

ヒト膀胱平滑筋のムスカリン性アセチルコリン 受容体の定量および正常、閉塞性、除神経膀胱に おける受容体量の比較

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

瀧 田 徹

COMPARISON OF MUSCARINIC CHOLINOCEPTOR DENSITIES AND AFFINITIES IN NORMAL, OBSTRUCTED AND DENERVATED HUMAN DETRUSOR

Tohru TAKITA

From the Department of Urology, School of Medicine, Nagoya University

(Director: Prof. H. Mitsuya)

Muscarinic cholinceptor densities and dissociation constants in normal, obstructed and denervated human detrusors were determined using ^3H -quinuclidinyl benzilate (^3H -QNB) as a radio-ligand in binding assays. Samples of detrusor were taken from 22 normal bladder domes (bladder tumor 10, primary VUR 5 and others 7), from normal bladder base in 10 bladder tumor cases, from obstructed bladders in 12 cases of benign prostatic hypertrophy and from denervated bladders in 6 spina bifida patients. The binding assay for muscarinic cholinceptor was performed according to the procedures of Yamamura et al. and Nilvebrant et al. The tissue samples were homogenized in ice cold phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) by a Polytron homogenizer and the homogenates were used immediately for the receptor binding assay. Homogenates (100 μl) in the presence or absence of 10 μM atropine sulfate and various concentrations (0.05–3 nM) of ^3H -QNB, diluted with phosphate buffer to 2 ml were incubated for 90 minutes at 25°C. The solutions were filtered through Whatman GF/F glass fiber filters. The filter was placed in a scintillation vial with 10 ml of scintillation fluid (ACS-II) for 24 hours. The radioactivity was determined by liquid scintillation spectrometry. The maximum binding (B max) and dissociation constant (K_D) were derived by Scatchard analysis.

B max is expressed as f mol/mg protein, and K_D as M. B max = 43.1 ± 12.3 , $K_D = (1.12 \pm 0.67) \times 10^{-10}$ in normal human detrusor (dome), B max = 23.8 ± 7.0 , $K_D = (1.45 \pm 0.64) \times 10^{-10}$ in normal human detrusor (base), B max = 39.9 ± 11.5 , $K_D = (1.04 \pm 0.35) \times 10^{-10}$ in obstructed human detrusor (dome) and B max = 48.4 ± 12.1 , $K_D = (1.63 \pm 0.5) \times 10^{-10}$ in denervated human detrusor (dome).

A significant difference in B max was found only between dome and base of normal detrusor. There were no significant differences in B max and K_D between any two groups of normal obstructed and denervated detrusors or between stable and unstable bladders. These results suggest that the regulation of muscarinic cholinceptor density and affinity in human bladder may not be influenced significantly by clinical outlet obstruction or congenital and chronic state of denervation.

Key words: Muscarinic cholinceptor, Receptor binding assay, Human detrusor

緒 言

近年の薬理学，殊に受容体に関する研究 (receptorology) の進歩により放射性物質で標識した結合物質

を用いて種々の受容体を同定できるようになり今まで概念上の存在であったレセプターがその実在を証明されるようになってきた。この方法論の泌尿器科領域への応用は主としてアンドロロジー，前立腺癌の内分泌

療法の分野でよく利用されているが¹⁻³⁾、尿流動態の基礎的研究としての尿路の自律神経受容体の研究に関しては、まだ少数であり、いまやとその緒についたばかりとの印象を受ける⁴⁻¹¹⁾。

膀胱のアトロピン抵抗性という問題点はあるものの膀胱排尿筋の収縮が主に副交感神経の骨盤神経によって支配されていることは広く認められており、detrusor areflexia (排尿筋反射消失) に対しては副交感神経刺激剤が、また detrusor hyperreflexia (排尿筋反射亢進)、unstable bladder (不安定膀胱) に対しては副交感神経遮断剤が臨床的に用いられている。さらに除神経を受けた膀胱がアセチルコリン類似物質に対して過敏に反応することは denervation supersensitivity として知られており¹²⁻¹⁴⁾、臨床的には Lapidus test として応用されている¹⁵⁾。

そこで筆者は、今回ヒトの膀胱平滑筋組織中のムスカリン性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor 以下 m-AchR と略す) を radioligand binding assay 法を用いて測定し、その受容体量 (maximum binding, 以下 Bmax) と結合物質と受容体との解離定数 (dissociation constant, 以下 K_D) を定量した。そして(1) detrusor hyperreflexia, detrusor instability が m-AchR の増加によって起こるか否か、(2) ヒトにおける除神経膀胱の denervation supersensitivity が m-AchR の増加を伴っているか否か、(3) 各種病態下における m-AchR の receptor kinetics などを検討することを目的として、正常膀胱だけでなく前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱、2分脊椎症に伴う除神経膀胱の m-AchR をも測定し正常膀胱との比較検討を行なった。なおヒトの膀胱平滑筋中の m-AchR を測定した報告は Levin et al.¹⁶⁾、Anderson et al.¹⁷⁾、Shapiro et al.¹⁸⁾、Nilvebrant et al.¹⁹⁾ があるが Shapiro et al. の膀胱外反症例以外は膀胱腫瘍、尿路奇形などの疾患に対する手術の際、膀胱体部の肉眼的に正常と思われる部分を対象にしており筆者の調べた限りではヒトの正常膀胱三角部、および前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱体部、2分脊椎症に伴う除神経膀胱体部における m-AchR の binding assay 法による定量は他になく本論文が最初の報告であると思われる。

対象および方法

今回対象とした症例は当科を受診した正常膀胱22例、閉塞性膀胱12例、除神経膀胱6例の計40症例である。正常膀胱22例の原疾患は膀胱腫瘍10例、原発性膀胱尿管逆流症5例、その他 duplication anomaly,

Table 1. Characteristics of patients.

♂ male : female = 28 : 12		
♂ age distribution 3~82yrs (45.6±28)		
♂ classification of patients		
Normal detrusor	Bladder Tumor	10
	Primary Reflux	5
	Others	7
Obstructed detrusor	Benign Prostatic Hypertrophy	12
	Spina Bifida with Reflux	6

megaureter, vesico-vaginal fistula など7例である。閉塞性膀胱12例は全例開放性前立腺摘出手術を受けた前立腺肥大症例であり、原則として通常の泌尿器科的検査で前立腺腺腫の肥大が認められ(摘出腺腫重量28g~62g)、尿波形成検査で客観的に排尿障害が認められ残尿が50 ml 以上のものに限定した。除神経膀胱は全例膀胱尿管逆流を伴い逆流防止術が必要とされた2分脊椎症で全例が lumbosacral myelomeningocele であり、これに対しては早期に脊椎管修復術が施行されている。年齢分布、性比は全体としては3~82歳(45.6±28)、男：女=28：12であり正常膀胱群では3~78歳(39.3±26.4)、男：女=15：7。閉塞性膀胱群では58~82歳(69.3±7.2)、男：女=12：0、除神経膀胱群では3~23歳(10.8±7.0)、男：女=0：6である (Table 1)。

なお、膀胱内圧測定は正常膀胱22例中8例に施行、stable bladder を4例に、unstable bladder を4例に認めた。前立腺肥大症は12例全例に施行し、stable bladder を6例に、unstable bladder を6例に認めた。2分脊椎症も6例全例に施行し1例に無抑制収縮を認め detrusor hyperreflexia と判定した他は、すべて基本的にはコンプライアンスの低い detrusor areflexia と言えるタイプであった。排尿パターンに関しては正常例はもちろん正常排尿であり、前立腺肥大症については手術前に自己導尿を行っていた1例を除き、すべて自排尿可能であった。2分脊椎症例は腹圧努責排尿をしていた1例を除き、他の5例はすべて清潔間歇導尿を常用していた。膀胱壁の肥厚の程度に関しては形態学的検索はしていないが内視鏡所見、膀胱造影で判断する限り正常例は全例肥厚(-)、前立腺肥大症では(-)~(軽度肥大)、2分脊椎症では正常に近い1例以外すべて著明な肉柱形成を示していた。術前の治療に関しては膀胱腫瘍に対する術前照射例はなく、前立腺肥大症全例にアンチ・アンドロゲ

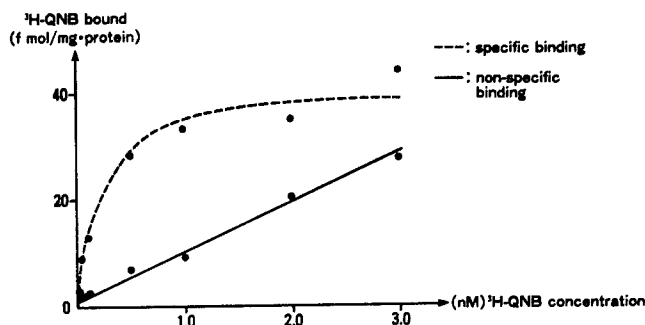


Fig. 1. A typical example of saturation curve of specific binding and non-specific binding in normal human detrusor(dome).

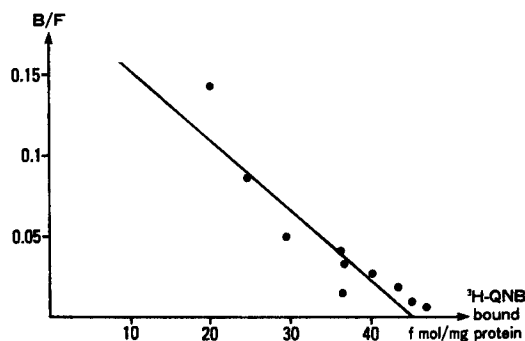


Fig. 2. A typical example of Scatchard plot of receptor density and affinity in normal human detrusor(dome).
(B/F : A ratio of bound and free ^3H -QNB)

ン剤, α 受容体遮断剤, 副交感神経遮断剤などが, また2分脊椎症には全例に抗菌剤, 半数に副交感神経遮断剤が投与されており大多数の症例では入院後可及的早期に服薬を中止したが, 中には手術前日まで服用していた症例も少数あった. なお, 用語については International Continence Society の提案した勧告基準に原則として従った²⁰⁾. 膀胱平滑筋の採取は原疾患に対する手術時に肉眼的に正常と思われる膀胱体部または三角部をおよそ拇指頭大のサイズで全層にわたって切り取った. 正常膀胱三角部については膀胱全摘術を行なった膀胱腫瘍10例より採取した. 採取された組織片はただちに -70°C のフリーザーに凍結保存した. binding assay の実験方法については Yamamura and Snyder²¹⁾, Nilvebrant et al^{6,19)} に原則として従った.

凍結後, 可及的早期に組織片を解凍し粘膜, 附着する脂肪, 結合織などを切除し重量測定の後ハサミでミンチ状に細切した. これを氷冷したビーカーに入れて重量の20倍量の 0.05 M phosphate buffer (PH 7.4)

を加え PolytronPT-10 (Kinematica) にて, 30秒の休止期をはさんで30秒間 $\times$ 3回氷冷下で破砕した後 (dial 7), さらに超音波ホモジナイザー Handy Sonic UR-20P (トミー精工) で5~10秒間よく攪拌し2重ガーゼで濾過した. このように作製されたホモジネートの一部を蛋白定量用として再凍結し, 残りを receptor binding assay に供した. 蛋白質の定量は Lowry et al. 法²²⁾ に従った.

実験の結合物質としては ^3H -quinuclidinyl benzilate (以下 ^3H -QNB) を使用した (30.1 Ci/m. mol : New England Nuclear, 56 Ci/m. mol Amersham) 実験にあたり各試験管にホモジネート 100 μl , 濃度を 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1, 2, 3 nM の10段階に調整された ^3H -QNB 液, 10 μM の硫酸アトロピン 20 μl , または同量の phosphate buffer 液を加え, buffer 液で希釈し全量を 2 ml/tube とした. 各濃度の試験管を 25°C 90分間振盪培養し, ただちに減圧下でグラスファイバー濾紙 (Whatman GF/F) にて吸引濾過し氷冷した buffer 液で試験管内を4回洗浄し組織に結合した ^3H -QNB を free ^3H -QNB から分離した. 濾紙をバイアルに入れ液体シンチレーター (ACS-II, Amersham) 10 ml を加え24時間放置後, 液体シンチレーション・カウンター (Beckman LS7500) にて放射活性を測定した. すべての測定は duplicate または triplicate で行ない, その平均値をとった. この放射活性値より Scatchard analysis²³⁾ により最大結合数 B_{max} =受容体量 receptor density, および解離定数 K_D を求めた. 硫酸アトロピン非存在下の結合量を total binding, アトロピン存在下のそれを non-specific binding とし, 前者より後者をひいた値を specific binding とした. Fig. 1, 2 に代表的な saturation curve および Scatchard plot の例を示す. 検定には t 検定を利用した (有意水準 $P<0.05$). データはすべて「平均値 $\pm$

標準偏差」で表した。

結 果

(1) 正常膀胱群における部位、性別、年齢分布による比較

Fig. 3 に示す如く、正常膀胱体部22例の B_{max} の (平均値 $\pm$ 標準偏差) は 43.1 ± 12.3 fmol/mg $\cdot$ protein, K_D は $(1.12 \pm 0.67) \times 10^{-10}$ M であった。正常膀胱三角部は $B_{max} = 23.8 \pm 7.0$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (1.45 \pm 0.64) \times 10^{-10}$ M であり正常膀胱体部と比較して B_{max} , すなわち m-AchR の受容体量は有意に低かったが ($P=0.001$), K_D には有意差はなかった。次に性差に関しては、正常膀胱体部の B_{max} では男:女 = $(42.4 \pm 9.3) : (44.4 \pm 18.6)$ fmol/mg $\cdot$

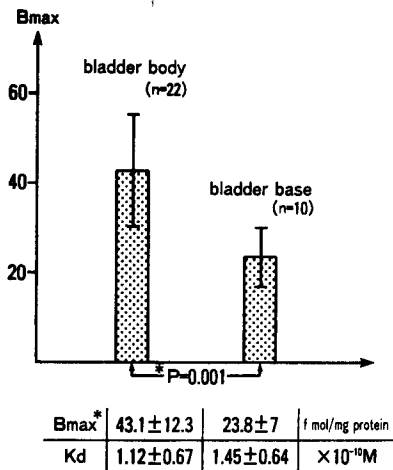


Fig. 3. Muscarinic cholinoreceptors of normal human detrusor: comparison between body and base of bladder. (*: significant difference)

protein であり、年齢別の比較では $<0 \sim 15 \text{歳}> = 43.8 \pm 14.7$, $<16 \sim 59 \text{歳}> = 36.0 \pm 1.2$, $<60 \text{歳以上}> = 46.2 \pm 10.6$, 各 fmol/mg $\cdot$ protein であり、性別、年齢別のどの群間の比較でも有意差は認められなかった。 K_D についても同様に有意差はなかった (Fig. 4).

(2) 正常、閉塞性、除神経膀胱体部の3群間における比較

前述のごとく、正常膀胱体部22例の $B_{max} = 43.1 \pm 12.3$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (1.12 \pm 0.67) \times 10^{-10}$ M に対して閉塞性膀胱群では $B_{max} = 39.9 \pm 11.5$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (1.04 \pm 0.35) \times 10^{-10}$ M, 除神経膀胱群で $B_{max} = 48.4 \pm 12.1$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (1.63 \pm 0.5) \times 10^{-10}$ M であった (Fig. 5). 正常群に対して他の2群の B_{max} , K_D 値はともに有意値を示さなかったが、 B_{max} の数値の上では正常群に対して閉塞群は低値、除神経群は高値を示した。

(3) Stable bladder 群と unstable bladder 群との比較

原発性膀胱尿管逆流症、尿管異所開口などの正常小児例と前立腺肥大症の成人男子例において各々8例と12例に膀胱内圧測定を施行した。小児群、前立腺肥大症群ともに stable bladder と unstable bladder の比率は50%ずつあった。

受容体量、解離定数は小児群では stable bladder グループが $B_{max} = 46.8 \pm 17.7$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (1.40 \pm 1.03) \times 10^{-10}$ M, unstable bladder グループが $B_{max} = 40.5 \pm 12.6$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (0.97 \pm 0.26) \times 10^{-10}$ M であった (Fig. 6 左側), 前立腺肥大症群では stable bladder グループが $B_{max} = 42.0 \pm 13.3$ fmol/mg $\cdot$ protein, $K_D = (0.85 \pm 0.33) \times 10^{-10}$ M, unstable bladder グループでは

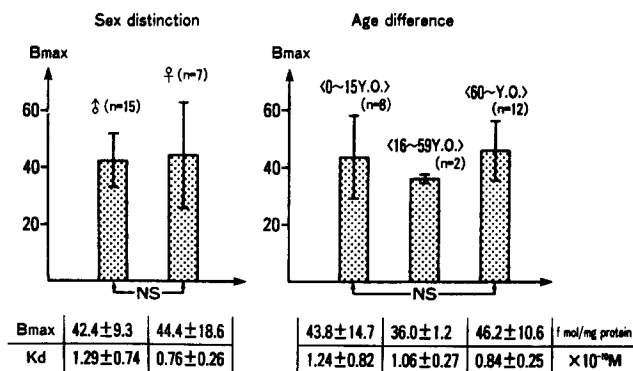


Fig. 4. Muscarinic cholinoreceptors of normal human detrusor (dome): comparison by sex distinction and age difference. (δ : male, η : female, NS: not significant)

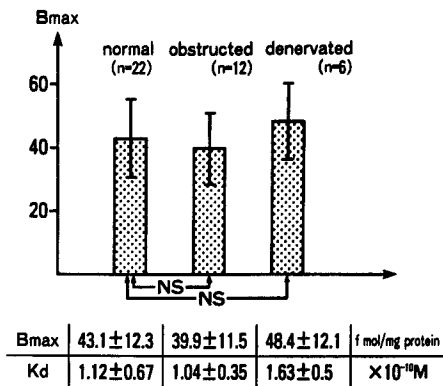


Fig. 5. Muscarinic cholinergic receptors. Comparison between normal, obstructed and denervated detrusor. (NS: not significant)

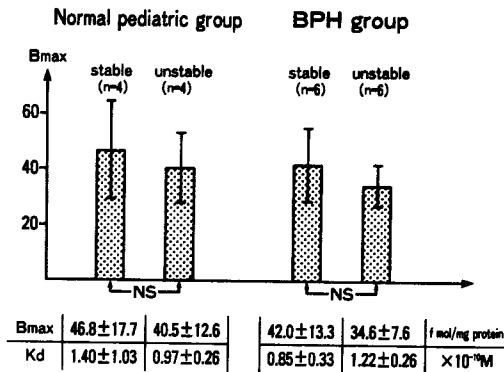


Fig. 6. Muscarinic cholinergic receptors: Comparison between stable and unstable bladder in both pediatric and BPH groups. (NS: not significant)

$B_{max}=34.6 \pm 7.6$ fmol/mg · protein, $K_D = (1.22 \pm 0.26) \times 10^{-10}$ M という結果であった (Fig. 6. 右側). B_{max} の数値の上では正常小児群, 前立腺肥大症群ともに unstable bladder グループが stable bladder グループより低くなっているが, 両群ともに両グループ間で B_{max} , K_D の有意差は認められなかった.

考 察

m-AchR は可溶, 精製する事がむずかしく nicotinic AchR 程にはその物理化学的特性, 構造が確かめられている訳ではないが, 放射線照射失活法などの研究によりラットの脳の m-AchR の分子量は約 80,000 でレセプターは重合せず単量体として存在していると推定されている²⁴⁾. Binding assay で求められるレセプター量の単位も $\text{fmol} = 10^{-15} \text{ mol}$ と極めて微量であり, それだけに実験方法の相違により結果もかなり影響を受けるものと思われる. それだけに方法論の標準化が

望まれるが, 少なくとも膀胱平滑筋の m-AchR に関する限り, まだ方法論が確立されているとは言い難い. 今回の研究は, 前述の如く Yamamura and Snyder²¹⁾, Nilvebrant et al.^{6,19)} らの方法に原則として従った. Nilvebrant ら¹⁹⁾ はヒト膀胱平滑筋の m-AchR に対する binding assay の実験方法について詳しく検討しており, $^3\text{H-QNB}$ の結合量と incubation time (25°C) の関係について $6.0 \times 10^{-11} \text{ M}$, $2.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ の2種類の $^3\text{H-QNB}$ 濃度で検討している. これによれば, specific binding は両濃度ともに 1.5 時間ではほぼ定常状態に達しており, 筆者も incubation time を 1.5 時間とした. 彼らはまた, ホモジネイトの蛋白濃度が 0.35 mg/ml 以下 ($6.0 \times 10^{-11} \text{ M}$), 0.4 mg/ml 以下 ($1.3 \times 10^{-10} \text{ M}$) でないと $^3\text{H-QNB}$ 結合量の tissue linearity が失われると報告している. 今回の実験はこの条件をみたしており, その他の実験条件 (QNB 濃度設定など) も彼らとほぼ同じに設定した. 飽和曲線では non-specific binding が $^3\text{H-QNB}$ 濃度が上昇するに従って直線的に増加していくのに対し, specific binding は $1 \sim 2 \text{ nM}$ の $^3\text{H-QNB}$ 濃度付近ではほぼ定常状態に達しており (Fig. 1), Scatchard plot は直線性を示し (Fig. 2), $^3\text{H-QNB}$ と受容体との結合は特異的 specific, 高親和性 high affinity, 飽和性 saturable であり, 結合部位の親和性は単一であると考えられる.

ただ正常膀胱三角部の Scatchard plot であたかも negative cooperativity を思わせるものが存在し, この点については今後さらに検討を要すると思われる.

今回の正常膀胱体部の受容体量 ($= B_{max}$), K_D 値を他の報告と対比してみると (Table 2), この「正常値」にバラツキがあるのがわかる. この差は実験方法の相違あるいは人種の差に基づくものかもしれない. 実際, 今回の実験でも m-AchR の値は $25.1 \sim 67.3$ fmol/mg · protein に広く分散し, 個体差も大きくこれは他の報告でも同様の傾向を示している¹⁶⁻¹⁹⁾. さらに Levin によれば同一のヒト膀胱体部でも部位によって B_{max} に相違があるとの報告もあり²⁵⁾, ヒト膀胱平滑筋の m-AchR の正常値を決めるのはかなり難しい.

Fig. 3 に図示した如く正常膀胱三角部の B_{max} が同体部のそれに比べて有意に低く約 1/2 であるという結果を得た. この事実は実験動物 (イヌ, ウサギ) ですでに報告されているが^{4,5)}, ヒトの膀胱については筆者の報告が最初である. m-AchR が膀胱体部に多く, 三角部に少なく分布している事は, 周囲臓器と粗に結合している体部が主に強力な収縮運動をしている

Table 2. Muscarinic cholinceptor density and dissociation constant in normal human detrusor (dome).

n	B max(fmol/mg-protein)	Kd	References
6	63±10	—	Levin et al., 1982
12	54.6±22.4	38.5±9.3pM	Anderson et al., 1985
21	160±15	(1.2±0.1)×10 ⁻⁹ M	Nilvebrant et al., 1985
22	43.1±12.3	(1.12±0.67)×10 ⁻⁹ M	Takita., 1987

(n:number of patients)

排尿動態を合理的に説明するものである。また正常膀胱体部の Bmax, KD に関して性差, 年齢差は認められなかったが, これは他のヒト¹⁶⁻¹⁹⁾ならびに実験動物⁷⁾の報告でも同様である。

今回の研究の主目的は, 正常膀胱に対して閉塞性, 除神経膀胱の Bmax, KD が, また stable bladder に対して unstable bladder の Bmax, KD が有意差を示すか否かを臨床例で検討することであった。結果は前述の如く, 上記の対比において有意差を認めなかった。しかし動物を用いた急性期の実験では, 興味ある知見が報告されている。Levin et al.²⁶⁾はウサギに実験的な尿道狭窄を作り1週間後膀胱を摘出したところ, 膀胱平滑筋は著明な肥大を示し重量はコントロール群の約9倍に増加し, 膀胱平滑筋中の intracellular ATP と m-AchR 量は著明に低下していたと報告した。この理由として, hypertrophy の結果, 膀胱壁に結合組織の増殖が起こり, 1 mg・protein あたりで表示する受容体量の値は相対的に低下したが, 実際のレセプター総数は減少していないと推測をしている。

これに対して Nilvebrant et al.²⁷⁾はラットを使って除神経, 排尿筋肥大, 尿路変向が膀胱の m-AchR に及ぼす影響を詳しく分析し, 注目すべき知見を述べている。すなわち, ラットの膀胱を用い対象を 1) コントロール群, 2) 両側骨盤神経節を切除した除神経の1週間後, 3) 同3週間後, 4) 除神経+尿路変向の1週間後, 5) 尿路変向のみ1週間後 6) 実験的下部尿路閉塞を作製して1週間後の排尿筋肥大群の6群に分けて m-AchR の測定, および膀胱平滑筋の形態学的研究を行なっている。これによれば m-AchR 量のコントロール群と比較して除神経1週間後, 3週間後群は有意の増加を示し, 尿路変向群, 除神経+尿路変向群は逆に有意に低下し, 排尿筋肥大群はわずかな増加を示したものの有意ではなかった。また KD についてはすべての群で変化は認められなかったとしている。この結果に加えて同じ条件で作製されたラットの除神経膀胱, 排尿筋肥大膀胱, 尿路変向による廃用膀胱が各々すべて *in vitro* の実験でムスカリン性 agonist

に対して supersensitivity を示したという事実を考え合わせて^{14,28,29)} Nilvebrant et al. は次のごとく結論づけている。すなわち「supersensitivity の発生は必ずしも m-AchR の増加や親和性の亢進を伴うものではなく, むしろ m-AchR の変動とは無関係である。m-AchR を制御する因子は除神経, 尿路変向, 尿路閉塞などという単一の因子だけでなく, それに伴う膀胱壁にかかる張力の有無, 排尿筋肥厚の程度, 排尿サイクルの有無などの「膀胱機能」そのものであろう。」と述べている²⁷⁾。加藤¹²⁾もイヌで尿路変向に伴う廃用膀胱 (disused bladder) の m-AchR の変動を検討し, 膀胱容量をゼロに保った廃用空虚群では受容体量はコントロール群より有意に低下し, 膀胱容量を 100 ml に保った廃用伸展群では逆に有意に増加したと述べている。この結果も Nilvebrant 等の主張を裏付けるものである。

この主張を受け入れる立場に立てば今回の実験結果は次のように解釈する事ができる。

(1) 前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱といっても動物実験のように著明な排尿筋肥大を伴う例は今回の対象中になく, 慢性尿閉で膀胱の過伸展が存在した症例もなく, 排尿障害はありながらも一応の排尿サイクルは維持されている症例ばかりである。この状態で正常膀胱との間に Bmax に有意差がなくても不自然ではないであろう。

(2) 2分脊椎症に伴う神経障害は先天性慢性期のものであり, 動物実験で骨盤神経節を切除した直後の状態とは全く異なる。また症例の大部分は著明な肉柱膀胱を示し, 慢性の尿路感染を有し, 持続的に間歇導尿を施行している。これらの複雑な因子が m-AchR に影響を与えている事は充分考えられる。

(3) 小児の unstable bladder は潜在性2分脊椎症を除けば排尿反射に対する高位中枢の抑制の未成熟が多いと考えられる事および前立腺肥大症における unstable bladder についても筆者が以前述べたごとく³⁰⁾, 膀胱三角部, 後部尿道における α -adrenergic overactivity, 膀胱排尿筋肥大による膀胱壁の低コンプライアンス化などが大きな原因となっていると推定

されること、およびそれにも増して不安定膀胱は排尿動態という意味ではほぼ正常と言ってもよく、stable bladder 群と unstable bladder 群で Bmax に差が出ないのも予想されるところである。

以上、実験結果に対する筆者の解釈を述べたが、この考え方とは異なる報告もある。Restorick and Mundy³¹⁾ は10例の正常膀胱と10例の detrusor hyperreflexia の膀胱平滑筋における m-AchR, α - and β -adrenergic receptor を binding assay 法で測定し、正常群に比べて hyperreflexia 群は m-AchR が有意に低く、 α -receptor は有意に高く、 β -receptor は変化なかったと述べ、m-AchR が低い理由として、膀胱の過剰収縮を抑制しようとする一種の代償機能によるものではないかと彼らは推測している。動物実験と異なり、ヒトを対象とする場合は、病態およびその程度が各人各様であり条件を統一することはほとんど不可能に近く実験の方法論もまだ確立されたとは言いがた、またデータ上でも個人差が大きい等のため現時点では相矛盾する種々の報告が出ているが、さらに症例数をふやし実験データを積み重ねること以外にこの混乱を解く鍵はないであろう。

事実今回の結果でも有意差はなかったものの Fig. 5 の如く、正常群の Bmax に比して閉塞群は低値に、除神経群は高値に出ており（この傾向は、今まで述べた動物実験の結果と一致する）さらに症例数をふやしていけば、有意差が出る可能性も存在する。

最後に現在使われている受容体量の表現法についての問題点を指摘しておきたい。一般的に汎用されているのは Scatchard plot より得られた最大結合数をホモジネイトの蛋白量 (mg) で割って fmol/mg $\cdot$ protein で表す方法である。しかし、これはあくまでホモジネイトに含まれる蛋白を全て合わせて測っており、平滑筋の他に間質の結合織の蛋白質も当然含まれる訳である。平滑筋：結合織の比率は各種の病態下では正常時に比して大きく変動すると予想され、これによって Bmax の値も少なからず影響を受けるはずである。事実 Nilvebrant et al は、ラットを使って除神経、排尿筋肥大、尿路変向を比較した前記の実験²⁷⁾の中で膀胱の組織標本に対して、morphometric study の手法を応用して平滑筋：結合織のおよその比率を測り fmol/mg $\cdot$ protein の値から fmol/mg $\cdot$ smooth muscle を算出している。これによれば平滑筋：結合織の比率は正常および尿路変向時の廃用膀胱では50：50であるが、除神経および排尿筋肥大膀胱ではこれが70：30に変化し、これにより除神経膀胱（1週間後）群の Bmax のコントロール群に対する変化

率は+98%から+32%に減少し、肥大膀胱（1週間後）群では+23%から-12%へ、尿路変向（1週間後）群においては-49%から-52%へと変化したと述べている。これは Levin et al²⁶⁾ がウサギの実験的肥大膀胱において m-AchR 濃度の低下した理由として、膀胱壁の結合織の増加を推論している事とは逆の結果である。いずれにしても fmol/mg $\cdot$ smooth muscle で表示の方が正確なことは明らかであり、この表示によるデータが /mg $\cdot$ protein のそれと大きく異なるのであれば、平滑筋：結合織の比率が変化する病態下ではデータの解釈を誤る恐れがある。これは receptology の根幹にかかわる問題であり、この点に関して研究者の議論が深まることを期待する。

Lapides test¹⁵⁾ の結果と mAChR の変化との関係は、大いに興味を持たれる点であるが、国内ではベサコリンの注射液が現在では製造されておらず本研究ではこの点を追求できなかったが、薬剤が入手できれば是非試みてみたいと考えている。さらに binding assay に際し種々のムスカリン性 agonist, antagonist を使用して各薬剤の m-AchR への親和性を比較する競合置換実験 competition experiment も重要なテーマであるが、これは続編にゆずりたい。

結 語

³H-quinuclidinyl benzilate を使用して receptor binding assay を行ない、ヒト膀胱平滑筋のムスカリン性アセチルコリン受容体量 (Bmax) と解離定数 (K_D) を測定した。

(1) 対象は正常膀胱22例、前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱12例、2分脊椎症に伴う除神経膀胱6例の計40症例である。

(2) 正常膀胱体部においては Bmax, K_D の値に関して性差、年齢差は認められず、全体として Bmax = 43.1 ± 12.3 fmol/mg $\cdot$ protein, K_D = $(1.12 \pm 0.67) \times 10^{-10}$ M であった。

(3) 正常膀胱三角部では Bmax = 23.8 ± 7.0 fmol/mg $\cdot$ protein, K_D = $(1.45 \pm 0.64) \times 10^{-10}$ M であり、三角部での Bmax は体部に比較して有意に低かった。

(4) 前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱体部では Bmax = 39.9 ± 11.5 fmol/mg $\cdot$ protein, K_D = $(1.04 \pm 0.35) \times 10^{-10}$ M であり、2分脊椎症に伴う除神経膀胱体部では Bmax = 48.4 ± 12.1 fmol/mg $\cdot$ protein, K_D = $(1.63 \pm 0.5) \times 10^{-10}$ M であった。正常群に対して前立腺肥大症群の Bmax は低値、2分脊椎症群のそれは高値を示し、これは動物実験で示された傾向と一致する

が、有意差は認められなかった。K_Dについても同様に有意差はなかった。

(5) 正常膀胱体部の小児例8例、前立腺肥大症に伴う閉塞性膀胱体部12例において stable bladder と unstable bladder との比較をしたが、B_{max}, K_D ともに有意差を認めなかった。

(6) 上記の結果について動物実験でのデータを基礎にして考察を加えた。

(稿を終るにあたり、御指導、御校閲をいただきました名古屋大学泌尿器科三矢英輔教授、名古屋市立大学薬理学教室松田友宏教授に深謝いたします。また本研究に適切な御指導、御助言をいただきました名古屋大学泌尿器科近藤厚生講師、実験に多大の協力を惜しまなかった加藤久美子先生、さらには教室員諸兄に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第73回、74回日本泌尿器科学会総会、第20回日本バプレンシア医学会、16th International Continence Society <Boston>で発表した。)

文 献

- 1) Shain SA and Boesel RW : Human prostate steroid hormone receptor quantitation. *Invest Urol* 16: 169~174, 1978
- 2) Hicks LL and Walsh PC : A microassay for the measurement of androgen receptors in human prostatic tissue. *Steroid* 33: 389~406, 1979
- 3) Shimazaki J, Hikage T, Sato R, Kodama T and Ito H : Measurement of androgen receptor in cytosols from normal, benign hypertrophic and cancerous human prostates. *Endocrinol Japon* 28: 725~734, 1981
- 4) Levin RM, Shofer FS and Wein AJ : Cholinergic, adrenergic and purinergic response of sequential strips of rabbit urinary bladder. *J Pharmacol Expt Therap* 212: 536~539, 1980
- 5) Levin RM and Wein AJ : Direct measurement of the anticholinergic activity of a series of pharmacological compounds on the canine and rabbit urinary bladder. *J Urol* 128: 396~398, 1982
- 6) Nilvebrant L and Sparf B : Muscarinic receptor binding in the guinea pig urinary bladder. *Acta Pharmacol et Toxicol* 52: 30~38, 1983
- 7) Hayes EE, McConnell JA and Benson GS : The effect of aging on cholinergic receptor binding in the rat urinary bladder. *Neurourol Urodynam* 2: 311~315, 1983
- 8) Johns A : Alpha- and beta-adrenergic and muscarinic cholinergic binding sites in the bladder and urethra of the rabbit. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 61~66, 1983
- 9) Lepor H and Shapiro E : Characterization of alpha₁ adrenergic receptors in human benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 132: 1226~1229, 1984
- 10) 横山英二・古屋聖児・熊本悦明：ヒト前立腺組織中の交感神経受容体に関する研究. *日泌尿会誌* 76: 325~337, 1985
- 11) 加藤久美子：廃用膀胱の研究（第2報）—イヌ膀胱平滑筋のムスカリン性アセチルコリン受容体量に対する廃用と伸展の影響. *日泌尿会誌 投稿中*
- 12) Cannon WB : A law of denervation. *Am J Med Sci* 198: 737~750, 1939
- 13) Carpenter FG and Root WS : Effect of parasympathetic denervation on feline bladder function. *Am J Physiol* 166: 686~691, 1951
- 14) Ekström J and Malmberg L : Development of supersensitivity to methacholine in the rat detrusor following either parasympathetic 16th International Continence Society <Boston> denervation or decentralization. *Acta Physiol Scand* 122: 175~179, 1984
- 15) Lapedes J, Friend CR, Ajemian EP and Reus WF : A new test for neurogenic bladder. *J Urol* 88: 245~247, 1962
- 16) Levin RM, Staskin DR and Wein AJ : The muscarinic cholinergic binding kinetics of the human urinary bladder. *Neurourol Urodynam* 1: 221~225, 1982
- 17) Anderson GF, Skender JG and Navarro SP : Quantitation and stability of cholinergic receptors in human bladder tissue from post-surgical and postmortem sources. *J Urol* 133: 897~899, 1985
- 18) Shapiro E, Jeffs RD, Gearhart JP and Lepor H : Muscarinic cholinergic receptors in bladder exstrophy : insights into surgical management. *J Urol* 134: 308~310, 1985
- 19) Nilvebrant L, Andersson KE and Mattiasson A : Characterization of the muscarinic cholinergic receptors in the human detrusor. *J Urol* 134: 418~423, 1985
- 20) From the International Continence Society Committee on Standardisation of Terminology : Reports on the standardization of terminology of lower urinary tract function. *泌尿紀要* 27 : 1559~1571, 1981
- 21) Yamamura HI and Snyder SH : Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum with [³H]quinuclidinyl benzilate. *Mol Pharmacol* 10: 861~867, 1974
- 22) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951
- 23) Scatchard G : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad*

- Sci 51: 660~672, 1949
- 24) 瀬川 富朗・小幡 邦彦・野村 靖幸: Bioscience Series. 神経 (第1版) P.128 ~ 129 化学同人, 京都 1985
- 25) Levin RM: personal communication
- 26) Levin RM, High J and Wein A: The effect of short-term obstruction on urinary bladder function in the rabbit. J Urol 132: 789~791, 1984
- 27) Nilvebrant L, Ekstrom J and Malmberg L: Muscarinic receptor density in the rat urinary bladder after denervation hypertrophy and urinary diversion. Acta Pharmacol et Toxicol 59: 306~314, 1986
- 28) Ekstrom J, Malmberg L and Wallin Å: Transient supersensitivity in the hypertrophied rat urinary bladder. Acta Physiol Scand 126: 365~370, 1986
- 29) Ekström J and Malmberg L: Disuse as cause of supersensitivity in the rat urinary bladder. Acta Physiol Scand 126: 429~432, 1986
- 30) 瀧田 徹・小谷俊一・近藤厚生・三矢英輔: 下部尿路の尿流動態研究 xii. 前立腺閉塞症に対する塩酸プラザシンの治療効果および不安定膀胱 (unstable bladder) の病因に関する一考察. 日泌尿会誌 74: 1~14, 1983
- 31) Restorick JM and Mundy AR: Density of cholinergic and alpha and beta adrenergic receptors in the human normal and hyper-reflexic detrusor, presented in the third joint meeting of International Continence Society and Urodynamic Society. (Boston), 1986
(1987年1月20日迅速掲載受付)