



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

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

久保和子

(昭和54年1月12日受付)

緒言

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¹⁾。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²⁾。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と規則立った変性・壊死の過程をとるが、その機序に関してはまだ不明であり、ただ“programmed cell death”という極めて抽象的な概念で説明されているのみである³⁾。

一方、Pourtoisは二次口蓋突起癒合過程を誘導するためには上皮・間葉系の相互作用が必須であると報告している⁴⁾。そこで著者はこの癒合過程を誘導する要因を明らかにするために、ラット胎仔二次口蓋突起をin vitroにおいて器官培養し、その癒合過程の初期段階であるepithelial fusionにおける上皮ならびに上皮・間葉接合部を形態学的に観察した。その結果、epithelial fusionの過程にのみ上皮・間葉接合部にラットC型ウイルスの発現が認められ、このC型ウイルスが癒合過程の誘導因子になりうる事を明らかにした。

更に本論文において、口蓋裂の発現要因の

一つである風疹ウイルスのラット胎仔ニ次口蓋突起癒合過程に与える影響についても述べる。

実験材料ならびに方法

1. ラット胎仔ニ次口蓋突起の器官培養法

実験には体重 250～350 g の Wistar 系雌ラットを使用し、同系の成熟雄ラットと一夜交配させて、翌朝腔栓の認められたものを妊娠 0 日とした。妊娠 15 日目に、エーテル麻酔下で母獣より胎仔を無菌的に取り出し、イーグルの最少必須培養液⁵⁾ (Eagle's Minimum Essential Medium, MEM, 日本製薬) にて 2 回洗浄後、実体顕微鏡下でニ次口蓋突起を摘出した。すなわち図 1 に示す様に、口角部・眼中央部で水平断を行いニ次口蓋突起を摘出し、その周辺組織を除去した。一对のニ次口蓋突起はその先端上皮を接触させた状態で MEM に最終濃度 20% の仔

牛血清（阪大微生物研究会）と 2 mM L- グルタミンと最終濃度 0.3 % の寒天（Special Agar Noble, Difco Laboratories, U.S.A.）を加えた寒天増殖培地上に静置され、5 % CO_2 を含む空气中で 37 °C にて 48 時間あるいは 72 時間培養された。

2. 細胞培養法

1) ラット胎仔 = 次口蓋突起ならびにヒト口蓋組織の初代培養

ラット胎仔 = 次口蓋突起は、MEM で 2 回洗った後、60 mm 径のペトリ皿に入れ室温で 1 時間静置された。二次口蓋突起がペトリ皿底面に付着後、10 % 仔牛血清を含む増殖培養液 1 ml を加えて 5 % CO_2 培養器にて 37 °C で培養を行い、培養 2 日目に 4 ml の増殖培養液を追加し、培養 10 日目で培養液の交換を行った。約 3 週間後二次口蓋突起周辺より増殖してきた細胞を、最終濃度 0.08 % (w/v) のトリプシン（阪大微生物研究会）と 1.4 % (w/v) のエチレンジアミン四酢酸 = ナトリウム（EDTA, 石津製薬）を含む

を $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ 脱リン酸緩衝液で処理して細胞を採取し、その細胞を MEM で 2 回洗った。その後増殖培養液に 20×10^4 個 / ml の割合に細胞を浮遊したものゝ、90 mm 径のペトリ皿に 15 ml 入れ培養を行った。なお継代培養は 5 日間隔にて施行した。

ヒト初代培養細胞は生後 1 年 6 ヶ月の女子口蓋裂患児の口蓋形成術中に得た口蓋組織より、上記のラット胎仔の二次口蓋突起と同様の方法で、初代培養ならびに継代培養を行った。

2) BHK21/WI-2 細胞ならびにそのクローンの継代培養

仔シリアンハムスター腎由来の株化細胞である BHK21/WI-2 細胞⁶⁾ は、MEM に最終濃度 5% の仔牛血清と 10 % の tryptose phosphate broth (Difco Lab.) と 2 mM の L-グルタミンを加えたものを増殖培養液として使用し、5 % CO_2 培養器中で 37 °C にて継代培養された。

風疹ウイルスのプラック形成による感染価

測定に好適な BSR 細胞は BHK21/WI-2 細胞よりコロニー形成され⁷⁾。その方法については既に報告されているが簡単に述べると、BHK21/WI-2 細胞 500 個を最終濃度 0.3% の割合に寒天を含む増殖培養液 1 ml に混和し、0.6% の寒天増殖培養液 2 ml で 30 mm 径のペトリ皿に形成された寒天培地上に重層した。5% CO₂ 培養器中で 37°C にて 30 日間培養する事により軟寒天中に形成されたコロニーをパストゥール・ピペットにて増殖培養液中に移し培養した。採取したコロニーのうち安定な増殖を示しかつ風疹ウイルスのプラック形成の感受性の一番良い細胞が BSR 細胞と名付けられた。この BSR 細胞も親株細胞と同様の方法により培養された。

3. ウイルス

実験には風疹ウイルス M-33 株⁸⁾、風疹ウイルスと BHK21/WI-2 細胞の retro ウイルスとの合の子である風疹ウイルス変種株 HPV-RV⁹⁾、なら

びに Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Indiana 株を使用した。上記のウイルスは BHK21/WI-2 細胞にて増殖させたものを用いた。すなわち BHK21/WI-2 単層培養細胞にウイルスを感染多重度 (multiplicity of infection, MOI) 0.1 で接種して 37 °C で 1 時間吸着させ、その後 MEM にて 3 回感染単層培養細胞を洗浄して未吸着ウイルスを除去した。その後、増殖培養液を加えて 5 % CO₂ 培養器中で 37 °C にて培養を継続した。ウイルスによる細胞変性効果が単層培養細胞の 70 ~ 80 % に出現した時に培養液を採取し、300 X g で 10 分間遠心して細胞残渣を除去し、その上清を種ウイルスとして実験に使用するまで -70 °C にて保存した。なお風疹ウイルスならびにその変種株ウイルスによる細胞変性効果の出現には約 6 日間、VSV では 3 日間の培養を必要とした。

4. ウイルス感染力価測定法

風疹ウイルスの感染力価測定には BSR 細胞

、風疹ウイルス変種株ならびに VSV の感染力価測定には BHK21/WI-2 細胞を用い、その感染力価は単層培養細胞上でのプラック形成能を指標として算定された。37 °C で 2 日間培養する事により 60 mm 径のペトリ皿に形成された単層培養細胞に MEM で 10 倍階段希釈したウイルス液を 0.1 ml ずつ接種して 37 °C で 1 時間吸着させた後、MEM で単層培養細胞を 3 回洗浄し未吸着ウイルスを除去した。その後、最終濃度 1% の割合に寒天を含む寒天増殖培養液 5 ml を重層した。このウイルス感染単層培養細胞は 5 % CO₂ 培養器中で 37 °C にて培養を継続され、形成されたプラック数が算定された。なおプラックは Dulbecco のリン酸緩衝液 (D-PBS, PH6.6)¹⁰⁾ にて 0.3 % (w/v) に調整したニュートラルレッド溶液で 3 時間染色された。風疹ウイルスならびにその変種株ウイルスによるプラックの出現には約 6 日間、VSV では 3 日間の培養を必要とした。

5. ラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞の軟寒天中におけるコロニー形成能

ラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞 (RaPC) でトランスホームした細胞の割合は、軟寒天中で形成されたコロニー数を算定する事により測定された¹¹⁾。

RaPC 細胞の 1000 個あるいは 10000 個が 0.3 % の割合に寒天を含む増殖培養液 1 ml と混合された。その後、この細胞浮遊液を 30 mm 径のペトリ皿内で 0.6 % の寒天を含む増殖培養液 2 ml にて調整した寒天培地上に重層し、細胞を含む軟寒天層が硬化した後、上記の細胞を 5 % CO₂ 培養器で 37 °C にて培養した。培養 2 ヶ月後、細胞分裂の結果 10 個以上の細胞からなるコロニーを倒立顕微鏡下で算定した。

6. ラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞 (RaPC) の retro ウイルス

1) ラットに内在する retro ウイルス精製法

一般に逆転写酵素 (reverse transcriptase) を保

有する内因性ウイルスは retro ウィルスと分類されている。

ラット retro ウィルスは以下に述べる方法により調整された。ラット胎仔ニ次口蓋突起より得た培養細胞 (RaPC) を 7 代継代培養した後、その培養上清 500 ml は $10,000 \times g$ で 1 時間遠心し細胞残渣を除去された。この培養上清を更に $100,000 \times g$ で 2 時間超遠心して集められた沈渣は 1.0 ml の 0.01M Tris-HCl 緩衝液 (PH 8.0) に溶解し粗 retro ウィルス標品とされた。この粗ウィルス標品 0.5ml を Cellulose Nitrate Ultracentrifuge Tube (Beckman Instruments, INC., U.S.A.) に上記の Tris-HCl 緩衝液にて 15 ~ 60 % (w/w) に調整された蔗糖密度勾配液 4 ml に重層し、 4°C で $62,500 \times g$ にて 2 時間遠心 (Martin Christ Omega Type 2, West Germany) した。その後チューブ底を穿孔して 20 画分に分取した。各々の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し、活性の存在する画分が精製ウィルス標品とされた。なお精製ウィルス標品のタンパク量は、

Lowry の方法により測定された¹²⁾。

2) ラット retro ウイルス粒子の酵素活性

ラット retro ウイルスが保有する逆転写酵素
ならびに DNA 依存性 DNA 合成酵素活性は Green
らの方法に準じて測定された¹³⁾。すなわち反
応混合液は、40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM dithiothreitol
(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 30 mM NaCl, 5.0 mM MgCl₂, 0.1
mM dATP, 0.1 mM dCTP, 0.1 mM dGTP (Sigma), 200 μ Ci ³H-TTP
(Specific Activity 17.4 Ci/m mol, New England Nuclear,
U.S.A.), 0.01 % Triton X-100 (石津製薬)、ならび
に適当量のラット retro ウイルスを含み総量 100
 μ l になる様に調整された。なお DNA 依存性 DNA
合成酵素活性測定には DNA の鋳型としてエン
ドヌクレアーゼにて活性化されていない仔牛
胸腺 DNA (Sigma) 10 μ g を使用した。この反応混合
液を 37°C の温浴中に静置し反応させた。反応
は経時的に 1 N 過塩素酸 (PCA) 150 μ l を加えて氷
冷することにより停止された。反応生成物を沈
殿させるために、担体として仔牛胸腺 DNA 100
 μ g と 10 % トリクロル酢酸 (TCA) 3 ml を加え 10 分

間水中に静置し、3000 X g で遠心して酸不溶性分画を得た。この沈渣はニトロセルロースメンブランフィルター (pore size 0.45 μ m, HA 型, Millipore filter, U.S.A.) 上に集められ、60 °C にて 40 分間乾燥された。その後トルエン系シンケレーターを加え完全にフィルターを溶解して、放射活性を Aloka 液体シンケレーションカウンタ― (日本無線医理学研究所) にて測定した。

3) 酵素反応生成物の分析

ラット retro ウイルスの保有する逆転写酵素により形成された反応生成物は以下に述べる方法により抽出された。すなわちタンパク量にして 300 μ g の retro ウイルスを用いて反応混合液が 1 ml になる様に調整したものを、37 °C にて 20 時間反応させ、最終濃度 0.01 M EDTA と 0.5 % ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を 1 ml 加えて反応を停止させた。その後 1 % イソアミルアルコールを含むクロロホルムを等容量加えよく混和し、5000 X g で 3 分間遠心し上層の水層を採取した。更にこの標品から完全にタンパクを

除去するため NET 緩衝液 (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA PH 7.4) で飽和したフェノールを等容量に加え、5,000 X g で 3 分間遠心し上層の水層を採取した。このフェノール処理を 3 回繰り返した後、得た水層からフェノールを除去するために蒸留水で飽和したエーテルを等容量に加えよく混和した後、水層を採取した。このエーテル処理も 3 回繰り返した後、0.1 X SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) で 4 °C にて 24 時間透析を行った。上記の過程を経て得られた反応生成物の放射活性を約 1500 CPM になる様に 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (PH 8.0) にて調整したものに、最終濃度 1 mg/ml の Deoxyribonuclease I (Sigma) あるいは 50 µg/ml の bovine pancreatic ribonuclease A (Sigma) を加え 37 °C で 1 時間反応させた。その後 10 % TCA と仔牛胸腺 DNA 100 µg を加えて酸不溶性画分の放射活性を測定した。

7. 細胞増殖抑制因子の調整

ヒト初代培養細胞を 37 °C で 3 日間培養して

形成された単層培養細胞に風疹ウイルス M-33
あるいは HPV-RV を MOI 0.1 にて感染させ 5 % CO₂
培養器で 37 °C にて培養した。感染後 6 日目に
細胞をラバー・ポリスマンにより採取して MEM
にてその細胞数を 1 ml 当り 10⁷ 個となる様に調
整し、その細胞悬浮液を 3 回凍結融解した後
、更に超音波処理 (Tomy Model UR-150P, Tominaga Works,
LTD., 1 amp, 7 分) を行い細胞を破壊した。その
後、32,000 X g で 2.5 時間遠心し、その上清を紫
外線照射 (15 W, GL 殺菌灯、東京芝浦電気社;
50 erg/mm²/sec, 1 mm の液層に対し 20 cm の距離で 5
分間照射) を行い生残ウイルスを不活化した
標品を細胞増殖抑制因子として使用した。
なお非感染ヒト初代培養細胞を上記と同様に
処理する事により調整された標品を対照とし
て使用した。

8. 蛍光抗体法

風疹ウイルスを感染させたラット胎仔二次
口蓋突起のウイルス抗原は間接蛍光抗体法に

より検索された。おなじちパラフィン包埋した標品を $1\mu\text{m}$ の厚みの切片に作製し、キシレンにてパラフィンを除去した後、 4°C アセトンにて5分間固定し、空气中で乾燥させた。この標品を抗風疹ウイルス家兔血清 (Flow Laboratory, U.S.A.) と 37°C の湿潤な空气中で1時間反応させた後、未反応の血清を除去するため D-PBS にて完全に洗浄した。その後、蛍光色素 (Fluorescence isothiocyanate, FITC) を結合させた抗家兔 IgG フラグ IgG (Dakopatts, Denmark) と 37°C で1時間反応させ未反応抗体を D-PBS で洗浄する事により除去した。この標品は、90% (v/v) の割合にグリセリンを含む炭酸緩衝液 (PH 9.4) で封入後、Nikon 蛍光顕微鏡 Type FL にて観察された。なお写真撮影には Kodak Tri-X film ASA 160 を使用した。

9. 形態学的観察

器官培養を行なったラット胎仔=次口蓋突起は中性ホルマリン液にて固定後、通法により

パラフィン包埋された。5 μm の厚みで一標品につき約200枚の連続切片標本を作製しヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行った後、その標本はNikon顕微鏡 S-Ke (日本光学) にて観察された。

10. 電子顕微鏡による観察

器官培養を行ったラット胎仔二次口蓋突起は、0.005 M 塩化カルシウム (CaCl_2) を加えた 0.1 M リン酸緩衝液 (PH 7.3) にて最終濃度 4% に調整されたグルタールアルデヒド (石津製薬) 溶液中で 2 時間固定された。その後、残存するグルタールアルデヒドを除去するためにリン酸緩衝液にて充分洗浄後、標品は 4 $^{\circ}\text{C}$ で一夜上記のリン酸緩衝液に浸漬された。更に 2% 四酸化オスミウム溶液 (OsO_4 , Merck, U.S.A.) で 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 時間固定を行い通法により冷エタールアルコールにて脱水し、プロピレンオキシサイド (石津製薬) を浸透させた後、この標品は Luft 法によりエポキシ樹脂包埋された¹⁴⁾。

ラット胎仔ニ次口蓋突起より得た培養細胞 (RaPC) はペトリ皿上に密な単層を形成した時、リン酸緩衝液にて2%に調整されたカルタールアルテヒド溶液で1時間固定された。この細胞をラバー・オリスマンを用いて採取し、200 X g にて5分間遠心した。その後、この細胞沈渣は上記と同様の方法でエポキシ樹脂包埋された。包埋ブロックを LKB 製ウルトラトームで600~800 Å の超薄切片に作製した後、この切片は4%酢酸ウラニールならびに水酸化鉛の二重染色を施され、日立電子顕微鏡 HU-12 A 型にて観察された。写真撮影には富士電子顕微鏡フィルム FG を用いた。

実験結果

1. ラット胎仔ニ次口蓋突起の器官培養における癒合過程の形態学的観察

ラット胎仔ニ次口蓋突起の in vitro における

癒合過程を形態学的に観察するため、摘出された一対の二次口蓋突起先端上皮を接触させ寒天増殖培地上に静置し、48時間あるいは72時間器官培養を行った。これら標品はホルマリソで固定後5 μ mの厚さで連続切片標本に作製されH-E染色後光学顕微鏡にて観察された。

この場合癒合過程は2つの形に分類された。すなわち図2-A, Bに示す様に、二層の上皮細胞間での癒合のみが生じているepithelial fusionと、もう一つの癒合形態として接合した上皮細胞の一部に不連続性を認め、その部分に間葉細胞の侵入しているmesenchymal transmigrationとに分類された。また一対の口蓋突起接合部で上皮細胞が完全に破綻し間葉細胞により同部が置換されている状態を完全な癒合complete fusionとした(図2-C)。なお本実験において癒合過程を形態学的に分類する場合、各々の標品から作製した連続切片において一部の切片標本のみにmesenchymal transmigration

が現われた場合も mesenchymal transmigration と分類した。complete fusion の場合においても mesenchymal transmigration の分類に入れた。また作製された連続切片標本に全く mesenchymal transmigration が認められず、ただ一部の標本のみに epithelial fusion を認める場合 epithelial fusion と分類された。

表 1 はラット胎仔二次口蓋突起癒合の状態を培養 48 時間あるいは 72 時間後に観察したものである。すなわち摘出された 15 対の二次口蓋突起を本実験条件下において 48 時間培養後の全ての標品は mesenchymal transmigration を示している。故に以後に行う実験においては培養期間を最少 48 時間とした。

2. 器官培養したラット胎仔二次口蓋突起癒合過程の超微細構造

ラット胎仔二次口蓋突起の癒合を誘導する過程として一対の接触した二次口蓋突起の先端上皮細胞が規則立った変性・壊死の過程、

すなわち programmed cell death を生じる事が必須
であると Smiley らによって報告されている^{2,15,16,17,18)}
。そこでラット胎仔二次口蓋突起の器官培養
を48時間行い、epithelial fusionを示す5標品に
ついて上皮細胞、上皮・間葉接合部、更に間
葉細胞層のそれぞれの超微細構造の変化を観
察した。

epithelial fusionを示す時期の二次口蓋突起の
超微細構造は以下のごとくである(図3)。
すなわち、一層に配列する上皮細胞はこの時
期においてもその超微細構造を比較的よく保
ち、互いの細胞間には上皮細胞に特有な desmo-
some が存在し、核は主として基底側へ偏位し
ていた。すなわち、細胞質には少数の粗面小
胞体、楕円形のミトコンドリア、ならびに微
細線維が認められた。ライソゾーム様顆粒あ
るいは空胞変性像は認められるが、間葉細胞
のものと比べると著明ではなかった。また一
部の上皮細胞が核分裂像を示している像をも
観察できた。これらの上皮細胞層は明瞭な一

層の basal lamella によって間葉細胞と境されていた。一方、間葉細胞層の構造について述べると、細胞の変性像は上皮細胞直下に存在する細胞では著明であるが、深層に存在する細胞はその構造を比較的よく保っていた。すなわち、深層の間葉細胞は長く伸びた多くの細胞突起を有し、星状形を呈し、細胞質に比して大きな核を有している。しかし上皮細胞層に近位した間葉細胞では多数のライソゾーム様顆粒ならびに著明な空胞変性像を持つため、細胞質は膨化し、細胞突起も著明でなくなった。すなわち口蓋突起上皮癒合部における細胞変性像について見ると、間葉細胞の方が上皮細胞よりその細胞変性過程が進行しているのが認められる。

この口蓋突起 epithelial fusion の段階で特に注目すべき超微細構造は上皮・間葉接合部に認められる。すなわち上皮・間葉接合部に生じた空隙に局在して電子密度の高い粒子が多数認められる。この粒子の微細構造を観察する

と直径 150 nm で中央に電子密度の高い nucleus を保有し、その周囲を envelope により取り囲まれている C 型ウイルス粒子である事が明らかにされた (図 3-A)。なお口蓋突起癒合過程において既に mesenchymal transmigration が生じている間葉細胞の細胞質ならびにその細胞間隙には、この C 型ウイルス粒子を全く認める事ができなかった。すなわちラット胎仔二次口蓋突起癒合過程において epithelial fusion の時期にのみ上皮・間葉接合部に局在して C 型ウイルス粒子が発現し、その際の間葉細胞の変性は上皮細胞変性よりも進行している事が観察された。

3. ラット胎仔二次口蓋突起培養細胞における C 型ウイルスの産生

ラット胎仔二次口蓋突起の epithelial fusion の過程に C 型ウイルス粒子が発現される事が超微細構造の観察により明らかにされた。この事実はラット胎仔の二次口蓋突起を構成する

細胞には内因性C型ウイルスが内在している事を強く示唆している。そこでラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞およびその培養上清について、形態学的ならびに生化学的にC型ウイルス粒子を検索した。

摘出したラット胎仔二次口蓋突起をペトリ皿に静置し、増殖培養液を加えた後、5% CO₂ 培養器中で37℃にて培養した。培養約3週間後、組織片周辺より増殖してきた培養細胞をEDTA-トリプシン処理により採取し、継代培養を行った。継代数7代目の培養細胞(RaPC)を電子顕微鏡により観察すると、図4に示す様にRaPCの細胞質にラット胎仔二次口蓋突起の器官培養において観察されたと同様の形態を示すC型ウイルス粒子の発現が明らかにされた。

このC型ウイルスの生物学的活性について検索するために、RaPC細胞の培養上清500 mlを採取し低速遠心にて細胞残渣を除去した後、100,000 X g, 2時間超遠心する事により沈渣を得

た。その沈渣を 1 ml の 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (PH 8.0) により懸濁し 15 ~ 60 % の蔗糖密度勾配遠心法により 20 画分に分離した。その後、この実験条件下における蔗糖密度 1.15 g/cm^3 ¹⁹⁾ を示す第 7 画分ならびにその前後の 2 画分ずつについて逆転写酵素活性ならびに DNA 依存性 DNA 合成酵素活性が測定された。その結果、第 7 画分をピークとして測定されたそれぞれの画分において高い酵素活性が認められた。図 5 は蔗糖密度勾配法により調整された精製ウィルス標品 $2.5 \mu\text{g}$ を使用してその逆転写酵素ならびに DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を経時的に測定したものである。すなわち逆転写酵素活性についてみれば、測定された 90 分以内においては酸不溶性画分への $^3\text{H-TMP}$ の取り込みは経時的に直線的に増加している。一方この標品の DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を測定するため、反応系に DNA の鑄型としてエンドヌクレアーゼで処理されている、仔牛胸腺 DNA $10 \mu\text{g}$ を使用した。その結果、DNA 依存性 DNA

合成酵素活性においても測定時間90分以内では、ほぼ経時的に酸不溶性画分への ^3H -TMPの取り込みが増加している事が明らかにされた。

またこの精製ウイルス標品の逆転写酵素により得た生成物の性質について Deoxyribonuclease I あるいは Ribonuclease A を用いて検討した。その結果、表2に示す様にクロロホルム・イソアミルアルコールならびにフェノールにより抽出された反応生成物に Deoxyribonuclease I を1 mg/ml になる様に添加した場合、酸不溶性画分に取り込まれた ^3H -TMP量は約1/5に低下した。しかしながら Ribonuclease A 50 $\mu\text{g/ml}$ で反応生成物が処理された場合では酸不溶性画分の ^3H -TMP量は対照と比較して変化を認める事ができなかった。この実験結果は反応生成物がDNAである事を強く示唆している。故にラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞には典型的な生物学的活性を保有している内因性ラット retro ウイルスの内在している事が明らかにされた。

4. 風疹ウイルスならびにその変種株のラット胎仔二次口蓋突起癒合に与える影響

風疹ウイルスの胎内感染は口蓋裂発生要因の一つとして既に報告されている²⁰⁻²²⁾。この事実は風疹ウイルス感染により口蓋形成の過程が修飾される事を強く示唆している。一方、風疹ウイルスが内因性 retro ウイルスを保有する動物株化細胞に感染すると、それら宿主細胞において両ウイルス間の合の子が形成される事が報告されている²³⁾。すなわち風疹ウイルスは内因性 C 型ウイルスの増殖・産生に強く関与していると考えられる。そこでラット胎仔二次口蓋突起の epithelial fusion の過程において上皮・間葉接合部に発現されている C 型ウイルスが風疹ウイルスを感染させた場合、いかなる影響を受けるか検討した。

ラット胎仔二次口蓋突起を既に述べた様に寒天増殖培地上にて器官培養を行い、培養 48 時

間後に感染力価 10^5 plaque forming unit/ml を保有する風疹ウイルス 0.1 ml を感染させ、二次口蓋突起癒合過程に与える影響について組織学的に検討した。その結果、表 3 に示す様に風疹ウイルス感染 48 時間培養群では実験に使用した 5 標品すべてにおいて epithelial fusion のみが生じ、mesenchymal transmigration は全く認める事ができなかった ($P < 0.005$)。

一方、風疹ウイルスを感染させ 72 時間培養した 10 標品についてその二次口蓋突起癒合段階を検討してみると、8 標品においては mesenchymal transmigration が認められたが 2 標品は epithelial fusion の段階でとどまっていた。すなわち風疹ウイルス感染群においては培養 48 時間で観察された場合には、統計学的に有意の差でもって癒合過程が遅延している事が明らかになった。

なお風疹ウイルス感染二次口蓋突起での風疹ウイルス抗原の存在を間接蛍光抗体法にて検索した。その結果、上皮・間葉接合部に存

在する間葉細胞の細胞質にのみ風疹ウイルス抗原が認められ、上皮細胞では同ウイルス抗原の発現はなかった(図6)。

この風疹ウイルスを感染させたラット二次口蓋突起で epithelial fusion の認められる領域の超微細構造を観察した。その結果、図7に示す様に上皮・間葉接合部にはラットC型ウイルスの発現をほとんど認める事ができなかった。また風疹ウイルス感染による細胞病理学的病変としては間葉細胞にのみ風疹ウイルスの増殖像、すなわち細胞質の空胞に風疹ウイルス粒子の集合と細胞質膜の不連続性肥厚が認められた。しかし上皮細胞には風疹ウイルス感染による細胞病変は全く認められなかった。また非感染二次口蓋突起の epithelial fusion の過程に見られた細胞変性像、すなわちライソゾーム様顆粒や空胞変性像は、風疹ウイルス感染実験群ではほとんど認める事ができなかった。

先に佐藤らは風疹ウイルス変種株の分離を

報告した⁹⁾。この風疹ウイルス変種株 HPV-RV は、風疹ウイルス M-33 と BHK21/WI-2 細胞の retro ウイルスとの合の子で、風疹ウイルスの補体結合抗原を保有し、抗 BHK retro ウイルス血清により HPV-RV のプラック形成能が中和され、またその赤血球凝集能は抑制される。あるいは HPV-RV のウイルス抗原は、風疹ウイルスと BHK retro ウイルスとの mosaic になっている。

またこの HPV-RV はそのウイルス粒子に DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を保有し、ヒト初代培養細胞でウイルスによる細胞変性効果をほとんど発現する事なく慢性感染が成立する²⁴⁾。故にこの風疹ウイルス変種株は器官培養されたラット二次口蓋突起に感染させた場合、風疹ウイルス野性株と同様に細胞変性を生じる事なく慢性感染系になりうると考えられる。

そこでラット胎仔二次口蓋突起を器官培養し風疹ウイルス野性株での実験系と同様の方法にて風疹ウイルス変種株 HPV-RV の口蓋突起癒合過程に与える影響について検討した。そ

の結果、表3に示す様に風疹ウイルス変種株を感染させ48時間器官培養したすべての標品は、epithelial fusionの状態にとどまっており、mesenchymal transmigrationは全く認める事ができなかった($P < 0.005$)。また風疹ウイルス変種株を感染させ72時間器官培養されたラット胎仔二次口蓋突起12標品について検討してみると5標品においてはmesenchymal transmigrationが認められたが、7標品はepithelial fusionの状態にとどまっていた。すなわち風疹ウイルス変種株を感染させた二次口蓋突起においても、風疹ウイルスと同様にその癒合過程が統計学的に有意の差で遅延している事が明らかになった。

この風疹ウイルス変種株が感染したラット二次口蓋突起のepithelial fusionの領域における超微細構造について観察すると、風疹ウイルス感染群と同様に上皮・間葉接合部のラットC型ウイルスの発現をほとんど認める事ができず、また上皮細胞ならびに間葉細胞の細胞構造においてもその細胞変性像はほとんど認

める事ができるかった。

以上述べた実験結果よりラット胎仔＝次口蓋突起が epithelial fusion の段階から mesenchymal transmigration へ進む過程において上皮・間葉接合部にラット C 型ウイルスが発現し、この口蓋突起癒合過程の誘導因子として働いていると考えられる。

5. 風疹ウイルスならびにその変種株により誘導された細胞増殖抑制因子のラット胎仔＝次口蓋突起癒合過程に与える影響

風疹ウイルスがヒト初代培養細胞に感染すると細胞増殖抑制因子が感染細胞内に產生される事が Plotkin らにより報告されている²⁵⁾。

ラット胎仔＝次口蓋突起癒合過程においても細胞の分化・増殖の過程が存在するものと考えられる。もし風疹ウイルスが感染したラット胎仔＝次口蓋突起を構成する間葉細胞中でこの細胞増殖抑制因子が產生されるならば、その結果 epithelial fusion から mesenchymal transmig-

ration への段階が抑制され癒合過程の遅延が生じたとも考えられる。この可能性について検討するため、風疹ウイルスならびにその変種株をヒト初代培養細胞に感染させ細胞増殖抑制因子を調整し、ラット胎仔ニ次口蓋突起癒合過程に与える影響について検討した。

ヒト初代培養細胞において調整された標品につき、その細胞増殖抑制能をヒト初代培養細胞を用いて検討した。すなわち調整された標品を MEM にて 10 倍に希釈し、ヒト初代培養細胞の増殖曲線に与える影響を観察した。図 8 に示す様に処理後 38 時間では対照と比較して細胞数は約 37% 減少しており、また 86 時間後では 21% 減少していた。HPV-RV 感染により調整された標品においても同様な細胞増殖抑制効果が認められた。

図 9 はこれら標品を MEM にて 10 倍から 80 倍に希釈したものでヒト初代培養細胞を一夜処理後 38 時間培養し、その細胞数を算定し、増殖抑制率を測定したものである。その結果、

40倍希釈標品で処理した場合、その細胞増殖抑制率は約18%であり、標品希釈率と細胞増殖抑制能には直線関係が認められる。

インターフェロン(IF)も細胞増殖抑制能を保有している事が報告されている²⁶⁾。そこでIFに対してその感受性が非常に高いVSVを用いてこの細胞増殖抑制因子を含む標品のIF力価が測定された。すなわち60mm径のペトリ皿に形成されたヒト初代単層培養細胞を上記の細胞増殖抑制因子を含む標品にて一夜処理した後、VSVのプラック形成能が測定された。

その結果10倍希釈標品で処理した単層培養細胞でのVSVのプラック数は対照に比較して約1/5に低下していた。またこの標品を更に希釈するとVSVのプラック形成能の抑制率が低下した(表4)。

なおこの標品で処理されたラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞ではVSVの感受性の低下は認められなかった(表5)。

故にヒト培養細胞で調整された細胞増殖抑制因子を含む標品は種特異性を示す抗ウ

イルス作用物質である IF 活性を保有している

この標品がラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞の増殖能に与える影響についても検討した。その結果図 10 に示すごとくこの標品で処理した RaPC の増殖はヒト初代培養細胞の場合と同様のパターンでもって抑制された。すなわち風疹ウイルスならびにその変種株により誘導された細胞増殖抑制因子は種特異性がなく、ヒト培養細胞で産生された因子でもラット単層培養細胞に対して細胞増殖抑制能を発現するので、この標品には IF と異なる細胞増殖抑制を示す活性物質が存在する事が明らかにされた。

それ故にこれら細胞増殖抑制因子を用いてラット胎仔二次口蓋突起癒合過程に与える影響を観察するために、寒天増殖培地中に細胞増殖抑制因子を最終濃度 $1/10$ に含む様に調整し、その上で器官培養された二次口蓋突起の癒合過程を形態学的に観察した。その結果、器

官培養⁴⁸時間で観察された4標品ではすべて癒合過程は mesenchymal transmigration の段階にまで進行しており癒合過程の遅延を認める事ができなかった(表6)。すなわち、この実験系において、細胞増殖抑制因子はラット胎仔二次口蓋突起の癒合過程に対して全く影響していないと考えられる。

考 察

一般に胎児がある器官を形成するために、ある種の細胞の死がその形態形成の最終過程で生じ、その結果器官形成が完了すると考えられている。例えば胎児の指趾あるいは原始歯肉から口唇が形成される過程において、ある種の細胞死が生じ形態形成が行われる。この様な生物学的現象は“programmed cell death”と表現されているが、その機構に関してほとんど明らかになっていない^{27,28)}。

胎生期口蓋形成においても、舌背上で水平方向に位置転換を行い、發育してきた両側の二次口蓋突起が癒合する過程で、この programmed cell death が生じると考えられている³⁾。また二次口蓋突起の癒合過程は in vitro で解析する事ができ、その癒合過程に働く programmed cell death の機構を解明するためには好適なモデルシステムとなりうる²⁹⁾。

そこで著者はラット胎仔二次口蓋突起を寒天増殖培地上で器官培養し、その癒合過程を解析した。二次口蓋突起の in vitro における器官培養に関して、既にマウスを用いた実験系で種々の方法が報告されている³⁰⁾。すなわち摘出された二次口蓋突起を、ミリポアフィルターあるいはレンズ紙上に静置し増殖培養液を加えて器官培養する方法、ペトリ皿上に調整された血漿凝塊の上で器官培養する方法、ならびに寒天増殖培地上で培養する方法等が報告されている。

一般に器官培養された口蓋突起の癒合過程

が完了するための必須条件は、その初期段階として相接した口蓋突起先端上皮が癒合する事であると言われている。故に *in vitro* において口蓋突起癒合過程を誘導するためには上皮細胞の変性を与えるだけ抑制しうる実験方法を選択する事が必要である。Smiley は器官培養を寒天増殖培地で行った時、口蓋突起先端上皮は細胞形態学的に比較的良く保存され、ほとんど変性過程は認められなかったと述べている³⁰⁾。そこで著者は本研究において口蓋突起の *epithelial fusion* の過程に生じる“*programmed cell death*”の誘導因子を解析するために、寒天増殖培地を用いた器官培養法が最適であると考えた。その結果、本実験において用いた条件下で培養されたすべての標品の上皮細胞はほとんど細胞変性を示さず良く保存されており、ラット胎仔口蓋突起の器官培養法としても非常に優れた方法である事が明らかにされた。

一般に口蓋突起癒合過程の初期段階として

口蓋突起先端上皮細胞に著明な変化の生じる事が細胞形態学的ならびに生化学的研究から多くの研究者により報告されている^{31~35)}。

すなわち口蓋突起の epithelial fusion の初期の過程を形態学的に観察すると、上皮細胞の扁平、菲薄化に続いて上皮細胞層の不連続性が生じる。またこの癒合過程を Pratt らは生化学的に研究し、epithelial fusion が誘導される直前に口蓋突起で cyclic AMP 量が上昇し、それと同時に先端上皮細胞 DNA 合成が停止し、上皮細胞死が生じ、その後 mesenchymal transmigration が誘導されると報告している³²⁾。一方 Pourtois は口蓋突起癒合過程において、上皮と間葉の相互作用、すなわち上皮・間葉接合部にその癒合過程を誘導する要因の存在する事を強く示唆している⁴⁾。

上に述べた諸家の実験結果は癒合過程に発現される種々の形態学的あるいは生化学的变化を示しているけれども、その癒合過程を誘導する因子については全く明らかにされてい

ない。ちなみに Pratt らが報告した epithelial fusion の直前に生じる口蓋突起での cyclic AMP 量の上昇という現象においても、この cyclic AMP は間葉細胞からその誘導因子の産生される事が考えられる³⁶⁾。すなわちこの生化学的現象にしても間葉細胞の機能が epithelial fusion の過程に働いている可能性が強い。

そこで著者は口蓋突起癒合の初期段階を誘導する要因が上皮・間葉接合部に存在するのではないかと考え検索した。その結果 epithelial fusion の初期段階において上皮・間葉接合部にラット C 型ウイルスの発現が認められた。またこの C 型ウイルス粒子は mesenchymal transmigration の過程においては全く認める事ができず、epithelial fusion から mesenchymal transmigration への誘導因子となりうる可能性が強く考えられた。

そこで器官培養された口蓋突起でみられた C 型ウイルスの生物学的特性を解析するため、ラット胎仔二次口蓋突起より培養細胞が調

整された。この培養細胞を7代以上継代培養してその細胞の超微細構造を観察すると、は蓋突起でみられたと同様のC型ウイルスの発現が認められた。またその培養上清中には逆転写酵素とDNA依存性DNA合成酵素活性を保有するウイルス粒子の産生が明らかにされた。

このC型ウイルスはDmochowskiにより1957年マウスの腫瘍細胞の電子顕微鏡での観察でその存在が明らかにされた³⁷⁾。そのためC型ウイルスはその発見以来現在に至るまで腫瘍発生要因の一つとして強く示唆されているが、多くの場合発現されたC型ウイルスはoncogeneを欠いている^{38, 39)}。一方、このC型ウイルス粒子は腫瘍細胞だけでなく、種々の動物の胎生期分化過程にある細胞においても発現されている事が報告されている。すなわち、ヒト・サル・ラット・マウス・ハムスター等の造血臓器の幹細胞、正常胎盤組織、腎臓、歯胚等にこのC型ウイルスが発現されており、胎

生期における器官形成に何らかの役割を演じていると考えられている⁴⁰⁻⁵⁰⁾

本実験において行われた *in vitro* におけるラット胎仔二次口蓋突起の癒合過程もまた胎生期における器官形成を表現する一つのモデルシステムである。それ故に、そこで発現されている C 型ウイルスが癒合過程の誘導因子として働いていると考えられる。この器官培養されたラット胎仔二次口蓋突起 *epithelial fusion* の初期段階に発現されている C 型ウイルスが器官形成過程に働く機序については、以下に述べる様に考察できる。すなわち、一般に C 型ウイルスの保有する DNA 合成酵素は、*in vitro* の実験において DNA の読み取り誤差が正常細胞に存在する同酵素と比較して約 10 倍から 100 倍高いと報告されている^{51,52)}。特に初代培養細胞でトランスフォームしている細胞に内在する内因性 C 型ウイルスの保有する DNA 合成酵素はその DNA 読み取り誤差が非常に高い事が知られている⁵³⁾。口蓋突起癒合過程に

ある細胞は増殖分化を繰り返しながら器官形成を行っている。もしその口蓋突起癒合過程の epithelial fusion の初期段階に発現されている c 型ウイルスの保有する DNA 合成酵素が細胞の増殖あるいはその修復機構に働くと、この癒合過程で読み取られた細胞染色体 DNA は誤写され、その結果必然的に細胞死が生じる。すなわち、この機序が programmed cell death の主要因となると考えられる。そこで、このラット胎仔二次口蓋突起に発現されている c 型ウイルスの保有する DNA 合成酵素の DNA の読み取り誤差の程度を推測するために、ラット胎仔二次口蓋突起より得た継代培養細胞が自発的にトランスフォームした細胞になりうるかどうかを検討した。一般にトランスフォームした細胞は軟寒天中で増殖しコロニーを形成する。ラット胎仔二次口蓋突起より得た細胞についてもトランスフォーム細胞を、軟寒天中でのコロニー形成能を指標として同定した。その結果、表 7 に示す様に細胞継代数 13 代目の細

胞の0.7%がコロニーを形成し、17代目の細胞は0.8%のコロニー形成能を保有していた。図11は形成されたコロニーを示している。しかしながら細胞継代数3代、5代のものでは軟寒天中において全くコロニーを形成しなかった。Rasheed らもまた Sprague-Dawley 系ラットの胎仔細胞を13代以上継代するとC型ウイルスが発現され、更に20代継代された細胞は自発的にトランスフォームしたと報告している^{29,30}。

すなわち上に述べた実験結果より、ラット胎仔二次口蓋突起で発現されているC型ウイルスの保有するDNA合成酵素のDNAの読み取り誤差は非常に高いと考えられる。

更に器官培養されたラット胎仔二次口蓋突起に風疹ウイルスを感染させた時、その癒合過程において epithelial fusion 及び mesenchymal transmigration への過程が遅延すると同時に、非感染口蓋突起培養群でみられたC型ウイルスの発現がほとんど認められなかった。すなわちこの実験においても epithelial fusion 及び mesenchy-

mal transmigration への過程においてC型ウィルスが主要な役割を演じる事が強く示唆される。しかし風疹ウィルスあるいはその変種株が感染した二次口蓋突起の癒合過程は、非感染群と比較して遅延しながらも mesenchymal transmigration に到達した。この実験結果より推測して、感染群二次口蓋突起で成熟C型ウィルス粒子が電子顕微鏡によりほとんど認められなかったが、C型ウィルス粒子由来のDNA合成酵素活性は、非感染群よりは低いレベルで存在していると考えられる。またC型ウィルスは、風疹ウィルスあるいはその変種株との干渉現象によりその成熟過程が阻害されているかもしれない。

この風疹ウィルス感染によりラット二次口蓋突起でC型ウィルス粒子の発現が抑制される機作については、以下に述べる様に考察できる。器官培養された口蓋突起癒合過程においてC型ウィルスの発現は、非常に限局された時期と部位に認められた。もしこのC型ウ

イルスの発現以前に二次口蓋突起に風疹ウイルスが感染すると、風疹ウイルスとC型ウイルスとのウイルス増殖干渉作用が生じ、その結果C型ウイルスの増殖がより著明に抑制されると思われる。このウイルス相互の干渉現象については、風疹ウイルスと Newcastle disease virus (NDV) との間で既に明らかにされている⁵⁶⁾。すなわち風疹ウイルスが先に急性感染しているかあるいは持続感染している細胞でNDVの増殖はほとんど認められない。故に風疹ウイルスが感染し、その増殖が著明に認められる二次口蓋突起においてこれから増殖しようとするC型ウイルス粒子の発現は、抑制されると思われる。

著者は本研究において、培養細胞に風疹ウイルスが感染した時、その培養上清中に細胞増殖抑制因子が産生されるか、器官培養された二次口蓋突起癒合過程にこの細胞増殖抑制因子は影響しないと述べた。しかし、二次口蓋突起の発育過程に風疹ウイルスが感染し、

その結果細胞増殖抑制因子が誘導された時、二次口蓋突起の発達は阻害され口蓋裂が発現するとも考えられる。すなわち、風疹ウイルスによる口蓋裂の発現様式には、少なくとも二つの機構が働いていると推測できる。

結 語

口蓋突起癒合過程における "programmed cell death" の機序を明らかにするために、ラット胎仔二次口蓋突起を寒天増殖培地上で器官培養し、その癒合過程が解析された。その結果、以下の結果を得た。

1) 器官培養されたラット二次口蓋突起の癒合過程は48時間以内に完了した。

2) epithelial fusion の時期に、上皮・間葉接合部に局在してC型ウイルスが発現され、その領域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。なお mesenchymal transmigration を示す領域には、全くこのC型ウ

ウイルス粒子を認める事はできなかった。

3) ラット胎仔二次口蓋突起より得た培養細胞は、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 retro ウイルス粒子を産生していた。更にこの培養細胞は細胞継代数¹³代で自発的にトランスフォームした。

4) 器官培養された二次口蓋突起に風疹ウイルスあるいはその変種株が感染すると、その癒合過程は遅延し、C 型ウイルスの発現は抑制された。

5) 風疹ウイルスあるいはその変種株が感染したヒト培養細胞は、インターフェロンと異なる細胞増殖抑制因子を産生した。この因子はラット培養細胞に対してもその増殖を抑制した。しかし本実験に用いられた条件下において、この細胞増殖抑制因子はラット胎仔二次口蓋突起癒合過程に影響を与えなかった。

以上の結果より、器官培養された二次口蓋突

起の epithelial fusion の時期に発現される C 型ウイルスの保有する DNA 合成酵素は、DNA の読み取り誤差を高頻度に生じる活性を保有していると考えられる。またこの C 型ウイルスが発現される領域の細胞の増殖ならびに修復過程に、この DNA 合成酵素が働き細胞死が生じられると思われる。

この生物学的現象が、ラット胎仔二次口蓋突起癒合過程における "programmed cell death" を表現している事が示唆された。

福を終えるにあたり、本研究課題を与えられご指導を賜った宮崎 正教授、本研究の実施に際し、終始かわらぬご指導をいただいた口腔外科学第 1 講座佐藤光信博士に心より謝意を表します。ご校閲をいただいた生化学講座鈴木不二男教授に深謝いたします。また研究の円滑な進展のために特別のご配慮をいただいた口腔外科学第 1 講座の教室員の方々に

深謝いたします。

文 献

- 1) Ferguson, M.W.J. (1978): Palatal shelf elevation in the wistar rat fetus. *J.Anat.*, 125, 555-577.
- 2) Smiley, G.R. and Koch, W.E. (1971): Fine structure of mouse secondary palate development in vitro. *J.Dent. Res.*, 50, 1671-1677.
- 3) Shapiro, B.L. and Sweney, L. (1969): Electron microscopic and histochemical examination of oral epithelial-mesenchymal interaction (programmed cell death). *J.Dent. Res.*, 48, 652-660.
- 4) Pourtois, M. (1972): Morphogenesis of the primary and secondary palate; Developmental aspects of oral biology. (Slavkin, H.C. and Bavetta, L.A., editor), Academic Press, New York, 81-108.
- 5) Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432-437.
- 6) Vaheri, A., Sedwick, W.D., Plotkin, S.A. and Maes, R. (1965): Cytopathic effect of rubella virus in BHK21 cells and growth to high titers in suspension culture. *Virology*, 27, 239-241.
- 7) Sato, M., Maeda, N., Yoshida, H., Urade, M., Saito, S., Miyazaki, T., Sibata, T. and Watanabe, M. (1977): Plaque formation of herpes virus hominus type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21 /WI-2 cells formed in soft agar. *Archs.Virology*, 53, 269-273.

- 8) Parkman, P.D., Beuscher, E.L. and Artenstein, M.S.
(1962): Recovery of rubella virus from army recruits.
Proc.Soc.Biol.Med., 111, 225-230.
- 9) Sato, M., Urade, M., Maeda, N., Miyazaki, T., Watanabe, M.,
Shibata, T. and Yamamoto, N. (1978): Isolation and char-
acterization of a new rubella variant with DNA poly-
merase activity. Archs.Virol., 56, 89-103.
- 10) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954): Plaque formation
and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.
J.Exp.Med., 99, 167-182.
- 11) Macpherson, I. and Stoker, M. (1962): Polyoma trans-
formation of hamster cell clones and investigation
of genetic factors affecting cell competence. Virol.,
16, 141-151.
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall,
R.J. (1951): Protein measurement with the folin-phenol
reagent. J.Biol.Chem., 193, 265-275.
- 13) Green, M., Rokutanda, M., Fujinaga, K., Ray, R.K.,
Rokutanda, H. and Gurgo, C. (1970): Mechanism of carcino-
genesis by RNA tumor viruses. I. An RNA-dependent DNA
polymerase in murine sarcoma viruses. Proc.Nat.Acad.
Sci.USA., 67, 385-393.
- 14) Luft, J.H. (1961): Improvement in epoxy resin embedd-
ing methods. J.Biophy.Biochem.Cytol., 9, 409-414.

- 15) Smiley, G.R. and Koch, W.E. (1972): An in vitro and in vivo study of single palatal processes. *Anat. Rec.*, 173, 405-416.
- 16) Mato, M., Smiley, G.R. and Dixon, A.D. (1972): Epithelial changes in the presumptive regions of fusion during secondary palate formation. *J. Dent. Res.*, 51, 1451-1456.
- 17) Smiley, G.R. and Dixon, A.D. (1968): Fine structure of midline epithelium in the developing palate of the mouse. *Anat. Rec.*, 161, 293-310.
- 18) Smiley, G.R. (1970): Fine structure of mouse embryonic palatal epithelium prior to and after midline fusion. *Archs. Oral. Biol.*, 15, 287-296.
- 19) Rasheed, S., Bruszewski, J., Rongey, R.W., Roy-Burman, P., Charman, H.P. and Gardner, M.B. (1976): Spontaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures. *J. Virol.*, 18, 799-803, 1976.
- 20) Gregg, N.M. (1941): Congenital cataract following german measles in the mother. *Tr. Ophth. Soc. Australia*, 3, 35-46.
- 21) 広谷勝 (1975): 口唇裂 口蓋裂の発生要因に関する細胞遺伝学的研究. 阪大歯学誌, 20, 6-21.
- 22) 菅原利夫 (1974): 口唇 口蓋裂発生原因としての風疹ウイルスに関する血清疫学的 及び 実験奇形学的研究. 阪大歯学誌, 19, 30-46.

- 23) Sato, M., Yamada, T., Yamamoto, K. and Yamamoto, N.
(1976): Evidence for hybrid formation between rubella virus and a latent virus of BHK21/WI-2 cells. *Virology*, 69, 691-699.
- 24) Sato, M., Maeda, N., Urade, M., Kuribayashi, M., Shirasuna, K., Yoshida, H. and Miyazaki, T. (1978): Persistent infection of primary human cell cultures with rubella variant carrying DNA polymerase activity. *Arch. Virology*, 56, 181-187.
- 25) Plotkin, S.A. and Vaheri, A. (1967): Human fibroblasts infected with rubella virus produce a growth inhibitor. *Science*, 156, 659-661.
- 26) Paucker, K., Cantell, K. and Henle, W. (1962): Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology*, 17, 324-334.
- 27) Basile, D.V., Wood, H.N. and Braun, A.C. (1973): Programming of cells for death under defined experimental conditions. Relevance to the tumor problem. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 70, 3055-3059.
- 28) Markert, C.L. (1968): Neoplasia: A disease of differentiation. *Cancer Res.*, 28, 1908-1914.
- 29) Sax'en, L., Karkinen-Jeaeaskeleainen, M. and Sax'en, I. (1976): Organ culture in teratology. *Curr. Top. Pathol.*, 62, 123-124.

- 30) Smiley, G.R. and Koch, W.E. (1975): A comparison of secondary palate development with different in vitro techniques. *Anat. Rec.*, 181, 711-724.
- 31) Hudson, C.D. and Shapiro, B.L. (1973): A radioautographic study of deoxyribonucleic acid synthesis in embryonic rat palatal shelf epithelium with reference to the concept of programmed cell death. *Archs. Oral Biol.*, 18, 77-84.
- 32) Pratt, R.M. and Martin, G.R. (1975): Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72, 874-877.
- 33) Hassell, J.R. (1975): The development of rat palatal shelves in vitro. An ultrastructural analysis of the inhibition of epithelial cell death and palate fusion by the epidermal growth factor. *Dev. Biol.*, 45, 90-102.
- 34) Hassell, J.R. and Pratt, R.M. (1977): Elevated levels of cAMP alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in the secondary palatal epithelium. *Exp. Cell Res.*, 106, 55-62.
- 35) Goss, A.N. and Avery, J.K. (1975): Epithelial-mesenchymal interaction in palatal shelf fusion (in vitro study). *Austral. Dent. J.*, 20, 152-156.
- 36) Otten, J., Johnson, G.S. and Pastan, I. (1972): Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. Effect of cell density and agents which alter cell growth on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in fibroblast. *J. Biol. Chem.*, 247, 7082-7087.

- 37) Dmochowski, L. and Grey, C.E. (1957): Electron microscopy of tumors of known and suspected viral etiology. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 15, 704-753.
- 38) Todaro, G.J. (1972): Spontaneous release of type C viruses from clonal lines of "spontaneously" transformed BALB/3T3 cells. *Nat. New Biol.*, 240, 157-159.
- 39) Todaro, G.J., Benveniste, R.E., Callahan, R., Lieber, M.M. and Sherr, C.J. (1975): Endogenous primate and feline type C viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39, 1159-1168.
- 40) Feldman, D. (1975): An electron microscopic study of virus particles in rhesus monkey placenta. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72, 118-121.
- 41) Gross, L., Schidlovsky, G., Feldman, D., Dreyfuss, Y. and Moore, L.A. (1975): C-type virus particles in placenta of normal healthy Sprague-Dawley rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 72, 3240-3244.
- 42) Feldman, D., Gross, L. and Swarm, R.L. (1976): Electron microscopic study of virus particles in yolk sac and placenta and hematopoietic organs of newborn C3Hf mice. *Cancer Res.*, 36, 1814-1820.
- 43) Kalter, S.S., Helmke, R.J., Heberling, R.L., Panigel, M., Fowler, A.K., Strickland, J.E. and Hellman, A. (1973): C-type particles in normal human placentas. *J. Nat. Cancer Inst.*, 50, 1081-1084.

- 44) Biczysko, W., Pienkowski, M., Solter, D. and Koprowski, H. (1973): Virus particles in early mouse embryos. J. Nat. Cancer Inst., 56, 1041-1050.
- 45) Chase, D.G. and Piko, L. (1973): Expression of A- and C-type particles in early mouse embryos. J. Nat. Cancer Inst., 51, 1971-1975.
- 46) Kalter, S.S., Helmke, R.J., Panigel, M., Heberling, R.L., Felsburg, P.J. and Axelrod, L.R. (1973): Observations of apparent C-type particles in baboon (Papio cynocephalus) placentas. Science, 179, 1332-1333.
- 47) Schidlovsky, G. and Ahmed, M. (1973): C-type virus particles in placentas and fetal tissues of rhesus monkeys. J. Nat. Cancer Inst., 51, 225-233.
- 48) Vernon, M.L., Lane, W.T. and Huebner, R.J. (1973): Prevalence of type-C particles in visceral tissues of embryonic and newborn mice. J. Nat. Cancer Inst., 51, 1171-1175.
- 49) 前田 憲昭 (1977): ハムスター胎盤組織における風疹ウイルス遺伝子の伝達型式について. 阪大歯学誌, 22, 158-173.
- 50) 永井哲夫, 高野利也, 田村隆明, 野田亮 (1978): ラット胎胚由来 C型ウイルスの性状. 日本癌学会総会記事, 233.

- 51) Battula, N. and Loeb, L.A. (1974): The infidelity of avian myeloblastosis virus deoxyribonucleic acid polymerase in polynucleotide replication. J. Biol. Chem., 249, 4086-4093.
- 52) Battula, N. and Loeb, L.A. (1975): On the fidelity of DNA replication. Characterization of polynucleotides with errors in base-pairing synthesized by avian myeloblastosis virus deoxyribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem., 250, 4405-4409.
- 53) Loeb, L.A., Springgate, C.F. and Battula, N. (1974): Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. Cancer Res., 34, 2311-2321.
- 54) Rasheed, S., Freeman, A.E., Gardner, M.B. and Huebner, R.J. (1976): Acceleration of transformation of rat embryo cells by rat type C virus. J. Virol., 18, 776-782.
- 55) Rasheed, S., Gardner, M.B. and Huebner, R.J. (1978): In vitro isolation of stable rat sarcoma viruses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 75, 2972-2976.
- 56) Sato, M., Tanaka, H., Yamada, T. and Yamamoto, N. (1977): Persistent infection of BHK21/WI-2 cells with rubella virus and characterization of rubella variants. Archs. Virol., 54, 333-343.

THE IN VITRO FUSION MECHANISM OF THE SECONDARY
PALATAL SHELVES OF RAT EMBRYO AND EFFECT OF
RUBELLA VIRUS AND ITS VARIANT ON THE FUSION
PROCESSES

Kazuko KUBO

The First Department of Oral and Maxillofacial
Surgery, Osaka University Dental School,
3-48, Nakanoshima 4-chome, Kita-ku, Osaka, Japan

In order to understand the fusion mechanism of secondary palatal shelves, they were prepared aseptically by being excised from Wistar rat embryo at 15 days of gestation and cultured on the agar medium containing 0.3% Special Agar Noble in Eagle's minimum essential medium supplemented with 20% calf serum and 2 mM L-glutamine in a 5% CO₂ incubator at 37°C.

Consequently, all 15 samples of the palatal shelves examined showed that epithelially fused layer disappeared in part and was penetrated by mesenchymal cells. This fusion process was designated as mesenchymal transmigration. Moreover, C-type viral particles were found to be expressed only in the area of epithelial-mesenchymal junction in the process of epithelial fusion.

To examine the biological property of this virus particle, the cells(RaPC) grown from the palatal shelves of rat embryo were subcultured and the cultured media were harvested at seven passage level. After clarification low speed centrifugation, they were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 X g for 2 hrs and submitted to sucrose density gradient [15-60%(w/w)] centrifugation at 62,500 X g for 2 hrs. Drops were collected from the bottom of the centrifuge tube and assayed for reverse transcriptase and DNA dependent DNA polymerase activities, resulting in the highest enzyme activities in fraction which indicated specific density of 1.15 g/cm³ under this experimental condition. In addition, treatment of the reaction product with deoxyribonuclease I reduced the acid-insoluble ³H-TMP to about 20 per cent of the control value whereas ribonuclease A did not affect. Furthermore, RaPC cells spontaneously transformed over 13th passage level.

From these findings, it is concluded that RaPC cells express rat retrovirus carrying reverse transcriptase and DNA dependent DNA polymerase activities which have high infidelity level in DNA replication or in cellular repair process.

When rubella virus or its variant infects the rat

palatal shelves in vitro, the fusion process were found to be delayed as compared with controls. Although primary human cells infected with these viruses produced the inhibitor against replication of human and rat cells, this inhibitor did not affect the in vitro fusion processes of the rat palatal shelves. However, rubella virus and its variant inhibited the expression of C-type virus in epithelial-mesenchymal junction which was observed in the uninfected controls.

The above findings may suggest that the C-type virus functions as a supporter in the fusion process from epithelial fusion to mesenchymal transmigration.

図 2 解説

ラット胎仔二次口蓋突起の in vitro における癒合形態を示す組織切片 (倍率: 400 倍)

A, epithelial fusion ;

二層の上皮細胞間での癒合

B, mesenchymal transmigration ;

上皮細胞層の一部に不連続性を生じ、その部分に間葉細胞の侵入が認められる

C, complete fusion ;

上皮細胞が完全に破壊し、間葉細胞により置換されている。

図 3 解説

ラット胎仔二次口蓋突起の in vitro における
上皮癒合の過程の超微細構造

A. 上皮・間葉接合部の構造；

右側の上皮細胞層と左側の間葉細胞層とは一層の
基底膜によって境され、上皮・間葉接合部に生じた
空隙部に多数のウイルス粒子が認められる。

(倍率：7,000 倍)

左下の挿入はウイルス粒子の高倍率像を示す。

(倍率：50,000 倍)

B. 深層部の間葉細胞；

間葉細胞は長く伸びた多数の細胞突起を有し、
細胞質の変性像は上皮細胞層に近位した
細胞に比較して少ない。(倍率：4,500 倍)

図4 解説

ラット胎仔二次口蓋突起から得た
培養細胞に存在するC型ウイルス粒子

- A. intracellular cysterna に存在する成熟
C型ウイルス (←) (倍率: 55,000倍)
- B. C型ウイルス粒子の発芽像 (←) (倍率: 80,000倍)

図 5 解説

ラット retro ウイルス 粒子の保有する DNA 合成酵素の反応時間曲線

○ — — — ○ : DNA 依存性 DNA 合成酵素
▲ — — — ▲ : 逆転写酵素

タンパク量 2.5 μ g の精製ラット retro ウイルス標品を
含むように調整された反応混合液 100 μ l は 37°C
の温浴中に静置された。反応を停止するために 1 N
過塩素酸 150 μ l が経時的に加えられ 酸不溶性画分中
にとりこまれた 3 H-TMP の放射活性が測定された。
なお DNA 依存性 DNA 合成酵素活性を測定する時、
エンドヌクレアーゼで処理されていない仔牛胸腺 DNA 10 μ g
が反応系に添加され、同様に処理された。

図 6 解説

風疹ウイルス感染二次口蓋突起での
風疹ウイルス抗原の発現

風疹ウイルス抗原は特に間葉細胞の細胞質に
見られる。(→)

図7 解説

風疹ウイルスが感染したラット二次口蓋突起の
in vitro における上皮癒合

- A. 上皮・間葉接合部にラットC型ウイルスの
発現は認めず、非感染対照群で見られた
間葉細胞の変性像は著明でない。
(倍率：4,000倍)
- B. 間葉細胞の細胞質内には風疹ウイルス
粒子の存在が認められる。(→)
(倍率：35,000倍)

図 8 解説

風疹ウイルス M-33 あるいはその変種株 HPV-RV が
感染したヒト培養細胞抽出液の
ヒト培養細胞の増殖に与える影響

- ▲-----▲ M-33: 風疹ウイルス M-33 株感染ヒト細胞から調整された細胞抽出液処理群
- HPV-RV: 風疹ウイルス変種株 HPV-RV 感染ヒト細胞から調整された細胞抽出液処理群
- 対照: 非感染ヒト細胞から調整された細胞抽出液処理群

風疹ウイルス M-33 あるいはその変種株 HPV-RV を MOI 1 で感染させ、
37°C にて 6 日間培養された感染ヒト培養細胞の抽出液が実験に
使用された。これら標品のヒト細胞の増殖に与える影響を検討する
ために、 30×10^4 個の初代ヒト培養細胞を 30 mm 径のペトリ皿に播き
37°C にて 24 時間培養された。この単層培養細胞は MEM にて
10 倍希釈された各々の標品 1 ml で一夜処理された。この
処理単層培養細胞は MEM にて 3 回洗浄された後、3 ml の増殖
培養液を加え培養が継続された。その間、経時的に全細胞数
が算定された。なお全細胞数はニグロシン排除試験により検定
された。

図 9 解説

ウイルス感染ヒト培養細胞抽出液の 希釈率がヒト培養細胞の増殖に与える影響

- — ○ M-33 : 風疹ウイルス M-33 株感染ヒト細胞から調整
された細胞抽出液処理群
- ▲ — ▲ HPV-RV : 風疹ウイルス変種株 HPV-RV 感染ヒト細胞から
調整された細胞抽出液処理群

細胞増殖抑制率は

$$\left(1 - \frac{\text{ウイルス感染細胞抽出液にて処理された単層培養細胞の平均細胞数}}{\text{非感染細胞抽出液にて処理された単層培養細胞の平均細胞数}} \right) \times 100$$

により算定された。

30×10^4 個のヒト細胞を 37°C にて 24 時間培養した。この単層培養細胞は MEM で希釈された標品にて一夜処理された。培養 72 時間後、生細胞数が算定された。

図 10 解説

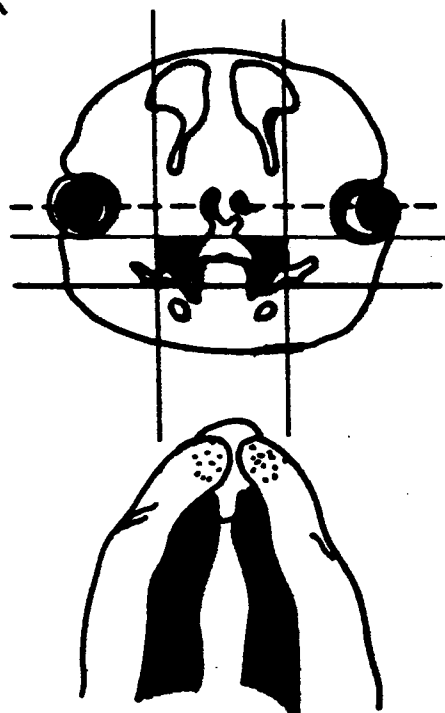
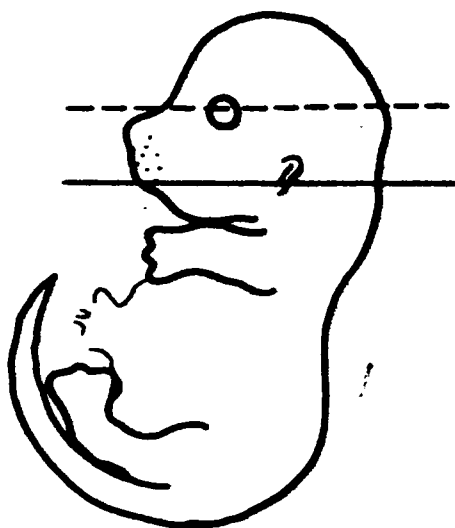
細胞増殖抑制因子の ラット培養細胞の増殖に与える影響

- ▲——▲ M-33 : 風疹ウイルス M-33 株感染ヒト細胞から調整
された細胞抽出液処理群
- 対照 : 非感染ヒト細胞から調整された細胞抽出液処理群

図 11 解説

ラット胎仔二次口蓋突起から得た培養細胞
の軟寒天培養液中で形成されたコロニー。
(倍率：100倍)

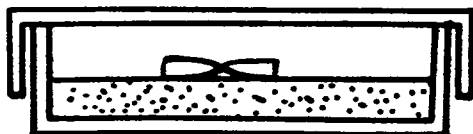
ラット胎仔二次口蓋突起の 器官培養法

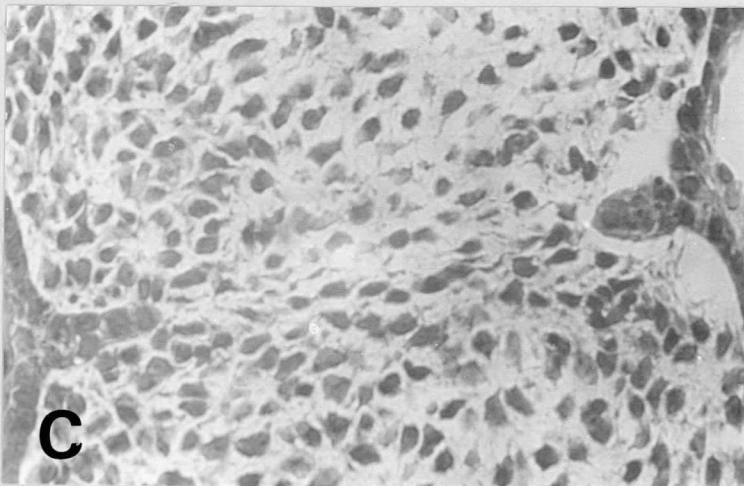
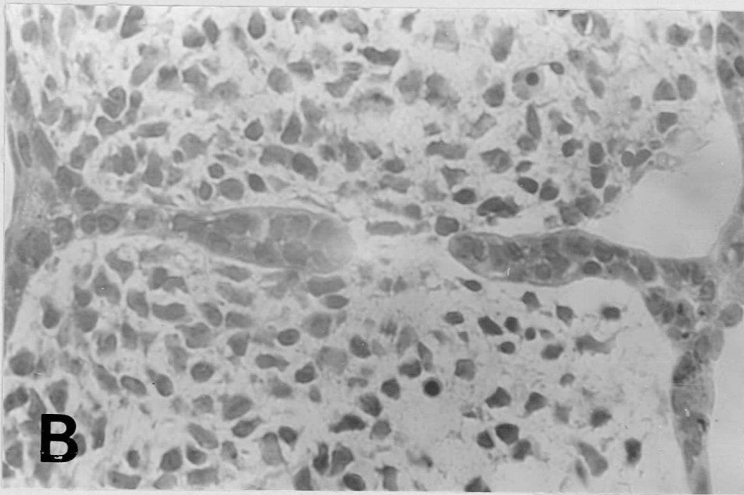
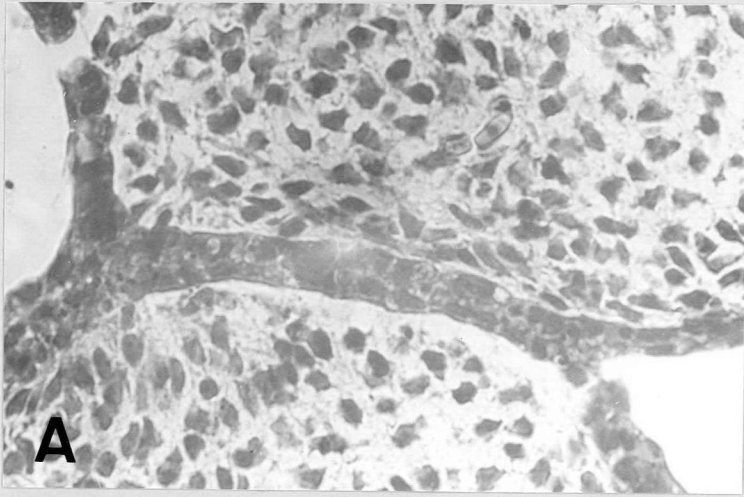


胎生15日目のラット胎仔は
眼中央部および口角部で水平断
された後、二次口蓋突起が
摘出された。

摘出された二次口蓋突起はその先端を
接触させた状態で最終濃度 0.3% の寒天と
20% 仔牛血清を含むように調整された
寒天増殖培地上に静置された。

器官培養は 5% CO₂
培養器中で 37°C
にて 48 時間あるいは
72 時間 行われた。





14 3

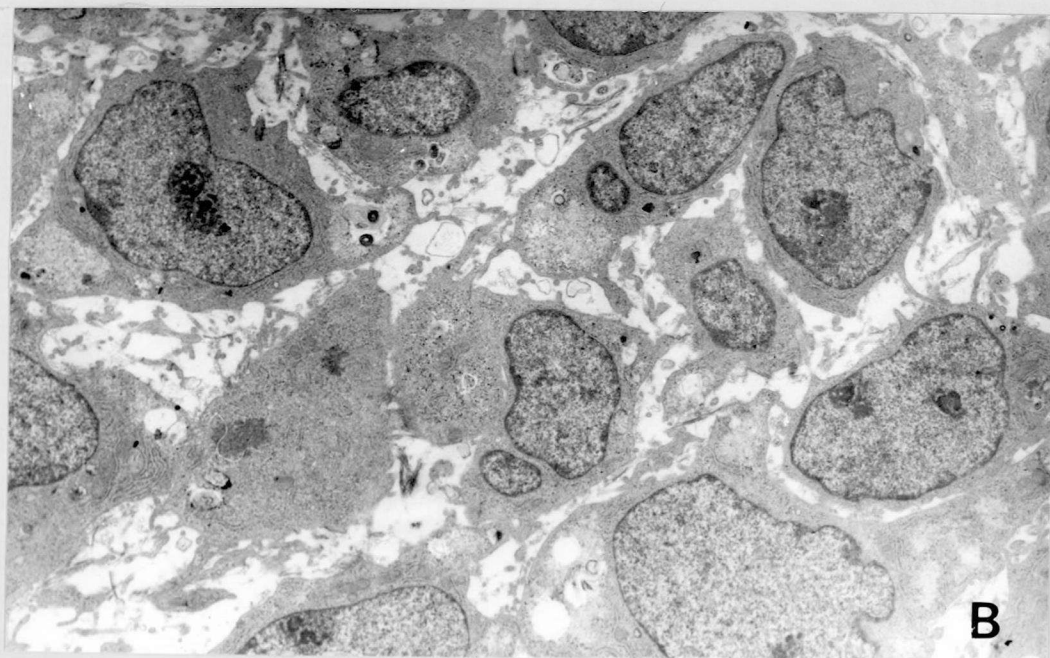
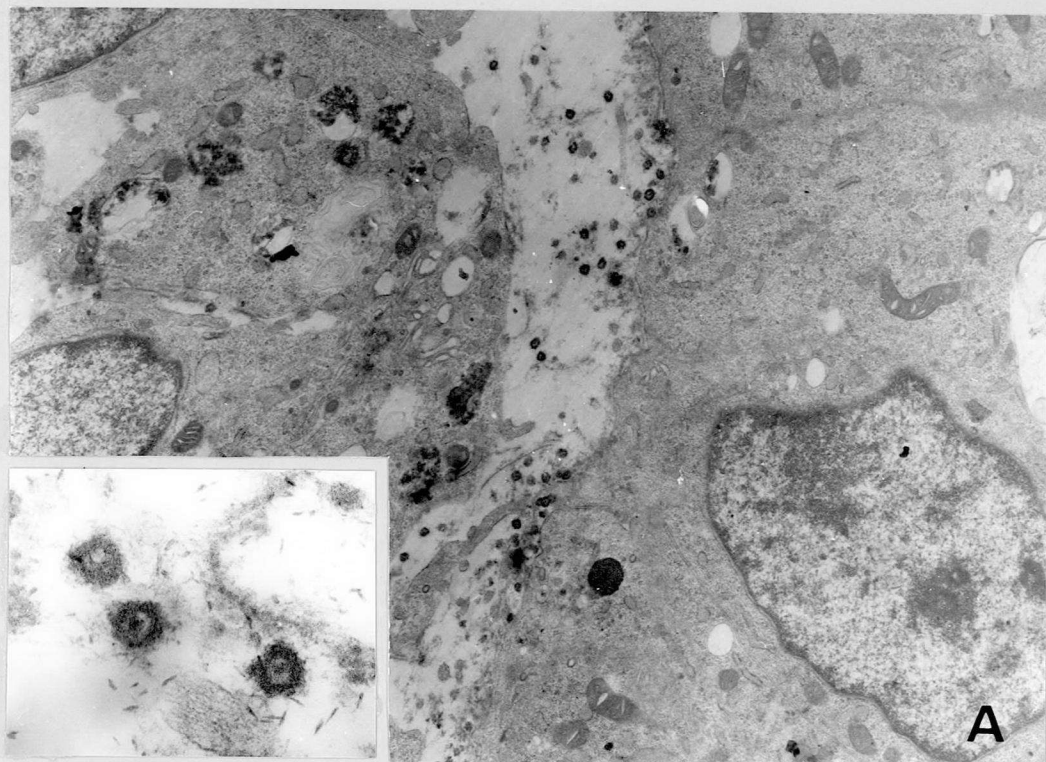


図 4

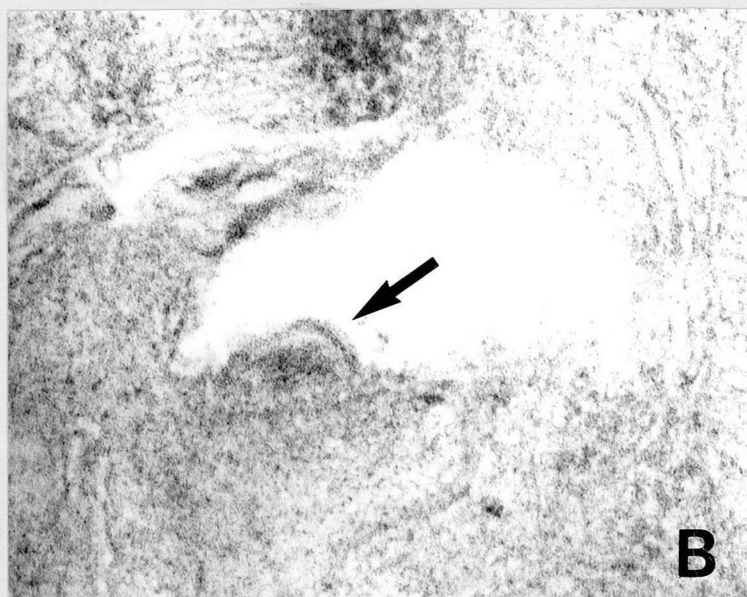
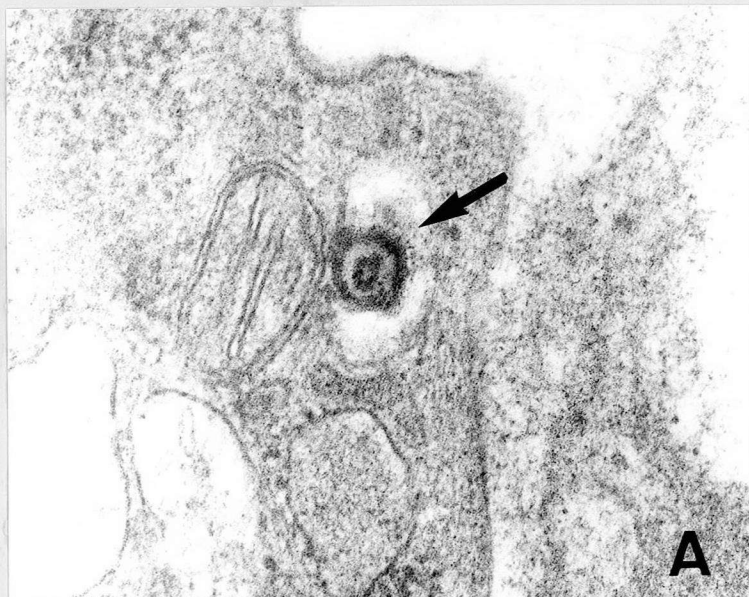
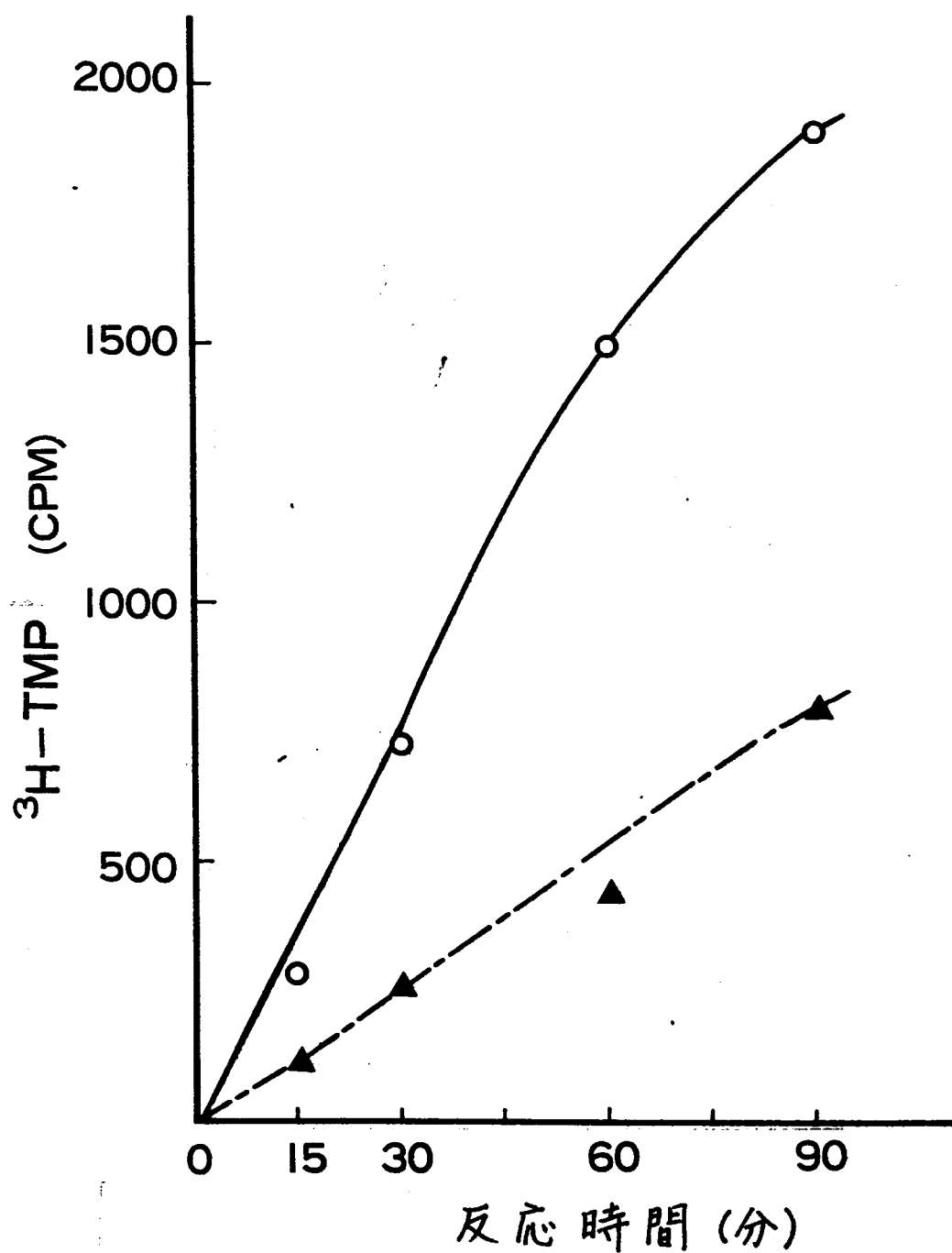


圖 5



14 6

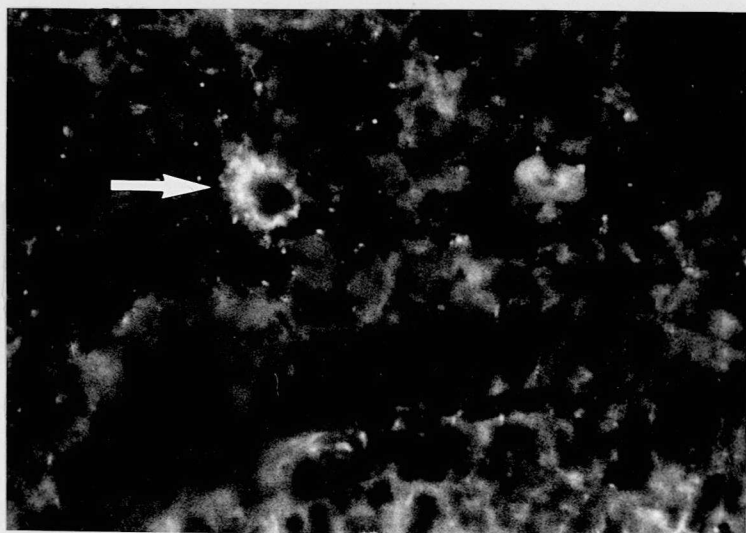


图 7

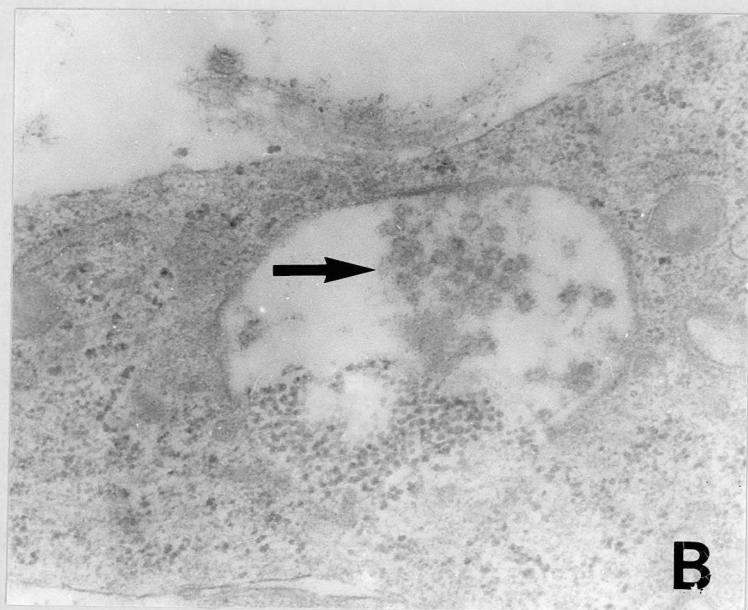


圖 8

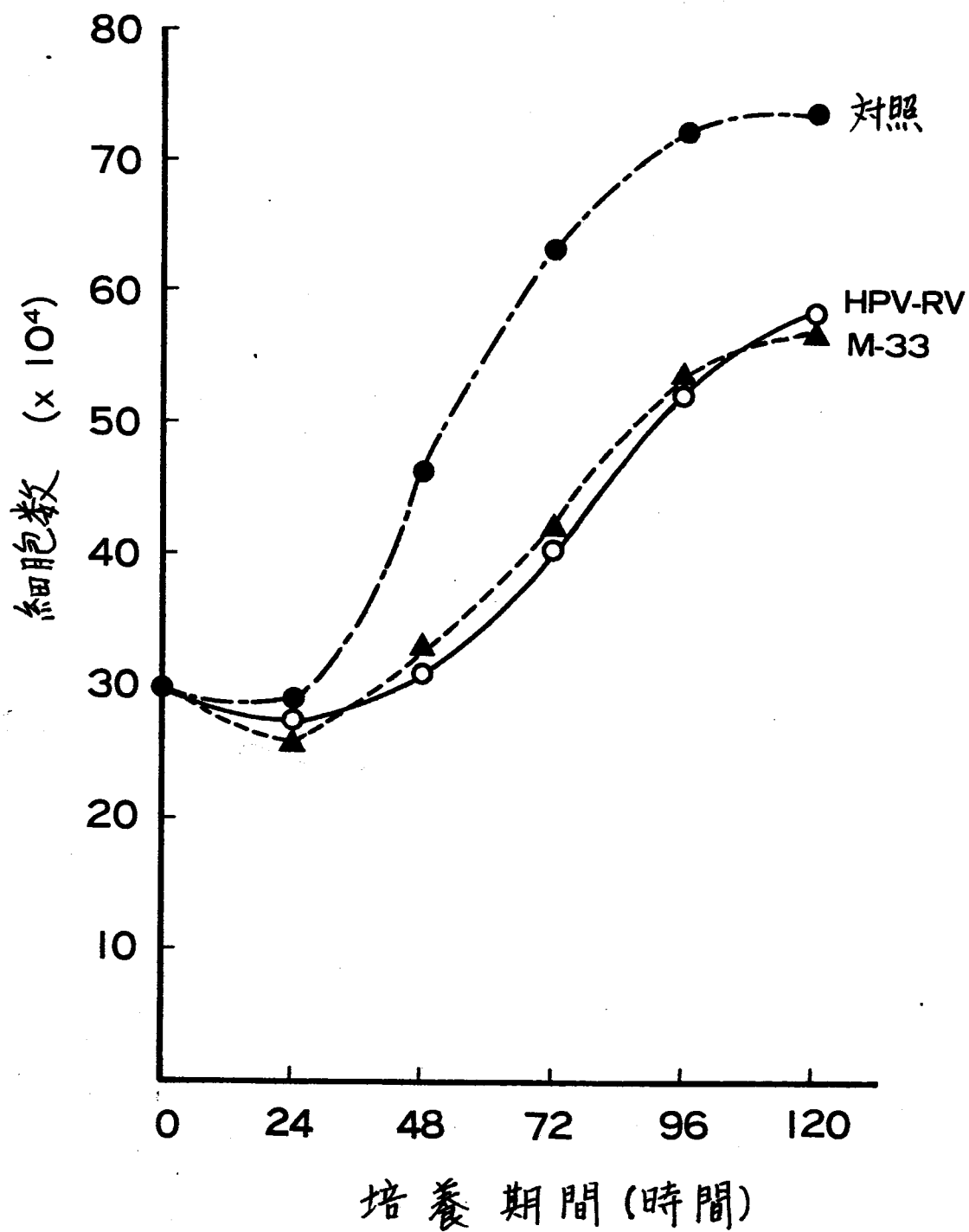


图 9

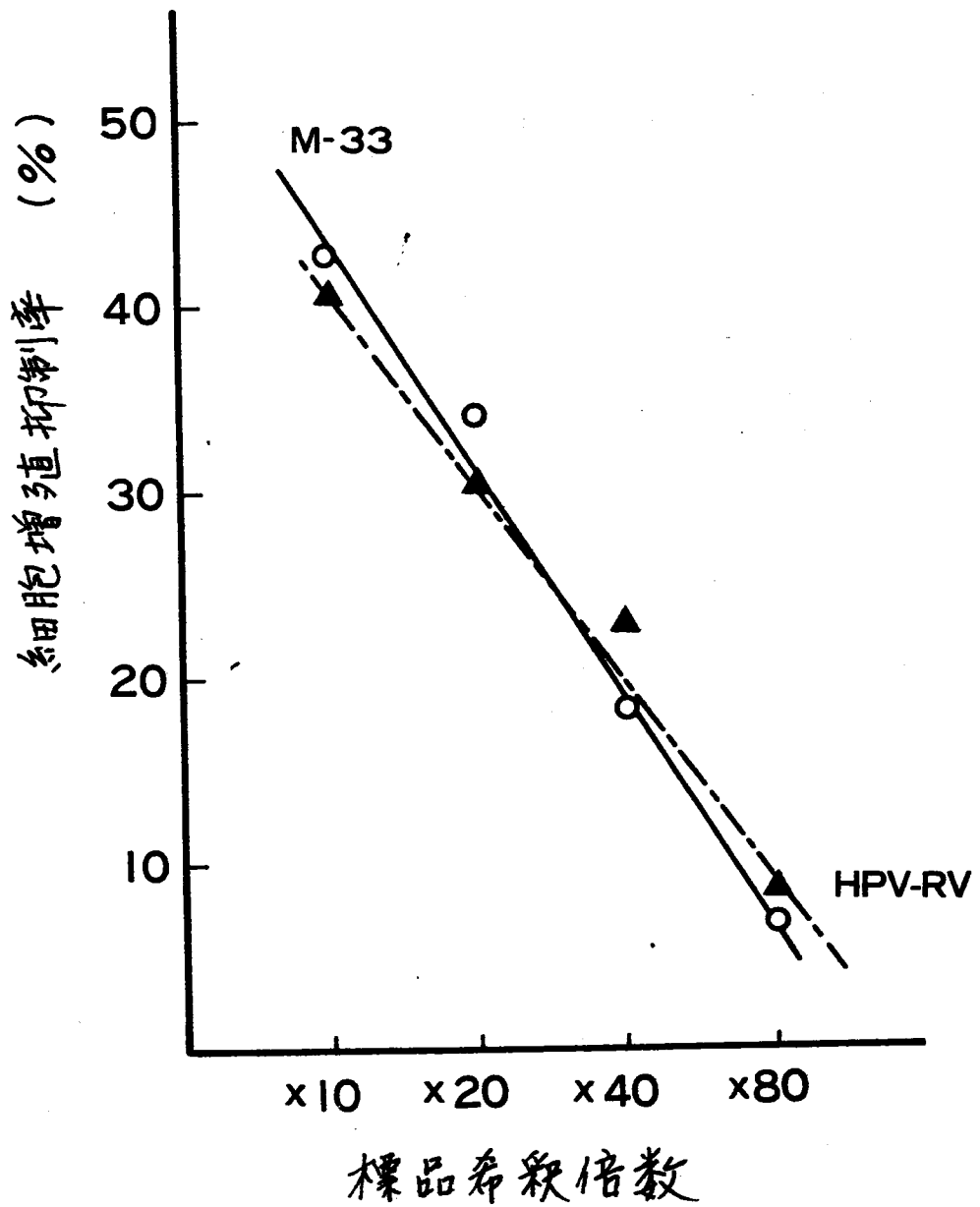


圖 10

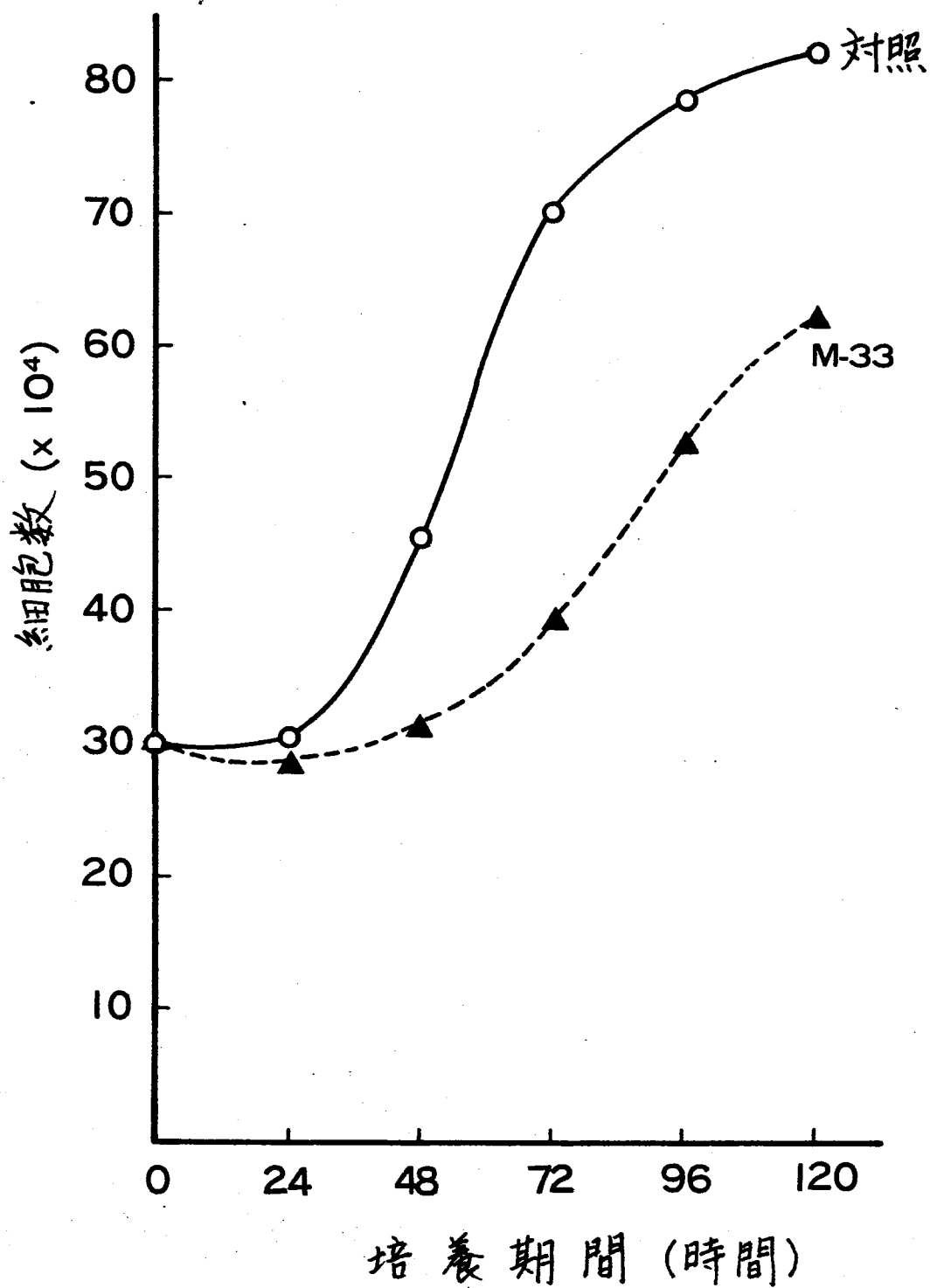
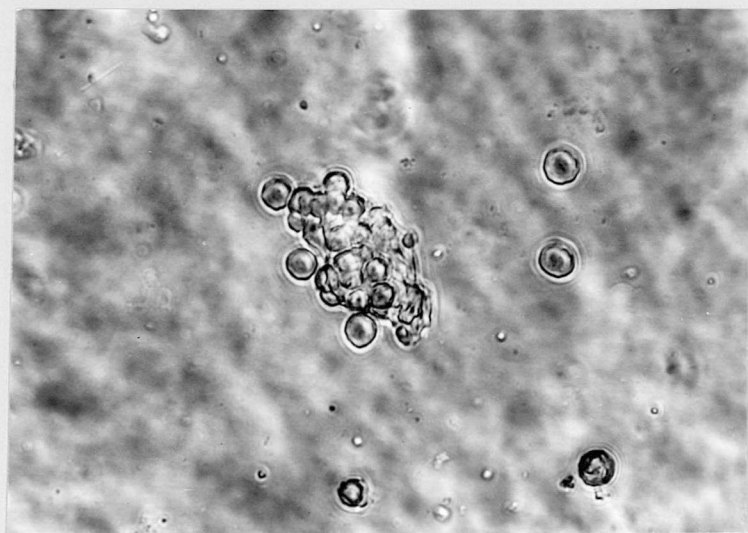


图 11



器官培養を行ったラット胎仔二次口蓋突起の癒合過程

被検ラット胎仔数 (匹)	培養期間 (時間)	癒合状態	
		Epithelial ^{a)} fusion	Mesenchymal ^{b)} transmigration
15	48	0	15
10	72	0	10

- a) : 連続切片標本において 一對の二次口蓋突起先端で
Epithelial fusion のみが観察される標品数
- b) : 二次口蓋突起癒合部ですべてあるいはその一部に
おいて 上皮層の不連続性が生じ間葉細胞の侵入
が観察される標品数

胎生 15 日目に摘出されたラット胎仔二次口蓋突起は
寒天増殖培地上に静置され、37°C にて 5%CO₂ 培養器中
で培養された。培養 48 時間あるいは 72 時間後、
二次口蓋突起は 5 μm の厚さの連続切片標本に
作製され H-E 染色後 その癒合状態が観察された。

ラット retro ウイルス粒子の保有する 逆転写酵素による反応生成物の性質

処 理	^3H -TMP (CPM)
フェノールで抽出された酵素反応生成物 ^{a), b)}	
+ 緩衝液 (対照)	1527
+ Deoxyribonuclease I	321
+ Ribonuclease A	1427

a): タンパク量 300 μg のラット retro ウイルスを含む
反応混合液 1 ml は 37°C で 20 時間反応が
行われた。

反応生成物は 1% イソアミルアルコールを含む
クロロホルムとフェノールにより抽出され, 0.1 X SSC
にて透析されたものが実験に使用された。

b): 対照において約 1500 CPM の放射性性を保有
する反応生成物は Deoxyribonuclease I (1mg/ml)
あるいは bovine pancreatic ribonuclease A
(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) により 37°C, 1時間処理された。

なお Ribonuclease A は実験に使用される前に
100°C にて 10 分間加熱された。

ラット retro ウイルスは ラット胎仔二次口蓋突起より得た
培養細胞 (RaPC) の培養上清より精製された。

表3

風疹ウイルスならびにその変種株が
ラット胎仔二次口蓋突起
癒合過程に及ぼす影響

ウイルス	a) 被検ラット 胎仔数(匹)	培養期間 (時間)	癒合状態	
			Epithelial fusion	Mesenchymal transmigration
風疹 ウイルス (M-33)	5	48	5	0
	10	72	2	8
風疹ウイルス 変種株 (HPV-RV)	4	48	4	0
	12	72	7	5
非感染対照	15	48	0	15

a): 器官培養開始 6 時間後に 10^5 PFU/ml の
感染力価を保有するウイルス溶液 0.1 ml が
二次口蓋突起に接種された。

表4

細胞増殖抑制因子で処理された
ヒト単層培養細胞におけるVSVの感受性

標品希釈倍数	処 理 ^{c)}					
	M-33 ^{a)}		HPV-RV ^{a)}		対照 ^{b)}	
	プラック数	平均	プラック数	平均	プラック数	平均
X 10	21, 18	20	17, 15	16	103, 98	101
X 20	35, 21	28	28, 25	27	97, 104	101
X 40	68, 72	70	53, 69	61	89, 113	101
X 80	88, 93	91	71, 74	73	107, 105	106

a) : 風疹ウイルス M-33 あるいはその変種株 HPV-RV
の感染したヒト培養細胞の抽出液

b) : ウイルス非感染ヒト培養細胞の抽出液

c) : MEM で希釈された細胞抽出液 1 mlにより
ヒト単層培養細胞は 5 % CO₂ 培養器中で
37°C にて 一夜処理された。
この処理単層培養細胞は MEM にて 3 回
洗浄された後、VSV の感受性が測定された。

表 5

細胞増殖抑制因子で処理された
フラット単層培養細胞における VSV の感受性

標品希釈倍数		処 理					
		M-33 ^{a)}			対 照		
		プラック数		平均	プラック数		平均
X	10	108,	116	112	112,	107	110
X	20	107,	112	110	105,	114	110
X	40	99,	115	107	117,	101	109
X	80	108,	105	107	98,	113	106

a) : 風疹ウイルス M-33 の感染した
ヒト培養細胞の抽出液

表6

細胞増殖抑制因子で処理した
ラット胎仔二次口蓋突起の癒合

標品 ^{a)}	被検ラット 胎仔数(匹)	癒合状態	
		Epithelial fusion	Mesenchymal transmigration
M-33	4	0	4
HPV-RV	4	0	4

a): 風疹ウイルス M-33 あるいは HPV-RV の感染した
ヒト培養細胞より調整された細胞増殖抑制因子

最終濃度 10 容量の細胞増殖抑制因子を含むように
調整された寒天増殖培地上で、ラット胎仔二次口蓋突起
は 48 時間 器官培養された。

表7

ラット胎仔二次口蓋突起より得た
培養細胞の軟寒天中における
コロニー形成能

細胞継代数 細胞数	1000			10000		
3	0,	0,	0 ^{a)}	0,	0,	0
5	0,	0,	0	0,	0,	0
13	8,	9,	5	65,	79,	80
17	8,	10,	7	73,	94,	87

a) : コロニー数

10^3 あるいは 10^4 個のラット培養細胞(RaPC)は
最終濃度0.3%の割合に寒天を含む増殖培養液1 mlに
混和され、先に調整されゲル化している0.6%寒天増殖培地
上に重層された。
約60日間5% CO_2 培養器中で 37°C にて培養し、形成された
コロニー数が算定された。