgCl₂-6 H₂O, 0.4 mM. NaH₂PO₄·H₂O, 1.8 mM. CaCl and 5.5 mM. glucose) にて 37°C に維持したマグヌス管内に取り付け、95% O₂ と 5% CO₂ を通し、等尺性張力収縮実験を施行した。発生張力は FD トランスデューサーを用いて検出、Amp を介して直流増幅し記録した。

1) 経壁電気刺激：電場刺激 (Electrical field stimulation: EFS) はマグヌス管内に標本を囲むように 2 本の円状白金電極を設置し、これを介して間接刺激を行った。EFS を行う場合には 0.3msec 持続、最大電圧 30 ボルトの 10mA 矩形波定電流刺激を行い、周波数は 2、8、32Hz でそれぞれ EFS を行い、膀胱小切片の等尺性張力収縮反応を記録した。

2) 薬物刺激：KCl (100 mM)、Carbachol (10 μM) (SIGMA, St.Louis, MO, USA) をマグヌス管内に投与し、膀胱小切片の等尺性張力収縮反応を記録した。

・病理組織学的検討：ホルマリン固定された検体を H.E. 染色し、BOO による変化を各群における膀胱平滑筋の肥厚度等の形態学的に検討した。また、膀胱繊維化の判断のため、Azan 染色も施行し、膀胱線維化の程度も検討した。

これらの結果を、本研究目的である BOO による膀胱機能障害に対する PDE3 阻害剤投与の膀胱機能への影響を総合的に検討した。

*Cilostazol の投与量：ラットの Cilostazol 経口投与では性差があり、同一投与濃度でも雌ラットでは雄ラットの数十倍の血中濃度になるとの報告を参考に、Cilostazol の雄ラットへの通常投与量が多く報告で 0.03%、0.1%、0.3% が用いられて点を考慮して、その 1/10 倍量の dose で設定し、今回は low dose (0.003% 飼料) と high dose (0.01% 飼料) のみの検討とした。

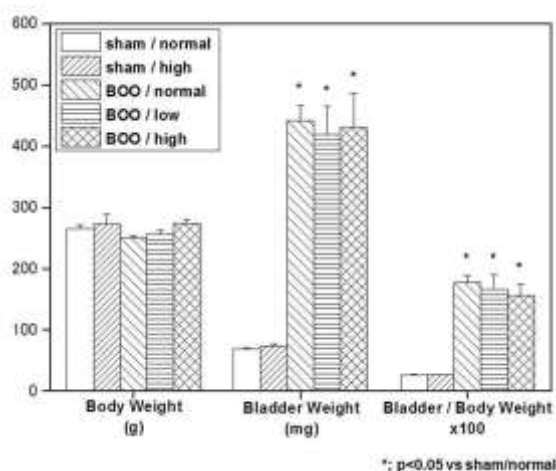
4. 研究成果

PDE3 阻害剤投与による出血傾向等の副作用は認めなかった。

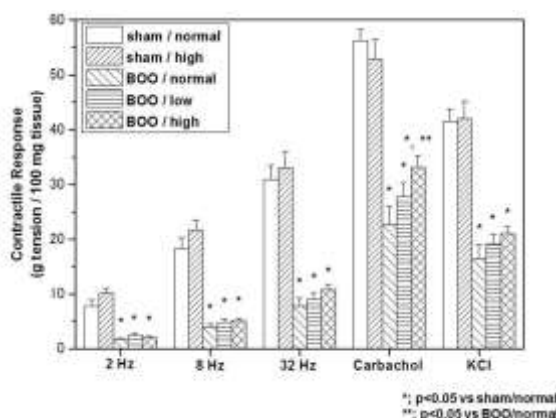
4 週間 BOO では、体重は変化を認めなかったが、膀胱重量は有意に増加していた。また PDE3 阻害剤投与による差は認めなかった (図 1)。

等尺性張力収縮反応の結果では、BOO 群の反応は、EFS および薬物刺激ともに sham 群の約 2-3 割に減弱しており、BOO による膀胱収縮障害を呈していた。PDE3 阻害剤投与により dose dependent にその収縮反応は改善傾向を示し、特に Carbachol の反応では、同じ BOO 群で PDE3 阻害剤非投与群 (BOO / normal) と比較し、PDE3 阻害剤 high dose 投与群 (BOO / high) では、有意に収縮反応は改善していた (図 2)。

(図 1)



(図 2)



病理組織学的検討では、H.E.染色および Azan 染色において、BOO 群は膀胱重量の有意な増加に示されるように、膀胱壁は有意に肥厚しており、コラーゲン線維が増加していたが、PDE3 阻害剤投与にて明らかな変化は認めなかった。

以上の結果より、臨床現場で広く使用されている抗血小板剤である PDE3 阻害剤 : Cilostazol は、BOO による膀胱機能低下を抑制、改善していた。

これらの結果より、PDE3 阻害剤はその抗血小板作用、血管拡張作用により、BOO による血流低下を改善し、結果として膀胱機能低下 (膀胱収縮障害) を抑制している可能性が示唆され、アスピリンの効果[28]と同様の機序で膀胱機能に関与していると考えられた。また、PDE3 阻害剤の効果は、以前報告した PDE5 阻害剤の効果[10]とほぼ同等であったことから、PDE ファミリーは、その使い分けで膀胱機能改善薬としての可能性を有していると思われる。

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 2 件)

- Matsumoto S, Kakizaki H. Causative significance of bladder blood flow in lower urinary tract symptoms. Int J Urol. 19(1):20-25,2012. doi.org/10.1111/j.1442-2042.2011.02903.x
- 松本成史, 柿崎秀宏. 旭川市および周辺地域の一般臨床医に対する前立腺肥大症診療アンケート調査. Progress in Medicine. 31(2):591-595,2011.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 3 件)

- 松本成史, 柿崎秀宏 : ◆ 排尿障害—最新診療動向. 排尿障害 (下部尿路機能障害) 病態解説. Overview of the lower urinary tract dysfunction (LUTD). 医学のあゆみ. 238(4):291-296,2011
- 松本成史, 柿崎秀宏 : 特集 : 頻尿・尿失禁. メタボリック症候群と過活動膀胱. 臨床泌尿器科. 65(10): 763-768, 2011.
- 松本成史 : 下部尿路閉塞による膀胱機能変化に対する PDE5 阻害剤の有用性とその機序. 旭川医科大学研究フォーラム. 12:78-79,2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 成史 (MATSUMOTO SEIJI)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：10288912

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：