

筑波大学

博士（医学）学位論文

ラットにおける加齢に伴う腹圧性尿失禁
(Stress urinary incontinence; SUI) の発生と
その科学的背景に関する考察
—SUI 病態モデルとしての可能性検討—

2017

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

稲村 広子

目次

略語一覧	1
諸言	2

第1章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿漏出時圧の変化

1. 序論	6
2. 実験方法	
2-1. 3, 12 及び 24 ヲ月齡ラットを用いた尿漏出時圧 (LPP) 測定	6
2-2. 21 及び 28 ヲ月齡ラットを用いた尿漏出時圧測定	7
3. 実験結果	
3-1. 3, 12 及び 24 ヲ月齡ラットを用いた尿漏出時圧 (LPP) 測定	8
3-2. 21 及び 28 ヲ月齡ラットを用いた尿漏出時圧測定	8
4. 考察	9

第2章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿道機能の変化

1. 序論	11
2. 実験方法	
2-1. 外尿道括約筋の機能評価	11
2-2. 尿道平滑筋の機能評価	12
3. 実験結果	
3-1. 外尿道括約筋の機能評価	13
3-2. 尿道平滑筋の機能評価	14
4. 考察	15

第3章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿道病理組織学的変化

1. 序論	17
2. 実験方法	
2-1. 尿道組織切片作製及び病理組織学的評価	17
2-2. 外尿道括約筋（EUS）組織切片作製及び蛍光免疫染色	18
2-3. 蛍光免疫二重染色標本画像の定量化	19
3. 実験結果	
3-1. 尿道における病理組織学的評価	20
3-2. 外尿道括約筋（EUS）の蛍光免疫染色像の評価	21
4. 考察	22

第4章 老齢ラットの尿道機能に対する duloxetine の作用

1. 序論	25
2. 実験方法	26
3. 実験結果	26
4. 考察	27

第5章 総括

参考文献	31
------	----

謝辞	37
----	----

略語一覧

BSA	bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
CSA	cross sectional area (筋線維径)
EUS	external urethral sphincter (外尿道括約筋)
LPP	leak point pressure (尿漏出時圧)
MUI	mixed urinary incontinence (混合性尿失禁)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PNS	pudendal nerve stimulation (陰部神経刺激)
QOL	quality of life (生活の質)
S.E.M.	standard error of mean (標準誤差)
SNRI	serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬)
SUI	stress urinary incontinence (腹圧性尿失禁)
UPP	urethral perfusion pressure (尿道灌流内圧)
UUI	urge urinary incontinence (切迫性尿失禁)

緒言

尿失禁とは、狭義的には自分の意志とは関係なく尿が漏れてしまうことを指し、広義的には尿が漏れてしまうことより社会的・衛生的に支障を生ずるものと定義づけられる。尿失禁は大きく3つのタイプに分類され、それぞれ腹圧性尿失禁、切迫性尿失禁および混合性尿失禁と呼ばれる。腹圧性尿失禁（Stress urinary incontinence ; SUI）は、咳、くしゃみ、笑う、運動などの急激な腹圧上昇時に不随意に尿が漏れ出てしまう症状である（Abrams P et al., 2002）。切迫性尿失禁（Urge urinary incontinence ; UII）は、突然強い尿意（尿意切迫感）に襲われて、トイレに間に合わずに漏らしてしまう症状である。混合性尿失禁（Mixed urinary incontinence ; MUI）は、上記2つの尿失禁が混在するタイプの症状であり（Haylen BT et. al., 2010）、いずれのタイプの尿失禁も生活の質（Quality of Life ; QOL）を著しく損ねる疾患である（Table 1）。尿失禁の中でも SUI は女性の尿失禁に多く見られるタイプであり、女性の約35%が罹患しているとの報告がある（Thom D, 1998）。現行の治療方法としては、骨盤底筋体操と呼ばれる行動療法、主に外尿道括約筋の収縮力を高めて尿道を閉める薬物療法及び尿道の支持組織を補強する外科手術法があるが、行動療法及び薬物療法による治療効果は十分ではなく、また外科手術法では侵襲性が強く、合併症のリスクを有することから、SUIは未だ満たされない医療ニーズの高い疾患であると考えられる。

Table 1. Types of urinary incontinence（尿失禁の分類）

疾患	症状
腹圧性尿失禁（Stress urinary incontinence ; SUI）	くしゃみ、笑い、運動などの急激な腹圧上昇時に不随意に尿が漏れ出てしまう症状
切迫性尿失禁（Urge urinary incontinence ; UII）	突然強い尿意（尿意切迫感）に襲われて、トイレに間に合わずに漏らしてしまう症状
混合性尿失禁（Mixed urinary incontinence ; MUI）	上記2つの尿失禁症状が混在するタイプ

尿禁制を維持するために必要な尿道抵抗は、外尿道括約筋 (external urethral sphincter ; EUS) および尿道平滑筋の収縮により起こることが知られている。これらの筋肉を収縮させる生理機能として、自律神経および体性神経の 2 種の神経反射が存在する。一つは自律神経の神経反射であり、蓄尿時における膀胱の進展刺激に起因し、下腹神経に繋がる交感神経の節前神経細胞を興奮させ、膀胱に存在する β 受容体を介して膀胱平滑筋を弛緩させるとともに、尿道平滑筋に存在する α_1 受容体を介して尿道平滑筋収縮を惹起する。もう一つは、咳、くしゃみ、運動時に認められるような急激な膀胱内圧 (腹圧) 上昇時に働く体性神経を介した反射である。この急激な腹圧上昇時には、骨盤神経の求心性神経を介して仙髄に存在するオヌフ核が興奮し、遠心性の体性神経である陰部神経が興奮して EUS が収縮することが知られている。これらの神経反射並びに膀胱、尿道組織が正常に機能することにより尿禁制は維持されているが、SUI 患者の尿道では、尿道抵抗に寄与する神経の障害や組織の脆弱化により尿禁制が維持できない状態になっていると考えられる (Figure 1)。

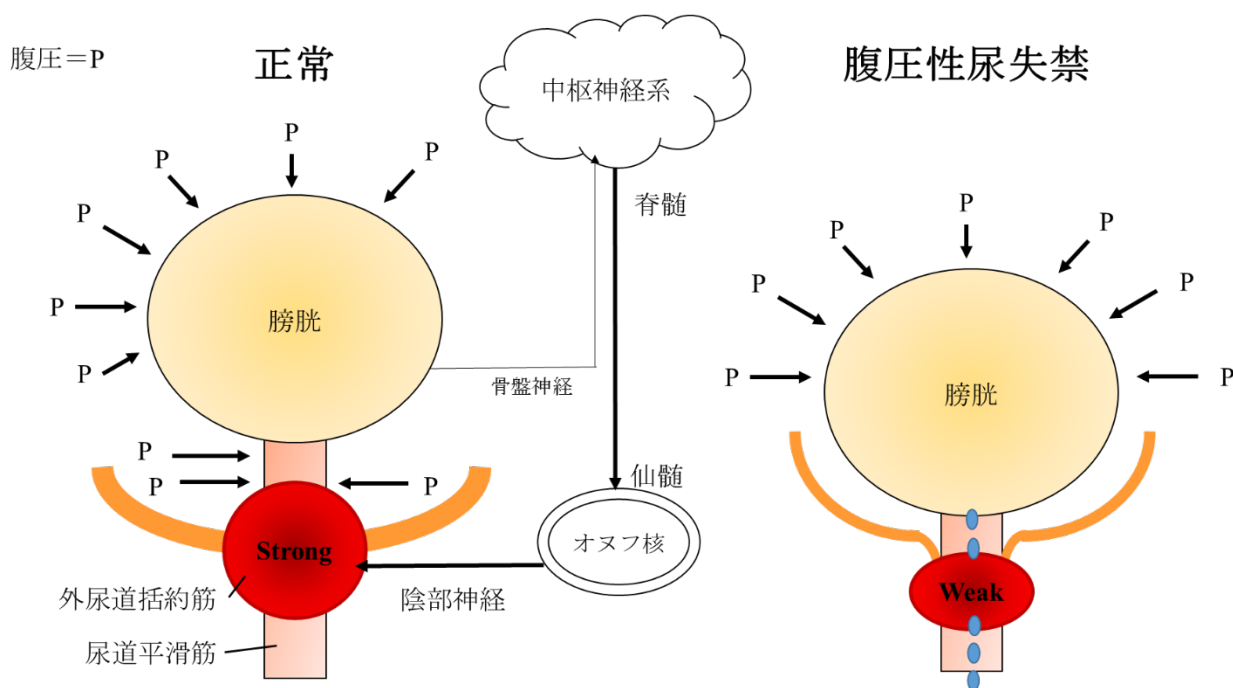


Figure 1. Mechanism of maintaining urinary continence under normal or stress urinary incontinence (SUI)

加齢は妊娠、出産、肥満と並ぶ尿失禁のリスクファクターの一つであることが知られており (Elving LB et. al., 1989; Hunskaar S et. al., 2000)、加齢に伴い蓄尿期の最大尿道閉鎖圧が低下することや、加齢が SUI の発症や重症度に関連していることが報告されている (Rud T, 1980; Hilton P and Stanton SL, 1983)。また、加齢に伴う尿道の EUS 筋線維数の減少並びに EUS 層の薄層化 (Carlile A et. al, 1988; Perucchini D et. al, 2002a and 2002b) などの組織学的な変化や、安静時における膀胱頸部・近位尿道の開大、尿道支持組織の脆弱化に伴う臓器位置の下垂などの物理的な要因に基づく組織学的な変化が起こっていることも報告されており (Kalejaiye O et al., 2015)、SUI の病態発生には複数の要因が関連していると考えられる。SUI の動物モデルとしては、尿道括約筋を支配している神経を外科的に損傷あるいは部分切断することにより作製されたモデル動物や (Chermansky CJ et al., 2004)、子宮内に挿入したバルーンカテーテルを膨張させて子宮を拡張した Vaginal distention (VD) モデル動物 (Lin ASet al., 1998; Cannon TW et al., 2002; Kaiho Yet al., 2007)、尿道を支持組織から全剥離した Urethrolisis モデル動物 (Rodriguez et al., 2005)、尿道周囲組織を焼灼して作製されたモデル動物 (Chermansky et al., 2004) などが研究に用いられている。これら公知のモデル動物は、いずれも外科的処置を行って神経や筋肉の損傷を起こしていることから、必ずしもヒトの病態のすべての側面を反映しているとは言い難い。近年、出産を経験した 14 ヶ月齢のリタイアラットを用いた実験において、くしゃみ誘発尿漏出時圧 (Leak point pressure ; LPP) 及び尿道平滑筋収縮圧のベースライン低下が認められたことから、加齢に伴い尿道機能が低下することが報告されたが (Sumino Y et. al., 2013)、加齢に伴う尿道の組織学的な変化は検討されていない。さらに 14 ヶ月齢以上の高齢ラットでの尿道機能並びに組織学的な変化は未だ明らかにされておらず、SUI のリスクファクターの要素を持つと考えられる高齢ラットが SUI のモデル動物になり得るか検討した十分な報告はない。

そこで、本研究において様々な月齢の雌性バージンラットの尿道機能を比較して尿道機能が著しく低下する月齢を見出し、尿道抵抗に寄与し、薬物治療アプローチのターゲットになり得ると考えられる EUS 並びに尿道平滑筋の機能及び組織学的な若齢と老齢の違いを明らかにした。更に高齢ラットにおける尿漏出時圧に対する薬剤の反応性を検討するこ

とで、老齡ラットがヒトへの外挿性を有する SUI のモデル動物になり得るか否かを検証した。

第1章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿漏出時圧の変化

1. 序論

腹圧性尿失禁 (SUI) のリスクファクターとして、妊娠、出産、加齢、肥満、骨盤底筋の手術などが知られており (Stothers L and Friedman B., 2011)、その中でも加齢は女性の尿道括約筋機能の低下と関連しているとの報告がある (Rud T, 1980; Zimmern P et al., 2014)。動物では、繁殖に利用した動物である雌性リタイアラットにおいて、加齢に伴うくしゃみ誘発尿漏出時圧 (LPP) の低下が報告されているものの (Sumino Y et al., 2013)、尿道の組織学的な変化は検討されていない。また前述の出産を経験したリタイアラットとは異なる背景を有するバージンラット (出産経験無し) において、加齢という単一の要因による尿道機能並びにその尿道の組織学的な変化を検討した報告もない。そこで、雌性バージンラットを用いて、3 ヶ月齢の若齢ラットを対照群とした時に、明確な尿漏出時圧 (LPP) 低下が認められる月齢を明らかにするために、経月齢的に尿漏出時圧を測定した。

2. 実験方法

2-1. 3, 12 及び 24 ヶ月齢ラットを用いた尿漏出時圧 (LPP) 測定

尿漏出時圧を測定する動物の時点設定は、Kitta ら (2016) が報告した尿道機能に対する加齢と卵巣摘出の影響を評価する為に用いたラットの月齢 (3 及び 12 ヶ月齢ラットをそれぞれ若齢及び中年齢ラットと定義) を参考にした。また高齢ラットとして 24 ヶ月齢を用いることで、3, 12 及び 24 ヶ月齢ラットをそれぞれ若齢、中年齢及び高齢として実験に供することとした。

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下にて、SD (Sprague-Dawley) 系雌性ラット (3, 12 および 24 ヶ月齢、日本エスエルシー、体重; 3 ヶ月齢: 240–275 g、12 ヶ月齢: 362–427 g、24 ヶ月齢: 473–565 g、各群 8 匹) の下腹部を正中切開して膀胱を露出させ、膀胱頂部を切開し、カテーテル (PE-100) を挿入後膀胱頂部に糸で結紮し、閉腹した。ラットは仰向けに実験台に寝かせ、膀胱頂部に固定したカテーテルと三方活栓を介し

て、一方はシリンジポンプ（テルモ）に連結し、他方は圧トランスデューサー（日本光電）を介してひずみ圧力用アンプ（日本光電）に接続し膀胱内圧を測定した。カテーテルを介し膀胱内に生理食塩水を注入し、外尿道口から漏れが認められるまでの注入量を膀胱容量とした。膀胱内を空にし、膀胱容量の 75% の生理食塩水を再度膀胱内に注入し、膀胱内圧測定を開始した。基礎圧が安定したところで、腹部を 50 mL 遠心チューブの蓋の部分でゆっくりと押し、尿道口から漏れが認められるまで膀胱内圧を上昇させた。漏れが認められた時点の膀胱内圧を尿漏出時圧（LPP）とした。実験中は漏れ出た分の生理食塩水を補うため、膀胱に生理食塩水を 0.3 mL/hr の流速で注入した。約 1-2 分間隔で尿漏出時圧を 5-6 回測定し、最後の 3 回の尿漏出時圧の平均値をその個体の尿漏出時圧とした。ただし、最後の 3 回の尿漏出時圧を測定した際に、3 回目の尿漏出時圧が先の 2 回の尿漏出時圧と顕著に異なった場合は除外し、先の 2 回の尿漏出時圧の平均値をその個体の尿漏出時圧とした。

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析は 3, 12 および 24 ヶ月群との比較に実測値を用いて Bonferroni の多重比較検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意な差とした。

2-2. 21 及び 28 ヶ月齢ラットを用いた尿漏出時圧測定

尿漏出時圧（LPP）が明確に低下する月齢を検証するため、24 ヶ月前後の時点である 21 及び 28 ヶ月齢ラットを用いて、尿漏出時圧測定を行った。

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下にて、SD 系雌性ラット (21 及び 28 ヶ月齢、日本エスエルシー、体重及び使用匹数；21 ヶ月齢：476 – 543 g 及び 8 匹、28 ヶ月齢：520 – 664 g 及び 3 匹) の下腹部を正中切開して膀胱を露出させ、2-1 と同様な手術を施し、2-1 と同様な手法で尿漏出時圧を測定した。

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。21 ヶ月齢ラットの尿漏出時圧は、2-1 で評価した動物群と測定時期が異なることから、2-1 で評価した動物群との有意差検定を行うことは不適切と考えられる。また 28 ヶ月齢ラットは生存率が低く、評価に使用できる動物数に限りがあり、有意差検定するには不十分な例数と考えられるため、2-1 で評価した動物群との有意差検定は行わなかった。ただし、これまでの検討から本評価系は安定した測定値が

得られることが確認できているため、実測値を確認することで結果を評価することが出来ると考える。

3. 実験結果

3-1. 3, 12 及び 24 ヶ月齢ラットを用いた尿漏出時圧 (LPP) 測定

明確な尿漏出時圧低下が認められる月齢を明らかにする為に、3, 12 および 24 ヶ月齢の雌性 SD ラットを用いて、尿漏出時圧を測定した。その結果、3, 12 および 24 ヶ月齢ラットそれぞれの尿漏出時圧は、 49.2 ± 2.6 , 46.9 ± 1.9 および 37.3 ± 1.6 mmHg であり、尿漏出時圧は経月齢的に低下し、24 ヶ月齢において有意な低下を示した ($P < 0.01$) (Figure 2)。一方で、3 および 12 ヶ月齢群間の尿漏出時圧に有意な差は認められなかった。

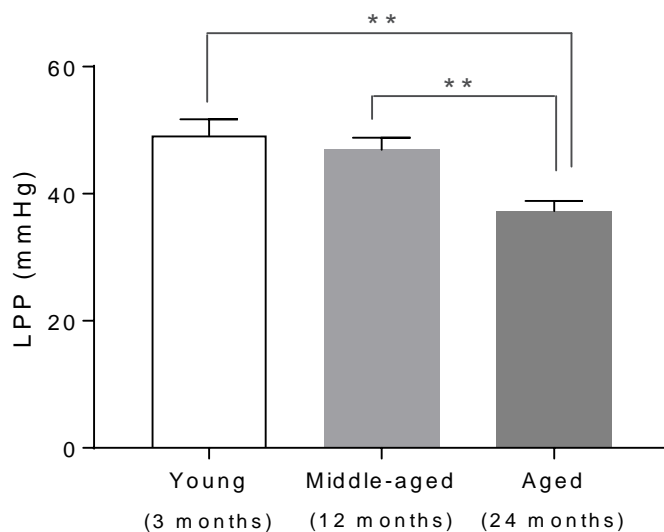


Figure 2. Leak point pressure (LPP) in 3 (young), 12 (middle-aged) and 24-months-old (aged). Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism ver. 7.01 (mean \pm S.E.M., n = 8).

** P < 0.01 (Bonferroni's multiple comparison test)

3-2. 21 及び 28 ヶ月齢ラットを用いた尿漏出時圧測定

3-1 の結果より、尿漏出時圧 (LPP) は経月齢的に低下することが示され、24 ヶ月齢において有意な尿漏出時圧低下が認められた。そこで 24 ヶ月齢の尿漏出時圧が最も低下した時

点であるかどうかを検証するために、24 ヶ月前後の月齢となる 21 並びに 28 ヶ月齢の雌性ラットを用いて、3-1 と同様な手法で尿漏出時圧を測定した。その結果、21 並びに 28 ヶ月齢の尿漏出時圧は、 43.2 ± 1.4 並びに 36.4 ± 2.9 mmHg であり、21 ヶ月齢では 24 ヶ月齢の LPP (37.3 ± 1.6 mmHg) より高く、28 ヶ月齢では 24 ヶ月齢の LPP と同程度であった。

4. 考察

本章では、3 ヶ月齢の若齢ラットを対照群とした時に、雌性バージンラットにおける加齢による尿漏出時圧 (LPP) への影響を明らかにするために、様々な月齢のラットを用いて尿漏出時圧測定を行った。

尿漏出時圧評価の時点は、Kitta ら (2016) が 3 及び 12 ヶ月齢ラットをそれぞれ若齢及び中年齢ラットに設定していることを参考にし、更にげっ歯類において繁殖期が終了した月齢と考えられる 24 ヶ月齢を老齢ラットに設定した。3, 12 及び 24 ヶ月齢ラットの LPP を比較すると、経月齢的に尿漏出時圧が低下し、3 及び 12 ヶ月齢の LPP と比較して 24 ヶ月齢の尿漏出時圧は有意に低下した。そこで、本時点が 3 ヶ月齢と比較して最も尿漏出時圧が低下した時点か否かを検証するため、24 ヶ月前後の時点である 21 ヶ月並びに 28 ヶ月齢ラットを用いて尿漏出時圧を測定した。その結果、21 ヶ月齢ラットの尿漏出時圧は 24 ヶ月齢よりわずかに高く、21 ヶ月の時点は尿漏出時圧低下の通過点の段階であると考えられた。また 28 ヶ月齢ラットの尿漏出時圧は 24 ヶ月齢とほぼ同程度であったことから、28 ヶ月齢ラットの尿漏出時圧は 24 ヶ月齢ラット同様、最も尿漏出時圧が低下した時点と考えられる。一方で、24 から 28 ヶ月にかけて動物の状態悪化 (衰弱など) が著しく生存率が低下し、評価に使用できる動物数が制限された (本試験における使用可能匹数, $n=3$)。尿道機能低下の程度並びに動物の状態などを総合的に考えると、24 ヶ月齢が老齢ラットとして様々な検討を行う時点として最も適当であると考えられた。以上より、24 ヶ月齢を老齢ラット、並びに 3 ヶ月齢を若齢ラットと定義し、これらの月齢の動物を以降の検討に供した。

これまでヒト並びに動物において加齢と尿道閉鎖圧の低下の関連性を示唆する報告はあるものの、本研究のようにラットの機能評価時点を細かく設定し、経時変化を示した研究

はない。本研究結果はヒトと同様に雌性ラットの尿道機能が加齢と共に低下していることを示唆しており、今後、加齢と尿道機能の関係を研究する上で非常に重要な情報になり得ると考える。

第2章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿道機能の変化

1. 序論

尿道は主に粘膜、外尿道括約筋（external urethral sphincter ; EUS）層、尿道平滑筋層及び結合組織から構成され（Lim SH et al., 2013）、尿禁制の維持に EUS と尿道平滑筋が大きく関与していることが知られている。SUI 患者において、EUS 収縮のアウトプットを反映していると考えられる最大尿道閉鎖圧（maximum urethral closure pressure: MUCP）が加齢に伴って低下する（Kapoor DS et. al., 2012）ことや尿道平滑筋の収縮力低下が報告されており、また動物モデルにおいても同様な報告がある。そこで、老齢ラットの尿漏出時圧（LPP）低下の要因を検討する目的で、尿禁制維持に寄与している EUS 及び尿道平滑筋をそれぞれ単独で機能評価が可能な実験系を用いて、若齢及び老齢ラットの尿道機能を評価した。EUS の機能評価には、脊髄から EUS に投射し、EUS の収縮を司る体性神経である陰部神経（pudendal nerve）を実験的に電気刺激することで EUS 収縮を惹起し、その時の尿道内圧（pudendal nerve stimulation [PNS]-induced urethral pressure）の上昇を測定する評価系を用いた（le Feber J and van Asselt E, 1999）。一方、尿道平滑筋の機能評価には、 $\alpha 1$ 受容体を選択的に活性化し、平滑筋への収縮作用を有するフェニレフリンを用いて尿道内圧（urethral perfusion pressure）の上昇を測定する評価系を用いた（Kurihara R et. al., 2016）。

2. 実験方法

2-1. 外尿道括約筋の機能評価

Urethane（1.2 g/2mL/kg, 皮下投与）麻酔下にて、SD 系雌性ラット（日本エスエルシー、体重及び使用匹数 ; 3 ヶ月齢 233 – 254 g 及び 6 匹、24 ヶ月齢 412 – 674 g 及び 6 匹）の下腹部を正中切開して膀胱を露出し、尿道内圧測定用にひずみ圧力用アンプ（日本光電）に接続した 2.5 F センサーチップ圧トランスデューサーカテーテル（Millar Inc.）を外尿道口から尿道へ挿入した。ラットを伏臥位にし、背下部の皮膚及び筋肉を切開し陰部神経を露出させた。露出した陰部神経に刺激用電極を留置し、電気刺激装置（日本光電）による電

電気刺激により尿道内圧上昇反応を惹起した。電気刺激（パルス幅：1 msec、刺激頻度：40 Hz、刺激時間：400 msec）による尿道内圧上昇反応を惹起し、最大の尿道内圧上昇反応が得られるポイントにカテーテルを留置させた。個体ごとに最大付近の尿道内圧上昇反応収縮力が得られる電圧を設定し、5 Hz から 160 Hz までの電気刺激（パルス幅：1 msec、刺激時間：400 msec）を約 60 秒間隔で行い、尿道内圧上昇の頻度依存性反応を得た（Figure 3）。各電気刺激時点における最大尿道内圧からベースライン尿道内圧を差し引くことで、尿道内圧上昇反応値を算出した。

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析は最大尿道内圧上昇反応における若齢群と老齢群との比較に Student の t 検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意な差とした。

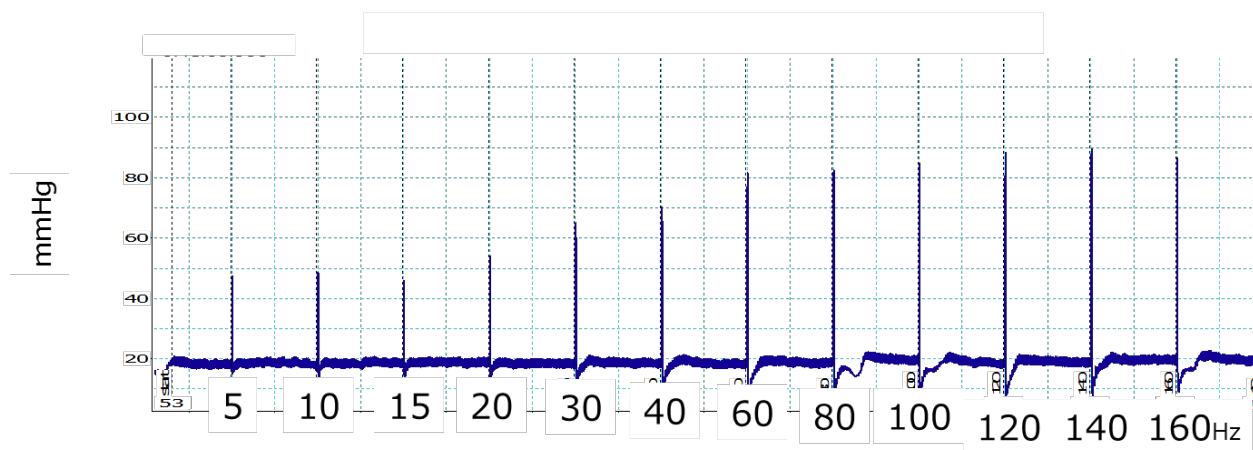


Figure 3. Typical chart of pudendal nerve stimulation (PNS)-induced elevation of urethral pressure

2-2. 尿道平滑筋の機能評価

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下にて、SD 系雌性ラット（日本エスエルシー、体重及び使用匹数；3 ヶ月齢 282 – 305 g 及び 8 匹、24 ヶ月齢 384 – 623 g 及び 8 匹）の下腹部を正中切開して膀胱を露出させ、膀胱頂部を切開し、カテーテル（PE-50）を膀胱より尿道内へ挿入し、先端が膀胱頸部から近位尿道付近に位置するように糸で尿道周囲を結紮し固定した。PE-50 カニューレを介して尿道内へ 4.5mL/hr の流速にて生理食塩水を注入しながら圧トランスデューサー（日本光電）を介してひずみ圧力用アンプ（日本光電）に接続し、尿道内圧（urethral Perfusion Pressure；UPP）を測定した。また、フェニレフ

リン投与のため、大腿静脈にカテーテル（PE-50）と連結した注射針を留置した。

安定化期間の後にフェニレフリン（0.03 mg/mL/kg）を静脈内に投与し、フェニレフリン投与後の尿道内圧を測定した（Figure 4）。フェニレフリン投与後の最大尿道内圧からフェニレフリン投与前の尿道内圧を差し引くことで、フェニレフリンに対する尿道内圧の最大変化値を算出した。

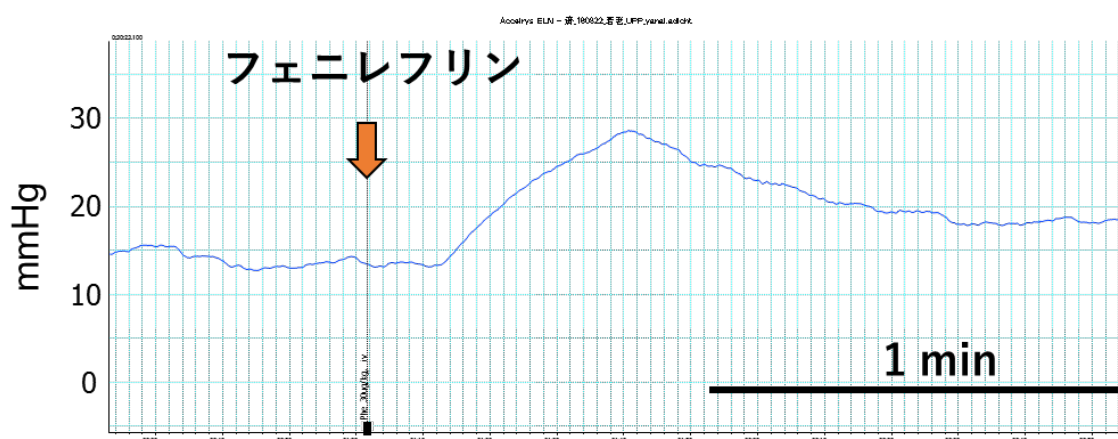


Figure 4. Typical chart of urethral perfusion pressure (UPP) before and after phenylephrine administration

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析は若齢群と老齢群との比較にはフェニレフリンに対する尿道内圧の最大変化値を用いて Student の t 検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意な差とした。

3. 実験結果

3-1. 外尿道括約筋の機能評価

陰部神経無刺激時の尿道内圧（ベースライン尿道内圧）は、若齢ラット並びに老齢ラットでそれぞれ 15.5 ± 2.1 並びに 13.7 ± 1.5 mmHg であり、両群間に差は認められなかった。次に、陰部神経を 5~160Hz の頻度で電気刺激した結果、若齢及び老齢ラットともに頻度依存的な尿道内圧の上昇が認められたが（Figure 5A）、老齢ラットの PNS 誘発時の最大尿道内圧（ 71.4 ± 0.8 mmHg）は、若齢ラットの最大尿道内圧（ 96.0 ± 4.4 mmHg）より有意に低

かった (Figure 5B)。

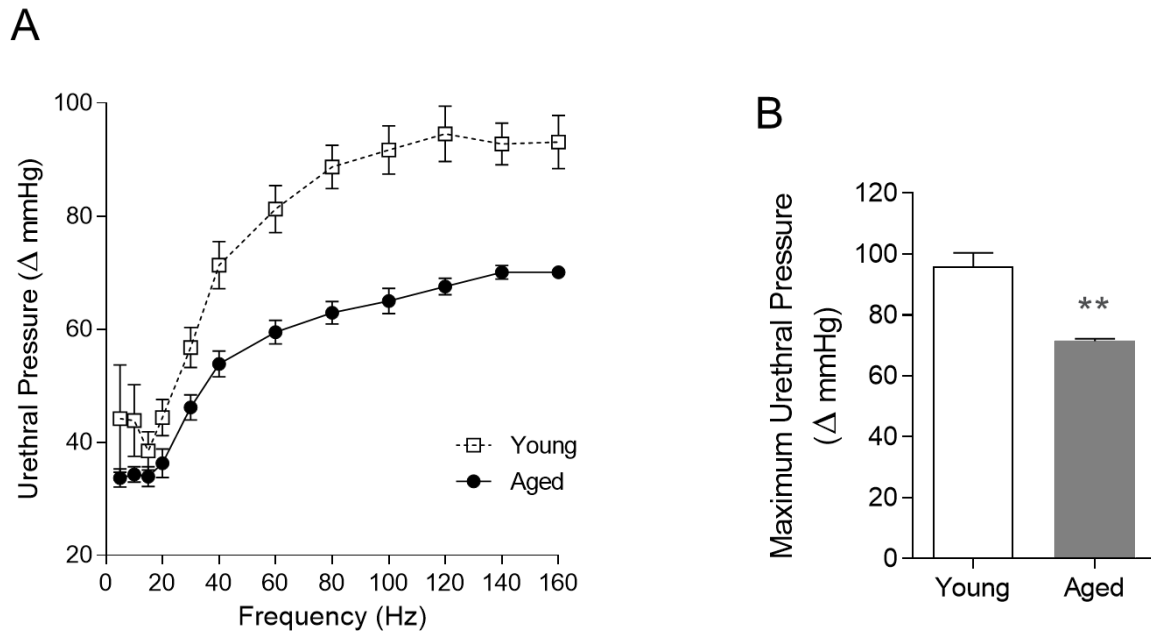


Figure 5. Urethral pressure in response to electrical stimulation of the pudendal nerve in young (3 months old) and aged (24 months old) female rats. (A): Urethral pressure in young and aged rats following stimulation of the pudendal nerve at different frequencies. (B): Maximum urethral pressure by pudendal nerve stimulation in young and aged rats. Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism ver. 7.01 (mean \pm S.E.M., n=6). ** P < 0.01 (Student's t-test)

3-2. 尿道平滑筋の機能評価

フェニレフリン投与前のベースライン尿道内圧は、若齢及び老齢群の間で有意な差は認められなかった (若齢: 17.6 ± 1.7 mmHg、老齢: 16.6 ± 1.7 mmHg) ($p=0.68$, data not shown)。また、フェニレフリン投与後の尿道内圧上昇の程度も両群で差は認められなかった (若齢: 9.7 ± 1.3 mmHg、老齢: 10.9 ± 1.3 mmHg) ($p=0.53$, Figure 6)。

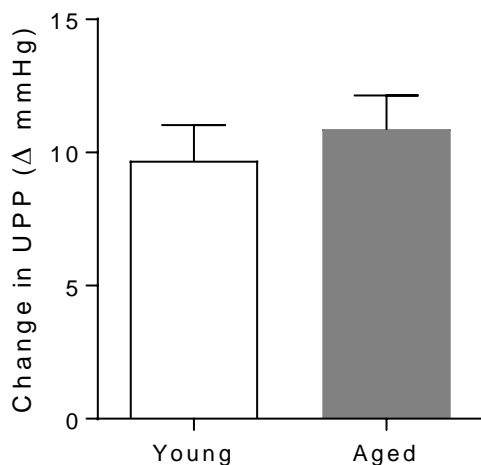


Figure 6. The contractile response of smooth muscle induced by phenylephrine was measured as a change in urethral perfusion pressure (UPP) in young (3 months old) and aged (24 months old) female rats. Change in UPP (delta mmHg) was calculated by subtracting baseline UPP just before phenylephrine (0.03 mg/kg) administration from the maximum UPP after intravenous administration of phenylephrine. Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism ver. 7.01 (mean \pm S.E.M., n=8). There was no significant difference in UPP elevation after intravenous administration of phenylephrine between young and aged female rats (Student's t-test).

4. 考察

本章では、老齡ラットの尿漏出時圧 (LPP) 低下の要因を検討する目的で、尿禁制維持に寄与している EUS 及び尿道平滑筋をそれぞれの成分ごとに機能が評価可能な実験系を用いて、若齡及び老齡ラットの尿道機能を検討した。

EUS の収縮機能を評価したところ、陰部神経誘発尿道内圧上昇反応 (PNS-induced urethral pressure) は若齡及び老齡ラットともに頻度依存的に上昇したが、群ごとの最大尿道内圧上昇反応は若齡ラットと比較して老齡ラットの方が有意に小さく、同じ刺激頻度に対する老齡ラットの反応性は若齡と比較して弱いことが明らかとなった。臨床において、急激な腹圧上昇時の尿道収縮能、すなわち EUS の収縮能が評価可能な手法の一つである valsalva 法による尿道内圧 (Valsalva leak point pressure ; VLPP) を測定すると、老齡女性の VLPP が低

下していることが報告されている (Zimmern P et al., 2014)。またラットにおいても臨床と同様な EUS 収縮能の評価系と考えられるくしゃみ誘発尿漏出時圧 (LPP) 測定系で検討され、結果も臨床と同様に加齢に伴う尿漏出時圧の低下が報告されている (Sumino Y et al., 2013)。これまでの報告と本研究結果から、老齢ラットの EUS 収縮能は低下していることが考察された。

次に、フェニレフリン誘発尿道灌流圧上昇 (phenylephrine-induced increase of UPP) 測定系を用いて、尿道平滑筋の機能を評価した。蓄尿期の尿道平滑筋の収縮は主にアドレナリン $\alpha 1$ 受容体によって制御されており、フェニレフリンは多くの研究においてアドレナリン $\alpha 1$ 受容体刺激薬として用いられ、尿道平滑筋の収縮を惹起することが知られている。また、フェニレフリンは静脈内投与により尿道内圧を上昇させ、フェニレフリン 0.03 mg/kg が用量反応曲線の submaximal dose にあたる用量であることは検討済みである (data not shown)。そこで、フェニレフリン 0.03 mg/kg を静脈内投与することで若齢及び老齢ラットの尿道平滑筋を収縮させ、その収縮能の差を比較した。結果として、フェニレフリン投与前のベースライン尿道内圧、並びに投与後のフェニレフリンに対する尿道内圧の最大変化量において、若齢及び老齢ラットの間には差はなかった。一方で、Sumino ら (2013) は、センサーチップ圧トランスデューサーカテーテルを用いて、3 ヶ月及び 14 ヶ月齢リタイアラットにおけるくしゃみ誘発腹圧上昇時のセンサーチップ部位における尿道内圧を測定し、尿道平滑筋の収縮能の評価指標として用いているベースライン尿道内圧が 14 ヶ月齢ラットにおいて低下していることを報告している。臨床及び非臨床において、尿道平滑筋の収縮能は加齢による影響を受けないとする報告もあれば、加齢により尿道平滑筋の収縮力が低下するという報告も存在する (Carlile A et al., 1988; Clobes A et al., 2008; Sumino et al., 2013) ことから、加齢による尿道平滑筋の機能低下の有無には議論の余地が残り、本研究結果とこれまでの報告との間には尿道内圧の測定法並びに尿道内圧上昇の惹起方法などの評価手法の違いがあるため、このような結果の差が生じたのかもしれない。

以上より、老齢ラットの尿漏出時圧の低下には、EUS 収縮成分の減弱が寄与している可能性が考察された。

第3章 雌性ラットにおける加齢に伴う尿道病理組織学的変化

1. 序論

前章までに述べたように、尿道機能の低下と加齢の関連性についてはヒト及びラットにおいて報告されており、また本研究結果においても、加齢に伴う尿漏出時圧 (LPP) 並びに EUS の収縮力の低下が認められた。そこで尿道機能低下が認められた 24 ヶ月齢の雌性ラットの尿道において、機能低下に関わる何らかの組織学的な変化が生じている可能性を推測した。ヒト 5 週齢において、尿道組織に対する括約筋量が 87.6% であるのに対し、91 歳においては 34.2% 程度に減少していること (Strasser H et al., 2000) や、加齢に伴う EUS 筋線維の数や密度の低下、並びに EUS 筋線維径の増大と EUS 筋層の厚みの減少に相関が認められることが報告されている (Perucchini D et al., 2002a)。また、加齢に伴い尿道平滑筋層の厚みの減少が起こっているという報告もある (Clobes A et al., 2008)。このように、ヒトにおいて加齢に伴う尿道機能の低下と尿道の組織学的な変化が関連していることが示される一方で、ラットにおいては加齢に伴う尿道の組織学的な変化を検討した報告はない。そこで、老齢ラットの尿道組織を単離し、病理組織学的評価及び免疫組織学的な評価を実施し、若齢ラットとの比較を行った。

2. 実験方法

2-1. 尿道組織切片作製及び病理組織学的評価

Isoflurane 麻酔下にて、SD 系雌性ラット (日本エスエルシー、体重及び使用匹数 ; 3 ヶ月齢 258 – 281 g 及び 5 匹、24 ヶ月齢 436 – 671 g 及び 5 匹) を安楽死させた後、膀胱を付けたまま尿道組織を摘出した。摘出した組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液で 24 時間組織固定後、中和し実験に供した。パラフィン固定した尿道組織は、尿管開口部から 4mm 地点にマーキングし、尿管開口部から 4 mm、4.5 mm、5 mm、5.5 mm、6 mm、6.5 mm、7 mm 及び 7.5 mm の間隔でミトクロームにて 3~4µm の厚みの切片を輪層方向に切り出し (Figure 7)、スライドガラスに貼付後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) 並びに

マッソントリクローム染色（MT 染色）を実施した。HE 染色像を鏡検し、個体ごとに EUS 筋層が最も厚い切片を用いて病理組織学的評価を行った。評価対象は、粘膜、EUS 層、尿道平滑筋層及び結合組織とし、それぞれの組織において若齢群と老齢群との比較を行った。

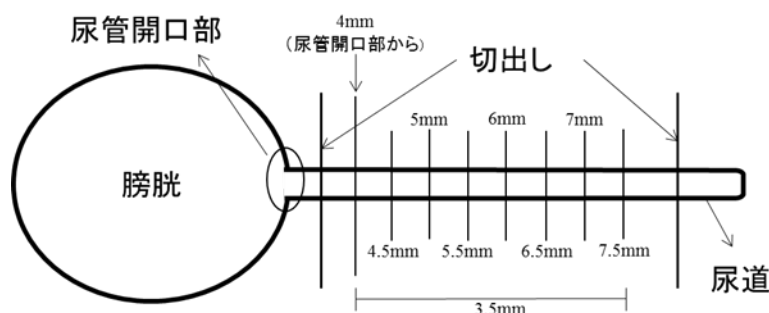


Figure 7. Histocytological preparation in urethra

2-2. 外尿道括約筋（EUS）組織切片作製及び蛍光免疫染色

Isoflurane麻酔下にて、SD系雌性ラット（日本エスエルシー、体重；3ヵ月齢 246 – 266 g、24ヵ月齢 498 – 540 g）を安楽死させた後、子宮を付けたまま尿道組織を摘出した。摘出した組織はリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline；PBS）で洗浄後、O.C.T Compoundを用いて包埋皿（Tissue Tekクリオモールド1号、サクラファインテックジャパン）に包埋し、ドライアイスで冷却したアセトンを用いて凍結した。凍結ブロックはクリオスタット（CryoStar NX70、Thermo Fisher scientific Inc.）を用いて尿道管腔と括約筋層が最も厚く見える位置で矢状方向に5 μ mの厚みで切片を切り出し、アミノシランコートしたスライドガラス（スーパーフロストAPSコートスライドガラス、Matsunami Glass Ind., Ltd.）に貼り付け、免疫組織染色を行った。4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液に室温で15分間浸漬して固定処理を行い、PBSで3回洗浄した。切片は室温下、ブロッキング液（1% Triton-X100及び10% Goat serumを混合したPBS）で60分間処理した後、working buffer（0.3% Triton-X100及び5% Goat serumを混合したPBS）にて希釈したラット抗myosin heavy chain抗体（1:200, eBioscience, Inc.）及びラット抗laminin抗体（1:1000, Sigma-Aldrich, Co. LLC.）を用いて4 $^{\circ}$ Cで終夜インキュベートした。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄

後、二次抗体としてAlexa Fluor[®] 568-labeled goat anti-mouse IgG (1:400, Thermo Fisher Scientific Inc) 及びAlexa Fluor[®] 488-labeled goat anti-rabbit IgG (1:400, Thermo Fisher Scientific Inc) を用いて室温下で1時間インキュベートした。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、切片をVECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories. Inc.) を用いて封入した。

2-3. 蛍光免疫二重染色標本画像の定量化

蛍光免疫二重染色画像は顕微鏡用デジタルカメラ (Digital Sight DS-U3 ; Nikon Corp.) に接続した倒立顕微鏡 (Model TE2000-U microscope ; Nikon Corp.) を用いて、抗 laminin抗体結合部位は緑色に、抗myosin heavy chain抗体結合部位は赤色に発色させ、観察した。各個体の各染色像の中から最も筋層が厚く見える切片を抽出し、その最も筋層の厚い部分の背側並びに腹側を20倍率に拡大し撮影した (若齢 : Figure 8A、老齢 : Figure 8B) 。蛍光免疫二重染色画像はNeurolucida ver. 8.0 (MBF Bioscience)にインポートし、解析に供した。解析はlaminin陽性領域 (緑色) で囲まれたmyosin heavy chain陽性領域 (赤色) を1つの筋管として筋管周囲を手動でトレースし、画像内のEUS筋線維を抽出し、筋繊維径(CSA)及び筋線維数を算出した。

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は若齢群と老齢群との比較には単位面積当たりのEUS筋線維数を用いてStudentのt検定を行い、p値が0.05未満の場合を有意な差とした。

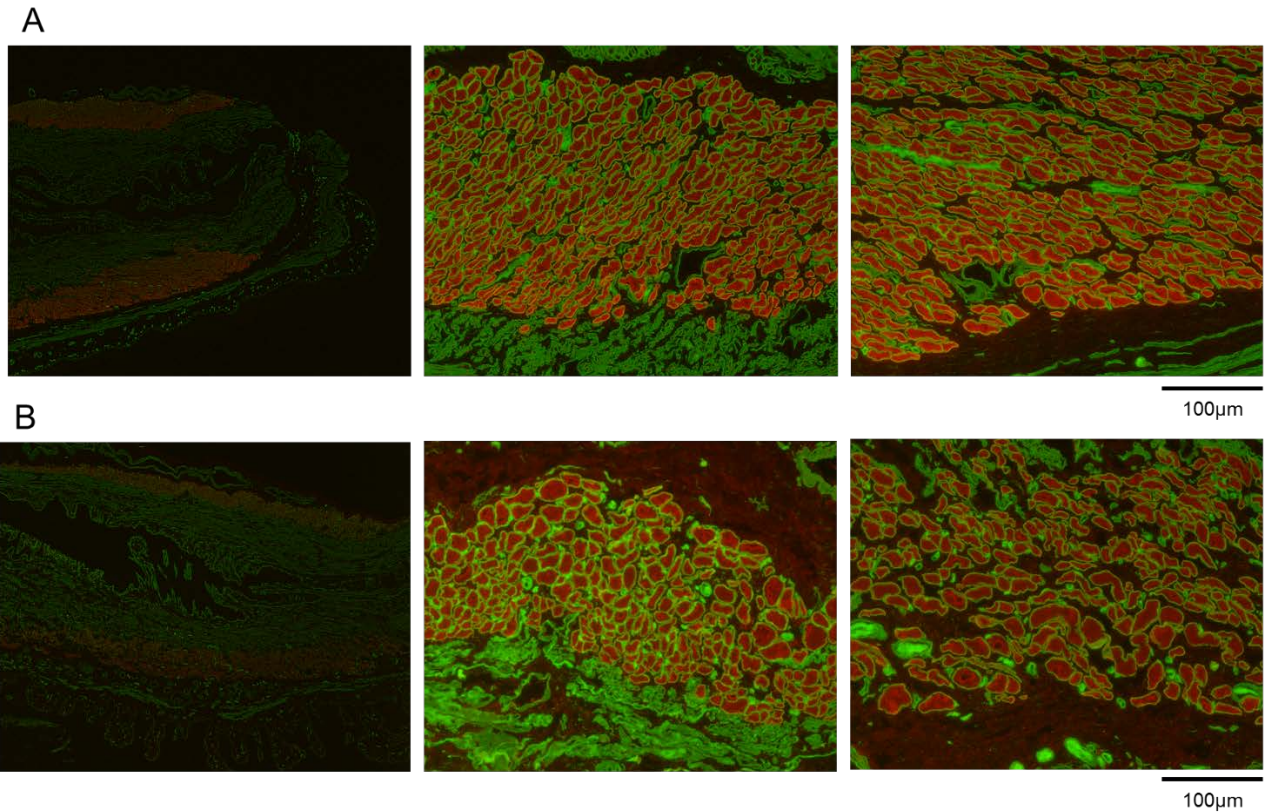


Figure 8. Sections of the urethra of young (3 months old) and aged (24 months old) rats were stained using rat anti-myosin heavy chain antibody (red) and rat anti-laminin antibody (green). Representative images are shown of whole urethral tissue and EUS fibers (identified as anti-myosin heavy chain stained area surrounded anti-laminin stained area) in young (A) and aged (B) rats. Left-hand panels show images of the whole urethra (original magnification $\times 2$); the middle and right-hand panels show images of the ventral and dorsal position of urethra, respectively (original magnification $\times 20$).

3. 実験結果

3-1. 尿道における病理組織学的評価

HE 染色において、若齢及び老齢ラットの尿道粘膜、EUS 層、尿道平滑筋層または結合組織の組織像に顕著な違いは認められなかった。MT 染色においても HE 染色と同じ項目を評価したところ、若齢ラットと比較して老齢ラットの EUS 層の中の結合組織（黄色矢印）の増加が認められた（老齢：Figure 9A、若齢：Figure 9B）。一方、若齢並びに老齢ラットの

尿道平滑筋や粘膜の組織における顕著な相違は認められなかった。

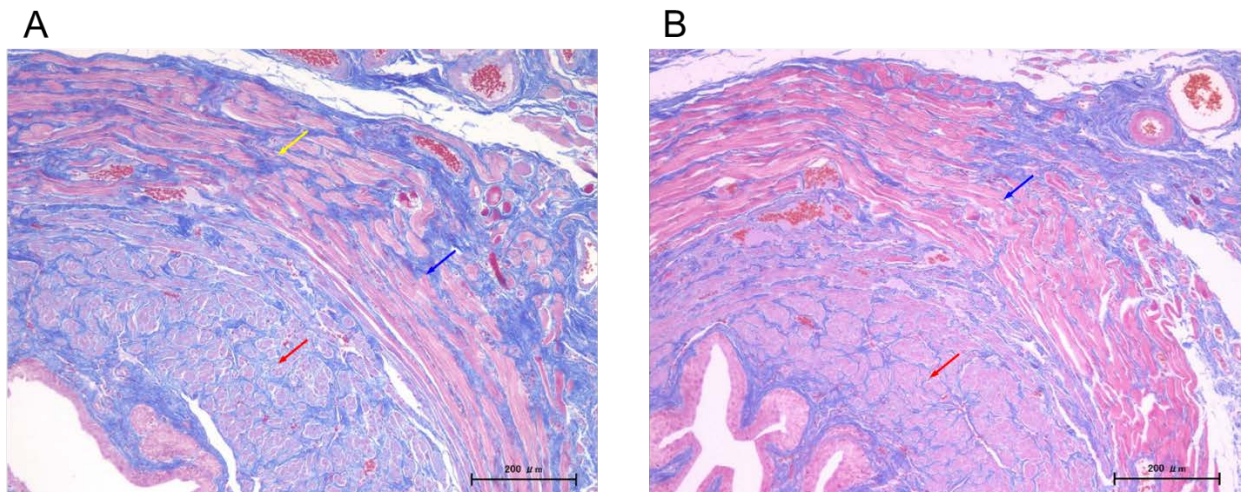


Figure 9. Representative images of Masson's trichrome-stained urethral tissue from (A) aged (24 months old) and (B) young (3 months old) female rats. Red arrows indicate smooth muscle area, blue arrows indicate the external urethral sphincter, and the yellow arrow indicates the extracellular matrix

3-2. 外尿道括約筋 (EUS) の蛍光免疫染色像の評価

骨格筋に特異的に結合する抗 myosin heavy chain 抗体と細胞基底膜に特異的に結合する抗 laminin 抗体による蛍光免疫二重染色によって、尿道組織における EUS 層を識別し (Figure 8A 及び 8B の左側、2 倍率画像)、更に拡大画像を得ることで EUS 筋線維一本ずつの識別を可能にした (Figure 8A 及び 8B の中央及び右側、20 倍率画像)。その結果、老齡ラットの EUS の筋繊維径のヒストグラムは、若齡ラットと比較して右方シフトした (Figure 10A)。若齡及び老齡ラットの EUS の筋繊維径の中央値は、それぞれ 111.3 ± 3.4 及び $150.3 \pm 14.6 \mu\text{m}^2/\text{area}$ であり、加齢に伴い筋繊維径の中央値が増大することが示唆された。また、EUS の筋線維数は、若齡ラットと比較して老齡ラットにおいて統計的に有意な減少が認められ、それぞれ 866.4 ± 27.2 及び $466.0 \pm 92.5 \text{ fibers/area}$ であった (Figure 10B; $p < 0.01$)。

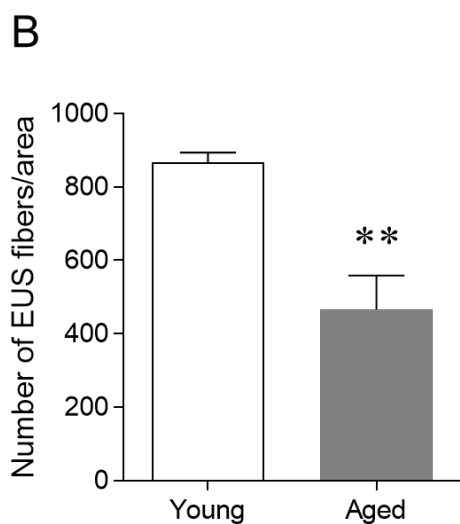
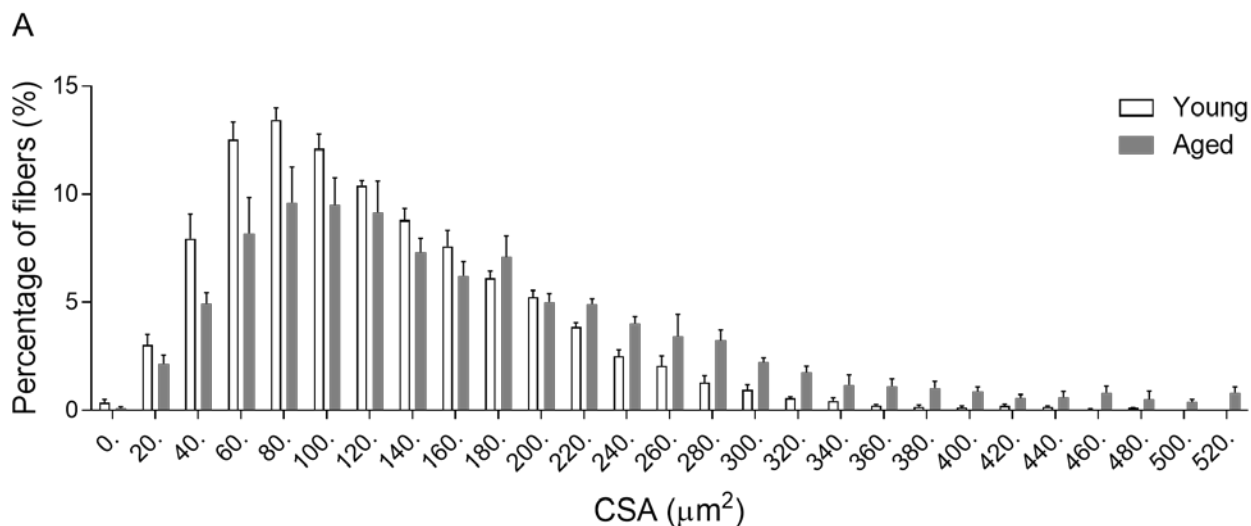


Figure 10. (A) Cross-sectional area (CSA) and (B) the number of EUS fibers per image in young and aged rats were quantified using images of the ventral and dorsal positions of the urethra. Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism ver. 7.01 (mean \pm S.E.M., n=5).

** P < 0.01 (Student's t-test)

4. 考察

本章では、老齡ラットの粘膜、EUS層、尿道平滑筋層及び結合組織の病理組織学的な評価をHE及びMT染色にて検討し、更にEUSに特化した組織学的評価、すなわちEUSの筋繊維径並びに筋線維数を蛍光免疫染色により検討した。

本研究結果は高齡女性の尿道で報告されているEUS筋線維数の減少やEUS層における

結合組織の増加と同様な所見を老齢ラットの尿道において捉えることができた。EUS 筋層におけるこれら組織学的な変化は、加齢により筋線維のターンオーバーに必要な筋サテライト細胞の再生能が減弱化し、括約筋の再生能が減衰することで新たに作られる筋線維が減少し、全体の筋線維数が減少した報告を支持していると考えられる (Jang YC et al., 2011)。更に、本研究結果はヒトにおいて認められた加齢に伴う EUS 筋線維数及び密度の減少と筋線維径の増加傾向を示す報告と類似していた (Strasser H et al., 2000; Perucchini D et al., 2002a)。これらの所見は、EUS 筋線維の消失が尿失禁を引き起こす原因の一つであることを示唆している。また括約筋は運動負荷や栄養状態といった様々な刺激によりそのサイズを変えることが出来る組織である。それゆえ、残存する EUS 筋線維が尿禁制を維持するために過剰な運動刺激を受け、その刺激により EUS 筋線維のサイズ (CSA) が増大したと推測している。すなわち、残存する EUS 筋線維が肥大することによって、低下した EUS 収縮力を代償し、尿禁制を維持しようとしているのかもしれない。しかしながら、このメカニズムを明らかにするためには更なる実験が必要であり、今後の課題と考えている。

次に尿道平滑筋の組織学的な変化については、本実験結果からは若齢と老齢の間に違いは観察されなかった。ラットまたはヒトにおいて、加齢に伴い尿道平滑筋の組織学的変化が起こっているという報告がある (Clobes A et al., 2008) 一方で、ヒトにおいていずれの年代にもかかわらず尿道平滑筋の組織学的変化はないという報告もあり (Carlile A et al., 1988)、加齢による尿道平滑筋の組織学的変化の有無は議論の余地が残るところである。また SUI 患者の尿道機能の低下には、EUS と尿道平滑筋以外に陰部神経の伝達遅延が起こっているとの報告もある (Smith AR, 1989)。神経障害は SUI 症状を起こす原因の一つと考えられるが、本研究では加齢に伴う神経活性の変化は検討していないので、老齢ラットにおける陰部神経活性に関する更なる研究が必要と考える。

更に、加齢に伴う組織学的な変化を病理のみでなく遺伝子発現解析の変化でも捉えることができないかと考え、尿道における細胞外マトリクス関連遺伝子 (Col1a-1, Col3a-1) 炎症関連遺伝子 (Cox-2, IL-6) 並びに萎縮関連遺伝子 (Atrogin-1, MuRF-1) の発現解析を予備的に行った。その結果、老齢ラットの尿道において、Col1a-1 や Col3a-1 に代表される細

胞外マトリクス関連遺伝子の発現が有意に減少し、COX-2 や IL-6 に代表される炎症関連遺伝子の発現は上昇傾向を示した。また筋タンパク質分解酵素（萎縮関連遺伝子）である Atrogin-1 や MuRF-1 の発現変動は確認できなかった（personal communication）。本結果と病理組織学的な変化（Figure 9）を比較すると相関は認められず、組織学的な変化を遺伝子発現解析で確認することはできなかった。

最後に、加齢に伴うエストロゲン分泌量の減少は SUI 症状を惹起する原因の一つであると考えられるにもかかわらず、ホルモン補充療法は SUI に対し治療効果を示さないこと（Fantl et al., 1996）や血清エストロゲン濃度と尿禁制に相関が認められないことが報告されている（Bodner-Adler B et al., 2017）。最近の報告では、ラット卵巢摘出モデルにおいて、くしゃみ誘発尿失禁回数が上昇し、エストロゲンの補充によって失禁回数が減少すること（Kitta T et al., 2011）や加齢と卵巢摘出によるエストロゲン欠乏が組み合わさることで、くしゃみによる急激な腹圧上昇時の尿道内圧が低下することが示されたが（Kitta et al., 2016）、その一方で、中年齢ラット（12 ヶ月齢）の血清エストラジオール濃度は若齢ラット（3 ヶ月齢）と変わらないとする報告もあり（Wang VC et al., 2009）、尿道機能とエストロゲンの関連性はいまだ明らかになっていない。本研究ではいずれの月齢においても血中エストロゲン濃度は測定しなかったため、老齢ラットにおけるエストロゲン濃度と尿道機能の関連性は不明であり、尿道機能の維持におけるエストロゲンの役割を明らかにするためには、今後更なる研究が必要であると考ええる。

ヒトにおいて、加齢に伴う SUI 病態の発生には、EUS 並びに尿道平滑筋の収縮力低下、EUS 筋線維数の減少、尿道支持組織の脆弱化、膀胱頸部・近位尿道の開大など、機能的、組織学的、あるいは物理的な様々な要因が複雑に関連していると考えられ、本研究において、それら要因の中の EUS の機能的及び組織学的な変化を老齢ラットで捉えることができた。すなわち、老齢ラットにおける尿道機能低下には、EUS の機能的及び組織学的変化が関与していることが推察された。また、尿道平滑筋の尿禁制への寄与並びに加齢に伴う変化に関する外部報告と合わせると尿道平滑筋の関与は否定できないため、加齢に伴う尿道平滑筋機能の変化の有無に関しては今後の検討課題であると考ええる。

第4章 老齡ラットの尿道機能に対する duloxetine の作用

1. 序論

前章までに、老齡ラットは若齡ラットと比較して尿漏出時圧（LPP）及びEUS収縮力の低下等の尿道機能の低下、並びにEUS筋繊維数の減少やEUS筋層における結合繊維の増加等の病理組織学的な変化を示し、これらの変化はヒト高齢女性の尿道における変化と類似していた。そこで本章では、老齡ラットが薬効評価可能なモデル動物になり得るか否かを検討する目的で、欧州で腹圧性尿失禁（SUI）治療薬として使用されているデュロキセチン（duloxetine）を用いて老齡ラットの薬剤に対する尿道機能の反応性を検討した。

尿道抵抗は、EUSおよび尿道平滑筋の収縮により上昇する。蓄尿状態を維持するための生理機能として、自律神経および体性神経の2種の神経反射が存在するが、咳、くしゃみ、運動時に認められるような急激な膀胱内圧（腹圧）上昇時に働くのは体性神経を介した反射である。この急激な腹圧上昇時には、骨盤神経の求心性神経を介して仙髄に存在するオヌフ核が興奮し、遠心性の体性神経である陰部神経が興奮してEUSが収縮することが知られている。この反射経路に関与する神経伝達物質であるノルエピネフリンおよびセロトニンが、オヌフ核に存在する α 受容体およびセロトニン受容体を介してオヌフ核の興奮性を亢進させることが報告されている（Thor KB, 2003）。Duloxetineはセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬（serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors ; SNRI）であり、作用点は仙髄に存在するオヌフ核である。Duloxetineはオヌフ核へ作用することによりオヌフ核におけるセロトニンおよびノルエピネフリン量を増加させ、陰部神経を介したEUSの収縮反応を増強することが報告されている（Thor KB and Katofiasc, 1995; Thor KB, 2004）。臨床において、placebo又はduloxetine 40mg経口投与時における腹圧上昇時の尿道閉鎖圧を比較したところ、duloxetine投与群において尿道閉鎖圧の上昇が確認されている（Yono M et. al., 2015）。またバルーンカテーテルを子宮へ挿入し、子宮を拡張することにより尿道組織を物理的に壊すことで尿道閉塞能を低下させた vaginal distention（VD）処置ラットにおいて、臨床有効濃度付近の投与量と考えられるduloxetine（1mg/kg, 静脈内投与）は、くしゃ

み誘発尿道内圧を上昇させ、尿漏れ回数を減少させたことが報告されている (Miyazato et al., 2008)。そこで、動物における duloxetine の有効用量付近と考えられる 0.3 又は 3mg/kg を老齢ラットへ静脈内投与し、神経刺激依存的な EUS 収縮を増強する機序を有する duloxetine による尿漏出時圧の上昇を検討した。

2. 実験方法

Pentobarbital sodium (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下に、SD 系雌性ラット (日本エスエルシー、体重及び使用匹数 ; 3 ヶ月齢 246 – 281 g 及び 9 匹、24 ヶ月齢 375 – 659 g 及び各群 9 匹) を用いて、第 1 章と同様の手術を施し、尿漏出時圧 (LPP) を測定した。本実験では duloxetine 投与のため、大腿静脈にカテーテル (PE-50) と連結した注射針を留置した。各個体につき約 1 分間隔で 5 回以上尿漏出時圧を測定し、安定して測定された最後の 3 回の尿漏出時圧の平均を投与前値とした。投与前値測定後、投与前値で群分けし、大腿静脈より溶媒 (1.5% N,N-ジメチルホルムアミド生理食塩水) もしくは duloxetine (0.3 または 3 mg/kg) を静脈内投与 (1mL/kg) し、投与後約 14, 15, 16 分における 3 回の尿漏出時圧を測定し、この平均値を duloxetine 投与後 15 分の尿漏出時圧とした。

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は若齢及び老齢群との比較には溶媒投与後 15 分の実測値を用いて Student の t 検定を行った。老齢群における溶媒と duloxetine 投与群との比較には Dunnett の多重比較検定を行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意な差とした。

3. 実験結果

溶媒を投与した若齢群と老齢群の尿漏出時圧には有意な差が認められ (若齢 : 48.4 ± 2.0 mmHg、老齢 ; 36.2 ± 1.7 mmHg)、第 1 章とほぼ同様な老齢ラットにおける尿漏出時圧の低下が認められた (Figure 11)。また、老齢ラットにおける溶媒、duloxetine 0.3mg/kg 及び duloxetine 3mg/kg 静脈内投与前の投与前値は、それぞれ 35.5 ± 2.0 , 37.5 ± 1.7 及び 38.6 ± 1.7 mmHg であり、群間に差は認められなかった。Duloxetine 投与後約 15 分における溶媒、duloxetine 0.3 及び 3mg/kg の静脈内投与後の尿漏出時圧は、それぞれ 36.2 ± 1.7 , 41.9 ± 1.9 及

び 44.8 ± 1.4 mmHg であり、duloxetine 0.3 mg/kg 投与群から有意な尿漏出時圧上昇が認められた (Figure 11)。

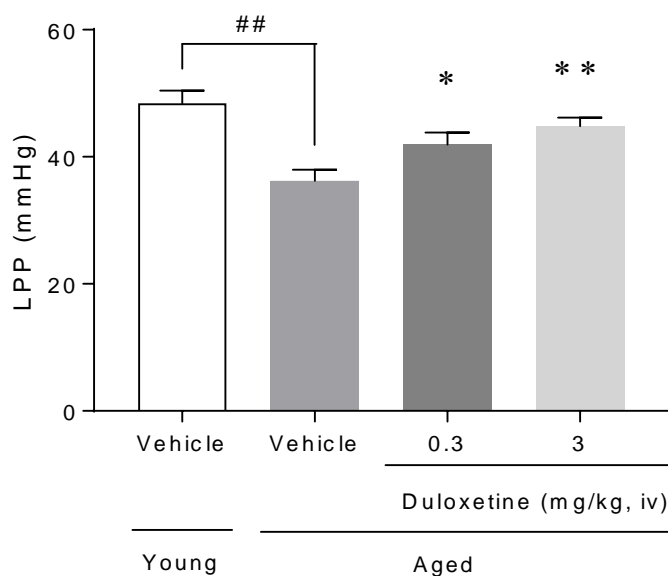


Figure 11. Effect of duloxetine on leak point pressure (LPP) in aged (24 months old) female rats. Data and statistical analyses were performed using GraphPad Prism ver. 7.01 (mean \pm S.E.M., n=9).

P < 0.01 (Student's t-test between young and aged female rats). * P < 0.05, ** P < 0.01 (Dunnett's multiple comparison test in aged female rats)

4. 考察

本章では、これまでの研究結果から機能並びに組織学的な変化が認められた老齢ラットの EUS に着目し、老齢ラットの EUS の収縮力を増強することで尿道機能が改善するかを検討するために、老齢ラットにおける尿漏出時圧 (LPP) を測定し、欧州で SUI 治療薬として使用されている duloxetine を用いて、薬剤反応性を検討した。

Duloxetine は仙髄に存在するオヌフ核におけるノルエピネフリン量を増加させ、陰部神経を介した EUS の収縮反応を増強することが報告されている。臨床における duloxetine の SUI に対する薬物治療効果は、くしゃみや咳などのような急激な腹圧上昇時に尿禁制維持に主要に関与する EUS の収縮力を増強し、漏れやすくなった尿道の閉塞能を上げ、尿漏れ

を防ぐことである。同様の効果は、VD ラットを用いて確認されており、duloxetine (1 mg/kg, 静脈内投与) が VD ラットの尿道内圧を上昇させることが報告されている (Miyazato et. al., 2008)。そこで、VD ラットにおいて duloxetine が尿道内圧を上昇させる投与用量付近の用量 (0.3 または 3 mg/kg) を用いて、老齢ラットにおける duloxetine の尿漏出時圧上昇作用を検討した。その結果、duloxetine は用量依存的な尿漏出時圧上昇作用を示し、いずれの用量における作用も統計学的に有意なものであった。この結果は、duloxetine が仙髄のオヌフ核におけるノルエピネフリン量を増加させ、陰部神経を介した EUS 収縮反応を増強するとする報告によっても支持される (Thor KB and Katofiasc, 1995; Thor KB, 2004)。老齢ラットでの EUS 筋線維数の減少を背景とした神経刺激依存的な EUS 収縮の低下が認められる状況においても、duloxetine による神経刺激依存的な EUS 収縮の増強が認められるとすれば、同様の組織学的変化を伴う SUI 病態においても duloxetine が EUS 収縮増強を示しうることを示唆する。

以上より、老齢ラットは VD モデル動物同様、EUS 収縮低下を改善する薬剤を評価可能な動物モデルであることが明らかとなった。

第5章 総括

腹圧性尿失禁（SUI）とは、重い物を持ち上げる動作時や、くしゃみ、咳など急激な腹圧の上昇時に起こる不随意的尿の漏れを認める疾患である。SUIは、成人女性の約35%が罹患していると報告される、生活の質（QOL）を著しく低下させる疾患の一つである。その原因としては妊娠、出産や加齢などが挙げられ、SUI病態の発生には、尿道の機能的、組織学的あるいは物理的な様々な要因が複雑に関連していると考えられる。このうち、尿道支持組織の脆弱化に伴う臓器位置の下垂等の物理的な要因によるSUI病態に対しては、主に外科手術法による治療が用いられている。一方、機能的あるいは組織学的な要因によるSUI病態に対しては、薬物治療が適用できると考えられる。そこで、尿道抵抗に寄与し、薬物治療アプローチのターゲットになり得ると考えられるEUS並びに尿道平滑筋に着目し、ヒト尿道において認められる加齢に伴うEUS並びに尿道平滑筋の形態及び機能の変化が老齢ラットにおいて捉えることが可能か、また老齢ラットがヒトへの外挿性を有する動物モデルになり得るかを検討することを目的に、老齢ラットの尿道機能及び尿道組織における各種検討ならびに考察を行った。

尿道機能の評価指標の一つである尿漏出時圧（LPP）測定によって、24ヵ月齢（老齢）ラットの尿漏出時圧は3ヵ月齢（若齢）ラットの尿漏出時圧より顕著に低下していることが明らかとなった。次に尿道を構成する組織ごとに分けて尿道機能を検討したところ、EUSの収縮能については、老齢ラットの陰部神経電気刺激誘発尿道内圧上昇反応が若齢ラットのそれと比較して有意に低下していたが、尿道平滑筋の収縮能に関しては若齢及び老齢ラットの間で有意な差は認められなかった。また尿道の病理組織学的な検討においては、若齢ラットと比較して老齢ラットの尿道のEUS筋層内の結合組織が増加していたが、尿道平滑筋層においては両群の差は認められなかった。更に老齢ラットの尿道のEUS筋繊維数は減少し、その筋繊維径（CSA）は増大した。本研究においてSUIを発症する原因の一つとして考えられる加齢というリスクファクターに基づく、ラット尿道における機能及び組織学的変化を捉えることができ、これらの所見はヒトで認められている現象に類似してい

た。本研究において重要なことは、これまで報告されていなかった加齢に伴う EUS 筋繊維数の減少をラットにおいても検証できたことと考える。

次に、非臨床と臨床を効果的に結び付けるトランスレーショナルサイエンスの観点から、老齢ラットが臨床予見性を示す動物モデルになり得るか否かを検討するため、神経刺激依存的な EUS 収縮を増強する SUI 治療薬として臨床の現場で使用されている duloxetine を用いて老齢ラットの尿漏出時圧に対する本薬の作用を検討した。その結果、老齢ラットの尿漏出時圧は、duloxetine によって用量に応じた上昇反応を示した。すなわち、老齢ラットの尿道機能は、EUS 筋繊維数減少という組織学的な変化を伴って収縮力低下を呈するが、その収縮力を増強することが尿漏出時圧改善につながることを示された。

以上より、ラットにおける加齢に伴う尿道機能並びに組織学的な変化は、ヒトの加齢に伴う変化の一部と類似しており、また老齢ラットの尿道機能が薬剤反応性を有することも考え合わせ、老齢ラットは EUS を作用点とする SUI 治療薬開発のための臨床予見性のあるモデル動物になり得ると考えられた。今後、更なる基礎検討を行うことで更なるヒトとの類似性を明らかにし、様々な機序の薬剤を検討することで、老齢ラットのモデル動物としての更なる有用性を示したい。

引用文献

Abrams P, Cardozo L, Fall M, et al. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 2002;21(2):167-78.

Bodner-Adler B, Bodner K, Kimberger O, Halpern K, Rieken M, Koelbl H, Umek W. Role of serum steroid hormones in women with stress urinary incontinence: a case-control study. *BJU Int*. 2017 Sep;120(3):416-421.

Cannon TW, Wojcik EM, Ferguson CL, Saraga S, Thomas C, Damaser MS., Effects of vaginal distension on urethral anatomy and function. *BJU Int*. 2002;90(4):403-7.

Carlile A, Davies I, Rigby A, Brocklehurst JC. Age changes in the human female urethra: a morphometric study. *J Urol* 1988;139(3):532-5.

Chermansky CJ, Cannon TW, Torimoto K, Fraser MO, Yoshimura N, de Groat WC, Chancellor MB., A model of intrinsic sphincteric deficiency in the rat: electrocauterization. *Neurourol Urodyn*. 2004;23(2):166-71.

Clobes A, DeLancey JO, Morgan DM. Urethral circular smooth muscle in young and old women. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(5):587.e1-5.

Elving LB, Foldspang A, Lam GW, Mommsen S. Descriptive epidemiology of urinary incontinence in 3,100 women age 30-59. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1989;125:37-43.

Fantl JA, Bump RC, Robinson D, McClish DK, Wyman JF. Efficacy of estrogen supplementation in the treatment of urinary incontinence. The Continence Program for Women Research Group. *Obstet Gynecol.* 1996;88(5):745-9.

Haylen BT, de Ridder D, Freeman RM, Swift SE, Berghmans B, Lee J, et al. An International Urogynecological Association (IUGA)/International Continence Society (ICS) joint report on the terminology for female pelvic floor dysfunction. *Neurourology and Urodynamics* 2010;29:4–20.

Hilton P, Stanton SL. Urethral pressure measurement by microtransducer: the results in symptom-free women and in those with genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol.* 1983;90(10):919-33.

Hunskar S, Arnold EP, Burgio K, Diokno AC, Herzog AR, Mallett VT. Epidemiology and natural history of urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2000;11(5): 301-19.

Jang YC, Sinha M, Cerletti M, Dall'Osso C, Wagers AJ. Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:101-11.

Kaiho Y, Kamo I, Chancellor MB, Arai Y, de Groat WC, Yoshimura N., Role of noradrenergic pathways in sneeze-induced urethral continence reflex in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F639-46.

Kalejaiye O, Vij M, Drake MJ. Classification of stress urinary incontinence. *World J Urol.* 2015 Sep;33(9):1215-20.

Kapoor DS, Housami F, White P, Swithinbank L, Drake M. Maximum urethral closure pressure in women: normative data and evaluation as a diagnostic test. *Int Urogynecol J*. 2012;23(11):1613-8.

Kitta T, Haworth-Ward DJ, Miyazato M, Honda M, de Groat WC, Nonomura K, Vorp DA, Yoshimura N. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on the urethral continence reflex during sneezing in rats. *J Urol*. 2011 Oct;186(4):1517-23.

Kitta T, Yoshikawa S, Kawamorita N, de Groat WC, Nonomura K, Yoshimura N. The effect of ovariectomy on urethral continence mechanisms during sneeze reflex in middle-aged versus young adult rats. *Neurourol Urodyn*. 2016;35(1):122–127.

Kurihara R, Ishizu K, Takamatsu H, Yoshino T, Masuda N. Study on Physiological Roles of Stimulation of Prostaglandin E2 Receptor Subtype EP2 in Urethral Function in Rats. *Low Urin Tract Symptoms*. 2016 May;8(2):125-9.

le Feber J and van Asselt E. Pudendal nerve stimulation induces urethral contraction and relaxation. *Am J Physiol*. 1999;277(5 Pt 2):R1368-75.

Lim SH, Wang TJ, Tseng GF et al.. The distribution of muscles fibers and their types in the female rat urethra: cytoarchitecture and three-dimensional reconstruction. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(10):1640-9.

Lin AS, Carrier S, Morgan DM, Lue TF., Effect of simulated birth trauma on the urinary continence mechanism in the rat. *Urology*. 1998;52(1):143-51.

Miyazato M, Kaiho Y, Kamo I, Chancellor MB, Sugaya K, de Groat WC, Yoshimura N., Effect of duloxetine, a norepinephrine and serotonin reuptake inhibitor, on sneeze-induced urethral continence reflex in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(1):F264-71.

Perucchini D, DeLancey JO, Ashton-Miller JA, Peschers U, Kataria T. Age effects on urethral striated muscle. I. Changes in number and diameter of striated muscle fibers in the ventral urethra. *Am J Obstet Gynecol* 2002a;186(3):351-5.

Perucchini D, DeLancey JO, Ashton-Miller JA, Galecki A, Schaer GN. Age effects on urethral striated muscle. II. Anatomic location of muscle loss. *Am J Obstet Gynecol* 2002b; 186(3):356-60.

Rodriguez LV, Chen S, Jack GS, de AF, Lee KW, Zhang R. New objective measures to quantify stress urinary incontinence in a novel durable animal model of intrinsic sphincter deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(5):R1332–R1338.

Rud T. Urethral pressure profile in continent women from childhood to old age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980;59(4):331-5.

Smith AR, Hosker GL, Warrell DW. The role of pudendal nerve damage in the aetiology of genuine stress incontinence in women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1989;96(1):29-32.

Stothers L, Friedman B. Risk factors for the development of stress urinary incontinence in women. *Curr Urol Rep*. 2011;12(5):363-9

Strasser H, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Eder I, Bartsch G, Konwalinka G. Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *J Urol* 2000;164(5):1781–5.

Sumino Y, Yoshikawa S, Mimata H, Yoshimura N. Association of remodelling of extracellular matrix and urethral dysfunction inducing stress urinary incontinence in aged, multiparous rats. International Continence Society 2013; Abstract 221.

Thom D. Variations in estimates of urinary incontinence prevalence in the community: effects of differences in definition, population characteristics, and study type. *J Am Geriatr Soc.* 1998;46:473-480.

Thor KB and Katofiasc MA, Effects of duloxetine, a combined serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, on central neural control of lower urinary tract function in the chloralose-anesthetized female cat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;274(2):1014-24.

Thor KB. Serotonin and norepinephrine involvement in efferent pathways to the urethral rhabdosphincter: implications for treating stress urinary incontinence. *Urology.* 2003 Oct;62(4 Suppl 1):3-9.

Thor KB, Targeting serotonin and norepinephrine receptors in stress urinary incontinence. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004;86 Suppl 1:S38-52.

Wang VC, Neese SL, Korol DL, Schantz SL. Chronic estradiol replacement impairs performance on an operant delayed spatial alternation task in young, middle-aged, and old rats. *Horm Behav.* 2009 Oct;56(4):382-90.

Yono M, Kimura M, Ito K, Inoue Y, Furukawa K, Hori M, Tsuji S, Tanaka T, Sakata S, Irie S, Urodynamic Measurement of Urethral Closure Function in Women with Stress Urinary Incontinence: A Randomized, Double-Blind, Single-Dose, Two-Period Crossover Study of Duloxetine. *Jpt Clin Pharmacol Ther.* 2015;46(6):259-264.

Zimmern P, Litman HJ, Nager CW, Lemack GE, Richter HE, Sirls L, Kraus SR, Sutkin G, Mueller ER. Effect of aging on storage and voiding function in women with stress predominant urinary incontinence. *J Urol.* 2014 Aug;192(2):464-8.

謝辞

本学位論文の作成、発表および審査にあたり、終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻とともに論文の校閲を賜りましたアステラス製薬株式会社 研究本部 宮田桂司 博士に謹んで感謝申し上げます。

本学位論文の作成、発表および審査にあたり、御指導、御配慮を賜りました筑波大学 主査 我妻ゆき子 教授、副査 濱田洋実 教授、副査 石井俊輔 連携教授、副査 岡山久代 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えて戴きましたアステラス製薬株式会社 研究本部本部長 内田渡 博士に深く感謝致します。

本研究の機会を賜るとともに、過分の御指導、御鞭撻を賜りましたアステラス製薬株式会社 リサーチポートフォリオ部 科学評価グループ長 武田全弘 博士に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御助言および御支援を賜りましたアステラス製薬株式会社 石上隆雄 研究員、大橋亮輔 研究員、熊倉文代 研究員、河野豪 研究員、平田拓也 博士、横野真典 博士に深く感謝いたします。

更に、本研究の遂行にあたり、共同研究者として終始ご協力を賜りましたアステラス製薬株式会社 上島浩二 博士、伊能克敏 研究員、鈴木ゆかり 研究員、佐藤大輔 博士、松井滋生 研究員、並びに、学位取得へ取り組むにあたりご助言いただきました大竹昭良 博士をはじめとする多くの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究をまとめるにあたり温かく見守ってくれた夫、ならびに息子達に深く感謝いたします。