

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	黒岩 正文
論文審査担当者	主査 多田 剛 副査 本郷 一博 山田 充彦
論文題目 Morphological analysis of regenerated bulbar fibers in relation to neonatal olfaction (新生児ラットの嗅覚機能発現に必要な嗅球由来の再生神経線維の形態解析)	
(論文の内容の要旨)	
[目的] 外側嗅索 (LOT) は、嗅球から嗅皮質への投射線維からなる脳内嗅覚伝導路である。我々は以前に新生児ラットで LOT 切断実験を行い、4 週間後に切断された軸索が再生し嗅覚が回復することを発表した。本研究では、新生児ラットにおける LOT 切断後の再生について、機能が回復する時期を正確に確定し、さらに機能回復に必要な再生線維量を調べることを目的として実験を行った。	
[方法] (1) 機能回復時期 生後 2 日 (P2) の新生児ラットの左 LOT を切断した。LOT の完全切断は、切断直後に LOT 切断部より後方の嗅皮質に逆行性の神経トレーサーである Fast Blue (FB) を注入し、嗅球投射ニューロンが FB で標識されないことにより確認した。哺乳期のラットは嗅覚がないと哺乳できないため、LOT 切断ラットの機能再生については、胃の中に存在する哺乳したミルクの有無で判定した。まず、P7, P9, P11 で右嗅球を吸引除去し、24 時間後 (P8, P10, P12) の胃内ミルクを調べた結果、LOT 完全切断例において胃内にミルクを認めたラットは P12 のみであった。次に詳細な再生時期を確定するため、P2 で左 LOT を切断したラットの右嗅球を P11 (9:00-10:00) で吸引除去し、P11 の 14:00, 17:00, 20:00, 23:00、P12 の 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00、P13 の 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00 に胃内ミルクの有無について調べた。 (2) 機能回復に必要な再生線維量 P2 ラットの左 LOT を切断し、LOT の完全切断を確認するため同側嗅皮質に FB を注入した。P5 で順行性の神経トレーサーである Biotinylated dextran amine (BDA) を両側嗅球に注入した。予備実験の結果を踏まえて、機能が回復していない時期 (P10) と機能回復が確認された時期 (P12) における再生線維量を比較するため、P10 および P12 で灌流固定を行った。脳を採取し、嗅球 (矢状断) および嗅球を除いた脳 (冠状断) から 50 μm 厚で 300 μm 間隔の凍結切片を 6 セット作成した。2 セット目の切片を蛍光顕微鏡下で観察し、LOT の不完全切断例を除外した。LOT 完全切断例において、1, 3, 5 セット目の切片を用いて BDA 陽性線維を検出し、LOT 切断部よりも尾側にある嗅結節の 4 つのレベル (レベル 1: 嗅結節吻側端、レベル 2: 嗅結節吻側 1/3、レベル 3: 嗅結節尾側 1/3、レベル 4: 嗅結節尾側端) において BDA 陽性部位の面積および密度を計測した。計測は LOT を切断した左側 (再生側) と LOT を切断していない右側 (正常側) の両方で行った。	

【結果】

(1) 機能回復時期

P2 で左 LOT を切断し P11 で右嗅球を吸引除去したラット (n=22) の完全切断例 (n=13) において胃内ミルクを認めた時期 (嗅覚が回復した時期) は、P11 が 0 匹 (0%)、P12 が 9 匹 (69%)、P13 が 4 匹 (31%) であった。

(2) 機能回復に必要な再生線維量

LOT の完全切断例において、機能的にまだ回復していない時期 (P10, n=5) と機能回復が確認された時期 (P12, n=6) のすべてのラットにおいて、切断部より尾側で BDA 陽性の再生線維が検出された。P10 における BDA 陽性部位の面積 (嗅結節レベル 1~4 の合計) および密度 (嗅結節レベル 1~4 の平均) は、それぞれ、LOT 切断側 (左側) では $1.91 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.13、非切断側 (右側) では $8.66 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.34 であった。P12 における BDA 陽性部位の面積 (嗅結節レベル 1~4 の合計) および密度 (嗅結節レベル 1~4 の平均) は、それぞれ、LOT 切断側 (左側) では $4.34 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.21、非切断側 (右側) では $11.05 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ および 0.35 であった。

【結論】

(1) LOT を切断された新生児ラットの嗅覚は、切断後 10 日で回復することが明らかとなった。

(2) LOT を切断された新生児ラットの嗅覚機能回復には、嗅結節レベルにおいて、面積では正常の約 40%、密度では正常の約 60%の再生線維が必要であることが明らかとなった。