

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01468

研究課題名(和文) 高血糖や老化に起因する排便障害の病態解明

研究課題名(英文) Morphological and functional changes in abdominal and external anal sphincter muscles of rats caused by streptozotocin-induced diabetes

研究代表者

丹羽 正利 (Niwa, Masatoshi)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：90274985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、排便運動に深く関連した腹壁筋と外肛門括約筋について、糖尿病による筋組織と運動ニューロンの形態的・機能的変化を明らかにすることを目的とした。運動ニューロン及び筋組織について、腹壁筋では、糖尿病の病期の進行とともに数と大きさの減少が観察されたが、外肛門括約筋では、大きな変化が観察されなかった。外肛門括約筋の強縮による収縮圧についても大きな変化が観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

排便運動に深く関連した腹壁筋と外肛門括約筋について、糖尿病による筋組織と運動ニューロンの形態的・機能的変化を明らかにした。腹壁筋が病期とともに変性が見られる一方、それに比例した外肛門括約筋の変性は観察されなかった。排便時には腹圧の上昇と同時に括約筋群を弛緩させ円滑に便を体外に排出させる必要があると考えられているが、それらのバランスが崩れていき適切な排便活動が妨げられている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study clarified the morphological and functional alterations in the muscle cells and motor neurons of the abdominal muscles and external anal sphincter muscle, which are closely related to defecation movement, of experimental type I diabetic rats. Although a decrease in number and size in the muscle cells and motor neurons was observed in the abdominal muscles as diabetes progressed, no major changes were observed in the external anal sphincter muscle. No major change was observed in the contraction pressure due to twitching of the external anal sphincter muscle. During defecation it is considered necessary to relax the sphincter muscles at the same time as the rise of abdominal pressure to expel the feces smoothly from the body. If a proper balance of the abdominal muscles and external anal sphincter muscle is disturbed during defecation, the defecation activity could be hindered.

研究分野：リハビリテーション基礎医学

キーワード：腹壁筋 外肛門括約筋 運動ニューロン 排便運動 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

日常生活動作場面において、トイレ動作は一日に数回は必要で、その性質上誰もが自立して行いたいと思う動作であり、排便・排尿といった排泄運動は、生体の恒常性維持に必要な機能の一つである。排泄機能の障害は脊髄損傷、脳損傷といった神経系の障害に起因するものだけでなく、正常な加齢によっても生じるため超高齢化社会を迎える今後、それらに障害を持つ患者の増加が予想される。とくに排便機能は人間の尊厳にも関わる問題であり、またそれを介護する者にとっても精神的・身体的労作量が多いことから、排便機能障害に対するリハビリテーションの重要性は極めて高い。現在、排便障害に対するリハビリテーションとしては骨盤底筋体操やバイオフィードバック療法など一部の方法が存在するのみで、依然として摘便や人工肛門造設に代表される対処療法や一部の観血的な方法が主流を占めている。このように排便機能そのものにアプローチするリハビリテーション手法が十分に確立されていない要因の一つに排便のメカニズムに不明な点が多く残されていることが挙げられる。

現在までに行なわれた排便機能の研究の多くは仙髄排便中枢に関するもので、直腸や結腸の伸展刺激や化学刺激によって排便反射弓が興奮し、結腸が収縮する一方で、内外肛門括約筋が弛緩し便を体外に押し出すといったものである。しかしながら、実際の生体において便を体外に押し出す作用を持つものは結腸の収縮のみだけでなく、腹圧性失禁に代表されるように腹壁筋の収縮による腹圧の上昇も重要な要因である。腹壁筋と括約筋の解剖学的な位置関係から蓄便時には腹壁筋の活動による腹圧の上昇によって便が体外に排出されないように肛門括約筋群が収縮し、排便時には腹圧の上昇と同時に括約筋群を弛緩させ円滑に便を体外に排出させる必要があると考えられているが、両者の活動を統合・制御する神経機構に関する研究は殆ど報告がなく、研究が必要な領域である。

2. 研究の目的

排泄機能の障害は脊髄損傷、脳損傷といった神経系の障害に起因するものだけでなく、日本の国民病ともされる糖尿病や老化によっても生じる。本研究は、排便運動に深く関連した腹壁筋と外肛門括約筋に着目し、糖尿病によって、その筋組織と運動ニューロンがどのような継時的変化を呈するか、またそれらの働きがどのように変化していくかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腹壁筋運動ニューロンと筋組織の解析

実験にはオスの Wistar 系ラットを用い、ストレプトゾトシン (100mg/kg) を生理食塩水に融解させた溶液を腹腔内投与して糖尿病を発症させ、1 カ月後と 3 カ月後の糖尿病群とその健常コントロール群を比較対象としてそれぞれ解析した。方法は、イソフルラン吸入麻酔下にて、腹壁筋を支配する筋枝を剖出し切断した。生理食塩水に融解させた 10%Dextran-fluorescein 溶液に切断神経中枢端を 1~2 時間浸した上で術創を閉じた。2~3 週間の生存期間後、深麻酔下にて灌流固定を行い、第 10 胸髄から第 3 腰髄までの脊髄を取り出し後固定を行った。その後、厚さ 80 μ m の水平断切片を作成し、蛍光顕微鏡にて標識された運動ニューロンをデジタルカメラを用いて撮影し、ImageJ (NIH) を用いて平均細胞径を算出した。腹壁筋の筋組織は断面をいくつかの部分に分け、クリオスタットを用いて厚さ 10 μ m の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を加え標本作製した。それにより筋組織の筋細胞の大きさの測定を行った。

(2) 外肛門括約筋の運動ニューロンと筋組織の解析

実験にはメスの Wistar 系ラットを用い、ストレプトゾトシン (100mg/kg) を生理食塩水に融解させた溶液を腹腔内投与して糖尿病を発症させ、1 カ月後、3 カ月後、5 カ月後の糖尿病群とその健常コントロール群を比較対象としてそれぞれ解析した。方法は、イソフルラン吸入麻酔下にて、陰部神経を剖出し切断した。生理食塩水に融解させた 10%Dextran-fluorescein 溶液に切断神経中枢端を 1~2 時間浸した上で術創を閉じた。2~3 週間の生存期間後、深麻酔下にて灌流固定を行い、下部腰髄から仙髄までの脊髄を取り出し後固定を行った。その後、厚さ 80 μm の水平断切片を作成し、蛍光顕微鏡にて標識された運動ニューロンをデジタルカメラを用いて撮影し、ImageJ (NIH) を用いて平均細胞径を算出した。外肛門括約筋の筋組織は断面をいくつかの部分に分け、クリオスタットを用いて厚さ 10 μm の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を加え標本作製した。それにより筋組織の筋細胞の大きさの測定を行った。

(3) 排便機能の解析

実験にはメスの Wistar 系ラットを用い、ストレプトゾトシン (100mg/kg) を生理食塩水に融解させた溶液を腹腔内投与して糖尿病を発症させ、1 カ月後の糖尿病群とその健常コントロール群を比較対象としてそれぞれ解析した。方法は、イソフルラン吸入麻酔下にて、左右の外肛門括約筋を支配する陰部神経を剖出し、双極カフ電極を装着し、電気刺激できるようにした。肛門に内圧計を挿入し、外肛門括約筋収縮圧を記録できるようにした。左右の陰部神経の筋枝を同時に強縮が起こる頻度で電気刺激し、その時に発生する外肛門括約筋収縮圧を測定した。

4. 研究成果

(1) 腹壁筋運動ニューロンと筋組織の解析 (表 1)

運動ニューロンでは、健常コントロール群と比べ、糖尿病群では数と大きさの減少が観察された ($p < 0.05$)。1 カ月後と比べ 3 カ月後の糖尿病群ではその傾向がより大きくなっていった ($p < 0.05$)。筋組織においても、健常コントロール群と比べ、糖尿病群では筋の厚さと細胞の大きさの減少が観察された ($p < 0.05$)。1 カ月後と比べ 3 カ月後の糖尿病群ではその傾向がより大きくなっていった ($p < 0.05$)。

表 1

			運動細胞数	運動細胞体径 (μm)	筋細胞面積 (μm^2)
糖尿病群	1 カ月	第 13 胸髄	36.7 \pm 1.9 (n = 5)	221.0 \pm 71.0 (n = 5)	2003.8 \pm 368.2 (n = 4)
		第 1 腰髄	34.6 \pm 1.9 (n = 5)	192.4 \pm 14.6 (n = 5)	1866.8 \pm 483.6 (n = 4)
	3 カ月	第 13 胸髄	34.1 \pm 2.6 (n = 5)	240.6 \pm 49.2 (n = 5)	1047.3 \pm 296.3 (n = 5)
		第 1 腰髄	33.3 \pm 1.7 (n = 5)	199.8 \pm 46.8 (n = 5)	990.0 \pm 343.6 (n = 4)
コントロール群	1 カ月	第 13 胸髄	40.4 \pm 2.5 (n = 5)	283.0 \pm 17.9 (n = 5)	4047.1 \pm 693.3 (n = 4)
		第 1 腰髄	37.8 \pm 1.4 (n = 5)	288.0 \pm 25.6 (n = 5)	4379.5 \pm 1001.7 (n = 4)
	3 カ月	第 13 胸髄	40.3 \pm 1.5 (n = 5)	295.4 \pm 22.6 (n = 5)	4859.5 \pm 780.3 (n = 6)
		第 1 腰髄	36.8 \pm 2.6 (n = 5)	277.4 \pm 27.7 (n = 5)	4904.1 \pm 863.8 (n = 6)

(2) 外肛門括約筋の運動ニューロンと筋組織の解析 (表 2)

運動ニューロンでは、健常コントロール群と比べ、糖尿病群では数と大きさの減少が観察され

なかった($p>0.05$)。1 カ月後、3 カ月後、5 カ月後と解析し比べたが、大きな変化は観察されなかった($p>0.05$)。筋組織においても、健常コントロール群と比べ、糖尿病群では細胞の大きさの変化が観察されなかった($p>0.05$)。1 カ月後、3 カ月後、5 カ月後と解析し比べたが、大きな変化は観察されなかった($p>0.05$)。

表 2

		運動細胞数	運動細胞体径 (μm)	筋細胞面積 (μm^2)
糖尿病群	1 カ月	40.3 \pm 1.7 (n = 4)	27.1 \pm 0.5 (n = 4)	92.9 \pm 15.6 (n = 4)
	3 カ月	44.5 \pm 2.1 (n = 2)	26.3 \pm 1.8 (n = 2)	85.0 \pm 11.7 (n = 4)
	5 カ月	36.0 \pm 1.4 (n = 2)	26.8 \pm 0.3 (n = 2)	109.0 (n = 1)
コントロール群	1 カ月	43.0 \pm 3.5 (n = 6)	26.5 \pm 0.9 (n = 6)	103.2 \pm 14.1 (n = 4)
	3 カ月	43.7 \pm 3.8 (n = 3)	25.2 \pm 1.2 (n = 3)	94.1 \pm 20.0 (n = 4)
	5 カ月	40.0 \pm 1.7 (n = 3)	25.8 \pm 1.3 (n = 3)	94.0 (n = 1)

(3) 排便機能の解析

左右の陰部神経の筋枝を電気刺激し記録した外肛門括約筋収縮圧 (100Hz 時) は、糖尿病では 0.67mmHg、健常コントロールでは 0.67mmHg、0.71mmHg であり、その差は見られなかった。

(4) まとめ

運動ニューロン及び筋組織について、腹壁筋では、糖尿病の病期の進行とともに数と大きさの減少が観察されたが、外肛門括約筋では、大きな変化が観察されなかった。腹壁筋が病期とともに変性がすすんでいく一方、外肛門括約筋の比較的維持されていると考えられる。さらに病期初期ではあるが外肛門括約筋の強縮による収縮圧についても大きな変化が観察されなかった。排便時には腹圧の上昇と同時に括約筋群を弛緩させ円滑に便を体外に排出させる必要があると考えられているが、それらのバランスが崩れていき適切な排便活動が妨げられている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muramatsu Ken, Niwa Masatoshi, Tamaki Toru, Ikutomo Masako, Masu Yujiro, Hasegawa Tatsuya, Shimo Satoshi, Sasaki Sei-Ichi	4. 巻 115
2. 論文標題 Effect of streptozotocin-induced diabetes on motoneurons and muscle spindles in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 21～28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2016.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Naomi Oshiro, Ken Muramatsu, Toru Tamaki, Masatoshi Niwa	4. 巻 4
2. 論文標題 Streptozotocin-induced diabetes causes crucial morphological changes in abdominal motoneurons and muscles of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Physical Therapy & Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 1～8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Oshiro N, Muramatsu K, Tamaki T, Niwa M
2. 発表標題 Streptozotocin-induced diabetes causes crucial morphological changes in abdominal motoneurons and muscles of rats.
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Oshiro, Ken Muramatsu, Masako Ikutomo, Suzuho Kishino, Masatoshi Niwa
2. 発表標題 Morphological changes in abdominal muscles of streptozotocin-induced diabetes
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	大城 直美 (Oshiro Naomi) (20646939)	杏林大学・保健学部・助教 (32610)	
研究 分担者	村松 憲 (Muramatsu Ken) (00531485)	杏林大学・保健学部・准教授 (32610)	