モルモット嗅球内における分裂細胞の動態

新潟大学医学部耳鼻咽喉科学教室

中 村 英 生 樋 口 豊
近 藤 宏 美 高 橋 姿CELL DYNAMICS OF DIVIDING CELLS IN
THE OLFACTORY BULB OF GUINEA PIGSHideo Nakamura, Yutaka Higuchi, Hiromi Kondoh,
Sugata Takahashi

Department of Otorhinolaryngology, Niigata University School of Medicine, Niigata

Neural and glial cells in the olfactory bulb of rats were reported to regenerate even after birth. We studied cell division dynamics the guinea pig olfactory bulb using immunohistochemical double staining. Anti-bromodeoxyuridine (BrdU) antibody for detecting dividing cells, anti-calbindin antibody, anti-protein gene product antibody for neural cells, and anti S-100 antibody for glial cells were used immunohistochemical staining.

At 1 hour after BrdU injection, many BrdU-labeled cells were present in the subventricular zone. BrdU-labeled cells migrated from the subventricular zone to the subependymal zone of the olfactory bulb through rostral migratory pathway within 5 days. Labeled cells then moved peripherally from the bulb zone differentiated neural cells and glial cells in some layers.

Key words : 嗅球, 分裂細胞, 幹細胞, 再生

はじめに

成熟動物における中枢神経系では通常、神経の再生は生じないとされている。しかし、第 I 脳神経に属する嗅神経細胞は、幹細胞（再生母細胞）を有し、再生が生ずるという能力を有する特異な神経細胞である。また近年大脳内にも幹細胞が大脳側脳室傍に存在し、この幹細胞が嗅索を経て嗅球内に流入し、そこで嗅球内における嗅覚に関与する神経細胞の再生に関与していることが分かってきた。今回われわれはモルモット大脳を用いて嗅球内へ流入する幹細胞の動態について免疫組織化学的二重染色による観察により検討したので報告する。

材料および方法

実験動物として生後 2 週 of モルモットを用いた。分裂期細胞を標識するために Bromodeoxyuridine (以下 BrdU) (80mg/kg) を蒸留水に溶解後腹腔内に注射し、分裂期細胞を BrdU にて標識した。BrdU 投与直後および 1, 5, 7, 14, 21, 28 日後に sodium pentobarbital (30mg/kg) 深麻酔下にブアン液による灌流固定を行い断頭し、大脳を嗅球も含めて採取した (n = 5)。アルコール系列脱水, パラフィン包埋後に 5 μ m の切片を作製した。免疫組織化学的手法としてはストレプトアビジンビオチン (SABC 法) (ニチレイヒストファイン) を用いた。標本を脱パラフィン, アルコール系列脱水後, 0.3% 過酸

化水素水添加メタノールにて室温下で15分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ反応を抑制した。その後DNA二重鎖を単鎖状態にするために2N-HClに37°Cで1時間浸漬し、さらにリン酸緩衝液(PBS)にて十分中和した。まず二重染色の第一段階としてBrdUに対する免疫組織化学染色を施行した。1次抗体としてマウス抗BrdU抗体(DAKO社製1:35)を37°Cで1時間反応させ、さらにビオチン標識マウス第二抗体にて37°Cで15分間処理した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを付加、37°Cで15分間反応させた。その後ジアミノベンジジン(DAB)にて褐色に発色させた。第二段階としては神経細胞およびグリア細胞の特異的蛋白に対する一次抗体、すなわち抗Calbindin D抗体(sigma社製)、抗protein gene product (PGP9.5)抗体(Ultra Clone社製)、抗S-100抗体(ニチレイ社製)を用いて第一段階と同様に反応させ、最後の発色剤には4クロロナフトールを用いて暗青色にそれぞれ発色させた。

結 果

1. 投与直後

大脳側脳室傍(subventricular zone: SVZ)にBrdU標識細胞が密に存在している。側索の大脳側にも少数ながら認める。嗅球内にはごくわずかに認めるのみである(図1, 2)。

2. 投与5日後

SVZから嗅索を経て嗅球内に流入するBrdU標識細胞を認める。球内ではほぼ中心部(subependymal zone)に存在し(図3)、Calbindin D、PGP9.5陽性の神経細胞および顆粒細胞の存在する領域には広がっていない。

3. 投与14日(2週)後

BrdU標識細胞は顆粒細胞領域へと拡散している。S-100抗体に反応するグリア細胞に分化している細胞も散見される(図4)。ほとんどの細胞は固有の突起を伸長させるまで分化成熟していない。

4. 投与28日(4週)後

BrdU標識細胞は嗅球の半径にして約2/3の位置まで拡散して分布していた。表面には未だ到達していない。Calbindin D、PGP9.5に反応する僧帽細胞の領域内にも認められるが、二重染色される細胞はごく少数のみである(図5)。

考 察

動物の嗅覚関連神経細胞は再生能力を有する特異な神経細胞である。実際動物実験においては嗅神経切断後約1カ月で速やかに嗅上皮内の嗅細胞は再生することが知

図1 嗅球—大脳全体の模式図

BrdU標識細胞はsubventricular zone (SVZ)からrostral migratory pathway (RMP)を経てolfactory bulb (OB)に流入する。SEZ: subependymal zone

図2 投与1時間後のSVZの所見

SVZに多数集簇している褐色に染色されるBrdU標識細胞を認める。ヘマトキシリン核染色を追加。Bar=50μm

られている^{1,4)}。一方哺乳動物の中樞神経系においてニューロン新生は起こらないとされるが、例外的に幹細胞の存在する領域が2箇所あることが近年分かった。一つは、側脳室外側の脳室下帯(subventricular zone: SVZ)と称する領域に存在する幹細胞で、嗅球におけるニューロン新生に寄与している。もう一つは海馬の歯状回に存在する細胞で、歯状回自身におけるニューロン新生に関与している^{5,6)}。SVZ幹細胞の存在はラットにて既に確認され、この細胞が嗅索を経て嗅球内に流入、嗅覚系の神経細胞、グリア細胞の再生に関与していることが分かっている⁷⁾。嗅球内の神経細胞全てがこのSVZに由来するかどうかについては確証がないものの、嗅球内の神経細胞のターンオーバーに大きく影響していることは間違いない。今回はモルモットを用いて嗅球内の細胞新生に関する幹細胞の動態を免疫組織化学的に観察した。

図3 投与5日後の嗅球の所見
BrdU 標識細胞は RMP を経て嗅球内に流入, この時点では SEZ にとどまっている細胞が大半である。ヘマトキシリン核染色を追加。
Bar=50 μ m

図5 投与28日目の嗅球内の所見
標識細胞は嗅球内にひろく分布するようになる。僧帽細胞 (矢印) 層へも浸透している。
Bar=25 μ m

図4 投与14日目の嗅球内の所見
標識細胞は顆粒細胞領域へと拡散している。S-100 抗体に反応するグリア細胞に分化して二重染色される細胞も散見される (矢印)。
Bar=25 μ m

今回は生後2週とまだ幼弱のモルモットを用いた。モルモット嗅上皮の幹細胞は加齢に伴って減少することが知られており^{8,9)}, また, ラット歯状回における検討でも BrdU 取り込みを取り込む分裂細胞は加齢とともに減少することが分かっている⁹⁾。経時的に観察するにあたり脱落する細胞も考慮し, 初期ラベリング時に多数の取り込み細胞があったほうが望ましいと考えたからである。

投与一時間後の SVZ には多数の BrdU 取り込み細胞を認めた。この SVZ における幹細胞の詳細な起源については明確なことは分かっていない^{10,11)}。これらの細胞は経時的に rostral migratory pathway (RMP) と称するルートを経由して嗅球へと向かい, そこで周辺へ拡散するように移動し, かつ神経細胞へと分化する。成熟ラ

ットでは RMP への移動が約1週間である⁵⁾のに対して今回用いた幼弱モルモットでは5日であった。動物種の違いもあろうし, 幼弱期と成熟期とでは細胞のターンオーバーの速度が異なり嗅上皮内分裂細胞の動態と同様に大脳-嗅球間の幹細胞の移動も幼弱期の方が速いためではないかとも考えられた。RMP から嗅球内での周辺の移動および嗅球内神経細胞への分化についてであるが嗅上皮内分裂細胞が BrdU を取り込んでから1-2日で嗅細胞へと分化し始める¹²⁾のとは比べて時間を要することが分かった。嗅上皮では基底部の幹細胞は嗅神経細胞への唯一の幹細胞 (前駆細胞) であり, 嗅球内では SVZ-RMP らの幹細胞は嗅球内の各種神経細胞やグリアへと細胞環境における様々な分化促進因子により多種類の細胞へと分化することが知られている^{7,13)}。すなわち, 一旦嗅球内に流れ込み, その嗅球内において各種因子の影響を受け, 嗅球内の各種構成細胞の前駆細胞になり, やがて分化することが考えられる。SVZ から RMP を経て移動中は multipotential な細胞であると考えられるのが妥当で, これらが分裂から分化までに時間の要する一つの理由と思われる。

嗅球内における神経細胞は少なくとも BrdU ラベルから4週間後には神経細胞に分化していることが分かった。今回の検討ではこの神経細胞の寿命についての検討は出来なかったが, 細胞死に関してはアポトーシスが関与しているという報告がある¹⁵⁾。少なくとも嗅神経細胞の寿命約1カ月に比べると長いものと推察される。

ところで嗅上皮内嗅細胞と同様嗅球内においても細胞は turn over を行っていることが分かった訳であるが, これらの再生分化を制御している因子に関する研究もす

すんでいる。近年細胞増殖因子の一つである線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) や上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF)⁷⁾あるいはエストロゲン¹⁴⁾がSVZ由来幹細胞の増殖分化に影響を与えているとの報告がある。

第I脳神経に属する嗅神経細胞, 嗅球内神経細胞がモルモットにおいても再生分化を繰り返していることが判明した。近年細胞工学の発達とともに幹細胞や再生に関する研究が盛んである。嗅神経はヒトにおいては鼻腔内嗅裂部に存在し, 外界に接した神経細胞であり, かつ再生を行う感覚器である。神経系の再生という大きな問題解決に向けての格好の研究対象であり, 今後ともさらなる研究が望まれる。

文 献

- 1) Andres KH: Differenzierung und Regeneration von Sinnes-zellen in der Regio Olfactria. *Naturwiss* 17: 500, 1965.
- 2) Clark WE, Warnick RTT: The pattern of olfactory innervation. *J Neural Psychiat* 9: 101-111, 1946.
- 3) Nagahara: Experimentelle Studien über die histologischen Veränderungen des Geruchsorgans nach der Olfactoriusdurchschneidung — Beiträge zur Kenntnis des freieren Baus des Geruchsorgans—. *Jap J Med Sci V Pathol* 5: 165-199, 1940.
- 4) Nakamura H: Immunohistochemical observation of dividing cells in olfactory epithelium using anti BrdU antibody. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 248: 298-301, 1991.
- 5) Luskin MB: Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189, 1993.
- 6) Kuhn HG, Anson HD, Gage FH: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-2033, 1996.
- 7) Kuhn HG, Winkler J, Gage FH, et al: Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17: 5820-5829, 1997.
- 8) Farbmann AI: Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13: 362-365, 1990.
- 9) Nakamura H, Fujiwara M, Kawasaki M, et al: Age-related changes in dividing cells of the maturing guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 289-292, 1998.
- 10) Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al: Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34, 1999.
- 11) Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716, 1999.
- 12) 川崎 克: モルモット嗅上皮内分裂細胞の経時的観察—免疫組織化学二重染色法による—。日耳鼻 100: 1419-1424, 1997.
- 13) Suhonen JO, Peterson DA, Gage FH, et al: Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383, 624-627, 1996.
- 14) Smith MT, Pencea V, Wang Z, et al: Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Hormones & Behavior* 39: 11-212, 2001.
- 15) Brain KF, Peter CB: Cell death in the developing and sensory-deprived rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 431: 311-319, 2001.

(2001年10月9日受稿, 2001年12月6日受理)

別刷請求先 〒951-8510 新潟市旭町通1

新潟大学医学部耳鼻咽喉科 中村 英生

Tel: 025-227-2306 Fax: 025-227-0786