

Study of the Distribution and the Function of Nerve Growth Factor in the olfactory tract of Mice

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/2297/9293

マウス嗅覚伝導路系における神経成長因子の 動態および機能に関する研究

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)

浦 本 直 紀

嗅覚伝導路における神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) の動態, 機能を調べる目的で, ^{125}I -NGF をマウス嗅球に投与した後, 嗅上皮をオートラジオグラフィ法により観察した。また抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスと, 嗅球除去後 NGF を持続投与したマウスに対して, 経時的に HE 染色による組織学的観察, NGF の高親和性受容体を形成する *trk* 遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織化学的観察, ナラマイシンを用いた嗅刺激性行動観察を行った。その結果, オートラジオグラフィ法では ^{125}I -NGF を嗅球に投与した側の嗅上皮に高い放射線活性を認めた。抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスでは, 持続投与後 7 日目に嗅細胞の強い変性と *trk* 遺伝子産物の発現を認め, その後 28 日目にかけて嗅細胞の再生を認めたものの, *trk* 遺伝子産物の発現は持続していた。行動学的にも 28 日目までに嗅覚の回復は認めなかった。嗅球除去後 NGF を持続投与したマウスでは, 持続投与後 7 日目に嗅細胞の強い変性と *trk* 遺伝子産物の発現を認めたが, 28 日目までに徐々に嗅細胞は再生し *trk* 遺伝子産物の発現も減弱した。しかし行動学的には 28 日目までに嗅覚の回復は認めなかった。以上の結果から, 嗅球で合成される NGF は嗅神経を通じ嗅細胞へ逆行輸送され, 嗅細胞の生存維持, 嗅覚伝導路系の障害後の再生に関与していると考えられた。

Key words olfactory tract, nerve growth factor, autoradiography, immunohistochemistry, olfactory mediated behavior

神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) は 1954 年, Cohen ら¹⁾によって雄マウス顎下腺に多量に存在することが発見され, その後, 交感神経節細胞や後根神経節細胞の分化, 発達, 生存維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた²⁾。さらに, この NGF は中枢神経系においても嗅球, 海馬, 新皮質に豊富に存在し³⁾前脳基底部のコリン作動性ニューロン群である対角帯 (水平部, 垂直部), 中隔野, マイネルト基底核の生存維持に必要であることが明らかにされてきた。ところで嗅球には NGF 蛋白のみならず mRNA も豊富に存在していることが判明しており^{4)~6)}, 嗅球における NGF 蛋白の存在意義として, 嗅球へ投射線維を送っている前脳基底部の対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存に関与しているものと考えられてきた⁷⁾。一方堀川はマウスにおいて胎生後期から生直後にかけての嗅細胞の発達期および嗅系切断後の再生期に嗅細胞に高親和性神経成長因子受容体 (nerve growth factor receptor, NGFR) の発現が増強し, 嗅細胞の成熟期および再生完了時には高親和性 NGFR の発現が減少していることを証明した⁸⁾。この研究は NGFR の発現を免疫組織化学的に観察したものであり, 嗅細胞の発達, 成熟には嗅細胞の NGFR の発現と, 嗅球での NGF が必要であることが示唆されたが, 直接 NGF の動

態を観察したものではなかったため, 嗅細胞の発達, 成熟が NGF に依存するかどうかは不明であった。最近, 海馬へ投射する中隔野のコリン作動性ニューロンにおいては, その投射路である脳弓の破壊によって 90% のニューロンが細胞死を起こすが, 脳弓の破壊と同時に NGF を脳室内投与することによって細胞死が阻止されることが報告されている^{9)~11)}。そこで NGF が嗅覚伝導路においてもその生存維持に重要な役割を果たしているかどうか, すなわち嗅球で合成された NGF が嗅神経を通じて嗅細胞に逆行輸送されているのか, またその NGF は嗅細胞の生存, 機能の維持に関与しているのかどうかを調べるために本研究を計画した。

嗅細胞は日常的に変性と再生 (新生) を繰り返し, 障害により変性に陥った後も, 再生するという特徴を持つ神経細胞であることから, NGF と何らかの関係を持つ可能性があると考えられ, 嗅細胞における NGFR の発現に関する研究が行われてきた。これまで行われてきた嗅覚系における NGFR の研究は, 低親和性 NGFR に対する抗体を用いた免疫組織化学法によるものや^{12)~14)}低親和性 NGFR の mRNA を用いた分子生物学的手法によるものが^{15)~17)}ほとんどであった。しかし, 低親和性 NGFR は NGF 以外の栄養因子, すなわち脳由来神経栄養因子

平成 8 年 12 月 3 日受付, 平成 9 年 2 月 4 日受理

Abbreviations : BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BDNFR, brain-derived neurotrophic factor receptor; BG, background; NGF, nerve growth factor; NGFR, nerve growth factor receptor; NT-3, neurotrophin-3; NT-3R, neurotrophin-3 receptor; OE, olfactory epithelium; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PSL, photo-stimulated luminescence

(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) やニューロトロフィン-3 (neurotrophin-3, NT-3) に対する受容体として共通のものであることが判明し^{29, 30)}, 低親和性 NGFR の発現のみではどの栄養因子が関与しているのか決定できなかった。最近, 高親和性 NGFR の一部をコードしている遺伝子が, 1986年に Martin-Zanca らによって報告された結腸癌由来のオンコジーンである *trk* のカルボキシル基末端側半分のチロシキナーゼドメインを含む領域に対応するプロトオンコジーンあることが判明した^{30, 32)}。さらにこの *trk* プロトオンコジーンに極めて相同性の高い *trkB*, *trkC* 遺伝子が発見され, *trk* (A) 遺伝子産物は NGF と *trkB* 遺伝子産物は BDNF と, *trkC* 遺伝子産物は NT-3 と結合することが判明した³²⁻³⁵⁾。現在は従来から知られていた低親和性 NGFR と *trk* 遺伝子産物が結合して高親和性 NGFR を形成し, 低親和性 NGFR と *trkB* 遺伝子産物が結合して高親和性脳由来神経栄養因子受容体 (brain-derived neurotrophic factor receptor, BDNFR), 低親和性 NGFR と *trkC* 遺伝子産物が結合して高親和性ニューロトロフィン-3 受容体 (neurotrophin-3 receptor, NT-3R) が形成されると考えられている³²⁾。これらの理由により低親和性 NGFR の発現は必ずしも NGF との関係のみを示すものではないことが明らかになり, NGF のみの作用, あるいは動態を検討する場合は高親和性 NGFR を形成している *trk* 遺伝子産物の発現を観察する必要がある¹⁾。

今回著者は嗅覚伝導系における NGF の動態を観察する目的で, 直接 ¹²⁵I-NGF を嗅球に投与した後, その ¹²⁵I-NGF が嗅上皮に逆行性に輸送されるかどうかをオートラジオグラフィ法を用いて観察した。また NGF の機能を観察する目的で正常マウスの嗅球に NGF に対する抗体を投与することにより NGF の作用が失活した状態を作製し, NGF が嗅細胞の神経栄養因子であるのか, またその時, 嗅細胞に高親和性 NGFR はどのように発現するのかを, HE 染色による組織学的観察ならびに *trk* 遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織学的手法により観察, 検討し, さらにナラマイシン[®] (シクロヘキシミド, 田辺製薬, 大阪) を用いた嗅刺激性行動観察法を用いて嗅覚機能を観察, 検討した。次にマウスの嗅球を除去することにより嗅細胞の標的組織である嗅球に NGF が存在しない状況を作製し, その状況下に NGF を投与した場合マウスの嗅細胞が外因性に投与された NGF によってその細胞死が阻止されるのか, またその時, 嗅細胞に高親和性 NGFR はどのように発現するのかを, 同様に HE 染色ならびに *trk* 遺伝子産物に対する抗体を用いた免疫組織学的手法, および嗅刺激性行動観察法により観察, 検討した。

材料および方法

I. ¹²⁵I-NGF 嗅球投与例の作製とオートラジオグラフィによる検討

実験材料として成熟雄 ddy-コンベンショナルマウス (静岡県実験動物農業協同組合, 浜松) を使用した。ペントバルビタール (ネプタール[®], ダイナポット, 大阪) 100mg/Kg を成熟雄マウスの腹腔内に注射した後, 補助麻酔として頭皮下に 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た後, マイクロシリッジにて, ¹²⁵I-NGF (Du Point Company, Biotechnology Systems, Barley Mill Plaza, USA) 溶液を 2 分間かけて右側嗅

球内に注入した。¹²⁵I-NGF は蒸留水に溶解して投与し, その投与量は, 1 μ l (222000dpm, NGF 1ng) とした。注入してから 18 時間後に, ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後, 開胸し, 経心的に灌流固定を行なった後, 鼻中隔面の嗅粘膜と脳を摘出した。なお, 灌流液には 0.01M リン酸緩衝液 (0.01M phosphate-buffered saline, PBS), 固定液にはブアン固定液を使用した。脳組織は OCT コンパウンド (Tissue-Tek, Elkhart, USA) に包埋し, -20°C で凍結した後, クライオスタット CR-502 (大和光機工業, 埼玉) で 10 μ m の連続切片を作製した。採取した鼻粘膜と連続切片を作製した脳組織をカバーガラスで密封した状態で, 14 日間, 感光用カセット内でイーミングプレート BAS-SR2025 (富士フイルム, 東京) に密着感光を行った。その後, そのイーミングプレートに蓄積, 保持された放射線情報を, フジイーミングアナライザー BAS 5000 (富士フイルム) を使用して読み取り, 画像解析を行った。各組織部位の感光度は, 各組織部位の輝尽発光 (photo-stimulated luminescence, PSL) 値からバックグラウンド (background, BG) を差し引いた, PSL-BG 値を 1mm² 当たり換算した (PSL-BG)/mm² 値を用いて評価した。

II. 抗 NGF 抗体投与モデルの作製と浸透圧ポンプの留置

上記と同様の手技を用いて, 両側嗅球の上面全体を露出させた後, 太さ 0.36mm の金属カニューレ (Alza Corporation, Palo Alto, USA) をセメントを用いて前頭骨に固定し, カニューレ先端を右側嗅球内部に差し込み, 抗 NGF 抗体溶液が嗅球内部に持続的に注入されるようにした。頭部皮膚切開部より後方に向かって背部皮下にウサギ抗マウス 2.5SNGFIgG 抗体 (Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, USA) を溶解させた生理食塩水を注入した浸透圧ポンプ (Alza Corporation) を埋め込み留置して, 留置した浸透圧ポンプにビニール製のカテーテルチューブ (Alza Corporation) を接続し, そのカテーテルチューブの末端に, カニューレを接続した。浸透圧ポンプに注入した抗 NGF 抗体溶液は, 浸透圧ポンプから排出されるウサギ抗マウス 2.5SNGFIgG 抗体が 1 日当たり 1.2 μ g になるように濃度を調節した。後述する嗅刺激性行動観察において対側の嗅覚系の影響を避けるために, 左側嗅球は吸引除去した。その後, 皮膚を絹糸にて縫合し術創を閉鎖した。

対照として, 同様の処置を行い, 生理食塩水のみを注入した浸透圧ポンプを留置したマウスを作製した。

III. 嗅上皮の採取と凍結切片の作製

上記の方法に従って作製したマウスを 1, 3, 7, 14, 21, 28 日に, ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後, 開胸し, 経心的に灌流固定を行なった後, 鼻中隔面の嗅粘膜を摘出して標本を採取した。なお, 灌流液には 0.01M PBS, 固定液には 4% パラホルムアルデヒド (4% paraformaldehyde, PFA) を使用した。

その後, 4% PFA にて 4~8 時間の後固定を行い, 次いで 25% ショ糖加リン酸緩衝食塩水にて 1 晩浸透後, 標本を OCT コンパウンド (Tissue-Tek) に包埋し, -20°C で凍結した後, クライオスタット CR-502 (大和光機工業) で 10 μ m の連続切片を作製し, HE 染色ならびに免疫染色を施行した。

IV. 免疫組織化学的検討

免疫染色はアビジン-ビオチン複合体 (avidin biotin peroxidase complex, ABC) 法にてスライドガラス上で行った。凍結切片を 0.3% トライトン X 加リン酸緩衝食塩水 (PBS with

0.3% トライトン-X100, 0.3% PBST) に2日間つけた後, 0.3% 過酸化水素水加メタノールにて10分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した. 続いて非特異的反応を阻止するため2% 正常ヤギ血清を30分間反応させた後, 1次抗体を48時間反応させた. 1次抗体には抗 trk (763) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California USA) を50倍希釈して使用した. 2次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (200倍希釈, TAGO

IMMUNOCHEMICALS, Inc., Camarillo, USA) を使用し, 45分間反応させた後, 3, 3' ジアミノベンチジン四塩酸塩溶液 (3, 3-diaminobenzidine, DAB) にて7~15分間発色反応をおこなった.

V. 嗅球除去マウスの作製と浸透圧ポンプの留置

Iと同様の手技を用いて, 両側嗅球の上面全体を露出させた後, 両側嗅球を吸引除去した. マウス 2.5SNGF (CIDtech

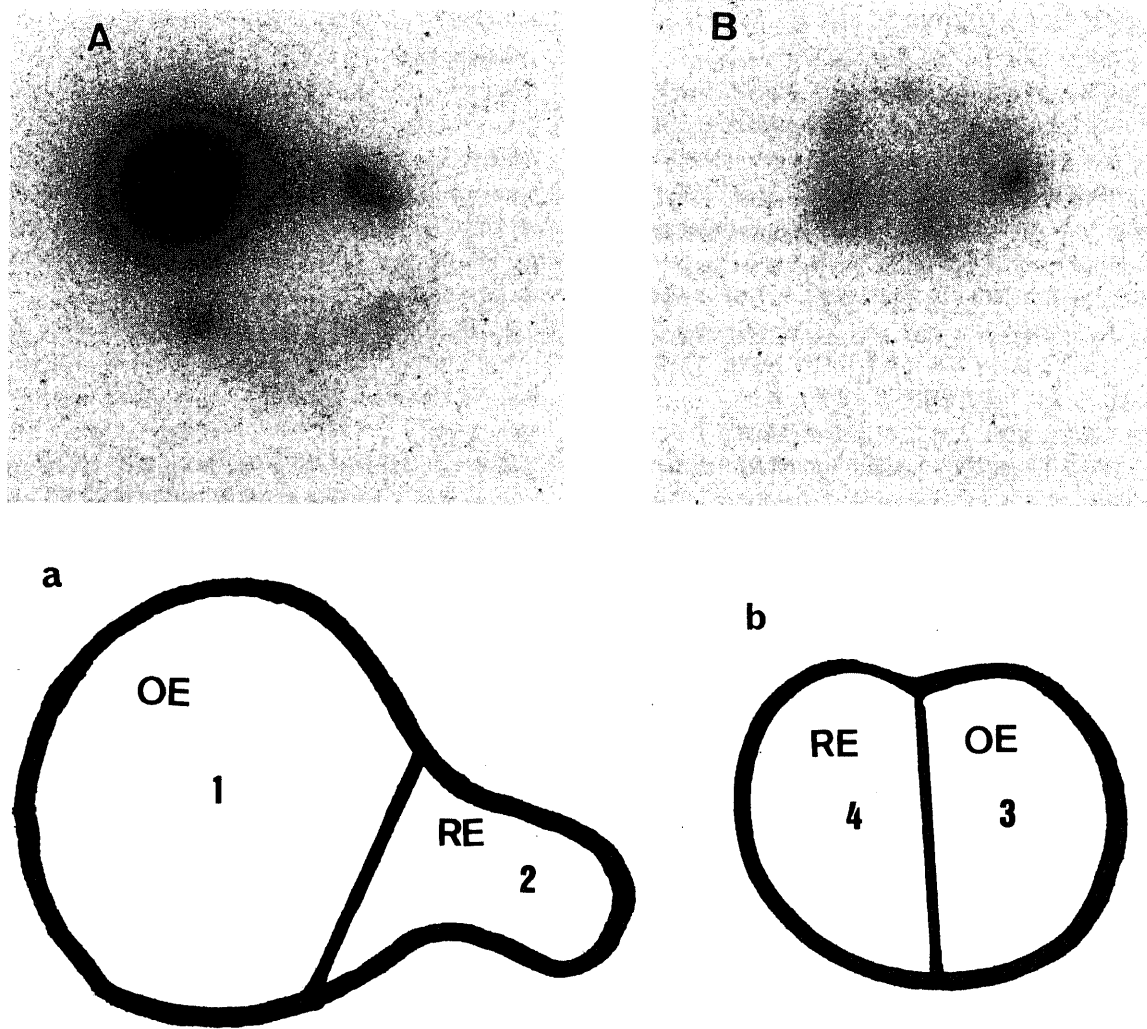


Fig. 1. Autoradiographic distribution of ^{125}I -NGF in right (A, a) and left (B, b) olfactory epithelium 18 hr following an infusion into right olfactory bulb of mouse. NGF, nerve growth factor. OE, olfactory epithelium. RE, respiratory epithelium. BG, back ground. 1, right olfactory epithelium; 2, right respiratory epithelium; 3, left olfactory epithelium; 4, left respiratory epithelium; 5, background.

Table 1. Distribution of ^{125}I -NGF in olfactory epithelium 18 hr after an ^{125}I -NGF infusion into right olfactory bulb of mouse

Area	PSL	Area (mm ²)	PSL-BG/mm ²
Right olfactory epithelium	1822.00	1.32	1371.00
Right respiratory epithelium	51.80	0.76	61.56
Left olfactory epithelium	67.63	1.55	36.92
Left respiratory epithelium	52.60	1.42	30.06
Back ground (BG)	81.57	11.57	—

NGF, nerve growth factor; back ground; PSL, phot-stimulated luminescence.

Research Inc., Mississauga, Canada) を溶解させた生理食塩水を注入した浸透圧ポンプをマウスの背部皮下に埋め込み留置した。浸透圧ポンプに注入した NGF 溶液は、浸透圧ポンプから排出される NGF が、1 日当たり $1.2 \mu\text{g}$ になるように濃度を調節した。上記と同様に、留置した浸透圧ポンプにビニール製の

カテーテルチューブを接続し、そのカテーテルチューブの末端に太さ 0.36mm の金属カニューレを接続した。カニューレをセメントを用いて前頭骨に固定しカニューレ先端を嗅球除去した空間に留置することにより、NGF 溶液が嗅球除去部に持続的に注入されるようにした。その後、皮膚を絹糸にて縫合し術創

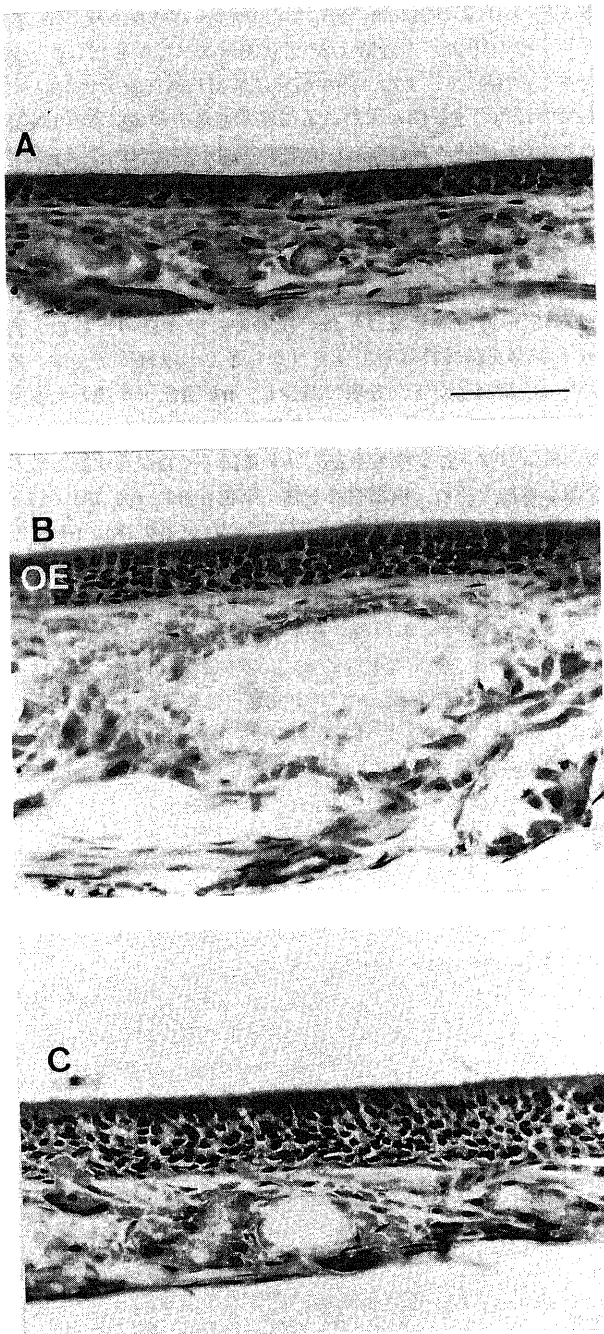


Fig. 2. Photomicrographs of coronal frozen sections through olfactory epithelia, 7 (A), 14 (B), 28 days (C) in anti-NGF treated mice, HE stain. Note the remarkable decrease of the thickness of olfactory epithelia of 7 days after infused with anti-NGF solution, and the increase, but not completely, of the thickness of olfactory epithelium of 28 days after infused with anti-NGF solution. NGF, nerve growth factor. OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicate $50 \mu\text{m}$.

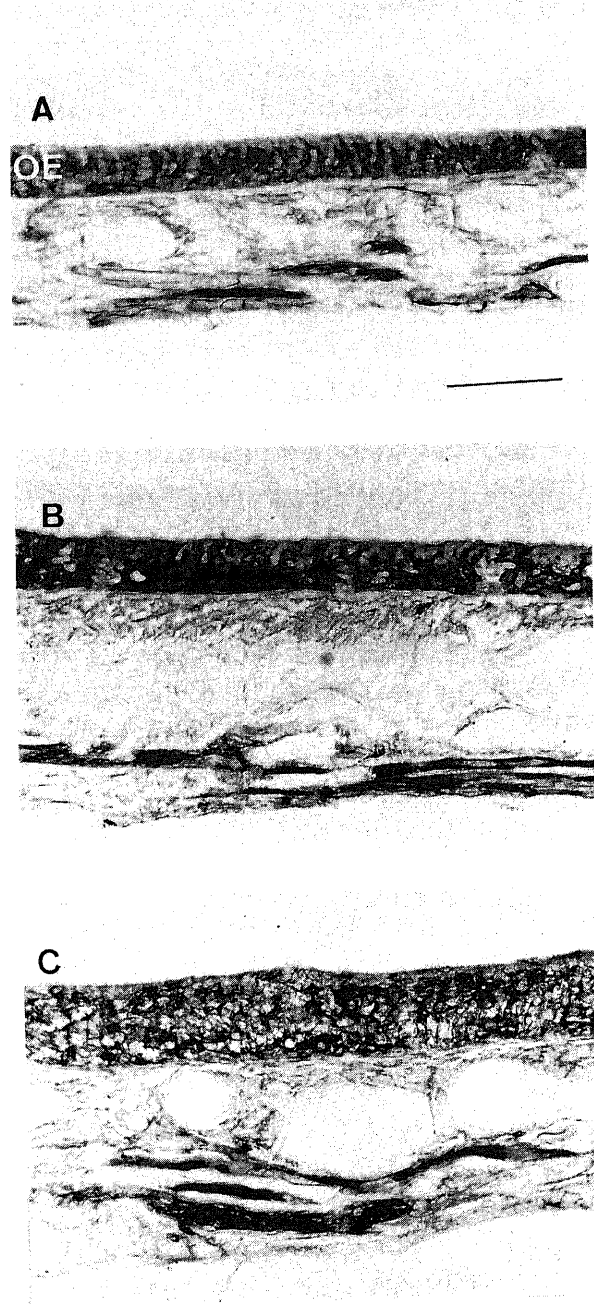


Fig. 3. Photomicrographs of coronal frozen sections through olfactory epithelia, 7 (A), 14 (B), 28 days (C) in anti-NGF treated mice, immunohistochemically stained for anti-trk antibody. Note the increased trk immunoreactivity in olfactory receptor cells and axonal bundles of 7 and 14 days after infused with anti-NGF solution, and the still increased trk immuno reactivity in olfactory receptor cells of 28 days after infused with anti-NGF solution. NGF, nerve growth factor. OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicate $50 \mu\text{m}$.

を閉鎖した。

対照として、同様の処置を行い、生理食塩水のみを注入した浸透圧ポンプを留置したマウスを作製した。

このようにして作製したマウスを、1, 3, 7, 14, 21, 28日目に嗅上皮を採取し、前述のごとく凍結切片を作製し、HE染色ならびに免疫組織化学的検討を施行した。

VI. 嗅刺激性行動観察法による検討

嗅球除去後28日間 NGF を持続投与したマウスと対照として生理食塩水のみを持続投与したマウス、正常嗅球に28日間抗NGF抗体を持続投与したマウスと対照として生理食塩水のみを持続投与したマウスに対してナラマイシンを用いた嗅刺激性行動観察を行った。ナラマイシンはマウスにとって特有のニオイと嫌な味を持ち、マウスは一度その味を経験すると、ナラマイシンの持つニオイを記憶し、その後はそのニオイをかいただけでナラマイシンを他と区別し得て近づかなくなるため、駆鼠剤として用いられている薬剤である。

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時間絶水させた後、マウス飼育ケージに0.01%ナラマイシン水溶液の入った給水瓶と水道水を入れた給水瓶を備えた。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施行ずつ調べた。実験中も渴の状態にするため、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。正解数を全施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ない、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。

先に述べた両群における28日間投与を行ったマウスに対して、3日目、7日目、14日目、21日目、28日目に嗅刺激性行動

を観察した。

成 績

I. ¹²⁵I-NGF 嗅球投与例のオートラジオグラフィ法による観察

オートラジオグラフィ法によって得られた18時間後の標識NGFの分布を図1に示した。フジイメージングアナライザーBAS 5000で画像解析を行った結果、¹²⁵I-NGFを投与した側の右嗅上皮の(PSL-BG)/mm²値は1371.00で、右呼吸上皮の61.56、左嗅上皮の36.92、左呼吸上皮の30.06に比べて明らかに高い値を示した(表1)。また、脳組織では厳密には同定できないが、右側の対角帯水平部と思われる前脳基底部の領域にも¹²⁵I-NGFの取り込みが認められた。

II. 抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスにおける嗅上皮の組織学的変化ならびに *trk* 遺伝子産物の発現様式(図2, 3)(表2)

正常成熟マウスの嗅上皮では平均7, 8層の嗅細胞層を認め、*trk* 遺伝子産物の発現は小数の嗅細胞にのみ認められた。抗NGF抗体を持続投与して3日目から多くの嗅細胞が変性、消失して嗅細胞層が4, 5層に減少し、*trk* 遺伝子産物の発現もやや増強した。7日目には嗅細胞層はさらに減少し平均2, 3層と最低の厚さとなり(図2A)、*trk* 遺伝子産物発現嗅細胞数の急激な増加を認め、嗅細胞層が強く染色された(図3A)。14日目には嗅細胞層が4, 5層に回復し始めたが(図2B)、*trk* 遺伝子産物の発現もまだ嗅細胞層の全層にわたって強い染色を認めた(図3B)。21日目から28日目にかけては嗅細胞層は5, 6層にまでには回復するものの、正常嗅細胞層の厚さまでにはいたらなかった(図2C)。嗅細胞の*trk* 遺伝子産物の発現も7~14日目に比べ減弱してはいるものの、28日目になっても依然として多くの嗅細胞に発現が認められた(図3C)。粘膜固有層の*trk* 遺伝子産物の発現は正常嗅上皮でも認められたが、7~14日目にかけて強く認められた後、28日目には正常嗅上皮とほぼ同程度になった(表2)。

対照として生理食塩水のみを持続投与したマウスでは、1~28日のいずれの期間においても、嗅細胞の変性、*trk* 遺伝子産

Table 2. Summary of the expression of *trk* gene in anti-NGF treated mice and bulbectomized mice

Area	No. of mice used	Object	Expression of <i>trk</i> gene					
			Day after infused with solution					
			1	3	7	14	21	28
Anti-NGF-treated	3	Olfactory cells	+	#	#	#	#	#
		Axonal bundles in lamina propria	#	#	#	#	#	#
Saline-treated	3	Olfactory cells	+	+	+	+	+	+
		Axonal bundles in lamina propria	#	#	#	#	#	#
Bulbectomy with NGF infusion	3	Olfactory cells	+	#	#	#	+	±
		Axonal bundles in lamina propria	#	#	#	#	#	#
Bulbectomy with saline infusion	3	Olfactory cells	+	#	#	#	#	#
		Axonal bundles in lamina propria	#	#	#	#	#	#

NGF, nerve growth factor

#, strong; #, moderate; +, weak; ±, faint; -, absent; nd, not determined.

物の発現の増強を認めなかった。

Ⅲ. NGF を持続投与した嗅球除去マウスにおける嗅上皮の組織学的変化ならびに *trk* 遺伝子産物の発現様式 (図 4, 5) (表 2)

両側嗅球除去後 NGF を嗅球に投与してから 1 日目から 14 日

目までの嗅細胞の変性, 消失の様式と *trk* 遺伝子産物の発現様式は, 抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスにおける嗅細胞とほぼ同様の経過をたどった (図 4A, B) (図 5A, B). しかし 21 日目になると嗅細胞層は 5, 6 層に回復し, *trk* 遺伝子産物の発現も減弱して少数の嗅細胞のみに認められるようになって

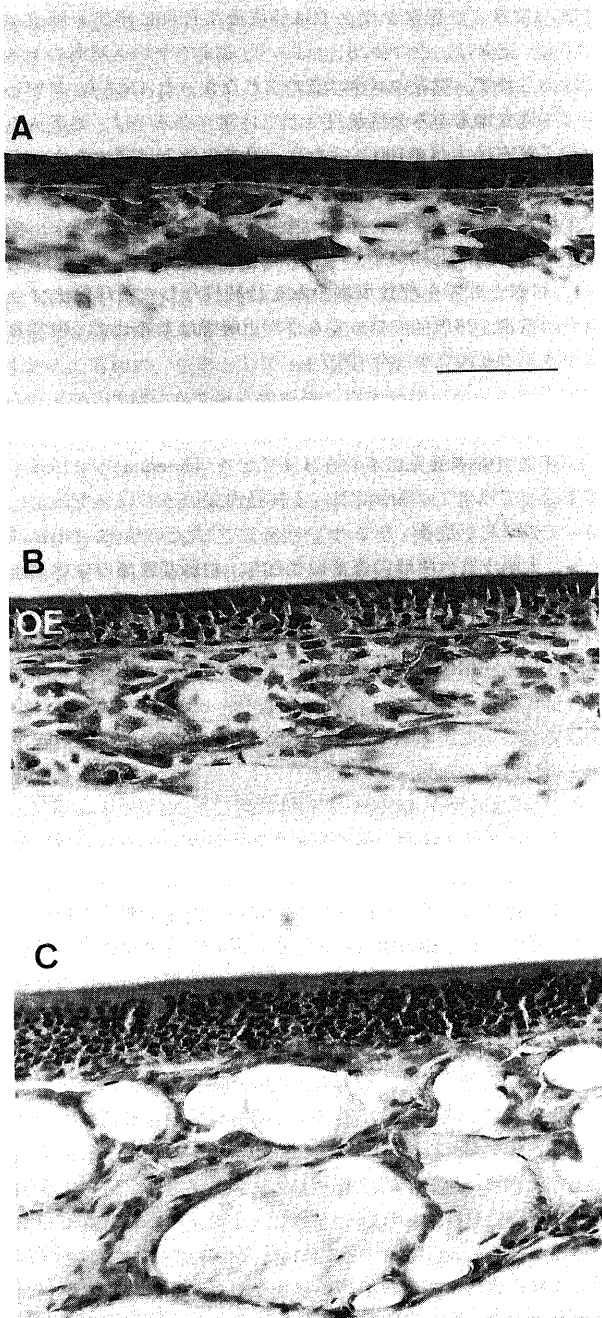


Fig. 4. Photomicrographs of coronal frozen sections through olfactory epithelia of bulbectomized mice, 7 (A), 14 (B), 28 days (C) after infused with NGF solution, HE stain. Note the remarkable decrease of the thickness of olfactory epithelia of 7 days after infused with NGF solution, and the increase of the thickness of olfactory epithelium of 28 days after infused with NGF solution. NGF, nerve growth factor, OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicate 50 μ m.

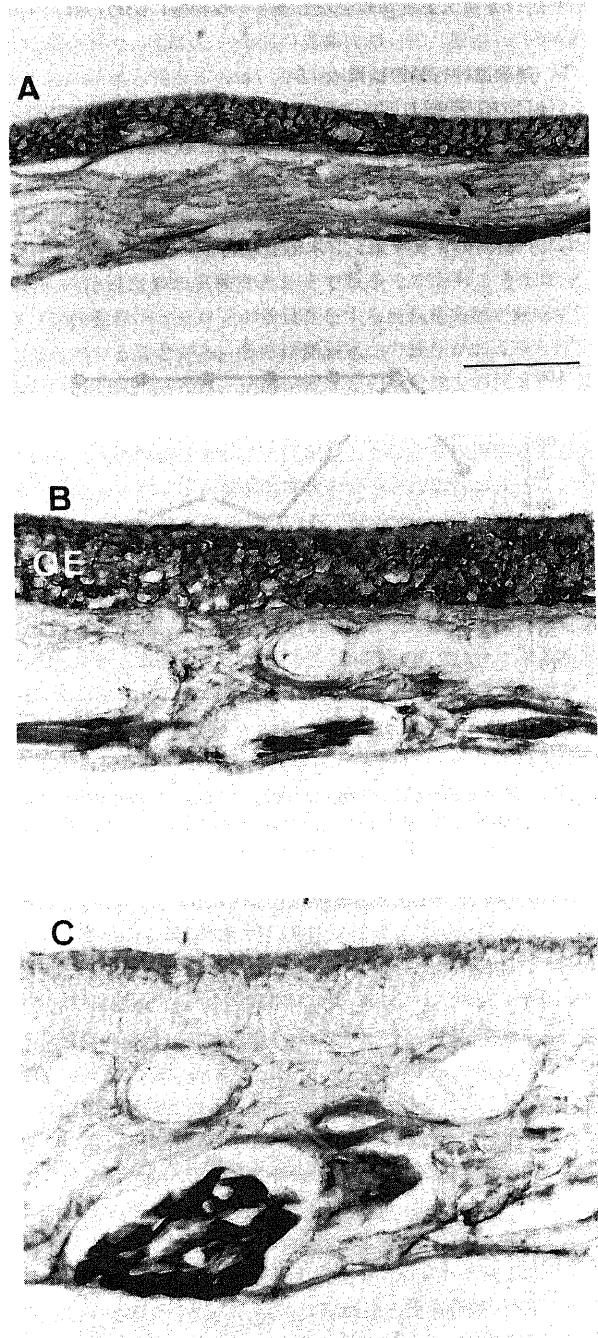


Fig. 5. Photomicrographs of coronal frozen sections through olfactory epithelia of bulbectomized mice, 7 (A), 14 (B), 28 days (C) after infused with NGF solution, immunohistochemically stained for anti-*trk* antibody. Note the increased *trk* immunoreactivity in olfactory receptor cells and axonal bundles of 7 and 14 days after infused with NGF solution, and the decreased *trk* immunoreactivity in olfactory receptor cells of 28 days after infused with NGF solution. NGF, nerve growth factor. OE, olfactory epithelium. Bar in (A) indicate 50 μ m.

た。28日目では嗅細胞層はほぼ正常と同程度の厚さに回復し(図4C), *trk* 遺伝子産物の発現も著明に減弱した(図5C)。粘膜固有層の *trk* 遺伝子産物の発現は、抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスとほぼ同様の経過をたどった(表2)。

対照として嗅球除去後生理食塩水のみを持続投与したマウスでは、14日目までは、NGF 持続投与群とほぼ同様の経過を示したが、その後28日目になっても嗅細胞層は正常の厚さには回復せず、*trk* 遺伝子産物の発現も多くの嗅細胞に認められた(表2)。

V. 嗅刺激性行動の結果(図6, 7)

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、平均正解率は80%であった。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だそうと努めた。そ

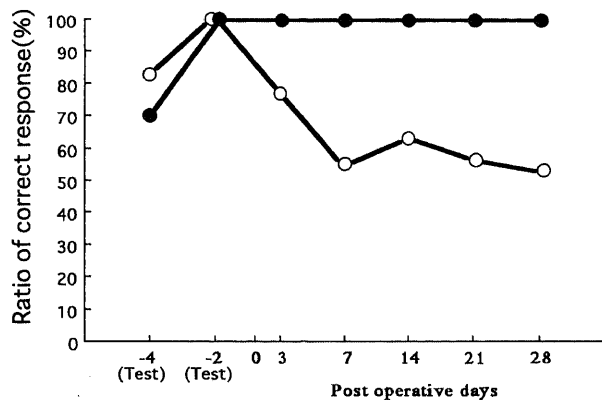


Fig. 6. Mean percentage of correct response in two groups of mice, anti-NGF treated mice (○) and normal mice infused with saline solution (●). Test means the training of mice to discriminate between a 0.01% cycloheximide solution and distilled water. NGF, nerve growth factor.

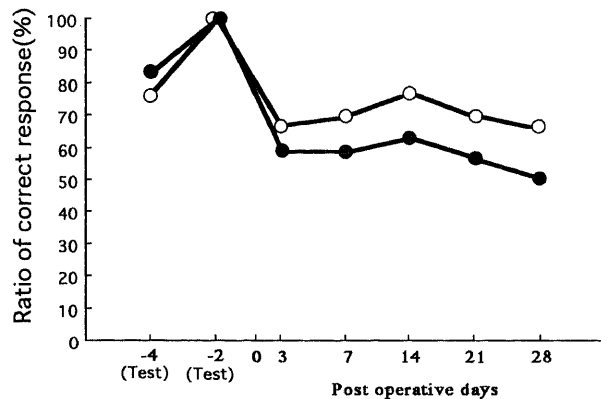


Fig. 7. Mean percentage of correct response in two groups of mice, bulbectomized mice infused with NGF solution (○) and bulbectomized mice infused with saline solution (●). Test means the training of mice to discriminate between a 0.01% cycloheximide solution and distilled water. NGF, nerve growth factor.

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ろうとはしなかった。

2回目の学習ではナラマイシン水溶液を口にさせたマウスは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、抗 NGF 抗体を持続投与した正常マウスでは処置後7日目に平均正解率が56.7%と減少し、その後28日目にいたるまで平均正解率の上昇は認められず、嗅覚の回復は認められなかった(図6)。対照として生理食塩水のみを持続投与した正常マウスでは、処置後の平均正解率はすべて100%であり、嗅覚の低下は認めなかった(図6)。NGFを持続投与した嗅球除去マウスでは処置後3日目で平均正解率は66.7%と著明に減少し、その後28日目になっても平均正解率は上昇せず、嗅覚の回復は認められなかった(図7)。対照として生理食塩水のみを持続投与した嗅球除去マウスも同様に、28日目になっても平均正解率は上昇せず、嗅覚の回復は認められなかった(図7)。

考 察

NGFが中枢神経系にも存在することを Thoenen らが1985年に報告して以来³⁶⁾、脳内における神経栄養因子の局在や役割についての研究が数多くなされている。^{47,37)~40)}その結果、NGFは海馬、大脳皮質、嗅球に豊富に存在し、前脳基底部のコリン作動性ニューロンに逆行輸送され、その生存維持に作用していることが明らかになっている⁴¹⁻⁹⁾。嗅球で合成される NGF はこれまで前脳基底部の対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存維持に関与すると考えられていた¹⁰⁾。しかし、Miwa らは、マウス嗅糸切断後の低親和性 NGFR の発現を観察し、切断後7~35日目に嗅細胞、支持細胞そして基底細胞に陽性所見を認め²⁰⁾、堀川は、マウス嗅糸切断後の高親和性 NGFR をコードしている *trk* 遺伝子産物の発現を観察し、切断後7~14日目に再生嗅細胞の細胞体と嗅神経線維束に発現の増強を認め、以後28日目まで減少した¹³⁾と、報告していることから、嗅球で合成される NGF は前脳基底部の対角帯水平部のコリン作動性ニューロンの生存維持に関与するだけではなく、嗅細胞の生存維持にも関わっていることが推察された。実際に嗅球除去や嗅索の切除によって対角帯水平部のコリン作動性ニューロンは細胞死を起こさないとこの実験結果がこの見解を強く支持している¹¹⁾。

本研究では、嗅球で合成される NGF が実際に嗅細胞に逆行輸送されているのかどうかを調べるためにマウス片側嗅球に¹²⁵I-NGF を注入した後に、オートラジオグラフィを用いて嗅粘膜の放射活性を観察した。その結果、注入した側の嗅上皮の放射活性が、注入した側の呼吸上皮、注入しなかった側の嗅上皮、呼吸上皮に比べて明らかに高いという結果であった。中枢神経系においては、¹²⁵I-NGF をラットの側脳室や、脳実質内に様々な方法で投与し^{41)~43)}、オートラジオグラフィを用いて脳内での¹²⁵I-NGF の分布を観察することにより、NGF の脳内での動態が直接的に証明されている。Altar ら¹⁰⁾は本研究と同様に¹²⁵I-NGF を嗅球内に注入しているが、この研究では脳内での分布を観察することとどまり、嗅上皮の観察は行われなかった。今回の著者の研究により嗅球の NGF が嗅細胞に逆行輸送されていることが初めて直接的に示された。

中枢神経系における抗 NGF 抗体投与の実験も現在までに数多くなされておられ、主に側脳室への投与がなされてきた。Vantini ら⁴⁰⁾はラットの側脳室に抗 NGF 抗体を投与することにより前脳基底部の中隔野のコリン作動性ニューロンの数が減少したことを報告しており、Van der Zee ら^{45/46)}は中隔野のコリン作動性ニューロンから海馬へ投射する神経線維の破壊後、側脳室に抗 NGF 抗体を投与すると、その神経線維の再生が障害されたことを報告している。また Urschel ら⁴⁷⁾はラットの皮下に抗 NGF 抗体を投与し脳内の低和性 NGFR を発現する神経細胞の減少を認めたことを報告している。これらの結果は、脳内の NGF が外部から投与された抗 NGF 抗体により不活性化されたために起こったものと考えられる。本研究ではマウス正常嗅球に抗 NGF 抗体を直接投与することにより嗅球内の NGF を不活性化することを目的として行い、嗅細胞の経時的変化を、HE 染色ならびに *trk* 抗体を用いて免疫組織化学的に観察し、さらに嗅刺激性行動観察法を用いて観察、検討した。その結果、抗 NGF 抗体投与後 7 日目に嗅細胞層の厚さが最低となり、*trk* 遺伝子産物の発現も増強し、その後 28 日目に若干嗅細胞の再生を認めたものの、依然として *trk* 遺伝子産物の発現は持続していた。堀川¹³⁾はマウス嗅糸切断後の再生過程において最初に嗅細胞における *trk* 遺伝子産物の発現が増強し、その発現が減弱する嗅糸切断後約 21 日目前後に嗅球糸球体での発現が増強したことを観察し、その時期に嗅球糸球体内でのシナプス結合のピークがあるのではないかと推察している。Pallera ら⁴⁸⁾はラットの側脳室に低親和性 NGFR に対する抗体を投与したところ、嗅球内のシナプスが減少したことを報告している。これらの報告は、嗅球糸球体内のシナプスの形成には NGF と NGFR の存在が必要であるということを示唆しており、今回の実験では嗅球への抗 NGF 抗体の投与により嗅球内の NGF が不活性化された結果、嗅細胞の変性を認めたことから、NGF が嗅細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることが推察された。嗅細胞の細胞死に対応して、嗅刺激性行動観察法においても 3 日目に平均正解率の減少を認め、その後 28 日目まで平均正解率の上昇を認めなかった。

本研究では嗅細胞へ逆行輸送された NGF が嗅細胞の再生にどのように関与しているのかを調べるために、マウスの嗅球を除去することにより嗅球の NGF が存在しない状況を作製し、その状況下に NGF を浸透圧ポンプを用いて嗅球除去部に持続投与した場合の嗅細胞の経時的変化を、HE 染色ならびに *trk* 抗体を用いて免疫組織化学的に観察し、さらに嗅刺激性行動観察法を用いて観察、検討した。嗅球除去後のマウスにおける嗅細胞の *trk* 遺伝子産物の発現については、堀川¹³⁾が報告しており、それによると嗅球除去後 7 日目に嗅細胞層の厚さが最低となり、*trk* 遺伝子産物発現嗅細胞数の急激な増加が認められ、その後徐々に嗅細胞の厚みが増したものの、28 日目になっても多くの嗅細胞に *trk* 遺伝子産物の発現が認められたと報告している。これは、本研究で対照として嗅球除去後 NGF を含まない生理食塩水のみを持続投与したマウスの結果とほぼ合致している。発達期、再生期の嗅上皮には嗅球とシナプス結合を有しない未熟な嗅細胞が多く存在し、その未熟な嗅細胞に *trk* 遺伝子産物の発現が増加するが、嗅球とのシナプス結合の完成後、嗅細胞の成熟と共に *trk* 遺伝子産物の発現は減少するものと考えられている¹³⁾。嗅球を除去した場合には嗅細胞は嗅球とシナプス結合ができないため *trk* 遺伝子産物の発現が持続するもの

と考えられる。本研究では、嗅球除去後 NGF を持続投与しても、その直後より嗅細胞が変性しはじめ、7 日目には嗅細胞層の厚さが最低となり、*trk* 遺伝子産物も嗅細胞層に強く発現し、NGF を投与しない場合とほぼ同様の結果となった。中隔野-海馬系においては、脳弓の破壊と同時に NGF を脳室内に投与すると中隔野のニューロンの生存、機能が維持されることが明らかになっているが^{12/14)}、本研究の結果からは嗅覚伝導路系においては、NGF のみでは嗅細胞の変性は阻止できない可能性が示唆された。しかし、今回の実験において、堀川¹³⁾の嗅球除去後の結果と異なるのは、28 日目には嗅細胞層はほぼ正常と同程度の厚さに回復し、*trk* の発現も著明に減弱したということで、これは嗅球除去部に投与した外因性の NGF が逆行輸送により嗅細胞に送られ作用し、嗅細胞の再生を促進させ、NGFR 数の減少(ダウンレギュレーション)を誘導したものと考えられる。中枢神経系において、浸透圧ポンプを用いた NGF の持続投与の実験はこれまで数多くなされてきており、コリン作動性ニューロンが多数存在する前脳基底部が側脳室に近接していることから、多くは側脳室への投与がおこなわれてきた。Fischer ら^{50/51)}は、迷路学習などの学習能力の低下した老化ラットの側脳室に浸透圧ポンプを用いて NGF を持続投与した結果、迷路学習において一度記憶したことを保持する能力が著しく改善され、また前脳基底核のコリン作動性ニューロンの萎縮が改善されたと報告している。Isaacson ら⁵²⁾はラットの側脳室に浸透圧ポンプを用いて NGF を持続投与した結果、硬膜内の内頸動脈周囲の交感神経の増性を認め、Mervis ら⁵³⁾は同様の実験で、大脳皮質の樹状突起が正常と比べて太くなり棘の数も増加したと報告している。また Dekker ら⁵⁴⁾はラットの基底核を障害した後、その障害した脳実質部位に浸透圧ポンプを用いて NGF を持続投与した結果、大脳皮質の低親和性 NGFR を発現する神経細胞の萎縮の度合いが、NGF を投与しなかったものと比較して少なかったと報告している。これらの結果は、いずれも外因性の NGF が中枢神経系の神経細胞に作用しうることを示しており、今回の実験と一致すると考えられる。本実験においては、NGF のみでは嗅細胞の変性は阻止できなかったが、嗅球除去後 NGF の持続投与によって、嗅細胞層が正常と同程度に回復した事実から NGF が変性後の再生になんらかの役割をはたしているのは明らかである。本実験では NGF の神経栄養因子としての役割を直接証明することはできなかったが、NGF 投与量の増量、NGF の嗅球内前投与、NGF とそれ以外の他の神経栄養因子の両者の投与などにより細胞死が阻止されるかもしれない。Gundersen ら⁵⁵⁾は培養した神経細胞を用いて、神経細胞から伸展する神経繊維は NGF の濃度勾配を認識して伸展することを証明しており、また Graziadei ら⁵⁶⁾は、幼若マウスでは片側の嗅球を除去した後、30 日目に再生した嗅線維が前脳との間にシナプス様の構造をもつことを電子顕微鏡で観察している。今回の実験では嗅球除去後最長 28 日間の NGF 投与しか施行しておらず、それ以上の期間の NGF 投与を施行した場合、嗅球除去部に投与した NGF を嗅神経が認識して伸展してくるにより嗅覚が回復することや、NGF だけでなくそれ以外の神経栄養因子の必要性も考えられ、今後の課題と思われた。

NGF の 1 日当たりの投与量は各研究により様々⁵⁰⁻⁵⁴⁾で 0.3 μ g から最高 3 μ g 投与されている。Venero ら⁵⁷⁾は NGF の量を変えてラットに投与したところ、脳実質に投与する場合は 1 日当た

り 0.75 μg で効果が最大となり、それ以上増量しても効果は変わらなかったと報告しており、Williams⁵⁰はラット側脳室に投与した場合は1日当たり1.2 μg で効果が最大となり、それ以上増量しても効果は変わらなかったと報告している。今回の実験では、1日当たりのNGF投与量を1.2 μg としたわけであるが、これでは嗅細胞の変性を阻止できなかったことを考えると1.2 μg が有効な量でなかった可能性もあり、投与量ならびに投与部位に関する検討が今後必要であると思われる。

以上の結果より、嗅球で合成されたNGFは嗅球内の嗅神経とのシナプスの生存、機能維持に関与し、さらに末梢の嗅神経、嗅細胞に逆行輸送され、それらの生存、機能維持にも関与していると考えられた。しかし、嗅覚伝導路系の障害において、嗅細胞の変性を阻止するためには変性を阻止するためのNGFの必要量や投与方法、ならびにNGF以外の他の神経栄養因子の関与を今後、考慮していく必要があると思われる。高齢化社会の到来により、老化による嗅覚低下の問題は生活の質の向上の観点からも重要な問題であり、将来的にNGFを含めた神経栄養因子が嗅覚障害患者へ臨床応用される場合、今回の実験結果は嗅覚伝導路系におけるNGFの動態、機能に関しての基礎的研究データを提示できたものと思われる。

結 論

マウス嗅覚伝導路系におけるNGFの動態、機能を調べる目的で、¹²⁵I-NGFを用いたオートラジオグラフィによる観察と、嗅球除去後にNGF持続投与したマウス、正常嗅球に抗NGF抗体を持続投与したマウスに対する組織学的ならびに行動学的観察を行い、以下の結論を得た。

1. 嗅球に¹²⁵I-NGFを投与した側の嗅上皮の放射線活性が、同側の呼吸上皮、対側の嗅上皮に比べて明らかに高い値を示した。よって、嗅球で合成されるNGFは嗅神経を通じて同側の嗅上皮に逆行輸送されていることが示唆された。

2. 正常嗅球に抗NGF抗体を投与したマウスの嗅細胞は7日目をピークに変性をみとめ、以後28日目までに若干再生は認められたものの、嗅細胞層の*trk* 遺伝子産物の発現は持続し、嗅球除去後とほぼ同様の結果となった。行動学的にも嗅覚の回復を認めなかった。これは、抗NGF抗体の投与により嗅球内のNGFが不活性化されたことによるものと思われ、NGFが嗅細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることが推察された。

3. 嗅球除去後にNGFを投与したマウスの嗅細胞は7日目をピークに変性を認めた。よって、嗅覚伝導路障害において、嗅細胞の生存維持のためにはNGF以外の他の神経栄養因子の関与が推察された。

4. 嗅球除去後にNGFを投与したマウスの嗅細胞層は28日目にはほぼ、正常と同程度の厚さにまで回復し、*trk* 遺伝子産物の発現も著名に減弱したことから、NGFが嗅覚伝導路系の再生過程において何らかの役割を果たしているものと考えられた。

5. 嗅球除去後にNGFを投与したマウスでは28日目でも嗅覚の回復を認めなかった。嗅球除去後の嗅覚機能回復にはそれ以上の期間のNGFの投与や他の神経栄養因子の必要性などが考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御鞭撻を賜りました恩師古川 亘教授ならびに、終始直接の御教示、御指導を頂きました金沢大学耳鼻咽喉科学

教室三輪高喜博士に深甚なる謝意を表します。また貴重な御助言を賜りました信州大学医学部解剖学第2講座森泉哲次教授に深謝いたします。また実験手法に関し御助言を頂きました金沢大学アイソトープ総合センター柴 和弘博士に深謝いたします。最後に本研究に御協力頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室の皆様にも深く感謝いたします。

文 献

- 1) Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. Proc Natl Acad Sci USA 40: 1014-1018, 1954
- 2) Levi-Montalcini R, Angretti PU. Nerve growth factor. Physiol Rev 18: 619-628, 1968
- 3) Thonen H, Barde Y-A. Physiology of nerve growth factor. Physiol Rev 60: 1284-1335, 1980
- 4) Whittemore SR, Seiger Å. The expression, localization and functional significance of β -nerve growth in the central nervous system. Brain Res Rev 12: 439-464, 1987
- 5) Thonen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. Rev Physiol Biochem Pharmacol 109: 145-178, 1988
- 6) Ebendal T. Review Function and evolution in the NGF family and its receptors. J Neurosci Res 32: 461-470, 1992
- 7) Korsching S, Auburger G, Heumann R, Scott J, Thonen H. Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of correlate with cholinergic innervation. EMBO J 4: 1389-1393, 1985
- 8) Whittemore SR, Ebendal T, Larkfors L, Olson L, Seiger Å, Stromberg I, Person H. Developmental and regional expression of β nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 83: 817-821, 1986
- 9) Maness LM, Kastin AJ, Weber JY, Banks WA, Beckman BS, Zadina JE. The neurotrophins and their receptors: Structure, function, and neuropathology. Neurosci Biobehav Rev 18: 143-159, 1994
- 10) Altar AC, Bakhit C. Receptor-mediated transport of human recombinant nerve growth factor from olfactory bulb to forebrain cholinergic nuclei. Brain Res 541: 82-88, 1988
- 11) 堀川 勲. 嗅覚路における神経栄養因子受容体発現の発達加齢および嗅糸切断にともなう変化. 十全医会誌 104: 206-215, 1995
- 12) Hefti F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. J Neurosci 6: 2155-2162, 1986
- 13) Lapchak PA, Hefti F. BDNF and NGF treatment in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. Neuroreport 3: 405-408, 1992
- 14) Williams LR, Jodelis KS, Donald MR. Axotomy-dependent stimulation of choline acetyltransferase activity by exogenous mouse nerve growth factor in adult rat basal forebrain. Brain Res 498: 243-256, 1989
- 15) Williams LR, Varon S, Peterson GM, Victorin K, Fischer W, Bjorklund A, Gage FH. Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria fornix transection. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9231-9235, 1986

- 16) Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. Regulation of hippocampal muscarinic receptor function by chronic nerve growth factor treatment in adult rats with fimbrial transections. *Neurosci* 53: 379-394, 1993
- 17) Yan OY, Johnson Jr EM. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci* 8: 3481-3498, 1988
- 18) Vickland H, Kott JN, Bothwell MA, Westrum LE. Nerve growth factor receptor and the transplanted rat olfactory bulb. *Exp Neurol* 115: 137-141, 1992
- 19) Vickland H, Westrum LE, Kott JN, Patterson SL, Bothwell MA. Nerve growth factor receptor expression in the young and adult rat olfactory system. *Brain Res* 565: 269-279, 1991
- 20) Aiba T, Mori J, Nakai Y. Nerve growth factor (NGF) and its receptor in rat olfactory epithelium. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 506: 37-40, 1993
- 21) Miwa T, Moriizumi T, Sakashita H, Kimura Y, Donjyo T, Furukawa M. Transection of the olfactory nerves induces expression of nerve growth factor receptor in mouse olfactory epithelium. *Neurosci Lett* 155: 96-98, 1993
- 22) Tayrien MW, Koh S, Springer JE, Loy R. Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in the rat olfactory bulb. *Anat Rec* 214: 133A, 1986
- 23) Gong Q, Bailey MS, Pixley SK, Ennis M, Liu W, Shipley MT. Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *J Comp Neurol* 344: 336-348, 1994
- 24) Roback JD, Diebe SJ, Downen M, Lee HJ, Kwon J, Large TH, Otten U, Wainer BH. Expression of neurotrophins and the low-affinity NGF receptor in septal and hippocampal reaggregate cultures: local physiologic effects of NGF synthesized in the septal region. *Dev Brain Res* 70: 123-133, 1992
- 25) Rodriguez-Tébar A, Dechart G, Barde Y-A. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4: 487-492, 1990
- 26) Rodriguez-Tébar A, Dechart G, Gotz R, Barde Y-A. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J* 11: 917-922, 1992
- 27) Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of *trk* proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-683, 1991
- 28) Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319: 743-748, 1986
- 29) 池内俊彦, 畠中 寛. 神経成長因子ファミリーと *trk* 遺伝子産物. *実験医学* 10: 126-131, 1992
- 30) Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of *trk* proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350: 158-160, 1991
- 31) Kaplan DR, Hempstead B, Martin-Zanca D, Chao M, Parada LF. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252: 554-558, 1991
- 32) Klein R, Jing S, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65: 189-197, 1991
- 33) Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the *trkB* tyrosine kinase receptor. *Cell* 65: 895-903, 1991
- 34) Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M. The *trk* tyrosine kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66: 395-403, 1991
- 35) Lamballe F, Klein R, Barbacid M. *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979, 1991
- 36) Thonen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: Comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 109: 145-178, 1988
- 37) 畠中 寛. 脳の神経成長因子. 神経成長因子ものがたり, 第1版, 80-108頁, 羊土社, 東京, 1992
- 38) Ayer-Lelievre C, Olson L, Ebenthal T, Seiger Å, Persson H. Expression of the β -nerve growth factor gene in hippocampal neurons. *Science* 240: 1339-1341, 1988
- 39) Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock L, Barde Y-A. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9: 2459-2464, 1990
- 40) Maisonpierre PC, Belluscio L, Friednan B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: Parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5: 501-509, 1990
- 41) Lapchak PA, Araujo DM, Carswell S, Hefti F. Distribution of [¹²⁵I]nerve growth factor in the rat brain following a single intraventricular injection: correlation with the topographical distribution of *trk* A messenger RNA-expressing cells. *Neurosci* 54: 445-460, 1993
- 42) Seiler M, Schwab ME. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res* 300: 33-39, 1984
- 43) Krewson CE, Klarman ML, Saltzman WM. Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res* 680: 196-206, 1995
- 44) Vantini G, Schiavo N, Di Martino A, Polato P, Triban C, Callegaro L, Toffano G, Leon A. Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats. *Neuron* 3: 267-273, 1989
- 45) Van der Zee CEEM, Fawcett J, Diamond J. Antibody to NGF inhibits collateral sprouting of septohippocampal fibers following entorhial cortex lesion in adult rats. *J Comp Neurol* 326: 91-100, 1992
- 46) Van der Zee CEEM, Rashid K, Le K, Moore KA, Stanisz J, Diamond J, Racine RJ, Fahnstock M. Intraventricular

- administration of antibodies to nerve growth factor retrads kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci* 15: 5316-5323, 1995
- 47) Urschel BA, Hulsebosch CE. Distribution and relative density of p75 nerve growth factor receptors in the rat brain as a function age and treatment with antibodies to nerve growth factor. *Brain Res* 591: 223-238, 1992
- 48) Pallerla AM, Schweitzer JB, Book AM, Wiley RG. 192 IgG-saporin causes a major loss of synaptic content in rat olfactory bulb. *Exp Neurol* 127: 265-277, 1994
- 49) 堀川 勲, 三輪高喜, 木村恭之, 土定建夫, 長山郁夫, 古川 亘. 嗅上皮における神経栄養因子受容体の分布. *耳鼻臨床*, 補85, 58-64, 1995
- 50) Fischer W, Wictorin K, Björklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 329: 65-68, 1987
- 51) Fischer W, Björklund A, Chen K, Gage FH. NGF improves spatial memory in aged rodents as a function of age. *J Neurosci* 11: 1889-1906, 1991
- 52) Isaacson LG, Crutcher KA. The duration of sprouted cerebrovascular axons following intracranial infusion of nerve growth factor. *Exp Neurol* 131: 174-179, 1995
- 53) Mervis RF, Pope D, Lewis R, Dvorak RM, Williams LR. Exogenous nerve growth factor reverses age-related structural changes in neocortical neurons in the aging rat. *Ann N Y Acad Sci* 640: 95-101, 1991
- 54) Dekker AJ, Fagan AM, Gage FH, Thal LJ. Effects of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor on remaining neurons in the lesioned nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res* 639: 149-155, 1994
- 55) Gundersen RW, Barrett JN. Neuronal chemotaxis: Chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206: 1079-1080, 1979
- 56) Graziadei PPC, Levine RR, Monti Graziadei GA. Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neurosci* 4: 713-727, 1979
- 57) Venero JL, Hefti F, Knusel B. Trophic effect of exogenous nerve growth factor on rat striatal cholinergic neurons: comparison between intraparenchymal and intraventricular administration. *Mol Pharmacol* 49: 303-310, 1996
- 58) Williams LR. Hypophagia is induced by intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *Exp Neurol* 113: 31-37, 1991

Study of the Distribution and the Function of Nerve Growth Factor in the olfactory tract of Mice Naoki Uramoto, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, 106, 180—190 (1997)

Key words olfactory tract, nerve growth factor, autoradiography, immunohistochemistry, olfactory mediated behavior

Abstract

The aim of this study was to examine distribution and function of nerve growth factor (NGF) in the olfactory tract of mice. In one examination, after 18 hours of infusing ^{125}I -NGF into the right olfactory bulb of a mouse, autoradiographic analysis was performed on the olfactory epithelium. In other examination, using the mice which had received unilateral bulbectomy and been continuously infused with anti-NGF contralaterally and the bilateral bulbectomized mice continuously infused with NGF, three kinds of analysis were then performed; histological analysis on olfactory epithelium by HE stain, immunohistochemical analysis on olfactory epithelium using polyclonal antibodies of trk which forms the NGF receptor, and olfactory mediated behavioral analysis with cycloheximide. For observations, these animals had been sacrificed at day 1, 3, 7, 14, 21 and day 28. As a result of the above analysis, several facts were found. By autoradiographic analysis, a higher level of ^{125}I -NGF was recognized in the olfactory epithelium on the side in which ^{125}I -NGF was infused in olfactory bulb. In the mice continuously infused with anti-NGF, degeneration of the olfactory cells and trk expression were observed at day 7, and the olfactory cells were regenerated at day 28. However, trk expression was still recognized and the function of olfaction was not restored at day 28. In the bulbectomized mice continuously infused with NGF, degeneration of the olfactory cells and trk expression were also observed at day 7. But, at day 28, the olfactory cells were regenerated and trk expression had decreased. However, the function of olfaction was not restored. From these examinations, it is suggested that NGF produced in the olfactory bulb was transported retrogradely to olfactory cells through nerves, and were related to sustaining the existence of the those cells and to regenerating the olfactory tract after injury.