

Study of Behavioral and Histological Change in Mice Following Olfactory Nerve Section

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/2297/8107

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

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座 (主任: 梅田良三教授)

三 輪 高 喜

(平成1年2月23日受付)

嗅神経細胞は、常に変性と再生を繰り返しているという点で、他の神経と異なっている。これまで嗅神経細胞の変性後の再生に関しては組織学的あるいは生化学的に多くの研究者によって報告されている。しかし、嗅糸切断後の嗅上皮の変化を定量的にとらえ、それと行動学的な変化を直接対比した報告はない。そこで、マウス嗅糸切断後に生ずる嗅覚系の障害と回復の過程を、行動学ならびに組織学的に、定量的に観察し、比較した。行動学的観察は、マウスが感知できる特殊なニオイと嫌な味を有するシクロヘキシミド (ナラマイシン[®]) 水溶液 (0.01%) を忌避する反応を用いて行った。組織学的には光学顕微鏡を用いて鼻中隔における嗅上皮の厚さを測定することによって、嗅上皮の変性と再生の過程を定量的に分析するとともに、走査型電子顕微鏡を用いて、嗅上皮表面の形態を観察した。嗅刺激性行動観察では、マウスは嗅糸切断後1日で嗅覚脱失の状態に陥り、28日で正常な嗅覚を有するまでに回復した。一方組織学的には、嗅糸切断後1日から嗅上皮の変性所見が観察され、5日で嗅上皮の厚さは最低値を示した。再生所見は嗅糸切断後7日から確認され、日をおって嗅上皮の厚さは増加し、嗅糸切断後35日で対照と有意差を認めないまでに回復した。嗅刺激性行動観察による嗅覚の回復の経過は、再生期における嗅上皮の厚さの変化と強い相関を認めた。走査電子顕微鏡による観察でも、嗅糸切断後1日で嗅上皮の変性が観察された。再生は嗅糸切断後7日から始まり100日で完了していた。

Key words olfactory nerve section, olfactory mediated behavior, light microscopy, quantitative analysis, scanning electron microscopy

嗅神経細胞は鼻腔後上部に位置する嗅上皮内にあり、嗅覚路における末梢受容細胞である。形態学的にはこの嗅神経細胞は双極細胞であり、樹状突起先端の嗅小胞を嗅上皮表面に出し、一方軸索は頭蓋内までのびて嗅球でシブナスを形成している。外界と中枢との直接の結合を有する神経細胞は嗅神経細胞の他にないことから、古くから様々な障害実験が行われてきた。一般的に一度破壊された神経細胞は、二度と再生することはなく、成熟した動物においては神経細胞は核分裂によって増殖することはないといわれている。嗅神経細胞においても、19世紀後半から今世紀前半にかけては、一度変性すると再生しないという報告が大勢を占めていた。

嗅上皮が変性後再び再生すると最初に報告したのは

Nagahara¹⁾である。彼は、正常なマウスの嗅神経細胞には“functioning or active cell”, “resting cell”の二つの型の細胞が存在し、それらは形態学的に存在部位および形態が異なっており、また機能的にも後者が核分裂によって増殖し、嗅神経細胞の再生がおけると述べた。そして、嗅糸切断後の嗅上皮の再生は、切断後90日で完了し、その間支持細胞や基底細胞には変性を認めなかった、と述べている。その後、Andres²⁾³⁾は、透過型電子顕微鏡を用いた実験において、“blastema cell”と呼ばれる新しい細胞を、犬、猫、ラットの嗅上皮で発見した。そして彼はそのblastema cellは、嗅神経細胞が分化や再生を行う際のreservoir cellであり、嗅神経細胞は成熟後も常に変性と再生を繰り返しているのものであろうと述べた。ま

Abbreviations: 走査電顕, 走査型電子顕微鏡; 光顕, 光学顕微鏡; 切断群, 嗅糸切断群; 非切断群, 嗅糸非切断群

た、その後 Graziadei ら⁹⁾ は電頭オートラジオグラフィを用いて、嗅神経細胞は常に変性と再生を繰り返す、その再生のための幹細胞は基底細胞であると報告した。その後も、嗅糸切断⁹⁾⁷⁾⁸⁾、嗅球除去¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、有害ガスの暴露⁹⁾¹³⁾、硫酸亜鉛溶液点鼻¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、インフルエンザウイルス経鼻接種¹⁷⁾¹⁸⁾、抗生物質投与¹⁷⁾¹⁹⁾などによって嗅上皮の変性実験が行われ、いずれも程度の差はあっても嗅神経細胞の再生を証明する報告が大勢を占めている。しかしこれらの実験は形態学的なあるいは生化学的な面からのものばかりであり、実際にどの程度嗅覚が障害を受け、どのような過程で嗅覚が回復していくかを哺乳類で観察した報告は少ない。そこで著者は、マウスの嗅神経切断後の嗅覚の変化をシクロヘキシミド(ナラマイシン[®])；以下ナラマイシンと記述する(田辺、東京)を用いた嗅刺激性行動を観察すると同時に、その間の嗅上皮の変性と再生の過程を光学顕微鏡 OPTIPHOT (光頭)(日本光学工業、東京)を用いて定量的分析を行い、また、走査型電子顕微鏡 S-900 型(走査電頭)(日立、東京)を用いて観察し、それらと行動学的変化とを比較検討した。

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

木村ら²⁰⁾が報告したナラマイシンを用いた嗅刺激性行動観察を応用して行った。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(木村らの報告ではナラマイシン水溶液の濃度は0.1%であった)。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。10回の試行に要した時間も計測し、その際、10分間に10回試行しなかったマウスは600秒(10分)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. 両側嗅糸切断

第2回目の学習終了24時間後に両側嗅糸切断を行った。

ペントバルビタールナトリウム(ネンプタール)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、その前方、側方、下方に沿って耳手術用のピンを用いて、節板から頭蓋内に入る嗅糸を切断した。切断後は皮膚を絹糸にて縫合し術創を閉鎖した。

また、嗅球露出まで同様の操作を行った後、嗅糸を切断せずに頭皮を縫合したマウスを10匹作製した(嗅糸非切断群、非切断群)。

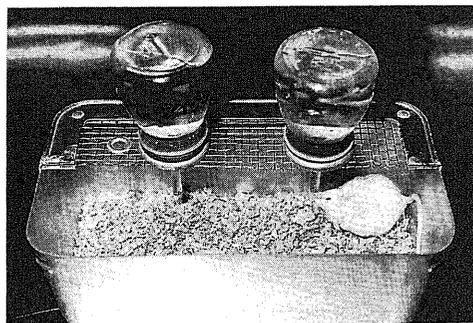


Fig.1. View of the experimental equipment. The one bottle contains Naramycin solution, and the other contains distilled water. Half of the cover was cut off in order to illustrate the inside.

3. 嗅糸切断後の嗅刺激性行動

嗅糸切断後、マウスを10匹ずつ、1日群、3日群、5日群、7日群、14日群、21日群、28日群、35日群、42日群、56日群、100日群の11の亜群に分け、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100日群では1、3、5、7、10、14、21、28、35、42、56、70、84、100日目に行い、他の群もそれに準じて行った。また非切断群においては100日群と同様に100日まで行動を観察した。7日までは、観察後1~2時間自由に飲水させた後、約48時間水を断った。

4. 組織学的観察

各群とも所定の日数に達し次第、嗅刺激性行動を観察した後に組織標本を作製した。各亜群のうち1~2匹は走査電顕標本、残りを光顕標本とし、以下に述べる方法で標本を作製した。なお、所定の日数まで生存しなかったマウスに関しては嗅刺激性行動を観察した日までの記録のみ結果に加えた。

1) 光顕による観察

マウスをネブタールを用いて麻酔し、脱血、断頭後、70%エタノール 75ml, ホルムアルデヒド 20ml, 氷酢酸 5ml の混合液で2日間浸漬固定し、Plank-Rychlo 液で脱灰、5%硫酸ナトリウムで中和、上昇エタノール系列で脱水後、セロイジンに包埋、水平断で15 μ m の薄片を100 μ m 毎に切り出し、HE染色を施した。

光顕標本では嗅部の粘膜、粘膜固有層および頭蓋内での嗅神経線維の状態を観察するとともに、嗅上皮の厚さを測定し、各亜群での平均値を算出し、非切断群と比較した。嗅上皮の厚さは鼻腔の部位によって異なるため、同一部位で測定した。すなわち、鼻中隔上端から1mm 腹側よりの高さで、鼻中隔後端、すなわち篩板から約2mm 吻側の鼻中隔粘膜を測定部位とした。

なお、マウス鼻腔の構造は、人と比べて複雑であるため、各部位の名称は上出¹⁴⁾の報告に従って記載した。すなわち、マウス鼻腔後方の篩骨鼻介を内鼻介と外鼻介に分け、更に前者を第I~IV内鼻介に、そして後者を第1、2外鼻介に分けた(図2)。

2) 走査電顕による観察

各亜群から任意に抽出したマウスを用いて走査電顕標本を作製した。ネブタールを用いて麻酔した後、開胸、胸腔内からヘパリン加生理食塩水にて灌流し、その後2%グルタルアルデヒド溶液にて30分から1時間かけて灌流固定を行った。断頭後、直ちに鼻中隔粘膜を軟骨とともに摘出し、生理食塩水にてジェット

水洗を行った後、2%グルタルアルデヒド溶液で1時間固定、さらに2%オスミウム酸にて後固定を行った。次いでエタノール上昇系列で脱水を行った後、エタノールを酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥を行い、白金-パラジウム蒸着を施し、走査電顕S-900(日立、東京)にて観察した。

5. 統計学的検討

得られた計量値はすべて平均値と標準偏差で示した。

両群の各観察日における各マウスの正解率、試行に要した時間、試行数のそれぞれの和をマウス数で除して、それぞれ平均正解率、平均試行時間、平均試行回数とした。したがって、理論的には嗅覚が正常なマウスの平均正解率は100%に近づき、嗅覚脱失の状態のマウスの平均正解率は50%に近づくことになる。

各群の平均正解率、平均試行時間、平均試行回数および各亜群の嗅上皮の厚さの平均値にもとづいて、統計学的検討を行った。

1) 平均正解率

まず、処置前の2回の学習において、嗅糸切断群(切断群)と非切断群との間で差がないかを確認するために、両群の平均正解率の間で一元配置分散分析の後、Schefféの多重比較法によって比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

次いで、切断群の嗅糸切断後の平均正解率の変化は、嗅糸切断前の第2回目の学習の正解率を対照として統計学的検討を行った。すなわち、切断群の第2回目の学習における平均正解率と、嗅糸切断後の各日数において行動を観察したマウスの平均正解率との間で一元配置分散分析の後、Schefféの多重比較法によって比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

2) 平均試行時間

処置前の2回の学習および処置後の各日数における

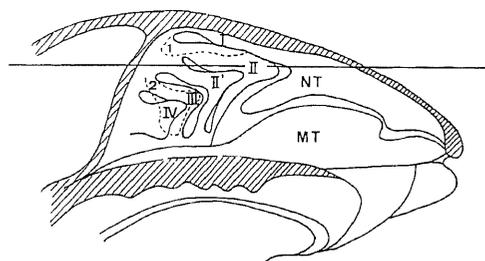


Fig. 2. Medial view of the left nasal cavity of a mouse. Anterior is to the right. NT, nasoturbinal. MT, maxilloturbinal. I~IV, endoturbinal I~IV. 1, 2, ectoturbinal 1, 2.

平均試行時間は、切断群と非切断群との間で、Student-t 検定を用いて比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3) 平均試行回数

処置後の両群間の平均試行回数の比較も、平均試行時間の検定と同様に切断群と非切断群との間で Student-t 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4) 嗅上皮の厚さ

嗅上皮の厚さは、各亜群での平均値を求め、非切断群の処置後100日における嗅上皮の厚さの平均値と比較した。比較は、まず非切断群の嗅上皮の厚さの平均値と、嗅糸切断後の各日数におけるマウス嗅上皮の厚さの平均値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。

5) 平均正解率と嗅上皮の厚さとの相関について

各マウスの、組織標本作製時の正解率と、嗅上皮の厚さの間に相関関係がないか検討した。各マウスの最後の学習における正解率と、組織標本から測定した嗅上皮の厚さの間で、Spearman の順位相関係数を求め、 $p < 0.05$ を有意な相関ありとした。

成 績

嗅糸切断時に死亡したマウスがあったため、嗅刺激性行動を観察したマウスは、切断群は99匹であった。非切断群では死亡したマウスは1匹もなく10匹とも観察し得た。

I. 嗅刺激性行動

両群の平均正解率、平均試行時間、平均試行回数およびそれらの標準偏差を表1、図3～5に示す。

1. 1回目の学習

1回目の学習では、全てのマウスが最低1回はナラマイシン水溶液に口をつけ、正解率は33.3%から90.0%までであった。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なり、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ろうとはしなかった。

各群の平均正解率をみると、非切断群は84.0%±6.6%、切断群は81.1%±9.7%で両群間に有意差を認めなかった。10回の試行に要した時間の平均は前者が344.2秒±93.4秒で、後者は351.3秒±142.1秒と有意差を認めなかった。109匹中8匹は10分間の試行時間内に10回の試行を行わなかった。

2. 2回目の学習

2回目の学習では、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させたマウスは1匹もいなかった。また10回の試行に要した時間の平均は非切断群が160.4秒±36.4秒、切断群が148.0秒±63.6秒と1回目の学習と比べて著明に短縮し、やはり、両群間に有意差を認めなかった。

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

Table 1. Effects of olfactory nerve section on discrimination tests between Naramycin solution and distilled water.

Group	Test	Postoperative days																
		1	2	1	3	5	7	10	14	21	28	35	42	56	70	84	100	
Sham operation	Ratio of correct response (%)	mean	84.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		S.D.	6.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Trial time (sec)	mean	334.2	160.4	138.4	127.6	110.7	111.7	93.1	90.9	79.8	86.7	88.4	89.1	94.1	109.9	95.6	90.3
		S.D.	93.4	36.6	30.7	41.8	24.3	27.1	16.8	25.3	16.2	19.4	14.2	19.1	19.5	15.2	16.6	12.0
Frequency of trial	mean	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	
	S.D.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Number		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
Olfactory nerve section	Ratio of correct response (%)	mean	81.1	100.0	52.2	61.6	66.5	70.0	74.3	80.2	88.0	92.0	98.9	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		S.D.	9.7	0.0	19.9	18.7	17.3	20.7	19.4	20.3	18.0	16.4	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Trial time (sec)	mean	351.3	148.0	447.1	296.5	268.6	230.7	217.8	224.2	178.4	138.8	119.9	120.4	127.0	95.4	105.4	102.0
		S.D.	142.1	63.6	175.9	188.2	154.3	143.9	151.5	153.9	128.8	100.4	46.3	57.0	40.9	23.5	21.1	26.0
Frequency of trial	mean	9.69	10.00	8.05	9.04	9.52	9.61	9.65	9.57	9.70	9.78	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	
	S.D.	1.13	0.00	2.95	2.17	1.59	1.48	1.65	1.72	1.56	1.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Number		99	99	99	89	79	70	63	63	55	45	37	27	17	9	9	9	

Ratio of correct response means the percentage which mice choose the distilled water. Trial time means the time spent mice drinking the water. When mice did not drink the water ten times within ten minutes, the trial time was recorded as 600 seconds.

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。

3. 手術後の嗅刺激性行動

1) 非切断群

次に、処置後の嗅刺激性行動についてみると、非切断群ではすべてのマウスが処置後1日から100日まで常に10回の試行を行い、1回のエラーもなかった。すなわち、平均正解率はすべて100%であり、平均試行

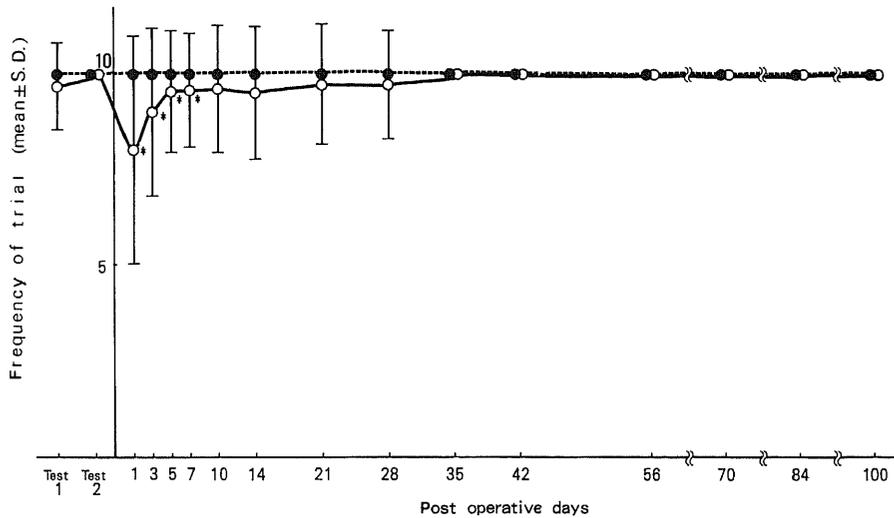


Fig. 3. Mean frequency of trial in 10 minutes and standard deviation in two groups, olfactory nerve section group (○) and sham operation group (●). In olfactory nerve section group the mean frequency was reversibly dropped after operation. * $p < 0.05$ vs. sham operation mice by Student's t-test.

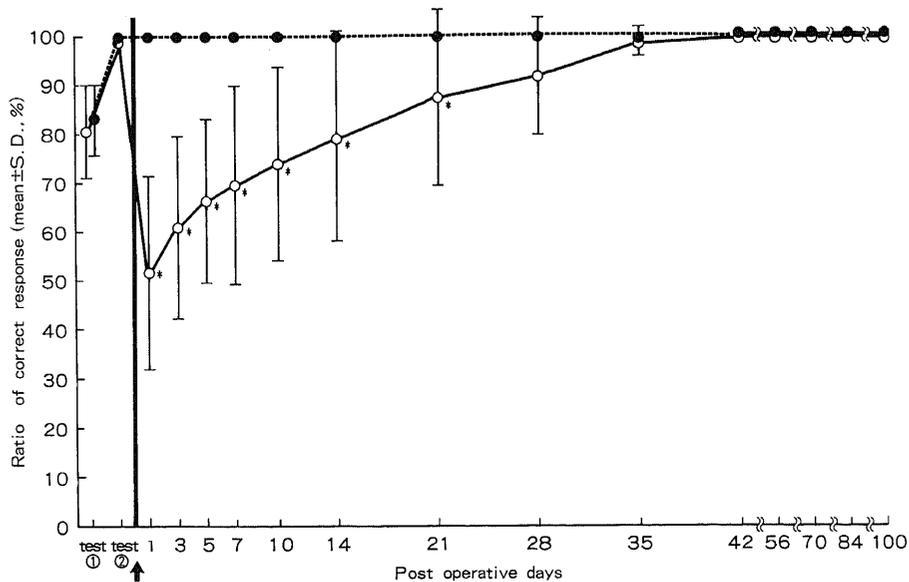


Fig. 4. Mean percentage and standard deviation of correct response in two groups of mice, olfactory nerve section group (○) and sham operation group (●). * $p < 0.05$ vs. the second test by one-way ANOVA (Analysis of variance) followed by Scheffé's multiple comparison. The arrow marks the point of surgery.

回数はすべて10回であった。平均試行時間は日がたつにつれて徐々に短縮し、最終的には100秒前後であった。

2) 切断群

切断群では、嗅糸切断後1日で平均正解率は52.2%±19.9%と著明に減少し、2回目の学習での平均正解率100%との間に有意差を認めた。また平均試行時間は非切断群と相反して447.1秒±175.9秒と2回目の学習時より延長し、平均試行回数は8.05回±2.95回と減少し、いずれも非切断群との間に有意差を認めた。

切断後3日では、平均正解率、平均試行回数はそれぞれ61.6%±18.7%、9.04回±2.17回と嗅糸切断後1日と比べて増加し、平均試行時間は296.5秒±188.2秒と短縮したが、それぞれの対照との間には有意差を認めた。

嗅糸切断後5日、7日と平均正解率および平均試行回数は更に増加し、平均試行時間は短縮していったが、まだ対照との間には有意差を認めた。

嗅糸切断後10日で、平均試行回数は9.65回±1.65回と非切断群と比べて有意差を認めなくなった。平均正解率および平均試行時間はそれぞれ、74.3%±19.4%、217.8秒±151.5秒と更に改善したが対照との間にまだ有意差を認めた。

その後平均試行回数は日をおって増加し、嗅糸切断後35日で10回となり、以後はすべてのマウスが試行時間内に10回の試行を行った(図3)。

嗅糸切断後14日で平均正解率は80.2%±20.3%、21日で88.0%±18.0%と日をおって上昇し、嗅糸切断後28日で92.0%±16.4%と2回目の学習での平均正解率と有意差を認めなくなり、42日以後は平均正解率はすべて100%となった(図4)。

平均試行時間も日をおって短縮していったが、非切断群と有意差を認めなくなったのは嗅糸切断後70日で、平均試行時間からみた回復は、平均正解率、平均試行回数の回復と比べて長くなっていた(図5)。

II. 光顕による観察

非切断群および嗅糸を切断した各亜群の計測部位での嗅上皮の厚さの平均値を表2、図6に示す。

1. 非切断群

マウス頭蓋の水平断の標本で、鼻中隔上端から1mm腹側の高さでは、鼻腔の吻側1/2~1/3は呼吸部で、その尾側が嗅部となっていた。呼吸部では鼻中隔の外側に鼻骨甲介が観察された。嗅部では鼻中隔の外側に第II内鼻甲介の上端付近が観察され、更にその外側に第I内鼻甲介が観察された。このレベルでは顎骨甲介および第III、IV内鼻甲介は認めなかった。一部の標本では第I内鼻甲介の更に外側に第1外鼻甲介の下端が観察された(図7-a)。

嗅上皮の厚さの測定部位である鼻腔後端から2mmの部分の鼻中隔粘膜は、いずれの標本でもこのレベルでは嗅部のほぼ中央に位置し、他の部位に比べて比較的平坦であった(図7-a)。以上の解剖学的な位置関係

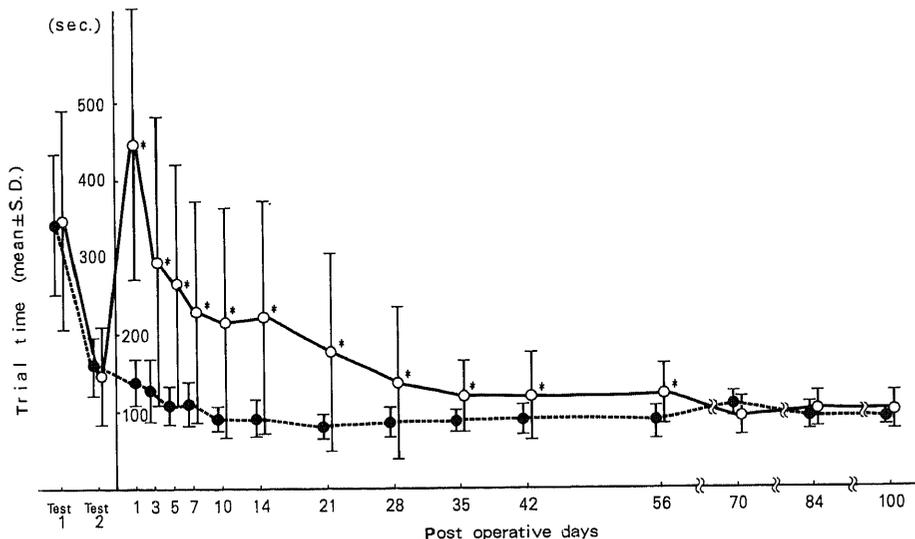


Fig. 5. Mean latency per trial and standard deviation in two groups, olfactory nerve section group (○) and sham operation group (●). * $p < 0.05$ vs. sham operation by Student's t-test.

は、すべてのマウスに共通して観察された。

嗅粘膜は嗅上皮と粘膜固有層からなり、嗅上皮は吻側端で呼吸上皮に連続して移行していた(図7-b)。嗅上皮は呼吸上皮に比べて厚く、その表面から支持細胞、嗅神経細胞、基底細胞の順に配置され、その下方は基底膜を介して粘膜固有層となっていた。最も表面の近くにある支持細胞と、最深部にある基底細胞はほぼ一層からなり、その間には多くの嗅神経細胞が密集していた。また、嗅神経細胞の核は大小不同で、小さい核は円形で核小体が少なく、大きい核は楕円形で核小体が多い傾向があったが、それらの核の配列には特に一定の傾向はなかった(図7-c)。全視野に数個ではあるが好塩基性に染まる核分裂像を認めた(図7-d)。粘膜固有層には豊富な血管とボウマン腺を認めた。また動鼻神経の太い神経束が粘膜固有層の深部を走行しているのを認めた(図7-c)。

鼻腔の最も尾側は盲端となり、その後方は篩板を介

して、頭蓋となっていた。篩板には所々小孔があり、多くの神経束が通っていた。

篩板の後方の頭蓋内には嗅球があり、外層から嗅神経線維層、糸球体層、外叢状層、僧帽細胞層、内叢状層、顆粒細胞層の順に配列していた(図7-e)。

嗅上皮の厚さは平均 85.9 μ m であった。

2. 嗅糸切断後1日

嗅上皮の厚さは72.9 μ m と非切断群と比べて若干薄くなっていたが、有意差は認めなかった。

呼吸上皮には変化はなかったが、嗅上皮では嗅神経細胞の変性を示す核濃縮や核崩壊の所見を多く認め、また変性した核が集合して貪食されている所見もあった(図8-a)。またそれらの変性所見は鼻腔の尾側になるほど多い傾向があった。

粘膜固有層の血管やボウマン腺には変化を認めなかった。

頭蓋内では嗅球の前方に血液塊が充満していた(図

Table 2. Thickness of olfactory epithelium after olfactory nerve section and sham operation.

Group	sham ope.	1 day	3 days	5 days	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	42 days	56 days	100 days
mean(μ m)	85.9	72.9	55.0	51.3	52.9	57.9	57.2	61.4	71.6	76.3	80.8	87.9
S.D.(μ m)	4.3	10.4	5.0	5.5	4.4	6.7	8.2	6.9	11.7	4.3	7.5	7.2
N	8	7	7	6	6	6	8	7	8	8	6	7

Mice which sectioned the olfactory nerve were divided into subgroups according to postoperative days. Measurements were taken from the horizontal sections of the septal epithelium.

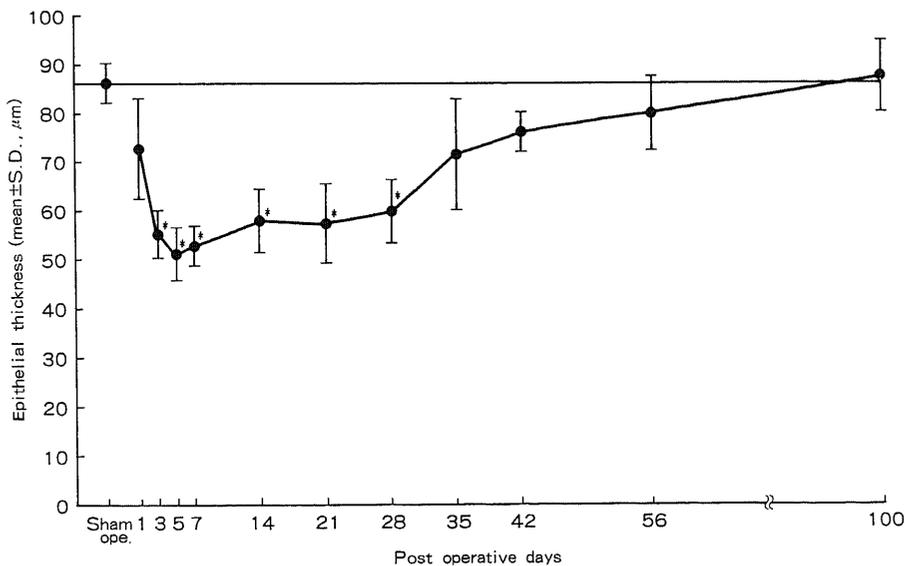
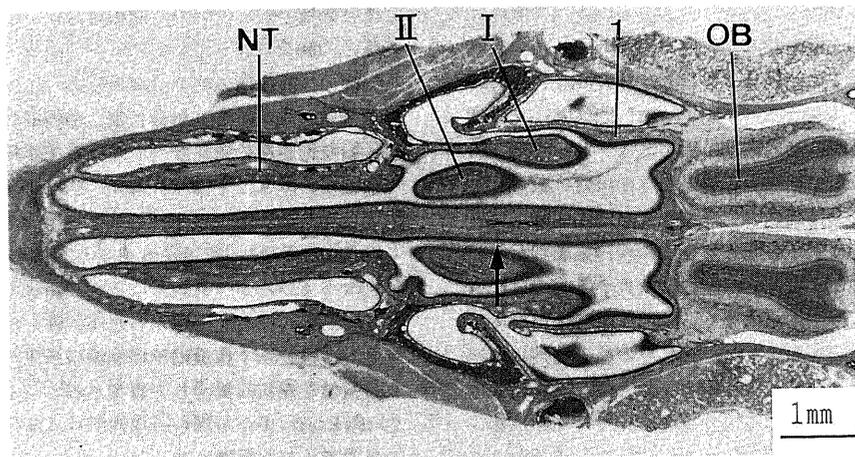
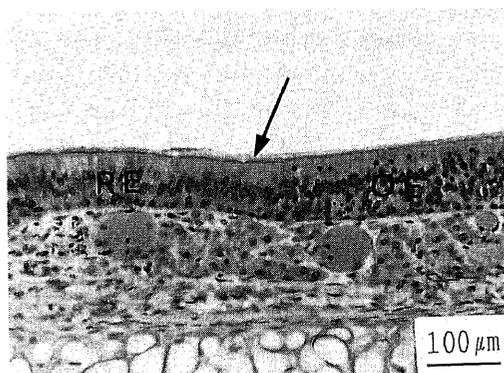


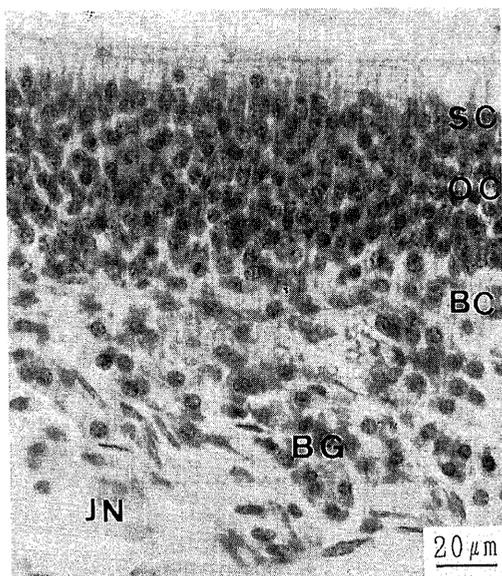
Fig. 6. Mean thickness on the olfactory epithelium. * $p < 0.05$ vs. sham operation mice by one-way ANOVA followed by Scheffé's multiple comparison.



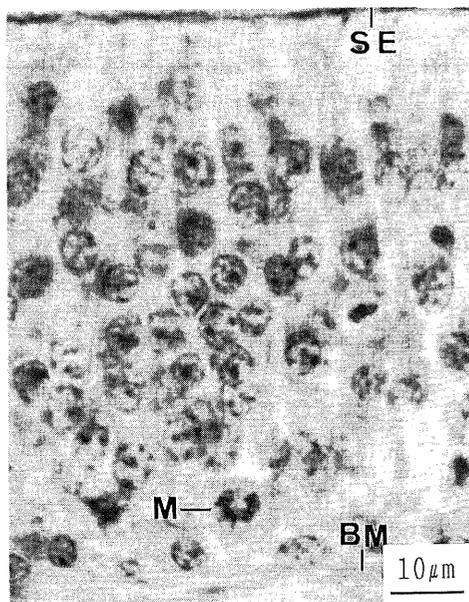
a



b



c



d

8-b).

3. 嗅糸切断後3日

嗅上皮では大部分の嗅神経細胞が消失し、上皮の厚さは平均 $55.0\mu\text{m}$ となり、非切断群との間に有意差を認めた ($p < 0.05$). 嗅糸切断後1日でみられた核濃縮や核崩壊の所見は減少し、それに代わって上皮基底層付近に核分裂像が多くみられるようになった (図9-a). 変性していない嗅神経細胞は集合して存在し、それらの核は一様に大きく、核小体も豊富であった. 支持細胞および基底細胞には変化は認めなかった (図9-b).

4. 嗅糸切断後5, 7日

嗅上皮の厚さは更に薄くなり、嗅糸切断後5日で $51.3\mu\text{m}$ と最低値を示した. 核濃縮や核崩壊の所見はほとんど消失し、核分裂像はさらに多くみられた. また、嗅神経細胞核の密度は非切断群と比べて疎になり、部位によっては支持細胞核と基底細胞核との間に

まったく嗅神経細胞核を認めない部分もあった (図10-a). しかし7日ではさきに述べた大型の核をもつ細胞が密集している部分もあった (図10-b). 嗅球ではその嗅神経線維層の変性を認めた (図10-c).

5. 嗅糸切断後14, 21, 28日

嗅上皮は徐々に厚くなったが、まだ非切断群との間に有意差を認めた ($p < 0.05$). しかし嗅上皮内では大型の細胞が増加し、嗅神経細胞の密度は徐々に増えていった (図11-a, b, c). 嗅球は全体に萎縮し特に前方に強く、篩板を通過した嗅神経線維は外側から嗅球と連絡していた (図11-d).

6. 嗅糸切断後35, 42, 56日

嗅上皮は更に厚くなり、嗅糸切断後35日で平均 $71.6\mu\text{m}$ となり、非切断群との間に有意差を認めなくなった. 嗅神経細胞の密度も非切断群と同程度まで増加した (図12-a, b, c). 56日でも嗅球ではまだ萎縮がみられたが、嗅神経線維層は28日群までと比べて増大し

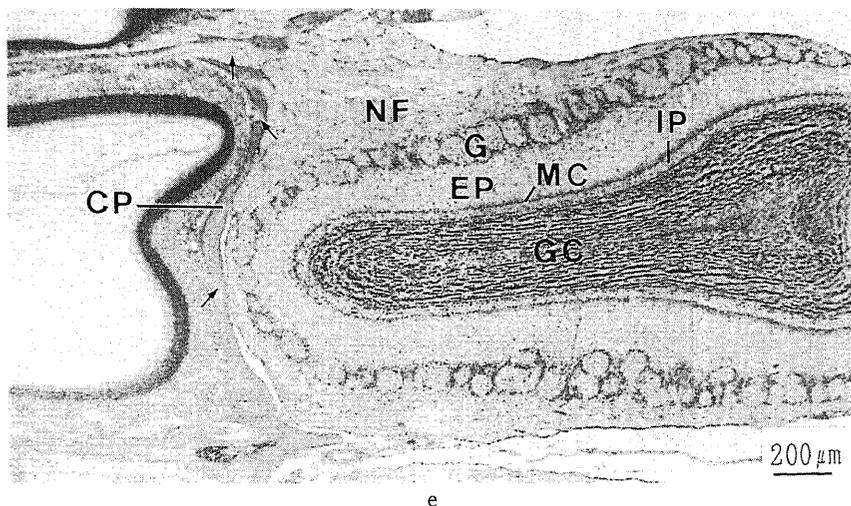
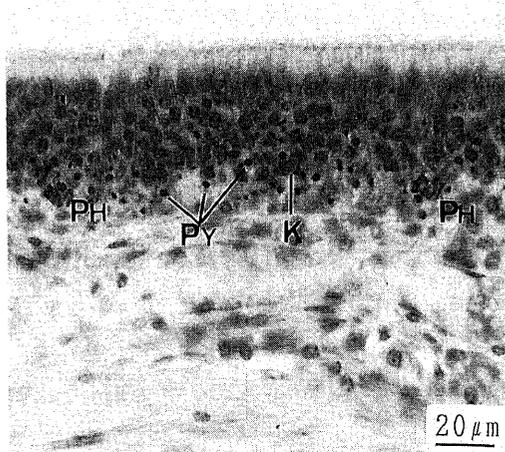


Fig. 7. Sham operated mouse. (horizontal section) a, Nasal cavity approximately 1 mm ventral to the dorsal limit. NT, nasoturbinal. I, II, endoturbinal I, II. 1, ectoturbinal 1. OB, olfactory bulb. Arrow indicates region for measurement of epithelial thickness. Anterior is to the left. HE stain. $\times 10$. b. The demarcation between olfactory epithelium (OE) and respiratory epithelium (RE) is marked by arrow. Olfactory epithelium is thicker than respiratory epithelium. HE stain. $\times 100$. c. Olfactory epithelium in sham operated mouse. SC, supporting cells' nuclei. OC, olfactory cells' nuclei. BC, basal cells' nuclei. BG, Bowman's gland. JN, Jacobson's nerves. HE stain. $\times 400$. d, figure of mitotic division of the olfactory cell nucleus (M). SE, surface of the epithelium. BM, basement membrane. HE stain. $\times 1,000$. e, right olfactory bulb. NF, olfactory nerve fibers. G, glomerular layer. EP, external plexiform layer. MC, mitral cells layer. IP, internal plexiform layer. GC, granular cells layer. CP, cribriform plate. The arrows mark the small pores in which the olfactory nerve fibers through. HE stain. $\times 40$.

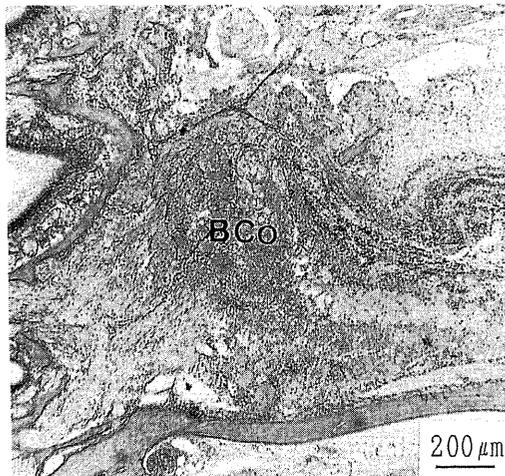
た(図12-d).

7. 嗅糸切断後100日

嗅上皮の厚さは平均 $87.9\mu\text{m}$ と、非切断群とほぼ同じになり嗅神経細胞核の密度も非切断群とまったく変わりなくなった(図13-a). 嗅球は頭蓋内で嗅部を充滿し、外側では嗅神経線維層の内側に糸球体層が形成



a



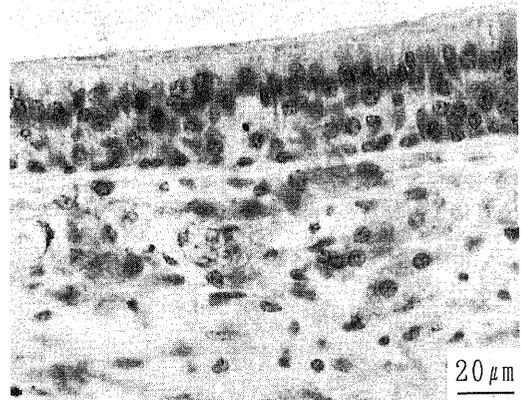
b

Fig. 8. Olfactory epithelium and olfactory bulb one day after the nerve section. a, olfactory epithelium. The thickness of olfactory epithelium is slightly decreased. Figures of pyknosis (Py), karyorrhexis (K) and phagocytosis (Ph) are seen. HE stain. $\times 400$. b, left olfactory bulb. Bloody coagulum (BCo) is filled in the bulb cavity. Anterior is to the left. HE stain. $\times 40$.

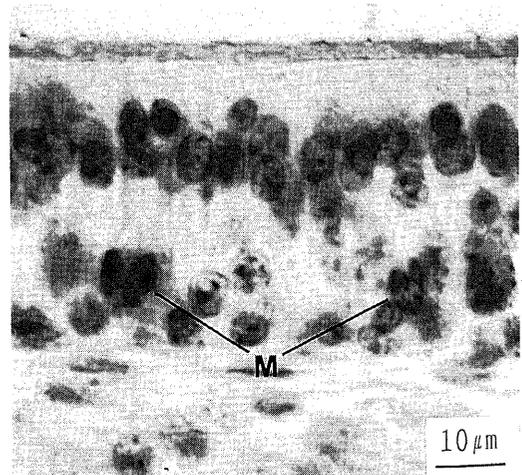
されていた。しかし、28日群でみられた前方の欠損部では嗅神経線維層および糸球体層は薄く、代わって顆粒層が前方へ向かって伸びてきている像を認めた(図13-b).

嗅糸切断後1日から100日まで常に呼吸上皮には変化はなく、また嗅上皮下の粘膜固有層における血管およびボウマン腺にもまったく変化を認めなかった。

III. 行動学的回復と組織学的回復との相関



a



b

Fig. 9. Olfactory epithelium 3 days after section. a, the thickness of epithelium is remarkably decreased. HE stain. $\times 400$. b, mitotic figures (M) are seen in deep area of olfactory epithelium. HE stain. $\times 1,000$.

嗅上皮の厚さは嗅糸切断後7日から増加しているため、嗅糸切断後7日以後のマウスについて、嗅上皮の厚さと、正解率との相関を検定した(図14)。マウスの正解率は正規分布をしていないため、Spearmanの順位相関係数を求めたところ0.682となり、両者には有意な相関関係が認められた($p < 0.05$)。

IV. 走査電顕による観察

1. 非切断群

嗅上皮表面は大部分が嗅線毛マットで覆われ、その下の構造はみることができなかった。嗅線毛マットは上皮表面と水平に一定の方向に走行していたが、表面

ではわずかに網目状になっていた(図15-a)。

嗅上皮と呼吸上皮の境界部は波状を呈しており、呼吸線毛細胞が島状に嗅上皮の所へ入り込んでいるところもあった(図15-b)。

呼吸上皮表面には上皮表面に対して垂直方向に伸び、嗅線毛と比べて明らかに太い線毛細胞を持つ呼吸線毛細胞を認めた(図15-c)。

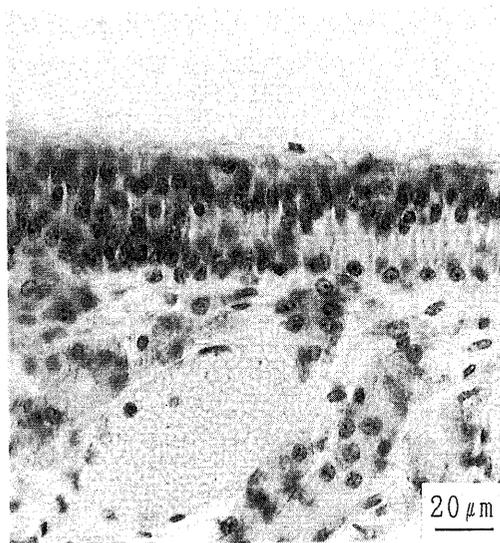
2. 嗅糸切断後1日

嗅線毛マットは高度に消失し、短く太い嗅線毛を有した嗅小胞が観察され、またすでに変性がおこっている嗅小胞も認めた。しかし、まだ嗅線毛マットの残存する部分も観察された。嗅線毛マットの消失しているところでは支持細胞の微絨毛が観察された。またボウマン腺の開口部と思われる小孔が認められた(図16-a,b)。

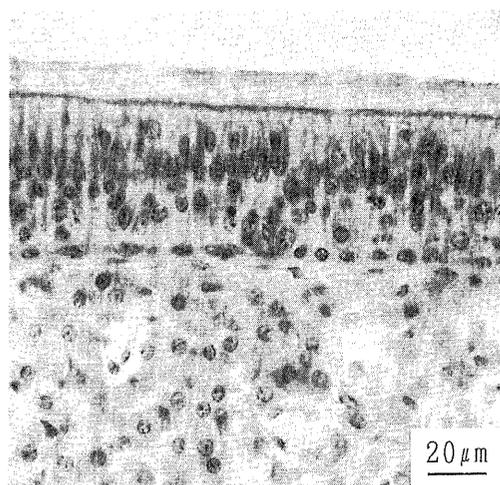
一方、呼吸上皮には変性所見は見られなかった。

3. 嗅糸切断後3, 5日

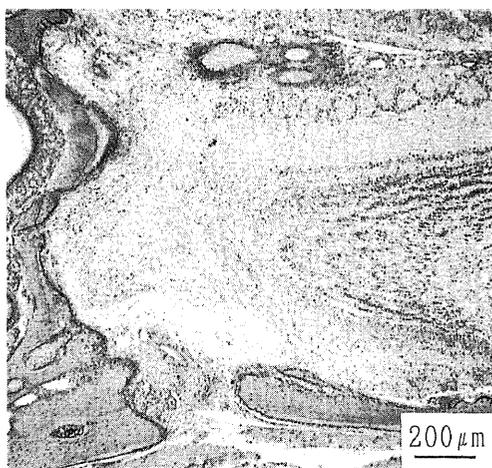
嗅糸切断後3日で嗅線毛マットは完全に消失し、変性した嗅小胞がごくわずかに認められるのみで、嗅上皮表面は支持細胞で覆われていた(図17-a)。支持細胞は個々の細胞が明瞭に区別され、その表面の微絨毛は短く、膨化している所も観察された(図17-b)。また



a



b



c

Fig. 10. a, Olfactory epithelium 5 days after the section. The figures of pyknosis, karyorrhexis and phagocytosis are almost disappeared. HE stain. $\times 400$. b, Olfactory epithelium 7 days after the section. HE stain. $\times 400$. c, left olfactory bulb 7 days after nerve section. Olfactory nerve fibers show degenerative changes. Anterior is to the left. HE stain. $\times 40$.

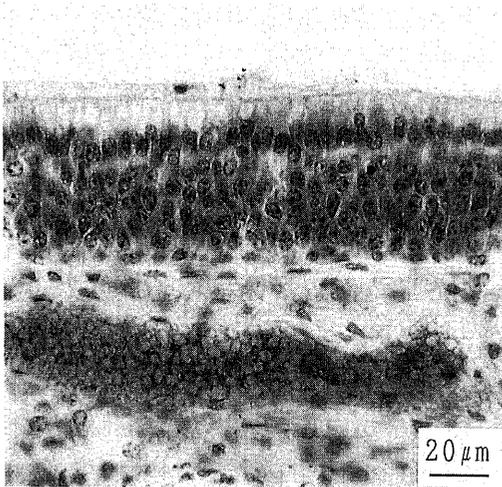
ボウマン腺の開口部と思われる所見も認めた (図 17-c).

嗅上皮と呼吸上皮の境界部では、短い線毛を有した呼吸上皮細胞が島状に嗅上皮部に入り込んでいた (図 17-d).

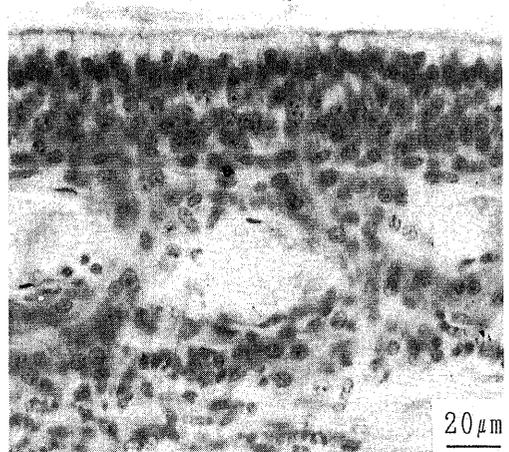
4. 嗅糸切断後 7 日

嗅線毛マットは認められず、嗅糸切断後 3, 5 日で観察されたように、個々の支持細胞が明瞭に区別され、嗅小胞がまったく消失している部分がみられた (図 18-a). またやや長めの微絨毛を有した支持細胞が存在し、細胞表面の構造が見えなくなっている部分も

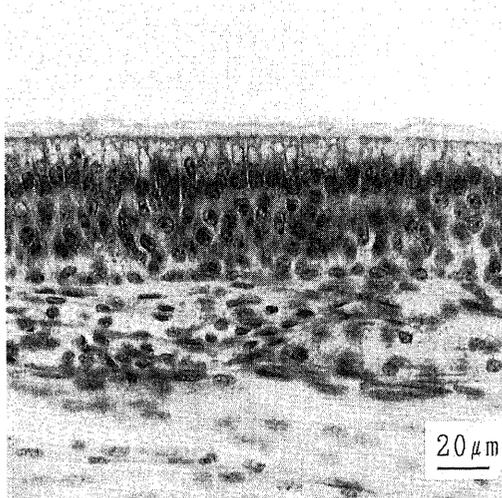
みられた. その部分では成熟した嗅小胞と比べて明らかに細く短い線毛を有する嗅小胞がみられた (図 18-b). また、支持細胞の微絨毛の間から、長く固い絨毛を突出している細胞、すなわち、Andres²¹⁾、岡野²²⁾²³⁾、菊屋⁹⁾が報告した第 5 型細胞が観察された (図



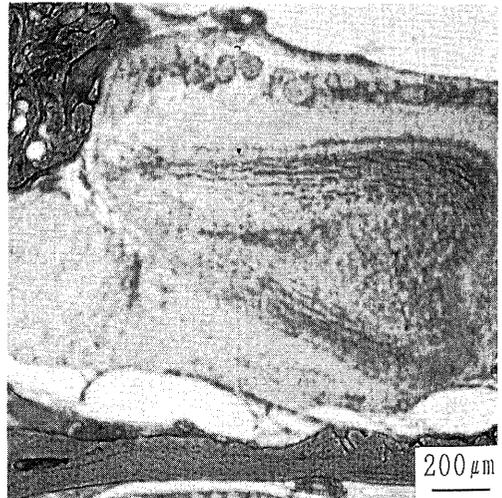
a



c



b



d

Fig. 11. a, b and c, olfactory epithelium 14, 21 and 28 days after the section, respectively. HE stain. $\times 400$. d, Left olfactory bulb 28 days after nerve section. Anterior is to the left. HE stain. $\times 40$.

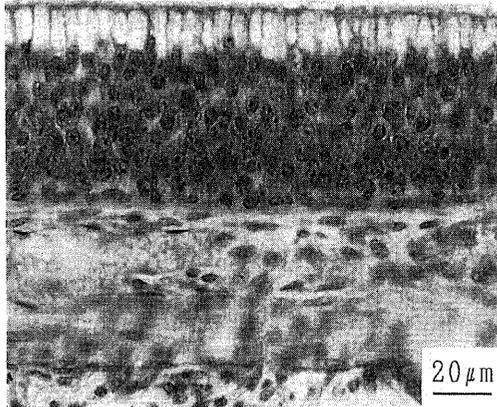
18-c, d).

5. 嗅糸切断後14, 21日

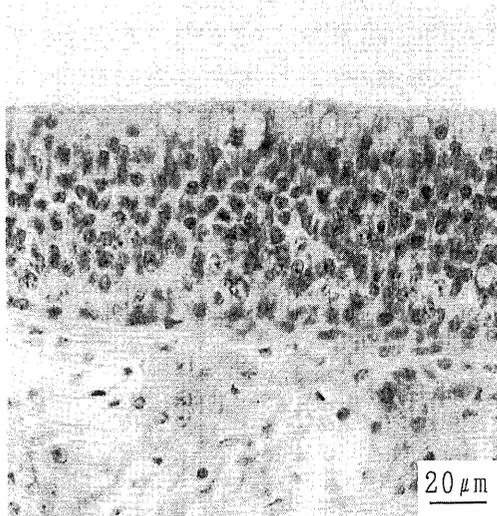
再生嗅小胞は嗅糸切断後14日でさらに増加し、嗅線毛も太く、長くなっていた。しかしまだ嗅線毛マットは形成されなかった (図19-a)。

21日では支持細胞の微絨毛はさらに長くなり、その下の細胞表面はほとんど見えなくなったが、大きな穴が開いている部分もあった。前述した第5型細胞の絨毛が多数観察された (図19-b)。

6. 嗅糸切断後28, 35日



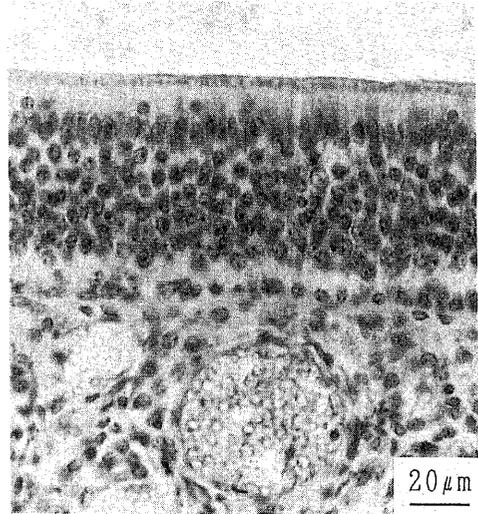
a



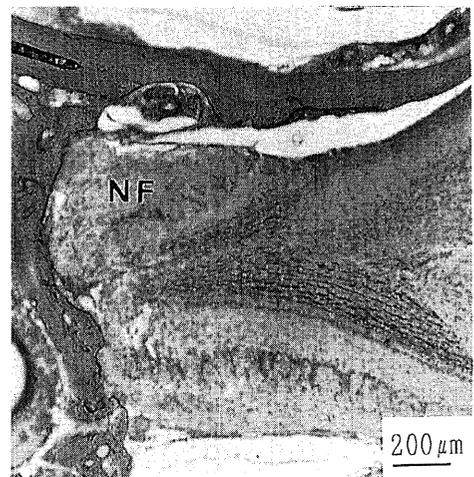
b

再生嗅小胞はさらに数を増し、その線毛はさらに太く、長くなったが、まだ嗅線毛マットは観察されなかった (図20)。

7. 嗅糸切断後42, 56日



c



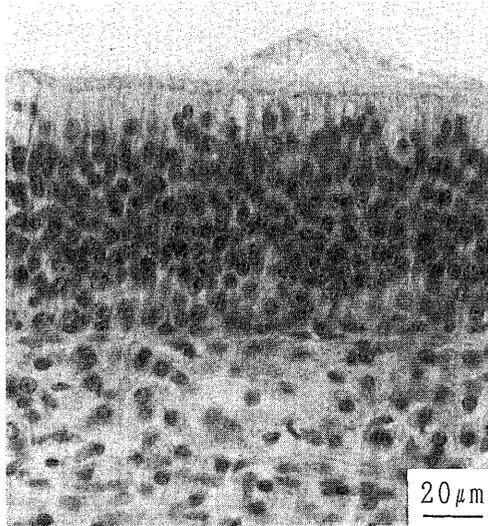
d

Fig. 12. a, b and c, olfactory epithelium 35, 42 and 56 days after the section, respectively. HE stain. $\times 400$. Thickness of olfactory epithelium is increased day by day. HE stain. $\times 400$. d, right olfactory bulb 56 days after nerve section. The regeneration of olfactory nerve fibers (NF) is remarkable in the lateral of olfactory bulb. Anterior is to the left. HE stain. $\times 40$.

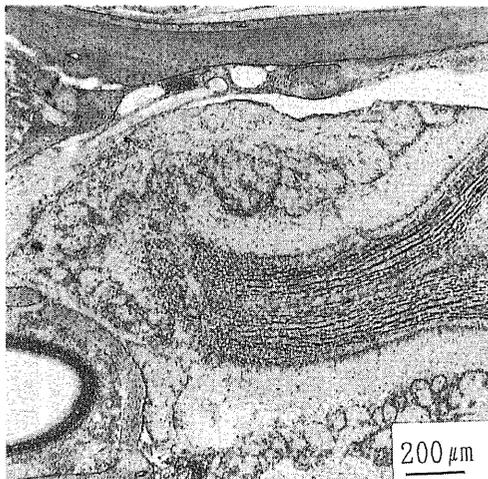
嗅糸切断後42日で一部嗅線毛マットの形成を認めたが、大部分は嗅小胞のない、支持細胞の微絨毛で覆われた部分であった(図21-a)。嗅糸切断後56日でも嗅線毛マットの形成は十分ではなかった(図21-b)。

8. 嗅糸切断後100日

嗅糸切断後100日ではほとんどの嗅上皮部が嗅線毛



a



b

Fig. 13. Olfactory epithelium and olfactory bulb 100 days after the nerve section. a, olfactory epithelium. HE stain. $\times 400$. b, right olfactory bulb 100 days after nerve section. Many glomerular formations are seen. HE stain. $\times 40$.

マットで覆われていた(図22-a)。嗅上皮と呼吸上皮の境界部分では、非切断群でみられたような、呼吸線毛細胞が島状に嗅上皮の所へ入り込んでいる所見も観察された(図22-b)。

考 察

ナラマイシンは1954年奥田²⁴⁾が、奈良から持ち帰った土壤中の1放線菌の中に発見した物質で、抗酵母性物質として単離し、ナラマイシンと命名した。しかし、それは既に米国で発見されていた抗生物質シクロヘキシミドと同一物質であることが判明している²⁴⁾。

シクロヘキシミドは当時、既に米国では、強い駆鼠作用を持つことが知られており、駆鼠剤として使用されていたが、鼠がシクロヘキシミドを忌避する機序に関して小村ら²⁵⁾はラットを用いて実験的に証明した。その報告で小村らは、「ラットは最初ナラマイシンを飲んだとき、その激烈な嫌悪すべき味に対して強い吃驚反応を示すが、その際ナラマイシンのもつニオイを一度で記憶し、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これに近づかなくなる。」と述べている。

現在でもナラマイシンは更に水や温度に対して安定したかたちで、カーテンや電気製品のコードなどに含ませて駆鼠剤、防鼠剤として製品化され使用されている。

さて、動物の嗅覚の行動実験は1950年代から行われてきた²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。しかし、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広くは普及されなかった。また、組織学的に嗅上皮の変性と再生を観察する実験では、動物の大きさの面からマウスがよく用

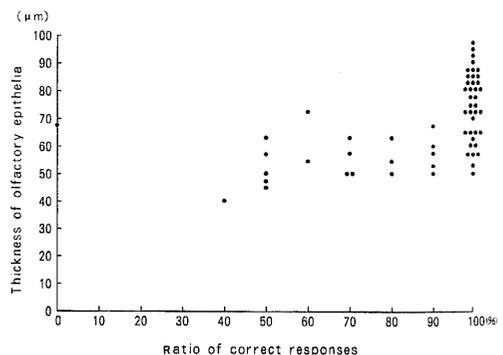
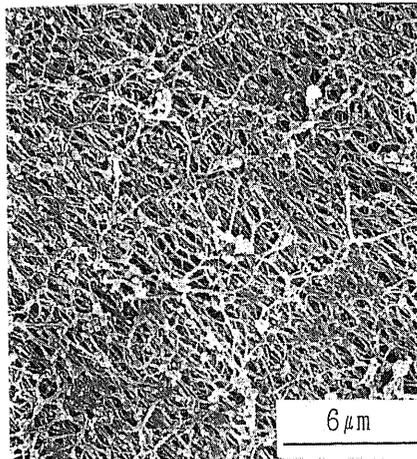
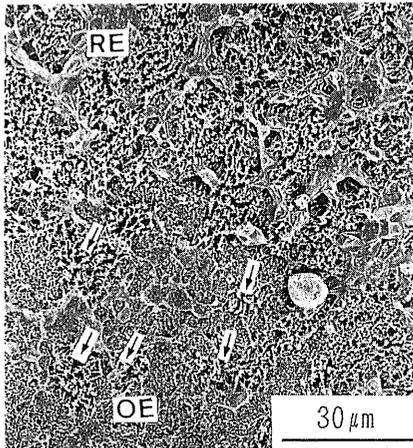


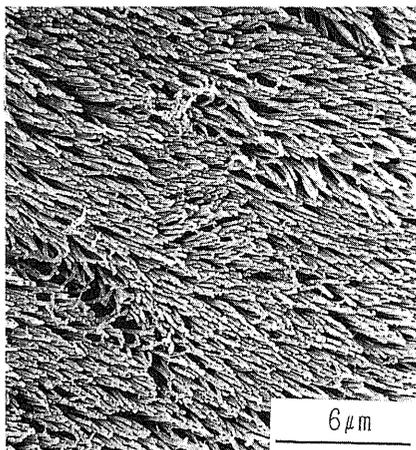
Fig. 14. Correlation between ratio of correct responses and thickness of olfactory epithelia.



a

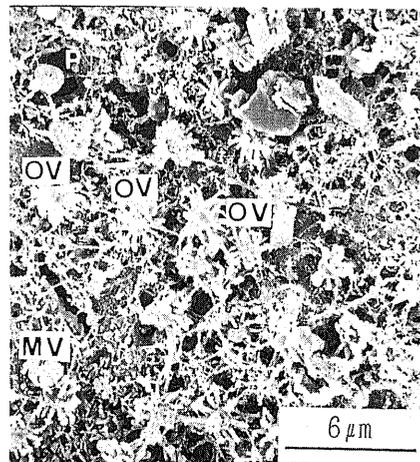


b

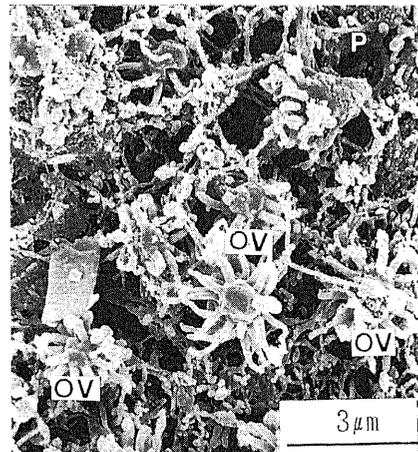


c

Fig. 15. The surface of nasal mucosa in sham operated mouse. a, olfactory epithelium. Long and fine cilia run parallel to each other. SEM. $\times 3,000$. b, Demarcation between the olfactory epithelium (OE) and respiratory epithelium (RE). The arrows mark respiratory epithelium too. SEM. $\times 600$. c, respiratory epithelium. SEM. $\times 3,000$,



a



b

Fig. 16. a and b, olfactory epithelium a day after the nerve section. OV, olfactory vesicles (degenerative). MV, microvilli of supporting cells. P, pore-like opening. a, SEM. $\times 3,000$. b, SEM. $\times 6,000$.

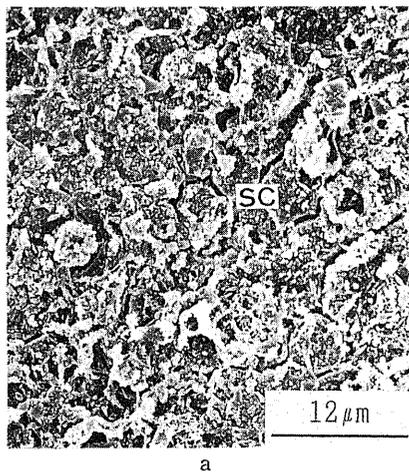
いられているが、行動学的実験でマウスを用いた報告は非常に少ない。

牧野²⁹⁾、梅沢³⁰⁾はナラマイシンを用いて、ラットに条件反射を形成して、ニオイの識別能力に関して報告した。牧野や梅沢の方法は、それまで一般的に行われてきた bar-press の方法に比べて、実験装置や反射形成の面でかなり簡便な方法であった。しかしそれでも反射形成までに10日を要し、また使用動物はラットであった。

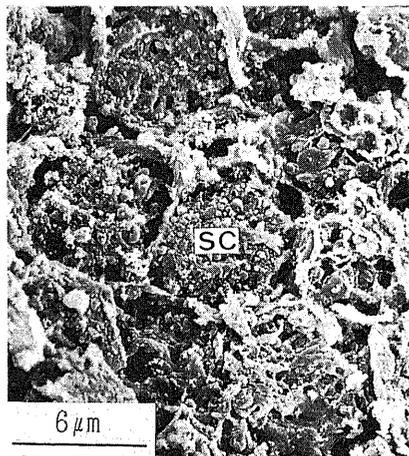
木村ら³⁰⁾はナラマイシンのニオイを学習させて、マウスの嗅刺激性行動を観察する方法を考案した。この方法は1回の学習で学習が完了し、また記憶についても長期間とどまり、最低20日は再学習しなくてもよいと述べている。

著者の実験では、ナラマイシンの濃度は0.01%と、木村らの実験よりも更に10倍薄い濃度で行った。それでもマウスは2回目の学習ではナラマイシン水溶液に口をつけることはなく、やはり、1回目の学習で学習は完了したものと思われた。また、非切断群で処置後84日から100日まで16日の間隔があったにもかかわらずエラーはなく、著者の実験では記憶に関する問題はなかった。

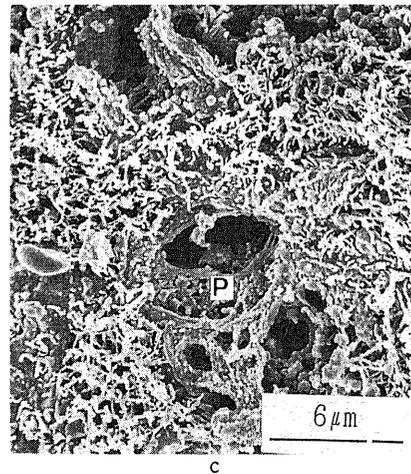
また、著者の実験では、嗅糸切断後1日での平均試行回数は8.05回であり、木村らの硫酸亜鉛点鼻後1日



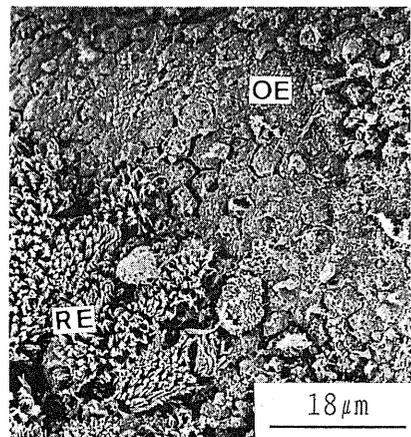
a



b



c



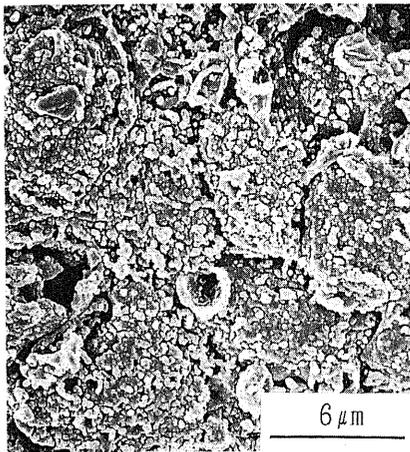
d

Fig. 17. a, and b, olfactory epithelium 3 days after the section. SC, supporting cells. a, $\times 1,500$. b, $\times 3,000$. c, olfactory epithelium 5 days after the section. Pore-like opening is seen. $\times 3,000$. d, demarcation between olfactory epithelium and respiratory epithelium 5 days after the section. $\times 1,000$.

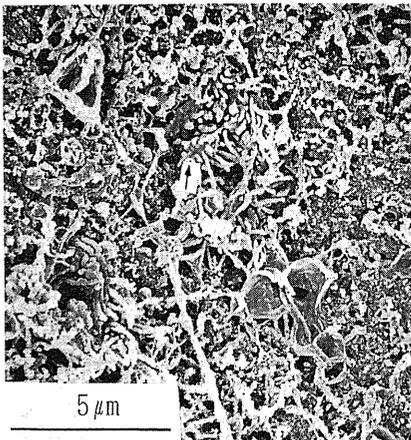
の平均試行回数5.5回と比べて、マウスの試行回数は多くなっている。変性をおこさせる方法が異なるため、一概には論じられないが、これは、マウスのナラマイシンに対する忌避反応が、0.1%で行った場合と比べて弱いと思われる。すなわち木村らの0.1%の濃度での実験では、嗅覚障害が強い場合、マウスは一度でもナラマイシン水溶液を口にすると、ニオイによる区別がつかないため、忌避反応が強く現れ、どちらの水も飲まなくなるのに対して、0.01%の濃度では、忌避反応が弱いため、渴の状態のマウスの、水に対する欲求が、忌避反応よりも強く表れるのではないかと考えた。しかし、嗅糸切断後1日の平均正解率が52.2%と、嗅糸切断による嗅覚脱失の状態として、理論的な値となっていることから、ナラマイシン水溶液の濃度は0.01%の方が行動観察に適しているといえ

る。

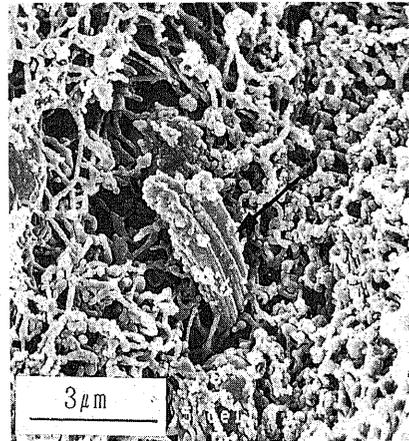
さて、今回指標とすべく検討した平均正解率、平均試行時間、および平均試行回数が有用な指標となり得るか検討してみた。嗅糸切断後各指標が対照と比べて有意差を認めなくなるのは、平均正解率で28日、平均試行回数で10日、平均試行時間では70日と各指標で差がみられた。平均試行時間の回復が、他の指標と比べ



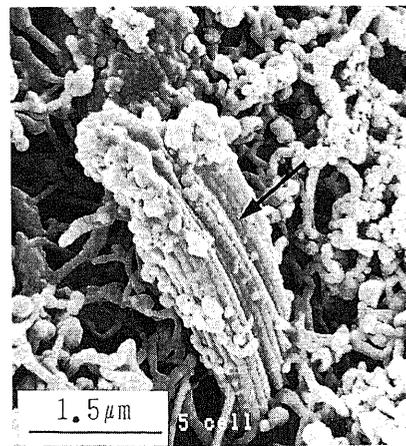
a



b



c



d

Fig. 18. Olfactory epithelium 7 days after the section. a, the area showing more severely altered degenerative condition. Each supporting cell is distinguished. $\times 3,000$. b, the area showing the least severely altered degenerative condition. Each supporting cell cannot be distinguished. Immature olfactory vesicle is observed (marked by arrow). $\times 4,200$. c and d, so-called the fifth cell is observed (arrow). c, $\times 6,000$. d, $\times 12,000$.

て遅くなっている理由としては、次のことが考えられる。第1に、非切断群では嗅覚が正常な状態での学習を何回も繰り返し行っているのに対し、切断群では嗅覚障害がおこっている間は、十分な学習ができない。第2に試行時間は嗅覚が正常と思われるマウスでも、個体差が大きいのである。したがって、嗅糸切断後の嗅刺激性行動の平均試行時間は嗅糸切断後に延長し、その後経過とともに短縮するという。平均正解率とは逆の特徴を持った経過を示すものの、回復

の指標としては不適當と思われた。また、平均試行回数に関しては、嗅糸切断直後でもエラー数が多いにもかかわらず、10回の試行を行うマウスも多数みられたため、指標としてはやはり不適當であると思われ、今回の指標の中では平均正解率が回復の指標として最も信頼のおけるものといえる。

そこで、平均正解率の変化について検討してみると、平均正解率は嗅糸切断後1日で約50%まで低下した。今回の実験では統計学的に推定すると、理論的には嗅覚脱失の状態では平均正解率は50%となるため、嗅糸切断によって完全に嗅糸が切断され、嗅覚脱失の状態になったものと考えられる。その後日数が経過するにしたがって正解率は上昇し、嗅糸切断後28日では切断前の2回目の学習での平均正解率と有意差を認めなくなった。そして、嗅糸切断後42日ですべてのマウスの正解率が100%となった。ナラマイシンはマウスにとって非常に嫌な味であるため、そのニオイを検知できていれば、どれほど渴の状態が強くても決してナラマイシン水溶液を飲むことはない。したがって、嗅糸切断によってマウスは嗅覚脱失の状態になり、嗅糸切断後28日で統計学的にはマウスの嗅覚が回復したものと考えられる。そして、嗅糸切断後42日ですべてのマウスが0.01%ナラマイシン水溶液のニオイを検知できるようになったと判断した。

先にも述べたが、マウスに嗅覚障害をおこして行動学的に観察を行った報告は非常に少なく、さらに、著者の実験の様に嗅糸切断後の行動観察を行った報告は、

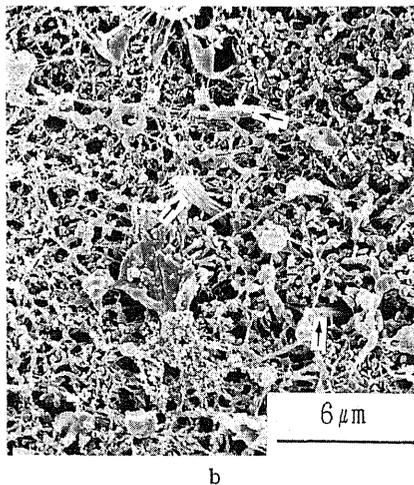
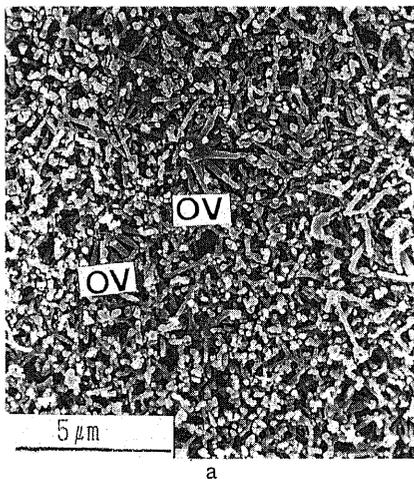


Fig. 19. Olfactory epithelium 14 and 21 days after the section, respectively. a, 14 days after the section. Many olfactory vesicles are seen. $\times 4,200$. b, 21 days after the section. Many cilia of fifth cells are observed (arrows). $\times 3,000$.

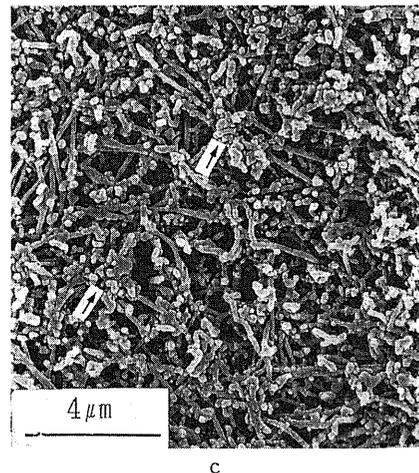
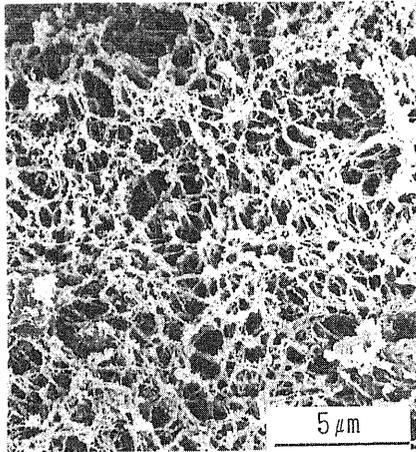


Fig. 20. Olfactory epithelium 35 days after the section. The arrows mark regenerative olfactory vesicles. $\times 4,800$.

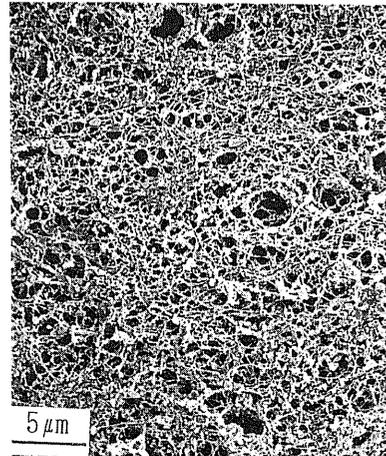
著者が検索し得た限りで、Harding ら⁸⁾の報告をみるのみである。その理由としては、マウスの嗅糸を完全に切断することが困難であり、そのうえ、マウスの嗅刺激性行動を観察するには条件反射の形成に日数がかかったり、複雑な実験装置が必要となるためと思われる。

Harding らはマウスを open field において、おがくずの下に隠されたニオイ付きの飼料を何秒でみつけら

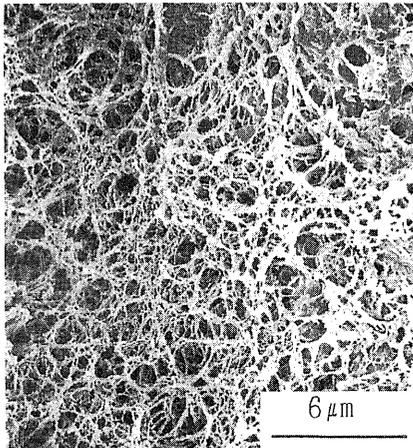
れるかを調べた。数回学習した後、3分以内に飼料をみつけれない場合を嗅覚脱失とし、嗅糸切断後の嗅覚の回復を、3分以内に飼料をみつけることのできたマウスの割合で表現すると同時に、飼料をみつけるのに要した時間を嗅糸を切断しなかったマウスと比較した。それによると、嗅糸切断後21日ですべてのマウスが3分以内に飼料を発見できるようになり、飼料をみつけるのに要した時間は、対照と比較して23~25日で



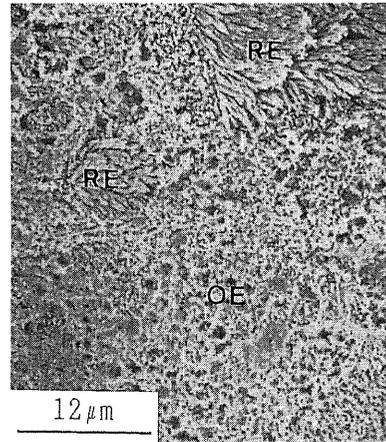
a



a



b



b

Fig. 21. Olfactory epithelium 42 and 56 days after the section. a, 42 days after the section. Developed cilia of the olfactory cells are seen partially. $\times 3,600$. b, 56 days after the section. More developed cilia are seen. $\times 3,000$.

Fig. 22. Olfactory epithelium 100 days after the section. a, olfactory epithelium is nearly normal. $\times 2,100$. b, demarcation between the olfactory epithelium and respiratory epithelium. $\times 1,500$.

有意差がなくなったと報告している。

著者の結果は、回復に要した時間は若干長くなっているが、彼らの実験は、個々のマウスの嗅覚障害の程度をみたものではなく、何匹のマウスが3分以内に飼料をみつけることができたかというものであり単純には比較はできない。しかし実験方法からみると、今回のナラマイシンを用いた嗅刺激性行動の観察は実験装置が単純であることはもちろんのこと、学習に要する時間も短く、かなり強い記憶が残るため、実験間隔があいても再学習の必要がなく、さらに個々のマウスの嗅覚障害の程度を把握できるという点から、欧米で行われているいわゆる food finding test に比して、より有用な方法であると考えられる。

嗅糸切断後の嗅上皮の変化についての報告は Hoffman (1867) に始まる。彼はカエルの嗅神経を切断し、嗅神経細胞に脂肪変性が起こり、その後変性部位は線毛のない立方上皮に変化したと報告した。

今世紀前半までは、嗅神経は変性後は再生しないという説が大勢を占めていた。しかし、前述したように、1940年 Nagahara が嗅上皮の再生を報告して以来、嗅上皮は嗅糸切断後、再生するという報告が大多数を占めている³⁰⁾。また、成熟後の動物において、嗅上皮内で嗅神経細胞が常に turnover を繰り返していることもすでに知られている⁴⁹⁾。今回の実験では、非切断群の嗅上皮においても基底部付近で核分裂像が観察され、嗅糸切断後はその数はさらに増加した。また、非切断群の嗅上皮に2種類の嗅神経細胞を認め、そのうち核が大きく、核小体が豊富な細胞のみが嗅糸切断後も残っていたことから、この細胞が Nagahara の指摘する resting cell に相当し、嗅糸切断時点でまだその軸索が嗅球まで達しておらず、嗅糸切断の影響を受けなかったものと思われた。そして、それらの細胞が成熟して、嗅球でシブナスを形成し、嗅上皮内ではあらたな神経細胞が核分裂によって増殖、成熟して、嗅糸切断前と同じ形態を持つようになるものと思われた。

嗅糸切断後の嗅上皮の経時的な変化は、多くの研究者によって報告されている。Graziadei, P.P.C. ら³²⁾⁽³³⁾と Monti Graziadei ら⁷⁸⁾によると、マウス、ラットでは嗅糸切断後約24時間で変性が始まり、7日前後で最高に達する。そして約30日で嗅糸切断前の形態に復すると述べている。著者の実験でもほぼ同じ結果を得たが、さらにその経過を嗅上皮の厚さを計測することによって、定量的に分析した。その結果、嗅上皮の厚さは嗅糸切断後5日で最低値を示し、7日から厚さを増していき、嗅糸切断後35日では対照と有意差を認めな

くなった。これまでに嗅糸切断後の嗅上皮の厚さの変化を経時的に観察した報告は著者の検索し得た限りではない。Costanzo ら¹⁴⁾は、嗅球除去後の観察で、動物の個体差あるいは同一嗅上皮内でも、部位による厚さの差のために、嗅上皮の厚さは再生の経過をみる上では不適切であると述べている。しかし、今回著者が定めたマウスの鼻中隔の計測部位では、非切断群、すなわち成熟後100日経過したマウスでも個体間の嗅上皮の厚さの差は少なく、また、明らかな凹凸もなかった。さらに、再生が進んでいく過程、すなわち、嗅糸切断後7日以後の経過は、行動学的観点からみた嗅覚の回復と強い相関を示した。したがって、嗅上皮の厚さを、鼻中隔のある1点で定めて計測すれば、嗅上皮の変性と再生の定量的な指標になりうると考えた。

そこで、嗅糸切断後の嗅上皮の厚さと、嗅刺激性行動を対比してみると、嗅刺激性行動の平均正解率が切断前の平均正解率と有意差がなくなるのは切断後28日であった。一方嗅上皮の厚さは28日で平均 61.4 μm で、非切断群の71.5%であり、まだ有意差を認めていた。

したがって、組織学的に嗅上皮が完全に再生する前にすでに正常に近い行動が行えるものと考えられる。

嗅糸切断後の嗅上皮の観察は、光顕や透過型電子顕微鏡による観察が中心となって進められてきたが、近年、嗅神経特異蛋白 (Olfactory Marker Protein: O.M.P.) をはじめとする免疫組織化学的研究も発達してきた³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾。しかし、それらは嗅上皮を側面から観察したものであり、実際にニオイ物質が最初に到達する部位である嗅上皮表面を観察するためには、走査電顕による観察も必要である。それにもかかわらず嗅糸切断後の嗅上皮を走査電顕で観察した報告は少なく、Ichikawa ら³⁸⁾のキンギョ、菊屋⁹⁾のマウス、そして山岸ら¹³⁾のモルモットの嗅上皮の観察をみるのみである。このように走査電顕による嗅上皮の観察が少ない理由の一つに、嗅上皮表面を覆っている粘液の存在があげられる。鼻腔粘膜の走査電顕試料作製方法に関しては昭和53年度日本鼻副鼻腔学会のワークショップでとりあげられた³⁹⁾。その中で、粘液除去法として、超音波洗浄器を用いる方法、ジェット水流による方法、毛筆による方法などがあげられた。しかし鼻腔内でも呼吸上皮は線毛が太く、短くしかも垂直方向に走行しているため、それらの方法で比較的容易に粘液を除去できるが、嗅上皮の場合その逆で、線毛は細く、長く、しかも上皮表面に対して大部分が水平方向に走行しているため、呼吸上皮と比べて粘液除去は困難である。また、除去作用が強すぎると、嗅線毛マットの走

行を乱したり、あるいは嗅線毛マット自体も傷害することがあり、特に、上皮内で嗅神経細胞の変性、脱落が生じ、嗅線毛マットも消失している嗅糸切断後まもない嗅上皮では支持細胞の変性所見が、嗅糸切断後の変化であるのか、あるいは試料作製時の人工産物であるのか判断に苦しむこともある。そこで著者の実験では、体内からの固定を重視し、2%グルタルアルデヒドを用いて、30分以上かけてゆっくりと灌流固定を行ったところ、高い粘液除去効果を得た。

さて、マウス嗅糸切断後の嗅上皮の変性所見は、まず嗅糸切断後1日で嗅線毛マットの脱落から始まった。そして、7日で変性は最高に達したが、その時点で早くも嗅小胞の再生を認めた。再生嗅小胞は日をおって増加したが、嗅線毛マットの形成を認めたのは嗅糸切断後56日であった。しかし56日での嗅線毛マットの形成はまだ不十分で、嗅糸切断後100日でほぼ嗅上皮全域にわたって完成した。

再生嗅小胞の出現は、菊屋の報告⁹⁾に比べて早くなっているが、嗅神経細胞は常にturn overしており、嗅糸切断時点でほぼ成熟しつつあった神経細胞が存在している可能性があり、また、嗅刺激性行動で7日で平均正解率が若干改善していることから、この時点で出現しても矛盾はないと思われる。

支持細胞の表面の形態は、嗅線毛マットが脱落した状態でよく観察された。嗅糸切断後1日では支持細胞表面の微絨毛は短かったが強い変性所見は認めなかった。切断後3~5日で支持細胞の変性所見が出現し、微絨毛も膨化したが、7日では長い微絨毛を持つ支持細胞が出現し、14日では微絨毛が細胞表面を覆うまでになった。支持細胞の機能および細胞動態に関しては、まだ十分に解明されていないが、菊屋の報告でも同様の所見を認め、また、Okanoら¹⁰⁾、Naessen¹¹⁾も嗅糸切断後の支持細胞表面の変化を指摘している。

菊屋はこの様な変化は、嗅線毛マットが脱落したための反応性の変化であると推察している。しかし、嗅糸切断後14日では嗅線毛マットはほとんど形成されていないが、嗅神経細胞の細胞体は、光顕による観察で、その密度がかなり増していることから、嗅神経細胞も支持細胞の変化に影響をおよぼしているものと思われる。

嗅上皮の変性後に線毛上皮への変化がおこるか否かという問題は以前から論じられている。今回の実験では嗅上皮と呼吸上皮の境界部付近では呼吸上皮への変化が多く観察されたが、境界部から離れると呼吸上皮細胞へ変化している部位は認められず、また、非切断群でもそれらの所見を認めたため、加齢や炎症による

変化とも考えられる。

結 論

マウスの嗅糸切断後の変化を、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、光顕、走査電顕を用いて組織学的に観察し、以下の知見を得た。

1. 嗅刺激性行動の観察には0.01%ナラマイシン水溶液を用い、2回の学習ですべてのマウスが学習を完了し得た。また記憶に関しては、少なくとも16日間は保たれた。

2. ナラマイシンを用いた嗅刺激性行動の観察は、実験設備の簡便さや、学習に要する日数の短縮の点で有用であった。

3. 嗅糸切断後の嗅覚の回復の指標としては、平均正解率が有用であり、嗅糸切断後28日で0.01%ナラマイシン水溶液のニオイを感知できるまでに回復した。

4. 鼻中隔の一定の部位の厚さを測定することによって、嗅上皮の変性、再生の過程を定量的に観察することが可能であった。

5. 嗅糸切断後、嗅上皮の厚さは5日で最低値を示し、35日で対照と有意差がないまでに回復した。

6. 再生の過程における嗅上皮の厚さの変化は、その間の嗅刺激性行動の正解率と有意な相関を示し、組織学的に嗅上皮が完全に再生する前に、すでに正常に近い嗅刺激性行動が行えることがわかった。

7. 走査電顕による観察では、嗅糸切断後1日で嗅線毛マットの脱落がおこり、7日で変性は最高に達したが、同時に再生嗅小胞が出現しており、再生もその時点で始まっていた。さらに42日で嗅線毛マットが形成されはじめ、100日ではほぼ正常嗅上皮と変わらぬまでになっていた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師梅田良三教授、御指導を賜りました橋本和夫教授に深甚なる感謝の意を表します。研究に際し終始御指導と御助言を頂きました上出文博博士ならびに木村恭之博士に深謝いたします。本研究の遂行にあたり、御協力頂いた金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室員各位、ならびに電子顕微鏡室の米田邦雄氏、山口稔毅氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Nagahara, Y.: Experimentelle Studien über die histologischen Veränderungen des Geruchsorgans nach der Olfactoriusdurchschneidung. Jap. J. Med. Sci. V. Pathol., 5, 165-200 (1940).
- 2) Andres, K. H.: Differenzierung und Re-

generation von Sinneszellen in der Regio olfactoria. *Naturwissenschaften*, **17**, 500 (1965).

- 3) **Andres, K. H.**: Der Feinbau der Regio olfactoria von Makrosmatikern. *Z. Zellforsch.*, **69**, 140-154 (1966).
- 4) **Graziadei, P. P. C. & Metcalf, J. F.**: Autoradiographic and ultrastructural observations on the frog's olfactory mucosa. *Z. Zellforsch.*, **116**, 305-318 (1971).
- 5) **Graziadei, P. P. C. & Monti Graziadei, G. A.**: neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytol.*, **8**, 1-18 (1979).
- 6) **Graziadei, P. P. C. & Okanao, M.**: Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first cranial nerve. *Acta. anat.*, **104**, 220-236 (1979).
- 7) **Monti Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. C.**: 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).
- 8) **Harding, J. W. & Wright, J. W.**: Reversible effect of olfactory nerve section on behavior and biochemistry in mice. *Brain Res. Bull.*, **4**, 17-22 (1979).
- 9) **菊屋義則**: マウス嗅上皮の変性と再生. *耳鼻臨床*, **77**, 1659-1680 (1984).
- 10) **Wright, J. W. & Harding, J. W.**: Recovery of olfactory function after bilateral bulbectomy. *Science*, **216**, 322-344 (1982).
- 11) **Costanzo, R. M. & Graziadei, P. P. C.**: A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J. comp. neurol.*, **215**, 370-381 (1983).
- 12) **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).
- 13) **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).
- 14) **上出文博**: マウス鼻粘膜嗅部の拡がりや微構造, 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).
- 15) **Matulionis, D. H., Breipohl, W. & Bhatnagar, K. P.**: Degeneration and regeneration of olfactory epithelium in the mouse. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.*, **89**, 3-12 (1982).
- 16) **木村恭之**: マウスの嗅刺激性行動に関する研究. *耳鼻臨床*, **77**(増3), 861-888 (1984).
- 17) **梅田良三**: 嗅覚障害の診断と治療をめぐって, 第82回日耳鼻総会宿題報告, 66-77 (1981).
- 18) **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).
- 19) **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).
- 20) **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).
- 21) **Andres, K. H.**: Der olfactorische Saum der Katze. *Z. Zellforsch.*, **96**, 250-274 (1969).
- 22) **岡野真臣**: 嗅上皮の形態学, *日本医師会雑誌*, **69**, 1356-1365 (1973).
- 23) **岡野真臣**: 嗅粘膜上皮の形態. *神経進歩*, **25**, 249-260 (1981).
- 24) **奥田朝晴**: ナラマイシン(シクロヘキシイミド)の駆鼠作用. *医学のあゆみ*, **30**, 280-286 (1959).
- 25) **小村京子, 高木貞敬, 原田 紀**: ラットのナラマイシン忌避の機序について. *北関東医学*, **11**, 207-215 (1961).
- 26) **Pfaffman, C.**: An olfactometer for the rat. *Science*, **128**, 1007-1008 (1958).
- 27) **Michelson, W. J.**: Procedure for studying olfactory discrimination in pigeons. *Science*, **130**, 630-631 (1959).
- 28) **Henton, W. W., Smith, J. C. & Tucker, D.**: Odor discrimination in pigeons. *Science*, **153**, 1138-1139 (1966).
- 29) **牧野総太郎**: ラットの“におい”条件反応による嗅覚の研究, その1 “におい”識別の学習と嗅神経の経路障害の影響. *北関東医学*, **21**, 104-113 (1971).
- 30) **梅沢久男**: ラットのニオイ条件反応による嗅覚の研究, その2 嗅覚経路障害のニオイの識別に及ぼす影響. *北関東医学*, **24**, 11-20 (1974).
- 31) **Takagi, S. F.**: Degeneration and regeneration in the olfactory epithelium. In *Beidler, L. M. (ed.), Handbook of Sensory Physiology. Vol. IV, Part I. (Chemical Senses)*, pp.75-94, Springer-

Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1971.

- 32) **Graziadei, P. P. C. & Monti Graziadei, G. A.**: The olfactory system: A model for the study of neurogenesis and axon regeneration in mammals. In Cotman, W. (ed.), *Neuronal Plasticity*, pp.131-153, Raven Press, New York, 1978.
- 33) **Graziadei, P. P. C. & Monti Graziadei, G. A.**: Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. In Jacobson, M. (ed.), *Handbook of Sensory Physiology*. Vol. IX, pp.55-83, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1978.
- 34) **Monti Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. C.**: Studies on neuronal plasticity and regeneration in the olfactory system: Morphologic and functional characteristics of the olfactory sensory neuron. In E. Meisami and M. A. B. Brazier (eds.), *Neural Growth and Differentiation*, pp.373-396, Raven Press, New York, 1979.
- 35) **Monti Graziadei, G. A., Margolis, F. L., Harding, J. W. & Graziadei, P. P. C.**: Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 1311-1316 (1977).
- 36) **Monti Graziadei, G. A. & Graziadei, P. P. C.**: Experimental studies on the olfactory marker protein. I. presence of the olfactory marker protein in tufted and mitrall cells. *Brain Research*, **209**, 405-410 (1981).
- 37) 山岸益夫: 嗅上皮再生過程の免疫組織化学的研究. *日耳鼻*, **91**, 730-738 (1988).
- 38) **Ichikawa, M. & Ueda, K.**: Fine structure of the olfactory in the goldfish, *Carassius aureus*, A study of retrograde degeneration. *Cell tiss. Res.*, **183**, 445-455 (1977).
- 39) 原田康夫, 川端五十鈴, 他: ワークショップ8, SEM のための鼻粘膜標本の作り方. *日本鼻副鼻腔学会誌*, **17**, 91-98 (1978).
- 40) **Okano, M & Takagi, S. F.**: Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J. Physiol.*, **242**, 353-370 (1974).
- 41) **Naessen, R.**: The receptor surface of the olfactory organ (epithelium) of man and guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, **71**, 335-348 (1971).

Study of Behavioral and Histological Change in Mice Following Olfactory Nerve Section Takaki Miwa, Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 98, 391—414 (1989)

Key words olfactory nerve section, olfactory mediated behavior, light microscopy, quantitative analysis, scanning electron microscopy

Abstract

It has generally been held that the olfactory sensory neuron, unlike other central neurons, can undergo continuous degeneration. However, there have been few reports based on the reversible effects of olfactory nerve section on behavior in mice. Therefore, the reversible effects of the nerve section on behavior and histology in mice were studied. The results concerning olfactory-mediated behavior were as follow. (1) When mice tasted Cycloheximide (Naramycin) solution, they refused to drink the solution because of its specific odor and unpleasant taste. (2) All mice drank the solution within a few days after the section of the nerve. However, their ability of olfactory discrimination improved day by day. There was no significant difference in olfactory-mediated behavior between presurgery and 28 days after surgery, and all mice refused to drink the solution 42 days after the section. The results of the histologic changes observed by light microscopy after the section of mouse olfactory nerve were as follow. (1) The degeneration of olfactory epithelium was observed immediately after the nerve section; followed by decrement to 59.7% of the epithelial thickness of the sham-operation group by 5 days after the section. (2) An increase in both epithelial thickness and number of olfactory cells was observed 7 days after the section, and epithelial thickness 35 days after the section was similar to that of the sham-operation group. Furthermore the ultrastructural changes observed by scanning electron microscopy were as follow. (1) Degeneration of olfactory epithelium over extensive areas was observed one day after the olfactory nerve section. (2) Immature olfactory vesicle was observed 7 days after the section, which indicated the first stage of regeneration of olfactory epithelium. (3) Regeneration to the normal surface structures over the whole epithelium was observed 100 days after the section. The data showed that the olfactory-mediated behavior after the olfactory nerve section was correlated with the histologic change.