

嗅覚系情報伝達機構に関する形態学的ならびに
分子生物学的研究

1998年

岐阜大学大学院
総合生命科学研究科
(岐阜大学)

宇島 崇 行

嗅覚系情報伝達機構に関する形態学的ならびに
分子生物学的研究

中 島 崇 行

目 次

第1章	緒 言	1
第2章	ゴールデンハムスターの嗅球における短軸索細胞の免疫組織化学的 ならびに酵素組織化学的特性	
	材料と方法	7
	結 果	9
	考 察	11
	表、図および付図説明	14
第3章	発生過程のハムスター嗅球における protein gene product 9.5 (PGP 9.5) の免疫反応性	
	材料と方法	21
	結 果	22
	考 察	25
	図および付図説明	27
第4章	コモンマーモセット (<i>Callithrix jacchus</i>) の鋤鼻神経系におけるレクチン 組織化学的ならびに免疫組織化学的研究	
	材料と方法	33
	結 果	34
	考 察	37
	表、図および付図説明	41
第5章	結 論	52
	謝 辞	55
	文 献	56

略 号

Con A	concanavalin A
Gal	galactose
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalactosamine
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBT	nitroblue tetrazolium
NCAM	neural cell adhesion molecule
NOS	nitric oxide synthase
NPY	neuropeptide Y
OMP	olfactory marker protein
PGP 9.5	protein gene product 9.5
PNA	peanut agglutinin
SOM	somatostatin
SP	substance P
s-WGA	succinylated wheat germ agglutinin
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
VVA	<i>Vicia villosa</i> agglutinin

第1章

緒言

これまでの生理学的研究ならびに行動学的研究によって、哺乳動物では、嗅覚によるコミュニケーションが、攻撃行動、交尾行動、育仔行動などにおいて、重要な役割を担っていることが示されている[24, 56, 61, 64, 95-97]。動物にとって、嗅覚は、個体の維持あるいは種の存続につながる個体間のコミュニケーションをとるための重要な感覚系であるため、嗅覚系のメカニズムの解明が必要であると考えられる。

一般に、哺乳類には主嗅覚系と副嗅覚系（鋤鼻神経系）と呼ばれる2つの独立した嗅覚系が存在する。主嗅覚系は一般の匂いを認識する感覚系であり、その感覚器である嗅上皮で匂い分子を受容し、その情報を一次中枢である主嗅球へと伝達する（図1-1）[10, 28, 52, 58, 59, 71]。主嗅球は、表層から嗅神経層、嗅糸球層、外網状層、僧帽細胞層、内網状層、顆粒細胞層の6層から構成されている（図1-3A）[52]。嗅上皮の嗅細胞から入力された匂い情報は、嗅神経層を通過して、嗅糸球といわれる嗅球特有の構造物内で出力ニューロンへと伝達される（図1-2）。主嗅球では、出力ニューロンとして、房飾細胞と僧帽細胞の2種類が存在する（図1-2）。主嗅球には、これらの出力ニューロンの他に、傍糸球細胞、顆粒細胞および短軸索細胞などの抑制性の介在ニューロンが存在している（図1-2）。これらの介在ニューロンは、出力ニューロンの機能を調節している。

一方、副嗅覚系（鋤鼻神経系）はフェロモンを認識する感覚系であり、その感覚器である鋤鼻器でフェロモン分子を受容し、その情報を一次中枢である副嗅球へと伝達する[10, 24, 40, 51, 52, 58, 59, 71]（図1-1）。副嗅球は、鋤鼻神経層、嗅糸球層、僧帽/房飾細胞層、外側嗅索、顆粒細胞層の5層から構成されている（図1-3B）[78]。鋤鼻器の感覚細胞から入力された匂い情報は、鋤鼻神経層を通過して、嗅糸球で出力ニューロンへと伝達される（図1-2）。副嗅球では、房飾細胞と僧帽細胞の区別が付かないため、出力ニューロンとして、僧帽/房飾細胞の1種類が存在している（図1-2）。副嗅球には、主嗅球同様、これらの出力ニューロンの他に、傍糸球細胞、顆粒細胞および短軸索細胞などの抑制性の介在ニューロンが存在している（図1-2）。

短軸索細胞は、嗅球の介在性ニューロンの1種で、その形態および分布位置によって、いくつかの種類に分類される [52, 67, 67, 73]。短軸索細胞は、嗅球の出力ニューロンあるいは介在ニューロンとシナプスを形成し、それらのニューロンの機能を調節していると言われている [52]。しかしながら、短軸索細胞は、嗅球内に散在していることから、例えば電気生理学的手法などの嗅球外部からの実験的アプローチが困難なため、その機能については、不明な点が多く残されている。これまでの研究により、短軸索細胞には、ニューロペプチドなどの種々の伝達物質が局在していることが報告されている [5, 7, 12, 13, 22, 42, 48, 54, 55, 60, 75, 77]。しかしながら、短軸細胞は、主嗅球だけでなく、副嗅球にも存在しているにも拘わらず、これらの研究のほとんどが、主嗅球の短軸索細胞のみを対象としており、副嗅球の短軸索細胞に関する報告はほとんどない。

そこで第2章では、副嗅覚系が発達しているハムスターの主嗅球および副嗅球の短軸索細胞における各種神経伝達物質、神経特異的タンパクおよび一酸化窒素合成酵素の局在を、免疫組織化学的ならびに酵素組織化学的に検出し、主嗅球および副嗅球の短軸索細胞の神経化学的特性について検討した。

一方、ヒト脳由来の可溶性タンパクである protein gene product 9.5 (PGP 9.5) は、ニューロンおよび内分泌細胞の細胞質に豊富に認められるので、これらの細胞のマーカーとして利用されている [9, 16, 37, 39, 62, 74, 86, 88, 94]。近年、PGP 9.5は蛋白分解経路において形成されるユビキチン/タンパク複合体あるいはポリユビキチン鎖からユビキチンを再生する酵素である、ユビキチンC末端加水分解酵素に相当することが示された [25, 93]。

また、olfactory marker protein (OMP) は嗅細胞および鋤鼻器感覚細胞に対する有効なマーカーであることが知られているが、嗅球の各種ニューロンには局在していない [53, 57]。これに対し、PGP 9.5は、嗅細胞および鋤鼻器感覚細胞はもちろん、嗅球の僧帽細胞、僧帽/房飾細胞および短軸索細胞に豊富に局在していることが示されている [62, 86]。

そこで第3章では、PGP 9.5が発生の早期段階から嗅球において発現しているか否か、また、嗅球の各種ニューロンの分化過程および嗅球の層構造の形成過程を調べるための有効なマーカーとし

て利用できるか否かについて検討するため、発生過程のハムスター嗅球においてPGP 9.5に対する免疫組織化学を行った。

ところで鋤鼻神経系は、系統発生学的には、両生類から出現する感覚系である。高等霊長類では、新世界ザル（広鼻猿類）のみが鋤鼻神経系を有している。これまで、齧歯類における鋤鼻神経系については、多数報告されているが [5, 6, 11, 17, 20, 21, 24, 33, 36, 37, 42, 50, 54-57, 60, 61-63, 68, 78-80, 84-86, 89, 99, 100]、高等霊長類における鋤鼻神経系については、少数の報告があるにすぎない [28, 31, 38, 49, 76]。

一方、これまでの研究により、糖鎖および糖脂質や糖タンパクなどの複合糖質が、神経突起の伸長、軸索束形成、ニューロン-ニューロン間あるいはニューロン-細胞外マトリックス間の接着、ニューロンの移動、分化および発達など、神経系における様々な現象に重要な役割を果たしていることが示されている [14, 15, 32, 34, 35, 46]。また、近年、特定の糖鎖に結合する非免疫原性のタンパクであるレクチン [18, 47] を組織化学に応用したレクチン組織化学が開発された。この方法は、各種の組織に分布する糖鎖を検出するための有効な手段であるため、多くの研究で利用されており [2, 19, 33, 50, 68, 79]、例えばラットの鋤鼻器では、その遊離縁、感覚細胞、付属腺に多種類のレクチンが結合することが報告されている [68]。また、ラットの副嗅球では、嗅糸球層の吻側部と尾側部間でレクチンの反応性に相違が認められることから、両者の間に何らかの機能的相違のあることが示唆されている [33]。さらに、主嗅覚系および鋤鼻神経系では、レクチン組織化学は、嗅神経軸索あるいは鋤鼻神経軸索の主嗅球あるいは副嗅球への投射のパターンを調べるためにも利用されている [29, 41, 69]。

そこで第4章では、新世界ザルの1種であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の鋤鼻器における各種糖鎖の分布を理解するため、レクチン組織化学的手法を用いて、この動物の鋤鼻器におけるレクチン結合パターンを調べた。さらに、本研究で使用したレクチンのうち鋤鼻神経軸索に豊富に結合したレクチンを用いて、鋤鼻神経軸索の副嗅球への投射経路を同定するとともに、PGP 9.5に対する免疫組織化学的手法を用いて、副嗅球の細胞構築ならびに層構造を調べた。

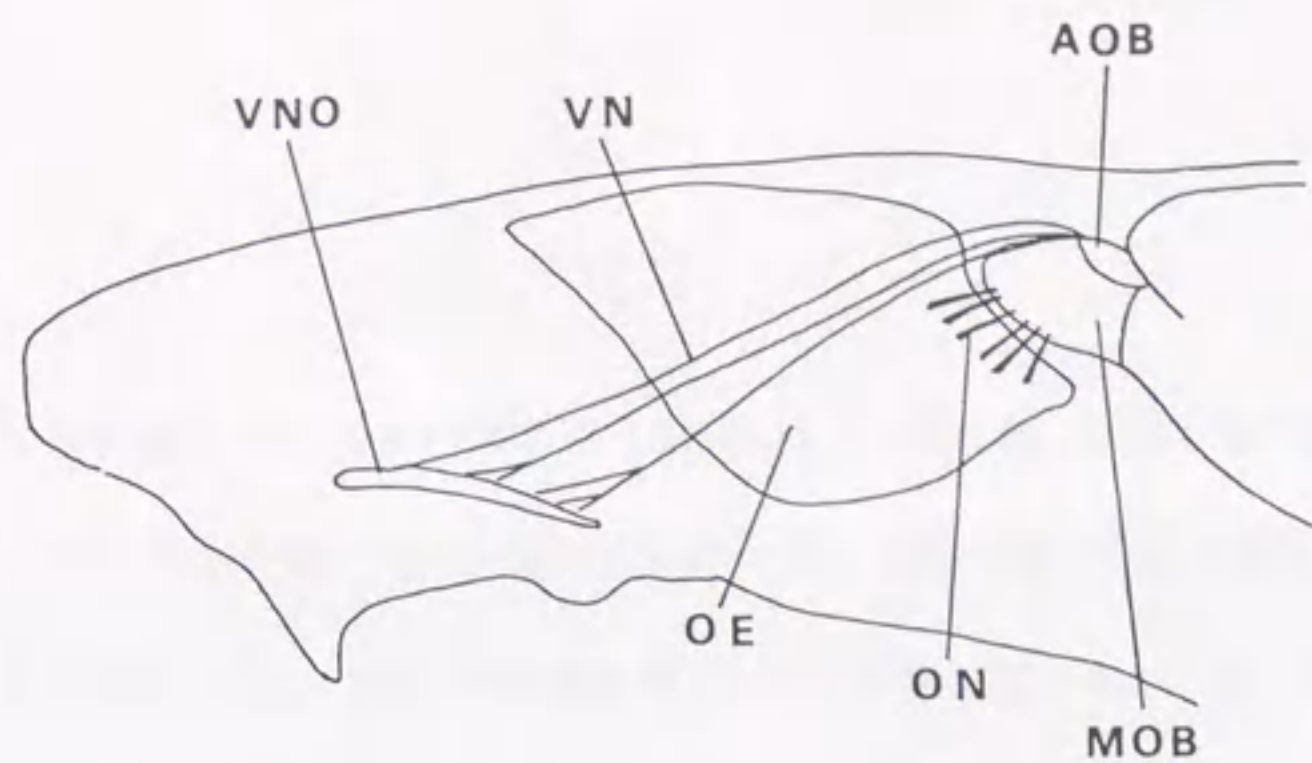


図 1-1. 嗅覚系の投射に関する模式図。AOB: 副嗅球。MOB: 主嗅球。OE: 嗅上皮。

ON: 嗅神経線維。VN: 鋤鼻神経線維。VNO: 鋤鼻器。

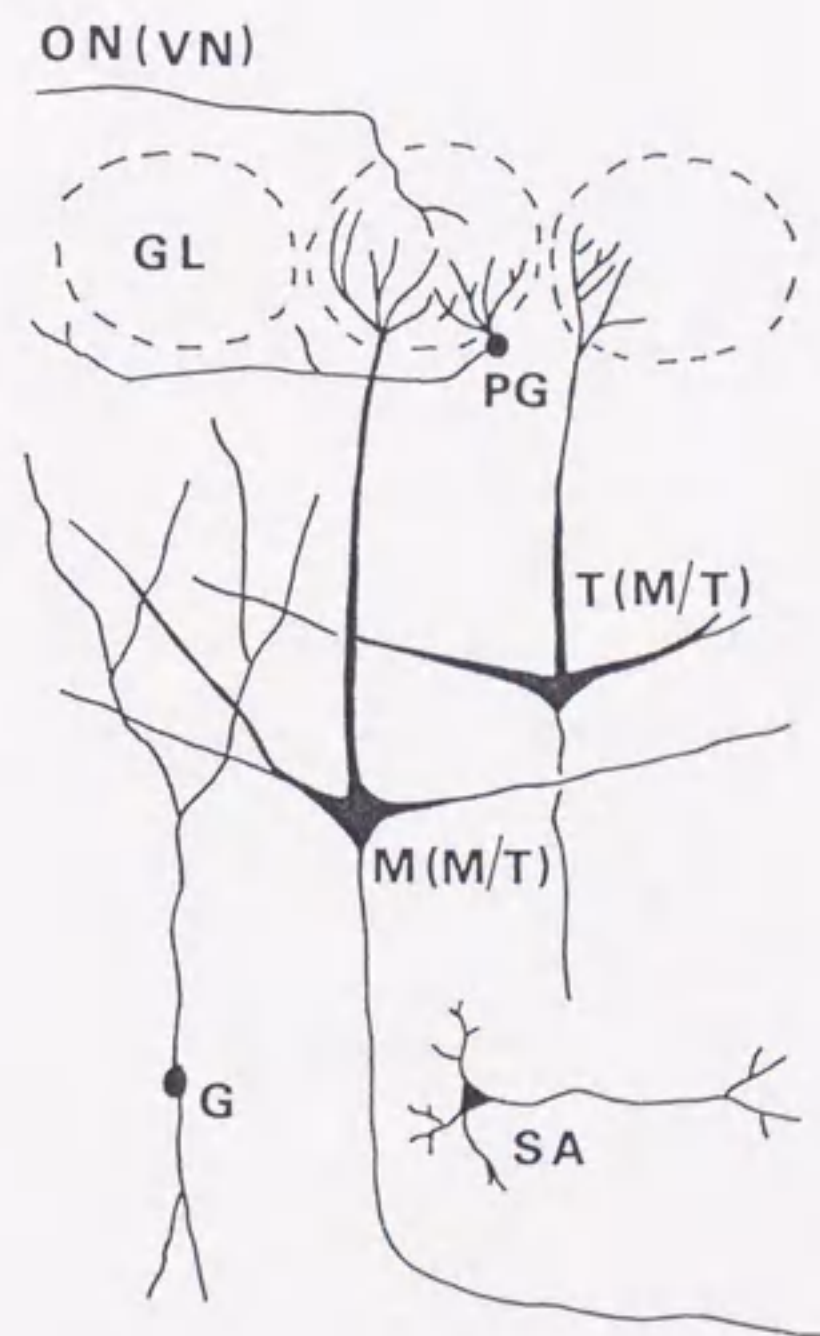
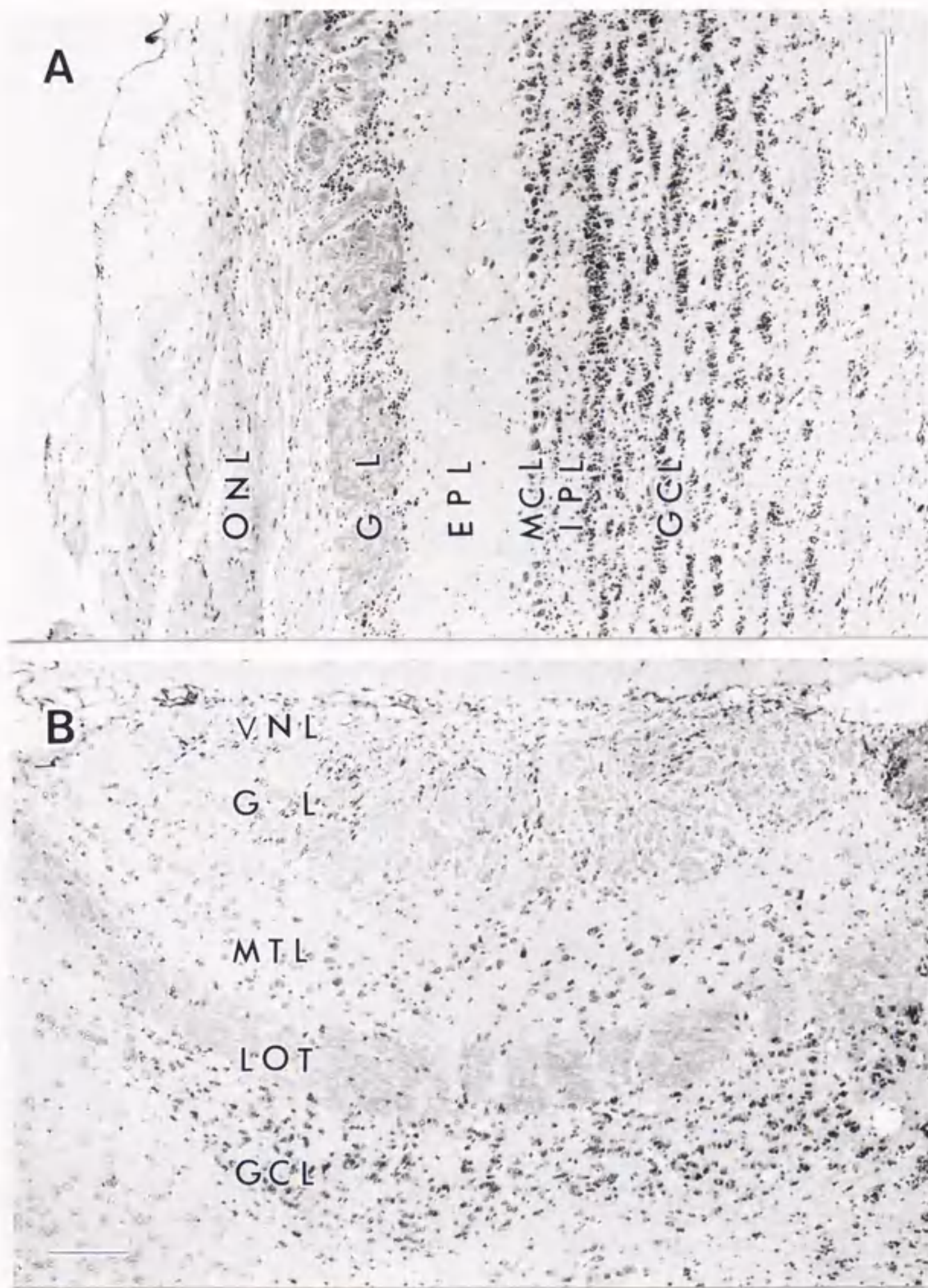


図 1-2. 主嗅球および副嗅球の神経回路に関する模式図。G: 顆粒細胞。GL: 嗅糸球。M: 僧帽

細胞。M/T: 僧帽/房飾細胞。ON: 嗅神経線維。PG: 傍糸球細胞。SA: 短軸索細胞。

T: 房飾細胞。VN: 鋤鼻神経線維。

図 1-3. ラット主嗅球 (A) および副嗅球 (B) の H. E. 染色像。ONL: 嗅神経層。GL: 嗅糸球層。EPL: 外網状層。MCL: 僧帽細胞層。IPL: 内網状層。GCL: 顆粒細胞層。VNL: 鋤鼻神経層。MTL: 僧帽/房飾細胞層。LOT: 外側嗅索。Bars=100 μ m.



第2章

ゴールデンハムスターの嗅球における短軸索細胞の免疫組織化学的ならびに酵素組織化学的特性

材料と方法

組織標本：実験動物として、成熟した雌雄のゴールデンハムスター（140～200 g）計7頭を用いた。動物に、エーテル麻酔下で、パラフィン切片作製用として酢酸を除いたブアン液あるいは、凍結切片作製用として4% パラフォルムアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）で灌流固定を施した。パラフィン切片作製の嗅球は、酢酸を除いたブアン液にて室温で6～20時間、後固定を行い、常法に従って、パラフィンに包埋した。パラフィン包埋後、5 μ m の矢状断切片を作製した。凍結切片作製の嗅球は、4% パラフォルムアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）にて4℃で2時間、後固定を行った。後固定後、嗅球を30% シュクロース-0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）にて4℃で一晩浸漬し、ドライアイス/アセトンで低温にしたヘキサンにて凍結後、4 μ m の凍結切片を作製した。

免疫組織化学：本研究で使用した抗血清は、表2-1に示した。これらの抗血清は、以前に、脳の各領域において局在が報告されている物質に対する抗血清である。切片に各抗血清を4℃で24～48時間反応させ、Vectastain ABC kit（Vector, Burlingame, U.S.A.）を用いて発色を行った。発色後、いくつかの切片には、ヘマトキシリン液で核染色を施した。各抗血清に対する positive control として、抗 somatostatin (SOM) 血清、抗 arginine-vasopressin 血清、抗 oxytocin 血清、抗 substance P (SP) 血清、抗 neurotensin 血清および抗 dopamine 血清は視床下部に、抗 vasoactive intestinal polypeptide (VIP) 血清、抗 protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 血清および抗一酸化窒素合成酵素 (NOS) 血清は大脳皮質に、抗 neuropeptide Y (NPY) 血清および抗 calcitonin gene-related peptide 血清は脳幹に、抗 pancreatic polypeptide 血清は膵臓に、抗 calcitonin 血清は甲状腺に反応

させた。各組織において、これらの抗血清に対する陽性反応が認められた。Negative controlとして、抗血清の代わりに、非免疫ウサギ血清あるいはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）（pH 7.25）を切片に反応させた。Negative control 染色では、陽性反応は認められなかった。

NADPH-diaphorase 染色：凍結切片を用い、1 mM β -NADPH、0.1 mM NBT および 0.3% triton X-100 を含む 0.1M リン酸緩衝液（pH 7.4）にて 37℃で 40～50 分反応させた。反応後、切片を蒸留水にて軽く洗浄し、glycerine jelly で封入した。NADPH-diaphorase 染色の negative control として、 β -NADPH を除いた溶液中で切片を反応させた。Negative control 染色では、NADPH-diaphorase に対する特異反応は認められなかった。

結 果

本研究で使用した13種類の抗血清のうち、抗NPY、SOM、VIP、PGP 9.5およびNOSの5種類の抗血清に対する陽性反応が短軸索細胞で認められた。NADPH-diaphorase陽性反応も短軸索細胞で認められた。NADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞の形態的特徴および分布は、NOS陽性の短軸索細胞のそれらと一致していた。

主嗅球：嗅糸球層では、NPY、NOSおよびNADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が認められた。これらの短軸索細胞は、嗅糸球と嗅糸球の間に分布しており、大型で細胞質に富んでいた。本研究では、これらの短軸索細胞において、シナプスボタンを確認することはできなかった。NOSおよびNADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞は、小型で卵形を呈し、細胞質に乏しかった。これらの樹状突起のほとんどは、嗅糸球内に進入することなく嗅糸球の周囲に分布していた。これらの細胞においても、シナプスボタンを確認することはできなかった。また、外網状層の内側で、少数のVIP陽性短軸索細胞が認められた（図2-1A）。これらの短軸索細胞は、細胞質に乏しく、垂直方向に樹状突起を伸ばしていた。顆粒細胞層では、NPY、SOM、PGP 9.5、NOSおよびNADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が認められた（図2-1B, Cおよび2-2A, B）。これらの細胞は、その形態が互いに類似しており、中型から大型で、紡錘形および多角形を呈し、双極性および多極性の突起を有していた。これらの短軸索細胞におけるシナプスボタンは認められなかった。NPYおよびSOM陽性の短軸索細胞の出現頻度は、PGP 9.5、NOSおよびNADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞のそれよりも非常に低かった。

副嗅球：VIPおよびPGP 9.5陽性の短軸索細胞が僧帽/房飾細胞層で認められたが、VIP陽性の短軸索細胞は非常に少数であった（図2-3A, B）。これらの細胞は、その形態および分布位置が互いに類似しており、小型で細胞質に乏しく、副嗅球の各層に対して平行に突起を伸ばしていた。一方、NPY、SOM、NOSおよびNADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞は顆粒細胞層で認められた。NPYおよびSOM陽性の短軸索細胞は、中型から大型で、紡錘形および多角形を呈し、細胞質に富んでいた。これらの形態的特徴は、主嗅球で認められたNPYおよびSOM陽性の短軸索細胞のもの

と類似していた。NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞は、小型で卵形を呈し、細胞質に乏しかった。

考 察

嗅球における短軸索細胞は、その形態的特徴および分布位置によって、Blanes 細胞、Golgi 細胞、Cajal の垂直細胞、水平細胞、Van Gehuchten 細胞および表在性短軸索細胞の 6 種類に分類される [52, 67, 68, 74]。

本研究では、主嗅球の嗅糸球層において、NPY、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞が検出された。ハムスターおよびラットの主嗅球の嗅糸球層もしくは外網状層の表層における NPY 陽性の短軸索細胞は、Gall ら [22]、Matsutani ら [54]、Scott ら [76] によって表在性短軸索細胞として報告されている。NOS 陽性の短軸索細胞は、ラットおよびマウスで報告されているが、ハムスターでの報告はなされていない。表在性短軸索細胞は、嗅糸球層もしくは外網状層の表層に限局しており、それらの樹状突起は、嗅糸球間に分岐してはいるが、嗅糸球内には進入せず、傍糸球細胞と軸索-細胞体間および軸索-樹状突起間シナプスを形成している [52]。形態的特徴および分布位置から判断すると、本研究で認められた嗅糸球層における NPY、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞は、表在性短軸索細胞に相当すると思われた [52, 76]。ところで、Golgi 染色法を用いたこれまでの研究によって、表在性短軸索細胞は細胞体および樹状突起にシナプスボタンを有していることが示されている [67, 74, 76]。しかしながら、本研究では、NPY、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の表在性短軸索細胞においてシナプスボタンを確認することはできなかった。この点に関して、Scott ら [76] は、光学顕微鏡で検出しうる量の NADPH-diaphorase が、これらの細胞のシナプスボタンには局在していないのではないかと推測している。本研究において、シナプスボタンを確認することができなかったことは、このような理由によるのではないかと考えられた。また、Matsutani ら [54]、Scott ら [76] および Takami ら [78] は、ラットにおいて SOM 陽性の表在性短軸索細胞を検出しているが、本研究では、ハムスターにおいて SOM 陽性の表在性短軸索細胞を検出することはできなかった。この相違は、種差による可能性が高い。一方、Davis と Kream [13] は、コルヒチン処理を行ったハムスターの主嗅球において、SP 陽性の表在性短軸索細胞を検出しているが、本研究で用いたハムスターには、コルヒチ

ン処理を施さなかったため、SP 陽性の表在性短軸索細胞を検出することはできなかった。

本研究では、外網状層の内側においてVIP 陽性の短軸索細胞を検出することができた。Gall ら [22] は、ラットの主嗅球の僧帽細胞層および顆粒細胞層においてVIP 陽性の短軸索細胞を検出し、それらの短軸索細胞は、Van Gehuchten 細胞に相当するとしている。López-Mascaraque ら [48] は、ハリネズミの主嗅球の嗅糸球層および外網状層においてVIP 陽性の短軸索細胞を検出し、それらの細胞を、表在性短軸索細胞、水平細胞あるいはVan Gehuchten 細胞に相当するとしている。水平細胞は、僧帽細胞層および内網状層に分布しており、顆粒細胞の遠位樹状突起と軸索-樹状突起間シナプスを形成している [52]。Van Gehuchten 細胞は、外網状層、僧帽細胞層および内網状層に分布しているが、そのシナプス結合については不明である [52]。表在性短軸索細胞は、すでに述べたように、嗅糸球層もしくは外網状層の表層に分布している。本研究で認められたVIP 陽性の短軸索細胞は、形態的特徴および分布位置から判断すると、Van Gehuchten 細胞に相当すると思われる [22, 48, 52]。今回の結果と以前の結果 [48] との相違は、種差によると思われる。

これまでの研究 [12, 22, 54, 55, 76, 78] により、ハムスター、ラットおよびモルモットの主嗅球の顆粒細胞層において、NPY およびSOM 陽性の短軸索細胞が認められており、それらの短軸索細胞は、Blanes 細胞およびGolgi 細胞に相当することが報告されている。Blanes 細胞およびGolgi 細胞は、主に顆粒細胞層に分布しているが、僧帽細胞層および内網状層にも分布し、顆粒細胞および嗅球深層の短軸索細胞と軸索-細胞体間および軸索-樹状突起間シナプスを形成している [52]。本研究において、顆粒細胞層で認められたNPY、SOM、PGP 9.5、NOS およびNADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞は、大きさおよび分布位置が互いに類似しており、Blanes 細胞およびGolgi 細胞に相当すると思われた [11, 12, 22, 52, 54, 55, 76, 78]。Blanes 細胞とGolgi 細胞は樹状突起および細胞体上のシナプスボタンの数によって区別される [52, 67, 74, 76] が、本研究では、NPY、NOS およびNADPH-diaphorase 陽性の表在性短軸索細胞同様、顆粒細胞層におけるNPY、SOM、PGP 9.5、NOS およびNADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞でもシナプスボタンを確認することはできなかった。このため、これらの細胞が、Blanes 細胞、Golgi 細胞のいずれの細胞であるのか

を正確には同定できなかった。

副嗅球において、VIP、PGP 9.5、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞が存在していることが本研究によって初めて示された。これらの細胞は、形態的特徴から僧帽/房飾細胞および顆粒細胞とは明瞭に区別された。VIP および PGP 9.5 陽性の短軸索細胞は、形態および分布位置が互いに類似しており、主嗅球の水平細胞に相当する短軸索細胞であると思われた [48, 52]。NPY および SOM 陽性の短軸索細胞は、顆粒細胞層において認められた。Matsutani ら [54] もラット副嗅球の顆粒細胞層における NPY および SOM 陽性の短軸索細胞を報告している。副嗅球における NPY および SOM 陽性の短軸索細胞は、本研究において主嗅球の顆粒細胞層で認められた NPY および SOM 陽性の短軸索細胞に類似しているので、副嗅球におけるこれらの細胞も、Blanes 細胞あるいは Golgi 細胞に相当すると思われた [11, 12, 22, 52, 54, 55, 76, 78]。一方、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞は、形態的特徴から、NPY および SOM 陽性の短軸索細胞とは異なっているように思われた。NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞は、主嗅球の Cajal の垂直細胞、水平細胞あるいは Van Gehuchten 細胞に相当する細胞であると思われたが [48, 52]、副嗅球におけるこのようなタイプの短軸索細胞は、これまで報告されていない。

短軸索細胞の機能を直接的に証明するデータはほとんどないが、短軸索細胞には、多種類の神経伝達物質が局在していることが報告されている [5, 7, 12, 13, 22, 42, 48, 54, 55, 60, 76, 78]。免疫組織化学的ならびに形態学的に短軸索細胞に類似した神経細胞が、大脳皮質、嗅脚および線条体に分布しているので [11, 91, 92]、短軸索細胞は、これらの神経細胞と同じグループに属する可能性がある。主嗅球および副嗅球のいずれにおいても、NPY、SOM、VIP、PGP 9.5、NOS および NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞が存在している。同じ神経化学的特性を有したそれぞれのタイプの短軸索細胞は、主嗅球および副嗅球のいずれに分布していようとも、同じ役割を果たしている可能性が高い。従って、主嗅球および副嗅球には、これらの細胞に関わる共通の情報伝達機構が存在すると思われる。

表2-1. 本研究で使用了た抗血清

Antiserum for	Host species	Dilution	Source
Arginine-vasopressin	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	UCB-Bioproducts, Braine l' Alleud, Belgium
Calcitonin	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Incstar, Stillwater, U.S.A.
Calcitonin gene-related peptide	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Cambridge Research Biochemicals, Chesire, U.K.
Dopamine	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Cambridge Research Biochemicals, Chesire, U.K.
Neuropeptide Y	Rabbit (polyclonal)	1 : 8,000	Dr. N. Yanaihara, Japan
Neurotensin	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Chemicon, Temmecula, U.S.A.
Brain type nitric oxide synthase	Rabbit (polyclonal)	1 : 600	Euro-Diagnostica, Malmo, Sweden
Oxytocin	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Incstar, Stillwater, U.S.A.
Pancreatic polypeptide	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Euro-Diagnostica, Malmo, Sweden
Protein gene product 9.5	Rabbit (polyclonal)	1 : 6,000	UltraClone, Wellow, U.K.
Substance P	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Incstar, Stillwater, U.S.A.
Vasoactive intestinal polypeptide	Rabbit (polyclonal)	1 : 1,000	Incstar, Stillwater, U.S.A.

図および付図説明

図 2-1. A. 主嗅球の外網状層で認められた vasoactive intestinal polypeptide 陽性の短軸索細胞 (矢印)。

B. 主嗅球の顆粒細胞層で認められた neuropeptide Y 陽性の短軸索細胞 (矢印)。

C. 主嗅球の顆粒細胞層で認められた somatostatin 陽性の短軸索細胞 (矢印)。

Bars = 100 μm .

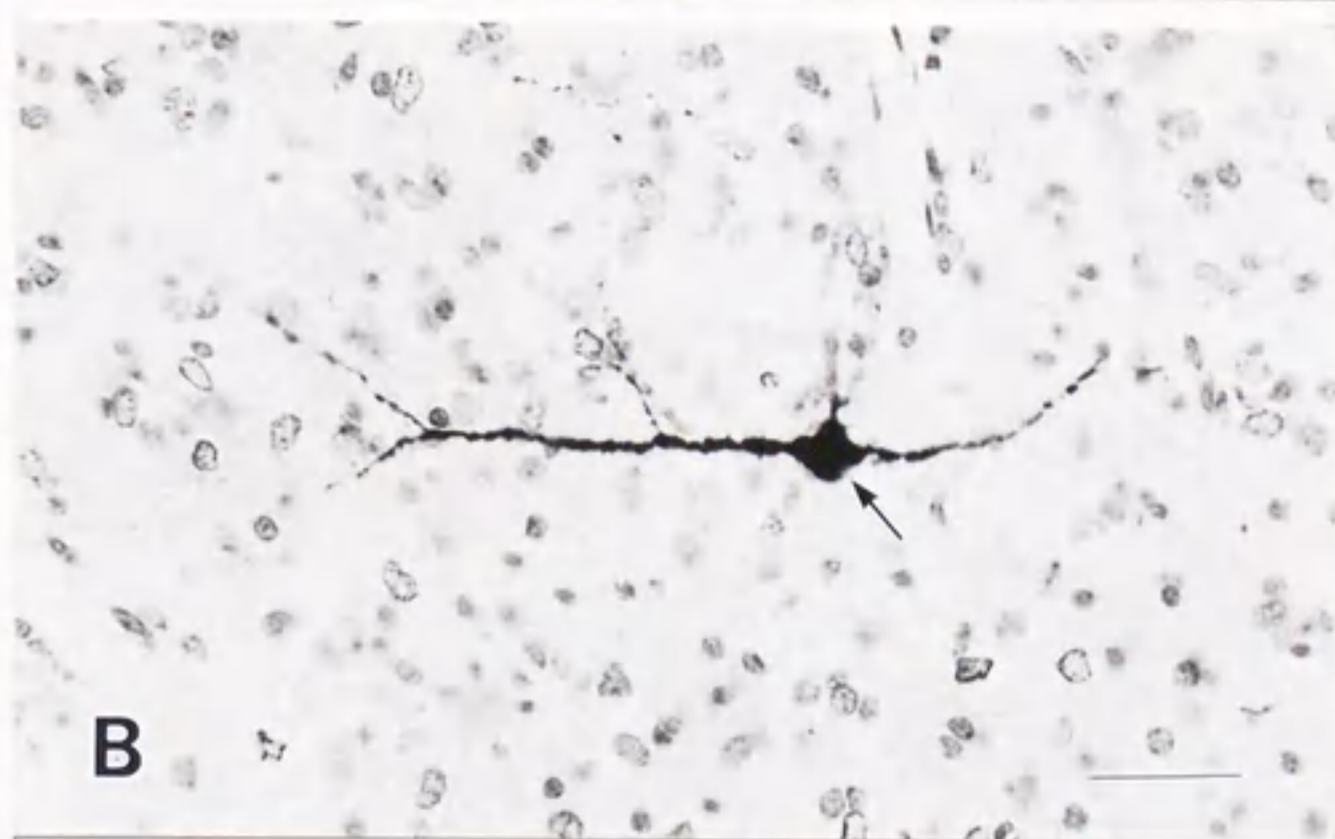


図 2-2. A. 主嗅球の顆粒細胞層で認められた一酸化窒素合成酵素陽性の短軸索細胞（矢印）。

B. 主嗅球の顆粒細胞層で認められた NADPH-diaphorase 陽性の短軸索細胞（矢印）。

Bars = 100 μ m.



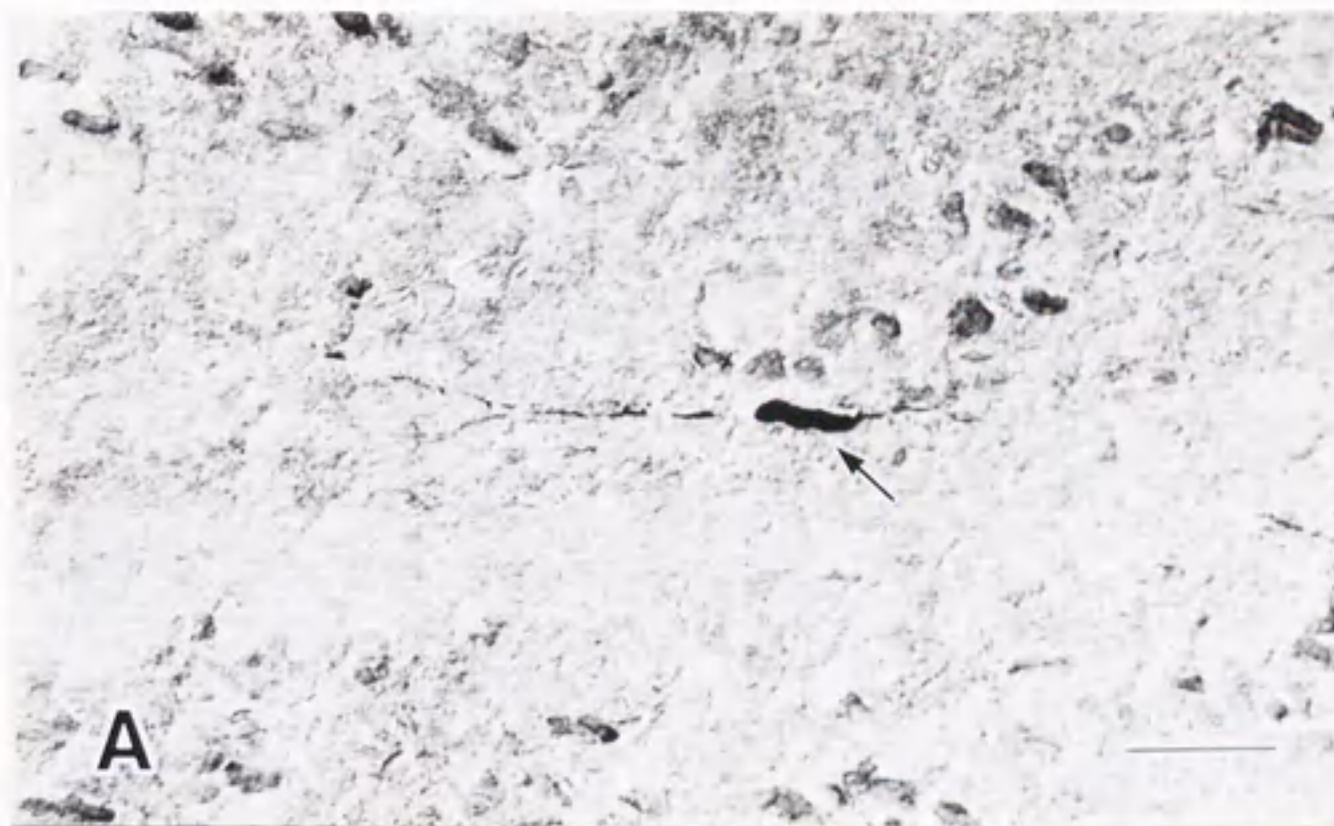
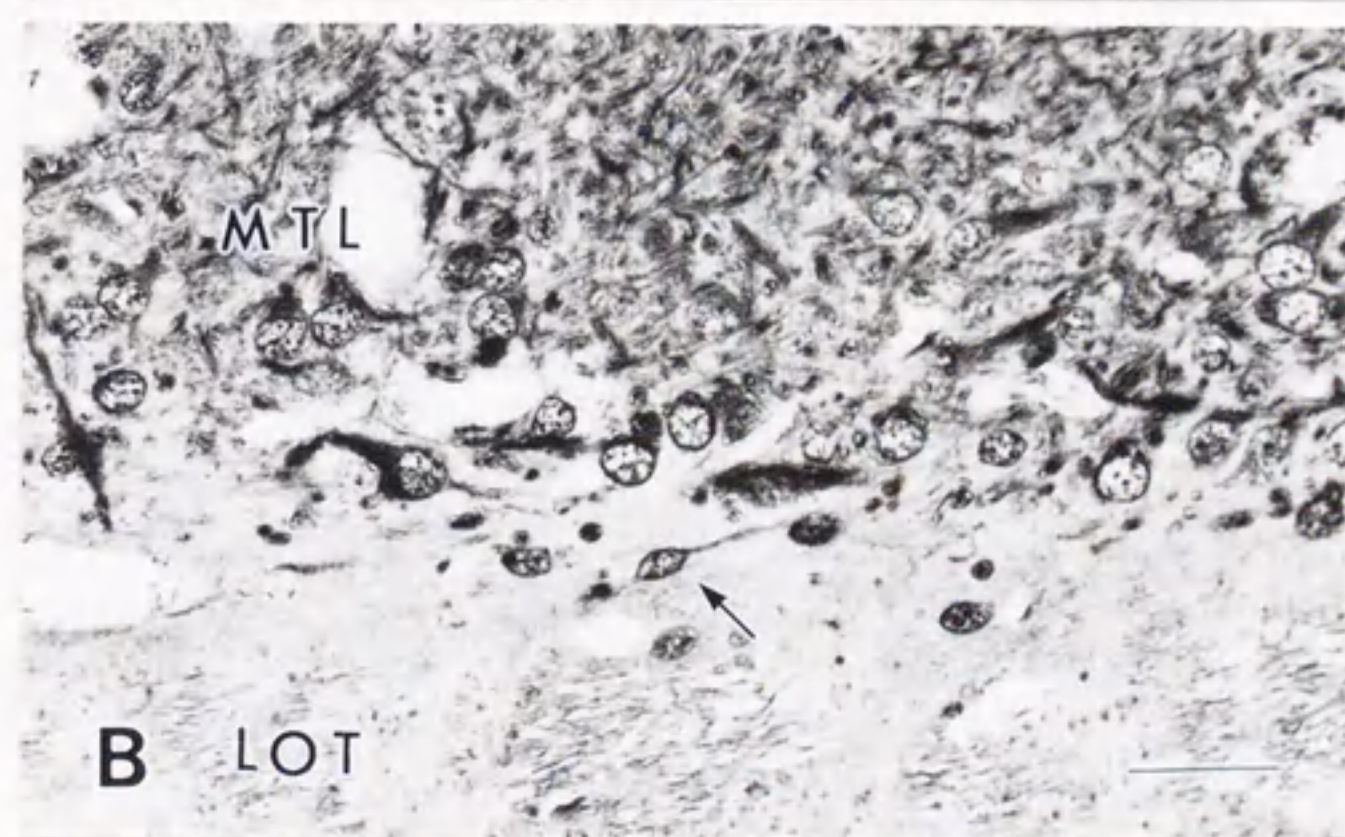
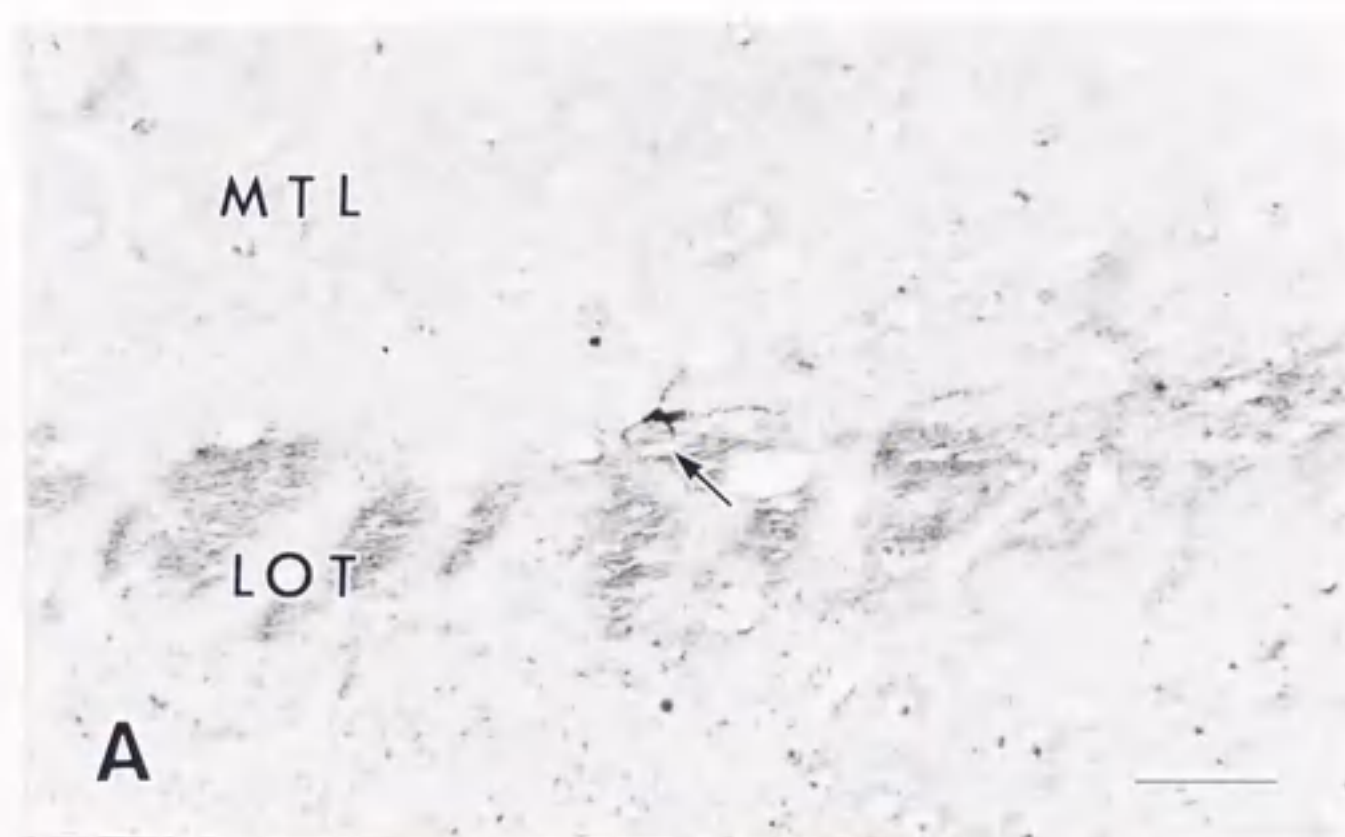


図 2-3. A. 副嗅球の僧帽/房飾細胞層で認められた vasoactive intestinal polypeptide 陽性の短軸索細胞（矢印）。

B. 副嗅球の僧帽/房飾細胞層で認められた protein gene product 9.5 陽性の短軸索細胞（矢印）。

MTL: 僧帽/房飾細胞層。LOT: 外側嗅索。Bars = 100 μ m.



第3章

発生過程のハムスター嗅球における protein gene product 9.5 (PGP 9.5) の免疫染色性

材料と方法

実験動物として、胎齢 11、12、13、14、15 日、生後 0、1、3、5、7、10、15 日および成体のゴールデンハムスターを用いた。本研究では、固定液として酢酸を除いたブアン液と酢酸アルコール液（95%アルコール-5%酢酸）の2種類を使用した。胎齢 11 日および 12 日の胎仔については、断頭後、直ちに脳を採取し、酢酸を除いたブアン液にて 24~48 時間あるいは酢酸アルコール液にて 5~6 時間浸漬固定を行った。胎齢 13 日以後については、動物をネンブタール麻酔下で酢酸を除いたブアン液あるいは酢酸アルコール液で灌流固定し、脳を採取後、酢酸を除いたブアン液にて 24~48 時間あるいは酢酸アルコール液にて 5~6 時間浸漬固定を行った。固定後、常法に従って、組織をパラフィンに包埋し、5 μ m の矢状断切片を作製した。切片は脱パラフィン後、抗ヒト PGP 9.5 ポリクローナルウサギ血清（1:3,000）（UltraClone, Wellow, U.K.）に、4℃で 24~48 時間反応させ、Vectastain ABC kit（Vector, Burlingame, U.S.A.）を用いて発色を行った。コントロール染色として、一次抗体の代わりに、非免疫ウサギ血清を用い、染色を行った。コントロール染色では、特異的反応は認められなかった。

結 果

酢酸を除いたブアン液固定：胎齡 11 日および 12 日齡では、嗅球は、大脳先端の小突起として認められ、嗅脳室周囲に分布する胚芽細胞および、表層に分布する未分化な細胞から構成されていた。このステージでは、免疫反応は認められなかった。

胎齡 13 日では、主嗅球と副嗅球の区別はすでに可能となったが、その境界は不明瞭であった。主嗅球は、表層から嗅神経層、僧帽細胞層および胚芽細胞層の 3 層構造を呈した（図 3-1A）。嗅神経層では、嗅神経線維束が PGP 9.5 陽性反応を示した。僧帽細胞層では、未分化な僧帽細胞および房飾細胞が 4 または 5 層に配列し、弱度の免疫染色性を示した。胚芽細胞層は、主嗅球の深層の大部分を占め、免疫染色陰性の胚芽細胞と免疫染色陽性の未分化な細胞から構成されていた。一方、副嗅球は、鋤鼻神経層および僧帽/房飾細胞層の 2 層から構成されていた（図 3-2A）。鋤鼻神経層では、鋤鼻神経線維束が中等度の免疫染色性を示した。僧帽/房飾細胞層では、多数の未分化な僧帽/房飾細胞が密集し、弱度の免疫染色性を示した。主嗅球および副嗅球におけるいくつかの PGP 9.5 陽性細胞において、PGP 9.5 免疫染色性は、細胞質だけでなく核でも検出された。

胎齡 14 日では、嗅球の大きさおよび PGP 9.5 の発現は、わずかに増加した。主嗅球の僧帽細胞層では、未分化な僧帽細胞あるいは房飾細胞が樹状突起を伸長し始めた。副嗅球においては、形態的变化は認められなかった。

胎齡 15 日では、嗅球の大きさが著しく増加した。主嗅球では、少数の免疫陽性の房飾細胞が、僧帽細胞から外網状層へと移動し始めたが、大部分の未分化な房飾細胞は、僧帽細胞層にとどまっていた。大部分の僧帽細胞および房飾細胞は、樹状突起を外網状層に伸長し、嗅糸球を形成し始めた（図 3-1B）。胚芽細胞層では、胎齡 13 日で認められた免疫染色陽性の未分化な細胞が、樹状突起を伸長し始めた（図 3-1C）。これらの細胞は、形態的特徴から短軸索細胞であると思われた。副嗅球では、僧帽/房飾細胞が大きさを増し、それらの細胞の一部が樹状突起を伸長し始めた。僧帽/房飾細胞は強度の免疫染色性を示した（図 3-2B）。このステージで、副嗅球においても PGP 9.5 陽性の短軸索細胞が認められた。

生後0日では、嗅糸球が明瞭に認められるようになったので、嗅神経層と外網状層の間に嗅糸球層が区別できるようになった。嗅糸球は、強度の免疫染色性を示すようになった(図3-1D)。副嗅球では、形態的な変化は認められなかった。

生後3日では、主嗅球の僧帽細胞および房飾細胞の樹状突起が太くなり、また抗PGP 9.5血清に対する免疫染色性も増加した(図3-1E)。嗅糸球層では、免疫染色陰性の傍糸球細胞が嗅糸球を取り巻くようにして分布するのが認められるようになった。このステージで、主嗅球の顆粒細胞が、胚芽細胞層から区別されるようになった。顆粒細胞は、免疫染色陰性であった。副嗅球では、嗅糸球が明瞭に区別されるようになった(図3-2C)。これらの嗅糸球は、抗PGP 9.5血清に対し、中等度の免疫染色性を示した。

生後7日では、主嗅球の6層構造が明瞭に区別されるようになった(図3-1F)。嗅糸球層では、嗅糸球の数が増加した。僧帽細胞層では、僧帽細胞が1もしくは2列に配列するようになった。大部分の房飾細胞は、僧帽細胞層から外網状層へ移動した。これらの形態的特徴および免疫染色性は、成体の主嗅球で認められるものとほぼ同様となった。

生後15日では、副嗅球の僧帽/房飾細胞の分布パターンが成体で認められるものとほぼ同様となったので、副嗅球は明瞭な5層構造をとるようになった(図3-2D)。副嗅球では、このステージで免疫染色性も成体とほぼ同様となった。

酢酸アルコール固定：胎齢11日で嗅球の表層における未分化な細胞はすでに抗PGP 9.5血清に対し陽性反応を示し、胎齢12日で免疫染色性は増加した(図3-3A, B)。酢酸アルコール固定を行った嗅球でも、いくつかの細胞において、抗PGP 9.5血清に対する免疫染色性は細胞質だけでなく、核にも認められた。

胎齢13日では、酢酸を除いたブアン液で固定をした組織において免疫染色陽性を示した神経要素とほぼ同様の神経要素において、抗PGP 9.5血清に対する免疫染色性が検出されたが、その免疫染色性は、酢酸を除いたブアン液で固定をした組織で認められた染色性よりも強度であった(図3-3C, D)。

胎齡 15 日以後では、免疫染色性は、酢酸を除いたブアン液で固定をした組織で認められた染色性とほぼ同程度となった。

考 察

本研究において、酢酸を除いたブアン液で固定した嗅球では、胎齢 13 日から嗅神経線維束、鋤鼻神経線維束、未分化な僧帽細胞、房飾細胞および僧帽/房飾細胞で、また、酢酸アルコール固定した嗅球では、胎齢 11 日から嗅球表層に存在する未分化な細胞で PGP 9.5 免疫染色性が検出された。この免疫反応検出時期の相違は、早期発生段階の嗅球の未分化な細胞における PGP 9.5 のエピトープがフォルムアルデヒドによって変性しやすいということを反映していると思われる [94]。PGP 9.5 は、ユビキチン C 末端加水分解酵素に相当するタンパクであり、細胞内タンパク分解経路において重要な役割を果たしていると考えられている [25, 93]。本研究結果は、嗅球のニューロンが分化を始めると同時に、この代謝経路を獲得するということを示唆している。本研究結果により、PGP 9.5 の出現パターンは、主嗅球では生後 7 日で、副嗅球では生後 15 日で成体で認められるのとはほぼ同様となることが示されたので、この代謝活性のレベルは、主嗅球では生後 7 日、副嗅球では生後 15 日になって初めて成体のそれとほぼ同様となると考えられる。嗅球のいくつかのニューロンでは、PGP 9.5 に対する免疫反応は、細胞質だけでなく、核にも認められた。この結果は、他の神経系についての研究結果と一致しており [37, 94]、ユビキチンが関与するタンパク分解経路が、細胞質だけでなく、核内でも存在することを示唆している [37]。

胎齢 13 日では、胚芽細胞層でも、PGP 9.5 免疫染色陽性細胞が認められた。これらの細胞は、胎齢 15 日の時点で確認された形態的特徴および分布パターンから未分化な短軸索細胞であると思われる。短軸索細胞は、嗅球において生後になってから発生すると報告されてきた [6] が、本研究により、少なくともその一部は、胎齢の段階ですでに発生していることが示された。

これまでの研究により、嗅細胞および鋤鼻器感覚細胞における PGP 9.5 は、成体だけでなく、発生の早期段階からすでに検出されることが示されており [37, 39, 74, 86]、PGP 9.5 がこれら 2 つの感覚細胞を早期発生段階から検索するうえで有効なマーカーとなることが示唆されている。これらの研究結果は、嗅球の嗅神経線維束および鋤鼻神経線維束において、早期発生段階から PGP 9.5 免疫反応が検出されるという本研究結果と一致している。一方、嗅球のニューロンにおいては、各

ニューロンが分化を始める早期発生段階から豊富に発現する物質に関する報告はほとんど見られない。OMPは、嗅細胞および鋤鼻器感覚細胞に対する有効なマーカーであることが知られているが、嗅球においては、このタンパクは嗅神経線維束および鋤鼻神経線維束のみに局在している[53, 57]。これに対し、PGP 9.5は、発生の早期段階から嗅球において、嗅神経線維束および鋤鼻神経線維束だけでなく、嗅球の各種ニューロンにおいても検出されるので、PGP 9.5は、嗅球の各種ニューロンの分化過程および嗅球の層構造の形成過程を調べるための有効なマーカーとなり得ることが示唆された。PGP 9.5はすでに述べたように、細胞機能の維持に対して重要な役割を果たしているので、各種ニューロペプチドなどの神経伝達物質よりも早期に産生されるのは当然かもしれない[54]。

本研究において、樹状突起の伸長、嗅糸球の形成および層構造の完成は、主嗅球において副嗅球よりも早期に認められた。これまでの研究により、ハムスターの嗅上皮は、生後1日で、成体で認められるのとほぼ同様な形態的特徴をとるが、鋤鼻器感覚上皮は、生後10日になっても未熟な形態的特徴を残していることが示されている[85]。本研究結果およびこれまでの研究結果から、主嗅球は、副嗅球よりも早期に成熟することが示唆される。主嗅球の僧帽細胞および房飾細胞は、胎齢14日で樹状突起を伸長し始め、胎齢15日で嗅糸球を形成し始めることが本研究により明らかとなった。マウス主嗅球においても、嗅糸球は、胎齢15日で形成され始めることが報告されている[26]。また、ラット主嗅球の僧帽細胞および房飾細胞は、胎齢16日から各種ニューロペプチドの産生を開始することが示されている[54]。嗅細胞からの嗅覚情報は、嗅神経層を経て嗅糸球内において嗅球の固有ニューロンに伝達されるので[52, 58, 71]、これらの研究結果は、齧歯類においては、主嗅球は、胎齢の時期にすでに、ある程度の嗅覚情報伝達能力を有していることを示唆している。

図および付図説明

図 3-1. 酢酸を除いたブアン液で固定した胎齡 13 日 (A)、15 日 (B, C)、生後 0 日 (D)、3 日 (E)、7 日 (F) の主嗅球における protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 免疫染色陽性反応。A: PGP 9.5 免疫染色陽性反応は、嗅神経層 (ONL)、僧帽細胞層 (MCL) における未分化な僧帽細胞および房飾細胞および胚芽細胞層 (GMCL) における未分化な細胞 (矢頭) において検出された。B: 免疫染色陽性反応を示す房飾細胞 (矢印) が、僧帽細胞層から外網状層 (EPL) へと移動し始めた。僧帽細胞および房飾細胞の樹状突起 (矢頭) が外網状層に向かって伸長し、嗅糸球 (星印) を形成し始めた。C: PGP 9.5 免疫染色陽性の短軸索細胞 (矢印) が主嗅球で認められた。D: 主嗅球の嗅糸球層 (GL) における嗅糸球 (星印) の形が明瞭になった。E: 僧帽細胞および房飾細胞の樹状突起 (矢頭) が太くなり、免疫染色性の強度が増加した。F: 主嗅球の 6 層構造が明瞭に区別されるようになった。GCL: 顆粒細胞層。IPL: 内網状層。Bars = 25 μ m.

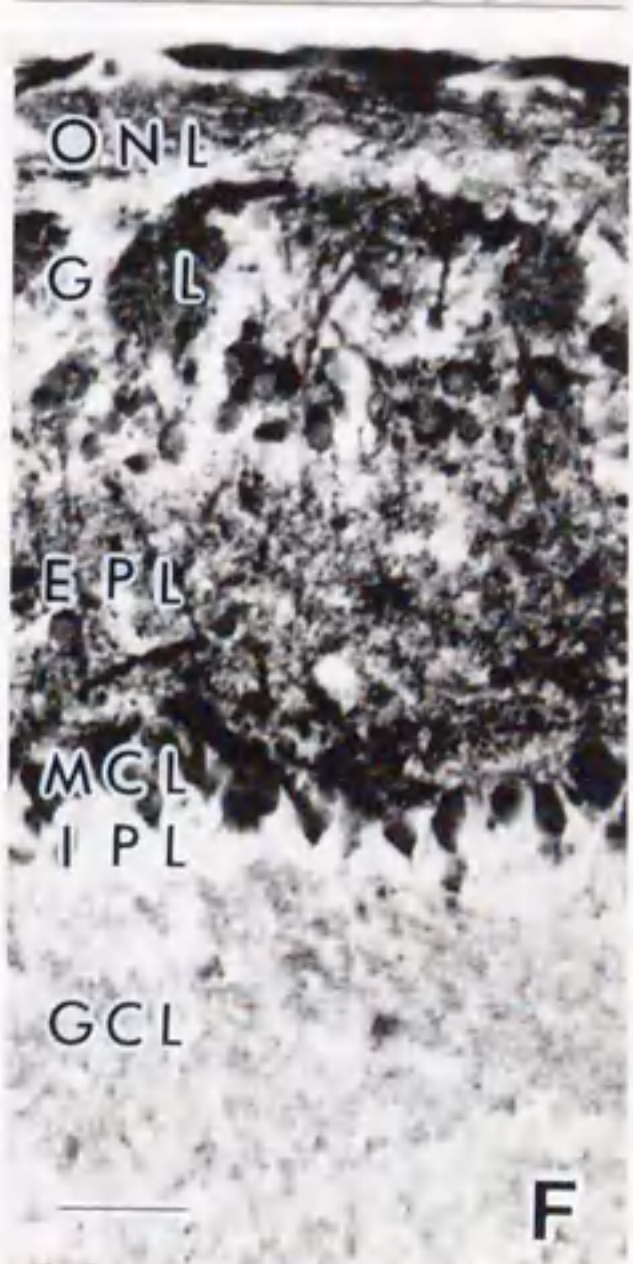
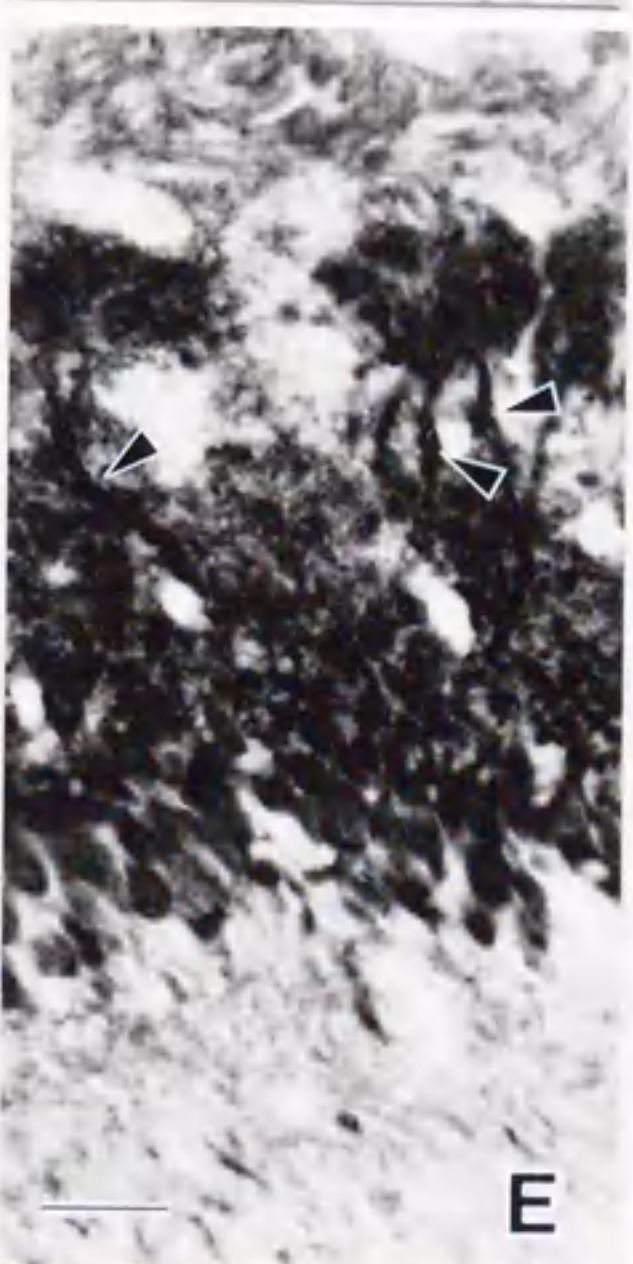
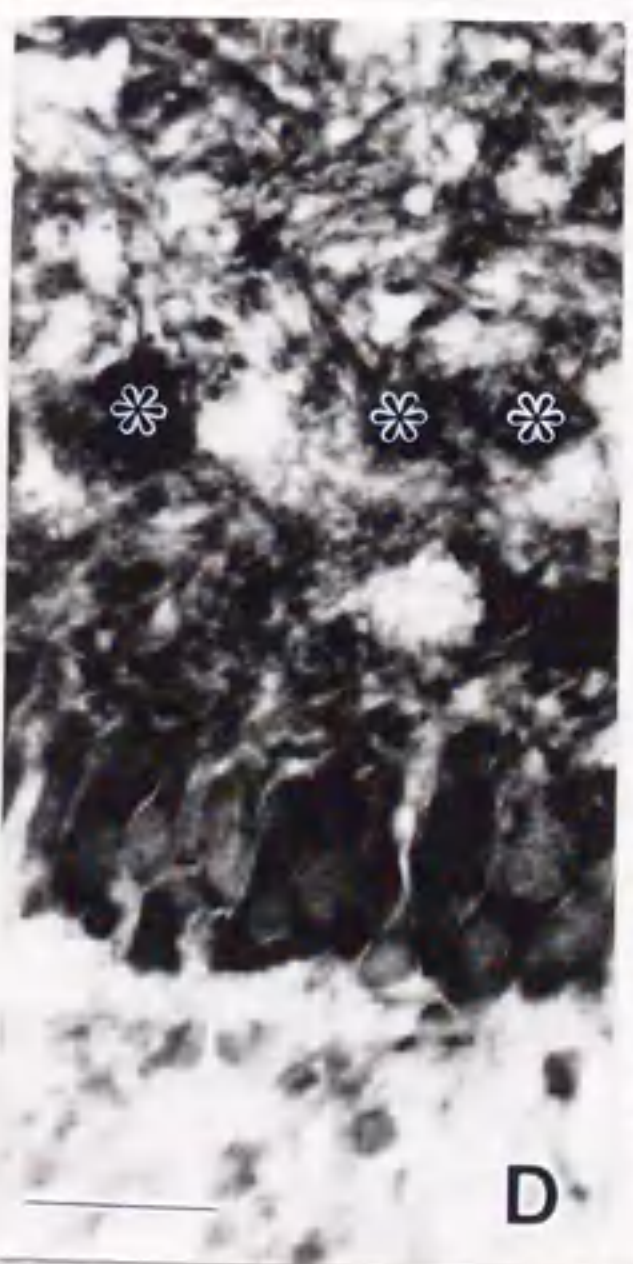
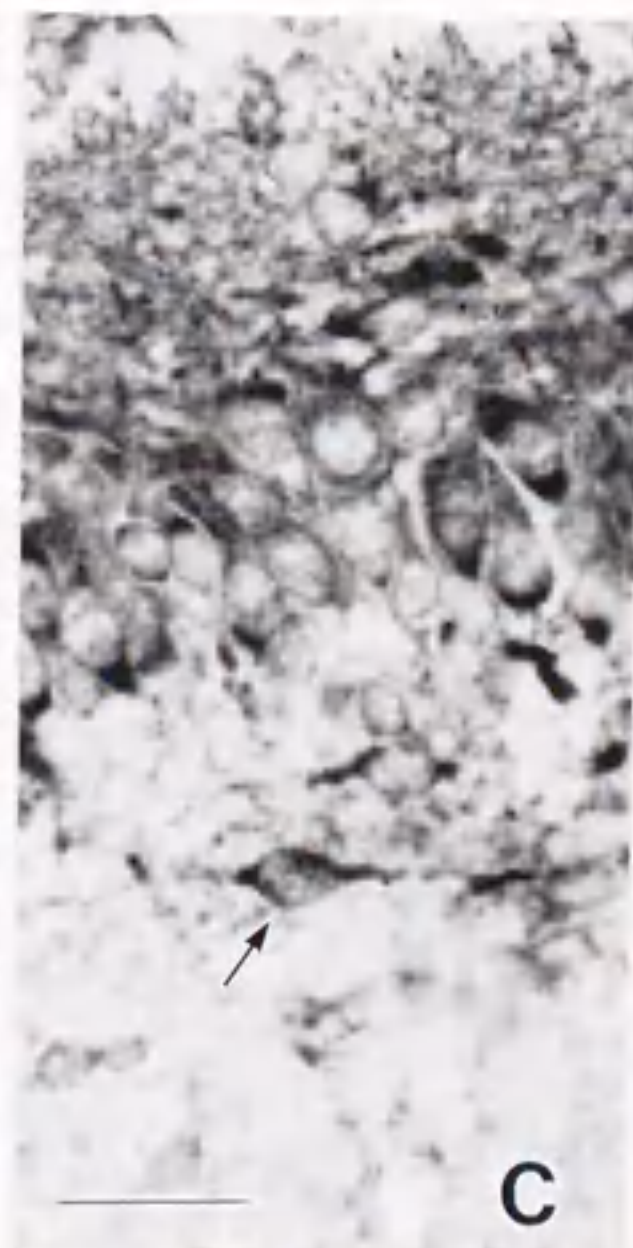
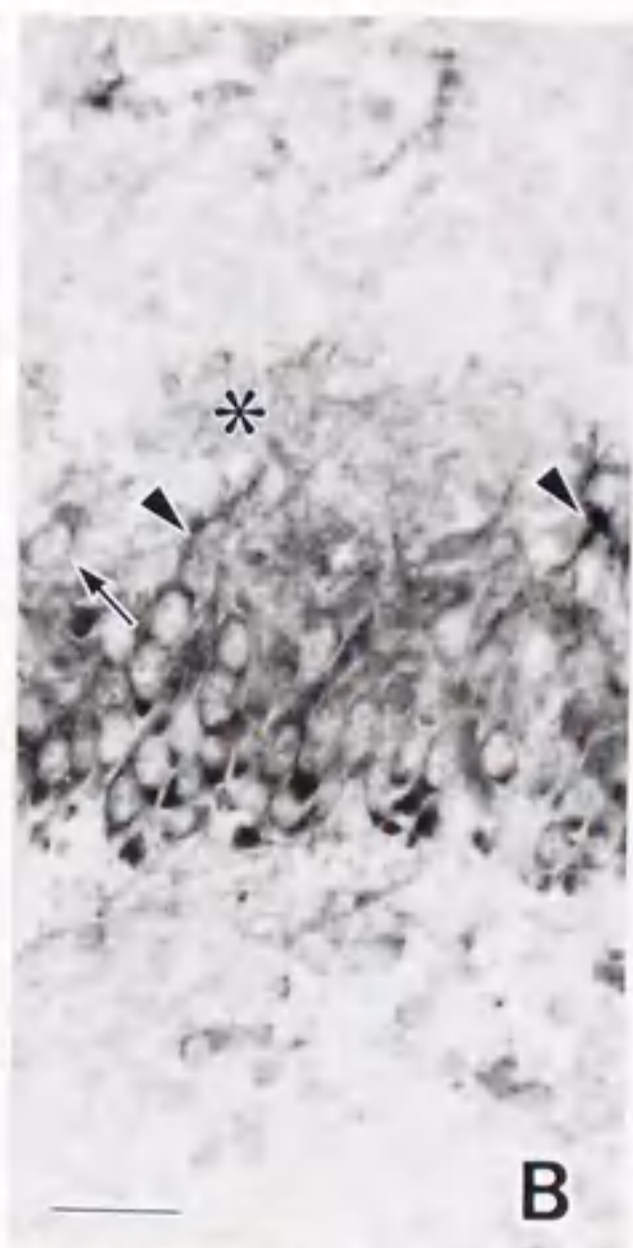


図 3-2. 酢酸を除いたブアン液で固定した胎齢 13 日 (A) 、 15 日 (B) 、 生後 3 日 (C) 、 15 日 (D) の副嗅球における protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 免疫染色陽性反応。A: PGP 9.5 免疫染色陽性反応は、鋤鼻神経層 (VNL) および僧帽/房飾細胞層 (MTL) における僧帽/房飾細胞で検出された。B: 僧帽/房飾細胞において、PGP 9.5 に対する強度の免疫染色陽性反応が認められた。C: 副嗅球の嗅糸球層 (GL) における嗅糸球 (星印) が明瞭に認められるようになった。D: 副嗅球の 5 層構造が明瞭に認められるようになった。GCL: 顆粒細胞層。LOT: 外側嗅索。Bars = 25 μ m in A, B, C and 100 μ m in D.

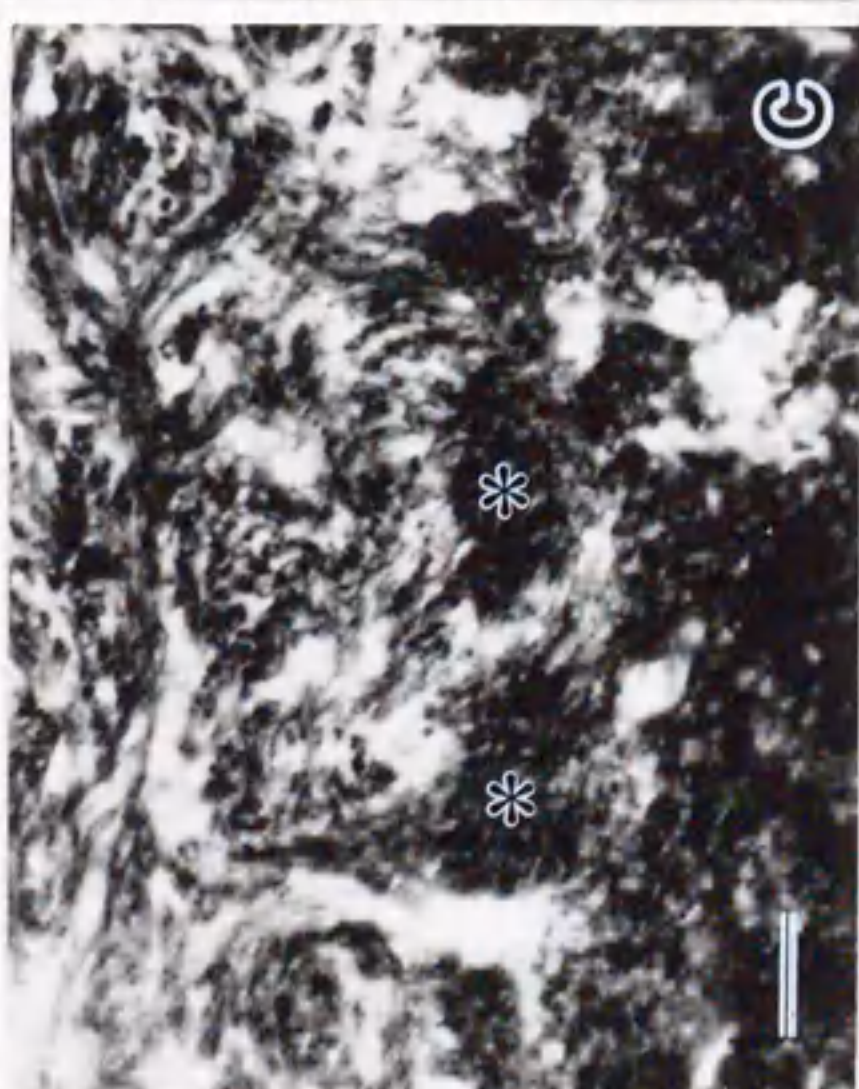
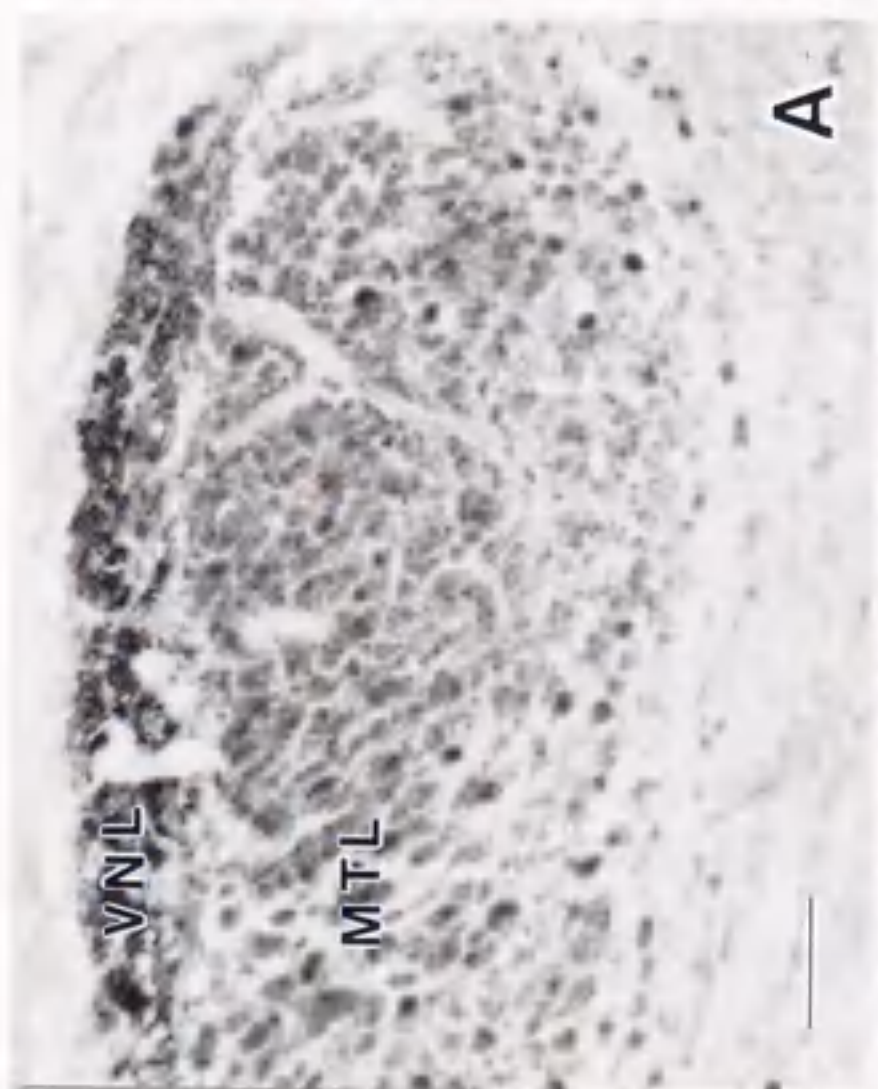
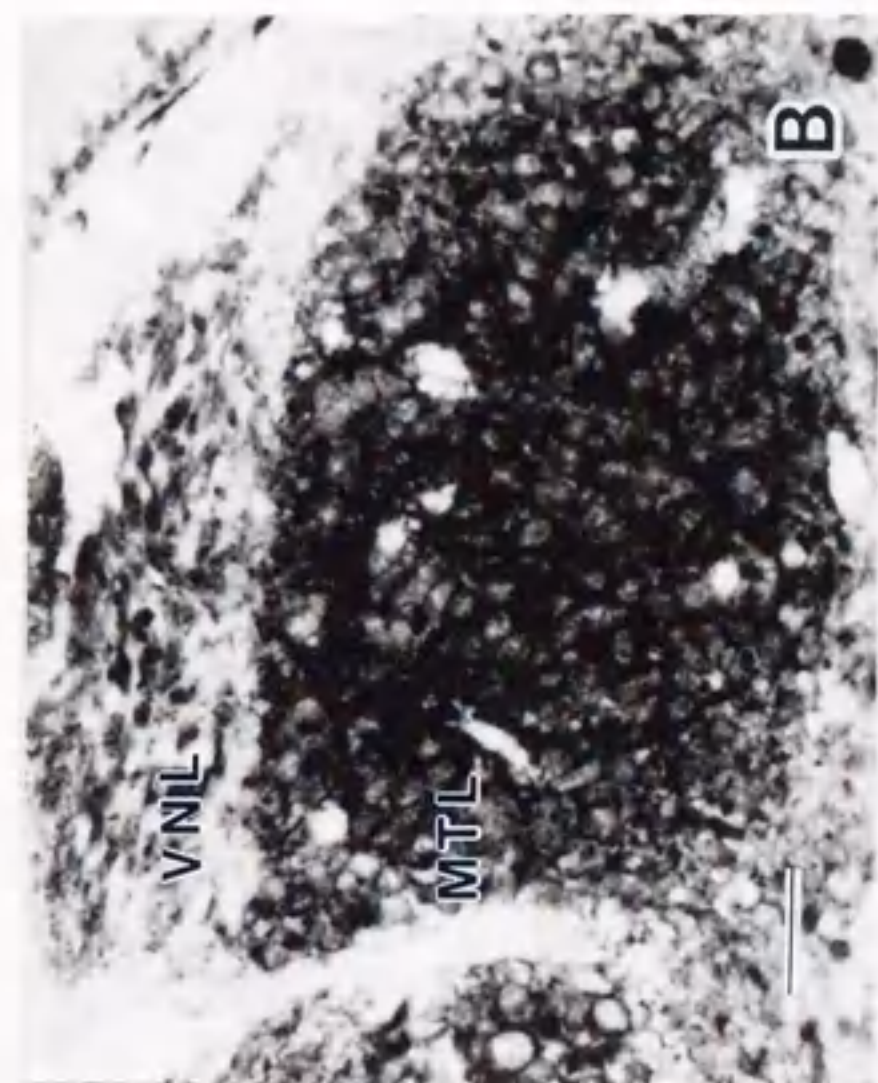
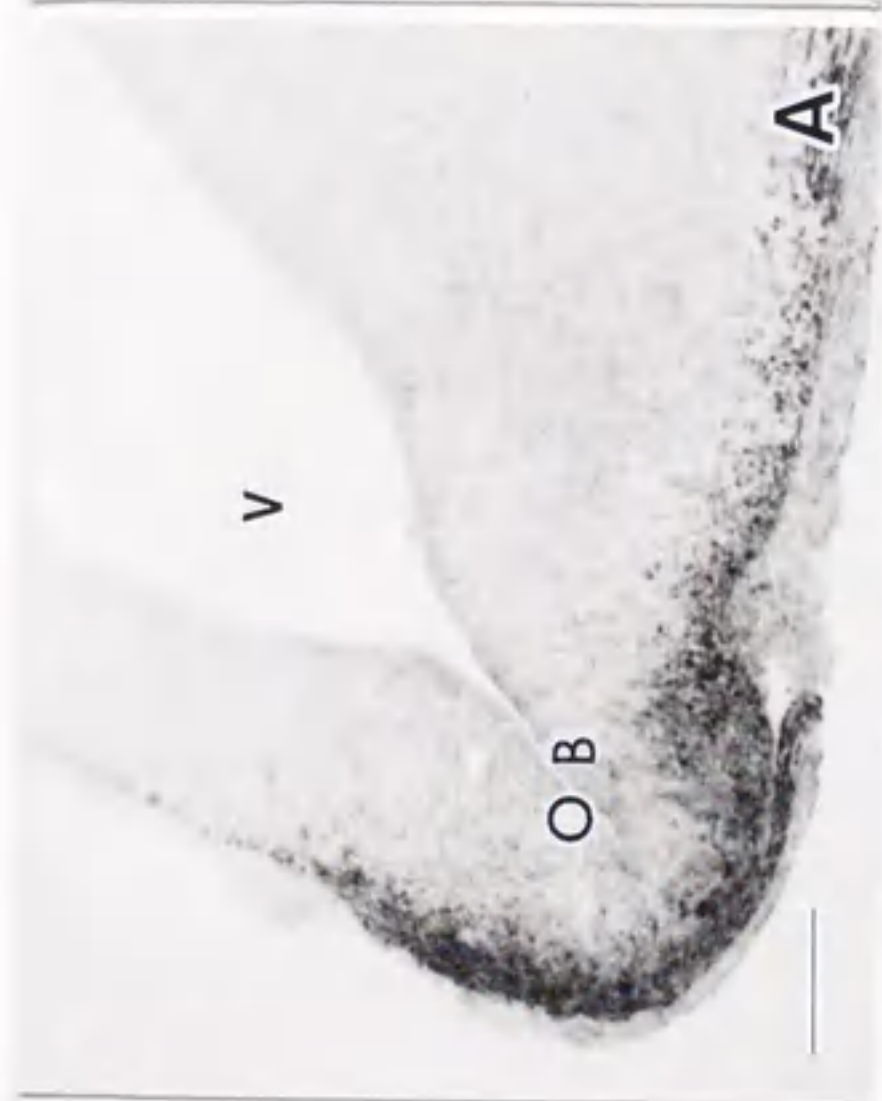
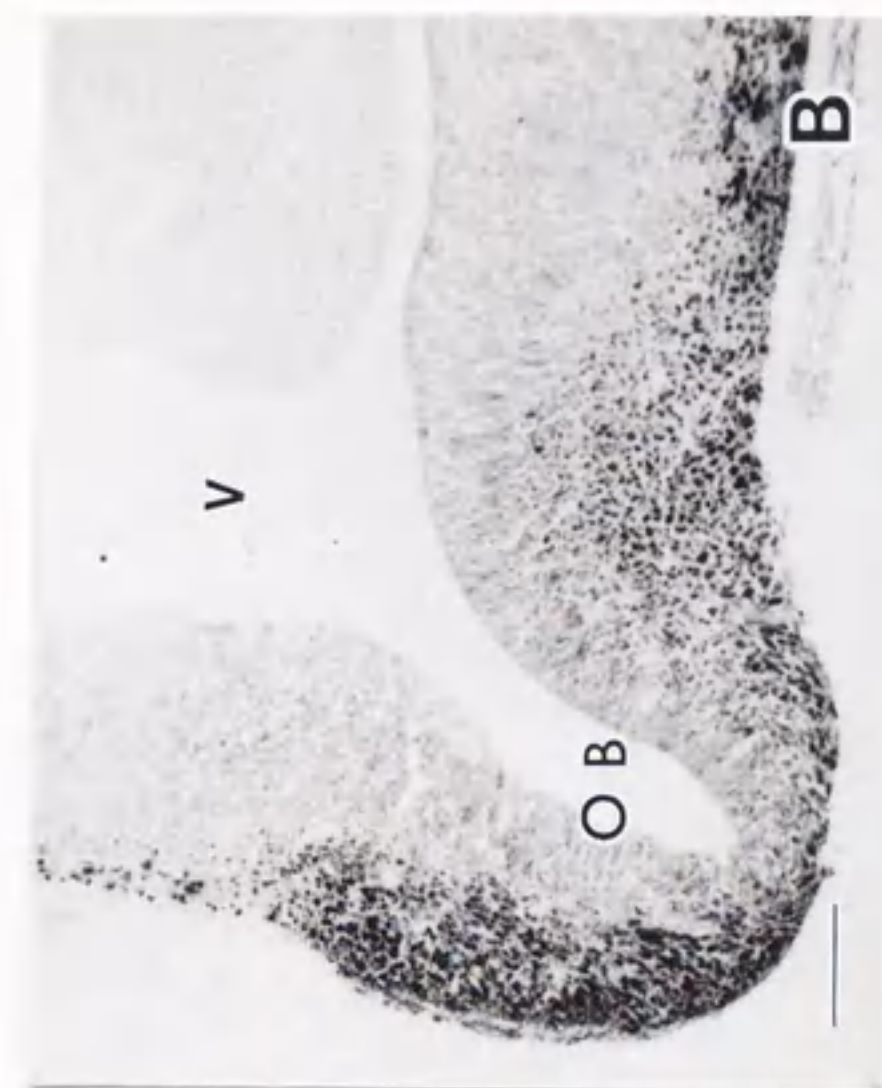


図 3-3. 酢酸アルコール液で固定した胎齡 11 日 (A) 、 12 日 (B) 、 13 日 (C) の嗅球における PGP 9.5 免疫染色陽性反応。酢酸を除いたブアン液で固定した胎齡 13 日 (D) の嗅球における PGP 9.5 免疫染色陽性反応。酢酸アルコール液で固定した嗅球では、PGP 9.5 免疫染色陽性反応は、表層に存在する未分化な細胞において胎齡 11 日からすでに検出された。

AOB: 副嗅球。MOB: 主嗅球。OB: 嗅球。V: 脳室。Bars = 100 μ m.



第4章

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) の鋤鼻神経系におけるレクチン組織化学的ならびに免疫組織化学的研究

材料と方法

組織標本：実験動物には、成熟したメスのコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) (300~400 g) 計6頭を用いた。動物には、ケタミン/キシラジンで麻酔を行い、酢酸を除いたブアン液で灌流固定を施した。灌流固定後、鋤鼻器および脳を採取し、同液にて24~36時間浸漬固定後、常法に従ってパラフィンに包埋した。包埋後、鋤鼻器は、5 μ m の前頭断切片とし、嗅球を含む脳は、5 μ m の矢状断あるいは水平断切片とした。パラフィン切片は、キシレンによる脱パラフィン後、レクチン組織化学および免疫組織化学的検索に用いた。

レクチン組織化学：本研究では、5種類のビオチン化レクチン (Vector, Burlingame, U.S.A.) を使用した。これらは、予備実験で、鋤鼻器に結合することが確認されたレクチンである。これらのレクチンの最適濃度および結合する特異糖については表4-1に示した。切片に各種レクチンを4℃で48時間反応させ、Vectastain ABC kit (Vector, Burlingame, U.S.A.) を用いて発色を行った。コントロール染色として、各種レクチンに対する特異糖とあらかじめ反応させたレクチンを切片に反応させた後に染色する方法と、レクチンの代わりにPBSあるいはウシ血清アルブミンを切片に反応させた後に染色する方法を行った。これらのコントロール染色では、特異的反応は認められなかった。

免疫組織化学：切片に抗ヒトPGP 9.5ポリクローナウサギ血清 (1:3,000) (UltraClone, Wellow, U.K.) を4℃で24~48時間反応させ、Vectastain ABC kit (Vector, Burlingame, U.S.A.) を用いて発色を行った。コントロール染色として、一次抗体の代わりに、非免疫ウサギ血清を用い、染色を行った。コントロール染色では、特異的反応は認められなかった。

結 果

鋤鼻器の形態

鋤鼻器は、鼻中隔の腹側基部に沿って左右対照的に走行する1対の細管で、鋤鼻軟骨によって囲まれている。図4-1は、鋤鼻神経に豊富に局在していることが示されているPGP 9.5 [37]に対する免疫組織化学を行ったコモンマーモセット鋤鼻器の組織切片である。多くの哺乳類では、鋤鼻器の管腔内側のみが、鋤鼻神経が分布する感覚上皮で裏打ちされている [1, 45, 69, 80, 84] が、コモンマーモセットでは、鋤鼻器管腔の全面が感覚上皮で裏打ちされていた (図4-1A) [83]。感覚上皮は、感覚細胞 (すなわち鋤鼻神経細胞体)、支持細胞、基底細胞から構成されていた (図4-1B)。粘膜固有層では、鋤鼻神経軸索束と鋤鼻器の付属腺であるヤコブソン腺が認められた (図4-1B)。ヤコブソン腺の導管は、感覚上皮を貫いて管腔に開口し、分泌物を感覚上皮の遊離縁に分泌していた。

レクチン結合パターン

レクチン反応の強弱の結果は、表4-2に示した。

Conavalia ensiformis (Con A) : Con Aの反応は、遊離縁には認められなかった。顆粒状の反応が、感覚細胞および基底細胞の細胞質全体ならびに支持細胞の核上部に認められた。鋤鼻神経の軸索には、反応は認められなかった。顆粒状の反応は、ヤコブソン腺の腺細胞にも認められた (図4-2A)。

Arachis hypogaea (PNA) : 遊離縁では、PNAの弱度の反応が認められた。本研究では、感覚細胞をPNAの結合パターンによって2つのサブグループに分類することができた。一方のサブグループでは、その核上部および樹状突起に顆粒状の反応が認められたが、他方のサブグループでは、PNAの反応は認められなかった。PNAが結合した感覚細胞は、感覚上皮内に散在していた。鋤鼻神経の軸索、支持細胞および基底細胞には、反応は認められなかった (図4-2B)。ヤコブソン腺の腺細胞群も、PNAの結合パターンによって2つのサブグループに分類することができた。一方のサブグループでは、分泌顆粒が貯留している核上部において、散在性の反応が認められたが、他方のサブグループでは、PNAに対する反応は認められなかった (図4-2F)。PNAが結合した腺細胞の分布パ

ターンには、部位的相違は認められなかった。

Succinylated triticum vulgaris (s-WGA) : 遊離縁では、s-WGA の強度の反応が認められた。感覚細胞および支持細胞では、顆粒状の反応が細胞体および樹状突起の細胞質で認められたが、特に核上部領域においてその反応が豊富に認められた。また、散在性の弱度の反応も、これらの細胞の細胞膜上で認められた。鋤鼻神経の軸索束では、散在性および顆粒状の反応が認められた。基底細胞では、顆粒状の反応が認められ、ヤコブソン腺の腺細胞では、核上部領域で散在性の反応が認められた (図 4-2C, 4-3A)。

Ulex europaeus-I (UEA-I) : 遊離縁では、UEA-I の強反応が認められた。鋤鼻神経、支持細胞および基底細胞では、細胞質全体および細胞膜上において、拡散性の強い反応が認められた。鋤鼻神経の軸索束でも同様の反応が認められた。ヤコブソン腺の腺細胞群は、UEA-I の結合パターンによっても2つのサブグループに分類された。一方のサブグループでは、細胞質および細胞膜において散在性の強い反応が認められたが、他方のサブグループでは、UEA-I の反応は認められなかった (図 4-2D, 4-3B)。UEA-I が結合した腺細胞の分布パターンには、部位的相違は認められなかった。

Vicia villosa (VVA) : 遊離縁では、VVA の中等度の反応が認められた。感覚細胞および支持細胞では、核上部において顆粒状の反応が認められた。基底細胞および鋤鼻神経の軸索には、反応は認められなかった。ヤコブソン腺の腺細胞では、核上部において散在性の反応が認められた (図 4-2E)。

以上、鋤鼻器においては、5種類のレクチンを使用して、その結合パターンを調べたが、感覚上皮における各レクチンの結合パターンに部位的相違は認められなかった。

副嗅球の位置および層構造 : 本研究では、使用したレクチンのうち、鋤鼻神経の軸索に最も豊富に結合したレクチンは UEA-I であったので、嗅球の切片において UEA-I を用いたレクチン組織化学染色により、コモンマーモセットの鋤鼻器から副嗅球への投射経路を同定した。嗅神経の軸索束および主嗅球の嗅系球においては、UEA-I の反応は弱度あるいは無反応であったので、鋤鼻神経の軸索束と嗅神経の軸索束は明瞭に区別することができた。鋤鼻神経軸索束は、篩骨篩板を貫き、主嗅

球に到達すると、主嗅球内側表層に沿って主嗅球を通り抜け、大脳皮質と嗅脚の間に進入し、嗅脚内で副嗅球の鋤鼻神経層および嗅糸球層を形成していた（図 4, 5A）。

齧歯類の副嗅球の僧帽/房飾細胞には、PGP 9.5 が豊富に局在していることが示されているので、コモンマーモセットの副嗅球の細胞構築ならびに層構造を調べるため、PGP 9.5 の分布を免疫組織化学的に検出した。抗 PGP 9.5 血清に対する免疫染色陽性反応は、鋤鼻神経軸索束、嗅糸球および嗅糸球層周囲に 1 もしくは 2 列に配列するニューロンで認められた（図 5B）。これらのニューロンは、卵円形で直径 9~17 μm であった。形態的特徴から判断すると、これらのニューロンは僧帽/房飾細胞であると思われたが、その数は、非常に少数であった。このため、コモンマーモセットの副嗅球では、齧歯類の副嗅球で認められるような発達した僧帽/房飾細胞層は認められなかった。従って、コモンマーモセットの副嗅球は、齧歯類と比較すると、層構造が単純化されており、その大部分を鋤鼻神経層と嗅糸球層が占めていた。コモンマーモセットの副嗅球の大きさは、齧歯類のそれと比較すると、はるかに小型で、短径 400~470 μm 、長径 530~540 μm であった。本研究では、表層から鋤鼻神経層、嗅糸球層および僧帽/房飾細胞層の 3 層を区別することができたが、齧歯類の副嗅球で認められる顆粒細胞層を同定することはできなかった。

考 察

コモンマーモセット鋤鼻器の遊離縁には、PNA、s-WGA、UEA-I および VVA が結合した。この結果から、遊離縁には、Gal β 1, 3 GalNAc, fucose, GalNAc および GlcNAc を含む複合糖質が存在していることが示唆される。これらのレクチンは、ヤコブソン腺の腺細胞において分泌顆粒が貯留している核上部にも結合したので、遊離縁においては、これらのレクチンは、主にヤコブソン腺からの分泌物に結合していると考えられる。一方、Con A の反応はヤコブソン腺の腺細胞に豊富に認められたにも拘わらず、遊離縁においてはその反応は認められなかった。Con A は、 α -マンノース残基の反復配列に結合する [19]。マンノース残基の存在は、アミノ酸のアスパラギンに結合する N-アセチルグルコサミン鎖を有する N 結合型糖鎖の存在を示唆する [27, 73]。N 結合型糖鎖は、粗面小胞体およびゴルジ装置で合成されるため [27, 73]、腺細胞で認められた Con A の顆粒状の反応は、主に粗面小胞体およびゴルジ装置で合成されている N 結合型糖鎖およびライソゾームに含まれる N 結合型糖鎖に対する反応であると思われる。Con A は、高マンノースオリゴサッカライドに強く結合する [19]。N 結合型糖鎖には高マンノース型以外にも、シアル酸化 N-アセチラクトースアミンを末端に有する複合型も存在するので [19]、N 結合型糖鎖を有する糖タンパクが、必ずしもコモンマーモセット鋤鼻器の遊離縁には分泌されていないということではない。コモンマーモセット鋤鼻器の遊離縁には、複合型の N 結合型糖鎖を有する糖タンパクが分泌されている可能性が考えられる。

鋤鼻神経では、各種レクチンは、それぞれ特有の反応性を示した。Con A の顆粒状の反応は、樹状突起および細胞体の細胞質で認められたが、この反応は、主に、粗面小胞体、ゴルジ装置およびライソゾームにおける N 結合型糖鎖を有する糖タンパクの存在を反映していると考えられる [27, 73]。PNA が強く結合する Gal β 1, 3 GalNAc 末端鎖は、O 結合型糖鎖で認められる [19]。O 結合型糖鎖は主としてゴルジ装置で合成されるので [27]、核上部で認められた PNA の顆粒状の反応は、ゴルジ装置内でタンパクに付加された Gal β 1, 3 GalNAc の存在を、樹状突起で認められた PNA の顆粒状の反応は、ゴルジ装置から樹状突起に輸送された糖タンパクの Gal β 1, 3 GalNAc の

存在を、それぞれ反映していることが考えられる。VVAの顆粒状の反応は、核上部のみで認められた。この反応は、ゴルジ装置において合成の途中にある糖鎖の α -あるいは β -GalNAc末端鎖の存在を反映しているのかもしれない。s-WGAおよびUEA-Iの反応は、細胞体および樹状突起だけではなく、軸索にも認められた。Pesteanらは、ラット嗅神経および鋤鼻神経において、UEA-Iは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子の1種であるNCAMに結合することを示唆している[66]。近年、OCAM、Thy-1、TAG-1およびBIG-2などの他のイムノグロブリンスーパーファミリー分子も嗅神経および鋤鼻神経において発現していることが明らかにされ、これらの分子が、嗅神経および鋤鼻神経の軸索の伸長に重要な役割を果たしていることが示唆されている[99, 100, 101]。これらの分子は、糖鎖を有しているので[99, 100, 101]、コモンマーモセット鋤鼻神経軸索で認められたs-WGAおよびUEA-Iの反応は、ある種のイムノグロブリンスーパーファミリー分子の存在を反映しているのかもしれない。

ラットおよびマウスでは、s-WGAおよび*Dolichos biflorus* agglutininの結合パターンによって鋤鼻神経のサブグループの存在が示されている[50, 80]。コモンマーモセットでは、PNAの結合パターンによって鋤鼻神経の2つのサブグループの存在が示された。一方は、末端がGal β 1, 3 GalNAcである糖鎖を持つ複合糖質を有するサブグループであり、他方は、それを有していないサブグループである。シアル酸を除去するノイラミニダーゼ処理を行うと、PNAの反応が増加するという報告があるので[50]、後者のサブグループの一部は、末端から順に、シアル酸→Gal β 1, 3 GalNAcという構造をとる糖鎖を持つ複合糖質を有している可能性が考えられる。推定上のフェロモンレセプター、ある種の細胞接着分子あるいはGタンパクの発現に関する最近の研究により、ラットおよびマウスでは、鋤鼻器の感覚上皮の中間層と深層ではその発現パターンに相違のあることが認められ、感覚細胞が、機能的に異なる2つのサブグループとして、感覚上皮の中間層と深層に分かれて分布していることが示唆されている[17, 36, 100]。コモンマーモセット鋤鼻器では、PNAが結合した感覚細胞は感覚上皮に散在していた。また、他のレクチンの反応性については、感覚上皮の中間層と深層間で明確な相違は認められなかった。従って、本研究では、機能的相違がある2つの感

覚細胞サブグループが感覚上皮の中間層と深層に分かれて分布していることを示唆する結果を得ることはできなかった。また、コモンマーモセットでは、他の多くの哺乳類とは異なり、鋤鼻器管腔は、感覚上皮のみで裏打ちされているので [1, 45, 69, 83, 84, 85]、内側と外側の感覚上皮間で機能的相違がある可能性が考えられる。しかしながら、本研究では、それらの間における機能的相違を示唆する結果を得ることはできなかった。

支持細胞では、PNAを除いた全てのレクチンが、感覚細胞で認められたのとほぼ同様な結合パターンを示した。PNAの反応は、いずれの支持細胞においても認められなかったので、支持細胞において発現するほとんど全てのO結合型糖鎖は、その末端をシアル酸で覆われているのかもしれない [50]。

基底細胞のレクチン結合パターンと感覚細胞のそれを比較すると、PNAとVVAの結合パターンにおいて、相違が認められた。基底細胞は、鋤鼻神経細胞の幹細胞であるので [93]、本研究結果は、鋤鼻神経細胞の成熟過程において発現する糖鎖が何らかの修飾を受けることを示唆している。

ラットでは、ヤコブソン腺の腺細胞は、*Bandeirae simplicifolia* I-B₄ isoelectin および *Dolichos biflorus* agglutinin の結合パターンによっていくつかのサブグループに分けられることが示されている [80]。コモンマーモセットでは、PNAおよびUEA-Iの結合パターンによってヤコブソン腺の腺細胞をそれぞれ2つのサブグループに分けることができた。これらの研究結果により、ヤコブソン腺の各腺細胞ごとで、産生される粘液の種類に相違のあることが示唆される。

コモンマーモセットの副嗅球の存在は、Stephanによって報告されているが [77]、その位置および構造に関する詳細な報告はなされていない。本研究では、UEA-Iを用いたレクチン組織化学法により、コモンマーモセット鋤鼻神経軸索の副嗅球への投射経路および副嗅球の位置を同定するとともに、PGP 9.5に対する免疫組織化学法により、僧帽/房飾細胞の分布を明瞭に示した。

コモンマーモセットの副嗅球は、その大部分を、鋤鼻神経層と嗅糸球層で占められており、一見すると鋤鼻神経層と嗅糸球層が非常に発達しているように見えた。しかしながら、齧歯類と比較すると、その幅ははるかに狭い。鋤鼻神経層と嗅糸球層は主に、鋤鼻神経の軸索によって形成される

ので [33, 52, 58]、本研究結果から、コモンマーモセット鋤鼻器に分布する鋤鼻神経細胞の数は、齧歯類のそれよりもはるかに少ないことが示された。

齧歯類の副嗅球では、嗅系球の下層において多数の僧帽/房飾細胞が集積し、発達した僧帽/房飾細胞層を形成している [5, 52, 58, 63, 87]。コモンマーモセットの副嗅球における僧帽/房飾細胞の数は、齧歯類と比較すると、非常に少数である。主嗅覚系では、嗅上皮において同種の匂いレセプターを発現している嗅神経は、その軸索を主嗅球の左右一对の特定の嗅系球に投射しており、これらの嗅系球に対して、それぞれ1つの僧帽細胞あるいは房飾細胞が1本の樹状突起を伸長し、これらの嗅神経からの情報を受け取っている [8, 52, 58]。鋤鼻神経系の投射パターンについては、現在のところ、十分な解明には至っていないが、おそらく主嗅覚系と類似した投射パターンを有していると考えられる。これらのことから、齧歯類と比較すると、コモンマーモセットでは、鋤鼻器に分布する鋤鼻神経の数だけでなく、フェロモン分子に対するレセプターの種類も少ないことが推測される。

齧歯類の副嗅球では、その最深層において多数の顆粒細胞が密集し、発達した顆粒細胞層を形成している [5, 7, 11, 42, 54, 79]。本研究では、コモンマーモセットの副嗅球において、顆粒細胞層を同定することはできなかった。しかし、PGP 9.5は、主嗅球および副嗅球の顆粒細胞では検出されない [63, 87]、コモンマーモセットの副嗅球において、顆粒細胞が存在しないとは言えない。齧歯類およびハリネズミの副嗅球の顆粒細胞では、NOS免疫反応およびNADPH-diaphorase反応が豊富に認められることが示されているので [4, 7, 11, 42]、今後、NOSに対する免疫組織化学法あるいはNADPH-diaphoraseに対する酵素組織化学法を利用することにより、コモンマーモセットの副嗅球の顆粒細胞の分布パターンを明瞭に示すことができるかもしれない。

表4-1. 本研究で使したレクチンの種類、濃度および特異糖

Source of lectin	Common name (abbreviation of lectin)	Concentration (mg/ml)	Specific sugar	Inhibitory sugar
<i>Canavalia ensiformis</i>	Jack bean (Con A)	5.56×10^{-5}	α -Mannose	0.4 M α -D-Mannose
<i>Arachis hypogaea</i>	Peanut (PNA)	6.67×10^{-4}	Terminal Gal β 1, 3 GalNAc	0.4 M Gal
<i>Triticum vulgare</i> ; succinylated	Succinylated wheat germ (s-WGA)	1.66×10^{-3}	Terminal and internal β -GlcNAc	0.4 M β -GlcNAc
<i>Ulex europaeus</i>	Gorse (UEA-I)	4.00×10^{-3}	Terminal α -Fucose	0.4 M α -Fucose
<i>Vicia villosa</i>	Hairy vetch (VVA)	8.33×10^{-4}	Terminal α -, β -GalNAc	0.4 M GalNAc

GlcNAc: N-acetylglucosamine. GalNAc: N-acetylgalactosamine. Gal: D-galactose.

表 4-2. コモンマーモセット鋤鼻器におけるレクチン結合パターン

	Con A	PNA	s-WGA	UEA-I	VVA
Free border	-	+	+++	+++	++
Receptor cell					
Dendrite	++	^a +	+	++	-
Cell body	+++	^a +	++	+++	+
Axon	-	-	++	+++	-
Supporting cell	++	-	++	++	+
Basal cell	+	-	++	++	-
Gland	+++	^a ++	+++	^a +++	++

+++ : 強度. ++ : 中等度. + : 弱度. - : 陰性. a : 一部の細胞.

図および付図説明

図 4-1. コモンマーモセット鋤鼻器における PGP 9.5 免疫染色陽性反応。PGP 9.5 免疫染色陽性反応が認められる感覚上皮が、鋤鼻器管腔の全面を裏打ちしている (A)。感覚上皮は、PGP 9.5 免疫染色陽性を示す感覚細胞、免疫陰性の支持細胞および基底細胞から構成されていた (B)。粘膜固有層では、PGP 9.5 免疫陽性を示す鋤鼻神経軸索束 (矢印) と付属腺であるヤコブソン腺 (星印) が認められた。 Bars = 50 μ m.

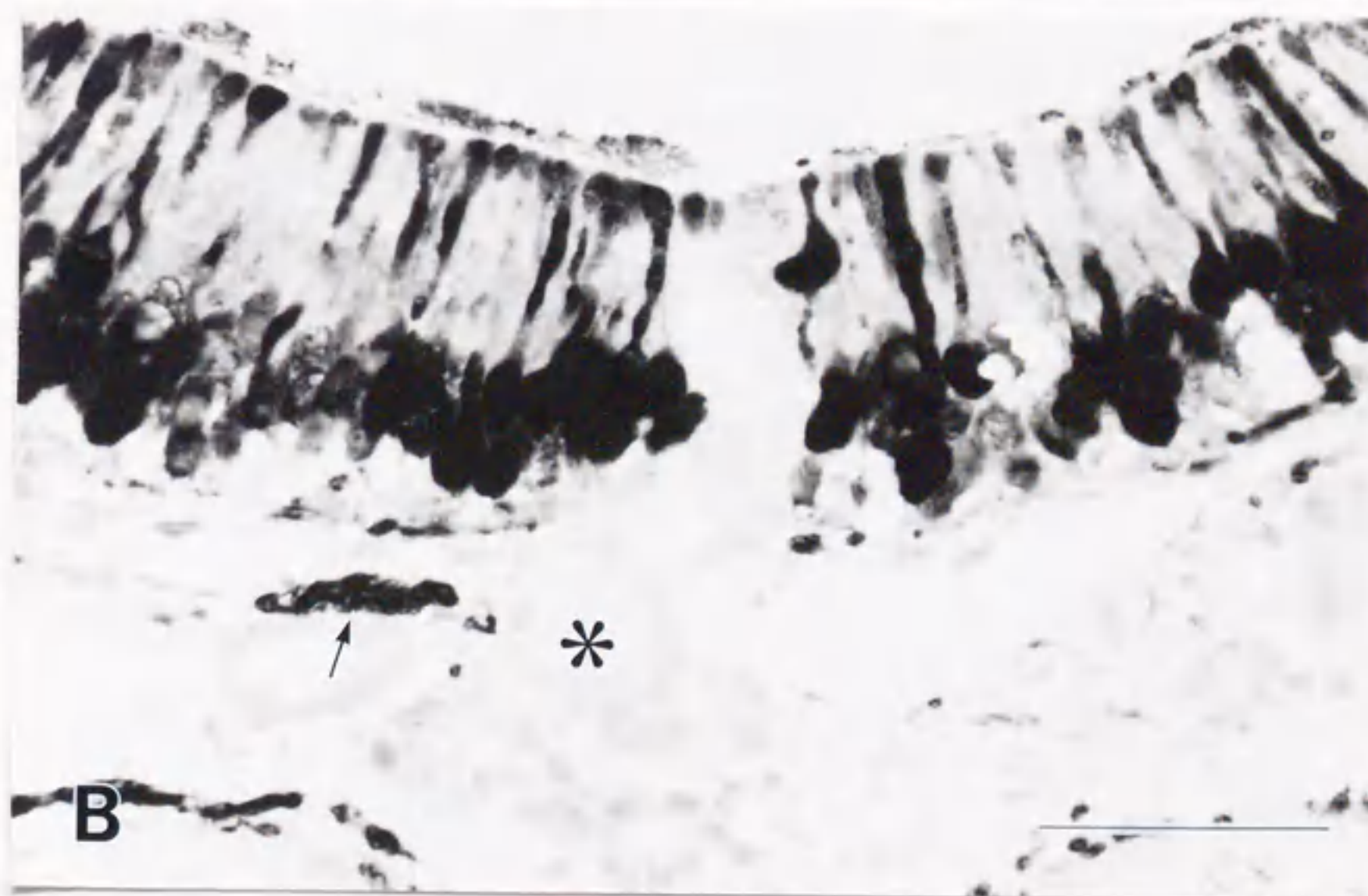
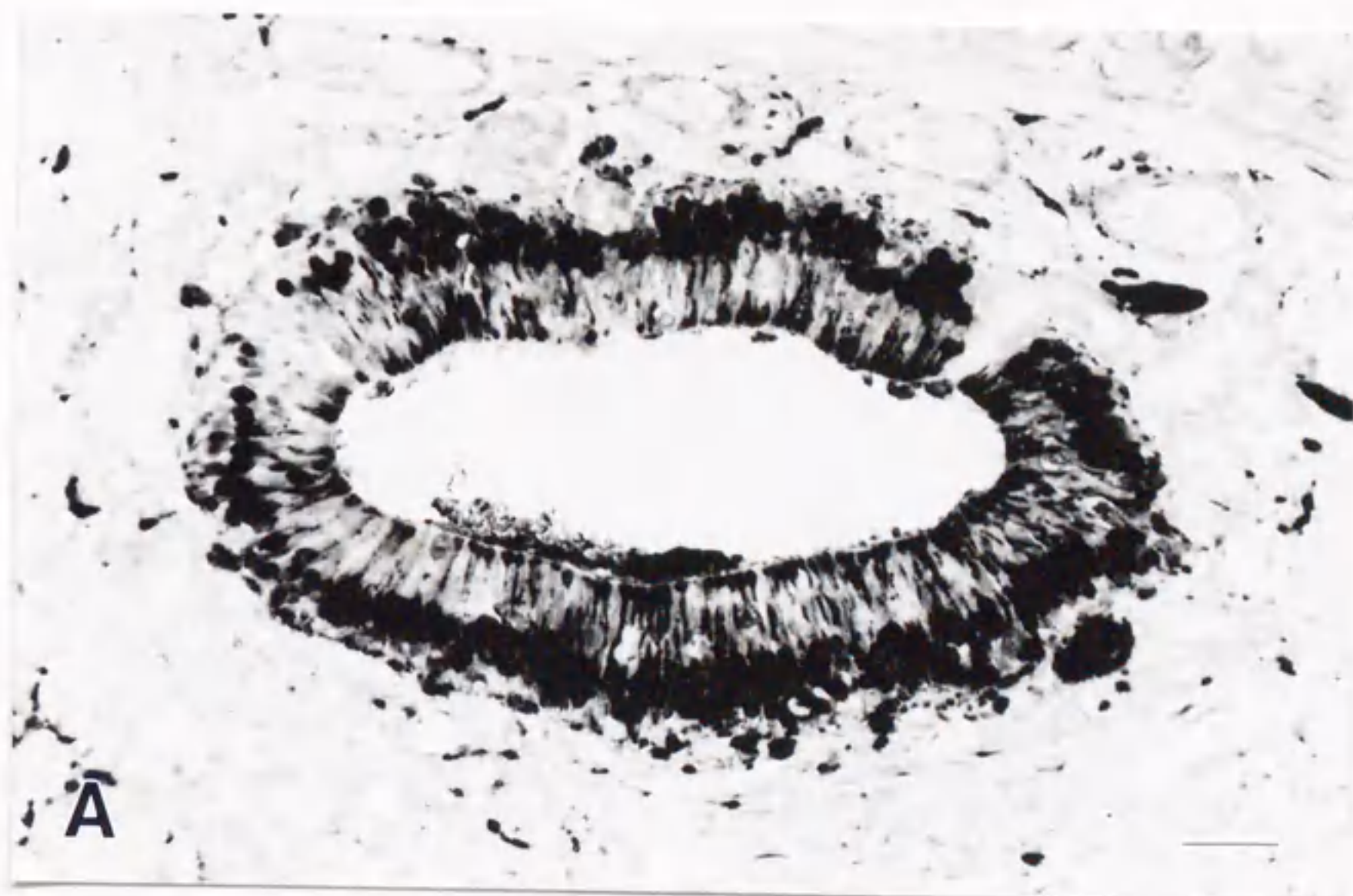


図4-2. コモンマーモセット鋤鼻器における Con A (A) 、 PNA (B) 、 s-WGA (C) 、 UEA-I (D) および VVA (E) の結合パターン。鋤鼻器の遊離縁には、PNA、s-WGA、UEA-I および VVA が結合した (B, C, D, E) 。Con A、s-WGA、UEA-I および VVA は、ほとんど全ての感覚細胞および支持細胞に結合したが (A, C, D, E) 、PNA は、少数の感覚細胞のみに結合した (B) 。Con A、s-WGA および VVA は、ほとんど全ての腺細胞に結合したが (A, C, E) 、PNA および UEA-I は、一部の腺細胞のみに結合した (D, F) 。矢印：鋤鼻神経軸索。星印：ヤコブソン腺。Bar = 25 μ m.

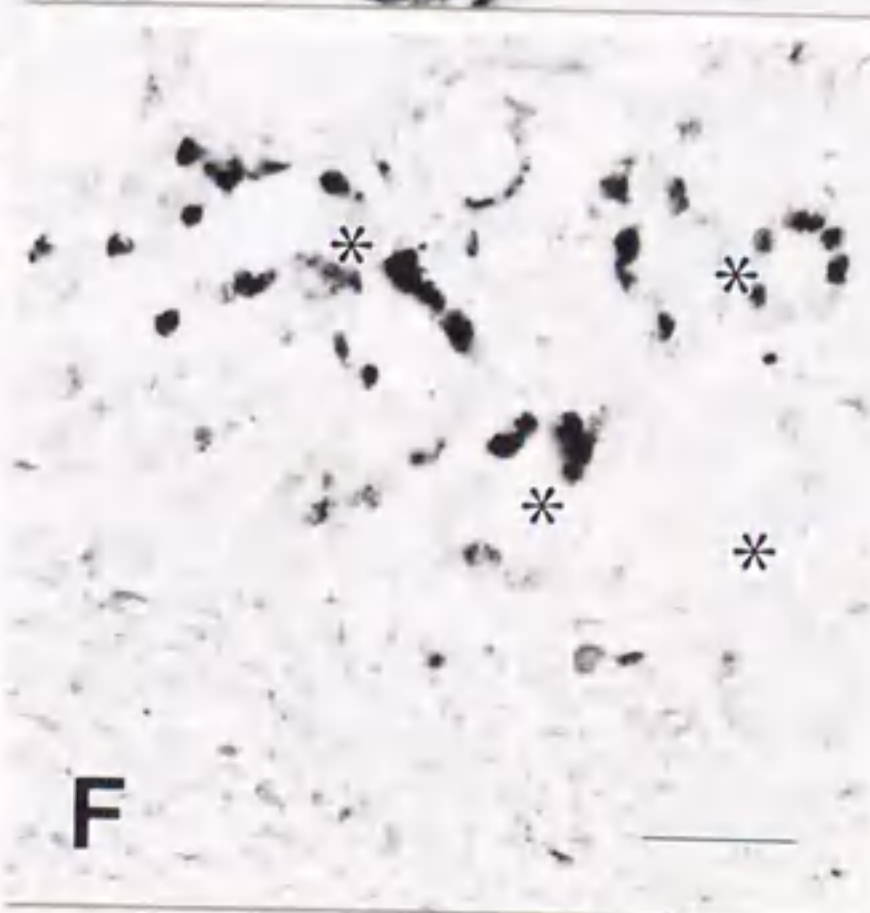
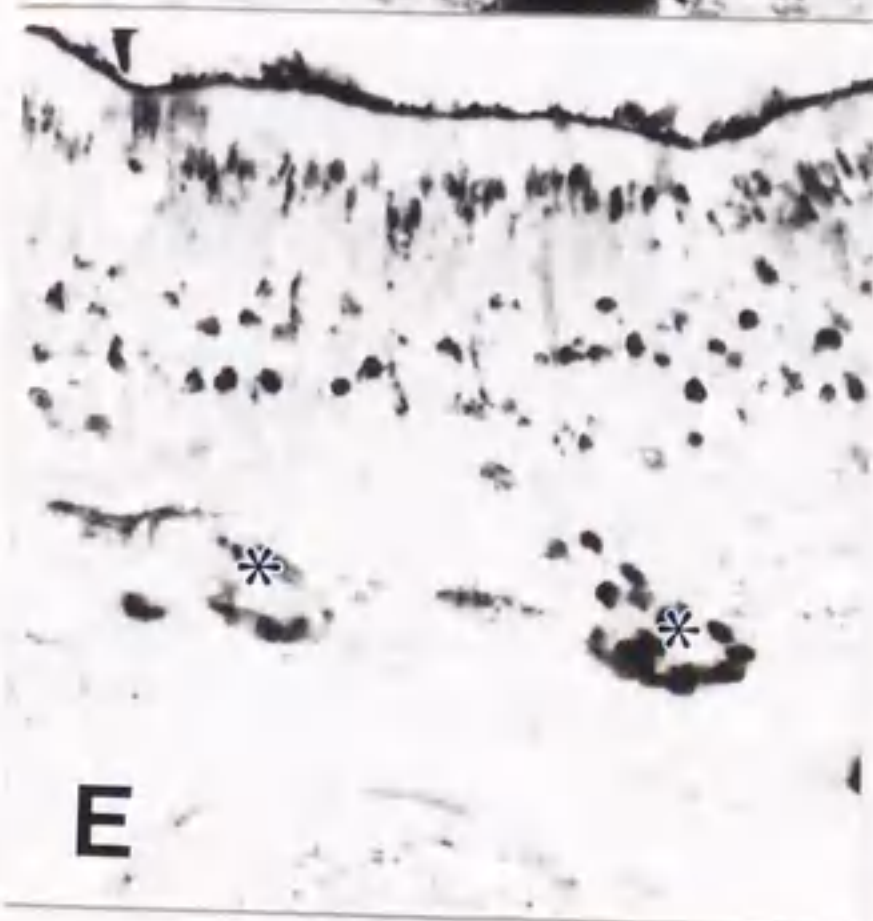
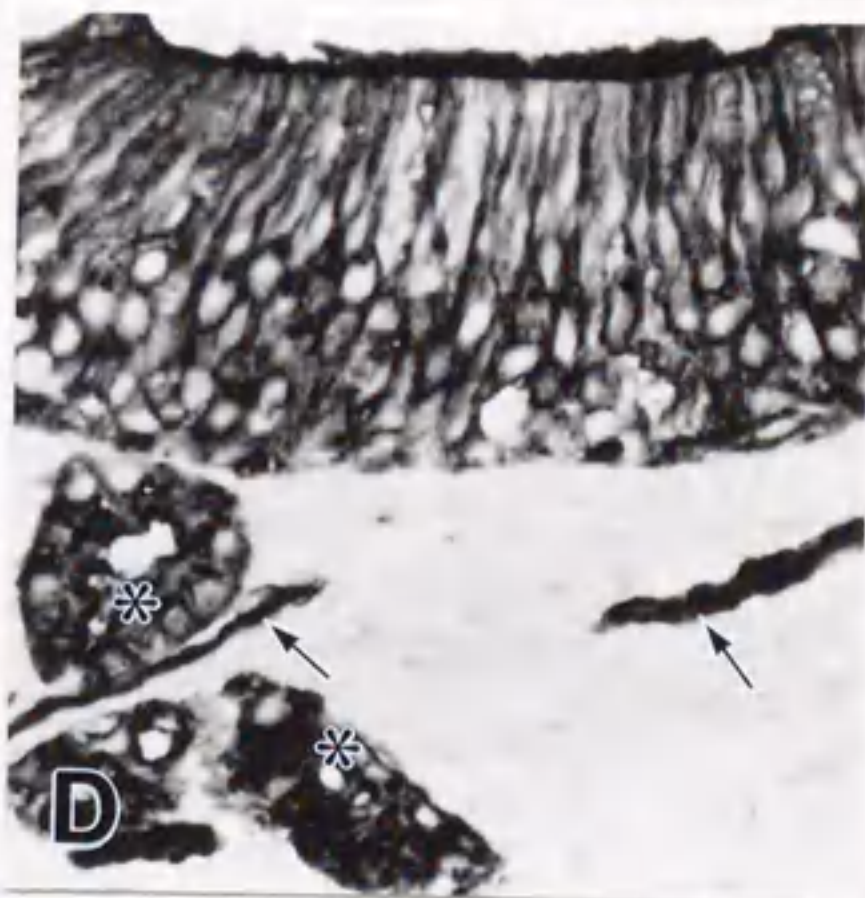
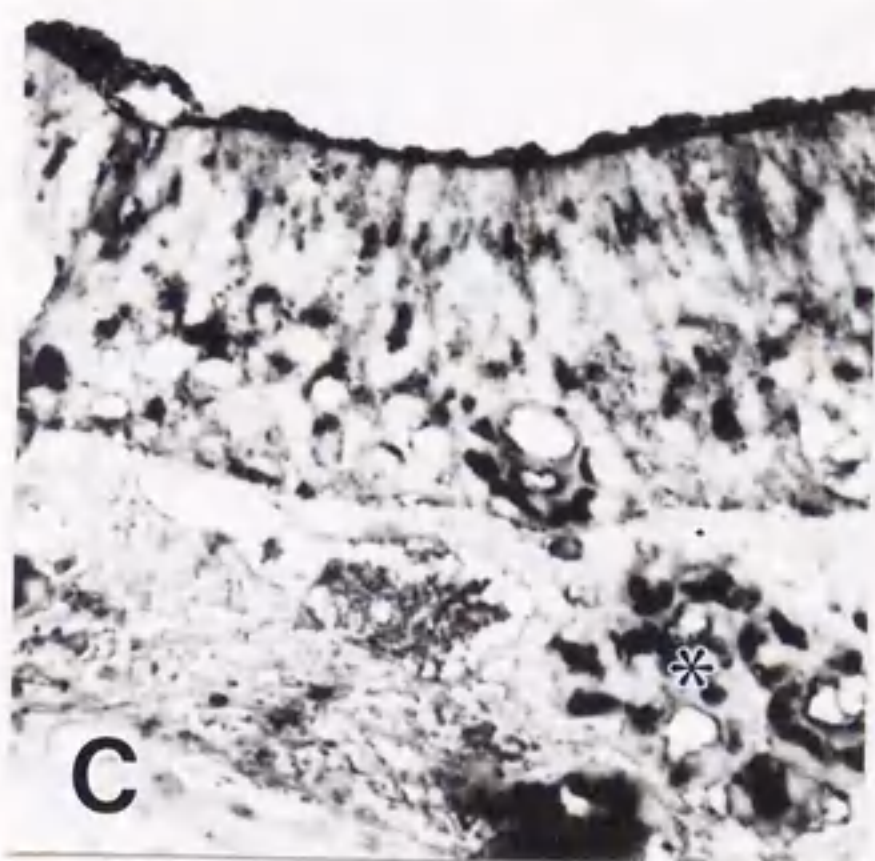
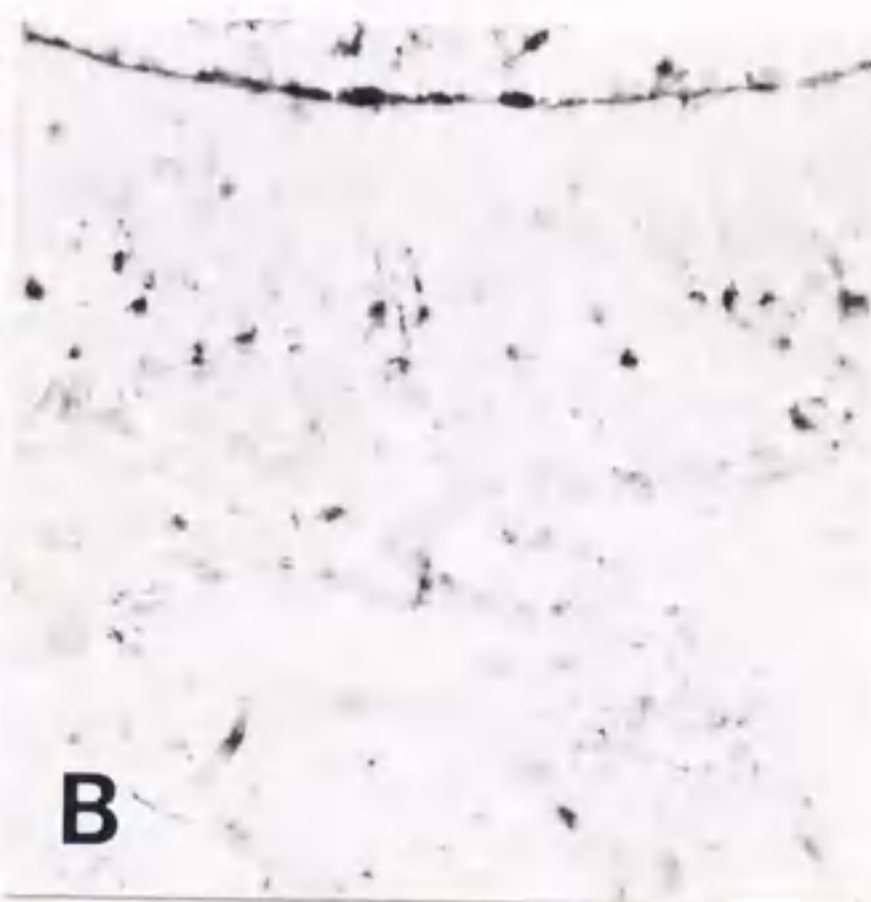
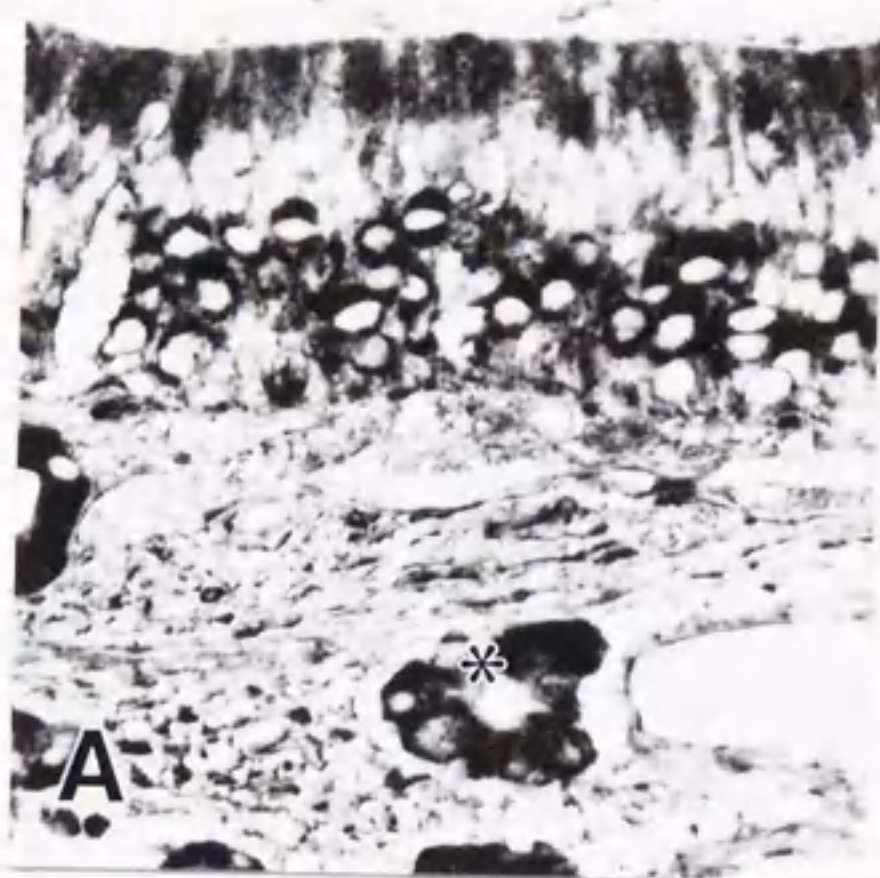
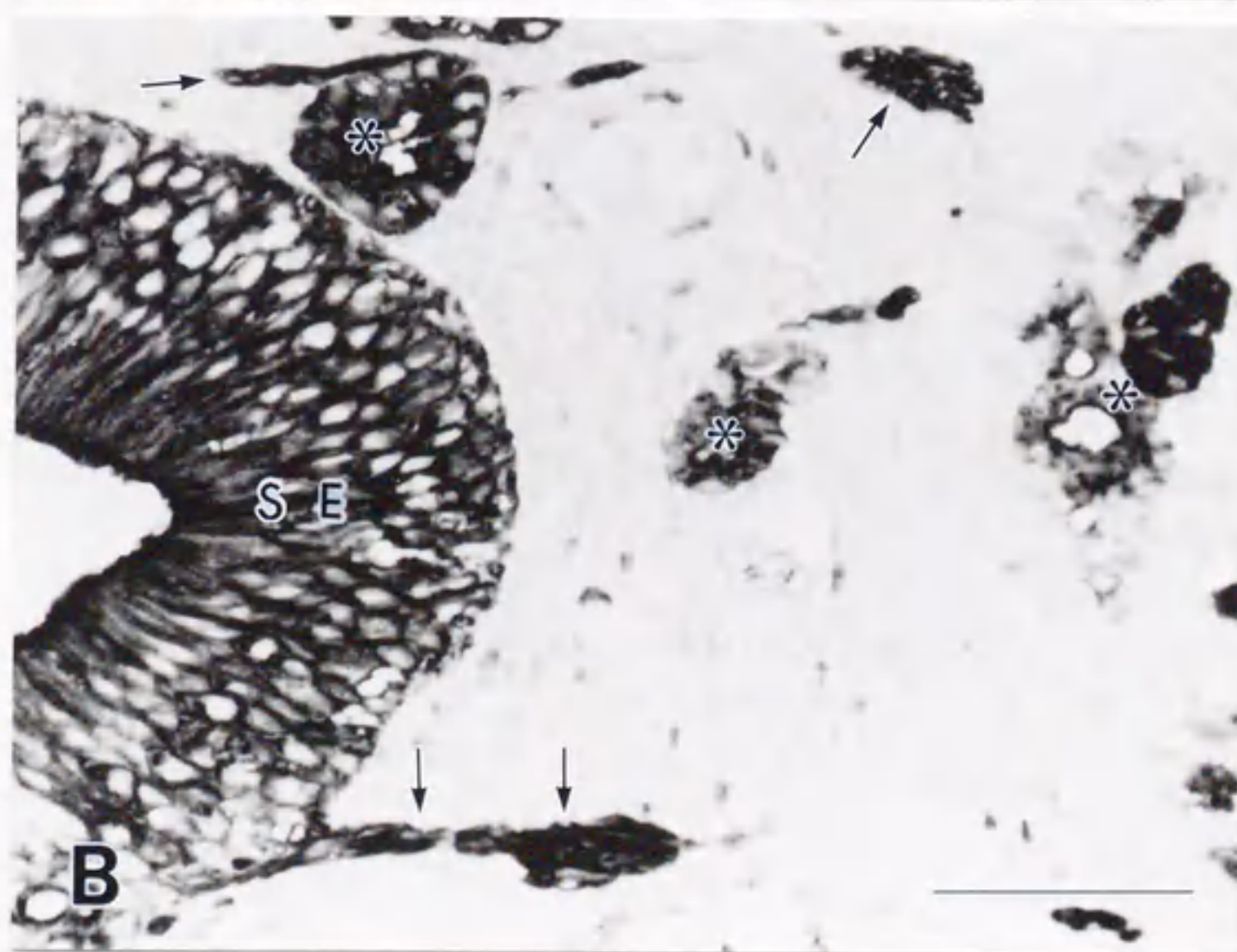
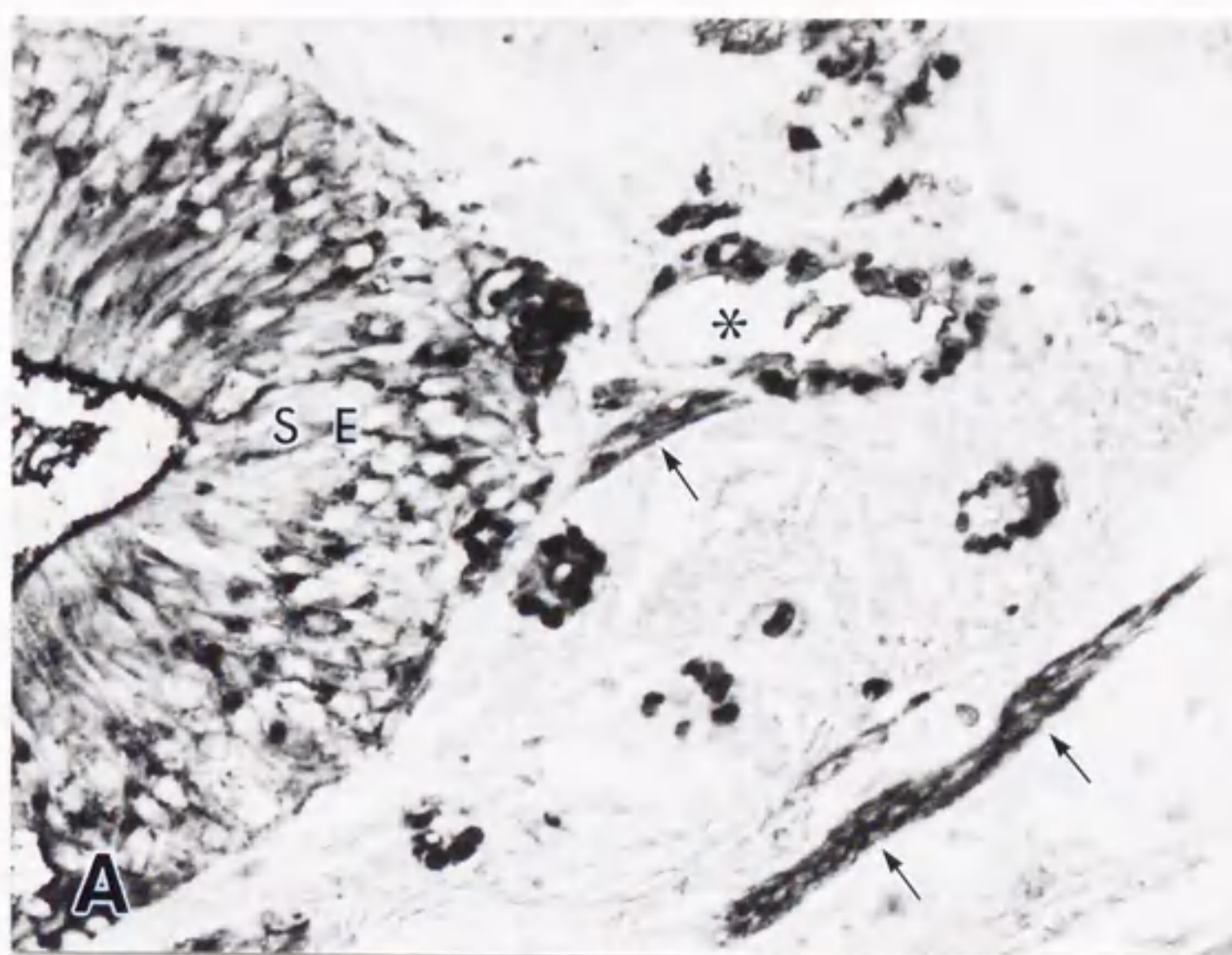


図 4-3. 鋤鼻器における s-WGA (A) および UEA-I (B) の結合パターン。s-WGA および UEA-I は、感覚細胞、支持細胞、基底細胞およびヤコブソン腺以外に、鋤鼻神経軸索にも結合した。SE：感覚上皮。星印：ヤコブソン腺。矢印：鋤鼻神経軸索。Bar = 50 μ m.



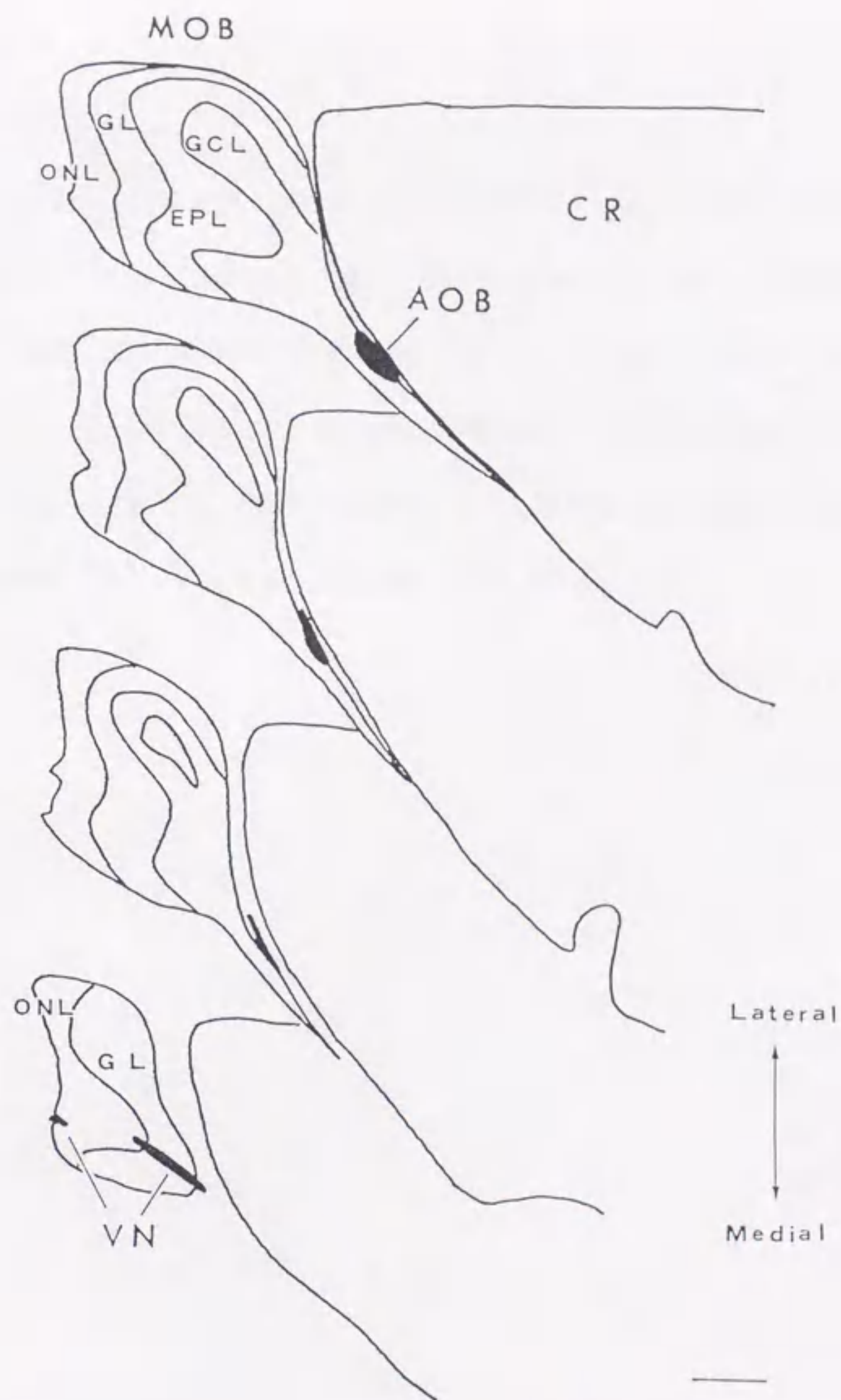
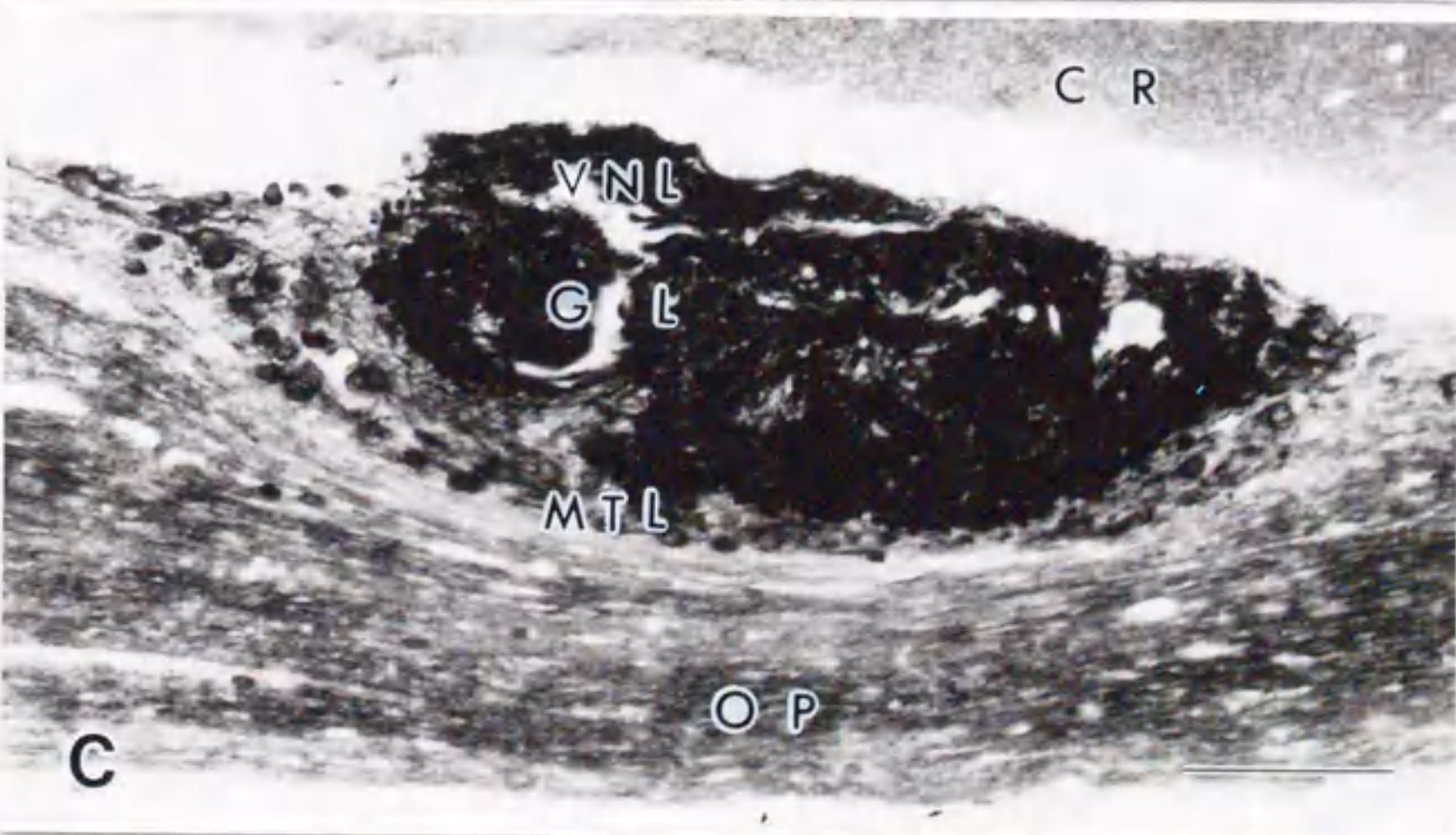
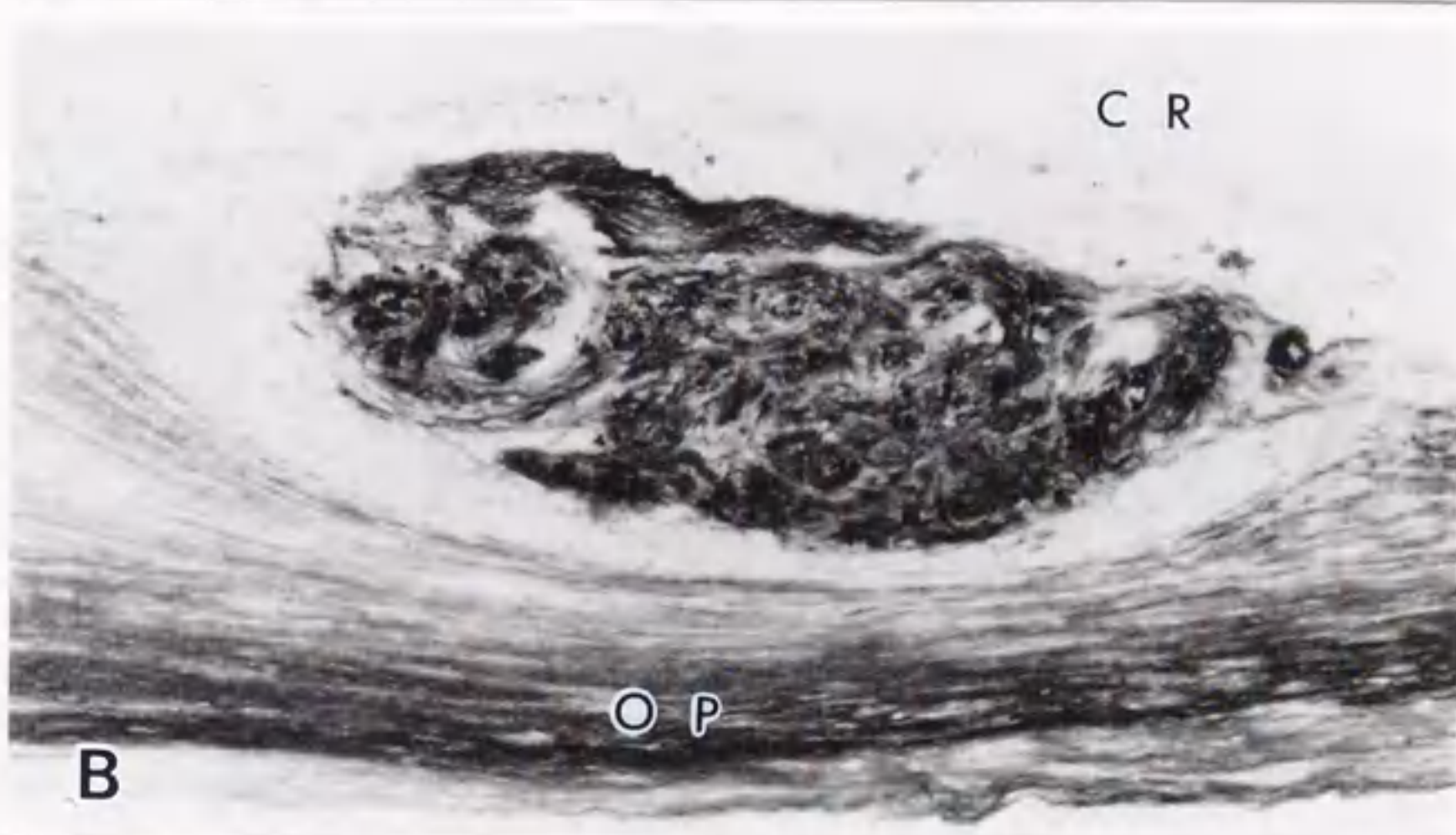
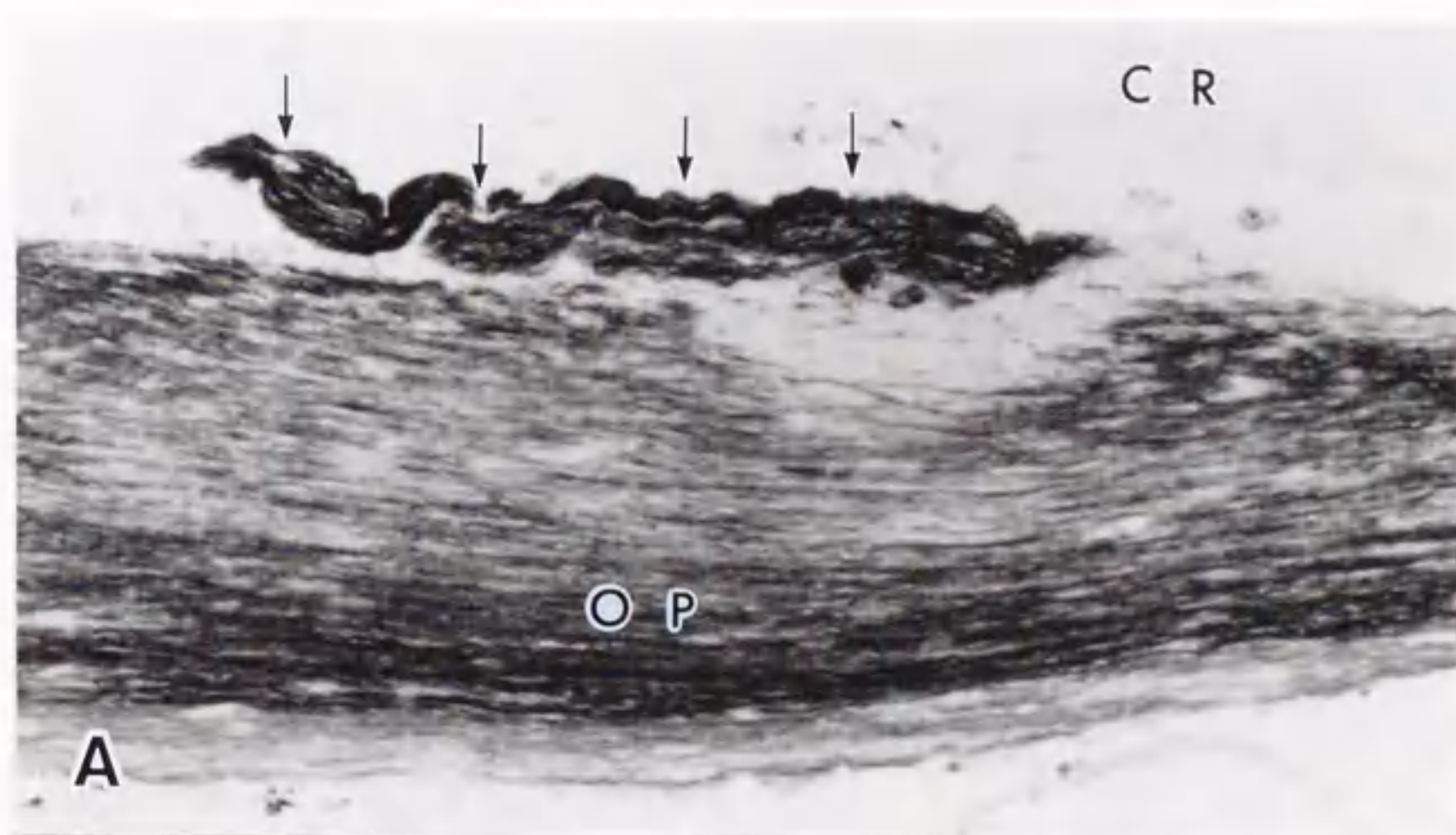


図 4-4. コモンマーモセットの鋤鼻神経軸索のトレース図。鋤鼻神経軸索は、篩骨篩板を貫き、主嗅球に到達すると、主嗅球の内側表層に沿って主嗅球を通り越し、大脳皮質と嗅脚の間に入し、嗅脚内で副嗅球の鋤鼻神経層および嗅糸球層を形成していた。VN：鋤鼻神経軸索。MOB：主嗅球。ONL：嗅神経層。GL：嗅糸球層。EPL：外網状層。GCL：顆粒細胞層。AOB：副嗅球。CR：大脳皮質。Bar = 1 mm.

図 4-5. コモンマーモセット副嗅球における UEA-I の結合パターン (A, B) および PGP 9.5 免疫染色陽性反応 (C)。主嗅球を通り抜け、嗅脚と大脳皮質の間に進入した鋤鼻神経軸索束は (矢印)、嗅脚において副嗅球の鋤鼻神経層 (VNL) および嗅糸球層 (GL) を形成した。コモンマーモセット副嗅球では、少数の僧帽/房飾細胞が嗅糸球層の周囲を取り巻くように分布していた。本研究では、表層から鋤鼻神経層、嗅糸球層および僧帽/房飾細胞層 (MTL) が区別できた。OT: 嗅脚。CR: 大脳皮質。Bar = 100 μ m.



第5章

結 論

哺乳類の嗅覚系には主嗅覚系（嗅上皮-主嗅球系）と副嗅覚系（鋤鼻器-副嗅球系）の2系統が存在し、前者は一般的な匂い、後者はフェロモン様物質などを知覚すると考えられている。しかし、それぞれの嗅覚系の情報伝達機構の詳細については、いまだ不明な点が多数残されている。そこで、本研究では、嗅覚系情報伝達機構の分子および細胞レベルの構築を詳細に解明するために、以下のような検索を行った。

第2章では、ハムスターの嗅球の短軸索細胞に局在する神経伝達物質、神経特異的タンパク質および一酸化窒素合成酵素（NOS）を免疫組織化学的に検出した。また、NOSと同一であるとされるNADPH-diaphoraseの活性を酵素組織化学的に検出した。主嗅球では、嗅糸球層において、neuropeptide Y（NPY）、NOS、NADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が、外網状層において、vasoactive intestinal polypeptide（VIP）陽性の短軸索細胞が、顆粒細胞層において、NPY、somatostatin（SOM）、protein gene product 9.5（PGP 9.5）、NOS、NADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が認められた。一方、副嗅球では、僧帽/房飾細胞層において、VIPおよびPGP 9.5陽性の短軸索細胞が、顆粒細胞層において、NPY、SOM、NOS、NADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が認められた。以上の結果は、NPY、SOM、VIP、PGP 9.5、NOS、NADPH-diaphorase陽性の短軸索細胞が、主嗅球、副嗅球のいずれにも分布していることを示している。また、同じ反応性を示す各種類の短軸索細胞は主嗅球あるいは副嗅球のいずれに分布していようとも、同様の役割を果たしている可能性が高い。従って、主嗅球および副嗅球には、これらの細胞に関わる共通の情報伝達機構が存在すると考えられる。

第3章では、発生過程のハムスター嗅球におけるPGP 9.5を免疫組織化学的に検出し、その発現パターンを観察するとともに、PGP 9.5を各種ニューロンのマーカーとして、主嗅球および副嗅球の発生過程を観察した。PGP 9.5に対する免疫染色性は、胎齢13日から嗅神経線維束、鋤鼻神経線維束および未分化のニューロンにおいて検出された。PGP 9.5に対する免疫染色性のパターンは、

主嗅球では、生後7日で、副嗅球では、生後15日で成体とほぼ同様となった。従って、PGP 9.5に対する免疫染色により、短軸索細胞は、僧帽細胞、房飾細胞および僧帽/房飾細胞と同様、胎生期に分化すること、主嗅球では、樹状突起の伸長、嗅糸球の形成および層構造の完成は、副嗅球よりも早期に認められることが明らかとなった。また、PGP 9.5は、細胞内のタンパク質代謝経路に関与するユビキチンのC末端加水分解酵素に相当し、発生の早期段階から発現することから、嗅球の各種ニューロンの機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

第4章では、新世界ザルの1種であるコモンマーモセットの鋤鼻器における各種糖鎖の分布を理解するため、レクチン組織化学的手法を用いて、その鋤鼻器におけるレクチン結合パターンを調べた。さらに、使用したレクチンのうち鋤鼻神経軸索に豊富に結合したレクチンを用いて、鋤鼻器から副嗅球への投射経路を同定するとともに、PGP 9.5をマーカーとして、副嗅球の細胞構築を調べた。その結果、Con A、s-WGA、UEA-IおよびVVAの結合パターンから、ほとんど全ての鋤鼻神経において、mannose、GalNAc、fucose および GlcNAc が分布していることが示唆された。これに対し、PNAは、少数の鋤鼻神経のみに結合したので、鋤鼻神経細胞群は、Gal β 1, 3 GalNAc 末端鎖を有する複合糖質を含む鋤鼻神経サブグループとそれを含まない鋤鼻神経サブグループとに分けられることが示唆された。一方、鋤鼻神経軸索に最も豊富に結合したUEA-Iを用いて、レクチン組織化学法により鋤鼻器から副嗅球への投射経路を同定したところ、鋤鼻神経軸索束は、篩骨篩板を貫き、主嗅球に到達すると、その内側表層に沿って主嗅球を通り越し、大脳皮質と嗅脚の間に進入し、嗅脚内で副嗅球の鋤鼻神経層および嗅糸球層を形成していた。副嗅球では、PGP 9.5陽性反応は、鋤鼻神経層における鋤鼻神経軸索束、嗅糸球層における嗅糸球および僧帽/房飾細胞において認められた。従って、コモンマーモセットの副嗅球は、表層から鋤鼻神経層、嗅糸球層、僧帽/房飾細胞層の3層に分けることができたが、顆粒細胞層の存在については、明らかにすることはできなかった。鋤鼻神経層と嗅糸球層は主に、鋤鼻神経の軸索によって形成されるので、コモンマーモセット鋤鼻器に分布する鋤鼻神経細胞の数は、齧歯類のそれよりもはるかに少ないことが示された。

以上より、本研究では一般の匂いを知覚する主嗅覚系とフェロモンを知覚する副嗅覚系（鋤鼻神

経系)の2系統の嗅覚系について、その介在ニューロンである短軸索細胞の神経伝達物質、主嗅球および副嗅球の発生過程における各種ニューロンの分化過程と層構造の発達過程、副嗅覚系における糖鎖の分布パターンと投射経路などを各種技法を用いて検索し、嗅覚系情報伝達機構の一端を形態学的ならびに分子生物学的に解明した。

謝 辞

本論文の作成に当たり、御指導、御校閲を賜りました岩手大学 谷口和之教授に深く感謝するとともに、実験に際し御協力頂いた岩手大学 小川和重助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Adams, D. R. and Wiekamp, M. D. (1984). The canine vomeronasal organ. *J. Anat.* 138, 771~787.
- 2) Allen, W. K. and Akeson, R. (1985). Identification of a cell surface glycoprotein family of olfactory receptor neurons with a monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 5, 284~296.
- 3) Allen, R. D., Schroeder, C. C. and Fole, A. K. (1989). Intracellular binding of wheat germ agglutinin by Golgi complexes, phagosomes, and lysosomes of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 195~202.
- 4) Alonso, J. R., Arévalo, R., García-Ojeda, E., Porteros, A., Briñón, J. G. and Aijón, J. (1995). NADPH-diaphorase active and calbindin D-28k-immunoreactive neurons and fibers in the olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J. Comp. Neurol.* 351, 307~327.
- 5) Baker, H. (1986). Species differences in the distribution of substance P and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 252, 206~226.
- 6) Bayer, S. A. (1983). ³H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.* 50, 329~340.
- 7) Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M. and Snyder, S. H. (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH-diaphorase. *Neuron* 7, 615~624.
- 8) Buck, L. B. and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175~187.
- 9) Chen, S. T., von Bussman, K. A., Gray, L. J. and Jen, L. S. (1994). Protein gene product 9.5-immunoreactive retinal neurons in normal developing rats and rats with optic nerve or tract lesion. *Dev. Brain Res.* 78, 265~272.

- 10) Crosby, E. C. and Humphrey, T. (1939). Studies of vertebrate telencephalon. I. The nuclear configuration of the olfactory and accessory olfactory formation and the nucleus olfactorius anterior of certain reptiles, birds and mammals. *J. Comp. Neurol.* 71, 121~213.
- 11) Davis, B. J. (1991). NADPH-diaphorase activity in the olfactory system of the hamster and rat. *J. Comp. Neurol.* 314, 493~511.
- 12) Davis, B. J., Burd, G. D. and Macrides, F. (1982). Localization of methionine-enkephalin, substance P, and somatostatin immunoreactivities in the main olfactory bulb of the hamster. *J. Comp. Neurol.* 204, 377~383.
- 13) Davis, B. J. and Kream, R. M. (1991). Substance P immunoreactivity in the superficial laminae of the hamster olfactory bulb. *NeuroReport* 2, 739~742.
- 14) DeGeorge, J. J. and Carbonetto, S. (1986). Wheat germ agglutinin inhibits nerve fiber growth and concanavalin A stimulates nerve fiber initiation in cultures of dorsal root ganglia neurons. *Brain Res.* 393, 169~175.
- 15) DeGeorge, J. J. and Carbonetto, S. (1987). Specificity and valency of concanavalin A in neuron-substratum adhesion and redistribution of cell surface receptors. *Dev. Biol.* 119, 45~58.
- 16) Doran, J. F., Jackson, P., Kynoch, P. A. M. and Thompson, R. J. (1983). Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J. Neurochem.* 40, 1542~1547.
- 17) Dulac, C. and Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83, 195~206.
- 18) Etzler, M. E. (1985). Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Res. Plant Physiol.* 36, 209~234.

- 19) Foster, J. D., Getchell, M. L. and Getchell, T. V. (1991). Identification of sugar residues in secretory glycoconjugates of olfactory mucosae using lectin histochemistry. *Anat. Rec.* 229, 525~544.
- 20) Franceschini, V., Lazzari, M., Revoltella, R. P. and Ciani, F. (1994). Histochemical study by lectin binding of surface glycoconjugates in the developing olfactory system of rat. *Int. J. Devl. Neurosci.* 12, 197~206.
- 21) Fujita, S., Mori, K., Imamura, K. and Obata, K. (1985). Subclass of olfactory receptor cells and their segregated central projections demonstrated by a monoclonal antibody. *Brain Res.* 326, 192~196.
- 22) Gall, C., Seroogy, K. B. and Brecha, N. (1986). Distribution of VIP- and NPY-like immunoreactivities in rat main olfactory bulb. *Brain Res.* 374, 389~394.
- 23) Graziadei P. P. C. and Monti Graziadei, G. A. (1979). 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.
- 24) Halpern, M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. *Annu. Rev. Neurosci.* 10, 325~362.
- 25) Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761~807.
- 26) Hinds, J. W. and Hinds, P. L. (1976). Synapse formation in the olfactory bulb. 1. Quantitative studies. *J. Comp. Neurol.* 169, 15~40.
- 27) Hirschberg, C. B. (1987). Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 63~87.
- 28) Hoffman, H. H. (1963). The olfactory bulb, accessory olfactory bulb and hemisphere of some animals. *J. Comp. Neurol.* 120, 317~368.

- 29) Hofman, M. H. and Meyer, D. L. (1991). Functional subdivisions of the olfactory system correlate with lectin binding properties in *Xenopus*. Brain Res. 564, 344~347.
- 30) Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M. and Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 2811~2814.
- 31) Hunter, A. J., Fleming, D., Dixon, A. F. (1984). The structure of the vomeronasal organ and nasopalatine ducts in *Aotus trivirgatus* and some other primate species. J. Anat. 138, 217~226.
- 32) Hynes, M. A., Buck, L. B., Gitt, M., Barondes, S., Dodd, J. and Jessell, T. M. (1989). Carbohydrate recognition in neuronal development: structure and expression of surface oligosaccharides and β -galactoside-binding lectins. Ciba Found. Symp. 145, 189~210.
- 33) Ichikawa, M., Takami, S., Osada, T. and Graziadei, P.P.C. (1994). Differential development of binding sites of two lectins in the vomeronasal axons of the rat accessory olfactory bulb. Dev. Brain Res. 78, 1~9.
- 34) Jessell, T. M. (1985). Cellular interactions at the central and peripheral terminals of primary sensory neurons. J. Immunol. 135, 746~749.
- 35) Jessell, T. M., Hynes, M. A. and Dodd, J. (1990). Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. Annu. Res. Neurosci. 13, 227~255.
- 36) Jia, C. and Halpern, M. (1996). Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins ($G_{\alpha 2}$ and $G_{\alpha o}$) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. Brain Res. 719, 117~128.
- 37) Johnson, E. W., Eller, P. M. and Jafek, B. W. (1994). Protein gene product 9.5 in the developing and mature rat vomeronasal organ. Dev. Brain Res. 78, 259~264.
- 38) Jordan, J. (1972). The vomeronasal organ (of Jacobson) in primates. Folia Morphol. 31, 418~432.

- 39) Kent, C. and Rowe, H. L. (1992). The immunolocalisation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) in developing paraneurons in the rat. *Dev. Brain Res.* 68, 241~246.
- 40) Keverne, E. B. (1983). Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.* 6, 381~384.
- 41) Key, B. and Giorgi, P. P. (1986). Selective binding of soybean agglutinin to the olfactory system of *Xenopus*. *Neurosci. Lett.* 18, 507~515.
- 42) Kishimoto, J., Keverne, E. B., Hardwick, J. and Emson, P. C. (1993). Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1684~1694.
- 43) Kosaka, T., Hataguchi, Y., Hama, K., Nagatsu, I. and Wu, J.-Y. (1985). Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res.* 343, 166~171.
- 44) Koshimoto, H., Katoh, K., Yoshihara, Y. and Mori, K. (1992). Distribution of putative odour receptor proteins in olfactory epithelium. *NeuroReport* 3, 521~523.
- 45) Kratzing, J. E. (1970). The structure of the vomeronasal organ in the sheep. *J. Anat.* 108, 247~260.
- 46) Lehmann, S., Kuchler, S., Theveniau, M., Vincendon, G. and Zanetta, J. P. (1990). An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6455~6459.
- 47) Lis, H. and Sharon, N. (1986). Lectin as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 35~67.
- 48) López-Mascaraque, L., Villalba, R. M. and de Carlos, J. A. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the main olfactory bulb of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Neurosci. Lett.* 98, 19~24.

- 49) Loo, S. K. (1973). A comparative study of the nasal fossa of four nonhuman primates. *Folia Primatol.* 20, 410~422.
- 50) Lundh, B., Brockstedt, U. and Kristensson, K. (1989). Lectin-binding pattern of neuroepithelial and respiratory epithelial cells in the mouse nasal cavity. *Histochem. J.* 21, 33~43.
- 51) MacCotter, R. E. (1912). The connection of the vomeronasal nerves with the accessory olfactory bulb in the opossum and other mammals. *Anat. Rec.* 6, 299~318.
- 52) Macrides, F. and Davis, B. J. (1983). The olfactory bulb. *In: Chemical Neuroanatomy.* P. C. Emson, ed., Raven Press, New York, pp:391~426.
- 53) Margolis, F. L. (1985). Olfactory marker protein : from PAGE band to cDNA clone. *Trends Neurosci.* Dec. 542~546.
- 54) Matsutani, S., Senba, E. and Tohyama, M. (1988). Neuropeptide- and neurotransmitter-related immunoreactivities in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 272, 331~342.
- 55) Matsutani, S., Senba, E. and Tohyama, M. (1989). Distribution of neuropeptidlike immunoreactivities in the guinea pig olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 280, 577~586.
- 56) Molina, V., Ciesielski, L., Gobaille, S. and Mandel, P. (1986). Effects of the potentiation of the GABAergic neurotransmission in the olfactory bulbs on mouse-killing behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 657~664.
- 57) Monti-Graziadei, G. A., Stanley, R. S. and Graziadei, P. P. C. (1980). The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience* 5, 1239~1252.
- 58) Mori, K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.* 29, 275~320.

- 59) Mori, K., Fujita, S. C., Imamura, K. and Obata, K. (1985) Immunohistochemical study of subclasses of olfactory nerve fibers and their projections to the olfactory bulb in the rabbit. *J. Comp. Neurol.* 242, 214~229.
- 60) Mugnaini, E., Oertel, W. H. and Wauterlood, F. (1984). Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci. Lett.* 47, 221~226.
- 61) Munaro, N. I. (1990). Maternal behavior: glutamic acid decarboxylase activity in the olfactory bulb of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 81~84.
- 62) Nakajima, T., Okamura, M., Ogawa, K. and Taniguchi, K. (1996). Immunohistochemical and enzyme histochemical characteristics of short axon cells in the olfactory bulb of the golden hamster. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 903~908.
- 63) Nakajima, T., Murabayashi, C., Ogawa, K. and Taniguchi, K. (1998). Immunoreactivity of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the developing hamster olfactory bulb. *Anat. Rec.* 250, 238~244.
- 64) Navarro Becerra, N. and Munaro, N. I. (1996). Glutamic acid decarboxylase activity of the olfactory bulb in male rats is influenced by olfactory stimuli and hormonal status. *Neuropharmacology* 35, 57~61.
- 65) Pestean, A., Krizbai, I., Bottcher, H., Parducz, A., Joo, F. and Wolff, R. (1995). Identification of the *Ulex europaeus* agglutinin - I - binding protein as a unique glycoform of the neural cell adhesion molecule in the olfactory sensory axons of adult rats. *Neurosci. Lett.* 195, 117~120.
- 66) Pinching, A. J. and Powell, T. P. S. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 9, 305~345.
- 67) Price, J. L. and Powell, T. P. S. (1970). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 7, 631~651.

- 68) 斉藤晴美、小川和重、谷口和之. (1994). ラット嗅覚受容器 (嗅上皮、鋤鼻器、マセラ器) のレクチン結合様式について. 実験動物 43, 51~60.
- 69) Salazar, I., Baber, P. C. and Cifuentes, J. M. (1992). Anatomical and immunohistological demonstration of the primary neural connections of the vomeronasal organ in the dog. Anat. Rec. 233, 309~313.
- 70) Salazar, I., Quinteiro, P. S., Cifuentes, J. M. and Caballero, T. G. (1996). The vomeronasal organ of the cat. J. Anat. 188, 445~454.
- 71) Scalia, F. and Winans, S. H. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. J. Comp. Neurol. 161, 31~56.
- 72) Schachter, H. (1974). Glycosylation of glycoproteins during intracellular transport of secretory products. In: Advances in Cytopharmacology, vol. 2. B. Ceccarelli, F. Clementi, J. Meldolesi, eds., Raven Press, New York, pp: 207~218.
- 73) Schneider, S. P. and Macrides, F. (1978). Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. Brain Res. Bull. 3, 73~82.
- 74) Schofield, J. N., Day, I. N. M., Thompson, R. J. and Edwards, Y. H. (1995). PGP 9.5, a ubiquitin C-terminal hydrolase; pattern of mRNA and protein expression during neural development in the mouse. Dev. Brain Res. 85, 229~238.
- 75) Scott, J. W., McDonald, J. K. and Pemberton, J. L. (1987). Short axon cells of the rat olfactory bulb display NADPH-diaphorase activity, neuropeptide Y-like immunoreactivity, and somatostatin-like immunoreactivity. J. Comp. Neurol. 260, 378~391.
- 76) Stephan, H. (1965). Der Bulbus olfactorius accessorius bei Insektivoren und Primaten. Acta Anat. 62, 215~253.
- 77) Takami, S., El-Hawary, M. H. and Graziadei, P. P. C. (1990). Somatostatin-28-like immunoreactivity in the rat olfactory bulb. Brain Res. 526, 333~337.

- 78) Takami, S., Fernandez, G. D. and Graziadei, P. P. C. (1992). The morphology of GABA-immunoreactive neurons in the accessory olfactory bulb of rats. *Brain Res.* 588, 317~323.
- 79) Takami, S., Getchell, M. L. and Getchell, T. V. (1994). Lectin histochemical localization of galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine in glycoconjugates of the rat vomeronasal organ, with comparison to the olfactory and septal mucosae. *Cell Tissue Res.* 277, 211~230.
- 80) Takami, S. and Graziadei, P. P. C. (1990). Morphological complexity of the glomerulus in the rat accessory olfactory bulb - a Golgi study. *Brain Res.* 510, 339~342.
- 81) Takami, S. and Graziadei, P. P. C. (1991). Light microscopic Golgi study of mitral/tufted cells in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 311, 65~83.
- 82) Taniguchi, K., Matsusaki, Y., Ogawa, K. and Saito, T. R. (1992). Fine structure of the vomeronasal organ in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Folia Primatol.* 59, 169~176.
- 83) Taniguchi, K. and Mikami, S. (1985). Fine structure of the epithelia of the vomeronasal organ of horse and cattle. A comparative study. *Cell Tissue Res.* 240, 41~48.
- 84) Taniguchi, K. and Mochizuki, K. (1982). Morphological studies on the vomeronasal organ in the golden hamster. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 419~426.
- 85) Taniguchi, K., Taniguchi, K. and Mochizuki, K. (1982). Comparative developmental studies on the fine structure of the vomeronasal sensory and the olfactory epithelia in the golden hamster. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 881~890.
- 86) Taniguchi, K., Saito, H., Okamura, M. and Ogawa, K. (1993). Immunohistochemical demonstration of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in the primary olfactory system of the rat. *Neurosci. Lett.* 156, 24~26.
- 87) Terkelson, O. B. F., Boch, E. and Mollgård, K. (1989). NCAM and Thy-1 in special sense organs of the developing mouse. *Anat. Embryol. (Berl)* 179, 311~318.

- 88) Thompson, R. J., Doran, J. F., Jackson, P., Dhillon, A. P. and Rode, J. (1983). PGP 9.5 - a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.* 278, 224~228.
- 89) Vaccarezza, O., Sepich, L. N. and Tramezzani, J. H. (1981). The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.* 132, 167~185.
- 90) Valtschanoff, J. G., Weinberg, R. J., Kharazia, V. N., Schmidt, H. H. H. W., Nakane, M. and Rustioni, A. (1993). Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH-diaphorase histochemistry, NOS immunoreactivity, and colocalization with GABA. *Neurosci. Lett.* 157, 157~161.
- 91) Vincent, S. R., Johansson, O., Hökfelt, T., Skirboll, L., Elde, R. P., Terenius, L., Kimmel, J. and Goldstein, M. (1983). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J. Comp. Neurol.* 217, 252~263.
- 92) Wang, R. T. and Halpern, M. (1988). Neurogenesis in the vomeronasal epithelium of adult garter snakes. 3. Use of ^3H -thymidine autoradiography to trace the genesis and migration of bipolar neurons. *Am. J. Anat.* 183:178-185.
- 93) Wilkinson, K. D., Lee, K., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J. M. and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246, 670~673.
- 94) Wilson, P. O. G., Barber, P. C., Hamid, Q. A., Power, B. F., Dhillon, A. P., Rode, J., Day, I. N. M., Thompson, R. J. and Polak, J. M. (1988). The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br. J. Exp. Path.* 69, 91~104.
- 95) Wysocki, C. J. (1979). Neurobehavioural evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3, 301~341.

- 96) Wysocki, C. J., Nyby, J., Whitney, G., Beauchamp, G. K. and Katz, Y. (1982). The vomeronasal organ: primary role in mouse chemosensory gender recognition. *Physiol. Behav.* 29, 315~327.
- 97) Wysocki, C. J., Wellington, J. T. and Beauchamp, G. K. (1980). Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science* 207, 981~983.
- 98) Yamamoto, M. and Schwarting, G. (1991). The formation of axonal pathway in developing cranial nerves. *Neurosci. Res.* 463, 21~27.
- 99) Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Mori, K. (1997). OCAM: a new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J. Neurosci.* 17, 5830~5842.
- 100) Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Nagata, S., Kagamiyama, H. and Mori, K. (1997). Overlapping and differential expression of BIG-2, BIG-1, TAG-1, and F3: four members of an axon-associated cell adhesion molecule subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. Neurobiol.* 28, 51~69.

