

〔原 著〕

味蕾細胞割面の走査電顕的観察

鈴木 裕子, 武田 正子

東日本学園大学歯学部口腔解剖学第Ⅱ講座

(主任: 武田 正子 教授)

Scanning Electron Microscopic Study of
Fractured Taste Bud Cells

Yuko SUZUKI and Masako TAKEDA

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Masako TAKEDA)

Abstract

Fractured taste bud cells of circumvallate papillae in mouse were treated with the revised Osmium digestion method, and observed by scanning electron microscopy.

Intracellular structures of three types of taste bud cells were three-dimensionally analysed. The rough-surfaced endoplasmic reticulum (r-ER) of type-I cells formed a complicated network, and the flattened cisternae in the close vicinity of the cytoplasmic membrane were fenestrated. The smooth-surfaced endoplasmic reticulum (s-ER) of type-II cells formed an irregular-shaped network of branching and anastomosing tubules. The swollen cisternae of s-ER which were connected with other s-ER through the small tubules, were occasionally found along the nerve terminals. Type-III (gustatory) cells were characterized by the presence of large vesicles of 110-140 nm in diameter and small vesicles of about 60 nm in diameter. These vesicles were held together by a slender strand. An aggregation of the vesicles were observed along the nerve terminals, and some vesicles were attached to the membranes of the terminals. The cytoplasm was partly loosened by treatment with a prolonged digestion, and it was observed that the nerve fibers forming the swollen terminals came in contact with the taste bud cells. The small protrusions of interdigitations were observed on the surface of the taste bud cells. Removal of the taste buds revealed the underlying basal lamina and the pores

受付: 昭和60年3月27日

本論文の要旨は、第90回日本解剖学会総会(昭和60年4月)において発表した。

within it. These pores were circular in shape and 0.5 to 3 μm in diameter and amounting to about 10 pores per taste bud. It is suggested that the most of the pores in the basal lamina underlying the taste buds are the passage of the nerve fibers across the basal lamina.

Key words: Scanning electron microscopy, Osmium-digestion method, taste bud cell

緒 言

近年, オスミウム消化法 (Osmium-DMSO-Osmium 法=O-D-O 法) による試料作製技術が開発されて以来¹⁾, 細胞内小器官の微細構造を走査電子顕微鏡で三次元的に観察することが容易になった。これまで肝臓²⁾, 副腎皮質³⁾, 小腸上皮細胞⁴⁾, 頸下腺⁵⁾, 関節軟骨細胞⁶⁾, 脊髄の運動神経細胞⁷⁾, 骨芽細胞⁸⁾, エナメル芽細胞⁹⁾などさまざまな組織, 細胞の細胞内小器官の立体構造が剖出してきた。

一方, 味蕾については味孔部の表面構造を走査電顕で観察した報告は数多いが^{10~14)}, 割断面の観察は非常に少なく¹⁵⁾, さらに味蕾を構成する各細胞型¹⁶⁾や神経の立体的微細構造の観察は全くなされていない。

原法 (O-D-O 法) または低濃度のアルデヒドを加えた A-O-D-O 法⁷⁾ともに, 味蕾は固定不十分で微細構造の保存が悪い。しかしアルデヒド濃度を高めると固定は良くなるが, オスミウム消化の効果が低下する。そこで我々はさらに固定方法を検討, 改良し, 味蕾細胞の細胞内小器官の剖出を行なった。

材料と方法

成熟 dd マウスを用いた。0.3~0.5% グルタルアルデヒド + 2% パラホルムアルデヒド混液 ($1/15\text{M}$ リン酸緩衝液 pH 7.4 使用) を用いて左心室から灌流した。有郭乳頭を切り出し, 同液または 2% パラホルムアルデヒド単独液に 1 時間浸漬した後, 1% オスミウム酸で 1 時間固定し

た。ついで 12.5%, 25%, 50% DMSO (dimethyl sulfoxide) 液中に各々 30 分浸漬し, 割断器 (Eiko 製, TF-1) を用いて液体窒素中で割断した。割断した味蕾は 0.1% オスミウム酸 ($1/15\text{M}$ リン酸緩衝液, pH 7.4 使用) に入れ, 20°C で 48~96 時間放置し, 消化を行なった。1% オスミウム酸で再固定した後, 脱水, 酢酸イソアミル置換, 臨界点乾燥を行い金蒸着を施し, 走査型電顕 (日立 S-650) にて観察し, 2,000~17,000 倍で写真撮影を行った。

結 果

有郭乳頭の割断面像では溝の周囲に多数の味蕾が観察された。味蕾は紡錘形で, 周囲の上皮細胞に比べて明調を呈しており, 核, 小胞体等の細胞内構造が認められた (Fig. 1)。細胞内小器官の特徴と分布により, 基底部から味孔まで伸びる細胞は 3 種類に分類された。

I 型細胞: 粗面小胞体が網目状に走行しており, その表面には多数のリボゾームが付着していた (Fig. 2)。細胞膜付近の粗面小胞体は扁平槽状で直径 35~60 nm の小孔がいくつか認められた (Fig. 3)。基底部の粗面小胞体は神經終末としばしば接していたが, 特に他の部位の小胞体と異なるような特徴はなかった。またミトコンドリアが粗面小胞体槽にとりかこまれている像を観察した (Fig. 4)。

II 型細胞: 滑面小胞体が発達しており, 細管状の小胞体が枝分れと吻合をくり返して複雑な網工を形成していた。比較的扁平な滑面小胞体には 20~70 nm の小孔が時折認められた (Fig. 5)。

滑面小胞体と粗面小胞体との連絡が認められ、その移行部ではリボゾームの数が減少していた (Fig. 6)。滑面小胞体の表面のところどころには直径 100 nm 前後の空胞が付着していた。このような空胞はリボゾームが少数付着する粗面小胞体の移行部にも認められた (Fig. 7)。神経終末に接している滑面小胞体の一部には内腔がふくらんでいるものがあり、他の小胞体と細管で結合していた (Fig. 8)。

Ⅲ型細胞：多数の直径約 110~140 nm と 60 nm の小胞が互いに細糸で連絡しながら胞体に散在しており、ミトコンドリアがその間隙を埋めていた。神経終末の膜に沿って小胞が集積しており、さらに一部の小胞は神経終末の膜に付着していた (Fig. 9)。

各細胞型に共通する細胞内小器官であるゴルジ装置のゴルジ槽は 3~4 層の扁平な層板状構造を形成しており、その表面には直径約 80nm の小胞が付着していた (Fig. 10)。ゴルジ装置の内側面には細管が分岐吻合して網状構造を作り、その間隙に直径 50~500nm の多数の小胞が認められた (Fig. 11)。またゴルジ層板からは細管が出ており、周囲の滑面小胞体と連絡していた (Fig. 10)。頂上部は通常の消化の過程では脱落してしまい、透過電顕で観察されている微絨毛や味孔内物質は観察することが出来なかった。しかし各細胞型の頂上部に近接する胞体には透過電顕で観察されたⅠ型細胞の分泌顆粒に相当する多数の顆粒を認めた (Fig. 12)。基底部には多数の神経終末の割断像が認められ、その内部にはミトコンドリアが充満しており、細胞の基底部の膜は不規則な陥入を示した (Fig. 13)。

オスミウム消化時間を延長すると細胞質が脱落し、味蕾細胞間を神経線維が走行するのが観察された。神経線維はところどころで膨大した終末部を形成して味蕾細胞に接触し、再び細い線維に戻っていた。また味蕾細胞の表面からは小突起が突出しており、これは隣接する細胞と

の間に嵌合を形成していた (Fig. 14)。さらに消化時間を延長すると、粘膜上皮が完全に除去され、基底膜が観察された。一個の味蕾の直下の基底膜は周囲上皮細胞直下の基底膜に比べて若干陥凹していた。表面はなめらかで直径 0.5~3 μm の円形の孔が一個の味蕾直下に約 10 個散在していた (Fig. 15)。基底膜下部の粘膜固有層には細い膠原線維が網目を形成し、基底膜を裏打ちしていたが (Fig. 16)、円形の孔の部分では膠原線維を欠き裏打ち構造は存在しなかった (Fig. 17)。また大部分の孔は種々の形をした内容物で埋められていた (Fig. 16)。

考 察

味蕾細胞の微細構造に関しては、これまで多数の透過電顕による報告がある^{16~18)}。今回の走査電顕による観察では頂上部をのぞくほとんどの細胞内小器官の三次元的微細構造が明瞭に観察された。基底膜から味孔まで伸びる三種類の細胞は透過電顕で調べたⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型細胞¹⁶⁾にそれぞれ対応した像が観察された。Ⅰ型とⅡ型細胞の胞体は小胞体で満たされており、これらの小胞体にはところにより小孔が認められた。この小孔は小胞体の融合によって生じると思われ、このような小孔を持つ粗面小胞体は網目状から扁平槽状へ、滑面小胞体は細管状から層板状へ移行する過程にあると考えられる。特に滑面小胞体においては、同様の小孔が顎下腺終末部にも報告されており⁵⁾、融合が進むと、精巣の間細胞¹⁹⁾で見られるような有窓層板状を経て、精管粘膜上皮²⁰⁾の層板状小胞体へ移行すると推測され、それぞれの細胞の機能状態を反映していると考えられる²⁰⁾。

また神経終末に接する小胞体のうち、粗面小胞体は胞体の他の部位の小胞体と同様の形態を示すが、滑面小胞体の中には内腔がふくらんでいるものがあった。このことは透過電顕の報告でも指摘されており¹⁶⁾、内耳有毛感覚細胞で認め

られたシナプス下槽構造²¹⁾に類似していることから遠心性の情報伝達に関与するのではないかと言われている¹⁶⁾しかし連続超薄切片からの復構像の検索により、Ⅲ型(味)細胞と求心性シナプスを形成する神経は同時にⅡ型細胞をも支配することが報告されている²²⁾そして極めて少數の神経のみが、Ⅲ型細胞と接触せずにⅡ型あるいはⅠ型、基底細胞のみと接觸していたが、この場合、味蕾直下の粘膜固有層で神経線維が分岐して他の味蕾のⅢ型細胞を支配することがない時のみ、この神経が遠心性である可能性が生じるであろう。しかし、今回観察されたシナプス下槽様構造をもつ神経が遠心性であるかどうかは決定出来なかった。

田中ら^{1~7)}はオスミウム消化法は膜系の立体構造を見るのには効果的であるが顆粒や小胞を観察するのには適切な方法ではないと述べている。すなわち顆粒や小胞の輸送の主役をなすのは微小管であるが、この方法が微小管を細胞基質とともに消化するので、顆粒や小胞は支持がなくなり脱落すると考えられているからである。今回の観察では、Ⅲ型細胞に多数の小胞が細糸でつながって散在していた。この細糸は不完全に消化された微小管、その他の細胞骨格の変形と思われる。消化時間を延長した場合、膜系も脱落する傾向が認められたが、この方法でも膜系が保存されている場合には、小胞もかなりの数が保存されていた。Ⅲ型細胞の小胞のうち直径が大のもの(110~140nm)は透過電顕で観察されている有芯小胞に、小のもの(60nm)は小型明小胞に相当するものと推測される。神経終末と接する部位ではこれら二種類の小胞が混在して集積しており、一部の小胞が終末の膜に付着している像も観察されたが、特にその部位の胞体の膜あるいは神経終末の膜の肥厚は観察出来なかった。

基底膜の孔は小腸^{23,24)}大腸²⁴⁾でも観察されているが、味蕾直下の基底膜の孔の形態は腸管の

ものとほぼ同様であったが、数は味蕾の方が少數であった。小腸では一本の絨毛につき約500個の孔が分布していると言われている²³⁾腸管では好中球、大食細胞、リンパ球などの自由細胞²³⁾さらに粘膜上皮細胞²⁵⁾がこの孔を通過すると考えられている。味蕾でも、カエルでは味蕾細胞の指状突起が基底膜をつらぬいて固有層へ出ている²⁶⁾ことが報告されているが、恒常に味蕾の基底膜をつらぬくものとしては神経があげられている。神経は束をなして基底膜に孔を開け味蕾内に侵入しており、透過電顕でも神経の通路としての孔の存在が予測されている²⁷⁾さらに基底膜は機械的刺激によりゾルーゲル変化を起すので、裏打ちする膠原線維が構造をささえていると考えられており²⁸⁾したがって小孔の形も容易に変化しうると推測される。味蕾の場合、絶えず細胞は交代しており、細胞の死滅により、支配神経は変性し、通過していた基底膜の孔はふさがり、新たな神経線維が侵入する際に再び形成されるというように孔は恒常的な存在ではないと思われる。また味蕾直下の基底膜の孔の大部分は神経線維の通路と考えられるが、一部の小孔はリンパ球などの自由細胞の通路でもあることが推測される。

結論

オスミウム消化法により、味蕾細胞の細胞内小器官を走査電顕で観察した。Ⅰ型細胞の粗面小胞体、Ⅱ型細胞の滑面小胞体、Ⅲ型(味)細胞の小胞、また各型細胞に存在するゴルジ装置の立体構造が剖出された。さらに味蕾細胞間を走行する神経線維、味蕾細胞同士の嵌合、基底膜の小孔の存在を観察した。

文献

1. Tanaka, K. and Naguro, T. : High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method, Biomed.

- Res., 2 (supple.) ; 63—70, 1981.
2. 山形健治：ハムスター肝細胞の走査電顕的研究, 米子医学雑誌, 33 ; 227—239, 1982.
 3. 益永恭光：副腎皮質ミトコンドリアの走査電顕的観察, 米子医学雑誌, 32 ; 24—30, 1981.
 4. Miyamoto, T. and Tanaka, K. : Three-dimensional structure of Golgi complex in rat intestinal epithelium and its morphological changes during fat absorption, Arch. histol. jap., 45 ; 23—36, 1982.
 5. 小川隆嗣：ラット顎下腺の走査電顕的観察, 米子医学雑誌, 33 ; 358—369, 1982.
 6. 丹生讓治：関節軟骨細胞の走査電顕的研究, 米子医学雑誌, 34 ; 475—487, 1983.
 7. Tanaka, K. and Mitsushima, A. : A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy, J. Microscopy, 133 ; 213—222, 1983.
 8. 濑川和之, 滝口勵司：骨芽細胞と骨基質の形成層と石灰化層の立体超微形態について, 歯基礎誌, 26(抄) ; 240p, 1984.
 9. 大御 覚, 小沢英浩：形成期エナメル芽細胞の立体微細構造学的特徴と機能—SER-Golgi系を中心として—, 歯基礎誌, 26(抄) ; 241p, 1984.
 10. Shimamura, A., Tokunaga, J. and Tōh, H. : Scanning electron microscopic observations on the taste pores and taste hairs in rabbit gustatory papillae, Arch. histol. jap., 34 ; 51—60, 1972.
 11. Ovalle, W. K. and Shinn, S. L. : Surface morphology of taste buds in catfish barbels, Cell Tissue Res., 178 ; 375—384, 1977.
 12. Düring, M. v. and Andres, K. H. : The ultrastructure of taste and touch receptors of the frog's taste organ, Cell Tissue Res., 165 ; 185—198, 1976.
 13. Korte, G. E. : Ultrastructure of the taste buds of the red-eared turtle, *Chrysemys scripta elegans*, J. Morphol., 163 ; 231—252, 1980.
 14. 鈴木裕子, 武田正子：鳥類味蕾の微細構造, 歯基礎誌, 26 ; 669—678, 1984.
 15. Toyoshima, K. and Shimamura, S. : A scanning electron microscopic study of taste buds in the rabbit, Biomed. Res. 2 (supple.) ; 459—463, 1981.
 16. Murray, R. G. : The ultrastructure of taste buds. In : Ultrastructure of Sensory Organs, (ed. Friedman, I.), 1—81, North Holland, American Elsevier, 1973.
 17. Takeda, M. and Hoshino, T. : Fine structure of taste buds in the rat, Arch. histol. jap., 37 ; 395—413, 1975.
 18. Paran, N., Mattern, C. F. T. and Henkin, R. I. : Ultrastructure of taste bud of the human fungiform papillae, Cell Tissue Res., 161 ; 1—10, 1975.
 19. Christensen, A. K. : The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs, J. Cell Biol., 26 ; 911—935, 1965.
 20. 稲賀 潔：滑面小胞体の走査電顕的考察, 米子医学雑誌, 34 ; 44—55, 1983.
 21. Smith, C. A. and Sjöstrand, F. S. : Structure of the nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections, J. Ultrastr. Res., 5 ; 523—556, 1961.
 22. Suzuki, Y. and Takeda, M. : Three-dimensional ultrastructure of taste bud cells and nerve fibers in the mouse, Jpn. J. Oral Biol., in press, 1985.
 23. Komuro, T. : Fenestrations of the basal lamina of intestinal villi of the rat. Scanning and transmission electron microscopy, Cell Tissu Res., 239 ; 183—188, 1985.
 24. McClugage, S. and Low, F. N. : Micro dissection by ultrasonication: Porosity of the intestinal epithelial basal lamina, Am. J. Anat., 171 ; 207—216, 1984.
 25. 名黒知徳, 飯野晃啓, 舟木賢治：腸管基底膜の穴に関与する細胞, 解剖誌, 60 ; 21p, 1985.
 26. Toyoshima, K., Honda, E., Nakahara, S. and Shimamura, A. : Ultrastructural and histochemical changes in the frog taste organ following denervation, Arch. histol. jap., 47 ; 31—42, 1984.
 27. Nemetschek-Gansler, H. and Ferner, H. : Über die ultrastruktur der Geschmacksknospen, Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 63 ; 155p, 1964.
 28. Warfel, K. A. and Hull, M. T. : Migration of lymphocytes through the cutaneous basal lamina in normal skin: an ultrastructural study, Anat. Rec., 208 ; 349—355, 1984.

Explanation of Figures

- Fig. 1** Fractured surface of a circumvallate papilla. Taste buds (T) are clearly distinguished from the surrounding epithelium. G : groove. bar : 10 μm . $\times 1,800$.
- Fig. 2** Middle part of a type-I cell (1). Cisternae of rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER) form a complicated network. On their surface, many ribosomes are attached. bar : 0.5 μm . $\times 18,000$.
- Fig. 3** r-ER in close vicinity to the cytoplasmic membrane (M) in a type-I cell. A flattened cisterna of r-ER is fenestrated (arrows). bar : 0.5 μm . $\times 20,000$.
- Fig. 4** Basal part of a type-I cell. rER (arrows) is located along a nerve terminal (N). M : mitochondria. bar : 0.5 μm . $\times 18,000$.
- Fig. 5** Middle part of a type-II cell (2). Smooth-surfaced endoplasmic reticulum (sER) form an irregular network of branching and anastomosing tubules. Small pores (arrows) are frequently seen in the flattened cisternae. bar : 0.5 μm . $\times 21,000$.
- Fig. 6** A connection between smooth-surfaced endoplasmic reticulum (sER) and rough-surfaced endoplasmic reticulum (rER) in a type-II cell. bar : 0.5 μm . $\times 15,000$.
- Fig. 7** Vacuoles (V) are attached on the surface of endoplasmic reticulum in a type-II cell. rER : rough-surfaced endoplasmic reticulum. sER : smooth-surfaced endoplasmic reticulum. bar : 0.5 μm . $\times 16,000$.
- Fig. 8** A swollen cisterna of smooth surfaced endoplasmic reticulum (arrows) is located along a nerve terminal (N) in a type-II cell. M : mitochondria. bar : 0.5 μm . $\times 25,000$.
- Fig. 9** Middle part of a type-III (3) cell. Many vesicles (V) of 110–140 nm in diameter and of 60 nm are scattered in the cytoplasm. M : mitochondria. bar : 0.5 μm . $\times 20,000$.
Inset shows an accumulation of vesicles (V) along a nerve terminal (N). Some vesicles (arrow) are attached to the membrane of the terminal in a type-III cell. bar : 0.5 μm . $\times 18,000$.
- Fig. 10** A Golgi apparatus (Go) in a type-II cell. Vesicles (V) of 60 nm in diameter are attached on the outer surface of cisternae. sER : smooth-surfaced endoplasmic reticulum. bar : 0.5 μm . $\times 16,000$.
- Fig. 11** A Golgi apparatus (Go). A network consisting of the branching tubules is seen in the inner side of Golgi apparatus. Many vesicles of various sizes are seen. bar : 0.5 μm . $\times 16,000$.
- Fig. 12** Apical part of a taste bud. 1 : type-I cell. 2 : type-II cell. G : granule. bar : 0.5 μm . $\times 18,000$.
- Fig. 13** Basal part of a taste bud. Many nerve terminals (N) penetrate among the taste bud cells. bar : 0.5 μm . $\times 13,000$.
- Fig. 14** A nerve fiber (N) which form a swollen nerve terminal (NT) contacts with both the type-I (1) and type-II (2) cells. Arrows indicate the processes of the taste bud cells. bar : 0.5 μm . $\times 13,000$.
- Fig. 15** The basal lamina after removal of the epithelium. Asterisks indicate the basal lamina which is located directly beneath the removed taste buds. bar : 5 μm . $\times 2,200$.
- Fig. 16** The basal lamina underlying a taste bud is perforated by small pores (P). Collagenous fibrils (Co) are clearly seen under the basal lamina. bar : 0.5 μm . $\times 12,000$.
- Fig. 17** Collagenous fibrils are lacking within the pores (P) of the basal lamina underlying a taste bud. bar : 0.5 μm . $\times 18,000$.









