

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500594

研究課題名(和文) 温度受容体の神経因性膀胱の病態への関与の解明

研究課題名(英文) Involvement of temperature receptors in neurogenic bladder

研究代表者

吉田 輝 (Yoshida, Akira)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40347109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：覚醒ラットと無麻酔除脳ラットで温熱が排尿反射へ与える影響を検討した。膀胱内への温熱刺激は、排尿閾値圧、静止圧、排尿反射の第2相収縮圧を低下させ、膀胱の進展性を増加させた。一方、S1皮膚分節レベルの皮膚への温熱刺激は、排尿反射の第2相収縮圧を低下させたが、静止圧は上昇させ、排尿閾値圧や膀胱の進展性に影響を及ぼさなかった。以上のことから膀胱内と皮膚表面への温熱刺激は、異なる機序で排尿反射に影響を及ぼすと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of warming on the micturition reflex in conscious and decerebrate rats. Intravesical warming decreased pressure threshold for inducing micturition, resting pressure, closing peak pressure, and increased bladder compliance. On the other hand, skin warming at S1 dermatome level decreased closing peak pressure, increased resting pressure, and had no effect on pressure threshold for inducing micturition and bladder compliance. These results suggest that intravesical warming and skin warming exert effects on the micturition reflex by different mechanisms.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：温熱 排尿反射 ラット シストメトリー

1. 研究開始当初の背景

神経因性膀胱による頻尿・尿失禁は、リハビリテーション対象患者とその介護者の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。

最近の研究により、脊髄損傷後には脊髄レベルで排尿の神経経路の再構築が起こること、また脊髄損傷後には膀胱収縮に関わるムスカリン受容体サブタイプに変化が生じることが報告され、病態下では正常と異なる排尿制御機構が働いていることが明らかにされている。したがって神経因性膀胱に対するより効果的な治療法の発展のためには、病態下での排尿制御機構について明らかにし、治療の効果を病態モデルを用いて明らかにしていくことが極めて重要な意味を持っている。ところで、外界の温度受容がどのような機序で行な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 チャンネルと呼ばれるイオンチャンネルにより行なわれていることが報告され、これまでに活性化温度閾値の異なる 6 つの TRP チャンネルの存在が明らかにされている。また TRP チャン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十分解明されていない。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報告され臨床応用されているが、このカプサイシンの受容体こそが TRP チャンネルのひとつである 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の排尿機能への影響を調べ、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、これまで行なってきた TRPM8 からそれ以外の TRP チャンネルへ研究対象をひろげ、脊髄損傷後の神経因性膀胱における温度受容体温度感受性 TRP チャンネルの機能を明らかにし、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) 覚醒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。

(2) 無麻酔除脳ラットを用いたシストメトリーを行い、膀胱内及び体表面から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. 研究の方法

すべての実験で、Sprague-Dawley 系雌ラットを用いて、シストメトリーで以下の検討をおこなった。

(1) 覚醒ラットでの膀胱内への温熱刺激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(イントラメディックポリエチレンチュービング PE-50, 日本ベクトン・ディッキンソン)とサーミスタ温度プローブ(ITP324-01, 日機装サーモ)を挿入固定し腹部から導出した後、腹部を縫合。麻酔を停止し、ラットをボールマンケージに収容した。麻酔停止の 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。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ポリグラフシステム(LEG1000)に接続した後、膀胱内へ 36.7 ± 0.4 の生理食塩水を 0.2 ml/分の速度で持続注入し、排尿反射を誘発させ、膀胱内圧を測定する持続注入シストメトリーを行った。なお、実験中の室温は、 25 ± 0.5 に維持した。

注入開始の 1~2 時間後、安定した排尿反射が連続して誘発されることを確認したところで、膀胱内へ注入する生理食塩水の温度を変化させ、膀胱内の温度を 40.7 ± 1.0 に 30 分間維持した際の、諸パラメータの変化を調べた。観察された排尿反射の典型例と測定パラメータの詳細を図 1 に示す。排尿反射が誘発され外尿道口から尿の流出が始まった時点の膀胱内圧を排尿閾値圧 (pressure threshold for inducing micturition; PT, cmH₂O)、排尿時の最大の膀胱内圧を最大排尿圧 (maximal voiding pressure; MVP,

cmH₂O)とした。また、排尿停止後に観察される膀胱内圧上昇の最大値を第2相収縮圧(closing peak pressure; CPP, cmH₂O)とし、排尿反射後に最も膀胱内圧が低下した時点の圧を静止圧(resting pressure; RP, cmH₂O)とした。また、排尿反射の間隔を排尿間隔時間(intercontraction interval; ICI, sec)とし、膀胱コンプライアンス(bladder compliance; BCP)は、次の計算式から求めた[注入速度(0.2 ml/分) × ICI/60 (ml)/(PT - RP)(cmH₂O)]。また、排尿反射の第1相収縮持続時間(1st phase contraction duration; 1st PD, sec)と第2相収縮持続時間(2nd phase contraction duration; 2nd PD, sec)を調べ、その和を膀胱収縮時間(bladder contraction duration; BCD, sec)とした。データの解析は、温度を変化させる直前の2回の排尿反射のパラメータをbaselineとし、温度変化後、最も変化の大きかった連続した2回の排尿反射のパラメータと比較することで行った。

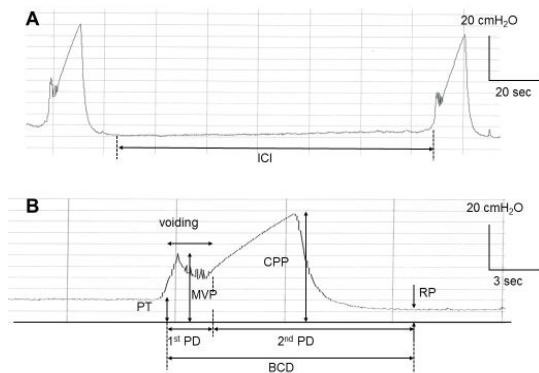


図1 A: シストメトリーで観察される排尿反射の典型例 B: 測定パラメータ

(2) 無麻酔除脳ラットでの膀胱内及び体表面への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((イントラメディックポリエチレンチュービング PE-50, 日本ベクトン・ディッキンソン)とサーミスタ温度プローブ(ITP324-01, 日機装サーモ)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37.3 ± 0.5 に維持した。麻酔停止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36.9 ± 0.6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。注入開始2時間後に注入する生理食塩水の温度を変化させ膀胱内温度を40.7 ± 1.0に30分間維持した際の変化を調べた。さらに、生理食塩水の温度を元の温度に戻し、約1時間後、諸パラメータがベースラインのレベルに戻っているのを確認したのちS1皮膚分節付近の皮膚表面から40~42の温熱を30分間作用させた際の変化を調べた。測定パラメータは(1)の実験と同様の項目とした。

なお、統計解析は(1)(2)の実験とも温熱を作用させる前後での変化paired t testを用いて検定し、p < 0.05を統計学的に有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 覚醒ラットでの膀胱内への温熱刺激が排尿反射へ及ぼす影響

温熱による排尿反射の変化の典型例を図2に諸パラメータの変化を表1に示す。

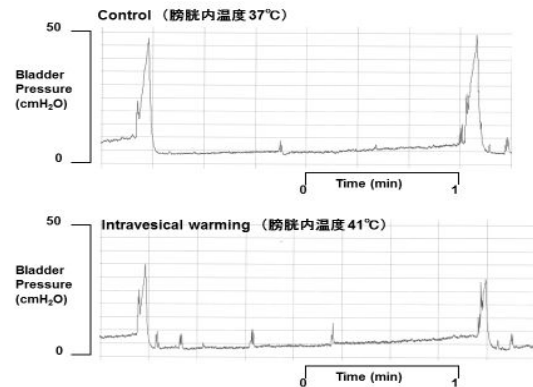


図2 覚醒ラットでの膀胱内への温熱刺激による排尿反射の変化

PT (cmH ₂ O)	MVP (cmH ₂ O)	CPP (cmH ₂ O)	RP (cmH ₂ O)	
膀胱内温度 36.7 ± 0.4				
8.4 ± 0.7	23.4 ± 0.8	34.2 ± 4.3	3.7 ± 0.6	
膀胱内温度 40.7 ± 1.0				
7.2 ± 0.6	23.4 ± 1.1	26.6 ± 2.6	2.5 ± 0.5	
BCP (ml/cmH ₂ O)	1st PD (sec)	2nd PD (sec)	BCD (sec)	ICI (sec)
膀胱内温度 36.7 ± 0.4				
0.16 ± 0.01	4.3 ± 0.5	11.1 ± 1.7	15.3 ± 1.8	215 ± 17
膀胱内温度 40.7 ± 1.0				
0.19 ± 0.01	4.4 ± 0.5	7.0 ± 1.1	11.4 ± 1.3	242 ± 20

P < 0.05

表1 覚醒ラットでの膀胱内への温熱刺激によるシストメトリーの諸パラメータの変化

膀胱内に注入する生理食塩水の温度を変化させ、膀胱内の温度を 40.7 ± 1.0 に 30 分間維持することにより、排尿閾値圧が 14%、静止圧が 30% 有意に低下した。排尿間隔時間は統計学的に有意ではなかった ($p = 0.07$) が延長の傾向を示し、膀胱コンプライアンスは、17% 有意に増加した。また、排尿反射の第 2 相収縮の収縮圧が 22% 有意に低下、収縮持続時間が 36% 有意に短縮し、膀胱収縮時間も 26% 有意に短縮した。最大排尿圧と第 1 相収縮持続時間には変化を認めなかった。また、膀胱内の温度を 36.7 ± 0.4 へ戻すことにより、諸パラメータも元のレベルに戻った。

まず、排尿閾値圧と静止圧の低下、膀胱コンプライアンスの増加については、以前我々は等尺性張力実験で 40~42 の温熱が 40mM KCl 及びカルバコールによる摘出排尿筋収縮を抑制することを明らかにしており、温熱が平滑筋層に作用し、膀胱平滑筋を弛緩させたことによるものと考えられる。また、排尿間隔時間は、有意ではないものの延長の傾向を示した。ラットにおいて、寒冷受容体 TRPM8 を活性化させる作用を持つメントールの膀胱内注入や、43 以上の熱で活性化される TRPV1 の刺激作用を持つカプサイシンの膀胱内注入は、尿路上皮や知覚神経終末に存在するそれぞれのチャネルに作用し、知覚求心路を刺激し排尿反射を誘発し、排尿間隔時間を短縮させるが、今回の実験から 40.7 ± 1.0 の温熱が、知覚神経に作用し、排尿反射に促進的に作用する可能性は低いものと考えられる。一方、温熱は、最大排尿圧と第 1 相収縮時間には影響を及ぼさなかった。この排尿反射の第 1 相収縮は、骨盤神経終末から放出されるアセチルコリンと ATP が、ムスカリン受容体と P2X 受容体に作用することで起こる収縮反応である。温熱が、この収縮に影響を及ぼさなかったことは、温熱がアセチルコリンや ATP に対する排尿筋収縮へ抑制作用を持つものの、膀胱頸部や尿道の平滑筋の収縮をきたし尿道抵抗が増加することにより、最大排尿圧の低下と第 1 相収縮持続時間の短縮が起こらなかった可能性が考えられ、今後、尿道機能への温熱の影響を検討する必要がある。また温熱は、排尿反射の第 2 相収縮の収縮圧を低下、収縮持続時間を短縮させ膀胱収縮時間を短縮させた。この排尿反射の第 2 相収縮は、小動物を用いた持続注入シストメトリーで通常観察されるもので、排尿が終了し尿道が閉鎖した状態で起こる圧の上昇である。この第 2 相収縮圧は、膀胱内への生理食塩水の注入速度を上げることで上昇することから、収縮直後の内腔が小さい膀胱へ生理食塩水が急速に注入されることにより起こる圧の上昇と考えられるが、その本態については十分解明されていない。この第 2 相収縮へ影響を与える因子として、外尿道括約筋の収縮の抑制作用を持つ -bungarotoxin の投与が第 2 相収縮圧を低下させること、膀胱平滑筋や尿路上皮に発現す

る TRPV4 のアゴニストの膀胱内注入が第 2 相収縮圧を増加させることが報告されており、今回、観察された温熱の第 2 相収縮の抑制がどのような機序で起こるのかについては、第 2 相収縮の本態の解明とともに今後検討を進めていかなければならない課題である。

ところで、表在性の膀胱癌に対する補助療法として膀胱内化学療法と組み合わせた温熱療法が有効であることが証明され、臨床応用がなされているが、Haveman らは、ラットを用いて 41~45 の温熱を膀胱内に 1 時間作用させた後の膀胱機能へ与えるダメージを膀胱容量と血中 BUN を測定することで検討している。その結果、膀胱容量に関しては、43 までは変化はなかったが、44 と 45 の温熱を作用させた群で、数日間にわたり膀胱容量の減少を認め、45 の温熱を作用させた群では、60% の動物が数日以内に死亡したこと、また、血中 BUN については、42 以上の温熱を作用させた群で上昇し、42 群では 1 週間で正常化するが、43 群では 1 週間後でも 2 倍、44 群では 6 倍の高値が持続していたことを報告しており、過度の温熱を作用させることは膀胱へダメージを与えるものと考えられる。今回の実験で用いた 40.7 ± 1.0 、30 分という条件では、温度を元のレベルに戻すことで、速やかに諸パラメータも回復しており、膀胱へのダメージを与えるものではないと思われるが、作用時間を延ばした場合の影響がないかについては今後確認を行う必要がある。

脊髄損傷による神経因性膀胱の患者では、排尿筋過活動や排尿筋括約筋協調不全により、膀胱が高圧状態にさらされると、低コンプライアンス膀胱となる。低コンプライアンス膀胱は、膀胱尿管逆流の原因となり、膀胱容量を低下させ、頻尿、尿失禁につながることから、重要な治療の対象である。今回、得られた温熱が膀胱コンプライアンスを低下させるという結果は、低コンプライアンス膀胱の治療に、温熱が有用である可能性を示唆するものである。今回の実験では、温熱を膀胱内へ作用させた際の影響の検討であったが、温熱や温泉の治療への応用という観点では、体表面への作用させた温熱の影響についての検討が必要である。体表面へ温熱を作用させると、膀胱のみではなく、皮膚に対する温熱の影響という要素が加わってくるが、これまでに、動物実験において、会陰部皮膚への鍼刺激や軽い触刺激が、排尿反射に抑制的に作用するとの報告もあり、同様の条件で皮膚への温熱刺激が排尿反射にどのような影響を及ぼすのかについては興味を持たれるところである。今後、体表面からの温熱が排尿機能へ与える影響を明らかにすることができれば、温泉、温熱の排尿障害の治療への応用の可能性を示すことができると考えられる。

(1) 無麻酔除脳ラットへの温熱刺激が排尿反射へ及ぼす影響

膀胱内への温熱刺激による排尿反射の変化の典型例を図3に諸パラメータの変化を表2に示す。またS1皮膚分節付近の皮膚表面への温熱刺激による排尿反射の変化の典型例を図4に諸パラメータの変化を表3に示す。

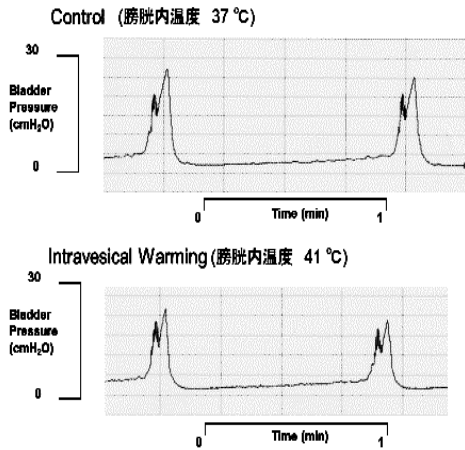


図3 無麻酔除脳ラットでの膀胱内への温熱刺激による排尿反射の変化

PT (cmH ₂ O)	MVP (cmH ₂ O)	CPP (cmH ₂ O)	RP (cmH ₂ O)
膀胱内温度 36.9 ± 0.6			
5.6 ± 0.6	17.0 ± 0.6	23.2 ± 1.4	1.7 ± 0.2
膀胱内温度 40.7 ± 1.0			
4.0 ± 0.4	16.0 ± 0.6	19.7 ± 1.3	1.1 ± 0.1

BCP (ml/cmH ₂ O)	1st PD (sec)	2nd PD (sec)	BCD (sec)	ICI (sec)
膀胱内温度 36.9 ± 0.6				
0.16 ± 0.04	5.0 ± 0.4	10.9 ± 1.6	15.9 ± 1.9	137 ± 20
膀胱内温度 40.7 ± 1.0				
0.21 ± 0.05	5.8 ± 0.4	10.1 ± 1.7	15.9 ± 1.9	140 ± 22

P<0.05

表2 無麻酔除脳ラットでの膀胱内への温熱刺激によるシストメトリーの諸パラメータの変化

無麻酔除脳ラットで膀胱内に温熱刺激を加えることにより排尿閾値圧が29%、静止圧が40%有意に低下した。また、膀胱コンプライアンスは、61%有意に増加した。また、排尿反射の第2相収縮の収縮圧が15%有意に低下した。最大排尿圧、第1相収縮持続時間、第2相収縮持続時間、収縮持続時間には変化を認めなかった。

無麻酔除脳ラットにおいても、温熱が排尿閾値圧と静止圧、膀胱コンプライアンス、第2相収縮圧に与える影響は覚醒ラットと同様の傾向を示しており、この変化は、温熱が大脳皮質以下の排尿反射経路へ影響を与えることによって起こる変化であると考えられる。

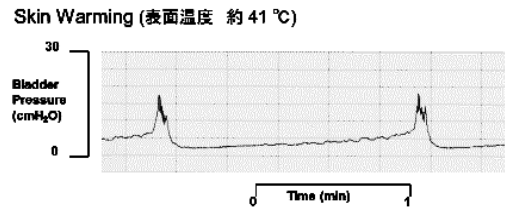
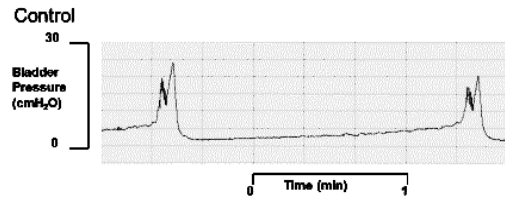


図4 無麻酔除脳ラットでのS1皮膚分節付近の皮膚表面への温熱刺激による排尿反射の変化

PT (cmH ₂ O)	MVP (cmH ₂ O)	CPP (cmH ₂ O)	RP (cmH ₂ O)
コントロール			
4.6 ± 0.5	16.6 ± 0.7	23.8 ± 2.2	1.5 ± 0.1
皮膚表面からの温熱刺激中			
4.9 ± 0.6	15.4 ± 0.6	19.8 ± 2.5	1.9 ± 0.2

BCP (ml/cmH ₂ O)	1st PD (sec)	2nd PD (sec)	BCD (sec)	ICI (sec)
コントロール				
0.22 ± 0.06	5.4 ± 0.4	15.9 ± 5.1	21.3 ± 15.3	148 ± 25
皮膚表面からの温熱刺激中				
0.20 ± 0.06	5.5 ± 0.4	11.8 ± 3.5	17.3 ± 3.6	136 ± 21

P<0.05

表3 無麻酔除脳ラットでのS1皮膚分節付近の皮膚表面への温熱刺激によるシストメトリーの諸パラメータの変化

一方、S1皮膚分節付近の皮膚表面から温熱刺激を与えることにより、排尿反射の第2相収縮の収縮圧が17%有意に低下、第2相収縮持続時間が26%、収縮持続時間が19%有意に短縮し、静止圧は22%上昇した。排尿閾値圧、最大排尿圧、第1相収縮持続時間、膀胱コンプライアンスには変化を認めなかった。また、温熱刺激中に膀胱内の温度には変化を認めなかった。

膀胱内からと体表面からの温熱の影響を比較すると、排尿反射の第2相収縮の収縮圧を低下させるという作用は共通していたが、排尿閾値圧や膀胱コンプライアンス、静止圧への影響は大きく異なっていた。今後、温泉、温熱の排尿障害の治療への応用の可能性を示すためには、今回得られた体表面からの温熱が排尿反射に及ぼす変化の機序を解明していくことが重要である。

5. 主な発表論文等
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、池田 聡
ラット摘出排尿筋収縮と排尿反射に対する
温熱の影響 日本温泉気候物理医学会雑誌
77: 227-236, 2014 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

1. 吉田 輝、池田 聡
ラット排尿反射に対する温熱の作用 第 51
回日本リハビリテーション医学会 2014 年
6月6日 名古屋国際会議場(名古屋市)
2. 吉田 輝、池田 聡
ラット排尿反射に対する温熱の作用 第 79
回日本温泉気候物理医学会 2014 年 5月 13
日 国立京都国際会館(京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 輝 (YOSHIDA Akira)
鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病
院・講師

研究者番号: 49347109

(2)研究分担者

池田 聡 (IKEDA Satoshi)
北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号: 00343369

川平和美 (KAWAHIRA Kazumi)
鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員
研究員

研究者番号: 20117493

大渡昭彦 (OHWATASHI Akihiko)

鹿児島大学・医歯域医学系・准教授

研究者番号: 30295282