

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592175

研究課題名（和文） 哺乳に関連した嗅覚系ニューロンの統合的解析

研究課題名（英文） Integrative studies on suckling-related olfactory neurons

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

研究成果の概要（和文）：哺乳行動に必要な最小単位の嗅覚系ニューロン数を新生児ラットで調べた。嗅覚受容器ニューロンは正常値の約50%以上、嗅球投射ニューロンは正常値の約40%以上存在すれば、哺乳のための嗅覚機能は正常に維持されることが判明した。また、哺乳のための嗅覚情報は、嗅覚伝導路である外側嗅索を経由すること、さらに、新生児ラットの外側嗅索は切断後約2週間で機能回復し、哺乳可能となることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Neuronal populations essential for nipple search, nipple attachment and subsequent suckling behavior were determined to be approximately 50% and 40% of normal values of olfactory receptor neurons and bulbar projection neurons in neonatal rats. Further, suckling-related olfactory information was demonstrated to be conveyed via the lateral olfactory tract and its functional recovery was determined to occur approximately 2 weeks after the tract transection of neonatal rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・鼻科学

キーワード：嗅覚、哺乳、ニューロン

1. 研究開始当初の背景

これまで哺乳における口腔領域の運動・知覚の役割を知る目的で研究し、哺乳に関連した感覚情報として、上唇の知覚と舌の知覚の重要性を報告してきた。嗅覚は哺乳行動のスタートとなる Nipple search に必須の感覚情報であることから、哺乳における嗅覚系の役割をより統合的に解析することを目的に、本研究を計画した。

2. 研究の目的

嗅覚情報は、2つのニューロンシステムで嗅皮質に伝達される。1つは、鼻粘膜の嗅上皮に存在する嗅覚受容器ニューロンで、その神経線維は第一脳神経である嗅神経を形成し、脳の嗅球に連絡する。もう1つは、嗅神経入力を受けた嗅球投射ニューロンで、その神経線維は外側嗅索（脳内の主要な嗅覚伝導路）を形成し嗅皮質に連絡する。どの程度までニューロンが傷害されても、嗅覚機能は維持さ

れるか、またどの程度以上にニューロンが傷害されれば、嗅覚機能は消失するか未解明の点が少なくない。そこで、嗅覚受容器ニューロンと嗅球投射ニューロンの2つのレベルで、ニューロンを様々な程度に傷害し、哺乳 (Nipple search, nipple attachment and subsequent suckling behavior) に最小限必要なニューロン閾値 (嗅覚機能発現に必要な最小のニューロン数) を求めることを主たる目的として、本研究を実施した。その他、哺乳 (Nipple search) に関連した嗅覚伝導路が外側嗅索を経由するか、哺乳が傷害される外側嗅索切断のレベルはどこか、外側嗅索切断後の自然再生における哺乳開始時期 (機能発現の時期) はいつか等の哺乳に関連した諸課題についても解明を試みた。また、今後重要な研究課題となることが予想される信頼性の高いニューロンの定量化が可能かどうか、嗅上皮の受容器ニューロンと嗅球の投射ニューロンについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 嗅覚受容器ニューロンの計測

生後1日の新生児ラットにおいて、哺乳のための嗅覚機能発現に必要な嗅覚受容器ニューロン数を計測した。一侧の嗅球を除去し、他側の鼻腔に $ZnSO_4$ 溶液を数回注入し様々な程度の嗅上皮障害モデルを作成した。哺乳の有無は、Nipple attachment と胃内ミルクで判定した。鼻腔・嗅球の $500\mu m$ 間隔のパラフィン切片を作成し、嗅覚受容器ニューロンのマーカーである Olfactory Marker Protein (OMP) 抗体を用いて、OMP (+) 嗅細胞 (嗅覚受容器ニューロン) を計測した。

(2) 嗅球投射ニューロンの計測

同様の方法で、新生児ラットを用いて、哺乳のための嗅覚機能発現に必要な嗅球投射ニューロン (僧帽細胞) を計測した。生後1日の新生児ラットの右側の嗅球を除去し、左側の嗅覚伝導路 (外側嗅索: LOT) をガラスマイクロピペットで様々な程度に損傷した。哺乳の有無は、Nipple attachment と胃内ミルクで判定した。神経トレーサー (FG: Fluoro-Gold) を外側嗅索損傷部後方の嗅皮質 (梨状皮質) に注入し、軸索損傷を免れた FG (+) 僧帽細胞 (嗅球投射ニューロン) を標識した。パラホルムアルデヒド溶液で還流固定し、嗅球を含む脳を摘出した。嗅球・嗅索は、パラフィン切片 (前頭断・ $5\mu m$ 厚・ $100\mu m$ 間隔) を作成し、FG 注入部は、凍結切片 (前頭断・ $50\mu m$ 厚・ $100\mu m$ 間隔) を作成した。嗅球投射ニューロンの定量化は、細胞核を有する FG (+) 僧帽細胞を $100\mu m$ 間隔のすべての嗅球切片で計測を行った。哺乳機能で2群に分けら

れた個々の外側嗅索損傷ラットについて、すべての FG (+) 僧帽細胞を計測した。

(3) 外側嗅索切断実験

哺乳 (Nipple search) の嗅覚情報は、当然外側嗅索経由であると考えていたが、文献的に詳しく調べた所、“成熟ラットの外側嗅索切断は無嗅覚をおこさない”との論文 (Brain Res Bull 5: 141-145 (1979)) が報告されていた。このため、今回外側嗅索切断により、嗅覚障害が確実に起こることを成熟ラットで証明する実験を行った。成熟ラットの右側の嗅球を吸引除去し、左側の外側嗅索を嗅球後端から中大脳動脈までの様々なレベルで鋭利に切断した。3日間絶水させたのち、水と 0.01% シクロヘキシミド溶液を用いて、嗅覚機能 (olfactory discrimination test) を調べた。嗅覚機能検査後、外側嗅索が完全に切断されていることを確認する目的で、左嗅球に順行性の神経トレーサーを注入した。3日後に還流固定を行い、脳を採取した。 0.1 mm スケールのマイクロメジャーを用いて、中大脳動脈から外側嗅索切断部までの距離を計測した。新生児ラットについては、右嗅球を除去後、嗅球に近い外側嗅索の切断と嗅球から離れた外側嗅索の切断を左側で行い、哺乳の有無を判定した。

(4) 外側嗅索切断後の哺乳開始時期

哺乳初期の新生児ラットでは、嗅覚系の脳内伝導路 (外側嗅索) は自然再生する。再生がいつおこるかは重要なテーマなので、再生時期 (哺乳能力獲得時期) を決定する実験を行った。生後2日の新生児ラットの左側の外側嗅索を切断し、術後母ラットに戻し生存させた。外側嗅索切断8~14日後に右側の嗅球を除去し、切断側の嗅覚神経系のみで哺乳が開始される時期を調べた。

(5) 嗅覚系ニューロンの定量化

Stereology とは、数・長さ・面積・表面積・体積など、2次元および3次元の構造物の幾何学的量を代表的な部位の計測から推定する統計的な方法論である。特に細胞数計測では、バイアスのかからないランダムな計測部位を設定し、さらに重複した細胞計測を避けるために立方体のうち、相対する一方の面にかかる細胞を棄却して細胞計測を行う。今回 Stereo Investigator (MBF Bioscience Inc.) の Optical Fractionator を用いて計測を行った。嗅覚受容器ニューロンは、8週齢の雄・雌ラットの嗅上皮の連続パラフィン切片 (前頭断・ $10\mu m$ 厚・ $100\mu m$ 間隔) を作成し、OMP

(+) の嗅覚受容器ニューロンを計測した。嗅球投射ニューロンは、12週齢の雌ラットの嗅皮質（嗅結節&梨状皮質）にFG注入を行い、嗅球の連続凍結切片（前頭断・50 μ m厚・200 μ m間隔）を作成し、FG (+)の嗅球投射ニューロンを計測した。

4. 研究成果

(1) 哺乳と嗅覚受容器ニューロン

正常・対照ラットのOMP (+) 嗅細胞は、4330, 4825, 4934, 5303, 5455 (n=5)であった。哺乳 (+)ラットのOMP (+) 嗅細胞は、2457, 2740, 3080, 3162, 3738, 4009, 4176, 4301, 4615 (n=9)で、哺乳 (-)ラットのOMP (+) 嗅細胞は、112, 150, 175, 191, 1043, 2074, 2177, 2217, 2398 (n=9)であった。正常・対照群のOMP (+) 嗅細胞を100%とすると、哺乳 (+)群のOMP (+) 嗅細胞は49-93%で、嗅覚 (-)群のOMP (+) 嗅細胞は2-48%であった。以上の結果より、1側に約50%の嗅覚受容器ニューロンが存在すれば哺乳のための嗅覚機能は正常に維持されるものと結論された。

(2) 哺乳と嗅球投射ニューロン

正常・対照ラットのFG (+)僧帽細胞は、3189, 3209, 3350, 3409 (n=4)であった。哺乳 (+)ラットのFG (+)僧帽細胞は、1203, 1360, 1454, 1534, 1568, 1583, 1586, 1641, 1781, 2046 (n=10)であった。哺乳 (-)ラットのFG (+)僧帽細胞は、460, 569, 1161, 1296 (n=4)であった。正常・対照群のFG (+)僧帽細胞を100%とすると、哺乳 (+)群のFG (+)僧帽細胞は37-62%で、嗅覚 (-)群のFG (+)僧帽細胞は14-39%であった。以上の結果より、1側に約40%の嗅球投射ニューロンが存在すれば、哺乳のための嗅覚機能は正常に維持されるものと結論された。

(3) 外側嗅索切断部位と嗅覚機能

成熟ラットでは、中大脳動脈から2.5mmを基準として、嗅球に近い外側嗅索を切断されたラットは無嗅覚となり、嗅球から離れた外側嗅索を切断されたラットは嗅覚機能を有していた。新生児ラットでも検討した結果、嗅球に近い外側嗅索を切断されたラットは哺乳不能となり、嗅球から離れた外側嗅索を切断されたラットは哺乳可能であるという同様な結果が得られた。今回の研究から、外側嗅索の切断はその傷害部位により嗅覚障害をきたす場合と嗅覚障害をきたさない場合があることが判明した。

(4) 外側嗅索の自然再生後の哺乳開始時期

左外側嗅索切断8~10日後に右嗅球を除去したラットは、哺乳不能で生存できなかった(n=6)。左外側嗅索切断11日後に右嗅球を除去したラットは、切断13日後に哺乳能力を獲得した(n=1)。左外側嗅索切断12日後に右嗅球を除去したラットは、切断13日後に哺乳能力を獲得した(n=3)。左外側嗅索切断13日後に右嗅球を除去したラット(n=2)は、切断14日後・15日後に哺乳能力を獲得した。左外側嗅索切断14日後に右嗅球を除去したラット(n=2)は、切断14日後・15日後に哺乳能力を獲得した。以上の結果より、自然再生後の哺乳開始時期は、外側嗅索切断13日後であることが判明した。新生児ラットの外側嗅索は、切断後約2週間で機能回復することが明らかになった。

(5) 嗅覚系ニューロンの定量解析

嗅覚受容器ニューロンは、雄ラットの右鼻腔では21173332で、左鼻腔では21260000であった。雌ラットの右鼻腔では21525000で、左鼻腔では21018332であった。性差・左右差がなく、1側の鼻腔には約2100万個の嗅覚受容器ニューロンが存在するという計測値が得られた。嗅球投射ニューロンは、25489, 26256, 27024であり、1側の嗅球には約2万6000個の嗅球投射ニューロンが存在するという計測値が得られた。今回の研究では、Stereologyを用いた定量解析は行わなかったが、特定ニューロンの定量解析には非常に有力であると思われた。

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)

[雑誌論文] (計 3件)

- ① Sekiguchi Y, Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Hirayama S, Moriizumi T. Functional correlation between olfaction and various sectioning of the lateral olfactory tract. *Neurosci Res* 73: 17-23 (2012), 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2012.02.006>
- ② Sakamoto M, Yokouchi K, Sekiguchi Y, Fukushima N, Kawagishi K, Kakegawa A, Sumitomo N, Moriizumi T. Re-evaluation of spontaneous regeneration of the lateral olfactory tract. *Neurosci Res* 68: 15-21 (2010), 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.05.004>

- ③ 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 1276: 50-57 (2009), 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.032>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 横内 久美子、福島 菜奈恵、川岸 久太郎、平山 周一、森泉 哲次 外側嗅索傷害部位と嗅覚機能との関係 日本味と匂学会第42回大会 2011.10.6、金沢
- ② 森泉 哲次、関口 泰之、横内 久美子、掛川 晃、福島 菜奈恵、川岸 久太郎 嗅球—嗅皮質投射システムの神経解剖学的解析 第33回日本神経科学大会 2010.9.4、神戸
- ③ 横内 久美子、関口 泰之、福島 菜奈恵、川岸 久太郎 森泉 哲次 外側嗅索の自然再生：臨界期と機能発現時期の決定 第33回日本神経科学大会 2010.9.4、神戸

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・准教授
研究者番号：90334888

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

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし

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

平山 周一 (HIRAYAMA SHUICHI)
信州大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし

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