雌ラット膀胱, 尿道における α_1 -アドレナリン 刺激剤の組織内濃度と局在

東京大学医学部附属病院分院泌尿器科 (科長: 田島 惇)

森 山 信 男 田 島 惇

東京大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 阿曾佳郎)

高橋 悟 本間 之夫 東原 英二 阿曾 佳郎

大正製薬株式会社総合研究所

皆川 俊哉 太田 勝次 奥山 茂

THE DISTRIBUTION AND LOCALIZATION OF α_1 -ADRENOCEPTOR AGONIST ON THE BLADDER AND URETHRA OF FEMALE RATS

Nobuo Moriyama and Atushi Tajima

Department of Urology, Branch Hospital, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

(Director: Associate Prof. A. Tajima)

Satoru Takahashi, Yukio Homma, Eiji Higashihara and Yoshio Aso

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

(Chairman: Prof. Y. Aso)

Toshiya Minagawa, Katsuji Ota and Shigeru Okuyama

Research Center, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.

The distribution of selective α_1 -adrenoceptor agonist 1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-glycinamido-ethanol hydrochloride, midodrine, and its active metabolite 1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol, DMAE, was evaluated on bladder and urethra of 8-weeks and 52-weeks old female rats. Prior to the intravenous injection of ^{14}C -labeled midodrine and DMAE, bilateral ureters were ligated to prevent drug uptake from the urinary tract. In 8-weeks rats, ^{14}C -midodrine activity was significantly ($p<0.01$) higher in the bladder than in the femoral muscle, which served as a control for drug distribution. Similarly, higher uptake of ^{14}C -DMAE was observed in the bladder than in the femoral muscle ($p<0.01$) and the urethra ($p<0.05$). In 52-weeks rats, there was no significant difference of midodrine uptake among these tissues. However, significantly higher uptake of ^{14}C -DMAE was observed in the urethra than in the femoral muscle ($p<0.05$). Compared with midodrine, the concentration of DMAE was significantly increased in the bladder of 8-weeks rat and in the urethra of 52-weeks rats (respectively, $p<0.05$). In autoradiogram, the grains corresponding to midodrine and DMAE were diffusely distributed on the smooth muscles of bladder (mainly bladder neck and trigone) and urethra. The grains were also recognized on the vessels and perivascular areas of these tissues. These findings support that midodrine and DMAE could be effective for stress incontinence, because these drugs are known to bind specifically to α_1 -adrenoceptor.

Key words: α_1 -adrenoceptor agonist, bladder and urethra, female rats

要旨: α_1 -アドレナリン刺激剤の尿失禁 (特に腹圧性尿失禁) に対する治療薬としての可能性を検討するため, 雌ラット膀胱, 尿道における同刺激剤の組織内濃度, 局在, および加齢による相違を検討した. 生後8週と52週のウイスター系雌ラットに α_1 -アドレナリン刺激剤のプロドラッグである midodrine とその活性体 (DMAE) の ^{14}C 標識体を静注し, 膀胱, 尿道, 大腿部筋肉 (薬物分布に対する対照) での各薬剤の放射能濃度と局在を検討した. 1) midodrine の組織内濃度は8週齢ラットでは大腿部筋肉より膀

膀胱が高値だが ($p < 0.01$), 52週齢ラットでは差はなかった。2) DMAE の組織内濃度は 8 週齢ラットでは大腿部筋肉や尿道より膀胱が高く (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$), 52週齢ラットでは大腿部筋肉より尿道が高濃度であった ($p < 0.05$)。3) DMAE の組織内濃度は 8 週齢ラットの膀胱と 52週齢ラットの尿道で, midodrine の濃度よりも高かった (それぞれ $p < 0.05$)。4) 大腿部筋肉, 尿道, 膀胱の各部位における midodrine, DMAE の組織内濃度はラット週齢で差がなかった。5) オートラジオグラフィーでは grain が膀胱 (主に膀胱頸部から三角部), 尿道の平滑筋に広く認められた。以上より, これらの α_1 -アドレナリン刺激剤は尿道, 膀胱頸部・三角部の平滑筋によく集積するので, これらの部位の α_1 -アドレナリン受容体を介して, 尿失禁の治療に有効である可能性が示唆された。

キーワード: α_1 -アドレナリン刺激剤, 膀胱・尿道, 雌ラット

緒 言

排尿に関して, 膀胱, 尿道に分布する α -アドレナリン受容体の興奮は排尿抵抗を強め, その障害は排尿困難を改善する¹⁾²⁾。 α -アドレナリン刺激剤, ことに選択的 α_1 -アドレナリン刺激剤は尿道平滑筋の収縮をもたらし, 尿失禁の治療薬としての可能性があると考えられる。しかし, これらアドレナリン刺激剤の膀胱, 尿道における作用は充分検討されていない。我々は新しい選択的 α_1 -アドレナリン刺激剤, 1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-glycinamidoethanol hydrochloride (midodrine hydrochloride: 以下 midodrine) の活性化代謝物である (1-(2',5'-dimethoxyphenyl)-2-aminoethanol: 以下 DMAE)³⁾ が雌の生体犬で平滑筋部尿道 (膀胱頸部から約 3~4cm までの近位尿道にあたる部分) の内圧を有意に上昇するので, 尿失禁の治療に有効な事を示した⁴⁾。また, ラットでの本薬剤の組織内濃度は主要臓器で測定されているが⁵⁾, 尿失禁に関連する膀胱, 尿道での検討はなされていない。今回我々は雌ラットを使い, α_1 -アドレナリン刺激剤の膀胱, 尿道での組織内濃度, 局在, ならびに 8 週齢ラットと 52週齢ラットの間, 薬剤の組織内濃度や局在に差があるかどうかを検討したので報告する。

方 法

1) 標識化合物

薬剤の標識化合物は Hafslund Nycomed Pharma 社 (オーストリア) から提供された [^{14}C]-midodrine (比放射能 110.6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, 放射化学的純度 95% 以上) と同活性体である [^{14}C]-DMAE (比放射能 137.7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$, 放射化学的純度 97% 以上) を使用した。

2) 実験動物ならびに方法

生後 8 週齢ならびに 52週齢のウイスター系雌ラットを, エーテル麻酔下で開腹し, 尿中から膀胱, 尿道粘膜を経由した間質への薬物の浸透を除外するために,

両側の尿管を結紮した。次いで, [^{14}C]-midodrine と [^{14}C]-DMAE を大腿静脈より, それぞれ 6.8 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 静注した。5 分後, 放血致死させ, 膀胱, 尿道 (一部腔壁附着) を en bloc に摘出した。また薬物分布の対照として大腿部筋肉も摘出した。

3) 組織内薬物濃度

膀胱, 尿道は移行部 (膀胱頸部) で切断し, 秤量の後それぞれの薬物の濃度を測定した (各週齢, 各薬物とも 3 匹ずつ, 計 12 匹)。組織は 4 倍量の蒸留水を加えてホモジナイズした後, その 0.5ml を放射能測定に使用した。各試料は Soluene-350 (Packard 社, USA) を 0.5ml 加え可溶化し, イソプロピルアルコール 0.5 ml および 30% 過酸化水素水 0.4ml で脱色した。次いで 1N 塩酸で中和した後シンチレーター (Instagel, Packard 社, USA) 10ml を加え, 液体シンチレーションカウンター (Tris-Carb 460CD 型, Packard 社, USA) で放射能を測定した。

4) 局在 (オートラジオグラフィー)

[^{14}C]-midodrine および [^{14}C]-DMAE をそれぞれ投与したラットを 5 分後に放血致死させ, 膀胱, 尿道を en bloc に摘出した。組織はドライアイスへヘキサン混液中で凍結し, 保存した。凍結標本は -20°C のクリオミクロトーム (LKB-2250, AHS 社, Japan) およびクリオスタットミクロトーム (Bright 社, England) で薄切後, 肉眼的オートラジオグラフィー (各週齢, 各薬物とも 1 匹ずつ, 計 4 匹) および光顕的オートラジオグラフィーに供した (各週齢, 各薬物とも 1 匹ずつ, 計 4 匹)。肉眼的オートラジオグラフィー用には, 20 μm に薄切した標本をスライドガラスにマウントさせ, 凍結乾燥後, カセット内で工業用 X 線フィルム (No. 150, 富士写真フィルム社, Japan) に 4°C で 8 週間露光させた。その後現像・定着を行い, コンピューター画像解析装置 (Imagingresearch 社, Canada) に取り込み, 画像解析を行った。光顕的オートラジオグ

ラフィー用には、 $5\mu\text{m}$ に薄切した標本を乳剤（Ilford K5）を塗布したスライドガラスに暗室操作でマウントさせた。次いで暗箱に入れ、 4°C で8週間露光させた後、現象・定着を行った。その後、ヘマトキシリン単独またはヘマトキシリン・エオジン染色を行って、検鏡した。

5) 検定

各薬剤の大腿部筋肉、膀胱、尿道組織内の薬物濃度の比較には Scheffe の多重比較を用いた。また各部位の ^{14}C -midodrine と ^{14}C -DMAE 濃度の比較ならびに 8

週齢ラットと52週齢ラットの組織内薬物濃度の有意差検定には Welch の t 検定を用いた。有意差は危険率 0.05, 0.01 で検定した。

結 果

midodrine の大腿部筋肉、膀胱、尿道の組織内濃度は 8 週齢ラットではそれぞれ 3.9 ± 0.4 , 7.5 ± 0.7 , $5.8 \pm 0.2 \text{ nmol eq./g}$ (平均値 $\pm$ 標準誤差)であり、52週齢ラットではそれぞれ 5.0 ± 1.0 , 6.3 ± 1.3 , $6.7 \pm 0.3 \text{ nmol eq./g}$ であった。一方 DMAE の大腿部筋肉、膀胱、尿道組織内濃度は 8 週齢ラットでは 4.1 ± 0.6 , $11.4 \pm$

図1 8週齢ラットと52週齢ラットにおける ^{14}C -midodrine と ^{14}C -DMAE の組織内濃度

図2 52週齢ラットの肉眼的オートラジオグラム、midodrine は尿道から膀胱頸部の筋層を中心に局在し、DMAE は midodrine よりも広範に、ほぼ尿道全体から膀胱体部にかけて局在していた（ともに $150 \sim 180 \text{ nCi/mg}$ 程度）。

0.2, 7.4 ± 1.3 nmol eq./g であり, 52週齢ラットでは 3.6 ± 0.8 , 9.5 ± 2.1 , 9.8 ± 0.6 nmol eq./g であった(図1), midodrine の組織内濃度は8週齢ラットの膀胱で

図3 52週齢ラットの光顕的オートラジオグラム(尿道; $\times 260$). 粘膜下の排尿筋に一致して [^{14}C]-DMAE に相当する grain の集積を認める.

大腿部筋肉より有意に高かった ($p < 0.01$) が, 52週齢ラットでは差がみられなかった. DMAE の組織内濃度は8週齢ラットでは大腿部筋肉や尿道よりも膀胱が高く(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$), 52週齢ラットでは大腿部筋肉より尿道が高濃度であった ($p < 0.05$). また, DMAE の組織内濃度は midodrine の組織内濃度に比較して8週齢ラットの膀胱と, 52週齢ラットの尿道で有意に高値を示した(それぞれ $p < 0.05$). しかし, 大腿部筋肉, 膀胱, 尿道の各部位における midodrine と DMAE の組織内濃度は8週齢ラットと52週齢ラットの間で差が無かった.

肉眼的オートラジオグラフィーでは midodrine は尿道から膀胱頸部, 三角部の筋層を中心に約150~180 nCi/g の濃度で認められた(図2). 一方, DMAE は midodrine よりも広範囲に, ほぼ尿道全体から膀胱体部にかけて150~180 nCi/g の濃度で認められた(図2). 光顕的オートラジオグラフィーでは midodrine, DMAE とともに grain は尿道・膀胱の平滑筋層に局在していた(図3). また血管内腔から血管壁を通過し, 周囲間質に拡散する所見も認められた(図4). 以上より, これらの物質は血管壁から平滑筋へ移行することが示された. 神経節内への取り込みは検索した範囲ではなかった. また, ラットの週齢による局在の差異は認めなかった.

考 察

α_1 -アドレナリン受容体は膀胱頸部より尿道にかけ

図4 8週齢ラットの光顕的オートラジオグラム(尿道; $\times 130$). 血管(特に小動脈)内腔とその周辺間質に [^{14}C]-midodrine に相当する grain の集積を認める. 平滑筋にも grain が見られる.

ての平滑筋に高濃度に分布し、筋緊張を高め、尿禁制を保つ役割をはたしている¹⁾。今回使用した選択的 α_1 -アドレナリン刺激剤 midodrine はすでに低血圧症治療の経口薬として有効なことが知られている^{6)~8)}。また、血圧上昇をきたさない低濃度(0.03mg/kg~0.1 mg/kg)でも雌成犬の尿道内圧を有意に増加させることが報告されている⁴⁾。

ラット組織における midodrine と DMAE の親和性はそれぞれ異なっており、腎臓、脾臓では midodrine が、また肺、脳、副腎、下垂体や骨髄では DMAE が高いと報告されている⁶⁾。今回の実験結果では両薬剤とも大腿部筋肉より膀胱、尿道で多い傾向にあった。すなわち midodrine の組織内濃度は8週齢ラットで大腿部筋肉と膀胱の間に有意差を認めた。DMAE の組織内濃度は8週齢ラットでは膀胱が大腿部筋肉や尿道よりも高く、52週齢ラットでは大腿部筋肉より尿道が高濃度であった(いずれも有意)。またラットの週齢によらず、DMAE は膀胱、尿道で全体的に midodrine よりも濃度が高い傾向にあり、特に8週齢ラットの膀胱と52週齢ラットの尿道で有意に高値を示した。以上、ラットの膀胱、尿道にこれらの薬剤、特に DMAE が高濃度存在することが明らかになった。なぜ膀胱、尿道に多いのかについては、本実験では対照に膀胱、尿道に近い大腿部筋肉を選んだので血流の差はあまり考え難く、これら薬物が大腿部筋肉より膀胱や尿道に親和性があるためと考えられる。

8週齢ラットと52週齢ラットで組織内薬物濃度に相違があるが、これは週齢による影響が一番考えられる。しかし、この週齢差が、単に週齢による血流動態の差なのか、週齢による α -アドレナリン受容体や平滑筋細胞の加齢変化によるものか不明である。高齢ラットでは、膀胱平滑筋細胞膜の Ca^{++} イオンに対する透過性の低下⁹⁾や、ムスカリン受容体刺激剤に対し膀胱頸部の収縮性増加¹⁰⁾などが報告されている。今回の実験では両薬剤とも膀胱、尿道の組織内濃度は8週齢ラットと52週齢ラットの間で有意差はなかったため、上記の組織内薬物濃度差は α -アドレナリン受容体や平滑筋細胞の加齢変化よりも、週齢による血液動態の変化に起因するのではないかと考えられる。

今回の実験ではこれら薬剤の局在を示したにすぎないが、これら薬剤が α -アドレナリン受容体と選択的に結合することが知られているので、膀胱、尿道に移行したこれらの薬剤が受容体と結合して作用すると推測される。midodrine の薬理作用が脱グリジン化された

DMAE に基づく¹¹⁾ので、52週齢ラットの尿道で、DMAE の組織内濃度が高かったことは比較的高齢者の腹圧性尿失禁の治療に本剤が有効である可能性を示唆している。

膀胱では膀胱頸部や三角部には α -アドレナリン受容体が圧倒的に多いが、体部ではほとんど認められない¹²⁾。我々の実験では膀胱にもかなり高濃度に DMAE や midodrine が含まれていた。この理由としては、まず第一に肉眼的オートラジオグラムでも示すように、膀胱頸部や三角部の平滑筋の α -アドレナリン受容体に結合した薬剤を測定したと考えられる。また、光顕的オートラジオグラフィーでは、今回ははっきりした神経節への grain の集積を認めなかったが、この可能性も完全には否定できない。さらに膀胱体部などの DMAE の局在は受容体との結合ではない、単に血流による集積が主原因と考えられる。今後 in vitro receptor autoradiography 等による検討が必要であらう。

Jonas ら¹³⁾によると DMAE は静脈注入後速やかに尿中に排泄され、膀胱粘膜から再吸収されるので、通常のラットではラベル体の静脈注入後10~30分で膀胱粘膜や粘膜固有層にオートラジオグラフィーで grain が見られる。一方、尿管を結紮したラットでは grain は主に膀胱三角部の排尿筋の平滑筋や線維芽細胞に見られている。尿道に関する midodrine や DMAE の局在は文献的にも検討されていない。今回の検討では、肉眼的、光顕的オートラジオグラフィーの膀胱所見は Jonas らの尿管結紮のそれと同じく、主に膀胱頸部から三角部の平滑筋や線維芽細胞に grain の集積を見た。また尿道もほぼ同様の所見であった。我々の実験では静注後5分で屠殺したため、尿管結紮による血液動態や体液バランスの変化による生体への影響はあまり考慮する必要はなく、膀胱、尿道での midodrine、DMAE の組織内濃度や局在はほぼ生理的状況に近いと考えている。

文 献

- 1) Raz, S. and Caine, M.: Adrenergic receptors in the female canine urethra. Invest. Urol., 9, 319-323, 1972.
- 2) Kawabe, K. and Nijima, T.: Use of an α -blocker, YM-12617, in micturition difficulty. Urol. Int., 42, 280-284, 1987.
- 3) Pittner, H., Stormann, H. and Enzenhofer, R.: Pharmacodynamic actions of midodrine, a new α -adrenergic stimulating agent, and its main metabolite, ST-1059. Arzneim. Forsch. Drug

- Res., 26, 2145—2154, 1976.
- 4) 高橋 悟, 森山信男, 本間之夫, 東原英二, 阿曾佳郎, 山崎隆三郎, 奥山 茂: 雌イヌの膀胱・尿道に対する α_1 -アドレナリン刺激剤の尿水力学的作用. 日泌尿会誌, 82, 1292—1298, 1991.
 - 5) 諏訪俊男, 河野喜郎, 増田直記, 皆川俊哉, 佐野美恵子, 谷川恵子: Midodrine の体内動態(第2報), 組織分布および蛋白結合. 薬物動態, 2, 21—31, 1987.
 - 6) 土田勝晴, 山崎隆三郎, 金子勝義, 高橋健三, 吉住奈苗, 相原弘和: 新しい交感神経興奮薬 Midodrine の循環作用. 薬理と治療, 15, 89—104, 1987.
 - 7) 筒井末春, 長澤紘一, 本多和雄: 低血圧症に対する塩酸ミドドリンの有用性の検討. 臨床成人病, 17, 1201—1214, 1987.
 - 8) 丸山勝一, 後藤文男, 片山宗一, 平井俊策, 竹宮敏子, 水野美邦, 濱口勝彦, 平山恵造, 高須俊明, 赫彰郎, 萬年 徹, 古川哲雄, 渡邊晴雄, 宮原 正, 木下真男, 田崎義昭, 篠原幸人: midodrine hydrochloride の起立性低血圧に対する臨床的検討. 神経内科治療, 5, 51—67, 1988.
 - 9) 斉藤政彦, 後藤百万, 加藤久美子, 長谷川総一郎, 近藤厚生: 高齢ラットの膀胱利尿筋の無機イオンに対する反応. 日泌尿会誌, 81, 862—867, 1990.
 - 10) 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.
 - 11) Pittner, H.: Vasoconstrictor effects of midodrine, ST1059, noradrenaline, etilefrine and norfenefrine on isolated dog femoral arteries and vein. Gen. Pharmac., 14, 107—109, 1983.
 - 12) Awad, S.A., Bruce, A.W., Carro-Ciampi, G., Downie, J.W., Lin, M. and Marks, G.S.: Distribution of α - and β -adrenoceptors in human urinary bladder. Brit. J. Pharmac., 50, 525—529, 1974.
 - 13) Jonas, D., Moritz, F., Jenner, S. and Baumgarten, H.G.: In vivo labelling of Alpha-adrenoceptor-binding sites and membrane-bound extraneural transport sites in the urinary bladder of the rat by ^3H -ST-1059 and ^3H -phentolamine. Urologia. Int., 35, 47—62, 1980.
(1991年12月17日受理)