

学位論文題名

Volume-evoked micturition reflex is mediated by the ventrolateral periaqueductal gray in anesthetized rats.

(麻醉下ラットにおいて、膀胱伸展により誘発される排尿反射は
中脳中心灰白質腹外側部を介する)

学位論文内容の要旨

【背景】

ほ乳類における排尿反射は脊髄より上位の中枢神経で制御されている。ネコやラットを用いた電氣的破壊病変の作成実験から橋被蓋背外側部に排尿反射中枢(以下 Barrington 核)が同定され、電気生理学・神経薬理的にも Barrington 核が排尿反射に重要な部位であることが確認された。以上より Barrington 核・仙髄(ラットでは腰仙髄)・下部尿路が排尿に必須の「基本的な排尿反射回路」を形成していると考えられてきた。

最近の神経標識物質および電子顕微鏡を用いた神経解剖学的検討から、ラットにおいては、腰仙髄領域からの求心性神経線維が Barrington 核に加え中脳中心灰白質(以下 PAG)に投射すること、さらに PAG から Barrington 核に投射する神経線維の存在することが確認された。またネコにおいては、仙髄からの求心性神経線維が最初に PAG に終末し、直接 Barrington 核に投射する神経線維が存在しないことが証明された。これらの結果から PAG も基本的な排尿反射回路の一部を形成している可能性が示唆された。

本研究ではこの仮説を機能的な面から解明することを目的とし、シナプス伝達阻害薬塩化コバルト(CoCl_2)の脳内微量投与による排尿反射抑制の有無を検討した。

【実験方法】

オス Wistar ラット ($n=27$, 285-516g.)を用いた。ウレタン麻酔(1.2g/kg, i.p.)後、大腿動脈より血圧測定用のポリエチレンチューブ(PE50)を留置した。次に、下腹部の正中切開にて膀胱・近位尿道部を露出後、膀胱内圧測定用のポリエチレンチューブ(PE60)を膀胱頂部より留置し固定した。このチューブより生理食塩水の持続注入(0.10-0.25ml./min.)と膀胱内圧測定を行った。外尿道括約筋筋電図測定用にテフロン被膜された銀線(0.25mm.径)2本を外尿道括約筋に刺入した。膀胱内圧および外尿道括約筋筋電図の信号はコンピュータにて表示・記録し、後の解析に用いた。脳定位固定装置を用いてラットの頭部を固定し、必要部位の頭蓋骨を除去した。生理食塩水の持続注入により安定した周期的排尿が起こることを確認した後、開頭部より 10mM CoCl_2 溶液(人口脳脊髄液で溶解)を満たしたガラス微量ピペット(先端径 20-40 μm .)を刺入した。ピペットより CoCl_2 溶液を片側微量投与(25-50nl.)し、排尿状態と血圧の変化を観察した。 CoCl_2 微量投与により変化を示した部位には 2%Fluoro-Gold または 10%India インクを注入し、投与部位の同定に用いた。また CoCl_2 投与により排尿が抑制される部位(以下、効果部位)の周囲(0.5mm.間隔)にも CoCl_2 を投与し排尿反射への影響を検討した。コントロールとして効果部位に人口脳脊髄液を投与した。実験終了時、10%ホルマリンにて灌流後、脳を取り出し投与部位を組織学的に検討した。尚、基礎実験として4匹のラットを用いて比較的多量(100-200nl.)の 10mM CoCl_2 を bregma -5.60~-11.0 の領域に投与し、効果部位の分布を予め検討しておいた。

【結果】

1) 膀胱伸展により誘発される排尿反射：生理食塩水の膀胱内持続注入により周期的な膀胱収縮（および尿道からの排尿）と収縮に同期した外尿道括約筋の電氣的活動を観察した。膀胱収縮の出現までに要する注入量は平均 0.29ml、最大収縮圧は平均 26.0cmH₂O であった。動脈圧は生理食塩水の注入時には 80~120mmHg の間で安定しており、排尿時に同期して 2 相性の微少な変化を認めた。

2) CoCl₂ 微量投与に伴う排尿反射の変化：基礎実験から中脳・橋の限られた範囲（bregma -7.60 ~ -9.80）にのみ効果部位が存在することが判明していたが、今回の 25-50nl の CoCl₂ 投与では、効果部位の分布はさらに限局していた。効果部位への CoCl₂ 投与では、投与直後より膀胱の収縮と外尿道括約筋の活動が消失し、持続する尿閉状態とこれに伴う溢流性尿失禁を認めた。この間の膀胱内圧は高圧のまま経過した。この CoCl₂ による抑制はほとんどの場合 30 分以内に回復し、またその後の CoCl₂ 投与で再現性を認めた。効果部位への人口脳脊髄液の投与は排尿反射に影響を認めず、また効果部位より 0.5mm 離れた部位・中脳水道・第 4 脳室への CoCl₂ の投与では変化を認めなかった。

3) 効果部位の分布：橋では Barrington 核への CoCl₂ 投与のみが排尿反射を抑制した。隣接する青斑核では排尿反射の抑制を認めなかった。中脳においては、PAG の尾側領域（bregma -7.80 ~ -8.80）、特に腹外側領域の境界部（以下、PAGvl）に限定して効果部位が分布していた。検討した範囲内でこの 2ヶ所（Barrington 核および PAGvl）以外に効果部位を認めなかった。

【考案】

今回の神経薬理的な検討から、Barrington 核と同様に PAGvl が基本的排尿反射に必須な部位であることが機能的に証明された。

PAG は一般に痛覚中枢としても知られており、痛みは各種反射を抑制するが、今回の実験では効果部位への人口脳脊髄液投与では排尿の抑制が無かったこと、CoCl₂ 投与時に血圧の有意な変動を認めなかったことなどから、CoCl₂ 投与による排尿反射消失は CoCl₂ 自体の作用によるものと考えられる。シナプス伝達阻害薬である CoCl₂ は、キシロカインなどの麻酔薬と異なり走行する神経線維には影響することなくシナプス伝達のみを特異的に阻害することが指摘されている。この点から今回観察された反射の消失は、効果部位に存在するシナプスへの直接作用により発現したもので、PAGvl も Barrington 核と同様に基本的な排尿反射回路において重要な役割を担っていると考えられる。

神経解剖学的検討から、ラットでは腰仙髄からの求心性神経終末は PAG 腹外側部に広く投射し、さらに PAG 腹外側部の広い領域から Barrington 核への投射がみられる。また電気生理学的には、ラット膀胱の求心性神経線維を電気刺激すると PAG 背側部に誘発電位が記録されるが、PAG 背側部の電気刺激では排尿反射は起こらず、PAG 腹側部の刺激により排尿が誘発される。このように形態的にも機能的にも腰仙髄から PAG への多くの神経投射が確認されているが、この中でも基本的な排尿反射に関わる部位は PAG の非常に限られた部分であることが今回の検討から示された。

【結論】

ウレタン麻酔下ラットを用いた神経薬理的な検討より、Barrington 核に加え PAG の限局した部位（PAGvl）が基本的な排尿反射に深く関連していることが機能的に証明された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 福 島 菊 郎

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

Volume-evoked micturition reflex is mediated by the ventrolateral periaqueductal gray in anesthetized rats.

(麻酔下ラットにおいて、膀胱伸展により誘発される排尿反射は
中脳中心灰白質腹外側部を介する)

ほ乳類における排尿反射は、橋被蓋背外側部に存在する橋排尿反射中枢により制御されており、仙髄（ラットでは腰仙髄）および下部尿路とあわせて排尿に必須の「基本的な排尿反射回路」を形成していると考えられてきた。最近の神経解剖学的検討から、この橋排尿中枢に加え中脳中心灰白質（以下、PAG）も基本的な排尿反射回路の一部を形成している可能性が示唆された。本研究ではこの仮説を機能的な面から解明することを目的とし、シナプス伝達阻害薬である塩化コバルトの脳内微量投与による排尿反射抑制の有無を検討した。

オス Wistar ラット (n=27, 285-516g.) を用いた。ウレタン麻酔 (1.2g/kg, i.p.) 後、下腹部の正中切開にて膀胱・近位尿道部を露出後、膀胱内圧測定用のポリエチレンチューブ (PE60) を膀胱頂部より留置した。このチューブより生理食塩水の持続注入 (0.10-0.25ml./min.) と膀胱内圧測定を行った。外尿道括約筋筋電図測定用にテフロン被膜された銀線 (0.25mm.径) 2 本を外尿道括約筋に刺入した。膀胱内圧および外尿道括約筋筋電図の信号はコンピュータにて表示・記録し、のちの解析に用いた。脳定位固定装置に頭部を固定し、必要部位の頭蓋骨を除去した。生理食塩水の持続注入により安定した周期的排尿が起こることを確認した後、開頭部よりガラス微量ピペット (先端径 20-40 μ m.) を刺入した。ピペットより 10mM 濃度の塩化コバルト液を片側微量投与 (25-50nl.) し、排尿反射の抑制の有無を観察した。塩化コバルト投与後に抑制を認めた部位には 2%Fluoro-Gold または 10%India インクを注入し、投与部位の同定に用いた。また抑制部位の周囲 (0.5mm.間隔) にも塩化コバルトを投与し抑制の有無を検討した。コントロールとして抑制部位に人口脳脊髄液を投与した。実験終了後、すべての投与部位を組織学的に確認した。尚、予備実験として比較的多量 (100-200nl.) の塩化コバルト液を bregma -5.60 ~-11.0 の範囲に投与し、排尿が抑制される部位を絞り込んでおいた。

生理食塩水の膀胱内持続注入により周期的な膀胱収縮 (および尿道からの排尿) とこの収縮に同期し

た外尿道括約筋の電氣的活動を観察した。今回検討した範囲では、1) 橋排尿中枢および2) PAG の尾側 (bregma-7.80~-8.80) 腹外側領域境界部 (以下 PAGvl) の2ヶ所でのみ塩化コバルト投与による排尿反射の抑制を認め、ほとんどの場合で30分以内に排尿反射は回復した。またこれらの抑制部位への塩化コバルト再投与で再現性を認めた。抑制部位への人口脳脊髄液の投与では排尿反射に影響を認めず、また効果部位より0.5mm離れた部位や中脳水道・第4脳室への塩化コバルトの投与では変化を認めなかった。

シナプス伝達阻害薬である塩化コバルトは、走行する神経線維には影響を与えずにシナプス伝達のみを阻害する。今回観察された反射の消失は、抑制部位に存在するシナプスへの直接作用により発現したもので、橋排尿中枢と同様に PAGvl も基本的な排尿反射回路に重要であると考えられる。神経解剖学的検討から、ラット腰仙髄からの求心性神経終末は腹外側部を含む PAG 全域に広く分布し、さらに PAG 腹外側部の広い領域から橋排尿中枢への投射がみられる。また電気生理学的には、ラット膀胱の求心性神経線維を電気刺激すると PAG 腹外側部に加え背側部においても誘発電位が記録される。このように形態的にも機能的にも腰仙髄から PAG への多くの神経投射が確認されているが、基本的な排尿反射に関わる部位は PAG の非常に限られた部分であることが今回の検討から示された。

この論文は、排尿反射回路における中脳中心灰白質の重要性を機能的な面から詳細に検討し証明した点で高く評価され、今後の下部尿路に対する脳制御の解明に大きく寄与することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断する。