The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット二次口蓋突起のin vitroにおける癒合過程とその過程に及ぼす風疹ウィルスならびにその変種株の影響
Author(s)	久保, 和子
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32189
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏名・(本籍)	久保和子
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 4577 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	歯学研究科 歯学臨床系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ラット二次口蓋突起のin vitroにおける癒合過程とその過程に及ぼす風疹ウィルスならびにその変種株の影響**
論文審査委員	(主査)教授 宮崎 正 (副査)教授 赤井三千男 助教授 藤田 訓也 助教授 石田 武

論文内容の要旨

口蓋形成過程において，一次口蓋突起の後方に存在する一対の二次口蓋突起は，上顎突起下面より出現し，垂直方向に発達後，舌背上で水平方向に位置転換を行う。この両側の二次口蓋突起先端が，epithelial contact, epithelial adherence, epithelial reorganization, epithelial disruption, mesenchymal transmigration の一連の癒合過程を経る事により口蓋形成過程は終了すると考えられている。この口蓋突起癒合過程における上皮細胞は細胞形態学的観察による規則立った変性・壊死の過程をとるが，その機序は不明であり，"programmed cell death"という概念で説明されているだけである。そこで，このprogrammed cell death の機序を明らかにするために，胎生15日目のWistar系ラット胎仔から無菌的に二次口蓋突起を摘出し，二次口蓋突起の器官培養を行った。 培養はイーグルの最少必須培養液に最終濃度 0.3%の寒天と20%の仔牛血清と2mM L-グルタミンを含む寒天増殖培地上に，二次口蓋突起先端上皮を接触させた状態で，5%CO_2培養器中にて37℃で行われた。その結果，48時間以内に15例の標品全てにepithelial disruption が生じ，mesenchymal transmigrationが認められた。更に上皮・間葉接合部に局在してepithelial fusion の時期にのみC型ウイルス粒子が発現されており，その部位の間葉細胞の変性は上皮細胞におけるよりも進行していた。このC型ウイルス粒子はmesenchymal transmigration を示す領域には全く認める事ができなかった。

このC型ウイルス粒子の生物学的活性を検索するために，ラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞の培養上清を細胞継代数7代で採取した。低速遠心にて細胞残渣を除去した後，100,000×gで2時間超遠心し，その沈渣から粗ウイルス標品を調整した。粗ウイルス標品は15～60%(W/W)の蔗糖密度勾配に重層後，62,500×gで2時間遠心され20画分に分取された。各画分について逆転写酵素活性，

DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を測定すると，本実験条件下において蔗糖密度 1.15 g/cm^3 を示す画分に高い酵素活性が存在した。更にこの反応生成物を deoxyribonuclease I で処理すると酸不溶性画分の^{3}H-TMP 量は未処理の対照に比べて約1／5に減少したが，ribonuclease A で処理しても影響はなかった。更にこの細胞のトランスホーム能を検索するために，軟寒天中でのコロニー形成能を測定した。継代数13代目で 0.7%の細胞がコロニーを形成し，この培養細胞は自発的にトランスホームした。すなわち，ラット胎仔二次口蓋突起より得た細胞は逆転写酵素ならびに DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を保有するラット retro ウイルス粒子を発現し，そのDNA 合成酵素は DNA の読み取り誤差を高頻度に生じる事を示唆している。

一方，器官培養された二次口蓋突起に風疹ウイルス M-33株あるいはその変種株 HPV-RV を感染させ器官培養を行うと，培養48時間では epithelial fusion の状態にあり，癒合過程は遅延しC型ウイルス粒子の発現は抑制されていた。また風疹ウイルスあるいはその変種株を感染させたヒト培養細胞を凍結融解ならびに超音波処理により破壊し，32,000×g で 2.5時間遠心し，その上清を紫外線照射する事により細胞増殖抑制因子が得られた。この因子はインターフェロンとは異り，ラット培養細胞の増殖をも抑制した。しかしこの因子を最終濃度1/10に含む様に調整された寒天増殖培地上で，ラット胎仔二次口蓋突起の器官培養を行っても，その癒合過程に直接的な影響は認められなかった。

以上の結果をまとめると，器官培養されたラット二次口蓋突起の epithelial fusion の時期にC型ウイルスが発現されるが，このウイルス粒子の保有する DNA 合成酵素活性は DNA の読み取り誤差が高く，口蓋突起の領域の細胞の増殖・修復過程に働く際に細胞死を生じる事が強く示唆された。また風疹ウイルスならびにその変種株が epithelial fusion から mesenchymal transmigration の段階へと移行するのを遅延させた事からも，C型ウイルスが口蓋突起癒合過程の programmed cell death を誘導している因子である事を強く示唆している。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ラット胎仔二次口蓋突起の器官培養を行う事により，二次口蓋突起癒合過程の機序を解析したものである。

epithelial fusion の時期に上皮・間葉接合部に局在して逆転写酵素活性を保有するラット retro ウイルスが発現している事を明らかにし，また口蓋裂発生要因の一つである風疹ウイルスならびにその変種株が癒合過程に与える影響を検討する事により，癒合過程の遅延とともに，上記の retro ウイルスの発現が抑制される事も明らかにしている。

すなわち，ラット二次口蓋突起癒合過程において epithelial fusion から mesenchymal transmigration を誘導する因子としてラット retro ウイルスが働いている事を解明している。

以上，本研究は二次口蓋突起癒合過程の調節機構を知る上で極めて価値ある業績であり，口蓋裂発生機序を解明する上で有用である。

故に，本研究者は歯学博士の学位を得る資格があると認める。