

老齡ラット膀胱におけるアトロピン抵抗性収縮に対する プロピペリンの効果

山田晃子, 小林優子, 會田智美, 南里真人*, 石幡明**, 片野由美

山形大学医学部看護学科臨床看護学講座

*大鵬薬品育薬研究所薬理部門

**奥羽大学薬学部病態機能学分野

(平成20年4月18日受理)

要 旨

【背景】膀胱平滑筋収縮はコリン作動性と非アドレナリン非コリン作動性神経によって仲介されている。健常者では、膀胱収縮は主としてムスカリン受容体を介して引き起こされるが、排尿障害を伴う高齢者では抗コリン薬の効果が十分でない場合もある。この原因として、ムスカリン受容体を介さない収縮、すなわちアトロピン抵抗性収縮が加齢により増加する可能性が考えられる。しかし、これまでにアトロピン抵抗性収縮と加齢との関係は明らかにされていない。また、臨床で頻用されているプロピペリンは抗ムスカリン作用の他に Ca^{2+} 拮抗作用を有し、下部尿路症状のある高齢者に対しても効果をもたらす薬剤として期待されている。そこで本研究では、(1) 加齢に伴う膀胱平滑筋のアトロピン抵抗性収縮の変化、および(2) 膀胱平滑筋収縮に対する抗コリン薬(アトロピンおよびプロピペリン)の効果について検討した。

【研究方法】若齡(3ヵ月齡)および老齡(28ヵ月齡以上)の雄性Fischer 344ラットから膀胱を摘出し短冊標本を作製した。標本をorgan bathに懸垂し、等尺性収縮張力を測定した。抗コリン薬(アトロピンおよびプロピペリン)投与後、経壁電気刺激(刺激頻度1~128Hz、持続時間0.2ミリ秒、刺激時間3秒、刺激間隔180秒)により発生する収縮張力の頻度反応曲線を求め、コントロールに対する抑制効果を比較した。

【結果および結論】高濃度 K^+ による収縮反応に加齢変化はなかった。アトロピンは経壁電気刺激による収縮を若齡で約55%、老齡で約25%抑制した。プロピペリンは電気刺激による収縮を若齡で約54%、老齡で約60%抑制した。これらの結果より、加齢に伴ってアトロピン抵抗性収縮が増強されること、プロピペリンはアトロピン抵抗性収縮を伴う高齢者の排尿障害に有効に作用する可能性が示唆された。

キーワード：膀胱、平滑筋、アトロピン抵抗性収縮、老化

緒 言

高齢社会を迎え、加齢に伴う頻尿や尿失禁などの下部尿路症状が注目を集め、問題となっている¹⁾。下部尿路症状は、排尿困難や残尿感等の排出障害と、頻尿や尿失禁などの蓄尿障害に分けられる。頻尿や尿失禁などの蓄尿障害は、一回の出現または増加でもQOL(quality of life)に対する影響は大きい²⁾。蓄尿障害の原因の一つには、膀胱の不随意収縮があげられる³⁾が、65歳以上の女性では38%に過活動膀胱を認めるとの報告や、前立腺肥大症を有する高齢男性の約2/3に過活動膀胱を認め、前立腺切除後も30~40%の症例に排尿筋不安定が残るという報告がある⁴⁾。このように、加齢が膀胱の機能変化と関わりがあることは広く認められているが、その機序については未だ解明されていない部分が多い。

蓄尿と排尿という膀胱の主な機能は、末梢では自律神経(副交感神経と交感神経)と体性神経によって調節されている。蓄尿期には交感神経が優位なため、膀胱平滑筋は弛緩した状態で維持され、膀胱出口部以下が収縮することで尿禁制が保持される。一方で、排尿期には副交感神経が優位となり、膀胱が収縮すると同時に、膀胱出口部以下は弛緩することで、十分な排尿が可能となる⁵⁾。

通常、膀胱平滑筋の収縮は、主に副交感神経終末から放出されたアセチルコリンが平滑筋上のムスカリン受容体と結合することで生じる、コリン作動性収縮によって引き起こされる。それゆえ、蓄尿障害に対する治療の第一選択薬として、アセチルコリンと競合してムスカリン受容体に結合することで、膀胱の不随意収縮を抑制し、蓄尿障害を改善させる抗コリン薬が頻用されている。しかし、高齢者には抗コリン薬の効果が十分でない場合があり、その原因としてムスカリン受容体を介さない、すなわちアトロピン抵抗性収縮の存在が以前から指摘されて

いる⁶⁾。しかし、このアトロピン抵抗性収縮と加齢との関係についてはまだ明らかにされていない。また、臨床で頻用されているpropiverineは抗ムスカリン作用の他にCa²⁺拮抗作用を有し、下部尿路症状のある高齢者に対しても効果をもたらす薬剤として期待されている。

そこで本研究では、加齢による膀胱機能変化、およびCa²⁺拮抗作用を有する抗コリン薬の作用を明らかにすることを目的に、①膀胱平滑筋におけるアトロピン抵抗性収縮の加齢変化、②膀胱平滑筋収縮の加齢変化に対するpropiverineの作用についてラット膀胱平滑筋を用いて検討した。

対象と方法

実験には若齢(3ヵ月齢)、老齢(28ヵ月齢以上)の雄性Fischer 344ラットを用いた。本実験は、山形大学医学部動物実験指針⁷⁾、動物愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の使用及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)を遵守して行った。

収縮機能実験

各月齢ラットをエーテル麻酔下に頸椎脱臼した後、速やかに開腹し膀胱を摘出した。膀胱体部を縦方向に切断し、幅1.5~2.0mm、長さ10~11mmの短冊標本を作製した。標本を混合ガス(95%O₂, 5%CO₂)を通気したKrebs-Henseleit液(37±0.1℃)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(7T-15-240、オリエンテック、東京)を用いて測定した。灌流液の組成(mM)は、NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 24.9, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11.1, ascorbic acid 0.057, CaCl₂ 1.8, pH 7.4であった。標本をorgan bathに懸垂した後、1.0gの静止張力を負荷し、15分間隔で新鮮な灌流液と交換しながら1時間標本を安定させた。

膀胱平滑筋自体の収縮能を確認するために、

アトロピリン抵抗性収縮の加齢変化

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。KCl溶液による収縮反応は66.7 mMで最大収縮が得られた。なお、KCl溶液投与時は、37°Cの灌流液(NaCl 56, KCl 66.7 mMを含む)に混合ガスを通気しておき、通常の灌流液と速やかに置換した。

経壁電気刺激(electrical field stimulation; EFS)は、organ bathの中に2本の白金電極を設置し、標本をこの電極間に懸垂して行った。電気刺激は、電気刺激装置(SEN-7203, Nihon Kohden)を用いて行い、刺激頻度1~128Hz、持続時間0.2ミリ秒のパルス電流を加えた。刺激時間は3秒、刺激の間隔は180秒とし、閾値の10~20%増の電圧で矩形波電気刺激を行い、発生した収縮張力の頻度反応曲線を求めた。1標本につきEFSの頻度反応曲線を3回繰り返し、頻度反応曲線に再現性があることを確認しコントロールとした。

アトロピン抵抗性収縮の割合を評価するために、ムスカリン受容体遮断薬であるatropine (10^{-6} M)存在下でEFSを行い頻度反応曲線を求めた。

また、膀胱平滑筋収縮の加齢変化に対するpropiverineの効果を検討するために、ムスカリン受容体遮断作用に加え、 Ca^{2+} 拮抗作用を有するpropiverine (10^{-5} M)存在下でEFSを行い、頻度反応曲線を求めた。

tetrodotoxin (10^{-6} M)を用いて神経を介する収縮反応と、平滑筋への直接刺激により起こる収縮反応とを鑑別した。

使用薬物

atropine sulfate monohydrateは和光純薬(大阪)から、tetrodotoxinはSigma chemical Co.(St. Louis, MO, USA)から購入した。propiverine hydrochlorideは大鵬薬品工業(徳島)から分与された。これらはすべて生理食塩液を用いて溶解希釈した。

統計処理

得られたデータは、一元配置分散分析法(ANOVA)と多重比較検定を用いて検定を行っ

た。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で表現した。P<0.05の場合に有意差があるものとした。

結 果

1. KClおよびEFSによる収縮反応の加齢変化

KCl溶液による膀胱平滑筋収縮反応の加齢変化について検討した。その結果、若齢(4.5±0.2g, n=12)と老齢(5.0±0.2g, n=5)の間で、KCl溶液による最大収縮反応に加齢変化は認められなかった(図1)。そこでEFSによる収縮反応をKCl溶液による最大収縮反応で標準化した。1~128Hzの頻度でのEFSは、頻度依存的に膀胱平滑筋収縮を引き起こした。その頻度反応曲線は、若齢および老齢で有意な差はみられなかった。また、EFSによる収縮反応は、tetrodotoxin存在下においてほぼ完全に抑制された。

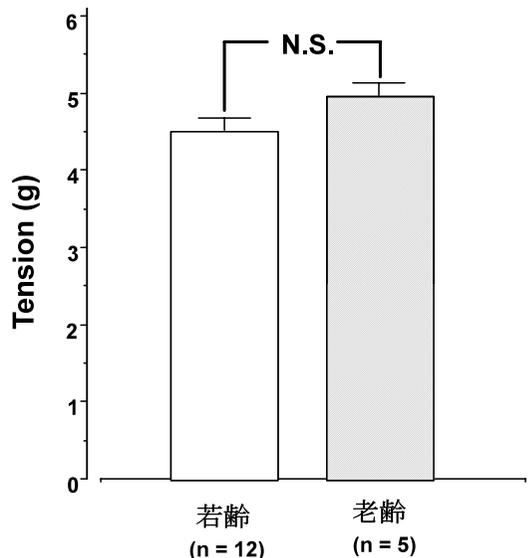


図1. ラット膀胱におけるKCl溶液による最大収縮反応

縦軸：収縮張力、□若齢ラット、■老齢ラット、N.S.: not significant、nは実験例数、値は、平均値±標準誤差で表している。

2. アトロピン抵抗性収縮反応の加齢変化

図2、図3に示すようにEFSによる収縮はatropine投与後、若齢では有意に抑制された(48.1±3.1%, n=6)。一方、老齢では抑制傾

向がみられたが(72.3±3.1%, n=5)、有意差はみられなかった。すなわち、アトロピン抵抗性収縮は若齢に比べ老齢において有意に増強し、加齢により増加が認められた。

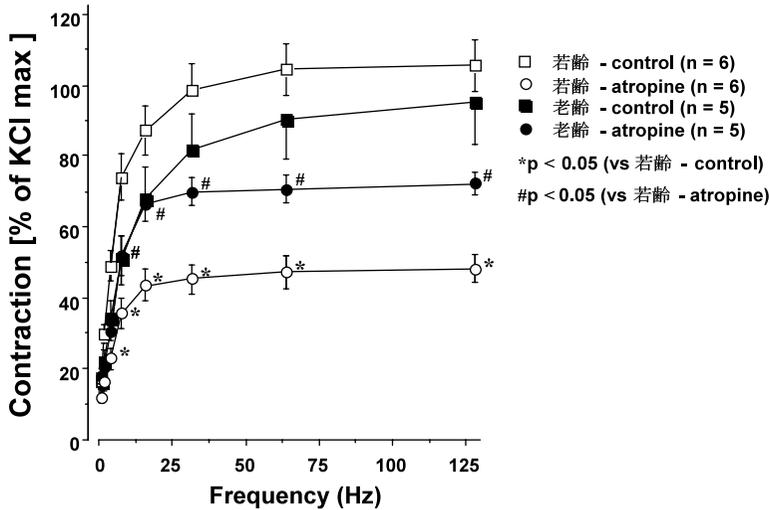


図2. ラット膀胱におけるatropine存在下での経壁電気刺激による頻度反応曲線
 縦軸: KCl溶液による最大収縮反応を100%とし、経壁電気刺激による収縮値を%で表した。
 横軸: 刺激頻度、nは実験例数、
 □若齢ラットでのコントロール、○若齢ラットでのatropin10⁻⁶ M存在下、
 ■老齢ラットでのコントロール、●老齢ラットでのatropin10⁻⁶ M存在下、
 *p<0.05 (vs 若齢-control)、#p<0.05 (vs 若齢-atropine)、値は、平均値±標準誤差で表している。

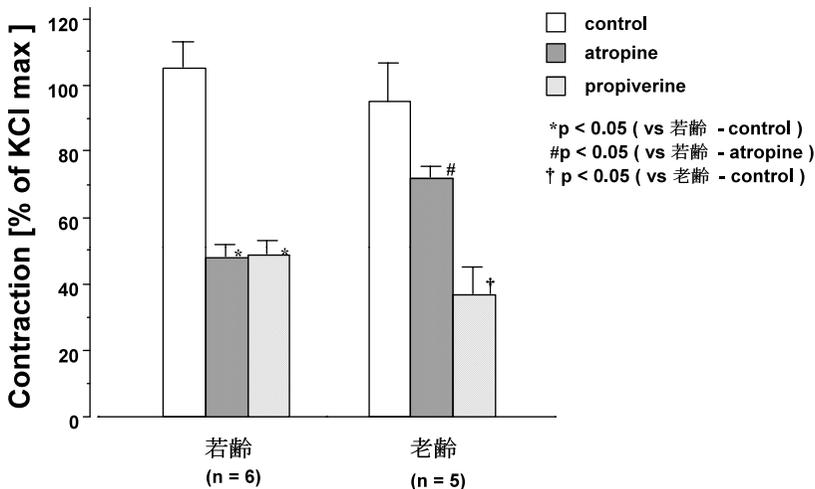


図3. ラット膀胱におけるatropineおよびpropiverine存在下での経壁電気刺激による収縮反応
 縦軸: KCl溶液による最大収縮反応を100%とし、経壁電気刺激(128Hz)による収縮値を%で表した。
 □コントロール、■atropin10⁻⁶ M存在下、□propiverine 10⁻⁵ M存在下、*p<0.05 (vs 若齢-control)、
 #p<0.05 (vs 若齢-atropine)、†p<0.05 (vs 老齢-control)、nは実験例数、値は、平均値±標準誤差で表している。

3. EFSによる収縮に対するpropiverineの作用

EFSによる収縮はpropiverine投与後、若齢では約54%、有意に抑制された。その抑制作用はatropineと同等だった。老齢においても約60%、有意に抑制された。その抑制作用に加齢変化は認められなかった。また老齢でのpropiverineの抑制作用は、atropineよりも強い傾向がみられた(図3、図4)。

考 察

本研究では、下部尿路症状と加齢との関わりに着目し、①膀胱平滑筋におけるアトロピン抵抗性収縮の加齢変化、②膀胱平滑筋収縮の加齢変化に対するpropiverineの作用について検討した。

膀胱平滑筋収縮機構の加齢変化

まず、受容体を介さずに収縮を惹起させる薬物として、脱分極刺激により電位依存性Ca²⁺チャンネルを介して細胞内Ca²⁺濃度を高め、平滑筋収縮を惹起させる塩化カリウム(KCl)によ

る収縮反応の加齢変化について検討した。KCl溶液は濃度依存性に膀胱を収縮させ、その反応は66.7mMでほぼ最大に達した。このKCl溶液が引き起こす収縮反応に加齢変化は認められなかった。したがって、電位依存性Ca²⁺チャンネルを介した膀胱平滑筋自体の収縮能に、加齢による影響はないことが示唆された。Ordway、會田も膀胱体部・底部において、KCl溶液による収縮反応に加齢変化はみられなかったと報告している^{8),9)}。

次に、摘出膀胱平滑筋の神経刺激による収縮反応の加齢変化について検討した。経壁電気刺激(EFS)は頻度依存的に膀胱の収縮をおこし、その頻度反応曲線に加齢変化はみられなかった。この結果は、Yuら¹⁰⁾のEFSによる頻度反応曲線が若齢と老齢ラットの膀胱で全く同じであったという報告と一致し、膀胱平滑筋における総合的な神経性の収縮に、加齢による影響がないことを示唆している。本実験条件下でのEFSによる収縮反応は、Na⁺チャンネルの特異的阻害剤であるtetrodotoxin存在下において、ほ

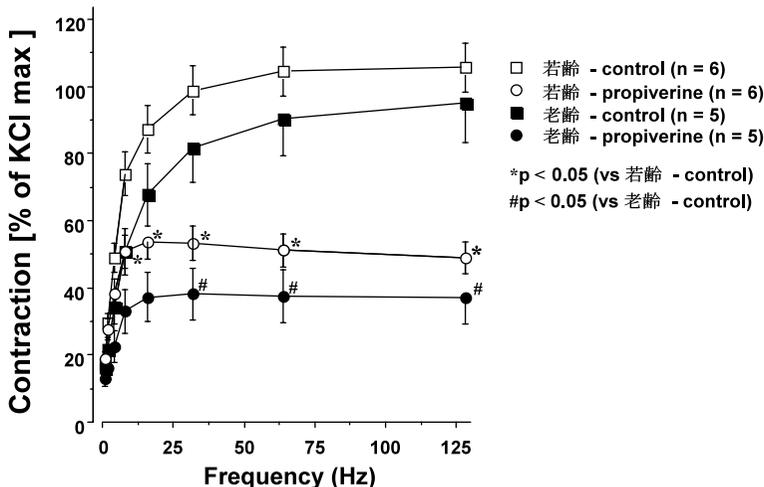


図4. ラット膀胱におけるpropiverine存在下での経壁電気刺激による頻度反応曲線
縦軸: KCl溶液による最大収縮反応を100%とし、経壁電気刺激による収縮値を%で表した。
横軸: 刺激頻度、nは実験例数、

□若齢ラットでのコントロール、○若齢ラットでのpropiverine 10⁻⁵ M存在下、

■老齢ラットでのコントロール、●老齢ラットでのpropiverine 10⁻⁵ M存在下、

*p<0.05 (vs 若齢-control)、#p<0.05 (vs 老齢-control)、値は、平均値±標準誤差で表している。

ば完全に抑制されたことから、平滑筋直接刺激による収縮は関与していない。

さらに、摘出膀胱平滑筋の受容体を介する収縮反応については、ヒト膀胱平滑筋においてムスカリン受容体作用薬であるcarbacholによる収縮反応に加齢変化はないことが報告されている¹¹⁾。従って、コリン作動性神経伝達物質を介する膀胱平滑筋収縮の反応性は加齢によって影響を受けにくいと考えられる。

アトロピン抵抗性収縮反応の加齢変化

ラット膀胱平滑筋でのアトロピン抵抗性収縮は若齢に比べ老齢において有意に増強し、加齢によって増加が認められた。ヒト膀胱平滑筋においてもアトロピン抵抗性収縮は加齢によって増加する¹¹⁾。その原因について、carbacholによる膀胱平滑筋収縮の反応性自体に加齢変化はみられないのに対し、加齢に伴って神経終末から放出されるアセチルコリンが減少している¹²⁾ことから、コリン作動性収縮が減少すること¹¹⁾が示唆されている。

以上より加齢に伴うアトロピン抵抗性収縮の増加は、下部尿路機能障害を有する高齢者において従来の抗コリン薬では十分な効果が得られない原因の一つとなっている可能性がある。

EFSによる収縮の加齢変化に対するpropiverineの作用

propiverineはEFSによる収縮を有意に抑制し、その効果に加齢差はなかった。また、老齢では、atropine投与後に残っていたアトロピン抵抗性収縮を若齢と同程度にまで抑制した(図3)。propiverineには、抗コリン作用の他にCa²⁺拮抗作用があると報告されており¹³⁾、このCa²⁺拮抗作用がアトロピン抵抗性収縮部分に作用していると考えられている。このことからpropiverineは、アトロピン抵抗性収縮の増加により従来の抗コリン薬では十分な効果が得られなかった高齢者にも効果をもたらす可能性がある。実際に摘出ヒト膀胱においてpropiverineは、アトロピン抵抗性の収縮を抑制することが明らかにされており¹⁴⁾、本研究の結果と一致し

ている。

本研究では、膀胱平滑筋のアトロピン抵抗性収縮が加齢により増強すること、propiverineは加齢に関わらずEFSによる収縮を有意に抑制し、老齢でのアトロピン抵抗性収縮を抑制することが示された。したがって、加齢に伴ってアトロピン抵抗性収縮が増強されること、プロピベリンはアトロピン抵抗性収縮を伴う高齢者の蓄尿症状に有効に作用する可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、平成18年度受託研究費(c404050006)によって行われたものである。

文 献

1. 西沢理, 井川靖彦, 石塚修: 加齢に伴う膀胱・尿道機能の変化. 老化と疾患 1998;11:104-106
2. 菅谷公男, 宮里実: 高齢者の頻尿・尿失禁. Hospha 2004; 1: 11-13
3. 秋野裕信, 横山修: 過活動膀胱の病因と発生メカニズム. 臨床泌尿器科 2007; 61: 579-584
4. 高橋悟, 本間之夫: 老化による膀胱形態の変化. 排尿障害プラクティス 1998; 6: 22-27
5. 吉村直樹: 排尿反射機構に関する新しい考え. 日薬理誌 2003; 121: 290-298
6. Anderson KE: Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. Pharmacol Rev 1993; 45: 253-308
7. 山形大学医学部動物実験指針. 2001: 1-2
8. Ordway GA, Esbenshade TA, Kolta MG, Gerald MC, Wallace LJ: Effect of age on cholinergic muscarinic responsiveness and receptors in the rat urinary bladder. J Urol 1986; 136: 492-496
9. 會田智美, 會田梢, 山田晃子, 石幡明, 片野由美: 老齢ラット膀胱における体部ムスカリン受容体と三角部α受容体の変化. 山形医学 2004; 22(2): 129-138

10. Yu HJ, Wein AJ, Levin RM: Age-related differential susceptibility to calcium channel blocker and low calcium medium in rat detrusor muscles: response to field stimulation. *Neurourol Urodyn* 1996; 15: 563-576
11. Yoshida M, Homma Y, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y et al.: Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. *Exp Gerontol* 2001; 36: 99-109
12. Yoshida M, Inadome A, Yono M, Seshita H, Miyamoto Y, Ueda S: Age-related changes in acetylcholine and adenosine triphosphate releases from human bladder smooth muscles. *Neurourol Urodyn*. 1999 18: 346-347
13. Tokuno H, Chowdhury JU, Tomita T: Inhibitory effects of propiverine on rat and guinea-pig urinary bladder muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 348: 659-662
14. Yono M, Yoshida M, Wada Y, Kikukawa H, Takahashi W, Inadome A et al.: Pharmacological effects of tolterodine on human isolated urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 1999; 368: 223-230

Effect of Propiverine on the Atropine-Resistant Contraction of Urinary Bladders in Aged Rats

Akiko Yamada, Yuko Kobayashi, Tomomi Aita, Masato Nanri*, Akira Ishihata, Yumi Katano**

Course of Clinical Nursing, School of Nursing, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

**Division of Pharmacology, Taiho Pharmaceutical Company, Limited, Tokushima, Japan*

***Division of Pathophysiology, Ohu University School of Pharmaceutical Sciences, Fukushima, Japan*

ABSTRACT

Bladder contraction is mediated neurogenically by both cholinergic and nonadrenergic-noncholinergic pathways. Muscarinic receptor stimulation plays a main role in emptying bladders. However, atropine is not fully effective in some older patients with overactive bladder. Because propiverine has Ca²⁺ channel-blocking effects in addition to antagonizing muscarinic receptors, it is useful for treatment of overactive bladder which is resistant to atropine. It is possible that the increase in the atropine-resistant contraction (ARC) may be responsible for the increased urinary bladder dysfunction in aging. Therefore we studied whether ARC was enhanced by aging and whether propiverine could inhibit the contraction in rat urinary bladders. Urinary bladders were isolated from young (3 months) or aged (> 28 months) male Fischer 344 rats, and the electrical field stimulation (EFS)-induced contractions were recorded in the presence of atropine or propiverine. Atropine inhibited EFS-induced contractions by 55% and 25% in young and aged, respectively. Propiverine inhibited EFS-induced contractions by 54% and 60% in young and aged rats, respectively. These results indicate that the ARC was increased by aging and was, in part, sensitive to propiverine.

Key words : urinary bladder, smooth muscle, atropine-resistant contraction, aging