

〔総説〕

味蕾細胞と神経

武田 正子*, 内田 暢彦**, 鈴木 裕子*

*北海道医療大学歯学部口腔解剖学第二講座

**北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座

*(主任：武田 正子教授)

Taste bud cells and nerves

Masako TAKEDA*, Nobuhiko UCHIDA**, and Yuko SUZUKI*

*Department of Oral Anatomy, **Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

*(Chief. Prof. Masako TAKEDA)

Abstract

Sectioning of glossopharyngeal nerves which innervate the taste buds in the circumvallate papillae caused apoptosis of taste buds, the numbers decreasing and the taste buds disappearing after 11 days. This indicates that gustatory nerves may release a trophic substance that induces and maintains taste buds. Taste bud cells contain neurotrophins, NCAM, NSE, PGP9.5, and NeuroD which are specific markers of neurons. The BDNF and GDNF of neurotrophins, and Trk B and GFR α 1 of their receptors were expressed in normal taste bud cells. After denervation they were still expressed in the remaining taste bud cells, and after regeneration of nerves they reappeared in regenerated taste bud cells. It is suggested that BDNF and GDNF are involved in ensuring an adequate contact between taste bud cells and nerves, and that they act as a neurotrophic factor for innervating gustatory neurons, although they can not prevent apoptosis of taste bud cells. The types of taste bud cells containing NCAM, NSE, PGP 9.5, serotonin, Mash 1, and Neuro D are also discussed.

Key words : Taste bud, Apoptosis, Denervation, BDNF, GDNF.

受付：平成14年3月31日

緒 言

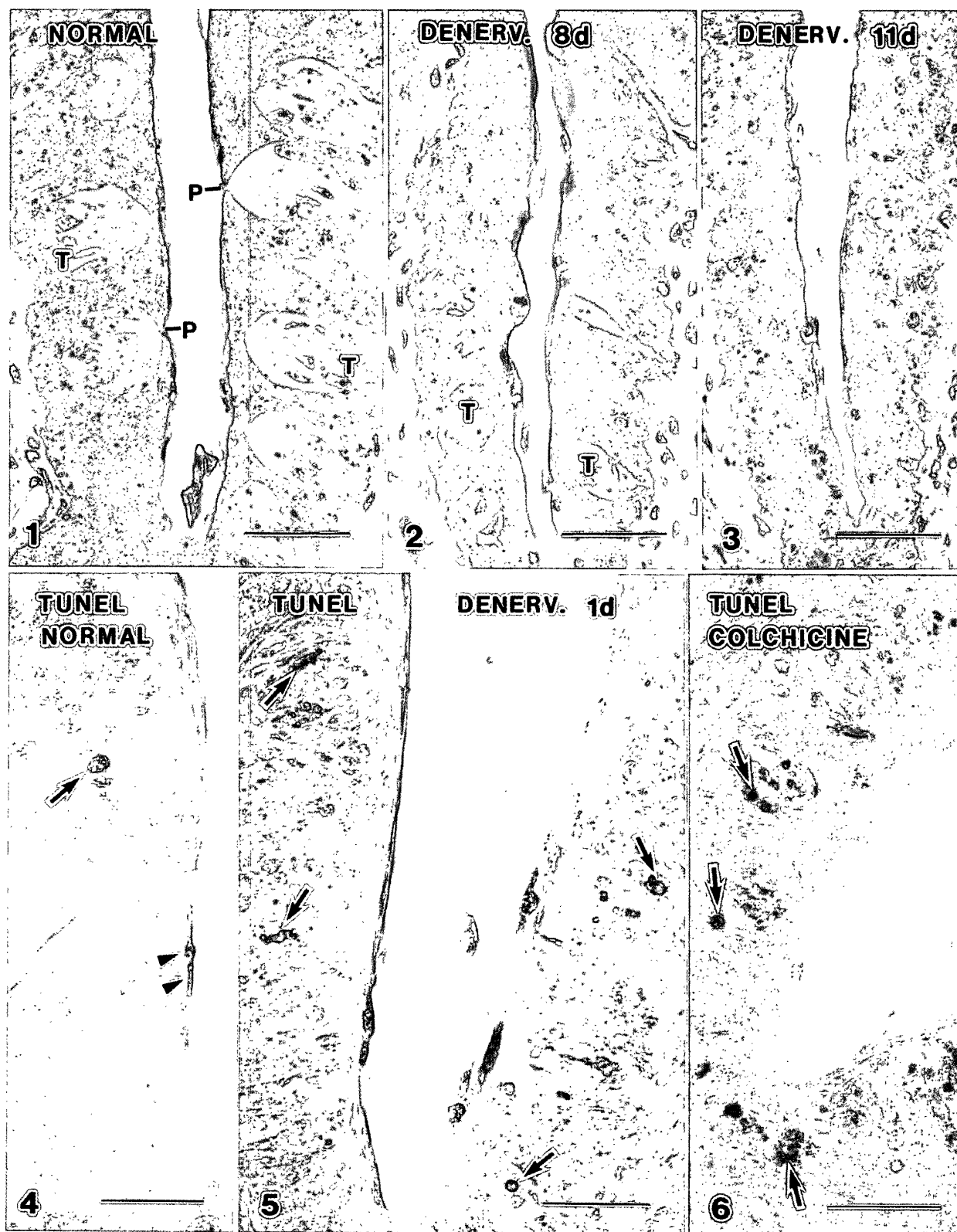
味蕾は文字通り、つぼみ(蕾)の形をしており、味覚を受容する末梢の器官である。舌背の有郭、葉状、および茸状の各乳頭、さらに口蓋、咽頭、喉頭蓋などの上皮内に明るい細長い大きな細胞の集合体として存在する(Fig. 1)。味蕾の頂上部の味孔には味蕾細胞の先端が微絨毛となって突き出ており、この部分の細胞膜の受容体が味物質を受容する。その結果、味細胞が興奮し、その興奮は細胞の基底側にあるシナプスを介して神経線維に伝えられ、延髄、視床を経由して大脳皮質の味覚中枢に伝えられる。

一方、味覚と同じ化学感覚で、匂いを受容する鼻腔の嗅上皮の嗅細胞は、それ自身が神経線維を持つニューロンである¹⁾。味蕾の細胞は、嗅細胞のような軸索は持っていないが、ニューロンを特異的に認識するマーカーであるNCAM (neural cell adhesion molecule, 神経細胞接着分子)²⁻⁶⁾、NSE (neuron-specific enolase)⁷⁻¹⁰⁾、PGP 9.5 (protein gene product 9.5)^{8,9,11)}、Spot 35¹⁰⁾などのタンパク質を含有する。また、神経分化に関与するMash 1 (mammalian achaete-scute homologue 1)¹²⁾やNeuroD¹³⁾などの転写因子も味蕾細胞に発現する。さらに、神経栄養因子(neurotrophin, NT)と呼ばれているNGF^{14,15)}、BDNF¹⁵⁻¹⁹⁾あるいはGDNF²⁰⁾などが味蕾細胞に検出されている。また哺乳類において、味覚を伝達する舌咽神経あるいは鼓索神経を切断すると、その支配領域の味蕾が変性、消失し、切断された神経が再生すると味蕾も再生してくることが古くから知られている²¹⁻²³⁾。このことから、味蕾の支配神経は味蕾を栄養する因子を持つことが推測されているが、その因子がどのような物質であるかは現在のところ不明である。われわれのグループの最近の研究により、支配神経切断後の味蕾の消失は、味蕾細胞がアポトーシスにより死んでい

くことによるということがわかった²⁴⁾。すなわち、味神経は味蕾細胞のアポトーシスを抑制する物質を持つということである。ここでは、味蕾細胞のアポトーシスについて述べ、さらに神経栄養因子やNCAMなどの味蕾細胞に発現するタンパク質について述べながら、味蕾細胞と神経との関係を考察してみた。

味蕾細胞のアポトーシス

アポトーシスは、ネクローシスとは異なり核DNAのヌクレオソーム単位の断片化により引き起こされる細胞死である²⁵⁾。DNA nick end labeling (TUNEL) 法は、切片上でアポトーシス細胞を検出する方法である²⁶⁾。この方法によりマウスの有郭乳頭を染めると、溝に面する非角化重層扁平上皮の最表層の上皮細胞にしばしば陽性反応がみられるが、味蕾には時折陽性細胞が見られるのみであった(Fig. 4)。すなわち、有郭乳頭の溝に面する上皮細胞は基底側で分裂、増殖して次第に表層に移動し、最表層でアポトーシスにより死ぬと考えられる。また、正常の味蕾細胞もゆっくりとではあるが、アポトーシスにより置きかえられると思われる²⁴⁾。³H-thymidineを投与する方法により、味蕾細胞の寿命はラットやマウスでは9-10日ぐらいであり、絶えず味蕾周囲の基底側の上皮細胞の分化により補充されていることがわかっている^{27,28)}。有郭乳頭味蕾の支配神経である舌咽神経を切断すると、3日目頃から味蕾の数が減少し始め、小型化し、11日目にはほぼ消失する(Fig. 2, 3)。TUNEL法を行うと、切断24時間後に味蕾内に多くのTUNEL陽性核が認められ(Fig. 5)、その後、次第に陽性核は減少した。神経切断24時間後の味蕾を透過電子顕微鏡により観察すると、アポトーシスに特有の凝縮した均質の高電子密度の細胞核が認められた²⁴⁾。このことから支配神経と切り離された味蕾細胞は生存出来ず、さらに周囲上皮の基底細



Figs. 1-3 Toluidine-blue staining of circumvallate papillae from normal and denervated mice. Scale bar=50 μ m.

Fig. 1 Normal mouse. Numerous taste buds (*T*) are situated in the trench walls. *P*, taste pore.

Fig. 2 8 days after denervation. The number and size of taste buds (*T*) decreased.

Fig. 3 11 days after denervation. The taste buds had disappeared.

Figs. 4-6 TUNEL staining of circumvallate papillae from normal, denervated, and colchicine injected mice. Scale bar=50 μ m.

Fig. 4 Normal mouse. TUNEL-positive nuclei (*arrow*) are scarce in the taste buds, however, they are common in the uppermost layer of the trench wall epithelium (*arrowheads*).

Fig. 5 1 day after denervation. TUNEL-positive nuclei (*arrows*) are numerous in the taste buds.

Fig. 6 16 hours after colchicine injection. TUNEL-positive nuclei (*arrows*) are numerous in the taste buds. Nuclei are stained with methyl green.

胞が味蕾細胞へ分化することも出来ず、味蕾は消失してしまうものと考えられる。すなわち、味蕾の支配神経は味蕾細胞の分化と生存維持を促す栄養因子を持つということになる²⁴⁾。言いかえれば、味蕾細胞の生存は自律的なものではなく、支配神経のニューロンが放出する栄養因子に依存していると言える。

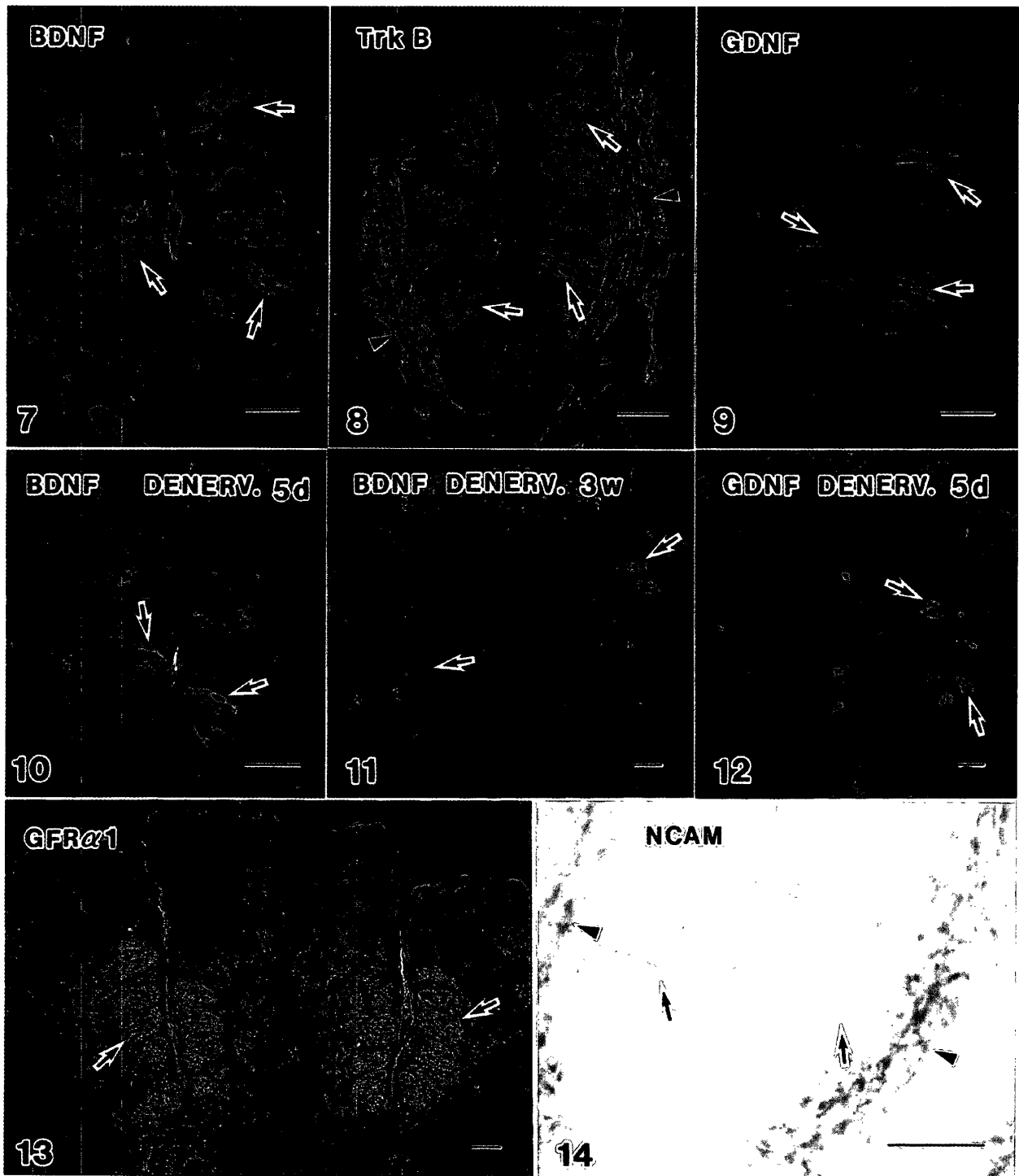
種々の細胞のアポトーシスはこのような細胞の栄養因子除去によるものの他に、放射線やある種の薬剤投与後にも起こることがわかっている。味蕾でも、微小管の脱重合剤であるコルヒチンをマウスの腹腔内に注射し、16時間後に有郭乳頭上皮をTUNEL法で観察すると、多数の味蕾細胞がアポトーシスに陥っていた (Fig. 6)。これを、透過電子顕微鏡や抗tubulin抗体による免疫組織化学的方法により調べると味蕾細胞の微小管が減少していた。これは、微小管の減少により細胞膜の透過性が変化し、カルシウムイオンの流入が促進され、あるいはcaspase-3の活性化が起こり、その結果DNAaseが活性化されてDNAの断裂が起こったものと考えられる²⁹⁾。一方、カリウムイオノフォアであるバリノマイシンも、味蕾細胞のアポトーシスを引き起こすが、これも、バリノマイシンの細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる作用によると思われる³⁰⁾。

味蕾細胞の神経栄養因子

神経栄養因子は、神経細胞の増殖、分化の調節、生存、さらに機能維持などに働く神経栄養作用を持っている。この因子には、NGFファミリーに属するものとしてNGF (nerve growth factor, 神経成長因子)、BDNF (brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子)、

NT 3, NT 4, NT 5があり、GDNFファミリーとしてGDNF (glia cell-line derived neurotrophic factor, グリア細胞株由来神経栄養因子)、NTN (neurturin), PSP (persephin), ARTN (artemin) があり、その他に、CNTF (ciliary neurotrophic factor), PDGF (platelet derived growth factor) などがある。これらの因子は、標的細胞から由来して神経細胞に作用する。このうち、味蕾細胞に発現するBDNFとGDNFについて述べてみる。

BDNFは、119個のアミノ酸から成り、分子量は13.5kDでその構造はNGFに良く似ている。BDNFの高親和性レセプターは、trkBで145kDの膜貫通型チロシンキナーゼである³¹⁾。GDNFファミリーはTGF- β スーパーファミリーに属し、GDNFは211個のアミノ酸から成る前駆タンパク質として翻訳された後、プロテアーゼによる分解を受けて134個のアミノ酸から成る分子量18-42kDの分泌型の成熟タンパク質になる。GDNFは、細胞表面タンパク質のGFR α 1と結合後、膜型チロシンキナーゼであるRetを活性化し作用を発揮する^{32,33)}。われわれのグループではマウスの有郭乳頭味蕾について、BDNFおよびGDNF、さらにそれらのレセプターについて抗体を用いて免疫組織化学的方法で調べてみた。BDNFは、味蕾の細胞の殆どの胞体に陽性を示した (Fig. 7)。レセプターのTrkBは、大部分の味蕾細胞の膜に反応し、さらに結合組織に多数存在する神経線維にも陽性を示した (Fig. 8)。GDNFは、味蕾の中の一部の細長い細胞の胞体に陽性を示した (Fig. 9)。GFR α 1は大部分の味蕾細胞の膜が反応したが (Fig. 13)、Retは味蕾細胞には全く反応を示さなかった。すなわち、味蕾細胞ではレセプター



Figs.7-13 Immunofluorescent staining of circumvallate papillae from normal and denervated mice. Scale bar=50 μ m.

Fig. 7 BDNF, normal mouse. Most taste bud cells (*arrows*) are stained.

Fig. 8 TrkB, normal mouse. Most taste bud cells (*arrows*) and many nerve fibers in the connective tissue (*arrowheads*) are stained.

Fig. 9 GDNF, normal mouse. Some taste bud cells (*arrows*) are stained.

Fig.10 BDNF, 5 days after denervation. A few taste buds (*arrows*) are stained.

Fig.11 BDNF, 3 weeks after denervation. Some taste buds (*arrows*) are regenerated.

Fig.12 GDNF, 5 days after denervation. A few taste buds (*arrows*) are stained.

Fig.13 GFR α 1, normal mouse. Most taste bud cells (*arrows*) are stained.

Fig.14 NCAM. Immunohistochemical staining of circumvallate papillae from a normal mouse. Some taste bud cells (*arrows*) and nerve fibers (*arrowheads*) are positive. Scale bar=50 μ m.

のGFR- α 1はRetを介さない経路をとると思われる。舌咽神経を切断すると次第に味蕾の数は減少するが、残存する味蕾細胞は、抗BDNF抗体と抗GDNF抗体に対して無処置のものと同様の陽性反応を示した (Figs.10, 12)。さらに神経切断後3週頃になると神経が再生するとともに消失した味蕾も再生してくるが、この再生味蕾にもBDNF, およびGDNFは存在した (Fig.11)。

In situハイブリダイゼーション法により、BDNF mRNAが、発達過程および成熟したラットの舌乳頭の味蕾細胞に発現することが報告されているが^{16,17)}、われわれのタンパク質レベルでの正常及び神経切断後の味蕾細胞のBDNFの存在と合わせて、味蕾細胞はそれ自身でBDNFを合成していると言える。このBDNFの役割であるが、一つは、結合組織の神経線維にレセプターのtrkBが発現していることから、味蕾細胞が合成したBDNFがこのtrkBに結合し、所属神経節のニューロンに情報が伝えられ、ニューロンの栄養因子として作用を発揮することが考えられる。なお、舌咽神経節ニューロンにはBDNF免疫陽性活性とBDNF mRNAが検出されていることから³⁴⁾、このニューロンが到達する延髄の弧束核ニューロンも、BDNFの栄養効果を享受しているのかもしれない。さらに、神経節ニューロンで合成されたBDNFが逆行性に神経線維を輸送されて、味蕾に到達して細胞膜のtrkBに結合し、味蕾細胞を栄養する作用を発揮するのかもしれない。一方、味蕾細胞のBDNFのもう一つの役割は、味蕾細胞膜のTrkBを介して隣接する細胞が相互に情報を交換し、それぞれの細胞が活性化され、あるいは自分自身も活性化され増殖、分化、維持が図られるというようなオートクライン、パラクラインの作用が考えられる。しかし、神経切断により味蕾の神経が消失すると残存する味蕾細胞がBDNFを持っているにもかかわらず、この細胞

が減少、消失してしまったことを考えると、味蕾細胞の持つBDNFのみでは細胞死は抑制出来ず、また上皮細胞からの新しい味蕾細胞の分化も起こらないと言える。味蕾の分化、生存を可能にするには味覚神経から分泌、あるいは放出される別の未知の物質が必要ということになる。その他に神経細胞は電気的活動、すなわち脱分極刺激などが生存にとって必要な条件の一つとして考えられているが、このことが味蕾細胞にもあてはまると推測される。すなわち、神経切断の結果として味蕾細胞の興奮が起らなくなるのが細胞死につながる原因の一つであるのかもしれない。BDNFのノックアウトマウス (bdnf^{-/-}) は、生後2-3週で死亡するが、この時、葉状、茸状の各乳頭が未発達で小さく、乳頭を支配する神経線維の減少と各乳頭の味蕾の著しい減少、あるいは欠失、味覚識別不能が報告されている³⁵⁻³⁸⁾。また、TrkBのノックアウトマウスでも有郭乳頭の神経線維の減少と味蕾の消失が観察されており³⁹⁾、BDNFが味覚神経線維の発達のために必要であることがわかる。BDNFを過剰発現するトランスジェニックマウスでは膝と舌咽神経節のニューロンは増加するが、乳頭は未発達で、味蕾も小さいものが少数しか認められない。これは、多数の神経線維が舌の基部まで来るが、そこから乳頭まで伸びていけないからであり³⁹⁾、このことから正常の神経線維が乳頭上皮に侵入することが味蕾の発達にとって必須であると言える。

GDNFは、培養系で中脳黒質ドーパミン作動性ニューロンに対して生存維持作用を示し、ドーパミンの取り込みを促進させる⁴⁰⁾。マウスにドーパミンの前駆物質であるL-ドーパを注射すると、味蕾細胞はこれを取り込みドーパミンに変え、Falck-Hillarp法によりカテコールアミン蛍光が検出される^{41,42)}。このことからドーパミンは、味蕾細胞のシナプスにおける神経伝達物質の一つとして働く可能性が考えられ

ている。したがって、味蕾細胞に発現するGDNFはドーパミンの作用を助け、シナプス伝達を円滑に行わせることに役立つのではないかと思われる。また、GDNFは味蕾細胞の細胞膜の受容体GFR α 1と結合して、自身のあるいは隣接する細胞の生存維持に働くのかもしれない。ただし、この場合もBDNFと同様、神経切断後の残存する味蕾細胞がGDNFを持つにもかかわらず細胞死を防げなかったことから、神経との接続が必須であり、GDNFのみでは細胞死を防ぐことは出来ないと言える。また、GDNFはBDNFとともにtarget由来の神経栄養因子として味覚神経節のニューロンに作用するのかもしれない。

味蕾細胞と神経に発現するその他の因子

哺乳類の味蕾は基底側から味孔まで伸びる紡錘形の細胞から成るが、光学顕微鏡観察では、明るい比較的幅の広い明細胞と、暗く幅の狭い暗細胞に分けられ、透過電子顕微鏡観察では4つの型に分けられている。I型細胞は暗調で細長く頂上部胞体に味孔内物質を分泌する顆粒を持ち、II型細胞は明調で幅広く空胞や滑面小胞体を多数含有し、III型細胞は比較的暗調で神経線維とシナプス接合を行い味覚を神経に伝達する役割を持ち、IV型は基底側にあり背が低く未分化で、I、II、III型の各細胞型に分化する基底細胞である^{43,44}。近年、味蕾の細胞に種々のタンパク質が免疫組織化学的方法により証明されるようになり、これらがどの型の細胞に存在するか調べられ、各細胞型の機能が次第に明らかにされてきた。

神経細胞接着分子NCAMは、ニューロンなどの細胞膜に存在し、Ca非依存性に細胞間の接着を媒介する糖タンパク質であるが、マウスの味蕾細胞膜に発現する²⁻⁶(Fig.14)。これは4型の細胞のうちのシナプスを持つIII型の膜に存在することが免疫電顕法により証明されており、ま

た、支配神経切断後10日目頃まで残存する味蕾細胞にも発現する^{2,6}。前述のように味蕾細胞は絶えず入れ代わっており、それに従いシナプスも作り変えられる。したがってNCAMは、III型細胞と神経との適切なシナプス接合に関与するものと思われる。免疫蛍光法で二重染色を行い共焦点走査レーザー顕微鏡で観察した報告によると、ラットでは、NCAMとセロトニンが同一のIII型細胞に共存し、別のIII型細胞にはNCAMとPGP9.5およびNSEが共存し、さらに別のIII型細胞にはNCAMが単独で存在する⁹。セロトニンはドーパミンと同様、III型細胞のシナプスにおける神経伝達物質候補の一つである⁴⁵。PGP9.5とNSEはII型細胞でも共存する⁹。また、II型細胞にはgustducinが存在することが報告されている⁴⁶。Gustducin (G protein, guanine nucleotide-binding protein)は、ノックアウトマウスが苦味と甘味に対する感受性を失っていたことから、苦味と甘味の受容に関与すると考えられている。したがってII型細胞はIII型細胞とともに味覚伝達に直接関与するものと思われる。また、明細胞には α -gustducinとoligosaccharide blood-group抗原の一つであるLewis^bが共存する⁴⁷。

味蕾は、重層扁平上皮の中に神経が侵入した後、基底側の上皮細胞が分化して味蕾の基底細胞となる⁴⁸。発達過程において一定の間隔で繰り返す構造に関わるSonic hedgehog (Shh, ソニックヘッジホッグタンパク質)が、胎生14日のマウス舌で茸状乳頭の形成とともにこの乳頭に発現する⁴⁹。成熟マウスの味蕾の周囲上皮の基底側の細胞には、ShhのレセプターであるPatched 1 (Ptc)のmRNAが発現しており、さらに味蕾の中の基底細胞にはShhのmRNAが発現している。これらは、味蕾の支配神経を切断すると切断後4日目のまだ味蕾が残存している時期にすでに消失してしまう⁵⁰。このような味蕾の支配神経切断後早期のShhの消失は、神

経から放出される因子がShhの発現を調節していることを示している。核内においてDNAに結合し、遺伝子の転写を調節するHLH型の因子であるMASH 1は神経系の前駆細胞に一過性に発現し、神経分化に必須のものであるが、これが味蕾の基底細胞に発現する¹²⁾。同じようにHLH型転写制御因子に属するNeuro D (neurogenic differentiation factor)は細長い味蕾細胞において検出されている。Neuro Dは、NCAMと同一細胞に共存することはないがgustducinとは共存することから、III型細胞には存在せず、II型細胞に存在すると考えられる¹³⁾。Neuro Dは、活発な分化が行われているニューロンに発現することが報告されていることから、おそらく絶えず交代している味蕾の細胞の分化の制御、成熟に働いているのであろう。

一方、味蕾直下の結合組織、味蕾内および味蕾の周辺上皮に存在する多数の神経線維には、種々のタンパク質が検出されている。これらには、すでに述べた味蕾細胞にも含まれるPGP9.5, NSE, NCAM(Fig.14), TrkB(Fig. 8)などの他に神経線維のみが持つGAP-43 (growth-associated protein 43)⁵¹⁾, CGRP (calcitonin gene-related peptide)⁸⁾, SP(substance P)⁵²⁾がある。SPを持つ神経は味蕾内に侵入してI, II, IIIの各型細胞に接触するが、III型細胞とのシナプス接合は観察されていない。また、このSPはCGRPと共存することが多い。これらGAP-43, CGRP, SPいずれも味蕾細胞の誘導や維持への関与が推測されているが、確たる証拠は今のところない。

今後、味蕾細胞および味覚ニューロンに発現する種々のタンパク質が明らかにされ、それらが味蕾の発生とどう関わっているのか、味覚の伝達にどのような役割を果たしているのかが解明されていくことにより、神経から由来する味蕾細胞を栄養する因子も明らかになっていくことと思われる。

文 献

1. Suzuki, Y. and Takeda, M. : Basal cells in the mouse olfactory epithelium after axotomy : immunohistochemical and electron microscopic studies. *Cell Tissue Res.*, **266** : 239-245, 1991.
2. Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J. Electron Microsc.*, **41** : 375-380, 1992.
3. Nolte, C. and Martini, R. : Immunocytochemical localization of the L1 and N-CAM cell adhesion molecules and their shared carbohydrate epitope L2/NHK-1 in the developing and differentiated gustatory papillae of the mouse tongue. *J. Neurocytol.*, **21** : 19-33, 1992.
4. Nelson, G. M. and Finger, T. E. : Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J. Comp. Neurol.*, **336** : 507-516, 1993.
5. Smith, D. V., Klevitsky, R., Akesson, R. A. and Shipley, M. T. : Expression of the neural cell adhesion molecule (NCAM) and polysialic acid during taste bud degeneration and regeneration. *J. Comp. Neurol.*, **347** : 187-196, 1994.
6. Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Breipohl, W. : Expression of the neural cell adhesion molecule in mouse taste buds after denervation. *J. Electron Microsc.*, **48** : 39-45, 1999.
7. Hirata, K. and Kanaseki, T. : Immunohistochemical studies on neuron-specific enolase in developing rat vallate papillae. *Anat. Embryol.*, **180** : 159-163, 1989.
8. Wakisaka, S., Miyawaki, Y., Youn, S. H., Kato, J. and Kurisu, K. : Protein gene-product 9.5 in developing mouse circumvallate papilla : comparison with neuron-specific enolase and calcitonin gene-related peptide. *Anat. Embryol.*, **194** : 365-372, 1996.
9. Yee, C. L., Yang, R., Böttger, B., Finger, T. E. and Kinnamon, J. C. : "Type III" cells of rat taste buds : immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.*, **440** : 97-108, 2001.
10. Yoshie, S., Wakasugi, C., Teraki, Y., Iwanaga,

- T. and Fujita, T. : Immunocytochemical localizations of neuron-specific proteins in the taste bud of the guinea pig. *Arch. Histol. Cytol.*, **51** : 379-384, 1988.
11. Iwanaga, T., Han, H., Kanazawa, H. and Fujita, T. Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) in sensory paraneurons of the rat. *Biomed. Res.*, **13** : 225-230, 1992.
 12. Seta, Y., Toyono, T., Takeda, S. and Toyoshima, K. : Expression of Mash1 in basal cells of rat circumvallate taste buds is dependent upon gustatory innervation. *FEBS Letters*, **444** : 43-46, 1999.
 13. Suzuki, Y., Takeda, M. and Obara, N. : Expression of neuroD in the mouse taste buds. *Cell Tissue Res.*, **307** : 423-428, 2002.
 14. Takami, S., Getchell, M. L., Albers, K. M. and Getchell, T. V. : An age-dependent novel hyperinnervation of circumvallate papillae by tyrosine hydroxylase-containing nerve fibers in NGF-overexpressing transgenic mice. *Brain Res.*, **707** : 303-307, 1996.
 15. Chou, H-C., Chien C-L. and Lu, K-S. : The distribution of PGP 9.5, BDNF and NGF in the vallate papilla of adult and developing mice. *Anat. Embryol.*, **204** : 161-169, 2001.
 16. Nosrat, C. A. and Olson, L. : Brain-derived neurotrophic factor mRNA is expressed in the developing taste bud-bearing tongue papillae of rat. *J. Comp. Neurol.*, **360** : 698-704, 1995.
 17. Nosrat, C. A., Ebendal, T. and Olson, L. : Differential expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin3 mRNA in lingual papillae and taste buds indicates roles in gustatory and somatosensory innervation. *J. Comp. Neurol.*, **376** : 587-602, 1996.
 18. 高橋真弓, 沢伯孔, 高見茂 : ラット味蕾における神経栄養因子BDNFとその受容体trkBについての免疫組織化学的解析. *日本味と匂学会誌*, **3** : 552-555, 1996.
 19. Nosrat, C. A., MacCallum, D. K. and Mistretta, C. M. : Distinctive spatiotemporal expression patterns for neurotrophins develop in gustatory papillae and lingual tissues in embryonic tongue organ cultures. *Cell Tissue Res.*, **303** : 35-45, 2001.
 20. Takeda, M., Uchida, N., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Expression of GDNF and GFR α 1 in mouse taste bud cells. *Acta Anat. Nippo.*, **77** : 37, 2002.
 21. Fujimoto, S. and Murray, R. G. : Fine structure of degeneration and regeneration in denervated rabbit vallate taste buds. *Anat. Rec.*, **168** : 393-414, 1970.
 22. Farbman, A. I. : Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell Tissue Kinetics* **13** : 349-357, 1980.
 23. Hosley, M. A., Huguhe, S. E. and Oakley, B. : Neural induction of taste buds. *J. Comp. Neurol.*, **260** : 224-232, 1987.
 24. Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Apoptosis in mouse taste buds after denervation. *Cell Tissue Res.*, **286** : 55-62, 1996.
 25. Wyllie, A. H. : Apoptosis : cell death in tissue regulation. *J. Pathol.*, **153** : 313-316, 1987.
 26. Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119** : 493-501, 1992.
 27. Beidler, L. M. and Smallman, R. L. : Renewal of cells within taste buds. *J. Cell Biol.*, **27** : 263-272, 1965.
 28. 武田正子 : マウス味蕾の ^3H -サイミジン-オートラジオグラフィによる研究. *解剖誌*, **54** : 230, 1979.
 29. Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Induction of apoptosis by colchicin in taste bud and epithelial cells of the mouse circumvallate papillae. *Cell Tissue Res.*, **302** : 391-395, 2000.
 30. Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Induction of apoptosis by valinomycin in mouse taste buds. *Acta Anat. Nipp.*, **75** : 310, 2000.
 31. Snider, W. D. : Functions of the neurotrophins during nervous system development. What the knockouts are teaching us. *Cell*, **77** : 627-638, 1994.
 32. Unsicker, K. : GDNF : a cytokine at the interface of TGF- β s and neurotrophins. *Cell Tissue Res.* **286** : 175-178, 1996.
 33. Heuckeroth, R. O., Enomoto, H., Grider, J. R., Golden, J. P., Hanke, J. A., Jackman, A., Mol-

- liver, D. C., Bardgett, M. E., Snider, W. D., Johnson, E. M. and Milbrandt, J. : Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* **22** : 253-263, 1999.
34. 岡田美代子, 高見茂, 西山文朗: ラット舌咽神経節におけるBDNFの分布. *日本味と匂学会誌*, **6** : 599-602, 1999.
35. Nosrat, C. A., Blomlöf, J., ElShamy, W. M., Ernfors, P. and Olson, L. : Lingual deficits in BDNF and NT3 mutant mice leading to gustatory and somatosensory disturbances, respectively. *Development*, **124** : 1333-1342, 1997.
36. Oakley, B. : Taste neurons have multiple inductive roles in mammalian gustatory development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **855** : 50-57, 1998.
37. Mistretta, C. M., Goosens, K. A., Farinas, I. and Reichardt, L. F. : Alterations in size, number, and morphology of gustatory papillae and taste buds in BDNF null mutant mice demonstrate neural dependence of developing taste organs. *J. Comp. Neurol.*, **409** : 13-24, 1999.
38. Zhang, C., Brandemuhl, A., Law, D., Lawton, A. and Oakley, B. : BDNF is required for the normal development of taste neurons in vivo. *Neuro. Report*, **8** : 1013-1017, 1997.
39. Ringstedt, T., Ibanez, C. F. and Nosrat, C. A. : Role of brain-derived neurotrophic factor in target invasion in the gustatory system. *J. Neurosci.*, **19** : 3507-3518, 1999.
40. Lin, L. -F. H., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. and Collins, F. : GDNF : a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260** : 1130-1132, 1993.
41. Takeda, M. and Kitao, K. : Effect of monoamines on the taste buds in the mouse. *Cell Tissue Res.*, **210** : 71-78, 1980.
42. Takeda, M., Shishido, Y., Kitao, K. and Suzuki, Y. : Monoamines of taste buds in the fungiform and foliate papillae of the mouse. *Arch. Histol. Jap.*, **45** : 239-246, 1982.
43. Murray, R. G., Murray, A. and Fujimoto, S. : Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. *J. Ultrastr. Res.*, **27** : 444-461, 1969.
44. Takeda, M. and Hoshino, T. : Fine structure of taste buds in the rat. *Arch. Histol. Jap.*, **37** : 395-413, 1975.
45. 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.
46. Yang, R., Tabata, S., Growley, H. H., Margolskee, R. F. and Kinnamon, J. C. : Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **425** : 139-151, 2000.
47. Pumplin, D. W., Getschman, E., Boughter, J. D., Yu, C. and Smith, D. V. : Differential expression of carbohydrate blood-group antigens on rat taste-bud cells : relation to the functional marker α -gustducin. *J. Comp. Neurol.*, **415** : 230-239, 1999.
48. 武田正子: 味蕾の電子顕微鏡的研究. *東日本歯学雑誌*, **1** : 1-17, 1982.
49. Jung, H-S., Oropeza, V. and Thesleff, I. : Shh, Bmp-2, Bmp-4 and Fgf-8 are associated with initiation and patterning of mouse tongue papillae. *Mech. Dev.*, **81** : 179-182, 1999.
50. Miura, H., Kusakabe, Y., Sugiyama, C., Kawamatsu, M., Ninomiya, Y., Motoyama, J. and Hino, A. : Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mech. Dev.*, **106** : 143-145, 2001.
51. Wakisaka, S., Daikoku, H., Miyawaki, Y., Youn, S. H., Maeda, T. and Kurisu, K. : Immunohistochemical observation of growth-associated protein 43 (GAP-43) in the developing circumvallate papilla of the rat. *Cell Tissue Res.*, **293** : 499-507, 1998.
52. Yamasaki, H., Kubota, Y., Takagi, H. and Tohyama, M. : Immunoelectron-microscopic study on the fine structure of substance-P-containing fibers in the taste buds of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **227** : 380-392, 1984.