

平成21年 5月 1日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591668

研究課題名 (和文) 脳内伝導路の自然再生の再検討

研究課題名 (英文) Re-examination of spontaneous regeneration of the brain fiber tract

研究代表者

森泉 哲次 (MORIZUMI TETSUJI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：70157874

研究成果の概要：脳内伝導路の再生は脳科学にとって重要な課題である。本研究は、嗅覚系の主要な脳内伝導路である外側嗅索を研究対象として、傷害を受けた伝導路の自然再生の可能性を実験的に検討した。出生直後の新生児ラットの外側嗅索を切断し、完全切断が確認されたラットについて、その後一定期間（切断2週・4週・6週・8週）経過後に、種々の神経トレーサーを用いて、傷害を受けた神経軸索が伸長し、切断部を越えて自然再生されることを形態学的に証明することができた。成熟ラットの脳内伝導路の再生に向けて、重要な基礎的データを提供できたものと思われる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：自然再生 脳内伝導路 外側嗅索 嗅覚

## 1. 研究開始当初の背景

傷害された脳領域の機能的再生は現在なお達成されたとはいいがたく、脳内伝導路の再生は脳科学にとって重要な課題である。その意味でも、1997年に発表された中枢神経伝導路の自然再生を報告した論文 (Munirathinam S. et al. Regeneration of the olfactory tract following neonatal lesion in rats. *Exp Neurol* 144: 174-182, 1997) は

興味深い。論文を概略すると、新生児ラットの嗅覚伝導路である嗅索を切断し、8ヵ月後に神経トレーサーを嗅索後方の嗅皮質に注入すると、嗅球の投射ニューロンが神経トレーサーで逆行性に標識されるようになるというものである。つまり、8ヶ月後に、中枢神経伝導路の自然再生がおこるという内容である。

## 2. 研究の目的

しかしながら、上記の論文を批判的に読むと、以下の重要な問題点が指摘できる。

(1) 嗅覚伝導路の切断について：嗅索を切断したと記載されているが、嗅覚伝導路（外側嗅索）が完全切断されたかどうかの客観的指標がなく、8ヶ月後に神経トレーサーで標識された嗅球投射ニューロンは新生児期に軸索切断（Axotomy）されたかどうか判定できない。むしろ、新生児期に切断されなかったニューロンである可能性が否定できない。

(2) 神経細胞死について：外側嗅索の切断により、Axotomyされた嗅球投射ニューロンが細胞死を起こすのかについて不明である。新生児期の幼弱ニューロンは一般に軸索損傷または入力遮断により、細胞死をおこしやすいという特徴がある。

(3) 順行性神経トレーサーによる再生伝導路の直接証明について：外側嗅索の再生の証明は、神経トレーサーの逆行性輸送のみによってなされており、切断部を越えて伸長する再生神経線維が直接に証明されていない。

(4) 再生に要する期間について：神経軸索の再生に、8ヶ月もの長い期間が必要であるか疑問が残る。

これらの点を踏まえて、実験的に厳密な検証を加え、脳内伝導路再生の諸条件を明らかにすることを目的に本研究を行った。

## 3. 研究の方法

研究方法の特徴について、以下に概説する。

(1) 嗅覚伝導路である外側嗅索を選択的に切断し、外側嗅索以外の嗅索の構造は温存する。

(2) 外側嗅索切断が完全になされたかを客観的に評価する（完全切断・不完全切断・未切断）ために、切断と同時に逆行性の神経トレーサー（Fast Blue: FBまたはFluoro-Gold: FG）を切断遠位部の嗅皮質に注入する。

(3) 外側嗅索の完全切断（Axotomy）で、嗅球投射ニューロンに神経細胞死がおこるかどうか検討する。

(4) 一定期間後に、別の逆行性の神経トレーサーを切断遠位部の嗅皮質に注入し、伝導路の再生を終末側から細胞体側に向かって、切断部を越えて逆行性に神経トレーサーが軸索輸送されることを、形態学的に証明する。

(5) 順行性の神経トレーサー（BDA10000）を神経細胞体のある嗅球に注入し、外側嗅索の再生を細胞体側から終末側に向かって、切断部を越えて順行性に神経トレーサーが軸索輸送されることを、形態学的に証明する。

(6) 形態学的な再生が、外側嗅索切断後、いつ起こるかを確定する。

(7) 外側嗅索切断の時期（哺乳初期 哺乳中

期 哺乳後期 離乳期 成熟期）による自然再生能の違いを確定する。

(8) 機能的にも再生されているか（嗅覚機能が維持されているか）を検討する。

## 4. 研究成果

新生児ラットの外側嗅索を切断し、切断直後に神経トレーサー（FBまたはFG）を注入し、経時的に8週齢まで生存させ、脳を採取して、肉眼的並びに蛍光顕微鏡で嗅覚神経系を検索した。その結果、完全切断例では、肉眼的にも白色の外側嗅索がまったく形成されず、さらに嗅球投射ニューロン（僧帽細胞）も神経トレーサーでまったく標識されることが判明した。不完全切断例では、外側嗅索は形成されるが細く、僧帽細胞も一部が神経トレーサーで標識された。また、未切断例では、外側嗅索は非切断側と同様の正常な形状を呈し、多数の僧帽細胞が神経トレーサーで標識された。以上の結果から、外側嗅索の肉眼的形状と嗅球投射ニューロンの神経トレーサーによる標識により、伝導路切断の客観評価（完全切断・不完全切断・未切断）が正確にできることが判明した。

新生児ラットについて、嗅球投射ニューロンの軸索（外側嗅索）切断と嗅神経の入力遮断（硫酸亜鉛）を左側に行い、外側嗅索に投射線維を送っている僧帽細胞が細胞死を起こすかどうか検討した。切断1週・4週後に脳を固定・摘出し、200 $\mu$ m間隔で5 $\mu$ m厚のパラフィン切片を作成し、僧帽細胞数を計測した。神経トレーサーで完全切断と評価されたラットのみを検索対象とした。完全切断1週では平均左94.5個/mm右95.3個/mm、完全切断4週では平均左41.8個/mm右42.5個/mmと左右差がなかった。非切断側（右側：100%）に対する切断側（左側）の単位長さあたりの僧帽細胞数の比率を求めた。完全切断1週では、切断側の単位長さあたりの僧帽細胞数は、非切断側（100%）の92.8—108.6（99.1 $\pm$ 5.4）%であった。完全切断4週では、切断側の単位長さあたりの僧帽細胞数は、非切断側（100%）の94.4—105.4（98.4 $\pm$ 3.9）%であった。以上の結果より、新生児期の嗅球投射ニューロンは、入力遮断や出力軸索の損傷後も、細胞死に陥らないと結論された。

新生児ラットの左側の外側嗅索を細い注射針（27G）で鋭利に切断し、切断直後に神経トレーサー（FB）を切断後方部の嗅皮質に微量注入（0.1~0.2 $\mu$ l）した。一定期間（切断2週・4週・6週・8週）経過後に、成長したラットに対して、別の神経トレーサー（FG）を前回の注入部位に相当すると思われる切断

後方部の嗅皮質に注入(2週:0.2  $\mu$ l; 4週:0.4  $\mu$ l; 6週 & 8週:0.5  $\mu$ l)し、2日後に脳を固定・採取した。嗅球・外側嗅索切断部・神経トレーサー注入部位について、30  $\mu$ m厚の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。前述した様に、新生児期の外側嗅索切断時に注入した神経トレーサー(FB)で、嗅球投射ニューロンが標識された不完全切断・未切断例が、約半数で認められ、これらのケースは実験対象から除外した。外側嗅索が未形成で、FB(+)嗅球投射ニューロンが全く無い完全切断が確認されたケースで、成長後に注入した神経トレーサー(FG)が、注入部位から切断部を越えて、細胞体のある嗅球に軸索輸送されることが確認できた。FG(+)嗅球投射ニューロンが多数認められ、これらは切断部を越えて再生神経線維を伸長させたニューロン群であると結論できた。

新生児ラットの外側嗅索切断と神経トレーサー(FB)の嗅皮質への微量注入を行い、一定期間(4週&8週)成長させたラットに対して、順行性の神経トレーサー(BDA10000)を嗅球全体に注入(0.2  $\mu$ l X 10箇所)し、2週後に脳を固定・採取した。嗅球・外側嗅索切断部・神経トレーサー注入部位について、30  $\mu$ m厚の凍結切片を作成し、BDA反応後に、顕微鏡で観察した。外側嗅索が未形成で、FB(+)嗅球投射ニューロンが全く無い完全切断が確認されたケースで、成長後に注入した神経トレーサー(BDA10000)が、注入部位の細胞体のある嗅球から、切断部を越えて、後方部の嗅皮質に軸索輸送されることが確認できた。つまり、切断部を越えて伸長する再生神経線維の存在が、逆行性トレーサーと順行性トレーサーの両方で確かめられた。新生児期に傷害された嗅覚伝導路(外側嗅索)は、その後比較的早い時期に、自然再生されるという重要な事実を明らかにすることができた。

今後の明らかにすべき課題として、以下の項目が挙げられる。研究をさらに継続して、早期に結論を得たいと希望している。

- (1) 現在までの研究で、切断2週で再生がおこることが、逆行性トレーサーで明らかになった。さらにより早期(切断1週)におこるかどうかを確定する。
- (2) 出生直後(生後1日)の外側嗅索の切断では、自然再生が起こることが判明したが、発達期のどの時期(生後8日・15日・22日・8週)までの傷害ならば、自然再生が起こるかを確認する。
- (3) 切断2週・4週・8週後に、右嗅球吸引を行い、新生児期に外側嗅索切断を行った左側の嗅覚系に限定して、Nipple attachmentによる Suckling behavior やシクロヘキシミドによる Olfactory aversion behavior によ

り、嗅覚機能が維持されているかどうかを調べて、形態的のみならず、機能的にも再生されているかどうかを検討したい。

#### 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)

[雑誌論文](計 1 件)

① Kawagishi K, Yokouchi K, Fukushima N, Sakamoto M, Sumitomo N, Moriizumi T. Determination of functionally essential neuronal population of the olfactory epithelium for nipple search and subsequent suckling behavior in newborn rats. Brain Res in press, 2009 doi: 10.1016/j.brainres.2009.04.032 (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

① 横内 久美子、川岸 久太郎、福島 菜奈恵、森泉 哲次 Nipple search に関連した嗅覚伝導路の同定 第114回日本解剖学会総会、2009.3.28、岡山

② 川岸 久太郎、横内 久美子、福島 菜奈恵、森泉 哲次 新生児ラットにおける哺乳のための嗅覚機能発現に必要な嗅神経細胞数 第114回日本解剖学会総会、2009.3.28、岡山

③ 坂本 道雄、横内 久美子、川岸 久太郎、福島 菜奈恵、森泉 哲次 新生児ラットにおける外側嗅索切断後の嗅球投射ニューロンの細胞死の検討 日本味と匂学会第42回大会、2008.9.18、富山

④ 横内 久美子、坂本 道雄、川岸 久太郎、福島 菜奈恵、森泉 哲次 哺乳と嗅球投射ニューロンの相関—新生児ラットにおける研究— 日本味と匂学会第42回大会、2008.9.18、富山

⑤川岸 久太郎、横内 久美子、坂本 道雄、  
福島 菜奈恵、森泉 哲次 哺乳と嗅細胞の  
相関—新生児ラットにおける研究— 日本  
味と匂学会第42回大会、2008.9.18、富山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森泉 哲次 (MORIIZUMI TETSUJI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：70157874

### (2) 研究分担者

福島 菜奈恵 (FUKUSHIMA NANAЕ)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：90334888

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI KYUTARO)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：40313845

横内 久美子 (YOKOUCHI KUMIKO)  
信州大学・医学部・技術専門職員  
研究者番号：なし

住友 憲深 (SUMITOMO NORIMI)  
信州大学・医学部・技術職員  
研究者番号：なし

坂本 道雄 (SAKAMOTO MICHIO)  
信州大学・医学部・大学院生  
研究者番号：なし

関口 泰之 (SEKIGUCHI YASUYUKI)  
信州大学・医学部・大学院生  
研究者番号：なし