

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861872

研究課題名(和文)高齢者の夜間頻尿アセスメントとケアにかかわる排尿間隔調節因子の検討

研究課題名(英文) Influencing factor for micturition frequency in aged rat

研究代表者

高梨 あさき (TAKANASHI, ASAKI)

順天堂大学・医療看護学部・講師

研究者番号：60567361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：年をとることで夜間の排尿回数が増すことは経験的にも知られ、その要因は様々ではあるが、最近体内時計の変化が夜間頻尿の原因になっている可能性が示されている。そこで、体内時計のリズムに深く関わるメラトニンの前駆物質であり、頻尿を呈する過活動膀胱で収縮反応が増強することが報告されているセロトニンへの反応性が年をとることによってどのように変化するかを実験動物を用いて検討した。その結果、今回使用した老化実験モデルラットでは、セロトニンに対する反応性が減弱傾向にあり、その反応経路も変化している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The question has remained unanswered how the nocturia increases by getting old. Although, there are many influencing factors, some recent studies have suggested that the change of the biological clock causes the nocturia. Therefore the present study was undertaken in order to investigate whether the bladder body contraction by serotonin (5-HT) has influenced with aging in experimental animal. 5-HT is a precursor of the melatonin that is maintaining the biological clock, and it has been reported that the 5-HT-induced contraction has increased in the overactive bladder. Our results suggested that the 5-HT-induced contraction has changed in aged bladder, moreover the mechanism can change.

研究分野：基礎看護学

キーワード：排尿機能 加齢変化 F344rat serotonin

1. 研究開始当初の背景

高度高齢社会となった現代において看護対象の多くは高齢者となり、患者の疾患に加え加齢による様々な変化をアセスメントしながら対象に合った看護を提供することが求められる。しかし、高齢者では排泄障害の増加、認知機能や運動機能の低下などが起こることは看護援助の中で目の当たりにしているが、加齢変化が起こるメカニズムについては研究の余地が残されている。特に高齢者で有病率の高い夜間頻尿は、不眠の原因ともなり患者の Quality of life (QOL) を著しく損なうばかりか転倒リスクを高め生命予後に関わることも報告されている。それに対し夜間頻尿や不眠の改善につながる看護ケアや対象に合った転倒予防策を行うことが重要であり、より効果的なケアの開発にはそのメカニズムの解明が急務と考えた。

夜間頻尿は「夜間 1 回またはそれ以上排尿のために起きなければならない訴え」と International Continence Society により定義され 60 代で約 60% に認め加齢に伴い増加するとも報告されている。当初夜間頻尿は加齢に伴う前立腺肥大などの器質的な変化に付随して起こるものと捉えられていたが、手術や薬物療法による治療後も残存することが多い症状として器質的な変化以外の原因も複雑に関与している事がわかってきた。その中で、夜間の休息期に腎の尿生成減少と膀胱容量の増大により排尿間隔が延長する生体の概日時計によるリズムそのものが加齢により狂いやすくなることが一因と推測される。しかし、この概日時計による排尿機能の日内変動は経験的に知られていたがその調節がどのようになされているかについての研究は発展途上である。これまでに生体の概日時計は中枢神経だけでなく各臓器独立して存在することが報告されていたが、最近になって膀胱でも独自の概日時計が存在し、膀胱の容量変化を制御している可能性が示唆されている。一方、生体の概日時計に影響するものとしては松果体から放出されるメラトニンの存在が古くから知られており、その分泌量が加齢に伴い減少するとの報告がある。さらにメラトニンは中枢神経だけでなく各種臓器に直接作用を持つことも明らかになってきており、膀胱においても平滑筋の収縮抑制作用が報告され始めたがこの加齢変化についての報告はほとんどない。この概日時計に重要なメラトニンは起床時に太陽光を浴び、日中の適度な活動と規則的な食事等により分泌を促せると言われており、看護援助が果たす役割が大きいと言える。つまり、膀胱機能の日内変動を調節する機序を明らかにし、その加齢変化について検討することで夜間頻尿とそれに伴う不眠や転倒へのより効果的な看護援助につながると考えられた。

2. 研究の目的

高齢者に多い夜間頻尿は Quality of life を著しく損なうばかりか生命予後にもかかわり、対象に合った看護援助や治療が重要といえる。しかし、加齢による夜間頻尿の発症機序にはいまだ不明点が残されており解明が待たれている。その中で加齢に伴い排尿機能の正常な日内変動が損なわれることが夜間頻尿の一因となっている可能性が示されている。そこで本研究では排尿機能への様々な修飾因子を排除し、加齢による影響のみを見るために実験動物を用いて検討することとした。加齢による不随意的膀胱収縮にはムスカリン (M) 受容体以外が関与している可能性が報告されており、その原因物質の 1 つと考えられる serotonin (5-HT) に対する反応性、受容体拮抗薬の作用が加齢の影響を受けるかを明らかにすることで、高齢者の夜間頻尿アセスメントとより効果的なケアの開発のために必要な基礎データを得る事を目的とした。

なお、当初予定していたメラトニンの直接作用ではなく、セロトニンの作用についての検討に変更しているが、セロトニンはメラトニンの前駆物質であり、メラトニン同様日光や活動で活性化されることも知られている。

3. 研究の方法

研究対象は疾患や生活習慣による変化を排除するため、老化実験モデル動物を用いて以下の実験を行った。なお、本実験に必要な動物実験の実施については「動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)に基づいて制定された順天堂大学実験動物等管理規則および山形大学医学部動物実験指針を遵守して行った。

- 1) 膀胱体部収縮機能実験: 自然老化モデル動物である Fischer344 (F344) ラットの雄性 young (3 ヶ月齢、以下 Y) 6 匹、aged (26 ヶ月齢以上、以下 A) 7 匹を用いた。加齢による不随意的膀胱収縮にはムスカリン受容体以外が多く関連しているとのこれまでの報告を受け、摘出膀胱体部短冊標本を用い収縮機能実験を行った。

収縮機能実験は各月齢ラットより組織標本となる膀胱平滑筋を採取し、幅 1.5 ~ 2.0 mm、長さ 10 ~ 11 mm の短冊標本を作製した。標本は混合ガス (95% O₂、5% CO₂) を通気した Krebs-Henseleit 液 (37±0.1 °C) で満

たした 10ml organ bath に懸垂し、その収縮張力を等尺性張力トランスデューサーを用いて以下の項目について測定した。

66.7mM KCl による収縮反応：膀胱平滑筋自体の収縮能を確認するために、受容体を介さずに収縮を惹起させる KCl 溶液を用いて検討した。

5-HT 濃度反応曲線：66.7mM KCl により収縮反応が起こる事を確認した後、5-HT の累積投与により濃度反応曲線を求めた。

テトロドトキシン (TTX) 前処置下での 5-HT 濃度反応曲線の測定：

5-HT による神経性の反応因子を排除するために Na チャネルブロッカーである TTX を前処置し、5-HT 濃度反応曲線を求めた。

5-HT 受容体拮抗薬の前処置：

TTX 存在下で 5-HT 受容体の内、膀胱平滑筋収縮に関与している 5-HT₂ 受容体サブタイプ blocker を前処置し、セロトニン濃度反応曲線を求めた。

経壁電気刺激 (EFS)：刺激時間 3 秒、頻度 1~128 Hz、間隔は 180~240 秒とし、持続時間 0.2 m 秒のパルス電流を加え頻度反応曲線を求めた。また、アトロピン (Atro) 抵抗性収縮を測定するために、M 受容体遮断薬である Atro を前処置し EFS を行い、さらに、Atro 存在下で 5-HT₂ 受容体サブタイプ blocker を前処置して同様に EFS を行った。

- 2) 膀胱体部平滑筋組織標本の組織学的検討：パラフィン包埋切片を作成し、HE 染色を行い、観察を行った。
- 3) リアルタイム RT PCR：5-HT 受容体サブタイプについて、リアルタイム PCR 法で発現量を比較した。
- 4) 統計処理：結果は平均値 ± 標準誤差で示し、young と aged で t 検定により有意差検定を行い、危険率 5%未満を有意差があるものと判断した。

4. 研究成果

1) 収縮機能実験

KCl に対する反応性

KCl 溶液による収縮反応は 66.7 mM で最大収縮が得られた。収縮反応は young (3.63 ± 0.24 g) と aged (4.06 ± 0.21 g) で比較し、有意差を認めなかった (Fig1.a)。しかし、標本のサイズに差を認めたため、断面積あたりの張力を算出したところ、aged で有意 ($P < 0.0001$) に収縮反応が減弱していた (Fig1.b)。そこで、66.7mM KCl に対する最大収縮を 100%として、以下の収縮実験結果を示した。

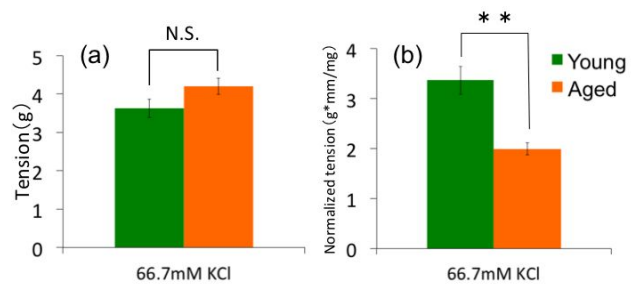


Fig. 1 Contraction induced by KCl in the bladder strips of young and aged rats. KCl-induced contraction was then measured by replacement with 66.7 mM KCl solution (a). Data were normalized by strip length and weight (b). ** $P < 0.01$ vs. young rats. N.S.: not significant

5-HT に対する反応性

両月齢とも 5-HT 濃度依存的に収縮反応が増強したが aged (10^{-7} M、 $P \leq 0.05$) では反応の閾値上昇を認めたが、最大収縮反応はほぼ同等であった (Fig2)。

TTX 前処置による反応性の変化

TTX を前処置し、5-HT の濃度反応曲線を求めた結果、Aged でのみ TTX 前処置により反応が減弱 ($P < 0.01$) した (Fig2)。

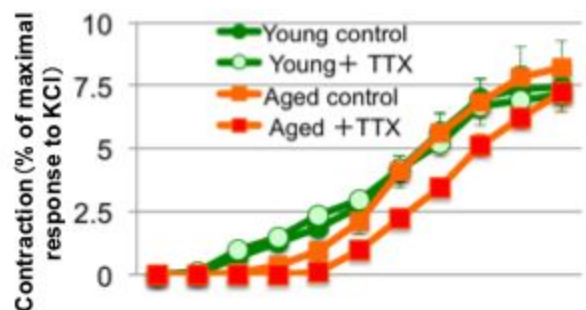


Fig2. Contraction induced by 5-HT in the bladder strips of rats

セロトニン受容体拮抗薬の作用

TTX 存在下で 5-HT₂ 受容体サブタイプの blocker を前処置し 5-HT 濃度

反応曲線を求めた結果、aged では抑制作用も減弱する傾向が認められた。

EFS

EFS ではいずれの 5-HT₂ 受容体拮抗薬もアトロピン抵抗性収縮に明らかな抑制作用は認めなかった。

2) 組織学的検討

HE 染色により組織の観察を行ったところ、Aged の一部の標本ではやや組織の肥厚を認めた。

3) RT PCR

5-HT₂ 受容体サブタイプの発現量の比較を行った結果、有意差は認めなかったが、あるサブタイプで aged で発現量が低下していた。

ラットの膀胱体部平滑筋においてセロトニンに対する反応の閾値が aged で高くなっていたが、最大反応はほぼ同等であった。セロトニンは全身に存在し、中枢だけでなく末梢においても様々な役割を持つ。中でも消化管の機能制御で重要な役割を果たしていることが知られているが、近年膀胱平滑筋に対しても収縮作用を持ち、過活動膀胱モデルである部分的尿道閉塞モデル動物では、セロトニンへの反応性が有意に亢進することが報告されている。今回の結果はこの報告と反対の結果となっているが、本研究で用いている加齢モデル動物である F344 ラットでは加齢により頻尿よりむしろ排尿回数の減少を観察しており、本研究結果であるセロトニンへの閾値の上昇が排尿回数や排尿行動になんらかの影響を与えている可能性が考えられる。また、TTX 前処置により aged でのみセロトニンに対する収縮反応の減弱を認めたことから、神経を介した収縮が aged では増加している可能性が示唆された。さらに 5-HT₂ 受容体サブタイプの拮抗薬の抑制作用も aged で変化しており受容体サブタイプの発現量や、局在が変化している可能性が示された。今回行ったリアルタイム RT PCR の結果では有意な差とは言えないが、aged である種のセロトニン受容体サブタイプの発現量の減少も認めている。

しかし、一方で EFS の実験結果では、セロトニン受容体サブタイプの拮抗薬ではアトロピン抵抗性収縮反応は抑制されなかった。これらのことから、膀胱体部の神経終末か

ら収縮物質としてセロトニンが放出されているというより、血液中や尿中などの神経終末以外に存在するセロトニンが神経や平滑筋に作用して収縮反応を惹起している可能性が考えられる。反応経路については更なる検討が必要である。

また、HE 染色による組織観察の結果、一部の aged ラットでは膀胱体部平滑筋の肥厚を認め、形態学的な変化が起きている可能性が考えられた。今回使用した F344 ラットは加齢による体重増加が少ない系統であるが、肉眼的には膀胱サイズは aged の方が大きかったため、今後は膀胱全体の重量比較なども行って評価していく必要がある。

以上の結果より、ラット膀胱体部平滑筋において、セロトニンに対する収縮反応は加齢により変化していた。さらに aged では外因性のセロトニンによる神経性の収縮成分が増加していた可能性があるため、膀胱体部平滑筋でのセロトニンの詳細な作用機序を検討する必要がある。また、生体内でのセロトニンの日内変動についても検討することで、夜間排尿の増加との関係性を明らかにしていく必要がある。

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) 高梨あさき、酒井 亜月、後藤 のぞみ、石幡 明、片野 由美: 未病の視点からみた加齢による排尿機能の変化、日本未病システム学会雑誌 Vol.20 No.3、pp.46-50.
- 2) 酒井亜月、真崎琴美、紺野恵里奈、細田朋佳、高梨あさき、片野由美、石幡明: 成熟ラットにおける膀胱の排尿機能調節、基礎科学をもとにした Co-medical 研究会雑誌、Vol. 3、no.1、pp.51-56.

[学会発表](計2件)

- 1) 高梨あさき、酒井 亜月、後藤 のぞみ、石幡 明、片野 由美: ラットの膀胱体部平滑筋自発性収縮における加齢変化の検討、第4回 Co-medical 研究会(山形、山形大学医学部看護学科)
- 2) Takanashi Asaki, Sakai-Saitou Azuki, Hattori Tuyoshi, Katano Yumi, Ishihata Akira, The aging effect on the detrusor muscle serotonergic contraction in rats, 32nd Annual European Association of Urology

Congress, 2017.3.26. (London,
ExCeL London)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高梨 あさき (TAKANASHI ,Asaki)
順天堂大学・医療看護学部・講師
研究者番号 : 60567361

(4)研究協力者

酒井 亜月 (SAKAI AZUKI)
山形大学 大学院 医学系研究科看護学専攻
菅野純果 (KANNO Sumika)
山形大学 大学院 医学系研究科看護学専攻
後藤 のぞみ (Goto Nozomi)
山形大学 大学院 医学系研究科看護学専攻