

マウス胎子における嗅上皮の発達—走査電顕による観察

森 幸 威

マウス胎子の嗅上皮の発達を明らかにするために、胎生12日から生後2日のマウス嗅部を用いて、特に嗅小胞の形態と分布に着目し、鼻中隔側、天蓋部および外側の嗅上皮を走査電顕で観察した。嗅上皮の発達は Stage I から Stage V の5段階に区別できる。Stage I は嗅小胞が全くみられない状態。Stage II は大小不同の少数の嗅小胞が孤立性に分布し、短い嗅線毛がみられる。Stage III は3個から4個の嗅小胞がグループ化して出現する時期。Stage IV では嗅小胞が少なくなり、再び孤立化し嗅線毛も長くなる。Stage V は孤立化した嗅小胞から複数本の嗅線毛が長く伸びる。胎生期の外側嗅上皮では胎生12日で Stage I となり、胎生16日が Stage IV に対応する。鼻中隔側の嗅上皮では胎生12日が Stage II に対応し、胎生16日で Stage V となる。すなわち、鼻中隔側嗅上皮の方が外側嗅上皮に比べて胎齢でおよそ1日早く発達する。胎生14日の嗅上皮では、嗅小胞の数は鼻中隔側に比べ外側壁に1.5から2倍と有意に多い ($P < 0.01$)。さらに天蓋部嗅上皮は鼻中隔側嗅上皮よりも0.5から1日早く発達する。嗅上皮の発達は鼻腔上部の区域で均一に進行するのではなく、部位差がみられる。すなわち天蓋部が最も早く、外側部が最も遅いことが明らかとなった。嗅上皮の発生における嗅小胞数の変化ならびに嗅小胞の分布様式の変化は、嗅上皮中に発生するアポトーシスが関与する可能性が示唆された。 (平成12年10月3日受理)

Scanning Electron Microscopic Observation on Olfactory Epithelium of the Mouse Embryos

Yukitake MORI

To clarify development of the olfactory epithelium, ICR mouse nasal mucosa was examined from 12 days of gestation to 2 days after birth chiefly by scanning electron microscopy. On the basis of the appearance of olfactory vesicles and cilia, the development was divided into five stages. During stage I, no olfactory vesicles could be found on the mucosa. During stage II, a few solitary olfactory vesicles of various sizes appeared on the olfactory mucosa, then during stage III, there was an increase in the number of vesicles, and they were gathered in small clusters. During stage IV, a decrease in the number of olfactory vesicles was noted, and short olfactory cilia were recognized on solitary vesicles. During stage V, numerous long cilia were noted on the vesicles. The olfactory epithelium of mouse embryos was of three areas; lateral, nasoseptal and roof epithelium. At 12 days of gestation, the lateral olfactory epithelium was at stage I, while the nasoseptal epithelium was at stage II. The number of olfactory vesicles per unit area in the lateral area was significantly greater than that in the nasoseptal area ($p < 0.01$). At 16 days of gestation,

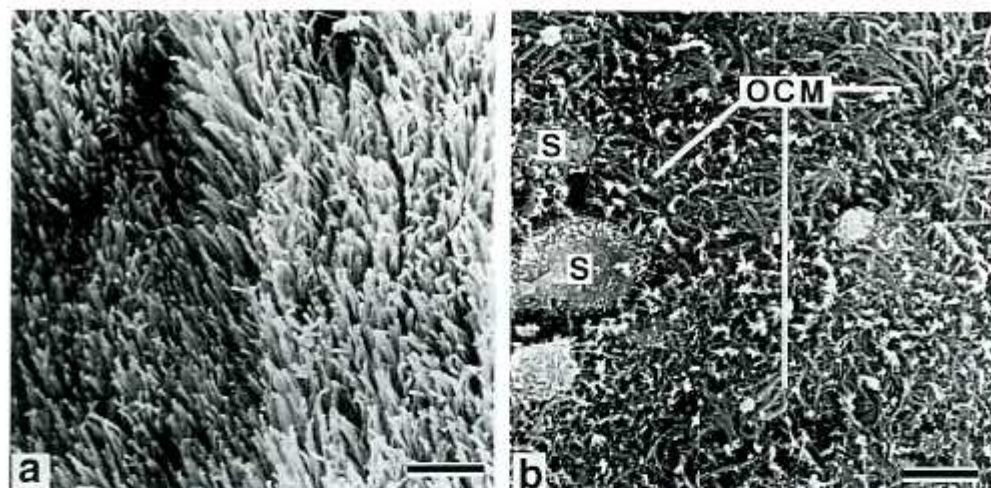


Fig. 1. SEM images of the nasal cavities at two days after birth. Bar = $4.0 \mu\text{m}$

a. The respiratory region

The respiratory mucosa is covered with long dense cilia.

b. The olfactory region

The roofs of the supporting cells (S) can be confirmed on the olfactory mucosa, where bundles of olfactory cilia form a thick olfactory ciliary mat (OCM).

影面積は鼻中隔側・外側とも約 $2000 \mu\text{m}^2$ である。5例の胎子を観察し、単位面積($1000 \mu\text{m}^2$)当たりの嗅小胞数の平均値を求め、StudentのT検定で鼻中隔側と外側嗅上皮における有意差を検定した。

透過型電子顕微鏡観察

胎生14日のマウスを断頭し、切断した頭部を前頭断して鼻腔を露出した後、約 $1 \mu\text{m}^2$ に剃刀刃で細切し、カルノフスキー液(4%パラホルムアルデヒド・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4℃で前固定した。ついで組織片を1%四酸化オスミウムで2時間後固定後、酢酸ウランにて一昼夜染色し、アルコール系列で型のごとく脱水後、エポン812に包埋した。超ミクロトームを用い、厚さ約100nmの超薄切片を作成後、クエン酸鉛で染色しJEM-2000EX II(日本電子社製)で80kVにて鼻腔上部を観察した。

本研究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

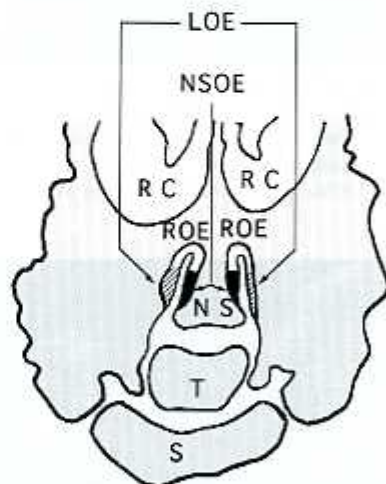


Fig. 2. A midsagittal section of the head of a 14-day-old mouse embryo. The olfactory epithelium can be divided into three areas, lateral (LOE), nasoseptal (NSOE) and roof olfactory epithelium (ROE). NS: nasal septum, RC: rhinencephalon, S: submaxilla, T: tongue.

指針に基づいて実施された。

結 果

1. 新生子マウスの鼻腔粘膜の表面形態
生後2日のマウス鼻腔表面において、線毛が密

在する呼吸部と嗅線毛の横走する嗅部は、走査電顕による観察で明瞭に区別できる。すなわち呼吸部は線毛が極めて密に粘膜表面を覆い、その長さはほぼ一定で垂直に鼻腔へと突出する (Fig. 1a)。一方、嗅部では長い嗅線毛が束状になって粘膜表面上を横走し、嗅線毛束の間に

内腔へ緩く膨隆する支持細胞の頂部が認められる。支持細胞頂部には $0.3\mu\text{m}$ の多数の短い微絨毛がみられる (Fig. 1b)。新生子嗅粘膜の表面の支持細胞間部は、大量の横走する嗅線毛束がマット状に覆い、鼻腔上部のいずれの部位でも粘膜表面から嗅小胞を直接観察することは

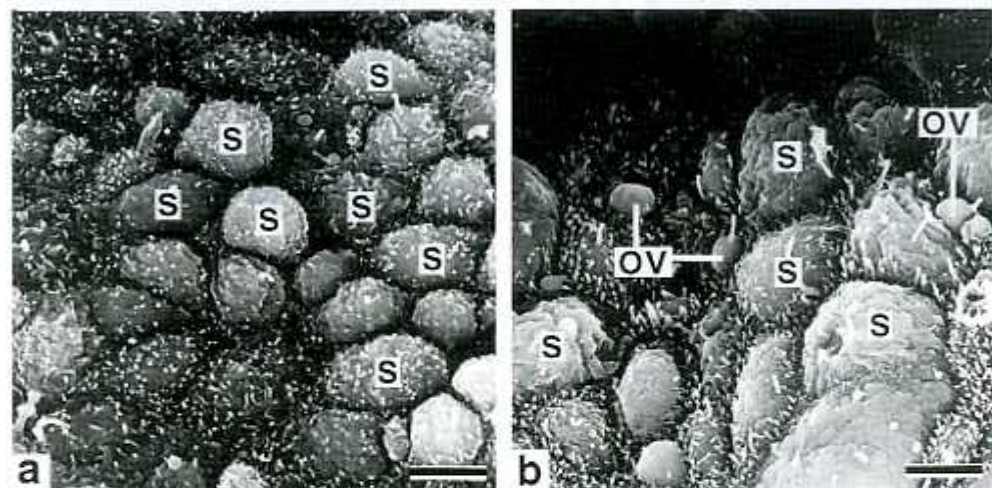


Fig. 3. SEM images of 12-day-old embryonic olfactory epithelium. Bar = $4.0\mu\text{m}$.

a. Lateral olfactory epithelium

The roofs of the supporting cells are slightly protuberant, and no olfactory vesicles can be observed.

b. Nasoseptal olfactory epithelium

A few isolated olfactory vesicles (OV) can be seen among the roofs of the supporting cells (S).

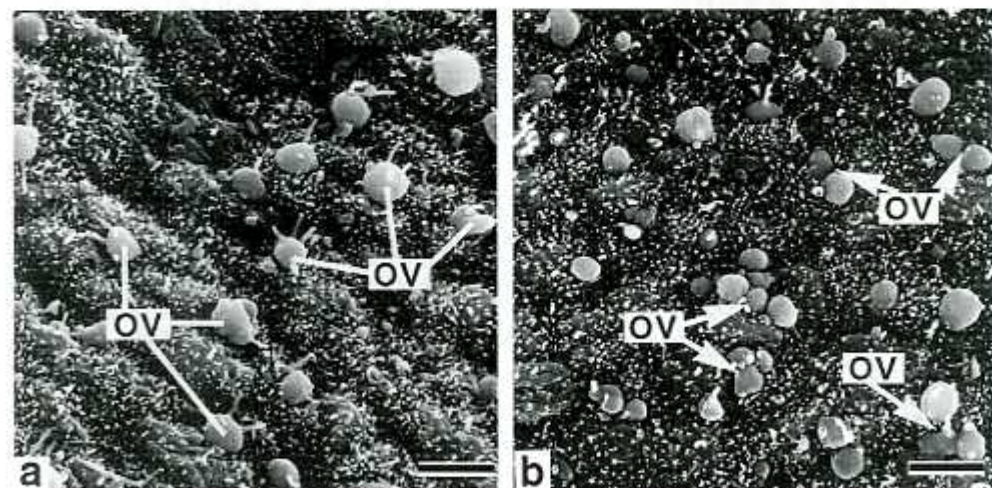


Fig. 4. SEM images of a 13-day-old embryonic olfactory epithelium. Bar = $4.0\mu\text{m}$.

a. Lateral olfactory epithelium

Small spherical olfactory vesicles (OV) with olfactory cilia can be recognized.

b. Nasoseptal olfactory epithelium

Two to six olfactory vesicles form (OV) small clusters (arrows).

きない。しかしながら嗅線毛が未発達な胎齢期において、嗅上皮表面には嗅小胞と嗅線毛とを走査電顕で明確に観察することができる。胎子嗅上皮における嗅小胞の発達・分布は一様でなく、嗅上皮の部位によって差がある。マウス胎生期における嗅上皮の表面形態を鼻中隔側嗅上皮、天蓋部嗅上皮および外側嗅上皮の3区域に分け (Fig. 2), その表面形態の差の著しい鼻中隔側と外側嗅上皮の発達をはじめに明ら

かにした後、天蓋部嗅上皮の発達をこれら2区域と比較した。

2. 胎子の嗅上皮の発達

A. 鼻中隔側と外側嗅上皮の比較

1) 胎生12日

鼻腔上部の外側壁の表面は鼻腔内へと膨隆する支持細胞頂部のみで覆われる (Fig. 3a)。一方、鼻中隔側嗅上皮には支持細胞頂部に小球状

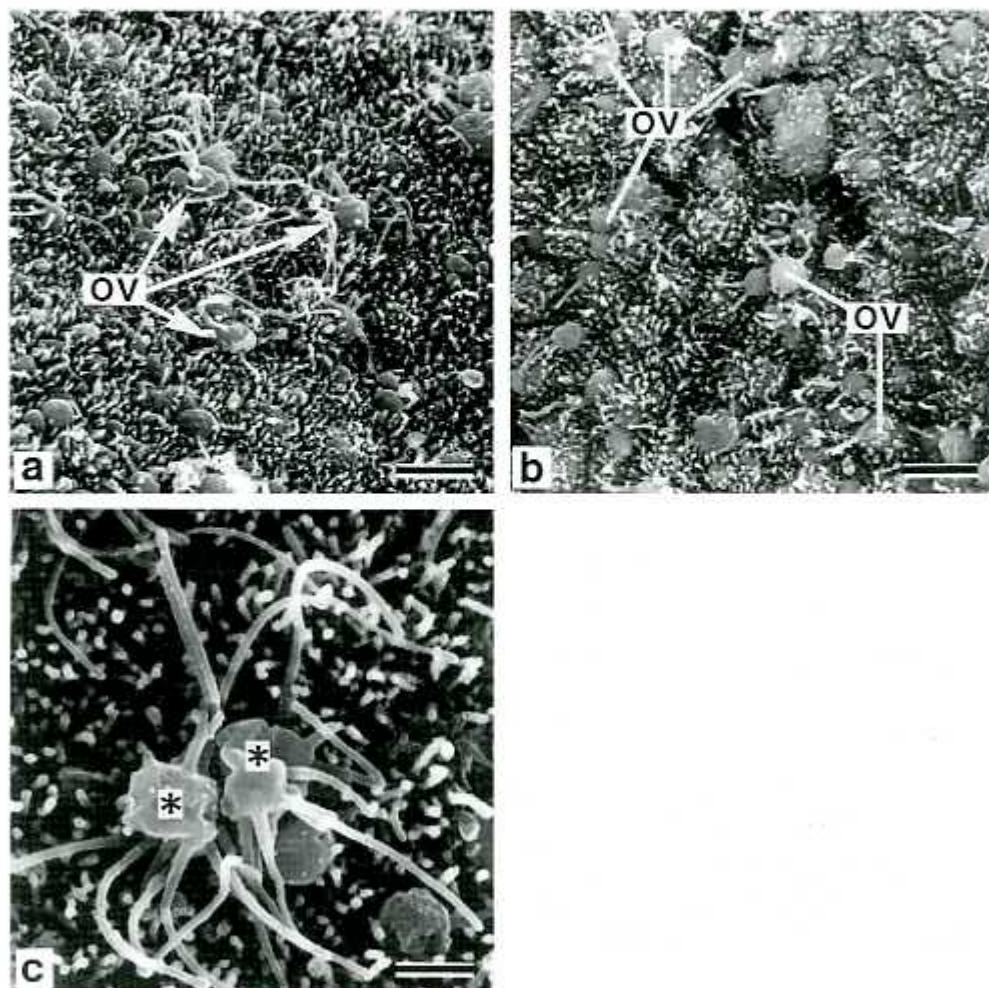


Fig. 5. SEM images of 14-day-old embryonic olfactory epithelium

a. Lateral olfactory epithelium

Three to four olfactory vesicles (OV) form small groups, and long olfactory cilia can be recognized on the vesicles. Bar = 4.0 μ m

b. Nasoseptal olfactory epithelium

Olfactory vesicles (OV) are distributed solitarily. Some of the olfactory vesicles are smaller than 1 μ m in diameter. Bar = 4.0 μ m

c. Olfactory vesicles (*) on the lateral epithelium with long olfactory cilia. Bar = 1.4 μ m

の嗅小胞が多数認められる (Fig. 3b). 嗅小胞は直径0.7から2.4 μm と大小様々で、嗅線毛を欠いた嗅小胞や長さ約1.6 μm の短い嗅線毛を少数有する嗅小胞が散在的に分布する。支持細胞の頂部は外側・鼻中隔側いずれの部位においても鼻腔内へと半球状に膨隆する。支持細胞頂部の細胞表面には長さ0.1から0.4 μm の多数の微絨毛がみられ、細胞頂部中央に1.2 μm の長い微絨毛が1本認められることが多い。

2) 胎生13日

嗅小胞は鼻中隔側と外側壁のいずれの嗅上皮にも認められるようになるが、その分布・形態は両側で異なる。すなわち外側壁では大小様々の大きさの嗅小胞が単独で支持細胞間に散在し、嗅小胞は複数本の短い嗅線毛を有することが多い (Fig. 4a)。一方、鼻中隔側の嗅小胞は、3個から4個が集まってグループを形成し、嗅小胞には0.8から1.0 μm の長さの線毛がみられるようになる (Fig. 4b)。支持細胞頂部は12日とくらべて内腔への膨隆は不明瞭になり、約0.4 μm の長さの微絨毛が頂部を密に覆うようになる。

3) 胎生14日

鼻中隔側・外側の両側嗅上皮で支持細胞頂部の微絨毛は0.4から1.0 μm と長さを増す。嗅小胞は両側とも支持細胞微絨毛間に明瞭に観察できる。外側嗅上皮で嗅小胞は、3個から5個がグループで分布するようになり、嗅線毛も長さ4.2 μm から6.2 μm に達し、複数の線毛を有する嗅小胞もみられる (Fig. 5a,c)。一方、鼻中隔側嗅上皮では嗅小胞は単独で分布するものが多く、嗅小胞は直径1.4から2.1 μm とほぼ均一の大きさになり、1.0 μm 以下の小型の嗅小胞は消失する。小胞表面には短い嗅線毛が少数認められるが、なかには長さ約1.4から2.1 μm の長い嗅線毛を数本有する嗅小胞もみられる (Fig. 5b)。Figure 6a に胎生14日の外側壁と鼻中隔側嗅上皮における嗅小胞の分布の違いを示す。この図にみるように、外側嗅上皮では鼻中隔側にくらべて嗅小胞の数が多く、嗅小胞は大小不揃いで数個が集集しグループを形成する傾向が強い。単位面積当たりの嗅小胞の数を計測すると、外側は $46.1 \pm 10.4/1000 \mu\text{m}^2$ 、鼻中隔側は $23.5 \pm 4.7/1000 \mu\text{m}^2$ で、外側壁嗅上皮で鼻

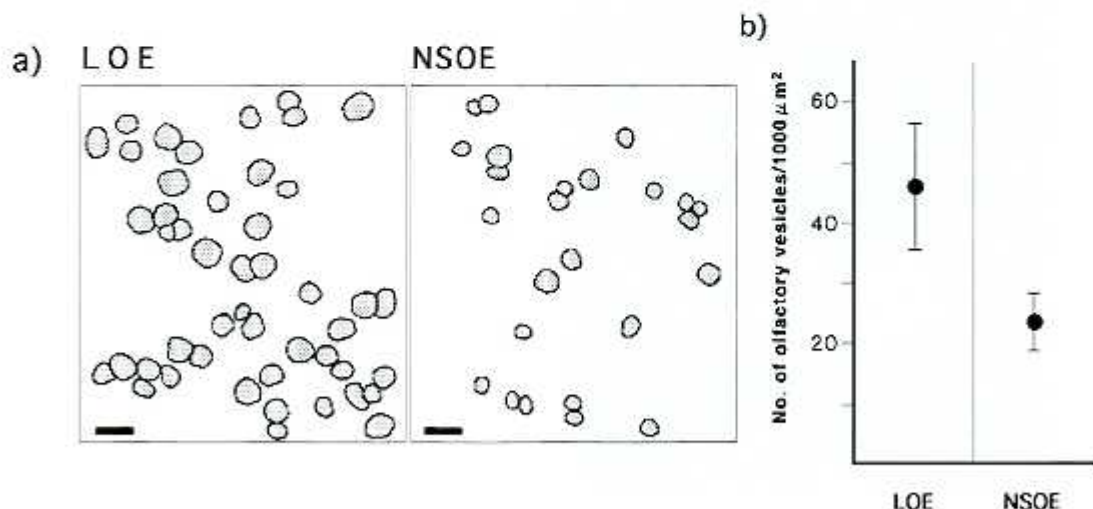


Fig. 6. Distribution and density of olfactory vesicles of a 14-day-old embryo

a. Distribution of olfactory vesicles on lateral olfactory epithelium (LOE) and nasoseptal olfactory epithelium (NSOE)

Vesicles are more numerous on the lateral olfactory epithelium than on nasoseptal epithelium. These on the lateral olfactory epithelium tend to form clusters.

b. Numbers of olfactory vesicles on the lateral olfactory epithelium (LOE) and nasoseptal olfactory epithelium (NSOE).

The density of olfactory vesicles at 14 days of gestation is approximately two times greater on the lateral olfactory epithelium than nasoseptal olfactory epithelium. Mean \pm SD

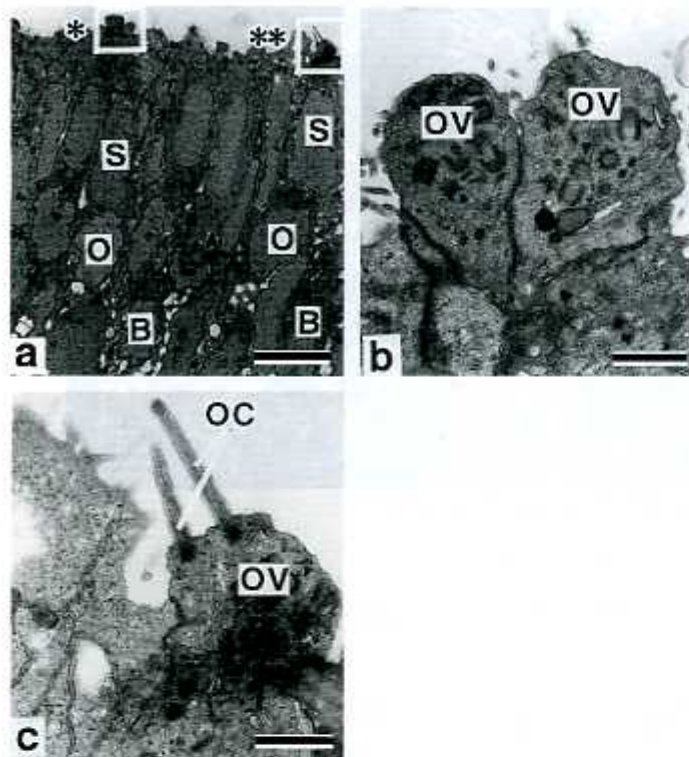


Fig. 7. TEM images of olfactory epithelium at 14 days of gestation

a. A low-powered micrograph

The supporting cell layer (S), olfactory cell layer (O) and basal cell layer (B) are distinguishable. Bar = $7.7 \mu\text{m}$

b. A high-powered micrograph of the olfactory vesicles in the rectangle in (*). Two adjacent olfactory vesicles (OV) protrude together into the nasal cavity. Bar = $0.8 \mu\text{m}$

c. A high-powered micrograph of the olfactory vesicles in the rectangle in (**). The vesicle has two cilia, and a few basal bodies can be recognized in the vesicle. Bar = $0.9 \mu\text{m}$

中隔側の約2倍の有意の高値をとる ($P < 0.01$) (Fig. 6b).

透過電顕で胎生14日齢の嗅粘膜上皮をみると基底細胞層、支持細胞層、嗅細胞層の3層が区別でき、樹状突起の先端に直径約 $2.0 \mu\text{m}$ の嗅小胞が鼻腔内へ突出する様子を詳細に観察できる (Fig. 7a)。なかには2個の嗅小胞が接した状態で鼻腔内に突出する像も観察できる (Fig. 7b)。嗅小胞からは線毛が伸び、嗅小胞内には線毛内の細管と連続する基底小体が複数認められる (Fig. 7c)。

4) 胎生16日

嗅小胞から伸びる嗅線毛の数は著しく増加し

発達するが、線毛の長さは部位によって異なる。外側嗅上皮の嗅小胞は長さ約 $1.7 \mu\text{m}$ の短い嗅線毛を多数有する (Fig. 8a)。グループ化した嗅小胞と単独の嗅小胞が混在する。一方、鼻中隔嗅上皮で嗅小胞は単独で分布することが多く、嗅小胞からは約 $5.5 \mu\text{m}$ の長い多数の嗅線毛が伸びる (Fig. 8b)。鼻中隔側・外側とも支持細胞頂部は多数の微絨毛で覆われるようになる。

マウス胎子における嗅上皮の発達を走査電顕で観察すると、嗅上皮の発達は Stage I から Stage V までの5つの段階に区別できる (Fig. 9)。Stage I は嗅小胞が嗅上皮表面に全くみられない状態。Stage II では大小不同の少数の嗅小胞が孤立性に分布し、短い嗅線毛がみられ Stage III では3個から4個の嗅小胞がグループを作って出現する。Stage IV では嗅小胞が減り、グループを作らず単独となり嗅線毛も長くなる。Stage V では孤立化した嗅小胞から複数本の嗅線毛が長く伸びる。胎生期の外側嗅上皮では胎生12日で Stage I となり、

胎生16日が Stage IV に対応する。一方、鼻中隔側の嗅上皮では胎生12日が Stage II に対応し、胎生16日で Stage V となる。すなわち、鼻中隔側嗅上皮の発達の Stage は外側嗅上皮に比べて胎齢でおよそ1日早い。

B. 天蓋部嗅上皮

鼻腔上部の天蓋部は胎生12日で多角状輪郭を有する支持細胞頂部で覆われ、その間に小型球状の嗅小胞が少数みられる。天蓋部の嗅小胞は直径 0.7 から $2.4 \mu\text{m}$ で単独ないし3個から6個が集合して分布し、 0.8 から $2.5 \mu\text{m}$ の長さの嗅線毛を少数有する小胞もある (Fig. 10a)。すな

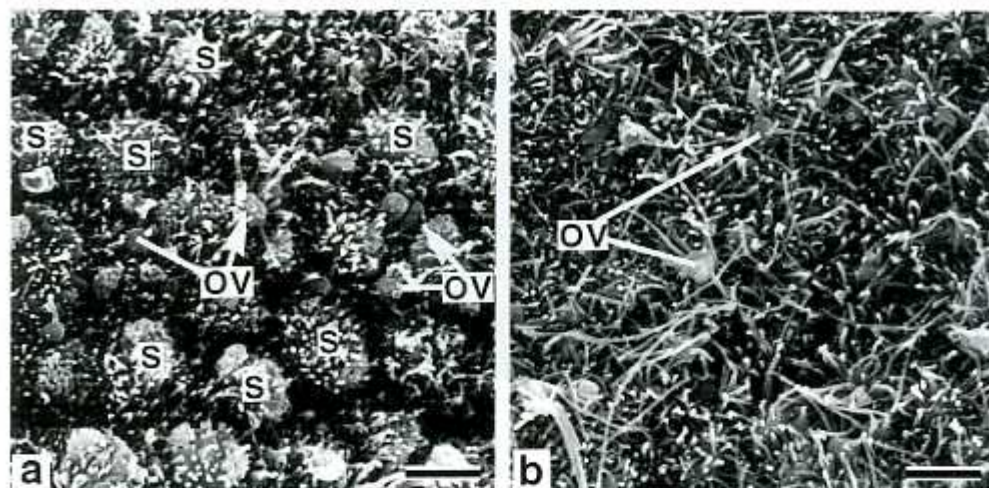


Fig. 8 SEM images of 16-day-embryonic olfactory epithelium. Bar = 4.0 μ m

a. Lateral olfactory epithelium

Groups of olfactory vesicles and solitary vesicles can be recognized.

b. Nasoseptal olfactory epithelium

Solitary olfactory vesicles are scattered, and numerous long cilia run on the mucosa.

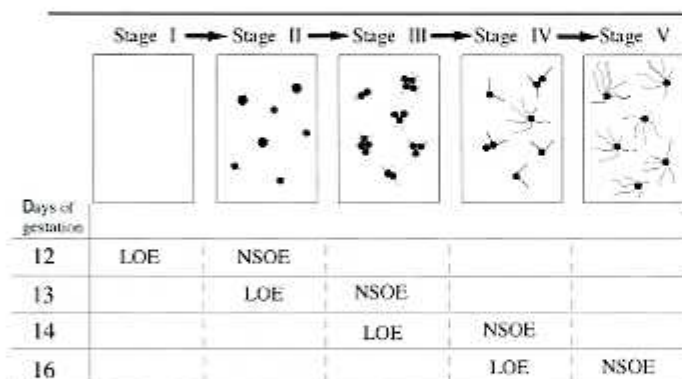


Fig. 9 Development of olfactory epithelium in the mouse embryo.

The development of olfactory vesicles and cilia can be divided into five stages. Nasoseptal olfactory epithelium (NSOE) develops approximately one day earlier than lateral olfactory epithelium (LOE).

わち天蓋部嗅上皮では胎生12日で Stage II と III に対応する。胎生13日で嗅線毛を持たない嗅小胞が4から9個集合し (Fig. 10b), 胎生14日では各々の嗅小胞から長さ0.7 μ m から1.1 μ m の嗅線毛が伸びるようになり (Fig. 10c), これは Stage IV に該当する。胎生16日になると嗅線毛は著しく伸び, そのため嗅小胞は表面より直接観察することができない (Fig. 10d), このように天蓋部は鼻中隔側嗅上皮の発達に比べ

て, さらに0.5から1日早い。嗅小胞の形態を検討すると嗅上皮の発達が最も早いのは天蓋部嗅上皮で, 約1日遅く鼻中隔側嗅上皮が発達し, 外側壁嗅上皮が3区域のなかで最も遅れて発達する。

考 察

胎生期のマウス嗅部では新生子や成熟マウスとは異なり, 走査電顕によって嗅小胞を明確に観察することが可能である。嗅上皮の発達を嗅小胞の形態形成の視点で観察すると, 成績で述べたように鼻中隔側, 天蓋部および外側部いずれにおいても同様に Stage I から V の5段階を区別することができる。しかし嗅小胞の形成・発達の進行は局所的にその Stage に差違がみられた。すなわち, 天蓋部領域が最も早く発達し, 次いで内側壁, 最後に最も遅れて外側壁の嗅上皮が発達することが明らかになった。また嗅小胞の数は胎齢とともに一律に直線的に増加するわけではない。すなわち

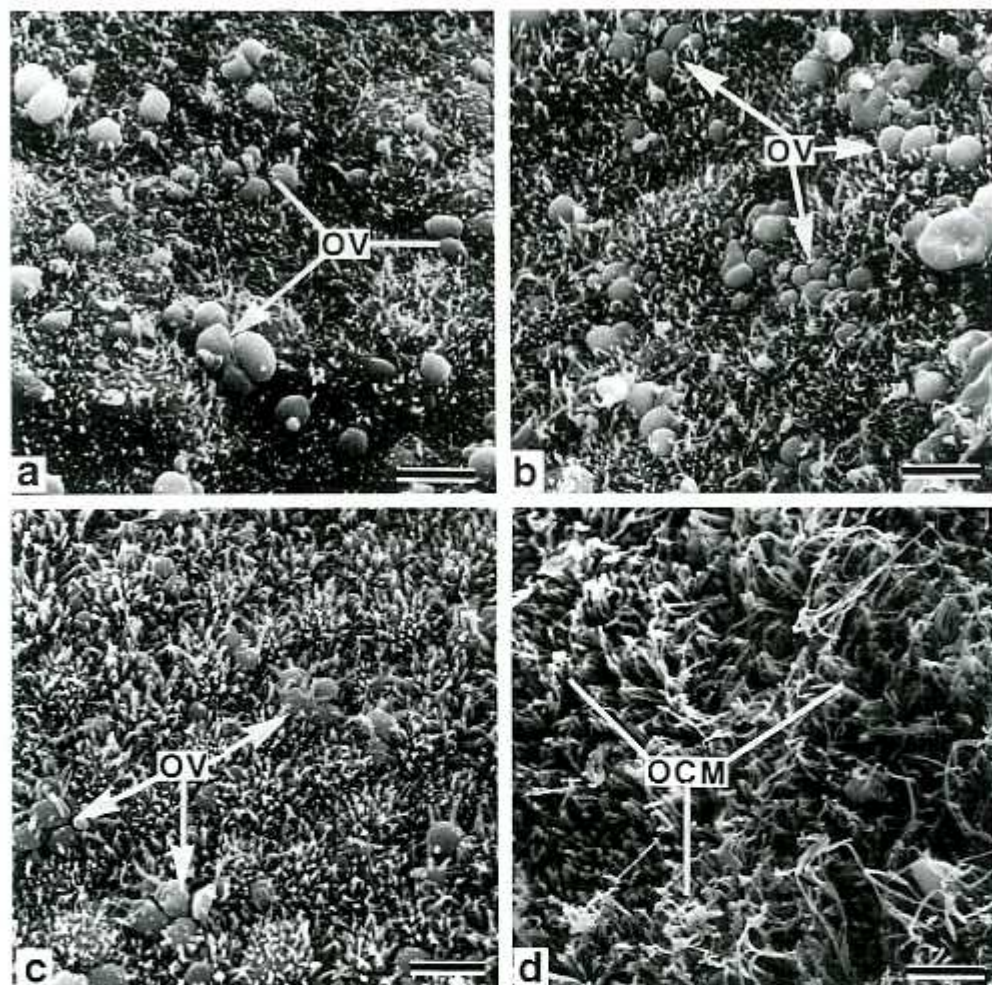


Fig. 10. SEM images of roof olfactory epithelium. Bar = 4.0 μ m

a. 12 days of gestation

Olfactory vesicles of various sizes can be seen. Vesicle clusters are scattered at random.

b. 13 days of gestation

Most olfactory vesicles (OV) appear to form vesicle clusters.

c. 14 days of gestation

Short cilia appear on the olfactory vesicles (OV).

d. 16 days of gestation

Olfactory cilia become long and dense to form the olfactory ciliary mat (OCM), and olfactory vesicles can hardly be recognized on the olfactory epithelium.

嗅小胞は Stage II から III において数個がグループをつくって鼻腔表面に出現した後、Stage IV で減少し散在して分布するようになり、Stage V で残った嗅小胞に長い嗅線毛が発達するようになる。従って、嗅小胞は胎生期にいったん過剰な数の小胞が形成された後、嗅小胞数が減少するという過程を経ると考えられる。前報⁹⁾に

において私共は発達過程の嗅上皮には細胞死がみられ、その細胞死に胎生14日で鼻中隔壁と外側壁とで局所的な差違のみられることを報告した。胎生14日では内側嗅上皮は嗅小胞が減少する Stage IV の状態、外側嗅上皮では Stage III の状態で、このような Stage III と Stage IV の嗅小胞の数と分布の違いは、前報の嗅上皮中にみられ

た細胞死に直接起因する可能性が高い。

Voyron ら⁵⁾は嗅上皮の発達過程で嗅上皮中にアポトーシスが2回のピークで現れ、アポトーシスが嗅球の発達と関連して嗅上皮中に出現すると報告している。ZnSO₄による嗅小胞の変性実験^{6),9)}や、電気焼灼による傷害後の嗅上皮の再生¹⁰⁾、さらに嗅糸切断後の嗅上皮の再生^{11),12)}、さらに嗅球切除後の嗅上皮の再生において、いずれも再生過程で嗅上皮中に核濃縮を来した死細胞が多数現れる^{13),14)}、従って胎生期の発生であっても、さらに損傷後の再生であっても、嗅上皮の発達・形成において細胞死は共通して出現する現象としてとらえることができる。嗅上皮は嗅細胞、支持細胞および基底細胞3種類の上皮細胞から構成される。嗅小胞は双極性ニューロンである嗅細胞の樹状突起の先端が球状となり鼻腔内に突出したものである¹⁾。Stage IIIとIVの間にみられた嗅小胞の減少は、嗅上皮の中でもとくに嗅小胞が細胞の1部である嗅細胞の細胞死と関連する可能性が高いと考えられるが、いずれにせよ嗅上皮形成の過程で死に至る細胞の種類は超微形態レベルの観察によってさらに検討する必要がある。

神経の分化、発達や維持に深く関与する神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) は大脳皮質、海馬、視床、視床下部領域および嗅球に多

くみられ¹⁵⁾⁻¹⁷⁾、NGFの欠如で神経細胞は細胞死に至る¹⁸⁾。嗅細胞は双極性ニューロンであり、嗅球でシナプスを形成し、嗅球と嗅上皮は密接に関連して発達する^{11),12)}。今回明らかにした嗅上皮発達における局所的な差違、すなわち天蓋域が最も早く発達し、外側壁嗅上皮はそれから約2.5日遅れて発達する所見は、鼻腔上壁で嗅覚を感知する特殊感覚上皮として発達する嗅上皮において、NGFを含む嗅球に対する嗅部各部位の距離的な違いが反映されている可能性も要因の1つとして考えられよう。

謝 辞

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、実験に御協力いただいた岩月宏彦助教授、須田満寿夫、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惜しま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104回日本解剖学会総会 (1999年) にて発表した。

文 献

- 1) Fawcett DW: A Textbook of Histology. 12th ed, New York, Chapman & Hall, 1994, pp 704-707
- 2) Cuschieri A, Bannister LH: The development of the olfactory mucosa in the mouse. ; Light microscopy. J Anat 119: 277-286, 1975
- 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) Voyron S, Giacobini P, Tarozzo P, Perroteau A, Fasolo A: Apoptosis in the development of the mouse olfactory epithelium. Dev Brain Res 115: 49-55, 1999
- 6) 森 幸威: 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. 川崎医学会誌 25: 211-221, 1999
- 7) Costanzo RM, Morrison EE: Three-dimensional scanning electron microscopic study of the normal hamster olfactory epithelium. J Neurocytol 18: 381-391, 1989
- 8) Matulionis DH: Light and electron microscopic study of the degeneration and early regeneration of olfactory

- epithelium. *Am J Anat* 145 : 79-99, 1976
- 9) Manalions DH, Breipohl W, Bhatnagar KP : Degeneration and regeneration of olfactory epithelium in the mouse. A scanning electron microscopic study. *Ann Oto Rhinol Laryngol Suppl* 89 : 1-12, 1982
 - 10) Benson TH, Ryugo DK, Hinds JW : Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system : A light and electron microscopic, morphometric analysis. *J Neurosci* 4 : 868-879, 1984
 - 11) Monti Graziadei GA, Karlan MS, Bernstein JJ, Graziadei PPC : Reinnervation of the olfactory bulb after section of the olfactory nerve in monkey (*Saimiri Sciureus*). *Brain Res* 189 : 343-354, 1980
 - 12) Graziadei PPC, Monti Graziadei GA : Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J Neurocytol* 9 : 145-162, 1980
 - 13) Costanzo RM, Graziadei PPC : A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J Comp Neurol* 215 : 370-381, 1983
 - 14) Carr VM, Farbman AI : The dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* 124 : 308-314, 1993
 - 15) Whitmore SR, Seiger Å : The expression, localization and functional significance of β -nerve growth factor in the central nervous system. *Brain Res Rev* 12 : 439-464, 1987
 - 16) Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R : The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system : Comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 109 : 145-178, 1988
 - 17) Ebendal T : Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res* 32 : 461-470, 1992
 - 18) Deckwerth TL, Johnson EM Jr : Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *J Cell Biol* 123 : 1207-1222, 1993