

論文要旨

Effect of Menthol on Detrusor Smooth-Muscle Contraction and the Micturition Reflex in Rats.

〔ラットの排尿筋収縮と排尿反射に対するメントールの影響〕

野元佳子

【序論および目的】

メントールは、ミント系の植物に含まれる主成分で古くから医薬品などで冷感や清涼感をもたらす効果が利用されているが、その冷感や清涼感をもたらす機序については不明であった。しかし、2002年にメントールで活性化される TRPM8 と呼ばれる冷刺激の受容体の存在が明らかにされ、後根神経節や三叉神経節の知覚神経の A δ 線維と C 線維の両方に発現していることが報告された。

膀胱と TRPM8 の関係に関して、これまでヒト膀胱では TRPM8 の mRNA が尿路上皮には発現し排尿筋には発現しないこと、TRPM8 が尿路上皮と尿路上皮下の神経線維に発現し、神経線維における TRPM8 の発現が過活動膀胱の患者で増加し症状の重症度と相関があることが報告されている。ラット膀胱においては、TRPM8 の mRNA が膀胱と L6-S1 の後根神経節に発現すること、TRPM8 が後根神経節と尿路上皮に発現することが報告されているが、その排尿機能への影響は検討されていない。またメントールは腸管平滑筋の収縮を抑制するが、その排尿筋への作用についてはいまだ報告されていない。そこで、今回、メントールのラット排尿筋収縮と排尿反射に対する影響を検討した。

【材料および方法】

体重 240–310g の雌性 SD ラットを用いて以下の実験をおこなった。

シストメトリー

深麻酔下でラット下腹部を切開して膀胱を露出し、膀胱頂部からポリエチレンカテーテルを挿入して膀胱瘻を作製。膀胱瘻術後ラットをボールマンケージに収容し、皮下トンネルを通じて背部から導出したカテーテルから 36–37°C 生理食塩水を 0.2ml/min の速度で膀胱内に注入し、安定した排尿反射が得られたところで、1mM 及び 3mM メントール、あるいは 3mM メントール溶液の溶媒である 1.5% エタノールを 30 分間膀胱内注入した際の排尿量 (VV)、残尿量 (RV)、膀胱容量 (VT)、排尿効率 (VE)、排尿時膀胱内圧 (MP)、排尿閾値圧 (PT) の変化を調べた。また、カプサイシン 125mg/kg を実験 4 日前に皮下投与し、無髄 C 線維を脱感作させたラットでも同様の実験を行った。

摘出排尿筋標本を用いた等尺性張力実験

ラット摘出膀胱から 2×10mm の平滑筋標本を作製し、標本を 1g の静止張力をかけマグヌス管内に

懸垂。0.01mM カルバコールを25分毎に作用させ、反応が安定したところで、0.1、0.3、1mM メントールとあるいはその溶媒で11分間前処置した後のカルバコールで誘発される収縮反応の変化を調べた。

【結果】

シストメトリー

3mM メントールの膀胱内注入により、排尿量が20%、膀胱容量が19%有意に減少し、排尿閾値圧が31%有意に低下したが、残尿量、排尿効率、排尿時膀胱内圧は変化しなかった。また、3mM メントールの溶媒である1.5%エタノールの膀胱内注入はシストメトリーのパラメータに変化を及ぼさなかった。カプサイシン前処置ラットにおいては、正常ラットと比較してシストメトリーのベースラインの値に有意な変化なく、3mM メントールの膀胱内注入により、排尿量が24%、膀胱容量が22%有意に減少し、排尿閾値圧は30%低下したが、残尿量、排尿効率、排尿時膀胱内圧は変化しなかった。

摘出排尿筋標本を用いた等尺性実験

カルバコール誘発収縮反応は、0.1、0.3、1mM メントール前処置によってそれぞれ10.7%、36.7%、97.3%濃度依存性に抑制された。メントール溶液の溶媒であるエタノールの前処置において、0.1及び0.3mM メントールの溶媒である0.05%、0.1%エタノールでは変化を認めなかったが、1mM メントールの溶媒である0.5%エタノールの前処置によってカルバコール誘発収縮が6.4%抑制された。

【考察及び結論】

3mM メントールの膀胱内注入により、排尿量、膀胱容量が減少し排尿閾値圧が低下したことから膀胱内注入されたメントールは排尿反射を促進するものと考えられた。また、カプサイシン前処置により無髄C線維を脱感作させたラットにおいても同程度に排尿反射の促進が認められたことから、メントールによる排尿反射の促進はカプサイシン抵抗性の求心路を介するものであると考えられた。一方、摘出排尿筋においては0.1mM～1mM メントールはカルバコール誘発収縮を濃度依存性に抑制した。以上より、メントールの膀胱内注入による変化は、メントールが浸透して排尿筋に作用したのではなく、恐らくは尿路上皮もしくは感覚神経終末のTRPM8に作用して、カプサイシン抵抗性の求心路を介し、排尿反射を促進させて得られたものと考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	医研第	687号	氏名	野元 佳子
審査委員	主査	中川 昌之		
	副査	有田 和徳	宮田 篤郎	

Effect of Menthol on Detrusor Smooth-Muscle Contraction and the Micturition Reflex in Rats.

ラットの排尿筋収縮と排尿反射に対するメントールの影響

Urology Vol.72, No.3 2008年 掲載

メントールは冷感や清涼感をもたらすが、それは温度感受性 TRP チャンネルの1つで、メントールで活性化される TRPM8 と呼ばれる冷刺激受容体を介している。TRPM8 は後根神経節や三叉神経節の知覚神経の A δ 線維と C 線維の両方に発現し、その膀胱との関連においては、ヒト膀胱では TRPM8 の mRNA が尿路上皮には発現し排尿筋には発現しないこと、TRPM8 が尿路上皮と尿路上皮下の神経線維に分布し、特に過活動膀胱の患者ではその発現増加が症状の重症度と相関があることが報告されている。ラット膀胱においては、TRPM8 の mRNA が膀胱と L6-S1 の後根神経節に発現すること、TRPM8 が後根神経節と尿路上皮に分布することが報告されているが、その排尿機能への関与やメントールの排尿筋への作用についてはこれまで検討されていない。今回、メントールのラット排尿筋収縮と排尿反射に対する影響に関して、雌性 SD ラットを用いて、シストメトリーと摘出排尿筋標本を用いた等尺性張力実験を行い検討した。

その結果、本研究で以下の知見を明らかにした。

- 1) 3mM メントールの膀胱内注入は、有意な排尿量、膀胱容量の減少と排尿閾値圧の低下をきたし、排尿反射を促進させた。
- 2) カプサイシン感受性 C 線維を脱感作したラットでも 3mM メントールの膀胱内注入により排尿反射が促進された。
- 3) 0.1 ~ 1 mM メントールはラット排尿平滑筋収縮を濃度依存性に抑制した。

これらの結果から、ラットの膀胱内に注入されたメントールは筋層までは浸透せず、尿路上皮もしくは上皮下の感覚神経終末の TRPM8 に作用して排尿反射を促進させたと考えられた。また、メントールによる排尿反射の促進は、カプサイシン抵抗性の求心路、すなわち A δ 線維を介した反応である可能性が示唆された。

過活動膀胱で悩む患者・障害者は多い。昨今、膀胱機能やその病態における TRP チャンネルの関与が明らかにされつつある。本研究で TRPM8 を活性化させるメントールの膀胱内注入が排尿反射を促進させた知見は、TRPM8 と過活動膀胱の関連を示唆した点で非常に興味深い。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものとして判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 687 号	氏名	野元 佳子
審査委員	主査	中川 昌之	
	副査	有田 和徳	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成22年11月1日、学位請求者 野元佳子 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 今回の研究で膀胱容量の英語表記はvolume threshold for inducing micturitionとなっており、逐語的には膀胱容量閾値となるが、機能的膀胱容量と考えてよいのか？ (回答) 機能的膀胱容量と考えてよい。</p> <p>質問2) 実験では3つのパラメーターが減少あるいは低下しているが、キーになるのはどれか？ (回答) メントールで排尿反射が促進されるので、排尿閾値圧の低下がキーになると考える。</p> <p>質問3) この実験で雌ラットを用いたのはなぜか？ (回答) 今回は正常ラットを用いた実験だったが、同様の実験を脊損ラットで計画しているので、用手圧迫での排尿管理が容易な雄ラットを用いた。</p> <p>質問4) メントールの注入時間を30分間にしたのはなぜか。それによって反応が鈍化することはないのか。 (回答) 30分間の注入時間は排尿間隔が長い脊損ラットでの実験条件に合わせて設定した。注入時間が長くなると反応は少し減弱するが、コントロールより反応が弱まることはない。</p> <p>質問5) 実験では注入温度を体温程度に保っているが、TRPM8 が活性化されるような低温での反応はどうか？ (回答) 冷水の注入は行っていない。</p> <p>質問6) 論文の中にice water test、bladder cooling reflexに触れているが、この反応はAδ線維もしくはC線維のどちらを介した反応か。 (回答) C線維を介した反応とされている。</p> <p>質問7) 今回の実験ではカプサイシン前処置によるC線維の脱感作後、メントールによる排尿反射が促進されたことからAδ線維を介した反応だとしているが、C線維もしくはAδ線維との両方を介した可能性はないか。 (回答) 今回の結果はC線維の関与を完全に否定するものではない。</p> <p>質問8) 膀胱内注入したメントールがAδ線維に作用する機序はどのようなものか。 (回答) 上皮下神経にも発現しているTRPM8が直接刺激された可能性と、尿路上皮のTRPM8活性化によって放出された伝達物質がAδ線維に作用した可能性がある。</p> <p>質問9) 論文には尿路上皮のTRPV1が活性化されると、細胞内カルシウム濃度が上昇し、それがNOやATPなどの神経伝達物質を放出するとあるが、その可能性はないのか？ (回答) そのような可能性も考えられる。</p> <p>質問10) 尿路上皮のTRPV1はNOの放出を促すとあるが、TRPM8についてはどうか？ (回答) これまでTRPM8についてそのような報告はない。</p> <p>質問11) メントールの膀胱頸部のα受容体への作用はどうか。 (回答) 今回は検討していない。</p>			

(質問12) これまでの脊損モデルでの同様な実験では膀胱容量の変化があったか。

(回答)膀胱容量は増大した。

質問13) 脊損では膀胱収縮への抑制が外れているので、メントールの刺激で膀胱収縮反射は亢進する可能性が高いのではないか？

(回答)脊損などの病態モデルでは膀胱上皮の透過性が変化するとの報告がある。脊損ラットへのメントール注入で膀胱容量が増大したが、膀胱上皮の透過性の亢進によってメントールが筋層まで浸透して平滑筋弛緩作用が表われたと考えている。

質問14) メントール及びペパーミントオイルの過活動膀胱へ臨床応用は進んでいるか？

(回答)ペパーミントオイルは内視鏡検査時の消化管蠕動の抑制や過敏性腸症候群の治療に使用されており、膀胱においても平滑筋弛緩作用が優位となれば臨床応用可能と考えるが、これまで過活動膀胱へのメントール及びペパーミントオイルの臨床応用は行われていない。

質問15) メントールを全身投与した場合、何%が膀胱に行くか？臨床ではどのような投与方法が考えられるか？

(回答)今回の実験は脊損患者の導尿時にメントールを膀胱内に注入する方法を想定している。現時点では全身投与は考えていないが、その場合の膀胱への移行率や薬理作用の程度などは分からない。

質問16) 臨床応用を考えた場合、実験に用いたメントールの濃度は高すぎることはないか？

(回答)実験に用いた3mMメントールは重量%濃度では0.04%であるが、市販の医薬品には0.1～1%程度含有されているものが多い。従ってヒトへの使用において濃度が高すぎることはないと考ええる。

質問17) 臨床で行われているカプサイシン膀胱内注入の作用機序はどのようなものか。

(回答)病態下の膀胱においては、その求心路としてC線維を介して排尿反射が促進されていると考えられている。C線維はカプサイシンで活性化されるTRPV1を発現しており、カプサイシンを膀胱内注入してC線維を脱感作させ、過活動膀胱を抑制する機序である。

質問18) 脱感作される時に、刺激によって排尿反射が促進されることはないか？

(回答)カプサイシン膀胱内注入は麻酔薬の前処置下で行われることが多く、排尿反射が亢進するかどうかははっきりしないが、その可能性は考えられる。

質問19) *N*-(3-aminopropyl)-2-[[3-methylphenyl)methyl]oxy]-*N*-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride salt (AMTB)の過活動膀胱への作用機序はどのようなものか。

(回答)カルシウム流入が関与するようだが、詳しい機序はわからない。

質問20) 将来、メントールがOABへの治療薬となる可能性を挙げたが、今回の研究では、排尿筋の収縮は抑制するが排尿閾値圧は下げるとの相反する作用を示している。尿意切迫がOABの症状なので、メントールが排尿閾値圧を下げるとすれば、OABの治療薬としては使いにくいのではないか？

(回答)今回の正常ラットでは閾値圧が低下したが、病態下ではメントールがDSDを誘発するとの報告もあり、臨床応用を考えると、切迫症状や膀胱出口への効果については更に検討が必要である。

質問21) OABの治療薬としては、TRPM8をブロックするAMTBとTRPM8を促進するメントールのどちらが使えるのか。

(回答)病態下の膀胱における膀胱壁の透過性の変化により、メントールが筋層まで浸透しその筋弛緩作用が優位に表われれば、メントールの膀胱内注入による排尿筋弛緩作用がOABの治療に使える可能性がある。しかし、膀胱内注入は特殊な投与方法であり、全身投与可能なAMTBのほうが治療薬として用いやすいと考える。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。