

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06737

研究課題名(和文) 嗅覚神経系の3つの階層におけるニューロン総数と嗅覚機能の定量解析

研究課題名(英文) Quantitative analyses of total neuron numbers at three different neuronal levels in relation to olfactory function

研究代表者

森泉 哲次 (MORIIZUMI, Tetsuji)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：70157874

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)：新生児ラットにおける大脳皮質吸引実験により、前嗅核は嗅覚機能に関与しないこと、また嗅覚は前嗅核後方の嗅皮質(梨状皮質・嗅結節)の残存領域の大きさで決まることが明らかになった。成熟ラットにおける外側嗅索切断と神経毒注入を併用した複合損傷実験により、前嗅核は嗅覚に関与しないこと、また前嗅核後方の嗅皮質が約20%以上あれば嗅覚は正常に維持されることが明らかになった。新生児ラットにおける外側嗅索切断実験により、嗅覚は切断後10日で回復すること、また嗅覚の回復には、再生線維が嗅結節レベルの嗅皮質で、正常の約40%の領域に分布し、正常の約60%の密度まで増加する必要があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cerebral cortical ablations in neonatal rats revealed that the anterior olfactory nucleus was not related to the olfactory discriminative ability and that the size of the remaining cortical regions of the piriform cortex and olfactory tubercle was important for the ability. Combined lesions of sectioning of the lateral olfactory tract and injections of a neurotoxin in adult rats showed similar results to the experiments in neonates and further uncovered that the minimal cortical size for the olfactory discriminative ability was approximately 20% of the normal cortical size. Transection of the lateral olfactory tract in neonatal rats revealed that functional recovery occurred as early as 10 days after tract transection and that areas and densities of regenerated nerve components essential for functional recovery were approximately 40% and 60% of the normal values in the olfactory cortices at the level of the olfactory tubercle.

研究分野：神経科学 神経解剖学 嗅覚

キーワード：嗅上皮 嗅球 外側嗅索 嗅皮質 嗅覚

### 1. 研究開始当初の背景

嗅覚神経系は、末梢組織から脳に至るまで、嗅上皮・嗅球・嗅皮質の3つのニューロン群の直列した神経回路に単純化できる。初めのニューロン群は嗅上皮の嗅覚受容器ニューロンであり、次のニューロン群は受容器ニューロンからの嗅神経入力を受ける僧帽細胞と呼ばれる嗅球の大型ニューロンであり、最後のニューロン群は僧帽細胞からの入力を外側嗅索経由で受ける嗅覚系大脳皮質であり、脳底部の広い領域を占める嗅皮質の錐体細胞である。本研究は、嗅上皮・嗅球・嗅皮質という嗅覚神経系の3つの階層別に、とりわけ嗅皮質に焦点をあて、嗅覚機能と嗅皮質のサイズの関係性を明らかにすることを目的として計画された。

### 2. 研究の目的

これまでの嗅覚研究は嗅上皮の嗅覚受容器ニューロンに関する研究がほとんどで、嗅球・嗅皮質などの嗅覚中枢に関する研究は少ない。特に、嗅球からの神経連絡を受ける高位の大脳皮質である嗅皮質に関する研究は極めて少ない。また、嗅覚機能と関連したニューロン総数に関する統合的研究も極めて少ないのが現状である。そこで、本研究は嗅皮質レベルで、嗅覚機能発現に必要な大脳皮質の最小サイズを明らかにする目的で行った。

### 3. 研究の方法

はじめに、嗅覚機能と嗅皮質に関連して、以前の重要な研究報告について概説する。ラットの外側嗅索を切断しても、嗅覚機能に異常がまったく見られないという驚くべき結果が報告された (Brain Res Bull 5: 141-145 (1979))。外側嗅索は、主要な嗅覚伝導路であるので、別の方向から追試を行った。成熟ラットの右嗅球を吸引除去後に、左外側嗅索の切断部位を様々なレベルで行い、嗅覚機能の有無を調べた所、嗅球に近いレベルでの外側嗅索の切断では、ラットは無嗅覚となり、嗅球から遠いレベルでの外側嗅索の切断では、ラットの嗅覚機能は正常に保たれていた。嗅覚機能の有無を分ける外側嗅索の切断部位は、嗅球後端から約 2.5 mm であり、前嗅核のすぐ後方の嗅皮質 (梨状皮質・嗅結節) が切断部より後方にある場合は無嗅覚となり、切断部よりも嗅球側に存在すれば、嗅覚機能は正常に維持されることが判明した。つ

まり、前嗅核は嗅覚機能には関与していないこと、さらに前嗅核後方の梨状皮質・嗅結節がある程度存在すれば嗅覚機能は正常に維持されることが分り、外側嗅索の切断はその部位により、ラットの嗅覚機能は異なる結果がもたらされることが判明した (Neurosci Res 73: 17-23 (2012))。

これらの結果を踏まえて、新生児ラットと成熟ラットの嗅皮質に種類の異なる損傷を加えた実験動物を作成し、嗅覚機能を調べて、嗅覚機能と関連した嗅皮質のサイズを定量評価することを目的として、様々な実験を行った。また、研究課題である外側嗅索の切断実験を行っている際に、新たにアイデアが生まれて研究を伸展させることができた研究テーマ (再生軸索線維がどの程度嗅皮質に到達すれば、失われた嗅覚機能の回復が得られるか) についても、当初計画していなかったが、嗅球から嗅皮質への再生軸索線維の量と嗅覚機能の関係を調べた実験に関しても以下に記載する。

#### (1) 新生児ラットにおける大脳皮質吸引実験

出生直後 (生後 1 日) の新生児ラットを研究対象として、右大脳皮質を広汎に吸引除去し、成長させた。1 か月後に、残存する小さな右大脳皮質に嗅覚機能があるかを判定するために、左嗅球を完全に吸引除去し左側の嗅覚神経系の影響をなくした状態で、右大脳皮質を広汎除去した 10 匹のラットの嗅覚機能の有無を、水道水とシクロヘキシミド溶液を嗅いで識別する能力 (嗅覚識別能) があるかどうかにより判定した。嗅覚検査後に、パラフォルムアルデヒド溶液で還流固定し、脳を採取し、マクロ画像を撮影し、右大脳皮質広汎除去ラットの残存する大脳皮質の領域を、特に嗅球に連続する嗅皮質 (前嗅核・梨状皮質・嗅結節) のサイズに注目して検討した。

## (2) 成熟ラットにおける複合損傷(外側嗅索切断・神経毒注入)実験

成熟ラットの右嗅球を吸引除去し、3日間絶水後、水道水とシクロヘキシミド溶液を嗅いで区別するように嗅覚学習させた(正解率100%)。嗅覚学習3日後に、嗅球から離れた左側の外側嗅索を切断し、嗅覚機能が維持されていることを確認した。3日後に神経細胞毒であるイボテン酸(1%)を左嗅球と左外側嗅索切断部の間の嗅皮質に注入した。イボテン酸は注入部位(3-5か所)と注入量(合計2-5  $\mu$ l)を変化させて、嗅皮質のニューロン群に程度の異なる傷害を与えた。イボテン酸注入3日後から3日間絶水し、嗅覚検査を行った結果、外側嗅索切断・イボテン酸注入ラットは、水道水とシクロヘキシミド溶液を嗅いで識別する能力(嗅覚識別能)の高いラット(正解率90-100%)と低いラット(正解率40-60%)の2群に分けられた。前者を嗅覚(+ )ラット、後者を嗅覚(- )ラットとして分類した。嗅覚検査3日後に、順行性神経トレーサーであるBDA-10000 (biotinylated dextran amine)を左嗅球に注入した。BDA注入3日後、パラフォルムアルデヒド溶液で還流固定し、嗅球と脳を採取した。連続凍結切片(300  $\mu$ m 間隔・50  $\mu$ m 厚)を作成し、神経トレーサーBDAの反応を行い、外側嗅索の完全切断を確認し、ニューロンマーカー(NeuN)の免疫染色を行い、イボテン酸で破壊されなかった嗅皮質の残存ニューロン群の面積を計測した。

## (3) 新生児ラットにおける外側嗅索切断後の機能回復に関する実験

低温麻酔状態で、新生児ラット(生後2日)の前方の左外側嗅索を切断した。哺乳期のラットは嗅覚がないと哺乳できないことを利用して、右嗅球除去後に左側の嗅覚神経系だけで哺乳が可能となった時期を、外側嗅索が再生された時期とした。なお、哺乳可能時期は胃内ミルクが出現した時期として判定した。また、外側嗅索の完全切断は、切断時に

切断後方の嗅皮質に注入した蛍光神経トレーサー(FB: fast blue)が切断部を越えて嗅球まで軸索輸送されていないことにより、客観的に判定した。再生軸索線維を標識する目的で、新生児ラット(生後2日)の左外側嗅索を切断し、3日後に順行性神経トレーサーであるBDAを両側嗅球に注入し、胃内ミルクが出現した嗅覚機能回復時期の嗅皮質の再生線維をBDAで標識し、BDA陽性部位の面積( $\mu$ m<sup>2</sup>)と密度(density index)を計測した。切断側と非切断側で定量評価を行い、切断側の再生線維の面積と密度を非切断側(正常)と比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 新生児ラットにおける大脳皮質吸引実験

最後まで生存できたラットは全部で10匹であった。7匹のラットは、嗅覚識別能を有する嗅覚(+ )ラットであり、マクロ画像で判断すると、嗅球に連続する嗅球後方の嗅皮質のサイズが大きく、多くのラットでは、外側嗅索も識別できた。3匹のラットは、嗅覚識別能を有しない嗅覚(- )ラットであり、嗅球後方の嗅皮質のサイズは非常に小さく、外側嗅索も識別できなかった。嗅皮質を詳細に検討すると、嗅球に続く嗅索内の前嗅核はすべてのラットで損傷はなかった。前嗅核後方の嗅皮質である梨状皮質と嗅結節の残存領域が大きいラットは嗅覚(+ )で、小さいラットは嗅覚(- )であった。以上の結果より、嗅球からの投射を受ける3つの代表的な嗅皮質である前嗅核・梨状皮質・嗅結節に関して、前嗅核は嗅覚機能には関係がないこと、さらに嗅覚機能は梨状皮質と嗅結節の残存領域の大きさで決定されることが明らかになった。現在、残存する嗅皮質が最も小さい嗅覚(+ )ラットと残存する嗅皮質が最も大きい嗅覚(- )ラットについて、残存する嗅皮質を連続切片標本にして、嗅覚機能維持に最低限必要な最小サイズの嗅皮質の定量化を行っている。

### (2) 成熟ラットにおける複合損傷(外側嗅索切断・神経毒注入)実験

嗅覚 (+) ラット並びに嗅覚 (-) ラットについて、イボテン酸で破壊されなかった嗅皮質の NeuN 陽性の残存ニューロン群の面積 ( $\mu\text{m}^2$ ) を、前嗅核 (AON)・梨状皮質 (PC)・嗅結節 (OT) の領域に分けて計測し、以下の結果が得られた。なお、正常ラットの嗅皮質全体の面積は、 $1,060 \pm 78 (10^4 \mu\text{m}^2)$  ( $n = 6$ ) であった。

嗅覚 (+) ラット ( $n = 12$ ) \* 残存する嗅皮質の大きさ順に記載する

No. 1:  $385 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (AON),  $129 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (PC),  $185 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (OT)  $699 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (66%) (Total (% of control)); No. 2:  $328, 60, 119, 507$  (48%); No. 3:  $97, 250, 130, 477$  (45%); No. 4:  $42, 188, 155, 385$  (36%); No. 5:  $235, 0, 117, 352$  (33%); No. 6:  $147, 67, 124, 338$  (32%); No. 7:  $47, 104, 138, 289$  (27%); No. 8:  $111, 54, 104, 269$  (25%); No. 9:  $0, 72, 165, 237$  (22%); No. 10:  $0, 62, 172, 234$  (22%); No. 11:  $40, 54, 55, 149$  (14%); No. 12:  $28, 68, 40, 136$  (13%)

嗅覚 (-) ラット ( $n = 4$ ) \* 残存する嗅皮質の大きさ順に記載する

No. 13:  $332, 0, 117, 449$  (42%); No. 14:  $75, 43, 84, 202$  (19%); No. 15:  $20, 8, 145, 173$  (16%); No. 16:  $8, 0, 43, 51$  (5%)

以前の2つの実験で、前嗅核は嗅覚機能には関与しないことが示唆された。今回の実験でも、前嗅核の残存ニューロンがすべてイボテン酸で傷害を受けているにもかかわらず嗅覚機能を有するラットが2匹存在し、また前嗅核のニューロンは全く傷害を受けていないにも関わらず嗅覚機能を有しないラットが1匹存在した。

前嗅核が嗅覚機能に関与していないことが、3つの別々の実験から、強く示唆されたので、前嗅核 (AON) の残存ニューロンの面積を除いて、梨状皮質 (PC) と嗅結節 (OT) の面積

にすると、以下の結果になった。なお、正常ラットの前嗅核を除いた嗅皮質全体の面積は、 $724 \pm 58 (10^4 \mu\text{m}^2)$  ( $n = 6$ ) であった。

嗅覚 (+) ラット ( $n = 12$ ) \* 残存する嗅皮質の大きさ順に記載する

No. 1:  $250 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (PC),  $130 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (OT)  $380 (10^4 \mu\text{m}^2)$  (53%) (Total (% of control)); No. 2:  $188, 155, 343$  (47%); No. 3:  $129, 185, 314$  (43%); No. 4:  $104, 138, 242$  (33%); No. 5:  $72, 165, 237$  (33%); No. 6:  $62, 172, 234$  (32%); No. 7:  $67, 124, 191$  (26%); No. 8:  $60, 119, 179$  (25%); No. 9:  $54, 104, 158$  (22%); No. 10:  $0, 117, 117$  (16%); No. 11:  $54, 55, 109$  (15%); No. 12:  $68, 40, 108$  (15%);

嗅覚 (-) ラット ( $n = 4$ ) \* 残存する嗅皮質の大きさ順に記載する

No. 13:  $8, 145, 153$  (21%); No. 14:  $43, 84, 127$  (18%); No. 15:  $0, 117, 117$  (16%); No. 16:  $0, 43, 43$  (6%)

外側嗅索切断と神経毒注入による複合損傷実験により、前嗅核は嗅覚識別能には関与しないこと、前嗅核後方の嗅皮質 (梨状皮質・嗅結節) が少しあれば、嗅覚機能は正常に維持され、正常の約20%に相当することが明らかになった。

(3) 新生児ラットにおける外側嗅索切断後の機能回復に関する実験

左外側嗅索切断9日後に、右嗅球を吸引除去したラット ( $n = 22$ ) の完全切断例 ( $n = 13$ ) において、哺乳が可能になった (胃内ミルクが出現した) 時期は、切断9日後は1匹もなく、切断10日後に9匹 (69%) が初めて哺乳が可能になり、切断11日後に4匹 (31%) が初めて哺乳が可能になった。再生線維がどの程度嗅皮質に到達すれば機能回復が得られるかを知るために、嗅球に順行性の神経トレーサー-BDA を注入したラットは、嗅覚機能が回復していない外側嗅索切断8日後と嗅

覚機能が回復した直後の外側嗅索切断10日後に、ラットを還流固定し、嗅皮質の連続切片を作成し、嗅結節の4つのレベルで、嗅結節と梨状皮質のBDA陽性線維を定量評価した。切断8日後では、嗅皮質のBDA陽性部位の面積と密度は、切断側では191,000 ( $\mu\text{m}^2$ )と0.13 (density index)で、非切断側では866,000と0.34であった。切断10日後では、嗅皮質のBDA陽性部位の面積と密度は、切断側では434,000と0.21で、非切断側では1,105,000と0.35であった。

以上の結果より、外側嗅索を切断された新生児ラットの嗅覚は、切断後10日で回復すること、嗅覚機能の回復には、嗅結節レベルにおいて、面積では正常の約40%、密度では正常の約60%の再生線維が必要であることが明らかになった。

#### 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)

[雑誌論文](計 1件)

Kuroiwa M, Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Moriizumi T.

Morphological analysis of regenerated bulbar fibers in relation to neonatal olfaction. Brain Res Bull 127: 66-73 (2016), 査読有

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.015>

[学会発表](計 1件)

福島菜奈恵、黒岩正文、森泉哲次

外側嗅索切断新生児ラットの神経再生 - 機能回復時期と再生線維量 -  
第76回日本解剖学会中部地方会  
2016.10.8、松本

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

森泉 哲次 (MORIIZUMI, Tetsuji)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号： 70157874

##### (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

##### (3)連携研究者 なし

##### (4)研究協力者

横内 久美子 (YOKOUCHI, Kumiko)

黒岩 正文 (KUROIWA, Masafumi)