The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Evaluation of the T&T Olfactometer by Mapping c-fos Protein in an Olfactory Bulb
Author(s)	川本, 将浩
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43769
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	川　本　将　浩（かわもと まさひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16908　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Evaluation of the T&T Olfactometer by Mapping c-fos Protein in an Olfactory Bulb （嗅球における c-fos 発現による T&T オルファクトメーターの評価）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　久保　武 （副査） 教　授　田野　保雄　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

T&T オルファクトメーターは日本耳鼻咽喉科学会で承認されている基準嗅覚検査であり、嗅覚障害の程度を客観的に評価する目的で広く用いられている。T&T オルファクトメーターは、(A)α-フェニルエチルアルコール・(B)メチルシクロペンテノロン・(C)イソ吉草酸・(D)γ-ウンデカラクトン・(E)スカトールの5つの化学合成香料から構成されており、これらを段階希釈系列にしたものを患者に嗅がせてニオイ閾値を測定するものであるが、5つのニオイ物質が選ばれた科学的根拠はない。本実験ではこれら5つのニオイ物質をラットに嗅がせ、それぞれのニオイ物質で嗅覚ニューロンがどのように興奮するのかを免疫組織学的手法を用いて実験し、嗅覚検査としての有用性を検討した。神経細胞興奮の指標として c-fos 蛋白を用い、ラット嗅球におけるその発現を検出した。

【方法】

3週齢ウィスター系オスラットを清潔ケージで120分間放置し、既存のニオイ暴露から解放した。次に無麻酔にてアプリケーターに固定し、T&T オルファクトメーターの5つのニオイ物質のうちの1種類を90分間嗅がせた（1ニオイ物質につき、ラットは n=3)。その後ただちに4%PFA にて潅流固定し、嗅球を取り出した後、クライオスタットにて30μm 厚前頭断連続切片を作製した。抗 c-fos 抗体（Santa Cruz 社製）を1次抗体として免疫染色（ABC 法）を行った。まず c-fos 蛋白発現に最適なニオイ刺激濃度と刺激時間を決定した。次に糸球体1個あたりの c-fos-IR (immunoreactive) 傍糸球体細胞数により糸球体を4つのグレードに分類し、嗅球切片上にマッピングした。嗅素(A)から(E)に関して同様の実験を行い、それぞれのニオイ刺激が嗅覚ニューロンをどのように興奮させるか比較検討した。ここでの実験内容は大阪大学動物実験規約（IEXAS）に則っている。

【成績】

適切な濃度と時間をもってニオイ刺激を与えると、傍糸球体細胞とその投射先である僧帽細胞・顆粒細胞層が興奮し、それらの細胞核に c-fos 蛋白が発現することを確認した。120分間の清潔ケージ放置によって既存の c-fos-IR 細胞はかなり減少した。それでもなお残存している c-fos 蛋白は生理的なレベルのものと考えられ、ニオイ刺激による c-fos 蛋白発現と比較すると明らかにその発現は弱く区別できた。ニオイ物質(A)から(E)はいずれも複数の糸球体を興

奮させていた。ニオイ刺激により興奮した糸球体が最も少なかったのはニオイ物質(A)による刺激であり、最も多かったのはニオイ物質(C)による刺激であった。また各嗅素によって興奮する糸球体は嗅球にランダムに存在するのではなく、ニオイごとに一塊になって存在し、固有のゾーンを形成していた。それぞれのゾーン間には明らかな重複を認めず、5つのニオイ物質によって興奮した糸球体を重ねあわせると、嗅球全体を広く網羅していた。

【総括】

嗅上皮には約1000種類のニオイ受容体が存在しているといわれている。それらはランダムに散在しているのではなく、アミノ酸相同性の高い受容体群がゾーンを形成して存在していると考えられている。また、一種類のニオイ受容体は嗅球の一つないし数個の糸球体にアクソンを伸ばして一次シナプスを形成しているが、嗅球内の糸球体においてもニオイ受容体群と同様にゾーンを形成しており、嗅上皮と嗅球は1対1の対応をしていると考えられている。つまり一つのニオイ分子はそのニオイ分子特異的に嗅上皮と嗅球の固有のゾーンのみを活性化させると考えられる。本実験では、T&Tオルファクトメーターを構成する5つのニオイ物質で、嗅球のかなり広い部分を興奮させることがわかった。これは5つのニオイが嗅上皮上のニオイ受容体を偏ることなく広く刺激していることを示している。また、それぞれのニオイはいずれも複数の糸球体を興奮させ、嗅球において各々固有のゾーンを形成していることがわかり、用いられた5つのニオイ物質の選択は適切であると判断された。本実験で用いたc-fos蛋白発現を検出する免疫組織学的手法は種々の嗅覚検査の有用性の判定に役立つと考えられた。

論文審査の結果の要旨

嗅上皮には約1000種類のニオイ受容体が存在しているといわれている。それらはランダムに散在しているのではなく、アミノ酸相同性の高い受容体群がゾーンを形成して存在していると考えられている。また、一種類のニオイ受容体は嗅球の一つないし数個の糸球体にアクソンを伸ばして一次シナプスを形成しているが、嗅球内の糸球体においてもニオイ受容体群と同様にゾーンを形成しており、嗅上皮と嗅球は1対1の対応をしていると考えられている。つまり一つのニオイ分子はそのニオイ分子特異的に嗅上皮と嗅球の固有のゾーンのみを活性化させると考えられる。本研究ではT&Tオルファクトメーターを構成する5つのニオイ物質を嗅覚正常ラットに嗅がせ、それぞれのニオイ物質で嗅覚ニューロンがどのように興奮するのかを検討した。具体的には、抗c-fos抗体を用いた免疫染色を行い、c-fos陽性傍糸球体細胞の数で興奮した糸球体を区別するという独自の方法を用いて、ニオイ物質別に嗅球ニオイ地図を作成し、ニオイ識別を客観的に評価した。また嗅糸切断ラットに対して同様の実験を行い、嗅覚障害時におけるニオイ感覚の変化を客観的に評価した。

T&Tオルファクトメーターを構成する5つのニオイ物質は嗅球のかなり広い部分を興奮させていた。それぞれのニオイ物質はいずれも複数の糸球体を興奮させ、嗅球において各々固有のゾーンを形成していることがわかり、用いられた5つのニオイ物質は異なった中枢刺激パターンをもつと結論された。一方、嗅糸切断から4週間経過したラットにおける嗅球ニオイ地図は本来のゾーンを越えた範囲に形成されていた。これは、嗅神経は再生するにもかかわらず、嗅上皮と嗅球の1対1の関係が壊れてしまうため、ニオイ感覚が変化することを証明する結果であった。動物モデルを用いたニオイの中枢機構の解析は現在広く臨床に用いられている基準嗅覚検査の基礎的裏付けをするものと考えられ、学位に値すると考える。