雌家兎外尿道括約筋の生化学的検討

旭川医科大学泌尿器科教室 (主任: 八竹 直教授)

徳中 莊平 藤井 敬三 岡村 廉晴
宮田 昌伸 八竹 直

BIOCHEMICAL ANALYSIS OF THE EXTERNAL URETHRAL SPHINCTER OF FEMALE RABBITS

Sohei Tokunaka, Hiromitsu Fujii, Kiyoharu Okamura, Masanobu Miyata and Sunao Yachiku

Department of Urology, Asahikawa Medical College

The proportion of fast and slow myosin molecules in external urethral sphincter (EUS) was studied. The contents of fast and slow myosin light chains in EUS from 6 female rabbits (Japanese White, 6-month-old) were estimated using two-dimensional electrophoresis. The percentages of fast and slow myosin molecules were 54.5 ± 14.9 and 46.0 ± 14.9 , respectively. It was thus shown that female rabbits EUS is composed of both fast and slow muscle fibers. The ratio of fast to slow myosins in female EUS was different from that in male EUS (fast myosin 90%). These results implicate that female and male EUS would be functionally distinct.

Key words: external urethral sphincter, female rabbit, myosin

要旨: 6カ月齢の雌家兎6頭から外尿道口より近位の外尿道括約筋 (external urethral sphincter: EUS) を採取し, 分離した筋肉から調製した試料を2次元電気泳動した。2次元電気泳動ゲルから速筋型軽鎖2と遅筋型軽鎖2のスポットを切出し, ピリジンで染色剤を溶出し, 605nmにおける吸光度を測定して試料内の速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの比率を算出した。その比率は速筋型 $54.0 \pm 14.9\%$, 遅筋型 $46.0 \pm 14.9\%$ であった。したがって雌EUSも雄EUSと同様に速筋型線維と遅筋型線維で構成されている。しかし以前に報告した雄家兎EUSでは速筋型ミオシンが90%であることと比較すると, かなり異なり, 雌EUSでは速筋型ミオシン, 遅筋型ミオシンが合いなかばしている。家兎尿道は雌雄で形態が全く異なるが, 速筋型, 遅筋型ミオシンの比率の分析でも雌雄間に違いが見られ, 機能的にも性差があることが示唆された。

キーワード: 外尿道括約筋, 雌家兎, ミオシン

緒 言

外尿道括約筋 (external urethral sphincter: EUS) は尿道の主要な括約筋機構であり骨格筋と同様に横紋筋で構成される随意筋である。哺乳類の横紋筋を構成する筋線維は収縮速度, ATPase 活性, 構成タンパクの違いにより, 速筋線維と遅筋線維に大別出来る。ある特定の骨格筋における速筋線維と遅筋線維の構成比率は同一動物種では多少の個体差はあるものの, ほぼ一定であるとされている¹⁾。

過去の多くの電気生理学的研究では, 外尿道括約筋は尿の禁制を持続的に保持する性質から大部分が遅筋線維で構成される筋肉であると記載されて来た²⁾。しかし, 我々は, 雄家兎の外尿道括約筋の収縮タンパク,

ミオシンとATPase染色による検討³⁾⁴⁾で雄家兎の外尿道括約筋では速筋線維比率が非常に高い (約90%) ことを報告した。

今回, 外尿道括約筋の構成筋線維比率に性による違いが存在するかどうか知るために雌家兎の外尿道括約筋の速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの比率を検討した。

対象と方法

雌家兎の泌尿生殖器の構造の模式図を図1に示す。雌家兎の泌尿生殖器は犬猫等の多くの哺乳動物と同様に尿道が腔内に開口する。外尿道口が腔内にあり外尿道口の遠位側では単一の管腔 vestibulum を形成し外陰部における開口部は一つになっている⁵⁾。すなわち,

図1 雌家兎の泌尿生殖器, 直腸の模式図。bl: bladder, v: vagina, vs: vestibulum, r: rectum.

尿道と膣が完全に分離して外陰部に開口するヒトや高等霊長類の雌と大きく異なっていて, 胎生期の泌尿生殖洞の形態を維持している。

雌家兎のEUSは図1に描いたように膀胱頸部(尿道)と膣をいっしょに取囲む輪状筋で, 膀胱頸部(尿道)と膣の間にはEUS筋線維は存在しない。つまり雌家兎では雄家兎と異なり尿道のみを取囲むEUSは存在せず, 横紋筋性括約筋は尿道と膣を取囲むurogenital sphincterとも言うべき構造をしている。

ヒト女性の横紋筋性尿道括約筋も男性のそれとは大きく異なり遠位部1/3では膣と尿道をいっしょに取囲んでいる⁶⁾ことが知られているが, Gosling, J.A.⁷⁾は尿道周囲の骨盤底筋ではない尿道固有の横紋筋性括約筋を男女の区別なくEUSと呼んでいる。

また男女の会陰部は胎生初期には区別がないが, 男性では精巣由来のdihydrotestosterone, Müllerian duct inhibiting hormoneの作用で男性化し, 女性ではこれらのホルモンを欠如するために女性化することが知られている。尿道固有の横紋筋性括約筋も男女で全く同じ原器から分化して来たものが男性では前立腺や尿道球腺の分化, 女性ではミューラー管由来の膣の分化により最終的には形態的に大きく異なるようになると考えられる。

以上の二つの理由から本論文では雌家兎の尿道固有の横紋筋性括約筋を雄家兎のそれと同様に外尿道括約筋(EUS)と呼ぶことにする。

尿道の膣への開口部以下のvestibulumの周囲にも輪状筋構造があり図1ではperivestibular muscle: PVMとした。従来の猫, 家兎その他の雌動物の神経解剖学的研究⁸⁾で, これら雌動物のEUSは膣に開口する外尿道口より近位の部分にあることが分っている。したがってPVMはヒト男子の前部尿道周囲の筋肉と同様に尿の禁制には直接関与しない外陰部の筋肉と考えられる。

標本採取と2次元電気泳動用試料の調製: ネンブタールを耳静脈より急速静注して屠殺した6頭の雌家兎(日本白色, 体重2.4kg)から膀胱, vestibulum(泌尿生殖洞), 膣を外陰部, 直腸と一塊にして摘出した。この摘出組織からさらに直腸と外陰部を切除してvestibulumと膀胱および膣の遠位部からなる標本を作成して-80℃で凍結した。

この凍結標本から尿道が膣に開口する外尿道口の部位より近位のEUS部分を0.3mmの厚さに横断薄切して50%グリセリン50%リラックスバッファー(RB)³⁾に浸けて-20℃で2週間以上保存してグリセリン化した。

既報³⁾のごとく実体顕微鏡を用いてグリセリン化した組織から横紋筋のみを採取した。採取した横紋筋はミリポアフィルターにのせて水分を可及的に取除いた後, 湿重量を測定した。採取筋組織は位相差顕微鏡で横紋の観察をして横紋筋であることを確認した。採取筋組織に3倍量のライシスバッファーを加えてマイクロガラスホモジナイザーで室温でホモジナイズした後600×gで10分間遠心して上清を2次元電気泳動用試料とした。タンパク濃度はBradford法⁹⁾で測定した。

2次元電気泳動: 2次元電気泳動はO'Farrell¹⁰⁾に準じて, 1次元目に当電点電気泳動, 2次元目にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。1次元ゲルには100μgの試料を注入した。2次元目のSDS-ポリアクリルアミドゲルには分離ゲルのアクリルアミド濃度15%のものを使用した。電気泳動は既報³⁾の様にを行った。

速筋型ミオシン軽鎖と遅筋型ミオシン軽鎖の比率の測定: 2次元電気泳動ゲルは既報³⁾のごとくCoomassie Brilliant Blue Rで染色した脱染色した。このゲルから速筋型ミオシン軽鎖2Fのスポットと遅筋型ミオシン軽鎖2Sのスポットを切出した。Fenner¹¹⁾の方法に従って, 切出したゲル片からピリジン溶液でCoomassie Brilliant Blue Rを抽出し, ウシ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

表1 採取した外尿道括約筋（EUS）の湿重量

Rabbit No.	EUS (g)
1	0.50
2	0.30
3	0.10
4	0.30
5	0.30
6	0.50
mean ± 1sd	0.33 ± 0.14

表2 外尿道括約筋（EUS）における速筋型ミオシン軽鎖2（fast MLC2）と遅筋型軽鎖2（slow MLC2）の割合

Rabbit No.	fast MLC2(percent)	slow MLC2(percent)
1	68.7	31.3
2	38.8	61.2
3	36.7	63.3
4	70.0	30.0
5	67.5	32.5
6	42.2	57.8
mean ± 1sd	54.0 ± 14.9	46.0 ± 14.9

てタンパク濃度を算出した。1つの試料について12枚の2次元ゲルを作成し、それぞれのゲルについてミオシン軽鎖2Fと2Sの比率を算出した。

結 果

採取したEUSの湿重量を表1に示した。6頭のEUSの平均重量は0.33±0.14gであった。EUSにおける速筋型ミオシン軽鎖2Fと遅筋型ミオシン軽鎖2Sの比率を表2に示した。2Fと2Sの比率は個体によりかなりの差異が見られた。2Fと2Sの比率の平均はそれぞれ54.0±14.0%と46.0±14.0%であった。図2は表2の家兎No. 2のEUSの2次元電気泳動ゲルのミオシン軽鎖領域の写真であるが、速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンはほぼ同量であり、特に2Fと2Sのスポットをくらべると2Sのスポットが2Fよりやや大きいことが分る。

考 察

横紋筋線維は収縮速度や疲労性の違いなどで、速筋線維と遅筋線維に大別される。筋線維のタイプ分類においてその簡便さと確実性で汎用されているATPase染色では、成熟家兎の横紋筋線維はタイプ1、タイプ2A、タイプ2Bの3種類に分類される¹²⁾。タイプ1線維は、疲労しにくい遅筋線維であり、タイプ2Aとタイプ2Bはともに速筋線維であるがタイプ2A

図2 EUSの2次元電気泳動ゲル、ミオシン軽鎖領域。表のNo. 2の家兎、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)のスポットがほぼ同量であり、特に2Fと2Sのスポットを比べる2Sがやや大きい。

は、やや疲労しにくいのに対し、タイプ2Bは、易疲労性である。

各種の電気泳動法による研究で、速筋線維と遅筋線維ではATPase活性が違っただけでなく収縮タンパク、ミオシンも異なったアイソザイムを持つことが知られている¹³⁾¹⁴⁾。また調節タンパク、トロポニンや、トロポミオシンにも速筋型、遅筋型アイソザイムがある¹⁵⁾¹⁶⁾。

ミオシン1分子は2本の重鎖と4本の軽鎖で構成されている。重鎖¹⁷⁾、軽鎖¹⁸⁾¹⁹⁾にも速筋型、遅筋型が知られている。遅筋線維タイプ1線維のミオシン軽鎖は、1S、1'S、2Sの3種類があり、速筋線維タイプ2Aと2Bの軽鎖は、1F、2F、3Fの3種類が知られている。速筋型でも遅筋型でもミオシン1分子にある4本の軽鎖のうち2本は必ず軽鎖2（DTNB軽鎖）であることが分っている¹⁸⁾¹⁹⁾。したがって、本研究で行った様に、ある試料中の速筋型ミオシンと遅筋型ミオシンの比率を求めるためには軽鎖2Fと2Sの比率を算出すればよいことになる。

今回検討した雌家兎EUSではかなりの個体差があったが、平均すると速筋型ミオシン54%、遅筋型ミオシン46%であった。

ヒトおよび動物のEUSを構成している筋線維タイプの比率と分布についてはいくつかの研究があるが、結果は色々で統一された見解は無いようである^{20)~23)}。我々は、以前にATPase染色を使って雄家兎のEUSがタイプ1線維、13%、タイプ2A線維、45%、タイプ2B線維、42%で構成されることを報告した⁴⁾。

またミオシン軽鎖と未変性ミオシンの分析から雄家兎 EUS 由来のミオシンは速筋型88%, 遅筋型12%からなることも報告した³⁾。したがって家兎では、雌の方が雄より EUS の遅筋線維の比率が高くなっている。

横紋筋に普遍的に認められる法則としてサイズ原則²⁴⁾が知られている。個々の横紋筋は多数の筋線維で構成されている。一つの運動神経細胞 (motoneuron) は複数の筋線維を支配しており、同じ motoneuron に支配されているこれら複数の筋線維はすべて同じ筋線維型になっている。支配 motoneuron と支配される筋線維を合せて運動単位と言うが、ある動作を行うための筋肉の収縮にどの運動単位が動員されるかは毎回変わるわけではなく、運動単位の動員の順序は中枢神経系に制御された機構によってきちんと決っている。この機構は motoneuron の大きさ(サイズ)、興奮閾値、神経伝動速度により成立っている。

すなわち、遅筋線維であるタイプ1線維と、速筋線維であるタイプ2A線維、タイプ2B線維の motoneuron はそれぞれ異なっている。タイプ1線維の支配 motoneuron が最も小さく興奮閾値も最も低く、神経伝動速度が最も遅くなっている。タイプ2B線維の支配 motoneuron は最も大きく、興奮閾値が最も高く、神経伝動速度が最もはやくなっている。タイプ2A線維の支配 motoneuron は前2者の中間の大きさで、中間の興奮閾値、中間の神経伝動速度を持つ。

したがって、motoneuron に対する中枢からの刺激が弱く、筋の収縮強度が弱いときにはタイプ1線維のみが動員され、motoneuron に対する刺激が強まり、収縮の強度が増すにつれてタイプ2A、タイプ2Bの順序で動員される。これをサイズ原則と言っている。

EUS にこのサイズ原則を適用すると、膀胱の蓄尿期には EUS の遅筋線維が弱い神経刺激で収縮を持続し、意識的な尿線の中断や腹圧の急激な上昇に起因する膀胱内圧の変化など短時間の強い収縮が必要な時だけ強い神経刺激により速筋線維が収縮に参加すると考えられる。

雌家兎 EUS の速筋型、遅筋型ミオシン比率は雄家兎のそれと大きく異なるので雌雄による排尿動態が異なる可能性を示していると推定される。

雌家兎と雄家兎の EUS の解剖学的形態は大きく異なっており、雌家兎 EUS は雄のそれと異なって尿道のみならず陰茎をも取囲んでいる。この理由は「対象と方法」の項で述べたように、雌雄で異なった外陰部、会陰部分化が起こるために雌雄で同じ原器から分化し

た EUS が雌では陰茎の発生分化により、雄では前立腺、尿道球腺の発生分化によって影響を受け異なる形態となるものと考えられる。しかし、雌家兎の vestibulum を雄家兎の前部尿道に置き換えて考えるならば、雌家兎の泌尿生殖器は雄家兎のそれと同様に胎生期の泌尿生殖洞の形態を残していると考えられ、EUS も雌雄で非常に似た形態をとっていると見ることも出来る。

成熟雄 EUS は成熟雌 EUS よりも筋量が多い。また今回の実験で示されたように速筋型ミオシン、遅筋型ミオシンの構成比率も雌雄で異なっており、雄は雌より速筋型ミオシンの比率が高い。つまり、EUS は雌雄により形態的にも機能的にも異なる性質を持つようである。この違いが何によっておこってくるのか興味を持たれる。

雄ラットの球海綿体筋や、陰茎根部の横紋筋は、胎児期に胎児の睾丸由来の androgen の影響を受けて発達し、これらの筋肉を支配する motoneuron の発育にも androgen の存在が必要なが知られている。一方、雌ラットでは、球海綿体などを支配する motoneuron は胎生早期には雄ラットと同様に存在するが、androgen が無いためにその多くが消失して減少し、球海綿体筋は出生後数日で消滅する²⁵⁾。

すなわち、一般の横紋筋と異なり球海綿体筋などの会陰部の横紋筋は、胎児期の androgen により、性差が生ずるわけである。外尿道括約筋では、このような現象はまだ知られていないが、雌雄における著しい形態の差は、球海綿体筋と同様の機構により引き起こされるのではないかと想像される。

結 語

雌家兎 EUS の解剖学的構造は、雄家兎のそれとはかなり異なる。しかし雌家兎の泌尿生殖器を雄家兎のそれと同様に胎生期の泌尿生殖洞の形態を残していると考えれば対応する位置に存在する相同の器官であると考えられた。

雌家兎 EUS は雄家兎 EUS と同様に、速筋線維と遅筋線維の両方で構成されており、尿の禁制に必要な持続的な収縮と短時間の強い収縮が共に可能な筋肉であることが示された。

雌家兎 EUS ミオシンの速筋型、遅筋型比率は雄家兎のそれとは異なることが確認された。したがって雌雄の EUS は異なる性格をもつことが推定された。

文 献

- 1) Johnson, M.A., Polgar, J., Weightman, D. and Appleton, D.: Data on the distribution of fibre

- types in thirty-six human muscles, an autopsy. *J. Neurol. Sci.*, 18, 111–129, 1973.
- 2) Mackel, R.: Segmental and descending control of the external urethral and anal sphincters in the cat. *J. Physiol.*, 294, 105–122, 1979.
 - 3) 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.
 - 4) 岡村廉晴, 徳中荘平, 宮田昌伸, 藤井敬三, 水永光博, 橋本 博, 八竹 直: ヒストグラム解析による雄家兎外尿道括約筋の組織学的検討, 日泌尿会誌, 80, 1127–1133, 1989.
 - 5) Cragie, E.H.: The urogenital system. in *Bensley's Practical Anatomy of the Rabbit*, Cragie, E.H., 8th. ed., p. 122, University of Tronto Press, Toronto, 1948.
 - 6) Oelrich, T.M.: The striated urogenital sphincter muscle of the female. *Anat. Rec.*, 205, 223–232, 1983.
 - 7) Gosling, J.A., Dixon, J.S. and Humpherson, J. R.: *Functional Anatomy of the Urinary Tract*, 1st ed., p. 5.8, Gower Medical Publishing, London, New York, 1982.
 - 8) Langley, J.N. and Anderson, H.K.: The innervation of the pelvic and adjoining viscera. Part VII Anatomical observations. *J. Physiol.*, 20, 372–406, 1896.
 - 9) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254, 1976.
 - 10) O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007–4021, 1975.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) d'Albis, A. and Gratzner, W.B.: Electrophoretic examination of native myosin. *F.E.B.S. Letters*, 29, 292–296, 1973.
 - 14) Fitzsimons, R.B. and Hoh, J.F.Y.: Isomyosins in human type 1 and type 2 skeletal muscle fibres. *Biochem. J.*, 193, 229–233, 1981.
 - 15) Moore, G.E., Briggs, M.M. and Schachar, F.H.: Patterns of troponin T expression in mammalian fast, slow and promiscuous muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 8, 13–22, 1987.
 - 16) Schachar, F.A., Bronson, D.D. and McDonald, O.B.: Heterogeneity of contractile proteins. A continuum of troponin-tropomyosin expression in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 260, 1108–1113, 1985.
 - 17) Carraro, U. and Catani, C.: A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 793–802, 1983.
 - 18) Lowey, S. and Risby, D.: Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature (Lond.)*, 278, 81–85, 1971.
 - 19) Barton, P.J.R. and Buckingham, M.E.: The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.*, 231, 249–261, 1985.
 - 20) 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 muscles. *Brit. J. Urol.*, 53, 35–41, 1981.
 - 21) Schrøder, H.D. and Reske-Nielsen, E.: Fiber type in the striated urethral and anal sphincters. *Acta Neuropathol.*, 60, 278–292, 1983.
 - 22) 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.
 - 23) Tokunaka, S., Okamura, K., Fujii, H. and Yachiku, S.: The proportions of fiber types in human external urethral sphincter: Electrophoretic analysis of myosin. *Urol. Res.*, 18, 341–344, 1990.
 - 24) Saltin, B. and Gollnick, P.D.: Skeletal muscle adaptability: Significance for metabolism and performance. in *Handbook of Physiology*, Sec. 10, Skeletal Muscle, Peachey, L.D., Adrian, R. H. and Geiger, S.R., 1st ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.
 - 25) Arnold, A.P. and Jordan, C.L.: Hormonal organization of neural circuits. in *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 10, Martini, L. and Ganong, W.F., p. 185, Raven Press Ltd., New York, 1988.

(1991年12月17日受理)