

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

2015

土岸 広治

謹呈

様

拙書ではございますが、御一読頂ければ幸いに存じます。
今後とも御指導、御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

平成 28 年 3 月 23 日

土岸 広治

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

2015

土岸 広治

目次

緒言	1
第一章 H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルの病態解析	4
実験方法.....	5
実験結果.....	9
考察.....	19
第二章 H₂O₂ 誘発膀胱炎ラットモデルの作製と評価	23
実験方法.....	24
実験結果.....	27
考察.....	37
総括および結論	40
謝辞	42
発表論文目録	43
参考文献	44

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（図 I）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。

	シクロホスファミド (CP)モデル	間質性膀胱炎 (臨床)
1. 頻尿	△	○
2. 炎症性細胞	△	○
3. 組織肥厚化	△	○
4. 線維化	-	○
5. 疼痛	△	○
6. 点状出血	-	○

△: 急性のみ
○: 慢性化
-: 認められず

図 I シクロホスファミド（CP）誘発膀胱炎モデルおよび IC の所見比較

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い、以下の新知見を得た。

第一章では、マウスに対して H_2O_2 を膀胱内注入することで作製したマウスモデルに、長期的な炎症を引き起こす要因となる炎症性細胞の活性化・浸潤とそれに伴う組織の肥厚化・線維化が生じていることを見出し、さらに急性期から慢性期にかけて 2 種類の疼痛関連行動を起こすことを明らかにし、その薬物感受性について評価した。

第二章では、マウスに比して、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て、同様に H_2O_2 膀胱内注入により慢性膀胱炎モデルが作成可能であることを示し、ラット膀胱炎モデルが、マウスと同等かそれ以上の長期の頻尿症状を呈することを示した。さらに急性期から組織の炎症所見が見られ、各種炎症性細胞の活性化・浸潤が慢性期に至るまで認められることを見出し、慢性期においても知覚神経を刺激することにより、2 種類の膀胱炎由来の疼痛関連行動を起こすことを明らかにした。

以上、本研究は、 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、IC 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ものであり、本モデルが IC 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。

以下にこれらの研究成果について論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AMT:	amitriptyline
BSA:	bovine serum albumin
CP:	cyclophosphamide
DMSO:	dimethyl sulfoxide
FGF2:	fibroblast growth factor 2
FVC:	frequency volume chart
HE:	hematoxylin and eosin
i.p.:	intraperitoneal administration
i.ves.:	intravesical administration
IC:	interstitial cystitis
IND:	indomethacin
MMP:	matrix metalloproteinase
MOH:	morphine
NSAID(s):	non-steroidal anti-inflammatory drug(s)
OXY:	oxybutynin
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PDGF:	platelet-derived growth factor
PFA:	paraformaldehyde
QOL:	quality of life
qPCR:	quantitative polymerase chain reaction
ROS:	reactive oxygen species
RT-PCR:	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
TRPV1:	transient receptor potential vanilloid 1
VEGF:	vascular endothelial growth factor

第一章

H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルの病態解析

膀胱の慢性的な炎症は、頻尿、尿意切迫感および夜間頻尿などの排尿機能障害や、骨盤痛および下腹部痛を引き起こすことが知られている。代表的な慢性膀胱炎の一つである 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 (1, 2) であり、患者の QOL は著しく低下する (3, 4)。しかしながら、IC の治療法は確立されておらず、現在、日本で使用されている治療薬の全てが承認された効能以外の適応外処方により、使用されており、IC に適した治療薬は世界的にもほとんど実用化されていない (5-7)。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、不明な点が多い (8, 9)。このように、IC の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。代表的な膀胱炎モデルとして、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腹腔内に投与することで、膀胱の炎症、頻尿症状、膀胱関連痛を伴う急性膀胱炎を惹起させるモデルが頻繁に用いられている (10-13)。またこのモデル以外にも多数の膀胱炎モデルが報告されているが、これらの膀胱炎モデルのほとんどは、単回処置では急性膀胱炎の症状のみで、数時間から数日以降には回復してしまい、慢性膀胱炎として評価ができないなどの問題点がある (14-18)。さらに、シクロホスファミドや他の起炎物質等を複数回投与し、より長時間症状を持続させるモデルも存在するが、これらは急性膀胱炎の繰り返しであると考えられ、慢性膀胱炎としての所見を呈していないと考えられる。これらの状況から、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。そこで、当研究室ではこれまでに、H₂O₂ 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 (19)。この H₂O₂ 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) での組織学的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。

実験方法

使用動物

実験には雌性 C57BL6/J Jms Slc マウス（体重 16-18 g、5-6 週齢；日本 SLC 静岡）を使用した。全ての動物は室温が 24±1℃、明暗周期が 12 時間の室内、餌および水は自由摂取の状況下で飼育した。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、倫理規定に従い、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

試薬

H₂O₂（和光純薬工業 大阪）は、生理食塩水（大塚製薬工場 徳島）に溶解した。三環系抗うつ薬のアミトリプチリン（LKT Laboratories Inc. St. Paul, MN）、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）のインドメタシン（Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO）、麻薬性鎮痛薬のモルヒネ（武田薬品工業 大阪）、抗コリン薬のオキシブチニン（Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO）は 5% DMSO（ナカライテスク 京都）、2% Tween80（ナカライテスク）に溶解後、生理食塩水にて希釈した。

H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルの作製

イソフルラン（ファイザー 東京）麻酔下にポリエチレンカテーテル（尿道内挿入部 PE-10）を尿道口から挿入し、下腹部をゆっくり指圧することで、尿を排出させた。その後、1.5% H₂O₂ を膀胱内に 50 μL 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。

免疫組織化学評価

○経心灌流固定および膀胱組織切片作成

マウスをソムノペンチル（共立製薬 東京）（64.8 mg/kg, i.p.）麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS を 20 mL 経心灌流することで脱血した後、15 mL の 4% PFA in 0.1 M PB で経心灌流を行い、全身を固定した。その後、膀胱を摘出し、4% PFA に浸し後固定を 1 時間行った。続いて 15% sucrose in 0.1 M PB に一晩静置し、ティシュー・テック O.C.T.コンパウンド（サクラファインテックジャパン 東京）に浸し、粉碎したドライアイスにて凍結し-80℃にて保存した。次にマイクロトーム刃（LEICA819; Leica, Nussloch, Germany）を装着した凍結マイクロトームであるクリオスタット（Leica3050; Leica）を用いて厚さ 20 μm の凍結切片を作成し、MAS コート付きスライドガラス（松浪硝子工業 大阪）に接着した。切片作成の前に組織サンプルはマイクロトーム内で 30 分以上静置し、マイクロトーム

ム内の温度 (-17°C~-20°C) に組織サンプルを馴染ませたのち切片作成を開始した。

○蛍光抗体法

膀胱組織切片を 0.1% Triton-X100 (ナカライテスク) を含む PBS にて透過処理を行った後、0.3% BSA を含む PBS にてブロッキングを行った。一次抗体として、rat monoclonal anti-Gr1 (Ly-6G) antibody (1:300, R&D Systems, Minneapolis, MN)、rabbit polyclonal anti-Iba1 antibody (1:500, 和光純薬工業)、rat polyclonal anti-CD31 antibody (1:300, Biolegend, San Diego, CA) を用いて、4°Cで一晩静置し、PBS により洗浄後、適切な蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit IgG antibody, Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rat IgG antibody, 1:500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) にて室温遮光条件で 1 時間反応させた。その後、PBS にて洗浄し、Vectashild (Vector, Burlingame, CA) によりスライドガラス上に封入した。乾燥後、共焦点顕微鏡 (Fluoview FV10i; オリンパス 東京) により画像を取得した。

○蛍光強度の測定

蛍光強度の測定は ImageJ 1.47v software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて評価を行った。

組織化学評価

○経心灌流固定および膀胱組織切片作成

マウスをソムノペンチル (6.48 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS を経心灌流することで脱血した後、4% PFA in 0.1 M PB で経心灌流を行い、全身を固定した。その後、膀胱を摘出し、パラフィン包埋を行った。続いて、マイクロトーム刃 (LEICA819; Leica) を装着した microscope system (BZ-8100; Keyence 大阪) を用いて厚さ 5 μm の切片を作成し MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業) に接着した。

○マッソントリクローム染色

マッソントリクローム染色は TRICHROME STAIN KIT (ScyTek Laboratories Inc., Logan, UT) を用いて行った。キシレン (ナカライテスク) およびエタノール (ナカライテスク) にて脱パラフィン作業を行った膀胱組織切片を切片が透明になるまで流水洗にて洗浄後、ブアン固定を 60°C で 1 時間行い、再度の流水洗後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液で 5 分染色し洗浄後、Biebrich Scarlet/Acid Fuchsin Solution 液で 15 分染色し洗浄後、Phosphomolybdic/Phosphotungstic Acid Solution 液で 10 分染色し、Aniline Blue Solution 液

で5分染色し洗浄後、Acetic Acid Solution 液で3分反応させ脱水行程を行った。エタノールで脱水し、キシレンで透徹後、MAS コート付きスライドガラス（松浪硝子工業）に封入し観察した。

○膠原線維面積の定量

膠原線維面積の定量は ImageJ 1.47v software（National Institutes of Health）を用いて行った。

RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR 法

抽出した膀胱組織からの全 RNA の抽出は ISOGEN（ニッポンジーン 東京）を用いて行った。抽出した全 RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix（トウヨウボウ 大阪）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。全 RNA の 1 µg に相当する cDNA を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（トウヨウボウ）を用いて全量 20 µL にて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。反応は StepOne real-time PCR systems（Thermo Fisher Scientific）を用いて行った。各 mRNA の発現量は、標準曲線法を用い、内部標準として 18s rRNA の mRNA 発現量との相対的な値として計算した。用いたプライマーは以下の通りである。

使用プライマー（以下全て 5'-3'）

18s rRNA

Forward: GCAATTATCCCCATGAACG

Reverse: GGCCTCACTAAACCATCCAA

FGF2

Forward: GTCACGGAAATACTCCAGTTGGT

Reverse: CCCGTTTTGGATCCGAGTTT

VEGF-A

Forward: AGGCTGCTGTAACGATGAAGC

Reverse: AGGTTTGATCCGCATGATCTG

TGF-β

Forward: TGACGTCCTGGAGTTGTACGG

Reverse: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC

PDGF-A

Forward: GATGAGGACCTGGGCTTG

Reverse: GATCAACTCCCGGGGTATCT

自発運動活性の測定

H₂O₂ もしくは生理食塩水をマウス膀胱内に注入し、3 時間、1 日、7 日、14 日後にマウスをプラスチックケージ（横：10 cm×縦：20 cm×高さ：30 cm）内に入れ、30 分間の馴化を行った。その後、15 分間のビデオ撮影を行い、ANY-maze™ (Stoelting Co., Wood Dale, IL) を用いて、自発運動活性（すくみ時間・総移動距離・平均移動速度）を測定した。

膀胱拡張刺激による疼痛関連行動の評価

H₂O₂ もしくは生理食塩水を膀胱内に注入した 1 日、7 日、14 日後のマウスを再びイソフルラン麻酔下に経尿道的にカテーテルを挿入し、その後、1 分間麻酔環境下から空気下に移動させた。続いて、カテーテルを介して、膀胱内に生理食塩水を 50 μ L 注入し、プラスチックケージ（横：10 cm×縦：20 cm×高さ：30 cm）内に入れ、その後の 20 分間に観察される下腹部への licking 行動（図 II）の累計時間を測定した。治療薬の効果は、膀胱拡張による 7 日後の licking 行動に対して、オキシブチニン（3 mg/kg）、インドメタシン（3 mg/kg）、アミトリプチリン（1 mg/kg）、モルヒネ（3 mg/kg）を評価 30 分前に腹腔内投与し評価した。



図 II 下腹部への licking 行動

統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で表記した。検定は one-way あるいは two-way ANOVA および Bonferroni post hoc test を用いて、Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルにおける好中球の浸潤

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(19)が、本研究では、それらを引き起こす炎症性細胞、特に好中球の浸潤について、蛍光免疫染色により評価を行った。H₂O₂もしくは生理食塩水をマウス膀胱内に注入し、3時間、1日、7日および14日後の膀胱組織に対して、好中球のマーカであるGr1の抗体を用い蛍光免疫染色を行い、Gr1陽性細胞の計数を行った。その結果、3時間、1日および7日後の組織において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、Gr1陽性細胞数が有意に増加していた。また、14日後ではH₂O₂膀胱内注入群のGr1陽性細胞数は、生理食塩水膀胱内注入群に対して有意差は認められないものの増加傾向にあった(図1-1)。

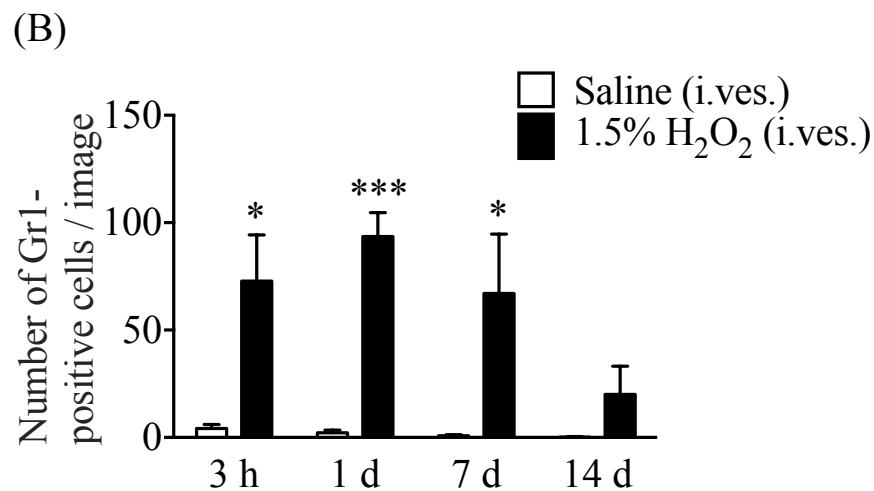
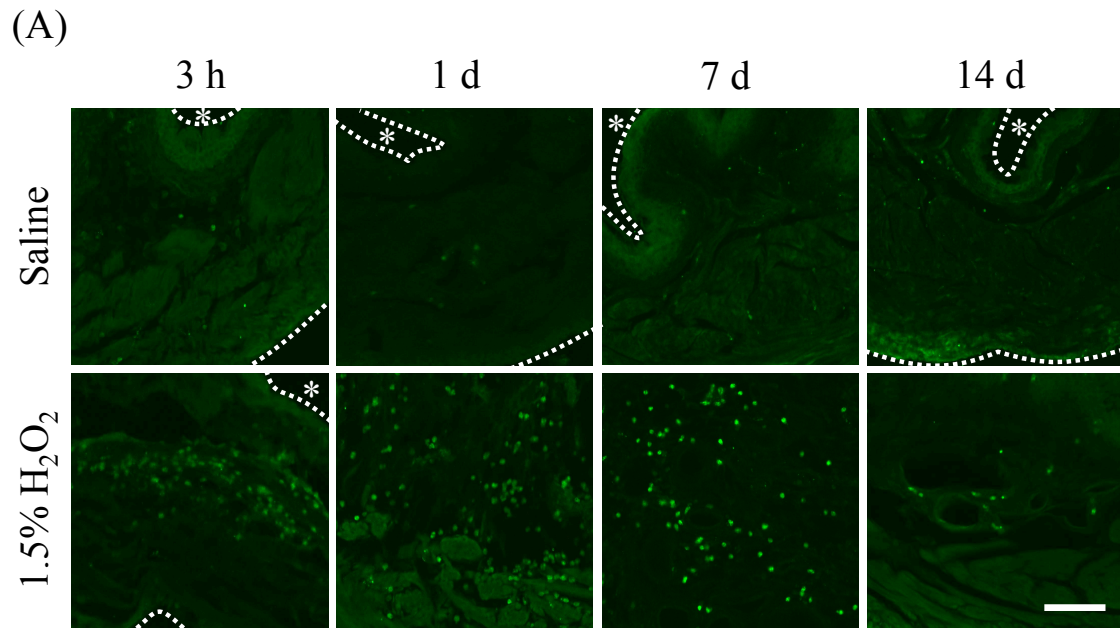


図 1-1 膀胱組織における好中球に関する蛍光免疫組織化学的検討

(A) H₂O₂ もしくは生理食塩水の膀胱内注入 3 時間、1 日、7 日、14 日後の膀胱組織における、好中球のマーカである Gr1 に対する免疫染色画像。*は膀胱腔を、スケールバーは 100 μm を表す。白色点線は膀胱組織と外界の境界線を表す。

(B) Gr1 陽性細胞数の定量を行った。n = 4-7, **P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs. saline.

H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルにおけるマクロファージの浸潤および活性化

次に、H₂O₂ 誘発マウス膀胱炎モデルでのマクロファージの膀胱組織への浸潤および活性化を検討するため、H₂O₂ もしくは生理食塩水をマウス膀胱内に注入し、3 時間、1 日、7 日および 14 日後の膀胱組織に対して、マクロファージのマーカーである Iba1 の抗体を用い免疫染色を行い、Iba1 の蛍光強度を測定した。その結果、H₂O₂ 膀胱内注入 3 時間および 1 日後では、Iba1 の蛍光強度に変化は認められなかったが、注入 7 日および 14 日後の組織において、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、蛍光強度が有意に増強していた。Iba1 の蛍光強度の増強は H₂O₂ 膀胱内注入 7 日後がピークであり、14 日後にはやや減少していた (図 1-2)。

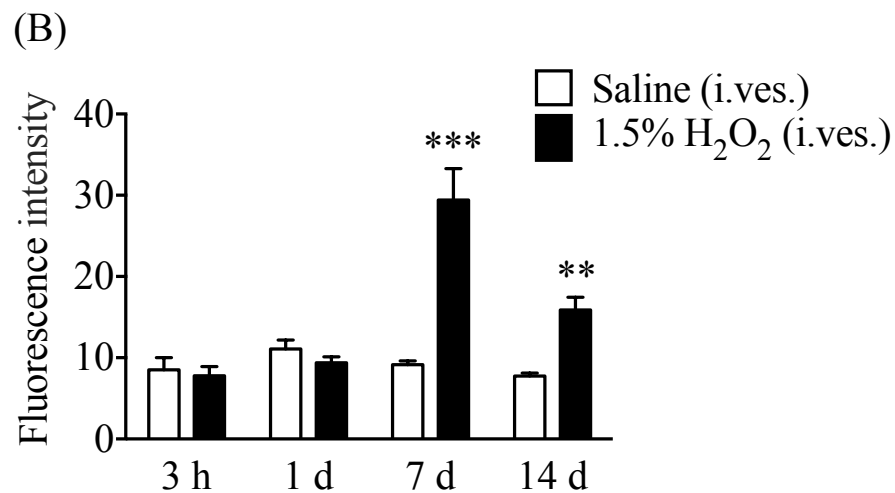
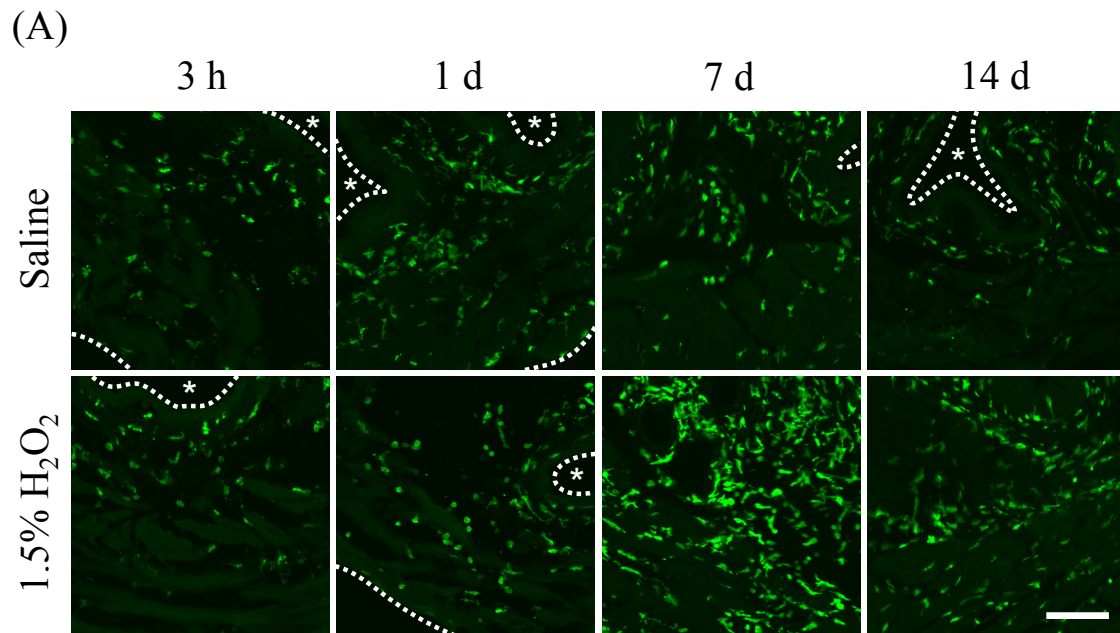


図 1-2 膀胱組織におけるマクロファージに関する免疫組織化学的検討

(A) H₂O₂ もしくは生理食塩水の膀胱内注入 3 時間、1 日、7 日、14 日後の膀胱組織における、マクロファージのマーカである Iba1 に対する免疫染色画像。*は膀胱腔を、スケールバーは 100 μm を表す。白色点線は膀胱組織と外界の境界線を表す。

(B) Iba1 の蛍光強度の測定を行った。n = 4, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. saline.

H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルにおける血管新生

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 (20, 21)、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ため、本モデルにおいても血管新生について検討を行った。H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスを作製後、7 日および 14 日後の膀胱組織に対して、血管内皮のマーカーである CD31 の抗体を用い免疫染色を行い、血管数の計数を行った。その結果、7 日および 14 日後の組織のどちらも 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、有意に血管数が増大していた (図 1-3)。

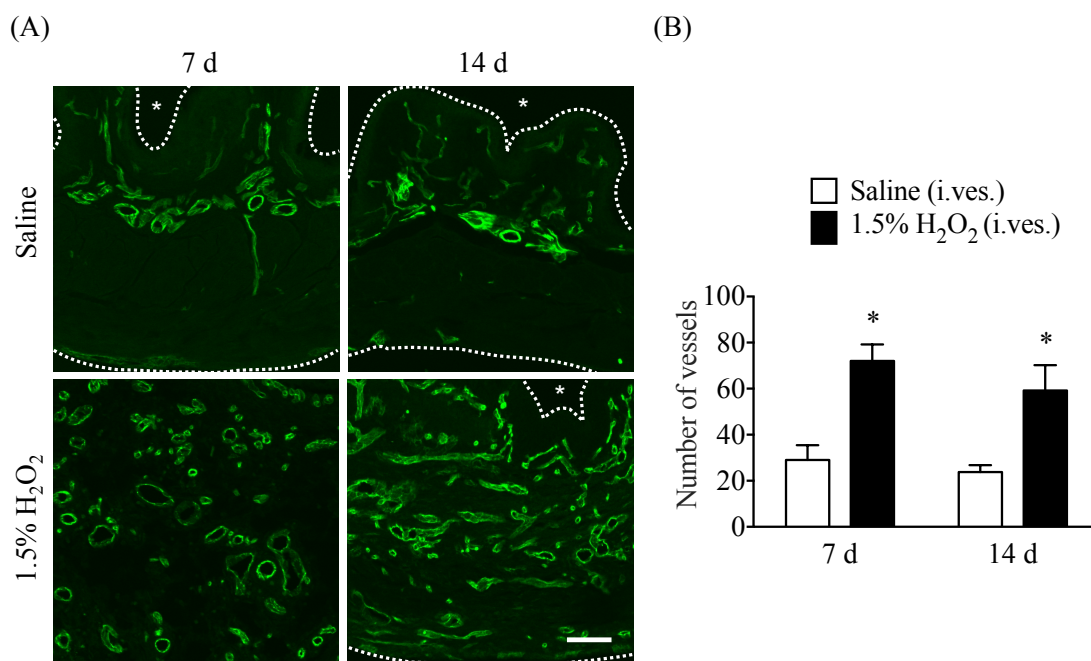


図 1-3 膀胱組織における血管新生に関する免疫組織化学的検討

(A) H₂O₂ もしくは生理食塩水の膀胱内注入 7 日、14 日後の膀胱組織における、血管内皮・血管新生のマーカーである CD31 に対する免疫染色画像。*は膀胱腔を、スケールバーは 100 μm を表す。白色点線は膀胱組織と外界の境界線を表す。

(B) 新生血管数の定量を行った。n = 3-6, *P < 0.05 vs. saline.

H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルにおける組織線維化

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 (22)。そこで、本モデルでも組織線維化の評価を行った。H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスを作製後、7 日および 14 日後の膀胱組織に対して、膠原線維を染め分けるマッソントリクローム染色を行い、膀胱全体の面積に対する膠原線維の比率を算出した。その結果、7 日および 14 日後の組織のどちらも 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、有意に膠原線維の比率が増大していた (図 1-4)。

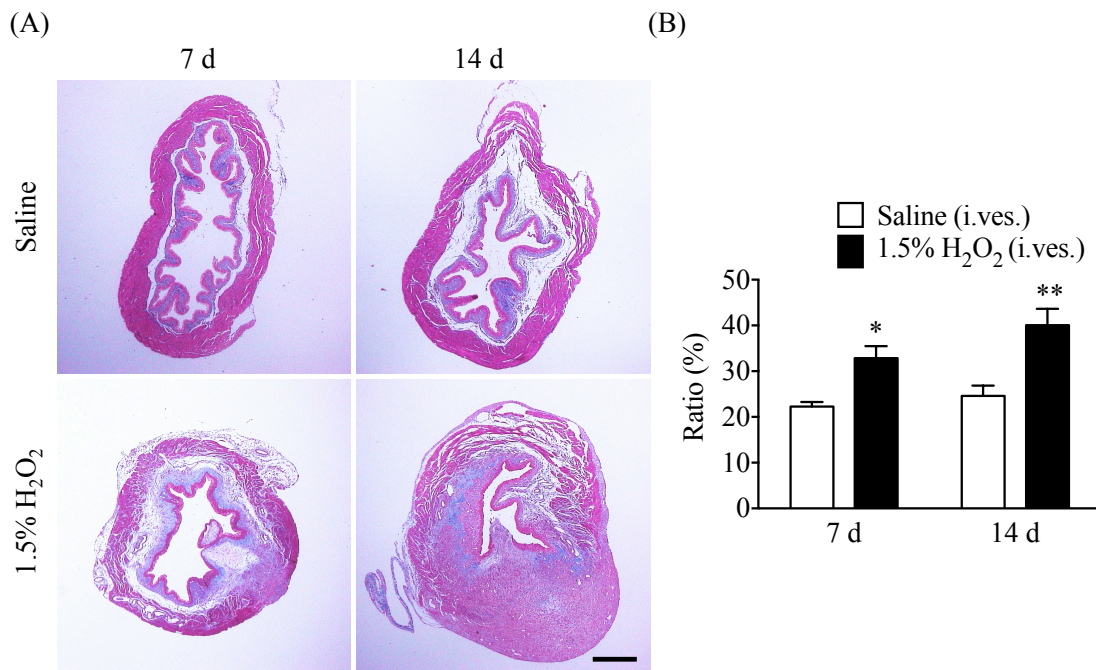


図 1-4 H₂O₂ 膀胱内注入による膀胱組織の線維化に関する組織化学的検討

(A) H₂O₂ もしくは生理食塩水の膀胱内注入 7 日、14 日後の膀胱組織のマッソントリクローム染色画像。膠原線維は青色、細胞質は赤色、核は黒色に染色された。スケールバーは 500 μ m を表す。

(B) 青色に染まった膠原線維の面積を膀胱全体の面積で除し、膠原線維の割合を算出した。n = 3-5, **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. saline.

H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルにおける増殖因子

このように本モデルでは、膀胱組織の血管新生や膠原線維の増大が認められたため、組織における増殖因子である FGF2、VEGF-A、血小板由来成長因子 A (PDGF-A) および TGF- β の mRNA をリアルタイム RT-PCR にて定量を行った。その結果、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、3 時間後において、FGF2 は顕著に増大しており、その後減少していき、VEGF-A は 3 時間後から増大傾向にあった (図 1-5A, B)。また、TGF- β は 1 日後から増大傾向にあり、7 日および 14 日後において有意に増大していた (図 1-5C)。一方、PDGF-A は 3 時間後の増大傾向に止まった (図 1-5D)。これらのことから、本モデルでは血管新生や組織線維化が起こっていると考えられる。

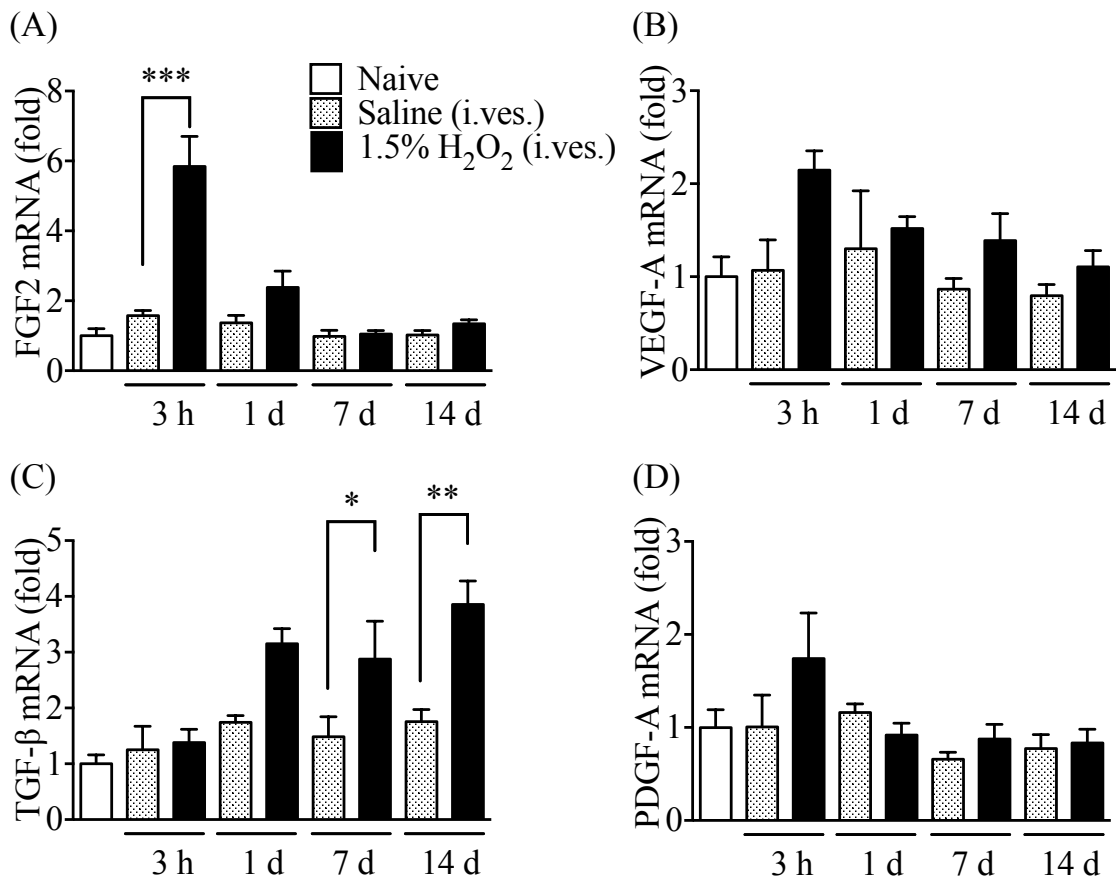


図 1-5 膀胱組織における各種増殖因子の mRNA 変動

H₂O₂ もしくは生理食塩水の膀胱内注入 3 時間、1 日、7 日、14 日後の膀胱組織中の増殖因子 ((A) FGF2、(B) VEGF-A、(C) TGF- β 、(D) PDGF-A) の mRNA の発現量変化を、内部標準である 18s rRNA の mRNA 発現量との相対的な値として算出し、無処置群の値を 1 として相対的に計算した。n = 4-5, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルにおける自発運動活性の変化

げっ歯類の内臓痛は自発運動活性の低下を引き起こすことが知られており、シクロホスファミド誘発膀胱炎モデルでも報告されている (23)。そこで本モデルでも自発運動活性の測定を行った。H₂O₂もしくは生理食塩水をマウス膀胱内に注入し、3時間、1日、7日および14日後のマウスの自発運動活性 (15分間) を測定した。その結果、H₂O₂膀胱内注入群では、生理食塩水膀胱内注入群と比較し、3時間後という急性期においてのみ、すくみ時間の延長、総移動距離の減少、平均移動速度の減少という自発運動活性の低下が認められたが、生理食塩水膀胱内注入群ではこのような変化は認められなかった (図 1-6)。これらの変化は、翌日から7日後にかけて徐々に回復していった。

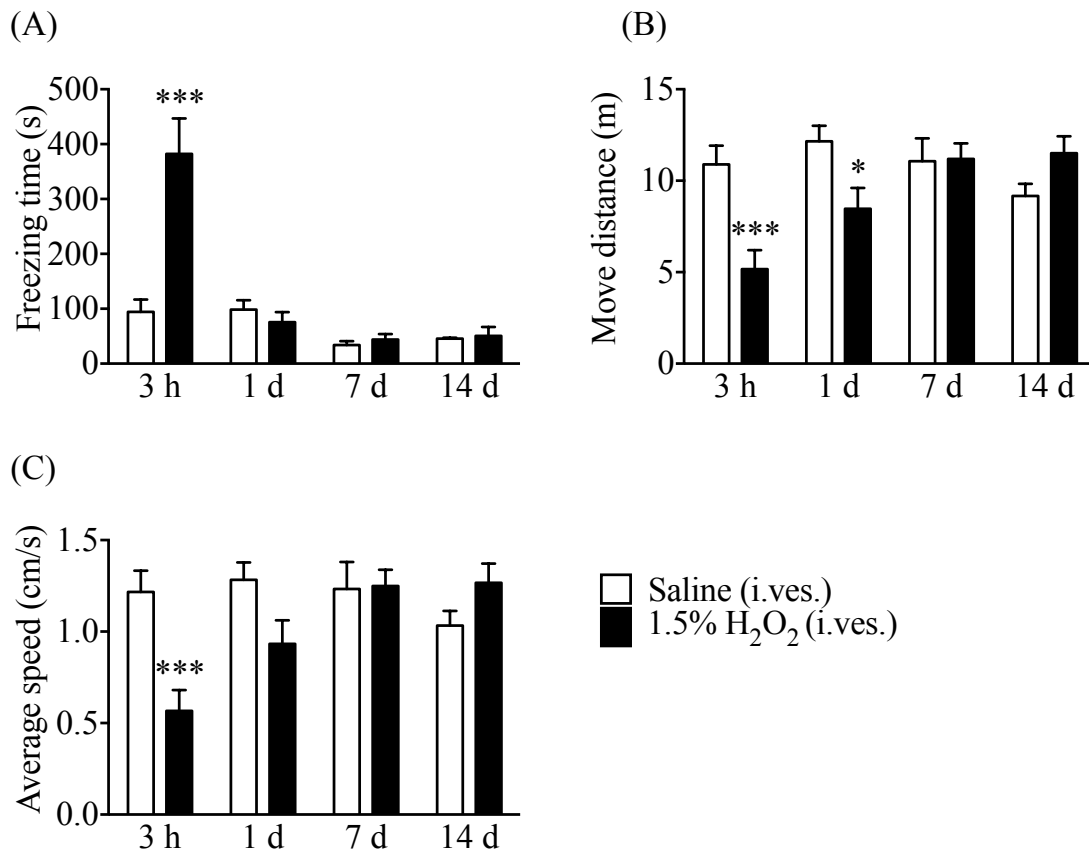


図 1-6 H₂O₂膀胱内注入による自発運動活性への影響

H₂O₂もしくは生理食塩水の膀胱内注入3時間、1日、7日、14日後のマウスの自発運動を15分間ビデオ撮影し、ANY-maze™を用いて自発運動活性 ((A) すくみ時間、(B) 総移動距離、(C) 平均移動速度) を測定した。n = 6, *P < 0.05, ***P < 0.001, vs. saline.

H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルに対する膀胱拡張による疼痛関連行動評価

さらに、慢性期の疼痛関連行動を評価するため、膀胱拡張刺激による行動変化を評価した。H₂O₂もしくは生理食塩水をマウス膀胱内に注入し、1日、7日および14日後のマウスの膀胱内に、50 μLの生理食塩水を膀胱内に注入（膀胱拡張）することにより下腹部へのlicking行動が観察された。このlicking行動の20分間の累計時間を計測した結果、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日後では変化は認められなかったものの、慢性期（7日、14日後）においてlicking行動時間は有意に増大した（図1-7A）。

この7日後におけるlicking行動時間の増大に対して、麻薬性鎮痛薬のモルヒネ、三環系抗うつ薬のアミトリプチリン、NSAIDsのインドメタシンおよび抗コリン薬のオキシブチニンを用いたところ、モルヒネ（3 mg/kg）およびアミトリプチリン（1 mg/kg）により有意に抑制された。また、インドメタシン（3 mg/kg）では抑制傾向にあり、オキシブチニン（3 mg/kg）では抑制されなかった（図1-7B）。

(A)

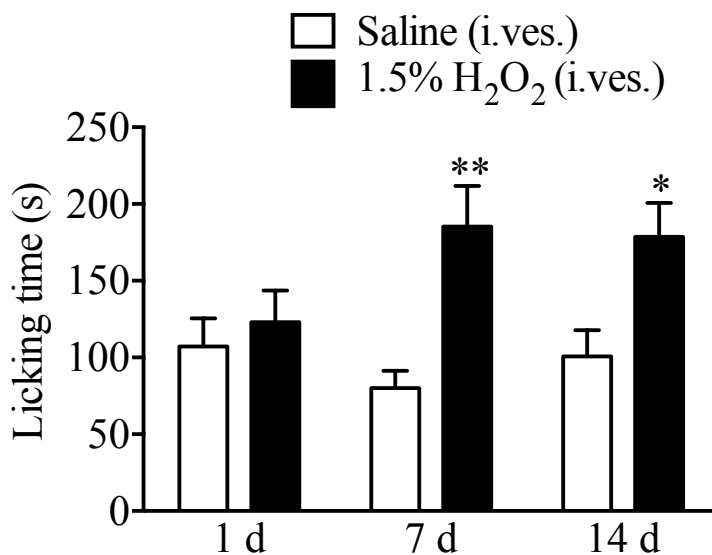


図1-7A H₂O₂誘発膀胱炎マウスモデルに対する膀胱拡張による疼痛関連行動評価

H₂O₂もしくは生理食塩水の膀胱内注入1日、7日、14日後のマウスの膀胱内に生理食塩水を50 μL注入し、その後の20分間に観察される下腹部へのlicking行動の累計時間を測定した。n = 6-15, *P < 0.05, **P < 0.01, vs. saline.

(B)

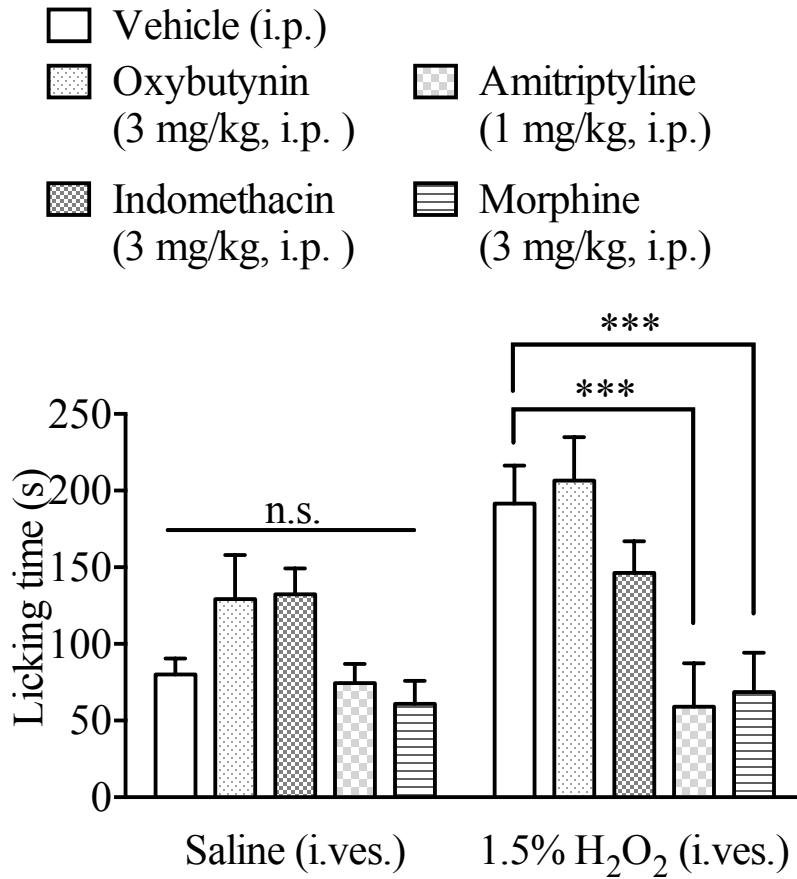


図 1-7B H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルに対する膀胱拡張による疼痛関連行動における各種薬効評価

膀胱拡張による 7 日後の licking 行動に対して、オキシブチニン (3 mg/kg)、インドメタシン (3 mg/kg)、アミトリプチリン (1 mg/kg)、モルヒネ (3 mg/kg) を評価 30 分前に腹腔内投与し効果を評価した。n = 7-13, *** $P < 0.001$, n.s. = not significant.

考察

本章において、著者は下記の結果を示し、 H_2O_2 誘発膀胱炎マウスモデルは、長期に持続する炎症性細胞の浸潤・活性化が起こっており、多数の新生血管や肥厚化・線維化といった組織学的変化に加えて、膀胱関連痛が認められることを明らかにした。

1. 好中球は3時間後という急性期から少なくとも H_2O_2 膀胱内注入7日後まで浸潤が認められ、マクロファージは7日、14日後という慢性期に浸潤および活性化が認められた。
2. H_2O_2 膀胱内注入7日、14日後において多数の新生血管が認められ、膠原線維の割合も増大して、増殖因子も増大していた。
3. H_2O_2 膀胱内注入3時間後では自発運動活性の低下が、7日、14日後では膀胱拡張による疼痛関連行動が認められた。この *licking* 行動はモルヒネおよびアミトリプチリンにより抑制された。

前述したように、 H_2O_2 膀胱内注入により、長期にわたり持続する頻尿症状や炎症性サイトカインの増大が引き起こされるが(19)、それらの所見を引き起こす要因となる炎症性細胞についてはこれまで明らかにされていなかった。炎症状態では生体内で様々な細胞が寄与している。好中球は急性炎症時に動員される白血球であること、様々なケモカイン、炎症性サイトカイン、増殖因子などを放出されることが報告されている(24, 25)。本章では、免疫染色法を用いて、モデル動物の膀胱組織を用いて定量的に評価を行った。本モデルでも 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、 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ーである 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あるが、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。また、マクロファージは生体内で免疫機構に大きく寄与しており、組織常在性マクロファージは組織障害や感染によって活性化され、さらに、組織傷害により血液からの単球遊走およびそのマクロファージへの活性化が惹起され、浸潤したマクロファージは細胞死や、その死細胞の貪食に関与している。加えて、炎症性・抗炎症性サイトカインや種々の増殖因子を放出することも報告されている(26)。また、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。そこで、膀胱組織中のマクロファージについて定量的に評価を行った。マクロファージのマーカである Iba1 の蛍光強度は、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、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。IC 患者においても膀胱組織の血管や粘膜下層に多数の好中球が浸潤していること、マクロファージの浸潤・活性化が起こっていることも報告されている (1, 27)。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 (19) 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 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 (28-31)。

炎症状態においては、種々の細胞が TGF- β 、FGF、VEGF、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 (20, 21)、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。一方、IC の診断や治療において、膀胱水圧拡張術 (生理食塩水を注入して膀胱を膨らませる) と呼ばれる手法を行うことがある。注入の数分後に水を抜くと、炎症部分がひび割れて出血し、これが診断の決め手になり、さらには、一時的なものではあるが硬くなった膀胱を物理的に広げほぐすだけでなく、正常な粘膜の再生を促す効果があるとされ、治療にも用いられている。この時の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 (32)。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、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、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。また、血管新生によって出来た脆弱血管からはさらなる炎症性細胞の浸潤が起こりやすいと考えられる。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 (22)。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、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、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おり、特に粘膜下層、平滑筋層

で認められた。また、血管新生や、組織線維化に関与する増殖因子であり、損傷治癒期に増大するとされている FGF2 および VEGF-A は、本モデルにおいても 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、急性期に顕著に増大または増大傾向にあり、さらに線維化期に増大するとされている TGF-β は 7 日、14 日後といった慢性期で増大していた。一方、PDGF-A は増大傾向に止まったため、本モデルでは組織変化への寄与は小さいと考えられる。

IC は慢性的な頻尿、炎症所見および疼痛が主な所見であるが、これまで疼痛の評価を行っていなかった。そこで、まずマウスの自発運動活性の解析を行った。これまでにシクロホスファミド誘発膀胱炎モデルにおいて自発運動活性の低下が生じることが報告されている (23)。本研究でも、H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルについて評価したところ、H₂O₂ 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、この低下は急性期にのみ生じる疼痛関連行動であると考えられた。H₂O₂ 投与後の急性期 (数時間) には H₂O₂ が膀胱上皮層を破壊し、膀胱粘膜透過性および血管透過性を伴う急性炎症につながり、粘膜下層の浮腫や炎症生サイトカインの増大が起こる (19)。このような激しい膀胱の損傷が自発運動活性の低下を引き起こしたものと考えられる。この自発運動活性の低下を指標とした疼痛関連行動は膀胱組織の修復とともに数日内に回復したため、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。内臓痛の評価にはバルーン法と呼ばれる内臓組織の拡張により疼痛を評価する手法が報告されており (33, 34) 本研究では、それを膀胱に応用した。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、H₂O₂ 誘発膀胱炎マウスモデルにおいて増加した。この増加は、H₂O₂ 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 (19)、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 (35)。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 (36)。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 (37)。

以上のことから、H₂O₂ 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 (19)。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い、また、代謝ケージや膀胱内圧測定（シストメトリー法）を用いた排尿動態の解析、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色による詳細な組織学的解析、さらに、transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 刺激薬の膀胱内注入による疼痛関連行動の評価を行った。

実験方法

使用動物

実験には雌性 Slc:SD ラット（体重 190-200 g、8-9 週齢；日本 SLC）を使用した。全ての動物は室温が $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内、餌および水は自由摂取の状況下で飼育した。実験は全て、京都大学動物実験委員会による審査・承認を受け、倫理規定に従い、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

試薬

H_2O_2 （和光純薬工業）は、生理食塩水（大塚製薬工場）に溶解した。レシニフェラトキシン（RTX; Sigma-Aldrich Co.）は 10%エタノール（ナカライテスク）、10% Tween80（ナカライテスク）に溶解後、生理食塩水にて希釈した。

H_2O_2 誘発膀胱炎ラットモデルの作製

イソフルラン（ファイザー）麻酔下にポリエチレンカテーテル（尿道内挿入部 PE-50）を尿道口から挿入し、下腹部をゆっくり指圧させることで、尿を排出させた。その後、1.5% H_2O_2 を膀胱内に 300 μL 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。

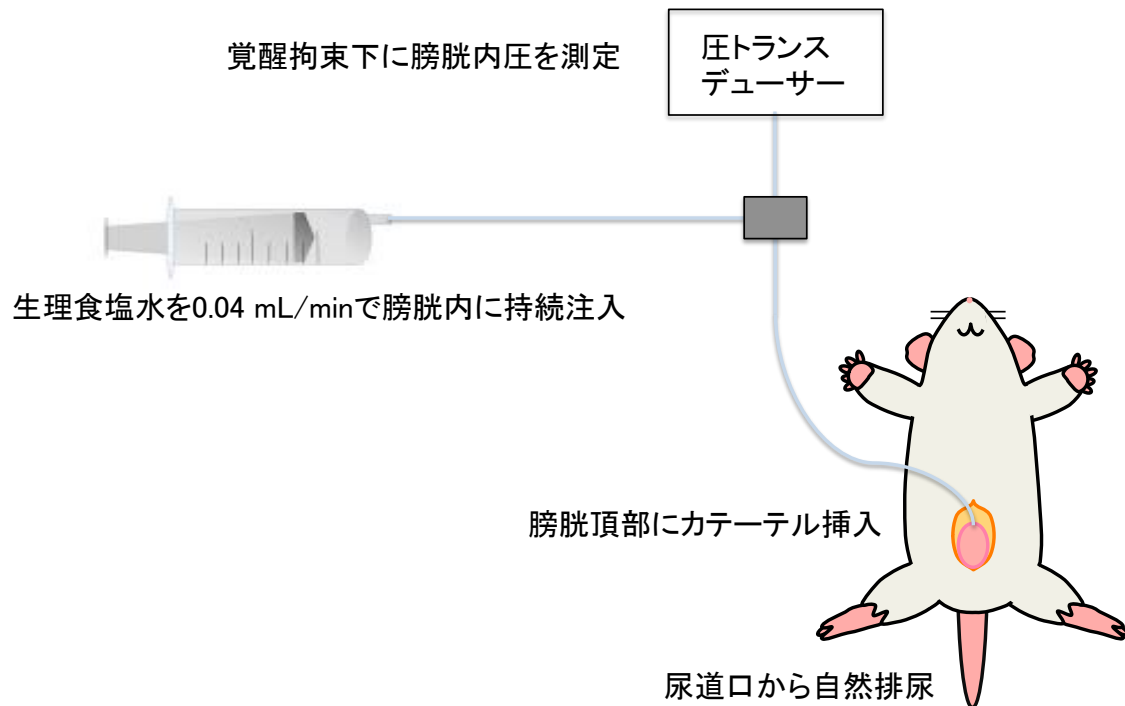
FVC 法 (frequency volume chart)

ラットを、下に PowerLab 16/30 ML-880 model（AD Instruments, Milford, MA）に接続した校正用分銅内蔵型汎用天びん GX-200（研精工業 茨城）を置いた代謝ケージ内で 1 日馴化させた後に、そのまま非絶食・自由飲水下 24 時間の排尿量、排尿回数を測定した。モデル作製後に代謝ケージに戻し、非絶食・自由飲水下にて 24 時間の排尿パターンを測定し（1 日）、そのまま馴化を続け、再び同様に排尿パターンを測定した（3 日、7 日、14 日）。明期（08:00-20:00）と暗期（20:00-08:00）のそれぞれ評価を行った。解析は LabChart8（AD Instruments）を用いて行った。

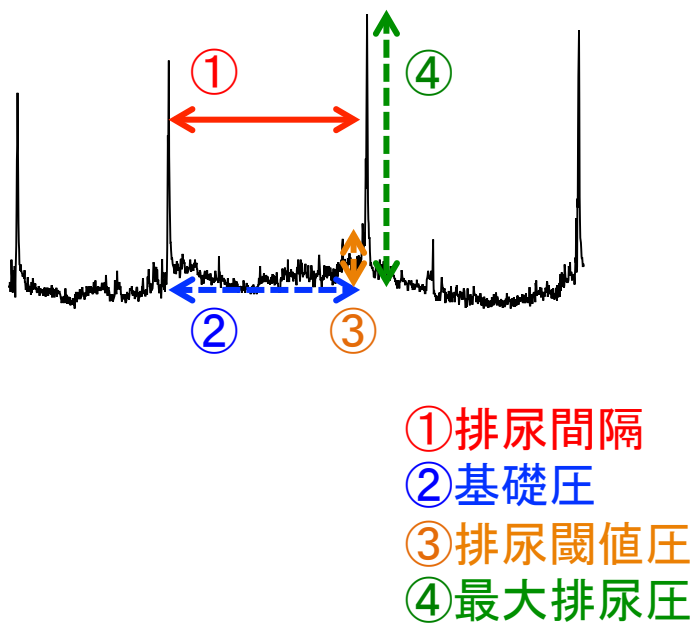
膀胱内圧測定 (シストメトリー法)

H_2O_2 もしくは生理食塩水をラット膀胱内に注入し、7 日後にイソフルラン麻酔下、膀胱頂部にポリエチレンカテーテル（PE-50）を挿入し、3 方活栓付きの圧トランスデューサーおよび PowerLab 16/30 ML-880 model（AD Instruments）に接続した。生理食塩水を 0.04 mL/min で持続注入させ、ボールマンケージ（夏目製作所 東京）に拘束し、覚醒

下で膀胱内圧測定を行った（図Ⅲ）。解析は LabChart8 (AD Instruments) を用いて排尿間隔、基礎圧、排尿閾値圧および最大排尿圧の評価を行った（図Ⅳ）。



図Ⅲシストメトリー法実験概略



図Ⅳ膀胱内圧測定項目

組織化学評価

○経心灌流固定および膀胱組織切片作成

ラットをソムノペンチル（共立製薬）（64.8 mg/kg, i.p.）麻酔下にて開胸し、0.1 M PBS を用い経心灌流することで脱血した後、4% PFA in 0.1 M PB で経心灌流を行い、全身を固定した。その後、膀胱を摘出し、パラフィン包埋を行った。続いて、マイクロトーム刃（LEICA819; Leica）を装着した microscope system (BZ-8100; Keyence) を用いて厚さ 5 μm の切片を作成し MAS コート付きスライドガラス（松浪硝子工業）に接着した。

○ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色

キシレン（ナカライテスク）およびエタノールにて脱パラフィン作業を行った膀胱組織切片を切片が透明になるまで流水洗にて洗浄後、ヘマトキシリン溶液で 5 分染色し、流水洗後、0.25% エオシン溶液で 5 分染色し、洗浄を行った。その後、エタノールで脱水し、キシレンで透徹後、MAS コート付きスライドガラス（松浪硝子工業）に封入し観察した。

膀胱関連痛行動の評価

ラットにおける膀胱関連痛行動の評価は、吉村らによって以前に報告された手法を用いた (38)。H₂O₂ 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 日後にイソフルラン麻酔下、カテーテルを経尿道的に膀胱内に挿入しボールマンケージに固定する。麻酔覚醒後にカテーテルを介し、RTX (3 μM) を 300 μL 注入し 1 分間漏れ出ないように保持する。その後、カテーテルを抜き直ちに行動を観察した。下腹部への licking 行動、下腹部へ頭を向けて動きを止める freezing 行動を観察し、5 秒ごとに行えば 1 ポイントと数え、15 分間に渡って評価した。

統計解析

値は全て、平均値±標準誤差で表記した。検定は二群間の差は Student's t-test により、三群間以上の差は one-way あるいは two-way ANOVA および Bonferroni post hoc test を用いて、Prism 6 software (GraphPad) により解析した。危険率 5%未満の場合には統計学的に有意な差があると判定した。

実験結果

H₂O₂ 誘発膀胱炎ラットモデルの排尿動態

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FVC法（frequency volume chart）により測定した。得られたチャート図から、H₂O₂膀胱内注入群は生理食塩水膀胱内注入群と比較すると、明らかな縦軸の1回排尿量の減少および横軸の排尿間隔の短縮が読み取れた（図2-1A）。詳細な解析を行ったところ、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、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（図2-1B）。明期および暗期に分けると、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（図2-1D, F）。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いた（図2-1C）。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（図2-1E, G）。

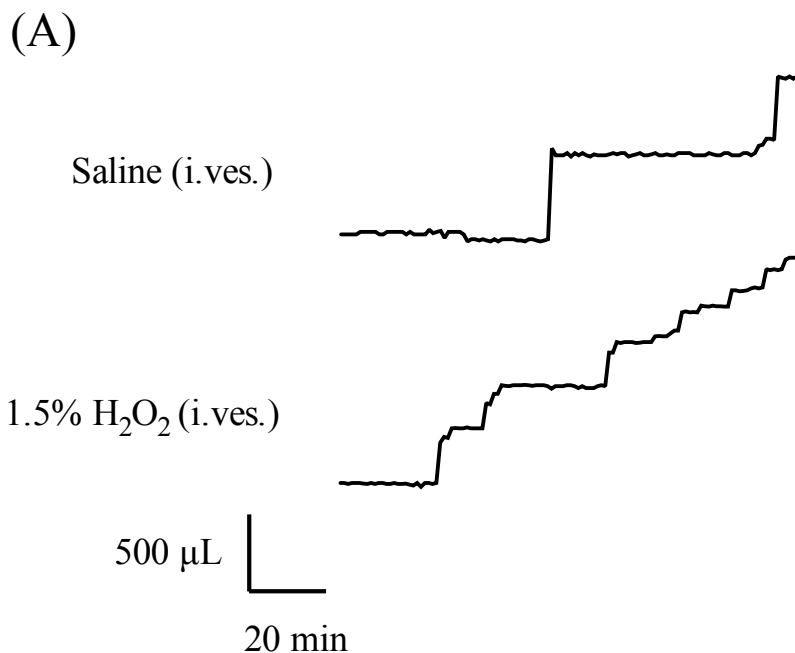


図2-1A H₂O₂膀胱内注入7日後の排尿動態

代謝ケージ内で非絶食・自由飲水下24時間の排尿量、排尿回数を測定した。H₂O₂膀胱内注入7日後の代表的排尿チャート（20:00-22:00）を表す。

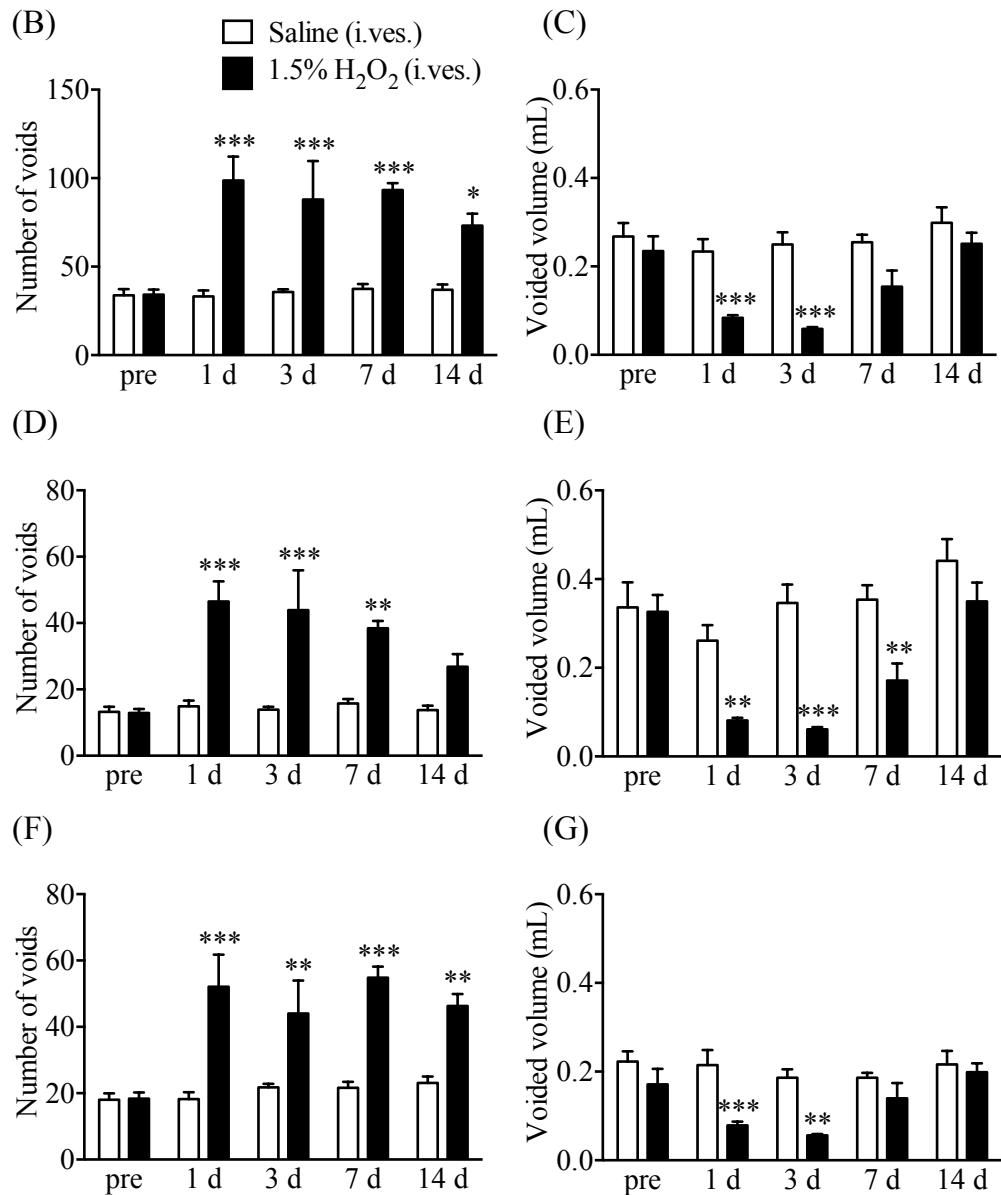


図 2-1B-G H₂O₂膀胱内注入による排尿動態への影響

代謝ケージ内で1日馴化させた後に、非絶食・自由飲水下24時間の排尿量、排尿回数を測定した（処置前、1日、3日、7日、14日）。

(B) 24時間排尿動態測定 of 累計排尿回数 (C) 24時間排尿動態測定 of 1回排尿量

(D) 明期 (08:00-20:00) における累計排尿回数

(E) 明期 (08:00-20:00) における1回排尿量

(F) 暗期 (20:00-08:00) における累計排尿回数

(G) 暗期 (20:00-08:00) における1回排尿量

n = 8, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. saline.

H₂O₂誘発膀胱炎ラットモデルの膀胱内圧測定

さらに、H₂O₂もしくは生理食塩水をラット膀胱内に注入し、7日後に膀胱内圧測定(シストメトリー法)を行った。得られたチャート図から、H₂O₂膀胱内注入群は生理食塩水膀胱内注入群と比較すると、明らかな横軸の排尿間隔の短縮が読み取れた(図 2-2A)。詳細な解析を行ったところ、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いた(図 2-2B)。また、膀胱の収縮力を評価できる基礎圧、排尿閾値圧および最大排尿圧には変化は認められなかった(図 2-2C, D, E)。

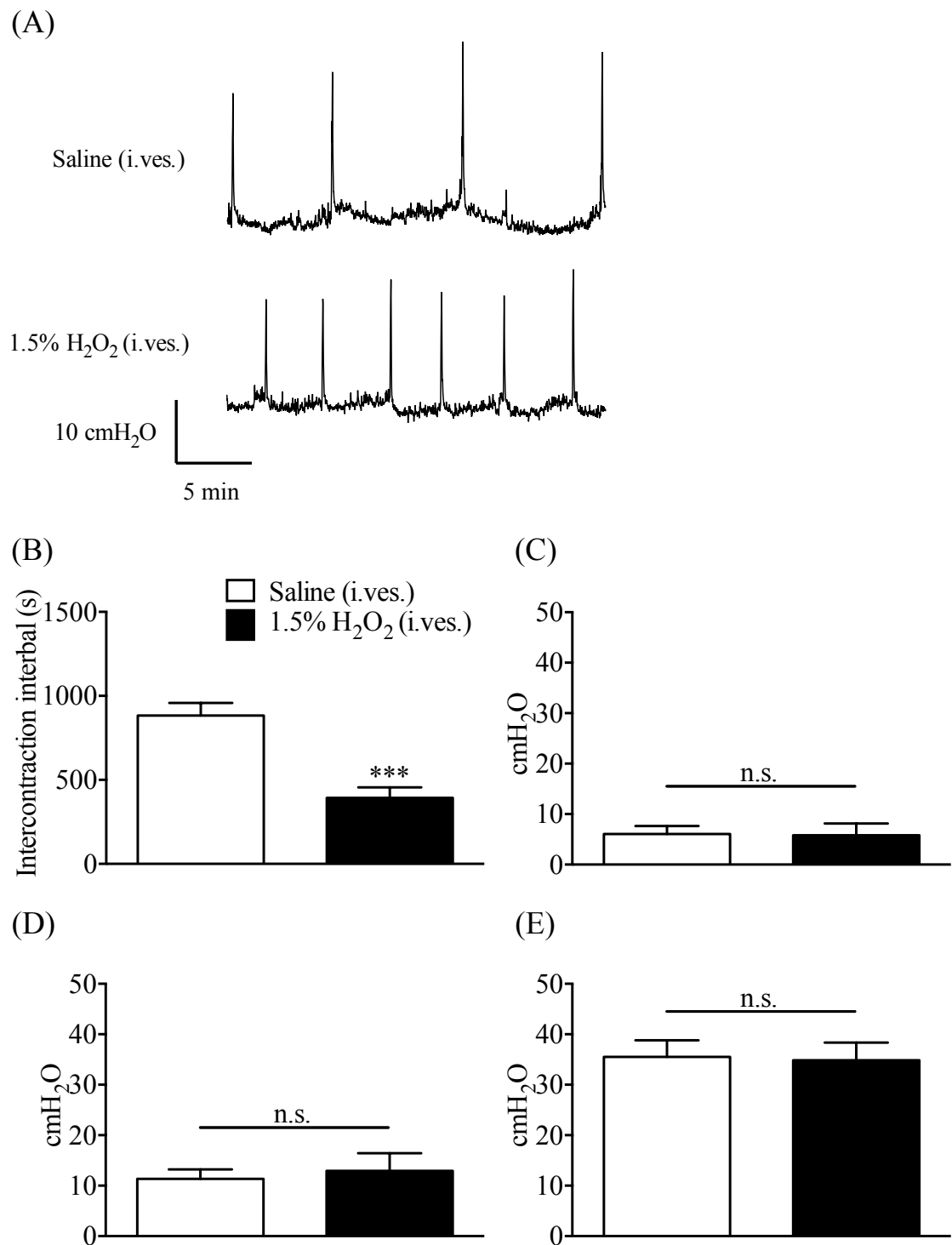


図 2-2 H₂O₂膀胱内注入 7 日後における膀胱内圧測定

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、覚醒拘束下で(B) 排尿間隔および膀胱内圧 ((C) 基礎圧、(D) 排尿閾値圧、(E) 最大排尿圧) を測定した。

- (A) H₂O₂膀胱内注入7日後の代表的シストメトリーチャート
 - (B) 排尿から次の排尿までの時間を排尿間隔とした。
 - (C) 1回の排尿の中で最も低い膀胱内圧を基礎圧とした。
 - (D) 排尿が起こる直前の膀胱内圧を排尿閾値圧とした
 - (E) 排尿時の最も高い膀胱内圧を最大排尿圧とした。
- n = 5-6, ****P* < 0.001 vs. saline. n.s. = not significant.

H₂O₂誘発膀胱炎ラットモデルの組織化学的検討

ラットの膀胱組織を用いて形態学的評価を行うために 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（図 2-3A）。一方、H₂O₂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、桿状核や分葉核を持つ好中球の浸潤や、好塩基に染まり顆粒を持つマスト細胞の増大が認められた（図 2-3B）。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、好酸性に染まる好酸球、紡錘形の線維芽細胞、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（図 2-3C）。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（図 2-3D）。

(A)

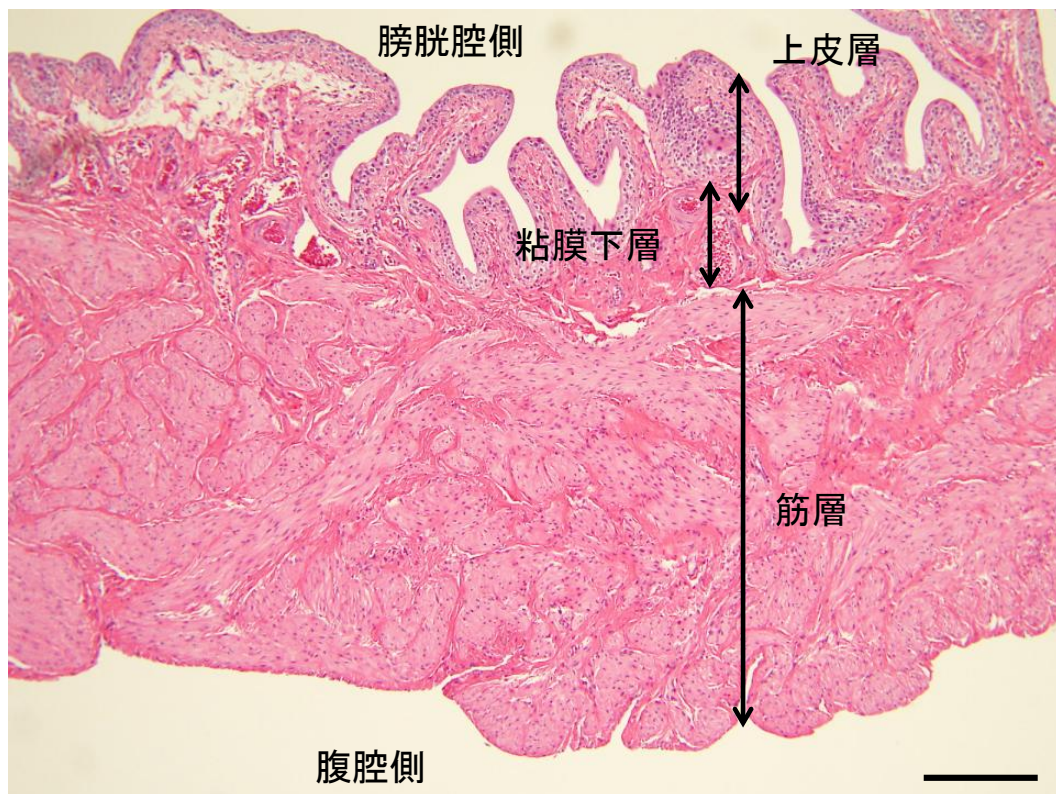


図 2-3A 正常ラット膀胱組織の HE 染色画像

スケールバーは 100 μm を表す。

(B)

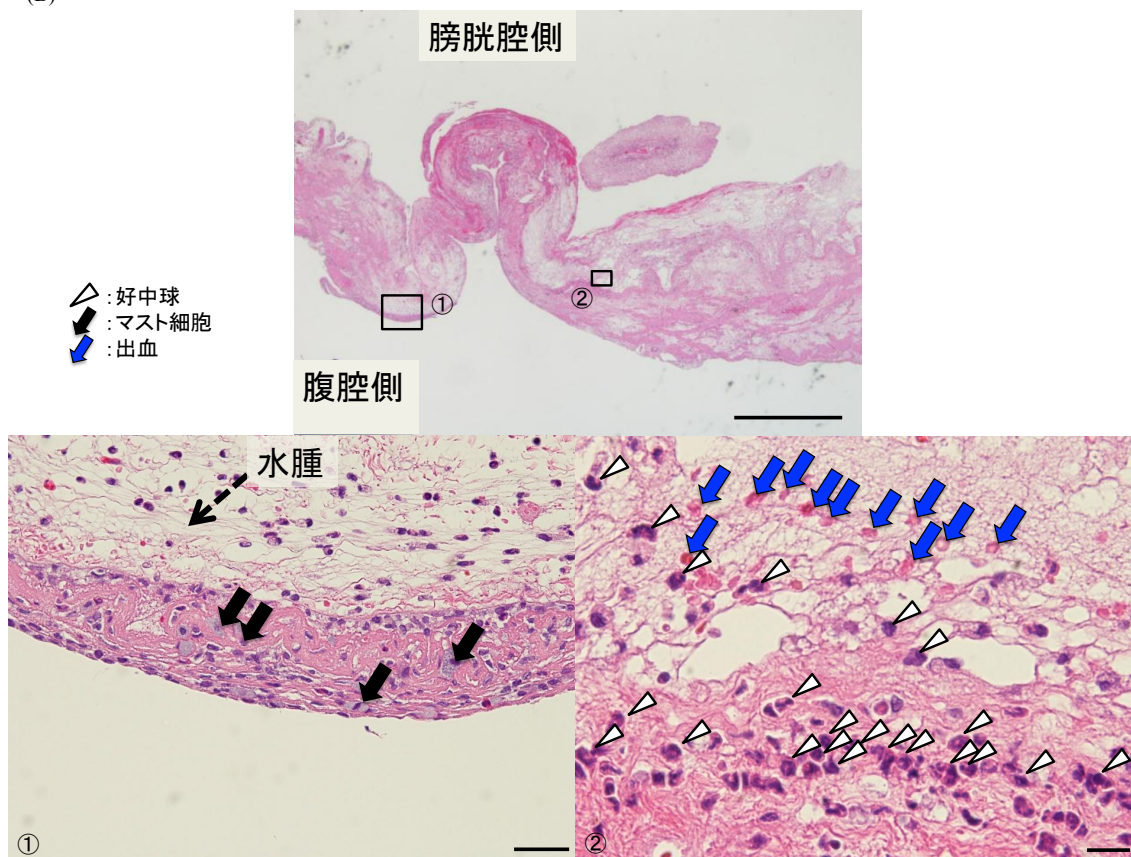


図 2-3B H₂O₂ 膀胱内注入 1 日後の膀胱組織 HE 染色画像

(上段) 各番号は下段の各番号の拡大図に該当する。スケールバーは 400 μm を表す。

(下段) ①粘膜下層、平滑筋層、外膜領域の拡大図。スケールバーは 25 μm を表す。

②粘膜下層の拡大図。スケールバーは 10 μm を表す。

(C)

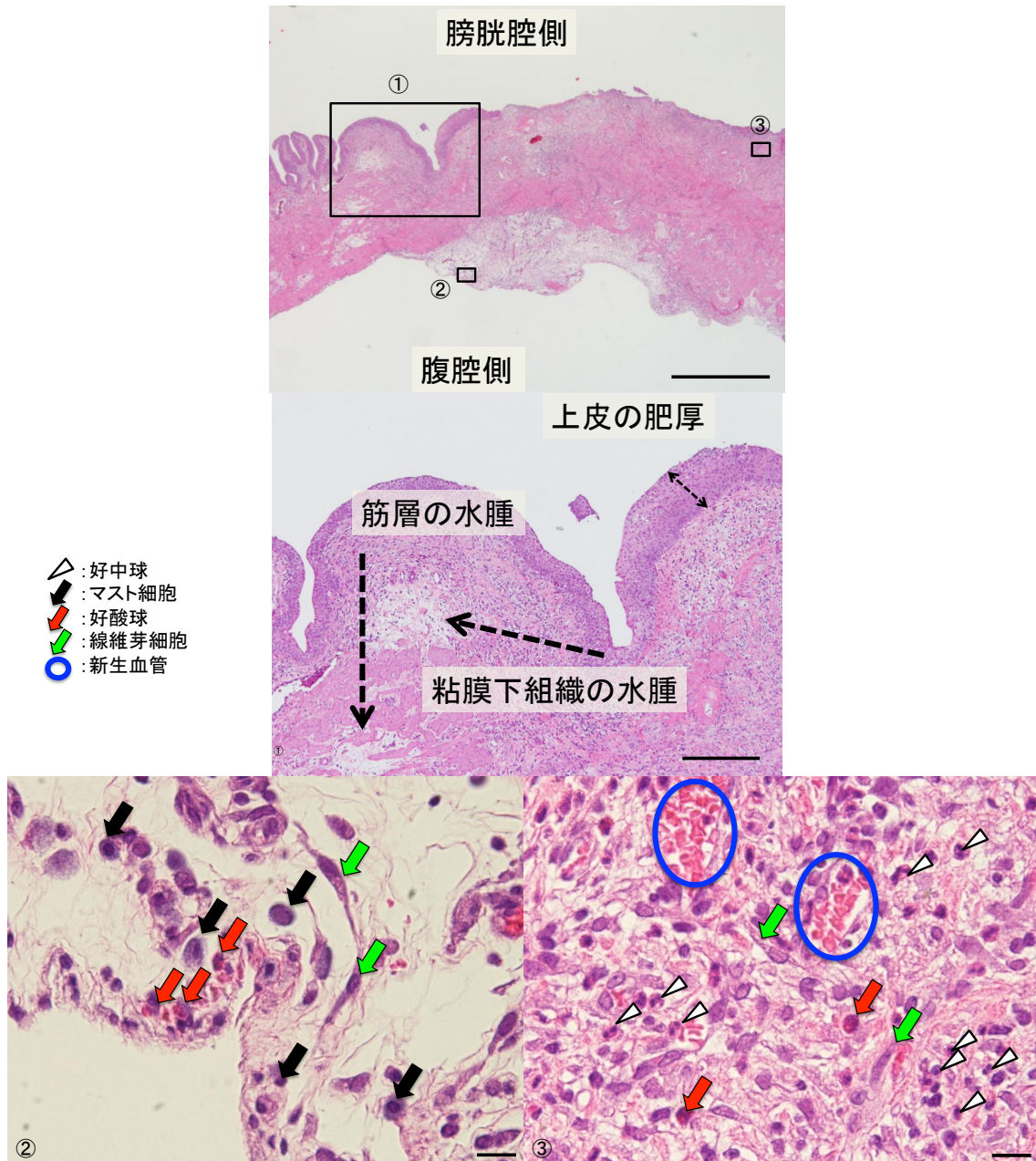


図 2-3C H₂O₂膀胱内注入 7 日後の膀胱組織 HE 染色画像

(上段) 各番号は下段の各番号の拡大図に該当する。スケールバーは 400 μm を表す。

(中段) ①上皮層、粘膜下層の拡大図。スケールバーは 100 μm を表す。

(下段) ②平滑筋層、外膜領域の拡大図。スケールバーは 10 μm を表す。

③粘膜下層の拡大図。スケールバーは 10 μm を表す。

(D)

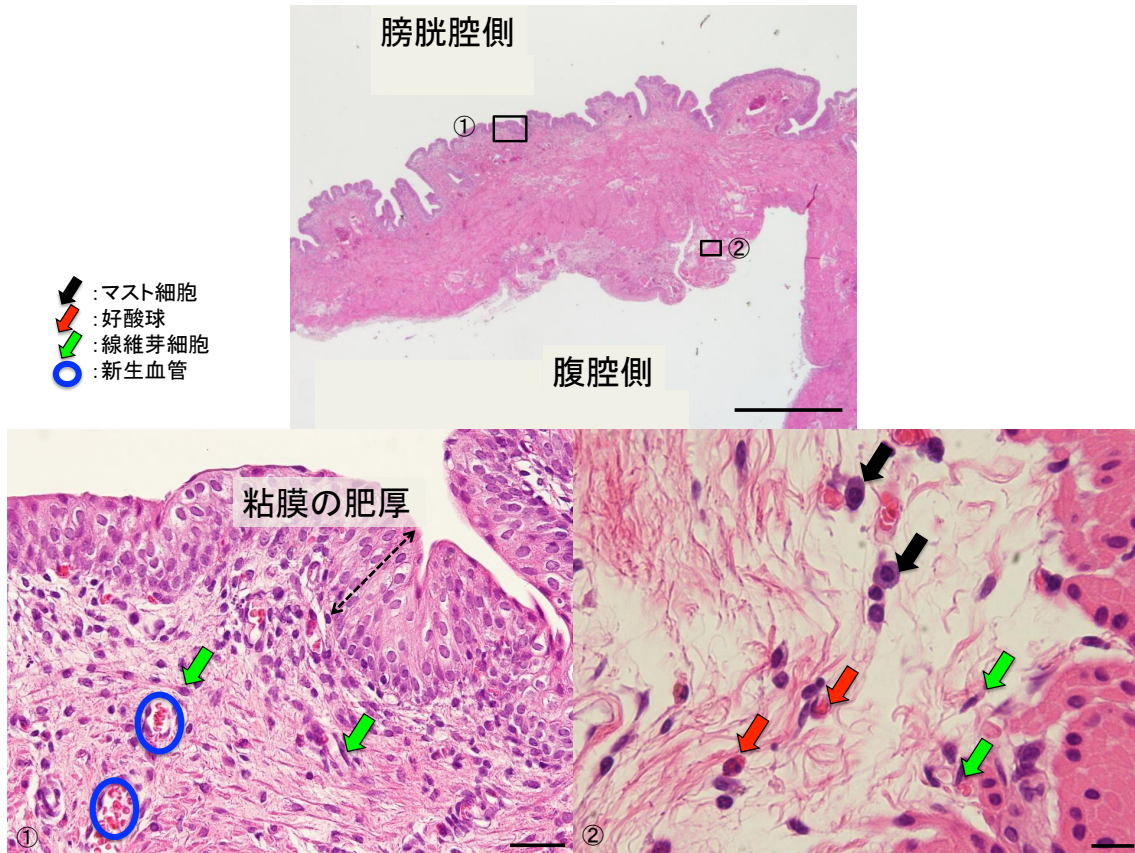


図 2-3D H₂O₂ 膀胱内注入 14 日後の膀胱組織 HE 染色画像

(上段) 各番号は下段の各番号の拡大図に該当する。スケールバーは 400 μm を表す。

(下段) ①上皮層、粘膜下層の拡大図。スケールバーは 25 μm を表す。

②粘膜下層、平滑筋層の拡大図。スケールバーは 10 μm を表す。

H₂O₂ 誘発膀胱炎ラットモデルの疼痛関連行動評価

本モデルでの疼痛関連行動は、TRPV1 刺激薬である RTX を膀胱内に注入することで惹起される licking 行動および freezing 行動を評価した。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 (図 2-4A)。H₂O₂ 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 (図 2-4A,C)。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。

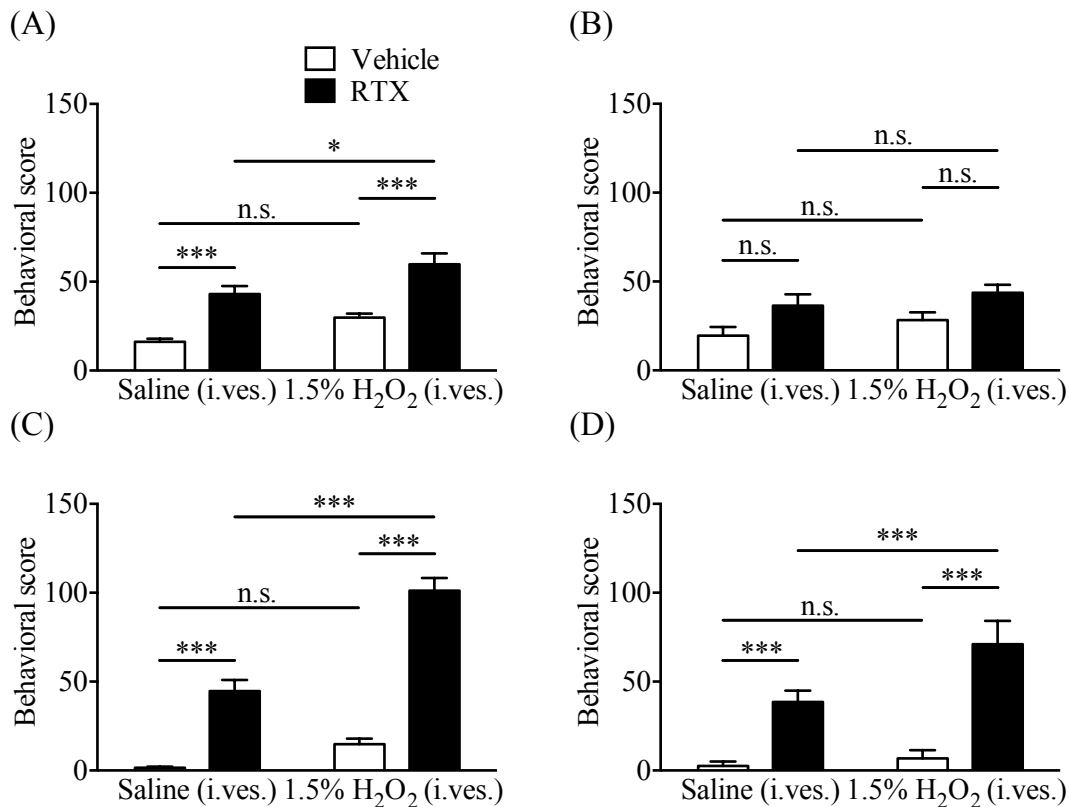


図 2-4 H₂O₂ 誘発膀胱炎ラットモデルにおける疼痛関連行動評価

300 μ L の RTX (3 μ M) を膀胱内に注入し、1 分保持後からの 15 分間の licking 行動 ((A) 7 日後、(B) 14 日後)、freezing 行動 ((C) 7 日後、(D) 14 日後) をスコア化した。n = 6-7, * P < 0.05, *** P < 0.001, n.s. = not significant.

考察

本章において、著者は下記の結果を示し、 H_2O_2 誘発膀胱炎ラットモデルは、マウスモデルと同様に長期に持続する頻尿症状や、組織の肥厚化、炎症性細胞の浸潤・活性化、さらに長期にわたる膀胱関連痛が認められることを明らかにした。

1. 24 時間の排尿動態を FVC 法により評価したところ、 H_2O_2 誘発膀胱内注入により、少なくとも 14 日後まで排尿回数は増大しており、特に暗期において顕著であった。1 回排尿量は 3 日後をピークに減少しており、特に明期においては 7 日後に至るまで減少していた。
2. 膀胱機能を評価できるシストメトリー法にて評価したところ、 H_2O_2 膀胱内注入後、7 日目において排尿間隔は顕著に短縮されていた。
3. H_2O_2 膀胱内注入により、1 日後から、潰瘍・粘膜下から外膜にかけての出血・水腫および好中球の浸潤が認められた。それらの変化に加え、7 日後では粘膜上皮の肥厚、粘膜下組織における間質細胞の増加、粘膜下組織および外膜における血管新生、平滑筋の空胞化、粘膜上皮および外膜における出血、好酸球の浸潤など多くの炎症所見が観察された。14 日後では、7 日後で認められた変化が軽度なものとして認められた。
4. H_2O_2 誘発膀胱炎ラットモデルの膀胱内に RTX 投与で惹起される licking 行動および freezing 行動は 7 日後において増大し、14 日後では freezing 行動のみ増大していた。

前述したように、ラットはマウスと比較して、尿量の多さや体が大きいことに加え、これまでに様々な泌尿器関連の研究手法が構築されてきたことから、より詳細な排尿動態や形態学および行動学的評価が可能である。排尿機能の評価は多くの研究が、本研究でも行ったように、非絶食・自由飲水下で糞尿を分け測定できる代謝ケージを用いた方法（FVC 法）と、外科的に膀胱頂部にカテーテルを挿入後、生理食塩水持続注入下でトランスデューサーを介し膀胱内圧を測定する方法（シストメトリー法）により行われてきた（39-43）。前者は、時間はかかるものの経時的に、より自然な状態で排尿回数および排尿量を測定することができ、後者は、外科手術が必要ではあるが、膀胱内圧を測定することで膀胱の収縮力といった機能や、尿が排出される排尿間隔を短時間で正確に測定することができる。高コンプライアンス膀胱とは、膀胱内圧がさほど上昇することなく、膀胱内腔が拡大できる膀胱のことで、逆に低コンプライアンス膀胱とは膀胱内圧の上昇に対して、膀胱内腔があまり拡張できない膀胱のことである。こうしたことか

ら、膀胱内圧やその排尿間隔を評価することで、平滑筋などの膀胱組織や知覚神経の過敏化などの状態を示唆することができる。本研究では 08:00-20:00 を明期、20:00-翌 08:00 を暗期として 24 時間の排尿動態を記録したところ、 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、1 日後から排尿回数は増大していき、少なくとも 14 日後まで増大していた。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、14 日後において暗期では排尿回数は増大していたが、明期では増大傾向に止まっていた。一方、1 回排尿量は 1 日後から減少していき少なくとも 3 日後まで減少していた。7 日後において、明期では 1 回排尿量は減少していたが、暗期では減少傾向に止まっていた。また、7 日後においてシストメトリー法を行った結果、 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、排尿間隔は顕著に短縮しており、ラットモデルにおいても H_2O_2 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 (22)。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。

正常ラットの膀胱組織には、炎症性細胞は認められなかったが、 H_2O_2 膀胱内注入群では 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、好中球の浸潤やマスト細胞の増加が認められた。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 (19)、好中球の浸潤は前章の結果からも一致している。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 (1, 44)。 H_2O_2 膀胱内注入 7 日後では好中球およびマスト細胞の増加、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、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。なお、好酸球も IC 患者では増大が報告されている (45)。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 (28-31)。同じく、ラットモデルにおいても新生血管数や、線維芽細胞数の増加が認められ、これらはマウスモデルおよび IC 患者の所見と一致している (22, 32)。

ラットモデルの疼痛関連行動評価は、以前に吉村らによって報告されたように(38)、熱、酸やカプサイシンなどの侵害刺激に応答し開口するチャネルである TRPV1 の刺激薬である RTX を膀胱内に注入することで惹起される 2 種類の行動を評価することで行った。1 つ目は主に尿道由来の疼痛を反映するとされている *licking* 行動（下腹部を舐める行動）で、2 つ目は主に膀胱由来の疼痛を反映するとされている *freezing* 行動（頭部を下腹部へ向けたまま無動状態になる行動）である。その根拠としては、主に尿道を支配する陰部神経を切断すると *licking* 行動が顕著に減弱すること(38)、また、エンケファリンや抗炎症性サイトカインを膀胱に投与、もしくはそれらをコードした遺伝子を単純ヘルペスウイルスベクターを用いて主に膀胱を支配する骨盤神経に遺伝子導入すると *freezing* 行動が顕著に減弱することにある(46-48)。本モデルにこの RTX による疼痛評価法を用いると、H₂O₂ 膀胱内注入群により、7 日後では両行動とも増大し、14 日後では *freezing* 行動のみが増大していた。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(49)。

以上のことから、H₂O₂ 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

本研究において、著者は H_2O_2 の膀胱内注入により誘発される膀胱炎マウスモデルを用い、長期的な行動学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、マウスと比較して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検討を行い、以下の新知見を得た。

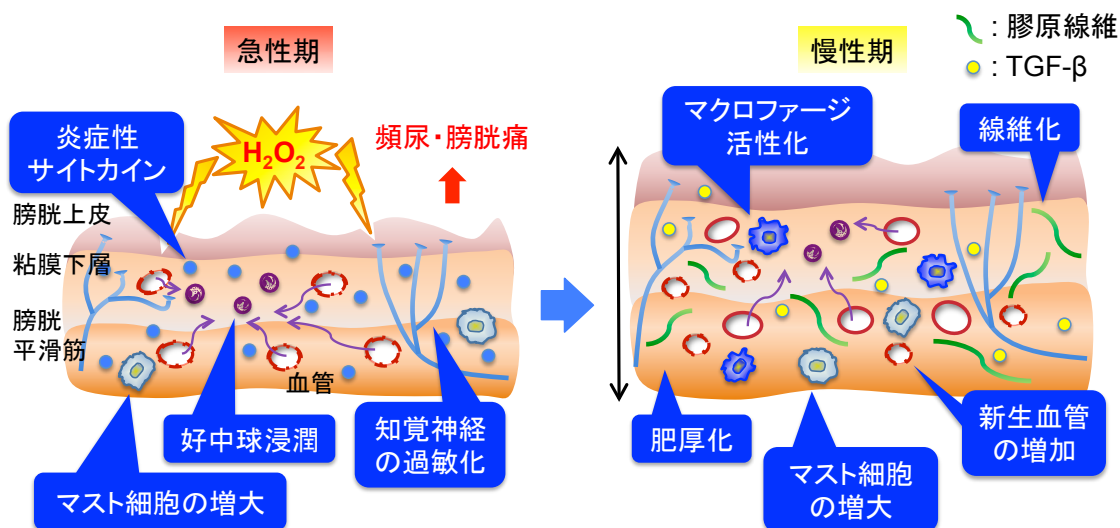
第一章では、マウスに対して H_2O_2 を膀胱内注入することで作製したマウス膀胱炎モデルに、長期的な炎症を引き起こす要因となる炎症性細胞の活性化・浸潤とそれに伴う組織の肥厚化・線維化が起こっていることを見出し、さらに膀胱炎由来の急性期から慢性期にかけて生じる2種類の膀胱関連痛行動を起こすことを明らかにした。

第二章では、マウスに比して、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に対して H_2O_2 を膀胱内注入することでラット膀胱炎モデルを新たに作製し、マウスと同等かそれ以上の長期の頻尿症状を呈すことを示した。さらに急性期から組織の炎症所見が見られ、各種炎症性細胞の活性化・浸潤が慢性期に至るまで認められることを見出し、慢性期においても知覚神経を刺激することにより、2種類の膀胱炎由来の疼痛関連行動を起こすことを明らかにした。

H_2O_2 により引き起こされる膀胱炎のメカニズム（図V）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、IC 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 H₂O₂ 誘発膀胱炎モデルに対して、治療標的探索を行うことで、IC を想定した創薬に有効利用出来るうる知見を提供したものである (図VI)。



図V H₂O₂ 誘発膀胱炎モデルのメカニズム概略

	シクロホスファミド (CP)モデル	H ₂ O ₂ モデル	間質性膀胱炎 (臨床)
1. 頻尿	△	○	○
2. 炎症性細胞	△	○	○
3. 組織肥厚化	△	○	○
4. 線維化	-	○	○
5. 疼痛	△	○	○
6. 点状出血	-	○	○

△: 急性のみ
○: 慢性化
-: 認められず

図VIシクロホスファミド (CP) 誘発膀胱炎モデル、H₂O₂ 誘発膀胱炎モデルおよび IC の所見比較

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えて頂き、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接ご指導を賜り、終始多くの有益なご助言を頂きました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生、並びに京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科教授 赤池昭紀 先生、京都大学大学院薬学研究科准教授 久米利明 先生、助教 泉安彦 先生に深く感謝いたします。本研究の遂行に当たり、著者の実験技術習得のために短期留学を引き受けてくださり、多大なるご助言を頂きました米国ピッツバーグ大学医学部泌尿器科学・薬理学教授 吉村直樹 先生に深く感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、実験技術習得のために研修を引き受けてくださり、多大なるご助言を頂きました東京大学大学院医学系研究科コンチネンス医学講座特任教授 井川靖彦 先生、特任助教 相澤直樹 先生、並びに多大なるご助言およびお力添えをいただきました日本新薬株式会社の尾山達哉 博士、寶満隆 博士、岡本賢 修士、小西静香 学士に深く感謝いたします。研究生活を始めるに当たり、ご指導とご助言を頂きました京都大学大学院薬学研究科の永安一樹 博士、崎元伸哉 博士、趙萌 博士をはじめ、諸先輩方に心から感謝いたします。本研究にご協力頂きました京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の都築徹教 学士、小寺みずき さん、尾山翔平 学士に心から感謝いたします。そして日々の研究生活において切磋琢磨し合えた京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の宗可奈子 学士、勇昂一 学士、三宅崇仁 修士、西谷直也 学士、宮之原遵 修士、浅岡希美 学士、長島卓也 君並びに京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野および京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるように終始支えてくださった父 史典、母 法子、兄 央治、妹 礼佳、叔父 弘典に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究は以下の論文にて公表済みおよび公表予定である。

第一章

① Long-lasting pain-related behaviors in mouse chronic cystitis model induced by a single intravesical injection of hydrogen peroxide

(過酸化水素単回膀胱内注入による慢性膀胱炎マウスモデルの持続性疼痛関連行動)

Koji Dogishi, Mizuki Kodera, Shohei Oyama, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

Journal of Pharmacological Sciences 2015;129:244-246 に**掲載**

② Pathological mechanism of a chronic cystitis model induced by hydrogen peroxide

(過酸化水素誘発膀胱炎モデルの病態機序)

Koji Dogishi, Mizuki Kodera, Shohei Oyama, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

英文雑誌に**投稿予定**

第二章

③ Rat chronic cystitis model induced by a single intravesical injection of hydrogen peroxide

(過酸化水素単回膀胱内注入による慢性膀胱炎ラットモデルの作製)

Koji Dogishi, Takashi Homan, Tsuyoshi Majima, Ken Okamoto, Shizuka Konishi-Shiotsu, Mizuki Kodera, Shohei Oyama, Tatsuya Oyama, Shirakawa Hisashi, Naoki Yoshimura, Takayuki Nakagawa, Shuji Kaneko

英文雑誌に**投稿予定**

参考文献

1. Saini R, Gonzalez RR, Te AE. Chronic pelvic pain syndrome and the overactive bladder: the inflammatory link. *Curr Urol Rep*. 2008;9:314-319.
2. Grover S, Srivastava A, Lee R, Tewari AK, Te AE. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther Adv Urol*. 2011;3:19-33.
3. Dubeau CE, Simon SE, Morris JN. The effect of urinary incontinence on quality of life in older nursing home residents. *J Am Geriatr Soc*. 2006;54(9):1325-1333.
4. Coyne KS, Sexton CC, Irwin DE, Kopp ZS, Kelleher CJ, Milsom I. The impact of overactive bladder, incontinence and other lower urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality and emotional well-being in men and women: results from the EPIC study. *BJU Int*. 2008;101(11):1388-1395.
5. El Khoudary SR, Talbott EO, Bromberger JT, Chang CC, Songer TJ, Davis EL. Severity of interstitial cystitis symptoms and quality of life in female patients. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009;18:1361-1368.
6. Homma Y1, Ueda T, Tomoe H, Lin AT, Kuo HC, Lee MH, Lee JG, Kim DY, Lee KS; Interstitial cystitis guideline committee. Interstitial cystitis guideline committee. Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder syndrome. *Int J Urol*. 2009;16:597-615.
7. Hanno PM, Burks DA, Clemens JQ, Dmochowski RR, Erickson D, Fitzgerald MP, Forrest JB, Gordon B, Gray M, Mayer RD, Newman D, Nyberg L Jr, Payne CK, Wesselmann U, Faraday MM; Interstitial Cystitis Guidelines Panel of the American Urological Association Education and Research, Inc. AUA guideline for the diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *J Urol*. 2011;185:2162-2170.
8. Metts JF. Interstitial cystitis: urgency and frequency syndrome. *Am Fam Physician*. 2001;64:1199-1206.

9. Hanno PM. Painful bladder syndrome/interstitial cystitis and related disorders. *Campbell-Walsh Urology, 9th ed.* 2007;330-370.
10. Watson NA, Notley RG. Urological complications of cyclo- phosphamide. *Br J Urol.* 1973;45:606-609.
11. Cox PJ. Cyclophosphamide cystitis-identification of acrolein as the causative agent. *Biochem Pharmacol.* 1979;28:2045-2049.
12. Olivar T, Laird JM. Cyclophosphamide cystitis in mice: behavioural characterisation and correlation with bladder inflam- mation. *Eur J Pain.* 1999;3:141-149.
13. Boucher M, Meen M, Codron JP, Coudore F, Kemeny JL, Eschalier A. Cyclophosphamide-induced cystitis in freely- moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. *J Urol.* 2000;164:203-208.
14. Ribeiro RA, Freitas HC, Campos MC, Santos CC, Figueiredo FC, Brito GA, Cunha FQ. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol.* 2002;167:2229-2234.
15. Bjorling DE, Elkahwaji JE, Bushman W, Janda LM, Boldon K, Hopkins WJ, Wang ZY. Acute acrolein-induced cystitis in mice. *BJU Int.* 2007;99:1523-1529.
16. McMahon SB, Abel C. A model for the study of visceral pain states: chronic inflammation of the chronic decerebrate rat urinary bladder by irritant chemicals. *Pain.* 1987;28:109-127.
17. Chuang YC, Yoshimura N, Huang CC, Chiang PH, Chancellor MB. Intravesical botulinum toxin A administration produces analgesia against acetic acid induced bladder pain responses in rats. *J Urol.* 2004;172:1529-1532.
18. Stein PC, Pham H, Ito T, Parsons CL. Bladder injury model induced in rats by exposure to protamine sulfate followed by bacterial endotoxin. *J Urol.* 1996;155:1133-1138.

19. Homan T, Tsuzuki T, Dogishi K, Shirakawa H, Oyama T, Nakagawa T, Kaneko S. A Novel mouse model of chronic inflammatory and overactive bladder by a single intravesical injection of hydrogen peroxide. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(4):327-337.
20. Usman A, Ribatti D, Sadat U, Gillard JH. From Lipid Retention to Immune-Mediate Inflammation and Associated Angiogenesis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2015;22(8):739-749.
21. Park S, Kim JW, Kim JH, Lim CW, Kim B. Differential Roles of Angiogenesis in the Induction of Fibrogenesis and the Resolution of Fibrosis in Liver. *Biol Pharm Bull.* 2015;38(7):980-985.
22. Richter B, Roslind A, Hesse U, Nordling J, Johansen JS, Horn T, Hansen AB. YKL-40 and mast cells are associated with detrusor fibrosis in patients diagnosed with bladder pain syndrome/interstitial cystitis according to the 2008 criteria of the European Society for the Study of Interstitial Cystitis. *Histopathology.* 2010;57(3):371-383.
23. Bon K, Lichtensteiger CA, Wilson SG, Mogil J. Characterization of cyclophosphamide cystitis, a model of visceral and referred pain, in the mouse: species and strain differences. *J Urol.* 2003;170(3):1008-1012.
24. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-175.
25. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35(4):377-394.
26. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(21):4111-4126.
27. Erickson DR1, Belchis DA, Dabbs DJ. Inflammatory cell types and clinical features of interstitial cystitis. *J Urol.* 1997;158(3):790-793.

28. Masuda H, Kihara K, Saito K, Matsuoka Y, Yoshida S, Michael B. Chancellor, William C. de Groat, Yoshimura N. Reactive oxygen species mediate detrusor overactivity via sensitization of afferent pathway in the bladder of anaesthetized rats. *BJU Int.* 2008;101:775-780.
29. Yeh CH, Chiang HS, Chien CT. Hyaluronic acid ameliorates bladder hyperactivity via the inhibition of H₂O₂-enhanced purinergic and muscarinic signaling in the rat. *Neurourol Urodyn.* 2010;29:765-770.
30. Ghoniem G, Faruqui N, Elmissiry M, Mahdy A, Abdelwahab H, Oommen M, Abdel-Mageed AB. Differential profile analysis of urinary cytokines in patients with overactive bladder. *Int Urogynecol J.* 2011;22:953-961.
31. Patra PB, Thorneloe KS. Enhanced sensitivity to afferent stimulation and impact of overactive bladder therapies in the conscious, spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338:392-399.
32. Tamaki M, Saito R, Ogawa O, Yoshimura N, Ueda T. Possible mechanisms inducing glomerulations in interstitial cystitis: relationship between endoscopic findings and expression of angiogenic growth factors. *J Urol.* 2004;172(3):945-948.
33. Zhang S, Jiao T, Chen Y, Gao N, Zhang L, Jiang M. Methylglyoxal induces systemic symptoms of irritable bowel syndrome. *PLoS One.* 2014;9(8):105307-105314.
34. Annaházi A, Gecse K, Dabek M, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Róka R, Molnár T, Theodorou V, Wittmann T, Bueno L, Eutamene H. Fecal proteases from diarrheic-IBS and ulcerative colitis patients exert opposite effect on visceral sensitivity in mice. *Pain.* 2009;144(1-2):209-217.
35. Masunaga K, Yoshida M, Inadome A, Iwashita H, Miyamae K, Ueda S. Prostaglandin E2 release from isolated bladder strips in rats with spinal cord injury. *Int J Urol.* 2006;13(3):271-276.
36. Johansson SL, Fall M. Clinical features and spectrum of light microscopic changes in interstitial cystitis. *J Urol.* 1990;143:1118-1124.

37. Klumpp DJ, Rudick CN. Summation model of pelvic pain in interstitial cystitis. *Nat Clin Pract Urol*. 2008;5(9):494-500.
38. Saitoh C, Chancellor MB, de Groat WC, Yoshimura N. Effects of intravesical instillation of resiniferatoxin on bladder function and nociceptive behavior in freely moving, conscious rats. *J Urol*. 2008;179(1):359-364.
39. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Characteristics of lower urinary tract dysfunction and bladder afferent nerve properties in type 2 diabetic goto-kakizaki rats. *J Urol*. 2013;189(4):1580-1587.
40. Ozawa H, Chancellor MB, Jung SY, Yokoyama T, Fraser MO, Yu Y, de Groat WC, Yoshimura N. Effect of intravesical nitric oxide therapy on cyclophosphamide-induced cystitis. *J Urol*. 1999;162(6):2211-2216.
41. Aizawa N, Wyndaele JJ, Homma Y, Igawa Y. Effects of TRPV4 cation channel activation on the primary bladder afferent activities of the rat. *Neurourol Urodyn*. 2012;31(1):148-155.
42. Oyama T, Homan T, Kyotani J, Oka M. Effect of tramadol on pain-related behaviors and bladder overactivity in rodent cystitis models. *Eur J Pharmacol*. 2012;676(1-3):75-80.
43. Beckel JM, Daugherty SL, Tyagi P, Wolf-Johnston AS, Birder LA, Mitchell CH, de Groat WC. Pannexin 1 channels mediate the release of ATP into the lumen of the rat urinary bladder. *J Physiol*. 2015;593(8):1857-1871.
44. Theoharides TC, Sant GR, el-Mansoury M, Letourneau R, Ucci AA Jr, Meares EM Jr. Activation of bladder mast cells in interstitial cystitis: a light and electron microscopic study. *J Urol*. 1995;153(3):629-636
45. Bouchelouche K1, Kristensen B, Nordling J, Horn T, Bouchelouche P. Increased urinary leukotriene E4 and eosinophil protein X excretion in patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2001;166(6):2121-2125.

46. Funahashi Y1, Oguchi T, Goins WF, Gotoh M, Tyagi P, Goss JR, Glorioso JC, Yoshimura N. Herpes simplex virus vector mediated gene therapy of tumor necrosis factor- α blockade for bladder overactivity and nociception in rats. *J Urol*. 2013;189(1):366-373.
47. Oguchi T, Funahashi Y, Yokoyama H, Nishizawa O, Goins WF, Goss JR, Glorioso JC, Yoshimura N. Effect of herpes simplex virus vector-mediated interleukin-4 gene therapy on bladder overactivity and nociception. *Gene Ther*. 2013;20(2):194-200.
48. Yokoyama H1, Oguchi T, Goins WF, Goss JR, Nishizawa O, de Groat WC, Wolfe D, Krisky DM, Glorioso JC, Yoshimura N. Effects of herpes simplex virus vector-mediated enkephalin gene therapy on bladder overactivity and nociception. *Hum Gene Ther*. 2013;24(2):170-180.
49. Skryma R, Prevarskaya N, Gkika D, Shuba Y. From urgency to frequency: facts and controversies of TRPs in the lower urinary tract. *Nat Rev Urol*. 2011;8(11):617-630.