

Delayed Splotch マウスにおける 膀胱平滑筋の発生についての検討

学位論文内容の要旨

I. 目 的

二分脊椎症は神経管閉鎖不全により発生する先天性疾患である。特に脊髄髄膜瘤に代表される顕在性二分脊椎症では、先天性神経因性膀胱として生下時から高度の膀胱尿道機能障害を伴うことが多く、未治療で経過すると尿路合併症や上部尿路障害を高率に併発する。一方、二分脊椎症胎児膀胱の結合組織と筋組織の検討から、平滑筋が正常に発達するためには神経系が正常に発達することが必要であるとの指摘がなされており、神経発生の内因性障害に伴う膀胱平滑筋の発生異常が、膀胱機能を障害する因子として作用する。

本研究は、二分脊椎症における神経系の発生障害と膀胱平滑筋の発生障害との関係を詳細に検討することを目的とした。本研究では正常マウスおよび二分脊椎マウスの胎児を経時的に観察し、両者における膀胱平滑筋および支配神経の発生過程の差異について検討した。

II. 対象と方法

1. 正常マウス胎児

C57BL/6Jを用いて、交配日を妊娠0日とし、妊娠14日 (以下E14)、16日 (以下E16) および18日 (以下E18) で犠牲死させ、胎児を摘出した。

2. 二分脊椎マウス胎児

Pax3遺伝子変異マウスであるdelayed Splotchを用いて同様に行った。

3. 組織学的検討

マウス胎児は、2日間亜鉛固定しパラフィン包埋後、5 μ mの切片を作製した。この切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および筋組織系の指標として α -smooth muscle actin (以下 α SM actin)、神経系の指標としてPGP9.5、副交感神経系の指標としてvesicular acetylcholine transporter (以下VACHT) に対する抗体を用いた免疫組織化学を行った。免疫組織化学はABC法にて行った。

4. 検討項目

膀胱のほぼ中心部の切片を用いて以下の検討を行った。膀胱全体の面積、内腔の面積等を測定し、その値を用いて筋層の面積、筋層の発達の指標として膀胱全体に占める筋層の割合、神経障害による膀胱過伸展の指標として膀胱全体に占める内腔の割合を計算した。PGP9.5およびVACHTによる免疫組織化学を行った切片を400倍で鏡検し、陽性神経線維数を数え、測定した筋層の面積を用いて神経密度を計算した。上記についてE14、E16、E18の3つの時期の間および正常マウス胎児と二分脊椎マウス胎児との間での差異を検討した。独立した2群の差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用いて、危険率5%以下を有意差とした。

III. 結 果

検討した胎児膀胱（正常マウス $n=43$ (E14: 14, E16: 14, E18: 15)、二分脊椎マウス $n=29$ (E14: 9, E16: 9, E18: 11)）について、特に形態的な性差は認められなかった。

1. HE染色

正常マウスのE14、E16、E18の胎児膀胱（以下それぞれE14n、E16n、E18n）、および二分脊椎マウスのE14、E16、E18の胎児膀胱（以下それぞれE14sb、E16sb、E18sb）において、粘膜、粘膜下組織、筋層の3層は明瞭に区別されていた。正常マウスと二分脊椎マウスで明らかな差異を認めなかった。

2. α SM actin

E14、E16およびE18のいずれにおいても膀胱筋層には強く陽性染色されており、 α SM actinはE14で既に発現していることが示唆された。筋層の面積は、E14n: 0.048、E14sb: 0.042、E16n: 0.12、E16sb: 0.099、E18n: 0.147、E18sb: 0.123 (mm^2)であった。正常マウスの各時期間、二分脊椎マウスの各時期間およびE16nとE16sbの間に有意差を認めた。筋層の占める割合は、E14n: 52.3、E14sb: 50、E16n: 57.2、E16sb: 47.6、E18n: 59.5、E18sb: 51.9 (%)であった。各時期の正常マウスと二分脊椎マウスの間およびE14nとE18nの間、E14sbとE16sbの間に有意差を認めた。内腔の占める割合は、E14n: 7.3、E14sb: 6.3、E16n: 8.2、E16sb: 18.1、E18n: 7.4、E18sb: 14.8 (%)であった。E14sbとE18sbの間およびE18nとE18sbの間に有意差を認めた。

3. PGP9.5

E14、E16およびE18のいずれにおいても膀胱筋層内にPGP9.5陽性神経線維が認められたが、前壁に比して後壁で密度が高かった。PGP9.5陽性神経の密度は、E14n: 1831.75、E14sb: 71.43、E16n: 838.41、E16sb: 222.22、E18n: 1347.22、E18sb: 401.96 (本/ mm^2)であった。各時期の正常マウスと二分脊椎マウスの間およびE14nとE16nの間、E14sbとE18sbの間、E16sbとE18sbの間に有意差を認めた。

4. VAcHT

PGP9.5と同様にE14、E16およびE18のいずれにおいても膀胱筋層内にVAcHT陽性神経線維が認められた。PGP9.5と同様に、前壁に比して後壁で密度が高かった。VAcHT陽性神経の密度は、E14n: 531.25、E14sb: 98.04、E16n: 478.11、E16sb: 102.56、E18n: 925.17、E18sb: 138.21 (本/ mm^2)であった。E14nとE14sbの間および、E18nとE18sbの間に有意差を認めた。

IV. 考 察

マウス胎児膀胱は、正常マウス、二分脊椎マウスともE14で既に筋層における α SM actinの免疫反応が明瞭に認められたが、筋層の発達は不十分である。E16、E18と進むにつれ、筋層の面積は増大する。ただし、正常マウスにおいては在胎日数に伴い筋層の面積自体も増大し、膀胱全体に占める筋層の割合も増加する一方、二分脊椎マウスにおいては筋層の面積は増大するものの、膀胱全体に占める筋層の割合は明らかな増加を示さない。膀胱全体に占める筋層の割合は全ての時期で有意に正常マウスの方が二分脊椎マウスより大きかった。正常マウスと二分脊椎マウスとの間で神経密度にも差を認める。従来報告されている様に、二分脊椎マウスでは胎児期より膀胱平滑筋の発育異常がみられ、そこにおける神経支配の異常も、筋発達異常に関与していることが推察される。

V. 結 語

マウス正常胎児および二分脊椎胎児を経時的に観察し、膀胱平滑筋および支配神経の発生過程を検討した。二分脊椎症に伴う神経障害を軽減するための胎児治療の可能性、ある

いは母体内での何らかの発症予防の可能性を考慮する時、二分脊椎マウスはモデル動物として貴重な存在であると考えられる。本研究で得られた知見を基礎として、今後二分脊椎マウスの胎児膀胱における受容体の発現や尿道の発生に関する研究が展開されることを期待したい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 岩 崎 喜 信
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

Delayed Splotch マウスにおける 膀胱平滑筋の発生についての検討

顕在性二分脊椎症では、生下時から高度の膀胱尿道機能障害を伴い、生後早期から適切な尿路管理が必要である。神経管閉鎖不全を出生前に診断し、胎児手術により神経機能障害の軽減を図る試みがなされているが、膀胱尿道機能の改善は得られていない。ヒト二分脊椎症胎児の、膀胱支配神経と平滑筋組織の検討から、平滑筋組織の正常な発達には正常な膀胱の神経支配が必要である可能性が推測されている。Splotchマウスは、器官発生の調節遺伝子であるPax3遺伝子の変異体であり、ヘテロ接合体では体表に白斑を認めるのみだが、ホモ接合体では神経管の閉鎖障害を来す。高率に腰仙部や菱脳の閉鎖不全を認めるが、これが葉酸の補給により予防されるなどヒトの二分脊椎と類似しており、先天性二分脊椎の研究モデルとして有用である。本研究は、二分脊椎症における神経系発生障害と膀胱平滑筋の発生障害との関係を検討することを目的とし、正常マウスおよびSplotchマウスの胎児を経時的に観察し、両者における膀胱平滑筋および支配神経の発生過程の差異を検討した。対象は、二分脊椎マウスとしてdelayed Splotchマウスを、正常controlとしてそのwild typeであるC57BL/6Jを用いた。交配日を妊娠0日 (E0) とし、E14、E16、E18で犠牲死させ胎児を摘出した。摘出胎児の切片を作製し、HE染色および免疫組織染色を行った。免疫組織染色は筋組織系のマーカーとして α SM actin、神経系一般のマーカーとしてPGP9.5、副交感神経系のマーカーとしてVACHTに対する抗体を用いた。膀胱の断面が最大面積となる切片を用いて以下の検討を行った。1) α SM actin染色を行った切片で、膀胱全体の面積、膀胱全体から筋層を除いた面積および内腔の面積を測定した。平滑筋の発達に関して、筋層の面積および発育による膀胱全体の面積の増大を考慮し膀胱全体に占める筋層の割合を計算した。また、平均的な膀胱容量を示す指標として膀胱全体に占める内腔の割合を計算した。2) 神経密度の測定は、PGP9.5およびVACHT染色を行った切片を400倍で鏡検し膀胱筋層内の神経線維数を数え、筋層の面積で除して筋層の神経密度とした。2群間の差の検定にはMann-WhitneyのU検定を用いて危険率5%で有意差判定を行った。結果は、HE染色では正常マウス、二分脊椎マウスともE14から粘膜、粘膜下組織、筋層の3層を認めた。 α SM actin染色では正常マウス、二分脊椎マウスともE14から α SM actinの発現を認めた。筋層の面積は正常マウス、二分脊椎マウスとも経時的に増大していたが、両群間の比較では明らかな差は認められなかった。筋層の占める割合は、正常マウスでは経時的な増大を認めたが、二分脊椎マウスでは経時的な変化を認めず、両群間の比較では二分脊椎マウスで有意に低値であった。内腔の占める割合は、

正常マウスでは変化を認めなかったが、二分脊椎マウスでは経時的な増大を認め、両群間の比較では二分脊椎マウスの方が高値であった。PGP9.5染色、VChT染色とも、正常マウス、二分脊椎マウスの両群においてE14から膀胱筋層内に陽性神経線維を認めたが、両群間の比較では二分脊椎マウスの方が有意に低値であった。今回のHE染色による基本的膀胱形態の観察と α SM actin染色による膀胱平滑筋のSM actinの発現に関する検討から、E14までの膀胱の発達には二分脊椎による神経系の発生異常は関与しないものと推測された。膀胱平滑筋発達の経時的変化の検討から、E14以降の膀胱平滑筋の発達には二分脊椎による影響が示唆された。また、PGP9.5およびVChT染色における神経密度の検討と考えあわせると、二分脊椎マウスにおける膀胱の発達過程にみられる平滑筋組織の発達障害と支配神経の障害とが関連していることが示唆された。今後の展望として、構造的な面から電子顕微鏡を用いた膀胱平滑筋の微細構造の観察や、機能的な面からMuscle stripを用いた胎児膀胱平滑筋の収縮実験等を行うことにより、Delayed splotchマウスにおける神経系の発生障害と、膀胱平滑筋の発生障害との関係がより明らかになり、将来的に胎児治療や母体内での発症予防に役立つことを期待したい。

この論文は、Delayed splotchマウスにおける神経系の発生障害と膀胱平滑筋の発生障害の関係を明らかにした点で高く評価され、今後のさらなる研究の進展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。