

氏名・(本籍)	若林賢彦(滋賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士(論)第122号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成5年6月25日
学位論文題目	Immuno-electron microscopic study of tyrosine hydroxylase in the cat urinary bladder and proximal urethra (ネコ膀胱・近位尿道におけるチロシン水酸化酵素免疫陽性神経の電顕による検討)
	審査委員
	主査教授 木村 宏
	副査教授 前田 敏博
	副査教授 友吉 唯夫

論文内容要旨

[目的]

これまでのアミン蛍光法などの組織学的研究より、ネコを含む哺乳類において膀胱筋層の交感神経の密度は、膀胱体部に少なく、膀胱底部・尿道に多いことが知られている。また膀胱筋層の交感神経終末は、過マンガン酸カリウム固定や6-, 5-水酸化ドーパミン処理をおこなって電顕で観察されているが、膀胱筋層における交感神経終末の存在様式が膀胱体部と膀胱底部・尿道のあいだで差異があるのか不明であった。

本研究では、ネコ膀胱筋層の交感神経終末の存在様式を調べるために、ノルアドレナリン合成酵素の一つであるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase: TH) の抗体を用いた免疫電顕組織化学によりTH免疫陽性神経終末と平滑筋細胞との関係を詳細に検討した。

[方法]

1) TH免疫組織化学法

ネコ(体重2.5~4.0kg)を用い、麻酔下に用手的に排尿させた後、開胸し経心的に4%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド、0.2%ピクリン酸の混液で灌流固定した。膀胱・尿道を摘出し、4%パラホルムアルデヒド、0.2%ピクリン酸の混液で2日間後固定した。膀胱体部下部、膀胱底部(膀胱底部外側、三角部、膀胱頸部)、近位尿道の5カ所をクリオスタットで凍結切片を作成した。抗TH抗体を用いた免疫組織化学(ABC法)で染色し、光顕および電顕にて観察した。

2) アミン蛍光組織化学法

グリオキシール酸を用いた高感度湿式法で、上述の5カ所の部位を染色した。

3) 6-水酸化ドーパミン処理

化学的交感神経除神経を目的に、第1、2日に6-水酸化ドーパミンを14mg/kg、第7、8日に34mg/kg筋注後第22日に灌流固定後、TH免疫組織化学およびアミン蛍光法で染色した。

4) 統計学的分析

カイ二乗検定および1×m表を用い、p値が0.05以下を有意差ありとした。

[結果]

1) 光学顕微鏡による観察

筋層のTH免疫陽性神経線維は膀胱底部・近位尿道に多くみられ、膀胱体部には少なかった。膀胱体部ではTH免疫陽性神経線維は筋層の外層に多く観察され、膀胱底部・近位尿道では筋層の外層と内層でほぼ等しかった。アミン蛍光法による神経線維は、その分布と密度がTH免疫陽性神経線維のそれとほぼ同じであった。6-水酸化ドーパミン処理を施したネコでは、膀胱体部においてTH免疫陽性神経線維も、蛍光神経線維も認められなかった。膀胱底部・近位尿道では、少数のTH免疫陽性神経線維と蛍光神経線維を観察した。

2) 電子顕微鏡による観察

膀胱体部下部、膀胱底部（膀胱底部外側、三角部、膀胱頸部）、近位尿道の5カ所の筋層でTH免疫陽性神経終末を計3728コ観察した。膀胱底部外側、三角部、膀胱頸部、近位尿道のTH免疫陽性神経終末の多くは筋束の外部に存在し、膀胱体部では逆にその大部分が筋束の内部に位置していた。膀胱体部においてTH免疫陽性神経終末が筋束外部に位置する割合（30.3%）は、膀胱底部外側、三角部、膀胱頸部、近位尿道における割合（おのおの57.1、75.7、71.7、89.2%）よりも有意に低かった（ $p < 0.001$ ）。またTH免疫陽性神経終末と平滑筋細胞との関係は、①TH免疫陰性神経終末を伴って平滑筋細胞に接する、②TH免疫陽性神経終末のみが平滑筋細胞に接する、の2形態に分けられた。それぞれの部位において①と②の割合は約2:1で、各部位間において有意な差は認められなかった。

[考察]

最近の研究によれば、THは末梢神経において交感神経以外にも存在することが示されている。本研究の、1) TH免疫陽性神経線維の分布と密度が、アミン蛍光法による神経線維のそれとほぼ同じであった、2) 化学的交感神経除神経によりTH免疫陽性神経線維のほとんどが消失したという結果より、THはネコ膀胱において交感神経のマーカーとなりうることを確かめた。さらに申請者は抗ノルアドレナリン抗体を用いた免疫染色により全く同じ結果をすでに得ている。これらが今回、TH免疫電顕組織化学を用いて膀胱・近位尿道の交感神経終末を調べるに至った理由である。

交感神経の興奮は、膀胱体部で β レセプターを介して平滑筋の弛緩を、膀胱底部・尿道では α レセプターを介して収縮を引き起こすことが知られている。一方、交感神経線維の密度は、膀胱体部よりも膀胱底部・尿道で高い。したがって両者における交感神経終末の存在様式が異なることが考えられる。そこで本研究では両者の筋層でTH免疫陽性神経終末を計3728コ観察した。TH免疫陽性神経終末は、膀胱体部では大部分が筋束の内部に位置しているのに対し、膀胱底部・尿道ではその多くが筋束の外部に存在していた。この結果により、膀胱体部では交感神経終末が筋束内部に存在することにより効果的に筋線維に働き、膀胱底部・尿道に比べて低い線維密度を補っていることが考えられる。また両部位とも交感神経終末の約2/3は副交感神経と推測される神経終末と共に平滑筋細胞に接しており、交感神経の大部分は膀胱体部・底部・尿道いずれの部位においても副交感神経と協同で蓄尿、排尿に関与していることが示唆された。

[結論]

ネコ膀胱・近位尿道におけるTH免疫陽性神経の電顕的観察により、交感神経終末の存在様式が膀胱体部と膀胱底部・近位尿道において異なることを明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、ネコ膀胱および尿道の筋層を支配する交感神経終末の分布様式を光顕ならびに電顕的に検索し、機能的意義を考察したものである。交感神経の観察はアミン蛍光法のほか、電顕観察が可能であるチロシン水酸化酵素 (TH) の免疫組織化学を用いている。

光顕的には、アミン蛍光法でも TH 免疫染色法でも同様の所見が得られ、正常ネコの尿道およびそれに接する膀胱底部の壁は膀胱体部に比べてより密な陽性線維が分布するという従来知見を裏付けるものであった。ネコに 6-OHDA を投与し化学的に交感神経を破壊すると、アミン蛍光線維も TH 免疫陽性線維も同様にほとんど消失した。以上の予備実験で TH がネコ膀胱において交感神経のマーカーとなることを確認の上、以下の本実験を行った。

電顕的に計約 3700 個の TH 陽性神経終末を膀胱体部、膀胱底部、尿道の各部分で観察し、定量形態学的に解析した。その結果、陽性終末は膀胱体部では筋束の内部に多く分布するのに対し、膀胱底部・尿道では筋束の外側に近接する傾向が、はじめて明らかとなった。この特異的かつ選択的な終末分布の超微様式は、膀胱体部に分布する交感神経が β 受容体を介し弛緩性に働き、逆に膀胱底部・尿道を支配するそれが α 受容体を介し収縮性に作用する、という生理学的な事実を反映するものと推定される。換言すれば、膀胱壁の弛緩をもたらす交感神経は分布密度は疎であるが平滑筋束の奥深くまで侵入し、そこに位置する β 受容体を標的とする。一方、尿道に近い部位の収縮を司る交感神経は密に平滑筋の外層を取り巻き、筋外層に分布する α 受容体に働きかけるのであろう。

以上、交感神経の解剖学的な詳細と特徴が明らかにされたことは、膀胱機能の調節機構のさらなる理解に大きく寄与するものであり、本論文は博士 (医学) 授与に値するものと認められる。