

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592284

研究課題名（和文） 上眼瞼ミュラー筋内の機械刺激受容チャネルに関する組織学的研究

研究課題名（英文） Histological study for mechanosensitive channels in the supratarsal Mueller's muscle of upper eyelid

## 研究代表者

杠 俊介（YUZURIHA SHUNSUKE）

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：10270969

研究成果の概要（和文）：ミュラー筋は眼瞼縁に存在する平滑筋組織である。同筋は交感神経刺激により収縮する。同筋は上眼瞼を挙上する筋であるとともに、骨格筋で動眼神経支配である上眼瞼挙筋を収縮させる機械刺激受容器官としても働いている。本研究では、ミュラー筋内の神経終末に機械刺激受容チャネルが存在していること、および神経刺激を神経から平滑筋細胞に伝達するカハール介在細胞が腸管や膀胱同様にミュラー筋にも存在することを組織学的に証明した。

研究成果の概要（英文）：Mueller's muscle is a smooth muscle tissue on the margin of eyelid. It is contracted by stimulation of the sympathetic nerve. It is not only one of the muscle elevating upper eyelid but also a mechanoreceptor to contract the levator palpebral muscle which is a main eye opening skeletal muscle innervated by oculomotor nerve. In this histological study, we found mechanosensitive channels at the nerve ending and smooth muscle cells in Mueller's muscle. And, we also found interstitial cells of Cajal mediating neurotransmission between nerve and smooth muscle in Mueller's muscle like in the bladder and gastrointestinal tract.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,100,000 | 630,000   | 2,730,000 |
| 2010年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2011年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学

キーワード：上眼瞼、ミュラー筋、機械刺激受容、カハール介在細胞、ICC、平滑筋、神経線維、免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 上眼瞼は、前頭眼野から動眼神経核、動眼神経を介して、随意的な刺激により、上眼瞼挙筋が収縮することにより挙上され、開瞼状態となる。

(2) 覚醒時の開瞼は随意にではなく、無意識な状態で維持されているが、不随意刺激によ

る開瞼の維持が成立するためには、抗重力筋に存在するような反射弓が、上眼瞼挙筋にも存在しなければならない。

(3) 上眼瞼挙筋自体には、反射を成立させるような筋紡錘などの機械的固有知覚受容器は存在しない。

(4) ミュラー筋内にその機械的固有知覚受

容器が存在することが生理学的組織学的手法により予測されている。

(5) 細胞の外から加えられた温度や進展、圧力などの機械的刺激を電気信号に変換し、神経刺激として伝達させる TRPV に代表される機械刺激受容チャネルが様々な細胞の細胞膜上で見出されている。

(6) カハール介在細胞 ICC は、消化管や膀胱等の平滑筋層内に存在し、その自動運動のペースメーカーとして働くものと、神経と平滑筋との間に介在して神経伝達を調整する働きをするものがある。

(7) ミュラー筋内で機械的刺激がどのように神経に伝達されるのか、その詳細なメカニズムやそこで働く構造は解明できていない。

## 2. 研究の目的

(1) TRPV に代表される機械刺激受容チャネルを発現している細胞がミュラー筋内に存在するか、それらはどのような形式で存在するかを組織学的に検証すること。

(2) カハール介在細胞 ICC がミュラー筋内に存在するか組織学的に検証すること。

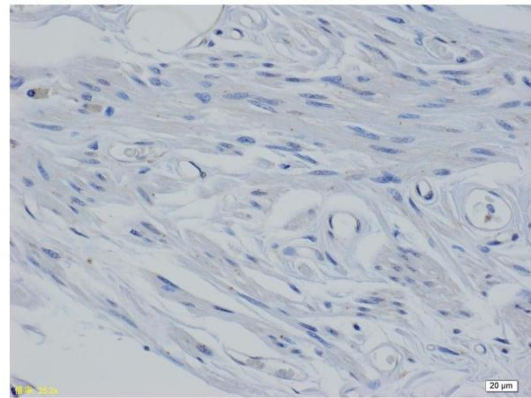
## 3. 研究の方法

解剖学実習用検体 6 体のホルマリン固定上眼瞼標本。パラフィン包埋して連続切片を作成。上眼瞼は、抗原賦活の後、TRPV1、TRPV2、TRPV4、TRPV6 (以上、機械的刺激受容チャネル)、substance P、CGRP (以上、感覚神経における伝達物質)、c-Kit (カハール介在細胞 ICC と肥満細胞のマーカー)、 $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA 平滑筋の収縮蛋白)、tyrosine hydroxylase (TH ノルアドレナリン前駆物質であるドーパを作る酵素で交感神経節後線維のマーカーとなる) および S100 蛋白 (神経の髄鞘のマーカー) に対する抗体を一次抗体に用いた免疫組織化学染色を行った。他、ヘマトキシリンエオシン染色とトリジンブルー染色 (肥満細胞がメタクロマジーを起こし紫色に染まる) を行った。機械刺激受容チャネル陽性細胞、カハール介在細胞とミュラー筋内の各組織との位置関係を光学顕微鏡下に観察した。

## 4. 研究成果

(1) TRPV2、TRPV4、TRPV6 の各 TRP に陽性の細かい神経終末枝が平滑筋細胞に接して存在した。これらの神経線維中には Substance P や CGRP 陽性のもも存在した。シュワン細胞のマーカーである S100 陽性の有髄神経線維と TRP 陽性細胞は必ずしも一致していなかった。ミュラー筋の平滑筋細胞自体には TRPV4、6 を発現している部分もあった。TRPV1 に陽性の神経線維や細胞は今回の検討ではミュラー筋内に存在しなかった。

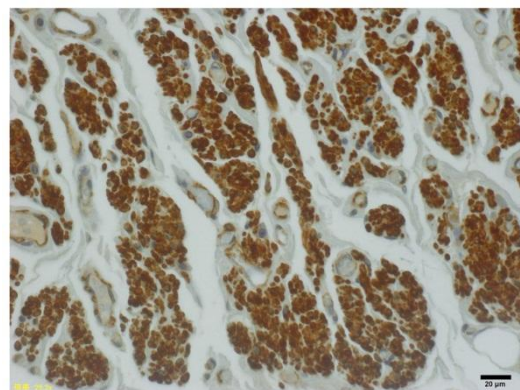
ミュラー筋内には機械刺激受容チャネル



TRPV2

を持った神経終末が存在する。ミュラー筋にはシュワン細胞に囲まれた有髄の神経が多く存在し、それらの神経は電顕上濃く染まる顆粒を有していると報告されている。今回の研究結果から、それら神経終末は必ずしも有髄神経の末梢枝ばかりではなく、CGRP や Substance P も共有しているため、痛覚に関連した知覚神経に類似した特徴を有した無髄神経の終末も多く存在することが予測される。TRP は無髄の C 線維と有髄の A $\delta$  線維で認められるとされている。これらの無髄の自由神経終末と考えられる部位から、ミュラー筋全体に加えられた伸展刺激などの物理的な機械刺激が涙腺神経から三叉神経を介して中枢へ電気信号として伝達される可能性は高い。三叉神経節にも各 TRP は多く存在すると報告されている。膀胱平滑筋と同様に、ミュラー筋平滑筋自体にも少なからず一部の TRP が存在するようである。これはミュラー筋自体が物理的刺激を受信して自らの緊張状態を調節している可能性を予測させる。

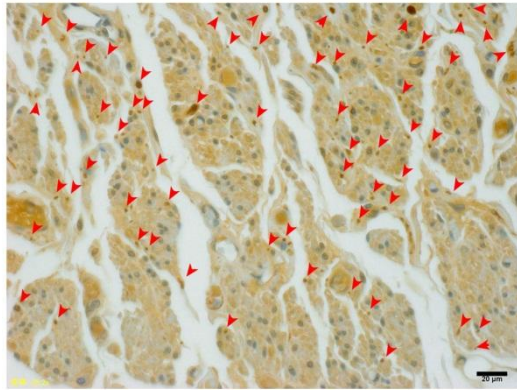
(2) SMA に良く染まるミュラー筋平滑筋線維の間隙に、S100 に染まる有髄神経線維は蜜に存在した。



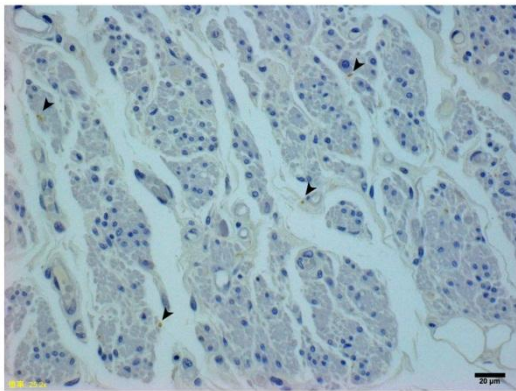
SMA

TH に染まる交感神経節後線維 (無髄神経線維) は平滑筋間隙にまばらにしか存在しなかった。光学顕微鏡で 400 倍率の下、 $260 \mu\text{m} \times 340 \mu\text{m}$  の長方形の視野の中にミュラー筋内に確認できた交感神経節後線維の

数は  $4.7 \pm 1.1$ 、カハール介在細胞数は  $7.3 \pm 1.5$ 、肥満細胞数は  $6.3 \pm 1.2$  であった。



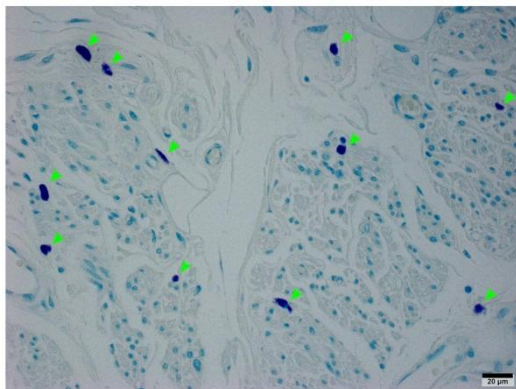
S100



TH

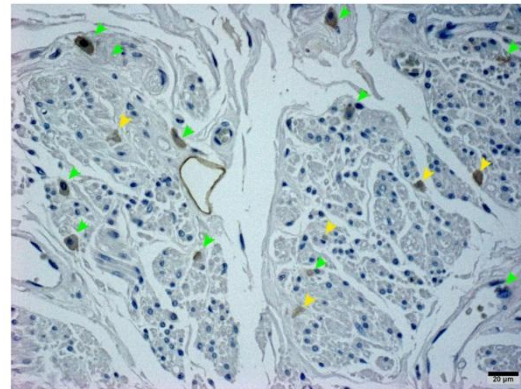
20名のボランティアで交感神経 $\alpha 1$ 受容体刺激剤（ミューラー筋を収縮させる）であるフェニレフリンを上眼瞼結膜円蓋に点眼した時、最大開瞼は点眼後平均  $3.8 \pm 0.8$  分で、その影響は20分残存した

ミューラー筋内に、その収縮を指示する交感神経節後線維線維がまばらにしか存在しないため、ミューラー筋の平滑筋細胞全部にその収縮指令がいきわたるのには何らか別の機構が働いていることが予測できる。今回の研究で、ミューラー筋内に膀胱や消化管と同様にカハール介在細胞を見出すことができ、ミューラー筋全体に刺激を伝達する仕組みとして



トルイジンブルー

カハール介在細胞が働いている可能性が考えられた。交感神経刺激剤による刺激が最大に達するのに4分近くかかり、20分持続する事象にカハール介在細胞がかかわって



c-Kit

いるかもしれない。

少数の交感神経節後線維からの刺激を平滑筋間のカハール介在細胞が介在してミューラー筋が収縮しその収縮が維持されることで機械刺激受容器としてのミューラー筋の感受性が調整されている仕組みが予測できた。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Yuzuriha S, Matsuo K, Ban R, Yano S, Moriizumi T, A Contractile Network of Interstitial Cells of Cajal in the Supratarsal Mueller's Smooth Muscle Fibers with Sparse Sympathetic Innervation, ePlasty, 査読有、12巻、2012、e13  
[http://www.eplasty.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=629&catid=15&Itemid=116](http://www.eplasty.com/index.php?option=com_content&view=article&id=629&catid=15&Itemid=116)

〔学会発表〕（計3件）

- ① 杠俊介、ミューラー筋内におけるカハール介在細胞 ICC の検索、日本形成外科学会基礎学術集会、2010年9月16日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ② 杠俊介、ミューラー筋内の機械刺激受容チャネルに関する組織学的検索、日本形成外科学会基礎学術集会、2009年10月1日、都市センターホテル（東京都）
- ③ 矢野志春、下眼瞼板筋に分布する神経

線維、日本形成外科学会基礎学術集会、  
2009年10月1日、都市センターホテル  
(東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杠 俊介 (YUZURIHA SHUNSUKE)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号：10270969

(2) 研究分担者

松尾 清 (MATSUO KIYOSHI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：20135156

藤田 研也 (FUJITA KENYA)  
信州大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：00447781

矢野 志春 (YANO SHIHARU)  
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)  
研究者番号：10531907

伴 緑也 (BAN RYOKUYA)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：30447784

三島 吉登 (MISHIMA YOSHITO)  
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)  
研究者番号：80464098

(3) 連携研究者

なし