

マウス嗅粘膜発生と嗅上皮における細胞死の組織学的観察

森 幸 威

胎生12日, 14日, 16日および生後2日目のICRマウスを用いて, 嗅上皮の発生とそれに伴う細胞死について光顕, TUNEL法および走査電顕で観察し, 鼻腔の発生, 嗅上皮の鼻腔内での分布, 嗅上皮3層の分化および嗅上皮内における細胞死と細胞分裂の局在について検討した. 胎生12日の鼻腔上皮は, 大型明調核を有する上皮細胞からなる多列上皮で, 嗅上皮と呼吸上皮とは明瞭に区別できないが, 胎生14日では支持細胞層, 嗅細胞層および基底細胞層の3層を持つ嗅上皮を鼻腔上部で区別できるようになり, 嗅上皮表面に嗅小胞と長い嗅線毛を走査電顕で確認できる. 嗅上皮内には濃縮核を有するTUNEL反応陽性の死細胞が出現する. 胎生14日の嗅上皮に含まれる細胞分裂は嗅部と呼吸部に均等に多数認められるが, 細胞死は嗅部に特に多い. 死細胞は外鼻孔端より後部鼻腔まで広く出現し, 特に鼻腔天蓋と外側壁に多く, 鼻腔のいずれの部位でも鼻中隔上の内側壁嗅上皮には少ない. 死細胞は嗅上皮内で特に浅層と中間層すなわち支持細胞層と嗅細胞層とに多く, 基底細胞層には稀で, 細胞死の分布に嗅上皮内の層で局所的な差違が認められる. 嗅上皮内のアポトーシスの意義を鼻腔の発達と関連して検討した. (平成11年9月13日受理)

A Histological Study of Cell Death in the Developing Olfactory Epithelium of the Mouse Embryos

Yukitake MORI

The occurrence of cell death in developing olfactory epithelium was histologically studied in ICR-mouse embryos at 12, 14 and 16 days of gestation and neonates at 2 days after birth. The distribution of cell death was examined not only by the TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end-labeling) method in paraffin sections, but also by observation of serial 1 μ m plastic sections at 14 days of gestation. At 12 days of gestation, the nasal cavity was wholly covered by pseudostratified epithelium, and it was difficult to distinguish between olfactory epithelium and respiratory epithelium on histological sections. At 14 days of gestation, however, the epithelium of the upper nasal cavity became thick, consisting of three cell layers; a superficial supporting cell layer, a middle olfactory cell layer and a basal cell layer. Under a scanning electron microscope, olfactory vesicles and olfactory cilia could also be observed. The olfactory epithelium contained dying cells with highly pyknotic nuclei in which a TUNEL-positive reaction appeared. Although both the respiratory epithelium and olfactory epithelium contained numerous mitotic figures, apoptotic cells could be observed in the olfactory part of the nasal cavity at 14 days of gestation. The dying cells, which were recognized in the supporting and olfactory cell layers, were observed more frequently in the

olfactory epithelium on the lateral and roof walls than in the median olfactory epithelium on nasal septum. The relationship between programmed cell death and development of the olfactory epithelium was discussed. (Accepted on September 13, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(3): 211-221, 1999

Key Words ① Olfactory epithelium ② Development ③ Apoptosis
④ Mouse embryo

はじめに

嗅上皮は嗅覚の感覚組織であり、嗅線毛や嗅小胞を有する特殊な上皮組織で、その微細構造は Frisch¹⁾ および Seifert ら²⁾ によって詳細に報告された。Cuschieri ら³⁾ はマウスを用いて嗅上皮の発生を観察し、胎生10日目で嗅細胞の軸索突起が発達し始め、嗅小胞は最も早いものでは、胎生12日目に確認できると報告している。嗅上皮の発生を光顕、電顕にて観察すると胎生12日目、13日目のラット嗅粘膜上皮に細胞死が生じ⁴⁾、さらに鼻腔上部の間葉内に一時的に出現する嗅神経層にも細胞死が生じるといわれ⁵⁾、嗅上皮の形成にプログラム細胞死が重要な役割を果たしている可能性がある。

よく知られているように、胎生期のアポトーシスは個体発生における器官発生に関連して生じるプログラム細胞死で、器官の形態形成は細胞分裂と細胞死という拮抗する細胞動態の上で進行する⁶⁾。嗅細胞は約35日周期というきわめて短時間で細胞周期を繰り返す特異性を持つという^{7)~9)}。しかしながら嗅上皮内の細胞死と細胞分裂について、嗅上皮内の層構造の発達と関連させて観察した報告は少ない。

本研究は、鼻腔全域の嗅上皮におけるアポトーシスの分布を組織学的に観察して、嗅上皮発生と細胞死との関連を明らかにすることを目的とする。

材料と方法

使用した動物は ICR マウス胎生12日目11匹、胎生14日24匹、胎生16日7匹および生後2日13匹の総計55匹である。恒常的条件下(22±2℃)

で固形飼料(オリエンタル酵母工業, NMF)と自由飲水とで飼育した雌性成熟マウスを雄性マウスと一晚交配し、翌朝を妊娠0日とした。妊娠マウスを所定の妊娠日数でクロロホルムにて深麻酔して開腹し、子宮より胎子を摘出し断頭した。新生マウスはクロロホルムにて深麻酔後に断頭した。これら胎子および新生子の頭部を次の方法で処理し、鼻腔とくに嗅粘膜を光学顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡で観察した。

光顕観察用切片の作製

1) パラフィン切片

各日齢で6から13匹を用いた。断頭した頭部をブアン液(ピクリン酸飽和液15:ホルマリン5:酢酸1)に投入し、4時間固定した。固定後アルコール系列で型のごとく脱水し、パラフィンに包埋した。5μm厚の前頭断連続切片を作製して、ヘマトキシリン・エオシン染色し光顕にて観察した。

2) 準超薄切片

胎生14日の3匹では、断頭した頭部をただちにカルノフスキー液(4%パラフォルムアルデヒド・5%グルタルアルデヒド混合液, 0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4)に投入し2時間固定後、0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液にて1時間洗浄した。次いでアルコール系列で型のごとく脱水し、水溶性樹脂(テクノビット7100, Kulzer社製)に包埋した。ガラスナイフを用い1μm厚の前頭断面準超薄切片を作製して、トルイジンブルーで染色し観察した。3匹のうち外鼻孔より鼻腔後端まで、前頭断1μm厚切片が完全に連続して作製できた1匹について、次の方法で鼻腔粘膜内の核濃縮像と核分裂像の分布を観察した。すなわち全930枚

の切片から 30 μm ごとに29枚を選択して、顕微鏡 TV モニターで40倍に拡大投影した。鼻腔、嗅粘膜、呼吸粘膜、口腔、大脳、眼球および顔面の外輪郭をプラスチックシートにトレースし、コンピューター (Power Macintosh) にスキャナーで取り込み、鼻腔内における嗅上皮の分布を観察した。次いで鼻腔を外鼻孔より鼻腔後端までをほぼ4等分し、4等分した領域の中央部で3枚の連続切片を重ねて、嗅上皮と呼吸上皮に含まれる上皮細胞の核濃縮像と核分裂像をマークし、細胞死と核分裂の分布・局所の違いを観察した。

3) アポトーシスの検出

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP nick end-labeling) 法で DNA の断片化を、鼻腔粘膜を含む前頭断組織切片上で検出した。胎生14日目の胎子頭部を4%パラホルムアルデヒド液で4℃にて4時間固定し、型のごとくアルコール系列で脱水した後、パラフィンに包埋した。3 μm 厚の切片を作製後、脱パラフィン、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で洗浄し、室温で30分間0.3%過酸化水素水 (99%メタノール) に浸漬して、内因性ペルオキシダーゼを封鎖した。蒸留水で洗浄後再度 PBS で洗浄し、TUNEL 反応液 (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Cat. No. 1684817, Boehringer Mannheim 社製) で60分間37℃で反応させた。PBS で洗浄した後、コンバーター POD 液 (ペルオキシダーゼ標識羊由来抗フルオレセイン抗体, Fab フラグメント) を30分間37℃で反応させた。PBS 洗浄後、DAB (3, 3-ジアミノベンチジン 20 mg, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 100 ml, 5%過酸化水素水, 0.1 ml) で2分間発色させ光顕観察した。対照標本は TUNEL 反応液の代わりに、ターミナルトランスフェラーゼを含まない標識液で処理した。また隣接する切片をヘマトキリン・エオシン染色して核濃縮像と対比して観察した。

走査電顕観察用試料の作製

胎生14日、16日と生後2日の各7から15例について断頭後、外鼻孔から後頭部への水平断面を剃り刃で作製し、鼻腔を上部と下部に分けた。露出した上下の鼻腔表面を PBS で洗浄し、2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジル緩衝液, pH 7.4) にて2時間4℃で前固定した。次いで2%四酸化オスミウム (0.1 M カコジル緩衝液, pH 7.4) にて2時間4℃で後固定し、1%タンニン酸 (0.1 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) で15時間4℃、さらに2%四酸化オスミウム水溶液で2時間4℃で導電染色した。型のごとくアルコール系列で脱水し、t-ブチルアルコールにて凍結乾燥させアルミニウムステージに載台した。鼻腔の標本を白金蒸着した後、S-570 走査型電子顕微鏡 (日立製作所製) にて観察した。

本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 97-078), 川崎医科大学動物実験指針に基づいて実施された。

成 績

1. 新生子マウスの鼻腔粘膜

生後2日のマウス鼻腔の前頭断面を観察すると、鼻腔粘膜は厚い上皮の嗅粘膜と薄い呼吸粘膜とに明瞭に区別できる (Fig. 1a)。嗅粘膜は厚さ 50~70 μm の極めて厚い上皮と固有層を持ち、鼻腔上部に広く分布する。すなわち、鼻中隔上部、鼻腔天蓋部および鼻甲介を含む鼻腔外側壁上部で、鼻腔の上部およそ2/3が嗅粘膜で覆われる。嗅上皮は円柱細胞が密在し、主として円柱細胞の核の位置から鼻腔側の支持細胞層、中央部の嗅細胞層、粘膜固有層に近接する基底細胞層の3層が区別できる。支持細胞は細長い円柱状細胞で、嗅細胞は大型球形の明調核をもち、基底細胞は低円錐形で小型暗調核を有する。粘膜固有層には漿液性嗅腺も認められる (Fig. 1b)。一方、呼吸粘膜は厚さ 10~20 μm の多列線毛円柱上皮で、粘膜固有層には混合腺である鼻腺がみられる (Fig. 1c)。鼻腔の表面を走査電顕で観察すると、線毛が密在する呼吸部

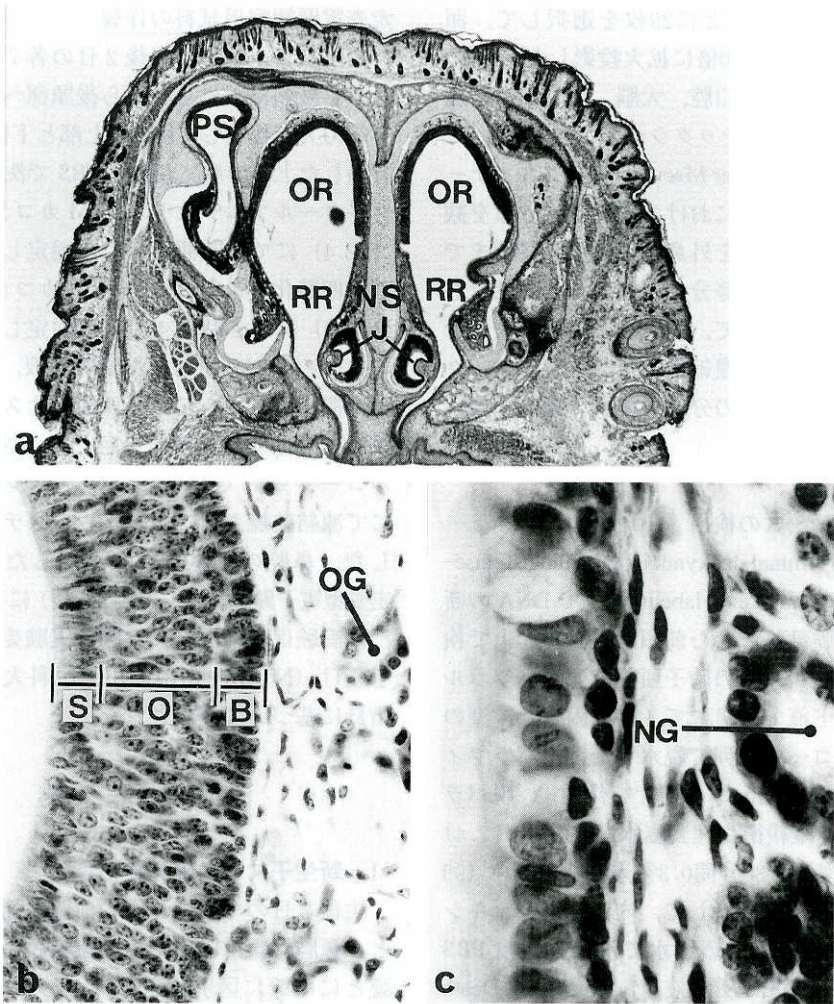


Fig. 1. A midsagittal section of nasal cavity of a two-day-old neonate. H-E staining.

a. A low-powered micrograph.

Epithelium of the olfactory region (OR) is thick and covers the upper nasal cavity. The lower nasal cavity is covered by thin epithelium of the respiratory region (RR). J : Jacobson organ, NS : nasal septum. PS : paranasal sinus. $\times 18$

b. Olfactory region.

The epithelium is about $50-70 \mu\text{m}$ thick, and supporting (S), olfactory (O) and basal (B) cell layers can be distinguished in the epithelium. The olfactory gland (OG) is seen in the lamina propria. $\times 370$

c. Respiratory region.

The epithelium is ciliated simple columnar and about $10-20 \mu\text{m}$ thick. NG : nasal gland. $\times 920$

と嗅部が明瞭に区別できる。嗅部では長い嗅線毛が束状になって粘膜表面上を横走する。嗅線毛束の間に内腔に向かってゆるく膨隆する支持細胞の頂部を認める。支持細胞頂部には多数の短い微絨毛がみられる。粘膜表面の支持細胞間部は大量の横走する嗅線毛束に覆われるため、

粘膜表面から嗅小胞を直接観察することはできない。

2. 胎子嗅上皮の組織学的観察

1) 鼻腔粘膜の発達

a) 胎生12日

口蓋突起の癒合が不完全で、鼻腔と口腔は広い領域で連続する。鼻腔内腔を覆う粘膜上皮の大部分は厚さ $60\sim 80\ \mu\text{m}$ ときわめて厚く、多列円柱上皮で上皮細胞は一様に明調な大型核を有し、新生マウスにみられる支持細胞層、嗅細胞層、基底細胞層の3層構造は形態的に不明瞭である (Fig. 2a)。上皮内には核分裂像がきわめて多数認められ、とくに鼻腔内腔に接する上皮浅層に多い。粘膜表面における嗅小胞の形成は不明瞭である。上皮内には核分裂像に混じって、ごくわずかであるが強度の核濃縮を呈する死細胞が含まれる (Fig. 2b)。

b) 胎生14日

口蓋突起の癒合は胎生12日に比べ進行するが、口蓋の形成はまだ一部で完了しない。この時期に鼻腔の粘膜、粘膜固有層にはいずれの部位にも外分泌腺はみられない。粘膜上皮は鼻腔上部で厚さ約 $100\ \mu\text{m}$ 、口蓋突起の近くや鼻中隔の下部では約 $10\ \mu\text{m}$ の厚さで、鼻腔内で上皮の厚さに明瞭な差違が認められるようになる (Fig. 3a)。厚い嗅上皮は上部鼻腔を、薄い呼吸上皮は下部鼻腔を覆う。嗅上皮では上皮の中間層と基底層の細胞が胎生12日と同様に明調な球形核を有す

るが、上皮浅層の細胞では核は暗調になり、核および細胞ともに長楕円状を呈するようになり、上皮中間層の大きく明調な核を有する嗅細胞と区別が可能になる (Fig. 3b)。上皮内には多数の細胞分裂像とともに、核濃縮を呈する細胞が増加する (Fig. 3c)。嗅上皮を $1\ \mu\text{m}$ 準超薄切片でみると、嗅細胞の樹状突起の先端が鼻腔内腔へ小球状に突出し、嗅小胞形成が確認できる (Fig. 4a)。嗅部の表面形態を走査電顕で観察すると、粘膜表面には支持細胞の頂部が鼻腔内へと軽度に膨隆する。支持細胞の頂部は径約 $3.0\sim 4.0\ \mu\text{m}$ の球状ないし多角形状を呈し、その表面には太さ約 $0.2\ \mu\text{m}$ 、長さ約 $0.4\sim 1.0\ \mu\text{m}$ の短い微絨毛が多数認められる。隣接する支持細胞間には支持細胞の微絨毛に取り囲まれるように、直径約 $2\ \mu\text{m}$ の小球状を呈する嗅小胞が多数認められる。嗅小胞は単独ないしは $3\sim 4$ 個がグループを作り、その表面には短い嗅線毛が少数認められるが、なかには表面側部に太さ約 $0.3\sim 0.4\ \mu\text{m}$ 、長さ約 $4.0\sim 5.0\ \mu\text{m}$ の嗅線毛を数本有する嗅小胞もある (Fig. 4b)。嗅線毛は長さが微絨毛の $4\sim 5$ 倍で粘膜表面に平行に長く伸びるので、支持細胞の微絨毛との鑑別は容易である。

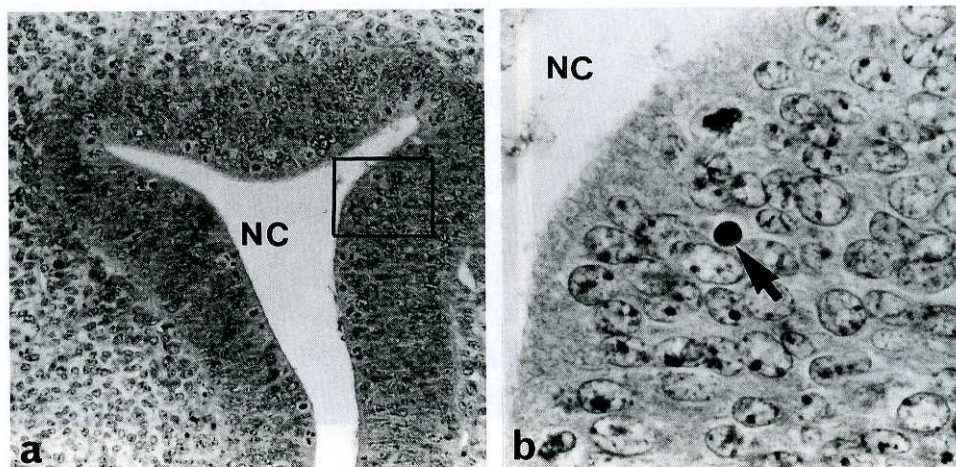


Fig. 2. A midsagittal section of nasal cavity of a 12-day-embryo. H-E staining.

a. Mucosa of the upper nasal cavity.

The epithelium is thick, but a three-layered structure cannot be observed. NC : nasal cavity. $\times 180$

b. Micrograph of the framed area in a.

The epithelium contains round cell debris (arrow). NC : nasal cavity. $\times 920$

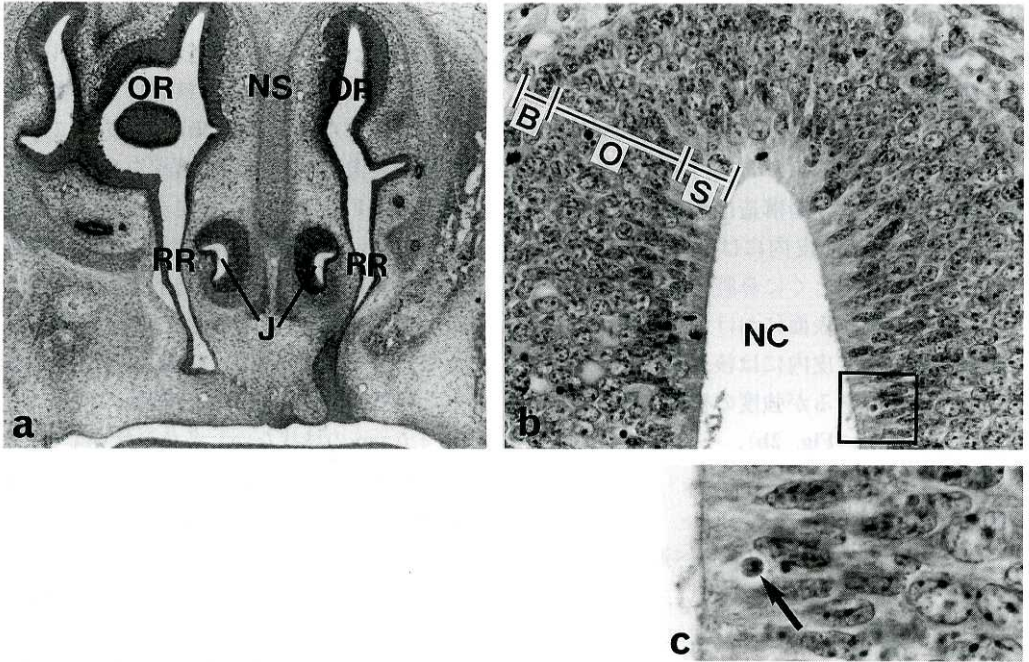


Fig. 3. A midsagittal section of nasal cavity of a 14-day-embryo. H-E staining.

a. A low-powered micrograph.

Thick epithelium in the olfactory region (OR) can easily be distinguished from thin epithelium in the respiratory region (RR). NS : nasal septum. × 18

b. Olfactory epithelium.

Cells in the superficial layer become slender. Three layers, i.e. supporting (S), olfactory (O) and basal (B) cell layers, can be recognized. NC : nasal cavity. × 370

c. Epithelium of the framed area in b.

Round cell debris (arrow) can be seen in the superficial layer of the olfactory epithelium. × 920

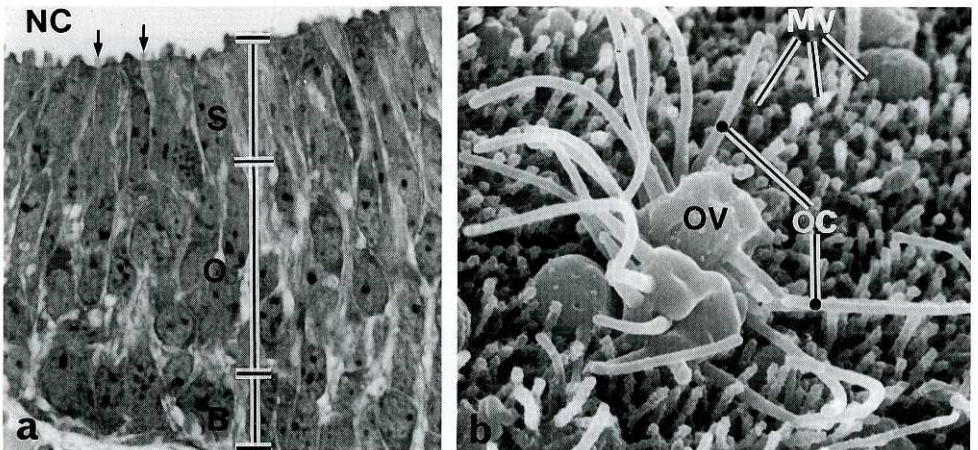


Fig. 4. Olfactory epithelium of a 14-day-embryo.

a. 1 μm plastic section image.

Several olfactory vesicles (arrows) can be seen on the epithelial surface. B : basal cell layer, NC : nasal cavity, O : olfactory cell layer, S : supporting cell layer, Toluidine blue staining. × 340

b. SEM image.

Numerous long olfactory cilia (OC) stretch out from an olfactory vesicle (OV). MV : microvilli of supporting cells. × 10,000

c) 胎生16日

口蓋突起の癒合によって、完全に鼻腔と口腔は分離する。嗅上皮は約 $80\ \mu\text{m}$ の厚さで、浅層の支持細胞層、中間層の嗅細胞層、基底層の基底細胞層の3層が区別できるようになる (Fig. 5a)。上皮内には多数の核分裂像に加えて死細胞が観察できる (Fig. 5b)。死細胞は基底層に少なく、浅層の支持細胞層と中間層の嗅細胞層に多い。走査電顕で鼻腔表面を観察すると、嗅部では支持細胞頂部は胎生14日と同様に径約 $2.0\sim 4.0\ \mu\text{m}$ の円型ないし多角形状で、鼻腔内へと強く膨隆して細胞輪郭がより明瞭となる。支持細胞の微絨毛は太さ約 $0.1\sim 0.3\ \mu\text{m}$ 、長さ約 $0.3\sim 1.1\ \mu\text{m}$ で粘膜表面より垂直に長く伸びる。粘膜表面には直径約 $2.0\sim 2.7\ \mu\text{m}$ の嗅小胞が認められ、胎生14日とは異なりグループを作ることなく単独に分散する傾向がある。嗅小胞からは太さ約 $0.1\sim 0.4\ \mu\text{m}$ 、長さ約 $5.6\sim 12.8\ \mu\text{m}$ の嗅線毛が、複雑にからみあって束状となって横走る。嗅粘膜および呼吸粘膜固有層には、嗅腺と鼻腺とがみられるようになる。

2) アポトーシスの鼻腔内の分布

胎生期の鼻腔粘膜上皮内には、強度の核濃縮を呈する死細胞が認められる。死細胞は嗅上皮内に多く、とくに胎生14日～16日で最も多い。この死細胞と DNA 断片化の関連を明らかにするために、胎生14日で TUNEL 染色を行うと、鼻腔粘膜上皮では呼吸部に少なく、とくに嗅上皮内に TUNEL 陽性細胞を多く観察することができる。TUNEL 陽性細胞は単独で粘膜上皮内に存在し、上皮内で鼻腔内腔に近い上皮浅層の支持細胞層と嗅細胞の分布する中間層にとくに多く、基底細胞層には少ない。隣接する連続切片の HE 染色と対比観察すると、TUNEL 陽性細胞は HE 染色標本における核濃縮像に対応する (Fig. 6a, b)。TUNEL 陽性細胞は嗅上皮でも鼻腔天蓋部と外側壁に多い傾向がみられ、嗅上皮以外では口蓋突起の間葉組織、Jacobson 器の上皮、鼻中隔の軟骨膜、さらにわずかではあるが呼吸上皮にも認められた。

3. 嗅上皮内の細胞死と細胞分裂の局在

TUNEL 法で嗅上皮内でのアポトーシスは、胎

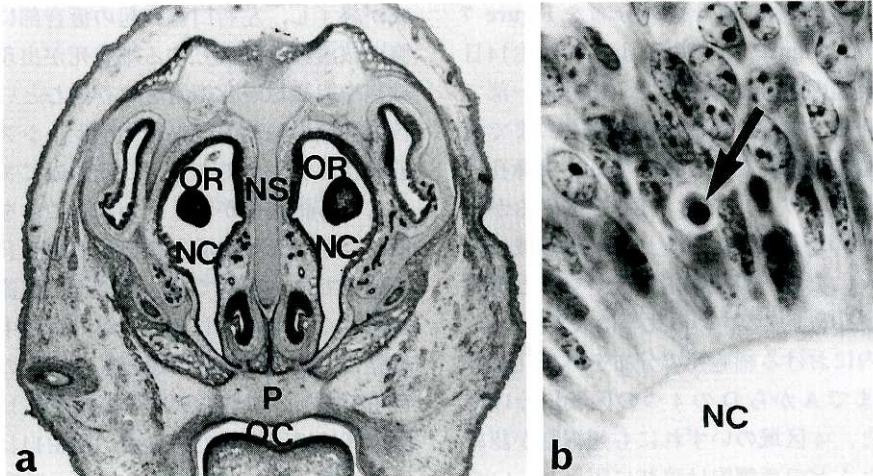


Fig. 5. A midsagittal section of nasal cavity of a 16-day-embryo. H-E staining.

a. A low-powered micrograph.

H-E staining shows the nasal cavity (NC) to be completely separated from the oral cavity (OC) by the palate (P). OR : olfactory region, RR : respiratory region, J : Jacobson organ. $\times 18$

b. A dying cell with a highly condensed nucleus (arrow) in olfactory epithelium. NC : nasal cavity. $\times 920$

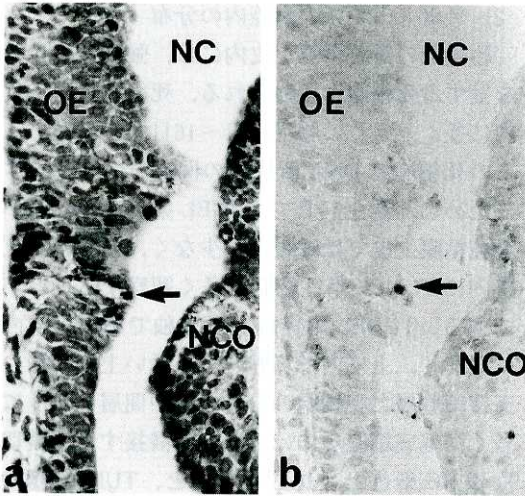


Fig. 6. Two serial sections of the olfactory epithelium on the lateral nasal wall of a 14-day-embryo.

NC : nasal cavity, NCO : nasal concha, OE : olfactory epithelium. $\times 370$

a. An H-E stained section.

b. A TUNEL stained section.

Arrow in a indicates a highly pyknotic nucleus in the superficial epithelial layer, and the same nucleus is also positive in the TUNEL stained section in b.

生14日で天蓋部と外側壁に多い傾向が認められる。外鼻孔より鼻腔後端までの30 μm 毎の準超薄切片を用いて、鼻腔全体の嗅上皮内における細胞死の分布、さらに核分裂の分布を Figure 7 で比較した。Figure 7a にみるように胎生14日では口蓋突起の癒合は進行中で、口蓋は一部で未形成である。嗅部は切片# 7 から# 27まで鼻腔のほぼ全領域にわたって存在する。外鼻孔に近い領域切片# 7, 8 では上1/3を占めるが、中央部以降の切片では1/2以上の広い領域に分布するようになり、鼻腔後端に近づくほど鼻腔粘膜における嗅上皮の占める比率は大きくなる。左側鼻腔内における細胞死の分布を外鼻孔より鼻腔後端までA からD の4つの区域に分けて観察すると、4区域のいずれにも死細胞が認められ、ほとんどの死細胞は嗅部に限局し、いずれの区域でも鼻腔内側には少なく天蓋部と外側壁に多い。また嗅粘膜上皮内では、左側鼻腔の4区域ともに基底細胞層に死細胞はほとんどみられず、浅層の支持細胞と中間層の嗅細胞層に多い (Fig. 7b)。一方、核分裂像を観察すると、

4区域いずれについても嗅部だけでなく呼吸部にも共通して出現し、死細胞にみられたような嗅上皮と呼吸上皮の局所的な差違はみられない。また核分裂像は嗅上皮において鼻中隔上の内側壁、天蓋部、外側壁のいずれにも同様の出現頻度で認められる。嗅粘膜上皮内では浅層の支持細胞層と深層の基底細胞層に細胞分裂が多いが、嗅細胞層には少なく、死細胞の上皮内の分布とは明らかに異なる (Fig. 7c)。なお、細胞死と核分裂は、左右両側鼻腔において同様の分布を示した。

考 察

成績で述べたように、マウス胎子の鼻腔ではとくに嗅部に TUNEL 陽性細胞が多いこと、発達途中の嗅上皮内の細胞死の出現数は内側壁と外側壁とで局所的な差違のあること、死細胞は嗅上皮内で浅層と中間層に多く基底層に少ないことが本研究で明らかとなった。

マウス胎子において、口蓋の形成に上皮細胞の細胞死が関与することが古くから知られている^{10), 11)}。胎生15日から15.5日にかけて口蓋の形成が終了し、左右口蓋突起の癒合部には上皮細胞の核濃縮を特徴とする細胞死が出現し、上皮細胞や組織球が死細胞を取り込むという。細胞核染色質の強度の凝集はアポトーシスの超微形態的特徴の一つであり、口蓋形成にアポトーシスによる細胞死が深くかかわることを示している。今回、鼻腔全域を観察した胎生14日のマウス胎子では、成績で示したように口蓋形成は外鼻孔近くでは完了しているが、鼻腔中央部では鼻腔と口腔は広範囲で連続し、口蓋の形成が進行中である。鼻腔粘膜の厚さは胎生12日では鼻腔全体にほぼ均一であるが、胎生14日には嗅上皮は鼻腔上部でその厚さを増し、呼吸部と明瞭に区別できるようになる。Kaufman¹²⁾のマウス発生図譜においても、胎生13日の嗅上皮は未発達の状態であると記載されている。従って、胎生14日はマウスの嗅上皮が形態学的に識別できる最も早い胎齢にあたとみなすことができる。

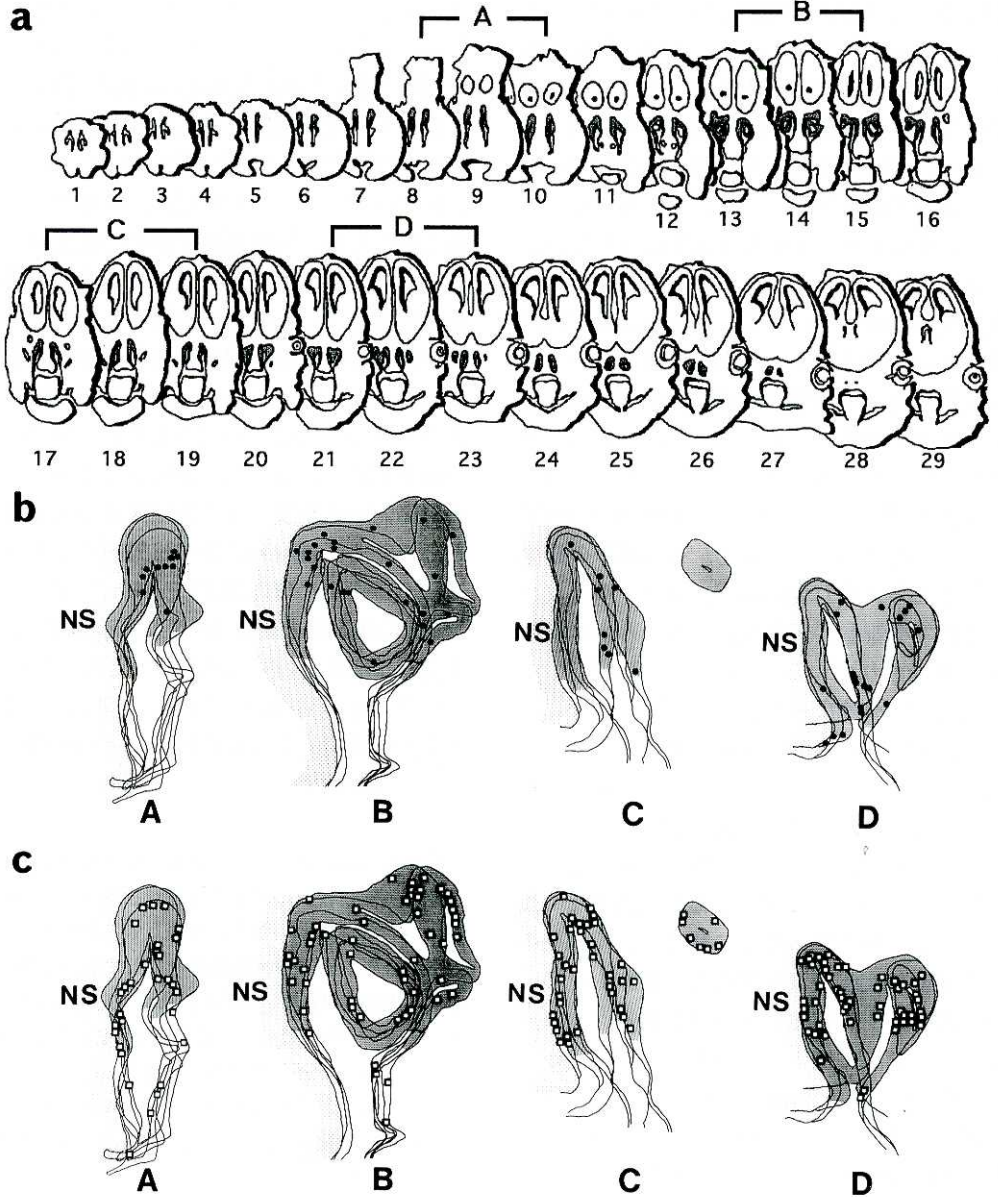


Fig. 7. Distribution of cell death and mitosis in the nasal mucosa of 14-day-embryo.

a. Frontal serial sections of the mouse head.

Twenty-nine serial sections are shown, and the interval of each serial section is $30\ \mu\text{m}$. The nasal cavities are continuous with the oral cavities in section No. 12–23. The distributions of cell death and mitosis are shown in four groups, A to D areas. $\times 5$

b. Distribution of cell death. in left nasal cavity.

Cell death (solid circles) is widely distributed throughout the olfactory epithelium dotted area. The olfactory epithelium on the roof and lateral wall of the nasal cavity from the A to D areas contains more numerous dying cells than that on the median wall. Dying cells are generally found in the superficial and middle layers of the olfactory epithelium. NS : nasal septum. $\times 40$

c. Distribution of cell mitosis. in left nasal cavity.

In both the olfactory epithelium and respiratory epithelium in all areas, there exist numerous cell mitotic figures (open circles). The superficial and basal cell layers contain more numerous mitotic figures than the olfactory layers. NS : nasal septum. $\times 40$

この時期、TUNEL陽性細胞や核濃縮を呈する細胞は、呼吸上皮にくらべ嗅上皮中に多数認められ、核分裂像は嗅部・呼吸部ともに同様で両部間で差は不明瞭であった。これらの所見から、アポトーシスは口蓋形成とは別に鼻腔粘膜の発生とも深い関連を持ち、口蓋形成以前でとくに嗅上皮の発生初期に重要な役割をはたしていると考えられる。

嗅上皮の3層構造のうち、細胞死は胎生14日で浅層と中間層に多く、基底層には少ない。浅層は支持細胞、中間層は嗅細胞、そして深層には基底細胞が層状に分布している。これら三種の細胞の機能的役割について、嗅細胞と基底細胞は感覚受容細胞群¹³⁾として、支持細胞は嗅細胞の樹状突起を四方から支え、神経膠様の細胞群としてとらえられている¹⁴⁾。また、嗅上皮の発生過程で嗅細胞が細胞死に至ることが電顕レベルで報告されている⁴⁾。従って、嗅細胞の前駆細胞としての基底細胞層に細胞死が少ないのは、基底細胞が嗅細胞へ分化を終了した後に、一部の嗅細胞が死に至ることを示すと考えられよう。一方、嗅上皮の3層構造が明瞭になる胎生14日で核濃縮を広く鼻腔全体で観察すると、嗅細胞層のみならず浅層にも細胞死は少なくない。従って、嗅上皮の発生に関連し、嗅細胞のみならず樹状突起を取り囲む支持細胞もその一部がアポトーシスに至る可能性がある。

マウスにおいて嗅上皮の分布には部位差がみられ、嗅上皮の占める面積は咽頭に近づくに従って広範囲になる¹⁵⁾。この特徴は嗅上皮の発生の初期である胎生14日ですでに明瞭に認めることができる。胎子で鼻腔の前部から後部へと嗅上皮の面積は増大するが、細胞死の分布には差は

みられない。しかし発生初期の嗅上皮中の死細胞は、成績で示したように、内側、天蓋および外側嗅上皮でその出現頻度に差違が認められた。すなわち、死細胞は外鼻孔から鼻腔後端までのいずれの部位でも天蓋と外側部の嗅上皮に多く、内側には少ない。この所見は、鼻中隔上の内側嗅上皮と天蓋・外側部とではその発達に差違がある可能性を示唆している。嗅上皮の形成は鼻腔全体で必ずしも均一に進行するのではなく、鼻中隔上の嗅上皮と副鼻腔の形成が進む外側壁上の嗅上皮とでは、異なった速度で進行する可能性がある。成績で述べたように、外鼻孔に近い鼻腔粘膜では嗅上皮の面積比率は低く、鼻腔後端に向かう程嗅上皮の面積比率が上がる。しかしながら、細胞死の分布は外鼻孔より鼻腔後端に至るまで、ほぼ均等に分布しており、このことから嗅上皮の面積比の変化と嗅上皮の分化・発達とは直接の関連性が薄いと考えられよう。嗅上皮発達の局所的な差違は、嗅小胞および嗅線毛の形成発達を走査電顕による形態観察で、さらに詳細に明らかにしつつある¹⁶⁾。

稿を終えるにあたり、終始懇切な御指導をいただいた佐々木和信教授に深甚なる謝意を表すとともに、実験について御協力いただいた岩月宏彦助教授、須田満寿美、板野ちか子研究補助員をはじめとする解剖学教室員、また電顕観察に多大の技術助力を借しきれなかった上平賢三主任、須田泰司副主任をはじめとする組織・電子顕微鏡センター員に深く感謝する。なお、本研究の一部は日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助（大学院重点特別経費・学生分、1998年度分）の助成を受け行われた。

本論文の要旨は、第103回日本解剖学会総会（1998年）にて発表した。

文 献

- 1) Frisch D : Ultrastructure of mouse olfactory mucosa. *Am J Anat* 121 : 87-120, 1967
- 2) Seifert K, Ule G : Die ultrastruktur der riechschleimhaut der neugeborenen und jugendlichen weissen maus. *Z Zellforsch* Bd 76 : 147-169, 1967
- 3) Cuschieri A, Bannister LH : The development of the olfactory mucosa in the mouse : Electron microscopy. *J Anat* 119 : 471-498, 1975

- 4) Pellier V, Astic L : Cell death in the developing olfactory epithelium of rat embryos. *Dev Brain Res* 79 : 307 - 315, 1994
- 5) Pellier V, Saucier D, Oestreicher AB, Astic L : Ultrastructural and cytochemical identification of apoptotic cell death accompanying development of the fetal rat olfactory nerve layer. *Anat Embryol* 194 : 99 - 109, 1996
- 6) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251 - 306, 1980
- 7) Nakamura H : Immunohistochemical observations of dividing cells in olfactory epithelium using anti-BrdU antibody. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 248 : 298 - 301, 1991
- 8) 中村英夫：モルモット嗅上皮分裂細胞と基底細胞の観察－免疫組織化学二重染色による－. *耳鼻臨床* 85 : 645 - 648, 1992
- 9) 川崎 克：モルモット嗅上皮分裂細胞の経時的観察－免疫組織化学二重染色による－. *日耳鼻* 100 : 1419 - 1424, 1997
- 10) Farbman AI : Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Dev Biol* 18 : 93 - 116, 1968
- 11) Matthiessen M, Andersen H : Disintegration of the junctional epithelium of human fetal hard palate. *Z Ant Entwickl - Gesch* 137 : 153 - 169, 1972
- 12) Kaufman MH : *The Atlas of Mouse Development*. 1st ed, London, Academic Press. 1992, pp 158
- 13) Costanzo RM, Graziadei PPC : A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J Com Neurol* 215 : 370 - 381, 1983
- 14) Anholt R : Molecular physiology of olfaction. *Am J Physiol* 257 : C1043 - C1054, 1989
- 15) 長岡悟郎：マウス嗅上皮の拡がりについて. *十全医会誌* 65 : 1 - 20, 1960
- 16) 森 幸威, 佐々木和信, 須田満寿美, 板野ちか子, 岩月宏彦：胎生期マウス嗅上皮の走査型電子顕微鏡による観察. *解剖誌* 74 : 137, 1999