

〈原著論文〉

水素水はラット下部尿路閉塞モデルにおける膀胱機能改善効果を示す

清水 真次朗

川崎医科大学泌尿器科学

抄録 下部尿路症状 (low urinary tract symptoms: LUTS) は、動脈硬化や前立腺肥大症に伴う下部尿路閉塞による膀胱血流障害が原因の一つとして考えられており、症状として排尿症状、畜尿症状、排尿後症状がある。ラットの下部尿路閉塞 (bladder outlet obstruction: BOO) モデルは閉塞に伴い膀胱虚血を生じさせ、酸化ストレス状態を惹起し、LUTS を引き起こす病態モデルとして確立されている。近年、水素がもつ抗酸化、抗アポトーシス作用が注目されており、様々な臓器において組織の保護作用を示すことが解明され、様々な疾患の予防と治療に応用できることが多施設、多領域から報告されている。今回、ラット BOO モデルに対して、水素水 (Hydrogen Water: H₂) 投与を行い、抗酸化作用の検証に加え、水素水が影響を及ぼす代表的メディエーターの探索を行った。

BOO モデルの作成には、9週齢の雌性ラットを用いた。開腹し、尿道に19G 針を沿わせた状態で尿道を結紮し、尿道の部分閉塞を作成した。作成直後から sham 群、水素水非投与 (BOO H₂(-)) 群と投与 (BOO H₂(+)) 群に分け、4週間後、膀胱機能検査と組織学的、生化学的および免疫組織学的検討を行った。なお、水素水は経口投与した。

膀胱重量および一回排尿量は、sham 群に対して BOO H₂(+) 群で有意差はなかったが、BOO H₂(-) 群で有意に増加していた (重量 p<0.01), (一回排尿量 p<0.05)。BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群では有意差は認めなかった (p>0.05)。膀胱内圧測定では、BOO 群で排尿筋過活動が確認され、BOO H₂(-) 群では、BOO H₂(+) 群と比較して、排尿筋過活動回数は有意に増加していた (p<0.01)。膀胱筋層部における膠原繊維の比率については、BOO H₂(-) 群で sham 群および BOO H₂(+) 群と比較して、有意に上昇していた (vs sham p<0.01, vs BOO H₂(+) p<0.01)。膀胱組織内8-OHdG の定量では、BOO H₂(-) 群は BOO H₂(+) 群と比較して高値を示しており (p<0.05)、8-OHdG 染色では BOO H₂(-) 群のみ筋層で著明な発現が認められた。網羅的サイトカイン/ケモカイン解析では TNF- α が、BOO H₂(-) 群において BOO H₂(+) 群と比較してもっとも発現が亢進しており、免疫染色では、BOO H₂(-) 群で膀胱上皮粘膜下の間質および筋層においての発現の増加が認められた。一方、BOO H₂(+) 群では、筋層部においての発現が抑制されていた。

水素水は、慢性虚血に起因する下部尿路症状の治療の一つになり得る可能性がある。本研究において、膀胱筋層の酸化ストレスを抑制することにより、膀胱筋層の TNF- α を中心とした炎症性サイトカインの抑制が、その作用機序の一つとして考えられた。

doi:10.11482/KMJ-J44(2)137 (平成30年10月4日受理)

キーワード：下部尿路閉塞, 下部尿路症状, 水素水, 酸化ストレス

別刷請求先

清水 真次朗

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学泌尿器科学

電話：086 (463) 4747

ファックス：086 (462) 7897

Eメール：sshimizu@med.kawasaki-m.ac.jp

緒言

下部尿路症状 (low urinary tract symptoms: LUTS) は、下部尿路の機能障害によって生じるすべての症状の総称と定義されている^{1, 2)}。LUTS は、膀胱の血流障害が原因の一つと考えられており、膀胱の血流障害は、加齢やメタボリック症候群による動脈硬化や前立腺肥大症に伴う下部尿路閉塞によっておこる^{3, 4)}。ラットの下部尿路閉塞 (bladder outlet obstruction: BOO) モデルでは閉塞に伴い膀胱虚血を生じさせ、前立腺肥大症に伴う過活動膀胱や膀胱収縮障害のモデルとして用いられている⁵⁾。蓄尿時には虚血状態となり、排尿後には組織再灌流が起こり、酸化ストレスを誘導する。このサイクルが繰り返し起こることにより、膀胱の虚血再灌流の程度が中程度では排尿筋過活動による畜尿症状を呈し、重度となるとさらに排尿筋低活動を呈する⁶⁻⁸⁾。

2007年に Ohsawa らが、脳の虚血再灌流の研究において水素がもつ抗酸化、抗アポトーシス作用による臓器保護作用を示し、また、様々な疾患の予防と治療に応用できることも報告した⁹⁾。その後も諸家により虚血再灌流における動物実験が行われ、心臓^{10, 11)}、肝臓¹²⁾においても水素の臓器保護効果の報告がなされてきた。

水素は生体内で容易に拡散し酸化力の高い活性酸素であるヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) のみを抑制する。虚血再灌流では、そのサイクルで大量に $\cdot\text{OH}$ が放出され、組織障害が引き起こされる。

LUTS の病態の一つは、膀胱の虚血再灌流による酸化ストレスによって生じる排尿筋障害であり、これに対し、水素の持つ抗酸化作用に着目し、本研究の着想に至った。本研究では、ラット BOO モデルにおいて、水素水 (Hydrogen Water: H_2) の投与を行い、その治療効果の検討と膀胱における水素水の作用機序の解析を行うとともに膀胱虚血の新規 molecular marker の検索を行った。

対象と方法

水素水 (H_2) (図1)

H_2 SERVER 水素水冷温水サーバー (株式会社ドクターズチョイス, 日本, 東京) で作られた水素水を専用アルミボトルに入れてゲージで投与を行った。濃度変化を図1に示す。

水素濃度維持のため、12時間ごとに水素水の交換を行った。

水素発生量 20~30 cc/min, 溶存水素濃度 1.2~1.6 ppm

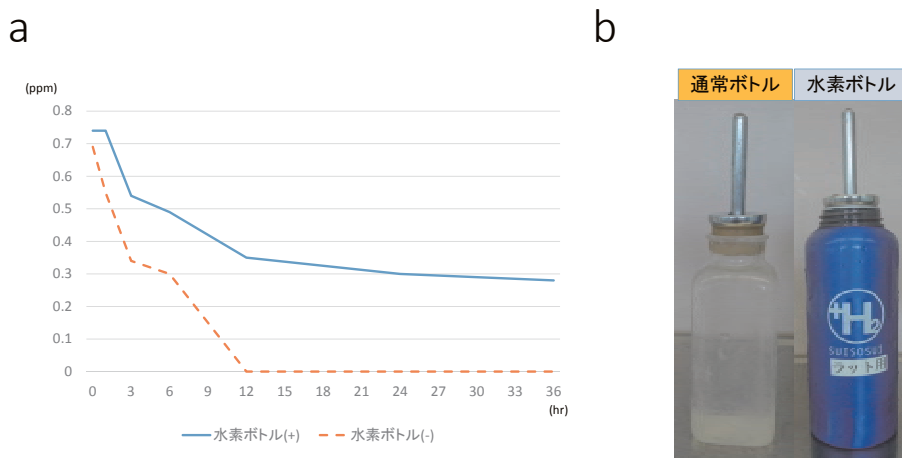


図1 経時的な水素濃度 (a) と専用ボトル (b)

a: ポータブル溶存水素計にて計測。通常ボトルでは12時間後には水素水濃度はゼロとなる。—: 水素水ボトル …: 通常ボトル

b: 通常ボトル (左) と水素水専用ボトル (右)

ラット下部尿路閉塞モデルの作成

9週齢、雌性、Sprague-Dawley (SD) ラットに対して、セボフルラン（導入5%、維持4%、Pfizer Japan Inc., Tokyo）を用いて吸入麻酔下にて下腹部正中切開を行い、膀胱を露出させ尿道周囲の脂肪織と結合織を剥離した。膀胱頸部の尿道に19ゲージ針を沿わせた状態で尿道を結紮し、尿道部分閉塞を作った⁸⁾。Sham手術として、尿道露出まで同様の手技を行った。

Sham群、BOO H₂(-)群、BOO H₂(+)群の3群に分け、4週間飼育した後、膀胱内圧測定と組織学的、生化学的および免疫組織学的検討を行った。

本研究は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.17-068)、川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

膀胱機能検査

セボフルラン（導入5%、維持4%、Pfizer Japan Inc., Tokyo）を用いて吸入麻酔下にて下腹部正中切開し、膀胱を露出させた。膀胱頂部から24ゲージ留置針（サーフロー®留置針24G）を挿入し、予め膀胱頂部に巾着状にかけておいた3-0バイクルで膀胱に固定し、留置した。セボフルランを1.5%程度に下げ、浅麻酔状態とした。シリンジポンプ（KDS200、株式会社ブレインサイエンス・イデア、大阪、日本）から膀胱留置カテーテルを經由して生理食塩水を膀胱内に持続注入し、膀胱内圧をモニターした。生理食塩水の注入速度はsham群では6 ml/hr、BOOラットでは18 ml/hrとした。注入速度の決定は、以前の報告からBOO群は比較対象群より膀胱容量が大きいことを加味し⁸⁾、両群のラット共に10分以内で排尿が数回観察できるように先行実験にて調節を行って決定した。膀胱内圧は多用途測定記録装置（ポリグラフシステムRM-6000、日本光電、東京、日本）で測定し、LabChart Reader（バイオリサーチセンター株式会社、名古屋、東京）で収録した。また、小動物用体温保持装置システム（BWT-100A、バイオリサーチセンター株式会社、名古屋、日本）

を用いて、体温を37℃に保温した。膀胱内圧測定とともに一回排尿量と排尿時圧（排尿時の膀胱収縮の最大圧）、排尿筋過活動回数（30分間での排尿とは無関係な膀胱収縮の発生回数）を記録した。

膀胱重量測定

摘出した膀胱は周囲脂肪組織を取り除き、尿を完全に排出したのち、電気式はかり（RJ-320、新光電子株式会社、東京、日本）にて重量測定した。

組織学的解析

膀胱は10%ホルマリン（マイルドホルム10N、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪、日本）で固定し、エタノールにより脱水処理を加えた後、パラフィン包埋を行った。5 μmでパラフィン切片を作成し、脱パラフィン後にヘマトキシリン&エオジン（HE）染色およびマッソントリクロール染色を行い、光学顕微鏡（Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan）を用いて組織学的解析を行った。膀胱筋層における膠原繊維の比率は、赤色（筋層）と青色（膠原繊維）に対する青色の割合（青/(赤+青)）をパーセンテージで計算した。計算方法は、強拡大(100倍)で4視野を選択し、画像解析・計算ソフトウェア（WinROOF 2018 Ver. 4.0、三谷商事株式会社、大阪）を用いて算出した。

8-OHdGの発現解析

摘出組織にCell Lysis Buffer®（ホスファターゼ阻害薬・プロテアーゼ阻害薬含有、Cell signaling technology, CA, USA）、PMSF（1 mM, Cell signaling technology, CA, USA）を加え、ホモジナイザーによる破碎を行った。遠心分離（15,000×g、5分間、5℃）を行った後、組織片を除去した。膀胱における8-OHdGの発現を8-OHdG ELISA Kit（NIKKEN SEIL Co, Ltd, JaICA, Japan）を用いて検討した。測定機器はVarioskan Flash®（Thermo Fisher Scientific, Weltham, MA, USA）を用いて、測定波長を540

nm に設定し、吸光度を測定することで定量検査を行った。

8-OHdG の免疫組織学的解析

パラフィン包埋組織を 5 μm 厚で薄切し、脱パラフィン後に BLOXALLTM (Vector laboratories, CA, USA) を用いてブロッッキング処理 (室温, 10 分間) を行った。1 次抗体は, anti-rabbit 8-OHdG antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 2.5% normal horse serum (Vector laboratories, CA, USA) で 100 倍希釈して使用した。(4 $^{\circ}\text{C}$, overnight)。2 次抗体として免疫染色試薬 ImmPRESSTM -Alkaline Phosphatase (AP) Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit[®] (Vector laboratories, CA, USA) を用いた。免疫染色基質として, ImmPACT Vector Red Alkaline Phosphatase (AP) Substrate[®] (Vector laboratories, CA, USA) を用いた。対比染色として 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector laboratories, CA, USA) を用いて核染色を行い, VectaMount Permanent Mounting Medium[®] (Vector laboratories, CA, USA) により封入を行った後, 蛍光顕微鏡 (Olympus BX-53, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて免疫組織学的検討を行った。

網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査および免疫組織学的解析

ホモジナイズを行い, 組織片を除去した膀胱サンプル内のタンパク濃度を 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に

調整し, Rat Cytokine Antibody Array kit (R&D Systems, MN, USA) を用いて網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査を行った。画像解析装置 Image Quant LAS4000 mini[®] (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan), 画像解析ソフトウェア Image Quant TL[®] (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いて pixel density (PD) を算出し, PD ratio は BOO H₂(-) / BOO H₂(+) 比を用いた。網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査の中から群間で差異のあったサイトカイン/ケモカインに対し, 免疫組織学的解析を加えた。

統計学的解析

3 群間の比較には Tukey-Kramer 法を用い, $P < 0.05$ を有意とした。統計解析は Microsoft Excel 2016 edition を使用した。

結果

膀胱重量, 膀胱機能検査 (表 1)

Sham 群 8 匹, BOO H₂(-) 群 11 匹, BOO H₂(+) 群 11 匹について, 膀胱重量測定および膀胱内圧測定 (一回排尿量, 排尿時圧, 排尿筋過活動回数) (表 1, 図 2) を行った。膀胱重量は, sham 群, BOO H₂(-) 群, BOO H₂(+) 群, でそれぞれ 103.5 ± 4.3 (平均値 \pm 標準誤差) mg, 310.3 ± 53.6 mg, 234.4 ± 40.0 mg であり, sham 群に対して, BOO H₂(-) 群は約 3.0 倍, BOO H₂(+) 群では, 約 2.3 倍であった。BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群間で有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。一回排尿量は BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群間で有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。一回排尿量は BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群間で有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。

表 1 膀胱重量および膀胱機能検査

| | Mean \pm SE Sham Operated | Mean \pm SE BOO H ₂ (-) | Mean \pm SE BOO H ₂ (+) |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 膀胱重量 (mg) | 103.50 \pm 4.33 | 310.28 \pm 53.57** | 234.40 \pm 39.97 |
| 一回排尿量 (ml) | 0.34 \pm 0.03 | 1.69 \pm 0.38* | 0.99 \pm 0.26 |
| 排尿時圧 (cmH ₂ O) | 81.89 \pm 5.72 | 134.00 \pm 6.85** | 81.46 \pm 3.42 ‡ |
| 排尿筋過活動回数 (times/0.5hr) | 0.80 \pm 0.25 | 7.75 \pm 0.77** | 2.80 \pm 0.65* ‡ |

* $p < 0.05$ vs sham operated

** $p < 0.01$ vs sham operated

‡ $p < 0.01$ vs BOO H₂(-)

膀胱重量および一回排尿量は sham 群に対して BOO H₂(-) 群で有意に増加していた。排尿時圧は BOO H₂(-) 群で sham に対して有意に上昇していた。BOO H₂(+) 群では sham に対して上昇はなかった。排尿筋過活動の回数は, sham 群に対して BOO モデルで有意に回数が増加した。BOO H₂(+) 群は BOO H₂(-) 群より排尿筋過活動回数は少なかった。

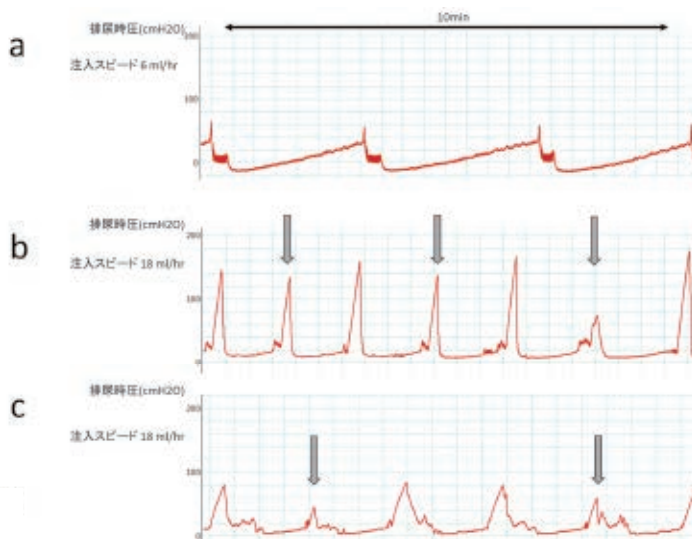


図2 膀胱内圧測定
Sham 群 (a), BOO H₂(-) 群 (b), BOO H₂(+) 群 (c). aでは規則正しく排尿が行われている。b, cにおいて排尿筋過活動が観察される。↓：排尿筋過活動

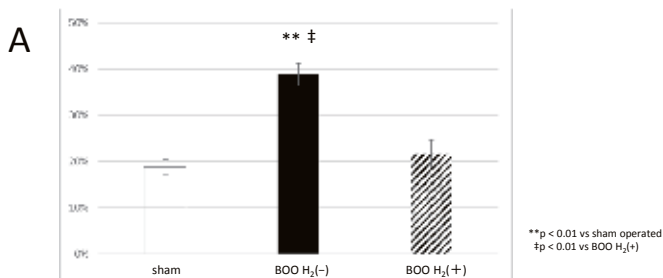
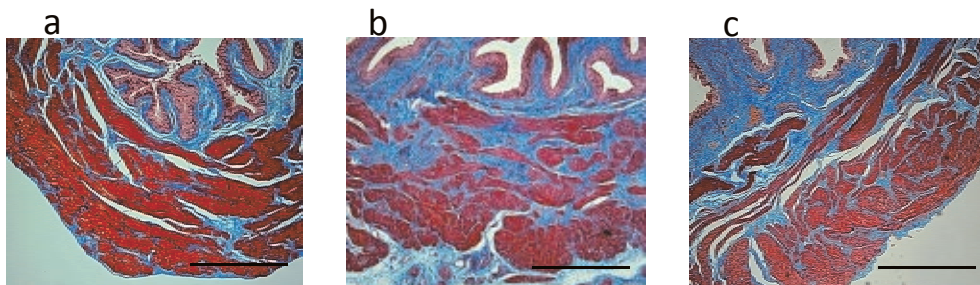


図3 膀胱の Masson trichrome 染色像
Sham 群 (a), BOO H₂(-) 群 (b), BOO H₂(+) 群 (c). 赤:膀胱平滑筋, 青:膠原繊維. グラフ (A) は膀胱筋層部における膠原繊維の比率. BOO H₂(-) で筋層部における膠原繊維の比率が高い. スケールバー: 300 μm, 観察倍率は100倍

(-) 群と BOO H₂(+) 群間で有意差はなかった (p>0.05) が, 排尿時圧は BOO H₂(-) 群で BOO H₂(+) 群に対して有意に上昇していた (p<0.01). Sham 群で排尿筋過活動はほとんど観察されなかったが, BOO 群では, 排尿筋過活動が観察され, BOO H₂(+) 群で BOO H₂(-) 群と

比較して, 排尿筋過活動回数は有意に少なかった (p<0.01).

組織学的解析 (図3)

Sham 群に対して BOO 群では筋層の菲薄化を認めた. 膀胱筋層部における膠原繊維の比

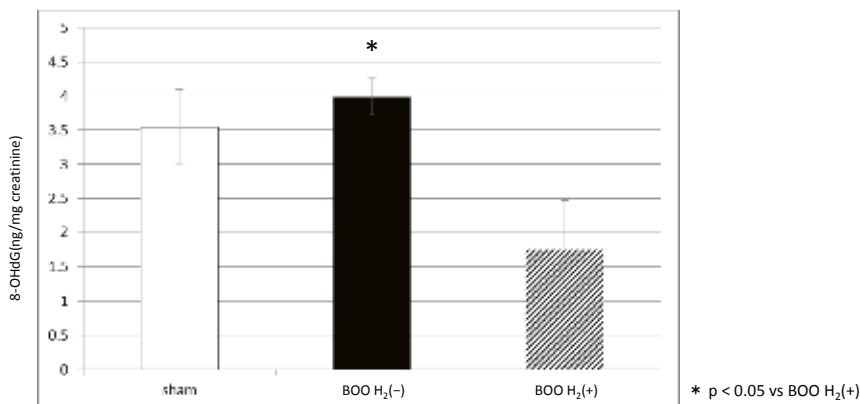


図4 8-OHdG 定量検査

BOO H₂(-) 群は BOO H₂(+) 群に対して高値を示していた (p=0.04).

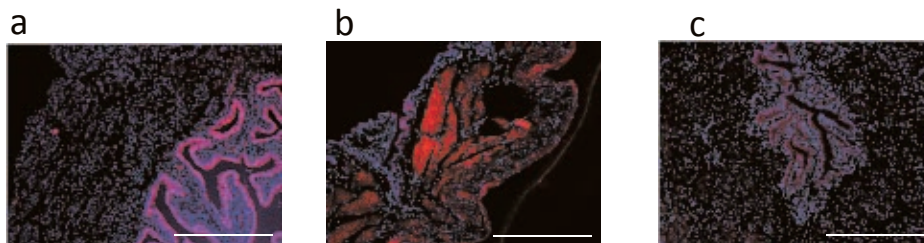


図5 8-OHdG 免疫組織像

Sham 群 (a), BOO H₂(-) 群 (b), BOO H₂(+) 群 (c). Sham 群と BOO H₂(+) 群では筋層部での発現は乏しいが, BOO H₂(-) 群では, 筋層部の発現を認める. 対比染色: DAPI 核染色, スケールバー: 500 μm, 観察倍率は100倍.

率については, sham 群, BOO H₂(-) 群, BOO H₂(+) 群でそれぞれ 18.6 ± 1.7 (平均値 ± 標準誤差), 38.9 ± 2.4 , 21.6 ± 3.1 であり, BOO H₂(-) 群で sham 群および BOO H₂(+) 群に比して, 有意に増加していた. (vs sham p<0.01, vs H₂(+) p=0.01)

8-OHdG の生化学的解析と免疫組織学的解析 (図4, 図5)

膀胱組織内8-OHdG 定量では, sham 群, BOO H₂(-) 群, BOO H₂(+) 群でそれぞれ 3.5 ± 0.6 (平均値 ± 標準誤差) ng/mg, 4.0 ± 0.3 ng/mg, 1.8 ± 0.7 ng/mg であり, BOO H₂(-) 群は BOO H₂(+) 群に対して高値を示していた (p<0.01). BOO H₂(-) 群で筋層の発色が示された.

網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査および TNF-α の発現 (図6, 図7)

29種類のサイトカイン/ケモカインの中から, BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群間での差異が大きかった上位10種類を図6に示す. 炎症性サイトカインである TNF-α が, BOO H₂(-) 群において BOO H₂(+) 群と比較してもっとも発現が亢進していた (5-fold 以上). 次に, TNF-α の発現と局在を解析するために免疫染色を行った. 1次抗体は, TNF-α (D1G2) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, MA, USA) を用い, 400倍希釈して使用した. BOO H₂(-) 群では, 膀胱上皮粘膜下の間質および筋層において発現が増加していた. BOO H₂(+) 群では, 間質においては BOO H₂(-) 群と同程度の発現を認めたが, 筋層部においてのその

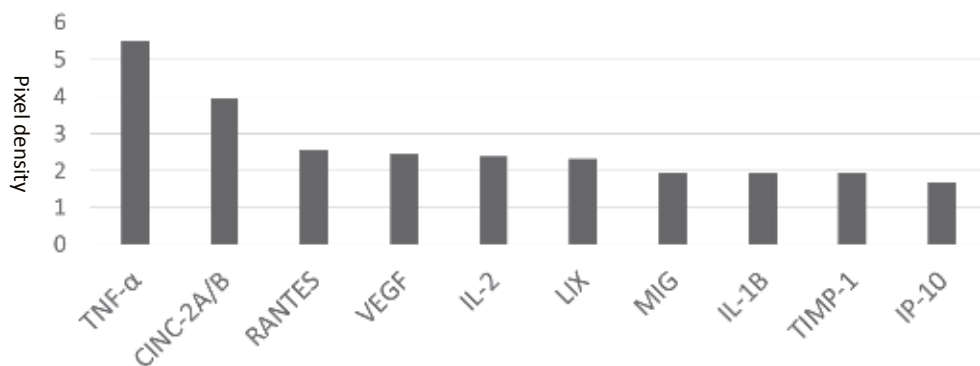


図6 網羅的サイトカイン/ケモカイン定量検査

29種類のサイトカイン/ケモカインの中から、BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群間での差異が大きかった上位10種類を示す。炎症性サイトカインである TNF- α で BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群でもっとも差異があった。

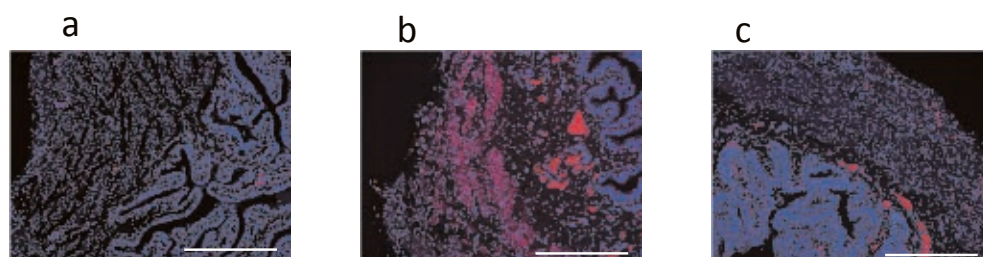


図7 TNF- α 免疫組織染色像

Sham 群 (a), BOO H₂(-) 群 (b), BOO H₂(+) 群 (c). Sham 群では TNF- α の発現はほとんどない。BOO H₂(-) 群では膀胱上皮粘膜下の間質および筋層まで広域に発現を認める。BOO H₂(+) 群では、間質において発現は認めるが、筋層部位では発現は抑制されている。対比染色:DAPI 核染色, スケールバー: 500 μ m, 観察倍率は100倍

発現は抑制されていた。

考察

水素に関する論文は、年々増加しており、2007年の Ohsawa ら⁹⁾の報告に始まり現在まで、数百件にのぼる¹³⁾。糖尿病¹⁴⁾、動脈硬化¹⁵⁾、肥満¹⁶⁾、舌癌¹⁷⁾ など多くの疾患、生活習慣病への治療に効果が期待できるばかりでなく、潜在的な危険状態にある病態への予防医学的見地からも、様々な領域で注目されている。水素の確立された投与方法としては、吸入¹⁸⁾、注射¹⁹⁾、点眼²⁰⁾ および経口投与があり、疾患ごとに至適投与方法は決定される。

酸化ストレスは、酸素の代謝過程から産生される活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) の過剰な状態で、生体膜や組織を構成する生体

内分子を損傷し、結果として様々な疾患を誘発する。水素は ROS の中でも酸化力の強いヒドロキシラジカル (\cdot OH) を還元することにより抗酸化作用を示す。生体膜にあるリン脂質の一つである1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスファジルコリン (PAPC) が酸化によって放出する脂質メディエーターを水素水が改変し、その結果、転写因子の活性を低下させ、様々な遺伝子発現を制御することがわかっている。水素は、不活性であるため、酸化ストレスがない時は効果を発揮せず、フリーラジカルの連鎖反応が亢進しているときのみにその効果を発揮する²¹⁾。

ラット BOO モデルでは、下部尿路閉塞に伴う二次的膀胱虚血により LUTS を呈する⁶⁾。畜尿時から排尿時にかけての高圧状態が膀胱壁の

張力を増大させ虚血状態となり、排尿後には組織再灌流が起こり、酸化ストレスを誘導する。膀胱血流低下の評価は、ペンシル型 CCD 生体顕微鏡による膀胱壁微小循環の評価で確認されており、BOO 群は sham 群と比較して有意な血流の低下する²²⁾。このサイクルが繰り返し起こることにより、膀胱の虚血再灌流の程度が中程度では排尿筋過活動による畜尿症状を呈し、重度となるとさらに排尿筋低活動を呈する。この膀胱組織障害の早期の段階で、さまざまなメディエーターが尿路上皮細胞や膀胱壁から放出され、膀胱平滑筋の組織学的変化や膀胱求心路の活性化が惹起される^{23, 24)}。

今回、我々は水素水のもつ抗酸化作用に着目し、前述機序による二次的に膀胱虚血を生じるラット BOO モデルにおける効果を検証した。また、膀胱における水素水の作用機序の解析を行うとともに新規 molecular marker の検索を行った。水素水を投与することによって、BOO モデルで認められた排尿筋過活動は抑制された。今回は、臨床への応用を目指し経口投与方法を選択した。実際の臨床での適応としては、膀胱虚血により生じた排尿筋過活動がある過活動膀胱の患者がよい適応と考えられた。水素水投与により排尿筋過活動が抑制された機序を解明するために、膀胱の組織学的検討、膀胱組織の酸化ストレスの測定および網羅的サイトカイン/ケモカイン解析を行った。組織学的検討では BOO H₂(-) 群ではもともと膀胱筋層における膠原繊維の増加が観察され、排尿時圧は BOO H₂(-) 群で最も高かった。一方、BOO H₂(+) 群では膠原繊維の増加が抑制されていた。一般に膀胱内圧と膀胱血流は負の相関がある。膀胱内圧が高くなるほど、膀胱血流が低下する²⁵⁾。BOO 群では高度な膀胱虚血が生じていることが推測されたが、水素水は、虚血再灌流後の膀胱筋層での組織保護作用を有していることが判明した。また、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の発現において、筋層部における発現のみで差異を認め、BOO H₂(-) 群で BOO H₂(+) 群と比較して発現が高かった。

つまり、水素水の BOO モデルでの作用の中心は膀胱上皮でなく筋層であることが判明した。また、sham 群は BOO H₂(-) 群と同程度の発現で、BOO H₂(+) 群で発現が低かった。これは、前述の水素はフリーラジカルの連鎖反応が亢進しているときのみはその効果を発揮する²²⁾ という観点から、BOO H₂(+) 群でのみ効果を発揮したと考える。そのため、BOO H₂(+) 群では sham 群と比較し、上皮の発現が低下している。

網羅的サイトカイン/ケモカイン解析によって、BOO H₂(-) 群と BOO H₂(+) 群で、数種類の炎症性サイトカインに発現の差異を認めた。その中で、TNF- α は 5-fold 以上の差異を認めた。免疫染色において、BOO H₂(-) 群では、膀胱粘膜下と筋層部で、BOO H₂(+) 群では、粘膜下に発現を認めたが、筋層部の発現は低下していた。8-OHdG と同様に、筋層部での発現に変化が認められた。この結果から、膀胱筋層において、8-OHdG を介した TNF- α の発現が、膀胱虚血での LUTS を引き起こすことが推測された。膀胱上皮から間質の異常を主体とする間質性膀胱炎に対する水素水投与の報告では、プラセボと比較して治療効果に有意差は認められていない²⁶⁾。今回の検討により、水素水の作用部位が膀胱筋層であったことより、間質性膀胱炎においては効果が乏しかったものと推測できる。他の膀胱疾患においては、慢性虚血かつ筋層障害が中心となる放射線性膀胱炎等にも水素水の効果が期待できるものと考えられる。

TNF- α は多面発現性サイトカインで、活性化されたマクロファージで産生され、その主要な役割は免疫細胞の調節である²⁷⁾。TNF- α 産生の異常は癌や炎症性腸疾患を引き起こすことが知られている^{28, 29)}。しかし、TNF- α と膀胱機能についての報告は数少ない。高脂肪食誘発メタボリック症候群マウスにおいて、排尿筋過活動を主とする LUTS を呈することが知られているが、Fan らは、PKC (protein kinase) と NF- κ B (nuclear factor- κ B) を介した TNF- α の産生亢進が膀胱筋層障害を惹起させると報告して

いる³⁰⁾。高脂肪食誘発メタボリック症候群マウスにおいては、高血圧、動脈硬化および前立腺肥大を呈することが知られており、LUTSを呈する原因としては膀胱虚血が考えられ、本研究と同様の結果であった。Iuchiらは、酸化ストレス下の培養細胞において、水素水を投与することで、転写因子であるNFAT (Nuclear factor of activated T-cells) の発現を低下させ、TNF- α を含むサイトカインの産生を抑制したと報告している²¹⁾。

臨床現場において、LUTSの診断と重症度評価に重要な指標となっているのは自覚症状であるが、一方で、LUTSの病態把握などを数値化、定量化する指標としてバイオマーカーが注目されている³¹⁾。特に非侵襲的に採取できる尿での研究が進んでおり、LUTSの尿中バイオマーカーとして、NGF (神経成長因子: nerve growth factor)^{32, 33)}、BDNF (脳由来神経栄養因子: brain-derived neurotrophic factor)³⁴⁾、PGs (プロスタグランジン)³⁵⁾、8-OHdG^{36, 37)}などが報告されている。しかし、疾患特異性や再現性に問題があり、実用化には程遠いのが現状である。先に述べた高脂肪食誘発メタボリック症候群マウスにおいて、Fanらは、血清TNF- α 値と膀胱収縮能についての相関性を述べている²⁹⁾。今回、網羅的サイトカイン/ケモカイン解析によって、確認されたTNF- α を中心としたサイトカインは、膀胱組織内における結果であるが、今後尿中において、これらのバイオマーカー研究を進めていき、膀胱虚血で生じるLUTSの血中または尿中の新規バイオマーカーとなれば、患者さんにとって福音となる。

本研究によって、水素水は慢性虚血に起因する下部尿路症状の治療の一つになり得る可能性が示唆された。その作用機序の一つとして、膀胱筋層のTNF- α を中心とした炎症性サイトカインの抑制による膀胱筋層の酸化ストレスの抑制が考えられた。また、これらサイトカインは膀胱虚血における新規尿中 molecular maker の候補となる可能性があると考えられた。

結 語

- ・ラット下部尿路閉塞モデルを作成し水素水を投与した
- ・水素は慢性虚血に起因する下部尿路症状の治療の一つになり得る可能性が示唆された

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閲を賜りました川崎医科大学泌尿器科学教授 永井敦先生、川崎医科大学泌尿器科学講師 原綾英先生には、深なる謝意を表します。なお、本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 (課題番号 27基-102) により行われた。

引用文献

- 1) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A: Standardisation Sub-committee of the International Continence Society: The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 21: 167-178, 2002
- 2) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A: Standardisation Sub-Committee of the International Continence Society: The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 61: 37-49, 2003
- 3) Pinggera G, Mitterberger M, Steiner E, Pallwein L, Frauscher F, Aigner F, Bartsch G, Strasser H: Association of lower urinary tract symptoms and chronic ischaemia of the lower urinary tract in elderly women and men: assessment using colour Doppler ultrasonography. *BJU Int* 102: 470-474, 2008
- 4) Ponholzer A, Temml C, Wehrberger C, Marszalek M, Madersbacher S: The association between vascular risk factors and lower urinary tract symptoms in both sexes. *Eur Urol* 50: 581-586, 2006
- 5) Igawa Y, Kumano S, Aizawa N, Saito Y, Ito H, Watanabe S, Takahashi N, Tajimi M, Nishimatsu H, Homma Y: Changes in the function and expression of T-type and N-type calcium channels in the rat bladder after bladder outlet obstruction. *J Urol* 191: 1159-1167, 2014
- 6) Yamaguchi O, Nomiya M, Andersson KE: Functional

- consequences of chronic bladder ischemia. *Neurourol Urodyn* 33: 54-58, 2014
- 7) Oka M, Fukui T, Ueda M, Tagaya M, Oyama T, Tanaka M: Suppression of bladder oxidative stress and inflammation by a phytotherapeutic agent in a rat model of partial bladder outlet obstruction. *J Urol* 182: 382-390, 2009
 - 8) Shimizu S, Saito M, Oiwa H, *et al.*: Olmesartan ameliorates urinary dysfunction in the spontaneously hypertensive rat via recovering bladder blood flow and decreasing oxidative stress. *Neurourol Urodyn* 33: 350-357, 2014.
 - 9) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694, 2007
 - 10) Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, *et al.*: Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 30-35, 2008
 - 11) Sakai K, Cho S, Shibata I, Yoshitomi O, Maekawa T, Sumikawa K: Inhalation of hydrogen gas protects against myocardial stunning and infarction in swine. *Scand Cardiovasc J* 46: 183-189, 2012
 - 12) Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S: Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 670-674, 2007
 - 13) Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K: Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen - comprehensive review of 321 original articles. *Med Gas Res* 5: 12, 2015
 - 14) Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S: Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice. *Obesity* 19: 1396-1403, 2011
 - 15) Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S: Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 1195-1198, 2008
 - 16) Katakura M, Hashimoto M, Tanabe Y, Shido O: Hydrogen-rich water inhibits glucose and α , β -dicarbonyl compound-induced reactive oxygen species production in the SHR. *Cg-Leprcp/NDmcr rat kidney. Med Gas Res* 9: 18, 2012
 - 17) Saitoh Y, Okayasu H, Xiao L, Harata Y, Miwa N: Neutral pH hydrogen-enriched electrolyzed water achieves tumor-preferential clonal growth inhibition over normal cells and tumor invasion inhibition concurrently with intracellular oxidant repression. *Oncol Res* 17: 247-255, 2008
 - 18) Ono H, Nishijima Y, Adachi N, *et al.*: Improved brain MRI indices in the acute brain stem infarct sites treated with hydroxyl radical scavengers, Edaravone and hydrogen, as compared to Edaravone alone. A non-controlled study. *Med Gas Res* 7: 12, 2011
 - 19) Nagatani K, Nawashiro H, Takeuchi S, Tamura S, Otani N, Osada H, Wada K, Katoh H, Tsuzuki N, Mori K: Safety of intravenous administration of hydrogen-enriched fluid in patients with acute cerebral ischemia: initial clinical studies. *MedGas Res* 3: 13, 2013
 - 20) Kubota M, Shimmura S, Kubota S, *et al.*: Hydrogen and N-acetyl-L-cysteine rescue oxidative stress-induced angiogenesis in a mouse corneal alkali-burn model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 427-433, 2011
 - 21) Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S: Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci Rep* 7: 18971, 2016
 - 22) Mine S, Yamamoto T, Mizuno H, Endo K, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M: Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in rat model of bladder outlet obstruction using pencil lens charge-coupled device microscopy system. *Urology* 81: 155-159, 2013
 - 23) Yamaguchi O, Nishizawa O, Takeda M, *et al.*: Clinical guidelines for overactive bladder. *Int J Urol* 16: 126-142, 2009
 - 24) Abrams P, Andersson KE, Birdir L, *et al.*: Fourth International Consultation on Incontinence Recommendations of the International Scientific Committee: Evaluation and treatment of urinary incontinence, pelvic organ prolapse, and fecal incontinence. *Neurourol Urodyn* 29: 213-240, 2010
 - 25) Saito M, Miyagawa I: Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats. *J Urol* 165: 1745-1747, 2001
 - 26) Matsumoto S, Ueda T, Kakizaki H: Effect of supplementation with hydrogen-rich water in patients with interstitial cystitis/painful bladder syndrome.

- Urology 81: 226-230, 2013
- 27) Heller RA, Krönke M: Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 126: 5-9, 1994
- 28) Chu WM: Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328: 222-225, 2013
- 29) Qiao YQ, Shen J, Gu Y, Tong JL, Xu XT, Huang ML, Ran ZH: Gene expression of tumor necrosis factor receptor associated-factor (TRAF)-1 and TRAF-2 in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 14: 244-250, 2013
- 30) Fan EW, Chen LJ, Cheng JT, Tong YC: Changes of urinary bladder contractility in high-fat diet-fed mice: the role of tumor necrosis factor- α . *Int J Urol* 21: 831-835, 2014
- 31) Wróbel AF, Kluz T, Surkont G, Wlazlak E, Skorupski P, Filipczak A, Rechberger T: Novel biomarkers of overactive bladder syndrome. *Ginekol Pol* 88: 568-573, 2017
- 32) Kuo HC, Liu HT, Chancellor MB: Can urinary nerve growth factor be a biomarker for overactive bladder? *Rev Urol* 12: e69-77, 2010
- 33) Yokoyama T, Kumon H, Nagai A: Correlation of urinary nerve growth factor level with pathogenesis of overactive bladder. *Neurourol Urodyn* 27: 417-420, 2008
- 34) Antunes-Lopes T, Pinto R, Barros SC, Botelho F, Silva CM, Cruz CD, Cruz F: Urinary neurotrophic factors in healthy individuals and patients with overactive bladder. *J Urol* 189: 359-365, 2013
- 35) Kim JC, Park EY, Hong SH, Seo SI, Park YH, Hwang TK: Changes of urinary nerve growth factor and prostaglandins in male patients with overactive bladder symptom. *Int J Urol* 12: 875-880, 2005
- 36) Lin WY, Chen CS, Wu SB, Lin YP, Levin RM, Wei YH: Oxidative stress biomarkers in urine and plasma of rabbits with partial bladder outlet obstruction. *BJU Int* 107: 1839-1843, 2011
- 37) Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT: Urinary 8-OHdG : a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 339: 1-9, 2004

〈Regular Article〉

Hydrogen water shows the effect of improving bladder function in a rat model of bladder outlet obstruction

Shinjiro SHIMIZU

Department of Urology, Kawasaki Medical School

ABSTRACT Lower urinary tract symptoms (LUTS) are considered to be caused by vascular insufficiency to bladder, and include voiding, urine collection, and post-voiding symptoms. The bladder outlet obstruction (BOO) model of rat is used as a pathological model, in which ischemia of the bowel is induced by obstruction, followed by chronic ischemia of the bowel and oxidant stress, resulting in LUTS. Since the antioxidant and anti-apoptotic actions of hydrogen have been attracting attention in recent years, it has been clarified that hydrogen could protect various organs, and multiple facilities and fields have reported that hydrogen could be used in the prevention and treatment of various diseases. In this study, we administered hydrogen water (H_2) to the BOO model rats to investigate its effects and mechanism of action.

We used 9-week old female rats to prepare the BOO model. After laparotomy, a 19G needle was placed along the urethra and sutured to the urethra to induce partial obstruction of the urethra. Immediately after the preparation, the rats were divided into the sham, hydrogen water no-administration (BOO $H_2(-)$), and administration (BOO $H_2(+)$) groups to compare the effects of intravesical pressure, and the histological, biochemical and immunohistological changes in 4 weeks.

The weight of the urinary bladder increased significantly in the BOO groups, 3.0- and 2.3-fold in the BOO $H_2(-)$ and BOO $H_2(+)$ groups, respectively, compared with the sham group. The urination volume in one voiding increased significantly in the BOO groups, compared with the sham group. In the measurement of intravesical pressure, hyperreflexia of the urinary bladder was confirmed in the BOO groups, and the degree of detrusor overactivity was increase significantly in the BOO $H_2(-)$ group, compared with the BOO $H_2(+)$ group. The proportion of collagen fiber in the bladder musculature increased significantly in the BOO $H_2(-)$ group, compared with the sham and BOO $H_2(+)$ groups. In the quantification of 8-OHdG in the bladder tissues, the levels in the BOO $H_2(-)$ group were higher than the BOO $H_2(+)$ group. In the 8-OHdG staining, significant expression was observed in the muscle layers only in the BOO $H_2(-)$ group. In the exhaustive chemokine/cytokine analysis, TNF- α was obviously inhibited in the comparison between the BOO $H_2(-)$ and BOO $H_2(+)$ groups. In fact, TNF- α immune tissue imaging, expression was increased in the interstitium beneath the bladder cell mucosa and the muscle layers of the BOO $H_2(-)$ group. In the BOO $H_2(+)$ group, TNF- α expression was reduced in the muscle layers.

Hydrogen water would be useful treatment as new alternative therapy for LUTS caused by

the ischemic change of bladder. In this study, one of the mechanism of action of hydrogen water should be inhibition of various cytokines with a focus on TNF- α via inhibition of the oxidant stress.

(Accepted on October 4, 2018)

Key words : **bladder outlet obstruction, low urinary tract symptoms, hydrogen water, oxidative stress**

Corresponding author

Shinjiro Shimizu

Department of Urology, Kawasaki Medical School, 577

Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 463 4747

Fax : 81 86 462 7897

E-mail : sshimizu@med.kawasaki-m.ac.jp

