

20030234

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究
(H13-長寿-012)

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 丹生健一

平成16(2004)年 3月

総括研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究 -----	2
丹生健一	
老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発 -----	4
丹生健一 石田春彦 土井清司	
(資料1) アデノウイルスベクターによる嗅神経細胞と嗅球への遺伝子導入	
(資料2) 神経栄養因子による嗅神経細胞の再生	
高齢者の嗅覚障害に関する臨床研究 -----	5
阪上雅史 深澤啓二郎	
(資料3) 高齢者の嗅覚障害	
高齢者の嗅覚障害に関する臨床研究 -----	6
竹内直信	
(資料4) 高齢者の嗅覚障害	
嗅球の老化による変化に関する研究 -----	7
森 憲作	
加齢に伴う嗅上皮の変化 -----	9
近藤健二	
(資料5) 加齢に伴う嗅上皮の変化	
嗅球除去後の嗅上皮粘膜における遺伝子発現の検索 -----	12
石橋敏夫 藤城芳徳	
(資料6) cDNA microarrayによる遺伝子発現解析	
嗅神経細胞のアポトーシス抑制に関する研究 -----	14
太田 康	
(資料7) 嗅神経細胞のアポトーシス抑制	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	15
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	17
------------------------	----

厚生労働省科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
総括研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 丹生健一 神戸大学大学院 教授

研究要旨：加齢とともに嗅覚機能が低下することは良く知られているが、高齢者の嗅覚機能低下は栄養摂取、衛生管理、安全確保、QOLなどの様々な面で問題となり、これからの高齢者社会では重要な問題となってくる。現時点ではステロイドの局所投与以外に有効な治療法はないが、その作用機序もあきらかでなく治療効果も思わしくない。このような背景から本研究は高齢者の嗅覚障害に対する新たな治療法の開発を目指して計画された。その結果、1. 高齢者の嗅覚障害は主に嗅上皮の加齢変化により生じていること、2. 加齢に伴い嗅神経細胞の増殖能が低下していること、3. 治療薬であるステロイドにより副腎機能が一時的に抑制されること、4. アポトーシス阻害剤により嗅神経細胞のアポトーシスを抑制できること、5. アデノウイルスベクターが嗅神経細胞ならびに嗅球への遺伝子導入に有効であること、6. 神経栄養因子 bFGF による増殖の亢進、NGF ならびに BDNF による成熟嗅神経細胞の増加の可能性が期待できること、が明らかとなった。嗅神経細胞ならびに嗅球への drug delivery system としての有効性が明らかとなったアデノウイルスベクターを用いて神経栄養因子やアポトーシス抑制因子の嗅神経細胞や嗅球への導入を試み、臨床応用への可能性を検討することが今後の検討課題である。

A. 研究目的

嗅覚は栄養摂取、衛生管理、安全確保、QOLなどの様々な面で重要な役割を果たしている。特に高齢者においては嗅覚障害の与える影響は大きく、これからの高齢化社会において解決すべき重要な問題である。しかしながら、現時点ではステロイドの点鼻以外に有効な治療法はなく、治療効果も思わしくない。こうした背景から、本研究は高齢者の嗅覚障害に対する新たな治療法の開発を目指して計画された。本年度は、1) 高齢者の嗅覚障害の実体を調査、2) 嗅覚の一次中枢である嗅球の機能解明、3) 嗅上皮再生のメカニズムの解明、4) 現在用いられている唯一の治療薬であるステロイド剤の治療効果および副作用についての解析、5) 褥創治療薬として市販化されたbFGFをはじめとする各種神経栄養成因子や、6) アポトーシス阻害剤の嗅覚障害治療薬としての効果の検討、7) アデノウイルスをベクターとして用いた遺伝子治療の可能性の検討、について研究を行った。

B. 研究方法

1. (老人性嗅覚障害の実体調査)

兵庫医科大学耳鼻咽喉科嗅覚外来ならびに東京大学耳鼻咽喉科嗅覚外来における高齢者の嗅覚障害患者の病態と治療効果および副作用について、嗅覚機能検査、内視鏡検査、画像診断、鼻腔通気度検査、血中 ACTH 値などにより検討した。

2. (マウス嗅上皮における嗅神経細胞のアポトーシ

スと再生の分子機構の解明)

マウス嗅球を除去することにより嗅神経細胞にアポトーシスと引き続く神経再生を誘導し、1176 個のラット遺伝子の cDNA がスポットされた cDNA microarray を用いて、嗅球除去後のラット嗅覚上皮とコントロール粘膜における各種遺伝子の発現パターンの比較を行った。

3. (老化に伴う嗅球の変化に関する検討)

正常ラットならびに Semaphorin3A ノックアウトマウスを用いて、構造が異なる 200 種類のおい刺激による内因性信号を光学的測定法により記録し、嗅球外側の「におい地図」を作成した。

4. (神経栄養因子の嗅神経細胞再生への治療効果の検討)

市販化された bFGF を含め主な神経栄養因子について、嗅糸切断による嗅上皮障害モデルに、局所投与を行い、その効果を検討した。

5. (アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する研究)

LacZ を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて嗅上皮や嗅球への遺伝子導入の可能性を検討した。

6. (アポトーシス抑制に関する研究)

嗅球除去あるいはコルヒチン投与による嗅神経細胞のアポトーシスモデルにおいて Caspase3 抑制薬や bcl2 遺伝子の導入により嗅神経細胞のアポトーシスが抑制できるか検討した。

C. 結果と考察

1. (老人性嗅覚障害の実体調査)

平成7年から平成15年までに兵庫医科大学耳鼻咽喉科嗅覚外来を受診した嗅覚障害患者は623例で、内、65歳以上は111例であった。若年者では慢性副鼻腔炎、頭部外傷後嗅覚障害が多く、中高年者では感冒罹患後嗅覚障害が増加している。さらに65歳以上では原因不明例の割合が増加していた。東京大学嗅覚外来での検討では高齢者の場合、重症例が多く治療に対して抵抗する症例が多かった。副腎機能は高齢者で低下する割合が高い傾向がみられたが、

2. (マウス嗅上皮における嗅神経細胞のアポトーシスと再生のメカニズムの解明)

嗅球除去後3日目、7日目の遺伝子の発現を Atlas rat cDNA expression arrays によって解析した結果を別紙に示す。コントロールのシグナルと1.7倍以上の増強あるいは減衰したものをリストアップしている。

3. (老化に伴う嗅球の変化に関する検討)

個々の糸球は分子構造の類似した1群のにおい分子により活性化されること、におい分子応答が似ている糸球群は嗅球外側の特定の領域に集合し、糸球クラスターを形成していること、これらの配置は一定で個体間で保存されていること、が判明した。

4. (神経栄養因子の嗅神経細胞再生への治療効果の検討)

bFGF の投与により基底層近傍の細胞の分裂が活発となっている所見、NGF ならびに BDNF の投与により成熟嗅神経細胞が増加している所見、が得られた。今後は投与の時期や期間、投与量、多剤同時投与などによる治療効果を更に検討する必要がある。

5. (アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の検討)

LacZ を組み込んだウイルスベクターを鼻腔に投与し

たところ嗅神経細胞ならびに嗅球において LacZ 遺伝子の発現がみられた。また心配された嗅上皮への障害は全く認められなかった。これらの結果より嗅神経細胞のみならず嗅球への遺伝子導入による治療の可能性が示唆された。

6. (アポトーシス抑制に関する研究)

Capase3 抑制薬によりコルヒチンに誘導された嗅神経細胞のアポトーシスは著明に抑制された。老化に伴うアポトーシスの増加を抑制する治療薬としての可能性が期待された。

D. 結論

1. 実体調査から高齢者の嗅覚障害は明らかな原因疾患がないものが多いことが判明した。マウスおよびラットを用いた嗅上皮の加齢に伴う変性と考え合わせると、老化に伴う嗅覚障害は加齢による嗅上皮の機能低下が主な原因であると考えられた。

2. 嗅覚の一次中枢である嗅球の「におい地図」がほぼ完成した。今後は加齢にともないこの「におい地図」がどのように変化するか検討する予定である。

3. ステロイドにより副腎機能が一時的に低下することが確認された。予備力のない高齢者には慎重な投与が必要であることが明らかとなった。

4. 市販化された bFGF や、NGF、BDNF により嗅神経細胞の増殖や維持が期待される結果が得られた。今後は投与時期や投与方法に工夫をこらして更に検討を加える必要がある。

5. アデノウイルスベクターは嗅神経細胞ならびに嗅球への drug delivery system として有用であると考えられた。

6. 嗅神経細胞のアポトーシスを抑制することにより、老化に伴う嗅上皮の退縮を予防するというあらたな治療法の可能性がみいだされた。

厚生労働省科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業
主任研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究

主任研究者 丹生健一 神戸大学大学院 教授
分担研究者 石田春彦 神戸大学大学院 助教授
研究協力者 土井清司 神戸大学大学院 大学院生

研究要旨：加齢に伴う嗅覚機能低下に対する新たな治療法の開発を目指して基礎的研究をおこなった。本年度は、1. アデノウイルスベクターが嗅神経細胞ならびに嗅球への遺伝子導入に有効であること、2. 神経栄養因子は鼻腔内投与による嗅神経細胞の分裂増加や寿命延長を可能性があること、があきらかとなった。今後はアデノウイルスベクターに神経栄養因子の遺伝子を組み込んで投与することにより、その有効性を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

加齢に伴う嗅覚障害に対する新たな治療法の開発を目指して、褥創治療薬として市販化されたbFGFをはじめとする各種神経栄養因子の治療効果、アデノウイルスをベクターとして用いた遺伝子治療の可能性の検討、について研究を行った。

B. 研究方法

1. (神経栄養因子の嗅神経細胞再生への治療効果の検討)

市販化された bFGF および、NGF, BDNF を、嗅糸切断による嗅上皮障害モデルの鼻腔内に投与し、その効果を検討した。

2. (アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療に関する研究)

LacZ を組み込んだアデノウイルスベクターを用いて嗅上皮や嗅球への遺伝子導入の可能性を検討した。

C. 結果と考察

1. (神経栄養因子の嗅神経細胞再生への治療効果の検討)

今回の研究では bFGF の投与により嗅神経細胞のもととなる基底細胞の分裂が活発となること、成熟嗅神経細胞層が増加しており、嗅神経細胞の寿命が増加している所見が得られた。今後は、投与の時期や期間、投与量、多剤同時投与などによる治療効果を更に検討する必要がある。次項のアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法による検討も予定している (投稿予定)。

2. (アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の検討)

LacZ を組み込んだウイルスベクターを鼻腔に投与したところ嗅神経細胞ならびに嗅球において LacZ 遺伝子の発現がみられた。また心配された嗅上皮への障害

は全く認められなかった。これらの結果より嗅神経細胞のみならず嗅球への遺伝子導入による治療の可能性が示唆された (投稿予定)。

D. 結論

1. 市販化された bFGF をはじめ、NGF や BDNF により嗅神経細胞の増殖な寿命の延長が期待される結果が得られた。今後、投与時期や投与方法に工夫をこらして更に検討を加える必要がある。

2. アデノウイルスベクターは嗅神経細胞だけではなく、嗅球への drug delivery system としても有用であることが判明した。今後は神経栄養因子やアポトーシス阻害薬の遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込み、臨床応用への可能性を検討する。

E. 発表論文

丹生健一 嗅上皮の構造と機能 耳鼻咽喉科臨床 96:847-854, 2003

丹生健一 加齢による嗅覚の変化 Aging & Health 12 16-17 2003

Doi K, et al. Notch expression in developing olfactory neuroepithelium Neuroreport in press

Yasui R, et al. Quantitative Analysis of Expression of NeuroD, GAP43 and TrkB. Acta Otolaryngol in press

Tsukamoto Y, et al. Retrograde labeling of mouse spinal descending tracts by recombinant adenovirus Arch Histol Cytol 66:209-220, 2003

Nibu K. Introduction to Olfactory Neuroepithelium. Microsc Res Tech 58:133-136, 2002

Nibu K, et al. Expression of NeuroD and TrkB in developing and aged mouse olfactory epithelium. Neuroreport 291:835-837, 2001.

Figure1 Infection of olfactory receptor neurons with lacZ-carrying adenovirus (post infection day 3)

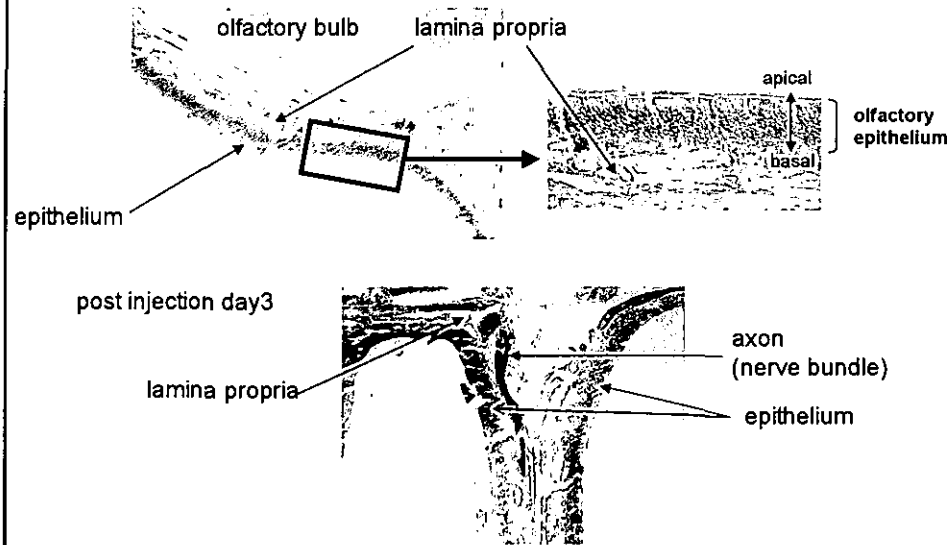
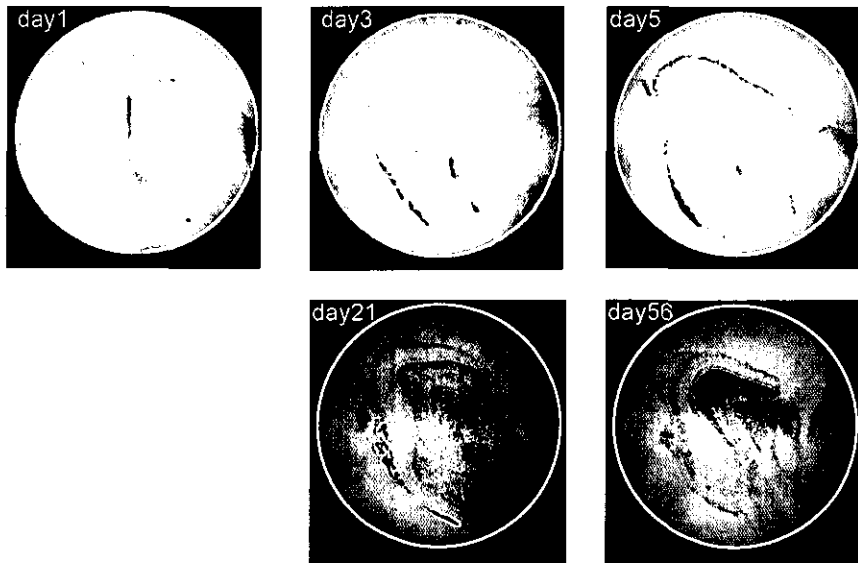


Figure2 Anterogradely labeled nerve terminals and axons in olfactory bulb



**Figure3 Infection of olfactory receptor neurons
with lacZ-carrying adenovirus(post injection day 14)**

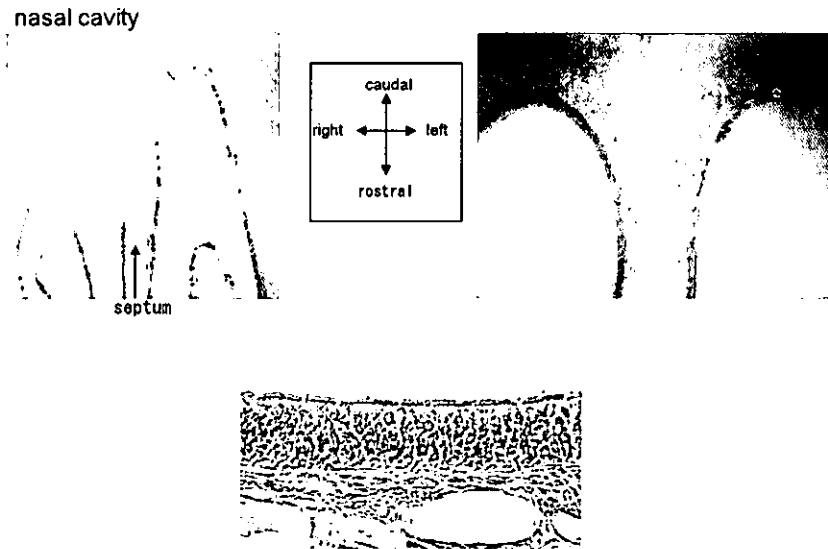


Figure4A olfactory bulb (post infection 3days)

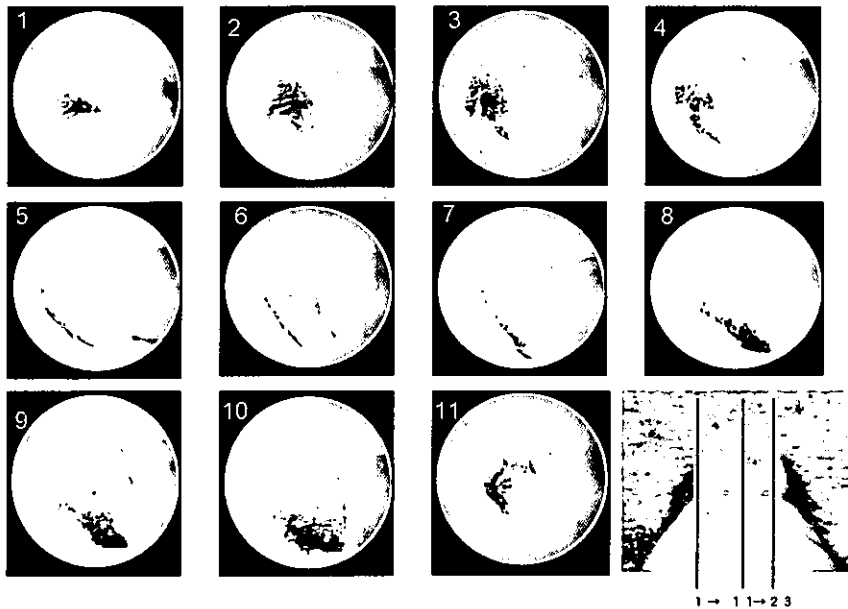
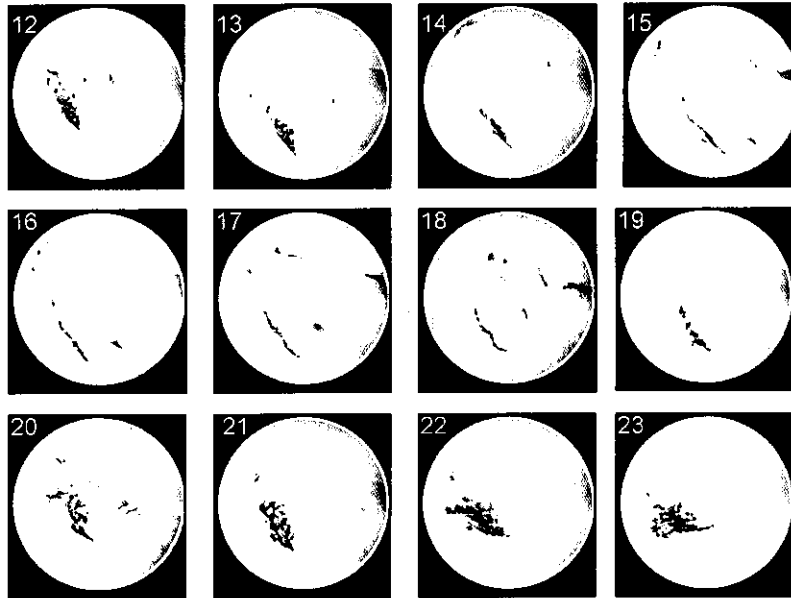


Figure4B Olfactory bulb (no injection side)



**Figure5 labeled olfactory nerve terminals and axons
(post infection day 58)**

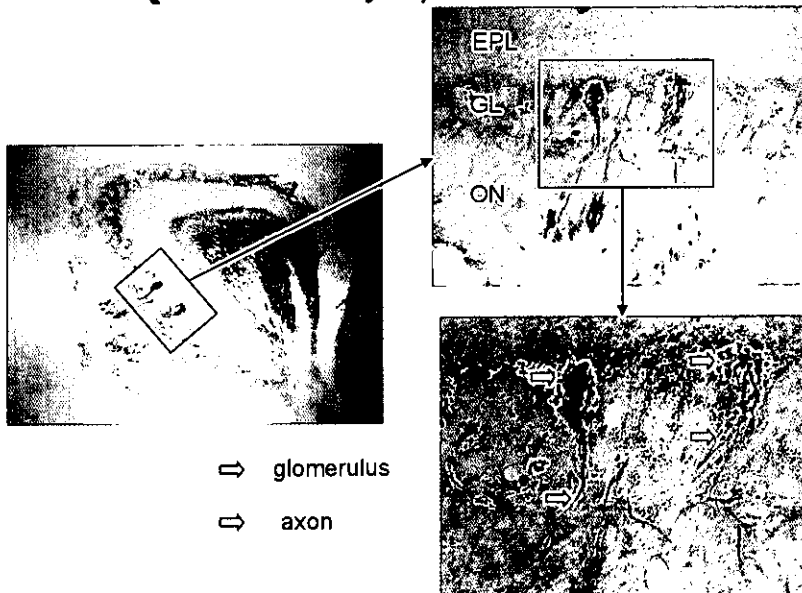
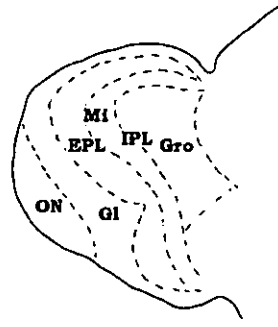
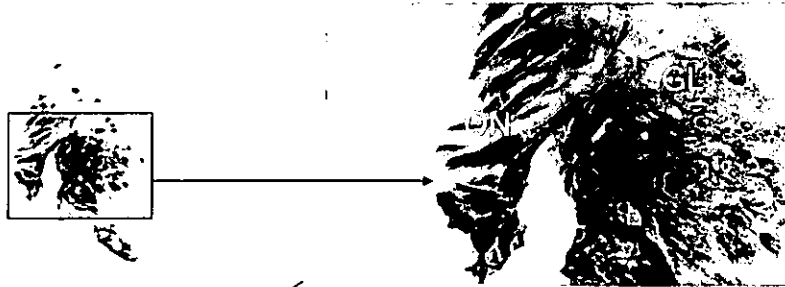
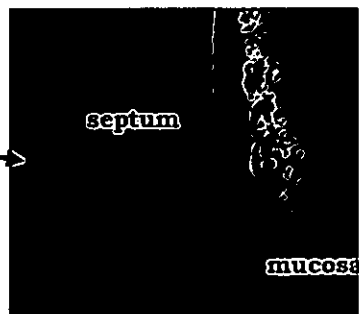
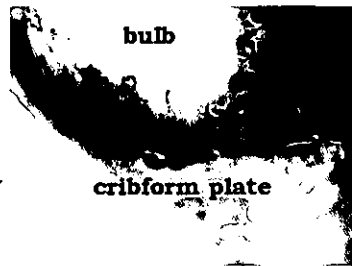


Figure6 Anterogradely labeled nerve terminals and axons (post infection day 5)



ON:嗅神経纖維層
 GI:糸球体層
 EPL:外叢状層
 Mi:僧帽細胞体層
 IPL:内叢状層
 Gro:顆粒細胞層

**Figure7
 post infection day 14
 (macro photography)**



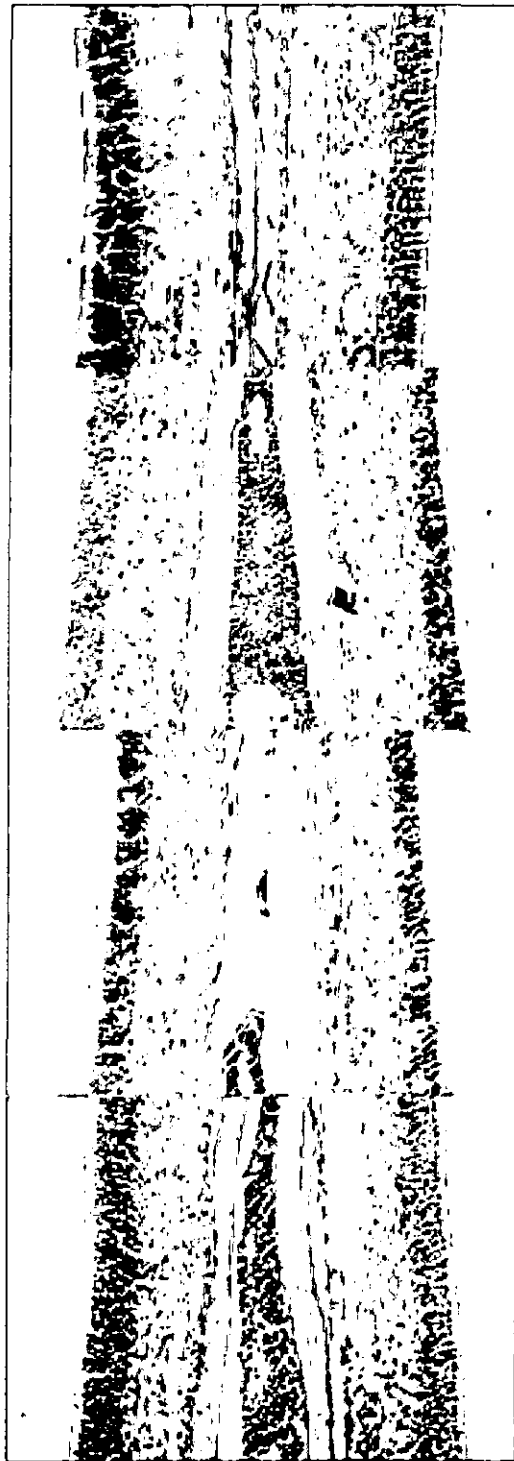
嗅球除去後 21 日
(H E 染色)

嗅球除去のみ

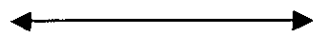
bFGF 投与

NGF 投与

BDNF 投与



非除去側



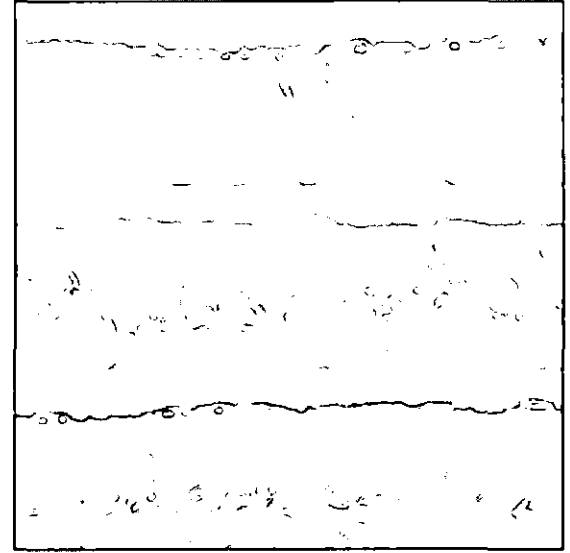
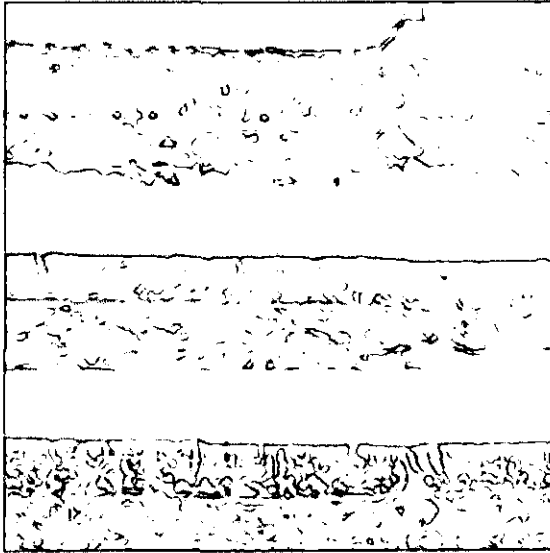
除去側

嗅上皮（嗅球除去側）
免疫組織化学染色（PCNA）

嗅球除去のみ

b-FGF投与

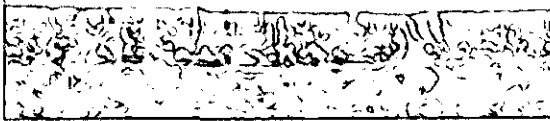
day5



day12



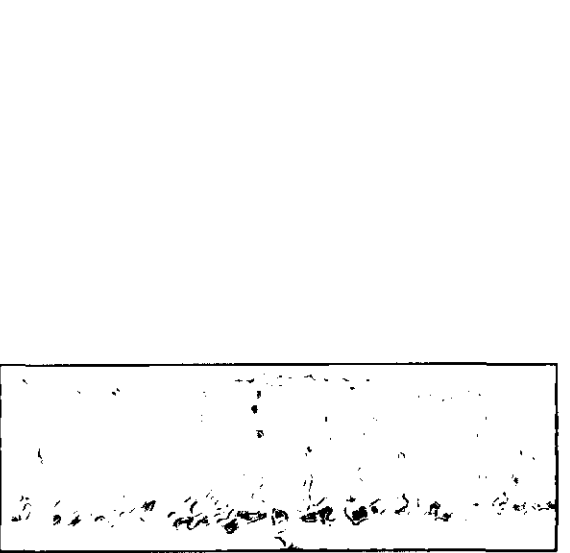
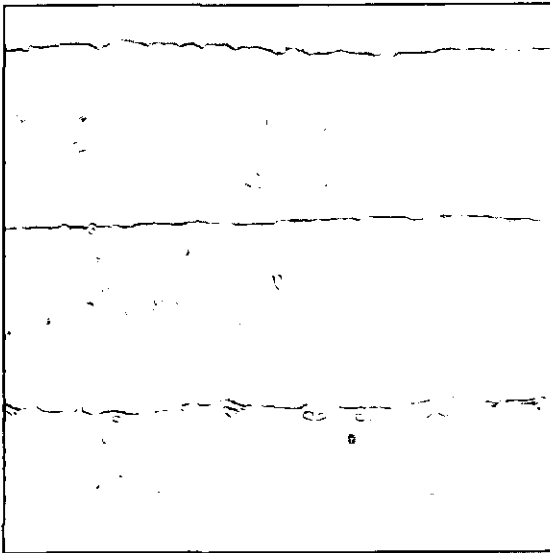
day21



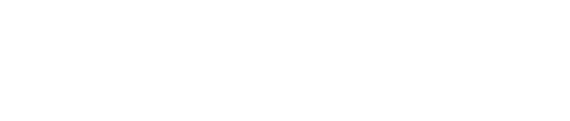
NGF投与

BDNF投与

day5



day12



day21



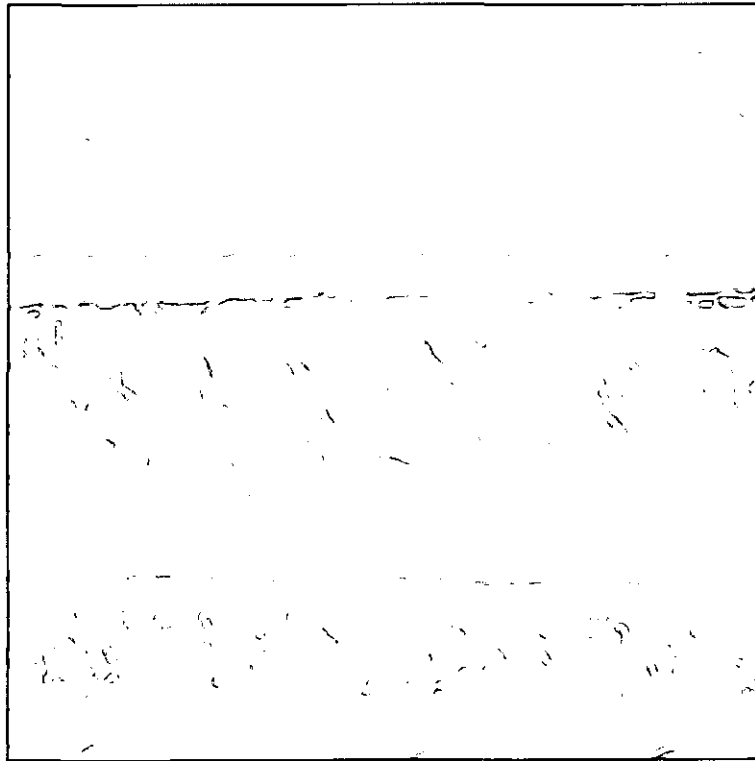
嗅上皮 (嗅球除去側)
免疫組織化学染色 (TrkB)

(嗅球除去のみ)

day5

day12

day21

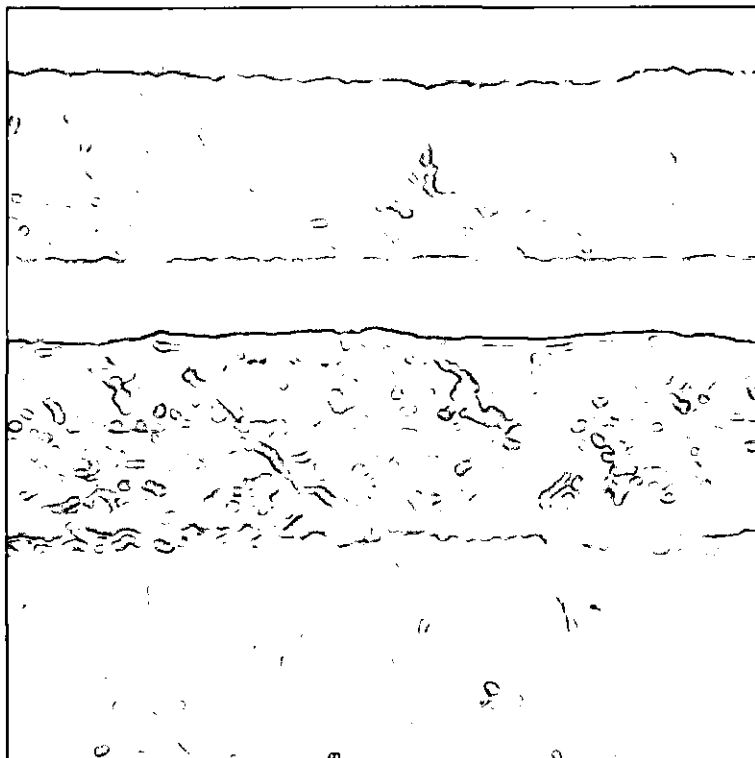


(NGF投与)

day5

day12

day21



厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究
嗅覚障害に対する治療法に関する臨床的研究

分担研究者 阪上 雅史 兵庫医科大学 教授
深澤啓二郎 兵庫医科大学 助教授

研究要旨：高齢者の嗅覚障害は治療困難な感冒後や原因不明なものが多い。嗅覚障害が長期にわたる症例では嗅上皮の損傷がつよく、治療に抵抗するものが多い。しかしながら感冒後などの経過が短い嗅細胞・神経障害例では、若年者と治療成績に違いはなく、積極的な治療が望まれる。

A. 研究目的

高齢化社会により高齢者の嗅覚障害が増加することが予想される。そこで高齢者における嗅覚障害の特徴(原因)および治療成績の検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

兵庫医科大学耳鼻咽喉科嗅覚外来を受診した嗅覚障害患者を対象に臨床研究をおこなう。嗅覚障害の原因疾患および治療による嗅覚改善度を、65歳以上の高齢者と65歳未満の患者とで比較検討する。嗅覚の評価は、基準嗅力検査にて行い、治療は原因疾患の治療に加え、ステロイド剤の点鼻あるいは鼻粘膜への局所注入による治療法を行った。

C. 研究結果

対象となった症例は623例あり、男性202例、女性421例であった。50,60歳代に患者数のピークがあり、65歳以上は111例であった。年代別での嗅覚障害原因は50歳代以上で感冒罹患後、原因不明例がおおく若年層では頭外傷後例が多いのが特徴であった。原因別治療成績では、鼻副鼻腔炎例で成績が良好であったが高齢者群では、やや悪い傾向にあった。感冒罹患後では、65歳未満例と高齢者例では治療成績にあまり差を認めなかった。

D. 考察

嗅覚の加齢変化は65歳代から顕著に現れるとされる。今回の検討では鼻副鼻腔炎例で高齢者の治療成績がやや悪く、長期にわたる鼻粘膜(嗅裂)の障害によるものと思われる。一方、感冒罹患後などの嗅細胞・神経障害例では、両者に治療成績の差はあまり無く、積極的な治療が必要であると考えた。

E. 結論

長期にわたる鼻粘膜炎症により高齢者では嗅上皮の損傷が重度であると考ええる。しかし、その他の原因による嗅覚障害では高齢者においても改善がみられ、積極的な治療が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 感冒罹患後嗅覚障害. 日鼻誌42:73-74, 2003
- (2) 嗅覚障害患者におけるスティック型におい検査の有用性. 味と匂学会誌9:401-404, 2002

2. 学会発表

- (1) 外傷性嗅覚障害の治療成績の検討. 日耳鼻兵庫県地方部会, 2003
- (2) 内視鏡下鼻内手術を行った喘息合併慢性副鼻腔炎新鮮例の嗅覚について. 日耳鼻 2003
- (3) 異常嗅感症例の検討. 日鼻科, 2002

図 1 年代別嗅覚障害症例

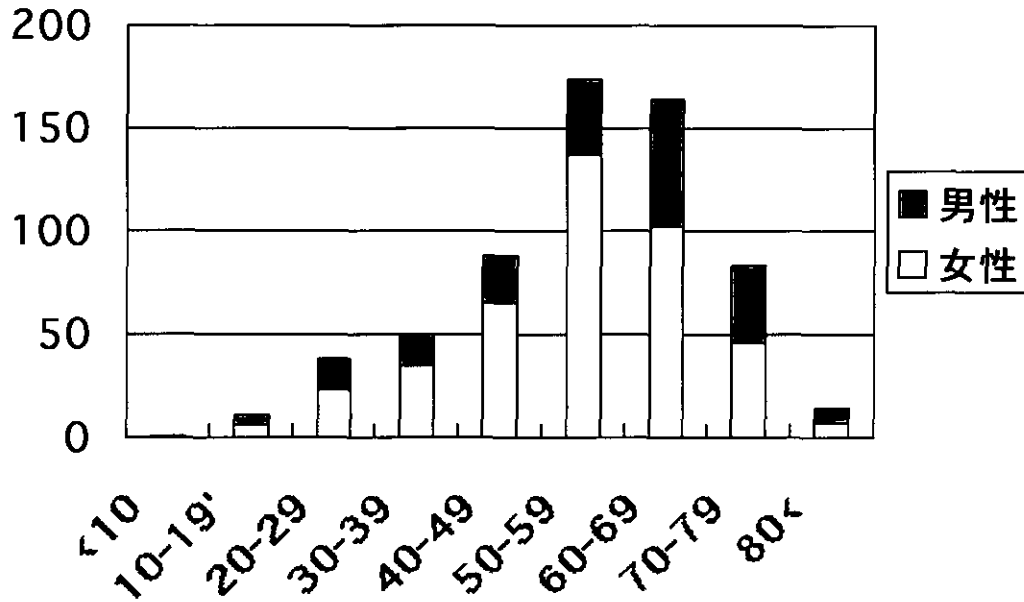


図 2 年代別嗅覚障害原因

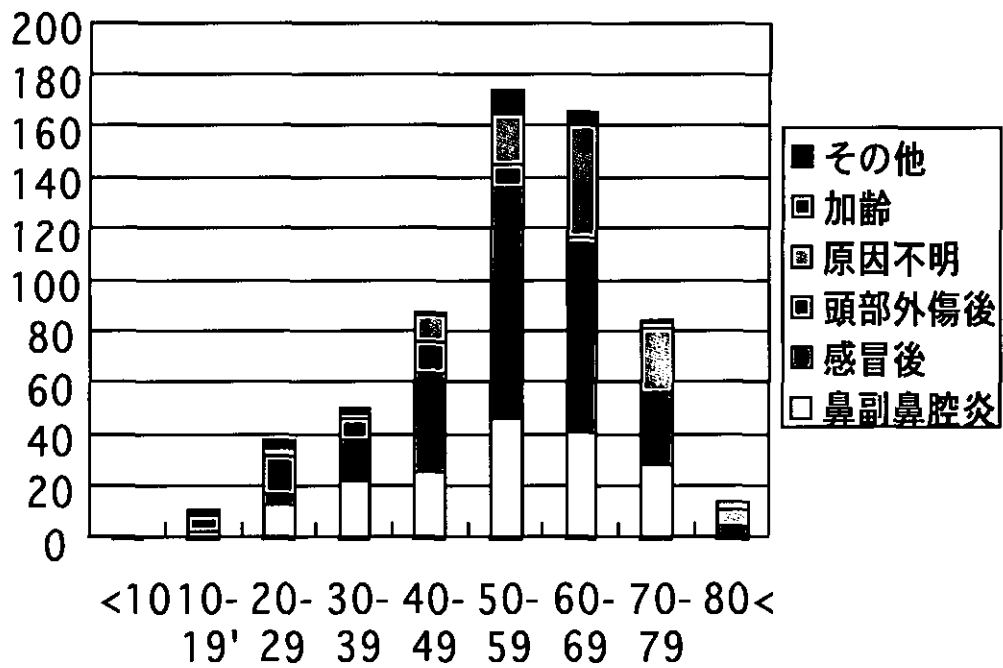
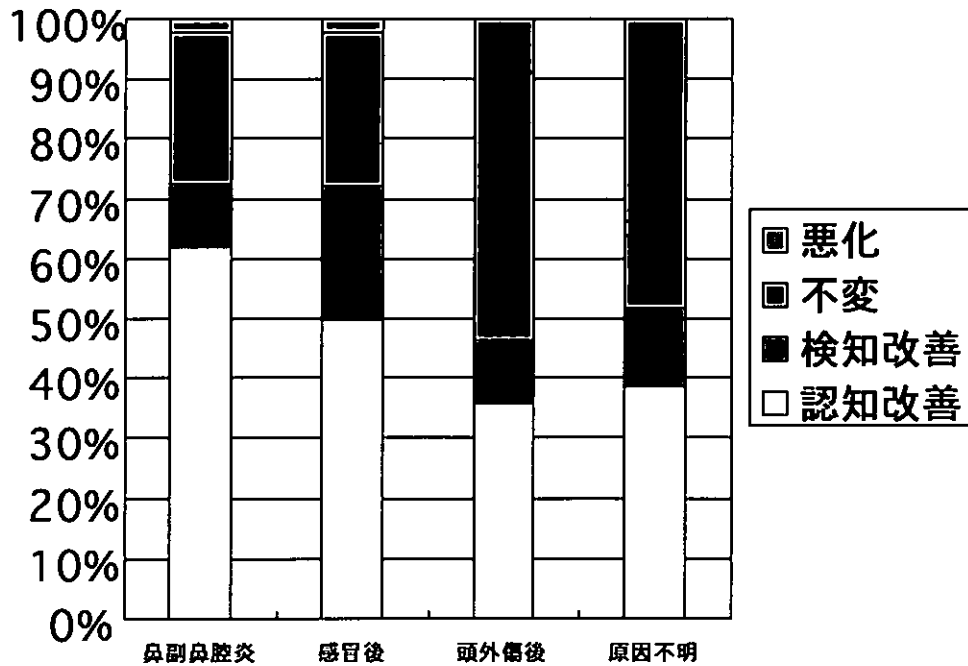
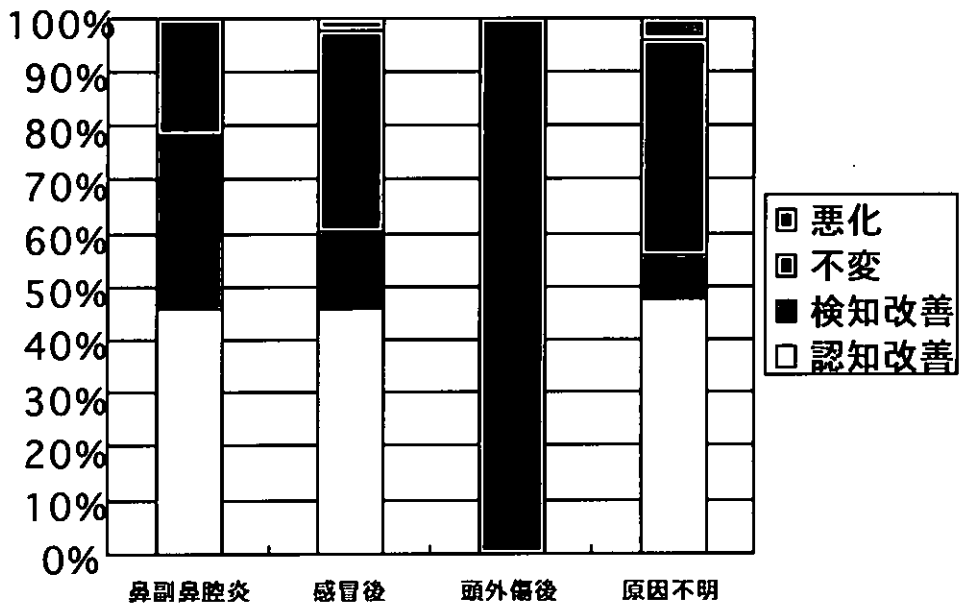


図3 高齢者嗅覚障害の治療成績



65歳未満の原因別治療成績



65歳以上の原因別治療成績

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究
嗅覚障害に対するステロイド剤の副作用に関する研究

分担研究者 竹内直信 東京大学大学院 講師

研究要旨：画像上異常を認めない嗅覚障害患者に対するステロイド点鼻治療の効果とステロイド点鼻がもたらす副作用について検討した。基準嗅力検査による治療成績では、有効率は60歳以上では60歳未満に比べ劣る傾向にあった。またベタメサゾン点鼻により血中コルチゾールあるいはACTHの有意な変化をきたした者も60歳以上に多い傾向があった。

A. 研究目的

画像上異常を認めない嗅覚障害、すなわち感冒後・外傷後症例についてステロイド点鼻の効果や点鼻の副作用の出現につき年代別に検討する。

B. 研究方法

1998年から2002年に東大病院耳鼻科に嗅覚障害を主訴に受診した、画像上異常を認めない患者で、治療としてベタメサゾン点鼻を行った者を対象とした。治療前と治療中、治療後に基準嗅覚検査 (T&T オルファクトメーター) および静脈性嗅覚検査、さらに血中コルチゾールと ACTH の測定を実施した。治療効果および副作用について検討した。

(倫理面への配慮)

この研究は retrospective に行われた。

C. 研究結果

患者数は36人 (男性8、女性26) であり、年齢は23歳から81歳で平均53.6歳。60歳以上は12人であった。原因は感冒後：27人、外傷：4人、不明：5人である。治療期間は3ヶ月から40ヶ月であった。

嗅覚障害重症度別の分類は、軽症0名、中等度7名、高度17名、脱失12名であった。基準嗅力検査の結果をみると有効率は、平均認知域値で55.6%であり、年齢別にみると60歳以上33.3%、60歳未満66.7%で

あった。

ベタメサゾン投与により血中コルチゾールあるいはACTH値が変化し正常域より逸脱した者は全体で22%であり、年齢別にみると60歳以上は25%、60歳未満は19%であった。なお点鼻中止により全例が正常に戻った。

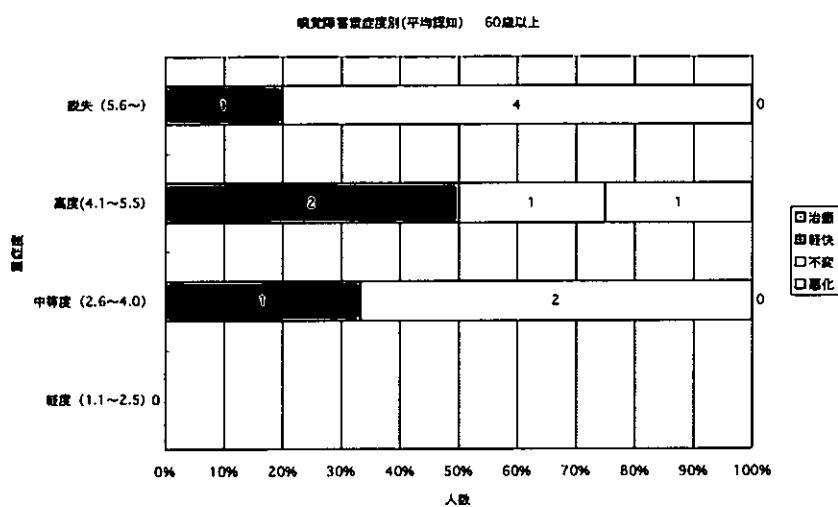
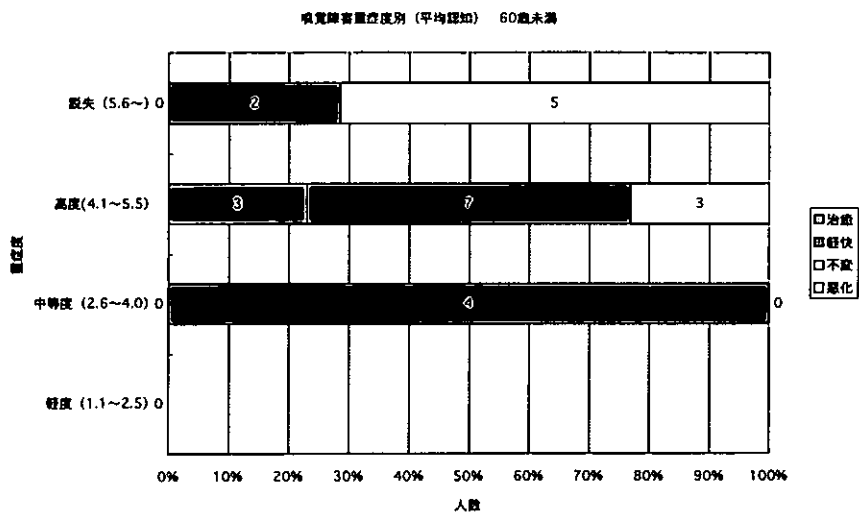
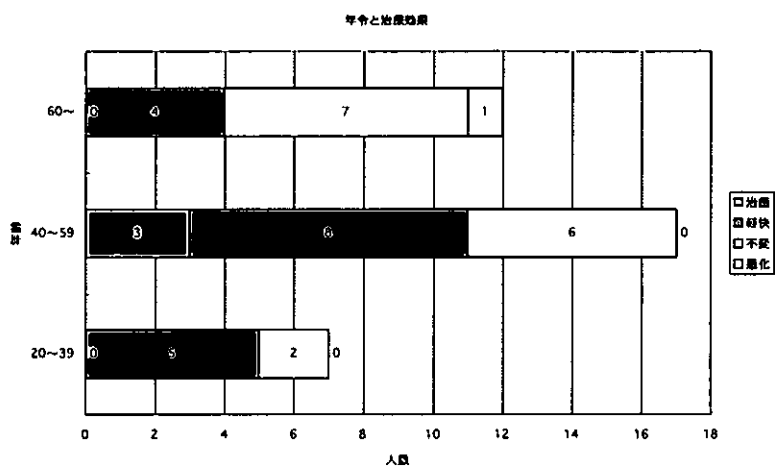
D. 考察

今回は慢性副鼻腔炎やアレルギー性鼻炎等明らかな鼻副鼻腔疾患の無い症例、すなわち画像上異常のない症例について検討を行った。重症度が中等度のものでは60歳未満では全例が軽快したのに対し、60歳以上では1例しか軽快していない事は、高齢者の嗅覚障害の治療が困難な事を示している。ステロイド、特にベタメサゾンの点鼻は嗅覚障害の保存的治療法として確立されているが、時として副腎抑制をきたすという難点がある。今回の検討でも60歳以上では60歳未満に比べ抑制がかかる頻度が高かった。ステロイドに代わる安全で改善率の高い薬剤の開発が望まれるところである。

E. 結論

60歳以上の嗅覚障害患者は60歳未満に比べステロイド点鼻の効果は劣る傾向があり、副作用として副腎抑制をきたしやすい傾向があった。

重症度別年齢と治療効果



研究要旨： 研究要旨：食物の腐敗によって生じる（腐敗臭をもった）アミン類に
応答する糸球群の位置を、ラット嗅球の「におい地図」内で決定した。これらアミン類
応答糸球群は、食物の劣化によって生じる（くさいにおいをもった）アルデヒド類や
脂肪酸類にも応答し、食物の「不可食化」の嗅覚信号を担当している領域だと予想さ
れる。

A. 研究目的

高齢者の嗅覚障害では食物のにおいや香りの感覚低下や、腐った食べ物など悪臭にたいする認知能力の低下がよく見られる。本研究では、嗅覚の第1次中枢である嗅球が、老化にともないどのように機能変化するのか調べるための基礎研究として、成体の嗅球における機能地図「におい地図」を決定することを目的としている。本年度は特に「食物の腐敗」を知らせるにおいに応答する「におい地図領域」を決定することを主目的とした。

B. 研究方法

ラットを麻酔し、内因性信号の光学的測定法を用いて、嗅球の糸球群より、各種におい分子刺激に対する応答を記録した。また、光学的測定法で決定した領域に微小電極を挿入し、嗅球の主要ニューロンから細胞外単一電気応答を記録し、におい分子に対する応答様式をしらべた。本動物実験は、日本生理学会および東京大学動物実験指針にもとづいておこなった。

C. 研究結果

内因性信号の光学的測定法をもちいて、これまでにラットやマウスの嗅球では、(1) 個々の糸球は、分子構造が類似した一群のにおい分子によって活性化されること、(2) におい分子応答特性が類似している糸球群は、嗅球の特定の領域に集合し、糸球クラスターを形成すること、および糸球クラスターの空間的配置は一定で、個体間で保存されていることが明らかになっている。細菌により食物が腐敗すると、アミノ酸が細菌の脱炭酸酵素によって分解され各種のアミンが生じるが、これらのアミンの多くは腐敗臭がし、アミン類の多くは食物の腐敗を示す嗅覚信号となっている。本実験では、ラットの嗅球に光学的測定法を適用し、「匂い地図」上のどの領域がアミン類に応答するのかを調べた。この結果、アミン応答糸球群は、嗅球の背側表面の内側部に集合しクラスターを形成することが

判明した。これらの糸球クラスターはアミンだけではなく、食物の劣化にともなう脂質の酸化によって生じるアルデヒド類や脂肪酸類のにおい分子にも応答した。このクラスター内のニューロンから記録をおこなうと、アミン刺激にたいして、多くのものが刺激終了後も数十秒にわたって信号（活動電位）をだし続けるのが観察された。これは、腐敗臭の感覚が長く続くことと対応しているのではないかと考えられる。（発表準備中）

D. 考察

本実験により嗅球の「匂い地図」内で見つかった、食物の腐敗を示すアミン分子群に反応する糸球クラスターは、人や動物が嗅覚を用いて食物の腐敗の有無を知るうえで、したがって細菌を体内に摂取しないように警告する嗅覚信号を認識するうえで重要な役割を持つ領域だと考えられる。食べ物のにおいと結びつく嗅球「匂い地図」内の特定の機能領域の発見は、本研究が最初であるが、この研究の継続により、「食物」のにおいに関するまだ未知の機能地図領域が判明するものと思われる。これら「におい機能地図」の知識は、高齢者の嗅覚障害の病態や治療法に関する研究にたいする基礎知識を提供するものと予想される。

E. 結論

食物の腐敗によって生じる（腐敗臭をもった）アミン類に反応する糸球群の位置を、ラット嗅球の「におい地図」内で決定した。これらアミン類応答糸球群は、食物の劣化によって生じる（くさいにおいをもった）アルデヒド類や脂肪酸類にも応答し、食物の「不可食化」の嗅覚信号を担当している領域だと予想される。

F. 研究発表

1) Taniguchi, M., Nagao, H., Takahashi, Y. K., Yamaguchi, M., Mitsui, S., Yagi, T., Mori, K. and Shimizu, T. (2003) Distorted odor maps in the olfactory bulb of semaphorin3A

deficient mice. *J. Neurosci.*, 23, 1390-1397.

2) Treloar, H.B., Gabeau, D., Yoshihara, Y., Mori, K. and Greer, C.A. (2003) Inverse expression of OCAM in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 458, 389-403.

3) Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, LP., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.*, 23, 373-382

4) Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M.

Miyamoto, Y., Hisatsune, T. (2003) Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.*, 23, 9357-9366.

5) Mori, K. (2003) Grouping of odorant receptors: odour maps in the mammalian olfactory bulb. *Biochem. Soc. Trans.*, 31, 134-136.

6) Nagayama, S., Takahashi, Y. K., Yoshihara, Y., Mori, K. (2004) Mitral and tufted cells differ in the decoding manner of odor maps in the rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* (in press)

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

老化に伴う嗅覚障害に対する治療法の開発に関する研究
加齢に伴う嗅上皮の変化

分担研究者 近藤健二 東京大学医学部附属病院 助手

研究要旨 マウスを用い、加齢変化が嗅覚の維持機構に及ぼす影響についての形態学的・免疫組織学的研究を行った。加齢した嗅上皮では基底層での新生細胞数が大きく減少していたが、嗅神経への分化速度は年齢にかかわらず一定であることが示唆された。また単位嗅上皮面積あたりのBowman腺の占有体積が生後に増大する傾向が認められた。

A. 研究目的

加齢と関連したヒトの嗅覚障害の病態生理の理解及びこれに対する効果的な治療法の開発のためには、老化した嗅上皮がとりうる細胞動態、およびその背後にあるメカニズムを詳細に検討することが必要不可欠であると考えられるが、残念ながらこれらの機構に関する分子レベルでの解析はほとんど進んでいない。この点に鑑み、本研究は生理的加齢変化による嗅上皮の変化を形態学的、及び細胞動態の面から明らかにすることを目的とした。

具体的には、嗅覚の維持に

- ①嗅神経細胞の再生維持機構
 - ②嗅神経鞘細胞 (olfactory ensheathing cells (OEC)) : 嗅神経細胞をサポートするグリア系細胞
 - ③Bowman腺 : 嗅素の溶解・受容に重要な役割を果たす嗅上皮特異的な粘液の産生源
- の3つの要素が健全であることが必要であるとの認識に立ち、各々の要素に加齢が及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

Jcl:ICRマウス (雌) (埼玉実験動物より購入) を使用した。動物の取り扱いについては東京大学動物実験実施マニュアルに従い動物愛護に最大限の配慮を払った。

組織標本の作成

生後10日、3ヶ月、7ヶ月、16ヶ月の各日・月齢マウス (各年齢群約30匹～40匹) にそれぞれ細胞増殖マーカーであるプロモデオキシウリジン (BrdU) を100mg/kgで腹腔内投与し、投与後2時間、1日、2日、3日、5日、7日、14日、28日後に各群3～5匹ずつ10%中性緩衝ホルマリンで灌流固定し、鼻腔を含む頭部組織を摘出し、10%EDTA液で脱灰した。頭部を嗅球の最前端を通る冠状断で切断し (以下この面をS4と呼ぶ) パラフィン包埋し組織染色用試料を作成した。

研究1. 加齢変化が生理的条件下の嗅上皮の形態及び

細胞動態に与える影響の検討

生後10日、3ヶ月、16ヶ月の各日・月齢マウスのS4切片 (4μm厚) にヘマトキシリン・エオジン染色を施し鼻腔嗅部の形態学的変化を光学顕微鏡で観察した。

またS4切片に成熟嗅神経細胞の特異的マーカーである抗olfactory marker protein (OMP) 抗体 (メリーランド大学Margolis博士より分与) と抗BrdU抗体による免疫2重染色を行い、前者はVector SG (Vector) により灰青色に発色、後者はDAB (ニチレイ) により茶褐色に発色した。この免疫組織染色標本を用い、

- ①加齢に伴う成熟嗅神経細胞の分布の変化を検討した。
- ②BrdU陽性細胞 (すなわちBrdU投与時に分裂して生まれた細胞およびその系譜の細胞) の分布およびそのBrdU投与後の時間経過による変化、さらに同細胞がOMPと2重に陽性になるまでの時間経過を各年齢群で比較し、嗅神経細胞の前駆細胞の増殖能、およびこれが成熟嗅神経細胞に分化する時間経過を検討した。

研究2. 加齢に伴うBowman腺の形態変化および分布変化の検討

生後10日、3ヶ月、7ヶ月、16ヶ月の各日・月齢マウスのS4切片に粘液多糖類に対する染色法であるアルシアンブルー染色およびケルンエヒトロートによる核染色を行い光学顕微鏡下に観察、各年齢群におけるBowman腺の形態、分布変化を検討した。

研究3. 嗅上皮下の神経束におけるOECの分布密度の検討

生後10日、3ヶ月、16ヶ月の各日・月齢マウスのS4切片に抗OMP抗体による免疫染色およびヘマトキシリンによる核染色を行った。上皮下を走行する嗅神経細胞の軸索束内に存在する細胞体はごく一部の血管内皮細胞を除いてすべてOECであることを利用し、OMP陽性である上皮下の嗅神経の神経束を同定し、同神経束内にあるOEC核の数を顕微鏡下にカウントした。