マウス有郭乳頭味蕾のセロトニンの免疫組織化学

内 田 隆

山梨医科大学解剖学教室（主任：小林 繁教授）

〔受付：昭和59年9月20日〕

Serotonin-like immunoreactivity in the taste bud of the mouse circumvallate papilla

Takashi Uchida

*Department of Anatomy, Yamanashi Medical School
Tamaho, Yamanashi 409-38*

(Chief: Prof. Shigeru Kobayashi)

[Accepted for publication September 20, 1984]

Key words: taste bud / serotonin-like immunoreactivity / immunocytochemistry / protein A-colloidal gold method

Abstract: Serotonin-like immunoreactivity in the circumvallate taste buds of untreated and serotonin- or 5-hydroxytryptophan (5-HTP, a precursor of serotonin)-treated mice were investigated by a modified PAP method with light microscopy and protein A-colloidal gold method with electron microscopy. As a control, supraependymal nerve plexus was immunostained by the same method.

In both untreated and serotonin-treated mice, no specific immunostaining was seen in the taste bud, whereas supraependymal nerve plexuses of the lateral and third ventricles contained nerve fibers showing a distinct serotonin-like immunoreactivity. After intraperitoneal injection of 5-HTP, some taste bud cells showed serotonin-like immunoreactivity. Under electron microscopy, colloidal gold particles representing serotonin-like immunoreactivity were seen in the cytoplasm, nucleus and dense-cored vesicles in the type III cell. Positive immunoreaction of the taste bud and supraependymal nerve plexus disappeared by preincubation of the anti-serotonin serum with serotonin-creatinine sulfate. Immunostaining was not affected by preincubation of the antiserum with 5-HTP.

Functional significance of 5-HTP uptake and serotonin synthesis in the type III cell was discussed with particular reference to taste sensation.

緒 言

マウス有郭乳頭味蕾には、モノアミンの前駆物質である5-ハイドロキシトリプトファン（5-HTP）やL-DOPAを取り込む能力を持つ細胞が存在することが、蛍光組織化学によって示されている¹⁻³⁾。Takedaらは無処置マウスと5-HTPを投与したマウスの味蕾の微細構造を比較し、味蕾を構成する細胞のうち、Ⅲ型細胞が5-HTPを取り込み、セロトニンに転換して大型芯あり小胞と小型のシナプス小胞に貯蔵すると予想した^{2,3)}。そ

して電顕オートラジオグラフにより5-HTPがⅢ型細胞に取り込まれることを証明したが、芯あり小胞とシナプス小胞に³H-5-HTP由来の銀粒子を認めることはできなかったと報告しており⁴⁾、芯あり小胞やシナプス小胞がセロトニンを含むかどうかは明らかにされていない。また蛍光組織化学では、モノアミンの他にその前駆物質である5-HTPやL-DOPAもホルムアルデヒドと縮合して蛍光性の物質を作る。そしてモノアミン由来の蛍光とモノアミン前駆物質由来の蛍光を区別することはきわめて困難である⁵⁾。従ってⅢ型細胞に取り込まれた5-HTPがセロトニンに転換されて

いるか否かも推測の域を出ない。

Steinbusch らによって開発されたセロトニンの免疫組織化学は蛍光組織化学やオートラジオグラフに比べ、感度、特異性とも優れており⁶⁾、電顕観察も可能である。本研究はセロトニンの免疫組織化学を用いて、マウス有郭乳頭味蕾のセロトニンの局在を光顕および電顕レベルで明らかにすることを目的とする。

材料および方法

1. 実験材料

体重30~40gの雄の ddY 系マウスの有郭乳頭を使用し、対照として第3脳室と側脳室壁に分布するセロトニンニューロンを用いた。これは多くの動物で脳室壁に豊富なセロトニンニューロンが分布していることが明らかにされており⁷⁾、中枢神経内における位置の同定も容易なためである。

動物は3群に分け、第1群は無処置のままとし、第2群は固定1時間から1時間30分前にセロトニンクレアチニン硫酸 (Merk, 60~100mg/kg) を腹腔内投与し、第3群には同様に 5-HTP (半井化学, 60~100mg/kg) を投与した。

2. 抗血清

抗セロトニン血清は、セロトニンクレアチニン硫酸をウシ血清アルブミン (BSA) とホルムアルデヒドで結合させたものを免疫抗原とし、ウサギを感作して得られたものを使用した。この抗セロトニン血清の詳細についてはすでに発表されている⁸⁾。

3. 光顕免疫組織化学

ヘパリン投与 (1,000 IU/kg) した動物をペントバルビタールナトリウム麻酔下 (50mg/kg) で開胸し、左心室から氷冷した4%パラホルムアルデヒド—0.2%ピクリン酸—0.067M 磷酸緩衝液, pH 7.2で灌流固定した。舌と脳を取り出し、厚さ3mm以下のスライスとして同固定液にさらに4°C, 12~24時間浸漬後、厚さ15~20 μ mの凍結切片を作製し、免疫組織化学の材料とした。

内因性ペルオキシダーゼ活性と赤血球のカタラーゼ様活性を阻止するためには、切片を PBS (磷酸緩衝生理食塩水; 0.01M, pH 7.2, NaCl 8 g/l) 中で 65°C, 30 分間加熱し、次で 3%過酸化水素

を含む PBS で室温10分間処理した。

免疫染色は浮遊切片法による PAP 法⁹⁾で行ない、抗セロトニン血清は 16,000 倍に希釈して 4°C, 18~24時間作用させた。二次血清や PAP 複合体の希釈倍率、時間については Takeuchi らの方法⁹⁾に従った。

4. 電顕免疫組織化学

光顕用と同様にして動物は4%パラホルムアルデヒド—0.2%ピクリン酸—0.4%グルタルアルデヒド—0.067M 磷酸緩衝液, pH 7.2で灌流固定した。有郭乳頭と第3脳室後下壁部を取り出し、細切して上記の固定液からグルタルアルデヒドを除いた液でさらに4°C, 12~24時間固定した。固定後の試料は低温下でグリコールメタクリレート (メタクリル酸ハイドロキシエチル, GMA) に包埋した。脱水は50, 80, 90, 100%ジメチルホルムアミドで行ない、50%は4°Cで、それ以降の段階は-20°Cで各々30分づつかけた。その後試料は GMA 混合液に移し、-20°Cで24時間浸透させた後にゼラチンカプセルに包埋した。重合は-20°Cで24時間紫外線照射して行なった。GMA 混合液は Leduc と Bernhard の処法¹⁰⁾を改変したもので、GMA70ml, メタクリル酸-n-ブチル25ml, ジメタクリル酸エチレングリコール5mlに、触媒としてベンゾインメチルエーテル0.5gを加えたものである。

超薄切片はプロテインA・金コロイド法^{11,12)}で免疫染色した。抗セロトニン血清は2,000倍から4,000倍に希釈し、4°Cで12~18時間または室温で3~4時間反応させた。プロテインA・金コロイド複合体は, Slot と Geuze の方法¹²⁾に従って塩化金酸をアスコルビン酸ナトリウムで還元して作った金粒子をプロテインA (Pharmacia Fine Chem., Uppsala, Sweden) と結合させ、さらにグリセリン濃度勾配で金粒子の直径が6~8nmのものを分離して使用した。

5. 免疫組織化学の特異性の検定

免疫組織化学の特異性を調べるため、抗セロトニン血清のかわりに PBS または希釈した正常ウサギ血清を用いて免疫染色を行なった。

吸収試験としては、希釈した抗セロトニン血清にセロトニンクレアチニン硫酸と BSA をホルム

アルデヒドで結合させたもの（免疫抗原と同じ方法で作製したもの, $100\mu\text{g/ml}$), BSA (1mg/ml), セロトニンクレアチニン硫酸 ($0.1\sim 20\text{mM}$), 5-HTP ($0.1\sim 20\text{mM}$) および 5-ハイドロキシインドール-3-酢酸（半井化学, $0.1\sim 20\text{mM}$ ）を加え, 4°C , 暗所で1晩反応させたものを一次血清のかわりに使用して免疫染色を行なった。

結 果

1. 光顕免疫組織化学

無処置およびセロトニンを投与したマウスでは, 味蕾内にセロトニン様免疫活性を示す細胞は全く認められなかった。しかし粘膜固有層の肥満細胞と対照として用いた脳室壁のセロトニンニューロンは明瞭なセロトニン様免疫活性を示した。

セロトニンの前駆物質である 5-HTP を投与すると, 一部の味蕾細胞がセロトニン様免疫活性を示した。この細胞は基底膜から味孔部まで達する長紡錘形で, 厚さ約 $15\mu\text{m}$ の切片では1つの味蕾内に2～8ヶ存在した。核を含む細胞体から味

孔部と基底膜へ向う突起は細く, 分枝は認められなかった。免疫活性の強さは細胞ごとに種々であったが, 一つの細胞内では細胞質はほぼ均一な強さで染色され, 核も細胞質よりやや弱い免疫活性を示した (Fig. 1)。

2. 電顕免疫組織化学

無処置およびセロトニンを投与したマウスの味蕾内には, セロトニン様免疫活性の局在を示す金粒子の集積は全く認められなかった。マウス有郭乳頭味蕾を構成している細胞は, I 型, II 型, III 型の3型に分類されている¹³⁾。III型細胞は神経終末とシナプスを形成していることと, 直径約 80nm の芯あり小胞を含むことで同定されたが, シナプス小胞は識別困難で, 芯あり小胞に免疫活性は全く認められなかった。対照として用いた脳室壁にはセロトニン様免疫活性を示す神経線維が認められた。免疫活性の局在を示す金粒子は主として直径 $80\sim 100\text{nm}$ の芯あり小胞に集積していたが, 細胞質中にも小数ながら金粒子が認められた。

5-HTP 投与群では味蕾内のIII型細胞がセロ

Fig. 1 A light micrograph of a circumvallate papilla from a 5-HTP-treated mouse. A number of serotonin-like immunoreactivity containing cells are seen in the taste buds. Mast cells (arrows) in lamina propria also show serotonin-like immunoreactivity. $\times 360$

Fig. 2 Ultrastructural localization of serotonin-like immunoreactivity in a type III cell from a 5-HTP-treated mouse taste bud. Colloidal gold particles are seen in the dense-cored vesicles (arrows), mitochondria (M) and cytoplasm. $\times 46,000$

トニン様免疫活性を示した。免疫活性の強さ（金粒子の分布密度）は細胞ごとに異なっていたが、細胞質全体に免疫活性が認められた。核とミトコンドリアにも細胞質と同程度あるいはやや弱い免疫活性が認められたが、粗面小胞体とゴルジ層板内腔はほとんど免疫活性を示さなかった。芯あり小胞も免疫活性を示したが、免疫活性を示さないものも認められた (Fig. 2)。前シナプス部に集積していると考えられるシナプス小胞の識別は困難で、芯を持つかどうか不明であった。また免疫活性は前シナプス部に強いとはいえなかった (Fig. 3)。

I型とII型の味蕾細胞、味蕾内の神経終末、味蕾周囲の重層扁平上皮と結合組織には全く免疫活性は認められなかった (Figs. 2, 3)。

3. 免疫組織化学の特異性の検定

抗セロトニン血清の代わりに PBS または希釈した正常ウサギ血清を用いた場合には、反応は全く認められなかった。

抗セロトニン血清に セロトニンクレアチニン硫

酸と BSA をホルムアルデヒドで結合させたものを加えた場合、免疫活性は完全に消失した。セロトニンクレアチニン硫酸を加えた場合、光顕では 0.5mM で味蕾内とセロトニンニューロンの反応は著しく減弱し、2mM で完全に消失した。電顕では 5mM のセロトニンクレアチニン硫酸を加えることによって免疫活性は消失した。

抗セロトニン血清に 5-HTP または 5-ハイドロキシインドール-3-酢酸を 0.1~20mM 加えた場合および BSA を 1mg/ml 加えた場合には、免疫活性に全く変化は認められなかった。

考 察

本研究はマウス有郭乳頭味蕾のセロトニン様免疫活性の局在を明らかにした。すなわち無処置およびセロトニンを投与したマウスの味蕾には全く免疫活性を認めなかったが、5-HTP 投与後のマウスでは味蕾内にセロトニン様免疫活性を示す細胞が出現し、電顕免疫組織化学ではIII型細胞に免疫活性が認められた。本研究で用いた抗セロトニ

Fig. 3 A synaptic contact (s) between a type III cell (III) and a nerve ending (Ne) from a 5-HTP-treated mouse taste bud. Serotonin-like immunoreactivity is seen in the dense-core vesicle (arrow), nucleus (N), mitochondria (M) and cytoplasm of the type III cell. Endoplasmic reticulum (Er) is devoid of serotonin-like immunoreactivity. Synaptic type vesicles are not distinguishable in the presynaptic region. Nerve ending and type I cell (I) show no serotonin-like immunoreactivity. $\times 42,000$

ン血清の特異性については、すでに Nishiitsutsuji-Uwo らによって報告されており、免疫組織化学に使用した場合は組織内のセロトニンと特異的に反応することが明らかにされている⁸⁾。吸収試験の結果は本研究で用いた免疫組織化学系がセロトニンに特異的であり、投与した 5-HTP やセロトニンの主要代謝産物である 5-ハイドロキシインドール-3-酢酸とほとんど交叉反応をおこさないことを示している。以上の結果からマウス有郭乳頭味蕾のⅢ型細胞が 5-HTP を取り込み、脱炭酸してセロトニンに転換し、これを細胞内に貯蔵していることが明らかとなった。Ⅲ型細胞がアミン前駆体を取り込む能力を持つことはすでにオートラジオグラフによって明らかにされていた⁴⁾。取り込まれたアミン前駆体はモノアミンに転換されて細胞内に貯蔵されていると予想されていたが²⁻⁴⁾、本研究は免疫組織化学の持つ鋭い特異性を利用し、詳細な吸収試験を行なうことによって

これを証明したといえる。

マウス味蕾のⅢ型細胞は芯あり小胞とシナプス小胞の両者を含んでいる¹³⁾。ナマズやカエルの味覚器には生理的状态でセロトニンを含有している細胞が存在し^{14,15)}、この細胞は多数の芯あり小胞を含むため^{14,16)}、セロトニンは芯あり小胞中に貯蔵されていると考えられている^{14,17)}。マウス味蕾においては nialamide の前処置後、5-HTP を投与することにより、Ⅲ型細胞の芯あり小胞の数が増加し、芯の電子密度が高くなり、またシナプス小胞に芯を持つものが出現するという^{2,3)}。このことから芯あり小胞とシナプス小胞の両者にセロトニンが含まれていると考えられていた³⁾。しかし電顕オートラジオグラフでは、投与した ³H-5-HTP 由来の銀粒子はⅢ型細胞の核と細胞質に認められ、芯あり小胞とシナプス小胞には認められなかったと報告されている⁴⁾。本研究の電顕免疫組織化学では芯あり小胞にセロトニン様免疫活性を検

出すことができた。しかし大部分の金粒子は核と細胞質全域に出現し、免疫活性を示さない芯あり小胞も認められた。またシナプス小胞には明瞭な免疫活性を認めることはできなかった。

水溶性のセロトニンがどのようにして組織中に固定され、不溶化されるかはよくわかっていない。しかし、固定液中のホルムアルデヒドにより、Mannich 反応と類似の反応によって組織中の蛋白質とセロトニンが結合し、不溶性になると考えられている¹⁸⁾。この場合固定中にセロトニンが拡散によって移動し、本来の局在部位とは異なる場所で不溶化される可能性もある。しかしⅢ型細胞と接する他の味蕾細胞や神経終末、結合組織には全く免疫活性は認められず、Ⅲ型細胞内でもゴルジ層板や粗面小胞体内腔には免疫活性はほとんど検出されなかった。この結果は固定中にセロトニンが移動して他の場所で不溶化された可能性がほとんどないことを示していると考えられ、電顕レベルで検出されたセロトニン様免疫活性の局在は本来のセロトニンの局在を正しく反映している可能性が強い。すなわちⅢ型細胞内で合成されたセロトニンの一部は芯あり小胞に取り込まれるが、大部分は細胞質中と核内に存在していると考えられる。

今回の研究ではシナプス小胞に明瞭なセロトニン様免疫活性を検出することはできなかった。Schipper と Tilder によるゼラチンモデルの実験では、4%パラホルムアルデヒド固定と洗浄の間に約50%のセロトニンが流失すると報告されている¹⁹⁾。組織中でも同様なことが起こると考えられ、シナプス小胞中にセロトニンが含まれているか否かを確認するためには、組織中の物質の流失がより少ない方法、例えば凍結乾燥法によって調べることが必要と思われる。

哺乳動物の味蕾ではⅢ型細胞のみが神経終末と求心性シナプスを形成している^{13,20-22)}。それゆえ味蕾が味覚の受容・伝達と関係しているとすれば、Ⅲ型細胞が受容細胞であると予想されている^{13,20-22)}。ウサギ味蕾のⅢ型細胞は生理的状态でセロトニンを含むと考えられ^{23,24)}、マウス味蕾のⅢ型細胞もアミン前駆体を取り込む能力を持つ²⁻⁴⁾。それゆえⅢ型細胞から神経終末への化学伝

達物質としてはセロトニン、ノルアドレナリン等のモノアミンが候補としてあげられている。しかしマウスでは生理的状态でモノアミンの存在を味蕾内に証明した報告はなく、アミン前駆体を投与した場合にのみモノアミンの蛍光が観察されている¹⁻⁴⁾。本研究では蛍光組織化学より高感度であると考えられる免疫組織化学を用いて検索したが、生理的状态では味蕾内にセロトニン様免疫活性を検出できなかった。しかし対照として用いたセロトニンニューロンには明瞭な免疫活性が認められた。この結果は生理的状态ではマウス有郭乳頭味蕾のⅢ型細胞のセロトニン含有量は、セロトニンニューロンのセロトニン含有量よりも著しく少なく、あるいはほとんどないことを示しており、セロトニンがⅢ型細胞から神経終末への化学伝達物質である可能性は低いと考えられる。

Larsson²⁵⁾、Probert ら²⁶⁾は結腸の Auerbach 神経叢内の神経細胞や神経終末に含まれる芯あり小胞のうち、あるものはVIPを含み、あるものはP物質を含むことを、電顕免疫組織化学により示した。味蕾内の細胞にペプチドを見出した報告はないが、Ⅲ型細胞の芯あり小胞にペプチドが含まれ、これが神経伝達物質として作用している可能性は十分考えられる。

結 論

マウス有郭乳頭味蕾におけるセロトニンの局在を光顕および電顕免疫組織化学で調べた。その結果、味蕾のⅢ型細胞が5-HTPを取り込み、セロトニンに転換していることが明らかになり、セロトニンの一部は芯あり小胞に貯蔵されるが、大部分は細胞質中に存在すると考えられた。また生理的状态でⅢ型細胞にセロトニン様免疫活性は認められず、Ⅲ型細胞から神経終末への化学伝達物質としてセロトニン以外の物質が関係していると考えられた。

謝辞：本研究ではシオノギ研究所宇尾淳子博士が作製された抗セロトニン血清を使用させていただきました。ここに深謝します。

抄録：無処置およびセロトニンまたはセロトニンの前駆物質である5-ハイドロキシトリプトファン（5-HTP）を投与したマウスの有郭乳頭味蕾について、光顕では浮遊切片法を用いた PAP 法で、電顕ではプロテイン A・金コロイド法でセロトニン様免疫活性の局在を調べた。また対照として側脳室壁と第3脳室壁に分布する supraependymal nerve plexus を同一の方法で免疫染色した。

無処置およびセロトニンを投与したマウスでは、味蕾内にセロトニン様免疫活性は全く認められなかったが、supraependymal nerve plexus 内には明瞭なセロトニン様免疫活性を示す神経線維が認められた。5-HTP 投与後のマウスでは、味蕾内の一部の細胞がセロトニン様免疫活性を示し、電顕免疫組織化学ではⅢ型細胞の細胞質、核、芯あり小胞に免疫活性が認められた。これらの免疫活性は抗セロトニン血清をセロトニンクレアチニン硫酸で吸収させることにより完全に消失したが、5-HTP によって免疫活性は影響されなかった。

マウス有郭乳頭味蕾のⅢ型細胞は、5-HTP を取り込みこれをセロトニンに転換する能力を持っているが、生理的状态ではほとんどセロトニンを含まず、セロトニン以外の化学伝達物質がⅢ型細胞から神経終末への味覚伝達に関係している可能性が考えられた。

文 献

- 1) Geerdink, H. G. and Drukker, J.: Uptake of L-Dopa by cells in the taste buds of the vallate papilla of the mouse. *Histochemie* **36**: 219-223, 1973.
- 2) Takeda, M.: Uptake of 5-hydroxytryptophan by gustatory cells in the mouse taste bud. *Arch. Histol. Jpn.* **40**: 243-250, 1977.
- 3) Takeda, M. and Kitao, K.: Effect of monoamines on the taste buds in the mouse. *Cell Tiss. Res.* **210**: 71-78, 1980.
- 4) Takeda, M. and Suzuki, Y.: An autoradiographic study of the taste bud following injections of labeled biogenic amine precursors. *J. Electron Microsc.* **32**: 357-360, 1983.
- 5) Ritzén, M.: Quantitative fluorescence microspectrophotometry of 5-hydroxytryptamine-formaldehyde products in models and in mast cells. *Exp. Cell Res.* **45**: 178-194, 1966.
- 6) Steinbusch, H. W. M., Verhofstad, A. A. J. and Joosten, H. W. J.: Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience* **3**: 811-819, 1978.
- 7) Sano, Y., Takeuchi, Y., Kimura, H., Goto, M., Kawata, M., Kojima, M., Matsuura, T., Ueda, S. and Yamada, H.: Immunohistochemical studies on the processes of serotonin neurons and their ramification in the central nervous system-with regard to the possibility of the existence of Golgi's rete nervosa diffusa. *Arch. Histol. Jpn.* **45**: 305-316, 1982.
- 8) Nishiitsutsuji-Uwo, J., Takeda, M. and Saito, H.: The production of an antiserum to serotonin and serotonin-like immunoreactivity in the cockroach brain-midgut system. *Biomed. Res.* **5**: 211-224, 1984.
- 9) Takeuchi, Y., Kimura, H. and Sano, Y.: Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brain-stem of the rat and cat. *Cell Tiss. Res.* **224**: 247-267, 1982.
- 10) Leduc, E. H. and Bernhard, W.: Recent modifications of the glycol methacrylate embedding procedure. *J. Ultrastr. Res.* **19**: 196-199, 1967.
- 11) Roth, J., Bendayan, M. and Orci, L.: Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.* **26**: 1074-1081, 1978.
- 12) Slot, J. W. and Geuze, H. J.: Sizing of protein A-colloidal gold probes for immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **90**: 533-536, 1981.
- 13) Takeda, M.: An electron microscopic study on the innervation in the taste buds of the mouse circum vallate papillae. *Arch. Histol. Jpn.* **39**: 257-269, 1976.
- 14) Reutter, K.: Die Geschmacksknospen des Zwergwelses *Amiurus nebulosus* (Lesueur). Morphologische und histochemische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* **120**: 280-308, 1971.
- 15) Goossens, N. and Vandenbergh, M.-P.: The basal cells in the papillae fungiformes of the tongue of the common frog, *Rana temporaria* L. *Arch. Histol. Jpn.* **36**: 173-179, 1974.
- 16) Düring, M. v. and Andres, K. H.: The ultrastructure of taste and touch receptors of the frog's taste organ. *Cell Tiss. Res.* **165**: 185-198, 1976.
- 17) Hirata, K. and Nada, O.: A monoamine in the gustatory cell of the frog's taste organ. A fluorescence histochemical and electron microscopic study. *Cell Tiss. Res.* **159**: 101-

- 108, 1975.
- 18) Brusco, A., Peressini, S. and Saavedra, J. P.: Serotonin-like immunoreactivity and anti-5-hydroxytryptamine (5-HT) antibodies: Ultrastructural application in the central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 524-530, 1983.
- 19) Schipper, J. and Tilders, F. J. H.: A new technique for studying specificity of immunocytochemical procedures: Specificity of serotonin immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.* **31**: 12-18, 1983.
- 20) Murray, R. G., Murray, A. and Fujimoto, S.: Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. *J. Ultrastr. Res.* **27**: 444-461, 1969.
- 21) Takeda, M. and Hoshino, T.: Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jpn.* **37**: 395-413, 1975.
- 22) Paran, N., Mattern, C. F. T. and Henkin, R. I.: Ultrastructure of the taste bud of the human fungiform papilla. *Cell Tiss. Res.* **161**: 1-10, 1975.
- 23) Nada, O and Hirata, K.: The occurrence of the cell type containing a specific monoamine in the taste bud of the rabbit's foliate papilla. *Histochemistry* **43**: 237-240, 1975.
- 24) Nada, O and Hirata, K.: The monoamine-containing cell in the gustatory epithelium of some vertebrates. *Arch. Histol. Jpn.* **40** (Suppl.): 197-206, 1977.
- 25) Larsson, L. -I.: Ultrastructural localization of a new neuronal peptide (VIP). *Histochemistry* **54**: 173-176, 1977.
- 26) Probert, L., De May, J. and Polak, J. M.: Distinct subpopulations of enteric p-type neurones contain substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *Nature* **294**: 470-471, 1981.