

〔原 著〕

## マウス口蓋形成過程の組織化学的研究

松本賢二, 小原伸子\*, 武田正子\*, 金澤正昭

北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座  
\*北海道医療大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任: 金澤正昭 教授)  
\*(主任: 武田正子 教授)

## Histochemical study of palate development in fetal mice

Kenji MATSUMOTO, Nobuko OBARA\*, Masako TAKEDA\* and Masaaki KANAZAWA

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

(Chief: Prof. Masaaki KANAZAWA)  
\*(Chief: Prof. Masako TAKEDA)

### Abstract

The fusing palate of day 13-15 fetuses of ddYmice was examined by using the TUNEL (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) method, immunofluorescent staining for cadherin (a cell adhesion molecule), and electron microscopy. Only few TUNEL-positive (apoptotic) cells were observed in the medial edge epithelium before the palatal shelves came into contact. After the epithelial seam was formed along the opposing palatal shelves and nasal septum, many TUNEL-positive cells appeared in the midline sheam, and in the nasal and oral epithelial triangles. There was E-cadherin in the epithelial cells of both the basal and superficial cell layers, and P-cadherin in only the basal cell layers, before the opposing shelves came into contact. After the shelves adhered to each other, E-cadherin was present in all seam cells, and P-cadherin in only the basal layer cells of the seam. Some mesenchymal cells were observed by electron microscopy to be in direct contact with the basal epithelial cells of the seam through the basement membrane.

It is supposed that cadherin has an important role during fusion of the medial edge epithelium of the opposing palatal shelves and that the fused midline seam is disrupted and disappears by apoptotic cell death.

---

受付: 平成11年9月1日

**Key words** : palate, development, cadherin, apoptosis, electron microscope.

## 緒 言

唇顎口蓋裂は新生児500人に一人と比較的高頻度に見られる疾患で、その発生要因を究明するための基礎的な実験が古くから行われている。代表的な実験は、bromodeoxyuridine<sup>1)</sup>, glucocorticoids<sup>2,3)</sup>, retinoic acids<sup>4-8)</sup>, その他<sup>9-11)</sup>の薬物を使って実験的に口蓋裂を発生させるものである。さらに、このような口蓋裂を誘発する薬物とともに、methionine<sup>12)</sup>, vitamine B<sub>6</sub><sup>13)</sup>などを投与すると口蓋裂の発生が抑制されるという研究もある。また、初期胚を子宮へ移植して胎仔を得る実験により、口唇、口蓋裂の発生要因として母体の環境要因も重要であることがわかっている<sup>14-16)</sup>。口蓋裂発生にかかわる二次口蓋の形成は、左右の口蓋突起の下方伸長、挙上、水平転位、接触、接着、癒合の一連の複雑な過程を経ることが知られている<sup>17-21)</sup>。この口蓋突起の挙上、水平転位の要因としては、舌の下降<sup>22)</sup>、間葉細胞増殖活性の増加<sup>7,9,23,24)</sup>、ヒアルロン酸の集積<sup>25)</sup>、血管網の発達<sup>6)</sup>などの説がある。口蓋突起は水平転位の後、左右が接触し、先端上皮の接着が生じる。この上皮接着の際の表層細胞の脱落の有無に関しては二つの説がある。一つは表層の細胞は脱落せず、そのまま左右の突起の上皮が接着するという説<sup>26-28)</sup>と、もう一つは接着前に基底層と表層の二層の細胞層のうちの表層の細胞が剥落<sup>29-31)</sup>、あるいはアポトーシス<sup>32)</sup>を起し脱落するために、容易に基底層同士が接着するという説がある。また接着した上皮は正中上皮索を形成し、急速に細胞層を減じて断裂し消失するが、そのメカニズムとして三つの説がある。それはアポトーシス (apoptosis) による細胞死説<sup>27,28,32)</sup>、上皮細胞の間葉細胞への転換説<sup>25,29,30)</sup> および口蓋突起の成長に応じ、上皮細胞が口腔

と鼻腔側上皮に向かって移動するという説<sup>26,33)</sup>である。

そこで著者らは、二次口蓋の形成がどのような機序によって起こるかを検討するために、とくに左右の口蓋突起先端上皮の接着、癒合過程のメカニズムを検討した。すなわち、アポトーシスに陥った細胞核の断裂したDNAの3'-OH末端を標識するTUNEL法 (the method of TdT-mediated dUTP-nick end labeling)<sup>34)</sup>により、アポトーシスの有無を観察した。さらに細胞の接着に関与する蛋白質の発現を調べるために、カルシウム依存性の細胞膜貫通性の糖蛋白質 (分子量約120kD) で細胞接着分子のカドヘリンについて、蛍光抗体法によりその発現と分布について検索した。また上皮細胞の癒合過程とアポトーシス細胞を透過型電子顕微鏡を用いて微細構造学的に観察した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験材料には生後9週から15週の11匹の雌のddYマウスを用いた。マウスは温度25°C、湿度60%の部屋で飼育され、水と飼料は常に供給された。雌マウスは膣垢検査を行い夕方6時から翌日朝8時まで雄と同衾させ、膣栓を認めたものを妊娠0日とした。妊娠13, 14, 15日の母マウスから、クロロホルムによる全身麻酔下で胎仔を取り出し、以下の方法で前頭断切片を作製した。

### 2. 光学および電子顕微鏡による観察

採取した胎齢13, 14, 15日のマウスの頭部を、2%パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で4°C, 24時間、浸漬固定を行った。次いで、1%

四酸化オスミウム溶液を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で4°C, 2時間の後固定を行った。その後, 上昇エタノール系列により脱水しエポキシ812に包埋した。2 $\mu$ mの厚さの準超薄切片を作製し, トルイジンブルー染色を行い, OPTIPHOT-2光学顕微鏡 (ニコン社製, 東京) で観察した。さらに微細構造の観察のため60~100nmの超薄切片を作製し, 酢酸ウラニウムとクエン酸鉛の二重染色を行った。なお, 観察にはH-700透過型電子顕微鏡 (日立社製, 東京) を用いた。

### 3. TUNEL法

胎齢14日の胎仔を4%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で室温, 24時間浸漬固定を行い, エタノール脱水, パラフィン包埋後6 $\mu$ mの厚さの切片を作製した。切片は5 $\mu$ g/mlプロテイナーゼK (宝酒造社製, 京都) で室温, 3分間浸漬した。アポトーシスの検出にはApop Tag™ in situアポトーシス検出キット (Oncor社製, MD, U. S. A.) を用いた。切片を平衡緩衝液に15分間浸し, その後TdT酵素混合液 (terminal deoxynucleotidyl transferaseとdigoxigenin-dUTP) でおおい37°C, 1時間, 湿箱の中に置いた。この反応は反応停止, 洗浄緩衝液に37°C, 30分間浸漬することにより終了した。次いで, 抗ジゴキシゲニン-ペルオキシダーゼに浸して室温で30分間湿箱の中に静置し, 0.01M PBS (リン酸緩衝食塩水) で洗浄した後, 0.005%過酸化水素を加えた0.02% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) で反応させ, アポトーシス細胞の有無をOPTIPHOT-2光学顕微鏡 (ニコン社製, 東京) で観察した。さらに一部の切片はヘマトキシリンによって核染色を行い観察した。

### 4. 免疫組織化学

胎齢14日の胎仔の頭部をPLP (periodate

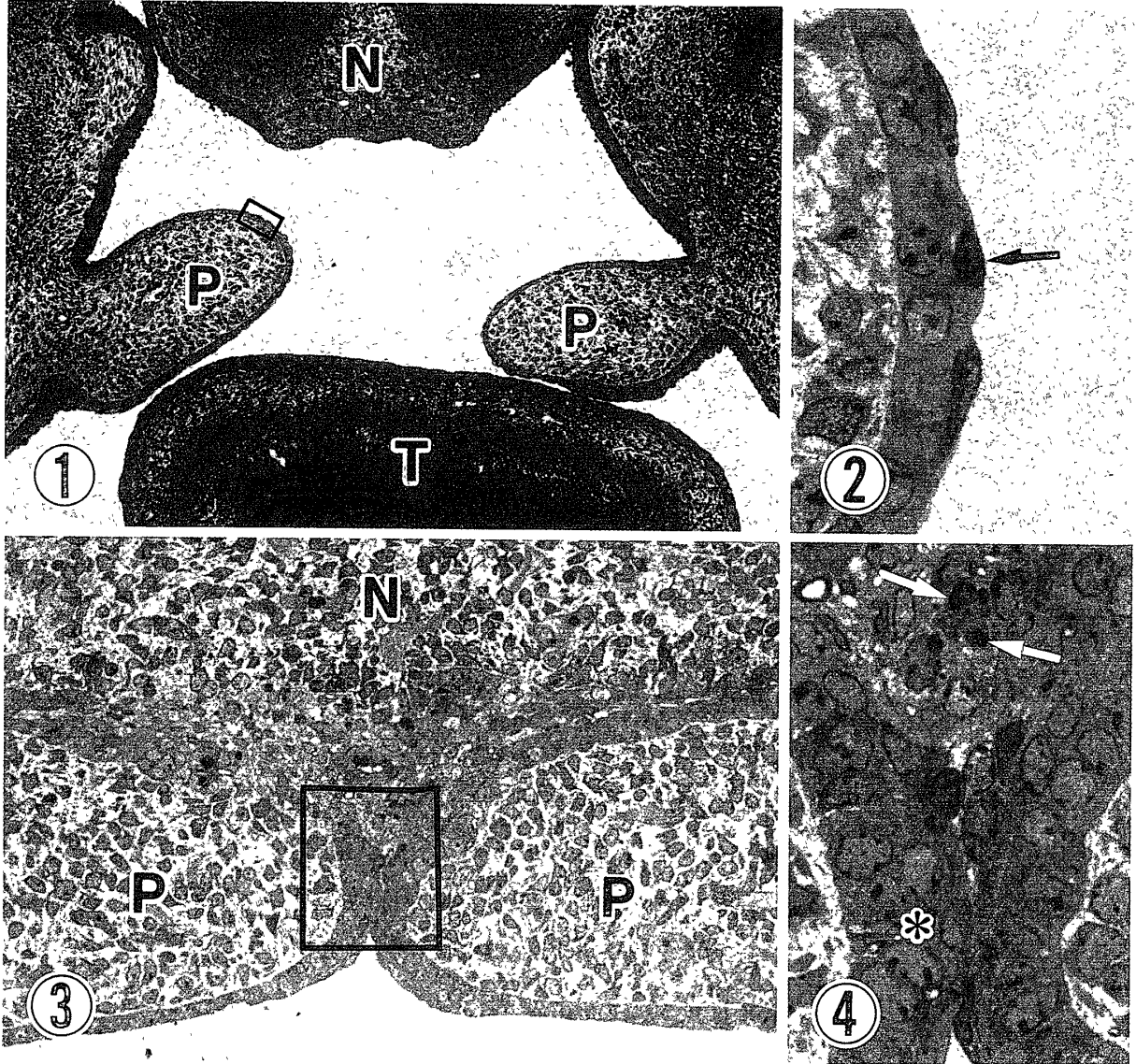
-lysine-paraformaldehyde) 溶液で4°C, 2時間固定し, 10%, 15%および20%の蔗糖を加えたPBSに各4時間浸漬した。その後, 液体フロン22のsupray freezerで凍結し, 10 $\mu$ m厚切片を作製した。抗マウスP-カドヘリン抗体 (モノクローナル, PCD-1: 宝酒造社製, 京都), または抗マウスE-カドヘリン抗体 (モノクローナル, ECCD-2: 宝酒造社製, 京都) を一次抗体として37°C, 2時間反応させた。一次抗体は希釈液 (20mM TBS pH 7.4, 1.0%ウシ血清アルブミン, 0.1%アジ化ナトリウム, 10mM塩化カルシウム) で使用濃度10 $\mu$ g/mlに調整して用いた。次いで二次抗体としてFITC-抗ラットIgG抗体 (Cappel社製, PA, U. S. A.) をPBSで50倍に希釈して室温で1時間反応させた間接蛍光抗体法を行い, TCS4D全自動共焦点レーザー顕微鏡 (Leica社製, Heidelberg, Germany) によって観察した。なお, コントロールには一次抗体の代わりにラットの正常血清を用いた。

## 結 果

### 1. 二次口蓋形成過程

胎齢13日のマウスでは, 左右の口蓋突起は鼻中隔を挟んで下方へ伸びているが, 14日になると挙上し水平となって次第に接近し, 遂には接触, 接着, 癒合した (Figs.1-4)。左右の口蓋突起の接触直前の口蓋突起先端部の上皮細胞層は, 一層の立方形の基底細胞と扁平な表層細胞との二層から成っていた。この時期に, ごくまれにトルイジンブルー染色によりアポトーシスを思わせる濃染した核をもつ細胞が表層細胞層に見られた (Fig.2)。次いで左右の口蓋突起が一部接着を開始した部分では, 殆んどの上皮細胞は, 本来の基底層と表層の二層の構造を保ったまま接着して四層の正中上皮索を形成していた。口蓋突起と鼻中隔の接着部においても, 口蓋突起と鼻中隔の上皮は, それぞれ基底層と表層の二層構造を保ったまま接着していた

(Fig. 3)。上皮索にはアポトーシス小体を思わせる濃染した物質をもつ細胞が点在していた (Fig. 4)。



Figs. 1-4 Toluidine blue staining in coronal sections of fetal mouse palates at various stages of fusion at day 14 of gestation

Fig. 1 Opposing palatal shelves (P) elevated to a horizontal position, but not in contact N, nasal septum, T, tongue. x110

Fig. 2 Higher magnification of the square area of Fig. 1. Medial edge epithelial cells are a basal cubic cell layer and a superficial flat cell layer There is a dense-stained nucleus (arrow) in the superficial layer. x1,300

Fig. 3 Initial contact of opposing palatal shelves (P) and nasal septum (N) x210

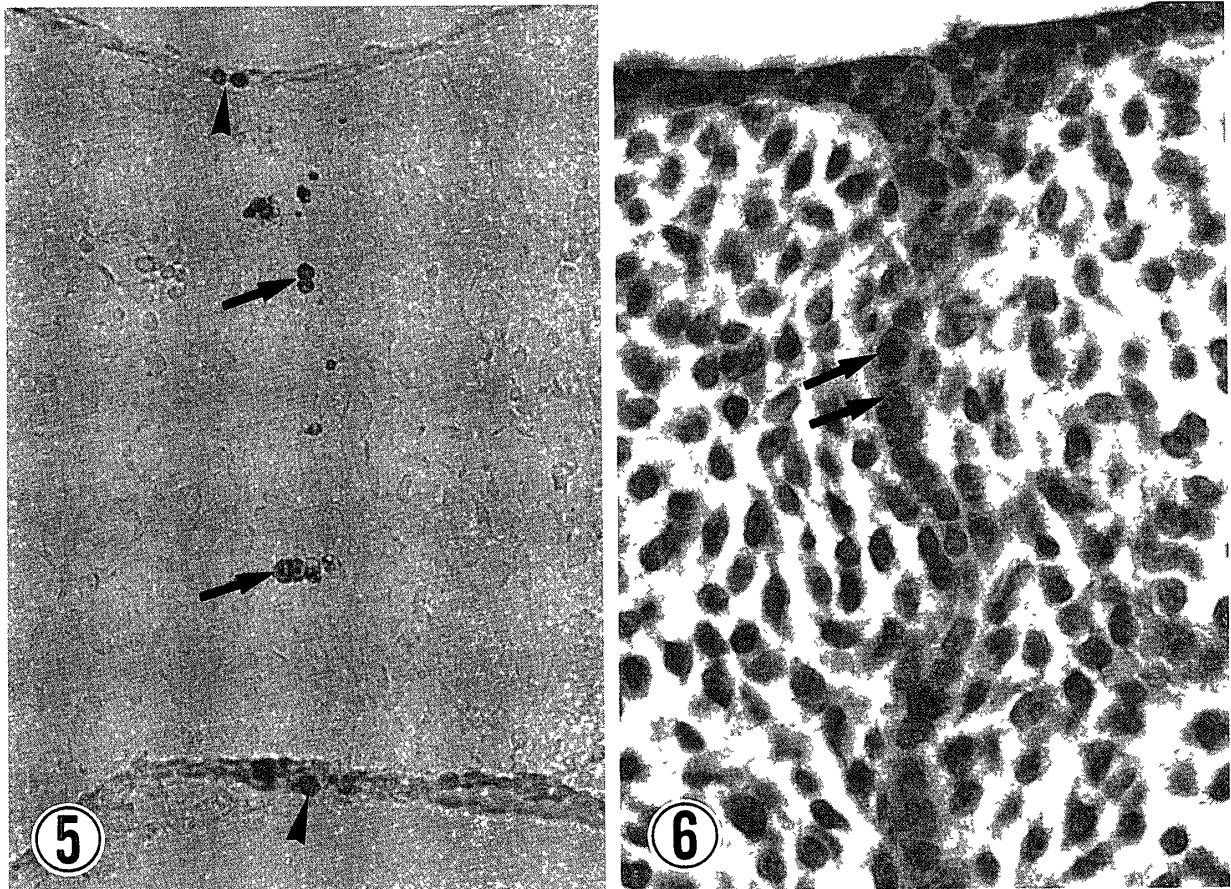
Fig. 4 Higher magnification of the square area of Fig. 3 Medial edge epithelial cells make contact in two cell layers (\*) without desquamation Dense bodies (arrows), possibly apoptotic bodies, are seen in the epithelial sheath x770

## 2. TUNEL法

アポトーシス細胞を検出するTUNEL法による所見では、左右の口蓋突起が接触する前の上皮には、褐色のTUNEL陽性細胞はごくまれにしか認められなかった。上皮が一部接触を開始した部分でも、褐色のTUNEL陽性細胞はめったに認められなかった。しかし左右の口蓋突起の接着が始まると、接着部分の上皮索内に褐色のTUNEL陽性細胞が散見されるようになった。口蓋突起の上皮細胞層が完全に接着し部分的に上皮索の断裂が始まると、多数のTUNEL陽性細胞が、上皮索全体にみられるようになり、さらに口腔および鼻腔側の上皮三角の部分にも出現した (Figs.5, 6)。

## 3. 免疫組織化学

P-カドヘリンに対する抗体の反応は、左右の口蓋突起の先端上皮が接着する前では、口蓋突起を含む口腔の粘膜と鼻腔粘膜の上皮の基底細胞層の細胞膜が陽性反応を示したが、表層細胞層の細胞膜には陽性反応は認められなかった (Fig.7-A)。左右の上皮が接着すると上皮索の基底細胞層の細胞膜は陽性反応を示すが、表層細胞層であった上皮索の真中の二層の細胞層は陰性のままであった (Fig.7-C)。上皮索が断裂を開始すると、上皮細胞が残存している島状の部分の基底細胞だけに陽性反応が認められた (Fig.7-E)。なお、反応強度には接着、癒合過程を通じて変化を認めなかった。



Figs 5,6 TUNEL staining of the fused palate at day 14 of gestation

Fig 5 TUNEL-positive cells (arrows) in the midline seam and oral and nasal triangles (arrow heads) x610

Fig 6 TUNEL-positive cells (arrows) in midline seam consisting of a cell layer Nuclei are also stained by hematoxylin x610

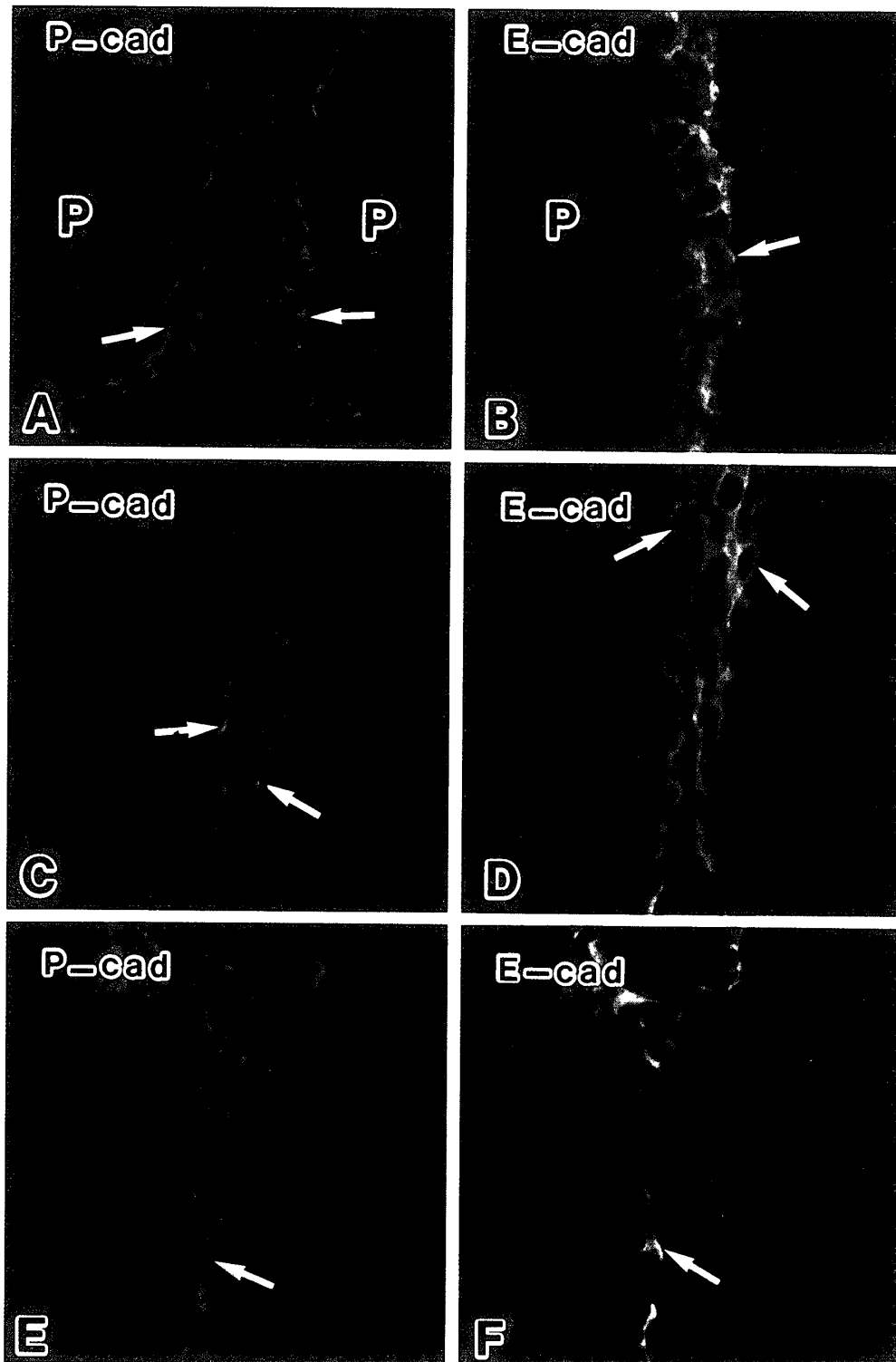


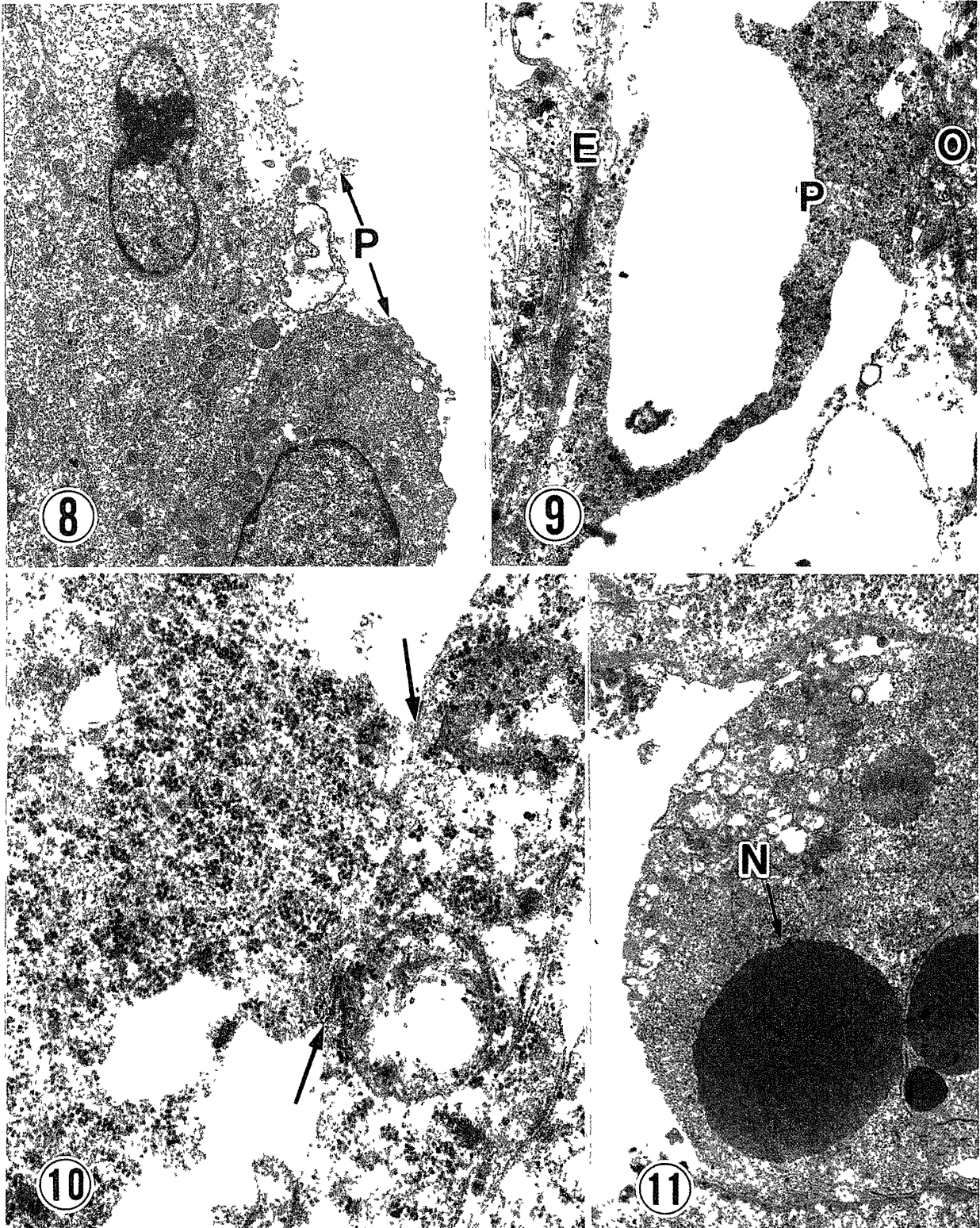
Fig 7 Confocal laser micrographs of immunofluorescent staining for P-cadherin and E-cadherin of the palates at various stages at day 14 of gestation x530

7-A, B Prior to contact between opposing palatal shelves (P) A Cell membranes of the basal layers (arrows) are stained for P-cadherin B Cell membranes of both the basal and superficial layers (arrow) are stained for E-cadherin

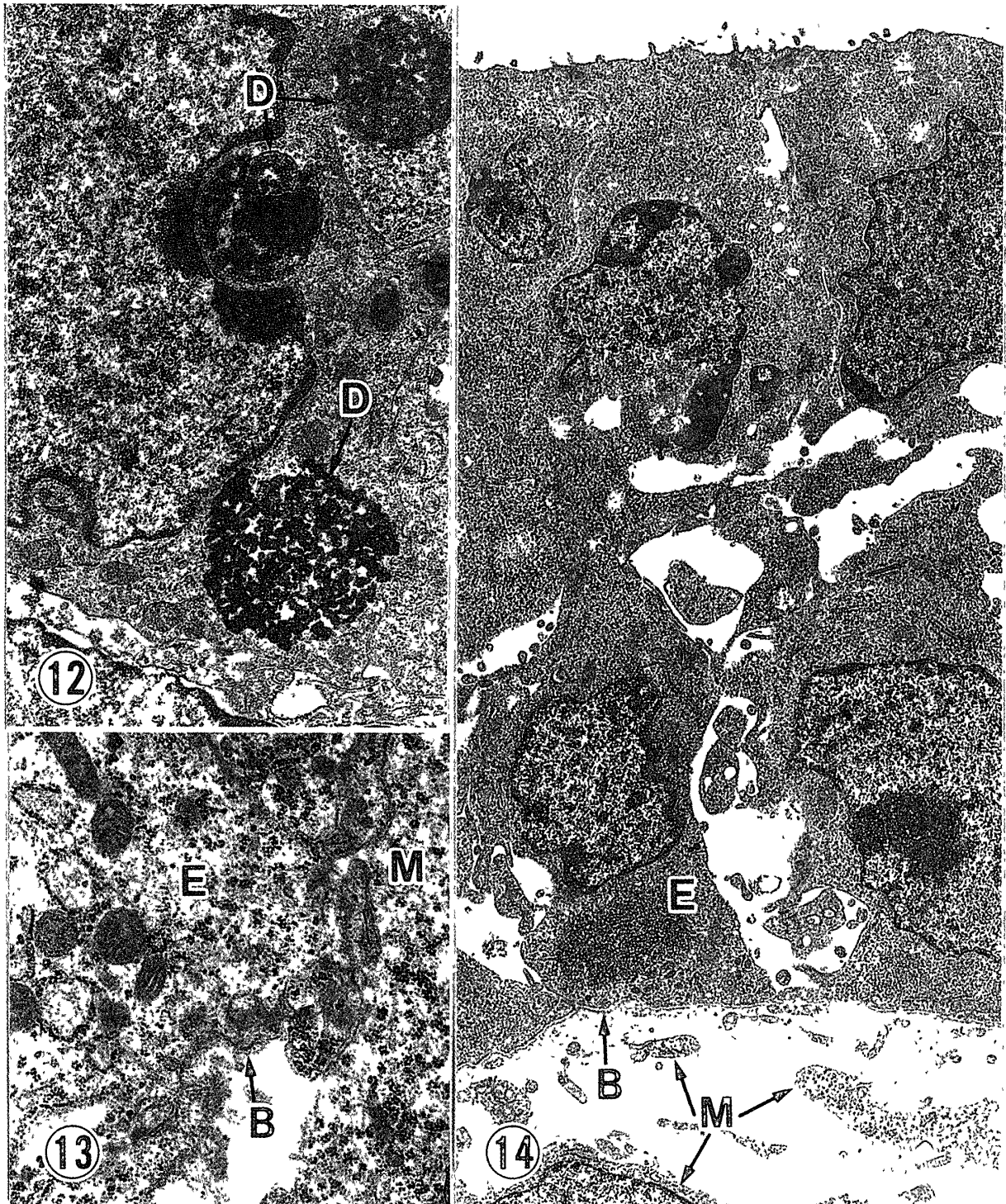
7-C, D Initial contact between opposing palatal shelves C Cell membranes of the basal layers (arrows) are stained for P-cadherin, but the central layers are not stained D Cell membranes of all layers of the midline seam (arrows) are stained for E-cadherin

7-E, F Disrupted midline seam E Basal cell membranes (arrow) of the remaining epithelial islands are stained for P-cadherin F All cell membranes of the remaining epithelial islands (arrow) are stained for E-cadherin





**Figs 8-11** Electron micrographs of epithelial cells of the palates at various stages at day 14 of gestation  
**Fig 8** Prior to contact of opposing palatal shelves The surface of the medial edge epithelial cells has small processes (P) x7,000  
**Fig 9** A superficial epithelial cell of the medial edge (E) reaches a process (P) toward an opposite cell (O) x14,000  
**Fig 10** Opposing superficial epithelial cells in contact (arrows), but no desmosomes between opposing cells x34,000  
**Fig 11** An epithelial cell in the fused midline seam with condensed and fragmentary nuclei (N) in the cytoplasm x10,000



Figs 12-14 Electron micrographs of epithelial cells of the palates at various stages at day 14 of gestation  
 Fig 12 An epithelial cell in the fused midline seam with dense bodies (D) filled with the debris of cytoplasmic organelles  $\times 13,000$   
 Fig 13 The basal side of the fused midline seam A mesenchymal cell (M) in direct contact with a basal epithelial cell (E) B, basement membrane  $\times 20,000$   
 Fig 14 The nasal side epithelium of the fused palatal shelves The basal epithelial cells (E) are separated from the mesenchymal cells (M) by the intact basement membrane (B)  $\times 6,000$



E-カドヘリンに対する反応をみると、P-カドヘリンよりも反応が強く、口蓋突起を含む口腔上皮、さらに鼻腔上皮の全ての層に陽性反応が認められた。口蓋突起先端上皮では接着前および接着後ともに、基底細胞層と表層細胞層の両方の細胞膜が陽性反応を示した(Fig.7-B, D)。上皮索の断裂が始まると島状に上皮細胞が残存する部分では、残存するすべての上皮細胞膜が陽性であった(Fig 7-F)。なお陽性反応の強さには、上皮の接触前から接触、癒合の全過程を通じて変化を認めなかった。

#### 4. 電子顕微鏡観察

口蓋突起の基底層および表層のすべての上皮細胞は、リボゾームに富むが、他の細胞小器官が少ない未分化な細胞であった。左右の口蓋突起先端が接触する直前では表面の細胞膜は波状に起伏しており(Fig.8)、しばしば指状の突起を伸ばして互いを探り合っているような像が見られた(Fig 9)。さらに、左右の表層細胞がところどころで接触を開始した時点では、表層細胞間にはまだデスモゾームの形成がみられなかった(Fig 10)。相対する上皮細胞膜が平行になり、その間にデスモゾームが形成され上皮索が形成されると、上皮索の中にアポトーシス細胞に特有の電子密度の高い破碎した核を持つ細胞が見られた(Fig.11)。また、上皮索の細胞には、細胞小器官や核の断片を含む食胞を持つものが認められた(Fig 12)。さらに、この時期には正中上皮索の周囲の間葉組織の間葉細胞の胞体の一部分が、基底膜を貫いて上皮細胞と直接接触している像が観察された(Fig 13)。このような間葉細胞と上皮細胞が接触する像は、癒合過程の遅れている口蓋突起の鼻腔側と鼻中隔の部分(Fig 14)や、将来にわたって癒合の起こらない口蓋突起口腔側においては認められなかった。

## 考 察

本研究は、口蓋突起先端上皮の癒合過程を詳細に解明するために行った。左右の突起先端部上皮は、接触前には基底細胞層と表層細胞層の二層から構成されており、この二層がそのまま接着、癒合した。Taniguchiら<sup>32)</sup>は、ラットで、接触前の上皮表層にTUNEL陽性の細胞核を認め、表層細胞がアポトーシスにより死んで脱落し、基底細胞同士が接触するようになると考えた。FitchettとHay<sup>30)</sup>やGriffithとHay<sup>29)</sup>は接触前の上皮表層細胞が剥落することにより、露出された強い接着性を持つ基底細胞同士が容易に接着すると述べている。しかし、宮本ら<sup>26)</sup>はマウスで、閉鎖前の口蓋前方部の上皮は二～三層で構成され、後方に行くに従い四～五層になるが、閉鎖前の上皮に変性細胞は出現しないと報告した。Moriら<sup>28)</sup>もマウスで、左右の上皮の接着以前には、上皮にTUNEL陽性細胞を観察していない。本研究でも左右の先端上皮の接触前には、TUNEL陽性核はごくたまに認めるのみであったことから、接触前の表層細胞の消失はごく少数であり、表層細胞の脱落が接着の際に重要な役割をはたすものではないと思われる。

左右の口蓋突起先端上皮の接着により、口蓋正中部には上皮索が形成される。この上皮索の断裂、消失のメカニズムについては、古くから口蓋発生の途上プログラムされた、あるいは予定された細胞死(programmed cell death)であるという考え方があった<sup>35-37)</sup>。HudsonとShapiro<sup>35)</sup>は、口蓋癒合時の胎生15日から16日のラット胎仔において、口蓋突起先端上皮は鼻腔や口腔、あるいは舌の上皮に比べて、細胞分裂活性(mitotic activity)が非常に減少していることからプログラム細胞死の考え方を支持した。また、ShapiroとSweney<sup>36)</sup>、HinrichsenとStevens<sup>38)</sup>、Farbman<sup>39)</sup>は、プログラム細胞死の形態学的根拠として、正中上皮索の細胞内に、

食胞やライソゾームが多数みられ, さらに大食細胞が出現する事をあげている。一方, FitchettとHay<sup>30)</sup>は, 上皮索の断裂, 消失の際に細胞死は観察しておらず, 免疫組織化学的研究から, 上皮細胞はケラチンを失い, ビメンチンを持つ間葉細胞に転換する (transformation) と考えた。Ferguson<sup>25)</sup>は, 上皮索はまず細胞死により断裂し, 残った上皮細胞は上皮下の間葉組織の誘導により間葉細胞へ転換するとした。GriffithとHay<sup>29)</sup>は, 脂溶性マーカーのCCFSE (carboxydichloro-fluorescein diacetate succinimidyl ester) で上皮を標識し, そのマーカーが癒合した口蓋の間葉組織の線維芽細胞に移行したことから, 上皮細胞の間葉細胞への転換説をとらえた。しかし, CaretteとFerguson<sup>33)</sup>は, *in vitro*で, DiIにより口蓋上皮を標識し, レーザー走査顕微鏡で観察の結果, 正中上皮索の細胞は口腔側および鼻腔側の上皮へ移動すると考えた。宮本ら<sup>26)</sup>は, 口蓋閉鎖部の前端の細胞層が閉鎖前よりも増加し, また上皮索内の変性細胞の出現が少ないことから, 上皮索の崩壊と排除には上皮細胞の前後方向, および口腔側, 鼻腔側への移動が重要な役割を果たすと考えた。

前述のプログラム細胞死は, 形態学的にはKerrら<sup>40)</sup>によりアポトーシスと呼ばれ, 核のDNAのヌクレオソーム単位の断片化を伴うものであることが明らかになった。Gavrieliら<sup>34)</sup>は, 断片化したDNAの3'-OH末端にterminal deoxynucleotidyl transferaseを特異的に結合させ標識することにより, アポトーシス細胞を形態学的に検出する方法 (TUNEL法) を開発した。Moriら<sup>28)</sup>は, この方法により口蓋の正中上皮索の断裂, 消失は, アポトーシスによる細胞死の結果起こることを報告した。本研究では, Gavrieliら<sup>34)</sup>の方法のbiotinの代わりに digoxigeninを用いる変法を行ったが, 結果は, Moriら<sup>28)</sup>と同じく, 正中上皮索の中央部のみならず鼻腔側および口腔側上皮三角にもTUNEL陽性

細胞が認められ, アポトーシス説を補強する結果となった。本研究では, 陽性細胞数はそれほど多くみられなかったが, これはアポトーシスに陥った細胞がTUNEL陽性を示すのは1~3時間とごく短い<sup>34)</sup>ためであろうと思われる。本研究の電子顕微鏡による観察では, 正中上皮索内にアポトーシス細胞に特有の均質で非常に高電子密度の破碎した核を持つ細胞や, 断片化したアポトーシス小体を貪食したと思われる細胞小器官や核の断片を含む食胞を持つ上皮細胞が認められた。すなわち, 上皮索内のアポトーシスに陥った細胞は, 周囲の上皮細胞に貪食され, 処理されると考えられる。このような食胞を持つ細胞の電子顕微鏡像の報告は多数あるが, Smiley<sup>31)</sup>は, これらを単に変性細胞 (degenerative cell) としている。またFerguson<sup>25)</sup>や宮本ら<sup>26)</sup>は, われわれと同じような電子顕微鏡像を観察しているが, このような細胞の変化を上皮索の崩壊の重要な原因とはみなしていない。またMoriら<sup>28)</sup>やTaniguchiら<sup>32)</sup>も, 正中上皮索の消失はアポトーシスによる細胞死の他に, 一部の上皮細胞は鼻腔側や口腔側上皮に向かって移動するか, あるいは間葉細胞へ転換する可能性も捨てきれないとしている。

Mori<sup>27)</sup>は, 抗BrdU抗体を用いる免疫組織化学的方法により, 口蓋突起先端の上皮細胞は対側の上皮細胞との接触の24時間前にDNA合成を停止すると報告した。*In vitro*で接触前の口蓋突起を左右別々に培養しても, 先端上皮は死に至ることがわかっている<sup>41)</sup>。すなわち, 先端上皮は最後のDNA合成を接触の24時間前に行った後ただちに遺伝子の発現パターンに変化を生じ, 細胞死遺伝子のスイッチがオンに入ると考えられる<sup>42)</sup>。すなわち接触予定部の先端上皮細胞は, 接触以前にすでにアポトーシスにおちいる運命が定まっている。このような先端上皮の細胞では, 互いを認知し接着を容易にする物質が合成され, 細胞膜に存在するようになるので

はないかと想像される。

形態形成のさいに細胞接着に関与する膜蛋白は種々あり、これらは時間的、空間的に特定の部位に特定の期間発現し、特定のリガンドと接着して機能を発揮する。このうち上皮に広く発現する代表的なものはE-カドヘリン（上皮由来）である。その他にP-カドヘリン（胎盤由来）も上皮に発現することが多い。E-カドヘリンは、通常、上皮の基底層と中間層の細胞に、またP-カドヘリンが上皮に発現する場合には基底層の細胞のみに存在する<sup>43)</sup>。Lüningら<sup>44)</sup>は、E-カドヘリンとそのm-RNAについて免疫組織化学（酵素抗体法）とin situ hybridizationにより調べ、口腔上皮のこれらの反応は分化に伴って増強し、また口蓋突起癒合部の上皮は、わずかながら周囲の上皮よりも反応が強いと報告した。本研究では、胎齢14日のマウスにおいてE-カドヘリンは、口腔および鼻腔の上皮のすべての細胞に存在し、口蓋突起接触前、接着、癒合過程を通じて、先端上皮および正中上皮索の全ての細胞に陽性反応を示した。しかしその反応は、癒合部上皮が他の部分に比べて強いということとはなかった。一方、P-カドヘリンは上皮の表層細胞は陰性で、基底層細胞のみが陽性を示した。そして接着後も、上皮索の基底層細胞のみが陽性で、その反応の強さは癒合過程を通じて変わらなかった。このようなことから、E-およびP-カドヘリンは、左右の口蓋突起の上皮細胞同士の安定した接着に一定の役割を果たすものと考えられる。

本研究の電子顕微鏡観察では、左右の口蓋突起先端の上皮が接近すると表層細胞が対側の細胞の表面に向かって不規則な形の突起を伸ばしている像が認められた。これは神経突起の先端が標的細胞を認知する時、偽足を出したりひっこめたりしながら相手を探っている像に似ている。おそらく口蓋でも、このようにして対側の細胞膜に触れることにより接着すべき細胞を認知

するものと思われる。HinrichsenとStevens<sup>38)</sup>も、接触直前になると、口蓋突起先端の表層細胞が微絨毛様突起を持つようになることを電子顕微鏡で観察している。本研究で、口蓋突起接着後に出来る正中上皮索の基底膜を貫いて間葉細胞が突起を出し、上皮細胞と直接接触している像が電子顕微鏡で観察された。正中上皮索の基底膜は連続しており、このような細胞突起貫通による基底膜の断裂はないとする報告もあるが<sup>38)</sup>、しかしSmiley<sup>31)</sup>は上皮索の細胞が微絨毛様突起を出し、基底膜を貫いて間葉組織へと伸びている像を観察している。このような上皮と間葉組織の接触によって両者の間に何らかの情報交換が行われることになり、上皮索の断裂の進行が助けられるのではないかと想像される。

## 結 論

胎齢13-15日のddYマウス胎仔の口蓋の癒合過程を、TUNEL法、カドヘリン（細胞接着分子）の免疫蛍光染色および電子顕微鏡により検索した。

1. 口蓋突起先端の上皮細胞は、接着前は基底層と表層の二層から構成されている。TUNEL陽性細胞は上皮の接着前にはまれに観察されるのみであったが、接着後は上皮索内に多数出現した。このことから、接着前にアポトーシスにより死ぬ上皮細胞はごく少数であり、口蓋突起が二層構造を保持したまま接着・癒合した後に大部分の上皮細胞は、アポトーシスにより死に至るものと推察される。
2. 左右の口蓋突起の接触前には、E-カドヘリンは上皮の基底細胞層と表層細胞層のすべての細胞に存在したが、P-カドヘリンは基底細胞層だけにみられた。左右の突起接着後には、E-カドヘリンは上皮索のすべての細胞に存在し、P-カドヘリンは基底層細胞のみに存在した。これらのカドヘリンは、上皮細胞の安

定した接着に関与するものと思われる。

3. 透過型電子顕微鏡観察の結果, 接着した上皮索内に濃縮した核の断片を含む食胞を持つ細胞がみられたことから, アポトーシスに陥った細胞は, 周囲の上皮細胞により処理されるものと考えられる。
4. 口蓋突起先端上皮の表層細胞は接触直前に, 神経突起にみられるような細長い突起を伸ばし, 対側の上皮を認知した上で接触が生じることが示唆される。また上皮索下の間葉細胞が, 基底膜を貫いて上皮細胞と直接接触している像が観察されたことから, 両者の細胞の間には何らかの情報の交換があることが推測される。

## 文 献

1. Antoniadou K, Economou L, Sioga A, Vahtsevanos K, Manthos A Pathogenesis of bromodeoxyuridine-induced cleft palate in mice J Craniofac Surg, **23** : 252-255, 1995.
2. Waker BE Induction of cleft palate in rabbits by several glucocorticoids Proc Soc Exp Biol Med, **125** : 12-27, 1967.
3. Shah RM, Travill AA The teratogenic effects of hydrocortisone on palatal development in the hamster J Embryol Exp Morph, **35** : 213-224, 1976.
4. Kochher DM, Johnson EM Morphological and autoradiographic studies on cleft palate induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A J Embryol Exp Morph, **14** : 223-238, 1965.
5. Wersig G, Swenson MJ Teratogenicity of vitamin A in the canine Fed Proc, **26** : 486, 1967.
6. 千葉順一・正常ならひにビタミンA誘発口蓋裂ラット胎仔の二次口蓋形成過程における血管構築の推移—血管鋳型走査電子顕微鏡による観察—。日口蓋誌, **13** : 182-203, 1988.
7. 中山勝徳: 正常ならひにヒタミンA誘発口蓋裂ラット胎仔の二次口蓋形成過程における細胞増殖活性の推移。日口蓋誌, **41** : 290-300, 1992.
8. Nanda R Tritiated thymidine labelling of the palatal processes of rat embryos with cleft palate induced by hypervitaminosis A Arch Oral Biol, **16** : 435-444, 1971.
9. Singh GD, Moxham BJ Mesenchymal cell activity during 5-fluoro-2-deoxyuridine-induced cleft palate formation in rat Cleft Palate Craniofac J, **33** : 395-399, 1996.
10. Bienengraber V, Fanghanel J, Malek FA, Kundt G Application of thiamine in preventing malformations, specifically cleft alveolus and palate, during the intrauterine development of rats Cleft Palate Craniofac J, **34** : 318-324, 1997.
11. Watanabe T, Dakshinamurti K, Persaud TV Biotin Influences palatal development of mouse embryos in organ culture J Nutr, **125** : 2114-2121, 1995.
12. Lau EC, Li ZQ Protection of mice teratogen-induced cleft palate by exogenous methionine Proc Soc Exp Biol Med, **209** : 141-145, 1995.
13. Jacobsson C, Granstrom G Effects of vitamin B<sub>6</sub> on beta-aminopropionitrile-induced palatal cleft formation in rat Cleft Palate Craniofac J, **34** : 95-100, 1997.
14. Yoshida K, Natsume N, Kimoshita H, Tsunoda N, Takahashi H, Kawai T Experimental study on cleft lip and/or palate fetuses of A/J mice in utero of F1 hybrid mothers using transplantation Cleft Palate Craniofac J, **33** : 291-296, 1996.
15. Nonaka K, Sasaki Y, Martin DA, Nakata M Effect of dam strain on the spontaneous incidence of cleft lip and palate and intrauterine growth of CL/Fr mouse fetuses J Assist Reprod Genet, **12** : 447-452, 1995.
16. 角田典隆 受精卵移植による口唇, 口蓋裂発生予防法に関する研究。日口蓋誌, **41** : 97-103, 1995.
17. Zeiler KB, Weinstein S, Gibson RD A study of the morphology and the time of closure of the palate in the albino rat Arch Oral Biol, **9** : 545-554, 1964.
18. Walker BE Palate morphogenesis in the rabbit Arch Oral Biol, **16** : 275-286, 1971.
19. 栗栖浩二郎 口蓋裂の発生機序。歯界展望, **53** : 58-65, 1979.
20. 間藤方雄 形態形成と癒合現象。生体の科学, **23** : 179-196, 1972.
21. Coleman RD Development of rat palate Anat Rec, **151** : 107-118, 1965.

22. Wragg LE, Klein M, Steinvorth G, Warpeha R Facial growth accommodating secondary palate closure in rat and man Arch Oral Biol, **15** : 705-719, 1970.
23. Nanda R, Romeo D Differential cell proliferation of embryonic rat palatal processes as determined by incorporation of tritiated thymidine Cleft Palate J, **12** : 436-443, 1975.
24. Brinkley LL, Bookstein FL Cell distribution during mouse secondary palate closure II mesenchymal cells J Embryol Exp Morph, **96** 111-130, 1986.
25. Ferguson MWJ Palate development Development, 103 Suppl 41-60, 1988.
26. 宮本洋二, 長山勝, 高木知道 マウス(BALB/c) 二次口蓋突起癒合に関する研究—変性細胞の分布と上皮細胞の移動について—解剖誌, **64** : 5-18, 1987.
27. Mori C Significance of programmed cell death (apoptosis) in mammalian limb and palate development Acta Anat Nippon, **70** . 503-508, 1995.
28. Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, Osawa M, Shiota K Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palate by specific labelling of DNA fragmentation Anat Embryol, **190** : 21-28, 1994.
29. Griffith CM, Hay ED Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels Development, **116** : 1087-1099, 1992.
30. Fitchett JE, Hay ED Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse Dev Biol, **131** . 455-474, 1989.
31. Smiley GR Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion Arch Oral Biol, **15** : 287-296, 1970.
32. Taniguchi K, Sato N, Uchiyama Y Apoptosis and heterophagy of medial edge epithelial cells of the secondary palatine shelves during fusion Arch Histol Cytol, **58** : 191-203, 1995.
33. Carette MJM, Ferguson MWJ The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion in vitro an analysis by DiI labelling and confocal microscopy Development, **114** 379-388, 1992.
34. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation J Cell Biol, **119** . 493-501, 1992.
35. Hudson CD, Shapiro BL A radioautographic study of deoxyribonucleic acid synthesis in embryonic rat palatal shelf epithelium with reference to the concept of programmed cell death Arch Oral Biol, **18** . 77-84, 1973.
36. Shapiro BL, Sweney L Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial-mesenchymal interaction (programmed cell death) J Dent Res, 48 Suppl, **5** . 652-660, 1969.
37. Glucksmann A Cell death in normal vertebrate ontogeny Biol Rev, **26** . 59-86, 1951.
38. Hinrichsen CFL, Stevens GS Epithelial morphology during closure of the secondary palate in the rat Arch Oral Biol, **19** : 969-980, 1974.
39. Farbman AI Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos Dev Biol, **18** : 93-116, 1968.
40. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR Apoptosis A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics Br J Cancer, **26** : 239-257, 1972.
41. Shah RM, Crawford BJ, Green RM, Suen RS, Burdett D, King KO, Wong DTW In vitro development of hamster and chick secondary palate J Craniofac Genet Dev Biol, **5** : 299-314, 1985.
42. Tone S, Tanaka S, Kato Y The cell cycle and cell population kinetics in the programmed cell death in the limb-buds of normal and 5-bromodeoxyuridine-treated chick embryos Development, **30** : 261-270, 1988.
43. Takeichi M The cadherins cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis Development, **102** : 639-655, 1988.
44. Luning C, Rass A, Rozell B, Wroblewski J, Obrink B Expression of E-cadherin during craniofacial development J Craniofac Genet Dev Biol, **14** : 207-216, 1994.