

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462661

研究課題名(和文) 嗅覚器及び嗅球の神経細胞数のステレオロジーを用いた定量解析

研究課題名(英文) Stereological quantification of the total olfactory receptor neurons in the olfactory epithelium.

研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI, Kyutaro)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：40313845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの鼻腔にはGrueneberg ganglion・鋤鼻器(Vomerol nasal organ: VNO)・Septal organ・主嗅上皮と4種類の嗅覚器が存在する。その中で主嗅上皮は嗅覚をつかさどる主たる器官である。我々は実験動物としてひろく利用されているC57BL/6Jマウスの一側鼻腔の嗅上皮で、嗅球に投射して機能している嗅神経細胞数は成獣で約500万個であることを明らかにした。

またラットにおける一側鼻腔の嗅上皮に存在し、嗅球に投射して機能している嗅神経細胞数は新生児期では約50万個であるのに対し、生後8週の成獣では約2100万個であり2歳齢までほぼ不変であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The total number of olfactory marker protein (OMP) positive olfactory receptor neurons in the unilateral olfactory epithelium of adult mice was estimated by using stereology method. The number was approximately 5,000,000 in adult C57BL/6J mice.

Corresponding neuronal numbers were also estimated in newborn and adult Wistar rats. The numbers were approximately 500,000 in newborn rats and approximately 21,000,000 in 8 weeks old adult rats. In adult rats, the numbers of olfactory receptor neurons remained unchanged until 2 years old.

研究分野：神経科学

キーワード：嗅神経 神経総数 神経解剖 嗅覚

1. 研究開始当初の背景

鼻腔に存在する嗅神経は生涯にわたり神経再生が起こっており、嗅神経が投射する中枢神経系の神経再生とも相まって、神経再生の研究モデル部位として注目されている。また遺伝子レベルでは嗅神経の嗅覚レセプターの遺伝子発現機序が注目され 2004 年には Axel 博士と Buck 博士が同分野の研究でノーベル医学・生理学賞を受賞するなど多くの研究がなされている。しかし、基礎的な研究に目を向けてみると鼻腔の嗅上皮の細胞数など現在においても正確な数値は明らかになっていなかった。

そのような状況の下、中枢神経系の神経変性疾患において初期に嗅覚異常が出現することも明らかになってきており、臨床的にも嗅覚系の研究の重要度が高まっていた。

神経変性疾患のうち、特にアルツハイマー病 (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、最終的には全般的痴呆を呈するが、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。嗅覚機能検査がアルツハイマー病の早期発見の有効的手法の一つとして報告されており (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。(なお、嗅覚機能に関し、研究代表者らの ZnSO₄ 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.))

加えてその後の研究代表者の研究により、8 日齢 (P8) や 8 週齢 (8w) のラットにおいても嗅覚機能維持のためには約 50% の嗅神経細胞数が必要であることが明らかになっている。

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。このように正確な神経細胞数がわからなければ単純にパーセントを比較することは出来ない。

そこで研究代表者らは生後 (P0) ~ 8 週齢 (8w) の正常ラットにおいて嗅上皮の正確な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 500,000 (P0) から約 20,000,000 個 (8w) であることを明らかとした。

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を含む神経変性疾患に関する研究において注目されている。しかし多くの研究でモデルとなる齧歯類において形態学的研究、特に神経細胞総数を明らかにする研究ではその細胞総数が膨大であるがゆえに今まで性差、年齢差、種差を含む網羅的な研究は行われていなかった。

そこで我々はラットにおいて、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してきた。本研究では遺伝子改変動物のモデル動物として多用されているマウスや他動物においても同様の手法を用い、生後から成長期、加齢期に至るまで各種嗅覚器の嗅神経細胞数を明らかとし、先述の研究に基礎研究として形態学的データを提供することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では成獣の正常な雄雌のマウス (遺伝子解析に用いられた C57BL/6J) 及び成長ステージの各段階にあるラットにおける主嗅上皮を含む各種嗅覚器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。

具体的には各動物の雌雄動物を 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する。そして摘出した頭蓋骨を EDTA 溶液に浸し脱灰を行い、脱灰した頭蓋骨および嗅球をパラフィン包埋し 10 μm の厚さで前額断し連続切片を作成した。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を明らかにしている。

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。主嗅上皮の嗅神経細胞は生涯にわたり新生、入れ替えを繰り返しており、嗅覚機能に関与する嗅神経細胞は嗅球と結合した嗅神経のみである。OMP (Olfactory Marker Protein) は、嗅球と結合して機能している嗅神経にのみ発現する蛋白で、細胞体や軸索で認められるものである (図 1)。

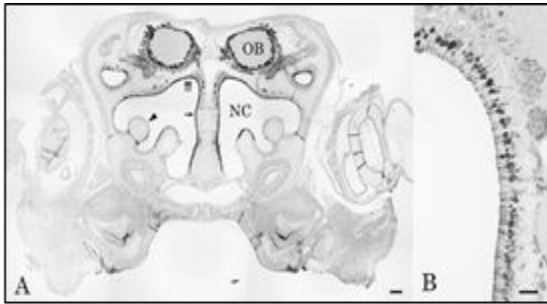


図 1：新生児ラット鼻腔の前額断 OMP 染色組織像 A:鼻腔 (NC) 全体像で、嗅神経から投射を受ける嗅球も OMP 陽性に染まっている。B: 嗅上皮の強拡大像。機能している嗅神経細胞が染色されている。

その後、OMP 陽性嗅神経細胞をステレオロジー解析装置 (Stereoinvestigator: MBF Bioscience, USA) を用いて計測し、嗅神経細胞数を明らかにした (図 2)。

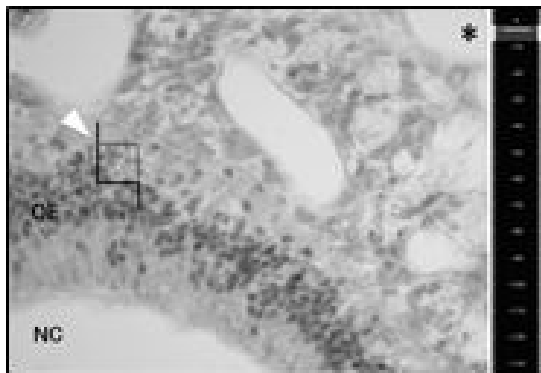


図 2：ステレオロジー細胞計測の画面 3次元で正確に細胞数を計測するため、枠内 (白矢頭) が一定の深度 (アスタリスク) 内の細胞のみ計測し統計学的手法を用いて正確な細胞数を算出する。

4. 研究成果

今まで遺伝子解析によく用いられていたにもかかわらず主嗅上皮に存在する嗅神経細胞総数の報告がなかったマウス (C57BL/6J) において 8 週齢における標本作製し、主嗅上皮内の OMP 陽性嗅神経細胞数の計測を Stereology の手法を用いて行った。

抗 OMP 抗体を用いた免疫組織化学法による染色では OMP 陽性嗅神経細胞の形態や層構造の厚さは鼻腔の各部位によって異なることが明らかとなったが (図 3) Stereology を用いて全ての OMP 陽性細胞数の総数を計測、推定した。

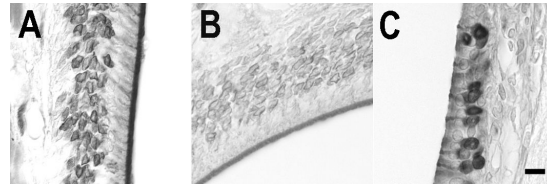


図 3：マウス鼻腔内の部位による OMP 陽性嗅神経細胞の違い。(A) 鼻中隔部では OMP が強く陽性である。(B) 鼻甲介部分では OMP の染色性は弱い、OMP 陽性嗅神経細胞は厚い層構造を呈する。(C) 鼻腔外側部では OMP 強陽性の大型で丸い OMP 陽性嗅神経細胞が認められた。

これらの OMP 陽性嗅神経細胞を成獣 (8 週齢) の C57BL/6J マウスにおいて計測した。その結果、1 側主嗅上皮における OMP 陽性嗅神経細胞の総数は雄では $5,140,000 \pm 380,000$ 個、雌では $5,210,000 \pm 380,000$ 個であることが明らかとなった (図 4)。

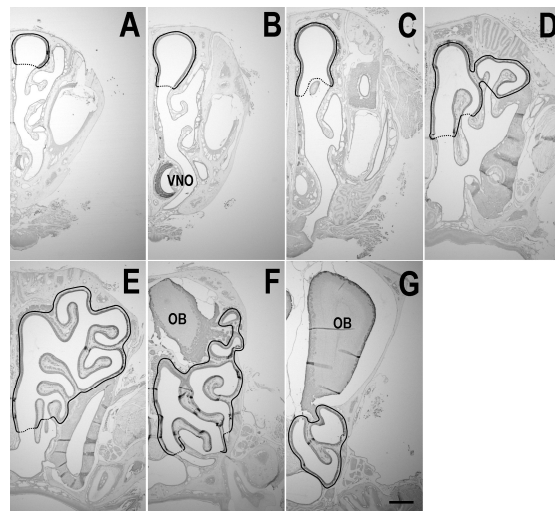


図 4：8 週齢アダルトマウスの鼻腔構造と OMP 陽性嗅神経細胞が存在する主嗅上皮の範囲。(実戦で囲われている部分が主嗅上皮)

また 8 週齢の C57BL/6J マウスの主嗅上皮に存在する OMP 陽性嗅神経細胞の数は統計学的に性差は認められなかった。

これらの結果、マウスの一側主嗅上皮における OMP 陽性嗅神経細胞の総数が約 5,000,000 個であることを初めて明らかとした。

また、Wistar ラットにおいては生後 (P0) ~ 8 週齢 (8w) の正常ラットにおいて嗅上皮の正確な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計測を行い、その細胞数が約 500,000 (P0) から約 20,000,000 個 (8w) であること

を明らかとしていたが、さらに8週以降は6か月、1年、2年と加齢に伴って1側嗅上皮に存在するOMP陽性嗅神経細胞数は約20,000,000個と変化しないことを明らかとした。

さらに正常Wistarラットでは新生児期において一側の約50%のOMP陽性嗅神経細胞が残存しないと嗅覚機能が維持できないことを明らかにしていたが、これが成獣においても同様に約50%のOMP陽性嗅神経細胞が残存しないと嗅覚機能が維持できないことを初めて明らかにした。

従来報告では、成獣ではより低濃度の匂い物質での嗅覚機能維持が報告されていた。しかし、近年の研究では匂い物質の質の違いにより匂いの感知に差異があるのではないかと報告がなされていた(Sinding C., Puschmann L., and Hummel T. Is the Age-Related Loss in Olfactory Sensitivity Similar for Light and Heavy Molecules? Chem. Senses, 39 : 383-390, 2014)。

我々の用いたシクロヘキシミドは分子量が大きく、このような匂い物質の嗅覚機能維持にはより多くのOMP陽性嗅神経細胞が必要であることを明らかとした。

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)

Kawagishi K, Ando M, Yokouchi K, Sumitomo N, Karasawa M, Fukushima N, Moriizumi T. Stereological estimation of olfactory receptor neurons in rats. Chem Senses. (査読有) 40(2):89-95. 2015.

Kawagishi K, Ando M, Yokouchi K, Sumitomo N, Karasawa M, Fukushima N, Moriizumi T. Stereological quantification of olfactory receptor neurons in mice. Neuroscience. (査読有) 272:29-33. 2014.

Hirayama S, Kawagishi K, Yokouchi K, Fukushima N, Karasawa M, Moriizumi T. Regenerative capacity of bulbar projection neurons during development: a quantitative neuronal analysis with functional correlation. Chem Senses. (査読有) 39(1):47-56. 2014.

〔学会発表〕(計 2件)

川岸 久太郎、横内 久美子、住友 憲深、唐沢 未佳、福島 菜奈恵、森泉 哲次. ヒト嗅神経細胞のステレオロジー解析. 第121回日本解剖学会. 郡山. 2016.

川岸久太郎、横内久美子、福島菜奈恵、森泉哲次. げっ歯類の嗅覚受容器ニューロン総数に関するステレオロジー定量解析. 第37回日本神経科学大会. 横浜. 2014年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI, Kyutaro)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 40313845

(2) 研究分担者

福島 菜奈恵 (FUKUSHIMA, Nanae)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号: 90334888