マウス嗅球除去後の行動学的変化ならびに嗅上皮における組織学的変化に関する研究

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：古川 仩教授）

三 輪 高 喜, 土 定 建 夫, 坂 下 英 雄, 木 村 恭 之, 古 川 仩

STUDY OF BEHAVIORAL AND HISTOLOGICAL CHANGE IN MICE FOLLOWING OLFACTORY BULBECTOMY

TAKAKI MIWA, M.D., TAKEO DONJO, M.D., HIDEO SAKASHITA, M.D.
YASUYUKI KIMURA, M.D. and MITSURU FURUKAWA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa

Behavioral and histological changes in mice following bilateral olfactory bulbectomy were studied. Mice were trained to discriminate between a 0.01% Cycloheximide solution and distilled water. After olfactory bulbs were removed, discrimination was lost, and had not returned 300 days after bulbectomy.

The histological changes observed by light microscope were as follow. Degeneration of olfactory epithelium was observed immediately after the bulbectomy, followed by decrement of the epithelial thickness and the number of olfactory cells. An increase in both epithelial thickness and the number of olfactory cells was observed 14 days after the bulbectomy, and epithelial thickness 300 days after the bulbectomy was similar to that of the sham-operation group. At 300 days after the bulbectomy, axons of olfactory cells migrated through the lamina cribrosa, but didn't contact the forebrain.

In this study, the olfactory bulb was considered to have played a role in functional recovery of olfactory behavior, and that olfactory cells were continuously renewed under conditions of target organ, i.e. olfactory bulb, loss.

Key words: 嗅球除去, 嗅刺激性行動, ナラマイシン, 光学顕微鏡,
マウス

A 95-0329-32590

はじめに

嗅細胞は、様々な障害による変性後も再生することが数多くの実験によって証明されている^{1)~9)}。しかし、これらの実験のほとんどが形態学的あるいは生化学的な面からのアプローチであり、嗅細胞が再生した際に嗅力も実際に回復しているのかどうかの裏付けはいまだ十分になされていないのが現状である。ところで、ヒトの外傷性嗅覚障害は、頭蓋内における嗅神経の非連続性がその原因として考えられており、動物モデル

実験として、頭蓋内での嗅糸切断や嗅球除去が過去に行われてきた。それによると、動物実験では嗅上皮は変性後速やかに再生するのに対して、ヒト外傷性嗅覚障害ではその回復率は非常に低い。この動物実験結果と臨床結果との矛盾を解明するために、今回われわれは、マウス嗅球除去後の変化をシクロヘキシミド（ナラマイシン[®]）を用いた嗅刺激性行動観察法を用いて行動学的に観察し、組織学的変化と対比し検討を行ったので報告する。

材料および方法

I. 実験材料

体重約 30g の成熟雄 ddy-conventional マウスを使用した。マウスはナラマイシンには未経験のものである。マウス飼育室は空調装置により、室温 23°C、湿度 55% に設定され、約 12 時間ごとの昼夜周期を維持するため、照明は 9:00～20:30 の間点灯した。

II. 実験方法

1. 嗅刺激性行動

固形飼料は任意に与えたが、マウスを渴の状態にするために、48 時間飲水させなかった後、マウス飼料ケージに 0.01% ナラマイシン水溶液の入った給水瓶と、蒸留水の入った給水瓶を備えた。この飼育ケージにマウスを 1 匹ずつ入れ、マウスがどちらの給水瓶から飲水するかを、10 分間以内の観察時間で、各マウス最高 10 試行ずつ調べた(図 1)。実験中も渴の状態を維持するため、給水瓶の先端に口をつけるとすぐに給水瓶を取り外して、マウスには 1 回にごく少量の水しか飲めないようにした。1 回ごとに Gellermann 系列に従って、右、左、左、右、左、左、右、右、右、左の順序でナラマイシン水溶液の入った給水瓶の位置を替えた。蒸留水を飲んだ場合を正解とし、ナラマイシン水溶液を飲んだ場合をエラーとした、正解数を全試行数で除したものを正解率とした。以上を第 1 回目の学習とした。第 1 回目の学習終了後マウスに十分な飲水をさせた後、給水瓶をはずし、水分を与えないようにして、48 時間後に同様の実験を行い、第 2 回目の学習とした。嗅刺激性行動の観察は条件を一定にするため、すべて 19:00～21:00 の間に、脱臭装置の中で行った。

2. 両側嗅球除去

図 1 実験風景
写真撮影のため、ケージの蓋を半分取り去ってある。

第 2 回目の学習終了 24 時間後に両側嗅球除去を行った。

ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®) 100mg/Kg をマウス腹腔内に注射した後、補助麻酔として頭部皮下に 1% 塩酸リドカイン(キシロカイン®) を約 0.2ml 注射した。頭部に正中皮膚切開を入れ、顕微鏡下にマイクロドリルを用いて前頭骨の最前方で開頭し、両側嗅球の上面全体を露出させ、前脳を傷つけないよう注意しながら、嗅球を吸引除去した。

嗅球除去後は皮膚を絹糸にて縫合し術創を閉鎖した。

また、対照として、嗅球露出まで同様の操作を行った後、嗅球を除去せずに頭皮を縫合したマウスを 10 匹作製した。

3. 嗅球除去後の嗅刺激性行動

嗅球除去後、マウスを 4 匹ずつ 7 日群、14 日群、28 日群、42 日群、56 日群、84 日群、300 日群に分け、それぞれの日まで嗅刺激性行動を前述した方法で観察した。観察は例えば 300 日群では、3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, 84, 300 日目に行い、他の群もそれに準じて行った。また対照群においては 300 日群と同様に 300 日まで行動を観察した。

統計学的検定は嗅球除去群の平均正解率と対照群の平均正解率との間で、一元配置分散分析の後、Scheffé の多重比較法を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 組織学的観察

嗅球除去群のマウスは所定の日数に達し次第、嗅刺激性行動を観察した後、マウス頭部の水平断、HE 染色標本作製し嗅粘膜及び嗅脳部を光顕にて観察した。また対照群のマウスは処置後 300 日目に光顕標本作製し観察した。

HE 染色標本作製は以下の方法で行った。まずマウスをネンブタールを用いて全身麻酔後開胸し、心腔内からヘパリン加生食およびブアン固定液にて灌流固定、その後断頭し、頭部をさらにブアン固定液にて固定、15% EDTA 水溶液(pH7.4)にて脱灰後、アルコール系列脱水を行ってパラフィン包埋を行い、水平断で 4 μ m の切片を作製し、HE 染色を施した。

結 果

嗅球除去群のうち、300 日群のマウスは 2 匹しか生存せず、2 匹を検討の対象とした。

I. 嗅刺激性行動

図 2 対照群および嗅球除去群における平均正解率の推移 () 内はマウス数

嗅刺激性行動観察結果を図 2 に示す。1 回目の学習では、すべてのマウスが最低 1 回はナラマイシン水溶液に口をつけ、嗅球除去群では平均正解率は 81.3%、対照群は 84.0% と両群間に有意差を認めなかった。マウスはナラマイシン水溶液に口をつけると、慌てて両前肢を口にあててこするようにしたり、ケージの壁面に口をこすりつけて唾液をたらし、口内のナラマイシン水溶液を流し出そうと努めた。そして、ナラマイシン水溶液に口をつけると、なかなか次の試行にかかるうとはしなかった。

2 回目の学習では、嗅球除去群、対照群ともにすべてのマウスが 10 回の試行を行い、しかもナラマイシン水溶液を口にしたマウスは 1 匹もなく、平均正解率は 100% となった。

以上の結果から、今回の実験に用いたマウスは、すべて 0.01% ナラマイシン水溶液のニオイを感知することができ、しかも 2 回の学習終了時点でナラマイシン水溶液のニオイを記憶したものとみなした。

次に、処置後の嗅刺激性行動についてみると、対照群ではすべてのマウスが処置後 1 日から 300 日まで常

に 10 回の試行を行い、1 回のエラーもなかったのに対し、嗅球除去群では、嗅球除去後 3 日で平均正解率は 59.8% と著明に減少し、対照群との間に有意差を認めた。その後も嗅球除去群の平均正解率は上昇せず、常に対照群との間に有意差を認めた。

II. 光顕による観察

嗅球除去後 7 日の嗅上皮では厚さが減少し、嗅細胞はほとんど消失し、ほとんどの部位で支持細胞と基底細胞しか認めなかった。

残存する支持細胞および基底細胞には変化は認めなかった (図 3)。嗅球除去後 14 日ではすでに嗅細胞の再生が始まっており、嗅上皮の厚さはまだ薄いものの、多くの嗅細胞を認めるようになった (図 4)。その後嗅上皮は日を追って厚くなり、また嗅細胞の密度も増加し (図 5)、嗅球除去後 300 日では対照と変わらぬまでに再生した (図 6, 7)。

一方、頭蓋内では篩板を通過した嗅神経が侵入し、前脳の一部が元来嗅球が存在した部位に伸びてきており、嗅球を除去した空隙は少なくなっているものの、嗅神経と前脳との接触および結合を示す所見は認めな

図3 嗅上皮（嗅球除去7日後）（×300）
嗅神経細胞は消失し，支持細胞と基底細胞のみとなっている。

図6 嗅上皮（嗅球除去300日後）（×300）
嗅上皮は対照とほぼ同じ厚さまで再生している。

図4 嗅上皮（嗅球除去14日後）（×300）
嗅上皮は厚さを増し，再生嗅神経細胞が出現している。

図7 嗅上皮（対照）（×300）

図5 嗅上皮（嗅球除去84日後）（×300）
さらに嗅上皮は厚みを増し，基底層付近に多くの嗅神経細胞を認める。

図8 嗅脳部（嗅球除去300日後）（×75）
嗅神経線維（→）が頭蓋内に侵入しているが，前脳（FB）との間に連絡を認めない。

かった(図8)。

考 察

嗅細胞は、障害による変性後も速やかに再生するという他の脳神経ではみられない特性を持つため、過去に数多くの障害実験が行われてきた。しかし、再生後の嗅上皮が実際に嗅力を有するまでに回復しているのか否かを行動学的に観察した報告は非常に少ない¹⁰⁾。それは、装置が複雑であったり、条件反射を形成するのに手間がかかったためである。

その点、われわれが行っている嗅刺激性行動観察法は、1回の学習で確実に学習が完了し、記憶も長期間とどまり、また非常に装置が簡便であるという点で、マウスやラットの嗅力を判定する方法として有用である¹¹⁾。

この方法を用いてわれわれは、以前、マウス嗅糸切断後の嗅刺激性行動を観察し、その結果、マウスは嗅糸切断後28日で正常な嗅力を回復し、またその回復は組織学的な嗅上皮の再生の過程と有意な相関を示すことを証明した¹²⁾。今回の実験では、嗅細胞の再生能力に関してみると、嗅上皮の厚さおよび嗅上皮における嗅細胞の密度は、嗅球除去後一旦減少した後速やかに回復しており、その間の経時的変化は以前に行った嗅糸切断後の変化と非常に似ていた。しかし、実際の嗅力の回復は嗅球除去300日後にも起こらなかった。この点については次のように考えた。まず今回の実験で嗅糸切断実験と大きく異なる点は嗅球が存在しないことである。嗅球自体にはにおいの識別能力はあまりないことはすでに証明されている¹³⁾。しかし嗅球が嗅細胞の成熟に及ぼす影響に関して Chuah ら¹⁴⁾はラット胎児の嗅上皮の培養を行い嗅球が存在しない条件下では嗅細胞の成熟が起こらないことを証明した。一方 Graziadei ら¹⁵⁾は、片側の嗅球を除去した後、再生した嗅線維が前脳との間にシナプス様の構造を持つことを電子顕微鏡で観察したが、残存する嗅球の有する機能の影響も考慮する必要がある、またはたして高次において中枢とつながりを持っているものなのか不明である。従ってこれまでの多くの報告にもみられるように、嗅細胞は中枢との結合がなくても常に turn over を繰り返し、次々と再生されるものの、中枢との連続を持たないため、本来の機能を持つまでにはいたらないのではないかと思われた。

ヒトでの外傷性嗅覚障害は調所ら¹⁶⁾の報告でもみられるように難治性であり、それは一般臨床医の認め

るところでもある。今回の実験では、嗅球除去後の長期間の観察において、嗅細胞の再生が認められたにもかかわらず嗅力は回復せず、その原因として嗅神経と中枢との非連続性によるものが考えられた。しかしながら、この中枢との非連続性をそのままヒトの外傷性嗅覚障害の難治性にすべて直結することはできないように思われる。なぜならば、それは今回のマウスにおける実験では嗅上皮において嗅細胞は中枢との連続性がないにもかかわらず対照と同程度まで再生したが、山岸ら¹⁷⁾が報告した外傷性嗅覚障害患者からの嗅上皮の生検所見では、嗅細胞は高度の萎縮をきたしているとして述べており、両者間に大きな違いがみられたためである。この差にはヒトとマウスの嗅細胞の再生能力あるいは turn over の速度が関与しているものと思われる。ヒトの外傷性嗅覚障害の難治性の一要因となっている可能性が示唆された。また、それは、ヒトのマウスの両者間の嗅覚の重要性の違いから生じた差ではないかとも思われた。

ま と め

マウス嗅球除去後の嗅覚系の変化を、ナラマイシンを用いた嗅刺激性行動で観察するとともに、組織学的に観察し以下の結果を得た。

1. マウスは嗅球除去によって0.01%ナラマイシン水溶液のニオイを識別することができなくなり、嗅球除去300日後までその状態は続いた。
2. 組織学的には、嗅球除去後7日目では嗅上皮内の嗅細胞はほとんど消失していたが、嗅球除去後14日目では新たな嗅細胞が出現し、細胞数およびその密度では300日後には対照とほぼ変わらぬまでに再生した。
3. 頭蓋内では篩板を通過してきた嗅神経を認めたが、それらが大腦皮質と結合を示す所見は得られなかった。
4. 従って嗅細胞は嗅球が存在しない状況下においても再生はするものの、本来の機能を有しないことが証明された。

参 考 文 献

- 1) Monti Graziadei GA, Graziadei PPC: Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. J Neurocytol 8: 197-213, 1979.
- 2) 菊屋義則: マウス嗅上皮の変性と再生. 耳鼻臨床 77:

- 1659-1680, 1984.
- 3) Costanzo RM, Graziadei PPC: A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J comp neurol* 215: 370-381, 1983.
 - 4) 夜久有滋, 猿田敏行: 嗅球除去後ラット嗅上皮の変性と再生に関する電顕的研究. *日耳鼻* 89: 1777-1786, 1986.
 - 5) 山岸益夫, 小西和朗, 五十嵐淑晴, 中野雄一: NO₂ ガス暴露によるモルモット嗅上皮の微細構造の変化. *日耳鼻* 85: 11-18, 1982.
 - 6) 上出文博: マウス鼻粘膜嗅部の拡がりと微構造, ならびに ZnSO₄ 溶液点鼻によるその変性と再生について. *十全医会誌* 89: 1-23, 1980.
 - 7) Matulionis DH, Breipohl W, Bhatnagar KP: Degeneration and regeneration of olfactory epithelium in the mouse. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: 3-12, 1982.
 - 8) 加納美樹子: インフルエンザAウイルス経鼻接種のマウス嗅粘膜への影響の観察. *耳展* 29: 129-157, 1986.
 - 9) 吉田克彦: 抗生物質投与によるマウス嗅粘膜の組織学変化について. *耳展26 (補)*: 1-22, 1983.
 - 10) Harding JW, Wright JW: Reversible effect of olfactory nerve section on behavior and biochemistry in mice. *Brain Res Bull* 4: 17-22, 1979.
 - 11) 木村恭之, 上出文博, 宮崎為夫, 梅田良三: マウスの嗅刺激性行動に関する研究. 防鼠剤ナラマイシンを使用して. *耳鼻臨床* 80: 469-475, 1987.
 - 12) 三輪高喜: マウス嗅糸切断後の行動学的ならびに組織学的変化に関する研究. *十全医会誌* 98: 391-414, 1989.
 - 13) Mathews DF: Response patterns of single units in the olfactory bulb of the rat to odor. *brain res* 47: 389-400, 1972.
 - 14) Chuah MI, Farbman AI, Menco BM: Influence of olfactory bulb on dendritic knob density of rat olfactory neurons in Vitro. *Brain Res* 338: 259-266, 1985.
 - 15) Graziadei PPC, Levine RR, Monti Graziadei GA: Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience* 4: 713-727, 1979.
 - 16) Zusho H: Posttraumatic anosmia. *Arch Otolaryngol* 108: 90-92, 1982.
 - 17) 山岸益夫: 外傷性嗅覚障害患者嗅粘膜の免疫組織化学的観察. *耳鼻と臨床* 35: 1009-1013, 1989.
-
- (1991年7月1日受稿 1991年10月8日受理)
- 別刷請求先 〒920 金沢市宝町13-1
金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室 三輪高喜