HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	経膣分娩モデルラットに対する骨盤底筋群の組織学的検討
Author(s)	阿部, 由依
Description	配架番号：2869
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16145号
Issue Date	2024-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16145
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93621
Type	doctoral thesis
File Information	ABE_Yui.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

経腟分娩モデルラットに対する
骨盤底筋群の組織学的検討

(Histological Investigation of Pelvic Floor Muscles
in a Rat Model of Vaginal Delivery)

2024 年 9 月

北海道大学
阿部　由依
Yui Abe

学　位　論　文

経腟分娩モデルラットに対する
骨盤底筋群の組織学的検討

(Histological Investigation of Pelvic Floor Muscles
in a Rat Model of Vaginal Delivery)

2024 年 9 月

北海道大学
阿部　由依
Yui Abe

目次

発表論文目録及び学会発表目録 1

要旨 2

略語表 4

緒言 5

第 1 章

緒言 8

方法 9

結果 13

考察 19

第 2 章

緒言 22

方法 23

結果 24

考察 30

総括及び結論 32

謝辞 33

利益相反 33

引用文献 34

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

- Abe-Takahashi Y, Kitta T, Ouchi M, Chiba H, Higuchi M, Togo M, Kusakabe N, Kakizaki H, Shinohara N. Morphological examination of pelvic floor muscles in a rat model of vaginal delivery. BMC Pregnancy Childbirth. 2024 Jan 31;24(1):95. doi: 10.1186/s12884-024-06278-5. PMID: 38297206; PMCID: PMC10832168.

  投稿先： BMC Pregnancy Childbirth.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

- 阿部由依, 橘田岳也, 大内みふか, 千葉博基, 樋口まどか, 東郷未緒, 日下部直久, 篠原信雄：経腟分娩後に起こる腹圧性尿失禁の病態解明に関する基礎研究　第 8 回日本ウィメンズヘルス・メンズヘルス理学療法学術大会　2022 年 11 月 25-26 日　神奈川県　川崎市

- Abe-Takahashi Yui, Takeya Kitta, Mifuka Ouchi, Hiroki Chiba, Madoka Higuchi, Mio Togo, Naohisa Kusakabe, Nobuo Shinohara: Histological examination of Pelvic Floor Muscle in a Rat Model of Vaginal Delivery. International continence society 2022 Sept 7-10 (Vienna, Austria)

- 阿部由依, 橘田岳也, 大内みふか, 千葉博基, 樋口まどか, 東郷未緒, 日下部直久, 篠原信雄：骨盤底筋群に着目した経腟分娩後に起こる腹圧性尿失禁の病態解明 第 29 回日本排尿機能学会　2022 年 9 月 1-3 日　北海道　札幌市

要旨

【背景と目的】 腹圧性尿失禁は, 妊娠と分娩に起因することが多く, 骨盤底の脆弱化が要因の 1 つである. また, 経腟分娩経験者では 12.2%が腹圧性尿失禁を発症するとされる. 腹圧性尿失禁に対する治療は, 生活指導や骨盤底筋トレーニングを含む行動療法, 薬物療法, 手術治療が挙げられるが, 第一選択の保存療法としては行動療法が推奨されている. 行動療法の中で, 骨盤底筋トレーニングは骨盤底筋群の収縮と弛緩を繰り返し実施することで, 骨盤底筋群の収縮力を強化するものである. ヒトにおける骨盤底筋群の構成は, 約 70%が遅筋線維 (type I), 約 30%が速筋線維 (type II) であり, type I 線維は骨盤臓器の保持, type II 線維は尿道閉鎖に関与している. トレーニングによる筋力増強効果を引き出すためには, 腹圧性尿失禁に対する病態の理解と, 筋線維タイプの特性に応じたトレーニングを実施することが重要である. ラットを対象とした基礎研究では, 産後の腹圧性尿失禁の発症には, 尿道機能の低下が影響していることが明らかとなっている. しかしながら, 経腟分娩時に生じる筋損傷や神経損傷に対する骨盤底筋群の影響については, 検証されていない.

本研究では, 擬似出産外傷モデルラットを用いて, 経腟分娩が骨盤底筋群の筋組成および尿道機能へ及ぼす影響について, 研究 1 (第 1 章) では 4 週間の短期的な影響, 研究 2 (第 2 章) では 12 週間の中長期的な影響について検証した.

【対象と方法】 対象は, 研究 1 では, 実験動物に 12 週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラット 24 匹を用いた. ラットは 6 匹ずつ無作為に (1) 偽手術群 (sham 群), (2) 腟拡張術後 1 週間群 (1W 群), (3) 腟拡張術後 2 週間群 (2W 群), (4) 腟拡張術後 4 週間群 (4W 群) の 4 群に分類した. 研究 2 では, 実験動物に 12 週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラット 18 匹を用いた. ラットは 6 匹ずつ無作為に (1) sham 群, (2) 4W 群, (3) 腟拡張術後 12 週間群 (12W 群) の 3 群に分類した. 方法は, 研究 1, 2 ともに, 模擬出生外傷による腹圧性尿失禁を誘発するモデルとして腟拡張を実施した. 尿道内圧の測定は, 安静時の尿道基礎圧 (UBP) と腹部電気刺激に対する尿道反応圧 (A-URE) を測定した. 対象筋は, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋とし, それぞれ筋湿重量 (MWW) を測定した. 組織学的分析として, 筋線維タイプ (type I, IIa, IIb 線維) 分類のため, Myosin Adenosine triphosphatase (ATPase) 染色 (pH 10.2) およびコハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色を施した. ATPase 染色と SDH 染色により得られた標本は, 光学顕微鏡を用いて, 筋線維を type I, IIa, IIb に分類した. また, 各筋線維 type の筋横断面積 (CSA) を測定した. 分析には左側の恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋を用いた. 統計学的解析は, 各群における UBP, A-URE, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋 MWW /body weight (BW) (mg/g), 各筋線維 type および各 CSA の比較を行った. 有意水準は 5%に設定した.

【結果】 研究 1 では, UBP は 4 群間で有意差は認めず, A-URE は 1W 群で sham 群, 2W 群, 4W 群よりも有意に低値であった. MWW/BW は, 恥骨尾骨筋では sham 群に比べ, 1W 群, 2W 群, 4W 群で有意に低値であった. CSA について, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋ともに type I は sham 群に比べ, 1W 群, 2W 群, 4W 群で有意に低値であった. 各筋線維の占有率は, 恥骨尾骨筋では, type I は sham 群に比べ, 1W 群, 2W 群, 4W 群で有意に低値であった. Type IIb は, sham 群に比べ, 1W 群, 2W 群で有意に高値であった. 腸骨尾骨筋では, type I は sham 群に比べ, 2W 群, 4W 群で有意に低値であった. 研究 2 では, UBP は 3 群間で有意差は認めず, A-URE は sham 群に比べ, 4W 群で有意に低値を示した. MWW/BW は, 恥骨尾骨筋では, sham 群に比べ, 4W 群, 12W 群で有意に低値であった. CSA について, 恥骨尾骨筋では type I は 12W 群に比べ, 4W 群で有意に低値であった. 腸骨尾骨筋では, type I は sham 群に比べ, 4W 群で有意に低値であった. 各筋線維の占有率は, 恥骨尾骨筋では, type I は sham 群に比べ, 4W 群, 12W 群で有意に低値であった. type IIb は, sham 群に比べ, 4W 群, 12W 群で有意に高値であった. 腸骨尾骨筋では, type I は sham 群に比べ, 4W 群, 12W 群で有意に低値であった.

【考察】 研究 1 では, 腟拡張術後 4 週の経腟分娩モデルラットは, sham 群に比べて, 恥骨尾骨筋の MWW/BW および type I 線維占有率の有意な低下を認めた. 分娩中における恥骨尾骨筋は, 骨盤底筋群の中で最も伸長され, より重度の障害を受けやすい. また, ラットのヒラメ筋に対する除神経後の筋組成について検討した報告では, type I 線維の減少と type II 線維の増加が認められており, 本研究においても同様の結果であった. 脱神経は, 筋収縮力を低下させることから, 経腟分娩は骨盤底筋群の筋組成を変化させ, type I 線維の収縮力低下により, 腹圧性尿失禁発症の一要因となる可能性が考えられる. 以上より, 経腟分娩は, 骨盤底筋群の筋萎縮と筋組成変化を生じる可能性が示唆された. 研究 2 では, A-URE について sham 群に比べ, 4W 群で有意な低下を認めた. また, 腟拡張術後 12 週の経腟分娩モデルラットでは, sham 群に比べて恥骨尾骨筋の MWW/BW および type I 線維占有率の有意な低下を認めた. 筋萎縮は, 除神経後 1 か月で顕著であり, その後 6 か月は進行し, type II 線維よりも type I 線維に影響が強く表れるとされる. 経腟分娩による骨盤底筋群への損傷は, 筋組成を変化させ, 骨盤底筋筋力の低下を招き, 産後の腹圧性尿失禁の発症と長期化に関与している可能性が示唆された.

【結論】 経腟分娩モデルラットでは, 腟拡張術後 4〜12 週において骨盤底筋群の筋萎縮と筋組成変化 (type I 線維占有率の低下) を認めることが示唆された. これは, 経腟分娩後の腹圧性尿失禁発症に対するメカニズム解明に寄与する可能性がある.

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下のとおりである.

A-URE	Amplitude of the urethral response to electrical stimulation, 電気刺激に対する尿道反応圧
CSA	Cross-sectional area, 断面積
MWW	Muscle wet weight, 筋湿重量
UBP	Urethral baseline pressure, 尿道基礎圧

緒言

尿失禁は, 不随意に尿が漏れる状態と定義される泌尿器科疾患であり, 尿失禁全体の有症率は世界で25〜45%におよぶ (Milsom et al, 2023). 尿失禁は, 腹圧性尿失禁, 切迫性尿失禁, 混合性尿失禁などの種類に分類され, 尿失禁全体の49%を腹圧性尿失禁が占める (Milsom et al, 2023). 腹圧性尿失禁の多くは, 加齢に加え, 妊娠と分娩に起因することが多く, 経腟分娩経験者では12.2%が腹圧性尿失禁を発症するとされる (Rortveit et al, 2003). また, 経腟分娩による骨盤底の損傷は, 長期的に影響することが明らかとなっている (Tähtinen et al, 2016).

女性が生涯を通して腹圧性尿失禁に罹患し手術を受ける割合は, 11.1%と報告されており(Fialkow et al, 2008), 急速に進む高齢社会においては, その治療により医療費負担の増大が予想され, 腹圧性尿失禁患者への対策が重要な課題であると考える. 腹圧性尿失禁は, 腹圧上昇時に膀胱内圧が尿道内圧を上回り, 膀胱収縮を伴わずに尿が漏れる状態である. 腹圧性尿失禁の病態としては, 尿道の支持機構が障害される尿道過活動, 尿道粘膜や尿道括約筋の閉鎖機構が障害される尿道括約筋不全の2つがある. いずれも骨盤底の脆弱化により引き起こされる.

腹圧性尿失禁に対する治療は, 生活指導や骨盤底筋トレーニングを含む行動療法, 薬物療法, 手術治療があるが, 第一選択の保存療法としては行動療法が推奨されている (Dumoulin et al, 2016). 行動療法のうち骨盤底筋トレーニングは, 骨盤底筋群の収縮と弛緩を繰り返すことで, 骨盤底筋群の収縮力を強化するものである. 骨盤底筋群の構成については, 生体組織検査から, 約70%が遅筋線維 (type I) , 約30%が速筋線維 (type II) とされている (Gilpin et al, 1989). type I線維は収縮速度が遅く持久性に優れており, type II線維は収縮速度が速く瞬発性に優れていることから, 骨盤底筋群のtype I線維は骨盤臓器の保持, type II線維は尿道閉鎖に関与する (Wyndaele, 2016). トレーニングによる筋力増強効果を引き出すためには, 腹圧性尿失禁の病態に対する理解と, それぞれ筋線維タイプの特性に応じたトレーニングを実施することが重要である.

一般に, 四肢骨格筋に対する神経損傷では, 筋組成の変化が起こることが知られている. ラットを対象とした基礎研究では, 坐骨神経切断後のヒラメ筋を組織学的に検討した結果, type I線維の有意な低下とtype II線維の有意な増加を認めたと報告されている (Sakakima et al, 2000; Ijkema-Paassen et al, 2001). また, ラットの長趾伸筋を対象に除神経後の筋組成変化について検討した報告では, type II線維の有意な増加を認めたとされる (Buffelli et al, 1997).

分娩による骨盤底の脆弱化は, 骨盤底筋群 (Lien et al, 2004) および陰部神経 (Lien et al, 2005) の伸張による損傷が主な要因である. しかしながら, 経腟分娩時に生じる筋損傷や神経損傷に対する骨盤底筋群の筋組成変化については, 明らかになっていない.

産後の腹圧性尿失禁に対する骨盤底筋トレーニングを指導する上でも, 筋組成変化の特性を知ることで, より効果的なトレーニングの考案や指導につながるものと考える.

本研究では, 第1章では擬似出産外傷モデルラットに対して, 経腟分娩が骨盤底筋群の筋組成および尿道機能へ及ぼす4週間の短期的な影響について, 第2章では12週間の中長期な影響について, 検証することとした.

第 1 章

経腟分娩モデルラットに対する骨盤底筋群の筋組成および尿道機能へ及ぼす短期的な影響

Short-term effects on muscle composition and urethral function of pelvic floor muscles in a rat model of vaginal delivery

緒言

骨盤底筋群は, 下部尿路機能や生殖機能に関与しており, 特に女性では加齢, 閉経, 経腟分娩などと密接に関連している (Ptak et al, 2019). なかでも経腟分娩による骨盤底の損傷は, 腹圧性尿失禁の発症リスクである (Tähtinen et al, 2016). 疫学調査によると, 経腟分娩後1か月では, 腹圧性尿失禁の有症率が12.2%であり, 帝王切開経験者よりも2.4倍有症率が高いとされる (Rortveit et al, 2003). さらに, 経腟分娩経験者では, 約2%が2か月後も腹圧性尿失禁が継続するとの報告 (Meyer et al, 1993; Meyer et al, 1998)や, 13%が腹圧性尿失禁を1年以上継続しているとの報告 (Burgio et al, 2003) も見受けられる.

産前の腹圧性尿失禁とは異なり, 産後の腹圧性尿失禁は, 通常, 神経や筋の損傷, 尿道損傷, 膀胱外傷など, 分娩の結果として起こる病態生理学的変化に起因すると考えられている (Dimpfl et al, 1992). 経腟分娩の第2期で誘発される肛門挙筋 (Lien et al, 2004) と陰部神経 (Lien et al, 2005) の伸張について検討したシミュレーション研究では, 恥骨尾骨筋においては最大伸長比（伸長時の組織の長さ／元の組織の長さ) が3.26に達するとされ, 陰部神経においては最大ひずみ比 (伸長時の組織の長さ／元の組織の長さ×100) が35%を示したと報告されている. また, ヒトを対象とした経腟分娩による骨盤底筋群の影響について検討した報告では, 磁気共鳴画像により肛門挙筋の欠損が認められること (DeLancey et al, 2003), 帝王切開経験者や未経産婦に比べて, 骨盤底筋筋力が有意に低値であること (Batista et al, 2011), さらに, 肛門挙筋の神経伝導速度が遅延すること (Weidner et al, 2006) が明らかとなっている.

ラットを対象とした基礎研究では, 腟拡張術を用いた擬似出産外傷モデルによる腹圧性尿失禁の発症機序について, 検証されている. 腟拡張モデルラットでは, 術後4日目に腹圧性尿失禁が生じ, 尿道機能の低下を認めるとされる (Yoshikawa et al, 2017). また, 恥骨尾骨筋の支配神経である骨盤神経運動枝の切断により, 尿道抵抗の減少も認めている (Kamo and Hashimoto, 2007). しかし, 骨盤底筋群の筋組成に与える影響については不明であり, 検証が必要であると考える. 本研究の仮説としては, 経腟分娩が骨盤底筋群の萎縮を引き起こし, 筋組成の変化を生じさせるのではないか考える.

本研究の目的は, 経腟分娩モデルラットを対象に, 骨盤底筋群の筋組成および尿道機能に対する4週間の短期的な影響について検討することである.

方法

１．実験動物

実験動物には, 12週齢のSprague-Dawley系雌性ラット24匹 (初期体重：211.0-328.3 g) を用いた. 明暗期のサイクルは12時間毎とし, 全てのラットは自由に飲食可の状態とした. 飼育および実験に関しては, 「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に準拠した.

ラットは6匹ずつ以下のように無作為に4群に分類した. (1) 偽手術群 (sham群), (2) 膣拡張術後1週間群 (1W群), (3) 膣拡張術後2週間群 (2W群), (4) 膣拡張術後4週間群 (4W群). なお, 本研究は北海道大学動物実験倫理委員会 (No.22-0070) の承認を得て実施した.

２．膣拡張術

イソフルラン(Viatris Instruments, Pittsburgh, PA, USA) 吸入麻酔およびペントバルビタール麻酔 (30mg /kg) (共立製薬株式会社, 東京, 日本) 下にて, 先端を切断した14Frのオールシリコーンフォーリーバルーンカテーテル (Clinique, 横浜, 日本) を膣内に挿入し, カテーテルが抜けないように膣口を縫合糸で閉鎖した. その後, バルーンを4mLの水で膨張させ, 膣を4時間拡張した (Kamo et al, 2006). 膣拡張は, 模擬出生外傷による腹圧性尿失禁を誘発するモデルとして確立されている. sham群では, カテーテルを膣内に挿入し, バルーンは膨張させずに4時間静置した.

３．尿道内圧の測定

尿道内圧測定は, sham群では偽手術の2週間後に, 1W群, 2W群, 4W群ではそれぞれ膣拡張術の1週間後, 2週間後, 4週間後に行った. 外科的手順は, 先行研究 (Kitta et al, 2010; Ouchi et al, 2018) に則り実施した. 腹部切開により膀胱を露出させ, 両側の尿管を結紮し, その遠位端を切断した. 骨盤神経の膀胱枝を内腸骨動脈付近で両側に切断し, 反射性の膀胱収縮を消失させた. 3.5Frのナイロンカテーテル (SPR-524; Millar Instruments, Houston, TX, USA) の先端から, 1mmの位置にマイクロトランスデューサを装着し, 圧力制御ユニット (PCU-2000; Millar社製) に接続した. 尿道反応圧は, アナログ／デジタル変換器 (Power Lab®; AD Instruments社製, 名古屋, 日本) を用い, データは400Hzのサンプリング周波数でパーソナルコンピュータに記録した. アイソレーター (SS-104J; 日本光電社製, 東京, 日本) と電気刺激装置 (SEN-3301; 日本光電社製, 東京, 日本) を用いた. 腹斜筋へ電極を貼付するため, 第11～13肋骨周囲を両側切開し, 露出した両側腹斜筋を刺激した (図1A). 電気刺激は, 20ms間隔で0.5msの持続時間の電気刺激を1.8～2.0Vの強度で, 10秒ごとに繰り返した. 尿道内圧測定は, 安静時に対する尿道基礎圧 (urethral baseline pressure; UBP) と電気刺激に対する尿道反応圧 (amplitude of the urethral

response to electrical stimulation; A-URE) を測定した. A-UREは, 尿道基礎圧からの最大圧力変化 (cmH_2O) を求めた.

UBPは, 電気刺激応答直前の圧力記録の平坦部分より求めた (図1B). それぞれ10回の電気刺激により得られた尿道反応圧の平均値を代表値とした. 測定中, ラットは仰臥位とし, ウレタン麻酔 (0.72 g/kg) (和光純薬工業株式会社製, 大阪, 日本) を腹腔内投与し実施した. 電気刺激の前に, 必要に応じて追加用量の麻酔薬 (0.1 g/k) を投与し, ウレタンの最終用量は1.0〜1.2 g /kgであった.

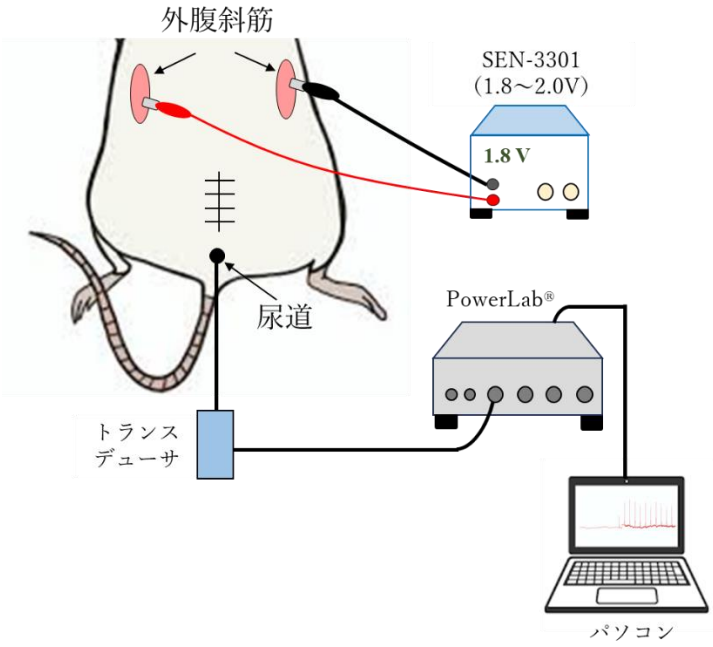

図1A 尿道内圧測定の概略

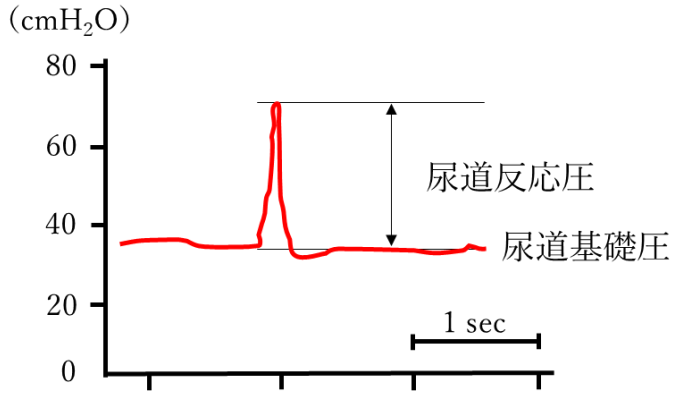

図1B　UBPとA-UREの測定
UBP: urethral baseline pressure
A-URE: amplitude of the urethral response to electrical stimulation

４．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋の採取

尿道内圧測定後, 恥骨結合からハサミを挿入し腸骨稜を開き, 両側の恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋を採取した (図2). 採取した恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋から脂肪と結合組織を除去し, デジタルスケールを用いて筋湿重量 (muscle wet weight; MWW) を測定した. 採取した恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋を中央で2分割し, トラガカントガム (富士フイルム和光純薬株式会社製, 大阪, 日本) に埋包した後, 液体窒素で冷却したイソペンタン溶液 (ナカライテスク社製, 京都, 日本) に浸漬して凍結した. 凍結した筋試料は, -80℃のディープフリーザーで保存した.

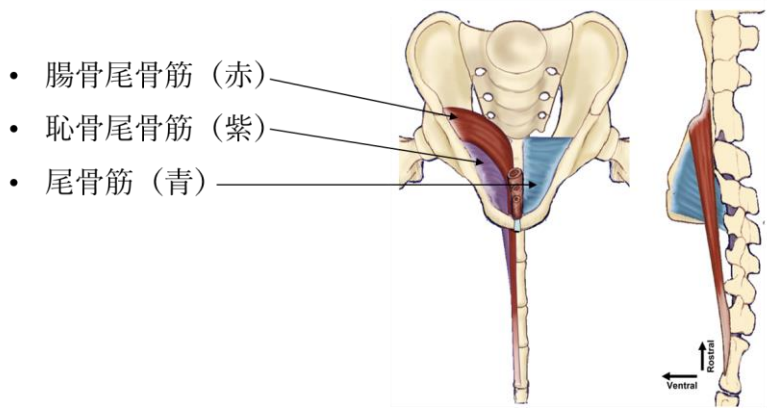

図2　ラットの骨盤底筋群 (引用改変: Thor and de Groat, 2010)

５．組織学的分析と定量解析

凍結した恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋は, -20℃に冷却したクライオスタット (CM 1510 S; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて, 10μm厚の連続横断切片を10枚程度作成した. 染色用の凍結連続切片は, 解凍し30分間風乾した. 筋線維タイプ分類 (type I, IIa, IIb線維) のため, Myosin Adenosine triphosphatase (ATPase) 染色 (pH 10.2) およびコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase; SDH) 染色を施した. ATPase染色およびSDH染色により得られた標本は, 光学顕微鏡 (BX 43; オリンパス, 東京, 日本) と顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (FX 630; オリンパス) を用いて, 各標本の顕微鏡写真を100倍率で撮影した. 筋全体を反映するように10箇所を無作為に選出し, 筋線維type別構成比率を各typeの筋線維数より算出した. 各筋線維typeの分類は, Brookeら (Brooke and Kaiser, 1970) の分類に基づき, type I, IIa, IIbに分類した. また, 各筋線維typeから無作為に選んだ100本の筋線維の筋横断面積 (cross-sectional area; CSA) を測定した. CSAの測定には, ImageJ (version 1.52a, National Institutes of Health) を使用した. なお, 分析には左側の恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋を用いた.

６．統計解析

統計処理は, 統計フリーソフトR (version 4.1.3) を使用した. sham群, 1W群, 2W群, 4W群におけるUBP, A-URE, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋のMWW /body weight (BW) (mg/g), 各筋線維type, および各CSAの比較は, 一元配置分散分析 (ANOVA), Welchのt検定, およびKruskal-Wallis検定により解析した. ANOVAを用いたパラメトリック検定の事後比較は, Tukey検定またはGames-Howell検定を用い, Kruskal-Wallis検定によるノンパラメトリック検定の事後比較は, Steel-Dwass検定を用いた. 有意水準は5%に設定した.

結果

１．UBPとA-UREの比較

UBPは, sham群 (22.3 ± 7.6 cmH_2O), 1W群 (23.2 ± 10.9 cmH_2O), 2W群 (20.9 ± 2.7cmH_2O), 4W群 (24.7 ± 8.1cmH_2O) の間で, 有意差は認めなかった ($p = 0.87$). A-UREは1W群 (5.2 ± 3.0 cmH_2O) で, sham群 (55.4 ± 17.0 cmH_2O), 2W群 (35.5 ± 12.6 cmH_2O), 4W群 (32.5 ± 5.2cmH_2O) よりも有意に低値であった (いずれも$p < 0.01$) (図3).

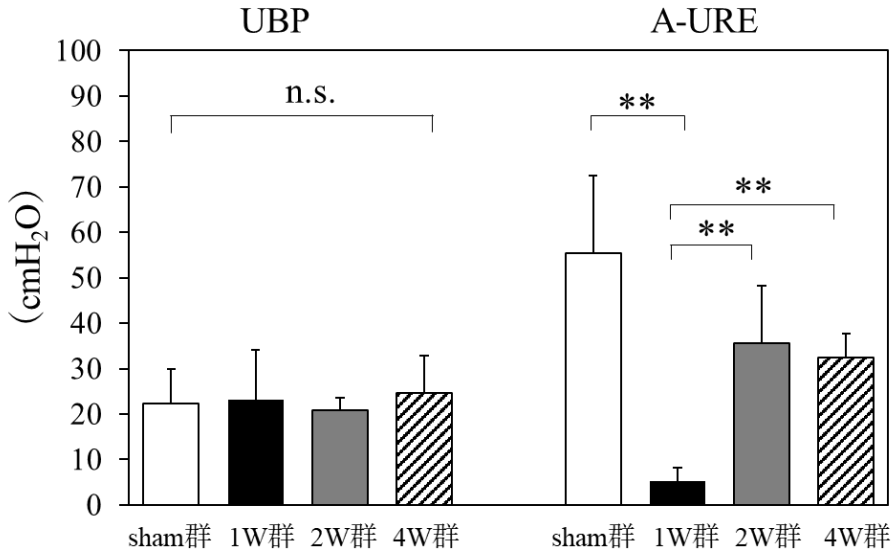

図3　UBPとA-UREの比較

データは平均値 ± 標準偏差

UBP: urethral baseline pressure
A-URE: amplitude of the urethral response to electrical stimulation
n.s.: not significant
**$p < 0.01$
Statistical analysis: ANOVA, Games-Howell test

２．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるMWW/BWの比較

恥骨尾骨筋のMWW/BWは, sham群 (0.57 ± 0.08 mg /g) に比べ, 1W群 (0.31 ± 0.07 mg /g), 2W群 (0.38 ± 0.07 mg /g), 4W群 (0.39 ± 0.07 mg /g) で, 有意に低値であった (いずれもp＜0.01) (図4).

腸骨尾骨筋のMWW /BWは, 4群間で有意差は認めなかった (p = 0.17) (図4).

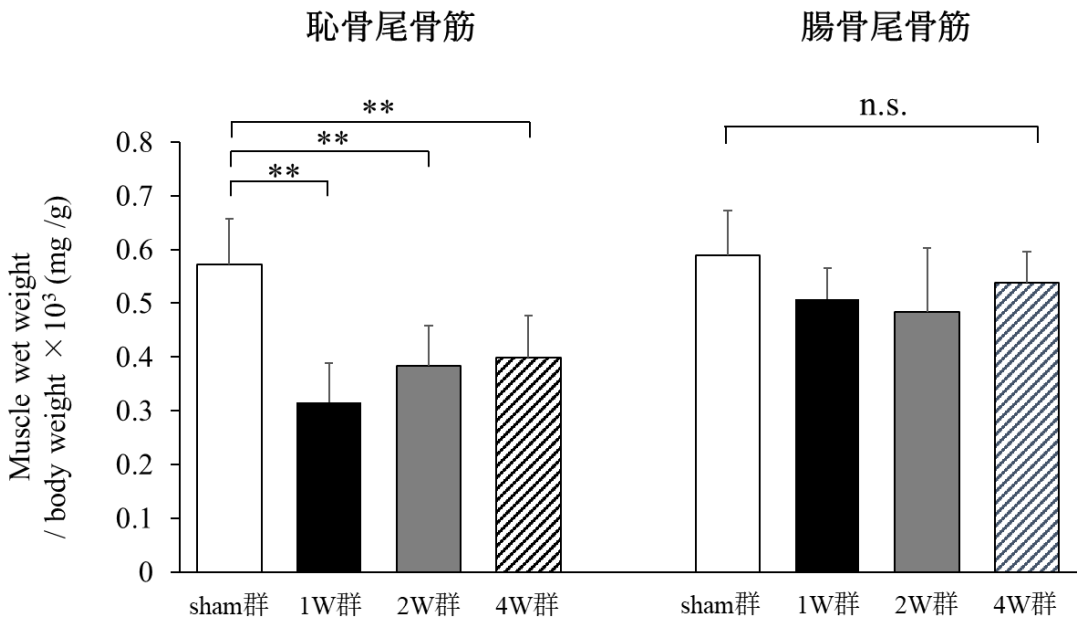

図4　恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるMWW/BWの比較

データは平均値 ± 標準偏差

MWW: muscle wet weigh
n.s.: not significant
**p < 0.01
Statistical analysis: Tukey’s test

３．恥骨尾骨筋および腸骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

恥骨尾骨筋について, type I線維のCSAは, sham群 (1,337.2 ± 252.9 μm^2) に比べ, 1W群 (1,223.1 ± 173.3 μm^2, p = 0.02), 2W群 (995.9 ± 295.6 μm^2, p = 0.03), 4W群 (1,183.9 ± 126.7 μm^2, p = 0.02) で有意に低値であった. Type IIa線維 (p = 0.16)とIIb線維 (p = 0.59) のCSAについては, 4群間で有意差は認めなかった (図5A).

腸骨尾骨筋について, type I線維のCSAは, sham群 (1,947.8±235.5 μm^2) に比べ, 1W群 (1,340.7 ± 137.0 μm^2, p = 0.02), 2W群 (1,158.4 ± 207.5 μm^2, p = 0.03), 4W群 (1,238.9 ± 179.4 μm^2, p = 0.02) で有意に低値であった. Type IIa線維については, 1W群 (1,438.5 ± 105.1 μm^2) に比べ, sham群 (2,246.5 ± 265.1 μm^2), 2W群 (2,134.4 ± 85.2 μm^2), 4W群 (2,201.2 ± 225.8 μm^2) で有意に高値であった (すべてp＜0.01). Type IIb線維については, 4群間で有意差は認めなかった (p = 0.06) (図5B).

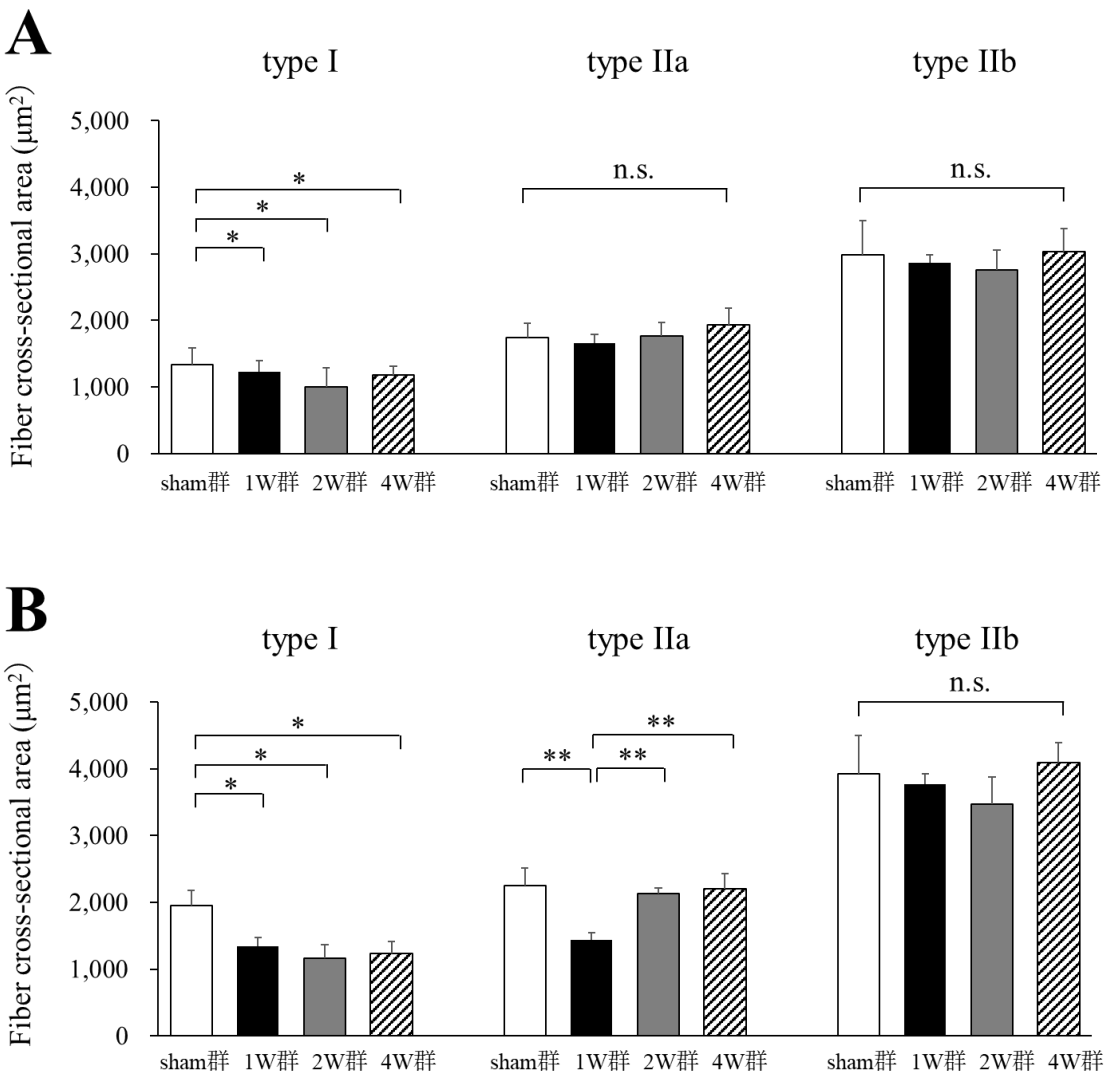

図5A　恥骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

図5B　腸骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

データは平均値 ± 標準偏差

CSA: cross-sectional area
*p < 0.05
**p < 0.01
n.s.: not significant
Statistical analysis: ANOVA, Welch’s t-test and Steel-Dwass multiple comparison test

４．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

恥骨尾骨筋について, type I線維占有率は, sham群 (17.1 ± 3.9 %) に比べ, 1W群 (3.8 ± 2.4 %, p = 0.02), 2W群 (0. 3 ± 0.5 %, p = 0.01), 4W群 (3.1 ± 2.7 %, p = 0.02) で有意に低値であった. また, 2W群に比べ, 1W群 (p = 0.01), 4W 群 (p = 0.04) で有意に高値であった. Type IIa線維占有率は, 4群間で有意差は認めなかった (p = 0.20). Type IIb線維占有率は, sham群 (55.2 ± 3.6 %) に比べ, 1W群 (72.8 ± 11.4 %), 2W群 (73.0 ± 9.9 %) で有意に高値であった (すべてp < 0.01) (図6A, 6B).

腸骨尾骨筋について, type I線維占有率は, sham群 (15.6 ± 3.7 %) に比べ, 2W群 (1.0 ± 1.1 %), 4W群 (4.5 ± 3.1 %) で有意に低値であった (すべてp < 0.01). Type IIa (p = 0.47) とIIb (p = 0.12) 線維占有率は, 4 群間で有意差は認めなかった (図7A, 7B).

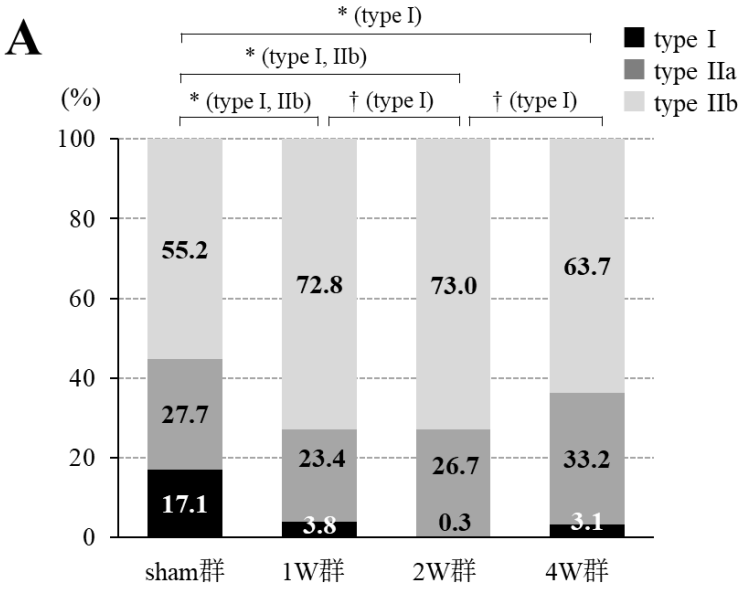

図6A　恥骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

データは平均値

Statistical analysis: ANOVA, Steel-Dwass multiple comparison test, Tukey's test
*Indicates a statistically significant difference (p < 0.05 versus the sham group)
†Indicates a statistically significant difference (p < 0.05 versus the 2 W group)

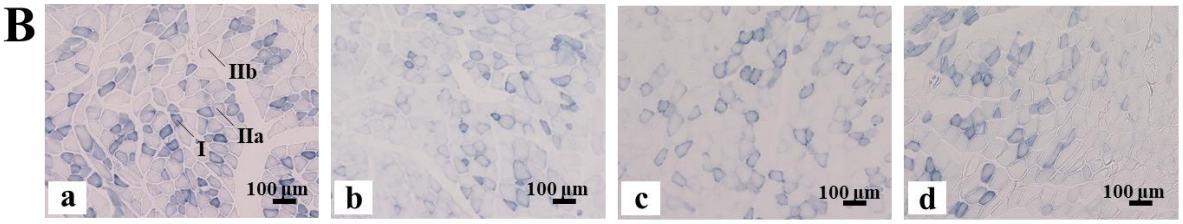

図6B　恥骨尾骨筋のSDH染色断面：sham群 (a), 1W群 (b), 2W群 (c), 4W群 (d)

SDH; succinate dehydrogenase
Scale bar = 100 µm

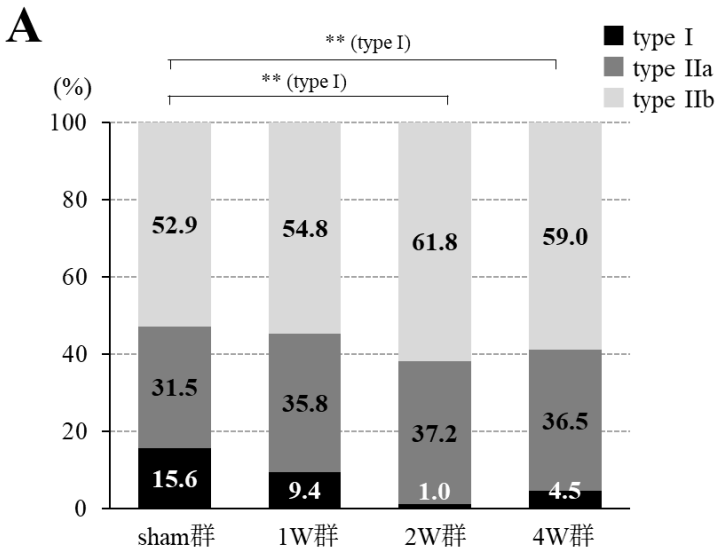

図7A　腸骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

データは平均値

Statistical analysis ANOVA, Steel–Dwass multiple comparison test

**Indicates a statistically significant difference ($p < 0.01$ versus the sham group)

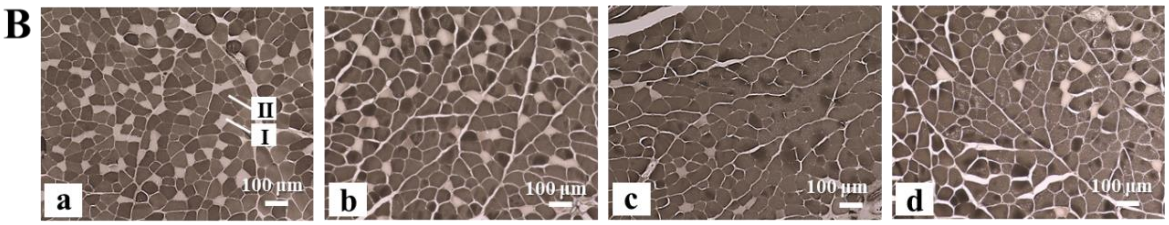

図7B　腸骨尾骨筋のATPase (pH 10.2) 染色断面：sham群 (a), 1W群 (b), 2W群 (c), 4W群 (d)

ATPase: myosin adenosine triphosphatase

Scale bar = 100 μm

Statistical analysis: ANOVA, Steel-Dwass multiple comparison test

考察

本研究の目的は, 膣拡張モデルラットに対して, 骨盤底筋群の筋組成および萎縮の程度, 尿道機能に対する4週間の短期的な影響について, 検討することである.

まず, 今回用いた膣拡張モデルラットが, 経膣分娩による腹圧性尿失禁を呈するモデルとしての妥当性を確認するために, 尿道機能について評価を行った. その結果, A-UREは1W群で, sham群, 2W群, 4W群よりも有意に低値であった. 既報 (Kamo et al, 2006) では, 膣拡張術 4日後にA-UREが最低値を示すことが報告されており, 本研究も同様に既報の結果を支持した. そのため, 今回使用した膣拡張モデルラットは経膣分娩後の腹圧性尿失禁を呈するモデルとして妥当であると考える.

恥骨尾骨筋のMWW/BWについては, 1W群, 2W群, 4W群がsham群に比べて有意に低値であった. これは, 膣拡張の1週間後より筋萎縮が起こったものと考えられ, 骨格筋に対する除神経後に起こる筋萎縮の開始時期と同様であった (Higashino et al, 2013). 恥骨尾骨筋は, 恥骨のすぐ外側に付着しており, 恥骨尾骨筋の外側に腸骨尾骨筋が位置している. 経膣分娩中の恥骨尾骨筋は, 骨盤底筋群の中で最も伸長され (Lien et al, 2004), より重度の障害を受けやすい (DeLancey et al, 2003). 今回, A-UREは膣拡張の2週以降でsham群と同程度まで回復する結果であったが, 恥骨尾骨筋の萎縮は2週以降も継続していることが確認された. これは, 経膣分娩2週後は腹圧性尿失禁の症状が改善するものの, 骨盤底筋群に対する損傷の影響は, 残存していることが考えられる.

また, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋のtype I線維におけるCSAについては, 1W群, 2W群, 4W群がsham群に比べて有意に低値であった. ラットの恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋を支配する骨盤神経は, 内臓枝 (感覚) と体性運動枝に分岐しており (Pacheco et al, 1989), 体性運動枝を除去すると, 恥骨尾骨筋のCSAが減少することが確認されている (Alvarado et al, 2013). さらに, ラットの坐骨神経損傷後の各筋線維別CSA変化を検討した研究では, ヒラメ筋ではtype I線維, 足底筋ではtype II線維のCSAが, 損傷後早期に萎縮するとの報告 (Jaweed et al, 1975)や, ヒラメ筋のtype I, IIともにCSAの有意な減少を認めるとの報告 (Sakakima and Yoshida, 2003) が見受けられる. ラットの骨盤底筋群は, type II線維の優位な構成であり, 本研究結果は, 各筋線維優位型の骨格筋において筋萎縮を引き起こすとの報告結果 (Roy et al, 1991) とは異なることが示唆された. 以上より, 膣拡張モデルラットでは, 骨盤底筋群におけるtype I線維の萎縮が生じている可能性が考えられる.

筋組成変化について, type I線維占有率は, 恥骨尾骨筋では1W群, 2W群, 4W群がsham群よりも有意に低値を示し, 2W群で最も低値であった. 腸骨尾骨筋では2W群, 4W群がsham群よりも有意に低値であった. また, type II線維占有率は, 恥骨尾骨筋において1W群, 2W群がsham群よりも有意に高値であった. 先行研究 (Ohira et al, 2006) では, 除神経

後に有意な遅筋線維の減少と速筋線維の増加が認められており, 本研究においても同様の結果であった. 経腟分娩後に腹圧性尿失禁を経験した女性と健常な未経産婦を対象に, 骨盤底筋群の筋電図学的検討を行った報告 (Deindl et al, 1994) では, 腹圧性尿失禁女性において, 筋活性化の遅延, 活性時間の短縮, 反応の欠如などが認められるとされる. 脱神経は, 筋収縮力を低下させる (Fitts et al, 1986) ことからも, 経腟分娩は, 骨盤底筋群の筋組成を変化させ, type I線維の収縮力低下が生じることにより, 腹圧性尿失禁発症の一要因となる可能性が考えられる.

以上の結果より, 経腟分娩後の4週後の短期的影響は, 骨盤底筋群の筋萎縮と筋組成の変化を生じる可能性が示唆された.

第 2 章

経腟分娩モデルラットに対する骨盤底筋群の筋組成および尿道機能へ及ぼす中長期的な影響

Mid and long-term effects on muscle composition and urethral function of pelvic floor muscles in a rat model of vaginal delivery

緒言

第1章において, 経腟分娩モデルラットに対する骨盤底筋群の筋組成および尿道機能への影響について, 腟拡張後1～4週の短期モデルを用いて検討を行った. 結果は, 腟拡張の4週後において, 尿道機能の回復は認めたが, 骨盤底筋群の萎縮と筋組成の変化は継続しており, 骨盤底筋機能は回復していない可能性を見出した.

腟拡張モデルラットを用いた腹圧性尿失禁発症のメカニズムについて検討した報告では, 多くが術後4日後での検討 (Kamo et al, 2006; Kaiho et al, 2007; Ouchi et al, 2018) であり, 長くとも腟拡張後6週モデルを用いた検証 (Pan et al, 2007; Yoshikawa et al, 2017) である. しかし, 経腟分娩経験者のうち2～13%で腹圧性尿失禁が2～12か月以上継続しており (Meyer et al, 1993; Meyer et al, 1998; Burgio et al, 2003), 産後1年後 (Memon and Handa, 2012) や5年後 (Viktrup et al, 1992) に腹圧性尿失禁を生じるケースもある. そのため, 経腟分娩による骨盤底筋群へ及ぼす中長期的な影響について検証することが課題となり, 本実験を行った.

本研究の目的は, 経腟分娩モデルラットを対象に, 骨盤底筋群の筋組成および尿道機能に対する12週間の中長期的な影響について検討することである.

方法

１．実験動物

実験動物には, 12週齢のSprague-Dawley系雌性ラット18匹 (初期体重：261.4-351.4g) を用いた. 明暗期のサイクルは12時間毎とし, 全てのラットは自由に飲食可の状態とした. 飼育および実験に関しては, 「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に準拠した.

ラットは6匹ずつ以下のように無作為に3群に分類した. (1) sham群, (2) 4W群, (3) 膣拡張後12週間群 (12W群). なお, 本研究は北海道大学動物実験倫理委員会 (No.22-0070) の承認を得て実施した.

２．膣拡張

第1章と同様の手順で実施した.

３．尿道内圧の測定

尿道内圧測定は, sham群では偽手術の2週間後に, 4W群, 12W群ではそれぞれ膣拡張の4週間後, 12週間後に行った. 外科的手順は, 第1章と同様の手順で実施した.

４．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋の採取

第1章と同様の手順で実施した.

５．組織学的分析と定量解析

第1章と同様の手順で実施した.

６．統計解析

統計処理は, 統計フリーソフトR (version 4.1.3) を使用した. sham群, 4W群, 12W群におけるUBP, A-URE, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋のMWW /body weight (BW) (mg/g), 各筋線維type, および各CSAの比較は, 一元配置分散分析 (ANOVA), Kruskal-Wallis検定により解析した. ANOVAを用いたパラメトリック検定の事後比較はTukey検定を用い, Kruskal-Wallis検定によるノンパラメトリック検定の事後比較は, Steel-Dwass検定を用いた. 有意水準は5%に設定した.

結果

１．UBPとA-UREの比較

UBPは, sham群 (22.3 ± 7.6 cmH_2O), 4W群 (24.7 ± 8.1cmH_2O), 12W群 (24.1 ± 7.9cmH_2O) で, 有意差は認めなかった ($p = 0.86$). A-UREは, sham群 (55.4 ± 17.0 cmH_2O) に比べ, 4W群 (32.5 ± 5.2 cmH_2O) で有意に低値を示した ($p = 0.04$) (図8).

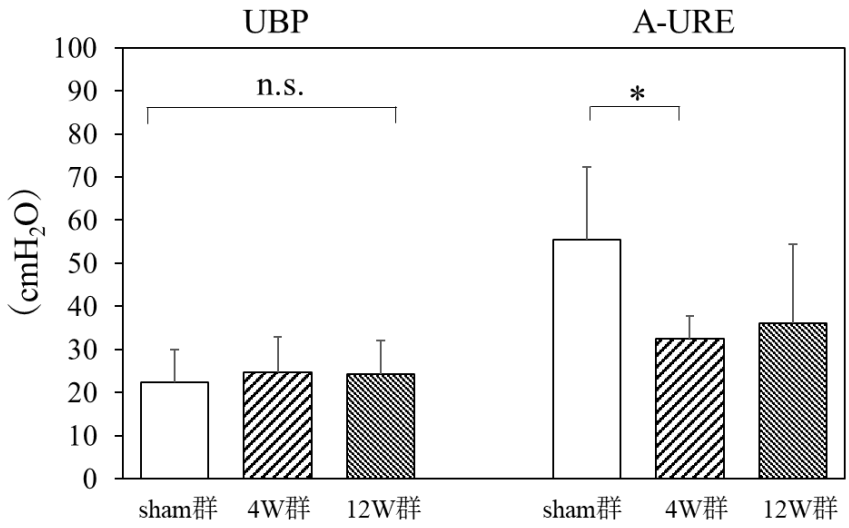

図8　UBPとA-UREの比較

データは平均値 ± 標準偏差

UBP: urethral baseline pressure
A-URE: amplitude of the urethral response to electrical stimulation
n.s.: not significant
*$p < 0.05$
Statistical analysis: ANOVA, Tukey’s test

２．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるMWW/BWの比較

恥骨尾骨筋のMWW/BWは, sham群 (0.57 ± 0.08 mg /g) に比べ, 4W群 (0.40 ± 0.08 mg /g, $p < 0.01$), 12W群 (0.39 ± 0.07 mg /g, $p = 0.01$) で, 有意に低値であった (図9).

腸骨尾骨筋のMWW /BWは, 3群間で有意差は認めなかった ($p = 0.40$) (図9).

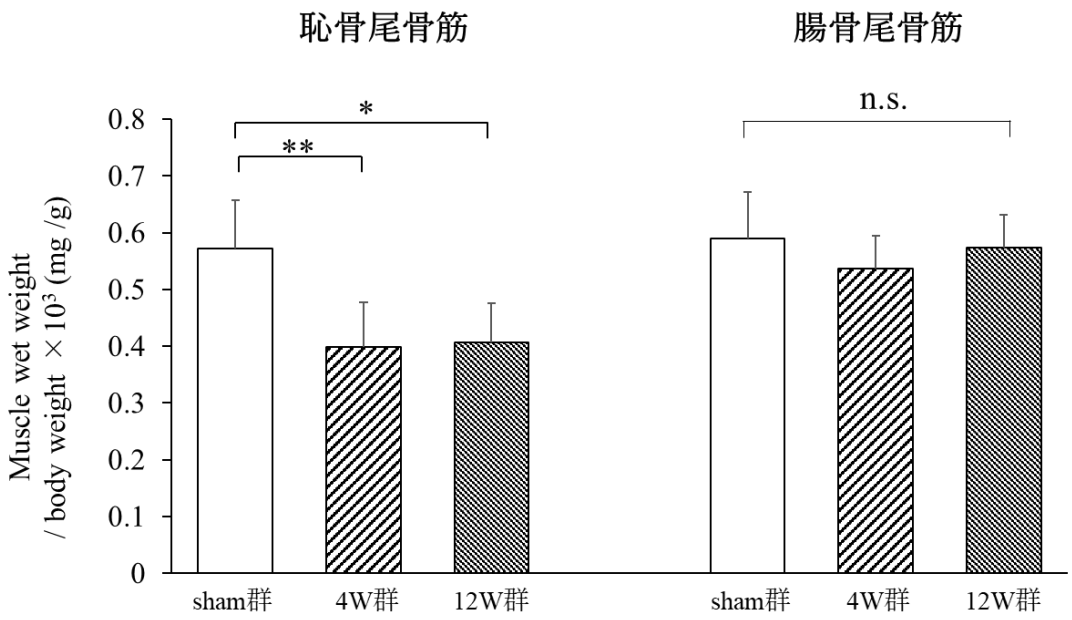

図9　恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるMWW/BWの比較

データは平均値 ± 標準偏差

MWW: muscle wet weigh

n.s.: not significant

*$p < 0.05$

**$p < 0.01$

Statistical analysis: ANOVA, Tukey’s test

３．恥骨尾骨筋および腸骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

恥骨尾骨筋について, type I線維のCSAは, 12W群 (1,507.5 ± 213.7 μm^2) に比べ, 4W群 (1,183.9 ± 126.7 μm^2) で有意に低値であった (p = 0.04). Type IIa線維 (p = 0.21) とIIb線維 (p = 0.13) のCSAについては, 3群間で有意差は認めなかった (図10A).

腸骨尾骨筋について, type I線維のCSAはsham群 (1,947.8±235.5 μm^2) に比べ, 4W群 (1,238.9 ± 179.4 μm^2) で有意に低値であった (p = 0.01). Type IIa線維については, sham群 (2,246.5 ± 265.1 μm^2) に比べ, 12W群 (1,883.8 ± 180.7 μm^2) で有意に低値であった (p = 0.04). Type IIb線維については, 3群間で有意差は認めなかった (p = 0.08) (図10B).

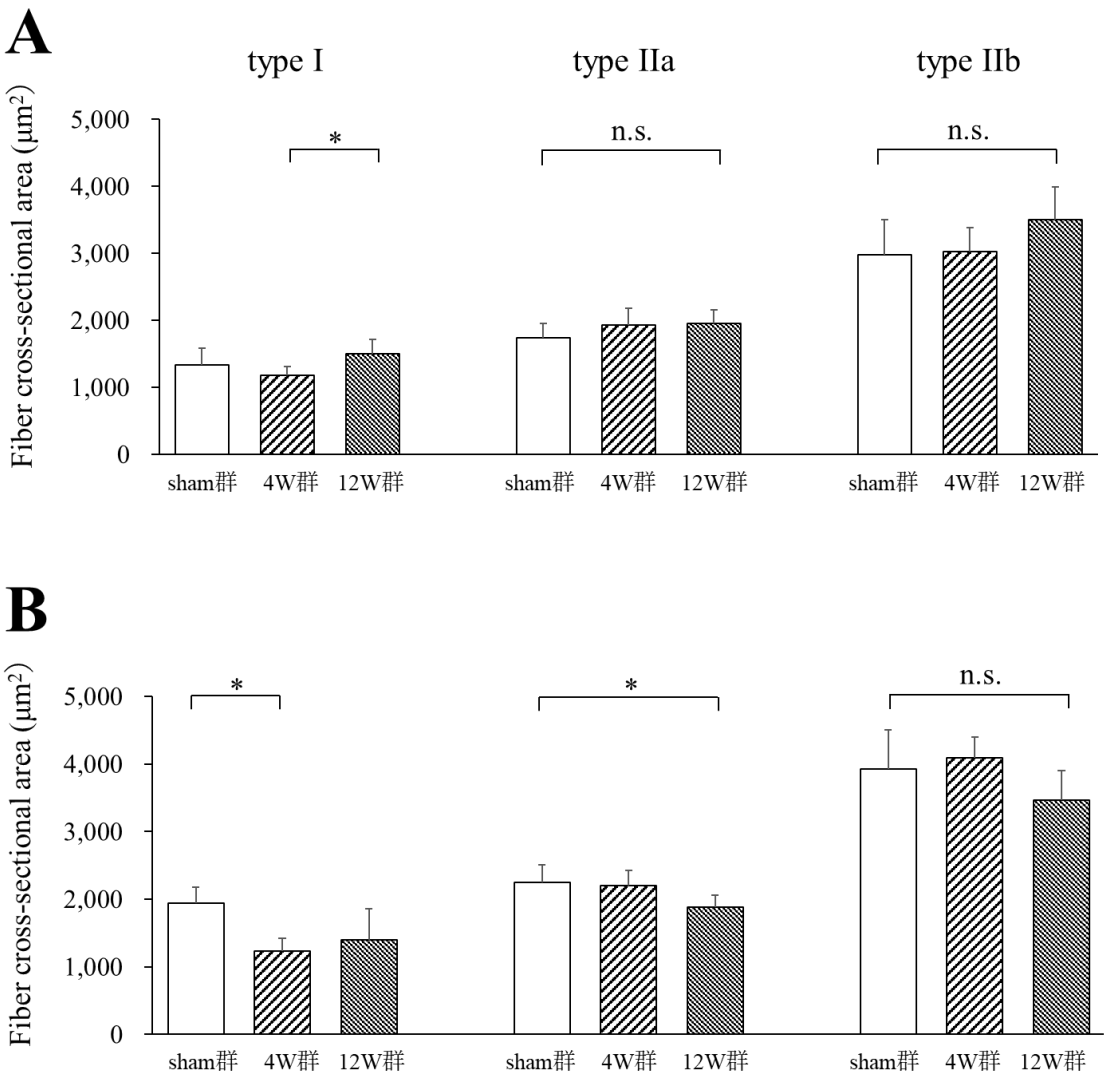

図10A　恥骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

図10B　腸骨尾骨筋の各筋線維type別CSAの比較

データは平均値 ± 標準偏差

CSA: cross-sectional area
*p < 0.05
n.s.: not significant
Statistical analysis: ANOVA, Kruskal-Wallis test, Tukey’s test and Steel-Dwass multiple comparison test

４．恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

恥骨尾骨筋について, type I線維占有率は, sham群 (17.1 ± 3.9 %) に比べ, 4W群 (3.1 ± 2.7 %), 12W群 (6.9 ± 4.8 %) で有意に低値であった (いずれも$p < 0.01$). Type IIa線維占有率は, 4群間で有意差は認めなかった ($p = 0.13$). Type IIb線維占有率は, sham群 (55.2 ± 3.6 %) に比べ, 4W群 (63.7 ± 6.8 %, $p = 0.01$), 12W群 (65.1 ± 5.0 %, $p = 0.04$) で有意に高値であった (図11A, 11B).

腸骨尾骨筋について, type I線維占有率は, sham群 (15.6 ± 3.7 %) に比べ, 4W群 (4.5 ± 3.1 %), 12W群 (6.9 ± 3.1 %) で有意に低値であった (すべて$p < 0.01$). Type IIa ($p = 0.23$) と IIb ($p > 0.05$) 線維占有率は, 3群間で有意差は認めなかった (図12A, 12B).

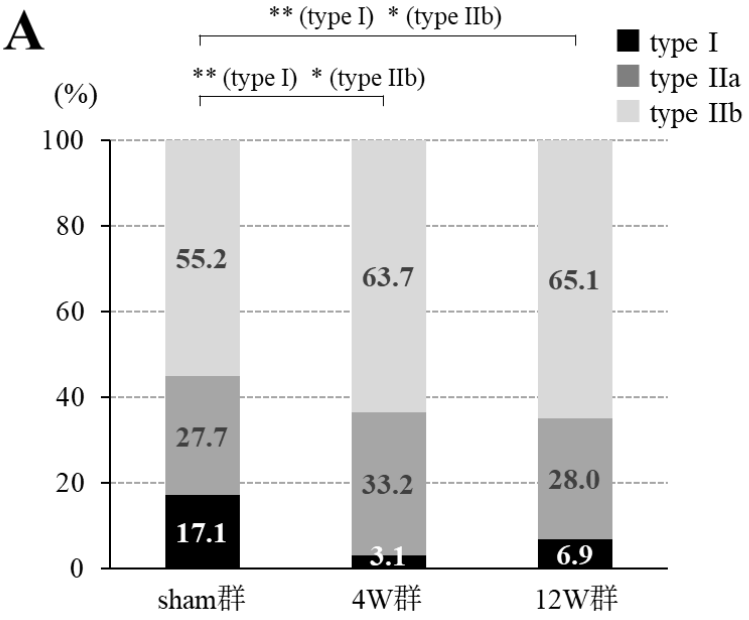

図11A　恥骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

データは平均値

Statistical analysis: ANOVA, Tukey's test

*Indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$ versus the sham group)

**Indicates a statistically significant difference ($p < 0.01$ versus the sham group)

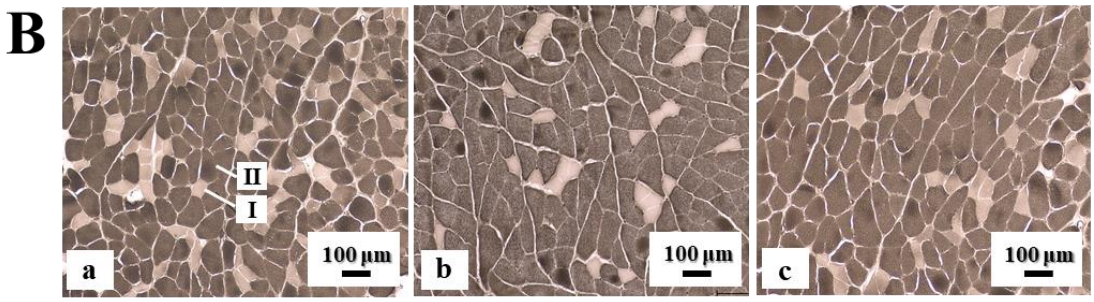

図11B　恥骨尾骨筋のATPase (pH 10.2) 染色断面：sham群 (a), 4W群 (b), 12W群 (c)

ATPase: myosin adenosine triphosphatase

Scale bar = 100 µm

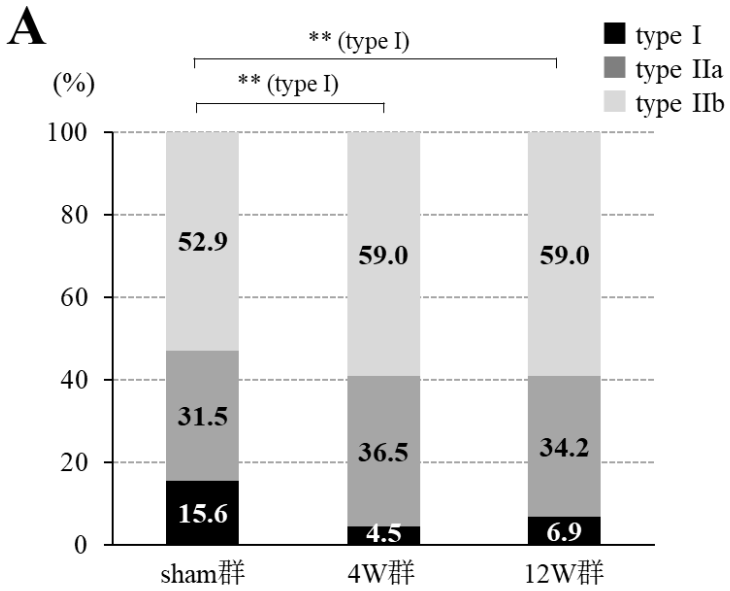

図12A　腸骨尾骨筋におけるtype I, IIa, IIb線維占有率の変化

データは平均値

Statistical analysis: ANOVA, Tukey's test

**Indicates a statistically significant difference ($p < 0.01$ versus the sham group)

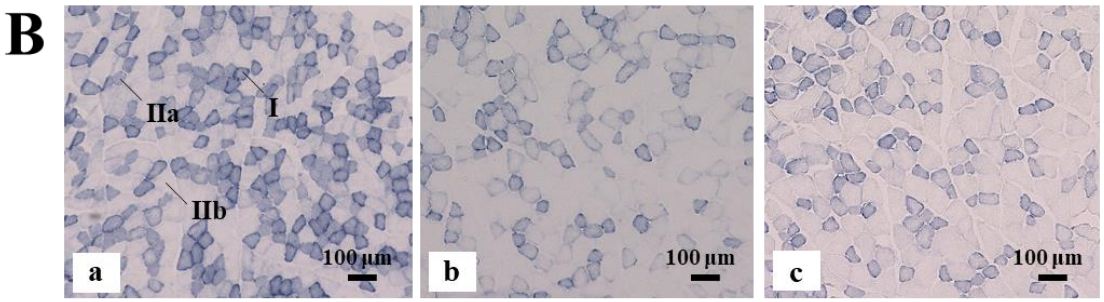

図12B　腸骨尾骨筋のSDH染色断面：sham群 (a), 4W群 (b), 12W群 (c)

SDH; succinate dehydrogenase

Scale bar = 100 µm

考察

第2章の目的は, 膣拡張モデルラットに対して, 骨盤底筋群の筋組成および萎縮の程度, 尿道機能に対する12週間の中長期的な影響について, 検討することである.

尿道機能について, UBPは3群間で有意差は認めず, A-UREはsham群に比べ, 4W群で有意に低値を示した. A-UREは, 腹圧上昇時の尿道機能を評価するために, UBPからの最大圧力変化 (cnH_2O) として測定される. 臨床的に, 膣拡張モデルラットにおけるA-UREの低下は, 外尿道括約筋および尿道閉鎖の機能不全を反映していると考えられている (Yoshikawa et al, 2017). 今回の結果から, 膣拡張の4W後においても腹圧性尿失禁を呈するモデルであることが確認された. また, 膣拡張後の尿道機能について12週に渡り検証している既報は, 我々が渉猟した限りでは見当たらない. 本結果は, 膣拡張後の尿道機能について初めて中長期的に検討したものである.

MWW/BWについては, 恥骨尾骨筋において4W群と12W群がsham群に比べて有意に低値であった. 筋萎縮は, 除神経後1か月で顕著であり, その後6か月は進行するとされ, 本研究においても先行研究の結果を支持した (Calson, 2015; Mu et al, 2018). 一方CSAは, 腸骨尾骨筋のtype I線維では, sham群に比べて4W群で有意に低下を認めたが, 恥骨尾骨筋では膣拡張群において有意差は認めなかった. ラットの除神経筋に対する組織学的な変化について, 2カ月間検討した報告 (Dedkov et al, 2003) では, 長趾伸筋においては除神経の2か月後, type II線維におけるCSAの有意な低下を認めたがtype I線維では変化がなかったとし, さらに, 前脛骨筋においてはtype II線維CSAの有意な低下は同様であったが, type I線維は除神経1〜2か月でCSAの有意な増加を認めている. また, 筋線維総数については, 除神経4か月後に低下を認めることも明らかとなっている (Viguie et al, 1997). 本研究では恥骨尾骨筋の萎縮が除神経後12週においても継続しており, これは筋線維総数の低下が影響している可能性があると考える.

筋組成変化については, 恥骨尾骨筋と腸骨尾骨筋ともにtype I線維占有率は, sham群に比べ4W群, 12W群で有意に低値を示した. また, 恥骨尾骨筋におけるtype IIb線維占有率は, sham群に比べ4W群, 12W群で有意に高値を示した. これは, 第1章の結果と同様に, 膣拡張後12週においても, 尿道機能の改善はみられるものの, 骨盤底筋群の筋機能の低下は継続していることが考えられる. 筋の萎縮は, type II線維 (速筋) よりもtype I線維 (遅筋) に影響が強く表れ, 速筋化と収縮力の低下を招く (Thompson et al, 1998). また, 筋萎縮のメカニズムには, 筋線維タイプの組成変化, 筋タンパク質の減少・合成速度の低下などが関連している (Gardetto et al, 1989; Riley et al, 1990; Steffen and Musacchia, 1986; Thomason et al, 1989). 本研究結果から, 経膣分娩による骨盤底筋群への損傷は, 筋組成を変化させ骨盤底筋筋力の低下を招き, 産後の腹圧性尿失禁の発症と長期化に関与している可能性が示唆された.

本研究の限界として, 第一に本研究に用いたモデルは, 加齢や閉経の影響について検討していないこと, 第二に筋線維総数は未測定であること, 第三に骨盤底筋群の筋組成 (type Iと II線維占有率) について, ヒトではtype I線維が7割, type II線維が3割 (Morley et al, 1996) に対して, ラットではtype I線維が2割, type II線維が8割 (Wyndaele, 2016) と異なること, 第四に腟拡張に伴う神経損傷については確認できていないことが挙げられる.

今後の展望は, 骨盤底筋群に対する加齢による影響や卵巣摘除による閉経モデルを用いた検証, 除神経後の骨盤底筋群に対し電気刺激を加えることによる治療介入効果について検討していきたい. そして, 基礎研究の結果より得られた知見を基に, ヒトを対象に検証し, より効果的な骨盤底筋トレーニング法（遅筋に対する持久的トレーニングおよび速筋に対する瞬発的トレーニング）の確立を目指したい.

総括及び結論

1.　本研究から得られた新知見

第 1 章：経腟分娩モデルラットに対して, 腟拡張後 1〜4 週における尿道機能および骨盤底筋群の筋組成変化について検討した. その結果, A-URE は 1W 群で最も低値を示した. 恥骨尾骨筋のMWW/BW と CSA (type I) および type I 線維占有率は, sham 群に比べ, 腟拡張後の 1W 群, 2W 群, 4W 群で有意に低値を示した.

第 2 章：腟拡張後 12 週における経腟分娩モデルラットでは, A-URE は sham 群に比べ, 4W群で有意に低値を示した. 恥骨尾骨筋の MWW/BW および typeI線維占有率は, sham 群に比べ, 4W 群, 12W 群で有意に低値を示した.

2.　新知見の意義

第 1 章： 腟拡張 4 週後では, 骨盤底筋群の萎縮と筋組成変化 (type I 線維占有率の低下) を認めた. 経腟分娩後に生じる腹圧性尿失禁は, 骨盤底筋群 (type I 線維) の萎縮と収縮力低下が影響している可能性が示唆された.

第 2 章：第 1 章と同様に, 経腟分娩後 3 か月以上継続する腹圧性尿失禁は, 骨盤底筋群の萎縮が関与しており, その背景には筋組成変化 (type I 線維占有率の低下) が影響している可能性が示唆された. 以上より, 経腟分娩による骨盤底筋群への損傷は, 筋組成を変化させ, 骨盤底筋筋力の低下を招き, 産後の腹圧性尿失禁の発症と長期化に関与している可能性が示唆された.

3.　今後の展開と課題

今後の展開と課題は, 骨盤底筋群に対する加齢による影響や卵巣摘除による閉経モデルを用いた検証, 除神経後の骨盤底筋群に対し, 電気刺激による治療効果について研究すること, また, 評価項目として筋線維総数を追加し検討することである. さらに, これらの知見を基にヒトを対象に検証し, より効果的なトレーニング法の確立を行うことが必要である. これらの研究によって, 産後の腹圧性尿失禁発症に対するさらなるメカニズムの解明と骨盤底筋トレーニングのより効果的な実施方法の確立につながるものと考える.

謝辞

稿を終えるにあたり, 本研究の機会を与えてくださり, 終始ご指導, ご助言を賜りました北海道大学大学院医学院腎泌尿器外科学教室の篠原信雄名誉教授, 安部崇重准教授, 千葉博基助教, 樋口まどか助教, 外科系部門外科学分野消化器外科学教室Iの武冨紹信教授, 旭川医科大学腎泌尿器外科学講座柿崎秀宏名誉教授に心より感謝いたします. また, 実験の遂行にあたり, 実験方針や方法, 論文作成のご指導を頂きました旭川医科大学腎泌尿器外科学講座の橘田岳也准教授に感謝申し上げます.

研究を進める上で様々な面でご協力いただきました皆様に, この場をお借りして厚く御礼申し上げます.

利益相反

研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係はありません.

引用文献

Alvarado M, Lara-García M, Cuevas E, Berbel P and Pacheco P (2013) Denervation and castration effects on the cross-sectional area of pubococcygeus muscle fibers in male rats. Anat Rec (Hoboken) 296, 1634-1639.

Batista EM, Conde DM, Do Amaral WN and Martinez EZ (2011) Comparison of pelvic floor muscle strength between women undergoing vaginal delivery, cesarean section, and nulliparae using a perineometer and digital palpation. Gynecol Endocrinol 27, 910-914.

Brooke MH and Kaiser KK (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol 23, 369-379.

Buffelli M, Pasino E and Cangiano A (1997) Paralysis of rat skeletal muscle equally affects contractile properties as does permanent denervation. J Muscle Res Cell Motil 18, 683-695.

Burgio K, Clark A, Lapitan MC, Nelson R, Sillen U and Thom D (2005) Epidemiology of Urinary (UI) and Faecal (FI) Incontinence and Pelvic Organ Prolapse (POP), In Incontinence 3rd edition. Abrams P, Cardozo L, Khoury S and Wein A, ed (International Continence Society: Bristol UK) pp. 255-312.

Burgio KL, Zyczynski H, Locher JL, Richter HE, Redden DT and Wright KC (2003) Urinary incontinence in the 12-month postpartum period. Obstet Gynecol 102, 1291-1298.

Carlson BM (2015) The biology of long-term denervated skeletal muscle. Eur J Transl Myol 24, 3239.

Chang SD, Hsieh WC, Chiu SY, Ng KL and Liang CC (2023) Factors determining the persistence of prenatal stress urinary incontinence 12 months postpartum. Taiwan J Obstet Gynecol 62, 40-44.

Dedkov EI, Borisov AB and Carlson BM (2003) Dynamics of postdenervation atrophy of young and old skeletal muscles: differential responses of fiber types and muscle types. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 58, 984-991.

Deindl FM, Vodusek DB, Hesse U and Schüssler B (1994) Pelvic floor activity patterns: comparison of nulliparous continent and parous urinary stress incontinent women. A kinesiological EMG study. Br J Urol 73, 413-417.

DeLancey JO, Kearney R, Chou Q, Speights S and Binno S (2003) The appearance of levator ani muscle abnormalities in magnetic resonance images after vaginal delivery. Obstet Gynecol 101, 46-53.

Dimpfl T, Hesse U and Schüssler B (1992) Incidence and cause of postpartum urinary stress incontinence. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 43, 29-33.

Dumoulin C, Hunter KF, Moore K, Bradley CS, Burgio KL, Hagen S, Imamura M, Thakar R, Williams K and Chambers T (2016) Conservative management for female urinary incontinence and pelvic organ prolapse review 2013: Summary of the 5th International Consultation on Incontinence. Neurourol Urodyn 35, 15-20.

Fialkow MF, Newton KM, Lentz GM and Weiss NS (2008) Lifetime risk of surgical management for pelvic organ prolapse or urinary incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 19, 437-440.

Fitts RH, Metzger JM, Riley DA and Unsworth BR (1986) Models of disuse: a comparison of hindlimb suspension and immobilization. J Appl Physiol (1985) 60, 1946-1953.

Gardetto PR, Schluter JM and Fitts RH (1989) Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. J Appl Physiol (1985) 66, 2739-2749.

Gilpin SA, Gosling JA, Smith AR and Warrell DW (1989) The pathogenesis of genitourinary prolapse and stress incontinence of urine. A histological and histochemical study. Br J Obstet Gynaecol 96, 15-23.

Higashino K, Matsuura T, Suganuma K, Yukata K, Nishisho T and Yasui N (2013) Early changes in muscle atrophy and muscle fiber type conversion after spinal cord transection and peripheral nerve transection in rats. J Neuroeng Rehabil 10, 46.

Ijkema-Paassen J, Meek MF and Gramsbergen A (2001) Muscle differentiation after sciatic nerve transection and reinnervation in adult rats. Ann Anat 183, 369-377.

Jaweed MM, Herbison GJ and Ditunno JF (1975) Denervation and reinnervation of fast and slow muscles. A histochemical study in rats. J Histochem Cytochem 23, 808-827.

Kaiho Y, Kamo I, Chancellor MB, Arai Y, de Groat WC and Yoshimura N (2007) Role of noradrenergic pathways in sneeze-induced urethral continence reflex in rats. Am J Physiol Renal Physiol 292, F639-F646.

Kamo I, Kaiho Y, Canon TW, Chancellor MB, de Groat WC, Prantil RL, Vorp DA and Yoshimura N (2006) Functional analysis of active urethral closure mechanisms under sneeze induced stress condition in a rat model of birth trauma. J Urol 176, 2711-2715.

Kamo I and Hashimoto T (2007) Involvement of reflex urethral closure mechanisms in urethral resistance under momentary stress condition induced by electrical stimulation of rat abdomen. Am J Physiol Renal Physiol 293, F920-F926.

Kitta T, Miyazato M, Chancellor MB, de Groat WC, Nonomura K and Yoshimura N (2010) Alpha2-adrenoceptor blockade potentiates the effect of duloxetine on sneeze induced urethral continence reflex in rats. J Urol 184, 762-768.

Lien KC, Morgan DM, Delancey JO and Ashton-Miller JA (2005) Pudendal nerve stretch during vaginal birth: a 3D computer simulation. Am J Obstet Gynecol 192, 1669-1676.

Lien KC, Mooney B, DeLancey JO and Ashton-Miller JA (2004) Levator ani muscle stretch induced by simulated vaginal birth. Obstet Gynecol 103, 31-40.

Memon H and Handa VL (2012) Pelvic floor disorders following vaginal or cesarean delivery. Curr Opin Obstet Gynecol 24, 349-354.

Meyer S, de Grandi P, Kuntzer T, Hürlimann P and Schmidt N (1993) Birth trauma: its effect on the urine continence mechanisms. Gynakol Geburtshilfliche Rundsch 33, 236-242.

Meyer S, Schreyer A, De Grandi P and Hohlfeld P (1998) The effects of birth on urinary continence mechanisms and other pelvic-floor characteristics. Obstet Gynecol 92, 613-618.

Milsom I, Altman D, Cartwright R, Lapitan MC, Nelson R, Sjöström S and Tikkenen K (2023) In Incontinence 7th Edition (2023). ICI-ICS, Cardozo L, Rovner E, Wagg A, Wein A and Abrams P, eds (International Continence Society: Bristol, UK) pp. 17-130.

Morley R, Cumming J and Weller R (1996) Morphology and neuropathology of the pelvic floor in patients with stress incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 7, 3-12.

Mu L, Chen J, Li J, Nyirenda T, Fowkes M and Sobotka S (2018) Immunohistochemical Detection of Motor Endplates in the Long-Term Denervated Muscle. J Reconstr Microsurg 34, 348-358.

Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Kawano F, Wang XD, Higo Y, Terada M, Matsuoka Y, Roy RR and Edgerton VR (2006) The role of neural and mechanical influences in maintaining normal fast and slow muscle properties. Cells Tissues Organs 182, 129-42.

Ouchi M, Kitta T, Kanno Y, Higuchi M, Togo M, Moriya K and Shinohara N (2018) Effect of a 5-HT2c receptor agonist on urethral closure mechanisms in female rats. Neurourol Urodyn 37, 2382-2388.

Pacheco P, Martinez-Gomez M, Whipple B, Beyer C and Komisaruk BR (1989) Somato-motor components of the pelvic and pudendal nerves of the female rat. Brain Res 490, 85-94.

Pan HQ, Kerns JM, Lin DL, Liu S, Esparza N and Damaser MS (2007) Increased duration of simulated childbirth injuries results in increased time to recovery. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 292, R1738-R1744.

Ptak M, Ciećwież S, Brodowska A, Starczewski A, Nawrocka-Rutkowska J, Diaz-Mohedo E and Rotter I (2019) The Effect of Pelvic Floor Muscles Exercise on Quality of Life in Women with Stress Urinary Incontinence and Its Relationship with Vaginal Deliveries: A Randomized Trial. Biomed Res Int 2019, 5321864.

Riley DA, Slocum GR, Bain JL, Sedlak FR, Sowa TE and Mellender JW (1990). Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. J Appl Physiol (1985) 69, 58-66.

Rortveit G, Daltveit AK, Hannestad YS and Hunskaar S; Norwegian EPINCONT Study (2003)

Urinary incontinence after vaginal delivery or cesarean section. N Engl J Med 348, 900-907.

Roy RR, Baldwin KM and Edgerton VR (1991) The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. Exerc Sport Sci Rev 19, 269-312.

Sakakima H, Kawamata S, Kai S, Ozawa J and Matsuura N (2000) Effects of short-term denervation and subsequent reinnervation on motor endplates and the soleus muscle in the rat. Arch Histol Cytol 63, 495-506.

Sakakima H and Yoshida Y (2003) Effects of short duration static stretching on the denervated and reinnervated soleus muscle morphology in the rat. Arch Phys Med Rehabil 84, 1339-1342.

Steffen JM and Musacchia XJ (1986) Spaceflight effects on adult rat muscle protein, nucleic acids, and amino acids. Am J Physiol 251, R1059-R1063.

Tähtinen RM, Cartwright R, Tsui JF, Aaltonen RL, Aoki Y, Cárdenas JL, El Dib R, Joronen KM, Al Juaid S, Kalantan S, et al (2016) Long-term Impact of Mode of Delivery on Stress Urinary Incontinence and Urgency Urinary Incontinence: A Systematic Review and Meta-analysis. Eur Urol 70, 148-158.

Thomason DB, Biggs RB and Booth FW (1989) Protein metabolism and beta-myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. Am J Physiol 257, R300-R305.

Thompson LV, Johnson SA and Shoeman JA (1998) Single soleus muscle fiber function after hindlimb unweighting in adult and aged rats. J Appl Physiol (1985) 84, 1937-1942.

Thor KB, and de Groat WC (2010) Neural control of the female urethral and anal rhabdosphincters and pelvic floor muscles. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 299, R416-R438.

Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H and Carlson BM (1997) Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. Anat Rec 248, 346-354.

Viktrup L, Lose G, Rolff M and Barfoed K (1992) The symptom of stress incontinence caused by pregnancy or delivery in primiparas. Obstet Gynecol 79, 945-949.

Weidner AC, Jamison MG, Branham V, South MM, Borawski KM and Romero AA (2006) Neuropathic injury to the levator ani occurs in 1 in 4 primiparous women. Am J Obstet Gynecol 195, 1851-1856.

Wyndaele JJ (2016) Study on the influence of the type of current and the frequency of impulses used for electrical stimulation on the contraction of pelvic floor muscles with different fibre content. Scand J Urol 50, 228-233.

Yoshikawa S, Sumino Y, Kwon J, Suzuki T, Kitta T, Miyazato M and Yoshimura N (2017) Effects of multiple simulated birth traumas on urethral continence function in rats. Am J Physiol Renal Physiol 313, F1089-F1096.