

アドレナリン  $\alpha_{1A}$  受容体遮断薬シロドシンの  
糖尿病性低活動膀胱への効果

**Effects of silodosin, adrenergic  $\alpha_{1A}$  receptor antagonist,  
on underactive bladder with diabetes mellitus**

2022 年

阿波加 沙織

## 略語一覧

略語	説明
AR	adrenoceptor, adrenergic receptor, アドレナリン受容体
DM	diabetes mellitus, 糖尿病
IUP	intraurethral pressure, 尿道内圧
<i>i.p.</i>	intraperitoneal, 腹腔内投与
<i>i.v.</i>	intravenous, 静脈内投与
MBP	mean blood pressure, 平均血圧
<i>p.o.</i>	per os, 経口投与
<i>s.c.</i>	subcutaneous, 皮下投与
SD	Sprague-Dawley
STZ	streptozotocin, ストレプトゾトシン
ZDF	Zucker diabetic fatty

## 目次

序章 .....	1
第 1 章. 自然発症糖尿病モデル (ZDF ラット) におけるシロドシンとジスチグミンの治療効果 .....	6
1.1 緒言 .....	6
1.2 実験材料・方法 .....	7
1.2.1 実験動物 .....	7
1.2.2 使用薬物 .....	7
1.2.3 排尿動態測定 .....	7
1.2.4 データ処理 .....	9
1.3 結果 .....	10
1.3.1 ZDF ラットの一般状態と排尿機能 .....	10
1.3.2 ZDF ラットにおけるシロドシンとジスチグミンの排尿機能に対する治療効果 .....	12
1.4 考察 .....	14
1.5 小括 .....	15
第 2 章. 雌性正常ラットにおけるシロドシン及びウラピジルのプロファイ ルと薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) における両薬物の治療効果 .....	16
2.1 緒言 .....	16
2.2 実験材料・方法 .....	17
2.2.1 実験動物 .....	17
2.2.2 使用薬物 .....	17
2.2.3 尿道内圧測定 .....	17
2.2.4 血圧測定 .....	18
2.2.5 モデル動物作製 .....	18
2.2.6 薬物処置 .....	18
2.2.7 膀胱血流測定 .....	19
2.2.8 排尿動態測定 .....	19
2.2.9 データ処理 .....	20
2.3 結果 .....	21

2.3.1 雌性ラットに対するシロドシン及びウラピジルのプロファイル .....	21
2.3.2 STZ ラットの一般状態とシロドシン及びウラピジルの影響 .....	23
2.3.3 STZ ラットにおけるシロドシン及びウラピジルの排尿機能に 対する治療効果 .....	24
2.4 考察 .....	26
2.5 小括 .....	27
第3章. 薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) におけるシロドシンの予防 効果と作用機序解析 .....	28
3.1 緒言 .....	28
3.2 実験材料・方法 .....	29
3.2.1 実験動物 .....	29
3.2.2 使用薬物 .....	29
3.2.3 モデル動物作製 .....	29
3.2.4 薬物処置 .....	29
3.2.5 膀胱血流測定 .....	30
3.2.6 膀胱内圧測定 .....	30
3.2.7 網羅的遺伝子発現解析 .....	30
3.2.8 定量的 PCR .....	30
3.2.9 免疫染色 .....	31
3.2.10 データ処理 .....	31
3.3 結果 .....	32
3.3.1 STZ ラットの一般状態とシロドシンによる影響 .....	32
3.3.2 STZ ラットにおけるシロドシンの排尿機能に対する予防効果 .....	33
3.3.3 STZ ラットにおける膀胱組織の網羅的遺伝子発現変化とシロド シンによる影響 .....	35
3.3.4 STZ ラットにおける膀胱神経脱落とシロドシンの影響 .....	39
3.4 考察 .....	42
3.5 小括 .....	43
総括 .....	44
謝辞 .....	45

掲載論文 .....	46
引用文献 .....	47

## 序章

2014年の世界の糖尿病患者は約4億2,200万人<sup>1)</sup>、2018年の厚生労働白書の報告によると、我が国の糖尿病有病者及びその予備軍はそれぞれ約1,000万人と推計されている<sup>2)</sup>。糖尿病では心血管疾患、神経症、網膜症、腎症だけでなく様々な合併症を誘発する<sup>3)</sup>。Diabetes がギリシャ語の“流れ出る、多尿”を起源とするように糖尿病は古くから腎臓や膀胱と関わりがあると考えられてきた<sup>4)</sup>。糖尿病性下部尿路症状の有病率は25%~83%と推定されており<sup>5)</sup>、女性の尿流動態検査では、2型糖尿病患者の約半数が排尿筋低活動に陥るとされている<sup>6),7)</sup>。糖尿病性排尿機能障害は一般的に、膀胱の知覚低下、膀胱の容量増加、膀胱の収縮力低下及び排尿時の残量増加を生じる<sup>5),7)-9)</sup>。排尿機能障害が重篤化すると、失禁、尿崩症及び水腎症を生じ、それらを防ぐために間欠自己導尿を行う必要がある。下部尿路症状を伴う糖尿病患者では、症状の進行度及び期間に応じて、排尿筋過活動から排尿筋低活動へと発展することが懸念される。過活動膀胱は、排尿筋過活動を示す症候群として認知されている。その一方、低活動膀胱は未だ理解が浅く、その研究も不十分な状態にある<sup>9)</sup>。排尿筋の低活動状態は、糖尿病以外にも特発性、神経原性及び筋原性と定義される様々な病的過程から生じる。その主たる危険因子として、加齢、神経原性疾患（脳卒中、パーキンソン病、多発性硬化症など）、メタボリック症候群及び膀胱出口閉塞症がある<sup>10),11)</sup>。

排尿筋の低活動状態の診断には、内圧尿流検査に基づく尿流動態検査が用いられる<sup>12)</sup>。内圧尿流検査とは、尿道と直腸からカニューレを挿入し、膀胱内圧、直腸内圧（腹圧）、排尿筋圧（膀胱内圧から腹圧を差し引いた圧）を測定することで求められる。つまり、排尿時の尿流率と排尿筋圧の関係から膀胱出口部閉塞の度合い及び膀胱収縮機能を評価する侵襲性の高い検査である。排尿筋低活動は、非神経原性下部尿路障害の尿流動態検査を受けている男性の9%~48%、高齢女性の12%~45%で認められ<sup>13)</sup>、多数の患者が尿路障害の愁訴を持っている。そのため、非侵襲的な検査で診断できることが望ましいものの、侵襲的な内圧尿流検査を必要とすることがこの疾患の診断及び治療を制限している。過活動膀胱が排尿筋過活動状態の症候群であるように、排尿筋低活動による症候群を示すため、低活動膀胱が提唱された。2018年、国際禁制学会は低活動膀胱を「尿勢低下、遷延性排尿（排尿遅延）及び腹圧排尿で特徴づけられ、残尿感はある場合とない場合があり、ときに蓄尿症状を伴う」と定義した<sup>14)</sup>。低活動膀胱の症状は下部尿路閉塞のそれと類似しているため、患者からの愁訴のみで低活動膀胱の診断することが難しい。2021年、日本排尿機能学会は、内圧尿流検査に基づく診断を行わず低活動膀胱の可能性が高い患者を潜在的に特定するため、新たな臨床診断基準を提唱した<sup>15)</sup>。その診断基準では、低侵襲性の検査で明らかとなる残尿量>100 mL、排尿効率<90%、

最大尿流率<12 mL/s 及び下部尿路閉塞を除外するという条件を組み合わせることで、高感度に低活動膀胱を診断できる可能性が示されている<sup>15)</sup>。

下部尿路の末梢神経を随意的に制御するには、交感神経と副交感神経の自律神経及び陰核神経の体性神経を複雑に相互作用させることが必要である。副交感神経はアセチルコリンを放出し、膀胱平滑筋のアセチルコリン M<sub>3</sub> 受容体を刺激して膀胱を収縮する。交感神経はノルアドレナリンを放出し、アドレナリン β<sub>3</sub> 受容体を活性化して膀胱平滑筋を弛緩し、アドレナリン α<sub>1</sub> 受容体 (Aα<sub>1</sub>R) を活性化し尿道平滑筋を収縮する。また体性神経はアセチルコリンを放出し、アセチルコリン N<sub>M</sub> 受容体を活性化して外尿道括約筋を収縮する<sup>16)</sup>。

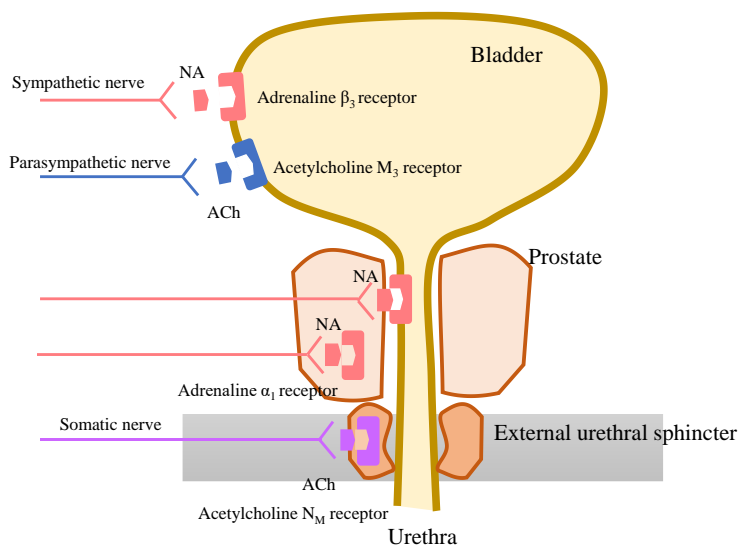


図 1 Efferent pathways of the lower urinary tract. 16)modified

Afferent pathways and neurotransmitter mechanisms control the lower urinary tract. Parasympathetic nerve release acetylcholine (ACh), which produces a bladder contraction by stimulating acetylcholine M<sub>3</sub> receptors in the bladder smooth muscle. Sympathetic neurons release noradrenaline (NA), which activates adrenaline β<sub>3</sub> receptors to relax bladder smooth muscle and activates adrenaline α<sub>1</sub> receptors to contract urethral smooth muscle. Somatic nerve also release ACh, which produces a contraction of the external sphincter striated muscle by activating acetylcholine N<sub>M</sub> receptors.

低活動膀胱には、膀胱収縮を増強させる薬物あるいは膀胱出口抵抗を下降させる薬物が治療に有効とされる。現在、標準的な薬物として、膀胱平滑筋の収縮力を高めることが出来るベタネコールなどのムスカリン性アセチルコリン受容体刺激薬とジスチグミンなどのコリンエステラーゼ阻害薬が用いられている<sup>17)</sup>。ヒトを含む様々な動物種において、ムスカリン性アセチルコリン受容体作動薬が膀胱平滑筋収縮を誘発し、コリンエステラーゼ阻害薬がそれを増強することが実験的に示されている<sup>18)-20)</sup>。しかしながら、これらの薬物の有用性を示した研究は、試験が小規模かつ盲検性が欠如しており、エビデンスの質が低く、追跡調査期間も短期間に留まるという課題があり<sup>21)</sup>、本邦の「女性下部尿路症状診療ガイドライン (第2版)」での推奨グレードはC1 (行ってもよい) に留まる<sup>22)</sup>。さらに、コリンエステラーゼ阻害薬のジスチグミンは、その有害事象となるコリン作動性クリ

ーゼの報告が年々増加し、死亡例も認められている<sup>23)</sup>ことから、2010年に我が国では排尿障害に使用できる最大用量が10 mgから5 mgに制限された<sup>24)</sup>。コリン作動性クリーゼとは、コリンエステラーゼ阻害薬による呼吸困難を伴うアセチルコリン過剰により誘発される症状の急激な悪化とされる<sup>25)</sup>。その症状は、人工呼吸を要する状態に至るため、悪心・嘔吐、腹痛、下痢などの初期症状が見られた場合、ただちに薬物の使用を中止しなければならない<sup>26)</sup>。

$\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬も排尿障害の治療に用いることが可能である<sup>27),28)</sup>。 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬は、主に前立腺及び尿道に分布する $\text{A}\alpha_1\text{R}$ を遮断し、尿道閉塞を解除する<sup>29),30)</sup>。タムスロシン、ナフトピジル及びシロドシン等の $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬は前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療を目的とするため、女性への使用は推奨されない。その中で、ウラピジルは女性の排尿機能障害にも適用できる唯一の $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬となっている<sup>28)</sup>。ウラピジルは末梢動脈に多く発現している $\text{A}\alpha_{1\text{B}}\text{R}$ も遮断するため、高血圧症での降圧薬としても用いられている<sup>31)</sup>。加えて、低活動膀胱患者において、 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬とコリン作動性薬物の併用は、膀胱平滑筋の収縮力を増強し、尿道抵抗を低下させ、排尿障害を改善することも報告されている<sup>32)</sup>。したがって、 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬とコリンエステラーゼ阻害薬の併用投与は、それぞれの臨床効果を維持しながらコリンエステラーゼ阻害薬の投与量を減らすことで、コリンエステラーゼ阻害薬による副作用を軽減させることが期待される。

1980年代、プラゾシン、テラゾシン、ウラピジル等の $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 遮断薬が排尿障害治療薬として使用されるようになった。しかしながら、これらは、元来、高血圧症治療薬として用いられていた薬物のため、過度の降圧による起立性低血圧症及びめまいが副作用として問題になっていた。その後、1990年前半に、分子生物学的手法により治療標的となる $\text{A}\alpha\text{R}$ 遺伝子がクローニングされ<sup>33)</sup>、 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ には遺伝的に異なる3種類の受容体サブタイプの存在が明らかにされた。つまり、 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ には薬理学的特性から $\text{A}\alpha_{1\text{A}}\text{R}$ 、 $\text{A}\alpha_{1\text{B}}\text{R}$ 及び $\text{A}\alpha_{1\text{D}}\text{R}$ があり、それぞれに対応する遺伝子として $\text{A}\alpha_{1\text{a}}$ 、 $\text{A}\alpha_{1\text{b}}$ 及び $\text{A}\alpha_{1\text{d}}$ が同定された<sup>34)</sup>。その後、動物及びヒトの各種臓器での $\text{A}\alpha_1\text{R}$ 分布についても解析が進み、各 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ サブタイプは種々の組織で異なった表現パターンを示すことが明らかとなった。現在、下部尿路（前立腺、尿道及び膀胱三角部）の $\text{A}\alpha_1\text{R}$ は、主に $\text{A}\alpha_{1\text{A}}\text{R}$ であることが報告されている<sup>35)-37)</sup>。一方、 $\text{A}\alpha_{1\text{B}}\text{R}$ は、主に血圧調節に関与している<sup>38),39)</sup>。 $\text{A}\alpha_{1\text{D}}\text{R}$ は多くの組織で検出困難なため、その研究は他の受容体サブタイプよりも遅れている<sup>40)</sup>。これらの知見から、治療薬として使用されていたプラゾシン、テラゾシン及びウラピジルが前立腺の緊張を緩和する作用と同時に血圧低下作用を示すのは、各 $\text{A}\alpha_1\text{R}$ サブタイプに対する選択性の低さによるためと考えられる<sup>41)</sup>。したがって、 $\text{A}\alpha_{1\text{A}}\text{R}$ に親和性が高く、かつ $\text{A}\alpha_{1\text{B}}\text{R}$ への親和性の低い薬物、つまり血圧降下作用を示さずに排尿障害を改善する治療薬が、有用と考えられる。この特性に着目し、排尿障害治療薬として開発さ



れたのがタムスロシン及びナフトピジルである。これら薬物は下部尿路への作用の選択性が高く、かつ血圧降下作用が弱い治療薬として汎用されていた。しかしながら、タムスロシン及びナフトピジルでも下部尿路作用と血圧に対する作用を十分に乖離できておらず、臨床においてそれらの投与量を排尿障害の治療に最大効果を示す用量に設定できていない。そこで、前立腺肥大症に伴う排尿障害を対象疾患とし、既存の  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬よりも前立腺及び下部尿路への標的臓器選択性が高く、かつ臨床において血圧に影響しない新規  $\text{A}\alpha_{1A}\text{R}$  遮断薬として、シロドシン (1-(3-Hydroxypropyl)-5-[(2R)-2-({2-[2-(2,2,2-trifluoroethoxy)-phenoxy]ethyl}amino)propyl]-2,3-dihydro-1H-indole-7-carboxamide) が創製された。シロドシンは、既存の  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬よりも高い  $\text{A}\alpha_{1A}\text{R}$  選択性に加えて、前立腺の組織選択性が高く<sup>42)</sup>、*in vivo* 条件下でも、血圧への影響が少ない薬理学的特性を示す<sup>43)</sup>。加えて、シロドシンは、従来の  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬より作用持続性にも優れている<sup>44)</sup>。臨床試験においてもシロドシンは、下部尿路症状への優れた改善作用を示した<sup>45)</sup>。このような経緯を経て、現在では前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療に  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬として、タムスロシン及びナフトピジル等に加え、シロドシンが使用されている<sup>46)</sup>。

薬物効果の評価には、ヒトへの外挿が可能な動物モデルを用いることが重要である。原発性の低活動膀胱モデルは、その構築が困難な病態モデルであることから、病態に応じた表現型への薬物の効果で評価されている<sup>47)</sup>。前述したように、低活動膀胱には様々の原因があり、低活動膀胱の要因となる糖尿病、加齢、下部尿路閉塞、パーキンソン病及び骨盤神経切断の病態モデルが薬物の効果の評価するために用いられている<sup>9)</sup>。24ヵ月齢の加齢動物は排尿頻度の増加、残尿の増加、排尿閾値の増加及びカプサイシンへの C 線維の反応性が減弱する<sup>48)</sup>。糖尿病モデルは自然発症モデルとストレプトゾトシン (STZ) あるいはアロキサンの誘発モデルがある<sup>49),50)</sup>。Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットはレプチン受容体のホモ接合体不活性化変異を持ち、ヒトの 2 型糖尿病に類似した代謝プロフィールと病態を示す<sup>51)</sup>。この糖尿病ラットは初期には過活動膀胱様の排尿症状を示すものの、長期間の高血糖状態での酸化ストレス及び多尿により、低活動膀胱様症状を示す。STZ 誘発糖尿病モデルは、糖尿病で続発する排尿障害の評価で汎用されている<sup>50)</sup>。ZDF ラットと同様に、初期には過活動膀胱様の排尿症状を示すものの、STZ 投与後 9-12 週目から低活動膀胱に移行するとされている<sup>52),53)</sup>。低活動膀胱の発症機序として、糖尿病モデルでは膀胱知覚に関わる求心性  $\text{A}\delta$  神経線維及び C 線維の感受性低下に加え<sup>54)</sup>、膀胱神経及び血管の密度が低下していることが報告されている<sup>55),56)</sup>。糖尿病は神経障害に関連する知覚低下などを誘発することが知られており、組織内の血流が神経機能と密接に関係している。

最近の研究では、過活動膀胱モデルラットにタムスロシンを継続投与すると膀胱血流が維持され、排尿回数の増加が抑制されることも示されている<sup>57),58)</sup>。さら

に、下部尿路閉塞を伴わない動脈硬化による膀胱虚血を生じたラットにおいて、シロドシンの継続投与により、膀胱血流の回復に伴い膀胱機能障害が改善されたことも報告されている<sup>59)</sup>。これらの結果から、 $A\alpha_1R$  遮断薬は尿道弛緩作用に加えて、膀胱血流を改善し、排尿機能障害を改善することが推察される。

本研究は、選択的  $A\alpha_{1A}R$  遮断薬シロドシンの糖尿病性低活動膀胱治療薬としての有用性を明らかにするために企画された。第 1 章では、自然発症糖尿病モデル (ZDF ラット) の低活動膀胱へのシロドシンの効果とコリンエステラーゼ阻害薬ジスチグミンとの併用効果について検討した。第 2 章では、薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) を用い、低活動膀胱へのシロドシンの治療効果を  $A\alpha_1R$  遮断薬ウラピジルのそれと比較した。同時に、 $A\alpha_1R$  遮断薬で懸念される血圧への影響についても検討した。第 3 章では、STZ ラットの低活動膀胱に対するシロドシンの予防効果とその作用機序について検討した。

# 第1章. 自然発症糖尿病モデル (ZDF ラット) におけるシロドシンとジスチグミンの治療効果

## 1.1 緒言

低活動膀胱の治療には、膀胱平滑筋の収縮圧を増強させるコリン作動性薬物と尿道閉塞を解除する  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬が用いられている<sup>17),27),28)</sup>。コリンエステラーゼ阻害薬ジスチグミンは「手術後及び神経因性膀胱などの低緊張性膀胱による排尿困難」<sup>60)</sup>、アセチルコリン受容体刺激薬ベタネコールは「手術後、分娩後及び神経因性膀胱などの低緊張性膀胱による排尿困難 (尿閉)」<sup>61)</sup>に適応があり、低活動膀胱の病態を緩解させる。ジスチグミンは、内因性のアセチルコリン放出時のみ作用するため、臨床でベタネコールより汎用されてきた。しかしながら、前述したように有害事象のコリン作動性クリーゼへの対策として、2010年にジスチグミンの排尿障害に対する用量は10 mg から5 mg に制限された<sup>24)</sup>。一方、「神経因性膀胱に伴う排尿困難」の適応で、女性の低活動膀胱に唯一用いられている  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬ウラピジル<sup>62)</sup>は、 $\text{A}\alpha_{1A}\text{R}$  だけでなく血圧調節に関わる  $\text{A}\alpha_{1B}\text{R}$  にも作用するため血圧低下が懸念される<sup>63)</sup>。この様に患者の QOL の観点から、新たな治療薬の選択肢が求められている。

シロドシンは第2世代の  $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬で、「前立腺肥大症に伴う排尿障害」に用いられている<sup>64)</sup>。シロドシンは下部尿路 (前立腺、尿道、膀胱頸部) に豊富に分布する  $\text{A}\alpha_{1A}\text{R}$  へ選択的に作用し、循環動態への影響が少ないことを特徴とする<sup>43)</sup>。その一方で、シロドシンの低活動膀胱への治療効果については、未だ不明な点がある。 $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬とコリン作動性薬物の併用は、低活動膀胱患者において、膀胱収縮力を増強させ、かつ尿道抵抗を低下させることにより排尿を改善する<sup>32)</sup>。したがって、 $\text{A}\alpha_1\text{R}$  遮断薬とコリンエステラーゼ阻害薬の併用は、両薬物による相乗効果が発揮されるため、コリンエステラーゼ阻害薬の投与量を減量しても臨床効果を維持することが可能となり、薬物による副作用の軽減につながると期待される。

ZDF ラットは、ヒトの2型糖尿病に似た代謝プロファイルと病態を示し、かつ症状の発現が緩やかな自然発症糖尿病モデルである<sup>51)</sup>。しかしながら、ZDF ラットを用いた排尿機能の解析及び薬物効果に関する研究はほとんど行われていない。

本章では、自然発症糖尿病モデル ZDF ラットの排尿機能の変化と、その排尿機能変化に及ぼすシロドシンとジスチグミンの単独あるいは両薬物の併用効果について検討した。

## 1.2 実験材料・方法

### 1.2.1 実験動物

本研究はキッセイ薬品工業の実験動物倫理委員会の審査・承認を得て、本邦のガイドラインに従って実施した<sup>65)</sup>。本研究では、ZDF ラット (ZDF/Gmi Crl-fa/fa、雄性) 及び Lean ラット (ZDF/Gmi Crl-lean、雄性) を使用した。実験動物は日本チャールス・リバー (神奈川、日本) から購入した。温湿度条件 (温度: 20~26 °C、湿度: 40~60%)、明期 12 時間/暗期 12 時間 (明期: 8:00~20:00) ならびに 3-5 匹毎の群飼いにて飼養し、試験開始まで水及び標準固形飼料 (CE-2 型固形飼料、日本クレア、東京、日本) を自由に摂取させた。

### 1.2.2 使用薬物

シロドシン 2 臭化水素酸塩 (キッセイ薬品工業、松本、日本) をハルトマン溶液 (ネオクリティケア製薬株式会社、東京、日本) に溶解した。

臭化ジスチグミン (1%点眼液; 鳥居薬品、東京、日本) はハルトマン液で希釈した。

### 1.2.3 排尿動態測定

30-42 週齢のラットをウレタン (1.0 g/kg, *i.p.*) で麻酔した。麻酔後、ラットの尾静脈から採取した血液 (10~20  $\mu$ L) 中のグルコース濃度を小型電極式グルコース分析装置 (ANTSENSE II; 堀場製作所、京都、日本) を用い測定した。その後、ラットを背位固定し、腹部を正中切開した。膀胱の充満を防ぐため、ポリエチレンカテーテル (PE-10; 日本ベクトン・ディッキンソン、東京、日本) で尿管を両側からカニューレションし、腎臓からの尿を排出した。その後、ポリエチレンカテーテル (PE-50; 日本ベクトン・ディッキンソン) を膀胱頂部から留置した。カテーテルは T 字管を介して圧トランスデューサー (DT-XX; メリットメディカル・ジャパン、東京、日本) 及びインフュージョンポンプ (KDS-100; 室町機械、東京、日本) に接続した。左大腿静脈には、被験薬投与の為にカニューレを留置した。

手術後、動物を伏臥位に固定し、張力トランスデューサー (Type 45196A; NEC 三栄、東京、日本) に接続した採尿カップ中に捕集し、排尿量を測定した。膀胱内に一定速度 (6 mL/h) の生理食塩水 (大塚生食注; 大塚製薬工場、徳島、日本) を持続注入し、排尿反射を誘発した。膀胱内圧及び排尿量は波形記録装置 (Power Lab; ADInstruments Japan、名古屋、日本) 及びペン書き記録器にて記録した (図 2)。波形解析装置 (Chart 5、Version 5.5.5; ADInstruments Japan) により、排尿動態パラメーターを取得した (図 3)。排尿パターンが安定した後薬物を投与し、投与前後の排尿指標の値をそれぞれ比較した。

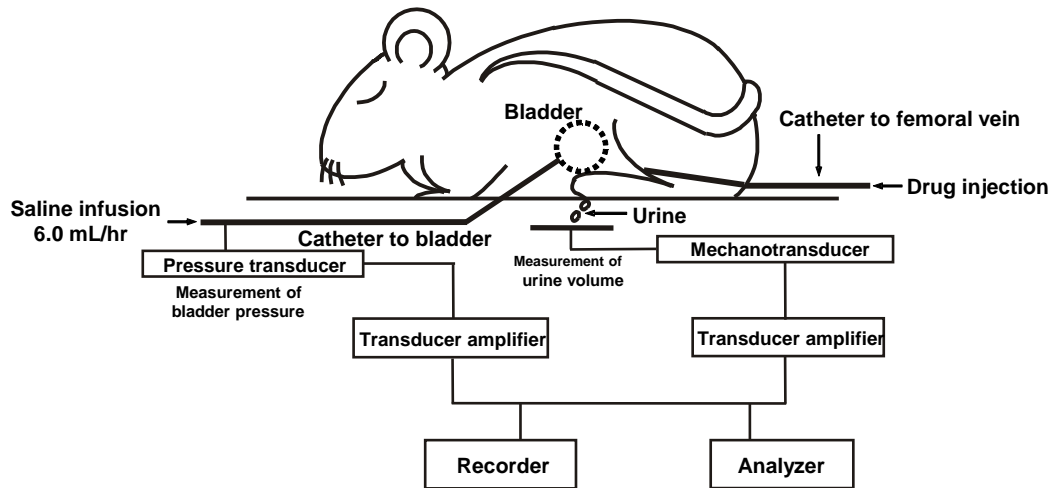


圖 2 Schematic diagram showing equipment required to perform cystometry and uroflowmetry in the anesthetized rat.

A polyethylene catheter was implanted into the bladder through the dome. Saline was continuously infused into the bladder at 6 mL/h to induce the micturition reflex. The catheter was branched and connected to a pressure transducer to measure IVP. MV is measured by a fluid collector connected to a force displacement transducer. MV, micturition volume, IVP, intravesical pressure

表 1 List of the urodynamic parameters indexes

Term	Abbreviation	Explanation	
micturition volume	排尿量	MV	-
micturition interval	排尿間隔	MI	-
bladder capacity	膀胱容量	BC	infusion rate × micturition interval
residual volume	殘尿量	RV	BC-MV
micturition duration	排尿時間	-	-
bladder voiding efficiency	排尿效率	BVE	$MV/BC \times 100$
average flow rate	平均尿流率	Qave	$MV/\text{micturition duration}$
maximum flow rate	最大尿流率	Qmax	-
intravesical pressure	膀胱內壓	IVP	-
intravesical pressure at Qmax	最大尿流率時膀胱內壓	-	IVP at Qmax
urethral resistance	尿道抵抗	-	$IVP \text{ at } Q_{\max}/Q_{\max}^2$
detrusor contraction velocity	排尿筋收縮速度	Vdet	-

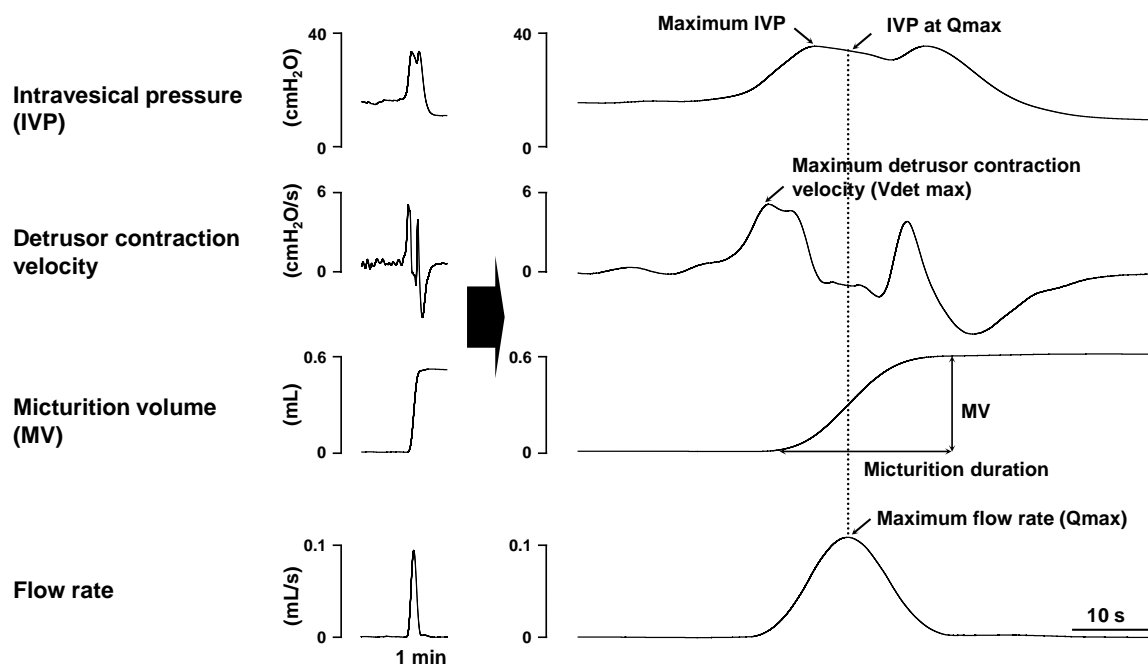


図 3 Schematic representation of the urodynamic parameters.

Saline was continuously infused into the bladder at 6 mL/h to induce the micturition reflex. IVP and MV were continuously recorded on a waveform record system. Using a waveform analysis system, urodynamic parameters were measured. Urodynamic parameters were IVP, MV, Qmax, Qave, Vdet max, IVP at Qmax, BC, RV, urethral resistance and BVE. BC, bladder capacity, BVE, bladder voiding efficiency, IVP, intravesical pressure, MV, micturition volume, Qave, average flow rate, Qmax, maximum flow rate, RV, residual volume, Vdet, detrusor contraction velocity

#### 1.2.4 データ処理

データは平均値±標準誤差で示した。2 群間の比較は Student's *t* 検定を行った。統計学的有意性は、 $p < 0.05$  とした。

## 1.3 結果

### 1.3.1 ZDF ラットの一般状態と排尿機能

ZDF ラット及びその対照動物である Lean ラットの体重、血糖値及び膀胱重量を表 2 に示す。ZDF 群の体重 ( $441.9 \pm 10.5$  g) は Lean 群のそれ ( $415.9 \pm 6.2$  g) よりも重かった。ZDF 群の血糖値は  $615.7 \pm 38.2$  mg/dL であり、糖尿病状態が確認された。ZDF 群の膀胱重量 ( $0.271 \pm 0.008$  g) は、Lean 群のそれ ( $0.104 \pm 0.004$  g) よりも高値になった。

表 2 Blood glucose, body weight, bladder weight in Lean and ZDF rats

Subject	Lean (n=7)	ZDF (n=15)
Blood glucose (mg/dL)	$127.0 \pm 4.6$	$615.7 \pm 38.2^{**}$
Body weight (g)	$415.9 \pm 6.2$	$441.9 \pm 10.5^*$
Bladder weight (g)	$0.104 \pm 0.004$	$0.271 \pm 0.008^{**}$

Data in the table represent the means  $\pm$  S.E. \*, \*\* Significantly different from the Lean group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's *t*-test). ZDF, Zucker diabetic fatty

Lean ラットと ZDF ラットの代表的な膀胱内圧の変化を図 4 に、各種排尿動態指標の値を表 3 に示す。一定速度 (6 mL/h) で生理食塩液を膀胱内に注入した際、ZDF ラットでは排尿間隔の延長が観察された。ZDF ラットでは、最初の排尿反射が誘発された後、残尿は膀胱容量の 80%以上になり、その後の排尿間隔が短縮した。ZDF 群の膀胱容量、残尿量、尿道抵抗は Lean 群のそれらよりも高値となった。一方、ZDF 群の排尿量、最大尿流率、平均尿流率、最大排尿筋収縮速度及び排尿効率は Lean 群のそれらよりも低値となった。ZDF 群及び Lean 群の最大膀胱内圧はいずれも同様の値となったが、ZDF 群の最大排尿筋収縮速度は遅く、それに伴う最大尿流率時膀胱内圧は高値となった。

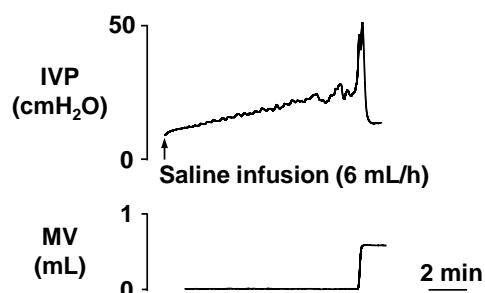
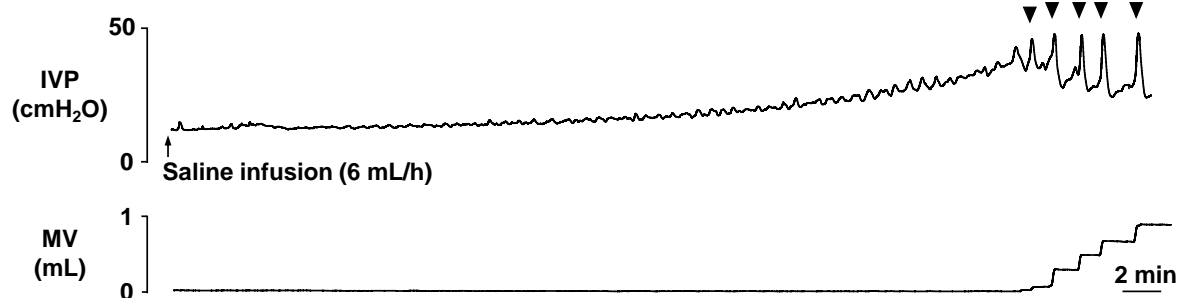
**(A) Lean****(B) ZDF**

图 4 Typical cystometrography recordings in Lean (A) and ZDF (B) rats.

Saline was continuously infused into the bladder at 6 mL/h to induce the micturition reflex. IVP and MV were continuously recorded on a waveform record system. Using a waveform analysis system, urodynamic parameters were measured. IVP, Intravesical pressure, MV, Micturition volume, ZDF, Zucker diabetic fatty ▼: micturition reflex

表 3 Cystometric parameters in Lean and ZDF rats

Parameter	Lean (n=5)	ZDF (n=12)
Maximum IVP (cmH <sub>2</sub> O)	43.9 ± 4.2	50.3 ± 3.5
Vdet max (cmH <sub>2</sub> O/s) <sup>a)</sup>	5.11 ± 0.23	3.25 ± 0.45**
BC (mL)	0.80 ± 0.08	4.33 ± 0.44**
RV (mL)	0.28 ± 0.02	4.05 ± 0.42**
MV (mL)	0.52 ± 0.08	0.28 ± 0.06*
Qmax (mL/min)	5.57 ± 0.86	1.49 ± 0.22**
Qave (mL/min)	2.98 ± 0.52	0.73 ± 0.13*
IVP at Qmax (cmH <sub>2</sub> O)	35.6 ± 2.1	48.6 ± 2.5**
Urethral resistance <sup>b)</sup>	2.01 ± 1.11	78.45 ± 32.45*
BVE (%) <sup>c)</sup>	63.01 ± 6.43	6.77 ± 1.36**

Data in the table represent the means ± S.E. \*, \*\* Significantly different from the Lean group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's *t*-test).

a) Vdet max: Maximum detrusor contraction velocity.

b) Urethral resistance: IVP at Qmax/Qmax<sup>2</sup>.

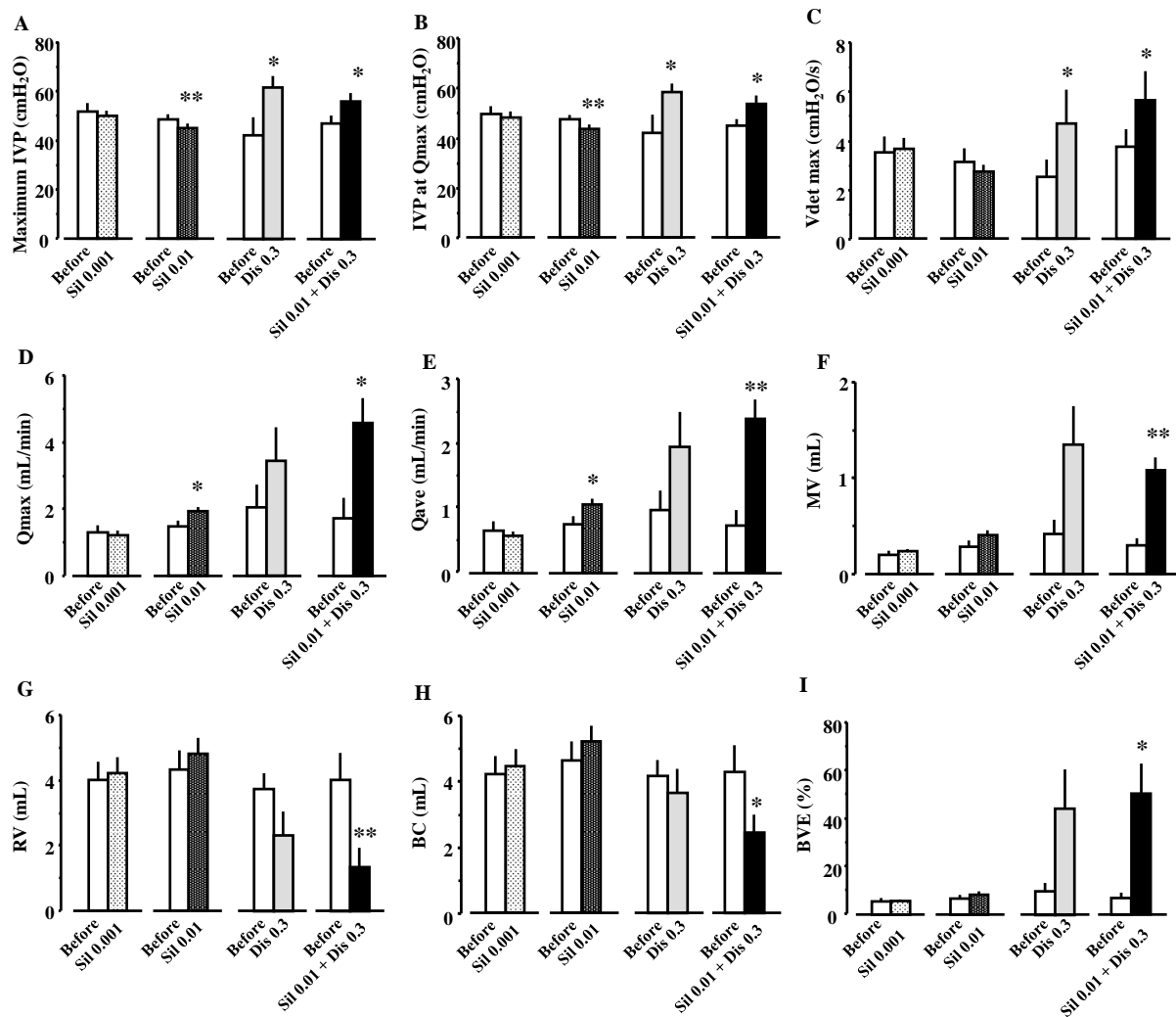
c) Bladder voiding efficiency: Micturition volume/Bladder capacity.

BC, bladder capacity, BVE, bladder voiding efficiency, IVP, intravesical pressure, MV, micturition volume, Qave, average flow rate, Qmax, maximum flow rate, RV, residual volume, Vdet, detrusor contraction velocity, ZDF, Zucker diabetic fatty



### 1.3.2 ZDF ラットにおけるシロドシンとジスチグミンの排尿機能に対する治療効果

ZDFラットの排尿動態指標の値に及ぼすシロドシンとジスチグミンのそれぞれの単独効果と両薬物の併用効果を図 5 に示す。シロドシン (0.01 mg/kg, *i.v.*) は、投与前に比して最大尿流率及び平均尿流率を増加させ、最大膀胱内圧及び最大尿流率時膀胱内圧を低下させた。ジスチグミン (0.3 mg/kg, *i.v.*) は投与前に比して最大膀胱内圧、最大尿流率時膀胱内圧及び最大排尿筋収縮速度を上昇させた。シロドシン (0.01 mg/kg, *i.v.*) とジスチグミン (0.3 mg/kg, *i.v.*) の併用投与は、投与前に比して最大膀胱内圧、最大尿流率時膀胱内圧、最大排尿筋収縮速度、最大尿流率、平均尿流率、排尿量及び排尿効率を上昇させ、その一方で、残尿量及び膀胱容量を減少させた。



☒ 5 Effects of silodosin and distigmine and combined effects of these drugs on urodynamic parameters in ZDF rats.

Data in the table represent the means  $\pm$  S.E. of 4 -7 animals. \*, \*\* Significantly different from the before value at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Student's *t*-test). Each parameter before and after drug administration was estimated from the average of three repetitive series of micturition for silodosin and from a single micturition for distigmine and combined of these drugs. Urethral resistance was calculated using the following formula:  $IVP \text{ at } Q_{max} / (Q_{max}^2)$ . BC, bladder capacity, BVE, bladder voiding efficiency, Dis 0.3, distigmine 0.3 mg/kg, IVP, intravesical pressure, MV, micturition volume, Qave, average flow rate, Qmax, maximum flow rate, RV, residual volume, Sil 0.01, silodosin 0.01 mg/kg, Vdet, detrusor contraction velocity, ZDF, Zucker diabetic fatty

## 1.4 考察

排尿動態の測定は、動物モデルにおける排尿動態特性や薬物の評価に多くの情報を提供する。これまでに、ホルモン誘発前立腺肥大ラットモデルやフェニレフリン ( $A\alpha_1R$  作動薬) による膀胱出口部閉塞モルモットの排尿動態への  $A\alpha_1R$  遮断薬の効果が評価されている<sup>66),67)</sup>。これらの病態モデルは、主に閉塞症状に着目した解析に用いられた。一方、糖尿病に伴う排尿障害への薬物の効果を評価した報告はない。そこで、本章では、糖尿病モデル動物の排尿動態指標に及ぼすシロドシンとジスチグミンの効果について検討した。

本章では、30~42 週齢の ZDF ラットを用いた。ZDF ラットは、通常 8 週齢までに耐糖能異常が出現し、その後 12 週齢までに明らかな高血糖状態に陥る<sup>68),69)</sup>。ZDF ラットでは糖尿病発症後約 4 ヶ月で坐骨-脛骨感覚軸索の感覚・運動伝導速度が低下する<sup>70)</sup>。本実験で用いた ZDF ラットは、膀胱容量及び残尿量の高値と排尿量、最大尿流率、平均尿流率、最大排尿筋収縮速度及び排尿効率の低値を示した。これらの結果から、30 週齢以上の ZDF ラットを低活動膀胱の評価に用いることとした。

シロドシンは ZDF ラットの最大膀胱内圧と最大尿流率時膀胱内圧を減少させ、かつ最大尿流率及び平均尿流率を上昇させた。高血糖は前立腺肥大症の危険因子であり、高インスリン血症が惹起され、交感神経が過緊張状態に陥り、前立腺平滑筋の増殖及び緊張亢進により、下部尿路症状が出現すると考えられている<sup>46)</sup>。STZ 投与後 4 週目のラットにおいても、高血糖と前立腺の増殖が認められている<sup>71)</sup>。これらを勘案すると、ZDF ラットでは、シロドシンの  $A\alpha_{1A}R$  遮断作用を介して前立腺肥大による尿道閉塞が緩和されたと推察される。

STZ ラットでは、膀胱収縮時の尿道横紋筋及び平滑筋の弛緩機構に障害を生じているとの報告がある<sup>72)</sup>。自然発症 2 型糖尿病モデルの Spontaneously Diabetic Torii ラットにおいても、膀胱求心路の活性低下と尿道弛緩機構の障害が示唆されている<sup>73)</sup>。しかしながら、雄性動物を用いた場合、シロドシンの前立腺部への影響が排除できないため、尿道弛緩機能に対するシロドシンの効果を本章では評価出来ていない。

ジスチグミンはモルモットの摘出膀胱排尿筋標本においてアセチルコリン併存下で濃度依存的に排尿筋の収縮力を増強させる<sup>74)</sup>。ジスチグミンは麻酔下モルモットを用いた排尿動態測定では、最大尿流率時膀胱内圧の上昇が認められるものの、尿道括約筋のニコチン性アセチルコリン受容体を介した尿道内圧の上昇のため、排尿量及び尿流率の改善が認められていない<sup>75)</sup>。STZ ラットにおいても、ジスチグミン投与により最大膀胱内圧上昇が認められるものの、その高用量群では排尿量が減少する報告がある<sup>76)</sup>。ジスチグミンは膀胱に存在するムスカリン性アセチルコリン受容体と尿道括約筋に存在するニコチン性アセチルコリン受容体の

両者に作用することにより、尿道を収縮させることで排尿への効果を減弱させる可能性がある。本章でも、ジスチグミンは、最大膀胱内圧、最大尿流率時膀胱内圧及び最大排尿筋収縮速度を増加させたものの残尿量減少作用は弱かった。

シロドシンとジスチグミンの併用投与は、両薬物の単独投与よりも排尿量、残尿量、膀胱容量及び排尿効率を改善した。本章で用いた用量では、シロドシン単独投与で、最大膀胱内圧と最大尿流率時膀胱内圧が減少したものの、ジスチグミンとの併用投与で一転して上昇した。これらの結果から、 $A\alpha_{1A}R$  遮断薬とコリンエステラーゼ阻害薬の併用投与は、それぞれの保有する膀胱収縮作用と尿道弛緩作用により、排尿機能を改善させることが示唆された。

臨床試験において、低活動膀胱の治療には、 $A\alpha_{1R}$  遮断薬とコリン作動薬との併用投与がそれぞれの単独投与よりも有用であると報告されている<sup>32)</sup>。本章で得られた結果から、 $A\alpha_{1A}R$  遮断薬とコリンエステラーゼ阻害薬の併用投与は、低活動膀胱治療に有益であると期待される。

## 1.5 小括

ZDF ラットは低活動膀胱症状を呈し、シロドシンとジスチグミンの単独投与はZDFラットの低活動膀胱症状を改善した。両薬物の併用投与は、単独投与で得られるよりも高い治療効果を期待できることを示した。

## 第2章. 雌性正常ラットにおけるシロドシン及びウラピジルのプロファイルと薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) における両薬物の治療効果

### 2.1 緒言

低活動膀胱の治療には、膀胱平滑筋の収縮圧を増強させるジスチグミンやベタネコールと尿道閉塞を解除する  $A\alpha_1R$  遮断薬が用いられている<sup>17),27),28)</sup>。 $A\alpha_1R$  遮断薬であるタムスロシン及びナフトピジル、シロドシン等が前立腺肥大症に伴う排尿障害に用いられている<sup>46)</sup>。ウラピジルは、1999年に我が国で「神経因性膀胱に伴う排尿困難」の効能で認可された<sup>62)</sup>。2022年時点で、ウラピジルは、我が国で、女性の排尿機能障害に適用可能な唯一の  $A\alpha_1R$  遮断薬である<sup>22)</sup>。その詳細な機序は不明であるが、ウラピジルが前立腺以外の組織にも作用することにより、排尿機能障害を緩解すると推察される。ウラピジルは、末梢血管拡張作用に基づく降圧薬として承認されたが、本薬の低活動膀胱に対する非臨床検討結果は未だに明らかにされていない。

ウラピジルは第1世代の  $A\alpha_1R$  遮断薬であり、末梢血管に多く発現する  $A\alpha_{1B}R$  と前立腺、尿道及び膀胱三角部等に発現する  $A\alpha_{1A}R$  の両者を遮断する<sup>63)</sup>。一方、シロドシンは第2世代の  $A\alpha_1R$  遮断薬であり、 $A\alpha_{1A}R$  に高い選択性を示すため循環動態への作用が少ないことを特徴とする<sup>43)</sup>。いずれの薬物も尿道弛緩作用を示す<sup>46)</sup>。この知見は雄性動物から得られたものである。その一方で、雌性動物を用いた尿道弛緩作用に関する検討は行われていない。低活動膀胱は男女共に発症する疾患<sup>13)</sup>であり、前立腺部への影響を除外した検討が望まれる。

本章では、シロドシンとウラピジルの雌性正常ラットの尿道弛緩作用について検討した。同時に、循環動態への影響を明らかにするための血圧測定を行い、薬効を発揮する用量と薬物の安全域の関係について検討した。

第1章では自然発症糖尿病モデルであるZDFラットを用いて検討を行った。ZDFラットは雄性動物での糖尿病の発症となり、雌性ラットは病態モデルとして確立されていない。雄性動物を用いた場合、 $A\alpha_1R$  遮断薬の前立腺部への薬物の効果と尿道へのそれを判別することが極めて難しい。そこで、本章では、低活動膀胱の研究に汎用されるSTZラット<sup>50)</sup>の雌性動物を用い、糖尿病性低活動膀胱に対するシロドシンとウラピジルの治療効果を検証した。

## 2.2 実験材料・方法

### 2.2.1 実験動物

本研究はキッセイ薬品工業の実験動物倫理委員会の審査・承認を得て、本邦のガイドラインに従って実施した<sup>65)</sup>。実験には、日本チャールス・リバーから購入した雌性 Sprague-Dawley (SD)ラットを用いた。実験動物は、温湿度条件 (温度：20～26 °C、湿度：40～60%)、明期 12 時間／暗期 12 時間 (明期：8:00～20:00) ならびに 3-5 匹毎の群飼いに飼養し、試験開始まで水及び標準固形飼料 (CE-2 型固形飼料、日本クレア) を自由に摂取させた。

### 2.2.2 使用薬物

シロドシン 2 臭化水素酸塩 (キッセイ薬品工業) をハルトマン溶液 (ネオクリティケア製薬株式会社) に溶解した。ウラピジルは富士フィルム和光純薬工業 (大阪、日本) より購入した。塩酸フェントラミンはシグマアルドリッチ (MO, USA) から購入した。塩酸ミドドリンは、富士フィルム和光純薬から購入した。ウラピジル及び塩酸フェントラミンはハルトマン溶液に、塩酸ミドドリンは生理食塩水に溶解し、同溶液で適切な濃度に希釈した。

### 2.2.3 尿道内圧測定

9 週齢の雌性正常ラットをウレタン (1.5 g/kg *s.c.*) で麻酔した。腹部正中切開し、膀胱と尿道を露出させた後、ポリエチレンカテーテル (PE-50；日本ベクトン・ディッキンソン) を膀胱頂部から尿道に挿入し、膀胱頸部で固定した。尿道内圧測定は圧トランスデューサー (DT-XX；メリットメディカル・ジャパン) を用いた。インフュージョンポンプ (KDS-100；室町機械) を用いて、尿道内に生理食塩水を 3 mL/h の速度で持続注入した。尿道内圧が安定した後、ミドドリン (3 mg/kg) を大腿静脈から投与し、尿道内圧を上昇させた。尿道内圧はアンプを介して波形記録装置 (Power Lab；ADInstruments Japan) にて連続記録した。ミドドリン投与 10 分後にシロドシン (0.0001～0.03 mg/kg, *i.v.*) またはウラピジル (0.01～3 mg/kg, *i.v.*) を 5 分ごとに用量漸増法にて投与した。被験物質の最高用量を投与した 5 分後、フェントラミン (3 mg/kg) を大腿静脈内に投与し、5 分間、尿道内圧を観察した。その後、腹部大動脈から失血させることにより動物を安楽死させた。

被験薬投与前 (ミドドリン投与後) の尿道内圧を 0%とした。フェントラミン投与後に尿道内圧を低下させ、その最大減圧分を 100%とした。被験薬投与後の尿道内圧の低下は、フェントラミンで誘発される最大尿道内圧低下分に対する百分率で表した。用量反応関係をプロットすると、本実験条件下では、尿道内圧を 30%低下させるとフェントラミン誘発での最大尿道内圧低下分の 50%低下分に相当する。そこで、薬物効果を評価する指標として、ミドドリン投与による尿道内圧を 30%低

下させる薬物の投与用量として ID<sub>30</sub> 値を用いた。

## 2.2.4 血圧測定

13 週齢の雌性正常ラットをウレタン (1.5 g/kg, *s.c.*) で麻酔した。ラットの頸動脈から平均血圧を連続的に測定した。被験薬を 30 分毎に用量漸増法にて投与した。各投与量において観察された最大効果を、投与前の値と比較した。MBP は以下の式で算出した。

$$\text{MBP} = \text{拡張期血圧} + \text{脈圧} [\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧}] / 3$$

被験薬投与前の MBP を 100% とし、被験薬投与後の値をそれぞれの MBP に対する百分率で表した。用量反応関係をプロットすると、本実験条件下では、平均血圧を 20% 低下させると被験薬の最大血圧低下分の 50% に相当する。そこで、薬物効果を評価する指標として、平均血圧を 20% 低下させる薬物の投与用量として ED<sub>20</sub> 値を用いた。

## 2.2.5 モデル動物作製

6 週齢の雌性正常ラットに、0.03 mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解した STZ を 50 mg/kg 静脈内投与した。非糖尿病ラットには、クエン酸緩衝液のみを投与した。STZ 投与後 8 週目に、小型電極式グルコース分析装置 (ANTSENSE III; 堀場製作所) を用いて非絶食時血糖値を測定した。血糖値が 300 mg/dL 以上となったものを糖尿病として実験に使用した。ラットは体重と血糖値に基づいて、群分けした。

## 2.2.6 薬物処置

血糖値測定の翌日 (STZ 投与後 8 週目)、背部皮下に浸透圧ポンプ (2ML4; Alzet, CA, USA) を設置した。薬物は、浸透圧ポンプを介して、4 週間皮下投与された。

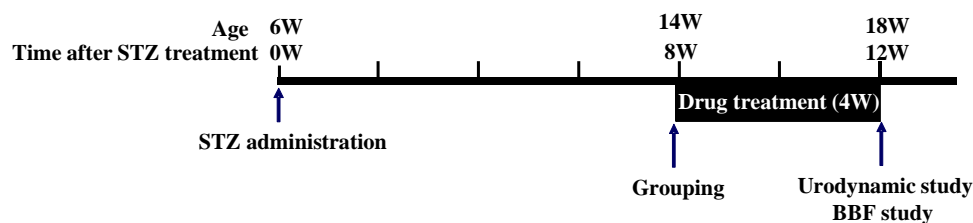


図 6 Schedule of drug treatment and various measurements

Six weeks old rats were treated with STZ (50 mg/kg *i.v.*). At week 8 of STZ administration, rats were grouped by blood glucose and body weight and treated with silodosin (0.3, 1.0 mg/kg/day *s.c.*) and urapidil (30, 100 mg/kg/day *s.c.*) for 4 weeks using an osmotic pump. Voiding function and bladder blood pressure measurements were performed at week 12 of STZ administration. BBF, bladder blood flow, *i.v.*, intravenous, *s.c.*, subcutaneous, STZ, streptozotocin

シロドシンの投与用量として、一日当たり 0.1 または 0.3 mg/kg/day の継続投与を設定した。本用量における、定常状態の血漿中非結合型シロドシン濃度はそれぞれ  $3.78 \times 10^{-10}$  及び  $1.13 \times 10^{-9}$  mol/L と推定されている。この濃度は臨床試験における血漿中の非結合型シロドシン濃度の  $1.43 \times 10^{-9}$  mol/L に相当する<sup>77)</sup>。ウラピジルの 1 日投与量は、シロドシンの尿道内圧に対する有効率に基づき、30 mg/kg/day 及び 100 mg/kg/day とした。同様に、正常群及び対照群には、浸透圧ポンプを介してハルトマン溶液を 4 週間皮下投与した。

## 2.2.7 膀胱血流測定

STZ 投与後 12 週目に、STZ ラットをウレタン (1.5 g/kg s.c.) で麻酔した。腹部正中切開を行い、膀胱を露出させた。18 ゲージカテーテルを頂部から膀胱内に留置し、膀胱内を空にした。膀胱血流を Omegazone laser speckle blood flow imager (Omegawave、東京、日本) を用いて測定した。

## 2.2.8 排尿動態測定

膀胱血流の測定後、排尿動態の測定を行った。ラットを仰臥位にさせ、膀胱に生理食塩水を持続注入するためのインフュージョンポンプ (KDS-100 ; 室町機械) 及び膀胱圧記録用の DT-4812 圧トランスデューサー (日本ベクトン・ディキンソン) に膀胱カテーテルを接続した。排尿量はプラスチックケージ下に設置した GF-300 デジタル天秤 (A&D、東京、日本) を用いて測定した。膀胱内圧の測定は、排尿間隔が約 20 分になるように生理食塩水を注入した (注入速度、正常ラット : 1-3 mL/h、糖尿病ラット : 6-24 mL/h)。膀胱内圧と排尿量は Rectigraph-8K (NEC 三栄) を用いて連続的に記録した。本実験では、膀胱内圧、排尿量及び残尿量を評価する指標とした。

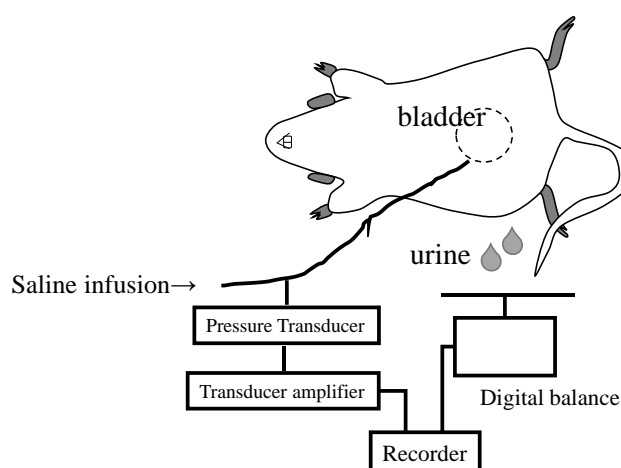


図 7 Schematic diagram showing equipment required to perform cystometry and uroflowmetry in the anesthetized rat.

A polyethylene catheter was implanted into the bladder through the dome. Saline was infused to achieve a voiding interval of approximately 20 min. The catheter was branched and connected to a pressure transducer to measure Intravesical pressure. Micturition volume was measured using a GF-300 digital balance.



### 2.2.9 データ処理

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析は、SAS version 9.3 (SAS Institute, NC, USA) を用いて実施した。Bartlett 検定で等分散を示した場合は、一元配置分散分析とパラメトリック Dunnett 多重比較検定で統計解析を行った。Bartlett 検定で等分散が示されない場合は、ノンパラメトリック Dunnett 多重比較検定で統計解析を行った。2 群間の比較は、F 検定により分散が等しい場合は、Student's *t* 検定を行った。分散が等しくない場合は、Aspin-Welch's *t* 検定を用いて統計解析を行った。統計学的有意性は  $P < 0.05$  とした。

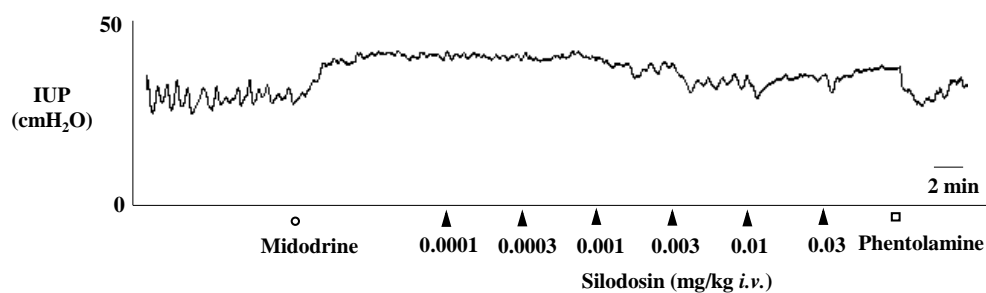
尿道内圧の増加に対する抑制作用を  $ID_{30}$  (mg/kg) で評価した。血圧降下作用は  $ED_{20}$  (mg/kg) で評価した。薬物の下部尿路への選択性は平均血圧  $ED_{20}$ /尿道内圧  $ID_{30}$  とした。

## 2.3 結果

### 2.3.1 雌性ラットに対するシロドシン及びウラピジルのプロファイル

雌性正常ラットにおけるシロドシン及びウラピジルの尿道内圧弛緩作用と血圧低下作用を図 8 及び図 9 に示す。ミドドリンは尿道内圧を上昇させ、両薬物は用量依存的にそれを低下させた。両薬物の最大低下作用の度合いは、約 60%であった。両薬物とも用量依存的に平均血圧を低下させた。シロドシン及びウラピジルによる平均血圧の最大低下作用の度合いは、それぞれ約 30%及び 40%であった。

#### (A) Silodosin



#### (B) Urapidil

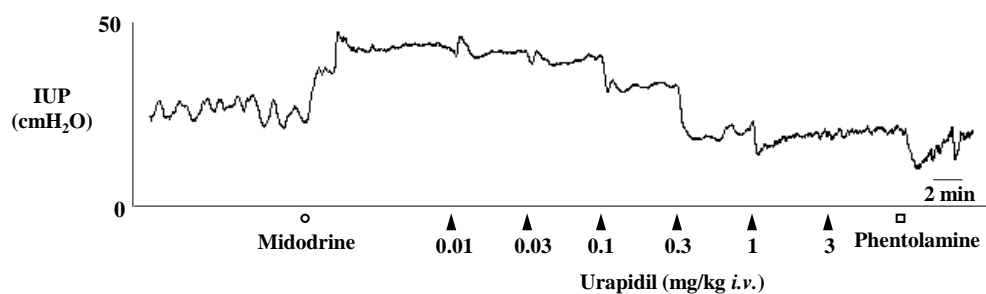


図 8 Representative recordings of relaxant effects of silodosin (A) and urapidil (B) on midodrine (3 mg/kg, *i.v.*) -induced increase in IUP in anesthetized female rats.

Ten minutes after midodrine (3 mg/kg, *i.v.*) administration to normal rats under urethane anesthesia, silodosin (0.0001–0.03 mg/kg, *i.v.*) or urapidil (0.01–3 mg/kg, *i.v.*) were administered every 5 minutes in a dose-dependent manner. Five minutes after the administration of the highest dose of drugs, phentolamine (3 mg/kg *i.v.*) was administered. IUP, intraurethral pressure, *i.v.*, intravenous

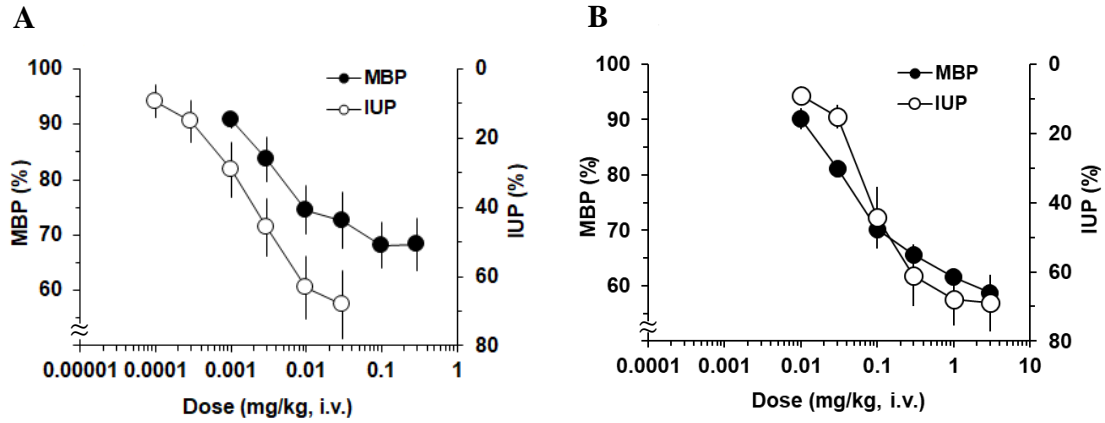


図 9 Comparison of the effects of intravenous doses of silodosin (A) and urapidil (B) on MBP (●) and IUP (○) in anesthetized female rats.

IUP before the administration of silodosin and urapidil (after midodrine administration) was 0% and that after phentolamine administration was 100%. The decrease in IUP after drugs administration was expressed as the percentage of the respective maximum decrease in IUP. MBP before silodosin and urapidil administration was taken as 100%, and the values after drugs administration were expressed as percentages of the respective baseline values. Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of 5-8 animals. IUP, intraurethral pressure, MBP, mean blood pressure

雌性正常ラットにおけるシロドシン及びウラピジルの尿道選択性を表 4 に示す。尿道内圧に対するシロドシンの ID<sub>30</sub> 値は 0.0011 mg/kg であり、ウラピジルの ID<sub>30</sub> 値 0.055 mg/kg の約 1/50 であった。平均血圧に対するシロドシンの ED<sub>20</sub> は 0.0048 mg/kg で、ウラピジルの ED<sub>20</sub> 0.034 mg/kg の約 1/7 倍となった。シロドシンの下部尿路選択性を ED<sub>20</sub>/ID<sub>30</sub> で評価した結果、シロドシンの下部尿路への選択性は 4.4、ウラピジルの下部尿路選択性は 0.62 となった。シロドシンのウラピジルに対する相対的な下部尿路の選択性は 7.1 倍であった。

表 4 ED<sub>20</sub>, ID<sub>30</sub>, and uroselectivity of silodosin and urapidil in anesthetized rats

Drug	MBP ED <sub>20</sub> (mg/kg, <i>i.v.</i> ) <sup>a)</sup>	IUP ID <sub>30</sub> (mg/kg, <i>i.v.</i> ) <sup>b)</sup>	ED <sub>20</sub> /ID <sub>30</sub> uroselectivity	Relative selectivity against urapidil
Silodosin	0.0048	0.0011	4.4	7.1
Urapidil	0.034	0.055	0.62	1.0

a) Dose at which MBP was decreased by 20% of the initial value.

b) Dose at which IUP was suppressed by 30% of the midodrine-induced increase in IUP.

ED, effective dose, ID, inhibitory dose, IUP, intraurethral pressure, *i.v.*, intravenous, MBP, mean blood pressure

### 2.3.2 STZ ラットの一般状態とシロドシン及びウラピジルの影響

STZ 投与後 12 週目の STZ ラットの体重、血糖値、膀胱重量とシロドシン及びウラピジル投与がそれらに及ぼす効果を表 5 に示す。STZ 群の血糖値は  $559.2 \pm 14.7$  mg/dL であり、正常群のそれ ( $174.7 \pm 10.7$  mg/dL) の約 3 倍であった。シロドシン及びウラピジル投与群においても血糖値は高値を示した。STZ 群の体重 ( $268.2 \pm 6.0$  g) は、正常群のそれ ( $308.7 \pm 9.5$  g) よりも低値となった。薬物投与により、体重低下は改善される傾向にあった。STZ 群における膀胱重量 ( $0.213 \pm 0.010$  g) は、正常群のそれ ( $0.099 \pm 0.004$  g) の約 2 倍であった。シロドシンとウラピジルは膀胱重量に影響しなかった。

表 5 Blood glucose, body weight, and bladder weight of rats after 12 weeks of STZ injection

Group	Number of animals	Blood glucose (mg/dL)	Body weight (g)	Bladder weight (g)
Normal-vehicle	13	$174.7 \pm 10.7$	$308.7 \pm 9.5$	$0.099 \pm 0.004$
DM-vehicle	12	$559.2 \pm 14.7$ ***	$268.2 \pm 6.0$ **	$0.213 \pm 0.010$ ***
DM-silodosin: 0.3 mg/kg/day	9	$554.4 \pm 28.6$ ***	$274.7 \pm 5.5$ **	$0.214 \pm 0.017$ ***
DM-silodosin: 1 mg/kg/day	12	$552.1 \pm 28.4$ ***	$294.8 \pm 5.4$	$0.223 \pm 0.013$ ***
DM-urapidil: 30 mg/kg/day	12	$518.7 \pm 23.6$ ***	$290.8 \pm 7.3$	$0.213 \pm 0.013$ ***
DM-urapidil: 100 mg/kg/day	4	$478.8 \pm 11.9$ **	$302.4 \pm 7.1$	$0.238 \pm 0.021$ **

Normal-vehicle group received citrate buffer as a control for STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-vehicle group received STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-silodosin 0.3, 1.0 mg/kg/day group and DM-urapidil 30, 100 mg/kg received STZ, followed by administration of silodosin 0.3, 1.0 mg/kg/day and urapidil 30, 100 mg/kg/day. Drugs were administered subcutaneously continuously by osmotic pump for 4 weeks. Data in the table represent the means  $\pm$  S.E. of 4 -13 animals. \*\*, \*\*\* Significantly different from the Normal-vehicle rats at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively (Dunnett's test). DM, diabetes mellitus, STZ, streptozotocin

### 2.3.3 STZ ラットにおけるシロドシン及びウラピジルの排尿機能に対する治療効果

STZ 投与後 12 週目の STZ ラットにおける排尿動態を図 10 及び表 6 に示す。STZ 投与後 12 週目の STZ 群では、膀胱容量 ( $3.97 \pm 0.52$  mL) と残尿量 ( $3.17 \pm 0.58$  mL) が正常群のそれらよりもそれぞれ約 9.2 倍、約 11.3 倍となった。STZ 群では膀胱伸展量 (膀胱容量/膀胱重量) が約 4.2 倍となり、膀胱菲薄化が示された。排尿効率も STZ 群では低かった ( $23.73 \pm 4.74\%$ )。STZ 群の膀胱内を空にした状態の膀胱血流は  $26.49 \pm 0.56$  units となり、正常群のそれの  $31.55 \pm 0.80$  units よりも低値となった。一方、STZ 群の膀胱内圧 ( $34.39 \pm 3.99$  cmH<sub>2</sub>O) は正常群のそれ ( $35.25 \pm 2.46$  cmH<sub>2</sub>O) と同様の値であった。

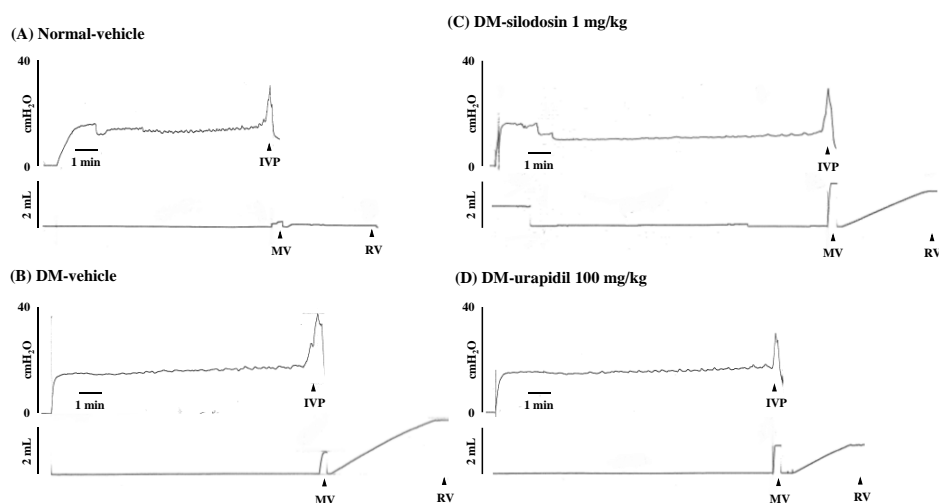


図 10 Typical cystometrogram tracing of Normal-vehicle, DM-vehicle, DM-silodosin (1 mg/kg, s.c.), and DM-urapidil (100 mg/kg, s.c.) in anesthetized rats.

Normal-vehicle group received citrate buffer as a control for STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-vehicle group received STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-silodosin 1.0 mg/kg/day group and DM-urapidil 100 mg/kg/day group received STZ, followed by administration of silodosin 1.0 mg/kg/day and urapidil 100 mg/kg/day. Drugs were administered subcutaneously continuously by osmotic pump for 4 weeks. Saline was infused into the bladders of Normal-vehicle, DM-vehicle, DM-silodosin, and DM-urapidil rats at rates of 2, 12, 9, and 9 mL/h, respectively.

DM, diabetes mellitus, IVP, intravesical pressure; MV, micturition volume; RV, residual volume; s.c., subcutaneously

表 6 Cystometric parameters in Normal-vehicle and DM-vehicle rats

Parameter	Normal-vehicle (n=13)	DM-vehicle (n=12)
BC (mL)	$0.43 \pm 0.08$	$3.97 \pm 0.52^{***}$
RV (mL)	$0.28 \pm 0.07$	$3.17 \pm 0.58^{***}$
BC (mL) / BlaW (g)	$4.36 \pm 0.70$	$18.26 \pm 1.94^{***}$
Maximum IVP (cmH <sub>2</sub> O)	$35.25 \pm 2.46$	$34.39 \pm 3.99$
BVE (%)	$46.05 \pm 7.91$	$23.73 \pm 4.74^*$
Mean blood flow per field arbitrary units	$31.55 \pm 0.80$	$26.49 \pm 0.56^{***}$

Normal-vehicle group received citrate buffer as a control for STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-vehicle group received STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. Drugs were administered subcutaneously continuously by osmotic pump for 4 weeks.

Data in the table represent the means  $\pm$  S.E. of 12 -13 animals. \*, \*\*\* Significantly different from the Normal-vehicle group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively (Student's *t*-test).

BC, bladder capacity, BlaW, bladder weight, BVE, bladder voiding efficiency, DM, diabetes mellitus, IVP, intravesical pressure, RV, residual volume

STZ 投与後 12 週目の STZ ラットにおける排尿動態に対するシロドシンとウラピジルの作用を図 11 に示す。シロドシン 1.0 mg/kg/day 群の膀胱容量及び残尿量は、薬物未処置群のそれらより減少した。ウラピジル 100 mg/kg/day 群の残尿量は、薬物未処置群のそれよりも減少した。シロドシン 1.0 mg/kg/day 群及びウラピジル 100 mg/kg/day 群は、膀胱伸展量 (膀胱容量/膀胱重量) で示される膀胱菲薄化を抑制した。なお、両薬物は、排尿時膀胱収縮圧、排尿効率及び膀胱血流には影響しなかった。

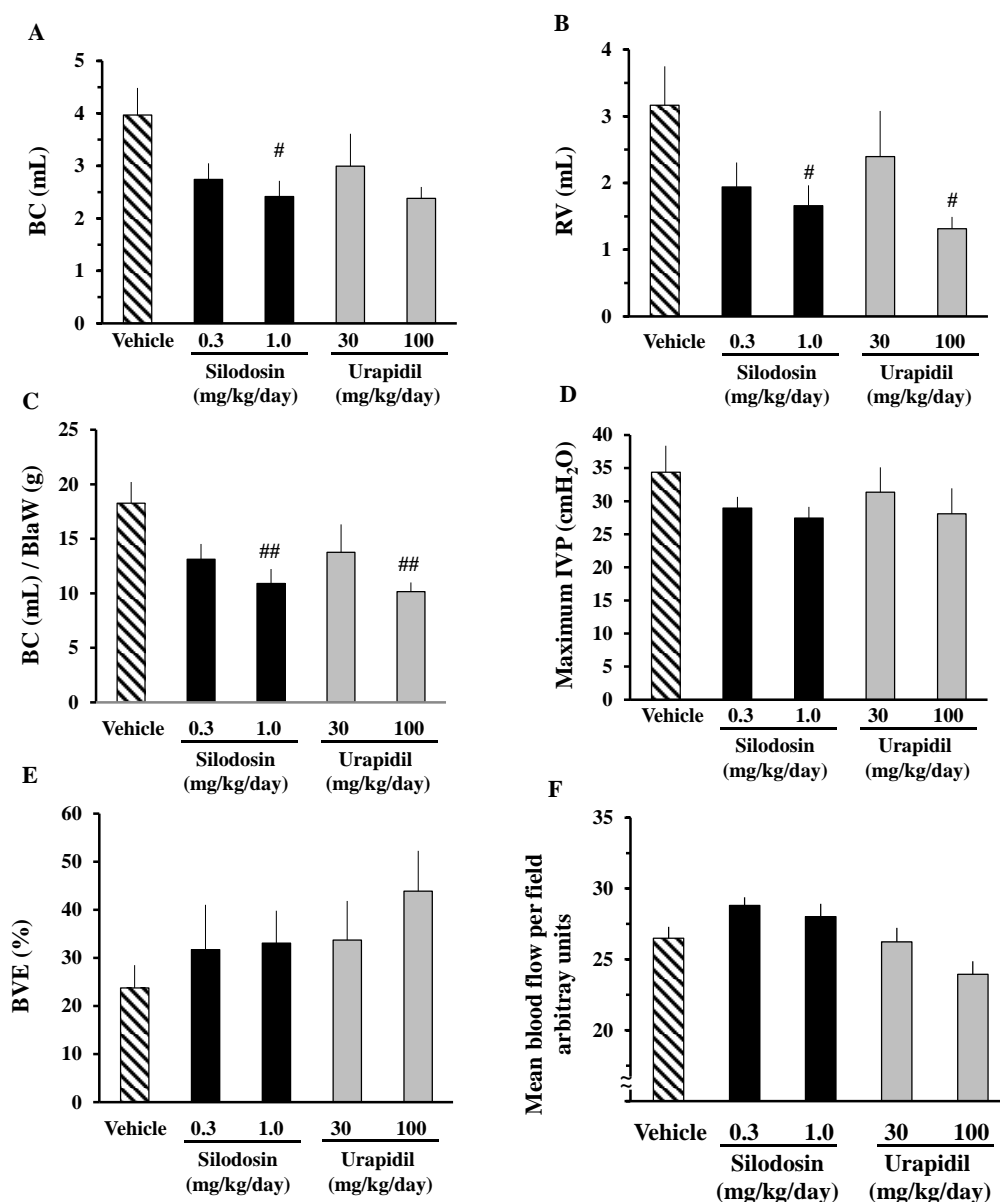


図 11 Effects of silodosin and urapidil on cystometrograms and bladder blood flow in DM rats.

A~E: Effects of silodosin and urapidil on BC (A), RV (B), BC/BlaW (C), maximum IVP (D), and BVE (E) in DM rats, as observed using cystometrograms. F: Effects of silodosin and urapidil on bladder blood flow in the empty DM rat bladders. Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of 4-13 animals. #, ## Significantly different from the Vehicle group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (Dunnett's test). BC, bladder capacity; BlaW, bladder weight; BVE, bladder voiding efficiency; DM, diabetes mellitus, IVP, intravesical pressure; RV, residual volume

## 2.4 考察

$A\alpha_1R$  遮断薬は、前立腺肥大に伴う排尿障害の治療で使用されている。 $A\alpha_1R$  サブタイプの存在比 ( $\alpha_{1a} : \alpha_{1b} : \alpha_{1d}$ ) は、男性の尿道で 100 : 0 : 0、女性の尿道で 90 : 0 : 10 であり<sup>36)</sup>、尿道での存在比は男女で大きな違いはない。去勢した雄性ラット及び雌ラットから単離された尿道標本では、 $A\alpha_1R$  作動薬フェニレフリンで誘発される最大収縮力は、雄性ラットのそれの約 10%である<sup>78)</sup>。本章より、雌性ラットの  $A\alpha_1R$  作動薬による膀胱内圧の上昇に対するシロドシンの抑制効果  $ID_{30}$  は 0.0011 mg/kg, *i.v.*であった。評価方法は異なるものの、雄性ラットの  $ID_{30}$  は 0.0010 mg/kg, *i.v.*であり<sup>78)</sup>、雌雄間で同様の値となった。これは、前立腺の影響を除いた尿道自体の弛緩作用には性差が無いことを示している。糖尿病では、フェニレフリンで惹起される尿道平滑筋収縮力が増大する。その結果、尿道抵抗が上昇し、排泄効率は低下することとなる<sup>79),80)</sup>。本章では、糖尿病による尿道弛緩機能の変化及びそれらの薬物の効果を検討していないものの、 $A\alpha_1R$  遮断薬による尿道収縮抑制、すなわち尿道弛緩促進が糖尿病での排尿機能の改善に寄与すると考えられた。シロドシンの尿道選択性は、ウラピジルのそれよりも約 7.1 倍高いことも示された。ウラピジルは、臨床の場では尿道弛緩作用と同用量で血圧低下作用を示す。したがって、シロドシンは平均血圧を指標とした血行動態への影響の少ない低活動膀胱症の治療薬となる可能性が示された。

シロドシン、タムスロシン及びナフトピジル等の「前立腺肥大症の排尿障害」への適応は、男性にしか使用出来ない<sup>46)</sup>。タムスロシン及びシロドシンは、排尿障害を持つ女性に対して症状スコアの有効性を示すものの、女性に対する長期安全性が担保されていないため、女性の低活動膀胱の治療に推奨されていない<sup>22),81),82)</sup>。ウラピジルは、前立腺肥大症に加え、女性の神経因性膀胱にも適応を持つ唯一の  $A\alpha_1R$  遮断薬である<sup>28),62)</sup>。ウラピジルは、女性患者の低活動膀胱に対して蓄尿症状スコアを改善し、残尿量を減少させる<sup>32)</sup>。ウラピジルは、 $A\alpha_1R$  遮断作用に加えてアドレナリン  $\alpha_2$  受容体遮断作用やセロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体刺激作用を併せ持つ<sup>83),84)</sup>。しかしながら、タムスロシン及びシロドシンが女性の排尿障害に対して有効性を示すことを鑑みると、主には  $A\alpha_1R$  遮断作用が寄与すると考える。本実験系で、ウラピジルによる膀胱機能改善が認められたことから、本モデルの低活動膀胱モデルとしての有用性が検証できた。

糖尿病の 3 大合併症の一つである末梢神経障害による自律神経障害は、排尿障害の誘因となる<sup>5),7)-9)</sup>。様々な糖尿病ラットの排尿障害が報告されている。例えば、STZ ラットでは、頻尿などの膀胱刺激症状から、膀胱容量と残尿量の増加を所見とする低活動膀胱状態へ進行する<sup>52),85)</sup>。本章で用いた STZ 投与後 12 週目の STZ ラットで、膀胱内圧は変化しなかったものの、膀胱容量と残尿量が増大した。これらの結果から、STZ 投与後 12 週目の STZ ラットを低活動膀胱の評価に用いること

とした。

本章では、STZ 投与後 8 週目からシロドシンあるいはウラピジルを 4 週間、皮下持続投与した。STZ 投与後 8 週目の膀胱機能は測定していないが、この後の第 3 章で用いた STZ 投与後 9 週目の膀胱機能変化 (膀胱容量、残尿量、膀胱容量/膀胱重量) は、STZ 投与後 12 週目のそれらと同じであった。低活動膀胱症は可逆的に改善されない<sup>50)</sup>ことから、これらの指標の変化は STZ 投与後 9~12 週間維持されており、本章での薬物投与のタイミングは、薬物の治療効果を観察するために妥当と考えられた。

膀胱の伸展性を評価する新たな指標として、本章では、膀胱容量/膀胱重量比を用いた。その結果、STZ ラットの膀胱容量/膀胱重量比は、正常群のそれよりも高くなることがわかった。下部尿路閉塞ラットでも膀胱容量と残尿量の増加が観察されるものの、下部尿路閉塞ラットの膀胱容量/膀胱重量比は、正常ラットのそれと同様の値となることが報告されている<sup>86),87)</sup>。下部尿路閉塞では、尿道閉塞のため、排尿では強力な膀胱収縮が要求されることから、膀胱平滑筋肥厚を生じる<sup>88)</sup>。一方、本章では、STZ ラットでは膀胱感覚が低下することで膀胱容量が増加し、その結果として膀胱平滑筋が菲薄化した。膀胱壁の厚さは、膀胱壁の肥厚または菲薄化に伴う切迫感や尿失禁等の症状の重症度の予測因子として研究されており、排尿筋低活動と膀胱壁厚の関係が注目されている<sup>89)</sup>。したがって、膀胱容量/膀胱重量比は、膀胱知覚低下に伴う膀胱伸展を定量的に評価する指標となる可能性がある。シロドシン及びウラピジルは膀胱容量/膀胱重量比を低下させたことから、雌性 STZ ラットでの膀胱壁の組織学的変化を改善したと考えられた。

## 2.5 小括

本章では、雌性正常ラットにおけるシロドシンとウラピジルの尿道弛緩作用及び血圧降下作用について検討した。両薬物は用量依存的にミドドリン ( $A\alpha_1R$  刺激薬) による尿道内圧上昇を抑制し、平均血圧を低下させた。本章では、ウラピジルに比して、シロドシンでは降圧の度合いよりも尿道弛緩のそれの方が強く現れた。その後、STZ ラットにおけるシロドシンとウラピジルの排尿機能に及ぼす効果について検討した。STZ 投与後 12 週目の STZ ラットでは、残尿量の増加、膀胱菲薄化 (膀胱容量/膀胱重量比の増加) 及び排尿効率の減少で示される低活動膀胱様の排尿機能障害が誘発された。両薬物は、残尿量の増加及び膀胱菲薄化を軽減した。これらの結果から、シロドシンは雌性動物において、平均血圧を指標とした血行動態への作用の少ない低活動膀胱の治療選択肢となる可能性が示された。



## 第3章. 薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) におけるシロドシンの予防効果と作用機序解析

### 3.1 緒言

第1章において、シロドシンは ZDF ラットの尿道弛緩作用により低活動膀胱の症状を改善した。第2章において、シロドシン及びウラピジルは、雌性正常ラットのミトドリン誘発尿道収縮を軽減した。これら両薬物は、STZ ラットの低活動膀胱の症状の治療効果を示した。加えて、STZ ラットでは膀胱菲薄化が示され、両薬物はそれを改善した。しかしながら、糖尿病における膀胱の組織的变化とシロドシンの作用機序については未だ明らかにされていない。

糖尿病性神経障害は微小血管合併症の一つであり、毛細血管基底膜の肥厚や内皮の過形成などの血管異常の発生及び、それに続く組織での低酸素状態が誘因となる<sup>90)</sup>。糖尿病モデルでは、膀胱の神経及び血管密度の低下が報告されているが<sup>55)</sup>、糖尿病モデルにおける排尿障害と膀胱血流の関与についての知見はほとんどない。膀胱動脈では  $A\alpha_{1B}R$  と  $A\alpha_{1D}R$  よりも  $A\alpha_{1A}R$  が多く発現している<sup>59)</sup>。近年、下部尿路閉塞ラットにタムスロシンを継続投与すると、膀胱血流の減少が軽減され、排尿回数の増加を抑制することが示されている<sup>57),58)</sup>。さらに、尿道閉塞を伴わない動脈硬化による膀胱虚血モデルラットにおいて、シロドシンの継続投与により、膀胱血流の回復を介して膀胱機能が改善されたことも報告されている<sup>59)</sup>。これらの結果から、 $A\alpha_1R$  遮断薬は、その主作用である尿道閉塞の緩和だけでなく、膀胱血流の改善も期待できることが考えられる。

本章でも、薬物の前立腺部への影響を除くため、第2章と同様に雌性 STZ ラットを用いた。STZ ラットは、初期には過活動膀胱を示すものの、STZ 投与後 9-12 週目から低活動膀胱に移行するとされている<sup>52),53)</sup>。本章では、STZ 投与後 1 週目から低活動膀胱に移行するとされる 9 週目までの 8 週間に渡ってシロドシンを継続投与し、糖尿病による排尿動態に及ぼすシロドシンの予防効果について検討した。同時に、シロドシンの膀胱血流に与える影響について膀胱血流測定にて評価した。続いて、膀胱組織を用いた網羅的遺伝子発現解析により、糖尿病が膀胱組織に与える遺伝子発現変化とシロドシンがそれらに及ぼす影響について評価した。さらに、糖尿病による神経発現変化及びシロドシンのそれに及ぼす影響について評価するために、定量的 PCR 法及び免疫染色法により神経特異的マーカーである NF-M 及び peripherin も測定した。

## 3.2 実験材料・方法

### 3.2.1 実験動物

本研究はキッセイ薬品工業の実験動物倫理委員会の審査・承認を得て、本邦のガイドラインに従って実施した<sup>65)</sup>。実験には、日本チャールス・リバーから購入した雌性SDラットを用いた。実験動物は、温湿度条件(温度:20~26 °C、湿度:40~60%)、明期12時間/暗期12時間(明期:8:00~20:00)ならびに3-5匹毎の群飼いで飼養し、試験開始まで水及び標準固形飼料(CE-2型固形飼料、日本クレア)を自由に摂取させた。

### 3.2.2 使用薬物

シロドシン2臭化水素酸塩(キッセイ薬品工業)をハルトマン溶液(ネオクリティケア製薬株式会社)に溶解した。

### 3.2.3 モデル動物作製

6週齢のラットに、0.03 mol/L クエン酸緩衝液(pH4.5)に溶解したSTZを50 mg/kg 静脈内投与した。非糖尿病ラットには、クエン酸緩衝液のみを投与した。STZ投与後1週間目に、小型電極式グルコース分析装置(ANTSENSE III;堀場製作所)を用いて非絶食時血糖値を測定し、血糖値が200 mg/dL以上を糖尿病として実験に使用した。ラットは体重と血糖値に基づいて群分けを行った。

### 3.2.4 薬物処置

STZ投与後1週目となる血糖値測定の翌日、背部皮下に浸透圧ポンプ(2ML4; Alzet)を設置した。薬物は、浸透圧ポンプを介して、8週間皮下投与された。

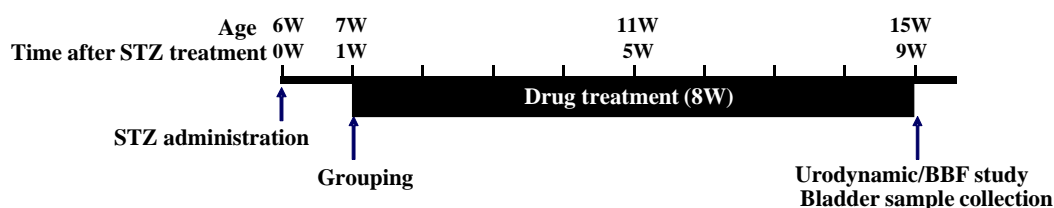


図 12 Schedule of drug treatment and various measurements

Rats (6 weeks old) were treated with STZ (50 mg/kg *i.v.*). At week 1 of STZ administration, rats were grouped by blood glucose and body weight and treated with vehicle and silodosin (0.3, 1.0 mg/kg/day *s.c.*) for 8 weeks using an osmotic pump. Voiding function, bladder blood pressure measurements and bladder tissue collection were performed at week 9 of STZ administration. BBF, bladder blood flow, *i.v.*, intravenous, *s.c.*, subcutaneous, STZ, streptozotocin

シロドシンの投与用量として、一日当たり0.1または0.3 mg/kg/dayの継続投与を設定した。本用量における、定常状態の血漿中非結合型シロドシン濃度はそれぞれ、 $3.78 \times 10^{-10}$  および  $1.13 \times 10^{-9}$  mol/Lと推定されている。この濃度は臨床試験にお

ける血漿中の非結合型シロドシン濃度である  $1.43 \times 10^{-9}$  mol/L に相当する<sup>77)</sup>。同様に、正常群及び対照群には、浸透圧ポンプを介してハルトマン溶液を 8 週間皮下投与した。

### 3.2.5 膀胱血流測定

STZ 投与後 9 週目に、25%ウレタン (1.5 g/kg, *s.c.*) で麻酔した。腹部正中切開を行い、膀胱を露出させた。18 ゲージカテーテルを頂部から膀胱内に留置し、膀胱内を空にした。膀胱血流を Omegazone laser speckle blood flow imager (Omegawave) を用いて測定した。

### 3.2.6 膀胱内圧測定

膀胱血流測定後、排尿動態を測定した。ラットを仰臥位にさせ、膀胱に生理食塩水を持続注入するためのインフュージョンポンプ (KDS-100; 室町機械) 及び膀胱内圧記録用の DT-4812 圧力変換器 (日本ベクトン・ディキンソン) に膀胱カテーテルを接続した。排尿量はプラスチックケージ下に設置した GF-300 デジタル天秤 (A&D) を用いて測定した。膀胱内圧測定は、排尿間隔が約 20 分になるように生理食塩水を注入した (注入速度、正常ラット: 1-3 mL/h、STZ ラット: 6-24 mL/h)。膀胱内圧と排尿量は Rectigraph-8K (NEC 三栄) で連続的に記録した。膀胱内圧、排尿量及び残尿量を膀胱内圧の指標として測定した。

### 3.2.7 網羅的遺伝子発現解析

STZ 投与後 9 週目に、イソフルラン麻酔下に腹部大動脈から失血させることによりラットを安楽死させた。本実験では、血流測定及び排尿動態測定に使用したラットとは別のラットを使用した。膀胱を摘出し正中切開し、遺伝子解析と免疫染色法に半分ずつ用いた。膀胱組織から RNeasy<sup>®</sup> Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。マイクロアレイは、Agilent SurePring G3 Rat GE 4 x 44K v3 Microarray (Agilent Technologies, CA, US) を用いて行った。100 ng の Total RNA 量で Cy3 標識の合成を行い、0.6  $\mu$ g の Cy 標識 cDNA を用いてハイブリダイゼーションを行った。解析には GeneSpring GX ver. 11 (Agilent Technologies)、Base Space Correlation Engine US (Illumina, CA, US) を使用した。

### 3.2.8 定量的 PCR

Total RNA から GeneAmp PCR System 9700 (ライフテクノロジーズジャパン、東京、日本) を用いて cDNA を合成した。PrimeScript<sup>™</sup> RT 試薬キット (タカラバイオ、滋賀、日本) 及び SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (タカラバイオ) を用いて、Applied Biosystems 7500 Fast (ライフテクノロジーズジャパン) でリアルタイム RT-PCR によ

り標的遺伝子に対応する mRNA の発現量を定量した。β-actin、neurofilament-M (NF-M) 及び peripherin のプライマーは、タカラバイオから購入した。

### 3.2.9 免疫染色

膀胱を Mildform® (富士フィルム和光純薬工業) に浸し、パラフィンに包埋し、5 μm 厚の切片に切り出した。切片を脱パラフィン後、加熱することで抗原を賦活化した。冷却後、プロテインブロック試薬 (Agilent Technologies) を用いて免疫グロブリンの非特異的結合を阻害した。抗 NF-M (AB1987、希釈度 1 : 200 ; Merck KGaA、Darmstadt、Germany) 抗体または抗 peripherin (AB1530、希釈度 1 : 100 ; Merck KGaA) 抗体と 4 °C で一晩インキュベーションした。Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (A11034、希釈度 1:500 ; ライフテクノロジーズジャパン) で 2 時間、室温にて切片を処理した。ヨウ化プロピジウムを加えて核を染色し、Fluoromount/Plus™ (Diagnostic BioSystems, CA, USA) で固定した。

標識した膀胱切片の顕微鏡写真を、Olympus IX71 顕微鏡に取り付けた DP72 デジタルカメラ (オリンパス、東京、日本) を用いて撮影した。膀胱の全域を撮影し、CellSens デジタルイメージングソフトウェア (オリンパス) を用いて高精度にタイル化し、画像処理、画像計測、画像解析、データ処理を WinROOF ソフトウェア (三谷商事、福井、日本) を用いて解析した。

### 3.2.10 データ処理

データは平均値±標準誤差で示した。統計解析は SAS version 8.20 (SAS Institute) を用いて実施した。3 群間の比較は以下のように行った。Bartlett 検定で等分散が示された場合は、一元配置分散分析とパラメトリック Dunnett 多重比較検定により統計解析を行った。Bartlett 検定で等分散が示されない場合は、ノンパラメトリック Dunnett 多重比較検定で統計解析を行った。2 群間の比較は以下のように行った。F-検定で等分散が示された場合は Student's *t* 検定、等分散が示されなかった場合は Aspin-Welch's *t* 検定で統計解析を行った。統計的有意性は  $P < 0.05$  とした。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 STZ ラットの一般状態とシロドシンによる影響

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの血糖値、体重及び膀胱重量を表 7 に示す。STZ 群の血糖値 ( $541.0 \pm 25.3$  mg/dL) は、正常群のそれ ( $161.4 \pm 7.6$  mg/dL) の約 3.4 倍であった。STZ 群の膀胱重量 ( $0.220 \pm 0.010$  g) は、正常群 ( $0.107 \pm 0.005$  g) への 2.1 倍となった。シロドシン群の血糖値、体重及び膀胱重量は STZ 群のそれらといずれも同様の値となった。

表 7 Blood glucose, body weight, and bladder weight of rats after 9 weeks of STZ injection

Group	Number of rats	Blood glucose (mg/dL)	Body weight (g)	Bladder weight (g)
Normal-vehicle	10	$161.4 \pm 7.6$	$278.5 \pm 10.7$	$0.107 \pm 0.005$
DM-vehicle	13	$541.0 \pm 25.3^{***}$	$260.4 \pm 4.6$	$0.220 \pm 0.010^{***}$
DM-silodosin 0.3 mg/kg/day	12	$521.4 \pm 15.2^{***}$	$262.5 \pm 4.2$	$0.223 \pm 0.014^{***}$
DM-silodosin 1.0 mg/kg/day	12	$474.6 \pm 27.5^{***}$	$271.8 \pm 8.1$	$0.210 \pm 0.014^{***}$

Normal-vehicle group received citrate buffer as a control for STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-vehicle group received STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-silodosin 0.3, 1.0 mg/kg/day group received STZ, followed by administration of silodosin 0.3, 1.0 mg/kg/day. Drugs were administered subcutaneously continuously by osmotic pump for 8 weeks.

Data in the table represent the means  $\pm$  S.E. of 10 -13 animals. \*\*\* Significantly different from the Normal-vehicle group at  $p < 0.001$  (Dunnett's test). DM, diabetes mellitus, STZ, streptozotocin

### 3.3.2 STZ ラットにおけるシロドシンの排尿機能に対する予防効果

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの排尿動態を表 8 に示す。STZ 群では膀胱容量 (3.94 ± 0.50 mL) 及び残尿量 (3.14 ± 0.57 mL) が正常群のそれらのそれぞれ約 7.4 倍及び 10.5 倍と高値となった。STZ 群では膀胱伸展量 (膀胱容量/膀胱重量) が約 3.6 倍と高値となり、膀胱菲薄化が示された。STZ 群の膀胱内を空にした状態の膀胱血流 (27.26 ± 0.88) は、正常群のそれ (31.46 ± 1.11) よりも低かった。一方、STZ 群の膀胱内圧 (29.18 ± 3.10 cmH<sub>2</sub>O) は正常群のそれ (30.04 ± 2.98 cmH<sub>2</sub>O) と同様の値であった。

表 8 Cystometric parameters in Normal-vehicle and DM-vehicle rats

Parameter	Normal-vehicle (n=10)	DM-vehicle (n=13)
BC (mL)	0.53 ± 0.11	3.94 ± 0.50 ***
RV (mL)	0.30 ± 0.08	3.14 ± 0.57 ***
BC (mL) / BlaW (g)	5.08 ± 1.12	18.25 ± 2.46 ***
Maximum IVP (cmH <sub>2</sub> O)	30.04 ± 2.98	29.18 ± 3.10
Mean blood flow per field arbitrary units	31.46 ± 1.11	27.26 ± 0.88 **

Normal-vehicle group received citrate buffer as a control for STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. DM-vehicle group received STZ, followed by administration of Hartmann's solution as a drug control. Data in the table represent the means ± S.E. of 10-13 animals. \*\*, \*\*\* Significantly different from the Normal-vehicle group at p<0.01 and p < 0.001, respectively (Student's *t*-test). BC, bladder capacity, BlaW, bladder weight, DM, diabetes mellitus, IVP, intravesical pressure, RV, residual volume, STZ, streptozotocin

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの排尿動態におけるシロドシンの作用を図 13 に示す。シロドシン群の膀胱容量と残尿量は、薬物未処置群のそれらより減少した。シロドシン群は膀胱伸展量 (膀胱容量/膀胱重量) で示される膀胱菲薄化を抑制した。なお、シロドシン群の排尿時膀胱収縮圧は、薬物未処置群のそれと同様な値であった。

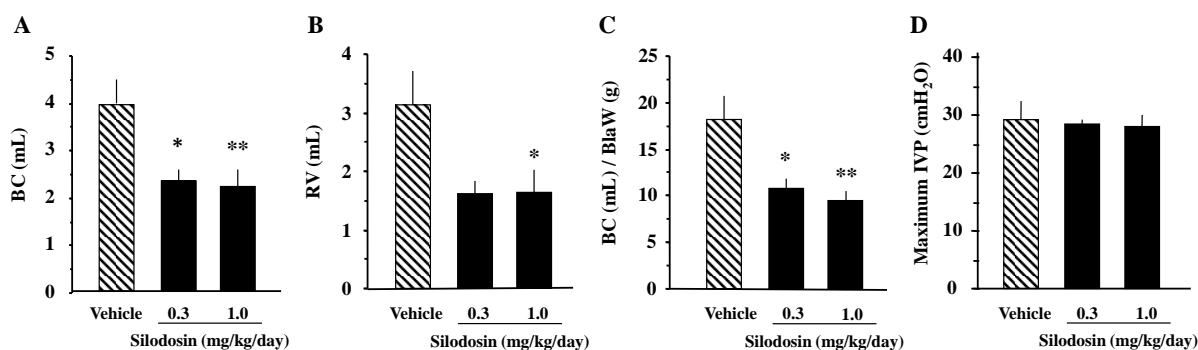


図 13 Effects of silodosin (0.3 and 1.0 mg/kg/day, s.c.) on cystometry in DM rats.

A~E: Effects of silodosin and urapidil on BC (A), RV (B), BC/BlaW (C), maximum IVP (D) in DM rats, as observed using cystometrograms. Data are presented as the means ± S.E. of 12-13 animals. \*, \*\* Significantly different from the Vehicle group at p < 0.05 and p < 0.01, respectively (Dunnett's test). BC, bladder capacity, BlaW, bladder weight, DM, diabetes mellitus, IVP, intravesical pressure, RV, residual volume, s.c., subcutaneously

次に、STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの膀胱血流の変化に及ぼすシロドシンの効果を図 14 に示す。シロドシン 1.0 mg/kg/day 処置により、STZ ラット群に対して膀胱血流が増加した。

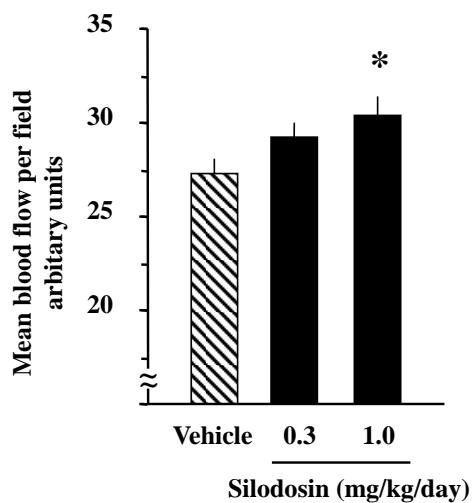


図 14 Effects of silodosin (0.3 and 1.0 mg/kg/day, s.c.) on bladder blood flow in empty DM rat bladders.

Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of 12-13 animals. \* Significantly different from the Vehicle group at  $p < 0.05$ , respectively (Dunnett's test). DM, diabetes mellitus, s.c., subcutaneously

### 3.3.3 STZ ラットにおける膀胱組織の網羅的遺伝子発現変化とシロドシンによる影響

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの膀胱組織における網羅的遺伝子解析結果を図 15 及び表 9-表 11 に示す。遺伝子発現変化は 2 倍以上の増減を閾値とした。正常群に対して、STZ 群で発現量が増加した遺伝子は 1229 遺伝子、逆に減少した遺伝子は 1015 遺伝子となった (図 15)。STZ 群で発現量が増加した 1229 遺伝子に対して Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、炎症反応を主とする 22 の遺伝子群 (表 9) の関連があることを見出した。上位 3 つは innate immune response (GO:0045087、GO:0002226)、chromosome segregation (GO:0007059)及び neutrophil chemotaxis (GO:0030593)であった。STZ 群で発現量が減少した 1015 遺伝子に対して GO 解析を行ったところ、lipid metabolic process (GO:0006629) の関連があった。また、正常群に対して STZ 群で発現量が変動した遺伝子に対して、Pathway 解析を行った。その上位 5 つを表 10 に示す。STZ 群で発現量が増加した 1229 遺伝子に対する Pathway 解析結果 (DM-vehicle/Normal-vehicle (Up)) の内 2 つは TNF に関連した Pathway だった。一方、STZ 群で発現量が減少した 1015 遺伝子に対する Pathway 解析結果 (DM-vehicle/Normal-vehicle (Down)) の内 4 つはインスリンに関連した Pathway であった。

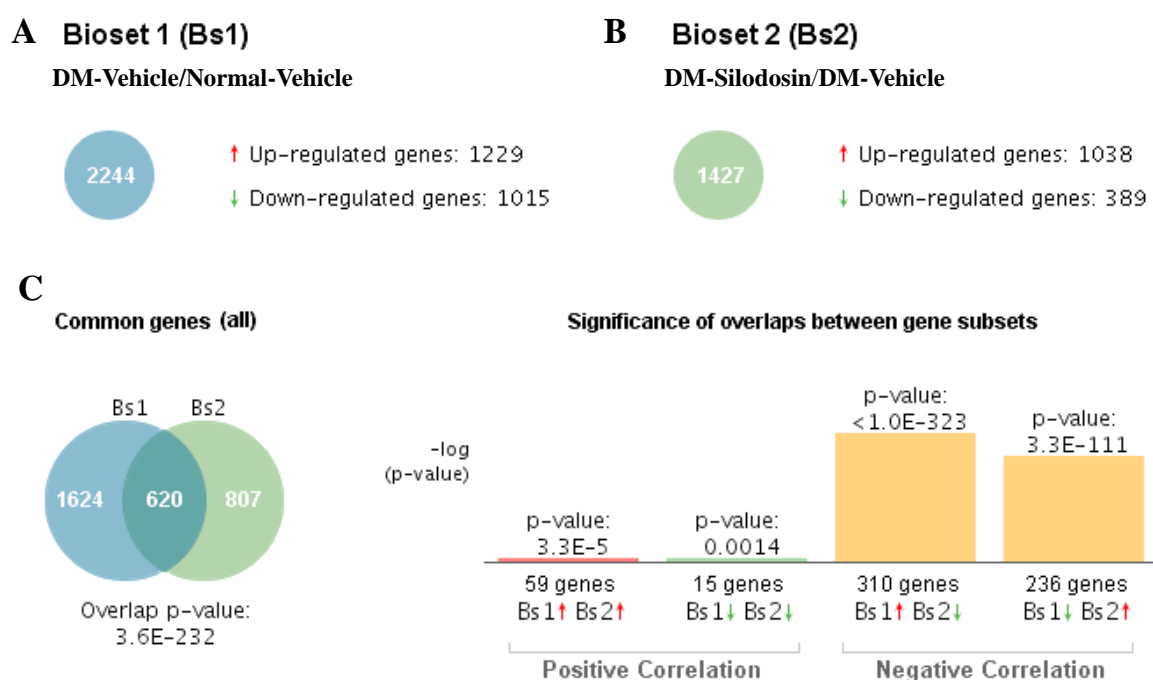


図 15 Effect of silodosin on gene expression analysis in DM rats

Equal amounts of mRNA from 3-4 samples in each group were mixed for microarray gene expression analysis. A. The group of genes expressed more than 2-fold in the DM-vehicle group relative to the Normal-vehicle group. B. The group of genes expressed more than 2-fold in the DM-silodosin (1.0 mg/kg/day *s.c.*) group relative to the DM-vehicle group. C. Positive and negative correlations for genes common to A and B. Base Space Correlation Engine (Illumina) was used for the analysis. DM, diabetes mellitus, *s.c.*, subcutaneously



表 9 Gene ontology analysis for genes increased in DM rats

GO No.	ACCESSION	GO Term	corrected p-value	Count in Selection	Count in Total
GO:0045087 GO:0002226		innate immune response	9.82E-06	14	92
GO:0007059		chromosome segregation	9.89E-06	11	60
GO:0030593		neutrophil chemotaxis	4.30E-05	11	22
GO:0007159		leukocyte cell-cell adhesion	4.30E-05	10	22
GO:0032496		response to lipopolysaccharide	6.19E-05	29	164
GO:0042742 GO:0042830		defense response to bacterium	1.14E-04	18	91
GO:0001819		positive regulation of cytokine production	1.99E-04	2	94
GO:0002544		chronic inflammatory response	5.18E-04	5	14
GO:0016064		immunoglobulin mediated immune response	5.23E-04	5	33
GO:0006956		complement activation	8.54E-04	3	29
GO:0050853		B cell receptor signaling pathway	0.00175887	7	12
GO:0030217 GO:0042112 GO:0046652		T cell differentiation	0.00509475	5	41
GO:0007067		mitosis	0.00522527	14	108
GO:0045408		regulation of interleukin-6 biosynthetic process	0.00574199	1	10
GO:0051223		regulation of protein transport	0.00884011	1	113
GO:0034612		response to tumor necrosis factor	0.01029167	6	26
GO:0009615		response to virus	0.01175206	12	67
GO:0030101		natural killer cell activation	0.01825696	5	8
GO:0045429		positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	0.02460456	8	23
GO:0034605		cellular response to heat	0.02867825	6	13
GO:0045576		mast cell activation	0.02867825	2	13
GO:0050729		positive regulation of inflammatory response	0.03596237	4	37

Gene ontology analysis was performed using GeneSpring GX ver. 11 (Agilent Technologies). Gene Ontology terms listed p-value < 0.05. DM, diabetes mellitus, GO, Gene Ontology

次に、STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの膀胱組織におけるシロドシン 1.0 mg/kg/day の作用についての網羅的遺伝子解析結果を示す (図 15、表 10)。遺伝子発現変化は 2 倍以上の増減を閾値とした。正常群に対して STZ 群で発現変動した 2244 遺伝子と STZ 群に対してシロドシン群で発現変動した 1427 遺伝子は、620 遺伝子が共通であった。それらは、負の相関を示した。正常群に対して STZ 群で発現量が増加した 1229 遺伝子に対し、シロドシン群では 59 遺伝子の発現量が増加し、その一方で、310 遺伝子の発現量が減少した。シロドシン群で発現量が増加した 59 遺伝子では有意な GO 解析結果は得られなかった。シロドシン群で発現量が減少した 310 遺伝子では GO:0006954: inflammatory response, GO:0045084: positive regulation of interleukin-12 biosynthetic process, GO:0009607: response to biotic stimulus, GO:000693 : chemotaxis, GO:000695 : immune response の 5 つの GO term が得られた。一方、STZ 群で発現量が減少した 1015 遺伝子に対し、シロドシン群では 236 遺伝子の発現量が増加し、その一方で、15 遺伝子の発現量が減少した。これらの遺伝子群に対して有意な GO term は得られなかった。次に、STZ 群に対してシロドシン群で発現量が変化した遺伝子の Pathway 解析を行った。上位 5 つの Pathway を表 10 に示した。STZ 群で遺伝子の発現量が増加し、シロドシンで低下した 310 遺伝子に対する Pathway 解析結果 (DM-silodosin/DM-vehicle (Down) ) には、正常に対して STZ 群で発現量が増加した遺伝子 (DM-vehicle/Normal-vehicle (Up) ) で見出された IFNG/IFNR Expression Targets 及び TNF に関連した Pathway があつた。

表 10 Pathway analysis of genes altered by silodosin in DM rats

	DM-vehicle/Normal-vehicle (Up)	DM-vehicle/Normal-vehicle (Down)	DM-silodosin/DM-vehicle (Up)	DM-silodosin/DM-vehicle (Down)
1	TNF->NF-kB Expression Targets	insulin ->CEBPA/CTNNB/FOXA/FOXO Expression Targets	Leptin ->CD25/IL6/IL10 Production	CXC Chemokine Receptor Signaling
2	IFNG/IFNR Expression Targets	insulin ->ELK/SRF/HIF1A/MYC/SREBF Expression Targets	Receptors and Adaptor Proteins Activated in Cancer	IFNG/IFNR Expression Targets
3	CD Markers -> Expression Targets in Lymphoid System and Blood	insulin -> MEF/MYOD Expression Targets	Neural Subtype of Glioblastoma	CCR1 Expression Targets
4	CD40 -> Expression Targets in Lymph Node	insulin -> STAT Expression Targets	PRL/PRLR Expression Targets	TNF -> STAT Expression Targets
5	TNF -> AP-1 Expression Targets	GH1/GHR -> STAT Expression Targets	HGF ->STAT Expression Targets	Leukocyte Migration Toward the Endothelial Cell in Ulcerative Colitis

Pathway analysis was performed using the Base Space Correlation Engine US (Illumina, CA, US). DM, diabetes mellitus

膀胱機能に関連すると推測される遺伝子群について遺伝子発現量の変動を抽出した結果を表 11 に示す。平滑筋マーカーの smooth muscle alpha-actin は変動がなかった。膀胱粘膜上皮マーカーの keratin 20 について、STZ 群の遺伝子発現量は、正常群のその約 1/4 に低下していた。神経マーカーの NF-M, L, MAP2, neurogenin 3, peripherin 及び parvalbumin の発現量は、STZ 群ではいずれも正常群の 70%以下になった。一方、シロドシン群では、いずれの遺伝子変動も正常群に近くなる傾向にあった。

表 11 Changes in gene expression related to bladder function

Marker	Gene name	DM-vehicle /Normal-vehicle	DM-silodosin /Normal-vehicle	DM-silodosin /DM-vehicle
Smooth muscle	smooth muscle alpha-actin	1.00	1.31	1.30
Bladder mucosal epithelium	keratin 20	0.25	0.38	1.57
Neuron	neurofilament, M (NF-M)	0.63	1.30	2.06
	neurofilament, L (NF-L)	0.15	0.41	2.73
	neurofilament, H (NF-H)	n.d.	n.d.	-
	MAP2	0.53	0.69	1.30
	neurogenin 3	0.35	0.71	2.03
Sensory neuron	enolase 2, gamma, neuronal	0.74	0.90	1.22
	perpherin	0.69	0.94	1.36
Moter neuron	parvalbumin	0.52	0.75	1.44
	survival of motor neuron protein in teracting protein 1	0.91	1.51	1.66
	suvival motor neuron domain containig 1	0.84	1.25	1.49
	suvival motor neuron 1	1.05	1.53	1.46

Genes involved in bladder function were listed in the table. DM-vehicle/Normal-vehicle shows gene expression variation in DM rats relative to normal rats. DM-silodosin/Normal-vehicle shows gene expression variation in DM rats administrated with silodosin (1.0 mg/kg/day *s.c.*) relative to normal rats. DM-Silodosin/DM-vehicle shows changes in gene expression of silodosin in DM rats in response to solvent administration. DM, diabetes mellitus, *s.c.*, subcutaneously

### 3.3.4 STZ ラットにおける膀胱神経脱落とシロドシンの影響

NF-Mは神経細胞に特異的に発現するマーカーであり、peripherinは感覚神経特異的マーカーである<sup>91)</sup>。これらは、中間径フィラメントで、神経細胞の構造を支えている。これら特異的神経マーカーの遺伝子発現量及びタンパク質発現量を図16から図19に示す。

神経細胞特異的マーカーNF-Mの遺伝子発現及びタンパク質発現は、正常群のそれらよりSTZ群で弱かった。シロドシン1.0 mg/kg/day投与群では、この減少が抑制されていた(図16, 図19)。感覚神経特異的マーカーperipherinの遺伝子発現は正常群のそれよりSTZ群で弱かった(図16)。免疫染色法による解析の結果、peripherinは平滑筋層に分布していた(図17)。蛍光免疫染色像におけるSTZ群のperipherinのシグナル強度は、正常群のそれより弱かった。シロドシン群のシグナル強度は正常群のそれと同程度であった(図18)。そこで、蛍光強度の定量値を図19に示す。STZ群でのperipherinの蛍光強度値は、正常群のそれより低値となり、この減少はシロドシンによって抑制された。

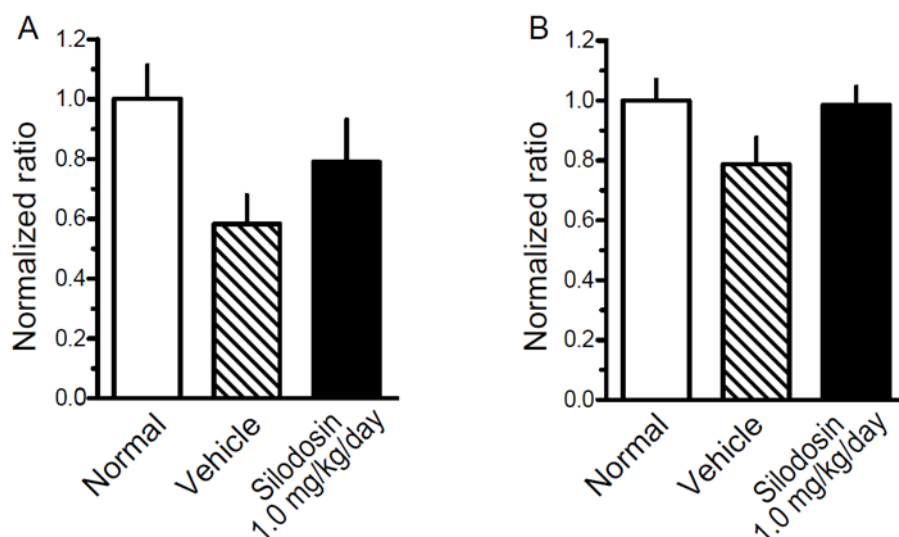
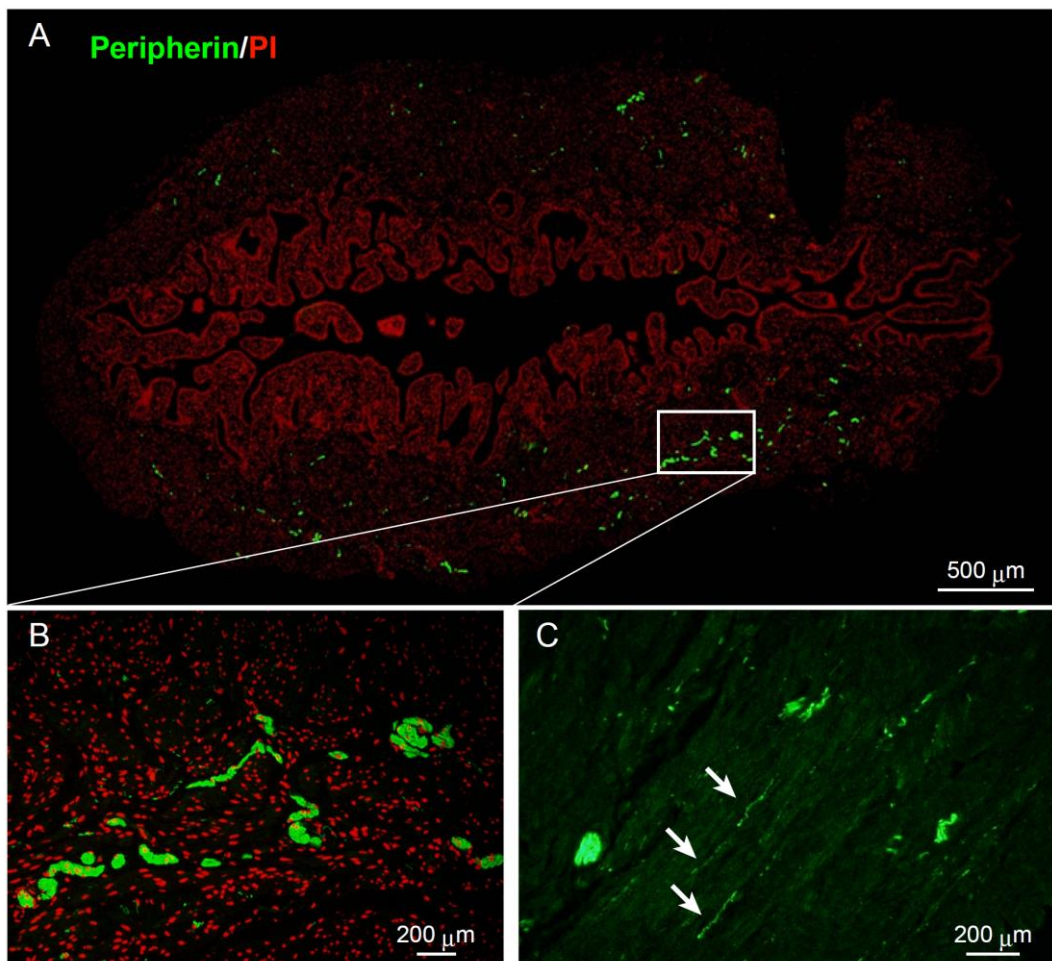


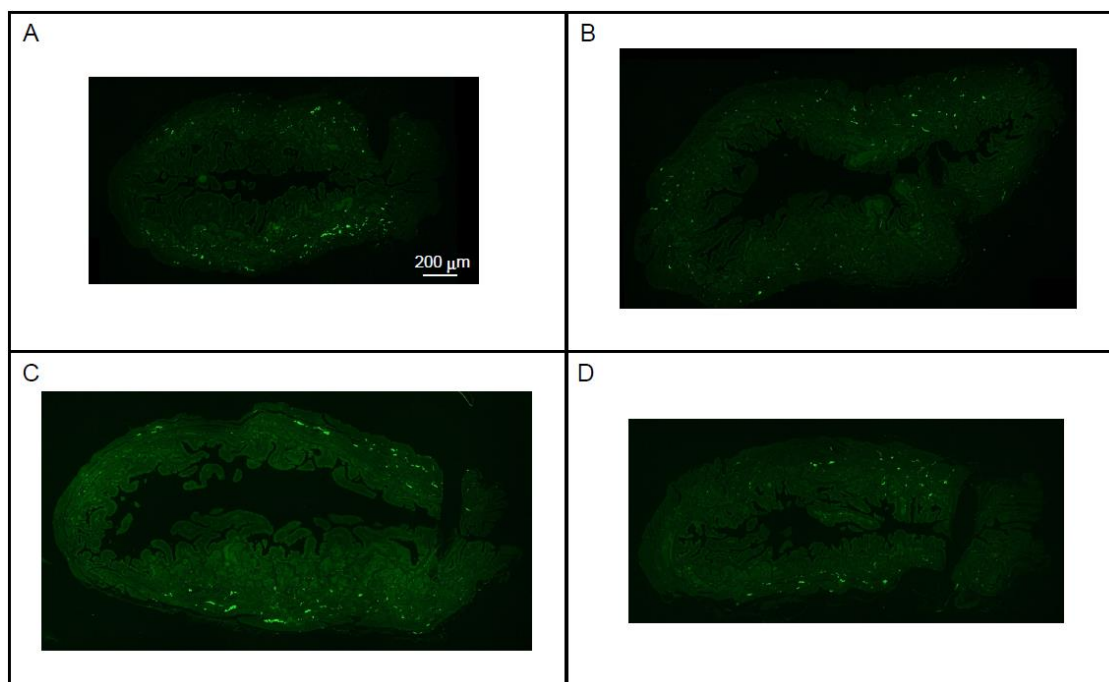
図 16 Gene expression of neurofilament-M (A) and peripherin (B) in the bladders of normal, DM-Vehicle, and DM-Silodosin rats.

Values are shown as the ratio to the normal rats. Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of 6-8 animals. DM, diabetes mellitus



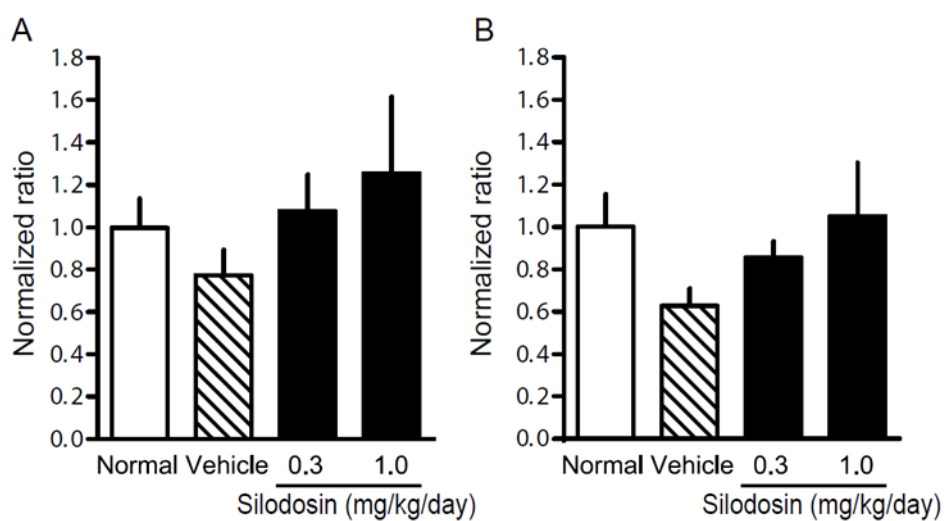
☒ 17 Representative immunofluorescence staining of peripherin-immunoreactive nerves (green) and propidium iodide-positive nuclei (red) in vertical sections of the bladder.

A, Whole bladder. B, Extended image. A few axons branched off from the plexus. A weaker signal was observed under increased magnification.



☒ 18 Peripherin expression in the vertical section of the whole bladder.

Photomicrographs of labeled bladder sections were captured using a DP72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan) attached to an Olympus IX71 microscope. A, Normal-vehicle bladder. B, STZ-induced DM-Vehicle bladder. C and D, STZ-induced DM-chronic subcutaneous infusion of silodosin 0.3 and 1.0 mg/kg/day bladder, respectively. DM, diabetes mellitus, STZ, streptozotocin



☒ 19 Immunohistochemical analysis of the effects of silodosin on neurofilament-M (A) and peripherin (B) in the bladder.

The whole bladder was photographed and tiled with high accuracy using cellSens software. WinROOF was used to measure the total area of the photographed bladder and immunopositive bundles. Values are shown as the ratio to the normal rats. Data are presented as the means  $\pm$  S.E. of 7-8 animals.

### 3.4 考察

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットにおいて、排尿動態指標の残尿量増加及び膀胱菲薄化 (膀胱容量/膀胱重量の増加) が観察された。STZ 投与後 1 週目の排尿動態は測定していないが、STZ 投与後 1 週目では神経発現や血管密度に変化が認められず、3 週目以降に過活動膀胱に移行する<sup>52),55)</sup>ことを鑑みると、本章での薬物投与開始のタイミングは、薬物の予防効果を観察するために妥当と考えられた。これら排尿動態指標の変化は、シロドシンにより抑制された。

第 2 章で明らかとしたように、シロドシンは雌性動物においても尿道弛緩作用を示し、排尿障害を改善する。加えて、本章では、シロドシンは STZ ラットの膀胱血流量の低下を抑制した。STZ ラットの膀胱組織では、STZ 投与後 20 週目に血管密度の低下が報告されているものの、STZ 投与後 9 週目では血管密度の低下には至っていない<sup>55)</sup>。しかしながら、本実験では、STZ 投与後 9 週目に血流が低下し、膀胱組織が乏血に陥っていると考えられた。膀胱動脈には  $\text{A}\alpha_{1\text{B}}\text{R}$  と  $\text{A}\alpha_{1\text{D}}\text{R}$  よりも  $\text{A}\alpha_{1\text{A}}\text{R}$  が多く発現し<sup>59)</sup>、 $\text{A}\alpha_{1\text{R}}$  遮断薬は膀胱血流量を増加させることが報告されている<sup>57)-59)</sup>。STZ ラットにおいて、シロドシンが膀胱動脈の  $\text{A}\alpha_{1\text{A}}\text{R}$  遮断を介して、膀胱血流低下を軽減した可能性が示された。

膀胱の感覚低下は、末梢神経障害の症状の一つとされる。末梢神経の血管分布はまばらであり、末梢神経は供給血流量の減少に対して脆弱である<sup>92)</sup>。したがって、末梢神経障害は血流の低下と密接に関係していると考えられる。本章では、神経細胞マーカーの NF-M 及び *peripherin* の膀胱組織における発現量を測定した。感覚神経細胞マーカーの *peripherin* の発現を測定することは、膀胱の感覚を評価するための有用な指標となる。STZ 投与後 9 週目の膀胱組織において、NF-M 及び *peripherin* の遺伝子及びタンパク質発現量は低下し、シロドシンにより低下は抑制傾向を示した。定量性は乏しいものの、膀胱組織の網羅的遺伝子発現解析においても、NF-M, *peripherin* 及びそれら以外の神経系マーカーの発現量も一様に低値を示し、シロドシンはそれらの発現量の低下を抑制した。シロドシンは、膀胱血流低下抑制を介して、膀胱の知覚低下を改善する可能性が示された。

網羅的遺伝子発現解析において、STZ 投与後 9 週目の STZ ラットの膀胱組織では、正常ラットに比べて、多くの遺伝子発現変化が観察された。シロドシンはそれらの遺伝子発現変化を制御する可能性が示された。GO 解析及び Pathway 解析のいずれにおいても、STZ ラットの膀胱組織で炎症反応が増強していた。これまでに、低活動膀胱の患者由来膀胱での遺伝子解析は行われておらず、患者とラットの病態の相関性については未だ検証できていない。しかしながら、糖尿病患者での慢性的な高血糖が終末糖化産物による活性酸素産生を介して、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  及び  $\text{IL-6}$  などの炎症性サイトカインの発現を亢進させ、種々の臓器障害を誘発するとの報告がある<sup>92),93)</sup>。糖尿病では、多尿ではなく、高血糖が膀胱組織での慢性炎症の誘

因とする報告もある<sup>94)</sup>。シロドシンは血糖値には直接影響しないことから、シロドシンによる膀胱機能障害の改善作用に、血糖値の低下が関与する可能性は低いと考える。膀胱における検証は行われていないものの、糖尿病患者の皮膚においては  $A\alpha_1R$  の発現が上昇している<sup>95)</sup>。また、心臓においてはフェニレフリンによる  $A\alpha_1R$  活性化はインフラマソームの活性を介して炎症反応を引き起こし、非選択的  $A\alpha_1R$  遮断薬プラゾシンにより抑制される<sup>96)</sup>という報告がある。詳細な作用機序は不明であるが、シロドシンの尿道弛緩作用による間接的な影響に加えて、糖尿病が誘発する炎症反応をシロドシンが抑制する可能性を見出した。

### 3.5 小括

STZ 投与後 9 週目の STZ ラットにおいて、排尿動態指標の残尿量増加及び膀胱菲薄化 (膀胱容量/膀胱重量の増加) が観察された。これら指標の変化は、STZ 投与後 1 週目から 8 週間のシロドシン継続投与により抑制された。同時に、シロドシンは STZ ラットで減少した膀胱血流量を改善した。STZ ラットの膀胱組織では、炎症反応の亢進及び神経細胞の脱落が生じ、シロドシンはそれらを改善する傾向を示した。これらの結果から、シロドシンは、膀胱血流低下抑制作用、炎症抑制作用及び神経脱落抑制作用により低活動膀胱の症状を改善する可能性が示された。



## 総括

本研究では、選択的  $A\alpha_{1A}R$  遮断薬シロドシンの糖尿病性低活動膀胱に対する治療薬としての有用性について検討した。

第 1 章では、シロドシンとジスチグミンの自然発症糖尿病モデル (ZDF ラット) の排尿動態に及ぼす効果について検討した。ZDF ラットにおいて、膀胱容量、残尿量及び尿道抵抗の増加と同時に、最大排尿筋収縮速度及び尿流量が低下していることから低活動膀胱状態に陥ったことが示された。シロドシンは、ZDF ラットの尿流量を増加させた。ジスチグミンは膀胱内圧及び最大排尿筋収縮速度を増加させた。両薬物の併用投与は、それぞれの尿道弛緩の促進と膀胱収縮の増大により、排尿機能を改善することが示唆された。

第 2 章では、雌性正常ラットにおけるシロドシンとウラピジルの尿道弛緩作用及び血圧降下作用について検討した。両薬物は用量依存的にミドドリン ( $A\alpha_1R$  刺激薬) による尿道内圧上昇を抑制し、同時に平均血圧を低下させた。シロドシンでは降圧の度合いよりも尿道弛緩のそれの方が強く現れた。薬物誘発糖尿病モデル (STZ ラット) を用いて、雌性動物における排尿動態を評価したところ、STZ 投与後 12 週目の STZ ラットでは、残尿量の増加、膀胱菲薄化 (膀胱容量/膀胱重量比の増加) 及び排尿効率の減少で示される低活動膀胱状態に陥ったことが示された。シロドシン及びウラピジルは、STZ ラットでの残尿量の増加及び膀胱菲薄化を軽減した。

第 3 章では、STZ ラットにおけるシロドシンの作用機序について検討した。STZ 投与後 9 週目の STZ ラットでは排尿動態指標の残尿量の増加及び膀胱菲薄化が観察された。これら指標の変化はシロドシン投与により抑制された。同時に、シロドシンは膀胱血流の低下を改善した。STZ ラットの膀胱組織では、炎症反応の亢進及び神経細胞の脱落が生じ、シロドシンはそれらを改善する傾向を示した。

以上の結果から、本研究では選択的  $A\alpha_{1A}R$  遮断薬であるシロドシンは、糖尿病性低活動膀胱の薬物治療の選択肢の一つとなる可能性を提示することができた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本学位論文の発表の機会と終始御懇切なる御指導を賜りました東京薬科大学 薬学部 病態生理学教室 教授 市田公美 博士に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、多大な御支援と多くの発表の機会を与えてくださいましたキッセイ薬品工業株式会社代表取締役 最高経営責任者 神澤陸雄 会長並びに最高執行責任者 竹花泰雄 社長に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、多大な御支援と御援助をいただきましたキッセイ薬品工業株式会社取締役研究本部長 宮澤敬治 博士、研究統括部長 平栃正博 博士、研究統括部創薬戦略部長 伏見信彦 博士、研究統括部創薬戦略グループマネージャー 滝川靖 博士、研究統括部創薬戦略グループ参事 生島一真 博士に深く感謝いたします。また、御指導をいただきました薬理研究所薬理研究グループ参事 立道聡 博士、薬理研究所参事 武田裕夫 博士、研究統括部研究企画グループ参事 木口純好 博士、研究統括部探索研究所長 藤森芳和 博士、薬理研究所薬理研究グループ所長 丸山格 博士、研究統括部探索研究所副主任研究員 五井嘉明 博士、信頼性保証本部信頼性調査部 丸山和容 博士及び公益財団法人神澤医学振興研究財団 小林護 博士に深く感謝いたします。さらに、実験にご協力いただいた土岡久美 氏、手塚基弘 氏及び実験動物の飼育にご協力いただいた皆様に感謝いたします。

最後に本学位論文作成に当たり、陰ながら支えてくれました夫 隼也、娘 朱莉に感謝いたします。

## 掲載論文

- 1) Tatemichi S, Tsuchioka K, Yonekubo S, Maruyama K, Kobayashi M., Effects of silodosin, an  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist, and distigmine, an acetylcholinesterase inhibitor, and their combined effects on impaired voiding function in Zucker diabetic fatty rats, *Pharmacology*, **95**, 285-292 (2015).
- 2) Yonekubo S, Tatemichi S, Maruyama K, Kobayashi M.,  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist improves underactive bladder associated with diabetic cystopathy via bladder blood flow in rats. *BMC Urol.*, **17**, 64 (2017).
- 3) Yonekubo-Awaka S, Tezuka M, Tatemichi S, Takeda H., Therapeutic effects of silodosin and urapidil on underactive bladder associated with diabetic cystopathy. *Low. Urin. Tract. Symptoms.*, **14**, 434–441 (2022).

## 引用文献

- 1) WHO Fact Sheet Diabetes, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>, 16 September 2022
- 2) 障害や病気を有する者などの現状と取組み, 平成 30 年版厚生労働白書, 69-121 (2018)
- 3) Zheng Y., Ley SH., Hu FB., Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **14**, 88-89 (2018).
- 4) 春日雅人, 糖尿病疾患概念の歴史的変遷, *日本臨牀*, **70**, 9-13 (2012).
- 5) Ellenberg M., Development of urinary bladder dysfunction in diabetes mellitus, *Ann. Intern. Med.*, **92**, 321-323 (1980).
- 6) Brown JS., Wessells H., Chancellor MB., Howards SS., Stamm WE., Stapleton AE., Steers WD., Van den Eeden SK., McVary KT., Urologic complications of diabetes, *Diabetes Care*, **28**, 177-185 (2005).
- 7) Lee WC., Wu HP., Tai TY., Yu HJ., Chiang PH., Investigation of urodynamic characteristics and bladder sensory function in the early stages of diabetic bladder dysfunction in women with type 2 diabetes, *J. Urol.*, **181**, 198-203 (2009).
- 8) Ellenberg M., Development of urinary bladder dysfunction in diabetes mellitus, *Ann. Intern. Med.*, **92**, 321-323 (1980).
- 9) Miyazato M., Yoshimura N., Chancellor MB., The other bladder syndrome: underactive bladder, *Rev. Urol.*, **15**, 11-22 (2013).
- 10) Aldamanhori R., Chapple CR., Underactive bladder, detrusor underactivity, definition, symptoms, epidemiology, etiopathogenesis, and risk factors, *Curr. Opin. Urol.*, **27**, 293-299 (2017).
- 11) Andersson KE., Bladder underactivity, *Eur. Urol.*, **65**, 399-401 (2014).
- 12) Osman NI., Esperto F., Chapple CR., Detrusor underactivity and the underactive bladder: A systematic review of preclinical and clinical studies, *Eur. Urol.*, **74**, 633-643 (2018).
- 13) Osman NI., Chapple CR., Abrams P., Dmochowski R., Haab F., Nitti V., Koelbl H., van Kerrebroeck P., Wein AJ., Detrusor underactivity and the underactive bladder: a new clinical entity? A review of current terminology, definitions, epidemiology, aetiology, and diagnosis, *Eur. Urol.*, **65**, 389-398 (2014).
- 14) Chapple CR., Osman NI., Birder L., Dmochowski R., Drake MJ., van Koeveringe G.,

- Nitti VW., Oelke M., Smith PP., Yamaguchi O., Wein A., Abrams P., Terminology report from the International Continence Society (ICS) Working Group on Underactive Bladder (UAB), *Neurourol. Urodyn.*, **37**, 2928-2931 (2018).
- 15) Yoshida M., Sekido N., Matsukawa Y., Yono M., Yamaguchi O., Clinical diagnostic criteria for detrusor underactivity: A report from the Japanese Continence Society working group on underactive bladder, *Low. Urin. Tract. Symptoms.*, **13**, 13-16 (2021).
  - 16) Fowler CJ., Griffiths D., de Groat WC., The neural control of micturition, *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 453-466 (2008).
  - 17) Wein AJ., "Lower urinary tract dysfunction in neurological imaging and disease," In Campbell-Walsh Urology, 9th ed. Edited by AJ Wein, LR Kavoussi, AC Novik, AW Partin and CA Peters. Philadelphia, WB Saunders Co, 2007, pp. 2011–2045.
  - 18) King JA., Huddart H., Staff WG., Effect of choline ester analogues, noradrenaline and nifedipine on normal and hypertrophied human urinary bladder detrusor muscle, *Gen. Pharmacol.*, **30**, 131-136 (1998).
  - 19) Maggi CA., Santicioli P., Meli A., J. Auton., Pharmacological evidence for the existence of two components in the twitch response to field stimulation of detrusor strips from the rat urinary bladder, *Pharmacol.*, **5**, 221-229 (1985).
  - 20) Sibley GN., A comparison of spontaneous and nerve-mediated activity in bladder muscle from man, pig and rabbit, *J. Physiol.*, **354**, 431-443 (1984).
  - 21) Christian M., Charlotte P., Vineesha V., Justin C., Paul G., Kari AOT., Anna MS., The effectiveness of parasympathomimetics for treating underactive bladder: A systematic review and meta-analysis, *Neurourol. Urodyn.*, **41**, 127-139 (2022).
  - 22) 日本排尿機能学会/日本泌尿器科学会，女性下部尿路症状診療ガイドライン（第2版），2019
  - 23) 平田（中原）久美子，鈴木 慎一郎，今井 徹，鷺巢 晋作，田村 めい，間 勝之，大塚 進，木村 高久，医薬品副作用報告データベース（JADER）を用いたジスチグミンによるコリン作動性症候群に対する添付文書の改訂の効果に関する検討，*社会薬学*, **39**, 19-22 (2020).
  - 24) 厚生労働省医薬食品局審査管理課，安全対策課，ウブレチド錠 5 mg の用法・用量一部変更承認申請について，事務連絡，平成 22 年 1 月 29 日
  - 25) 日本病院薬剤師会 編，重大な副作用回避のための服薬指導情報集②，薬事時報社（現 じほう），76 (1998)

- 26) Hameed A., Charles TJ., Cholinergic crisis following treatment of postoperative urinary retention with distigmine bromide, *Br. J. Clin. Pract.*, **48**, 103-104 (1994).
- 27) Sakakibara R., Hattori T., Uchiyama T., Suenaga T., Takahashi H., Yamanishi T., Egoshi K., Sekita N., Are  $\alpha$ -blockers involved in lower urinary tract dysfunction in multiple system atrophy? A comparison of prazosin and moxisylyte, *J. Auton. Nerv. Syst.*, **79**, 191-195 (2000).
- 28) Yamanishi T., Yasuda K., Homma Y., Kawabe K., Morita T., A multicenter placebo-controlled, double-blind trial of urapidil, an  $\alpha$ -blocker, on neurogenic bladder dysfunction, *Eur. Urol.*, **35**, 45-51 (1999).
- 29) Michel MC., Vrydag W.,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - and  $\beta$  -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate, *Br. J. Pharmacol.*, **147**, S88-S119 (2006).
- 30) Yamada S., Tanaka C., Kimura R., Kawabe K.,  $\alpha_1$ -adrenoceptors in human prostate: characterization and binding characteristics of  $\alpha_1$ -antagonists, *Life Sci.*, **54**, 1845-1854 (1994).
- 31) Dooley M., Goa KL., Urapidil. A reappraisal of its use in the management of hypertension, *Drugs*, **56**, 929-955 (1998).
- 32) Yamanishi T., Yasuda K., Kamai T., Tsujii T., Sakakibara R., Uchiyama T., Yoshida K., Combination of a cholinergic drug and an  $\alpha$ -blocker is more effective than monotherapy for the treatment of voiding difficulty in patients with underactive detrusor, *Int. J. Urol.* **11**, 88-96 (2004).
- 33) Weinberg DH., Trivedi P., Tan CP., Mitra S., Perkins-Barrow A., Borkowski D., Strader CD., Bayne M., Cloning, expression and characterization of human  $\alpha$  adrenergic receptors  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$  and  $\alpha_{1c}$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201**, 1296-1304 (1994).
- 34) Hieble JP., Bylund DB., Clarke DE., Eikenburg DC., Langer SZ., Lefkowitz RJ., Minneman KP., Ruffolo RR. Jr., International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: consensus update, *Pharmacol. Rev.*, **47**, 267-270 (1995).
- 35) Price DT., Schwinn DA., Lomasney JW., Allen LF., Caron MG., Lefkowitz RJ., Identification, quantification, and localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$  adrenergic receptor subtypes in human prostate, *J. Urol.*, **150**, 546-551 (1993).
- 36) Nasu K, Moriyama N, Fukasawa R, Tsujimoto G, Tanaka T, Yano J, Kawabe K., Quantification and distribution of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype mRNAs in human proximal urethra, *Br J Pharmacol.*, **123**, 1289-1293 (1998).

- 37) Walden PD., Durkin MM., Lepor H., Wetzel JM., Gluchowski C., Gustafson EL., Localization of mRNA and receptor binding sites for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor subtype in the rat, monkey and human urinary bladder and prostate, *J. Urol.*, **157**, 1032-1038 (1997).
- 38) Hatano A., Takahashi H., Tamaki M., Komeyama T., Koizumi T., Takeda M., Pharmacological evidence of distinct  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes mediating the contraction of human prostatic urethra and peripheral artery, *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 723-728 (1994).
- 39) Cavalli A., Lattion AL., Hummler E., Nenniger M., Pedrazzini T., Aubert JF, Michel MC., Yang M., Lembo G., Vecchione C., Mostardini M., Schmidt A., Beermann F., Cotecchia S., Decreased blood pressure response in mice deficient of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **94**, (1997).
- 40) M. Yang, F. Verfurth, R. Buscher, M.C. Michel, Is  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor protein detectable in rat tissues?, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **355**, 438-446 (1997).
- 41) Forray C., Noble SA., Expert. Opin. Investig. Subtype selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia, *Drugs*, **8**, 2073-2094 (1999).
- 42) 立道 聡, 小林 久美, 前澤 綾香, 小林 護, 山崎 芳伸, 柴田 信男, シロドシン (KMD-3213)の $\alpha_1$ -アドレナリン受容体サブタイプ選択性及び臓器特異性, *薬学雑誌*, **126**, 209-216 (2006).
- 43) 立道 聡, 小林 久美, 丸山 格, 小林 護, 山崎 芳伸, 柴田 信男, ラットのフェニレフリン誘発尿道内圧上昇及び血圧に対するシロドシン (KMD-3213) の作用-下部尿路選択性の検討-, *薬学雑誌*, **126**, 217-223 (2006).
- 44) 小林 護, 立道 聡, 小林 久美, 今村 卓広, 丸山 格, 山崎 芳伸, 柴田 信男, ラットのフェニレフリン誘発尿道内圧上昇に対するシロドシン (KMD-3213) の作用持続性, *薬学雑誌*, **126**, 231-236 (2006).
- 45) Kawabe K., Yoshida M., Homma Y., Silodosin, a new  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-selective antagonist for treating benign prostatic hyperplasia: results of a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study in Japanese men, *BJU Int.*, **98**, 1019-1024 (2006).
- 46) 日本泌尿器科学会, 男性下部尿路症状・前立腺肥大症診療ガイドライン, 2017
- 47) Tyagi P., Smith PP., Kuchel GA., de Groat WC., Birder LA., Chermansky CJ., Adam RM., Tse V., Chancellor MB., Yoshimura N., Pathophysiology and animal modeling of

- underactive bladder, *Int. Urol. Nephrol.*, **46**, S11-S21 (2014).
- 48) Chai TC., Andersson KE., Tuttle JB., Steers WD., Altered neural control of micturition in the aged F344 rat, *Urol. Res.*, **28**, 348-354 (2000).
- 49) Daneshgari F., Leiter EH., Liu G., Reeder J., Animal models of diabetic uropathy, *J. Urol.*, **182**, S8-S13 (2009).
- 50) Aizawa N., Igawa Y., Pathophysiology of the underactive bladder, *Investig. Clin. Urol.*, **58**, S82-S89 (2017).
- 51) Kava R., Greenwood MRC., Johnson PR., Zucker (fa/fa) rat, *ILAR Journal*, **32**, 4-8 (1990)
- 52) Daneshgari F., Liu G., Imrey PB., Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function, *J. Urol.*, **176**, 380-386 (2006).
- 53) Sasaki K., Chancellor MB., Phelan MW., Yokoyama T., Fraser MO., Seki S., Kubo K., Kumon H., Groat WC., Yoshimura N., Diabetic cystopathy correlates with a long-term decrease in nerve growth factor levels in the bladder and lumbosacral dorsal root Ganglia, *J. Urol.*, **168**, 1259-1264 (2002).
- 54) Sasaki K., Yoshimura N., Chancellor MB., Implications of diabetes mellitus in urology, *Urol. Clin. North. Am.*, **30**, 1-12 (2003).
- 55) Liu G., Li bcasanji A., Daneshgari F., Temporal diabetes and diuresis-induced alteration of nerves and vasculature of the urinary bladder in the rat, *BJU Int.*, **107**, 1988-1993 (2011).
- 56) Daneshgari F., Huang X., Liu G., Bena J., Saffore L., Powell CT., Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diuresis, and treated diabetes in mice, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **290**, 1728-1735 (2006).
- 57) Okutsu H., Matsumoto S., Ohtake A., Suzuki M., Sato S., Sasamata M., Uemura H., Effect of tamsulosin on bladder blood flow and bladder function in a rat model of bladder over distention/emptying induced bladder overactivity, *J. Urol.*, **186**, 2470-2477 (2011).
- 58) Okutsu H., Matsumoto S., Hanai T., Noguchi Y., Fujiyasu N., Ohtake A., Suzuki M., Sato S., Sasamata M., Uemura H., Kurita T., Effects of tamsulosin on bladder blood flow and bladder function in rats with bladder outlet obstruction, *Urology*, **75**, 235-240 (2010).



- 59) Goi Y., Tomiyama Y., Nomiya M., Sagawa K., Aikawa K., Effects of silodosin, a selective  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist, on bladder blood flow and bladder function in a rat model of atherosclerosis induced chronic bladder ischemia without bladder outlet obstruction, Yamaguchi O., *J. Urol.*, **190**, 1116-1122 (2013).
- 60) ウブレチド錠 5mg 添付文書, 鳥居薬品株式会社, 2011年8月改訂 (第11版)
- 61) ベサコリン散 5%添付文書, エーザイ株式会社, 2010年2月改訂 (第9版)
- 62) エブランチルカプセル 15mg/エブランチルカプセル 30mg 添付文書, 科研製薬株式会社, 2022年5月改訂 (第16版)
- 63) Sato S., Hatanaka T., Yuyama H., Ukai M., Noguchi Y., Ohtake A., Taguchi K., Sasamata M., Miyata K., Tamsulosin potently and selectively antagonizes human recombinant  $\alpha_{1A/1D}$ -adrenoceptors: slow dissociation from the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor may account for selectivity for  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor over  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor subtype, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 72-77 (2012).
- 64) ユリーフ錠 2mg/ユリーフ錠 4mg/ユリーフ OD錠 2mg/ユリーフ OD錠 4mg 添付文書, キッセイ薬品工業株式会社, 2021年7月改訂 (第2版)
- 65) 環境省, 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準, 環境省告示第88号, 2016
- 66) Tatemichi S., Akiyama K., Kobayashi M., Yamazaki Y., Yokoyama O., Uruno T., A selective  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist inhibits detrusor overactivity in a rat model of benign prostatic hyperplasia, *J. Urol.*, **176**, 1236-1241 (2006).
- 67) Nagabukuro H, Hashimoto T, Iwata M, et al. Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and tamsulosin, an  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist, and their synergistic effects on the urodynamic characteristics in a guinea-pig model of functional bladder outlet obstruction. *BJU Int.*, **95**, 1071-1076 (2005).
- 68) Richard G. P., Walter N. S., Mary-Ann Neel, L. A. Little, J., Eichberg, Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus, *ILAR J.*, **32**, 16-19 (1990).
- 69) Tokuyama Y., Sturis J., DePaoli AM., Takeda J., Stoffel M., Tang J., Sun X., Polonsky KS., Bell GI., Evolution of  $\beta$ -cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat, *Diabetes*, **44**, 1447-1457 (1995).
- 70) Brussee V., Guo G., Dong Y., Cheng C., Martinez JA., Smith D., Glazner GW., Fernyhough P., Zochodne DW., Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term

- type 2 diabetes rat model, *Diabetes*, **57**, 1664-1673 (2008).
- 71) Ye C., Cai Y., Cai Q., Yuan S., Huang F., Yang X., He S., Li Z., Wang Y., Yang D., Li Z., High glucose induces the proliferation of prostatic cells via downregulating MRE11., *Int. J. Mol. Med.*, **41**, 3105-3114 (2018).
- 72) Torimoto K., Fraser MO., Hirao Y., De Groat WC., Chancellor MB., Yoshimura N., Urethral dysfunction in diabetic rats, *J. Urol.*, **171**, 1959-1964 (2004).
- 73) Matsumoto Y., Torimoto K., Matsuyoshi H., Hirayama A., Fujimoto K., Yoshimura N., Hirao Y., Long-term effects of diabetes mellitus on voiding function in a new model of type 2 diabetes mellitus, the Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rat, *Biomed Res.*, **30**, 331-335 (2009).
- 74) Horinouchi T., Aoki T., Akiyama R., Ono T., Shibano M., Tanaka Y., Koike K., Effects of distigmine, a long-acting cholinesterase inhibitor, on urinary bladder detrusor and urethra smooth muscles of guinea-pig: Pharmacological analysis *in vitro* and *in vivo*., *Pharmacometrics*, **64**, 45-52 (2003).
- 75) Nagabukuro H, Okanishi S, Doi T., Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and various cholinomimetics on the urodynamic characteristics in anesthetized guinea pigs., *Eur. J. Pharmacol.*, **494**, 225-232 (2004).
- 76) Sekido N., Otsuki T., Kida J., Mashimo H., Wakamatsu D., Okada H., Matsuya H., EP2 and EP3 receptors as therapeutic targets for underactive bladder/detrusor underactivity due to diabetic cystopathy in a type 1 diabetic rat model., *Low. Urin. Tract. Symptoms*, **3**, 285-291 (2020).
- 77) 清水 智司, 宮下 格, 松原 靖人, 池田 貢, 山口 正之, シロドシンの臨床成績紹介—薬物動態を中心に, *薬学雑誌*, **126**, 257-263 (2006).
- 78) Akiyama K., Hora M., Tatemichi S., Masuda N., Nakamura S., Yamagishi R., Kitazawa M., KMD-3213, a uroselective and long-acting  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor antagonist, tested in a novel rat model, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 81-91 (1999)
- 79) Yang Z., Dolber PC., Fraser MO., Diabetic urethropathy compounds the effects of diabetic cystopathy, *J. Urol.*, **178**, 2213-2219 (2007).
- 80) Al-Noah Z., McKenna D., Langdale C., Thor KB., Marson L., Burgard E., Kullmann FA., Nitregic relaxations and phenylephrine contractions are not compromised in isolated urethra in a rat model of diabetes, *Auton. Neurosci.*, **183**, 58-65 (2014).
- 81) Meyer LE., Brown JN., Tamsulosin for voiding dysfunction in women, *Int. Urol.*

- Nephrol.*, **44**, 1649-1656 (2012).
- 82) 清水信貴, 杉本公一, 南高文, 山本豊, 林泰司, 辻秀憲, 野沢昌弘, 吉村一宏, 石井徳味, 植村天受, 成人女性における  $\alpha_1$  遮断薬シロドシンの安全性に関する検討, *新薬と臨牀*, **62**, 92-95 (2013).
- 83) Zelis R., Relative presynaptic and postsynaptic effects of urapidil on adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 746-749 (1986).
- 84) Mandal AK., Kellar KJ., Friedman E., Pineo SV., Hamosh P., Gillis RA., Importance of central nervous system serotonin<sub>1A</sub> receptors for mediating the hypotensive effect of urapidil, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 563-570 (1989).
- 85) Chancellor MB., The overactive bladder progression to underactive bladder hypothesis, *Int. Urol. Nephrol.*, **46**, 23-27 (2014).
- 86) Schroder A., Colli E., Maggi M., Andersson KE., Effects of a vitamin D<sub>3</sub> analogue in a rat model of bladder outlet obstruction, *BJU Int.*, **98**, 637-642 (2006).
- 87) Zeng J., Xie K., Jiang C., Mo J., Lindstrom S., Bladder mechanoreceptor changes after artificial bladder outlet obstruction in the anesthetized rat, *Neurourol. Urodyn.*, **31**, 178-184 (2012).
- 88) McConnell JD. Epidemiology, etiology, pathophysiology, and diagnosis of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan Jr. ED, and Wein AJ eds. *Campbell's Urology*, 7th ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia; 1998. P. 1429-1477.
- 89) Yu PH., Lin CC., Fan YH., Lin ATL., Huang WJS., Correlations between bladder wall thickness and clinical manifestations in female patients with detrusor underactivity and detrusor overactivity-with-detrusor underactivity, *J. Chin. Med. Assoc.*, **84**, 937-941 (2021).
- 90) Forbes JM., Cooper ME., Mechanisms of diabetic complications., *Physiol. Rev.*, **93**, 137-188 (2013).
- 91) Mizuseki K., Sakamoto T., Watanabe K., Muguruma K., Ikeya M., Nishiyama A., Arakawa A., Suemori H., Nakatsuji N., Kawasaki H., Murakami F., Sasai Y., Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 5828-5833 (2003).
- 92) Yagihashi S., Mizukami H., Sugimoto K., Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go?, *J. Diabetes Investig.*, **24**, 18-32 (2011)
- 93) Calle MC., Fernandez ML., Inflammation and type 2 diabetes, *Diabetes Metab.*, **38**,

183-191 (2012).

- 94) Inouye BM., Hughes FM. Jr., Jin H., Lütolf R., Potnis KC., Routh JC., Rouse DC., Foo WC., Purves JT., Diabetic bladder dysfunction is associated with bladder inflammation triggered through hyperglycemia, not polyuria, *Res. Rep. Urol.* **10**, 219-225 (2018).
- 95) Schlereth T., Morellini N., Lismont N.C.A.M., Lemper C., Birklein F., Drummond PD.,  $\alpha_1$  adrenoceptor expression in skin, nerves and blood vessels of patients with painful diabetic neuropathy, *Auton Neurosci.*, **234**, 1-7 (2021)
- 96) Xin JZ., Wu JM., Hu GM., Gu HJ., Feng YN., Wang SX., Cong WW., Li MZ., Xu WL., Song Y., Xiao H., Zhang YY., Wang L.,  $A\alpha_1R$  overactivation induces cardiac inflammation through NLRP3 inflammasome activation, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **41**, 311-318 (2020).