

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11209

研究課題名(和文) ヒト嗅覚器のステレオロジー解析と他動物との比較

研究課題名(英文) Total number of olfactory receptor neurons in human olfactory epithelium

研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI, KYUTARO)

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：40313845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：鼻腔に存在する嗅神経細胞は生涯にわたり神経再生が起こっている特殊な神経細胞であり、神経再生のモデルとして注目されている。またヒトに関しては、嗅覚の異常が新型コロナウイルス感染や中枢神経変性疾患との関係により注目されているにもかかわらず、嗅神経細胞数が正確に計測されていないことが明らかとなった。この為、我々はヒト鼻腔に存在する嗅神経細胞の総数を明らかにするためにヒト鼻腔全体を標本として摘出しステレオロジーの手法を用いて観察を行った。

この結果、ヒト嗅上皮ではヒト嗅神経細胞の総数は一側で約630万個、その内嗅球に投射している成熟した嗅神経細胞数は一側で約430万個であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔に存在する嗅神経細胞は生涯にわたり神経再生が起こっている特殊な神経細胞であり、神経再生のモデルとして注目されている。またヒトに関しては、嗅覚の異常が新型コロナウイルス感染や中枢神経変性疾患との関係により注目されているにもかかわらず、総細胞数などの基礎データが明らかになっていなかった。この為、本研究で明らかとなった基礎データは今後の研究における指標として重要になることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：The olfactory receptor neurons in the olfactory epithelium regenerate all through life. Therefore, it was difficult to estimate accurate number of the olfactory receptor neurons. The aim of this study was to estimate an accurate total number of the olfactory receptor neurons in the human by using stereology method.

The result showed that there were approximately 6,300,000 olfactory receptor neurons in the unilateral olfactory epithelium of the human. In addition, there were approximately 4,300,000 matured olfactory receptor neurons in the unilateral olfactory epithelium of the human, which was approximately 70% of the all olfactory receptor neurons.

研究分野：神経解剖学

キーワード：嗅神経細胞 嗅上皮 ヒト OMP 嗅覚 ステレオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

嗅覚系は生涯にわたり神経細胞が分裂・増殖を繰り返す特殊な神経系であり、神経再生研究分野で注目されていた。また、嗅覚系は神経再生の研究に加え、中枢神経系の神経変性疾患において初期から嗅覚異常が出現することが明らかになり、臨床的にも研究の重要度が増してきていた。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、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緩徐に発症し、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、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た。

我々は現在まで、嗅覚系の実験動物として多用されるマウスにおいて正常嗅神経細胞数を初めて明らかに(成獣で一側約 500 万)しており\*、またラットにおいても従来報告されていた倍の嗅神経細胞数(成獣で一側約 2000 万)が存在し、一側鼻腔で新生児期の約 50 万個から成獣の約 2000 万個まで 40 倍増加することを明らかにした\*\*。

しかし研究開始当初、ヒトにおいては臨床的にバイオプシー切除した鼻粘膜からの推計のみで\*\*\*、その研究手法は鼻粘膜の生検材料を基に電子顕微鏡で鼻粘膜中の細胞密度を算出し、表面積と掛け合わせるにより一側鼻腔に約 300 万個の嗅神経細胞があると推計しているのみである。この様にヒト鼻腔における嗅神経に関する基礎的研究が行われていないことが明らかとなった。我々のマウスやラットを用いた研究では嗅上皮内に存在する嗅神経細胞数は部位によって異なり、一様で無いことが明らかであった。

### 2. 研究の目的

このため本研究では齧歯類の研究で用いたものと同じ手法を用い、今まで鼻腔全体の網羅的な研究が行われていなかったヒト嗅上皮において嗅神経細胞数を明らかにし、加えて他動物の細胞数と比較することで嗅覚系の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。

またヒトにおける嗅上皮の構造に関し、その分布と表面積を明らかにすることも目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究ではヒト嗅上皮に存在する嗅神経細胞の分布、すなわち嗅上皮の正確な形態、および嗅神経細胞の正確な総数(未熟なものも含めた総数及び成熟し機能している嗅神経細胞数)をステレオロジーの手法を用いて明らかにするために以下の方法を用いた。

(1)解剖実習に用いられた御遺体から一側鼻腔上皮を摘出し、免疫組織化学法による予備染色を行い、染色性の優れた組織が保存されている御遺体より反対側の全鼻腔を摘出する。

なお、ヒト標本の取り扱いについては御遺体の家族等にも研究上の取り扱いを周知するとともに、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得ていた。

また、本研究に先立ち、長期間ホルマリン固定された御遺体における免疫組織化学染色性の評価を他研究でも用いるとともに\*\*\*\*、本研究でも予備実験として行い、固定状態によっては良好な染色性を得られることを明らかにしていた。

(2)その後摘出した鼻腔標本を EDTA 脱灰液に浸し脱灰を行い、脱灰した鼻腔の上部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する。我々の以前の研究から EDTA により 3 か月程度脱灰すると鼻腔内上皮や骨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。また、10  $\mu$ m の連続切片を作成する理由は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り、加えて正確な計測の為必ず等間隔の切片が必要である。

(3)薄切切片を嗅神経のマーカーである PGP 9.5 (Protein gene product 9.5)および成熟した嗅神経細胞のマーカーである OMP (Olfactory marker protein)免疫染色で染色する。PGP 9.5 は全ての神経細胞に発現しているのに対し、OMP は嗅球と結合して機能している成熟した嗅神経に発現する蛋白で、細胞体や軸索で認められる。

(4)嗅上皮の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するとともに嗅上皮の形態を調べた。従来の研究で用いられている代表部分や特定切片の測定による比較では数値的に問題がある点が指摘されており、ステレオロジーを用いた 3 次元の組織解析による細胞総数測定の有用性が報告されている\*\*\*\*\*。

#### 4. 研究成果

- (1) 嗅上皮の前後長は約 2.3 cmであった。また、嗅神経細胞の分布は嗅上皮上であっても上下、前後で部位によって異なり、一様でないことが明らかとなった。

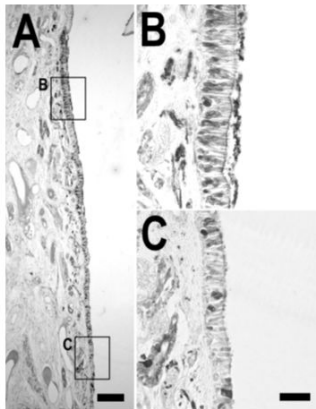


Figure 1: Human olfactory epithelium of the nasal septum with PGP 9.5 staining. Density of PGP 9.5 (+) ORNs are different in each parts of the epithelium (A). Under higher magnification (B,C) thickness of the epithelium and the number of PGP 9.5 (+) ORNs layers are also different. Bar=200um (A), and 40um (B,C).

図 1：鼻中隔における部位による嗅神経細胞の分布の違い。鼻中隔の上部では嗅神経細胞が多く、層構造を呈しているが、下方では嗅神経細胞数が少なく単層であることが分かる。

- (2) 一側鼻腔における嗅上皮の表面積は約 3.6 平方 cmであった。また鼻腔の前後で嗅上皮の存在する面が外側から内側に移ることが明らかとなった。

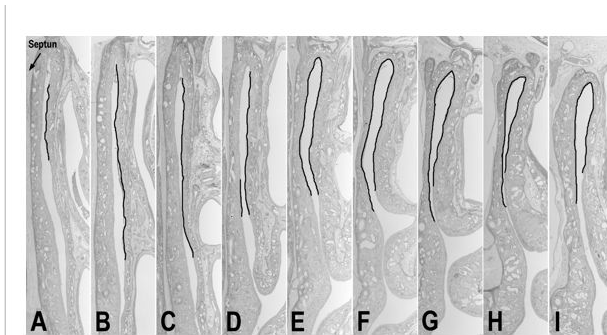


Figure 2: Human olfactory epithelium. Rostrocaudal sections of the human nasal cavity. With PGP 9.5 staining, areas of the olfactory epithelium containing PGP 9.5 (+) neurons are marked with lines.

図 2：ヒト鼻腔における嗅神経細胞の分布と広がり。前方では外側壁にのみ嗅神経層が認められるのに対し、後方では鼻中隔側の嗅上皮の面積がより大きくなることが示された。

- (3) ヒト嗅上皮ではヒト嗅神経細胞の総数は一側で約 630 万個であった。
- (4) その内、嗅球に投射している成熟した嗅神経細胞数は一側で約 430 万個であることが明らかとなった。

これらの結果、ヒト嗅上皮においては従来報告されていたよりも多い嗅神経細胞が存在することが明らかとなった。一方、他の動物においては嗅神経細胞数が加齢とともに減少することが知られており、本研究で用いられた解剖体の年齢が 63 歳から 97 歳であることを考えると、青年においてはより嗅神経細胞数が多い可能性は否定できない。

#### 参考文献

- \* Kawagishi K, Ando M, Yokouchi K, Sumitomo N, Karasawa M, Fukushima N, Moriizumi T. Stereological quantification of olfactory receptor neurons in mice. *Neuroscience*. 2014 Jul 11;272:29-33.
- \*\* Kawagishi K, Ando M, Yokouchi K, Sumitomo N, Karasawa M, Fukushima N, Moriizumi T. Stereological estimation of olfactory receptor neurons in rats. *Chem Senses*. 2015 Feb;40(2):89-95.
- \*\*\* Moran et al. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J. Neurocytol*. 1982; 11:721-746.

- \*\*\*\* Oikawa S, Kawagishi K, Yokouchi K, Fukushima N, Moriizumi T. Immunohistochemical determination of the sympathetic pathway in the orbit via the cranial nerves in humans. *J Neurosurg.* 2004 Dec;101(6):1037-44.
- \*\*\*\*\* Glaser JR et al. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem. Neuroanat.* 2000; 20(1):115-26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森泉 哲次  (MORIIZUMI TETSUJI)		データ解析
研究協力者	福島 菜奈恵  (FUKUSHIMA NANAЕ)		データ解析