



Title	マウスにおける口蓋裂の成立機序に関する実験的研究
Author(s)	武田, 矩夫
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/29802
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

マウスにおける口蓋裂の成立機序 に関する実験的研究

武 田 矩 夫

Morphogenetic Studies of Cleft Palate in Mouse Embryos

Norio TAKEDA

(昭和43年 3月16日受付)

序 言

従来、哺乳動物などでの口蓋裂の発現は、遺伝的原因に基づくものと理解されることが多かった^{1,2)}。ところが近年、実験奇形学の進歩にともなって種々の外因によって口蓋裂が惹起することが認められるに至り、その外因の種類は数十種類以上にのぼり³⁾、かくて、外因と口蓋裂の因果性を追求する研究は数多く報告されてきた。

しかし、その本態を明白にするための成立機序あるいは成立因子を追求した報告は僅少である。すなわち、それらの報告は、主に口蓋突起自身の發育障害⁴⁾あるいは転位遅延⁵⁾に成立因子を求めるものと、舌による口蓋突起転位の阻止を原因とするもの⁶⁻⁸⁾に大別されるが、いまだに定説をえるに至っていない。

そこで、著者は二次口蓋形成過程を組織発生の観点より再検討し、さらに実験的口蓋裂の発現経過の詳細な追求を試みた。すなわち、催奇形物質として口蓋裂発現率が高く、作用機序の相異と考えられるX線とdexamethasoneを用いて、誘導された口蓋裂については形態学的、組織学的あるいは³H-thymidine autoradiographyにより観察を行ない、口蓋裂成立機序について検討した。

材料ならびに方法

1 実験動物

実験動物として、大阪大学純系動物事業場産の ddO 系マウスを用いた。交配は雌マウス4匹に雄マウス1匹を午後6時より翌朝9時まで配し、膣栓の認められたものを受

大阪大学歯学部付属病院中央放射線室(室長 藤木芳成講師)
本論文の要旨は昭和40年10月の第6回日本歯科放射線学会総会、昭和41年10月の第7回日本歯科放射線学会総会および The 24th conference of American cleft palate association (by Dr. Y. Fujiki, 1966, 4) において発表した。

本研究は一部文部省科学研究費(昭和42年度, No. 740055)によった。

胎マウスと決定した。胎令の起算は午前2時からとして⁹⁾、胎令11½日より18½日に至る各時期の胎仔を検材に供した。

2 口蓋裂誘導法

i) X線照射法

マウスの口蓋裂の臨界期(critical period)中、最も発現率の高いとして知られている胎令11½日¹⁰⁾に、空中線量として150 R, 200 R, 250 Rならびに300 Rのそれぞれを全身1回照射した。照射条件は、190 kVp, 25 mA, Filter; Cu 0.5+Al 0.5, FSD; 50 cm, 線量率; 39 R/min. である。

ii) dexamethasone 投与法

最も発現率の高い胎令10½日から24時間々隔で4回¹¹⁾、おのおの0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg および0.4 mgを母体の尾静脈に注射した。

3 形態学的観察法

口蓋突起の形態観察は、胎令14½日より18½日に至る各時期の胎仔を対象とした。母体の子宮より採取した胎仔を、体重計量の後 Carnoy 氏固定液で固定し、razor blade を用いて実体顕微鏡下で前額断し、吻側より尾側に至る口蓋突起の形態を観察した。骨格は通法に従って、Alizarin red S 染色による骨透明標本¹²⁾を作製し実体顕微鏡下で観察した。

4 組織学的観察法

胎令12½日より18½日に至る各時期の胎仔を検材とした。Carnoy 氏固定液で固定後、通法にしたがって Paraffin 包埋し、前額断で5μの連続切片とし、H-E 重染色を施して検鏡した。

5 ³H-thymidine autoradiography 法ならびに標識率算定法

口蓋突起の上皮細胞の増殖能を測定するために、³H-thymidine (以下 TdR と略記する)を追跡子として用いた。胎令14½日より16½日に至る各時期の母体に1μCi/g (wt.) 注射し、1時間後に屠殺し胎仔を採取し、前記同様

にして組織切片を作製した。ついで、検材を SAKURA NR-M2 乳剤に浸し、4°C に保たれた暗箱内で約30日間曝射し、通法にしたがって現像処理を行ない H-E 重染色を施して検鏡した。

口蓋突起上皮における ^3H -TdR 標識細胞の局在性を追求するために、図1に示すように、口蓋突起内側壁の周皮が被覆していない鼻上皮部を起算零点と定め、上皮壁を長さ 100 μ 毎に区分して compartment analysis を行ない、各区分の標識率を算定した。

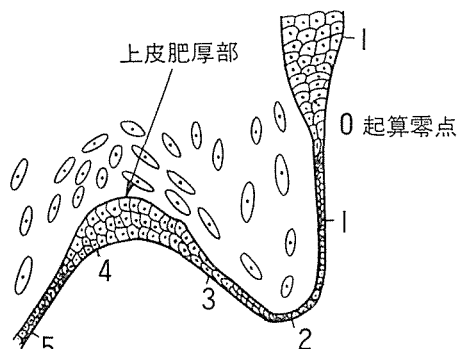


図1 口蓋突起における ^3H -TdR 標識率算出に際する上皮組織の分割模図

観 察 結 果

A. ddO 系マウス胎仔の二次口蓋形成過程

1) 口蓋突起の発育ならびに転位様相

胎令12日頃に一次口蓋の側壁に左右一対の口蓋突起が形成される。この口蓋突起は、舌を左右側から挟むように下方に生長し、図2に示すように、胎令14½日から15¼日の間に舌側から舌背に転位して水平位をとる。この左右の口蓋突起は、水平位のまま生長して正中で相癒合し上方から下ってきた鼻中隔とも癒合して二次口蓋形成は終了する。

口蓋突起の転位は図3~5に示すように、その吻側部の一侧より開始し漸時尾側に至り、ついで他側が転位する。

この詳細を観察すると以下のものであった。すなわち、胎令13¼日の口蓋突起は、図6に示すように、上顎突起内側面に口蓋稜として認められ、その内側壁は垂直位を、腹側壁は水平位を示す。口蓋突起上皮は基底細胞の1層とそれを覆う扁平な周皮細胞の1層より構成されている。ところが、この時期に口蓋突起腹側壁に上皮肥厚部が出現し、それに接する上下結合組織にも密な細胞配列が観察された。

胎令14½日の口蓋突起は、図7に示すように、口蓋突起腹側壁の上皮肥厚部は上下結合組織内に陥凹を示す。

胎令14¾日の口蓋突起は、図8に示すように、さきの上皮肥厚部はさらに上下結合組織内に深く陥凹するとともに、同部に小溝の形成をみた。口蓋突起は、この部位を境として下方に向って成長し、舌と下顎の間に深く入って垂直位をとる。

その後、口蓋突起は図9に示すように、内側壁に折れ目的形成して彎曲し変形する様相が観察された。

ついで、口蓋突起は図10に示すように、舌側面に沿って舌背に向って滑走するような転位様相を示し、この転位により小溝より垂直位を保っていた腹側壁は水平位をとり、さらに上方に移動し、鼻上皮との境界部に達した。

さらに、口蓋突起は図11に示すように、正中に移動し沈下した舌背の上に位置して水平位となり、鼻側の尖端部は鼻中隔下面に接し、口腔側は舌背に沿って正中方向にやや挙上する平坦な面を形成した。

水平転位を終了した口蓋突起は、図2に示すように、左右側の口蓋突起が正中方向に伸長して、鼻中隔と接し、ついで癒合する。この時期になると腹側壁の上皮肥厚は消失する。

2) 口蓋上皮の ^3H -TdR 標識様相

口蓋突起の上皮の生長点を確かめるために、 ^3H -TdR 標

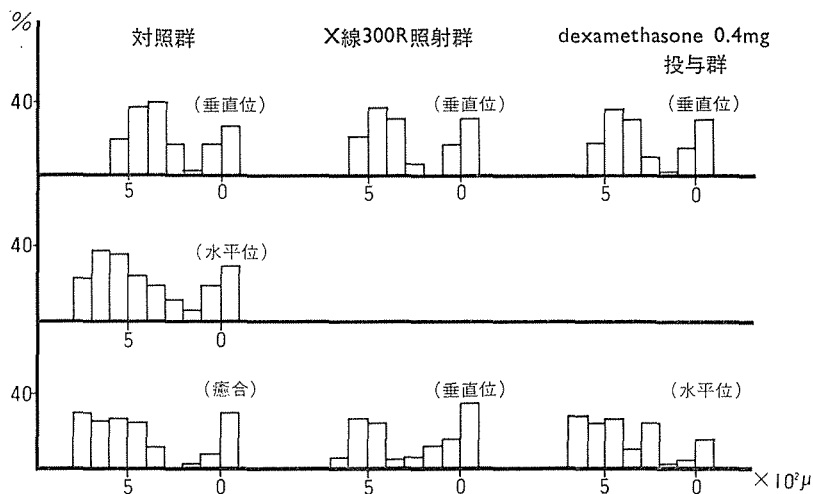


図12 口蓋突起上皮組織における ^3H -TdR 標識率推移 (縦軸: 標識率, 横軸: 上皮の巨離)

識細胞の局在性を観察した。観察対象は胎令14½日より15½日に至る口蓋突起で、垂直位、水平位および癒合期のものを選んだ。

転位前すなわち垂直位の口蓋突起では、小溝部の口蓋上皮細胞の標識が最も著明であり、鼻上皮との境界部がこれにつぎ、口蓋突起先端部の標識細胞数はきわめて僅かであった。すなわち、各区分の標識率は図12上段に示すように、小溝部では約40%、鼻上皮境界部では約35%を示したが、先端部では約2.8%を示すにすぎなかった。

水平位のそれは、図12中段に示すように、転位により小溝は消失するが、上皮肥厚部位の標識率は依然として顕著であり、約40%を示した。一方、鼻上皮境界部も同様で垂直位のものとは大差を認めなかった。

癒合期では、図12下段に示すように、腹側壁の上皮肥厚部と鼻上皮境界部の標識様相はほぼ等しくなり、標識率はともに約35%となったが、依然として旺盛な細胞増殖様相を示した。癒合後の正中部には、いまだ口蓋上皮が認められるが、いずれ消失する運命を辿るものであり、標識細胞は認められなかった。

以上の所見より、急速に成長しつつ転位して二次口蓋形成を行なう口蓋突起上皮の生長点が明確になった。すなわち、鼻側壁では鼻上皮境界部で、同側壁の成長を司り、一方、腹側壁では上顎突起との境界部で成長を司る。さらに、この部は小溝を形成して、口蓋閉鎖に必要な上皮の長さを確保して、水平転位を円滑に行なうための極めて合目的な発育形態であることが判明した。また、口蓋突起の水平転位後に、これらの部位が口蓋突起の正中方向への上皮成長点としての機能を営んでいることも示唆された。

3) 口蓋上皮と鼻上皮の形態形成と分化

胎令14½日の口蓋上皮は、図13に示すように、基底細胞の1層と、それを覆う扁平な細胞よりなる周皮とで構成されている。基底細胞は、円形ないし卵円形であり、中等度の塩基性を呈す。

鼻上皮は図14に示すように、表層にある細胞核は楕円形を示すものが多く、この時期の両上皮細胞は図21、22に示すように局在性をもつ³H-TdR 標識様相を示さずいまだ細胞の極性がえられていないことが判明した。

胎令15½日の口蓋上皮は、図15に示すように、細胞配列が密となり一部に中間層の形成が認められ上皮層の厚さも若干増加した。一方、一部の周皮細胞が核濃縮を呈するのが観察された。

鼻上皮は、図16に示すように、基底細胞と支持細胞の配列様相がかなり整然となってくるのが観察された。胎令16½日の口蓋上皮は、図17に示すように、基底細胞が極性を示して配列し始め、中間層の形成も旺盛となり上皮層の厚さはさらに増加する。この時期に至ると周皮細胞の多くは変性し、その残滓が観察されるにすぎなかった。

鼻上皮は、図18に示すように、線毛が形成され始め、細胞配列はより整然となった。この時期の両上皮細胞は、図

23、24に示すように基底層に列ぶ細胞のみが³H-TdR で標識され、それらの細胞が極性を呈するようになった。

胎令18½日の口蓋上皮は、図19に示すように、基底層、有棘層、顆粒層、角質層より構成され、分化した被蓋上皮となった。

鼻上皮は、図20に示すように、多くの線毛が観察され、分化した線毛上皮としての形態を示した。

以上より、胎令15½日、すなわち口蓋閉鎖終了に相当する時期より口蓋上皮、鼻上皮は急速に分化を営み始め、胎令16½日となると口蓋上皮は被蓋上皮として、鼻上皮は線毛上皮としての形態形成が著明となったが、これは、原始口腔が二次口蓋形成により、口腔と鼻腔に区分される時期に密接な関係をもって口蓋上皮と鼻上皮の分化が営まれることを示唆している。

B. X線照射ならびに dexamethasone 投与により誘導された口蓋裂の観察所見

1) X線および dexamethasone のマウス胎仔の発育におよぼす影響

a) 体重変化

各線量(投与量)における胎令18½日の胎仔の体重変化を表1に示す。

すなわち、X線照射群では、線量増加にもなって体重は減少し、300 R 照射のものは体重減少率約50%を示した。一方、dexamethasone 投与群では0.2 mg 以上では投与量間に著明な差を認めえなかった。

また、胎令15½日においては、300 R X線照射群では体重減少率37.8%を示すが、0.4 mg dexamethasone 投与群では16.2%を示すに過ぎずX線照射群に比べ体重減少率は低かった。

b) 肉眼的ならびに骨透明標本観察所見

対照群では、胎令15½日あるいは18½日の口蓋は、図25、28に示すように、すでに二次口蓋形成は終了しているが、300 R X線照射群では、図26、29に示すように、左右口蓋突起は、ともに、いまだ垂直位を示し、さらに、頭長、頭幅ともに対照より小さく、全身の発育遅延とあいまって、頭部や顎の発育不全が著明であった。0.4 mg dexamethasone 投与群では、図27、30に示すように、ほとんどの口蓋突起は水平転位を行なっているが、癒合していなかった。

胎令18½日の骨透明標本では、図31に示す対照群に比べ、X線照射群では図32に示すように、上顎骨、口蓋骨の口蓋突起の形成不全が認められるとともに、各骨の発育不全ならびに骨鬆粗化が観察された。dexamethasone 投与群では図33に示すように、上顎骨、口蓋骨の口蓋突起の形成不全を認める以外に対照と大差なかった。

2) X線照射および dexamethasone 投与による口蓋閉鎖不全形態とその発現頻度

胎令18½日における各処置群のマウス胎仔の口蓋閉鎖不全様相を口蓋突起転位の各段階における両側口蓋突起の形態を基準として、以下のように分類した。すなわち、図34

表1 線量(投与量)別体重変化

		胎令18½日		対照体重1.12(0.08)		胎令15½日 対照0.37(0.05)
X	線	150 R	200	250	300	300
体	重	0.97 g (0.09)	0.69 (0.06)	0.63 (0.08)	0.60 (0.08)	0.23 (0.04)
体	重 減 少 率	13.3 %	38.3	43.7	46.4	37.8
dex.		0.1 mg	0.2	0.3	0.4	0.4
体	重	1.07 (0.09)	0.86 (0.07)	0.80 (0.08)	0.28 (0.10)	0.31 (0.06)
体	重 減 少 率	4.4	23.2	28.5	26.7	16.2

体重減少率 = $\frac{\text{対照体重} - \text{処置体重}}{\text{対照体重}}$

() : S.D.

～38に示すように、両側口蓋突起が垂直位をとるものを VV 型、一側が垂直位をとり他側が一部斜めに舌上に転位して水平位への移行を示すものを DV 型、一側が水平位をとり他側が水平移行型のものを HD 型、両側が水平位をとるものあるいは一部癒合を示すものを HH 型とし、両側が完全に癒合したものを F 型とした。

これらの5形態の各線量(投与量)別発現頻度を表2に示す。まづ口蓋閉鎖不全(口蓋裂)の発現率はX線照射では150Rで0%, 200Rで82.5%, 250Rで96.3%, 300R

表2 胎令18½日における線量(投与量)別口蓋閉鎖不全形態発現頻度(胎仔数)

		150R	200	250	300
X 線 照 射 群	F	60(100%)	7(17.5)	2 (3.7)	0 (0)
	HH		17(42.6)	13(24.1)	5 (9.8)
	HD		9(22.5)	1 (1.8)	5 (9.8)
	DV		4(10.0)	14(25.9)	11(21.6)
	VV		3 (7.5)	24(44.4)	30(58.8)
	口蓋裂	0(0)	33(82.5)	52(96.3)	51 (100)
dex. 投 与 群		0.1mg	0.2	0.3	0.4
	F	31(57.4)	12(25.5)	3(10.3)	1 (2.1)
	HH	23(42.6)	33(70.2)	15(51.7)	28(58.3)
	HD		2 (4.3)	6(20.6)	14(29.2)
	DV			2 (6.8)	4 (8.3)
	VV			3(10.3)	1 (2.1)
	口蓋裂	23(42.6)	35(74.5)	26(89.7)	47(97.9)

で100%を示す。dexamethasone 投与では 0.1 mg で 42.6%, 0.2 mg で 74.5%, 0.3 mg で 89.7%, 0.4 mg で 97.9%を示した。

線量と5形態との関係は、線量増加にしたがって VV 型の占める率が増し、250 R で 44.4%, 300R で 58.8%と転位前の初期の形態で止まるものが多く認められた。

一方、dexamethasone 投与でも、投与量の増加にしたがって転位初期の形態も認められるが、その多くは HH 型、HD 型を示し、0.4 mg 投与でも DV 型、VV 型を示すものは少なかった。さらに、これらの線量と口蓋閉鎖形態の関係を判然とさせるために、口蓋の5形態のおおのこに、VV:2, DV:4, HD:6, HH:8, F:10の係数を与え、各形態の胎仔数にこの係数を乗じて線量(投与量)別の平均値を求め、これらを柱状図表にして図39に示した。これより、X線照射では、線量増加にともなって VV 型に移行する傾向が明らかに示されたが、dexamethasone 投与では、その傾向は認められなかった。

以上の発育障害および口蓋閉鎖不全についての所見を小括すると、X線照射群は dexamethasone 投与群に比べ、マウス胎仔に強い発育障害を惹起し、同時に口蓋閉鎖不全形態は垂直位が多くなる傾向を示した。また、X線照射群では、線量増加にともなって障害程度が顕著となり、口蓋閉鎖不全形態も垂直位に移行する、いわゆる線量効果関係が認められた。しかし、dexamethasone 投与では投与量効果関係は見出せなかった。

3) X線照射および dexamethasone 投与による口蓋突起の転位遅延

300 R X線照射と 0.4 mg dexamethasone 投与による口蓋突起転位遅延様相を、前述の口蓋突起閉鎖不全の5形態に分類し、胎令15½日より18½日に至る各時期について観察した。表3に各群の観察結果を一括して示す。対照群で

表3 口蓋突起の転位遅延 (胎仔数)
(N: 対照, R: X線照射, D: dexamethasone 投与各群)

	15 ¼ day			15 ½			15 ¾			16		16 ¼		16 ½		18 ½	
	N.	R.	D.	N.	R.	D.	N.	R.	D.	R.	D.	R.	D.	R.	D.	R.	D.
F	14 (56.0) %			27 (100)			31 (100)										1 (2.1)
HH	9 (36.0)				1 (3.1)	6 (17.1)		1 (4.0)	18 (64.3)	2 (18.1)	14 (82.4)	2 (7.1)	14 (70.0)	2 (11.1)	19 (57.6)	5 (9.8)	28 (58.3)
HD						10 (28.6)			7 (25.0)		2 (11.8)	3 (10.7)	6 (30.0)	3 (16.6)	13 (39.4)	5 (9.8)	14 (29.2)
DV	2 (8.0)				2 (6.2)			3 (12.0)	3 (10.7)	2 (18.1)	1 (5.9)	6 (21.4)		2 (11.1)	1 (3.0)	11 (21.6)	4 (8.3)
VV		15 (100)	11 (100)		29 (90.6)	19 (54.0)		21 (84.0)		7 (63.8)		17 (60.8)		11 (61.1)		30 (58.8)	1 (2.1)

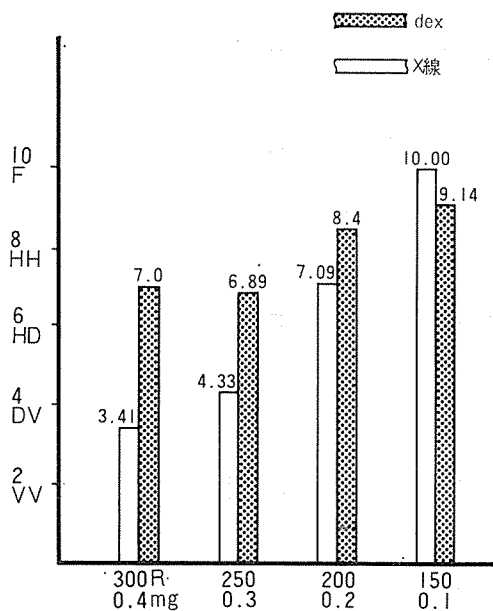


図39 表 2 の 柱 状 図 表

は胎令15¼日に DV 型, HH 型をとるものがあるが, 胎令15½日に至ると全て口蓋閉鎖が完了した. X 線照射群の胎令14¾日のものでは, 全ての口蓋突起は VV 型を示し, ついで胎令15½日, 15¾日に至り僅かに DV 型, HH 型が出現するが, 胎令16日以後18½日に至るまでは形態変化が認められなかった. dexamethasone 投与群では, 胎令15¾日で, ほとんど HH 型を示しており, その後は, その段階で転位, 伸長は停止し, 口蓋閉鎖を示すものはまれであ

った. 図40は, 図39同様の柱状図表により口蓋突起転位の様相を示したものである. X 線照射群では, 対照群の口蓋閉鎖時期以後, 口蓋突起転位は, そのほとんどが DV 型の段階に止まり, 胎令18½日に至る傾向を示した. dexamethasone 投与群では, 対照群の口蓋閉鎖時期以後, X 線照射の場合と同様に, 口蓋突起の転位, 伸長は進行せず HH 型の段階に止まる傾向を示した.

4) X 線照射および dexamethasone 投与による処置 口蓋上皮の ³H-TdR 標識様相

300 R X 線照射によって垂直位を示す口蓋突起と 0.4 mg dexamethasone 投与で水平位まで転位した口蓋突起の上皮の ³H-TdR 標識様相を, 対照の口蓋突起の各時期のそれと比較検討した. 胎令14¾日の垂直位をとる各口蓋突起の標識様相は, 図12上段に示すように, 標識細胞の局在性と標識率はともに対照との間に大差を認めなかった.

胎令15½日の癒合完了した対照, 垂直位に止まる X 線照射および水平転位した dexamethasone 投与の各群の口蓋突起では, 図12下段に示すように, 標識様相は, 従来から存在していた細胞増殖の旺盛であった部位の消失にともなうて全域にわたって平均化して各々約10%の標識率を示した. これは, この時期までの旺盛な成長点での細胞増殖が減少し, かわって上皮の形態形成のための細胞増殖が口蓋突起全域におよんで営まれることを示唆している.

5) X 線照射および dexamethasone 投与による処置 口蓋上皮および鼻上皮の形態形成と分化

300 R X 線照射および 0.4 mg dexamethasone 投与の口蓋上皮と鼻上皮を観察対象とした.

胎令14¾日の両処置群の口蓋上皮は, 基底細胞層と周皮より構成され, 鼻上皮の所見とともに対照との間に差異を

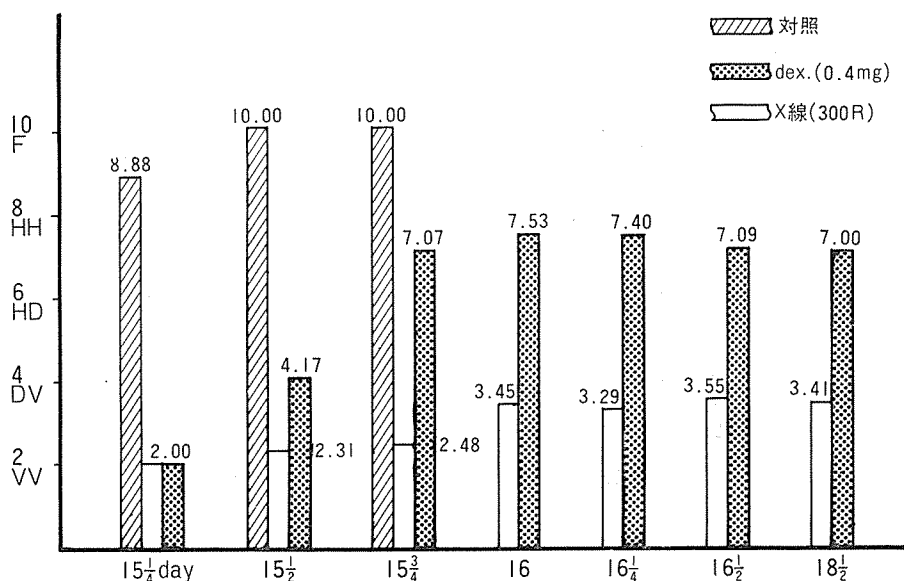


図40 表 3 の 柱 状 図 表

認めなかった。

胎令15½日の口蓋上皮は、対照と同様、両処置群ともに次第に上皮層の肥厚を示し、鼻上皮の所見もまた対照と差異がなかった。

胎令16½日の口蓋上皮は、図41に示すように、両処置群とも対照と同様、細胞極性を呈し始めたが、垂直位をいまだ示す口蓋突起の先端部に図43、44に示すような基底細胞の配列不整な集塊の形成が観察された。さらに、この部より鼻上皮に至る上皮は、腹側壁と異なり極性を示さない1～2層の細胞より成っていた。一方、鼻上皮は図42に示すように、対照と同様な線毛上皮の形態を示していた。

胎令18½日の口蓋上皮は、図45に示すように、対照と同様に、両処置群とも基底層、有棘層、顆粒層、角質層より構成されていた。また、内側壁の形成不全部は、図46に示すように、依然として存続しているが、口蓋突起先端部の細胞集塊は消失した。

鼻上皮も線毛上皮の形態を示し、対照との間に差異を認めなかった。

以上の口蓋突起の転位遅延と口蓋突起の³H-TdR 標識様相ならびに口蓋上皮、鼻上皮の形態形成の所見をあわせ小括すると、口蓋突起は、その転位が何らかの原因により遅延を来して口蓋閉鎖時期に至ると、転位、伸長の機能が急激に阻止されるため、閉鎖不全（口蓋裂）を招く。しかも、この阻止と口蓋上皮、鼻上皮の形態形成との間に密接な関連性があることが判った。

考 察

二次口蓋形成過程に関しては、ddO系マウスにおいても、従来からの教典^{13,14)}あるいは文献^{15,16,17)}のそれと大差なく大体異議のないところであった。すなわち、左右口蓋突起が垂直位から水平位に転位し、相癒合して二次口蓋形成を終了した。しかし、口蓋突起転位起始部については明らかに吻側部で起始することが確認された。この転位起始部について、Walker and Fraser¹⁷⁾はマウスでは後方から始まると報告している。他方、ラットで観察した Asling⁶⁾、Colman¹⁸⁾ はともに前方から始まり後方に進むと報告している。しかし、これらの見解は多分に推測的で転位初期の組織標本を提示しているものはない。その点、本観察でえた転位初期像の組織標本は転位起始部を適確に示した。

本観察で明らかに認められた口蓋突起腹側壁の上皮増殖部は、Schorr^{19,20)}が口蓋突起の転位の原動力として注目した増殖旺盛な結合組織の部位と符合している。最近結合組織が上皮の増殖を導くとする *in vitro* での観察報告に接するが、²¹⁻²³⁾他方、羽毛²⁴⁾、毛根¹³⁾、歯牙¹⁴⁾等の発生途上において、これらの原基が上皮層から結合組織側に陥入する場合に、それらを圍繞する結合組織が増殖することも知られており、一概に結合組織が上皮組織の増殖を誘導するとは考えられない。また、この口蓋突起の上皮増殖部は、胎生期の形態形成において、しばしば認められている陥入、屈曲など¹³⁾

と同一所見とみなされ、口蓋突起転位に対する形態変化とみなすことができる。

マウスの口腔粘膜上皮の発生分化については、従来明確な記載に乏しい。宝田²⁵⁾は人胎児の表皮と口腔粘膜上皮を観察して、表皮において顆粒層、角質層への分化がみられない時期の口蓋部上皮の所見は、表皮ときわめて類似しているが、表皮より発生分化が遅れる傾向を示唆している。マウスでは、胎仔表皮の組織発生に関する Hanson²⁶⁾の報告をみるに過ぎないが、マウスにおいても口蓋上皮は表皮より遅れて、胎令15½日ごろより中間層が加ってその厚みを増し、胎令16½日に至ると基底細胞は極性を呈し、周皮は消失した。McLoughlin²²⁾は、この上皮の厚さあるいは基底細胞の極性獲得が、上皮分化の指標として重要な因子であることを指摘している。とくに極性については、形態的に極性を呈することは、機能上からも極性を具備したことを意味し、例えば上皮組織形成において、単層培養細胞で極性が失われると組織再構築は起らない点より、細胞極性は形態形成における極性の指導的役割を果たすものと考えられている^{27,28)}。

一方、鼻上皮では、胎令15½日から細胞配列が変り、16½日には線毛を形成し、鼻粘膜としての性状を示した。この鼻上皮が線毛を形成することもまた、形態的あるいは機能的な分化の指標として要重であると考えられている²⁹⁾。

さらにこの口蓋上皮と鼻上皮の極性の獲得は、³H-TdR 標識様相でも明確に観察された。すなわち、胎令15½日頃までの標識細胞は一定の規則性を見えずに散在性に分布しているが、いったん極性を呈すると、その基底細胞のみが標識された。このように、口蓋上皮と鼻上皮が、胎令15½日から16½日の間に平行して形態形成を始めることは、原始口腔が二次口蓋形成によって口腔と鼻腔に分れた後、それぞれの場に応じた固有の形態形成を開始するものと考えられる。

口蓋突起の転位機序については、Dursy 以来二つの学説が生じたが¹⁵⁾、今日なお十分に解明されるに至っていない。すなわち、一方において、口蓋突起がその原形を保ちつつ転位するとする挙上説がある。さらに、この挙上説は、Schorr^{19,20)}の結合組織の増殖によって自動的に口蓋突起が転位するとする考えと、Inouye¹⁶⁾らの舌により他動的に転位するとする考えに二分される。他方においては、Pölzl によって唱えられた口蓋突起の形態変化によって転位するとする変形説がある¹⁵⁾。この立場をとる Walker and Fraser¹⁷⁾は口蓋突起の内部力 (an intrinsic shelf force) によっておきる波動性運動によって転位すると考え、さらに Lasson³⁰⁾はこの内部力を acid mucopolysaccharides に求めた。しかも、本研究でも口蓋突起の上皮組織の増殖様相を追求し、転位との関係を求めようと試みたが、転位力については明確な知見を求め得なかった。

転位に際する口蓋突起と舌との関係については、Moriarty ら³¹⁾、Reeve ら³²⁾は *in vitro* でラットの口蓋閉鎖

を観察し、ともに舌を切除した場合、速かに口蓋突起が転位することを観察している。また、Trasler and Fraser³³⁾は自然発生した唇裂をもったマウスでは内鼻突起に大きな隆起が形成され、それが舌の前進を妨げ、その結果、口蓋裂が発生するものと報告して、舌圧が相対的に亢進する場合には転位が阻止されることを示唆している。本研究の観察結果は、口蓋突起の転位は、舌圧が最も低く、舌の可動性が高いと考えられる吻側部の舌尖近くで起始することを明示し、口蓋突起の転位は舌による口蓋突起の挙上によるのではなく、口蓋突起自身の変形によって始まることを提示した。

催奇形物質の口蓋裂発現胎仔の発育におよぼす影響については、X線の場合、すでに体重減少、発育遅延、従属奇形発現などが著明であることは、Wilson^{34,35)}、Hicks³⁶⁾、Russell and Russell^{37,38)}らによって報告されている。他方、副腎皮質ホルモンについては、cortisone 投与の場合、Walker and Fraser⁹⁾は口蓋突起に特異的に転位遅延を来すが、頭部の発育遅延および口蓋突起の発育不全は認められないと報告している。本実験の dexamethasone 投与の場合も、cortisone と同様に口蓋突起の転位遅延は認められたが、頭部の発育遅延は認められなかった。しかし、体重減少が著明であったことは、なんらかの胎仔の発育障害が口蓋裂の発現に関与していることを示唆している。

口蓋突起の転位遅延については、すでに諸家^{5,39-42)}によって報告されている。本研究でも同様の所見が確認されたが、とくに注目されるのは、胎令15%日の口蓋形態様相と、胎令18½日の口蓋裂の形態様相とが同一の傾向を示し、差異がなかったことである。これは迅速に行なわれる二次口蓋形成過程の発育段階の種々相の口蓋裂を認めた所見とあいまって、二次口蓋閉鎖過程のある時点に口蓋閉鎖機能が急速に停止することを示唆している。さらに、この時点が口蓋上皮と鼻上皮が形態形成を開始する時期に符合していることは、口蓋突起の閉鎖機能の停止と口蓋上皮、鼻上皮の形態形成との間に強い関連があることを物語っている。

口蓋裂の形態について、Callas and Walker⁴⁰⁾は cortisone 投与、vitamin A 過剰投与、riboflavin 欠乏ならびに X 線照射によって発現した口蓋裂を比較したが、これらの間には形態的に差異がなく、同一傾向を示したと報告している。また、藤野ら⁴³⁾は副腎皮質ホルモン投与では全て口蓋突起は水平位を示し、vitamin A 過剰投与では水平位が22.2%、一側のみ舌上に転位したものが10.7%、両側とも垂直位のもの4.8%であったと報告している。本実験での X 線照射によって出現した口蓋裂は、線量増加に伴って、その形態が水平位から垂直位に移行する傾向を示したのに反し、dexamethasone 投与では、投与量によって口蓋裂の形態に若干の差異は認められたが、そのほとんどは水平位を示すものであった。これらの成績を検討すると、一般に口蓋裂発現率が低い場合は水平位が多く、発現率が高くなると垂直位が多くなる傾向がある。換言すれば、胎仔に対する催

奇形作用が強力な場合には垂直位を示す口蓋裂が多いといえる。

分化に対する催奇形物質の影響については、いまだ明らかでない。Callas and Walker⁴⁰⁾は 300 R X 線照射の場合、胎仔の体重減少が著明であるにもかかわらず、器官分化(morphological rating)は正常に進行したことを報告している。また、菅原ら⁴⁴⁾はショウジョバエの発生における生長ホルモンと分化ホルモンの分泌に対する放射線の影響を比較して、障害の型式が異なることを示唆し、機能的に生長と分化が区別しえることを報告している。著者ら⁴⁵⁾も胎仔末梢血の分化に対し ³H-TdR 標識率の上からは X 線の影響が認められないことを報告した。

他方、放射線が上皮の角化を促すことが放射線治療の場合に、しばしば遭遇する事実として知られている⁴⁶⁾。また、cortisone の場合にもこれと同じことが報告されている。すなわち、胎生上皮に対する影響を in vitro で検索した Fell⁴⁷⁾、Weissmann and Fell⁴⁸⁾は、cortisone が分化を促進して早期角化を来すことを報告している。本実験においては、X 線照射あるいは dexamethasone 投与によって上皮分化の遅延は惹起されなかった。

かように、X 線あるいは dexamethasone などの催奇形物質が、発生途上において、体重減少等の量的変化を来すにもかかわらず、上皮分化等の質的变化に対しては障害的でないことは、きわめて興味深い事実である。

結 語

口蓋裂成立機序を解明するため、マウスにおける二次口蓋形成過程および X 線照射と dexamethasone 投与により誘導した口蓋裂の成立経過を、組織発生の観点より、組織学的に、また ³H-TdR autoradiography により観察し、以下の結果をえた。

1 ddO 系マウス口蓋突起の上皮の成長点は、内側壁では鼻上皮との境界部であり、腹側壁では上顎突起との境界部であった。

2 口蓋突起腹側壁の成長点の上皮は、増殖しつつ上皮下結合組織内へ陥凹し、ついで小溝を形成して、口蓋閉鎖を行なうために必要な口蓋突起の長さを狭い口腔内で確保し、さらに水平転位を円滑に行なうための合目的な発育様相を示した。

3 口蓋突起転位は、吻側部の一側より開始して尾側に至り、ついで他側が同様に転位することが確認された。

4 口蓋上皮および鼻上皮は、口蓋閉鎖期すなわち胎令15½日頃を転機にして、おのおの上皮固有の形態形成を開始し、それぞれ、被蓋上皮、線毛上皮に分化することが判明した。

5 口蓋上皮の成長点での細胞増殖は口蓋上皮の分化の開始にともなって急速に低下し、形態形成のための細胞増殖に転換することが示唆された。

6 X 線照射、dexamethasone 投与はともに胎仔の発育

を阻害し、種々な程度の口蓋裂を誘導した。X線照射では、線量効果関係を持つ傾向を示したが、dexamethasone投与ではその傾向は認められなかった。

7 X線照射, dexamethasone投与により誘導された口蓋裂胎仔の口蓋上皮および鼻上皮の分化様相と対照のそれとの間には、差異が認められなかった。

8 X線照射, dexamethasone投与で胎仔の口蓋突起転位の遅延を認めたが、この転位は胎令15 $\frac{3}{4}$ 日頃に停止し、その転位段階での形態を示す口蓋裂として出現することが判明した。

以上のことから、次のような口蓋裂成立に関する一機構が明らかになった。すなわち、口蓋上皮は、口蓋閉鎖時期までは増殖旺盛で口蓋突起の転位、伸長、癒合の機能を十分に保持するが、それ以後は、その機能を停止する。また、上皮はこの時期を転機にして上皮自身の形態形成を始める。したがって、なんらかの原因で口蓋突起が發育遅延を来して口蓋閉鎖時期に至ると、それ以後は転位、伸長、癒合を行なわない、そのために、その發育遅延のままで経過して閉鎖不全となり口蓋裂を招くものと推定される。

稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を賜った大阪大学歯学部口腔外科学第一講座永井蔵教授ならびに大阪大学歯学部口腔外科学第二講座川勝賢作教授に深厚なる謝意を表します。

またご助言、ご鞭撻を賜った大阪大学歯学部口腔病理学講座寺崎太郎教授に深く感謝の意を表します。

さらに研究に際し手をとりと教示にあずかった藤木芳成講師に衷心より深謝します。

文 献

- 1) Rischbieth, H. (1910): Hare-lip and cleft palate. *Eugenics. Lab. Mem.* **11**, 79-128.
- 2) Steiniger, F. (1936): Neue Beobachtungen an der erblichen Hasenscharte der Maus. *Z. Mensch. Verergs. und Konst. Lehre.* **23**, 427-462.
- 3) Kalter, H. and Warkany, J. (1959): Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure. *Physiol. Rev.* **39**, 69-115.
- 4) Kitamura, H. (1965): Epithelial remnants and pearls in the secondary palate in the human abortus: A contribution to the study of the mechanism of cleft palate formation. *Cleft palate J.* **3**, 240-257.
- 5) Walker, B. E. and Fraser, F. C. (1957): The embryology of cortisone-induced cleft palate. *J. Embryo. Expl. Morph.* **5**, 201-209.
- 6) Trasler, D. G., Walker, B. E. and Fraser, F. C. (1956): Congenital malformations produced by amniotic-sac puncture. *Science* **124**, 439.
- 7) Fitch, N. (1961): Development of cleft palate in mice homozygous for the shorthair mutation. *J. Morph.* **109**, 151-157.
- 8) Asling, C. G. and Nelson, M. M. et al (1960): The development of cleft palate resulting from maternal pteroylglutamic (folic) acid deficiency during the latter half of gestation in rats. *Gynec. and Obst.* **111**, 19-28.
- 9) Snell, C. D., Fekete, E. et al. (1940): The relation of mating, ovulation, and the estrus smear in the mouse to time of day. *Anat. Rec.* **76**, 39-54.
- 10) 増山彌太郎(1959): X線照射による口蓋裂の実験発生学的研究, 阪大歯学誌 **4**, 847-870, 昭和34.
- 11) Pinsky, L. and DiGeorge, A. M. (1965): Cleft palate in the mouse; A teratogenic index of glucocorticoid potency. *Science* **149**, 402.
- 12) Johnson, M. L. (1933): The time and order of appearance of ossification center in the albino mouse. *Am. J. Anat.* **52**, 241-271.
- 13) Arey, L. B. (1954): *Developmental anatomy.* ed. 6, W. B. Saunders co.,
- 14) Sicher, H. (1966): *Orban's oral histology and embryology.* ed. 6, C. V. Mosby co..
- 15) Peter, K. (1929): Die Entwicklung des Säugetiergaumens. *Ergebn. Anat. Entwicklungsgesch.* **25**, 448-564.
- 16) Inouye, M. (1912): Die Entwicklung des sekundären Gaumens einiger Säugetiere mit besonderer Berücksichtigung der Bildungsvorgänge am Gesicht und der Umlagerungsprozesse der Gaumenplatten. *Anat. Hefte* **46**, 1-61.
- 17) Walker, B. E. and Fraser, F. C. (1956): Closure of secondary palate in three strains of mice. *J. Embryo. Expl. Morph.* **4**, 176-189.
- 18) Coleman, R. D. (1965): Development of the rat palate. *Anat. Rec.* **151**, 107-117.
- 19) Schorr, G. (1907); Zur Entwicklungsgeschichte des sekundären Gaumens bei einigen Säugetieren und beim Menschen. *Anat. Anz.* **30**, 24-26.
- 20) Ibid. (1908) *Anat. Hefte* **36**, 69-104.
- 21) McLoughlin, C. B. (1961): The importance of mesenchymal factor in the differentiation of chick epidermis. I. The differentiation in culture of the isolated epidermis of the embryonic chick and its response to excess vitamin A. *J. Embryo. Expl. Morph.* **9**, 370-384.
- 22) McLoughlin, C. B. (1963): Mesenchymal influences on epithelial differentiation: In cell differentiation. *Symposia of the society for expl. biol.* **17**, 359-388,
- 23) Wessells, N. K. (1964): Tissue interactions and

- cytodifferentiation. *J. Expl. Zool.* **157**, 139-152.
- 24) Wessells, N. K. (1965): Morphology and proliferation during early feather development. *Develop. Biol.* **12**, 131-153.
 - 25) 宝田博(1966): 人胎児の表皮および口蓋粘膜上皮に関する光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡の研究, 第1編 光学顕微鏡のレベルにおける分化と基底層, 中間層における微細構造からみた分化について, *口科誌* **15**, 339-364, 昭和41.
 - 26) Hanson, J. (1947): The histogenesis of the epidermis in the rat and mouse. *Am. J. Anat.* **81**, 184-197.
 - 27) 中沢信午(1965): 細胞分化, 裳華房, 昭和40.
 - 28) 伊勢村寿三他(1966): 発生と分化, 岩波書店, 昭和41.
 - 29) 団勝磨(1964): 細胞分裂と分化, *科学* **34**, 186-187, 昭和39.
 - 30) Lasson, K. S. (1960): Studies on the closure of the secondary palate. II. Occurrence of sulfo-mucopolysaccharides in the palate processes of the normal mouse embryo. *Expl. cell Res.* **21**, 498-503.
 - 31) Moriaty, T. M., Weinstein, S. and Gibson, R. D. (1963): The development in vitro and in vivo of the palate processes of rat embryos. *J. Embryo. Expl. Morph.* **11**, 605-619.
 - 32) Reeve, W. L., Porter, K. and Lefkowitz, W. (1966): In vitro closure of the rat palate. *J. dent. Res.* **45**, 1375-1380.
 - 33) Trasler, D. C. and Fraser, F. C. (1963): Role of the tongue in producing cleft palate in mice with spontaneous cleft lip. *Develop. Biol.* **6**, 45-60.
 - 34) Wilson, J. G. et al (1951): Effects of irradiation of embryonic development. I. X-ray on the 10th day of gestation in the rat. *Am. J. Anat.* **88**, 1-34.
 - 35) Wilson, J. G. et al. (1953): Ibid. II. X-ray on the 9th day of gestation in the rat. *Am. J. Anat.* **92**, 153-187.
 - 36) Hicks, S. P. (1954): The effect of ionizing radiation, certain hormones and radiomimetic drugs on the developing nervous system. *J. cell Comp. Physiol.* **43**, 151-178.
 - 37) Russell, L. B. and Russell, W. L. (1954): Analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. cell Comp. Physiol.* **43**, 103-149.
 - 38) Russell, L. B. (1954): The effects of radiation mammalian prenatal development. *Rad. Biol.* **I. Part 2**, P. 861, New York, McGraw-Hill Book co., Inc.
 - 39) 亀井民雄(1962): マウスにおける実験的口蓋裂の胎生学的ならびに組織化学的研究, *解剖誌*, **37**, 140-158, 昭和37.
 - 40) Callas, G. and Walker, B. E. (1963): Palate morphogenesis in mouse embryos after x-irradiation. *Anat. Rec.* **145**, 61-71.
 - 41) Walker, B. E. and Crain, B. (1960): Effects of hypervitaminosis A on palate development in two strain of mice. *Am. J. Anat.* **107**, 49-58.
 - 42) Walker, B. E. and Crain, B. (1961): Abnormal palate morphogenesis in mouse embryos induced by riboflavin deficiency. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **107**, 404-406.
 - 43) 藤野博, 半田純雄(1964): 口蓋裂の実験研究. 第12報 第四回日本先天異常学会講演抄録, 先天異常 **4**, 28, 昭和39.
 - 44) 菅原努, 堀川正克(1959): 組織培養法による生細胞に及ぼす放射線作用の研究, *細胞化学シンポジウム* **9**, 丸善, 昭和34.
 - 45) 武田矩夫他(1968): マウス胎仔における放射線効果: 第3報 X線照射による胎仔末梢血の影響について, 歯放誌投稿中, 昭和43.
 - 46) Chase, L. P., Toto, P. D. and Magalotti, M. F. (1961): Radiation-induced changes in the epithelium of the buccal mucosa. *J. dent. Res.* **40**, 929-935.
 - 47) Fell, H. B. (1962): The influence of hydrocortisone on the metaplastic action of vitamin A on the epidermis of embryonic chicken skin in organ culture. *J. Embryo. Expl. Morph.* **10**, 389-409.
 - 48) Weissmann, G. and Fell, H. B. (1962): The effect of hydrocortisone on the response of fetal rat skin in culture to ultra-violet irradiation. *J. Expl. Med.* **116**, 365-380.

付 図 説 明

- 図2 胎令14 $\frac{1}{2}$ 日から15 $\frac{1}{2}$ 日に至る口蓋突起吻側 (rostral region) および尾側 (caudal region) における二次口蓋形成過程
- 図3～5 口蓋突起転位初期像。転位は吻側(図3)から一侧より開始し尾側(図5)に至る。
- 図6 胎令13 $\frac{3}{4}$ 日の口蓋突起。腹側壁に上皮肥厚(矢印)が認められる(t:舌)。
- 図7 胎令14 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋突起。上皮肥厚部は皮下結合織に陥凹する。
- 図8 胎令14 $\frac{3}{4}$ 日の口蓋突起。陥凹部は小溝をなす。
- 図9 胎令14 $\frac{3}{4}$ 日～15日頃の口蓋突起。口蓋突起先端は内上方に屈曲し、内側壁に折れ目(矢印)を作る。
- 図10 胎令15日頃の口蓋突起。口蓋突起先端は舌背に達し、内側壁の折れ目(矢印)は鼻上皮部に変位する。
- 図11 胎令15 $\frac{1}{4}$ 日の口蓋突起。口蓋突起は鼻中隔(ns)と舌(t)の間を正中に向かって伸長する。
- 図13 胎令14 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。周皮と基底層より構成される。
- 図14 同上、鼻上皮。主に楕円形の細胞から構成される。
- 図15 胎令15 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。図13より上皮層は厚くなる。
- 図16 同上、鼻上皮。基底細胞と支持細胞が明確となる。
- 図17 胎令16 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。上皮はさらに肥厚し、基底細胞は極性を呈し、周皮は核濃縮をおこす。
- 図18 同上、鼻上皮。線毛上皮となる。
- 図19 胎令18 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。顆粒層と角質層が加わり4層構成の被蓋上皮となる。
- 図20 同上、鼻上皮。線毛上皮を示す。
- 図21 胎令14 $\frac{1}{2}$ 日の上皮肥厚部の ^3H -TdR 標識様相。標識細胞は散在している。
- 図22 同上、鼻上皮。上皮層全域に標識細胞を認める。
- 図23 胎令16 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。標識細胞は基底層に局在する。
- 図24 同上、鼻上皮。口蓋上皮同様に標識細胞は基底層に局在する。
- 図25 対照胎仔、胎令15 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋部
- 図26 X線 300 R 照射胎仔(胎令15 $\frac{1}{2}$ 日)。矮少で、口蓋突起は垂直位を示し、両口蓋突起間が広い。
- 図27 dexamethasone 0.4 mg 投与胎仔(胎令15 $\frac{1}{2}$ 日)。対照と大きさは変わらない。口蓋突起は水平位で癒合不全を呈す。
- 図28 対照胎仔、胎令18 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋部
- 図29 X線 300 R 照射胎仔(胎令18 $\frac{1}{2}$ 日)。矮少で、垂直型の口蓋裂を示す。
- 図30 dexamethasone 0.4 mg 投与仔胎(胎令18 $\frac{1}{2}$ 日)。対照と大きさは変わらないが、口蓋裂を呈す。
- 図31 対照胎仔、胎令18 $\frac{1}{2}$ 日の骨標本
- 図32 X線 300 R 照射胎仔(胎令18 $\frac{1}{2}$ 日)の骨標本。骨の發育不全と化骨不全が著明である。
- 図33 dexamethasone 0.4 mg 投与胎仔(胎令18 $\frac{1}{2}$ 日)の骨標本。骨の發育不全は認めないが化骨不全を認める。
- 図34 X線 300 R 照射胎仔、胎令16 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋部を示す。左右口蓋突起は垂直位でVV型を示す(本文参照)。
- 図35～38 dexamethasone 0.4 mg 投与胎仔(胎令16 $\frac{1}{2}$ 日)。おのおの、VD型、HD型、HH型、F型を示す。
- 図41 同上、口蓋上皮。対照同様に基底細胞は極性を呈し、上皮層は厚くなってくる。
- 図42 同上、鼻上皮。対照同様の線毛上皮を示す。
- 図43 X線 300 R 照射胎仔(胎令16 $\frac{1}{2}$ 日)。垂直位の口蓋突起先端に認められた上皮細胞集塊を示す。
- 図44 同上、口蓋突起を示す。上皮集塊から鼻上皮に至る(矢印)上皮は1～2層の構成である。
- 図45 dexamethasone 0.4 mg 投与胎仔、胎令18 $\frac{1}{2}$ 日の口蓋上皮。対照同様の被蓋上皮を呈す。
- 図46 同上、口蓋突起を示す。1～2層上皮(矢印)は依然として残存する。