高齢ラットの膀胱利尿筋の無機イオンに対する反応

名古屋大学泌尿器科学教室 (主任: 三宅弘治教授)

斉藤 政彦 後藤 百万 加藤久美子

長谷川総一郎 近藤 厚生

PHARMACOLOGICAL EXPERIMENTS IN THE AGED RAT URINARY BLADDER Responses to Inorganic Ions (Ca^{2+} , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+})

Masahiko Saito, Momokazu Gotoh, Kumiko Kato, Soitiro Hasegawa and Atsuo Kondo

Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

(Director: Prof. K. Miyake)

We studied in vitro the change in muscle contractility and ion permeability of cell membrane of aged rat urinary bladder (16 and 24 months old) and compared with young rat bladder (6 months old). The results are summarized as follows:

1. In aged rat bladder the contractile response to Ca^{2+} was significantly decreased comparing to young rat bladder.

The speed of muscle contractility was also significantly slower in aged rat bladder.

2. There was no significant change in muscle contractility in response to K^+ and Ba^{2+} among the 3 age groups, which indicated that contractile force of aged rat bladder per se was not impaired.

3. Mg^{2+} relaxed the detrusor muscle in a dose-dependent manner. The magnitude of the response was not different between aged and young rat bladders.

It is concluded that the response of aged rat urinary bladder to Ca^{2+} was decreased in contraction strength and contraction speed. This finding seems to suggest that membrane permeability of Ca^{2+} has been compromised, which may account for the impaired detrusor contractility frequently observed in elderly persons.

Key words: aged rat, urinary bladder, inorganic ions

要旨: 高齢化にともなう膀胱平滑筋の筋細胞自体の収縮力, 細胞膜の透過性の変化を研究する目的で, マグヌス法を用いて高齢ラットにおける無機イオンに対する反応性を実験した。高齢ラットは16カ月齢と24カ月齢のものを, コントロールとしては6カ月齢のものを使用した。その結果, 以下の実験成績が得られた。

1) Ca イオンに対する収縮反応性は16カ月齢, 24カ月齢でコントロールに比較して有意に低下し, また最大収縮値の1/2に達する時間 ($T_{0.5}$) も有意に延長していた。

2) K イオン, Ba イオンに対する反応は3群間に有意差はなく, 基本的な筋の収縮力に差はないものと判断された。

3) Mg イオンは平滑筋に対して濃度依存性に弛緩作用を示した。しかしその反応性は3群間に有意差は認めなかった。

以上の実験データは, 高齢ラットの膀胱を構成する平滑筋細胞膜の, Ca イオンに対する透過性が低下していることを示唆する。ヒト高齢者においても同様の機能的変化が発生するならば, この現象は膀胱収縮力の減弱に関与する要因として重要な役割を果たしていると推測する。

キーワード: 高齢ラット, 膀胱, 無機イオン

結 言

高齢化に伴う膀胱の機能的変化を考える場合、排尿筋の易刺激性が特徴である不安定膀胱に起因する頻尿、切迫性尿失禁などが問題である。その一方で尿道に通過障害がなく、また明らかな神経障害がないにも拘らず排尿筋収縮力の低下が認められ、残尿が多いという症例も存在する¹⁾、不安定膀胱における易刺激性の発生メカニズムは norepinephrine, ATP および serotonin に対するリセプターの増加が関与していることを「高齢ラットにおける薬理学的実験：第1報」²⁾と「第2報」³⁾で報告した。老化現象をとらえる際、それぞれの臓器の退行性変化は、細胞自体の加齢に伴う生物物理学的变化の表れと考えることができよう。例えば細胞間隙の分離や、平滑筋細胞膜の透過性に変化が生じている可能性が考えられる。今回は高齢ラット膀胱の平滑筋収縮に關与する無機イオンに対する反応性の変化を検討した。

実験動物と実験方法

実験動物、筋切片の作成方法、および Krebs'液の組成などの詳細に関しては「高齢ラットにおける薬理学的実験」の第1報²⁾に述べた。若年ラットとしては6カ月齢のものを、高齢ラットは16カ月齢、24カ月齢のものを使用した。

K イオン、Ba イオンに対する反応：利尿筋切片を30分間 Krebs'溶液中で incubation し、筋切片の静止張力が1g 前後に安定するうに調節した。その後さらに30分間 incubation した後に、KCl または BaCl₂を20 mM, 40mM, 100mM, 200mM, 300mM と non-cumulative な方法で添加した。すなわち1回ごとに Krebs'液で3回洗浄して、筋切片の張力が基線にもどったことを確認後、次の濃度を静加して反応の強さを調べた。

Ca イオンに対する反応：筋切片に張力を付加し、30分間 incubation 後、静止張力が1g 前後に安定していることを確認した。その後浴槽内溶液を Ca-free Krebs'溶液 (0.01mM EGTA 含) に置換し、3回洗浄後、30分間 incubation した。筋切片の張力がプラトーになったことを確認した後に、CaCl₂を0.5mM, 1.0 mM, 2.5mM, 5.0mM, 10.0mM と cumulative に添加し反応を観察した。

Mg イオンに対する反応：30分間 incubation 後に筋切片にかかる静止張力が1g 前後に安定していることを確認し、さらに30分間 incubation した後、続いて Mg イオンを1mM, 2.5mM, 5mM, 10mM と cumula-

Fig. 1 Dose-response curve to non-cumulative addition of KCl. Number of specimen : control 10, 16 months old 10 and 24 months old 10.

Fig. 2 Dose-response curve to non-cumulative addition of BaCl₂. Number of specimen : control 14, 16 months old 10 and 24 months old 14.

Fig. 3 Dose-response curve to cumulative addition of CaCl_2 . Number of specimen: control 25, 16 months old 16 and 24 months old 10.

Fig. 4 Response of the detrusor muscle, which has been incubated in Ca-free Krebs' solution, to cumulative addition of CaCl_2 (0.5~10.0mM). A: control B: 16 months old C: 24 months old.

tive に添加して反応を観察した。

結 果

K イオン, Ba イオンに対する反応: K イオンに対する 3 群間の収縮反応性に有意差は認められなかった (Fig. 1). Ba イオンに対する収縮反応性にも有意差は認められなかった (Fig. 2).

Ca イオンに対する反応: Ca イオンに対しては16カ月齢, 24カ月齢でコントロールに比べて反応性の有意な低下が認められた. 16カ月齢と24カ月齢の間では差を認められなかった (Fig. 3). また高齢ラットでは Ca イオン添加に反応する収縮速度が遅延していた (Fig. 4). たとえば, 2.5mM (Krebs'液と同濃度) に反応する最大収縮の1/2値に達する時間 ($T_{0.5}$) はコントロールに比較して有意に延長していた (Table).

Mg イオンに対する反応: Mg イオンは, いずれの月齢ラットの膀胱に対しても弛緩反応を示したが, 3

Table Time to the half value of the maximum contractile response to 2.5mM CaCl_2 ($T_{0.5}$)

Age (months)	Number of studies	$T_{0.5}$ (min)
6	25	0.68 ± 0.36
16	16	$1.14 \pm 0.46^{**}$
24	10	$1.35 \pm 0.35^{**}$

** $P < 0.01$

Fig. 5 Dose-response curve to cumulative addition of MgCl_2 . Number of specimen: control 24, 16 months old 10 and 24 months old 14.

群間に有意差は認めなかった (Fig. 5).

考 察

高齢化に伴う膀胱の各種薬剤に対する薬理学的反応性の変化を第1報²⁾、第2報³⁾で報告した。この中で我々は高齢者における頻尿、尿失禁患者の原因の多くを占める不安定膀胱における易刺激性の発生はnorepinephrine, ATP および serotonin に対する過敏性が強く関与していることを示唆した。高齢者でしばしば遭遇する不安定膀胱は、その過活動性の故に排尿筋収縮力は強力で、残尿は存在しない。しかし Resnick & Yalla¹¹⁾は高齢者の詳細な尿流動態研究の結果、DHIC (detrusor hyper-reflexia with impaired contractility) という排尿筋過反射 (不安定膀胱) の亜型の存在を報告した。DHICは排尿筋の蓄尿期における無抑制収縮、排尿筋の収縮力の減弱、排尿筋収縮速度の低下、排尿筋収縮余力の低下、高い残尿率で特徴づけられると主張した。DHICは臓器 (膀胱) の退行性変化に一致するものであり、当然のことながら臓器を構成する個々の細胞レベルにおいても同様の生物物理学的変性が生じていると推論できる。今回はマグヌス法を用いて筋細胞そのものの収縮力の変化、および、平滑筋細胞膜の過透性の変化を追求する目的で、無機イオンに対する高齢ラット膀胱の反応性の変化を検討した。

膀胱を含め平滑筋の収縮は、主にCaイオンが細胞外から細胞内へ流入して発生することは明確である⁵⁾。細胞外のCaイオンが細胞内へ流入する経路には主に電位依存性とレセプター作動性の二つのCaチャンネルがある⁶⁾。後者に関しては以前に報告した如く、ある種の薬剤に対しては高齢ラット膀胱では反応性が亢進していることが判明した²⁾³⁾。一方、高濃度のKイオン、Baイオンは細胞膜を持続的に脱分極し、電位依存性のCaチャンネルを通してCaイオンを細胞内へ急速に流入させる。この結果、平滑筋は持続的な強い収縮反応を示す。この収縮は神経刺激に起因する収縮反応、すなわちレセプター作動性のCaチャンネルを経由する反応とは無関係な平滑筋細胞固有の収縮力を示すと考えられている。このため筋切片の薬理学的反応を検討する場合、Kイオンが惹起する最大反応を基準にすることがある⁷⁾⁸⁾。すなわち100mM~300mMのKClをnoncumulativeに加えて、これを分母に薬理学的な反応の強さを評価しようとするものである。今回の実験においてはKイオン、Baイオンに対する反応性に有意差を認めず、電位依存性のCaチャンネルを

經由して得られた筋細胞の収縮力には加齢にともなう変化はないことが確認された。

我々は以前、今回と同様の方法を用いて家兎膀胱のCaイオンに対するdenervation supersensitivityを報告し⁹⁾、除神経膀胱ではCaイオンに対する反応性が亢進していることを報告した。Ca-free Krebs'液中でincubationした筋切片にCaCl₂をcumulativeに添加することにより得られた反応は、ベラパミールなどのカルシウム遮断剤によりほぼ完全に抑制される⁹⁾。一般にカルシウム遮断剤は電位依存性のCaチャンネルをblockするという事実¹⁰⁾から、今回の反応は電位依存性のCaチャンネルを經由して得られたものと考えられる。ただし、実際には細胞膜の電位は変化していないため得られた反応性は細胞膜固有のCaイオンの透過性を示す指標になるといえる。今回の実験から高齢ラットではCaイオンに対する反応性が低下していた。すなわち、16カ月齢、24カ月齢のラットの膀胱平滑筋細胞では、加齢にともなう退行性変化が細胞膜に発生していることを示唆する結果であった。さらに筋切片のCaイオンに反応する収縮速度が、若年ラットのそれに比べて有意に低下しており、上記のDHICの臨床的特徴の一つと一致する点は極めて興味深い。平滑筋の収縮反応は、骨格筋の明確な神経終盤を有する神経筋伝達方式とは異なり、神経の興奮刺激が細胞膜を順次伝播する筋筋伝達方式が考えられている。したがって個々の細胞におけるCaイオンの透過性低下は、筋全体の収縮力低下 (Fig. 1) と収縮速度の遅延 (Fig. 2) に結びつくことになる。

Ramos et al.¹¹⁾は精管を使ったskinned fiberにおけるCaイオンに対する反応性の実験で、今回と同様の結果を報告している。すなわち、除神経された精管ではCaイオンに対する反応性が亢進し、その反応速度が速いとしている。彼らはこの反応性の変化は細胞内におけるCaイオンのカルモジュリンなどに対する親和性の差からきている可能性が大きいと推論している。細胞内のCaイオンの動向については今回実験していないため結論は出せないが、Kイオンに対する反応に有意差はなく、よって細胞内のCaイオンの生理的活性を含めて平滑筋細胞の収縮力には変化はないと予想される。すなわち、今回得られた高齢ラットにおけるCaイオンに対する反応性の低下は、利尿筋細胞膜のCaイオンに対する透過性の退行性変化を表わすものと結論される。

Mgイオンに対して、膀胱が弛緩反応を示すことは

ほとんど知られていない。しかし骨格筋に対しては抗痙攣作用を有し、低 Mg 血症は痙攣、テタニーの重要な発生要因の一つである¹²⁾。また妊娠中毒症の一つである子癇の鎮痙目的で硫酸マグネシウムを使用することはよく知られている¹³⁾。Mg イオンは筋収縮に重要な役割を果たしており、平滑筋の収縮反応は主に Ca イオンと Mg イオンに依存しているとされている¹⁴⁾。具体的に平滑筋の細胞膜に対しては Na イオン、K イオンの輸送に関与し、細胞膜を過分極させることにより反応性を低下させ¹⁵⁾、平滑筋細胞に対して Ca blocker と同様の作用を有する¹⁶⁾。我々は Mg イオンが膀胱平滑筋を弛緩することを観察したがラットの三月齢群間に有意差は存在しなかった。血管平滑筋におけるその Ca blocker としての作用は verapamil や nimodipine などの Ca entry blocker の 1/5~1/3 と弱いものの特異な反応を示し¹⁴⁾、高血圧における重要な因子と言われている¹⁵⁾。また細胞内ではミオシンのリン酸化に関係したり¹⁴⁾¹⁷⁾、細胞内の Ca イオンの貯蔵場所からの遊離を阻害するとも考えられている¹⁸⁾。このように Mg イオンは平滑筋の収縮に対して重要な役割を果たしており、よって Mg-free 溶液中では薬に対する反応性に差が生じるとされている¹⁹⁾²⁰⁾。

結 語

平滑筋細胞自体の収縮力及び細胞膜の加齢にともなう変化を研究する目的で Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} の 4 イオンに対する反応性の変化を検討した。Ca イオンによって引き起こされる高齢ラット膀胱の筋切片における収縮反応は、若年ラットのそれに比較して有意に低下していた。さらに利尿筋切片の収縮速度も遅延していた。 K^{+} 、 Ba^{2+} によって引き起こされる急速な脱分極に起因する収縮力には差を認めなかった。 Mg^{2+} イオンは濃度依存性の弛緩作用を示したが、その反応性は 3 群間で差を認めなかった。

文 献

- 1) Resnick, N.M. and Yalla, S.V.: Detrusor hyperactivity with impaired contractile function; an unrecognized but common cause of incontinence in elderly patients. *J.A.M.A.*, 275, 3076—3081, 1987.
- 2) 齊藤政彦, 後藤百万, 加藤久美子, 近藤厚生: 高齢ラットにおける薬理学的実験。第 1 報。Acetylcholine, Norepinephrine, Isoproterenol に対する反応。日泌尿会誌, 81, 25—30, 1990.
- 3) 齊藤政彦, 後藤百万, 加藤久美子, 近藤厚生: 高齢ラットにおける薬理学的実験。第 2 報。ATP,

- Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, Serotonin, Angiotensin II, VIP に対する反応。日泌尿会誌, 81, 31—36, 1990.
- 4) Resnick, N.M., Yalla, S.V. and Laurino, E.: The pathophysiology of urinary incontinence among institutionalized elderly persons. *N. Engl. J. Med.*, 320, 1—7, 1989.
- 5) Batra, S., Sjögren, C., Andersson, K.-E. and Fovaeus, M.: Source of calcium for contractions induced by depolarization and muscarinic receptor stimulation in rabbit bladder. *Acta Physiol. Scand.*, 130, 545—551, 1987.
- 6) Bolton, T.B.: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.*, 59, 606—718, 1979.
- 7) Ordway, G.A., Esbenshade, T.A., Kolta, M.G., Gerald, M.C. and Wallace, L.J.: Effect of age on cholinergic muscarinic responsiveness and receptors in the rat urinary bladder. *J. Urol.*, 136, 492—496, 1986.
- 8) Ordway, G.A., Kolta, M.G., Gerald, M.C. and Wallace, L.J.: Age related change in α -adrenergic responsiveness of the urinary bladder of the rat is regionally specific. *Neuropharmacology*, 25, 1335—1340, 1986.
- 9) Saito, M., Gotoh, M., Kato, K. and Kondo, A.: Denervation supersensitivity of the rabbit urinary bladder to calcium ion. *J. Urol.*, 142, 418—421, 1989.
- 10) Nayler, W.G. and Poole-Wilson Ph.: Calcium antagonists: Definition and mode of action. *Basic Res. Cardiol.*, 76, 1—15, 1981.
- 11) Ramos, K., Gerthoffer, W.T. and Westfall, D.P.: Denervation-induced supersensitivity to calcium of chemically skinned smooth muscle of the guineapig vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236, 80—84, 1986.
- 12) 小出 輝: マグネシウム。内科総合誌。Medical Practice, Vol. 4, 臨床検査ガイド臨時増刊号, p. 309—310, 1987.
- 13) 福田 透, 平林稔之, 北村文明: 妊娠中毒症の薬物療法。臨床医薬情報, 6, 121—125, 1987.
- 14) Barsotti, R.J., Ikebe, M. and Hartshorne, D.J.: Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and myosin phosphorylation on skinned smooth muscle fibers. *Am. J. Physiol.*, 252, 543—554, 1987.
- 15) Altura, B.M., Altura, B.T.: Interactions of Mg and K on blood vessels—aspects in view of hypertension. Review of present status and new findings. *Magnesium*, 3, 175—194, 1984.
- 16) Altura, B.M., Altura, B.T., Carella, A., Gebr ewold, A., Murakawa, T. and Nishio, A.: Mg^{2+} - Ca^{2+} interaction in contractility of vascu-

- lar smooth muscle: Mg^{2+} versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist induced responsiveness of blood vessels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65, 729—745, 1987.
- 17) Paul, R.J. and Ruegg, J.C.: Role of magnesium in activation of smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 255, 465—472, 1988.
- 18) Sjögren, A. and Edvinsson, L.: The influence of magnesium on the release of calcium from intracellular depots in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Toxicol.*, 62, 17—21, 1988.
- 19) Howell, R.E., Carrier, G.O.: Influence of magnesium on norepinephrine and histamine induced contractions of pulmonary vascular smooth muscle. *Pharmacology*, 33, 27—33, 1986.
- 20) Johns, A.: The effect of magnesium-free solutions on the responses of the guinea pig urinary bladder to adenosine 5'-triphosphate and nerve stimulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 57, 1320—1323, 1979.

(1990年2月2日受理)