

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	平 山 周 一
論文審査担当者	主 査 多 田 剛 副 査 本 郷 一 博 田 淵 克 彦
論文題目	Regenerative capacity of bulbar projection neurons during development: a quantitative neuronal analysis with functional correlation (嗅球投射ニューロンの再生能：再生ニューロンの定量評価並びに機能解析)
(論文の内容の要旨)	<p>目的</p> <p>外側嗅索 (LOT) は嗅球からの嗅覚情報を嗅皮質へ伝える重要な脳内伝導路である。生後2日 (P2) の新生児ラットの LOT を切断すると、4週後に切断部を超えて嗅球から嗅皮質へ新たな神経線維の連絡ができ、再生された嗅球投射ニューロン (僧帽細胞) により機能的にも嗅覚機能が正常に維持されることを報告した。しかし、LOT 切断の時期による嗅球投射ニューロンの軸索再生の時期や本来の標的部位 (嗅皮質) に再生軸索を伸ばすニューロンの割合さらに再生ニューロン数と嗅覚機能の関係については不明であり、これらの課題を解明することを目的として本研究を行った。</p> <p>方法</p> <p>(1) 嗅覚投射ニューロンの再生の時期：P7、P10 および P14 の新生児ラットの左 LOT を切断し、完全切断を客観的に評価する目的で、切断直後に切断部後方の左嗅皮質 (嗅結節・梨状皮質) に逆行性の蛍光神経トレーサー (FB: Fast blue) を注入した。5週間生存させた後に、別の逆行性の蛍光神経トレーサー (FG: Fluoro-Gold) を切断部から離れた後方の左嗅皮質に注入し、2日後に還流固定し、脳の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。FB 陽性の僧帽細胞のない完全切断例について、FG 陽性の再生した僧帽細胞の有無を観察した。</p> <p>(2) 再生ニューロンのステレオロジー定量解析：再生がおこることが確認された P2 と P7 の新生児ラットの左 LOT を切断し、12週間生存させ、後方の左嗅皮質に FG を注入した。12週齢の正常ラットの左嗅皮質にも FG を注入した。FG 注入2日後に還流固定し、左嗅球・左脳の連続凍結切片 (冠状断 / 50 μm 厚 / 嗅球：400 μm 間隔 & 脳：600 μm 間隔) を作成し、抗 FG 抗体を用いて、FG 注入部位と FG (+) の再生した僧帽細胞を DAB 反応後に可視化し、ステレオロジー解析装置を用いて再生ニューロンを定量化した。計測は、各個体とも3回行い、実測値とニューロン総数の推定値のそれぞれの平均値を求めた。なお、不完全切断例は除外した。</p> <p>(3) 嗅覚機能検査：P7 の新生児ラットの左 LOT の切断12週後に、切断側の嗅覚機能を知る目的で、非切断側の右嗅球を吸引除去し、2-3日間絶水後に、水と0.01%シクロヘキシミド溶液を用いて嗅覚機能を調べた。一部のラットは、FG を左嗅皮質に注入し、FG (+) の再生ニューロンを定量化した。</p>

結果

- (1) 再生の時期：P7 LOT 切断ラットの嗅球には、切断部後方の嗅皮質に注入された FG が逆行性に軸索輸送され、切断部を越えて、多数の FG (+) 僧帽細胞が確認された。P10 LOT 切断ラットは、FG (+) 僧帽細胞が見られない群とわずかに見られる群に分かれた。P14 LOT 切断ラットでは、FG (+) 僧帽細胞はなかった。
- (2) 再生ニューロンの定量評価：正常 12 週齢ラットの FG (+) 僧帽細胞数は、平均実測値 804 ± 46 個 (100%)、ステレオロジーによる平均推測値 49700 ± 4300 個 (100%) であった。P2 LOT 切断ラットでは、再生した FG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ 561 ± 53 個 (70%)、 35100 ± 4500 個 (71%)、P7 LOT 切断ラットでは、再生した FG (+) 僧帽細胞数は、それぞれ 327 ± 76 個 (42%)、 19700 ± 5000 個 (40%) であり、3 群間で有意差 ($P < 0.01$) を認めた。
- (3) 再生ニューロンによる嗅覚機能：P7 LOT 切断ラットの 78% (14/18) では、嗅覚は正常に維持されていたが (正解率： $90 \pm 3\%$)、22% (4/18) では無嗅覚であった (正解率： $50 \pm 2\%$)。嗅覚 (+) ラット ($n = 2$) の再生した FG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、328 個と 294 個であり、平均推測値は 23400 個と 21300 個であった。嗅覚 (-) ラット ($n = 2$) の再生した FG (+) 僧帽細胞数の平均実測値は、173 個と 137 個であり、平均推測値は 13000 個と 9600 個であった。

結論

- (1) LOT 切断後、嗅球投射ニューロンが再生可能な時期は、P0~P10 の間であることが明らかとなった。
- (2) P2 もしくは P7 LOT 切断ラットの FG (+) 再生ニューロン数は、正常のそれぞれ約 70% & 40% に減少しており、切断時期が遅くなるほど自然再生するニューロン数が少なくなることが明らかとなった。
- (3) 再生ニューロンが正常の約 40% に減少している P7 LOT 切断ラットの多く (78%) では、嗅覚機能は正常に維持されていたが、嗅覚を失ったケースが少数存在し、その再生ニューロンは正常の約 26% 以下に低下していた。

以上の結果より、形態的並びに機能的両面から、嗅球投射ニューロンの再生能が明らかにされた。