

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01523

研究課題名(和文) 経膈分娩と閉経が尿禁制機構に与えるリスクを実験形態学的観点から解析する

研究課題名(英文) Morphological analysis of the external urethral sphincter in the model rats of simulated birth trauma and menopause

研究代表者

津森 登志子 (Tsumori, Toshiko)

県立広島大学・保健福祉学部(三原キャンパス)・教授

研究者番号：30217377

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)：ラットを使用して経膈分娩モデル(一定時間の膈拡張処理)と閉経モデル(卵巣除去)を作製し、尿漏れ防止に重要な役割を果たす外尿道括約筋の組織特性の変化について、筋線維タイプ(速筋あるいは遅筋)に着目して解析した。その結果、膈拡張処理直後から速筋線維の中でもタイプ2B線維(最も収縮速度が速いが疲労しやすいという特徴を持つ)が特異的に損傷し、時間が経過しても萎縮・脱落したままで回復しないことが明らかになった。このことは、経膈分娩によって外尿道括約筋の即時収縮能に影響が出る可能性を示唆する結果として注目された。一方、閉経モデルでは、筋タイプ構成に顕著な影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿漏れ防止に重要な役割を果たす外尿道括約筋は横紋筋でかつ随意筋でもある。ヒトでは実験操作を加えて解析することができない本筋組織の特性について、様々なモデル動物を用いて形態学的・機能的な特徴を明らかにすることは、尿失禁の病態解明や適切な予防・リハビリプログラムの開発に貢献する。今回得られた結果は、長時間の分娩による膈を介した尿道への圧迫や虚血が、外尿道括約筋の機能特性に影響を及ぼす可能性を示し、腹圧性尿失禁発症回避のため、妊娠中あるいは経膈分娩後にどのような介入をすべきかについて有用な示唆を与えると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The external urethral sphincter plays a crucial role in urinary continence. Understanding of the morphological features of the external urethral sphincter in female rats after vaginal distention and ovariectomy, models of birth trauma and menopause respectively, contributes to the evaluation of its functional and metabolic properties. Our study demonstrated that the type 2B fibers in the the external urethral sphincter after vaginal distention were selectively damaged in the early stages post-vaginal distention and did not recover fully later using immunofluorescence staining. On the other hand, ovariectomy did not significantly effect on the composition of fiber types of the sphincter. These results suggest that a birth trauma may affect the contractile ability of the external urethral sphincter.

研究分野：解剖学(含組織学)

キーワード：外尿道括約筋 腹圧性尿失禁 経膈分娩モデル Type2B線維 多重蛍光免疫染色 ラット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 腹圧性尿失禁の治療法開発の過程ではこれまで多くのモデル動物が作製され、主として薬理的な観点から活発なアプローチがなされてきた。これらの研究が行われるためには、尿失禁メカニズムに関わる筋やその神経支配機構に対する形態学的基盤の構築は不可欠である。尿道閉鎖に第一義的役割を担う外尿道括約筋は、膀胱平滑筋や尿道平滑筋と協調して括約機能を発揮する、特殊な骨格筋組織であり、この筋の組織学的特性の解明は尿道閉鎖機序を理解する上で必須のものとなる。

(2) これまでヒト生検試料を用いた古典的な酵素組織化学的解析からモデル動物による免疫組織化学的解析を含む様々なアプローチが行われてきたが、外尿道括約筋の機能特性に直結する筋線維タイプ(速筋と遅筋の構成割合やその分布)に着目した知見は未だ十分ではない。近年骨格筋の筋線維タイプ同定に関して、複数の筋線維タイプ同定が迅速かつ明確に可能になる蛍光多重免疫染色法が開発された。この洗練された解析方法を駆使してモデルラットを使用した実験形態学的なアプローチを行うことにより、尿道閉鎖機構に関わる括約筋組織の特性について新たな情報を付加できる余地が多く残されていると考え、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

腹圧性尿失禁の治療法開発のために開発されてきたモデル動物のうち、本研究では経膈分娩モデルと閉経モデルを用いて、多重蛍光免疫染色による詳細な筋線維タイプ解析を行うことを目的とした。本研究の遂行によって、女性の腹圧性尿失禁のリスクファクターとされる妊娠・分娩や閉経が外尿道括約筋の形態的及び機能的な特性に与える影響について基礎的データを提供し、エビデンスに基づく予防や運動療法プログラムの確立にも貢献することが期待される。

### 3. 研究の方法

メスラットを用いて経膈分娩モデルと閉経モデルを作製し、外尿道括約筋を含む尿道周囲組織を対象に筋線維タイプマーカーを用いた蛍光免疫組織化学的解析を行なった。全ての実験操作は県立広島大学動物実験委員会において実験計画書の承認を経た後実施した。

#### (1) モデルラットの作製と試料採取

経膈分娩モデル：深麻酔下で8週令メスラット(Wistar系)の膈内に10F尿道カテーテルを挿入、生理食塩水を注入してバルーンを拡張させ、4時間留置後カテーテルを抜去する。膈拡張処理後、3日、1・2・4・8週間生存させた後、試料(尿道周囲組織)を採取した。対照動物は、未処理の8週令メスラットを用いた。

閉経モデル：深麻酔下で繁殖リタイヤメスラット(Wistar系)の両側卵巣を摘出し、8週間経過後試料を摘出した。対照動物は、開腹のみで卵巣摘出しないリタイヤメスラットを用いた。

動物の苦痛軽減処置：モデル動物作製時には、導入麻酔としてイソフルランによる吸入麻酔の後、三種(ミダゾラム・ブトルファール・メドミジン)混合麻酔薬の腹腔内投与による深麻酔下で処置を行なった。試料採取時には、イソフルラン導入麻酔の後、ペントバルビタールを腹腔内に過量投与して安楽死させた後、開腹して尿道周囲組織を摘出した。

#### (2) 組織染色

凍結切片の作製：摘出した組織は液体窒素で急速凍結した後、クリオスタットによって尿道長軸に対する縦断面での連続凍結切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた。

ヘマトキシリン・エオジン染色：尿道周囲組織の組織構築と外尿道括約筋の立体構築把握とともに、尿道縦断標本における免疫染色対象部位の選定を行う目的で行った。

筋線維タイプ(Type1・2A・2B)の同定：一次抗体のカクテル(anti-mouse type1 (IgG<sub>2b</sub>), anti-mouse type2A (IgG<sub>1</sub>), anti-mouse type2B (IgM)を混合)と蛍光標識 mouse 二次抗体のカクテル(AlexaFluor350 標識 IgG<sub>2b</sub>, AlexaFluor555 標識 IgG<sub>1</sub>, AlexaFluor488 標識 IgM)の組み合わせにより蛍光三重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE)で観察した。

再生筋の同定：幼若筋のマーカーを交えた一次抗体のカクテル(anti-mouse embryonic myosin heavy chain, anti-rabbit myosin heavy chain)と蛍光標識二次抗体のカクテル(anti-mouse Dilight555 標識 IgG, anti-rabbit AlexaFluor488 標識 IgG)の組み合わせにより蛍光二重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

#### (3) 電子顕微鏡による観察

外尿道括約筋を構成する筋細胞の微細構造上の特徴について、電子顕微鏡観察用標本を作成し、透過型電子顕微鏡(JEM-1010, JEOL)を用いて観察した。特に経膈分娩モデルにおいては、筋芽細胞または幼若筋細胞の有無について注目して観察した。

#### (4) 画像解析

蛍光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE) と専用解析ソフト ( マルチスタックモジュール, ハイブリッドセルカウント ) を用いて、多重蛍光免疫染色した尿道縦断標本における筋線維タイプ別の横断面積・筋線維径を計測し、各モデル動物における外尿道括約筋層全体におけるタイプ別筋線維の構成割合を中心に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 主な成果

メスラットの外尿道括約筋は主として Type2A 線維から構成されていたが、尿道近位 1/3 の領域には、外膜側に偏位して Type2B 線維が局在していた。一方、Type1 線維は尿道近位端と遠位端の内腔側に局在するという特徴を示し、明瞭な尿道部位局在が存在することを詳細に報告した<sup>1)</sup>。閉経モデルでは、顕著な筋タイプ構成の変化は認められなかった。これらのメスラットにおける外尿道括約筋の組織特性は、尿道閉鎖における機能特性に直結することが示唆されるとして報告した<sup>1)</sup>。

次に、経膈分娩モデルの筋線維タイプ構成を解析したところ、尿道近位部に局在する Type2B 線維の構成割合が特異的に減少することを明らかにして報告した<sup>2)</sup>。さらに経膈分娩モデルにおける Type2B 線維の経時的な変化を追跡すると、時間が経過しても Type2B 線維の構成比率に占める割合は回復しないことが明らかになった。このことは、メスラット外尿道括約筋を構成する速筋線維の中で、特に Type2B 線維が虚血や圧迫によって不可逆的な損傷を受けることを示唆する結果として注目された。経時的な追跡過程では再生筋の出現は確認されたものの、Type2B 線維の構成割合を回復させるに十分な再生ではなかったことが示唆された。

#### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、しばしば尿失禁モデル動物の作成に用いられるラットを対象に、外尿道括約筋の機能的特性に大きく影響する筋線維タイプ構成に着目した解析である。これまで主として実施されてきた、Type1 型と 2 型の区分ではなく、Type 2 をさらにサブタイプに分ける解析であるため、速筋線維に関する情報量を多く提供した。さらに、複数の筋線維タイプを同一標本上で可視化する多重蛍光免疫染色による解析法を導入したことにより、筋線維 ( サブ ) タイプ毎の特徴的な局在性や加えた処理による筋線維タイプ構成の動態を効率的に把握できる方法を確立した。この解析により、ラット外尿道括約筋の筋線維タイプ別の部位局在性について初めて詳細に明らかにすることができた<sup>1)</sup>。さらに、腹圧性尿失禁研究のための筋損傷モデルを使用して、Type 2 B 線維損傷後の不可逆性について示したのも初めての報告となる<sup>2)</sup>。これらの結果は、経膈分娩を含む長時間の尿道圧迫が外尿道括約筋の尿道閉鎖機能不全に繋がるリスクを示唆することができた点で意義深いと考える。モデル動物によって明らかになった外尿道括約筋の組織特性は、腹圧性尿失禁の発生機序に新たな知見を与えると同時に、罹患者へのセラピーの施術時期や方法にも有用な示唆を与えると考えられた。

#### (3) 今後の展望

経膈分娩モデルを使用した解析では、最終年度に電子顕微鏡を使用した微細構造レベルの解析結果も追加した。これらのデータをまとめて R3 年度中に論文作成・投稿を行う予定である。

本研究では、メスラット外尿道括約筋を構成する筋線維の大部分が速筋の Type2A であることが判明したが、電子顕微鏡での観察では、このタイプ線維はミトコンドリアが豊富な遅筋 ( Type 1 ) 型の特徴を持つことを確認した。今後は、筋線維タイプ別の微細構造上の特徴について、電子顕微鏡レベルでのデータの追加を計画している。

#### (4) 予期せぬ結果と新たな知見

ラット外尿道括約筋における基本的な筋タイプ構成について雌雄を比較したところ、オスではほとんど Type2B 線維から構成され、近位 1/3 の内腔側には Type2A 線維も混在するが Type1 線維はごく少数が近位部内腔寄りに存在するに留まった。このことから、ラット外尿道括約筋の筋線維タイプ構成には顕著な性差が存在すると同時に、オスにおいても尿道の部位局在的な特徴も示すことが明らかになった<sup>1)</sup>。

さらに、性腺除去に対する雌雄外尿道括約筋の反応について、雌では顕著な動きは見られなかったのに対し、雄では著しい筋層の萎縮 ( 大部分 Type2B 線維の減少や萎縮 ) が見られた<sup>1)</sup>。よって、筋組織におけるアンドロゲン受容体の発現を蛍光免疫組織化学的に検索したところ、筋細胞はもちろん衛星細胞にも発現していた ( 図 1, 2 )。逆行性神経路標識法と組み合わせた解析では、下部腰髄の外尿道括約筋支配ニューロンにも受容体が発現していた ( 図 3 )。オスラット外尿道括約筋における Type2B 線維主体という特

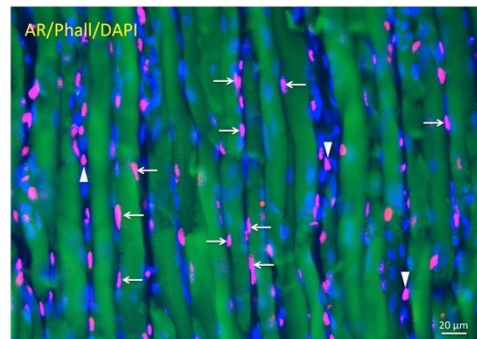


図 1 アンドロゲン受容体を発現したオスラット外尿道括約筋の筋細胞の核 ( 矢印 ) と結合組織性の細胞 ( 矢頭 ) 。

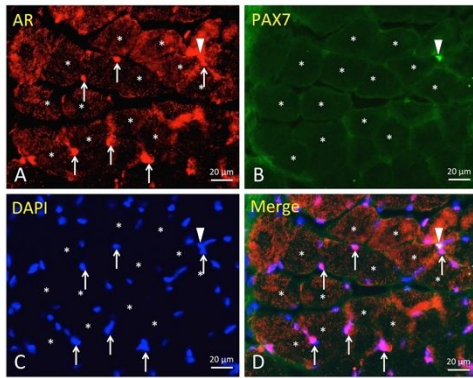


図2 アンドロゲン受容体が発現したオスラット外尿道括約筋の筋細胞の核（矢印）と衛星細胞（矢頭），\*：筋線維の横断面

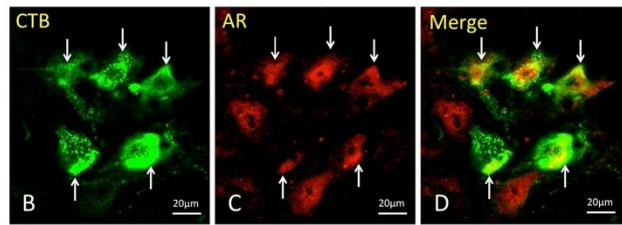


図3 アンドロゲン受容体が発現したオスラット下部腰髄の外尿道括約筋支配ニューロン（矢印）

徴とアンドロゲンへの反応性から、本研究で得られた結果は男性の腹圧性尿失禁の発生機序に新たな知見を与えると同時に、前立腺摘出後のホルモン療法に関して有用な示唆を与えられた。

#### <引用文献>

- 1)T.Tsumori, W.Tsumiyama, Sexual and regional differences in myosin heavy chain expression in the rat external urethral sphincter, *Anat.Rec.*,300:2058-2069,2017.
- 2)T.Tsumori, W.Tsumiyama, Myosin heavy chain expression in the external urethral sphincter of rats with simulated birth trauma, *J.Anat.Sci.Res.*,1(2:4),2018.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toshiko Tsumori, Wakako Tsumiyama	4. 巻 1 No.1:5
2. 論文標題 Myosin Heavy Chain Expression in the External Urethral Sphincter of Rats with Simulated Birth Trauma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Antomical Science and Research	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 -

1. 著者名 T. Tsumori, W. Tsumiyama	4. 巻 300
2. 論文標題 Sexual and regional differences in myosin heavy chain expression in the rat external urethral sphincter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anatomical Record	6. 最初と最後の頁 2058-2069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ar.23627	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津森登志子, 積山和加子
2. 発表標題 オスラット外尿道括約筋はアンドロゲン受容体を発現する
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津森登志子, 積山和加子
2. 発表標題 経膣分娩モデルラット外尿道括約筋におけるType 2B線維の選択的な損傷
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiko Tsumori, Wakako Tsumiyama
2. 発表標題 Histological properties of the external urethral sphincter of rats with simulated birth trauma
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------