ヒト外尿道括約筋の生化学的研究

旭川医科大学泌尿器科 (主任: 八竹 直教授)

徳中 荘平 藤井 敬三 岡村 廉晴

宮田 昌伸 金子 茂男 八竹 直

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF HUMAN EXTERNAL URETHRAL SPHINCTER

Sohei Tokunaka, Hiromitsu Fujii, Kiyoharu Okamura, Masanobu Miyata,

Shigeo Kaneko and Sunao Yachiku

Department of Urology, Asahikawa Medical College

(Director: Prof. Sunao Yachiku)

Human external urethral sphincter (EUS) muscle was isolated from urethrae obtained in surgery by glycerination. Electrophoretic samples were made from the isolated EUS muscle and pyrophosphate electrophoresis and two-dimensional electrophoresis were performed. Denatured myosin isozymes and myosin light chain components from EUS muscle were analysed by pyrophosphate electrophoresis and two-dimensional electrophoresis, respectively. Human EUS was concluded to be comprised with both fast twitch and slow twitch muscle fibers. The distribution of fast and slow myosin in EUS was examined in six cases. The distribution was various from case to case. In no case the percentage of slow twitch myosin was less than 38.8%.

要旨: 膀胱尿道全摘除術で得た男子尿道より外尿道括約筋の筋線維を分離し, 電気泳動用試料を調製した。ピロリン酸電気泳動法と2次元電気泳動法を用いて未変性ミオシンのアイソザイムとミオシン軽鎖を検討した結果, ヒト外尿道括約筋は, 速筋線維と遅筋線維の両者によって構成されることが示された。速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの量比を6症例で検討したところ, それらの量比は個々の症例により大きく異なったが, 遅筋型ミオシンが38.8%以下のものは見られなかった。

緒 言

括約筋部尿道には, 尿道粘膜をとり囲む, 不随意筋の平滑筋と, これをさらに外側よりとり囲む, 随意筋の横紋筋よりなる外尿道括約筋 (EUS) が存在する。尿道括約筋は, 膀胱蓄尿時には持続的に緊張を続けて尿の continence を保ち, 排尿時には, 膀胱収縮に合わせて速やかに弛緩してスムーズな排尿を遂行する¹⁾。随意筋である EUS は, 近年のウロダイナミクス検査法の発達とともに, 尿道括約筋機構の主体であると考えられてきたが, その機能は, 不随意筋の平滑筋臓器である膀胱の機能と密接に関連しており²⁾, 他の部位の横紋筋と異なった特殊な構造をしていることが知られて来た^{3,4)}。

ヒトを含めた哺乳類の横紋筋線維は, 速やかに収縮出来るが, 疲労しやすい速筋線維と, ゆっくり収縮するが, 疲労しにくい遅筋線維に大別される。速筋線維は, anerobic-glycolytic, 遅筋線維は, aerobic-

oxidative な代謝をして, motoneuron の形態も全く異なる⁵⁾。

一般の横紋筋は, 速筋線維と遅筋線維が混合して出来ている。すなわち, 人体で最も速やかに収縮する必要がある外眼筋は, 速筋線維85%, 遅筋線維15%で構成され, 径骨のそばにあって立位姿勢を保持するため緊張を持続する必要があるヒラメ筋は, 速筋線維11%, 遅筋線維89%で構成されている⁶⁾。従って, 筋肉の筋線維の構成は, その筋肉の機能により異なっており, また, 筋線維の構成を知ること, その筋肉の機能を知ることが可能であると思われる。

従来, 横紋筋の筋線維型は, 1950年代初めに Padycula & Hermann により開発された, ATPase 染色法⁷⁾をはじめとする組織化学的方法⁸⁾で行われてきたが, 1970年代後半より, 速筋線維と遅筋線維では, ATPase 活性だけでなく, ミオシン, トロポニン C などの筋構成タンパク質も異なることがわかり⁹⁾, これ

らの筋構成タンパク質を生化学的に分析することでも筋線維型を知ることが可能となった。

ヒト EUS の筋線維型を研究することは EUS の機能、特性を解明する上で大変役立つと考えられるが、現在まで、組織化学的あるいは、形態学的研究が数編³⁾¹⁰⁾¹¹⁾報告されているだけである。我々は、かつて、家兎 EUS を、生化学的、組織化学的に分析し、家兎 EUS は、速筋線維80%、遅筋線維20%で構成される速筋であることを報告している^{12)~14)}が、今回は、ヒト EUS の筋線維型を生化学的に検討した。

材料と方法

ヒト EUS とヒト腹直筋の採取と処理：膀胱腫瘍患者における、膀胱尿道全摘除術で得た男子尿道を、液体窒素でただちに凍結し、 -80°C のフリーザーで保存した。この凍結保存した尿道から、EUS を含む部分(前立腺の遠位半分と前部尿道の近位端1cm)を切り出し、凍結状態のまま、横断方向に0.3mmの厚さに薄切し、50%グリセリン、50%Relaxing buffer (RB): 0.1M KCl/2mM MgCl_2 /2mM EGTA/0.1mM Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)/0.01M Tris-maleate buffer, pH 6.8¹⁵⁾の中で、 -20°C で、2週間以上保存した。この薄切した尿道から実体顕微鏡を用いて 4°C の RB の中で可及的に EUS の筋層のみを分離採取した。分離 EUS は、位相差顕微鏡で横紋筋であることを確認した(図1)。ヒト腹直筋は手術の際に採取し、液体窒素でただちに凍結し、 -80°C のフリーザーで保存した。

電気泳動用試料の調製：ピロリン酸電気泳動用の粗ミオシンの調製は、EUS および腹直筋より、それぞれ、直接抽出¹⁶⁾して行なった。EUS および腹直筋からの2次元電気泳動用試料の調製は、それぞれの筋肉を細切した後、lysis buffer¹⁷⁾を加え、ミクロガラスホモジナイザーで充分ホモジナイズした。これらを600×g, 10分間、遠心した後、上清を泳動用試料とした。泳動用試料のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford 法¹⁸⁾で決定した。

電気泳動法：ピロリン酸電気泳動は、Hoh ら¹⁹⁾に準じて行なった。ゲルのアクリルアミド濃度は4%で行なった。80V で1時間プレランした後、ゲル1本あたり4~6 μg の粗ミオシンを重層し、80V で24時間ないし36時間の泳動を行なった。泳動槽は氷水で冷却し、泳動バッファーは、泳動中 $2 \sim 3^{\circ}\text{C}$ に維持した。2次元電気泳動は、O'Farrell¹⁷⁾に準じて、1次元目に等電点電気泳動を行ない、2次元目は、1次元目の等電点

図1 分離したヒト外尿道括約筋 (EUS) グリセリン筋の位相差顕微鏡写真。横紋が認められる。Scale bar = 20 μm 。

ゲルを重層して、SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動を行なった。等電点ゲルには100 μg の試料を重層した。等電点電気泳動は、400V で12時間行なった後、800V で1時間通電して終了した。2次元目のゲルは、厚さ1mmで、深さ2.5cmのアクリルアミド濃度4.5%の濃縮ゲルとアクリルアミド濃度15%の分離ゲルからなり、電気泳動は、最初2時間を5mA、その後20mAで終了まで行なった。泳動後のゲルは、ピロリン酸電気泳動、2次元電気泳動ともに0.13%、Coomassie Brilliant Blue R/45%エタノール/9.2%酢酸で染色し、5%エタノール/7.5%酢酸で脱染色した。

腹直筋粗ミオシンからの速筋型および遅筋型ミオシンの分離精製：8本のピロリン酸ゲルに、それぞれ、4 μg の腹直筋粗ミオシンを重層し、ピロリン酸電気泳動を行なった。ゲルを0.13%Coomassie Brilliant Blue R/45%エタノール/9.2%酢酸で1時間染色し、水洗後、速筋型ミオシンおよび遅筋型ミオシンのバンドを切り出し、これらのゲル片から Allington ら²⁰⁾に準じて電気泳動によりタンパク質の抽出を行なった。抽出バッファーは、25mM Tris/192mM グリシン/0.1% SDS, pH 8.4で4mAの通電で、12時間行なった。抽出タンパク質は、10mM リン酸バッファー/0.1%SDS, pH 7.0で5時間透析後、さらに12時間凍結乾燥し、lysis buffer に溶解して2次元用試料とした。

EUS ミオシン軽鎖2Fとミオシン軽鎖2Sの量比の検討：EUS より調製した2次元泳動用試料を前述のように2次元泳動した後、ゲルを染色、脱染色し、速筋型ミオシン軽鎖2Fと遅筋型ミオシン軽鎖2Sのスポットを切り出した。Fenner ら²¹⁾に準じて、切り出し

たゲル片から Coomassie Brilliant Blue R をビリジン溶液で抽出し、牛血清アルブミンを標準として605nmにおける吸光度を測定し、EUS ミオシン軽鎖の量比を算出した。

結 果

腹直筋と EUS から調製した未変性ミオシンのピロリン酸電気泳動：図2に示すように腹直筋のピロリン酸ゲル（ゲル A）では、Hoh ら²²⁾の報告と同様に、速筋型ミオシンのアイソザイムである FM1, FM2, FM3 の3本のバンドと遅筋型ミオシンのアイソザイムの SM のバンドを認める。次に、代表的な異なる2症例の EUS のピロリン酸ゲルでは、1例では（ゲル B）、速筋型ミオシンアイソザイムのバンドが無く、遅筋型ミオシンアイソザイム SM のみがあり、他の1例では（ゲル C）、腹直筋のゲルと同様に、速筋型ミオシンの FM1, FM2, FM3 の3本のバンドと遅筋型ミオシンの SM のバンドを認める。

ヒト腹直筋の2次元電気泳動：図3にヒト腹直筋粗ミオシンより分離精製した速筋型ミオシン（図3A）と遅筋型ミオシン（図3B）の2次元電気泳動結果を示す。図3Aでは、速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fのスポットのみが認められ、遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sのスポットが認められない。これに対し、図3Bでは、遅筋型ミオシン1S, 1'S, 2Sのスポットとともに速筋型ミオシンの1Fのスポットが認められる。これらの結果は、図は割愛するが、同時に行なった銀染色でも確かめられた。以上の結果より、ヒト腹直筋粗ミオシンの2次元電気泳動ゲルにおけるタンパク質スポットを図4のように同定した。

ヒト EUS 2次元電気泳動用試料の2次元電気泳動：図5にヒト EUS 2次元電気泳動用試料の2次元電気泳動結果を示す。図5Aの症例では、遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sのスポットを認めるが、速筋型ミオシン軽鎖1Fのスポットのみがあり、2Fと3Fのスポットを認めない。図5Bと図5Cの2症例では、ともに速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fのスポットと遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sのスポットを認める。ただし、図5Bの症例では、遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sのスポットが速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fのスポットより濃く染色されているが、図5Cの症例では、速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fのスポットが遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sのスポットより濃く染色されている。また、トロポニン C のスポットも図5Bでは、遅筋型トロポニン C が速筋型トロポニン C より濃く染色され

図2 ピロリン酸ゲル電気泳動写真（4%ゲル）。A、ヒト腹直筋の粗ミオシン、速筋型ミオシンアイソザイムの FM1, FM2, FM3 の3バンドと遅筋型ミオシンアイソザイムの SM バンド*が認められる。B、ヒト外尿道括約筋粗ミオシン、遅筋型ミオシンアイソザイムの SM バンドのみを認め、速筋型ミオシンアイソザイムのバンドを認めない。C、Bとは異なった症例から得たヒト外尿道括約筋粗ミオシン、腹直筋と同様に速筋型ミオシンアイソザイムの FM1, FM2, FM3 の3バンドと遅筋型ミオシンアイソザイムの SM バンドを認める。ゲル A とゲル B は同時に電気泳動したが、ゲル C は異なった泳動である。* SM バンドは他の報告者の SM1, SM2 の2バンドに相当する²²⁾。

ているのに、図5Cでは、速筋型トロポニン C が遅筋型トロポニン C より濃く染色されている。

表1に6症例のヒト EUS 2次元電気泳動用試料の2次元電気泳動ゲルから切り出した速筋型ミオシン軽鎖2Fと遅筋型ミオシン軽鎖2Sのモル比を示した。6症例から得た EUS 試料を2次元電気泳動して、染色後、ゲルのミオシン軽鎖スポットを切り出し、ビリジン溶液で染色剤の Coomassie Brilliant Blue R を溶出

図3 ヒト腹直筋より精製した速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの2次元電気泳動写真。A. 速筋型ミオシン, 1F, 2F, 3Fの速筋型ミオシン軽鎖のみを認める。B. 遅筋型ミオシン, 1S, 1'S, 2Sの遅筋型ミオシン軽鎖とともに速筋型ミオシン軽鎖の1Fを認める。

図4 ヒト腹直筋の2次元電気泳動写真, ゲル左が酸性側, 1F, 2F, 3F: 速筋型ミオシン軽鎖, 1S, 1'S, 2S: 遅筋型ミオシン軽鎖, FTC, STC: 速筋型トロポニンCおよび, 遅筋型トロポニンC, A: アクチン, $TM\alpha$, $TM\beta$: トロポミオシン。

図5 ヒト外尿道括約筋(EUS)の2次元電気泳動写真。A. 症例S.T. 63歳, 遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sとともに速筋型ミオシン軽鎖1Fを認める。速筋型ミオシン軽鎖2F, 3Fは認められない。B. 症例Y.W. 69歳, 速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fと遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sを認めるが, 遅筋型ミオシン軽鎖のスポットの方が速筋型ミオシン軽鎖のスポットより濃く染まっている。トロポニンCも遅筋型が速筋型より濃く染まっている。C. 症例T.F. 54歳, 速筋型ミオシン軽鎖1F, 2F, 3Fと遅筋型ミオシン軽鎖1S, 1'S, 2Sを認めるが, 速筋型ミオシン軽鎖のスポットの方が遅筋型ミオシン軽鎖のスポットより濃く染まっている。トロポニンCも速筋型が遅筋型より濃く染まっている。

表1 ヒト外尿道括約筋(EUS)における速筋型ミオシン軽鎖2 Fと遅筋型ミオシン軽鎖2 Sの量比.

(1 症例 6 枚のゲルを測定, mean $\pm$ 1SD)

症 例	遅筋型ミオシン 軽鎖 2 S	速筋型ミオシン 軽鎖 2 F
S. I. 53歳男子	83.5 $\pm$ 9.5%	16.5 $\pm$ 9.5%
T. F. 54歳男子	38.8 $\pm$ 2.0%	61.2 $\pm$ 2.9%
T. N. 61歳男子	50.6 $\pm$ 2.8%	49.4 $\pm$ 2.8%
S. T. 63歳男子	95.0 $\pm$ 2.0%	5.0 $\pm$ 2.0%
M. H. 67歳男子	73.4 $\pm$ 1.8%	26.7 $\pm$ 1.8%
S. S. 71歳男子	39.8 $\pm$ 0.5%	60.2 $\pm$ 0.5%

し、速筋型ミオシン軽鎖 LC2F と遅筋型ミオシン軽鎖 LC2S のモル比を染色剤の量から算出した。ミオシン 1 分子は 4 個のミオシン軽鎖を持ち、その内 2 個は軽鎖 2 で(速筋線維では、LC2F, 遅筋線維では、LC2S), 残り 2 個の軽鎖は軽鎖 2 以外の軽鎖(速筋線維では、LC1F と LC3F, 遅筋線維では、LC1S と LC1'S あるいは LC1F)から構成される²³⁾。従って、速筋型ミオシン軽鎖 LC2F と遅筋型ミオシン軽鎖 LC2S のモル比は、速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンのモル比と同一となり、速筋線維と遅筋線維の量比を反映すると考えられる。検討症例は 6 例と少ないが、速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの量比は、症例により大きく異なることがわかった。

考 案

EUS の生化学的研究のためには、純度の高い筋肉組織を得ることが必要である。一般の横紋筋(骨格筋)は、多数の筋細胞(筋線維)が小量の線維性結合組織により結びつけられた筋束を形成している²⁴⁾ので、純度の高い筋肉組織が容易に得られるが、ヒト EUS は、骨格筋と異なって、筋束を形成しないで個々の筋線維が厚い結合組織の中に散在しており、また平滑筋である内尿道括約筋と隣接して存在する²⁵⁾。従って、標本をそのままホモジナイズした場合、結合組織に妨害されて筋構成タンパク質の抽出が困難であること、また平滑筋成分の混入が避けられないことが問題となった。我々は、採取した EUS を含む尿道をグリセリン処理することで EUS の横紋筋線維を周囲の線維性結合組織や平滑筋から分離採取することが出来た。グリセリン処理は、細胞膜に多数の孔をあけ、線維性結合組織を軟らかくして、EUS の筋線維の採取を容易にする。一方、グリセリン処理により、EUS 筋細胞膜も破壊され、代謝系に関連する可溶性タンパク質は失われるが、

収縮構造タンパク質は、生筋とはほぼ同様の状態で保持されている²⁶⁾ため今回の研究目的によく合うと考えられた。

ミオシン 1 分子は、2 本のミオシン重鎖と 4 本のミオシン軽鎖から構成される²²⁾。Hoh ら¹⁹⁾、d'Albis ら²⁷⁾によって考案されたピロリン酸電気泳動法は、ミオシンを重鎖と軽鎖に分けずにミオシン分子を未変性のまま電気泳動できるのが特徴である。成人の骨格筋ミオシンは、ピロリン酸ゲルで下から上に FM1, FM2, FM3, SM1, SM2 の 5 本のバンドに分けられる。FM1, FM2, FM3 は、それぞれ速筋型ミオシンのアイソザイム、SM1, SM2 は、それぞれ遅筋型ミオシンのアイソザイムであり、それぞれのアイソザイムの量比は、色々な筋肉により異なっていることが知られている。遅筋型ミオシンアイソザイム SM1, SM2 の 2 本のバンドは非常に近接した部位にあるため、特に、我々の使った 4 %ゲルでは分離が悪いので 1 本の SM バンドとして表示した(図 2)。速筋線維は、速筋型ミオシンアイソザイムだけを持ち、遅筋線維は、遅筋型ミオシンアイソザイムを持つ。また胎児期のミオシンアイソザイムは、成人のものとは全く異なっていることも分かっている²²⁾。我々は、一般の骨格筋である腹直筋と、EUS から調製した試料を比較検討した。腹直筋は、小児および成人の数例で行なったが、図 2 ゲル A のように、いずれも速筋型ミオシンアイソザイムの 3 本のバンドと遅筋型ミオシンアイソザイムのバンドがみられた。腹直筋は、文献的には、速筋線維 50%, 遅筋線維 50%で構成される⁶⁾とされ、今回の結果は、このことを裏づけるものと考えられた。EUS では、図 2 ゲル B のように、遅筋型ミオシンアイソザイムのバンドのみがみられるものと、図 2 ゲル C のように、腹直筋と同様に速筋型、遅筋型両方のミオシンアイソザイムが存在するものがあった。従って、前者の EUS は、ほとんど遅筋線維のみで構成され、後者の EUS は、速筋線維と遅筋線維の両方で構成されていると考えられた。

2 次元電気泳動法によるヒト横紋筋構成タンパク質の検討は、1978 年頃より行なわれてきた²⁸⁾²⁹⁾。2 次元電気泳動用試料は、調製の段階でミオシン分子が軽鎖と重鎖に分解される。ミオシン重鎖は、分子量が大きすぎてゲル内にほとんど入ってこないため、2 次元電気泳動法によるミオシンの分析は、もっぱらミオシン軽鎖で行なわれる。一般に、速筋線維は速筋型ミオシン軽鎖 LC1F, LC2F, LC3F の 3 種類をもち、遅筋線維は遅筋型ミオシン軽鎖 LC1S, LC1'S, LC2S の 3 種類

を持つ。現在まで報告されている文献でミオシン軽鎖のスポットの位置が報告者により異なる²⁸⁾²⁹⁾ため、我々は、腹直筋粗ミオシンをピロリン酸電気泳動して、速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンに分け、これらを試料として2次元電気泳動を行ない、2次元電気泳動ゲルにおけるミオシン軽鎖のスポット位置を決定した(図3, 4)。その結果、ヒト速筋型ミオシン軽鎖LC1Fと遅筋型ミオシン軽鎖LC1Sは非常に接近して存在し、かつ他の哺乳類骨格筋線維と異なって遅筋型ミオシンが遅筋型ミオシン軽鎖LC1S, LC1'S, LC2Sだけでなく、速筋型ミオシン軽鎖LC1Fをも持つことが明らかとなった。この事実は、他の研究者によっても確認されている³⁰⁾³¹⁾。

従来のEUS研究は、猫を使って電気生理学的方法で行なわれたものがほとんどで、EUSを遅筋として記載しているものが多い。ヒトEUSも動物実験の結果と尿のcontinenceを保持する機能から推定して遅筋と考えられてきた。

実際に、EUSの筋肉自体を筋肉の代謝系酵素の組織化学的分析、筋収縮構造タンパク質の生化学分析、あるいは電子顕微鏡を用いた超微構造の検討などを行なった研究はまだ非常に少ない。我々は、家兎EUSを生化学的、組織化学的に検討して速筋線維80%、遅筋線維20%で構成される速筋であることを報告した。Bazeedら³²⁾は、犬EUSをATPase染色を主体とする組織化学的方法で検討し、速筋線維65%、遅筋線維35%で構成され、遅筋線維の比率は、EUSの内側ほど高いと報告している。我々も家兎EUSのATPase染色でEUS内側ほど遅筋線維の比率が高まることを確認している¹⁴⁾。Bazeedらは、さらに膀胱にストレスの加わった状態では、EUS部の尿道内圧がすみやかに上昇すること、仙骨神経根に高周波の電気刺激を加え、速筋線維を疲労させた状態でもEUS部の尿道内圧が一定以下に下がらないことから、疲労しにくく、持続的に緊張を保つ遅筋線維が安静時における尿のcontinenceを主に維持しており、疲労し易い速筋線維は、ストレス時における急激なEUSの緊張の上昇や、尿線の中断に関与すると推定している。

Goslingら³⁾は、9例の膀胱尿道全摘除症例のEUSを透過型電子顕微鏡とATPase染色法で検討したところ、純粋に遅筋線維のみで構成された遅筋であると報告している。しかし、Schröderら¹⁰⁾は、3症例の剖検例をATPase染色法で検討し、EUSは速筋線維と遅筋線維の両者で構成されると報告している。従って、

ヒトEUSの筋線維型については、今だ定説がなく、議論のあるところである。

今回の我々の検討では、ピロリン酸電気泳動による末変性ミオシンも、2次元電気泳動によるミオシン軽鎖も速筋型、遅筋型の両方が認められた。試料に用いたEUS筋線維は、EUS部尿道全体から可及的完全に採取し、その全量を使って試料を調製したため、試料内の速筋型、遅筋型ミオシンの量比は、そのままEUS全体の速筋線維、遅筋線維の量比を反映することになる。従って、ヒトEUSは、速筋線維、遅筋線維の両者から構成されることは間違いない。後日発表する予定であるが、我々は、この事実をATPase染色でも確かめている。

ヒトEUSの速筋型、遅筋型ミオシンの量比、即ち、速筋線維と遅筋線維の量比が個体により著しく異なるのは、他の動物では見られない現象であり、ヒトEUSの特徴と思われる。一般に、個々の横紋筋の速筋線維と遅筋線維の量比は、生まれつき決まっており、生後の運動負荷などのトレーニングによっては変化しないとされている³³⁾ので、EUS筋線維の量比も個人の遺伝素因、あるいは、EUSの神経支配が形成される胎児期の母体および胎児環境における種々の要因により異なってくるものと考えられる。本研究で検討し得た症例はいずれも男子で50歳以上であったが、女子および、より若年の症例の検討も必要であろう。EUSの遅筋型ミオシンの比率は、症例により95.0%から38.8%まで色々であった。換言すれば、速筋型ミオシンが5%と非常に少ない症例はあったが、遅筋型ミオシンの比率が38.8%以下の症例はないことから、ヒトEUSにおいても安静時の尿のcontinenceの維持には、遅筋線維が主に関与していると推定される。ヒトEUSの遅筋線維の比率が、家兎、犬より高い理由の一つとして、家兎、犬が四足行歩行するのに対し、ヒトは、二足歩行するため、膀胱に対して膀胱径部、尿道が、家兎、犬などより下方に位置し、安静時においてもより強い閉鎖圧を必要とするためと思われる。ヒトおよび霊長類の骨盤底筋群も同様の理由で、他の哺乳類より著しく発達していることが知られている³⁴⁾。

EUSは、骨格筋と同様に随意筋ではあるが、骨格筋と異なって筋束を形成せず、起始部、停止部が無く、個々の筋線維が線維性結合組織中に散在している²⁵⁾。神経支配も骨格筋と同様の体性神経ばかりでなく、自律神経である交感神経、副交感神経の支配も受け³⁵⁾、筋紡錘の存在が証明されない³⁾など、むしろ平滑筋に近

い性質を持っている。これらのEUSの特性は、平滑筋臓器である膀胱および尿道括約筋と密接に関連して機能する必要性から生じたものと考えられる。この、いわば骨格筋と平滑筋両方の性質をかね備えたEUS横紋筋の筋収縮構造タンパク質が、一般の骨格筋と同様のものか、あるいは生きている限り拍動し続ける心臓筋の筋収縮構造タンパク質³⁶⁾のような一般の骨格筋と異なって特殊化した筋収縮構造タンパク質であるのか興味を持たれた。今回の検討の結果、ピロリン酸電気泳動によるミオシンアイソザイムと2次元電気泳動によるミオシン軽鎖の両方ともEUSは一般の骨格筋である腹直筋とほぼ同様であることが証明された。

結 語

グリセリン処理により平滑筋成分や結合組織成分を混入せずにヒトEUSを単離することが出来た。単離したEUS横紋筋線維より電気泳動用試料を調製し、ピロリン酸電気泳動と2次元電気泳動を行なった。ヒトEUSをヒト腹直筋と比較して、ピロリン酸電気泳動により未変性ミオシンを、2次元電気泳動によりミオシン軽鎖を検討し、ヒトEUSは、速筋線維と遅筋線維の両者から構成されることを証明した。6例のヒトEUSの速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの量比を検討したところ、それらの比率は個体により非常に異なったが、遅筋型ミオシンが38.8%以下の症例はみられなかった。

本研究に用いた試料の一部を御提供いただいた近畿大学医学部泌尿器科教室、栗田 孝教授、旭川厚生病院泌尿器科、南 茂正医長に深謝いたします。また、筋肉の生化学的研究法全般にわたって御指導いただいた、本学、化学教室の内田幸喜教授、村上梅司博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Kuru, M.: Nervous control of micturition. *Physiol. Rev.*, 45, 425—494, 1965.
- 2) Fletcher, T.F. and Bradley, W.E.: Neuroanatomy of the bladder-urethra. *J. Urol.*, 119, 153—160, 1978.
- 3) Gosling, J.A., Dixon, J.S., Critchley, H.O.D. and Thompson, S.A.: A comparative study of the human external sphincter and periurethral levator ani muscle. *Brit. J. Urol.*, 53, 35—41, 1981.
- 4) Oelrich, T.M.: The urethral sphincter muscle in the male. *Am. J. Anat.*, 158, 229—246, 1980.
- 5) Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P. and Zajac, F.E. III: Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat

- gastrocnemius. *J. Physiol.*, 234, 723—748, 1973.
- 6) Johnson, M.A., Polgar, J., Weightman, D. and Appleton, D.: Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles, and autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, 18, 111—129, 1973.
- 7) Padykula, H.A. and Hermann, E.: Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 161—169, 1955.
- 8) Dubowitz, V.: Muscle biopsy: A practical approach, 2nd ed. p. 19—40, Balliere Tindall, London, 1985.
- 9) Lowey, S. and Risby, D.: Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature*, 234, 81—85, 1971.
- 10) Schrøder, H.D. and Reske-Nielsen, E.: Fiber types in the striated urethral and anal sphincters. *Acta Neuropathol.*, 60, 278—282, 1987.
- 11) 熊谷 章: ヒト外尿道括約筋及びその神経支配に関する超微的研究. *日泌尿会誌*, 77, 930—937, 1986.
- 12) 徳中荘平, 岡村廉晴, 大橋健児, 八竹 直, 村上梅司: O'Farrellの2次元電気泳動法による雄家兎外尿道括約筋の解析. *日泌尿会誌*, 75, 1956—1963, 1984.
- 13) Tokunaka, S., Murakami, U., Okamura, K., Miyata, M. and Yachiku, S.: The fiber type of the rabbits' striated external urethral sphincter: Electrophoretic analysis of myosin. *J. Urol.*, 135, 427—430, 1986.
- 14) 岡村廉晴, 徳中荘平, 藤井敬三, 宮田昌伸, 八竹直: 家兎外尿道括約筋の検討—ATPase染色を用いた組織化学的解析—. *日泌尿会誌*, 投稿中.
- 15) Etlinger, J.D., Zak, R. and Fischman, D.A.: Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle. *J. Cell Biol.*, 68, 123—141, 1976.
- 16) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 2nd ed., p. 144, Academic Press, New York, 1951.
- 17) O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007—4021, 1975.
- 18) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248—254, 1976.
- 19) Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A. and White, R.I.: Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast twitch and slow twitch muscles of the chick. *Biochem. J.*, 157, 87—95, 1976.

- 20) Allington, W.B., Cordry, A.L., McCullough, G. A., Mitchell, D.E. and Nelson, J.W.: Electrophoretic concentration of macromolecules. *Anal. Biochem.* 85, 188—196, 1978.
- 21) Fenner, C., Traut, R.R., Mason, D.T and Wikman-Coffelt, J.: Quantification of coomassie blue stained proteins in polyacrylamide gels based on analysis of eluted dye. *Anal. Biochem.*, 63, 595—602, 1975.
- 22) Fitzsimons, R.B. and Hoh, J.F.Y.: Embryonic and foetal myosins in human skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.*, 52, 367—384, 1981.
- 23) Kelly, M.A.: Emergence of specialization in skeletal muscle. In *Handbook of Physiology*, Section 20, Skeletal muscle, Peachey, L.D., Adrian, R.H. and Geiger, S.R., 1st. ed., p. 507—537, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1983.
- 24) 石川春津, 山田英智: 筋の微細構造. 筋肉病学, 里吉宮二郎, 豊倉康夫, 第1版, p. 21, 南江堂, 東京, 1973.
- 25) Oelrich, T.M.: The urethral sphincter muscle in the male. *Am. J. Anat.*, 158, 229—246, 1980.
- 26) 北沢俊雄: グリセリン筋. 生化学実験講座15, 筋肉, 第1版, p. 281, 東京化学同人, 東京, 1975.
- 27) d'Albis, A., Pantaloni, C. and Bechet, J.: An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.*, 99, 261—272, 1979.
- 28) Fardeau, M., Godet-Guillain, J., Tome, F.M.S., Carson, S. and Whalen, R.G.: Congenital neuromuscular disorders: A critical review. In *Current topics in Nerve and Muscle Research*, Aguayo, A.J. and Karpatis, G., 1st ed., p. 164—177, Excerpta Medica, Amsterdam, 1978.
- 29) Giometti, C.S., Anderson, N.G. and Anderson, N.L.: Muscle protein analysis. I. High-resolution two-dimensional electrophoresis of skeletal muscle proteins for analysis of small biopsy samples. *Clin. Chem.*, 25, 1877—1884, 1979.
- 30) Ishiura, S., Takagi, A., Nonaka, I. and Sugita, H.: Heterogenous expression of myosin light chain 1 in a human slow twitch muscle fiber. *J. Biochem.*, 90, 279—282, 1981.
- 31) Billeter, R., Heizmann, C.W., Howald, H. and Jenny, E.: Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibres. *Eur. J. Biochem.*, 116, 389—395, 1981.
- 32) Bazeed, M.A., Thuroff, J.W., Schmidt, R.A. and Tanagho, E.A.: Histochemical study of urethral striated musculature in the dog. *J. Urol.*, 128, 406—410, 1982.
- 33) Dubowitz, V.: Muscle biopsy: A practical approach, 2nd ed. p. 71—73, Balliere Tindall, London, 1985.
- 34) 佐藤達夫, 佐藤健次: 肛門挙筋と外肛門括約筋の神経支配. *神経内科*, 10, 313—320, 1979.
- 35) Elbadawi, A. and Atta, M.A.: Ultrastructure of vesicourethral innervation: IV. Evidence for somatomotor plus autonomic innervation of the male feline rhabdosphincter. *Neurology and Urodynamics*, 4, 23—36, 1985.
- 36) Price, K.M., Littler, W.A. and Cummins, P.: Human atrial and ventricular myosin light-chain subunits in the adult and during development. *Biochem. J.*, 191, 571—580, 1980, 116, 1986.
(1987年9月28日受理)