Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第１６００号
学位記番号	第３２６号
氏名	山本 清司
授与年月日	平成 29 年 3 月 31 日
学位論文の題名	膀胱上皮における MR-ENaC シグナルに着目した蓄尿症状の病態解明
論文審査担当者	主査：　鈴木 匡 副査：　木村 和哲，肥田 重明，山村 壽男

名古屋市立大学学位論文

膀胱上皮における MR-ENaC シグナルに着目した 蓄尿症状の病態解明

平成 28 年度（2017 年 3 月）

名古屋市立大学大学院薬学研究科

医療機能薬学専攻

病院薬剤学分野

山本　清司

1. 本論文は、2017 年 3 月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査　鈴木　匡　　教授
副査　木村　和哲　教授
副査　肥田　重明　教授
副査　山村　寿男　准教授

2. 本論文は、学術雑誌に収載された次の報文を基礎とするものである。

1) Seiji Yamamoto, Yuji Hotta, Kotomi Maeda, Tomoya Kataoka, Yasuhiro Maeda, Takashi Hamakawa, Shoichi Sasaki, Takahiro Yasui, Kiyofumi Asai, Kazunori Kimura
Mineralocorticoid receptor stimulation induces urinary storage dysfunction via upregulation of epithelial sodium channel expression in the rat urinary bladder epithelium.
Journal of Pharmacological Sciences, **130**, 219-225 (2016)

2) Seiji Yamamoto, Yuji Hotta, Kotomi Maeda, Tomoya Kataoka, Yasuhiro Maeda, Takashi Hamakawa, Yasuhiro Shibata, Shoichi Sasaki, Shinya Ugawa, Takahiro Yasui, Kazunori Kimura
High salt loading induces urinary storage dysfunction via upregulation of epithelial sodium channel alpha in the bladder epithelium in Dahl salt-sensitive rats.
Journal of Pharmacological Sciences, **135**, 121-125 (2017)

3. 本論文の基礎となる研究は、木村和哲教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

略語 1

序章 2

第一章　ラット膀胱上皮における MR–ENaC 経路の膀胱機能への関与
第一節　背景 7
第二節　実験材料および方法 9
第三節　実験結果 15
第四節　考察 25

第二章　食塩感受性高血圧モデルラットを用いた蓄尿障害の機能解析
第一節　背景 29
第二節　実験材料および方法 31
第三節　実験結果 33
第四節　考察 40

総括 42

引用文献 43

謝辞 50

略語

ACh:	acetylcholine
ANOVA:	analysis of variance
ASIC:	acid-sensing ion channel
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DS rats:	Dahl salt-sensitive rats
DR rats:	Dahl salt-resistant rats
ENaC:	epithelial sodium channel
EPL:	eplerenone
FC:	fludrocortisones
HPMC:	hydroxypropyl methylcellulose
ICI:	intercontraction intervals
MP:	maximum intravesical pressure
MR:	mineralocorticoid receptor
mRNA:	messenger ribonucleic acid
PAGE:	poly-acrylamide gel electrophoresis
PBS:	phosphate buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PVDF:	polyvinylidene fluoride
RT-PCR:	reverse transcription polymerase chain reaction
SD rats:	Sprague-Dawley rats
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SHR:	spontaneously hypertensive rats
TBST:	tris-buffered saline tween-20
TCA:	trichloroacetic acid
TRP:	transient receptor potential

序章

腎臓から尿道へ尿が排泄される経路を尿路といい、腎臓から尿管までを上部尿路、膀胱から尿道までを下部尿路という。下部尿路の機能には、尿を膀胱に貯める蓄尿機能、および、膀胱から尿を排出する排尿機能がある。下部尿路症状とは、蓄尿や排尿に関係する症状を広く意味し下部尿路の機能障害に由来する症状を指す。下部尿路症状は以下の 3 種に大別される。一つ目は、蓄尿機能に障害が起きており、昼間頻尿、夜間頻尿、尿意切迫感および尿失禁などを呈する「蓄尿症状」、二つ目は、排尿機能に障害が起きており、排尿時の尿勢低下、尿線分割および排尿遅延などを呈する「排尿症状」、そして、排尿の直後にみられる残尿感や排尿後尿滴下を呈する「排尿後症状」である[1]。なかでも蓄尿症状は、下部尿路症状の中で最も患者の生活の質（QOL）を低下させるとされている。著しい高齢化が進んでいる現代社会において、下部尿路症状は大きな問題となっている。

2002 年 11 月から 2003 年 3 月にかけて、日本排尿機能学会によって行われた、我が国の 40 歳以上の男女 4480 人を解析対象者とした疫学調査により、60 歳以上においては約 78%が何らかの下部尿路症状を有していることが示された。今回我々が着目した蓄尿症状については、解析対象者全体のうち、約 70%が就寝時に 1 回以上排尿のために起床する必要がある夜間頻尿を訴え、約 50%が日中に 8 回以上の排尿がある昼間頻尿を訴えている（Fig. 1）[2]。また、昼間頻尿、

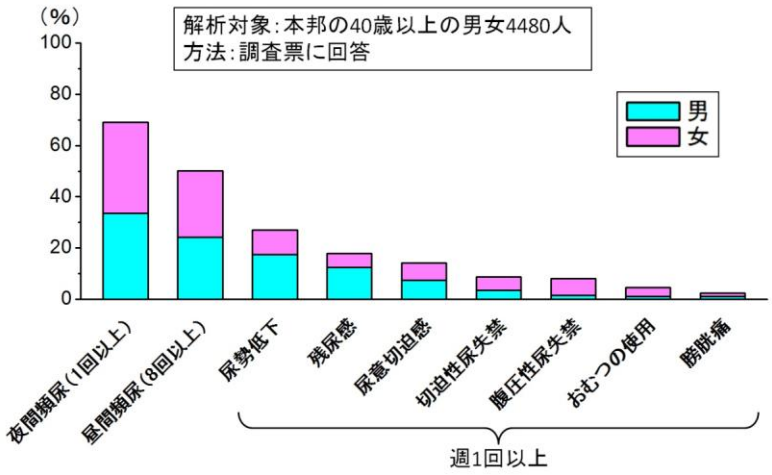


Fig. 1　本邦における下部尿路症状に関する疫学調査（参考文献２.改変）

夜に眠るために床に入ってから翌朝の離床までの間に排尿のために 1 回以上起きなければならないという愁訴を「夜間頻尿」、日中の排尿回数が多すぎるという愁訴を「昼間頻尿」という。本図では、日中の 8 回以上の排尿がある状態を昼間頻尿とした。また、尿の勢いが以前より相

対的に弱くなったという愁訴を尿勢低下、排尿後に完全に膀胱が空になっていない感じがするという愁訴を「残尿感」、予兆がなく唐突に起こり、抑えられないような強い尿意を感じ我慢することが困難であるという愁訴を「尿意切迫感」、尿意切迫感と同時または尿意切迫感の直後に、不随意に尿が漏れるという愁訴を「切迫性尿失禁」、労作時または運動時、もしくはくしゃみまたは咳の際に、腹部に圧力がかかった際に不随意に尿が漏れるという愁訴を「腹圧性尿失禁」という[2]。解析対象者のうち、約 70%が夜間頻尿を、約 50%が昼間頻尿を訴えていることがわかった。

夜間頻尿、尿勢低下、残尿感、膀胱痛、尿意切迫感、切迫性尿失禁、腹圧性尿失禁などの下部尿路症状のうち、ほとんどの症状において、男女ともに年齢が増加するにつれて頻度が上昇することが示されており、一例として夜間頻尿（1 回以上）に関して、Fig. 2 に年齢別の有症者の割合を示した[2]。

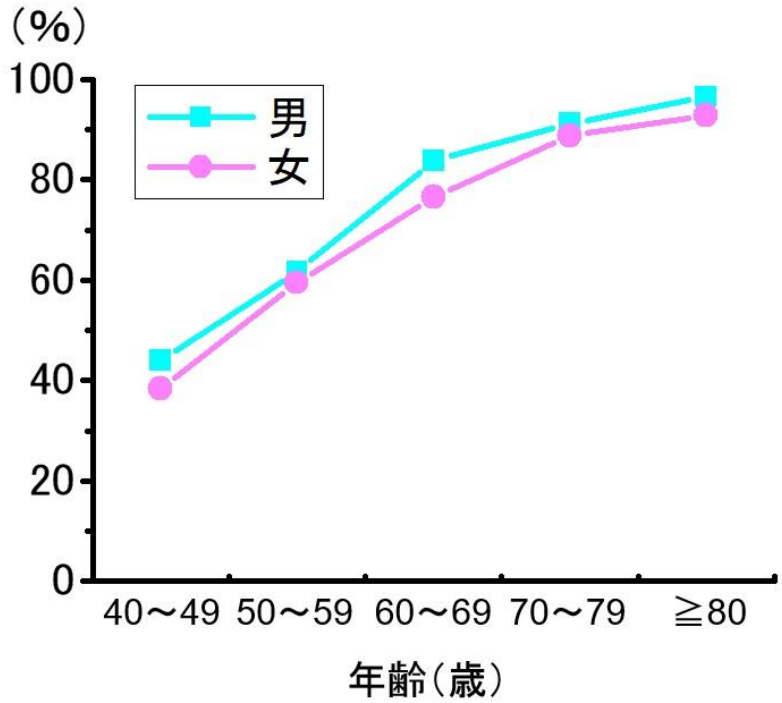


Fig. 2　本邦における夜間頻尿の有症者の割合（参考文献２.改変）

男女ともに、年齢の上昇とともに夜間頻尿を訴える有症者の割合は増加することがわかった。

膀胱壁は、大きく分けて、内腔側から粘膜、筋層、外膜／漿膜の 3 層から構成される。粘膜のうち、最も内腔側には膀胱上皮（移行上皮）が存在し、膀胱壁の拡張や収縮に応じてその厚みは変化し、尿の貯留量を変化させる（Fig. 3）[3]。従来、この膀胱上皮の役割は尿中の物質や微生物からの防御機能のみであ

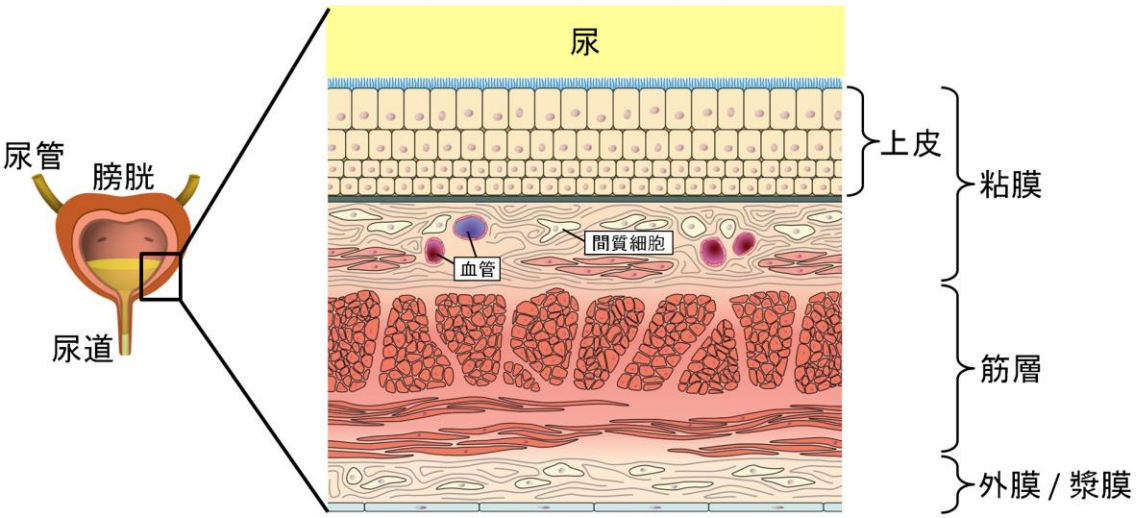


Fig. 3　膀胱壁の構造（参考文献 3 改変）

膀胱壁は内腔側から粘膜、筋層、外膜／漿膜の 3 層から構成される。粘膜の最も内腔側には膀胱上皮が存在し、膀胱壁の拡張や収縮に応じてその厚みは変化し、尿の貯留量を変化させる。

ると考えられてきたが、近年、中枢への尿意の伝達機構に対する役割を担うことが発見され、蓄尿機能にも影響を及ぼすとして重要視されている。すなわち、膀胱上皮には、膀胱壁の伸展、温度の変化、化学物質を感知するための様々な受容器が発現しており、上皮がそれらの刺激を感知すると、上皮細胞から、ATP、アセチルコリン（ACh）およびプロスタグランジン（PG）などの生理活性物質が放出され、これらの物質が上皮下に存在する知覚神経終末に作用し、尿意が中枢へ伝達される（Fig. 4）[3-5]。したがって、膀胱上皮の異常は、蓄尿症状を呈する疾患である間質性膀胱炎／膀胱痛症候群や過活動膀胱などの病態に関与すると考えられている[6]。

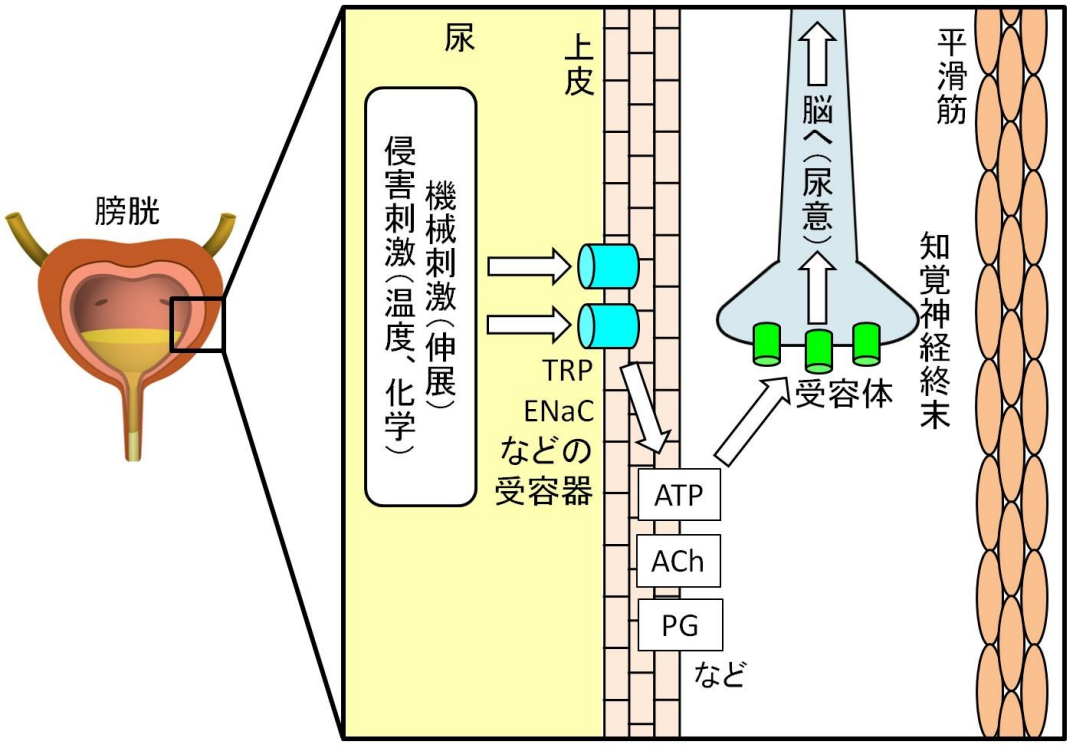


Fig. 4　膀胱上皮に着目した知覚伝達（参考文献 5 改変）

膀胱上皮には、機械刺激（膀胱壁の伸展）や侵害刺激を感知するための様々な受容器が発現しており、上皮がそれらの刺激を感知すると、上皮細胞から種々の生理活性物質が放出され、これらの物質が上皮下に存在する知覚神経終末に作用し、尿意が中枢へ伝達される。

膀胱上皮には、Epithelial sodium channel（ENaC）が機械受容器として発現しており、ENaC が膀胱壁の伸展を感知することで上皮細胞からの ATP 放出を介した膀胱の収縮に寄与することが報告されている[7]。一方、腎臓の遠位ネフロンの上皮細胞においては、ENaC は Na^+の再吸収に関わり、体液量や血圧の維持に寄与する。ENaC の発現量や活性は Mineralocorticoid receptor（MR）により調節されていることが知られている[8]。しかし、これまでに、哺乳類の膀胱における MR の発現は報告されておらず、MR-ENaC 経路が膀胱機能に与える影響については未解明である。そこで、本研究において、第一章では、膀胱における MR の発現解析と、MR–ENaC 経路の膀胱機能への関与について検討した。第二章では、蓄尿障害モデルの一つである食塩感受性高血圧モデル Dahl salt-sensitive rat（DS ラット）を用いて、蓄尿障害に MR–ENaC 経路が関与するか検討した。

第一章

ラット膀胱上皮における

MR–ENaC 経路の膀胱機能への関与

第一節　背景

過活動膀胱の治療には、行動療法、薬物療法および外科的治療法などが用いられるが、薬物療法はその治療の根幹をなすものである。過活動膀胱に伴う頻尿、尿意切迫感および尿失禁などの蓄尿症状に対し、現状の薬物療法としては、イミダフェナシン、ソリフェナシン、トルテロジンおよびプロピベリンなどの抗コリン薬が主に用いられる[9, 10]。しかしながら、効果不十分な症例が多数存在する[10]。また、その抗コリン作用を起因とした口渇、便秘および排尿障害といった副作用の発現が、患者の服薬アドヒアランスを良好に維持することができない要因となっている[11, 12]。また、国際的には 2011 年 7 月より、過活動膀胱の治療薬としては新規の作用機序である選択的アドレナリンβ_3 受容体刺激作用を有するミラベグロンが承認され、上市されたが[13]、依然として治療に難渋する症例が存在する。したがって、新規のメカニズムを有する治療薬の開発が必要である。

膀胱上皮には、温度、化学物質および機械刺激に反応する受容器が発現していることが近年明らかにされており[3, 4]、膀胱機能障害の要因として、膀胱上皮の構造的変化や、膀胱上皮細胞に発現する種々のタンパク質の発現変化、および、細胞内シグナル伝達の変化などが関与することが知られている[6, 14]。膀胱の伸展による機械刺激を感知する機械受容器として、非選択性陽イオンチャネルである transient receptor potential（TRP）チャネル（TRPV2、TRPM7、TRPA1）、プリン受容体（P2X、P2Y）、および上皮性ナトリウムチャネル（ENaC）などのイオンチャネルが発現していることが報告されている[4, 15]。ラットの膀胱上皮に発現する ENaC は、膀胱の伸展を感知し、粘膜からの ATP 放出の役割を担っていることが報告されている[7]。さらに、下部尿路閉塞を伴う前立腺肥大症患者において、国際前立腺症状スコアのうちの蓄尿症状スコアと ENaC の mRNA 発現量には有意な相関があったことが報告されている[16]。

ENaC は、1990 年代初頭に発見された線虫（*Caenorhabditis elegans*）の機械刺激受容の役割を持つタンパク質である degenerin をコードする遺伝子と高い相同性を持つ遺伝子群である DEG/ENaC 遺伝子ファミリーに属し、Na^+を選択的に輸送するイオンチャネルである[17]。ENaC を構成するサブユニットには、α、β、γ、δサブユニットが同定されているが、δサブユニットはヒトにおいてのみ発現しており、生理的、病態的役割は解明されていない。正常な ENaC は、α、β、γサブユニットが会合したヘテロマーであることが報告されているが、会合する各サブユニットの数については諸説あるが、2:1:1の比で会合した4量体として機能するという説が最も有力であると考えられる[18]。チャネルポアの形成

にはαサブユニットが最も重要な役割を果たし、βおよびγサブユニットは、チャネル活性を亢進するための補助的な役割を果たす[19]。

1960 年代、オオヒキガエルの膀胱において副腎皮質ステロイド作用を媒介する特定の受容体があることが提唱され、1970 年代になり、その実体は MR であると同定された。その後、MR はラット腎臓における Na^+再吸収において、主要な制御因子であることが示され、ヒトを含む様々な種でクローニングされた[8]。

腎臓の遠位ネフロンや、遠位結腸、および胎生期のⅡ型肺胞において、ENaC の発現量や活性は MR により調節されている。特に腎臓においては、MR に関する研究がさかんに行われている。MR と、内在性のミネラロコルチコイドであるアルドステロンが結合すると、ENaC の細胞膜上での活性の維持や発現量の上昇を促し、ENaC からナトリウムが再吸収されることで体液量や血圧を維持することが知られている[8, 20, 21]。

また、ヒキガエルの膀胱を用いた研究では、アルドステロンが MR に結合し、粘膜側から漿膜側への一方向性の、アミロライド感受性の Na^+輸送を亢進させることが報告されている[22]。しかし、哺乳類の膀胱における MR の発現やその機能については現在までに報告されていない。本研究では、哺乳類の膀胱における MR の発現を解析し、さらに、MR の刺激薬として合成ミネラロコルチコイドであるフルドロコルチゾンや ENaC の阻害薬であるアミロライドを用いて MR-ENaC 経路が膀胱においてどのような役割を担うのか検討した。

第二節　実験材料および方法

1．使用動物および組織の摘出

10～12 週齢、雄性、Sprague-Dawley (SD) ラット(SLC, Hamamatsu, Japan)を用いた。動物は、温度および湿度が、それぞれ 23±2℃および 50±10%になるようにコントロールされた部屋で、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 h 毎の明暗サイクルで飼育した。

組織を摘出する際には、ラットをイソフルラン(Wako, Osaka, Japan)で安楽死させてから行った。摘出した組織は reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法や蛍光免疫染色法に用いた。なお、本研究の実験計画は、名古屋市立大学動物実験委員会によって承認され、遂行した。

2．遺伝子学的検討

2-1．組織からの total RNA の抽出

ラットから摘出した尿管や腎盂を含まない腎実質、および、膀胱から、ISOGEN reagent (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて、添付のプロトコールに従い total RNA を抽出した。得られた RNA 溶液の 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、濃度と純度を測定した。260 nm の吸光度を 280 nm の吸光度で除した値が 1.8 以上であったサンプルについてのみ逆転写反応に使用した。

2-2．cDNA の合成

得られた total RNA 1 μg から、ReverTra Ace-α-キット®(Toyobo, Osaka, Japan)を用いて、添付のプロトコールに従い、table 1 の組成で Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA)を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は 42℃ 20 min、99℃ 5 min の条件で行った。合成した cDNA は滅菌精製水で 5 倍に希釈し－20℃で保存した。

Table 1　Composition of reverse transcription

materials	volume	
RNase free water	12.4 － X	μL
5×RT Buffer	4	μL
dNTP mixture (10 mM)	2	μL
RNase Inhibitor (10 U/μL)	0.3	μL
Oligo(dT)20 (10 pmol/μL)	1	μL
Total RNA (1 μg)	X	μL
ReverTra Ace® (10 U/μL)	0.3	μL
Total Volume	20	μL

2-3. RT-PCR（reverse transcriptase-polymerase chain reaction）

ラット MR（official symbol：Nr3c2、accession number：NM_013131）を検出するために、RT-PCR に用いたプライマーの配列は、センスプライマーとして、 5′-GTGGACAGTCCTTTCACTACCG-3′、アンチセンスプライマーとして、5′ -TGACACCCAGAAGCCTCATCTC-3′ であり、PCR 産物は 286 bp となるよう設計した。プライマーの特異性はラットのゲノムのデータベースを用いて BLAST search により確認した。

cDNA は AmpliTaq Gold DNA Polymerase in Buffer II と $MgCl_2$ (Applied Biosystems)とともに混ぜ、プライマーを加え、Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems)を用いて PCR を行った。反応は 1 サイクル 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s の条件で 35 サイクル行い、前後の反応は 95℃ 10 min、72℃ 7 min の条件で行った。cDNA を加えない反応液を陰性対照とした。得られた PCR 産物は 2%アガロースゲルにマウントし、泳動した後、ethidium bromide で染色し、FAS-III (Toyobo)を用いて紫外線を照射し撮影した。さらに、得られた PCR 産物の塩基配列をシークエンス解析により同定し、データベース上の Nr3c2 gene の塩基配列との相同性を確認した。

2-4. real-time PCR

MR の mRNA 発現量を解析するための real-time PCR 解析に用いたプライマーは、センスプライマーとして、 5′-TGATTGACAGTTGGTCGGCA-3′、アンチセンスプライマーとして、5′ -TGGGAGTGGAGAGGGAAGAGT-3′ である。各 primer は、sense primer と antisense primer が 5 μM となるよう調整した。Table 2 に示す組成にて ABI Prism7300 (Applied Biosystems)を用いて

real-time PCR を行った。反応条件は 50℃ 2 min、95℃ 10 min、95℃ 15 sec、60℃ 1 min (40 cycle)で行った。解析には⊿⊿Ct 法を用いて GAPDH との比で比較した。

Table 2　Composition of real-time PCR

cDNA	2 μL
primer (5 μM)	2 μL
POWER SYBR® PCR MASTER MIX	10 μL
milli Q	6 μL
Total volume	20 μL

3. 蛍光免疫染色

Fig.7 において、SD ラットから摘出した組織は、4%パラホルムアルデヒド溶液中で一晩静置し固定した。固定後 10%、20%、30%スクロース溶液に順次、それぞれ 12 h 以上静置し、スクロース置換を行った。その後、組織を O.C.T. compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) を用いて包埋し、液体窒素を用いて凍結した。凍結したサンプルは解析に用いるまで、－80℃で保存した。凍結したサンプルから、厚さ 10 μm の組織切片を作製し、スライドガラスに乗せ、phosphate buffered saline（PBS）溶液で洗浄し、5% skim milk in PBS 中で 1～2 h インキュベートし、1 次抗体の非特異的結合をブロッキングした。PBS で洗浄した後、一次抗体として、goat anti-MR polyclonal antibody (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)を用いて 30 min、または、rabbit anti-ENaC-α polyclonal antibody (1:200, Bioss, Woburn, USA)を用いて一晩インキュベートした。MR の可視化には Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) antibody (1:250, Molecular Probes, Eugene, USA)を用いて 30 min、ENaCαの可視化には、Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody (1:250, Molecular Probes)を用いて 30 min インキュベートした。そして細胞核を染色するために Cellstain DAPI solution (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)で 3～5 min インキュベートした。

Fig.13 において、摘出した組織に対しては、10%ホルムアルデヒド溶液中で一晩静置し固定し、70%エタノール中に保存した状態で、パラフィンブロックの作製を奈良病理研究所に依頼した。ブロックより厚さ 4 μm の組織切片を作製した。切片を Hemo-De にて脱パラフィンし、100%、90%、80%、70%エタノールを用いて順次、再水和を行い、10 mM TCA (trichloroacetic acid)でマイク

ロウェーブによる抗原の賦活化を行った。5% skim milk in PBS で 1 h 室温にて一次抗体の非特異的結合をブロッキングした。一次抗体の製品と濃度は上述したものを用い、両者を IMMUNO SHOT Reagent 1 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)中で混ぜて 4℃で一晩インキュベートした。可視化するための二次抗体として、Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) antibody (1:250)および Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody (1:1000, Molecular Probes)を IMMUNO SHOT Reagent 2 中で混ぜ、30 min インキュベートした。

一次抗体を用いずに同様のプロトコールを行ったものを陰性対照とした。

蛍光画像の撮影には、倒立顕微鏡（Eclipse Ti-U, Nikon, Tokyo, Japan)を用い、画像統合ソフトウェア NIS-Elements BR Ver3.22.14（64bit 版）(Nikon)を用いた。

なお、ENaC がイオンチャネルとして機能するためには、チャネルポアを構成するαサブユニットの発現が不可欠であるため[23]、本研究においては、ENaC の指標としてαサブユニットを選択した。

4. MR 刺激モデルおよび MR 阻害モデルの作製

SD ラットに、vehicle として 1%ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）(Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)を投与した群を Control 群、1% HPMC に懸濁した、合成ミネラロコルチコイドであるフルドロコルチゾン（FC）を 6 mg/kg/day の投与量[24, 25]で投与した群を FC 群とした。投与は 1 日 1 回、3 日間の経口投与で行い、4 日目に各種膀胱機能の評価を行った。

さらに、MR の膀胱機能への関与について検討するため、上述と同様の Control 群と FC 群に加え、MR 以外のステロイド受容体に対する作用が比較的弱い選択的 MR 阻害薬であるエプレレノン（EPL）を、FC と同時に 1% HPMC に懸濁し、75 mg/kg/day の投与量[26]で 1 日 1 回 3 日間投与した FC+EPL 群を作製し、生理食塩液のみを用いた膀胱内圧測定を行った。

5. 全身血圧、心拍数および膀胱重量の測定

全身血圧および心拍数を非観血式血圧計(BP-98A-L, Softron, Tokyo, Japan)を用いて測定した。37℃に設定した保温器(THC-31, Softron)内にラットを固定し、30 min 分間以上保温器内で安定化させたのち、tail-cuff 法により血圧および心拍数の測定を行った。測定は 1 匹につき 3 回行い、得られた値の平均値を解析に用いた。また、摘出した膀胱の重量は、湿重量として測定した。

6. タンパク質の抽出およびウェスタンブロッティング

薬物投与期間終了後、摘出した組織から、PRO-PREP Protein Extraction

Solution (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)を用いてタンパク質を抽出し、BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)を用いてタンパク質濃度を測定した。

25 μg のタンパク質のサンプルを用いて 10% SDS-PAGE gel で泳動し PVDF 膜（ImmobilinTM; Millipore, Bedford, USA）に転写した。転写後の PVDF 膜は、5% skim milk in TBST (tris-buffered saline tween-20) にて室温で 1 h、ブロッキング処理し、primary rabbit anti-ENaC-α polyclonal antibody (1:500; Bioss)もしくは mouse anti-β-actin monoclonal antibody (1:2500; Sigma, Saint Louis, MO, USA) in 5% skim milk にてインキュベートした。TBST にて洗浄後、二次抗体として、anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) conjugated to horseradish peroxidase (1:5000; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in TBST、もしくは anti-mouse IgG (1:5000; GE Healthcare)を用いてインキュベートした。その後、再び TBST にて洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いて発色し、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)で撮影した。得られたバンドを ImageJ ソフトウェア(National Institutes of Health, Bethesda, USA)を用いて解析した。発現量の定量化はβ-actin との比較で行った。

7. 膀胱内圧測定

吸入麻酔装置(NS-1, Yazawakagaku, Nagoya, Japan)を用い、導入麻酔を 3%イソフルラン、維持麻酔を 2%イソフルランによって行い、麻酔下で、下腹部を切開し、露出した膀胱の頭頂部より PE-50 チューブを挿管し、5-0 糸(Coated VICRYL, Ethicon, Somerville, USA)を用いて二重結紮により固定し、膀胱瘻を作製した。PE-50 チューブは下腹部より皮下を通し、首の後ろから体外へ出し、圧トランスデューサー(UD5500, Dantec, Skovlunde, Denmark)につなぎ、さらに膀胱への生理食塩水注入のためシリンジポンプ(NE-300, New Era Pump Systems, Farmingdale, USA)へとつないだ。膀胱内圧測定は、麻酔の影響を避けるため、覚醒下にて、固定器内でラットを固定し行った。生理食塩液（室温）の膀胱内注入速度は 80 μl/min とした。その後、必要に応じて、生理食塩液に溶解した 1 mM アミロライド溶液（室温）に交換した。圧トランスデューサーの信号を PowerLab 4/26 (ADInstruments, Sydney, Australia)で記録し、得られた膀胱内圧曲線から、ソフトウェア Chart5 (ADInstruments) を用いて排尿間隔および排尿時最大膀胱内圧を算出した（Fig. 5)。

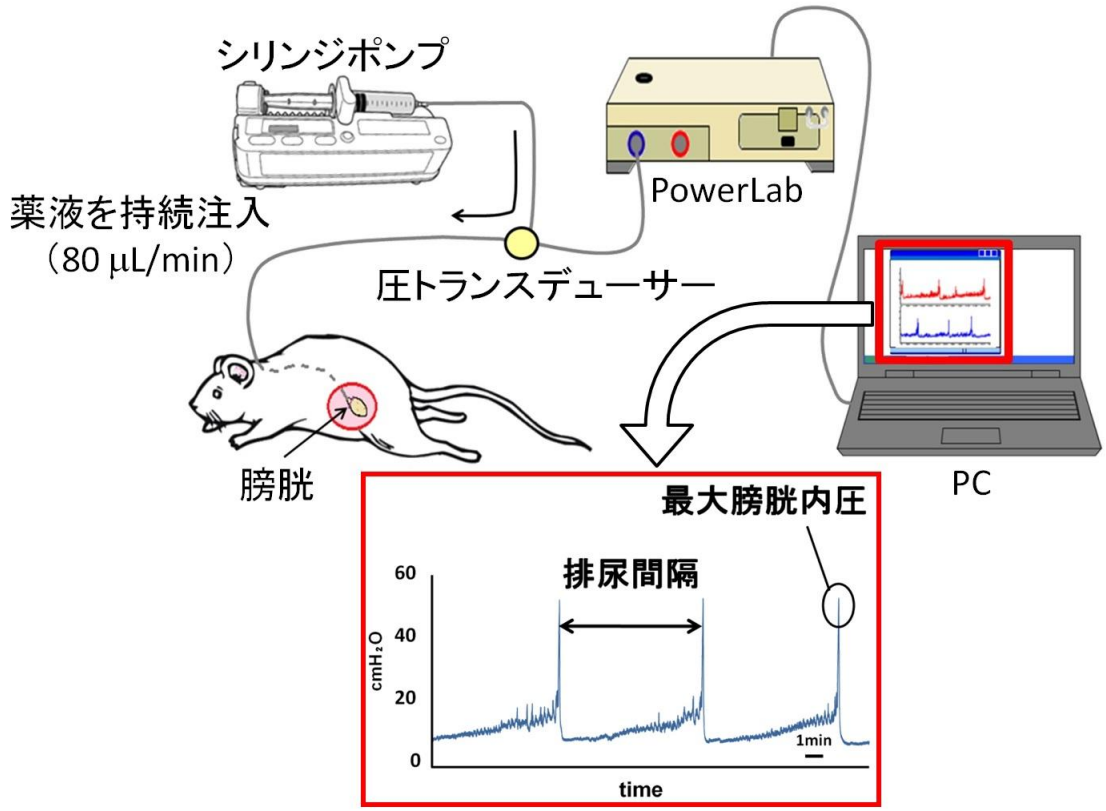


Fig. 5　膀胱内圧測定

ラット膀胱内にカニューレを固定し、圧トランスデューサーを介してシリンジポンプにつなぎ、薬液を定速で持続注入した。圧トランスデューサーが感知する圧の変化をコンピューターで記録し、パラメーターとして排尿間隔と排尿時の最大膀胱内圧を算出した。

8. 統計解析

結果は全て平均値±標準誤差で表してあり、2 群間の検定は Student's *t*-test を用いた。膀胱内圧測定において、群内での注入液の置換の前後の比較には paired *t*-test を用いた。多群間の検定には、analysis of variance （ANOVA）で解析し、Bonferroni 補正法を用いた多重 *t*-test を用いた。

第三節　実験結果

1．膀胱における MR の mRNA 発現

RT-PCR 法により、膀胱における MR の mRNA 発現を解析した。腎臓と同様に膀胱における MR の mRNA の発現が見られた（n=7)。反応液の組成として cDNA を加えず行った陰性対照では検出されないことを確かめた（Fig. 6)。また、シークエンス解析により、膀胱サンプル由来の PCR 産物の塩基配列は、以前に報告されているラット MR の配列[27]と同一であることを確認した。

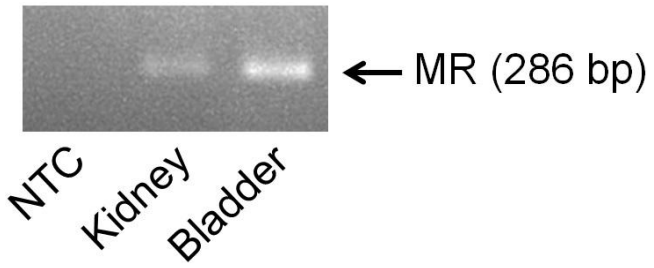


Fig. 6　Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and agarose gel electrophoresis to analyze MR expression in the rat urinary bladder. MR mRNA expression was clealy observed in the rat urinary bladder. The kidney cDNA was used as a positive control, and the non-template control (NTC) was used as a negative control.

2. MR と ENaCαタンパク質の分布

蛍光免疫染色により、MR タンパク質と ENaCα タンパク質の膀胱における発現部位を解析した。MR（n=4）と ENaCα（n=5）の膀胱上皮における局在が見られた（Fig. 7）。陽性対照として腎臓を用い（n=3）、陰性対照としては一次抗体を用いずに同様のプロトコールを行い、一次抗体の感度と特異性を確かめた（n=5）。

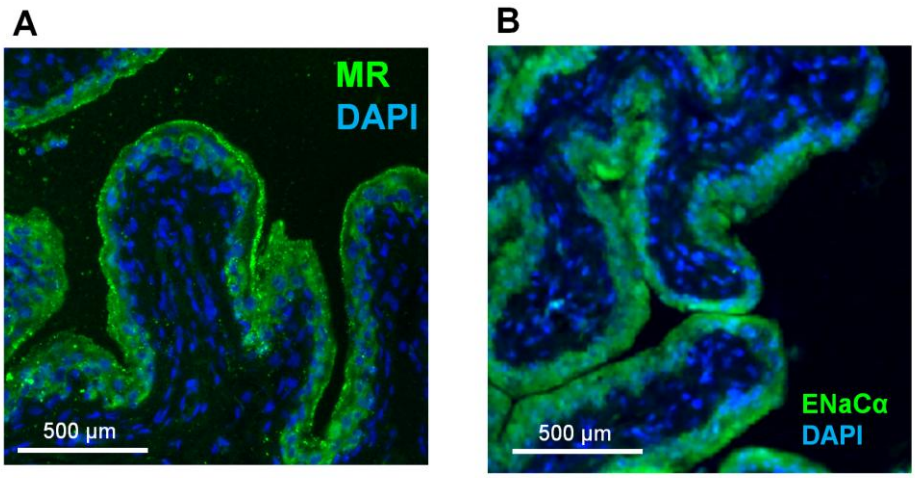


Fig. 7　Expression and localization of MR and ENaCα proteins in the rat urinary bladder. Blue staining indicates 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-positive nuclei. (A) Green staining indicates localization of the MR protein at the rat urinary bladder epithelium. (B) Green staining indicates localization of the ENaCα protein at the rat urinary bladder epithelium. Scale bar = 500 μm.

3. FC 群の体重、膀胱湿重量、心拍数、および全身血圧

次に、MR を刺激するため、合成ミネラロコルチコイドである FC を用いて MR を刺激した群を作製し、体重、膀胱湿重量、心拍数、および全身血圧への影響を調べた。FC 群の体重は、Vehicle を投与した Control 群に比べ、減少が見られた（$P < 0.05$）が、膀胱湿重量および膀胱重量/体重比に変化は見られなかった（$P > 0.05$）。FC 群の心拍数、および全身血圧は、Control 群と比べ、変化は見られなかった（$P > 0.05$）（Table 3）。

Table 3　Baseline parameter of the control and FC groups

	Control group (n=7)	FC group (n=6)
Body weight (g)	356.4 ± 4.1	336.5 ± 7.7 *
Bladder weight (mg)	101.2 ± 5.3	93.6 ± 5.0
Bladder-to-body weight ratio (mg/g)	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Heart rate (beats per min)	358.0 ± 10.2	336.1 ± 9.2
Systolic blood pressure (mmHg)	127.2 ± 5.0	125.1 ± 3.5
Diastolic blood pressure (mmHg)	90.6 ± 4.1	94.3 ± 1.7

Data are expressed as mean ± standard error. Three days following administration, no statistically significant differences were observed between the control (vehicle) and fludrocortisone (FC) groups on day 4. *$P < 0.05$ vs control.

4. MR 発現量における FC の影響

Real-time PCR 法を用いて Control 群(n=6)と FC 群(n=6)の膀胱における MR の mRNA 発現量を解析した。両群間での MR の mRNA 発現量の違いは見られなかった（P > 0.05）（Fig. 8）。

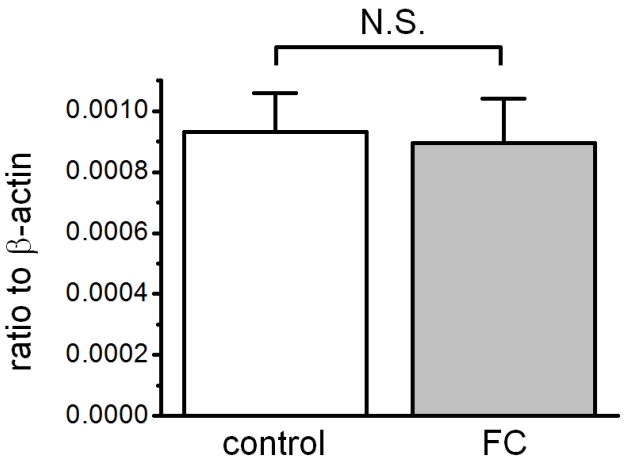


Fig. 8　Quantitative analysis of MR mRNA expression in the rat urinary bladder after three days of FC administration using real-time reverse transcriptase-PCR. MR expression normalized by mRNA expression levels of β-actin. Expression levels of MR mRNA in the FC group was not changed compared with the control group. Each bar indicates mean ± standard error values. N.S., not significant.

5. ENaCα 発現量における FC の影響

ウェスタンブロッティング法を用いて Control 群(n=3)と FC 群(n=7)の膀胱における ENaCα タンパク質の発現量を解析した。FC 群の膀胱における ENaCα タンパク質の発現量は、Control 群に比べ、平均値で約 10.4 倍の増加が見られた（$P < 0.05$）（Fig. 9）。

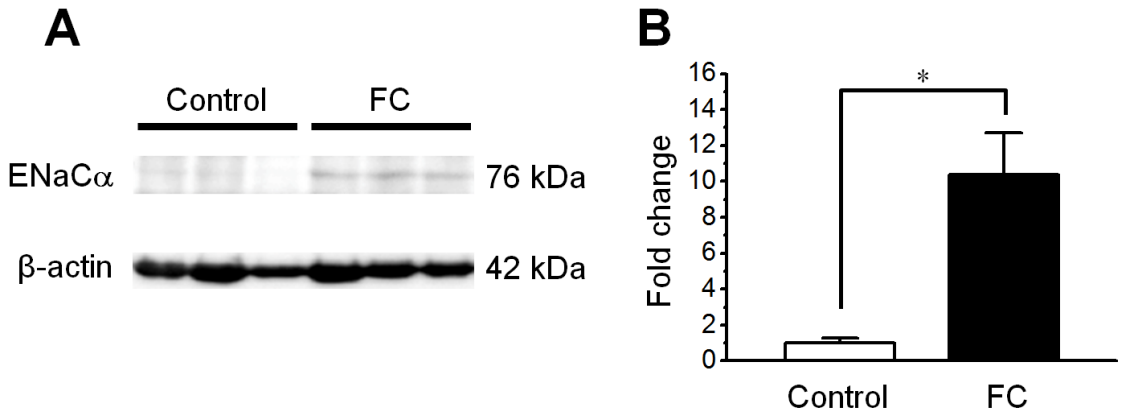


Fig. 9　Western blot analysis of the expression of epithelial sodium channel-α protein in the rat urinary bladder after three days of fludrocortisone administration. (A) Representative immunoblots of epithelial sodium channel-α (ENaCα) and ß-actin proteins. (B) Densitometric quantification of the corresponding bands revealed that ENaCα protein in the fludrocortisone (FC) group was significantly upregulated, compared with the control group. The mean expression level of ENaCα protein in the control group was set to 1.0-fold for the comparative analysis. Each bar indicates mean ± standard error values; n=3 in the control group (vehicle administration), and n=7 in the FC group. *P < 0.05.

6. 膀胱機能における FC の影響

膀胱内圧測定により、Control 群（n=4）と FC 群（n=7）の膀胱機能を解析した。本実験では、膀胱内注入液として、生理食塩液と、ENaC 阻害薬として 1 mM アミロライドを用いた。

Fig. 10A に、膀胱内圧測定によって得られた、Control 群および FC 群の各々の代表的なチャートを示した。生理食塩液の注入時の FC 群の排尿間隔は Control 群に比べて短縮が見られた。膀胱内への注入液を、生理食塩液から 1 mM アミロライド溶液に置換したところ、Control 群では排尿間隔に生理食塩液の注入時と変化が見られなかったが、FC 群では排尿間隔に延長が見られた。

Fig. 10B, C に膀胱内圧測定の解析結果を示した。生理食塩液の注入時の排尿間隔は、Control 群で 639.5 ± 138.0 s あり、FC 群では 360.0 ± 50.8 s であり、2 群間

には有意差が見られた（P < 0.05）。生理食塩液をアミロライド溶液に置換したところ、排尿間隔は、Control 群で 635.0 ± 140.5 秒、FC 群で 538.4 ± 79.1 秒となり、有意差は見られなかった（P > 0.05）。Control 群内での排尿間隔にはアミロライドの注入による変化は見られなかった（P > 0.05）。一方、FC 群内ではアミロライドの注入によって有意に延長した（P < 0.01）。排尿時最大膀胱内圧に関しては、control 群、FC 群、さらに、アミロライド非存在下、存在下に関わらず同等であった。

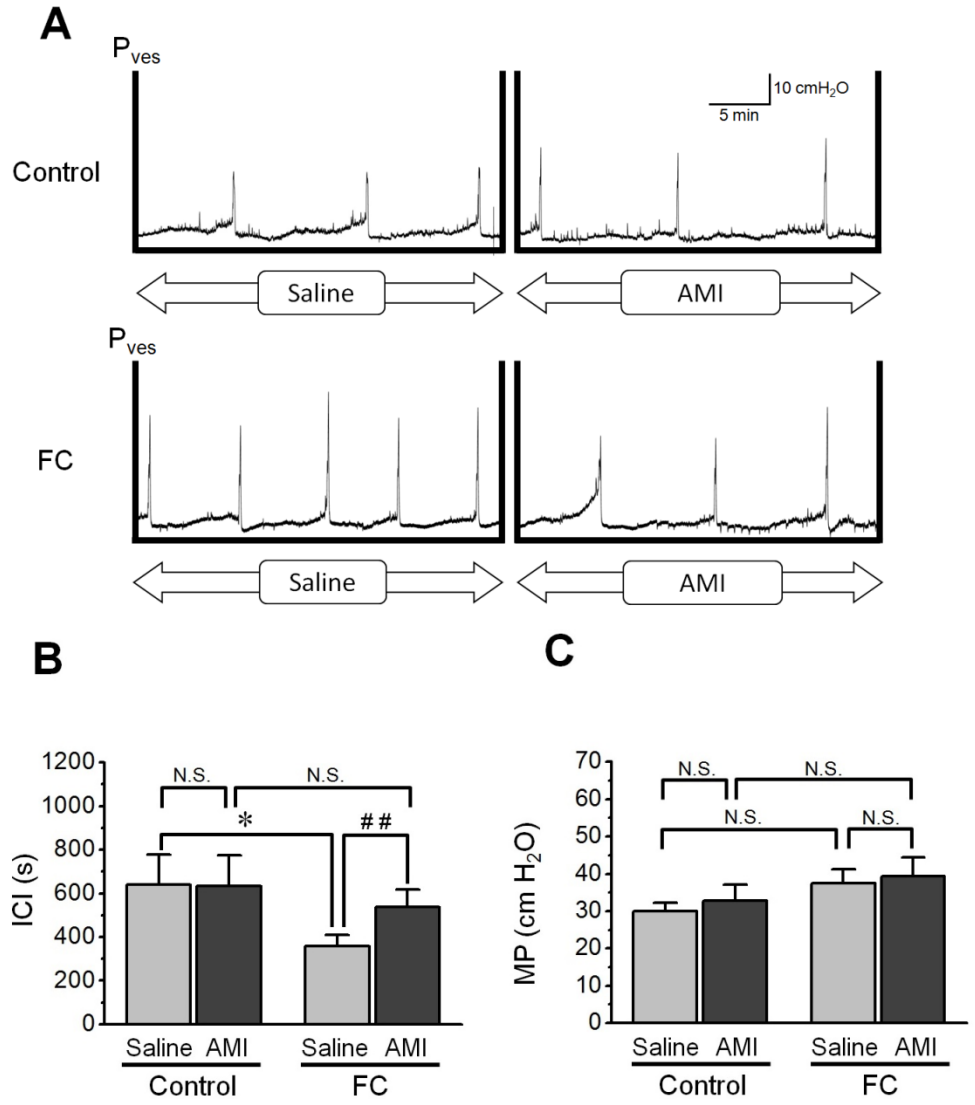


Fig. 10　Cystometry after three days of fludrocortisone administration. (A) Representative cystometrogram during intravesical infusion of saline and the subsequent amiloride (AMI) treatment in the control and fludrocortisone (FC) groups. (B) Results of the intercontraction intervals (ICI) analysis. The FC group exhibited significantly shorter ICIs during the saline infusion, compared with the control group.

The subsequent infusion of 1 mM amiloride significantly prolonged the ICIs in the FC group, although it did not change the ICIs of the control group. (C) The maximum intravesical pressure (MP) during saline and amiloride infusion in each group. No intra-group or inter-group changes in MPs were observed during infusion of saline and amiloride. Each bar indicates mean ± standard error values (panels B, C); n = 4 in the control group (vehicle administration), and n = 7 in the FC group. *P < 0.05 vs. control. ## P < 0.01 vs. saline. N.S., not significant. Pves, intravesical pressure.

7. MR 阻害薬エプレレノンの膀胱機能および ENaCα 発現に対する効果

7-1）膀胱内圧測定

選択的 MR 阻害薬エプレレノン（EPL）を用いて、FC 群に対する MR 阻害の効果を検討した。これまでと同様に作製した Control 群および FC 群に加え、FC と EPL を同時に経口投与した FC+EPL 群を作製して膀胱内圧測定を行った。膀胱内への注入液としては生理食塩液のみを用いた。

Fig. 11 に、膀胱内圧測定によって得られた、Control 群、FC 群および FC+EPL 群の各々の代表的なチャートを示した。生理食塩液の注入時の FC 群の排尿間隔は Control 群に比べて短縮が見られた。一方、FC+EPL 群では FC 群に比べて、排尿間隔の延長が見られた。

Table 4 に膀胱内圧測定の解析結果を示した。FC 群の排尿間隔は Control 群に比べて有意に短縮した（P < 0.01）。一方、FC+EPL 群では FC 群に比べて、平均値で 29.2%の排尿間隔の延長が見られ、Control 群との有意差は見られなかった（P > 0.05）。

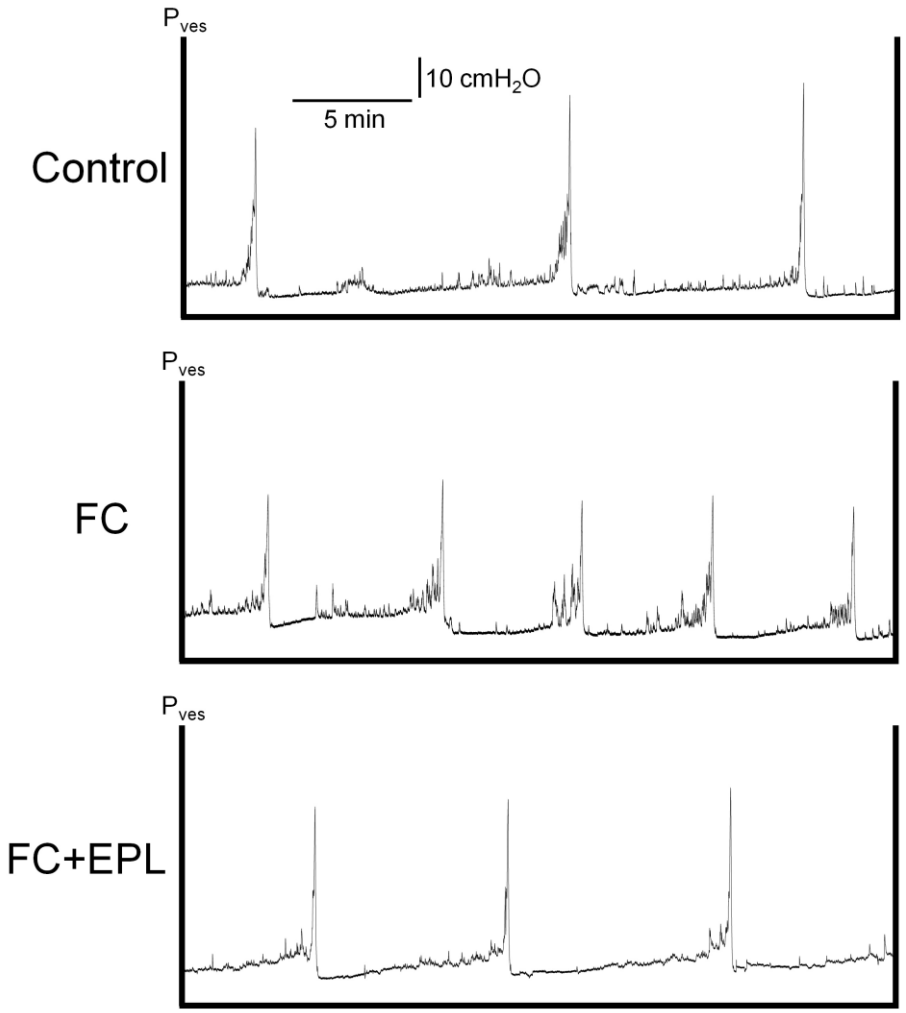


Fig. 11 Cystometry after three days of drug administration. Representative cystometrogram during intravesical infusion of saline in the control, FC and FC+EPL groups. The FC group exhibited significantly shorter ICIs during the saline infusion, compared with the control group and that was be ameliorated by EPL. Pves, intravesical pressure.

Table 4 Intercontraction intervals of control, FC, and FC+EPL groups

Group	Intercontraction intervals (s)
Control	746.3 ± 73.8 (n=11)
FC	394.0 ± 60.5 ** (n=10)
FC + EPL	509.2 ± 110.1 (n=5)

Data are expressed as mean ± standard error.
** $P < 0.01$ vs. control group

7-2）ENaCα 発現量の解析

ウエスタンブロッティング法を用い、Control 群（n=4）、FC 群（n=7）および FC+EPL 群（n=5）における ENaCα タンパク質の発現量を解析した。FC 群の ENaCα タンパク質の発現量は、Control 群に比べて有意に増加した（$P < 0.05$）。一方、FC+EPL 群では FC 群に比べて、平均値で 36.9％の抑制が見られ、Control 群との有意差は見られなかった（$P > 0.05$）。（Fig. 12）。

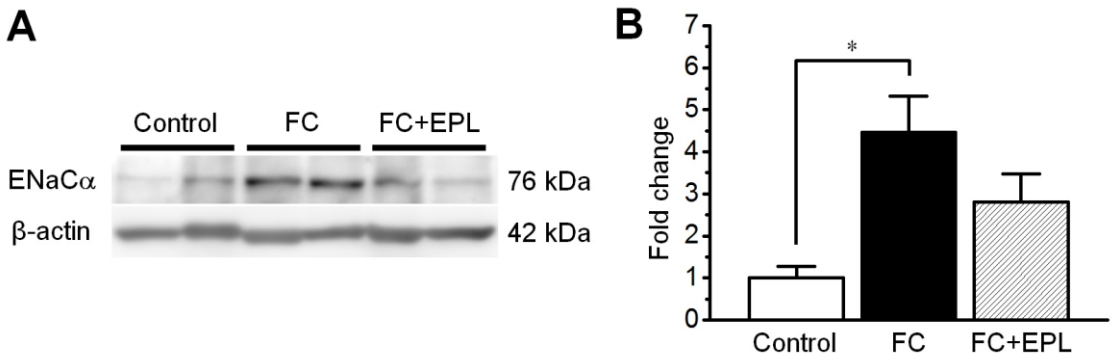


Fig. 12　Western blot analysis of the expression of epithelial sodium channel-α protein in the rat urinary bladder after three days of vehicle, fludrocortisone or fludrocortisone plus eplerenone administration. (A) Representative immunoblots of epithelial sodium channel-α (ENaCα) and ß-actin proteins. (B) Densitometric quantification of corresponding bands revealed that ENaCα was significantly upregulated in the fludrocortisone (FC) group compared with the control group. Co-administration of EPL with FC attenuated this effect of FC, although the difference was not statistically significant. The expression levels in the FC+EPL group were not significantly different from those in the control group. The mean ENaCα expression in the control group was set to 1.0 for the comparative analysis. Each bar indicates mean ± standard error values; n = 4 in the control group (vehicle administration), n = 7 in the FC group and n = 5 in the FC+EPL group. * $P < 0.05$.

7-3）MR および ENaCα の発現部位の解析

膀胱組織を用いた蛍光免疫染色法により Control 群（n=4）、FC 群（n=3）、FC+EPL 群（n=4）における MR タンパク質と ENaCα タンパク質の発現の分布を解析した。全ての群において上皮における局在が見られ、筋層や血管には発現は見られなかった（Fig. 13）。

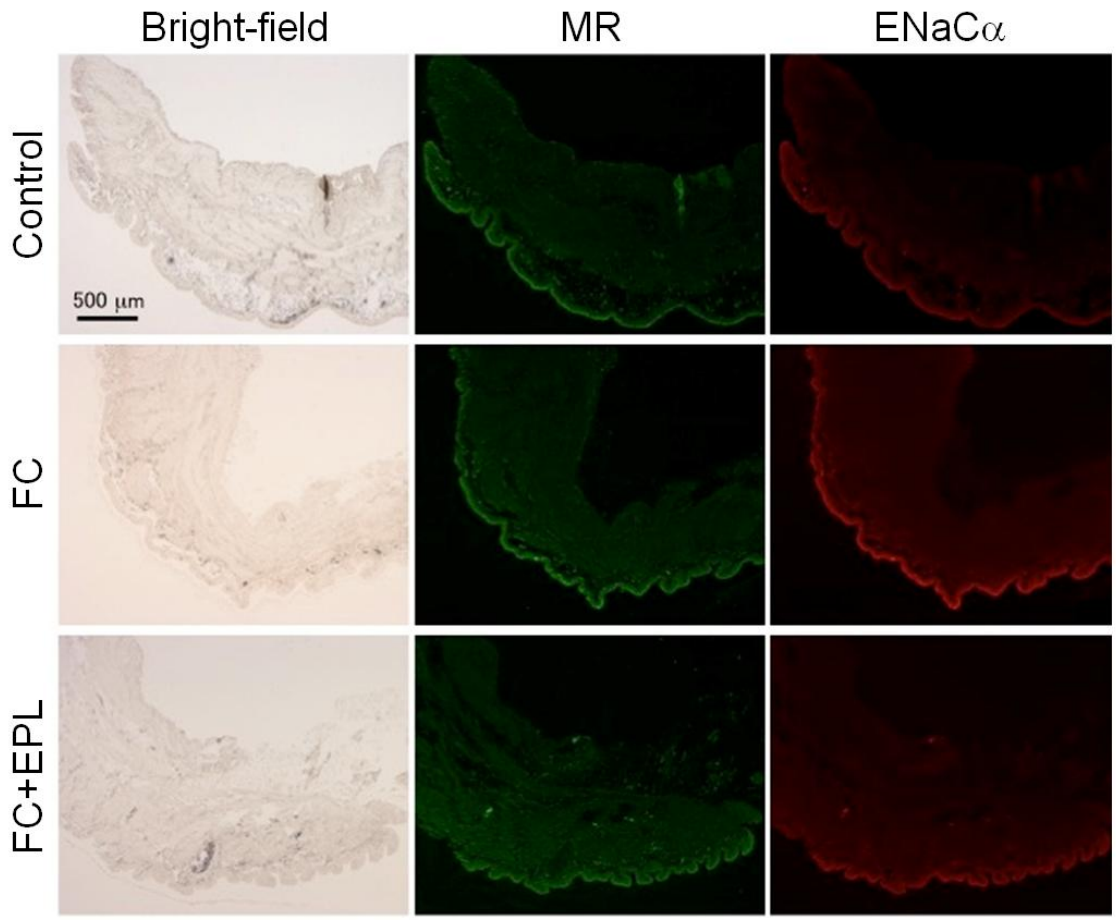


Fig. 13　Immunofluorescent analysis of mineralocorticoid receptor protein and epithelial sodium channel-α protein in the rat urinary bladder after three days of vehicle, fludrocortisone or fludrocortisone plus eplerenone administration. Green and red staining indicates mineralocorticoid receptor (MR) protein and epithelial sodium channel-α (ENaCα) protein, respectively, in the rat urinary bladder. MR and ENaCα were localized at the rat urinary bladder epithelium. The staining distribution were not altered between control, FC, and FC+EPL groups. Scale bar = 500 μm.

第四節　考察

膀胱上皮に発現する ENaC は、膀胱壁の伸展を感知する機械受容器として機能しており、その活性化により、膀胱の収縮に重要な役割を持つ ATP の上皮細胞からの放出を亢進することが報告されている[7]。一方、腎臓の遠位ネフロンの上皮細胞において、Na^+の再吸収に関わる ENaC の発現量や活性は、MR により調節されていることが知られている[8, 20, 21]。これらのことより、本研究においては、膀胱上皮における ENaC の発現量や活性の調節に MR が関与しており、この MR-ENaC 経路が膀胱機能の調節に関与するという仮説を立て、検討した。

これまでに、哺乳類の膀胱における MR の発現は報告されておらず、膀胱機能における MR の機能も不明だった。本研究ではラット膀胱に MR が存在するか解析したところ、哺乳類の膀胱上皮に MR が発現していることを初めて明らかにした。次に MR が膀胱機能においてどのような役割を担うのか明らかにするため、MR 刺激薬として合成ミネラロコルチコイドである FC をラットに投与したモデルを作製した。FC を投与したラットでは、ENaCαタンパク質の発現量の増加と排尿間隔の短縮が見られたことから、蓄尿障害が起こったと憶測された。膀胱内へ ENaC 阻害薬であるアミロライドを注入することにより、FC による蓄尿障害は改善した。ENaC は機械感受性を持つことが知られており[28]、膀胱上皮の ENaC は膀胱壁の伸展を感知し膀胱機能に関与することが報告されている[4, 7, 15]。したがって、FC により誘発された蓄尿障害には、ENaC の発現量の増加により求心路への刺激の入力が亢進したことによる尿意の増大が起こっている可能性が考えられる。しかしながら、FC により ENaC の発現が増加したメカニズムについては未だ不明である。これまでに腎臓では、アルドステロンにより MR が活性化すると non-genomic な作用や genomic な作用により ENaC の発現量が増加することが報告されている[21]。また、genomic な作用を介した ENaC の分解抑制も報告されている[21]。このことから、本研究における FC を投与したラットの膀胱においても、これらの作用により ENaC の発現量が増加した可能性が考えられる。

さらに、選択的 MR 阻害薬である EPL を FC と共に投与したところ、FC により惹起された蓄尿障害が改善する傾向が見られ、ENaCαの発現量が減少する傾向が見られた。このことから、膀胱上皮において、MR 刺激による ENaC の発現の誘導が起こり、膀胱壁の伸展に対する感受性が上昇することで蓄尿障害が生じたと考えられる。本研究においては、Control 群に EPL を投与した群の作製を行っていないため、EPL が MR を介さず膀胱容量を増やした可能性を否定することはできない。なお、本研究では、3 日間 FC を連日投与したモデルを

作製したが、より短期間、もしくは長期間での検討は行っておらず FC 投与による時間的な変化は不明である。

一方、Control 群のラットにおいては、生理食塩液の注入時の排尿間隔とアミロライドの注入時の排尿間隔には差は見られなかった。健常の SD ラットの蓄尿相において、膀胱壁の伸展を感受する分子はアミロライドに感受性を示さない成分であることが考えられる。病態時の膀胱における ENaC の発現量が亢進する報告としては、蓄尿症状を訴える前立腺肥大を伴う下部尿路閉塞患者の膀胱粘膜における ENaCα、β、γの mRNA 発現量が顕著に増加していたが、対照群では発現量が非常に低いレベルであったという報告があり[16]、膀胱における MR-ENaC 経路は病態時で亢進することが想定される。本研究において、排尿時最大膀胱内圧に関しては FC の投与の有無および、膀胱内圧測定時におけるアミロライドの注入前後での変化がなかったことから、膀胱上皮における MR の活性化は、排尿筋の収縮力には影響を与えないことが明らかとなった。なお、本研究で用いたアミロライド溶液の濃度は、ラットを用いて膀胱上皮の ENaC をターゲットとした膀胱内圧測定を行った過去の報告[7]と同様の 1 mM という高濃度を用いた。ENaC の他にも 1 mM アミロライドにより阻害されうるイオンチャネルについての報告はあるが、アミロライドに対する親和性を比較すると ENaC に対する優先度が最も高いため、本研究においては 1 mM アミロライドは ENaC に作用しイオンチャネルとしての作用を阻害したと考えられる。

本研究の結果から、内因性の MR アゴニストであるアルドステロンの血中レベルが高い患者は、蓄尿症状を示すことが想定される。実際に、原発性アルドステロン症患者は、夜間頻尿を呈することが報告されている。しかし、これは、膀胱機能の障害に由来する蓄尿障害によるものではなく、尿を生成する腎臓の能力が低下しているためと考えられる。つまり、血中の K^+の濃度が低いことにより尿生成が増加した結果である多尿が夜間頻尿の要因になっていることが推測される[29]。したがって、この病態に関しては、膀胱上皮の障害に由来する蓄尿障害と腎臓からの尿生成の増加による多尿を区別して扱うことは難しいと考えられる。他の病態としては、メタボリック症候群や肥満は、健常人より血中アルドステロン濃度が高いことや、レニンアンジオテンシンアルドステロン系が亢進していることが知られている[30-32]。近年、メタボリック症候群と下部尿路症状の関連についての報告がなされており、基礎研究においても[33]、臨床研究においても[34-36]、メタボリック症候群と蓄尿障害が関係することが報告されているが、その分子機構については不明である。これらの病態の背景に、血中アルドステロン量の上昇による膀胱における MR-ENaC 系の亢進が起こっている可能性が想定される。したがって、本研究により、メタボリック症候群に伴う蓄尿障害に対する新規の治療ターゲットを探索するための有用な知見が

得られた。

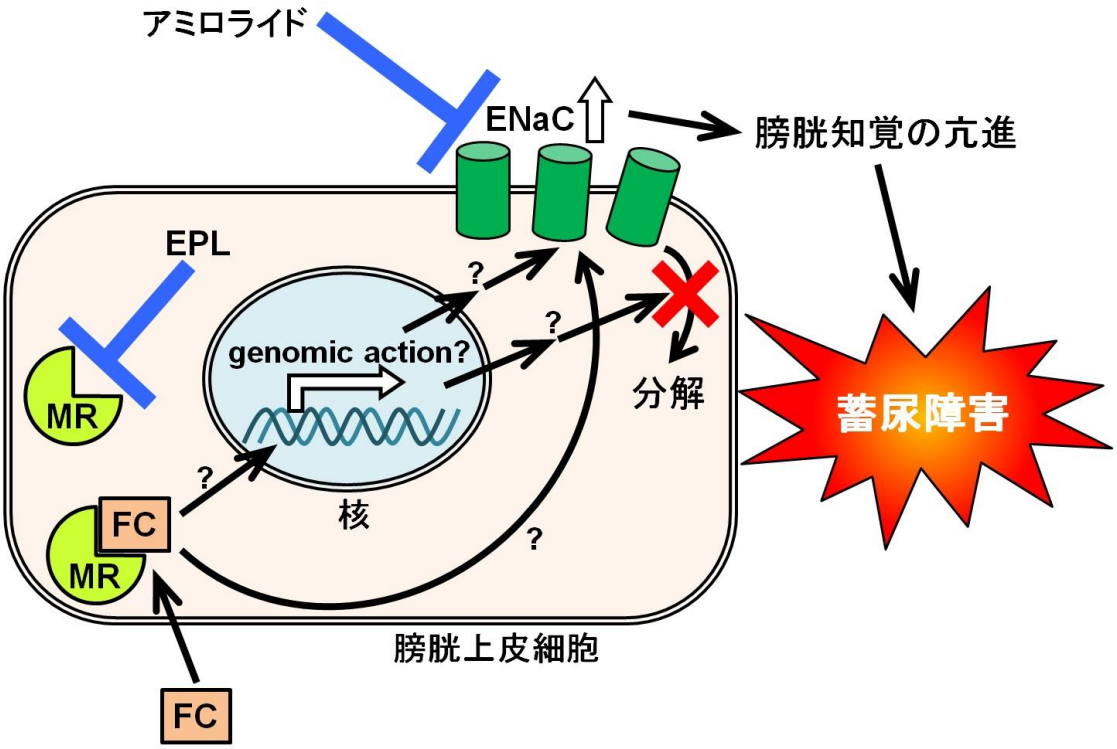


Fig. 14　第一章の結果より想定されるシグナル伝達機構

第二章

食塩感受性高血圧モデルラットを用いた

蓄尿障害の機能解析

第一節　背景

多くの疫学的調査により、生活習慣病と下部尿路症状との関連が示唆されており、生活習慣病の中でも高血圧は、昼間頻尿、夜間頻尿などの蓄尿症状のリスク因子のひとつであることが報告されている[37-39]。このうち、本邦において、2004 年 10 月から 2005 年 12 月の間に下部尿路症状と診断された、平均年齢が 68.5 歳の 4828 名の男性を解析対象とした行われた臨床研究において、最も多い併存疾患は高血圧（25.9%）であり、次いで、糖尿病（9.9%）、心疾患（7.2%）であったことが報告されている[38]。さらに、この報告では、国際前立腺症状スコアを用いた質問票への回答により、蓄尿症状スコア（昼間頻尿、尿意切迫感および夜間頻尿スコアの合計）と排尿症状スコア（尿線途絶、尿勢低下および腹圧排尿スコアの合計）を分けて評価したところ、排尿症状スコアと高血圧の罹患率には相関がなかったが、蓄尿症状スコアが上昇するにつれて高血圧の罹患率の有意な上昇が見られた[38]。

高血圧は、その発症の原因により、本態性高血圧と二次性高血圧に分けられる。本態性高血圧の病因としては、遺伝的素因、生活習慣、体重、Na^+摂取量、およびストレスなどが考えられているが、明確な病因を同定することができない。一方、二次性高血圧に関しては、腎臓の疾患、原発性アルドステロン症、薬剤の副作用、および睡眠時無呼吸症候群などといった明確な病因を検査等により同定することができる。そして、日本人の高血圧患者の 85～90%は本態性高血圧であり、約 10～15%が二次性高血圧である[40]。また、高血圧は、日常的な高食塩食の摂取により発症する食塩感受性高血圧と、食塩の影響を受けない食塩非感受性高血圧にわけられ、米国において、高血圧患者のうち約 60%が食塩感受性高血圧を呈する[41]。食塩感受性高血圧モデルである Dahl salt-sensitive rats（DS ラット）は高食塩食を負荷することにより高血圧を発症するモデル動物であり、食塩感受性高血圧の研究分野において広く使用されている。高食塩食を負荷しても高血圧を発症しない Dahl salt-resistant rat（DR ラット）は DS ラットの正常対照として使用される[42]。通常食塩食を与えた DR および DS ラット、高食塩食（8% NaCl）を与えた DR および DS ラットの 4 群で排尿について検討した報告では、高食塩食を与えた DS 群のみが 1 回あたりの排尿量が減少しており、さらに 1 日のうちの安静期（睡眠期）の排尿回数の増加が見られることが示されている[43]。

一方、高食塩食を負荷した DS ラットの腎臓においては、ENaC による Na^+の輸送が増加していることや、ENaC の発現量が増加していることが知られており、このことが食塩感受性高血圧の発症の要因であると考えられている[19]。

また、高食塩食を負荷したDSラットは、高食塩食を負荷したDRラットと同等の血中アルドステロン濃度を示すにも関わらず、DS ラットの腎臓においては、アルドステロン非依存的に MR の活性化が起こっていることが報告されている[44]。しかしDSラットの膀胱において MR や ENaC に関して検討された報告は未だない。

本研究において、第一章では、MR-ENaC 経路の亢進が蓄尿障害を引き起こすことが示唆された。そこで、第二章では、DSラットの膀胱において、MR-ENaC経路が亢進し、蓄尿障害を引き起こすのではないかという作業仮説を立て、検討した。

第二節　実験材料および方法

1．使用動物および組織の摘出

6 週齢、雄性、DR ラットおよび DS ラット(SLC, Hamamatsu, Japan)を用いた。動物は、温度および湿度が、それぞれ 23±2℃および 50±10%になるようにコントロールされた部屋で、自由に餌と水を摂取することができるようにし、12 h 毎の明暗サイクルで飼育した。

DR ラットおよび DS ラットに対し、通常食塩飼料(0.3% NaCl; CE-2, CLEA Japan, Tokyo, Japan)および高食塩飼料(8% NaCl; CE-2, CLEA Japan)を 1 週間負荷し、それぞれ、DR+ normal salt (NS)群、DS+NS 群、DR+ high salt (HS)群、および、DS+HS 群とし、全身血圧および心拍数を非観血式血圧計(BP-98A-L, Softron, Tokyo, Japan)を用いて測定した。37℃に設定した保温器(THC-31, Softron)内にラットを固定し、30 min 以上保温器内で安定化させたのち、tail-cuff 法により血圧および心拍数の測定を行った。測定は 1 匹につき 3 回行い、得られた値の平均値を解析に用いた。

組織を摘出する際には、ラットをイソフルラン(Wako, Osaka, Japan)で安楽死させてから行った。摘出した膀胱の重量は、湿重量として測定した。摘出した組織はウェスタンブロットや蛍光免疫染色法に用いた。

DS ラットの膀胱における MR-ENaC 経路の関与を検討するため、DS ラットに高食塩飼料を 1 週間負荷した DS+HS 群と、高食塩飼料とともに選択的 MR 阻害薬である EPL(75 mg/kg/day)を 1 週間、経口投与した DS+HS+EPL 群を作製し、上述と同様に組織の摘出を行い、摘出した組織はウェスタンブロットに用いた。

なお、本研究の実験計画は、名古屋市立大学動物実験委員会によって承認され、遂行した。

2．膀胱内圧測定

DR+HS 群および DS+HS 群に対し、膀胱機能の評価のために膀胱内圧測定行った。方法は第一章に準ずる。

3．蛍光免疫染色

方法および用いた ENaCαに対する一次抗体は第一章のパラフィンブロックを用いた方法に準ずる。ただし、二次抗体は Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody (1:1000, Molecular Probes)を用いた。

4．タンパク質の抽出およびウェスタンブロッティング

方法は概ね第一章に準ずるが、泳動に用いたタンパク質の量および SDS-PAGE gel の濃度は 15 μg および 7.5%であり、バンドの撮影には LAS 3000 mini (GE Healthcare)を用いた。また、β-actin に対する一次抗体の濃度は 1:5000 で行った。

5. 統計解析

結果は全て平均値±標準誤差で表してあり、2 群間の検定には Student's *t*-test を用いた。膀胱内圧測定において、群内における注入液の置換の前後の比較には paired *t*-test を用いた。

多群間の検定には、ANOVA で解析し、Bonferroni 補正法を用いた多重 *t*-test を用いた。

第三節　実験結果

1．通常食塩食、高食塩食負荷後の DR、DS ラットの体重と膀胱湿重量

0.3%NaCl を含む通常食塩食および 8% NaCl を含む高食塩食を、それぞれ DR および DS ラットに 1 週間負荷した後、体重と膀胱湿重量を測定した。

全群間の比較により、通常食塩食を負荷した 2 群（DR+NS 群 8 例および DS+NS 群 8 例）に比べ、高食塩食を負荷した 2 群（DR+HS 群 6 例および DS+HS 群 9 例）の体重に有意な増加が見られた（Fig. 15A）（DR+NS 群と DS+HS 群間で $P < 0.05$、DS+NS 群と DS+HS 群間で $P < 0.05$、DR+NS 群と DR+HS 群間で $P < 0.01$、DS+NS 群と DR+HS 群間で $P < 0.01$）。また、全群間の比較により、通常食塩食を負荷した 2 群（DR+NS 群および DS+NS 群）に比べ、高食塩食を負荷した 2 群（DR+HS 群および DS+HS 群）の膀胱湿重量に有意な増加が見られた（Fig. 15A）（いずれも $P < 0.01$）。

通常食塩食を負荷した DR+NS 群および DS+NS 群間、また、高食塩食を負荷した DR+HS 群および DS+HS 群間において膀胱湿重量の変化は見られなかった（$P > 0.05$）（Fig. 15B）。このことから、膀胱の器質的な変化が起こっており、この 4 群での膀胱機能の比較は難しいことが想定され、これ以降の検討においては高食塩食を負荷した群のみ（DR+HS 群および DS+HS 群）を用いた。

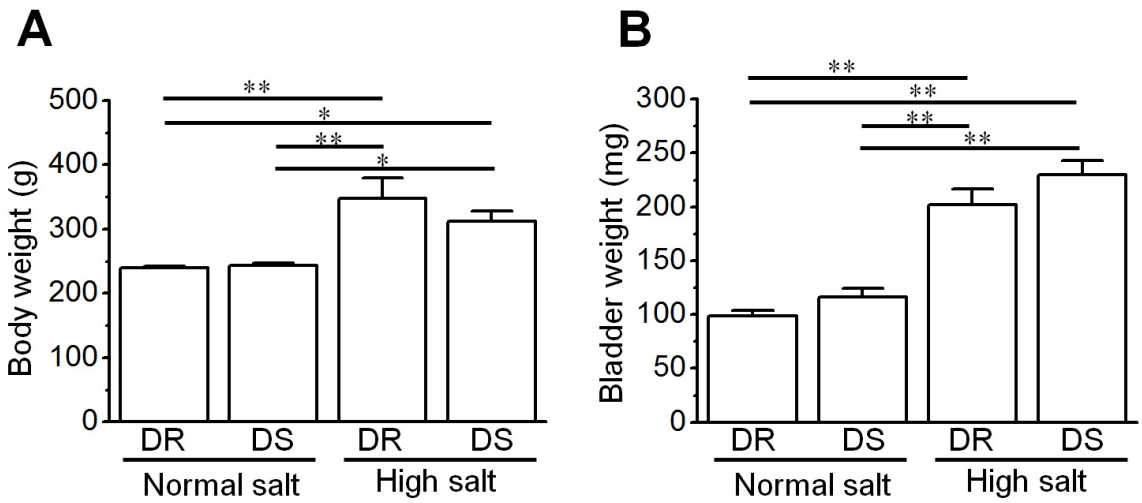


Fig. 15　Body weight and bladder weight of DR and DS rats after normal salt loading or high salt loading for one week
Data are expressed as mean ± standard error; *P < 0.05 ; **P < 0.01.

2. 高食塩食負荷後の DR、DS ラットの心拍数、および全身血圧

DR および DS ラットに、8% NaCl を含む高食塩食を 1 週間負荷した後、心拍数、および全身血圧を測定した。

心拍数に有意な差は見られなかった（$P > 0.05$）。収縮期血圧および拡張期血圧に関しては、DR+HS 群に比べ、DS+HS 群が有意に高値であった（それぞれ、$P < 0.05$ および $P < 0.01$）（Table 5）。

Table 5　Heart rate and blood pressure of DR and DS rats after high salt loading for one week

	DR+HS (n=6)	DS+HS (n=8)
Heart rate (beats per min)	429.4 ± 5.4	423.9 ± 6.6
Systolic blood pressure (mmHg)	118.4 ± 3.7	128.2 ± 2.4 *
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.7 ± 3.4	94.3 ± 3.2 **

Data are expressed as mean ± standard error; *P < 0.05 vs. DR+HS group; **P < 0.01 vs. DR+HS group.

3. 高食塩負荷の DS ラットの膀胱機能に対する影響

DR（n=5）および DS ラット（n=5）に 8% NaCl を含む高食塩食を 1 週間負荷した後、膀胱内圧測定により膀胱機能を解析した。

Fig. 16A に膀胱内圧測定によって得られた、DR+HS 群および DS+HS 群の各々の代表的なチャートを示した。生理食塩液の注入時の DS+HS 群の排尿間隔は DR+HS 群に比べ、短縮が見られた。膀胱内への注入液を生理食塩液からアミロライド溶液に置換したところ、生理食塩液の注入時と比べ、DR+HS 群の排尿間隔に変化は見られなかったが、DS+HS 群では延長が見られた。

Fig. 16B, C に膀胱内圧測定の解析結果を示した。生理食塩液の注入時の排尿間隔は、DR+HS 群で 696.6 ± 27.0 秒、DS+HS 群では 339.0 ± 69.0 秒であり、DS+HS 群では排尿間隔が有意に短縮された（$P < 0.01$）。生理食塩液をアミロライド溶液に置換したところ、排尿間隔は、DR+HS 群で 748.4 ± 51.3 秒、DS+HS 群で 528.0 ± 104.3 秒となり、有意差は見られなかった（$P > 0.05$）。DR+HS 群内での排尿間隔には変化はなく（$P > 0.05$）、DS+HS 群内では有意に延長した（$P < 0.05$）。排尿時の最大膀胱内圧に関しては、各群内および 2 群間において、変化は見られなかった。

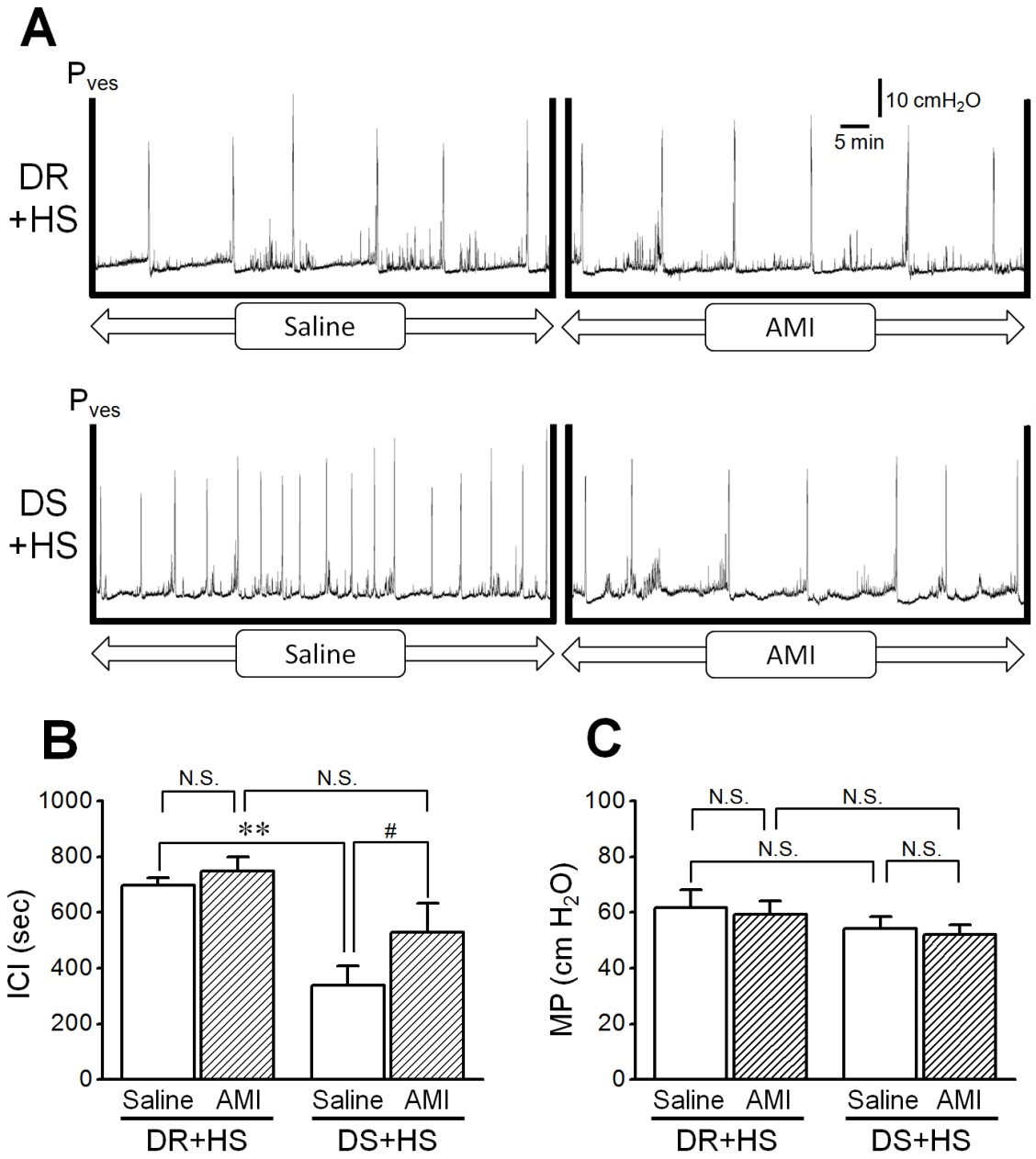


Fig. 16 Cystometry after the 1-week high salt diet treatment. (A) Representative cystometrogram during intravesical infusion of saline and during the subsequent amiloride (AMI) infusion in DR+HS and DS+HS group. (B) Results of the intercontraction intervals (ICI) analysis. The DS+HS group exhibited significantly shorter ICIs during the saline infusion, compared with DR+HS group. The subsequent infusion of amiloride significantly prolonged the ICIs in the DS+HS group, although it did not change the ICIs of DR+HS group. (C) The maximum intravesical pressure (MP) during saline and amiloride infusion in each group is shown, with no intra-group or inter-group changes in MPs observed during infusion of saline and amiloride. Each bar indicates mean ± standard error values (panels B, C); n = 5 in DR+HS group, and n = 5 in DS+HS group. **P < 0.01 vs. DR+HS group. # P < 0.01 vs. saline. N.S., not significant (P > 0.05). Pves, intravesical pressure.

4. 高食塩負荷の DS ラットの膀胱における ENaCα タンパク質の発現量の解析

ウェスタンブロット法により、8% NaCl を含む高食塩食を 1 週間負荷した後の DR（n=6）および DS ラット（n=5）の膀胱における ENaCαタンパク質の発現量を解析した。DR+HS 群に比べ、DS+HS 群において、ENaCαタンパク質の発現量は約 1.8 倍の有意な増加が見られた（P < 0.01）（Fig. 17）。

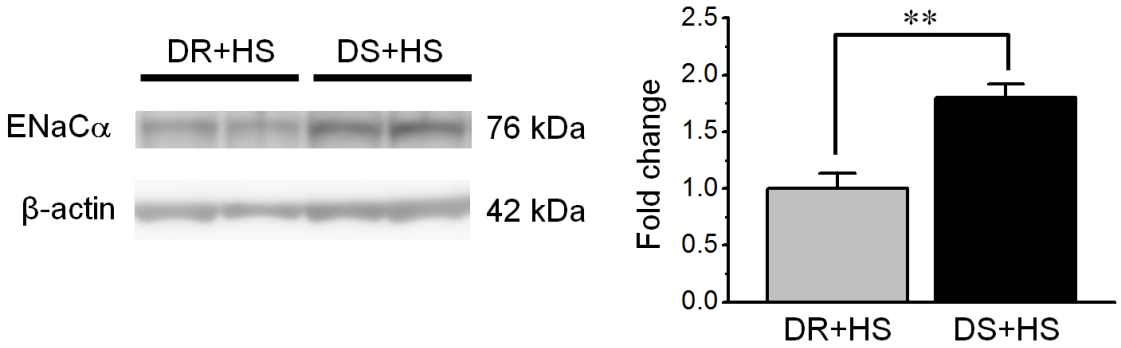


Fig. 17　Western blot analysis of the expression of epithelial sodium channel-α protein in the urinary bladder of DR and DS rat after the 1-week high salt diet treatment. (A) Representative immunoblots of epithelial sodium channel-α (ENaCα) and ß-actin proteins. (B) Densitometric quantification of the corresponding bands revealed that ENaCα protein in DS rats was significantly up-regulated, compared to DR+HS group. The mean expression level of ENaCα protein in the DR+HS group was set to 1.0-fold for the comparative analysis. Each bar indicates mean ± standard error values; n = 6 in DR+HS group, and n = 5 in DS+HS group. ** P < 0.01.

5. 高食塩負荷の DR および DS ラットの ENaCα タンパク質の発現分布の解析

免疫染色により、8% NaCl を含む高食塩食を 1 週間負荷した後の DR および DS ラットの膀胱における ENaCαタンパク質の発現分布を解析した。DR+HS 群（n=3）および DS+HS 群（n=4）において、上皮における ENaCα タンパク質の局在が見られ、2 群間での発現の分布に違いは見られなかった（Fig. 18A, B）。陰性対照として、DS+HS 群の膀胱サンプルに対して一次抗体を用いずに同様のプロトコールを行い、一次抗体の感度と特異性を確かめた（n=5）（Fig. 18C）。

さらに、陽性対照として、10～12 週齢、雄性、SD ラット腎臓を用い、一次抗体の存在下（n=4）と一次抗体の非存在下（n=4）で同様のプロトコールを行い、一次抗体の感度と特異性を確かめた（Fig. 19）。

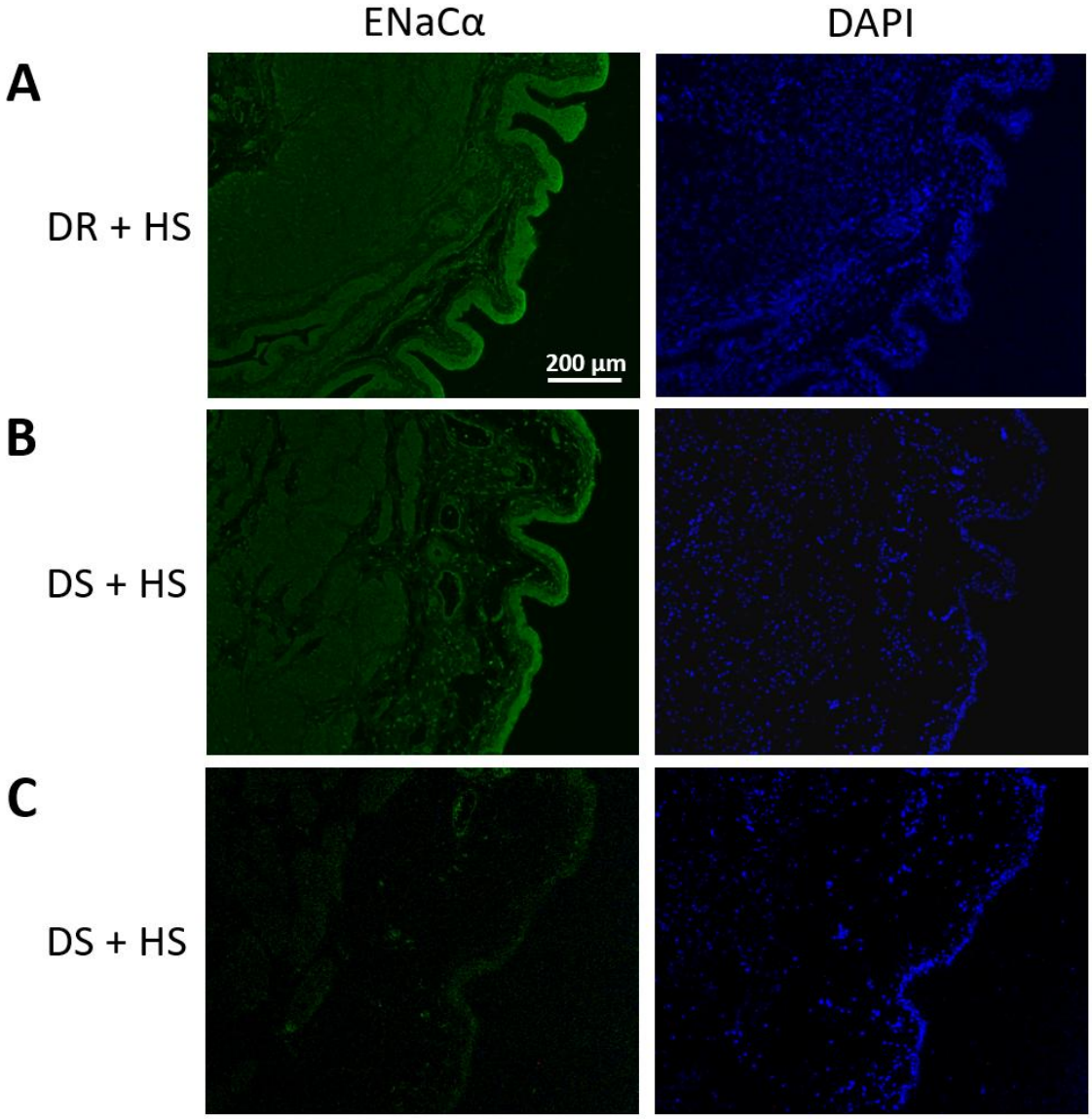


Fig. 18 (A, B) Expression and localization of epithelial sodium channel alpha (ENaCα) protein in urinary bladder of DR+HS and DS+HS group. Green staining indicates localization of the ENaCα protein at the rat urinary bladder epithelium. (C) Immunohistochemical analyses performed without the primary antibody, using the urinary bladder of DS+HS group. Green staining was hardly detectable. Blue staining indicates the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-positive nuclei. Scale bar = 200 μm.

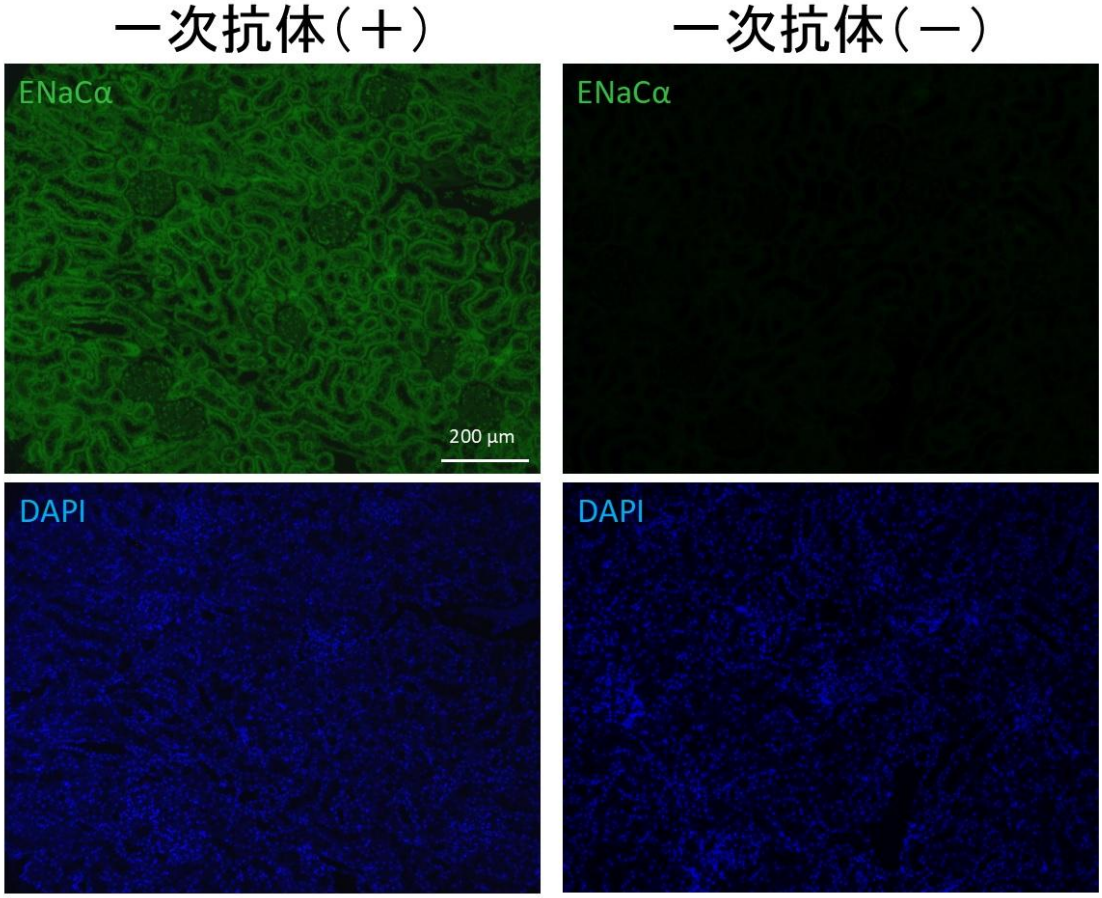


Fig. 19 Immunohistochemical analyses of the positive controls with the primary antibody and the negative controls without the primary antibody, using the kidney tissues of Sprague-Dawley rats. Blue staining indicates the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-positive nuclei. In the positive control, green staining indicates the epithelial sodium channel alpha (ENaCα) protein in the rat kidney. Green staining was hardly detectable in the negative control. Scale bar = 200 μm.

6. MR 阻害が ENaCα タンパク質の発現量に与える効果

MR-ENaC 経路の関与を検討するため、DS+HS 群（n=5）と DS+HS+EPL 群（n=3）の膀胱を用い、ウェスタンブロッティング法により ENaCα タンパク質の発現量を検討した。DS+HS+EPL 群では、DS+HS 群に比べ、ENaCα の発現量が平均値で 56.3%減少し、有意な差が見られた（$P < 0.05$）（Fig. 20）。

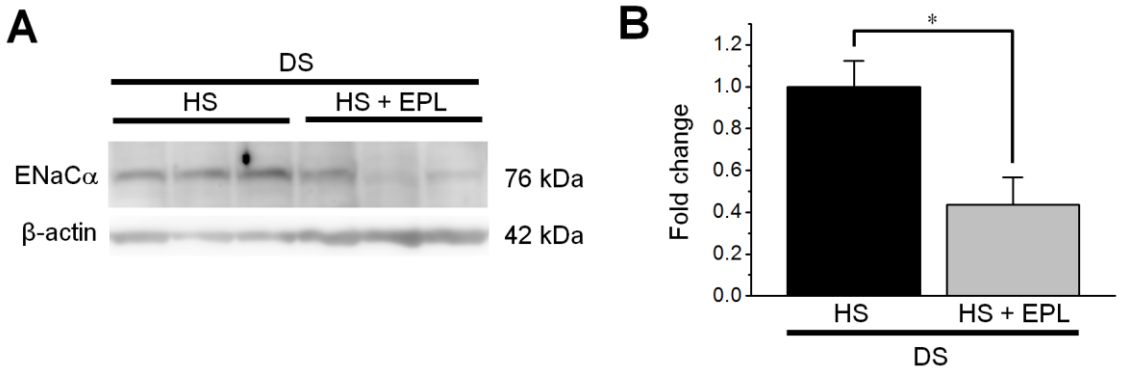


Fig. 20　Western blot analysis of the expression of epithelial sodium channel-α protein in the urinary bladder of DS+HS group and DS+HS+EPL group. (A) Representative immunoblots of epithelial sodium channel-α (ENaCα) and β-actin proteins. (B) Densitometric quantification of the corresponding bands revealed that ENaCα protein in DS+HS+EPL group was significantly inhibited the up-regulation of ENaCα protein, compared to DS+HS group. The mean expression level of ENaCα protein in the DS+HS group was set to 1.0-fold for the comparative analysis. Each bar indicates mean ± standard error values; n = 5 in DS+HS group, and n = 3 in DS+HS+EPL group. *P<0.05.

第四節　考察

本態性高血圧患者において、食塩の過剰摂取は高血圧発症の一因となりうる。また、高血圧は、下部尿路症状のリスク因子となる可能性があることが報告されている[37-39]。基礎研究においては、自然発症高血圧モデルである SHR が、高血圧に関連する蓄尿障害の研究にはよく用いられてきたが[45]、食塩感受性高血圧モデルである DS ラットの下部尿路機能についての報告は現在までにほとんどない。SHR に関しては、遺伝的背景が高血圧発症の病因であるが、DS ラットは遺伝的背景に加え、高食塩食の摂取という生活習慣に由来する病因が高血圧の発症に関与する。さらに、DS ラットの腎臓においては、MR-ENaC 経路が亢進していることが報告されており[44]、本研究においては、腎臓と同様に膀胱においても MR-ENaC 経路が機能しており、膀胱機能に寄与しているという仮説を立て、DS ラットを用いた検討を行った。

高食塩食を負荷した DS ラットは、高食塩食を負荷した DR ラットに比べ、1 回あたりの排尿量の減少や、安静期（睡眠期）の排尿回数の増加がみられるという報告がある[43]。本研究では、膀胱内圧測定により、高食塩食を負荷した DS ラットは高食塩食を負荷した DR ラットに比べ、生理食塩液の定速注入時の排尿間隔の短縮が見られた。つまり高食塩食を負荷した DS ラットは膀胱容量が減少しており、膀胱に尿を貯めにくくなっていた。これは、膀胱内への ENaC 阻害薬であるアミロライド溶液の注入により改善した。このことから、食塩感受性高血圧に伴う蓄尿障害には膀胱上皮の ENaC が関与していることが示唆された。一方、DR+HS 群において、生理食塩液の注入時の排尿間隔とアミロライド溶液の注入時の排尿間隔には差がなかった。このことから、健常時の蓄尿相においては、上皮における膀胱壁の伸展を感受する分子は、アミロライドに感受性を示さない成分であると考えられ、膀胱における MR-ENaC 経路は食塩感受性高血圧に伴う蓄尿障害という病態において亢進することが示唆された。

高食塩食を負荷した DS ラットの膀胱における ENaCαタンパク質の発現量は、高食塩食を負荷した DR ラットに比べて増加が見られた。また、DR ラットと DS ラットにおいて、いずれも ENaCαタンパク質の膀胱上皮における局在が見られた。したがって、2 群における ENaCαタンパク質の発現量の相違は上皮に限定された相違であると考えられる。さらに、DS ラットに、高食塩食の負荷とともに、選択的 MR 阻害薬である EPL を投与したところ、高食塩食の負荷のみを施した DS ラットに比べて膀胱における ENaCαタンパク質の発現量の減少が見られた。なお、この 2 群については全身血圧の測定を行っていないが、今回用いた EPL の投与量は、当研究室において、以前に同様の検討を行った、本研

究より長期の食塩負荷と EPL 投与期間で血圧を下げなかった事例（未発表データ）と同じ投与量であるため、得られた結果は単なる血圧の下降による効果ではないと考えられる。また、本研究においては、DR＋HS 群に EPL を投与した群の作製を行っていないため、EPL が MR を介さず、膀胱における ENaCαの発現量を減少させた可能性を否定することはできない。EPL を用いた検討に関しては、膀胱機能の評価を含め、諸々の詳細な検討については今後の課題である。

本研究において、我々は、食塩感受性高血圧モデルを用い、高食塩食が膀胱上皮における ENaCαの発現量を増加させており、蓄尿障害を引き起こす可能性を初めて示した。さらに、選択的 MR 阻害薬である EPL の投与により、ENaCαの発現量は減少した。これらのことより、本研究により、食塩感受性高血圧を伴う蓄尿障害に対する新規の治療ターゲットを探索するための有用な知見が得られた。

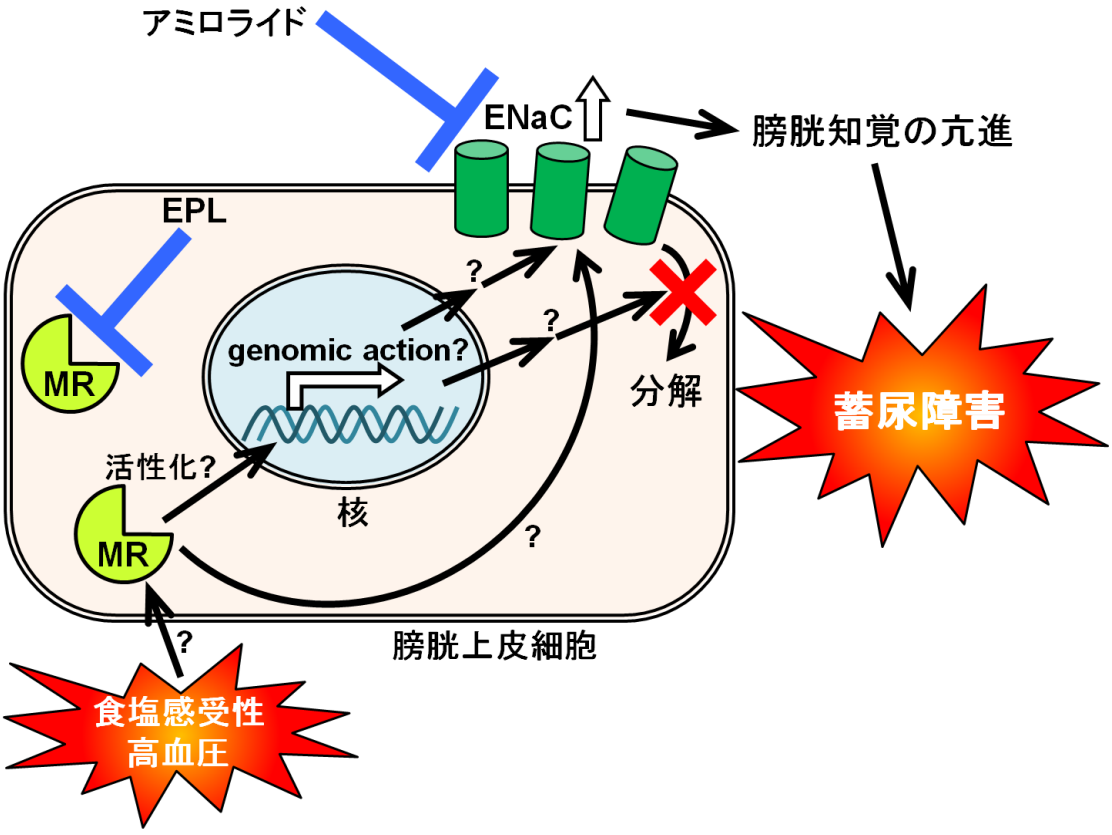


Fig. 21　第二章の結果より想定されるシグナル伝達機構

総括

人口が著しく高齢化している現代社会において問題となっている蓄尿症状に対する薬物治療の選択肢は限られており、さらに、副作用の発現や治療抵抗性を示す症例がある。そのため、新規治療ターゲットを探索することが必要と考えられる。

膀胱上皮に発現する ENaC が膀胱の伸展を感知し、上皮からの ATP 放出を促進させることや、蓄尿症状を訴える下部尿路閉塞患者においては対照患者に比べ、膀胱上皮における ENaC の発現量が多いという報告がある[16]。また、腎臓の遠位ネフロンや遠位結腸などの上皮細胞においては、ENaC の発現量の調節には、上流で MR が関与していることが知られている[8]。さらに、食塩感受性高血圧モデルラットにおいては、腎臓における MR-ENaC 経路の亢進が報告されている[44]。

本研究において、第一章では、ラット膀胱上皮には MR が発現しており、ENaC の発現を調節していることと、この MR-ENaC 経路の亢進が蓄尿障害を引き起こすことを明らかにした。そして、第二章では、食塩感受性高血圧モデルラットにおいては、正常対照に比べ、高食塩食負荷の条件下で、膀胱上皮における ENaCαの発現量が増加していることが蓄尿障害につながっていると考えられ、さらに、MR を阻害することで膀胱における ENaCαの発現量が減少することを明らかにした。

本研究により、我々が新規に発見した膀胱上皮における MR が、生活習慣としての過剰な食塩摂取による高血圧をリスク因子とした蓄尿症状に対する新規治療ターゲットの候補として有用である可能性があるという有益な知見が得られた。

引用文献

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A.
   The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society.
   Neurourol Urodyn. 2002;21:167–178.

2. 日本排尿機能学会　編集
   男性下部尿路症状診療ガイドライン　2008
   http://minds.jcqhc.or.jp/n/medical_user_main.php

3. Birder L, Andersson KE.
   Urothelial signaling.
   Physiol Rev. 2013;93:653–680.

4. Merrill L, Gonzalez EJ, Girard BM, Vizzard MA.
   Receptors, channels, and signalling in the urothelial sensory system in the bladder.
   Nat Rev Urol. 2016;13:193–204.

5. 松本成史.
   排尿障害（下部尿路機能障害）病態解説.
   医学のあゆみ. 2011 年. 238 巻 4 号. p.291-296

6. Keay SK, Birder LA, Chai TC.
   Evidence for bladder urothelial pathophysiology in functional bladder disorders.
   Biomed Res Int. 2014;2014:865463.

7. Du S, Araki I, Mikami Y, Zakoji H, Beppu M, Yoshiyama M, Takeda M.
   Amiloride-sensitive ion channels in urinary bladder epithelium involved in mechanosensory transduction by modulating stretch-evoked adenosine triphosphate release.
   Urology. 2007;69:590–595.

8. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M.
The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology.
Nucl Recept Signal. 2007;5:e012.

9. Yamaguchi O, Nishizawa O, Takeda M, Yokoyama O, Homma Y, Kakizaki H, Obara K, Gotoh M, Igawa Y, Seki N, Yoshida M.
Clinical guidelines for overactive bladder.
Int J Urol. 2009;16:126–142.

10. 日本排尿機能学会過活動膀胱診療ガイドライン作成委員会　編集
過活動膀胱診療ガイドライン［第 2 版］2015

11. Sexton CC, Notte SM, Maroulis C, Dmochowski RR, Cardozo L, Subramanian D, Coyne KS.
Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy: a systematic review of the literature.
Int J Clin Pract. 2011;65:567–585.

12. Benner JS, Nichol MB, Rovner ES, Jumadilova Z, Alvir J, Hussein M, Fanning K, Trocio JN, Brubaker L.
Patient-reported reasons for discontinuing overactive bladder medication.
BJU Int. 2010;105:1276–1282.

13. Takasu T, Ukai M, Sato S, Matsui T, Nagase I, Maruyama T, Sasamata M, Miyata K, Uchida H, Yamaguchi O.
Effect of (R)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)-amino]ethyl} acetanilide (YM178), a novel selective beta3-adrenoceptor agonist, on bladder function.
J Pharmacol Exp Ther. 2007;321:642–647.

14. Birder LA, de Groat WC.

Mechanisms of disease: involvement of the urothelium in bladder dysfunction.
Nat Clin Pract Urol. 2007;4:46–54.

15. Hill WG.
Control of urinary drainage and voiding.
Clin J Am Soc Nephrol. 2015;10:480–492.

16. Araki I, Du S, Kamiyama M, Mikami Y, Matsushita K, Komuro M, Furuya Y, Takeda M.
Overexpression of epithelial sodium channels in epithelium of human urinary bladder with outlet obstruction.
Urology. 2004;64:1255–1260.

17. Kellenberger S, Schild L.
Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure.
Physiol Rev. 2002;82:735-767.

18. Kellenberger S, Schild L.
International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na^+ channel.
Pharmacol Rev. 2015;67:1-35.

19. Sun Y, Zhang JN, Zhao D, Wang QS, Gu YC, Ma HP, Zhang ZR.
Role of the epithelial sodium channel in salt-sensitive hypertension.
Acta Pharmacol Sin. 2011;32:789–797.

20. Marunaka Y.
Characteristics and pharmacological regulation of epithelial Na^+ channel (ENaC) and epithelial Na^+ transport.
J Pharmacol Sci. 2014;126:21–36.

21. Ong GS, Young MJ.
Mineralocorticoid regulation of cell function: the role of rapid signalling

and gene transcription pathways.
J Mol Endocrinol. 2017;58:R33–R57.

22. Garty H.
Mechanisms of aldosterone action in tight epithelia.
J. Membrane Biol. 1986;90:193–205.

23. Shehata MF.
Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) in kidneys of salt-sensitive Dahl rats: insights on alternative splicing.
Int Arch Med. 2009;2:28.

24. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA.
The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:14552–14557.

25. Kammerl MC, Richthammer W, Kurtz A, Krämer BK.
Angiotensin II feedback is a regulator of renocortical renin, COX-2, and nNOS expression.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002;282:R1613–R1617.

26. Rafiq K, Nakano D, Ihara G, Hitomi H, Fujisawa Y, Ohashi N, Kobori H, Nagai Y, Kiyomoto H, Kohno M, Nishiyama A.
Effects of mineralocorticoid receptor blockade on glucocorticoid-induced renal injury in adrenalectomized rats.
J Hypertens. 2011;29:290–298.

27. Patel PD, Sherman TG, Goldman DJ, Watson SJ.
Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus.
Mol Endocrinol. 1989;3:1877–1885.

28. Bianchi L.
Mechanotransduction: touch and feel at the molecular level as modeled in Caenorhabditis elegans.

Mol Neurobiol. 2007;36:254–271.

29. Young WF.
Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome.
Clin Endocrinol (Oxf). 2007;66:607–618.

30. Ingelsson E, Pencina MJ, Tofler GH, Benjamin EJ, Lanier KJ, Jacques PF, Fox CS, Meigs JB, Levy D, Larson MG, Selhub J, D'Agostino RB Sr, Wang TJ, Vasan RS.
Multimarker approach to evaluate the incidence of the metabolic syndrome and longitudinal changes in metabolic risk factors: the Framingham Offspring Study.
Circulation. 2007;116:984–992.

31. Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M.
Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2013;137:99–106.

32. Engeli S, Böhnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM.
Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system.
Hypertension. 2005;45:356–362.

33. Lee WC, Chien CT, Yu HJ, Lee SW.
Bladder dysfunction in rats with metabolic syndrome induced by long-term fructose feeding.
J Urol. 2008;179:2470–2476.

34. Uzun H, Zorba OÜ.
Metabolic syndrome in female patients with overactive bladder.
Urology. 2012;79:72–75.

35. Tai HC, Chung SD, Ho CH, Tai TY, Yang WS, Tseng CH, Wu HP, Yu HJ.
Metabolic syndrome components worsen lower urinary tract symptoms in women with type 2 diabetes.

J Clin Endocrinol Metab. 2010;95:1143–1150.

36. Pashootan P, Ploussard G, Cocaul A, de Gouvello A, Desgrandchamps F.
Association between metabolic syndrome and severity of lower urinary tract symptoms (LUTS): an observational study in a 4666 European men cohort.
BJU Int. 2015;116:124–130

37. Yoshimura K, Terada N, Matsui Y, Terai A, Kinukawa N, Arai Y.
Prevalence of and risk factors for nocturia: Analysis of a health screening program.
Int J Urol. 2004;11:282–287.

38. Ito H, Yoshiyasu T, Yamaguchi O, Yokoyama O.
Male lower urinary tract symptoms: hypertension as a risk factor for storage symptoms, but not voiding symptoms.
Low Urin Tract Symptoms. 2012;4:68–72.

39. Sugaya K, Kadekawa K, Ikehara A, Nakayama T, Gakiya M, Nashiro F, Goya M, Hatano T, Ogawa Y.
Influence of hypertension on lower urinary tract symptoms in benign prostatic hyperplasia.
Int J Urol. 2003;10:569–574.

40. 谷津圭介, 梅村敏
二次性高血圧をどこまで診断すべきか
Heart View 19: 350-354, 2015.

41. Haddy FJ.
Role of dietary salt in hypertension.
Life Sci. 2006;20;79:1585–1592.

42. Rapp JP.
Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review.
Hypertension. 1982;4:753–763.

43. Kurokawa T, Zha X, Ito H, Aoki Y, Akino H, Kobayashi M, Yokoyama O.
Underlying mechanisms of urine storage dysfunction in rats with salt-loading hypertension.
Life Sci. 2015;15;141:8–12.

44. Fujita T
Mechanism of salt-sensitive hypertension: focus on adrenal and sympathetic nervous systems.
J Am Soc Nephrol. 2014;25:1148–1155.

45. McMurray G, Casey JH, Naylor AM.
Animal models in urological disease and sexual dysfunction.
Br J Pharmacol. 2006;147:S62–S79.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始、熱心に温かく、御指導、御教授を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野　木村和哲教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、熱心な御指導、御鞭撻を賜りました、名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬剤学分野　前田康博先生、堀田祐志先生、ならびに名古屋市立大学大学院医学研究科臨床薬剤学　片岡智哉先生に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院医学研究科　浅井清文先生、安井孝周先生、鵜川眞也先生、佐々木昌一先生、柴田泰宏先生、濱川隆先生に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験を手伝って下さり、また、様々な助言を頂いた、前田琴美さんをはじめとする病院薬剤学分野の研究員の皆様に深謝致します。

私の研究活動に理解を示し過分なるご配慮を賜りました名古屋市立大学病院薬剤部の皆様に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、動物のお世話をして頂いた動物舎の皆様に深謝致します。

最後に、私を見守り、時には励まし、支えてくれた家族や友人たちに深謝致します。