

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791886

研究課題名（和文） 嗅覚神経系の発達・加齢変化 —3次元ステレオロジー解析—

研究課題名（英文） Development and aging of the olfactory system

研究代表者

川岸 久太郎（KAWAGISHI KYUTARO）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：40313845

研究成果の概要（和文）：

ラット各週齢における鼻腔内の嗅覚器・すなわち嗅上皮及び鋤鼻器において成熟した嗅神経細胞マーカーである抗嗅覚標識蛋白（以下 OMP）抗体陽性の神経細胞数を測定した。

結果、ラット鼻腔における嗅上皮における OMP 陽性細胞数は新生児期（P0）で 52 万±1 万であるのに対し、成長に伴い成獣期（8w）では 2120 万±81 万となることが明らかとなった。すべての時期を通して明らかな左右差や性差は認められなかった。一方、鋤鼻器は、新生児期（P0）で 6 千±867 であるのに対し、成長に伴い成獣期（8w）では 24 万±3 万となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the total numbers of the olfactory receptor neurons in the olfactory epithelium (OE) and vomeronasal organ (VNO) of newborn and adult rats. The olfactory receptor neurons were stained immunohistochemically by using an anti-olfactory marker protein antibody. The total numbers of the olfactory receptor neurons were counted with a computer assisted stereological microscope. We concluded that the total numbers of the olfactory receptor neurons in the OEs were 520,000 ± 10,000 in newborn rats and 21,200,000 ± 810,000 in young adult (8w) rats, and that the total numbers of the olfactory receptor neurons in the VNOs were 6,000 ± 867 in newborn rats and 240,000 ± 30,000 in young adult rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：嗅覚機能・正常発達・加齢変化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病(Alzheimer's Disease)は認知機能低下や人格変化を伴う認知症の一種であり、日本国内においては有病者約 60～100 万人(推計)と、「脳血管性痴呆」、「レビー小体型認知症」と並び最も多い疾患である。

このアルツハイマー病は潜行性に発症し、最終的には全般性痴呆を呈するが、早期発見による治療により症状の進行が抑えられることも知られている。アルツハイマー病の早期発見の手法の一つとして嗅覚機能検査の有効性が知られており(Schiffman SS.Taste and smell losses in

normal aging and disease. JAMA. 1997;278(16):1357-62.)、また嗅覚機能はそれ以外にも様々な神経変性疾患の早期発見にも関連して注目されている。

しかし、嗅覚機能に関する嗅神経細胞や嗅球神経細胞の加齢変化や性差、特に実数としての細胞数は未だ明らかになっておらず、この究明が基礎研究として今後の研究発展のために必要と考えられた。

(2) 嗅覚機能に関し、申請者らの ZnSO<sub>4</sub> を用いた嗅上皮障害実験では、哺乳期のラットにおける嗅覚機能維持のための必要最低限の嗅神経細胞数は約 50 % であることが明らかとなっている。(Kawagishi K et. al. Determination of functionally essential neuronal population of the olfactory epithelium for nipple search and subsequent suckling behavior in newborn rats. Brain Res. 2009;1276:50-7.)。

またその後の申請者らの研究では成長し、週齢が増えても嗅覚機能維持のための必要最低限の嗅神経細胞数は約 50 % であることが明らかとなっている。

しかし上記結果では週齢にかかわらず必要な嗅神経細胞数は約 50% であるが、鼻腔の容積や上皮内の正常嗅神経細胞数は週齢により大きく変化する。2 日齢 (P2) や 8 日齢 (P8) の哺乳期であっても 500  $\mu$  m 間隔の細胞計測で正常嗅神経細胞数は約 5,000 個 (P2) ~ 約 13,000 個 (P8) と倍以上異なっていた。

(3) さらに申請者らは 8 週齢(8w)の正常ラットにおいて嗅上皮の嗅神経細胞数を明らかにするためステレオロジー解析装置を用いて嗅神経細胞数の測定を行い、その細胞数が約 20,000,000 個であることが明らかにしている。

このようにステレオロジーの手法を用いると細胞総数が統計学的に正しいとされる実数として求められる点が利点である。

このため、申請者らは新生児期から老齢期までの正常なラットの嗅神経細胞数をステレオロジーの手法を用いて明らかにする着想を得た。

## 2. 研究の目的

嗅覚系の神経細胞と機能は、神経再生やアルツハイマー病等の神経変性疾患との関連で注目されている。しかし多くの実験でモデルとなる齧歯類において、鼻腔の構造や容積は加齢に伴い大きく変化するにもかかわらず、正常の嗅神経細胞数や加齢に伴う神経細

胞数の変化、性差は明らかになっていない。

また、嗅神経細胞から入力を受ける嗅球は動物の一生を通し新生神経細胞が供給される特殊な部位であるが、加齢に伴う正確な神経細胞数の変化も明らかとなっていない。

本研究では、膨大な量の細胞計測を、統計学的手法を用いて測定するステレオロジーの手法を用い、ラットの嗅上皮および嗅球における神経細胞の加齢変化を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用動物

正常 Wistar ラットの週齢をそろえ、新生児期 (P0)、哺乳中期 (P7)、哺乳後期 (P14)、若年期(4w)、成熟期 (8w) のそれぞれの雌雄ラット(各週齢雄雌 6 匹ずつ)を飼育した。

### (2) 標本作成

①週齢が達したのものから 4 % パラフォルムアルデヒド溶液にて還流固定を行い、鼻腔(頭蓋骨)と嗅球を一体として摘出した。

②摘出した頭蓋骨を EDTA 溶液に浸し脱灰を行った。なお、通常成獣の頭蓋骨の薄切標本作成は困難であるが、我々の以前の研究から EDTA により 1 か月程度脱灰すると鼻腔内上皮や嗅球の構造を残したまま薄切標本が作製できることが明らかになっている。

③ 脱灰した頭蓋骨および嗅球をパラフィン包埋し 10  $\mu$  m の厚さで前額断し連続切片を作成した。

なお、ステレオロジー計測法では 3D で細胞計測を行う為、最低でも 10  $\mu$  m 以上の厚さが必要である。また、正確な計測の為必ず等間隔の切片が必要なため連続切片を作成した。

### (3) 免疫科学組織法による染色

薄切切片を嗅神経のマーカーである OMP (Olfactory marker protein) 免疫染色で染色した。OMP (Olfactory Marker Protein) は、嗅球と結合して機能している嗅神経に発現する蛋白で、細胞体や軸索で認められる (図 1)。

次頁図 1: 新生児ラット鼻腔の前額断 OMP 染色組織像 A: 鼻腔 (NC) 全体像で、嗅神経から投射を受ける嗅球も OMP 陽性に染まっている。B: 嗅上皮の強拡大像。機能している嗅神経細胞が染色されている。

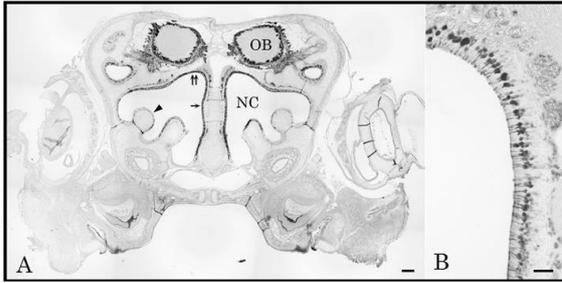


図1：新生児ラット鼻腔の前額断 OMP 染色組織像

(4) 鼻腔内の各嗅覚器の前後長の計測

鼻腔内には嗅上皮(Main Olfactory Epithelium：MOE)以外にも、吻側より Gruenberg Ganglion (GG) や鋤鼻器 (Vomeronasal Organ：VNO)、Septal Organ (SO)が存在している(図2)。OMP 陽性神経細胞の観察により鼻腔内に存在する嗅覚器の前後長を計測した。

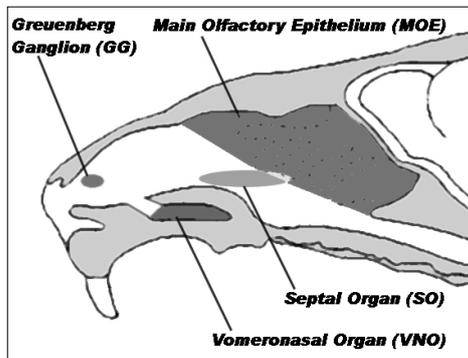


図2：ラット鼻腔内の各嗅覚器の位置(模式図)

(5) ステレオロジー法を用いた細胞計測

嗅上皮及び鋤鼻(VNO)上皮 OMP 陽性嗅神経細胞をステレオロジー解析装置 (Stereoinvestigator：MBF Bioscience, USA) (図3) を用いて計測し、嗅神経細胞数を明らかにした。

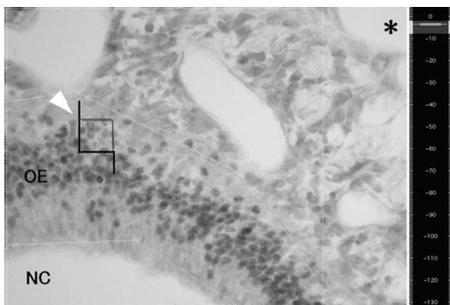


図3：ステレオロジー細胞計測の画面  
3次元で正確に細胞数を計測するため、枠内(白矢頭)かつ一定の深度(アスタリスク)内の細胞のみ計測し統計学的手法を用いて正確な細胞数を算出する。

ステレオロジーは一定の体積内に存在する物質や細胞を代表点の計測より求める統計学的手法であり、最小限の誤差で計測可能である。

4. 研究成果

(1) まず、我々は嗅上皮およびその他の嗅覚器の前後長が成長・加齢に伴いどのように変化するかを明らかにした。

その結果、P0～8w 齢において鼻腔の前後長は性差なく約4倍となることが明らかとなった(図4)。また、鼻腔内には嗅上皮(Main Olfactory Epithelium:MOE)以外にも Gruenberg Ganglion や鋤鼻器 (Vomeronasal Organ：VNO)、Septal Organ (SO)が存在している。これらの嗅覚器も成長に伴い前後長が伸長していることが明らかとなった。但し、その成長速度は嗅覚器により異なり、嗅上皮はP0の約5000 μmから8wの約15000 μmと約3倍になるのに対し、VNOはP0の約2200 μmが8wでは5500 μmと2.5倍となった。

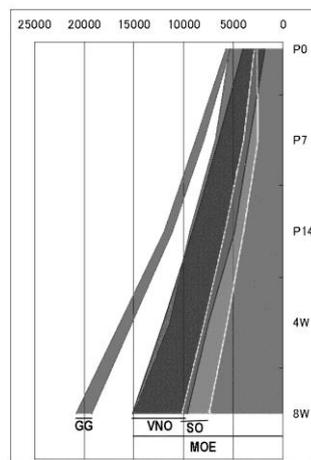


図4：Wistarラット鼻腔内の各嗅覚器の前後長の成長に伴う変化  
GG: Gruenberg Ganglion, VNO: Vomeronasal Organ, SO: Septal Organ, MOE: Main Olfactory Epithelium  
単位：μm

(2) さらにステレオロジーの手法を用いて新生児期のP0及び成獣である8w 齢のWistarラットの嗅上皮及び鋤鼻上皮のOMP陽性嗅神経細胞数を計測した。

①その結果、P0では嗅上皮のOMP陽性嗅神経細胞数は約510000～530000個で、平均520000±10000個であることが明らかとなった。また、8wの嗅上皮OMP陽性嗅神経細胞数は20700000～2270000個で、平均21200000±810000個であることが明らかとなった。P0・8wともに左右差は存在せず、明らかな性差も認められなかった。

②鋤鼻 (VNO) における OMP 陽性神経細胞数は P0 では 4670~6670 個で、平均  $6000 \pm 867$  個なのに対し、8w では 200000~290000 個で、平均  $240000 \pm 30000$  個であることが明らかとなった。さらに明らかな左右差や性差は認められなかった。

③これらの結果を総合すると、Wistar ラットは生後、骨格の成長に伴い鼻腔の前後長も増大するが、その際に P0 から 8 週にかけて嗅上皮も約 3 倍の長さになることが明らかとなった。嗅上皮に存在する OMP 陽性神経細胞数は前後長の変化だけでなく、鼻甲介の発達による表面積の増加に伴い 52 万個から 2120 万個と約 40 倍増加することが明らかとなった。また鋤鼻においても P0 から 8w にかけて 6000 個から 240000 個と約 40 倍に増加していることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

①川岸久太郎, 安藤舞, 横内久美子, 住友憲深, 平山周一, 福島菜奈恵, 森泉哲次, 歯類嗅上皮における嗅神経細胞数のステレオロジーを用いた比較, 第 118 回日本解剖学会, 2013. 03. 29, 高松

②安藤舞, 横内久美子, 住友憲深, 平山周一, 福島菜奈恵, 森泉哲次, 川岸久太郎, 新生児期及び成熟期ラットの嗅上皮と鋤鼻上皮における嗅神経細胞数とその性差, 第 118 回日本解剖学会, 2013. 03. 29, 高松

③安藤舞, 横内久美子, 住友憲深, 平山周一, 森泉哲次, 川岸久太郎, ラット嗅上皮における嗅神経細胞数のステレオロジー解析, 第 46 回日本味と匂学会, 2012. 10. 03, 大阪

④安藤舞, 横内久美子, 福島菜奈恵, 住友憲深, 掛川晃, 森泉哲次, 川岸久太郎, ラット鋤鼻器の発達に伴う神経細胞数のステレオロジー解析, 第 117 回日本解剖学会, 2012. 03. 26, 山梨

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI KYUTARO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 40313845

### (2) 研究協力者

安藤 舞 (ANDO MAI)

信州大学・医学系研究科・大学院生

研究者番号: なし