

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870073

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛時に発生する排尿異常の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of neurogenic bladder in neuropathic pain

研究代表者

善積 克 (YOSHIZUMI, MASARU)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70553379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロスタグランジン(PG)合成阻害薬ロキソプロフェン(Lox)及びグリシン(Gly)の排尿機能抑制に着目し、本研究では、排尿機能における相互作用を検討した。覚醒条件下で膀胱内圧測定を行い、静脈内および脊髄髄腔内投与による検討では、Lox及びGlyは排尿間隔の延長を示し、併用投与によりさらに延長した。また、Gly受容体 $\alpha 3$ サブユニット(GlyR $\alpha 3$)のノックダウンによりGly髄腔内投与による排尿機能抑制が阻害された。したがって、Lox及びGlyの排尿機能抑制効果は脊髄求心路に寄与していることが示唆された。また、GlyはGlyR $\alpha 3$ を介して排尿機能を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the inhibitory effects of loxoprofen, a cyclooxygenase inhibitor, and glycine, a major inhibitory neurotransmitter, on the micturition reflex in conscious rats and the involvement of crosstalk. With cystometry, intravenous or intrathecal injection of loxoprofen and glycine prolonged the intercontraction intervals (ICI) in conscious rats. The combination of loxoprofen and glycine prolonged the ICI more than with either drug alone. The inhibitory effects of glycine on the ICI prevented by GlyR $\alpha 3$ -siRNA treatment. These results suggest that loxoprofen and glycine inhibits the afferent limbs of the micturition reflex pathway in the lumbosacral cord via cyclooxygenase inhibition and glycine receptor $\alpha 3$ subunit-mediated inhibition, respectively.

研究分野：神経生理

キーワード：プロスタグランジン ロキソプロフェン グリシン 排尿機能 脊髄 グリシン受容体 $\alpha 3$ サブユニット

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、神経の損傷部位により、末梢性または中枢性神経障害性疼痛に分類され、症状としては痛覚過敏やアロディニアといった知覚異常を引き起こす。この知覚異常は排尿機能にも影響し、ラットで化学的な坐骨神経損傷 (L4-L5損傷) により排尿回数の増加が数週間観察されることが報告された (Foster R et al, *Neuroscience*, 2011)。

そこで、神経障害性疼痛時に惹起される排尿異常の病態モデルラットを作製するため、片側のL5脊髄神経結紮モデルを作製し、経日的に疼痛閾値と排尿行動を試験したが、3日目以降から疼痛閾値の低下が認められたが、代謝ケージを用いての排尿行動実験では排尿回数が増加傾向になるものの有意な排尿回数の増加が認められなかった。炎症性疼痛や神経障害性疼痛時において、プロスタグランジン (PG) が脊髄内に遊離・生合成され、グルタミン酸を介して痛覚過敏反応を引き起こされるが、排尿機能においてもPGによる排尿促進が報告されている。臨床研究において、PG合成阻害薬であるロキソプロフェンが夜間頻尿に効果があることが報告されているが (Araki R et al, *Acta Med. Okayama*, 2008)、その作用機序の詳細は不明である。また、抑制性神経伝達物質であるグリシンが侵害受容過程や排尿機能を抑制することから、本研究では、覚醒条件下でロキソプロフェン及びグリシンの単独及び併用投与による排尿機能に対する効果及び役割について検討した。

2. 研究の目的

夜間頻尿に対して抑制効果を示すロキソプロフェンの作用機序には、PG合成阻害による腎臓の血流低下による尿産生量の減少が考えられている。しかし、排尿量に影響せず、排尿回数の減少がみられることもあり、尿量抑制以外の排尿反射経路の抑制が考えられるが、その詳細は明らかではない。そこで、覚醒条件下でロキソプロフェンの排尿機能に対する

抑制効果を検討し、その役割を探索することにした。また、抑制性神経伝達物質であるグリシンが排尿機能を抑制することに着目した。痛み研究では、脊髄PGが特異的にグリシン神経伝達を抑制することが報告されていることから (Harvey RJ et al, *Science*, 2004)、ロキソプロフェンとグリシンの併用投与による排尿機能に対する相互作用も検討することにした。また、病態モデルとして尿道を狭窄することで排尿筋肥厚が生じ、潜時の短い脊髄性の排尿反射が増加することが知られている尿道部分閉塞 (bladder outlet obstruction; BOO) モデルラットを作製し、同様に排尿機能に対する効果を検討することにした。

3. 研究の方法

(1) 排尿行動実験は、ラットを代謝ケージに入れ、3日間環境に順化させた後、1日目と2日目に溶媒 (0.5%トラカントガム溶液) を強制経口投与し、ベースとなる排尿回数及び排尿量を記録した。薬物は3日目に経口投与し、溶媒群と比較した。測定はゲージの下に天秤を設置し、天秤上の容器に尿を直接落下させ累積的に測定し、その重量変化をパソコンに記録した。

(2) 膀胱内圧測定は、セボフルレン麻酔下で膀胱頂部にポリエチレンチューブ (PE50) を挿入・留置し、ラットはボールマンケージにて拘束した。麻酔回復後、ポンプを用いて2.4 ml/hrの速度で生理食塩水を膀胱内に灌流し、膀胱内圧を連続的に測定した。薬物は静脈内投与 (頸静脈) あるいは脊髄腔内投与 (L6) で行い、膀胱内圧は圧トランスデューサを介して記録し、薬物投与前の安定した3回の排尿サイクルの平均値をコントロール値として投与後の3~4回の排尿サイクルの各パラメータ (排尿間隔、最大排尿圧) を解析した。

(3) BOOラットの作製は、セボフルレン麻酔下で尿道を露出し、尿道を1.1 mm径のステンレスパイプを用いて尿道を狭窄し、2週間後

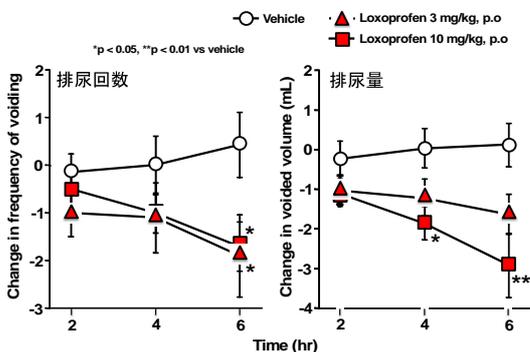
に膀胱内圧測定にて灌流実験に用いた。

4. 研究成果

(1) ロキソプロフェン経口投与における排尿回数と排尿量の経時的变化

排尿行動実験において、ロキソプロフェン（3及び10 mg/kg）経口投与は、3及び10 mg/kg群において6時間後の排尿回数が溶媒投与群と比較して有意に減少し、排尿量は10 mg/kgのみ4及び6時間後に溶媒投与群と比較して有意に減少した（Fig. 1）。つまり、ロキソプロフェンの3 mg/kgは排尿量に影響せず、排尿回数が減少した。

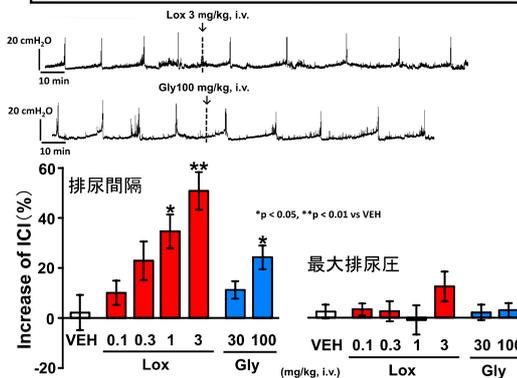
Fig. 1 ロキソプロフェン経口投与における排尿回数と排尿量の経時的变化



(2) 覚醒下ラットでのロキソプロフェン及びグリシン静脈内投与における単独及び併用投与による排尿機能抑制効果

膀胱内圧測定において、排尿量に影響しない用量であるロキソプロフェン（1及び3 mg/kg）静脈内投与は、最大排尿圧に影響はなく、排尿間隔が溶媒と比較して有意に延長した（Fig. 2）。グリシン（100 mg/kg）静脈内投与も有意な排尿間隔の延長が認められた（Fig. 2）。それぞれ単独投与で抑制効果を示さなかったロキソプロフェン（0.1 mg/kg）とグリシン（30 mg/kg）静脈内投与による併用投与は、排尿間隔が有意に延長し、最大排尿圧に影響はなかった。

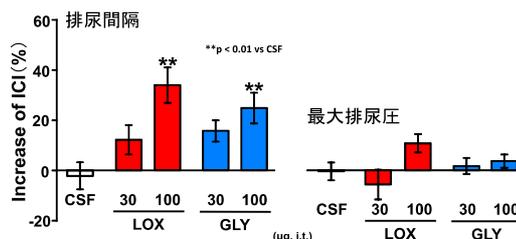
Fig. 2 ロキソプロフェン及びグリシン静脈内投与による排尿機能抑制効果



(3) 覚醒下ラットでのロキソプロフェン及びグリシン脊髄髄腔内投与における単独及び併用投与による排尿機能抑制効果

ロキソプロフェン（100 µg）及びグリシン（100 µg）脊髄髄腔内投与による単独投与は、最大排尿圧に影響はなく、排尿間隔が溶媒と比較して有意に延長した（Fig. 3）。さらに、併用投与による検討により、ロキソプロフェン（100 µg）及びグリシン（100 µg）髄腔内投与による併用投与は、さらに排尿間隔が延長し、各単独投与と比較しても有意に延長した。

Fig. 3 ロキソプロフェン及びグリシン脊髄髄腔内投与による排尿機能抑制効果

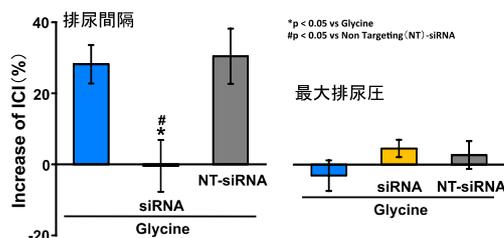


(4) グリシン脊髄髄腔内投与による排尿機能抑制効果に対するグリシン受容体α3サブユニットの関与

グリシン受容体α3サブユニット（GlyRa3）が脊髄後角に局在することが報告されていることから（Harvey RJ et al, *Science*, 2004）GlyRa3を標的としたsmall interfering RNA（GlyRa3-siRNA）を用いて、GlyRa3のノックダウンラットを作製し、グリシン髄腔内投与による排尿機能抑制効果に対する影響を検討した。GlyRa3-siRNAのノックダウンにより、グリシン（100 µg）髄腔内投与による排

尿間隔の延長を有意に抑制した (Fig. 4)。非標的siRNA投与群は、グリシン (100 μg) 髄腔内投与による排尿間隔の延長に変化がなかった。また、ウェスタンブロッティング解析により L6-S1 脊髄後角上で検出された GlyRa3 のタンパク質発現の強さは、未処置群あるいは非標的 siRNA 投与群と比べ、GlyRa3-siRNA 投与群で有意な減少が確認できた。

Fig. 4 GlyRa3-siRNA 髄腔内投与によるグリシンの排尿機能抑制効果に対する効果



本研究結果より、ロキソプロフェン及びグリシンは排尿機能において抑制効果を示したが、その効果は相加効果であった。また、両薬物の排尿機能抑制効果は、腰仙髄の排尿反射経路の求心性経路に寄与していることが示唆された。ロキソプロフェンは少なくとも脊髄内の PG の生合成を阻害することで排尿機能を抑制し、グリシンはグリシン受容体 α3 サブユニットを介して排尿機能を抑制していることが明らかとなった。今後の展望として、BOO モデルラットで生じる過活動膀胱の発生機序に腰仙髄のグリシン神経伝達の活動性低下による知覚系の閾値低下が関与していることが報告されていることから (Miyazato M et al, *Int J Urol*, 2008) BOO モデルラットでのグリシン髄腔内投与による効果を検討する。また、炎症疼痛時の痛覚過敏に脊髄 PG によるグリシン神経伝達の抑制が関与し、標的分子としてグリシン受容体 α3 サブユニットが提唱されていることから (Harvey RJ et al, *Science*, 2004) BOO モデルラットでの脊髄 PG とグリシン受容体の役割を探索する。

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4件)

Fukiya Y, Yoshizumi M, Saito M, Matsumoto-Miyai K, Nimura T, Kawatani M: Synergistic effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats. *Biomed Res.* 35: 17-23, 2014. 査読有

河谷正仁、松本-宮井和政、善積克: 膀胱の自律神経支配. *Clinical Neuroscience.* 1363-65, 2014. 査読無

Yoshizumi M, Eisenach JC, Hayashida K: Valproate prevents dysregulation of spinal glutamate and reduces the development of hypersensitivity in rats after peripheral nerve injury. *J pain.* 14: 1485-91, 2013. 査読有

善積克、松本-宮井和政、林田健一郎、河谷正仁: 膀胱知覚と脊髄の可塑性、最近の知見. *排尿障害プラクティス.* 21(3): 15-23, 2013. 査読無

[学会発表](計5件)

国際学会

Yoshizumi M, Matsumoto-Miyai K, Kawatani M: Inhibitory effects of loxoprofen and glycine on the micturition reflex in conscious rats. 44th Society for Neuroscience. 2014.11.15-19 Washington, DC, USA

Yoshizumi M, Akihiko Y, Furukawa K, Kimura Y, Sakurada S: 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. 2013.5.31-6.3 Kanazawa (Symposium)

国内学会

善積 克、松本-宮井和政、河谷正仁：覚醒下ラットにおけるロキソプロフェン及びグリシン排尿機能抑制効果と併用投与による効果。第 21 回日本排尿機能学会。2014.9.17-20. 岡山

吹谷由美子、善積 克、松本-宮井和政、河谷正仁：覚醒下ラットにおけるロキソプロフェン及びグリシン併用投与による排尿機能抑制の相乗効果。第 102 回日本泌尿器科学会総会。2014.4.24-27 神戸

松本-宮井和政、善積 克、河谷正仁：一酸化窒素-cGMP 経路による膀胱上皮からの ATP 分泌の抑制。第 20 回日本排尿機能学会。2013.9.18-21. 静岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=seiri2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

善積 克 (YOSHIZUMI MASARU)
秋田大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：70553379

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし