九州歯会誌 50 (1) : 269 ~ 286, 1996.

マウスの有郭乳頭ならびに茸状乳頭の味蕾の 免疫組織化学的・微細構造的 연구

— コンピュータによる味蕾の 3 次元解析 —

瀬 田 祐 司

九州歯科大学口腔解剖学第 2 講座 (指導: 嶋村昭辰名誉教授, 豊島邦昭教授)

平成 7 年 12 月 25 日受理

Ultrastructural and Immunohistochemical Study in Taste Buds of Circumvallate and Fungiform Papillae of the Mouse

— A Computer-assisted Three-dimensional Analysis of Taste Buds —

Yuji Seta

Second Department of Oral Anatomy (Directors: Prof. Emeritus Akitatsu Shimamura
Prof. Kuniaki Toyoshima)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Taste buds in circumvallate and fungiform papillae of the mouse were examined with immunohistochemistry, electron microscopy and computer-assisted, three-dimensional reconstruction from serial ultrathin sections. In accord with observations by Murray (1973), four distinct cell types, type I, II, III and basal cells, were identified in taste buds of both papillae. After intraperitoneal injection of 5-HTP, a precursor of serotonin, some taste bud cells showed serotonin-immunoreactivity. The number and location of the serotonin-immunoreactive cells coincided with those of type III cells.

The taste bud of the circumvallate papilla was made up of 70 to 100 cells. Of these, only the type III cells, about 5 to 10 percent of total number of cells, made synaptic contacts with nerve fibers. The type III cell made 3 to 5 synapses with 5 to 8 nerve terminals. These synapses were characterized by symmetric membrane thickenings of both the type III cell and apposed axon plasma membrane, and by accumulation of numerous small, clear vesicles and dense-cored vesicles in the type III cell cytoplasm. These findings clearly indicated a gustatory transducer function for the type III cell.

The taste bud of the fungiform papilla contained about 40 cells. Similar to the circumvallate taste bud, only type III cells made synaptic contacts with nerve terminals and contained both small, clear vesicles and dense-cored vesicles. Synapses in fungiform type III cells contained many more synaptic vesicles than those of circumvallate taste buds. One to three type III cells, about 5 percent of total number of cells, could be identified within a fungiform taste bud. The type III cell made 6 to 8 synapses with 6 to 12 nerve terminals. There were

no transitional cells showing intermediate morphological characteristics between cell types. The present results thus contrast with the studies by Kinnamon and his group.

Although the exact nature and function of type I and type II cells in the taste buds still remains enigmatic, the present study strongly supports the view that there are separate taste cell lines that retain their unique identities, never transforming into one another in the mouse taste buds.

Key words: Taste bud / Immunohistochemistry / Electron microscopy / Three-dimensional reconstruction / Mouse

緒 言

味蕾の研究は、Leydig (1851)¹⁾ が魚で “Geschmacksbecher (味覚杯)” として記載したのに始まり、その後すべての脊椎動物に存在することが知られるようになった。Engström ら (1956)²⁾ が、ウサギの葉状乳頭の味蕾の構造を、電子顕微鏡を用いて初めて観察して以来、様々な哺乳動物の味蕾の微細構造に関する研究が報告されてきた³⁻¹⁰⁾。一般に哺乳動物の味蕾は数種類の細胞から構成されていることが知られている。これらの細胞は、従来より光学顕微鏡的ならびに電子顕微鏡的に、暗調細胞と明調細胞に区別され、それぞれ味細胞あるいは支持細胞としての役割をもつことが推測されてきた^{3,4)}。しかしながら、これら 2 種類の細胞が実際に “味細胞” あるいは “支持細胞” として機能しているという明確な根拠は示されず、このことが味蕾の形態学的ならびに生理学的研究の解明を、より複雑なものとしてきた。そのような中で、Murray ら (1969)¹¹⁾ は、ウサギの葉状乳頭の味蕾において、神経終末と求心性シナプスを形成する新しい細胞型が存在することを示し、この細胞型を III 型細胞として、暗調細胞 (I 型)、明調細胞 (II 型) から明確に区別するとともに、III 型細胞が味蕾の中で唯一の味覚受容細胞であることを示した。Murray ら (1969)¹¹⁾ による III 型細胞 (味細胞) の発見以来、多くの哺乳動物の味蕾で III 型細胞の存在することが報告されてきた^{5-10, 12)}。その中で Murray (1973)⁸⁾ は、味蕾内に見られるこれら各細胞型 (I, II, III 型) は、異なった幹細胞よりそれぞれ独立して分化した細胞からなっており、それぞれがお互いに移行しないと述べた。

一方、Kinnamon らの研究グループ¹³⁻¹⁷⁾ は、超高圧電子顕微鏡と 3 次元立体再構築を用いて研究した結果、マウスの有郭乳頭、葉状乳頭および茸状乳頭の味蕾細胞を 3 種類の細胞型 (暗調型、中間調型および明調型) に分

類した。さらに、各細胞型 (暗調型、中間調型、明調型) は、同じ幹細胞に由来するもので、各細胞の形態の差異は細胞の成熟過程 (暗調→中間調→明調) を反映したものであると述べるとともに、すべての細胞型において神経終末との間に求心性シナプスが形成されることを示した。このようなことを背景に、彼らは “III 型味覚受容細胞” という特別な細胞型は少なくともマウスの味蕾には存在しないと結論した。

茸状乳頭の味蕾は、味覚の電気生理学的な研究の対象としてしばしば用いられてきたが¹⁸⁻²⁰⁾、その微細構造に関する研究は有郭乳頭ならびに葉状乳頭の味蕾に比べ非常に少ない^{3, 8, 21-22)}。さらに、有郭乳頭ならびに葉状乳頭の味蕾の微細構造は、多くの点で共通していることが示されてきたが、茸状乳頭の味蕾は有郭・葉状乳頭の味蕾と比較して微細構造的に多くの異なった特徴をもつことが報告されてきた^{5, 21, 23)}。

本研究は、マウスの有郭乳頭ならびに茸状乳頭の味蕾を組織化学的、微細構造的に詳細に検索することによって、両乳頭の味蕾を構成する細胞の形態的分類とその機能的意義について検討することを目的におこなった。さらに、連続超薄切片を作製し、その中で神経終末との間に求心性シナプスを形成する細胞をコンピュータを用いて、その 3 次元構築像を作成し、神経終末と味蕾細胞との立体関係を明らかにした。

材料および方法

実験動物には体重 30 g 前後の成熟マウス (ICR 系) を使用した。

I. 組織化学的検索

マウスにセロトニン (5-hydroxytryptamine) の前駆物質である 5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP, 100 mg/kg) を腹腔内に投与し、2 時間後に腹腔内にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル) を 50

mg/kg投与して麻酔した後、有郭乳頭および茸状乳頭を含む組織を取り出した。採取した組織の半数は Falck-Hillarp 法²⁴⁾に従い、直ちにドライアイス・イソペンタン中で急速凍結した後、 -35°C で8日間凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後、組織を 80°C で90分間ホルムアルデヒドガスに暴露し、真空下でパラフィン浸透を行い、パラフィンブロックを作製した後、約 $6\mu\text{m}$ に薄切し、落射型蛍光顕微鏡にて観察した。他の組織は Zamboni 固定液²⁵⁾で3時間浸漬固定し、リン酸緩衝液で1晩洗浄した後、ドライアイス・イソペンタン中で急速凍結し、クリオスタットを用いて約 $20\mu\text{m}$ の凍結切片を

作製した。切片は抗セロトニン抗体 (Chemicon Int. U. S. A. 1:300) を一次抗体として用い、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法²⁶⁾に従って、ベクタステイン ABC-PO キットを用いて、免疫染色を施した。対照試験として、一次抗体の抗セロトニン抗体の代わりに正常ウサギ血清または PBS を用いて免疫染色をおこなった。

II. A. 電子顕微鏡的検索

マウスの腹腔内にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル) を 50 mg/kg 投与して麻酔した後、 0.1M リン酸 (pH 7.3) で緩衝した 1% パラホルムアルデヒ

写真1 マウス有郭乳頭の光顕写真。乳頭溝の側壁上皮内に多数の味蕾が認められる。×100

写真2 マウス茸状乳頭の光顕写真。味蕾は乳頭背面の上皮内に認められる。×420

写真3 マウス有郭乳頭の蛍光顕微鏡写真。

a: 味蕾の一部の細胞にセロトニン様モノアミンの存在を示す蛍光の発現が認められる。×100

b: 蛍光を発する紡錘形の細胞は、1つの味蕾に4～8個観察される。×380

ドと1.25% グルタルアルデヒド混合液にて左心室より灌流固定をおこなった。固定後直ちに舌を全摘し、舌前方部より茸状乳頭を含む $1 \times 1 \times 1$ mmのブロックを、また舌後方正中部より有郭乳頭を含む $2 \times 2 \times 2$ mmのブロックをそれぞれ切除した。各ブロックは同固定液で6時間浸漬固定をおこなった後、1% オスミウム酸²⁷⁾で2時間、後固定をおこない、上昇エタノール系列にて脱水、プロピレンオキサイドで置換した後、Epon 812²⁸⁾に包埋した。組織はガラスナイフを装着したウルトラミクローム (Ultracut E, Reichert-Jung) にて $1 \mu\text{m}$ の切片とし、メチレンブルー・アズールII溶液²⁹⁾で染色した後、光学顕微鏡的観察に供した。さらにダイヤモンドナイフを用いて90 nmの連続超薄切片を作製後、フォルムバル膜を張った1スロットの銅製グリッドにすくい取り、メタノール・酢酸ウラン³⁰⁾ならびに三重鉛法³¹⁾による電子染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200 EX, JEOL) にて観察した。

B. 3次元立体再構築

有郭乳頭ならびに茸状乳頭の味蕾の連続電子顕微鏡写真から、味蕾の輪郭、Ⅲ型細胞ならびにⅢ型細胞に接触する神経線維を選び出し、それらの外形をトレーシングペーパーにトレースした (有郭乳頭: 138枚, 茸状乳頭: 162枚)。トレース像の位置合せには、味蕾直下の固有層に出現する毛細血管を用いた。それらのトレース像をディジタイザを用いて、コンピュータ (PC 9801,

NEC) に入力し、3次元立体構築ソフト (TRI, RATOC) を使用して、3次元立体構築像を作成し、解析した。

結 果

I. A. マウス有郭乳頭味蕾の組織構造

マウスの有郭乳頭は約 $400 \mu\text{m}$ の径をもち、舌背後方の正中部に一個存在する。有郭乳頭背部は角化層をともなった重層扁平上皮によっておおわれている。味蕾は乳頭溝の側壁上皮内に多数出現し、味孔を介して口腔環境と直接接する。エポキシ樹脂切片をメチレンブルー染色して観察すると、味蕾は細胞質、核ともに好塩基性を示す暗調な細胞と、比較的大型の明調な細胞、さらにその中間調の染色性を示す細胞の3種類の細胞型とに区別することができた (写真1)。

マウスに5-HTPを投与した後、Falck-Hillarp法により落射型蛍光顕微鏡で観察すると、味蕾の一部の細胞に、セロトニン様モノアミンの存在を示す黄色蛍光の発現が認められた (写真3a)。蛍光を発する紡錘形の細胞は、味蕾の基底部から味孔にまで達しており、1つの味蕾に4~8個観察された (写真3b)。

また、有郭乳頭の味蕾を抗セロトニン抗体を用いて免疫染色すると、味蕾内に紡錘形をしたセロトニン免疫陽性の細胞がセロトニン蛍光細胞の場合と同様に4~8個観察された (写真4)。

写真4 抗セロトニンを用いて免疫染色を施した有郭乳頭の光顕写真。味蕾中に紡錘形のセロトニン免疫陽性の細胞が観察される。固有層内の肥満細胞 (矢印) もセロトニン免疫陽性を示す。×100

写真5 抗セロトニンを用いて免疫染色を施した茸状乳頭の光顕写真。味蕾 (＊) の基底部にセロトニン免疫陽性の細胞 (矢印) が3個観察される。固有層内の肥満細胞 (矢印) もセロトニン免疫陽性を示す。×400

写真6 有郭乳頭味蕾の透過電顕写真. D: I型細胞, L: II型細胞, G: III型細胞, 矢頭: 味孔. $\times 2,500$

写真7 茸状乳頭味蕾の透過電顕写真. D: I型細胞, L: II型細胞, G: III型細胞, 矢頭: 味孔, 矢印: 基底膜を貫いて味蕾内に侵入した神経線維. $\times 3,660$

写真8 有郭乳頭味蕾の味孔部の透過電顕写真。味毛の間には電子密度の高い不定形物質が存在する。 × 8,400

写真9 茸状乳頭味蕾の味孔部の透過電顕写真。味孔内は小胞状（矢印）の物質によって満たされる。 × 16,000

B. 有郭乳頭の味蕾の電子顕微鏡的観察

有郭乳頭の味蕾を電子顕微鏡で観察すると、味蕾は長径約 $65\mu\text{m}$ 、短径約 $40\mu\text{m}$ の蕾状を呈しており、70～100個の味蕾細胞から構成されていた(写真6)。味蕾内には、味蕾の基底部から味孔に達する紡錘形をした細胞とともに、少数ではあるが基底細胞も観察された。また神経線維は、固有層から基底膜を貫いて味蕾内に侵入し、細胞間に分布しながら味孔付近まで到達していた。

有郭乳頭の味蕾の味孔は直径、深さともに $2\sim 3\mu\text{m}$ であった。各味蕾細胞は細胞頂部で微絨毛を形成し、味毛として味孔内に終末していた(写真8)。これら味毛の長さは細胞型によって異なり、Ⅱ型、Ⅲ型細胞の味毛が味孔内にとどまっているのに対して、Ⅰ型細胞の味毛はしばしば味孔外に突出していた。味毛の間は均一に電子密度の高い不定形物質で満たされていた(写真8)。

味孔直下では、細胞は隣接する細胞と密着結合を形成するとともに、基底部にいくにしたがって、よく発達し

たデスモゾームによって結合していた。

今回の観察で、マウスの有郭乳頭の味蕾を構成する細胞は、微細構造的に4種類の細胞に区別できた。それぞれの細胞型はMurray (1973)⁹⁾ がウサギの葉状乳頭の味蕾で示した細胞型と微細構造的にはほぼ一致したので、Murray の分類に従ってⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型、基底細胞の4型の細胞に分類した。各細胞型の比率は、Ⅰ型細胞が約50%、Ⅱ型細胞が約30%、Ⅲ型細胞は5～10%で、Ⅲ型細胞は1つの味蕾に5～10個みられた。

Ⅰ型細胞は細胞質、核ともに暗調の細長い紡錘形をした細胞で、基底膜から味孔まで達していた。細胞頂部にはよく発達した微絨毛がみられ、その内部は長軸方向に走る多数のアクチンフィラメント芯が認められた。また、これらのフィラメントはしばしば細胞質内にまで深く伸長していた。微絨毛直下の細胞質内には、味孔内物質とほぼ同じ電子密度をもった直径 $100\sim 200\text{nm}$ の分泌果粒が多数観察された(写真10)。さらに、細胞質内

写真10 有郭乳頭味蕾の細胞頂部の透過電顕写真。Ⅰ型細胞(D)の細胞質内には、分泌果粒が認められる。×21,000
Inset: Ⅱ型細胞の細胞質内に認められる caveolae。×105,000

写真11 茸状乳頭味蕾の細胞頂部の透過電顕写真。Ⅰ型細胞(D)の細胞質内には、棍棒状の分泌果粒(矢印)が認められる。×36,000

にはよく発達した粗面小胞体とともに多数のリボゾーム、水解小体等の細胞内小器官が存在していた。また、I型細胞の細胞質内には、変性した細胞や神経線維を含む二次水解小体も観察された。I型細胞は、しばしば神経線維と mesaxon 様に接触していたが、そのようなところではシナプス等の特別な構造は見い出されなかった。

II型細胞は細胞質、核ともに明調で、他の細胞型と比較して大型の細胞である。細胞質内には広く分布する滑面小胞体とともに細胞質頂部に出現する多数の caveolae の存在によって特徴づけられた (写真 10 Inset)。また、II型細胞は神経線維と幅広く接触し、そのような部位の形質膜に沿った細胞質内には、滑面小胞体槽が出現するのが観察された。

III型細胞は細胞質、核ともに I型細胞および II型細胞の中間の電子密度を示した。III型細胞の最も大きな形態的特徴は、細胞質内に出現する直径 50 ~ 60 nm のシナプス小胞と直径 100 ~ 120 nm の有芯小胞の存在である。シナプス小胞は神経線維と接触する形質膜直下の細胞質内に多数集合し、そのような部位では細胞、神経線維ともに形質膜の対称性肥厚を伴う典型的な求心性シナ

プスが観察された (写真 13)。また、このようなシナプス小胞に介在して有芯小胞が少数出現するのが認められた。III型細胞は、基底膜と直接幅広く接し、そのようなところでは有芯小胞が特に多く集合する傾向が観察された。

味蕾直下の固有層には、基底膜に沿って電子密度の高い果粒状の構造物がしばしば認められた (写真 12)。また、そのようなところでは、しばしば窓あき型の毛細血管の出現するのが観察された。

C. 有郭乳頭味蕾の3次元立体再構築

連続超薄切片から作製した立体再構築像で有郭乳頭味蕾のIII型細胞を観察すると、III型細胞は基底膜から味孔に達する紡錘形を呈していた (写真 15 a)。また、基底側において複雑に分岐するIII型細胞も認められた。味蕾内に侵入した神経線維はIII型細胞の形質膜に沿って走行し、味孔直下のIII型細胞頸部まで達するものも観察された。III型細胞と神経線維との間に出現する求心性シナプスは主に核周囲から基底側にかけての形質膜において観察された (写真 15 b)。有郭乳頭味蕾のIII型細胞は1細胞当たり5 ~ 8本の神経線維と接触し、それらの神経線維と間に3 ~ 5個のシナプスを形成していた。また、2

写真12 有郭乳頭味蕾の基底部の透過電顕写真。III型細胞 (G) の基底側には有芯小胞が多く存在するのが認められる。味蕾直下の固有層には、基底膜に沿って電子密度の高い果粒状 (矢印) の構造物が認められる。× 20,000

写真13 有郭乳頭のⅢ型細胞 (G) と神経終末 (N) との間にみられる求心性シナプスの透過電顕写真. × 24,000

写真14 茸状乳頭のⅢ型細胞 (G) と神経終末 (N) との間にみられる求心性シナプスの透過電顕写真. × 35,000

写真15 有郭乳頭のⅢ型細胞の立体再構築像。

a: Ⅲ型細胞は基底膜から味孔に達する紡錘形を呈する。

b: シナプスは主に核の周囲から基底側にかけての形質膜において観察される。

青: 味蕾の外形 赤: Ⅲ型細胞 緑: 神経線維 黄: 核 白: シナプス

写真16 茸状乳頭のⅢ型細胞の立体再構築像。

a: Ⅲ型細胞の基底部は基底膜と接触していない。

b: シナプスは主に核の周囲の形質膜において観察される。

青: 味蕾の外形 赤: Ⅲ型細胞 緑: 神経線維 黄: 核 白: シナプス

つのシナプスを形成する神経線維やシナプスを形成しない神経線維もしばしば観察された。

II. A. マウス茸状乳頭味蕾の組織構造

舌前方舌背部に茸状乳頭は高さ約 200 μm 、直径約 150 μm で、多数の糸状乳頭に介在して存在する。マウスの茸状乳頭の味蕾は菲薄な角化層をともなった重層扁平上皮からなる乳頭背面上皮内に 1 個存在する（写真 2）。光顕的に観察すると、茸状乳頭の味蕾は有郭乳頭の味蕾と同様に、暗調、明調および中間調の染色性を示す細胞の 3 細胞型が区別された。また、茸状乳頭下部の固有層内には、よく発達した神経叢が存在していた。

有郭乳頭の味蕾の場合と異なり、5-HTP を投与後も、茸状乳頭の味蕾においてはモノアミン蛍光を検出することはできなかった。しかし、抗セロトニン抗体を用いた免疫染色では、茸状乳頭の味蕾内にセロトニン免疫陽性の細胞を 1～3 個検出することができた（写真 5）。

B. 茸状乳頭味蕾の電子顕微鏡的観察

茸状乳頭味蕾は長径約 50 μm 、短径約 30 μm で卵円形を呈し、40～50 個の細胞から構成されていた（写真 7）。マウスの茸状乳頭の味蕾を構成する細胞は、微細構造的に有郭乳頭の味蕾の場合と同様に、Murray (1973)⁸⁾ の I 型、II 型、III 型、および基底細胞の 4 細胞型に区別された。各細胞型の比率は、I 型細胞が約 50%、II 型細胞が約 30%、III 型細胞は約 5% で、III 型細胞は 1 つの味蕾に 1～3 個であった。

茸状乳頭味蕾の味孔は直径 2～3 μm 、深さ 3～6 μm であった。各味蕾細胞は細胞頂部で微絨毛を形成し、味毛として味孔底部に終末していた（写真 9）。これら味毛の形態は各細胞型による差は認められなかった。味孔内には、有郭乳頭の味蕾の味孔で観察されたような電子密度の高い均一な不定形物質は認められず、直径 40～60 nm の限界膜で囲まれた小胞状の物質が充満していた（写真 9）。

有郭乳頭の味蕾と同様に味孔直下の部位では、味蕾細胞は隣接する細胞と接着複合体を形成していた。

I 型細胞は基底膜から味孔まで達する細長い紡錘形を呈し、細胞質ならびに核が電子密度の高い暗調の細胞である。茸状乳頭の I 型細胞は有郭乳頭の I 型細胞で認められたような分泌果粒はみられず、細胞質頂部に棍棒状をした多数の小果粒が認められた（写真 11）。これらの果粒は有郭乳頭の分泌果粒と比較して、電子密度がやや低いのが特徴であった。核の外縁は複雑に入り組み、また細胞質内にはリボソーム、水解小体ならびに粗面小胞体等の細胞内小器官がよく発達していた。また、茸状乳

頭の味蕾においても、I 型細胞の細胞質内には変性した細胞や神経線維を含む二次水解小体が観察された。さらに I 型細胞が、しばしば味蕾内の神経線維と mesaxon 様に接触している所見も観察された。

II 型細胞は細胞質、核ともに幅の広い明調な細胞であり、核は比較的大型で、円形あるいは卵円形を呈していた。細胞質全体に滑面小胞体が広く分布し、細胞質頂部には caveolae が多数観察された。また、II 型細胞は神経線維と幅広く接触していた。

III 型細胞は細胞質、核ともに I 型細胞および II 型細胞の中間調の電子密度を呈していた。III 型細胞は細胞頂部で微絨毛を形成し、それらは味孔縁に向かって終末していた。他の細胞型とは異なり、III 型細胞の基底膜は、基底膜に達していなかった。III 型細胞の細胞質内にはシナプス小胞と有芯小胞の 2 種類の小胞が存在していた。シナプス小胞は直径 50～60 nm で、神経線維と接触する部位の細胞質内に多数集合し、そのような部位では細胞、神経線維ともに形質膜の肥厚を伴う典型的な求心性シナプスが観察された（写真 14）。茸状乳頭の味蕾におけるシナプスは有郭乳頭のものと比較して、シナプス小胞の数が非常に多いのが特徴であった。一方、有芯小胞は直径約 100～130 nm で、核から基底膜にかけての細胞質内に散在していた。

C. 茸状乳頭味蕾の 3 次元立体再構築

作製した立体再構築像から、茸状乳頭の III 型細胞は核の部分が膨隆した紡錘形を呈していた。細胞の上部は味孔にまで達するが、細胞基底膜は基底膜にまで達していなかった（写真 16 a）。茸状乳頭の III 型細胞は、細胞 1 個当たり 6～12 本の神経線維と接触し、それらの神経線維との間に 6～8 個のシナプスを形成しているのが観察された（写真 16 b）。神経線維は主に細胞の核周囲を取り囲むように III 型細胞と接し、シナプスは主に核の周囲の形質膜において形成されていた。また、神経線維の中にはシナプスを形成しないものや 2 つのシナプスを形成するものも認められた。

考 察

本研究では、マウスの有郭乳頭ならびに茸状乳頭に存在する味蕾について、その微細構造と III 型細胞の立体構造を明らかにした。

哺乳動物では、Schwalbe (1867)³²⁾ ならびに Lovén (1868)³³⁾ が味蕾の形態に関する研究を初めて報告して以来、多くの研究者によって組織学的、生理学的研究の対象として用いられてきた。これまでの組織学的研究が

ら哺乳動物の味蕾内には、光学顕微鏡的ならびに電子顕微鏡的に暗調細胞（dark cell）と明調細胞（light cell）の少なくとも2種類の細胞が存在するとともに、それぞれの細胞型が味細胞あるいは支持細胞として機能していることが示唆されてきた。

Murray ら（1969）¹¹⁾ は、ウサギの葉状乳頭の味蕾を透過電顕で観察した結果、細胞質内にシナプス小胞と有芯小胞をもち、神経線維と求心性シナプスを形成する細胞が存在することを初めて報告した。彼らはこの細胞をⅢ型細胞と呼び、この細胞型が唯一の味覚受容細胞（味細胞）として機能していることを示唆するとともに、従来より報告されてきた暗調細胞（Ⅰ型）、明調細胞（Ⅱ型）から明確に区別した。さらに Murray（1973）⁸⁾ はこれら各細胞型はそれぞれ異なった機能をもち、独立した細胞系を形成していると述べた。このようにウサギの葉状乳頭の味蕾で発見されたⅢ型細胞は、ラット⁵⁾、マウス^{34, 35)}、モルモット⁶⁾、イヌ⁷⁾等の他の哺乳動物の味蕾にも存在することが示されてきた。

しかしながら、近年 Murray の分類、特にⅢ型細胞（味細胞）の存在を疑問視する結果が報告されてきた^{13-17, 36-38)}。その中で、Kinnamon らの研究グループは、マウスの有郭、葉状ならびに茸状乳頭の味蕾の連続準超薄切片（0.2～0.5 μm）を作製し、超高圧電子顕微鏡を用いて観察した結果、味蕾内には3種類の細胞型（暗調型、中間調型、明調型）が存在することを報告するとともに、各細胞型の移行型と思われる形態を示す細胞も出現することを明らかにした。また、彼らは、各細胞型の形態の差異は、それぞれの細胞の成熟過程を反映したものであると述べた。さらに、すべての細胞型が神経終末との間に求心性シナプスを形成していることから、細胞の成熟過程のどの段階においても味覚受容細胞として機能している可能性のあることを示唆した。一方、彼らは、ウサギの葉状乳頭の味蕾についても同様の方法を用いて検索した結果、ウサギの葉状乳頭の味蕾では Murray が示したⅢ型細胞の存在することを確認するとともに、味蕾細胞の分類と機能は動物種間において必ずしも一致しないと述べた³⁹⁾。

このような中で、Murray（1993）³⁵⁾ はマウスの有郭乳頭の味蕾を詳細に検索した結果、ウサギの味蕾の場合と同様に、マウスの味蕾にもⅢ型細胞が存在することを示した。このように味蕾を構成する細胞の分類とその機能的意義に関しては、研究者の間で未だに一致した結論は得られていない。

本研究においては、Murray（1973）⁸⁾ がウサギの葉

状乳頭の味蕾で示したⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型細胞ならびに基底細胞をマウスの有郭乳頭および茸状乳頭の味蕾においても確認することができた。さらに味蕾細胞の中に移行型と思われる細胞は存在しないことから、各細胞型は独立した細胞系に属していると考えられた。その中で、Ⅲ型細胞だけが神経線維との間に求心性シナプスを形成していた。この結果は、Kinnamon ら（1985, 1993）^{13, 15)} が報告した結果と相違する。その理由として、彼らは準超薄切片（厚さ 0.25～0.5 μm）を用いて超高圧電子顕微鏡で観察しているため、細胞の電子密度やその微細構造が通常の電子顕微鏡とは異なって観察された結果によるものではないかと推測された。

有郭乳頭味蕾のⅠ型細胞は、核上部細胞質内に分布する多数の分泌果粒によって特徴づけられた。この分泌果粒の内容物質は、味孔内の不定形暗調物質と同じ電子密度を有することから、Ⅰ型細胞が外分泌細胞としての役割をもつことが推測された。また、Ⅰ型細胞の細胞質内には、しばしば変性した味蕾細胞や神経線維を含む二次水解小体が観察されたことは、この細胞がマクロファージのようなたべ込み能をもつことを示唆するものと考えられた。

Ⅱ型細胞は刷子状の微絨毛の存在とともに、核上部細胞質内には多数の caveolae が認められた。同様の形態を示す caveolae は消化管、胆嚢ならびに気管等に出現する刷子細胞にも認められることから^{40, 41)}、Ⅱ型細胞が刷子細胞に近縁の細胞であることが強く示唆された。一方、武田（1982）⁴²⁾ は、細胞質頂部の caveolae をライソゾームの一種であると考え、Ⅱ型細胞が不用になった味孔内の物質を取り込み、処理する役割をはたしているのではないかと述べた。また、Ⅱ型細胞は神経線維と幅広く接触し、そのような部位の形質膜直下には滑面小胞体槽が神経線維に沿って配列するのが観察された。このような構造は内耳蝸牛の有毛細胞にみられる遠心性シナプス^{43, 44)}に類似することから、味蕾においても遠心性シナプスの存在することが示唆されてきた^{45, 46)}。

Ⅲ型細胞の細胞質内には、2種類の小胞（シナプス小胞、有芯小胞）が認められた。Paran ら（1975）⁴⁷⁾ は、ラット有郭乳頭の味蕾においてアセチルコリンエステラーゼの活性がみられることから、アセチルコリンが伝達物質として関与していることを示唆した。しかしながらシナプス小胞に含まれると考えられる神経伝達物質については、まだ解明されていない。同様に有芯小胞の機能的意義についても、まだよく理解されていない。Takeda（1977）⁴⁸⁾、Takeda ら（1980）⁴⁹⁾ はマウスに5

-HTP を投与した後、Ⅲ型細胞の細胞質内に有芯小胞の数が增加することを報告し、5-HTP がⅢ型細胞で代謝を受けセロトニンに転換され、有芯小胞にたくわえられるのではないかと推測した。さらに内田 (1985)⁵⁰⁾ は、マウスの有郭乳頭味蕾のⅢ型細胞に見られる有芯小胞がセロトニンを含有することを免疫電顕的に明らかにした。

一方、Fujita (1976, 1977)^{51, 52)}、Fujita ら (1988)⁵³⁾ は、パラニューロンの概念の中で味細胞 (Ⅲ型細胞) を典型的なパラニューロンと見なした。このような中で、Kanazawa (1993)⁷⁾ はイヌのⅢ型細胞の有芯小胞が細胞基底部に多く集合することから、有芯小胞の内容物が傍分泌され、近在のエブネル腺等に局所ホルモンとして働きかけているのではないかと推測した。今回の観察でも、有郭乳頭のⅢ型細胞にみられる有芯小胞は基底膜に面した細胞質内に多数集合する傾向がみられ、さらに味蕾直下にはしばしば窓あき型の毛細血管が出現するのが認められた。これら小胞が含有するシグナル物質やその機能に関しては、まだよく理解されておらず、今後解明しなければならない重要な課題であると考えられた。

葉状乳頭と有郭乳頭の味蕾は、微細構造的に多くの共通点があるのに対し、茸状乳頭の味蕾はこれらの乳頭の味蕾と比較して、多くの異なった形態的特徴があることが指摘されてきた^{5, 8, 23)}。今回の観察でも、マウスの茸状乳頭と有郭乳頭の味蕾の間には、微細構造的に多くの相違点がみられた。すなわち、1) 茸状乳頭の味蕾の味孔は、細長い味管によって構成され、味蕾細胞の微絨毛は味孔外まで伸長しない、2) 茸状乳頭の味蕾の味管内には、小胞状物質によって満たされ、有郭乳頭の味蕾の味孔において観察される電子密度の高い不定形物質は存在しない、3) 茸状乳頭のⅠ型細胞の細胞頂部には、有郭乳頭のⅠ型細胞で観察される分泌果粒とは、形態が異なった長円形の果粒が存在する、4) 茸状乳頭のシナプスは有郭乳頭のシナプスに比べ、シナプスの数は少ないが、シナプス部位におけるシナプス小胞の数が非常に多い、さらに5) 有郭乳頭の味蕾の基底部においては、基底膜に沿って出現する暗調物質は茸状乳頭の味蕾では決して観察されない、等である。このような形態の違いが、機能的にどのように反映しているのかについては、今後解明されなければならない課題であると考えられた。

味蕾は舌だけでなく、軟口蓋にも存在するが、その味孔部の微細構造は、茸状乳頭の味蕾に類似していることが報告されている⁵⁴⁾。このことから、有郭乳頭や茸状乳

頭の味蕾の味孔部の形態の相違は、味蕾を支配する神経の違いによるのではなく、味孔が直接口腔に開口しているか、乳頭溝に開口しているのかに関係しているのではないかと考えられる。また、Takeda ら (1975)⁵⁵⁾ は、茸状乳頭と有郭乳頭の味蕾の味孔部の形態の差が電気生理学的な反応性の違いを反映している可能性があることを示唆した。

今回の観察では、マウスの茸状乳頭味蕾のⅢ型細胞にみられるシナプスは有郭乳頭のものと比較して、シナプスの数は少ないが、シナプス部位においてシナプス小胞が非常に多く出現することを示した。同様の所見をKinnamon ら (1993)¹⁵⁾ も報告している。彼らは、このような結果に対して有郭乳頭と茸状乳頭の味蕾ではシナプス小胞に含まれる神経伝達物質が異なるのか、あるいは神経伝達物質に対する感受性が異なるのかかもしれないと述べた。また、有郭乳頭のⅢ型細胞では基底膜に面する細胞質内に有芯小胞が多数出現するのが観察されたが、茸状乳頭のⅢ型細胞ではこのような分布は認められなかった。このように有郭乳頭と茸状乳頭のⅢ型細胞の間にみられる微細構造の違いは、両乳頭の周囲の組織環境の違い (エブネル腺の有無など) にもとづくものではないかと推測された。

哺乳動物の味蕾には、spot 35⁵⁶⁾、calbindin⁵⁶⁾、N-CAM⁵⁷⁾、Met-Enk-8⁵⁸⁾ を含む細胞が存在することが免疫組織化学的に報告されてきた。特に、spot 35 と N-CAM は、Ⅲ型細胞にのみ存在することが免疫電顕法により明らかにされ、他の細胞型には全く認められないことが確認されている。この結果は、Ⅲ型細胞の存在を強く示唆するとともに、この細胞が独立した細胞系であることを示すものと考えられた。

今回マウスの有郭乳頭の味蕾でみられたセロトニン陽性細胞の数は、味蕾1個当たり4～8個で、連続超薄切片により得られたⅢ型細胞の数とほぼ一致した。一方、茸状乳頭の味蕾では、Falck-Hillarp 法によってモノアミン蛍光を検出することはできなかったが、免疫組織化学的に観察されたセロトニン陽性細胞の数は、味蕾1個当たり1～3個で、同様に連続超薄切片により得られたⅢ型細胞の数とほぼ一致した。

Ⅲ型細胞に含有されるセロトニンの役割については、様々な議論がなされてきた。その中でNada ら (1977)⁵⁹⁾、Takeda (1977)⁴⁸⁾、Takeda ら (1980)⁴⁹⁾ はセロトニンが神経伝達物質としての役割をもつことを示唆してきた。しかしながら、内田 (1985)⁵⁰⁾ は、マウスの味蕾は生理状態ではセロトニンは検出されないことから、

マウスではセロトニンが神経伝達物質である可能性は低いと報告した。

哺乳動物の味蕾と異なり、魚類や両生類の味蕾に出現するセロトニン含有細胞は、味蕾基底部に局在しており、味孔を介して口腔環境と直接接触することは決してないことから基底細胞と呼ばれてきた。さらに、これら基底細胞はメルケル細胞と多くの形態的特徴を共有することから、しばしばメルケル様細胞とも呼ばれてきた。メルケル様基底細胞は味物質と接触しないことから、含有するセロトニンは味覚情報の伝達に直接関与していないと考えられてきた。しかしながらサンショウウオを用いた研究で、Delay ら (1994)⁶⁰⁾ は単離した味細胞が細胞外のセロトニンの濃度によって、味刺激に対する反応性が変化することから、メルケル様基底細胞から分泌されたセロトニンが、味細胞の味刺激に対する反応性を調節することで神経修飾物質として働いているのではないかと推測した。一方、セロトニンが神経栄養因子としての働きをもつことから、Toyoshima (1994)⁶¹⁾ は味蕾の発生、分化に必要な神経終末を舌上皮へ誘導するために、メルケル様基底細胞が神経終末に対する“target”として栄養効果的な役割をもつことを示唆した。

一方、哺乳動物の味蕾では、下等脊椎動物の味蕾で見られるメルケル様基底細胞に相当する細胞は存在しない。しかしながら、哺乳動物の味蕾におけるⅢ型細胞はセロトニンを含有するとともに、細胞質内に散在する有芯小胞の存在など、メルケル様基底細胞と形態的に類似した特徴を有していた。このことから、これら2つの細胞が近縁の細胞であり、Ⅲ型細胞が味覚受容細胞としての機能をもつとともに、神経終末に対しての神経修飾的な、あるいは栄養効果的な役割をもつ細胞である可能性が考えられた。特に、哺乳動物の味蕾細胞は他の口腔粘膜上皮に比較して、細胞周期が短いことが報告されており^{62, 63)}、味蕾の形態維持に必要な神経終末を味蕾内に維持するために、Ⅲ型細胞の神経終末に対する神経栄養的な役割は重要であると考えられ、今後解明しなければならない重要な課題であると考えられる。

結 論

マウスの有郭乳頭ならびに茸状乳頭の味蕾について、組織化学的ならびに連続超薄切片を用いて微細構造学的に比較検討をおこなった。さらに連続超薄切片から、コンピュータを用いた両乳頭のⅢ型細胞の3次元立体再構築像を作成し、Ⅲ型細胞と神経線維の立体構造について検討をおこなった。

ウサギの葉状乳頭の味蕾に認められる、Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型ならびに基底細胞の4種類の細胞をマウスの有郭乳頭ならびに茸状乳頭の味蕾においても確認した。また、マウスにセロトニンの前駆物質である5-HTPを投与した後、抗セロトニン抗体を用いて免疫組織化学的に味蕾を検索すると、味蕾の一部にセロトニン免疫陽性の細胞が検出された。セロトニン免疫陽性の細胞の数は、両乳頭とも連続超薄切片の観察から得られたⅢ型細胞の数にほぼ一致した。

マウスの有郭乳頭の味蕾は、70～100個の細胞から構成されており、その中でⅢ型細胞は有郭乳頭の味蕾細胞中の5～10%存在していた。また、Ⅲ型細胞だけに神経終末との間に求心性シナプスの形成が認められた。Ⅲ型細胞は5～8本の神経線維と3～5個のシナプスを形成していた。これらのシナプスはⅢ型細胞、神経線維ともに形質膜の対称性肥厚をとまなうとともに、そのような部位でのⅢ型細胞の細胞質内には多数のシナプス小胞と有芯小胞の集合するのが観察された。このことから、マウスの味蕾においてⅢ型細胞が唯一の味覚受容細胞として機能していることが示唆された。

一方、マウスの茸状乳頭の味蕾は約40個の細胞から構成されていた。その中で、有郭乳頭の味蕾の場合と同様に、Ⅲ型細胞の細胞質内には多数のシナプス小胞と有芯小胞が存在し、神経終末との間に求心性シナプスの形成が認められた。Ⅲ型細胞は6～12本の神経線維と6～8個のシナプスを形成していた。茸状乳頭のⅢ型細胞は、有郭乳頭と比較して、シナプス部位におけるシナプス小胞の数が非常に多いのが特徴であった。茸状乳頭の味蕾において、Ⅲ型細胞は約5%存在していた。また、味蕾細胞の中には、2つの細胞型の形態的特徴をあわせもつ移行型と思われる細胞は認められなかった。今回の観察結果は、Murrayの多元説を強く支持するとともに、各細胞型の形態の差異は細胞の成熟過程を反映したものであるとした一元説をとるKinnamonらの研究グループの報告と相違した。

Ⅰ型細胞とⅡ型細胞の機能的意義については未だに不明であるが、今回の観察結果は、マウスの味蕾内にみられる各細胞型は、それぞれ独立して分化した細胞系からなっており、それぞれが独自の機能をもつ細胞である可能性を強く示唆した。

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師九州歯科大学口腔解剖学第2講座豊島邦昭教授に対し深甚なる謝意を表します。また御懇篤なる御教

示と研究の機会を与えてくださいました恩師嶋村昭辰名誉教授に心から厚くお礼申し上げます。さらに立体構築像の作成に当たり、多大なる御指導と御助力を戴きましたラトックシステムエンジニアリング株式会社の飯塚俊幸氏に深甚なる感謝の意を表し、あわせて本研究に数多くの御助言、御指導を戴きました口腔解剖学第 2 講座の皆様衷心より謝意を表します。

本論文の要旨は、日本解剖学会第 100 回総会記念全国学術集会 (1995 年 4 月 3 日, 東京), 第 55 回九州歯科学会総会 (1995 年 5 月 14 日, 北九州), 2nd International Malpighi Symposium (September 15, 1995, Rome) において発表した。

なお, 本研究の一部は, 平成 5 年度九州歯科大学後援会大学院生研究援助費ならびに平成 7 年度岩垂育英会奨学金によっておこなわれた。

引用文献

- 1) Leydig, F.: Über die Haut einiger Süsswasserfische. Z. Wiss. Zool. 3 : 1-12, 1851.
- 2) Engström, H. and Rytznér, C.: The fine structure of taste buds and taste fibers. Ann. Otol. 65 : 361-375, 1956.
- 3) Farbman, A. I.: Fine structure of the taste bud. J. Ultrastruct. Res. 12 : 328-350, 1965.
- 4) Uga, S.: A study on the cytoarchitecture of taste buds of rat circumvallate papillae. Arch. histol. jap. 31 : 59-72, 1969.
- 5) Takeda, M. and Hoshino, T.: Fine structure of taste buds in the rat. Arch. histol. jap. 37 : 395-413, 1975.
- 6) Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., Kanazawa, H., Iwanaga, T. and Fujita, T.: Fine structure of the taste buds in guinea pigs. I. Cell characterization and innervation patterns. Arch. Histol. Cytol. 53 : 103-119, 1990.
- 7) Kanazawa, H.: Fine structure of the canine taste bud with special reference to gustatory cell functions. Arch. Histol. Cytol. 56 : 533-548, 1993.
- 8) Murray, R. G.: The ultrastructure of taste buds. In : The ultrastructure of sensory organs. (ed. by Friedmann, I.) North-Holland, Amsterdam, 1973, 1-81.
- 9) Murray, R. G.: The mammalian taste bud type III cell: A critical analysis. J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res. 19 : 327-353, 1986.
- 10) Reutter, K. and Witt, M.: Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. In : Mechanisms of taste transduction (eds. by Simon S. A. and Roper S. D.). CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo, 1993, 29-82.
- 11) Murray, R. G., Murray, A. and Fujimoto, S.: Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. J. Ultrastruct. Res. 27 : 444-461, 1969.
- 12) Farbman, A. I., Hellekant, G. and Nelson, A.: Structure of taste buds in foliate papillae of the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. Am. J. Anat. 172 : 41-56, 1985.
- 13) Kinnamon, J. C., Taylor, B. J., Delay, R. J. and Roper, S. D.: Ultrastructure of mouse vallate taste buds. I. Taste cell and their associated synapses. J. Comp. Neurol. 235 : 48-60, 1985.
- 14) Kinnamon, J. C., Sherman, T. A. and Roper, S. D.: Ultrastructure of mouse vallate taste buds: III. Patterns of synaptic connectivity. J. Comp. Neurol. 270 : 1-10, 1988.
- 15) Kinnamon, J. C., Henzler, D. M. and Royer, S. M.: HVEM ultrastructural analysis of mouse fungiform taste buds, cell types, and associated synapses. Microsc. Res. Tech. 26 : 142-156, 1993.
- 16) Delay, R. J., Kinnamon, J. C. and Roper, S. D.: Ultrastructure of mouse vallate taste buds. II. Cell types and cell lineage. J. Comp. Neurol. 253 : 242-252, 1986.
- 17) Royer, S. M. and Kinnamon, J. C.: Ultrastructure of mouse foliate taste buds: Synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibers. J. Comp. Neurol. 270 : 11-24, 1988.
- 18) Kimura, K. and Beidler, L. M.: Microelectrode study of taste receptors of rat and hamster. J. Comp. Physiol. 58 : 131-139, 1961.
- 19) Nagai, T., Mistretta, C. M. and Bradley, R. M.: Developmental decrease in size of peripheral receptive fields of single chorda tympani nerve fibers and relation to increasing NaCl taste sensitivity. J. Neurosci. 8 : 27-38, 1980.
- 20) Tonosaki, K. and Funakoshi, M.: Effect of polarization of mouse taste cells. Chem. Senses 9 : 381-387, 1984.
- 21) Murray, R. G.: Ultrastructure of taste receptors. In : Handbook of sensory physiology, Vol. 4. Chemical senses. II. Taste. (ed. by Beidler, L. M.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1971, 31-50.
- 22) Seta, Y. and Toyoshima, K.: Three-dimensional structure of the gustatory cell in the mouse fungiform taste buds: a computer-assisted reconstruction from serial ultrathin sections. Anat. Embryol. 191 : 83-88, 1995.
- 23) Miller, R. L. and Chaudhry, A. P.: Comparative ultrastructure of vallate, foliate and fungiform taste buds of golden Syrian hamster. Acta Anat. 95 : 75-92, 1976.

- 24) Falck, B., Hillarp, N.-Å., Thieme, G. and Trop, A. : Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.* 10 : 348–354, 1962.
- 25) Zamboni, L. and DeMartino, C. : Buffered picric acid-formaldehyde : A new rapid fixation for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35 : 148 A, 1967.
- 26) Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 577–580, 1981.
- 27) Millonig, G. : Advantages of a phosphate buffer for O_3O_4 solutions in fixation. *J. Appl. Physics.* 32 : 1637, 1961.
- 28) Luft, J. H. : Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409, 1961.
- 29) Laczkó J. and Lévai, G. : A simple differential staining method for semi-thin sections of ossifying cartilage and bone tissues embedded in epoxy resin. *Mikroskopie* 31 (s) : 1–4, 1975.
- 30) Stempak, J. G. and Ward, R. T. : An improved staining method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 22 : 697–701, 1967.
- 31) Hanaichi, T., Sato, T., Iwamoto, T., Malavasi-Yamashiro, J., Hoshino, M. and Mizuno, N. : A stable lead by modification of Sato's method. *J. Electron Microsc.* 35 : 304–306, 1986.
- 32) Schwalbe, G. : Das Epithel der Papillae vallatae. *Arch. Mikrosk. Anat.* 3 : 504–508, 1867.
- 33) Lovén, C. : Beiträge zur Kenntnis vom Bau der Geschmackswärzchen der Zunge. *Arch. Mikrosk. Anat.* 4 : 96–110, 1868.
- 34) Takeda, M. : An electron microscopic study on the innervation in the taste buds of the mouse circumvallate papillae. *Arch. histol. jap.* 39 : 257–269, 1976.
- 35) Murray, R. G. : Cellular relations in mouse circumvallate taste buds. *Microsc. Res. Tech.* 26 : 209–224, 1993.
- 36) Arvidson, K., Cottler-Fox, M. and Friberg, U. : Taste buds of the fungiform papillae in *Cynomolgus* monkey. *J. Anat.* 133 : 271–280, 1981 a.
- 37) Arvidson, K., Cottler-Fox, M. and Friberg, U. : Fine structure of taste buds in the human fungiform papilla. *Scand. J. Dent. Res.* 89 : 297–306, 1981 b.
- 38) Sweazey, R. D., Edwards, C. A. and Kapp, B. M. : Fine structure of taste buds located on the lamb epiglottis. *Anat. Rec.* 238 : 517–527, 1994.
- 39) Royer, S. M. and Kinnamon, J. C. : Application of serial sectioning and three-dimensional reconstruction to the study of taste bud ultrastructure and organization. *Microsc. Res. Tech.* 29 : 381–407, 1994.
- 40) Nabeyama, A. and Leblond, C. P. : "Caveolated cells" characterized by deep surface invaginations and abundant filaments in mouse gastro-intestinal epithelia. *Am. J. Anat.* 140 : 147–166, 1974.
- 41) Luciano, L. and Reale, E. : Brush cells of the mouse gallbladder. *Cell Tissue Res.* 262 : 339–349, 1990.
- 42) 武田正子 : 味蕾の電子顕微鏡的研究. *東日本歯学雑誌* 1 : 1–16, 1982.
- 43) Smith, C. A. and Sjostrand, F. S. : Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* 5 : 523–556, 1961.
- 44) Saito, K. : Fine structure of the sensory epithelium of the guinea pig organ of Corti : Afferent and efferent synapses of hair cells. *J. Ultrastruct. Res.* 71 : 222–232, 1980.
- 45) Fujimoto, S. and Murray, R. G. : Fine structure of degeneration and regeneration in denervated rabbit vallate taste buds. *Anat. Rec.* 168 : 393–414, 1970.
- 46) Idé, C. and Munger, B. L. : The cytologic composition of primate laryngeal chemosensory corpuscles. *Am. J. Anat.* 158 : 193–209, 1980.
- 47) Paran, N. and Mattern, C. F. T. : The distribution of acetylcholinesterase in buds of the rat vallate papilla as determined by electron microscope histochemistry. *J. Comp. Neurol.* 159 : 29–44, 1975.
- 48) Takeda, M. : Uptake of 5-hydroxytryptophan by gustatory cells in the mouse taste bud. *Arch. histol. jap.* 40 : 243–250, 1977.
- 49) Takeda, M. and Kitao, K. : Effects of monoamines on the taste buds in the mouse. *Cell Tissue Res.* 210 : 71–78, 1980.
- 50) 内田 隆 : マウス有郭乳頭味蕾のセロトニンの免疫組織化学. *歯基礎誌* 27 : 132–139, 1985.
- 51) Fujita, T. : The gastro-enteric endocrine cell and its paraneuronic nature. In : Chromaffin, enterochromaffin and related cells. (Ed. by Coupland, R. E. and Fujita, T.), Elsevier, Amsterdam, 1976, 191–208.
- 52) Fujita, T. : Concept of paraneurons. *Arch. histol. jap.* 40, (Suppl.) : 1–12, 1977.
- 53) Fujita, T., Kanno, T. and Kobayashi, S. : The paraneuron. Springer-Verlag, Tokyo, 1988.
- 54) 鈴木裕子, 武田正子 : マウス軟口蓋味蕾の微細構造とモノアミン前駆物質の取り込みについて. *歯基礎誌* 24 : 45–54, 1982.
- 55) Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., Iwanaga, T. and Fujita, T. : Fine structure of the taste bud in guinea pigs. II. Localization of spot 35 protein, a cerebellar Purkinje cell-specific protein, as revealed by electron-microscopic immunocytochemistry. *Arch. Histol. Cytol.* 54 : 113–118, 1991.
- 56) Johnson, E. W., Eller, P. M., Jafek, B. W. and Norman, A. W. : Calbindin-like immunoreactivity in two peripheral chemosensory tissues of the rat :

- taste buds and vomeronasal organ. Brain Res. 572 : 319–324, 1992.
- 57) Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Neural cell adhesion molecule of taste buds. J. Electron Microsc. 41 : 375–380, 1992.
- 58) Yoshie, S., Wakasugi, C., Kanazawa, H. and Fujita, T. : Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-like immunoreactivity in mammalian taste buds. Arch. Histol. Cytol. 56 : 495–500, 1993.
- 59) Nada, O. and Hirata, K. : The monoamine-containing cell in the gustatory epithelium of some vertebrates. Arch. histol. jap. 40 (Suppl.) : 197–206, 1977.
- 60) Delay, R. J., Mackay-Sim, A. and Roper, S. D. : Membrane properties of two types of basal cells in *Necturus* taste buds. J. Neurosci. 14 : 6132–6143, 1994.
- 61) Toyoshima, K. : Role of Merkel cells in the taste organ morphogenesis of the frog. In : Olfaction and Taste XI. (Eds. by Kurihara, K., Suzuki, N. and Ogawa, H.), Springer-Verlag, Tokyo, 1994, 13–15.
- 62) Beidler, L. M. and Smallman, R. L. : Renewal of cells within taste buds. J. Cell Biol. 27 : 263–272, 1965.
- 63) Farbman, A. I. : Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. Cell Tissue Kinet. 13 : 349–357, 1980.