

Histological Study of the Olfactory Epithelium and Olfactory Bulb in Experimental Rat Models of Sinusitis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9491

ラット実験的副鼻腔炎モデルにおける 嗅上皮および嗅球の組織学的検討

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座 (主任: 古川 侃教授)
達 富 真 司

副鼻腔炎による嗅覚障害の発症機序を明らかにするためラットで実験的副鼻腔炎モデルを作成し、嗅上皮ならびに嗅球の組織学的検討を行った。ラットの側鼻腔に細菌感染した異物を挿入して3, 7, 14, 21, 28日後に各10匹づつ鼻腔組織および嗅球を採取した。鼻腔組織および嗅球はパラフィン包埋後、冠状断連続切片を作成した。鼻腔組織切片はHE染色を施行して上顎洞を観察し、副鼻腔炎の発症の有無を検討した。副鼻腔炎を発症したラットの鼻腔組織切片は嗅粘膜を観察し、嗅上皮の厚さを計測した。また副鼻腔炎を発症したラットの鼻腔組織切片は抗プロテインジーンプロダクト9.5 (protein gene product 9.5, PGP9.5) 抗体, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) 抗体, 抗単鎖DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 抗体, 抗誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体を用いて嗅上皮の免疫組織学的検討を行った。副鼻腔炎を発症したラットの嗅球切片は抗タイロシンハイドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase, TH) 抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。その結果, 3日群では6匹, 7日群では7匹, 14日群では6匹, 21日群では6匹, 28日群では7匹のラットに副鼻腔炎の発症が確認された。副鼻腔炎群の嗅上皮では3日目に炎症が起こっており, 28日目でも炎症が持続していた。嗅上皮の厚さ, 嗅細胞層数, 嗅上皮100 μm あたりの嗅細胞数は21日目まで有意差をもって減少し続けた。嗅神経線維束は異物を挿入する日数が長いほど細くまばらになっていた。嗅細胞の新生は7日目まで著明に低下し続け, 21, 28日目には嗅細胞の新生はほとんど認められなかった。嗅細胞のアポトーシスは3, 7日目で最も多く観察され, その後減少し, 21, 28日目にはほとんど認められなかった。嗅上皮におけるiNOSの発現は正常嗅上皮ではほとんど認められなかったが, 副鼻腔炎群では基底細胞を中心に多量のiNOS発現を認めた。しかし嗅上皮の変性が高度なものではiNOS発現は減少していた。嗅球では傍糸球体細胞のTH発現が7日目から減少し始め, 21, 28日目では著明に減少していた。

Key words experimental sinusitis, olfactory epithelium, apoptosis, nitric oxide, olfactory bulb

嗅覚障害の原因には様々な疾患が挙げられるが, なかでも日常診療で最も多く遭遇するのは副鼻腔炎に起因するものである¹⁾。一般に副鼻腔炎による嗅覚障害は鼻粘膜の腫脹や鼻ポリープ, 鼻汁による呼吸性嗅覚障害, 嗅上皮の炎症による末梢神経性嗅覚障害あるいは両者が混在した混合性嗅覚障害であると考られている¹⁾。副鼻腔炎による嗅覚障害の組織学的検討は, これまでヒト副鼻腔炎患者の嗅粘膜^{2)~4)}あるいは副鼻腔炎動物モデル⁵⁾を用いた研究が行われてきた。しかしヒトを用いた研究では副鼻腔炎による嗅上皮の組織学的変化を経時的に検討できないため, 詳細な病態の解明には至っていない。一方, 副鼻腔炎動物モデルを用いた研究の場合, これまで用いられてきたモデルはウサギ上顎洞自然孔を外科的に閉鎖し上顎洞に菌を注入するというMaeyama⁶⁾の方法で作成されたものである。このモデルでは炎症が上顎洞から周囲に波及していくため副鼻腔炎の発症機序から考えて生理的ではなく, 副鼻腔炎による嗅覚障害を検討するには適切なモデルとはいえなかった。1997年にMarks⁷⁾が発表した新しい副鼻腔炎モデルは, 細菌感染した異物をウサギ鼻腔に挿入するという簡便な方法ながら各副鼻腔の

換気の阻害と感染により副鼻腔炎が惹起されるという点で生理的なものであり, 副鼻腔炎による嗅覚障害を検討するのに適していると思われる。

今回著者はMarksの方法に準じ, 初めてラットで副鼻腔炎モデルを作成することに成功した。本実験では新たに作成したラット副鼻腔炎モデルを用いて嗅上皮の組織形態学的変化, 嗅細胞の新生, 嗅細胞のアポトーシスを検討して副鼻腔炎による嗅覚障害の発症機序について考察した。また副鼻腔炎が嗅覚伝導路におよぼす影響を検討するために嗅球について組織学的検討を行った。さらに副鼻腔炎における嗅上皮の一酸化窒素産生能について検討を行った。

材料および方法

I. 実験的副鼻腔炎モデルの作成

1. ポリビニールアセタール (polyvinyl acetal) 挿入群
実験には生後8週の雄Sprague-Dawley系ラット50匹を使用した。ペントバルビタール (ネンブタール[®], 大日本製薬, 大阪)の腹腔内投与による麻酔後, 前頭部から鼻背正中, そして

平成12年9月13日受付, 平成12年11月1日受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; AX, olfactory axonal bundles; bNOS, brain nitric oxide synthase; DAB, diaminobenzidine; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LP, lamina propria; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide

左鼻翼まで皮膚切開を行い、前頭骨および鼻骨を露出し、鼻入口部を広げた。次に黄色ブドウ球菌 10^9 CFUを塗布した $1 \times 2 \times 18$ mmのポリビニールアセタール (Merocel®, XOMED Surgical Product, Jacksonville, USA) を左側鼻腔に挿入した。黄色ブドウ球菌はJCM (Japan Collection of Microorganisms, 埼玉) より購入したJCM2151 (Staphylococcus aureus strain 209P) を平板寒天培地 (日水プレート羊血液寒天培地®, 日水製薬, 東京) 上で 37°C にて24時間培養したものを使用した。

上記のラットを5群に分け、異物を挿入してから3, 7, 14, 21, 28日後に各10匹ずつペントバルビタール深麻酔下に開胸し、経心的に灌流固定した。灌流液は0.01M PBS, 固定液は4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA)-0.1Mリン酸緩衝液 (phosphate buffer, PB) を使用した。灌流固定後直ちに鼻腔組織および嗅球を取り出した。鼻腔組織は固有鼻腔と副鼻腔がすべて含まれるよう一塊に採取した。鼻腔組織は4%PFA-0.1M PBにて一晩後固定した後12%EDTA溶液にて脱灰した。アルコール上昇系列にて脱水後パラフィン包埋し、ミクロトームにて頬骨突起のやや前方から前鼻孔へ向かって前額断方向の厚さ $3 \mu\text{m}$ の冠状断切片を作製した。嗅球は4%PFA-0.1M PBにて一晩後固定した後アルコール上昇系列にて脱水後パラフィン包埋し、ミクロトームにて前額断方向の厚さ $3 \mu\text{m}$ の冠状断切片を作製した。

2. 正常群

コントロールとして生後8, 9, 10, 11, 12週の未処置の雄ラット各2匹, 計10匹の鼻腔組織と嗅球を前述と同様の方法で採取して切片を作成した。

なお今回の実験はすべて金沢大学宝町地区動物実験委員会の規定に基づき適正に行われた。

II. 組織学的検討

1. HE染色

副鼻腔炎の有無を検討するために、前述の処置を施した各群の鼻腔組織切片にてHE染色を施行し、光学顕微鏡下に観察した。3, 7, 14, 21, 28日の各群において上顎洞貯留液, 上顎洞粘膜の肥厚や浮腫, 炎症細胞浸潤などを認め、副鼻腔炎の発症が確認されたものを副鼻腔炎群とした。副鼻腔炎の認められない例は検討から除外した。副鼻腔炎群は鼻中隔, 鼻腔天蓋, 鼻腔外側にて嗅上皮を光学顕微鏡下600倍で写真撮影して嗅上皮の厚さを計測し、その平均値を求めた。正常群の鼻腔組織切片においても同様の方法で嗅上皮の厚さを計測した。

2. 免疫組織学的検討

副鼻腔炎群と正常群の鼻腔組織および嗅球の切片を用いて、以下に示す免疫組織学的検討を行った。免疫組織学的検討はアビジン-ビオチン複合法 (avidin-biotin peroxidase complex method, ABC法) にて行った。

1) 嗅上皮

i) 嗅細胞の観察

嗅細胞と嗅神経線維束を観察するためprotein gene product 9.5 (PGP9.5) に対する抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。鼻腔組織切片のパラフィンを除去した後、0.3%過酸化水素加メタノールにて10分間内因性ペルオキシダーゼの活性を阻

止した。0.3%TritonX-100加PBS (PBS with 0.3%Triton-X100, 0.3%PBST) に2時間つけた後、0.4%トリプシン液にて10分間消化処理を加えた。非特異的反応を阻止するため5%正常ヤギ血清を15分間反応させた。2000倍希釈したウサギ抗PGP9.5抗体 (Ultracolon, Wellow, England) を室温で一晩反応させた後、二次抗体として100倍希釈したビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Vector, Burlingame, USA) を室温で1時間反応させた。続いてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (ABC kit®, DAKO, Glostrup, Denmark) と1時間反応させた後、ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) 溶液にて5~10分発色させた。染色後、鼻中隔, 鼻腔天蓋, 鼻腔外側の嗅上皮を光学顕微鏡下600倍で写真撮影して嗅細胞層数を計測し、その平均値を求めた。また嗅上皮 $100 \mu\text{m}$ あたりの嗅細胞数を計測し、その平均値を求めた。

ii) 嗅細胞新生の検討

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) を細胞増殖能の指標とし、PCNAに対する抗体を用いて嗅上皮における嗅細胞の新生を検討した。鼻腔組織切片を脱パラフィンし、0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼの活性を阻止した後、マウス抗PCNA抗体 (1:100) (DAKO, Glostrup, Denmark) を室温で一晩反応させた。二次抗体はビオチン化ウマ抗マウスIgG抗体 (1:100) (Vector, Burlingame, USA) を1時間反応させた。二次抗体を反応させた後はi) と同様の手順で行い、DABによる発色は8~15分とした。過去の報告によると、嗅上皮基底層には新生嗅細胞が連続して存在する動的領域と全く認められない静的領域が存在する^{9)~11)}。今回の検討では、光学顕微鏡下倍率400倍で嗅上皮基底層を観察し、動的領域で3カ所を選んで1視野あたりのPCNA陽性細胞数を計測し、平均値をもとめた。

iii) アポトーシス嗅細胞の検出

単鎖DNA (single-stranded DNA, ssDNA) に対する抗体を用いて免疫組織学的に嗅細胞のアポトーシスを検出した。一次抗体としてウサギ抗ssDNA抗体 (1:100) (DAKO, Glostrup, Denmark) を用いて、ii) と同様の方法で鼻腔組織切片の染色を行った。ただし、一次抗体の反応時間は1時間とし、二次抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体を使用した。DABによる発色は1~3分とした。染色後、光学顕微鏡下倍率400倍で嗅上皮を観察し、任意の3カ所を選んで1視野あたりのssDNA陽性細胞数を計測し、その平均値をもとめた。

iv) 一酸化窒素産生能

鼻副鼻腔粘膜の一酸化窒素産生能の変化を検討するため、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) に対する抗体を用いて免疫組織学的に観察した。一次抗体としてウサギ抗iNOS抗体 (1:500) (BIOMOL Research Laboratories, Plymouth Meeting, USA) を用いてiii) と同様の方法で、鼻腔組織切片の染色を行った。DABによる発色は5~10分とした。染色後、嗅上皮を光学顕微鏡にて観察した。

2) 嗅球

タイロシンハイドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase, TH) に対する抗体を用いて、嗅球を免疫組織学的に観察した。一次

synthase; OB, olfactory bulb; OE, olfactory epithelium; ONL, olfactory nerve layer; ORN, olfactory receptor neuron; PB, phosphate buffer; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PFA, paraformaldehyde; PGP9.5, protein gene product 9.5; RE, respiratory epithelium; ssDNA, single-stranded DNA; TH, tyrosine hydroxylase

抗体としてウサギ抗 TH 抗体 (1:100) (Protos Biotech Corporation, New York, USA) を用いて, i) の手順からトリプシンによる消化処理を省略した方法で嗅球切片の染色を行った. DAB により 10~15 分発色させた後, クレシルファストバイオレット溶液によるニッスル染色を行った. 染色後, 光学顕微鏡にて観察した.

3. 統計学的処理

嗅上皮の厚さ, 嗅細胞層数, 嗅上皮 100 μm あたりの嗅細胞数, PCNA 陽性細胞数および ssDNA 陽性細胞数においては, 統計学的に各群の間の差を調べるため, 各群の平均値の間で一元配置分散分析の後, Scheffe の多重比較法を行い, $p < 0.01$ を優位差ありとした.

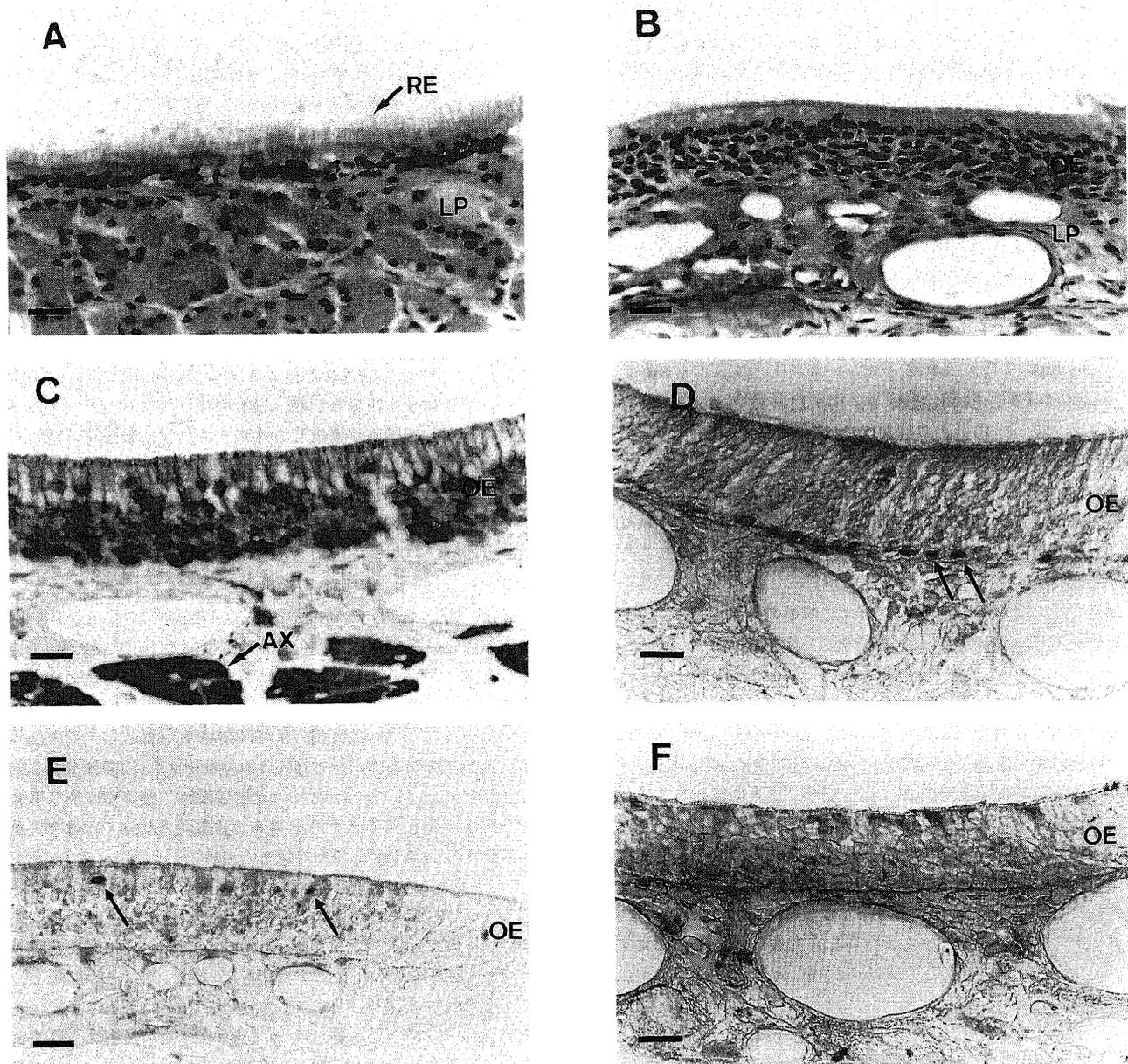


Fig. 1. Maxillary sinus mucosa and olfactory mucosa of control rats. (A) HE staining of maxillary sinus mucosa. The normal ciliated epithelium is observed. Inflammatory cells are rare. (B) HE staining of olfactory mucosa. No inflammatory change is observed in OE and in lamina propria. (C) Immunohistochemical staining of PGP9.5 in olfactory mucosa. OE contains several layers of ORNs exhibiting PGP9.5 immunoreactivity. Within ORNs, the soma and dendrite are intensely immunopositive. In lamina propria, a large number of olfactory axonal bundles exhibiting PGP9.5 immunoreactivity are observed. (D) Immunohistochemical staining of olfactory mucosa for PCNA. Numerous cells exhibiting PCNA immunoreactivity can be found in the basal cell layer of OE. Arrows indicate PCNA positive cells. (E) Immunohistochemical staining of olfactory mucosa for ssDNA. OE contains a several number of apoptotic ORNs exhibiting ssDNA immunoreactivity. Arrows indicate ssDNA positive cells. (F) Immunohistochemical staining of olfactory mucosa for iNOS. There is no expression of iNOS in OE. AX, olfactory axonal bundles; LP, lamina propria; OE, olfactory epithelium; RE, respiratory epithelium. Scale bar indicates 20 μm for A to F.

成 績

I. ラット実験的副鼻腔炎モデルの組織像

1. 上顎洞粘膜の組織形態学的観察

正常群の上顎洞粘膜は多列線毛上皮にて覆われ、粘膜固有層には結合組織の中に豊富な腺組織、血管が観察され、炎症所見を認めなかった(図1A)。ポリビニールアセタール挿入群を観察すると異物挿入後3日目では、固有鼻腔および上顎洞内に好中球を多量に含んだ浸出液を認めた(図2A)。上顎洞粘膜は好中球浸潤や呼吸上皮の増生、浮腫状の腫脹、血管の拡張や増生

が観察された。7、14日目ではさらに多くの好中球が粘膜に浸潤し炎症はより強くなっていたが、21、28日目では7、14日目と同程度の炎症であった。

HE染色にて上記の如く副鼻腔炎の発症が確認されたのは3日群6匹、7日群7匹、14日群6匹、21日群6匹、28日群7匹であった。以下の検討はこれら副鼻腔炎発症例にて行い、副鼻腔炎群とした。

2. 嗅粘膜の組織形態学的観察

1) HE染色による観察

正常群の嗅上皮は表層部にある支持細胞、その下層の嗅細胞、

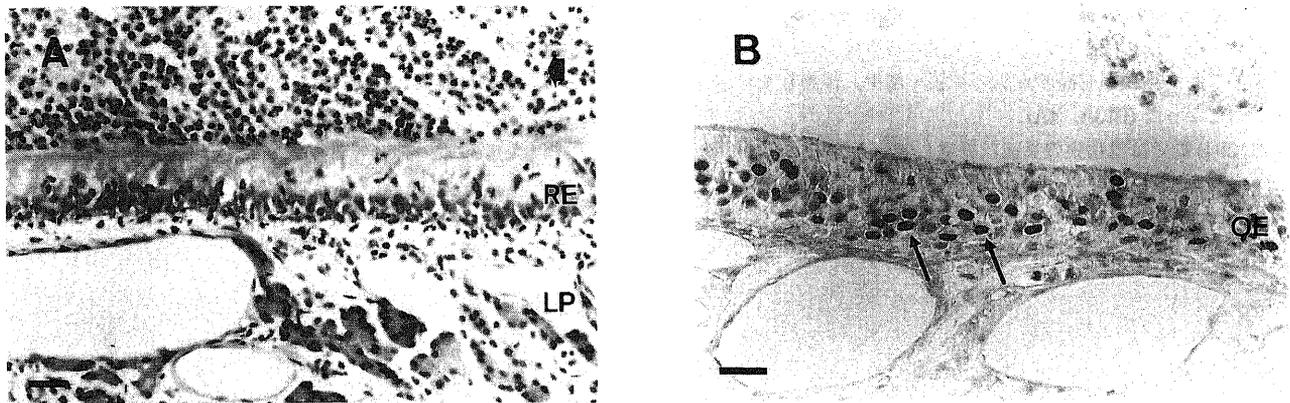


Fig. 2. Maxillary sinus mucosa and olfactory mucosa at 3 days after insertion of a foreign body. (A) HE staining of maxillary sinus mucosa. The sinus mucosa is intensely inflamed with heavy luminal exudation of predominantly neutrophils. A thick arrow indicates luminal exudation. (B) Immunohistochemical staining of olfactory mucosa for ssDNA. Apoptotic ORNs increase significantly compared with controls. LP, lamina propria; OE, olfactory epithelium; RE, respiratory epithelium. Scale bar indicates 20 μ m for A and B.

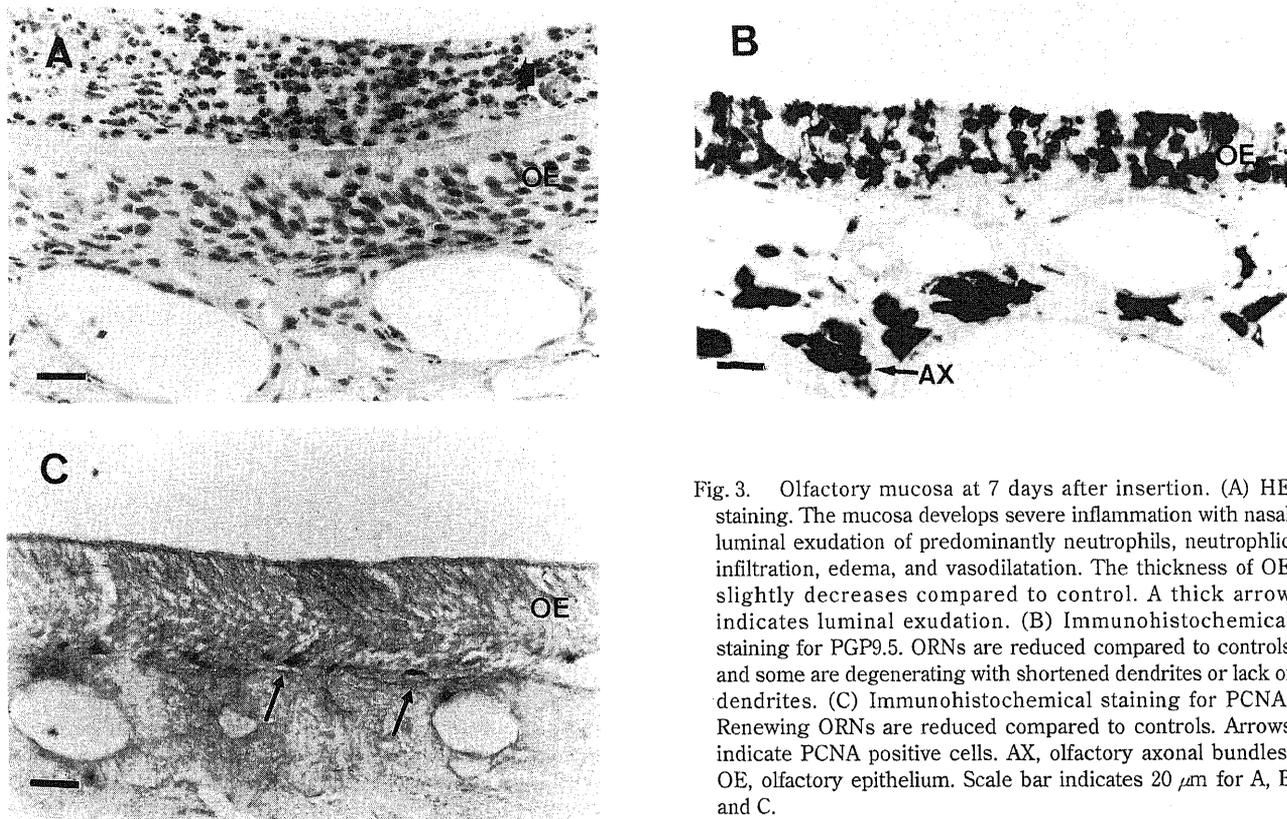


Fig. 3. Olfactory mucosa at 7 days after insertion. (A) HE staining. The mucosa develops severe inflammation with nasal luminal exudation of predominantly neutrophils, neutrophilic infiltration, edema, and vasodilatation. The thickness of OE slightly decreases compared to control. A thick arrow indicates luminal exudation. (B) Immunohistochemical staining for PGP9.5. ORNs are reduced compared to controls and some are degenerating with shortened dendrites or lack of dendrites. (C) Immunohistochemical staining for PCNA. Renewing ORNs are reduced compared to controls. Arrows indicate PCNA positive cells. AX, olfactory axonal bundles; OE, olfactory epithelium. Scale bar indicates 20 μ m for A, B and C.

最下部の基底細胞の3層構造を認め、粘膜固有層には血管、嗅細胞の軸索が集合して形成される嗅神経線維束などが観察された。炎症所見は認めなかった(図1B)。副鼻腔炎群を観察すると、3日群では嗅上皮の3層構造は比較的保たれているが細胞配列がやや不規則になり、正常で認められた嗅上皮最表層にある支持細胞の核や細胞質の部分が減少し、嗅細胞自身も正常に比べて減少していた。そのため嗅上皮は正常群に比べてやや薄くなり、上層の嗅細胞の核はかなり上皮表層に接近しているように観察された。粘膜固有層は浮腫状に腫脹し、血管の拡張や増生が観察された。好中球の浸潤が嗅上皮および粘膜固有層に少数認められた。

7, 14日群では嗅上皮の細胞配列はさらに不規則となり、3層構造がはっきりしないものもあった。嗅上皮の厚さはさらに薄くなっていった。嗅上皮および粘膜固有層の好中球浸潤はさらに多くなり、粘膜固有層の血管の拡張・増生、浮腫状変化は一層著明となった(図3A, 4A)。

21, 28日群では嗅粘膜の炎症は終息している傾向にあったが、

嗅上皮はさらに薄くなり、多くは3層構造が不明瞭になっていた(図5A, 6A)。

正常ラットにおいて嗅上皮の厚さの平均には週齢で差が見られなかったので、正常ラット10匹全てを一つの正常群とした。正常群の嗅上皮の厚さの平均値は $58.53 \pm 2.40 \mu\text{m}$ であった。副鼻腔炎群では、3日群 $53.7 \pm 6.93 \mu\text{m}$ 、7日群 $38.34 \pm 6.23 \mu\text{m}$ 、14日群は $31.57 \pm 9.65 \mu\text{m}$ 、21日群 $15.85 \pm 5.59 \mu\text{m}$ 、28日群 $25.54 \pm 8.72 \mu\text{m}$ であり、21日目までは有意差をもって減少し続けた(図8A)。

2) 免疫組織染色による観察

抗PGP9.5抗体を用いた免疫染色で嗅細胞および嗅神経線維束を観察した。PGP9.5は神経細胞の細胞質内の主要な構成成分で、嗅粘膜では嗅上皮の嗅細胞と粘膜固有層の嗅神経線維束で陽性となる^{12)~14)}。正常群の嗅上皮では嗅細胞の細胞体が密集して幾層にも重なり、そこから上皮表層に向かって多数の樹状突起が伸び、その先端に嗅小胞が存在するのが観察された。粘膜固有層では太い神経線維束が多数存在していた(図1C)。

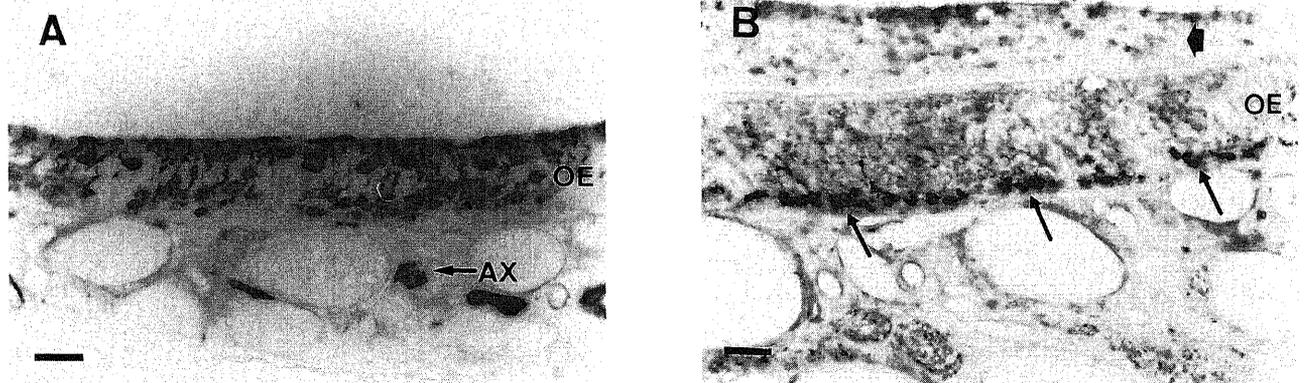


Fig. 4. Olfactory mucosa at 14 days after insertion. (A) Immunohistochemical staining of PGP9.5. The number of ORNs is reduced and degenerated ORNs increased. Thinner olfactory axonal bundles are observed sparsely. (B) Immunohistochemical staining of iNOS. Marked expression of iNOS was observed mainly in the basal layer of OE. A thick arrow indicates luminal exudation. Arrows indicate iNOS positive basal cells. AX, olfactory axonal bundles; OE, olfactory epithelium. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$ for A and B.

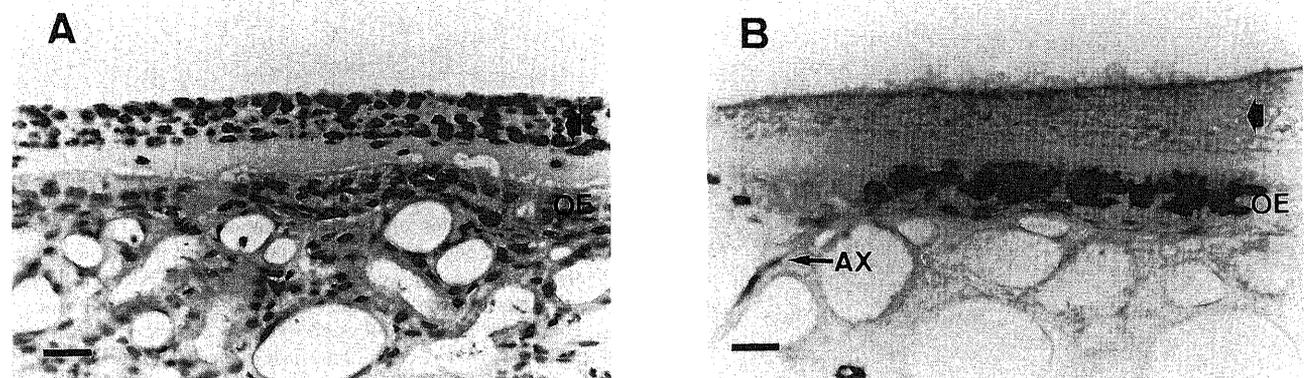


Fig. 5. Olfactory mucosa at 21 days after insertion. (A) HE staining. The mucosa continues to be inflamed. The thickness of OE decreases compared to control. (B) Immunohistochemical staining of PGP9.5. Many degenerated ORNs are observed. Thinner olfactory axonal bundles are observed sparsely. A thick arrow indicates luminal exudation. AX, olfactory axonal bundles; OE, olfactory epithelium. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$ for A and B.

副鼻腔炎3日群では正常群に比べて嗅細胞の数は減少していた。嗅細胞のなかには樹状突起の一部が消失したり、あるいは樹状突起が全て消失してほとんど細胞体だけとなってしまった変性嗅細胞も観察された。嗅神経線維束は正常に比べてやや細く、減少していた。

7日群では3日群と同様の変化が認められたが、3日群よりも嗅細胞は減少し、変性嗅細胞の占める割合が高くなっていた。嗅神経線維束も3日群に比べて細く、減少していた(図3B)。

14日群では3, 7日群で認められた変化が一層著明となっていた。嗅細胞はかなり減少し、嗅神経線維束も明らかに細くまばらとなっていた(図4B)。

21, 28日群ではもはや正常な形態を示す嗅細胞はほとんど存在せず、変性した嗅細胞が散在的に見られるものが多かった。嗅神経線維束は著明に減少し、ほとんど認められないものもあった(図5B, 6B)。

嗅細胞層数の平均は、正常群では 6.78 ± 0.27 層であった。副鼻腔炎群では3日群 5.98 ± 0.41 層、7日群 4.39 ± 0.76 層、14日群 3.28 ± 0.72 層、21日群 1.27 ± 0.82 層、28日群 1.61 ± 0.55 層

で、21日目までは有意差をもって減少し続けた(図8B)。嗅上皮 $100 \mu\text{m}$ あたりの嗅細胞数の平均は、正常群では 67.37 ± 3.37 個であった。副鼻腔炎群では3日群 47.83 ± 6.97 個、7日群 32.43 ± 4.23 個、14日群 22.45 ± 6.10 個、21日群 8.73 ± 8.15 個、28日群 9.40 ± 5.02 個で、21日目までは有意差をもって減少し続けた(図8C)。

II. 嗅細胞の新生

PCNAは細胞周期のG1からS期にかけて特異的に合成され、これに対応する抗PCNA抗体はG1, S, G2, M各期のいずれとも反応を示す¹⁰⁾。正常嗅上皮では基底層に連続して並んで存在するPCNA陽性細胞が多数観察され、過去に報告されているように^{9)~11)}動的領域と静的領域が存在した(図1D)。

副鼻腔炎群を観察すると、3, 7, 14日群では正常群に比べてPCNA陽性細胞が減少し(図3C)、21, 28日群ではPCNA陽性細胞はほとんど認められなくなり、嗅細胞の分裂、新生がほぼ停止している状態と考えられた。

PCNA陽性基底細胞の平均は正常群では 29.53 ± 2.46 個であった。副鼻腔炎群では3日群 13.28 ± 1.95 個、7日群 5.69 ± 2.88

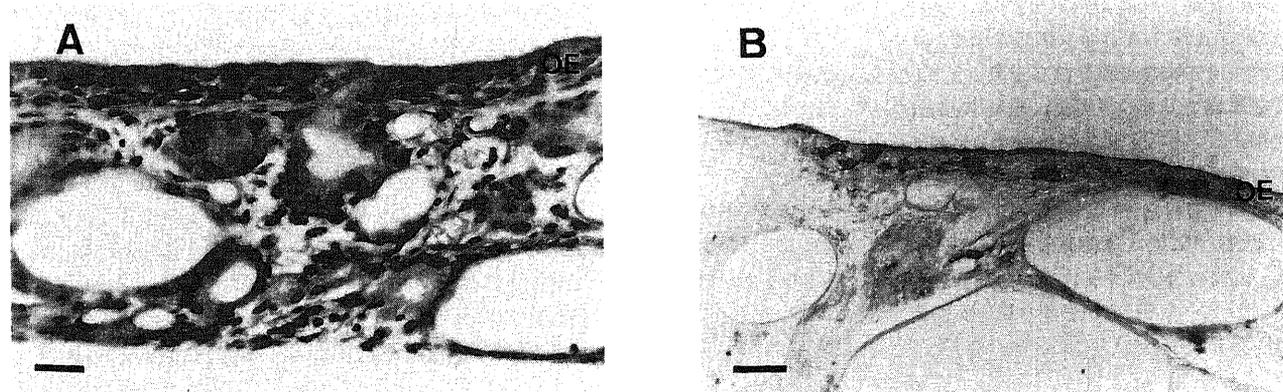


Fig. 6. Olfactory mucosa at 28 days after insertion. (A) HE staining. Inflammation is still continued, however slightly reduced. The thickness of OE significantly decreased. (B) Immunohistochemical staining of PGP9.5. Degenerated ORNs are observed sparsely. OE, olfactory epithelium. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$ for A and B.

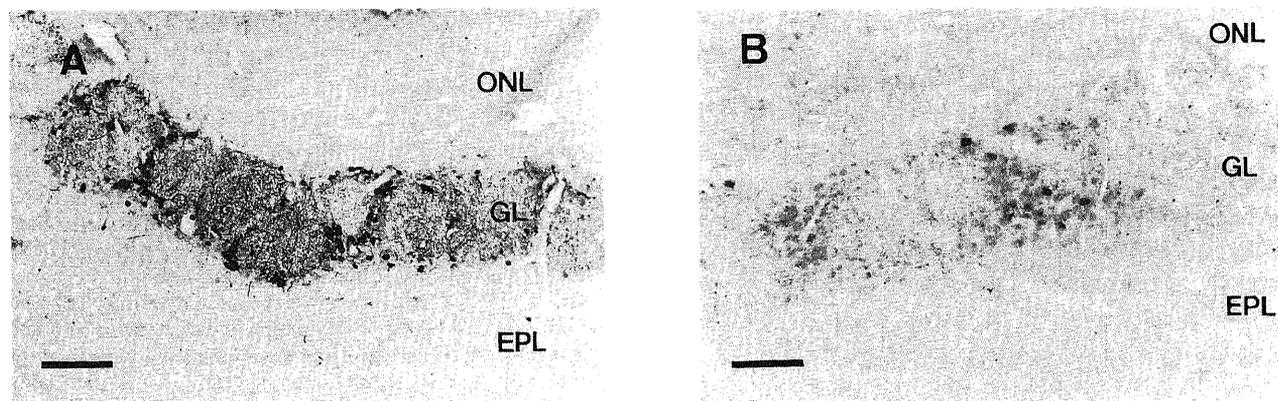


Fig. 7. Immunohistochemical staining of OB for TH. (A) Control. Note numerous TH-immunoreactive neurons and axons in glomerular layer of control OB. (B) At 21 days after insertion. Neuronal elements with TH immunoreactivity of OB show marked decrease. EPL, external plexiform layer; GL, glomerular layer; ONL, olfactory nerve layer. Scale bar indicates $20 \mu\text{m}$ for A and B.

個, 14日群 6.45 ± 6.27 個, 21日群 0.27 ± 0.52 個, 28日群 0.49 ± 0.75 個であった (図8 D).

Ⅲ. 嗅細胞のアポトーシス

抗ssDNA抗体は切断されたDNA末端を免疫組織化学的手法により検出するもので, 従来アポトーシスの検出に利用されてきたTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) 法に替わる新しいアポトーシス検出法として最近注目されている^{16)~19)}. 正常嗅上皮ではssDNA陽性嗅細胞は散在的に存在しているの

みであった (Fig. 1E). しかし副鼻腔炎群では3, 7日群でssDNA抗体陽性嗅細胞が多数観察され, 正常群に比べて著明に増加していた (図2 B). 14日群では3, 7日群と比べるとssDNA陽性嗅細胞は明らかに少なく, 正常群と同程度かそれ以下まで減少していた. 21, 28日群ではssDNA陽性嗅細胞はほとんど観察されなかった.

ssDNA陽性嗅細胞数の平均は正常群では 9.50 ± 2.24 個であった. 副鼻腔炎群では3日群 40.20 ± 23.54 個, 7日群 34.00 ± 19.70 個, 14日群 5.72 ± 5.01 個, 21日群 0.83 ± 0.75 個, 28日群

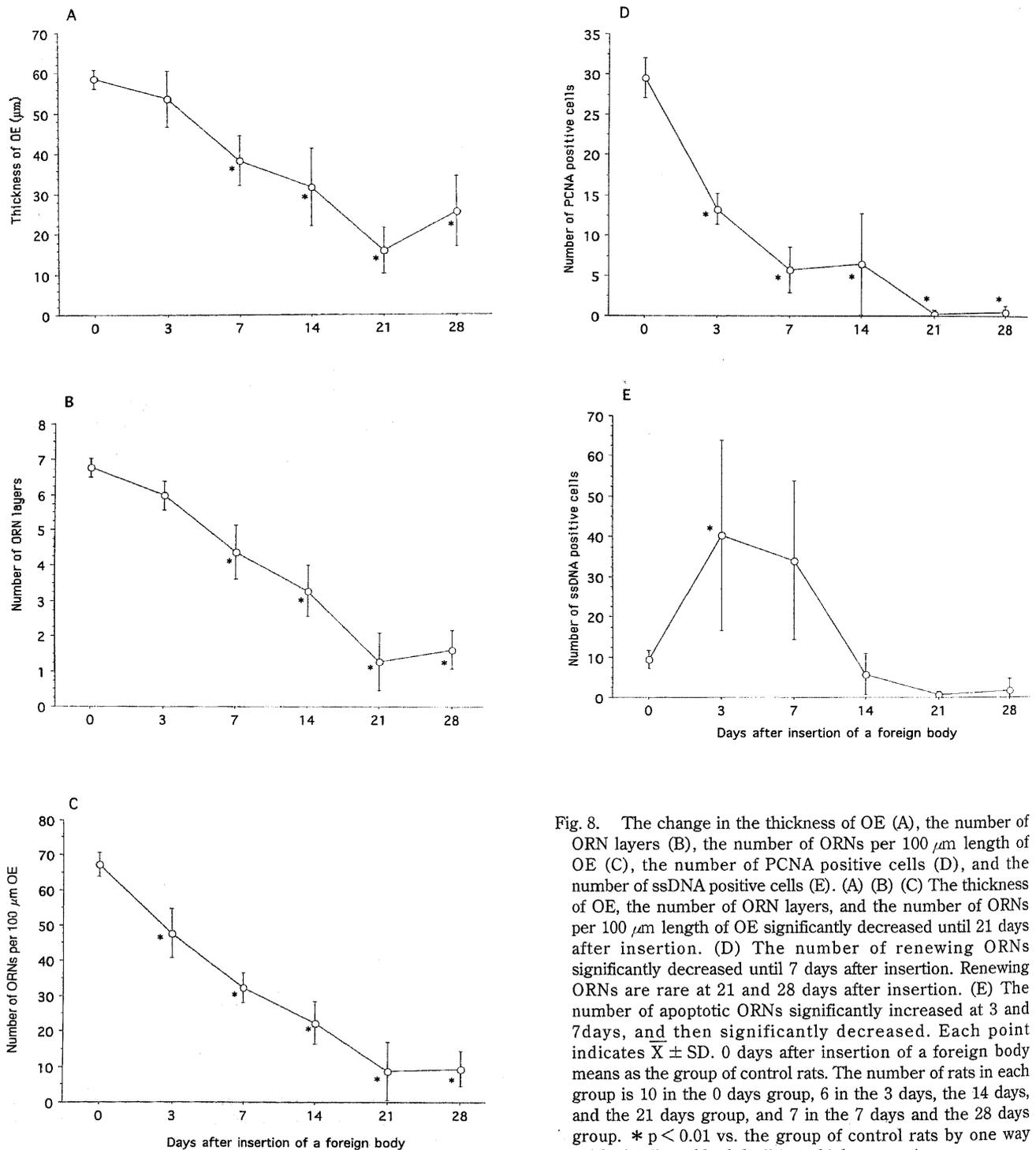


Fig. 8. The change in the thickness of OE (A), the number of ORN layers (B), the number of ORNs per 100 μm length of OE (C), the number of PCNA positive cells (D), and the number of ssDNA positive cells (E). (A) (B) (C) The thickness of OE, the number of ORN layers, and the number of ORNs per 100 μm length of OE significantly decreased until 21 days after insertion. (D) The number of renewing ORNs significantly decreased until 7 days after insertion. Renewing ORNs are rare at 21 and 28 days after insertion. (E) The number of apoptotic ORNs significantly increased at 3 and 7 days, and then significantly decreased. Each point indicates $\bar{X} \pm \text{SD}$. 0 days after insertion of a foreign body means as the group of control rats. The number of rats in each group is 10 in the 0 days group, 6 in the 3 days, the 14 days, and the 21 days group, and 7 in the 7 days and the 28 days group. * $p < 0.01$ vs. the group of control rats by one way ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.

1.71 ± 2.98個であった(図8 E).

Ⅳ. 嗅上皮におけるiNOSの発現

iNOSは生理的状態ではあまり存在しないが様々な刺激によって発現し、一過性に大量のNOを産生する²⁰⁾。したがってiNOSの発現は組織におけるNO産生能の亢進を示す。

正常群を観察すると、嗅上皮および粘膜固有層にはiNOSは全く発現していなかった(図1 F)。

副鼻腔炎群を観察すると、3, 7, 14日群では嗅上皮中間層から表層にかけてはiNOS陽性細胞は散発的に存在し、これらは嗅細胞もしくは嗅上皮内に浸潤した炎症細胞であると考えられた。嗅上皮基底細胞にはさらに強くiNOSが発現しており、なかには嗅上皮のほぼ全長にわたってiNOSが発現しているものもあった(図4 B)。21, 28日群ではiNOSの発現は減少し、変性が著明なラットの嗅上皮では、基底細胞のiNOS発現はほとんど認められなかった。

Ⅴ. 嗅球の組織学的観察

THはドーパミン生合成酵素でドーパミン作動性細胞のマーカーとなり、嗅球では糸球体の周囲に分布する傍糸球体細胞に発現する¹⁴⁾²¹⁾。正常群の嗅球糸球体層では糸球体周囲の傍糸球体細胞にTHが多数発現しているのが観察された(図7 A)。副鼻腔炎群の嗅球では3日群は正常群とほぼ同様に傍糸球体細胞にTHが発現しているのが観察されたが、7, 14日群では正常と比較してTHの発現が減少し、さらに21, 28日群では著明にTHの発現が減少していた(図7 B)。

考 察

嗅覚障害のうち日常診療で最も多く遭遇するのは副鼻腔炎に起因するものである¹⁾。嗅覚障害は障害を受ける部位により呼吸性、末梢神経性、混合性、中枢性に大別される。呼吸性嗅覚障害は鼻粘膜の腫脹や鼻汁によってニオイ分子を含んだ空気が嗅粘膜に到達できないために起こるもの、末梢神経性嗅覚障害は嗅細胞、すなわち嗅上皮表面の嗅覚受容器から嗅球まで伸びる嗅神経線維までの異常により起こるもの、混合性嗅覚障害はその原因が呼吸性と末梢神経性の両者からなるもの、そして中枢性嗅覚障害は嗅球およびそれより中枢の障害が原因で起こるものの総称である²²⁾。

副鼻腔炎に起因する嗅覚障害は呼吸性、末梢神経性、ならびに混合性嗅覚障害であると考えられている¹⁾が、その発症機序についてはまだ十分には明らかにされていない。これまでにも嗅覚障害を発症した副鼻腔炎患者の嗅上皮を組織学的に検討した報告がいくつかある²³⁻⁴⁾。江川²⁾は嗅覚障害を訴える患者に嗅上皮生検を施行し、HE染色にて観察したところ、様々な程度で炎症細胞浸潤を認めたと報告しているが、この報告では嗅細胞がどの程度障害されているのか考察されていない。山岸³⁾は嗅覚脱失を訴える慢性副鼻腔炎患者3例に嗅上皮生検を施行し免疫組織学的検討を行った。その結果、治療により嗅覚の改善傾向を認めた1例ではほぼ正常な嗅細胞を認めた。改善を認めなかった2例のうち1例は嗅細胞を全く認めなかったが、残る1例は正常嗅細胞を多く認めており、治療の継続により今後嗅覚の回復が期待できると報告している。しかしこの報告では嗅覚障害を発症してから長期間が経過しているため、副鼻腔炎を発症してからの時間経過と嗅上皮の障害程度との関係については明らかにされていない。またヒト副鼻腔炎患者の嗅上皮を用いた検討では症例数が充分ではないため、副鼻腔炎と嗅

上皮障害過程の関係を考察するのは困難である。

一方、副鼻腔炎動物モデルを用いた嗅上皮の組織学的検討もいくつか報告されている²⁵⁾。江川²⁾はウサギ副鼻腔炎モデルを作成し、それを抗生物質による治療群と未治療群に分けHE染色による観察を行っている。その結果、未治療群では著明な炎症細胞浸潤を認めたのに対し、治療群では炎症細胞の減少を認めたと報告している。Aiba⁵⁾はウサギ副鼻腔炎モデルを作成して1, 4, 24週後に嗅上皮を採取し電子顕微鏡による観察を行っている。その結果、副鼻腔炎の炎症が嗅粘膜に波及すると呼吸上皮との境界付近の嗅上皮に障害が起こり、一部は嗅上皮に、一部は呼吸上皮による修復が起こる。この過程を繰り返すことにより嗅上皮の呼吸上皮化生が進み、徐々に嗅上皮の面積が減少し、臨床的に嗅覚障害を発症すると考察している。しかしこれらの報告では副鼻腔炎の炎症により嗅上皮がどのように障害され、どのような変化をきたすのか明らかにされていない。またこれらの報告で用いられたウサギ副鼻腔炎モデルはMaeyamaの方法⁶⁾に準じて作成されたもので、上顎洞自然孔を閉鎖したうえで上顎洞前壁を削開し洞内に菌を注入するというものであった。Maeyamaのモデルでは主として、嗅上皮の存在する鼻腔上後方部には炎症が波及しにくく、副鼻腔炎による嗅覚障害を検討するには適切なモデルとは言い難い。副鼻腔炎の発症には鼻腔内に生じた何らかの原因によって副鼻腔の換気障害が起こることが重要であると考えられているが、この点から見てもMaeyamaのモデルは生理的な副鼻腔炎モデルとは言い難い。1997年にMarks⁷⁾が発表した新しいウサギ副鼻腔炎モデルは細菌感染した異物をウサギ鼻腔に挿入するという簡便な方法ながら上顎洞に直接侵襲を加えることなく各副鼻腔の換気障害と感染による副鼻腔炎が惹起される⁷⁾⁸⁾ため従来の副鼻腔炎モデルに比べて生理的であり、副鼻腔炎による嗅覚障害を検討するのに適しているものと思われる。今回著者はMarksの方法をラットに応用し上顎洞を組織学的に観察したところ、多くのラットで上顎洞内に多核白血球を多量に含んだ貯留液を認め、上顎洞粘膜には炎症細胞浸潤、粘膜固有層の浮腫状変化、血管の拡張や増生といった副鼻腔炎の所見を認めた。これは従来のウサギ副鼻腔炎モデルと同様の所見であり、Marksのウサギ副鼻腔炎モデルとも同様の所見であった。このことからMarksの方法を利用すればラットで副鼻腔炎モデルを作成することが可能であることが分かった。そこで本実験では新たに作成したラット副鼻腔炎モデルの嗅上皮および嗅球を組織学的に検討し、副鼻腔炎に起因する嗅覚障害の発症機序について考察を行った。

組織学的には正常群の嗅粘膜および固有鼻腔には炎症所見を認めなかった。副鼻腔炎群では固有鼻腔内には多核白血球を多量に含む浸出液を様々な程度で認め、嗅上皮および粘膜固有層には炎症細胞浸潤、浮腫状変化、血管の拡張や増生を認めた。これら嗅粘膜の炎症所見は副鼻腔炎3日目ですでに観察され、7, 14日目でも最も強く、21, 28日目では炎症が終息していく傾向にあった。嗅上皮の形態を詳細に観察すると、嗅上皮の厚さ、嗅細胞層数、および嗅上皮100 μmあたりの嗅細胞数はいずれも副鼻腔炎21日目まで減少し続けた。副鼻腔炎の発症により嗅粘膜に炎症が波及すると嗅細胞が減少することが分かった。また嗅粘膜の炎症が急性期を過ぎても嗅細胞は増加することなく、減少したままであった。これらの結果から、副鼻腔炎に罹患すると嗅上皮障害が生じて嗅上皮の面積が減少し、臨床的に

嗅覚障害を発症するようになると考えられる。

アポトーシスは1972年Kerrら²³⁾によって提唱された概念で、生理的あるいは病的状態において細胞自らが遺伝子プログラムに従って起こる細胞死のことである。アポトーシスは生理的状態においては個体の発生、発達、老化の過程で不要になった細胞を除去し、また病的状態においては障害を受けた細胞を除去するなど、生体制御や生体防御機構として機能し、個体の維持に必須の役割を果たしている²⁴⁾。今回、正常群および副鼻腔炎群における嗅細胞のアポトーシスを検討した結果、正常群では嗅細胞のアポトーシスは散在的にしか認められなかった。しかし副鼻腔炎3、7日目では嗅細胞のアポトーシスは著明に増加していた。副鼻腔炎14日目では嗅細胞のアポトーシスは減少し、21、28日目ではほとんど認められなくなった。副鼻腔炎群、特に副鼻腔炎3日目と7日目における嗅細胞の減少には多数の嗅細胞がアポトーシスに陥ることが関与していることが分かった。神経細胞では発生過程におけるシナプス形成期、急性障害、神経変性疾患、老化などによる細胞死を認めるがこれらにはアポトーシスが関与していると考えられている²⁵⁾。嗅細胞は他の中枢神経系と異なり、一生涯にわたって新生と変性を繰り返す特異な神経細胞であり、生理的状態でも約30日の周期で変性と新生を繰り返している⁹⁾。従って嗅細胞は生理的状態においても細胞死を迎えているが、その死にもアポトーシスが関与すると考えられている²⁶⁾。嗅細胞が死を迎える局面には、老廃し寿命を迎えた場合、嗅球におけるシナプス形成に失敗した場合、過剰に産生された場合、外界からの影響によって障害を受けた場合などがある²⁷⁾²⁸⁾。このような局面において、アポトーシスは不要になった嗅細胞や障害を受けた異常嗅細胞を速やかに排除するにはきわめて有効な機能と考えられる。一方、嗅細胞のアポトーシスは嗅球を除去すると増加するが、これは軸索切断による逆行性の変性や神経栄養因子の失活などが原因であると推察されている²⁹⁾。副鼻腔炎群における嗅細胞の障害が、嗅上皮内にある細胞体と粘膜固有層にある軸索のうち、どちらから先に起こったのかは分からない。したがって本実験で認められた嗅細胞のアポトーシスが嗅球を除去した場合と同じような機序で起こるのか、あるいは嗅粘膜に波及した炎症により何らかのシグナルが生じて嗅細胞のアポトーシスが誘導されるのか不明である。しかし、炎症により障害を受けた嗅細胞をアポトーシスにより速やかに排除することは一定の嗅覚機能の維持の上で重要であると考えられる。

嗅細胞が生理的状態でも約30日の周期で新生と変性を繰り返すことは前述した。嗅細胞の幹細胞は嗅上皮基底膜直上の固有基底細胞あるいはその直上にある球状基底細胞と推測されているがまだ結論には至っていない²⁹⁾。嗅細胞は外界に露出しており常に細菌、ウイルス、大気中の有毒物質による障害を受けるため、一定の嗅覚機能の維持の点からも、活発な新生と変性を行う必要のあることは必然的なことと考えられる³⁰⁾。嗅細胞の新生は様々な物理的・化学的的刺激、たとえば嗅糸切断などで亢進することが知られている⁹⁾。副鼻腔炎における嗅細胞の新生について、江川²⁾はMaeyamaの方法に準じて作成したウサギ副鼻腔炎モデルを用いて検討しており、その結果、嗅細胞の新生は変化しなかったと報告している。今回、正常群および副鼻腔炎群における嗅細胞の新生を検討した結果、正常群の嗅上皮基底層では多数の分裂細胞が観察され、活発な嗅細胞の新生が認められた。しかし副鼻腔炎群では嗅細胞の新生は3、7、14

日目では著明に減少し、21、28日目では嗅細胞の新生はほとんど認められなかった。嗅粘膜の炎症が終息傾向を示し、アポトーシスによる嗅細胞死が減少しても嗅細胞は増加することなく減少を続けた。これは嗅粘膜に波及した炎症によって嗅上皮基底細胞も障害を受け、嗅細胞の新生が減少していったためと考えられる。今回の結果は江川の報告とは異なるものであった。これは、従来の副鼻腔炎モデルでは上顎洞から嗅上皮まで炎症が波及しにくいいため、嗅細胞新生の検討を行った時点では多くの基底細胞がまだ障害を受けず、正常な細胞増殖能を持っていたからではないかと考えられる。これに対し本モデルでは上顎洞の変化とほぼ並行して嗅粘膜にも炎症が起こっており、嗅細胞の新生に関してより長期的に観察されている。したがって、実際にヒトが長期間にわたって副鼻腔炎に罹患した場合の嗅細胞新生の変化と類似した状態を再現しているのではないかと考えられる。前述したように生理的状態では嗅細胞は新生と変性を繰り返すことによって嗅上皮全体の恒常性を保っている。嗅糸切断モデルのように基底細胞がほとんど正常に保たれていれば嗅細胞の分裂・新生を亢進させて嗅上皮の恒常性を保つことが可能である。副鼻腔炎においても減少した嗅細胞を十分に補充できるだけの基底細胞が残っていれば嗅上皮の恒常性を保つことは可能であろう。しかし本実験のように成熟嗅細胞だけでなく基底細胞も障害を受けてしまうと、もはや正常な新生が行われず、減少した嗅細胞を補充することができなくなる。このような状態に陥ると嗅細胞は減少を続け、嗅覚障害を発症するのではないかと考えられる。そして基底細胞の障害がさらに進行すると、不可逆的な嗅覚障害に進展するのではないかと考えられる。一方、Farbmanら³¹⁾は幼弱ラットの一側前鼻孔を30日間閉鎖すると嗅覚刺激が嗅上皮に到達しにくくなり、また外界に存在する有毒物質や病原体に曝露される危険性も減少するため、嗅細胞の新生は60%程度に抑制されると報告している。今回作成した副鼻腔炎モデルでは鼻腔に挿入した異物や鼻腔内浸出液により鼻腔が閉塞されているため嗅上皮に到達する嗅覚刺激が減少し、嗅細胞の新生が抑制された可能性も考えられる。ヒト副鼻腔炎では鼻粘膜腫脹や鼻ポリープ、鼻汁による鼻閉を伴っていることが多く、そのような症例では炎症による基底細胞の障害以外に、嗅上皮に到達する嗅覚刺激の低下により嗅細胞の新生がさらに抑制されている可能性も考えられる。

嗅細胞の減少と同時に粘膜固有層の嗅神経線維束は細くまばらになり、それからやや遅れて嗅球では傍糸球体細胞のTH発現が減少していくのが観察された。傍糸球体細胞はドーパミン陽性細胞であり、そのTH発現は嗅細胞が誘導することが分かっている¹²⁾¹⁹⁾。動物において一側前鼻孔を閉鎖した場合や一側鼻腔に硫酸亜鉛やTriton-Xなどを点鼻して嗅上皮を障害した場合には傍糸球体細胞のTH発現は減少することが知られている³²⁾³³⁾。本実験では炎症によって嗅細胞が減少するため、傍糸球体細胞のTH発現が減少していったと考えられる。THの減少が嗅覚にどのような影響を及ぼすかは不明であるが、これまで副鼻腔炎が嗅球に及ぼす影響について検討した報告はなく、今回動物モデルにおいて副鼻腔炎はより中枢の嗅球にまでも組織学的変化をもたらすことが明らかとなった。

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は低分子量のガス状ラジカルである。1987年血管内皮細胞由来平滑筋弛緩因子の本体がNOである³⁴⁾ことが発見されて以降、生体内におけるその多彩な役割が注目を集めており、近年鼻副鼻腔領域においてもNOの

存在が注目されるようになった。NOはガス状分子なので組織内でその局在を同定することはできないが、一酸化窒素合成酵素 (NO synthase, NOS) の存在を証明することにより間接的にNOの発生部位を知ることができる。現在NOSは構成型NOSとiNOSに分類されている²⁰⁾。構成型NOSは生理的状态において少量のNOを産生するもので、主として神経細胞に存在する神経型一酸化窒素合成酵素 (brain NOS, bNOS) と内皮細胞に存在する血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial NOS, eNOS) に大別される。bNOSにより産生されるNOは非アドレナリン性・非コリン性神経系において主な神経伝達物質として作用する。eNOSにより産生されるNOは血管弛緩物質として作用する。一方、iNOSは生理的状态ではあまり存在しないが、サイトカインや細菌リポ多糖などによって大量に発現が誘導され、一過性に大量のNOが産生される³⁵⁾ ため、組織内のNO産生の変化を検討するのに適している。

鼻副鼻腔におけるiNOSの局在はこれまでに鼻副鼻腔疾患に罹患したヒト鼻副鼻腔粘膜や様々な動物を用いて検討されている^{36)~39)}。それらの報告によると、ヒト、動物ともに呼吸上皮粘膜には正常でもiNOSが存在し、炎症性疾患あるいは細菌リポ多糖や炎症性サイトカインの処置により呼吸上皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、漿液腺細胞、炎症細胞などにiNOS発現の増加を認めている。鼻副鼻腔粘膜においてiNOSが産生するNOは、鼻副鼻腔における病原性微生物の増殖阻止、線毛運動の調節、粘膜血流や腺分泌の調節などの作用があり、鼻副鼻腔疾患においては多量に産生されたNOがその作用により鼻副鼻腔粘膜の恒常性を維持していると考えられている³⁹⁾。成熟した正常な中枢神経系にはiNOSは発現しないが、エンドトキシンやサイトカインの曝露、ウイルス感染、虚血などで神経細胞はiNOSを発現する^{40)~42)}。これらiNOSにより産生されるNOは神経毒性と神経保護という相反する作用を持つと考えられている⁴⁰⁾。さらにiNOSが産生するNOは細胞分化や増殖に関与すると考えられている⁴⁴⁾。Arnholdら⁴³⁾は胎児マウスの嗅上皮を用いて嗅細胞のiNOS発現を検討している。その結果、胎生11日目から16日目の嗅細胞と嗅神経線維束にはiNOSが発現し、胎生20日目にはiNOSは全く発現していなかった。この報告では、iNOSは細胞分裂を促進して神経細胞の分化を誘導する作用があり、胎生期の嗅上皮においては多数の細胞集団を同時期に成熟嗅細胞へ誘導するため一過性にiNOSが発現し、その後嗅細胞が正常な分裂・新生を行うようになるとiNOSは発現しなくなると考察している。今回、抗iNOS抗体を用いた免疫組織染色で嗅粘膜でのiNOS発現を検討した結果、正常群ではiNOSの発現はほとんど認められなかった。しかし副鼻腔炎群では基底細胞でiNOSの著明な発現を認め、固有鼻腔の浸出液中の炎症細胞や粘膜に浸潤している炎症細胞の一部、血管周囲、そして嗅細胞、支持細胞、嗅神経線維束にもわずかがiNOSが発現しているのが観察された。著者が渉猟し得た限りでは、胎生期以外で嗅上皮にiNOSが発現したという報告はなく、また嗅上皮基底細胞にiNOSが発現したという報告もない。今回発現したiNOSが嗅覚系にどのような影響を与え、嗅覚障害とどのように関与するのかわかり不明である。今後さらなる検討が必要であろう。

今回の実験で、副鼻腔炎を発症すると嗅粘膜に炎症が波及して嗅細胞が減少することが分かった。副鼻腔炎による嗅細胞の減少には嗅細胞アポトーシスの亢進、嗅細胞新生の抑制が関与

していることが明らかとなった。このような過程を経て嗅細胞が減少していくと臨床的に嗅覚障害を発症すると考えられる。また嗅細胞の減少とともに嗅神経線維束は細くまばらになり、より中枢の嗅球でも傍糸球体細胞のTH発現が減少していくことが明らかとなった。ヒトとラットでは副鼻腔と嗅上皮、嗅球の解剖学的位置関係が異なるためこれらの結果がそのままヒトに当てはまるとは断言できない。しかしヒト副鼻腔炎においても嗅粘膜に強い炎症が生じると同様の変化が起こる可能性がある。アポトーシスは異常嗅細胞を排除するという点では嗅上皮の恒常性を維持するのに重要な機能であるが、本実験のように嗅細胞の新生が抑制された状態では減少した嗅細胞を補充することができず、結果的に嗅上皮障害を促進してしまうと考えられる。嗅上皮の組織学的形態を観察するだけでなく嗅細胞のアポトーシスや新生も検討すれば、実際の臨床の場において嗅覚障害の予後を予測し治療に応用できる可能性があると思われる。一方、副鼻腔炎による嗅球の変化や嗅上皮のiNOS発現が嗅覚障害にどのような影響を及ぼすかは本実験からは明らかにされなかった。この点に関しては今後さらなる検討が必要である。

結 論

鼻腔に細菌感染させた異物を挿入してラット実験的副鼻腔炎モデルを作成し嗅上皮および嗅球の組織学的検討を行った。その結果、嗅粘膜には炎症が起こり、嗅上皮の厚さ、嗅細胞層数、嗅上皮100 μ mあたりの嗅細胞数は副鼻腔炎21日目まで有意差をもって減少していった。嗅細胞のアポトーシスは副鼻腔炎3、7日目で最も多く観察され、その後減少し、21、28日目にはほとんど認められなかった。副鼻腔炎早期における嗅細胞の減少はアポトーシスが関与していると考えられた。嗅細胞の新生は7日目まで著明に低下し、21、28日目にはほとんど認められなかった。副鼻腔炎後期でも嗅細胞が減少していくのは嗅細胞新生の抑制が関与していると考えられた。嗅球では嗅細胞の減少により副鼻腔炎7日目から傍糸球体細胞のTH発現が減少し、21、28日目では著明に減少していた。嗅覚障害との関連は不明であるが、副鼻腔炎ではより中枢の嗅球にまでも組織学的変化が起こることが分かった。副鼻腔炎では嗅上皮基底細胞に著明にiNOSが発現することが確認されたがその意義は不明である。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座古川似教授ならびに、終始直接御指導、御教示いただきました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座塚谷才明博士に深謝いたします。また貴重な御助言をいただきました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座三輪高喜助教授、同教室伊藤真人博士、金沢大学医学部微生物学講座加藤はる博士、金沢大学医学部病理学第二講座常山幸一博士、統計学的処理を行うにあたり御指導を賜りました金沢大学医学部公衆衛生学講座長瀬博博士に心より御礼申し上げます。最後に本研究に御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座の皆様へ深く感謝いたします。本研究は平成11年度文部省科学研究補助金奨励研究の援助を受けたことを付記する。

文 献

- 1) 調所廣之. 慢性副鼻腔炎と嗅覚障害. *JOHNS* 3: 275-280, 1987
- 2) 江川雅彦. 慢性副鼻腔炎における嗅覚障害—臨床的、組織形態学的検討—. *日耳鼻* 98: 843-854, 1995

- 3) 山岸益夫, 長谷川聡, 鈴木正治, 中村英生, 中野雄一, 岩永敏彦. 慢性副鼻腔炎患者嗅上皮の免疫組織化学的観察-嗅覚脱失例について-. 耳鼻と臨床 35: 11-15, 1989
- 4) Yamagishi M, Nakamura H, Suzuki S, Hasegawa S, Nakano Y. Immunohistochemical examination of olfactory mucosa in patients with olfactory disturbance. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99: 205-210, 1990
- 5) Aiba T, Nakai Y. Influence of experimental rhino-sinusitis on olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 486: 184-192, 1991
- 6) Maeyama T. A study of experimental sinusitis in rabbits. *Auris Nasus Larynx (Tokyo)* 8: 87-98, 1981
- 7) Marks SC. Acute sinusitis in the rabbit: a new rhinogenic model. *Laryngoscope* 107: 1579-1585, 1997
- 8) Marks SC. Acute sinusitis in the rabbit model: histologic analysis. *Laryngoscope* 108: 320-325, 1998
- 9) 木村恭之, 上出文博, 古川 昶, 三輪高喜, 作本 真, 梅田良三. 抗BrdUを用いたマウス嗅上皮のターンオーバーに関する免疫組織化学的研究. 日耳鼻 93: 165-170, 1990
- 10) Nakamura H, Fujiwara M, Kawasaki M, Nonomura N, Takahasi S. Age-related changes in dividing cells of the olfactory epithelium of the maturing guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 289-292, 1998
- 11) Fujiwara M, Nakamura H, Kawasaki M, Nakano Y, Kuwano R. Expression of a calcium-binding protein (spot35/calbindin-D28k) in mouse olfactory cells: possible relationship to neuronal differentiation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 254: 105-109, 1997
- 12) Taniguchi K, Saito H, Okamura M, Ogawa K. Immunohistochemical demonstration of protein gene product 9.5 (PGP9.5) in the primary olfactory system of the rat. *Neurosci Lett* 156: 24-26, 1993
- 13) Iwanaga T, Han H, Kanazawa H, Fujita T. Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) in the paraneurons of the rat. *Biomed Res* 13: 225-230, 1992
- 14) 塚谷才明. セロトニンの嗅覚機能への影響. 十全医会誌 103: 1-12, 1994
- 15) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376, 1984
- 16) Maeda M, Sugiyama T, Akai F, Jikihara I, Hayashi Y, Takagi H. Single stranded DNA as an immunocytochemical marker for apoptotic change of ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 240: 69-72, 1998
- 17) Naruse I, Keino H, Kawarada Y. Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug-induced apoptosis. *Histochemistry* 101: 73-78, 1994
- 18) Kawarada Y, Miura N, Sugiyama T. Antibody against single-stranded DNA useful for detecting apoptotic cells recognized hexadeoxynucleotides with various sequences. *J Biochem* 123: 492-498, 1998
- 19) Watanabe I. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods: Antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res* 90: 188-193, 1999
- 20) 中根正樹. NO合成酵素の生化学. NO (戸田 昇編), 第3版, 14-27頁, メジカルビュー社, 東京, 1997
- 21) Halasz N, Ljungdahl A, Hokfelt T, Johansson O, Goldstein M, Park D, Biberfeld P. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I. Immunohistochemical localization of monoamine synthesizing enzymes. Support for intrabulbar, periglomerular dopamine neurons. *Brain Res* 126: 455-474, 1977
- 22) 古川 昶, 三輪高喜. 嗅覚障害-最近の話題(その2)-. 耳鼻展望 37: 571-577, 1994
- 23) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 24) 山田 武. アポトーシスとは-overview-. 医学のあゆみ 187: 283-288, 1998
- 25) 畠中 寛, 阿比留康弘. シナプス形成とニューロトロフィン. 神経細胞の生と死 (畠中 寛編), 66-74頁, 東京化学同人社, 東京, 1997
- 26) 土定建夫. マウス嗅細胞のアポトーシスに関する研究. 耳鼻展望 42: 240-251, 1999
- 27) Deckner ML, Risling M, Frisen. Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Exp Neurol* 143: 132-140, 1997
- 28) Nakagawa T, Aiba T, Shiotani H, Tomiyama K, Nakai Y. Apoptosis in the normal olfactory epithelium of the adult guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 253: 371-373, 1996
- 29) 三輪高喜, 古川 昶. 嗅覚障害-最近の話題(その1)-. 耳鼻展望 37: 472-479, 1994
- 30) 夜久有滋. 嗅粘膜上皮の再生. 細胞 18: 251-255, 1986
- 31) Farbman AI, Brunjes PC, Rentfro L, Michas J, Ritz S. The effect of naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 8: 3290-3295, 1988
- 32) Baker H, Morel K, Stone DM, Maruniak JA. Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res* 614: 109-116, 1993
- 33) Crespo C, Jorge RJ, Alonso JR, Brinon JG, Arevalo R, Aijon J. Segregated distribution of TH-immunoreactivity in olfactory glomeruli. *Neuroreport* 8: 2311-2316, 1997
- 34) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 35) Cattel V, Jansen A. Inducible nitric oxide synthase in inflammation. *Histochem J* 27: 777-784, 1995
- 36) 松脇由典, 春名真一, 深見雅也, 吉見充徳, 森山 寛. 鼻副鼻腔疾患における呼気中NO濃度について. 耳展 42: 358-367, 1999
- 37) Furukawa K, Harrison DG, Saleh D, Shennib H, Chagnon FP, Giaid A. Expression of nitric oxide synthase in the human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 847-850, 1996
- 38) Kawamoto H, Takumida M, Takeno S, Watanabe H, Fukusima N, Yajin K. Localization of nitric oxide synthase in human nasal mucosa with nasal allergy. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 539: 65-70, 1998
- 39) Hess A, Bloch W, Rocker J, Addicks K, Stennert E, Michel

- O. In vitro expression of inducible nitric oxide synthase in the nasal mucosa of guinea pigs after incubation with lipopolysaccharides or cytokines. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 448-453, 1998
- 40) Minc-Golomb D, Yadid G, Tsarfaty I, Resau JH, Schwartz JP. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem* 66: 1504-1509, 1996
- 41) Zheng YM, Schafer MKH, Weihe E, Sheng H, Coriesdeo S, Fu Z, Koprowsky H, Ditzschold B. Severity of neurological sign and degree of inflammatory lesions in the brain of rats with Borna disease correlate with the induction of nitric oxide synthase. *J Virol* 67: 5786-5791, 1993
- 42) Endoh M, Maiese K, Pulusinelli WA, Wagner JA. Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. *Neurosci Lett* 154: 125-128, 1993
- 43) Arnhold S, Andressen C, Bloch W, Mai JK, Addicks K. NO synthase- II is transiently expressed in embryonic mouse olfactory receptor neurons. *Neurosci Lett* 229: 165-168, 1997
- 44) Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68-73, 1995

Histological Study of the Olfactory Epithelium and Olfactory Bulb in Experimental Rat Models of Sinusitis

Shinji Tatsutomi, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 109, 318 — 329 (2000)

Key words experimental sinusitis, olfactory epithelium, olfactory bulb, apoptosis, nitric oxide

Abstract

In order to elucidate the mechanisms of olfactory disturbance caused by sinusitis, an experimental rat model was created by inserthion of a foreign body containing pathogenic bacteria into the nasal cavity. Specimens from the nasal cavity and olfactory bulb (OB) were taken for histological examination at 3, 7, 14, 21, and 28 days after insertion and coronal sections of the nasal cavity and OB specimens were prepared. Sections of the nasal cavity were stained with hematoxylin and eosin (HE) and evaluated for inflammation of the maxillary sinus. The thickness of the olfactory epithelium (OE) in sinusitis rats was measured. An immunohistochemical analysis of the OE in sinusitis rats was also performed using antibodies against protein gene product 9.5 (PGP9.5), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), single stranded deoxyribonucleic acid (ssDNA), and inducible nitric oxide synthase (iNOS). An immunohistochemical analysis of the OB in sinusitis rats was performed using an antibody against tyrosine hydroxylase (TH). As a result, the number of rats with sinusitis were 6 at 3 days after insertion, 7 at 7 days, 6 at 14 days, 6 at 21 days, and 7 at 28 days. Inflammation in the olfactory mucosa was detected at 3 days after insertion and continued until 28 days after insertion. The thickness of the OE, the number of olfactory receptor neuron (ORN) layers, and the number of ORNs per 100 μm length of OE were decreased significantly until 21 days after insertion. The turnover of ORNs decreased significantly until 7 days after insertion and was hardly detected at 21 and 28 days after insertion. Many apoptotic ORNs appeared at 3 and 7 days after insertion, but then gradually decreased in number, with few apoptotic ORNs detected at 21 and 28 days after insertion. The elevated expression of TH in periglomerular cells was observed in OB with experimental sinusitis at 3 and 7 days after insertion. The expression of TH started to gradually disappear at 14 days after insertion and decreased markedly at 21 and 28 day after insertion. While there was no expression of iNOS in the control OE, elevated expression of iNOS was observed mainly in basal cells with sinusitis.