

熊本大学学位論文

トラマドール塩酸塩の下部尿路機能
に関する薬理学的研究

2012

尾山 達哉

**Pharmacological studies of the effect of tramadol hydrochloride
on lower urinary tract function**

Tatsuya Oyama

Pharmacological studies of the effect of tramadol hydrochloride on lower urinary tract function

Tatsuya Oyama

Tramadol hydrochloride (tramadol) is a widely used analgesic that activates μ -opioid receptors and inhibits the reuptake of serotonin and noradrenaline. There have been studies on the analgesic effects of tramadol based on the tail-flick test, the formalin test, and the induction of allodynia by sciatic-nerve ligation. However, the effects of tramadol on behaviors related to bladder pain induced by cystitis have not been reported. Although tramadol is also known to inhibit the micturition reflex in rats, its effects on urinary frequency induced by cystitis or on urethral continence function have not been reported. Thus, the effects of tramadol on lower urinary tract function have not been well characterized. Lower urinary tract function is divided into two phases, urinary storage and micturition. Urinary storage disorders, including urinary incontinence, cause a considerable reduction in the quality of life, and are becoming a social problem. Urinary storage dysfunction can be classified broadly into dysfunction of the bladder (including bladder primary afferent nerves) induced by cerebral impairment or cystitis and dysfunction of the urethra (including the pelvic floor muscle). In this study, I investigated the effects of tramadol on urinary storage function, including both bladder and urethral function, and explored the potential of tramadol for the treatment of lower urinary tract disorders.

1. Effect of tramadol on pain-related behaviors and bladder overactivity in rodent cyclophosphamide-induced cystitis models.

To investigate the usefulness of tramadol for patients with cystitis, I investigated the effects of tramadol in rodent cystitis models. Intraperitoneal injection of cyclophosphamide (100-400 mg/kg) caused bladder-specific inflammation and increases in pain-related behaviors, the number of voids and bladder weight in mice. Tramadol at 1 mg/kg per os significantly suppressed the pain-related behaviors induced by 300 mg/kg cyclophosphamide. During continuous-infusion cystometrograms in anesthetized rats, cyclophosphamide (150 mg/kg) shortened the intercontraction interval, indicating bladder overactivity. Intravenous tramadol (3 mg/kg) significantly prolonged the intercontraction interval, and the effect was partially blocked by the opioid antagonist naloxone. This finding indicates that μ -opioid receptors are involved in the action of tramadol.

2. Leak volume induced by electrical stimulation as a novel evaluation index for stress urinary incontinence in rats.

Stress urinary incontinence (SUI) is one of the most prevalent disorders of the lower urinary tract, with symptoms characterized by involuntary leakage of urine caused by an increase in abdominal pressure during sneezing or coughing. For the study of the mechanisms of SUI, several female rat models that mimic SUI symptoms have been developed. Many of these SUI models, which are induced by artificial sneezing or electrical stimulation of abdominal muscles, are evaluated by bladder leak point pressure. However, it is difficult to use these models to measure urinary leakage, an important clinical index, or to measure long-term drug efficacy. Here, we describe a novel female rat model that allows the long-term measurement of the leak volume (LV) produced by electrical stimulation of abdominal muscles. Using this model, we have shown that intravenous injection of duloxetine, a selective serotonin/noradrenalin reuptake inhibitor, and WAY-161503, a serotonin-2 receptor agonist, significantly decreased LV. These results indicate that the measurement of LV is a useful quantitative method for evaluating the long-term efficacy of agents for the treatment of SUI.

3. Effects of tramadol hydrochloride on urethral continence function in rats.

The effects of tramadol on urethral continence function have not yet been reported. Therefore I investigated whether intravenous tramadol affects intraurethral pressure, bladder leak point pressure, and leak volume in urethane-anesthetized female rats. For comparison, I also investigated the effects of the μ -opioid agonist morphine. Intravenous tramadol (1-10 mg/kg) significantly increased the intraurethral pressure. Both tramadol and morphine increased the bladder leak point pressure and decreased the leak volume. These results indicate that tramadol enhanced urethral continence function. These changes were reversed by subcutaneous pretreatment with naloxone. Hence, tramadol improved urethral function and inhibited urinary incontinence through μ -opioid receptors.

In conclusion, tramadol ameliorated cyclophosphamide-induced bladder-pain-related behaviors and bladder overactivity in rodents, and improved urethral function. These findings suggest that tramadol might be a useful treatment option for lower urinary tract disorders such as cystitis-induced bladder pain, bladder overactivity, and urethral incontinence.

論文要旨

トラマドール塩酸塩の下部尿路機能に関する薬理学的研究

尾山 達哉

トラマドール塩酸塩（トラマドール）は、 μ -オピオイド受容体に対する作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を合わせ持つ鎮痛薬である。トラマドールは、Tail-flickテスト、ホルマリンテスト、坐骨神経結紮アロディニアモデルなどにおいて鎮痛作用を有することが報告されているが、膀胱炎による疼痛に対する作用はこれまで検討されていない。また、これまで、ラットにおいてトラマドールが排尿反射を抑制することが明らかにされているが、膀胱炎によって誘発される頻尿に対する作用や尿道の尿禁制機能に対する作用は検討されていない。このように、トラマドールの下部尿路機能に対する作用については未だ不明な点が多い。下部尿路機能は尿をためる蓄尿機能と尿を排出する排尿機能に分類されるが、蓄尿機能の障害は尿失禁を引き起こすなど QOL が著しく低下するため社会的に大きな問題となっている。蓄尿機能の障害の原因として、中枢疾患や膀胱炎などによって引き起こされる膀胱機能（膀胱求心路神経を含む）の異常と尿道機能（骨盤底筋を含む）の異常に大別されるが、このどちらも蓄尿機能に重要な役割を果たしている。そこで本研究では、トラマドールの下部尿路機能、特に蓄尿機能に対する詳細を膀胱機能と尿道機能の両面から解明し、下部尿路機能障害治療薬としての可能性を検討した。

1. トラマドール塩酸塩のシクロホスファミド誘発膀胱炎モデルにおける膀胱痛、排尿反射亢進に対する作用

シクロホスファミドによって誘発した膀胱炎における疼痛及び頻尿に対するトラマドールの抑制作用を、マウス及びラットを用いて検討した。シクロホスファミド（100, 200, 300, 400 mg/kg）をマウスに腹腔内投与すると、用量依存的に疼痛関連行動、排尿回数及び膀胱湿重量の増加が認められた。シクロホスファミド 300 mg/kg 腹腔内投与によって誘発された疼痛関連行動を、トラマドールの経口投与は 1 mg/kg から有意に抑制した。シクロホスファミド 150 mg/kg を腹腔内投与したラットでは、麻酔下膀胱内圧測定において排尿間隔が短縮しており、排尿反射の亢進が認められた。トラマドールの静脈内投与は、シクロホスファミドによって短縮した排尿間隔を延長し、この延長作用はオピオイド拮抗薬のナロキソンの前投与で減弱した。以上の結果から、トラマドールは、シクロホスファミドによって誘発された膀胱炎に伴う疼痛及び頻尿を抑制する作用を有し、少なくともその作用の一部は μ -オピオイド受容体を介することが示唆された。

2. 新規腹圧性尿失禁評価方法としての電気刺激誘発ラット漏れ量測定

次に、尿道平滑筋や尿道を支配する神経の障害、骨盤底筋群の障害によって起こる腹圧性尿失禁に対する作用を検討した。腹圧性尿失禁は、くしゃみや咳などの腹圧が上昇する動作によって不随意に尿が漏れる疾患で、これまで、動物で腹圧性尿失禁を誘発する方法としてくしゃみさせる方法や腹筋を電気刺激する方法が使用され、その薬効評価には尿漏れ時の膀胱閾値圧を測定する方法が用いられている。しかし、この方法では薬効を経時的に評価することは困難であった。また、臨床で実際に起こる、「漏れ」を評価する試験方法ではないため、腹圧性尿失禁特有の「漏れ」を評価する新たな方法が求められていた。そこで、雌性ラットを用い、腹筋電気刺激による一過性の膀胱内圧上昇に伴う尿道口からの漏れ量を測定することによって経時的に薬効を評価する新しい方法を確立した。この方法を用いて、腹圧性尿失禁治療薬として欧州で認可されている選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬の塩酸デュロキセチンおよび脊髄を作用点として尿道を支配する神経を活性化させることが報告されている 5-HT₂ 受容体作動薬 WAY-161503 の静脈内投与を検討した。結果、塩酸デュロキセチン及び WAY-161503 は共に漏れ量を減少させた。このことから、漏れ量を測定するこの新しい方法は腹圧性尿失禁治療薬の効力を経時的かつ定量的に評価する方法として有用であることが示唆された。

3. ترامadol塩酸塩のラット尿禁制機能に対する作用

トラマドールの尿禁制機能に対する作用の検討を、麻酔下ラットを用いて、1) 尿道内圧、2) 漏出時膀胱閾値圧および 3) 電気刺激誘発による漏れ量を指標にして行った。また、比較対象として、 μ -オピオイド受容体作動薬である塩酸モルヒネの作用を検討した。トラマドールの静脈内投与は、尿道内圧および膀胱直接圧迫による漏出時膀胱閾値圧を上昇させ、電気刺激時の漏れ量を減少させた。これらの結果はすべて、トラマドールによって尿禁制機能が増強されたことを示すものである。トラマドールによる漏出時膀胱閾値圧の上昇作用および漏れ量の減少作用はナロキソンの前投与で完全に消失した。また、モルヒネの静脈内投与によっても同様に漏れ閾値圧の上昇および漏れ量の減少が認められ、これらの作用はオピオイド受容体拮抗薬のナロキソンによって完全に拮抗された。これらの結果から、トラマドールは μ -オピオイド受容体を介して、尿禁制機能を増強させる作用を有することが示唆された。

以上、本研究では、トラマドールは少なくとも一部は μ -オピオイド受容体を介してシクロホスファミド誘発膀胱炎の疼痛と頻尿を抑制し、尿道における尿禁制機能の増強作用を持つことが明らかとなった。トラマドールの、膀胱求心路の抑制という膀胱機能に対する作用と、尿禁制機能の増強という尿道機能に対する作用は、協調して蓄尿機能の維持、つまり尿失禁抑制

に寄与すると考えられる。このことは、トラマドールが、間質性膀胱炎などの難治性膀胱炎に伴う症状や腹圧性尿失禁など、現在有効な薬物療法のない下部尿路機能障害に対する治療法の一つとして有用であることを示唆するものである。

略語集

本論文において次の略語を使用した。

5-HT	: serotonin (5-hydroxytryptamine)
CP	: cyclophosphamide
ICI	: intercontraction interval
ICR	: the Institute for Cancer Research
LPP	: leak point pressure
LV	: leak volume
NA	: noradrenaline
SD	: Sprague-Dawley
SUI	: stress urinary incontinence

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) 新規腹圧性尿失禁評価方法としての電気刺激誘発ラット尿漏れ量測定.
日本排尿機能学会誌, **19**, 214-219 (2008).
河合裕子、尾山達哉、梅原真人、田中充士

- 2) Effect of tramadol on pain-related behaviors and bladder overactivity in rodent cystitis models.
Eur. J. Pharmacol., **676**, 75-80 (2012).
Tatsuya Oyama, Takashi Homan, Junko Kyotani, Michiko Oka

- 3) Tramadol enhances urethral continence function through μ -opioid receptors in rats.
Neurourol. Urodyn., doi: 10.1002/nau.22274 (2012).
Tatsuya Oyama, Yuko Kawai, Michiko Oka

目次

序論	1
第1章 トラマドール塩酸塩のシクロホスファミド誘発膀胱炎モデルにおける膀胱痛、排尿反射亢進に対する作用	7
1.1. 諸言	8
1.2. 実験材料および方法	9
1.3. 結果	11
1.3.1. マウス CP 誘発膀胱炎における疼痛関連行動、排尿回数、膀胱重量の測定	11
1.3.2. ラット CP 誘発膀胱炎におけるシストメトリー試験	16
1.4. 考察	20
第2章 新規腹圧性尿失禁評価方法としての電気刺激誘発ラット漏れ量測定	23
2.1. 諸言	24
2.2. 実験材料および方法	25
2.3. 結果	27
2.3.1. 電気刺激誘発漏れ量測定方法の確立	27
2.3.2. 塩酸デュロキセチンおよび WAY-161503 の漏れ量に対する作用	29
2.4. 考察	31
第3章 トラマドール塩酸塩のラット尿禁制機能に対する作用	33
3.1. 諸言	34
3.2. 実験材料および方法	35
3.3. 結果	38
3.3.1. ラット尿道内圧に対する作用	38
3.3.2. ラット漏出時膀胱閾値圧に対する作用	40
3.3.3. ラット漏れ量に対する作用	42
3.4. 考察	44
総括	47
実験の部	51
引用文献	55
謝辞	63

序 論

トラマドール塩酸塩（トラマドール）は、ドイツのグリュエントール社がモルヒネよりも依存性の弱い鎮痛薬の開発を目指して創製したアミノ基を有するフェノールエーテル類の化合物である（Fig. 1）。トラマドールはこれまで世界 100 カ国以上で使用されており、注射剤や経口剤等の種々の剤型が開発されている¹⁾。国内においては、筋注剤（販売名：トラマール® 注 100）に加え、「軽度から中等度の疼痛を伴う各種癌における鎮痛」を効能・効果とする非麻薬のオピオイド鎮痛薬（販売名：トラマール® カプセル 25mg・50 mg）として 2010 年 7 月に承認され、同年 9 月より日本新薬株式会社が販売を開始している²⁾。

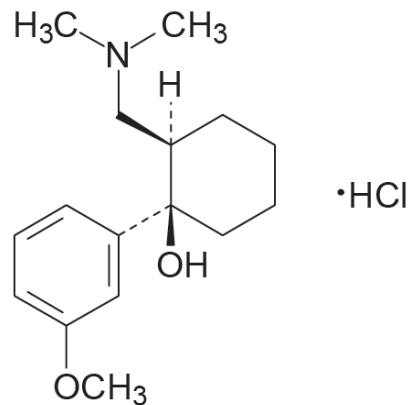


Fig. 1. Chemical structure of tramadol hydrochloride

トラマドールはオピオイド受容体結合能を抑制し、ラット μ 、 κ および δ -オピオイド受容体に対する K_i 値はそれぞれ 6.7 ± 0.3 、 81 ± 2 および $100 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ である（Table 1）。ヒトオピオイド受容体発現細胞の膜標品を用いた検討では、トラマドールは μ および κ -オピオイド受容体に対してそれぞれ 17 および $49.7 \mu\text{mol/L}$ の K_i 値を示すが、 δ -オピオイド受容体にはほとんど作用しない³⁾。このように、トラマドールは μ -オピオイド受容体に対して高い選択性を示し、この特徴はモルヒネと同様である。その他、多くの受容体に対して結合性を示さないことが報告されている⁴⁻⁶⁾。ただし、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能発現実験においてムスカリン性およびニコチン性アセチルコリン受容体を介した反応を、 μ -オピオイド受容体結合に対する K_i 値に近い濃度でトラマドールが抑制し、これが薬理作用の一部に関与する可能性が示唆されている⁶⁾。

Table 1. Inhibition of opioid binding by tramadol or morphine

Compound	Ki ($\mu\text{mol/L}$)					
	rat			human		
	μ	κ	δ	μ	κ	δ
Tramadol	6.7±0.3	81±2	100±10	17	49.7	-
Morphine	0.0058±0.001	0.17±0.02	0.08±0.001	0.0071	0.0147	0.15

(Data from Ref.3)

また、ラット脳のスナプトソーム標品を用い、 $[^3\text{H}]$ ノルアドレナリン (NA) および $[^3\text{H}]$ セロトニン (5-HT) の取り込み反応に対するトラマドールの影響が検討されている⁴⁾。トラマドールは $[^3\text{H}]$ NA および 5-HT の取り込み能を抑制し、その Ki 値はそれぞれ 1.8 ± 0.6 および $1.9\pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ であった (Table 2)。

薬物動態試験成績から、トラマドールを 50 mg 摂取したときのヒトにおける脳内濃度は約 $5.8\pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ と推定されており⁷⁾、Ki 値が 1 桁 $\mu\text{mol/L}$ である μ -オピオイド受容体、NA および 5-HT の再取り込み系がトラマドールの作用点と考えられている。

Table 2. Inhibition of monoamine uptake by tramadol or selected reference compounds

Compound	Ki ($\mu\text{mol/L}$)	
	NA	5-HT
Tramadol	1.8±0.6	1.9±0.2
Morphine	>100	>100
Nisoxetine	0.0017±0.0002	0.37±0.05
Fluoxetine	0.53±0.18	0.026±0.002

(Data from Ref.4)

トラマドールの侵害刺激に対する鎮痛作用は、アセチルコリン誘発ライシング法、空気誘発ライシング法、ホットプレート法およびテールフリック法を用いて検討されている⁵⁾。トラマドールを経口、皮下または腹腔内投与することにより、いずれの侵害刺激に対しても投与用量を増加することでモルヒネと同様に各試験系の最大の抗侵害作用を示す。トラマドールとモルヒネのED₅₀値から、両者の効力は同程度かあるいは5~10倍程度モルヒネの方が強いとされている (Table 3)。アセチルコリン誘発ライシング法およびホットプレート法におけるモルヒネの抗侵害作用はナロキソンで完全に抑制されるが、トラマドールの抗侵害作用は約50~70%しか抑制されない。そのため、これらの侵害刺激法では、トラマドールはオピオイド受容体を介した作用に加え、オピオイド受容体を介さない機序に基づいて抗侵害作用を生じた可能性が考えられている⁵⁾。さらに、 α_2 -アドレナリン受容体拮抗薬であるヨヒンビンおよび5-HT₂受容体拮抗薬であるリタンセリンは、テールフリック法において、くも膜下投与したモルヒネによる抗侵害作用を抑制しなかったが、同様の方法で生じたトラマドールの抗侵害作用を抑制した⁵⁾。また、 μ -オピオイド受容体欠損マウスにおいてもトラマドールの鎮痛作用が残存し、その鎮痛作用の一部はヨヒンビンで拮抗された⁸⁾ことから、トラマドールは、 μ -オピオイド受容体に対する作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を合わせ持つことによってその鎮痛効果を発揮するものと考えられる。

Table 3 Tramadol-induced antinociception in rodent

All values are expressed as the ED₅₀ (95% confidence intervals) at time of peak effect (15 or 30 min). Morphine is included for comparison. p.o.: per oral, i.p.: interperitoneal injection.

Test	Route	ED ₅₀ (mg/kg)	
		Tramadol	Morphine
Mouse acetylcholine-induced abdominal constriction test	p.o.	5.4(4.1-7.1)	2.9(2.0-4.2)
Rat air-induced abdominal constriction test	p.o.	1.7(0.7-3.2)	1.6(0.8-4.0)
Mouse hot-plate test (48°C)	i.p.	21.4(18.4-25.3)	3.2(1.8-4.7)
Mouse tail-flick test	i.p.	22.8(19.2-30.1)	2.3(1.7-3.1)

(Data from Ref.5)

下部尿路機能は尿をためる蓄尿機能と尿を排出する排尿機能に分類されるが⁹⁾、それぞれの機能が障害をうけた場合の疾患、原因、症状、治療ターゲット、機序、代表的薬剤およびその問題点を Table 4 に示した。この内、尿失禁などにより QOL が低下して大きな問題となるのは蓄尿機能の障害である。蓄尿機能の障害の原因は多岐にわたるが、その治療ターゲットは膀胱、知覚神経（膀胱求心路神経）および尿道（骨盤底筋を含む）に大別される。トラマドールの下部尿路機能、特に膀胱の蓄尿機能に関しては、ラットを用いた検討で、アポモルヒネ皮下投与¹⁰⁾ および脳梗塞¹¹⁾ によって誘発した頻尿を抑制することが報告されている。また、Pandita らは、無麻酔無拘束下のラットで、トラマドールがモルヒネと同様に排尿反射を抑制し、その作用の一部にはオピオイド受容体が関与することを報告している¹²⁾。臨床研究としては、Singh らの報告がある¹³⁾。15名の患者に疼痛治療としてトラマドールを 100 mg 脊髄硬膜内投与したところ、尿禁制時膀胱内圧に影響を与えず、膀胱容量の増大とコンプライアンスの増加を認め、膀胱充満時の感覚の遅れが認められた。これらの報告から、トラマドールは排尿反射に対して抑制的に働くと考えられ、そのターゲット部位は知覚神経であると推測される。しかし、これまで、膀胱炎による疼痛・頻尿に対する作用はほとんど検討されていなかった。そこで、本博士論文の第 1 章では、マウスおよびラットのシクロホスファミド誘発膀胱炎モデルを用い、トラマドールの膀胱炎誘発疼痛・頻尿に対する作用を明らかにする。

Table 4 Lower urinary tract dysfunction and drug treatment

Disorder	Disease	Etiology	Symptom	Target organ	Mechanism	Drug	Problem
Storage	Over active bladder	Cerebral vascular disease, Parkinson's disease, Spinal cord injury, Bladder outlet obstruction, Idipathic	Urinary frequency/ incontinence	Bladder	Inhibition of contraction	Anti-cholinergic	Side effect (Dry mouse)
					Relax	β agonist	Weak action
				Sensory nerve	Inhibition	None	
	Stress urinary incontinence	Childbirth, aging, Obesity, Pelvic surgery etc.	Urinary incontinence	Urethra	Contraction	SNRI ※	Nausea, Vomiting
Hypersensitive bladder	Cystitis (bacterial, interstitial) Idiopathic etc.	Urinary frequency, Bladder pain	Sensory nerve	Inhibition	None		
Void	Detrusor under activity	Spinal cord injury, Diabetes, Pelvic surgery	Voiding difficulty, Slow urine flow	Bladder	Contraction	Cholinesterase inhibitor	Side effect (Cholinergic crisis)
	Benign prostatic hypertrophy	Aging		Urethra	Inhibition of contraction	α blocker	Weak action

※SNRI: serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor (only approved in Europe)

また、尿道機能に関する尿禁制機能に対するトラマドールの作用もこれまで検討されていない。通常、おなかに強い力（腹圧）がかかった場合、骨盤底筋が膀胱と尿道を支えることで、尿道が締まる、いわゆる「尿禁制機能」が働き、尿が漏れるのを防いでいる¹⁴⁾。腹圧性尿失禁（stress urinary incontinence; SUI）は、この骨盤底筋が出産や加齢、肥満などで弱くなったり傷んだりすることによって、尿道をうまく締められなくなり腹圧がかかる刺激によって尿漏れを起こす疾患で（Table 4）、女性では尿失禁の中で最もよく認められる¹⁵⁾。尿禁制機能を評価する方法としては、雌性ラットを用いて尿道内圧を測定する方法やくしゃみや電気刺激による漏出時膀胱閾値圧を測定する方法が一般的であるが¹⁶⁾。これに加え、私は、咳やくしゃみなど SUI の多くを占める一過性の刺激による反応を経時的に捉えることを目的として、ラットを用いて新規評価系を構築した。この方法は、一過性の刺激による反応においても簡便な薬物評価を可能とし、臨床で重要な意味をもつ「漏れ量」を反映するものである。これについては第 2 章で述べる。

第 3 章では、トラマドールの尿禁制機能に対する作用を明らかにすることを目的として、新規に確立したモデルを含む、ラットを用いた 3 つの評価方法（尿道内圧、漏出時膀胱閾値圧、漏れ量）での検討を実施した。また、オピオイド受容体の役割を検討するため、 μ -オピオイド受容体作動薬のモルヒネ、およびオピオイド拮抗薬のナロキソンの前投与の漏出時膀胱閾値圧および漏れ量に対する作用を検討した。

第1章

トラマドール塩酸塩のシクロホスファミド誘発膀胱炎モデルにおける 膀胱痛、排尿反射亢進に対する作用

トラマドール塩酸塩（トラマドール）は、 μ -オピオイド受容体への結合作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を合わせ持つ、広く使用されている鎮痛薬である。Tail-flick テスト、ホルマリンテスト、坐骨神経結紮アロディニアモデルなどにおいて、トラマドールが鎮痛作用を有することが報告されている。しかし、これまで、膀胱炎による疼痛や頻尿に対する作用は検討されていなかった。そこで本章では、シクロホスファミドによって誘発した膀胱炎における疼痛及び頻尿に対するトラマドールの抑制作用を、マウス及びラットを用いて検討した。シクロホスファミド（100–400 mg/kg）をマウスに腹腔内投与すると、用量依存的に疼痛関連行動、排尿回数及び膀胱湿重量の増加が認められた。シクロホスファミド 300 mg/kg 腹腔内投与による疼痛関連行動を、トラマドールの経口投与は 1 mg/kg から有意に抑制した。トラマドールは、排尿回数及び膀胱重量の増加に対しては影響を及ぼさなかった。シクロホスファミド 150 mg/kg を腹腔内投与したラットでは、麻酔下膀胱内圧測定において排尿間隔が短縮しており、排尿反射の亢進が認められた。トラマドール（3 mg/kg）の静脈内投与は、シクロホスファミドによって短縮した排尿間隔を延長し、この延長作用はオピオイド拮抗薬のナロキソンの前投与で減弱した。以上の結果から、トラマドールは、シクロホスファミドによって誘発された膀胱炎に伴う疼痛及び頻尿を抑制する作用を有し、その作用の一部は μ -オピオイド受容体を介することが示唆された。

1.1. 諸言

トラマドールは、 μ -オピオイド受容体に対するアゴニスト作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を合わせ持つ鎮痛薬である^{3,4)}。それぞれの活性は弱いものの、 μ -オピオイド受容体を介する作用とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害作用が相乗的に働き、鎮痛効果を発揮すると言われている¹⁾。

トラマドールは、ヒトの癌性疼痛^{17,18)}、神経因性疼痛¹⁹⁻²¹⁾に有効であることが報告されており、動物においても tail-flick テストや hot-plate テスト⁵⁾、ホルマリンテスト²²⁾、坐骨神経結紮アロディニアモデル²³⁾ などにおいて鎮痛作用を有することが報告されている。また、排尿反射機能に対する作用として、アポモルヒネ¹⁰⁾ や脳梗塞¹¹⁾ による頻尿に対する抑制作用が報告されている。しかし、これまで、膀胱炎に対する疼痛、頻尿に対するトラマドールの作用を検討した報告は無い。

抗癌剤のシクロホスファミド (cyclophosphamide; CP) は、経口投与でヒトに深刻な膀胱炎と膀胱痛を誘発する²⁴⁾。その原因として、CP の代謝物のアクロレインが膀胱に蓄積し、CP 特有の膀胱への毒性を示すと考えられている^{25,26)}。げっ歯類へ CP を腹腔内投与すると、ヒト同様、亜急性的な膀胱痛が誘発され、CP による炎症とともに痛み関連行動や頻尿が誘発される²⁷⁻³⁰⁾。このような性質から、CP 誘発膀胱炎は、げっ歯類において、膀胱痛や頻尿を評価する上で有用なモデルとして汎用されている³⁰⁻³³⁾。

本章での研究目的は、トラマドールの膀胱炎に伴う症状に対する効果を明らかにし、難治性膀胱炎治療薬としての可能性を検討するものである。この目的のため、ラット及びマウスを用いて、トラマドールの CP 誘発膀胱痛及び膀胱炎誘発頻尿に対する作用を検討した。

尚、本章の内容は既に論文発表している (引用文献 68)。

1.2. 実験材料および方法

1.2.1 動物

実験には 4-5 週齢 ICR 系雄性マウス及び 8-12 週齢 SD 系雌性ラットを用いた。

1.2.2 マウス CP 誘発膀胱炎における疼痛関連行動、排尿回数、膀胱重量の測定

生理食塩液または CP (100, 200, 300, 400 mg/kg) を腹腔内投与した 3 時間後、濾紙を敷いたプラスチック製の観察ケージに動物を置き、1 時間馴化させた。馴化後、新しい濾紙に交換し、15 分間の疼痛行動観察およびビデオでの撮影を実施した。被験物質は観察直前に静脈内投与 (10 mL/kg) した。疼痛行動の観察では、5 項目の疼痛関連行動 (目の開き、うずくまり、腹這い歩行、排尿時行動、腹舐め行動) を事前検討の結果と過去の報告^{28, 30-32, 34-36}) を基に決定し、以下の基準でそれぞれ 10 点満点 (合計 50 点) としてスコア化した (Fig. 1-1)。

- 目の開き (正常 0 点、時々閉じるまたは半目になる 5 点、完全に閉じる 10 点)
- うずくまり (正常 0 点、時々うずくまる 5 点、ほとんどうずくまっている 10 点)
- 腹這い歩行 (正常 0 点、腹這い歩行 10 点)
- 排尿時行動 (正常 0 点、排尿時に尻を震わせる 10 点)
- 腹舐め行動 (0-3 回 0 点、4-10 回 5 点、11 回以上 10 点)

観察終了後ビデオを再生し、Sugino らの報告³⁷⁾と同様に、排尿動態の指標として濾紙上への排尿回数を測定した。試験終了後、頸椎脱臼にて安楽死させた後に膀胱を摘出し、膀胱湿重量を電子天秤にて計測した。

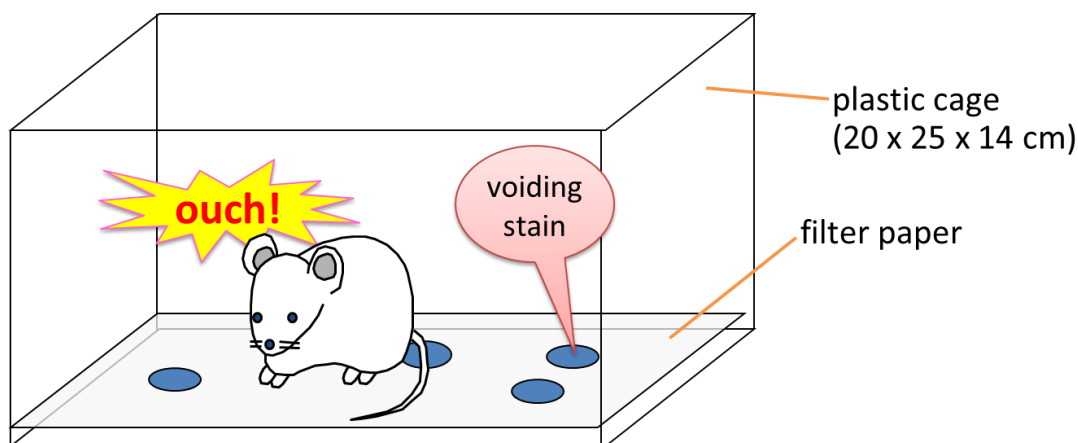


Fig. 1-1 Observation of pain-related behaviors and number of voids in mice with cyclophosphamide (CP)-induced cystitis

1.2.3 ラット CP 誘発膀胱炎における膀胱内圧測定（シストメトリー）試験

生理食塩液または CP 150 mg/kg は、膀胱内圧測定前日（約 18 時間前）に腹腔内投与した。ウレタン（0.9 g/kg, s.c.）麻酔下、動物を背位に固定し腹部を切開し、両側の尿管を膀胱側で縛り腎臓側を切断した後、膀胱頂部にインフュージョンポンプと圧トランスデューサーに接続された注射針付きのカニューレを挿入した。生理食塩液を早送りして結紮した部分から漏れずに排尿することを確認し、一旦、膀胱内の生理食塩液を排出した。3 mL/h または 6 mL/h の一定の流速で生理食塩液を膀胱に連続的に灌流し、膀胱内圧を歪圧力アンプで増幅してレクチコーダーに記録した。約 1 時間後、排尿間隔が安定していることを確認した後、被験物質を投与する場合には大腿部静脈より静脈内投与した。被験物質投与前、及び被験物質投与後、15 分毎に 120 分まで、それぞれ連続する 3 回の排尿反射を選択し、排尿間隔と排尿時の最大膀胱収縮圧をチャート上で計測し、その平均をそれぞれの時点における排尿間隔（intercontraction interval; ICI）、排尿時最大膀胱収縮圧（amplitude）とした（Fig. 1-2）。被験物質を投与した場合には、被験物質投与前を 0% とした被験物質投与後の変化率の平均値±標準誤差を求めた。

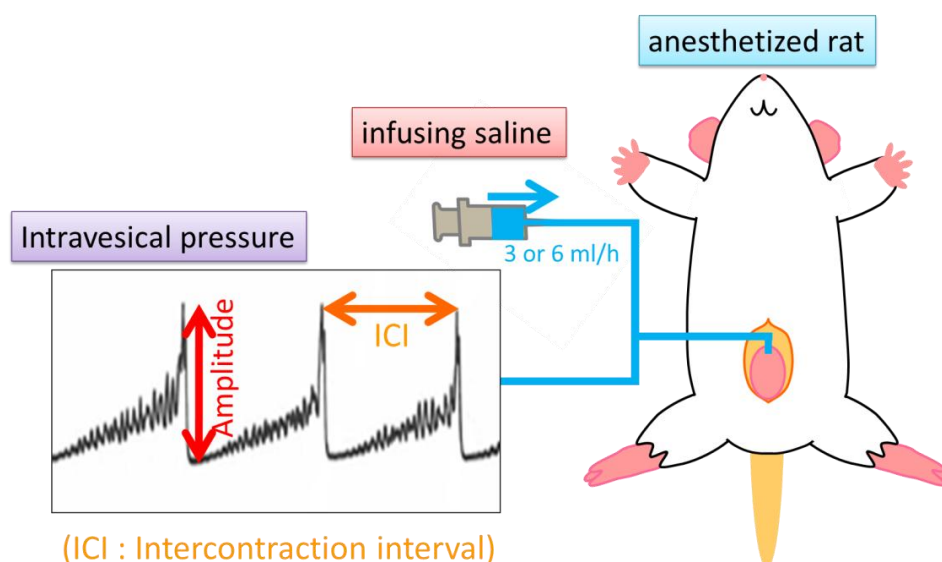


Fig. 1-2 Cystometry in rats with cyclophosphamide-induced cystitis

1.2.4 統計解析

データの解析は SAS プログラムを用いて行った。すべてのデータは平均値±標準誤差として表した。疼痛スコアの 2 群間比較には Wilcoxon rank-sum test、多重比較には Shirley-Williams test を用いた。また、排尿回数、膀胱重量及びシストメトリー試験の 2 群間比較には Student's t-test を、多重比較には Williams test を用いた。いずれの検定においても、危険率 5 %未満を有意差ありと判定した。

1.3. 結果

1.3.1. マウス CP 誘発膀胱炎における疼痛関連行動、排尿回数、膀胱重量の測定

生理食塩液の投与では、すべての疼痛関連行動が認められなかった (Fig. 1-3-A)。CP の腹腔内投与によって疼痛関連行動が発現し、目の開き、うずくまり、腹這い歩行、排尿時行動は 200 mg/kg 以上で、腹舐め行動は 400 mg/kg 投与で生理食塩液投与群との比較において有意に増加していた (Fig. 1-3-A)。特に、排尿時行動の発現が顕著に認められ、CP 200 mg/kg 以上では全例において排尿時に尻を振る特徴的な行動が認められた。疼痛関連のトータルスコアでは、100 mg/kg 以上で生理食塩液投与群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-3-B)。CP 投与により排尿回数の増加も認められ、200 mg/kg 以上で生理食塩液投与群と比較して有意な増加が認められた (Fig. 1-4-A)。膀胱湿重量は、CP 200 mg/kg 以上で生理食塩液投与群と比較して有意に増加した (Fig. 1-4-B)。

CP 300 mg/kg 腹腔内投与によって増加した疼痛関連行動、排尿回数、膀胱湿重量に対する、トラマドール (1, 3, 10 mg/kg) 経口投与の作用を検討した。疼痛関連行動の項目別では、腹這い歩行、排尿時行動及び腹舐め行動で用量に依存した抑制作用が認められ (Fig. 1-5-A)、疼痛関連行動トータルスコアにおいては、1 mg/kg 以上において、有意な抑制作用が認められた (Fig. 1-5-B)。CP 投与によって増加した排尿回数及び膀胱湿重量は、トラマドールによってほとんど影響を受けなかった (Fig. 1-6)。

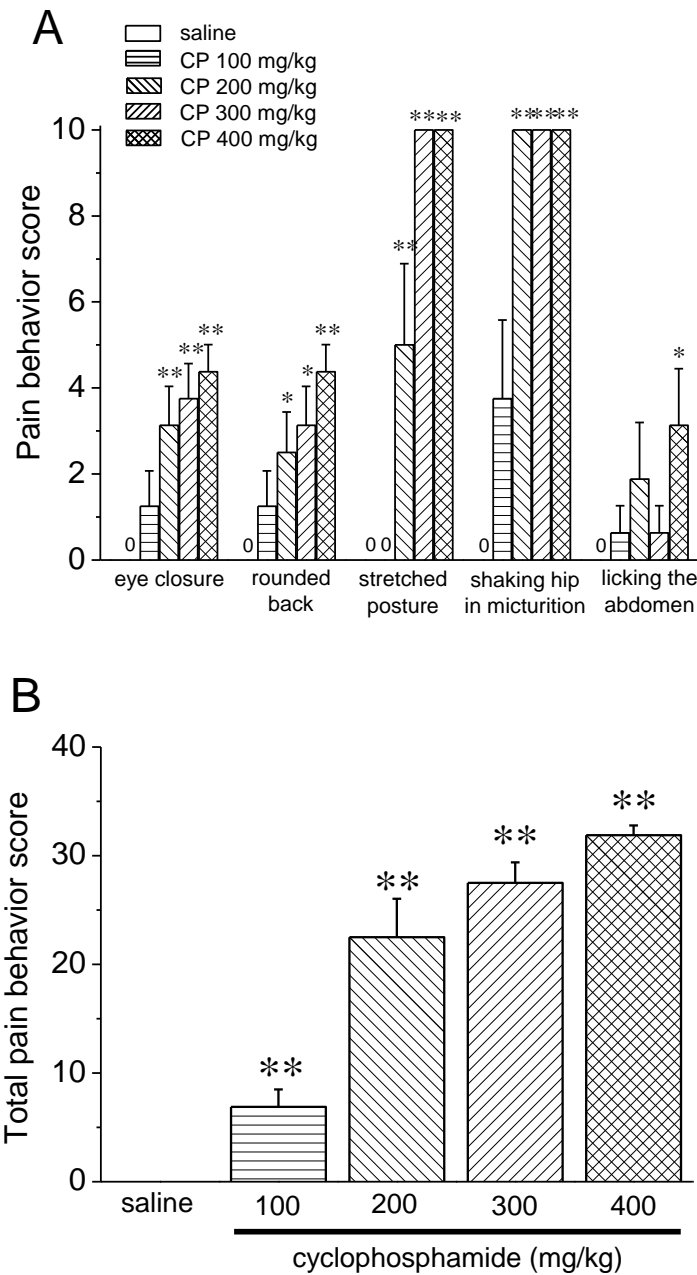


Fig. 1-3 Effect of cyclophosphamide on pain-related behaviors in mice.

Saline or cyclophosphamide (CP) was given i.p. and 4 h later, five pain-related behaviors were scored for 15 min. A) Each pain behavior score (maximum score 10 for each). B) Total pain behavior score (maximum score 50). Values are means for groups of eight mice. All pain behavior scores of all mice were 0 in each saline group: (Fig. 1A and B), and the score of stretched posture of all mice was 0 in CP 100 mg/kg (Fig. 1A). These were expressed as “0”. Error bars show the S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus the corresponding values in the vehicle-treated group (Shirley–Williams test).

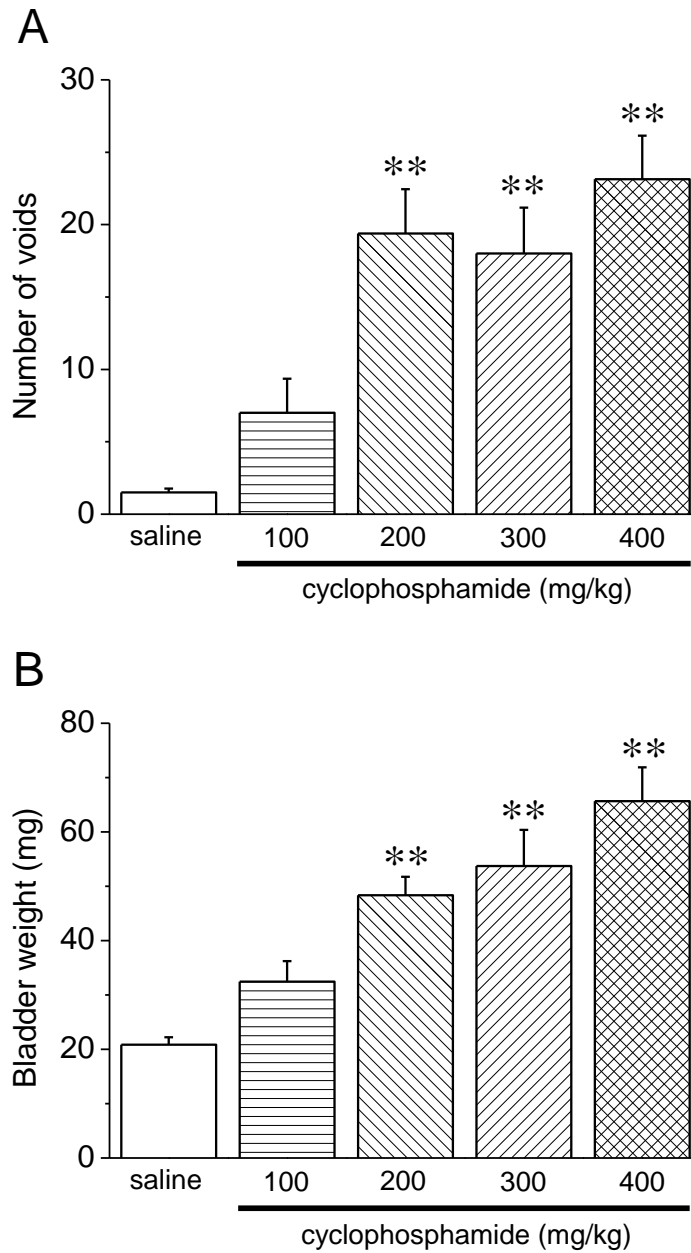


Fig. 1-4 Effects of cyclophosphamide on number of voids, and bladder weight in mice.

Four hours after administration of saline or cyclophosphamide, the number of voids (A) was counted for 15 min. After scoring and counting, the bladders were removed and weighed (B). Values are means for groups of eight mice. Error bars show the S.E.M. **P<0.01 versus the corresponding values in the vehicle-treated group (A, Shirley-Williams test; B, C, Williams test).

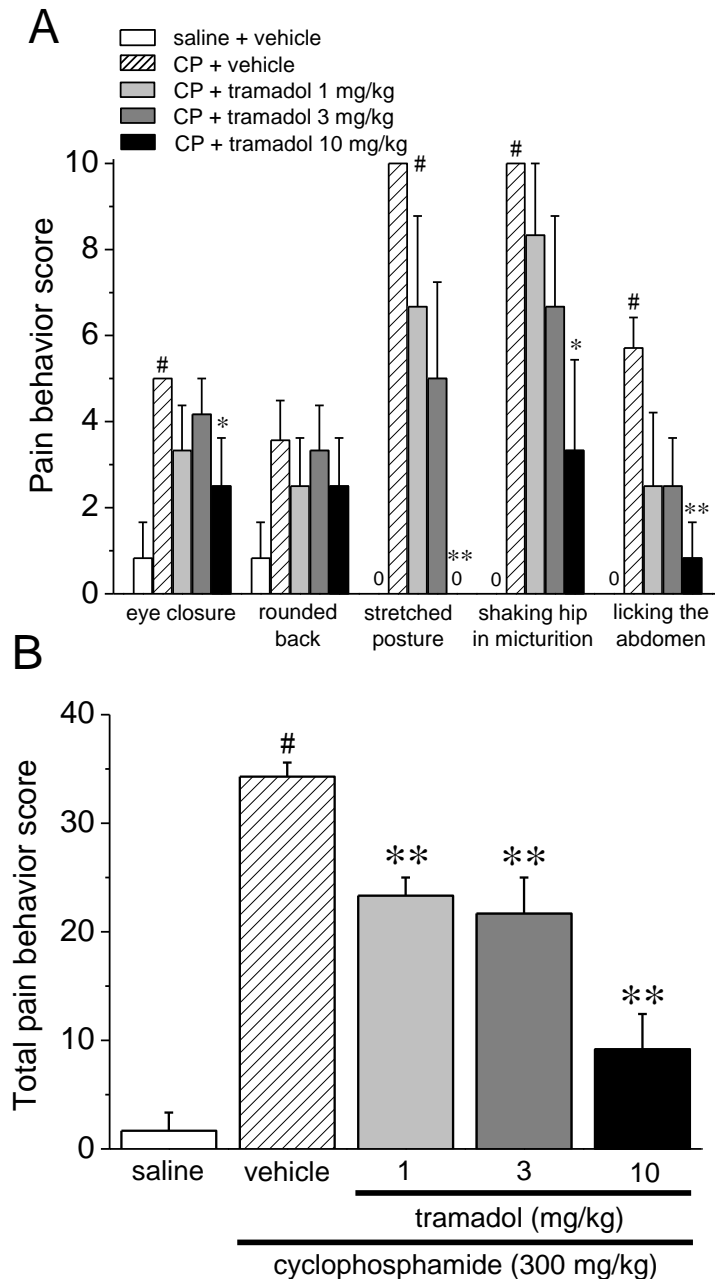


Fig. 1-5 Effect of tramadol on cyclophosphamide-induced pain-related behaviors in mice.

Tramadol or vehicle (saline) was given p.o. 3 h after cyclophosphamide (CP; 300 mg/kg, i.p.) and after another hour, five pain-related behaviors were scored for 15 min. A) Each pain behavior score (maximum score 10 for each). B) Total pain behavior score (maximum score 50). Values are means for groups of six (saline+vehicle group and CP+tramadol groups) or seven (CP+vehicle group) mice. In A, pain behavior scores of stretched posture, shaking hip in micturition and licking the abdomen of all mice were 0 in saline group, and the score of stretched posture was also 0 in CP +tramadol 10 mg/kg. These were expressed as “0”. Error bars show the S.E.M. [#]P<0.05 versus the corresponding values in the saline+vehicle group (Wilcoxon rank-sum test). ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 versus the corresponding values in the CP +vehicle group (Shirley–Williams test).

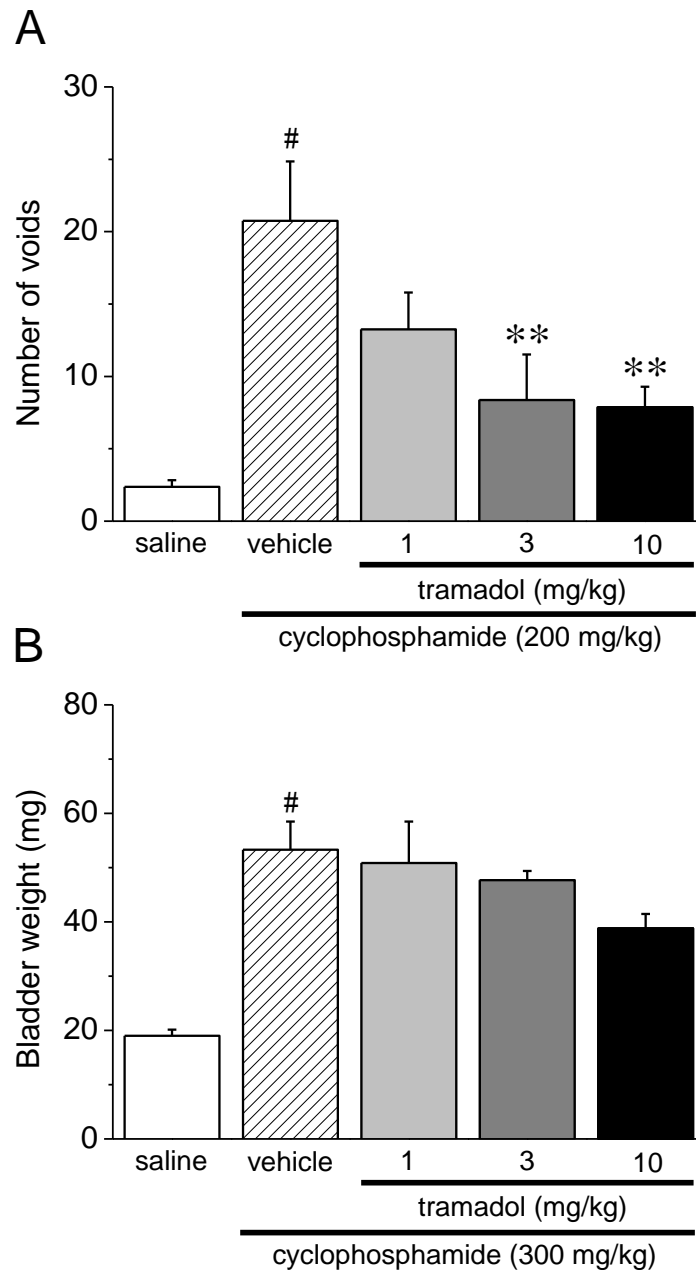


Fig. 1-6 Effects of tramadol on number of voids, and bladder weight in cyclophosphamide-treated mice.

Tramadol or vehicle (saline) was given p.o. 3 h after cyclophosphamide (200 or 300 mg/kg, i.p.) and after another hour, the number of voids (A) was counted for 15 min. After scoring and counting, the bladders were removed and weighed (B). Values are means for group of eight mice. Vertical lines show the S.E.M. [#]P<0.05 in comparison with the corresponding values in the saline group (A, Wilcoxon rank-sum test; B, C, Student's t-test). ^{**}P<0.01 in comparison with the corresponding values in the CP+vehicle group (Shirley-Williams test).

1.3.2 ラット CP 誘発膀胱炎におけるシストメトリー試験

CP 150 mg/kg の腹腔内投与処置により、顕著な排尿間隔 (ICI) の短縮が認められた (Fig. 1-7-A)。この時、排尿時最大膀胱収縮圧 (amplitude) に変化はなかった (Fig. 1-7-B)。

CP 処置したラットに対するトラマドール (0.3, 1, 3 mg/kg) 静脈内投与の作用を検討した。トラマドール 3 mg/kg により、投与後 30 分から ICI の延長が認められ、その作用は投与後 120 分においても溶媒投与群と比較して有意なものであった (Fig. 1-8-A)。トラマドール 0.3 mg/kg, 1 mg/kg においても ICI を延長する傾向が認められたが、その差はいずれの観察点においても有意なものではなかった。Amplitude は投与後時間とともに減少していく傾向が認められた (Fig. 1-8-B)。また、トラマドール 3 mg/kg の投与後 15 分で一過性の有意な amplitude 減少作用が認められた (Fig. 1-8-B)。

トラマドール 3 mg/kg による ICI 延長作用は、オピオイド拮抗薬ナロキソン 1 mg/kg の前投与によって部分的に抑制された (Fig. 1-9-A)。Amplitude は、ナロキソン処置群において、大きな変化は認められなかった (Fig. 1-9-B)。

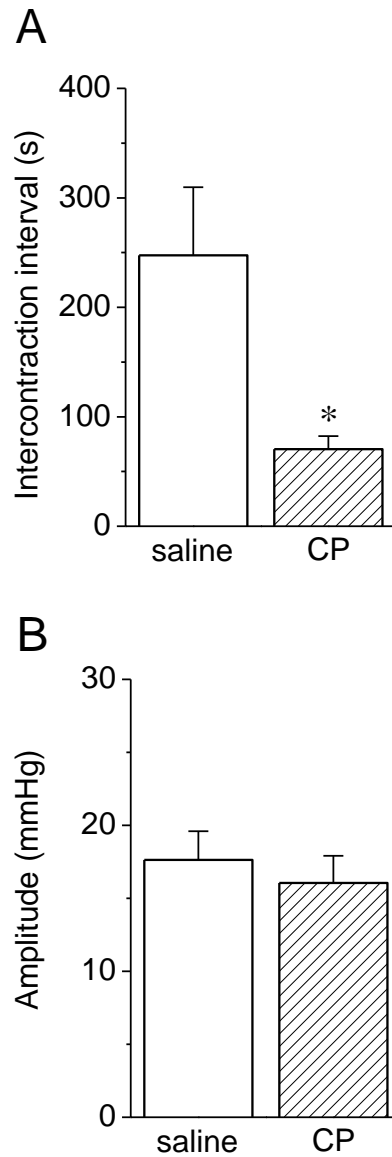


Fig. 1-7 Effect of cyclophosphamide on cystometrogram parameters in rats.

Cyclophosphamide (CP; 150 mg/kg) or saline was injected i.p. into rats about 18 h before cystometry. Rats were anesthetized with urethane, and continuous cystometry was performed (saline infusion rate 6 ml/h). Two cystometrogram parameters, intercontraction interval and amplitudes of bladder contractions were measured. Values are means for group of the seven (saline group) or eight (CP group) rats. Vertical lines show the S.E.M. * $P < 0.05$ in comparison with the corresponding values in the saline group (Shirley-Williams test).

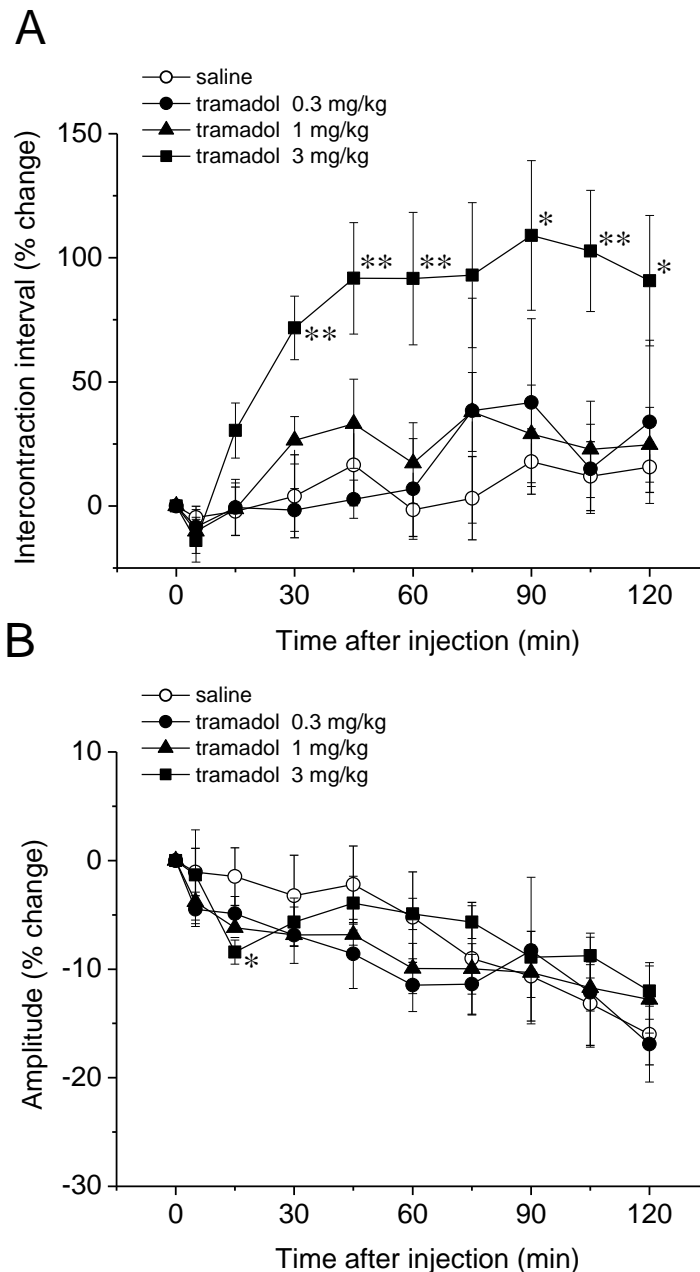


Fig. 1-8 Effect of tramadol on the cystometrogram parameters in cyclophosphamide-treated rats.

Cyclophosphamide (150 mg/kg) was injected i.p. into rats about 18 h before cystometry. Rats were anesthetized with urethane, and continuous cystometry was performed (saline infusion rate 3 ml/h). Values are means of the percent changes in intercontraction interval and amplitudes of bladder contractions from the value before the saline or tramadol administration for group of six. Vertical lines show the S.E.M. The intercontraction interval values before the drug administration were as follows: saline group, 186.63 ± 34.27 s; tramadol 0.3 mg/kg group, 186.63 ± 45.17 s; tramadol 1 mg/kg group, 221.29 ± 47.54 s; tramadol 3 mg/kg group, 171.78 ± 24.78 s. The amplitudes of bladder contraction values before the drug administration were as follows: saline group, 24.14 ± 2.28 mm Hg; tramadol 0.3 mg/kg group, 27.96 ± 0.87 mm Hg; tramadol 1 mg/kg group, 30.42 ± 3.14 mm Hg; tramadol 3 mg/kg group, 27.57 ± 2.21 mmHg. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ in comparison with corresponding values in saline group at each time point (Williams test).

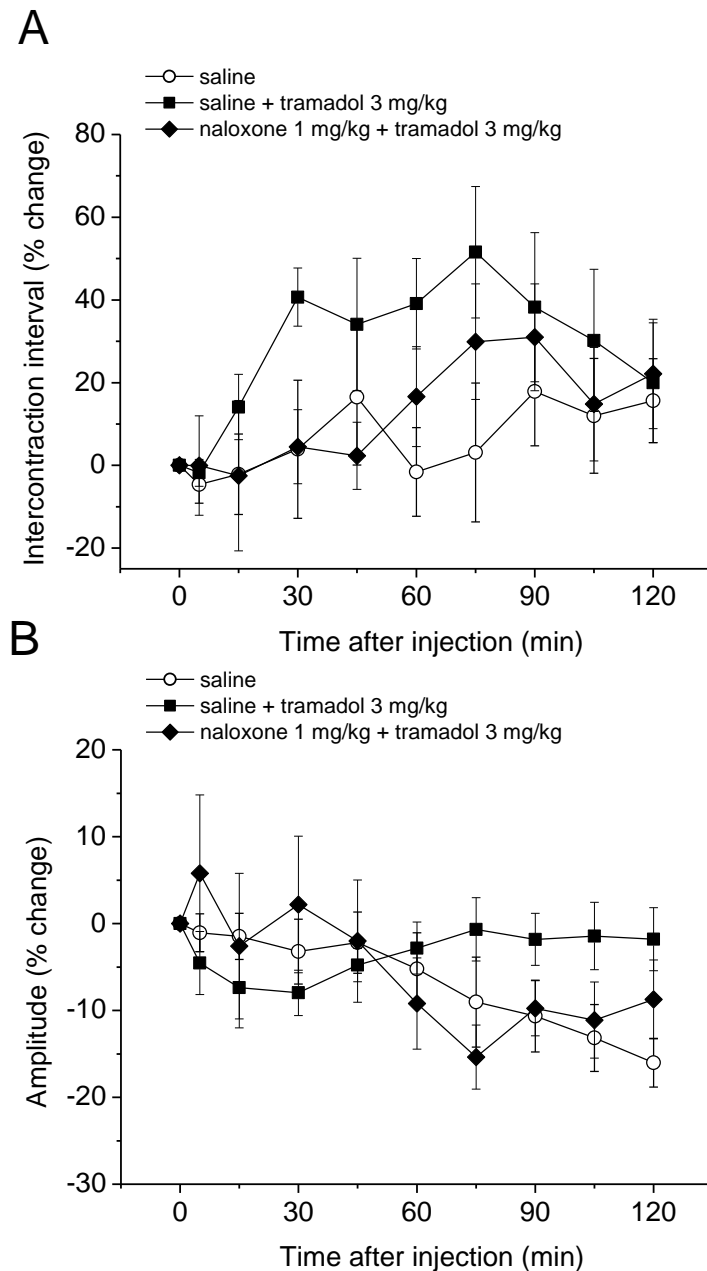


Fig. 1-9 Effect of tramadol with naloxone on cystometrogram parameters in cyclophosphamide-treated rats.

Cyclophosphamide (150 mg/kg) was injected i.p. into rats about 18 h before cystometry. Rats were anesthetized with urethane, and continuous cystometry was performed (saline infusion rate 3 ml/h). Saline or naloxone was subcutaneously injected 5 min before tramadol administration. Values are means of percent changes in intercontraction interval and amplitudes of bladder contractions from the value before saline or tramadol administration. Vertical lines show the S.E.M. The intercontraction interval values before the drug administration were as follows: saline group, 186.63±34.27 s; saline+tramadol 3 mg/kg group, 225.73±48.19 s; naloxone 1 mg/kg+tramadol 3 mg/kg group, 212.84±14.53 s. The amplitudes of bladder contraction values before the drug administration were as follows: saline group, 24.14±2.28 mm Hg; saline+tramadol 3 mg/kg group, 25.89±1.40 mm Hg; naloxone 1 mg/kg +tramadol 3 mg/kg group, 26.14±1.30 mm Hg. *P<0.05 in comparison with corresponding values in saline+tramadol 3 mg/kg group at each time point (Student's t-test).

1.4. 考察

マウスにシクロホスファミド (CP) を腹腔内投与すると、これまでの報告同様、疼痛関連行動^{28, 31)}、排尿回数の増加³⁷⁾、膀胱重量³⁸⁾の増加が認められた。今回の実験では、目の開き、うずくまり、腹這い歩行、排尿時行動、腹舐め行動の5つの行動で痛みを評価した。これらの内、目の開きはラット^{30, 32)}にCPを投与した時に、うずくまり、腹這い歩行などの異常姿勢はラット^{30, 32)}及びマウス^{28, 31)}にCPを投与すると観察されるとの報告があり、痛みの指標として既に用いられている。また、腹舐め行動は、マウスにCPを投与した時^{28, 31)}以外にも、ラットにキシレン³⁴⁾やTRPV1作動薬のレジニフェラトキシシン^{35, 36)}を膀胱内注入した時に認められる疼痛関連行動である。今回、CPを投与したマウスにおいて、通常のマウスでは認められない、排尿をするときに尻を振るわせるという独特の排尿時行動が認められた。この行動は、他の疼痛関連行動と比較してもより顕著にCPの用量の増加に伴って観察され、CP 200 mg/kgで全例にこの行動が認められた。これまでの膀胱炎における疼痛関連行動において排尿時行動を指標にした研究はこれまでに無く、今回が初めての報告である。間質性膀胱炎や膀胱痛症候群の大部分の患者は、尿充満時に痛みを感じ、排尿時もしくは排尿後には痛みが軽減するなど、排尿と膀胱の痛みが深く関係していると報告されている³⁹⁾。今回認められた排尿時行動がどのような感覚を表現しているのかは不明であるが、膀胱の痛み、もしくはその痛みからの軽減を反映しているのかもしれない。トラマドールの経口投与によって、用量依存的なCP誘発の疼痛関連行動の明確な抑制作用が認められた。この結果は、これまでに報告されている、酢酸で誘発されたマウス内臓痛に対するトラマドールの鎮痛作用⁴⁰⁾と一致するものであった。目の開きやうずくまりに対する作用は弱いものであったが、腹這い行動、排尿時行動、腹舐め行動は、トラマドールの用量の増加に伴って強く抑制された。

ラットを用いた検討で、アポモルヒネ皮下投与¹⁰⁾または脳梗塞¹¹⁾によって誘発した頻尿をトラマドールが抑制することが報告されている。また、Panditaらは、無麻酔無拘束下のラットで、トラマドールがモルヒネと同様に排尿反射を抑制することを示している¹²⁾。今回の麻酔下ラットを用いた検討においても、トラマドールはCPによって短縮した排尿間隔を延長させる作用を示した。このことは、これまでの報告同様、トラマドールがCP膀胱炎においても排尿反射を抑制する作用を有することを示すものである。今回、CP 300 mg/kgではマウスのCPの排尿回数の増加に対して、トラマドールは明確な抑制作用を示さなかった。この理由として、CPによる排尿回数の増加が強いものであったこと、疼痛の軽減によってマウスの運動量が増加したことなどが影響したことが考えられる。実際、CPを200 mg/kgにした場合には、トラマドールはCPによる排尿回数の増加を抑制していた。

トラマドールの鎮痛、排尿反射抑制の作用機序としては、 μ -オピオイド受容体に対する作用とノルアドレナリン・セロトニン (モノアミン) 再取り込み阻害作用が考えられる⁴⁾。 μ -オ

ピオイド受容体作動薬のモルヒネは CP 誘発疼痛に対する鎮痛作用^{31, 32)}と共に、排尿反射を抑制^{41, 42)}することが報告されており、また、モノアミン再取り込み阻害剤のデュロキセチンも CP 誘発疼痛³¹⁾ や神経因性疼痛⁴³⁾ に対する抑制作用、過活動膀胱に対する抑制作用⁴⁴⁾ が報告されている。今回、オピオイド拮抗薬のナロキソンが、トラマドールの排尿間隔延長作用を一部抑制したことから、トラマドールの μ -オピオイド受容体に対する作用が関与することが示唆された。しかしながら、ナロキソンでは完全に抑制されなかったことから、モノアミン再取り込み阻害作用もトラマドールの排尿反射抑制作用に関与している可能性がある。Panditaらは、無麻酔無拘束下ラットにおけるトラマドール 5 mg/kg 静脈内投与による排尿反射抑制作用は今回用いた量よりも少量のナロキソン 0.3 mg/kg の静脈内投与で完全に拮抗されたと報告しており¹²⁾、今回の私の結果と矛盾する。この違いは、今回の検討が、麻酔下の CP 誘発膀胱炎ラットで実施されたことと関係するのかもしれない。トラマドールの CP 誘発疼痛、排尿反射亢進に対する鎮痛、排尿反射抑制作用機序については、更なる検討が必要である。

第 1 章の結論として、トラマドールはマウスにおいて CP 誘発疼痛を、ラットにおいて CP 誘発排尿反射の亢進を抑制した。今回の CP 膀胱炎に対するトラマドールの作用は、膀胱炎に伴う症状に対する治療法の選択肢の一つとして、トラマドールが適用できることを示唆するものである。

第2章

新規腹圧性尿失禁評価方法としての電気刺激誘発ラット漏れ量測定

第1章においては、トラマドールが膀胱炎に伴う疼痛関連行動や排尿回数の増加（頻尿）を抑制することを示した。このことは、トラマドールが膀胱炎による膀胱機能障害、そしてそれに伴う膀胱知覚神経の亢進による頻尿や疼痛などの下部尿路疾患に有効であることを示唆するものである。次に、同じく下部尿路疾患である、尿道平滑筋や尿道を支配する神経の障害、骨盤底筋群の障害によって起こる腹圧性尿失禁（SUI）に対するトラマドールの作用を検討した。SUIは、くしゃみや咳などの腹圧が上昇する動作によって不随意に尿が漏れる疾患で、これまで、動物でSUIを誘発する方法として実際にくしゃみを誘発する方法や腹筋を電気刺激する方法が使用され、薬効評価には尿漏れ時の膀胱閾値圧を測定する方法が用いられてきた。しかし、この方法では薬効を経時的に評価することは困難であった。第2章では、雌性ラットを用い、腹筋電気刺激による一過性の膀胱内圧上昇に伴う尿道口からの漏れ量（leak volume; LV）を測定することによって経時的に薬効を評価するLV法を確立したことを示す。

選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬塩酸デュロキセチン、および5-HT₂受容体作動薬WAY-161503の静脈内投与はLVを減少させ、LV法はSUI治療薬の効力を経時的かつ定量的に評価する方法として有用であると考えられた。

2.1 諸言

SUIは咳、くしゃみなどの腹圧が上昇する動作により同時に膀胱内圧も上昇し、膀胱内圧が最大尿道閉鎖圧を上まわることによって不随意に尿漏れがおこる疾患である⁴⁵⁾。SUIは女性に多く発症し、一般に全成人女性の約20–30%に認められるとされており⁴⁶⁾、その原因として出産による骨盤周囲筋および神経の損傷⁴⁷⁾、肥満⁴⁸⁾、女性ホルモンの低下⁴⁹⁾などがあると言われている。SUIの治療としては尿道スリング手術、骨盤底筋体操などが主に行われ、現在のところ、薬物治療は補助的な位置づけとなっている⁵⁰⁾。有効性の高いSUI治療薬が無い現状において、効果が高く安全なSUI治療薬は求められている薬剤の一つであり⁵¹⁾、SUI治療薬開発のための評価方法は重要な検討課題となっている。

動物実験においてSUIを誘発するために、腹筋を電気刺激あるいは実際にくしゃみを起こさせて一過性に膀胱内圧を上昇させる、または、腹壁あるいは膀胱を圧迫して緩やかに膀胱内圧を上昇させる方法が一般に用いられており、これらの刺激を尿が漏れるまで加えた時の膀胱内圧 (leak point pressure; LPP) が尿禁制の指標となっている^{52–54)}。SUIの動物モデルとしては、経膈的にバルーンを挿入して作成する偽経産モデルや、外尿道括約筋を支配している陰部神経を損傷するモデルなどが報告されており⁵⁵⁾、これらのSUI動物モデルにおいてLPPの減少が認められている^{56, 57)}。また、欧州でSUI治療剤として認可されている選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である塩酸デュロキセチンや、尿道平滑筋収縮作用を有する α 受容体作動薬はLPPを上昇させることが報告されており^{58, 59)}、LPPはSUI動物モデルの評価や治療薬の作用の検討に広く用いられている。しかしながら、電気刺激によって一過性に膀胱内圧を上昇させる場合、LPPを測定するためには電気刺激条件を変更しながら繰り返し刺激する必要があり、電気刺激によるLPP評価法では薬物の評価などにおいて、経時的な変化を捉えることは困難である。SUI治療薬の作用の経時的変化を評価する場合、腹壁や膀胱を圧迫して緩やかに膀胱内圧を上昇させる場合には刺激自体を自在に変化させることができるので、LPP測定により経時的な変化を捉えることが可能である。しかし、SUIは咳やくしゃみなど一過性の刺激によっても惹起されることから、SUIに有効な薬剤を評価する上で、一過性刺激における経時的変化を捉えることは重要である。

そこで本章では、一過性の刺激においても経時的にSUIに対する薬物の作用を評価する方法として、腹筋の電気刺激によって誘発されて漏れる量 (leak volume; LV) に着目し、塩酸デュロキセチンおよび5-HT₂受容体作動薬WAY-161503を用いて⁶⁰⁾、これらの薬物のLVに対する作用を検討した。

尚、本章の内容は既に論文発表している (引用文献 69)。

2.2 実験材料および方法

2.2.1 動物

8 - 12 週齢の雌性 Sprague-Dawley 系ラットを使用した。

2.2.2 漏れ量の測定 (Fig. 2-1)

ラットをウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、脊髄を T8 - T9 レベルで切断することにより排尿反射に関わる上位中枢からの神経路を遮断し、排尿反射を消失させた後、腹部横隔膜付近の筋肉（腹筋）に左右 2 箇所電気刺激電極を固定した。腹部を約 1 cm 正中切開し、尿管を結紮した後、近位 5 mm のところで尿管を切断した。さらに膀胱頂部からカニューレを挿入した後、切開部分から圧が漏れないように腹部を縫合した。カニューレから膀胱に約 1 mL の生理食塩液を注入し、この状態で一定量の生理食塩液が漏れる電気刺激条件を検討した。電気刺激によって漏れた生理食塩液は濾紙に染み込ませ、電子天秤で重量を測定し、比重を 1.0 として計算、すなわち 1 g の漏れた生理食塩液を 1 mL としてその量を LV とした。薬物による LV 変化を捉えやすくするため、LV が 10 - 20 μ L となるように個体ごとに電気刺激条件を固定し、LV が安定するまで数回計測を繰り返した後に被験物質を静脈内投与し、10 分毎に 60 分間（計 6 回）LV の測定を行った。また同時に、電気刺激時の膀胱内圧の測定も行った。膀胱内量は 1 試験毎に調節し、1 試験中は膀胱への生理食塩液の追加は行わなかった。

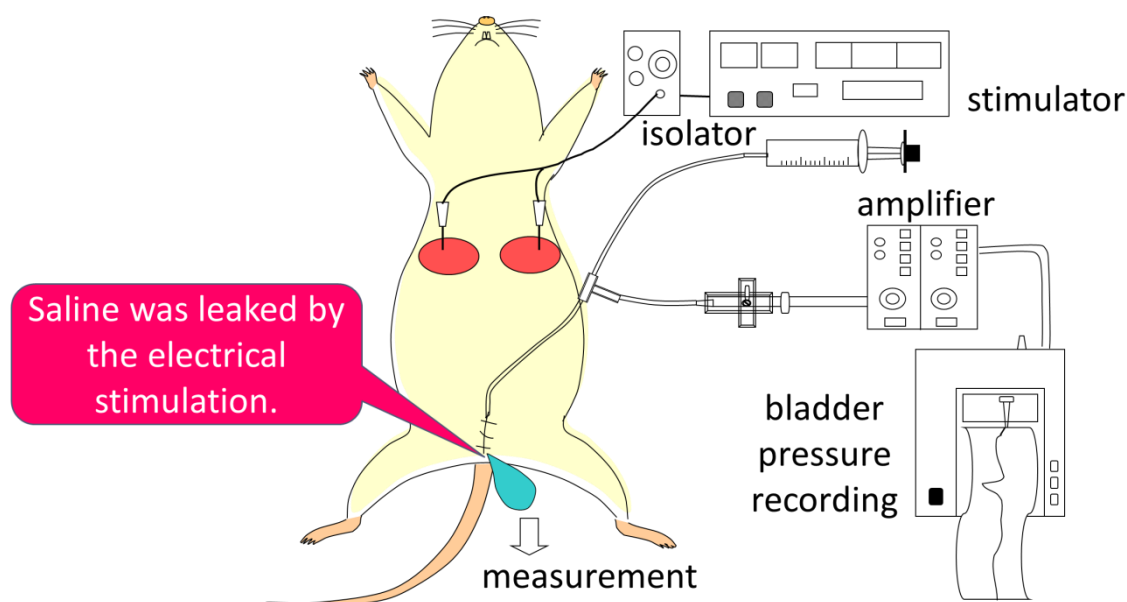


Fig. 2-1 Measurement of leak volume in rats.

2.2.3 統計解析

データの解析は SAS プログラム Ver. 8.2 を用いて行った。データは各個体における実測値もしくは LV 変化率の平均値±標準誤差として表した。各計測時点における媒体投与群と被験物質投与群の有意差検定を多重比較法 (Dunnett's test) により行い、危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

2.3 結果

2.3.1 電気刺激誘発漏れ量測定方法の確立

持続時間を 1 ミリ秒、インターバルを 5 ミリ秒に固定し、刺激パルス回数を 4 回に固定した条件で電圧を変化させると、刺激電圧の増加とともに膀胱内圧は上昇し、6 V 付近で膀胱内圧は 80–90 mmHg で安定した (Fig. 2-2A)。また、刺激電圧 3–5 V 付近から急激に LV も増加した (Fig. 2-2B)。次に電圧を 5 V に固定した条件において、刺激パルス回数を増加させると膀胱内圧の上昇及び LV の増加が認められ、膀胱内圧は刺激パルス 9 回付近で (Fig. 2-3A)、LV は刺激パルス 11 回で最大となった (Fig. 2-3B)。膀胱内圧と LV の関係を Fig. 2-4 に示した。一定の膀胱内圧までは LV はみられず、40–100 mmHg と個体差はあるものの、一定の膀胱内圧を超えると膀胱内圧の上昇に伴う LV の急激な増加がみられた。

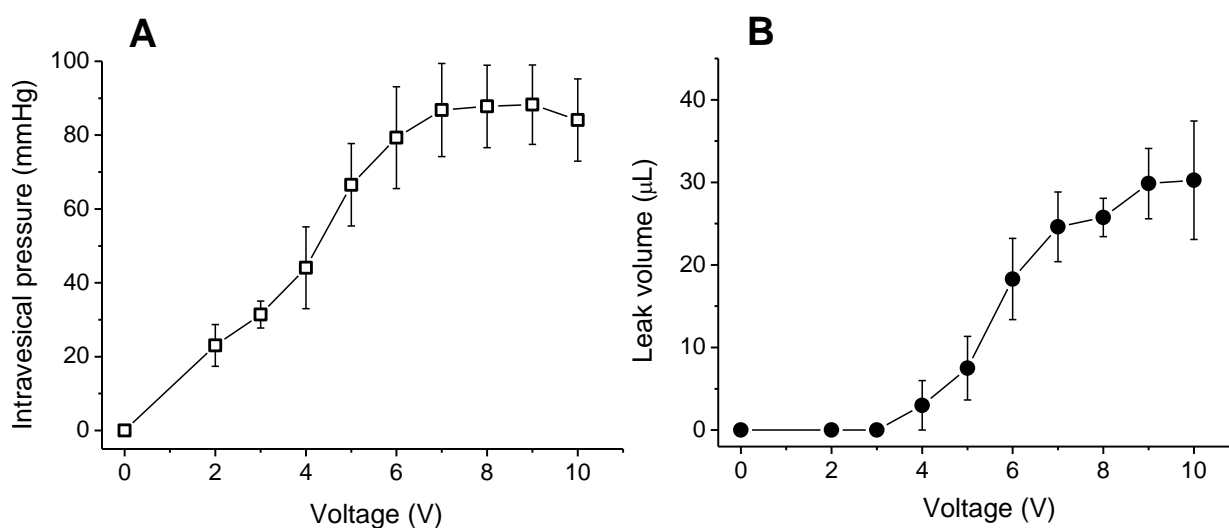


Fig. 2-2 Alternations in intravesical pressure (A) and leak volume (B) response to changes in voltage.

Train: 4, Mean±S.E.M., n=4.

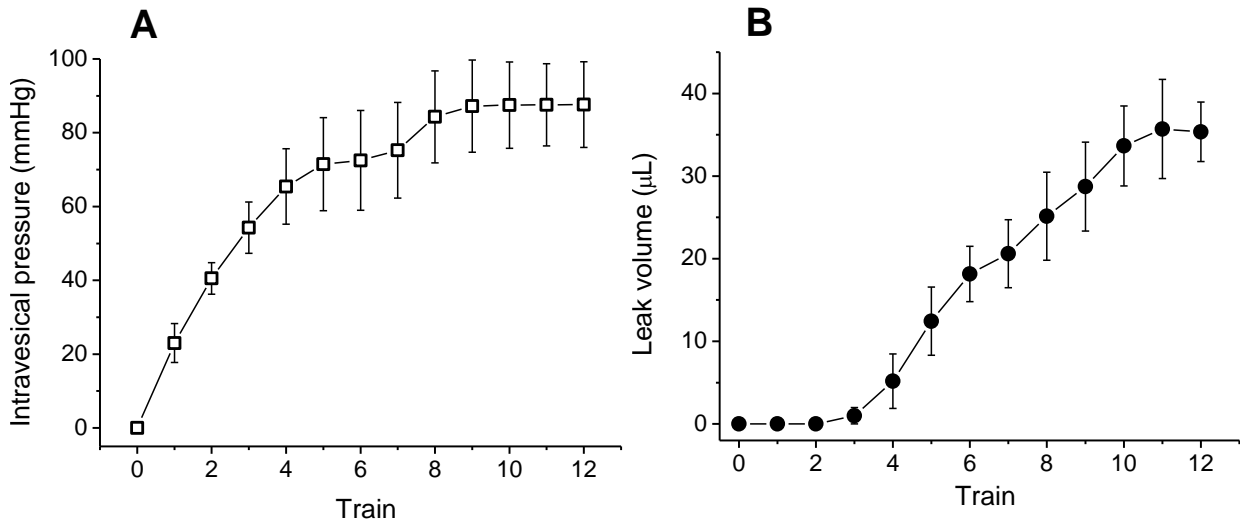


Fig. 2-3 Alternations in intravesical pressure (A) and leak volume (B) response to changes in train.

Voltage: 5V, Mean±S.E.M., n=4.

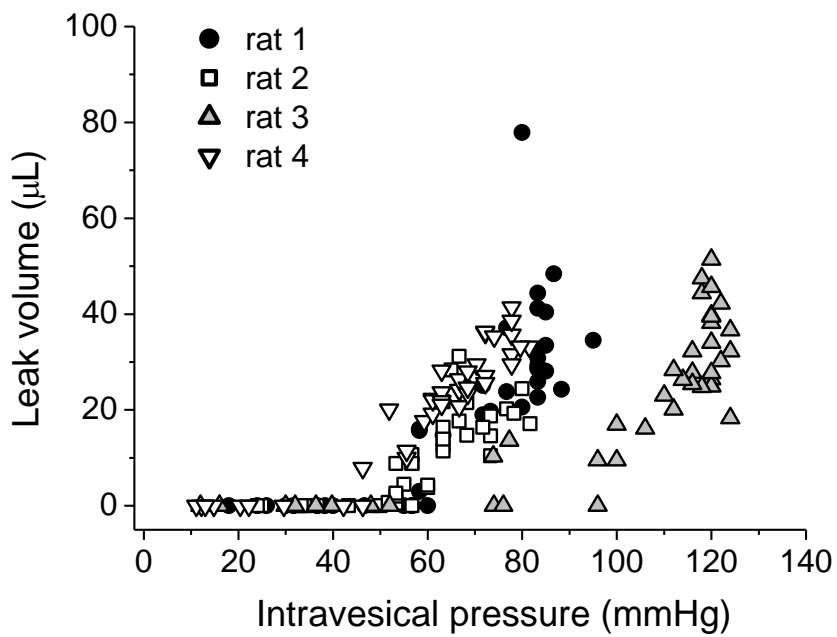


Fig. 2-4 Relation between intravesical pressure and leak volume.

Train: 4, Voltage: 5V, Mean±S.E.M., n=4.

2.3.2 塩酸デュロキセチンおよびWAY-161503の漏れ量に対する作用

電気刺激を、持続時間 1 ミリ秒、インターバル 5 ミリ秒、刺激パルス回数 2-3 回、電圧 5 V の範囲内で調整し、LV が 10-20 μ L となるように設定し、選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 塩酸デュロキセチンおよび5-HT₂受容体作動薬 WAY-161503 の作用を検討した。塩酸デュロキセチンは 1 mg/kg 静脈内投与では明らかな作用を示さなかったが、3 mg/kg の静脈内投与では有意に LV を減少させた。その作用は投与後 10-20 分をピークとし、60 分時点においてもその作用は持続していた (Fig. 2-5)。WAY-161503 も 0.1 mg/kg 静脈内投与で有意に LV を減少させた。その作用は 10-20 分をピークとし、その後速やかに減弱した (Fig. 2-6)。塩酸デュロキセチンおよび WAY-161503 投与によって電気刺激時の膀胱内圧に変化は認められなかった (Table 2-1、2-2)。

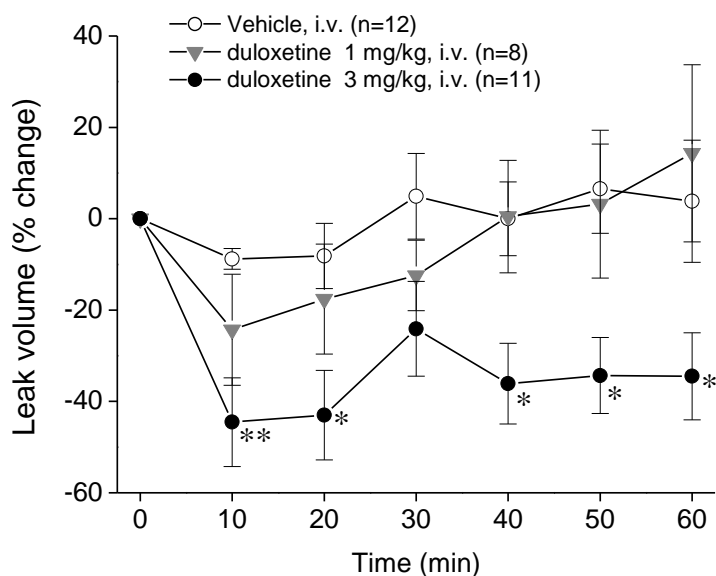


Fig. 2-5 Effect of duloxetine on leak volume in anesthetized rats.

Values are the mean percentage change resulting from the administration of vehicle or duloxetine and the error bars show the SEM. The leak volumes before administration (μ L) were 12.1 ± 1.7 (vehicle group), 19.8 ± 1.9 (1 mg/kg group), 15.5 ± 1.5 (3 mg/kg group). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus the vehicle group (Dunnett's test).

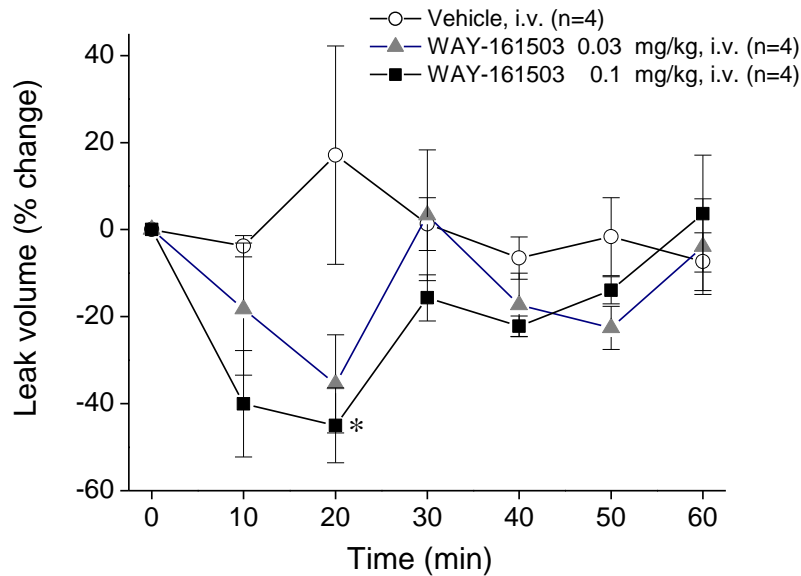


Fig. 2-6 Effect of WAY-161503 on leak volume in anesthetized rats.

Values are the mean percentage change resulting from the administration of vehicle or duloxetine and the error bars show the SEM. The leak volumes before administration (μl) were 17.3 ± 1.7 (vehicle group), 18.0 ± 2.5 (1 mg/kg group), 15.0 ± 1.7 (3 mg/kg group). * $P < 0.05$ versus the vehicle group (Dunnett's test).

Table 2-1 Effect of duloxetine on intravesical pressure in anesthetized rats.

duloxetine, mg/kg i.v.	intravesical pressure change (ΔmmHg)					
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
0 (vehicle)	-1.1 ± 0.6	-0.9 ± 0.8	-0.2 ± 1.0	-1.7 ± 1.2	-1.5 ± 1.5	-1.8 ± 1.8
1	-0.4 ± 0.6	0.2 ± 0.6	-0.8 ± 0.6	1.0 ± 0.9	1.3 ± 1.2	1.4 ± 1.4
3	-1.5 ± 1.1	-1.5 ± 1.1	-2.6 ± 1.2	-2.3 ± 1.3	-3.0 ± 1.6	-3.6 ± 2.1

The values before administration: 68.03 ± 5.36 mmHg – 72.63 ± 4.59 mmHg. Mean \pm S.E.M.

Table 2-2 Effect of WAY-161503 on intravesical pressure in anesthetized rats.

WAY-161503, mg/kg i.v.	intravesical pressure change (ΔmmHg)					
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
0 (vehicle)	-0.9 ± 1.2	-1.0 ± 0.6	-0.9 ± 1.1	-1.4 ± 0.6	-1.0 ± 1.6	-3.0 ± 1.0
0.03	-1.0 ± 0.1	-0.2 ± 0.8	-1.1 ± 1.8	-1.8 ± 2.2	-2.3 ± 1.3	-1.9 ± 1.8
0.1	0.9 ± 0.9	0.9 ± 1.5	1.1 ± 1.2	-1.0 ± 1.9	-1.5 ± 2.1	-0.6 ± 2.5

The values before administration: 95.10 ± 10.88 mmHg – 95.73 ± 12.93 mmHg. Mean \pm S.E.M.

2.4. 考察

ラット腹筋の電気刺激による一過性の膀胱内圧上昇によっておこる膀胱内に注入した生理食塩液の漏れ量 (LV) を経時的、定量的に捉えることのできる新規評価方法 (LV 法) を確立した。刺激条件などの検討を詳細に行い、60 分以上一定の LV を起こすことのできる条件を見出した。LV は個体ごとに一定の膀胱内圧を超えると急激に上昇するため、薬効評価に適した LV となるように、電圧および刺激パルス回数を調節した。溶媒投与群では投与前から 60 分後まで LV が安定しており、薬物の評価が可能であることがわかった。

塩酸デュロキセチンは SUI 治療薬として 2004 年に欧州で承認をうけたセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である⁵⁸⁾。塩酸デュロキセチンは、脊髓前角のオヌフ核と呼ばれる排尿反射中枢のシナプス間隙においてセロトニン及びノルアドレナリンの濃度を高めることで陰部神経を活性化し、活性化した陰部神経が尿道周囲の外尿道括約筋を活性化して腹圧性に起こる尿の漏れを防ぐと推測されている⁶¹⁾。5-HT₂ 受容体拮抗薬によって塩酸デュロキセチンの外尿道括約筋活性化が一部抑制されること⁵⁴⁾、脊髓前角のオヌフ核には 5-HT₂ 受容体が高発現していること⁶²⁾、さらに 5-HT₂ 受容体作動薬がラット尿道括約筋を活性化し、尿道内圧を上昇させる⁶³⁾ことから、塩酸デュロキセチンの尿禁制維持作用において 5-HT₂ 受容体の関与が示唆されている。LV 法において、塩酸デュロキセチン及び 5-HT₂ 受容体作動薬の WAY-161503 は、電気刺激時の膀胱内圧に変化を与えることなく LV を減少させ、LV 法が SUI 治療薬の経時的、定量的な薬効評価方法となりうることがわかった。また、LV 法では、一過性の電気刺激による LV に対する塩酸デュロキセチンと WAY-161503 の薬効持続時間の違いも捉えることができた。この薬効持続時間の違いは、これらの薬物の作用機序に基づくものかもしれない。

SUI は、咳やくしゃみなどのように一過性の刺激で起こる場合が多く⁶⁴⁾、SUI に対する薬物の効果を評価するには、一過性の刺激による尿漏れに対する作用を検討することが临床上重要である。従来、電気刺激のような一過性刺激で誘発した SUI モデル⁵³⁾においては、SUI 治療薬の薬効評価および SUI 動物モデルの評価には電気刺激強度を変化させて何度も刺激を行う必要があり、薬効の経時変化の評価が困難であったが、今回の LV 法はこの問題点を LV の測定という新しい方法で克服した。また、実際の SUI の臨床評価において、パッドテストと呼ばれる尿漏れ量の測定方法が使用されるが^{65,66)}、LV 法はパッドテストと同じく尿道からの漏れ量を測定するという観点からもこれまででない臨床評価に近い動物モデルと言える。LV 法と LPP 法、それぞれの評価方法のもつ意味合いの違いについて検討することが今後の課題である。

今回確立した LV 法は、LPP 法とともに SUI 治療薬の尿禁制評価に適した方法となりうるものであり、第 3 章においては、LV 法を含む複数の試験を組み合わせることで、トラマドールの尿禁制に対する作用を検討する。

第3章

トラマドール塩酸塩のラット尿禁制機能に対する作用

トラマドール塩酸塩（トラマドール）の下部尿路機能に対する作用として、これまでに、ラットの排尿反射を抑制することが報告されている。また、第1章において、トラマドールが膀胱炎誘発の頻尿を抑制することを示した。しかし、これまで、トラマドールの尿禁制機能に対する作用の検討は行われていなかった。そこで、第3章では、トラマドールの尿禁制機能に対する作用の検討を、麻酔下ラットを用いて、1) 尿道内圧、2) 漏出時膀胱閾値圧および3) 電気刺激誘発による漏れ量を指標にして行った。また、比較対象として、塩酸モルヒネの作用を検討した。

トラマドールの静脈内投与は、尿道内圧および膀胱直接圧迫による漏出時膀胱閾値圧を上昇させ、電気刺激時の漏れ量を減少させた。トラマドールによる漏出時膀胱閾値圧の上昇作用および漏れ量の減少作用は、ナロキソンの前投与で完全に消失した。モルヒネの静脈内投与によっても同様に漏れ閾値圧の上昇および漏れ量の減少が認められ、これらの作用はオピオイド受容体拮抗薬のナロキソンによって完全に拮抗された。

以上の結果から、トラマドールは μ -オピオイド受容体を介して尿禁制機能を増強させる作用を有することが示唆された。

3.1 諸言

通常、おなかに強い力（腹圧）がかかった場合、骨盤底筋が膀胱と尿道を支えることで、尿道が締まる、いわゆる「尿禁制機能」が働き、尿が漏れるのを防いでいる¹⁴⁾。腹圧性尿失禁（SUI）は、この骨盤底筋が出産や加齢、肥満などで弱くなったり傷んだりすることによって、尿道をうまく締められなくなり腹圧がかかる刺激によって尿漏れを起こす疾患で、女性では尿失禁の中で最もよく認められる¹⁵⁾。本邦では β 受容体刺激薬の塩酸クレンプテロールがSUIに対する適応を持つが、その作用は限定的で、長期間の尿禁制を得るためには尿道スリング術（尿道を吊り上げる方法）などの手術が最善の方法とされている⁶⁷⁾。このような状況から、尿禁制機能を有する薬物が求められている。

尿禁制機能を評価する方法としては、雌性ラットを用いて尿道内圧を測定する方法やくしゃみや電気刺激による漏出時膀胱閾値圧を測定する方法が一般的である¹⁶⁾。これに加え、第2章において示したように、私は、咳やくしゃみなどSUIの多くを占める一過性の刺激による反応を経時的に捉えることを目的として、腹筋の電気刺激によって誘発される漏れ量を測定する方法を雌性ラットで新規に確立し、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬のデュロキセチンや5-HT₂受容体作動薬のWAY-161503が漏れ量を減少させることを報告した⁶⁹⁾。

第3章では、尿禁制機能に対する作用を明らかにすることを目的として、新規に確立したモデルを含む3つのラットを用いた評価方法（尿道内圧、漏出時膀胱閾値圧、漏れ量）で、トラマドールの作用を検討した。また、オピオイド受容体の役割を検討するため、 μ -オピオイド受容体作動薬のモルヒネ、およびオピオイド拮抗薬のナロキソンの前投与の漏出時膀胱閾値圧および漏れ量に対する作用を検討した。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 動物

実験には 8-12 週齢 SD 系雌性ラットを用いた。

3.2.2 ラット尿道内圧の測定 (Fig. 3-1)

ラットをウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、固定台に背位に固定した。下腹部を正中切開した後、膀胱を露出させ、膀胱を軽く押さえて膀胱内貯留尿を体外へ排出させた後、両側の尿管を切断した。マイクロチップ圧トランスデューサーを外尿道口から膀胱内へ挿入し、尿道内圧測定用引き抜き装置及び尿道内圧コントロールモジュールを用いて、一旦膀胱頸部から尿道口まで引き抜いた。再度、トランスデューサーを膀胱内へ挿入し、遠位尿道部まで引き抜き、留置した。尿道内圧は、トランスデューサーコントロールユニットを介して歪圧カアンプにより増幅させた後、レクチコーダーに記録した。安定した尿道内圧が得られたことを確認した後、被験物質を静脈内投与し、投与前後における尿道内圧の変化を記録した。

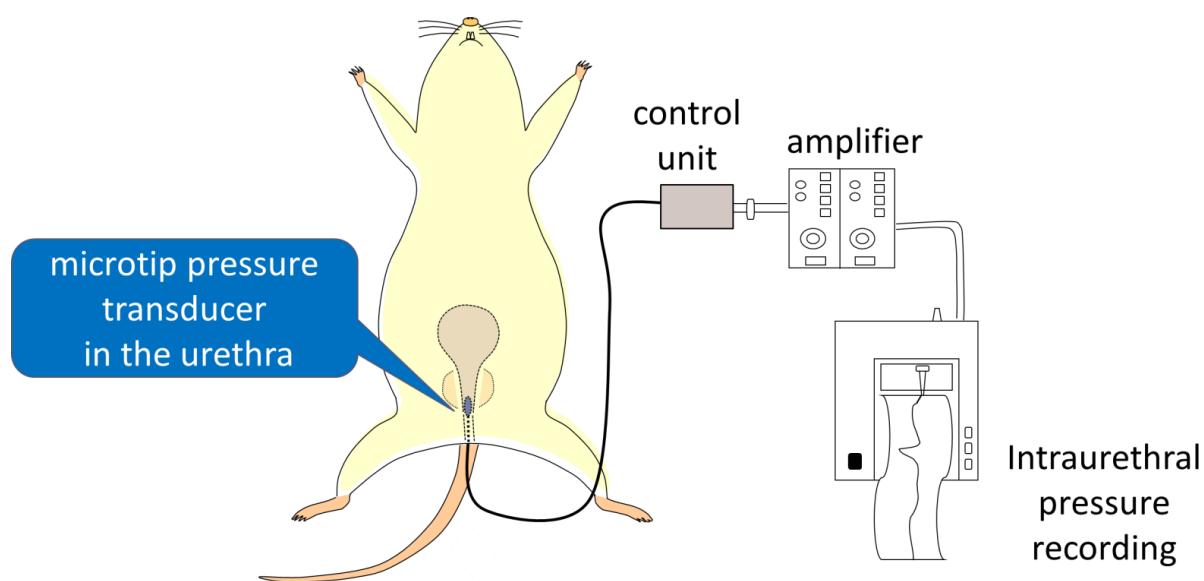


Fig. 3-1 Measurement of intraurethral pressure in rats.

3.2.3 ラット漏出時膀胱閾値圧の測定 (Fig. 3-2)

動物をウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、脊髄を T8-T9 レベルで切断することにより排尿反射を消失させた後、背位に固定し、圧トランスデューサーと生理食塩液で満たした注射筒に繋がっているカニューレを挿入した。カニューレから膀胱に約 0.4 mL の生理食塩液を注入した状態で、Jiang らの方法⁷⁰⁾に従って二本の綿棒を用いて膀胱を両側からゆっくりと圧迫した。実験誤差を防ぐため、綿棒を用いた圧迫は同一の実験者が行い、圧迫するタイミングはできる限り統一するようにした。尿道口から生理食塩液が漏れた時の膀胱内圧 (LPP) を歪圧カンプで増幅してレクチコーダーに記録した。LPP が安定するまで数回計測を繰り返した後、被験物質を静脈内に投与し、10 分毎に 30 分間または 60 分間 (それぞれ、計 3 回または 6 回) 測定を行った。

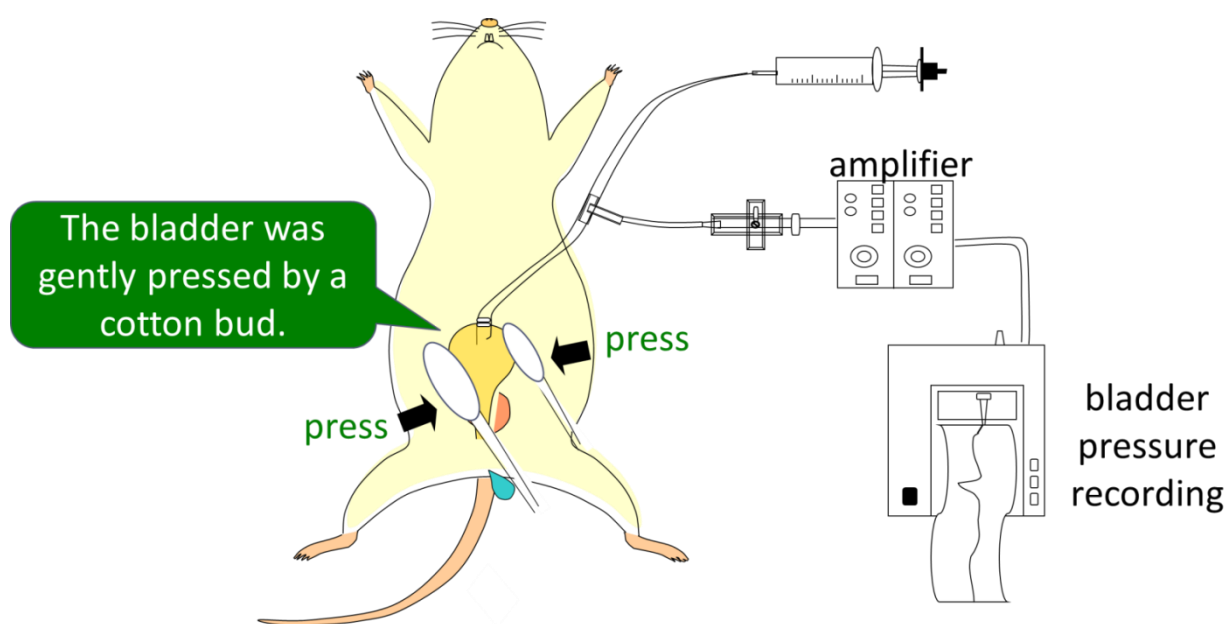


Fig. 3-2 Measurement of bladder leak point pressure in rats.

3.2.3 ラット漏出量の測定（第2章参照）

腹壁電気刺激による漏出量（LV）測定については第2章にて示した。すなわち、ラットをウレタン麻酔し、脊髄を T8-T9 レベルで切断することにより排尿反射に関わる上位中枢からの神経路を遮断し、排尿反射を消失させた後、腹部横隔膜付近の筋肉に刺激電極を固定した。さらに腹部を正中切開し、尿管を結紮した後、尿管を切断した。膀胱にカニューレを挿入した後、切開部分から圧が漏れないように腹部を縫合した。カニューレから膀胱に約 1 mL の生理食塩液を注入し、この状態で電気刺激装置を用いて一定量の尿が漏れる電気刺激条件を検討した。電気刺激によって漏れた尿は濾紙に染み込ませ、電子天秤で重量を測定し、比重を 1.0 として計算、すなわち 1 g の尿量を 1 mL として尿道口からの生理食塩液の漏れ量を LV とした。LV が 15 μ L 程度となるように、個体ごとに電気刺激条件を固定した状態で、LV が安定するまで数回計測を繰り返した後、被験物質を静脈内に投与し、10 分毎に 30 分間または 60 分間（それぞれ、計 3 回または 6 回）測定を行った。膀胱内の生理食塩液は 1 試験毎に調節し、1 試験中は膀胱への生理食塩液の追加注入は行わなかった。

3.2.4 統計解析

データの解析は SAS プログラムを用いて行った。データは各個体における尿道内圧変化率の平均値 \pm 標準誤差、LPP 変化率の平均値 \pm 標準誤差もしくは LV 変化率の平均値 \pm 標準誤差として表した。各計測時点における媒体投与群と被験物質投与群の有意差検定を多重比較法（Williams test または Dunnett's test）により行い、危険率 5 %未満を有意差ありと判定した。

3.3 結果

3.3.1 ラット尿道内圧に対する作用

尿道口から膀胱へ挿入したマイクロチップ圧トランスデューサーを膀胱頸部から尿道口まで引き抜いた時、膀胱近位部に高い圧を示す地点があり、その後尿道内圧は緩やかに下降した。再度、トランスデューサーを膀胱内へ挿入し、外尿道括約筋が支配すると考えられる遠位尿道部まで引き抜き、留置した (Fig. 3-3)。トラマドール (1, 3, 10 mg/kg) を静脈内投与すると、投与直後から尿道内圧が上昇した (Fig. 3-4)。トラマドールによる尿道内圧の有意な上昇作用は投与後 5 分をピークとして 1 mg/kg より観察され、3, 10 mg/kg と用量の増加に伴い作用の増強が認められた (Fig. 3-5)。トラマドール 10 mg/kg 投与においてはその尿道内圧上昇作用は投与後 20 分においても有意なものであった。

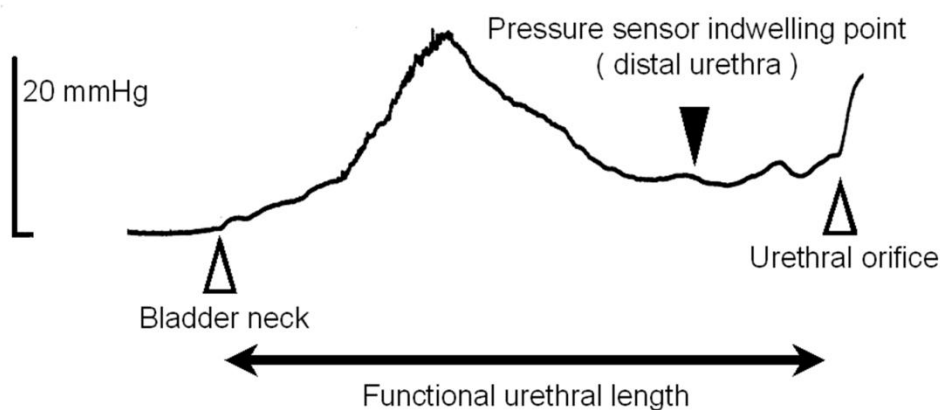


Fig. 3-3 Changes in urethral pressure from bladder neck to urethral orifice.

Left Δ : Bladder neck, Right Δ : Urethral orifice,
▼ : Pressure sensor indwelling point (measurement position) .

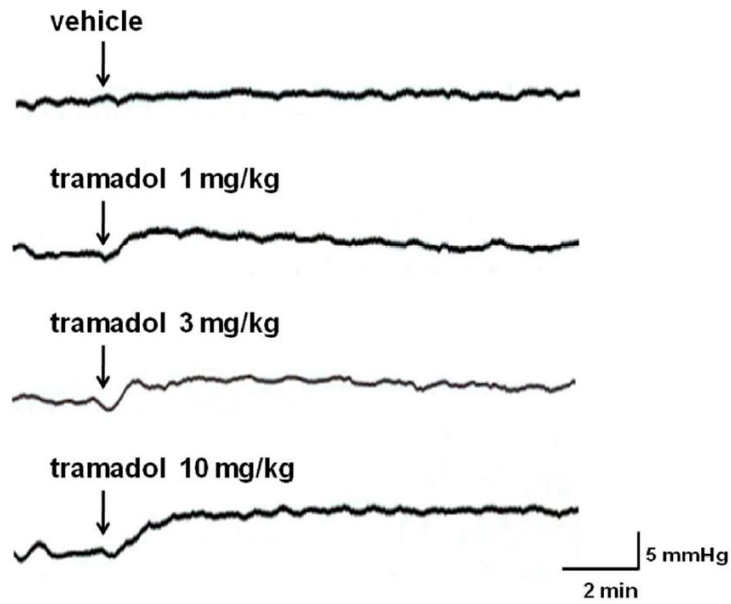


Fig. 3-4 Representative recordings of intraurethral pressure in anesthetized rats.

Arrows indicate the time of injection of vehicle or tramadol. Intraurethral pressure was monitored for 2 min before and 10 min after drug administration.

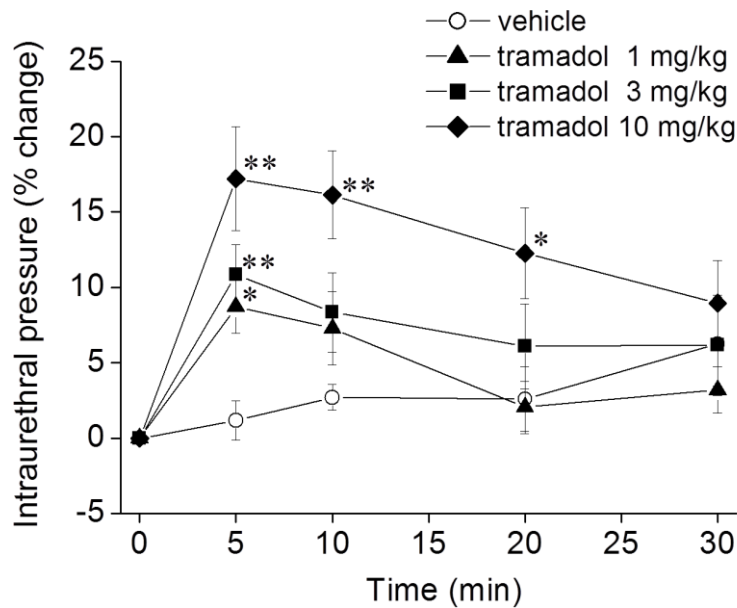
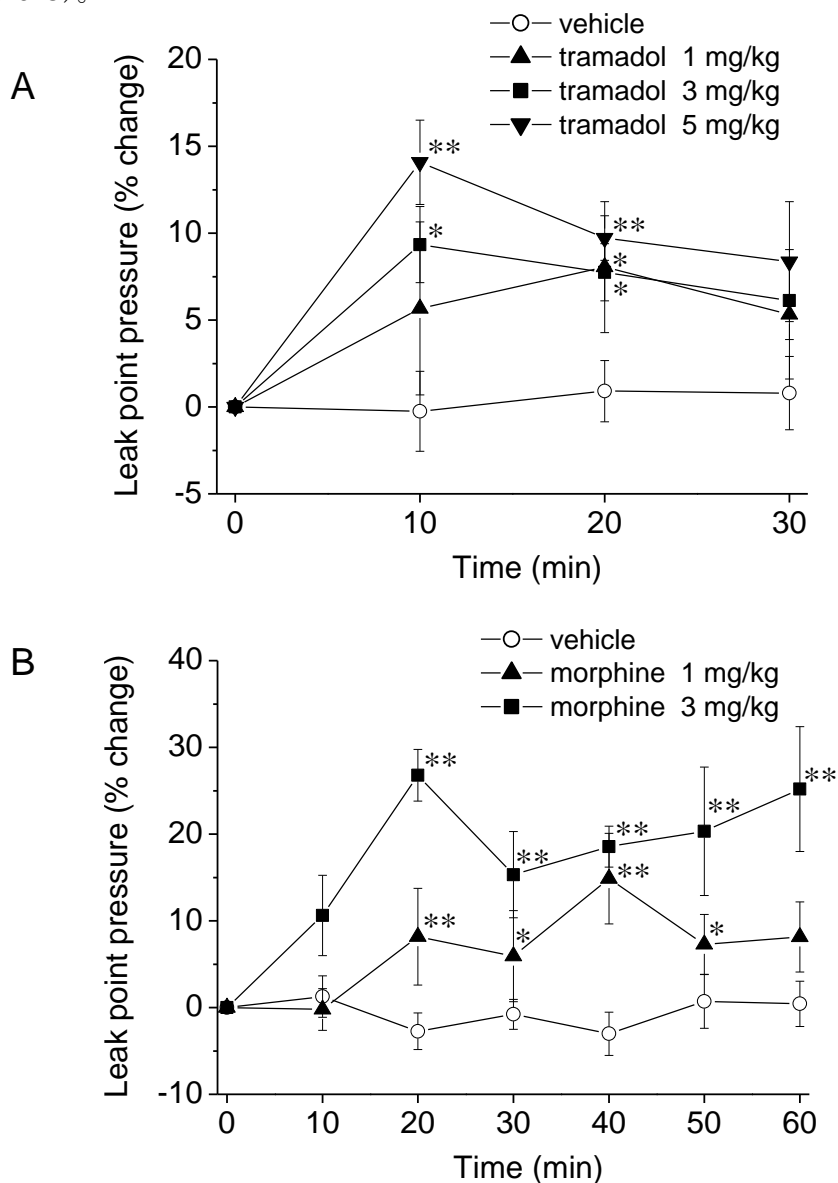


Fig. 3-5 Effect of tramadol on intraurethral pressure in anesthetized rats.

Values are the mean percentage change resulting from the administration of vehicle or tramadol and the error bars show the SEM. The intraurethral pressure values before administration (mmHg) were 12.2 ± 1.3 (vehicle group; n=7), 12.0 ± 1.5 (1 mg/kg group; n=6), 13.1 ± 1.3 (3 mg/kg group; n=6), and 13.1 ± 1.3 (10 mg/kg group; n=7). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus the vehicle group (Williams test).

3.3.2 ラット漏出時膀胱閾値圧に対する作用

生理食塩液を充満させた膀胱を綿棒でゆっくりと圧迫すると、膀胱内圧が上昇し、一定の圧（漏出時膀胱閾値圧; LPP）に達した時、尿道口から生理食塩液の漏れを認めた。トラマドール（1, 3, 5 mg/kg）の静脈内投与は、LPP を上昇させ、その最大上昇率は、1 mg/kg で 8.05%（20 min）、3 mg/kg で 9.34%（10 min）、5 mg/kg では 14.08%（10 min）であった（Fig. 3-6-A）。モルヒネ（1, 3 mg/kg）の静脈内投与も LPP を上昇させ、その作用はトラマドールよりも持続的であり、最大上昇率は 1 mg/kg で 14.86%（40 min）、3 mg/kg で 26.78%（20 min）であった（Fig. 3-6-B）。オピオイド拮抗薬のナロキソン（1 mg/kg）を 5 分前に皮下投与した時、トラマドール 5 mg/kg 及びモルヒネ 3 mg/kg 静脈内投与による LPP 上昇作用は消失した（Fig. 3-6-C）。



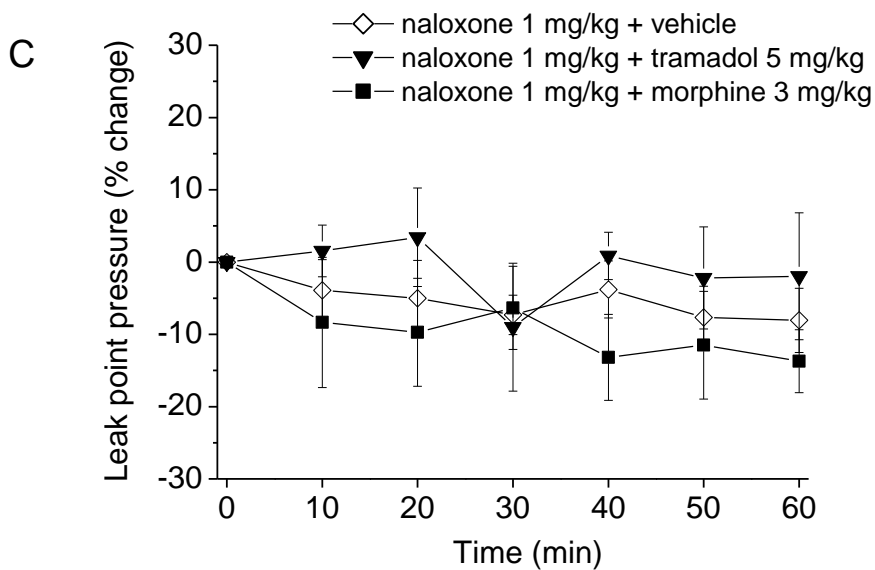
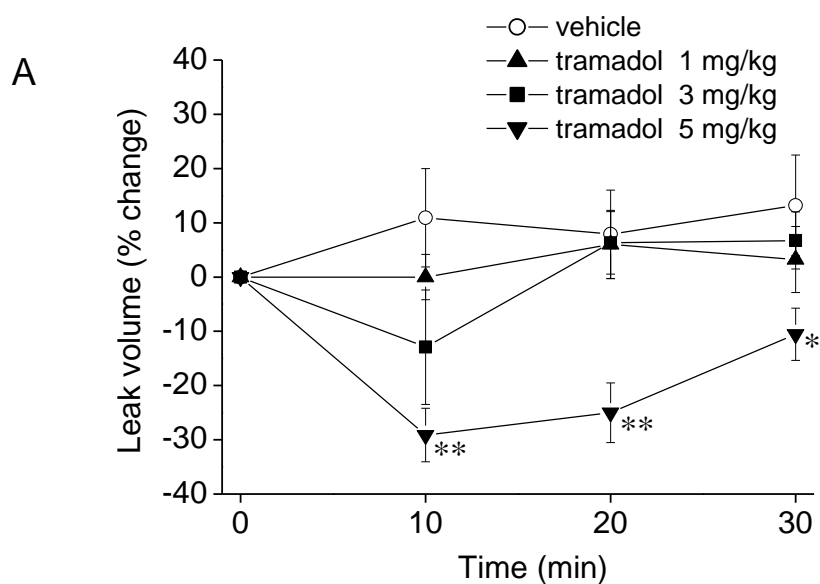


Fig. 3-6 Effect of compounds on bladder leak point pressure in anesthetized rats.

Values are the mean percentage change resulting from the administration of vehicle or compound(s) and the error bars show the SEM. A: Tramadol. The leak point pressure values before administration (mmHg) were 55.8 ± 2.3 (vehicle group; n=8), 42.6 ± 6.5 (1 mg/kg group; n=4), 54.6 ± 2.5 (3 mg/kg group; n=8), and 56.5 ± 2.6 (5 mg/kg group; n=8). B: Morphine. The leak point pressure values before administration (mmHg) were 55.1 ± 3.5 (vehicle group; n=8), 51.5 ± 3.6 (1 mg/kg group; n=8), and 52.1 ± 5.3 (3 mg/kg group; n=4). C: Tramadol or morphine with naloxone. Naloxone was injected s.c. 5 min before drug administration. The leak point pressure values before administration (mmHg) were 49.3 ± 2.7 (naloxone 1 mg/kg + vehicle group; n=4), 41.9 ± 2.7 (naloxone 1 mg/kg + tramadol 5 mg/kg group; n=6), and 47.7 ± 2.2 (naloxone 1 mg/kg + morphine 3 mg/kg group; n=4). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus the vehicle group (Williams test).

3.3.3 ラット漏れ量に対する作用

電気刺激装置による刺激（持続時間 1 ミリ秒、インターバル 5 ミリ秒、刺激パルス回数 2-3 回、電圧 5 V）によって、一過性に膀胱内圧が上昇し、平均 16.55 μL (n=58、7.3 μL - 37.1 μL) の漏出量 (LV) が認められた。トラマドール (5 mg/kg) の静脈内投与は、投与後 10-30 分で LV を有意に減少させ、その最大減少率は、-29.14% (10 min) であった (Fig. 3-7-A)。トラマドール 1 及び 3 mg/kg の静脈内投与は LV にほとんど影響を与えなかった。モルヒネ (1, 3 mg/kg) の静脈内投与においても投与後 10 分から LV の減少が認められ、その作用はトラマドールよりも強力且つ持続的であり、最大減少率は 1 mg/kg で-33.99% (30 min)、3 mg/kg で-80.81% (30 min) であった (Fig. 3-7-B)。オピオイド拮抗薬のナロキソン (1 mg/kg, s.c.) を 5 分前投与した時、トラマドール 5 mg/kg 及びモルヒネ 3 mg/kg 静脈内投与による LV 減少作用は消失し、ナロキソン前投与のトラマドール投与群においては逆に LV が増加する傾向が認められた (Fig. 3-7-C)。



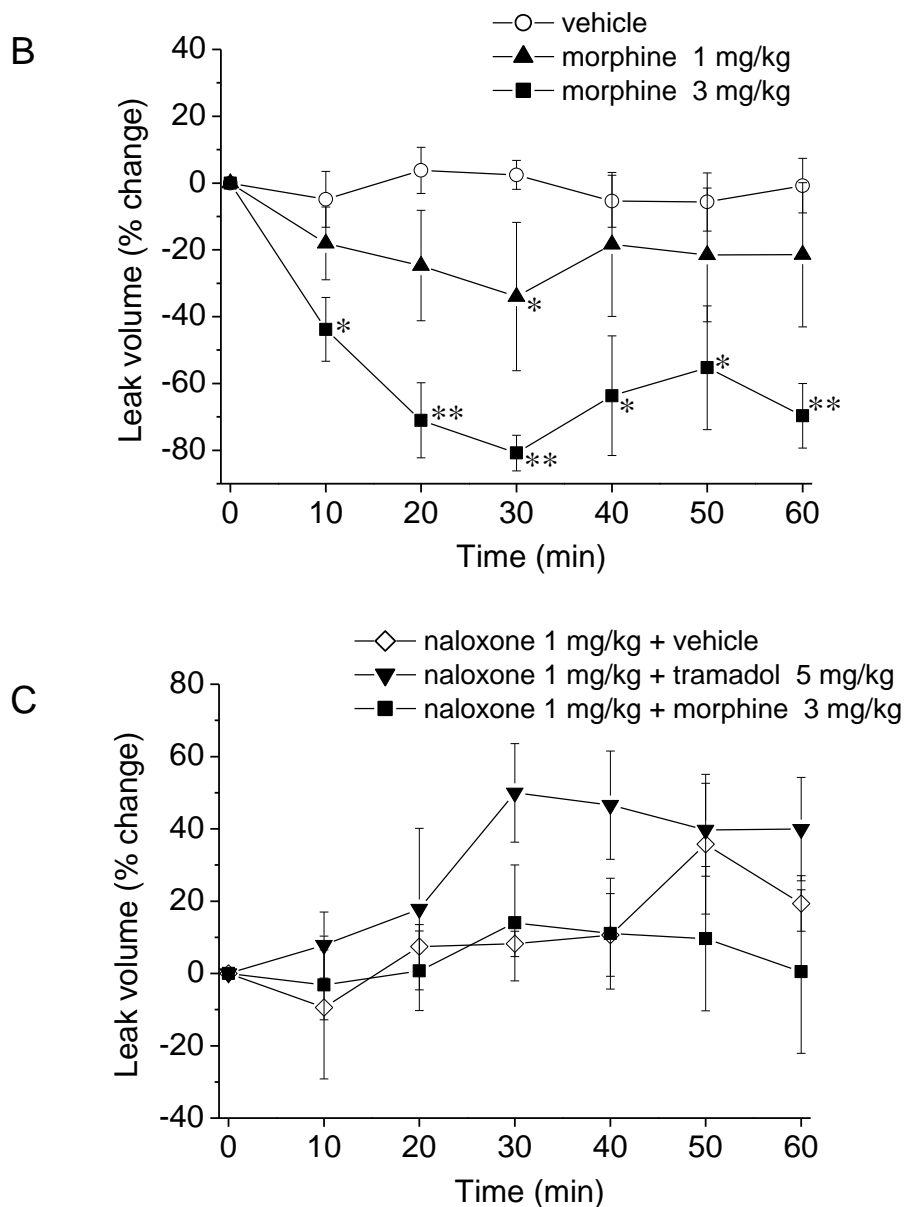


Fig. 3-7 Effect of compounds on leak volume in anesthetized rats.

Values are the mean percentage change resulting from the administration of vehicle or compound(s) and the error bars show the SEM. A: Tramadol. The leak volumes before administration (ml) were 18.8 ± 1.8 (vehicle group; n=8), 14.8 ± 1.6 (1 mg/kg group; n=4), 19.9 ± 1.5 (3 mg/kg group; n=8), and 23.4 ± 3.0 (5 mg/kg group; n=8). B: Morphine. The leak volumes before administration (ml) were 11.7 ± 0.9 (vehicle group; n=8), 12.0 ± 1.9 (1 mg/kg group; n=4), and 14.8 ± 1.1 (3 mg/kg group; n=4). C: Tramadol or morphine with naloxone. Naloxone was injected s.c. 5 min before drug administration. The leak volumes before administration (ml) were 13.3 ± 2.6 (naloxone 1 mg/kg + vehicle group; n=4), 14.2 ± 1.9 (naloxone 1 mg/kg + tramadol 5 mg/kg group; n=6), and 16.4 ± 1.5 (naloxone 1 mg/kg + morphine 3 mg/kg group; n=4). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus the vehicle group (Williams test).

3.4. 考察

今回の検討で、鎮痛薬のトラマドールがラットにおいて、尿道内圧及び漏出時膀胱閾値圧 (LPP) を上昇させ、電気刺激によって誘発される漏れ量 (LV) を減少させることを示した。また、LPP の上昇作用及び LV の減少作用は μ -オピオイド受容体作動薬のモルヒネでも認められ、トラマドール、モルヒネいずれの作用もオピオイド拮抗薬ナロキソンで拮抗されることを示した。このことは、トラマドールが μ -オピオイド受容体を介して尿禁制機能を増強させる働きを有することを示唆する。

これまで、 μ -オピオイド受容体を介する尿道内圧に対する作用を明確に示した報告はほとんどない。Crayton らは、動脈内投与した内因性の κ -オピオイド作動薬のダイノルフィンや δ 作動薬のエンケファリンはラット尿道内圧を上昇させたが、モルヒネは明確な作用を示さなかったことを報告している⁷¹⁾。また、モルヒネの静脈内投与は排尿反射を完全に抑制するものの、膀胱頸部から尿道にかけての抵抗に影響を与えないと報告されている⁴¹⁾。ヒトにおいても、髄腔内投与したモルヒネは排尿筋を弛緩したが、この時尿道内圧に変化はなく、また静脈内投与したモルヒネは排尿反射に影響を与えなかったという報告⁷²⁾ や、 μ -オピオイド受容体作動薬のフェンタニル、モルヒネ、 μ -オピオイド受容体部分作動薬の buprenorphine、 κ -オピオイド受容体作動薬の nalbuphine の静脈内投与は、初発尿意までの膀胱容量は増大させたものの、尿道内圧には影響を与えなかった、という報告がある⁴²⁾。今回、トラマドールが尿道内圧を上昇させた正確な機序は明確ではないものの、 μ -オピオイド受容体の関与は否定できない。尿道内圧に対する μ -オピオイド受容体の関与についてのこれまでの報告との矛盾の一つの理由として、尿道内圧の測定部位の違いによる可能性が考えられる。たとえば、Kontani ら⁴¹⁾ は膀胱頸部付近の圧の高い部分の尿道内圧を測定しているが、私は外尿道括約筋が支配している尿道口に近い部分の尿道内圧を測定した。

LPP の測定は、尿道の尿禁制機能を検討する目的で行われ、刺激としては、くしゃみ⁵⁷⁾ や電気刺激による方法⁵³⁾、膀胱の直接圧迫法^{70, 73)} などが用いられる。今回私は、簡便でありながらも安定した値が得られるという理由で、2本の綿棒で膀胱をゆっくりと直接圧迫する方法を用いた。トラマドールおよびモルヒネは LPP を上昇させ、その作用はオピオイド拮抗薬のナロキソンで拮抗された。このことから、トラマドールの LPP 上昇作用には μ -オピオイド受容体が関与することが強く示唆される。

膀胱に注入した生理食塩液の尿道口からの LV を測定する方法は、私が初めて報告した方法で、詳しくは第2章で示した。この方法は、LPP 同様、尿禁制機能を測定するものである。尿禁制機能が増強されると、漏れ量が減少し、すなわち、尿禁制状態となる。臨床では、SUI を評価する方法として、24時間パッドテストが用いられる^{65, 66)}。尿漏れ量を直接測定することで、尿失禁に対する作用を検討するコンセプトはラットの LV 法と同じであるが、24時間パ

ッドテストとは、1) 無麻酔下であるところ、2) 機能実験ではなく行動実験であるということ、3) 刺激が電気刺激のような単一刺激ではないこと、4) 排尿反射も影響すること、などが異なる。このような違いはあるものの、LVを継続的に測定することは、尿禁制機構に対する薬物評価として有用である。今回の検討では、トラマドールとモルヒネは共にLVを抑制し、この作用はLPP同様、オピオイド拮抗薬のナロキソンで拮抗された。このことから、LVの抑制作用にも μ -オピオイド受容体の関与が考えられた。

中枢の μ -オピオイド受容体は、下部尿路機能を調節することが知られている⁴¹⁾。また、脊髄においては、尿禁制機能に特に重要とされる脊髄前部のオヌフ核にエンケファリン神経が高密度分布していることがネコを用いた免疫組織学的検討で報告されている⁷⁴⁾。このことは、内因性オピオイドが尿道を含む下部尿路を支配している脊髄の運動神経起始核に直接関与している可能性を示唆している。また、ブタを用いた免疫組織学的検討では、遠位部尿道に伸びる神経にオピオイド含有神経が存在することが報告されている⁷⁵⁾。これらのことから、脳に加え、脊髄オヌフ核もトラマドールの作用点の一つである可能性がある。

トラマドールはオピオイド受容体結合能を抑制し、ラット μ -オピオイド受容体に対するKi値は $6.7 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ である³⁾。薬物動態試験成績から、トラマドールはモルヒネと比較して脳脊髄内への移行性が高く、トラマドールを50 mg摂取したときのヒトにおける脳内濃度は約 $5.8 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ と推定されており⁷⁾、Ki値が1桁 $\mu\text{mol/L}$ である μ -オピオイド受容体はトラマドールの作用点の一つと考えられる。一方、トラマドールは $[^3\text{H}]$ NAおよび5-HTの取り込み能を抑制し、そのKi値はそれぞれ 1.8 ± 0.6 および $1.9 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$ である⁴⁾。今回の検討からは、NAおよび5-HTの取り込み阻害能の関与は不明であった。これらの関与を検討するには、脊髄NA神経や5-HT神経を除神経したラットを用いたり、NAや5-HTの代表的な拮抗薬を用いたりする実験が必要である。トラマドールの尿禁制機構の解明には今後の更なる研究が必要である。

下部尿路に関して、トラマドールは正常ラットの排尿反射を抑制し¹²⁾、シクロホスファミド誘発膀胱炎⁶⁸⁾やアポモルヒネ誘発¹⁰⁾の過活動を抑制する。また、臨床研究においても、トラマドールの硬膜外投与は膀胱容量を増大させ、尿意を鈍らせることが知られている¹³⁾。その上、無作為二重盲検のプラセボコントロール試験において、トラマドール徐放剤が非神経因性の突発性排尿筋過活動患者の排尿パラメーターを有意に改善したことが報告されている⁷⁶⁾。トラマドールは μ -オピオイド受容体に作用する鎮痛薬であるため、これらの排尿反射の抑制作用には膀胱の求心性神経の抑制が主に関与していると推測される。この排尿反射抑制作用に加え、本章で示したようにトラマドールは尿道における尿禁制機能の増強作用を持つ。求心路の抑制と尿禁制機能の増強というトラマドールの可能性のある二つの作用は、協調して尿失禁抑制に寄与すると考えられる。

がん性疼痛、神経因性疼痛治療薬として使用されるトラマドールの副作用として、嘔気、便秘、頭痛、眠気などが知られている¹⁹⁾。ラットにおいて、尿禁制機能を増強させた今回のトラマドールの用量は、神経因性疼痛を抑制する用量とほぼ同じであった⁷⁷⁾。このことから、トラマドールをSUIなどに用いる場合にも同様の副作用が起こることが予想されるため注意が必要である。

今回の結論として、尿道内圧、漏出時膀胱閾値圧、漏れ量という三つの異なる検討から、トラマドールがラットにおいて尿禁制機能を増強させる作用があることがわかった。このことは、トラマドールがSUIなどの尿禁制機能の障害を伴う疾患に有用であることを示唆するものである。

総 括

下部尿路機能障害は、蓄尿（尿をためる）障害と排尿（尿を出す）障害に大別される。本研究では、鎮痛薬として用いられているトラマドールの蓄尿障害に関連する下部尿路機能に対する作用の検討を行った。膀胱および膀胱知覚神経に対する作用として、マウス及びラットを用いて膀胱炎における疼痛及び頻尿への効果を検討し、尿道および尿道を支配する神経に対する作用として、麻酔下ラットにおける尿禁制機能への効果を検討した。

第1章では、膀胱に選択的に炎症を起こすことが知られている、シクロホスファミド(CP)を用いて、膀胱炎における疼痛・頻尿に対する作用を検討した。マウスにCPを腹腔内投与すると、これまでの報告同様、疼痛関連行動^{28,31)}、排尿回数の増加³⁷⁾、膀胱重量³⁸⁾の増加が認められた。今回、私は、目の開き、うずくまり、腹這い歩行、排尿時行動、腹舐め行動の5つの行動を疼痛関連行動として評価に用いた。CPを投与したマウスにおいて、通常のマウスでは認められない、排尿をするときに尻を振るわせるという独特の排尿時行動が認められた。この行動は、他の疼痛関連行動と比較してもより顕著にCPの用量の増加に伴って観察された。排尿時行動を疼痛の指標にした研究はこれまでに無く、今回が初めての報告である。間質性膀胱炎や膀胱痛症候群の大部分の患者は、尿充満時に痛みを感じ、排尿時もしくは排尿後には痛みが軽減するなど、排尿と膀胱の痛みが深く関係していると報告されている³⁹⁾。今回認められた排尿時行動がどのような感覚を表現しているのかは不明であるが、膀胱の痛み、もしくはその痛みからの軽減を反映しているのかもしれない。トラマドールの経口投与によって、用量依存的なCP誘発の疼痛関連行動の明確な抑制作用が認められた。

麻酔下ラットを用いた検討において、トラマドールはCPによって短縮した排尿間隔を延長させる作用を示した。このことは、これまでの報告同様、トラマドールがCP膀胱炎においても排尿反射を抑制する作用を有することを示すものである。

トラマドールの鎮痛、排尿反射抑制の作用機序としては、 μ -オピオイド受容体に対する作用とモノアミン再取り込み阻害作用が考えられる⁴⁾。薬物動態試験成績から、トラマドールは脳脊髄内への移行性が高く、トラマドールを50 mg 摂取したときのヒトにおける脳内濃度は約 $5.8 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$ と推定されており⁷⁾、 K_i 値が1桁 $\mu\text{mol/L}$ である μ -オピオイド受容体に対する作用やモノアミン再取り込み阻害作用はトラマドールの作用点であると考えられる。

μ -オピオイド受容体のモルヒネはCP誘発疼痛に対する鎮痛作用^{31,32)}と共に、排尿反射を抑制^{41,42)}することが報告されており、また、モノアミン再取り込み阻害剤のデュロキセチンもCP誘発疼痛³¹⁾や神経因性疼痛⁴³⁾に対する抑制作用、過活動膀胱に対する抑制作用⁴⁴⁾が報告されている。今回、オピオイド拮抗薬のナロキソンが、トラマドールの排尿間隔延長作用を一部抑制したことから、トラマドールの μ -オピオイド受容体に対する作用が関与することが示唆された。 μ -オピオイド受容体の活性化は、脊髄および脳を作用点として、求心路神経を抑

制すると考えられる (Fig. 2)。しかしながら、ナロキソンでは完全に抑制されなかったことから、モノアミン再取り込み阻害作用もトラマドールの排尿反射抑制作用に関与している可能性がある。この場合も、下行性抑制系を介する脊髄での求心路抑制作用が作用機序と考えられる。トラマドールの CP 誘発疼痛、排尿反射亢進に対する鎮痛、排尿反射抑制作用機序については、モノアミン再取り込み阻害作用の関与を検討するための拮抗薬を用いた実験などの更なる検討が必要である。

第 2 章では、ラット腹筋の電気刺激による一過性の膀胱内圧上昇によっておこる膀胱内に注入した生理食塩液の漏れ量 (LV) を経時的、定量的に捉えることのできる新規評価方法 (LV 法) を確立した。尿禁制機能が增強されると、漏れ量が減少し、すなわち、尿禁制状態となる。臨床では、腹圧性尿失禁 (SUI) を評価する方法として、24 時間パッドテストが用いられる^{65, 66)} が、尿漏れ量を直接測定することで、尿失禁に対する作用を検討するコンセプトは本法と同じである。本評価方法を用いて、SUI 治療薬の塩酸デュロキセチンおよび 5-HT₂ 受容体作動薬の WAY-161503 が電気刺激時の膀胱内圧に変化を与えることなく LV を減少させ、LV 法が SUI 治療薬の経時的、定量的な薬効評価方法となりうることを見出した。

第 3 章では、トラマドールがラットにおいて、尿道内圧及び漏出時膀胱閾値圧 (LPP) を上昇させ、電気刺激によって誘発される LV を減少させることを示した。また、LPP の上昇作用及び LV の減少作用は μ -オピオイド受容体作動薬のモルヒネでも認められ、トラマドール、モルヒネいずれの作用もオピオイド拮抗薬ナロキソンで拮抗されることを示した。このことは、トラマドールが μ -オピオイド受容体を介して尿禁制機能を增強させる働きを有することを示唆する。

中枢の μ -オピオイド受容体は、下部尿路機能を調節することが知られている⁴¹⁾。また、脊髄においては、尿禁制機能に特に重要とされる脊髄前部のオヌフ核にエンケファリン神経が高密度分布していることがネコを用いた免疫組織学的検討で報告されている⁷⁴⁾。このことは、内因性オピオイドが尿道を含む下部尿路を支配している脊髄の運動神経起始核に直接関与している可能性を示唆している。また、ブタを用いた免疫組織学的検討では、遠位部尿道に伸びる神経にオピオイド含有神経が存在することが報告されている⁷⁵⁾。これらのことから、脳に加え、脊髄オヌフ核もトラマドールの作用点の一つの可能性はある (Fig. 2)。今回の検討では、正確な作用部位、作用機序は不明である。作用部位を特定するためには脊髄局所へトラマドールを投与する検討が、モノアミン再取り込み阻害作用の関与を検討するためには脊髄におけるノルアドレナリンやセロトニン神経を除神経したモデルにおける検討やノルアドレナリンやセロトニンの拮抗薬を用いた検討が必要である。

第 1 章で示したように、トラマドールは CP 誘発膀胱炎の疼痛と頻尿を抑制した。トラマドールは μ -オピオイド受容体に作用する鎮痛薬であるため、これらの排尿反射の抑制作用には膀胱の求心性神経の抑制が主に関与していると推測される。この排尿反射抑制作用に加え、第

3章で示したようにトラマドールは尿道における尿禁制機能の増強作用を持つ。求心路の抑制と尿禁制機能の増強というトラマドールの可能性のある二つの作用は、協調して尿失禁抑制に寄与すると考えられる。このことは、トラマドールが間質性膀胱炎などの難治性膀胱炎に伴う症状やSUIなどに対する治療法の選択肢の一つとして有用であることを示唆するものである。ただし、今回の実験で用いたトラマドールの用量は神経因性疼痛を抑制する用量とほぼ同じであった⁷⁷⁾。このことから、トラマドールをこれらの下部尿路疾患の治療に用いる場合にも嘔気、便秘、頭痛、眠気などの副作用には十分注意が必要である。

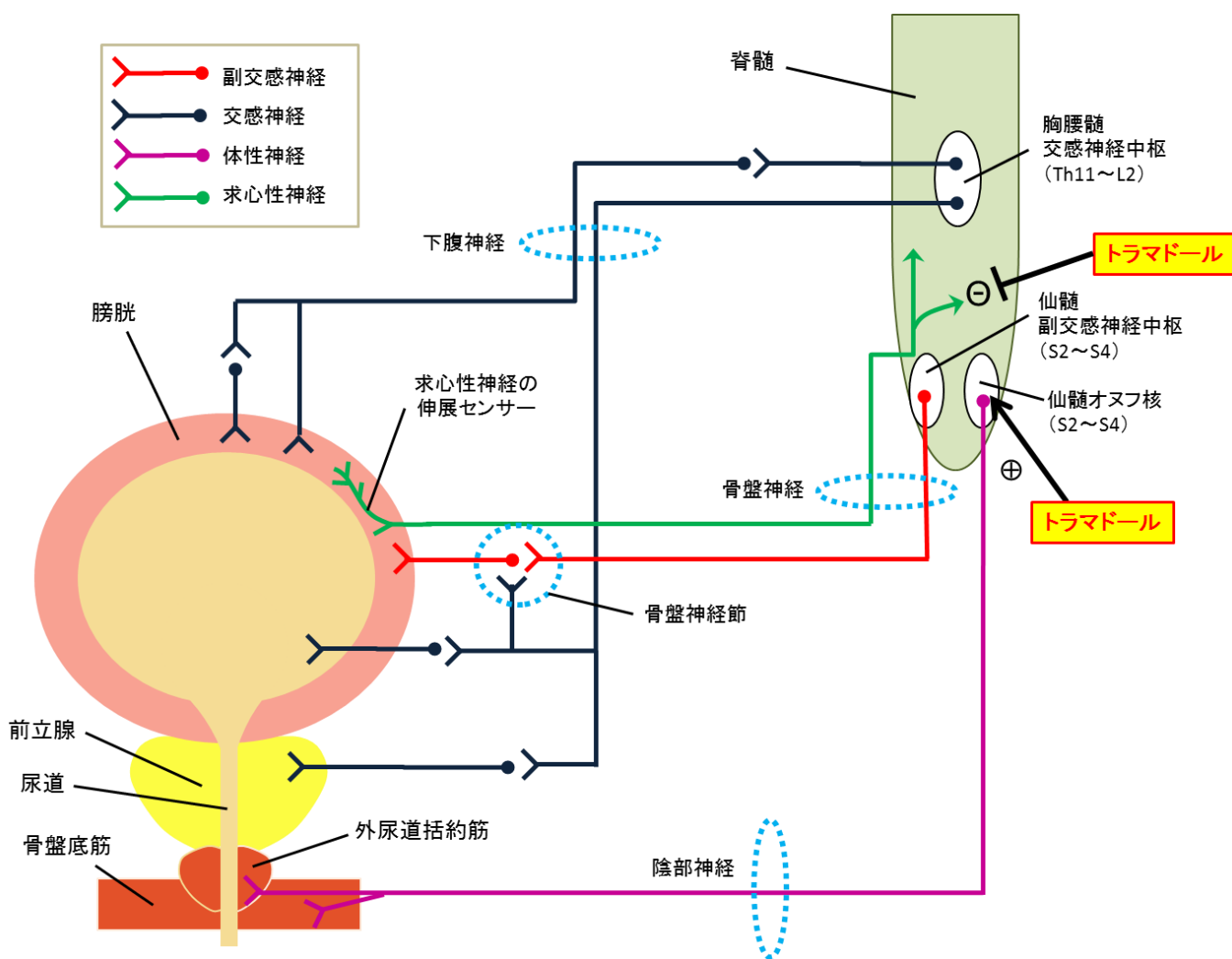


Fig. 2 Predictable schema shows the role of tramadol in micturition reflex.

実験の部

使用動物

- 一連の動物実験は動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、平成 18 年 6 月 1 日最終改正）に基づき定められた日本新薬の動物実験に関する社内規程に従い実施した。
- 実験には ICR 系雄性マウス（日本エスエルシー株式会社、浜松市）及び Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット（日本エスエルシー株式会社、浜松市）を用いた。マウス及びラットには固形試料（F-2：フナバシファーム、船橋市）および水道水を自由に摂取できるようにして飼育した。

試薬類

- トラマドール塩酸塩（Grünenthal GmbH, Aachen, Germany より譲渡）
- ナロキソン（naloxone hydrochloride dehydrate; SIGMA-ALDRICH, MO, USA）
- ウレタン（SIGMA-ALDRICH, MO, USA）
- シクロホスファミド（CP: cyclophosphamide monohydrate; 和光純薬、大阪）
- 蒸留水（大塚製薬工場、徳島）
- 生理食塩液（大塚製薬工場、徳島）
- 塩酸モルヒネ（morphine hydrochloride; 大日本製薬（現大日本住友製薬）、大阪）
- 5%グルコース溶液（大塚糖液 5%、大塚製薬工場、徳島）
- 塩酸デュロキセチン（日本新薬株式会社、京都）
- WAY-161503（Tocris bioscience, UK）

機器・実験用品類

- 濾紙（CHROMATOGRAPHY PAPER No.50、東洋濾紙）
- ビデオ（NV-GS50, Panasonic）
- 電子天秤（AX120, SHIMADZU）
- インフュージョンポンプ（STC-521, TERUMO）
- 圧トランスデューサー（DX-360、インターフェースケーブル G-IFCN L296、日本光電）
- カニューレ（ポリエチレンチューブ PE60）

- 歪圧力アンプ (AP-621G、日本光電)
- レクチャーダー (RJG-4124、日本光電)
- SAS プログラム (Ver.8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- 電気刺激装置 (SEN-3301、日本光電)
- マイクロチップ圧トランスデューサー (3-Fr , SPC-330, Miller)
- 尿道内圧測定用引き抜き装置 (KU-601G、日本光電)
- 尿道内圧コントロールモジュール (AU-601G、日本光電)
- トランスデューサーコントロールユニット (TC-500, Miller)
- 歪圧力アンプ (AP-621G、日本光電)
- レクチャーダー (RJG-4124、日本光電)
- 圧トランスデューサー (TP-400T、日本光電)

実験方法

マウス CP 誘発膀胱炎モデルにおける疼痛行動観察、排尿回数および膀胱重量の測定

生理食塩液または CP (100, 200, 300, 400 mg/kg) を腹腔内投与した 3 時間後、濾紙を敷いたプラスチック製の観察ケージ (W20 cm×D25 cm×H14 cm) に動物を置き、1 時間馴化させた。馴化後、新しい濾紙に交換し、15 分間の疼痛行動観察およびビデオでの撮影を実施した。被験物質は観察直前に静脈内投与 (10 ml/kg) した。疼痛行動の観察では、5 項目の疼痛関連行動 (目の開き、うずくまり、腹這い歩行、排尿時行動、腹舐め行動) を事前検討の結果と過去の報告を基に決定し、以下の基準でそれぞれ 10 点満点 (合計 50 点) としてスコア化した。目の開き (正常 0 点、時々閉じるまたは半目になる 5 点、完全に閉じる 10 点)、うずくまり (正常 0 点、時々うずくまる 5 点、ほとんどの時間うずくまっている 10 点)、腹這い歩行 (正常 0 点、腹這い歩行 10 点)、排尿時行動 (正常 0 点、排尿時に尻を震わせる 10 点)、腹舐め行動 (0-3 回 0 点、4-10 回 5 点、11 回以上 10 点)。観察終了後、ビデオを再生し、排尿動態の指標として濾紙上への排尿回数を測定した。試験終了後、頸椎脱臼にて安楽死させた後に膀胱を摘出し、膀胱湿重量を電子天秤にて計測した。

ラット CP 誘発膀胱炎モデルにおける膀胱内圧測定 (シストメトリー)

生理食塩液または CP 150 mg/kg は、シストメトリー試験前日 (約 18 時間前) に腹腔内投与した。ウレタン (0.9 g/kg, s.c.) 麻酔下、動物を背位に固定し腹部を切開した。両側の尿管を膀胱側で縛り腎臓側を切断した後、膀胱頂部に灌流ポンプと圧トランスデューサーに接続

された注射針付きのカニューレを挿入した。生理食塩液を早送りして結紮した部分から漏れずに排尿することを確認し、一旦、膀胱内の生理食塩液を排出した。3 mL/h または 6 mL/h の一定の流速で生理食塩液を膀胱に連続的に灌流し、膀胱内圧を歪圧力アンプで増幅してレクチコーダーに記録した。約 1 時間後、排尿間隔が安定していることを確認した後、被験物質を投与する場合には被験物質を大腿部静脈より静脈内投与した。被験物質投与前、及び被験物質投与後、15 分毎に 120 分まで、それぞれ連続する 3 回の排尿反射を選択し、排尿間隔と排尿時の最大膀胱収縮圧をチャート上で計測し、その平均をそれぞれの時点における排尿間隔、排尿時最大膀胱収縮圧とした。被験物質を投与した場合には、被験物質投与前を 0% とした被験物質投与後の変化率の平均値±標準誤差を求めた。

ラット尿道内圧の測定

ラットをウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、固定台に背位に固定した。下腹部を正中切開した後、膀胱を露出させ、膀胱を軽く押さえて膀胱内貯留尿を体外へ排出させた後、両側の尿管を切断した。3-Fr マイクロチップ圧トランスデューサー (SPC-330、Miller) を外尿道口から膀胱内へ挿入し、尿道内圧測定用引き抜き装置 (KU-601G、日本光電) 及び尿道内圧コントロールモジュール (AU-601G、日本光電) を用いて、一旦膀胱頸部から尿道口まで引き抜いた。再度、トランスデューサーを膀胱内へ挿入し、遠位尿道部まで引き抜き、留置した。尿道内圧は、トランスデューサーコントロールユニット (TC-500、Miller) を介して歪圧力アンプ (AP-621G、日本光電) により増幅させた後、レクチコーダー (RJG-4124、日本光電) に記録した。安定した尿道内圧が得られたことを確認した後、被験物質を静脈内投与し、投与前後における尿道内圧の変化を記録した。

ラット漏出時膀胱閾値圧の測定

動物をウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、脊髄を T8-T9 レベルで切断することにより排尿反射を消失させた後、背位に固定し、歪圧力トランスデューサー (TP-400T、日本光電) と生理食塩液で満たした注射筒に繋がっているカニューレ (ポリエチレンチューブ PE50) を挿入した。カニューレから膀胱に約 0.4 mL の生理食塩液を注入した状態で、二本の綿棒を用いて膀胱を両側からゆっくりと圧迫し、尿道口から生理食塩液が漏れた時の膀胱閾値圧 (leak point pressure; LPP) を歪圧力アンプ (AP-621G、日本光電) で増幅してレクチコーダー (RJG-4124、日本光電) に記録した。LPP が安定するまで数回計測を繰り返した後、被験物質を静脈内に投与し、10 分毎に 30 分間または 60 分間(それぞれ、計 3 回または 6 回)測定を行った。

ラット漏れ量の測定

ラットをウレタン 1.2 g/kg 皮下投与にて麻酔し、脊髄を T8 - T9 レベルで切断することにより排尿反射に関わる上位中枢からの神経路を遮断、排尿反射を消失させた後、腹部横隔膜付近の筋肉（腹筋）に左右 2 箇所電気刺激電極を固定した。腹部を約 1 cm 正中切開し、尿管を結紮した後、近位 5 mm のところで尿管を切断した。さらに膀胱頂部からカニューレを挿入した後、切開部分から圧が漏れないように腹部を縫合した。カニューレから膀胱に約 1 mL の生理的食塩液を注入し、この状態で一定量の生理的食塩液が漏れる電気刺激条件を検討した。電気刺激によって漏れた生理的食塩液は濾紙に染み込ませ、電子天秤で重量を測定し、比重を 1.0 として計算、すなわち 1 g の漏れた生理的食塩液を 1 mL としてその量を LV とした。薬物による LV 変化を捉えやすくするため、LV が 10 - 20 μ L となるように個体ごとに電気刺激条件を固定し、LV が安定するまで数回計測を繰り返した後被験物質を静脈内投与し、10 分毎に 60 分間（計 6 回）LV の測定を行った。また同時に、電気刺激時の膀胱内圧の測定も行った。膀胱内量は 1 試験毎に調節し、1 試験中は膀胱への生理的食塩液の追加は行わなかった。

引用文献

- 1 Grond S, Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 879-923.
- 2 Hirouchi M, Tanaka M, Nishimura T. Pharmacological profiles and clinical roles of tramadol hydrochloride (Tramal® capsules 25 mg・50 mg) in the treatment of cancer pain. *Nippon Yakurigaku Zasshi (Folia Pharmacol Jpn)* 2011; 137: 189-197 [in Japanese with English abstract].
- 3 Lai J, Ma SW, Porreca F, Raffa RB. Tramadol, M1 metabolite and enantiomer affinities for cloned human opioid receptors expressed in transfected HN9.10 neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol* 1996; 316: 369-372.
- 4 Frink MC, Hennies HH, Englberger W, Haurand M, Wilffert B. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung* 1996; 46: 1029-1036.
- 5 Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260: 275-285.
- 6 Minami K, Uezono Y, Ueta Y. Pharmacological aspects of the effects of tramadol on G-protein coupled receptors. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 253-60.
- 7 トラマールカプセル 25 mg・50 mg 申請資料概要, 新薬の承認に関する情報 平成 22 年 7 月承認分
- 8 Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 2006; 51: 651-658.
- 9 de Groat WC. Integrative control of the lower urinary tract: preclinical perspective. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 2: S25-40.
- 10 Pehrson R, Andersson KE. Tramadol inhibits rat detrusor overactivity caused by dopamine receptor stimulation. *J Urol* 2003; 170: 272-275.

- 11 Pehrson R, Stenman E, Andersson KE. Effects of tramadol on rat detrusor overactivity induced by experimental cerebral infarction. *Eur Urol* 2003; 44: 495-499.
- 12 Pandita RK, Pehrson R, Christoph T, Friderichs E, Andersson KE. Actions of tramadol on micturition in awake, freely moving rats. *Br J Pharmacol* 2003; 139: 741-748.
- 13 Singh SK, Agarwal MM, Batra YK, Kishore AV, Mandal AK. Effect of lumbar-epidural administration of tramadol on lower urinary tract function. *Neurourol Urodyn* 2008; 27: 65-70.
- 14 Fraser MO, Chancellor MB. Neural control of the urethra and development of pharmacotherapy for stress urinary incontinence. *Br J Urol* 2003; 91: 743-748.
- 15 Hampel C, Wienhold D, Benken N, Eggersmann C, Thuroff JW. Definition of overactive bladder and epidemiology of urinary incontinence. *Urology* 1997; 50: 4-14.
- 16 Rodríguez LV, Chen S, Jack GS, de Almeida F, 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: R1332-R1338.
- 17 Leppert W, Luczak J. The role of tramadol in cancer pain treatment-a review. *Support Care Cancer* 2005; 13: 5-17.
- 18 Leppert W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 978-992.
- 19 Harati Y, Gooch C, Swenson M, Edelman S, Greene D, Raskin P, Donofrio P, Cornblath D, Sachdeo R, Siu CO, Kamin M. Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy. *Neurology* 1998; 50: 1842-1846.
- 20 Boureau F, Legallicier P, Kabir-Ahmadi M. Tramadol in post-herpetic neuralgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain* 2003; 104: 323-331.

- 21 Hollingshead J, Duhmke RM, Cornblath DR. Tramadol for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 3: CD003726.
- 22 Oliva P, Aurilio C, Massimo F, Grella A, Maione S, Grella E, Scafuro M, Rossi F, Berrino L. The antinociceptive effect of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. *Eur J Pharmacol* 2002; 445: 179-185.
- 23 Tsai YC, Sung YH, Chang PJ, Kang FC, Chu KS. Tramadol relieves thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 335-340.
- 24 Stillwell TJ, Benson RC, Jr. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A review of 100 patients. *Cancer* 1988; 61: 451-457.
- 25 Chaviano AH, Gill WB, Ruggiero KJ, Vermeulen CW. Experimental cytoxan cystitis and prevention by acetylcysteine. *J Urol* 1985; 134: 598-600.
- 26 Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2045-2049.
- 27 Grinberg-Funes DJ, Sheldon C, Weiss M. The use of prostaglandin F2 alpha for the prophylaxis of cyclophosphamide induced cystitis in rats. *J Urol* 1990; 144: 1500-1504.
- 28 Olivar T, Laird JM. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflammation. *Eur J Pain* 1999; 3: 141-149.
- 29 Bon K, Lanteri-Minet M, de Pommery J, Michiels JF, Menetrey D. Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats. A survey of hindbrain structures involved in viscerosception and nociception using the expression of c-Fos and Krox-24 proteins. *Exp Brain Res* 1996; 108: 404-416.
- 30 Boucher M, Meen M, Codron JP, Coudore F, Kemeny JL, Eschalier A. Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. *J Urol* 2000; 164: 203-208.
- 31 Wantuch C, Piesla M, Leventhal L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. *Neurosci Lett* 2007; 421: 250-252.

- 32 Joshi SK, Mikusa JP, Weaver B, Honore P. Morphine and ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist) exert centrally mediated antinociception in the rat cyclophosphamide cystitis model of visceral pain. *J Pain* 2008; 9: 146-156.
- 33 Smaldone MC, Vodovotz Y, Tyagi V, Barclay D, Philips BJ, Yoshimura N, Chancellor MB, Tyagi P. Multiplex analysis of urinary cytokine levels in rat model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Urology* 2009; 73: 421-426.
- 34 Abelli L, Conte B, Somma V, Maggi CA, Giuliani S, Meli A. A method for studying pain arising from the urinary bladder in conscious, freely-moving rats. *J Urol* 1989; 141: 148-151.
- 35 Craft RM, Henley SR, Haaseth RC, Hrubby VJ, Porreca F. Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 1535-1542.
- 36 Saitoh C, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Effects of intravesical instillation of resiniferatoxin on bladder function and nociceptive behavior in freely moving, conscious rats. *J Urol* 2008; 179: 359-364.
- 37 Sugino Y, Kanematsu A, Hayashi Y, Haga H, Yoshimura N, Yoshimura K, Ogawa O. Voided stain on paper method for analysis of mouse urination. *Neurourol Urodyn* 2008; 27: 548-552.
- 38 Hacker MP, Ershler WB, Newman RA, Gamelli RL. Effect of disulfiram (tetraethylthiuram disulfide) and diethyldithiocarbamate on the bladder toxicity and antitumor activity of cyclophosphamide in mice. *Cancer Res* 1982; 42: 4490-4494.
- 39 Warren JW, Brown J, Tracy JK, Langenberg P, Wesselmann U, Greenberg P. Evidence-based criteria for pain of interstitial cystitis/painful bladder syndrome in women. *Urology* 2008; 71: 444-448.
- 40 Dursteler C, Miranda HF, Poveda R, Mases A, Planas E, Puig MM. Synergistic interaction between dexamethasone and tramadol in a murine model of acute visceral pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 515-520.
- 41 Kontani H, Kawabata Y. A study of morphine-induced urinary retention in anesthetized rats capable of micturition. *Jpn J Pharmacol* 1988; 48: 31-36.

- 42 Malinovsky JM, Le Normand L, Lepage JY, Malinge M, Cozian A, Pinaud M, Buzelin JM. The urodynamic effects of intravenous opioids and ketoprofen in humans. *Anesth Analg* 1998; 87: 456-461.
- 43 Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G. Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2005; 48: 252-263.
- 44 Steers WD, Herschorn S, Kreder KJ, Moore K, Strohbehn K, Yalcin I, Bump RC. Duloxetine compared with placebo for treating women with symptoms of overactive bladder. *BJU Int* 2007; 100: 337-345.
- 45 Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61: 37-49.
- 46 Hunskaar S, Burgio K, Diokno A, Herzog AR, Hjalmas K, Lapitan MC. Epidemiology and natural history of urinary incontinence in women. *Urology* 2003; 62: 16-23.
- 47 Dannecker C, Anthuber C. The effects of childbirth on the pelvic-floor. *J Perinat Med* 2000; 28: 175-184.
- 48 Hannestad YS, Rortveit G, Daltveit AK, Hunskaar S. Are smoking and other lifestyle factors associated with female urinary incontinence? The Norwegian EPINCONT Study. *BJOG* 2003; 110: 247-254.
- 49 Lang JH, Zhu L, Sun ZJ, Chen J. Estrogen levels and estrogen receptors in patients with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse. *Int J Gynaecol Obstet* 2003; 80: 35-39.
- 50 Smith PP, McCrery RJ, Appell RA. Current trends in the evaluation and management of female urinary incontinence. *CMAJ* 2006; 175: 1233-1240.
- 51 Zinner NR, Koke SC, Viktrup L. Pharmacotherapy for stress urinary incontinence : present and future options. *Drugs* 2004; 64: 1503-1516.

- 52 Conway DA, Kamo I, Yoshimura N, Chancellor MB, Cannon TW. Comparison of leak point pressure methods in an animal model of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005; 16: 359-363.
- 53 Kamo I, Hashimoto T. Involvement of reflex urethral closure mechanisms in urethral resistance under momentary stress condition induced by electrical stimulation of rat abdomen. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293: F920-926.
- 54 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: F639-646.
- 55 Hijaz A, Daneshgari F, Sievert KD, Damaser MS. Animal models of female stress urinary incontinence. *J Urol* 2008; 179: 2103-2110.
- 56 Kamo I, Kaiho Y, Canon TW, Chancellor MB, de Groat WC, Prantil RL, Vorp D A, Yoshimura N. Functional analysis of active urethral closure mechanisms under sneeze induced stress condition in a rat model of birth trauma. *J Urol* 2006; 176: 2711-2715.
- 57 Kamo I, Torimoto K, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Urethral closure mechanisms under sneeze-induced stress condition in rats: a new animal model for evaluation of stress urinary incontinence. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R356-365.
- 58 Nitti VW. Duloxetine: a new pharmacologic therapy for stress urinary incontinence. *Rev Urol* 2004; 6 Suppl 3: S48-55.
- 59 Brune ME, O'Neill AB, Gauvin DM, Katwala SP, Altenbach RJ, Brioni JD, Hancock AA, Sullivan JP. Comparison of alpha 1-adrenoceptor agonists in canine urethral pressure profilometry and abdominal leak point pressure models. *J Urol* 2001; 166: 1555-1559.
- 60 Rosenzweig-Lipson S, Zhang J, Mazandarani H, Harrison BL, Sabb A, Sabalski J, Stack G, Welmaker G, Barrett JE, Dunlop J. Antiobesity-like effects of the 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-161503. *Brain Res* 2006; 1073-1074: 240-251.
- 61 Thor KB, 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: 1014-1024.
- 62 Thor KB, Nickolaus S, Helke CJ. Autoradiographic localization of 5-hydroxytryptamine1A, 5-hydroxytryptamine1B and 5-hydroxytryptamine1C/2 binding sites in the rat spinal cord. *Neuroscience* 1993; 55: 235-252.
- 63 Mbaki Y, Ramage AG. Investigation of the role of 5-HT₂ receptor subtypes in the control of the bladder and the urethra in the anaesthetized female rat. *Br J Pharmacol* 2008; 155: 343-356.
- 64 Koelbl H, Mostwin J, Boiteux JP. *Pathophysiology. Incontinence*. Plymouth: Health Publication Ltd. 2002; 205-241.
- 65 Siltberg H, Victor A, Larsson G. Pad weighing tests: the best way to quantify urine loss in patients with incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1997; 166: 28-32.
- 66 Price DM, Noblett K. Comparison of the cough stress test and 24-h pad test in the assessment of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J* 2012; 23: 429-433.
- 67 Rogers RG. What's best in the treatment of stress urinary incontinence? *N Engl J Med* 2010; 362: 2124-2125.
- 68 Oyama T, Homan T, Kyotani J, Oka M. Effect of tramadol on pain-related behaviors and bladder overactivity in rodent cystitis models. *Eur J Pharmacol* 2012; 676: 75-80.
- 69 Kawai Y, Oyama T, Umehara M, Tanaka M. Leak urine volume induced by electric stimulation as a novel evaluation index for stress urinary incontinence in rats. *Nippon Hainyo Kino Gakkai Shi (J Jpn Neurogenic Bladder Soc)* 2008; 19: 214-219 [in Japanese with English abstract].
- 70 Jiang HH, Pan HQ, Gustilo-Ashby AM, Gill B, Glaab J, Zaszczurynski P, Damaser M. Dual simulated childbirth injuries result in slowed recovery of pudendal nerve and urethral function. *Neurourol Urodyn* 2009; 28: 229-235.

- 71 Crayton R, Soller W, Mattiasson A, Bossowska A, Borkowski T, Majewski M, Radziszewski P. Exogenously administered opioids contract the female rat intrinsic urethral sphincter in vivo. *Neurourol Urodyn* 2010; 29: 777-782.
- 72 Rawal N, Mollefors K, Axelsson K, Lingardh G, Widman B. An experimental study of urodynamic effects of epidural morphine and of naloxone reversal. *Anesth Analg* 1983; 62: 641-7.
- 73 Cannon TW, Damaser MS. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sci* 2001; 69: 1193-1202.
- 74 Glazer EJ, Basbaum AI. Leucine enkephalin: localization in and axoplasmic transport by sacral parasympathetic preganglionic neurons. *Science* 1980; 208: 1479-1481.
- 75 Crowe R, Burnstock G. A histochemical and immunohistochemical study of the autonomic innervation of the lower urinary tract of the female pig. Is the pig a good model for the human bladder and urethra? *J Urol* 1989; 141: 414-422.
- 76 Safarinejad MR, Hosseini SY. Safety and efficacy of tramadol in the treatment of idiopathic detrusor overactivity: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61: 456-463.
- 77 Christoph T, Kögel B, Strassburger W, Schug SA. Tramadol has a better potency ratio relative to morphine in neuropathic than nociceptive pain models. *Drugs R D* 2007; 8: 51-57.

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究の遂行に際してご指導とご鞭撻を賜り、かつご校閲を頂きました、熊本大学大学院 生命科学研究部 薬物活性学分野 香月 博志 教授に深く感謝いたします。また、本研究の審査にご尽力いただきました、熊本大学大学院 生命科学研究部 環境分子保健学分野 高濱 和夫教授、ならびに薬学生化学分野 杉本 幸彦 教授に心より厚く御礼申し上げます。

共同研究者として、本研究にご協力いただきました、日本新薬株式会社 創薬研究所 河合 裕子 修士、岡 美智子 博士、寶満 隆 修士、梅原 真人 修士、田中 充士 博士、京谷 純子 氏に深く感謝いたします。さらに、本研究に関して有益なご助言をいただきました、日本新薬株式会社 創薬研究所 Dr. Gerald .E. Smyth に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり多大なご支援、ご指導を戴きました日本新薬株式会社 研究開発本部 松浦 明 本部長、創薬研究所 向井 英也 所長、探索研究部 松岡 正人 部長、そして、探索研究部泌尿器・疼痛研究グループの皆様に感謝申し上げます。

最後に、終始暖かく見守り、応援してくれた家族に感謝致します。