糖尿病ラット膀胱におけるムスカリンレセプターの分布に 関する研究: オートラジオグラフィーを用いて

鳥取大学泌尿器科学教室 (主任: 宮川征男教授)

齊藤 源顕 中村 勇夫 宮川 征男

AUTORADIOGRAPHIC LOCALIZATION OF MUSCARINIC RECEPTORS IN DIABETIC RAT BLADDER

Motoaki Saito, Isao Nakamura and Ikuo Miyagawa
Department of Urology, Tottori University School of Medicine
(Director: Prof. Ikuo Miyagawa)

(Purpose) We evaluated the alterations of density, localization and subtype specificity of muscarinic receptors in experimentally-induced diabetic rat bladder.

(Methods) Five groups of rats were maintained for sixteen weeks 1) diabetic, 2) diabetic insulin-treated (insulin started 8 weeks after the onset of diabetes), 3) sucrose-fed diuretic, 4) sucrose-removed and 5) age matched controls. We used radioligand binding technique and light microscopic autoradiography to define the density and distribution of muscarinic receptors in the rat urinary bladder.

(Results & Conclusion) Saturation experiments showed an increase in the density of muscarinic receptors in the bladders of diabetic and diuretic rats compared with age matched controls. Insulin treatment partially reversed the up-regulation of muscarinic receptors in rat urinary bladder. Autoradiographic studies also indicated that muscarinic receptors were located in all layers of the bladder muscularis. The muscularis of the bladder dome contained higher densities of muscarinic receptors than that of the bladder base. Lack of [³H]QNB binding to transitional epithelium, lamina propria, and tunica adventitia suggests an absence of muscarinic receptors in these regions. Inhibition of [³H]QNB binding to the bladder sections by selective muscarinic antagonists indicated existence of the M₂ and M₃ receptor subtypes in the muscularis of the rat bladder.

Key words: diabetic rat bladder, muscarinic receptor, autoradiography

要旨: (目的) 糖尿病によって、膀胱ムスカリンレセプターの濃度と局在およびサブタイプの変化が生じるか否かを実験的にラット膀胱を用いて検討した。

(対象と方法) ラットを16週間にわたり以下の条件にて飼育した。1) STZ により誘発された糖尿病群 2) インシュリン治療群 (糖尿病発症後 8 週目より開始) 3) シュークロス飲水による多尿群 4) シュークロス除去群 (多尿導入 8 週後除去) 5) コントロール群。これらの 5 群に対し、放射性リガンドを用いた膀胱平滑筋の飽和および結合抑制実験ならびにオートラジオグラフィーを施行し、ラット膀胱におけるムスカリンレセプターの濃度と分布を比較検討した。

(結果) 飽和結合実験では、糖尿病群、多尿群で膀胱におけるムスカリンレセプターの濃度がコントロール群に比べて増加した。インシュリン治療群では、膀胱ムスカリンレセプターのアップレギュレーションの改善が見られた、オートラジオグラフィーによりムスカリンレセプターが膀胱平滑筋層に存在することがわかった。膀胱頂部は、膀胱三角部に比べ高濃度のムスカリンレセプターが存在した。 [³H] QNB の結合が存在しないことにより、ムスカリンレセプターが移行上皮、粘膜固有層、外膜および結合

組織には存在しないことがわかった。 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ のラット膀胱切片の結合に対してムスカリンレセプターサブタイプへの選択的拮抗剤を用いた結合抑制実験から、 M_2 、 M_3 サブタイプの混在を示唆した。

キーワード：糖尿病ラット膀胱、ムスカリンレセプター、オートラジオグラフィー

緒 言

臨床的に、糖尿病に伴い下部尿路機能が障害されることは広く知られている。一般的に、糖尿病性自律神経障害は、それに起因する膀胱平滑筋の収縮力の低下を誘発し、排尿困難や溢流性尿失禁などの臨床症状を呈する¹⁾²⁾。これまでの実験的糖尿病病態下における膀胱平滑筋の自律神経障害に関しての報告は、ムスカリンレセプター濃度が増加し、その平滑筋のムスカリンアゴニストに対する反応性が亢進するとされている^{1)3)~5)}。

最近、分子生物学的に5つのムスカリンレセプターサブタイプ ($m1\sim m5$) がクローニングされた⁶⁾。また薬理学的には副交感性ムスカリンレセプター作動薬または拮抗薬の親和性の違いにより、ムスカリンレセプターは主に3つのサブタイプに分類されている。そして M_1 レセプターサブタイプはpirenzepine (PRZ) と4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidin (4-DAMP) に、 M_2 レセプターサブタイプはmethoctoramine (MET) に、 M_3 レセプターサブタイプは4-DAMP に親和性が高いことが報告されている^{7)~12)}。

STZにより誘導された糖尿病ラットおよびシュークロース群による誘導された多尿ラットは膀胱頂部においてムスカリンレセプターの濃度の増加 (アップレギュレーション) を示し、糖尿病の導入早期インシュリン治療 (糖尿病導入3日目) ではこのアップレギュレーションが予防され、後期インシュリン治療 (糖尿病導入8週目) では改善されることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、膀胱におけるムスカリンレセプターおよびそのサブタイプの局在についてはほとんど知られていない。

今回我々はこれら最近の知見による薬理学的手法として放射性リガンドを用いて、ラット糖尿病における膀胱平滑筋のムスカリンレセプターのサブタイプの変化とその局在について検討してみた。更に、インシュリン治療によってそれらの変化が可逆性であるか不可逆性であるかについても検討した。

対象と方法

実験動物

雄 Sprague-Dawley ラット (55~56日 齢, 体重 240~285g) を、糖尿病群, 糖尿病インシュリン治療群,

シュークロース群, シュークロース除去群, コントロール群の5群に分け16週間飼育した。糖尿病および糖尿病インシュリン治療群はSTZ (streptozotocin) を0.1 M の citrate buffer (pH 4.5) に溶解し、尾側静脈より65mg/kg 1回静脈注射した。糖尿病の導入確認は、注射の2日後尿中グルコース値を測定し (Chemstrip, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 1,000mg/dl 以上のラットを糖尿病ラットとした。糖尿病の導入より8週間後、糖尿病インシュリン治療群は5~8単位のインシュリン (protamin zinc insulin) の皮下注射を毎日8週間続けたが、糖尿病群はそのまま放置した。シュークロース群は、5%のシュークロース水溶液を16週間与えたが、シュークロース除去群は8週間後に飲料水からシュークロースを除去した。各群のラットは食料および水分は自由に摂取できるようにした。各群ラットは、糖尿病の導入より16週間後に断頭し、血液サンプルと膀胱を迅速に摘出した。血清グルコース値はヘキソキナーゼ法を用いて測定した (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。また血清インシュリン値と血清テストステロン値はラジオイムノアッセイを用いて測定した (Ventrex Laboratories Inc., Portland, ME, および Diagnostic Products Corp. Los Angeles, CA)。

実験方法

各群の膀胱は摘出後、迅速にHistoprepを用いて包埋し、ドライアイスの上に置いて凍結した後、 -80°C で保存した。 -20°C の条件下で、クリオスタット (2800 FRIGIOCUTN, Cambridge Instruments GmbH, West Germany) を用いてゼラチンコートしたスライドガラス上に20 μm の連続切片を作製した。各切片は、使用時まで再び -80°C で保管した。

飽和結合実験：まず最初に至適条件を設定するため以下の予備実験を施行した。20mM HEPES (100mM NaCl, 1mM MgCl_2 , pH 7.35) に $[^3\text{H}]\text{QNB}$ を1.5 nM となるように希釈し、スライドガラス上の膀胱組織に前記の反応液を0.5ml 加え、1, 5, 15, 30, 60, 90分反応させた (23°C)。なお、この反応液に $\text{ATP } 10^{-6}\text{ M}$ 加えた場合と加えなかった場合の差をリガンドの特異的結合とした。反応後 Tris-HCl (pH 8.0, 4°C) にて10分間2回洗浄した。この結果、60分後には放射

Table 1 General features of experimental animals

	C	DM	DI	S(-)	S(+)
Body Wt., g					
initial	257±2	259±3	257±2	256±3	258±3
8 Weeks	512±6	280±3 ^a	275±10 ^a	530±11	515±15
16 Weeks	610±9	301±11 ^b	471±9 ^c	622±19	613±20
Bladder Wt., mg	120±5	211±20 ^b	168±4 ^c	147±6 ^c	240±7 ^c
S. Glucose, mM	7.3±0.1	30.3±1.2 ^a	21.4±2.0 ^c	8.0±0.2 ^c	8.1±0.2 ^c
S. Insulin, μ U/l	430±27	62±7 ^a	1168±25 ^c	555±47	507±43
Water Intake, ml/day	40±2	198±5 ^a	76±6 ^c	43±2 ^b	191±16 ^c

Diabetes was induced in diabetic and insulin-treated diabetic groups with a single i.v. injection of 65 mg/kg STZ. Beginning eight weeks after the injection of diabetes, the insulin treated diabetic group received 5-8 units of protamine zinc insulin, subcutaneously daily for eight weeks whereas the diabetic group was left untreated for the same period of time. Sucrose-fed and sucrose removed groups were given 5% sucrose water orally. After eight weeks sucrose was removed from the drinking water of the sucrose removed group. Data are shown as mean±S.E.M. of 20 to 25 determinations in each group. Sixteen weeks after the initial injection of STZ or vehicle, rats were killed by decapitation.

C; control, DM; diabetic, DI; diabetic insulin treated, S(+); sucrose-fed for all periods, S(-); sucrose removed. $p<0.05$ is level of significance.

a) significantly different from C, S(+), S(-) of the same age group.
b) significantly different from C, DI, S(+), S(-) of the same age group.
c) significantly different from C, DM, S(+), S(-) of the same age group.
d) significantly different from C, S(+) of the same age group.
e) significantly different from C.
f) significantly different from DM, DI of the same age group.
g) significantly different from C, DI, S(-) of the same age group.
h) significantly different from DM, DI, S(+) of the same age group.

線で標識したリガンドが膀胱組織と結合し平衡状態に達し、90分まで持続することが確認された (Fig. 1A). 次に洗浄時間を設定するための予備実験を行った. 20 mM HEPES (100mM NaCl, 1mM MgCl₂, pH 7.35) に [³H]QNB を 1.5nM となるように希釈し, 膀胱組織と反応液を合計 0.5ml となるように加え, 60分間反応させた (23°C) 後, 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60分間の洗浄を 2 回行った (Tris-HCl, pH 8.0, 4°C). この結果洗浄時間は 5 分間の 2 回の洗浄でリガンドの膀胱組織への結合が平衡になることが確認された (Fig. 1B). ここで, 各群の膀胱組織を 20mM HEPES (100 mM NaCl, 1mM MgCl₂, pH 7.35) に [³H]QNB を 0.08nM から 2.0nM となるように希釈し, 反応液を合計 0.5ml とし, 60分反応させた (23°C) 後, 洗浄を 5 分間 2 回行った (Tris-HCl, pH 8.0, 4°C). ここで得られた膀胱切片のうち半分を放射能の測定用に, 残りの半分をオートラジオグラフィ用とした. この放射線で標識された膀胱組織をスライドガラスから Whatman GF/B glass fiber でふき取り, この放射線で標識された膀胱組織と glass fiber を counter vial に移し Uitima Gold (Packard, Sterling, VA) を 4ml 加え 12時間放置拡散させた後, liquid scintillation counter (Packard, Tri-Carb 1600CA) で放射能を測定した. 蛋白質の測定のため膀胱の連続切片の 5 枚ごとに, スライドガラスから剃刀刃で削り取った膀胱組織を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 4ml の中に溶解させた. この

溶液の蛋白質含有量を牛血清アルブミンを標準として, Lowry 法で測定した¹⁶⁾.

結合抑制実験: [³H]QNB の膀胱組織に対する結合抑制実験は, M₁レセプターサブタイプ選択的薬剤である pirenzopine (PRZ), M₂レセプターサブタイプ選択的薬剤である methoctramine (MET), M_{1/3}レセプターサブタイプ選択的薬剤である 4-DAMP および非

選択的な atropine (ATR) のムスカリンレセプター選択的阻害剤を7段階の濃度に分け、20mM HEPES (100mM NaCl, 1mM MgCl₂, pH 7.35) に [³H]QNB を1.5nM となるように希釈した。この溶液を合計0.5 ml とし、60分間各群の膀胱組織と反応させた (23°C) 後、5 分間の洗浄を2 回行った (Tris-HCl, pH 8.0, 4°C)。以降の操作は飽和結合実験と同様に施行した。

オートラジオグラフィー：飽和結合実験および結合抑制実験において得られた半数の切片を用いて行った。洗浄を5 分間2 回行った (Tris-HCl, pH 8.0, 4°C) 後、ドライアイスで冷却した空気で乾燥させ、カセットの中に並べた。暗室でこのカセットに Hyperfilms-³ H を装着し、3 週間4°Cにて露光させた。このフィルムは3 週間後 Radio Kodak D19を用いて現像した。現像後、膀胱切片をヘマトキシリンエオジン染色して光学顕微鏡で検鏡した。

結果の解析：得られた飽和結合曲線は Rosenthal の方法¹⁷⁾で X 軸を bound, Y 軸を bound/free とする直線に変換し、直線の X 切片から最大結合部位数 (Bmax 値) を、傾きの負の逆数から K_D 値を求めた。また linear regression analysis より Hill の係数 (n_H) を算出した。結合抑制実験においては、コンピューター解析 (log-logist 解析) により実験に使用したムスカリンックレセプター選択的薬剤の IC₅₀ ([³H]QNB のラット膀胱に対する結合を50%抑制するのに必要な濃度) を求めた。さらにこの IC₅₀ 値より Cheng と Pruff の方法により抑制定数 (Ki 値) を算出した (Ki=IC₅₀/(1+F/KD), F=free ligand)^{18)~20)}。結果の統計的有意差の検定に分散分析と多量 Fisher 検定を用いて、p<0.05を有意差有り と判定した。

オートラジオグラフィーは光学顕微鏡よりコンピューターに取り込み NIH Image 1.54を使用してコンピューター解析した。そして各群ラット膀胱ムスカリンレセプターの濃度をこのプログラムを用いて疑似カラー化し提示した。ヘマトキシリンエオジン染色したラット膀胱切片は光学顕微鏡で検鏡した。

使用薬剤：[³H]QNB (44.3Ci/mM) は New England Nuclear (Boston, MA) より購入した。Atropine, pirenzepine, methoctramine, 4-DAMP は Sigma Chemical (St. Louis, MO) より購入した。その他の試薬は一般の市販品を使用した。Atropine, pirenzepine, 4-DAMP は0.05%塩酸を用いて希釈した。methoctramine は最初の95%エタノールで溶解した後、0.05%塩酸を用いて希釈した。

Table 2 Saturation of [³H]QNB binding in rat bladder

	C	DM	DI	S(+)	S(-)
Bmax fmol/mg prot	79±18	137±9 ^a	114±21	134±8 ^a	78±3
K _D , pM	355±4	301±91	434±139	358±20	363±13

Data are analyzed by the liner regression of bound vs. bounds/free¹⁷⁾. Bmax; maximum number of binding sites, K_D; equilibrium dissociation constant. C; control, DM; diabetic, DI; diabetic insulin treated, S(+); sucrose fed for all periods, S(-); sucrose removed. Data are shown as mean±S.E.M. of three to four determinations in each group. p<0.05 is levels of significance.
a) significantly different from C and S(-).

Table 3 Inhibition of [³H]QNB binding to rat urinary bladder by muscarinic antagonists

	C	DM	DI	S(+)	S(-)
PRZ Ki (nM)	1323±384	1350±298	1595±163	960±249	1182±728
n _H	0.79±0.19	0.75±0.07	0.80±0.14	0.69±0.02	0.88±0.16
MET Ki (nM)	200±11	107±47	162±29	166±419	107±71
n _H	1.21±0.18	1.09±0.12	1.04±0.21	0.86±0.06	0.89±0.09
4-DAMP Ki (nM)	10.6±4.5	5.1±1.7	23.6±7.1	7.6±1.9	11.9±6.7
n _H	0.83±0.11	0.70±0.02	0.84±0.06	0.87±0.08	0.68±0.02
ATR Ki (nM)	2.1±0.5	1.9±0.8	2.1±1.1	3.6±0.6	4.9±2.7
n _H	0.92±0.13	0.75±0.03	0.78±0.08	0.80±0.03	0.82±0.14

Data are analyzed with non-linear curve fitting program LIGAND according to a one site binding model. Ki is inhibition constant and n_H is Hill coefficient. C; control, DM; diabetic, DI; diabetic insulin treated, S(+); sucrose fed for all periods, S(-); sucrose removed. Values are mean±S.E.M. of three separate experiments.
PRZ; pirenzepine, MET; methoctramine, 4-DAMP; 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodine, ATR; atropine.

結 果

実験動物：実験動物の結果を Table 1 に示す。糖尿病ラット群は体重減少(コントロール比55%)、膀胱重量の増加(同76%)、血清グルコース値の増加、血清インシュリン値の減少、飲水量の増加をコントロール群と比べて示した。インシュリン治療群はこれらの検査項目(体重、膀胱重量、血清グルコース値、血清インシュリン値、飲水量)は血清インシュリン値を除いてすべて改善傾向を示したが、完全にはコントロール群まで回復しなかった(体重はコントロール群の77%、膀胱重量は140%)。シュークロース群は体重、血清グルコース値およびインシュリン値はコントロール群と比べて有意差がなかったが、膀胱重量は2 倍に、飲水量は糖尿病群と同程度を示した。シュークロース除去群はすべての検査項目(体重、膀胱重量、血清グルコース値、血清インシュリン値、飲水量)でコントロール群と同程度の値を示した。

飽和結合実験：まず初めに行った予備実験では、[³H] QNB スライドガラス上の膀胱組織に対する結合は反応時間依存性であり、反応開始後60分で平衡状態に達した。またすでに [³H]QNB 標識した膀胱組織は洗浄時間に依存して減少していき、5 分間の洗浄を2 回で平衡状態に達した (Fig. 1A, B)。

Fig. 2 Autoradiographic Localization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Control and Diabetic Rat Bladder. A and F, Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained rat bladder sections; B-D and G-I, Colored computerenhanced autoradiographs of approximately 0.08~2 nM of [3 H]QNB binding to bladder sections; E and J, Non-specific binding determined in the presence of 1 μ M atropine. C; A-E, DM; F-J.

実験した各群のラット膀胱組織に対する [3 H]QNB の飽和結合実験では、飽和可能な単一の結合部位が存在することが判明した。Table 2 に各群膀胱の最大結合部位数 (Bmax 値, fmol/mg protein) と解離定数 (K_D , pM) を示した。この実験において膀胱ムスカリン受容体の最大結合部位数は、糖尿病群およびシュクロース群においてコントロール群と比べて有意に増加を示した。インシュリン治療群は膀胱ムスカリン受容体濃度が回復傾向を示したが、糖尿病群、コントロール群と比べて有意差がなかった。またシュクロース除去群は膀胱ムスカリン受容体濃度がコントロール群と同程度であった。解離定数においては若干のばらつきがあったが各群とも有意差がなかった。

結合抑制実験：PRZ, MET, 4-DAMP, ATR は濃度依存性に [3 H]QNB のラット膀胱に対する結合を抑制した。Table 3 に各群の膀胱ムスカリン受容体の [3 H]QNB の結合に対する PRZ, MET, 4-DAMP, ATR の抑制定数 (K_i 値) を示した。このデータはワンサイトモデルとして解析した。膀胱の [3 H]QNB

結合に対する各薬剤の抑制能力は ATR > 4-DAMP > MET > PRZ であった。また抑制実験において抑制曲線の傾きを示す指標である Hill の係数は MET が若干高い値を示したが、各薬品間ではほぼ一定の値を示していると思われた。この結果は実験した 5 群とも同様の結果を示した。

オートラジオグラフィー： [3 H]QNB の膀胱組織に対する結合は、フィルム上黒点として観察される。この黒点を光学顕微鏡を通してコンピューターに読み込ませ、この黒点の濃度を NIH Image 1.54 を用いて疑似カラー化した。ヘマトキシリンエオジン染色を施行した膀胱切片を鏡検した結果、糖尿病群およびシュクロース群は膀胱平滑筋の肥大を示したが、インシュリン治療群およびシュクロース除去群はこの肥大が改善していた。Fig. 2 に糖尿病およびコントロール群の膀胱の飽和結合実験で用いた切片のヘマトキシリンエオジン染色とオートラジオグラフィーの 1 例を示した。膀胱組織に対する最も高濃度の [3 H]QNB 結合 (ムスカリン受容体) は膀胱頂部の 3 層の膀胱平滑筋に存在した。また膀胱三角部の平滑筋の受容体濃

Fig. 3 Autoradiographic Localization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Control and Diabetic Rat Bladder. A and F, Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained rat bladder sections; B-E and G-J, Colored computerenhanced autoradiographs of approximately 0.1 nM of [3 H]QNB binding to bladder sections in the presence of 0, 3×10^{-7} , 3×10^{-6} and 1×10^{-5} M of pirenzepine. C; A-E, DM; F-J.

度は膀胱頂部に比べて低かった。移行上皮、粘膜固有層、外膜および結合組織にはムスカリンレセプターは存在しなかった。 [3 H]QNB の各濃度の膀胱組織に対する非特異的結合のオートラジオグラフィーは、ほぼフィルムのバックグラウンドと同様であった。 Fig. 3, 4, 5, 6 に糖尿病およびコントロール群の膀胱の結合抑制実験で用いた切片のヘマトキシリンエオジン染色とオートラジオグラフィーの例を PRZ, MET, 4-DAMP および ATR の順に示した。 PRZ は M₁レセプターの選択的阻害剤であるが、 10^{-4} M より低濃度で [3 H]QNB の膀胱に対する結合が観察された。 MET は、M₂レセプターの選択的阻害剤であるが、 10^{-6} M より低濃度で [3 H]QNB の膀胱に対する結合が観察された。 M_{1/3}の選択的阻害剤である4-DAMP および非選択的阻害剤である ATR はそれぞれ 10^{-7} M より低濃度でムスカリンレセプターは観察された。 これらの実験によると、ムスカリンレセプターは膀胱平滑筋に存在し、特に膀胱頂部の方が膀胱三角部よりも高濃度であった。 また移行上皮、粘膜固有層、外膜および結合組織にはムスカリンレセプターは存在しなかった。 イン

シュリン治療群、シュークロース群そしてシュークロース除去群のオートラジオグラフィーにおいても同様のことが観察された(データ未提示)。 しかし、各ムスカリンレセプターの阻害剤 (PRZ, MET, 4-DAMP, ATR) を用いた結合抑制実験からムスカリンレセプターサブタイプの分布に違いは確認できなかった。

考 察

今回の実験では、糖尿病の諸病態における膀胱平滑筋ムスカリンレセプターの変化を調べるため、糖尿病群、インシュリン治療群、多尿ラット実験モデルとしてシュークロース飲水ラット群、シュークロース除去ラット群、無治療群の5群で比較検討した。

ムスカリンレセプターの各群の膀胱における濃度 (Bmax 値) は、糖尿病およびシュークロース群ではコントロール群に比べて有意に増加傾向を示した。 また、シュークロース除去群ではシュークロース群に比べて有意に下がり、ほぼコントロール群のレベルまで下がっていたが、インシュリン治療群は糖尿病群とコントロール群との中間値を示した。 また、解離定数に関

Fig. 4 Autoradiographic Localization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Control and Diabetic Rat Bladder. A and F, Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained rat bladder sections; B-E and G-J, Colored computerenhanced autoradiographs of approximately 0.1 nM of [3 H]QNB binding to bladder sections in the presence of 0, 3×10^{-8} , 1×10^{-7} and 1×10^{-6} M of methoctramine. C; A-E, DM; F-J.

しては各群とも変化がなかった。糖尿病群と多尿群ではほぼ同量の飲水があり、このことは、尿量がほぼ同量であると推定できる。糖尿病群と多尿群の膀胱では、ほぼ同量のムスカリンレセプター濃度であった。このことより、多尿がムスカリンレセプターのアップレギュレーションが起こる機序の重要な因子と思われた。またシュクロース除去群では完全に飲水量がコントロールのレベルまで回復したにも関わらず、インシュリン治療群では完全に回復しなかった。シュクロース除去群では完全にムスカリンレセプター濃度のレベルがコントロールのレベルまで回復したにも関わらず、インシュリン治療群では完全には回復しなかった。この実験結果は、糖尿病ラット膀胱のムスカリンレセプターのアップレギュレーションは、糖尿病における多尿により二次的に引き起こされていることを強く示唆している。しかし、糖尿病のラット膀胱におけるムスカリンレセプターのアップレギュレーションの機序は、多飲以外に蛋白合成の亢進や分解の低下や、糖尿病により誘発された内分泌異常も含めた複雑なメカニズムによるものも完全には否定できな

い¹³⁾¹⁵⁾²³⁾。血糖値、膀胱重量、飲水量の改善および膀胱におけるムスカリンレセプター濃度の改善から判断して、インシュリン治療は糖尿病に合併した神経因性膀胱に有効な治療であることが示唆された。

ムスカリンレセプターは、ムスカリンレセプターの選択的阻害剤の親和性の違いから、薬理学的に3ないし4のサブタイプに分類されている。このうち M_1 レセプターは脳皮質に多く存在し、選択的阻害剤としては PRZ が知られている。 M_2 レセプターは、心筋に存在することが報告されており、MET が選択的阻害剤として報告されている。 M_3 レセプターは腺組織に多く存在し、4-DAMP が高い親和性を示すことが報告されている^{7)~11)}。このほかに M_4 レセプターを分類する報告もあるが²¹⁾、レセプターサブタイプの選択的阻害剤は現在のところ報告されていない。また、多くの平滑筋ではムスカリンレセプターの複数のサブタイプが、混在していることが報告されている²²⁾。今回の実験で、我々は PRZ, MET, 4-DAMP, ATR の各選択的ムスカリンレセプター阻害剤を用いて各群のラット膀胱のムスカリンレセプターをサブタイプへの分類を試み

Fig. 5 Autoradiographic Localization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Control and Diabetic Rat Bladder. A and F, Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained rat bladder sections; B-E and G-J, Colored computerenhanced autoradiographs of approximately 0.1 nM of [3 H]QNB binding to bladder sections in the presence of 0, 1×10^{-9} , 1×10^{-8} and 1×10^{-7} M of 4-DAMP. C; A-E, DM; F-J.

た。その結果、[3 H]QNB の膀胱組織に対する結合抑制実験では $ATR > 4\text{-DAMP} > MET > PRZ$ の順に抑制能力が高かった。この結果は実験した 5 群とも同様であった。この結果より糖尿病病態下においては、膀胱平滑筋のムスカリンレセプターサブタイプの組成の変化が有意に起こっていないことが示唆された。これらの薬剤の抑制能力は、 M_1 レセプターサブタイプが主に発現しているラット大脳皮質では、 $ATR > 4\text{-DAMP} > PRZ = MET$ 、 M_2 レセプターサブタイプが優位なラット心筋では $ATR > MET \geq 4\text{-DAMP} > PRZ$ 、 M_3 レセプターサブタイプが主に発現しているラット前立腺では $ATR > 4\text{-DAMP} \geq PRZ > MET$ と報告されている¹⁵⁾²³⁾。我々のデータは上記のムスカリンレセプターを典型的に発現しているどの組織とも異なるが、4-DAMP の作用が強く PRZ の作用が弱いこと、比較的 MET の作用も強いことより、ラット膀胱には M_2 と M_3 サブタイプが混在しているのではないかと推測した。我々は家兎膀胱のムスカリンレセプターのサブタイプは M_2 が優位なレセプターだと報告した²²⁾。Fukumoto らは、本実験と同様の結合抑制実験をホモジ

ネートしたラット膀胱平滑筋の細胞膜で行い、ラット膀胱のサブタイプは M_2 と報告している¹⁵⁾。一般に K_i 値は、ホモジネートした細胞膜を用いて結合実験を行った方が、スライドガラス上の組織を使用して結合抑制実験を行うより数倍小さい値をとることが多い。しかし、我々の実験では MET の作用が Fukumoto らの報告に比べて弱く、結果的に今回使用した 4 種のムスカリンレセプター阻害剤の K_i 値の順位が異なっていた。このことは、MET はホモジネートした細胞膜には強く作用するが、スライドガラスに乗せた膀胱組織では何らかの影響をうけて、薬理作用が弱くなることを示していると思われた。また、現在報告されているムスカリンレセプターの選択的阻害剤の選択性はそれほど無くなく、特に M_3 のみに選択的に働く阻害剤は存在しないため、ムスカリンレセプターサブタイプの割合を正確に述べることは難しいと思われた²²⁾。

今回我々は、オートラジオグラフィーを施行するにあたって、放射線感受性のフィルムを使用した。他の方法として、乳剤を使用し直接組織切片に黒点として示す方法がある。どちらの方法にも一長一短があり、

Fig. 6 Autoradiographic Localization of Muscarinic Cholinergic Receptors in Control and Diabetic Rat Bladder. A and F, Photomicrographs of hematoxylin-eosin stained rat bladder sections; B-E and G-J, Colored computerenhanced autoradiographs of approximately 0.1 nM of [3 H]QNB binding to bladder sections in the presence of 0, 1×10^{-10} , 1×10^{-9} and 1×10^{-7} M of atropine. C; A-E, DM; F-J.

より詳しい局在には乳剤を使用する方が適しているが、レセプターの濃度をコンピューター解析を用いてカラー化するには、フィルムを使用する方が他の影響がより少ないので適していると思われた。ラット膀胱組織のオートラジオグラフィーからムスカリンレセプターは膀胱頂部の平滑筋にも最も高濃度に存在し、膀胱三角部では濃度が低いことが確認できた。また、移行上皮、粘膜固有層、外膜および結合組織には存在しなかった。この膀胱平滑筋には副交感神経のコリン作動性神経の神経末端が豊富に存在していることが様々な方法で報告されているが²⁴⁾、直接ムスカリンレセプターの局在を確認した報告は見あたらない。また、Latifpour らは、ラット膀胱頂部のムスカリンレセプターはコントロール群、糖尿病群とも膀胱三角部の紙2倍の濃度であったと報告している¹³⁾。我々のオートラジオグラフィーの結果はこの報告とよく一致するものと思われた。各ムスカリンレセプター選択的阻害剤を用いたオートラジオグラフィーでは、どの薬剤を用いて結合阻害実験を行ってもムスカリンレセプターの分布には差がなかった。以上の結果より、ムスカリン

レセプターは、膀胱平滑筋に存在するが、移行上皮、粘膜固有層、外膜および結合組織には存在せず、また、そのレセプターのサブタイプ $M_{2,3}$ サブタイプであるが、このレセプターのサブタイプによる分布の差はなかった。このことは、実験した5群について共通していた。

稿を終るに当たり、この実験を指導していただいた Yale 大学医学部泌尿器科主任教授 R.M. Weiss 教授および J. Latifpour 博士、M. Yoshida 博士、Y. Fukumoto 博士に深謝致します。この実験の一部は、第12回国際薬学会(1994年モントリオール)にて発表した。

文 献

- 1) Faerman, I., Maler, M., Jaddzinsky, M., Alvarez, E., Fox, D., Zilbervarg, J., Cibeire, J.B. and Colinas, R.: Asymptomatic neurogenic bladder in juvenile diabetes. *Diabetologia*, 7, 168-172, 1971.
- 2) Ellenberg, M.: Development of urinary bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Ann. Inter. Med.*, 92, 321-323, 1980.
- 3) Bissada, N.K. and Finkbeiner, A.E.: Neuropharmacology of the lower urinary tract. in

- Pharmacology of Genitourinary Tract and Male Reproductive System, edited by Finkbeiner, A.E., Barbour, G.L. and Bissada, N.K. p199—216, Appleton-Century-Crofts, New York, 1982.
- 4) Kolta, M.G., Wallace, L.J. and Gerald, M.C.: Streptozotocin-induced diabetes affects rat urinary bladder response to automatic agents. *Diabetes*, **34**, 917—921, 1985.
 - 5) Kudlacz, E.M., Gerald, M.C. and Wallace, L.J.: Effects of diabetes and diuresis on contraction and relaxation mechanisms in rat urinary bladder. *Diabetes*, **38**, 278—284, 1989.
 - 6) Dorje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. and Brann, M.R.: Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 727—733, 1991.
 - 7) Eglen, R.M. and Whiting, R.L.: Muscarinic receptor subtypes; a critique of the current classification and proposal for a working nomen clature. *J. Auton. Pharmacol.*, **5**, 323—346, 1986.
 - 8) Michelson, F.: Muscarinic Receptor differentiation. *Pharmacol. Ther.*, **37**, 357—423, 1988.
 - 9) Hammer, R. and Giachetti, A.: Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, **31**, 2991—2998, 1982.
 - 10) Soulie, M.L., Cros, G., Serrano, J.J. and Bali, J. P.: Impairment of contractile response to carbachol and muscarinic receptor coupling in gastric antral smooth muscle cells isolated from diabetic streptozotocin-treated and db/db mice. *Mol. Cell. Biochem.*, **109**, 185—188, 1992.
 - 11) Melchiorre, C., Angeli, P., Lambrecht, G., Mutschler, E., Picchio, M.T. and Wess, J.: Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **144**, 117—124, 1987.
 - 12) Hulme, E.C., Birdsall, M.J.M. and Buckley, N. J.: Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 633—673, 1990.
 - 13) Latifpour, J., Gousse, A., Kondo, S., Morita, T. and Weiss, R.M.: Effects of experimental diabetes on biochemical and functional characteristics of bladder muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**, 81—88, 1989.
 - 14) Latifpour, J., Nishimoto, T., Marian, M.J., Yoshida, M. and Weiss, R.M.: Differential regulation of bladder β -adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in experimental diabetes. *Diabetes*, **40**, 1150—1156, 1991.
 - 15) Fukumoto, Y., Yoshida, M., Weiss, R.M. and Latifpour, J.: Reversibility of diabetes- and diuresis-induced Alterations in rat bladder dome muscarinic receptors. *Diabetes*, **43**, 819—826, 1994.
 - 16) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measuremetn with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—274, 1951.
 - 17) Rosenthal, H.E.: Graphic methods for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem.* **20**, 525—532, 1967.
 - 18) Bennett, J.P. and Yamamura, H.I.: Neurotransmitter, Hormone, or drug receptor binding methods. in *Neurotransmitter Receptor Binding*. Edited by Yamamura, H.I., Enna, S.J. and Kuhar, M.J. Raven Press, p61—89, 1985.
 - 19) Chen, Y.C. and Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibition which causes 50% inhibition (I_{50}) of an enzyme reaction. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 3099—3108, 1973.
 - 20) DeLean, A., Hanock, A.A. and Lefkowitz, R.J.: Validation and statical analysis of computer modeling methods for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of oharmacological receptor subtype. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 5—16, 1982.
 - 21) Batink, H.D., Davidesko, D., Doods, H.N., van Charldorp, K.J., de Jonge, A. and van Zwieten, P.A.: Subdivision of M2 receptors into 3 subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 81, 1987.
 - 22) Mutoh, S., Latifpour, J., Saito, M. and Weiss, R. M.: Evidence for the regional differences in the subtype specificity of muscarinic receptors in rabbit lower urinary tract. *J. Urol.* **157**: 717—721, 1997
 - 23) Kamai, T., Fukumoto, Y., Gousse, A., Yoshida, M., Davenport, T.A., Weiss, R.M. and Latifpour, J.: Diabetes-induced alterations in the properties of muscarinic cholinergic receptors in rat vas deferens. *J. Urol.*, **152**, 1017—1021, 1994.
 - 24) Nakamura, I., Takahashi, C. and Miyagawa, I.: The alteration of norepinephrine and acetylcholine concentrations in immature rat urinary bladder caused by streptozotocin-induced diabetes. *J. Urol.*, **148**, 423—426, 1992.

(1996年12月24日受付, 1997年3月24日受理)