

アルツハイマー型痴呆に伴う神経因性膀胱の成因解明及び遺伝子治療に関する実験的研究

著者	横山 修
著者別表示	Yokoyama Osamu
雑誌名	平成11(1999)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1998-1999
ページ	46p.
発行年	2000-03
URL	http://doi.org/10.24517/00049362



アルツハイマー型痴呆に伴う神経因性膀胱の成因
解明及び遺伝子治療に関する実験的研究

(10470334)

平成10年度～11年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）研究成果報告書

平成12年(2000)3月

研究代表者 横山 修
(金沢大学・医学部附属病院・講師)

寄贈

研究組織

研究代表者： 横山 修（金沢大学・医学部附属病院・講師）

研究分担者： 並木幹夫（金沢大学・医学部・教授）

研究分担者： 高 栄哲（金沢大学・医学部附属病院・助手）

研究分担者： 小松和人（金沢大学・医学部附属病院・助手）

研究協力者： 大塚直樹（金沢大学大学院自然科学研究科医療薬学）

研究経費

平成 10 年度 7,800 千円

平成 11 年度 4,300 千円

計 12,100 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Yokoyama O, Komatsu K, Ishiura Y, Nakamura Y, Morikawa K and Namiki M: Change in bladder contractility associated with bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol* 159: 571-576, 1998
2. Yokoyama O, Ishiura Y, Komatsu K, Mita E, Nakamura Y, Kunimi K, Morikawa K and Namiki M: Effects of MK-801 on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol* 159: 577-580, 1998
3. Yokoyama O, Yoshiyama M, Namiki M and de Groat WC: Glutamatergic and dopaminergic contributions to rat bladder hyperactivity after cerebral artery occlusion. *Am J Physiol* 276: R935-R942, 1999
4. Jung SY, Fraser MO, Ozawa H, Yokoyama O, Yoshiyama M, de Groat WC and Chancellor MB: Urethral afferent nerve activity affects the micturition reflex; implication for the relationship between stress incontinence and detrusor instability. *J Urol* 162: 204-212, 1999
5. Nakamura Y, Yokoyama O, Komatsu K, Mita E, Namiki M and Kontani H: Effects of nifedipine on bladder overactivity in rats with cerebral infarction. *J Urol* 162: 1502-1507, 1999
6. Yoshiyama M, Nezu FM, Yokoyama O, Chancellor MB and de Groat WC: Influence of glutamate receptor antagonists on micturition in rats with spinal cord injury. *Exp Neurol* 159: 250-257, 1999
7. Yoshiyama M, Nezu FM, Yokoyama O, de Groat WC and Chancellor MB: Changes in micturition after spinal cord injury in rats. *Urology* 54:929-933, 1999
8. 大塚直樹：アルツハイマー型痴呆モデルにおける排尿反射亢進に対する脳内アセチルコリンの関与。金沢大学大学院自然科学研究科医療薬学教室修士論文 金沢大学, 2000

(2) 口頭発表

1. AUA (米国泌尿器科学会) 93rd 980530-980604 San Diego
Contribution of glutamatergic and dopaminergic mechanisms to bladder overactivity following cerebral infarction in the rat

Yokoyama O, Yoshiyama M, de Groat WC, Namiki M

2. AUA (米国泌尿器科学会) 93rd 980530-980604 San Diego

Urethral afferent nerve activity affects the micturition reflex; implication for the relationship between stress incontinence and detrusor instability

Yokoyama O, Fraser MO, Jung SY, Ozawa H, Yoshiyama M, de Groat WC, Chancellor MB

3. Society for Neuroscience 28th 981107-981112 Los Angeles

Effects of Ca²⁺ antagonist on bladder hyperactivity induced by cerebral ischemia in rats

Nakamura Y, Yokoyama O, Komatsu K, Ishiura Y, Mita E, Namiki M, Tsuji T, Kontani H

4. AUA (米国泌尿器科学会) 94rd 990501-990506 Dallas, Texas

Role of the forebrain in bladder overactivity following cerebral infarction in the rat. Yokoyama O, Yoshiyama M, de Groat WC, Namiki M

5. AUA (米国泌尿器科学会) 94rd 980501-980506 Dallas, Texas

Role of NMDA and AMPA/Kainate receptor channels in the prevention of bladder overactivity after cerebral infarction in rats

Mizuno H, Komatsu K, Ishiura Y, Yokoyama O, Namiki M, de Groat WC

6. International Continence Society 29th Annual Meeting 990823-990826 Denver Colorado

Central muscarinic mechanisms regulating voiding in rats

Ishiura Y, Yokoyama O, Namiki M, Chancellor MB, de Groat WC

研究成果

1. 研究目的

現在、我が国では、急速な高齢化社会を迎え、高齢痴呆老人の排尿障害は医学的、社会的問題になってきている。老人の痴呆としては、脳血管性痴呆とアルツハイマー型痴呆が大きな比重を占めている。アルツハイマー型痴呆は、記憶障害で発症した後、進行性の経過をたどり、最終的には慢性植物状態に至る経過の長い疾患である。尿失禁も初期は機能的尿失禁であるが、次第に運動性切迫尿失禁となり、この時期の尿路管理は多額の医療費を必要とし極めて重大な問題となっている。しかしながら、アルツハイマー型痴呆を伴う神経因性膀胱の本態の解明は全くなされておらず、現在行われている治療は満足いくものではない。患者の QOL を向上させるためにも痴呆による排尿障害のメカニズムを解明することが急務となってきている。

本研究では、ibotenic acid による Ch4 コリナジック細胞群を破壊した慢性期痴呆の症状を有する実験モデルを作成し、oxotremorine M (M1、M2 受容体作動薬)と pirenzepine (選択性 M1 受容体拮抗薬)を用いて、覚醒下での排尿反射に対する効果を薬理的に検討した。そして、アルツハイマー型痴呆による過活動型神経因性膀胱の発生機序について薬理的検討を行った。

2. 研究方法

a) ibotenic acid による前脳基底核障害モデル作成

ラットを pentobarbital sodium 腹腔内投与(30 mg/kg)にて麻酔し、脳定位固定装置に頭部を固定した。ibotenic acid (7.5 µg/rat)を前脳基底核部に注入した(BF 群; basal forebrainlesion rats)。また、対照群として PBS のみを注入した(SO 群; sham operated rats)も作成した。

b) CAT 活性測定

ibotenic acid 投与 7 日から 10 日経過後、覚醒下で膀胱内圧測定を施行してから、ラットを断頭屠殺し前脳部を摘出した。約 1 時間 ice-cold saline 中に脳を保存した。この脳断片の組織重量を測定した後、CAT 活性は Fonnum らの方法で測定した。

c) 覚醒下 oxotremorine M、pirenzepine の右側脳室投与による排尿反射への影響

Ibotenic acid および PBS の前脳基底核投与 7 - 10 日後、halothame 麻酔下で膀胱瘻、側脳室のステンレススチール管留置を行い、覚醒後膀胱内圧測定を行った。膀胱内圧測定開始 2 時間後よりステンレススチール管より oxotremorine M (0.0015, 0.015, 0.15, 1.5, 15 pmol/5 µ l)あるいは、a.c.s.fを

1 時間毎に累積投与あるいは単回投与し、投与前後の膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量を測定した。

d) oxotremorine M、pirenzepine の橋排尿中枢あるいは第 4 脳室投与による膀胱収縮および外尿道括約筋活動への影響

urethane 麻酔後、ラットを脳定位固定装置に固定した。脳地図に従い、橋排尿中枢および第 4 脳室にステンレススチール管を刺入した。橋排尿中枢への oxotremorine M の投与用量は $1.5 \text{ pmol}/1 \mu\text{l}$ を左右両側に同時に注入した。また、第 4 脳室への投与用量は $15 \text{ pmol}/1 \mu\text{l}$ である。一方、pirenzepine の用量は橋排尿中枢に $10 \text{ nmol}/1 \mu\text{l}$ を左右両側に同時に注入し、また、第 4 脳室へは $100 \text{ nmol}/1 \mu\text{l}$ を注入した。ラットの会陰部から絶縁した 2 本の白金ワイヤー電極を外尿道括約筋の 3 時と 6 時の位置に直接挿入し、外尿道括約筋筋電図測定を行った。

3. 結果

a) ibotenic acid 注入による前脳基底核破壊により、大脳皮質 CAT 活性は、約 30%の低下がみられた。

b) 前脳基底核破壊ラット(basal forebrain lesion rats ; BF 群)は偽手術ラット(sham operated rats; SO 群)に比べ有意な膀胱容量の減少が認められた。

c) M1、M2 受容体アゴニストである oxotremorine M の右側脳室内累積投与により SO 群では高用量($15 \text{ pmol}/5 \mu\text{l}$)で膀胱容量の有意な減少がみられた。BF 群では低用量($0.015, 0.15 \text{ pmol}/5 \mu\text{l}$)で有意な膀胱容量の増大がみられ、高用量($15 \text{ pmol}/5 \mu\text{l}$)で膀胱容量のは逆に減少し二相性の作用が認められた。

d) M1、M2 受容体アゴニストである oxotremorine M の右側脳室内単回投与により SO 群では高用量($15 \text{ pmol}/5 \mu\text{l}$)で膀胱容量の有意な減少がみられた。BF 群では選択したすべての容量($0.015, 1.5, 15 \text{ pmol}/5 \mu\text{l}$)で膀胱容量を有意に増大させた。

e) M1 受容体アンタゴニストである pirenzepine の右側脳室内単回投与により SO 群では高用量($100 \text{ nmol}/5 \mu\text{l}$)で膀胱容量の有意な増大がみられた。BF 群も高用量($10 \text{ nmol}/5 \mu\text{l}$)で有意な増大が認められた。BF 群は SO 群に比べ 10 分の 1 の低用量より増大反応が認められた。

f) 膀胱容量を変化させない低用量の pirenzepine を前投与したラットに oxotremorine M を投与すると、BF 群では、膀胱容量の増大が認められなかった。

g) 橋排尿中枢(pontine micturition center; PMC)への oxotremorine M($1.5 \text{ pmol}/1 \mu\text{l}$)局所投与により膀胱容量は減少した。外尿道括約筋活動に変化は認められなかった。

- h) PMC への pirenzepine(10 nmol/1 μ l) 局所投与により膀胱容量に変化は認められなかった。外尿道括約筋活動にも影響は認められなかった。
- i) 第4脳室への oxotremorine M(15 pmol/1 μ l)局所投与により膀胱容量の増大がみられた。外尿道括約筋活動は蓄尿時、軽度に低下していた。
- j) 第4脳室への pirenzepine(100 nmol/1 μ l)局所投与により膀胱容量の増大がみられた。外尿道括約筋活動にも膀胱容量の増大に伴って活動の亢進がみられた。

4. 結論および今後の展望

以上の結果から前脳基底核より大脳皮質に投射する ACh 系は排尿反射中枢に対し抑制的に投射していると考えられる。今回、前脳基底核破壊を行ったアルツハイマー型痴呆類似モデルにおいては、大脳皮質ムスカリン受容体を介する抑制系は、up-regulation されることにより排尿反射の亢進が生じていると思われる。この投射系は pirenzepine により遮断されることより M1 受容体を介するものであると思われる。脳幹部の橋排尿中枢における ACh 系は、おもに M2 受容体を介すると考えられ、これは排尿反射に対し促進性に作用していると推測された。

現在、アルツハイマー型痴呆の治療薬として試みられている薬物は、ACh 賦活薬、神経ペプチド系作用薬、神経成長因子(NGF)作用薬等で、この中で最も多く試みられているのは ACh 系賦活薬である。我々の研究からアルツハイマー型痴呆の症状の1つである排尿反射亢進が oxotremorine M で抑制されたことから、ACh 系賦活薬がアルツハイマー型痴呆に起因する頻尿、尿失禁に有効なのではないかと考えた。

学 位 論 文

主論文題名

アルツハイマー型痴呆モデルにおける排尿反射亢進に対する脳内アセチルコリンの関与

金沢大学大学院自然科学研究科（博士前期課程） 医療薬学専攻
病態解析学研究室

学籍番号	9813051286
学生氏名	大塚 直樹
主任指導教官	宮本 謙一
論文提出	平成 12年 2月

目次

第1章 緒言	...	1
第2章 実験動物および実験方法		
(1) 使用動物	...	5
(2) 使用試薬	...	5
(3) Ibotenic acidによる前脳基底核障害モデル作成	...	6
(4) 膀胱瘻作成	...	6
(5) 膀胱内圧測定	...	6
(6) 右側脳室へのステンレススチール管留置	...	7
(7) CAT活性測定	...	7
(8) 覚醒下oxotremorine Mの右側脳室への累積投与による 排尿反射への影響	...	8
(9) 覚醒下oxotremorine Mの右側脳室への単回投与による 排尿反射への影響	...	8
(10) 覚醒下pisenzepineの右側脳室への単回投与による排尿 反射への影響	...	8
(11) 覚醒下oxotremorine M、pirenzepineの右側脳室への単回 投与による排尿反射への影響	...	8
(12) Oxotremorine M、pirenzepineの橋排尿中枢あるいは第4 脳室投与による膀胱収縮および外尿道括約筋活動への影響	...	9
(13) 統計処理	...	9
第3章 実験結果		
第1節 Ibotenic acidによる前脳基底核破壊によって引き起こさ る膀胱容量の変化	...	10
第1項 Ibotenic acid投与群(BF群)とPBS投与群(SO群)の体重の変化	...	11
第2項 SO群とBF群との膀胱内圧測定における各種パラメーター比較		
第3項 CAT活性の比較	...	12
第2節 Oxotremorine M累積投与による排尿反射への影響		
第1項 覚醒下oxotremorine M累積投与による排尿反射への影響	...	13
第2項 覚醒下oxotremorine M累積投与による排尿収縮圧への影響	...	15
第3項 覚醒下oxotremorine M累積投与による排尿閾値圧への影響	...	16
第4項 覚醒下oxotremorine M累積投与による残尿量への影響	...	17

第3節	Oxotremorine M単回投与による排尿反射への影響	...	18
第1項	覚醒下oxotremorine M単回投与による膀胱容量への影響	...	18
第2項	覚醒下oxotremorine M単回投与による排尿収縮圧への影響	...	21
第3項	覚醒下oxotremorine M単回投与による排尿閾値圧への影響	...	22
第4項	覚醒下oxotremorine M単回投与による残尿量への影響	...	22
第4節	Pirenzepine単回投与による排尿反射への影響	...	23
第1項	覚醒下pirenzepine単回投与による膀胱容量への影響	...	23
第2項	覚醒下pirenzepine単回投与による排尿収縮圧への影響	...	26
第3項	覚醒下pirenzepine単回投与による排尿閾値圧への影響	...	27
第4項	覚醒下pirenzepine単回投与による残尿量への影響	...	28
第5節	Pirenzepine前投与におけるoxotremorine M排尿反射への影響	...	29
第1項	覚醒下pirenzepine前投与におけるoxotremorine Mの膀胱容量への影響	...	29
第2項	覚醒下pirenzepine前投与におけるoxotremorine Mの排尿収縮圧への影響	...	33
第3項	覚醒下pirenzepine前投与におけるoxotremorine Mの排尿閾値圧への影響	...	33
第4項	覚醒下pirenzepine前投与におけるoxotremorine Mの残尿量への影響	...	33
第6節	Urethane麻酔下oxotremorine Mおよびpirenzepineの単回投与による膀胱容量および外尿道括約筋活動への影響	...	34
第1項	Oxotremorine Mの高用量における作用部位の特定	...	34
第2項	Pirenzepineの高用量における作用部位の特定	...	36
第4章	考察	...	38
	総括	...	41
	謝辞	...	43
	引用文献	...	44

第1章 緒言

現在、我が国では、急速な高齢化社会を迎え、高齢痴呆老人の排尿障害は医学的、社会的問題になってきている。老人の痴呆としては、脳血管性痴呆とアルツハイマー型痴呆が大きな比重を占めている。アルツハイマー型痴呆は、記憶障害で発症した後、進行性の経過をたどり、最終的には慢性植物状態に至る経過の長い疾患である。尿失禁も初期は機能的尿失禁であるが、次第に運動性切迫尿失禁となり、この時期の尿路管理は多額の医療費を必要とし極めて重大な問題となっている¹⁾²⁾。しかしながら、アルツハイマー型痴呆を伴う神経因性膀胱の本態の解明は全くなされておらず、現在行われている治療は満足いくものではない。患者の QOL を向上させるためにも痴呆による排尿障害のメカニズムを解明することが急務となってきている。

痴呆患者では、知的機能のほか、感情障害、自発性の異常、睡眠障害などの数多くの神経機能の変化も伴っていることが知られている。アルツハイマー型痴呆患者の脳においては神経原線維の変化や老人班が存在することが組織学的特徴とされているが、症状の発現は神経伝達物質を介しての神経機能の障害の結果といわれている。その中で特に注目されているのが、アセチルコリン(ACh)神経系の異常である。ACh 神経系の機能は、加齢とともに低下するが、同時に ACh 合成酵素コリン転移酵素(CAT : choline acetyltransferase)の活性も低下することが知られている。一方、アルツハイマー型痴呆患者の大脳皮質、海馬、扁桃体などでは CAT 活性の著しい低下を認め、しかも前シナプスの部分に生じていることから大脳皮質に ACh を投射している Meynert 基底核神経線維の脱落がその原因とされている³⁻⁵⁾。

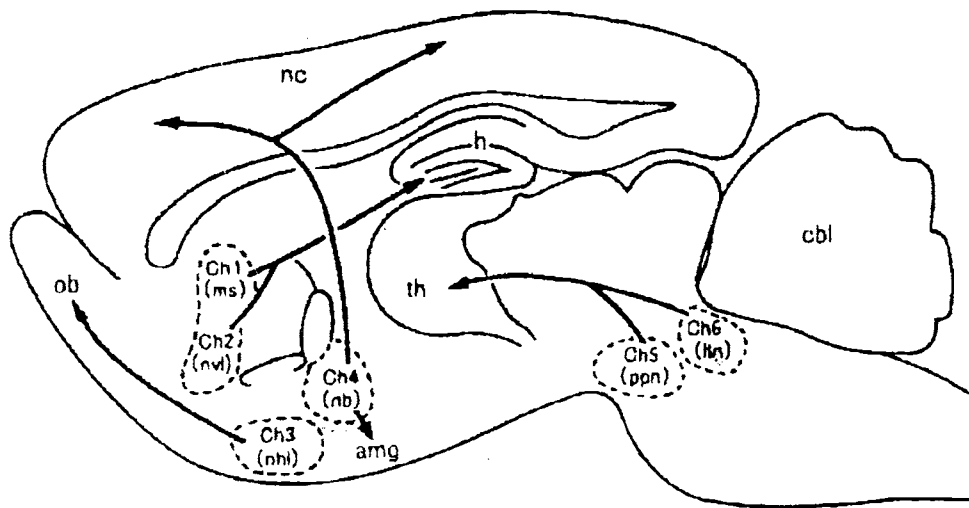
現在のところ動物を用いたアルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆の厳密な意味での病態モデルは未だ発見されいないが、ACh 神経機能低下に基づいた記憶や認知障害として使用されるイボテン酸モデル⁶⁾⁷⁾、空間認知障害を示すスコポラミンモデル⁸⁾⁹⁾、テトラヒドロカンナビノール(THC : $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol)モデル¹⁰⁾、さらにカオリンを用いた正常圧水頭症モデル¹¹⁾、虚血モデル¹²⁾が、症状モデルとして用いられている。

Yamamoto らは、前脳基底核に ibotenic acid を局所投与した ibotenic acid モデルを用いて、排尿反射の亢進を認める実験モデルを作成し、頻尿治療薬の薬効評価を行っている。このモデルは、高次中枢の障害に起因した頻尿、すなわち排尿反射亢進を有しており¹³⁾、アルツハイマー型痴呆に伴う排尿障害を研究する上で有用な実験モデルと思われる。

排尿にかかわる神経回路の根幹は、橋排尿中枢(PMC : Pontine micturition center)に存在し、またラットでは背外側被蓋核(nucleus tegmentalis dorsolateralis)に局在するとされている¹⁴⁾。橋排尿中枢まで脊髄を上行して到達する刺激が同部の神経細胞を興奮させ閾値を越えたときに排尿が始まる。この興奮は橋排尿中枢から仙髄排尿中枢に至る下行路を経て骨盤神経を経由し、膀胱体部のムスカリン受容体に働いて膀胱収縮を引き起こすとされている。また、橋排尿中枢からの下行性投射は胸腰髄で交感神経の活動を抑制すると同時に、仙髄で陰部神経の活動を抑えて外尿道括約筋を随意的に弛緩させると考えている¹⁵⁾。我々は、痴呆モデルによる排尿反射亢進は、橋排尿中枢よりさらに上位に存在する前脳から橋排尿中枢に投射する抑制系の障害によるものではないかと考えた。

ACh は運動神経の神経筋接合部、副交感神経末端、神経節の節前および節後線維間のシナプスの伝達物質であり、中枢神経系においても伝達物質として働いている。特に記憶や情緒に関わっているといわれている前脳基底核から海馬へ投射している Ch1 および Ch2 のコリナジック細胞群^{16) 17)}、認知と意識に関わるといわれている前脳基底核から大脳皮質に ACh を投射している Ch4 のコリナジック細胞群¹⁸⁾、さらに睡眠や覚醒、注意力に関わっているといわれている脳幹から視床に ACh を投射する Ch5 および Ch6 のコリナジック細胞群が存在していることが知られている^{17) 19)}。このコリナジック細胞群の中で、アルツハイマー型痴呆と非常に関連深いと注目されているのが Ch4 のコリナジック細胞群である²⁰⁻²²⁾。アルツハイマー型痴呆では、Ch4 の神経細胞群の変性、脱落が著明であり、したがって、この細胞群を破壊したイボテン酸の前脳基底

核破壊ラットは、アルツハイマー型痴呆の病態を検討する上で有用と思われる (Fig. 1 にラット脳におけるコリン投射系を示す)。著者は、ibotenic acid による Ch4 コリナジック細胞群を破壊した慢性期痴呆の症状を有する実験モデルを作成し、oxotremorine M (M1、M2 受容体作動薬)と pirenzepine (選択性 M1 受容体拮抗薬)を用いて、覚醒下での排尿反射に対する効果を薬理的に検討した。そして、アルツハイマー型痴呆による過活動型神経因性膀胱の発生機序について薬理的検討を行った。



amg:扁桃体 cbl:小脳 h:海馬 ltn :外背側被蓋核
 ms :内側中隔核 nb:マイネルト基底核 nc:大脳皮質 nhl:対角帯核水平部
 nvl :対角帯核垂直部 ob:嗅球 ppn:上小脳脚周囲網様体 th:視床

Fig. 1 Cholinergic pathways in the rat .

第2章 実験動物および実験方法

(1) 使用動物

8週齢の Wistar 系雄性ラット(240~260g、日本 SLC 株式会社、浜松)を使用した。

(2) 使用試薬

本研究には、 α -amino-3-hydroxy-5-isoxazoleacetic acid (ibotenic acid ; SIGMA CHEMICAL Co.)、muscarine 受容体 agonist である *N,N,N*-trimethyl-4-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)-2-butyn-1-aminium-iodide (oxotremorine M; Research Biochemicals International) および muscarine 受容体 antagonist である 5, 11-dihydro-11-[(4-methyl-1-piperazinyl)]-6H-pyrido[1,2,3-b][1,4]-benzodiazepin-6-one (pirenzepine dihydrochlorine; research biochemicals international) を使用した。Ibotenic acid は phosphate buffered saline(PBS; SIGMA CHEMICAL Co.)に溶解希釈し実験に使用した。また、oxotremorine M および pirenzepine は人工脳脊髄液(artificial cerebrospinal fluid (a.c.s.f.): 136 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 1.16 mM CaCl₂, 11.9 mM NaHCO₃ を蒸留水で溶解し pH は 7.0~7.2 に調整)溶解希釈し実験に使用した。Ibotenic acid の注入には、10 μ l マイクロシリンジ針を使用し、oxotremorine M および pirenzepine は 25 μ l マイクロシリンジ針を使用した。

(3) Ibotenic acid による前脳基底核障害モデル作成

ラットを pentobarbital sodium (ダイナポット)腹腔内投与(30 mg/kg)にて麻酔し、脳定位固定装置(NARISHIGE ; ST-7)に頭部を固定した。頭頂部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出した。Paxinos and Watson の脳地図に従い Bregma より鼻側に 1.4 mm、右側に 2.8 mm、の位置にドリルで穴を開け、10 μ l のマイクロシリンジ針を挿入し、ibotenic acid (10 μ l)を 5 分間かけて 0.75 μ l 前脳基底核部に注入した(BF 群; basal forebrainlesion rats)。また、対照群として PBS のみを 5 分間かけて 0.75 μ l 注入した(SO 群; sham operated rats)。最後に頭頂部の皮膚を、4-0 monofilament nylon thread (ケイセイ医科工業)で閉創した。

(4) 膀胱瘻作成

ラットを 1.5% halothane(武田薬品工業)にて吸入麻酔し維持した。仰臥位にて下腹部の皮膚を剃毛し正中切開した後、膀胱を露出して膀胱頂部に小切開を加えた。ポリエチレンカテーテル(size 4; Hibiki)の膀胱側は加熱の上、襟を作成して膀胱内に挿入した。カテーテルの他端は皮下トンネルを経由し、ラット頸の背部切開創へ通した。膀胱瘻カテーテルを固定の上、膀胱切開部を縫合、皮膚切開部を閉創した。

(5) 膀胱内圧測定

膀胱内圧測定は、ラットが halothane 麻酔より覚醒していることを確認した上で行った。ラットをボールマンケージ (3 型、夏目製作所)内に拘束した。膀胱瘻先端に T 字管を連結の上、シリンジポンプ(TE-311: TERUMO)および圧トランスジューサー (TP-200T: 日本光電)にそれぞれ接続した。0.08 ml/min の注入速度で連続的に生理食塩水を膀胱内に注入し、膀胱収縮を誘発させ、経時的に膀胱内圧測定を行った。また、排尿毎に排尿量と残尿量を計測し、その和を膀胱容量とした。

(6) 右側脳室へのステンレススチール管留置

1.5% halothane 麻酔下にて脳定位固定装置にラット頭部を固定し、頭頂部皮膚を切開して頭蓋骨を露出した。Paxinos and Watson の脳地図に従い Bregma より鼻側に 0.3 mm、右側に 1 mm の位置にドリルで穴を開け、ステンレススチール管(外径 0.6 mm、内径 0.3 mm、長さ 10.5 mm; ユニークメディカル株式会社)を深さ 3.3 mm まで挿入した。

ステンレススチール管近辺にロングロック丸頭ネジ(1.2 × 4.0 mm; Nisimura)を浅くねじ込み、スチール管とボトルの間を歯科用セメントで固め、スチール管(外径 0.3 mm、内径 0.14 mm、長さ 50 mm; ユニークメディカル株式会社)を深さ 5.3 mm まで挿入した。

(7) CAT 活性測定

膀胱内圧測定後、ラットを断頭屠殺し前脳部を摘出した。約 1 時間 ice-cold saline 中に脳を保存した。この脳断片の組織重量を測定した後、ice-cold 50 mM Tris – HCl beffer (pH 7.4)中に入れ、ホモジナイズした。その後 35,000 × *g*、15 分間で遠心分離した。上澄を抽出し、10 ml EDTA そして 2.5% Triton X-100 を含む ice-cold phosphate buffer (pH 7.4) 溶液と混合させ反応させた。0°C、15 分間放置した後、再び 35,000 × *g*、15 分間で遠心分離し上澄を取り出しサンプルとした。

CAT 活性は Fonnum らの方法で測定した。サンプルに 20 mM EDTA、50 mM phosphate buffer (pH 7.4)、0.1 mM physostigmine、8 mM choline bromide、0.3 M NaCl、0.2mM [³H] acetyl coenzyme A を加えた。37°C、15 分間でインキュベートした。Cold 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)を加え反応を停止させ、この反応で産出した沈殿物に 0.5% Na – tetraphenyl – borate を含む(4: 1v/v)の tolueneacetonitrile 25 ml で抽出させた。抽出物はスペクトル法を用いて蛋白質 1 mg あたりの時間における ACh 合成量(pmol)として表した。

(8) 覚醒下 oxotremorine M の右側脳室への累積投与による排尿反射への影響

Ibotenic acid および PBS の前脳基底核投与 7 – 10 日後、halothane 麻酔下で膀胱瘻、側脳室のステンレススチール管留置を行い、覚醒後膀胱内圧測定を行った。膀胱内圧測定開始 2 時間後よりステンレススチール管より oxotremorine M (0.0015, 0.015, 0.15, 1.5, 15 pmol/5 μ l)あるいは、a.c.s.f.を 1 時間毎に累積投与し、投与前後の膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量を測定した。

(9) 覚醒下 oxotremorine M の右側脳室への単回投与による排尿反射への影響

同様の実験モデルを用いて、oxotremorine M (0.015, 1.5, 15 pmol/5 μ l)あるいは、a.c.s.f.を単回投与し投与直後から 1 時間、膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量を測定した。

(10) 覚醒下 pirenzepine の右側脳室への単回投与による排尿反射への影響

同様の実験モデルを用いて、ステンレススチール管より pirenzepine(SO 群: 100、10、1 nmol/5 μ l, BF 群:10、1、0.1 nmol/5 μ l)あるいは、a.c.s.f.を単回投与し投与直後から 1 時間、膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量を測定した。

(11) 覚醒下 oxotremorine M、 pirenzepine の右側脳室への単回投与による排尿反射への影響

oxotremorine M の排尿反射に対する効果が pirenzepine により拮抗されるか否かを検討するため、同様の実験モデルに対し、pirenzepine(SO 群: 10 μ mol/5 μ l、 BF 群: 1 μ mol/5 μ l)を投与した。30 分後に oxotremorine M(0.015 pmol/5 μ l)を投与して、膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量を 1 時間測定した。

(12) Oxotremorine M、pirenzepine の橋排尿中枢あるいは第 4 脳室投与による膀胱収縮および外尿道括約筋活動への影響

urethane 麻酔後 (1 g/kg i.p.; SIGMA)、前述の如く、膀胱瘻を作成し、ラットを脳定位固定装置に固定した。脳地図に従い、橋排尿中枢は Breguma より尾側 8 mm, 左右側 1.3 mm, 深さ 5.8 mm まで外径 0.6 mm のステンレススチール管を左右にそれぞれ刺入した。第 4 脳室への投与は Breguma より尾側 7.5 mm, 正中にて穴を開け、深さ 5.6 mm まで同様のステンレススチール管を刺入した。橋排尿中枢への oxotremorine M の投与用量は 1.5 pmol/1 μ l を左右両側に同時に注入した。また、第 4 脳室への投与用量は 15 pmol/1 μ l である。一方、pirenzepine の用量は橋排尿中枢に 10 nmol/1 μ l を左右両側に同時に注入し、また、第 4 脳室へは 100 nmol/1 μ l を注入した。ラットの会陰部から絶縁した 2 本の白金ワイヤー電極 (UNW- 2000、直径 0.08 mm; ユニークメディカル株式会社) を外尿道括約筋の 3 時と 6 時の位置に直接挿入し、外尿道括約筋筋電図測定を行った。なお、尾に針電極を刺入しアース線とした (NE-223S; 日本光電)。オシロスコープをみながら経時的に外尿道括約筋筋電図を測定し、熱転写記録機 (日本光電) に記録した。

(13) 統計処理

各実験を 5 匹以上のラットで行った。実験結果は、平均値 \pm 標準誤差で表示した。有意差検定は two-way ANOVA と post hoc tests (Fisher's PLSD)、および paired t -test あるいは unpaired t -test を使用し、 $P < 0.05$ の場合を有意とした。

第3章 実験結果

第1節 Ibotenic acid による前脳基底核破壊によって引き起こされる膀胱機能の変化

Ibotenic acid を両側前脳基底核に注入し、ACh作動性ニューロンを化学破壊して、アルツハイマー型痴呆類似の病態を実験的に作成した。このモデルが中枢性の排尿障害モデルとして有用か否か検討した。

第1項 Ibotenic acid 投与群 (BF: basal forebrain lesion rats) と PBS 投与群 (SO: sham operated rats) の体重の変化

Fig. 2 は ibotenic acid あるいは PBS 投与群の BF 群と SO 群との体重変化を示す。手術日を0日目としている。1日目、2日目、3日目においてBF群がSO群に比較して有意な体重減少 ($P < 0.05$) が認められた。またBF群において1、2日目に摂食不能 (aphagia) がみとめられた。それ以降体重の回復が認められたが、運動失調 (ataxia) は1日目以降も持続していた。

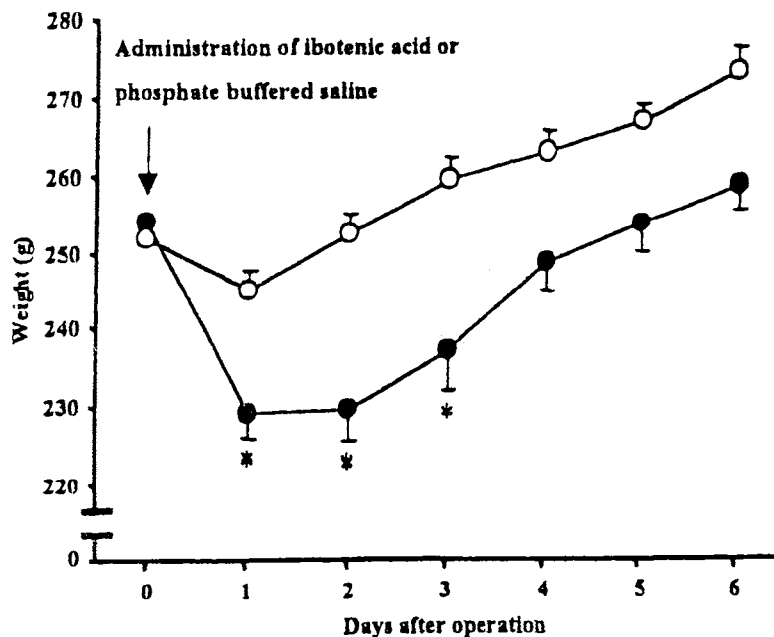


Fig. 2 Changes in body weight after administration of ibotenic acid (●) or phosphate buffered saline(○). Values are means \pm S.E.M. ($n = 10$) * $P < 0.05$, compared with sham operated rats (phosphate buffered saline).

第2項 SO 群と BF 群との膀胱内圧測定における各種パラメーターの比較

Table 1 に各パラメーター（膀胱容量、排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿量）の比較を示す。各パラメーターは膀胱瘻を作成して 2 時間後に測定したものである。膀胱容量において、BF 群は SO 群と比較して有意な減少 ($P < 0.01$) が認められた。しかし排尿収縮圧、排尿閾値圧、残尿は両群とも有意な差は認められなかった。

Table 1 Cystometric parameters in SO and BF rats

	Sham operated rats	Basal forebrain lesion rats
Bladder capacity (ml)	1.51 ± 0.11	0.66 ± 0.05 **
Contraction pressure (mm H ₂ O)	29.5 ± 1.52	25.0 ± 1.53
Threshold pressure (mm H ₂ O)	5.23 ± 0.39	3.24 ± 0.52
Residual volume (ml)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03

Values are means ± S.E.M. (n = 9).

** $P < 0.01$, compared with sham operated rats.

第3節 CAT 活性の比較

Fig. 3 に BF 群、SO 群、normal 群 (未処置群) それぞれの CAT 活性の比較を示す。BF 群は SO 群、normal 群と比較して有意な減少($P < 0.01$)が認められた。また、ibotenic acid 投与後 14 日目に CAT 活性を測定しても同様の結果が得られた。

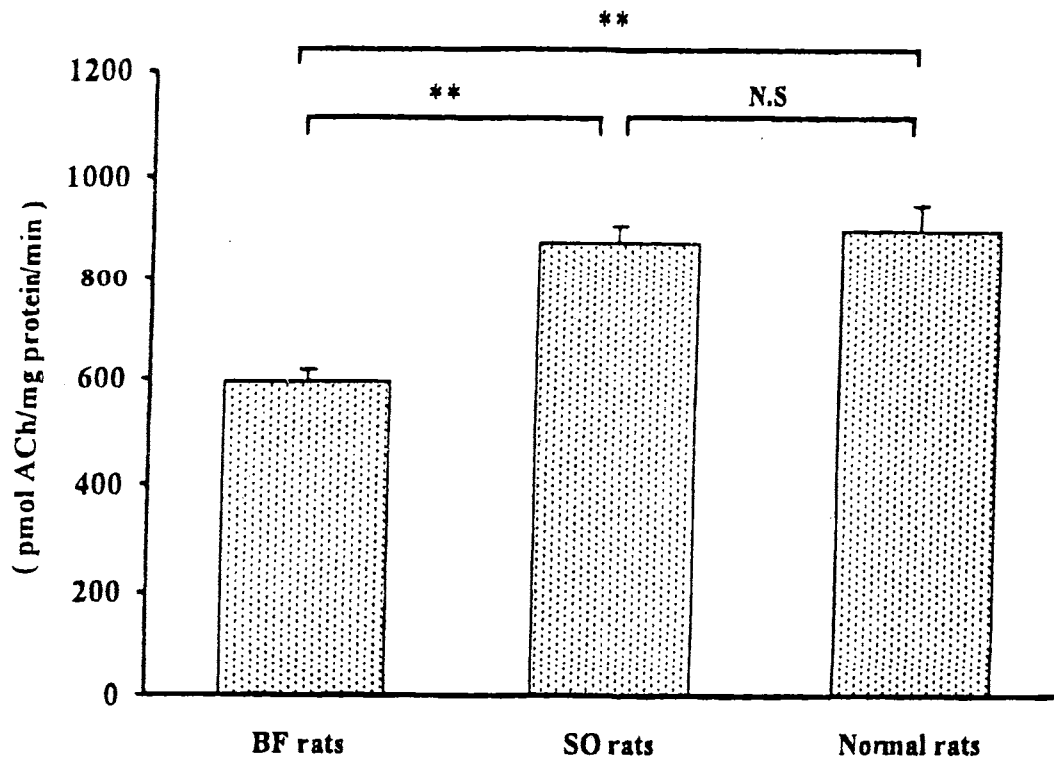


Fig. 3 Corrected CAT activity in basal forebrain lesion (BF) rats ($n = 9$), sham operated (SO) rats ($n = 9$), and normal rats ($n = 3$). Values are means \pm S.E.M. $** P < 0.01$, compared with SO rats or normal rats.

第2節 Oxotremorine M 累積投与による排尿反射への影響

Oxotremorine M を覚醒下で右側脳室に累積投与し排尿反射への影響を検討した。

第1項 覚醒下 oxotremorine M 累積投与の膀胱容量への影響

Table 2 に、oxotremorine M 累積投与による膀胱容量を示す。SO 群のうち vehicle 投与群と oxotremorine M 投与群では、投与直前の膀胱容量に有意な差が出たため oxotremorine M の膀胱容量に対する影響は実測値では検討できなかった。一方、BF 群では vehicle 投与前と oxotremorine M 投与前の実測値に有意差は認められなかった。BF 群 oxotremorine M の投与により膀胱容量の有意な増大がみられ (0.15 pmol/5 μ l, 1.5 pmol/5 μ l; $P < 0.05$)、また 15 pmol/5 μ l にて有意な減少が認められた ($P < 0.01$)。

Table 2 Effects of intracerebroventricular administration of vehicle or oxotremorine M on bladder capacity

Operation	Dose of oxotremorine M (pmol / 5 μ l)	Bladder capacity (ml)	
		vehicle	oxotremorine M
Sham	control	1.60 \pm 0.18	1.06 \pm 0.13 **
	0.0015	1.58 \pm 0.17	1.12 \pm 0.11 **
	0.015	1.75 \pm 0.20	1.27 \pm 0.13 **
	0.15	1.94 \pm 0.19	1.50 \pm 0.21 *
	1.5	2.12 \pm 0.20	1.42 \pm 0.20 **
	15	2.15 \pm 0.17	1.01 \pm 0.18 **
Basal forebrain lesion	control	0.68 \pm 0.09	0.51 \pm 0.06
	0.0015	0.68 \pm 0.10	0.54 \pm 0.10
	0.015	0.92 \pm 0.16	0.93 \pm 0.20
	0.15	0.87 \pm 0.14	1.13 \pm 0.25 #
	1.5	1.00 \pm 0.19	1.46 \pm 0.31 #
	15	1.17 \pm 0.22	0.52 \pm 0.11 ##

Vehicle or increasing doses of oxotremorine M were injected every hour. Values are means \pm S.E.M. (n = 6).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with sham operated rats (vehicle). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with basal forebrain lesion rats (vehicle).

実測値では投与前の膀胱容量の違い、また時間経過による膀胱容量の典型的な変化を見出すことが困難であった。そこで、これらの因子を取り除くため Fig. 4 では、oxotremorine M 累積投与による膀胱容量の変化率(%)を薬物投与直前の膀胱容量を 0%として示した。すなわち 1 時間おきに投与直前の膀胱容量を 0%としてその膀胱容量の変化率を求めた。その結果 SO 群においては oxotremorine M 投与群は高用量(15 pmol/5 μ l; $P < 0.01$)にて vehicle 投与群に比べ膀胱容量の有意な減少が認められた。BF 群では、oxotremorine M は低用量にて有意な増加 (0.015、0.15 pmol/5 μ l; $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)がみられ、さらに高用量にて有意な減少 (15 pmol/5 μ l; $P < 0.05$) が認められ、2 相性の反応がみられた。

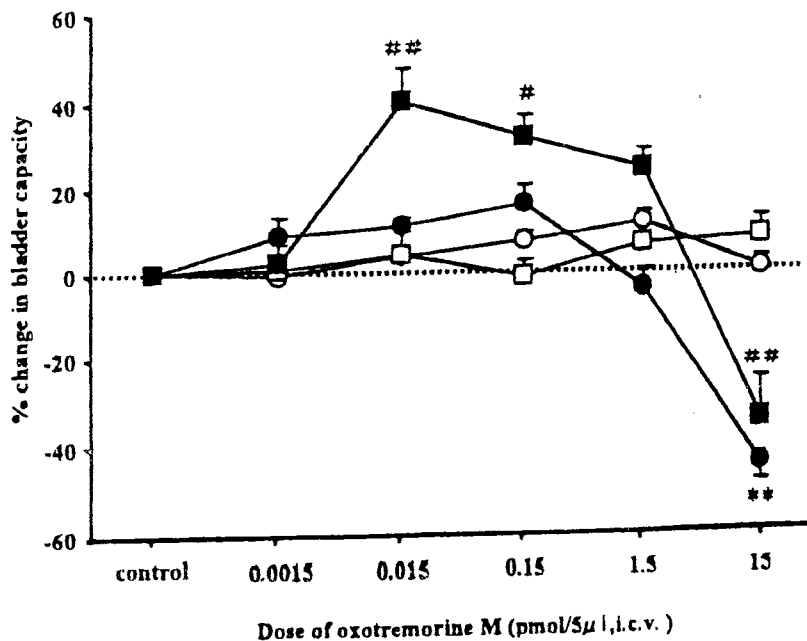


Fig. 4 Log dose response curves showing the effects of increasing doses of oxotremorine M on % changes in bladder capacity in sham operated (SO) rats (○; vehicle, n = 6, ●; oxotremorine M, n = 6) and basal forebrain lesion (BF) rats (□; vehicle, n = 6, ■; oxotremorine M, n = 6). Values are mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with SO rats (vehicle). ## $P < 0.01$, and # $P < 0.05$, compared with BF rats (vehicle).

第2項 覚醒下 oxotremorine M 累積投与による排尿収縮圧への影響

Fig. 5 に oxotremorine M 累積投与による排尿収縮圧の実測値(cmH₂O)の変化を示す。排尿収縮圧は SO 群の vehicle 投与群 と oxotremorine M 群、及び BF 群の vehicle 投与群と oxotremorine M 投与群との間で有意な差は認められなかった。

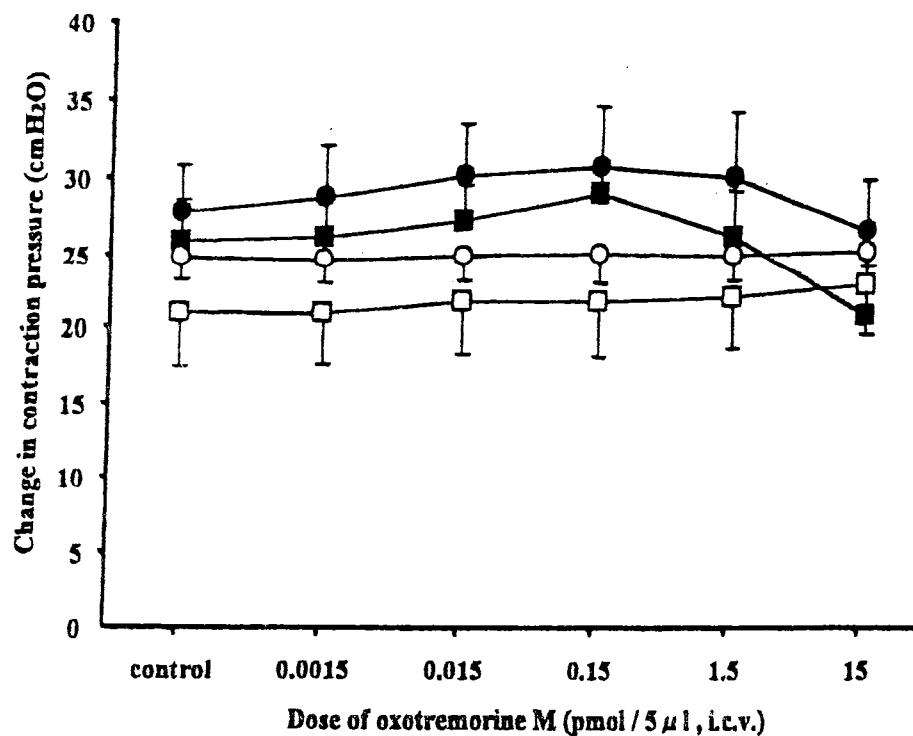


Fig. 5 Log dose response curves showing the effects of increasing doses of oxotremorine M on changes in contraction pressure in sham operated rats (○; vehicle, n = 6, ●; oxotremorine M, n = 6) and basal forebrain lesion rats (□; vehicle, n = 6, ■; oxotremorine M, n = 6).

第3項 覚醒下 oxotremorine M 累積投与による排尿閾値圧への影響

Fig. 6 に oxotremorine M 累積投与による排尿閾値圧の実測値(cmH₂O)の変化を示した。排尿閾値圧は oxotremorine M 高用量(15 pmol/5 μ l)投与により SO 群および BF 群で有意な増加($P < 0.05$, $P < 0.01$)がみられた。

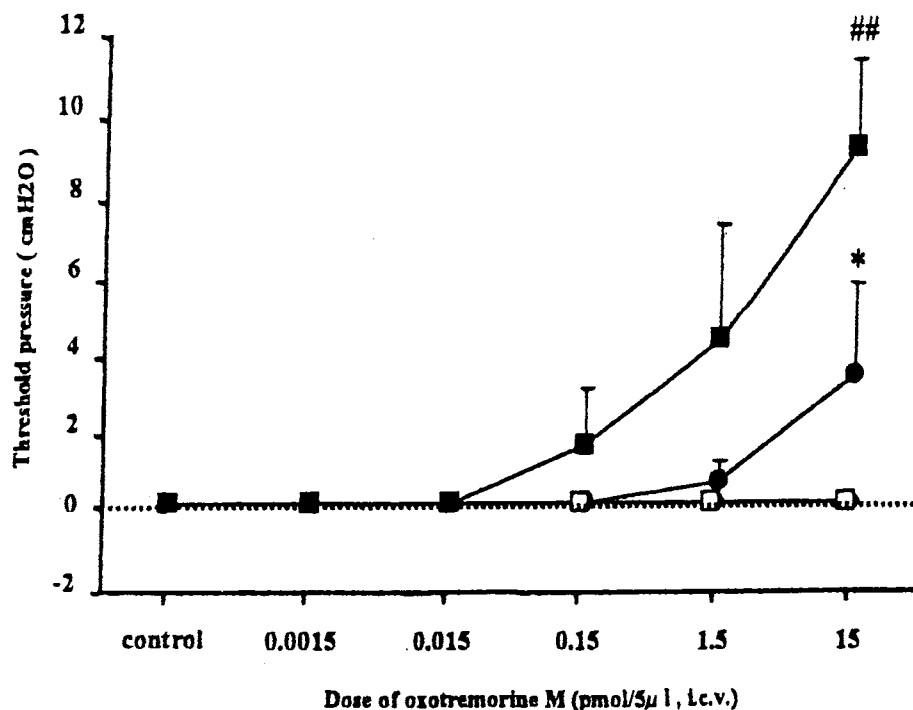


Fig. 6 Log dose response curves showing the effects of increasing doses of oxotremorine M on changes in threshold pressure in sham operated(SO) rats (○; vehicle, n = 6, ●; oxotremorine M, n = 6) and basal forebrain lesion (BF) rats (□; vehicle, n = 6, ■; oxotremorine M, n = 6). Values are mean \pm S.E.M.

* $P < 0.05$, compared with SO rats (vehicle). ## $P < 0.01$, compared with BF rats (vehicle).

第4項 覚醒下 oxotremorine M 累積投与による残尿量への影響

Fig. 7 に oxotremorine M 累積投与による残尿量の実測値 (ml) の変化を示した。残尿量は oxotremorine M 高用量(15 pmol/5 μ l)投与により SO 群および BF 群で有意な増加($P < 0.05$)がみられた。

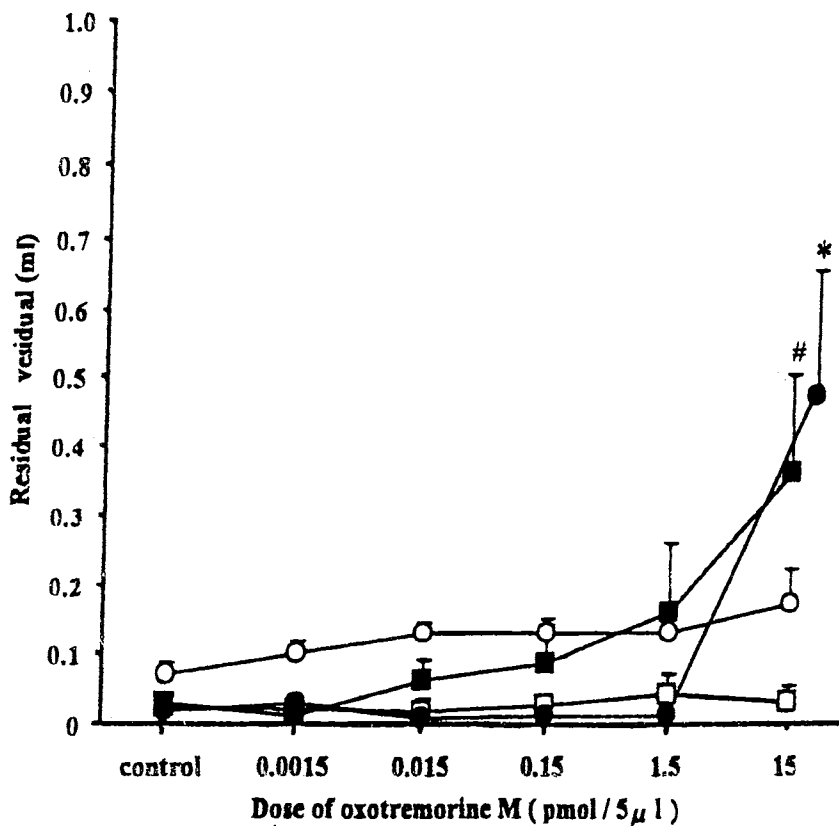


Fig. 7 Log dose response curves showing the effects of increasing doses of oxotremorine M on changes in residual volume in sham operated (SO) rats (○; vehicle, n = 6, ●; oxotremorine M, n = 6) and basal forebrain lesion (BF) rats (□; vehicle, n = 6, ■; oxotremorine M, n = 6). Values are mean \pm S.E.M.

* $P < 0.05$, compared with SO rats (vehicle). # $P < 0.05$, compared with BF rats (vehicle).

第3節 覚醒下 oxotremorine M 単回投与による排尿反射への影響

第2節では覚醒下 oxotremorine M 累積投与による排尿反射への影響を検討したが、vehicle 投与にも時間の経過とともに膀胱容量が大きくなる傾向があり oxotremorine M の作用が不明確であった。そこで oxotremorine M 単回投与により排尿反射への影響を再検討した。なお、累積投与の結果より BF 群で膀胱容量を有意に増大させた用量(0.015 pmol/5 μ l)、有意差がでなかった用量 (1.5 pmol/5 μ l)、膀胱容量が有意に減少した用量 (15 pmol/5 μ l)を選択し投与した。

第1項 覚醒下 oxotremorine M 単回投与による膀胱容量への効果

Table 3 に oxotremorine M 単回投与による膀胱容量の実測値(ml)の変化を示す。SO 群においては、高用量 (15 pmol/5 μ l) にて、投与後 15 分と 30 分の膀胱容量が有意に減少した。BF 群では、低用量(0.015 pmol/5 μ l)で投与後 60 分間膀胱容量の有意な増加がみられた。しかし、高用量(15 pmol/5 μ l)では累積投与でみられた膀胱容量の減少はみられなかった。

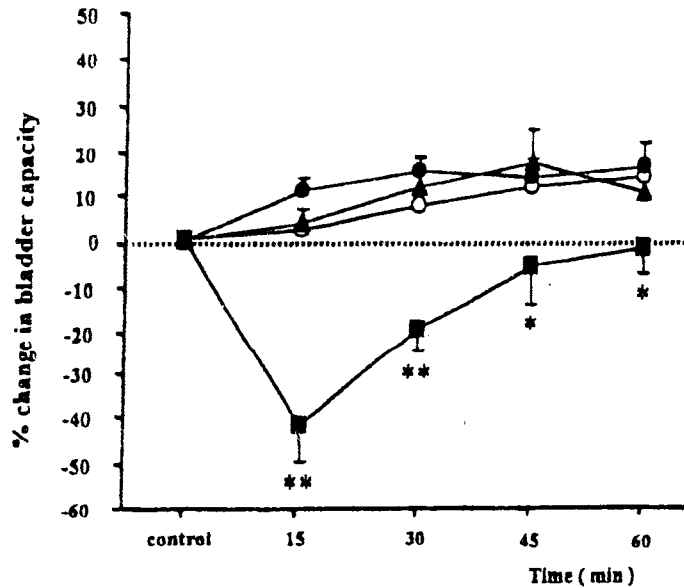
Table 3 Effects of intracerebroventricular administration of vehicle or oxotremorine M on bladder capacity

Operation	Time (min)	Bladder capacity (ml)			
		Dose of oxotremorine M (pmol /5 μ l)			
		vehicle	0.015	0.15	15
Sham	control	1.15 \pm 0.06	1.27 \pm 0.16	1.19 \pm 0.17	1.17 \pm 0.18
	15	1.15 \pm 0.07	1.36 \pm 0.26	1.23 \pm 0.18	0.78 \pm 0.18 **
	30	1.21 \pm 0.06	1.42 \pm 0.19	1.37 \pm 0.27	0.99 \pm 0.19 *
	45	1.22 \pm 0.06	1.43 \pm 0.22	1.42 \pm 0.26	1.11 \pm 0.19
	60	1.23 \pm 0.06	1.45 \pm 0.20	1.34 \pm 0.24	1.15 \pm 0.20
Basal forebrain lesion	control	0.55 \pm 0.08	0.58 \pm 0.07	0.59 \pm 0.05	0.78 \pm 0.06
	15	0.56 \pm 0.07	0.82 \pm 0.11 **	0.72 \pm 0.07	0.89 \pm 0.08
	30	0.58 \pm 0.07	0.77 \pm 0.12 *	0.65 \pm 0.05	0.88 \pm 0.10
	45	0.60 \pm 0.07	0.76 \pm 0.12 *	0.66 \pm 0.07	0.86 \pm 0.11
	60	0.59 \pm 0.08	0.75 \pm 0.12 *	0.67 \pm 0.09	0.86 \pm 0.11

Time courses of changes in bladder capacity after administration of vehicle or oxotremorine M. Values are means \pm S.E.M (n = 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with sham operated rats (vehicle). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with basal forebrain lesion rats (vehicle).

Fig. 8 に oxotremorine M 単回投与による膀胱容量の変化率(%)を薬物投与前の膀胱容量を0%として示した。SO 群では、高用量(15 pmol/5 μ l)で膀胱容量の有意な減少が認められた。BF 群では投与 15 分後にすべて用量で vehicle 群と比較すると、有意な膀胱容量の増加が認められた。

A



B

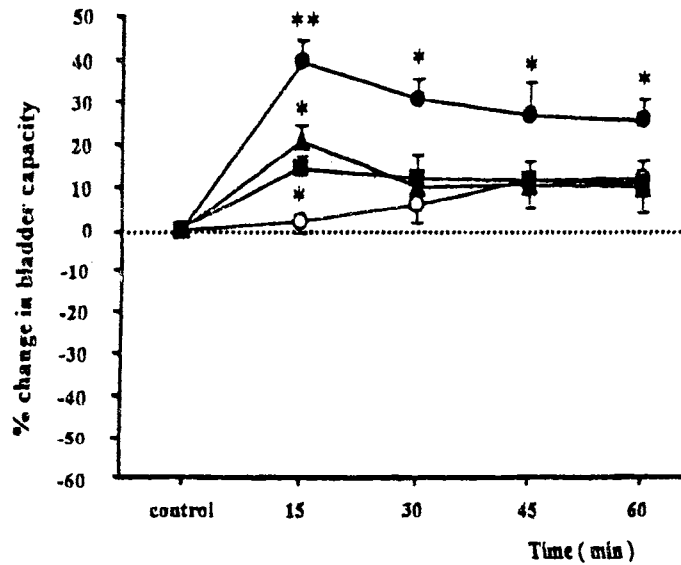
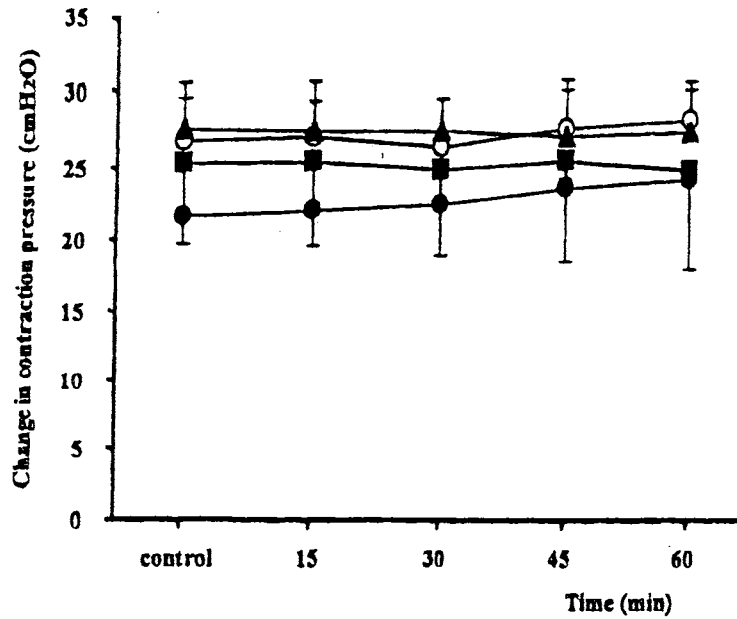


Fig. 8 Time courses of changes in bladder capacity after administration of oxotremorine M in sham operated(SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B). Three doses of oxotremorine M were administrated to each rat group (○; vehicle, ●; 0.015 pmol, ▲; 1.5 pmol, ■; 15 pmol). Values are means \pm S.E.M. (n = 6). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with SO rats (vehicle) or BF rats (vehicle).

第2項 覚醒下 oxotremorine M 単回投与による排尿収縮圧への影響

Fig. 9 に oxotremorine M 単回投与による排尿収縮圧の実測値(cmH₂O)の変化を示す。SO 群および BF 群の両群に有意な差は認められなかった。

A



B

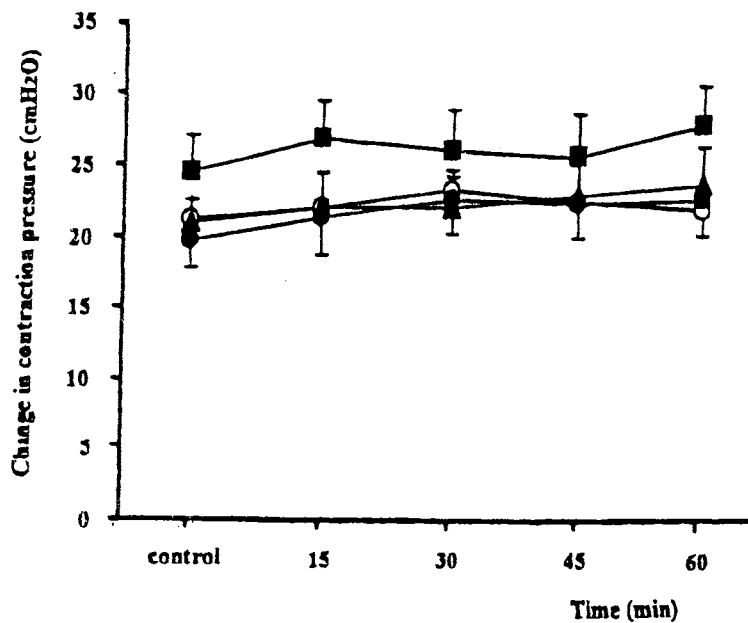


Fig. 9 Time courses of changes in contraction pressure after administration of oxotremorine M in sham operated rats (A) and basal forebrain rats (B). Three doses of oxotremorine M were administered to each rat group (○; vehicle, ●; 0.015 pmol, ▲; 1.5 pmol, ■; 15 pmol).

第3項 覚醒下 oxotremorine M 単回投与による排尿閾値圧への影響

SO 群および BF 群ともに oxotremorine M 単回投与による排尿閾値圧への影響は認められなかった。

第4項 覚醒下 oxotremorine M 単回投与による残尿量への影響

SO 群および BF 群ともに oxotremorine M 単回投与による残尿量への影響は認められなかった。

第4節 Pirenzepine 単回投与による排尿反射への影響

Pirenzepine を覚醒下で右側脳室に単回投与し、排尿反射への影響を検討した。

第1項 覚醒下 pirenzepine 単回投与の膀胱容量への効果

Table 4 に、pirenzepine 単回投与による膀胱容量の実測値 (ml) の変化を示す。SO 群では、低用量 (1.0 nmol/5 μ l、10 nmol/5 μ l) では、vehicle 群と比較して有意な差は認められなかったが、高用量 (100 nmol/5 μ l) で、投与後 30 分間、膀胱容量の有意な増大が認められた ($P < 0.01$)。BF 群では、低用量 (0.1 nmol/5 μ l、1.0 nmol/5 μ l) にて、vehicle 群と比較して有意な差は認められなかったが、高用量 (10 nmol/5 μ l) で、膀胱容量の有意な増大が認められた。膀胱容量を増加させる用量は、SO 群と BF 群との間に 10 倍の差がみられた。

Table 4 Effects of intracerebroventricular administration of vehicle or pirenzepine on bladder capacity

operation	Time (min)	Bladder capacity (ml)				
		Dose of pirenzepine (nmol/5 μ l)				
		vehicle	0.1	1	10	100
Sham	control	1.15 \pm 0.06		1.30 \pm 0.13	1.16 \pm 0.12	1.16 \pm 0.09
	15	1.15 \pm 0.07		1.33 \pm 0.13	1.21 \pm 0.12	1.66 \pm 0.16**
	30	1.21 \pm 0.06		1.35 \pm 0.16	1.23 \pm 0.15	1.51 \pm 0.14**
	45	1.22 \pm 0.06		1.40 \pm 0.21	1.31 \pm 0.20	1.40 \pm 0.14
	60	1.23 \pm 0.06		1.43 \pm 0.22	1.40 \pm 0.20	1.40 \pm 0.14
Basal forebrain lesion	control	0.55 \pm 0.08	0.56 \pm 0.10	0.58 \pm 0.07	0.42 \pm 0.10	
	15	0.56 \pm 0.07	0.58 \pm 0.10	0.60 \pm 0.08	1.05 \pm 0.20##	
	30	0.58 \pm 0.07	0.57 \pm 0.12	0.60 \pm 0.06	0.97 \pm 0.20##	
	45	0.60 \pm 0.07	0.61 \pm 0.12	0.64 \pm 0.05	0.88 \pm 0.12##	
	60	0.59 \pm 0.08	0.64 \pm 0.14	0.64 \pm 0.06	0.77 \pm 0.10#	

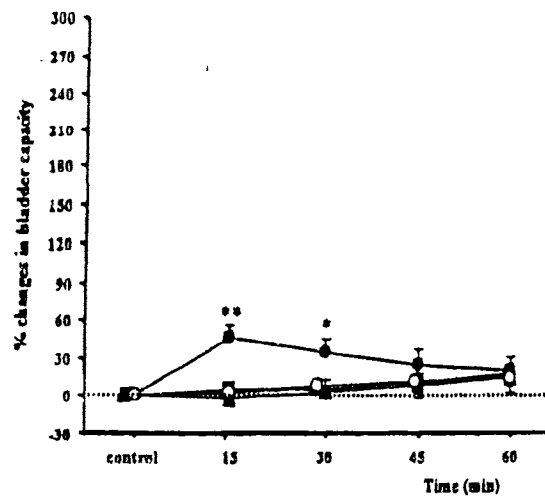
Time courses of changes in bladder capacity after administration of pirenzepine or vehicle.

Values are means \pm S.E.M. (n = 6) ** $P < 0.01$, compared with sham operated rats

(vehicle). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with basal forebrain lesion rats (vehicle).

Fig. 10 に pirenzepine 単回投与による膀胱容量の変化率 (%)を薬物投与前の膀胱容量を0%として示した。SO 群においては、低用量域 (1.0 nmol/5 μ l, 10 nmol/5 μ l)で、vehicle 群と比較して有意な差は認められなかったが、高用量域 (100 nmol/5 μ l)では膀胱容量の有意な増大が認められた。BF 群においては、低用量域 (0.1 nmol/5 μ l, 1.0 nmol/5 μ l)で、vehicle 群と比較して有意な差は認められなかったが、高用量域 (10 nmol/5 μ l)で、膀胱容量は投与後 60 分間持続して有意な増加が認められ、その後 1~2 時間で投与前の膀胱容量に戻った。

A



B

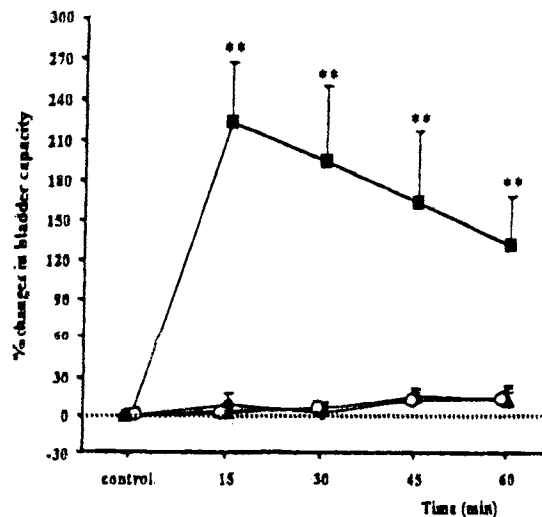
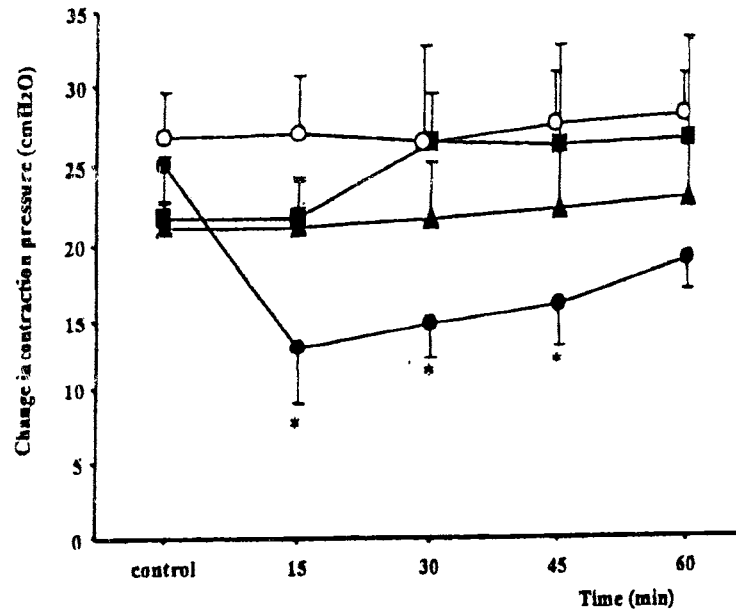


Fig. 10 Time courses of changes in bladder capacity after administration of pirenzepine in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B). Four doses of pirenzepine were administered to each rat group (○; vehicle, ◆; 0.1 nmol, ▲; 1 nmol, ■; 10 nmol, ●; 100 nmol) Values are means \pm S.E.M. (n = 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with SO rats (vehicle) or BF rats (vehicle).

第3項 覚醒下 pirenzepine 単回投与による排尿収縮圧への影響

Fig. 11 に pirenzepine 単回投与による排尿収縮圧の実測値(cmH₂O)の変化を示した。SO 群では、高用量域 (100 nmol/5 μl)において排尿収縮圧の有意な減少が認められた。BF 群においても、高用量域 (10 nmol/5 μl)排尿収縮圧の有意な減少がみられた。

A



B

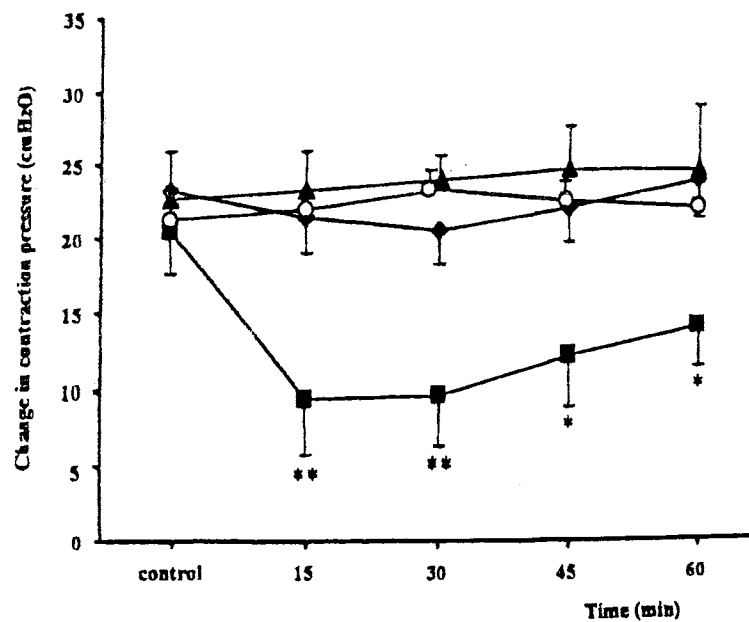
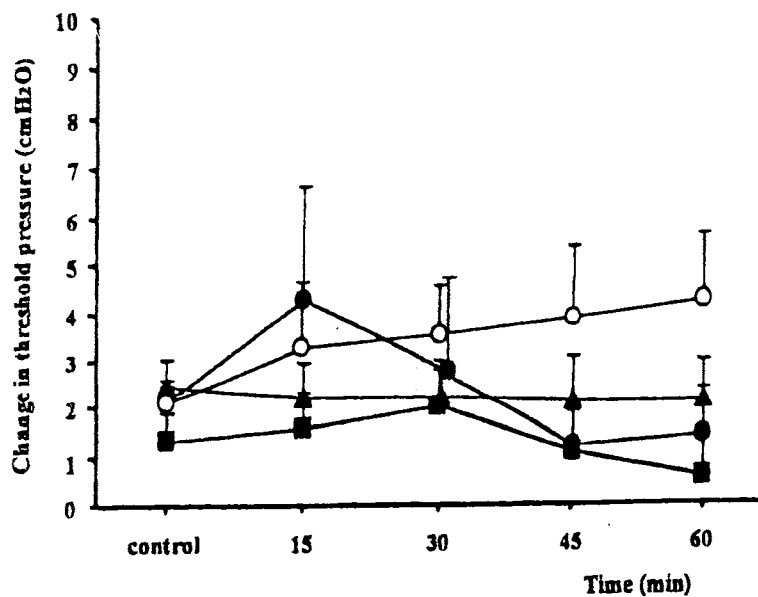


Fig. 11 Time courses of changes in contraction pressure after administration of pirenzepine in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B). Four doses of pirenzepine were administered to each rat group (○; vehicle, ◆; 0.1 nmol, ▲; 1 nmol, ■; 10 nmol, ●; 100-nmol) Values are means \pm S.E.M. (n = 6). * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with SO rats (vehicle) or BF rats (vehicle).

第4項 覚醒下 pirenzepine 単回投与による排尿閾値圧への影響

Fig. 12 に pirenzepine 単回投与による排尿閾値圧の実測値(cmHzO)の変化を示した。SO 群および BF 群とも有意な差は認められなかった。

A



B

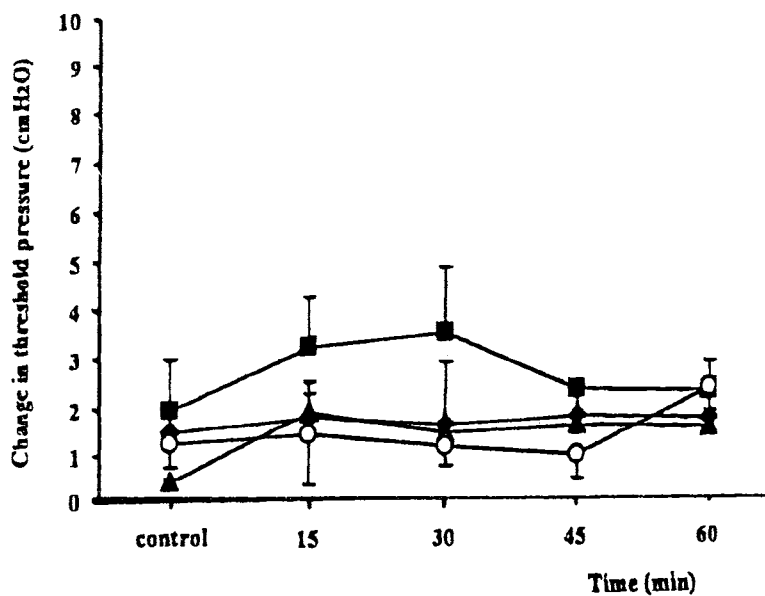
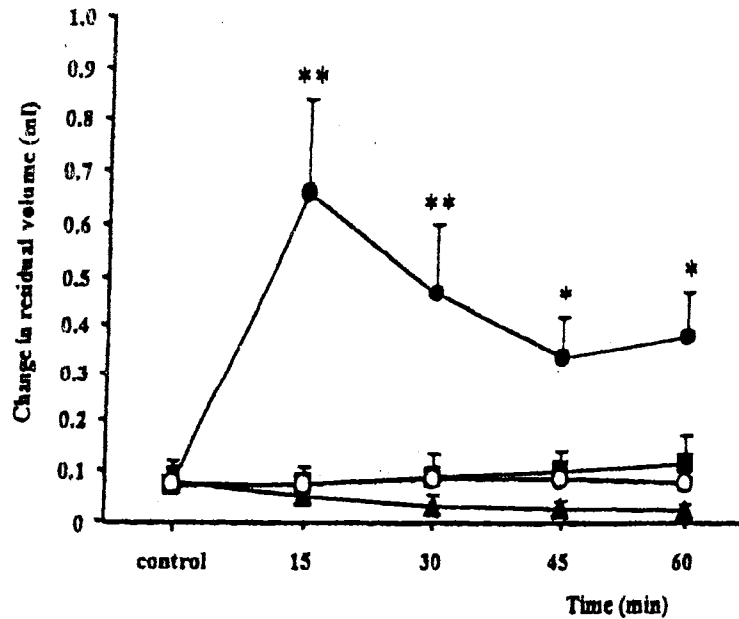


Fig. 12 Time courses of changes in threshold pressure after administration of pirenzepine in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B). Four doses of pirenzepine were administered to each rat groups (○; vehicle, ◆; 0.1 nmol, ▲; 1 nmol, ■; 10 nmol, ●; 100 nmol). Values are means \pm S.E.M. (n = 6).

第5項 覚醒下 pirenzepine 単回投与による残尿量への影響

Fig. 13 に pirenzepine 単回投与による残尿量の実測値(ml)の変化を示した。SO 群では、高用量域 (100 nmol/5 μ l) で残尿量の有意な増大が認められた。BF 群においても、高用量域 (10 nmol/5 μ l) において有意な残尿量の増大が認められた。

A



B

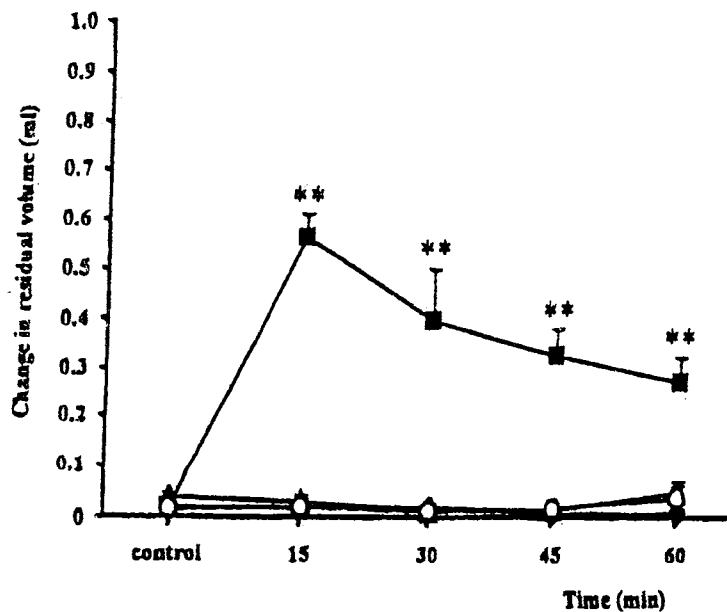


Fig. 13 Time courses of changes in residual volume after administration of pirenzepine in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B). Four doses of pirenzepine were administered to each rat group (○; vehicle, ◆; 0.1 nmol, ▲; 1 nmol, ■; 10 nmol, ●; 100 nmol). Values are means \pm S.E.M. (n = 6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with SO rats (vehicle) or BF rats (vehicle).

第5節 pirenzepine 前投与における oxotremorine M 排尿反射への影響

Oxotremorine M の排尿反射に対する影響が muscarine M1 受容体 antagonist である pirenzepine により拮抗されるか否か検討した。前投与する pirenzepine の用量は第3節で反応が出た用量の10倍希釈した用量 (SO 群:10 nmol/5 μ l, BF 群: 1 nmol/5 μ l)を用いた。

第1項 覚醒下 pirenzepine 前投与における oxotremorine M 膀胱容量への影響

Table 5 に pirenzepine および a.c.s.f. 前投与後に oxotremorine M あるいは a.c.s.f.単回投与した時の膀胱容量の実測値(ml)の変化を示す。SO 群においては、どの群とも膀胱容量に有意な変化を示さなかった。一方、BF 群においては、a.c.s.f.-oxotremorine M 投与群は、oxotremorine M 投与により有意な膀胱容量の増大が認められた。しかし、pirenzepine 前処置後の oxotremorine M 投与群は、pirenzepine-a.c.s.f 群と a.c.s.f.-a.c.s.f.群と比較して有意な差は認められなかった。oxotremorine M による増大の効果が pirenzepine により拮抗されていた。

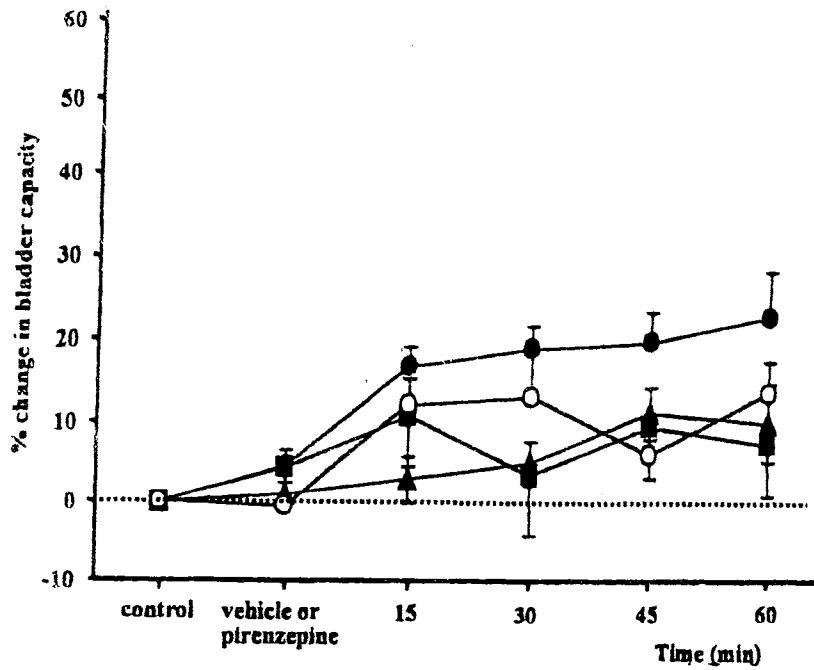
Table 5 Effect of intracerebroventricular administration of vehicle or oxotremorine M on bladder capacity in SO or BF rats pretreated with pirenzepine

Operation	Time (min)	Bladder capacity (ml)			
		vehicle + vehicle	vehicle + oxotremorine M	pirenzepine + vehicle	pirenzepine + oxotremorine M
Sham	control	1.15 ± 0.15	1.27 ± 0.27	1.08 ± 0.10	1.07 ± 0.09
	vehicle or pirenzepine	1.20 ± 0.16	1.35 ± 0.28	1.09 ± 0.09	1.05 ± 0.09
	15	1.25 ± 0.18	1.55 ± 0.32	1.12 ± 0.11	1.13 ± 0.08
	30	1.23 ± 0.19	1.55 ± 0.31	1.14 ± 0.12	1.17 ± 0.07
	45	1.24 ± 0.16	1.55 ± 0.29	1.21 ± 0.12	1.18 ± 0.10
	60	1.25 ± 0.15	1.60 ± 0.32	1.21 ± 0.12	1.21 ± 0.15
Basal forebrain lesion	control	0.70 ± 0.07	0.64 ± 0.09	0.66 ± 0.13	0.74 ± 0.09
	vehicle or pirenzepine	0.71 ± 0.08	0.67 ± 0.13	0.65 ± 0.12	0.80 ± 0.12
	15	0.76 ± 0.07	0.96 ± 0.19 **	0.70 ± 0.14	0.83 ± 0.14
	30	0.74 ± 0.07	0.93 ± 0.18 *	0.71 ± 0.13	0.85 ± 0.14
	45	0.75 ± 0.07	0.90 ± 0.17 *	0.74 ± 0.13	0.89 ± 0.13
	60	0.84 ± 0.08	0.86 ± 0.14	0.80 ± 0.15	0.89 ± 0.13

Time courses of changes in bladder capacity after administration of oxotremorine M in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain (BF) rats (B) pretreated with pirenzepine. Values are mean ± S.E.M. (n = 7). ***P* < 0.01, **P* < 0.05, compared with BF rats (vehicle – vehicle).

Fig. 14 に pirenzepine および a.c.s.f. 前投与後に oxotremorine M あるいは a.c.s.f. 単回投与による膀胱容量の変化率(%)を示す。SO 群において、膀胱容量に有意な変化はみられなかった。一方、BF 群の oxotremorine M 投与群は、投与 15 分、30 分、45 分、60 分後にそれぞれ有意な膀胱容量の増大が認められた。しかし、pirenzepine-oxotremorine M 投与群では、膀胱容量に有意な差は認められなかった。

A



B

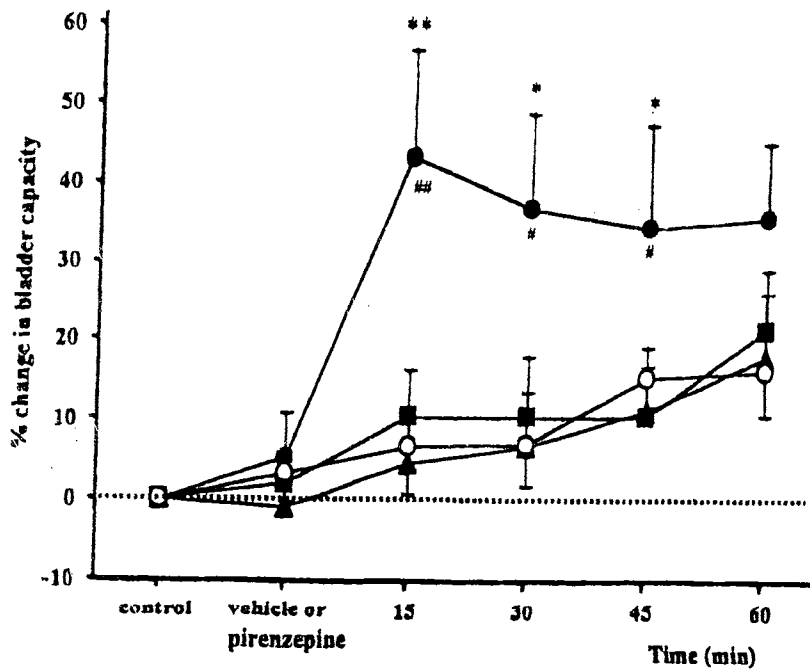


Fig. 14 Time courses changes in bladder capacity after administration of oxotremorine M in sham operated (SO) rats (A) and basal forebrain lesion (BF) rats (B) pretreated with pirenzepine. Data were compared in 4 groups (■; pirenzepine - oxotremorine M, ●; vehicle-oxotremorine M, ▲; pirenzepine - vehicle, ○; vehicle - vehicle). Values are mean \pm S.E.M. (n = 7). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with BF rats (vehicle - vehicle) and # $P < 0.01$, # $P < 0.05$, compared with BF rats (pirenzepine - oxotremorine M).

第2項 覚醒下 pirenzepine 前投与における oxotremorine M 排尿収縮圧への影響
pirenzepine および a.c.s.f. 前処置後の oxotremorine M あるいは a.c.s.f.による排尿収縮
圧への有意な影響は SO 群、BF 群共に認められなかった。

第3項 覚醒下 pirenzepine 前投与における oxotremorine M 排尿閾値圧への影響
pirenzepine および a.c.s.f. 前処置後の oxotremorine M あるいは a.c.s.f.による排尿閾値
圧の有意な影響は SO 群、BF 群共に認められなかった。

第4項 覚醒下 pirenzepine 前投与における oxotremorine M 残尿量への影響
pirenzepine および a.c.s.f. 前処置後の oxotremorine M あるいは a.c.s.f.による残尿量の
有意な影響は、SO 群、BF 群共に認められなかった。

第6節 Urethane 麻酔下 oxotremorine M および pirenzepine の単回投与による膀胱収縮および外尿道括約筋活動への影響

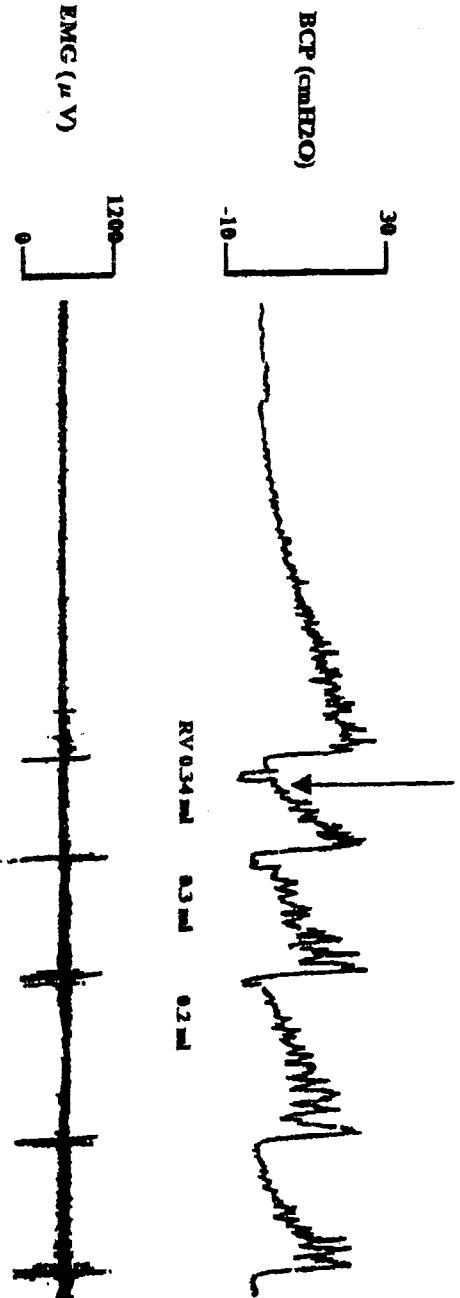
第1項 Oxotremorine M の高用量における作用部位の特定

Oxotremorine M 累積投与あるいは単回投与により低用量域では排尿反射の抑制がみられ、高用量域では排尿反射の亢進が認められた。この機序を検討するため oxotremorine M 橋排尿中枢あるいは第4脳室への投与を行った。

Fig. 15(A)に urethane 麻酔下、橋排尿中枢への oxotremorine M 単回投与による膀胱容量および外尿道括約筋活動への影響を示す。橋排尿中枢への oxotremorine M (1.5 pmol/1 μ l)投与では、蓄尿時および排尿時の外尿道括約筋活動には、変化がみられなかった。膀胱容量は oxotremorine M 投与直後から減少が認められた。

Fig. 15(B)に urethane 麻酔下、第4脳室への oxotremorine M 単回投与による膀胱容量、外尿道括約筋活動への影響を示す。第4脳室への oxotremorine M (15 pmol/5 μ l)投与により、蓄尿時の外尿道括約筋活動は軽度に低下していた。膀胱容量については oxotremorine M 投与により増大が認められた。また残尿量は投与前後では変化がみられなかった。

(A) PMC(Pontine micturition center) Oxotremorine M (1.5 pmol/l μ l)



(B) Fourth ventricle Oxotremorine M (15 pmol/l μ l)

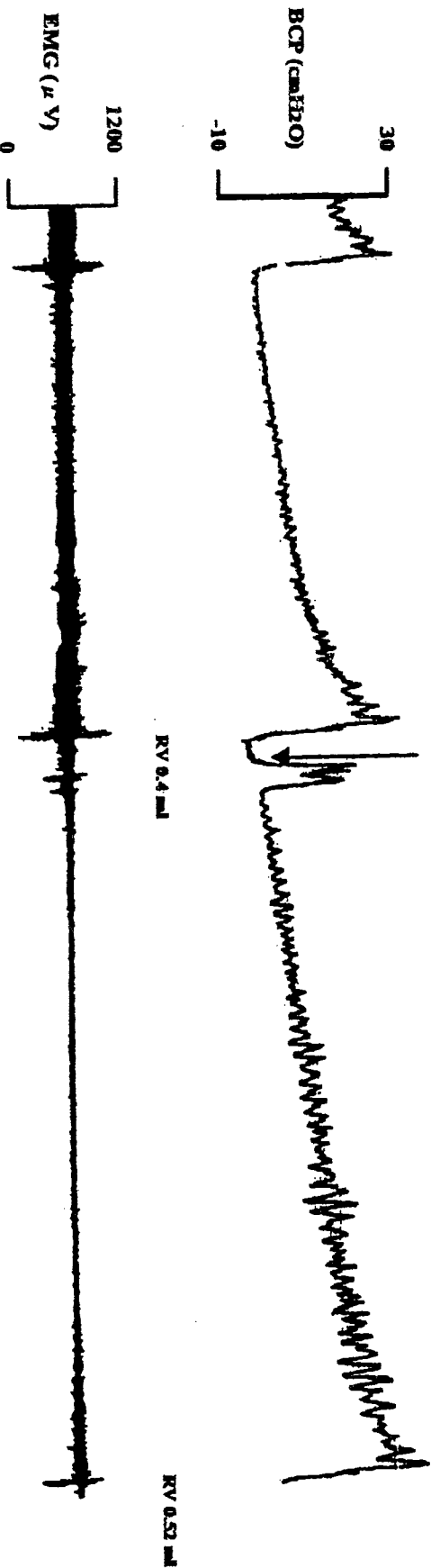


Fig. 15 Effects of oxotremorine M on cystometrogram and electromyogram of the external urethral sphincter (EMG) in urethane anesthetized rats. RV; residual volume, BCP; bladder contraction pressure.

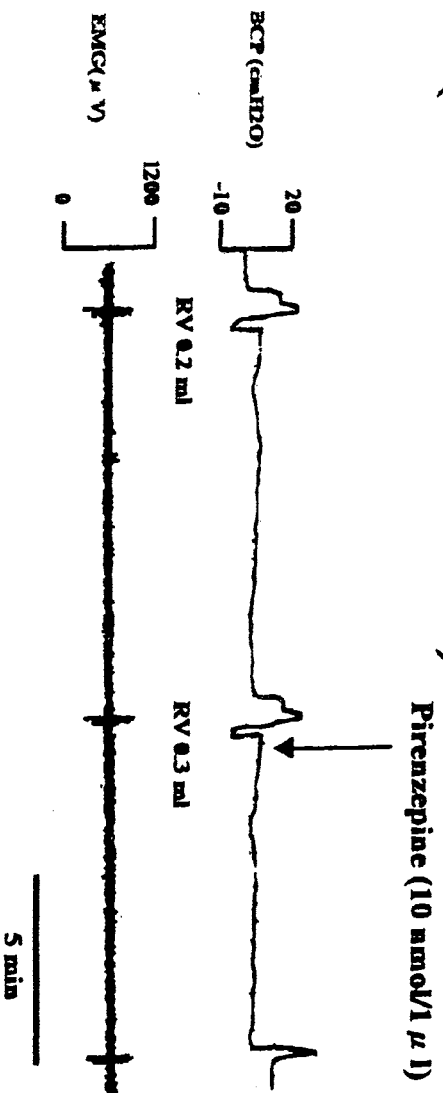
第2項 Pirenzepine の高用量における作用部位の特定

Pirenzepine の単回投与により排尿反射の抑制が認められた。この作用機序を検討する目的で橋排尿中枢あるいは第4脳室への pirenzepine の投与を行った。

Fig. 16(A)に urethane 麻酔下、橋排尿中枢への pirenzepine 投与による膀胱容量、外尿道括約筋活動さらに残尿量への影響を示す。脳幹部への pirenzepine (10 nmol/1 μ l)投与により、外尿道括約筋活動はほとんど変化がみられなかった。膀胱容量、残尿量にも pirenzepine 投与により変化は認められなかった。

Fig. 16(B)に urethane 麻酔下、第4脳室への pirenzepine (100 nmol/1 μ l)単回投与による膀胱容量、外尿道括約筋活動への影響を示す。膀胱容量については増大が認められ、また残尿量も増大が認められた。外尿道括約筋活動は膀胱容量の増大に伴って活動の亢進がみられた。

(A) PMC(Pontine micturition center)



(B) Fourth ventricle

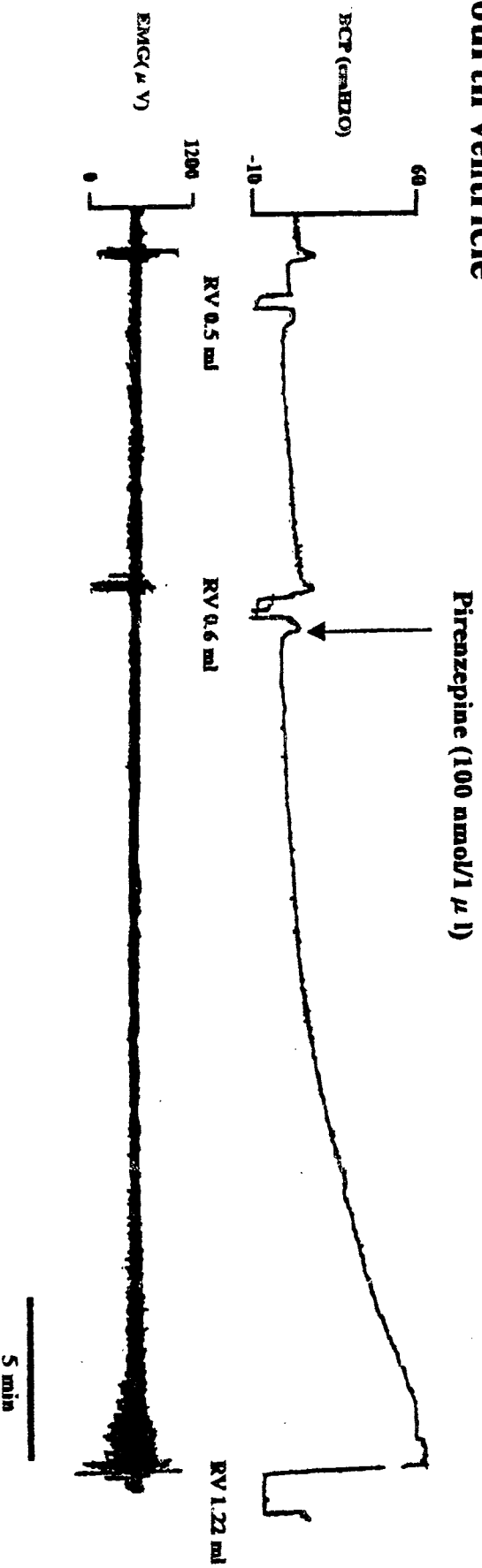


Fig. 16 Effects of pirenzepine on cystometrogram and electromyogram of the external urethral sphincter (EMG) in urethane anesthetized rats. RV; residual volume, BCP; bladder contraction pressure.

第4章 考察

ibotenic acid は、グルタミン受容体サブタイプであるイオンチャンネル型グルタミン受容体の NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid)受容体および代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptor)のアゴニストである。これら 2 つの受容体は小脳、海馬、歯状回など脳の各部に局在し、興奮性の神経伝達とともに神経の可塑性に關与する受容体と考えられている。ibotenic acid が大量に投与されるとシナプス後膜に存在する NMDA 受容体が強く刺激され、 Na^+ の流入により細胞膜の脱分極が起こり、膜電位依存性のL型 Ca^{2+} チャンネルが開く。また、脱分極により Mg阻害より解除された NMDA 受容体を介して Ca^{2+} が細胞内に流入し、この Ca^{2+} はカルパイン、ホスホリパーゼ C、C キナーゼ、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ、エンドヌクレアーゼなどの種々の酵素を活性化することで細胞死を誘発すると推測されている。この「グルタミン-カルシウム仮説」、さらに最近ではグルタミン受容体チャンネルから流入した Ca^{2+} が NO 合成酵素(NOS)を活性化し、産成された NO がスーパーオキシドと結合し極めて毒性の高いペルオキシニトライドが合成され細胞死を招く「グルタミン-カルシウム仮説」とフリーラジカルをむすびつけた説も注目を浴びている²³⁾。

本研究では、ラットの前脳基底核に ibotenic acid を大量に投与することで前脳基底核から大脳皮質へ投射するコリン作動性神経経路を破壊し、アルツハイマー型痴呆様病態モデルを作成した。このモデルの慢性期に認められる排尿反射亢進と大脳皮質 CAT 活性との相関については本研究以外に報告はない。Yamamoto らは ibotenic acid をラット前脳基底核に投与し排尿反射亢進モデルを作成したところ、偽手術ラットに比べ膀胱容量は 1~3 週間で 50%に減少したと報告している¹³⁾。しかし、このラットの大脳皮質における CAT 活性については報告していない。大脳皮質 CAT 活性および AChE 活性はイボテン酸前脳基底核局所投与により約 3 カ月間は低下が認められると報告されているが²⁴⁾、本研究では ibotenic acid 投与 7~10 日後に膀胱容量と CAT 活性を測定した。BF 群は SO 群に比べ有意な膀胱容量の減少が認められ、また大脳皮質 CAT 活性の低下も認められたことより CAT 活性と膀胱容量の減少との間には有意な相関があると考え

られた。したがってラット膀胱容量の減少はラット前脳基底核から大脳皮質に投射されている Ch4 コリナジック細胞群が *ibotenic acid* により破壊されたことが原因となっていると考えられる。さらに、前脳基底核から海馬に投射している Ch1 および Ch2 コリナジック細胞群も少なからず障害を受けていると考えられ、これらの神経細胞群の変性・脱落が総和として排尿反射の亢進に関与していると考えられる。すなわち、前脳基底核より大脳皮質、海馬への投射しているコリナジック細胞群は排尿中枢に対し抑制的に影響を及ぼしていると考えられる。

Oxotremorine M は M1 および M2 受容体 agonist であるが、そのリガンドとしての作用のほとんどは M1 に選択的である²⁵⁾。Mash らによれば大脳皮質のムスカリン受容体は M1 受容体が主であり、M2 受容体は脳幹から大脳皮質にかけて広く分布しているとされている。また、脳幹には M1 受容体がほとんど存在せず、M2 受容体の主である²⁶⁾。したがって前脳基底核破壊により排尿反射が亢進したラットにおいて *oxotremorine M* の側脳室投与により亢進した反射が抑制されたことから、次のような推測がなされた。すなわち、*ibotenic acid* により前脳基底核より大脳へ向かう投射系のプレシナプス側が破壊されることにより、ポストシナプスに多く存在する M1 受容体が *upregulation* されていると推測した。このことより、M1 受容体 agonist である *oxotremorine M* に対し強く反応し、これらの抑制性の投射が賦活されたと思われる。

SO 群において *oxotremorine M* の高用量にて、膀胱容量の減少が認められたのはなぜであるのか、*oxotremorine M* の脳幹部排尿中枢 (PMC) への作用も否定できなかったため、PMC に針を刺入し、*oxotremorine M* の局所投与の膀胱容量に対する変化を *urethane* 麻酔下で検討した。また同様の方法で、PMC 付近の第4脳室にも *oxotremorine M* の局所投与を行った。PMC への局所投与により膀胱容量は減少したが、この結果は Sugaya らの除脳ネコの青斑核 α (ヒトの排尿中枢に相当) にコリン作動性物質である *carbachol* を注入すると排尿反射の亢進したとの報告と一致し²⁷⁾、PMC に存在する M2 受容体が *oxotremorine M* や *carbachol* により刺激され排尿反射亢進を引き起こした可能性が示唆される。第4脳室へ投与直後排尿亢進がみられたのは、*oxotremorine M* が近隣する PMC

の M2 受容体を刺激したためと考えられるが、その後排尿反射の抑制がみられたのは、第4脳室内の oxotremorine M が時間の経過とともに側脳室へ移行し、しいては、大脳皮質を刺激したからではないかと思われた。また、oxotremorine M の BF 群に対する側脳室累積投与では高用量において膀胱容量が減少し、一方、単回投与時では高用量でも膀胱容量の増大が認められたのは、oxotremorine M の作用部位（大脳皮質側で反応して排尿反射を抑制する働きと脳幹部に作用し排尿反射を促進する働き）の相互作用によるのではないかと思われる。

Pirenzepine は、ムスカリン M1 受容体の antagonist であり、側脳室投与により BF ラット群、SO ラット群ともに膀胱容量の増大がみられ、排尿収縮圧の低下がみられたことにより排尿反射に対し抑制的に作用していた。M1 受容体 agonist の oxotremorine M が BF 群の排尿反射を抑制する結果が得られているが、antagonist である pirenzepine も抑制的に作用したのはなぜであろうか。Pirenzepine を PMC に直接投与しても排尿反射に変化がなかったことは、除脳ネコの青斑核 α に抗ムスカリン作用を有する oxybutynin を PMC に投与しても排尿反射に変化しなかったという報告^{28) 29)}に一致する。脳幹部には M1 受容体がほとんど存在しないための結果と考えられる。しかし、第4脳室内への pirenzepine 投与により膀胱容量が増大したが、これは、側脳室への効果によると考えられる。大脳皮質において、M1 受容体が GABA 受容体を抑制的に調節しているという報告³⁰⁾がある。また、GABA 受容体は排尿反射に対し、抑制的に投射している³¹⁾。したがって、本研究では、pirenzepine が大脳皮質に移行した大脳皮質 M1 受容体を遮断することにより GABA 系を賦活し排尿反射を抑制したと推測される。今後は、M1 受容体と GABA 受容体との関係についても検討する予定である。

現在、アルツハイマー型痴呆の治療薬として試みられている薬物は、ACh 賦活薬、神経ペプチド系作用薬、神経成長因子(NGF)作用薬等で、この中で最も多く試みられているのは ACh 系賦活薬である。我々の研究からアルツハイマー型痴呆の症状の1つである排尿反射亢進が oxotremorine M(低用量)で抑制されたことから、ACh 系賦活薬がアルツハイマー型痴呆に起因する頻尿、尿失禁に有効なのではないかと考えた。

総括

Ibotenic acid を用いた前脳基底核破壊により、アルツハイマー型痴呆の類似した病態モデルを作成し、排尿反射の亢進が生じることを確認した。このモデルを用いてアルツハイマー型痴呆による過活動型神経因性膀胱の発生機序について薬理的検討を行った。

- 1) Ibotenic acid 注入による前脳基底核破壊により、大脳皮質 CAT 活性は、約 30%の低下がみられた。
- 2) 前脳基底核破壊ラット(basal forebrain lesion rats ; BF 群)は偽手術ラット(sham operated rats ; SO 群)に比べ有意な膀胱容量の減少が認められた。
- 3) M1、M2 受容体アゴニストである oxotremorine M の右側脳室内累積投与により SO 群では高用量(15 pmol/5 μ l)で膀胱容量の有意な減少がみられた。BF 群では低用量(0.015, 0.15 pmol/5 μ l)で有意な膀胱容量の増大がみられ、高用量(15 pmol/5 μ l)で膀胱容量のは逆に減少し二相性の作用が認められた。
- 4) M1、M2 受容体アゴニストである oxotremorine M の右側脳室内単回投与により SO 群では高用量(15 pmol/5 μ l)で膀胱容量の有意な減少がみられた。BF 群では選択したすべての容量(0.015, 1.5, 15 pmol/5 μ l)で膀胱容量を有意に増大させた。
- 5) M1 受容体アンタゴニストである pirenzepine の右側脳室内単回投与により SO 群では高用量(100 nmol/5 μ l)で膀胱容量の有意な増大がみられた。BF 群も高用量(10 nmol/5 μ l)で有意な増大が認められた。BF 群は SO 群に比べ 10 分の 1 の低用量より増大反応が認められた。
- 6) 膀胱容量を変化させない低用量の pirenzepine を前投与したラットに oxotremorine M を投与すると、BF 群では、膀胱容量の増大が認められなかった。

- 7) 橋排尿中枢 (pontine micturition center; PMC) への oxotremorine M (1.5 pmol/1 μ l) 局所投与により膀胱容量は減少した。外尿道括約筋活動に変化は認められなかった。
- 8) PMC への pirenzepine (10 nmol/1 μ l) 局所投与により膀胱容量に変化は認められなかった。外尿道括約筋活動にも影響は認められなかった。
- 9) 第 4 脳室への oxotremorine M (15 pmol/1 μ l) 局所投与により膀胱容量の増大がみられた。外尿道括約筋活動は蓄尿時、軽度に低下していた。
- 10) 第 4 脳室への pirenzepine (100 nmol/1 μ l) 局所投与により膀胱容量の増大がみられた。外尿道括約筋活動にも膀胱容量の増大に伴って活動の亢進がみられた。

以上の結果から前脳基底核より大脳皮質に投射する ACh 系は排尿反射中枢に対し抑制的に投射していると考えられる。今回、前脳基底核破壊を行ったアルツハイマー型痴呆類似モデルにおいては、大脳皮質ムスカリン受容体を介する抑制系は、障害されることにより排尿反射の亢進が生していると思われる。この投射系は pirenzepine により遮断されることより M1 受容体を介するものであると思われる。脳幹部の橋排尿中枢における ACh 系は、おもに M2 受容体を介すると考えられ、これは排尿反射に対し促進性に作用していると推測された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御助言と御高見を賜りました、金沢大学医学部附属病院薬剤部 宮本謙一教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究は、並木幹夫教授（金沢大学医学部泌尿器科学教室）の終始、御懇切なる御指導と御鞭撻によるものであり、厚く御礼を申し上げますとともに、謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始、御指導、御助言を賜りました金沢大学医学部泌尿器科学教室 横山 修講師、小松和人助手に厚く御礼を申し上げますとともに、謹んで感謝の意を表します。

さらに、本研究に御助言、御協力戴きました病態解析学研究室ならびに泌尿器科学教室の諸氏、諸賢に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 平井俊策: アルツハイマー型痴呆と尿失禁. 老年精神医学雑誌 4: 27-31(1993).
- 2) 宇高不可思: 痴呆疾患における排尿障害—アルツハイマー型痴呆—, 排尿障害プラクティス, 2, 271-276 (1994).
- 3) Bowen, D. M. Allen, S. J. Benton, J. S.: Biochemical assessment of serotonergic and cholinergic dysfunction and cerebral atrophy in Alzheimers disease. *J. Neurochem.* 41: 266-272 (1983).
- 4) Etienne, P., Robitaille, Y., Wood, P.: Nucleus basalis neuronal loss, neuritic plaques and choline acetyltransferase activity in advanced Alzheimers disease. *Neuroscience* 19: 1279-1291 (1986).
- 5) Gottfries, C. G.: Alzheimers disease and senil dementia: Biochemical characteristics and aspects of treatment. *Psychopharmacology (Berlin)* 86: 245-252 (1985).
- 6) Arendt, T., Lehmann, K. Seeger, G.: Synergistic effects of tetrahydroaminoacridine and lithium on cholinergic function after excitotoxic basal forebrain lesions in rats. *Pharmacopsychiatry* 32: 242-247 (1999).
- 7) Senda, T., Matsuno, K., Kobayashi, T.: Ameliortative effects of SA4503, a novel cognitive enhancer, on the basal forebrain lesion-induced impairment of the Spatial learning performance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59: 129-134, (1991).
- 8) Flood, J. F., Cherkin, A.: Scopolamine effects on memory retention in mice: A model of dementia? *Behav. Neural. Biol.* 45: 169-184 (1986).
- 9) Yamazaki, M., Matsuoka, N., Maeda, N.: FR121196, a potential antidementia drug, ameliorates the impaired memory of rat in the Morris water maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 256-263 (1995).
- 10) Iwasaki, K., Matumoto, Y., Fujiyama, M.: Effect of Nebracetam on the disruption of spatial cognition in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 58: 117-126 (1992).
- 11) Tinklenberg, J. R., Melges, F. T., Hollister, L. E.: Marijuana and immediate memory. *Nature* 226: 1171-1172 (1970).
- 12) Fujiwara, M.: Impairment of spatial cognition in cerebral ischemia and drug evaluation for cognitive enhance. *J. Pharmacol.* 64 (Suppl) : 48-49 (1994).

- 13) Yamamoto, T., Koibuchi, Y., Miura, S.: Effects of vamicanide on urinary bladder functions in concius dog and rat model of urinary frequency. *J. Urol.* 154: 2174-2178 (1995).
- 14) Satoh, K., Shimizu, N., Tohyama, M.: Localization of the micturition reflex center at dorsolateral pontine tegmentum of the rat. *Neurosci. Lett.* 8: 27-33 (1978).
- 15) 渡辺 洸: 排尿障害のすべて—病態と治療—. 西沢 理, 井川靖彦, 石塚 修 編. 医薬ジャーナル社, 東京, pp. 21-23 (1998).
- 16) Bigl, V., Woolf, N., Butcter, L. L.: Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracter and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* 8: 727-749 (1982).
- 17) Shute, C. C. D., Lewis, P. R.: The ascending cholinergic reticular system : neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90: 497-520 (1967).
- 18) Lehmann, J., Nagy, J., Atmadja, S.: The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. *Neuroscience* 5: 1161-1174 (1977).
- 19) Armstrong, D. A., Saper, C. B., Levy, A. I.: Distribution of cholinergic neurons in the rat brain: demonstrated by the immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* 216: 53-68 (1983).
- 20) Ishii, T.: Distribution of Alzheimers neurofibrillary changes in the brain stem and hypothalamus of senile dementia. *Acta Neuropathol.* 6: 181-187 (1966).
- 21) Pilleri, G.: The Kluver-Bucy syndrome in man-a clinico-anatomical contribution to the function of medial temporal lobe strutres. *Psychiat. Neurol.(Basel)*. 152: 65-103 (1966).
- 22) Whitehouse, P. J., Price, D. L., Clark, A.W.: Alzheimers disease : evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.* 10: 122-126 (1981).
- 23) 桐野高明 : 脳虚血とは何か. 脳虚血の分子医学, pp. 12-20, 羊土社 (1994).
- 24) Ikeda, K., Egashira, T., Yamashita, J.: Effect of autotransplantation and bifemelane Hydrochloride on cholinergic markers and event-related potentials in rats with lesions Of the nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res.* 688: 171-183 (1995).

- 25) Fargeas, M., Fioramonti, J., Bueno, L.: Central muscarinic control of the pattern of small intestinal motility in rats. *Life Sci.* 27: 1709-1715 (1987).
- 26) Mash, D. C., Potter, L. T.: Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19: 551-564 (1986).
- 27) Sugaya, K., Matsuyama, K.: Effects of chemical stimulation to the pontine micturition center of the cat. *Neurosci. Res. (Suppl)*, 5: S23 (1987).
- 28) 会田陽子, 金子洋子, 笠間俊夫: Oxybutynin hydrochloride の摘出平滑筋 (回腸膀胱および尿道) に対する作用. *日薬理誌*, 87: 629-639 (1989).
- 29) 菅谷公男, 西沢 理, 能登宏光: 橋における baclofen、inaperisone と oxobutynin 下部尿路機能に及ぼす効果とその作用部位の検討. *自律神経*, 28:513-521(1991).
- 30) Hashimoto, T., Shu, H., Kuriyama, K.: Muscarinic M1 receptor mediated inhibition of GABA release from rat cerebral cortex. *Neurochem. Int.* 24(4): 389-94 (1994).
- 31) 蟹江小葉子: 脳梗塞ラットの過活動型膀胱における GABA の関与. 修士論文, 金沢大学 (1998)