

学位論文  
Doctor's Thesis

家兔膀胱平滑筋からのアセチルコリン放出における  
NO 及び prejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体の役割  
(The role of nitric oxide and prejunctional  $\beta$ -adrenoceptors  
on acetylcholine release in the rabbit bladder)

宮本 豊  
Yutaka Miyamoto

指導教官

上田 昭一 教授

熊本大学大学院医学研究科泌尿器科学講座

2002年3月

学位論文  
Doctor's Thesis

論文名： 家兔膀胱平滑筋からのアセチルコリン放出における NO 及び prejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体の役割

(The role of nitric oxide and prejunctional  $\beta$ -adrenoceptors on acetylcholine release in the rabbit bladder)

著者名：宮本 豊  
Yutaka Miyamoto

泌尿器科学講座教授

指導教官名： 上田 昭一

審査委員名	1) 神経生化学講座担当教授	宮本 英七
	2) 第二薬理学講座担当教授	西 勝英
	3) 微生物学講座担当教授	前田 浩
	4) 循環器内科学講座担当教授	小川 久雄

2002年3月

- 目次 -

1) 要旨.....	1
2) 発表論文リスト.....	5
3) 謝辞.....	6
4) 略語一覧.....	7
5) 研究の背景と目的.....	8
5)-1 排尿機能の概略.....	8
5)-2 下部尿路の機能的解剖と神経機構.....	9
(1) 下部尿路の機能的解剖.....	9
(2) 下部尿路の神経機構.....	10
5)-3 下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質の生理作用発現機構.....	13
(1) アセチルコリンの生理作用発現機構.....	14
(2) ノルアドレナリンの生理作用発現機構.....	16
(3) NOの生理作用発現機構.....	17
(4) その他の物質の生理作用.....	21
5)-4 本研究の目的.....	23
6) 実験方法.....	24
6)-1 実験動物.....	24
6)-2 膀胱平滑筋から放出される神経伝達物質の測定.....	24
(1) マイクロダイアリシス法による神経伝達物質の回収.....	24

(2) 高速液体クロマトグラフィーによるアセチルコリンの定量.....	25
6)-3 膀胱平滑筋における機能実験.....	29
6)-4 使用薬剤.....	31
6)-5 解析.....	32
7) 実験結果.....	33
7)-1 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出 及び収縮反応に対する NO の影響の検討.....	33
(1) 薬物非存在化における検討.....	33
(2) NOS 阻害薬及び NO ドナーの影響.....	34
(3) アトロピン抵抗性収縮、及びカルバコール・ATP 誘発収縮に対する検討.....	39
7)-2 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出及び収縮反応 に対する prejunctional アドレナリン受容体の役割の検討.....	42
(1) 非選択的アドレナリン受容体阻害薬の影響.....	42
(2) 各種 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬の影響.....	42
8) 考察.....	48
8)-1 アセチルコリン放出量の測定法の有用性の検討.....	48
8)-2 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出 及び収縮反応に対する NO の影響.....	49
8)-3 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出 及び収縮反応に対する $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプの役割の検討.....	55
9) 結語.....	60
10) 参考文献.....	62

## 1) 要旨

家兎膀胱平滑筋からの経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量と収縮反応に対する一酸化窒素 (NO) の影響、及び prejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体の役割について筋浴槽を用いた機能実験及びマイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた方法によって検討した。

まず NO と膀胱機能の検討を行った。低頻度 (5Hz) 経壁電気刺激時において、 $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine (L-NNA) 前処置はアセチルコリン放出量及び収縮反応を有意に増加させ、さらに L-アルギニンを投与するとその反応は打ち消された。sodium nitroprusside (SNP) の前処置は L-NNA の有無にかかわらずアセチルコリン放出量及び収縮反応を有意に減少させた。一方、高頻度 (20Hz) 経壁電気刺激時には L-NNA も SNP もどちらの前処置でもアセチルコリン放出量及び収縮反応に影響を与えなかった。また SNP の前処置はカルバコール及び ATP 誘発収縮の用量反応曲線に全く影響を与えなかった。SNP 及び L-NNA は経壁電気刺激によるアトロピン抵抗性収縮の部分には影響を与えなかった。これらの結果から家兎膀胱平滑筋においては低頻度の経壁電気刺激時には内因性の NO はコリン作動性神経終末からのアセチルコリンの放出を抑制する作用を有しており、これにより蓄尿期の膀胱収縮が抑制される可能性が示唆された。

次にコリン作動性神経における prejunctional アドレナリン受容体の役割について検討した。イソプロテレノール及びプロカテロール前処置により非処置時に比べて経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量と収縮反応は用量依存性に有意に減少したが、ドブタミン、GS-332 前処置は影響を与えなかった。一方プロプラノロール前処置ではアセチルコリン放出量は用量依存性に増加したが、収縮反応は有意な変化を示さなかった。またフェントラミン前処置はアセチルコリン放出と収縮反応に対して作用を示さなかった。この結果から経壁電気刺激時に  $\beta_2$ -アドレナリン受容体を介して prejunctional にアセチルコリン放出を抑制す

メカニズムが存在していることが示唆された。NOとコリン作動性神経終末の prejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体を介するアセチルコリン放出と膀胱収縮の抑制機構が蓄尿期における膀胱機能に関与しているものと考えられ、主に蓄尿時のアセチルコリン放出を抑制することで膀胱の弛緩に関与する事が示唆された。

## Summary

The effects of nitric oxide (NO) on acetylcholine release and contractile response induced by electrical field stimulation in rabbit bladder smooth muscles were evaluated, using muscle bath technique and high performance liquid chromatography coupled with microdialysis procedure. Electrical field stimulation (supramaximum voltage, pulse duration 0.5 ms, frequency 5 Hz and 20 Hz) was applied to smooth muscle strip isolated from rabbit bladder. In the low frequency (5 Hz) stimulation, the pretreatment with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) (100 μM) significantly increased electrical field stimulation-induced acetylcholine release and contractile responses, which were reduced in the addition of L-arginine. In contrast, in the high frequency (20 Hz) stimulation, the pretreatment with L-NNA did not have significant effect on the contractile response and acetylcholine release. The pretreatment with sodium nitroprusside did not cause the significant changes in carbachol and ATP-induced contractile responses. Sodium nitroprusside and L-NNA did not have significant effects on atropine-resistant part of contraction induced by electrical field stimulation in rabbit bladder smooth muscles. These results suggest that there is a NO-mediated mechanism inhibiting acetylcholine release from cholinergic nerve endings in rabbit bladder.

Furthermore, the effects of β-adrenoceptor subtypes on acetylcholine release and contractile response induced by electrical field stimulation (5 Hz) in rabbit bladder smooth muscles were evaluated. Pretreatment with isoproterenol and procaterol caused concentration dependent decreases in acetylcholine release and contractile response induced by electrical field stimulation, although pretreatment with dobtamine and GS-332 had no effect. On the other hand, pretreatment with propranolol increased acetylcholine releases in the concentration dependent

manners, but did not have effects on the contractile response. These results suggest that there are prejunctional  $\beta$ -adrenoceptors and that the stimulation of prejunctional  $\beta_2$ -adrenoceptor may inhibit electrical field stimulation-induced acetylcholine release from cholinergic nerve endings in rabbit bladder smooth muscles. In conclusion, both NO- and prejunctional  $\beta$ -adrenoceptor-mediated inhibitory mechanism for acetylcholine release and bladder contraction may contribute to bladder function in filling phase.

## 2) 発表論文リスト

1. **Yutaka Miyamoto, Masaki Yoshida, Wataru Takahashi, Akito Inadome, Makoto Yono, Hiroshi Seshita, Shigetaka Murakami, Shoichi Ueda (2001)** The effect of nitric oxide on acetylcholine release in the rabbit bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 428 : 59.
2. **Akito Inadome, Masaki Yoshida, Wataru Takahashi, Makoto Yono, Hiroshi Seshita, Yutaka Miyamoto, Shoichi Ueda, (1998)** Prejunctional muscarinic receptors modulating acetylcholine release in rabbit detrusor smooth muscles. *Urologia Internationalis.* 61(3) : 135.
3. **稲留彰人、吉田正貴、高橋 渡、米納 誠、瀬下博志、宮本 豊、村上 滋孝、上田昭一 (1999)** マイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーを用いた下部尿路平滑筋から放出される神経伝達物質の定量  
*J. Smooth Muscle Res.* 3 : 59.
4. **Yono, M., Yoshida, M., Takahashi, W., Inadome, A., Seshita, H., Miyamoto, Y., Ueda, S. (2000)** Effects of ovarian hormones on  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated relaxation in the female rabbit bladder. *Urol. Res.* 28 : 35.
5. **Seshita, H., Yoshida, M., Takahashi, W., Inadome, A., Yono, M., Miyamoto, Y., Murakami, S., Ueda, S. (2000)** Prejunctional  $\alpha$ -adrenoceptors regulate nitrenergic neurotransmission in the rabbit urethra. *Eur. J. Pharmacol.* 400 : 271.

### 3) 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御支援下さった本研究室の上田昭一教授、吉田正貴助教授、ならびに泌尿器科学講座の皆様に深謝いたします。

#### 4) 略語説明一覧

- AC; adenylate cyclase アデニル酸シクラーゼ
- ACh; acetylcholine アセチルコリン
- ATP; アデノシン三燐酸
- cAMP; cyclic AMP サイクリック AMP
- cGMP; cyclic GMP サイクリック GMP
- CGRP; calcitonin gene-related peptide
- DG; diacylglycerol ジアシルグリセロール
- EDRF; endothelium-derived relaxing factor 内皮由来弛緩物質
- EDTA; ethylen diamine tetraacetic acid
- GDP; グアノシン二燐酸
- Gi; 抑制性 G 蛋白
- Gs; 促進性 G 蛋白
- GTP; グアノシン三燐酸
- IP<sub>3</sub>; inositol-triphosphate イノシトール三燐酸
- L-NAME: N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester  
N<sup>G</sup>-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル
- L-NNA; N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine N<sup>G</sup>-ニトロ-L-アルギニン
- NA; noradrenaline ノルアドレナリン
- NADPH; ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド燐酸
- NANC; nonadrenergic noncholinergic 非アドレナリン非コリン作動性
- NO; Nitric Oxide 一酸化窒素
- NOS; NO synthase NO 合成酵素
- NPY; neuropeptide Y ニューロペプチド Y
- PDE; phosphodiesterase ホスホジエステラーゼ
- PLC; phospholipase C ホスホリパーゼ C
- TTX; tetrodotoxin テトロドトキシン
- VIP; vasoactive intestinal polypeptide 血管作動性腸管ペプチド

## 5) 研究の背景と目的

近年の高齢化社会に伴い、QOLを重視した治療が求められるようになってきている。この点、日常生活のQOLの維持の中で重要な部分を占める「蓄尿～排尿の機構」についても関心が深まりつつある。この「蓄尿～排尿の機構」の理解なしには、適切な治療が行えないと言っても過言ではなく、種々の病態生理について解明がすすんできているが、いまだ不明な点も多く、今後の課題となっている。

本章では、5)-1で排尿機能の概略を、5)-2では下部尿路の機能的解剖と神経機構を示したのち、5)-3では下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質の生理作用発現機構、5)-4では本研究の目的について述べる。

### 5)-1 排尿機能の概略

排尿機能は膀胱に尿をためる蓄尿機能とたまった尿を体外に排泄する排出機能という2つの機能がある。これらの排尿機能は下部尿路と呼ばれる膀胱及びその排出路（膀胱頸部、尿道、外尿道括約筋）によって行われており、以下に述べる複雑な神経系の支配下にある。蓄尿時には膀胱内の尿が漏れないように、尿量が増えても膀胱内圧が低く保たれ、排出路は常に閉じており、尿道閉鎖圧は膀胱内圧よりも高く維持されている必要がある。一方、排尿時は、随意的に排尿が開始でき、膀胱の収縮とともに排出路の抵抗が低下して、円滑に尿が排出されなければならない。この蓄尿及び排尿における膀胱と排出路の協調機能の大部分は脳幹部の橋排尿中枢以下の自律神経系の反射制御による。この自律神経反射により橋より上位の脳による制御が加わり、随意的な排尿の遅延、開始が可能となる。この概略を図5-1に示すが、本章では以後末梢神経を中心に述べる事とする。

## 5)- 2 下部尿路の機能的解剖と神経機構

### (1) 下部尿路の機能的解剖

膀胱平滑筋は三層で構成され、まとめて排尿筋と呼ばれる。排尿筋は外層の縦走筋、中層の輪状筋そして内層の縦走筋よりなるが、筋層構造は明瞭ではなく、厚い筋束がお互い連絡しあう網目構造をとっているため、膀胱は全体として収縮することができる機能的合胞体である。電顕的観察によると膀胱の個々の平滑筋細胞間では閉鎖帯が存在しない代わりに細胞の間隙が極めて狭い接合構造となっており、この構造によって電氣的興奮が伝播する。膀胱壁近傍には神経叢や神経節が存在しそこから多数の節前節後線維が排尿筋に分布する。排尿筋の組織化学染色がアセチルコリン陽性を示すことから、これらの神経は大部分コリン作動性神経であり排尿筋は副交感神経の活動によって収縮する。交感神経であるアドレナリン作動性神経も排尿筋に分布し、蓄尿時に排尿筋収縮を抑制している(Steers, 1997)。

膀胱頸部から近位尿道にかけても平滑筋が連続して、そこに括約筋機構が備わった内尿道括約筋を形成している。膀胱の機能的解剖は、男性と女性で相違はないが、内尿道口～尿道では大きく異なる。男性では、内尿道口（膀胱頸部）から始まり、後部尿道（前立腺尿道、膜様部尿道）、前部尿道（陰茎部尿道）を経て、亀頭部の外尿道口に至る。排尿機能に関与するのは、内尿道口から膜様部尿道である。膀胱頸部の平滑筋内層（内側縦走筋）は、内尿道口から尿道の平滑筋に移行する。平滑筋中層（中間の輪状筋）は、膀胱頸部から前立腺部で括約筋として機能する。外層の平滑筋（外側縦走筋）は主に背側で厚く、膀胱頸部を取り囲み、尿禁制機能にも関与するといわれている。これらの筋にはアドレナリン作動性神経が豊富に分布する。

女性の尿道は男性の尿道の近位尿道に相当すると考えられている。男性との相違は、平滑筋中層（中間輪状筋）の構造が男性ほど強固ではない点と、アドレナ

リン作動性神経が男性ほどは多くない点である。横紋筋である外尿道括約筋が中間部尿道で尿道を取り囲むように、そして尿道隔膜部近くで尿道と膣を一緒に取り囲むように存在する。外尿道括約筋の外側には尿道を拳上支持する骨盤底筋群が存在し、全体として尿道の閉鎖機構に関与している。

## (2) 下部尿路の神経機構

下部尿路を支配、調節している末梢神経として、自律神経系の骨盤神経(副交感神経)と下腹神経(交感神経)、および体性神経の陰部神経の三種類の神経がある。この各々の神経に下部尿路からの情報を中枢へ伝える求心性神経と、大脳や橋排尿中枢などの高位中枢からの命令を下部尿路へ伝える遠心性神経とがあり、蓄尿と排尿は複雑な神経機構によって営まれている。骨盤神経の起始核は仙髄中間外側核に、下腹神経の起始核は腰髄中間外側核に、陰部神経の起始核は仙髄前核(オヌフ核)にある。動物実験から、蓄尿機能は主に腰仙髄を介して行われるとされ、排出機能は脳幹部(橋排尿中枢)を介して行われると考えられている。

蓄尿時には膀胱伸展の情報が骨盤神経を経て脊髄後根から仙髄に入り、まずオヌフ核と呼ばれる陰部神経核の神経を興奮させる(Onuf, 1900)。オヌフ核からの遠心路は陰部神経、また一部は骨盤神経を経由して外尿道括約筋を収縮させる(Morita et al., 1984)。骨盤神経を介して仙髄に入った求心性入力はさらに脊髄内を上行して胸腰髄交感神経核(中間外側核)に至る。ここからの遠心路は交感神経幹の中に入ってニューロンを換える場合やそのまま素通りして下腹神経、骨盤神経叢あるいはさらに末梢の神経節でニューロンを換えたり一定の形式はないものの、下腹神経を経由して骨盤内へ入る。そのため下腹神経は節前節後線維が混在するが、最終的には節後線維としてアドレナリン作動性神経が内尿道括約筋、膀胱頸部に分布し、 $\alpha_1$ -アドレナリン受容体を介して緊張を増大させると同時に骨盤神経節にも分布し、神経節内で副交感神経のシナプス伝達を $\alpha_2$ -アドレナリン受容体を介して抑制して膀胱収縮を抑制する。さらに、膀胱体部に分布する下

腹神経は、 $\beta$ -アドレナリン受容体を介して膀胱平滑筋を弛緩させる (Edvardsen, 1968 ; de Groat and Saum, 1972 ; Norlen et al., 1978)。

排尿時には膀胱からの求心性入力は骨盤神経を經由して仙髄に入り上行して橋排尿中枢に至る。橋排尿中枢からの遠心性出力は仙髄副交感神経核 (中間外側核) の神経を興奮させ、骨盤神経を介して膀胱平滑筋を収縮させる。同時に橋排尿中枢からの遠心性出力は仙髄のオヌフ核を抑制して外尿道括約筋を弛緩させるとともに、胸腰髄の交感神経核を抑制して膀胱頸部の緊張、膀胱の弛緩および骨盤神経節での副交感神経興奮伝達の抑制を解除する。

最近、排尿時の尿道弛緩は交感神経の抑制によって膀胱頸部の緊張が解除されるだけでなく、主に NO 作動性神経によって分泌される NO による積極的な弛緩が関与していることが明らかにされた。各種動物 ( Dokita et al., 1991; Andersson et al., 1991, 1993 ; Hashimoto et al., 1993 ; Werkstrom et al., 1995 ; Bennett et al., 1995 ; Garcia-Pascual et al., 1996 ; Takahashi et al., 1997) あるいはヒト ( Andersson et al., 1992 ; Ehren et al., 1994 ; Dixon and Jen., 1995) において NO が尿道弛緩の一因になることを示している多くの報告がある。

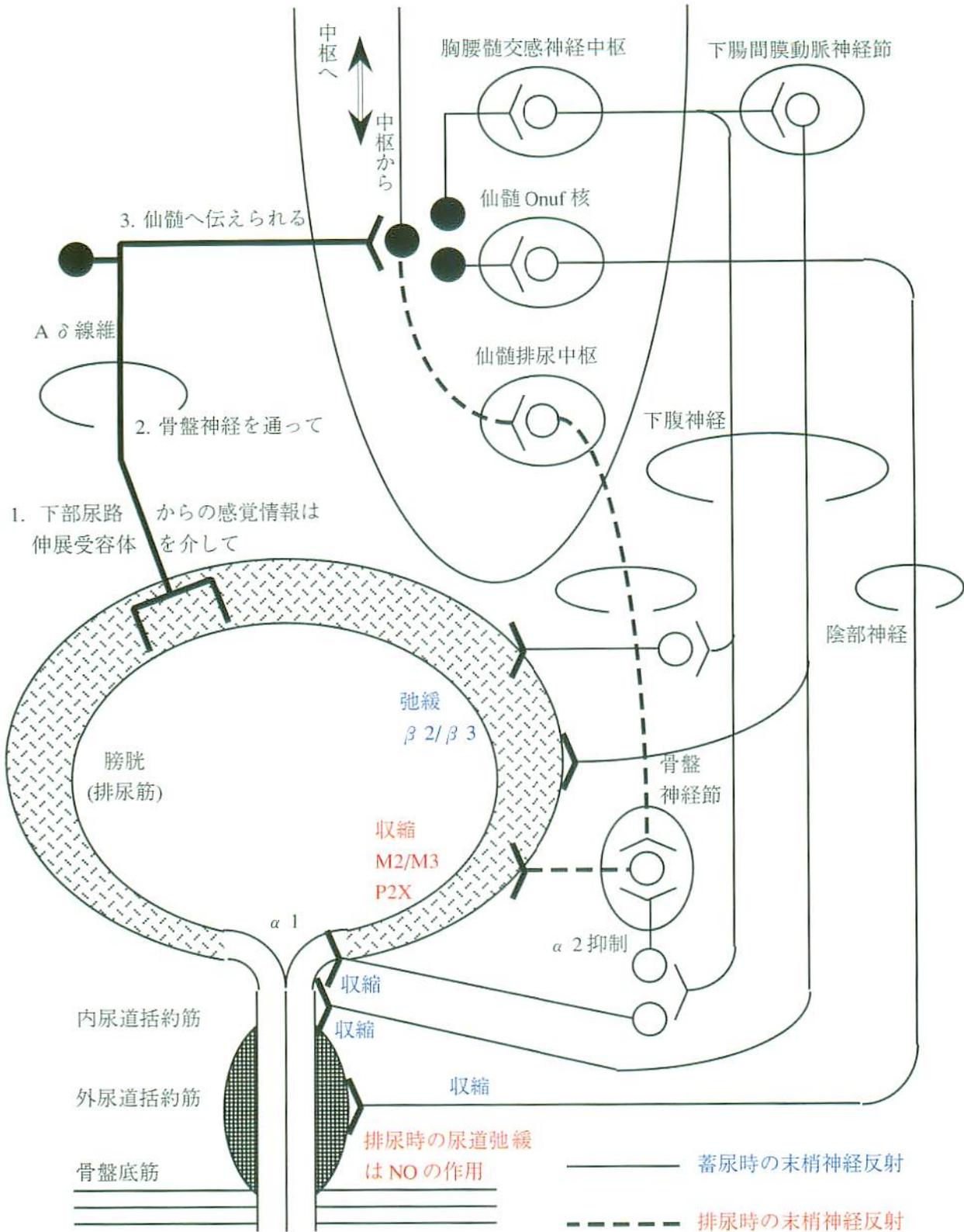


図 5-1 末梢神経機構

蓄尿時では、無意識下に下腹神経の  $\beta$  作用で排尿筋は弛緩し、 $\alpha 1$  作用で内尿道括約筋は収縮、陰部神経を介して外尿道括約筋は収縮する。

排尿時では、橋排尿中枢に対する大脳からの抑制が解除されるため、蓄尿時の神経反射はなくなり、仙髄排尿中枢からの骨盤神経の活動で排尿筋は収縮する。

### 5)-3 下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質の生理作用発現機構

下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質(アセチルコリン、ノルアドレナリン)の受容体は細胞外に N 末端を、細胞内に C 末端を出す 7 回膜貫通型受容体であり、7 本の  $\alpha$  ヘリックスが囲むポケットの内部に神経伝達物質が結合すると考えられている (Strader et al., 1994)。受容体に共役する G 蛋白質はいずれも  $\alpha \beta \gamma$  の三量体構造を持つ。グアノシン二リン酸 (GDP) が結合した  $\alpha \beta \gamma$  三量体は不活性型で、受容体刺激により GDP に代わってグアノシン三リン酸 (GTP) が  $\alpha$  に結合し、GTP 結合  $\alpha$  と  $\beta \gamma$  に解離して、この状態 (活性型) でエフェクターに作用して情報を伝達する (図 5-2)。一方、下部尿路から放出される NO は特殊な受容体との結合なしに、細胞内に情報を伝達する。以下、(1) アセチルコリン、(2) ノルアドレナリン、(3) NO、(4) その他の物質の生理作用発現機構に分けて述べる。

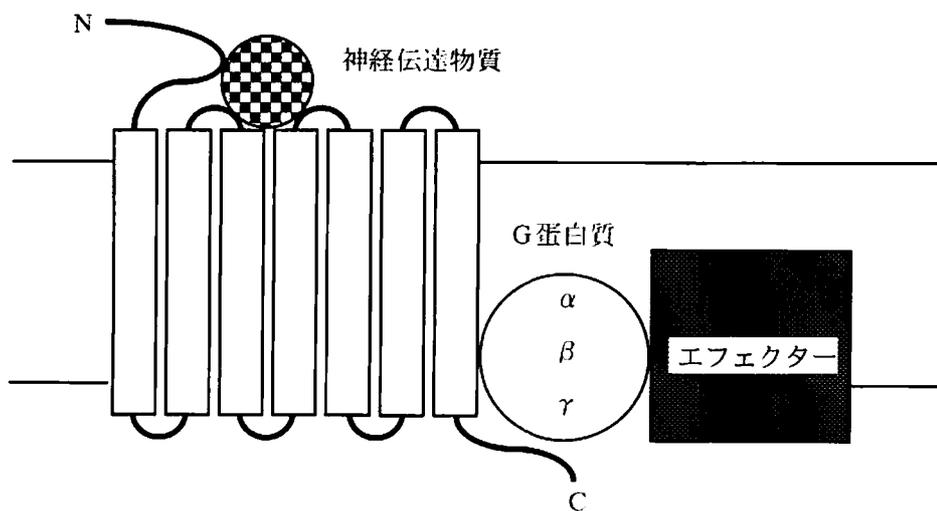


図 5-2 G 蛋白質共役型受容体 (7 回膜貫通型受容体) の模式図

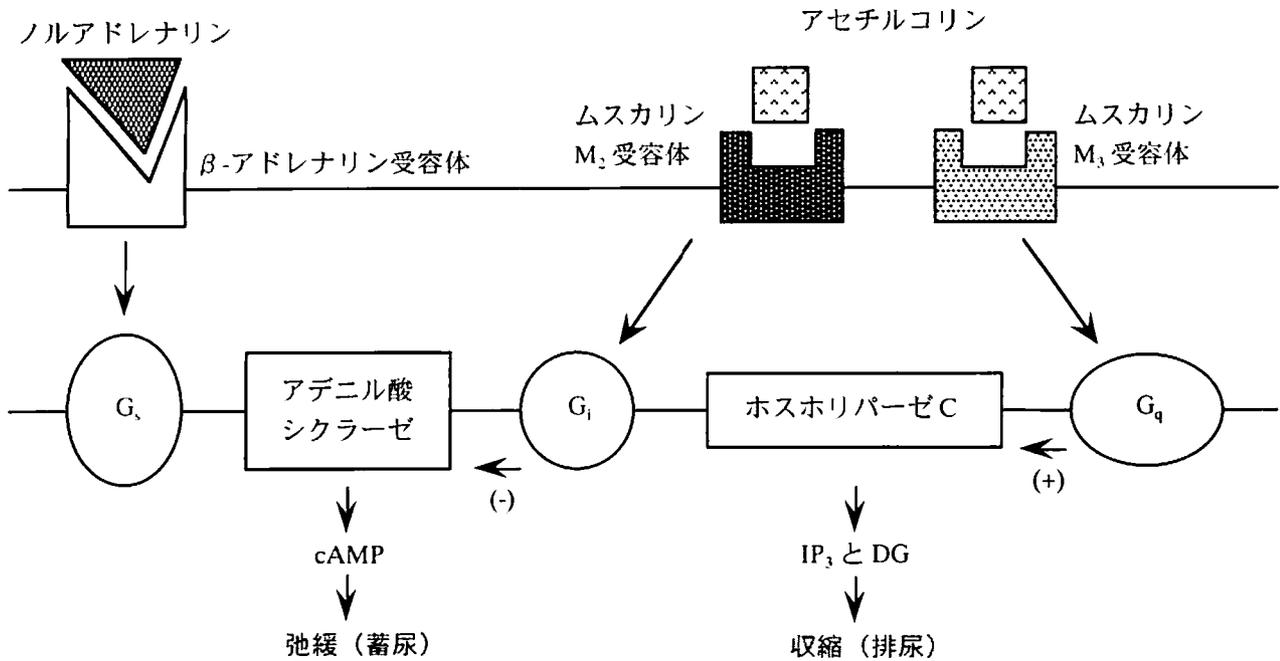
下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質(アセチルコリン、ノルアドレナリン)は水溶性の生理活性物質で、それ自身が細胞膜を透過することなく、細胞膜上にある受容体に結合する。G 蛋白質は GDP が結合した  $\alpha \beta \gamma$  の形で受容体の細胞質側ループ(主に第三ループの膜近傍部位)と直接相互作用を行っている。

### (1) アセチルコリンの生理作用発現機構

最近、ムスカリン受容体は薬理的にも分子生物学的にも5種類のサブタイプ ( $M_1$ - $M_5$ ) に分類され (Dörje et al., 1991; Caulfield and Birdsall, 1998)、膀胱平滑筋には  $M_2$  と  $M_3$  のサブタイプが存在し、ムスカリン  $M_2$  受容体が優位に存在するが、収縮にはムスカリン  $M_3$  受容体が関与することが明らかにされた (Wang et al., 1995; Mutoh et al., 1987)。アセチルコリンが膀胱平滑筋に存在するムスカリン  $M_3$  受容体に結合すると、これに共役する G 蛋白質 ( $G_q$ ) はホスホリパーゼ C を活性化し、ホスファチジルイノシトール二リン酸を分解して、ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) を産生する (図 5-3A)。DG はプロテインキナーゼ C (C キナーゼ) の活性化を通して種々の生理作用を調節し、 $IP_3$  は小胞体の  $IP_3$  受容体に作用して細胞内  $Ca^{2+}$  動員を誘導する (Berridge, 1993)。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が高まると、 $Ca^{2+}$  はカルモデュリンと結合し、ミオシン軽鎖がリン酸化されることによって膀胱平滑筋を収縮させる。またアセチルコリンが膀胱平滑筋に存在するムスカリン  $M_2$  受容体に結合すると、これに共役する G 蛋白質 ( $G_i$ ) はアデニル酸シクラーゼに対して抑制的に作用し (図 5-3A)、平滑筋の弛緩に影響を及ぼす (Eglen et al., 1994)。また、ムスカリン受容体はコリン作動性神経の神経終末にも存在しており、アセチルコリンの放出を抑制していることがわかってきた。ラットやウサギの膀胱のコリン作動性神経の神経終末には、アセチルコリンの放出に対して抑制的に働く  $M_2$  受容体と促進的に働く  $M_1$  受容体が存在することが知られている (Braverman et al., 1998; Inadome et al., 1998b)。

一方尿道におけるその役割は、下腹神経から放出されるノルアドレナリンに対し、骨盤神経を介して修飾作用を行ったり、NO 作動性神経の調節作用に関与するに留まり、尿道平滑筋の収縮、弛緩に対する直接的な作用は前2者と比較すると少ない。最近、尿道において  $M_2$  受容体が NO の放出を抑制している可能性が示唆されている。なお、副交感神経におけるアセチルコリン-ムスカリン受容体を主体とした神経筋接合部のシェーマを図 5-4 に示す。

## A 膀胱



## B 尿道

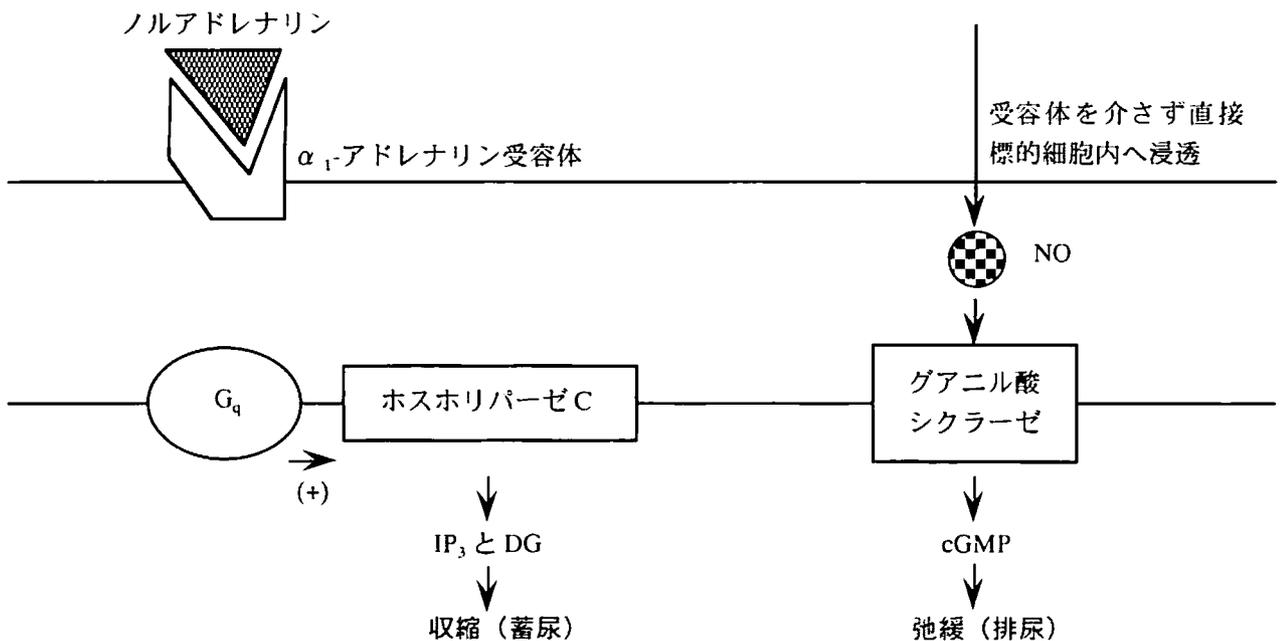


図 5-3 下部尿路の支配神経から放出される神経伝達物質の生理作用発現機構

蓄尿時には、アドレナリン作動性神経からノルアドレナリンが放出され、膀胱のβ-アドレナリン受容体が刺激されて膀胱平滑筋を弛緩させ、尿道のα<sub>1</sub>-アドレナリン受容体が刺激されて尿道平滑筋を収縮させる。

排尿時には、コリン作動性神経からアセチルコリンが放出され膀胱のムスカリン M<sub>3</sub> 受容体が刺激されて膀胱平滑筋を収縮させ、NANC 神経から NO が放出され尿道平滑筋を弛緩させる。

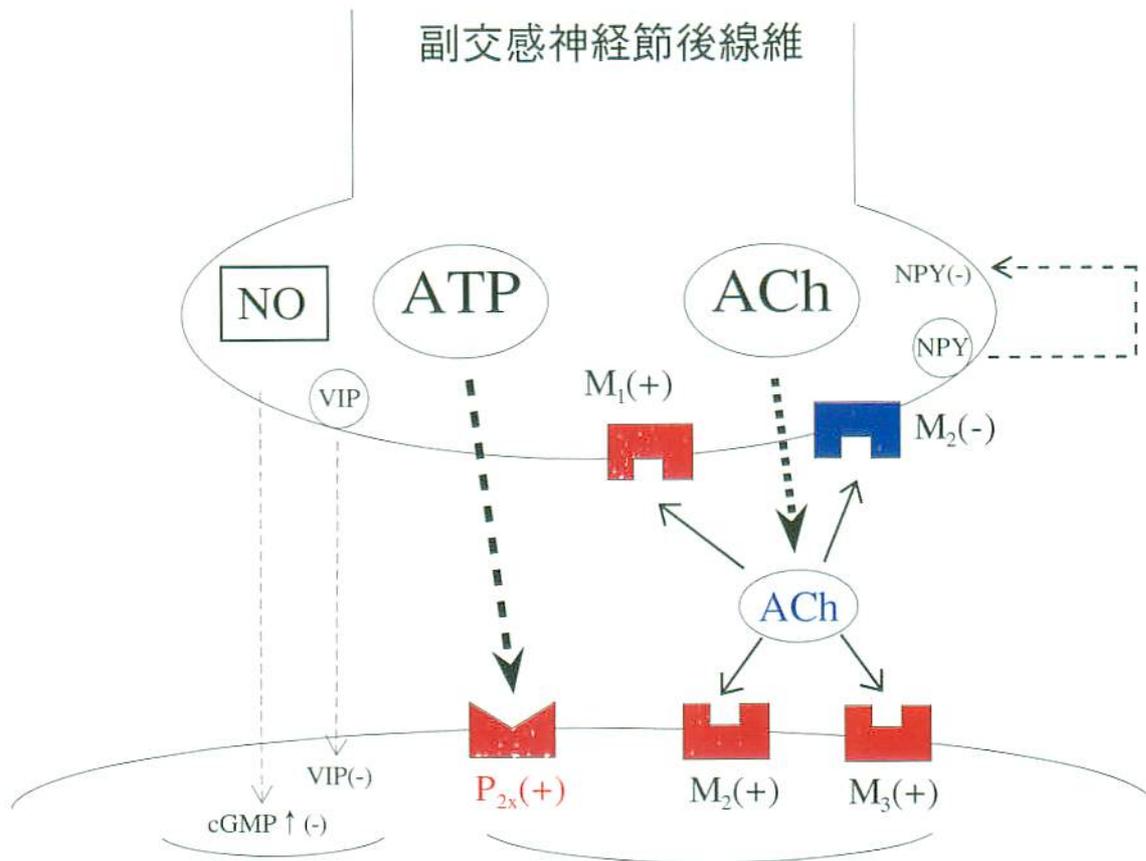


図 5-4 副交感神経の神経筋接合部における伝達機構のシエーマ  
赤受容体は収縮の促進、青受容体は抑制を示す (Yoshimura et al., 1997)。

## (2) ノルアドレナリンの生理作用発現機構

交感神経である下腹神経は前後線維末端よりノルアドレナリンを放出し、 $\alpha_1$  受容体を介して膀胱底部と尿道平滑筋の収縮を引き起こす。アドレナリン受容体には、大きく分けると  $\alpha$ 、 $\beta$  の二つがあり (Ahlquist, 1948)、 $\alpha$ -アドレナリン受容体は 1974 年に Langer により、さらに  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$  の二つに分類された。内尿道括約筋、膀胱頸部には、主に  $\alpha_1$  アドレナリン受容体が存在する。現在、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体はさらに薬理的 ( $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1B}$ 、 $\alpha_{1D}$ ) にも分子生物学的 ( $\alpha_{1a}$ 、 $\alpha_{1b}$ 、 $\alpha_{1d}$ ) にも三種類のサブタイプに分類されており (Hieble et al., 1995)、い

ずれも G 蛋白質 ( $G_q$ ) を介してホスホリパーゼ C を活性化し、 $IP_3$  と DG を産生する (図 5-3B)。尿道および前立腺の平滑筋に主に存在する  $\alpha_1$  受容体のサブタイプは、 $\alpha_{1A}$ 、 $\alpha_{1D}$  と報告されている。 $\alpha_2$  アドレナリン受容体は  $G_i$  蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、cAMP 産生を減少させ、平滑筋を収縮させる (図 5-3B)。 $\alpha_2$  アドレナリン受容体は薬理的に四種類のサブタイプ ( $\alpha_{2A}$ 、 $\alpha_{2B}$ 、 $\alpha_{2C}$ 、 $\alpha_{2D}$ ) に分類される。 $\alpha_{2A}$ 、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体には  $Ca^{2+}$  チャンネル抑制作用、 $\alpha_{2A}$ 、 $\alpha_{2C}$  アドレナリン受容体にはホスホリパーゼ C 活性化作用が報告されているが、 $\alpha_{2D}$  アドレナリン受容体の役割は不明である (Docherty, 1998)。尿道では膀胱平滑筋に比べ、 $\beta$  アドレナリン受容体の関与は少ない。 $\beta$  アドレナリン受容体は薬理的にも分子生物学的にも三種類のサブタイプ ( $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ ) に分類され (Lipworth, 1996; Strosberg and Pietri-Rouxel, 1996)、膀胱平滑筋においても  $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプが存在することが明らかにされた (Levin et al., 1988; Morita, 1989; Igawa et al., 1997, 1999; Takeda et al., 1997, 1999)。すなわち排尿筋の弛緩に関与する  $\beta$  受容体には種差があり、最新の知見ではヒト排尿筋の交感神経刺激による弛緩反応は主に  $\beta_3$  受容体を介することが明らかとなった。ノルアドレナリンが  $\beta$  アドレナリン受容体に結合すると、これに共役する G 蛋白質 ( $G_s$ ) はアデニル酸シクラーゼを活性化し、ATP を cAMP に変換して、これがセカンドメッセンジャーとして作用すると考えられている (Rodbell, 1980)。cAMP は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (A キナーゼ) の活性化を行い、ミオシン軽鎖が脱リン酸化されることによって膀胱平滑筋を弛緩させる。また、A キナーゼが膜の  $K^+$  チャンネルを開口させることによって膜の過分極が起こり、この結果平滑筋を弛緩させる機序も考えられている。

### (3) NO の生理作用発現機構

本章ではまず NO の基礎的事項について概説し、次に下部尿路 (尿道、前立腺、膀胱) における NO の生理的作用について述べる。

NO が生体内で産生され生理重要な物質であると考えられるようになったのは Furchgott (1980) の内皮由来弛緩因子 (Endothelium derived relaxing factor, EDRF) の発見にさかのぼる。この報告は、アセチルコリンの血管弛緩作用発現には正常な内皮細胞の存在が必須であり、内皮を除去するとアセチルコリンは血管平滑筋を他の平滑筋（気管、腸管、瞳孔括約筋など）と同様に収縮させるというものであった。つまり、アセチルコリンは内皮細胞に作用して強力な平滑筋弛緩因子 (EDRF) を遊離することにより末梢血管を拡張させると考えられた。また、この EDRF はアセチルコリン以外にもブラジキニン、 $Ca^{2+}$ -ionophore、ATP、ADP やサブスタンス P によっても放出され、血管の弛緩を引き起こすことがその後知られるようになった。これらの物質による内皮依存性の血管平滑筋弛緩反応はシクロオキシゲナーゼ阻害剤によって影響を受けないので、これまで強い血管弛緩物質として考えられていたプロスタグランジン (PG) $I_2$  や PGE によるものではないと考えられた。EDRF の本体をつきとめるための生化学的研究が多くの研究者により試みられたが、Furchgott (1988)、Palmer (1987) 及び Ignarro ら (1990) のグループは独自に EDRF の生化学的特性が NO のそれに極めて似ていることを報告した。また Moncada らのグループは培養内皮細胞の培地に L-アルギニンを加え EDRF 遊離物質として知られているブラジキニンを添加したところ、培養液中に NO の産生を認めることを報告し (Palmer, 1988)、この結果から内皮細胞において L-アルギニンが酵素の触媒を受けて L-シトルリンに変換する際に NO を産生することが明らかとなった。また彼らは NO の産生はアルギニン誘導体である N<sup>ω</sup>-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA) により抑制されることを報告し (Palmer, 1988)、その後多くの NO 合成酵素阻害剤が見出された (Moncada, 1991)。このような NO の産生とその阻害の立証はその後の NO 研究の進展に大きく貢献することとなった。

NO を産生する酵素が NO 合成酵素 (NOS) である。NOS は L-アルギニンと分子状酸素を基質として NADPH、FMN、FAD、テトラヒドロピオプテリンを補酵

素としてヒドロキシ-L-アルギニンを経てL-シトルリンとNOを生成する。今日NOSには3種類(I~III型)のアイソフォームが知られている。I型はラットの小脳から精製されたもので神経型NOS (nNOS、bNOS)、構成型NOS、cNOS(constitutive NOS)などと呼ばれている。主に中枢神経系に分布しているが、末梢のNANC神経線維、腎臓のマクロデンサ、肺上皮細胞、膵の $\beta$ 細胞、消化器官の神経叢などにも局在しており、必ずしも神経系に特異的なものではない。このタイプは生理的な環境においては $Ca^{2+}$ 濃度により活性が制御されているとされており、いろいろなホルモンや神経伝達物質によって、NOSを有する後シナプス部位の細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度が上昇すれば活性化が起これると考えられる。このようにして作られたNOは容易に細胞外へ放出され、周囲の細胞との間の細胞間伝達物質として機能していると考えられている。II型NOSはマクロファージなどの免疫系の細胞に誘導型の酵素として見出され、誘導型NOS、iNOS (inducible NOS)、マクロファージNOS、macNOS等と呼ばれている。またIII型は主に血管内皮細胞に存在するものであり、血管内皮型NOS、eNOS(endothelial NOS)と呼ばれている。これら後者二つのNOSに関しては今回の実験系において特に中心的役割を果たしていないと思われるため詳細は省略する。

実際の尿道、前立腺でのNOによる弛緩の生理作用は次のように考えられている。NO作動性神経においてnNOSによって産生されたNOは、小分子のガス状物質であるために特殊な受容体との結合なしに尿道平滑筋細胞内に容易に浸透し、ここで可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、GTPをcGMPに変換して(図5-3B)、これがセカンドメッセンジャーとして作用すると考えられている(Dokita et al., 1991; Andersson et al., 1992; Steers, 1997)。cGMPはcGMP依存性プロテインキナーゼ(Gキナーゼ)を活性化することによって、尿道平滑筋を弛緩させ、その後PDEにより分解される。

さて膀胱機能とNOの関係についてもいくつかの報告がある。Burnettら

(1995)の報告では、ラット脊髄 L5~S2の部分に NADPH ジアホラーゼ染色陽性の NOS 活性部位が見られ、これは副交感神経核とほぼ一致していた。また L3 部の NOS 活性部位は preganglionic な副交感神経と交感神経の起始部と一致していた。さらに、これらの腰仙髄部の NOS 陽性部は、major pelvic ganglia に投射しており、NO が膀胱を含めた骨盤内臓器の機能に大きく関係していることを示唆している。ラット、ヒト膀胱平滑筋でも NADPH ジアホラーゼ染色による NOS 活性部位が認められている (McNeil et al., 1992; Smet et al., 1994)。In vitro でカルバコールで前収縮させたブタの利尿筋は外因性に NO を与えた場合 (NaNO<sub>2</sub> SIN1; NO donor) には弛緩反応を惹起するが、経壁電気刺激ではエンドセリン 1 で前処置させた排尿筋はほとんど弛緩しなかった。この結果より、排尿筋では非アドレナリン、非コリン性線維を介した L-アルギニン-NO 系による弛緩反応は認められないと考えられる (Persson and Andersson, 1992)。一方膀胱三角部平滑筋をノルアドレナリンで収縮させ経壁電気刺激を行うと弛緩がおり、NOS 阻害剤やオキシヘモグロビン (グアニレートサイクラーゼ阻害剤) でこの弛緩は抑制される。膀胱平滑筋での NO の作用については、まだ一定の見解が得られておらず、このように、利尿筋と三角部平滑筋ではその機能への NO の関与は異なると考えられる。In vivo でラットに NO 合成阻害剤を注射すると、排尿量が低下し、膀胱は過活動の状態となり頻尿が続くと報告されている (Persson et al., 1992)。またラット利尿筋は NO donor により有意な弛緩反応を示すという結果より、NO donor の膀胱内注入が家活動膀胱の治療薬として有望であろうとの報告もみられている (Chung et al., 1996)。これらの報告に見られるように膀胱に対する NO の作用については未だ定まった見解が得られていないのが現状である。今回我々は NO の膀胱における働きについての、一つの可能性を示唆する結果を得た。これについては結果、考察の項で後述する。

#### (4) その他の物質の生理作用

##### (a)ATP

1972年、Burnstockらは、ノルアドレナリンとアセチルコリンとを完全にブロックしても膀胱収縮が残ることから、これを非アドレナリン非コリン作動性 (non-adrenergic, non-cholinergic : NANC) 神経と命名した。排尿時の排尿筋収縮は副交感神経の興奮により生じるが、多くの哺乳類の膀胱平滑筋は、経壁電気刺激により収縮を誘発した場合、その収縮反応はアトロピン前処置により部分的にしか抑制されない事が知られていた。その後、アトロピン抵抗性の排尿筋収縮をもたらす興奮性神経伝達物質はATPであることが判明した。動物では膀胱収縮のおよそ20~30%がATP依存性であるとされ、プリン受容体に結合する。プリン受容体サブタイプは主に $P_2$ であり、このうち $P_{2x}$ 受容体が膀胱収縮に働き、 $P_{2y}$ 受容体刺激では弛緩がみられる。膀胱収縮は早期に起こる短い収縮波と、これに続く長い収縮波の二相成分からなり、前者はATP作動性、後者はアセチルコリン作動性であるとされ (Chancellor et al., 1992)、また膀胱の $P_{2x}$ 受容体は排尿前収縮を惹起して排尿反射を促進するとされる (Igawa et al., 1994)。すなわち $P_{2x}$ 受容体波早期に作動してそれ以降に作動するムスカリン受容体と協調して一連の排尿反射を完結するとみなされている。しかし、正常機能を示すヒト膀胱では非コリン作動性神経伝達の関与はきわめてわずかで、あくまで主体はコリン作動性神経伝達によって収縮するものとされている。このATPを介する神経伝達の占める割合は加齢とともに増加する一方、コリン作動性収縮の割合は加齢とともに減少することが示され、この双方の割合の変化が高齢者の過活動膀胱の発症と関連する可能性を示唆している (Yoshida et al., 2001)。

##### (b) プロスタグランジン

プロスタグランジン (PG) はヒトを含む哺乳類の膀胱に伸展、粘膜障害、神経刺激、炎症等の刺激を加えると膀胱の平滑筋や粘膜から遊離される

(Andersson et al., 1993)。PG は膀胱平滑筋を直接収縮する作用があると同時に、capsaicin 感受性知覚神経に作用し、膀胱伸展に対する求心性神経の神経活動を促進させるため、排尿反射が誘発される閾値を低下させる作用がある (Andersson et al., 2000)。ヒト膀胱ではコリン作動性神経に節前性に PG 受容体が存在し、アセチルコリンの遊離を促進する作用があることが報告されている (Palea et al, 1998)。

#### (c) VIP

VIP は排尿筋の自発的な収縮を抑制するとみられている。無抑制収縮や不安定膀胱において膀胱の VIP 量が減少することから無抑制収縮との関連が示唆されている。

#### (d) タヒキニン

タヒキニン (substance P : SP, neurokinin A : NKA, neurokinin B : NKB) は無髄の知覚神経 C 線維の伝達物質である。タヒキニン受容体サブタイプは、膀胱では主に NK<sub>2</sub>、脊髄では主に NK<sub>1</sub> 受容体が関与しているとされる。タヒキニンを含有している C 線維は、脊髄損傷に伴う無抑制収縮の求心路であることが近年示された。トウガラシの主成分であるカプサイシンやレジニフェラトキシンは、知覚神経 C 線維や脊髄後根神経節上にあるバニロイド受容体に選択的に結合する神経毒である。脊髄損傷後の過活動型膀胱には、サブスタンス P を枯渇させ C 線維を選択的に破壊する神経毒カプサイシンの膀胱内注入療法が最近注目されている (Fowler et al., 1992)。

#### (e) その他の神経ペプチド

末梢神経におけるその他の神経ペプチドとしてニューロペプチド Y(NPY)、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、エンドセリン (ET) などがある。このうち

ETは膀胱平滑筋と尿道平滑筋の双方に ET-1 受容体の存在を認め、平滑筋の収縮をもたらすとされる (Garcia-Pascual et al., 1993 ; Wada et al., 2000)。NPYはアセチルコリンの放出を抑制しコリン性収縮を減少させるとされるが実態は不明である。また、CGRPはタヒキニン同様、膀胱の求心性神経にみられるが、その役割については他の神経ペプチド同様今後の説明が待たれている。

#### 5)- 4 本研究の目的

以上のように下部尿路機構は様々な神経伝達物質が複雑に絡み合いながら構築されている。しかしながら膀胱の収縮の大部分は、副交感神経由来のコリン作動性神経から神経伝達物質として放出されたアセチルコリンが膀胱排尿筋のムスカリン受容体を刺激することによって生じているのは疑いようの無い事実である。このアセチルコリンの放出に関しては、前述のようにムスカリン受容体においてはコリン作動性神経終末に抑制的に働く  $M_2$  受容体と促進的に働く  $M_1$  受容体が存在し、節前性の調節機構が注目されている (Braverman et al., 1998 ; Inadome et al., 1998b)。このようなアセチルコリン放出の節前性の調節機構について、NOと $\beta$ -アドレナリン受容体に注目した。これまで述べてきたようにNOは膀胱において蓄尿機能への関与を示唆され、またノルアドレナリンは蓄尿時の膀胱弛緩の神経伝達物質として捉えられている。

今回の研究では、膀胱におけるアセチルコリンの放出に関して、NOと $\beta$ -アドレナリン受容体の役割を解明することを目的として雌家兎の膀胱平滑筋において経壁電気刺激時のアセチルコリンの放出量と収縮反応を測定し、それぞれの神経伝達物質の作用を検討した。

## 6) 実験方法

### 6)-1 実験動物

2.5-3.0 kg の成熟雌家兎 (ニュージーランドホワイト) をペントバルビタール 50 mg/kg 投与にて屠殺したのち開腹し、膀胱を摘出した。標本をすぐにクレブス液 (NaCl 117.70 mM、KCl 4.69 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.16 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.20 mM、NaHCO<sub>3</sub> 24.39 mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20 mM、グルコース 9.99 mM) に浸漬し、膀胱体部より 3 x 10-12 mm の平滑筋条片を作製した。

### 6)-2 膀胱平滑筋から放出される神経伝達物質の測定

これまで平滑筋から放出されるアセチルコリンの測定にはラジオアイソトープを用いた方法が主に用いられてきた (Alberts, 1992, Somogyi et al., 1990)。しかし、この方法では神経終末にラジオアイソトープを取り込ませた後、刺激により取り込ませたラジオアイソトープが放出されるのを測定しているため、直接神経伝達物質を測定できないという欠点が指摘されていた。そこで当教室では、主に脳で使用されているマイクロダイアリシスを応用して、膀胱平滑筋におけるアセチルコリンを回収し、高速液体クロマトグラフィーによる定量を行った。以下、(1) マイクロダイアリシス法による神経伝達物質の回収、(2) 高速液体クロマトグラフィーによる神経伝達物質の定量について述べる。

#### (1) マイクロダイアリシス法による神経伝達物質の回収

平滑筋条片に 50 kDa の膜孔で長さ 1 cm の透析膜を有する臓器用透析プローブ (エイコム社製 O-P-100-10) を刺入し、クレブス液を満たした 20 ml の筋浴槽内に懸垂固定し、等尺性トランスデューサーを介して張力変化を記録した。挿入し

た透析プローブに透析液を  $2 \mu\text{l}/\text{min}$  で灌流させながら 10 分毎に回収し、刺激前の透析液を回収したのち、経壁電気刺激 (最大下電圧、パルス幅 0.5 ミリ秒、周波数 2-40 ヘルツ、刺激時間 2 秒、刺激間隔 2 分、5 回刺激) を行い、その時の回収液を刺激時のものとした。使用した透析液はリンゲル液 (NaCl 147 mM、KCl 4 mM、CaCl<sub>2</sub> 2.3 mM) を基本としたが、回収液中のアセチルコリンの安定性を保つために、フィゾスチグミン (エゼリン)  $100 \mu\text{M}$  を加えて使用した。

## (2) 高速液体クロマトグラフィーによるアセチルコリンの定量

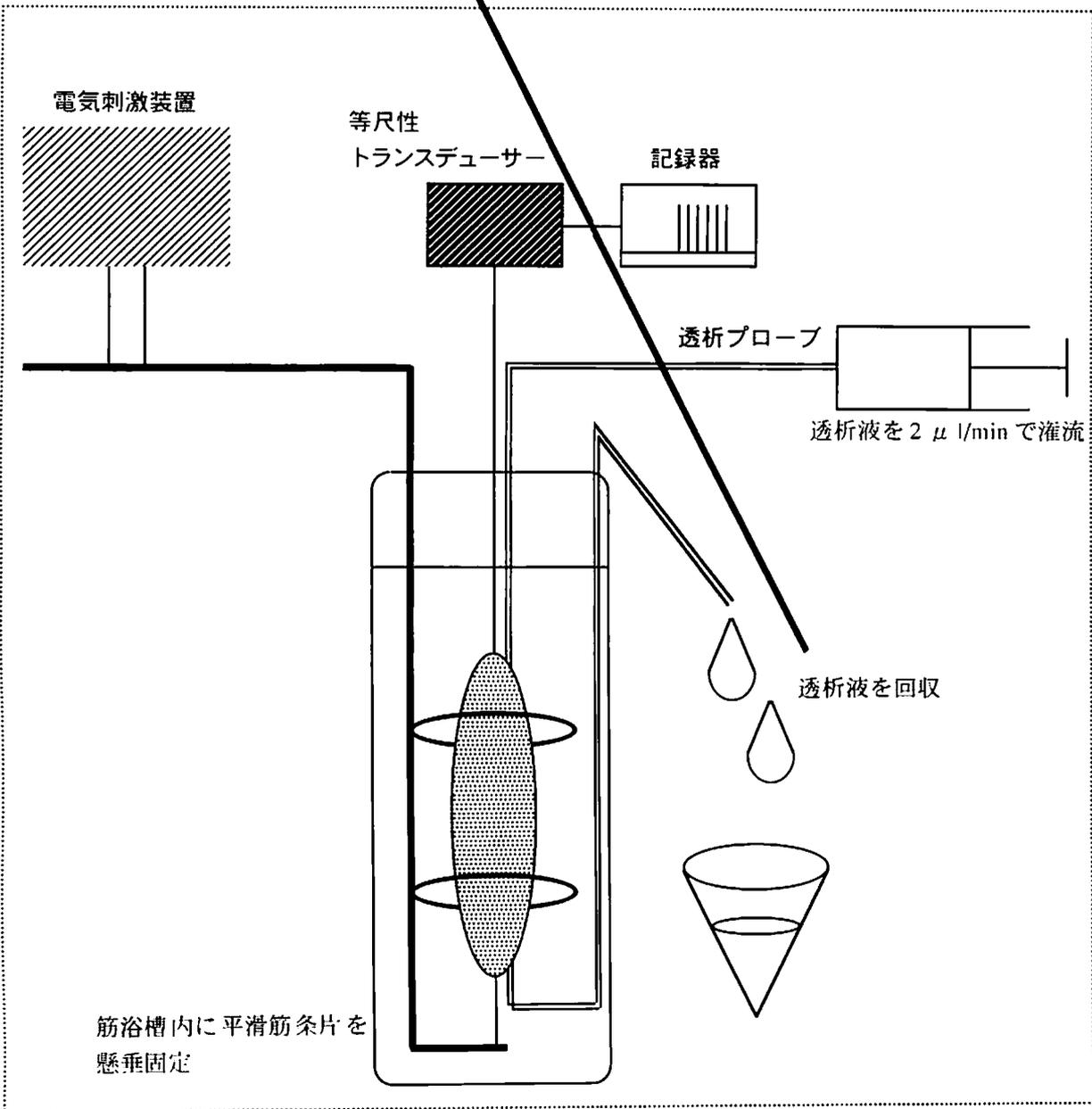
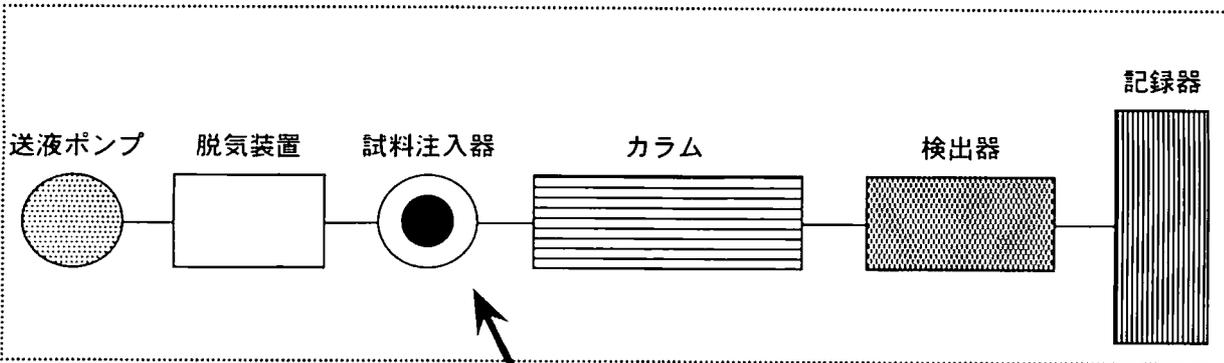
高速液体クロマトグラフィーの基本的な装置構成は図 6-1 に示すように、カラムに充填された固定相中に移動相が一定の流量で送液ポンプ (エイコム社製 EP-300) により送液されており、移動相は脱気装置 (エイコム社製 DG-300) によりカラム流入前に脱気するようになっている。試料溶液は試料注入器 (レオダイナ社製モデル 7725) から注入し、試料中の各成分はカラム通過中に固定相で分離され、検出器で検出されたのち、記録器 (システムインスツルメンツ社製クロマトコーダ 21) に記録した。

アセチルコリンの定量では、デカンスルホン酸ナトリウム 300 mg/l、塩化テトラメチルアンモニウム 65 mg/l、エチレンジアミン四酢酸 5 mg/l を溶解した 0.1 M の燐酸緩衝液 (pH 8.5) を移動相として用い、 $0.6 \text{ ml}/\text{min}$  で送液した。アセチルコリンの測定は酵素カラムの活性が変動しやすいため、回収した透析液に内部標準物質としてイソプロピルホモコリン (IPHC) を 150 nM になるように混合した後、 $10 \mu\text{l}$  を注入した。注入した透析液はプレカラム (エイコム社製 CA-ODS) にて妨害成分の除去を行い、分離カラム (エイコム社製 AC-GEL) にて分離され、アセチルコリンエステラーゼとコリンオキシダーゼを固定化した酵素カラムで分解され過酸化水素となり、それを電気化学検出器 (エイコム社製 ECD-300) で検出した (図 6-2)。アセチルコリンの量は、あらかじめ注入しておいた標準液のクロマトグラムをもとに IPHC を用いた一点修正内部標準法で計算

した。定量したアセチルコリンの放出量は、注入した透析液中の放出量を平滑筋重量で除して pmol/g として表した。透析プローブの回収率は、既知の濃度の薬液に透析膜を浸して検討し、アセチルコリンでは  $34.8 \pm 1.7\%$  であった。

なお当教室ではアセチルコリンの他にも神経伝達物質として、ノルアドレナリン、ATP、NO を測定し、下部尿路平滑筋における神経伝達物質の定量法としてのマイクロダイアリシス法の有用性を証明している（吉田ら 1999、稲留ら 1999）。それぞれの回収率はノルアドレナリンでは  $28.2 \pm 1.3\%$ 、ATP では  $24.1 \pm 1.3\%$ 、 $\text{NO}_2^-$  では  $65.7 \pm 3.9\%$ 、 $\text{NO}_3^-$  では  $63.5 \pm 3.2\%$  であった（NO の定量では、NO の代謝物である  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  を検出している）。これらの神経伝達物質の放出量測定における HPLC の典型的なクロマトグラムも図 6-2 に示す。

# 高速液体クロマトグラフィー



# マイクロダイアリシス法

図 6-1 マイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーを用いた実験の模式図

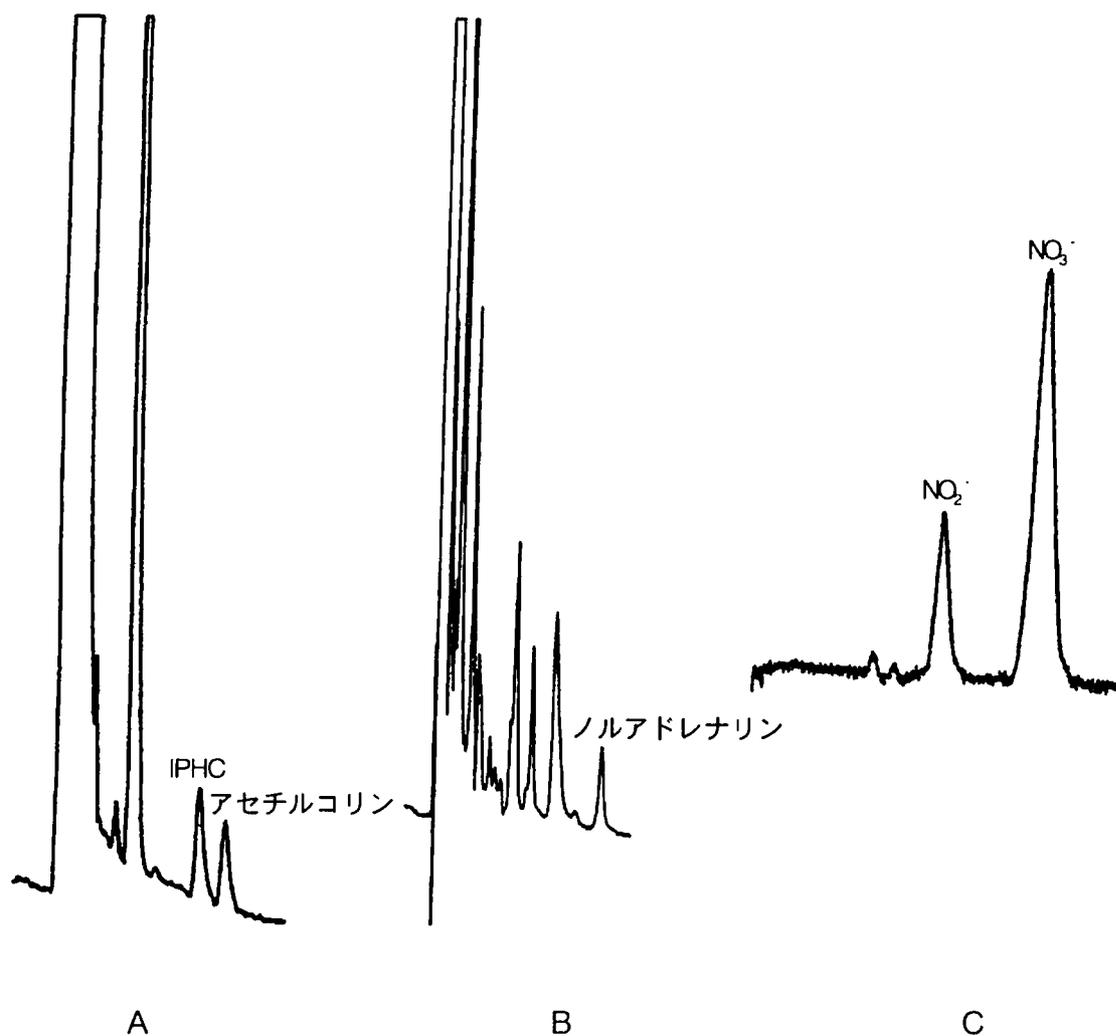


図 6-2 各種神経伝達物質の典型的なクロマトグラム

経壁電気刺激により放出されたアセチルコリン (A)、ノルアドレナリン (B)、NO<sub>x</sub>(C) のクロマトグラムの典型例を示す。

いずれも経壁電気刺激により有意に放出量が増加し、テトロドトキシン 1 μM にて抑制された。またノルアドレナリン放出量はグアネチジンにて、NO 放出量は L-NNA にて抑制が認められ、これらの神経伝達物質が神経由来であることが確認された。

### 6)-3 膀胱平滑筋における機能実験

上述のアセチルコリンの放出量の測定と平行して膀胱平滑筋の収縮実験を、既報 (Yoshida et al., 1992; Yono et al., 1999) の方法で行った。95 % O<sub>2</sub>-5 % CO<sub>2</sub> を通気した 37 °C の Krebs 液を満たした 20 ml の筋浴槽内に平滑筋条片を懸垂固定し、等尺性トランスデューサー(日本光電社製 TB-611T) を介して張力変化を記録した。各条片を至適張力が発生する長さ(静止張力約 1.0 g) に伸展させ、90 分間静置した後、経壁電気刺激にて平滑筋を収縮させた。経壁電気刺激収縮は、上下 2 個の白金電極を平行に設置し(幅 10 mm、間隔 8 mm)、その中を平滑筋条片がくぐるように固定して行い、このとき、条片の壁内神経系を電気刺激(パルス幅 0.5 msec、周波数 2-40 Hz、最大下電圧) することで得られ、その周波数反応曲線を作成した。実験を通じてプロスタグランジンと内因性のアドレナリン神経伝達物質の影響を除外するためにインドメタシン (10 μM) 及びグアネチジン (10 μM) を筋浴槽内に投与した(後半のフェントラミン、プラプラノロールを処置する実験の際にはグアネチジンは投与せず)。また筋収縮力の評価のために 80mM KCl による収縮反応を実験の前後で確認した。

まず、予備実験として薬物非存在下での経壁電気刺激の周波数によるアセチルコリン放出量の変化を検討した(図 6-3)。経壁電気刺激によりアセチルコリン放出量は周波数依存性に増加し、40 Hz で最大に達した。5 Hz 及び 20 Hz 刺激でのアセチルコリン放出量はそれぞれ最大放出量の約 30% と 80% であった。2 Hz 以下、または 40 Hz 以上の刺激条件ではアセチルコリンの放出量はごく僅かか、または最大に達しているため、このような条件下では薬物によるアセチルコリンの放出量の変化を評価するには適当でないと思われた。それゆえ今回の実験では 5 Hz 及び 20 Hz の刺激条件をそれぞれ低頻度刺激(5 Hz)、高頻度刺激(20 Hz) として検討した。

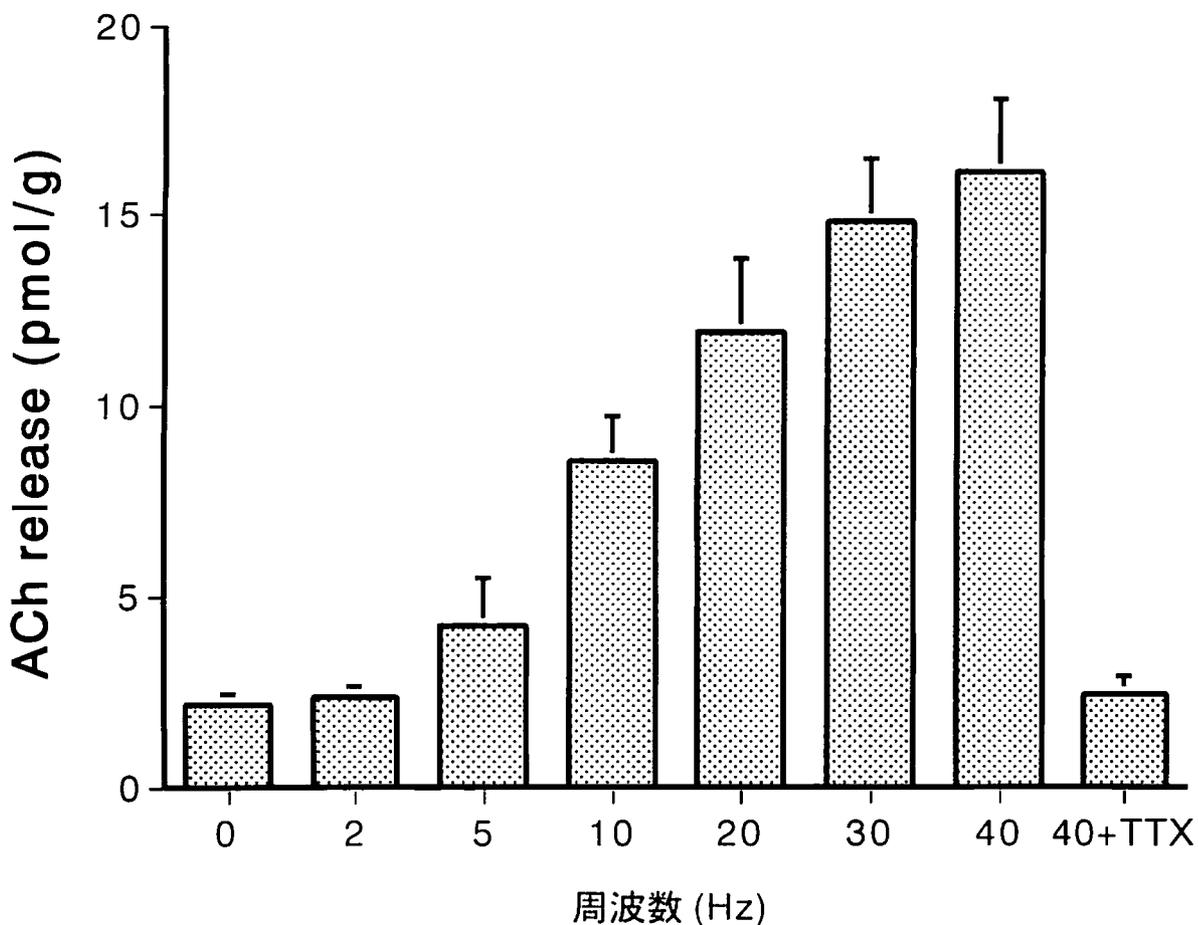


図 6-3 経壁電気刺激の周波数によるアセチルコリン放出量の変化

経壁電気刺激により周波数依存性に放出量が増加し、テトロドトキシン (TTX)  $1 \mu\text{M}$  にてほぼ抑制され、この実験系におけるアセチルコリンの放出は神経由来であることが確認された。

まず、 $\text{N}^\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA,  $100 \mu\text{M}$ ) 及び L-アルギニン ( $100 \mu\text{M}$ ) の経壁電気刺激時の収縮反応及びアセチルコリン放出量に対する影響を検討した。同様に、NO ドナーである sodium nitroprusside (SNP) ( $100 \mu\text{M}$ ) の経壁電気刺激時の収縮反応及びアセチルコリン放出量に対する影響を、L-NNA 存在下及び非存在下で検討した。これらの検討は 5 及び 20Hz の周波数条件で行った。

電気刺激は 1 時間間隔でそれぞれ 3 回行われ、各種薬剤はそれぞれ 2、3 回目の刺激 20 分前に投与され、収縮反応はそれぞれ最初のコントロール刺激に対する

百分率で表した。また、経壁電気刺激をアトロピン ( $1 \mu\text{M}$ ) 存在下でも同様の周波数条件で行った。このアトロピン抵抗性収縮に対する L-NNA ( $100 \mu\text{M}$ )、SNP ( $100 \mu\text{M}$ ) 前処置の影響を検討した。

さらにカルバコール ( $0.01-100 \mu\text{M}$ ) 及び ATP ( $0.001-5\text{mM}$ ) 誘発収縮反応に対する SNP ( $100 \mu\text{M}$ ) 前処置の影響を検討した。誘発収縮は低濃度から高濃度へ累積的に薬剤を筋浴槽内に投与することで得られ、その用量反応曲線を作成した。

次に、prejunctional アドレナリン受容体がアセチルコリン放出に及ぼす影響を観察する実験を行った。平滑筋条片の作成など実験のセットアップは上述の通りである。まず、筋浴槽内にフェントラミン (非選択的  $\alpha$ -アドレナリン受容体阻害薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ ) またはプロプラノロール (非選択的  $\beta$ -アドレナリン受容体阻害薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ ) を投与して 15 分後に経壁電気刺激を行いアセチルコリン放出量と収縮反応を観察した。するとフェントラミンの前処置はアセチルコリン放出量および収縮反応に影響を与えなかったのに対して、プロプラノロールの前処置はアセチルコリン放出量を用量依存性に増加させた。よってアセチルコリンの放出に prejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体が関与することが示唆されたため、イソプロテレノール (非選択的  $\beta$ -アドレナリン受容体 刺激薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ )、ドブタミン ( $\beta_1$ -アドレナリン受容体 刺激薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ )、プロカテロール ( $\beta_2$ -アドレナリン受容体 刺激薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ )、GS-332 ( $\beta_3$ -アドレナリン受容体 刺激薬;  $0.01-10 \mu\text{M}$ )、の各種薬剤を加えてアセチルコリン放出量と収縮反応を観察した。なお、アドレナリン受容体刺激薬は高濃度においては  $\alpha$ -アドレナリン受容体刺激作用を表すことが知られているので (Awad et al., 1974)、薬剤を投与する 15 分前にフェントラミン  $1 \mu\text{M}$  を投与した。

#### 6)-4 使用薬剤

塩化アセチルコリン、塩化コリン、塩化カルバミルコリン(カルバコール)、イソプロテレノール塩酸塩、ドブタミン塩酸塩、プロカテロール塩酸塩、フェントラミン塩酸塩、ニトロプルシッドナトリウム二水和物、アトロピン硫酸塩、プロプラノロール塩酸塩、L-NNA、L-アルギニン、エゼリンヘミ硫酸塩、テトロドトキシン、グアネチジン一硫酸塩、ATP、 $\alpha, \beta$ -メチレンATP、塩化ヘキサメトニウムはシグマアルドリッチジャパン株式会社(東京)より、インドメタシン、塩化テトラメチルアンモニウムはナカライテスク株式会社(京都)より、デカンスルホン酸ナトリウムは東京化成工業株式会社(東京)より、IPHCはエイコム株式会社(京都)より購入した。GS-332は東京田辺製薬株式会社(東京)から供与された。その他の薬剤および化学物質は一般の市販品を使用した。

#### 6)-5 解析

実験結果は平均値に標準誤差を付記し、実験結果のうち群間の統計解析には分散分析および多変量フィッシャー検定を用いて、P値が0.05以下を統計学的に有意差ありと判定した。

## 7) 実験結果

### 7)-1 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出 及び収縮反応に対する NO の影響の検討

#### (1) 薬物非存在下における検討

80mM KCl による収縮反応は実験の前後で有意差を認めず、筋収縮力は実験を通じて変化がないことを確認した。経壁電気刺激条件は実験方法の項で述べたように低頻度刺激 (5Hz)、及び高頻度刺激 (20Hz) として行った。薬物非存在下におけるアセチルコリン放出量、及び収縮反応は、低頻度刺激 (n = 12) で  $3.68 \pm 0.36$ g、高頻度刺激 (n = 8) で  $5.72 \pm 0.89$ g であった (表 1)。また、経壁電気刺激により収縮反応は TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) によってほとんど抑制されたが、ヘキサメトニウム ( $100 \mu\text{M}$ ) では抑制されなかった。

アセチルコリンは経壁電気刺激前から平滑筋条片より持続的に放出されていた。ここではこの放出を "basal release" と呼ぶ。アセチルコリンの放出は経壁電気刺激により有意に増加し、TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) の前処置によってほとんど抑制されたが、basal release は抑制されず残存していた。低頻度及び高頻度刺激における basal release の値はそれぞれ  $2.23 \pm 0.59$  pmol/g、 $3.85 \pm 1.30$  pmol/g であった (表 1)。

表 1 薬物非存在下での経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量  
及び収縮反応 (コントロール)

EFS frequency	Contraction (g)	ACh release (pmol/g)	
		Basal	Stimulation
5 Hz (n = 12)	$3.68 \pm 0.36$	$2.23 \pm 0.59$	$4.22 \pm 1.25$
20Hz (n = 8)	$5.72 \pm 0.89$	$3.85 \pm 1.30$	$11.88 \pm 1.98$

平均値 ± 標準誤差

## (2) NOS 阻害薬および NO ドナーの影響

低頻度刺激においては経壁電気刺激によってアセチルコリン放出量は  $4.22 \pm 1.25$  pmol/g へ有意に増加し、さらに L-NNA (100  $\mu$ M) の前処置によって  $8.31 \pm 2.45$  pmol/g へと有意に増加した。この L-NNA (100  $\mu$ M) の前処置による有意なアセチルコリンの増加は L-アルギニン (100  $\mu$ M) の投与によって、ほぼコントロール値程度 ( $4.88 \pm 1.55$  pmol/g) まで抑制された (図 7-1)。一方、高頻度刺激では経壁電気刺激によってアセチルコリン放出量は  $11.88 \pm 1.98$  pmol/g と有意な増加を示したが、L-NNA (100  $\mu$ M) 前処置や L-アルギニン投与によっても有意な変化を示さなかった (図 7-2)。

低頻度刺激では収縮反応も L-NNA 前処置により  $130.8 \pm 8.3\%$  へと増加し、L-アルギニン (100  $\mu$ M) の投与によって、ほぼコントロール値程度まで抑制された (図 7-1)。しかし、高頻度刺激では L-NNA (100  $\mu$ M) 前処置や L-アルギニン (100  $\mu$ M) 投与によっても有意な変化を示さなかった (図 7-2)。

次に NO ドナーである SNP の影響について検討した。低頻度刺激において、SNP (100  $\mu$ M) の前処置により経壁電気刺激によるアセチルコリンの放出量は有意に減少し ( $2.81 \pm 0.45$  pmol/g)、また収縮反応も  $75.5 \pm 7.0\%$  へと有意に減少した。さらに、L-NNA (100  $\mu$ M) にてインキュベーションした後、SNP を投与して経壁電気刺激を行うとアセチルコリンの放出量 ( $2.87 \pm 0.42$  pmol/g)、収縮反応 ( $72.1 \pm 9.0\%$ ) とともに有意に減少していた (図 7-3)。

高頻度刺激においては、SNP (100  $\mu$ M) の投与によって L-NNA によるプレインキュベーションの有無にかかわらず経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量、収縮反応ともに影響を与えなかった (図 7-4)。

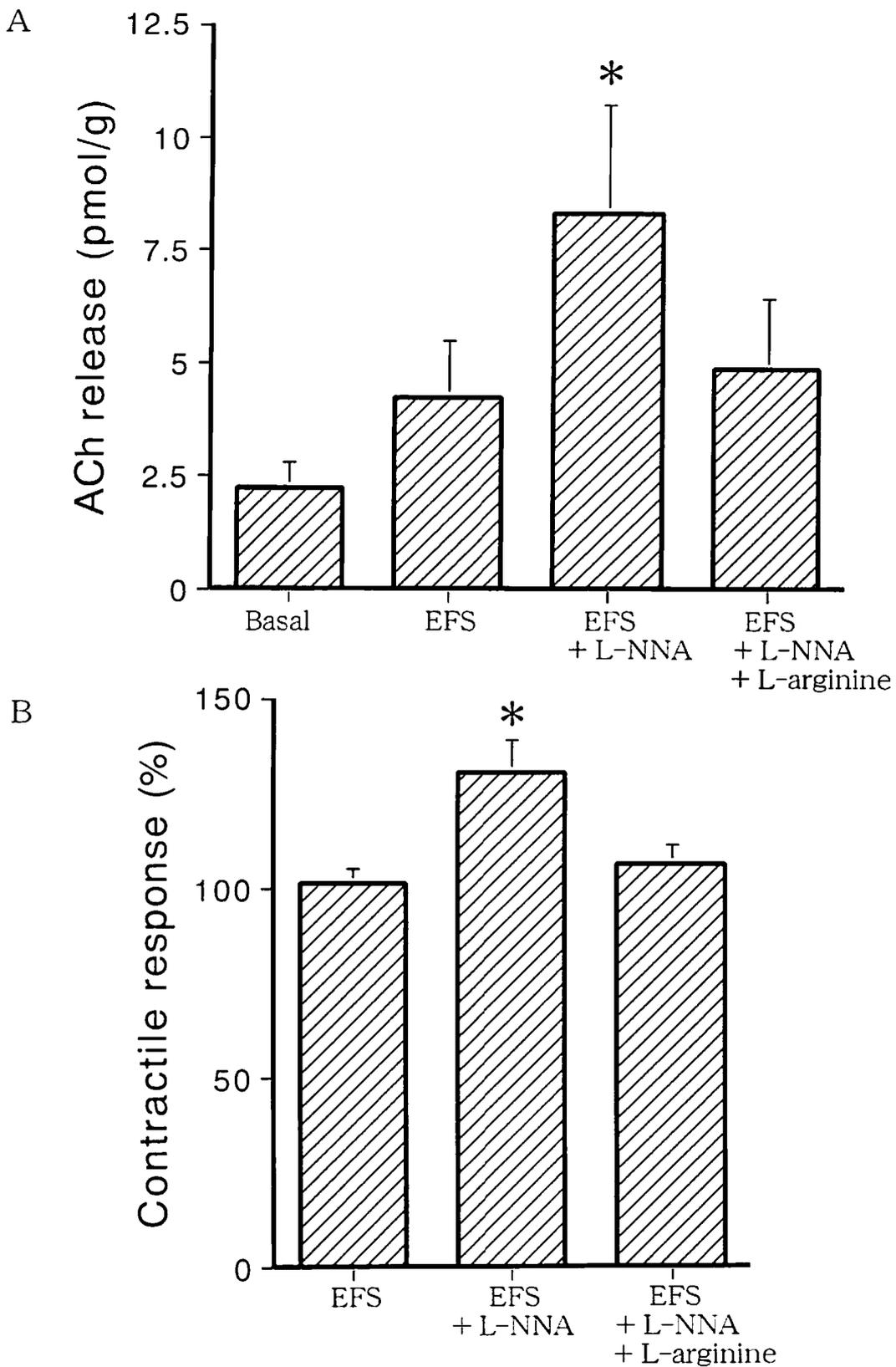


図 7-1 経壁電気刺激 (EFS) (低頻度刺激: 5Hz) によるアセチルコリン (ACh) 放出量 (A)、及び収縮反応 (B) に対する L-NNA 前処置及び L-arginine 投与の影響 \*P<0.05

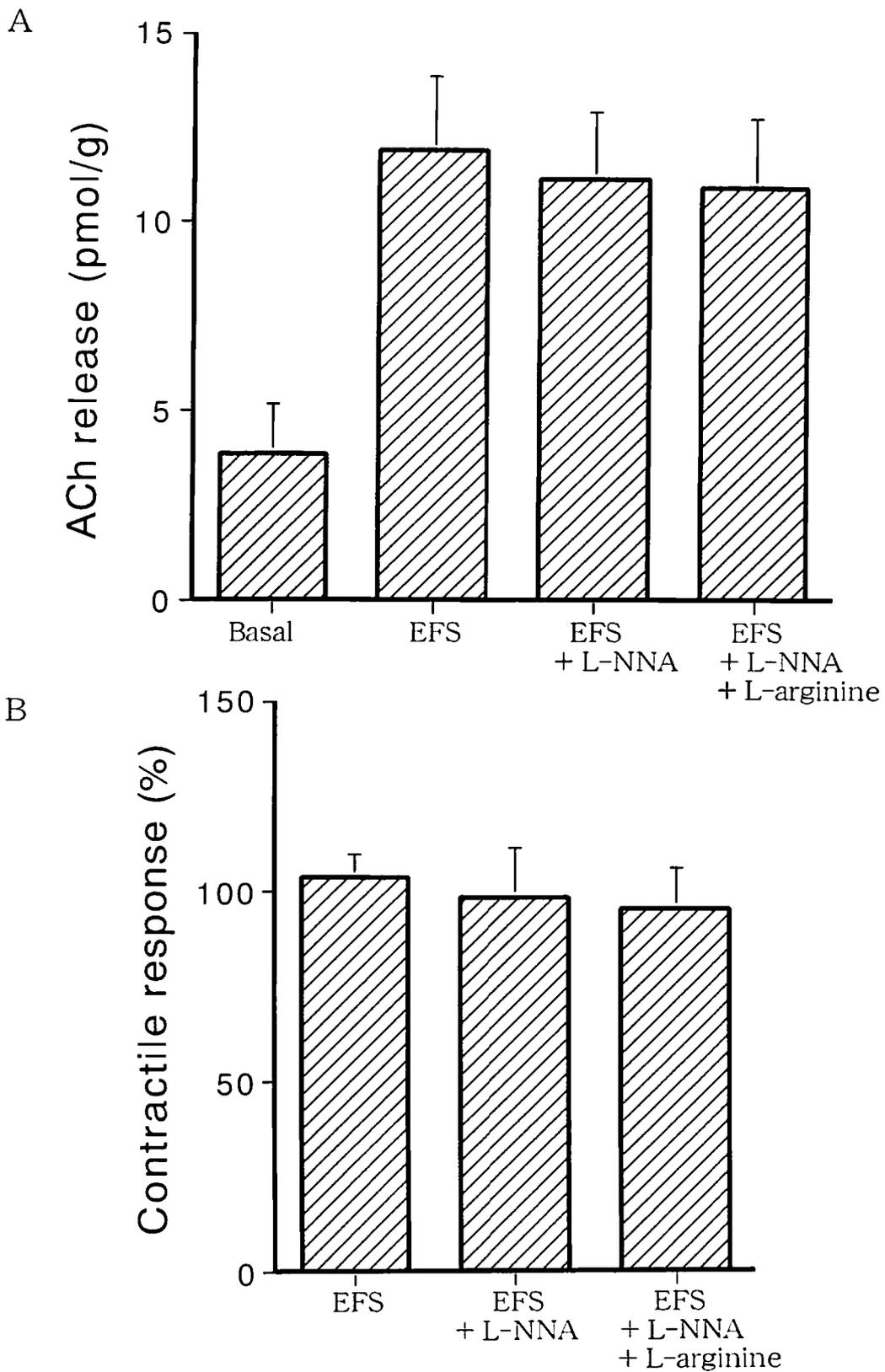


図 7-2 経壁電気刺激 (EFS) (高頻度刺激 ; 20 Hz) によるアセチルコリン (ACh) 放出量 (A)、及び収縮反応 (B) に対する L- NNA 前処置及び L- arginine 投与の影響 \*P<0.05

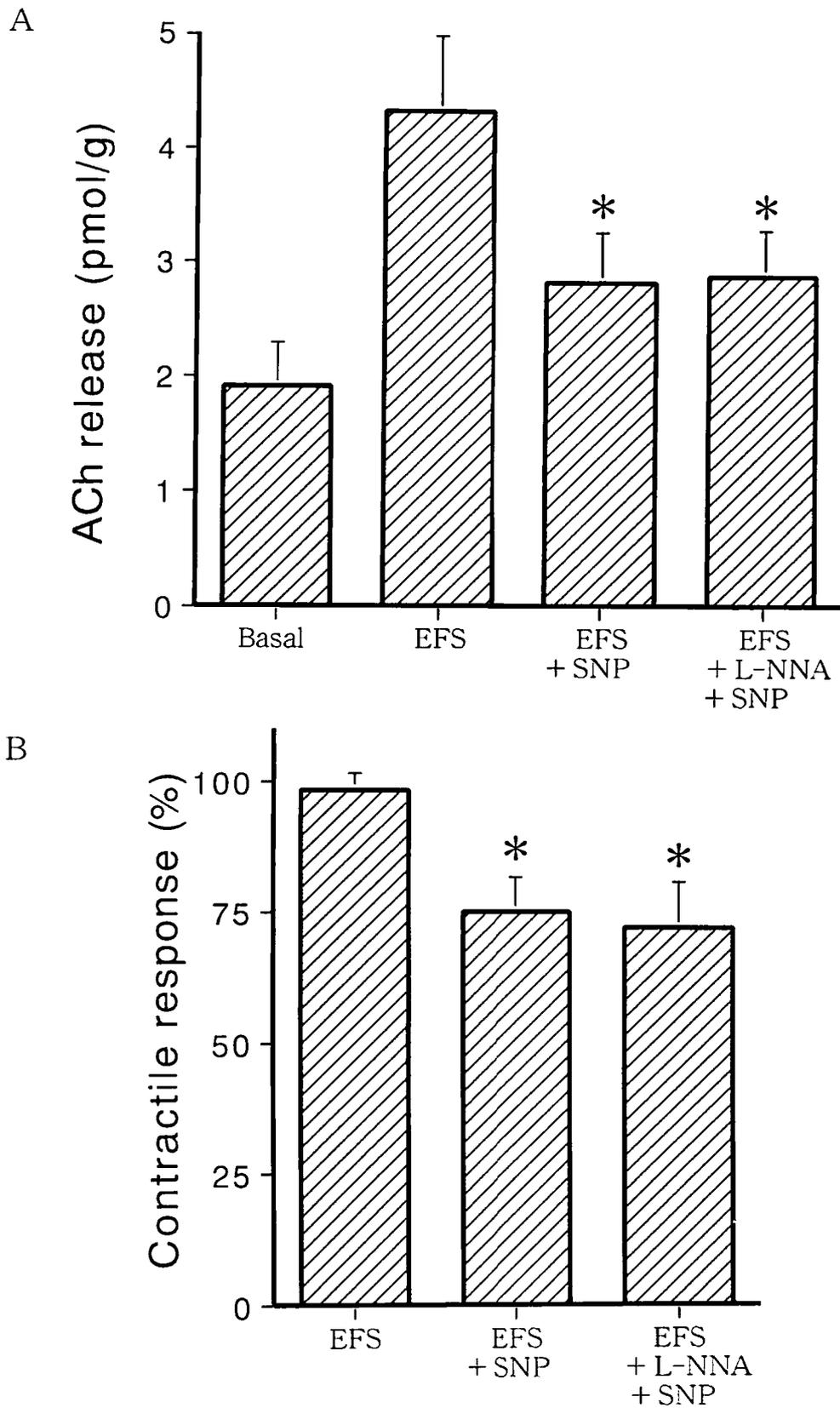


図 7-3 経壁電気刺激 (EFS) (低頻度刺激 ; 5 Hz) によるアセチルコリン (ACh) 放出量 (A)、及び収縮反応 (B) に対する SNP 前処置及び L- NNA 投与の影響 \*P<0.05

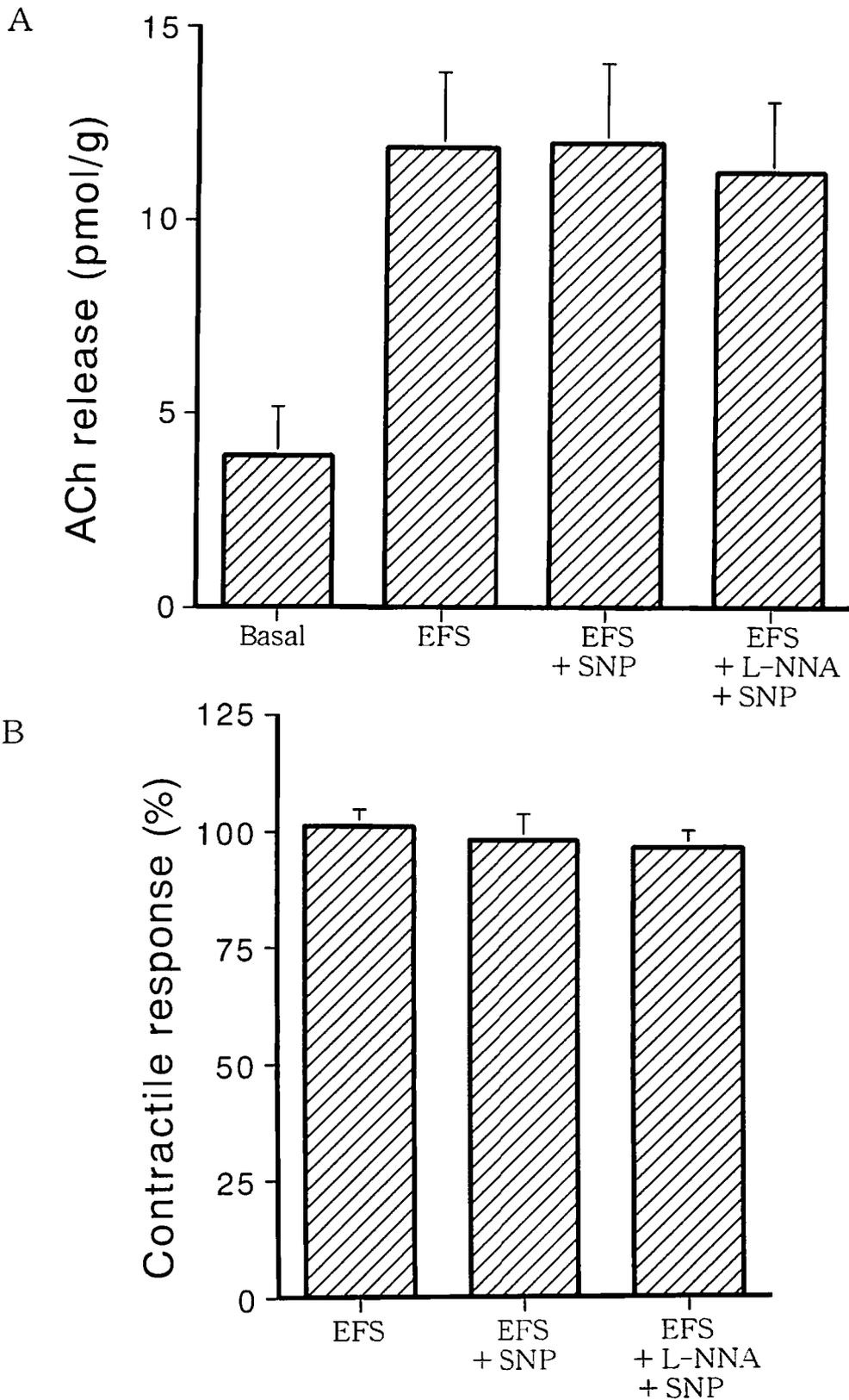


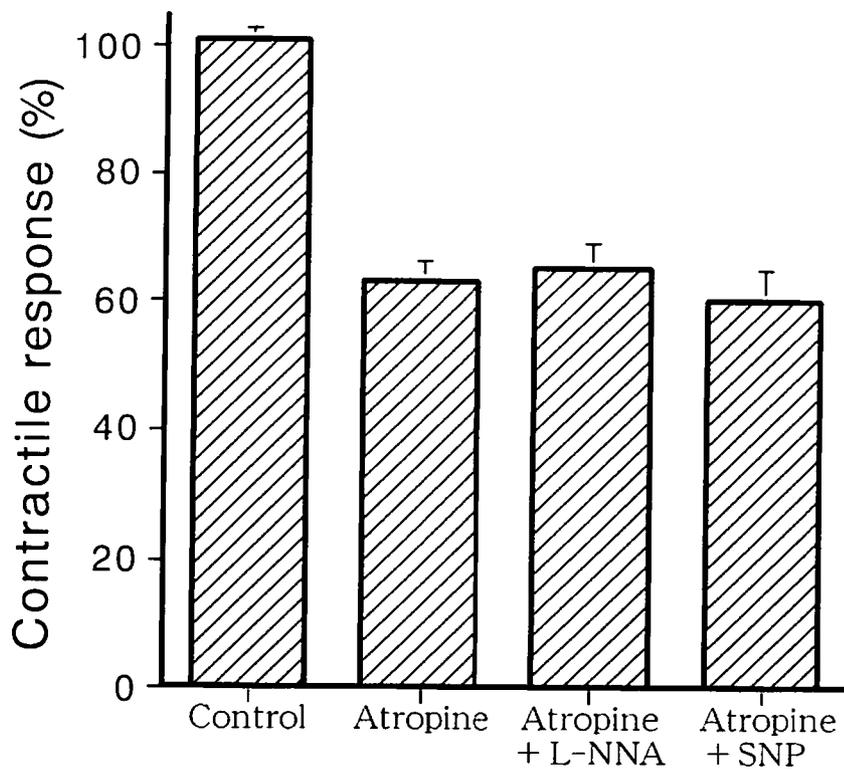
図 7-4 経壁電気刺激 (EFS) (高頻度刺激; 20 Hz) によるアセチルコリン (ACh) 放出量 (A)、及び収縮反応 (B) に対する SNP 前処置及び L- NNA 投与の影響 \*P<0.05

### (3) アトロピン抵抗性収縮、及びカルバコール・ATP 誘発収縮に対する検討

アトロピン ( $1 \mu\text{M}$ ) 前処置によって経壁電気刺激による収縮反応はコントロール値に対して低頻度刺激で  $63.2 \pm 3.0\%$  ( $n=5$ )、高頻度刺激で  $45.8 \pm 3.5\%$  ( $n=5$ ) とそれぞれ減少した。この残存する収縮は  $\alpha, \beta$ -メチレン ATP を反復投与することでほぼ完全に抑制された。このアトロピン抵抗性かつ  $\alpha, \beta$ -メチレン ATP 感受性の収縮に対して L-NNA ( $100 \mu\text{M}$ ) や SNP ( $100 \mu\text{M}$ ) の投与は、低頻度刺激、高頻度刺激双方において影響を与えなかった (図 7-5)。

また、カルバコール及び ATP 誘発収縮に対する SNP の影響も検討した。カルバコール ( $0.01-100 \mu\text{M}$ ) および ATP ( $0.001-5 \text{mM}$ ) 累積投与により用量反応曲線を作成し、次に SNP ( $100 \mu\text{M}$ ) 前処置後同様にカルバコール及び ATP を累積投与した。SNP 前処置によっても用量反応曲線に有意な影響を与えなかった (図 7-6)。

A



B

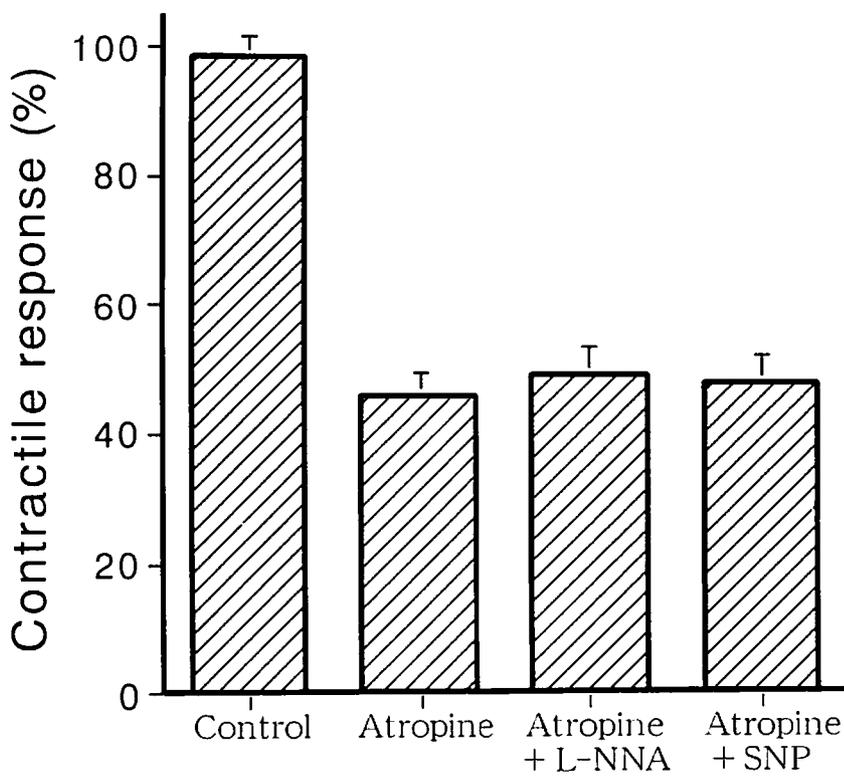


図 7-5 アトロピン抵抗性収縮に対する L- NNA 及び SNP 投与の影響  
経壁電気刺激条件は 5Hz(A) 及び 20Hz(B)

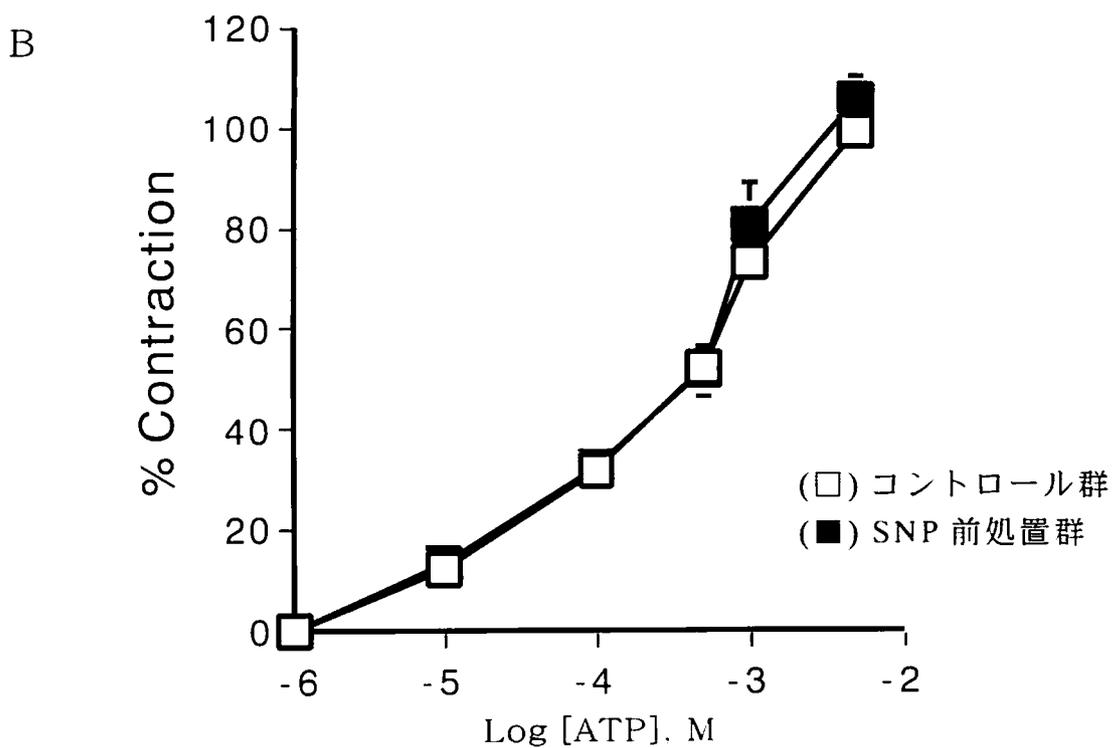
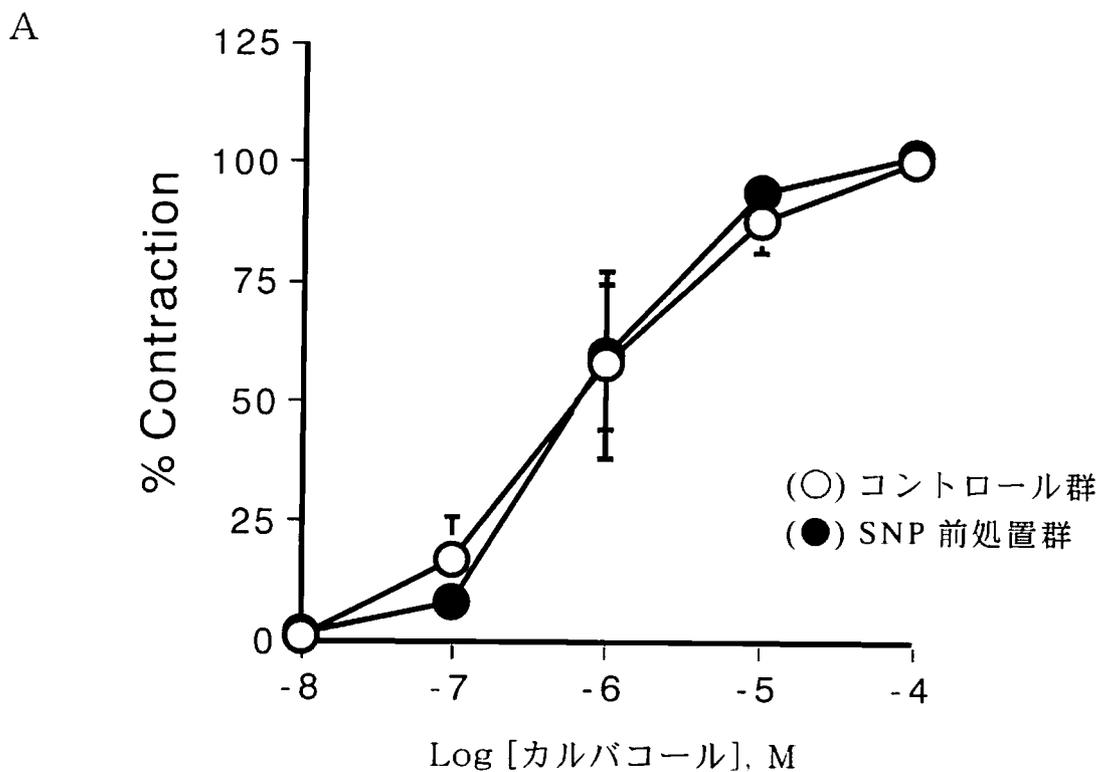


図 7-6 カルバコール (A) 及び ATP (B) 誘発収縮における用量反応曲線に対する SNP 前処置の影響

コントロール群における最大収縮を 100% として各群の収縮反応を百分率で計算し平均値 ± 標準誤差 (n=5) で表した。

## 7)-2 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出及び収縮反応に対する prejunctional アドレナリン受容体サブタイプの役割の検討

### (1) 非選択的アドレナリン受容体阻害薬の影響

フェントラミン（非選択的 $\alpha$ -アドレナリン受容体阻害薬：0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量及び収縮反応には有意な変化をもたらさなかった（図には示さない）。一方、プロプラノロール（非選択的 $\beta$ -アドレナリン受容体阻害薬：0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量は用量依存性に有意に増加し、10  $\mu$  M プロプラノロール前処置後の値は  $146.1 \pm 25.6\%$  であった。しかし収縮反応に対しては有意な変化をもたらさなかった（図 7-7）。

### (2) 各種 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬の影響

イソプロテレノール（非選択的 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬：0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量は用量依存性に有意に減少し、10  $\mu$  M イソプロテレノール前処置後の値は  $52.0 \pm 5.7\%$  であった。また同様に収縮反応も用量依存性に有意に減少し、10  $\mu$  M イソプロテレノール前処置後の値は  $76.2 \pm 3.4\%$  であった（図 7-8）。 $\beta_1$  アドレナリン受容体刺激薬のドブタミン（0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量、収縮反応は、ともに高濃度のドブタミン前処置（10  $\mu$  M）でコントロールに比べてそれぞれ  $90.0 \pm 4.1\%$ 、 $90.0 \pm 1.6\%$  と若干減少したが有意差はなかった（図 7-9）。同様に $\beta_2$  アドレナリン受容体刺激薬のプロカテロール（0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量、収縮反応はともに有意な減少を認め、10  $\mu$  M 前処置でそれぞれ  $70.0 \pm 4.1\%$ 、 $77.0 \pm 1.6\%$  であった（図 7-10）。さらに、 $\beta_3$  アドレナリン受容体刺激薬の GS-332（0.01 - 10  $\mu$  M）で前処置後に 5 Hz で刺激したときのアセチルコリン放出量、収縮反応は、ともに有意な変化を認めなかった（図 7-11）。

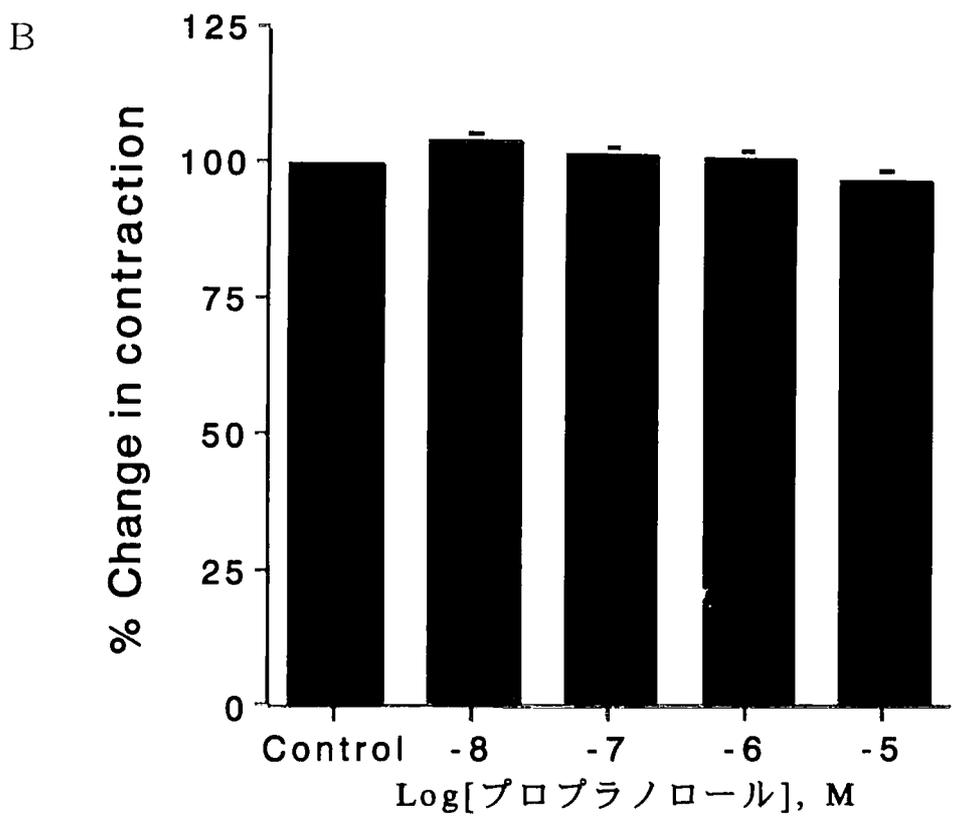
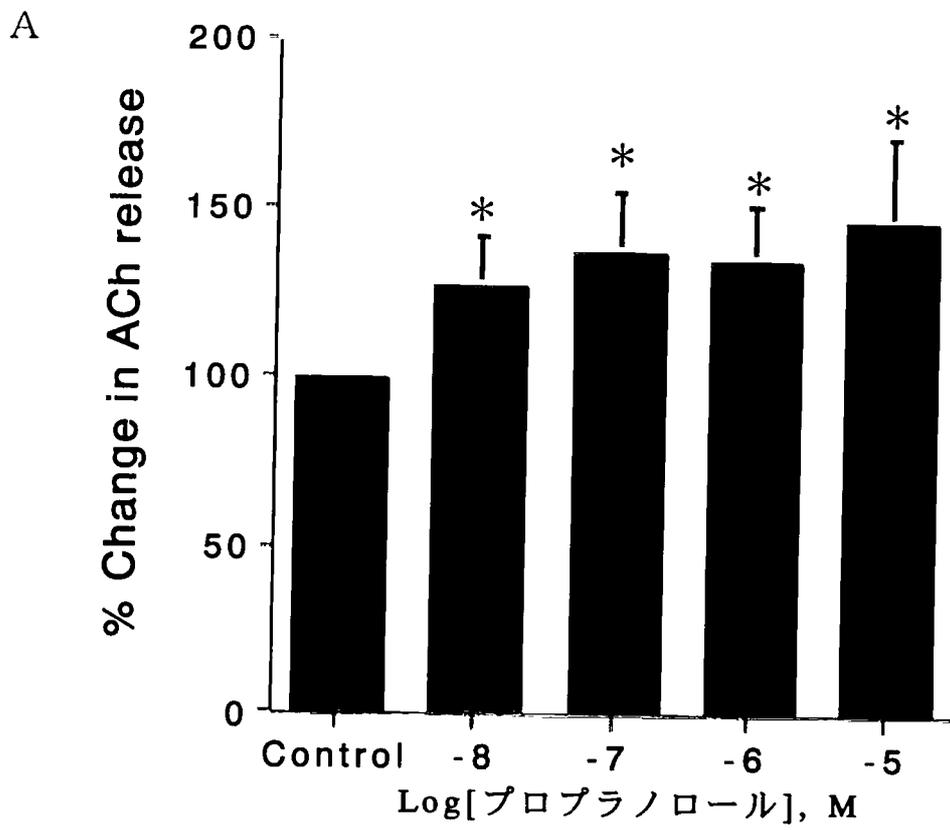


図 7-7 アセチルコリン放出量及び収縮反応に対するプロプラノロールの影響  
 コントロール群（薬物非存在下）における収縮反応を100%として、  
 各群の収縮反応を百分率で計算し平均値±標準誤差 (n=5) で表した。

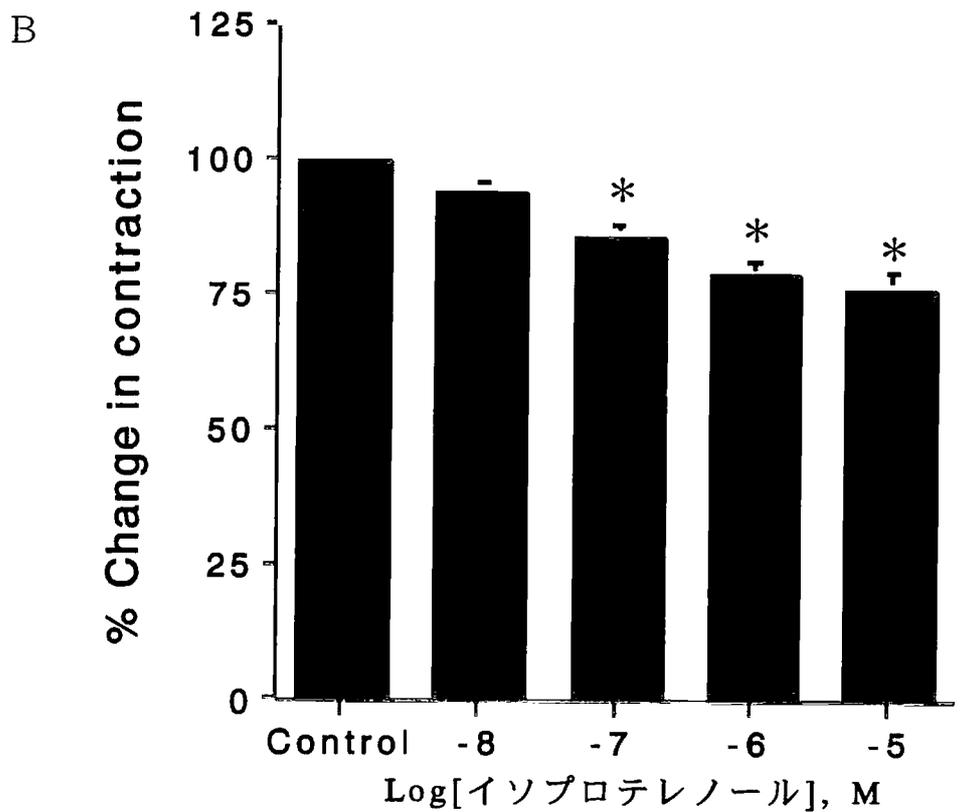
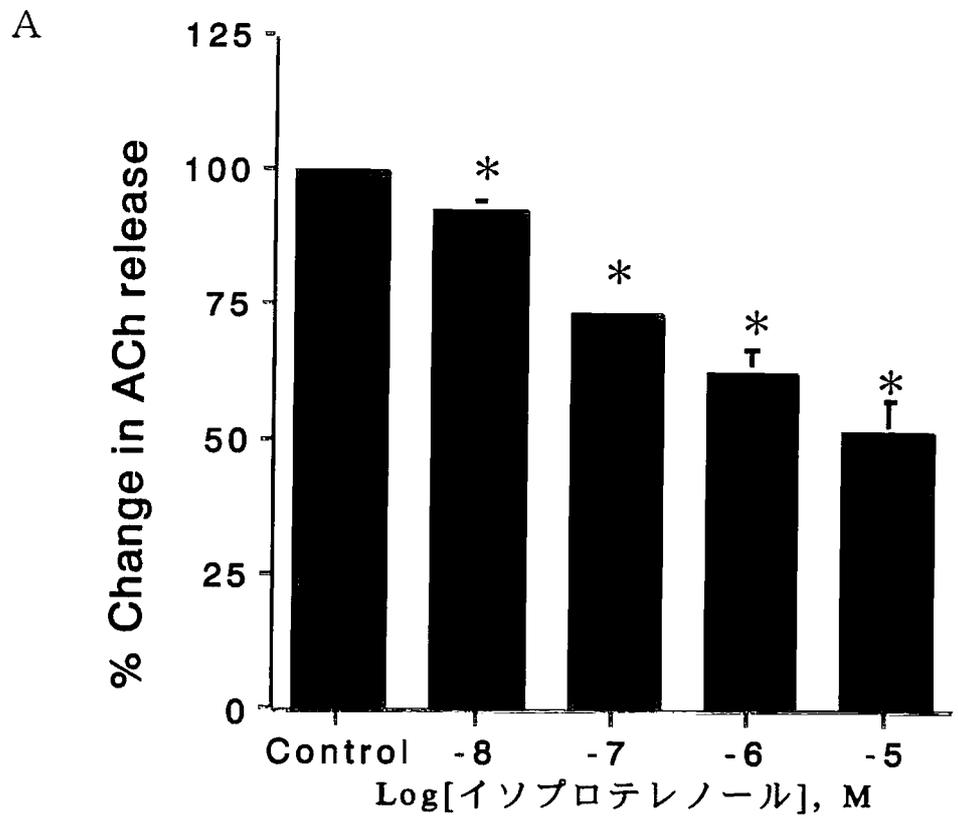


図 7-8 アセチルコリン放出量及び収縮反応に対するイソプロテレノールの影響  
 コントロール群（薬物非存在下）における収縮反応を 100%として、  
 各群の収縮反応を百分率で計算し平均値±標準誤差 (n=5) で表した。

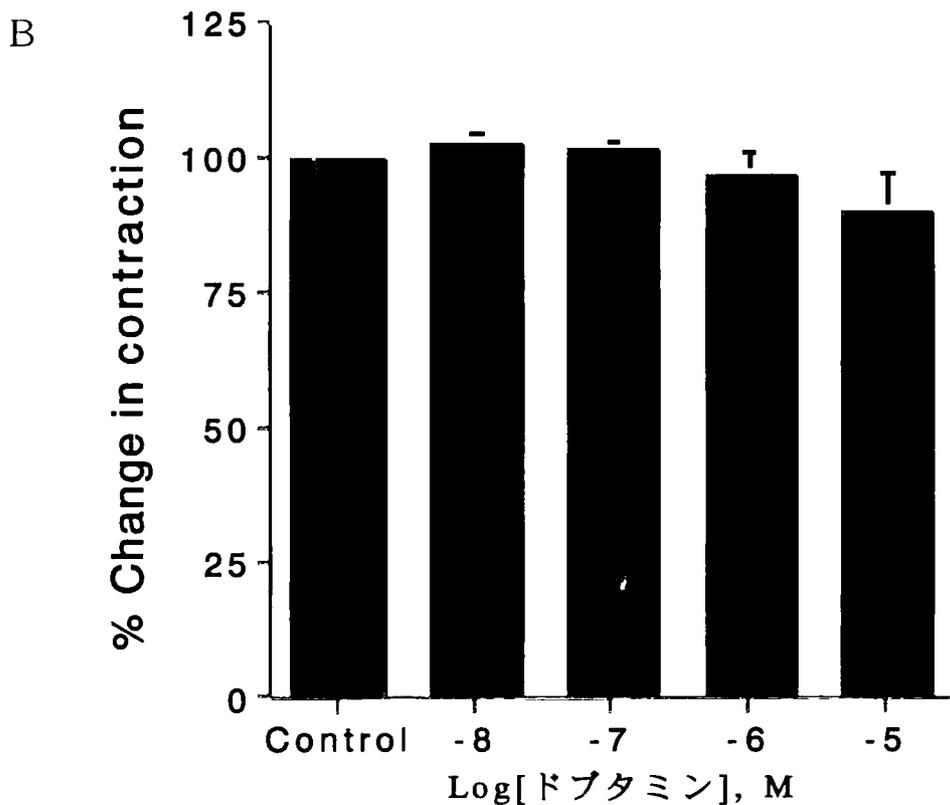
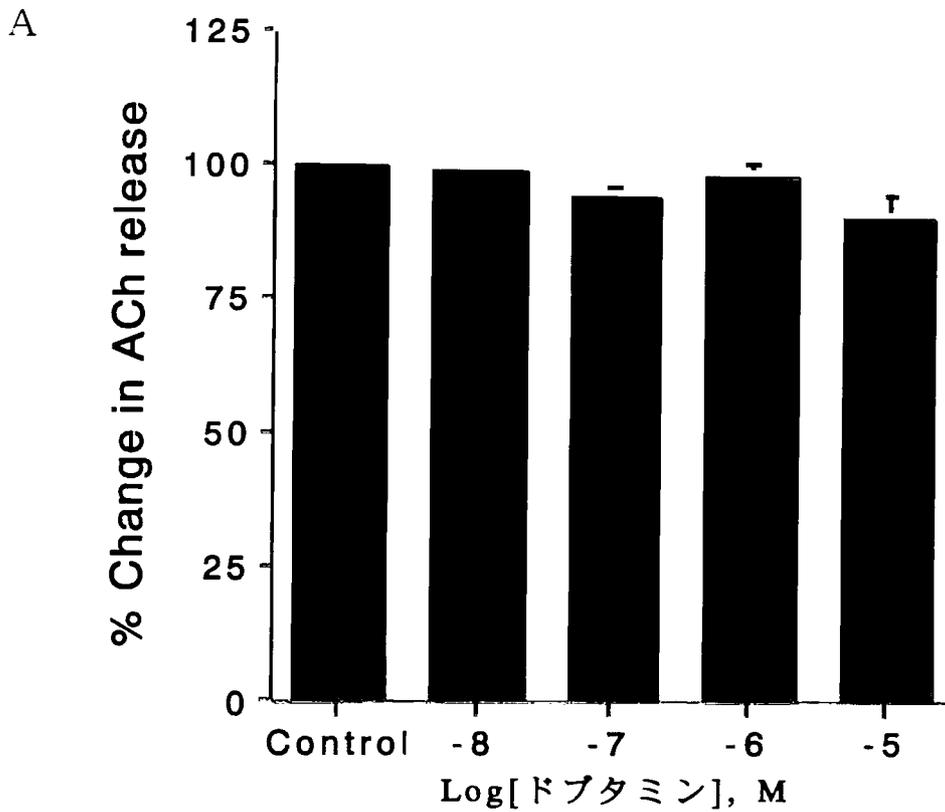


図 7-9 アセチルコリン放出量及び収縮反応に対するドプタミンの影響  
 コントロール群（薬物非存在下）における収縮反応を100%として、  
 各群の収縮反応を百分率で計算し平均値±標準誤差 (n=5) で表した。

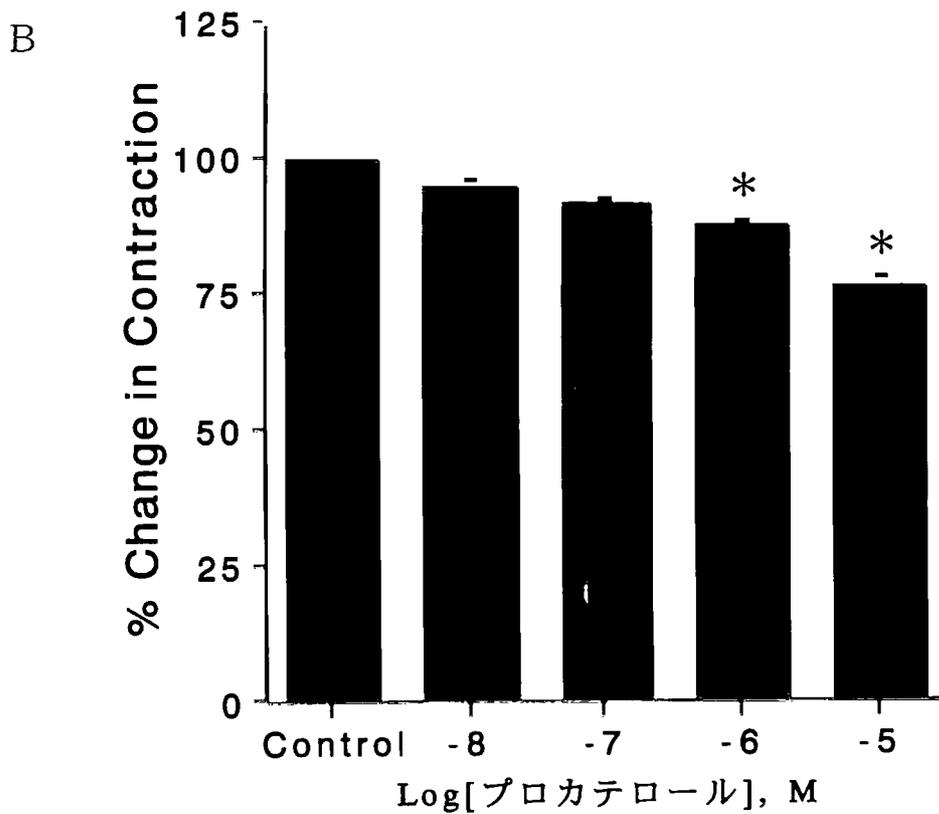
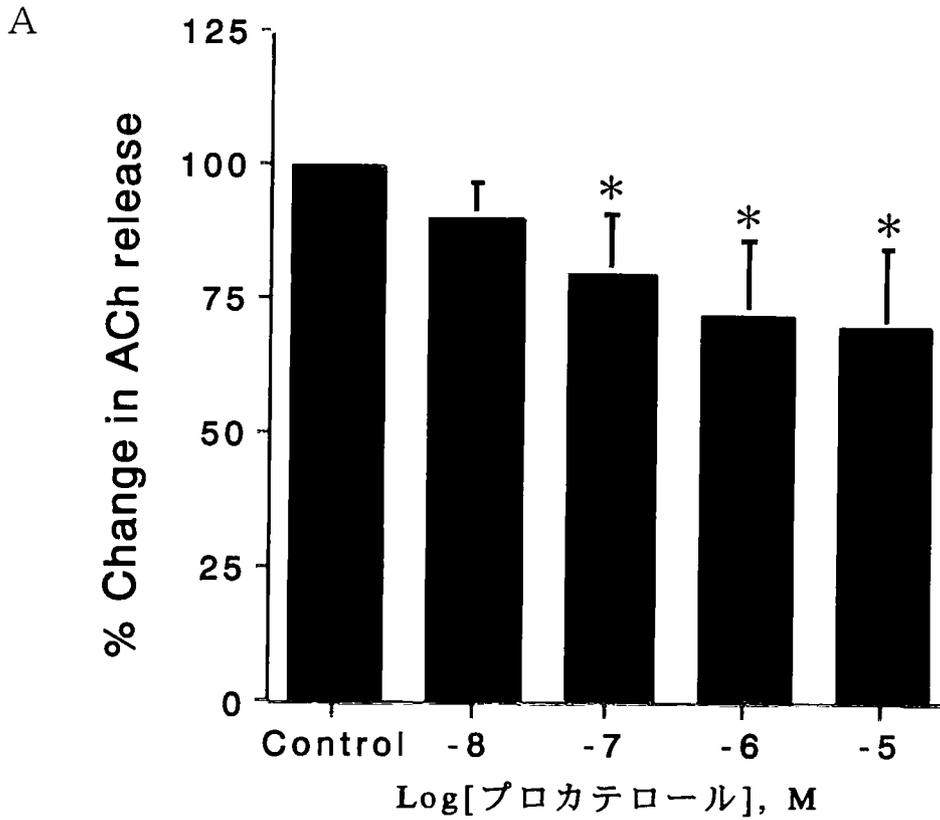
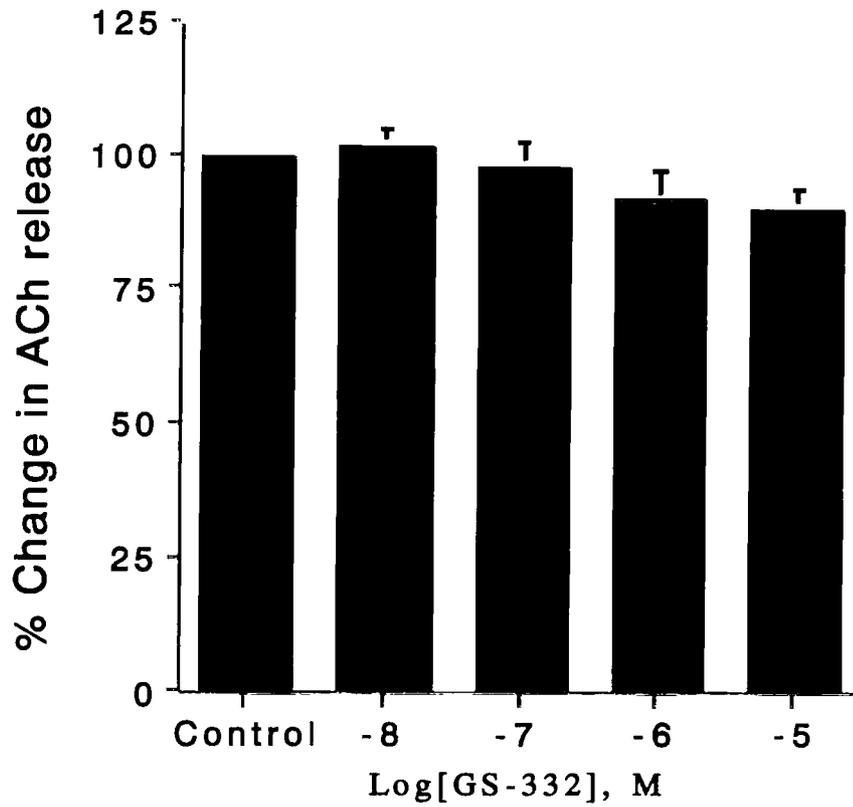


図 7-10 アセチルコリン放出量及び収縮反応に対するプロカテロールの影響  
 コントロール群（薬物非存在下）における収縮反応を100%として、  
 各群の収縮反応を百分率で計算し平均値±標準誤差 (n=5) で表した。

A



B

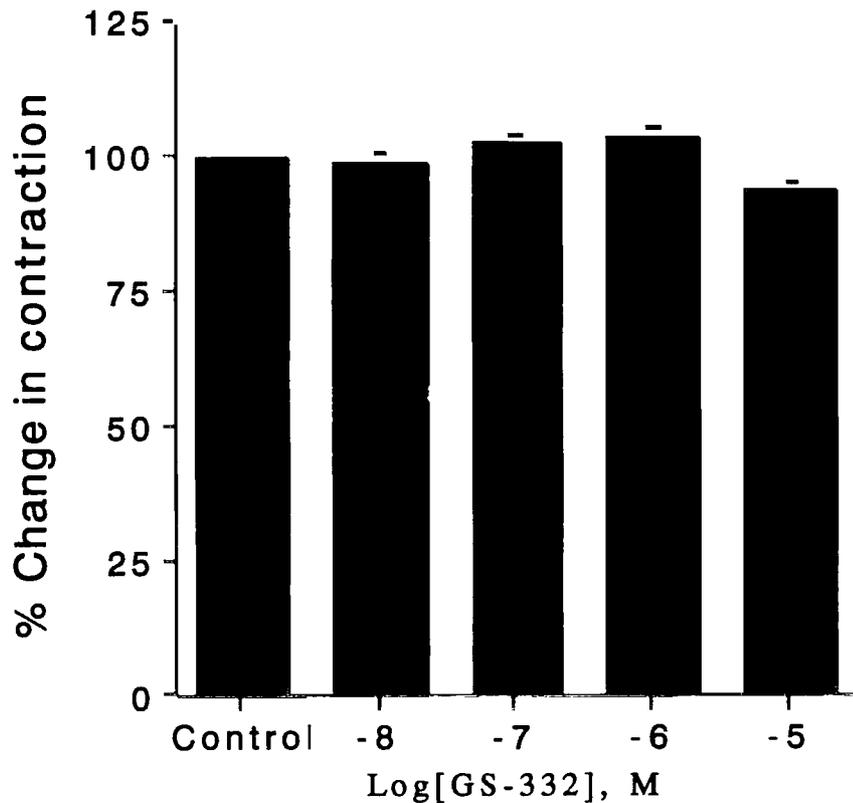


図 7-11 アセチルコリン放出量及び収縮反応に対する GS-332 の影響  
コントロール群（薬物非存在下）における収縮反応を100%として、  
各群の収縮反応を百分率で計算し平均値±標準誤差 (n=5) で表した。

## 8) 考察

### 8)-1 アセチルコリン放出量の測定法の有用性の検討

今回行った機能実験はオランダの Magnus により考案された方法を用いているが、この方法は方法論や再現性が確立されており、信頼性、簡便性、経済性にも優れ、生体に近い状態での反応性を検討できると考えられている。今回の実験でも、外因性に各種神経伝達物質や薬剤を平滑筋条片に投与することにより膀胱平滑筋の反応性について検討することができた。さらに今回の実験では、家兔尿道から放出されるアセチルコリンの放出量をマイクロダイアリス法と高速液体クロマトグラフィーを用いて検討した。これまで平滑筋から放出されるアセチルコリンの測定には RI を用いた方法が主に用いられてきた (D'Agostino et al., 1986; Somogyi et al., 1990; Alberts et al., 1992)。しかしこの方法では神経終末に RI を取込ませた後、刺激により取り込ませた RI が放出されるのを測定しているため直接神経伝達物質を測定できないという欠点が指摘されていた (Baker et al., 1992)。高速液体クロマトグラフィーでの神経伝達物質の測定は、数分の内に多数のサンプルの処理を可能にし、比較的簡便で、再現性、特異性、感受性において優れているが (Potter et al., 1983)、我々もこれまで主に脳で用いられてきたマイクロダイアリス法と組み合わせることで、家兔尿道や膀胱平滑筋において、それぞれ経壁電気刺激によって誘発された NO (Takahashi et al., 1997) やアセチルコリン (Inadome et al., 1998a) を測定してきた。今回の研究でのアセチルコリンの回収率は、約 30 % であり、これは 4-25% (Toide and Arima, 1989; Watanabe et al., 1990) とする既報での回収率と比べても遜色のない良好な結果であったことから家兔膀胱平滑筋から放出されるアセチルコリンの検討に有用であることが示唆された。

以上の方法を用いて得られた実験結果より、本章において本章において 8)-2 で

は経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出及び収縮反応に対する NO の影響、次いで 8)-3 では経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出及び収縮反応に対する prejunctional (節前性) アドレナリン受容体の役割について考察する。

#### 8)-2 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出 及び収縮反応に対する NO の影響

今回の検討で 5Hz と 20Hz の双方の刺激条件で家兎膀胱平滑筋の有意な収縮反応とアセチルコリン放出量の増加を認めた。テトロドトキシン処置は有意にこれらの反応を抑制したため今回の実験系における収縮は神経原性のものであることが示唆される。しかし、テトロドトキシン処置後も basal release は残存していた。Greaney (1993) らはこの basal release はプローブ刺入の際の組織傷害性の放出であり、非神経原性の放出である可能性を示唆したが我々の報告 (Inadome et al., 1998a) もその可能性を示唆している。

今回の検討で NO ドナーである SNP の前処置はカルバコール誘発収縮に影響を与えず、L-NNA は 5 Hz 経壁電気刺激によるアセチルコリン放出を増加させ、NO 前駆体である L-アルギニンは逆にアセチルコリン放出を減少させた。また、SNP の前処置は L-NNA の存在の有無にかかわらず 5 Hz 経壁電気刺激によるアセチルコリン放出を減少させた。これらの結果から、家兎膀胱平滑筋において NO は節後性 (postjunctional) のムスカリン受容体を介する収縮反応に影響を及ぼすのではなく、(少なくとも 5Hz 経壁電気刺激においては) むしろ節前性 (prejunctional) にコリン作動性神経終末からのアセチルコリン放出を抑制する作用に関係している事が示唆される。Wiklund ら (1993a) や Kilblinger と Wolf (1994) もモルモットの腸管平滑筋における NO とアセチルコリンの放出との関係についてわれわれと同様の報告を行っている。また収縮実験において、

L-NNAの前処置は5Hz経壁電気刺激による収縮反応を増強させ、L-アルギニンの投与により打ち消された。対照的にSNPの前処置ではL-NNAの存在の有無にかかわらず5Hz経壁電気刺激による収縮反応は減少した。これらの結果はモルモットの小腸や大腸、あるいはラットやウサギの胃においてNO合成阻害が経壁電気刺激によるコリン性収縮の増強をもたらすとの報告(Wiklund et al., 1993b; Knudsen and Tottrup, 1992; Lefebvre et al., 1992; Baccari et al., 1993)と同様である。このように今回の検討からは、家兎膀胱平滑筋においてコリン作動性神経終末からのアセチルコリン放出を内因性のNOが節前性に調節するメカニズムが存在する事を支持する結果となった。

NO作動性神経から放出されたNOは受容体を介さず直接細胞内に到達し、細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼを介してGTPをcGMPに変換し、平滑筋弛緩反応を起こすと考えられている。しかし、5)-3でも述べたように諸家の報告をまとめると、現時点ではNOと膀胱の関係については以下のように考えられている。すなわち、膀胱においてNOは直接の弛緩作用を持つ神経伝達物質としてよりは、他の神経伝達物質の放出に影響することで結果として蓄尿時に膀胱の弛緩状態を保つという間接的な役割を持つ事が示唆されている(Andersson and Persson, 1994; Ehren et al., 1994)。

NO 自身の神経系への作用について、神経細胞に対して NO が直接的な脱分極をもたらすといった報告は認められていないが、アセチルコリンの放出における神経終末での抑制機構への関与が示唆されている。表 2 に示すように NO 合成阻害薬の投与がアセチルコリンの放出に対してなんら影響を与えなかったという報告もあれば、我々の結果と同様に経壁電気刺激によるアセチルコリンの放出を増加させたという報告もある。また逆に減少させたという報告もあり、この差違は

表 2 NO 合成阻害薬によるアセチルコリン放出に対する影響に関する文献報告

文献	実験動物	組織	阻害薬	ACh に対する影響
Prast et al. (1995)	ラット	線条体 in vivo	L-NNA	Basal release の抑制
Suzuki et al. (1993)	ラット	海馬	L-NNA	なし
Sekizawa et al. (1993)	ラット	気管	L-NMNA	放出量の増加
Brave et al. (1991)	モルモット	気管	L-NNA	なし
Sotirov et al. (1999)	モルモット	胃底	L-NNA	放出量の減少
Kilbinger (1996)	モルモット	小腸	L-NMMA	放出量の増加
Hryhorenko et al. (1994)	イヌ	小腸	L-NAME	放出量の増加
Ward et al. (1993)	ヒト	気管	L-NAME	なし
Miyamoto et al. (2001)	ウサギ	膀胱	L-NNA	放出量の増加

L-NNA, N<sup>ω</sup>-ニトロ-L-アルギニン；L-NMNA, N<sup>ω</sup>-モノメチル-L-アルギニン；  
L-NAME, N<sup>ω</sup>-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル；ACh, アセチルコリン

刺激条件、NO 合成阻害薬の種類、種や組織の違いによるものなのかは不明である。しかし、膀胱平滑筋において同様の検討を行った報告はわれわれが初めてであり、今後更なる検討が待たれる。

今回の検討では上述のアセチルコリンの放出に対する NO 合成阻害薬の影響は 5 Hz の刺激条件では認められたが、20 Hz では L-NNA の前処置は家兔膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出、収縮反応双方に影響を及ぼさなかった。この刺激条件の違いにより反応性が異なる理由は不明である。以前の我々の検討 (Inadome et al., 1998b) では家兔膀胱平滑筋の経壁電気刺激による最大収縮は 20Hz で、一方アセチルコリンの放出は 40Hz で認められた。今回の検討では 20Hz で収縮反応は最大に達していたためその変化を評価できなかったのかもしれないがアセチルコリンの放出は 40Hz 刺激時の最大放出量の 80% であるにもかかわらず L-NNA 前処置は収縮反応同様影響を与えていない。これらの結果からは NO が介在するアセチルコリン放出及びアセチルコリン作動性収縮を抑制する機構は高頻度刺激時よりもむしろ低頻度刺激の際に主な役割を果たしていると思われる。今回の検討における経壁電気刺激の二つの刺激条件すなわち低頻度刺激、高頻度刺激はそれぞれ膀胱の蓄尿期（弛緩）、排尿期（収縮）に類似した状態とも考えられる。NO 合成阻害薬による NO 産生抑制がラット膀胱において蓄尿時の膀胱過活動を惹起し、膀胱容量を低下させるという報告 (Andersson, 1993; Persson et al., 1992) にもあるように、今回の結果から、NO は蓄尿期にアセチルコリンの放出を抑制することで膀胱過活動を抑制し、膀胱容量を増大する働きを有している可能性が示唆される。

さて、神経作動性の膀胱収縮に関していわゆるコリン作動性収縮のほかに、アトロピン抵抗性の非アドレナリン、非コリン性収縮が多く哺乳類において存在することは一般に受け入れられている。経壁電気刺激によるアトロピン抵抗性収縮の正確なメカニズムは明らかではないが、膀胱平滑筋収縮の非コリン性成分としていくつかの神経伝達物質が考えられている。なかでも ATP がその主体であ

るとの報告がある (Burnstock, 1996; Hoyle et al., 1989)。今回の検討でアトロピン処置により経壁電気刺激による収縮反応はコントロールの約 40-60%に減少した。アトロピンと  $\alpha, \beta$ -メチレン ATP によるプリン受容体の脱感作により収縮反応はほぼ抑制され、この結果は以前の報告 (Yokota and Yamaguchi, 1996) と同様であり、家兎膀胱平滑筋において ATP がアトロピン抵抗性収縮における非コリン性神経伝達物質の主体である事が示唆される。今回の検討で L-NNA (NO 合成阻害薬) は経壁電気刺激によるアトロピン抵抗性収縮の部分には影響を与えなかった。また、SNP (NO ドナー) は ATP による用量反応曲線及びアトロピン抵抗性収縮の双方に影響を与えなかった。この結果は家兎膀胱平滑筋において NO が神経終末からの ATP 放出あるいは ATP 誘発収縮には影響を与えないことを示唆している。

結論として家兎膀胱平滑筋において経壁電気刺激によるアセチルコリン放出とアセチルコリン作動性の収縮反応に対して NO 合成阻害薬は有意な増加を、NO ドナーは有意な減少をもたらし、この結果からはコリン作動性神経終末からのアセチルコリン放出を抑制するメカニズムが存在し、このメカニズムは内因性の NO により調節されていることが強く示唆された。すなわち NO は膀胱平滑筋に対して直接の弛緩作用よりは、神経終末からのアセチルコリン放出の抑制という節前性の働きによって膀胱の収縮を抑制することで間接的に蓄尿期に重要な役割を果たしていると考えられる (図 8-1)。

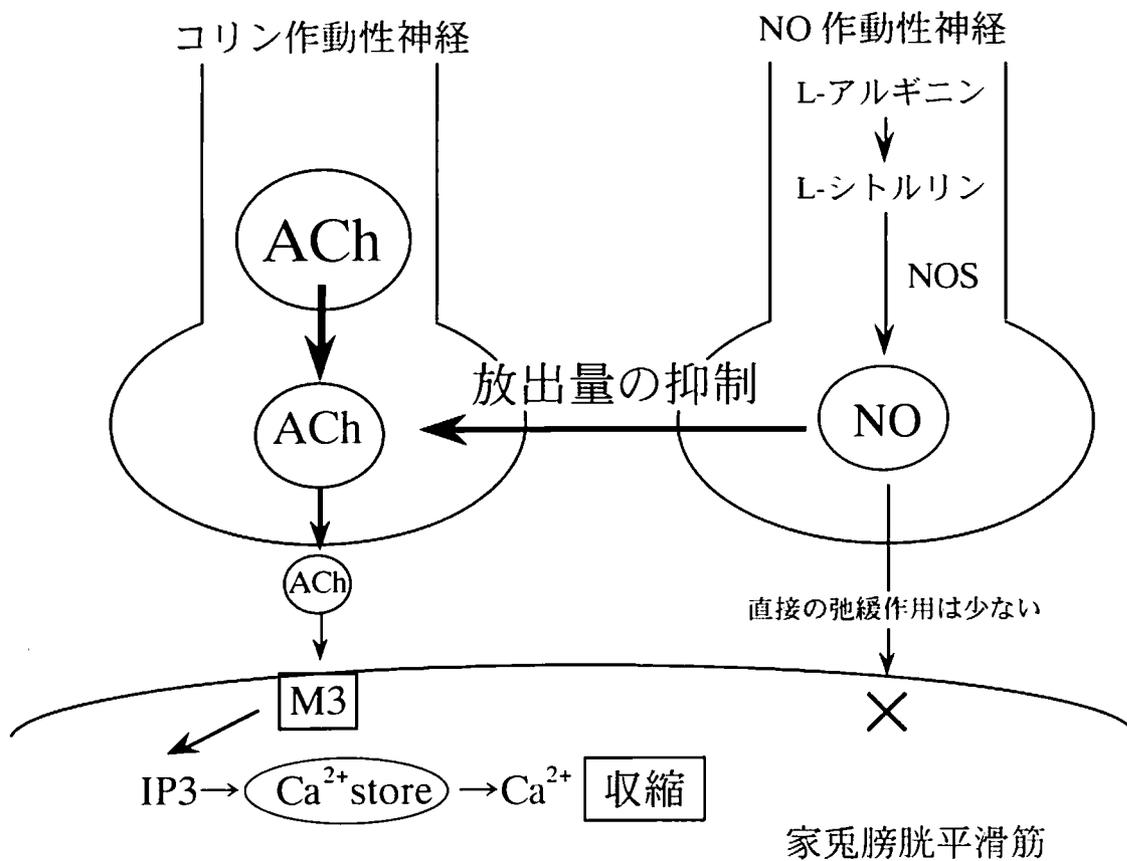


図 8-1 コリン作動性神経と NO 作動性神経の関係

NO は節前性にアセチルコリンの放出を抑制することで膀胱平滑筋の収縮を抑制し蓄尿機構の一部に関与している

### 8-3) 経壁電気刺激による膀胱平滑筋からのアセチルコリンの放出

#### 及び収縮反応に対する $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプの役割の検討

前述のようにNOは蓄尿時にアセチルコリンの放出を抑制する事で生理的に不都合な収縮を抑制している可能性が示唆された。一方で、蓄尿時における神経伝達物質の主体は交感神経節後線維から放出されるノルアドレナリンである。このノルアドレナリンが膀胱に存在するアドレナリン受容体を刺激して膀胱平滑筋が弛緩することにより蓄尿機構が成立しているが、コリン作動性神経のprejunctionalに存在するアドレナリン受容体についての役割は明らかではない。今回、まず $\alpha$ 、 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬をそれぞれ前処置してアセチルコリン放出及び収縮反応に与える影響を検討した。 $\alpha$ -アドレナリン受容体阻害薬のフェントラミンはアセチルコリン放出及び収縮反応に影響を与えなかったのに対し、 $\beta$ -アドレナリン受容体阻害薬のプロプラノロールはアセチルコリン放出量を用量依存性に有意に増加させた。よってNOの項でも述べたように節前性アセチルコリンの放出を調節する機構がprejunctional  $\beta$ -アドレナリン受容体を介して存在する可能性が示唆された。

そこで各種 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬のアセチルコリン放出及び収縮反応に与える影響を検討してみた。まず非選択的 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬のイソプロテレノールで前処置後に5 Hzで刺激したときのアセチルコリン放出量は用量依存性に有意に減少し、また同様に収縮反応も用量依存性に有意に減少した。さらに各種 $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬サブタイプ別の検討では、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体刺激薬であるプロカテロールがイソプロテレノールと同様、膀胱平滑筋からの5Hz経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量及び収縮反応を用量依存性に有意に減少させた。一方、 $\beta_1$ -アドレナリン受容体刺激薬であるドブタミン、 $\beta_3$ -アドレナリン受容体刺激薬であるGS-332 (Iizuka et al., 1998a,b)は高用量ではアセチルコリン放出量、収縮反応を若干減少させるもののほとんど影

響を与えてなかった。これらの結果からは前項で示唆されたような蓄尿時にアセチルコリンの放出をNOを介して節前性に抑制するメカニズムと同様の、蓄尿時には $\beta$ 受容体を介して膀胱の弛緩を引き起こすと同時に、節前性の $\beta$ -受容体を介してアセチルコリンの放出を抑制することで膀胱の収縮を抑制するメカニズムの存在が示唆され、またサブタイプ別の検討によりこの抑制機構には $\beta_2$ -アドレナリン受容体が関与する可能性が示唆している。この $\beta$ -アドレナリン受容体がアセチルコリンの放出を調節することに関しては、モルモットやウマの気管における報告 (Zhang et al, 1998; Belvisi et al., 1996) を散見する程度であり、今後の解明が待たれるところである。

Moran (1966) は $\beta$ -アドレナリン受容体遮断薬の薬理作用の検索により、 $\beta$ -アドレナリン受容体が均一のものではないことを示唆し、その後Landsら(1967)は、ノルアドレナリン、アドレナリンの作用強度をも考慮に入れて、 $\beta_1$ および $\beta_2$ の2種類のサブタイプに細分類できることを報告した。現在では、 $\beta$ -アドレナリン受容体は薬理的にも分子生物学的にも3種類のサブタイプ( $\beta_1$ - $\beta_3$ )に分類される (Lipworth, 1996; Strosberg and Pietri-Rouxel, 1996)。3種類のサブタイプは異なる組織分布を示し、 $\beta_1$ -アドレナリン受容体は心臓の機能に関与し、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体は主に平滑筋に多く存在し、特に気管支筋や血管の平滑筋を弛緩させ、 $\beta_3$ -アドレナリン受容体は交感神経を介する脂肪分解に関与する (Lipworth, 1996; Strosberg and Pietri-Rouxel, 1996)。いずれのサブタイプの $\beta$ -アドレナリン受容体も、これを興奮させると細胞内cAMPの増加を生じ、Aキナーゼが活性化され、種々の蛋白質を燐酸化する。心臓では、心筋細胞内筋小胞体のホスホランバンの燐酸化により、筋小胞体への $Ca^{2+}$ の取り込みが促進され、膜脱分極時の $Ca^{2+}$ 放出量が増加して強心作用を引き起こす。平滑筋では、ミオシン軽鎖キナーゼが燐酸化されて、 $Ca^{2+}$ 結合能が低下し、ミオシン軽鎖の脱燐酸化が進行してアクチンとの相互作用が抑制されて弛緩する。このように燐酸化される蛋白質が異なることにより、異なる作用が発現することになる。

表3 膀胱平滑筋の $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプに関する文献報告

文献	種	分類	$\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプ		
			$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$
Levin et al. (1988)	ウサギ	薬理的		◎	
Morita (1989)	ウサギ	薬理的		◎	
山崎ら (1997)	ウサギ	薬理的		◎	○
	ラット	薬理的		○	○
	イヌ	薬理的			◎
Igawa et al. (1997, 1999)	ヒト	薬理的		○	◎
		分子生物学的	○	○	○
Takeda et al. (1997, 1999)	ヒト	薬理的		○	◎
		分子生物学的	○	○	○

薬理的に優位に存在する受容体サブタイプを◎で表した。

また膀胱平滑筋の $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプには種差があることが報告されている(表3)。家兎膀胱平滑筋の弛緩反応は、主に $\beta_2$ -アドレナリン受容体を介することが報告されているが(Levin et al., 1988; Morita, 1989; 山崎ら, 1997)、ヒト膀胱平滑筋では、 $\beta_3$ -アドレナリン受容体を介する弛緩反応が報告されている(Igawa et al., 1997, 1999; Takeda et al., 1997, 1999)。当教室においても家兎膀胱平滑筋には $\beta_2/\beta_3$ -アドレナリン受容体が存在し、その弛緩反応は、主に $\beta_2$ -アドレナリン受容体を介し、一部 $\beta_3$ -アドレナリン受容体も関与することを報告した(Yono et al., 2000)。

今回の検討においてコリン作動性神経終末には $\beta_2$ -アドレナリン受容体が存在することが示唆されたが、アセチルコリン放出量の減少率はそれぞれ最大用量前

処置 (10  $\mu$  M) 時でイソプロテレノールが約 50%、プロカテロールが約 30% であった。この差は有意差はなかったとはいえ高用量のドブタミン、GS-332 前処置時のアセチルコリン放出量も若干減少傾向にあったことから節前性の  $\beta_1/\beta_3$ -アドレナリン受容体の存在も否定できない。また収縮反応からも同様のことが言えるが、この場合は膀胱平滑筋の  $\beta$ -アドレナリン受容体への直接の作用による影響に加え、通常の弛緩実験と今回の経壁電気刺激による収縮実験では同じ  $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬を用いても得られる反応が異なることによると思われる。今後選択的な  $\beta$ -アドレナリン受容体阻害薬などを用いた更なる検討が必要であろう。このアドレナリン作動性神経とコリン作動性神経の関係についてまとめのシェーマを示す (図 8-2)。

これまで述べてきた NO や  $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬がアセチルコリンの放出を節前性に抑制するメカニズムの様に、ある神経伝達物質の放出が神経終末上の受容体を介して他の神経からの神経伝達物質によって節前性に制御されているという報告 (Mutoh et al., 1987; Yoshimura, 1997; Holmquist et al., 1994; Tanaka et al., 1996; Inadome et al., 1998b; Seshita et al., 2000) は多くみられるが、マイクロダイアリシス法を用いて直接神経伝達物質の定量が可能となったことでさらに神経同士の相互作用についての新しい知見が見出されるものと思われる。また現在のところ、蓄尿障害 (過活動膀胱) に対する治療薬として L-アルギニン/NO 系を利用した薬剤や、 $\beta$ -アドレナリン受容体を介した薬剤は存在しない。今回の実験で蓄尿時の膀胱からのアセチルコリン放出のメカニズムの一端が明らかになったことで今後新たな薬剤の開発の糸口となれば幸いである。

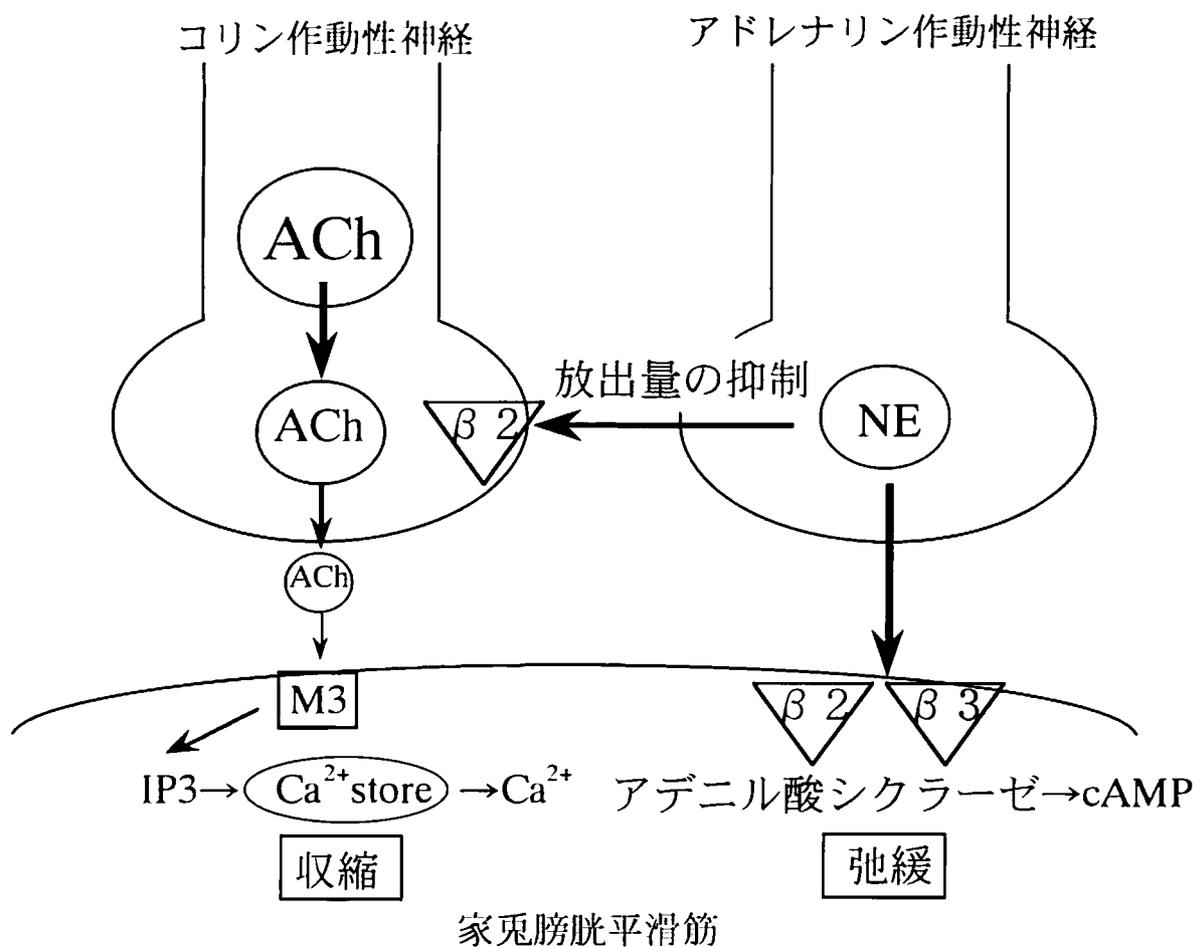


図 8-2 コリン作動性神経とアドレナリン作動性神経の関係

ノルアドレナリンは直接膀胱平滑筋を $\beta_2/\beta_3$ アドレナリン受容体を介して弛緩させるとともに、節前性に $\beta_2$ アドレナリン受容体を介してアセチルコリンの放出を抑制することで膀胱平滑筋の収縮を抑制し、弛緩時に不要な膀胱の過活動を抑制して蓄尿機構の一部に関与している

## 9) 結語

家兎膀胱平滑筋のアセチルコリン放出に対する NO 及びアドレナリン受容体サブタイプの影響について HPLC とマイクロダイアリース法を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 低頻度 (5Hz) の経壁電気刺激において L-NNA の前処置はアセチルコリン放出量、収縮反応を有意に増加させ、L-アルギニンの投与によりその反応は抑制された。また SNP 前処置は L-NNA の有無にかかわらずアセチルコリン放出量、収縮反応を有意に減少させた。
2. 高頻度 (20Hz) の経壁電気刺激において L-NNA または SNP の前処置はアセチルコリン放出量、収縮反応に対し影響を及ぼさなかった。
3. 各種  $\beta$ -アドレナリン受容体刺激薬前処置により経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量、収縮反応はイソプロテレノール、プロカテロールで用量依存性に有意に減少したが、ドブタミン、GS-332 は影響を与えなかった。
4.  $\beta$ -アドレナリン受容体阻害薬であるプロプラノロール前処置により経壁電気刺激によるアセチルコリン放出量は有意に増加したが、収縮反応には影響を与えなかった。

これらの結果より家兎膀胱平滑筋において

- 1、NO はコリン作動性神経終末からのアセチルコリン放出を節前性に抑制する役割を持つこと

2、コリン作動性神経終末上には $\beta_2$ -アドレナリン受容体が存在し、これを介してアセチルコリン放出を抑制するメカニズムが存在することが示唆された。この生理的意義としては主に蓄尿時のアセチルコリンを抑制することで膀胱の弛緩状態を保つことにあると考えられた。

## 10) 参考文献

- Ahlquist, RP. (1948)** A study of the adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.* 153 : 586.
- Alberts, P. (1992)** Subtype classification of the presynaptic alpha-adrenoceptors which regulate [<sup>3</sup>H]-noradrenaline secretion in guinea-pig isolated urethra. *Br. J. Pharmacol.* 105: 142.
- Andersson, KE. (2000)** Treatment of overactive bladder : other drug mechanisms. *Urology* 55 (Suppl 5A) : 51.
- Andersson, KE. (1993)** Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol. Rev.* 145: 253.
- Andersson, KE., Garcia-Pascual, A., Forman, A., Tottrup, A. (1991)** Non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation of rabbit urethra is caused by nitric oxide. *Acta Physiol. Scand.* 141: 133.
- Andersson, KE., Garcia-Pascual, A., Persson, K., Forman, A., Tottrup, A. (1992)** Electrically induced, nerve-mediated relaxation of rabbit urethra involves nitric oxide. *J. Urol.* 147: 253.
- Andersson, KE., Persson, K. (1994)** Nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated effects in lower urinary tract smooth muscle. *World J. Urol.* 12: 274.
- Awad, SA., Bruce, AW., Carro-Ciampi, G., Downie, JW., Lin, M., Marks, GS. (1974)** Distribution of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in human urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 50: 525.
- Baccari, MC., Bertini, M., Calamai, F. (1993)** Effects of L-NG-nitro arginine on cholinergic transmission in the gastric muscle of the rabbit. *Neuroreport.* 4 ; 1102.
- Baker, DG., Don, HF., Brown, JK. (1992)** Direct measurement of acetylcholine release in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.* 263 : L142.
- Belvisi, MG., Patel, HJ., Takahashi, T., Barnes, PJ., Giembycz, MA. (1996)** Paradoxical facilitation of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by isoprenaline. *Br. J. Pharmacol.* 117 : 1413.

**Bennett, BC., Kruse, MN., Roppolo, JR., Flood, HD., Fraser, MO., De Groat, WC. (1995)** Neural control of urethral outlet activity in vivo: role of nitric oxide. *J. Urol.* 153 : 2004.

**Berridge, MJ. (1993)** Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361: 315

**Brave, SR., Hobbs, AJ., Gibson, A. Tucker, JF. (1991)** The influence of L-N(G)-nitro-arginine on field stimulation induced contractions and acetylcholine release in guinea pig isolated tracheal smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 : 1017.

**Braverman, AS., Kohn, IJ., Luthin, GR. (1998)** Prejunctional M1 facilitory and M2 inhibitory muscarinic receptors mediate rat bladder contractility. *Am. J. Physiol.* 274 (2 Pt 2) : R517.

**Burnstock, G., Cocks, T., Kasacov, L. (1978)** Direct evidence for ATP release from non-adrenergic, non-cholinergic ("purinergic") nerves in the guinea-pig taenia coli and bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 49 : 145.

**Burnstock, G. (1996)** The changing face of autonomic neurotransmission. *Acta Physiol. Scand.* 126 ; 67.

**Burnett, AL., Saito, S., Maguire, MP., Yamaguchi, H., Chang, TSK., Hanley, DF. (1995)** Localization of nitric oxide synthase in spinal nuclei innervating pelvic ganglia. *J. Urol.* 153: 212.

**Caulfield, MP., Birdsall, NJM. (1998)** International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* 50 : 279.

**Chancellor, MB., Kaplan, SA., Blaivas, JG. (1992)** The cholinergic and purinergic components of detrusor contractility in a whole rabbit bladder model. *J. Urol.* 148 : 906.

**Chung, BH., Choi, SK., Chang, KC. (1996)** Effects of nitric oxide on detrusor relaxation. *J. Urol.* 155 : 2090.

**D'Agostino, G., Kilbinger, H., Chiari, M.C., Grana, E. (1986)** Presynaptic inhibitory muscarinic receptors modulating [<sup>3</sup>H] acetylcholine release in the rat urinary bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239 : 522.

**De Groat, WC., Saum, WR. (1972)** Sympathetic inhibition of the urinary bladder and of pelvic ganglionic transmission in the cat. *J. Physiol. (london)* 220 : 297.

**Dixon, JS., Jen, PY. (1995)** Development of nerves containing nitric oxide synthase in the human male urogenital organs. *Br. J. Urol.* 76 : 719.

**Dokita, S., Morgan, WR., Wheeler, MA., Yoshida, M., Latifpour, J., Weiss, RM. (1991)** N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation in rabbit urethral smooth muscle. *Life Sci.* 48 : 2429.

**Docherty, JR. (1998)** Subtypes of functional  $\alpha_1$ -adrenoceptors.(review) *Eur. J. Pharmacol.* 361 : 1.

**Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E., Brann, MR. (1991)** Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 256 : 727.

**Edvardsen, P. (1968)** Nervous control of urinary bladder in cats. 1. The collecting phase. *Acta Physiol. Scand.* 72 : 157.

**Eglen, RM., Reddy, H., Watson, N., Challiss, RAJ. (1994)** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 114.

**Ehren, I., Iversen, H., Jansson, O., Adolfsson, J., Wiklund, NP. (1994)** Localization of nitric oxide synthase activity in the human lower urinary tract and its correlation with neuroeffector responses. *Urology* 44 : 683.

**Fowler, CJ., Jewkes, D., McDonald, WI., Lynn, B., de Groat, WC. (1992)** Intravesical capsaicin for neurogenic bladder dysfunction. *Lancet* 339 : 1239.

**Furchgott, RF., Zawadzki, JV. (1980)** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373.

**Furchgott, RF. (1988)** Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite : The basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide in *Vasodilation* (Van-houtt, P.M., ed.), Raven Press, New York : 401.

**Garcia-Pascual, A., Persson, K., Holmquist, F., Andersson, KE. (1993)** Endthelin-1-induced phosphoinositide hydrolysis and contraction in isolated rabbit detrusor and urethral smooth muscle. *Gen. Pharmacol.* 24 : 131.

**Garcia-Pascual, A., Costa, G., Labadia, A., Persson, K., Triguero, D. (1996)** Characterization of nitric oxide synthase activity in sheep urinary tract: functional implications. *Br. J. Pharmacol.* 118 : 905.

**Greaney, MD., Marshall, DL., Baily, BA., Acworth, IN. (1993)** Improved method for the routine analysis of acetylcholine release in vivo: quantitation in the presence and absence of esterase inhibitor. *J. Chromatogr.* 622 : 125.

**Hashimoto, S., Kigoshi, S., Muramatu, I. (1993)** Nitric oxide-dependent and -independent neurogenic relaxation of isolated dog urethra. *Eur. J. Pharmacol.* 231 : 209.

**Hieble JP, Bylund DB, Clarke DI, Eikenberg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo, RR Jr. (1995)** International Union of Pharmacology. X. Recommendations of nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: Consensus update, *Pharmacol Rev* 47: 267.

**Holmquist, F., Persson, K., Bodker, A., Andersson, KE. (1994)** Some pre- and postjunctional effects of castration in rabbit isolated corpus cavernosum and urethra. *J. Urol.* 152 : 1011.

**Hoyle, C.H.V., Chapple, C., Burunstock, G., (1989)** Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P2X-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur. J. Pharmacol.* 174 ; 115.

**Hryhorenko, LM., Woskowska, Z., Fox-Threlkeld, JET. (1994)** Nitric oxide (NO) inhibits release of acetylcholine from nerves of isolated circular muscle of the canine ileum : relationship to motility and release of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 : 918.

**Igawa, Y., Mattiasson, A., Andersson, KE. (1994)** Micturition and premicturition contractions in unanesthetized raats with bladder outlet obstruction. *J. Urol.* 151 : 244.

**Igawa, Y., Yamazaki, Y., Takeda, H., Hayakawa, K., Akahane, M., Ajisawa, Y., Yoneyama, T., Nishizawa, O. (1997)** The role of  $\beta_3$ -adrenoceptors in normal and neurogenic detrusors, *Neurourol Urodyn* 16: 363.

**Igawa, Y., Yamazaki, Y., Takeda, H., Hayakawa, K., Akahane, M., Ajisawa, Y., Yoneyama, T., Nishizawa, O., Andersson, KE. (1999)** Functional and molecular biological evidence for a possible  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human detrusor muscle, *Br. J. Pharmacol.* 126 : 819.

**Ignarro, LJ., Busch, PA., Buga, GM. (1990)** Nitric oxide and cyclicGMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170 : 843.

**Iizuka, H., Osaka, Y., Kondo, S., Morita, T. (1998a)** Effect of an atypical adrenergic  $\beta_3$ -agonist, GS-332 : sodium (2R)- [3-[3-[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethylamino]cyclohexyl] phenoxy] acetate, on urinary bladder function in rats. *J. Smooth Muscle Res.* 34 : 139.

**Iizuka, H., Osaka, Y., Kondo, S., Morita, T. (1998b)** Effect of GS-332, a novel adrenergic  $\beta_3$ -agonist, on urinary bladder function in rats. *Neurourol. Urodyn.* 17 : 343.

**Inadome, A., Yoshida, M., Takahashi, W., Wada, Y., Kitani, K., Kikukawa, H., Yono, M., Seshita, H., Ueda, S. (1998a)** Measurement of acetylcholine released from rabbit detrusor smooth muscle using HPLC with electro-chemical detection coupled with microdialysis procedure. *Life Sci.* 62 : PL393.

**Inadome, A., Yoshida, M., Takahashi, W., Yono, M., Seshita, H., Miyamoto, Y., Kawano, T., Ueda, S. (1998b)** Prejunctional muscarinic receptors modulating acetylcholine release in rabbit detrusor smooth muscles. *Urol. Int.* 61 : 135.

**Kilbinger, H. (1996)** Modulation of acetylcholine release by nitric oxide. *Progress Brain Res.* 109 : 219.

**Kilbinger, H., Wolf, D. (1994)** Increase by NO synthase inhibitors of acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 349 : 543.

**Knudsen, MA., Tøttrup, A. (1992)** A possible role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea-pig taenia coli. *Br. J. Pharmacol.* 107 : 837.

**Lands, AM., Arnold, A., McAuliff, JP., Luduena, FP., Brown, TG. (1967)** Differentiation of the receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214 : 597.

**Langer, SZ. (1974)** Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem. Pharmacol.* 23 : 1793.

**Lefebvre, RA., De Vriese, A., Smits GJM. (1992)** Influence of vasoactive intestinal polypeptide and NG-nitro-L-arginine methyl ester on cholinergic neurotransmission in the rat gastric fundus. *Eur. J. Pharmacol.* 221 ; 235.

**Levin, RM., Ruggieri, MR., Wein, AJ. (1988)** Identification of receptor subtypes in the rabbit and human urinary bladder by selective radio-ligand binding, *J. Urol.* 139 : 844.

**Lipworth, BJ. (1996)** Clinical pharmacology of  $\beta_3$ -adrenoceptors, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42 : 291.

**McNeil, D., Traugh, N., Vaidya, A., Hua, H., Pepka, R. (1992)** Origin and distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons and fibers innervating the urinary bladder of the rat. *Neurosci. Letts.* 147 : 33.

**Moncada, S., Palmer, RMJ. and Higgs, EA. (1991)** Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43 : 109.

**Moran, NC. (1966)** Pharmacological characterization of adrenergic receptors. *Pharmacol. Rev.* 18: 503.

**Morita, T. (1989)** Experimental studies on urinary incontinence, 1. Effects of  $\beta$ -adrenoceptor agonists on the contractile activities and intracellular cAMP levels of rabbit, canine and human urinary bladder smooth muscle. *Jpn. J. Urol.* 80 : 407

**Morita, T., Nishizawa, O., Noto, H., Tsuchida, S. (1984)** Pelvic nerve innervation of the external sphincter of urethra as suggested by urodynamic and horse-radish peroxidase studies, *J. Urol.* 131: 591.

**Mutoh, S., Ueda, S., Fukumoto, Y., Machida, J., Ikegami, K. (1987)** Effect of adrenergic and cholinergic drugs on the noradrenergic transmission in bladder neck smooth muscle. *J. Urol.* 138 : 212.

**Norlen, L., Sundin, T., Waagstein, F. (1978)** Beta adrenoceptor stimulation of the human urinary bladder in vivo. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 43: 26.

**Onuf, B. (1900)** On the arrangement and function of the cell groups of the sacral region of the spinal cord in man. *Arch. Neurol. Psychopathol.* 3 : 387.

**Palea, S., Toson, G., Pietra, C. (1998)** Pharmacological characterization of thromboxane and prostanoid receptors in human isolated urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 124 : 865.

**Palmer, RMJ., Ashton, DS., Moncada, S. (1988)** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 : 664.

**Palmer, RMJ., Ferrige, AG., Moncada, S. (1987)** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524.

**Persson, K., Andersson, KE. (1992)** Nitric oxide and relaxation of pig lower urinary tract. *Br. J. Pharmacol.* 106 : 416.

**Persson, K., Igawa, Y., Mattiasson, A., Andersson, KE. (1992)** Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat urinary bladder in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 107 : 178.

**Potter, PE., Meek, JL., Neef, NH. (1983)** Acetylcholine and choline in neuronal tissue measured by HPLC with electrochemical detection. *J. Neurochem.* 41 : 188.

**Prast, H., Fischer, H., Werner, E., Werner-Felmayer, G., Philippu, A. (1995)** Nitric oxide modulates the release of acetylcholine in the ventral striatum of the freely moving rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352 : 67.

**Rodbell, M. (1980)** The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284 : 17.

**Sekizawa, K., Fukushima, T., Ikarashi, Y., Maruyama, Y., Sasaki, H. (1993)** The role of nitric oxide in cholinergic neurotransmission in rat trachea. *Br. J. Pharmacol.* 110 : 816.

**Seshita, H., Yoshida, M., Takahashi, W., Inadome, A., Yono, M., Miyamoto, Y., Murakami, S., Ueda, S. (2000)** Prejunctional  $\alpha$ -adrenoceptors regulate nitric oxide neurotransmission in the rabbit urethra. *Eur. J. Pharmacol.* 400 : 271.

**Smet, PJ., Edyvane, KA., Jonavicius, J., Marshall, V.R. (1994)** Distribution of NADPH-diaphorase-positive nerves supplying the human urinary bladder. *J. Auton. Nerv. Syst.* 47 : 109.

**Somogyi, GT., De Groat, WC. (1990)** Modulation of the release of [<sup>3</sup>H] norepinephrine from the base and body of the rat urinary bladder by endogenous adrenergic and cholinergic mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255 : 204.

**Sotirov, E., Papisova, M., Sántha, E. (1999)** Nitric oxide (NO) increases acetylcholine release from and inhibits smooth muscle contraction of guinea-pig gastric fundus. *Brain Res. Bull.* 49; 297.

**Steers, WD. (1997)** Physiology and pharmacology of the bladder and urethra. *Campbell's Urology, 7th edn* : 870.

**Strader, CD., Fong, TM., Tota, MR., Underwood, D., Dixon, RA. (1994)** Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63 : 101.

**Strosberg, AD., Pietri-Rouxel, F. (1996)** Function and regulation of the  $\beta_3$ -adrenoceptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 17 : 373.

**Suzuki, T., Nonaka, H., Fujimoto, K., Kawashima, K. (1993)** Effects of physostigmine and some nitric oxide-cyclic GMP-related compounds on muscarinic receptor-mediated autoinhibition of hippocampal acetylcholine release. *J. Neurochem.* 60 : 2285.

**Takahashi, Y., Yoshida, M., Wada, Y., Goto, S., Inadome, A., Yono, M., Ueda, S. (1997)** Effect of estrogen on nitric oxide-induced relaxation of the rabbit urethra. *Eur. J. Pharmacol.* 339 : 165.

**Takeda, M., Mizusawa, T., Obara, K., Koizumi, T., Tsutsui, T., Hatano, A., Kanai, T., Takahashi, K. (1997)** Adrenergic  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  receptor subtypes in the detrusor of human urinary bladder - evaluation by mRNA expression and isometric contraction. *NeuroUrol. Urodyn.* 16: 365.

**Takeda, M., Obara, K., Mizusawa, T., Tomita, Y., Arai, K., Tsutsui, T., Hatano, A., Takahashi, K., Nomura, S. (1999)** Evidence for  $\beta_3$ -adrenoceptor subtypes in relaxation of the human urinary bladder detrusor: Analysis by molecular biological and pharmacological methods. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288 : 1367.

**Tanaka, H., Jing, L., Takahashi, S., Ito, Y. (1996)** The possible role of nitric oxide in relaxations and excitatory neuroeffector transmission in the cat airway. *J. Physiol. London.* 493 : 785.

**Toide, K., Arima, T. (1989)** Effects of cholinergic drugs on extracellular levels of acetylcholine and choline in rat cortex, hippocampus and striatum studied by brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 173 : 133.

**Wada, Y., Latifpour, J., Sanematsu, H., Afiatpour, P., Wang, Z., Saito, M., Nishi, K., Weiss, RM. (2000)** Age-related changes in contractile responses of rabbit lower urinary tract to endothelin. *J. Urol.* 164 : 806.

**Wang P., Luthin GR., Ruggieri MR. (1995)** Muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediating urinary bladder contractility and coupling to GTP binding proteins. *J Pharmacol Exp Ther.* 273: 959.

**Ward, JK., Belvisi, MG. Fox, AJ., Miura, M., Tadjkarimi, S., Yacoub, MH., Barnes, PJ. (1993)** Modulation of cholinergic neural bronchoconstriction by endogenous nitric oxide and aasoactive intestinal peptide in human airways in vivo. *J. Clin. Invest.* 92 : 736.

**Werkstrom, V., Persson, K., Ny, L., Bridgewater, M., Brading, AF., Andersson, KE. (1995)** Factors involved in the relaxation of female pig urethra evoked by electrical field stimulation. *Br. J. Pharmacol.* 116 : 1599.

**Wiklund, CU., Olgart, C., Wiklund, NP., Gustafsson, LE. (1993a)** Modulation of cholinergic and substance P-like neurotransmission by nitric oxide in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 110 : 833.

**Wiklund, CU., Wiklund, NP., Gustafsson, LE. (1993b)** Modulation of neuroeffector transmission by endogenous nitric oxide - a role for acetylcholine receptor-activated nitric oxide formation, as indicated by measurements of nitric oxide/nitrite release. *Eur. J. Pharmacol.* 240 ; 242.

**Watanabe, H., Shimizu, H., Matsumoto, K. (1990)** Acetylcholine release detected by trans-striatal dialysis in freely moving rats correlates with spontaneous motor activity. *Life Sci.* 47 : 829.

**Yono, M., Yoshida, M., Wada, Y., Kikukawa, H., Takahashi, W., Inadome, A., Seshita, H., Ueda, S. (1999)** Pharmacological effects of tolterodine on human isolated urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 368 : 223.

Yono, M., Yoshida, M., Takahashi, W., Inadome, A., Seshita, H., Miyamoto, Y., Ueda, S. (2000) Effects of ovarian hormones on  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated relaxation in the female rabbit bladder. *Urol. Res.* 28 : 35.

Yokota, T. and Yamaguchi, O. (1996) Changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in pathologic bladder of chronic spinal rabbit. *J. Urol.* 156 : 1862.

Yoshida, M., Homma, Y., Inadome, A., Yono, M., Seshita, H., Miyamoto, Y., Murakami, S., Kawabe, K., Ueda, S. (2001) Age-related changes in cholinergic and purinergic neurotransmission in human isolated bladder smooth muscles. *Exp. Gerontology* 36 : 99.

Yoshida, M., Nishi, K., Machida, J., Sakiyama, H., Ikeda, K., Ueda, S. (1992) Effects of phorbol ester on lower urinary tract smooth muscle in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 222 : 205.

Yoshimura, N., de Groat, WC. (1997) Neural control of the lower urinary tract. *Int. J. Urol.* 4 : 111.

Zhang, XY., Zhu, FX., Michal, A., Michal, AO., Robinson, NE. (1998) Effects of enantiomers of  $\beta_2$ -agonists on ACh release and smooth muscle contraction in the trachea. *Am. J. Physiol.* 274 : L32.

稲留彰人、吉田正貴、高橋渡、米納誠、瀬下博志、宮本豊、村上滋孝、上田昭一 (1999) マイクロダイアリシス法と高速液体クロマトグラフィーを用いた下部尿路平滑筋から放出される神経伝達物質の定量。 *J. Smooth Muscle Res. (Jpn. Section)* 3: J-59.

吉田正貴、稲留彰人、上田昭一 (1999) 等尺性収縮実験—マイクロダイアリシスの応用—。 *神経泌尿器科学研究法* : 20

小友良、下田直威、佐藤 滋、佐藤一成、小川修、加藤哲郎 (1999) ラット膀胱ならびに尿道機能制御に対する ATP 受容体の役割。 *日泌尿会誌*、90 巻 7 号 : 681.

山崎芳伸、武田裕夫、赤羽増夫、味澤幸義、井川靖彦、西澤 理 (1997) ウサギ、ラットおよびイヌ膀胱排尿筋における  $\beta$ -アドレナリン受容体サブタイプ。学会抄録、日泌総会、横浜