

間質性膀胱炎動物モデルの行動学的および組織学的解析

緒言

間質性膀胱炎（IC）は、頻尿、尿意亢進、尿意切迫感、炎症、膀胱痛等の症状を示す非感染性の慢性膀胱炎であり、患者の生活の質（QOL）は著しく低下する。ICは稀な疾患と考えられてきたが、近年ICの認知度が高まるにつれ、非常に多くの患者がいることが分かってきた。未だ診察を受けていない患者や、正しい診断をされていない潜在患者を含めると、100人に1人は患者がいるとも言われている。しかし、ICの根本的な原因は未だ明らかにされておらず、ICおよびICに伴う諸症状に対する治療薬・治療法は、ほとんど実用化されていない。ICの治療薬開発が進まない原因の一つに、ICの病態を適切に反映した動物モデルが存在しないことが挙げられる。すなわち、これまでにアルキル化剤である抗悪性腫瘍薬シクロホスファミドを用いたモデル等が膀胱炎モデルとして挙げられるが、いずれも頻尿や炎症がわずかに数日で回復してしまい、また、ICに見られるような各臨床所見が認められないものが多いなど、慢性膀胱炎であるICの適切な動物モデルとは言い難い。一方、近年、虚血、炎症等に起因する膀胱組織障害に酸化ストレスの増大が関連し、ラジカルスカベンジャーや抗酸化剤が組織保護に有効であることが報告されている。また、IC患者の尿中および膀胱組織における酸化ストレスマーカーの増加が報告されている。さらに、このような酸化ストレスを起こす要因として活性酸素種（ROS）の関与が示唆されている。そこで当研究室ではこれまでに、ROSの一つである過酸化水素（ H_2O_2 ）をマウス膀胱内へ一過性に注入することにより、頻尿や膀胱の炎症が既存モデルより長期間持続する慢性膀胱炎マウスモデルを確立し、報告してきた。

以上のような背景のもと、本研究において著者は、この H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルについてより長期的な行動学的および組織学的解析を行うことで、ICモデルとしての妥当性を評価するとともに、より詳細な解析が可能なラットモデルを作製し、その病態形成メカニズムについても検討を行った。

第一章

H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルの病態解析

ICの原因は一つではなく、多くの要因（自己免疫性、アレルギー性、神経原性、環境、遺伝など）が関与していると考えられているが、不明な点が多く、ICおよびICに伴う諸症状に対する治療薬・治療法は、ほとんど実用化されていない。治療薬開発が進まない原因にはICの原因が不明なことに加え、ICの病態を適切に反映した動物モデルが存在しないことが挙げられる。そこで、ICの臨床像をより適切に反映した慢性膀胱炎モデルの創出が必要である

と考えられてきた。当研究室ではこれまでに、 H_2O_2 をマウス膀胱内へ一過性に注入することにより、頻尿や膀胱の炎症が既存モデルより長期間持続する慢性膀胱炎マウスモデルを確立し報告してきた。この H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルでは、少なくとも7日以上持続する排尿回数の増加と膀胱重量の増加、炎症性サイトカインの増大および膀胱組織の炎症所見が認められる。しかしながら、炎症に関与する炎症性細胞や、炎症が長期化した膀胱の組織学的評価や、慢性炎症に伴う行動などより詳細な検討は未だ行われていなかった。そこで、本章では、特に慢性期（7日以降）での組織学および行動学的変化に着目してより詳細な解析を行った。

雌性マウス（5-6週齢）に経尿道的に1.5% H_2O_2 を膀胱内に50 μ L注入し30分間貯留させた後、排出させることでモデルを作製した。本モデルでは長期間にわたる頻尿や膀胱重量の増加、各種炎症性サイトカインの産生増大などが報告されているが、本章では、それらを引き起こす炎症性細胞である好中球の浸潤およびマクロファージの浸潤・活性化について、蛍光免疫染色により評価を行った。 H_2O_2 膀胱内注入群では、生理食塩水膀胱内注入群と比較して、 H_2O_2 膀胱内注入の3時間後という急性期から好中球のマーカであるGr1の陽性細胞数は顕著に増大し、少なくとも7日後まで持続し14日後でも増大傾向にあった。この結果より、比較的長期にわたって好中球が膀胱組織に浸潤していることから、本モデルでは長期的に炎症状態にあることが示唆される。一般に、好中球は急性期に増大し、その後消失する炎症性細胞で、単球・マクロファージの浸潤・活性化は好中球と比較して遅れて浸潤・活性化してくるが、好中球が、本モデルにおいて比較的長時間組織中に確認されることは、本モデルに特徴的である可能性がある。マクロファージのマーカであるIba1の蛍光強度は、 H_2O_2 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、急性期では変化はなかったが、7日後から顕著に増大し、14日後においても持続していた。急性炎症により増大した好中球などから、炎症性サイトカインやケモカインが放出され、マクロファージなどの浸潤・活性化を引き起こしていることが考えられる。本モデルは、7日以上持続する排尿回数の増加と膀胱重量の増加、炎症性サイトカインの増大および膀胱組織の炎症所見が認められることを報告しているが、このように、膀胱に浸潤してきた炎症性細胞から産生される炎症性サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン類（PGs）および内因性の活性酸素種（ROS）のような炎症性メディエーターは膀胱の知覚神経の活性化を引き起こし、その結果膀胱の過活動が惹起されることが示唆される。

炎症状態においては、種々の細胞がトランスフォーミング増殖因子- β （TGF- β ）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）などの血管形成因子を放出することが報告されており、これらの因子により新生された血管が損傷組織の修復に必要であることが知られている。患者の膀胱を拡張させた際に見られる出血を点状出血と呼ぶが、これは血管新生によって生じた脆弱な血管の過伸展による破綻であると言われている。本モデルにおいて内皮細胞・血管新生のマーカであるCD31に対し

て免疫組織化学的検討を行い、血管数の定量を行った結果、 H_2O_2 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、7日、14日後において、特に粘膜下層において顕著に血管数は増大していた。本モデルでは長時間にわたって、浸潤した好中球やマクロファージなどの炎症性細胞から放出された増殖因子によって血管新生が起こっていることが示唆される。同様に、長期に炎症が持続し増殖因子が過度に作用すると組織の線維化が懸念されるため、肺線維症、肝硬変、腎炎などと同様にICにおいても過剰修復は避けたい事項であるといえる。本モデルの7日、14日における膀胱組織に対して膠原線維を染め分けるマッソントリクローム染色を行ったところ、 H_2O_2 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、両日とも平滑筋層の肥厚化が認められ、膠原線維の割合も増大していた。また、血管新生や、組織線維化に關与する増殖因子のFGF2、VEGF-Aは、本モデルにおいても H_2O_2 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、急性期に顕著に増大または増大傾向にあり、さらにTGF- β は7日、14日後といった慢性期で増大していた。

IC患者では疼痛が問題となるため、本モデルでも疼痛の評価を行った。 H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルについて内臓痛を反映するとされる自発運動活性の評価したところ、 H_2O_2 膀胱内注入群で自発運動活性の低下が認められた。しかし、3時間後という急性期でのみ自発運動活性の低下が生じ、翌日にはほぼ回復したため、慢性期の膀胱関連痛については評価できなかった。そこで慢性期の膀胱関連痛を評価するため、モデル作製後のマウス膀胱内に生理食塩水を注入することで膀胱を拡張させる手法を考案した。膀胱を生理食塩水で拡張させると、惹起される下腹部へのlicking行動は、 H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルにおいて増加した。この増加は、 H_2O_2 投与後の急性期（3時間、1日後）では認められず、慢性期（7日、14日後）においてのみ認められものであった。この行動は鎮痛作用のある三環系抗うつ薬のアミトリプチリンおよび麻薬性鎮痛薬のモルヒネによって抑制されたため、遅発性の疼痛関連行動であると示唆される。一方、頻尿治療薬として用いられ、本モデルでも頻尿抑制作用を示した抗コリン薬オキシブチニンは、抗炎症性作用を示さず、また、遅発性の疼痛関連行動に対しても鎮痛作用を示さなかった。膀胱過活動を示す他のモデルにおいて、PGsは膀胱拡張時に尿路上皮から放出されることが報告されている。NSAIDsであるインドメタシンはシクロオキシゲナーゼを阻害し、PGsの生合成を抑制することで、鎮痛作用を示すが、この遅発性の疼痛関連行動への影響は少なかった。この結果より、膀胱拡張による下腹部へのlicking行動は、非潰瘍型のIC患者に見られるようなPGsの寄与の少ない疼痛を表していることが示唆される。また、モデル作製7日後の疼痛評価30分前のみの投与になるため、すでに知覚神経の過敏化が引き起こされている状態ではPGsの作用のみを減弱させることでは疼痛を緩和するには不十分であると考えられる。Licking行動が慢性期のみ認められたことから、慢性膀胱炎由来の遅発性疼痛が起こっているものと考えられるが、その要因として、甚大な疼痛性刺激や慢性的な膀胱の炎症が脳や脊髄の疼痛経路の中樞感作を引き起こしている可能性がある。

以上のことから、 H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルが、長期にわたる炎症所見、血管新生、線

維化などの組織像を呈し、長期にわたる頻尿症状に加え、遅発性の膀胱関連痛が生じうることを明らかとした。

第二章 H₂O₂ 誘発膀胱炎ラットモデルの作製と評価

第一章で示した H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルでは、7 日以上持続する排尿回数の増加と膀胱重量の増加、および膀胱組織の炎症所見が認められる。さらに、前章において、H₂O₂ 膀胱内注入によりマウスモデルで長期にわたる炎症所見、血管新生、線維化などの組織像を呈し、長期にわたる頻尿症状に加え、遅発性の膀胱関連痛が生じることを述べてきた。マウスモデルは、各種遺伝子改変マウスが適応でき、さらにモデル作製の手技が容易であることなどから、先行して研究を開始したが、一方、マウスは体格が小さいことによる膀胱組織の小ささおよび尿量の少なさが災いし、詳細な排尿動態や形態学的評価の際に問題が生じることがあった。また、マウスの疼痛関連行動評価に関してはこれまでに汎用されているような手法がなく、著者が独自に開発した手法により評価を行わざるをえず、創薬開発には不利な点も多い。一方、マウスに比して体格や膀胱組織の比較的大きなラットでは、排尿動態評価法や行動学的評価法に関して、これまでも多く用いられ、一般に確立している手法を用いることができる。そこで本章では、より詳細な排尿動態、形態学および行動学的評価が可能なラットを用い、マウスと同様に H₂O₂ を膀胱内注入することで長期間持続する慢性膀胱炎モデルが作製可能か評価を行った。

雌性ラット（8-9 週齢）に経尿道的に 1.5% H₂O₂ を膀胱内に 300 μ L 注入し 30 分間貯留させた後、排出させることでモデルを作製した。はじめに、H₂O₂ もしくは生理食塩水をラット膀胱内に注入し、1 日、3 日、7 日、14 日後における 24 時間の排尿動態を代謝ケージを用いた FVC 法（frequency volume chart）により測定したところ、H₂O₂ 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、1 日後から排尿回数は増大し、少なくとも 14 日後まで排尿回数は増大していた。通常、げっ歯類は、夜行性で、明期および暗期の比較において、明期では排尿回数は減弱し、1 回排尿量は増大する傾向にある。本モデルの結果もこれに即した結果となっており、明期（08:00-20:00）および暗期（20:00-08:00）に分けると、排尿回数は特に暗期においては少なくとも 14 日後まで増大しており、明期では 7 日後まで増大していた。1 回排尿量は 1 日後から減少し、3 日後をピークに減少しており、明期および暗期に分けると、1 回排尿量は特に明期においては少なくとも 7 日後に至るまで減少しており、暗期では 3 日後まで減少していた。続いて、H₂O₂ 膀胱内注入 7 日後にイソフルラン麻酔下、膀胱頂部にカテーテルを挿入し、生理食塩水を 0.04 mL/min で持続注入させつつ、覚醒下で膀胱内圧測定（シストメトリー法）を行ったところ、H₂O₂ 膀胱内注入群では生理食塩水膀胱内注入群と比較して、排尿間隔は有意に短縮しており、ラットモデルにおいても H₂O₂ 誘発膀胱内注入により

長時間持続する頻尿症状が惹起されていると言える。通常、組織の肥厚化や線維化が起こると、膀胱の伸展性が損なわれる。本モデルでは、基礎圧、排尿閾値圧、最大排尿圧に変化は認められなかったため、膀胱組織の伸展性に対しては大きな影響が少ないと考えられるが、前章で述べたように、マウスでは線維化の兆候が認められており、理由としては種差によるものであることが挙げられる。しかし、下記に述べるようにラットにおいても組織の肥厚化は認められており、何らかの影響を与えている可能性はある。

膀胱組織を用いて形態学的評価を行うためにヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行った。正常ラットの膀胱組織では炎症性細胞の浸潤や、水腫などの炎症所見は認められなかった。一方、 H_2O_2 膀胱内注入により、1日後から粘膜下層から平滑筋層、外膜にかけて水腫や出血を表す赤血球、好中球の浸潤や、マスト細胞の増大が認められた。こうした急性期の所見はマウスモデルでも報告しており、好中球の浸潤は前章の結果からも一致している。7日後では好中球およびマスト細胞の増大、粘膜下層・筋層の水腫に加えて、上皮層の肥厚や、好酸球、線維芽細胞、内皮細胞に取り囲まれた赤血球で表される新生血管も数多く認められた。14日後ではこうした変化は軽度になりつつも認められた。IC患者の膀胱組織においては、前章で述べたような好中球の浸潤に加えて、マスト細胞も上皮層および粘膜下層において顕著に増大していることが報告されている。これらのことから、ラットモデルにおいてもマウスモデル同様に、長期的な膀胱の過活動は、 H_2O_2 膀胱内注入による急性炎症を発端として、浸潤してきた炎症性細胞から産生される炎症性サイトカイン、ケモカイン、PGs および内因性の ROS のような炎症性メディエーターによる膀胱知覚神経の活性化反応に一部起因するものと考えられる。

ラットにおける膀胱関連痛行動の評価は、TRPV1 刺激薬であるレシニフェラトキシシン (RTX) を膀胱内に注入することで惹起される licking 行動 (下腹部を舐める行動) および freezing 行動 (頭部を下腹部へ向けたまま無動状態になる行動) を評価した。 H_2O_2 もしくは生理食塩水をラット膀胱内に注入し、7日および14日後に、経尿道的に膀胱内に RTX (3 μ M) を 300 μ L 注入しその後の15分間の行動を観察した。その結果、RTX膀胱内注入により、生理食塩水膀胱内注入群においても有意な licking 行動および freezing 行動のスコアの増加が認められた。 H_2O_2 膀胱内注入群では、Vehicle 注入により、両行動の増加傾向が見られたが、前章のマウスで認められたような有意なものではなかった。一方、RTX膀胱内注入では、7日後では両行動とも有意なスコアの増大が認められた。14日後では freezing 行動は有意なスコアの増大が認められたが、licking 行動は有意な増大が認められなかった。licking 行動は主に尿道由来の疼痛を反映するとされ、freezing 行動は主に膀胱由来の疼痛を反映するとされている。これらのことから、これまで述べてきた長期に持続する炎症性細胞の浸潤・活性化などは、慢性炎症に止まらず、尿道や膀胱の知覚路の過敏化を引き起こしていることが考えられる。さらに、知覚神経の中でも TRPV1 を発現している C 線維が特に慢性膀胱炎由来の疼痛に寄与していることが示唆される。

以上のことから、 H_2O_2 膀胱内注入により、マウスのみならずラットにおいても長期にわたる炎症所見、血管新生などの組織像を呈し、長期にわたる頻尿症状に加え、膀胱関連痛が生じうることを明らかとした。ラットモデルの成果として、ラットはマウスと比較し、尿量の多さや膀胱組織の大きさが大きく異なることから、マウスモデルでは解析できなかった詳細な排尿動態を解析することができ、さらには、組織学的解析の行いやすさから、マウス組織からは判断の困難であったマスト細胞の増大などの所見が得られたことが挙げられる。

総括および結論

H_2O_2 により引き起こされる膀胱炎のメカニズムとして、まず H_2O_2 により膀胱上皮が傷害されると、損傷を受けた膀胱組織からの炎症シグナルにより、好中球などの炎症性細胞が速やかに浸潤し、浸潤した細胞は、さらにそこで炎症性サイトカインなどの伝達物質を放出することで、より多くの炎症性細胞を動員して炎症反応を増幅するとともに、膀胱知覚神経の過敏化を引き起こし、頻尿や膀胱痛が生じると考えられる。急性期が過ぎた後にも、浸潤した炎症性細胞が炎症を持続させるとともに、血管新生が盛んに行われて脆弱な新生血管が増加することで、出血やさらなる炎症性細胞の浸潤を招き炎症を長期化させている可能性があり、さらに炎症の悪化を抑えきれなかった膀胱組織では、筋層の肥厚および線維化などの異常修復・過形成が起こっていることが示唆され、これらは本来の膀胱機能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

以上、著者は H_2O_2 誘発膀胱炎モデルが、他の膀胱炎モデルには見られない長期に持続する病態を呈し、間質性膀胱炎の臨床像を反映したより適切な慢性膀胱炎モデルであることを明らかにした。本研究成果は、急性モデルでは得ることの出来ない、慢性モデルで認められる長期的な炎症性細胞所見、組織変化、行動変化が認められる H_2O_2 誘発膀胱炎モデルに対して、治療標的探索を行うことで、間質性膀胱炎を想定した創薬に有効利用出来る知見を提供したものである。